

# 马铃薯青枯病菌的 PE-ELISA 检测

李广存<sup>1</sup>, 王秀丽<sup>1</sup>, 杨元军<sup>1</sup>, 李戌彤<sup>2</sup>, 毕玉平<sup>1</sup>, Sylvie Priou<sup>3</sup>, 王毅<sup>3</sup>

(1. 山东省农业科学院, 济南 250100; 2. 天津农科院蔬菜所, 天津 300384; 3. 国际马铃薯中心驻京办)

**摘要:** PE-ELISA (Post-Enrichment Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 是一种快速、经济、有效的马铃薯青枯菌检测方法, 较普通 NCM-ELISA 方法灵敏度提高 100 万倍, 与 DAS-ELISA、NASH 等方法一样灵敏、可靠, 特别是对处于潜伏期感染而没有表现出症状的马铃薯块茎的检测更为有效。

**关键词:** 马铃薯; 青枯病菌; NCM-ELISA; 富集培养

**中图分类号:** S532

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-0092 (2002) 01-018-03

## 1 前言

马铃薯青枯病是马铃薯的重要的细菌性病害, 仅次于晚疫病, 已成为一种世界性病害, 可通过种薯或土壤传病。早在 1978 年, 湖南新晃县的秋薯田发病面积占 33.9%, 1980 年四川彭县损失种薯 1000 万 kg, 1988 年贵州省水城县有些地块在马铃薯开花中期发病株率即达 40%。根据青枯菌对 3 种双糖和 3 种己醇的氧化利用能力, 国际上公认将青枯菌划分为 5 个生物型: I、II、III、IV、V, 但这些生物型并不一定是一个稳定的群体, 其生长

与温度、光照强度、土壤温度等生态因子和寄主植物抗性有密切关系<sup>[1]</sup>。1985 年华静月等<sup>[2]</sup>也曾对此进行了报道, 认为我国马铃薯青枯菌由生物型 II、III、IV 组成, 其中生物型 II 占绝大多数, 是我国马铃薯青枯菌的优势菌系, 最近何云昆等<sup>[3]</sup>发现云南马铃薯青枯菌存在复合侵染现象。

目前用于马铃薯青枯菌的检测方法很多<sup>[4~8]</sup>, 但这些方法有的还处于实验室阶段, 有的检测起来花费太高, 不适合发展中国家应用, 有的则灵敏度偏低或专一性不强, 特别是对于潜伏期的新近感染的植株检测起来更为困难, 为此, 国内外专家就如何提高其检测灵敏性和专一性, 同时又经济实用等进行了研究。1997 年 Gorris 等人<sup>[9]</sup>在 Elphinstone 等人<sup>[10]</sup>研究的基础上对此进行了深入的探讨: 在进行青枯菌的 NCM-ELISA 检测之前, 对青枯菌进

来稿日期: 2001-08-06

作者简介: 李广存 (1972-), 男, 山东省农科院助研, 在职研究生, 从事分子生物学及免疫学研究。

45 d (10 月 30 日) 后测定块茎的还原糖含量达到了 1 个最高值, 此后开始下降。这与前人的研究结果相一致。只是不同品种的变化幅度不同。窖贮 75 d (11 月 29 日) 后降到最低值, 然后又有所回升。由此可见, 还原糖含量的变化, 始终遵循着淀粉→还原糖→淀粉的可逆动态平衡。不同品种块茎不同时期的生理变化决定了这种平衡的状态, 而温度是直接的影响因素。室温下进行窖贮种薯的回暖处理, 对降低还原糖含量的作用是肯定的。本试验进行回暖的场所温度较低 (10~16 °C 左右), 如果能提供一个温度适宜 (如 20 °C) 且稳定的回暖空间, 块茎还原糖含量会有更为明显的下降。另外还

可以考虑适当延长回暖时间以达到更好的效果。我们可以通过进一步的试验来摸索更加适宜的条件。

## 参 考 文 献

- [1] 张建旺等. 马铃薯贮藏还原糖含量不同因素的相互关系的分析 [J]. 马铃薯杂志, 1989 (3): 144-149.
- [2] 吕文河等. 马铃薯块茎中干物质与蛋白质、维生素 C 及还原糖的关系 [J]. 马铃薯杂志, 1993 (4): 193-196.
- [3] 巩秀峰等. 马铃薯块茎干物质、还原糖含量与炸片质量的关系 [C]. 中国马铃薯研究进展. 哈尔滨工程大学出版社, 陈伊里主编, 1999: 67-70.
- [4] 郝文胜等. 几种油炸加工类型马铃薯品种贮藏期间块茎还原糖含量的变化 [C]. 中国马铃薯研究进展. 哈尔滨工程大学出版社, 陈伊里主编, 1999: 71-76.

行了富集培养, 取得了良好的效果, 1999 年国际马铃薯中心科学家 Priou<sup>[11]</sup> 博士对此进行了再发展, 并使其更为简便、经济有效, 同时更加灵敏, 专一性更强, 此方法即 PE-ELISA。所有的 Rs (*Ralstonia solanacearum*) 小种, 生化变种和血清型都能通过 Rs 特异性抗体进行检测。因此该方法不仅可用于检测薯块上的青枯菌和评价品种对青枯菌的抗性, 而且对于研究青枯病的流行病学 (Rs 存活和传播) 具有重要意义。

## 2 原理

PE-ELISA 是在普通 NCM-ELISA<sup>[12]</sup> (硝酸纤维素膜酶联免疫吸附测定) 的基础上增加了样品 (青枯菌) 提取液的富集培养过程, 是 NCM-ELISA 的延伸和发展, 也是一种免疫酶分析法, 它同样用硝酸纤维素膜取代微量滴定板作为样品和试剂的支持物, 同双抗体夹心 ELISA 一样灵敏, 且更为简便。青枯菌的蛋白可作为一种抗原, Rs 特异性抗体可与青枯菌的菌体蛋白特异结合。由于羊抗兔抗体是通过 Rs 特异性兔抗体免疫山羊而获得的, 因此羊抗兔抗体即可与 Rs 特异抗体复合物 (RsAb-Rs) 特异结合, 而这种羊抗兔抗体带有标记酶, 当加入相应底物后, 酶与底物反应而显示出颜色。颜色的深浅与样品中青枯菌的浓度成正比。其基本步骤分为: ①点样: 点样前需将样品进行处理 (富集培养); ②封闭膜上没有样品的区域; ③抗体与抗原的结合; ④酶标抗体与抗体-抗原复合物的结合; ⑤酶催化底物反应显色。

## 3 实验方法

### 3.1 样品提取与富集

#### 3.1.1 块茎样品

用流动水冲洗块茎, 并在 1% 次氯酸钠 (NaOCl) 中浸泡 5 min, 晾干, 从块茎顶部切下一个薄片, 并用去皮器取约 3 mm × 3 mm (每个块茎不超过 0.5 g) 的一小片维管环, 放入塑料袋并称重, 加入适量无菌柠檬酸钠提取缓冲液 (0.1 mol/L 柠檬酸钠, 0.1 mol/L 柠檬酸, pH 5.6), 研碎后垂直放在碎冰上 (不超过 1 h), 避免酚氧化。

#### 3.1.2 茎样品

从底部 (如果萎蔫刚刚开始) 或顶端区域 (如果症状严重) 切下约 3 cm 组织, 放入装有 5 ml 蒸

馏水的管中。室温孵育 30 min。细菌液即从导管中渗出。最终浑浊的水相悬液可被直接当作样品 (20 μl) 用于膜上 (不经过富集)。

#### 3.1.3 富集过程 (48 h)

用微量移液器 (使用无菌吸头) 或无菌吸管分别吸取 500 μl 改良 SMSA (M-SMSA)<sup>[11]</sup> 和 500 μl 样品提取液, 加入灭菌的 eppendorf 管中, 30 °C 振荡孵育 48 h 后点样, 室温风干 60 min 并作以标记。

## 3.2 血清学检测

### 3.2.1 封闭

将膜缓慢浸入盛有 30 ml 封闭溶液 (2% 脱脂奶粉, 0.02 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L NaCl, pH 7.5)、直径 15 cm 的培养皿中, 避免形成气泡。缓和摇动孵育 1 h。

### 3.2.2 Rs 抗体结合

弃去封闭液, 用 TBS (0.02 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L NaCl, pH 7.5) 冲洗 3 次, 每次 3 min, 然后加 30 ml 抗体溶液 (按 1:300 稀释) 于培养皿中, 加盖后缓和摇动孵育 2 h 或过夜。

### 3.2.3 Rs 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 Tris-HCl, 0.05 mol/L NaCl, pH 7.5) 洗涤 3 次, 每次 3 min, 洗去未结合的 Rs 抗体。在最后一次洗涤时配制酶标抗体液 (酶杯抗体按 1:500 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。

### 3.2.4 显色反应 (酶促反应)

弃去酶标抗体溶液, 用 T-TBS 洗膜 3 次, 每次 3 min, 将未结合酶标抗体洗去。弃去最后一次的洗涤液, 加入显色反应液 (0.1 mol/L Tris, 0.1 mol/L NaCl, 0.005 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 5% NBT, 2.5% BCIP)。显色 5~20 min; 查看阴性对照所表现出的紫色, 以确定何时应停止反应。30 min 后将开始出现非特异性反应。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。

## 4 讨论

### 4.1 富集培养与样品制备

对于处于潜伏期感染而没有表现出症状的马铃薯块茎的检测, 进行 NCM-ELISA 之前, 必须先通过在半选择性肉汤 (改良 SMSA) 中进行富集培

养, 富集培养时间以 48 h 为宜, 这样可将此法的灵敏度提高 100 万倍。少至每毫升提取物中 10 个细菌都能被检出, 而不经富集的只有当青枯菌浓度达  $10^6 \sim 10^7$  bact./ml 时才能被检出。说明样品提取物中的青枯菌经富集培养后可百万倍增长, 同样其它杂菌在改良的 SMSA 培养基中与青枯菌一样也可大量增殖, 当杂菌太多时将直接影响青枯菌的检测。因此在制备样品时一定要注意无菌操作, 由于该方法较普通 NCM-ELISA 灵敏度提高 100 万倍, 因此, 该方法不仅对于具有严重症状的马铃薯块茎检测有效, 对于新近感染的无症状马铃薯块茎及土壤样品的检测仍然有效。

在富集培养过程中加以缓和震荡, 有利于青枯菌的大量增殖, 静置培养青枯菌的增殖总数要比加以震荡的至少要低 1~2 个数量级。因此, 在进行富集培养时, 有条件的最好使用摇床或类似设备, 无条件的可在培养过程中手动摇荡数次, 以求获得良好的效果。

纯化培养时当菌体浓度大于或等于  $10^8$  bact./ml, 某些腐生细菌可能会与  $R_s$  抗体进行交叉反应。但在富集培养块茎提取物后通过抗血清的免疫吸附作用可以消除这种交叉反应。

#### 4.2 血清学检测

PE-ELISA 是普通 NCM-ELISA 方法的发展, 因此与普通 NCM-ELISA 一样, 取用硝酸纤维素膜时应戴手套或用镊子, 手纹会造成假阴性。点样时移液枪头不要与膜接触, 点样后的硝酸纤维素膜可保存数周后继续进行实验或将膜寄往他处进行实验而不影响其实验效果。显色温度以 22~25 °C 为宜, 温度过高, 显色反应太快, 影响结果观察; 温度过低, 显色反应太慢, 容易出现假阳性。显色后的结果在硝酸纤维素膜上稳定并可良好时间保存。

#### 4.3 pH 值

pH 值是影响检测结果的重要因素。由于各地的条件不同, 所使用的蒸馏水或去离子水的酸碱度也会有所差异, 因此配制出缓冲溶液的酸碱度也不尽相同, 有时会相差很大, 特别是在配制底物缓冲液时, 最好用高纯度蒸馏水, 并用酸度计调 pH 值, 底物缓冲液的 pH 值以 9.6 为宜, 偏酸或偏碱都将影响显色反应。

#### 4.4 结果判定

阳性样品使酶反应呈紫色, 颜色深浅程度的变

化取决于样品中青枯菌的浓度。因此, 阳性对照 (含有浓度为  $10^8$  bact./ml 的柠檬酸缓冲液) 应为深紫色, 而浓度为  $10^6$  bact./ml 的稀释对照应为浅紫色。浓度为  $10^5$  bact./ml 的对照应为无可见的颜色反应, 因为在细菌不经富集的方法中, 这个浓度低于检测极限。只有那些颜色与阳性对照 (浓度为  $10^8$  bact./ml 和  $10^7$  bact./ml) 一样深的样品才被认为是阳性。不论是浅紫色 (与浓度  $10^6$  bact./ml 对照一样或更浅)、绿色或棕色 (块茎或茎的提取液的颜色) 都判为阴性。

### 参 考 文 献

- [1] Hayward, AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*, *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65-87.
- [2] 华静月等. 我国马铃薯青枯菌菌系和初步研究 [J]. 植物病理学报, 1985, 15 (3): 181-184.
- [3] 何云昆等. 云南省马铃薯青枯病菌生物型研究 [J]. 西南农业学报, 1999, 12 (4): 78-81.
- [4] 陈永芳. 我国植物青枯菌的遗传多样性和马铃薯青枯菌的 PCR 检测技术研究. 中国农业科学院研究生院. 北京: 2000, 51.
- [5] Black R. et al. Developing appropriate detection methods for developing countries. In *Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects* (eds Priou P. et al.), 1998, 128-132.
- [6] Cook D & Sequiera L. The use of subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race<sup>3</sup>. *Molecular and General Genetics*, 1991, 227, 401-410.
- [7] OEPP/EPPO. EPPO Standards PM3/26. Phytosanitary procedures. *Pseudomonas solanacearum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 1990, 20: 255-262.
- [8] Seal S. E. et al. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt; the Disease and its causative Agent Pseudomonas solanacearum* (eds Hayward AC & Hartman GL), 1994, 35-58.
- [9] Gorris MT. et al. Improvement of sensitivity of serological and molecular techniques for detection of *ralstonia solanacearum* by selective enrichment media. *Fitopatologia*, 1997, 33, 32.
- [10] Elphinstone, J. G., J. Hennesy, J. K. Wilson and D. E. Stead. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in potato tuber extracts. *EPPo/OEPP Bulletin*, 1996, 26: 663-678.
- [11] Priou, S., L. Gutarra and P. Aley. Highly sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latterly infected potato tubers by post-enrichment enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrane. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 1999, 29: 117-125.
- [12] Salazar LF. Serological methods for virus detection. In *potato viruses and their control*, 1996, 113-132. *International Potato Center, Lima (PE)*.