



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108051593 B

(45)授权公告日 2020.06.02

(21)申请号 201711292384.9

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.12.08

C12N 15/31(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 16/12(2006.01)

申请公布号 CN 108051593 A

C07K 16/06(2006.01)

(43)申请公布日 2018.05.18

审查员 赵晓明

(73)专利权人 山东省农业科学院植物保护研究所

地址 250000 山东省济南市工业北路202号

(72)发明人 高瑞 王洁 杨淑珂 李凡
路兴波

(74)专利代理机构 济南誉琨知识产权代理事务所(普通合伙) 37278

代理人 庞庆芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图1页

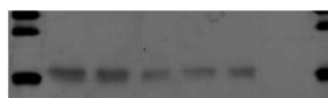
(54)发明名称

特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒

(57)摘要

本发明属于枣疯植原体检测领域,尤其涉及特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒。本发明所提供的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体主要应用于枣疯病的检测,其制备方法包括以下有效步骤:
a、从感染枣疯植原体的枣树总DNA中克隆获得枣疯植原体的免疫膜蛋白基因序列,预测免疫膜蛋白的氨基酸序列,选取C端表位暴露性较好的47-152aa区域进行蛋白表达,进行标签纯化;b、标签纯化后,将选取的蛋白与不完全弗氏佐剂混合免疫大耳白兔,采集兔子血液,经抗原亲和纯化获得枣疯植原体免疫膜蛋白的多克隆抗体。本发明所提供的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体在枣疯病的检测中,具有显著的特异性,确保了检测的准确性。

M 1 2 3 4 5 6 M



1. 一种特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下有效步骤:

a、从感染枣疯植原体的枣树总DNA中克隆获得枣疯植原体的免疫膜蛋白基因序列;预测免疫膜蛋白的氨基酸序列;选取枣疯植原体的免疫蛋白基因序列如SEQ ID NO:1所示C端表位暴露性较好的47-152aa区域进行蛋白表达,进行标签纯化;

b、标签纯化后,将选取的蛋白与不完全弗氏佐剂混合免疫大耳白兔,采集兔子血液,经抗原亲和纯化获得枣疯植原体免疫膜蛋白的多克隆抗体。

2. 上述权利1所述的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的应用试剂盒,其特征在于,包括以下有效成分:

| | |
|--------------------|-------|
| 枣疯植原体免疫膜蛋白多克隆抗体 | 10uL |
| 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 | 10uL |
| 牛血清蛋白 | 1mL |
| 抗原蛋白 | 0.5mL |
| 96 孔酶标板 | 1 块 |
| 20X 抗原包被缓冲液 | 20mL |
| 20X 洗涤缓冲液 | 100mL |
| 脱脂奶粉 | 15g |
| 20X 封闭缓冲液 | 50 mL |
| 碱性磷酸酯酶底物显色液 | 20ml |
| 2ml EP 管 | 100 个 |
| 研磨棒 | 100 个 |
| 直径为 0.2-0.7cm 的小钢珠 | 50 颗。 |

3. 上述权利要求2所述的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的应用试剂盒的应用方法,其特征在于,包括以下有效步骤:

A. 样品处理:将疑似病样按照1:10的比例加入抗原包被缓冲液,研磨后取上清作为检测样品备用;

B. 样品包被:取150 μ L稀释的检测样品液加入96孔酶标板中,以枣疯植原体阳性标准品为阳性对照,以健康枣树标准品为阴性对照,在4 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜或37 $^{\circ}$ C孵育1-2h;

C. 洗板:将酶联板迅速反扣,弃去孔中液体,每孔加入PBST液200 μ L,静置3-5min后迅速弃去孔中液体,并在吸水纸上扣打几下以尽量除去孔中液体,重复3次;

D. 封闭:去除酶标板中的PBST缓冲液,每孔加入150 μ L的封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1.5h;

E. 洗板:同步骤C;

F. 加一抗:用PBST稀释枣疯植原体免疫膜蛋白多克隆抗体至合适的工作浓度,每孔样品加150 μ L,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2h;

G. 洗板:同步骤C;

H. 加酶标抗体:每孔加入150 μ L PBST稀释的碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2h;

I. 洗板:同步骤C;

J. 底物显色:每孔加碱性磷酸酯酶显色液150 μ L;室温避光显色30-60min;酶联仪在405nm下读数,

K. 结果判定: $I/H = (\text{待测样品读数} - \text{空白读数}) / (\text{阴性样品的读数} - \text{空白读数}) \geq 3$ 判断为阳性反应;反之则为阴性。

4. 根据权利要求3所述的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的应用试剂盒的应用方法,其特征在于,所述A步骤中,疑似病样经研磨装置处理1min,8000rpm离心5min,取上清液用包被缓冲液稀释2倍备用。

5. 根据权利要求3所述的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的应用试剂盒的应用方法,其特征在于,所述A步骤中,将疑似病样用研磨棒研磨至样品呈糊状,静置15min,取上清液用抗原包被缓冲液稀释2倍备用。

6. 如权利要求1所述的一种特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体在枣疯病检测中应用。

特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于枣疯植原体检测领域,尤其涉及特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒。

背景技术

[0002] 枣树原产于我国,其栽培品种和野生酸枣资源极为丰富,是我国具有重要经济价值的特色果树树种之一。枣疯病是我国枣树上最严重的病害,也是世界上典型的植原体病害之一,其病原为枣疯植原体,属于榆树黄化16SrV-B亚组。

[0003] 植原体是一类无细胞壁、存在于植物筛管内的病原细菌,主要依靠叶蝉等从韧皮部取食的半翅目昆虫传播,也可由菟丝子和嫁接等传播,因此,植原体膜蛋白可能直接与昆虫或者植物细胞质的某些组分互作,免疫主导膜蛋白是植原体膜蛋白中的重要组分之一。植原体免疫主导膜蛋白承受着较大的选择压力,研究植原体免疫主导膜蛋白的多样性及功能,为进一步阐明植原体致病机制、抗病性鉴定及病害防治奠定基础。

[0004] 由于枣疯植原体不能离体培养,因而不能采用研究真菌、细菌的传统研究方法进行检测和鉴定。目前,枣疯植原体的检测主要依靠生物学测定(嫁接、症状类型等)、电镜观察、PCR检测技术。传统的症状观察依赖枣树枝叶的症状表现,主要依赖经验诊断,并无具体诊断数据支撑,仅能作为枣疯病植原体鉴定的形态学指标,而不能作为病原检测的主要方法;嫁接检测所需的等待时间过长,待检测结果确定,病害或已发病至中后期,不适用于大田生产的早期快速检测;电镜检查需要对感病组织做超薄切片、专业度高,并且依赖昂贵的电子显微镜检测,无法在农业生产实践中普及;PCR检测技术是一种基于核酸水平的检测技术,设计通用引物和特异性引物,通过PCR扩增检测植原体存在与否,具有较高的准确性和灵敏性,在学术研究、科研院所的实际检测方面起着重要作用,但专业度太高、操作复杂,成本高,检测结果容易受植物组织提取液的影响,假阳性或假阴性结果现象时有发生,另外,PCR技术操作过程繁琐、耗时长,完全依赖于PCR仪器和商业化的试剂,不适于田间的大规模病害检测。

[0005] 枣树感病后结果量减少,品质下降,通常2-3年内病树丧失产量并全株死亡。枣疯病几乎分布于国内主要枣树栽培区,每年造成死树高达千万株,直接经济损失达数亿元,已严重阻碍我国枣树产业的可持续发展。因此,我们亟需建立一种操作简单、成本低廉的枣疯植原体高效检测方法,方便工作人员田间病害调查快速检测,尤其是便于广大枣农或非专业人士快捷、易操作地发现病原、防止病害传播,保障农业生产的正常进行。

[0006] 因此,我们亟需建立一种操作简单、成本低廉的枣疯植原体高效检测方法,方便工作人员田间病害调查快速检测,尤其是便于广大枣农或非专业人士快捷、易操作地发现病原、防止病害传播,保障农业生产的正常进行。

发明内容

[0007] 本发明针对上述的枣疯病检测流程繁琐、检测成本高、检测技术难度大等技术问题，提出一种设计合理、方法简单、操作方便且无需专业知识即可检测出枣疯病的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备方法及其应用试剂盒。

[0008] 为了达到上述目的，本发明采用的技术方案为，本发明首次克隆到枣疯植原体免疫膜蛋白基因，其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 本发明还提供一种基于上述枣疯植原体免疫膜蛋白基因所制备的用于检测枣疯病的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体，其制备方法包括以下有效步骤：

[0010] a、从感染枣疯植原体的枣树总DNA中克隆获得枣疯植原体的免疫膜蛋白基因序列，预测免疫膜蛋白的氨基酸序列，选取C端表位暴露性较好的47-152aa 区域进行蛋白表达，进行标签纯化；

[0011] b、标签纯化后，将选取的蛋白与不完全弗氏佐剂混合免疫大耳白兔，采集兔子血液，经抗原亲和纯化获得枣疯植原体免疫膜蛋白的多克隆抗体。

[0012] 为了使特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体能够实现操作简单化，通俗化，本发明还提供了特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的应用试剂盒，该试剂盒包括以下有效成分：

| | |
|--|-------|
| 枣疯植原体免疫膜蛋白多克隆抗体 | 10uL |
| 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 | 10uL |
| 牛血清蛋白 | 1mL |
| 抗原蛋白 | 0.5mL |
| 96 孔酶标板 | 1 块 |
| 20X 抗原包被缓冲液 | 20mL |
| [0013] 20X 洗涤缓冲液 (0.02 mol/L PBST, pH 7.4) | 100mL |
| 脱脂奶粉 | 15g |
| 20X 封闭缓冲液 (PBST+5%脱脂奶粉) | 50 mL |
| 碱性磷酸酯酶底物显色液 | 20ml |
| 2ml EP 管 | 100 个 |
| 研磨棒 | 100 个 |
| 直径为 0.2-0.7cm 的小钢珠 | 50 颗 |

[0014] 本发明还提供了上述特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的应用试剂盒的应用方法，包括以下有效步骤：

[0015] A. 样品处理：将疑似病样按照1:10或1:100的比例加入抗原包被缓冲液，研磨后取上清备用；

[0016] B. 样品包被:取150 μ L稀释的检测样品液加入96孔酶标板中,以枣疯植原体阳性标准品为阳性对照,以健康枣树标准品为阴性对照,在4 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜或37 $^{\circ}$ C孵育1-2h;

[0017] C. 洗板:将酶联板迅速反扣,弃去孔中液体,每孔加入PBST液200 μ L,静置3-5min后迅速弃去孔中液体,并在吸水纸上扣打几下以尽量除去孔中液体,重复3次;

[0018] D. 封闭:去除酶标板中的PBST缓冲液,每孔加入150 μ L的封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1.5h;

[0019] E. 洗板:同步骤C;

[0020] F. 加一抗:用PBST稀释枣疯植原体免疫膜蛋白抗体(来源于兔)至合适的工作浓度(1:1000),每孔样品加150 μ L,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2h;

[0021] G. 洗板:同步骤C;

[0022] H. 加酶标抗体:每孔加入150 μ L PBST稀释的碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔(1:5000),37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2h;

[0023] I. 洗板:同步骤C;

[0024] J. 底物显色:每孔加底物溶液150 μ L;室温避光显色30-60min;酶联仪在405nm下读数。

[0025] K. 结果判定: $I/H = (\text{待测样品读数} - \text{空白读数}) / (\text{阴性样品的读数} - \text{空白读数}) \geq 3$ 判断为阳性反应;反之则为阴性。

[0026] 作为优选,所述A步骤中,疑似病样经研磨装置处理1min,8000rpm离心5min,取上清液用包被缓冲液稀释2倍备用。

[0027] 作为优选,所述A步骤中,将疑似病样用研磨棒研磨至样品呈糊状,静置15min,取上清液用抗原包被缓冲液稀释2倍备用。

[0028] 与现有技术相比,本发明的优点和积极效果在于,

[0029] 1、本发明通过提供一种特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体并使其应用在试剂盒中,进而使无专业技术人员也可以及时排查枣疯病病树病枝,并将其及时销毁、防止枣疯病传播,确保不发生重大枣生产质量安全,巩固当前农业农村经济形势,保障农民、保产、增产、增收。

[0030] 2、本发明所提供的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体在枣疯病的检测中,具有显著的特异性,进而避免了传统检测方法中极易出现的假阴性或假阳性的结果,确保了检测的准确性。

附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0032] 图1感染枣疯植原体不同枣树组织样品Western blotting检测结果示意图,

[0033] 其中,M为低分子量蛋白Marker;1为感病枣树的嫩叶组织检测结果;2为感病枣树的叶中脉组织检测结果;3,感病枣树的嫩枝组织检测结果;4,感病枣树的树皮韧皮部组织检测结果;5,感病枣树的根组织检测结果;6为健康枣树的嫩叶组织检测结果;

[0034] 图2感病样品进行1K-512K不同比例稀释的试剂盒检测酶联板反应结果示意图，
[0035] 其中，1为水作为空白对照组；2为健康枣树叶组织研磨上清液稀释1K倍作为阴性对照组；3为健康枣树叶组织研磨上清液稀释4K倍作为阴性对照组；4-12为感病枣树叶组织研磨上清液稀释1K-521K倍检测结果示意图；

具体实施方式

[0036] 为了能够更清楚地理解本发明的上述目的、特征和优点，下面结合附图和实施例对本发明做进一步说明。需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0037] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明，但是，本发明还可以采用不同于在此描述的方式来实施，因此，本发明并不限于下面公开说明书的具体实施例的限制。

[0038] 实施例1，本实施例一种用于检测枣疯病的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体

[0039] 为了制作枣疯病植原体免疫膜蛋白抗体，首先需要采集病原材料，在本实施例，前往枣树种植地区采集表现丛枝、小叶症状的枣疯病样品，通过16Sr RNA、rp和tuf基因测序表明样品确实含有枣疯植原体，这为后续得到枣疯植原体的序列做好病原基础。

[0040] 为了大量得到枣疯植原体免疫膜蛋白的基因序列，根据已报道的植原体免疫膜蛋白基因序列两侧的保守区域设计引物对进行枣疯病样品免疫膜蛋白的PCR扩增，引物序列如下：5'-ATGAGAGGAAAGAAGAAAATGCAAC-3'；5'-TTTGTTAATAACTGCAATTGCTGCT-3'。PCR扩增时以健康植株总DNA和双蒸水为阴性对照，PCR反应条件：预变性温度94℃，3min；然后94℃变性30s，58℃退火1min，72℃延伸90s，34个循环，最后72℃延伸10min。PCR产物回收后与pMD18-T连接，连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，挑取筛选平板上的白色菌落培养，提取质粒，经PCR和酶切鉴定为阳性的重组质粒送往上海英骏生物技术有限公司进行测序。枣疯植原体免疫膜蛋白的核苷酸序列如表1所示：

[0041] 表1：枣疯植原体免疫膜蛋白的核苷酸序列表

<110> 山东省农业科学院植物保护研究所
 <120> 特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒
 <130> 2017
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 459
 <212> DNA
 <213> 枣疯植原体的免疫膜蛋白
 <400> 1

[0042]

```

atgagaggaa agaagaaat gcaacaaaa gaaagtttt taaaaactaa aaaaggcaaa      60
atagttgttg gttcagttac tgggtcaatt gttttattat tatctatttt attactttgt      120
tggataaag aagttggcc atcgggtcca aaaattactg agacaaatgt aaaagattta      180
acaaacgact taaatggcac taaaacagcg gctgaaaaac atgacgtatt agaaaaattt      240
ataacagata aagtaaacaa agttaataaa aaactagacg atgcaaatga aggtactaaa      300
aaaattgggt ttgaccaaat aatgaagtt aaaaatcaac ttgcagcgtt aaaagcaaaa      360
acaacagcta ttacaccaga ggacacaact aaattacaaa cagcagttac agccttagat      420
acttacttaa aagcagcaat tgcagttatt aacaaataa                               459

```

[0043] 将获得的基因暂命名为枣疯植原体免疫膜蛋白基因,简称为 JWB-imp,采用 DNASTAR和MEGA软件对其进行氨基酸序列预测,氨基酸序列如表2所示:

[0044] 表2:枣疯植原体免疫膜蛋白的氨基酸序列表

<110> 山东省农业科学院植物保护研究所
 <120> 特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒
 <130> 2017
 <160> 1

[0045]

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 152

<212> PRT

<213> 枣疯植原体免疫膜蛋白基因

<400> 1

Met Arg Gly Lys Lys Lys Met Gln Gln Lys Glu Ser Phe Leu Lys Thr

1 5 10 15

Lys Lys Gly Lys Ile Val Val Gly Ser Val Thr Gly Ser Ile Val Leu

20 25 30

Leu Leu Ser Ile Leu Leu Leu Cys Trp Tyr Lys Glu Val Trp Pro Phe

35 40 45

Gly Pro Lys Ile Thr Glu Thr Asn Val Lys Asp Leu Thr Asn Asp Leu

[0046]

50 55 60

Asn Gly Thr Lys Thr Ala Ala Glu Lys His Asp Val Leu Glu Lys Phe

65 70 75 80

Ile Thr Asp Lys Val Asn Lys Val Asn Lys Lys Leu Asp Asp Ala Asn

85 90 95

Glu Gly Thr Lys Lys Ile Gly Phe Asp Gln Ile Asn Glu Val Lys Asn

100 105 110

Gln Leu Ala Ala Leu Lys Ala Lys Thr Thr Ala Ile Thr Pro Glu Asp

115 120 125

Thr Thr Lys Leu Gln Thr Ala Val Thr Ala Leu Asp Thr Tyr Leu Lys

130 135 140

Ala Ala Ile Ala Val Ile Asn Lys

145 150

[0047] 为验证本发明首次克隆到的枣疯植原体免疫膜蛋白氨基酸序列的特异性,将JWB-imp基因与已报道的翠菊黄化植原体 (AY)、苹果丛簇植原体 (AP)、欧洲石果黄化植原体 (ESFY)、梨衰退植原体 (PD)、三叶草丛簇植原体 (CP)、葡萄黄化植原体 (FD-C)、三叶草绿变植原体 (CPh)、洋葱黄化植原体 (OY)、桃黄化卷叶植原体 (PYLR)、甘薯丛枝植原体 (SPWB)、桃西方X植原体 (WX) 和小麦蓝矮植原体 (WBD) 等12个属于不同亚组植原体分离物的imp基因进行氨基酸序列同源性比较分析,如表3所示,JWB-imp与同属于16SrV组但不同亚组的FD-C

植原体imp基因氨基酸序列同源性最高为48.1%，与属于16SrI 组的AY、OY、CPh、WBD植原体imp基因同源性较低分别为34.1%、34.7%、30.2%和30.9%，而16SrI组内16SrI-B亚组的AY和OY植原体的同源性为97.0%、16SrI-C亚组的CPh和WBD植原体同源性为95.9%，这说明植原体不同组的免疫膜蛋白同源性较低，而同组不同亚组植原体分离物免疫膜蛋白的同源性较高。JWB植原体的imp基因与属于16SrII组的SPWB植原体imp基因同源性为36.2%，与属于16SrIII组的PYLR、WX植原体imp基因同源性分别为36.3%和29.5%，与属于16SrIII组的16SrVI植原体imp基因同源性为28.7%，与属于16SrX组的SPWB植原体imp基因同源性为36.2%，与属于16SrIII组的AP、ESFY、PD植原体imp基因同源性分别为36.7%、37.7%和34.5%，说明不同植原体免疫膜蛋白基因之间的差异非常大。

[0048] 表3 JWB-imp与在GeneBank中登陆的imp基因序列氨基酸同源性(%)比较

| 序号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 1 | 100 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 34.1 | 100 | | | | | | | | | | | |
| 3 | 36.7 | 27.8 | 100 | | | | | | | | | | |
| 4 | 37.7 | 25.5 | 50.8 | 100 | | | | | | | | | |
| 5 | 34.5 | 26.8 | 70.8 | 57.0 | 100 | | | | | | | | |
| 6 | 28.7 | 26.2 | 31.3 | 33.9 | 30.2 | 100 | | | | | | | |
| 7 | 48.1 | 26.1 | 35.6 | 36.6 | 37.5 | 30.2 | 100 | | | | | | |
| 8 | 30.2 | 51.3 | 24.2 | 27.5 | 24.9 | 25.6 | 26.2 | 100 | | | | | |
| 9 | 34.7 | 97.0 | 28.4 | 26.0 | 27.8 | 25.7 | 26.1 | 50.3 | 100 | | | | |
| 10 | 36.3 | 26.5 | 58.8 | 54.1 | 59.5 | 31.9 | 34.1 | 25.7 | 27.6 | 100 | | | |
| 11 | 36.2 | 25.3 | 31.6 | 28.3 | 29.7 | 25.6 | 39.5 | 24.5 | 24.7 | 29.5 | 100 | | |
| 12 | 29.5 | 20.9 | 26.0 | 23.2 | 26.0 | 27.9 | 26.0 | 24.6 | 20.5 | 27.6 | 25.3 | 100 | |
| 13 | 30.9 | 50.3 | 24.7 | 28.0 | 25.4 | 26.2 | 26.8 | 95.9 | 49.2 | 25.7 | 25.5 | 25.6 | 100 |

[0050] 说明:1代表JWB;2代表AY;3代表AP;4代表ESFY;5代表PD;6代表CP;7代表FD-C;8代表CPh;9代表OY;10代表PYLR;11代表SPWB;12代表WX;13代表WBD

[0051] 总之,通过同源性分析,本发明测得的枣疯植原体免疫膜蛋白的氨基酸序列与已报道的植原体枣疯植原体免疫膜蛋白氨基酸序列差异性极大,可以用来制备抗体,特异性针对枣疯植原体进行检测,极大提高了检测的可信度。

[0052] 为了制备特异性强的植原体免疫膜蛋白抗体,利用在线软件SignalP 4.0和TMHMM Server v.2.0对JWB-Imp进行信号肽及跨膜区预测。选取C端表位暴露性较好的47-152氨基酸区域进行蛋白表达,标签纯化后,将此蛋白与不完全弗氏佐剂混合免疫大耳白兔,采集兔子血液,经抗原亲和纯化获得枣疯植原体免疫膜蛋白的多克隆抗体。为验证所得抗体的适用性和特异性,对抗体进行Western blotting检测。采集感病枣树的嫩叶、叶中脉、嫩枝、树皮韧皮部和根部样品分别进行检测,结果表明,如图1所示,在所有感病枣树的组织中均检测到了目的条带,健康枣树叶片组织未检测到条带,说明该抗体有较好的适用性和特异性,能够对疑似感染枣疯植原体的不同植物组织进行检测。

[0053] 通过上述方法的制备出的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体,即可实现了准确的快速的对枣疯病的检测,考虑到利用特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体进行检测还需要具有一定专业技术的人员才可以,为此,在本实施例中,还专门提供了将特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备成试剂盒,试剂盒的组分(100次检测标准)如下:

| | | |
|--------|---|-------|
| | 枣疯植原体免疫膜蛋白多克隆抗体 | 10uL |
| [0054] | 碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 | 10uL |
| | 牛血清蛋白 | 1mL |
| | 抗原蛋白 | 0.5mL |
| [0055] | 以上试剂均-20℃保存 | |
| | 96 孔酶标板 | 1 块 |
| | 20X 抗原包被缓冲液 | 20mL |
| [0056] | 20X 洗涤缓冲液 (0.02 mol/L PBST, pH 7.4) | 100mL |
| | 脱脂奶粉 | 15g |
| | 20X 封闭缓冲液 (PBST+5%脱脂奶粉) | 50 mL |
| [0057] | 碱性磷酸酯酶底物显色液 | 20ml |
| [0058] | 以上试剂均4℃保存 | |
| [0059] | 2ml EP管 | 100个 |
| [0060] | 研磨棒 | 100个 |
| [0061] | 直径为0.2-0.7cm的小钢珠 | 50颗 |
| [0062] | 以上材料均室温保存。 | |
| [0063] | 上述特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备成试剂盒具体操作步骤如下: | |
| [0064] | A. 样品处理:取0.05g~0.15g疑似病样鲜枝装到2mL的离心管中,加入 2-5颗小钢珠并加入0.5-1.5mL抗原包被缓冲液。经研磨装置处理1min,8000rpm 离心5min,取上清液用包被缓冲液稀释2倍备用。 | |
| [0065] | B. 样品包被:取150μL稀释的检测样品液加入96孔酶标板中,以枣疯植原体阳性标准品为阳性对照,以健康枣树标准品为阴性对照,在4℃条件下孵育过夜或37℃孵育1-2h; | |
| [0066] | C. 洗板:将酶联板迅速反扣,弃去孔中液体,每孔加入PBST液200μL,静置3-5min后迅速弃去孔中液体,并在吸水纸上扣打几下以尽量除去孔中液体,重复3次; | |
| [0067] | D. 封闭:去除酶标板中的PBST缓冲液,每孔加入150μL的封闭缓冲液, 37℃恒温箱孵育1.5h; | |
| [0068] | E. 洗板:同步骤C; | |
| [0069] | F. 加一抗:用PBST稀释枣疯植原体免疫膜蛋白抗体(来源于兔)至合适的工作浓度(1:1000),每孔样品加150μL,37℃恒温箱孵育2h; | |
| [0070] | G. 洗板:同步骤C; | |
| [0071] | H. 加酶标抗体:每孔加入150μLPBST稀释的碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 (1:5000),37℃恒温箱孵育2h; | |
| [0072] | I. 洗板:同步骤C; | |
| [0073] | F. 底物显色:每孔加底物溶液150μL;室温避光显色30-60min;酶联仪在405nm下读数。 | |

[0074] G. 结果判定： $I/H = (\text{待测样品读数} - \text{空白读数}) / (\text{阴性样品的读数} - \text{空白读数}) \geq 3$ 判断为阳性反应；反之则为阴性。

[0075] 实验对比

[0076] 采集100个疑似感染枣疯植原体的枣树叶样品同时采用上述实施例1所提供的试剂盒及PCR进行检测。如表4所示，PCR检测结果表明，阳性样品有58个，阴性样品有42个。针对同一批样品，采用实施例1的方法检测PCR验证的阳性样品，结果表明，阳性样品有56个，漏检为阴性样品2个，阳性样品检测的符合率为93.10%；采用实例1的方法检测PCR验证的阴性样品，结果表明，阴性样品39个，漏检为阳性样品3个，阴性样品检测的符合率为92.9%。实施例1的方法检测综合符合率为94.7%。

[0077] 表4疑似感染枣疯植原体的100个枣树叶样品试剂盒检测与PCR检测结果对比

| 检测结果 | PCR 检测结果 | 实施例 1 检测结果 | | 符合率 |
|-----------|----------|------------|----|-------|
| | | 阳性 | 阴性 | |
| [0078] 阳性 | 58 | 56 | 2 | 96.5% |
| 阴性 | 42 | 3 | 39 | 92.9% |
| 合计 | 100 | 59 | 41 | 94.7% |

[0079] 通过上述实验对比可知，利用本实施例所提供的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备成试剂盒与PCR的检测基本一致，检测可信度较高，可以用于检测推广使用，充分证明本实施例所提供的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备成试剂盒在枣疯病检测中所存在的适用性和特异性。

[0080] 实施例2，考虑到离心处理需要一定的专业知识和设备，为此，本实施例还提供了上述特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备成试剂盒另一种具体操作步骤如下：

[0081] A. 样品处理：取0.05g~0.10g疑似病样鲜枝放入离心管中，再加入2-5颗小钢珠和0.5-1ml抗原包被缓冲液，用研磨棒研磨至样品呈糊状，静置15min，取上清液用抗原包被缓冲液稀释2倍备用。

[0082] B. 样品包被：取150μL稀释的检测样品液加入96孔酶标板中，以枣疯植原体阳性标准为阳性对照，以健康枣树标准为阴性对照，在4℃条件下孵育过夜或37℃孵育1-2h；

[0083] C. 洗板：将酶联板迅速反扣，弃去孔中液体，每孔加入PBST液200μL，静置3-5min后迅速弃去孔中液体，并在吸水纸上扣打几下以尽量除去孔中液体，重复3次；

[0084] D. 封闭：去除酶标板中的PBST缓冲液，每孔加入150μL的封闭缓冲液，37℃恒温箱孵育1.5h；

[0085] E. 洗板：同步骤C；

[0086] F. 加一抗：用PBST稀释枣疯植原体免疫膜蛋白抗体（来源于兔）至合适的工作浓度（1:1000），每孔样品加150μL，37℃恒温箱孵育2h；

[0087] G. 洗板：同步骤C；

[0088] H. 加酶标抗体：每孔加入150μLPBST稀释的碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔（1:5000），37℃恒温箱孵育2h；

[0089] I. 洗板：同步骤C；

[0090] J. 底物显色:每孔加底物溶液150 μ L;室温避光显色30-60min;酶联仪在 405nm下读数。

[0091] K. 结果判定: $I/H = (\text{待测样品读数} - \text{空白读数}) / (\text{阴性样品的读数} - \text{空白读数}) \geq 3$ 判断为阳性反应;反之则为阴性。

[0092] 本发明所提供的实施例首次提出推广枣疯植原体的兔抗多克隆抗体试剂盒,试剂盒内的试剂或溶剂均可放置于-20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C或室温下长期保存,实现了农户将试剂盒家庭保存的愿望,随用随取,无需前往科研院所等农业检测机构专门检索,节约了时间与金钱。

[0093] 而传统检测枣疯病的方法为生物学测定、电镜观察、PCR检测,相对来讲需要成熟的实验室环境、专业的操作知识和技能,而本实施例所提供的特异性识别枣疯植原体的兔抗多克隆抗体制备成试剂盒的应用方法既拥有科学、简单的操作步骤,又可方便检测者通过肉眼观察数据直接得出结论。本实施例提供的检测手段克服了传统生物学测定依赖经验、精确度不高,电镜观察成本高、依赖手工切片的缺点,也克服了PCR检测技术要求高、样品污染的缺憾,本实施例的检测手段既适用于田间对少量样品的快速检测,也适用于实验室室内的大量样品的高通量快速检测。

[0094] 实验对比

[0095] 采集100个疑似感染枣疯植原体的枣树叶样品同时采用上述实施例2所提供的试剂盒及PCR进行检测。如表5所示,PCR检测结果表明,阳性样品有 58个,阴性样品有42个。针对同一批样品,采用实施例2的方法检测PCR验证的阳性样品,结果表明,阳性样品有54个,漏检为阴性样品4个,阳性样品检测的符合率为93.10%;采用实例2的方法检测PCR验证的阴性样品,结果表明,阴性样品36个,漏检为阳性样品6个,阴性样品检测的符合率为85.71%。实施例2的方法检测综合符合率为89%。

[0096] 表5疑似感染枣疯植原体的100个枣树叶样品试剂盒检测与PCR检测结果对比

| 检测结果 | PCR 检测结果 | 实施例 2 检测结果 | | 符合率 |
|-----------|----------|------------|----|--------|
| | | 阳性 | 阴性 | |
| [0097] 阳性 | 58 | 54 | 4 | 93.10% |
| 阴性 | 42 | 6 | 36 | 85.71% |
| 合计 | 100 | 60 | 40 | 89% |

[0098] 通过上述检测结果可知,实施例2中的试剂盒检测与PCR检测的符合率为 89%,检测可信度较高,可以大批量检测推广使用。因未经离心处理,研磨液中叶绿素含量较高,导致OD405值偏高,所以有一定的偏差属于正常现象,但在田间快速或者大规模检测来讲,只需采用手工磨样,不需另行借助试剂盒外的昂贵试剂或器械,操作方便,整体性价比高。

[0099] 表6感病叶样品1K-512K不同比例稀释酶联仪读数结果表

| 加样孔 序号 | 空白 对照 | 阴性 对照 1 | 阴性 对照 2 | 样品 1:1k | 样品 1:4k | 样品 1:8k | 样品 1:16k | 样品 1:32k | 样品 1:64k | 样品 1:128k | 样品 1:256k | 样品 1:512k |
|-----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| [0100] 1 | 0.0683 | 0.0497 | 0.0532 | 1.7119 | 1.7018 | 1.6584 | 1.6467 | 1.573 | 1.4615 | 1.2097 | 0.9713 | 0.6257 |
| 2 | 0.0456 | 0.0476 | 0.0537 | 1.8211 | 1.7114 | 1.6971 | 1.5889 | 1.4425 | 1.34 | 1.0033 | 0.7472 | 0.4815 |
| 3 | 0.0371 | 0.0305 | 0.036 | 1.7012 | 1.6558 | 1.5002 | 1.3287 | 0.9976 | 0.7693 | 0.4967 | 0.3553 | 0.1922 |

[0101] 同时,为检测实施例2提供的试剂盒检测的灵敏度,将感病叶样品进行不同比例的

稀释,在酶联仪于405nm下测试读数结果。如图2和表6所示,当感病样品稀释至512K倍时,仍然能够检测到阳性结果,因此,本实施例实现了样品需要量少、检测灵敏度高的特点,可在感病初期、植原体含量少的情况下,尽早发现感病植株,尽早防治。

[0102] 综上所述,本实施例首次提出推广枣疯植原体的兔抗多克隆抗体试剂盒,试剂盒内的试剂或溶剂均可放置于冷藏或室温下长期保存,满足了枣树种植农户或非专业技能人士自行存储和使用试剂盒的需求,无需前往科研院所等农业检测机构专门检索,节约时间与金钱。

[0103] 另外,实施者只需要采用手工磨样,按照使用说明一步步操作即可,不需要专业的技能知识功底,亦不需要依靠昂贵的实验室专用器材,操作方便,6-8 小时便可得到检索结果。试剂盒的推广也可进行大批量样品的检测,真正实现了农户或非专业技能人士自行检测枣疯病病原体。

[0104] 本实施例的试剂盒方便大规模一次性检测的特性,利于种苗公司在无毒种苗检测上的大规模推广应用,可对田间枣树上枣疯植原体携带情况进行统计调查,也可对种苗带毒情况进行分析,解决了大量样品检测费时费力,成本高,通量低的缺点。

[0105] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对本发明作其它形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例应用于其它领域,但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

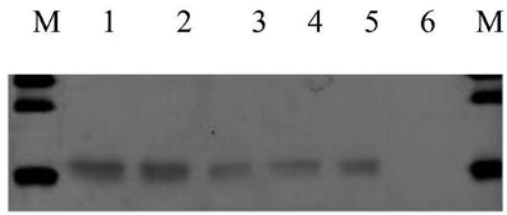


图1

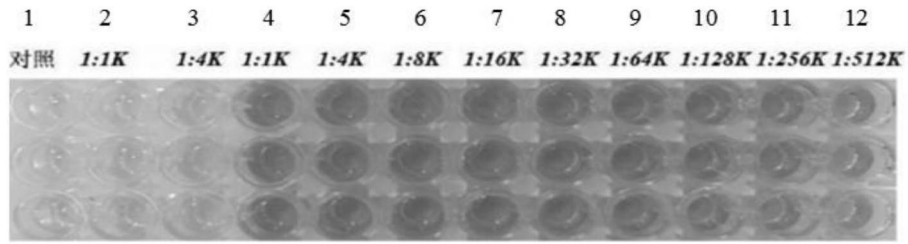


图2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 特异性识别枣疯植原体的免抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN108051593B | 公开(公告)日 | 2020-06-02 |
| 申请号 | CN2017111292384.9 | 申请日 | 2017-12-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 山东省农业科学院植物保护研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 山东省农业科学院植物保护研究所 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 山东省农业科学院植物保护研究所 | | |
| [标]发明人 | 高瑞 王洁 杨淑珂 李凡 路兴波 | | |
| 发明人 | 高瑞 王洁 杨淑珂 李凡 路兴波 | | |
| IPC分类号 | G01N33/569 G01N33/535 C12N15/31 C07K16/12 C07K16/06 | | |
| CPC分类号 | C07K14/195 C07K16/12 C07K2317/10 G01N33/535 G01N33/56911 G01N2333/195 G01N2333/415 | | |
| 审查员(译) | 赵晓明 | | |
| 其他公开文献 | CN108051593A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明属于枣疯植原体检测领域，尤其涉及特异性识别枣疯植原体的免抗多克隆抗体的制备方法及其应用试剂盒。本发明所提供的特异性识别枣疯植原体的免抗多克隆抗体主要应用于枣疯病的检测，其制备方法包括以下有效步骤：a、从感染枣疯植原体的枣树总DNA中克隆获得枣疯植原体的免疫膜蛋白基因序列，预测免疫膜蛋白的氨基酸序列，选取C端表位暴露性较好的47-152aa区域进行蛋白表达，进行标签纯化；b、标签纯化后，将选取的蛋白与不完全弗氏佐剂混合免疫大耳白兔，采集兔子血液，经抗原亲和纯化获得枣疯植原体免疫膜蛋白的多克隆抗体。本发明所提供的特异性识别枣疯植原体的免抗多克隆抗体在枣疯病的检测中，具有显著的特异性，确保了检测的准确性。

M 1 2 3 4 5 6 M

