

圆点印迹法检测葡萄斑点病毒技术研究

刘永清¹, 王国平²

(1. 湖北民族学院生命科学院, 恩施 445000;

2. 华中农业大学 湖北武汉 430070)

长期以来, 人们一直认为斑点病是葡萄扇叶病的一种, Vuittenez 等(1966 年)首先发现了该病的病原, 就该病毒的为害状、寄主范围、理化特性进行了研究, 并命名 Grapevine marbrure virus^[1]。1991 年 Boscia 等鉴定了葡萄斑点病的病原为葡萄斑点病毒(Grapevine fleck virus, GFkV)^[2]。该病毒分布广泛, 遍及世界各地, 其为害主要是使叶片皱缩、卷曲, 甚至可以诱发葡萄产生不同程度的矮化, 果实糖度下降^{3~5}, 风味极差, 新梢及果穗发育不良, 扦插苗生根发芽困难^[3]。本研究采用圆点印迹法对 GFkV 检测, 旨在探讨一种经济、简便、可靠的检测方法。

1 材料

葡萄斑点病毒多克隆抗体由意大利地中海作物病毒及类病毒研究所 Martelli 教授提供。碱性磷酸酯酶标记羊抗兔 IgG 及底物(NBT/BCIP)均购自 Promega。PVDF 膜购自 Amersham。

待检样品来源于湖北省农科院果茶所采集的葡萄胜宝的休眠枝条和叶片, 以葡萄病毒指示植物 LN33(由中国农科院辽宁兴城果树所提供)作为阴性对照。反应溶液主要涉及 Tris-Hcl 和 PBS 病毒提取液, 5% 的脱脂牛奶封闭液, 0.2% 的 PBS(pH7.4), 氯化氮蓝四唑(NBT)/5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)底物缓冲液: Tris 1.21 g(克)、NaCl 0.585 g(克)、MgCl₂0.112 g(克), 用 2 mol/L HCl 调节 pH 值至 9.5, 加蒸馏水定容至 100 ml(毫升)。

2 方法

2.1 取 0.5 g(克)葡萄韧皮部和叶组织, 分别在 1 ml(毫升)0.1 M PBS 提取缓冲液和 0.5 M 的 Tris-HCl 提取缓冲液中充分研磨, 然后在 5 000 mg/kg(毫克/公斤)的条件下离心 20 min(分钟), 收集上清液。

2.2 将 PVDF 膜剪成一定大小, 并作好标记, 用 100% 的甲醇浸湿膜 10 sec 钟, 然后用蒸馏水洗 5 min(分钟), 用 0.01 M 的 PBS 漂洗膜 5 min(分钟)。将膜放到经 0.01 MPBS 预浸润过的滤纸上, 自然晾干, 准备印迹。

2.3 吸取 2 μl 病毒提取液, 依次加到经上述处理过的 PVDF

膜上, 设 3 次重复, 自然晾干, 用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 缓冲液封闭 1 h(小时)。为了封闭均一充分, 整个封闭过程自始至终, 均需要在脱色摇床上震荡。

2.4 用 PBST 按 GFkV 多克隆抗体的效价(1:1 000)稀释, 并将上述封闭后的膜浸入其中, 震荡孵育 1 h(小时), 然后用 PBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 5 min(分钟)。

2.5 将 PVDF 膜放入碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 溶液中, 室温震荡孵育 1 h(小时), 洗涤方法同前。

2.6 取 33 μl 贮存液浓度为 100 mg/ml(毫克/毫升)的 NBT 和 35 μl 贮存液浓度为 50 mg/ml(毫克/毫升)的 BCIP, 加入 10 ml(毫升) NBT/BCIP 缓冲液, 使其终浓度分别达到 0.33 mg/ml 和 0.175 mg/ml(毫克/毫升), 室温下反应 5 min~20 min(分钟)。

2.7 用蒸馏水冲洗终止反应, 将 PVDF 膜放在滤纸上自然晾干, 肉眼或低倍放大镜上观察。

3 结果

以带 GFkV 的胜宝和无病毒沙地葡萄的韧皮部和叶片为材料, 分别用 0.1 MPBS 和 0.5 M 的 Tris-HCl 两种植物病毒提取液, 按 1:2 的比例研磨, 经离心后, 2 μl 点样, 每样品重复 3 次。检测结果表明: 两种病毒提取液在提取 GFkV 时效果相同, 经圆点印迹法检测, 已知的带毒材料均显示很深的紫色, 而健康的阴性材料 LN33 却呈现褐色或淡红色。选用同一植株的不同部位作为检测材料, 结果表明: 从韧皮部中粗提的病毒呈现出较深的紫色, 而从叶片中粗提的病毒却呈现较浅的紫色, 表明 GFkV 在同一植株的韧皮部中含量相对较高(见图)。



圆点印迹检测葡萄斑点病毒的结果图

注: 1、2、3、4 分别来源于胜宝的韧皮部和叶片; 5、6、7、8 分别来源于沙地葡萄的韧皮部和叶片; 1、3、5、7 为 PBS 提取液; 2、4、6、8 为 Tris-Hcl 提取液。

4 讨论

圆点印迹法所需样品量少, 每个样点仅 2 μl, 尤其那些不足以 ELISA 检测的珍贵少量样品能够采用此法进行检测。该法点样量少, 所需抗体数量也明显少于 ELISA, 而且只要抗体保存得当, 可以多次使用, 同样数量的抗体可以检测更多的样品, 比较适合于大量样品的快速检测, 而且检测成本低。该方法不需要额外的仪器, 检测结果直观, 待检样品也能存放数月之久, 但仍存在着操作步骤稍显繁琐, 不能定量缺点。

收稿日期: 2004-08-05

基中某种元素消耗过快或缺乏所致, 具体原因有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 刘志民, 王有年, 张鹏. 梨树三高栽培技术[M]. 中国农业出版社, 1996.
- [2] 傅玉瑚, 中连长. 梨高效优质生产新技术[M]. 中国农业出版社, 1997.
- [3] 龙兴柱. 现代中国果树栽培(落叶果树卷)[M]. 中国林业出版社, 1998.

- [4] 孟庆田, 赵惠祥等. 紧凑型矮化梨组织培养获得完整试管苗[J]. 天津农林科技, 1994(1): 3~5.
- [5] 陈荃, 高彦明, 赵占军. 诱导梨矮化砧木 OH×F₅ 试管苗生根的正交试验[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2001, 2: 71~75.
- [6] 刘利民, 蒲莉莉. 植物生长调节剂对梨矮化砧木 M₅₁ 离体芽生长的影响[J]. 天水师专学报, 1999(1): 65~66.
- [7] 王乔春. 培养种类对梨试管苗茎增殖的影响[J]. 四川农业大学学报, 1993, 11(1): 77~81.
- [8] 王乔春. 植物生长调节剂对梨试管苗培育及移栽的影响[J]. 果树科学, 1995, 12(1): 15~20.