

用 ELISA 方法检测稻田捕食者对摇蚊的捕食作用

刘雨芳¹, 古德祥², 张古忍², 陈 东², 温瑞贞²

(1. 湘潭师范学院生命科学与资源环境学院, 湖南湘潭 411201; 2. 中山大学昆虫学研究所, 生物防治国家重点实验室, 广州 519275)

摘要:应用酶联免疫吸附(ELISA)双抗体夹心法,研究了稻田 19 种常见捕食性天敌对中性昆虫摇蚊的捕食作用。用摇蚊作抗原免疫雄性大白兔获得抗血清,用中和法、双向琼脂扩散实验及交叉反应对所制备的抗血清作特异性检测,抗体反应表明制备的抗血清对摇蚊抗原具较高的特异性。测定了 19 种捕食者捕食摇蚊的临界吸收值。在检测的 19 种捕食者中,有 13 种捕食了摇蚊,占被检测捕食者种数的 67.89%。ELISA 阳性反应率最高的是在早稻前期采集的褶管巢蛛,阳性率高达 50%,其次是晚稻中期采集的拟水狼蛛,其阳性率为 40%。ELISA 方法敏感,能快速检测捕食者对猎物的捕食作用及确定节肢类捕食者如蜘蛛对水稻害虫控制作用大小,作为一种有效实验工具,可有助于发展水稻害虫综合管理理论。

关键词:酶联免疫吸附实验;摇蚊;捕食者;稻田

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Used to Explore the Predation of *Chironomus* sp. (Diptera:Chironomide) by Predators in Paddy Fields

LIU Yu-Fang¹, GU De-Xiang², ZHANG Gu-Ren², CHEN Dong², WEN Rui-Zheng² (1. College of Life Science and Resource Environment, Xiangtan Normal University, Xiangtan 411201, China; 2. Institute of Entomology & State Key Laboratory for Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(10): 1699~1703.

Abstract: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of double antibody sandwich was used to detect the predation of *Chironomus* sp. by 19 species of predators found in paddy fields. Antiserum was produced in a white male rabbit with an antigen from *Chironomus* sp., and its high specificity to *Chironomus* sp. was examined through crossing reaction, neutralization reaction and two-way agar diffusion in laboratory. The thresholds of 19 species of predators to *Chironomus* sp. were determined. 13 species of predators fed on *Chironomus* sp., which accounted for 67.89% among the accumulative 19 species tested. *Clubiona japonocola* collected at early stage of early rice field showed the highest frequency of positive reaction to *Chironomus* sp. with the frequency of 50%, and 40% frequency of positive reaction to *Chironomus* sp. was derived from another species, *Pirata subpiraticu* captured at middle stage of late rice. ELISA would enable the rapid detection of the feeding of predator to objectively reveal the relationships between preys and predators, and evaluate the contribution of predatory arthropods such as spiders to the control of rice pests, so ELISA was suggested to be a valuable tool to aid in developing theories of the community ecology and the integrated rice pest management.

Key words: ELISA; *Chironomus* sp.; predator; paddy field

基金项目:国家自然科学基金项目(39770514);国家自然科学基金重点项目(39830040);湖南省教委资助项目(00C239)
收稿日期:2001-01-02;修订日期:2001-10-10
作者简介:刘雨芳,女,湖南湘乡人,博士,教授。主要从事昆虫生态学、害虫综合防治及生物多样性研究。e-mail: yurainliu@yahoo.com.cn

文章编号:1000-0933(2002)10-1699-05 中图分类号:S476 文献标识码:A

在稻田生态系统中,既非害虫、又非天敌的中性昆虫的种类和数量非常丰富^[1],约占整个群落个体数量的 30%~76%,尤其摇蚊(*Chironomus* sp.)是稻田中性昆虫的优势类群,其优势度高达 0.80~0.95*。但由于稻田生态系统中的节肢动物个体小,行为隐蔽,在自然状况下难以观察到稻田捕食者对摇蚊等猎物在田间的直接捕食行为,许多相关研究都是通过室内实验证明或田间数量分析推论捕食者对猎物的捕食及中性昆虫对稻田节肢动物群落结构的调节作用^[2~4]。吴进才等在室内以功能反应法研究了蚊幼对稻田拟水狼蛛(*Pirata subpiraticus*)的营养、繁殖作用,并证明狼蛛对蚊幼的捕食符合 Holling II 型功能反应^[3]。目前仍无稻田捕食者对摇蚊发生捕食作用的直接证据和研究报道。检测捕食作用,尤其是检测在自然的不可控制条件下发生的捕食作用,最有前途、应用最多的方法是利用以免疫学为基础的检测技术,如酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等^[5~9]。

本文应用 ELISA 双抗体夹心法(ELISA double antibody sandwich technique)检测了稻田中常见的 19 种捕食性天敌对中性昆虫摇蚊的捕食作用。旨在进一步了解稻田生态系统中摇蚊对调节稻田节肢动物群落结构与控制害虫方面的作用,为水稻害虫的综合防治提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

摇蚊(抗原)及各种捕食性天敌均采自广东省四会市大沙镇综合防治稻作区稻田。

1.2 药品与试剂

pH 7.4, 0.05 mol/L 磷酸缓冲液; pH 7.6, 0.1 mol/L 碳酸缓冲液; pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸缓冲液; 25%戊二醛; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP, Sigma 出品, RZ≥3); 0.85%生理盐水; 30%过氧化氢(H₂O₂); 柠檬酸, 邻苯二胺(O-Phenylene Diamine, OPD, Sigma 公司出品); 20%NaCl; 冲洗液 PBS-Tween 20; 2 mol/L 硫酸。

1.3 捕食者的采集与处理

1999 年 4 月 20 日至 11 月 1 日,用吸虫器^[10]在田间系统地吸捕各种捕食者。作阴性对照检测用的捕食者,迅速用小试管分装,带回实验室后给水饥饿至少 72 h,让捕食者消化掉可能存在于体内的各类抗原物质。作阳性检测用的捕食者,采集后即刻放入冰壶内冷冻临时保存,带回实验室。经两种处理后的捕食者都单个分装,并加入适量的 PBS-Tween 20 浸润,迅速移入-30℃冰箱中冷冻保存,待检测。

1.4 抗原的提取

将冰冻保存的摇蚊称重,用无菌蒸馏水漂洗 3 次(去掉虫体表面污物),倒入匀浆管中,加入适量磷酸缓冲液(pH 7.4, 0.05 mol/L)匀浆。把匀浆液倒入三角烧瓶中,加入过量的磷酸缓冲液,在 4℃下搅拌 24 h 后,离心 20 m(4 500 rpm)。分离上清液,沉淀物重复抽提 1 次,将两次所得的上清液混合后,置于 4℃用冷盐水透析 24~48 h(其间更换 4~6 次冷盐水)。透析液用冰冻干燥法浓缩后,用紫外分光光度计测定浓缩液的蛋白质含量(蛋白质浓度(mg/ml)=1.45D₂₈₀-0.74D₂₆₀),即制成抗原。

1.5 抗血清的制备

参考张古忍等^[7]制备抗血清。采用耳缘静脉注射法免疫健康雄性新西兰大白兔。免疫剂量从 5mg/只逐渐递增至 15mg/只,抗血清效价(titre)达到 1:512。

1.6 特异性反应检查

制备好的抗血清在检测前作特异性检查,以确定抗血清是否纯净和具备只对该抗原起沉淀反应的特异性反应。用中和法结合双向琼脂扩散试验法和交叉反应方法^[11]来测定。

1.7 酶标记抗体的制备及 ELISA 检测

采用简易戊二醛二步法交联辣根过氧化物酶(HRP)与抗体蛋白制得酶标记抗体^[7]。

* 刘雨芳, 中山大学博士学位论文, 2000

1.8 抗摇蚊血清与酶标记抗体的最适工作浓度检测

抗摇蚊血清用 pH 9.6,0.05 mol/L 碳酸缓冲液从 50 至 1600 倍进行倍比稀释。抗原含量为 0.1 mg/ml,ELISA 检测。将吸收值约为最大吸收值 50%的抗血清稀释浓度确定为抗血清的最适工作浓度。这样既能满足实验检测需要,节约抗血清用量,又能减少非特异性干扰反应。酶标记抗体用 PBS-Tween 20 从 50 至 1600 倍进行倍比稀释,用抗血清的最适工作浓度检测,具最高 OD_{492} 值的酶标记抗体的稀释倍数确定为酶标记抗体的最适工作浓度。

2 结果与分析

2.1 特异性

特异性检测结果表明:所制备的抗血清对其抗原(摇蚊)具备特异性反应,而与各种待测天敌(阴性对照)及其它水稻害虫均无交叉反应。

2.2 抗摇蚊血清与酶标记抗体的最适工作浓度

通过检测,抗摇蚊血清与酶标记抗体的最适稀释倍数分别为 200 倍和 400 倍。

2.3 敏感性

捕食者消化道内猎物蛋白含量的检测水平取决于 ELISA 检测的敏感性,在确定了抗血清和酶标记抗体的最适稀释度后,对抗原溶液进行系列稀释与检测。多孔板每板的第一排孔不加抗原,代之以 PBS-Tween 20 作为空白对照调零。结果表明:在抗原被稀释到 0.004mg/ml 时,仍然能被检测出来(见图 1)。这说明所建立的方法灵敏度较高,完全能满足检测的需要。

2.4 各种捕食者的 OD_{492} 临界值

检测时以蒸馏水调零,在检测浓度范围内,各类空白对照的最大吸收值均低于阴性对照的最大吸收值。以 2 倍于阴性对照的 OD_{492} 作为临界值,当检测的 $OD_{492} \geq$ 临界值 = $2OD_{492}$ (阴性对照)时,判定为阳性,认为该种捕食者捕食了摇蚊。不同捕食者对摇蚊抗原检测时的临界值见表 1。

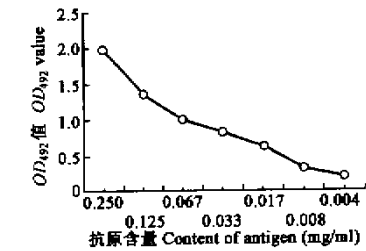


图 1 摇蚊抗原在一系列稀释浓度下的 OD_{492} 值
Fig. 1 ELISA OD_{492} value for dilutions of antigen of *Chironomus* sp.

2.5 捕食者对摇蚊阳性反应率

对系统采集的稻田捕食者,按水稻生长前期、中期和后期,分早稻、晚稻进行检测与统计。表 2 列出了稻田 19 种捕食者对摇蚊的 ELISA 检测的阳性反应率。

检测的 19 种捕食者中,早稻期和晚稻期分别有 12 种和 4 种捕食者、累计有 13 种捕食者(占检测种数的 67.89%)对摇蚊的 ELISA 检测呈阳性。在早稻前期、中期和后期,分别有 71.43%、46.67%和 36.27%

表 1 不同捕食者对摇蚊抗原检测的 OD_{492} 临界值 *
Table 1 The OD_{492} critical value of 19 predators for antigen of *Chironomus* sp.

捕食者 Predator	OD_{492} 临界值 OD_{492} critical value	捕食者 Predator	OD_{492} 临界值 OD_{492} critical value
PS1	1.468	PS10	0.654
PS2	1.420	PS11	0.792
PS3	0.894	PS12	0.784
PS4	1.296	PS13	1.306
PS5	1.844	PS14	1.552
PS6	1.048	PS15	0.244
PS7	0.740	PS16	0.254
PS8	1.826	PS17	0.242
PS9	2.088	PS18	0.226
		PS19	0.300

* PS1: 卵形园蛛 *Araneus inustus*, PS2: 四斑锯齿蛛 *Dyschiriognatha quadrimaculata*, PS3: 华丽肖蛸 *Tetragnatha nitens*, PS4: 八斑鞘蛛 *Coleosoma octomaculatum*, PS5: 草间小黑蛛 *Erigonidium graminicolum*, PS6: 食虫沟瘤蛛 *Ummeliata insecticeps*, PS7: 拟水狼蛛 *Pirata. subpiraticus*, PS8: 拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata*, PS9: 浙江豹蛛 *Pardosa tschekiangensis*, PS10: 褶管巢蛛 *Clubiona corrugata*, PS11: 棕管巢蛛 *Clubiona japonocola*, PS12: 斜纹猫蛛 *Oxyopes sertatus*, PS13: 华南菱头蛛 *Bianor hotingchiechi*, PS14: 纵条绳狮 *Marpiss magister*, PS15: 尖钩宽尾蟠 *Microvelia horvathi*, PS16: 黑肩绿盲蝽 *Cyrtorrhinus livilipennis*, PS17: 印度细颈步甲 *Casnoidea indica*, PS18: 青翅蚊形隐翅虫 *Paederus fuscipes*, PS19: 猩红瓢虫 *Micraspis discolor*; 表 2 同 The same as table 2

的捕食者捕食了摇蚊,其中以早稻生长前期,褶管巢蛛(*Clubiona corrugata*)对摇蚊的阳性反应率最高,为50%;晚稻前期和中期,捕食摇蚊的天敌种类分别占被检测种类的18.75%和23.08%,在晚稻生长中期,拟水狼蛛对摇蚊的阳性反应率高达40%。在晚稻生长后期,稻田中的摇蚊密度很低,未能检测到捕食现象。在稻田节肢动物群落重建初期,水稻害虫尚未迁入稻田或尚未建立种群,此时稻田中大量的摇蚊成为捕食性天敌的重要猎物,因而天敌对摇蚊的捕食率较高。说明捕食者的捕食对猎物的密度有一定的依赖性,且不同捕食者种类在同一时期以及同一捕食者在不同时期对摇蚊具有不同的阳性反应率。

表 2 在水稻发育各期不同捕食者对摇蚊的 ELISA 阳性率(1999 年)

Table 2 The ELISA positive percentage of predators to *Chironomus* sp. in 1999

水稻 生长期 Rice stage	早 稻 Early rice			晚 稻 Late rice		
	捕食者 Predator	检测头数 Num. tested	阳性率(%) Positive percentage	捕食者 Predator	检测头数 Num. tested	阳性率(%) Positive percentage
前 期 Early stage	PS3	6	33.3	PS1	1	0
	PS6	3	0	PS2	11	18.2
	PS7	8	25.0	PS3	6	0
	PS8	12	16.7	PS4	3	0
	PS9	1	0	PS5	3	0
	PS10	2	50.0	PS6	6	0
	PS18	9	22.2	PS7	13	23.1
				PS8	8	0
				PS9	2	0
				PS10	1	0
				PS12	9	22.2
				PS13	1	0
				PS14	1	0
				PS15	7	0
				PS16	3	0
				PS18	6	0
中 期 Intermediate stage	PS1	9	11.1	PS2	15	6.7
	PS2	7	0	PS3	2	0
	PS3	9	0	PS4	11	0
	PS4	8	12.5	PS5	3	0
	PS5	6	0	PS6	16	0
	PS6	18	16.7	PS7	10	40.0
	PS7	11	0	PS8	6	0
	PS8	3	0	PS11	9	22.2
	PS11	8	12.5	PS15	8	0
	PS12	9	11.1	PS16	4	0
	PS13	3	33.3	PS17	2	0
	PS14	2	0	PS18	5	0
	PS16	7	0	PS19	3	0
	PS18	12	8.3			
	PS19	12	0			
后 期 Late stage	PS2	2	0	PS2	7	0
	PS4	7	0	PS4	3	0
	PS5	3	33.3	PS6	2	0
	PS6	10	10.0	PS11	1	0
	PS7	7	14.3	PS13	1	0
	PS8	6	0	PS16	1	0
	PS9	1	0	PS18	2	0
	PS11	5	20.0	PS19	6	0
	PS12	5	0			
	S14	3	0			
	PS18	6	0			

3 讨论

吴进才等^[2,3]、郭玉杰等^[4]提出中性昆虫的概念,认为中性昆虫是稻田节肢动物群落的一个重要组成成份,是稻田捕食者替代或补充猎物,而摇蚊是稻田中性昆虫功能团中的优势类群。应用 ELISA 双抗体夹心法检测,在水稻生长发育的各个时期,都有天敌捕食了摇蚊,尤其在早稻发育前期,在被检测的天敌的

种类中,有高达 71.43%的天敌捕食了摇蚊,因而获得了在自然状况下稻田捕食性天敌捕食摇蚊的直接证据。在稻田节肢动物群落重建初期,水稻害虫尚未迁入稻田或未建立种群时,摇蚊作为稻田捕食性天敌的替代猎物及在群落发展过程中作为天敌的补充营养的作用也得以证明。

ELISA 方法的探讨是一非常活跃的领域^[6~8],已被成功地应用于检测单头捕食者消化道内的猎物,应用特异性抗体,能检测出捕食者消化道内非常微量的猎物残留物。应用 ELISA 不仅能快速检测捕食者对猎物的捕食作用,客观地揭示捕食者与猎物之间的捕食与被捕食的关系,也能快速确定节肢类捕食者对褐飞虱等水稻害虫的控制作用大小^[9],将其应用于群落食物网的研究很有前途。从生态系统出发,群落食物网研究的发展可以促进害虫综合治理的研究。获得捕食性节肢动物捕食摇蚊的直接证据,连接了分别以绿色植物和以腐殖质为基础的两条捕食物链,有助于更好地理解系统中物质循环、营养转移和能量传递,进一步了解群落结构与功能的关系,有助于发展群落生态学与水稻害虫综合管理理论^[9]。

ELISA 方法简便、敏感,酶标记抗体试剂制备容易、稳定、有效期长,应用于研究昆虫的捕食与被捕食关系具有明显的特异性,方法可靠^[12]。而 ELISA 双抗体夹心法能减弱非特异性颜色的干扰,是检测抗原最常用的方法^[11]。

但血清学检测的敏感性还依赖于高效价、特异性的抗血清。在免疫制备抗血清时,必须先测定效价,只有在效价达到要求后才能停止免疫并采血。采血时应防止标本溶血,以减少非特异性显色。将在田间采集的节肢动物确定为某种目标猎物的捕食者进行 ELISA 检测前^[9],必须对所制备的抗血清进行特异性鉴定,以确定抗血清中含有与待测猎物反应的抗体成份,且对待测猎物具有高特异性^[8],并通过阳性反应临界值的确定,来排除与其它节肢动物的交叉反应及降低捕食者消化道内所含的其它猎物蛋白的干扰作用。

捕食者的采集是在田间进行的随机取样,猎物(摇蚊)在捕食者的消化道内存留的时间有差异,一些个体较小的捕食者如八斑鞘蛛或检测数量也较少的种类,虽然在试验中没有出现阳性反应,但它们对摇蚊的捕食作用,仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Pang B P(庞保平), Chen J A(程家安), Wang Q F(王启法). Functional response and selectivity of spiders in paddy fields on Collembola. *Acta Phytophylacica Sinica* (in Chinese) (植物保护学报), 1998, **25**(3): 193~196.
- [2] Wu J C(吴进才), Hu G W(胡国文), Tang J(唐健). Studies on the regulation effect of neutral insect on the community food web in paddy field. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 1994, **14**(4): 381~386.
- [3] Wu J C(吴进才), Xu J X(徐建祥), Chen X N(程遐年). Studies on nutrition effect of larva of *Chironomus* on Lycosidae. *Acta Ecologica Sinica* (in Chinese) (生态学报), 1997, **17**(3): 292~297.
- [4] Guo Y J(郭玉杰), Wang N Y(王念英), Jiang J W(蒋金伟). Studies on nutrition effect of neutral insect on the community of predators in paddy fields. *Chinese Journal of Biological Control* (in Chinese) (中国生物防治), 1995, **11**(1): 5~9.
- [5] Hagler J R and Naranjo S E. Using gut content immunoassays to evaluate predaceous biological control agents; a case study. In: edited by Symondson W. O. C. and J. E. *The ecology of agricultural pests (biochemical approaches)*, Liddell. London, 1996. 383~400.
- [6] Service M W, Voller A and Bidwell D E. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of bloodmeals of hematophagous insects. *Bulletin of Entomological Research*, 1986, **76**: 321~330.
- [7] Zhang G R(张古忍), Gu D X(古德祥), Zhang W Q(张文庆). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application in predation studies. *Chinese Journal of Biological Control* (in Chinese) (中国生物防治), 1996, **12**(1): 33~38.
- [8] Guren Zhang, Wenqing Zhang and Dexiang Gu. Quantifying predation by *Ummeliata insecticeps* Boes. et Str. (Araneae: Linyphiidae) on rice planthoppers using ELISA. *Entomologia Sinica*, 1999, **6**(1): 77~82.
- [9] Un Taek Lim and Joon-Ho Lee. Enzyme-linked immunosorbent assay used to analyze predation of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by *Pirata subpiraticus* (Araneae: Lycosidae). *Environ. Entomol.*, 1999, **28**(6): 1777~1782.
- [10] Liu Y F(刘雨芳), Zhang G R(张古忍), Gu D X(古德祥). Investigating the arthropods community in paddy fields using an improvement suction sampling machine. *Plant Protection*(in Chinese)(植物保护), 1999, **25**(6): 39~40.
- [11] Zhou H H(周汉辉). A serological test technology in study insect ecology. *Entomological Knowledge* (in Chinese) (昆虫知识), 1986, **23**(1): 44~45.
- [12] Boreh and Ohiaigu C E. The use of serology in evaluating invertebrate prey-predator relationships: a review. *Bull. Entomol. Res.*, 1978, 171~194.