

双抗体夹心酶联免疫方法检测丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌

王文彬, 孔德昭, 唐丽娟, 马伟, 匡华*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌可以引起十字花科细菌性黑斑病, 是侵染萝卜、白菜、花椰菜等农作物的重要病害之一。以灭活的丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌(NCPPB1820)为免疫原免疫小鼠, 通过杂交瘤细胞技术, 筛选最终获得 6 株产生特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞。将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)与抗体偶联, 作为检测探针, 分别将 6 种单克隆抗体作为包被抗体, 进行两两配对筛选。结果表明, 所制备的抗体特异性较好, 对水稻细菌性谷枯病菌、水稻细菌性条斑病菌、玉米细菌性枯萎病菌、丁香假单胞菌丁香致病变种均没有交叉反应。以 6 号抗体作为检测抗体(6-HRP), 以 1 号抗体作为包被抗体, 建立酶联免疫分析法获得了最佳的敏感度。检测丁香假单胞杆菌斑点致病变种的最低检测限为 1.5×10^5 cfu/mL, 定量限为 4.12×10^5 cfu/mL。基于双抗体夹心的酶免疫方法特异性好, 便捷, 可以实现对丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌高通量测定。

关键词: 酶联免疫测定; 单克隆抗体; 丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌

中图分类号: S 436.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)02—0162—04

Sandwich Immunoassay Against *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*

WANG Wenbin, KONG Dezhao, TANG Lijuan, MA Wei, KUANG Hua*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A sandwich immunoassay based on monoclonal antibody for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* was developed. Killed *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* cell was used as immunogen to immunize BALB/c mice. The antisera was detected and the mice of highest antisera titer was selected for cell fusion. With hybridoma technology, six cell lines secreting specific antibody to *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* were obtained. Monoclonal antibodies (mAb) coded mAb1 and mAb6 were selected used as coating antibody and detection antibody based on pair-matching screening results. The sandwich measure based on double antibodies were found to be high specific to targeted bacteria and no cross reactions to other bacteria including *Burkholderia glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Under optimized conditions, the limit of detection was 1.5×10^5 cfu/mL and

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 国家十二五科技支撑计划项目(2012BAC01B07)。

* 通信作者: 匡华(1981—), 女, 河南长垣人, 农学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全方面的研究。

E-mail: kuangh@jiangnan.edu.cn

quantitative limit was 4.12×10^5 cfu/mL. This immunoassay was highly specific to *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* and suitable for in-field detection, which provide a convenient and fast tool in plant bacteria analysis.

Keywords: immunoassay, *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*, monoclonal antibody

由丁香假单胞杆菌斑点致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*) 病菌引起的十字花科细菌性黑斑病是世界上重要的十字花科蔬菜细菌性病害^[1]。该病菌在分类上属于原核生物细菌界、变形杆菌门、假单胞菌科^[2]。该菌最适培养温度在 25~27℃,主要宿主有白菜、萝卜、花椰菜等十字花科蔬菜。2002 年湖北省长阳县一处蔬菜基地的萝卜爆发的萝卜细菌性黑斑病即是由该病菌引起的^[3]。

国外关于该病菌的研究主要集中在致病机理的研究以及用脉冲电场凝胶电泳对该丁香假单胞菌进行分型^[4-7]。目前,对于病原微生物的测定技术主要有免疫检测和分子生物学检测技术。Youfu Zhao 等建立了检测丁香假单胞菌冠菌素的间接竞争 ELISA 方法^[8]。国内对丁香假单胞杆菌的研究较少。黄琼等对丁香假单胞菌中 6 个致病变种的全细胞蛋白质进行了电泳和分析,发现该方法可以鉴定不同的丁香假单胞菌致病变种^[9]。王华杰对丁香假单胞杆菌斑点致病变种进行了详细的研究和综述^[2]。然而,免疫技术检测丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌尚无报道^[10]。因此,作者以危害十字花科植物的重要病原微生物丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌为对象,开发并建立双抗体夹心法酶免疫测定方法,为实现丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌的快速鉴定和高通量、快速分析提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

丁香假单胞杆菌斑点致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*, NCPPB1820), 水稻细菌性谷枯病菌(*Burkholderia glumae*, NCPPB 3591), 水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*, NCPPB 1585), 玉米细菌性枯萎病菌(*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, NCPPB449), 丁香假单胞菌丁香致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, NCPPB2844): 来自英国 NCPPB 中心。哥伦比亚琼

脂培养基: 杭州微生物试剂有限公司; 脑心浸液 BHI 干粉: 北京陆桥技术有限公司。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂, 明胶: 购于 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP), 四甲基联苯胺(TMB): 阿拉丁试剂公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠 IgG: 康成生物工程公司产品; 沉淀型单组份 TMB 底物溶液: 上海天根公司; Tween-20, 氯化钠, 磷酸二氢钾, 十二水磷酸氢二钠, 柠檬酸和浓硫酸: 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

MK3 酶标仪: 美国 Thermo scientific 公司; PH050A 型培养箱: 上海恒一科学仪器有限公司制造; 96 孔酶标板, 美国 Corning 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌培养方法 丁香假单胞杆菌斑点致病变种冻存菌株在哥伦比亚平板上, 27℃培养 2~3 d。之后单菌落接种在 BHI 液体培养基中, 27℃培养 2 d。

1.3.2 单克隆抗体的制备 灭活的丁香假单胞杆菌斑点致病变种标准菌株与弗氏完全佐剂等体积混合, 乳化至形成油包水结构后皮下多点注射免疫 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 剂量为 10^8 cfu/只, 间隔周期为 3 周, 第 3 次免疫时剂量减半。第 3 次免疫 1 周后对小鼠尾部采血, 利用间接酶联免疫法检测血清效价, 待效价达到要求(血清滴度 $>1:10,000$) 后挑选效价最高的小鼠进行冲刺免疫。冲刺免疫采用腹腔注射, 冲刺剂量为 2×10^7 cfu/只。冲刺免疫 3 d 后, 将小鼠处死并取脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合。采用间接酶联免疫法对细胞上清液进行分析, 挑选分泌特异性识别丁香假单胞杆菌斑点致病变种菌株的细胞株进行亚克隆, 扩大培养并冻存。采用体内诱生法制备小鼠腹水, 采用辛酸饱和硫酸铵法纯化腹水, 获得单克隆抗体。单克隆抗体标记 HRP 采用 NaIO_4 法, 详细步骤见文献[11]。

1.3.3 抗体配对筛选 利用双抗体夹心法进行单克隆抗体的配对筛选, 操作方法如下: 将制备的单

克隆抗体分别用包被溶液(pH 9.6, 碳酸盐缓冲液)稀释至 5 $\mu\text{g/mL}$, 包被酶标板, 然后进行封闭, 封闭后加入标准品溶液, 设置阳性对照(P, 5×10^7 cfu/mL 的标准菌株溶液, 100 $\mu\text{L/孔}$)和阴性对照(N, 磷酸盐缓冲液 PBS, 100 $\mu\text{L/孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后, 加入 HRP 标记的抗体(用抗体缓冲液稀释 1 000 倍)并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 显色, 终止反应。检测后, 阳性孔吸光值与阴性孔吸光值比值(P/N) ≥ 2.1 的配对认为是成功的。比较各组的 P/N 值, 选择比值最高的两株抗体进行后续方法的优化, 建立双抗体夹心酶免疫测定方法。

1.3.4 检测方法评估 以挑选的两株抗体分别作为包被抗体和检测抗体, 通过优化抗体的稀释比例, 建立丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌检测的双抗体夹心检测方法。将采用磷酸盐缓冲液将标准菌株稀释成一系列浓度, 每个浓度设置 3 个重复, 空白孔做 6 个重复。以病菌浓度为横坐标, 其对应的检测吸光度值(OD_{450})值为纵坐标绘制标准曲线, 确定方法的线性范围、检测限和定量限。检测限

(LOD)的计算方式如下:以标准曲线中空白孔吸光度平均值加上 3 倍标准偏差时的吸光值对应的菌体浓度。定量限(QL)为空白孔吸光度平均值的 2.1 倍时的值对应的菌体浓度。分别以水稻细菌性谷枯病菌, 水稻细菌性条斑病菌, 玉米细菌性枯萎病菌, 丁香假单胞菌丁香致病变种菌株为测试菌, 测试检测方法的特异性。

2 结果与分析

2.1 抗体的筛选配对

采用杂交瘤技术经过融合筛选获得 6 株对丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌有亲和性的细胞株。分别将获得的 6 种抗体作为包被抗体包被酶标板, 以 HRP 标记抗体作为检测抗体, 配对筛选结果见表 1。表中数据为 P/N 比值, 可见采用 1 号抗体作为包被抗体, 6 号抗体作为检测抗体(标记 HRP)配对, P/N 值最高, 为 12.53。因此选择 1 号抗体和 6 号抗体作为最优配对抗体, 建立双抗体夹心免疫分析方法。

表 1 丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌单克隆抗体筛选配对结果

Table 1 Pairwise results of monoclonal antibodies against *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*

检测抗体	抗体 1	抗体 2	抗体 3	抗体 4	抗体 5	抗体 6
1-HRP	12.00	6.54	8.67	9.51	7.77	5.97
2-HRP	4.66	1.08	2.00	1.93	1.27	1.34
3-HRP	1.20	0.83	0.82	0.81	1.14	1.12
4-HRP	1.32	0.84	0.90	0.81	0.86	1.11
5-HRP	0.75	0.63	0.56	0.70	0.81	0.56
6-HRP	12.53	2.61	5.76	7.06	6.31	7.52

2.2 双抗体夹心酶联免疫测定方法建立

将包被抗体和检测抗体进行系列浓度稀释, 采用棋盘法进行优化分析。结果表明, 当包被抗体质量浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$, 检测抗体质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 获得最佳检测敏感度。图 1 为非线性拟合的标准曲线, 可以看出, 检测线性范围在 $10^6 \sim 10^8$ cfu/mL 之间, 该方法检测丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌的最低检测限(LOD)为 1.5×10^5 cfu/mL, 定量限(QL)为 $4.12 \sim 10^5$ cfu/mL。

用上述方法检测水稻细菌性谷枯病菌、水稻细菌性条斑病菌、玉米细菌性枯萎病菌, 丁香假单胞菌丁香致病变种病菌, 450 nm 下的吸光值(OD_{450})均在 0.2 以下, P/N 值均小于 2.1; 表明该方法特异性较好, 与上述病菌无交叉反应, 见表 2。

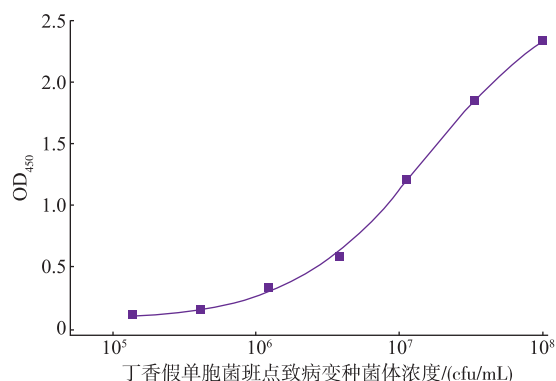


图 1 双抗体夹心酶联免疫法测定丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌标准曲线

Fig. 1 Standard curve of sandwich immunoassay for *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*

表 2 丁香假单胞杆菌斑点致病变种病毒的双抗体夹心免疫法检测特异性结果
Table 2 Specificity tests of sandwich immunoassay for *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola*

植物病菌	菌株编号	检测吸光值(OD ₄₅₀)
靶标病菌: 丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>)	NCPPB1820	2.326 ± 0.003
水稻细菌性谷枯病菌(<i>Burkholderia glumae</i>)	NCPPB3591	0.119 ± 0.030
水稻细菌性条斑病菌(<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzicola</i>)	NCPPB1585	0.121 ± 0.020
玉米细菌性枯萎病菌(<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>)	NCPPB449	0.092 ± 0.032
丁香假单胞菌丁香致病变种(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>)	NCPPB2844	0.139 ± 0.003

3 结 语

丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌是引起十字花科蔬菜黑斑病的重要植物病菌,可以通过种子传播。目前对于植物病菌危害均采用分子生物学的分析方法,步骤繁琐包括增菌培养、富集、菌体裂解提取 DNA、PCR 扩增等多个步骤,效率较低。本研究采用免疫学方法,获得了特异性的单克隆抗体,可

以实现丁香假单胞杆菌斑点致病变种病菌鉴定和快速检测。该方法检测丁香假单胞杆菌斑点致病变种的最低检测限(LOD)为 1.5×10^5 cfu/mL,定量限(QL)为 4.12×10^5 cfu/mL,若增加增菌环节,有望大大提高检测敏感度。本研究为研发植物病菌危害检测提供了有力手段,为研发快速检测试纸条等检测产品提供了核心试剂和技术支撑,可用于口岸、现场植物病菌的鉴定和测试。

参考文献:

- [1] ZHAO Y, Damicone J P, Demezas D H, et al. Bacterial leaf spot of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*[J]. **Plant Disease**, 2000, 84(9): 1015-1020.
- [2] 王华杰, 史晓晶, 赵廷昌, 等. 十字花科蔬菜细菌性黑斑病研究概述[J]. 菌物研究, 2009, 7(3): 218-220.
WANG Huajie, SHI Xiaojing, ZHAO Tingchang, HU Jun, et al. Progress of study on crucifer bacterial black spot[J]. **Journal of Fungal Research**, 2009, 7(3): 218-220. (in Chinese)
- [3] 喻法金, 赵毓潮, 毛张菊, 等. 萝卜细菌性黑斑病在高山菜区发生规律观察[J]. 湖北植保, 2007(3): 34-36.
YU Jinfa, ZHAO Yucao, MAO Zhangju, et al. Occurrence regularity of radish related bacterial black spot disease in alpine area [J]. **Plant Quarantine**, 2007, 21(3): 165-169. (in Chinese)
- [4] Cuppels D A, Ainsworth T. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1995, 61(10): 3530-3536.
- [5] Hendrickson E L, Guevera P, Ausubel F M. The alternative sigma factor RpoN is required for hrpActivity in *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* and acts at the level of hrpL transcription[J]. **Journal of Bacteriology**, 2000, 182(12): 3508-3516.
- [6] Hendrickson E L, Guevera P, PE Aloza-v Zquez A, et al. Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is rpoN dependent[J]. **Journal of Bacteriology**, 2000, 182(12): 3498-34507.
- [7] WANG L, Mitra R M, Hasselmann K D, et al. The genetic network controlling the arabidopsis transcriptional response to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*; roles of major regulators and the phytotoxin coronatine[J]. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2008, 21(11): 1408-1420.
- [8] ZHAO Y, Jones W, Sutherland P, et al. Detection of the phytotoxin coronatine by ELISA and localization in infected plant tissue [J]. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2001, 58(6): 247-258.
- [9] 黄琼, 任欣正. 丁香假单胞菌中六个致病变种的全细胞蛋白质电泳分析[J]. 云南农业大学学报, 1996, 11(4): 197-201.
HUANG Qiong, REN Xinzhen. Electro phoretic analysis of whole-cell protein of six pathovars in *Pseudomonas syringae* [J]. **Journal of Yunnan Agricultural University**, 1996, 11(4): 197-201. (in Chinese)
- [10] 孙艳秋, 赵奎华, 曹远银, 等. 植物病原细菌快速检测技术研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2012(1): 44-48.
SUN Yanqiu, ZHAO Kuihua, CAO Yuanyin, et al. The progress on the research of rapid detection technology of plant pathogenic bacteria[J]. **Liaoning Agricultural Sciences**, 2012(1): 44-48. (in Chinese)
- [11] KUANG H, WANG W B, XU L G, et al. Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A[J]. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2013, 10(4): 1598-1608.