



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104076144 B

(45) 授权公告日 2016.01.27

(21) 申请号 201410319850.8

(22) 申请日 2014.07.08

(73) 专利权人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市仓山区上下店路15号

(72) 发明人 贾东升 魏太云 陈红燕 陈倩 吴维

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56) 对比文件

CN 103555821 A, 2014.02.05,

CN 103468798 A, 2013.12.25,

CN 102168150 A, 2011.08.31,

Dongshengjia et al. Restriction of viral dissemination from the midgut determines incompetence of small brown planthopper as a vector of Southern rice black-streaked dwarf virus. 《Virus Research》. 2012, 第167卷第404-408页.

贾东升. SRBSDV 和 RRSV 在介体飞虱体内的侵染机理. 《中国博士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2013, D046-4, 第23页.

审查员 李倩

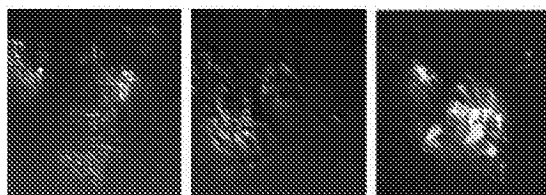
权利要求书2页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法

(57) 摘要

本发明属于农业生物技术蛋白检测领域的检测技术,公开了一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,可用于检测稻飞虱传播的病毒在其血淋巴内的分布。本发明可对稻飞虱的血淋巴直接进行免疫荧光标记检测病毒的分布,从而用于分析病毒在稻飞虱体血淋巴内的侵染。该方法通过对稻飞虱血淋巴的抽取,并对抽取到的血淋巴吸附在经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上,经固定、渗透、抗体孵育、制片和观察,从而检测稻飞虱血淋巴内的病毒。本发明解决了常规RT-PCR无法检测稻飞虱血淋巴内病毒的难题,使稻飞虱体内微量的血淋巴可通过免疫荧光标记技术直观准确地检测侵入其中的病毒。



1. 一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征在於:通过对稻飞虱血淋巴的抽取,并对抽取到的血淋巴吸附在经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上,经固定、渗透、抗体孵育、制片和观察,从而检测稻飞虱血淋巴内的病毒;方法包括以下步骤:

1) 昆虫饲毒:抓取 100 头室内饲养的 2 龄稻飞虱若虫,于水稻病毒侵染的水稻病株上饲喂 2 天,随后在健康水稻幼苗上饲养,饲养的不同时间点抓取 20 头稻飞虱用于检测稻飞虱血淋巴内的病毒;

2) Poly-L-lysine 玻片的制备:将清洗洁净的圆形玻片用碱液浸泡 2 小时,双蒸水洗涤 5 次;再用无水乙醇浸泡 30 min,烘干;将玻片放入 24 孔板中,并向每个孔加入 poly-L-lysine 溶液,室温孵育 2 小时;用移液枪吸去孔中的液体,并用双蒸水清洗 3 次;将玻片放置在 24 孔板孔沿上,使玻片的两面都暴露在空气中,放置 24 小时后即可用于吸附血淋巴;

3) 抽取稻飞虱的血淋巴:将活体昆虫装入玻璃试管,放在冰上使昆虫低温麻醉,然后将麻醉后的稻飞虱倒出并粘附在玻璃胶面上,用解剖镊拔去稻飞虱一侧的后足,吸取 1-2 μ l 0.01 mol/L PBS 溶液,在稻飞虱拔除后足的伤口处反复吸打 3-5 次,抽取出稻飞虱的血淋巴;

4) 吸附:将获得的稻飞虱血淋巴滴在处理后的 Poly-L-lysine 玻片上,28 ~ 35 $^{\circ}$ C 培养箱内放置 40 ~ 50 min,使血淋巴吸附在玻片上;

5) 固定:将吸附后的玻片放入装有 200 μ l 固定液的离心管中,静置 10-20 min;

6) 渗透:固定后的玻片用 pH 值为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液清洗两次,再滴加 200 μ l 渗透液处理 10-30 min;

7) 配制抗体标记液:将荧光抗体与抗体稀释液按 1:100 的体积比混合,制得荧光抗体标记液,并用锡箔纸包裹避光;每个玻片需 30 ~ 50 μ l 抗体标记液;

8) 抗体孵育:用 pH 值为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液清洗渗透后的玻片两次,将荧光抗体标记液滴加在清洗后的玻片上,于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 45-60 min;

9) 制片:孵育结束后,再次用 pH 值为 7.2 的 0.01mol/L PBS 溶液清洗玻片两次;向空白洁净的载玻片上加入一滴抗衰减液,将清洗后的玻片反盖在抗衰减液上;

10) 观察:在荧光显微镜下观察血淋巴内的病毒蛋白,判断病毒是否侵染稻飞虱血淋巴。

2. 根据权利要求 1 所述的稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征在於:步骤 2) 中 Poly-L-lysine 玻片的制备是用 0.1 mg/ml 的 poly-L-lysine 溶液处理。

3. 根据权利要求 1 所述的稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征在於:步骤 4) 中血淋巴的吸附是在 30 $^{\circ}$ C 培养箱内放置 45 min 完成。

4. 根据权利要求 1 所述的稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征在於:步骤 5) 所述固定液为含质量分数为 4% 多聚甲醛的 0.01 mol/L PBS 缓冲液。

5. 根据权利要求 1 所述的稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征在於:步骤 6) 所述渗透液是将 0.2 ml TritonX-100 溶液加入到 10 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液,充分搅拌混匀制得。

6. 根据权利要求 1 所述的稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征在於:步骤 7) 中的荧光抗体是将病毒的抗体与荧光素 FITC 交联制得;所述抗体稀释液为含

质量分数为 3% BSA 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液。

7. 根据权利要求 1 所述的稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,其特征
在于:步骤 9)中的抗衰减液是将甘油与 0.01mol/L PBS 缓冲液按体积比 9:1 混合后充分搅
拌制得。

一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物技术蛋白检测领域的检测技术,具体涉及一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法。

背景技术

[0002] 水稻是我国的第一大粮食作物,然而,近年来由介体稻飞虱传播的水稻病毒病在我国南方稻区大面积发生,已成为水稻生产上最严重的病害,严重威胁到我国的粮食生产。

[0003] 目前主要存在的可作为介体昆虫的稻飞虱有白背飞虱、灰飞虱和褐飞虱,其中白背飞虱传播南方水稻黑条矮缩病毒(Southern rice black streaked dwarf virus, SRBSDV),灰飞虱传播水稻黑条矮缩病毒(*Rice black streaked dwarf virus*, RBSDV)和水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV),褐飞虱传播水稻齿叶矮缩病毒(*Rice ragged stunt virus*, RRSV)和水稻草状矮缩病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV)。这些稻飞虱均以持久增殖型方式传播水稻病毒。不同稻飞虱在其所传播病毒感染的水稻病株上取食后,病毒通过稻飞虱的口针进入消化道系统,首先侵染中肠上皮细胞,然后扩散到其他器官和中肠以外的血淋巴,随后从血淋巴扩散到唾液腺。一旦病毒扩散到稻飞虱的唾液腺并增殖,病毒即可在昆虫取食时随唾液传播到健康水稻。

[0004] 正是由于稻飞虱是水稻病毒扩散和流行暴发的唯一传播途径,因此研究病毒在稻飞虱体内侵染和扩散的机理将为阻断稻飞虱传播水稻病毒奠定理论基础。水稻病毒在稻飞虱体内扩散到血淋巴是能否到达唾液腺的重要前提,而稻飞虱的个体小,血淋巴更少,如果要检测病毒是否扩散到血淋巴以及扩散到血淋巴的比例,则单头稻飞虱无法获得适量的血淋巴,以满足 RNA 的提取和后续 RT-PCR 检测病毒。因此需要建立一种有效的检测方法,可以对微量的血淋巴进行检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,可用于检测稻飞虱传播的病毒在其血淋巴内的分布。本发明可对稻飞虱的血淋巴直接进行免疫荧光标记检测病毒的分布,从而用于分析病毒在稻飞虱体血淋巴内的侵染。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法,是通过将稻飞虱血淋巴的抽取,并对抽取到的血淋巴吸附在经多聚赖氨酸处理的防脱玻片上,经固定、渗透、抗体孵育、制片和观察,从而检测稻飞虱血淋巴内的病毒。

[0008] 具体方法包括以下步骤:

[0009] 1) 昆虫饲毒:抓取 100 头室内饲养的 2 龄稻飞虱若虫,于水稻病毒侵染的水稻病株上饲喂 2 天,随后在健康水稻幼苗上饲养,饲养的不同时间点抓取 20 头稻飞虱用于检测稻飞虱血淋巴内的病毒;

[0010] 2) Poly-L-lysine 玻片的制备:将清洗洁净的圆形玻片用碱液浸泡 2 小时,双

蒸水洗涤 5 次;再用无水乙醇浸泡 30 min,烘干;将玻片放入 24 孔板中,并且每个孔加入 poly-L-lysine 溶液,室温孵育 2 小时;用移液枪吸去孔中的液体,并用双蒸水清洗 3 次;将玻片放置在 24 孔板孔沿上,使玻片的两面都暴露在空气中,放置 24 小时后即可用于吸附血淋巴;

[0011] 2) 抽取稻飞虱的血淋巴:将活体昆虫装入玻璃试管,放在冰上使昆虫低温麻醉,然后将麻醉后的稻飞虱倒出并粘附在玻璃胶面上,用解剖镊拔去稻飞虱一侧的后足,吸取 1-2 μ l 0.01 mol/L PBS 溶液,在稻飞虱拔除后足的伤口处反复吸打 3-5 次,抽取出稻飞虱的血淋巴;

[0012] 3) 吸附:将获得的稻飞虱血淋巴滴在处理后的 Poly-L-lysine 玻片上,28 ~ 35 $^{\circ}$ C 培养箱内放置 40 ~ 50 min,使血淋巴吸附在玻片上;

[0013] 4) 固定:将吸附后的玻片放入装有 200 μ l 固定液的离心管中,静置 10-20 min;

[0014] 5) 渗透:固定后的玻片用 pH 值为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液清洗两次,再滴加 200 μ l 渗透液处理 10-30 min;

[0015] 6) 配制抗体标记液:将荧光抗体与抗体稀释液按 1:100 的体积比混合,制得荧光抗体标记液,并用锡箔纸包裹避光;每个玻片需 30 ~ 50 μ l 抗体标记液;

[0016] 7) 抗体孵育:用 pH 值为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液清洗渗透后的玻片两次,将荧光抗体标记液滴加在清洗后的玻片上,于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 45-60 min;

[0017] 8) 制片:孵育结束后,再次用 pH 值为 7.2 的 0.01mol/L PBS 溶液清洗玻片两次;向空白洁净的载玻片上加入一滴抗衰减液,将清洗后的玻片反盖在抗衰减液上;

[0018] 9) 观察:在荧光显微镜下观察血淋巴内的病毒蛋白,判断病毒是否侵染稻飞虱血淋巴。

[0019] 步骤 2) 中 Poly-L-lysine 玻片的制备是用 0.1 mg/ml 的 poly-L-lysine 溶液处理。

[0020] 步骤 3) 中血淋巴的吸附是在 30 $^{\circ}$ C 培养箱内放置 45 min 完成。

[0021] 步骤 4) 所述固定液为含质量分数为 4% 多聚甲醛的 0.01 mol/L PBS 缓冲液。

[0022] 步骤 5) 所述渗透液是将 0.2 ml TritonX-100 溶液加入到 10 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液,充分搅拌混匀制得。

[0023] 步骤 6) 中的荧光抗体是将病毒的抗体与荧光素 FITC 交联制得;所述抗体稀释液为含质量分数为 3% BSA 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液。

[0024] 步骤 8) 中的抗衰减液是将甘油与 0.01mol/L PBS 缓冲液按体积比 9:1 混合后充分搅拌制得。

[0025] 本发明的特点在于:

[0026] 本发明的特点在于建立了稻飞虱血淋巴抽取和吸附的技术,通过将抽取到的稻飞虱血淋巴吸附在 poly-l-lysine 玻片上,然后通过免疫荧光标记技术检测血淋巴中的病毒,使微量的血淋巴也可用于检测病毒的存在。该技术解决了无法通过常规 RT-PCR 检测微量血淋巴中病毒的难题,而且使病毒检测的结果直观准确,极大地推动了水稻病毒在介体昆虫血淋巴内侵染的研究。

附图说明

[0027] 图1为本发明实施例中白背飞虱若虫的饲毒和饲养。A: 昆虫饲毒 ;B: 昆虫在健康水稻上饲养。

[0028] 图2为本发明实施例中 poly-l-lysine 玻片的制备器材和试剂。A :24孔板 ;B: 圆形玻片 ;C: poly-l-lysine 试剂。

[0029] 图3为本发明实施例中白背飞虱血淋巴的抽取过程。A: 固定昆虫的玻璃胶 ;B: 粘附昆虫的玻璃胶放在载物台上 ;C: 抽取昆虫血淋巴的细枪头。

[0030] 图4为本发明实施例中白背飞虱血淋巴的抽取过程。A: 体视镜下拨除昆虫的后足 ;B: 拨除后足的白背飞虱。

[0031] 图5为以免疫荧光标记技术标记的南方水稻黑条矮缩病毒 P10 蛋白在白背飞虱血淋巴的定位,其中6天血淋巴中的绿色荧光即为标记的 SRBSDV-P10 蛋白。

具体实施方式

[0032] 实施例1

[0033] 1. 试剂配制

[0034] 1) 碱液的配方 :用 60% (v/v) 的乙醇溶液配置 10% (w/v) 的 NaOH 溶解。

[0035] 2) 0.1mg/ml 的 poly-l-lysine :将购置的 1mg/ml 的 poly-l-lysine 液体用蒸馏水按 1 :9 稀释 10 倍。

[0036] 3) 0.01mol/L PBS :称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g KH_2PO_4 , 溶于 800 ml 蒸馏水中,用 HCl 调节 pH 值至 7.2,再加蒸馏水定容至 1L 即可。

[0037] 4) 固定液 :称取 4 g 多聚甲醛溶于 100 ml 0.01 mol/L PBS 缓冲液中,50°C -60°C 加热搅拌溶解,贮存于 4°C。

[0038] 5) 渗透液 :吸取 0.2 mL 的 TritonX-100 溶液加入到 10 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液,充分搅拌溶解即可,贮存于 4°C。

[0039] 6) 抗体稀释液 :称量 0.3g BSA 置于 15 ml 离心管中,加入 10mL 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液,充分搅拌溶解,贮存于 4°C。

[0040] 7) 抗衰减液 :量取 90 ml 甘油与 10mL 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液混合,充分搅拌,贮存于 4°C。

[0041] 8) 荧光抗体 :针对南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV),首先将病毒编码衣壳蛋白 SRBSDV-P10 的多克隆抗体的 IgG 于 0.1 mol/L 的碳酸氢钠溶液中透析 8 h ;然后将透析后的 IgG 收集到离心管中,每 100 μl IgG 加入 50 μl 溶于 DMF 的 FITC 进行混匀,室温震荡孵育 1 h ;然后用 0.01 mol/L PBS 缓冲液透析除去游离的荧光素,从而获得荧光抗体,分装后保存于 -20°C 备用。

[0042] 实验方法

[0043] 2.1 昆虫饲毒 :将 100 头健康的 2 龄白背飞虱若虫在病毒侵染的水稻病株上饲喂 2 天,随后转移到健康水稻幼苗上饲养(图1),在健康幼苗上饲养的第 2、4、6 天分别抓取 20 头白背飞虱用于检测病毒在昆虫血淋巴的分布 ;

[0044] 2.2 Poly-L-lysine 玻片的制备 :清洗洁净的玻片用碱液浸泡 2 小时,用双蒸水洗涤 5 次 ;再用无水乙醇浸泡 30 min,取出后立即在酒精灯上烘干 ;随后将玻片放入 24 孔板中,每个孔加入 1 ml 0.1 mg/ml 的 poly-l-lysine,室温孵育 2 小时 ;用移液枪移去孔中的

液体,并用双蒸水清洗 3 次;将玻片放置在 24 孔板孔沿表面,使玻片的两面都暴露漏在空气中,室温放置 24 小时后可用来吸附血淋巴(如图 2);

[0045] 2.3 血淋巴的抽取:将白背飞虱成虫装入 20mm 直径的玻璃试管中,冰上冰冻 5min;同时取 5cm×3cm 的玻璃胶,两端用载玻片压住并使胶面向上,放置于体视镜的载物台上(如图 3);随后将麻醉后的稻飞虱倒出并粘附在玻璃胶面上,用解剖镊拔去稻飞虱一侧的后足(如图 4),用移液器携带外直径 0.5 cm 的细枪头吸取 1-2 μl 0.01 mol/L PBS 溶液,在稻飞虱拔除后足的伤口处反复吸打 3-5 次,抽取出稻飞虱的血淋巴;

[0046] 2.4 吸附:将抽取的稻飞虱血淋巴滴在处理后的 Poly-L-lysine 玻片上,30°C 培养箱内放置 45 min,使血淋巴吸附在玻片上;

[0047] 2.5 固定:向吸附有稻飞虱血淋巴的玻片上滴加 200 μl 固定液,静置 10 min;

[0048] 2.6 渗透:固定后的玻片用 pH 值为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液清洗两次,再滴加 200 μl 渗透液于玻片上处理 20 min;

[0049] 2.7 配制抗体标记液:将荧光抗体 P10-FITC 与抗体稀释液按 1:100 混合于 0.5 ml 离心管中制得抗体标记液,并用锡箔纸包裹避光;每个玻片需 30 μl 抗体标记液;

[0050] 2.8 抗体孵育:用 pH 值为 7.2 的 0.01 mol/L PBS 溶液清洗玻片两次,将抗体标记液滴加在清洗后的玻片上,于 37°C 恒温孵育 60 min;

[0051] 2.9 制片:孵育结束后,再次用 pH 值为 7.2 的 0.01mol/L PBS 溶液清洗玻片两次;向洁净的载玻片上加入一滴抗衰减液,将清洗后的玻片反盖在抗衰减液滴上;

[0052] 2.10 观察:在共聚焦显微镜下观察血淋巴内的病毒蛋白,判断病毒是否侵染稻飞虱血淋巴。

[0053] 实验结果

[0054] 本实施例通过分别对饲毒后 2、4、6 天的白背飞虱血淋巴进行抽取和免疫荧光标记检测,结果表明饲毒后 6 天的白背飞虱血淋巴中可检测到荧光信号,如图 5 所示,显示绿色荧光的部分表明存在 SRBSDV 外壳蛋白 P10,因此根据荧光信号可确定 SRBSDV 在饲毒后 6 天可扩散到白背飞虱血淋巴。

[0055] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

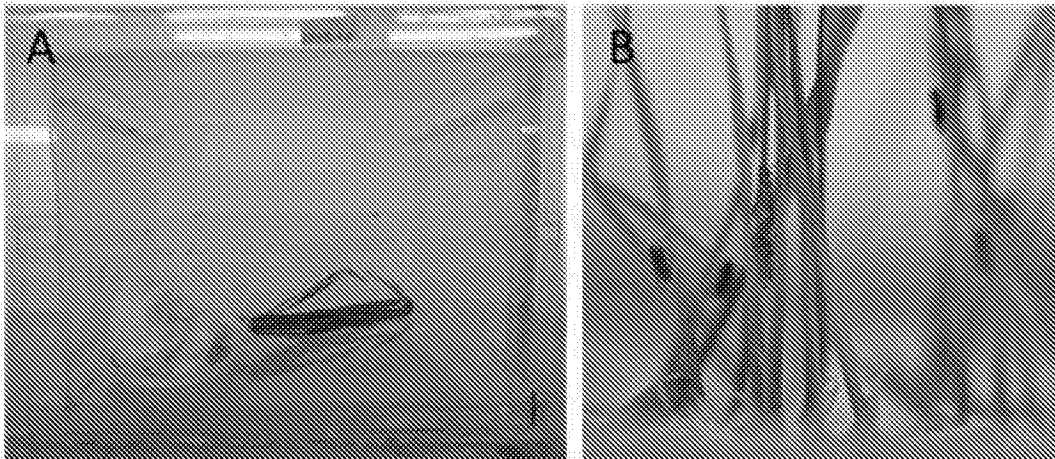


图 1

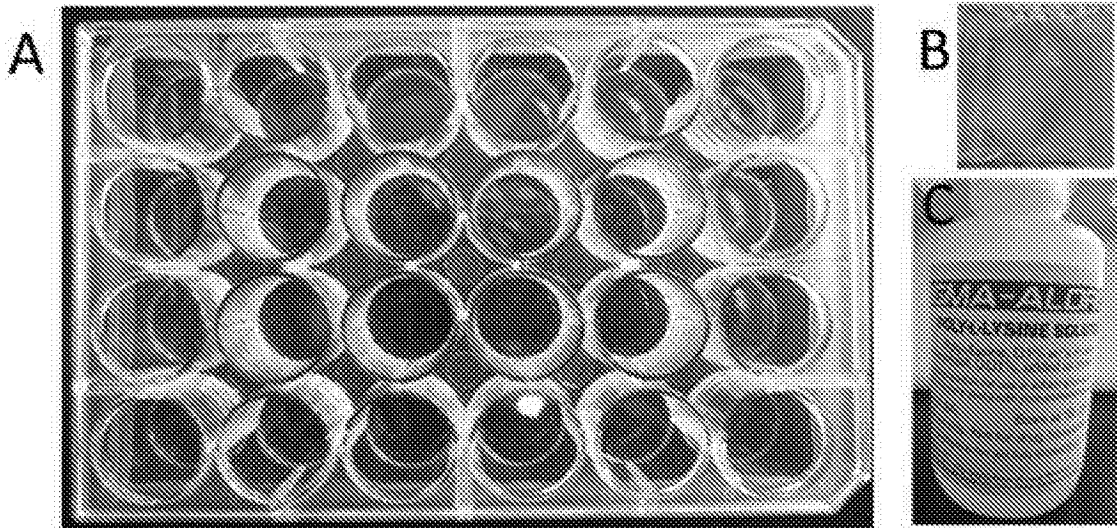


图 2

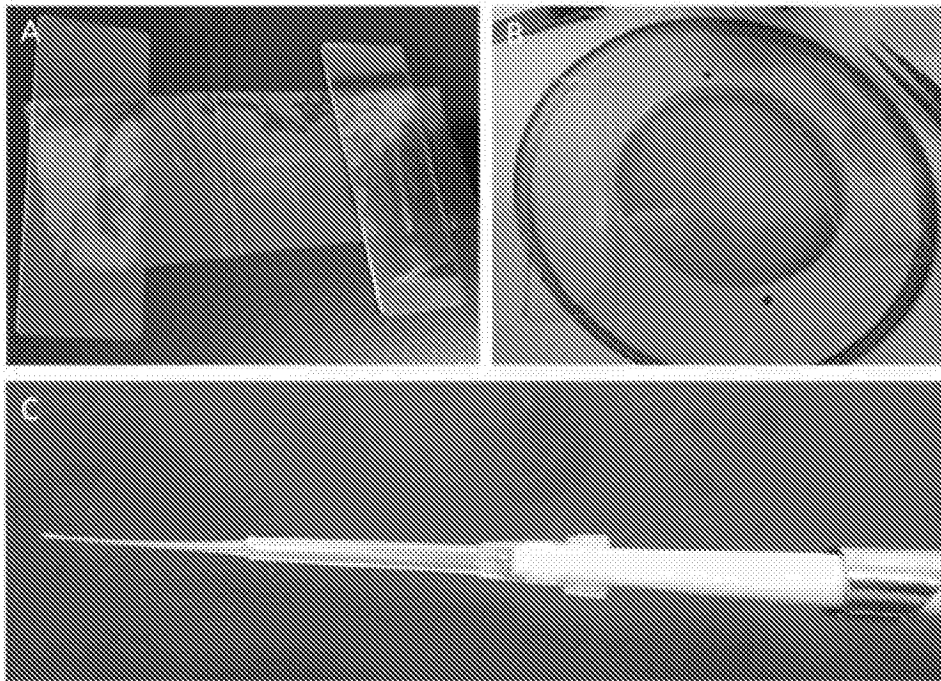


图 3

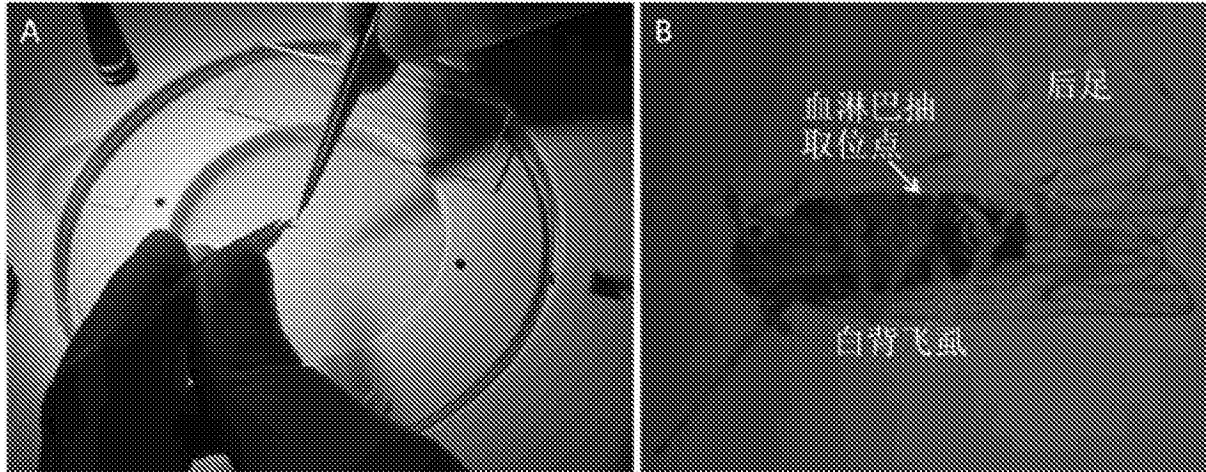


图 4

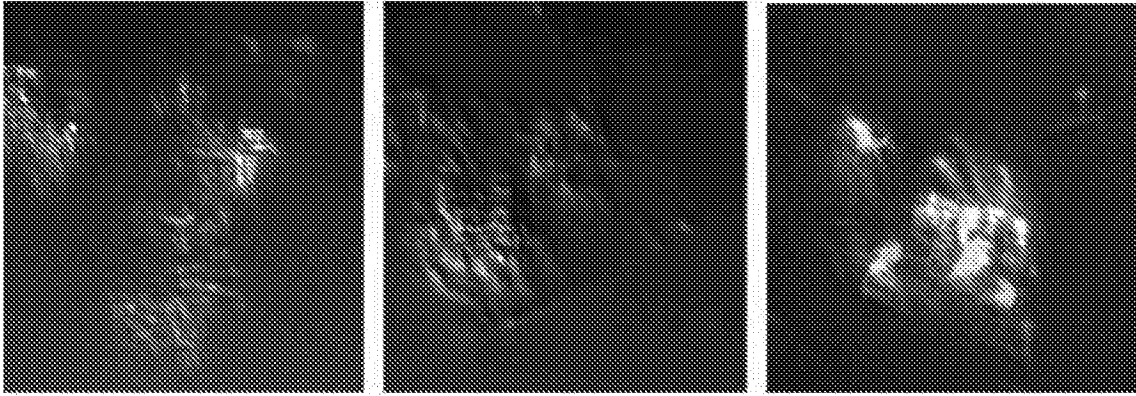


图 5

专利名称(译)	一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法		
公开(公告)号	CN104076144B	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410319850.8	申请日	2014-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
[标]发明人	贾东升 魏太云 陈红燕 陈倩 吴维		
发明人	贾东升 魏太云 陈红燕 陈倩 吴维		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/582		
代理人(译)	蔡学俊		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN104076144A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于农业生物技术蛋白检测领域的检测技术，公开了一种稻飞虱血淋巴内病毒蛋白的免疫荧光标记检测方法，可用于检测稻飞虱传播的病毒在其血淋巴内的分布。本发明可对稻飞虱的血淋巴直接进行免疫荧光标记检测病毒的分布，从而用于分析病毒在稻飞虱体内血淋巴内的侵染。该方法通过对稻飞虱血淋巴的抽取，并对抽取到的血淋巴吸附在经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上，经固定、渗透、抗体孵育、制片和观察，从而检测稻飞虱血淋巴内的病毒。本发明解决了常规RT-PCR无法检测稻飞虱血淋巴内病毒的难题，使稻飞虱体内微量的血淋巴可通过免疫荧光标记技术直观准确地检测侵入其中的病毒。

