核农学报 2013, (4) 473-478 DOI: ISSN: 1000-8551 CN: 11-2265/S

农产品辐照研究·食品科学

番茄黄化曲叶病毒双抗体夹心ELISA检测方法的初步建立

乔宁[1], 李美芹[1], 吕金浮[1], 刘永光[1], 王兴翠[1], 竺晓平[2]

1. 潍坊科技学院蔬菜花卉研究所, 山东 寿光 262700;
2. 山东农业大学植保学院, 山东 泰安 271018

摘要:

以纯化的番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)外壳蛋白为抗原,免疫家兔制备并纯化出TYLCV的多克隆抗体IgG,以此抗体做包被抗体,并用碱性磷酸酶(AP)对其进行标记作为酶标抗体,从而建立了番茄黄化曲叶病毒的双抗体夹心ELISA(DAS-ELISA)检测方法。通过ELISA方阵试验确定该法的最佳工作浓度为酶标抗体(IgG-AP)作1:400倍稀释,包被抗体浓度为6.25μg·mL^{-1};并且确定了抗原最低检出浓度为9.75ng·mL^{-1}。采用该法对山东寿光的田间病样进行了定性和定量检测,结果表明建立的DAS-ELISA 方法灵敏度高、特异性强,可用于番茄黄化曲叶病毒的常规检测。

关键词: 番茄黄化曲叶病毒 DAS-ELISA 快速检测

Establishment of Double Antibody Sandwich ELISA for Tomato Yellow Leaf Curl Virus

QIAO Ning[1], LI Mei-qin[1], LÜ Jin-fu[1], LIU Yong-guang[1], WANG Xing-cui[1], ZHU Xiao-ping[2]

1. Institute of Vegetables and Flowers, Weifang University of Science and Technology, Shouguang, Shandong 262700;
2. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018

Abstract:

The rabbit IgG of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) antiserum was purified and conjugated with alkaline phosphatase (AP) by glutaraldehyde one-step method. The DAS-ELISA method for TYLCV detection was established. The optimal dilution of IgG-AP was 1:400 and the optimal concentration of coated antibody was 6.25μg·mL^{-1}, which was determined by phalanx titrimetry, at the same time the curve indicated that the lowest detection limit was 9.75ng·mL^{-1}. Field samples collected from Shouguang of Shandong Province were detected qualitatively and quantitatively by DAS-ELISA. All of these results showed that DAS -ELISA method was sensitive and specific, which could be easily applied in the field.

Keywords: Tomato yellow leaf curl virus DAS-ELISA Rapid detection

收稿日期 2012-09-26 修回日期 2013-01-28 网络版发布日期

DOI:

基金项目:

山东省科技发展计划项目(2010GNC10915);国家公益性行业科研专项(201003065);山东省高等学校科技计划项目(J10LC73);大宗蔬菜产业技术体系(CARS-25)

通讯作者: 李美芹(1968-),女,山东潍坊人,博士,副教授,主要从事生物学研究。E-mail:mqli901@126.com

作者简介:
作者Email: mqli901@126.com

参考文献：

[1] Broadbent L. Epidemiology and control of tomato mosaic virus[J]. Annual Review Phytopathology,1976,14:75-96
[2] 龚一帆.威胁番茄生产的新病害—番茄黄化曲叶病毒病[J].中国蔬菜.2009,(21): 1-4
[3] 纪文磊,李文丽,王 富.山东寿光地区番茄黄化曲叶病毒株系的分子鉴定[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2010,27(3):216-219
[4] 乔 宁, 李美芹, 郭宝太, 刘永光, 裴华丽, 竺晓平.山东寿光地区番茄黄化曲叶病毒外壳蛋白基因克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中国蔬菜,2012,(6):35-40
[5] 余文贵, 赵统敏, 杨玛丽. 山东、安徽两省栽培番茄烟粉虱传双生病毒的PCR 检测及序列分析[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(4): 747- 751
[6] 何自福, 虞 皓, 罗方芳. 番茄烟粉虱传双生病毒PCR 检测[J]. 中国病毒学,2004,19 (1):67-69
[7] 谢 艳,张仲凯,李正和,丁 铭,周雪平. 粉虱传双生病毒的TAS-ELISA及PCR快速检测[J]. 植物病理学报,2002,32 (2):182-186
[8] Rojas M R,Gilbert son R L,Russel D R. Use of degenerate primers in t he polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted geminiviruses[J]. Plant Disease, 1993, 77:340-347
[9] Wyatt S D, Brown J K. Detection of subgroup Ⅲ gemini virus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction [J]. Phytopathology, 1996, 86 (12): l288-1293
[10] 方福德,周 吕,丁 濂,现代医学实验技巧全书(下册)[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995
[11] 沈关心.周汝麟. 现代免疫学实验技术[M].武汉:湖北科学技术出版社, 1998: 5-12
[12] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 北京:科学出版社, 1990:178-179
[13] 李广存, 王秀丽, 杨元军, 李成彤, 毕玉平, LuisF.Salazar, 王毅.马铃薯病毒检测中DAS-ELISA的改进及注意问题[J].中国马铃薯, 2001, 15(5):305-307