

植物检疫实验指导

(病理部分)

北京林业大学林病教研室
一九九五年八月

目 录

实验一	种子真菌病害的检验.....	1 — 2
实验二	种实细菌病害的检验.....	3 — 4
实验三	植物材料中的线虫分离.....	5 — 7
实验四	植物病毒血清学诊断方法 (一)	
	——琼脂双向扩散法	8 — 11
实验五	植物病毒血清诊断方法 (二)	
	——酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法	11 — 17

实验一 种实真菌病害的检验

一、目的要求

林木种实表面或内部带菌的情况是屡见不鲜的。许多重要林木病害、往往都是通过种实进行扩大传播的，而且，种实又易于携带、邮寄和装运，如若把关不严，容易引起病害扩散。因此，搞好种实检疫是保护林业生产，防止危险性病害传播的重要措施。

种实真菌病害检疫的方法很多，也比较成熟。本实验要求同学们掌握常见的种实病害检验方法。如：琼脂平板法，吸水纸法，直接镜检法，洗涤沉淀法等，并运用所学的真菌学知识，将实验中检验出来的真菌鉴定到属。

二、实验原理

种实带菌是指附着在种实外部和侵染种实内部组织的真菌而言，对于外部和内部症状都很明显的，可以用显微镜直接进行检验，对没有症状表现的种实，则应采取洗涤沉淀或培养检验方法检验。这些方法均可做定性检验，若进行定量测定，可用血球计数器及琼脂平板计数法检定。

三、实验材料及用具

材料：板栗、油松种子等

用具：250ml 三角瓶 2 个，载玻片 5 片，盖玻片 5 片，双面刀片 2 片，通草少量，灭菌培养皿 3 套，PDA 培养基 1 瓶、无菌水 1 瓶，酒精灯 1 个，消毒缸 1 个，挑针 1 支，镊子 1 把，扩大镜 1 个，滴瓶 1 个，玻璃棒 1 支，氯胺 T1 瓶，铝锅，电炉，离心机，显微镜，纱布、擦镜纸，天平等。

四、实验方法及步骤

1. 直接镜检法

取症状明显的病腐板栗，先用放大镜观察，表面有霉状物或粉状物等，可挑制水压片镜检；若果实上有颗粒状物等，则作徒手切片后镜检。鉴别果实上都有些什么病原真菌。

2. 洗涤离心法

该法用于表面带菌的种实检验

取油松种子 2 份，每份 10 克，分别放入三角瓶中，加入灭菌水（没过种子表面）。用力振荡 5 分钟将附着于种子表面的病原物洗下来。所得悬浮液倒入清洁的离心管内，离心 5 分钟（1000 转/分），使病原物沉于管底，倒去上清液，留 1 毫升于管内，稍加振动使沉淀物均匀地悬浮起来，立即用玻棒蘸取悬浮液滴于载玻片上镜检，一份样品制 5 张玻片，每片检查 10 个视野，记录所看到的病原物种类。

将剩余的悬浮液做适当稀释，用血球计数器计测出每克种子病原物的负荷量。

附：血球计数器的使用方法

血球计数器是一块很厚的载玻片，其上划有每边长 0.5 毫米的小方格，每小格的面积是 0.0025 平方毫米，加盖玻片后，小格的深度是 0.1 毫米，所以每小格的容积是 0.00025 立方毫米，也就是 $1/4000000$ 毫升。测数时，先将盖玻片放在测数计上有刻度的位置，从盖玻片的一边加入一小滴稀释度适宜（使每小格中只有 5—6 孢子）的悬浮液，镜检观察 80 个小格，以它的平均数乘以 4,000,000，就是每毫升悬浮液中的孢子数。

3. 吸水纸法

该法可以综合地研究种实外部和内部所带的病原物。

用直径 12—15 公分的培养皿，内垫 3 层吸水纸，经高压灭菌后，倒入适量的灭菌水，使吸水纸充分湿润，备用。

在试样中取 200 粒油松种子，分成两份，分别用 1% 氯胺 T 消毒 3 分钟后，用灭菌的镊子将种子移植到吸水纸上（若测定种子外部带菌则不必消毒），种子间距 1 公分。将培养皿置于 25℃ 温箱中培养一周后，镜检。

4. 琼脂平板法

取样及种子处理同吸水纸法

将 PDA 培养基溶化后，趁热倒入灭过菌的培养皿内，待冷却后，将处理过的油松种子在无菌条件下移植到平板培养基上，置 25℃ 温箱中培养，一周后镜检。

五、实验作业

1. 鉴定种实带菌的主要类别（鉴定别属）并绘图。
2. 统计种子受害的百分率及各类菌出现的频率。

实验二 种实细菌病害的检验

一、实验目的和要求

种实细菌病害不同于真菌病害,因此在检验方法等基本技术上也不相同,要求同学们通过对核桃细菌性黑斑病的检验,掌握细菌病害的基本分离方法——稀释分离法,以及细菌的基本染色方法等。

二、实验原理

病原细菌在病组织中存在的数量很大,用逐级稀释的方法易于将病原细菌与杂菌分开,并能形成分散的菌落,容易获得纯培养物。稀释分离有以下两种方法:

1. 培养皿稀释分离法(本实验用此法);
2. 平析划线分离法;

三、实验材料及用具

材料:核桃细菌性黑斑病病果,氯胺 T、PDA 培养基,灭菌水,结晶紫液、碘液,95%乙醇液,番红溶液

用具:灭菌培养皿 3 套,灭菌玻棒 1 支,1 毫升灭菌吸管 1 支,接种环 1 支,酒精灯、消毒缸,铝锅,电炉,洁净载玻片等。

四、实验方法及步骤

(1) 培养皿稀释分离法

这一方法是将细菌悬浮液与溶化了的 PDA 培养基相混合,制成琼脂平板,使琼脂平板上生出菌落的一种分离方法。操作步骤如下:

1. 取灭菌培养皿三套,每皿中加入灭菌水 1 毫升,注明培养皿标号;
2. 将病组织作表面消毒后(也可将病果在 95%酒精中浸一下后立即取出,占燃并烘干组织表面的酒精,可达消毒目的。),用灭菌解剖刀自病组织内部切取约 4—6 平方毫米的病组织一块,放入 1 号培养皿的水滴中,用无菌玻棒将组织捣碎,静置 10—15 分钟;
3. 用灭菌的接种环从第一皿中移取三环菌液到 2 号培养皿中,充分混合后,再移取三环到 3 号培养皿中,搅匀;

4. 将溶化的 PDA 培养基, 待其冷却到 40℃ 左右 (贴鼻试之, 不烫即可), 分别倾入三个培养皿中, 每皿约 7—10 毫升, 立刻摇匀, 冷却凝固后置 34℃ 温箱中培养;

5. 培养 48 小时后观察培养皿中所生菌落, 在菌落数量最少的 3 号皿中, 选取形态一致, 数量最多的菌落, 用接种环移植于试管斜面培养基上培养, 保存待用。同时记录菌落形状、大小、颜色和表面特征, 以备鉴定菌种时参考。

(2) 平板划线分离法

取小块病组织, 经表面消毒后, 置于灭菌载玻片上的灭菌水滴中, 用无菌玻棒研碎, 静置一段时间, 使细菌溢出, 之后, 用灭过菌的接种环蘸取该组织液在琼脂平板培养基上划线培养。先在平板的半边划五条平行线, 将培养皿转 90 度, 将接种环灭菌后, 从第二条线起, 顺序再划五条线, 亦可作其它形式的划线, 其目的均是为了使细菌分开而形成的单个菌落, 划线分离的关键是在平板冷凝水完全消失后才能进行, 否则细菌将在冷凝水中流动而影响形成单个分散的菌落。

(3) 格兰氏染色法

格兰氏染色反应是细菌分类和鉴定的重要性状, 技术拙劣会造成鉴定错误, 所以一定要熟练掌握。染色方法按下列顺序进行;

1. 在无菌载玻片上滴一滴脱离子水, 用灭过菌的接种环从试管斜面上挑取少量培养 24—48 小时的细菌与水滴充分混合;

2. 用接种环蘸取此悬浮液涂抹在另一载玻片的一端, 充分展布, 制成涂片;

3. 证涂抹液自行风干或在酒精灯火焰上方移过三次, 使之干燥;

4. 在固定了的涂片面上用结晶紫溶液染色 30—60 秒钟;

5. 用水洗去染色液;

6. 用碘液处理 1 分钟后, 水洗, 风干;

7. 用 95% 乙醇覆盖涂面 15—30 秒后, 水洗, 风干;

8. 用番红溶液复染 2 分钟, 然而水洗, 风干后镜检。

格兰氏阳性细菌被染成兰紫色, 而阴性细菌被染成淡红色。

五、作业

1. 你所分离的优势菌种是真菌还是细菌?

2. 格兰氏染色结果如何?

实验三 植物材料中的线虫分离

一、实验目的

通过实验初步掌握潜藏于植物组织中的线虫之取样,分离方法,并了解线虫检验的基本操作技术。

二、实验材料及用具

1. 材料: 甘藷茎线虫, 黄瓜根结线虫
2. 用具: 漏斗架, 带有乳胶管及止水夹的漏斗, 铁纱网, 纱布, 剪刀, 小培养皿, 吸管, 天平, 离心机, TAF 固定液, 双目解剖镜等。

三、实验方法和步骤

(1) 样品的采集

受线虫危害的植株, 受害部位往往产生较为明显的病变而形成特有的症状, 这也正是线虫存在较多的地方, 只要采集病变的组织或器官, 就可找到病原线虫。

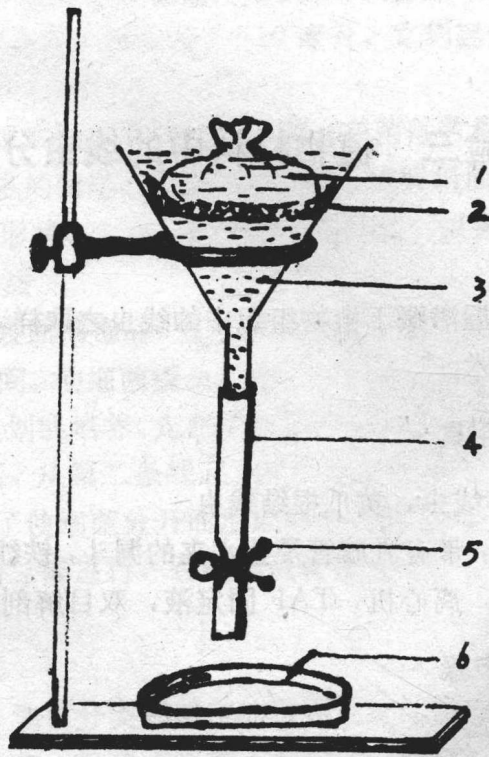
采好的样本连同标签一同放入压口的聚乙烯塑料袋中, 封好袋口以防干燥。样品最好在 1—2 日内分离完, 以保证尽可能多的分离出病原线虫, 若暂时来不及分离, 可放入冰箱中 (4℃) 短期保存。

(2) 线虫分离

把线虫从植物体内或土壤中分离出来的方法有许多种, 大致可分为二类: 一是利用线虫主动活动的原理而获得植物线虫, 如贝曼 (Baermann) 漏斗分离法, 浅盘分离法 (Pit—Pantechigue), 机械振荡法等; 二是靠外界力量和人人为的操作把不活动的线虫分离出来, 此方法主要有芬位克 (Fenwick) 漂浮法, 直接解剖法等。

本实验采用简便而常用的贝曼漏斗法, 该法不仅能分离出存在于植物组织内, 外的活动线虫, 而且能分离土壤中的线虫。其原理是利用线虫的向水性特点, 首先使线虫从植物组织里, 植物表面以及土壤中游向水里, 然后靠线虫本身的重力慢慢沉入水底, 从而可从水底收集线虫。其操作过程如下:

1. 装好 Baermann 漏斗分离装置 (见附图):



1. 盛样品的纱袋 2. 铁网 3. 水
4. 橡胶管 5. 止水夹 6. 小培养皿

2. 将样品植物组织切成小段或薄片，取 20 克包在纱布中放入漏斗中的铁纱网上；

3. 向漏斗中加足水，使分离材料浸入水中，在室温下浸 24 小时；

4. 打开漏斗下端的止水夹，收取约 5ml 带有线虫的水液于线虫皿中镜检。

从根围土壤中分离线虫的方法同上，但因土壤的比重较大，故土样可用 50 克。在向漏斗中加水时，注意不能冲激纱布包，以避免水液混浊而影响观察效果。

(3) 分离后对线虫的处理

1. 吸虫纯化

如果分离出的线虫中杂质较多，影响观察和鉴定，可用毛细吸管将线虫逐条吸出，移入另一线虫皿中，吸虫时要求虫多水少，尽量不吸入杂质，这是一项较难掌握的技术，应认真练习。

2. 鉴定线虫

供鉴定用的线虫，首先要经过杀死、固定处理，以便于观察和保存。

①杀死：一般采用热力杀死法。即是把纯化后的线虫移入小试管内，尽量少带水，轻摇试管使线虫悬浮于虫液中，然后将试管迅速浸入 62℃ 的热水槽中约 2 分钟，线虫即被杀死。

少量样本，可将线虫移入载玻片的水滴中，将载玻片在酒精灯火焰上过 2—3 次即可杀死。

②固定：为使线虫保持形态不变，杀死后的线虫要立即进行固定。通常所用的固定剂为 T A F 固定液，其配制方法如下：

三乙醇胺	2ml
甲醛 (40% 含量)	7ml
蒸馏水	91ml

将三者混合摇匀即成。使用时要尽量将线虫液中的水吸去，然后加入固定液。由于线虫液中还残留有水，会使固定液变稀，为保持固定液的标准浓度，还应每隔 2 小时换一次固定液，更换 3—4 次后，将容器加盖蜡封保存。

上述方法虽佳，但较费时费事，改进的较简单方法是将双倍浓度的 T A F 固定液（三乙醇胺 4ml、甲醛 14ml、蒸馏水 82ml）加热至沸腾，立即倒入等量的线虫混悬液中，可达到杀死，固定一次完成的目的。但要求加入的固定液量一定要准确，否则将影响固定质量，给以后的鉴定工作造成困难。

③线虫的计数

分离出的线虫数量较少时，可放在线虫计数皿中，置解剖镜下直接计数；线虫数量很大时，可将线虫悬浮液搅拌均匀后，吸取 5—10 毫升线虫液于计数皿中镜检计数，然后再换算出整个样品的线虫数量。

四、作业

1. 绘分离出来的线虫形态图
2. 计算样本中线虫的数量。

实验四 植物病毒血清学诊断方法（一）

——琼脂双向扩散法

一、实验原理

为了快速、准确地诊断出植物体内所带的病毒，近年来多采用高度敏感和特异性强的血清学诊断方法。其基本原理是利用病毒的抗体能够中和病毒的侵染力或者使病毒沉淀这一特性来判断病毒的存在。血清学技术因选用的方法不同而分为许多种，使抗体与抗原在半固体琼脂内扩展并进行沉淀反应的方法，叫琼脂双扩散反应或免疫双扩散反应。此法比较简单易行而灵敏度又较高，为经常采用的方法之一，应予熟悉和掌握。

二、实验材料

1. TMV 抗血清
2. TMV 抗原
3. 正常兔血清
4. 生理盐水
5. 蒸馏水
6. 精制琼脂粉 (Difco Bacto agar) 或净化琼脂

普通琼脂净化方法如下：

将普通琼脂条制成 4% 蒸馏水的琼脂凝胶，凝固后切成 $2\sim 3\text{cm}^2$ 小块，流水冲洗 2 天后，用蒸馏水冲洗 3 次，补足原液量，置大烧杯中常压蒸气溶化后，倒入量筒中，置温箱中使琼脂胶液态静置过夜，然后使其凝固。切去底部混浊琼胶，上中部的白色琼胶即 4% 净化琼胶。亦可低温烤干后备用。

7. 0.1M (pH7.0) 磷酸钾缓冲液，配方如下：

KH_2PO_4 13.6g

蒸馏水 200ml

溶解后用 0.1 N KOH 将 pH 调至 7.0 后，再补足蒸馏水至 1000ml。

8. 1/10 叠氮化钠液

9. 5% 及 10% 甘油

10. 5% 醋酸

11. 0.1%氨基黑液，配方如下：

氨基酸 10B (Amido Black 10B)	1g
1M 醋酸	450ml
0.1M 醋酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	450ml
蒸馏水	100ml

12. 滤纸 (普通)

三、实验步骤

1. 琼脂凝胶血清反应板的制备

选精制琼胶或净化琼脂，用生理盐水或 0.1M, pH7.0 磷酸钾缓冲液配制成 1.2—1.6% 的琼胶，趁热用绸布或 2—3 层纱布过滤，另加 0.1% 叠氯化钠防腐剂。然后趁热 (60℃) 用粗口吸管定量吸取琼脂液，垂直放到水平玻板上，使凝胶达到 1.5—2.0mm 厚。凝固后，将琼脂胶板放在样孔图纸上，按照图上样孔，用打孔器割圈，再用 1 号注射针头挑去孔中琼脂，即制成琼脂双向扩散用血清反应板，置室温下的保湿器中备用。

2. 实验采用梅花样孔排列组合进行琼脂双向扩散反应测定。在中间孔加抗血清 (或抗原)，周围 6 个孔放不同稀释度的或不同种类的抗原 (或抗血清)。反应液以注满孔穴为宜，一般重复 3 次。其中设一定数量孔或整个梅花样孔为对照。加完样后，将反应板置室温或 37℃ 下的保湿器中，经过一定时间 (2—24 小时)，在黑色背景的散射灯光上，斜侧观察沉淀线，并记录结果。

3. 结果的判断

抗原与抗血清在凝胶中相互扩散，当专化性抗原与相应的抗体在最适的平衡点上积聚沉淀时，就形成免疫沉淀线，两个相邻沉淀线的相关性基本表现出三种类型。即：

- (1) 两个相邻沉淀线愈合，指抗原性相同。
- (2) 两个相邻沉淀线交叉，指抗原性完全不同。
- (3) 两个相邻沉淀线为分枝状，指抗原性部分相同。

4. 根据专化性沉淀线反应的强弱，可以将反应强度分为五级，其标准如下：

- 无反应，肉眼见不到任何专化性沉淀线；
- ± 反应不明显，肉眼见到模糊不清的沉淀线；
- 十 弱反应，刚可以分辨出专化性沉淀线；
- ++ 中等反应，具有明显的专化性沉淀线；

卅 强反应，具有细、密且清晰的专化性沉淀线。

5. 此种琼脂双扩散的梅花样孔沉淀反应，可以根据排列组合分析抗原与抗血清之间，抗原与抗原之间的相关性。如测定抗原的种类及浓度，测定两种抗原间的血缘关系，以及诊断植物病毒等。

6. 琼脂扩散反应板的染色与保存

将琼脂反应板通过浸泡、烤板、染色、脱色及凉干，可以长期保存，同时可以拍照存查。

(1) 泡板：将充分反应的琼脂扩散反应板浸泡在蒸馏水或生理盐水中 2~3 天，每天换水一次，目的是洗去未起反应的杂蛋白及可溶性物质等。

(2) 烤板：取出浸泡过的反应板，在琼脂上滴加少许 5% 甘油，再复盖一层湿滤纸，置 37℃ 温箱中干燥。待琼脂胶干后，再撤湿滤纸并轻轻移去滤纸。干板可以保存，最好染色后保存。

(3) 染色与脱色：将琼脂板浸入 0.1% 氨基黑中 1—2 分钟，取出移到 5% 醋酸液中脱色至背景无色为止（一般 3 天左右），取出染色板用净水冲洗后，置 37℃ 下干燥保存。如欲取下琼脂薄膜，可于干燥前泡在 10% 甘油中，或在染色液中加入 10% 甘油，干后剥落薄膜保存即可。

(4) 摄影：可将未经染色或染过色的凝胶反应板放在反差强的 3 号印像纸上曝光，显影，定影制成照片存查。

近两年来，又发展了简化免疫琼脂双扩散技术。主要区别在于利用滤纸圆片及滤纸条，分别吸附上抗血清和抗原代替反应孔，作为研究或田间诊断用。

四、作业

1. 按表记录距各抗原最近和最远的沉淀线的距离，并选出最适比值的抗原稀释度。

抗 原	抗 原											
	1 : 10		1 : 20		1 : 40		1 : 80		1 : 160		1 : 320	
	最近	最远	最近	最远	最近	最远	最近	最远	最近	最远	最近	最远
沉淀线至抗原的距离												
抗体（适当稀释）												

2. 绘图表示琼脂玻片上出现的沉淀线。

五、参考材料

1. 方中达编 植病研究方法 P271—273
2. 中国植物病理学会编辑 植物病毒学讲义 (1983 年) P161—163

实验五 植物病毒血清学诊断方法 (二) ——酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法

一、基本原理

ELISA 是一个灵敏度高、特异性强, 操作简便、观察结果客观、安全的新血清学方法。

酶联免疫吸附法 (Enzyme Linke Immunosorbent assay) 的基本原理是把抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机地结合而发展起来的, 即通过化学的方法将酶与抗体或抗原结合起来, 形成酶标记物。或者通过免疫学方法将酶与抗酶抗体结合起来, 形成免疫复合物, 这些酶的标记物或复合物, 仍保持其免疫活性, 然后将它与相应的抗原或抗体起反应, 形成酶标记的, 或含有酶的免疫复合物。结合在免疫复合物上的酶, 在遇到相应酶的底物时, 催化无色的底物或化合物, 产生水解, 氧化或还原等反应, 生成可溶性的或不可溶性的有色产物。如果生成的产物是不溶性的沉淀物, 同时又是致密的物质, 则可用光学显微镜或电子显微镜识别和定量; 如果生成的产物是可溶性的, 则可用肉眼或比色法定性、定量测定结果。因此, 该法是用酶作为标记物或指示剂, 进行抗原或抗体定性、定量的综合技术。

二、实验材料

1. TMV 抗原 (经过梯级密度离心提纯过的 TMV)。
 2. TMV 抗血清 (免疫动物为家兔)。
 3. 羊抗兔酶标记抗体。
 4. pH9.5, 0.1M 碳酸盐缓冲液
 - (1) 0.1M Na_2CO_3 : $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 14.3 克加水溶至 500 毫升。
 - (2) 0.1M NaHCO_3 : NaHCO_3 8.4 克加水溶至 1000 毫升。
- 取 (1) 液 300 毫升, (2) 液 700 毫升混合即成。

5. pH 9.5, 0.01M 碳酸盐缓冲液

取 pH 9.5, 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释 10 倍即成。

6. pH 7.4, 0.02M PBS 液 (含 0.13M NaCl)

(1) 0.2M Na_2HPO_4 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.64 克加水溶至 1000 毫升;

(2) 0.2M NaH_2PO_4 : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 克加水溶至 1000 毫升;

(3) PBS: (1) 81 毫升, (2) 19 毫升, (3) NaCl 7.6 克, 加水溶至 1000 毫升。

7. 0.02M pH 7.2, PBS 液 (含 NaCl 0.13M, 0.05% 吐温 20)。

0.2M Na_2HPO_4 72 毫升 加 NaCl 7.6 克。

0.2M NaH_2PO_4 28 毫升 加吐温 20, 0.5 毫升, 再加水溶至 1000 毫升

8. pH 7.2, 0.02 M, PBS 吐温 20, 0.1% 白明胶 (或牛清白蛋白) 溶液
称白明胶 (或牛清白蛋白) 1 克, 溶于上述 PBS 吐温液 1000 毫升中即成。

9. 邻苯二胺溶液

a. pH 5.0 磷酸盐~柠檬酸缓冲液

甲 0.1M 柠檬酸: 柠檬酸 19.2 克加水溶至 1000 毫升;

乙 0.2M Na_2HPO_4 : Na_2HPO_4 28.4 克加水溶至 1000 毫升;

取甲液 24.3 毫升, 乙液 25.7 毫升混合而成。

b. 30% H_2O_2

c. 底物溶液: 称取邻苯二胺 40 毫克, 加上述缓冲液至 100 毫升, 临用前加 30% H_2O_2 0.15 毫升。

10. pH 7.5, 0.01M 磷酸缓冲液

A 液: 0.2M NaH_2PO_4 : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 克溶于 1000 毫升蒸馏水中;

B 液: 0.2M Na_2HPO_4 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 克溶于 1000 毫升蒸馏水中;

取 A 液 16 毫升, B 液 84 毫升, 加水至 2000 毫升。

三、实验方法

目前 ELISA 实验方法主要有六种方式, 据其容器之大小又分为巨量 (如试管法) 和微量 (微板) 两类。

1. 直接法 (Direct method): 用特异性酶标记抗体球蛋白检出样品中的抗原。操作的原则是: 将待检抗原装入聚苯乙烯管或多孔微量板孔中, 孵育使容器吸附抗原后洗涤, 保留附着壁面的抗原, 随后在这种吸附抗原的载体中加入

特异性酶标记抗体使抗原和酶标记抗体反应，经洗涤保留与抗原结合的酶标记抗体。在固相载体表面形成抗原抗体复合物。再加酶的底物，用肉眼观察定性地判断结果，还可以用分光光度计测定底物降解量，从而进行定性定量测定样品中的抗原（如图 1）。

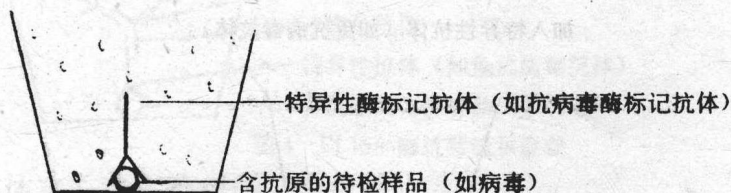


图 1 ELISA 直接法示意图

2. 双夹心法 (Double sandwich method): 此法可用酶标记抗体检查多种抗原，它不仅可以去掉标记每种抗体，还可以提高试验的敏感性。操作原则是：将第一种特异性抗体（如用豚鼠制备特异血清）吸附在固相载体上，孵育后洗涤未吸附的抗体，加入含待测抗原标样，使与吸附固相载体上的抗体反应，孵育后洗涤除去未起反应的样品，再加入用第二种动物（如家兔制备的特异血清）让起反应，孵育，最后加入酶标记抗体（如羊抗兔免疫球蛋白）使起反应，孵育后洗涤，并加入底物溶液，产生的颜色变化与第二步加入待测标样中抗原量呈正相关。观察记载结果的方法同前（图 2）。

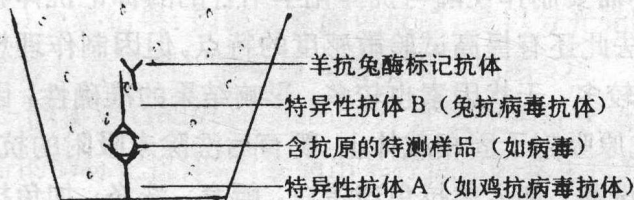


图 2 ELISA 双夹心法示意图

3. 竞争法 (Competitive method): 此法第一步是把纯化的抗体液注入聚

苯乙烯板孔，管中，孵育，洗涤，使保留吸附于其表面的抗体；加入待检抗原样品（可与酶标记抗原混合加入，或先加入样品，稍后加入酶标记抗原）孵育，对照容器中加入酶标记抗原液，使与吸附于固相载体表面的抗体起反应，孵育，洗涤；第三步加入酶底物使其显色（见图3）。同前法观测结果，根据和对照显色的差别进行定性定量分析。

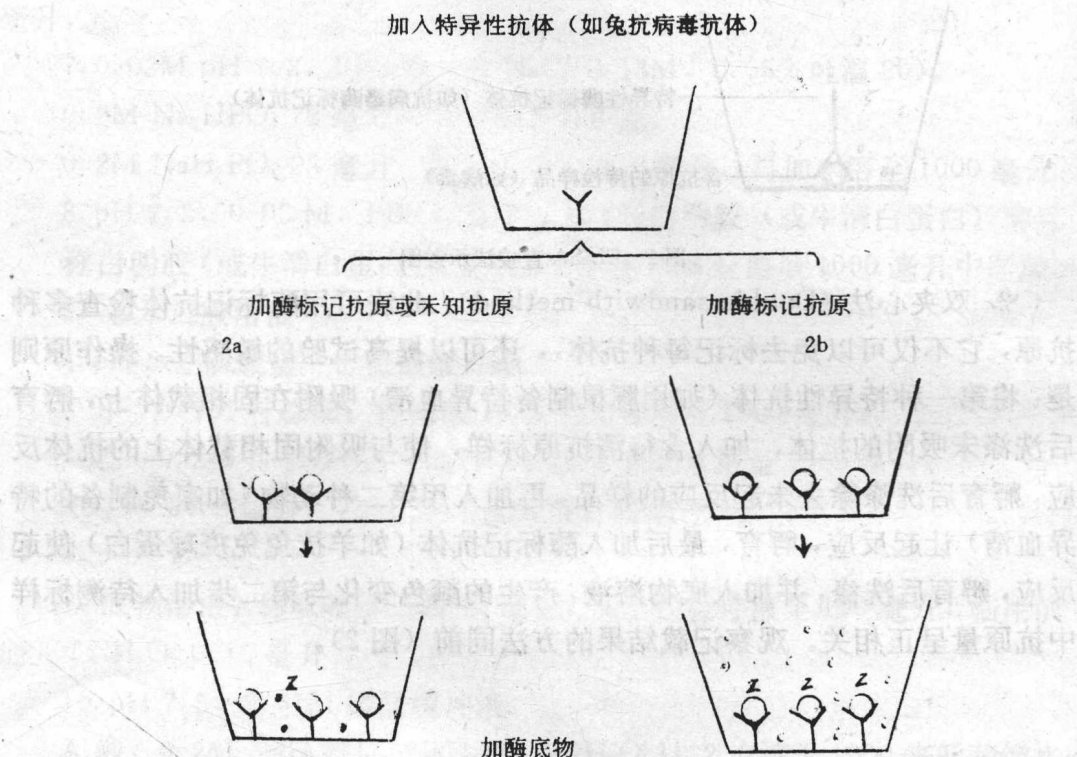


图3 ELISA 竞争法示意图

4. 酶抗酶法 (Enzyme anti-enzymemethod): 酶抗酶法使用的是抗酶抗体, 故又叫做抗酶抗体法, 不需要制作使酶与抗体化学结合的酶标记抗体就可以通用于各种抗原的检出。法此还有提高试验敏感度的特点。但因制作理想的抗酶抗体较难, 试验中操作较多, 干扰因素也较多, 影响结果的准确性, 因此采用较少。操作原则是: 将抗原吸附于固相载体上, 孵育后洗除未吸附的抗原, 加特异性家兔抗体, 孵育, 洗涤; 加入羊抗兔球蛋白, 孵育, 洗涤; 加兔抗酶抗体, 孵育, 洗涤; 加酶底物溶液, 显色后同前法观察结果 (见图4)。

5. 双抗体夹心法 (Double antibody sandwich method): 双抗体夹心法又叫双抗体法。是用酶标记特异性抗体检测抗原的方法, 在检测植物病原抗原上应用最广泛, 故此处作较详细的介绍。

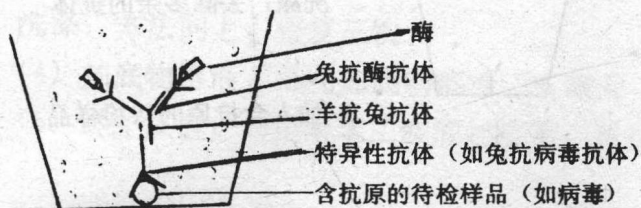


图4 ELISA 酶抗酶法示意图

双抗体夹心法实验程序（微板法）：

(1) 包被抗体：反应板每孔中加入 200 微升适宜浓度抗体球蛋白液（稀释液为 0.1M, pH9.5 碳酸盐缓冲液）置 37℃ 水浴 3 小时，移 4℃ 过夜。

洗涤：抽净孔中溶液，加洗涤液（0.02M, pH7.2, 磷酸缓冲盐水），室温静置 5 分钟，抽净，再加入上述洗涤液，静置 5 分钟后抽净，如此重复三次。

(2) 加待检的抗原标样，每孔 200 微升，同时设阳性、阴性，空白对照，，如果抗原需要稀释，其稀释液为上述洗涤液中再加入 0.1% 牛清白蛋白，37℃ 水浴 3 小时，移冰箱过夜。

洗涤：方法同上，重复三次。

(3) 加入酶标记抗体：每孔注入适宜浓度的酶标记抗体 200 微升，37℃ 水浴 2 小时。

洗涤：方法同上，重复三次。

(4) 加底物溶液：每孔加底物溶液 200 微升，37℃ 水浴 1 小时。

(5) 终止反应：如用磷苯二胺底物溶液，每孔加终止剂 2M H_2SO_4 50 微升。

(6) 观察结果：肉眼观察颜色反应，或以分光光度计（使用底物溶液不同，测定的波长亦不同）测定值判断结果（见图 5）。

6. 间接法 (Indirect method)：此法使用抗家兔球蛋白的山羊抗体与酶结合制备的酶标记抗体。只要制出某种抗原的家兔特异抗血清，不需制备酶标记抗体就可以通过这个酶标记抗体检出各种抗原。目前卫生部生物制品所出售的辣根过氧化物酶标记羊抗兔结合物，给本实验带来更大的方便。本次实验采用此法。