

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610091432.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/547 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2007年12月12日

[11] 公开号 CN 101086498A

[22] 申请日 2006.6.8

[21] 申请号 200610091432.3

[71] 申请人 新疆西域实业集团有限责任公司

地址 831100 新疆维吾尔自治区昌吉市宁边
东路32号

[72] 发明人 喻梅辉 张红 马光玉 王叶筠
周志成 丁建军 穆全昌 姜明
张兴平

[74] 专利代理机构 乌鲁木齐市禾工专利代理事务所
代理人 刘永生

权利要求书3页 说明书9页

[54] 发明名称

瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法

[57] 摘要

一种瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，属于一种用于检测引起的瓜类细菌性果实腐斑病 BFB 的燕麦嗜酸菌西瓜亚种病菌的试剂及其制备方法，1) 制备 BFB 免疫抗体；2) 制作 BFB 免疫磁珠：a. 选择不溶于水的惰性物作为固相载体；b. 固相载体与离子交换基团交链，形成离子交换固相载体；c. 通过离子交换活化固相载体，带有大量可交换的负离子；d. 活化离子交换固相载体与 BFB 免疫抗体交链而得到 BFB 免疫磁珠。本发明利用免疫学原理将抗体与惰性有机大分子相偶联而形成的一种特异吸附抗原的物质，利用免疫磁珠技术，建立 BFB 的快速检测，是控制该病传播的有效措施，这一技术具有快速简便、灵敏度高、特异性强的优点，提高 BFB 检测的特异性和灵敏度。

1、一种瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，

1)、制备 BFB 免疫抗体；

将标准的 BFB 病原扩大培养及收集菌体，超声波破碎提取菌体蛋白，制成佐剂 BFB 抗原，免疫家兔，待效价达到 1：64，放血获得抗 BFB 血清，用硫酸铵盐析，FpLc 蛋白酶 A 柱纯化得到 BFB 抗体 IgG；

2)、制作 BFB 免疫磁珠；

将上述 BFB 抗体 IgG，与固相载体相偶联后即为 BFB 免疫磁珠，制作路线如下：

(1)、选择不溶于水的情性物作为固相载体；

(2)、固相载体与离子交换基团交链，形成离子交换固相载体；

(3)、通过离子交换活化固相载体，使其带有大量可交换的负离子；

(4)、活化离子交换固相载体与 BFB 免疫抗体交链。

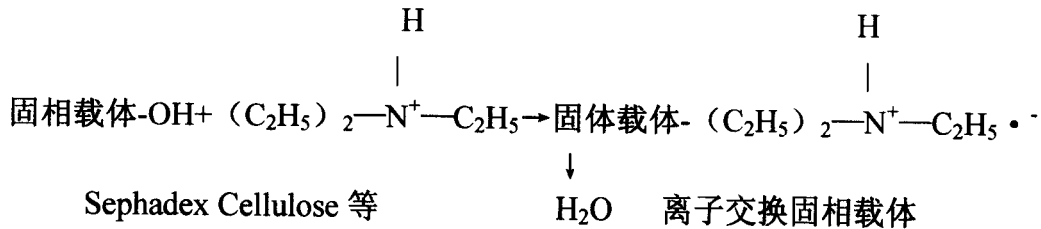
2、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，固相载体的选择，这种载体为多糖聚合物。

3、如权利要求 2 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，固相载体选择 Sephadex。

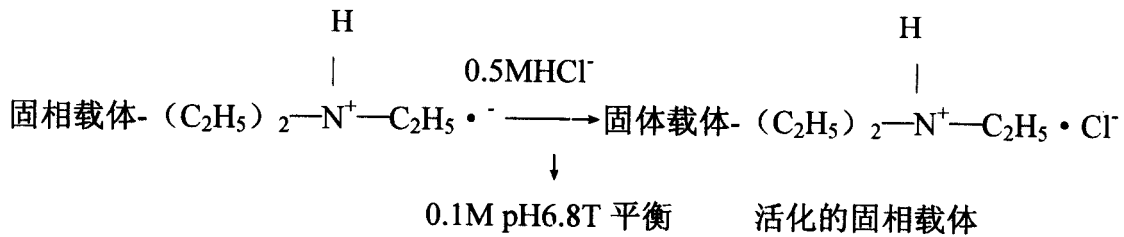
4、如权利要求 2 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，固相载体选择 Cellulose。

5、如权利要求 2 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，固相载体选择 Sephadex-agrose。

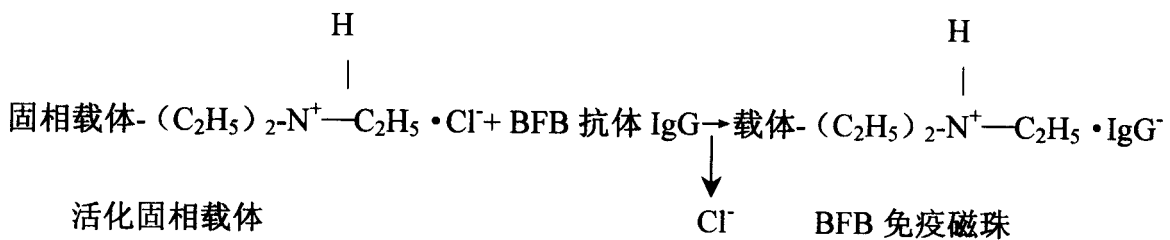
6、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，固相载体与离子交换基团二乙基氨基乙基交链，形成离子交换固相载体，反应如下：



7、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，离子交换固相载体的活化，



8、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，活化离子交换固相载体与 BFB 抗体交链得到 BFB 免疫磁珠，



9、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，其特征在于，1)、将标准的 BFB 病原扩大培养及收集菌体，超声波峰提取菌体蛋白，制成佐剂 BFB 抗原，免疫家兔，待效价达到 1：64，放血获得抗 BFB 血清，用硫酸铵盐析，FpLc 蛋白酶 A 柱纯化得到 BFB 抗体 IgG；2)、取带有阴离子交换基因固体载体 Sephadex 或 Cellulose

等 5 克，加入无菌水 250ml，过夜，充分溶胀；3)、将上述胶 1ml 装入小层析柱中，用 pH6.8，0.01mol/L 的 TB 含 0.4mol/L NaCl 洗脱 10ml，之后改用 pH6.8，0.01mol/L TB 液平衡洗脱 20ml；4)、取纯化的含蛋白量 5mg 的 BFB 抗体 0.5ml，加入上述小层析柱中，待 BFB 免体进入柱床后，此时 BFB 病原菌特异地被载体上的 BFB 抗体吸附，而后改用 pH6.8，0.01mol/L TB 洗脱约 10ml，至洗脱液中无蛋白质为止；层析柱中的胶即为含 BFB 抗体 IgG 的 BFB 免疫磁珠；取出后悬浮 5ml pH6.8，0.01mol/L TB 中，置 4℃ 保存备用。

瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法

一、技术领域

本发明属于一种用于检测由燕麦嗜酸菌西瓜亚种病菌引起的瓜类细菌性果实腐斑病，即 BFB 的特异试剂及其制备方法，尤其是一种瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法。

二、背景技术

燕麦嗜酸菌西瓜亚种 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)，简称 Aac，可以引起瓜类细菌性果实腐斑病 (Bacterial fruit blotch of cucurbits)，简称 BFB，这种细菌属于世界性检疫有害生物，而尤其引起的上述病害是我国公布的《中华人民共和国进境植物检疫危险性病、虫、杂草名录》中规定的三类危险性病害。

瓜类细菌性果实腐斑病目前发病地区有日益扩大的趋势。该病苗期症状常表现为大的黑色病斑而无任何水浸状，这使田间诊断变的很困难，病原细菌的分离培养诊断需要 10~14d，程序繁琐。瓜类种子细菌性果实腐斑病带菌率大于 0.1% 时，就可能给生产带来较大损失。但如此低的带菌率，给检测增加了很大的难度，如用 99% 的准确度确保种子批号的带菌率在 0.1% 以下，每个批号需抽取 50000 粒种子检测，这就是检测费用高的原因之一。研制出适合我国实际的种子带菌检测技术，是防止该病在我国蔓延的有效措施之一。

目前检测瓜类种子细菌性果实腐斑病的方法有：

(1) 幼苗检测。即在温室条件下，创造适合瓜类细菌性果实腐斑病的发病条件，即温度在 27~30℃之间，湿度在 85%以上，一般需要 4~5 周后才可检测出种子细菌性果实腐斑病的带菌率。这种方法是传统的病菌检测方法，是国际种子协会认可的检测方法，能反映在实际情况下可能的发病情况，但条件较难控制，费时，占地大，费用高。根据我国制种批次小，分散的具体实情，这种检测方法很难推广应用。

(2) 保湿生长盒检测法。即在透光的塑料盒中装入蛭石和珍珠岩，然后将种子散播其上，密封后放入 25℃，日光灯人工生长室中，大约两周后即可检测出病菌。这种方法的优点是条件控制准确，占地小，易于规范化操作，准确性较高；缺点是有时会受苗期其它病害如猝倒病的干扰。

(3) 利用半选择性培养基。将种子发芽后保湿保温，然后将幼苗匀浆液在半选择培养基上进行选择培养，找出细菌性果实腐斑病菌菌落，将其纯化后再根据病菌的生理生化和病理特征确认。也可从种子中分离获得，可先将种皮和种胚分离后分别置于 pH7.1 的磷酸缓冲液中培养过夜，然后划线分离，以确定种子是内部带菌还是外部带菌。对病叶、病果，取新鲜病健交界处病斑，用 KB 培养基就能够分离得到。瓜类细菌性果实腐斑病菌在该培养基上 37℃培养 2d 可见菌落，3d 后，菌落圆形，直径 1~2mm，3~4d 后，菌落继续扩大，形成一个橄榄绿中心的环形，而多数其它种传细菌菌落蓝色菌落更小。

(4) 血清学检测方法。近年趋向于利用荧光抗体法和酶联吸附法。荧光抗体法 (fluorescent antibody technique) 是将荧光染料与抗体以化学

方法结合起来形成标记抗体。抗体与荧光染料结合不影响抗体的特性，标记的荧光抗体与相应的抗原结合后，受荧光显微镜高压汞灯光源的紫外光照射，便激发出荧光，荧光的存在就表示抗原的存在。酶联免疫吸附法，enzyme linked immunosorbent assay 简称 ELISA，是继免疫荧光技术和放射免疫技术之后发展起来的一种免疫标记技术。有直接法、间接法、双抗夹心法及竞争法。ELISA 具有选择性好、灵敏度高、结果判断客观准确、实用性强的优点而广泛应用于生物和医学领域。ELISA 技术对大量样品的检测尤其适合。血清学技术最主要的缺点是受抗血清质量和专化性的限制。多克隆抗体制备简单，但通常和近缘细菌有交叉反应，饱和吸附虽然可以消除部分交叉反应，但常以降低效价为代价；单克隆抗体虽然专化性好，但一般只能检测一个或几个血清型的细菌，制备过程复杂，技术和设备要求较高。

(5) 分子检测。近些年来，以聚合酶链式反应 PCR 为代表的分子生物学技术被越来越多的应用于植物病原细菌的检测。由于这一技术具有快速简便、灵敏度高、特异性强的优点，故而在各个领域包括植物病原菌方面得到广泛应用和迅速发展。如中国专利 CN02125686.1，公开一种改进了 PCR 反应参数和目标产物电泳条带检测程序的定量聚合酶链反应方法。其特点是聚合酶链反应的正、反引物的最终浓度为 1—100 μ M。反应中正、反引物的解链温度为 85—92 $^{\circ}$ C，PCR 反应的引物长度可为 25—50 碱基。PCR 反应包括高温模板变性、引物与模板退火延伸两步。退火延伸温度为 72—82 $^{\circ}$ C。并可以将染色剂 SYBR 金与 PCR 样品混合后一起进行电泳，然后定量测定电泳凝胶上 PCR 产物条带的强度，SYBR 金在

加样缓冲液中的重量百分比浓度为万分之一至百分之一。PCR 反应更为稳定,使 PCR 平坡出现推迟,目标产物直线累积期增长。从而使经典 PCR 能在完全保持其简单、快速和专一的优点的同时,实现了定量功能的突破。将 SYBR 金与样品混合一起进行电泳的作法,则不仅提高了定量染色灵敏度,扩展了定量测定的线性范围,而且省略了染色步骤,减少了染色剂用量。

目前美国农业部、Georgia 大学和一些种子企业的科学家均已研究出瓜类细菌性果实腐斑病菌基因组专一的引物,这些引物主要为瓜类细菌性果实腐斑病基因组的 hrp 基因, 16SrRNA 基因和 16S-23SrRNA 间隔区。此法虽然其检测的灵敏度高、速度快,但需要较多的一次性投入。

吸附介质广泛用于生物化学及分子生物学领域分离纯化核酸、蛋白质等生物分子,但未见用于植物病原菌鉴定的报道。免疫磁珠及是一种较先进的吸附介质,它是利用免疫学原理将抗体与惰性有机大分子相偶联而形成的一种特异吸附抗原的物质,它能像磁铁吸附铁一样,特异扑捉和浓缩相对应的抗原,如蛋白质、酶、细菌、真菌、病毒等,将该磁珠与其它技术相结合,如 ELISA、PCR 等,可用于病原菌的快速诊断,极大提高诊断的特异性和灵敏度。如中国专利 CN99252058.4,公开一种空肠弯曲菌的实时荧光 PCR 检测方法,应用抗血清和磁性微珠制备空肠弯曲菌免疫磁珠,利用免疫磁珠直接捕获检样中的空肠弯曲菌,煮沸法提取空肠弯曲菌的 DNA,设计合成用于扩增空肠弯曲菌鞭毛蛋白 A(fl aA)基因的引物与探针和/或空肠弯曲菌的马尿酸酶(hip0)基因的引物与探针,通过荧光 PCR 技术检测得到扩增产物的荧光信号;又如中国专利

法，包括传感器、信号放大电路、信号处理电路、检测显示器和偏置磁场，传感器包括各 AMR 薄膜构成的惠斯登电桥；电桥的输入端与恒流电源相连接，输出端与信号放大电路的输入端相连接，电桥固定地或可位移地置于偏置磁场中；偏置磁场为电磁线圈产生的单向交变磁场，包括产生交变磁场的变磁线圈；信号放大电路包括锁相放大电路、电流放大器；锁相放大电路还与一信号发生器的输出端相连接，信号发生器的输出端一方面向锁相放大电路提供参考电压信号，另一方面与电流放大器相连接，而电流放大器与变磁线圈相连接。本发明的检测装置生产成本低、灵敏度高、能探测免疫磁微球产生的磁场微弱信号。

综上所述，利用免疫磁珠技术，建立 BFB 的快速检测是控制该病传播的有效措施。该项技术研究的主要目标是建立 BFB 的免疫吸附分离-聚合酶链式反应，即研制 IAS-PCR 快速检测技术及试剂盒，其核心技术是 BFB 免疫磁珠的设计与研制。

二、发明内容

本发明的目的在于，设计与研制，并提出一种 BFB 免疫磁珠，即一种瓜类细菌性果实腐病免疫磁珠及制备方法。

实现本发明目的的措施在于：

1、制备 BFB 免疫抗体；

将标准的 BFB 病原扩大培养及收集菌体，超声波峰提取菌体蛋白，制成佐剂 BFB 抗原，免疫家兔，待效价达到 1：64，放血获得抗 BFB 血清，用硫酸铵盐析，FpLc 蛋白酶 A 柱纯化得到 BFB 抗体 IgG。

2、制作 BFB 免疫磁珠；

2、制作 BFB 免疫磁珠；

将上述 BFB 抗体 IgG，与固相载体相偶联后即为 BFB 免疫磁珠，制作路线如下：

- (1)、选择不溶于水的惰性物作为固相载体；
- (2)、固相载体与离子交换基团交链，形成离子交换固相载体；
- (3)、通过离子交换活化固相载体，使其带有大量可交换的负离子；
- (4)、活化离子交换固相载体与 BFB 免疫抗体交链而得到 BFB 免疫磁珠。

本发明的优点在于：将广泛用于生物化学及分子生物学领域分离纯化细菌、病毒核酸、蛋白质等生物分子的吸附介质技术，用于植物病原菌鉴定。它是利用免疫学原理将抗体与惰性有机大分子相偶联而形成的一种特异吸附抗原的物质。利用免疫磁珠技术，建立 BFB 的快速检测是控制该病传播的有效措施，实现多种相关检测技术优点的整合，由于这一技术具有快速简便、灵敏度高、特异性强的优点，极大提高诊断的特异性和灵敏度。

四、具体实施方式

实施例 1：

1、制备 BFB 免疫抗体；

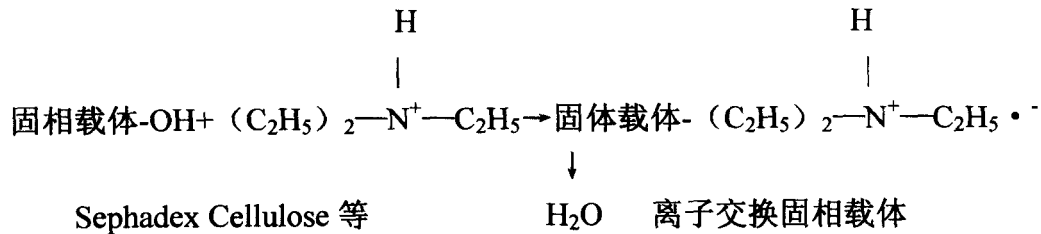
将标准的 BFB 病原扩大培养及收集菌体，超声波峰提取菌体蛋白，制成佐剂 BFB 抗原，免疫家兔，待效价达到 1：64，放血获得抗 BFB 血清，用硫酸铵盐析，FpLc 蛋白酶 A 柱纯化得到 BFB 抗体 IgG。

2、制作 BFB 免疫磁珠

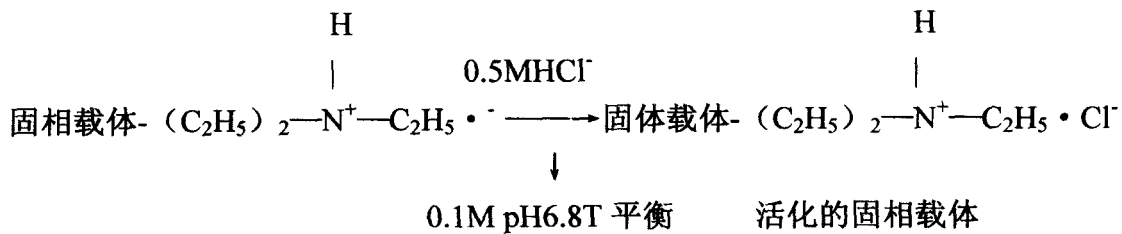
将上述 BFB 抗体 IgG ， 与固相载体相偶联后即为 BFB 免疫磁珠，
制作路线如下：

(1)、固相载体的选择。这种载体为多糖聚合物，选择 Sephadex Cellulose 或 Sephadex-agrose 等均可。

(2)、固相载体与离子交换基团二乙基氨基乙基交链，形成离子交换固相载体。反应如下：



(3)、离子交换固相载体的活化。



(4)、活化离子交换固相载体与 BFB 抗体交链得到 BFB 免疫磁珠。



实施例 2：本发明的瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠制备方法为：

1、将标准的 BFB 病原扩大培养及收集菌体，超声波破碎提取菌体蛋白，制成佐剂 BFB 抗原，免疫家兔，待效价达到 1：64，放血获得抗

BFB 血清，用硫酸铵盐析，FpLc 蛋白酶 A 柱纯化得到 BFB 抗体 IgG。

2、取带有阴离子交换基因固体载体 Sephadex 或 Cellulose 等 5 克，加入无菌水 250ml，过夜，充分溶胀。

3、将上述胶 1ml 装入小层析柱中，用 pH6.8，0.01mol/L 的 TB 含 0.4mol/L NaCl 洗脱 10ml，之后改用 pH6.8，0.01mol/L TB 液平衡洗脱 20ml。

4、取纯化的含蛋白量 5mg 的 BFB 抗体 0.5ml，加入上述小层析柱中，待 BFB 抗体进入柱床后，此时 BFB 病原菌特异地被载体上的 BFB 抗体吸附，而后改用 pH6.8，0.01mol/L TB 洗脱约 10ml，至洗脱液中无蛋白质为止。层析柱中的胶即为含 BFB 抗体 IgG 的 BFB 免疫磁珠。取出后悬浮 5ml pH6.8，0.01mol/L TB 中，置 4℃保存备用。

经上述制作过程最后得到了 BFB 免疫磁珠，这种磁珠能有效地捕捉，浓缩种子提取液中的 BFB 病原。

BFB 免疫磁珠应用实例

1、取待检测疑似菌种子 2000 粒三角开口，加 pH6.8 PB0.01mol/L 200ml，37℃真空抽提 4 小时，此时种子中的 BFB 进入 200ml 抽提液中并能扩增 BFB。

2、加入 BFB 免疫磁珠 0.1ml 悬浮液，轻轻搅拌 10 分钟，此时 200ml 抽提液中如存在 BFB 病原，则全部吸附在磁珠表面。500rpm 离心 5 分钟，弃去上清，沉淀为可能吸附 BFB 病原的 BFB 免疫磁珠，加 100 μ l 裂解液，置 4℃保存备用。

3、取上述可能吸附 BFB 病原的 BFB 免疫磁珠 50 μ l 加置 100℃裂

解 15min。

4、向上述可能吸附 BFB 病原的 BFB 免疫磁珠中，加入 PCR 扩增所需的试剂和扩增的条件扩增。

5、扩增后，电泳出现 360bp 特异带，为待测样品带有 BFB 病原菌。

上述内容中的离子交换固相载体，可以应用于任何细菌、病毒、蛋白质及酶的特异性免疫磁珠。

专利名称(译)	瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法		
公开(公告)号	CN101086498A	公开(公告)日	2007-12-12
申请号	CN200610091432.3	申请日	2006-06-08
[标]发明人	喻梅辉 张红 马光玉 王叶筠 周志成 丁建军 穆全昌 姜明 张兴平		
发明人	喻梅辉 张红 马光玉 王叶筠 周志成 丁建军 穆全昌 姜明 张兴平		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/546 G01N33/531 G01N33/569		
代理人(译)	刘永生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种瓜类细菌性果实腐斑病免疫磁珠及制备方法，属于一种用于检测引起的瓜类细菌性果实腐斑病BFB的燕麦嗜酸菌西瓜亚种病菌的试剂及其制备方法，1)制备BFB免疫抗体；2)制作BFB免疫磁珠：a.选择不溶于水的惰性物作为固相载体；b.固相载体与离子交换基团交链，形成离子交换固相载体；c.通过离子交换活化固相载体，带有大量可交换的负离子；d.活化离子交换固相载体与BFB免疫抗体交链而得到BFB免疫磁珠。本发明利用免疫学原理将抗体与惰性有机大分子相偶联而形成的一种特异吸附抗原的物质，利用免疫磁珠技术，建立BFB的快速检测，是控制该病传播的有效措施，这一技术具有快速简便、灵敏度高、特异性强的优点，提高BFB检测的特异性和灵敏度。

