

曹冬梅,李鑫,孙晓菲,等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒荧光纳米颗粒试纸条的研制[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):152-154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.046

黄瓜绿斑驳花叶病毒荧光纳米颗粒试纸条的研制

曹冬梅,李鑫,孙晓菲,张寅寅,曹际娟

(辽宁出入境检验检疫局,辽宁大连 11600)

摘要:以黄瓜绿斑驳花叶病毒为检测对象,应用黄瓜绿斑驳花叶病毒的特异性抗体,以稀土荧光纳米颗粒为标记物,制备黄瓜绿斑驳花叶病毒荧光纳米颗粒试纸条,建立高效、灵敏、准确检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的荧光免疫技术体系,旨在研发一种可用于快速、便捷检测黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)的检测方法。

关键词:黄瓜绿斑驳花叶病毒;荧光纳米颗粒;试纸条;免疫层析

中图分类号: S436.421.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0152-02

黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)是葫芦科作物上重要的植物检疫性病毒,主要分布在欧洲、印度和日本等,严重威胁着西瓜、甜瓜、黄瓜等葫芦科作物的生产,一般减产约 15%^[1]。2005 年辽宁省盖州市西瓜感染了黄瓜绿斑驳花叶病毒,损失惨重,此后在广西、辽宁、河北、山东、广东和北京等地陆续发现疫情,已严重威胁西瓜、甜瓜、黄瓜等作物的生产,因此加强该病毒的检测极为重要。快速检测技术是有效防止黄瓜绿斑驳花叶病毒疫情扩散的重要保障,而现有检测该病毒的方法多为酶联免疫吸附(ELISA)法,该方法可在短时间内检测大量样品,但对检测环境、人员素质及设备条件要求较高,且血清价格昂贵,不能满足现场快速检测的需要。此外,人们先后研究出多种快速诊断方法,如聚合酶链式反应 RT-PCR^[2]、免疫捕获 RT-PCR(IC-PT-PCR)^[3]、实时荧光 RT-PCR^[4]等,但这些分子生物学检测方法均具有费用昂贵、操作繁琐的缺点,不能满足一线检测人员或田间检测的需求。因此,本研究以黄瓜绿斑驳花叶病毒为检测对象,应用黄瓜绿斑驳花叶病毒的特异性抗体,以稀土荧光纳米颗粒为标记物,制备黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫层析试纸条,建立快速、灵敏、准确检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的荧光免疫技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

牛血清白蛋白(BSA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;羊抗鼠 IgG 购自中晶生物技术有限公司;硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜购自美国 Millipore 公司,所用试剂均为分析纯。荧光纳米颗粒购自深圳易瑞生物技术有限公司。

1.2 方法

收稿日期:2014-09-26

基金项目:辽宁省自然科学基金(编号:201102077);辽宁省博士启动基金(编号:20111149)。

作者简介:曹冬梅(1968—),女,辽宁大连人,高级工程师,主要从事检验检疫工作。E-mail:caomdongmei@163.com。

通信作者:李鑫,女,博士,高级农艺师。E-mail:14826155@qq.com。

1.2.1 黄瓜绿斑驳花叶病毒单克隆抗体的制备 参照曹洁等的方法^[5]。

1.2.2 单克隆抗体的纯化 将腹水 20 000 g 离心 30 min,取上清,往所得上清中逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液,边加边搅拌,室温搅拌 30 min,将液体置于 4 ℃ 冰箱中静置过夜;4 ℃,10 000 g 离心 30 min,弃上清,用 pH 值为 7.4 的 PBS 重悬沉淀,将所得溶液用 Protein A 柱进行纯化,用 PBS(pH 值为 7.4)滤洗所得产物 3 次,往透析后的产物中加入海藻糖,使海藻糖的终浓度为 5%,100 μL/支分装待用。

1.2.3 抗体与颗粒共价偶联 取荧光颗粒 50 μL,用 50 mmol/L MES(pH 值为 6.0)洗涤颗粒 2 次,每次 1 mL;用 600 μL 50 mmol/L MES(pH 值为 6.0)重悬颗粒;加入 100 mg/mL sulfo-NHS 和 EDC 各 200 μL,室温摇动 30 min;离心,弃上清;用 1 mL 50 mmol/L MES(pH 值 6.0)洗涤颗粒 1 次;用 1 mL 50 mmol/L MES(pH 值 6.0)重悬颗粒;加入适量纯化后的黄瓜绿斑驳花叶病毒单克隆抗体,室温振摇 1 h;加入等体积的 PBS-BSA(BSA 含量 2%,pH 值 7.4),继续反应 1 h;离心,弃上清;用 50 mmol/L MES(pH 值 6.0)洗涤颗粒 3 次,1 mL/次;用 300 μL 重悬液[10 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)、10%蔗糖]重悬颗粒,4 ℃ 保存,备用。

将单抗梯度稀释后,分别取 50、100、150、200、250、300 μg 单抗溶液,按上述方法与荧光纳米颗粒偶联,用 BCA 蛋白检测试剂盒检测偶联后的上清中抗体的浓度并筛选出最佳抗体浓度。

1.2.4 试纸条的装配 用点膜仪在结合垫上喷涂单抗-荧光纳米颗粒偶联物,在硝酸纤维素膜上按照 1 μL/cm 的量喷涂 1.5 mg/mL 黄瓜绿斑驳花叶病毒单抗和 1 mg/mL 羊抗鼠 IgG,分别作为检测线和质控线。依次将硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫,吸收垫粘贴于 PVC 衬板上,其中结合垫、吸收垫均与硝酸纤维素膜部分重叠,分别与硝酸纤维素膜重叠约 2 mm,样品垫部分重叠于结合垫上,二者重叠约 4 mm;粘贴好后切成 4 mm 宽的试纸条,将制备好的试纸条置于密封袋中,加干燥剂,密封,4 ℃ 保存。

1.2.5 检测方法 取 1 g 叶片于洁净塑料袋中,加入 3 mL PBST(1 × PBS,0.5% Tween20,pH 值 7.4),揉搓塑料袋中的叶片,取汁液进行检测。

往反应杯中加入 200 μL 提取物,插入试纸条,继续反应 5 min,紫外光下肉眼观察结果。

1.2.6 试纸条特异性检测 采用小西葫芦花叶病毒(ZYMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、烟草花叶病毒(TMV)、番木瓜环斑病毒(PRSV)、南瓜花叶病毒(SqMV)、烟草环斑病毒(TRSV)、甜瓜坏死斑点病毒(MNSV)和黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)作为特异性检测的参照,测试方法同上。

1.2.7 稳定性检测 将试纸条放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 7 d,每天检测阳性样品,观察其稳定性。

1.2.8 与胶体金试纸条灵敏性对比试验 采用 40 nm 胶体金参考 Frens 的方法^[6]制备胶体金试纸条。用 PBST 按 8、16、32、64、128 倍稀释同一份阳性样本,分别用胶体金和荧光颗粒试纸条进行检测。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体的效价

间接酶联法测定小鼠腹水抗体效价为 1 : 1 000 000。

2.2 抗体的最佳浓度

将单抗梯度稀释后,分别取 50、100、150、200、250、300 μg 单抗溶液与 50 μL 的 1 mg/mL 纳米颗粒偶联,用 BCA 蛋白检测试剂盒检测偶联后上清中抗体的浓度,取上清中抗体浓度刚好升高的前 1 个浓度为最佳抗体用量。本试验确定 150 μg 与 50 μL 颗粒共价偶联为佳。

2.3 荧光纳米颗粒试纸条制备的最佳条件

通过对检测线和质控线包被条件等条件进行优化,最终确定最佳免疫层析体系:随着二抗包被浓度的增加,检测线的亮度也逐渐增加,在达到 1.5 mg/mL 后亮度不再明显增加,因此确定检测线的最佳包被条件为 1.5 mg/mL 的二抗。图 1 为优化后的检测线;随着二抗包被浓度的增加,质控线的亮度也逐渐增加,在达到 2.5 mg/mL 后亮度不再明显增加,因此确定质控线的最佳包被条件为 2.5 mg/mL 的二抗。图 2 为优化后的质控线。

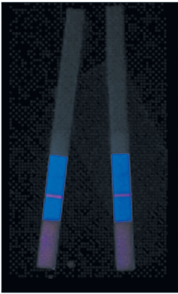


图1 优化后的检测线



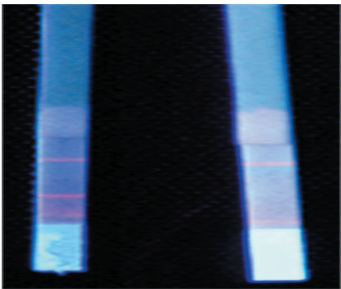
图2 优化后的质控线

2.4 特异性

用制备的荧光纳米颗粒试纸条检测黄瓜绿斑驳花叶病毒、小西葫芦花叶病毒等 9 种植物病毒的阳性样本,除黄瓜绿斑驳花叶病毒外,其余均无交叉反应。典型试验结果如图 3 所示。

2.5 稳定性试验

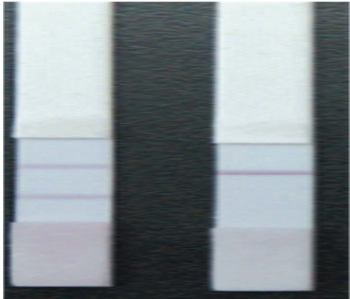
将试纸条放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 7 d,检测不同浓度的阳性样品,观察其稳定性。试验结果证实,试纸条在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 7 d,灵敏性没有明显降低,表明其稳定性较好。



左—阳性;右—阴性
图3 典型试验结果(紫外光下)

2.6 灵敏度对比试验结果

2.6.1 胶体金试纸条的制备 随着单抗-胶体金偶联物添加量的增加,检测线和质控线的信号越来越强,添加量在 0 ~ 6 μL 之间时,信号强度明显增强,6 μL 以上信号强度依然会增强,但是不再明显。考虑到非特异反应等因素,将胶体金的用量定在 6 μL 。胶体金试纸条典型反应结果如图 4 所示。



左—阳性;右—阴性
图4 胶体金试纸条典型反应结果

2.6.2 灵敏度的对比 用 PBST 倍比稀释同一份阳性样本,分别用胶体金和免疫层析方法进行检测。其中,荧光试纸条用肉眼方式判读,判读结果如表 1 所示。从表 1 可以看出,荧光纳米颗粒试纸条的灵敏性高于胶体金试纸条。

表 1 不同方法灵敏性比较

试纸条类型	放大不同倍数后的灵敏性结果				
	4 倍	8 倍	16 倍	32 倍	64 倍
胶体金试纸条	+	+	-	-	-
荧光纳米颗粒试纸条(肉眼)	+	+	+	+	-

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

3 结论与讨论

本研究研制的荧光纳米颗粒免疫层析试纸条可以在 10 min 之内得出检测结果,大大快于传统的 PCR(1 ~ 2 h)、ELISA(1 ~ 2 h)等检测方法,提高了检测效率;该方法既适合单份样品的检测,也适合大批量样品的快速检测;该方法对操作者的能力要求不高,操作者只需要经过简单培训就可以独立完成检测工作;该方法不需要大型精密的试验仪器,只需要 1 台紫外灯就可以了,非常容易开展。与近几年发展较为迅速的胶体金试纸条相比,荧光纳米颗粒中含有多个荧光颗粒,具有良好的发光性能,荧光信号也远远强于传统的标记物质。

张军高,漆永红,岳德成,等. 玉米田封闭除草剂撒施效果比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):154-157.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.047

玉米田封闭除草剂撒施效果比较

张军高¹,漆永红²,岳德成^{1,3},胡冠芳²,杨发荣⁴,李敏权^{1,5}

(1. 甘肃农业大学草业学院,甘肃兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院植物保护研究所,甘肃兰州 730070;
3. 甘肃省平凉市农业科学研究所,甘肃平凉 744000; 4. 甘肃省农业科学院畜草与绿色农业研究所,甘肃兰州 730070;
5. 甘肃省农业科学院,甘肃兰州 730070)

摘要:为了明确土壤封闭除草剂在全膜双垄沟播玉米田垄沟底和全地面的撒施效果,开展了玉米田除草剂撒施方式比较试验。田间试验结果表明,除草剂常规量全地面撒施,玉米株高、株高整齐度、成穗株率最高,分别达到 189.38 cm、33.34%、92.42%,主要农艺性状均高于其他药剂撒施处理,与其他处理差异显著。大剂量垄沟底撒施对杂草株防效、鲜质量防效最高,分别达到 97.37%、95.59%。常规量全垄面撒施和常规量全地面撒施对玉米增产效果最好,较对照分别增产 12.61%、9.92%。常规量全垄面撒施取得的经济效益最高,较对照增加 14.64%,同时对环境的污染轻。建议在生产中用全地面撒施进行全膜双垄沟播玉米田杂草防除。

关键词:全膜双垄沟;玉米田;杂草;防效

中图分类号:S451.22+2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0154-04

全膜双垄沟播技术是甘肃省广大农业科技人员在长期实践中研究出的一项抗旱新技术。该技术从根本上实现了对有限自然降水的高度富集与叠加利用^[1],现已成为甘肃省乃至全国旱作农业区重点推广的抗旱技术。近年来,甘肃省年推广全膜双垄沟播技术面积均在 66.7 万 hm^2 以上,玉米、马铃薯等主栽作物增产幅度均在 30% 左右,社会和经济效益显著。全膜双垄沟播技术突出的集水保墒效应在大幅度提高作物产量的同时,也诱致田间杂草严重发生,随着全膜双垄沟播技术推广面积的进一步增大,其危害性也越加凸显,已成为限制全膜双垄沟播技术高产稳产的瓶颈因素^[2]。化学除草是控制农田草害最有效的手段^[3-5],具有不可替代性,但由其造成的环境污染问题备受关注^[6-7],开展除草剂局部减量施用技术研究与推广是有效解决该问题的最有效途径。本试验于

2013 年度在土壤严重干旱条件下根据全膜双垄沟播玉米田杂草的分布特点,对土壤封闭性除草剂在全膜双垄沟播玉米田中局部减量施用方式进行了初步研究,旨在明确干旱胁迫条件下土壤封闭性除草剂在全膜双垄沟播玉米田局部施用最佳靶标区域及效果,为全膜双垄沟播玉米田杂草化学防除提供安全经济高效的施药方式。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验设在甘肃省平凉市农业科学研究所高平试验场,试验地地块平整,土层深厚,黑垆土质,无灌溉条件,排水良好,前茬为糜子,田内杂草分布均匀。所在地海拔 1 360 m,位于大陆性季风气候带,春季至初夏干旱多风,秋季多雨,冬季干燥,全年累计日照时数 2 424.8 h,年均气温 8.6 $^{\circ}\text{C}$, $\geq 0^{\circ}\text{C}$ 活动积温 3 511.6 $^{\circ}\text{C}$,年降水量 511.2 mm,年蒸发量 1 466.55 mm,7—9 月降水量占年降水量 60% 左右,无霜期 165 d。2013 年冬至春季,气候十分干旱,土壤墒情极差,严重偏离常年,覆膜至玉米播种期土壤含水量在 10% 以下,远低于坐水播种土壤临界含水率^[8],致使不能正常覆膜和播种;但玉米生长期雨水充沛,降水量明显超过常年。

268-270.

[3] 尚海丽,周雪平,吴建祥. 免疫斑点法和免疫捕获 RT-PCR 检测黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2010,36(5):485-490.

[4] 邓从良,黄峰,吕玉峰,等. 实时荧光 RT-PCR 方法检测黄瓜绿斑驳花叶病毒[J]. 植物检疫,2009,23(4):29-31.

[5] 曹洁,杨翠云,潘卫,等. 番茄环斑病毒单克隆抗体的制备[J]. 微生物学杂志,2007(3):35-37.

[6] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nature Physical Science,1973,241:20-22.

收稿日期:2014-08-29

基金项目:甘肃省科技支撑计划(编号:1011NKCA065);国家公益性行业专项(编号:201303022)。

作者简介:张军高(1987—),男,甘肃天水人,硕士研究生,主要从事农作物病虫害防治研究。E-mail:1102985032@qq.com。

通信作者:李敏权,博士,研究员,主要从事农作物病虫害防治研究。E-mail:lmq@gsau.edu.cn。

黄瓜绿斑驳花叶病毒荧光纳米颗粒检测试纸条的研制成功,为黄瓜绿斑驳花叶病毒的快速检测提供了一个极好的检测方法,便于野外检测的开展,为植物保护工作提供了一把利器,也为其他微生物、病毒等快速检测方法的建立打下了坚实的基础。

参考文献:

[1] Hollings M, Komuro Y, Tochiara H. Cucumber green mottle mosaic virus[J]. Descriptions of Plant Virus,1975,154:4.

[2] 李红霞,白静,陈红运,等. 南瓜果实中黄瓜绿斑驳花叶病毒的 RT-PCR 检测及 cp 基因序列分析[J]. 植物检疫,2007,21(5):