

植物病毒检测技术——组织印迹法

徐明全 郑 平 刘荣维 刘 擎 王 韬

(深圳市农业科学中心花卉研究所 深圳 518040)

摘要:组织印迹法(Tissue blotting)是在酶联免疫吸附(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA)的基础上发展起来的植物病毒检测技术,该技术不仅保持了 ELISA 对病毒检测的灵敏度高,特异性强的特点,而且大大地简化了操作程序,对病毒的检测更加快速、简单、方便、印迹在硝酸纤维素膜上的样品能保存 3 个月以上,检测结果能直观地显示出病毒感染的部位。组织印迹技术尤其适用于植物病毒的大规模普查。

关键词:植物病毒,组织印迹,抗体

中图分类号:S432 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2000)05-0360-04

A TECHNIQUE FOR DETECTION OF PLANT VIRUSES—TISSUE BLOTTING

XU Ming-Quan ZHENG Ping LIU Rong-Wei LIU Qing WANG Tao

(Shenzhen Research Center of Agric. Scis. Shenzhen 518040)

Abstract:Tissue blotting, based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), is a technique for detection of plant viruses. This technique is not only high sensitivity and specificity, but also simpler and more rapid for detection. Samples that are blotted on membrane can be kept over three months. The results can directly display the section of virus infected. It is especially suitable for detection of plant viruses on a large scale.

Key words: Plant virus, Tissue blotting, Antibody

由于植物病毒的感染,造成农作物的大幅度的减产和品质的严重下降,已受到国内外病毒学家的高度重视。到目前为止,在没有找到一种能有效地防治病毒病的化学药剂之前,在防治上除了选育对植物病毒有自然抗性的品种和应用基因工程技术培育抗病毒的新品种外,生产上通常采用植物检疫手段来严格控制各种途径的病毒传播和通过植物病毒的普查对感染病毒的植株进行隔离来控制病毒的扩散,因此植物病毒的检测技术对控制病毒病的发生起着重要作用。随着科学技术的发展,经科研工作者的不懈努力,已建立了多种植物病毒的检测技术,如:指示植物鉴定法^[1]、电泳技术^[1]、血清学技术^[1,2]以及生物技术-PCR^[3]等。组织

印迹技术^[4]是近年来国外对植物病毒检测广泛采用的技术,美国夏威夷大学 J. S. HU 实验室采用该技术对菠萝萎蔫病毒在世界范围内对菠萝主产地区进行了大规模的普查,获得了理想的效果。本文就组织印迹的技术要点和操作程序进行阐述。

1 基本原理

组织印迹法的基本原理同于间接 ELISA,首先将待测的样品印迹在固相载体-硝酸纤维素膜上,用病毒的家兔特异性抗体(IgG)与吸附在固相载体上的病毒进行特异性反应,再与碱式磷酸酶(Alkaline phosphatase

AP) 标记的羊抗兔 (Fc) 第二抗体进行反应, 最后用碱性磷酸酶的反应底物 BCIP / NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium) 进行显色反应, 根据颜色的变化, 确定病毒的感染程度。具体反应如图 1 所示。

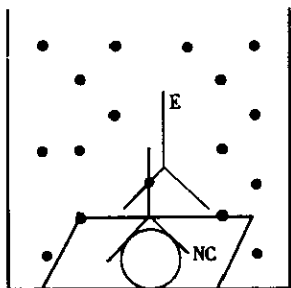


图1 组织印迹法检测病毒原理示意图

○ 待测的植物病毒, 人 特异性家兔抗体 (IgG),
人^E 羊抗兔酶标记抗体, ● 酶反应底物 (显色剂),
NC 硝酸纤维素膜

组织印迹法选用的碱性磷酸酶 (AP) 以硝基酚磷酸盐为底物, 在碱性 (pH9.5) 条件下产生不溶性蓝色, 而辣根过氧化物酶 (HRP) 是以 H_2O_2 为反应底物需要供氢体如四甲基联苯胺 (TMB) 参与, 在弱酸性 (pH5.0) 条件下产生可溶性产物, 需要借助于比色测定来进行结果分析^[1]。两种酶的反应过程如下:

碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase AP)

$AP + BCIP \rightarrow BCI + PO_4$ (pH9.5), $BCI + NBT \rightarrow$ 不溶性、蓝色

辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase HRP)

$HRP + H_2O_2 \rightarrow HRP \cdot H_2O_2$ (pH5.0), $HRP \cdot H_2O_2 + TMB \rightarrow$ 可溶性、黄色

2 试剂和器皿

2.1 试剂

家兔特异性抗体 (IgG), 碱性磷酸酶 (AP) 标记的羊抗兔第二抗体 (Sigma 公司), 硝基酚磷酸片 (Sigma 公司), 硝酸纤维素膜, PBS 缓冲液, PBS-T 缓冲液, 脱脂奶粉。

2.2 器皿

培养皿 (15cm), 镊子, 烧杯, 移液管, 微量移液枪, 量筒 (25mL, 100mL), 手术刀片, 玻璃棒, 卫生纸, 塑料袋。

3 操作步骤

3.1 采样

采取待测植株的叶、茎、根或果实, 避免手与样品

的伤口接触, 作好标记, 装入塑料袋。

3.2 点样

将硝酸纤维素膜 (15 × 8cm) 置于平整洁净滤纸上, 手和其它硬物不要直接与膜面接触 (戴医用手套), 以免影响检测效果。用干净手术刀片横切叶片、茎、根、或果实 (刀片不能重复使用, 以防样品之间相互污染而影响检测结果的准确性), 将切口均匀压印在硝酸纤维素膜上, 印迹清晰为宜, 每张膜上可排列数百个样品, 选择已确定感病和健康的植株作为检测的正负对照, 具体排列如图 2 所示。

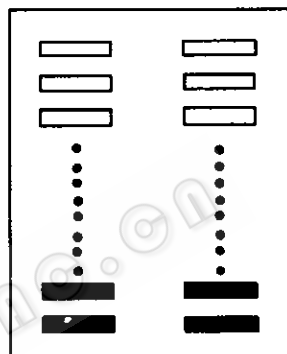


图2 待测样品与CK的排列顺序

□ 待测样品, ■ ±CK

3.3 封闭

将点好样的硝酸纤维素膜置于盛有 2% 脱脂奶粉的 PBS 封闭液的培养皿中, 封闭液的用量以覆盖硝酸纤维素膜为宜, 在 37℃ 下温育 1h 或 4℃ 下过夜。

3.4 洗涤

用 PBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5min, 并不断摇晃培养皿, 使之完全清洗干净。

3.5 病毒与抗体的特异性反应

将清洗后的膜转入含有特异性抗体 (1μg / mL) 的封闭液或 PBS 缓冲液的培养皿中, 37℃ 下温育 3h 或 4℃ 下过夜。

3.6 洗涤

操作过程同 3.4。

3.7 第二抗体联接反应

洗毕, 将膜转入含碱性磷酸酶标记的羊抗兔第二抗体的 PBS 液 (1:2000), 37℃ 下温育 3h 或 4℃ 下过夜。

3.8 洗涤

操作过程同 3.4。

3.9 显色反应

将膜转入显色液 [硝基酚磷酸片, 每片 (BCIP / NBT) 5mg / 30mg) 溶于 15mL 蒸馏水至阳性对照显色为止 (约 5~10min 左右) 。

3.10 终止显色

待阳性对照显示清晰的紫蓝色时, 将膜转入蒸馏水中, 使之终止反应。

3.11 干燥保存

终止显色反应后, 将膜放置于干净的卫生纸之间, 使之干燥, 待膜完全干燥后过塑, 以便永久保存和比较观察。

3.12 结果分析

组织印迹技术的灵敏度测定: 用感染蕙兰花叶病毒 (Cymbidium Mosaic Virus CyMV) 的兰花叶片, 进行一次切割, 连续在硝酸纤维素膜上压印 45 次, 和从感病的叶片中提取汁液, 用无菌水作不同的稀释至 1:100,000, 然后点渍在硝酸纤维素膜上, 经抗体特异性反应, 均显示阳性见图 3, 结果表明组织印迹技术对病毒检测的灵敏度很高。

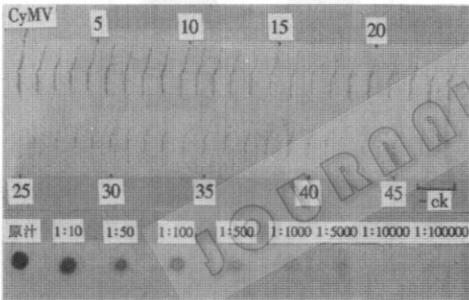


图3 组织印迹技术对病毒检测的灵敏度

组织印迹技术的特异性测定: 用 CyMV 特异抗体对蕙兰花叶病毒 CyMV 和 齿瓣兰属环斑病毒 (Odontoglossum Ringspot Virus ORSV) 进行特异性测定, 结果显示只有 CyMV 样品显示阳性, 而 ORSV 样品及负对照显示阴性, 结果表明组织印迹技术对病毒检测的特异性很强。

组织印迹技术对病毒检测的结果非常直观, 可直接显示出植物某一器官感染病毒的具体部位 (石斛兰叶片从叶尖至叶尾每 0.5cm 切割 1 次并压印在硝酸纤维素膜上), 见图 4。在操作上比 ELISA 更简便, 可在田间直接点样, 印迹到硝酸纤维素膜上的病毒能保存 3 个月以上而保持生物学活性不变, 尤其适用于病毒的大规模普查。植物病毒感染等级的具体划分见表 1。

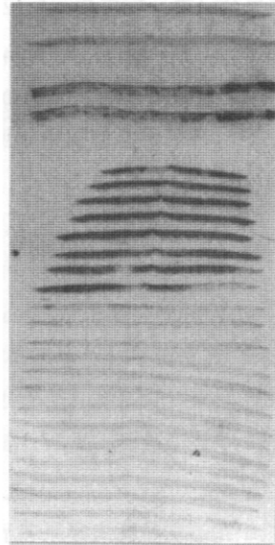


图4 组织印迹技术对兰花病毒ORSV的检测
黑色部分为已感染病毒, 浅色部分为未感染病毒

表1 植物病毒感染等级划分

样本编号	显色程度	感病等级	感病程度
1	绿至浅绿	—	健康
2	浅蓝色	+	轻度感病
3	蓝色	++	中度感病
4	紫蓝色	+++	严重感病
+ck	紫蓝色		
—ck	绿至浅绿		

我们采用组织印迹技术对国内 161 个品种的蕙兰进行了 CyMV 和 ORSV 病毒的重复检测, 结果表明, 其中感染 ORSV 的品种占所测品种的 42.8%, 感染 CyMV 的仅占 6.8%, 显示蕙兰易感 ORSV, 而对 CyMV 有一定的抗性。

4 讨论

4.1 采样部位

同一植物不同部位的病毒分布量是不同的, 所以同一品种内不同植株的采样部位必须一致, 测定不同的病毒要根据其在植物体内移动方式的不同^[5], 对被测植株的根、茎、叶、果等不同部位进行检测, 提高检测的准确性。

4.2 对照设立

为了准确地测定植株的感病程度, 排除样品的假阳性反应, 除设立阳性对照 (+ ck) 外, 还应用健康的无病毒感染植株作阴性对照 (- ck)。

4.3 操作要点

点样量与感病等级有一定的关系,故点样时最好都由同一人操作,压印每一个样品的用力要一致,不宜过轻或过重,只有均匀点样,才能客观反映植株的感病程度。

4.4 样品重复数

为了提高检测结果的准确性,同一样品应重复 3~5 次为宜,根据着色程度,样品感病数量综合评价所测植株(品种)感病等级。采样方式为随机抽样法。

4.5 结果分析

在进行检测结果的分析时,对轻度感病的样品,显色较淡,不易判断,但在光学解剖镜下能清楚地分辨出着色程度,可提高检测结果的准确性。

致谢 应用组织印迹法对我国兰花进行兰花两种主要

病毒 Cymv 和 ORSV 的检测,得到美国夏威夷大学 J.S. HU 教授的技术指导,并提供了 Cymv 和 ORSV 的抗体,在此谨表感谢!

参 考 文 献

- [1] 田 波,裴美云. 植物病毒研究方法(上册). 北京:科学出版社,1987,1~254.
- [2] Clark M F, Adams A N. J. Gen. Virol, 1977, 34: 475~483.
- [3] 林万明,杨瑞馥,黄尚志等. PCR 技术操作和应用指南. 北京:人民军医出版社,1995,491~505.
- [4] Lin N S, Hu Y H, Hsu H T. Phytopathology 1990, 80:824~828.
- [5] Hu J S, Ferreira S, Xu M Q, *et al.* Plant Disease 1994, 78:633~636.