

免疫胶体金技术在马铃薯病毒检测上的应用

范国权¹, 陈卓², 高艳玲¹, 张威¹, 耿宏伟¹, 申宇¹, 喻江³, 白艳菊¹

(1. 黑龙江省农业科学院 植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业广播电视学校, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 哈尔滨仁皇药业, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:免疫胶体金技术是一种快速、简便、结果容易判定的新型免疫标记技术, 应用免疫胶体金技术制备试纸条具有特异性强、价格低、灵敏度高的特点, 适用于马铃薯病毒检测, 特别广泛适用于田间和口岸现场检测等工作。文章对免疫胶体金技术的基本原理、制备方法以及其目前在马铃薯病毒检测中的应用情况进行了综述。

关键词:免疫胶体金技术; 马铃薯; 病毒检测

中图分类号: S41-30; S532

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)11-0060-03

免疫胶体金技术 (Immune colloidal gold technique, ICG) 是一种快速、简便、结果容易判定的新型免疫标记技术。1971 年 Faulk 和 Taylor^[1] 首次利用免疫胶体金技术检测细菌表面抗原的分布, 经过 30 多年的发展, 人们发现胶体金可以与蛋白质等多种生物大分子结合, 广泛地用于免疫学、组织学、病理学、细胞生物学等领域^[2], 该技术现已成为当今最快速、最直观、最灵敏的免疫学检测技术之一。近年来, 继 DAS-ELISA 方法广泛应用之后, 免疫胶体金技术作为一种以胶体金为示踪标志物的马铃薯病毒新型免疫检测技术已在马铃薯病毒检测中得到了应用。现就免疫胶体金技术的原理、特点、马铃薯病毒检测中的应用和发展前景作以简要综述。

1 免疫胶体金技术基本原理

免疫胶体金技术主要利用抗原抗体结合的免疫学原理, 以胶体金颗粒为抗原, 有效地检测病毒抗体。由于胶体金颗粒可以与蛋白质等生物大分子结合, 同时不同直径胶体金颗粒具有不同的颜色, 所以可以通过观察颜色的变化快速判定结果。免疫胶体金标记技术主要包括: 胶体金免疫层析

诊断法 (Gold-Immuno chromatography Assay, GICA) 和免疫胶体金渗滤法 (Dot-immuno gold filtration assay, DIGF)^[3]。目前, 应用较多的是胶体金免疫层析诊断法中的免疫层析快速诊断试纸条技术, 该方法还是进行定性或半定量检测的一种有效途径^[4-5]。

2 胶体金的制备方法

目前制备胶体金溶液主要应用化学还原法, 常用的还原剂有柠檬酸三钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷、硼氢化钠等。在还原剂作用下, 氯金酸可聚合成特定大小的金颗粒, 即向一定浓度的金溶液内加入一定量的还原剂使金离子变成金原子, 由于静电作用而成为稳定的胶体状态^[6]。

2.1 制备胶体金

取 0.01% 氯金酸水溶液, 加热至沸腾, 迅速加入 1% 柠檬酸三钠水溶液, 继续煮沸 7~10 min, 冷却后用双蒸水恢复到原体积, 制备胶体金溶液。在胶体金制备过程中, 胶体金颗粒的直径与加入还原剂的种类和浓度密切相关, 不同还原剂制备不同大小的胶体金颗粒, 例如: 硼氢化钠还原法 (2 nm)、白磷还原法 (5 nm)、抗坏血酸还原法 (8~12 nm)、柠檬酸-鞣酸还原法 (3~15 nm)、柠檬酸三钠还原法 (10~150 nm)。还原剂的浓度及还原能力越高, 制备的胶体金颗粒就越小。以柠檬酸三钠作为还原剂为例, 柠檬酸三钠用量越多, 胶体金颗粒的直径越小, 柠檬酸三钠的用量越少, 胶体金颗粒的直径越大^[7-8]。胶体金颗粒制备完成后, 可以通过投射电子显微镜、肉眼观察和光谱法分析胶体金制备的质量。

2.2 胶体金标记及纯化

胶体金标记, 就是蛋白质等高分子与胶体金

收稿日期: 2010-09-19

基金项目: 农业部科技成果转化资金资助项目 (2008 GB2B200084); 国家马铃薯产业技术体系资助项目 (NY CYTX-15); 948 资助项目 (2008-Z23); 黑龙江省农业科技创新工程重点资助项目

第一作者简介: 范国权 (1982-), 男, 黑龙江省木兰县人, 在读硕士, 研究实习员, 从事马铃薯病害研究。E-mail: fgq_520@126.com。

通讯作者: 白艳菊 (1972-), 女, 黑龙江省嫩江县人, 硕士研究生导师, 副研究员, 从事马铃薯病害研究。E-mail: yanjubai@163.com。

颗粒结合的过程,在标记过程中 pH 是关键^[9-10]。一般认为,在蛋白质的等电点(pI)略低或略高于等电点(0.5~1.0)的条件下,胶体金颗粒的吸附力最强,制成的胶体金蛋白质复合物也最稳定,标记过程可用浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{CO}_3$ 、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ (或 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) 进行调节。通过系列稀释法找出能使胶体金稳定的蛋白质溶液的最低浓度,在此基础上再加 10% 左右,即为最佳标记量。将待标记蛋白以最佳标记量适当稀释后,缓慢滴加到胶体金中。由于标记好的胶体金中往往还含有未结合的蛋白质、未充分标记的胶体金以及标记过程中形成的各种聚合物,因此标记好的胶体金还需经过纯化才能使用,一般纯化方法有离心法和凝胶过滤法等^[11]。

2.3 试纸条的制备和组装及储存

试纸条制备主要包括金标结合垫的制备和硝酸纤维素膜(NC)的包被过程,胶体金与垫结合的方式主要有浸泡法和定量非接触喷点法。NC 膜的包被目前有划膜式和非接触式 2 种点样方式^[12]。将稀释的马铃薯病毒抗体和抗胶体金标记后马铃薯病毒的抗体分别喷于 NC 膜上,作为检测线和控制线,干燥后再将 NC 膜、结合垫、吸收垫和样品垫依次粘在单面 PVC 板上,粘贴好后,用切割机将粘贴好的试纸板切成宽为 0.4 cm 试纸条,置于含有干燥剂的铝箔袋中密封,4℃ 保存。

2.4 胶体金试纸条的结果判定

胶体金试纸条的结果分为失效、阴性、阳性。失效:检测带(T)和质控带(C)均不出现色带,说明本试纸条已失效;阴性:检测带(T)不出现色带,质控带(C)出现一条颜色较深的色带,说明马铃薯样品无被检测病毒或有被检测病毒,但含量较低。阳性:检测带(T)和质控带(C)都出现了明显的色带,说明样品中的被检测病毒水平较高。检测带颜色越深,样品中的被检测病毒含量越高。

3 免疫胶体金在马铃薯病毒检测中的应用

DAS-ELISA 技术一直是国际上通用的马铃薯病毒检测手段,但是我国马铃薯生产企业拥有检测能力的实验室较少,大部分不能够自检,在田检时发现病株不能及时拔除,因此,会扩大病毒传播范围,严重影响种薯质量,使企业遭受损失。而应用免疫胶体金技术制备的国产试纸条价格较

低,特别广泛适用于田间和口岸现场检测等工作^[13]。

同时,2006 年,魏梅生等^[14]采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒的兔多克隆抗体,所得胶体金试纸条 10 min 内即可出检测结果,两种试纸条相互测试,未出现交叉反应。用健康马铃薯和缓冲液对照测试,两种试纸条结果都为阴性。试验结果表明,所制作的马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒检测试纸条,对新鲜的烟草和马铃薯病叶的检测,具有特异性强、灵敏度高的特点。目前,免疫胶体金技术在马铃薯病毒检测中的应用刚刚起步,大部分研究仅处于实验室阶段,真正田间应用较少。

4 结论

我国马铃薯种植面积约有 66.7 万 hm^2 ,居世界首位,但产量水平较低($11 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$),不仅低于世界平均水平($15.5 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$),更不及世界发达国家($30 \sim 50 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$)。影响我国马铃薯产量的主要因素是病毒病危害,研究证明马铃薯病毒引起马铃薯减产在 10%~30%,如果不同病毒混合侵染,可以造成 50%~80% 以上的产量损失^[15],免疫胶体金技术应用于马铃薯病毒检测中具有特异性强、灵敏度高、实用方便、成本低等特点,适用于马铃薯病毒检测,现已得到国内外学者的高度重视,因此该技术具有巨大的发展潜力和应用前景。

参考文献:

- [1] Faulk W, Taylor G A. immunocolloid method for the electron microscope[J]. Immuno-chemistry, 1971(8):1081.
- [2] 王清,吴振廷,王学林,等. 免疫胶体金标记技术及其在植物保护上的应用前景[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(3): 485-487.
- [3] 王虹玲. 免疫胶体金技术基本原理及其在疾病检测中的应用进展[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(1): 64-65.
- [4] 张喜悦,徐天刚,刘春菊,等. 免疫层析试纸条检测口蹄疫非结构蛋白 3ABC 抗体的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(7): 532-535.
- [5] Moses S, Brewer S H, Lowe L B. Characterization of single-and-double-stranded DNA on gold surfaces[J]. Langmuir, 2004, 20: 34-40.
- [6] 许保疆,郭成留. 免疫层析快速诊断试纸条的制备及在动物疫病诊断上的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(3): 48-51.
- [7] 周盛华,崔尚金,戚亨,等. 免疫层析快速诊断试纸条的制备及在养猪业上的应用[J]. 畜禽业, 2008(225): 72-75.
- [8] 刘文俊,王仲兵,郑明学,等. 免疫层析快速诊断试纸条的制备及在动物疾病诊断中的应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2009(11): 8-10.
- [9] 杨雪林,张福官,杨卫华,等. 胶体金快速诊断技术在兽医临

- 床诊断中的应用[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(2): 36-37.
- [10] Bassab C, Syamal R. Manufact uring high quality gold sol[J]. IVD Technology, 2001, 8: 16-54.
- [11] 朱文钊, 孔繁德, 林祥梅, 等. 免疫胶体金技术的应用及展望[J]. 生物技术通报, 2010(4): 81-87.
- [12] 张付贤, 王兴龙. 免疫胶体金技术影响因素分析[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(5): 199-202.
- [13] 吴海波, 邵建军, 常惠芸. 免疫层析快速诊断试纸条在动物疾病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫, 2005, 22(8): 43-45.
- [14] 魏梅生, 刘洪义, 李桂芬, 等. 马铃薯 X 病毒和马铃薯 Y 病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 139-141.
- [15] 李之芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

Application of Immune Colloidal Gold Technique on Rapid Detection of Potato Viruses

FAN Guo-quan¹, CHEN Zhuo², GAO Yan-ling¹, ZHANG Wei¹,
GENG Hong-wei¹, SHEN Yu¹, YU Jiang³, BAI Yan-ju¹

(1. Plant Virus-free Seedling Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Heilongjiang Province Agriculture Broadcast Television School, Harbin, Heilongjiang 150090; 3. Harbin Renhuang Pharmaceuticals Inc, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The immune colloidal gold technique is a new immunity labeling technique which fast, simple and the result easy to determine. Test strips with the immune colloidal gold technique bears the merit of specificity, cheap and sensitive. This method is applicable for the detection of potato viruses, and it's very suitable for the field and port scene detection. This paper focused on establishment and application of the immunity colloid gold technology for detecting potato viruses.

Key words: immune colloidal gold technique; potato; viruses detection

全国农机深松整地作业进度过半

当前,“三秋”机械化生产已进入高峰期,部分地区开始转入秋季整地阶段。目前,全国已出动大中型拖拉机 7.16 万台,配套深松机具 8.02 万台,共完成深松整地作业面积 396.5 万 hm^2 ,占年度实施计划面积的 52%。

各地按照农业部有关要求,将农机深松整地作业作为当前秋冬种生产的一项重要任务,科学调度机具,统筹安排作业任务,协调落实作业补贴,力求高速、高质量地完成今年秋季农机深松整地作业任务。河北省召开全省秋季农业生产紧急视频会议,对麦田深松(耕)技术的落实进行部署。黑龙江、吉林省分别召开“三秋”机构化生产现场会,要求充分发挥大机械作用,实现深松、耙耨、起垄、镇压连续作业,明确了 2010 年秋整地的目标和进度。目前,吉林、黑龙江(含农垦)、辽宁、山西、河北、天津等 7 个省市已落实 2010 年深松作业补贴资金,总额达 4 亿元。

各省区市在机具调配、人员安排、宣传推广和相关措施上加大工作力度,以保证东北地区能在上冻之前,黄淮海、华北地区在冬小麦适播期之前完成作业。截至 2010 年 10 月 18 日,全国已完成深松作业面积较大的省区有,黑龙江(含农垦)、山东、内蒙古和河南。根据各省 2010 年的计划深松面积,实施进度较快的省区有山东(已完成 81%)、河北(已完成 71.72%)、内蒙古(已完成 65.71%)、山西(已完成 64.25%)、黑龙江(含农垦,已完成 61.79%)。