

玉米细菌性枯萎病菌改良 Dot-ELISA 检测研究

王 岭^{1,2} 田世民^{2*} 高海霞^{1,2} 邹明强^{2*} 蒋继志¹ 崔 霞² 胡秀丽² 陈立本²

(1. 河北大学生命科学学院 保定 071002)

(2. 中国检验检疫科学研究院 北京 100025)

摘 要: 通过激光切割技术加工出硝酸纤维素膜小圆片并粘贴在已打孔的塑料胶条上, 制成包含 8 个圆片的 NCM 条(NCM test strip), 进一步在 NCM 条上建立了玉米细菌性枯萎病菌的 Dot-ELISA 检测方法。研究发现, 在 NCM 圆片上的 Dot-ELISA 检测灵敏度与点样量密切相关, 采用 10 μ L/点的加样量比通常的 1 μ L/点可提高检测灵敏度 10-100 倍; 间接 Dot-ELISA 的检测灵敏度是双抗夹心 dot-ELISA 的 10 倍, 该结果进一步在微孔板 ELISA 的检测中得到证实。玉米细菌性枯萎病菌的改良 Dot-ELISA 检测是一种较为灵敏、快速、稳定、规范的实验方法, 为进一步研究该病菌的微流控芯片斑点免疫检测方法奠定了前期工作基础。

关键词: 玉米细菌性枯萎病菌, Dot-ELISA, NCM 条, 检测

Study on Detection of *Pantoea Stewartii* subsp. *stewartii* Based on Dot-ELISA

WANG Ling^{1,2} TIAN Shi-Min^{2*} GAO Hai-Xia^{1,2} ZOU Ming-Qiang^{2*} JIANG Ji-Zhi¹
CUI Xia² HU Xiu-Li² CHEN Li-Ben²

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002)

(2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025)

Abstract: Enzyme linked immunosorbent assay performing on newly modified nitrocellulose membrane strip (NCM test strip) for detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, the casual agent of bacterial wilt of corn, was established. The test strip used in this study has eight round pieces of nitrocellulose membrane with a diameter of 2 mm, which was cut with a VersaLaser, and then was affixed on a plastic adhesive tape. Detection sensitivity for the pathogen was increased by 10-100 folds when 10 μ L per site of the bacterial suspension was used, as compared to that in the normal amount of 1 μ L per dot; detection sensitivity in indirect dot-ELISA was 10 folds higher than that in sandwich double antibodies dot-ELISA (DAS-dot-ELISA), These results were further confirmed from the ELISA tests carried on the normal microtiter plates. This study will promote development of microfluidic chip detection method combined with the dot immunoassay for *P. stewartii* subsp. *stewartii* on corn.

Keywords: *P. stewartii* subsp. *stewartii*, Dot-ELISA, NCM test strip, Detection

玉米细菌性枯萎病菌 (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, syn. *Erwinia stewartii*) 是一种黄色、不运动、革兰氏阴性、兼性厌氧杆菌, 能引起玉米细菌性枯萎病(Bacterial Wilt of Corn, BSW)。1897 年在美国纽约州首次发现此病害, 此后相继在加拿大、墨西哥、巴西等 22 个国家陆续发生^[1]。该病是玉米生产上的重要细菌病害之一, 尤其对甜玉米损坏巨大^[2]。我国已经将此病菌列为出入境 A1 类检疫对象。检测该病菌的方法有: 分离培养及生化鉴定^[3]、血清学检测(免疫荧光着色^[4]和酶联免疫吸附检测^[5])以及分子生物学检测(RAPD-PCR 法^[6], LCR-PCR 法^[7], Nested-PCR 法^[8], multiple -PCR 法^[9]和荧光实时 PCR 法^[10]等)。相比之下, 分离培养及生化鉴定法检测耗时长, 而分子生物学检测操作繁琐、样品处理量小。因此, 在检验检疫实践中 ELISA 仍然是进行玉米细菌性枯萎病菌快速初筛的主要方法, 如 2006 欧洲与地中海植物保护组织发布的玉米细菌性枯萎病菌诊断标准流程中规定首先对样品进行 ELISA 方法初筛, 阴性结果可直接判定, 阳性结果才进一步通过细菌培养与生化检测和分子生物学方法鉴定^[4]。

以硝酸纤维素膜(Nitro cellulose membrane, NCM)为反应载体的斑点酶联免疫吸附实验(Dot-ELISA)具有样品试剂用量少, 吸附量大, 易操作等特点, 其检测灵敏度有时还高于通常的微孔板 ELISA, 已经在多种病原微生物的检验中得到研究和应用^[11,12,13]。尚未见到有关 Dot-ELISA 法检测玉米细菌性枯萎病菌全菌抗原的报道。

通常的 Dot-ELISA 是在手工裁剪的 NCM 片上进行, 由于膜的扩散性和重复点样点的不一致, 导致样品间污染严重、显色点形状各异、显色不均匀、结果重复性差, 制约了 Dot-ELISA 的实际应用和推广。

在前期工作的基础上^[14], 本研究采用激光切割加工成形的硝酸纤维素膜条(NCM test strips)进行了玉米细菌性枯萎病菌 Dot-ELISA 检测研究, 拟通过测试点样量和 ELISA 操作方案对检测灵敏度的影响, 并与通常的微孔板 ELISA 结果进行比对, 以建立灵敏、快速、稳定、规范的玉米细菌性枯萎病菌 Dot-ELISA 检测方法。同时, 为进一步研究该病原细菌的微流控芯片斑点免疫检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

供试的玉米细菌性枯萎病菌株(编号: 0085)由

南京农业大学植物保护学院胡白石老师惠赠。该枯萎病菌的包被抗体(多克隆抗体)、检测抗体(单克隆抗体)和碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG 以及对应的显色底物(对硝基磷酸盐, PNPP)均购自美国 Agdia 公司。Dot-ELISA 所用的显色底物为 5-溴-4-氯-3-吲哚乙酸/氮蓝四唑(BCIP/NBT), 购自美国 Promega 公司。牛血清蛋白(bovine serum, BSA)购自 Sigma 公司。酵母浸出物购自 Oxoid 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 NCM 条的制作

硝酸纤维素膜条(NCM 条, NCM test strip)的制作过程简单如图 1, 用激光切割机(Versa laser, USA)将一块塑料胶片切割成若干个宽度为 2 mm 的胶条, 其上再切割出中心间距为 4 mm 的 8 个椭圆形小孔(长轴 2 mm, 短轴 1.5 mm); 掀起胶片, 在其下面放置一块合适大小的硝酸纤维素膜片(孔径 0.45 μm, Gelman Science, 美国), 与胶片椭圆孔的相同位置上再经激光切割机切割出直径 2 mm 的圆片, 揭去外缘部分的硝酸纤维素膜, 将切割好的塑料胶片按下, 使 NCM 圆片粘贴到胶片上, 即制成规范的 NCM 条。

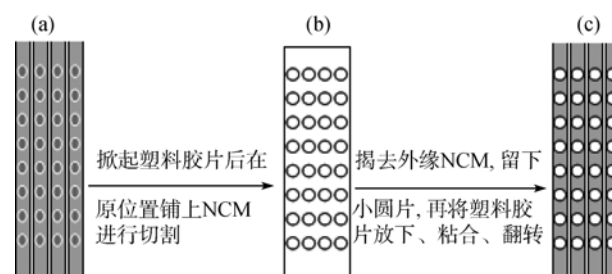


图 1 NCM 条制作示意图

Fig.1 Schematics of manufacturing nitrocellulose membrane strip

a: 圆形塑料胶片, 长轴 2 mm, 短轴 1.5 mm; b: 激光切割的 NCM 圆片, 直径 2 mm; c: 粘合成形的 NCM 条

a: Plastic adhesive tape strips with eight ellipse holes those are 2mm for long axis and 1.5mm for short axis; b: Nitrocellulose membrane pieces with a diameter of 2mm, which were incised by VersaLaser; c: Made-up nitrocellulose membrane strips

1.3 细菌培养与菌悬液制备

刮取细菌菌体转接于 NBY 液体培养基(营养肉汤 8.0 g, 酵母提取物 2.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, 葡萄糖 5.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, ddH₂O 1000 mL, pH 7.0)中, 在 28 °C 下于摇床中培养 24 h (转速为 100 r/min), 收集菌体悬液离心(10000 r/min, 10 min)后沉淀用无菌 PBS(KH_2PO_4 0.2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g, KCl 0.2 g, NaCl 0.2 g, pH 7.4)复悬, 重复 3 次。最后以碳酸缓冲液(Na_2CO_3 1.59 g,

NaHCO₃ 2.93 g, ddH₂O 1000 mL, pH 9.6, CBS)复悬沉淀用于间接法检测,以PBS复悬沉淀后用于双抗夹心法检测。以血球计数板法确定菌悬液浓度后备用。

1.4 Dot-ELISA 操作步骤

间接Dot-ELISA:参照李燕宏等^[15]的方法并略有改进。硝酸纤维素膜条使用前在PBST(含0.05%吐温20的PBS)中浸泡30 min以去除粉尘。用CBS将菌悬液进行10倍梯度稀释,再分别点加在NCM的小圆片上,空白点加CBS,室温自然干燥30 min,未经清洗的NCM条投入含2% BSA的CBS溶液中浸泡封闭60 min。PBST清洗3次后再将NCM条放入由PBS稀释200倍的检测抗体、酶标抗鼠IgG抗体混合液中浸泡60 min, PBST清洗5次,3 min/次。最后放入底物缓冲液[50 mg/mL NBT 33 μ L, 50 mg/mL BCIP 16.5 μ L, 碱性磷酸酶缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂ pH 9.0) 5 mL]中显色至满意,自然晾干的NCM条可在自封袋中长期保存。

双抗夹心Dot-ELISA:参照田世民等^[14]的方法并略有改进,用CBS将包被抗体稀释为200倍,将NCM投入包被抗体中浸泡60 min,未经清洗的NCM条投入含2% BSA的CBS溶液中浸泡封闭60 min。菌液用PBS稀释为10倍梯度后点样,空白为PBS。二抗反应、显色反应步骤和间接Dot-ELISA相同。

1.5 微孔板 ELISA 实验步骤

参照Lamka等^[5]的方法并略有改进,间接ELISA实验将菌悬液用CBS稀释成10倍梯度,加入100 μ L于微孔板中4下包被过夜。弃去菌悬液拍干后,加入200 μ L 2%BSA于37下封闭2 h。PBST洗3次,每次3 min。加入100 μ L用PBS稀释的检测抗体、酶标抗体混合物,抗体工作浓度为200倍稀释,37下反应1 h,然后洗5次。加入底物缓冲液100 μ L于室温下显色30 min。50 μ L 3 mol/L的NaOH终止反应,在酶标仪上测定OD₄₀₅值。DAS-ELISA实验将包被抗体用CBS稀释成200倍,加入100 μ L于4下包被过夜,排空微孔板拍干后,加入200 μ L 2%BSA于37下封闭2 h。PBST洗3次,加入用PBS稀释的10倍梯度菌悬液100 μ L, 37 1 h。二抗反应、显色反应步骤和间接ELISA相同。

在微孔板上设置板间和板内重复性实验,结果经originpro 7.5统计软件分析,以评价实验结果的可重复性与可靠性。

2 结果与分析

2.1 加样量对检测灵敏度的影响

将10倍梯度稀释的菌悬液按1 μ L/点的量点加到NCM条上进行Dot-ELISA检测,结果如图2-a所示,可见其检测限为 2×10^7 cfu/mL。为了观察点样量对检测限的影响,分别取 2×10^6 cfu/mL(图2-b-1)和 2×10^5 cfu/mL(图2-b-2)的菌悬液按照图2-b所示的加样量进行Dot-ELISA检测。图2-b-1显示,点样量对检测灵敏度影响显著,当点样量在5 μ L/点以下时没有阳性显色,大于11 μ L/点后显色基本稳定,因而选取10 μ L/点作为点样量比较适宜。图2-b-2显示,只有9 μ L~15 μ L/点之间才略有显色,说明随着细菌浓度的下降,点样量对检测灵敏度的影响逐渐减弱。

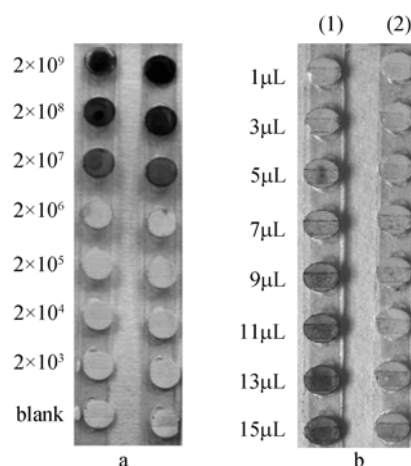


图2 不同点样量下 Dot-ELISA 对细菌性枯萎病菌的检测灵敏度

Fig. 2 Detection sensitivity for *P. stewartii* subsp. *stewartii* under different amounts of the bacterial suspension in Dot-ELISA

a: 加样量为1 μ L/点(细菌浓度单位: cfu/mL); b: 加样量为1 μ L~15 μ L/点; ((1)点加的细菌浓度为 2×10^6 cfu/mL; (2)点加的细菌浓度为 2×10^5 cfu/mL)

a: 1 μ L per site of the bacterial Suspension(Units of bacterial concentration: cfu/mL); b: 1 μ L-15 μ L per site of bacterial suspension (bacterial concentration; (1): 2×10^6 cfu/mL; (2): 2×10^5 cfu/mL).

2.2 在 NCM 条上间接 ELISA 与 DAS-ELISA 检测灵敏度比较

将离心复悬处理好的浓度为 2×10^9 cfu/mL的菌悬液,10倍梯度稀释后分别进行间接Dot-ELISA和DAS-dot-ELISA检测,点样量为10 μ L/点。结果如图3所示,间接Dot-ELISA和DAS-dot-ELISA的检测下限分别为 2×10^5 cfu/mL和 2×10^6 cfu/mL。间接法检测灵敏度是双抗夹心法的10倍。与图2-a相比较可见,在间接Dot-ELISA检测中,

10 μ L点样量比 1 μ L点样量的检测灵敏度提高10~100 倍。

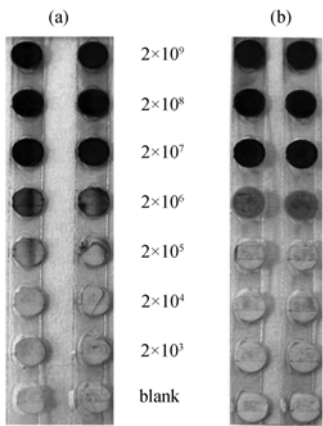


图 3 间接 Dot-ELISA(图 a)和 DAS-dot-ELISA(图 b)对玉米细菌性枯萎病菌检测结果比较(菌浓度单位 cfu/mL)
Fig.3 Comparison of detection sensitivity for *P. stewartii* subsp. *Stewartii* with indirect Dot-ELISA and DAS-dot-ELISA(concentration of bacterial suspension, cfu/mL)

2.3 在微孔板上间接 ELISA 与 DAS-ELISA 检测结果比较

与Dot-ELISA检测同步处理的菌悬液用以间接ELISA和DAS-ELISA检测,采用S/N 2 为阳性作为判定标准。结果如图 4 显示,间接ELISA和DAS-ELISA检测限分别为 2×10^5 cfu/mL和 2×10^6 cfu/mL。间接法检测灵敏度是双抗夹心法的 10 倍,和Dot-ELISA的结果完全一致。

板内重复性实验和板间重复性实验结果经originpro 7.5 统计软件分析表明,5 次实验的 OD_{405} 值变异系数在 1.2%~4.5%之间,说明间接 ELISA 和 DAS-ELISA 具有很好的重复性。

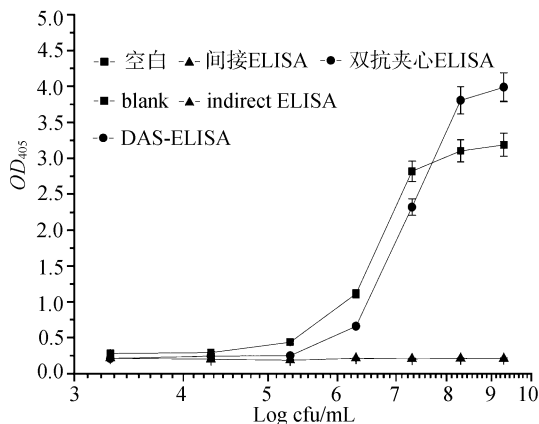


图 4 微孔板间接 ELISA 与双抗夹心 ELISA 检测结果比较
Fig. 4 Comparison of detection sensitivity for *P.stewartii* subsp. *Stewartii* between indirect ELISA and DAS-ELISA

3 讨论

本研究结果进一步验证了前期的实验结果^[14],即该种加工成型的NCM条可灵敏、稳定用于对植物病原细菌的检测,比通常的手工剪切的NCM片ELISA显色均匀、阴性孔背景低、便于操作和规范化生产,并且检测点之间不容易发生污染等。

在间接 Dot-ELISA 实验中,当单一菌浓度下递增点样量时(见图 2),显色强度有递增的趋势;10 μ L/点的加样量比 1 μ L/点可提高检测灵敏度10~100 倍。说明NCM条有很强的吸附和富集作用,优化点样量可以明显的提高 Dot-ELISA 的检测灵敏度。

本实验中,DAS-Dot-ELISA 与微孔板 DAS-ELISA的检测底限相同,间接Dot-ELISA与间接微孔板ELISA的检测底限也相同,说明Dot-ELISA和微孔板ELISA对玉米细菌性枯萎病菌的检测灵敏度相同。这也与王远程等^[16]用间接微孔板ELISA和间接Dot-ELISA对番茄斑萎病毒的实验结果相一致。然而,孟清等^[17]以间接Dot-ELISA法对马铃薯卷叶病毒的检测灵敏度高出间接微孔板ELISA 8 倍,因此评价Dot-ELISA和微孔板ELISA两种检测方法的灵敏度时,需要考虑具体的检测对象。

目前对于玉米细菌性枯萎病菌的ELISA检测主要采用Lamka等建立的双抗夹心法^[5]。Agdia公司的商品化玉米细菌性枯萎病菌双抗夹心ELISA检测试剂盒也是基于Lamka等的研究结果。本实验结果显示:无论微孔板ELISA还是Dot-ELISA,间接法的检测灵敏度都比双抗夹心法高 10 倍。这与Lamka等^[5]报道的结果相反,即Lamka等以间接ELISA法检测玉米细菌性枯萎病菌的灵敏度比双抗体夹心ELISA 低 10 倍左右,分别为 5.6×10^6 cfu/mL和 7.0×10^5 cfu/mL。造成这种不同结果的原因可能是因为所用微孔板的质量不同,现有微孔板(本研究使用美国Costar公司生产的可拆卸、平底微孔板)的吸附能力较 16 年前的提高了,因而对细菌类“大”微生物体的间接ELISA检测取得较好的效果,而过去的微孔板对细菌的弱吸附力和强解吸附性,导致检测灵敏度的降低,这方面还待进一步研究。Lamka等^[5]以间接法检测拌菌的玉米种子提取液结果为阴性,也从侧面说明微孔板对细菌的吸附力不高。

本试验结果对玉米细菌性枯萎病菌的实践检测具有重要指导价值,也为该病原菌的微流控芯片斑点免疫检测研究奠定了坚实基础。

参考文献

- [1] White DG. Compendium of corn diseases(3rd edition). USA: APS Press, 1999.
- [2] 郑雅楠, 王晓鸣, 吕国忠, 等. 玉米细菌病害及其防治策略. 作物杂志, 2006, 1: 62-65.
- [3] Blakemore EJA, Law JR, Reeves JC. PCR identification of *Erwinia stewartii* and its comparison with two other methods. *Seed Sci&Technol*, 1999, 27: 385-396.
- [4] EPPO Standards PM 7/60. Diagnostic protocols for regulated pests. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2006, 36: 111-115.
- [5] Lamka GL, Hill JH, McGee DC, et al. Development of an immunosorbent assay for seedborne *Erwinia stewartii* in corn seeds. *Phytopathology*, 1991, 81: 839-846.
- [6] Blakemore EJA, Reeves JC, Ball KL. Polymerase chain reaction used in the development of a DNA probe to identify *Erwinia stewartii*, a bacterial pathogen of maize. *Seed Sci&Technol*, 1992, 20: 331-335.
- [7] Wilson WJ, Wiedmann M, Dillard HR, et al. Identification of *Erwinia stewartii* by a ligase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 278-284.
- [8] WU Qiong, CHEN Zhi-Nan, FAN Huai-Zhong, et al. Identification of Corn Bacterial Wilt Pathogen by Nested-PCR Based on 16S rDNA. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2005, 35(5): 420-427.
- [9] Coplin DL, Majerczak DR. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. *Plant Dis*, 2002, 86: 304-311.
- [10] 漆艳香, 肖启明, 朱水芳. 玉米细菌性枯萎病菌 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立. 植物保护学报, 2004, 31(1): 51-56.
- [11] 臧红梅, 樊景凤, 王 斌. 应用斑点 ELISA 技术检测副溶血弧菌. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 79-82.
- [12] 康 明, 韩志辉, 李 刚, 等. 应用 Dot-ELISA 试验快速检测成品饲料中的沙门氏菌. 中国兽医杂志, 2005, 41(9): 21-23.
- [13] 马占鸿, 常胜军, 周广和. 应用 dot-ELISA 和 RT-PCR 法检测玉米花粉中玉米矮花叶病毒的研究. 植物病理学报, 1999, 29(3): 247-249.
- [14] 田世民, 施丽飞, 周 鹏, 等. 两种 NC 膜条上马铃薯 A 病毒 DAS-ELISA 检测研究. 微生物学通报, 2007, 34(4): 712-714.
- [15] 李燕宏, 吴建祥, 洪 健, 等. 单抗免疫斑点法和组织印迹法检测百合无症状病毒. 微生物学通报, 2006, 33(2): 25-29.
- [16] 王远程, 蔡少华, 谢云陆, 等. 用 ELISA 和 Dot-ELISA 方法检测植物病原的比较研究. 微生物学通报, 1992, 19(4): 237-241.
- [17] 孟 清, 张鹤龄, 宋伯符, 等. 应用 Dot-ELISA 检测马铃薯卷叶病毒. 植物病理学报, 1995, 25(1): 61-64.

稿件规范化与标准化

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 年用 a; 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: $20\text{cm} \times 0.3\text{cm}$, 不能写成 $20 \times 0.3\text{cm}$; $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 不可写成 $3 \sim 5^{\circ}\text{C}$; $3\% \sim 6\%$ 不可写成 $3 \sim 6\%$ 等。