

应用自制检测试剂盒(NCM-ELISA)检测马铃薯环腐病菌

胡林双, 闵凡祥, 王晓丹, 郭梅, 吕典秋, 于德才, 马纪

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所; 农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

马铃薯环腐病(Potato Ring Rot)是由*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*引起的一种危害输导系统的细菌性病害,它是马铃薯生产上危害较大的病害之一,在全国各地都有分布,每年都造成较大损失,世界各国也把它列为重要的进出口植物检疫对象,要求种薯带病允许率为“0”。近几年来,在我国马铃薯主产区环腐病普遍发生,危害日趋严重。这种病菌主要通过种薯传播蔓延,而种薯带菌又是马铃薯环腐病历年发病和远距离传播的主要污染源,由此可见,控制种薯病原菌是防治环腐病蔓延的重要措施。马铃薯环腐病菌在马铃薯块茎上侵染后,前期没有症状表现,用传统的革兰氏染色、双抗体夹心酶联免疫吸附测定法等检测方法又无法检测到病菌;用分子检测方法成本比较高,要求操作人员素质也很高,需要的仪器也比较多、昂贵,很多实验室没有相应的人员和仪器设备,所以该检测方法无法普及。因此,限制了对马铃薯环腐病的检测检疫。

本检测试剂盒成功地研制弥补了以上方法的不足之处,该检测方法称为硝酸纤维素膜酶联免疫吸附测定法(Nitro Cellulose-Membrane-Enzyme Linked Immunosorbent Assay,简称为 NCM-ELISA),其基本原理是抗血清可与预先吸附在硝酸纤维素膜上的细菌粒子特异结合,而带有标记物的抗体又可与细菌抗血清特异结合,当加入与抗体标记物相应的底物后,就可通过底物与标记物反应所表现出的特征来判断待检样品是否带有细菌。本方法独特之处是在“点样”之前增加了一步“富集培养”,即使样品中菌含量比较低,经过富集培养基培养之后,提高

了菌液浓度,从而大大提高了检测的灵敏度。

1 试剂盒内用品与说明

本试剂盒内共有 19 件用品,详见表 1,每件用品上都标明了“编号”和“名称”,使用时按试剂盒说明即可。

2 检测步骤

2.1 样品的制备

2.1.1 制备提取缓冲液

将 12#A 袋中的物质溶于 1 000 mL 蒸馏水中,然后边搅拌边缓慢加入 12#B 袋中的物质,用 HCl(2#瓶)或 NaOH(19#瓶)调 pH 值为 5.6,120℃灭菌 20 min,灭菌后放入 4℃冰箱内待用。

2.1.2 样品提取

(1) 从块茎中提取

用流动的水冲洗块茎,并在 1%次氯酸钠(NaClO)中浸泡 5 min,在干净的纸上晾干;用刀片从块茎顶部切下一个薄片,每切一个样品后在火焰上灭菌;用火焰将试剂盒中所包括的工具灭菌(去皮器)并挖取大约 2 mm 宽 1 mm(每个块茎不超过 0.5 g)的一小片维管束环;将块茎片放入 18#塑料袋内并称重;加入提取缓冲液,每克块茎组织 2 mL;用小槌或小木棒倒碎块茎;将塑料袋垂直放置于碎冰之上(不超过 1 h),避免酚氧化;检测潜在感染时,应按照段落 2.1.3 中描述的那样在进行 NCM-ELISA 之前将样品富集培养。

(2) 从茎中提取

在表现出脉间失绿萎蔫的植物上分析马铃薯环腐病菌,从底部(如果萎蔫刚刚开始)或顶端区域(如果细菌症状严重)切下大约 3 cm 组织,并将它放入装有 5 mL 蒸馏水的管中,用镊子挤压,最终

收稿日期: 2007-03-09

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(2004C0307)

作者简介: 胡林双(1977-),男,硕士,助理研究员,从事马铃薯病害检测技术研究。

表1 试剂盒内组分与说明

编号	名称	化学成分	数量	物理状态	备注
1#	TBS(1 000 mL)	0.02 mol·L ⁻¹ Tris=2.42 g 0.50 mol·L ⁻¹ NaCl=29.22 g 0.01% NaN ₃ =0.10 g	3包	白色粉末	4℃下可稳定1个月
2#	HCl	HCl 18.5%=6.0 mL	1瓶	透明液体	避免接触皮肤
3#	封闭缓冲液(30 mL)	脱脂奶粉=0.43 g(最终蛋白含量=0.16 g)	2包	白色粉末	现用现配
4#	抗体缓冲液(30 mL)	脱脂奶粉=0.43 g	2包	白色粉末	现用现配
5#	酶标缓冲液(30 mL)	脱脂奶粉=0.43 g	2包	白色粉末	现用现配
6#	Tween-20	Tween-20=1 mL	1微量离心管	透明液体	4℃下稳定
7#	底物缓冲液(100 mL)	0.1 mol·L ⁻¹ Tris=1.21g 0.1 mol·L ⁻¹ NaCl=0.58 g 5 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O=0.10 g	2包	白色粉末	4℃下稳定
8#	Cms-抗体	Cms-特异性兔 IgG=0.6 mL	1微量离心管	透明液体	4℃下稳定4个月
9#	酶标抗体=GAR-IgG	羊抗兔抗体=0.6 mL (555μL 0.5*PBS 中稀释 45 μL)	1微量离心管	透明液体	4℃下稳定4个月
10#	底物	A=硝基四氮唑兰(NBT)=30 mg B=Na25-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐(BCIP)=15 mg	1微量离心管 1微量离心管	黄色固体 白色固体	4℃下稳定
11#	溶剂	A=70%二甲基甲酰胺(DMF)=1.0 mL B=二甲基甲酰胺(DMF)=1.0 mL	1微量离心管 1微量离心管	透明液体 透明液体	室温下稳定剧毒, 皮肤吸收
12#	提取缓冲液	A=柠檬酸 0.1 mol·L ⁻¹ (1.995 g) B=柠檬酸钠 0.1 mol·L ⁻¹ (11.907 g)	3包 3包	白色固体 白色固体	4℃下稳定 4℃下稳定
13#	10×富集培养液	50 mL	1瓶	淡黄色液体	4℃下稳定, 灭菌后保存
14#	膜	硝化纤维素膜(NCM)	2张(10 cm×15 cm)	白色固体	很易碎, 用时戴手套或镊子
15#	阳性和阴性对照	点有不同菌液浓度的硝化纤维素膜	2张 NCM 条带	白色固体	很易碎, 取用时戴手套
16#	滤纸	3 mm Whatman 滤纸	6张	白色固体	取用时用镊子
17#	微量离心管	1.5 mL 微量离心管	100个	聚丙烯	1个样品 1个管
18#	塑料袋	制备块茎样品	100个	聚丙烯	1个样品 1个管
19#	1N NaOH	NaOH 1N=10 mL	1瓶	透明液体	避免接触皮肤

将浑浊的菌悬液 20 μL 点于膜上, 不经过富集; 估计来自感染田地表面正常茎段的潜在感染时, 从植物底部切取一段 3 cm 茎段, 放入塑料袋内, 并按照块茎的方法在提取缓冲液中将它碾碎。在进行 NCM-ELISA 之前, 茎提取物应按照 2.1.3 中所述方法进行富集。

2.1.3 富集培养

向所提供的 20 mL 10×富集培养液(13# 瓶)中加入 180 mL 蒸馏水进行稀释, 然后向无菌的 1.5 mL

微量离心管(17#)中加入 500 μL 1×富集培养液; 用微量移液器和无菌吸头, 小心吸取块茎或茎的提取液, 不要沉淀; 将 500 μL 植物提取液加入 500 μL 1×富集培养液; 在 23℃ 固定频率的摇荡培养箱中孵育 48 h; 孵育结束后, 如果不打算在同一天将它点在膜上, 于 -20℃ 储存。

2.2 点样

由于指纹会造成假阳性反应, 所以在取硝酸纤维素膜时要带手套或用镊子。

2.2.1 缓冲液的制备

将1#袋中的物质溶解于997.5 mL蒸馏水中,充分混匀。检测pH值并用2#瓶中提供的HCl调pH值至7.5。

2.2.2 膜的处理

向塑料盒内倒入大约30 mL TBS,将干燥的膜(14#袋内)缓慢地放入缓冲液中浸湿,避免形成气泡,浸泡5 min。

2.2.3 点样

(1) 采用点样装置

将一张3 mm Whatman滤纸(16#袋)浸泡在配好的TBS缓冲液中,然后置于多孔过滤加样器的抽真空板上,并将浸湿的膜置于其上。如果膜的大小比杂交装置表面小,就用封口膜封闭那些未被膜覆盖的部分,以防空气通过;用微量移液器取20 μL 富集植物提取液;振摇装有富集植物提取液的微量离心管,让悬液沉降数秒。吸取上清液,避免吸取含有淀粉的沉淀而影响ELISA反映;用一个大约125 mm汞柱的真空泵抽吸,然后将富集提取液滴在膜上;将膜从抽真空板上取下并置于一张干燥的滤纸上,在室温下风干60 min。

(2) 不使用点样装置

如果没有点样装置,将两张干燥的滤纸(16#袋)放于实验台上,将事先用TBS浸泡过的两张湿滤纸一张张地放于其上;将膜放在湿滤纸上时要避免形成气泡。等待数秒直到膜表面的液体被完全吸收。在膜上滚动干净无菌的试管或玻璃管,确保膜和滤纸很好的接触。这些步骤对于样品通过毛细作用被吸收而不在膜上扩散是非常重要的;象“采用点样装置”中描述的那样,用微量移液器取20 μL 富集植物提取液,让吸头与膜垂直,在液滴与膜接触时吸头的末端可以与膜有轻微的接触,不要让样品液滴落,因为那样会有所扩散而且斑点也会不统一,就这样非常缓慢地将液滴点在膜上;将膜置于一张干燥的滤纸上,并风干60 min;用铅笔在膜的左下角写上编号以便识别。

2.2.4 膜的保存

将膜放在两张干燥的滤纸之间,保存或邮寄时再用两块纸板保护,以备检测。

2.3 血清学检测

所有的体积和数量都是指在直径15 cm的培养皿中检测一张膜的用量。如果使用半张膜,就减少一

半体积并在直径10 cm的培养皿中进行ELISA反应。

每张膜需要300 mL TBS缓冲液(包括封闭时用的30 mL),其中180 mL用于配置T-TBS缓冲液。

所有的孵育和冲洗步骤均在室温下完成,并需要一个摇床,孵育时用50 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,冲洗时用100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。如果没有合适的摇床,孵育时可以手工振摇,但是,洗涤时必须进行持续的手工振摇。

每张膜加入点有阴阳性的对照NCM条(15#袋)。

2.3.1 封闭

(1) 制备封闭溶液

于30 mL TBS(在前述点样时配制)中溶解3#袋内的物质,制成封闭缓冲液。

(2) 封闭

将30 mL封闭溶液倒入直径15 cm的培养皿中,将膜和阴阳性对照条缓慢浸入其中,避免产生气泡。在50 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇动下孵育1 h。

2.3.2 与Cms抗体结合

(1) 制备抗体溶液

在30 mL TBS缓冲液中溶解4#袋内的物质,制成抗体缓冲液。然后边摇边加入100 μL IgG-Cms(8#微量离心管)。

(2) 与Cms特异性抗体结合

弃去封闭液,然后加抗体溶液30 mL于培养皿中,加盖以防蒸发,在50 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇动下孵育2 h,也可以孵育过夜并不会影响结果。

2.3.3 Cms抗体复合物与酶标羊抗兔抗体结合

(1) 配置洗涤缓冲液

将250 μL Tween-20(6#微量离心管)与500 mL TBS混合。

(2) 洗涤

弃去抗体溶液,在30 mL T-TBS中洗去未被结合的Cms抗体。共洗3次,以100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的频率振摇,每次3 min。

(3) 配置酶标抗体溶液

在最后一次洗涤时,将5#袋内的物质溶于30 mL TBS,制成酶标抗体缓冲液,在100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇动下加入100 μL 酶标羊抗兔抗体(9#微量离心管)。

(4) 与酶标抗体溶液一起孵育

弃去最后一轮的洗涤缓冲液,加入酶标抗体溶液30 mL,在50 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振摇下孵育1 h。

2.3.4 显色反应

(1) 配置底物缓冲液

用 100 mL 蒸馏水溶解 7# 袋内的物质, 充分混匀, 逐滴加入 HCl 溶液(2# 瓶)将 pH 值调至 9.6。

(2) 制备 NBT/BCIP 溶液

用 800 μL DMF/NBT(11#A 微量离心管中)溶剂溶解 10#A 微量离心管中的物质(NBT)。振摇直到完全溶解; 用 800 μL DMF/BCIP(11#B 微量离心管中)溶剂溶解 10#B 微量离心管中的物质(BCIP)。振摇直到完全溶解; 将 NBT 和 BCIP 溶液储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ (不超过一个月)。

(3) 洗涤

弃去酶标抗体溶液, 用 30 mL T-TBS 洗膜, 将未结合的酶标 GAR-IgG 洗去, 共洗 3 次, 每次 3 min, 以 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的频率振摇。

(4) 制备 NBT/BCIP 底物溶液

底物溶液(每张膜 20 mL)应该在最后一次洗涤时临时制备。所剩余的缓冲液, NBT 和 BCIP 溶液可以分别储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以备将来使用(后两者最多保存一个月)。底物对光非常敏感, 因此, 应在一个黑色的瓶子或包裹着铝铂纸的三角瓶中制备底物溶液。

用无菌的微量移液器吸头取 100 μL NBT 溶液, 边振摇边向装有 25 mL 底物缓冲液黑色瓶子中滴加; 然后, 用无菌的微量移液器吸头取 100 μL BCIP 溶液, 边振摇边滴加到瓶中。

(5) 显色反应

弃去最后一次洗涤的缓冲液并加入底物溶液(每张膜 25 μL)。反应可以进行 5~20 min, 查看阳性对照所表现出的颜色, 以确定何时应停止反应。

(6) 终止反应

弃去底物溶液并用流动的水充分洗膜以终止显色反应, 将膜置于滤纸上干燥, 保存时用两张干滤纸夹住。

3 结 论

硝酸纤维素膜对蛋白质有较高的亲和力, 提供蛋白比较大的结合表面, 抗原和硝酸纤维素膜的结合较聚苯乙烯载体更为有效, 使检测的灵敏度明显提高, 而且所需检测样品量少; 该方法在检测之前, 须通过富集培养基孵育块茎提取物, 这样几乎能将此方法的灵敏度提高 100 万倍, 少至每毫升提取物中 10 个细菌就能被检出, 而不经富集培养, 只有当浓度达到 10⁶ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上时才能被检出, 这使能够从马铃薯块茎(或茎)中检测出新近感染的没有可见症状的病菌; 该方法操作简单、快捷, 每张 NCM 的包被、洗涤、酶标 IgG 的反应都被作为一个整体在一个平皿中进行; 反应明显, 产生鲜明的色斑, 与底色形成强烈的对比, 用肉眼就可以观察到结果; 该方法点样后的硝酸纤维素膜可以储存数周, 然后再进行检测, 也可以将点好样的硝酸纤维素膜寄往其它的实验室进行检测。

本检测试剂盒是目前应用于植物细菌检测较为先进的一种血清学方法, 具有特异性强、敏感度高、稳定、可靠、操作简便、检测成本低等优点, 对早期马铃薯环腐病的病害防治和检疫有着重要的意义, 因此, 具有很好的推广和应用价值。

书 讯

《中国马铃薯》编辑部尚有部分由陈伊里教授等主编、哈尔滨工程大学出版社出版的马铃薯产业与开发方面的图书, 供读者选购:

① 2002 年出版的《高新技术与马铃薯产业》, 定价 50 元/本; ② 2003 年出版的《中国马铃薯研究与产业开发》, 定价 60 元/本; ③ 2005 年出版的《马铃薯产业与东北振兴》, 定价 60 元/本。④ 2006 年出版的《马铃薯产业与冬作农业》, 定价 60 元/本; ⑤ 2007 年出版的《马铃薯产业与现代农业》, 定价 80 元/本。

另外, 2001、2002、2003、2004 年、2005 年《中国马铃薯》杂志精装本, 定价 60 元/本。有欲求购的单位或个人请另寄 10% 邮费, 款到即寄。

联系电话: 0451-55190003

《中国马铃薯》编辑部