

玉米内州萎蔫病菌免疫学检测方法的建立

吴晓巍^{1,2} 金涌² 田世民^{2*} 董金皋^{1*} 张洋² 柳青松² 李娇³

(1. 河北农业大学植物保护学院 河北 保定 071001)

(2. 中国检科院综合检测中心 北京 100123)

(3. 河北大学 河北 保定 071002)

摘要: 以玉米内州萎蔫病菌单抗(4H4 和 4G12)为基础, 纯化抗体后, 进行亚类鉴定、效价及特异性测定。比较间接 ELISA 和双单克隆夹心 ELISA (DAS-ELISA) 的检测灵敏度, 并应用于玉米种子中萎蔫病菌的检测。结果表明, 两株单克隆抗体(0.4 g/L)效价均可达 1 : 256000, 亚类鉴定结果分别为 IgG_{2a} 和 IgG_{2b}, 轻链均为 K 链。与供试的 16 株非目标细菌均无交叉反应。DAS-ELISA 对萎蔫病菌种子悬浮液的检测灵敏度为 1.0×10^9 CFU/L, 在此基础上建立了灵敏、特异的玉米内州萎蔫病菌双单抗 DAS-ELISA 检测方法。

关键词: 玉米内州萎蔫病菌, 单克隆抗体, ELISA

Development of an Immunosorbant Assay for Seedborne *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense* in Corn Seeds

WU Xiao-Wei^{1,2} JIN Yong² TIAN Shi-Min^{2*} DONG Jin-Gao^{1*}
ZHANG Yang² LIU Qing-Song² LI Jiao³

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

(2. Comprehensive Inspection Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

(3. Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: We purified the McAbs and then determined the subclasses, activity and specificity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense* McAbs (4H4 and 4G12). We compared the detection sensitivity between indirect ELISA and double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) and utilized both of them on the detection of the corn bacteria. Titers of both McAbs in 0.4 g/L were 1 : 256000, subclasses of 4H4 belongs to IgG_{2a} while 4G12 belongs to IgG_{2b}. No cross reactivity was found within 16 bacterial strains tested from corn and other plants by ELISA. The minimum detection limit of the bacteria in the seed suspension with DAS-ELISA was 1.0×10^9 CFU/L. A specific and sensitive DAS-ELISA for detection of the *C. michiganensis* subsp. *nebraskense* was developed.

Keywords: *C. michiganensis* subsp. *nebraskense*, Monoclonal antibody, ELISA

基金项目: 国家科技支撑计划课题(No. 2006BAF07B01); 质检总局科研计划课题(No. 2008IK249); 中国检科院基本科研业务费专项资金资助项目(No. 2008Jk017)

* 通讯作者: 田世民 ✉: shimintian@yahoo.com.cn

董金皋 ✉: shmdig@hebau.edu.cn

收稿日期: 2010-02-01; 接受日期: 2010-04-19

玉米内州萎蔫病(Goss's bacterial wilt and blight of maize, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense*, 简称为 *Cmn*), 最早于1969年在美国内布拉斯加州中部和东部的马齿型玉米上发现, 之后相继在爱荷华州西部、堪萨斯州、南达科塔州及科罗拉多州等地发生^[1], 是玉米生产上一类重要病害, 可造成高达50%的玉米产量损失^[2]。目前国内尚无该病发生的报道。玉米内州萎蔫病菌的远距离传播和扩散主要是通过种子传带, 病菌在种子中至少可存活1年, 种子感病率在17.7%–30.7%之间^[3], 能造成病害在田间的大面积发生和流行。随着我国玉米深加工能力的需求及养殖业的大发展, 玉米国际贸易量迅速增加, 由此带来的玉米生产中新病害的风险日益加大, 2007年该病被列入了重新修订的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》^[4]。因此, 研究玉米内州萎蔫病菌的检测鉴定具有紧迫性和十分重要的意义。

Cmn 为棒形杆菌, 革兰氏阳性, 不产孢, 不固酸, 严格好氧性。目前记载的鉴定检验方法有传统的分离培养^[5]、血清学^[6]及分子生物学方法(REP-PCR 基因指纹技术^[7]、常规 PCR^[8–9]、实时 TaqMan-PCR^[10])等。分离培养准确、可靠, 但周期长, 不能达到即时检测的目的; 分子生物学方法灵敏度高, 但操作繁琐、成本高, 难以进行大批量样品的检测。血清学方法被认为是较普遍使用的检测技术, 已在很多植物病原细菌中得到应用^[11]。

在血清学检测方面, Aizawa 等^[6]、王岭等^[4]先后制备了抗 *Cmn* 多克隆抗体, 并建立了间接 ELISA 检测方法。由于多克隆抗体中不仅包括针对多种抗原决定簇产生的抗体, 还包括大量针对无关抗原的抗体, 因此在应用过程中, 容易出现鉴定结果不稳定及假阳性现象。单克隆抗体具有理化性质均一、生物活性单一、特异性强、易于标准化等优点, 因此越来越多的受到关注和广泛应用。至今未见该病菌单克隆抗体 ELISA 的报道。本研究的目的是在实验室现有单抗细胞株的基础上, 纯化其腹水、鉴定亚类并测定特异性、检测灵敏度, 建立适宜的玉米内州萎蔫病菌免疫学检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

玉米内州萎蔫病菌(ATCC-27822、27794、27795,

C. michiganensis subsp. *nebraskense*)、玉米细菌性枯萎病菌(ATCC-8200、0085, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*)购自 ATCC; 马铃薯环腐病菌(NO.01, *C. michiganense* subsp. *sepedonicus*)、番茄溃疡病菌(NO.02、NO.03, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*)和苜蓿细菌性萎蔫病菌(NO.04, NO.05, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*)由中国检科院动植物检验检疫研究所提供; 玉米细菌性茎腐病菌(NO.06, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Borgey et al)、玉米细菌性褐斑病菌(NO.07, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall)和玉米细菌性叶斑病菌 [NO.08, NO.09, *Xanthomonas campstris* pv. *Holcicola* (Elliott) Dye]购自中国农科院植保所; 玉米细菌性叶疫病病菌(NO.10, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* Willems et al)、小麦棒形杆菌(NO.11, NO.12, NO.13, *Clavibacter tritici* (Carlson and vidaver) Davis et al)、密执安棍状杆菌(NO.14, *C. michiganensis*)购自中国普通微生物保藏中心。

玉米内州萎蔫病菌单克隆抗体细胞株(4H4 和 4G12)由本实验室提供; 碱性磷酸酶(Ap)标记的羊抗小鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司; 碱性磷酸酶标记抗体试剂盒(Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂)购自日本 DOJINDO 公司; 硝基苯磷酸盐(pNPP)购自美国 Agdia 公司; 蛋白质测定试剂盒(BCA™ Protein Assay Kit)购自美国 Thermo 公司; protein G 纯化柱购自美国 PIERCE 公司; 缓冲蛋白胨水培养基、营养琼脂培养基购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 玉米种子

国育 998 (包衣)、郑单 958 购于河北省保定市农资市场。

1.3 仪器

全波长酶标仪(美国 Thermo)、台式天平、离心机、振荡器、小型粉碎机及恒温箱等。

1.4 细菌悬浮液的制备

将供试菌接种于缓冲蛋白胨水培养基(20 g 缓冲蛋白胨水, 加入 1 L ddH₂O, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 15 min)中活化 24 h 后, 置于营养琼脂(33.5 g 营养琼脂, 加入 1 L ddH₂O, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 15 min)平板划线培养, 28℃ 培养 48 h (100 r/min), 收集菌体悬液, 用灭菌的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, KH₂PO₄

0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, ddH₂O, 1 L, pH 7.4)清洗, 8000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次。用 PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS) 悬浮, 浓度为 1.0×10^{12} CFU/L 的悬浮液用 E-cups 进行分装(每管 1 mL), 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀中加入 10 μL 甘油, -20°C 下保存备用。

1.5 抗体纯化及亚类鉴定

采用 protein G 纯化柱对抗体进行纯化, 纯化后用蛋白浓度测定试剂盒测定抗体浓度; 同时采用抗体亚类鉴定试剂盒进行抗体亚类鉴定。

1.6 抗体碱性磷酸酶(Ap)标记

依照 DOJINDO 公司试剂盒产品说明书对 4G12 抗体进行 Ap 标记。

1.7 ELISA 条件优化及检测方法的建立

间接 ELISA 参照陈兴扶等^[12]介绍的“干包法”, 并略有改进。用 pH 9.6 碳酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L, Na_2CO_3 1.6 g, NaHCO_3 2.96 g, ddH₂O 1 L, CBS)配置 *Cmn* 细菌悬浮液(1.0×10^{11} CFU/L), 100 μL /孔进行包被, 45°C 条件下烘 4–6 h 至干燥, 然后加入冷冻的无水乙醇(-20°C 下保存, 每孔 200 μL), 常温下固定 15 min。单抗(4G12)按工作浓度稀释后作为一抗; Ap 标记的羊抗小鼠 IgG (1 : 5000)作为二抗; pNPP 显色 15 min, 2 mol/L NaOH 终止反应; 最后在酶标仪 405 nm 处测定 OD 值。

采用棋盘法确定 *Cmn* 悬浮液和单抗(4G12)的工作浓度, 用 pH 9.6 的 CBS 缓冲液将 *Cmn* 悬浮液从 1.0×10^{12} CFU/L 至 1.0×10^7 CFU/L 10 倍梯度稀释, CBS 做对照; 单抗(4G12)以 1 : 2000 至 1 : 256000 倍比稀释; Ap 标记的羊抗小鼠 IgG 稀释倍数为 1 : 5000。按照间接 ELISA 步骤进行操作, 选取 OD 值接近 2.0 的点为最适反应点。

DAS-ELISA 是参照 Lamka 等^[13]介绍的方法进行。捕获抗体(4H4)稀释至工作浓度后在 4°C 条件下过夜, 加入 1.0×10^{11} CFU/L 菌悬液或待测样品, 每孔 100 μL ; 加入检测抗体(Ap-4G12), 37°C 孵育 1 h; pNPP 显色 15 min, 终止反应并测 OD_{405} 值。

参照 Qing 等^[14]记载的方法, 采用棋盘法确定 4H4 和 Ap-4G12 抗体的工作浓度。前者用 pH 9.6 CBS 缓冲液从 1 : 500 到 1 : 8000 倍比稀释, 自左向右包被到酶标板上; 后者用 PBST 按 1 : 500 到 1 : 8000 倍比稀释, 自上而下加入到酶标板中, 设空

白对照。同上进行显色并测定 OD_{405} 值。

1.8 抗体效价的测定

采用间接 ELISA 方法测定抗体效价, 待测抗体进行倍比稀释(1 : 2000–1 : 256000), 设空白对照, 重复 3 次, 以 $P/N > 2.0$ 作为阳性判断标准(P 为样品 OD_{405} 值, N 为阴性对照 OD_{405} 值)。

1.9 抗体特异性及检测灵敏度的测定

采用 1.7 建立的 DAS-ELISA 进行抗体特异性测试。*Cmn* 及待测细菌浓度均为 1.0×10^{11} CFU/L, 同样以 $P/N > 2.0$ 作为阳性判断标准, 判断有无交叉反应。

将 *Cmn* 系列稀释为 1.0×10^{11} 、 5.0×10^{10} 、 1.0×10^{10} 、 5.0×10^9 、 1.0×10^9 、 5.0×10^8 、 1.0×10^8 CFU/L, 设空白对照。采用间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测 OD_{405} 值, 每个稀释度重复 2 孔, 根据 P/N 值确定最低检测浓度。

1.10 样品测试

1.10.1 种子悬浮液的制备和细菌添加: *Cmn* 的种子悬浮液的制备参照 SN/T 1375-2004^[15]玉米枯萎病菌种子悬浮液制备方法, 并略作改进。取外观健康的玉米籽粒, 用 3%–5% 的次氯酸钠溶液表面消毒处理 5–15 min, 之后用无菌水冲洗 3 次, 无菌条件下晾干备用。包衣的玉米种子用 95% 的乙醇洗去表面药剂, 再同上冲洗、晾干后备用。取 25 g 处理过的玉米种子, 粉碎后放入三角瓶中, 添加 1.0×10^{12} CFU/L 的 *Cmn* 5 mL, 加入 25 mL 生理盐水(0.85%), 置于 4°C 冰箱中过夜, 之后将种子浸泡液经 1000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 上清液 10000 r/min 离心 15 min, 沉淀中加入 5 mL PBST, 使之悬浮得到带菌的种子悬浮液(1.0×10^{12} CFU/L)。

1.10.2 样品中 *Cmn* 的检测: 将以上病菌种子悬浮液稀释成 1.0×10^{11} 、 1.0×10^{10} 、 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 CFU/L 等 5 个浓度, 同时设置以未消毒种子增菌后制备的悬浮液为阴性对照, 以种子消毒后制备的悬浮液为空白对照。采用 1.7 建立的两种 ELISA 方法进行检测, 每一浓度、处理重复 3 次, 确定样品中 *Cmn* 的最低检出限。

2 结果

2.1 单克隆抗体亚类鉴定及效价的测定

由表 1 可见, 4H4、4G12 抗体(浓度均为 0.4 g/L)

亚类分别被鉴定为 IgG_{2a} 和 IgG_{2b}, 并均为 K 链。

从表2可以看出, 在菌体浓度为 1.0×10^{11} CFU/L 时, 两株抗体的效价均为 1: 256000, 相比之下 4G12 抗体的 OD 值略高。

| 表 1 单抗亚类鉴定结果 | | |
|---|-------------------------------|-------|
| Table 1 Results in differentiation of subclasses of McAb subtypes (in indirect ELISA) | | |
| 亚型 Subtypes | OD 值 Optical density value | |
| | 4H4 | 4G12 |
| IgG ₁ | 0.210 | 0.124 |
| IgG _{2a} | 2.449 | 0.264 |
| IgG _{2b} | 0.349 | 1.944 |
| IgG ₃ | 0.364 | 0.215 |
| IgG _A | 0.176 | 0.232 |
| IgG _M | 0.335 | 0.357 |
| Kappa light chain | 1.111 | 1.197 |
| Lambda light chain | 0.188 | 0.227 |
| CK (Negative serum) | 0.130 | 0.133 |

| 表 2 抗体效价测定结果 | | |
|---|-----------------------------|-------|
| Table 2 The determination of antibody titer (in indirect ELISA) | | |
| 抗体稀释倍数 Antibody dilution | 抗体稀释倍数 Antibody dilution | |
| | 4H4 | 4G12 |
| 1 : 2000 | 3.023 | 3.295 |
| 1 : 4000 | 2.682 | 2.786 |
| 1 : 8000 | 2.282 | 2.310 |
| 1 : 16000 | 1.946 | 1.956 |
| 1 : 32000 | 1.471 | 1.510 |
| 1 : 64000 | 0.918 | 0.862 |
| 1 : 128000 | 0.542 | 0.438 |
| 1 : 256000 | 0.210 | 0.325 |
| CK (PBST) | 0.056 | 0.071 |

2.2 抗体的特异性及灵敏度测定

采用 DAS-ELISA 对 19 个供试细菌进行了交叉反应测试, 结果表明(表 3), 4G12 抗体对 3 株目标细菌(ATCC-27822、27794 和 27795)表现明显阳性, 而对其它 16 个非目标细菌均呈阴性反应, 说明单抗(4G12)具有较强特异性。

| 表 3 4G12 抗体特异性测定结果(DAS-ELISA) | | | |
|---|-----------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Table 3 The determination of specificity of 4G12 McAb | | | |
| 菌株名 Name of strains | 菌株号 No. of strains | OD 值 Optical density value | 判定结果 Determine results |
| <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskense</i> | ATCC 27822 | 1.733 | + |
| | ATCC 27794 | 1.523 | + |
| | ATCC 27795 | 1.546 | + |
| <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> | ATCC 8200 | 0.091 | - |
| | ATCC 0085 | 0.082 | - |
| <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> | NO.01 | 0.090 | - |
| <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | NO.02 | 0.089 | - |
| | NO.03 | 0.085 | - |
| <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i> | NO.04 | 0.093 | - |
| | NO.05 | 0.083 | - |
| <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> Borgey et al | NO.06 | 0.089 | - |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> van Hall | NO.07 | 0.092 | - |
| <i>Xanthomonas campstris</i> pv. <i>holcicola</i> (Elliott) Dye | NO.08 | 0.097 | - |
| | NO.09 | 0.092 | - |
| <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> Willems et al | NO.10 | 0.092 | - |
| <i>Clavibacter tritici</i> (Carlson and vidaver) Davis et al | NO.11 | 0.087 | - |
| | NO.12 | 0.088 | - |
| | NO.13 | 0.096 | - |
| <i>C. michiganensis</i> | NO.14 | 0.094 | - |
| CK (PBST) | - | 0.060 | - |

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

用 4G12 抗体作为检测抗体, 分别进行间接 ELISA 和 DAS-ELISA 试验, 以确定其检测灵敏度。在间接 ELISA 反应中, 当抗体浓度为 1 : 16000, 菌体包被浓度为 1.0×10^8 CFU/L 时, OD_{405} 值为 0.223, 阴性对照 OD_{405} 值为 0.105, $P/N > 2.0$, 因此确定间接 ELISA 的检测下限为 1.0×10^8 CFU/L。

采用棋盘法确定了 DAS-ELISA 中两个抗体的工作浓度, 捕获抗体(4H4)为 1 : 4000, Ap 标记检测抗体(AP-4G12)为 1 : 2000。在 *Cmn* 浓度为 1.0×10^8 CFU/L 时, OD_{405} 值为 0.324, 而阴性对照 OD_{405} 值为 0.083, 二者之比大于 2.0, 表明该 DAS-ELISA

的检测下限亦为 1.0×10^8 CFU/L。

2.3 样品测定

如图 1 所示, 在 PBST 稀释液中, 两种检测方法的检测限相同, 均为 1.0×10^8 CFU/L。但在带菌的种子悬浮液中, 检测结果有着明显的区别, 间接 ELISA 在两个样品中 *Cmn* 浓度为 1.0×10^{10} CFU/L 时, 检测显示弱阳性, 两个样品的 OD_{405} 值分别为 0.210、0.225, 阴性对照分别为 0.103、0.101。说明间接 ELISA 方法在样品检测中最低检测限为 1.0×10^{10} CFU/L, 而双抗体夹心方法的检测限可达 1.0×10^9 CFU/L。

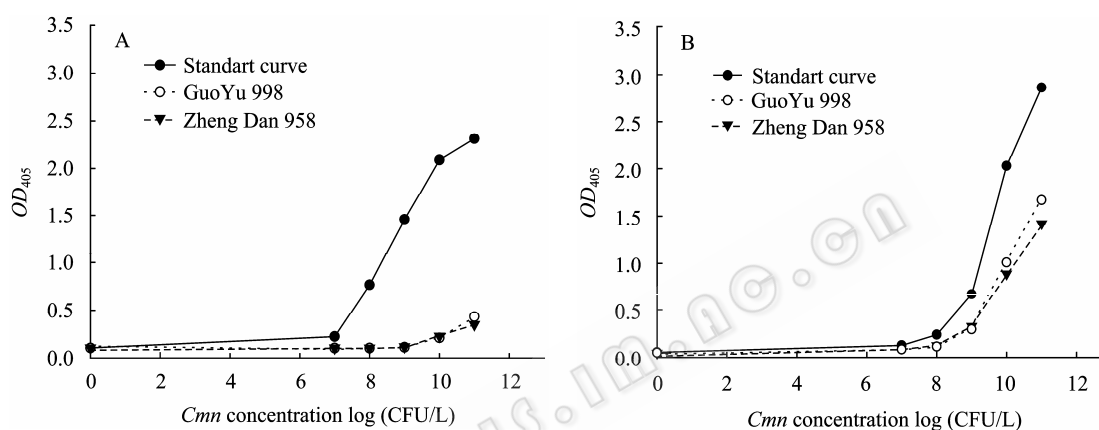


图 1 间接 ELISA (A)及 DAS-ELISA (B)对两种玉米种子样品添加 *Cmn* 后的检测结果

Fig. 1 The detection results of two samples of corn added with *Cmn* by indirect ELISA (A) and DAS-ELISA (B)

3 讨论

本研究基于 *Cmn* 单克隆抗体建立了特异、灵敏的 DAS-ELISA 检测方法, 根据文献检索结果, 玉米萎蔫病菌双单抗夹心 ELISA 为首次报道。

在间接 ELISA 试验中, 改进包被方法和提高包被效率, 是提高反应灵敏度的重要环节。Lamka 等^[13]采用 pH 9.6 的 CBS 对玉米枯萎病菌种子提取液进行 4℃ 过夜条件下包被, 检测结果为阴性, 说明常规条件下该细菌很难结合到酶标板上。陈兴扶等^[12]也在 Hovavol CJ 等人使用的“干包被”法的基础上做了改进, 用 0.02 mol/L 的 Tris 替代了 0.05 mol/L 的 CBS 进行包被, 在灵敏度及稳定性方面都有所提高。本研究中对包被方法又做了进一步优化, 即采用 0.05 mol/L CBS 在 45℃ 条件下烘干(4–6 h), 使之形成一层以物理性吸附为基础的蛋白膜, 之后再用水乙醇浸泡(15 min)。结果发现, OD 值较常规包被方法明显提高, 在 *Cmn* 浓度为 1.0×10^{10} CFU/L, 抗

体浓度为 1 : 16000 时, OD_{405} 为 1.956 较常规包被方法(37℃ 包被 2 h 或 4℃ 包被过夜)的 0.986 提高了 49.5%, 并且封闭后置于 4℃ 下保存 1 周, OD 值无变化。这可能取决于 45℃ 下的快速干燥, 或者无水乙醇对蛋白质的固定效果, 这方面还有待于进一步研究。

本试验通过比较两种 ELISA 反应, 确立了玉米内州萎蔫病菌 DAS-ELISA 的检测方法。在 PBST 中对 *Cmn* 进行检测, 两种检测方法灵敏度没有区别, 均可达到 1.0×10^9 CFU/L。但在进行带菌的玉米种子悬浮液检测时, 两种检测方法灵敏度明显低于在 PBST 中的检测结果。间接 ELISA 方法测定在 *Cmn* 浓度为 1.0×10^{10} CFU/L 时, 两个检测样品的 P/N 值分别为 2.039 和 2.227。DAS-ELISA 在 *Cmn* 浓度为 1.0×10^9 CFU/L, 两个检测样品的 P/N 值为 3.386 和 3.770, DAS-ELISA 的灵敏度是间接 ELISA 的灵敏度的 10 倍。分析原因, 可能是由于在微孔板内种子组

织会和细菌竞争或封闭掉结合位点^[13], 导致灵敏度降低, 尤其是在间接 ELISA 包被过程中此现象更为明显。因此在进行种子样品检测时, 多采用 DAS-ELISA 方法。

在样品检测试验中采用了两种 *Cmn* 的添加方法, 一种是将 *Cmn* 添加到粉碎的玉米种子中浸泡(4°C)过夜, 另一种是直接将 *Cmn* 添加到已制备的种子悬浮液中, 分别将其调整至待测浓度。DAS-ELISA 测试结果表明, 两种添加方法中前者比后者 OD 值稍高, 经统计分析($P > 0.05$), 差异不显著, 最终确定该 DAS-ELISA 的检测下限 1.0×10^9 CFU/L。由于国内尚无该病的发生, 考虑到 *Cmn* 的使用安全性问题, 本实验未进行田间植株接种检测方面的研究。本试验建立的 DAS-ELISA 方法, 填补了国内无 *Cmn* 免疫学检测方法的空白, 亦为研制检测试剂盒和快速检测试纸条奠定了基础。

致谢: 特别感谢中国航天员科研训练中心杨唐斌博士在实验过程中给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] Jackson AT, Harveson RM, Vidaver AK. Goss's bacterial wilt and leaf blight of corn. *University of Nebraska-Lincoln Extension publication*, 2007, online at <http://www.extension.unl.edu/publications>.
- [2] Kennedy BW, Alcorn SM. Estimates of US crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 1980(647): 674–676.
- [3] CABI, EPPO. 欧洲检疫性有害生物. 中国-欧盟农业技术中心译. 北京: 中国农业科技出版社, 1997.
- [4] 王岭, 田世民, 高海霞, 等. 玉米内州萎蔫病研究进展. *植物检疫*, 2008, 22(2): 118–121.
- [5] Gross DC, Vidaver AK. A selective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense* in corn. *Plant Disease*, 1990(74): 908–911.
- [6] Aizawa M, Tsukamoto T, Mizuno A. Studies on the diagnosis of foreign bacterial disease of quarantine significance VII. Preparation of selective medium and antiserum for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. *Research Bulletin of the Plant Protection Service (Japan)*, 1997(33): 7–15.
- [7] Louws FJ, Bell J, Medina-Mora CM, et al. Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 1998, 88(8): 862–868.
- [8] Ayala LA, Rodriguez HR, Aguilar GC, et al. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mandel and Iazari) Vidaver and Mandel, using the polymerase chain reaction. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 2004, 22(2): 239–245.
- [9] Pstrik KH, Rainey FA. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology*, 1999(147): 687–693.
- [10] Bach HJ, Jessen, Schlote M, et al. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(1): 85–91.
- [11] 张爱红, 苗红芹. 几种植物病原细菌的检测和鉴定技术. *河北农业科学*, 2008, 12(8): 30–32.
- [12] 陈兴扶, 肖桂英. ELISA 抗原的“干包被”方法实验. *中国动物检疫*, 1990, 6(4): 10–12.
- [13] Lamka GL, Hill JH, McGee DC, et al. Development of an immunosorbent assay for seedborne *Eriwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology*, 1991, 81(8): 839–845.
- [14] 青玲, 吴建祥, 戚益军, 等. 蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体制备及检测应用. *微生物学报*, 2000, 40(2): 166–173.
- [15] 玉米细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准, SN/T 1375-2004.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。