

## 技术与方法

## 用 ELISA 和 Dot-ELISA 方法检测植物病原的比较研究

王 远 程      蔡 少 华

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100081)

谢 云 陆      何 礼 远

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

徐 惠 迪

(美国农业部贝尔茨维尔农业研究中心, 马里兰)

**摘要** 比较了 ELISA 和 Dot-ELISA 方法检测番茄巨芽类菌原体(Tomato Big Bud Mycoplasma-Like Organism, TBB-MLO)、番茄斑萎病毒(Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)和青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)的差异,结果表明,两种方法对番茄斑萎病毒无明显差异,对番茄巨芽类菌原体,用 Dot-ELISA 比用 ELISA 的检测灵敏度高 50—100 倍,对青枯假单胞菌,用 Dot-ELISA 比用 ELISA 检测抗原的灵敏度高 20 倍,而检测抗体的灵敏度高 100 倍。

**关键词** 类菌原体;番茄斑萎病毒;青枯假单胞菌

ELISA 已广泛地应用于植物病原体的检测。由于所用的载体不同可分为常规 ELISA (用聚苯乙烯塑料板做载体)和 Dot-ELISA (用硝酸纤维素膜做载体)。常规 ELISA 可以用酶联读数仪定量分析,所以应用较为普遍,如 Hobbs 等<sup>[1]</sup>用此方法测定花生类菌原体, Lin<sup>[2]</sup>等和 Davis 等<sup>[3]</sup>用于测定玉米矮化螺旋体, Hung 等<sup>[4]</sup>用于测定植物细菌。关于用 ELISA 的方法测定植物病毒的报道则更多。有关 Dot-ELISA 的报道比常规 ELISA 少,但许多人认为 Dot-ELISA 比 ELISA 灵敏度高。Bantari<sup>[5]</sup>用 Dot-ELISA 测定 PVX 就比 ELISA 灵敏。

植物病毒、类菌原体和植物细菌在结构、大小、抗原性和纯化方法等各方面都有很大差别,对某种抗原选择一种好的测定方法关系到实验的成功与失败。本文报道用 ELISA 和 Dot-ELISA 测定 TSWV、TBB-MLO 和青枯假单胞菌的抗原及抗体的实验,比较了两种方法在以上三种病原体检测上的优劣。

## 材 料 和 方 法

## (一) 材料来源

TSWV 的单克隆抗体 (McAb) 10A6 以及 TBB-MLO 的 McAb 10B3G11 均完成于美国的 USDA-ARS, Plant Sciences Institute, Florist and Nurseries Crop Lab.。纯化的 TBB-MLO 样品由 Dr. Ing-Ming Lee (美国 USDA-ARS, Plant Sciences Institute, Microbiology and Plant Pathology Lab.) 提供。纯化的 TSWV 由 Dr. Dennis Gonsalves 和王敏 (Department of Plant Pathology, Cornell University New York state Agricultural Experiment station) 提供。青枯假单胞菌抗原及其抗血清制备完成于中国农业科学院植物保护研究所。

李英明博士提供 TBB-MLO 抗原, Dr. Dennis Gonsalves 和王敏研究生提供 TSWV 抗原, 谨表谢意。

## (二) 实验方法

1. ELISA 试验抗原用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.6 于室温下包被 2 小时。Tris 缓冲生理盐水吐温-20 溶液 (TBS-T) 洗三次, 每次三分钟。加用 TBS-T 稀释的抗体, 室温下放 2 小时, 然后洗三次。加用 TBS-T 2000 倍稀释的碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠的抗体标记物 4℃ 过夜, 洗三次, 加底物 (底物缓冲液: 97ml 2-乙醇胺, 800ml H<sub>2</sub>O, 100mg MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1mol/L HCl 调 pH 到 9.8。加对硝基磷酸二钠至 1mg/ml) 每孔 150μl, 反应 30 分钟在 MR-700 型酶联读数仪上测定 OD<sub>405nm</sub> 值。

### 2. 斑点酶联免疫试验 (Dot-ELISA)

(1) 剪下大小适合的 (8cm × 11cm) 孔径 0.2μm 的硝酸纤维素膜放入 TBS 缓冲液中浸透 (不要用手接触纤维素膜)。

(2) 把加样器 (SRC-96/O 型 Schleicher and Schuell Inc.) 上放一张略大于纤维素膜的滤纸及滤膜, 装好加样品, 用 TBS 缓冲液稀释抗原, 加在加样器的小孔内, 每孔 50μl 真空吸干。

(3) 浸入 TBS 缓冲液中 (含 1% 脱脂奶粉和 0.5% 牛血清白蛋白) 室温下放置 1 小时。

(4) 用 TBS 漂洗 30 秒。

(5) 用含 0.1% 脱脂奶粉和 0.05% 牛血清白蛋白的 TBS 缓冲液稀释抗体, 把膜放入稀释液中与抗体反应 4℃ 过夜或室温下 2 小时。

(6) 用 TBS 漂洗三次每次 10 分钟。

(7) 把膜浸入稀释 2000 倍的碱性磷酸酯酶标记的羊抗小鼠 IgG (用含 0.1% 脱脂奶粉和 0.05% 牛血清白蛋白的 TBS 缓冲液稀释), 室温下 2 小时。

(8) 用 TBS 漂洗四次, 每次 10 分钟。

(9) 把膜浸入底物中反应 10 分钟 (底物的配制法: 1 号液: H<sub>2</sub>O 35.5ml 加 2.5mol/L Tris pH9.6 2ml, 加 11% NaCl 2ml, 加 1mol/L MgCl<sub>2</sub> 0.2ml。2 号液: 14mg 氮蓝四唑 (NBT) 溶于 300μl 甲醇中。3 号液: 7mg 5-溴-4-氯-羟基吲哚 (BCIP) 溶于 50μl 二甲基亚砷 (DMSO) 中。将 2 号加入 1 号液中边加

边摇动。混匀后再加 3 号液边加边摇动, 最后混合均匀)。

(10) 用蒸馏水漂洗一次 (30 秒)。

(11) 把膜浸入 0.01mol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液中 (含 0.001mol/L EDTA) 洗二次每次 10 分钟。

(12) 室温下干燥, 并保存硝酸纤维素膜或照相保存。

## 试验结果

### (一) ELISA 和 Dot-ELISA 测定 TBB-MLO

实验结果见图版 I 上和表 1。以杂交瘤 10 B3G11 的腹水稀释 1:50000 倍测定纯化的 TBB-MLO, 用 Dot-ELISA 测定其稀释限度为 1:640—1:1280, 适用浓度为 1:160—1:320 之间。用 ELISA 测定 TBB-MLO 稀释到 1:40 时, 其 OD 值为 0.064 (McAb 所用浓度两种方法相同), 即使 TBB-MLO 稀释到 1:10—1:20 其 OD 值也很低, 分别为 0.187 和 0.164。用 Dot-ELISA 法比用 ELISA 法灵敏 50—100 倍。

### (二) ELISA 和 Dot-ELISA 测定 TBB-MLO 单克隆抗体灵敏度比较

试验结果见图版 I 中和图 1。用 Dot-ELISA 法, 每孔 1:15 的 TBB-MLO 50μl 点样时, 可检出的腹水抗体 10B3G11 的稀释限度为 1:2048000, 可用浓度为 1:50000 左右。ELISA 法用相同的抗原浓度包被检测板时, 抗体 10 B3G11 的稀释限度为 1:50000, 可用浓度为 1:5000 倍。可见 Dot-ELISA 法比 ELISA 法灵敏 20—40 倍。

### (三) ELISA 和 Dot-ELISA 法测定 TSWV 的比较

试验结果见图版 I 下和表 2。用 Dot-ELISA 以单抗 10A6 腹水稀释 1:50000 倍检出 TSWV 的稀释限度为 1:364500, 可用浓度为 1:10000—1:20000 之间。用 ELISA 法稀释限度及可用浓度与 Dot-ELISA 法无明显差异。

### (四) 用 ELISA 和 Dot-ELISA 的方法

表 1 用单克隆抗体 10B3G11 ELISA 的方法测定 TBB-MLO(OD<sub>495nm</sub>)

稀释	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
TBB	0.182	0.187	0.164	0.064	0.037	0.041	0.028	0.013
健	0.011	0.008	0.007	0.006	0.004	0.006	0.007	0.008

TBB: TBB-MLO; 健: 健康对照; 抗体浓度为 1:50000 倍稀释。

表 2 用单克隆抗体 10A6 ELISA 法测定 TSWV (OD<sub>495nm</sub>)

稀释	1:500	1:1500	1:4500	1:13500	1:40500	1:121500	1:364500	1:1093500
TSWV	1.917	1.597	0.964	0.527	0.188	0.068	0.020	0.007
健	0.005	0.004	0.002	0.003	0.002	0.003	0.000	0.000

抗体浓度 1:50000 倍稀释。

表 3 用 ELISA 法测定 TSWV 单抗 10A6 (OD<sub>495nm</sub>)

稀释	1:300	1:900	1:2700	1:8100	1:24300	1:72900	1:218700	1:656100	1:1968300
TSWV	***	***	***	***	1.685	0.892	0.423	0.146	0.073
健	-0.013	-0.016	-0.015	-0.016	-0.018	-0.016	-0.016	-0.016	-0.017

表 4 用 ELISA 法测定青枯病细菌 (OD<sub>495nm</sub>)

抗体 \ 抗原	1/10	1/100	1/300	1/900	1/2700	1/8100	1/24300
1/100	0.280	0.286	0.205	0.161	0.073	0.015	0.002
1/500	0.283	0.283	0.150	0.114	0.012	0.000	-0.007
1/2500	0.272	0.255	0.135	0.072	0.013	0.004	0.000
1/12500	0.095	0.074	0.032	0.003	-0.005	-0.006	-0.006
1/72500	0.015	0.016	0.008	-0.004	-0.005	-0.005	-0.009
1/362500	0.008	0.007	0.007	0.005	0.002	0.000	0.007
1/1812500	0.009	-0.006	-0.001	-0.005	-0.008	-0.007	-0.006
1/9062500	0.004	0.003	0.009	-0.006	-0.007	-0.008	-0.001

\*: 抗原浓度为 10<sup>8</sup> 个菌体/ml

测定 TSWV 的单抗灵敏度比较

从图版 II-上和表3可以看出,用 1:1000 倍提纯的TSWV 包被 ELISA板和点样在硝酸纤维素膜上,两种方法所测定的结果是一致的,可检出的抗体 10A6 腹水的稀释极限为 1:656100,可用浓度均为 1:72900。

(五) 用两种方法检测青枯假单胞菌

从表 4 图版 II-下可见Dot-ELISA比ELISA

方法测定抗原时灵敏度高 20 倍,测定抗体时灵敏度 高 500 倍。

讨 论

植物病毒,类菌原体和植物病原细菌分属于分子、亚细胞和单细胞类微生物。其性质及大小相差较大,因此被聚苯乙烯微量反应板和硝酸纤维素膜的吸附能力有很大差别。对于细

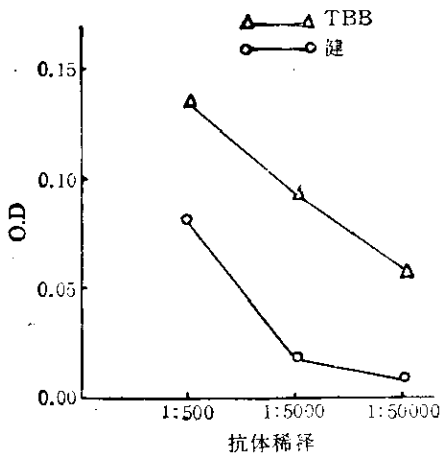


图1 用 ELISA 法测定 TBB-MLO 单抗10 B3G11

菌和类菌原体这类结构的微生物来说,在洗涤过程中包被在板上的细胞及亚细胞类微生物难免有一部分被冲洗掉,从而使检测灵敏度下降。而硝酸纤维素膜有不同的孔径,在包被过程中可以对抗原多位点吸附。此外合适的孔径还会

有镶嵌作用,使抗原能更牢固地结合在膜上,因而使用 Dot-ELISA 方法在检测这类抗原及抗体时比ELISA法更灵敏。此外,在应用 ELISA时如果用纯度不高而杂质很多的抗原(例如病叶汁液等),直接包被于塑料板其效果往往不佳,一般需要用双抗体夹心法或异种动物的抗体,这就要求做标记酶或同时免疫研制两种以上的抗体,从而使测定的工作量增加。而 Dot-ELISA 可应用直接包被法取得良好的检测效果。

### 参考文献

1. Hobbs H.A. et al.: *Plant Disease*, 71: 747-749.
2. Lin C. P. et al.: *Current Plant Sci. and Biotech. in Agri.*, 4: 347-351, 1987.
3. Davis R. E. et al.: *Current Plant Sci. and Biotech. in Agri.*, 4: 306-312 1987.
4. Hung H.Y. et al.: *Current Plant Sci. and Biotech. in Agri.*, 4: 352-356, 1987.
5. Banttari E.E. et al.: *Plant Disease*, 69: 203-205.

## THE STUDY OF COMPARISON BETWEEN ELISA AND DOT-ELISA TO DETECT TBB-MLO TSWV AND *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*

Wang Yuancheng Cai Shaohua

(Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081)

Xie Yunlu He Liyuan

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100094)

Hsu Heiti

(FNC-lab. BARC-west USDA-ARS, Beltsville MD. 20705 U.S.A.)

Tomato big bud mycoplasma-like organism (TBB-MLO) Tomato spotted wilt virus (TSWV) and *P. solanacearum* was detected by using ELISA and Dot-ELISA methods. The results showed that to detect TBB-MLO and *P. solanacearum* Dot-ELISA was about 50-100 times sensitive than ELISA method, but to detect TSWV it gave same results of both methods.

**Key words** TBB-MLO; TSWV; *P. solanacearum*