

文章编号: 1001-1498(2005)05-0585-05

免疫磁性捕获 ELISA 技术在松材线虫检测中的应用

曹宇¹, 李海燕², 马洪周¹, 胡加付², 杨文博¹, 王玉², 白钢^{1*}

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 国家林业局森林病虫害防治总站, 辽宁 沈阳 110034)

摘要:本研究采用种子聚合法合成聚苯乙烯磁性微球, 并以兔抗松材线虫 IgG 致敏, 制备出能特异性地捕获松材线虫蛋白抗原的免疫磁性微球。以生物素标记抗体为示踪抗体, 并结合酶标亲和素检测系统, 用于疫木样品的分析。利用该方法对采自不同地区的 3 种松树, 其中松材线虫病木 17 株、拟松材线虫病木 5 株和健木 3 株进行检测。实验结果表明, 虽然拟松材线虫病木也呈现了一定的交叉反应, 但疫木中松材线虫总检出率为 94.1%, 灵敏度达到 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线虫蛋白抗原。研究表明免疫磁性捕获 ELISA 技术可直接捕获木屑中的微量线虫抗原, 具有简便、快速、准确等优点, 是一种实用的松材线虫的快速检疫方法。

关键词: 免疫磁性微球; 免疫磁性捕获; ELISA; 松材线虫

中图分类号: S763 **文献标识码:** A

Development and Application of Immunomagnetic Separation ELISA for Identification of *Bursaphelenchus xylophilus* in Pinewood

CAO Yu¹, LI Hai-yan², MA Hong-zhou¹, HU Jia-fu², YANG Wen-bo¹, WANG Yu-yan², BAI Gang¹

(1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. General Station of Forest Pest Management, State Forestry Administration, Shenyang 110034, Liaoning, China)

Abstract: Using dispersion polymerization, polystyrene magnetic microspheres as carriers were prepared. By coating with rabbit anti-*Bursaphelenchus xylophilus* (BX) IgG, the immunomagnetic microspheres (MMS) could specifically capture nematode antigen on pinewood samples. Taking biotinylated Anti-BX rabbit IgG as a tracer antibody, together with horseradish peroxidase labeled avidin, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on MMS was developed. Three kinds of pine trees harvested from different areas were detected by this method. Although there were a few crossed reactivity between *Bursaphelenchus mucronatus* antigen with Anti-BX IgG, the relevance ratio of BX on infected pine trees was 94.1% and the detection limit could be $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ nematode antigen. The result suggested that immunomagnetic separation enzyme-linked immunosorbent assay (MS-ELISA) could directly capture trace nematode antigen on pinewood homogenizations. The method showed practicability of the quick quarantine inspection for its speediness, convenience and accuracy.

Key words: immunomagnetic microspheres; immunomagnetic separation; ELISA; *Bursaphelenchus xylophilus*

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle) (BX) 是松树 (*Pinus* spp.) 上的一种病原生物, 它以松墨天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) 成虫为媒介进行传播^[1]。我国于 1982 年秋

在南京紫金山松林中首次发现该病害, 至今已经在十多个省份发现, 成为我国华东和华南广大地区松林的灾难性病害, 对我国国民经济及生态环境造成十分巨大的损失^[2,3]。长期以来, 我国在松材线虫的

收稿日期: 2004-01-17

基金项目: 国家“十五”重点科技攻关子项目“林业重大病虫害预警及控制技术研究”中的专题

作者简介: 曹宇 (1977—), 男 (回族), 辽宁沈阳人, 博士研究生。

*通讯作者: 白钢, 南开大学生命科学学院, Email: gangbai@eyou.com; 电话: 022-23508371。

检疫方面基本上停留在抽样,线虫分离,镜检,鉴定的常规检验上^[4],检定时间长,专业性要求高。但往往由于线虫处于不同发育阶段,松材线虫在体内的分布和种群数量的不同,以及抽样和取样方法的不同,直接影响检验的准确性。因此,建立一种快速准确的检测方法显得十分迫切。目前,免疫学检测技术成为细菌、病毒等植物病原体的主要检测手段,在植物病害诊断上具有十分重要的价值^[5]。Lawler 等曾采用 ELISA 和免疫印迹方法鉴定用葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers.) 培养的松材线虫和拟松材线虫^[6],并进一步利用抗松材线虫的多克隆抗体检出了欧洲赤松 (*Pinus sylvestris* Linn.) 木材表面的微量松材线虫蛋白质^[7]。但该方法存在操作时间较长,需要特殊的仪器设备,非特异性较明显等缺点,严重影响了免疫学检测技术的推广。

免疫磁性微球 (Immunomagnetic microspheres, MMS) 是指连接有抗体或抗原的磁性微球,它通过表面的抗体或抗原特异性地与目的物质结合,从而赋予其磁响应性,在特定磁场的作用下,通过 MMS 可以发生定向移动,从而实现其免疫学捕获和分离的目的^[8,9]。免疫磁性捕获 ELISA 技术 (Immunomagnetic Separation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, MS-ELISA) 是将 MMS 技术和酶联免疫吸附试验结合起来的新兴技术,它不仅可以在含有大量污染物的悬液中有选择地快速捕获目的抗原,还可以通过标记抗体来测定样品中目的抗原的存在,目前已经广泛地用于病原微生物和蛋白质类抗原的检测^[10]。本文采用种子聚合法制备聚苯乙烯磁性微球,以免抗松材线虫 IgG 抗体致敏制备 MMS,并结合酶标抗体建立免疫学分析方法用于疫木中松材线虫抗原的检测,为疫木的快速检疫提供一种简捷、准确、实用的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

主要试剂:活化生物素 (sulfo-NHS-LC-Biotin EZ-Link™, PIERCE, 美国);二乙氨基乙基 (DEAE) 纤维素;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记亲和素;3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB);牛血清白蛋白 (BSA) 购自灏洋生物制品公司,其他试剂均为分析纯。

主要仪器:冷冻干燥机 (Christ, ALPHA 1-4);高速冷冻离心机 (Beckman, 20RP52D);酶标仪 (BD-TECH, ELX800);分部收集器、磁力搅拌器、电动搅

拌器、植物粉碎机、超声波清洗机等均为国产仪器。

本实验从采自江苏、安徽、浙江、广东和湖南等地的 25 株黑松 (*Pinus thunbergii* Parl.) 和 45 株马尾松 (*P. massoniana* Lamb.) 样木中筛选出了 7 个株系线虫含量大、纯度高的样品,其中松材线虫样木 4 株,拟松材线虫 (*Bursaphelenchus mucronatus* Mamiy et Enda) 样木 3 株。经常规分离、鉴定、收集线虫后,置 4℃ 保藏,作为本实验的标准线虫样品。

选择采自湖北孝感的湖南伞滑刃线虫 (*Bursaphelenchus hunanensis* Yin, Fang and Tarjan) 和双胃线虫 (*Diplogaster* sp.), 以及其他植物病原线虫为对照线虫样品。其中湖南伞滑刃线虫的特征为:在热杀死后雌虫虫体向腹面弯曲,雄虫呈“J”形,较雌虫个体小,在显微镜下与松材线虫极为相似。雌虫口针长 20~26 μm,阴道为向前倾斜的管道,无阴门盖;雄虫交合刺弓形,无盔帽,踝状突半圆球形。而双胃线虫较松材线虫活跃,显微镜下易与松材线虫容易区别,口腔内无口针。

1.2 抗松材线虫 IgG 抗体的制备及生物素标记

取适量的上述松材线虫样品经超声波粉碎处理,制备松材线虫抗原溶液,取蛋白量为 1 mg·mL⁻¹ 的抗原溶液 1 mL,与等体积的弗氏佐剂混合乳化后,在家兔皮下多点注射进行免疫。每隔两周加强注射一次,8 周后收集血清,灭活,得抗松材线虫血清 (Anti-BX)。取上述血清,经硫酸盐析,DEAE-纤维素离子交换层析精制抗体,收集 IgG 组分,透析,冷冻干燥,得 Anti-BX IgG 纯化抗体^[6]。

取 Anti-BX IgG 10 mg,溶于 2 mL 的 0.1 mol·L⁻¹ NaHCO₃ (pH 值 8.5) 溶液中,滴加 0.5 mg·mL⁻¹ 活化生物素 2 mL,搅拌,室温反应 2 h,加入甘氨酸 20 mg 终止反应。生物素结合抗体用 50% 饱和硫酸沉淀 2 次后,沉淀物以 2 mL PBS (0.01 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液,0.1 mol·L⁻¹ NaCl, pH 值 7.2) 溶解,4℃ 透析,得生物素标记 IgG 抗体 (Anti-BX IgG biotin), -20℃ 冷冻保存备用。

1.3 生物素亲和素 ELISA 夹心法的建立 (BAS-ELISA)

取 5 μg·mL⁻¹ Anti-BX IgG 抗体 100 μL 于酶标板的各孔中,37℃ 放置 3 h,包被酶标板。以 200 μL 封闭液 (0.01 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液,0.1 mol·L⁻¹ NaCl, 1% BSA, 0.1% NaN₃, pH 值 7.2) 室温放置 3 h,封闭酶标板。分别加入用稀释液 (0.01 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液,0.01 mol·L⁻¹ EDTAN_{a2}·2H₂O,

0.1% BSA, pH 值 7.4) 系列稀释的松材线虫抗原溶液 100 μL , 室温反应 2 h 后。用 200 μL PBST (0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Tween 20, pH 值 7.2) 清洗 6 次, 再加入 500 倍稀释的 Anti-BX IgG biotin 100 μL , 室温反应 2 h。经 PBST 清洗后, 加入 2 000 倍稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记亲和素 100 μL , 室温反应 30 min。经 PBST 清洗后, 加入 TMB 底物溶液 (0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ TMB, 0.1% H_2O_2 , 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸, 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 缓冲液, pH 值 5.2) 100 μL , 反应 5 min, 加入 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 50 μL 终止反应, 于 450 nm 处测定吸光度。

1.4 免疫磁性微球 (MMS) 的制备

取 $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6 g 溶于 37.5% 聚乙二醇溶液 400 mL 中, 加入 30% 的 H_2O_2 溶液 300 μL , 再滴加 NaOH 溶液至 pH 值 11.60, 搅拌反应 4 h, 形成棕黑色磁流体悬浮液。取上述磁流体 1.0 g 于 100 mL 60% 乙醇溶液中, 分别加入过氧化苯甲酰 6 g, 苯乙烯 36 mL, 二乙烯基苯 0.3 mL, 在 N 气保护下, 65 反应 8 h, 制备聚苯乙烯磁性微球^[7]。

取聚苯乙烯磁性微球 2 mL, 加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Anti-BX IgG 2 mL, 4 放置 24 h, 包被微球。经 PBS 清洗后, 加入封闭液封闭, 制备成抗体致敏的免疫磁性微球, 4 保存备用。

1.5 免疫磁性捕获 ELISA (MS-ELISA) 检测松材线虫抗原

分别取阴性对照 (空白溶液) 及待测样品各 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 再分别加入 15 μL 抗体致敏的免疫磁性微球, 37 振荡反应 1 h。以磁铁的磁场聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBST 反复清洗 3 次。加入 500 倍稀释的 Anti-BX IgG biotin 1 mL, 37

继续振荡反应 1 h。清洗后再加入 2 000 倍稀释的酶标亲和素 1 mL, 室温反应 30 min。清洗后加入新配制的 TMB 底物 1 mL, 反应 5 min, 加入 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应, 观察颜色变化, 并于 450 nm 处测定其吸光度。

2 结果与分析

2.1 BAS-ELISA 夹心法的特异性考察

以 Anti-BX IgG 为固相抗体, 以 Anti-BX IgG biotin 结合 HRP 标记亲和素为示踪物。如图 1 所示, 在 0.1 ~ 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 线虫蛋白浓度与 HRP 的结合酶活性呈现良好的相关性, 检测灵敏度为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。7 株线虫样品检测结果表明, 4 株松材线虫样品的线虫蛋白含量在 250 ~ 510 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 但拟松材线虫样品也呈现了一定的交叉反应, 线虫蛋白含量为 28 ~ 185 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 1)。而松木上其它腐生的线虫, 如双胃线虫和湖南伞滑刃线虫以及其他植物病原线虫则交叉反应很小, 说明该方法对松材线虫有一定的专属性。

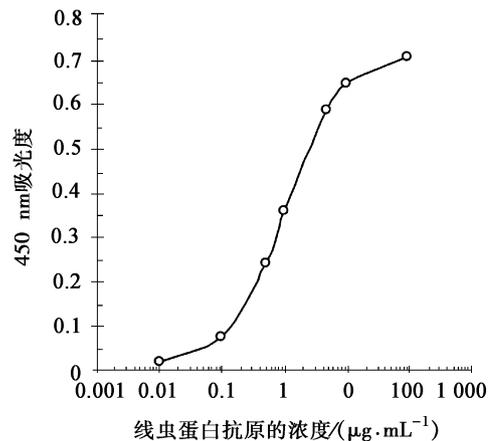


图 1 线虫蛋白的 ELISA 夹心法测定标准曲线

表 1 采用 ELISA 夹心法确定线虫样品中松材线虫抗原的含量

样号	线虫种类	采集地	寄主	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	松材线虫	浙江宁波	黑松	33.32
2	松材线虫	江苏南京	黑松	25.63
3	松材线虫	江苏南京	马尾松	24.84
4	松材线虫	江苏南京	马尾松	51.1
5	拟松材线虫	安徽黄山	马尾松	18.56
6	拟松材线虫	浙江绍兴	马尾松	7.97
7	拟松材线虫	浙江绍兴	马尾松	2.8
8	双胃线虫	湖北孝感	马尾松	0.1
9	湖南伞滑刃线虫	湖北孝感	马尾松	0.1
10	大豆孢囊线虫			ND
11	花生根结线虫			ND

ND: 采用 BAS-ELISA 无法确定

2.2 免疫磁性捕获 ELISA 的检测限

如图 2 所示,种子聚合方法制备的聚苯乙烯磁性微球其粒径为 50~100 μm 。经 Anti-BX IgG 包被聚苯乙烯磁性微球,致敏后通过 Lowry 法测定未结合的 IgG 浓度,由此推算聚苯乙烯磁性微球的抗体致敏量为每毫升微球可吸附 0.533 mg Anti-BX IgG 抗体。

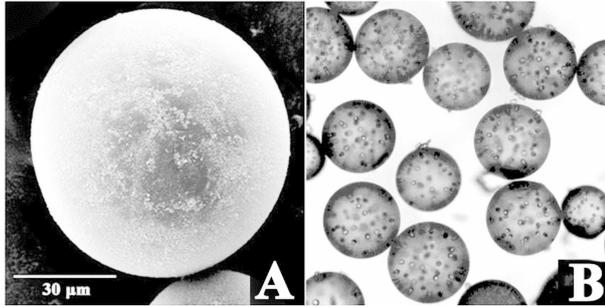


图 2 聚苯乙烯磁性微球照片

A: 扫描电镜照片 ($\times 1000$ 倍); B: 光镜照片 ($\times 400$ 倍)

以免疫磁性微球 (MMS) 为固相载体,分别加入 0.05、0.1、0.5、1.0、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 松材线虫蛋白抗原,依据上述 MS-ELISA 法考察松材线虫蛋白抗原的检测限,每个浓度重复考察 3 次,结果取平均值。如图 3 所示,与阴性对照相比其 P/N 值分别为 0.7、2.0、9.0、13.4、24.8,最低检测限为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 疫木中松材线虫抗原的检测

分别将于 2002 年采自安徽、浙江、江苏、江西、

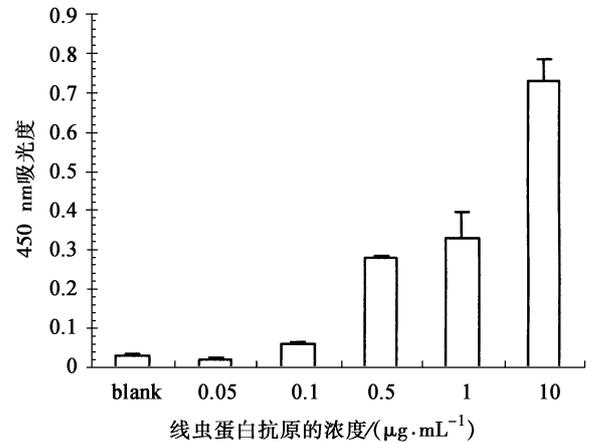


图 3 MS-ELISA 法检测限的考察

四川和天津等松材线虫疫区和非疫区不同类型的 25 株松树样木,用贝尔曼漏斗法进行线虫分离,根据形态学分类方法进行常规检验,确认松材线虫疫木 17 株 (黑松 6 株,马尾松 11 株),拟松材线虫病死木或濒死木 5 株 (均为马尾松),无任何线虫的健木 3 株 (黑松 2 株,雪松 (*Cedrus deodara* (Roxb.) Loud.) 1 株)。分别多点钻取上述样木木屑,各取 1 g 于 8 mL PBS 中,超声波振荡后,取混悬液分别采用 BAS-ELISA 和 MS-ELISA 法对样木中线虫抗原进行检测,每个样品重复测定 3 次,结果取平均值,见表 2。

表 2 BAS-ELISA 和 MS-ELISA 对松树样木中松材线虫抗原的检测结果

样号	采样地点	寄主	线虫种类	BAS-ELISA		MS-ELISA	
				蛋白含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	(P/N 值)	感染状况	
1	浙江 平湖	黑松	松材线虫	9.6	6.9	++	
2	浙江 宁波			44.4	20.7	++++	
3	江苏 林科院			20.4	10.8	++	
4	安徽 和县			35.6	14.4	++	
5	安徽 马鞍山			15.6	13.7	++	
6	安徽 马鞍山			5.7	8.5	++	
7	浙江 宁波	马尾松	松材线虫	14.4	11.3	++	
8	江苏 铁心桥			20.0	12.7	++	
9	江苏 林科院			22.8	14.1	++	
10	安徽 巢湖			33.6	18.5	+++	
11	安徽 巢湖			29.2	9.2	++	
12	安徽 当涂			10.0	3.6	+	
13	安徽 当涂			ND	2.2	+/-	
14	安徽 当涂			6.8	7.5	++	
15	安徽 当涂			9.6	5.7	+	
16	安徽 当涂			18.1	7.2	++	
17	安徽 和县			34.4	18.6	+++	
18	浙江 宁波	马尾松	拟松材线虫	5.6	8.7	++	
19	浙江 绍兴			65.6	23.4	++++	
20	安徽 黄山			7.8	5.1	+	
21	江西 九江			17.6	6.5	++	
22	四川 邻水			ND	2.6	+/-	
23	安徽 马鞍山	黑松	无线虫	ND	1.0	-	
24	浙江 平湖		(健康木)	ND	1.3	-	
25	天津 南开	雪松		ND	0.7	-	

注: +++++; +++; ++; +; +/- 和 -: 分别表示信噪比 P/N >20; >15; >6; >3; >2 和 <2。

ND: 采用 BAS-ELISA 无法确定

感染松材线虫的 6 株黑松的检出率为 100%, 11 株马尾松的检出率为 90.9%。感染拟松材线虫的 5 株马尾松有 4 株被检出, 而 3 株健木均未被检出。结果表明, 虽然松材线虫与拟松材线虫存在一定的交叉反应性, 但采用 MS-ELISA 法检定的结果与 BAS-ELISA 法完全一致, 疫木的感染程度与线虫抗原的含量呈一定的相关性。由于取样部位和取样时间不同导致线虫含量有一定的变化, 也许松材线虫寄主对松材线虫的抗性等原因使 ELISA 的实验结果与形态学鉴定存在着一定的差异, MS-ELISA 法对松材线虫感染疫木的总检出率为 94.1%, 这一点还有待进一步研究。

3 讨论

免疫磁性捕获 ELISA 技术 (MS-ELISA) 将免疫磁性微球 (MMS) 的捕获技术与 ELISA 检测技术相结合, 对于常规 ELISA 灵敏限以下无法检测到的抗原也可获得较高的检出率, 因此日益受到人们的关注^[13]。本研究采用种子聚合法合成聚苯乙烯磁性微球, 并以 Anti-BX IgG 致敏制备出松材线虫检测用免疫磁性微球。该微球可以直接从疫木的混悬液中特异性的捕获和浓集线虫抗原, 并通过生物素标记抗体结合酶标亲和素建立 MS-ELISA 法, 用于疫木样品中松材线虫蛋白抗原的检测, 其灵敏度可以达到 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线虫蛋白抗原。与传统的检测技术相比, 该方法检测准确率高, 操作简单, 不需要借助仪器设备, 可以在短时间内对大量的疫木进行现场检测, 便于普及推广, 是一种实用的松材线虫快速检测新方法。

另外, 本实验由于没有得到能够区分松材线虫和拟松材线虫的特异性抗体, 该方法对两种线虫存在一定的交叉反应。目前, 我们实验室正在筛选松材线虫的特征性抗原, 并制备该种蛋白抗原的特异性抗体, 这将为松材线虫病害的进一步研究提供有效的保证。

参考文献:

- [1] 杨宝君, 徐福元. 松材线虫病的潜伏侵染及松墨天牛传播途径 [J]. 林业科学研究, 2002, 15(3): 251~255
- [2] Kiyohara T, Bolla R I. Partition variability among populations of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Forest Science, 1990, 36(4): 1061~1076
- [3] 朱克恭. 松材线虫病研究综述 [J]. 世界林业研究, 1995, 8(3): 28~33
- [4] 杨宝君, 朱克恭, 周元生, 等. 中国松材线虫病的流行与治理 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1995: 1~319
- [5] Nolasco G, Torres V. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens [J]. J Virol Methods, 1993, 45(2): 201~218
- [6] Lawler C, Joyce P, Haimey M A. Immunological differentiation between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* [J]. Nematologica, 1993, 39(4): 536~546
- [7] Lawler C, Haimey M A. Immunological detection of nematode antigens on the surface of a wood section [J]. J. Fundamental and Applied Nematology, 1993, 16(6): 521~523
- [8] Ugelstad J, Soderberg L, Berge A, et al. Monodisperse polymer particles—a step forward for chromatography [J]. Nature, 1983, (303): 95~98
- [9] Yazdankhah S P, Hellenmann A L, Ronningen K, et al. Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus* species in milk by ELISA based on monodisperse magnetic particles [J]. Veterinary Microbiology, 1998, (62): 17~26
- [10] 徐敏, 姜丽丽. 免疫磁性制剂的研究 [J]. 药学进展, 1999, 23(1): 23~27
- [11] Tanimori H, Kitagawa T. A new liquid-phase enzyme immunoassay for rabbit IgM antibodies and its application for comparing the specificity of IgM and IgG antibodies contained in the same antiserum [J]. Journal of Immunological Methods, 1990, (129): 233~242
- [12] 邱广明. 磁性聚苯乙烯微球研究: 丙烯醛和苯乙烯的共聚与表征 [J]. 胶体与聚合物, 1999, 17(4): 1~4
- [13] Nibbeling H A, van Etten L, Fillie YE, et al. Enhanced detection of *Schistosoma* circulating antigens by testing 1 ml urine samples using immunomagnetic beads [J]. Acta Trop, 1997, 66(2): 85~92