

# 酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 在马铃薯 环腐病检测中的应用

于恒纯<sup>1</sup>, 姚德海<sup>1</sup>, 闫明宇<sup>2</sup>

(1. 黑龙江出入境检验检疫局, 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江省农业广播电视学校, 哈尔滨 150036)

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2003) 01-044-01

酶联免疫吸附检测法主要用于植物病毒的检测, 但近年来也在植物细菌检测上得到了应用。其原理是将抗原及抗体的免疫反应与酶的高效催化反应有机地结合起来, 即通过化学的方法将酶和抗体结合起来, 形成酶抗体。把抗原或抗体附着于固体表面, 用结合了某种酶的特异抗体 (酶标抗体) 和抗原结合形成免疫和酶的复合物 (抗原+酶标抗体), 然后加入酶的反映底物, 酶催化无色的底物发生水解、氧化或还原反应, 生成可溶性或不可溶性的有色产物, 从溶液的颜色变化, 可以用肉眼或酶标仪判定和测定结果。

2001年, 我们应用了此方法对从田间采集到的30多个马铃薯叶片样品进行了检测, 从实际工作中我们感觉到此方法在植物细菌检测和鉴定方面都显示了其他方法无法比拟的优点。

## 1 应用的试剂

抗体免疫球蛋白和酶标抗体、碳酸盐包被缓冲液、PBS-Tween<sup>20</sup> 缓冲液、样品缓冲液、底物缓冲液、终止液。

## 2 操作过程

### 2.1 包被微量滴定板

把免疫球蛋白用包被缓冲液按 1:1000 稀释, 用微量加样器向微量滴定板的每一样品孔内加入稀释的免疫球蛋白 200  $\mu\text{L}$ 。在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件孵育 2 h, 或 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜。在进行下一步骤前用洗涤缓冲液

洗涤三次, 每次至少停留 3 min。

### 2.2 加入被检测的样品

把待测样品按编号逐个放入编好号的小研钵中, 加入样品缓冲液, 研磨后按编号把汁液逐个加入到微量滴定板的凹孔中。每个凹孔中加入 200  $\mu\text{L}$ , 然后在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培育 2 h, 或在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜。进行下一步骤前, 用洗涤缓冲液洗涤三次。

### 2.3 加酶标抗体

把酶标抗体用样品缓冲液按 1:1000 稀释, 向每一样品孔中加入 200  $\mu\text{L}$  稀释的酶标抗体。加完后, 把微量滴定板放在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培育 2 h。加底物前, 用洗涤缓冲液洗涤三次。

### 2.4 加底物

碱性磷酸酶用二乙醇胺和对-硝基苯酚磷酸钠配制; 辣根过氧化物酶用邻苯二胺和过氧化氢配制。向每一样品孔中加底物缓冲液 200  $\mu\text{L}$ , 然后在微量滴定板的下面衬一张白纸, 这便于观察底物的变化, 当阳性对照和阴性对照的颜色能够明显区分时, 加入终止液, 每个凹孔 50  $\mu\text{L}$ 。

### 2.5 结果判定

a. 目测观察: 根据底物颜色的深浅目测记录为: 深 (+++)、中 (++)、浅 (+) 和无色 (-)。

b. 用酶标仪测定滴定板的吸光值。

## 3 结 论

植物细菌传统的分离培养方法既费时, 又费力, 而且要求检验人员具有相当高的经验, 而血清学方法对植物病原细菌的检测具有特异性强、灵敏度高、方法简单易行且结果快速准确的特点, 也是目前应用于植物细菌检测较为先进的方法。

收稿日期: 2002-11-15

作者简介: 于恒纯 (1967-), 男, 高级农艺师, 现在从事植保工作。