



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107918012 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201610885141.5

(22)申请日 2016.10.11

(71)申请人 上海市农业科学院

地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72)发明人 曾蓉 戴富明 徐丽慧 高士刚

(74)专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司 31114

代理人 费开逵 崔兆慧

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用,该试剂盒包括含有甜瓜黄斑病毒MYSV特异性的多克隆抗体和酶标二抗,具有使用方便、操作简便、快速灵敏、结果可靠、通量高等特点。本发明所述试剂盒可以在实验室和非实验室条件下检测植物叶片是否携带MYSV,适合样品的快速检测、MYSV的流行监测,进而采取恰当的防止措施,减少病害带来的损失。

1. 一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体和酶标二抗;

所述含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体是利用原核表达的甜瓜黄斑病毒衣壳蛋白为免疫原制备得到的抗体。

2. 根据权利要求1所述的甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体的制备方法为:通过原核表达的方法表达出甜瓜黄斑病毒的衣壳蛋白;再经电泳纯化后,耳静脉免疫家兔;免疫3-5次后心脏取血,收集上层血清,并纯化即得。

3. 根据权利要求1或2所述的甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述免疫检测试剂盒还包括阳性质控、滤膜、样品研磨液、洗膜液、封闭液和显色液,所述滤膜为尼龙膜或硝酸纤维素膜。

4. 如权利要求1-3任一项所述免疫检测试剂盒在甜瓜黄斑病毒检测中的应用。

5. 如权利要求1-3所述甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒的使用方法,其包括如下步骤:

1) 将待测样品与样品研磨液混合,将得到的混合液滴在滤膜上,室温风干;同时,设置阳性和阴性对照组;

2) 将干燥后的滤膜浸入封闭液中,室温放置0.5~2小时;

3) 用封闭液稀释包含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体,抗体稀释比例为:1:2000~1:20000,体积比;将步骤2)得到的滤膜浸入稀释后的多克隆抗体中,室温放置1~2小时,再用洗膜液洗膜5~10分钟;

4) 用封闭液稀释酶标二抗,酶标二抗稀释比例为1:4000~1:20000,体积比;将步骤3)得到的滤膜浸入稀释后的酶标二抗中,室温放置0.5~1小时,再用洗膜液洗膜5~10分钟;

5) 加入显色液,黑暗条件下室温放置至显色,观察显色结果:显示为紫色的,待测样品携带MYSV病毒;不显色或只有叶片本色的,待测样品不携带MYSV病毒。

一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于农业科学技术领域,具体涉及一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 甜瓜黄斑病毒(Melon Yellow Spot Virus,MYSV)属于布尼亚病毒科,斑萎病毒属,最早1992年在日本报导发生。该病毒主要侵染西瓜、甜瓜、黄瓜、苦瓜等重要葫芦科作物。在近十年,日本、中国、泰国、荷兰、厄瓜多尔等各地都有报导发生,对当地的葫芦科作物的生产造成严重的影响,经济损失严重。该病毒2009年在我国的广东、海南、广西、山东等地相继被发现,主要侵染西瓜和甜瓜,发病率为30%~100%。

[0003] 2013年,在上海市奉贤区的部分黄瓜植株上,发现MYSV病毒的发生,发病率约为10%。2014年,在上海市嘉定区、浦东新区等甜瓜种植区,也发现MYSV在部分甜瓜和哈密瓜品种上发生严重,发病率50%~80%。2015年,在上海的部分黄瓜植株上,发病率超过80%。该病毒的全球蔓延和爆发,给当地的葫芦科作物生产造成了极大的损失,成为葫芦科作物生产的重要威胁因子之一。

[0004] MYSV病毒侵染植株后,植株叶片症状非常多样,与其他病毒症状很难区分。目前针对MYSV的检测方法主要有电镜观察法、RT-PCR、RT-LAMP、Northern blot等,但他们都需要昂贵的仪器和繁琐的操作,且不适于大批量样品的检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用,针对目前病毒检测的操作繁琐、成本高、用时长等问题,提供一种快速、便捷、灵敏、高效、特异性强的非实验室条件的甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术方案是:

[0007] 一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒,其包括,含甜瓜黄斑病毒(MYSV)的多克隆抗体和酶标二抗;所述含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体是利用原核表达的甜瓜黄斑病毒衣壳蛋白为免疫原制备得到的抗体。

[0008] 进一步,所述含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体的制备方法为:通过原核表达的方法,表达出甜瓜黄斑病毒的衣壳蛋白(coat protein,CP);经SDS-PAGE电泳纯化后,耳静脉免疫家兔;免疫3-5次后心脏取血,收集上层血清,并纯化。

[0009] 所述酶标二抗为标记过的任意常用的能与MYSV抗体结合的抗体,其中,标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等,能与MYSV抗体结合的抗体如羊抗兔IgG、马抗兔IgG、牛抗兔IgG、鼠抗兔IgG等。所述酶标二抗优选为碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG血清。

[0010] 所述免疫检测试剂盒还包括阳性质控、滤膜、样品研磨液、洗膜液、封闭液和显色液,所述滤膜为尼龙膜或硝酸纤维素膜。

[0011] 再,所述阳性质控为甜瓜黄斑病毒N基因(MYSV-CP)的原核表达蛋白。

[0012] 本发明所述免疫检测试剂盒在甜瓜黄斑病毒检测中的应用。

[0013] 本发明所述甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒的使用方法,其包括如下步骤:

[0014] 1) 将待测样品与样品研磨液混合,将得到的混合液滴在滤膜上,室温风干,同时设置阳性和阴性对照组;

[0015] 2) 将干燥后的滤膜浸入封闭液中,室温放置0.5~2小时;

[0016] 3) 用封闭液稀释包含甜瓜黄斑病毒的多克隆抗体,抗体稀释比例为:1:2000~1:20000,体积比;将步骤2)得到的滤膜浸入稀释后的多克隆抗体中,室温放置1~2小时,再用洗膜液洗膜5~10分钟;

[0017] 4) 用封闭液稀释酶标二抗,酶标二抗稀释比例为1:4000~1:20000,体积比;将步骤3)得到的滤膜浸入稀释后的酶标二抗中,室温放置0.5~1小时,再用洗膜液洗膜5~10分钟;

[0018] 5) 加入显色液,黑暗条件下室温放置至显色,观察结果:显示为紫色的,待测样品携带MYSV病毒;不显色或只有叶片本色的,待测样品不携带MYSV病毒。

[0019] 本发明利用原核表达的MYSV衣壳蛋白制备的抗体,能特异的检测MYSV,与其他病毒或健康植株样品无交叉反应,能很好的用于该病的检测。

[0020] 本发明首次应用制备的MYSV特异性的多克隆抗体建立了一种斑点免疫(Dot Immunobinding Assay, DIBA)检测方法,以该方法建成了甜瓜黄斑病毒的检测试剂盒。该试剂盒具有使用方便、操作简便、快速灵敏、结果可靠、通量高等特点,可应用于实验室条件或非实验室条件下检测植物叶片是否携带MYSV的检测,以快速准确判定病害种类,从而制定针对的防治策略,减少病害带来的损失,具有非常高的实用价值。

[0021] 本发明的有益效果:

[0022] (1) 特异性好:本发明所述多克隆抗体来自MYSV的CP蛋白的兔抗体,能特异识别MYSV。该多克隆抗体与田间易混淆的CGMMV无免疫反应,即便同属的TSWV(番茄斑萎病毒)也无免疫反应,能很好的应用于实验室或田间的样品检测。

[0023] (2) 灵敏度高:本发明所述试剂盒在酶标二抗稀释浓度为1:10000时能检测到25 μ g植物样品中含MYSV;在酶标二抗稀释浓度为1:5000时能检测到3.12 μ g植物样品中含MYSV。

[0024] (3) 成本低:所述试剂盒可以在室温条件下进行,不需要昂贵的分子生物学仪器。

[0025] (4) 本发明所述试剂盒在非实验室条件仍能很好的特异检测出MYSV,简便、准确可靠,适用于基层植保人员操作,可及时发现和控制病毒,减少经济损失。

附图说明

[0026] 图1为本发明实施例2在实验室条件下甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒特异性结果图,其中,+为原核表达MYSV外壳蛋白抗原,第2~5列分别为MYSV,CGMMV(黄瓜绿斑驳花叶病毒),TSWV(番茄斑萎病毒),Healthy(无病毒感染)样品,试验重复三次。

[0027] 图2为本发明实施例3在实验室条件下甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒灵敏度结果图之一,其中,+为原核表达MYSV外壳蛋白抗原,第1行1~6为携带MYSV的黄瓜叶片,浓度梯度成2倍稀释,2.00 $\times 10^{-4}$ ~6.25 $\times 10^{-6}$ 克叶片;第二行为阴性对照CGMMV(黄瓜叶片)。

[0028] 图3为本发明实施例3在实验室条件下甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒灵敏度结果图之二,其中,+为原核表达MYSV外壳蛋白抗原,第1行1~6为携带MYSV的黄瓜叶片,浓度梯

度成2倍稀释, 2.00×10^{-4} – 6.25×10^{-6} 克叶片;第二行为阴性对照TSWV(烟草叶片)。

[0029] 图4为本发明实施例3在实验室条件下甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒灵敏度结果图之三,其中,+为原核表达MYSV外壳蛋白抗原,第1行1-6为携带MYSV的黄瓜叶片,浓度梯度成2倍稀释, 2.00×10^{-4} – 6.25×10^{-6} 克叶片;第二行为阴性对照黄瓜健康叶片。

[0030] 图5为本发明实施例3在实验室条件下甜瓜黄斑病毒免疫检测试剂盒中酶标二抗稀释浓度为1:5000时的灵敏度结果示意图,其中,+为原核表达MYSV外壳蛋白抗原;第一行1-9格为携带MYSV的黄瓜叶片,浓度梯度成2倍稀释, 2.00×10^{-4} – 7.81×10^{-7} 克叶片,第二行1-9格Negative为试验阴性对照。

[0031] 图6为本发明实施例4在非实验条件甜瓜黄斑病毒免疫检测试剂盒检测田间样品的显色结果示意图,其中,A1为阳性质控,A2-G6为田间样品,G7为健康黄瓜叶片。

具体实施方式

[0032] 下面结合实施例和附图对本发明做进一步说明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0033] 本实施例中,甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒包括:

[0034] (1) MYSV多克隆抗体:MYSV免疫家兔的多克隆抗体,每试剂盒50次反应;

[0035] (2) 酶标二抗:碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔IgG,其工作效价为1:4000–1:20000,每试剂盒50次反应,用于检测植物组织是否携带MYSV。

[0036] (3) 阳性质控:甜瓜黄斑病毒N基因(MYSV-CP)的原核表达蛋白抗原;

[0037] (4) 带正电的尼龙膜或硝酸纤维素膜;

[0038] (5) 样品研磨液:磷酸盐缓冲液($10 \times$ PBS, 0.1M, pH7.5; NaCl 1.37M, KCl 27mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mM, KH_2PO_4 14mM);

[0039] (6) 洗膜液:Tris-HCl-吐温缓冲盐($10 \times$ TBST, 200mM Tris-HCl, pH7.5; NaCl 1.5M; Tween 0.5%);

[0040] (7) 封闭液:5%脱脂奶粉($1 \times$ TBST);

[0041] (8) 显色液:BCIP/NBT(BCIP(5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐)0.42mg/mL; NBT(四唑硝基蓝)0.21mg/mL,溶解于0.01M AMP缓冲液),用于植物组织是否携带MYSV。

[0042] 本发明试剂盒的主要试剂均以工作液或浓缩液形式提供,该试剂盒保存或运输都应在低温4℃左右,以期保证试剂盒中多克隆抗体和酶标二抗的活性。

[0043] 注意:每次检测都需设置阳性和阴性对照组,若检测过程中出现假阳性或假阴性,可能为试剂盒失效,停止用于检测。

[0044] 实施例1MYSV多克隆抗体的制备

[0045] 1) 将MYSV的衣壳蛋白大量诱导表达后,取1mL菌,沉淀弃上清,用100μL PBST悬浮沉淀,加入20μL $6 \times$ SDS-PAGE Loading buffer,100℃将菌悬液煮沸10min,冰浴5min,10000r/min离心5min,后上清经12.5%的SDS-PAGE分离,用0.25mol/L氯化钾染色,切下目的条带;

[0046] 2) 将凝胶按1:1(W/V)加入0.9%NaCl低温研磨后用作抗原免疫两只家兔,第1次注

射加入等体积的弗氏完全佐剂,随后5次注射加入等体积的弗氏不完全佐剂,每隔7天免疫1次,第5次免疫后3天心脏取血;

[0047] 3) 血液4℃放置8h,14000r/min离心5min,收集上层血清,纯化。

[0048] 实施例2甜瓜黄斑病毒免疫检测试剂盒的特异性试验

[0049] 1) 将尼龙膜用铅笔划5mm×5mm的小方格,长宽分别为5×3格,剪下备用;

[0050] 2) 将洗膜液和样品研磨液用纯净水稀释10倍,使之成为1×TBST,1×PBS;

[0051] 3) 待测样品0.1g放入1.5mL离心管中,加入稀释好的样品研磨液1mL(即稀释10倍),小研磨棒捣碎后,取上清液体2μL小心滴于尼龙膜小方格中央,室温风干;尼龙膜第1行第1格点MYSV-CP的原核表达蛋白,第1行第2-5格分别为MYSV(黄瓜叶片),CGMMV(黄瓜叶片),TSWV(烟草叶片),黄瓜健康叶片,样品重复三次;

[0052] 4) 将干燥后的尼龙膜浸于5mL封闭液中,37℃培养箱放置0.5小时;

[0053] 5) 吸取1μL MYSV多克隆抗体到新鲜5mL封闭液中,将尼龙膜浸入洁净的培养皿,室温放置1.5小时;用洗膜液(1×TBST)摇床洗膜10min;

[0054] 6) 移液枪吸取0.5μL酶标二抗到新鲜5mL封闭液中,将尼龙膜浸入洁净的培养皿,室温放置1小时;用洗膜液(1×TBST)摇床洗膜10min;

[0055] 7) 加入显色液,黑暗条件室温至显色(20-30min),观测结果,具体结果参见图1。

[0056] 图1中,第2列均显示紫色,第3、5列均只有叶片本色(绿色)、第4列均不显色,由此验证:本试剂盒能特异地检测出MYSV病毒。

[0057] 实施例3甜瓜黄斑病毒免疫检测试剂盒的灵敏度试验

[0058] 1) 将尼龙膜用铅笔划5mm×5mm的小方格,长宽分别为5×3格,剪下备用;

[0059] 2) 将洗膜液和样品研磨液用纯净水稀释10倍,使之成为1×TBST,1×PBS;

[0060] 3) 待测样品0.1g放入1.5mL离心管中,加入稀释好的样品研磨液1mL,小研磨棒捣碎后,取上清液体2μL小心滴于尼龙膜小方格中央,室温风干;第1行第1格点MYSV-CP的原核表达蛋白,第2-6格分别为携带MYSV的黄瓜叶片样品,2.00×10⁻⁴-6.25×10⁻⁶克叶片,浓度梯度呈2倍稀释后取2μL点于方格中央,第2行为阴性对照样品,分别选取CGMMV(黄瓜叶片)、TSWV(烟草叶片),黄瓜健康叶片三个阴性对照,分别如图2-4所示;

[0061] 4) 将干燥后的尼龙膜浸于5mL封闭液中,37℃培养箱放置0.5小时;

[0062] 5) 吸取1μL MYSV多克隆抗体到新鲜5mL封闭液中,将膜浸入洁净的培养皿,室温放置1.5小时;

[0063] 6) 用洗膜液(1×TBST)摇床洗膜10min;

[0064] 7) 移液枪吸取0.5μL酶标二抗到新鲜5mL封闭液中,将膜浸入洁净的培养皿,室温放置1小时;

[0065] 8) 用洗膜液(1×TBST)摇床洗膜10min;

[0066] 9) 加入显色液,黑暗条件室温至显色(20-30min),观测结果,显示紫色为带MYSV病毒,不显色或只有叶片本色为不带毒,观测试验结果,具体显色结果如图2-4所示。

[0067] 图2-4中第1行第1-3格均显示紫色,图2、图4中第2行均只有叶片本色(绿色),图3中第2行均不显色。

[0068] 由图2-4可知,MYSV的抗血清能特异、灵敏的检测含有MYSV的植株样品,与CGMMV、TSWV、健康植株及磨样缓冲液无血清反应,不显示紫色,灵敏度达到能检测0.25×10⁻⁴克植

物叶片。

[0069] 将步骤7)的酶标二抗取1 μ L到新鲜,5mL封闭液中,将膜浸入洁净的培养皿,室温放置1小时,其他步骤同上,显色结果如图5所示。图5中,+为原核表达MYSV外壳蛋白抗原;第一行1-9格为携带MYSV的黄瓜叶片,浓度梯度成2倍稀释,2.00 $\times 10^{-4}$ -7.81 $\times 10^{-7}$ 克叶片,第二行1-9格Negative为试验阴性对照,即反应样品为磨样缓冲液。

[0070] 图5中,第1行第1-7格均显示紫色,且显色逐渐变浅;第8-9格显色不明显;第2行均不显色。由图5可知,提高酶标二抗的浓度,能大幅提高试剂盒的检测灵敏度,能检测到3.12 $\times 10^{-6}$ 克叶片含MYSV,灵敏度提高了8倍左右,且无假阳性出现。

[0071] 实施例4甜瓜黄斑病毒免疫检测试剂盒的非试验条件的应用

[0072] 1) 将尼龙膜用铅笔划5mm $\times$ 5mm的小方格,根据样品多少剪下备用;

[0073] 2) 将洗膜液和样品研磨液用纯净水稀释10倍,使之成为1 $\times$ TBST,1 $\times$ PBS;

[0074] 3) 将待测样品放入0.5mL离心管中,体积不超过离心管体积的1/4,加入稀释好的样品研磨液1-3滴,牙签捣碎后,蘸取上面液体小心滴于尼龙膜小方格中央,室温风干;

[0075] 4) 将干燥后的尼龙膜浸于5mL左右封闭液中,室温放置1小时;

[0076] 5) 牙签蘸1次反应的MYSV多克隆抗体到新鲜5mL封闭液中,将膜浸入,室温放置2小时;

[0077] 6) 用洗膜液(1 $\times$ TBST)洗膜10min;

[0078] 7) 牙签蘸1次反应酶标二抗到新鲜5mL封闭液中,将膜浸入,室温放置1小时;

[0079] 8) 用洗膜液(1 $\times$ TBST)洗膜10min;

[0080] 9) 加入显色液,黑暗条件室温至显色(20-30min),观测显色结果,显示紫色为带MYSV病毒,不显色或只有叶片本色为不带毒。

[0081] 具体显色结果如图6所示。图6中,A1为阳性质控,A2-G6为田间样品,G7为健康黄瓜叶片。由图6可知,在被检测的47个样品中,有21个样品感染了MYSV,后经过RT-PCR、测序验证了结果的可靠性,充分说明本发明可广泛的用于田间样品的检测,结果可靠、通量高。

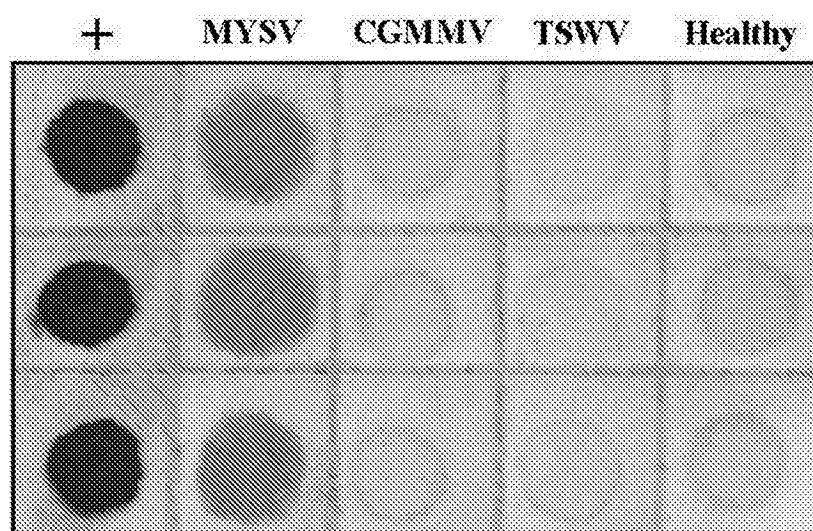


图1

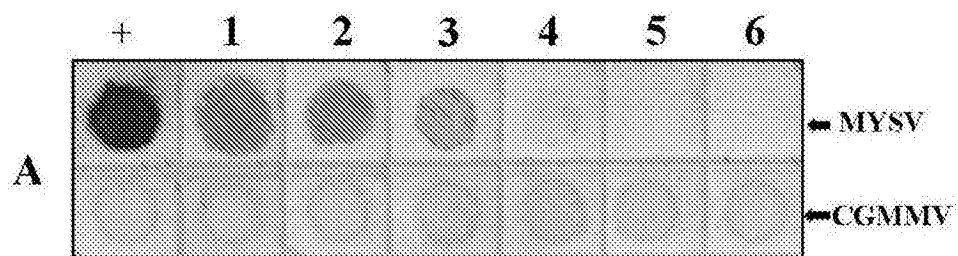


图2

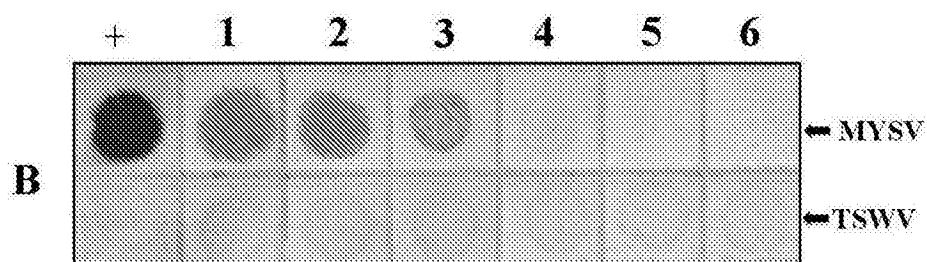


图3

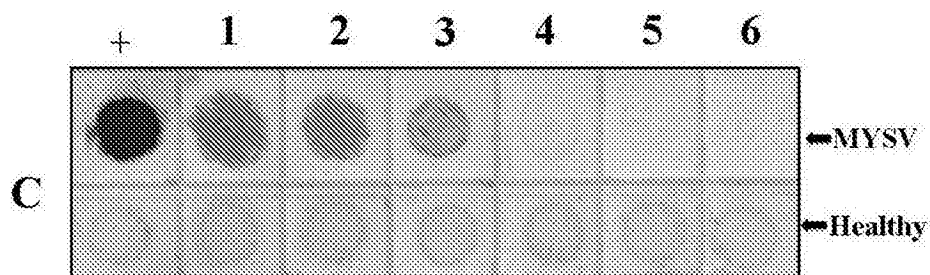


图4

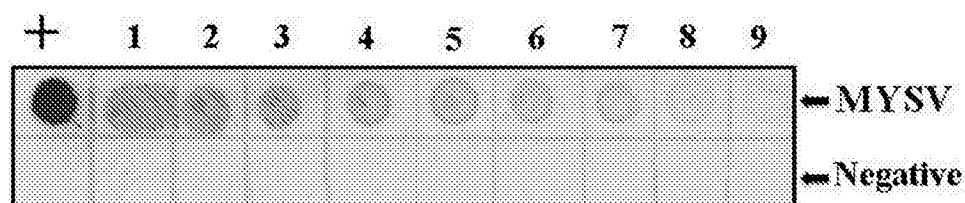


图5

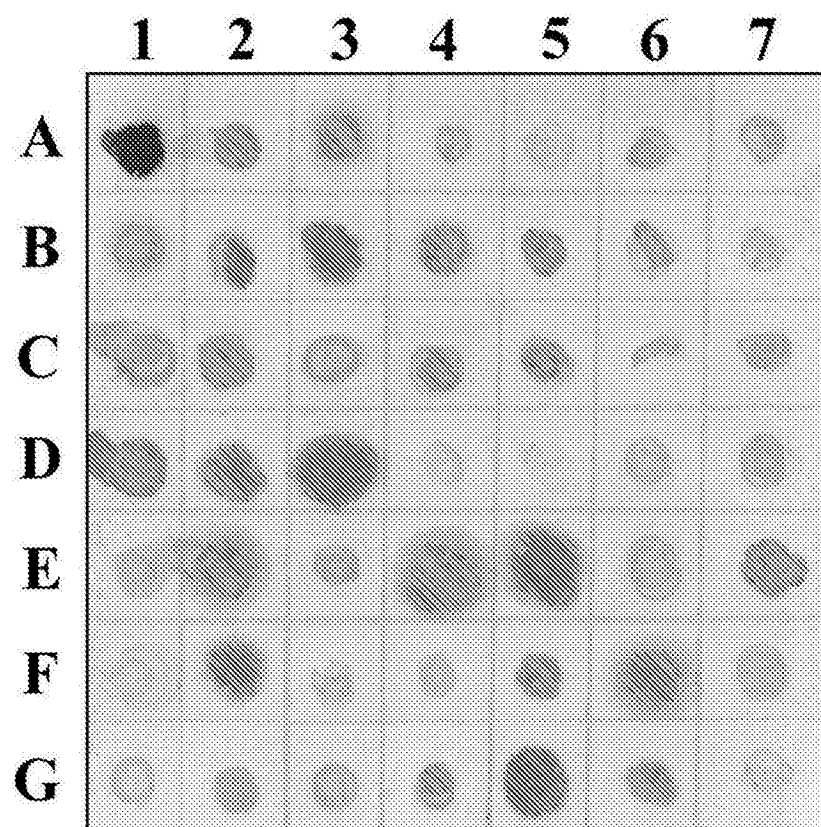


图6

专利名称(译)	一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN107918012A	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN201610885141.5	申请日	2016-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	上海市农业科学院		
申请(专利权)人(译)	上海市农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市农业科学院		
[标]发明人	曾蓉 戴富明 徐丽慧 高士刚		
发明人	曾蓉 戴富明 徐丽慧 高士刚		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甜瓜黄斑病毒的免疫检测试剂盒及其应用，该试剂盒包括含有甜瓜黄斑病毒MYSV特异性的多克隆抗体和酶标二抗，具有使用方便、操作简便、快速灵敏、结果可靠、通量高等特点。本发明所述试剂盒可以在实验室和非实验室条件下检测植物叶片是否携带MYSV，适合样品的快速检测、MYSV的流行监测，进而采取恰当的防止措施，减少病害带来的损失。

