



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103543264 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201310541274. 7

(22) 申请日 2013. 11. 05

(73) 专利权人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路 100 号

(72) 发明人 陈保善 邹承武 蒙姣荣

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务有限责任公司 45104

代理人 杨立华

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 99/46288 A2, 1999. 09. 16,

CN 101512002 A, 2009. 08. 19,

CN 102080132 A, 2011. 06. 01,

C, GouDOU-URBiNo et al. Differentiation

of Yam Virus Isolates Using Symptomatology, Western Blot Assay and Monoclonal Antibodies. 《J. Phytopathology》. 1996, 第 144 卷

吴兴泉 等. 马铃薯 X 病毒 CP 基因的原核表达及其特异性抗血清的制备. 《郑州工程学院学报》. 2003, 第 24 卷 (第 2 期),

于晓庆. 利用原核表达的衣壳蛋白制备马铃薯 X 病毒的抗血清. 《山东农业科学》. 2010, 第 3 卷第 5-7 页.

邹承武 等. 利用深度测序技术鉴定淮山药病毒病新病原. 《中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集》. 2012,

审查员 刘迎鸣

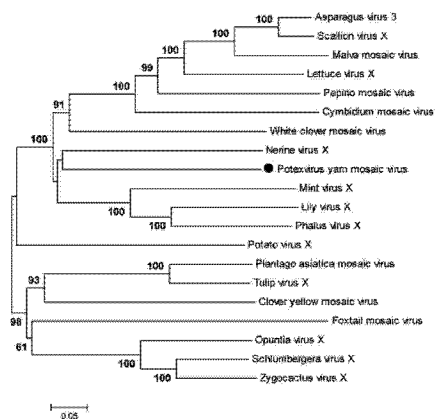
权利要求书2页 说明书8页
序列表18页 附图4页

(54) 发明名称

淮山药 X 病毒的多克隆抗体制备、检测及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种侵染淮山药的马铃薯 X 病毒属病毒——淮山药 X 病毒(Yam virus X, YVX)的多克隆抗体制备、检测及其应用。基于 YVX 基因组,发明人通过原核表达纯化 YVX 的外壳蛋白(Coat protein, CP)并用于免疫家兔制备多克隆抗体,该多克隆抗体能特异性识别原核表达的 YVX 的外壳蛋白和侵染淮山药的 YVX 病毒的外壳蛋白,并产生特异性免疫反应。基于此,发明人还建立了一套高效、高灵敏和准确的 IC-RT-PCR、ELISA 和 Western blot 方法,可以特异性地从感染 YVX 的淮山药植株中检测出 YVX。应用本发明,可为 YVX 与寄主相互作用研究以及该病毒的快速检测、分型和分子生物学研究提供物质基础和技术支撑,为该病毒的流行监测和防治打下坚实基础。



CN 103543264 B

1. 一种淮山药 X 病毒 (YVX) 的多克隆抗体制备方法, 其特征在于: 原核表达纯化淮山药 X 病毒的 CP 蛋白并用于免疫家兔制备多克隆抗体; 所述淮山药 X 病毒的 CP 蛋白具有序列表 SEQ. ID. No. 1 的氨基酸序列, 或由具有序列表 SEQ. ID. No. 2 的碱基序列的基因所编码。

2. 根据权利要求 1 所述的淮山药 X 病毒 (YVX) 的多克隆抗体制备方法, 其特征在于: 取纯化后的重组 CP 蛋白, 采用皮下多点注射法免疫新西兰大白兔, 以后每 2 周加强免疫一次, 共免疫 4 次; 首次免疫加入与蛋白等量的弗氏完全佐剂, 后 3 次加入与蛋白等量的弗氏不完全佐剂; 末次加强免疫 7 天后, 心脏采血, 分离血清; 再用抗原亲和层析纯化获得该病毒外壳蛋白 CP 的多克隆抗体。

3. 权利要求 1 或 2 所得淮山药 X 病毒 (YVX) 的多克隆抗体在检测淮山药 X 病毒方面的应用。

4. 基于权利要求 1 所述多克隆抗体的淮山药 X 病毒 (YVX) 的 ELISA 检测方法。

5. 根据权利要求 4 所述的 ELISA 检测方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 用 1mL 抗原包被缓冲液研磨 0.1g 淮山药新鲜叶片, 9000rpm 离心 5min, 取上清液稀释 20 倍, 按照 100 μ l/ 孔加入 ELISA 板; 感染 YVX 的淮山药病叶为阳性对照, 相应健康叶为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h;

(2) 用 200 μ l PBST 洗涤两次后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 30min;

(3) 用 200 μ l PBST 洗涤两次后, 每个孔中加入用抗体稀释缓冲液按照 1:8000 稀释的多克隆抗体, 100 μ l/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 或室温孵育 3h;

(4) 用 200 μ l PBST 洗涤两次后, 每个孔中加入按说明书稀释 3000 倍的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合物, 100 μ l/ 孔, 室温孵育 1h;

(5) 用 200 μ l PBST 洗涤三次后, 用 TMB 底物显色试剂盒进行显色, 室温避光孵育 25-30min, 反应产物呈蓝色, 每孔再加入 50 μ l 0.5M H_2SO_4 终止显色, 此时蓝色产物变为亮黄色, 立即用酶标仪读取 OD_{450} 的值, 以与阴性 OD 值比值大于 2.1 为阳性;

所述 PBST 含 3.2mM Na_2HPO_4 , 0.5mM KH_2PO_4 , 1.3mM KCl, 135mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4; 所述抗原包被缓冲液为碳酸盐缓冲液, 30mM 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH9.6; 所述抗体稀释缓冲液为 1% BSA, 0.01M PBS pH7.2。

6. 基于权利要求 1 所述多克隆抗体的淮山药 X 病毒 (YVX) 的 Western blot 检测方法。

7. 根据权利要求 6 所述的 Western blot 检测方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 用 TCA/ 丙酮沉淀法或采用植物蛋白质提取试剂盒提取淮山药总蛋白样品, 用 Bradford 法进行蛋白质定量, 调整蛋白质浓度为 2mg/mL;

(2) 制备蛋白电泳凝胶, 进行 SDS-PAGE;

(3) 半干式转移: 电泳结束后将凝胶割至合适大小, 用转膜缓冲液平衡, 5min \times 3 次; 预先裁好与凝胶同样大小的滤纸和 PVDF 膜, 用甲醇浸泡 1min 后, 浸入转膜缓冲液中 10min; 转膜装置从下至上依次按阳极碳板、3 层 3mm 滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层 3mm 滤纸、阴极碳板的顺序放好, 滤纸、凝胶、PVDF 膜精确对齐, 每一步去除气泡, 盖好阴极碳板之后接通电源, 恒流 1mA/cm², 转移 1.5h, 转移结束后, 断开电源将膜取出;

(4) 免疫反应: 用 0.01M PBS 洗膜, 1min; 加入封闭液, 室温封闭 1~2h; 弃封闭液, 用 0.01M PBST 洗膜, 5min \times 3 次; 加入用抗体稀释缓冲液按照 1:5000 稀释的 YVX 的 CP 蛋白多克隆抗体, 室温孵育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 放置 12h 以上; 阴性对照, 以 1% BSA 取代一抗, 其余步骤与实

验组相同；弃一抗和 1% BSA，用 0.01M PBST 分别洗膜，5min×4 次；加入用 0.01M PBS 用抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 结合物，平稳摇动，室温 2h；弃二抗，用 0.01M PBST 洗膜，5min×4 次；加入 BCIP/NBT 显色液，显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应；

所述转膜缓冲液为 25mM Tris, 192mM glycine, 0.01% SDS, 20% methanol, pH 8.3；所述 0.01M PBS 含有 3.2mM Na₂HPO₄, 0.5mM KH₂PO₄, 1.3mM KCl, 135mM NaCl, pH 7.4；所述封闭液为 5% 脱脂奶粉或 3% BSA。

8. 基于权利要求 1 所述多克隆抗体的淮山药 X 病毒 (YVX) 的 IC-RT-PCR 检测方法。

9. 根据权利要求 8 所述的 IC-RT-PCR 检测方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 用抗体稀释缓冲液按照 1:8000 稀释 YVX 多克隆抗体，每个 1.5mL 的离心管中加入 100 μl 稀释好的抗体，37℃ 孵育 1h 或室温孵育 3h；

(2) 将淮山药叶片与含 2% PVP 的 0.02M PBS 研磨缓冲液按质量体积比 0.2% 放入研钵中，研磨成叶汁匀浆，吸入 1.5mL 离心管中，9000rpm 离心 10min；

(3) 将步骤 (1) 中包被好抗体的 1.5mL 离心管用 PBST 洗两次，加入 200 μl 步骤 (2) 准备好的叶汁上清液，37℃ 水浴 3h；

(4) 移去叶汁，PBST 洗 3 次，DEPC 水洗 1 次，洗毕作短暂离心去除管底余液；

(5) 用 SuperRT 一步法 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应，检测引物为 YVX-F：5'-CCAGGTCCATCAGTCACTTCT-3' 和 YVX-R：5'-CTAATCTACCAGCAGTCACTTCATA-3'，PCR 阶段设置退火温度为 55℃，35 个循环；

(6) RT-PCR 结束后，取 5 μl 的 PCR 产物用质量体积浓度 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测；

所述抗体稀释缓冲液为 1% BSA, 0.01M PBS pH7.2。

淮山药 X 病毒的多克隆抗体制备、检测及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种侵染淮山药的马铃薯 X 病毒属病毒——淮山药 X 病毒的多克隆抗体制备、检测及其应用。

背景技术

[0002] 淮山药又称山药、淮山,为薯蓣科植物,其块根富含淀粉、蛋白质、维生素、氨基酸及多种药用成分如胆碱、皂甙、粘多糖等,还含有 Fe、Zn、Cu、Ca 等多种矿物质,依据种和品种的不同,可作药用或食用,具有良好市场前景和产业开发潜势。病毒病严重影响淮山药的产量和品质,在淮山药生产上造成重大损失。文献表明,全球范围内,自然条件下侵染淮山药的病毒有杆状 DNA 病毒属的参薯杆状病毒 (*Dioscorea alata bacilliform virus*, DaBV)、淮山药花叶病毒 (*Yam mosaic virus*, YMV)、淮山药温和花叶病毒 (*Yam mild mosaic virus*, YMMV)、中国淮山药坏死花叶病毒 (*Chinese yam necrotic mosaic virus*, CYNMV)、日本淮山花叶病毒 (*Japanese yam mosaic virus*, JYMV)、蚕豆萎蔫病毒 2 (*Broad bean wilt virus-2*, BBWV-2)。我国已发现 DaBV、YMMV、JYMV、CYNMV 和 BBWV-2 侵染淮山药,引发的症状包括花叶、斑驳、脉明、褪绿、生长迟缓和叶片扭曲等。不同淮山药病毒引起症状不同,也可以引起相似症状;其传播介体不一样,有不同的传播途径。为了保证淮山药生产的正常进行,首先要保证种薯不携带病毒,其次是在生产大田及时发现和鉴定病毒,以便制定有针对性的防治措施,包括控制传播介体来切断病毒病的传播。因此,要求有灵敏度高、特异性好的病毒检测技术来对淮山药的种薯和田间样本进行检测。目前,用于植物 RNA 病毒病原检测的主要技术手段有 RT-PCR、IC-RT-PCR、qRT-PCR、LAMP-PCR、ELISA、Western blot 等,在病毒病原检测检测方面应用最多的是 ELISA 和 qRT-PCR。

[0003] 近年来对中国各主要淮山产区的调查中,发现侵染淮山药的一个新病毒——分类上属于马铃薯 X 病毒属 (*Potexvirus*) 病毒,暂定名为淮山药 X 病毒 (*Yam virus X*, YVX)。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种淮山药 X 病毒的多克隆抗体制备、检测及其应用,以便用于快速检测侵染淮山药的淮山药 X 病毒。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:淮山药 X 病毒的多克隆抗体制备方法,原核表达纯化淮山药 X 病毒的 CP 蛋白 (*Coat Protein*) 并用于免疫家兔制备多克隆抗体。

[0006] 淮山药 X 病毒的 CP 蛋白具有序列 SEQ. ID. No. 1 的氨基酸序列,或由具有序列 SEQ. ID. No. 2 的碱基序列的基因所编码。

[0007] 上述多克隆抗体制备方法,取纯化后的重组 CP 蛋白,采用皮下多点注射法免疫新西兰大白兔,以后每 2 周加强免疫一次,共免疫 4 次;首次免疫加入与蛋白等量的弗氏完全佐剂,后 3 次加入与蛋白等量的弗氏不完全佐剂;末次加强免疫 7 天后,心脏采血,分离血清;再用抗原亲和层析纯化获得该病毒外壳蛋白 CP 的多克隆抗体。

[0008] 所得淮山药 X 病毒的多克隆抗体在检测淮山药 X 病毒方面的应用。

[0009] 基于上述多克隆抗体的淮山药 X 病毒的 ELISA 检测方法。

[0010] 上述 ELISA 检测方法,包括以下步骤:

[0011] (1)用 1mL 抗原包被缓冲液研磨 0.1g 淮山药新鲜叶片,9000rpm 离心 5min,取上清液稀释 20 倍,按照 100 μ l/孔加入 ELISA 板;感染 YVX 的淮山药病叶为阳性对照,相应健康叶为阴性对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h;

[0012] (2)用 200 μ l PBST 洗涤两次后,用 5% 脱脂奶粉封闭 30min;

[0013] (3)用 200 μ l PBST 洗涤两次后,每个孔中加入用抗体稀释缓冲液按照 1:8000 稀释的多克隆抗体,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 或室温孵育 3h;

[0014] (4)用 200 μ l PBST 洗涤两次后,每个孔中加入按说明书稀释 3000 倍的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 结合物,100 μ l/孔,室温孵育 1h;

[0015] (5)用 200 μ l PBST 洗涤三次后,用 TMB 底物显色试剂盒(康为世纪公司)进行显色,室温避光孵育 25-30min,反应产物呈蓝色,每孔再加入 50 μ l 0.5M H_2SO_4 终止显色,此时蓝色产物变为亮黄色,立即用酶标仪读取 OD_{450} 的值,以与阴性 OD 值比值(P/N)大于 2.1 为阳性;

[0016] PBST 含 3.2mM Na_2HPO_4 ,0.5mM KH_2PO_4 ,1.3mM KCl,135mM NaCl,0.05%Tween20, pH7.4;抗原包被缓冲液为碳酸盐缓冲液(30mM 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,pH9.6);抗体稀释缓冲液为 1%BSA,0.01M PBS pH7.2。

[0017] 基于上述多克隆抗体的淮山药 X 病毒的 Western blot 检测方法。

[0018] 上述 Western blot 检测方法,包括以下步骤:

[0019] (1)用 TCA/丙酮沉淀法或采用植物蛋白质提取试剂盒提取淮山药总蛋白样品,用 Bradford 法进行蛋白质定量,调整蛋白质浓度为 2mg/mL;

[0020] (2)制备蛋白电泳凝胶,进行 SDS-PAGE;

[0021] (3)半干式转移:电泳结束后将凝胶割至合适大小,用转膜缓冲液平衡,5min \times 3 次;预先裁好与凝胶同样大小的滤纸和 PVDF 膜,用甲醇浸泡 1min 后,浸入转膜缓冲液中 10min;转膜装置从下至上依次按阳极碳板、3 层 3mm 滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层 3mm 滤纸、阴极碳板的顺序放好,滤纸、凝胶、PVDF 膜精确对齐,每一步去除气泡,盖好阴极碳板之后接通电源,恒流 1mA/cm²,转移 1.5h,转移结束后,断开电源将膜取出;

[0022] (4)免疫反应:用 0.01M PBS 洗膜,1min;加入封闭液,室温封闭 1~2h;弃封闭液,用 0.01M PBST 洗膜,5min \times 3 次;加入用抗体稀释缓冲液按照 1:5000 稀释的 YVX 的 CP 多克隆抗体(一抗),室温孵育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 放置 12h 以上;阴性对照,以 1%BSA 取代一抗,其余步骤与实验组相同;弃一抗和 1%BSA,用 0.01M PBST 分别洗膜,5min \times 4 次;加入用抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍的碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG 结合物(二抗),平稳摇动,室温 2h;弃二抗,用 0.01M PBST 洗膜,5min \times 4 次;加入 BCIP/NBT 显色液,显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应;

[0023] 转膜缓冲液为 25mM Tris,192mM glycine,0.01%SDS,20%methanol, pH8.3;0.01MPBS 含有 3.2mM Na_2HPO_4 ,0.5mM KH_2PO_4 ,1.3mM KCl,135mM NaCl,pH7.4;封闭液为 5%脱脂奶粉或 3%BSA。

[0024] 基于上述多克隆抗体的淮山药 X 病毒的 IC-RT-PCR 检测方法。

[0025] 上述 IC-RT-PCR 检测方法,包括以下步骤:

[0026] (1) 用抗体稀释缓冲液按照 1:8000 稀释 YVX 多克隆抗体,每个 1.5mL 的离心管中加入 100 μ l 稀释好的抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 或室温孵育 3h;

[0027] (2) 将淮山药叶片与含 2%PVP 的 0.02M PBS 研磨缓冲液按质量体积比 0.2% (w/v) 放入研钵中,研磨成叶汁匀浆,吸入 1.5mL 离心管中,9000rpm 离心 10min;

[0028] (3) 将步骤(1)中包被好抗体的 1.5mL 离心管用 PBST 洗两次,加入 200 μ l 步骤(2)准备好的叶汁上清液,37 $^{\circ}$ C 水浴 3h,此时暴露的病毒颗粒特异性地附着于离心管内壁上(免疫捕捉);

[0029] (4) 移去叶汁,PBST 洗 3 次,DEPC 水洗 1 次,洗毕作短暂离心去除管底余液;

[0030] (5) 用 SuperRT 一步法 RT-PCR 试剂盒(康为世纪公司)进行 RT-PCR 反应,YVX 检测引物为 YVX-F:5'-CCAGGTCCATCAGTCACTTCT-3' 和 YVX-R:5'-CTAATCTACCAGCAGTCACTTCATA-3',PCR 阶段设置退火温度为 55 $^{\circ}$ C,35 个循环;

[0031] (6) RT-PCR 结束后,取 5 μ l 的 PCR 产物用质量体积浓度 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶进行电泳检测,预期片段大小为 692bp。

[0032] 抗体稀释缓冲液为 1%BSA,0.01M PBS pH7.2。

[0033] 为建立淮山药 X 病毒(YVX)的检测方法,发明人深入研究了 YVX 河南分离物(分离自河南省温县的铁棍山药(TG))的全长基因组序列,该病毒的全长基因组序列(见序列表 SEQ. ID. No. 3)共有 6159 个核苷酸,5' 非编码区有 73 个碱基,3' 非编码区有 235 个碱基(不包括 poly (A) 的长度),编码 5 个蛋白质,从 5' 端到 3' 端的顺序编码的蛋白大小分别为:1335aa,232aa,109aa,68aa,227aa。基于 YVX 基因组,发明人通过原核表达纯化 YVX 的外壳蛋白(CP)并用于免疫家兔制备多克隆抗体,该多克隆抗体能特异性识别原核表达的 YVX 的外壳蛋白和在侵染淮山药的 YVX 病毒的外壳蛋白,并产生特异性免疫反应,其 ELISA 效价为 1:16000。发明人更进一步,基于针对 YVX 外壳蛋白的特异性抗体,结合针对该病毒 YVX 的基因组的特异性引物建立了 IC-RT-PCR 方法,能够高效、高灵敏和准确地从感染 YVX 的淮山药植株中检测出 YVX;同理建立的 ELISA 和 Western blot 方法也可以特异性地从感染 YVX 的淮山药植株中检测出 YVX。应用本发明提供的 YVX 全基因组序列以及多克隆抗体,可为 YVX 与寄主相互作用研究以及该病毒的快速检测、分型和分子生物学研究提供物质基础和技术支撑,为该病毒的流行监测和防治打下坚实基础。

附图说明

[0034] 图 1 是 YVX 的 5' /3' RACE 电泳图,图中 :M 为 DNA 分子量标准(0' GeneRuler100bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific 公司),1 为 5' RACE 产物,2 为 3' RACE 产物。

[0035] 图 2 是 YVX 的分段 PCR 扩增电泳图,图中 :M 为 DNA 分子量标准(0' GeneRuler1kb DNA Ladder, Thermo Scientific 公司),1 为 YVX 片段 2,2 为 YVX 片段 3。

[0036] 图 3 是 YVX 的基因组结构示意图。

[0037] 图 4 是 YVX 的复制酶基因与其他马铃薯 X 病毒属病毒代表种的进化关系图。

[0038] 图 5 是 YVX 的外壳蛋白基因与其他马铃薯 X 病毒属病毒代表种的进化关系图。

[0039] 图 6 是 YVX 的外壳蛋白基因 PCR 扩增电泳图,图中 :M 为 DNA 分子量标准(0' GeneRuler1kb DNA Ladder, Thermo Scientific 公司),泳道 1~3 为 3 个重复的 YVX

的 CP 蛋白基因的 PCR 产物。。

[0040] 图 7 是原核表达载体 pET30a-YVX-CP 的酶切验证电泳图,图中 :M 为 DNA 分子量标准(0' GeneRuler1kb DNA Ladder, Thermo Scientific 公司),泳道 1 ~ 3 为 3 个重复的连接上 YVX 的 CP 蛋白基因的 pET30a-YVX-CP 质粒的酶切产物。

[0041] 图 8 是验证 YVX 的 CP 基因的重组蛋白表达形式的 SDS-PAGE 图,图中 :M 为蛋白分子量标准(PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific 公司),1 为超声波破碎细胞后离心收集的上清样品,2 为超声波破碎细胞后离心收集的沉淀样品。

[0042] 图 9 是亲和纯化的 YVX 的 CP 基因的重组蛋白的 SDS-PAGE 图,图中 :M 为蛋白分子量标准(PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific 公司),1 为镍柱纯化的带有 6×His 标签的 YVX 的 CP 重组蛋白。

[0043] 图 10 是 YVX 多克隆抗体效价测定图,图中 :1 为免疫前血清,2 为纯化抗体,3 为检测因子。

[0044] 图 11 是 ACP-ELISA 图,图中 :1 是感染 YVX 的淮山药总蛋白样品(三个重复),2 是未感染 YVX 的健康淮山药总蛋白样品(三个重复),3 是只加蛋白裂解液的空白对照(三个重复),4 是原核表达纯化的 YVX-CP 蛋白样品(三个重复)。

[0045] 图 12 是 Western blot 图,图中 :M 为蛋白分子量标准(PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific 公司),1 为 YVX 阳性样品,2 为 YVX 阳性样品,3 为 YVX 阳性样品,4 为 YVX 阴性样品,5 为 YVX 阳性样品,6 为 YVX 阴性样品。

[0046] 图 13 是 IC-RT-PCR 图,图中 :M 为 DNA 分子量标准(0' GeneRuler100bp DNA Ladder, Thermo Scientific 公司),1 为空白对照,2 为阴性对照(健康样品),3 为阳性对照(YVX 感病样品),4-6 为疑似病毒病的待测样品(其中 6 号泳道的样品经 ELISA 检测为 YVX 阳性)。

具体实施方式

[0047] 以下所用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 株系 DH5 α 和 BL21 (DE3)pLysS 菌株由本实验室保存,5' /3' RACE 试剂盒购自罗氏应用生命科学公司 (Roche),PCR 产物克隆载体购自 Invitrogen 公司,限制性内切酶、PCR Mix 等购自 Thermo 公司。

[0048] 一、YVX 的全长基因组序列的克隆

[0049] 1. 1YVX 的 3' 端序列克隆

[0050] 根据转录组深度测序获得的 YVX 的序列,设计互补 YVX3' poly(A) 末端、带有 oligo(dT) 的 cDNA 第一链合成引物 N1T (5' -GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)₁₇V-3', 见序列列表 SEQ. ID. No. 4, 试剂盒提供)、正向引物 YVX-3' -1F

[0051] (5' -TTGCTCGTCGTTCTCTGGCTGC-3', 见序列列表 SEQ. ID. No. 5) 和 YVX-3' -2F

[0052] (5' -CCTCCTGCTAACTGGTCTGCTCTC-3', 见序列列表 SEQ. ID. No. 6), 反向引物 N1

[0053] (5' -GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3', 见序列列表 SEQ. ID. No. 7, 试剂盒提供)。利用 5' /3' RACE 试剂盒 (Roche) 合成 YVX 基因组的 3' 端 cDNA。在 20 μ l 的反应体系中加入 7 μ l ddH₂O (RNase-Free), 4 μ l 的 5×cDNA synthesis buffer, 1 μ l N1T 引物 (10 μ M), 5 μ l 铁棍山药总 RNA (1 μ g) 和 2 μ l dNTP (10mM), 1 μ l Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche 公司), 混匀, 55°C 反应 60 分钟, 然后在 85°C 反应 5 分钟使逆转录酶失活。以反转录

获得的第一链 cDNA 为模板,用正向引物 YVX-3'-1F 和反向引物 N1 进行第一次 PCR,再以第一次 PCR 产物稀释 100 倍为模板,以 YVX-3'-2F 和 N1 为引物进行第二次 PCR,得到一条特异性的、预期大小为 489bp 的 DNA 片段(图 1,泳道 2)。利用 pCR2.1PCR 产物克隆试剂盒(Invitrogen 公司)克隆 3' RACE PCR 产物。连接反应体系为:1 μ l PCR 产物,2 μ l 5 \times 连接酶 Buffer,1 μ l pCR2.1vector,5 μ l ddH₂O 和 1 μ l T4DNA 连接酶。连接反应液在室温放置,反应 30 分钟后用于转化 E. coli DH5 α 感受态细胞,涂布在加有 100 μ g/L 的氨苄青霉素、10 μ l IPTG (24mg/mL) 和 20 μ l X-Gal (20mg/mL) 的 LA 培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 18 小时。挑取白色菌落提取质粒,并用 EcoR I 酶切鉴定,挑选 3 个酶切图谱正确的阳性克隆进行序列测定,将重组质粒命名为 pCR-YVX-3。

[0054] 1. 2YVX 的 5' 端 cDNA 的克隆

[0055] 根据高通量测序获得的 YVX 的序列,设计反向引物 YVX-5'-1R (5'-TGATGGGTGTTT GAAGTAAGCCTCTG-3', 见序列表 SEQ. ID. No. 8) 和 YVX-5'-2R (5'-TCTGATATGTATGCCACGGGTG TTTG-3', 见序列表 SEQ. ID. No. 9)。利用 5' /3' RACE 试剂盒(Roche) 合成 YVX 的 5' 端的 cDNA :在 20 μ l 的反应体系中加入 7 μ l ddH₂O,4 μ l 的 cDNA synthesis buffer,2 μ l dNTP (10mM),1 μ l YVX-5'-1R(10 μ M),5 μ l 铁棍山药总 RNA (1 μ g) 和 1 μ l Transcriptor Reverse Transcriptase,混匀,55 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟,然后在 85 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟使转录酶失活。反应结束后,用 PCR 产物纯化试剂盒(Roche 商品名)纯化第一链 cDNA 产物。取 19 μ l 纯化的第一链 cDNA 产物,加入 2.5 μ l 10 \times Reaction Buffer,2mM dATP,轻柔混匀并短暂离心,于 94 $^{\circ}$ C 反应 3 分钟,立即置于冰上。短暂离心,加入 1 μ l 末端转移酶 Terminal Transferase (Roche 公司),轻柔混匀并置于 37 $^{\circ}$ C 反应 20 分钟,然后在 70 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟以使末端转移酶失活。取 5 μ l 已经加了 A 尾巴的 cDNA 作为模板,加入 1 μ l 引物 N1T (10 μ M),1 μ l YVX-5'-1R (10 μ M),1 μ l dNTP (10mM),5 μ l 10 \times Reaction Buffer,0.5 μ l Taq DNA Polymerase (5U/ μ l) 和 36.5 μ l ddH₂O,进行第一次 PCR,再以第一次 PCR 产物稀释 100 倍为模板,以 YVX-5'-2R (10 μ M) 和 N1 (10 μ M) 为引物进行第二次 PCR,扩增出一条特异性预期大小为 541bp 的带(图 1,泳道 1)。利用 pCR2.1PCR 产物克隆试剂盒(Invitrogen 公司)克隆 5' RACE PCR 产物。连接反应体系为:1 μ l 新鲜 PCR 产物,2 μ l 5 \times 连接酶 Buffer,1 μ l pCR2.1vector,5 μ l ddH₂O 和 1 μ l T4DNA 连接酶。连接反应液在室温放置,反应 30 分钟后用于转化 E. coli DH5 α 的感受态细胞,涂布在加有 100 μ g/L 的氨苄青霉素、10 μ l IPTG (24mg/mL) 和 20 μ l X-Gal (20mg/mL) 的 LA 培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 18 小时。挑取白色菌落提取质粒,并用 EcoR I 酶切鉴定,挑选 3 个鉴定正确的阳性克隆进行序列测定,将重组质粒命名为 pCR-YVX-5。

[0056] 1.3 克隆测序验证高通量测序结果

[0057] 分别挑取 3' -cDNA 片段和 5' -cDNA 片段的 3 个克隆进行序列测定,获得病毒基因组部分片段序列(图 1)。根据获得的序列设计两对引物:正向引物 YVX-268F (5'-ACATACCCATGCCGCCTGTAAAG-3', 见序列表 SEQ. ID. No. 10) 和反向引物 YVX-3446R (5'-GCATTGCTCCGTCCTGAGATTGAT-3', 见序列表 SEQ. ID. No. 11); 正向引物 YVX-3277F (5'-CGTCCGCCGTCGAAGTTCAA-3', 见序列表 SEQ. ID. No. 12) 和反向引物 YVX-5824R (5'-CACGCTCAATCTCTGTAGGCTCTC-3', 见序列表 SEQ. ID. No. 13)。预期 PCR 扩增片段大小分别为 3179bp 和 2771bp。以 3' RACE 的 cDNA 为模板,分别用这两对引物进行 PCR 扩增获得

预期大小的目的片段(图 2),分别克隆至 pCR2.1vector 并挑取 3 个克隆进行测序。

[0058] 通过 3' RACE、5' RACE 和分段克隆测序最终拼接获得包含 6139nt 的 YVX 的全长基因组序列(见序列表 SEQ. ID. No. 3),经结构域预测和同源序列比对分析,发现其编码 5 个病毒蛋白,分别为复制酶多聚蛋白(replicase polyprotein,见序列表 SEQ. ID. No. 18),三重基因块蛋白 1(triple gene block protein1,见序列表 SEQ. ID. No. 19),三重基因区蛋白 2(triple gene block protein2,见序列表 SEQ. ID. No. 20),三重基因区蛋白 3(triple gene block protein3,见序列表 SEQ. ID. No. 21)和外壳蛋白(coat protein,见序列表 SEQ. ID. No. 1)(图 3)。

[0059] 选取复制酶多聚蛋白和外壳蛋白的氨基酸序列,用 MEGA4.0 软件的邻接法构建系统进化树。两个进化树均显示,该病毒与 Nerine virus X 在进化上的关系最近(图 4 和图 5)。

二、YVX 病毒外壳蛋白的原核表达及多克隆抗体制备

[0060] 2.1 YVX 外壳蛋白基因的克隆

[0061] 根据已获得的 YVX 的 CP 基因序列设计一对特异性引物:正向引物 YVX-CP-F (3'-CCCGAATTCATGATTGAAAGTATGTCTACACC-5',见序列表 SEQ. ID. No. 14,其 5' 端加入 EcoR I 酶切位点),反向引物 YVX-CP-R (3'-TTTGTCGACTTAAGGTTTCAGGCAAGTTGAG-5',见序列表 SEQ. ID. No. 15,其 5' 端加入 Sal I 酶切位点),预期产物为 771bp。经 RT-PCR,获得大小约 750bp 的 YVX 的 CP 基因片段(图 6)。将该产物克隆至 pUC19,构建 pUC19-YVX-CP,转化 E. coli DH5 α 感受态细胞。挑取 3 个阳性克隆测序,结果表明 pUC19-YVX-CP 包含 YVX 的 CP 基因的完整序列。BLASTX 比对结果表明,与 YVX 的 CP 同源性最高的为 Nerine virus X 的 CP (46%),其次为 White clover mosaic virus 的 CP (44%)。

[0062] 2.2 蛋白的诱导表达及纯化

[0063] 用 EcoR I 和 Sal I 双酶切 pUC19-YVX-CP 质粒,经凝胶电泳分离,回收 YVX 的 CP 片段(图 7)并克隆至原核表达载体 pET30a,构建原核表达质粒 pET30a-YVX-CP。用 pET30a-YVX-CP 转化 E. coli BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞,用 PCR 和双酶切方法筛选阳性克隆。挑取新鲜培养的含 pET30a-YVX-CP 的 BL21 (DE3) pLysS 单菌落,接种于 10mL 含 50 μ g/L 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按 1:100 的比例将过夜培养的菌液加入到 200mL 新鲜的含 25 μ g/L 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀=0.4~0.6。加入终浓度 0.5mM 的 IPTG,于 20 $^{\circ}$ C,160rpm 振荡培养诱导表达 5h。离心收集菌体,用 1/20 培养体积的细胞裂解缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,10mM Imidazole,10mM β -ME, pH8.0)进行悬浮,然后进行超声波破碎。离心后取少量上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,确定该蛋白为可溶性表达(图 8)。用 Ni-NTA 树脂(QIAGEN 公司)对超声波破碎的细胞离心上清液进行 YVX-CP 蛋白的亲和纯化。SDS-PAGE 检测显示,亲和纯化后的 YVX-CP 蛋白为单一条带,分子量约为 35kDa (图 9)。

[0064] 2.3 多克隆抗体制备及效价测定

[0065] 免疫用兔为新西兰大白兔(2 只)。免疫前采集正常血清作为阴性对照。取纯化后的重组蛋白 2mL(蛋白浓度为 1mg/mL),采用皮下多点注射法免疫新西兰大白兔,以后每 2 周加强免疫一次,共免疫 4 次。首次免疫加入与蛋白等量的弗氏完全佐剂,后 3 次加入与蛋白等量的弗氏不完全佐剂。末次加强免疫 7 天后,心脏采血,分离血清,再用抗原亲和层析,得到纯化的多克隆抗体。以原核表达的 YVX CP 为抗原,经 ELISA 法测定,纯化后的多克隆抗

体效价为 1:16000 (图 10)。

[0066] 三、基于 YVX 外壳蛋白多克隆抗体的检测方法

[0067] 3.1 间接抗原包被 ELISA (ACP-ELISA) 方法检测病毒

[0068] ACP-ELISA 方法的操作步骤：

[0069] (1) 用 1mL 抗原包被缓冲液研磨 0.1g 淮山药新鲜叶片, 9000rpm 离心 5min, 取上清液稀释 20 倍, 按照 100 μ l/孔加入 ELISA 板; 感染 YVX 的淮山药病叶为阳性对照, 相应健康叶为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h;

[0070] (2) 用 200 μ l PBST (3.2mM Na_2HPO_4 , 0.5mM KH_2PO_4 , 1.3mM KCl, 135mM NaCl, 0.05%Tween20, pH7.4) 洗涤两次后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 30min;

[0071] (3) 用 200 μ l PBST 洗涤两次后, 每个孔中加入用抗体稀释缓冲液按照 1:8000 稀释的 YVX 多克隆抗体, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 或室温孵育 3h;

[0072] (4) 用 200 μ l PBST 洗涤两次后, 每个孔中加入按说明书稀释 3000 倍的辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗兔 IgG 结合物(Abmart 公司), 100 μ l/孔, 室温孵育 1h;

[0073] (5) 用 200 μ l PBST 洗涤三次后, 用 TMB 底物显色试剂盒(康为世纪公司) 进行显色(图 11), 室温避光孵育 25-30min, 反应产物呈蓝色, 每孔再加入 50 μ l 0.5M H_2SO_4 终止显色, 此时蓝色产物变为亮黄色, 立即用酶标仪读取 OD₄₅₀ 的值, 以与阴性 OD 值比值(P/N) 大于 2.1 为阳性;

[0074] 其中, PBST 含 3.2mM Na_2HPO_4 , 0.5mM KH_2PO_4 , 1.3mM KCl, 135mM NaCl, 0.05%Tween20, pH7.4; 抗原包被缓冲液为碳酸盐缓冲液(30mM 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH9.6); 抗体稀释缓冲液为 1%BSA, 0.01M PBS pH7.2。

[0075] 3.2 蛋白质免疫印记(Western blot) 方法检测病毒

[0076] 操作步骤：

[0077] (1) 用 TCA/丙酮沉淀法或采用植物蛋白质提取试剂盒(康为世纪公司) 提取淮山药总蛋白样品, 用 Bradford 法进行蛋白质定量, 调整蛋白质浓度为 2mg/mL;

[0078] (2) 制备蛋白电泳凝胶, 进行 SDS-PAGE;

[0079] (3) 半干式转移: 电泳结束后将凝胶割至合适大小, 用转膜缓冲液平衡, 5min \times 3 次; 预先裁好与凝胶同样大小的滤纸和 PVDF 膜, 用甲醇浸泡 1min 后, 浸入转膜缓冲液中 10min; 转膜装置从下至上依次按阳极碳板、3 层 3mm 滤纸、PVDF 膜、凝胶、3 层 3mm 滤纸、阴极碳板的顺序放好, 滤纸、凝胶、PVDF 膜精确对齐, 每一步去除气泡, 盖好阴极碳板之后接通电源, 恒流 1mA/cm², 转移 1.5h, 转移结束后, 断开电源将膜取出;

[0080] (4) 免疫反应: 用 0.01M PBS (3.2mM Na_2HPO_4 , 0.5mM KH_2PO_4 , 1.3mM KCl, 135mM NaCl, pH7.4) 洗膜, 1min; 加入封闭液(5% 脱脂奶粉或 3%BSA), 室温封闭 1~2h; 弃封闭液, 用 0.01M PBST 洗膜, 5min \times 3 次; 加入用抗体稀释缓冲液按照 1:5000 稀释的 YVX 的 CP 多克隆抗体(一抗), 室温孵育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 放置 12h 以上; 阴性对照, 以 1%BSA 取代一抗, 其余步骤与实验组相同; 弃一抗和 1%BSA, 用 0.01M PBST 分别洗膜, 5min \times 4 次; 加入用抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍的碱性磷酸酶(AP) 标记的羊抗兔 IgG 结合物(二抗), 平稳摇动, 室温 2h; 弃二抗, 用 0.01M PBST 洗膜, 5min \times 4 次; 加入 BCIP/NBT 显色液, 显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应(图 12);

[0081] 其中, 转膜缓冲液为 25mM Tris, 192mM glycine, 0.01%SDS, 20%methanol, pH8.3;

0.01M PBS 含有 3.2mM Na_2HPO_4 , 0.5mM KH_2PO_4 , 1.3mM KCl, 135mM NaCl, pH7.4; 封闭液为 5% 脱脂奶粉或 3%BSA。

[0082] 3.3 用免疫捕获反转录聚合酶链式反应(IC-RT-PCR)方法检测病毒

[0083] IC-RT-PCR 方法的操作步骤:

[0084] (1) 用抗体稀释缓冲液按照 1:8000 稀释 YVX 多克隆抗体, 每个 1.5mL 的离心管中加入 100 μl 稀释好的抗体, 37°C 孵育 1h 或室温孵育 3h;

[0085] (2) 将淮山药叶片与含 2%PVP 的 0.02M PBS 研磨缓冲液按质量体积比 0.2% (w/v) 放入研钵中, 研磨成叶汁匀浆, 吸入 1.5mL 离心管中, 9000rpm 离心 10min;

[0086] (3) 将步骤(1)中包被好抗体的 1.5mL 离心管用 PBST 洗两次, 加入 200 μl 步骤(2)准备好的叶汁上清液, 37°C 水浴 3h, 此时暴露的病毒颗粒特异性地附着于离心管内壁上(免疫捕捉);

[0087] (4) 移去叶汁, PBST 洗 3 次, DEPC 水洗 1 次, 洗毕作短暂离心去除管底余液;

[0088] (5) 用 SuperRT 一步法 RT-PCR 试剂盒(康为世纪公司)按照说明书进行 RT-PCR 反应, YVX 检测引物为 YVX-F :5' -CCAGGTCCATCAGTCACTTCT-3' (见序列表 SEQ. ID. No. 16) 和 YVX-R :5' -CTAATCTACCAGCAGTCACTTCATA-3' (见序列表 SEQ. ID. No. 17), PCR 阶段设置退火温度为 55°C, 35 个循环;

[0089] (6) RT-PCR 结束后, 取 5 μl 的 PCR 产物用质量体积浓度 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 预期片段大小为 692bp (图 13)。

[0090] 其中, 抗体稀释缓冲液为 1%BSA, 0.01M PBS pH7.2。

[0001]

序 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> 广西大学

<120> 淮山药 X 病毒的多克隆抗体制备、检测及其应用

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> Yam virus X

<400> 1

```

Met Ser Thr Pro Gly Pro Thr Val Thr Ser Thr Ser Ala Thr Ala Arg
1           5           10           15
Ala Asp Ala Ala Phe Lys Ala Ser Val Ala Pro Lys Val Gln Phe Asn
           20           25           30
Ala Ser Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Met Ala Asp Leu Lys Leu Ile
           35           40           45
Lys Tyr Ser Pro Glu Ser Asn Ala Val Ala Ser Pro Ser Gln Ile Asp
           50           55           60
Met Ile Phe Thr Leu Trp Arg Ala Ala Gly Val Pro Glu Gln Tyr Leu
65           70           75           80
Ser Leu Leu Ala Ile Asp Ile Ala Arg His Cys Ala Asp Val Gly Ser
           85           90           95
Ser Lys Lys Ala Val Leu Ser Gly Val Ala Asn Phe Val Glu Asp Thr

```

[0002]

序 列 表

100	105	110
Thr Glu Gly Thr Gly Ser Leu Val Ala Arg Arg Ser Leu Ala Ala Ile		
115	120	125
Ile Lys Thr Val Val Pro Leu Arg Gln Phe Cys Arg Tyr Tyr Ala Arg		
130	135	140
Val Val Trp Asn Met Leu Asn Asp Pro Glu Asn Pro Thr Pro Pro Ala		
145	150	155
Asn Trp Ser Ala Leu Glu Tyr Lys Glu Glu Ser Lys Phe Ala Ala Phe		
165	170	175
Asp Phe Phe Asp Ala Ile Asp His Thr Ala Ala Leu Gln Met Pro Leu		
180	185	190
Val Arg Glu Pro Thr Glu Ile Glu Arg Val Ala His Ala Thr Gln Thr		
195	200	205
Arg Leu Thr Leu Thr Arg Arg Ala Arg Glu Ser Gly Asp Arg Lys Ser		
210	215	220
Ser Leu Leu		
225		

- <210> 2
- <211> 771
- <212> DNA
- <213> Yam virus X

<400> 2

```

cccgaattca tgattgaaag tatgtctaca ccaggtecat cagteacttc tgcttcagec 60
accgctcgcg ctgatgetgc ttttaaggcc tcagttgctc ccaaagttaa atttgatggt 120
tcaaatgcgg cttcaattcc ttctatggcc gatttgaaac ttataaagta ctetcccga 180
tcgaatgcgc tcgcgtcacc aagccaaata gaaatgatct tcacacttg gcgcgctgcc 240
gggttctctg aacagtaect ttaetcttt gctattgata ttgcccgcc 300
gttgatcat caaagaaagc tgtcttatct ggcgttgcaa actttgtaga agacactaat 360
    
```

[0003]

序 列 表

gaagggactg gttcattagt tgctcgtcgt tctctggctg caataatcaa aacagtcgtg	420
cctctgagac aatthttgtcg ttattaegca cgtgtttgitt ggaacatget taatgacceca	480
gagaacceca cacctccage caattggtea gcctctegaat ataaagatga gagtaagttt	540
gctgcatttg actttettga tgctattgat cacactgeag cattacaaat gccacttatt	600
cgagagcceca cggaaattga gcgtgtagcc cacgcgacac agaccagatt gactttaaca	660
agacgagcaa aagagtcctg gaatgcatct gtagtttett atgaagtga tgctggtaga	720
ttaggtaaat cacctggcct cctcaacttg cctgaacctt aagtcgacaa a	771

<210> 3

<211> 6139

<212> DNA

<213> Yam virus X

<400> 3

gctcttcega tctccaagat cgagcagatc gactcaagat aagaccgagc gtcgctaaaa	60
ccaaggtctc atcatgtctc aagtaaagtc cgttttggaa cgactaacgc actcctctgt	120
tagagctggt ctacaagagg aagcataaccg taatattagg cctatattag ctaaagctag	180
agctgtaaat ccttatgtac aaactagtaa ctcagctgac gttctagaga aattaggtat	240
cctcactaac ccatacaata tcaatgtaca taccatgcc gcctgtaaag ctatagagaa	300
tagactacta gaaattctcg gttctatatt gccccaaaagc ccagttacct ttcttttct	360
taaacgaagt aaattgggga tgatgcatcg tgatccgaac aaaaaccgag atttctttta	420
taatcagcat ttagagctc gagatctatc tagatatgcc ttcgaggatg tatataaac	480
aatcctcag atccaaacac ccgtggcata catatcagac acattacact ttgggaacc	540
agaagatctt tgttgcatct ttagatcaaa cccaatgcta gacacaectt atgccacatt	600
agtactacc cagaggctt acttcaaaaca cccatcagct gacctcatt tatatcaaat	660
tagttataat tatggtggat tccaatacat ccctgggggt catggtggag gttcctacca	720
tcatgaatte aaaagtctc aatggttggga atatggaaaa cttcattatt cctatcaaca	780
acgtagacac tacatcacat gccaaatgat tgaaagtcta ggtgccaacc atttattcgt	840
tttccaagc ggagattiga tcactccagc tgttcgggctc ttcaaagctg atgagtttgt	900
ctcattgcca aaaattttct cgccatctga caagaattgc tcaagaccaa ttaagaaaat	960

[0004]

序 列 表

ttttgcaatg caaatgctcc tatacattaa atccataaag agtccttctg aaagagacat	1020
ttatgcgaaa ataagacaac teatecaaac acacaaactt gatgaattcg acccgcaaga	1080
aatigtgcat atageccaatt atttttactt tatateccaa ctttcatcaa taaattceta	1140
tcaagagett ctatcctggt cctggttcaa gaaaaacatg tggtaeccag ttctgtactg	1200
gattgtcaat cgatgggaaa acactttcgg gatgagagaa tttgcacaat tactcaaagc	1260
tttagaatgg gagactttta cttattccat tgaagtgagg gaatatcgga atcaacatca	1320
catatacaat cccaacttag gtcacatttg ggatttgctt gctgaccaa etgagaataa	1380
gggtgttgat ttattcaaaa atgtgctaga gggtgtacca gccaccacaaa caaaaataga	1440
tgttgttgaa gagtgtaaag ctcaagcaga gcagatggag agaatttttg aaaactcaaa	1500
cagactcgat gagcttaaac aacttccatg gttttcatgg ttaaaaattc tcaacgctgc	1560
tggttttaag ggtgaccaag agcaatttaa cccaaatgat cattactaa tttgtccaat	1620
ttctgacatc aatacatgac caaaagtga aggtttcttt aatctatttg aggaagtcce	1680
gatgaaatta atcaatatat tatgtgatgc acatcgcagc cctatcaaaag taaattttga	1740
ccatcacaga gctagcatgt atgeatccga tgttaaaaat cacagaattg gagcacattt	1800
aaaacaaatg tccactgctt ggaaagctga gttctctttg cgttgtgagc aggacgacgt	1860
ctctttatac acttctgiga ttcacggcgc tgggtgatca ggtaaatcca acttgataca	1920
aaacttcatg cgatcacttc cacgeaatte tgaactttgt actgttgttg ttcgacaaa	1980
tgagttcgt attgactggg agtctaaagt gccactgetg aaccgcactt gttttaaac	2040
ttttgagaaa gcttttagtc agggttgtgg tccagtagta atatttgatg attacagcaa	2100
gctaccagct ggttgcaattg aagctcatat catgacacat ccaaatttg agttgggtgat	2160
actaactggt gattcaagge aatcattcca tcatgaaagt aacctgaag cgctaatcac	2220
tcacctcca ccagctaactg aaatttactc cccacattgt egatattatc tcaatgcgac	2280
acafagaaat aggaaagatt tggetaatat tttgggagtt tattctgaag ttgaaggac	2340
cactacaate actatgtcat cgcaaataca acaagggata ccaattttat gtccttcac	2400
tgttaaaaaa gactcactaa atgatttagg gaggtcatcc atgacatac ctggttgeca	2460
aggattaacc gctaagaaaa ttcaaattct tttggacact aacacttacc tatgttcaaa	2520
taatgtgatg tacacagcat tatcaagage tgttgactca attcatttta tcaaacactgg	2580
accgaatca caggaatact ggactaaact tgacgctact ccatacctaa aaactttct	2640
ggagttatctt cgggaggaga aatttaatga tgtgattgtt gaggaacctg ttgttaatga	2700
accaccacca cctcaaacac atttacctgt ggataatgca cacattttgc ttgataaaat	2760

[0005]

序 列 表

ggtcaggaa caaggagaaa aatatgacag agagctgttt gcatectcat ctggacatac	2820
caactgtata caaactaacg atectgttgt acaaatttte caacateagc aagcacgtga	2880
tgaaactetc ttttggaaga caatggacgt gagagttaac aattccacte caattaagaa	2940
tgaaatagaa tttgttetta agaaagacat tggagatatt ctgtttettaa attatcagea	3000
tgctatgaat ctcccaaagg agcccatcc ttttgataaa gacctttgga ccgctccgc	3060
cgtcgaagtt caaaacaaat acttgaaaa acccattcat gctttaatta atgcaaattt	3120
aagacaatcc cctgattttg atgetgaggg gatcatgata tttttgaagt cacaatgggt	3180
taagaaaaca gaaaaacteg geattctcaa cgttaaacec ggacaaaaca tagctgcttt	3240
tatgcaagaa acagtcatgt tgtacggaae tatggegagg tacatgcgaa agatgaggaa	3300
ccggtacaac ccaaggaatg ttttcatcaa ctgtgaaaag aatccggaag aactctcacc	3360
ctttatcaaa gactcatgga actttaacaa tagtgcacat tcaaatgatt ttacagcctt	3420
tgatcaatct caggacggag caatgctcca atttgaagta attaaggcca aacatcattg	3480
cattctgaa ccataatg aaggatatat acatttaaaa actcatgcca aatattcaec	3540
tggaacatta gcaattatga ggttgactgg tgagggaccg acttttgacg ccaaacctga	3600
atgtgccata gcttaccatt tcaccaaata tcatcacaat ccaaatgact catatttatt	3660
cgctgggtgat gattcggcca tggataacaa accaattggt aaaattttett ttgacaagtt	3720
atcttcaga ttgaagttaa ctgctaaaga aaaaatatac aagcaaaaac caggtgatta	3780
tgctgaattt tgtgggaatt taattactcc cgctgggett attaatctc cacttaaatt	3840
atatgcatca ctgaaactgg ccgagagaae tggtaatatt aaaaattgag ttaaatetta	3900
tgctgaggac tgctctttag catacaagct tggatgatgac attcataaca ttcttaacac	3960
cgaagaaatg atctaccate aatcgactgt taggaaatta gttaaacac atcaatcaga	4020
ggctctacaa ccagggttaa gttctcatga ctctgatttt gacatagacc acgctttctg	4080
atgfgtgata gactaattga cttattaact ttaaagtttt ctaggacctt agtaccactg	4140
acttttccaa ttgttttca tgcagttgcc ggagctggta aaactacttt cttaataaac	4200
ctgcttgttg acccaattta cgaaattgto agcttgaatg atttgactag agctaaaatt	4260
cacggaaatt ctatcaagac ttctttttagc tctgaaaggt ctgaacgtgt gctcatteta	4320
gacgaatacc tgcaatttga cgaggagacc atctcaaaag cacaattcat tttctctgat	4380
ccatatcaat cagcttgca accacgactt gcacacttca cttgcaacca aactcaaagg	4440
tttggtate aaactgeiga attettacgc aagttgaaet ttgatgtggg tteagataaa	4500
atggatgaat faaagtttgg tcatctcttc aattctgaac tttctggcac agtcattgga	4560

[0006]

序 列 表

tactcaccgg aggtgtgiga attgctttca gctcattgtg ttgaatttct tgaaccttgc	4620
egcaccgtgg gattgacttt caacaaagtc actctgggite tcaacaette gaatettgat	4680
gatattcett cacacattct gtacatcage ttaacacgte atategagag tatttttaatt	4740
ttaactcctg atgctetetta ctctctcacc agattataaa caagtttacc ttgtttttgt	4800
ggttggttg agtgtggcct taggttgita cattctgact agatctactc tgcctcacgt	4860
gggagataac ttgcattcct taceccatgg tggcacttat gctgatggta ccaagaggat	4920
aatttaccat agacetteag gacegttgca atcacacggc aacaacttca ttctctagg	4980
tettgtgete ttgetgatat tectcatota tgtctceggc actaatgccc acaggcgtgt	5040
tagttgcact tgttatgat gtgtgectce tgcgaattga aagcactcca tgtataatea	5100
gaattacagg agaatcaata accatacttt ctgcaacat cacgctgaa ctactacaag	5160
ctgtacaate tctccaaccg ctctcatatag acgggttaag ttttettaat aattgaaagt	5220
atgtctacgc caggtccaac agtcaacttca acttcagcta ctgcccagac tgatgcccgt	5280
tttaaggcct cagttgetcc caaggttcaa tttaatgctt caaatgcagc ctcaattcct	5340
tctatggctg atttgaagct tattaaatac tctctgfaat caaatgcggc cgcgtcacca	5400
agccaaatag acatgatitt tacactgtgg cgcgctgctg gtgttcccga acagtatctt	5460
tcacttttag caattgatat tgctcgccac tgcgcgatg ttggetcacc taagaaagca	5520
gttttatctg gagttgcaa ctctgtggaa gatactactg aaggaacagg ttcactagtt	5580
gctcgtcgtt ctctggctgc tattatcaag acggctgtgc cttaagaca attttgcct	5640
tattatgcac gtgtcgtctg gaacatgctt aacgatecgg agaaceccac gctctctget	5700
aactggctg ctctcgagta caaggaagag agtaagtttg ccgctttcga tttcttcat	5760
gegatgate acacagcggc actccaaatg ccactcgtac gagagcctac agagattgag	5820
cgtgttgcaac acgcaactca gaccagatta acattaacaa gacgagcaag agagtctgga	5880
gatcggaaga gcagtctctt atgaagtgac tgctggtaga ttaggtaaat cacctggcct	5940
cctcaacttg cctgaacctt aataaacgc atttcaaagc gttaaaatgt tggcttgcct	6000
accctactaa tagtatgccc tgggcttggc teattgatga cattgtttca caactttgtt	6060
ggctcatcaat tatttcaaag ttgtttctctg ccatagtaaa cttaagcact taggaagaag	6120
ttttcaataa atttctttt	6139

<210> 4

<211> 24

[0007]

序 列 表

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gaccacgegt atcgatgtcg actttttttt ttttttttv

40

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

ttgctcgtcg ttcctetgget gc

22

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

cctcctgcta actggtctgc tctc

24

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

gaccacgegt atcgatgtcg ac

22

[0008]

序 列 表

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

tgatgggtgt ttgaagtaag cctctg

26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

tctgatatgt atgccacggg tgtttg

26

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

acatacccat gccgcctgta aag

23

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

[0009]

序 列 表

gcattgctcc gtcctgagat tgat	24
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 12	
egtccgccgt cgaagttaa	20
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 13	
cacgctcaat ctctgtaggc tctc	24
<210> 14	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 14	
cccgaattca tgattgaaag tatgtctaca cc	32
<210> 15	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0010]

序 列 表

<400> 15	
tttgtcgaact taaggttcag gcaagttgag	30
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
ccaggtccat cagteacttc t	21
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
ctaatecacc agcagteact tcata	25
<210> 18	
<211> 1335	
<212> PRT	
<213> Yam virus X	
<400> 18	
Met Ser Gln Val Asn Ala Val Leu Glu Arg Leu Thr Asp Ser Ser Val	
1 5 10 15	
Arg Ala Val Leu Gln Glu Glu Ala Tyr Arg Asn Ile Arg Pro Ile Leu	
20 25 30	
Ala Lys Ala Arg Ala Val Asn Pro Tyr Val Gln Thr Ser Asn Ser Ala	

[0011]

序 列 表

275	280	285			
Cys Ser Arg Pro Ile Lys Lys Ile Phe Ala Met Gln Met Leu Leu Tyr					
290	295	300			
Ile Lys Ser Ile Lys Ser Pro Ser Glu Arg Asp Ile Tyr Ala Lys Ile					
305	310	315	320		
Arg Gln Leu Ile Gln Thr His Lys Leu Asp Glu Phe Asp Pro Gln Glu					
	325	330	335		
Ile Val His Ile Ala Asn Tyr Phe Tyr Phe Ile Ser Gln Leu Ser Ser					
	340	345	350		
Ile Asn Ser Tyr Gln Glu Leu Leu Ser Cys Ser Trp Phe Lys Lys Asn					
	355	360	365		
Met Trp Tyr Pro Val Arg Asp Trp Ile Val Asn Arg Trp Glu Asn Thr					
	370	375	380		
Phe Gly Met Arg Glu Phe Ala Gln Leu Leu Lys Ala Leu Glu Trp Glu					
385	390	395	400		
Thr Phe Thr Tyr Ser Ile Glu Val Arg Glu Tyr Arg Asn Gln His His					
	405	410	415		
Ile Tyr Asn Pro Asn Leu Gly His Ile Trp Asp Leu Pro Ala Asp Gln					
	420	425	430		
Thr Glu Asn Lys Gly Val Asp Leu Phe Lys Asn Val Leu Glu Gly Val					
	435	440	445		
Pro Ala Thr Gln Thr Lys Ile Asp Val Val Glu Glu Cys Lys Ala His					
	450	455	460		
Asp Glu Gln Met Glu Arg Ile Phe Glu Asn Ser Asn Arg Leu Asp Glu					
465	470	475	480		
Leu Lys Gln Leu Pro Trp Phe Ser Trp Leu Lys Ile Leu Asn Ala Ala					
	485	490	495		
Gly Phe Lys Gly Asp Gln Glu Gln Phe Asn Pro Asn Asp His Ser Leu					
	500	505	510		
Ile Cys Pro Ile Ser Asp Ile Asn Thr Leu Pro Lys Val Glu Gly Phe					

[0013]

序 列 表

515	520	525	
Phe Asn Leu Phe Glu Glu Val	Pro Met Lys Leu Ile Asn Ile Leu Cys		
530	535	540	
Asp Ala His Arg Ser Pro Ile Lys Val Asn Phe Asp His His Arg Ala			
545	550	555	560
Ser Met Tyr Ala Ser Asp Val Lys Asn His Arg Ile Gly Ala His Leu			
565	570	575	
Lys Gln Met Ser Thr Ala Trp Lys Ala Glu Phe Ser Leu Arg Cys Glu			
580	585	590	
Gln Asp Asp Val Ser Leu Tyr Thr Ser Val Ile His Gly Ala Gly Gly			
595	600	605	
Ser Gly Lys Ser Asn Leu Ile Gln Asn Phe Met Arg Ser Leu Pro Arg			
610	615	620	
Asn Ser Glu Leu Cys Thr Val Val Val Pro Thr Asn Glu Leu Arg Ile			
625	630	635	640
Asp Trp Glu Ser Lys Val Pro Leu Leu Asn Arg Thr Cys Phe Lys Thr			
645	650	655	
Phe Glu Lys Ala Leu Val Gln Gly Cys Gly Pro Val Val Ile Phe Asp			
660	665	670	
Asp Tyr Ser Lys Leu Pro Ala Gly Cys Ile Glu Ala His Ile Met Thr			
675	680	685	
His Pro Asn Ile Glu Leu Val Ile Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gln Ser			
690	695	700	
Phe His His Glu Ser Asn Thr Glu Ala Leu Ile Thr His Leu Pro Pro			
705	710	715	720
Ala Thr Glu Ile Tyr Ser Pro His Cys Arg Tyr Tyr Leu Asn Ala Thr			
725	730	735	
His Arg Asn Arg Lys Asp Leu Ala Asn Ile Leu Gly Val Tyr Ser Glu			
740	745	750	
Val Glu Gly Thr Thr Thr Ile Thr Met Ser Ser Gln Ile Gln Gln Gly			

[0014]

序 列 表

755	760	765	
Ile Pro Ile Leu Cys Pro Ser Thr Val Lys Lys Asp Ser Leu Asn Asp			
770	775	780	
Leu Gly Arg Ser Ser Met Thr Tyr Ala Gly Cys Gln Gly Leu Thr Ala			
785	790	795	800
Lys Lys Ile Gln Ile Leu Leu Asp Thr Asn Thr Tyr Leu Cys Ser Asn			
	805	810	815
Asn Val Met Tyr Thr Ala Leu Ser Arg Ala Val Asp Ser Ile His Phe			
	820	825	830
Ile Asn Thr Gly Pro Asn Ser Gln Glu Tyr Trp Thr Lys Leu Asp Ala			
	835	840	845
Thr Pro Tyr Leu Lys Thr Phe Leu Glu Leu Phe Arg Glu Glu Lys Phe			
	850	855	860
Asn Asp Val Ile Val Glu Glu Pro Val Val Asn Glu Pro Pro Pro Pro			
865	870	875	880
Gln Thr His Leu Pro Val Asp Asn Ala His Ile Leu Leu Asp Lys Met			
	885	890	895
Val Glu Glu Gln Gly Glu Lys Tyr Asp Arg Glu Leu Phe Ala Ser Ser			
	900	905	910
Ser Gly His Thr Asn Cys Ile Gln Thr Asn Asp Pro Val Val Gln Ile			
	915	920	925
Phe Gln His Gln Gln Ala Arg Asp Glu Thr Leu Phe Trp Lys Thr Met			
	930	935	940
Asp Val Arg Val Asn Asn Ser Thr Pro Ile Lys Asn Glu Ile Glu Phe			
945	950	955	960
Val Leu Lys Lys Asp Ile Gly Asp Ile Leu Phe Leu Asn Tyr Gln His			
	965	970	975
Ala Met Asn Leu Pro Lys Glu Pro Ile Pro Phe Asp Lys Asp Leu Trp			
	980	985	990
Thr Ala Ser Ala Val Glu Val Gln Asn Lys Tyr Leu Glu Lys Pro Ile			

[0015]

序 列 表

995	1000	1005
His Ala Leu Ile Asn Ala Asn	Leu Arg Gln Ser Pro	Asp Phe Asp
1010	1015	1020
Ala Glu Gly Ile Met Ile Phe	Leu Lys Ser Gln Trp	Val Lys Lys
1025	1030	1035
Thr Glu Lys Leu Gly Ile Leu	Asn Val Lys Pro Gly	Gln Thr Ile
1040	1045	1050
Ala Ala Phe Met Gln Glu Thr	Val Met Leu Tyr Gly	Thr Met Ala
1055	1060	1065
Arg Tyr Met Arg Lys Met Arg	Asn Arg Tyr Asn Pro	Arg Asn Val
1070	1075	1080
Phe Ile Asn Cys Glu Lys Asn	Pro Glu Glu Leu Ser	Ser Phe Ile
1085	1090	1095
Lys Asp Ser Trp Asn Phe Asn	Asn Ser Ala His Ser	Asn Asp Phe
1100	1105	1110
Thr Ala Phe Asp Gln Ser Gln	Asp Gly Ala Met Leu	Gln Phe Glu
1115	1120	1125
Val Ile Lys Ala Lys His His	Cys Ile Pro Glu Pro	Ile Ile Glu
1130	1135	1140
Gly Tyr Ile His Leu Lys Thr	His Ala Lys Ile Phe	Thr Gly Thr
1145	1150	1155
Leu Ala Ile Met Arg Leu Thr	Gly Glu Gly Pro Thr	Phe Asp Ala
1160	1165	1170
Asn Thr Glu Cys Ala Ile Ala	Tyr His Phe Thr Lys	Tyr His His
1175	1180	1185
Asn Pro Asn Asp Ser Tyr Leu	Phe Ala Gly Asp Asp	Ser Ala Met
1190	1195	1200
Asp Asn Lys Pro Ile Val Lys	Ile Ser Phe Asp Lys	Leu Ser Ser
1205	1210	1215
Arg Leu Lys Leu Thr Ala Lys	Glu Lys Ile Tyr Lys	Gln Lys Pro

[0016]

序 列 表

1 5 10 15
 Val Val Gly Leu Ser Val Ala Leu Gly Cys Tyr Ile Leu Thr Arg Ser
 20 25 30
 Thr Leu Pro His Val Gly Asp Asn Leu His Ser Leu Pro His Gly Gly
 35 40 45
 Thr Tyr Ala Asp Gly Thr Lys Arg Ile Ile Tyr His Arg Pro Ser Gly
 50 55 60
 Pro Leu Gln Ser His Gly Asn Asn Phe Ile Pro Leu Gly Leu Val Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Phe Leu Ile Tyr Val Ser Gly Thr Asn Arg His Arg Arg
 85 90 95
 Val Ser Cys Thr Cys Tyr Val Cys Val Pro Pro Ala Asn
 100 105

<210> 21

<211> 68

<212> PRT

<213> Yam virus X

<400> 21

Met Ser Pro Val Leu Ile Ala Thr Gly Val Leu Val Ala Leu Val Met
 1 5 10 15
 Tyr Val Cys Leu Leu Arg Ile Glu Ser Thr Pro Cys Ile Ile Arg Ile
 20 25 30
 Thr Gly Glu Ser Ile Thr Ile Ser Ser Cys Asn Ile Thr Pro Glu Leu
 35 40 45
 Leu Gln Ala Val Gln Ser Leu Gln Pro Leu His Ile Asp Gly Leu Ser
 50 55 60
 Phe Leu Asn Asn
 65

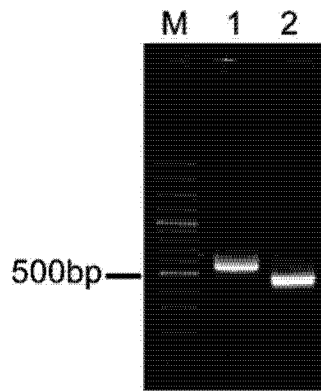


图 1

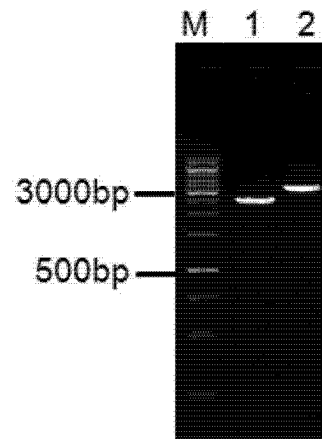


图 2

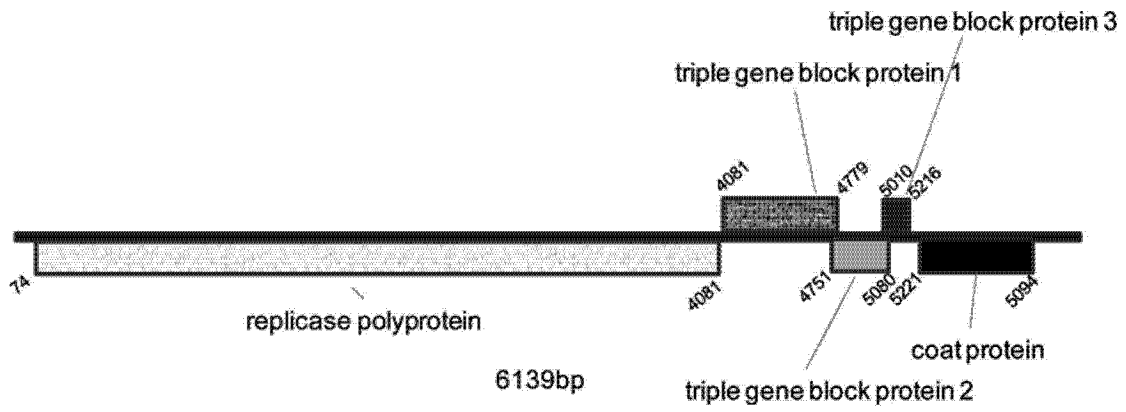


图 3

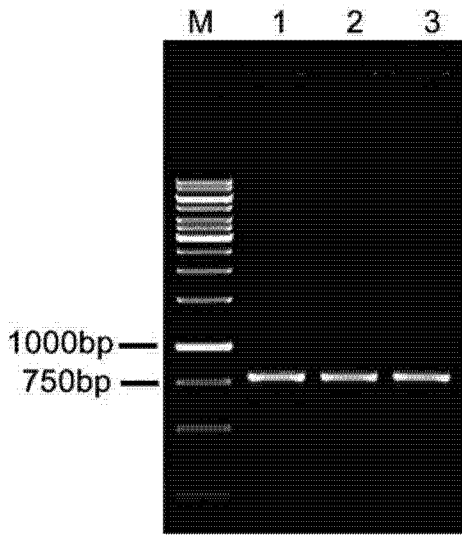


图 6

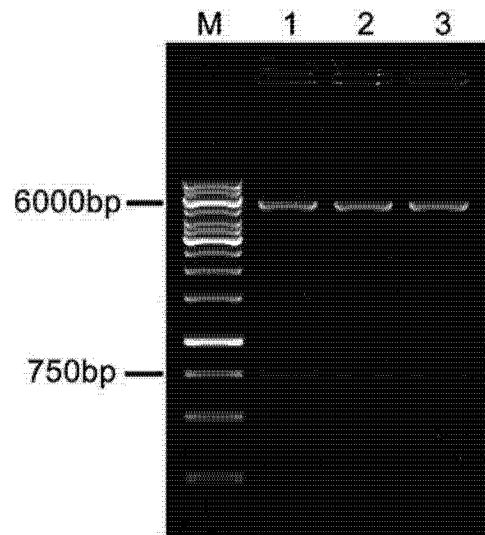


图 7

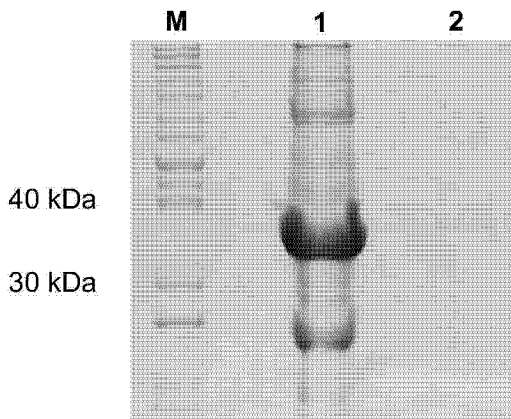


图 8

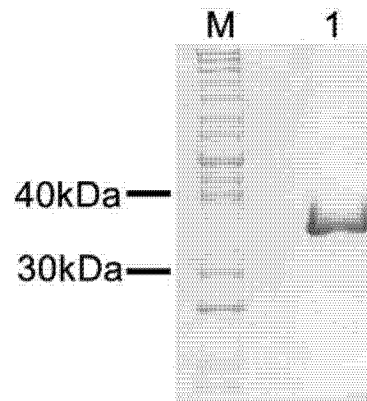


图 9

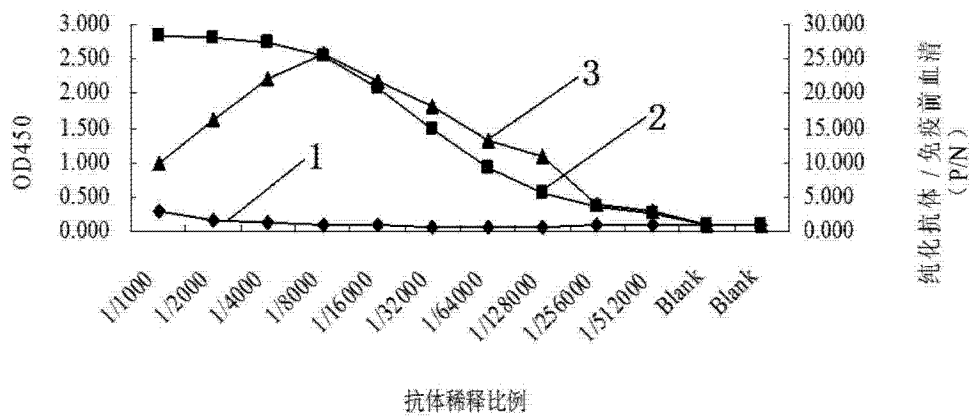


图 10

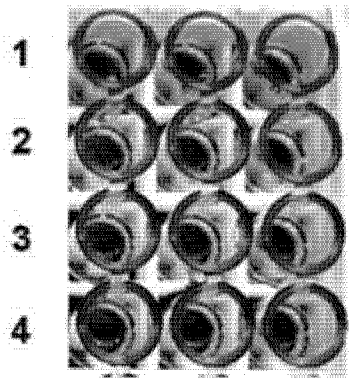


图 11

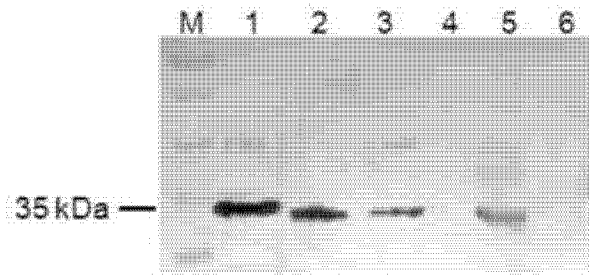


图 12

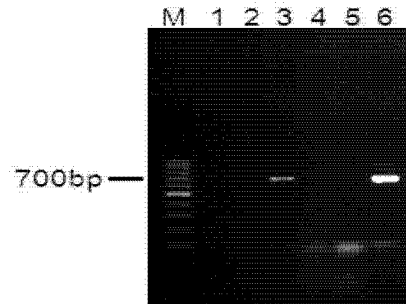


图 13

专利名称(译)	淮山药X病毒的多克隆抗体制备、检测及其应用		
公开(公告)号	CN103543264B	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201310541274.7	申请日	2013-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学		
申请(专利权)人(译)	广西大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学		
[标]发明人	陈保善 邹承武 蒙姣荣		
发明人	陈保善 邹承武 蒙姣荣		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	杨立华		
其他公开文献	CN103543264A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种侵染淮山药的马铃薯X病毒属病毒——淮山药X病毒 (Yam virus X, YVX) 的多克隆抗体制备、检测及其应用。基于YVX基因组, 发明人通过原核表达纯化YVX的外壳蛋白 (Coat protein, CP) 并用于免疫家兔制备多克隆抗体, 该多克隆抗体能特异性识别原核表达的YVX的外壳蛋白和侵染淮山药的YVX病毒的外壳蛋白, 并产生特异性免疫反应。基于此, 发明人还建立了一套高效、高灵敏和准确的IC-RT-PCR、ELISA和Western blot方法, 可以特异性地从感染YVX的淮山药植株中检测出YVX。应用本发明, 可为YVX与寄主相互作用研究以及该病毒的快速检测、分型和分子生物学研究提供物质基础和技术支撑, 为该病毒的流行监测和防治打下坚实基础。

