

# Study on Tissue Blotting Detection Technology of Tobacco Mosaic Virus (TMV) in Tobacco Seedbed Period

Chuanfu Kuang<sup>1</sup>, Shichao Liu<sup>2</sup>, Tao Zeng<sup>1</sup>, Xianchao Sun<sup>2</sup>, Dexin Chen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hunan Tobacco Company Chenzhou Branch, Chenzhou Hunan

<sup>2</sup>Southwest University, Chongqing

<sup>3</sup>China Academy of Agricultural Sciences Tobacco Research Institute, Qingdao Shandong

Email: kcf601@163.com

Received: Aug. 5<sup>th</sup>, 2018; accepted: Aug. 20<sup>th</sup>, 2018; published: Aug. 27<sup>th</sup>, 2018

---

## Abstract

Tobacco mosaic virus (TMV) tissue blotting detection technology in the seedling period of tobacco was discussed, including the determination of the most suitable concentration of the first antiserum, optimization of optimal temperature and time of first antiserum and second antiserum, selection of the best sampling parts of tobacco seedling, time of onset after infection with tobacco Mosaic virus and detection of the incidence of tobacco Mosaic virus of different varieties. The results show that the optimum concentration of the first antiserum was 1000 times. The first antiserum was diluted 1000 times, the second antiserum was diluted 6000 times. Samples in 37°C thermostat oscillator 60 r/min under the closed state, connected to the first antiserum 1 h, 37°C constant temperature oscillation, connected with the second antiserum 1 h, 37°C constant temperature oscillation, have the best effect. The best sampling site of tobacco seedling is the middle of petiole. On the first day after inoculation, virus accumulation occurred in all parts of the stem of tobacco seedling, stem-tip virus accumulation occurred earlier. Accumulation of virus was detected in all parts of the tobacco seedling on the 6th day after inoculation. Five varieties including KRK26, K326, Yunyan 87, Hongda and Yunyan 97 were tested. All 5 samples tested were infected by TMV. The incidence rate of TMV infection was highest in Yunyan 97 and lowest in K326.

## Keywords

Tobacco, Seedbed Period, Tobacco Mosaic Virus (TMV), Tissue Blotting, Detection Technology

---

# 烟草苗床期普通花叶病(TMV)组织印迹检测技术研究

匡传富<sup>1</sup>, 刘世超<sup>2</sup>, 曾涛<sup>1</sup>, 孙现超<sup>2</sup>, 陈德鑫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>湖南省烟草公司郴州市公司, 湖南 郴州

<sup>2</sup>西南大学, 重庆

<sup>3</sup>中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛

Email: kcf601@163.com

收稿日期: 2018年8月5日; 录用日期: 2018年8月20日; 发布日期: 2018年8月27日

## 摘要

本文探讨了烟草苗床期TMV组织印迹检测技术, 包括第一抗血清最适浓度的确定、第一抗血清和第一抗血清最佳温度及时间的优化、烟苗最佳取样部位的选择、感染烟草普通花叶病毒后的发病时间、不同品种烟草花叶病毒发病情况检测等。结果表明: 第一抗血清最适浓度以1000倍效果较理想; 用第一抗血清稀释1000倍, 第二抗血清稀释6000倍, 样品在37℃恒温振荡器60 r/min封闭状态下, 与第一抗血清连接1 h, 37℃恒温震荡, 与第二抗血清连接1 h, 37℃恒温震荡, 效果最好; 烟苗最佳取样部位的选择为叶柄中部; 接种后第1天烟苗茎的各部位都有病毒积累, 茎尖病毒积累出现较早, 病毒接种第6天烟苗各个部位都检测到病毒的积累; 试验了KRK26、K326、云烟87、红大、云烟97等5个品种, 检测的5个样品均被TMV侵染, 云烟97感染TMV的感病率最高, K326感病率最低。

## 关键词

烟草, 苗床期, 普通花叶病(TMV), 组织印迹, 检测技术

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

组织印迹法(Tissue Blotting)是在酶联免疫吸附(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)的基础上发展起来的植物病毒检测技术, 该技术不仅保持了ELISA对病毒检测的灵敏度高, 特异性强的特点, 而且大大地简化了操作程序, 对病毒的检测更加快速、简单、方便, 印迹在硝酸纤维素膜上的样品能保存3个月以上, 检测结果能直观地显示出病毒感染的部位。组织印迹技术尤其适用于植物病毒的大规模普查[1]。本研究采用组织印迹法对烟草苗床期普通花叶病(TMV)进行检测, 以尽早检测出带毒烟苗, 达到及时预防和处理烟草普通花叶病(TMV)的目的。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 田间样品采集

试验烟苗在本实验室种植, 接种TMV备用。苗期样品采自湖南桂阳实验基地。

### 2.2. 供试药剂

TMV、TMV抗血清本实验室制备保存。碱式磷酸酶标记的羊抗兔(GAR-AP, Bioreba公司)、辣根过氧化物酶标羊抗兔IGg(HRP-IGg)、TMB、羊抗鼠、PBS缓冲液、PBS-T缓冲液、脱脂奶粉等购自重庆川东化工集团有限公司。

### 2.3. 试验仪器设备

电子天平、台式离心机、恒温振荡器、高压灭菌锅、酶标仪、酶标板。

### 2.4. 试验方法

#### 2.4.1. 组织印迹基本步骤

1) 采样。采取待测感病烟叶植株和健康烟叶植株顶端幼嫩部位 5~7 cm 长及烟叶叶片。避免手套和伤口接触，将样品装入塑料袋(每样 3 片嫩叶)，封口做好标记，放入 4℃ 冰箱保存。

2) 打网格。硝酸纤维素膜(NCM)剪成适当大小(15 × 8 cm)，置于平整洁净滤纸上(3 层)，用打孔器印出印迹位置(也可以用没有水的圆珠笔做印迹)，手和其它硬物不要直接和膜面接触(戴医用手套)，以免样品病毒相互感染影响检测结果。

3) 点样。用单刃刀片横切茎，将叶片卷成筒状，用刀片迅速横切(刀片不能重复使用，可以用折断的刮胡刀片截取，将新刀片折成 8 小片，每点一个样品必须换一个刀片)，将切口均匀平压印在膜上，印迹清晰为宜(用镊子夹着叶柄横切面，在 NCM 上点一下)。每张膜可以点数百个样品，样品可以设置重复。选择已确定感染病毒的烟叶植株和健康的植株作为检测的正负对照。

4) 封闭。将点好样的硝酸纤维素膜置于盛有 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液的培养皿中，封闭液的量以覆盖 NCM 为宜，在 37℃ 下温育 1 h 或 4℃ 下过夜。

5) 洗涤。用 PBS-T 缓冲液洗膜 3 次，每次 5 min，摇床洗膜(取待测膜样品至合适大小的培养皿，加 5 ml PBS-T，用枪头搅拌溶解，放入印迹膜，要求完全浸没在液体中，在摇床上摇动封闭)。

6) 病毒和抗体的反应。将膜转入含有单抗体(1 μg/mL) PBS-T + 2% PVP (Sigma 公司 PVP-40 + 0.2% GBB 白蛋白)常温下培养 1 h，或含有特异抗体稀释 500~2000 倍液的 PBS 缓冲液中常温下培养 1 h (图 1)。

7) 洗涤。同上。

8) 第二抗体连接反应。洗毕后将膜转入含 GAR-AP 羊抗兔稀释 2000~5000 倍液的 PBS-T + 2%PVP 缓冲液中，常温下培养 1 h，摇晃。

9) 洗涤。同上。

10) 显色反应。将膜转入显色液(硝酸酚基磷酸片、BCIP/NTP、15 mg/30mg)溶于 15 mL 的蒸馏水中至阳性对照显色为止(约 5~10 min)。

11) 终止。阳性对照显示清晰的蓝紫色时，即用蒸馏水冲洗 NCM 2~3 分钟，然后取出置于吸水纸上，干燥后进行比较鉴定其结果。

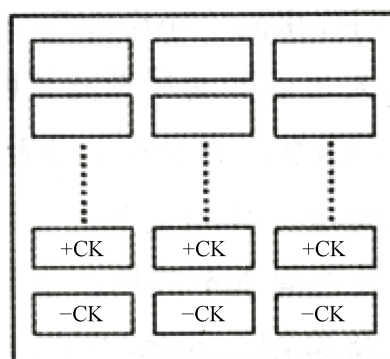


Figure 1. PBS sketch map at normal temperature in buffer solution

图 1. PBS 缓冲液中常温下培养示意图

#### 2.4.2. 第一抗血清最适浓度的确定

检测 TMV 组织汁液, 待测病毒血清一抗稀释倍数分别为 300、500、1000、2000、3000 倍。抗血清二抗稀释倍数均为 6000 倍。

#### 2.4.3. 第一抗血清和二抗最佳温育时间的优化

浓度不同时工作时间的确定。首先一抗稀释倍数为 3000 倍, 二抗稀释倍数 6000 倍。第一组一抗、二抗连接时间分别为 30 min, 恒温, 不震荡。第二组一抗连接 30 分钟, 与二抗连接 1 h, 恒温, 不震荡。第三组一抗连接 1 h, 与二抗连接 30 min, 恒温, 不震荡。

其次采取待测烟叶样品, 用叶中部进行组织印迹, 要求一抗稀释倍数为 2000 倍, 二抗稀释倍数为 6000 倍。每个样品在封闭时仍要求 37℃ 恒温振荡器 60 r/min 下进行, 第一组与一抗、二抗分别连接 30 min, 37℃ 恒温震荡。第二组与一抗连接 1 h, 37℃ 恒温震荡。与二抗连接 30 min, 37℃ 恒温震荡。

#### 2.4.4. 植物最佳取样部位的选择检验

采取待测烟叶样品, 取待测 TMV 发病显症烟苗植株和长势相同的健康烟叶植株叶片各一片。用干净刀片切取带病毒叶片, 由叶柄基部到叶尖处由上至下点十个点, 每隔 1 cm 进行一次切样再点样进行组织印迹。健康烟叶点样情况一样(点样分布如图 2 所示)。

#### 2.4.5. 感染烟草花叶病毒不同发病时间检测

用组织印迹检测法检验同种烟苗接种病毒后, 在不同时间病毒感染情况。取长势相同的同种烟苗 6 株, 置于温和的环境下(实验温室, 温度控制在 25℃~27℃, 湿度控制在 80%), 用摩擦接种法, 接种浓度 40 μg/ml, 给六株苗子接种上 TMV 病毒, 要求接种时间, 地点, 病毒量以及接种部位都相同。每隔 24 h 取出一盆烟苗, 拔出整株, 取下茎部和由下至上 4 片叶进行印迹实验。用干净刀片切取每株烟苗的茎基部、茎中部和茎尖部分, 由左至右分别进行点样进行组织印迹。再切取准备好的叶片(叶 1、叶 2、叶 3、叶 4), 从叶柄处和叶脉中部各切取一段进行组织印迹(点样分布如图 6 所示, 显色情况如表 1 所示)。

#### 2.4.6. 不同品种烟草花叶病毒发病情况检测

用组织印迹检验方法, 检验从綦江地区采集的烟苗样本(KRK26、K326、云烟 87、红大、云烟 97 五个品种的烟苗), 以及部分马铃薯样本。实验过程中再加上本实验室 TMV 已经显症的烟苗样本做阳性对照, 以及健康烟苗做空白对照。取各样品植株叶柄, 用干净刀片横切并在 NCM 上进行点样, 点样情况如图 6 所示图片, 每一品由上至下 1~5 分别为各样品按 1~5 编号点样情况。

### 3. 结果与分析

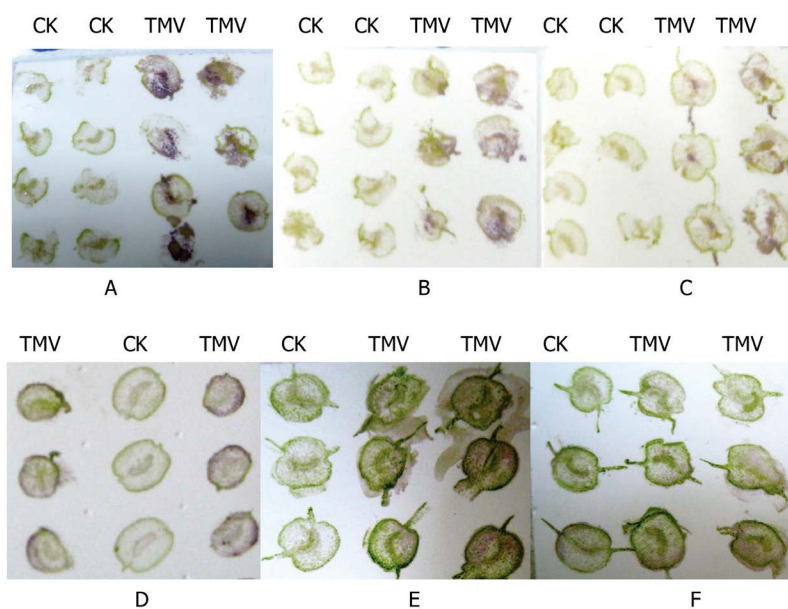
#### 3.1. 第一抗血清最适浓度的确定

在较低的血清稀释度 300、500、1000 时, 反应强度与稀释倍数无明显关系, 而 2000、3000 倍时反应强度明显降低(图 2(F))。空白对照 CK 无假阳性反应。考虑到反应强度和血清用量, 初步确定 1000 倍工作效果较理想(图 2(C), 图 2(D))。

#### 3.2. 第一抗血清和二抗最佳工作时间与浓度条件的优化结果

##### 3.2.1. 浓度一定时工作时间的确定

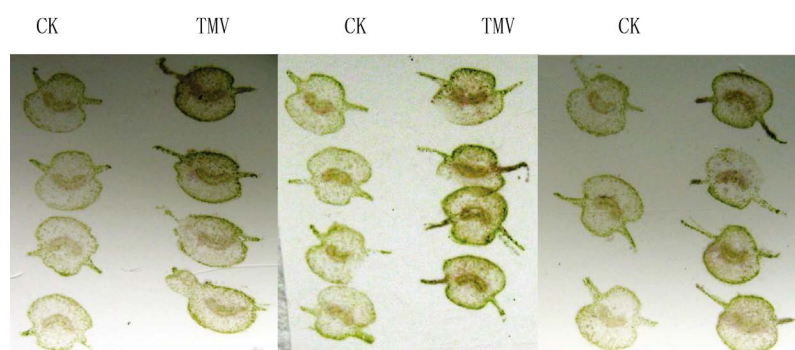
经实验结果验证得知。第一抗连接 1 h, 与二抗连接 30 min, 恒温, 不震荡。第一抗连接 30 min, 与二抗连接 1 h, 恒温, 不震荡。第三组与一抗连接 1 h, 37℃ 恒温, 不震荡, 与二抗连接 1 h, 恒温, 不震荡。这两组的时间分配效果较好, 但整体效果不明显(图 3)。



A: 300 倍; B: 500 倍; C: 1000 倍; D: 1000 倍; E: 2000 倍; F: 3000 倍。

**Figure 2.** An anti tissue imprinting film with different concentrations

**图 2.** 不同浓度一抗组织印迹膜



**Figure 3.** Tissue imprinting membrane at different temperatures

**图 3.** 不同温育时间组织印迹膜

**Table 1.** TMV verification at different time and plant location

**表 1.** 不同时间和植株部位 TMV 验证情况

序号	接种病毒	接种时间	茎部			叶部							
			茎基	茎中	茎尖	叶 1		叶 2		叶 3		叶 4	
						基部	中部	基部	中部	基部	中部	基部	中部
1	TMV	1 天	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	TMV	2 天	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	TMV	3 天	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
4	TMV	4 天	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
5	TMV	5 天	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
6	TMV	6 天	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3.2.2. 抗体浓度一定时得到最佳检测时间

一二组实验在该条件下结果与对照 CK 比较不明显, 因此, 总结得知, 用一抗稀释 1000 倍, 二抗稀释 6000 倍。每个样品在封闭时要求 37℃ 恒温振荡器 60 r/min 下进行, 与一抗连接 1 h, 37℃ 恒温震荡。与二抗连接 1 h, 37℃ 恒温震荡, 效果最好(图 4)。

### 3.3. 植株最佳检测部位确定

TMV 发病显症烟苗植株叶片不同部位点样情况可知, 叶柄中部效果最佳(图 5)。

### 3.4. 检测应用

#### 3.4.1. 检验不同感染时间烟草花叶病毒发病情况

用 NCM 检测法检验同种烟苗接种 TMV 病毒后, 在不同时间不同部位病毒感染情况。取长势相同的同种烟苗 6 株, 置于温和的环境下, 给六株烟苗的接种上 TMV 病毒, 要求接种时间, 地点, 病毒量以及接种部位都相同。每隔 24 h 取出一盆烟苗, 拔出整株, 取下茎部和由下至上 4 片叶进行印迹实验。用干净刀片切取每株烟苗的茎基部、茎中部和茎尖部分, 由左至右分别进行点样进行组织印记。再切取准备好的叶片(叶 1、叶 2、叶 3、叶 4), 从叶柄处和叶脉中部各切取一段进行组织印迹(点样分布如图 3 所示, 显色情况如表 1 所示)。结果表明接种后第 1 天烟苗茎的各部位都有病毒积累, 并且茎尖含部分病毒积累出现较早。病毒接种第 6 天烟苗各个取样部位都检测到病毒的积累(图 6)。

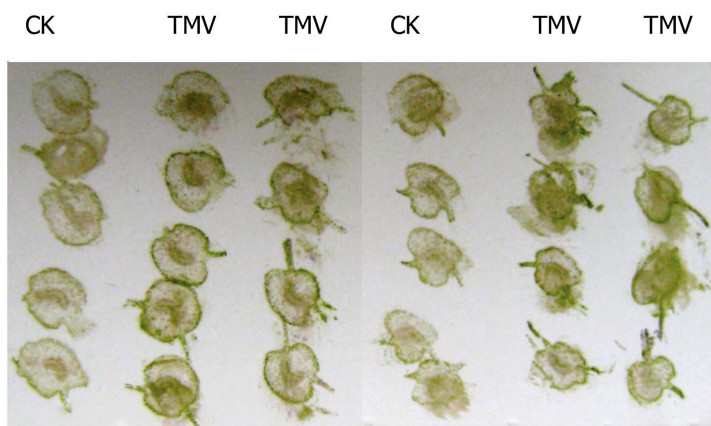


Figure 4. The best incubation time for antibody concentration is determined by tissue blotting

图 4. 抗体浓度一定时最佳温育时间检验组织印迹膜

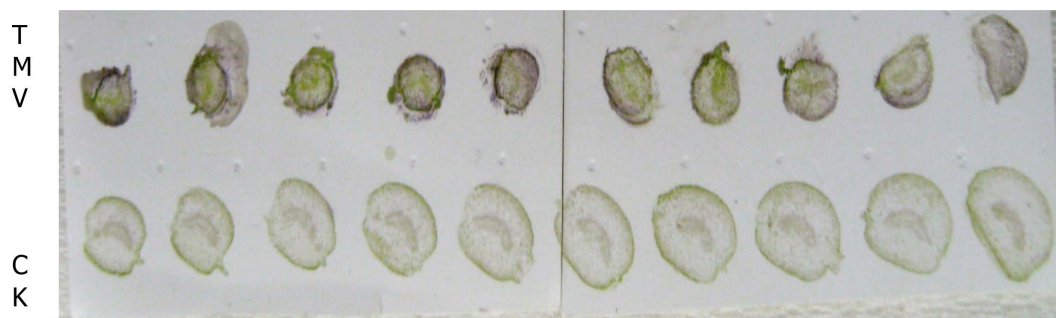
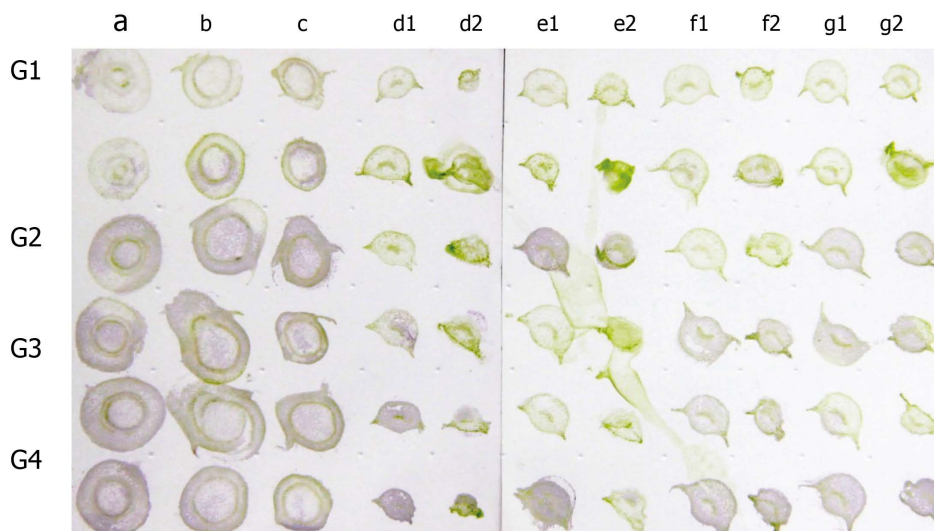


Figure 5. TMV tissue imprinted membrane in different parts

图 5. 不同部位 TMV 组织印迹膜



G1~G6: 第一天到第二天的检验情况; a、b、c: 茎部茎基、茎中和茎尖处点样结果; d1, e1, f1, g1: 叶一、叶二、叶三、叶四基部; d2, e2, f2, g2: 叶一、叶二、叶三、叶四中部。

**Figure 6.** TMV blotting membrane in different parts of plants at different times  
**图 6.** 不同时间不同部位植株 TMV 组织印迹膜

#### 3.4.2. 检验不同品种烟草花叶病毒发病情况

用组织印迹检验方法, 检验从重庆地区采集的烟苗样本(KRK26、K326、云烟 87、红大、云烟 97), 以及部分马铃薯样本。实验过程中再加上本实验室 TMV 已经显症的烟苗样本做阳性对照, 以及健康烟苗做空白对照。实验步骤按 3.1 所示方法进行。取各样品植株叶柄, 用干净刀片横切并在 NCM 上进行点样, 点样情况, 如图 7 所示, 每一品由上至下 1~5 分别为各样品按 1~5 编号点样情况。结果表明云烟-97 苗期感染 TMV 的几率最高, 检测的 5 个样品均被 TMV 侵染, K326 感病率最低。

#### 3.4.3. 用 NCM 方法检测病毒 TMV 和 CMV

用 NCM 组织印迹方法检测从郴州地区采集的样本 19 个, 实验过程设置阳性对照和阴性对照。1~19 为待测样本烟叶, 20~22 为阴性对照, 23~25 为阳性对照。由图 8 可以看出所检测的 19 个发病样品中有 18 个样品受 TMV 侵染, 由图 9 可知所有检测样品都感染了 CMV。

## 4. 结论与讨论

1) 本试验主要应用组织印记法研究出快速检测郴州烟区苗期烟草植株 TMV 的情况, 并且成功的在传统组织印迹检测法上进一步优化, 达到更加经济、快速、高效、准确的组织印迹效果。在此基础上整理出一套完整的组织印迹方案和试剂配方, 既可以测不同品种植株带病毒 TMV 情况, 又可以测出植株带病毒种类。

2) 组织印记法步骤中必须考虑到一抗、二抗的浓度及连接时间的控制, 在探究优化实验的过程中, 应用单因子变量法, 通过检验部位、植株大小、连接时间不变时, 将一抗浓度设定稀释 300、500、1000、1000、2000、3000 倍, 从而快速排出干扰因素, 确定合适的一抗浓度。最后确定应用本试验的一抗血清稀释 1000 倍, 二抗依照传统稀释 6000 倍的量效果最佳。刘勇等[2]曾应用组织印迹检测烟草中的 TMV, 血清选择浓度 TMV 为 1000 倍, 与本试验一致。同理, 在此基础上, 改变单因子变量, 优化一抗连接时间, 确定得到 1 h 为最佳连接时间。考虑到本试验用于快速测定田间烟苗苗期病毒, 在制定好一抗稀释 1000 倍, 连接 1 h, 二抗稀释 6000 倍, 连接 1 h 后。

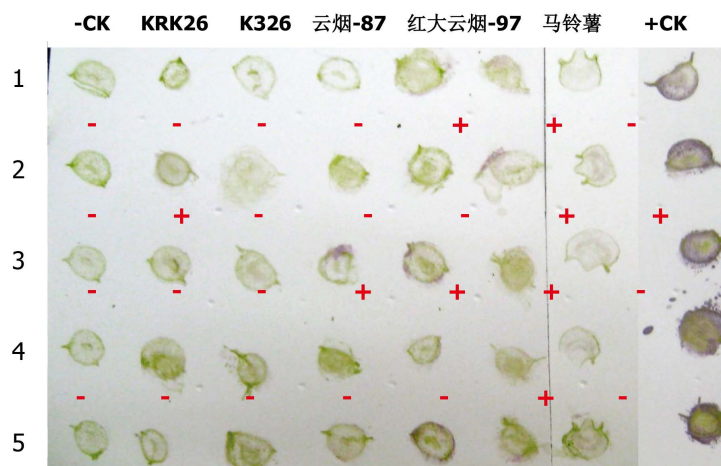


Figure 7. TMV detection results of different tobacco varieties infection  
图 7. 不同烟草品种感染 TMV 检测结果

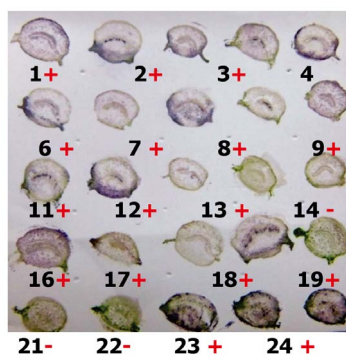


Figure 8. NCM detection of TMV in the sample  
图 8. NCM 检测样品中的 TMV

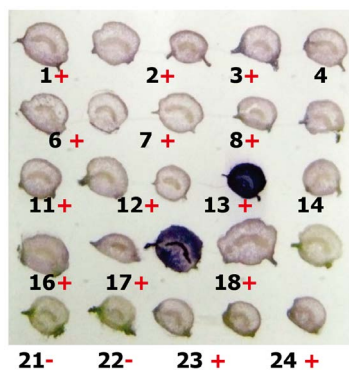


Figure 9. NCM detection of CMV in the sample  
图 9. NCM 检测样品中的 CMV

3) 为了在实际生产应用中更加高效, 通过使用最佳配方检测生长状况相同的植株不同部位, 测出病毒含量最稳定和明显的部位是叶脉基部三分之一处。同时, 烟叶苗期不同时期, 病毒感染状况也不相同, 通过人工施加病毒到长势相同的同种烟苗, 检测一周内病毒的感染严重程度, 在接种病毒前两天, 可以



检测出病毒,但是比较少量;第三天开始,病毒含量明显增加;第六天时植株各个部位已经含病毒十分丰富了。因此可以从实际应用中,通过判别病毒检测量确定该植株感染病毒的时间。

4) 试验不但在理论上得到了完善,而且进行了田间实践。为反复检验试验的准确性,通过采摘重庆等大型烟苗基地的烟苗样品,进行组织印记,对田间烟草苗期病毒进行检测,试验结果与预期十分吻合。

5) 实验室提供的高效特异的抗血清为检测烟草病毒病、蔬菜病毒病提供简便、快速的检测技术,不但减少烟草、蔬菜的经济损失,而且为试验增添了效率。组织印记法原理与 ELISA 来源相同,但是在本试验的优化基础上,组织印迹法在操作方法、精确度以及经济方面得到了肯定。预计将成为今后田间大量烟叶种植基地的普遍使用检测 TMV 的方法,多篇论文[2] [3] [4]认为,组织印记法比 Dot-ELISA 的操作简单,灵敏度高,适合大量样品检测,因此前景可佳,具有重要的研究意义。

## 基金项目

湖南省烟草公司重点科研项目(项目编号:14-16ZDAa02)。

## 参考文献

- [1] 徐明全,郑平,刘荣维,等. 植物病毒检测技术——组织印迹法[J]. 微生物学通报, 2000, 27(5): 360-363.
- [2] 刘勇,杨树军,李天飞. 应用点免疫结合法和组织印迹法检测烟草组织中的 TMV 和 CMV [J]. 烟草科技, 2000, 50(12): 42-44.
- [3] 兰玉菲,郗丽君,张德满. 植物病毒检测技术[J]. 山东农业科学, 2006(5): 57-58.
- [4] 张伟,徐硕,陈德鑫. 常用植物病毒病检测技术比较[J]. 南方农业, 2013, 7(12): 30-34.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)