

自制和进口试剂盒检测马铃薯环腐病的比较研究

闵凡祥, 胡林双, 王晓丹, 郭 梅, 李学湛, 白艳菊, 马 纪
(黑龙江省农科院植物脱毒苗木研究所, 哈尔滨 150086)

摘要:采用自制 NCM-ELISA 试剂盒和进口 DAS-ELISA 试剂盒进行马铃薯环腐病检测试验。比较发现:强化后的自制 NCM-ELISA 试剂盒不仅同进口 DAS-ELISA 试剂盒一样灵敏,而且价格低廉,且简便、快捷。自制 NCM-ELISA 试剂盒可以将点样后的硝酸纤维素膜存储数周,然后再继续实验,具有便于携带利于推广的优点。而且自制 NCM-ELISA 试剂盒在检测前,进行富集培养,与进口 DAS-ELISA 试剂盒相比将灵敏度提高 100 万倍,并且避免假阳性反应发生。因此 NCM-ELISA 试剂盒完全可以取代进口 DAS-ELISA 试剂盒。

关键词:马铃薯环腐病; NCM-ELISA; DAS-ELISA

中图分类号: S 435.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2007)05-0057-03

Comparison Study of the ELISA Kit Made in China and USA for Detecting Potato Ring Rot

MIN Fan xiang, HU Lin shuang, WANG Xiao dan,
GUO Mei, LI Xue zhan, BAI Yan ju, MA Ji

(Virus free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Applying NCM ELISA Kit and DAS ELISA Kit to Detect Potato Ring Rot was compared. The results showed that the intensifying NCM ELISA was as sensitive as the DAS ELISA, but also cheap, inconvenient and rapid. It had another important advantage, that was, the nitrocellulose membrane with the samples could be stored for several weeks before continuing with the test. The membrane could also be sent to another laboratory that could perform the assay, and it was easier and quicker before performing the NCM ELISA, an enrichment procedure must be carried out by incubating the tuber extracts in a semi selective broth (modified SM SA). This method increased the sensitivity by almost 1 million higher than DAS ELISA Kit, and avoided artificial positive reaction. Therefore, NCM ELISA Kit could replace DAS ELISA Kit.

Key words: Patato Ring Rot; NCM-ELISA technique; DAS-ELISA technique

马铃薯环腐病(Potato Ring Rot)是由密执安棒形杆菌环腐亚种(*Clavbacter michiganens subsp sepedonicum*; 简称 CMS)引起的一种危害输导系统的细菌性病害。马铃薯环腐病是世界性病害,现已遍及整个马铃薯产区^[1,2]。马铃薯受环腐病危害后,常造成植株严重萎蔫,甚至死亡,对产量影响较

大,发病重的地块可减产 30%~60%^[3]。贮运期间可加重该病发生,大大降低商品价值,常造成块茎大量腐烂,甚至烂窖。该病主要传播途径是通过种薯进行传播,被世界各国列为重要的进出口植物检疫对象^[4]。因此,研究马铃薯种薯中微量环腐菌的检测方法是十分必要的,对于保证马铃薯各级种薯、商

收稿日期: 2007-06-20
基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(2004C0307)
第一作者简介: 闵凡祥(1980—),男,黑龙江嫩江县人,学士,研实,主要从事马铃薯真细菌病害研究。E-mail: minfanxiang.ma@yahoo.com.cn.

品薯及其相关产品的质量具有重要意义。

ELISA 是一种免疫酶技术,它是 20 世纪 70 年代在荧光抗体和组织化学基础上发展起来的一种新的免疫测定方法^[3]。其敏感性高、特异性强、简便、快速等特点已经被广泛应用于多种疾病的诊断和免疫检测。ELISA 方法又可分为检测抗体和检测抗原两种,国外用 ELISA 法诊断抗体、抗原方面的技术相当成熟,美、英、日本等国已经有商品试剂盒出售。国内很多学者先后建立了 DAS-ELISA 方法检测马铃薯病毒病抗体均取得理想结果,但应用于细菌病害还非常少,而且 DAS-ELISA 方法检测仅限于实验室检测,在基层推广应用还有一定困难。本实验的目的是将自制 NCM-ELISA^[9](硝酸纤维素膜上进行的酶联免疫吸附测定)细菌试剂盒与国外同类试剂盒进行比较,得出敏感性高、特异性强、简便、快速、价格低廉的检测技术。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 进口试剂盒 美国 agdia 公司提供 DAS-ELISA 植物病原菌检测试剂盒。包括包被用的抗体;碱性磷酸酶标记物;96 孔微孔板;PNP 底物溶液、稀释液、洗涤液和终止液等。

1.1.2 自制试剂盒 由本实验室自行研制试剂盒,包括富集培养基;免疫家兔制备马铃薯环腐病抗血清,并提取马铃薯环腐病菌免疫球蛋白 IgG 作为 NCM-ELISA 反应为一抗,以国际马铃薯中心(International Potato Center, CIP)提供羊抗兔抗血清为二抗;硝酸纤维素膜;底物溶液、封闭溶液、缓冲液、洗涤液和终止液。

1.1.3 检测样品 纯化环腐病菌 20 份;其他细菌 20 份。

1.2 方 法

1.2.1 美国 agdia 试剂盒检测步骤 ①将待检样品及阴阳性对照按 1:10 比例稀释,同时按试剂盒说明书要求分别设阳性和阴性对照孔,每孔加 100 μ L 样品,室温反应 120 min 后洗涤,共洗 3 次。②每孔加入碱性磷酸酶标记兔抗马铃薯环腐病菌 IgG100 μ L,室温反应 60 min,洗涤程序同上。③每孔加入 100 μ L PVP 底物溶液,室温反应 30~60 min 后,每孔再加入 50 μ L 终止液终止反应。④用酶标仪在 405 nm 波长测定 OD 值。

1.2.2 自制试剂盒检测步骤 ①将少量样品进行富集培养 48 h。②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

液管或移液枪将每个样品加 20 μ L,加完样品后自然风干 15~30 min。③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⁻¹ tris-HCl 0.05 mol·L⁻¹ 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。④抗体结合:弃去封闭液,用 TBS(0.02 mol·L⁻¹ tris-HCl 0.05 mol·L⁻¹ 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。⑤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⁻¹ tris-HCl, 0.05 mol·L⁻¹ 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 1:1 500 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。⑥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⁻¹, 70% DMF) 20 μ L, BICP/DMF(50 mg·mL⁻¹, DMF) 20 μ L, 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,结果判读后将膜置于滤纸上干燥,保存。

1.2.3 比较试验 采用美国 agdia 公司 DAS-ELISA 试剂盒和自制 NCM-ELISA 试剂盒同时检测 40 份样品,比较两者的检测结果。并计算自制 NCM-ELISA 试剂盒特异性、灵敏度及符合率^[9]。

特异性=

$$\frac{\text{自制 NCM-ELISA 试剂盒阴性检出率}}{\text{美国 agdia 的 DAS-ELISA 试剂盒阴性检出率}} \times 100\%$$

相对灵敏度=

$$\frac{\text{自制 NCM-ELISA 试剂盒阳性检出率}}{\text{美国 agdia 的 DAS-ELISA 试剂盒阳性检出率}} \times 100\%$$

$$\text{符合率} = \frac{\text{两种方法检测结果一致}}{\text{总样品数}} \times 100\%$$

1.2.4 两种方法在不同样品浓度下检出率 将 40 份样品分别稀释到 10、10³、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ bact.·mL⁻¹,然后采用 1.2.1 和 1.2.2 步骤进行检测,并计算灵敏度。

2 结果与分析

2.1 自制试剂盒与进口试剂盒比较

通过表 1 可以看出,自制 NCM-ELISA 试剂盒检测结果与美国 agdia 公司 DAS-ELISA 试剂

盒检测结果比较,灵敏度为 100%,特异性为 0,两种的符合率为 100%,说明自制试剂盒完全达到国外同类产品水平。

表 1 两种试剂盒比较研究

DAS - ELISA 试剂盒检测结果	自制 NCM - ELISA 试剂盒检测结果			
	阳性	阴性	特异性 /%	相对灵敏度 /%
阳性 20	20	0	0	100
阴性 20	0	20	0	100

2.2 两种方法在不同样品浓度下检出率

通过表 2 可以得出,当样品中细菌浓度为 10 bact. · mL⁻¹,自制 NCM - ELISA 试剂盒检出率为 100%,美国 agdia 公司 DAS - ELISA 试剂盒检出率为 0。而美国 agdia 公司 DAS - ELISA 试剂盒在浓度为 10⁶bact. · mL⁻¹时才能被检测出来,检出率为 100%。

表 2 两种方法在不同样品浓度下检出率

项目	10	10 ³	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
DAS - ELISA	0	0	0	100	100	100
NCM - ELISA	100	100	100	100	100	100

2.3 两种试剂盒检测所需时间及成本

NCM - ELISA 的操作要比 DAS - ELISA 更容易,每张 NCM 的包被,洗涤,酶标 IgG 的反应都被作为一个整体在一个平皿或者一个塑料袋中进行,作一个样品周期只需 3 d,而 DAS - ELISA 法周期则需 4 d。并且,自制 NCM - ELISA 试剂盒成本低廉,仅需要 500 元;而进口 DAS - ELISA 试剂盒则需要 2 500 元。

表 3 两种试剂盒检测所需时间及成本情况

项目	所需时间/d	成本 /元
自制 NCM - ELISA 试剂盒	3	500
进口 DAS - ELISA 试剂盒	4	2 500

3 讨论

两种试剂盒均是酶联免疫反应实验。不同的是 NCM - ELISA 试剂盒以硝酸纤维素膜取代 DAS - ELISA 试剂盒微量滴定板作为样品和试剂的支持物。并且强化后的 NCM - ELISA 试剂盒同双抗体夹心DAS - ELISA 试剂盒一样灵敏,而且更

加简便、快捷,NCM - ELISA 作一个样品周期只需 3 d,而 DAS - ELISA 法周期则需 4 d。并且,自制 NCM - ELISA 试剂盒成本低廉,仅需要 500 元。而进口 DAS - ELISA 试剂盒需要 2 500 元。同时还具有另一个重要优点:点样后的硝酸纤维素膜可以存储数周,然后再继续实验^[8],具有便携带的优点。通过对样品进行富集培养,NCM - ELISA 试剂盒能够检测出 10 bact. · mL⁻¹样品中的细菌,而 DAS - ELISA 试剂盒只有在浓度达到 10⁶ bact. · mL⁻¹时才能准确检测出病菌存在,本试剂盒将检出率提高 100 万倍,完全可以应用于潜伏性马铃薯环腐病菌检测。采用 DAS - ELISA 试剂盒检测时,当样品浓度达到 10⁸bact. · mL⁻¹以上时,某些腐生菌可能会与抗体进行交叉反应,出现假阳性反应。而采用 NCM - ELISA 试剂盒检测通过富集培养完全可以消除这种交叉反应,避免假阳性反应发生。

参考文献:

[1] 孙秀梅. 马铃薯环腐病的发生及其防治[J]. 农业科技通讯, 2001(1): 26 26.

[2] Slack S A, Drennan J L, Westra A A G. Comparison Of PCR, ELISA and DNA hybridization for the detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in field grown potatoes[J]. Plant Disease, 1996, 80: 519 524.

[3] 高虹. 马铃薯环腐病的发生及防治[J]. 现代化农业, 2004(1): 10 11.

[4] 何云霞, 张儒喜, 白艳菊 等. 马铃薯环腐病菌鉴定 检测技术研究进展[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(3): 159 162.

[5] 周艳玲, 刘学敏, 孟玉芹. 马铃薯 Y 病毒的检测技术[J]. 中国马铃薯, 2000, 14(2): 89 93.

[6] Salazar L F. Serological methods for virus detection. In potato viruses and their control[C]. Lima(PE): International Potato Center, 1996: 113 132.

[7] 王乐义, 马洪. 自制和进口试剂盒检测鸡传染性支气管炎抗体的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1665 1713.

[8] 李汝刚, 郭军, 鞠振林, 等. 马铃薯 X、Y 病毒的单克隆抗体及其在马铃薯病毒检测上的应用[J]. 马铃薯杂志, 1992, 6(4): 233 236.

