



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101865918 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 200910094349. 5

(22) 申请日 2009. 04. 15

(71) 申请人 云南农业大学

地址 650201 云南省昆明市北郊黑龙潭云南
农业大学

(72) 发明人 刘雅婷 张世琬 李永忠 姬广海
罗佑珍 彭润 徐玲

(74) 专利代理机构 昆明今威专利代理有限公司
53115

代理人 康珉

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/536 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒及其鉴定方法

(57) 摘要

本发明公开一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒及其鉴定方法,属植物病原细菌的免疫测定法技术领域。该试剂盒由酶标反应板和如下相关试剂构成,(1)抗血清:PsY₅A,(2)0.05M pH9.6 包被缓冲液;(3)0.01M pH7.4PBS;(4)1×PBST 洗涤液;(5)pH5.4 的底物缓冲液;(6)TMB 底物反应液;(7)SPA 及 HRP-SPA(8)阳性对照物为烟草野火病菌株系的菌悬液,菌体浓度为 5×10^8 cells/ml。本发明还提供了用该试剂盒进行鉴定的方法。本发明以制备的 PsY₅A 抗血清为基础,应用 SPA-ELISA 技术,使检测真正做到了简便、快速、灵敏、准确。

1. 一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒,该试剂盒由酶标反应板和相关试剂构成,所述的相关试剂有以下部分:

(1) 抗血清:PsY₅A,所述的PsY₅A抗血清是通过检测菌株的致病性筛选致病力强的烟草野火病 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Y₅ 菌株为抗原,通过免疫注射健康新西兰大耳兔,按照颈动脉放血方法获得;

(2) 0.05M pH9.6 包被缓冲液,所述的包被缓冲液用 Na₂CO₃1.59g, NaHCO₃2.93g,加蒸馏水至 1000ml 制得;

(3) 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液;

(4) 1×PBST 洗涤液,所述的 1×PBST 洗涤液为吐温-200.5ml 加 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液至 1000ml;

(5) pH5.4 的底物缓冲液,其中 A 液为 0.1M 柠檬酸 2.22ml;B 液为 0.1MNa₂HPO₄2.78ml 加蒸馏水 10ml;

(6) 四甲基联苯胺底物反应液,所述的四甲基联苯胺底物反应液由四甲基亚砷配制成 10mg/ml 四甲基联苯胺 100 μl,加入 0.65% H₂O₂25 μl,再加入上述底物缓冲液至 10 μl;

(7) 金黄色葡萄球菌 A 蛋白纯品及辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白,所述的金黄色葡萄球菌 A 蛋白纯品的工作浓度为 2.5 μg/ml,以包被缓冲液先配成 1mg/ml 母液,4℃ 贮备;所述的辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白的工作浓度为 1:40;

(8) 阳性对照物为烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)Y₅ 株系的菌悬液,菌体浓度为 5×10⁸cells/ml。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒对烟草野火病菌的鉴定方法,该方法按以下步骤进行:

(1) 供试样品的处理,将样品混匀,称取种子或烟株组织 5g 放入研钵中,加入 0.01M 磷酸盐缓冲液 20ml 研磨,静置 3h~4h,备用。

(2) 用所述的快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒鉴定 (1) 中所述的样品处理液,并依如下步骤进行:

①包被金黄色葡萄球菌 A 蛋白,其工作浓度为 2.5 μg/ml,200 μl/孔,4℃ 过夜;

②加入用 0.01M 磷酸缓冲液稀释 5000 倍的一抗,200 μl/孔,37℃ 孵育 3h 或 4℃ 过夜,0.01M PBST 洗板 5 次,5min/次;

③加入供试样品处理液,200ul/孔,37℃ 孵育 3h;

④用 0.01M PBST 洗板 5 次,5min/次;

⑤加入用 0.01M 磷酸缓冲液稀释 2000 倍的二抗,200 μl/孔,37℃ 孵育 2h 或 4℃ 过夜,洗涤同④;

⑥加入辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白,其工作浓度为 1:40,200ul/孔,37℃ 孵育 2h 或 4℃ 过夜,洗涤同④;

⑦加入四甲基联苯胺底物反应液,100 μl/孔,37℃ 孵育 10~20min;

⑧加入 2M H₂SO₄ 终止反应,50 μl/孔,在酶联免疫检测仪上读 OD₄₅₀ 值,P/N > 2.0 判为阳性。

(3) 阳性对照为烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)Y₅ 株系的菌悬液,菌体浓度为 5×10⁸cells/ml;

(4) 空白对照为无菌水。

一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒及其鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物病原细菌的免疫测定法技术领域,具体涉及对烟草野火病菌进行鉴定的试剂盒及其鉴定方法。

背景技术

[0002] 烟草野火病(其病原学名为 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)是由烟草假单胞杆菌引起的细菌性病害。20世纪90年代以来,由于生产上大面积种植感病品种和品种单一等原因,该病害成为烟草生产上的一大难题。我国所有种烟省区皆有发生,尤以黑龙江、吉林、辽宁、山东、四川、云南等烟区发病较为严重,许多烟田发病率高达40%以上,有的甚至达100%,造成绝产绝收。烟草感病后严重影响烤烟品质及产量,为预防烟草野火病的危害,对烟草野火病菌其进行快速、准确的鉴定是防效的关键之一。

[0003] 现代血清学技术的迅速发展,为细菌性病害的种类鉴定、种群动态分布、发生流行规律研究及监测提供了快速、灵敏、准确的方法。

[0004] 血清学技术是以抗原、抗体为基础,利用抗原-抗体的特异性反应来检测、鉴定病原的。常用的血清学方法包括凝集反应测定法(包括有玻片凝集反应和试管凝集反应)、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA,简称ELISA法)等。ELISA法是目前植物细菌性病害诊断上应用较广泛的一种免疫学方法(张爱红等,2008,几种植物病原细菌的检测技术和鉴定技术,河北农业科学,12(8):30-32)。

[0005] 对于植物病原菌检测,最近使用最多的是金黄色葡萄球菌A蛋白酶联免疫吸附测定法(简称SPA-ELISA法),该方法在保持了ELISA法中的双抗夹心法灵敏度的同时,免除了制备两种抗体的麻烦,同时由于金黄色葡萄球菌A蛋白(*Staphylococcal Protein A*、简称SPA)本身的特性,大大缩短了与抗体孵育的时间。

[0006] 但是,上述血清学方法在检测和鉴定植物病原细菌方面各有优点,但也存在一些缺陷,如凝集反应的优点在于简便、快速,但灵敏度和专化性中等,而SPA-ELISA灵敏度和专化性都很好。

[0007] 长期以来对于烟草野火病的鉴定和检测主要是根据症状学特征,病原菌形态特征和生理生化特性,存在耗时较长、灵敏性、准确性较差的不足。

发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题是提供一种鉴定烟草野火病菌的试剂盒及其用该试剂盒鉴定烟草野火病菌的方法,该试剂盒及其用该试剂盒鉴定烟草野火病菌方法能简便、快速、灵敏、准确地鉴定烟草野火病。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案之一是提供一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒,该试剂盒由酶标反应板和相关试剂构成,所述的相关试剂有以下部分:

[0010] (1) 抗血清:PsY₅A,所述的PsY₅A抗血清是通过检测菌株的致病性筛选致病力强的烟草野火病 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Y₅ 菌株为抗原,通过免疫注射健康新西兰

大耳兔,按照颈动脉放血方法获得。

[0011] (2)0.05M pH9.6 包被缓冲液 (coating buffer, CB, 简易配方: Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水至 1000ml 即可)

[0012] (3)0.01M pH7.4 磷酸缓冲液 (PBS)

[0013] (4)1×PBST 洗涤液:吐温-20 (即 Tween-20):0.5ml 加 0.01M pH7.4PBS 至 1000ml

[0014] (5)pH5.4 的底物缓冲液,其中

[0015] A 液为 0.1M 柠檬酸 2.22ml;

[0016] B 液为 0.1M Na_2HPO_4 2.78ml 加蒸馏水 10ml;

[0017] (6)四甲基联苯胺底物反应液 (即 TMB 底物反应液):所述的四甲基联苯胺底物反应液由四甲基亚砷配制成 10mg/ml 四甲基联苯胺 $100\ \mu\text{l}$, 加入 0.65% H_2O_2 25 μl , 再加入上述底物缓冲液至 $10\ \mu\text{l}$;

[0018] (7)金黄色葡萄球菌 A 蛋白纯品 (SPA) 及辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (HRP-SPA), 所述的金黄色葡萄球菌 A 蛋白纯品的工作浓度为 $2.5\ \mu\text{g/ml}$, 以包被缓冲液先配成 1mg/ml 母液, 4°C 贮备; 所述的辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白的工作浓度为 1 : 40;

[0019] (8)阳性对照物为烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) Y_5 株系的菌悬液, 菌体浓度为 5×10^8 cells/ml。

[0020] 上述金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 为华美生物工程公司产品, 上述辣根过氧化物酶标记 A 蛋白 (HRP-SPA) 为上海科欣生物技术研究产品。

[0021] 为解决上述技术问题, 本发明的另一技术方案是提供一种用上述一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒对烟草野火病菌进行鉴定方法, 该方法按以下步骤进行:

[0022] (1) 供试样品的处理: 将样品混匀, 称取种子或烟株组织 5g 放入研钵中, 加入 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 20ml 研磨, 静置 3h ~ 4h, 备用。

[0023] (2) 用所述的快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒鉴定 (1) 中所述的样品处理液, 并依如下步骤进行:

[0024] ①包被金黄色葡萄球菌 A 蛋白, 其工作浓度为 $2.5\ \mu\text{g/ml}$, $200\ \mu\text{l}$ /孔, 4°C 过夜;

[0025] ②加入用 0.01M 磷酸缓冲液稀释 5000 倍的一抗, $200\ \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 3h 或 4°C 过夜, 0.01M PBST 洗板 5 次, 5min/次;

[0026] ③加入供试样品处理液, $200\ \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 3h;

[0027] ④用 0.01M PBST 洗板 5 次, 5min/次;

[0028] ⑤加入用 0.01M 磷酸缓冲液稀释 2000 倍的二抗, $200\ \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 2h 或 4°C 过夜, 洗涤同④;

[0029] ⑥加入辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白, 其工作浓度为 1 : 40, $200\ \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 2h 或 4°C 过夜, 洗涤同④;

[0030] ⑦加入四甲基联苯胺底物反应液, $100\ \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 10 ~ 20min;

[0031] ⑧加入 2M H_2SO_4 终止反应, $50\ \mu\text{l}$ /孔, 在酶联免疫检测仪上读 OD450 值, $P/N > 2.0$ 判为阳性。

[0032] (3) 阳性对照为烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) Y_5 株系的菌悬液, 菌体浓度为 5×10^8 cells/ml;

[0033] (4) 空白对照为无菌水。

[0034] 与现有技术相比,本发明的优点是:以制备的 PsY₅A 抗血清为基础,应用 SPA-ELISA 技术,使检测真正做到了简便、快速、灵敏、准确。

具体实施方式:

[0035] 下列实施例中所使用的实验方法如无特殊说明均为常规方法,本发明的试剂盒的制备方法按常规方法。

[0036] 实例 1:用本发明的试剂盒及其鉴定方法对病株进行鉴定的实施例

[0037] (1) 供试样品:收集从田间(样品代号和来源见表 1)采来的病株,在温室中种植,采收得到的烟草种子,根据不同的采集地分别记为“种 1”、“种 2”、“种 3”、“种 4”,将在温室接种发病的烟种记为“种 5”,健康烟株的种子记为“种 6”。

[0038] (2) 供试样品的处理:将样品混匀,称取种子 5g 放入研钵中,加入 0.01M 磷酸盐缓冲液(PBS) 20ml 研磨,静置 3h ~ 4h,备用。

[0039] (3) 用本发明的试剂盒鉴定(2)中所述的样品处理液,并依如下步骤进行:

[0040] ①包被金黄色葡萄球菌 A 蛋白,其工作浓度为 2.5 μg/ml, 200 μl/孔, 4℃ 过夜;

[0041] ②加入用 0.01M 磷酸缓冲液稀释 5000 倍的一抗, 200 μl/孔, 37℃ 孵育 3h 或 4℃ 过夜, 0.01M PBST 洗板 5 次, 5min/次;

[0042] ③加入供试样品处理液, 200 μl/孔, 37℃ 孵育 3h;

[0043] ④用 0.01M PBST 洗板 5 次, 5min/次;

[0044] ⑤加入用 0.01M PBS 稀释 2000 倍的二抗, 200 μl/孔, 37℃ 孵育 2h 或 4℃ 过夜, 洗涤同④);

[0045] ⑥加入辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白,其工作浓度为 1 : 40, 200 μl/孔, 37℃ 孵育 2h 或 4℃ 过夜, 洗涤同④);

[0046] ⑦加入四甲基联苯胺底物反应液, 100 μl/孔, 37℃ 孵育 10 ~ 20min;

[0047] ⑧加入 2M H₂SO₄ 终止反应, 50 μl/孔, 在 DG3022 型酶联免疫检测仪上读 OD₄₅₀ 值, P/N > 2.0 判为阳性。

[0048] (4) 阳性对照为烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) Y₅ 株系的菌悬液, 菌体浓度为 5 × 10⁸ cells/ml;

[0049] (5) 空白对照为无菌水。

[0050] 上述鉴定结果见表 2。

[0051] 实例 2 用本发明的试剂盒及其鉴定方法对土样进行鉴定的实施例,除(1)供试样品不同外,其余操作与实施例 1 相同,不再赘述,其鉴定结果见表 2。

[0052] (1) 供试样品:①田间土样:每块田采用 9 点取样法取样、混匀作为一个样品,不同点采集的样品代号。②温室土样:将盆栽烟株的盆中土壤混合取样,样品代号和来源见表 1。

[0053] 实例 3 用本发明的试剂盒及其鉴定方法对烟株根部残体进行鉴定的实施例,除(1)供试样品不同外,其余操作与实施例 1 相同,不再赘述,其鉴定结果见表 2。

[0054] (1) 供试样品:将田间或温室烟株的根部拔起,弃去土壤部分,不同点采集的样品样品代号和来源见表 1。

[0055] 表 1 供试菌株、样品及来源

[0056]

菌株及样品代号	细菌种名或试样部位及来源	采集地点
Y ₅	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	玉溪市红塔区延河
种 1 种 2 种 3 种 4	田间采来的病株, 在温室中种植, 采收得到的烟种子	昆明市寻甸县 曲靖市沾益县 昆明市安宁县 玉溪市红塔区延河
种 5	温室接种发病的烟种	温室
种 6	健康烟株的种子	温室
根 1 根 2 根 3 根 4	田间采集的病株, 在温室中种植, 的根部	昆明市寻甸县 曲靖市沾益县 昆明市安宁县 玉溪市红塔区延河
根 5	温室接种发病的根部	温室
根 6	健康烟株的根部	温室
根 7 根 8 根 9 根 10	直接从田间采来的病株的根部	大理州洱源县 1 大理州洱源县 2 大理州宾川县 楚雄
土 1 土 2 土 3 土 4	田间采来的病株, 在温室中种植, 采收得到的烟株的土壤	昆明市寻甸县 曲靖市沾益县 昆明市安宁县 玉溪市红塔区延河
土 5	温室接种发病的烟株的土壤	温室
土 6	健康烟株的土壤	温室
土 7 土 8 土 9 土 10	直接从田间采来的病株的土壤	大理州洱源县 1 大理州洱源县 2 大理州宾川县 楚雄

[0057] 表 2 用本发明试剂盒及其鉴定方法鉴定烟草野火病样品的结果

野火病样品		本发明试剂盒及其鉴定方法		
		重复 1	重复 2	重复 3
土壤样品	土 1	--	--	--
	土 2	--	--	--
	土 3	+	--	--
	土 4	--	--	+
	土 5	--	--	--
	土 6	--	--	--
	土 7	--	--	+
	土 8	--	--	+
	土 9	--	+	--
	土 10	--	--	--
烤烟根 残体	根 1	+++	++++	+++
	根 2	++	+++	+++
	根 3	++++	++++	++++
	根 4	++++	+++	+++
	根 5	+++	+++	+++
	根 6	--	--	--
	根 7	+++	++++	+++
	根 8	+++	+++	+++
	根 9	++++	+++	+++
	根 10	+++	+++	+++
种子	种子 1	++++	++++	+++
	种子 2	++++	+++	+++
	种子 3	++++	+++	+++
	种子 4	++++	+++	++++
	种子 5	+++	+++	++++
	种子 6	--	--	--
阳性对照		++++	++++	
空白对照		--	--	

[0058]

专利名称(译)	一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒及其鉴定方法		
公开(公告)号	CN101865918A	公开(公告)日	2010-10-20
申请号	CN200910094349.5	申请日	2009-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	云南农业大学		
申请(专利权)人(译)	云南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	云南农业大学		
[标]发明人	刘雅婷 张世琬 李永忠 姬广海 罗佑珍 彭润 徐玲		
发明人	刘雅婷 张世琬 李永忠 姬广海 罗佑珍 彭润 徐玲		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种快速鉴定烟草野火病菌的试剂盒及其鉴定方法，属植物病原细菌的免疫测定法技术领域。该试剂盒由酶标反应板和如下相关试剂构成，(1)抗血清：PsY5A，(2)0.05M pH9.6包被缓冲液；(3)0.01M pH7.4PBS；(4)1×PBST洗涤液；(5)pH5.4的底物缓冲液；(6)TMB底物反应液；(7)SPA及HRP-SPA(8)阳性对照物为烟草野火病菌株系的菌悬液，菌体浓度为5×10⁸cells/ml。本发明还提供了用该试剂盒进行鉴定的方法。本发明以制备的PsY5A抗血清为基础，应用SPA-ELISA技术，使检测真正做到了简便、快速、灵敏、准确。

菌株及样品代号	细菌种名或试样部位及来源	采集地点
Y.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	玉溪市红塔区延河
种 1	田间采来的病株，在温室中种植，采收得到的烟种子	昆明市寻甸县
种 2		曲靖市沾益县
种 3		昆明市安宁县
种 4		玉溪市红塔区延河
种 5	温室接种发病的烟种	温室
种 6	健康烟株的种子	温室
根 1	田间采集的病株，在温室中种植，的根部	昆明市寻甸县
根 2		曲靖市沾益县
根 3		昆明市安宁县
根 4		玉溪市红塔区延河
根 5	温室接种发病的根部	温室
根 6	健康烟株的根部	温室
根 7	直接从田间采来的病株的根部	大理州洱源县 1
根 8		大理州洱源县 2
根 9		大理州宾川县
根 10		楚雄
土 1	田间采来的病株，在温室中种植，采收得到的烟株的土壤	昆明市寻甸县
土 2		曲靖市沾益县
土 3		昆明市安宁县
土 4		玉溪市红塔区延河
土 5	温室接种发病的烟株的土壤	温室
土 6	健康烟株的土壤	温室
土 7	直接从田间采来的病株的土壤	大理州洱源县 1
土 8		大理州洱源县 2
土 9		大理州宾川县
土 10		楚雄