

研究报告

酶联免疫吸附技术 (ELISA) 对
大豆根瘤菌的鉴定

杨芬声 谢小保 李季伦

(北京农业大学微生物专业, 北京 100094)

摘要 本文用直接 ELISA 法检测大豆根瘤菌 USDA 110 和 RTt 50 的纯培养菌体和根瘤。确定了该试验的最佳工作条件: 酶标结合物 HRP-Ab 110 和 HRP-Ab 50 的工作稀释度分别为 1:3200 和 1:800, 抗体 Ab 110 和 Ab 50 的工作稀释度分别为 1:3200 和 1:800, 抗原 USDA 110 和 RTt 50 的最适工作浓度均为 6×10^7 细胞/ml。该法能够特异地检测和区别慢生型和快生型大豆根瘤菌。在这两种类型的大豆根瘤菌中, 同种内的少数菌株存在交叉反应, 通过吸收可以消除, 从而使 ELISA 的检测达到菌株水平。ELISA 的最低检测浓度为 2×10^5 细胞/ml。在冰箱低温 (-20°C) 和硅胶干燥常温条件下保存根瘤, 均不影响 ELISA 的检测效果, 灵敏度不降低。用 ELISA 研究 USDA 110 和 RTt 50 在不灭菌的盆栽土壤中的竞争结瘤能力, 发现 USDA 110 在大豆的不同生育期的占瘤率在 75—87.5%, RTt 50 则为 25—45%, 并证实 ELISA 比凝集法敏感。

关键词 酶联免疫吸附技术; 抗原; 抗体; 大豆根瘤菌

当前, 检测根瘤菌的方法有血清凝集法、琼脂糖扩散法、免疫荧光技术、ELISA、抗生素抗性标记、DNA 菌落杂交和其他方法。其中, ELISA 是 70 年代初建立的^[1], 经过 20 多年的发展, 现已日趋完善和成熟。由于该技术灵敏度高, 特异性强, 快速简便, 已在生物化学、免疫学、临床病理和药物化学等领域中得到广泛的应用。1971 年 Engvall 报道 ELISA 的灵敏度可与放射性免疫分析法相比, 比凝集法和琼脂糖扩散法高 4—6 个数量级^[2]。另外, 该法只需使用简单的酶标检测仪, 能够大规模地分析样品, 并在短期内完成。1978 年 Kishinevsky 首次将 ELISA 应用于根瘤菌的检测^[3], 随后 Berger(1979) 改用间接 ELISA 检测小扁豆根瘤菌^[4]。为了提高 ELISA 的灵敏度, Martenson(1983) 在 ELISA 中使用 β -半乳糖苷酶, 能检测 10^3 个细胞/ml 抗原和 $80\mu\text{g}$ 根瘤^[5]。

在国际上, 根瘤菌检测以 ELISA 和抗生素抗性标记用得较广泛, 其中又以 ELISA 使用得多, 而且相对稳定可靠。我国的根瘤菌检测基本

上还是用凝集法和抗生素抗性法, ELISA 在根瘤菌的检测上应用甚少。在我国, 研究根瘤菌和使用根瘤菌剂有 50 多年的历史, 目前已选育各种高效固氮的根瘤菌, 并施入田间, 但缺乏和很少使用根瘤菌田间快速检测技术, 影响了对根瘤菌在土壤中的生态、结瘤固氮效率和接种方法的有效性的确切了解。尤其在根瘤菌的应用方面, 往往只根据植物施加菌剂后的增产来估计效果, 而无法判断究竟是所施用的优良根瘤菌抑或土著根瘤菌在起作用, 也不清楚环境条件对所施菌剂的影响, 在根瘤菌剂的研究和应用上缺乏准确性和科学性。所以, 根瘤菌检测技术的研究已成为当务之急。本文用 ELISA 对慢生型大豆根瘤菌 USDA110 和快生型大豆根瘤菌 RTt50 进行检测研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

慢生型大豆根瘤菌 USDA110 引自美国加州大学戴维斯分校, 快生型大豆根瘤菌 RTt50

为本室研究用菌株，分别用作 ELISA 的抗原，并用以制备抗体。

慢生型大豆根瘤菌 USDA6、SM、B15 和 113-2 为国内外研究菌种，由本室保存。快生型大豆根瘤菌 USDA191 和 USDA192 引自美国，2057 引自中国农科院土肥所，RT3、RT7 和 RT14 分离自天津，RX41 分离自新疆。苜蓿根瘤菌 042B 由本室分离自新疆，紫云英根瘤菌 103 引自南京农业大学土化系，菜豆根瘤菌 RCR3622 和大肠杆菌 HB101 引自美国，固氮螺菌玉 62 由本室分离自北京郊区。

(二) 培养基

1. YMA 培养基 [6]
2. TY 培养基 [7]
3. 水培营养液 [8]

(三) 直接 ELISA 的使用

1. ELISA 的缓冲液 [9]
2. USDA110 和 RTt50 抗原的制备 [10]
3. 根瘤的培育和根瘤中菌体抗原的制备：

所用的大豆品种为“北引1号”。大豆根瘤的培育步骤参阅文献 [8]。大豆植株生长一个月后，将获得的光照室根瘤和田间收集的根瘤放在冰箱低温保存。使用前将根瘤用无菌水洗净，待根瘤吸足水份，再用无菌水洗一次，然后加 0.5ml 生理盐水逐个压碎，得到根瘤中的菌体抗原。在 65℃ 放置 15—30min，再加入 3—10ml 磷酸盐-吐温 (PBS-T) 缓冲液，用 722 分光光度计测其 O.D_{600nm} 值。

4. 大豆根瘤菌抗血清的制备 [10]。
5. 兔抗根瘤血清 IgG 的提纯 [11]。
6. 酶标抗体 IgG 的制备 [12]。
7. 酶标结合物辣根过氧化物酶 (HRP-IgG) 和血清最适工作浓度的确定 [9]。
8. 最适抗原稀释浓度的确定 [9]。

9. 田间盆栽试验：采用本校种植大豆的试验田土壤，不作灭菌处理。设不接种为对照，接种 USDA110 和 RTt50 三个处理，每个处理 15 盆。接种方法采用穴施，先撒菌肥，再播种大豆种子，盖上一层土，各盆放在试验田土上。分别在苗期、花期、结荚期和鼓粒期，各取三盆采

集 50 个根瘤，测定接种菌的占瘤率。

结果和讨论

(一) 酶标结合物与血清的最适工作浓度

当酶结合物 (HRP-IgG110) 和阳性血清 Ab110 各 1:3200 稀释时，O.D 值大于 1.0，因此，HRP-IgG110 和 Ab110 的工作浓度皆定为 1:3200。当 HRP-IgG50 和 Ab50 各作 1:800 稀释时，O.D 值大于 1.0。因此，HRP-IgG50 和 Ab50 的工作浓度都定为 1:800。

其抗原浓度均为起始浓度，即 O.D_{600nm}=0.5。

(二) 最适抗原稀释浓度的确定

当抗原 USDA110 和 RTt 50 各稀释 16 倍时，阳性血清的 O.D 值分别为 1.0 左右和 0.7，而阴性血清的 O.D 值分别在 0.1 以下和接近最低值，所以，这两种抗原均选择 1:16 稀释度作为工作浓度。

(三) 结果判定标准的制定

选用亲缘关系远的菌株作为阴性菌株进行测定 (表 1)。ELISA 试验判断标准取 O.D=O.D(平均值)+2 个标准差。由于 $\bar{X} = 0.086$, $S\delta = 0.018$, 阴性最高限为 $\bar{X} + 2S\delta = 0.12$ 。所以，O.D 值大于 0.12 的菌株为阳性，小于或等于 0.12 的菌株为阴性。

表 1 结果判定标准的制定

菌株	HB101	RCR3622	玉 62	042B	103
O.D _{600nm}	0.07	0.08	0.07	0.11	0.10

(四) ELISA 的特异性试验

1. 交叉反应试验：用慢生型大豆根瘤菌 USDA6、SM、B15、113-2 和快生型大豆根瘤菌 RT3、RT7、RT14、RTt50、RX41、2057、USDA191、USDA192，测定血清 Ab110 和 Ab50 的特异性。

从表 2 可知，USDA110 与供试的快生型大豆根瘤菌之间无同源性抗原，用 ELISA 可以特异性地检测出来。在慢生型大豆根瘤菌中，USDA110 和 113-2 之间存在同源性抗原，出现交叉反应，而与供试的其他慢生型大豆根瘤菌无交叉反应。快生型大豆根瘤菌 RTt 50 的抗体 Ab50 与慢生型大豆根瘤菌没有交叉反应，能够

轻易地检测出来。Ab50与RT3有交叉反应，而与其他供试的快生型大豆根瘤菌无交叉反应。

表2 Ab110和Ab50与其他根瘤菌的交叉反应试验

菌株 O.D _{600nm} 血清	USDA110	USDA6	SM	B15	113-2	RT3	RT7	RT14	RTt50	RX41	2057	USDA191	USDA192
Ab110	1.07	0.09	0.08	0.11	0.98	0.07	0.07	0.06	0.10	0.09	0.08	0.06	0.10
阴性血清	0.10	0.07	0.09	0.09	0.10	0.09	0.08	0.07	0.11	0.07	0.08	0.09	0.09
Ab50	0.04	0.05	0.08	0.06	0.09	0.70	0.09	0.10	0.73	0.09	0.04	0.07	0.06
阴性血清	0.05	0.03	0.07	0.07	0.06	0.08	0.08	0.08	0.07	0.09	0.07	0.06	0.05

2. 吸收试验：为了消除USDA110和113-2菌株之间的共同抗原，检测其特异性，将Ab110与113-2菌株在37℃下反应1h，然后在4℃过夜，离心除去菌体，重复1-2次。用113-2吸收过的血清Ab110作ELISA试验(表3)，发现USDA110的O.D值没有改变，而113-2的O.D值则降到0.1，说明USDA110与113-2除了具有共同抗原外，还存在特异性抗原。

表3 Ab110与113-2菌株的吸收试验

菌株 O.D _{600nm} 血清	USDA110	113-2
吸收前的Ab110	1.10	1.05
吸收后的Ab110	1.07	0.10

将Ab50与RT3菌株作吸收试验，方法同上。用RT3吸收过的抗体Ab50作ELISA试验(表4)，表明RTt50与RT3之间既具有共同抗原，也具有特异性抗原。通过吸收试验，可以排

除共同抗原产生的抗体，而把特异性的抗原检测出来。

表4 Ab50与RT3菌株的吸收试验

菌株 O.D _{600nm} 血清	RTt50	RT3
吸收前的Ab50	0.75	0.70
吸收后的Ab50	0.73	0.10

(五) 菌体抗原和根瘤中菌体抗原的一致性试验

用1:16倍稀释的菌体培养液和同样浓度的根瘤中的菌体抗原对比作ELISA试验，测定其O.D值。

如表5所示，菌体抗原和根瘤中菌体抗原的ELISA O.D值是一致的。用菌体抗原吸收后的特异性血清对根瘤中菌体抗原也是特异的，从而为消除根瘤菌体间非特异交叉反应提供了依据，有利于准确地检测目的根瘤菌的占瘤率。

表5 菌体抗原和根瘤中菌体抗原的一致性试验

菌株		USDA110	113-2	RTt50	RT3	USDA191
O.D _{600nm} 血清		CN	CN	CN	CN	CN
Ab110	吸收前	1.10 1.13	1.09 1.11	0.09 0.10	0.07 0.09	0.06 0.09
	吸收后	1.07 1.10	0.11 0.10	0.10 0.08	0.06 0.10	0.05 0.10
Ab50	吸收前	0.09 0.10	0.09 0.10	0.76 0.79	0.72 0.75	0.09 0.09
	吸收后	0.08 0.11	0.07 0.08	0.70 0.73	0.09 0.10	0.11 0.08

“C”示纯培养细胞；“N”示根瘤中菌体

(六) 根瘤中菌体抗原浓度对O.D值的影响

用经过二倍系列稀释的根瘤中菌体抗原作ELISA试验，检测抗原浓度变化对其O.D值的影响(表6)。

结果表明，虽然菌体抗原浓度在0.02-0.5之间变化，但ELISA的O.D值始终比本试验规定的阴性值大。因此，检测时不要求所有根瘤中菌体抗原的浓度一致，这就为根瘤中菌体抗原

的制备和根瘤的大量检测提供了方便。

表 6 根瘤中菌体抗原浓度对 ELISA 的 O.D 值影响

血清 O.D _{600nm} 抗原浓度	Ab110	Ab50
0.50	1.59	1.01
0.25	1.60	1.00
0.12	1.58	1.02
0.06	1.19	0.97
0.04	1.10	0.75
0.02	1.01	0.69

(七) 敏感性试验

为了比较 ELISA 和凝集试验的敏感性, 分别取 Ab110 和 Ab50, 以 1:100 为起始浓度进行倍比稀释, 然后进行 ELISA 测定, 以出现阳性结果的最高稀释度为其 ELISA 效价。以 1:50 为起始浓度进行倍比稀释, 然后进行凝集试验测定, 以出现阳性结果的最高稀释度为其凝集效价。

结果如下: Ab110 和 Ab50 的 ELISA 效价分别为 1:51200 和 12800, 而其凝集法效价则分别为 1:800 和 1:200, 表明 ELISA 的效价高于凝集法。

本试验检测抗原的最低浓度为 2×10^5 细胞/ml, 而凝集法能检测的浓度为 10^9 细胞/ml 左右, 因此 ELISA 的灵敏度比凝集法高 10^3 倍, 能够检测很小的根瘤, 而凝集法只能检测较大的根瘤。

(八) 根瘤的保存方法对 ELISA 测定值的影响

用冰箱低温 (-20 °C) 和硅胶干燥常温保存 USDA110 根瘤, 保存时间从 0-12 周。结果表明, 两种保存方法对 ELISA 试验均无影响。硅胶干燥常温保存法可以长期保存根瘤, 更适于偏远地区采集根瘤。

(九) 盆栽检测

用 ELISA 和凝集法检测 USDA110 和 RTt50 在盆栽试验中的占瘤率 (表 7)。结果表明: (1) ELISA 法比凝集法敏感, USDA110 所测得的占瘤率比凝集法高出 10-12.5%, RTt50 则高出 5-10%, 原因是凝集法的灵敏度低, 检测不出小根瘤。(2) USDA110 与土著根瘤菌的竞争结瘤能力比 RTt50 强。(3) USDA110 和 RTt50 的抗体与土著根瘤菌不发生交叉反应。

表 7 USDA110 和 RTt50 在大豆不同生育期的占瘤率 (%)

生育期	USDA110		RTt50	
	ELISA	凝集法	ELISA	凝集法
苗期	75	62.5	25	20
开花期	85	75	42	34
结荚期	87.5	75	45	40
鼓粒期	87.5	87.5	35	25
不接种对照	0	0	0	0

注: 土壤不经灭菌处理

小结

1. 在本试验中, 由于间接 ELISA 的重复性差, 不稳定和阴性血清的数值偏大, 所以, 采用直接 ELISA 检测大豆根瘤菌, 具有简便、快速、敏感和特异性强的特点。

2. 在检测过程中, 同种中的少数菌株间虽然会发生交叉反应, 但可通过吸收反应除去共同抗体, 使检测达到菌株水平。

3. 本试验首次使用价格低廉的辣根过氧化

物酶代替碱性磷酸酶, 检测的灵敏度较高, 适于我国国情, 有推广价值。

4. 直接 ELISA 用于盆栽检测, 效果较好, 可望用于田间根瘤菌的检测。

参 考 文 献

- Engvall E and P Perlmann: *Immunochemistry*, 8: 871-874, 1971.
- Hobbie J E et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228, 1977.

3. Kishinevsky B and M Bar - Joseph: *Can. J. Microbiol.* **24**: 1537 -1543, 1978.
4. Berger J A et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 642 -646, 1979.
5. Martenson A M et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 247 -253, 1983.
6. 上海植物生理研究所固氮组译: 根瘤菌实用研究手册, 上海人民出版社, 第3页, 1973年。
7. 杨苏声等: 微生物学报, **29** (2): 107-112, 1989。
8. 周平贞等: 中国油料, **2**: 60-62, 1979。
9. 蒋成淦: 酶免疫测定法, 人民卫生出版社, 第178-185页, 1984。
10. 王福生等: 华中农业大学学报, **4** (3): 38-47, 1985。
11. 蔡文琴等: 实用免疫细胞化学, 四川科学技术出版社, 第30-33页, 1988。
12. 郭春祥等: 上海免疫学杂志, **3** (2): 97-100, 1983。

(1992-10-9 收稿)

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR SOYBEAN RHIZOBIA STRAIN IDENTIFICATION

Yang Susheng Xie Xiaobao Li Jilun

(Department of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

The direct ELISA was used to detect cells from pure cultures and nodules of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 and *Rhizobium fredii* RTt50. The optimum dilution of enzyme-linked conjugates, HRP-Ab110 and HRP-Ab50, was 1:3200 and 1:800 respectively. The optimum dilution of antibodies, Ab110 and Ab50, was 1:3200 and 1:800 separately. The optimum concentrations of antigens, USDA110 and RTt50, were both 6×10^7 cells/ml. Slow and fast-growing soybean rhizobia can be detected and differentiated specifically by direct ELISA. Among a few strains of these two groups of soybean rhizobia, cross-reaction occurred. This was eliminated by absorption, so that specific strain could be identified by ELISA. The minimal concentration of antigen for detected was 2×10^5 cells/ml. It was found that nodules preserved by drying over silica gel or freezing were equally good, without loss in sensitivity of ELISA. ELISA was used to study the competition of USDA110 and RTt50 with indigenous rhizobia in soil pot experiment. Nodule occupancy of USDA110 ranged from 75-87.5% in different growing season of soybean and RTt50 ranged from 25-45%. The result showed that ELISA was more sensitive than agglutination.

Key words Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Antigen; Antibody; Soybean Rhizobia