

DAS-ELISA 与 RT-PCR 法检测 马铃薯 S 病毒的比较

申 宇,高艳玲,范国权,张 威,张 抒,白艳菊

(黑龙江省农业科学院 植物脱毒苗木研究所/农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心,
黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:在马铃薯种薯生产中,马铃薯 S 病毒是田间发病率较高的病毒之一,同时也是最不易脱掉的病毒。为了更准确地筛查马铃薯病毒病,减少病毒病在田间的侵染,保证种薯质量,提高种薯产量,用 DAS-ELISA 和 RT-PCR 两种方法对马铃薯 S 病毒筛查的效果进行了比较。结果表明:两种方法间有较高的吻合度,但也存在一定的差异。DAS-ELISA 相对 RT-PCR 而言成本更低效率更高,但灵敏度略低。同一条件下,对于同一样本,不同的试验方法会对试验结果有一定的影响。因此,在病毒检测工作中,应根据检测的实际要求,谨慎合理选取正确的方法,灵活利用 RT-PCR 进行补充检测,以保证检测及科研工作结果更加可靠。

关键词:马铃薯;PVS;检测;方法

中图分类号:Q789;S532 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)10-0058-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.10.0058

马铃薯是世界上最重要的粮食作物之一,具有分布范围广泛、适应性强、产量高、用途广等特点。中国马铃薯的种植面积和总产量均居世界首位^[1],然而整体水平却只有马铃薯生产发达国家荷兰平均单产的 32%^[2]。其中,病毒病是降低马铃薯种薯产量、引起种性退化的主要原因^[3]。现阶段对马铃薯病毒病尚没有有效的治疗办法,只能预防^[4]。马铃薯以营养体为繁殖材料,容易被病毒感染,并传播扩散到子代,造成病害逐年严重,产量逐年降低,种薯种质严重退化^[5]。病毒检测是防治措施中最为重要的环节,也是种薯质量认证的关键指标^[3]。

PVS 是马铃薯生产中,田间发生率较高的病毒,也是马铃薯生产中必须检测的病毒。有研究发现 PVS 在试管苗和原原种微型薯检出率均最高^[6]。因此,针对马铃薯 S 病毒检测,选取国际上广泛应用的 DAS-ELISA 法和 RT-PCR 法,进行检测结果的对比,通过比较、分析,根据检测的材

料性质和用途选用合适的检测方法,有利于快速、准确地筛查马铃薯 S 病毒,及时在马铃薯种薯的源头(种苗、种薯)进行病毒病控制,保证马铃薯质量安全,提高产品质量,利于马铃薯产业健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料

检测样品来自于黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所,样品为马铃薯种苗,苗期 25 d,苗高 7~12 cm,茎叶状态良好,符合检测要求。对 26 瓶试管苗进行随机编号分别为:S-1~26。

1.2 方法

在超净工作台中取样,每个样品去顶、根部各 1 cm,在试管苗中段取 0.1 g 茎叶,每个样品取 2 份,一份用于 DAS-ELISA 检测,一份用于 RT-PCR 检测。

1.2.1 DAS-ELISA 检测 按照马铃薯 S 病毒的 DAS-ELISA 试剂盒说明书,对 26 份样品进行检测,使用酶标仪读取 OD_{405/490} 值。

1.2.2 RNA 提取 应用 Trizol 法,按说明书提取植物总 RNA。

1.2.3 RT-PCR 检测 将 26 份样品进行 RT-PCR 扩增,使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳判定结果。

2 结果与分析

2.1 DAS-ELISA 检测结果

应用 DAS-ELISA 法对 26 个样品进行 PVS

收稿日期:2016-08-06

基金项目:现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-10-P14);哈尔滨市科技创新人才专项资金资助项目(2015RQQYJ031);国家科技支撑计划资金资助项目(2012BAD06B02)

第一作者简介:申宇(1966-),女,黑龙江省哈尔滨市人,高级农艺师,从事马铃薯病害检测技术与推广工作。E-mail:tianning66@163.com。

通讯作者:白艳菊(1972-),女,黑龙江省哈尔滨市人,在读博士,研究员,从事马铃薯病害研究。E-mail:yanjubai@163.com。

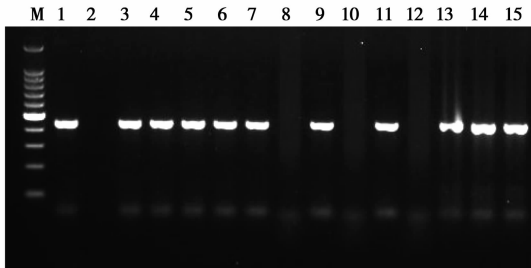
的检测,检测结果表明,在这 26 个样中,共有 15 个样品被检测出含有 PVS,占全部样品的 57.69%。在这 15 个阳性样品中,OD 值大于 2.0 小于 3.0 的样品为 3 个,大于 3.0 的样品为 6 个,而其余样品的检测 OD 值均小于 2.0。

表 1 DAS-ELISA 结果
Table 1 Result of DAS-ELISA

样品号 No.	重复 1	重复 2	样品号	重复 1	重复 2
1	0.045	0.044	14	0.053	0.046
2	0.055	0.056	15	3.045	3.158
3	3.221	3.452	16	0.045	0.047
4	2.545	2.068	17	3.518	3.048
5	1.538	1.426	18	0.044	0.044
6	0.052	0.055	19	2.223	2.352
7	1.588	1.536	20	1.432	1.325
8	0.043	0.047	21	0.043	0.042
9	3.225	3.368	22	3.632	3.145
10	0.044	0.045	23	1.227	1.208
11	1.225	1.342	24	0.044	0.044
12	1.452	1.363	25	3.525	3.295
13	2.448	2.574	26	0.044	0.044
阴性对照	0.044	0.045	阳性对照	2.654	2.356
空白对照	0.046	0.044			

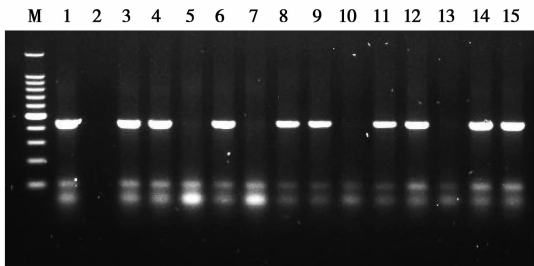
2.2 RT-PCR 检测结果

使用 Trizol 法对检测的 26 个样品提取了 Total RNA,经检测,RNA 质量良好,可应用于 RT-PCR 检测。利用 RT-PCR 法,使用 PVS 引物对 26 个样品进行检测,结果表明:在这 26 个样品中,PVS 阳性样品共检出 19 个,占全部样品的 73.08%。



M: DNA marker; 泳道1:阳性对照;泳道2:阴性对照;泳道3~15: 样品1~13
M:marker; line 1: positive control;line2: negative control; line3~15; samples1 ~ 13

图 1 PVS RT-PCR 结果
Fig. 1 PVS RT-PCR detection result



M: DNA marker;泳道1:阳性对照;泳道2:阴性对照;泳道3~15; 样品14~26样品
M:marker; line 1: positive control;line2: negative control;line3~15; samples14 ~ 26

图 2 PVS RT-PCR 结果
Fig. 2 PVS RT-PCR detection result

2.3 DAS-ELISA 和 RT-PCR 检测结果比较

应用 DAS-ELISA 法检测到 PVS 15 例,占全部检测样品数量的 57.69%,而使用 RT-PCR 方法检测出 PVS 病毒 19 例,占全部样品的 73.08%。DAS-ELISA 检测的病毒总数比 RT-PCR 少 4 例,两种方法检测出的病毒发病率相差 15.39百分点,RT-PCR 检测灵敏度要高于 DAS-ELISA 法。但 ELISA 的检测成本远低于 PCR,且操作简便。

3 结论与讨论

PVS 是马铃薯种苗生产中最不易脱掉的病毒,这种病毒在马铃薯生长过程中,并不会表现出明显的症状,仅有少数的染病样品会被发现有较轻微的症状表现。但在生产过程中,PVS 经常会与其它的病毒复合侵染马铃薯植株,会造成较为严重的经济损失。所以在马铃薯生产中,PVS 是一种必检病毒。

本研究通过两种不同方法对马铃薯样品中的 PVS 进行了检测。结果表明,应用 DAS-ELISA 和 RT-PCR 法检测出的 PVS 阳性样品数不同,可能是由多方面原因造成的。首先,很多研究结果表明 RT-PCR 法灵敏度及可靠性要高于 DAS-ELISA 方法,本研究结果也可以进一步的证明,应用 RT-PCR 法检测 PVS,其检测灵敏度确实要高于 DAS-ELISA 法。其次,DAS-ELISA 技术的原理是基于抗原(病毒颗粒)与其特异性抗体,在离体条件下产生专一性反应,检测目标为 PVS 的 CP 蛋白,而 PVS 的 CP 蛋白是由其编码基因所决定的,由于 PVS 在自然界中经常发生变异,可能导致 PVS 的 CP 蛋白构象发生了改变,若 DAS-ELISA 检测试剂盒中的抗体为单克隆抗体,有可能会出现漏检的情况,DAS-ELISA 检测

试剂盒中的单克隆抗体要尽量覆盖所有基因型,而多克隆抗体检测范围更宽。同理,在 RT-PCR 检测技术研究上,检测人员需要经常改进检测引物,使其适应能检测到病毒的所有株系。在 DAS-ELISA 检测技术的研究中,制备各个株系的抗体混合在一起使用,使试剂盒能够检测到病毒所有株系,保障检测的准确性。因此,DAS-ELISA 方法与 RT-PCR 方法可优势互补。

在实际的马铃薯生产及研究中,有人通常认为检测数据要详实准确,进而会倾向于使用更为精确的检测方法。但事实上,不论是生产或者科学研究,使用最适合当前工作,效率最高的方法才是最正确的选择。在马铃薯脱毒种苗、种薯生产过程中,种苗是整个生产链的源头,对于脱毒材料、试管苗的病毒筛查,以及其它方法无法确定的样品,需要使用检测灵敏度高的方法,如 RT-PCR 法等,以保证种薯的质量。

对于大田种薯样品检测以及企业自测,可以选择 DAS-ELISA 法,检测成本低,操作简单、易学易用、对仪器要求低,亦可根据检测结果初步掌握种薯质量情况。此外,在某些研究中,研究者们需要脱毒种薯为试验材料,这时,可使用灵敏度较高的方法进行检测,以免对试验造成损失。

在马铃薯生产及科学研究中,人们经常需要

使用不同的检测技术对马铃薯植株、块茎等进行病毒检测,而使用不同的检测方法有时候会得到有一定差异的结果。本研究利用两种不同的方法检测了 26 个相同来源的马铃薯样品,并通过检测结果对不同检测方法的优劣进行了比较分析。分析结果表明,可根据不同的生产或试验要求,选择不同方法进行检测,对于试管苗或茎尖脱毒材料,应用 RT-PCR 进行检测,可及时、准确地淘汰病株,保障种薯源头的质量。对于大田种薯,可采用 DAS-ELISA 检测方法,操作简单,对仪器设备要求低,降低检测成本,提高检测效率。

参考文献:

- [1] 张威,白艳菊,高艳玲,等. 马铃薯主产区病毒病发生情况调查[J]. 黑龙江农业科学,2010(4):71-73,86.
- [2] 王迎男,贾立国,樊明寿. 2010~2012 年世界各洲及各洲主要生产国马铃薯生产状况分析[C]// 中国作物学会马铃薯专业委员会. 马铃薯产业与现代可持续农业(2015),2015 中国马铃薯大会,2015.
- [3] 张丽珍,董家红,郑宽瑜,等. 云南省马铃薯脱毒试管苗和微型薯病毒检测与分析[J]. 中国马铃薯,2015(1):42-45.
- [4] 张威,白艳菊,文景芝,等. 马铃薯六种主要病毒通用 RT-PCR 检测体系的建立[J]. 中国马铃薯,2015(4):222-227.
- [5] 吴兴泉,陈士华,谢联辉. 马铃薯 X 病毒的分子鉴定与检测技术[J]. 河南农业科学,2006(2):72-75.
- [6] 郭志乾,董凤林. 马铃薯病毒性退化与防治技术[J]. 中国马铃薯,2004(1):48-49.

Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR Method for Detection of Potato Virus S

SHEN Yu,GAO Yan-ling,FAN Guo-quan,ZHANG Wei,ZHANG Shu,BAI Yan-ju

(Virus-free Seeding Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science/Ministry of Agriculture Virus-free Seed Potato Quality Supervision and Testing Center, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Potato virus S (PVS) is one of the viruses which causes high rate of incidence in the seed potatoes production, and it is also the hardest one to free. Therefore, it appears frequently in the fields. In order to screen the potato virus disease more accurately, reduce the infection of virus in the field, ensure the quality of seed potato, increase the seed potato yield, the effect of virus detection by DAS-ELISA and RT-PCR methods were compared and studied. The results showed that two methods had a good agreement, but there are some differences, too. Compared with RT-PCR, DAS-ELISA was lower costly, higher efficient, but the sensitivity was lower. Different methods in same situations have a certain effect on the experimental results. Therefore, in the virus detection work, correct method should be chosen based on the actual requirements of the detection, carefully and reasonably. RT-PCR method should be used to complement the detection, to ensure that the results of testing and scientific research was more reliable.

Keywords: potato; PVS; detection; method