

同步检测马铃薯 6 种病毒试纸条与 ELISA 方法比较分析

刘卫平

(黑龙江省农业科学院克山分院, 齐齐哈尔 161000)

摘要:为了尽快地将同步快速检测马铃薯 6 种病毒试纸条推广应用到全国各地的基层单位、马铃薯的种薯种植企业、合作社、种植大户、种子管理部门,以提高马铃薯的质量和产量,进一步完善马铃薯种薯的质量认证体系;将同步快速检测马铃薯 6 种病毒试纸条与国内外通用的 ELISA 检测方法进行比较分析。比较分析表明,任何马铃薯种植者可以利用马铃薯病毒快速检测试纸条在田间地头检测马铃薯病毒的发生情况;可以通过肉眼直接判断出病毒检测结果;5~10min 即可完成马铃薯病毒的检测;试纸条的检测成本低,灵敏度高。

关键词:同步快速检测; 6 种病毒; 试纸条; ELISA 方法

马铃薯具有适应性强、产量高、营养丰富等特点。它既可作为粮食,又可作为蔬菜,还可作为饲料和工业原料,是具有多种用途的经济作物;马铃薯的营养成分既丰富又齐全,集蔬菜与粮食作物的优点于一身,且弥补了蔬菜及粮食作物营养中的不足。世界范围内,中国马铃薯的种植面积最大、总产量最高,但单产水平低,黑龙江省马铃薯单产水平低于世界平均单产水平。造成马铃薯单产水平低的主要原

因是马铃薯脱毒种薯的质量达不到国家标准^[1],容易被马铃薯病毒侵染而退化,致使马铃薯的产量降低、品质下降。马铃薯病毒的检测技术是提高马铃薯脱毒薯质量的主要技术手段^[2]。目前国内外通用的检测马铃薯病毒的技术是酶联免疫吸附实验技术(以下简称 ELISA 方法),这是一种在实验室由专门的技术人员利用精密仪器才能完成的实验;该项技术不能推广应用普及到基层单位,大部分马铃薯种薯企业、合作社及种植大户不能利用这项技术来监测本企业、本合作社马铃薯田的马铃薯病毒的发生情况,也就不能对马铃薯病毒及时地进行防控,造

基金项目:黑龙江省马铃薯产业技术体系马铃薯病毒防控岗位专家 (HNWJZTX202001)

同时节省了南繁加代所需的巨额费用,为经费不足的科研单位或加代材料不多的科研试验提供了一种新方法。对于经费充足、有南繁能力的单位,通过本技术的应用,3~9 月份实现本地加代,11 月至次年 2 月份南繁加代,可实现芝麻 1 年 3 熟,进一步提高科研工作效率,有很好的实际利用价值。

参考文献

- [1] 宫慧慧,赵逢涛,裴伟,孟庆华. 芝麻种质资源及相关分子生物学研究进展. 植物遗传资源学报, 2016, 17 (3): 517-522
- [2] 王婧,傅漫琪,孙悦,刘斌,王小慧,陈阜. 1985-2015 年中国县域芝麻生产的时空演变. 中国农业大学学报, 2020, 25 (3): 203-213
- [3] 国家统计局. 主要农作物播种面积. [2022-04-05]. [https://data.](https://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=E0103&zb=A0D0P®=410000&sj=2020)

stats. gov. cn/easyquery. html?cn=E0103&zb=A0D0P®=410000&sj=2020

- [4] 张兴平,钱前,张嘉楠,邓兴旺,万建民,徐云碧. 分子植物育种助推南繁种业转型升级. 中国农业科学, 2021, 54 (18): 3789-3804
- [5] 曹文堂,杜有明,曹小娣,杜红琴,曹玉平. 日光温室玉米冬繁加代可行. 玉米科学, 1996, 4 (4): 35-36
- [6] 任秀荣,陈集平,许海涛,王纪伟,王成业,彭玉华. 大豆日光温室冬繁加代探讨. 中国油料作物学, 2001, 23 (2): 73-75
- [7] 卫双玲. 芝麻高产与防灾减灾技术. 郑州: 中原农民出版社, 2016
- [8] 陈宝珠,任春玲,姜玉忠. 夏芝麻高产栽培技术规程. 河南农业, 2008 (7): 11-12
- [9] 卫双玲,高桐梅,张海洋,孙梅英,刘焱,张仙美,郑永战,苗红梅,王永宏,李香芝. 不同时期打顶对不同地点夏芝麻产量、品质及光合特性的影响. 华北农学报, 2010, 25 (4): 170-174

(收稿日期: 2022-04-08)

成马铃薯病毒感染,马铃薯田的病毒感染率超出马铃薯种薯的国家标准要求,致使马铃薯脱毒种薯的质量差^[3],马铃薯单产水平低,且远远低于发达国家的马铃薯单产水平。

荷兰马铃薯种薯的质量高,出口到很多国家,主要是因为荷兰有很好的马铃薯种薯质量检测认证体系。马铃薯种薯质量检测认证是控制马铃薯种薯质量最有效的手段。利用同步检测马铃薯6种病毒的试纸条对马铃薯的各个级别的种薯田进行病毒检测,可以提高马铃薯种薯企业和合作社马铃薯种薯的质量,使各个级别马铃薯种薯的质量达到国家种薯标准,经过认证合格后,准许进入马铃薯种薯市场。为了建立我国完善的马铃薯种薯质量检测认证体系,全国农业技术推广服务中心为探索种子质量认证制度,总结种子认证工作内在规律,完善种子认证程序,从2017年开始进行了种子认证试点示范项目的田间检验,为建立健全种子认证制度提供科学依据。参加种子认证试点示范项目的企业有雪川农业发展股份有限公司、黑龙江龙薯马铃薯种薯繁育有限公司、内蒙古坤元太和农业科技有限公司、黑龙江万田金农业科技发展有限公司、宁夏固原天启薯业有限公司、依安县天润薯业有限公司。参加田间检验的品种有费乌瑞它(原种、一级种)、夏波蒂(原种)、中薯5号(原种、一级种)、兴佳2号(原种、一级种)、尤金(原种、一级种)、雪川1号(原种)、青薯9号(原种)。通过几年来马铃薯种子认证试点示范项目的田间检验,取得了良好的效果,上述企业的种薯均达到国家标准,以此可以带动所有的马铃薯种薯企业进行质量检测认证;每个企业和种薯质量监管部门均可以利用同步检测马铃薯6种病毒试纸条监控马铃薯田6种马铃薯病毒的发生情况,为马铃薯的综合防控和马铃薯种薯级别的定级提供理论基础。我国马铃薯种薯的质量和产量将有大幅度提高。

1 两种马铃薯病毒检测技术原理对比

胶体金是一种常用的标记技术,是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术,有其独特的优点。将特异性的抗原或抗体以条带状固定在膜上,胶体金标记试剂(抗体或单克隆抗体)吸附在结合垫上,当待检样本加到试纸条一端的样本垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解

结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,待检物与金标试剂的结合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。该方法也就是免疫层析法,现已发展成为常用的试纸条检测,使用十分方便。

ELISA方法的基本原理是酶分子与抗体或抗体分子共价结合,此种结合不会改变抗体的免疫学特性,也不影响酶的生物学活性。此种酶标记抗体可与吸附在固相载体上的抗原或抗体发生特异性结合。滴加底物溶液后,底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型,出现颜色反应。因此,可通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应,颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量成正比。此种显色反应可通过ELISA检测仪进行定量测定,这样就将酶化学反应的敏感性和抗原抗体反应的特异性结合起来,使ELISA方法成为一种既特异又敏感的检测方法。

2 两种检测技术检测地点的对比

常规的ELISA方法检测马铃薯病毒只能在实验室进行,对于有检测马铃薯病毒能力的科研单位、大学,需要到马铃薯田把马铃薯叶片采集到实验室即可做马铃薯病毒检测;对于没有马铃薯病毒检测能力的马铃薯种薯企业、合作社、种植大户,需要到马铃薯田采集马铃薯叶片,进行保鲜处理,然后将样品送到或邮到具有马铃薯病毒检测资质的科研单位的实验室等候检测。

快速试纸条检测马铃薯病毒可以在任何有马铃薯的地方,比如田间地头、贮藏窖、马铃薯的发运地点、海关等地进行就地取样、就地检测、就地读取马铃薯病毒检测结果,还可以及时地根据检测结果进行马铃薯病毒的综合防控和马铃薯脱毒种薯的定级。

3 两种检测技术检测仪器和检测人员的对比

利用ELISA方法进行马铃薯病毒检测必须经过精密的高价格仪器才能读取检测结果;而快速试纸条检测马铃薯病毒的结果读取不需要经过仪器,只是通过肉眼就可读取。

ELISA方法检测必须要由专门的技术人员进行,该实验步骤繁琐,需要配制多种检测所需的试

剂,需要调试并应用多台高精密度仪器;而快速检测马铃薯病毒的试纸条的使用者很广泛,任何马铃薯的种植者都能够利用该试纸条进行马铃薯病毒的检测。

4 两种检测技术检测时间和检测费用的对比

ELISA 方法检测因检测步骤繁琐,且每个步骤孵育的时间较长,完成整个检测实验的时间需要 2d;而快速试纸条检测马铃薯病毒只需要 5~10min 就能完成。

ELISA 方法检测,如果是检测马铃薯的 6 种主要的病毒,每份样品需要 150 元;如果马铃薯种薯企业、合作社以及种植大户本身没有检测能力,需要将样品送到具有马铃薯病毒检测资质的单位进行检测,每份样品需要 480 元;如果利用本团队研究的同步检测马铃薯 6 种病毒的试纸条进行马铃薯病毒的检测,每份样品只需要 70 元。由此看来,利用快速检测试纸条检测马铃薯病毒的费用是最低的。

5 两种检测技术灵敏度的对比

ELISA 方法检测的灵敏度是 10ng/mL,快速试纸条检测马铃薯病毒的灵敏度是 1ng/mL;由此看来,快速试纸条的检测灵敏度高于常规的 ELISA 方法检测的灵敏度。

6 两种检测技术检测结果读取方法的对比

常规的 ELISA 方法检测不能现场取样出检测结果,快速试纸条检测马铃薯病毒可以现场取样、现场出检测结果。常规的检测技术中 6 种马铃薯病毒需要 6 个聚苯乙烯反应板才能够完成检测;快速检测试纸条马铃薯 6 种病毒的检测仅需要 1 个试纸条就能够检测;常规的检测技术需要依靠仪器读取马铃薯病毒检测的结果,快速检测试纸条只靠肉眼就能读取检测结果。

7 快速检测试纸条的结构与特点

试纸条包括样品垫、金标垫、NC 膜、检测线 T 线、质控线 C 线、吸水垫、PVC 底板。(1)将 NC 膜粘贴在 PVC 底板上;(2)将金标垫搭接在 NC 膜一端的上方,搭接长度为 1~2mm;(3)将吸水垫搭接在 NC 膜另一端的上方,搭接长度为 2~3mm;(4)将样品垫搭接在金标垫的上方,搭接长度为 2~3mm;(5)在斩切机中将粘贴好的 PVC 底板剪切成条;(6)剪切成条后装壳并和干燥剂一并装入铝箔袋,密封

后贴上标签。

特点:(1)方便、适用性广。试纸条检测马铃薯病毒无需专门的技术人员在实验室完成,只需马铃薯种植者在马铃薯田间即可监测病毒的发生情况;为马铃薯病毒的综合防控、马铃薯种薯定级提供技术支持。(2)快速。一个试纸条可在 5~10min 时间内肉眼诊断出马铃薯是否感染病毒。(3)灵敏度、准确性高,特异性、稳定性强,检测成本低。

8 讨论

利用快速检测试纸条对雪川农业发展股份有限公司、黑龙江龙薯马铃薯种薯繁育有限公司、内蒙古坤元太和农业科技有限公司、黑龙江万田金农业科技发展有限公司、宁夏固原天启薯业有限公司、依安县天润薯业有限公司 6 个企业的马铃薯品种进行了病毒检测,马铃薯 Y 病毒和马铃薯 S 病毒的检出率最高,均是 9%。因为马铃薯 Y 病毒的传播方式除了靠汁液摩擦传播外,还主要依靠马铃薯蚜虫传播;马铃薯 S 病毒是 6 种马铃薯主要病毒中最难脱出的病毒;但是每个企业的马铃薯病毒的发生率均在马铃薯种薯国家标准的允许范围内,均符合国家标准。

同步快速检测马铃薯 6 种病毒的试纸条使马铃薯病毒的检测技术从实验室走向田间地头,检测人员由专门的技术人员变为任何马铃薯种薯种植者。每个马铃薯种植企业和合作社均会使用该试纸条监控和检测马铃薯种薯田马铃薯病毒的发生情况,为马铃薯种薯级别的定级和马铃薯病毒的综合防控提供依据。每个企业可以利用试纸条了解马铃薯病毒的发生情况,及时采取防控措施,确保马铃薯种薯的质量。同步快速检测马铃薯 6 种病毒的试纸条在保证马铃薯种薯健康中起到关键作用。

参考文献

- [1] 赵建宗,申建平.我国马铃薯种薯质量监督控制体系现状、问题与建议.种子,2017,36(12):92-94
- [2] 邱彩玲,申宇,高艳玲,范国权,张抒,张威,马纪,王绍鹏,张静华,胡林双,吕典秋.中国马铃薯种薯生产及质量控制.中国马铃薯,2019,33(4):249-254
- [3] 雷尊国,邓禄军,王启富,李飞.中美两国马铃薯种薯质量控制对比分析.中国马铃薯,2020,33(4):230-233

(收稿日期:2022-04-02)