

# 应用间接酶联免疫吸附试验 检测马铃薯环腐病

谢云陆 何礼远

(中国农业科学院植物保护研究所)

## 摘 要

用马铃薯环腐菌菌株 NCPPB2140 和 HEC<sub>1</sub> 免疫家兔得到效价 1:2048 的抗血清。通过硫酸铵沉淀法和 DE52 柱层析提取免疫球蛋白(IgG)。应用间接 ELISA 检测了马铃薯环腐菌及其供试样品。结果表明:免疫球蛋白最适浓度为 5~10 μg/ml, 酶标记羊抗兔结合物的最适稀释度为 1:75~100, 检测环腐菌的灵敏度为  $2 \times 10^5$  CF<sub>μ</sub>/ml, 用 NCPPB2140 和 HEC<sub>1</sub> 的 IgG 同马铃薯黑胫病菌、软腐病菌和青枯病菌等不发生反应, 用间接 ELISA 可以检出轻度感病或受其它细菌二次感染腐烂的环腐病薯块。

马铃薯环腐病 *Corynebacterium michiganens* Pv. *Sepedonicum* (Spieck. & Kotth.) Dye 是我国对内重要植物检疫病害之一。目前常用的检验方法主要有症状观察、革兰氏染色和病原培养鉴定等。但当感病较轻或与其它病害混合感染时就往往难以准确鉴定, 而且上述检验程序需要时间较长。为此, 寻找一种准确、快速、简便易行的检测方法是当前马铃薯种薯繁育生产中迫切需要解决的问题。

酶联免疫吸附试验(ELISA)是70年代发展起来的一项新的血清学技术。Clark等(1977)首先用ELISA技术测定植物病毒, 并提出完整的检测程序<sup>[3]</sup>。Vrugink(1978)用它检测植物病原细菌获得成功<sup>[4]</sup>。

本文报告我们应用间接ELISA方法检测马铃薯环腐病菌及其感病薯块的结果, 肯定了这一方法可作为种薯检验的重要技术环节。

## 材 料 和 方 法

### 一、抗血清制备

(一) 免疫动物为北京大耳白健康成年雄兔, 体重 2~3kg, 免疫前试血, 自然抗体为阴性。

(二) 免疫抗原选用具有致病力的 NCPPB2140 和 HEC<sub>1</sub> 两个菌株(详见表1)。

抗原细菌在酵母膏、蛋白胨、葡萄糖琼脂培养基上培养 5 天, 用灭菌生理盐水洗下制成菌悬液, 离心 (1000r/min) 10 分钟, 收集沉淀物, 用灭菌生理盐水洗涤离心 3 次, 最后用生理盐水配成  $5 \times 10^{10}$  CF<sub>μ</sub>/ml 的菌悬液, 供免疫用。

(三) 免疫注射程序: 第 1、2 次注射量为 0.5ml 和 1ml, 加等量福氏不完全佐剂, 采用肌肉注射, 间隔时间为 1 周。以后每次注射递增 0.5ml, 均为耳静脉注射, 间隔时

表 1. 供试菌种的来源

菌株号	来源
HEC <sub>1</sub>	从黑龙江省农科院马铃薯研究所病薯分离
HC <sub>1</sub>	从河北省坝上农科所病薯分离
QC <sub>1</sub>	从青海省农科院植保所病薯分离
JC <sub>1</sub>	农牧渔业部植物检疫实验所保存菌株
ZC <sub>1</sub>	中国农科院植保所检疫组保存菌株
NCPBP2140	英国国立植物病学细菌保藏中心 环腐菌菌株
CS171	西德联邦生物研究院 Zeller 博士提供的法 国环腐菌菌株
E.C.C.	西德联邦生物研究院 Zeller 博士提供的马 铃薯软腐菌菌株
E.C.A.	西德联邦生物研究院 Zeller 博士提供的马 铃薯黑胫病菌株
PO45	我室分离保存的马铃薯青枯病菌株
BAC.	北京农业大学植保系生防室提供的枯草孢 杆菌

间4天。第7次注射后,进行1次强化免疫。应用耳静脉和心脏采血,以试管凝集法测定效价。抗血清的滴度为1:2048,抗血清中加0.01%叠氮化钠,放于冰箱中保存备用。

### 二、免疫球蛋白(IgG)的提取

取抗血清2ml,加蒸馏水18ml,然后滴加饱和硫酸铵20ml,在室温下放置30分钟,4℃下,以8000r/min离心10分钟,弃上清液,用4ml PBS缓冲液(0.01M pH 7.4)溶解,装入透析袋内,在500ml半浓度PBS里于4℃冰箱中透析3次,每次3小时,将上述透析液通过DE52纤维素层析柱,并用半浓度PBS淋洗,分管收集流出物,将各管分别在紫外分光光度计280(nm)波长下测定光密度值,调节光密度直到1.4,即相当于IgG浓度1mg/ml,经分装后,于-20℃保存备用。

### 三、试验材料

采用上海产501型酶标比色计,滴定板为天津产40凹孔聚苯乙烯微量反应极,辣根

过氧化物酶标记羊抗兔结合物为北京生物制品研究所产品。所用溶液有包被溶液(0.1M pH9.5 碳酸盐缓冲液),洗涤溶液[0.02M pH 7.2 PBS(含0.05%吐温20)],稀释溶液(牛血清白蛋白用洗涤溶液稀释成0.1%),底物溶液(成分为1%联大茴香胺无水甲醇溶液1.7ml,0.01M pH 6 PB 100ml,30%过氧化氢10ml)和终止溶液(5N盐酸)。

### 四、测定方法

(一)间接ELISA试验基本按照朱培坤及文献[2,3]进行。

(二)间接免疫荧光技术(IFAS)和琼脂双扩散(ODD)检测法参照文献[1]。

## 试验结果

### 一、最适免疫球蛋白的浓度测定

固定环腐菌HEC<sub>1</sub>抗原浓度为 $2 \times 10^7$  CF<sub>μ</sub>/ml,阴性对照抗原为马铃薯青枯病菌PO<sub>45</sub>,辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物工作浓度采用1:50,对一系列稀释的2~20 μg/ml抗HEC<sub>1</sub>免疫球蛋白进行反应,加入联大茴香胺底物溶液后,测波长405nm的光密度值。结果表明:间接ELISA反应所需免疫球蛋白适宜浓度为5~10 μg/ml(详见表2)。

### 二、最适辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物工作浓度的选择

包被环腐菌HEC<sub>1</sub>抗原浓度为 $2 \times 10^7$  CF<sub>μ</sub>/ml,阴性对照抗原为马铃薯青枯病菌PO<sub>45</sub>。每ml含5 μg的免疫球蛋白用于吸附抗原。对50~150倍一系列稀释度的辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物进行间接ELISA试验,测定波长405nm的光密度值。结果证明,辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物的稀释度以1:75~100为适宜。为了防止非特异性,辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物可选用1:100为工作浓度。

表 2. 免疫球蛋白适宜浓度的选择

反应条件	1	2	3	4	5	6	空白对照	阳性对照
包被抗原 (CF $\mu$ /ml)	2 $\times$ 10 <sup>7</sup>							
免疫球蛋白 ( $\mu$ g/ml)	20	10	5	3.3	2.5	2	10	10
羊抗兔酶标结合物 (稀释度)	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
颜色反应	桔红	桔红	桔红	浅桔红	浅桔红	微红	无	微红
光密度值 (波长405nm)	1.00	0.96	0.96	0.89	0.72	0.64	0	0.36

### 三、特异性测定

应用抗 NCPPB2140 和 HEC<sub>1</sub> 血清制备的免疫球蛋白, 分别与 2 $\times$ 10<sup>8</sup>CF $\mu$ /ml 浓度的 5 个环腐菌菌株, 以及马铃薯上其它病原细菌和非致病菌进行反应, 结果见表 3。

表 3. 间接 ELISA 对环腐菌特异性的测定

被检抗原	光密度值 (波长 405nm)	
	NCPPB2140 IgG	HEC <sub>1</sub> IgG
NCPPB2140	0.675	0.495
C171	0.650	—
HEC <sub>1</sub>	0.655	0.490
HC <sub>1</sub>	0.615	0.475
QC <sub>1</sub>	0.675	0.440
PO45	0.345	0.210
E.C.C.	0.100	0.200
E.C.A.	0.240	0.210
ZC <sub>1</sub>	0.035	0.170
JC <sub>1</sub>	0.165	—
BAC.	0.050	0.195
	0.000	0.000

试验证明, 用上述两种免疫球蛋白 5 $\mu$ g/ml 可以分别检出不同来源的环腐菌菌株, 而马铃薯上其它病原细菌及非致病菌均呈阴性反应。

### 四、灵敏度测定

采用适宜的免疫球蛋白浓度 5 $\mu$ g/ml 和酶标记羊抗兔结合物工作浓度 1:100, 对每 ml 含不同菌量的环腐菌 HEC<sub>1</sub> 进行间接 ELISA 反应。试验表明, 应用间接 ELISA 可以检出抗原最低浓度为 2 $\times$ 10<sup>5</sup> CF $\mu$ /ml,

比琼脂双扩散法 (ODD) 灵敏度高 1000 倍, 是间接免疫荧光 (IFAS) 的灵敏度的十分之一。

### 五、应用间接 ELISA 试验检测马铃薯样品

供试环腐病薯块样品均为轻度感病, 症状不明显或受其它细菌再侵染的腐烂薯块, 由黑龙江省马铃薯研究所和河北省坝上农科所提供。青枯病薯块采于河北省坝上农科所。软腐病薯块和感环腐菌的茄苗均为人工接种所得。先将每份供试样品洗净, 从薯脐处取样 25g, 切成小块, 加 50ml PBS-吐温 20, 然后用高速组织匀浆器 (20000r/min) 将薯块粉碎匀浆, 室温静置 30 分钟, 抽滤 (滤纸型号 102, 中速), 将滤液在 10000r/min 下离心 10 分钟, 弃上清液, 取沉淀物一半, 用 3ml 包被溶液配成悬液作间接 ELISA 用, 另一半存于冰室作 IFAS 检测。

试验于 40 凹孔聚苯乙烯微量反应板上进行, 抗 HEC<sub>1</sub> 免疫球蛋白浓度为 5 $\mu$ g/ml, 酶标记结合物工作浓度为 1:100, 加联大茴香胺底物溶液后, 置 37 $^{\circ}$ C 下 30 分钟, 以 50 $\mu$ l 5N 盐酸终止反应, 于酶标比色计 405nm 波长下测定光密度值, 检测结果见表 4。结果表明, 应用间接 ELISA 方法可以把轻度感病或受其它细菌再侵染的腐烂环腐病薯块检测出来, 而青枯病薯和软腐病薯均呈阴性反应。采用 IFAS 检测时所得结果基本相同。

表 4. 应用间接 ELISA 检测

马铃薯薯块样品

薯 块 样 品	间接 ELISA (光密度值)		IFAS (细菌数/视野) <sup>1)</sup>	
	1	2	1	2
轻度感病 1 块	0.60	0.57	>50	>50
轻度感病 2 块二次感染	0.80	0.74	>100	>100
症状明显 1 块二次感染	0.85	0.68	>100	>100
腐烂病薯 1 块轻度感病	0.63	0.83	>100	>100
茄苗叶片 1 片	0.523	0.46	>50	>50
青枯病病薯 1 块	0.125	0.115	<2	<2
软腐病薯 1 块	0.14	0.138	<2	<2
健薯 1 块	0.13	0.15	0	0
NCPB2140 2 × 10 <sup>7</sup> CF <sub>u</sub> /ml	0.675	0.65	>100	>100
空白对照	0	0	0	0

1) 将原液以 10 倍稀释 3 个浓度后制片, 应用 Leitz 万能显微镜观察, 激发光源为 BP450—490, 放大倍数 6.3 × 100 × 1.5.

## 结 论 与 讨 论

应用抗 HEC<sub>1</sub> 免疫球蛋白 5μg/ml, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物工作浓度 1:100. 间接 ELISA 试验最检出马铃薯环腐菌的浓度为 2 × 10<sup>5</sup>CF<sub>u</sub>/ml, 这一方法的特异性能, 可将马铃薯上其它病原细菌和非致病菌明显区别开。

通过间接 ELISA 试验检测马铃薯样品, 可以把轻度感病和受其它细菌二次感染而腐烂的环腐病病薯检出。

间接 ELISA 试验的灵敏度比琼脂双扩散高 1000 倍。这一方法虽只为间接免疫荧

光技术灵敏度的十分之一, 但特异性比后者强。间接免疫荧光技术在样品带菌量大的情况下, 因抗原过剩, 常出现假阴性, 同时此法与马铃薯软腐菌和黑胫病菌产生弱反应, 易受干扰, 而且还需配置荧光显微镜, 不易普及。

由于细菌菌体较大, 固相载体吸附能力比病毒差, 因而采用间接 ELISA 检测马铃薯环腐病在灵敏度上有一定影响, 这有待今后进一步改进组合, 或制备更具有特异性和高效价的抗环腐菌单克隆抗体, 以提高对环腐菌的检出能力。

本试验曾得到河北省坝上农科所郭振国、刘锡香同志和黑龙江省农科院马铃薯研究所暴成光、李其文同志提供的环腐病薯块样品, 在此深表感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 北京医学院微生物学教研组:《实验免疫学》, 人民卫生出版社, 1981, 275—285。
- [2] 朱培坤:《免疫酶技术》, 山东科学出版社, 1983, 65—71; 109—112。
- [3] Clark, M. F. & A. N. Adams: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 1977, 34: 475—483.
- [4] Vrugink, H.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact.* (Angers, 1978).

(上接54页)

为 -0.841。图 2 是“男爵”还原糖含量与薯片 L 值的相关图, 相关系数为 -0.836。全糖含量与薯片糖粉末 L 值的相关系数, “麦克因”为 -0.780, “男爵”为 -0.791。认为: 非还原糖含量与薯片褐变的相关程度没有还原糖大。糖含量在 2g/100g 以下时,

与褐变的相关更为密切。“麦克因”的还原糖含量 <2g/100g, 相关系数为 -0.925, 全糖含量 <2g/100g 时, 为 -0.905, 均显示了高的相关。糖含量超过 2%, 对褐变的影响程度不大。

(于广建、宋亚平译)

# STUDY ON THE DETECTION OF BACTERIAL RING ROT OF POTATOES BY INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Xie Yunlu He Liyuan

(Institute of Plant Protection, Academy of  
Agricultural Sciences, Beijing)

## ABSTRACT

Rabbit antisera were produced against whole cells of *Corynebacterium michiganis* pv. *sepedonicum* (C. s.). The titer of antisera obtained were 1:2048. The Immunoglobulin (IgG) was extracted and purified by the ammonium sulfate precipitation method and DE52 chromatography. Goat antirabbit conjugated with horseradish peroxidase was obtained commercially. Antigen preparations were saline suspensions of washed cells from pure culture of C. s. or extracts of infected seed potatoes. The indirect ELISA method was used in detection experiments. The results showed that the most appropriate concentration of the antibody was 5—10 $\mu$ g/ml and the optimal dilution of the labelled antibody was 1:75—100. The sensitivity of indirect ELISA in detecting C. s. was  $2 \times 10^5$  CFU/ml, which was 10000 times higher than that of the Ouchterlong double diffusion (ODD) test. No positive reaction in indirect ELISA occurred with antigen preparations from several strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Pseudomonas solanacearum* and *Bacillus subtilis*. The ring rot in latent infection or in badly decayed tubers was successfully detected by indirect ELISA.

## · 敬 告 作 者 ·

本刊主要开设如下栏目:《学术研究》、《研究简报》、《文献综述》、《经验交流》、《学术争鸣》、《科技信息》、《考察、调查报告》、《讲座》、《译文》、《品种介绍》。请作者按如上栏目内容,踊跃为本刊撰稿、投稿。

本刊编辑部