

弹尾虫单克隆抗体的制备及其在捕食研究中的应用

赵伟春^{1 2}, 王光华¹, 程家安^{1,*}, 陈正贤³
(1. 浙江大学昆虫科学研究所 杭州 310029 2. 浙江中医药大学生物工程学院 杭州 310053 3. 浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘要 :应用杂交瘤技术制备了针对弹尾虫的单克隆抗体 2F10。该抗体的效价为 1.024×10^8 ,只与灰橄榄长角跳虫、球角跳虫和钩圆跳虫等弹尾虫发生强烈反应而不与稻田常见的其它昆虫和蜘蛛发生交叉反应 ,具有高度特异性。建立了 2F10、HRP-2F10 和蜘蛛样品分别稀释 4000 倍 (34.193 ng/L)、1500 倍 (2.4624 ng/L)和 50 倍 (50ml/individual)的抗体夹心 ELISA 检测系统用于检测稻田常见蜘蛛对弹尾虫的捕食作用。其检测灵敏度为 1/2 头灰橄榄长角跳虫 (4.49 μg) ,拟环纹豹蛛捕食 1 头灰橄榄长角跳虫成虫后 ,在 25℃ 下猎物的可测定时间为 4.5h。应用该检测系统研究了不同稻区常见蜘蛛对 2F10 的阳性反应率。其中狡蛛、拟环纹豹蛛、纵条蝇狮和纵条蝇虎的阳性反应率显著高于食虫瘤胸蛛、八斑球腹蛛和锥腹肖蛸。

关键词 :弹尾虫 蜘蛛 单克隆抗体 酶联免疫吸附试验 捕食作用

文章编号 :1000-0933 (2007)09-3694-07 中图分类号 :Q966 Q968 文献标识码 :A

Development of a monoclonal antibody to Collembola and its application on predation evaluation

ZHAO Wei-Chun^{1 2} , WANG Guang-Hua¹ , CHENG Jia-An^{1,*} , CHEN Zheng-Xian³
1 Institute of Insect Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China
2 College of Bioengineering , Zhejiang Chinese Medical University , Hangzhou 310053 , China
3 Institute of Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China
Acta Ecologica Sinica 2007 27 (9) 3694 ~ 3700.

Abstract : Collembola is a common detritivore in many cropping system. In order to understand the impact of Collembola on predators and the prey shifting behaviour in rice ecosystem , research was carried out to develop a monoclonal antibody (McAb) for major species of Collembola for identification. This paper reports the characterization of the McAb and evaluation to detecting the Collembola diet of spiders.

A McAb for Collembola , namely 2F10 , was developed using hybridoma technique. It had high absorption values even it was diluted over 1.024×10^8 times. It is specific to the proteins of *Entomobrya griseoclivata* (Packcord) , *Hypogastra matura* and *Bourletiella christianseni* (Banks) , and has no-reaction with other species in subtropical rice ecosystem.

A double antibody sandwich method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established to detect the Collembola antigens in the guts of the spiders. In this detecting system , 2F10 diluted 4000 times (34.193 ng/L) , enzyme-linked antibody HRP-2F10 diluted 1500 times (2.463 ng/L) and samples diluted 50 times (50ml/individual) were used. About 4.49 μg prey antigens (1/2 a Collembola individual) remaining in a predator gut could be detected under this

基金项目 国家 "973 "资助项目 (G2000016210) 国家自然科学基金资助项目 (30370934)
收稿日期 2006-05-21 ; 修订日期 2007-02-13
作者简介 赵伟春 (1973 ~) 女 浙江缙云人 博士 副研究员 主要从事细胞和分子生物学研究。
* 通讯作者 Corresponding author. E-mail : jacheng@zju.edu.cn
Foundation item The project was financially supported by National Basic Research Priorities Programme of China (No. G2000016210) and National Natural Science Fundation of China (No. 30370934)
Received date 2006-05-21 ; **Accepted date** 2007-02-13
Biography ZHAO Wei-Chun , Ph. D. , mainly engaged in cell and molecular biology. E-mail : weichunzhao@zjtem.net

system. It could recognize *E. griseoclivata* proteins after one adult was ingested by *Pardosa pseudoannulata* for about 4.5 hours at 25℃.

Samples of major spider species collected from rice paddies in Hangzhou , Fuyang and Anji were studied using this system. The result showed that *Dolomedes* sp. , *Paradosa pseudoannulata* , *Marpissa magister* and *Plexippus setipes* preyed significantly on more Collembola than *Ummeliata insecticeps* , *Coleosoma octomaculatum* and *Tetragnatha* sp.

Key Words : Collembola ; spider ; monoclonal antibody (McAb) ; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ; predation

在稻田生态系统中 ,包括摇蚊、蚊、弹尾虫和蝇类等在内的中性昆虫 ,是稻田群落食物网中捕食性天敌猎物的重要组分。在水稻生长前期 ,中性昆虫可作为捕食者的补充猎物来源 ,从而直接影响和维系着捕食性天敌的种群数量 ,进而关系到对主要稻田害虫的控制能力^[1~5]。但是 ,也有试验表明 ,在弹尾虫、摇蚊和白背飞虱并存时 ,食虫瘤胸蛛、拟环纹豹蛛、拟水狼蛛和稻田水狼蛛偏好于取食中性昆虫^[6,7] ,这可能削弱捕食者对害虫的控制作用。由于缺乏准确地评价捕食作用的研究方法 ,对于中性昆虫在稻田生态系统中的数量作用研究甚少 ,以往的研究也仅限于依据田间天敌、害虫与中性昆虫的数量消长的相关性^[1~5]和实验室的功能反应^[6,7]。为了获得中性昆虫在稻田生态系统调控作用的直接证据和数量关系 ,制备了针对弹尾虫 *Collembola* 的单克隆抗体 ,在研究了抗体的特性的基础上 ,建立了抗体夹心 ELISA 方法 ,并应用该方法比较研究了稻田主要蜘蛛对弹尾虫的捕食作用。

1 材料与方法

1.1 抗原的准备

将稻田常见的灰橄榄长角跳虫 *Entomobrya griseoclivata* (Packcord)、球角跳虫 *Hypogastra matura* 和钩圆跳虫 *Bourletiella christianseni* (Banks)混合种群供水饥饿 2 h 后 ,置于 - 20 ℃ 冰箱中冰冻致死。取出分类后称重 ,各种弹尾虫分别加入少量 0.01 mol/L 的 PBS ,研磨后加入适量的 PBS 后离心 (8000 r/min , 10 min) ,分离上清液后低温离心 (15000 r/min , 5 min) ,将上清液定容至 0.05 mg/L。取少量灰橄榄长角跳虫抗原用紫外分光光度仪测定抗原蛋白含量为 2.297 μg/L ,即 9.303 μg/头。将抗原液少量分装后 - 80℃ 冰冻保存。在临用前取少量于 - 20℃ 保存。

1.2 单克隆抗体的制备

单克隆抗体的制备采用传统的杂交瘤技术 ,包括用抗原免疫 Bal b/c 小鼠、小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合、杂交瘤细胞筛选及克隆化培养和腹水型单克隆抗体的制备等步骤 ,具体方法见赵伟春等^[8]。其中取相同体积的灰橄榄长角跳虫、球角跳虫和钩圆跳虫抗原作为免疫抗原。

1.3 单克隆抗体的效价测定

将灰橄榄长角跳虫抗原稀释至 0.05 μg/L (蛋白含量为 2.297 ng/L)作为抗原包被浓度 ,将供水饥饿 7 d 的拟环纹豹蛛稀释至 0.05 μg/L 作为阴性对照 ,将单克隆抗体进行一系列的倍比稀释 (10⁵ ~ 1.6384 × 10⁹ 倍) ,酶标羊抗鼠稀释 1000 倍 ,以间接 ELISA 测定各种单克隆抗体与抗原反应的 OD 值 ,比较弹尾虫抗原和拟环纹豹蛛与同一稀释倍数下的单克隆抗体反应的间接 ELISA 检测的 OD 值 ,从而确定不同单克隆抗体的最大稀释倍数 (即单克隆抗体的效价) ,并确定最佳检测浓度。

1.4 抗体的特异性检测

在抗体的最佳检测浓度下 ,分别以浓度为 0.05 μg/L 的褐飞虱和白背飞虱卵、各龄若虫、雌成虫、雄成虫及稻田其它常见昆虫及天敌 :灰飞虱 *Laodelphax striatella*、黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*、电光叶蝉 *Recilia dorsalis*、二化螟 *Chilo suppressalis*、三化螟 *Tryporyza incertulas*、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*、摇蚊 *Tendipes* sp、拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata*、拟水狼蛛 *Pirata subpiraticus*、纵条蝇狮 *Marpissa magister*、食虫瘤胸蛛 *Ummelita insecticeps*、斜纹猫蛛 *Oxyopes sertatus*、锥腹肖蛸 *Tetragnatha maxillosa*、八斑球腹蛛 *Coleosoma octomaculatum*

等及 3 种弹尾虫为检测对象,以 PBST 为空白对照,用间接 ELISA 测定抗体的特异性,其中捕食性天敌在饥饿 7d 后用于试验。求出空白对照样品 OD 值的平均值 N ,若测定样品 OD 值 $P \geq 2N$,则视为阳性反应,否则为阴性反应。

1.5 抗体夹心 ELISA 最适检测条件的确定

采用过碘酸钠法用辣根过氧化物酶标记单克隆抗体 (HRP-2F10,浓度为 3.694 $\mu\text{g/L}$),然后用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液将 2F10 从 250 倍至 4000 倍进行倍比稀释,将 HRP-2F10 用封闭液从 750 倍至 6000 倍进行倍比稀释,用封闭液将拟环纹豹蛛稀释 50 倍后,用该稀释液将灰橄榄长角跳虫抗原稀释 1000 倍 (2.297 ng/L),以 50 倍的拟环纹豹蛛稀释液作为阴性对照,进行抗体夹心 ELISA 方阵试验。试验步骤见赵伟春等^[9]。

1.6 抗体夹心 ELISA 检测灵敏度的测定

将拟环纹豹蛛用封闭液稀释 50 倍后,用该稀释液和封闭液分别将灰橄榄长角跳虫抗原进行一系列倍比稀释 (400 ~ 51200 倍),以 50 倍拟环纹豹蛛稀释液作为阴性对照,以 1.5 确定的最适检测浓度进行抗体夹心 ELISA 试验,检测抗体夹心 ELISA 的检测灵敏度。

1.7 猎物可测定时间的 ELISA 检测

挑选大小一致 (0.03 ~ 0.06g/头)的拟环纹豹蛛放于试管中,内插水稻苗 1 根,底部放少许水以保湿,管口用纱布封住以防灰橄榄长角跳虫逃出。25℃ 下饥饿 7d 后饲喂灰橄榄长角跳虫成虫 1 头,然后供水饥饿直至实验完毕。待蜘蛛开始取食弹尾虫时开始计时,在猎物消化一定时间 (0、0.5、1、2、3、6h 和 9h)后,分别将蜘蛛放入 -20℃ 冰柜中冰冻处死,各处理重复 10 次,共 70 个样品。取出单头蜘蛛,加入适量生理盐水研磨、离心 (8000r/min,10min),定容至 1ml/头。用封闭液将样品稀释 50 倍进行抗体夹心 ELISA 检测。同时以封闭液作空白对照,以饥饿 7d 的拟环纹豹蛛 50 倍稀释液作为阴性对照,用拟环纹豹蛛稀释液将灰橄榄长角跳虫抗原稀释 1000 倍作阳性对照,采用 2F10 抗体夹心 ELISA 进行检测。求出阴性对照样品 OD 值的平均值 N ,若样品测定 OD 值 $P \geq 2N$,则视为阳性反应,否则为阴性反应。

1.8 蜘蛛样品处理及 ELISA 检测

在杭州、富阳和安吉的单季稻田中用盆拍法调查稻田主要昆虫和捕食性天敌的种群数量并随机捕获拟环纹豹蛛、食虫瘤胸蛛、八斑球腹蛛、纵条蝇虎 *Plexippus setipes*、狡蛛、纵条蝇狮、锥腹肖蛸和拟水狼蛛各 30 ~ 50 头,迅速于 -20℃ 下冻死。蜘蛛样品的处理及 ELISA 检测方法同 1.7。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体的制备

经一次融合后,共获得有杂交瘤细胞生长的孔 254 个,经检测阳性孔为 76 个,其中强阳性且不与其它昆虫反应的孔 12 个。用有限稀释法对强阳性孔的细胞进行克隆化培养,最后筛选到 5 个分泌只与弹尾虫反应的单克隆抗体细胞株,分别命名为 1B5、2F10、2G12、3D8 和 4F8。经体外长期培养均能稳定地分泌单克隆抗体。将杂交瘤细胞注入 Bal b/c 小鼠制备腹水型单克隆抗体,1 周后小鼠腹部肿胀,每天采集小鼠的腹水,直至小鼠死亡。将腹水型单克隆抗体用硫酸铵盐析法纯化后,分别稀释 1000 倍后进行紫外扫描。根据公式计算单克隆抗体 1B5、2F10、2G12、3D8、4F8 的 IgG 含量分别为 94.95、136.77、30.72、42.74 $\mu\text{g/L}$ 和 28.27 $\mu\text{g/L}$ 。选择 IgG 含量最高的 2F10 作为进一步实验的单克隆抗体。

2.2 单克隆抗体的效价测定

以间接 ELISA 测定了 2F10 的抗体效价。随着单克隆抗体的稀释倍数从 10^5 增至 1.6384×10^9 ,其与阴性对照反应的 OD 值从 0.1 左右缓慢地降至 0.05,而与灰橄榄长角跳虫抗原反应的 OD 值呈 S 型曲线下降。当 2F10 稀释 1.6384×10^9 倍时,OD 值为阴性对照的 2 倍以上。单克隆抗体在 $8 \times 10^5 \sim 1.024 \times 10^8$ 倍的稀释范围内,OD 值下降最显著。确定 2F10 稀释 5×10^6 倍为最佳检测浓度,对应的 IgG 含量 27.35 pg/L 。此时,检测的 OD 值在 1.5 左右。

2.3 单克隆抗体的特异性测定

采用间接 ELISA 检测了稻田常见昆虫和蜘蛛种类与弹尾虫单克隆抗体的交叉反应。试验结果表明,

2F10 不与稻田常见的害虫种类包括褐飞虱、白背飞虱、黑尾叶蝉等同翅目昆虫、二化螟、三化螟等鳞翅目昆虫以及摇蚊等双翅目中性昆虫发生交叉反应 (图 1),检测的 OD 值均小于 0.1,与空白对照的 OD 值 (0.04 ~ 0.06)接近,而与 3 种弹尾虫抗原的反应均十分强烈,在 490nm 处的光密度 (OD 值)均在 0.85 ~ 1.2 之间,是空白对照样品 OD 值的 10 倍以上。

从图 2 可知 2F10 与稻田的常见蜘蛛抗原均不发生交叉反应。其中拟水狼蛛、纵条蝇狮、食虫瘤胸蛛、八斑球腹蛛检测的 OD 值在 0.1 ~ 0.2,分别接近于空白对照样品的 2 倍。

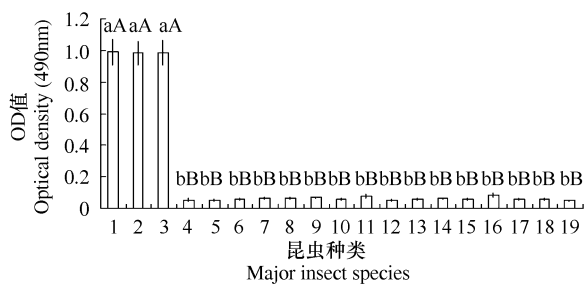


图 1 单克隆抗体与稻田常见昆虫抗原的 ELISA 检测

Fig. 1 Reactivities of the anti-Collembolan McAb to the major insect species in rice ecosystem

1 球角跳虫 2 钩圆跳虫 3 灰橄榄长角跳虫 4~7 褐飞虱 4 1~3 龄若虫 5 4~5 龄若虫 6 雌成虫 7 雄成虫 8~11 白背飞虱, 8 1~3 龄若虫 9 4~5 龄若虫 10 雌成虫 11 雄成虫 12 灰飞虱 13 黑尾叶蝉 14 电光叶蝉 15 二化螟 16 三化螟 17 稻纵卷叶螟 18 摇蚊 19 阴性对照;图中不同柱上字母相同者表示差异不显著 (t 检验,小写字母 $P < 0.05$;大写字母 $P < 0.01$)

1 : *H. matura* , 2 : *B. christianseni* , 3 : *E. griseoclivata* , 4 ~ 7 : *N. lugens* : 4 : 1 ~ 3rd instar , 5 : 4 ~ 5th instar , 6 : female , 7 : male , 8 ~ 11 : *S. furcifera* : 8 : 1 ~ 3rd instar , 9 : 4 ~ 5th instar , 10 : female , 11 : male , 12 : *L. striatella* , 13 : *N. cincticeps* , 14 : *R. dorsalis* , 15 : *C. suppressalis* , 16 : *T. incertulas* , 17 : *C. medinalis* , 18 : *Tendipes* sp. , 19 : Negative control ; Data in the same column followed by the same small and capital letters are not significantly different by Tukey test at levels of $P = 0.05$ and 0.01 , respectively

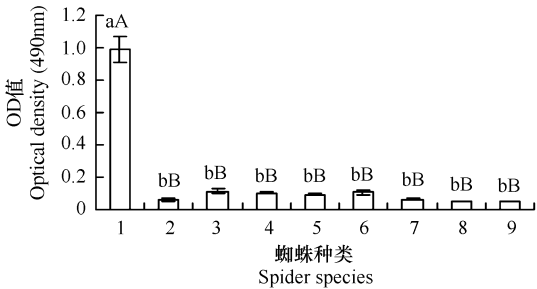


图 2 单克隆抗体与稻田常见蜘蛛抗原的 ELISA 检测

Fig. 2 Reactivities of the anti-Collembolan McAb to the major spider species in rice ecosystem

1 灰橄榄长角跳虫 2 拟环纹豹蛛 3 拟水狼蛛 4 纵条蝇狮 5 食虫瘤胸蛛 6 斜纹猫蛛 7 锥腹肖蛸 8 八斑球腹蛛 9 阴性对照;图中不同柱上字母相同者表示差异不显著 (t 检验,小写字母 $P < 0.05$;大写字母 $P < 0.01$)

1 : *E. griseoclivata* , 2 : *P. pseudoannulata* , 3 : *P. subpiraticus* , 4 : *M. magister* , 5 : *U. insecticeps* , 6 : *O. sertatus* , 7 : *T. maxillosa* , 8 : *C. octomaculatum* , 9 : Negative control ;

Data in the same column followed by the same small and capital letters are not significantly different by Tukey test at levels of $P = 0.05$ and 0.01 , respectively

2.4 抗体夹心 ELISA 最适检测条件的确定

在 2F10 释释 250 ~ 4000 倍 ,HRP-2F10 稀释 750 ~ 6000 倍的范围内 ,拟环纹豹蛛的检测 OD 值均在 0.12 以下 ,而灰橄榄长角跳虫的 OD 值在 2.45 ~ 0.56 间。当 2F10 稀释相同倍数时 ,灰橄榄长角跳虫的 OD 值随着 HRP-2F10 稀释倍数的增加而减小 ,当 HRP-2F10 稀释相同倍数时 ,其 OD 值亦随 2F10 稀释倍数的增加而减小。确定 2F10 稀释 4000 倍 ,HRP-2F10 稀释 1500 倍作为抗体夹心 ELISA 的工作浓度。此时 ,检测的 OD 值在 1.0 左右。

2.5 抗体夹心法的检测灵敏度

当灰橄榄长角跳虫抗原用 50 倍拟环纹豹蛛稀释液从 400 倍至 51200 倍稀释时 ,夹心 ELISA 检测的 OD 值呈“S 型”曲线下降 ,最大值达 3.5 以上 ,超出了仪器的检测范围 (图 3)。其抗原的最大稀释倍数为 25600 倍 ,即检测灵敏度为 $2.297 \mu\text{g/L} \div 25600 = 89.727 \text{ng/ml}$ (相当于 $89.727 \text{pg/L} \div 9.303 \mu\text{g/头} = 1/ (103.68 \text{头 ml})$)。

2.6 灰橄榄长角跳虫在拟环纹豹蛛肠道中的可测定时间

用单克隆抗体检测灰橄榄长角跳虫在拟环纹豹蛛肠道中消化不同时间后的 OD 值 ,试验结果见图 4 ,其中

阴性对照 OD 值为 0.226。根据检测 OD 值 (Y)与消化时间 (X)作散点图,初步确定猎物在捕食者肠道中呈指数降解,拟合方程为: $Y=0.4509+1.4054\exp(-1.6029X)$ $r=0.9961$ 。将阴性对照 OD 值的两倍作为 Y 值代入方程,求得 X 值即为灰橄榄长角跳虫在拟环纹豹蛛体内的可测定时间,结果为 4.5 h。

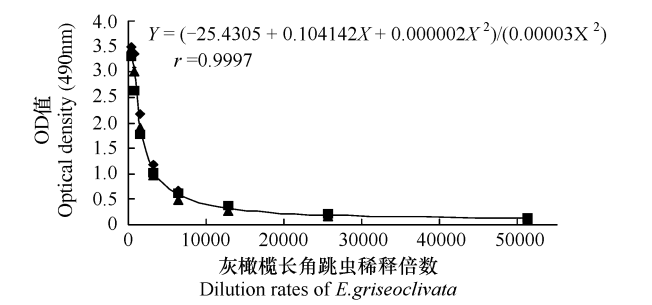


图3 灰橄榄长角跳虫抗体夹心 ELISA 检测的 OD 值曲线
Fig. 3 Curves of optical densities tested by sandwich ELISA with different *E. griseoclivata* concentrations

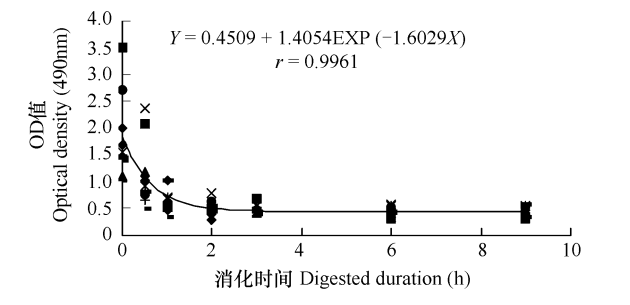


图4 灰橄榄长角跳虫抗原检测 OD 值与拟环纹豹蛛消化时间的关系
Fig. 4 Relationship between the optical density and digested duration of *E. griseoclivata* proteins in the guts of *P. pseudoannulata*

2.7 主要捕食性天敌田间样品的阳性反应率

应用单克隆抗体夹心 ELISA 法检测了不同田块采集的常见蜘蛛的阳性反应率。检测结果表明,狡蛛、拟环纹豹蛛、纵条蝇狮和纵条蝇虎的阳性反应率较其它蜘蛛的要高,分别为 27.63% ± 6.09%、24.96% ± 5.83%、23.87% ± 13.15% 和 18.36% ± 3.33%,而其它蜘蛛如食虫瘤胸蛛、八斑球腹蛛和锥腹肖蛸等的阳性反应率均小于 5% (表 1)。在蜘蛛取样期间,田间弹尾虫的密度范围为 0.29% ± 0.15% 至 21.45% ± 7.66%。

表1 不同蜘蛛对弹尾虫单克隆抗体的阳性反应率 (2002 年 杭州)
Table 1 Positive rates of main spider species in rice ecosystem to McAb against Collembola (2002, Hangzhou)

蜘蛛种类 Spider species	蜘蛛数量 No. of spider (n)	取样田块 No. of sample field	阳性反应率 (%) ± 标准误 Positive rates (%) ± Se
狡蛛 <i>Dolomedes</i> sp.	101	7	27.63 ± 6.09 aA
拟环纹豹蛛 <i>Pardosa pseudoannulata</i>	457	10	24.96 ± 5.83 aA
纵条蝇狮 <i>Marpissa magister</i>	38	4	23.87 ± 13.15abA
纵条蝇虎 <i>Plexippus setipes</i>	137	5	18.36 ± 3.33 abcAB
食虫瘤胸蛛 <i>Ummeliata insecticeps</i>	540	10	4.29 ± 1.00 bcB
八斑球腹蛛 <i>Coleosoma octomaculatum</i>	402	10	2.42 ± 0.85 cB
锥腹肖蛸 <i>Tetragnatha</i> sp.	438	10	0.60 ± 0.32 cB

表中字母相同者表示差异不显著 (邓肯氏新复极差法,小写字母 $P<0.05$;大写字母 $P<0.01$) Data in the same column followed by the same small and capital letters are no significantly difference by Tukey test at levels of $P=0.05$ and 0.01 , respectively

3 讨论

自从单克隆抗体被用于研究捕食作用以来,人们已经制备了多种害虫的单克隆抗体用于研究捕食性天敌对害虫的控制作用^[10,11]。近年来,人们开始制备密点龟甲、蚯蚓等非目标抗原的单克隆抗体用于研究非目标抗原在生态系统中的作用^[12,13]。本文应用杂交瘤技术,制备出了针对弹尾虫的单克隆抗体,这为研究中性昆虫在农业生态系统中的作用提供了一种新的方法。在本试验中,以富阳单季晚稻田中捕获的灰橄榄长角跳虫、球角跳虫和钩圆跳虫这 3 种稻田常见的弹尾虫^[14]的匀浆液作为免疫原制备针对弹尾虫的单克隆抗体,而不以单种弹尾虫为免疫原,这主要是考虑到对捕食性天敌来说,各种弹尾虫在稻田生态系统中所起的作用是一致的,制备出多种弹尾虫的共同抗体更有利于从整体水平上研究弹尾虫的作用。

对弹尾虫单克隆抗体的特异性检测结果表明,单克隆抗体与弹尾虫抗原的反应非常强烈,间接 ELISA 检

测的 OD 值均在 0.85 以上,而与其它稻田主要昆虫和蜘蛛种类均无交叉反应,检测的 OD 值接近或小于空白对照的 2 倍,表明该单克隆抗体具有高度的特异性。与筛选褐飞虱特异性单克隆抗体细胞株相比,筛选出与弹尾虫特异性结合的单克隆抗体细胞株相对比较容易。这可能是由于弹尾虫与稻田生态系统中其它昆虫种类及蜘蛛的亲缘关系较远,其特异性蛋白抗原决定簇与其它昆虫及蜘蛛差异较大的缘故。此外,弹尾目昆虫相对比较低等,其体内可溶性蛋白的种类相对比较少,这也有利于筛选到所需的单克隆抗体产生的细胞株。根据上述结果可知,该单克隆抗体可用于分析稻田生态系统中捕食者对弹尾虫的捕食作用。

建立一套切实可行的检测方法是在制备了针对目标抗原的单克隆抗体后用免疫学方法研究捕食作用的又一个重要内容^[10,14]。本实验建立了用于研究捕食者肠道中是否含有弹尾虫抗原的 2F10 抗体夹心 ELISA 检测系统,其中 2F10 的包被浓度为 34.193 ng/L (稀释 4000 倍),HRP-2F10 使用浓度为 2.4624 ng/L (稀释 1500 倍),考虑到弹尾虫的个体非常小,为了能够检测出单头弹尾虫被猎物取食后的抗原量,将捕食者匀浆液定容至 1 ml/头后再作 50 倍稀释。在此检测系统下,检测的灵敏度为 89.73 pg/L (相当于每头拟环纹豹蛛含 4.487 μg 灰橄榄长角跳虫抗原,即捕食 1/2 头灰橄榄长角跳虫)。拟环纹豹蛛捕食了 1 头灰橄榄长角跳虫成虫后在 25℃ 下的可测定时间为 4.5h,这为进一步研究弹尾虫在稻田生态系统中的作用提供了一套较为理想的检测工具。

稻田常见蜘蛛的检测结果表明,各种蜘蛛对弹尾虫单克隆抗体的阳性反应率大小与蜘蛛的生活习性相关。狡蛛、拟环纹豹蛛、纵条蝇狮和纵条蝇虎均是活动能力强,主动捕食猎物的体型大的蜘蛛种类,锥腹肖蛸在水稻的叶尖结大型网捕食被网住的蜘蛛。食虫瘤胸蛛和八斑球腹蛛是小型蜘蛛,而且经常停留在靠近水稻基部的位置活动,其中八斑球腹蛛的生态位略高于食虫瘤胸蛛。他们都可在水稻基部结小型网,其中食虫瘤胸蛛能在稻株上下活动捕捉小型猎物,而八斑球腹蛛活动性更低。拟水狼蛛也是主动攻击型蜘蛛,但它们偏爱于在稻田水面上和地面活动。而弹尾虫多数在稻丛基部,活动能力较弱,因此,活动能力强而且喜欢在稻丛基部活动的蜘蛛与弹尾虫相遇的机会就多,这与用弹尾虫单克隆抗体检测的阳性反应率的情况相一致。

利用本文建立的检测系统和已有的白背飞虱、褐飞虱单抗检测系统^[8,10]检测田间蜘蛛对各种猎物的捕食情况,再结合田间各种猎物、蜘蛛的消长动态,将可用于分析中性昆虫在稻田生态系统中的作用,作者已利用上述系统对浙江省不同稻区各种蜘蛛对弹尾虫、白背飞虱、褐飞虱的捕食作用进行了初步的动态监测,取得了较理想的效果^①。

本文利用单克隆抗体结合免疫学方法可以准确地测定捕食者肠道中残留的弹尾虫蛋白,从而对捕食作用进行较准确的定性分析。但是,在生态系统中,猎物在捕食者肠道中的消化速率受捕食者种类、饥饿状态、猎物种类、捕食量、环境温度及替换猎物等诸多因素的影响,本方法虽然能比其它方法更准确地测定出猎物残留量,但要将猎物残留量转换成起始的捕食量仍然与其它方法一样非常困难。因此,如何利用高度特异性的单克隆抗体 ELISA 测定结果结合田间调查来准确地定量评价某种节肢动物的捕食作用仍有待于进一步研究。

References :

[1] Wu J C, Hu G W, Tang J, *et al.* Studies on the regulation effect of neutral insect on the community food web in paddy field. *Acta Ecologica Sinica*, 1994, 14 (4) :381—386.

[2] Guo Y J, Wang N Y, Zhao J H, *et al.* Comparative study on the composition and structure of arthropod community in four rice ecosystems in China. *Acta Ecologica Sinica*, 1995, 15 (4) :433—441.

[3] Jiang M X, Zhu Z R, Cheng J A. Arthropod biodiversity in rice field during single cropping season in mountain areas of northwestern Zhejiang Province. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2000, 26 (3) :283—286.

[4] Settle W H, Ariawan H, Astuti E T, *et al.* Managing tropical rice pests through conservation of generalist natural enemies and alternative prey. *Ecology*, 1996, 77 (7) :1975—1988.

① 赵伟春博士后出站报告. 浙江大学. 2003.

[5] Hao S G ,Zhang X X ,Chen X N. The dynamics of biodiversity and the composition of nutrition classes and dominant guild of arthropoda community in paddy field. *Acta Entomologica Sinica* ,1998 ,41 (4) :343 — 353.

[6] Pang B P ,Cheng J A ,Wang Q F. On the functional response and preference of two paddy field spiders to a springtail. *Acta Phytophylacica Sinica* , 1998 ,25 (3) :193 — 196.

[7] Zhou H H. Serological analysis of control effects of predators on three rice insects. *Acta Phytophylacica Sinica* ,1989 ,16 (1) :7 — 11.

[8] Zhao W C ,Cheng J A ,Chen Z X. Development of a monoclonal antibody to detect predation of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *International Journal of Pest Management* ,2004 ,50 (4) :317 — 321.

[9] Zhao W C ,Cheng J A ,Chen Z X. Calibration of a suitable enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Nilaparvata lugens* (Stål) antigen detection. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)* ,2002 ,28 (6) :629 — 634.

[10] Pang B P ,Cheng J A ,Chen Z X , *et al.* Development and characterization of monoclonal antibodies to the white-backed planthopper *Sogatella furcifera*. *Acta Entomologica Sinica* ,2001 ,44 (1) :21 — 26.

[11] Harwood J D ,Sunderland K D ,Symondson W O C. Monoclonal antibodies reveal the potential of the tetragnathid spider *Pachygnatha degeeri* (Araneae :Tetragnathidae) as an aphid predator. *Bulletin of Entomological Research* ,2005 ,95 (2) :161 — 167.

[12] Bacher S ,Schenk D ,Imboden H. A monoclonal antibody to the shield beetle *Cassida rubiginosa* (Coleoptera ,Chrysomelidae) :A tool for predator gut analysis. *Biol. Control* ,1999 ,16 :299 — 309.

[13] Symondson W O C ,Glen D M ,Erickson M L , *et al.* Do earthworms help to sustain the slug predator *Pterostichus melanarius* (Coleoptera :Carabidae) within crops ?Investigations using monoclonal antibodies. *Mol. Ecol.* ,2000 ,9 :1279 — 1292.

[14] Bai Y Y ,Jiang M X ,Cheng J A. Impacts of transgenic crylAb rice on two collembolan species and predation of *Microvelia horvathi* (Hemiptera :Veliidae). *Acta Entomologica Sinica* ,2005 ,48 (1) :42 — 47.

参考文献：

[1] 吴进才 ,胡国文 ,唐健 ,等. 稻田中性昆虫对群落食物网的调控作用. *生态学报* ,1994 ,14 (4) :381 ~386.

[2] 郭玉杰 ,王念英 ,蒋金炜 ,等. 中性昆虫在稻田节肢动物群落中作为捕食者营养桥梁作用的研究. *中国生物防治* ,1995 ,11 (1) :5 ~9.

[3] 蒋明星 ,祝增荣 ,程家安. 浙西北山区单季稻田节肢动物群落的多样性. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)* ,2000 ,26 (3) :283 ~286.

[5] 郝树广 ,张孝羲 ,程遐年 ,等. 稻田节肢动物群落营养层及优势功能集团的组成与多样性动态. *昆虫学报* ,1998 ,41 (4) :343 ~353.

[6] 庞保平 ,程家安 ,王启法. 稻田蜘蛛对弹尾虫的功能反应及选择作用. *植物保护学报* ,1998 ,25 (3) :112 ~115.

[7] 周汉辉. 血清法探讨天敌对三种稻田昆虫的抑制作用. *植物保护学报* ,1989 ,16 (1) :7 ~11.

[9] 赵伟春 ,程家安 ,陈正贤 ,等. 褐飞虱抗原检测最佳 ELISA 条件的建立. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)* ,2002 ,28 (6) :629 ~634.

[10] 庞保平 ,程家安 ,陈正贤 ,等. 白背飞虱单克隆抗体的制备及其特性的研究. *昆虫学报* ,2001 ,44 (1) :21 ~26.

[14] 白耀宇 ,蒋明星 ,程家安. 转 Bt 基因水稻对两种弹尾虫及尖钩宽尾蝽捕食作用的影响. *昆虫学报* ,2005 ,48 (1) :42 ~47.