

用酶标记抗体免疫定位检测马铃薯环腐病

何云霞 李学湛 吕典秋 白艳菊

(黑龙江省农科院生物技术研究中心 哈尔滨 150086)

1 前言

马铃薯环腐病 (*Clavibacter michiganensis* Subsp. *sepedonicum*) 是一种严重危害马铃薯输导系统的细菌性病害, 各国都把它列为重要植物检疫对象。它主要以带病种薯传播蔓延; 因此, 寻找一种简易、快速、准确的鉴定和检验方法, 确保核心种薯不带病菌, 是目前国内外都在研究解决的问题。

多年来, 国内外有关专家学者尝试建立各种检测马铃薯环腐病的方法, 如茄苗接种鉴定技术、免疫荧光抗体技术、酶联免疫吸附试验、DNA 核酸杂交、PCR 检测环腐病技术等等。由于以上检测手段有的需特定仪器, 有的需特定条件; 有些方法程序繁杂, 可操作性低, 不太适合一般常规检测工作应用。我们对检测环腐病的各种方法进行了比较研究, 尝试在革兰氏染色阳性反应的基础上应用酶标记抗体免疫定位技术^[1], 使待测样品再进一步与马铃薯环腐菌的辣根过氧化物酶标记抗体反应, 以定位涂片中马铃薯环腐细菌, 经普通光学显微镜镜检可以直观地看到待测样品中环腐细菌的含量。

2 材料与方法

2.1 马铃薯环腐细菌抗血清的制备^[2]

应用中国农科院植保所提供的马铃薯环

腐病细菌培养物的完整细胞免疫家兔获得马铃薯环腐细菌抗血清。

(1) 将 YGM 液体培养基中对数增长期 (36~48 h) 的菌液用 8000 r/min 离心 10 min, 收集细菌, 用灭菌盐水洗涤 3 次。

(2) 将菌液浓度调到 OD_{660 nm} = 1.0, 即 1 亿个细菌/ml 作为免疫用细菌悬浮液。

(3) 用 3 份细菌悬浮液配 1 份福氏不完全佐剂进行注射, 左、右腿各注射 1 ml 细菌, 共进行 3 次肌肉注射, 每次间隔一周; 然后进行两次静脉注射 (不加佐剂), 最后一次注射一周后放血。

(4) 用凝集反应测定抗血清的效价为 1:512。

2.2 辣根过氧化物酶酶标记抗体的制备

用过碘酸钠法以辣根过氧化物酶标记从马铃薯环腐细菌抗血清中提取 IgG, 制备成酶标记抗体; 酶标抗体的工作浓度为 1:1000。

2.3 待测样品的制备

(1) 应用早大白品种作为试验材料, 切开脐部观察症状, 根据感病程度不同, 分为轻、中、重三个级别, 各取薯块 5 个; 另取健康薯块作对照。用中国农科院植保所提供的马铃薯黑胫、软腐培养物作参考对照。

(2) 切下薯块脐部的维管束附近组织约 1 cm³, 加 1 ml 无菌水研磨, 过滤后滴一滴汁液制备涂片, 每一样制备 2 张涂片, 风干 (不要热固定以免破坏细菌抗原性)。留 1 份汁液作酶联免疫吸附试验。

(3) 将马铃薯黑胫、软腐细菌用无菌水

稀释，制成2张涂片，留一些菌液作酶联免疫吸附试验用。

(4) 将一张涂片先作革兰氏染色。具体步骤如下：①滴1滴龙胆紫与碳酸氢钠等量混合液（现用现配）于涂片上，染色20 s；②滴1滴碘媒染液媒染20 s，滴水洗涤；③滴1滴乙醇、丙酮脱色液，脱色5~10 s，滴水洗涤；④滴1滴碱性品红溶液复染2~3 s，滴水洗涤，风干。

2.4 应用酶标抗体免疫定位

(1) 在上述制备的两张涂片（其中一张已经革兰氏染色）上各滴1滴稀释的马铃薯环腐细菌酶标抗体，在室温潮湿条件下反应30 min。

(2) 用PBS-Tween²⁰洗两次，每次10 min。

(3) 用底物DAB染色6~8 min。

(4) 用0.05 M pH 7.6的Tirs-HCl缓冲液洗30 min。

(5) 风干后用普通光学显微镜镜检，抗原部位呈现棕黄色，为酶水解底物产物的颜色。

2.5 酶联免疫吸附试验⁽³⁾

以常规双抗体夹心法检测待测样品液、黑胫细菌和软腐细菌。

3 结果与分析

3.1 革兰氏染色

感病样品经革兰氏染色后视野内大部分菌体被染成紫色（环腐菌为革兰氏阳性呈紫色），其中一部分感病重的薯块样品内可见到少量红色菌体，说明已经被黑胫、软腐等细菌复合侵染。感病程度不同的薯块样品内的紫色菌体的数量也不同，感病重的紫色菌体数量多，感病轻的样品内紫色菌体数量也少。外观健康薯块5个样品中的3个样品各含有少量紫色菌体，说明有些没有表现症状

的薯块已被环腐细菌潜伏感染。革兰氏染色呈阳性，只能说明样品中含有革兰氏阳性细菌，再与酶标抗体结合，加DAB底物后染成棕黄色，证明这一革兰氏阳性反应的细胞确实是马铃薯环腐细菌。黑胫、软腐是革兰氏阴性细菌，被染成红色。

3.2 酶标记抗体免疫定位

革兰氏染色后的涂片再滴加环腐细菌酶标记抗体，最后加入DAB底物后可以看到在原来的紫色的菌体上面覆盖了一层棕黄色，可以确认是环腐细菌。没经革兰氏染色直接滴加环腐细菌酶标记抗体的涂片，其视野内可见清晰的棕黄色细菌团。对比两张涂片，其棕黄色面积大小相似；且轻、中、重薯块样品中棕黄色面积也相应为少、中、多。外观健康薯块中的2个样品，经革兰氏染色后未显现紫色，经酶免疫定位也未显现棕黄色，其它3个革兰氏阳性反应样品中的2个样品，经酶免疫定位后显现棕黄色，可初步认为是被环腐细菌潜伏侵染，另外1个显现紫色反应的样品滴加酶标抗体后没有被染成棕黄色，可以认为这一样品虽然是革兰氏阳性细菌，但不是马铃薯环腐细菌。黑胫、软腐细菌经酶免疫定位后均未显现棕黄色，其菌体仍然保持原来的红色。

3.3 酶联免疫吸附试验

感病待测样品经用酶联夹心法检测后，其490 nm吸光值均能相应反应出薯块环腐病症状的轻、中、重3个级别。5个外观健康薯块样品均属于轻微的不同程度的阳性反应，这一点与上述两步结果稍有出入，这可能是前两步中受显微镜放大倍数（800倍）以及人辨别能力的限制已着色的部分没有观察到或分辨不清。

4 讨论与结论

应用革兰氏染色基础上的酶免疫定位技

R-PAGE 胶板的干燥方法

刘卫平

(黑龙江省农业科学院马铃薯研究所 克山 161606)

1 前言

马铃薯纺锤块茎类病毒 (potato spindle tuber viroid) 是一种严重危害马铃薯生产的类病毒, 降低产量 20%~30%。防治的主要措施是应用无病毒种薯。由于目前还没有脱掉类病毒的有效措施, 只能从未被饱和和感染的群体中鉴定筛选出未被感染的个体, 再脱掉其它病毒, 作为核心材料。为了能够筛选出更多的无马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 的个体, 确保种薯生产和无毒化育种的质量, 必须加强马铃薯纺锤块茎类病毒的检测工作。目前我们采用的检测马铃薯纺锤块茎类病毒的方法是往复一聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (R-PAGE), 该方法快速、准确、灵敏。每次试验的检测结果均用“+”、“-”表示该材料有无马铃薯纺锤块茎类病

毒。为了能够记录检测结果, 给以后的工作提供依据、方便, 对于可以直接反应检测结果的电泳凝胶板除了照相外, 我们可把凝胶板制成干板, 干板上可以反映被检测材料有无类病毒、类病毒的含量。

2 电泳凝胶板的干燥方法

2.1 自然干燥法

往复聚丙烯酰胺凝胶经 100% 乙醇和 0.5% 乙酸混合液固定 2 次, 每次 10 min; 经 0.2% 硝酸银溶液染色 15 min; 经蒸馏水洗涤 5 次每次 30 s; 经硼氢化钠和氢氧化钠、甲醛 (37%) 混合液还原显影 10~15 min, 经 0.75% 的碳酸钠溶液浸泡保护后, 把凝胶从保护液中拿出放在高: 宽: 厚 = 16: 14: 0.15 cm 的玻璃板上, 在室温条件下自然干燥, 避免太阳光直射, 尽量保持电泳凝胶板完整, 防止有裂痕, 如有裂痕, 凝胶板就随

收稿日期: 1998-00-00

术检测马铃薯环腐病比较直观, 简便, 易行, 操作周期短 (2 h 可出结果), 专业化较强, 尤其适合少量样品检测, 不失为一种较好的技术方法, 其灵敏度与酶联免疫吸附试验的灵敏度相似。另外, 两张涂片对比, 没有经革兰氏染色的酶免疫定位后的颜色清晰容易辨认, 经革兰氏染色后的涂片酶免疫定位后的颜色没有前者清晰, 所以一个样品可以制备两张涂片, 或只用酶标抗体免疫定位技术检测。

中国农科院植保所何礼远、谢云陆两位老师提供菌种并作技术指导, 本所崔荣昌先生帮助修改文稿, 并提出一些有益的建议, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 陶义训. 临床免疫学检验 (下册). 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 131~133
- [2] 何礼远译. 植物病原细菌的分类鉴定. 植物病理学译丛, 1980, (3): 27~28
- [3] 谢云陆, 何礼远. 马铃薯环腐病种薯检验技术程序. 植物保护, 1987, (4): 31~32