

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)03-0142-04

# 马铃薯环腐病菌快速检测方法 ( NCM-ELISA ) 的建立

胡林双, 王晓丹, 闵凡祥, 郭梅, 李学湛, 白艳菊

( 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(哈尔滨), 黑龙江 哈尔滨 150086 )

**摘要:** 建立检测马铃薯环腐病菌 NCM-ELISA 方法并组装成试剂盒, 应用于检测、检疫和流行病学调查具有实践意义。本研究以马铃薯环腐病菌为抗原, 制备兔抗血清, 利用碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔血清(GAR-AP)为酶标二抗, 建立了马铃薯环腐病菌 NCM-ELISA 快速检测方法。结果表明: 抗血清的最佳工作浓度为 1:400, 最低检出菌液浓度为  $1.0 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 特异性也比较强。因此, 该方法具有敏感性高、特异性强、速度快、实用方便等特点, 可以应用于马铃薯环腐病菌的快速检测和诊断。

**关键词:** 马铃薯; 环腐病; ELISA; NCM-ELISA

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”<sup>[1]</sup>。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。环腐病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。因此, 建立一种快速、准确、简便的环腐病检测方法以确保种薯质量是防治环腐病蔓延的重要手段。

植物细菌检测方法有多种, 如症状学、指示植物、电子显微镜、核酸斑点杂交、聚合酶链式反应及血清学检测等。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)是血清学检测方法中的一种<sup>[2]</sup>, 具有灵敏度高、快速有效、不需要特殊的仪器、点上样品的硝酸纤维素膜可以间隔一段时间再继续检测和测定结果可以长期保存等优点<sup>[3]</sup>。Hawkes 等<sup>[4]</sup>对此进行了描述。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, 而带有标记物的抗抗体又可与细菌抗血清特异结合, 当加入与抗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。

本试验通过制备马铃薯环腐病菌兔抗血清, 利用碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔血清(GAR-AP)为酶标二抗, 成功地建立了马铃薯环腐病菌 NCM-ELISA 快速检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验菌株

供试菌株详见表 1。

表 1 供试菌株

菌株名称	菌株号	来源
马铃薯环腐病菌	NCPB2140	中国农科院植保所
马铃薯环腐病菌	C382	中国农科院植保所
马铃薯环腐病菌	P1	黑龙江省讷河市
马铃薯环腐病菌	P2	黑龙江省克山县
马铃薯环腐病菌	P3	内蒙古呼伦贝尔
马铃薯黑胫病菌	Eca1526	中国农科院植保所
马铃薯软腐病菌	Ecc1	中国农科院植保所
马铃薯青枯病菌	Po1	中国农科院植保所
马铃薯青枯病菌	Pot	中国农科院植保所

收稿日期: 2007-04-01

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。

### 1.1.2 试验动物

新西兰大耳白兔, 购自哈尔滨医科大学动物中心实验动物养殖基地。

### 1.1.3 仪器

水浴振荡器(HZS-H型, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 振荡培养箱(HZQ-F100型, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 超净工作台(SW-CJ-1F型, 苏州净化设备有限公司); 周旋式振荡器(MS1型, 德国IKA)。

### 1.1.4 试剂

酶标二抗(碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔血清, 工作浓度 1: 1500, Sigma公司); 脱脂奶粉(上海伯奥生物科技有限公司); 硝酸纤维素膜(国际马铃薯中心赠送)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 抗原的制备

将马铃薯环腐病菌接种在 YGM 培养基上, 在 23℃ 培养 120 h; 在无菌条件下, 用 0.9%生理盐水自培养基上洗下, 然后用旋窝振荡仪振动, 使其充分混匀; 在 60℃ 恒温水浴中温育 1 h; 悬液中比例按 1: 1 混合, 然后用旋窝振荡仪振动 5 min, 使菌悬液充分乳化备用。

### 1.2.2 免疫血清的制备

选择体重 2.0~2.5 kg 的新西兰纯种健康雄性大白兔 2 只, 采用皮下注射免疫, 免疫间隔为 1 周, 分 3 次免疫。最后一次免疫 7 d 后, 耳静脉采血, 用双向扩散法测定抗体效价, 效价达到 1: 16 以上时, 心脏采血。采集的兔血清常温静置 2 h, 低速离心 (3000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min) 取血清, 抗体血清分装小试管后 -80℃ 保存。

### 1.2.3 NCM-ELISA 检测步骤

点样: 在点样架上先放一层吸水纸, 再将硝酸纤维素膜轻放于吸水纸上, 用干净的移液管或移液枪加样品, 每个样品加 20 μL, 加完样品后自然风干 15~30 min。

封闭: 在直径 15 cm 的培养皿中倒入 30 mL 封闭溶液 (2%脱脂奶粉, 0.02 mol·L<sup>-1</sup> tris-HCl, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH=7.5), 将膜缓慢浸入其中, 避免形成气泡。缓慢摇动, 室温孵育 1 h。

抗体结合: 弃去封闭液, 用 TBS (0.02 mol·L<sup>-1</sup> tris-HCl, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH=7.5) 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 min, 然后向培养皿中加 30 mL 抗体

溶液 (抗体按 1:400 稀释), 加盖以防蒸发, 缓慢摇动孵育 2 h 或过夜。

抗体复合物与酶标羊抗兔抗体结合: 弃去抗体溶液, 并用 30 mL T-TBS (0.05% Tween-20, 0.02 mol·L<sup>-1</sup> tris-HCl, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH=7.5) 洗涤 3 次, 每次 3 min, 洗去未结合的抗体。在最后一次洗涤时配制酶标抗体液 (酶标抗体按 1: 1500 稀释), 弃去最后一次洗涤液, 加入 30 mL 酶标抗体溶液, 缓慢振荡孵育 1 h。

显色反应 (酶反应): 弃去酶标抗体溶液, 用 T-TBS 洗膜, 将未结合的酶标抗体洗去。洗 3 次, 每次 3 min。弃去洗涤液, 加入显色反应液 (NBT/DMF (75 mg·mL<sup>-1</sup>, 70% DMF) 20 μL, BICP/DMF (50 mg·mL<sup>-1</sup>, DMF) 20 μL, AP 显色缓冲液 5 mL), 显色 5~30 min。弃去底物溶液并用流水充分洗膜以终止显色反应, 进行结果判读后将膜置于滤纸上干燥, 保存。

### 1.2.4 抗血清的最佳浓度确定

根据血清效价的测定, 将兔抗血清用 PBS 稀释成不同浓度 (1: 50, 1: 100, 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1600, 1: 3200)。抗原用包被液稀释成不同浓度 (1×10<sup>8</sup>、1×10<sup>7</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>3</sup> 个·mL<sup>-1</sup>) 进行 NCM-ELISA 试验, 确定抗血清的最佳工作浓度。

### 1.2.5 敏感性试验

将马铃薯环腐病菌液稀释成不同浓度后, 在相同的条件下分别作 NCM-ELISA 试验, 确定最小检出菌量。

### 1.2.6 特异性试验

马铃薯环腐病菌 NCPPB2140、马铃薯环腐病菌 C382、马铃薯环腐病菌 P1、马铃薯环腐病菌 P2、马铃薯环腐病菌 P3、马铃薯黑胫病菌 Eca1526、马铃薯软腐病菌 Eccl、马铃薯青枯病菌 Pat 和马铃薯青枯病菌 Po1 菌液作适当稀释, 使其浓度达到 1×10<sup>6</sup> 个条件下进行 NCM-ELISA 测定, 观察结果。

## 2 结果

### 2.1 抗血清最佳工作浓度的选择

抗血清分别按 1: 50~1: 3200 范围内稀释时, 当稀释浓度为 1: 50~1: 200 时, 底物在硝酸纤维素膜上显色呈深紫色; 当稀释浓度为 1: 400 时,

底物在硝酸纤维素膜上显色呈紫色, 并且每个点显色均匀; 当稀释浓度为 1: 800 时, 底物在硝酸纤维素膜上显色呈淡紫色; 当 1: 1600 ~1: 3200

时, 底物在硝酸纤维素膜上显色呈无色, 详情由表 2 可见。由此可见, 选择试验抗血清的最佳工作浓度为 1: 400。

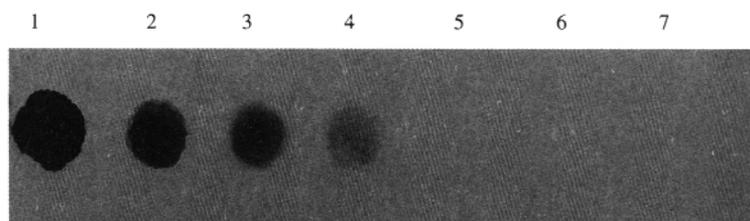
表 2 抗血清最佳工作浓度的选择

抗血清浓度	菌液浓度( $\text{bac}\cdot\text{mL}^{-1}$ )					
	$1\times 10^8$	$1\times 10^7$	$1\times 10^6$	$1\times 10^5$	$1\times 10^4$	$1\times 10^3$
1: 50	深紫	深紫	深紫	紫	无	无
1: 100	深紫	深紫	深紫	紫	无	无
1: 200	深紫	深紫	紫	淡紫	无	无
1: 400	深紫	紫	紫	淡紫	无	无
1: 800	淡紫	淡紫	无	无	无	无
1: 1600	无	无	无	无	无	无
1: 3200	无	无	无	无	无	无

### 2.2 敏感性试验

抗血清的工作浓度 1: 400, 对照为 TBS 溶液, 反应点不显色; 马铃薯环腐病菌- NCPPB2140 菌株

可被检测到的最低菌液浓度为  $1.0\times 10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 反应点呈紫色; 低于菌液浓度  $1.0\times 10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  时反应呈淡紫色, 而且界线很明显, 详见图 1。



注: 1 号为  $1.0\times 10^8$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2 号为  $1.0\times 10^7$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 3 号为  $1.0\times 10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 4 号为  $1.0\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 5 号为  $1.0\times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 6 号为  $1.0\times 10^3$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 7 号为  $1.0\times 10^2$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图 1 敏感性试验

将马铃薯环腐菌菌液稀释成不同浓度后, 在相同的条件下分别作 NCM- ELISA 试验, 确定最小检出菌量。

### 2.3 特异性试验

对 9 份菌株进行特异性试验, 马铃薯环腐病菌- NCPPB2140、马铃薯环腐病菌 C382、马铃薯环腐病菌 P1、马铃薯环腐病菌 P2、马铃薯环腐病菌 P3 菌株反应呈紫色, 对照和其他菌株反应呈无色, 表明该试验具有较高的特异性。

## 3 讨论

国内外有应用血清学方法检测马铃薯环腐病菌的很多, Slack 和 Kelmar<sup>[5]</sup>曾报道过应用乳胶致敏

试验(AG)、乌赫特明尼氏凝胶双扩散试验(DD)、间接荧光抗体染色试验(IFAS) 3 种方法检测马铃薯环腐病菌, 灵敏度依次为  $2\times 10^7$   $\text{bac}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2\times 10^7$   $\text{bac}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $10^{-10^2}$   $\text{bac}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 通过 DD 法和 IFAS 法可以将侵染于茄苗、马铃薯和番茄植株中环腐菌检测出来; 通过 AG 法、DD 法和 IFAS 法都可将侵染于马铃薯块茎中的环腐菌检测出来; 在应用其它 5 种不侵染马铃薯的植物病原细菌进行试验时只有 AG 法存在交叉反应; 在应用其它几种侵染马铃薯的植物病原细菌(例如软腐病菌、黑胫病菌等)进行试验时 3 种方法都呈阴性。从此试验的灵敏度和专化性可见 IFAS 法是最好的。然而 De Boer 和 Copeman<sup>[6]</sup>又对 IFAS 法的再现性提出质疑, 在 I-

FAS法中对于一个可靠的试验结果最佳的抗体稀释度是个问题, 抗体稀释度太高则抗原过量导致染色失败, 抗体稀释度太低将导致非专化性反应发生。也有人应用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 简称 DAS-ELISA)检测马铃薯环腐病菌<sup>[7]</sup>, 而应用 NCM-ELISA 方法检测马铃薯环腐病菌还未见报道。本试验成功地制备了马铃薯环腐病菌抗血清, 并且通过试验得出最佳的抗血清工作浓度为 1:400。在敏感性试验中得出 NCM-ELISA 方法检测马铃薯环腐病菌最小检出限为  $1.0 \times 10^6$  个·mL<sup>-1</sup>, 表明其具有很高的敏感性。在特异性试验中, 只检测出了马铃薯环腐病菌, 表明其具有较高的特异性。

本研究建立的 NCM-ELISA 方法检测马铃薯环腐病操作简便、特异性强、检出率高, 结果判定方便、直观、快速、准确, 通过对当地马铃薯样品进行检测, 证明该方法可以应用于马铃薯环腐病检测、检疫和流行病学调查等, 具有很高的推广应用价值。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] De Boer S H, Slack S A. Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America [J]. Plant Disease, 1984, 10: 841- 844.
- [ 2 ] Salazar L F. Potato viruses and their control [M]. Lima Peru: International Potato Center, 1996.
- [ 3 ] Chand P, Batra H V, Sadana J R. Detection of brucella specific protein- A reactive antibodies in buffaloes by dot enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Veterinary Record, 1989, 122: 162- 163.
- [ 4 ] Hawkes R, Niday E, Gordon J A. dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies [J]. Analytical Biochemistry, 1982, 119: 142- 147.
- [ 5 ] Slack S A, Kelmar A. Comparison of three serodiagnostic assays for detection of *Corynebacterium sepedonicum* [J]. Phytopathology, 1979, 69(2): 186- 189.
- [ 6 ] De Boer S H, Copeman R J. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure [J]. American Potato Journal, 1980, 57: 457- 465.
- [ 7 ] 于恒纯, 姚德海, 闫明宇. 酶联免疫吸附检测法(ELISA)在马铃薯环腐病检测中的应用 [J]. 中国马铃薯, 2003, 17(1): 44.

## Establishment of NCM-ELISA for Rapid Test of Potato Ring Rot

Hu Linshuang, Wang Xiaodan, Min Fanxiang, Guo Mei, Li Xuezhao, Bai Yanju

( Plant Virus-free Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences; Supervision and Testing Center for Virus-free Seed Potatoes Quality, Chinese Ministry of Agriculture, Harbin, Heilongjiang 150086, China )

Abstract: Establishment of NCM-ELISA and assembly of the technique into kits are helpful for testing, quarantine and epidemiology study of potato ring rot. Antiserum was prepared by rabbits with the antigen of potato ring rot, and GAR-AP was enzyme-linked secondary antibody. The results indicated that the suitable working concentration was 1:400, and the lowest testing concentration of bacterium liquid was  $1.0 \times 10^6$  bac·mL<sup>-1</sup>. The NCM-ELISA has many advantages, such as high sensitivity, better specialty, time saving, practicality and convenience, and therefore can be used for rapid testing and diagnosis of potato ring rot.

Key Words: potato; ring rot; ELISA; NCM-ELISA

