

[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 200610093646.4

[51] Int. Cl.

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年12月19日

[11] 公开号 CN 101089592A

[22] 申请日 2006.6.13

[21] 申请号 200610093646.4

[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

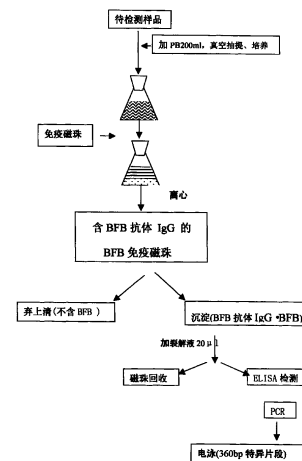
权利要求书4页 说明书11页 附图1页

## [54] 发明名称

瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒

## [57] 摘要

一种瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，该试剂盒由 IAS - PCR 检测瓜类细菌性果实腐斑病 BFB 的全部配套试剂、器材和检测的技术操作、判断标准两部分组成；配套试剂主要包括：BFB 免疫磁珠、磷酸 PB 缓冲液、去离子水、PCR 缓冲液、脱氧核苷酸 dNTP、BFB 引物或 Tag 酶。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，可有效方便地对瓜类种子 BFB 病毒进行快速、准确检测以及对瓜类种子生产、销售、使用和进出口进行质量监控。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，广泛使用可有效控制该病传播。



1、一种瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒由两部分组成：

- a、IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂和器材；
- b、进行 IAS-PCR 检测的技术操作和判断标准。

2、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，其特征在于，IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂主要包括：

- (1). A 溶液：BFB 免疫磁珠 0.1-1 mL
- (2). B 溶液：PH6.8, 0.01mol/L 磷酸 PB 缓冲液 1-20 mL
- (3). C 溶液：去离子水 1-5 mL
- (4). D 溶液：PCR 缓冲液， 0.1-1 mL
- (5). E 溶液：脱氧核苷酸 dNTP 0.001-0.01 mL
- (6). F 溶液：BFB 引物或 Tag 酶 0.1-0.5 mL。

3、如权利要求 2 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，其特征在于，检测技术操作为：

- (1). 样品前处理：取待检种子，加 PB 缓冲液于处理 1-5h，滤去种子，滤液离心弃上清，沉淀 PB 缓冲液重新悬浮，滤纸过滤，收集滤液；
- (2). 将 A 溶液加入经过前处理的样品悬浮液，分离，弃上清；
- (3). 加 B 溶液，分离弃上清；
- (4). 加 C 溶液，裂解；
- (5). 吸取 (3) 液加入 D、E、F 溶液，离心分离，进行 PCR 扩增。

反应条件：60-98℃预变性 2-10min；60-98℃变性 10-50s；50-70℃退火 5-50s；45-70℃延伸 5-45s；10-50 个循环；50-82℃延伸 1-15min，取 2-10  $\mu$ L 扩增产物，1-10%琼脂糖胶，1-15V/cm 电泳 0.5-2h，EB 染色，凝胶成相系统照相。

4、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，其特征在于，结果判断：与核酸标准分子量对照，出现 360 bp 核苷酸片段为阳性，反之，为阴性。

5、如权利要求 2 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，其特征在于，IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂为：

- |   |          |
|---|----------|
| (1). A 溶液：BFB 免疫磁珠                                | 0.5 mL   |
| (2). B 溶液：PH6.8, 0.01mol/L 磷酸 PB 缓冲液              | 10 mL    |
| (3). C 溶液：去离子水                                    | 1 mL     |
| (4). D 溶液：10×PCR 缓冲液，如：MgCl <sub>2</sub> 25mmol/L | 0.24 mL  |
| (5). E 溶液：2.5 mmol/L, 脱氧核苷酸 dNTP                  | 0.006 mL |
| (6). F 溶液：0.5 mmol/L 引物 BFB <sub>1</sub>          | 0.006 mL |
| (7). G 溶液：0.5 mmol/L 引物 BFB <sub>2</sub>          | 0.006 mL |
| (8). H 溶液：2u/μL Tag 酶                             | 0.006 mL |

其中，检测 BFB 引物序列：

BFB<sub>1</sub>：5' -GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'

BFB<sub>2</sub>：5' -CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3'

以此引物 PCR 扩增产生 360bp 特异片断。

6、如权利要求 5 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，其特征在于，检测技术操作为：

(1). 样品处理：取待检种子 1000 粒，加 200mL pH6.8 0.01mol/L PB 缓冲液真空抽提、培养 2h，用三层沙步滤去种子，滤液 10000r/min，离心 15min 弃上清，沉淀用 1.5mL pH 6.8 0.01mol/L PB 缓冲液重新悬浮，滤纸过滤，收集滤液。

(2). 将 A 溶液 0.1 mL 加入经过前处理的样品悬浮液，室温 15min，低速离心 10s，弃上清。

(3). 加 B 溶液 1mL，低速离心 10s，弃上清，重复一次。

(4). 加 C 溶液 20 μL，100℃裂解 15min。

(5). 取 D 溶液 5  $\mu$ L、加 C 溶液 31  $\mu$ L, 加 E、F、G、H 溶液各 1  $\mu$ L, 加 (4) 10  $\mu$ L, 离心 10s, 进行 PCR 扩增。

7、如权利要求 6 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒, 其特征在于, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s; 65 $^{\circ}$ C 退火 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 取 5  $\mu$ L 扩增产物, 2%琼脂糖胶, 5V/cm 电泳 1h, EB 染色, 凝胶成相系统照相。

8、如权利要求 1 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒, 其特征在于, BFB 免疫磁珠 IAS 的制备方法为: a、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; b、取带有阴离子交换基团固体载体 Sephadex 或 Cellulose 等 5 克, 加入无菌水 250ml, 过夜, 充分溶胀; c、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; d、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 $^{\circ}$ C 保存备用。

9、如权利要求 2 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒, 其特征在于, BFB 免疫磁珠 IAS 的制备方法为: IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂为:

- |  |          |
|--|----------|
| (1). A 溶液: BFB 免疫磁珠                                  | 0.5 mL   |
| (2). B 溶液: PH6.8, 0.01mol/L 磷酸 PB 缓冲液                | 10 mL    |
| (3). C 溶液: 去离子水                                      | 1 mL     |
| (4). D 溶液: 10×PCR 缓冲液, 如: MgCl <sub>2</sub> 25mmol/L | 0.24 mL  |
| (5). E 溶液: 2.5 mmol/L, 脱氧核苷酸 dNTP                    | 0.006 mL |
| (6). F 溶液: BFB 引物及 Tag 酶                             | 0.24 mL。 |

10、如权利要求 9 所述的瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒, 其特征在于, 试剂盒的检测技术操作为:

(1). 样品处理: 取待检种子 1000 粒, 加 200mL pH6.8 0.01mol/L PB 缓冲液于摇床上室温轻摇 4h, 用 3 层纱布滤去种子, 滤液 10000r/min, 离心 15min 弃上清, 沉淀用 1.5mL pH 6.8 0.01mol/L PB 缓冲液重新悬浮, 滤纸过滤, 收集滤液。

(2). 将 A 溶液 0.1 mL 加入经过前处理的样品悬浮液, 室温 15min, 低速离心 10s, 弃上清。

(3). 加 B 溶液 1mL, 低速离心 10s, 弃上清, 重复一次。

(4). 加 C 溶液 20  $\mu$  L, 100°C 裂解 15min。

(5). 吸取 (3) 液 10  $\mu$  L 加入 D 溶液管中, 加 E 溶液 1  $\mu$  L, 离心 10s, 加 F 液 40  $\mu$  L, 离心 10s, 进行 PCR 扩增。

## 瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒

### 一、技术领域

本发明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检测技术，尤其是一种瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒。

### 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，基因扩增 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 $\mu$ 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。

免疫磁珠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(*flaA*) 基因的引物与探针和/或空肠弯曲菌的马尿酸酶(*hipO*) 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 CN200410091834.4, 公开一种利用免疫磁珠的生物检测装置及其检测方法, 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。中国专利 CN02139253.6，公开了一种快速定量检测猪瘟病毒和猪瘟兔化弱疫苗的荧光定量 PCR 试剂盒，利用该试剂盒快速定量检测猪瘟病毒和猪瘟兔化弱疫苗的方法以及该试剂盒在快速定量检测猪瘟病毒和猪瘟兔化弱疫苗中的应用。该试剂盒及方法克服了传统和现代方法中存在的不足，可有效方便地对猪瘟病毒和猪瘟兔化弱疫苗进行定量检测以及对猪瘟兔化弱疫苗生产进行质量监控。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。

综上所述，目前亟需建立 BFB 的快速检测技术，这是控制该病传播的有效措施关键环节。

### 三、发明内容

本发明的目的在于，设计与研制，利用免疫磁珠技术，建立 BFB 的快速检测，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，尤其是研制免疫磁珠-PCR，即研制 IAS-PCR 快速检测技术

及试剂盒，也即瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒。该技术的核心内容包括检测 BFB 的特异免疫磁珠、引物、其他 PCR 有关试剂。

实现本发明目的的措施在于：

该试剂盒由两部分组成：

- 1、IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂和器材。
- 2、进行 IAS-PCR 检测的技术操作和判断标准。

IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂主要包括：

- |                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| (1). A 溶液：BFB 免疫磁珠                   | 0.1-1 mL      |
| (2). B 溶液：PH6.8, 0.01mol/L 磷酸 PB 缓冲液 | 1-20 mL       |
| (3). C 溶液：去离子水                       | 1-5 mL        |
| (4). D 溶液：PCR 缓冲液，                   | 0.1-1 mL      |
| (5). E 溶液：脱氧核苷酸 dNTP                 | 0.001-0.01 mL |
| (6). F 溶液：BFB 引物或 Tag 酶              | 0.1-0.5 mL    |

检测技术操作为：

- (1). 样品前处理：取待检种子，加 PB 缓冲液于处理 1-5h，滤去种子，滤液离心弃上清，沉淀 PB 缓冲液重新悬浮，滤纸过滤，收集滤液；
- (2). 将 A 溶液加入经过前处理的样品悬浮液，分离，弃上清；
- (3). 加 B 溶液，分离弃上清；
- (4). 加 C 溶液，裂解；
- (5). 吸取 (3) 液加入 D、E、F 溶液，离心分离，进行 PCR 扩增。

反应条件：60-98℃预变性 2-10min；60-98℃变性 10-50s；50-70℃退火 5-50s；45-70℃延伸 5-45s；10-50 个循环；50-82℃延伸 1-15min，取 2-10 μL 扩增产物，1-10%琼脂糖胶，1-15V/cm 电泳 0.5-2h，EB 染色，凝胶成相系统照相。

结果判断：

与核酸标准分子量对照，出现 360 bp 核苷酸片段为阳性，反之，为阴性。

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，克服了传统和现代方法中存在的不足，可有效方便地对瓜类种子细菌性果实腐斑病毒进行快速、准确检测以及对瓜类种子生产、销售、使用和进出口进行质量监控。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。广泛使用可有效控制该病传播。

#### 四、附图说明：

附图 1 是实施例 1 检测方法工作程序示意图

#### 五、具体实施方式

实施例 1：本发明实施例中该试剂盒由两部分组成，即：

- 1、IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂和器材。
- 2、进行 IAS-PCR 检测的技术操作和判断标准。

其中：1、IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂为：

- |   |          |
|---|----------|
| (1). A 溶液：BFB 免疫磁珠                                | 0.5 mL   |
| (2). B 溶液：PH6.8, 0.01mol/L 磷酸 PB 缓冲液              | 10 mL    |
| (3). C 溶液：去离子水                                    | 1 mL     |
| (4). D 溶液：10×PCR 缓冲液，如：MgCl <sub>2</sub> 25mmol/L | 0.24 mL  |
| (5). E 溶液：2.5 mmol/L, 脱氧核苷酸 dNTP                  | 0.006 mL |
| (6). F 溶液：0.5 mmol/L 引物 BFB <sub>1</sub>          | 0.006 mL |
| (7). G 溶液：0.5 mmol/L 引物 BFB <sub>2</sub>          | 0.006 mL |
| (8). H 溶液：2u/μ LTag 酶                             | 0.006 mL |

其中，检测 BFB 引物序列：

BFB<sub>1</sub>：5' -GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'

BFB<sub>2</sub>：5' -CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3'

以此引物 PCR 扩增产生 360bp 特异片断。

本实施例中试剂盒的检测技术操作为：

(1). 样品处理：取待检种子 1000 粒，加 200mL pH6.8 0.01mol/L PB 缓冲液真空抽提、培养 2h，用三层沙步滤去种子，滤液 10000r/min，离心 15min 弃上清，沉淀用 1.5mL pH 6.8 0.01mol/L PB 缓冲液重新悬浮，滤纸过滤，收集滤液。

(2). 将 A 溶液 0.1 mL 加入经过前处理的样品悬浮液，室温 15min，低速离心 10s，弃上清。

(3). 加 B 溶液 1mL，低速离心 10s，弃上清，重复一次。

(4). 加 C 溶液 20 μ L，100℃裂解 15min。

(5). 取 D 溶液 5 μ L、加 C 溶液 31 μ L，加 E、F、G、H 溶液各 1 μ L，加 (4) 10 μ L，离心 10s，进行 PCR 扩增。

反应条件：95℃预变性 5min；95℃变性 30s；65℃退火 30s；72℃延伸 30s；30 个循环；72℃延伸 5min，取 5 μ L 扩增产物，2%琼脂糖胶，5V/cm 电泳 1h，EB 染色，凝胶成相系统照相。

本实施例中检测结果判断方法和标准为：

与核酸标准分子量对照，出现 360 bp 核苷酸片段为阳性，反之，为阴性。

本实施例中：

(1). 配备的仪器设备、材料：

基因扩增仪；1000 μ L、100 μ L、0.5-10 μ L 移液器；电泳仪：水平式电泳槽；离心机；低温冰柜 (-20℃)；电泳试剂；离心管；研磨棒；锥形瓶；纱布；滤纸。

(2). 每次实验应设置阳性对照，阴性对照和空白对照。

(3). 试剂盒可同时检测 5 个样品。

(4). 试剂盒-20℃保存，保质期 6 个月。

本是实例中 BFB 免疫磁珠 I A S 的制备方法为：

1、取带有阴离子交换基团的固相惰性载体 Sephadex 或 Cellulose 5 克，加入无菌水 250ml，4℃过夜。

2、取上述充分吸涨的胶体 1ml 装入小层析柱中，用 pH6.8，0.01mol/L 的 PB 含 0.4mol/L NaCl 洗脱也洗脱约 10ml，之后改用 pH6.8，0.01mol/L PB 液平衡，洗脱 20ml。

4、取纯化的兔抗 BFB IgG 0.5ml，入上述小层析柱中，室温静置 15min，重复一次，用 pH6.8，0.01mol/L PB 洗液洗脱多余的 IgG，洗脱约 5ml，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。取出悬浮在 5ml pH6.8，0.01mol/L PB 液中，置 4℃保存。

实施例 2： 实施例 1 中 BFB 免疫磁珠 IAS 的制备方法为：

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团固体载体 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。

实施例 3：本发明实施例中该试剂盒由两部分组成，即：

1、IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂和器材。

2、进行 IAS-PCR 检测的技术操作和判断标准。

其中：1、IAS-PCR 检测 BFB 的全部配套试剂为：

- |   |          |
|---|----------|
| (1). A 溶液：BFB 免疫磁珠                                | 0.5 mL   |
| (2). B 溶液：PH6.8, 0.01mol/L 磷酸 PB 缓冲液              | 10 mL    |
| (3). C 溶液：去离子水                                    | 1 mL     |
| (4). D 溶液：10×PCR 缓冲液，如：MgCl <sub>2</sub> 25mmol/L | 0.24 mL  |
| (5). E 溶液：2.5 mmol/L, 脱氧核苷酸 dNTP                  | 0.006 mL |
| (6). F 溶液：BFB 引物及 Tag 酶                           | 0.24 mL  |

试剂盒的检测技术操作为：

(1). 样品处理：取待检种子 1000 粒，加 200mL pH6.8 0.01mol/L PB 缓冲液于摇床上室温轻摇 4h，用 3 层纱布滤去种子，滤液 10000r/min，离心 15min 弃上清，沉淀用 1.5mL pH 6.8 0.01mol/L PB 缓冲液重新悬浮，滤纸过滤，收集滤液。

(2). 将 A 溶液 0.1 mL 加入经过前处理的样品悬浮液，室温 15min，低速离心 10s，弃上清。

(3). 加 B 溶液 1mL，低速离心 10s，弃上清，重复一次。

(4). 加 C 溶液 20 μL，100℃裂解 15min。

(5). 吸取 (3) 液 10 μL 加入 D 溶液管中，加 E 溶液 1 μL，离心 10s，加 F 液 40 μL，离心 10s，进行 PCR 扩增。

---

本实施例中检测结果判断方法和标准为：

与核酸标准分子量对照，出现 360 bp 核苷酸片段为阳性，反之，为阴性。

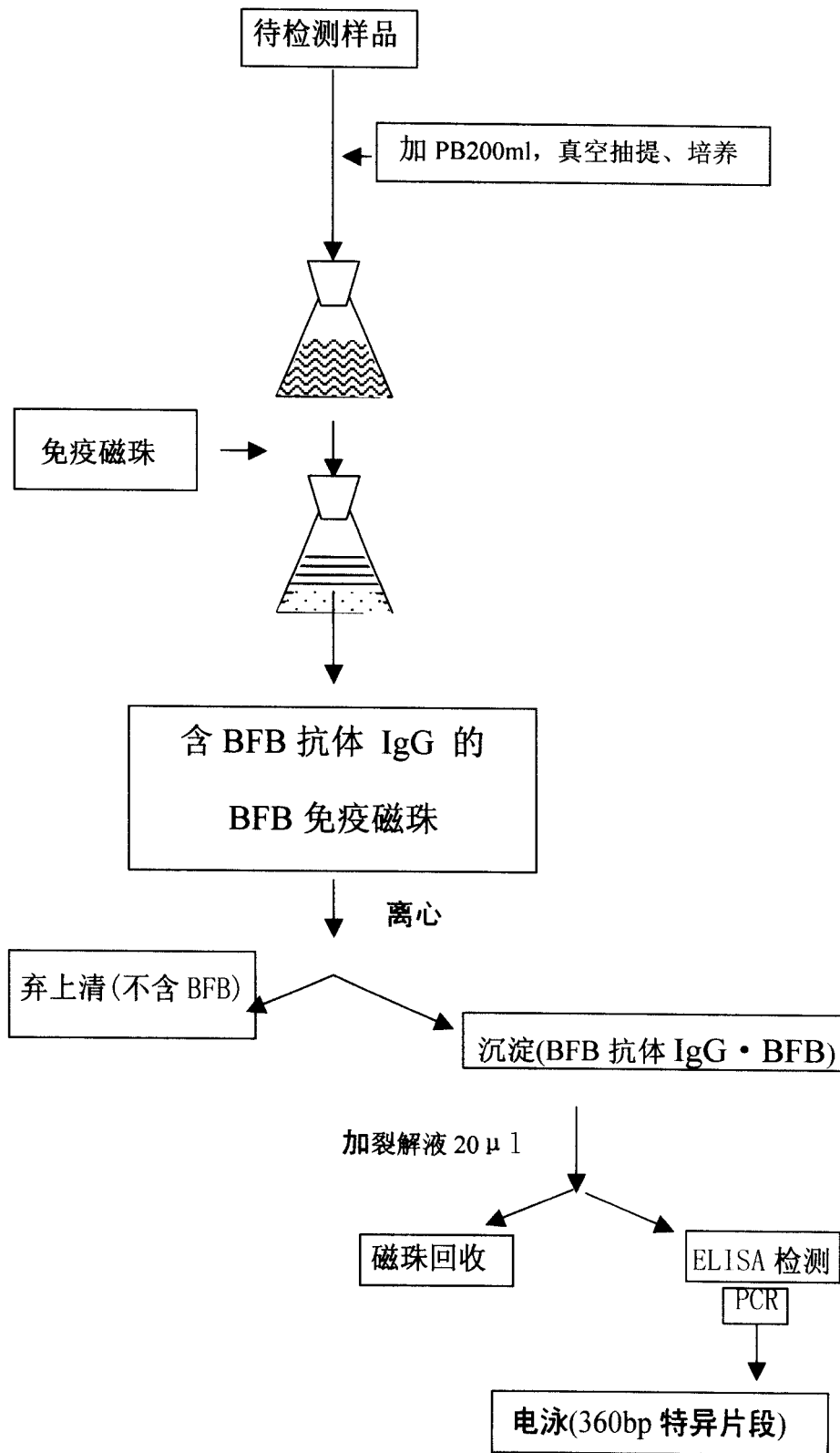


图 1

专利名称(译)	瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101089592A</a>	公开(公告)日	2007-12-19
申请号	CN200610093646.4	申请日	2006-06-13
[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	G01N21/25 G01N1/28 G01N33/53 C12Q1/00		
代理人(译)	刘永生		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种瓜类细菌性果实腐斑病快速检测试剂盒，该试剂盒由IAS - PCR检测瓜类细菌性果实腐斑病BFB的全部配套试剂、器材和检测的技术操作、判断标准两部分组成；配套试剂主要包括：BFB免疫磁珠、磷酸PB缓冲液、去离子水、PCR缓冲液、脱氧核苷酸dNTP、BFB引物或Tag酶。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，可有效方便地对瓜类种子BFB病毒进行快速、准确检测以及对瓜类种子生产、销售、使用和进出口进行质量监控。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，广泛使用可有效控制该病传播。

