

改良 DAS-Dot-ELISA 检测西瓜细菌性果斑病菌

熊亮斌^{1,2} 刘箐^{2,3*} 王天昌³ 高丽萍¹ 王婧⁴ 刘姝彤² 宋蕤² 施颖波²
王军平² 文朝慧²

(1. 兰州大学基础医学院 甘肃 兰州 730000)

(2. 甘肃出入境检验检疫局国家级外繁种子检疫重点实验室 甘肃 兰州 730020)

(3. 兰州慧盟生物科技有限公司 甘肃 兰州 730010)

(4. 甘肃农业大学食品科学学院 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以硝酸纤维素膜为载体, 对 Dot-ELISA 法的封闭条件、包被抗体浓度、点样量等反应条件进行优化, 建立改良 DAS-Dot-ELISA 法快速检测西瓜细菌性果斑病菌。研究发现, 以含乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的脱脂奶粉液高温处理后用于封闭, 可有效降低背景; 轻微振荡可提高杂交效率, 减少非特异性结合。改良 DAS-Dot-ELISA 可快速、经济的检测西瓜果斑病菌, 灵敏度达 1.9×10^5 CFU/mL。在对两批次种子样品的检测中, 改良 DAS-Dot-ELISA 法检测带菌率分别为 8.0% 和 6.0%, 与微孔板 ELISA 结果完全一致; 对每粒种子的检测结果, 改良 DAS-Dot-ELISA 法与微孔板 ELISA 吻合率平均达 99.0%, 显示较好的实用前景, 同时为快速检测西瓜果斑病菌提供一种新途径。
关键词: 西瓜细菌性果斑病菌, 双抗体夹心 Dot-ELISA, 硝酸纤维素膜, 快速检测

An Improved DAS Dot ELISA Method for Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

XIONG Liang-Bin^{1,2} LIU Qing^{2,3*} WANG Tian-Chang³ GAO Li-Ping¹
WANG Jing⁴ LIU Shu-Tong² SONG Rui² SHI Ying-Bo² WANG Jun-Ping²
WEN Zhao-Hui²

(1. School of Basic Medical Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

(2. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou, Gansu 730020, China)

(3. Lanzhou Prajna-Union Biology Technique Ltd., Lanzhou, Gansu 730010, China)

(4. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Based on nitrocellulose membrane, we optimized the blocking condition, the volume and concentration of coating antibody. Then, an improved Double Antibody Sandwich Dot Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-Dot-ELISA) for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, the casual agent of bacterial fruit blotch of watermelon, was established. Use adding Disodium Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) in nonfat dry milk treated with high temperature as blocking solution can effectively lower the background. Shaking gently can enhance hybridization and reduce the nonspecific binding. This improved DAS-Dot-ELISA assay detected *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as low as 1.9×10^5 CFU/mL quickly

and economically. On the detection of two batches seed sample, the germ-carrying rate with improved DAS-Dot-ELISA was 8.0%, 6.0% which was completely coincident with microwell plate ELISA. On the result of each seed, this improved method was coincided with microwell plate ELISA in 99%, showed a satisfactory prospect and provided a new rapid assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

Keywords: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, DAS-Dot-ELISA, Nitrocellulose membrane, Rapid detection

西瓜细菌性果斑病菌, 学名燕麦噬酸菌西瓜亚种 [*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad) Willemse *et al.* 1992, Aac], 是一种短杆状, 大小(0.2–0.8) $\mu\text{m} \times$ (1.0–5.0) μm 的革兰氏阴性菌。该菌可感染葫芦科中的西瓜、甜瓜、黄瓜等多种经济作物, 引起细菌性果斑病(Bacterial fruit blotch)。目前该病已在我国新疆、内蒙古、福建等省区有爆发记录, 给当地经济造成巨大损失。该病原主要依靠带菌种子远距离传播^[1], 故在种子销售、播种前及时检出已感染种子尤为重要。

检测西瓜果斑病菌主要有种子培养^[2]、分离培养、酶联免疫吸附法和 Direct-PCR^[3]、免疫-PCR^[4]、qRT-PCR^[5]、Bio-PCR^[6]等方法。种子培养法在温室进行, 约需 3 周时间, 耗时费力易漏检无明显病征的种子^[2]。分离培养及酶联免疫吸附法与种子培养类似, 都具耗时费力的缺陷。基于 PCR 的几种检测方法可快速检测病菌, 但易受种子成分抑制而出现假阴性结果。现行种子病害检疫中, 因种子培养法周期较长, 通常以微孔板 ELISA 对样品进行初筛, 再用基于 PCR 的分子生物学方法复检, 最终确定检测结果。

基于硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane)的 Dot-ELISA 法, 检测限可达到甚至超过微孔板 ELISA, 已较多用于多种病原的检测^[7–9]。本研究致力于改良斑点酶联免疫法(Dot-ELISA)检测西瓜果斑病菌。通过优化条件, 基本克服Dot-ELISA背景较高的难题, 初步建立快速检测西瓜果斑病菌的 DAS-Dot-ELISA法。全反应过程在本室自行设计的杂交盒中进行, 相对微孔板ELISA法具有抗体用量少, 检测周期短, 操作方便等优势, 结果用普通扫描仪直接获取后可进一步作半定量分析, 为快速检测该病原提供一种新途径。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

西瓜果斑病菌株 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Aac)购自英国国家植物致病性细菌培养中

心(National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, NCPPB, 编号: 3679), Aac 捕获抗体和相应检测抗体(碱性磷酸酶标记, 美国 Agdia), 显色底物5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐/四唑硝基蓝(BCIP/NBT, 天津 TIANGEN)。硝酸纤维素膜(孔径0.45 μm , 美国 Millipore), 脱脂奶粉(黑龙江省完达山乳业股份有限公司), 其余为常用分析纯试剂。

1.2 细菌悬液制备

菌种复壮后接种于金氏 B 液体培养基(聚蛋白胨 20.0 g, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, 丙三醇 10.0 mL, 蒸馏水 1000 mL), 28°C 水浴摇床(100 r/min)培养 18–24 h, 控制 OD_{600} 约为 0.5。以 0.01 mol/L 无菌 PBS (NaCl 8.0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, ddH_2O 1000 mL, pH 7.2–7.4) 10 倍梯度稀释, 制得 Aac 梯度悬液。平板计数法确定细菌悬液浓度。

1.3 硝酸纤维素膜预处理

膜经压迹(点间距 0.3 cm–0.5 cm)后, 剪成适当大小, 去离子水浸泡 30 min, 37°C 干燥 30 min。

1.4 DAS-Dot-ELISA 步骤

1.4.1 优化封闭条件: 用包被缓冲液(Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, NaN_3 0.2 g, ddH_2O 1000 mL, pH = 9.6)将捕获抗体稀释为 40、20、10、5、2.5 mg/L, 按照图 1A, 每点 0.3 μL 点样, 37°C 固定 30 min。分别以 65°C 水浴 10 min 的 5% 脱脂奶粉(含 5 mmol/L EDTA, PBST 配制), 5% 脱脂奶粉(PBST 配制), PBST (0.01 mol/L PBS + 0.05% Tween 20)为封闭液, 37°C 封闭 30 min。以 10^7 CFU/mL 菌悬液 25°C 振荡反应 (80 r/min) 1 h。用 1% 脱脂奶粉(5 倍稀释的封闭液) 200 倍稀释检测抗体, 加于膜面继续反应 1 h。BCIP/NBT 显色 5–20 min, ddH_2O 洗涤终止反应, 晾干扫描结果。每两步反应间以 PBST 振荡(120 r/min) 洗涤 3 次, 每次 5 min。

1.4.2 抗体包被浓度的选择: 按 1.4.1 步骤制备检测膜, 封闭后分别与 10^7 、 10^6 CFU/mL 菌悬液, 25°C 振荡反应(80 r/min) 1 h。检测抗体结合, 显色、洗涤步骤与 1.4.1 相同。

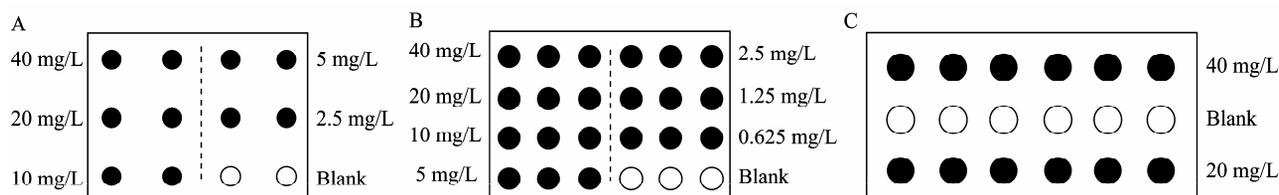


图 1 点阵设计示意图

Fig. 1 Schematic diagram of array design

注: A: 封闭条件优化, 最适抗体包被浓度试验点阵示意图。每点 0.3 μL , 梯度浓度(40–2.5 mg/L)点样, 2 个重复; B: 最佳抗体点样量、适当反应条件的探索试验点阵示意图; C: 实际检测试验点阵示意图。

Note: A: Schematic diagram of blocking condition and concentration of coating antibody optimized experiment. Spotting with gradient concentration (40–2.5) mg/L of 0.3 $\mu\text{L}/\text{dot}$, two repeats; B: Schematic diagram of the volume and react condition optimized experiment; C: Schematic diagram in practical experiments.

1.4.3 优化包被抗体点样量: 以包被缓冲液稀释捕获抗体为 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 mg/L 7 个梯度。按照图 1B, 每点 0.1、0.3、0.6 μL 分别点制 3 组检测膜。固定, 封闭, 与 10^7 CFU/mL 菌液按 1.4.1 条件反应。

1.4.4 反应条件对比: 取梯度稀释的捕获抗体, 按图 1B 每点 0.3 μL 制作 Aac 检测膜。菌液杂交和检测抗体结合步骤分别 25 $^{\circ}\text{C}$ 、80 r/min 反应 1 h, 25 $^{\circ}\text{C}$ 静止反应 1 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静止反应 1 h, 其余同 1.4.1。对比不同反应条件对检测结果的影响。

1.5 检测灵敏度验证

以优化后的条件, 按图 1C 制作 Aac 检测膜, 并固定于杂交盒中。封闭, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下分别与 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL 的 Aac 菌悬液振荡(80 r/min)反应 1 h, 再与 200 倍稀释的检测抗体 25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 1 h, 适量的 BCIP/NBT 显色 5–20 min, ddH₂O 冲洗终止显色, 室温晾干, 扫描仪记录结果。每两步反应间都以 PBST, 振荡(120 r/min)洗涤 3 次, 每次 5 min。检测改良 DAS-Dot-ELISA 法检测 Aac 的灵敏度。

直接 PCR 检测: PCR 反应体系为 5 μL 10 \times Taq buffer, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ each primer, Taq DNA 聚合酶 0.4 μL , 菌悬液 3 μL , ddH₂O 补至 50 μL 。扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 从第 2 个循环开始退火温度每循环升高 1 $^{\circ}\text{C}$, 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 微孔板 ELISA 和 DAS-Dot-ELISA 对种子带菌率的检测对比

选 2 批次西瓜种子, 各随机挑取 50 粒, 共 100 粒。用 3% 的漂白粉溶液浸泡种子 30 min, 取出以无菌水润洗, 晾干, 在已灭菌的研钵中将 100 粒种子

分别研磨至粉状。取种子粉末与样品提取缓冲液(聚乙烯吡咯烷酮 MW 24000–40000 20.0 g, Na₂SO₃ 1.3 g, NaN₃ 0.2 g, 卵清蛋白 2.0 g, Tween 20 20.0 g, PBST 1000 mL, pH 7.4)按 1 : 10 (1 g 种子粉末 : 10 mL 样品提取缓冲液)配制种子样品液。

按西瓜果斑病菌 ELISA 检测试剂盒推荐流程, 对 100 份种子样品液进行微孔板 ELISA 检测, 估算两批种子的带菌率。而后以本室建立的改良 DAS-Dot-ELISA 法检测, 计算种子带菌率, 评估该方法对实际种子样品的检测效果。

2 结果与分析

2.1 封闭条件优化结果

预实验发现, 适当处理的脱脂奶粉即可取得较好的封闭效果, 故不考虑用较贵的牛血清白蛋白(BSA)封闭。如图 2 所示, 在不同封闭条件下, 各检测膜阴性对照点都未显色, 在 40–50 mg/L 4 个包被抗体浓度下, 结果显色明显。对比图 2A、2B、2C 发现, 以含 5 mmol/L EDTA 的 5% 脱脂奶粉(65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理 10 min)封闭的检测膜(图 2A), 膜面背景最低, 显色点清晰可辨, 信噪比相对最高。

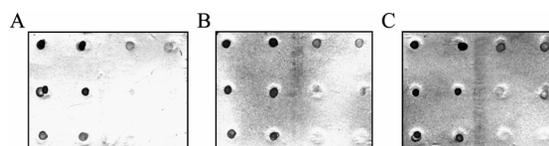


图 2 封闭条件的优化

Fig. 2 Optimization of blocking condition

注: A: 5%经 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 的脱脂奶粉(含 5mmol/L EDTA)封闭; B: 5%脱脂奶粉封闭; C: PBST 封闭。

Note: A: Blocking with 5% nonfat dry milk solution added to 5mmol/L EDTA, which was pretreated ten minutes under water bath at 65 $^{\circ}\text{C}$; B: Blocking with 5% nonfat dry milk solution; C: Blocking with 0.01 mol/L PBS added to 0.05% tween-20.

2.2 最适抗体包被浓度

如图3所示, 固定被检测的菌液浓度, 检测信号随包被抗体浓度的增加而加深。降低菌液浓度时, 同抗体包被浓度样点的显色结果随之变淡, 初步显示出半定量特征。当抗体包被浓度为20 mg/L 时, 检测点灰度达阈值, 实际检测中为确保可信度, 以40和20 mg/L 两个浓度同时包被。

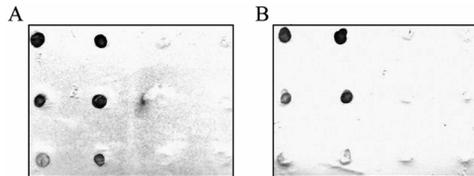


图3 适宜抗体包被浓度

Fig. 3 Detection results of different concentration to serial dilution of Aac

注: A: 与 10^7 CFU/mL 菌悬液反应; B: 与 10^6 CFU/mL 菌悬液反应。

Note: A: React with 10^7 CFU/mL suspension; B: React with 10^6 CFU/mL suspension.

2.3 最佳抗体点样量

当点样体积从 $0.1 \mu\text{L}$ 增加至 $0.6 \mu\text{L}$ 时, DAS-Dot-ELISA 法检测灵敏度无明显提高(图4)。这与王岭^[7]等的结果(点样体积低于 $5 \mu\text{L}$ 时, 增加点样体积对检测灵敏度无明显影响)相符合。因本实验室致力于建立微量抗体点样 Dot-ELISA 检测法, 故不再试验更大点样体积对检测限的影响。当点样体积为 $0.3 \mu\text{L}$ 时, 样点清晰可辨, 结合考虑经济性, 故以 $0.3 \mu\text{L}$ 为最终检测膜抗体点样量。

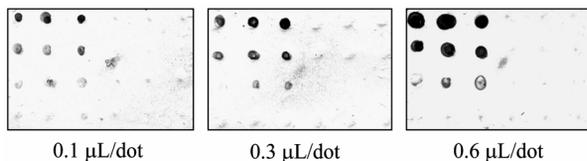


图4 点样体积对检测限的影响

Fig. 4 Comparison of detectability in different dot volume

2.4 适当反应条件的探索

试验发现相同条件制备的检测膜, 不同反应条件亦可影响检测结果。利用同等条件制备的检测膜分别以 25°C 、80 r/min 振荡杂交(图5A), 25°C 静止杂交(图5B), 37°C 静止杂交(图5C), 3种不同条件进行 DAS-Dot-ELISA 反应, 发现 25°C 、80 r/min 反应 1 h 的检测膜(图5A)背景较低。

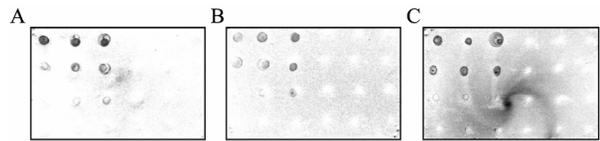


图5 反应条件对检测信号及背景的影响

Fig. 5 Influence of reaction condition to detection signal and background

注: A: 25°C 、80 r/min 振荡杂交; B: 25°C 静止杂交 1 h; C: 37°C 静止杂交 1 h。

Note: A: Membrane hybridized under 80 r/min shaking at 25°C ; B: Membrane hybridized static at 25°C ; C: Hybridized at 37°C .

2.5 检测灵敏度验证

改良 DAS-Dot-ELISA 法检测西瓜细菌性果斑病菌灵敏度达 1.9×10^5 CFU/mL(图6), 同时以直接 PCR 法对相同菌液进行扩增, 对比两种方法的灵敏度。图7显示直接 PCR 法对同组菌液的检测限为 1.9×10^5 CFU/mL, 与改良 DAS-Dot-ELISA 一致, 说明该改良方法检测灵敏度与直接 PCR 等同。

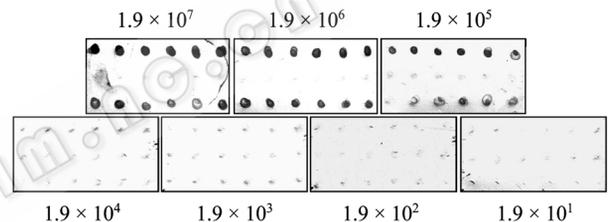


图6 DAS-Dot-ELISA 对西瓜果斑病菌灵敏度

Fig. 6 Sensibility of DAS-Dot-ELISA to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

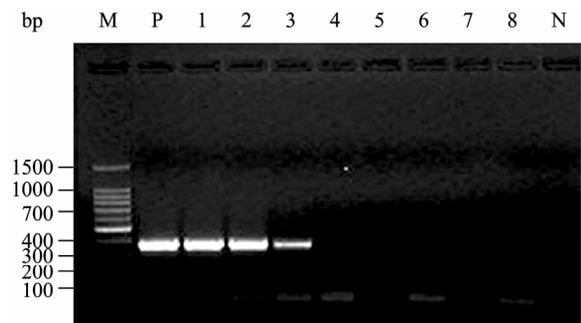


图7 直接 PCR 对西瓜果斑病菌检测限

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of Direct-PCR to Aac

注: M: 100 bp Ladder marker; P: 阳性对照; 1-8: 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL 菌液; N: 阴性对照。

Note: M: 100 bp Ladder marker; P: Positive control; 1-8: 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL of Aac; N: Negative control.

2.6 两种方法检测效果对比

以微孔板 ELISA 法及改良 DAS-Dot-ELISA 法(图8)对两批西瓜种子样品的带菌率的检测结果如表1所示。改良 DAS-Dot-ELISA 法检测两批种子

表 1 两种方法对两批次种子样品带菌率的检测结果对比
Table 1 Detection results of two batches seed sample using two methods

检测方法 Test method	西瓜种子样品 Seed sample of watermelon							
	第 1 批				第 2 批			
	+ ^a /粒	± ^b /粒	-/粒	带菌率 ^c	+ /粒	± /粒	- /粒	带菌率
微孔板 ELISA Microwell plate	4	2	44	8.0%	3	0	47	6.0%
DAS-Dot-ELISA	4	1	45	8.0%	3	0	47	6.0%
两种方法检测吻合率 Measuring goodness of fit	98.0% (49/50)				100.0% (50/50)			

注: ^a: 阳性结果, 微孔板 ELISA 法 $OD_{405} > 0.200$, Dot-ELISA 法膜面显色明显; ^b: 疑似结果, 微孔板 ELISA 法 $0.100 < OD_{405} \leq 0.200$, Dot-ELISA 法膜面显色极弱, 肉眼难辨; ^c: 微孔板 ELISA 检测得到的疑似结果, 需用其他方法进一步复检, 故带菌率仍以阳性粒数比种子样品总数计算。

Note: ^a: When OD_{405} of microwell plate ELISA exceed 0.200 or the membrane of Dot-ELISA show obvious color, the results can be judged positive; ^b: When OD_{405} is greater than 0.100 and lower than 0.200, the result is doubtful. As the membrane of Dot-ELISA shows undistinguishable by naked eye, the result is dubious; ^c: The germ-carrying ratio should be calculated with positive seeds divided sum total seeds.

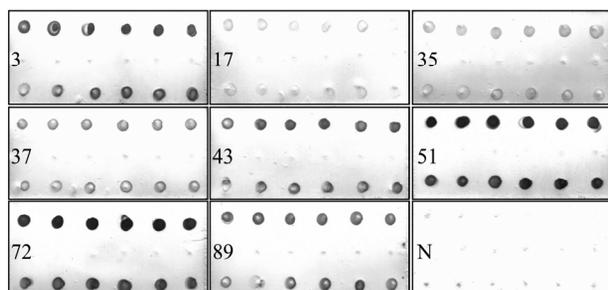


图 8 DAS-Dot-ELISA 法检出的带菌结果

Fig. 8 Germ carrying seeds detected with DAS-Dot-ELISA

注: 3, 35, 37, 43, 51, 72, 89 号种子检测结果清晰可辨, 判为阳性; 17 号种子显色较弱, 为疑似结果; N: 阴性结果。

Note: No. 3, 35, 37, 43, 51, 72, 89 showed clear positive results; No. 17 showed a weak and doubtful result; N: negative.

的带菌率分别为 8.0% 和 6.0%, 与微孔板 ELISA 法检测结果一致。对单粒种子, 本改良方法与经典微孔板 ELISA 检测结果平均吻合率达 99.0%, 显示较好的应用前景。

3 讨论

常规植物种子检疫中多以微孔板 ELISA 初筛样品, 再用基于 PCR 的分子生物学方法复检阳性样品, 最终确定检测结果。本研究致力于改良 DAS-Dot-ELISA 方法, 快速检测西瓜果斑病菌, 最终实现替代常规 ELISA 法批量初筛样品。试验发现, 室温、轻微振荡的杂交条件可有效降低背景, 提高信噪比。在简明的实验条件下, 本方法对西瓜果斑病菌检测灵敏度可达 1.9×10^5 CFU/mL, 等同于直接 PCR 对该菌 10^5 CFU/mL 的检测灵敏度^[10]。以 2 个

梯度浓度抗体点样, 结果可目视化判定, 显示良好的半定量特性, 经扫描仪获取结果, 通过灰度分析, 便可估算检测样品中目标病原浓度。对比微孔板 ELISA、直接 PCR 法各参数(表 2), 本方法在相对最低的检测成本下, 有效缩短检测周期, 对标准菌液的灵敏度与直接 PCR 法相当。在对种子带菌率的检测中, 本法以更少的抗体用量得到与微孔板 ELISA 法基本吻合的检测结果。经实验验证, 通过增加捕获抗体点样浓度, 延长样品孵育时间, 可进一步提高改良 DAS-Dot-ELISA 法的检测灵敏度(结果未给出)。另外, 本法亦具有多项直接 PCR 不可比拟的优点: (1) 本法不易受种子成分影响, 检测结果稳定, 直接 PCR 中引物、Taq 酶的活性易受种子成分抑制, 而出现假阴性结果。(2) 改良 Dot-ELISA 法, 单次检测的样品量更大, 可有效提高阳性样品的检出率。(3) Dot-ELISA 检测成本较低, 对贵重仪器依赖度低, 操作简易, 结果可目视化判定, 可推广至基层工作站, 用于种植一线对特定病原的快速自检。

随着实时定量 PCR 技术的普及, 近年又有多篇西瓜果斑病菌检测新方法的报道, 检测限最低甚至可达 1 CFU/mL。Feng 等人利用含抗生素的琼脂平板富集 Aac 后, 结合实时定量 PCR 技术建立 Bio-PCR 检测体系, 对 Aac 检测灵敏度可至 1 CFU/mL^[11]。Ha 等将定量 PCR 技术结合磁性捕获杂交, 实现对两种病原的同时检测, 其中对 Aac 的检测灵敏度可达 10 CFU/mL^[12]。Walcott 等将超顺磁化的聚苯乙烯珠连接特异性抗体, 结合 PCR 技术

表 2 3 种检测方法性能评价

Table 2 Performance evaluation of three detection methods

方法 Method	时间 Time (h)	灵敏度 Sensitivity (CFU/mL)	特异性 Specificity	检测成本 Expenditure	适用范围 Applicability
微孔板 ELISA Microwell plate	24	10 ⁴	Middle	Middle	General Lab
直接-PCR Direct-PCR	3.5	10 ⁵	High	High	General Lab
DAS-Dot-ELISA	3	10 ⁵	Middle	Low	Grass roots workstation

建立免疫磁化分离聚合酶链式反应检测技术 (IMS-PCR) 可检测 10 CFU/mL 的带菌种子提取液^[5]。以上几种方法对检测西瓜果斑病菌进行了有意义的探索, 具极高的检测灵敏度, 但遗憾的是其检测操作复杂, 专业性极高, 难以推广应用于常规检测。

参 考 文 献

- [1] Kirshner B, Kritzman G. Sweat boxes and selective media for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seeds. *Phytoparasitica*, 2008, **36**(2): 134.
- [2] Bahar O, Efrat M, Hadar M, et al. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathology*, 2008(57): 754–763.
- [3] Minsavage GV, Hoover RJ, Kucharek TA, et al. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 1995(85): 1162.
- [4] Song QLR. Rapid detection of seed borne *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by "pathogen immuno-concentration" PCR. *Journal of Plant Pathology*, 2008, **90**(3): 600.
- [5] Walcott RR, Gitaitis RD. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 2000, **84**(4): 470–474.
- [6] Woudt B, Beerepoort AJ, Carter LL. A new PCR method for detection of *Acidovorax citrulli* on seed. *Phytopathology*, 2009, **99**(6): S143.
- [7] 王岭, 田世民, 高海霞, 等. 玉米细菌性枯萎病菌改良 Dot-ELISA 检测研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(2): 230–234.
- [8] 田世民, 施丽飞, 周朋, 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.
- [9] 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病毒. *微生物学通报*, 2006, **33**(2): 25–29.
- [10] 冯建军, 许勇, 李健强, 等. 免疫凝聚试纸条和 Taq Man 探针实时荧光 PCR 检测西瓜细菌性果斑病菌比较研究. *植物病理学报*, 2006, **36**(2): 102–108.
- [11] Feng J, Zhao T, Sechler A, et al. An improved assay for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and melon seeds. *Phytopathology*, 2008, **98**(6): S215.
- [12] Ha Y, Fessehaie A, Ling KS, et al. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 2009, **99**(6): 666–678.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。