

双重检测马铃薯 X 和 Y 病毒试纸条制备技术研究

张微 李志新 赵雪 张金鹏 付春江 于倩倩 刘卫平

(黑龙江省农业科学院克山分院, 161600, 黑龙江齐齐哈尔)

摘要 为了实现在马铃薯种薯生产田现场同时快速检测马铃薯 X (PVX) 和 Y 病毒 (PVY), 利用胶体金标记和免疫层析技术研制了 PVX-PVY 双重检测试纸条。采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 在波长 526nm 处有最大吸收值, 金颗粒直径约 25nm。同时标记 PVX 和 PVY 兔多克隆抗体, 将抗体标记物喷射于玻璃纤维纸上, 作为金标垫。将 PVX 和 PVY 抗体分别划线于硝酸纤维素膜上作为检测线, 将羊抗兔抗体划线于硝酸纤维素膜上作为质控线, 制备胶体金试纸条。结果表明, 研制的双重试纸条能够在 2min 之内同时检出 PVX 和 PVY。PVX 病汁液检测稀释限度可达 10^6 倍 (W/V), PVY 可达 10^5 倍 (W/V), 其中对 PVX 检测更灵敏。用其他 4 种常见病毒 (PVS、PLRV、PVA 和 PVM) 检测, 未出现交叉反应。在田间采集马铃薯叶片, 分别利用试纸条与 DAS-ELISA 检测, 结果一致性非常高。由此可知, 该试纸条具有操作简便、反应快捷的特点, 特别适用于田间及口岸一线对于马铃薯 X 和 Y 病毒的同时检测。

关键词 马铃薯 X 病毒; 马铃薯 Y 病毒; 双重检测试纸条

马铃薯 X 病毒 (potato virus X, PVX) 是马铃薯最常见的病毒之一, 其感染症状是叶片变小, 花叶、叶片上有大小不等的黄绿色斑驳等, 可使马铃薯产量降低 10%~50%。马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 是危害马铃薯、烟草等茄科植物的主要病毒之一, 其感染症状是重花叶、叶脉坏死和出现褐斑等, 可导致马铃薯减产 20%~50%。在田间, PVX 与 PVY 常复合侵染, 造成马铃薯严重减产, 甚至绝产。我国马铃薯生产受病毒病危害非常严重, 在各主要产区如黑龙江、河南等地多为复合侵染^[1-3]。目前, 马铃薯感染病毒后主要通过电子显微镜、DAS-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和 PCR 等方法^[4-6]进行检测, 但此类方法在生产上的应用具有很大局限性^[7]。胶体金免疫层析技术 (gold immunochromatography assay, GICA) 是将胶体金标记、免疫检测、层析分析、单(多)克隆抗体和新材料等结合在一起的技术, 具有操作简便、快速、结果准确、无需特殊设备等优点^[8], 在医学、动植物检疫、食品安全监督等领域得到广泛应用^[9-12]。在马铃薯上已研制出 PVX 和 PVY 单重胶体金检测试纸条^[13]。目前, 多重马铃薯病毒的检测多使用分子生物学方法^[14], 而关于多重马铃薯病毒胶体金检测试纸条的研究尚未见报道。为此, 本试验研制定性检测 PVX 和 PVY 的双重胶

体金试纸条, 为马铃薯病毒病的田间检测提供一种快速的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PVX 和 PVY 为本研究室从马铃薯上分离得到。病毒分别摩擦接种繁殖于心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上。马铃薯 S 病毒 (PVS)、卷叶病毒 (PLRV)、M 病毒 (PVM) 和 A 病毒 (PVA) 为本研究室保存。供试马铃薯品种为克新 13 号。

1.2 试剂和仪器

PVX 和 PVY 兔多克隆抗体购买于美国 Agida 公司, 羊抗兔抗体购自北京百奥莱博科技有限公司, 氯金酸购自天津市光复精细化工研究所, 柠檬酸三钠和牛血清白蛋白购自上海惠世有限公司, 硝酸纤维素膜、玻璃纤维膜、样品垫、吸水纸、支持板、三维大平面点膜喷金仪、裁条机和微电脑自动斩切机均购自上海金标生物科技有限公司。DAS-ELISA 检测试剂盒购买于美国 Agida 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 胶体金的制备和鉴定

采用常规的氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备胶体金。取 297mL ddH₂O 于圆底烧瓶中, 加入 3mL 1% HAuCl₄·4H₂O 混匀。将圆底烧瓶置于电热套式

作者简介: 张微, 主要从事马铃薯病毒检测技术与马铃薯病害防控研究, E-mail: zw13936823026@126.com

基金项目: 黑龙江省现代农业马铃薯产业技术协同创新体系项目 (HNWJZTX201701)

收稿日期: 2020-12-03; 修回日期: 2021-10-18; 网络出版日期: 2021-11-08

恒温器中,加入干净搅拌子,低速搅拌加热至沸腾,迅速一次性加入 3mL 1%柠檬酸三钠,继续煮沸,观察颜色变化为浅黄色→黑色→紫色→紫红色,当完全转变成红色时,继续煮沸 5min 后停止加热,补水至原体积。将烧制的胶体金溶液用蛋白核酸分析仪(Gene Spec V, 日本日立)进行全波长扫描鉴定,并置于透射电镜(H7650, 日本日立)下观察拍照^[15]。

1.4 免疫胶体金试纸条制备工艺优化

主要对金标抗体的标记量、反应 pH、封闭时间、离心时间、复溶液和复溶量等进行优化。取 8 支干净的 1.5mL 离心管,分别加入 1mL 胶体金,然后分别加入 4 μ L 1mg/mL PVX 与 PVY 抗体,再分别加入 1、2、3、4、5、6、7、8 μ L 的 0.2mol/L K₂CO₃ 调节 pH,混匀后室温静置反应 30min,观察颜色变化。根据颜色结果确定免疫胶体金的最适 pH。另取 8 支干净的 1.5mL 离心管,分别加入 1mL 胶体金,然后分别加入已确定的最适 pH 对应的 0.2mol/L K₂CO₃ 的加入量,再分别加入 1、2、3、4、5、6、7 和 8 μ L 的 1mg/mL PVX 与 PVY 抗体,来调节抗体标记量,混匀后室温静置反应 30min,观察沉淀变化。根据沉淀结果确定免疫胶体金的最适抗体标记量。标记了胶体金后的抗体加入 10% BSA,分别设置封闭时间 10、20、30、40、50 和 60min,观察加入封闭剂后颜色变化,根据颜色变化选择颜色恢复成胶体金颜色 1 时为最佳封闭时间,设置离心时间 10、20、30、40、50 和 60min,留沉淀弃上清,选择沉淀量最多、沉淀效果最好的为最佳离心条件。分别用复溶液 50、60、70、80、90、100、110 和 120 μ L 复溶沉淀至合适的比例,用喷金仪器设置喷金量 3、4、5、6、7、8 和 9 μ L/cm,选择反应颜色容易观察的喷金量为最佳,喷在玻璃纤维纸上,制作金标垫。

1.5 检测线和质控线

将 PVX 与 PVY 抗体分别用超滤管(Millipore, 10kD)进行浓缩。将硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane, NC 膜)固定贴合于支持板上,使用三维平面点膜喷金仪分别将 PVX 抗体和 PVY 抗体浓度设置为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1 和 1.2mg/mL,并划线于 NC 膜上,作为检测线(testline, T 线),T1 线为 PVX 检测线,T2 线为 PVY 检测线。用 0.02mol/L 磷酸缓冲液(phosphate buffer,

PB, pH 7.4)将羊抗兔抗体稀释至 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1 和 1.2mg/mL,划线于 NC 膜上,作为质控线(control line, C 线),37 $^{\circ}$ C 烘干 4h。选择反应条带颜色可观察到的最低抗体使用量为最佳。

1.6 试纸条的组装

将样品垫、金标垫和吸水纸组装到附有 NC 膜的支持板上,然后用切条机切割成 3.5mm 宽的试纸条。

1.7 试纸条的质量检测

1.7.1 特异性检测 分别将 PLRV 与 PVS、PVA 与 PVM、PVM 与 PVS、PVX 与 PVA、PVY 与 PVA、PVX 与 PVY 病毒的阳性材料用 2mL 的磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液)混匀,制成样品检测液,将制备好的试纸条置于样品中检测,每 2 种病毒混合液重复检测 3 次。

1.7.2 灵敏度检测 取 PVX 和 PVY 阳性混合样品进行倍比稀释获得 1、10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 和 10⁷ 倍的样品稀释液,分别用试纸条进行灵敏度检测。

1.7.3 准确性检测 分别取马铃薯待检样品 93 份,分别采用胶体金试纸条与 DAS-ELISA 进行检测,将结果进行对比分析。

1.7.4 稳定性测试 将试纸条放在装有干燥剂的铝箔袋中,分别密封保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中、室温下和敞开保存在室温下;设置不同保存时间,利用阴性样品、只含有 PVX、只含有 PVY 和同时含有 PVX 和 PVY 的阳性材料定期检测试纸条的有效性。

2 结果与分析

2.1 胶体金颗粒观测

制备好的胶体金在波长 526nm 处有最大吸收峰(图 1),金颗粒为圆形,直径 20~30nm(图 2),表明胶体金质量较好,符合免疫层析试验要求。

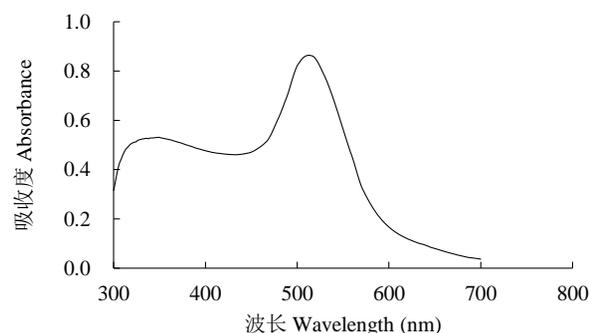


图 1 胶体金吸收光谱

Fig.1 Colloidal gold absorption spectrum

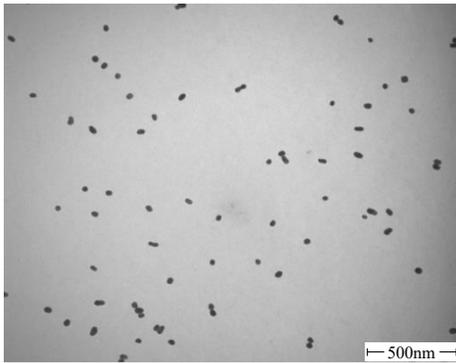


图2 透射电镜下胶体金颗粒形态 (Bar=500nm)
Fig.2 Colloidal gold particle morphology under transmission electron microscope (Bar=500nm)

2.2 胶体金试纸条制备条件优化

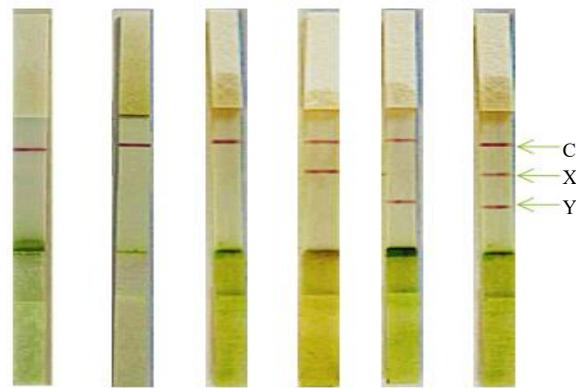
制备金标抗体的最佳反应条件为加入 2 μ L 0.2mol/L K₂CO₃ 调节 pH, PVX 抗体加入量为 4 μ L, PVY 抗体加入量为 5 μ L, 封闭时间 40min, 离心时间 30min, 100 μ L 复溶液复溶沉淀。胶体金喷涂量为 6 μ L/cm, T1 线的 PVX 抗体浓度为 1mg/mL, T2 线的 PVY 抗体浓度为 1.2mg/mL, C 线的羊抗兔抗体浓度为 1mg/mL, 检测线 T1、T2 与 C 线划膜量均为 1 μ L/cm。

2.3 试纸条特异性检测

由图 3 可知, 将试纸条分别插入 PVX 阳性样品与 PVY 阳性样品中, 相应病毒的检测线及质控线出现明显条带; 2 种病毒阳性样品混合后, 将试纸条插入混样后, 2 条检测线和质控线均出现明显条带; 将试纸条分别插入 PLRV、PVS、PVM、PVA 的阳性样品中, 仅质控线出现条带, 说明本试纸条具有非常好的特异性。

2.4 试纸条灵敏度检测

分别将试纸条插入稀释 1、10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 和 10⁷ 倍的 PVX 和 PVY 阳性样品中检测其灵敏度。结果 (图 4) 发现, 试纸条可检测稀释至 10⁶ 倍的 PVX 汁液和 10⁵ 倍 PVY 汁液。



PLRV/PVS PVA/PVM PVS/PVM PVX/PVA PVY/PVA PVX/PVY
C: 质控线, X: PVX 检测线, Y: PVY 检测线, 下同
C: control line, X: PVX test line, Y: PVY test line, the same below

图 3 试纸条对 6 种常见病毒的特异性检测

Fig.3 Specific detection of six common viruses by strips

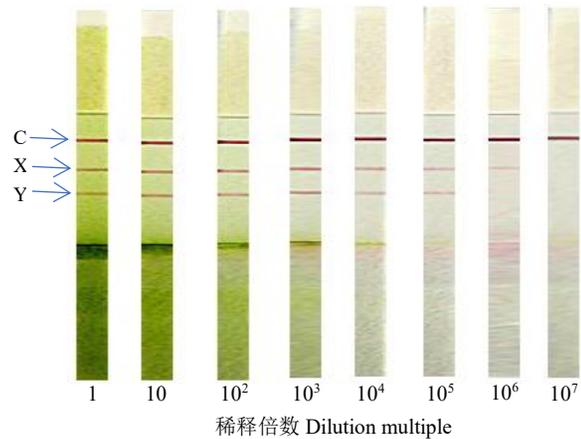


图 4 试纸条检测 PVX 和 PVY 汁液

Fig.4 Test strips detect PVX and PVY sap

2.5 试纸条与 DAS-ELISA 检测马铃薯苗带毒情况一致性分析

由表 1 可知, 双重病毒试纸条检出 PVX 阳性样品 12 份, PVY 阳性样品 26 份, 其中 PVX 和 PVY 同时侵染样品 8 份, 而 DAS-ELISA 检出 PVX 阳性样品 14 份, PVY 阳性样品 29 份, 其中 PVX 和 PVY 同时侵染样品 9 份。

表 1 2 种方法检测结果
Table 1 The results of two methods

检测方法 Test method	样本数 Sample number	PVX			PVY		
		阳性 Positive	阴性 Negative	阳性率 Positive rate (%)	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性率 Positive rate (%)
双重病毒检测试纸条 Double virus test strip	93	12	81	12.90	26	67	27.96
DAS-ELISA	93	14	79	15.05	29	64	31.18

如表 2 所示, 比对双重病毒检测试纸条和 DAS-ELISA 检测样品结果, 得出 2 种方法对 PVX 的检

测符合率为 97.85%, Kappa 值为 0.91, 判定 2 种方法符合率非常高; 比对双重病毒检测试纸条和

DAS-ELISA 检测样品结果，得出 2 种方法对 PVY 的检测符合率为 96.77%，Kappa 值为 0.92，可见 2

表 2 双重病毒检测试纸条与 DAS-ELISA 检测 PVX 和 PVY 的符合性对比

Table 2 Comparison of the compatibility between the double virus test strip and DAS-ELISA test for PVX and PVY

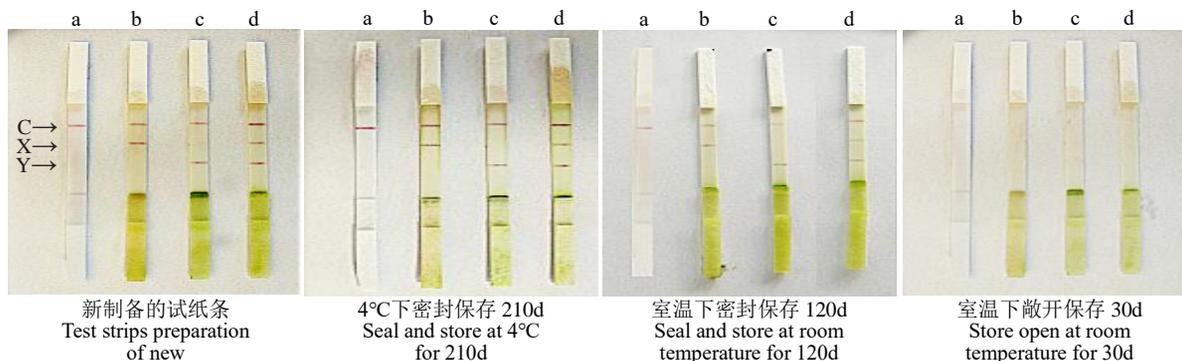
病毒 Virus	方法 Method		DAS-ELISA		合计 Total	符合率 Coincidence rate (%)	Kappa 值 Kappa value
			+	-			
PVX	双重病毒检测试纸条 Double virus test strip	+	12	0	12	97.85	0.91
		-	2	79	81		
		合计 Total	14	79	93		
PVY	双重病毒检测试纸条 Double virus test strip	+	26	0	26	96.77	0.92
		-	3	64	67		
		合计 Total	29	64	93		

种方法对 PVY 检测符合率非常高。

2.6 试纸条稳定性检测

如图 5 所示，将试纸条放在装有干燥剂的铝箔袋中密封，放在 4℃冰箱中保存，有效期可达 210d，

能够保持原有灵敏度；试纸条密封后室温保存，有效期大于 120d，检测灵敏度有所下降；试纸条在室温下敞开保存，30d 就失去了检测能力。说明在适当条件下保存，本试纸条具有较好的稳定性。



a: 阴性样品, b: PVX 阳性样品, c: PVY 阳性样品, d: PVX 和 PVY 阳性样品
a: negative sample, b: PVX positive sample, c: PVY positive sample, d: PVX and PVY positive sample

图 5 试纸条稳定性测试结果
Fig.5 Stability test results of strip

3 讨论

有研究^[1,16]表明，2 种及以上不相关的病毒复合侵染同一寄主是病毒侵染过程中的常见现象。由于复合侵染时 2 种病毒的相互作用，包括协生（增加病毒含量）或拮抗（减少病毒含量），会导致寄主产生的症状与单独侵染不同。PVX 复合侵染比单独侵染时复制能力增强，病毒含量大幅提高，并造成症状加重，因此对复合侵染病毒的检测方法尤其重要。已有研究^[14,17]表明，通过电镜手段和 PCR 技术可以对 PVX 和 PVY 复合侵染进行检测。对多种在烟草花叶病毒（tobacco mosaic virus, TMV）、黄瓜花叶病毒（cucumber mosaic virus, CMV）和 PVY 上病毒检测试纸条已有研究^[18]，对 3 种病毒的特异性、灵敏度和一致性进行了研究分析，但是试纸条的检测时间与稳定性没有提及。对于 PVX 和 PVY 双重病毒试纸条研究目前没有相关报道。PVX 和

PVY 是最常见、同时也是对马铃薯危害最严重的 2 种病毒，常规的检测方法只能在实验室由专业技术人员操作完成，给需要随时检测马铃薯病毒发生情况的田间及试验条件差的基层单位造成不便。而试纸条检测具有使用方便、反应快捷的特点。经过田间取样测试，本试纸条与 DAS-ELISA 检测结果吻合性非常高，双重病毒试纸条的阳性检出率稍低于 DAS-ELISA，可能是由于试纸条检测灵敏度低于 DAS-ELISA，但也不排除 DAS-ELISA 出现假阳性的可能^[19-20]。已有研究^[15]表明，单一检测 PVX 和 PVY 的试纸条检测样品的反应时间在 10min 之内；马铃薯 X 病毒试纸条检测烟草病汁液可稀释 10⁴ 倍（W/V），马铃薯 Y 病毒试纸条检测烟草病汁液可稀释 10³ 倍；低温保存时间大于 90d，室温保存时间大于 30d。本试纸条检测反应快捷，约 2min 就能得出结果，节约了检测时间。相对于单一检测 PVX 和 PVY 试纸条，节约了部分成本。对 PVX 试纸条

检测病毒汁液可稀释 10^6 倍 (W/V); PVY 试纸条检测病汁液可稀释 10^5 倍, 提高了检测灵敏度。低温 4°C 保存时间超过 210d, 室温密封保存时间可达 120d, 稳定性显著提高。双重病毒试纸条的检测效果基本能够满足田间及口岸一线的检测需求。

4 结论

PVX 和 PVY 双重病毒试纸条具有使用方便、操作简单的优点, 无需实验室及专业技术人员, 随时随地均可以操作使用, 而且反应快捷, 几分钟出结果, 可以实现现场取样现场出结果, 实用性强, 适用性广。特别适用于马铃薯田间和试验基础条件差的单位使用。实现了一个试纸条对 PVX 和 PVY 同时快速检测, 不仅提高了检测效率, 且节约了部分成本, 可进一步推广应用。

参考文献

- [1] 郭兴启, 冯忻, 李向东, 等. PVY/PVX 协生作用对病毒浓度及寄主细胞超微结构的影响. 中国农业科学, 2003(3): 281-286, 355-356.
- [2] 吴兴泉, 张慧聪, 时妍, 等. 我国部分马铃薯产区主要病毒病发生情况调查. 河南农业科学, 2013, 42(7): 84-87.
- [3] 范国权, 白艳菊, 高艳玲, 等. 我国马铃薯主产区病毒病发生情况调查. 黑龙江农业科学, 2014(3): 68-72, 87.
- [4] 周淑芹, 朱光新. 电子显微镜技术在鉴定筛选马铃薯无毒核心材料中的应用. 黑龙江农业科学, 1996(6): 17-20.
- [5] 郑世玲, 刘作易. 贵州 3 种马铃薯病毒的 DAS-ELISA 检测与分析. 贵州农业科学, 2006(6): 42-44.
- [6] 罗文彬, 李华伟, 汤浩, 等. 马铃薯 5 种病毒多重 PCR 检测技术的建立及应用. 园艺学报, 2015, 42(2): 280-288.
- [7] 张京宜, 曹秀芬, 宋涛, 等. 植物病毒检测技术研究进展分析. 北京农业, 2011(30): 79-80.
- [8] Suwussa B, Chayachon A, Warangkana C, et al. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay for influenza antigen using fluorescently-doped silica nanoparticles. *Microchimica Acta*, 2014, 181(1/2): 223-230.
- [9] Li L Y, Jian Z D, Li Y W, et al. Development of a rapid dipstick with latex immunochromatographic assay (DLIA) for diagnosis of schistosomiasis japonica. *Parasites and Vectors*, 2011, 4: 157.
- [10] 纪玲玲, 成巨龙, 朱信宁, 等. 烟草脉带花叶病毒试纸条的制作及田间病株的快速检测. 西北农业学报, 2009, 18(1): 180-183.
- [11] 赵肖, 白昀, 陈蓉, 等. 猪肺炎支原体抗体胶体金免疫层析检测方法的建立. 中国兽医学报, 2018, 38(9): 1693-1698.
- [12] 冯忠华, 李跃龙, 陈运勤, 等. 胶体金免疫层析技术及其在食品安全快速检测中的应用. 广东饲料, 2017, 26(12): 39-40.
- [13] 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. 植物保护, 2006(6): 139-141.
- [14] 陈阳婷, 桑有顺, 冯焱, 等. 双重 RT-PCR 法快速检测多种马铃薯病毒的研究. 西南农业学报, 2012, 25(1): 179-182.
- [15] 张微, 李志新, 付春江, 等. 马铃薯 S 病毒胶体金免疫层析试纸条的研制. 生物技术通报, 2019, 35(12): 184-188.
- [16] Kay S. Maize chlorotic mottle machlomovirus and wheat streak mosaic rymovirus concentrations increase in the synergistic disease com lethal necrosis. *Virology*, 1998, 242(1): 28-38.
- [17] 宋西娇, 谢礼, 宣裕吉, 等. 复合侵染的马铃薯花叶病原诊断. 浙江农业学报, 2018, 30(1): 99-105.
- [18] 阮小蕾, 邓海滨, 王晓宾, 等. 多重烟草病毒胶体金检测试纸条的研制及应用. 烟草科技, 2018, 51(10): 33-38.
- [19] 董雅琴, 刘爽, 郑辉, 等. 三种伪狂犬病病毒 gE 抗体 ELISA 检测试剂盒的比较. 中国动物检疫, 2017, 34(11): 79-81, 88.
- [20] 陈祺, 黄辉, 唐长玖, 等. 两种不同凝血功能检测方法的相关性和一致性研究. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(6): 1820-1824.

Development of a Double Test Strip for the Detection of Potato Virus X and Y

Zhang Wei, Li Zhixin, Zhao Xue, Zhang Jinpeng, Fu Chunjiang, Yu Qianqian, Liu Weiping

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161600, Heilongjiang, China)

Abstract In order to detect potato virus X (PVX) and Y (PVY) rapidly in potato seed production field, a PVX-PVY test strip was developed by colloidal gold labeling and immunochromatography. Colloidal gold solution was prepared by trisodium citrate reduction method with the maximum absorption value at the wavelength of 526nm and the diameter of gold particles was about 25nm. In the strip test, colloidal gold-labeled polyclonal rabbit antibody against PVX and PVY were sprayed on the glass fiber as the detection antibody, and goat anti-rabbit IgG at the control line and anti-PVX/ anti-PVY at the test line on the nitrocellulose membrane of the test strip were served as the capture antibody. The results showed that the two kinds of viruses could be simultaneously detected within 2min. The detection was still feasible when the PVX sample was diluted by 10^6 (W/V), the PVY sample was diluted by 10^5 (W/V), which was more sensitive to PVX detection. The test strip showed no cross effect when tested by other common four viruses (PVS, PLRV, PVA, and PVM) samples. DAS-ELISA was used to detect the consistency of potato leaves collected in the field. The strip has the characteristics of simple operation and quick reaction, especially suitable for field and port inspection.

Key words Potato virus X; Potato virus Y; Double test strip