

应用酶联免疫吸附技术 (ELISA) 鉴定根瘤菌血清型和测定大田接种回收率

姜荣文 张学江

(中国农业科学院油料作物研究所,武汉)

P. T. C. Nambiar

(国际热带半干旱地区作物研究所,印度)

摘要 本文采用酶联免疫吸附技术测定了我国根瘤菌株与引进菌株 NC92 的血清型异同和大田接种花生后的结瘤比率,并比较了限定培养基和 YMA 培养基培养制备的抗原-抗体反应。结果指出,NC92 酶标记抗体与其相对应的 NC92 菌株抗原起专性反应,不与供试的我国根瘤菌株抗原起反应;NC92 菌株大田接种三个花生品种后的结瘤比率与不接种比较,达到极显著水准 ($P < 0.01$),不同花生品种间也达到显著水准 ($P < 0.05$),证明酶联免疫吸附技术用于根瘤菌血清型鉴定及其大田接种回收率测定是可行的。两种不同制备来源的 NC92 抗体和酶标记抗体结合物的酶联反应均为一致,证明简单的 YMA 培养基可以代替复杂的限定培养基培养菌体抗原来制备所需的抗血清。

关键词 酶联免疫吸附技术;抗原;抗体;根瘤菌

根瘤菌血清型的鉴定及其大田接种回收率的测定,是豆科作物共生固氮应用研究的一项重要实验工作。某些血清学技术如试管凝集技术,荧光抗体技术等作为该项实验的手段,早已被国内外常规使用。然而,试管凝集技术相对比较粗放,难于对较小的根瘤样品进行检测^[1],荧光抗体技术对实验的结果观察常带有主观因素,而且操作麻烦,需要复杂的显微设备,七十年代初发展起来的酶联免疫吸附技术(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,简称 ELISA),有效地克服了上述两者的不足,本身具有反应灵敏、准确、操作和所需设备简便等特点,已经在国内外动植物病害检疫,医疗诊断以及生物制品研究等方面得到了广泛地应用。

目前,该项技术应用于根瘤菌的研究,国内外尚报道较少。本文采用酶联免疫吸附技术,研究和检测了我国来源不同的根瘤菌株与引进菌株 NC92 的血清型异同;测定了 NC92 菌株在我国武汉地区大田接种花生后的结瘤比率;同时,比较了限定培养基和 YMA 培养基培养制备的 NC92 抗血清抗体和酶标记抗体,在酶联试验中的反应结果。

材料和方法

(一) 主要药品器材及来源

碱性磷酸酶, E 型 (Sigma); 酶底物 (对-磷酸硝基苯) (No. 104-40T, Sigma); Tween 20, 上海化学试剂采购供应站; 酶标盘 (No. 1-223-29, Dynatech Labs Inc., USA); 透析管 (ICRISAT, 印度); 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 等。

(二) 被检测抗原

1. 供试菌株: 采用在我国花生、大豆上研究和应用较多的几个主要活性菌株,其菌株名称和来源见表 1。所有菌株均培养在 YMA 斜面上, 28℃ 培养 10 天, 无菌条件下分别刮取菌苔于灭菌的生理盐水中, 煮沸捣碎, 冷却后至 4℃ 保藏备用。

2. 花生根瘤样品: 根瘤样品取自大田试验小区的花生。试验品种有 Robut 33-1、红花

本研究工作得到卫生部武汉生物制品研究所江先觉先生、罗丽珍先生、黄征杰先生的指导和帮助, 江先觉先生审阅此文并提出修改意见。本所植保室陈金香同志和栽培室王子见同志分别帮助血清球蛋白的提纯和浓度测定。作者在此一并致谢。

表 1 供试根瘤菌株及来源

菌株号	来源和共生效应	保藏单位
NC 92	美国北卡大学分离自南美洲的花生根瘤,我国 1981 年从国际干旱地区作物研究所引进,花生接种有效。	中国农科院油料作物研究所
009	从中国农科院土肥所保藏菌株 1046 自然变异株中,挑选单个菌落选育而成,花生接种有效。	同上
97-1	从云南西双版纳采集的木豆中分离,花生接种有效。	同上
113-2	从湖南衡阳水田土接种水培盆栽大豆猴毛品种根瘤中分离,大豆接种有效。	同上
马大 3	从中华马桑压碎汁接种大豆根瘤中分离,大豆接种有效。	同上

1 号、鄂花 2 号,分接种 NC92 菌株和不接种,共 6 个处理,裂区设计^[2],6 次重复。NC92 接种量为 $0.5-1 \times 10^7$ 菌数/花生种子(CRM 平板稀释法计数)。花生生长 60 天后,每小区随机挖取 5 株,摘下全部根瘤混合,60℃ 干燥,再从这些根瘤中随机取 8 个根瘤,装纸袋封好,置干燥器保存待测。

(三) 抗血清制备

以 YMA 培养基和 Bergersen 描述的限定培养基^[3]分别培养的 NC92 菌株作为抗原,并分别采用文献[4]和文献[5]方法制备相应的抗血清。

(四) 抗血清抗体的提纯

制备的 NC92 菌株相应的抗血清抗体的提纯系采用硫酸钠沉淀法^[6]。将上述制备的抗血清用蒸馏水对比稀释,然后加入等量的 36% 硫酸钠溶液,在 10000 r/min 下离心 10 分钟,去上清,取沉淀蛋白,然后用 18% 的硫酸钠溶液再按上述步骤洗涤两次,收集沉淀蛋白,在中性 PBS 中 4℃ 下透析 9 小时,每隔 3 小时换新鲜 PBS 一次,最后用 PBS 稀释透析物,用紫外光谱法将蛋白浓度调至 1 mg/ml。

(五) 酶标记抗体的制备

提纯的上述抗体 γ -球蛋白,采用 Kishinevsky & Bar-Joseph^[7] 以及 Rajeswari Ramanan^[8] 记述的方法,用碱性磷酸酶进行标记。分别取碱性磷酸酶 0.4 ml (含酶 2 mg) 在 8000 r/min 下离心 10 分钟,去上清,在沉淀物中加入上述的 γ -球蛋白 1 ml (含 1 mg 抗体蛋白),用吸管

轻轻吹吸,使之混匀,转入透析管,在 4℃ 对中性 PBS 透析 3 次,每次 1.5 小时,然后将透析管取出,换至含 0.06% 戊二醛的 BBS 中在室温下透析 1 小时,又重新转入 PBS 中在 4℃ 下透析 3 次,每次 3 小时。此时,酶抗体结合物即基本制备,将透析管中的结合物移出,按每 ml 加入 50 mg 牛血清蛋白,置 4℃ 保存备用。

(六) 用 NC92 酶标记抗体检测样品

我国若干菌株和 NC92 菌株血清型的异同的检测及田间试验根瘤样品的测定,均按文献[7, 8]方法进行。

(七) 不同培养基制备的抗原-抗体反应

分别以来源于限定培养基和 YMA 培养基的 NC92 抗血清抗体作包被抗体(第一抗体)和酶结合物抗体(第二抗体),对 NC92 和 97-1 菌株抗原进行检测。

结果和讨论

(一) 根瘤菌血清型鉴定(表 2)

从表 2 看出,NC92 酶标记抗体与其相对应

表 2 几个不同根瘤菌抗原与 NC92 抗体酶结合物的反应结果

不同根瘤菌抗原	NC92 抗体酶结合物稀释倍数			
	1000	2000	4000	8000
NC92	++++	++++	+++	++
009	+	-	-	-
97-1	-	-	-	-
113-2	-	-	-	-
马大 3	-	-	-	-
空白对照	-	-	-	-

“++++、+++、++、+”依次表示酶联反应的颜色梯度,即最深、深、较深、浅。

“-”表示无颜色反应。

的 NC92 菌株抗原具有很强的专性黄颜色反应,而与我国的几个菌株基本不反应,尤其酶结合物抗体稀释至 2000 倍以后,完全不反应。这说明,运用酶联免疫吸附技术,对不同根瘤菌血清型的区分和鉴定是有效的。同时还指明,来源于南美洲花生根瘤的 NC92 菌株,与我国的分离菌株,在抗原成分上有很大的差异,甚至完全不同,血清型亲缘性极低。

(二) 大田接种回收率测定(表3)

从表3结果看出,在不接种处理中, NC92

表3 NC92 菌株大田接种回收率测定结果与统计分析

处 理	花 生 品 种		
	Robut 33-1	红花1号	鄂花2号
接 种	52.1%	89.6%	50.0%
不接种	0.4%	0	0.4%
接种与不接种 $LSD_{0.01} = 28.5$			
不同花生品种间 $LSD_{0.05} = 13.8$			

$LSD_{0.01}$ 和 $LSD_{0.05}$ 分别表示在1%和5%机率水平上的最小显著差异。

在三个花生品种上的回收率极低,以至完全没有。这表明,在我国武汉地区土壤中的土著根瘤菌系,很少或者几乎没有 NC92 血清型的菌株;而在接种处理中,三个品种的花生根瘤与酶标抗体反应,其回收率均在50%以上,表明花生根瘤总数中一半以上是由接种的 NC92 菌株所形成的,达到极显著水准 ($P < 0.01$)。该菌株在三个花生品种上接种所表现出的良好大田增产效应^[9],通过本文采用酶联技术对其接种后根瘤回收率的测定结果,再次得到证实。表3结果还可以看出,在三个花生品种中,红花1号接种 NC92 菌株的回收率高达89%以上,显著地 ($P < 0.05$) 高于其他两个品种,表明花生寄主作物对结瘤作用具有不可忽视的影响。寄主因子与根瘤菌同时控制豆科作物的共生结瘤性状。

(三) 两种培养基培养制备的抗原-抗体反应(表4)

在根瘤菌的血清学技术应用研究中,为了保证抗原的纯净,以避免血清学反应的非特异性干扰,有人提出用限定培养基培养菌株^[3],但也有人指出,用其他复合培养基培养抗原制备的抗血清,在血清学反应上不一定导致非特异性干扰^[10]。本文比较了两种培养基培养制备的抗原-抗体反应。从表4结果看出,无论是用 YMA 培养基,还是用限定培养基培养来源的包被抗体或酶结合物抗体,在对 NC92、97-1 抗原和空白处理的检测上,其抗原-抗体反应均

表4 两种不同制备来源的 NC92 抗体和酶标记抗体结合物的酶联反应

酶标记抗体结合物		被检抗原	包 被 抗 体		
来源	稀释倍数		限定来源稀释倍数		YMA 来源 稀释倍数
			100	200	100
限定*	1000	NC92	+	+	++
		97-1	-	-	-
		空白	-	-	-
	2000	NC92	+	+	+
		97-1	-	-	-
		空白	-	-	-
YMA	2000	NC92	+	+	+
		97-1	-	-	-
		空白	-	-	-

*“限定”表示限定培养基,“YMA”表示 YMA 培养基。

**“+”表示有酶联颜色反应,“-”表示无酶联颜色反应。

为一致。这表明,不同培养基培养制备的 NC92 抗体,在血清学反应上的不存在非特异性干扰。经试验证明,可以不用限定培养基,而用 YMA 培养基培养菌株抗原来制备所需的抗血清,仍然获得较理想的实验结果^[4,11]。由于限定培养基所需药品较多,配制麻烦,采用 YMA 培养基可简化操作。通俗易懂。

酶联免疫吸附技术不仅具有克服免疫荧光技术 (IF) 中结果检测上的主观性和放射免疫技术 (RIA) 中危害人体安全、污染环境的弊病等优点,而且在样品检测中酶标抗体用量极少,因而花费较低。根据本实验室的实际用量,按每次制备 1 mg 抗体 r-球蛋白计,这种酶标抗体结合物一经制备,就可以用于几千次以至上万次的检测。因此,酶标技术将成为根瘤菌应用研究以至整个土壤微生物学工作中一项重要技术。

参 考 文 献

- [1] Trinick, M. J.: J. Appl. Bacteriol., 32: 181—186, 1969.
- [2] 赵仁铭, 余松烈编著: 田间试验方法, 农业出版社, 247—270, 1978.
- [3] Bergersen, F. J.: Aust. J. Biol. Sci., 14: 349—360, 1961.
- [4] 中国农业科学院土肥所生物固氮组: 农业科技通讯, 3: 24—25, 1979.

- [5] Nambiar, P. T. C. et al.: J. Appl. Bacteriol., 58: 187—197, 1985.
- [6] Van Weemen, et al.: FEBS Letters, 15: 232—236, 1971.
- [7] Kishinsky, B.: et al.: Canadian, J. Microbiol., 24: 1537—1543, 1978.
- [8] Rajeswari, R.: Presentation to ICRISAT-NifTal-FAO/UNEP Training Course. at ICRISAT, India, 1983.
- [9] 张学江、姜荣文: 中国油料, 4: 45—47, 1985。
- [10] Schwingbarn, E. A. et al.: In Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, Ed. by Bergersen, F. J., 337—366, 1980.
- [11] Vincent, J.M.: 根瘤菌实用研究手册, 上海植生所固氮室译, 上海人民出版社, 25—39, 1970。