

用 DTBA 方法检测马铃薯病毒

朱 国 春

朱 国 庆

(青海省师范高等专科学校基础部 810007)

(四川省西昌市农科所 615000)

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 01-0059-02

1 前 言

检测马铃薯病毒没有单一的最佳技术, 用电子显微镜检测病毒很灵敏, 但昂贵, 同时要具备经验, 这种经验是许多诊断学家无法具备的。而血清检测相比灵敏、迅速、准确、连贯、成本低、方便。例如 ELISA 方法在所有种类中应用相对好些, 以下用 DTBA 方法与 ELISA 方法比较检测马铃薯病毒病。

2 材料与方 法

栽培材料: 供试材料来自大田、温室以及组培试管苗。

组织材料: 叶、茎、根、叶柄及块茎。

膜: 应用 0. 45um 硝酸纤维膜或 Nytran 膜。

试剂: 叶温-20, 脱脂牛奶、磷酸缓冲液、Pas-tween、酶标缓冲液、底物缓冲液。

最初进行的试验样品是我们收集的被感染的马铃薯, 用 DTBA 和 ELISA 方法同时测定病毒 (表 1、2)。

表 1 DTBA 与 ELISA 同时测定不同组织

品 种		阳性反应	
组织	样品	ELISA	DTBA
叶子	23	2	2
叶柄	2	0	1
根	18	4	8
块茎	39	3	4
总和	82	9	* 15

* 含所有 ELISA 阳性反应

DTBA 方法的步骤是将膜切到 5~6cm 大小, 并用铅笔标出记号, 用刀片切植物组织, 新切开的植物材料压在膜上, 然后用岩盘处理或贮存在信封

表 2 DTBA 与 ELISA 方法检测各种类型的马铃薯病毒

病 毒	组织类型					总计
	叶	块茎	茎	根	叶	
PVX	462	61	10	0	0	533
PVS	97	61	10	0	0	168
PVY	1290	61	10	0	0	1361
PVM	74	10	0	0	0	84
PVA	83	10	0	0	0	93
PLRV	578	61	10	0	241	890
TRV	23	39	0	18	2	82

套内。PVX 和 PLRV 的膜在处理前 9 周, 贮藏在室温下岩盘的膜浸泡 60min, 并按特异性抗体 PBS 增强抗体结合。每种结合用 ELISA 方法同样比例稀释, 膜在室温下孵育 2h 或在前一夜 4℃下孵育一夜, 轻轻倒出膜, 然后用提取缓冲液清洗两遍, 并再次浸泡 15min。步骤重复两次, 清洗三次, 最后一次浸泡将提取缓冲液轻轻倒出, 在室温下将膜浸泡 30min 在新配制的底物缓冲液中或在-4℃下几小时, 把底物缓冲液轻轻倒出并可看到膜上阳性反应产生一种紫红色, 阴性反应无色, 但也有出现植物色素, 解剖镜下可看出痕迹反应。

3 讨论与结论

DTBA 方法无特殊规定要求, 除非植物组织难以操作。同样, DTBA 方法不适合冷冻样品, 只需刀片和移液管, 膜易于使用, 不用撕开就可控制更多处理, 并可提供较好的对照。

试验证明, 用 DTBA 方法比 ELISA 方法更多检测出病毒 (如 PVA、PVM), 除 PVY 和 PCRV 病毒、叶子外, 用茎或块茎测 PLRV 病毒, 在 DTBA 和 ELISA 之间有良好的一致性 (表 3)。

表 3 ELISA 与 DTBA 对比未测试前检测病毒

病毒测试	样品种类	阳性反应	
		ELISA	DTBA
马铃薯 X 病毒	449	^a 36	36
马铃薯 S 病毒	145	^b 14	24
马铃薯 Y 病毒	1341	^c 257	240
马铃薯 M 病毒	72	0	0
马铃薯 A 病毒	81	^a 3	11
马铃薯卷叶病毒 (反叶子)	508	^d 36	21

注：a. 在叶中所有阳性反应用 DTBA 与 ELISA 检测相同；
b. 一种阳性反应在茎中；
c. ELISA 检测 25DTBA 不到 10%；
d. ELISA 检测 15DTBA 不到 42%。

使用 DTBA 方法能在一天内单独完成，而使用 DAS－ELISA 方法需两到三天才能完成 (表 4)。同样 DTBA 方法的花费大约是 ELISA 方法花费的 34%，而结合抗体使用减少 50%，这主要在表面抗体的清除上节约成本 (表 5)。

在检测 PLRV 时，DTBA 的敏感性和一致性是较少清晰的。PLRV 病毒局限了韧皮部，并且在叶肉组织中分散。当叶柄或茎被使用时，用 ELISA 有较好的一致性，在使用叶子时，却没有一致性。

对于 PVS 和 PVA 病毒，DTBA 比 ELISA 方法更准确，用电子显微镜检查时，DTBA 方法结果

表 4 测试 72 样品要求间隔时间及各项目功能对比

DAS－ELISA			DTBA		
项目功能	时间 (min)	间隔时间 (h)	项目功能	时间 (min)	间隔时间 (h)
日常工作	10		日常工作	10	
膜	8	12	样品准备装卸	24	1
洗板	2	12	切成块状	2	1
点样	89	12	包被	2	2
洗板	2	0.1	洗盘	2	0.75
包被	4	1.4	酶合成物	4	0.5~1
洗板	2	0.1	读数	8	
酶合成物	4	1.0	最后日常工作	14	
读数	4		清扫		
最后日常工作	14				
清扫	10				
总计	149	2.3		57	1day

表 5 72 样品耗费

DAS－ELISA		DTBA	
项 目	金额 (元)	项 目	金额 (元)
酶联板	28.0	膜	19.0
抗血清	77.0	岩盘	3.0
合成抗体	92.0	合成抗体	46.0
缓冲液	3.0	缓冲液	3.0
酶底物	7.0	酶底物	2.0
总计	207.0	总计	73.0

DTBA 方法做为一种诊断工具用来检测马铃薯病毒，使用方便，成本低，灵敏、迅速是强优势。既使结果不定量，作为一种基本工具在实验室里，可以在马铃薯项目中筛选大量的植株，对马铃薯 PVX、PVY、PVM 和 PLRV 病毒的诊断还是很有用途的。

参 考 文 献

[1] R. G. Samson, T. C. Allen and J. L. Whitworth. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. American Potato Journal. Vol70, No3, 1993, 257~264
[2] Clark, M. F and A. N. Adams. Charactcteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J Gen Virol, 1977, 34, 475~483
[3] Hsu, H. T and R. M. Lawson. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in impatiens. Plant Disease, 1991, 75: 292~295
[4] Harrison, B. D. Potato leafroll virus. CML/ABB descriptions of plant viruses. 1984, 291

准确，无论植物未被侵染，还是用 ELISA 方法或用 EM 是否有可视觉的病毒标准，没有确定。总之，DTBA 比 ELISA 更敏感。DTBA 方法已显示出其特定的价值。DTBA 的一个弊端是结果不定量，或许在反射光谱测定，通过应用计算机增强现象，不定量价值从 DTBA 中获取，但检测仪器是很昂贵的。