

柑橘溃疡病菌免疫荧光检测技术研究^{*}

罗志萍¹, 洪 霓²

(1 湖北省出入境检验检疫局, 湖北 武汉 430022; 2 华中农业大学 植物科技学院, 湖北 武汉 430064)

[摘 要] 选取不同浓度的柑橘溃疡病菌 SOB 培养液, 利用载玻片进行固定、封闭、抗体结合、免疫荧光标记及荧光强度检测, 以探讨免疫荧光检测技术在柑橘溃疡病菌快速检测方面的应用。结果表明, 30 ℃ 下用 BSA 封闭 2 h, 30 ℃ 下抗体结合 1 h, 荧光抗体浓度为 4 μg/mL, 室温放置 40 min 后, 在荧光显微镜下可以清楚看到绿色的柑橘溃疡病菌体。该方法操作简便, 检测过程仅需 4 h, 抗原抗体反应特异性极强, 检测灵敏度可达 10³ cfu/mL。

[关键词] 柑橘溃疡病菌; IgG-FITC; 免疫荧光检测; 植物检疫

[中图分类号] S436.661.1⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)08-0143-03

柑橘溃疡病(citrus bacterial canker)是影响全球柑橘生产的重大检疫性病害, 可危害包括柑桔属中的绝大多数商品化栽培品种在内的数十种芸香科植物。柑橘溃疡病菌病原菌为地毯草黄单胞柑橘致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), 可通过带菌种苗、接穗、果实等柑橘材料进行远距离传播。该病主要分布在亚洲、非洲、太平洋和印度洋群岛及南美洲的 30 多个国家, 以亚洲国家发生较为普遍, 在我国广东、广西、福建、湖南、湖北、江西、浙江及四川等地均有发生报道。目前, 世界上已将其列为检疫性病害, 实施检疫禁止输入、输出的国家和地区有 30 多个^[1-2]。

我国加入 WTO 后, 柑桔产品进出口以及种苗、种质资源的调运和交换日趋频繁, 柑桔溃疡病人为传播的危险性加大。目前, 我国已开始着手实施柑桔非疫生产区建设、大力强化植物检疫、严防病害传入的监控策略。因此, 开展柑桔溃疡病菌的快速、灵敏和准确检测技术研究具有重要意义。同时, 加强这方面的研究也是植物检疫作为一个国家在对外贸易中发挥技术壁垒作用的必然要求。

柑橘溃疡病菌的检测技术主要有常规判定法、ELISA 检测法、噬菌体检测法和分子生物学检测法^[3-8]。常规判定法简便易行, 但检测周期过长, 经验不足者易误判; ELISA 检测法是将抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合的一种综合性技术, 具有灵敏度高、特异性强、安全快速的特点; 噬菌体检测法准确度高, 但操作复杂、检测周期较长; 用

DNA 杂交技术对柑桔溃疡病菌进行检测, 特异性强、灵敏度高, 但检测成本较高, 检测周期约为 1 周。而 PCR 检测技术是基于质粒 DNA 序列设计的引物, 由于质粒的不稳定性, 有时检测不到某些菌株。

免疫荧光细胞化学是根据抗原抗体反应原理, 将已知抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物, 再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。Hartung 等^[8]和王公金等^[9]用 I 标记 A 蛋白和多克隆抗血清, 建立了柑桔溃疡病菌的液相免疫放射分析鉴定法, 获得了较满意的效果。但由于其方法较复杂, 操作性不强, 故一直未得到推广使用。本研究选取不同浓度的柑橘溃疡病菌 SOB 培养液, 利用载玻片进行固定、封闭、抗体结合、免疫荧光标记及荧光强度检测, 以探讨免疫荧光检测技术在柑橘溃疡病菌快速检测方面的应用, 这对防止有害生物的传入和传出, 保护我国柑橘业生产和生态安全具有重要检疫意义。

1 材料与方法

1.1 材料

柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), 由南京农业大学提供。水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*), 由华中农业大学提供。柑橘溃疡病菌(X. a. c)抗体, 由重庆大学提供, 用 0.01 mol/L、pH 7.4 的 PBS 稀释 1 000 倍。0.03 g/mL 小牛血清(BSA), 以 0.01 mol/L、pH 7.4 的 PBS 稀释。

* [收稿日期] 2005-11-22

[基金项目] 湖北省出入境检验检疫局重点科技项目(HUBE2005-04)

[作者简介] 罗志萍(1971-), 女, 青海贵德人, 农艺师, 硕士, 主要从事进出口植物检疫研究。E-mail: luozp@hbcq.gov.cn

异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔抗体(IgG-FITC),用0.01 mol/L、pH 7.4 的PBS 稀释成4 μg/mL。缓冲甘油,由无荧光的甘油(分析纯)9 份和0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.2)1 份配制。0.01 mol/L PBST 缓冲液,由0.55 g NaH₂PO₄ · H₂O + 2.85 g Na₂HPO₄ · 2H₂O + 9 g NaCl + 0.01% 吐温+ 1 000 mL 去离子水配制。SOB 培养液,由2% 胰蛋白胨+ 0.5% 酵母浸膏+ 0.5 g/L NaCl + 2.5 mmol/L KCl + 10 mmol/L MgCl₂ 配制,121 ℃ 湿热灭菌15 min。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备 分别挑取柑橘溃疡病菌和水稻白叶枯病菌单菌落,于SOB 培养液中振荡培养3 h,使菌液浓度(菌落计数法测得)约为1 × 10², 1 × 10³, 1 × 10⁴ 和 1 × 10⁵ cfu/mL。

1.2.2 免疫荧光标记与观察 (1)涂片。分别用接种环取1 环浓度为1 × 10⁵ cfu/mL 的柑橘溃疡病菌和水稻白叶枯病菌培养液,涂抹于洁净的载玻片上,火焰固定。(2)封闭。将涂片置于有盖搪瓷盒内,用BSA 布满菌体涂层,30 ℃ 下封闭1~ 3 h, PBST 缓冲液洗板3 次,每次5 min。(3)抗体结合。将柑橘溃疡病菌抗体(1:1 000)布满菌体涂层,30 ℃ 下放置1~ 2 h, PBST 缓冲液洗板3 次,每次5 min。(4)荧光标记观察。涂层上加4 μg/mL IgG-FITC,室温下放置40 min 后取出涂片,用滤纸吸去多余水分,但不使标本干燥,加1 滴缓冲甘油,以盖玻片覆盖。立即用Nikon DFM-30 荧光显微镜(500 nm 波长)于高倍视野下观察标本的特异性荧光强度。

1.2.3 检测灵敏度的确定 选用浓度为1 × 10², 1 × 10³, 1 × 10⁴ 和 1 × 10⁵ cfu/mL 的柑橘溃疡病菌菌液,用1.2.2 的方法分别在30 ℃ 下用BSA 封闭2 h,抗体结合在30 ℃ 下放置1 h,荧光抗体浓度为4 μg/mL,室温放置40 min 后在荧光显微镜下观察荧光的有无和荧光强度,同时以水稻白叶枯病菌为阴性对照。每处理重复2 次。

2 结果与分析

2.1 柑橘溃疡病菌免疫荧光检测方法的建立

由表1 可以看出,将浓度为1 × 10⁵ cfu/mL 的柑橘溃疡病菌菌液于30 ℃ 下用BSA 封闭2 h,抗体结合后在30 ℃ 下放置1~ 2 h,荧光抗体浓度为4 μg/mL,室温放置40 min 后镜检,可以在荧光显微镜下清楚地看到绿色的柑橘溃疡病菌体(图1),而在同等方法和条件下,水稻白叶枯病菌不发荧光。

表1 柑橘溃疡病菌和水稻白叶枯病菌的免疫荧光检测结果
Table 1 Detection results of Xac and Xoo by immunofluorescence microscopy

菌种 Fungi	BSA 封闭 时间/h BSA blocking	抗体结合 时间/h Antibodies co-culturing	荧光强度 Fluorescence reaction
柑橘溃疡病菌 <i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i>	1	1	±
		2	+
	2	1	+++
		2	++
	3	1	+
		2	++
水稻白叶枯病菌 <i>X. oryzae pv. oryzae</i>	1	1	-
		2	-
	2	1	-
		2	-
	3	1	-
		2	-

注: - . 无荧光; ±. 极弱的可疑荧光; +. 荧光较弱,但清晰可见; ++. 荧光明亮; +++ . 荧光闪亮。下表同。

Note: - . No fluorescence; ±. weak fluorescence; +. obvious fluorescence; ++. bright fluorescence; +++ . blink fluorescence

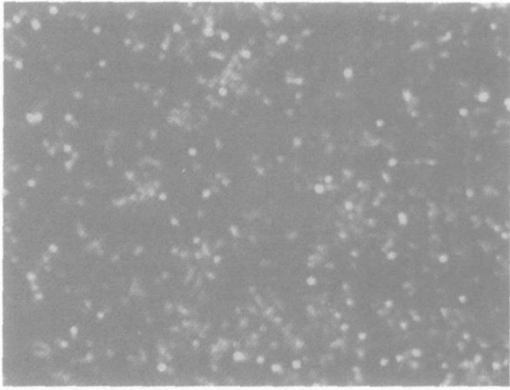


图1 柑橘溃疡病菌免疫荧光显微观察

Fig 1 Detection of Xac by immunofluorescence microscopy

2.2 免疫荧光检测法检测柑橘溃疡病菌的灵敏度
不同浓度柑橘溃疡病菌菌液在30 ℃ 下用BSA 封闭2 h,抗体结合在30 ℃ 下放置1 h,荧光抗体浓度为4 μg/mL,室温放置40 min 后镜检结果见表2。

表2 不同浓度柑橘溃疡病菌菌液的荧光免疫检测结果
Table 2 Fluorescence detection results of Xac by different concentration

菌种 Fungi	菌液浓度 Concentration	荧光强度 Fluorescence reaction
柑橘溃疡病菌 <i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i>	10 ²	- -
	10 ³	+ ±
	10 ⁴	+++
	10 ⁵	+++
		+++
水稻白叶枯病菌 <i>X. oryzae pv. oryzae</i>	10 ²	-
	10 ³	-
	10 ⁴	-
	10 ⁵	-
		-

由表2可知,本研究建立的柑橘溃疡病菌荧光免疫检测方法的检测灵敏度可达 1×10^3 cfu/mL。

3 讨论

荧光免疫检测法易受荧光物质特性的影响,所以荧光染色后一般应该在1 h内完成观察,或于4保存4 h,时间过长会使荧光减弱。此外在操作的各个步骤中,涂片应该始终保持湿润,避免干燥。所滴加的待检抗体标本或荧光标记物应始终保持在已知抗原标本玻片上,避免因放置不平使液体流失,造成非特异性荧光染色。

本研究结果表明,30℃下用BSA封闭2 h,抗体结合后在30℃下放置1 h,荧光抗体浓度为4 μ g/mL,室温放置40 min后镜检,可以在荧光显微镜下清楚地看到绿色的柑橘溃疡病菌体。用该方法进行柑橘溃疡病菌免疫荧光抗体检测操作简便,仅需1台荧光显微镜,整个检测过程仅需4 h,抗原抗体反应特异性极强,检测灵敏度可达 10^3 cfu/mL,所需试剂易购,仪器均为常规设备。因此,该方法能满足柑橘植物检疫工作中快速准确验放的实际需求,适合在植物检疫部门推广使用。

[参考文献]

- [1] 中国进出境动植物检疫局 中国进出境植物检疫手册[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 56
- [2] Hartung J S, Oliver Pruvost Detection of *Xanthanomonas campestris* pv. *citri* by hybridization and polymerase chain reaction assays[J]. Biotechnology Advances, 1996, 14: 338
- [3] 何万兴, 江式富, 宁红, 等. 用酶联免疫吸附分析技术检测柑橘溃疡病菌[J]. 西南农业学报, 1993(6): 55-60
- [4] 王中康, 唐显富, 欧阳秩, 等. 柑橘溃疡病菌噬菌体XCP1 检验技术研究[J]. 中国农业科学, 1990, 23(2): 39-44
- [5] 李云锋, 李祥. 柑橘溃疡病菌离体叶片接种检验法的研究[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 421-423
- [6] 王中康, 舒正义, 罗怀海, 等. 应用A 蛋白酶联法快速检测柑橘溃疡病的研究[J]. 西南农业大学学报, 1992(2): 142-146
- [7] Khodakaramian J, Swings J. A FL P fingerprinting of the strains of *Xanthanomonas axonopodis* inducing citrus canker disease in southern Iran[J]. Journal of Phytopathology, 2002, 150: 227-231
- [8] Hartung J S, Pruvost O P, Vicens L, et al Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthanomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay[J]. Phytopathology, 1996, 86: 95-101
- [9] 王公金, 严建民. 液相免疫放射分析快速鉴定柑桔溃疡病原菌[J]. 核农学通报, 1992, 13(5): 235-237

Study on detecting *Xanthanomonas axonopodis* pv. *citri* by immunofluorescence

LUO Zhi-ping¹, HONG Ni²

(1 Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Wuhan, Hubei 430022, China;

2 College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Citrus bacterial canker disease, caused by *Xanthanomonas axonopodis* pv. *citri*, is a serious quarantine disease of most citrus species and cultivars in many citrus-producing areas worldwide. The study tried to use a piece of glass to establish a simple and convenient immunofluorescent technique for a quick identification of *Xanthanomonas axonopodis* pv. *citri*. Immunofluorescence experiments demonstrate that green *Xanthanomonas axonopodis* pv. *citri* bacteria bodies can be seen explicitly under fluorescent microscope after enclosed by BSA under 30℃ for 2 hours, combined with antibody for 1 hours, with the fluorescent antibody concentration of 4 μ g/mL in room temperature for 40 minutes while *Xanthanomonas oryzae* pv. *oryzae* can not. The testing with immunofluorescence antibodies by this means is so simple that only a fluorescent microscope is needed and the whole testing process only takes 4 hours with an extremely strong specificity in antigen-antibody reaction and the assessing delicacy of less than 10^3 cfu/mL. Therefore, this method meets the practical demands of the rapid Citrus bacterial canker quarantine identification quite well in export and import sites.

Key words: *Xanthanomonas axonopodis* pv. *citri*; IgG-FITC; immunofluorescence detection; plant quarantine