

[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 200910077612. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 8 月 5 日

[11] 公开号 CN 101498724A

[22] 申请日 2009.1.24

[21] 申请号 200910077612. X

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号中国检验检疫科学研究院

[72] 发明人 田世民 邹明强 王 岭 哈 斯
马吉湘 陈 艳 齐小花 金 涌

[74] 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司

代理人 卢 新

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

玉米细菌性萎蔫病菌生物素 - 亲和素酶联免疫检测方法

[57] 摘要

一种针对玉米细菌性萎蔫病菌的生物素 - 亲和素酶联免疫检测方法, 包括以下步骤: 制备上述的多克隆抗体、纯化并进行生物素标记; 样品中细菌的提取, 将样品提取液包被在微孔板上; 之后相继加入生物素标记抗体、碱性磷酸酶标链霉亲和素复合物及 PNP 底物, 显色后用酶标仪读取波长在 405nm 下的吸光度值; 本发明提供的玉米细菌性萎蔫病菌生物素 - 亲和素酶联免疫检测方法, 特异性强, 灵敏度高, 检测灵敏度达到 1×10^6 cfu/mL, 操作简便快速, 结果准确高效。

1、一种抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体，其特征在于：所述多克隆抗体效价在 1×10^4 以上；所述多克隆抗体的特异性，其与 2 株玉米细菌性萎蔫病菌（ATCC 27822，ATCC 33114）表现强烈反应，而与相关的其他 11 个病原细菌种或亚种无交叉反应。

2、权利要求 1 所述的抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体制备方法，其特征在于：包括以下步骤：

（1）制备免疫原：玉米细菌性萎蔫病菌菌株（来自美国菌种保藏中心 ATCC）接种于液态 NBY 培养基上，28 °C 下恒温振荡培养；在细菌生长对数期收集菌体，12000g 离心 10 分钟，倒去上清液，菌体用无菌磷酸盐缓冲液（PBS）复溶，反复离心清洗三次后再加入无菌 PBS 复悬；用比浊法计数并定溶细菌菌体浓度到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mL；

（2）动物免疫：取上述菌悬液按常规免疫方法对供试家兔进行免疫操作，定期采集血清，并分装后置于 -20 °C 下保存备用；

（3）纯化抗体：从上述血清中筛选出效价表现最高的抗血清（效价在 10^4 以上）进行纯化，浓度定溶为 1.0 mg/mL，即得抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体。

3、根据权利要求 2 所述的抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体制备方法，其特征在于：所述步骤（3）中抗血清的纯化方法为硫酸铵沉淀法和 Protein A 柱亲和层析法。

4、一种玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，其特征在于：将权利要求 1 所述的多克隆抗体进行生物素标记；制备样品提取液或细菌悬浮液，并包被在微孔板上；之后相继加入生物素标记抗体、碱性磷酸酶标链霉亲和素和 PNP 底物，显色后用酶标仪读取波长在 405 nm 下的吸光度值。

5、根据权利要求 4 所述的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，分设阴性和阳性对照，其特征在于：以健康玉米组织悬浮液作为阴性对照，玉米细菌性萎蔫病菌悬液作为阳性对照进行 ELISA 检测。

6、根据权利要求 5 所述的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，其特征在于：其检测灵敏度达到 1×10^6 cfu/mL。

7、根据权利要求 6 所述的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，其特征在于：所述抗体进行生物素标记的方法为：取 1mL 抗体（IgG，1.0mg/mL）用交联缓冲液 4 °C 下透析过夜，期间换 3 次缓冲液；加入 100 ul 标记试剂在室温下反应 30 min，加入 100 ul 1M Tris/HCl 终止反应；然后用 0.85% NaCl 缓冲液 4 °C 下透析过夜，期间换 3 次缓冲液，得到标

记好的生物素抗体；其中所用的标记试剂为 1 mg 生物素与 1 mL 二甲基甲酰胺（DMF）或二甲基亚砜（DMSO）充分溶解得到的。

8、根据权利要求 7 所述的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，其特征在于：所述样品提取液的制备方法为：取 30 g 玉米籽粒样品用无菌水冲洗 3 次，在 300 ml 碳酸缓冲液（CBS）中浸泡过夜，然后将种子研磨破碎，获得浓度为 0.1 g/mL 的玉米组织悬浮液；所述菌悬液的制备方法为：将玉米细菌性萎蔫病菌和培养基的冻干粉用无菌水制备成 $1 \times 10^{8-9}$ cfu/mL 的菌悬液，将等体积的此菌悬液与上述玉米组织悬浮液混合，形成 5×10^8 cfu/mL 样品液，再通过倍比稀释分别配成 1×10^8 ， 5×10^7 ， 10^7 ， 5×10^6 ， 10^6 ， 5×10^5 ， 10^5 cfu/mL 的菌悬液。

9、一种根据权利要求 4 所述的检测方法组建的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：供 200 孔检测用，使其包含下述组分：

A、检测抗体：权利要求 1 所述的经生物素标记的玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体；

容量：0.125 mL 使用浓度：0.1 mg/mL 稀释倍数：1:200
含量：0.5 ug/mL 防腐剂：0.05% NaN_3 贮藏：4 °C 下 6 个月

B、酶标链霉亲和素复合物；

容量：0.05 mL (含 0.05% NaN_3) 稀释倍数：1:500 贮藏：4 °C 下 6 个月

C、10 倍 PBST 浓缩液：1:10 稀释后，用于稀释检测抗体、酶标链霉亲和素和洗涤酶标板；

规格：60 mL/瓶 贮 藏：室温

D、10 倍碳酸盐缓冲液（CBS）：1:10 稀释后，用于样品提取和封闭液配制；

规格：60 mL/瓶 贮 藏：室温

E、封闭液：用 CBS 配制的 0.5 % (w/v) BSA 或 2 % (w/v) 脱脂奶粉；

F、底物：对硝基苯磷酸盐（PNPP）片剂：5 mg/片；

G、5 倍底物缓冲液：1: 5 稀释后，用于配制显色液，pH 9.8；

组分：0.5 mol/L 二乙醇胺缓冲液

规格：10 mL/瓶 贮 藏：室温

H、显色液：用底物缓冲液配制的 PNPP 溶液，1mg/mL，现配现用；

I、终止液：2M NaOH 溶液；

规 格：50 mL/瓶 贮 藏：室温

J、阳性对照：玉米细菌性萎蔫病菌和培养基的冻干粉；

K、阴性对照：健康玉米籽粒粉。

玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法

技术领域

本发明涉及一种酶联免疫检测方法，特别是涉及一种玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法及检测试剂盒。

背景技术

玉米(内州)萎蔫病又称玉米细菌性萎蔫病(Goss's bacterial wilt and blight of maize, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*), 是一种可以造成严重玉米损失的植物病害。1969年, 该病首次在美国内不拉斯加州道森县发生, 之后陆续蔓延到克罗拉罗州、伊利诺斯州、爱荷华州、肯萨斯州、密歇根州、明尼苏达州, 内布拉斯加州、南达科他州和威斯康星州, 至2000年已经扩散至加拿大的安大略湖区。萎蔫病的危害性和分布区域的扩张蔓延引起人们的高度重视, 欧盟、加拿大等国都已经建立了该病的风险评估体系。我国于2007年5月将该病菌列入最新修订的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》。

玉米细菌性萎蔫病有两种主要表现形式, 一为叶片萎蔫, 二为系统枯萎。该病在叶片上最初为不连续的水渍状斑点, 初为暗绿色至黑色, 后变褐色, 与叶脉平行, 表面常有细菌溢脓。系统侵染时, 维管束变色, 根和近地面的茎秆干腐或水渍状褐腐。玉米幼苗和成株均可发病。细菌通过伤口侵染, 也可直接通过叶片侵染或者细嫩植株的根和茎秆系统侵染引起发病。苗期侵染引起萎蔫、死亡, 后期侵染造成植株矮化, 叶片上出现灰白色或黄绿色条纹, 条纹边缘波浪形或不规则形, 有时有黑色斑点, 最后干枯。

酶联免疫吸附方法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是实施生物检测(涉及包括人类病原菌, 动植物病原菌, 生物毒素, 农兽药残留, 蛋白质, DNA等多种/类生物体和化合物)的最为行之有效和重要的手段之一。鉴于生物素-亲和素反应体系的高亲和力和高特异性, 近些年在ELISA检测中得到广泛重视。目前, 国内外尚未见玉米细菌性萎蔫病菌ELISA检测研究的报道, 建立灵敏、稳定的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素ELISA检测方法(biotin-avidin ELISA)是玉米检疫的迫切要求。

发明内容

本发明的目的是建立一种满足特异性和高灵敏的多克隆抗体的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法, 并研制出试剂盒, 为玉米细菌性萎蔫病菌检测提供一种高效、简便的技术手段。

一种抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体，所述多克隆抗体的效价在 10^{-4} 以上；所述多克隆抗体采用间接 ELISA 法测定其特异性，其与 2 株玉米细菌性萎蔫病菌（ATCC 27822，ATCC 33114）表现强烈反应，而与相关的其他 11 个病原细菌种或亚种无交叉反应，供试细菌菌体浓度为 $1 \times 10^{8-9}$ cfu/mL。

本发明的抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

（1）制备免疫原：供试的玉米细菌性萎蔫病菌接种于液态 NBY 培养基上，28 °C 下恒温振荡培养，在细菌生长对数期收集菌体；12000 g 离心 10 分钟，倒去上清液，菌体用无菌磷酸盐缓冲液（PBS）复溶，反复离心清洗三次后再加入无菌 PBS 复悬，比浊法计数并定溶菌体浓度到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cfu/mL，制得细菌菌体悬液；

（2）动物免疫：取上述菌悬液按常规免疫方法对供试家兔进行免疫操作后，采集血清，并分装后于 -20 °C 下保存；

（3）纯化抗体：从上述血清中筛选出效价表现最高的抗血清（效价在 10^{-4} 以上）进行纯化，抗体浓度定溶为 1.0 mg/mL，即得抗玉米细菌萎蔫病菌多克隆抗体。

本发明的抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体的制备方法，所述步骤（3）中抗血清的纯化方法为硫酸铵沉淀法和 Protein A 柱亲和层析法。

一种玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，包括以下步骤：将上述的多克隆抗体进行生物素标记，制备样品提取液或菌悬液，然后在微孔板上包被样品提取液或菌悬液，之后相继加入生物素标记抗体、碱性磷酸酶标链霉亲和素和 PNP 底物，显色后用酶标仪读取波长在 405 nm 下的吸光度值。

其中所述检测方法以健康玉米粉悬浮液作为阴性对照，玉米细菌性萎蔫病菌悬液作为阳性对照进行 ELISA 检测。样本吸光度值与其所含玉米细菌性萎蔫病菌含量成正相关，采用 $P/N \geq 2.0$ 作为阳性结果的判定标准。

其检测灵敏度达到 1×10^6 cfu/mL。

本发明的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法，其中所述抗体进行生物素标记的方法为：取 1.0 mg/mL 的 1mL 抗体（IgG）用 CBS 缓冲液 4 °C 下透析过夜，期间换 3 次缓冲液，加入 100 μ L 标记试剂在室温下反应 30 min，然后加入 100 μ L 1M Tris/HCl 终止反应，用 0.85% NaCl 缓冲液 4 °C 下透析过夜，期间换 3 次缓冲液，得到生物素标记的抗体；其中所用的标记试剂为 1 mg 生物素与 1 mL 二甲基甲酰胺（DMF）或二甲基亚砜（DMSO）充分溶解得到的。

其中所述样品提取液的制备方法为：取 30 g 玉米籽粒样品用无菌水冲洗 3 次，在 300 mL 碳酸缓冲液中浸泡过夜，然后将种子研磨破碎，获得浓度为 0.1 g/mL 的玉米组织悬浮液；

所述菌悬液的制备方法为：将玉米细菌性萎蔫病菌和培养基的冻干粉用无菌水制备成 1×10^9 cfu/mL 的菌悬液，将等体积的此菌悬液与上述玉米组织悬浮液混合，形成 5×10^8 cfu/mL 样品液，再通过倍比稀释分别配成 1×10^8 ， 5×10^7 ， 10^7 ， 5×10^6 ， 10^6 ， 5×10^5 ， 10^5 cfu/mL 的菌悬液。

一种根据所述的检测方法组建的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测试剂盒，可供 200 孔检测用，使其包含下述组分：

A、检测抗体：用生物素标记的上述的玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体；

容量：0.125 mL 使用浓度：0.1 mg/mL 稀释倍数：1:200

抗体液含量：0.5 ug/mL 防腐剂：0.05% NaN_3 贮藏：4 °C 下 6 个月

B、酶标链霉亲和素复合物；

容量：0.05 mL (含 0.05% NaN_3) 稀释倍数：1:500 贮藏：4 °C 下 6 个月

C、10 倍 PBST 浓缩液：1:10 稀释后，用于稀释检测抗体、酶标链霉亲和素和洗涤酶标板；

规格：60 mL/瓶 贮藏：室温

D、10 倍碳酸缓冲液 (CBS)：1:10 稀释后，用于样品提取和配制封闭液；

规格：60 mL/瓶 贮藏：室温

E、封闭液：用 1 倍 CBS 配制的 0.5 % (w/v) BSA 或 2% (w/v) 脱脂奶粉；

F、底物：对硝基苯磷酸盐 (PNPP) 片剂：5 mg/片；

G、5 倍底物缓冲液：1:5 稀释后，用于配制显色液，pH 9.8；

组分：0.5 mol/L 二乙醇胺缓冲液

规格：10 mL/瓶 贮藏：室温

H、显色液：用底物缓冲液配制的 PNPP 溶液，1mg/mL，现配现用；

I、终止液：2M NaOH 溶液；

规格：50 mL/瓶 贮藏：室温

J、阳性对照：玉米细菌性萎蔫病菌和培养基的冻干粉；

K、阴性对照：健康玉米籽粒粉。

本发明提供的玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫检测方法及其检测试剂盒，其中多克隆抗体的制备是用病原细菌注射免疫大白兔并经筛选获得，抗体效价在 10^4 (1:10000) 以上；抗体与玉米细菌性萎蔫病菌有特异性反应，而与供试的其他病原细菌种/亚种无交叉反应；抗体纯化后进行生物素标记，建立了生物素-亲和素间接 ELISA (BA-ELISA)，检测灵敏度达到 1×10^6 cfu/mL。现在通常的碱性磷酸酶标抗体式间接 ELISA 采用多克隆抗体直接作为检测抗体或者用经碱性磷酸酶标记的多克隆抗体作为检测抗体，再加入通用的碱磷酶标羊抗兔

IgG 和/或 PNP 底物显色，而本发明提供的间接 BA-ELISA 的检测灵敏度比之提高了 5-10 倍。

具体实施方式

为进一步说明本发明，结合以下实例具体阐述：

1. 免疫原制备

供试玉米细菌性萎蔫病菌接种于液态 NBY 培养基上，28 °C 下恒温振荡培养，在细菌生长对数期收集菌体，12000 g 下离心 10 分钟，倒去上清液；沉淀菌体再用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)复溶，反复离心清洗三次后再加入无菌 PBS 复悬，比浊法计数并定溶菌体浓度到 1×10^8 cfu/mL。

NBY 培养基：

牛肉汁	8 g
酵母膏	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
葡萄糖	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g
双蒸水 (ddH ₂ O)	1000 mL

PBS 缓冲液：0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.4

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
双蒸水 (ddH ₂ O)	1000 mL

2. 动物免疫

取 3 mL 菌悬液 (1×10^8 cfu/mL) 与等体积的弗氏完全佐剂混和，乳化后对供试家兔进行背部皮下多点注射，两周后进行第一次耳缘静脉采血。第一次采血三天后进行第二次注射免疫（方法同），二免是用等体积的弗氏不完全佐剂，乳化后同上进行背部皮下多点注射。两周后进行第二次耳缘静脉采血，三天后进行第三次免疫，三免与二免的方案相同；再两周后处死动物，采集全部血清，并分装后于 -20 °C 下保存。

3. 抗体纯化

1) 硫酸铵沉淀法

取 2 mL 备用抗血清，在 4 °C 下 10000 × g 离心 30min，保留上清液；向血清中边搅拌边缓慢加入等体积的 3.9 M 饱和硫酸铵溶液。溶液在 4 °C 下搅拌过夜，以使蛋白质充分沉淀。抗

血清悬液同上离心, 弃去上清液保留沉淀。沉淀物用少量 1xPBS 复溶, 然后放入透析袋中对 PBS 透析过夜, 每隔约 6 h 更换一次透析液。收集初步纯化的抗体, 待进一步纯化备用。

2) 亲和层析法

Protein A 柱 (规格: 1 mL)、交联缓冲液 (MAPS II binding buffer) 和洗脱缓冲液 (MAPS II elute buffer), 均购自 Bio-Rad 公司。

- A. 平衡柱体: 用 0.01 mol/L PBS 洗脱柱子直至基线;
- B. 上样吸附: 将以上抗体缓慢加入柱床;
- C. 洗脱杂蛋白: 用约 5 倍柱体积的 MAPS II binding buffer 冲洗层析柱;
- D. 解吸附和收集: 用 5 倍柱体积的 MAPS II elute buffer 洗脱抗体, 边洗脱边收集;
- E. 柱的清洗和保存: 用约 5-7 倍柱体积 50% 甲醇冲洗 (流速: 3ml/min), 再用约 8 倍柱体积的 0.1 N NaOH 冲洗, 然后用去离子水和 20% 乙醇冲洗 2-3 次并最后保存在 20% 乙醇中。

4. 抗体交叉反应测定

采用通常的间接 ELISA 法测试了抗玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体的免疫反应性, 结果表明, 本抗体对目标玉米萎蔫细菌反应强烈, 而对供试的其它 11 种/亚种病原细菌无交叉反应。

供试病原细菌: ① 玉米细菌性萎蔫菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (No.27822, No.33114, 来自美国菌种保藏中心 ATCC), ② 玉米细菌性茎腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (No.12104, 中国农科院植保所), ③ 玉米细菌性褐斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (No.12056, 中国农科院植保所), ④ 玉米细菌性叶疫病病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (No.1.1726, 中国普通微生物保藏中心), ⑤ 玉米细菌性叶斑病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* (No. 1.1510, 中国普通微生物保藏中心), ⑥ 玉米细菌性枯萎病菌 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (No.0085, 来自南京农业大学植保系), ⑦ 苜蓿细菌性萎蔫病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (No.1.1908, 中国普通微生物保藏中心), ⑧ 番茄溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (No.12103, 中国农科院植保所), ⑨ 马铃薯环腐病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (No.12057, 中国农科院植保所), ⑩ 小麦棒形杆菌 *Clavibacter fangii* (No.1.1909, 1.1999, 1.2000, 中国普通微生物保藏中心)。

间接 ELISA 操作步骤:

- 1) 菌体包被: 供试病原细菌用 CBS 缓冲液稀释定溶到 1×10^8 cfu/mL, 每孔 100 μ L 加入到酶标板上, 每个菌株重复 3 孔, 4°C 下过夜包被;
- 2) 封闭: 弃去反应孔上清液, PBST 冲洗 3 次 (3 min/次), 每孔加入 200 μ L 2% BSA (牛

- 血清蛋白, bovine serum albumin), 37°C 下封闭 1 h;
- 3) 检测抗体: 同上处理和冲洗, 每孔加入 100 μL 玉米菱蔺细菌抗体, 工作浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 37°C 下反应 1 h;
- 4) 酶标抗体: 同上处理和冲洗, 加入碱性磷酸氧化酶标记羊抗兔 IgG (Sigma 公司), 按 1: 5000 倍稀释, 每孔加入 100 μL , 37°C 下反应 1 h;
- 5) 显色: 同上处理和冲洗, 每孔加入 100 μL PNP 显色液, 室温下反应 30 min, 用酶标仪读取波长在 405 nm 下的吸光度值 (optical density, OD);
- 6) 判定标准: 测试菌 OD 值/目标菌 OD 值, 小于 10% 确定为无交叉反应, 大于并等于 10% 表现为有弱交叉反应; 大于 30% 可确定为有交叉反应 (抗体对该测试菌不能用)。

CBS 缓冲液: 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6

Na_2CO_3	10 g
NaHCO_3	10 g
ddH_2O	1000 mL

PBST 冲洗液: 1 倍磷酸盐缓冲液, pH 7.4

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH_2PO_4	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
吐温 20	1 mL
NaN_3	0.2 g
双蒸水 (ddH_2O)	1000 mL

5. 抗体生物素标记

1) 准备: 生物素 X-NHS-Biotin (Sigma 公司)

溶剂: 二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, DMF, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$),

或者二甲基亚砷 (dimethylsulfoxide, DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)

标记试剂: 称取 1 mg 生物素与 1 mL DMF 或 DMSO 充分溶解

交联缓冲液: 10 g NaCl , 10g NaHCO_3 , 1000 mL H_2O , pH 7.5

1M Tris/HCl: 121 g Tris + 1000 ml H_2O , 用 2N HCl 调 pH 7.4

盐水 (saline): 0.85% NaCl

2) 标记: 取 1mL IgG (1mg/mL) 在交联缓冲液中透析过夜 (4°C, 期间换 3 次缓冲液), 然后加

入 100 μ l 标记试剂在室温 (RT) 下反应 30 min, 再加入 100 μ l 1M Tris/HCl 终止反应, 最后在 saline 缓冲液中透析过夜 (4°C, 期间换 3 次缓冲液), 分装保存。

6. 样品检测

取 30 g 健康玉米籽粒用无菌水冲洗 3 次, 在 300 ml 碳酸缓冲液中浸泡过夜, 然后将种子研磨破碎, 最终获得浓度为 1 mg/mL 的玉米组织悬浮液。将等体积的菌悬液 (1×10^9 cfu/mL) 与玉米组织悬浮液混合, 形成 5×10^8 cfu/mL 样品液, 再通过倍比稀释分别配成 1×10^8 , 5×10^7 , 10^7 , 5×10^6 , 10^6 , 5×10^5 , 10^5 cfu/mL 的菌悬液。以健康玉米籽粒提取液作为阴性对照, 萎蔫病菌悬液作为阳性对照进行 ELISA 检测。结果表明, 该 BA-ELISA 的最低检测限达到 1×10^6 cfu/mL。

间接 BA-ELISA 操作步骤:

- 1) 菌体/样品包被: 将以上菌体悬浮液加入酶标板, 100 μ L/孔, 4 °C 下过夜包被;
- 2) 封闭: 弃去反应孔上清液, PBST 冲洗 3 次 (3 min/次), 每孔加入 200 μ L 2% BSA (牛血清蛋白, bovine serum albumin), 37 °C 下封闭 2 h;
- 3) 生物素标记抗体: 同上处理和冲洗后, 加入生物素标记抗体 (1: 500 倍稀释), 每孔 100 μ L, 37 °C 下反应 1 h;
- 4) 酶标亲和素: 同上处理和冲洗, 每孔加入 100 μ L 碱性磷酸酶标-链霉亲和素 (1: 5000 倍稀释), 37°C 下反应 1 h;
- 5) 显色: 同上处理和冲洗, 每孔加入 100 μ L PNPP 显色液, 室温下反应 30 min, 用酶标仪读取波长在 405 nm 下吸光度值 (optical density, OD)。

7. 检测玉米细菌性萎蔫病菌生物素-亲和素酶联免疫试剂盒的组建

组建玉米细菌性萎蔫病菌酶联免疫检测试剂盒, 可供 200 孔检测用, 使其包含下述组分:

A 检测抗体 (detection antibody, biotin-antibody)

用生物素标记的玉米细菌性萎蔫病菌多克隆抗体

容量: 0.125 mL 抗体液含量: 0.5 μ g/mL 稀释倍数: 1:200

使用浓度: 0.1 mg/mL 防腐剂: 0.05% NaN_3 贮藏: 4 °C 下 6 个月

B 碱性磷酸酶标记链霉亲和素复合物 (streptavidin-AP conjugate)

容量: 0.05 mL (含 0.05% NaN_3) 稀释倍数: 1:500 贮藏: 4 °C 下 6 个月

C 10 倍 PBST 浓缩液 (1:10 稀释后, 用于稀释检测抗体、酶标链霉亲和素、洗涤酶标板)

规格: 60 mL/瓶 贮藏: 室温

D 10 倍碳酸缓冲液 (CBS, 1:10 稀释后, 用于样品提取和配制封闭液)

规格: 60 mL/瓶 贮 藏: 室温

E 封闭液: 用 CBS 配制的 0.5%BSA 或 2% 脱脂奶粉 (wt/vol)

F 底物: PNPP 片剂 (p-Nitrophenylphosphat, 对硝基苯磷酸盐, 5 mg/片)

G 5 倍底物缓冲液 (1: 5 稀释后, 用于配制显色液, pH 9.8)

组分: 0.5 mol/L 二乙醇胺缓冲液

规格: 10 mL/瓶 贮 藏: 室温

H 显色液: 用底物缓冲液配制的 PNPP 溶液, 1mg/mL(w/v, 现配现用)

I 终止液 (2M NaOH 溶液)

规 格: 50 mL/瓶 贮 藏: 室温

J 阳性对照: 玉米细菌性萎蔫病菌及培养基的冻干粉, 使用时加入 CBS 缓冲液溶解备用

K 阴性对照: 健康玉米粉, 同法样品进行提取, 离心后取上清液备用。

本发明中涉及的% 如无特殊说明外, 均指的是重量百分比。

以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述, 并非对本发明的范围进行限定, 在不脱离本发明设计精神的前提下, 本领域普通工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进, 均应落入本发明的权利要求书确定的保护范围内。

专利名称(译)	玉米细菌性萎蔫病菌生物素 - 亲和素酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101498724A	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	CN200910077612.X	申请日	2009-01-24
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	田世民 邹明强 王岭 哈斯 马吉湘 陈艳 齐小花 金涌		
发明人	田世民 邹明强 王岭 哈斯 马吉湘 陈艳 齐小花 金涌		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	卢新		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种针对玉米细菌性萎蔫病菌的生物素 - 亲和素酶联免疫检测方法，包括以下步骤：制备上述的多克隆抗体、纯化并进行生物素标记；样品中细菌的提取，将样品提取液包被在微孔板上；之后相继加入生物素标记抗体、碱性磷酸酶标链霉亲和素复合物及PNP底物，显色后用酶标仪读取波长在405nm下的吸光度值；本发明提供的玉米细菌性萎蔫病菌生物素 - 亲和素酶联免疫检测方法，特异性强，灵敏度高，检测灵敏度达到 1×10^6 cfu/mL，操作简便快速，结果准确高效。