

快速 ELISA 法鉴定马铃薯病毒

刘卫平

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所 克山 161606)

摘 要

本文用三种方法鉴定马铃薯病毒,第一种方法为常规 ELISA 法,第二种和第三种均为快速 ELISA 法。三种方法的阳性率和灵敏度一致,快速 ELISA 法的精密度高于常规 ELISA 法。快速组比常规组可节约时间约 10h,该法适合大量、快速检测样品的需要。

关键词 常规 ELISA 法,快速 ELISA 法,精密度

1 前 言

黑龙江省北部地区是我国主要马铃薯种薯产区之一。从原种中彻底汰除主要马铃薯病毒,控制其再侵染,建立种薯分级与检验制度是提高种薯质量的关键。为了更多、更快地提供高质量的种薯,为资源开发利用和科研工作提供更多的健康材料,提高鉴定马铃薯病毒的速度和精确度是至关重要的。

本试验对常规的鉴定马铃薯病毒的酶联免疫吸附试验法(ELISA),在时间上,操作方法上进行了改进。

2 材料与方法

2.1 供试材料

本所检测室和病毒室的 20 个品种的 217 管试管苗。

2.1.1 常规的 ELISA 法和快速的 ILISA 法的相同点

PVX 和 PVY 抗原提纯主要参照 HUNST 等(1982)的方法^[1]进行。以家兔为免疫动物,第一次免疫时,用提纯的抗原和等量的福氏完全佐剂进行肌肉注射,第二、三次免疫时加不完全佐剂,最后一次注射 1 周后取血制备抗血清,用试管沉淀法测定抗血清效价。按 Clark 方法^[2]提纯 PVX、PVY 抗血清中的丙种球蛋白(γ -globulin),以辣根过氧化物酶(HRP 上海生化研究所产品)按 Avramecv (1969)所建立的戊二醛法标记抗体。

ELISA 鉴定法在抗血清、球蛋白、酶标都制备完全的基础上进行。

抗体用 9.6pH 碳酸盐缓冲液包被,酶标和样品用 PBS-Tween20-2%PVP 溶液稀释。

2.1.2 常规的 ELISA 法和快速的 ELISA 法的不同点

常规法 ELISA 中各种反应是在静止状态下进行的,快速的 ELISA 中各种反应是在振摇状态下进行;常规法中抗体、抗原、酶标各孵育 4h,快速法中抗体、抗原、酶标孵育 30min。

2.2 操作方法

收稿日期:1996-12-10

2.2.1 常规法

用 9.6pH 的碳酸盐缓冲液包被抗体后, 在聚乙烯反应板中孵育 4h (37℃) 用 PBS-Tween-20 溶液冲洗 3 次, 每次 3min。

用 PBS-Tween²⁰-2%PVP 溶液稀释抗原后, 将抗原加入聚苯乙烯反应板中孵育 4h, 用 PBS-Tween-20 冲洗 3 次, 每次 3min。

用 PBS Tween²⁰ 2% PVP 溶液稀释酶标, 酶标在反应板中孵育 4h, 用 PBS-Tween-20 冲洗 3h, 每次 3min。

2.2.2 快速法

用 9.6pH 的碳酸盐缓冲液包被抗体后, 在聚苯乙烯反应板中孵育 30min, 用同上洗液洗 3 次, 每次 3min。

用 PBS-Tween²⁰-2%PVP 溶液稀释抗原, 抗原在反应板中孵育 30min。用同上洗液洗 3 次, 每次 3min。

用 PBS-Tween²⁰-2%PVP 溶液稀释酶标, 酶标在反应板中孵育 30min。用同上洗液洗 3 次, 每次 3min。

这里介绍的快速法试验, 抗原和酶标分开孵育, 也可将抗原和酶标放在一起孵育, 使时间更短, 也就是在整个试验中的第三种试验方法。

2.2.3 测 OD 值

在孵育工作完毕后常规法和快速法均在反应板中加底物, 根据底物和酶反应的黄色测 OD 值, 用 DG3021 型酶联免疫检测仪 490nm 波长测吸光值, 以超过阴性对照的吸光值 2 倍的吸光值做为阳性反应。

以上各种快速反应是在 37℃ 恒温振摇状态下进行的, 转速为 300r/min, 采用的设备是摇床和光照培养箱, 把摇床放入光照培养箱中(调温至 37℃)。如果有普通台式恒温(37℃)振荡器(300r/min)用于该试验更便于操作。

整个比较试验分三批材料进行, 每份材

料进行三种试验, 阳性率和灵敏度三种方法均相同, 精密度快速组比常规组高。每批材料快速组 OD 值均高于常规组。OD 值大, 在反应中液体颜色深, 在一定的浓度范围内, 颜色深浅与样品相应抗原量成正比。

快速试验中也做了孵育时间长短的试验, 进行了 20、30、40、60、90min 组试验, 阳性率无差异, 但 30min 效果最好。

3 结果与讨论

用三种试验方法进行了 20 个品种的 217 管试管苗的病毒鉴定, 三种方法的阳性率和灵敏度一致, 但快速组的精度高于常规组。快速组所用时间远远少于常规组, 前者用 1.5~2h, 后者用 12~14h。

快速组的试验是在振摇状态下进行的, 抗原、抗体、酶标和固相受体分子之间碰撞的机率增大, 因此包被及反应过程在短时间内可迅速达到最佳饱和状态, 常规组是在静置状态下进行, 包被的时间长, 易使包被物失活, 并易产生边缘效应。

酶联免疫吸附试验是免疫生物化学反应, 其整个反应过程受诸多因素的影响, 其中酶标抗体的工作浓度、样品中病毒浓度、底物浓度以及试验的温度条件, 都对最终颜色反应强度有影响。

在今后的种薯生产、资源利用、无毒化育种中, 快速鉴定病毒的方法将发挥重大作用。

参 考 文 献

- 1 崔荣昌等. 应用酶联免疫吸附试验法鉴定几种主要马铃薯病毒. 植物保护学报, 1989, 2
- 2 刘卫平等. 马铃薯种质材料的检测. 马铃薯杂志, 1995, 4: 223~224

湖北恩施马铃薯一种新记录病害

田世民¹ 刘晓鹏² 朱杰华¹ 张志铭¹

(河北农业大学农学院植保系 保定 071001;² 中国南方马铃薯中心 湖北恩施 445019)

摘 要

在湖北恩施从马铃薯上采集到一种叶斑病,病原菌鉴定为 *Mycovellosiella*(*Cer-cospora*) *concors*(*Casp.*) *Deighton*,经文献检索该病害为湖北省内新记录。初步调查,马铃薯灰斑病(*M. concors*) 在个别品种上零星发生。

关键词 湖北, 马铃薯, 病害

1996 年 7 月在湖北恩施南方马铃薯中心附近采集到一种马铃薯叶斑病,进行症状描述和病害调查,然后进行室内病原菌鉴定。在另外两个马铃薯产区未发现此病。

1 病害症状

该病危害叶片和地上茎,块茎未见发病。

初期病斑圆形, 黄色至浅褐色, 扩大后呈褐色不规则形, 或者叶斑不太明显。在天气潮湿情况下, 叶片背面形成致密的灰色霉层(分生孢子梗和分生孢子), 可区别于晚疫病(*Phytophthora infestans*) ; 没有同心轮纹可区别于早疫病(*Alternaria solani*) 。该病一般在马铃薯后期发生, 生产上危害不大。

收稿日期:1996-11-04

ESTABLISHMENT OF IMPROVED ELISA METHODS

Liu Weiping

(Keshan Potato Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan 161606)

ABSTRACT

Potato virus are detected by three methods. The first method is routin ELISA and the second and third methods are modified ELISA. The positive reaction and sentivity are the same for the three methods, but the precision of modified methods are higher than that of the routin ELISA. Furthermore, the modified methods need shorter time compared with the routin method.

KEY WORDS: routin ELISA, modified ELISA, precision