



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596935 A  
(43)申请公布日 2017. 04. 26

(21)申请号 201611222794.1

(22)申请日 2016.12.26

(71)申请人 山西师范大学

地址 041000 山西省临汾市尧都区贡院街1号

(72)发明人 陈伟 樊泽璐 王圣楠 杨延祯  
蔡华成 王祎玲 郭瑞珍

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

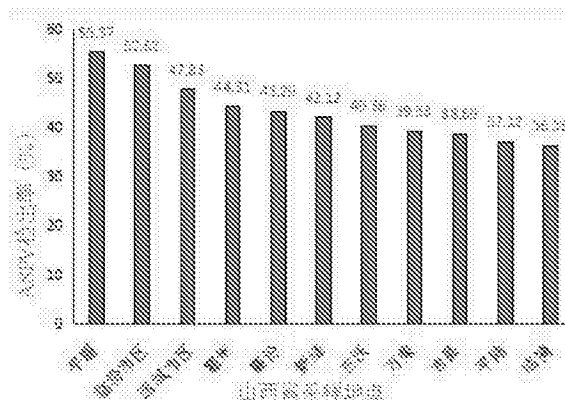
权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法,与现有技术相比,本发明旨在创制一种能够用以快速、特异、简便的检测苹果主要潜隐病毒的全新手段。研究成果不仅可以明确山西省苹果潜隐病毒的分子变异、侵染流行、毒力状况,而且基于上述研制的多重免疫胶体金试纸条能准确、快速的诊断苗木、砧木是否带毒,将有效控制该类病引发毒病的传播流行,提高苹果生产数量 and 产品质量。



1. 一种苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 器皿清洁:

要用的所有玻璃器皿在流水下洗干净,放置到酸液中(重铬酸钾100g,浓硫酸50ml,加蒸馏水至1000ml)浸泡24h,用自来水反复冲刷,然后使用蒸馏水浸泡24h,用超纯水洗涤三次,再次使用超纯水浸泡72h,烤箱中干燥后备用;在配制试剂时一定要保持严格的纯净,所有试剂都要使用ddH<sub>2</sub>O配制;

(2) 胶体金制备:

取1%氯金酸水溶液1ml,加99ml超纯水,加热到沸腾,一边搅一边一次性快速滴加1.8ml新鲜配置的1%柠檬酸三钠水溶液,溶液颜色从黄逐渐转为紫红,再在沸水中加热3~5分钟,冷却到室温,加超纯水至原体积,4℃环境下保存备用,避免光照;

(3) 金标抗体的制备:

将待标记抗体提前把0.005mol/l pH7.0的NaCl溶液中4℃透析过夜,从而除去多余的盐离子,10000rpm 4℃离心30分钟,去除聚合物;

测定待标记抗体最适用量:用0.1mol/l的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液调胶体金溶液的pH值到8.5,分装10管,每管1ml,分别滴加2μl、4μl、6μl、8μl、10μl、20μl抗体,充分混合均匀后每管滴加10% (m/v)的NaCl溶液0.1ml;另设对照管,即1ml胶体金中只加0.1ml 10%的NaCl溶液,混合均匀后放置2小时,观察结果;用0.1mol/l的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将胶体金溶液的pH值调至8.5;搅动过程中,向金溶胶内滴加最佳标记含量的抗体,均匀搅动2~3分钟;滴加10%的BSA作为稳定剂,使其浓度为1%,继续搅拌15分钟,4℃保存备用;

将金标抗体溶液在1200rpm、4℃离心10分钟从而清除其中的胶体金聚合物,取上清液,再用14000rpm、4℃离心50分钟,可见离心物分成3层,上清液中含有还没有结合的抗体,没有结合的胶体金颗粒聚合物在最底层形成深黑色斑点,中部紫红色絮状沉淀是良好结合的胶体金-抗体复合物;弃去上清,把紫红色絮状沉淀溶于1/10原体积的含1%BSA的PBS缓冲液(0.01mol/l, pH8.2)中,4℃保存备用;

(4) 试纸条的组装:

将裁剪好的玻璃纤维膜放入含1%BSA的0.01mol/l的PBS中封闭1h,待自然晾干后,将适当稀释过的不同金标抗体等体积混合后均匀滴加在玻璃纤维膜上至饱和,37℃烘箱中烘干备用;

分别取已经纯化过的抗体和羊抗兔抗体用PBST缓冲液进行一定的稀释,分别在硝酸纤维素膜上滴加样品于T线和C线上,室温晾干后,放在封闭溶液里,37℃环境中进行1h孵化培育,用PBST缓冲液洗2次,每次5分钟,在正常室内温度晾干保存;

抗体固相硝酸纤维素膜、滤纸、金标抗体结合释放垫、样品垫按照顺序安在PVC板上,相互间留1~2mm的重叠,用力压紧,避免产生气泡;4℃避光干燥保存;

(5) 试纸条检测:

取经RT-PCR验证过的感染病毒的苹果叶片,称重后放在干净研钵中,依照1:10 (m/v)的比例滴加PBST,进行研磨并成为匀浆,2000rpm离心10分钟,取上清液作为样品分别用试纸条检验,再把相同量的样本混合均匀,拿试纸条检验。

## 苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物病害研究方法,尤其涉及一种苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法。

### 背景技术

[0002] 苹果褪绿叶斑病毒(Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、苹果茎痘病毒(Apple stem pitting virus, ASPV)和苹果茎沟病毒(Apple stem grooving virus, ASGV)对苹果产量和品质的影响极为严重,这3类潜隐病毒,分布区域极广,产生后果严重。利用传统血清学,生物学和分子生物学等技术检测这些病毒,操作复杂,专业技术性强,需要专业的仪器设备,不能满足大田推广应用。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的就在于为了解决上述问题而提供一种苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法。

[0004] 本发明通过以下技术方案来实现上述目的:

[0005] 本发明包括以下步骤:

[0006] (1) 器皿清洁:

[0007] 要用的所有玻璃器皿在流水下洗干净,放置到酸液中(重铬酸钾100g,浓硫酸50ml,加蒸馏水至1000ml)浸泡24h,用自来水反复冲刷,然后使用蒸馏水浸泡24h,用超纯水洗涤三次,再次使用超纯水浸泡72h,烤箱中干燥后备用;在配制试剂时一定要保持严格的纯净,所有试剂都要使用ddH<sub>2</sub>O配制;

[0008] (2) 胶体金制备:

[0009] 取1%氯金酸水溶液1ml,加99ml超纯水,加热到沸腾,一边搅一边一次性快速滴加1.8ml新鲜配置的1%柠檬酸三钠水溶液,溶液颜色从黄逐渐转为紫红,再在沸水中加热3~5分钟,冷却到室温,加超纯水至原体积,4℃环境下保存备用,避免光照;

[0010] (3) 金标抗体的制备:

[0011] 将待标记抗体提前把0.005mol/l pH7.0的NaCl溶液中4℃透析过夜,从而除去多余的盐离子,10000rpm 4℃离心30分钟,去除聚合物;

[0012] 测定待标记抗体最适用量:用0.1mol/l的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液调胶体金溶液的pH值到8.5,分装10管,每管1ml,分别滴加2μl、4μl、6μl、8μl、10μl、20μl抗体,充分混合均匀后每管滴加10% (m/v)的NaCl溶液0.1ml;另设对照管,即1ml胶体金中只加0.1ml 10%的NaCl溶液,混合均匀后放置2小时,观察结果;用0.1mol/l的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将胶体金溶液的pH值调至8.5;搅动过程中,向金溶胶内滴加最佳标记含量的抗体,均匀搅动2~3分钟;滴加10%的BSA作为稳定剂,使其终浓度为1%,继续搅拌15分钟,4℃保存备用;

[0013] 将金标抗体溶液在1200rpm、4℃离心10分钟从而清除其中的胶体金聚合物,取上清液,再用14000rpm、4℃离心50分钟,可见离心物分成3层,上清液中含有还没有结合的抗

体,没有结合的胶体金颗粒聚合物在最底层形成深黑色斑点,中部紫红色絮状沉淀是良好结合的胶体金-抗体复合物;弃去上清,把紫红色絮状沉淀溶于1/10原体积的含1%BSA的PBS缓冲液(0.01mol/l,pH8.2)中,4℃保存备用;

[0014] (4) 试纸条的组装:

[0015] 将裁剪好的玻璃纤维膜放入含1%BSA的0.01mol/l的PBS中封闭1h,待自然晾干后,将适当稀释过的不同金标抗体等体积混合后均匀滴加在玻璃纤维膜上至饱和,37℃烘箱中烘干备用;

[0016] 分别取已经纯化过的抗体和羊抗兔抗体用PBST缓冲液进行一定的稀释,分别在硝酸纤维素膜上滴加样品于T线和C线上,室温晾干后,放在封闭溶液里,37℃环境中进行1h孵化培育,用PBST缓冲液洗2次,每次5分钟,在正常室内温度晾干保存;

[0017] 抗体固相硝酸纤维素膜、滤纸、金标抗体结合释放垫、样品垫按照顺序安在PVC板上,相互间留1~2mm的重叠,用力压紧,避免产生气泡;4℃避光干燥保存;

[0018] (5) 试纸条检测:

[0019] 取经RT-PCR验证过的感染病毒的苹果叶片,称重后放在干净研钵中,依照1:10(m/v)的比例滴加PBST,进行研磨并成为匀浆,2000rpm离心10分钟,取上清液作为样品分别用试纸条检验,再把相同量的样本混合均匀,拿试纸条检验。

[0020] 本发明的有益效果在于:

[0021] 本发明是一种苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法,与现有技术相比,本发明旨在创制一种能够用以快速、特异、简便的检测苹果主要潜隐病毒的全新手段。首先对山西苹果主产区3种潜隐性病毒的发生危害、分子变异与基因组结构进行系统研究;其次是利用RT-PCR技术获得3种潜隐病毒的外壳蛋白(coat protein,CP)基因,将经过酶切之后得到目的片段插入到载体中构建原核表达载体,再转化大肠杆菌,且使用IPTG手段诱导表达外壳蛋白。对原核表达的3种病毒外壳蛋白为抗原免疫的实验家兔,制作出所用的抗血清,并提纯免疫球蛋白,结合胶体金标记技术和免疫层析原理,最终研制出快速检验苹果3种潜隐性病毒多重免疫胶体金试纸条。该项目研究成果不仅可以明确山西省苹果潜隐病毒的分子变异、侵染流行、毒力状况,而且基于上述研制的多重免疫胶体金试纸条能准确、快速的诊断苗木、砧木是否带毒,将有效控制该类病引发毒病的传播流行,提高苹果生产数量 and 产品质量。

## 附图说明

[0022] 图1 ASPV在山西11个苹果产区的RT-PCR检测结果;

[0023] 图2 ACLSV在山西11个主要苹果产区的RT-PCR检测结果;

[0024] 图3 ASGV在山西11个主要苹果产区的RT-PCR检测结果;

[0025] 图4 提取的苹果叶片总RNA;

[0026] 图5是SDS-PAGE电泳检测BL-PE-ASGV-CP蛋白的表达;

[0027] 图6是SDS-PAGE电泳检测ASPV-CP蛋白表达;

[0028] 图7是SDS-PAGE电泳检测ACLSC-CP的表达;

[0029] 图8是SDS-PAGE检测ACLSV-CP、ASPV-CP和ASGV-CP纯化效果图;

[0030] 图9是特异性检测结果图。

[0031] 图5中:1:未经1PTG诱导的样品;2-4:分别经1PTG诱导2h、4h、6h的样品;M:蛋白Marker;

[0032] 图6中:1:未经1PTG诱导的样品;2-4:分别经1PTG诱导2h、4h、6h的样品;M:蛋白Marker;

[0033] 图7中:未经1PTG诱导的样品;2-4:分别经1PTG诱导2h、4h、6h的样品;M:蛋白Marker;

[0034] 图8中:1-3:ACLSV-CP未诱导样品、诱导样品、纯化后样品;4-6:ASPV-CP未诱导样品、诱导样品、纯化后样品;7-9:ASGV-CP未诱导样品、诱导样品、纯化后样品;M:蛋白Marker;

### 具体实施方式

[0035] 下面结合附图对本发明作进一步说明:

[0036] 本发明包括以下步骤:

[0037] (1) 器皿清洁:

[0038] 要用的所有玻璃器皿在流水下洗干净,放置到酸液中(重铬酸钾100g,浓硫酸50ml,加蒸馏水至1000ml)浸泡24h,用自来水反复冲刷,然后使用蒸馏水浸泡24h,用超纯水洗涤三次,再次使用超纯水浸泡72h,烤箱中干燥后备用;在配制试剂时一定要保持严格的纯净,所有试剂都要使用ddH<sub>2</sub>O配制;

[0039] (2) 胶体金制备:

[0040] 取1%氯金酸水溶液1ml,加99ml超纯水,加热到沸腾,一边搅一边一次性快速滴加1.8ml新鲜配置的1%柠檬酸三钠水溶液,溶液颜色从黄逐渐转为紫红,再在沸水中加热3~5分钟,冷却到室温,加超纯水至原体积,4℃环境下保存备用,避免光照;

[0041] (3) 金标抗体的制备:

[0042] 将待标记抗体提前把0.005mol/l pH7.0的NaCl溶液中4℃透析过夜,从而除去多余的盐离子,10000rpm 4℃离心30分钟,去除聚合物;

[0043] 测定待标记抗体最适用量:用0.1mol/l的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液调胶体金溶液的pH值到8.5,分装10管,每管1ml,分别滴加2μl、4μl、6μl、8μl、10μl、20μl抗体,充分混合均匀后每管滴加10% (m/v) 的NaCl溶液0.1ml;另设对照管,即1ml胶体金中只加0.1ml 10%的NaCl溶液,混合均匀后放置2小时,观察结果;用0.1mol/l的K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将胶体金溶液的pH值调至8.5;搅动过程中,向金溶胶内滴加最佳标记含量的抗体,均匀搅动2~3分钟;滴加10%的BSA作为稳定剂,使其终浓度为1%,继续搅拌15分钟,4℃保存备用;

[0044] 将金标抗体溶液在1200rpm、4℃离心10分钟从而清除其中的胶体金聚合物,取上清液,再用14000rpm、4℃离心50分钟,可见离心物分成3层,上清液中含有还没有结合的抗体,没有结合的胶体金颗粒聚合物在最底层形成深黑色斑点,中部紫红色絮状沉淀是良好结合的胶体金-抗体复合物;弃去上清,把紫红色絮状沉淀溶于1/10原体积的含1%BSA的PBS缓冲液(0.01mol/l, pH8.2)中,4℃保存备用;

[0045] (4) 试纸条的组装:

[0046] 将裁剪好的玻璃纤维膜放入含1%BSA的0.01mol/l的PBS中封闭1h,待自然晾干后,将适当稀释过的不同金标抗体等体积混合后均匀滴加在玻璃纤维膜上至饱和,37℃

烘箱中烘干备用；

[0047] 分别取已经纯化过的抗体和羊抗兔抗体用PBST缓冲液进行一定的稀释,分别在硝酸纤维素膜上滴加样品于T线和C线上,室温晾干后,放在封闭溶液里,37℃环境中进行1h孵化培育,用PBST缓冲液洗2次,每次5分钟,在正常室内温度晾干保存;

[0048] 抗体固相硝酸纤维素膜、滤纸、金标抗体结合释放垫、样品垫按照顺序安在PVC板上,相互间留1~2mm的重叠,用力压紧,避免产生气泡;4℃避光干燥保存;

[0049] (5) 试纸条检测:

[0050] 取经RT-PCR验证过的感染病毒的苹果叶片,称重后放在干净研钵中,依照1:10 (m/v) 的比例滴加PBST,进行研磨并成为匀浆,2000rpm离心10分钟,取上清液作为样品分别用试纸条检验,再把相同量的样本混合均匀,拿试纸条检验。

[0051] 研究材料与方法

[0052] 样品采集

[0053] 2015年至2016年的4-6月份,进行样品采集。具体采集方法为:每个地区一种树龄采集4个果园,每个地区共采集12个果园,每个果园随机选取4棵苹果树,每棵苹果树上随机选取一根枝条,采摘全部叶片,分成两份分保存在塑料袋中,用记号笔标记好采样的树龄,地点和时间,存放在-80℃,一份用于血清学检测,一份用于分子实验。

[0054] 血清学检测

[0055] 使用双抗体夹心法 (DAS-ELISA) 对三类潜隐性病毒 (ACLSV/ASPV/ASGV) 采取血清学检验。其中,ACLSV与ASGV的ELISA试剂盒从安德珍生物技术(北京)有限公司购买,ASPV的ELISA试剂盒从美国ACD公司购买。

[0056] DAS-ELISA需要用到的试剂及配方

[0057] (1) 包被抗体:使用试剂盒中提供的相应病毒的包被抗体。

[0058] (2) 酶标抗体:使用试剂盒中提供的相应病毒的酶标抗体。

[0059] (3) 底物:对硝基苯磷酸钠

[0060] (4) 包被缓冲液 (50ml):碳酸钠 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,0.075g;碳酸氢钠 $\text{NaHCO}_3$ ,0.1465g;蒸馏水定容至50ml,4℃储存。

[0061] (5) 样品提取缓冲液:亚硫酸钠 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,1.3g;聚乙烯吡咯烷酮PVP,20g;溶于1000ml洗涤缓冲液 (PBST) 中。

[0062] (6) 洗涤缓冲液 (PBST):氯化钠 $\text{NaCl}$ ,8.0g;磷酸氢二钠(十二水) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,2.9g;磷酸二氢钾 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.2g;氯化钾 $\text{KCl}$ ,0.2g;Tween20,0.5ml;溶于1000ml蒸馏水中。

[0063] (7) 酶标稀释缓冲液:向50ml的PBST中滴加牛血清白蛋白 (BSA) 0.1g;PVP 1.0g。

[0064] (8) 底物缓冲液:将0.005g对硝基苯磷酸钠滴加40ml的蒸馏水里,使用HCl调pH到9.8,蒸馏水定容到50ml,在4℃环境下存放。

[0065] DAS-ELISA检测

[0066] (1) 包被抗体

[0067] 依照说明,用包被缓冲液稀释,滴加到酶联板小孔里,100 $\mu\text{l}$ 一个孔,加上盖子,在37℃环境下进行2小时孵育,清空孔中溶液、使用PBST进行3次洗涤,每一次洗涤3分钟。

[0068] (2) 样品制备

[0069] 依照1:1 (重量:体积) 把待测样品加进抽提的缓冲液中,把样品进行研磨直至成浆

液,2000rpm离心10分钟,上清液即为制备成功的检测样品。用相适应的处理方法或依照说明书进行阴性/阳性对照。

[0070] (3) 加样

[0071] 滴加制备成功的检测样品、阴性(与阳性)对照。每孔滴加100 $\mu$ l,盖上盖子,放在4 $^{\circ}$ C冰箱里培育,并把酶联板彻底清洁干净,再用蒸馏水冲洗3次,拿PBST进行1次冲洗,每一次进行进行3分钟。

[0072] (4) 加酶标抗体

[0073] 在酶联板中滴加已稀释酶标抗体,每孔滴加100 $\mu$ l,加上盖子,在37 $^{\circ}$ C环境下进行2小时或者4小时孵育,用自来水彻底冲洗酶联板,再分别用蒸馏水和PBST洗涤1次和3次,每一次洗涤3分钟。

[0074] (5) 加底物

[0075] 将所得的底物溶液滴到底物缓冲液里使得终浓度成为1mg/ml(注意:应当现配现用),在称取底物及用底物缓冲液溶解底物时,尽量避光。依照100 $\mu$ l一孔,滴加到酶联板中,用锡箔纸遮盖,避光温室培养。

[0076] (6) 读数

[0077] 在几个不一样的时间:30分钟、1h、2h、以及更长时间,用酶联仪处读取OD值,或用人眼观测显色结果。

[0078] 数据处理及结果判断

[0079] (1) 把OD<sub>405</sub>值进行对照(缓冲液孔、阴性/阳性对照孔),结果应在质量监控里。

[0080] A 缓冲液孔以及阴性对照孔测得OD<sub>405</sub>值大于0.05。如果阴性对照孔测定出OD<sub>405</sub>值小于0.05时,依照0.05计算。

[0081] B 阳性对照孔所测OD<sub>405</sub>/阴性对照孔所测OD<sub>405</sub>所得值大于510。

[0082] C 孔的重复性基本一致。

[0083] (2) 达到上述质量要求后,结果可按照下面判断:

[0084] A 样品所测OD<sub>405</sub>值/阴性对照所测OD<sub>405</sub>结果显然就大于2,那么结果就是阳性。

[0085] B 样品所测OD<sub>405</sub>/阴性对照所测OD<sub>405</sub>的结果位于阈值左右,可以确定是可疑样品,应该再做一次,或者用不一样的手段加以检验证明。

[0086] C 样品OD<sub>405</sub>/阴性对照OD<sub>405</sub>明显小于,可以确定为阴性。

[0087] (3) 如果不能达到上述质量要求,那么不能用2进行结果判断。

[0088] 苹果叶片总RNA及RT-PCR

[0089] 苯酚-氯仿方法提取苹果叶片总RNA

[0090] (1) 取无RNase的1.5mL离心管,向管中分别滴加500 $\mu$ L RNA抽提液,250 $\mu$ L氯仿:异戊醇(24:1),250 $\mu$ L水饱和酚(pH=7.5)盖好离心管盖,在冰上保存备用;

[0091] (2) -80 $^{\circ}$ C冰箱的拿出一定量的样品,放进已冷好的研钵里,放适量的液氮,拿研棒快速研磨样品;

[0092] (3) 用预冷的药匙迅速将研钵中的粉末滴加到步骤(1)准备的离心管中,盖好离心管盖,快速摇晃离心管,并放在漩涡震荡仪上漩涡震荡1分钟,室温静置5分钟;

[0093] (4) 放到预先低温处理的离心机中,4 $^{\circ}$ C 1,2000rpm离心15分钟;

[0094] (5) 吸取上清液400 $\mu$ L到没有RNase 1.5mL离心管里,拿100 $\mu$ L量程的移液枪分4

次提取,吸取上清液的时候要快而稳,避免将下层的杂质吸入,滴加250 $\mu$ L氯仿:异戊醇(24:1),250 $\mu$ L水饱和酚(pH=7.5)盖好离心管盖;漩涡震荡仪上剧烈震荡30s,室内温度中静置5分钟,放到预先低温处理离心机中,4 $^{\circ}$ C环境中转速1,2000离心15分钟;

[0095] (6) 使用50 $\mu$ L的移液枪吸取上清液,分4次,共200 $\mu$ L滴加到没有RNase的1.5mL离心管内,滴加200 $\mu$ L异丙醇,轻轻晃动离心管,待管里液体呈透明状态时,将离心管放置在-40 $^{\circ}$ C沉淀30分钟;或者-20 $^{\circ}$ C沉淀2h;

[0096] (7) 沉淀结束后,把离心管放在4 $^{\circ}$ C离心机,转速1,2000离心15分钟;

[0097] (8) 倒掉上清液,用冰置的70%乙醇,200 $\mu$ L洗涤沉淀;随后4 $^{\circ}$ C,1,2000rpm离心5分钟;

[0098] (9) 重复步骤一次。

[0099] (10) 倒掉上清液,用10 $\mu$ L的移液器小心吸取残留的液体,随后将离心管敞口放置在超净工作台里,通风模式下吹5分钟,散去多余的乙醇。

[0100] (11) 吹干后,向离心管中滴加灭活的DEPC水30~50 $\mu$ L,直接用于后续实验或保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0101] 反转录扩增

[0102] 本实验使用的SuperRT cDNA第一链合成试剂盒是北京康为世纪生物科技有限公司生产的用以提取的苹果叶片样品RNA为模板进行体外反转录扩增,具

[0103] 体操作步骤如下:

[0104] 依照照下表1所示,将反转录试剂迅速滴加200 $\mu$ L无RNase的离心,离心、

[0105] 表1:反转录体系混匀。

	试剂	体积
	dNTP Mix, 2.5 mM Each	2 $\mu$ L
[0106]	Primer Mix	2 $\mu$ L
	RNA Template	9 $\mu$ L
	RNase - Free Water	5 $\mu$ L
	总体积	18 $\mu$ L

[0107] 把加完试剂的无RNase的离心管放在70 $^{\circ}$ C环境进行5分钟孵育,再进行5分钟冰浴。

[0108] 对上述离心管中分别滴加以下试剂:5 $\times$ RT Buffer,5 $\mu$ L;SuperRT (200U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L;使用1 $\mu$ L RNA酶的抑制剂,短时间快速离心混匀,依照照一下描述程序进行反转录反应:42 $^{\circ}$ C孵育1h,70 $^{\circ}$ C 10分钟,10 $^{\circ}$ C for ever。

[0109] 反应结束后,产物直接在PCR扩增反应使用或者保存在-20 $^{\circ}$ C环境下保存。

[0110] PCR扩增三种苹果病毒的外壳蛋白

[0111] 本实验使用的PCR-MIX北京康为世纪生物科技有限公司生产的,对得到采集样品的cDNA进行PCR扩增反应,反应体系及反应程序如表2所示:

[0112] 表2:PCR扩增体系



	试剂	体积
	cDNA	2 $\mu$ L
	10 $\times$ MIX	12.5 $\mu$ L
[0113]	上游引物	1 $\mu$ L
	下游引物	1 $\mu$ L
	DDW	8.5 $\mu$ L
	总体积	25 $\mu$ L

[0114] PCR反应的程序是:95 $^{\circ}$ C,3分钟;94 $^{\circ}$ C,30s;退火温度56 $^{\circ}$ C,30s;72 $^{\circ}$ C,30s;35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10分钟;10 $^{\circ}$ C,10分钟。PCR反应结束后,用PCR产物3 $\mu$ L,在1 $\times$ TAE buffer中进行电泳检验,电压是130V,恒压;电泳时间大约是25分钟,电泳完成后把琼脂糖凝胶投入EB染液中染色5分钟,放在紫外灯环境中。观察电泳结果并照相保存。

[0115] 三种苹果病毒的外壳蛋白基因序列测定

[0116] 阳性PCR产物回收

[0117] 采用北京百泰克生物技术有限公司(Biotek)生产的琼脂糖凝胶回收试剂盒对经琼脂糖凝胶电泳鉴定为阳性的PCR产物进行回收,详细的操作步骤如下所示:

[0118] (1)紫外灯环境中把目标条带使用刀片取出,置于称过重量的1.5mL离心管内;称重,计算出回收胶块的重量;

[0119] (2)依照照1:1(g:mL)向离心管中滴加溶胶结合液,65 $^{\circ}$ C水浴3~5分钟,期间反复上下翻动离心管,从而使得胶块融化速度加快;

[0120] (3)等到胶块全部融化,把溶液移动到吸附管里,往该离心吸附柱里放700 $\mu$ L漂洗液(加无水乙醇),在正常室内温度中转速1,2000离心1分钟;倒掉废液;

[0121] (4)重复步骤一次;

[0122] (5)室温1,2000rpm,空离心2分钟,倒掉废液;

[0123] (6)把吸附柱放在1.5mL离心管里,干燥5分钟;

[0124] (7)把吸附柱里滴加35 $\mu$ LEB洗脱液,室内温度环境下静置2分钟,转速1,2000,离心1分钟。离心管底部液体即为目标产物。

[0125] 回收产物的连接和转化

[0126] 回收产物的连接

[0127] 使用的连接试剂盒是宝生物工程(大连)有限公司的,能对回收产物进行连接反应,连接体系如下表3所示:

[0128] 表3:连接体系

	试剂	体系
	2×Rapid Ligation Buffer	5 μL
[0129]	pGEM - T Easy Vector	1 μL
	T4 DNA Ligase	1 μL
	回收产物	3 μL
	总体积	10 μL

[0130] 4℃过夜连接。

[0131] 回收产物的转化

[0132] 将连接完成的产物依照照如下步骤转入到大肠杆菌中：

[0133] (1) 拿存放在-80℃感受态细胞，放在冰袋环境里融化；

[0134] (2) 把连接好产物滴加到已融化感受态细胞，拿移液器吸打混合均匀，冰盒中放置30分钟；

[0135] (3) 将混合液放在42℃的水浴锅进行热激90s，冰浴5分钟；

[0136] (4) 拿无菌的1.5mL离心管，将混合液转入其中，滴加200μL LB液体培养基，37℃180rpm摇床培养60~90分钟；

[0137] (5) 拿50μL转化液，均匀涂布于LB固体皿(氨苄抗性)，37℃培养箱里放置过夜。

[0138] 转化产物的筛选

[0139] 转化完成的产物在筛选出阳性菌落，操作步骤如下所示：

[0140] (1) 无菌1.5mL离心管中依次滴加LB液体培养基和抗生素(氨苄)且依照照1:1000的比例；

[0141] (2) 拿无菌的牙签挑出大小均匀的菌斑，将挑取的白色菌落滴加上述无菌的1.5mL离心管，一个离心管中培养一菌落；37℃摇菌，220rpm，过夜培养。

[0142] (4) PCR验证摇好。

[0143] 序列测定

[0144] 经PCR检测为阳性的菌液，依照照菌液:50%甘油=1:1放在灭菌的1.5ml离心管里，测序。

[0145] 目的基因的诱导表达

[0146] 检测目的蛋白的表达情况

[0147] 按照1:100把含有表达载体液通至Kan是0.1%10ml培养基里，37℃环境里进行振荡活化操作3h；取1.5ml菌液作为未诱导对照组，其余菌液里滴加30μl 0.1mol/L的IPTG，继续振荡，每隔2小时就吸取1.5ml到离心管，共提3次。转速12000离心2分钟后再提取沉淀，滴加75μl超纯水和相同量的2×上样缓冲液，煮沸10分钟，12000rpm离心3分钟，取上清液进行SDS-PAGE。

[0148] SDS-PAGE运用不连续系统，分离胶浓度是10%，浓缩胶浓度是5%，上样量10μl；电泳时浓缩胶的稳压为80V，分离胶稳压150V；待样品前沿距胶底部1cm时，停止电泳并剥胶，用0.05%考马斯亮蓝染色30分钟，清水中煮沸3次，浸泡一整夜的脱色。

[0149] 1.4.2检测目的蛋白是否形成包涵体

[0150] 以1:100的比例将含有表达载体BL21液通至Kan含量是0.1%LB培养基里,37℃振荡活化3h后滴加相应量的0.1mol/L的IPTG,继续振荡培养6h;取2ml诱导液到离心管里,转速5000离心10分钟,除去上清液,沉淀重新悬于200 $\mu$ L PBS中;超声裂解12分钟后转速12000离心30分钟,分离沉淀与上清液,其中沉淀重悬于200 $\mu$ L 1 $\times$ 上样缓冲液中加热沸腾10分钟,上清液依照1:3溶于1 $\times$ 上样缓冲液中,分别进行SDS-PAGE。

[0151] 目的蛋白的纯化

[0152] (1) 依照1.4.1探索条件在100mlLB培养基里表达目的蛋白;

[0153] (2) 两次拿诱导液于同一50ml离心管里转速5000并离心10分钟,除去上清液,沉淀中滴加10ml PBS重悬后超声破碎12分钟,12000rpm离心10分钟,弃上清液;

[0154] (3) 滴加20ml buffer B,室温下摇动45分钟,至沉淀大部分溶解,转速12000离心30分钟,使用上清液,用0.22 $\mu$ m的滤膜经过滤过后为蛋白样品,准备用AKTA蛋白纯化层析系统过镍离子亲和层析柱进行纯化;

[0155] (4) 用20倍柱体积的buffer B平衡亲和层析柱;

[0156] (5) 上样;

[0157] (6) 用buffer E和buffer B依照1:24混合后清洗杂蛋白;

[0158] (7) 用buffer E洗脱目的蛋白;

[0159] (8) 电透析:把透析袋剪成10~20cm的适当长度小段,在2% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>和1mmol/L EDTA (pH8.0) 等量混合液中煮沸10分钟,使用蒸馏水清洁,1mmol/L EDTA (pH8.0) 中进行10分钟加热,温度下降以后保持浸没状态存储于4℃,拿前灌ddH<sub>2</sub>O清洗,透析袋一边夹紧之后滴加等待去进行透析的蛋白溶液,并夹紧另一边,浸没于放有0.1mol/L PBS缓冲液的水平电泳槽里,45V恒压进行45分钟反应,立即反向作用45sec;

[0160] (9) 检测目标蛋白溶液的OD值,确定纯化蛋白的浓度。

[0161] (10) SDS-PAGE检测蛋白纯化的效果,方法同。。

[0162] (11) -20℃冻存目的蛋白备用。

[0163] 多克隆抗体的制备

[0164] 抗血清的制备

[0165] 取目标蛋白溶液1ml (0.5~1.2mg),初次免疫滴加体积相同的弗氏完全佐剂,加强免疫滴加相同量的弗氏不完全佐剂,漩涡震荡充分混匀乳化,直至转速1000离心1分钟液体不再有多层出现为止,家兔背部皮下多点注射。初次免疫后30天进行3次加强免疫,每次间隔七天,最后的免疫1周后进行心脏血样采集,37℃放置1h,4℃过夜,3000rpm离心5分钟获得抗血清,滴加NaN<sub>3</sub>至0.1% (w/v),-20℃保存。

[0166] 1.5.2琼脂双扩散法测定抗血清效价

[0167] 把琼脂粉高温溶解,倒到培养皿中冷却,使用打孔器打出“梅花形”小孔(7个一组),每个孔直径0.3cm,两孔间距0.4cm。把纯化的蛋白溶液滴加到中间孔中,周围孔中分别滴加不同倍数的抗血清,每孔50 $\mu$ L,放在保湿盒中37℃,24h,查看沉淀线判定抗血清效价。

[0168] 多克隆抗体的纯化

[0169] (1) 抗血清用binding buffer依照1:1稀释;

[0170] (2) 上清液经过0.22 $\mu$ m滤膜滤过,以方便上样过蛋白A柱;

- [0171] (4) 使用A) 稀释后的样品4℃,10000rpm离心10分钟;
- [0172] (3) 把KTA蛋白纯化层析系统用蛋白A柱进行;
- [0173] (5) 拿20倍柱体积的binding buffer平衡亲和层析柱;
- [0174] (6) 上样;
- [0175] (7) 用10倍柱体积的binding buffer清洗杂蛋白;
- [0176] (8) 用洗脱buffer洗脱目的蛋白,收集目的抗体,测定OD值得到纯化抗体的浓度。

#### [0177] 结果与分析

#### [0178] 山西11个苹果主产区的三种潜隐性病毒发生情况

##### [0179] (1) ASPV的发生情况

[0180] 对RT-PCR的检测结果显示,ASPV在平遥、临汾市区这两个产区的发生率最高,都在50%以上;运城市区、霍州、襄汾、新绛和曲沃这5个产区的发生率居中,在40%-50%之间;万荣、吉县、平陆和临猗这4个产区的发生率最低,在40%以下(图1)。

##### [0181] (2) ACLSV的发生情况

[0182] 对RT-PCR的检测结果显示,ACLSV在山西11个主要苹果产区的发生率都比较高,其中,ACLSV在运城市区、万荣、霍州、曲沃、吉县和临猗这6个地区的发生率都在60%以上;在襄汾、新绛和平陆这3个地区发生率在50%-60%之间;在平遥和临汾这2个地区,ACLSV的发生率最低,低于50%(图2)。

##### [0183] (3) ASGV的发生情况

[0184] 对RT-PCR的检测结果显示,ASGV在山西11个主要苹果产区的发生率普遍比较高,发生率都在50%之上。其中,运城市区、霍州、襄汾、平遥和临汾的发生率最高,都在70%之上;新绛、曲沃、吉县和临猗的发生率在60%-70%之间;万荣和平陆这2个产区的ASGV发生率在60%之下,分别是56.53%和51.38%(图3)。

#### [0185] 植物总RNA电泳检测结果

[0186] 采用提取液中滴加 $\beta$ -巯基乙醇的方法提取苹果叶片总RNA,在RNA沉淀时,采用-40℃沉淀30分钟和-20℃沉淀2h分别对提取的RNA进行沉淀,凝胶电泳检测图中,可以清晰的看到:28S、18S和5S三个条带,其中28S带亮度2倍于18S(图4)。

#### [0187] 目标蛋白的诱导表达与纯化结果

[0188] 将含有表达载体菌株BL-PE-ASGV-CP、BL-PE-ASPV-CP和BL-PE-ACLSV-CP活化3h后,1PTG诱导培养6h,每2h取样,离心后上清液经SDS-PAGE分析,诱导的菌株分别产生了约32kD(图5)、37kD(图6)和22kD(图7)的目标蛋白,未经诱导的菌株未产生此条带。

[0189] 大量表达的蛋白用AKTA蛋白纯化层析系统经Ni离子亲和层析纯化,纯化产物并进行了透析,经SDS-PAGE确认为纯化的蛋白(图8),最终纯化蛋白的浓度为:ASGV-CP为1.1mg/ml;ACLSV-CP为0.5mg/ml;ASPV-CP为1.4mg/ml。抗血清的制备、效价测定与抗体纯化结果

[0190] 分别用诱导表达并纯化的ACLSV-CP、ASGV-CP、ASPV-CP三种蛋白各免疫一只家兔,并经3次加强免疫后取血,获得了抗血清。用琼脂双扩散法测定了3份效价,其中ASGV的抗性血清与纯化蛋白未出现任何沉淀带,效价为0,ASPV抗血清和ACLSV抗血清效价均为8。

[0191] 利用AKTA蛋白纯化系统过蛋白A柱纯化ASPV抗血清和ACLSV抗血清的抗体,纯化产物测定OD值得其浓度,其中ASPV抗体为0.7mg/ml,ACLSV抗体为0.6mg/ml。

#### [0192] 试纸条检测结果

[0193] 依照纪玲玲(2008)的方法制备了胶体金,将胶体金分别与ASPV抗体和ACLSV抗体结合制备了金标抗体,组装成了ACLSV/ASPV多重检测检测试纸条、ASPV/ASGV多重检测检测试纸条、ACLSV/ASGV多重检测检测试纸条。分别用试纸条检测大田病株汁液,健康苹果叶片汁液作为对照,病株汁液对应检测试纸条均显示出明显的特异性条带(图9)。第1条检测试纸条表明,样品分别含有ACLSV和ASPV,为混合病毒侵染样品;第2条检测试纸条表明,样品分别含有ASPV和ASGV,为混合病毒侵染样品;第3条检测试纸条表明,样品分别仅含有ASGV,为单一病毒侵染样品;第4条检测试纸条表明健康苹果叶片不携带任何病毒。

[0194] 讨论与结论

[0195] 1ACLSV、ASPV和ASGV在山西苹果产区均有发生

[0196] 通过DAS-ELISA和RT-PCR相结合的方法,对150份苹果叶片样品进行检测,结果表明这三种潜隐性病毒在山西的12个苹果主产区都有分布,但是它们的发生率并没有呈现明显的地区分布。单一侵染情况中,苹果茎沟病毒(ASGV)发生率最高,是67.6%。在混合侵染中,三种同时受到感染的发生率最高,是17.8%。在不同树龄的样品中,树的年龄越大,三种潜隐性病毒的发生情况越严重。

[0197] ACLSV、ASPV和ASGV多重检测试纸条的研制

[0198] 若制备高质量免疫血清,首先需要合适的抗原材料。目前,获得抗原的方法主要有两种,即以提纯病毒粒子作为抗原和以用分子生物学方法表达纯化的蛋白作为抗原。

[0199] 提纯病毒粒子作为抗原是制备抗血清的传统手段,但是由于寄主体里的病毒量较低,需要足够的毒源才能得到足够的材料,且分离提纯对实验仪器的要求很高。最为关键的是,用该方法获得的大量的抗原很难保证其有很高的纯度,常含有寄主植物的蛋白,用此混合蛋白制备的抗血清进行免疫检测,出现假阳性的风险会很大。

[0200] 本文所用抗原蛋白是用原核表达系统得到的病毒外壳蛋白亚基。用原核表达的方法获得抗原蛋白,只需要少量的病毒基因组RNA作为原始材料,再利用常规的分子生物学方法即可完成,它有生产数量高、所用成本低、生产所需时间短的优势,特别适合实验室操作。另外,原核表达载体构建成功后可以永久保存,并且随时可以在任何实验单位进行诱导表达。但是,也应注意到,原核表达并纯化的病毒外壳蛋白亚基并不能等同于整个病毒粒子的蛋白外壳,因此,其免疫性与自然状态下的病毒粒子或许存在差异,会给免疫检测带来假阴性的风险。

[0201] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征及本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

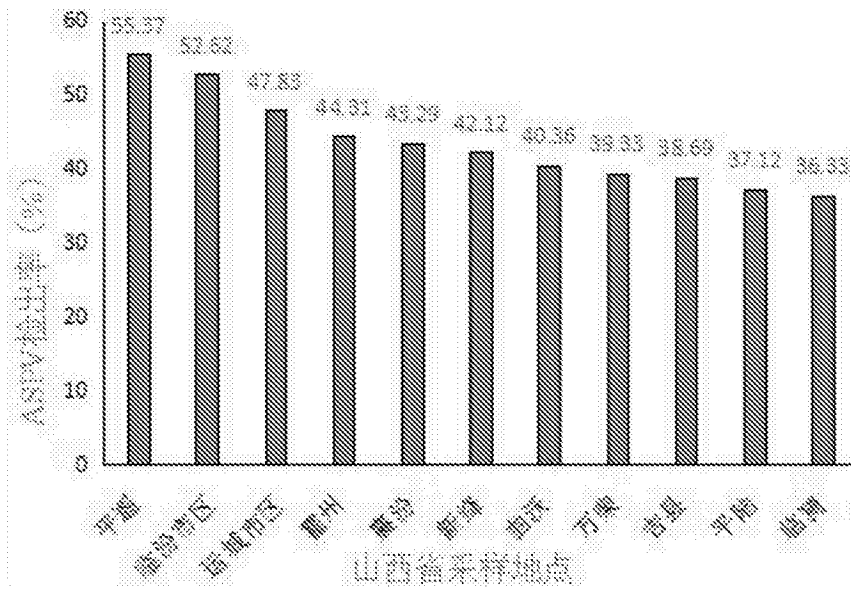


图1

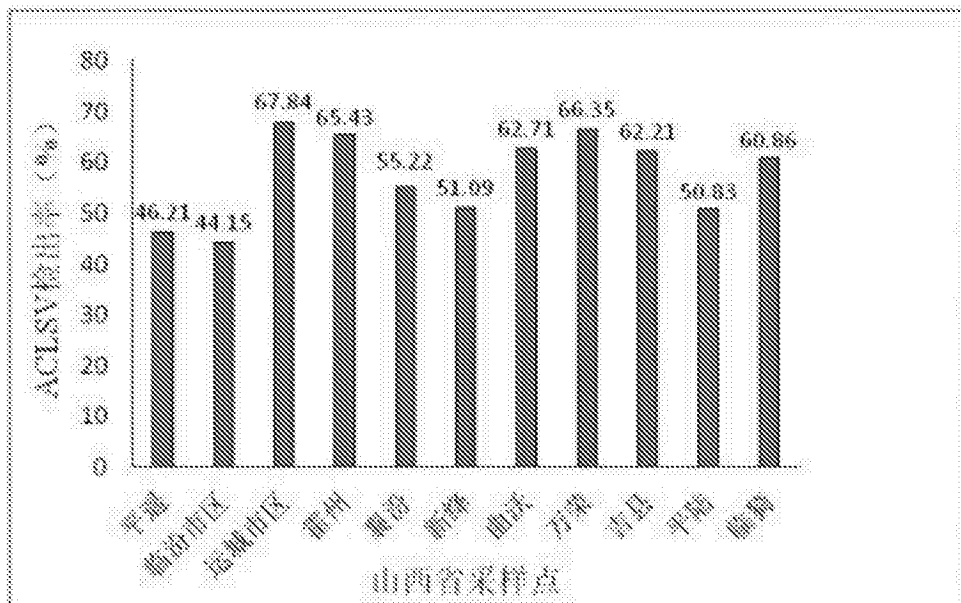


图2

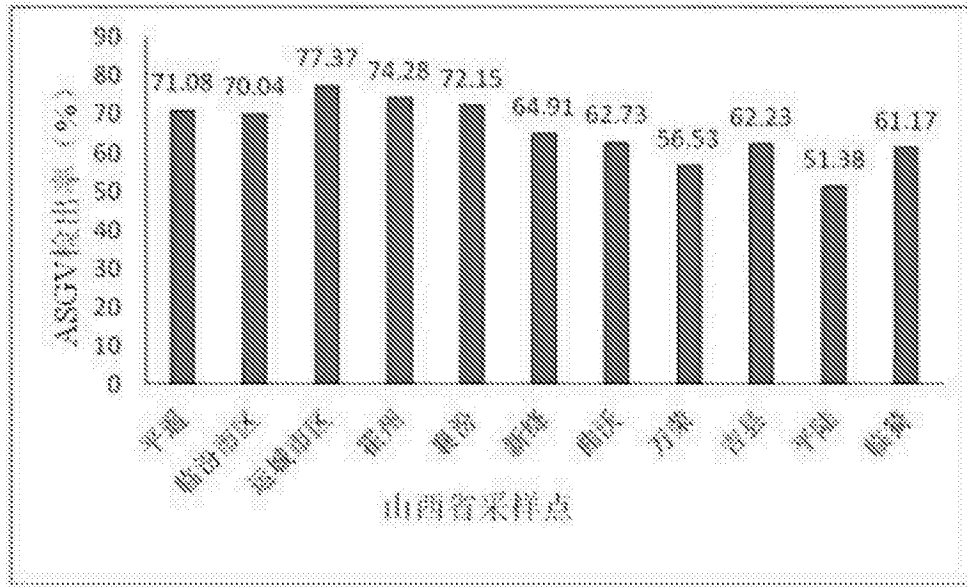


图3

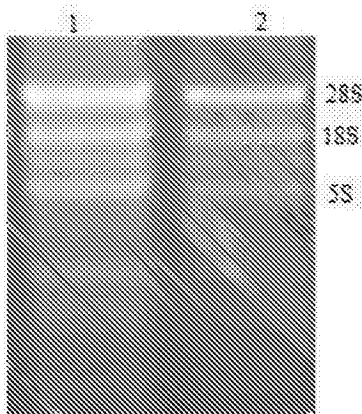


图4

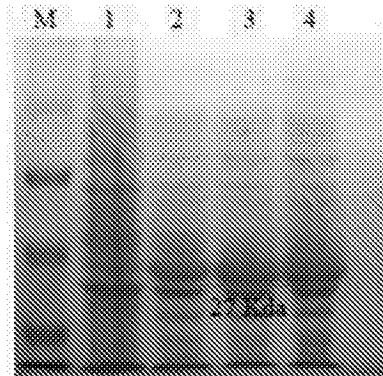


图5

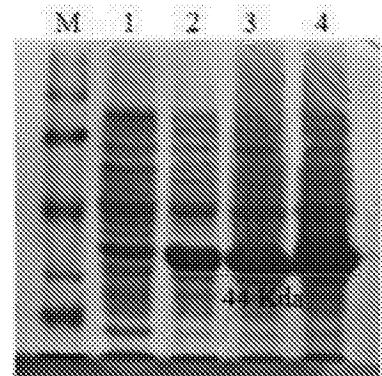


图6

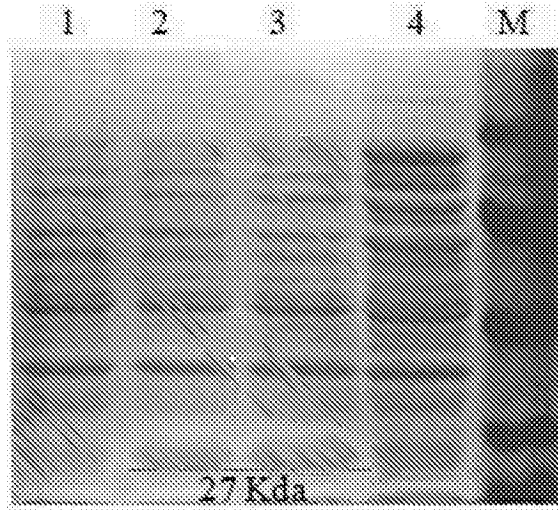


图7

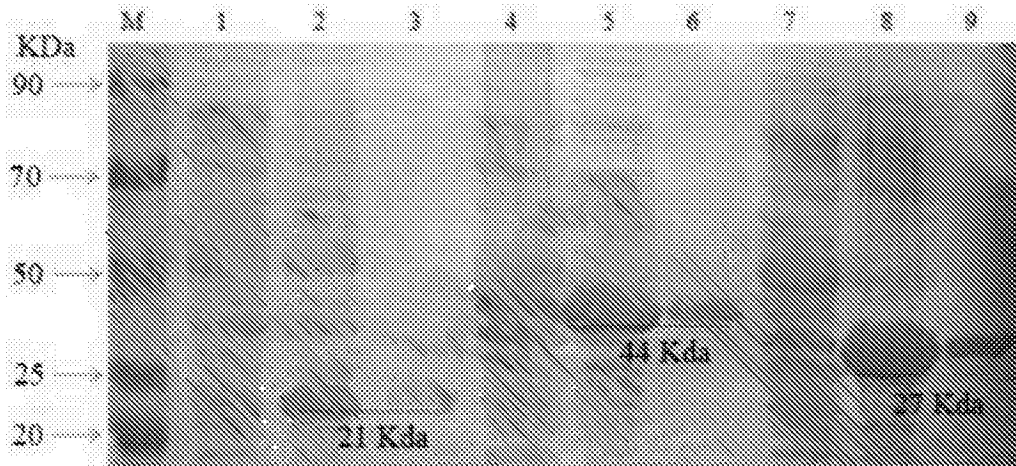


图8



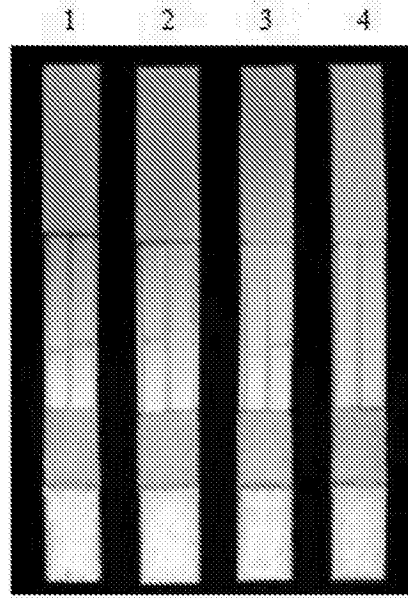


图9

专利名称(译)	苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106596935A</a>	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201611222794.1	申请日	2016-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	山西师范大学		
申请(专利权)人(译)	山西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	山西师范大学		
[标]发明人	陈伟 王圣楠 蔡华成 郭瑞珍		
发明人	陈伟 樊泽璐 王圣楠 杨延祯 蔡华成 王祎玲 郭瑞珍		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种苹果潜隐病毒多重免疫胶体金检测试纸条的制备方法，与现有技术相比，本发明旨在创制一种能够用以快速、特异、简便的检测苹果主要潜隐病毒的全新手段。研究成果不仅可以明确山西省苹果潜隐病毒的分子变异、侵染流行、毒力状况，而且基于上述研制的多重免疫胶体金试纸条能准确、快速的诊断苗木、砧木是否带毒，将有效控制该类病引发毒病的传播流行，提高苹果生产数量 and 产品质量。

