

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410044129.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 21/33 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月29日

[11] 公开号 CN 1869698A

[22] 申请日 2004.12.17

[21] 申请号 200410044129.9

[71] 申请人 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所

地址 150086 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号

[72] 发明人 李学湛 白艳菊 吕典秋 何云霞
胡林双 于德才 张儒喜 马纪

[74] 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有限责任公司

代理人 刘庆吉

权利要求书8页 说明书14页 附图1页

[54] 发明名称

马铃薯 PVX、PVY、PLRV、PVS 病毒诊断试剂制作工艺方法

[57] 摘要

本发明涉及试剂，属于马铃薯 PVX、PVY、PLRV、PVS 病毒诊断试剂制作工艺方法，其特点是：采集马铃薯生产田中具有典型马铃薯病毒症状的材料，经 ELISA 鉴定筛选所需毒源材料，选鉴定结果阳性，吸光值较高，再用透射电镜作辅助检验，确定毒源材料。将毒源材料分别接种于温室种植的一系列健康的指示植物进行病毒分离研究，接种后的指示植物须每隔 2 天调查一次，根据每组指示植物发病情况，筛选分离出需要的病毒，再经过多次接种滤去其它病毒，纯化病毒，然后用纯化的病毒接种在繁毒材料上扩繁病毒，供提纯用。

1. 一种马铃薯 PVX、PVY、PLRV、PVS 病毒诊断试剂制作工艺方法，其特征是：病毒抗血清的制备如下：第一步搜集病毒分离用的指示植物；第二步采集病毒毒源，鉴定病毒种类；第三步指示植物分离并纯化病毒；第四步指示植物病毒扩繁；第五步马铃薯主要病毒的提纯；第六步病毒提纯液免疫家兔获得抗血清；第七步抗血清免疫球蛋白（IgG）的提取与浓度测定；第八步抗血清免疫球蛋白的酶标记；第九步马铃薯病毒检测灵敏度测试；第十步免疫球蛋白与酶标免疫球蛋白的工作浓度测定；

实施路线

(1) 马铃薯病毒的指示植物是：

表 1 马铃薯主要病毒繁育植物

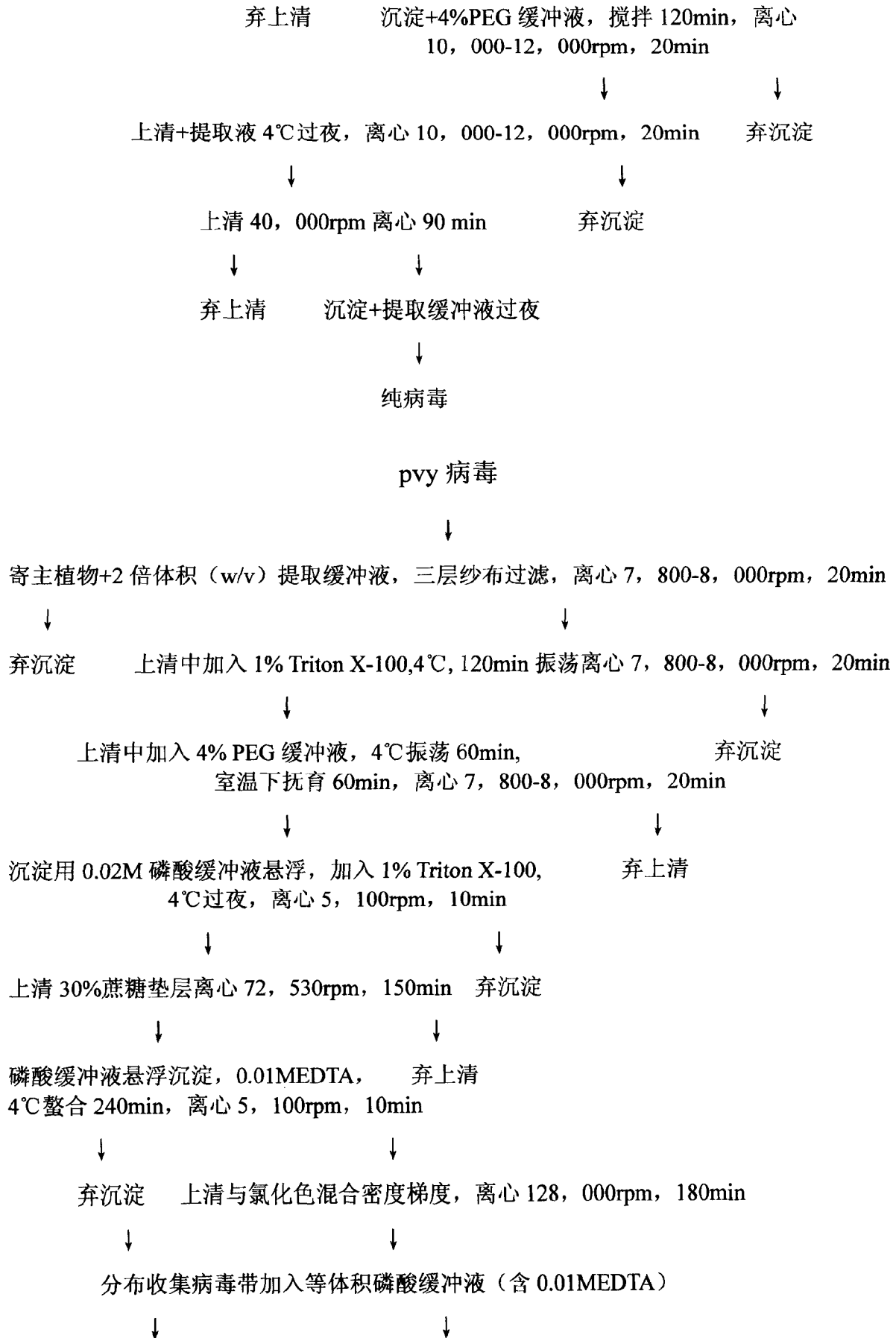
病 毒	繁毒植物	学 名
马铃薯卷叶病毒 PLRV	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
	白花刺果曼陀罗	<i>Datura Stramonium</i>
马铃薯 Y 病毒 PVY	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
马铃薯 X 病毒 PVX	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>
马铃薯 S 病毒 PVS	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>

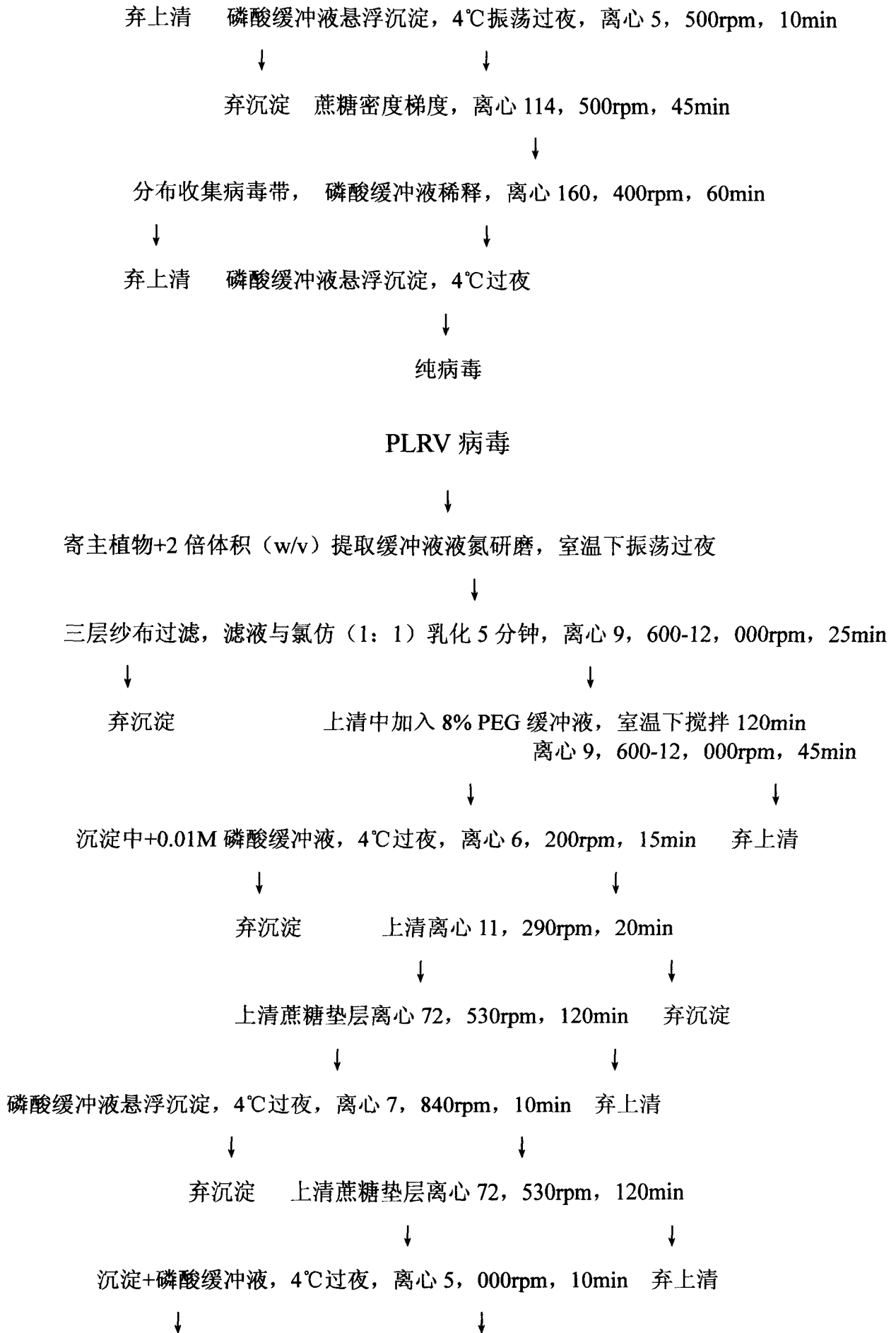
(2) 毒源采集

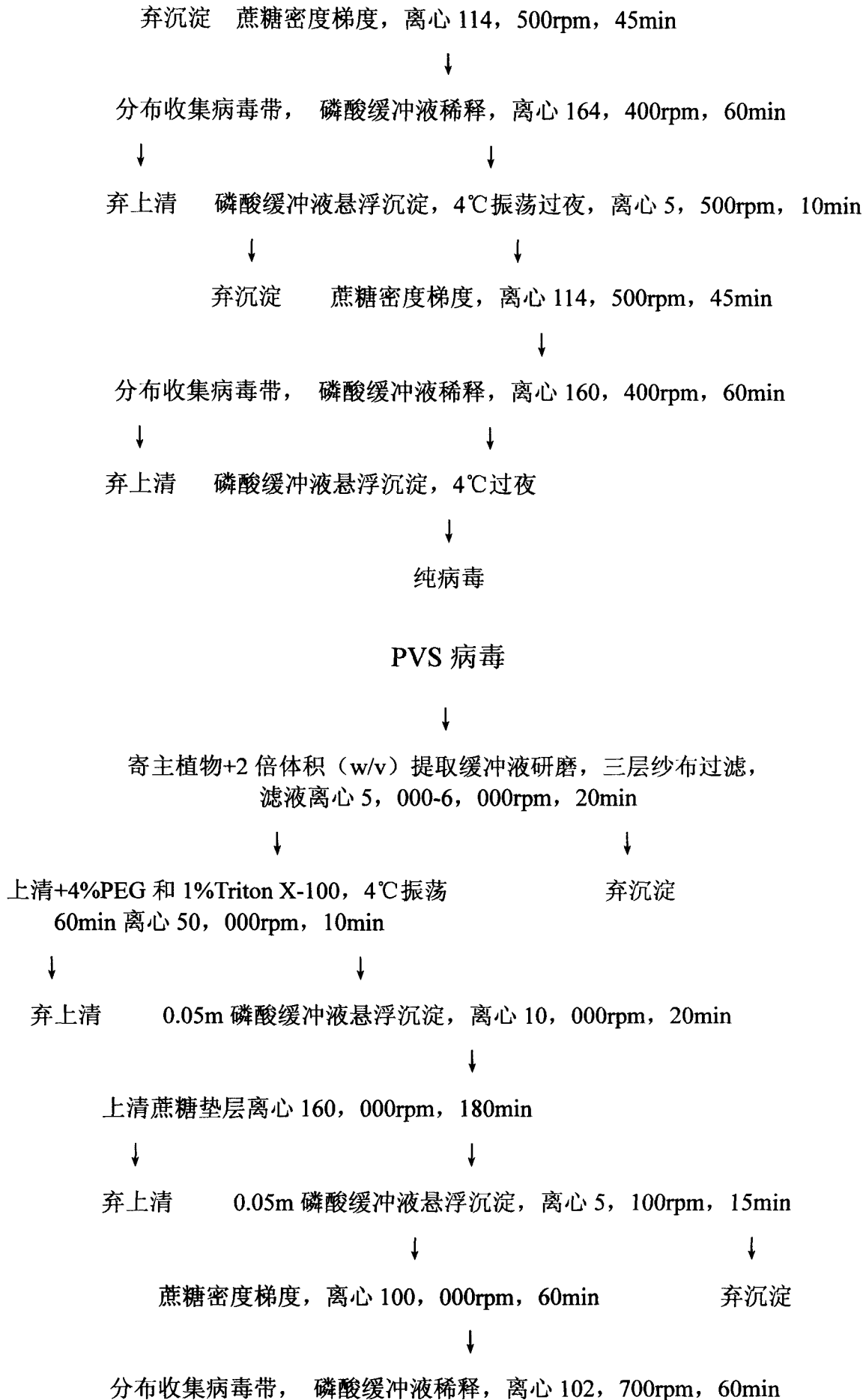
采集马铃薯生产田中具有典型马铃薯病毒症状的材料，经 **ELISA** 鉴定筛选所需毒源材料，选鉴定结果阳性，吸光值较高，再用透射电镜作辅助检验，确定毒源材料。

(3) 马铃薯主要病毒的分离、繁殖

将毒源材料分别接种于温室种植的一系列健康的指示植物进行病毒分离







取出的家兔粗血清塑料离心管中倾斜 30 度角放置, 室温下静止过夜(或 60~120 分钟, 或冰浴 30 分钟), 用巴士德吸管从边缘剥离并取出析出血清(离心除去白细胞、红细胞、获得病毒抗血清), 血清用几个玻璃管存放。一次取血可得病毒抗血清 50ml 左右。

(6) 免疫球蛋白 IgG 制备

1) 免疫球蛋白 IgG 提取

1ml 血清加 9ml 水加 10ml 水饱和硫酸铵, 混匀, 室温静置 30~45 分钟, 4°C 条件下, 8000 转/秒, 离心 20 分钟, 弃上清, 留沉淀, 用 1ml 0.5×PBS 缓冲液回溶。4°C 0.5×PBS 缓冲液 500~1000 ml 中透析, 2 小时换一次透析液, 共换 4 次。

2) 病毒球蛋白 IgG 浓度测定

取球蛋白稀释 200 倍 280nm 下测吸收值

病毒球蛋白 IgG 1mg/ml 时 $OD_{280}=1.4$

$$[IgG] = OD_{280} \times 200 / 1.4$$

	PVX	PVY	PLRV	PVS
OD280	0.125	0.113	0.130	0.107
浓度 mg/ml	17.85	16.14	18.57	15.28

(7) 免疫球蛋白 IgG 酶标记

1) 酶标记免疫球蛋白 IgG- AP 制备

标记物: 碱性磷酸酶(AP)

免疫球蛋白 IgG 浓度: 1mg/ml

1mg/ml IgG+24ml AP+2.6ul 25%戊二醛溶液

混匀, 室温放置 2 小时, 4°C 透析, 透析步骤同上

2) 酶标记免疫球蛋白 IgG- AP 保存

透析后液体加 5 mg 牛血清白蛋白 (BSA)，混合后放置

4°C 或 -20°C 保存半年~1 年

(8) 免疫球蛋白 IgG 与酶标记免疫球蛋白 IgG-AP 质量测定

1) 用已知成品免疫球蛋白 IgG 与酶标记免疫球蛋白 IgG-AP 作对照，
IgGOK=1:1000, IgG-APOK=1:500

2) 免疫球蛋白与酶标免疫球蛋白的工作浓度的测定：

酶联法测定免疫球蛋白和酶标免疫球蛋白工作浓度，IgG 用包被缓冲液
稀释 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000；IgG—AP 用酶标缓冲液稀释 1/500，
1/1000，DAS—ELISA 法测定。确定 IgG 和 IgG—AP 的相应工作浓度。

马铃薯 PVX、PVY、PLRV、PVS 病毒诊断试剂制作工艺方法

技术领域：本发明涉及试剂，属于马铃薯 PVX、PVY、PLRV、PVS 病毒诊断试剂制作工艺方法。

背景技术：马铃薯是我国主要的粮、菜作物和食品加工原料，全国栽培面积 460 万公顷，居世界首位。但产量水平较低（11 吨/公顷）不仅低于世界单产（15.5 吨/公顷），更不及世界发达国家（30-50 吨/公顷）。影响我国马铃薯产量的主要因素，是病毒病害，植物病毒为专性寄生物，只能在其寄主的活细胞内复制，马铃薯为营养体繁殖，病毒随马铃薯繁殖而逐年积累，导致马铃薯种性退化，研究证明马铃薯病毒引起马铃薯减产在 30-35%。目前，在马铃薯作物上已经发现并报导的病毒和病毒病有 25 种以上，所幸只有少数病毒对马铃薯危害较重，通常复合侵染比某一种病毒单独侵染严重，马铃薯生产田中多数为复合侵染。本发明针对马铃薯生产中危害较重的病毒 PVX、PVY、PVS 和 PLRV 进行研究。

目前国际上对马铃薯病毒防治最佳办法是利用免疫血清技术汰除病株，结合茎尖脱毒、组织培养，生产脱毒马铃薯种薯。酶联（DAS-ELISA）法检测马铃薯病毒，因其具有快速、准确、灵敏的特点而为国际、国内普遍采用。

随着我国加入 WTO，国产脱毒马铃薯生产受到威胁，植物检疫和病毒检测必须与国际接轨，全国马铃薯栽培面积 460 万公顷，种薯田 30.7 万公顷，按标准化生产要求 1 公顷检测 200 个样品计算，全国共检样 6000 万个，年需试剂盒 60 万个。进入 WTO 后，加之我国西部大开发战略的实施，因此急需大批量的高质量，低价格的国产马铃薯病毒抗血清。病毒血清是酶联检测中的关键内容，国际上利用免疫技术制备马铃薯病毒高效价血清检测试剂盒已有数年历史，但能够批量生产高质量马铃薯病毒血清的只有少数国家，所以价格较高，例如全球最大植物病害诊断试剂生产商——美国 agdia 公司每病毒 500 反应孔 4200 元；德国 Loewe 生化技术公司每病毒 500 反应孔 4000 元……我国早在 20 世纪 80 年代就开始了相关技术的研究，但存在试剂特异性差，检测流程复杂，种类不全等诸多问题，一直没能进行批量生产开发。

发明内容：本发明的目的在于提供一种成本低廉，抗马铃薯病毒效果显著的马铃薯 PVX、PVY、PLRV、PVS 病毒诊断试剂制作工艺方法。本发明的目的是这样实现的：病毒抗血清的制备如下：

实施路线

- (1) 马铃薯病毒的指示植物是：

表 1 马铃薯主要病毒繁育植物

病 毒	繁毒植物	学 名
马铃薯卷叶病毒 PLRV	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
	白花刺果曼陀罗	<i>Datura Stramonium</i>
马铃薯 Y 病毒 PVY	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
马铃薯 X 病毒 PVX	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>
马铃薯 S 病毒 PVS	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>

(2) 毒源采集

采集马铃薯生产田中具有典型马铃薯病毒症状的材料, 经 **ELISA** 鉴定筛选所需毒源材料, 选鉴定结果阳性, 吸光值较高, 再用透射电镜作辅助检验, 确定毒源材料。

(3) 马铃薯主要病毒的分离、繁殖

将毒源材料分别接种于温室种植的一系列健康的指示植物进行病毒分离研究, 接种后的指示植物须每隔 2 天调查一次, 根据每组指示植物发病情况, 筛选分离出需要的病毒, 再经过多次接种滤去其它病毒, 纯化病毒, 然后用纯化的病毒接种在繁毒材料上扩繁病毒, 供提纯用。

将分离纯化的马铃薯病毒一部分低温贮存, 作为日后试剂盒制备的病毒毒源繁殖病毒以供提纯用。

病毒分离:

PVX: 汁液摩擦接种, 千日红——白花刺果曼陀罗——指尖椒——千日红——黄苗榆烟

PVY: 汁液摩擦接种或蚜虫非持久性接种, 洋酸浆——黄苗榆烟

PVS: 蚜虫非持久性接种, 千日红——毛曼陀罗——苋色藜——德伯尼烟

PLRV: 蚜虫持久性接种, 洋酸浆——白花刺果曼陀罗

(4) 马铃薯主要病毒的提纯

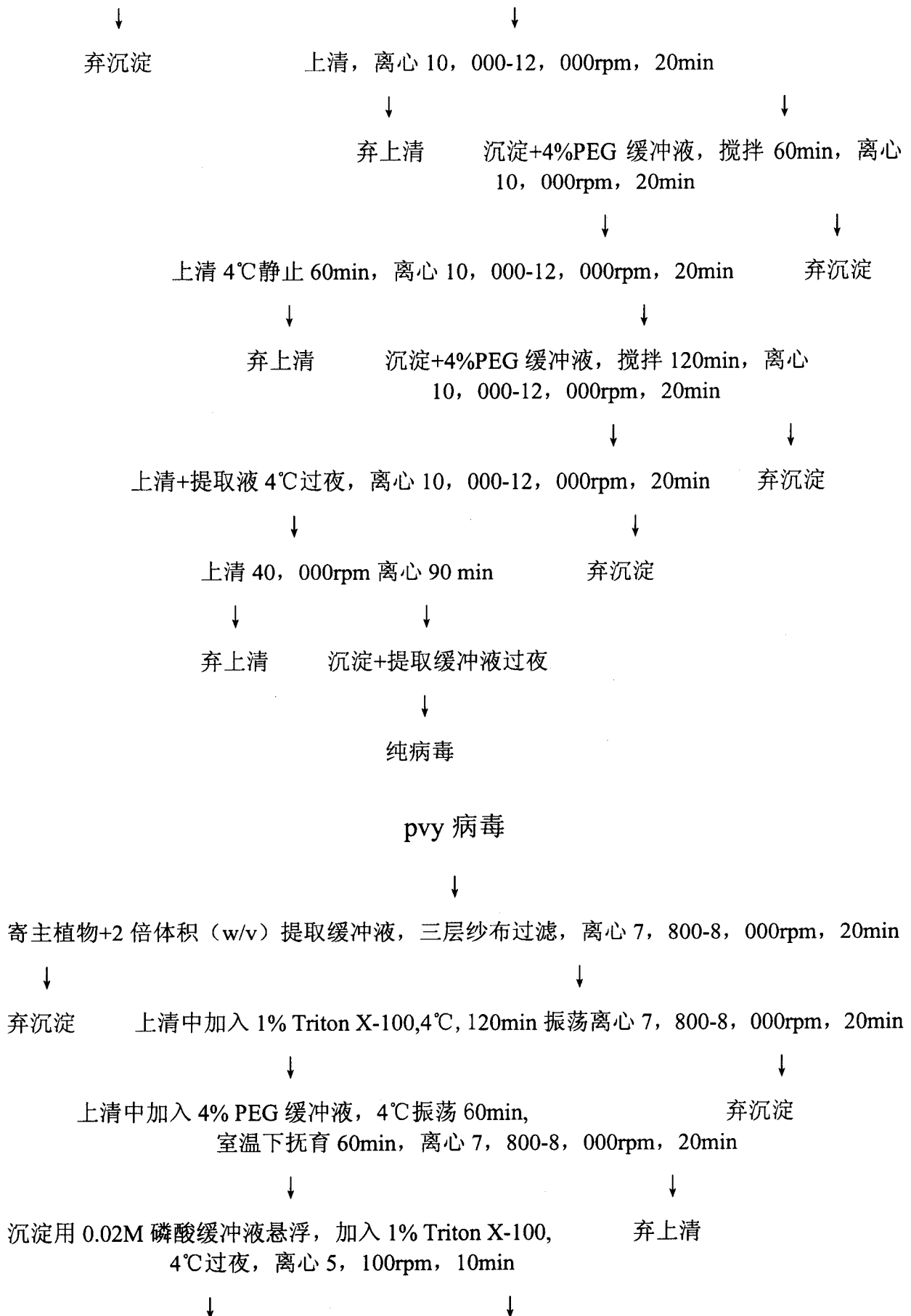
以差速离心为基础, 根据不同病毒特征, 采用相应方法进行提纯。

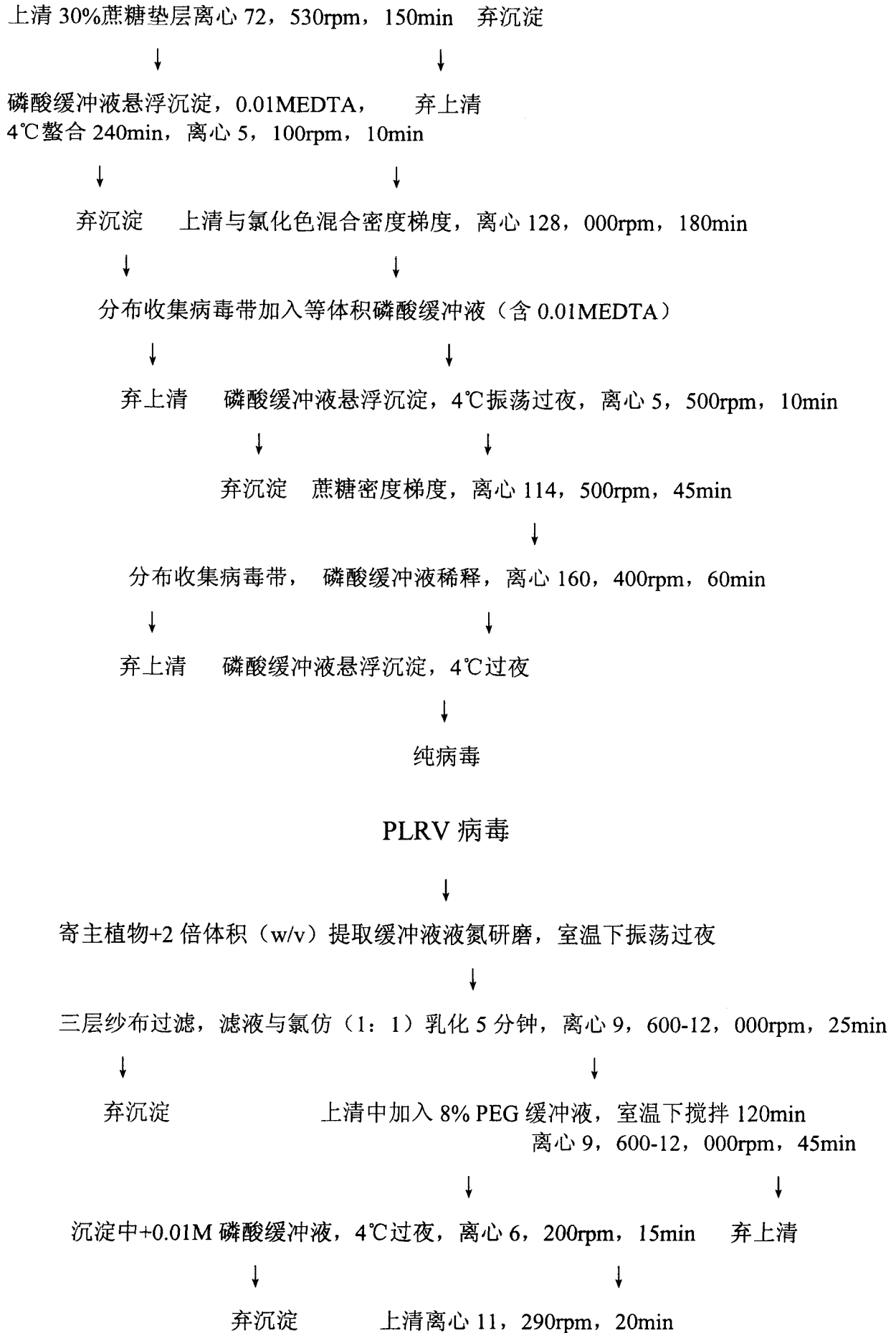
1) 几种病毒提纯路线

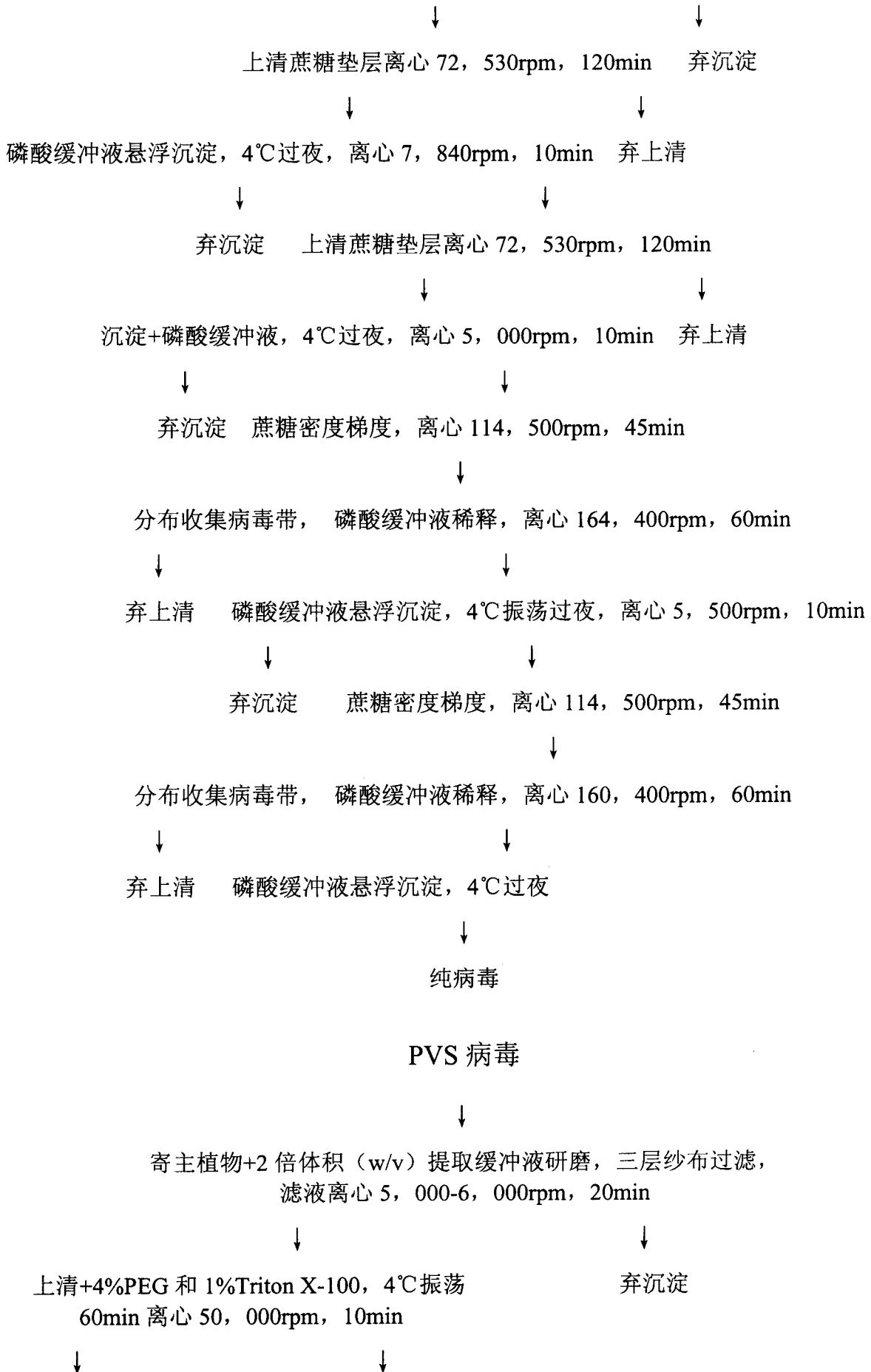
PVX 病毒

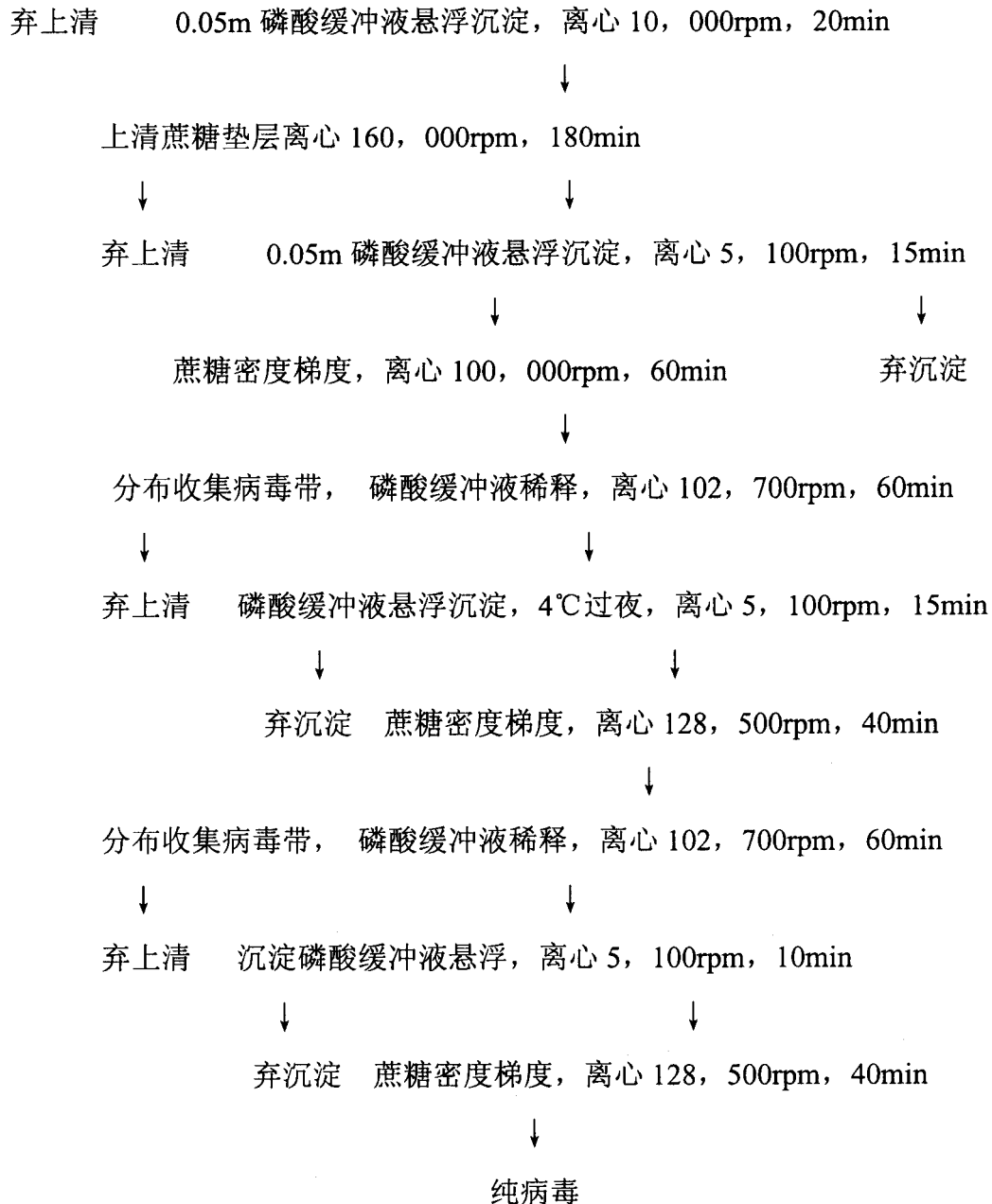


寄主植物+2 倍体积 (w/v) 提取缓冲液研磨, 离心 3, 000-4, 000rpm, 20min









2) 病毒浓度测定

取各病毒提纯液用紫外分光光度计测得各病毒纯度，具体情况如下表。

紫外分光光度计测病毒量

病毒	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	RNA 含量%
PLRV	8.6	10.62	0.81	3.2
PVY	2.8	2.33	1.20	5.4
PVS	2.93	2.31	1.27	5.3
PVX	2.97	2.50	1.19	5.9

(5) 免疫家兔

取各病度稀释后，用福氏佐剂与抗原 1:1 混合乳化免疫家兔，每周注射一次，共注射 3 次，注射量为 2ml, 2ml, 3ml。3 周后每周耳颈脉取血 20~30 ml，测抗体浓度，抗体浓度降到最高峰一半时进行第二次注射。

1) 注射试

:freund'adguent+生理盐水+ 1mg/ml 抗原

2) 提取血清

取出的家兔粗血清塑料离心管中倾斜 30 度角放置，室温下静止过夜(或 60~120 分钟, 或冰浴 30 分钟), 用巴士德吸管从边缘剥离并取出析出血清(离心除去白细胞、红细胞、获得病毒抗血清), 血清用几个玻璃管存放。一次取血可得病毒抗血清 50ml 左右。

(6) 免疫球蛋白 IgG 制备

1) 免疫球蛋白 IgG 提取

1ml 血清加 9ml 水加 10ml 水饱和硫酸铵, 混匀, 室温静置 30~45 分钟, 4℃ 条件下, 8000 转/秒, 离心 20 分钟, 弃上清, 留沉淀, 用 1ml 0.5×PBS 缓冲液回溶。4℃ 0.5×PBS 缓冲液 500~1000 ml 中透析, 2 小时换一次透析液, 共换 4 次。

2) 病毒球蛋白 IgG 浓度测定

取球蛋白稀释 200 倍 280nm 下测吸收值

病毒球蛋白 IgG 1mg/ml 时 $OD_{280}=1.4$

$$[IgG] = OD_{280} \times 200 / 1.4$$

	PVX	PVY	PLRV	PVS
OD280	0.125	0.113	0.130	0.107
浓度 mg/ml	17.85	16.14	18.57	15.28

(7) 免疫球蛋白 IgG 酶标记

1) 酶标记免疫球蛋白 IgG- AP 制备

标记物: 碱性磷酸酶(AP)

免疫球蛋白 IgG 浓度: 1mg/ml。

1mg/ml IgG+24ml AP+2.6ul 25%戊二醛溶液混匀, 室温放置 2 小时, 4℃ 透析, 透析步骤同上。

2) 酶标记免疫球蛋白 IgG- AP 保存

透析后液体加 5 mg 牛血清白蛋白 (BSA), 混合后放置 4℃ 或 -20℃ 保存半年~1 年。

(8) 免疫球蛋白 IgG 与酶标记免疫球蛋白 IgG-AP 质量测定

1) 用已知成品免疫球蛋白 IgG 与酶标记免疫球蛋白 IgG-AP 作对照, IgGOK=1:1000, IgG-APOK=1:500

2) 免疫球蛋白与酶标免疫球蛋白的工作浓度的测定:

酶联法测定免疫球蛋白和酶标免疫球蛋白工作浓度, IgG 用包被缓冲液稀释 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000; IgG-AP 用酶标缓冲液稀释 1/500, 1/1000, DAS-ELISA 法测定。确定 IgG 和 IgG-AP 的相应工作浓度。

本发明的试剂已应用于“农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)”2003年和2004年农业部田间普查任务,以及一些地方农技推广中心及种子生产单位的病毒检测。因此,利用免疫技术制备马铃薯病毒抗血清检测试剂,具有深远的社会价值和巨大的经济价值,同时,对于完善我国马铃薯生产质量监控体系,开展病毒监督,提高我国马铃薯产量和质量,赢得国际市场,具有重大意义。

附图说明:图1为本发明病毒抗血清的制备工艺流程图。

具体实施方式:病毒抗血清的制备如下:病毒抗血清的制备如下:

实施路线

(1) 马铃薯病毒的指示植物是:

表1 马铃薯主要病毒繁育植物

病 毒	繁毒植物	学 名
马铃薯卷叶病毒 PLRV	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
	白花刺果曼陀罗	<i>Datura Stramonium</i>
马铃薯 Y 病毒 PVY	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
马铃薯 X 病毒 PVX	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>
马铃薯 S 病毒 PVS	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>

(2) 毒源采集

采集马铃薯生产田中具有典型马铃薯病毒症状的材料,经 **ELISA** 鉴定筛选所需毒源材料,选鉴定结果阳性,吸光值较高,再用透射电镜作辅助检验,确定毒源材料。

(3) 马铃薯主要病毒的分离、繁殖

将毒源材料分别接种于温室种植的一系列健康的指示植物进行病毒分离

研究，接种后的指示植物须每隔 2 天调查一次，根据每组指示植物发病情况，筛选分离出需要的病毒，再经过多次接种滤去其它病毒，纯化病毒，然后用纯化的病毒接种在繁毒材料上扩繁病毒，供提纯用。

将分离纯化的马铃薯病毒一部分低温贮存，作为日后试剂盒制备的病毒毒源繁殖病毒以供提纯用。

病毒分离：

PVX:汁液摩擦接种，千日红——白花刺果曼陀罗——指尖椒——千日红——黄苗榆烟。

PVY:汁液摩擦接种或蚜虫非持久性接种，洋酸浆——黄苗榆烟。

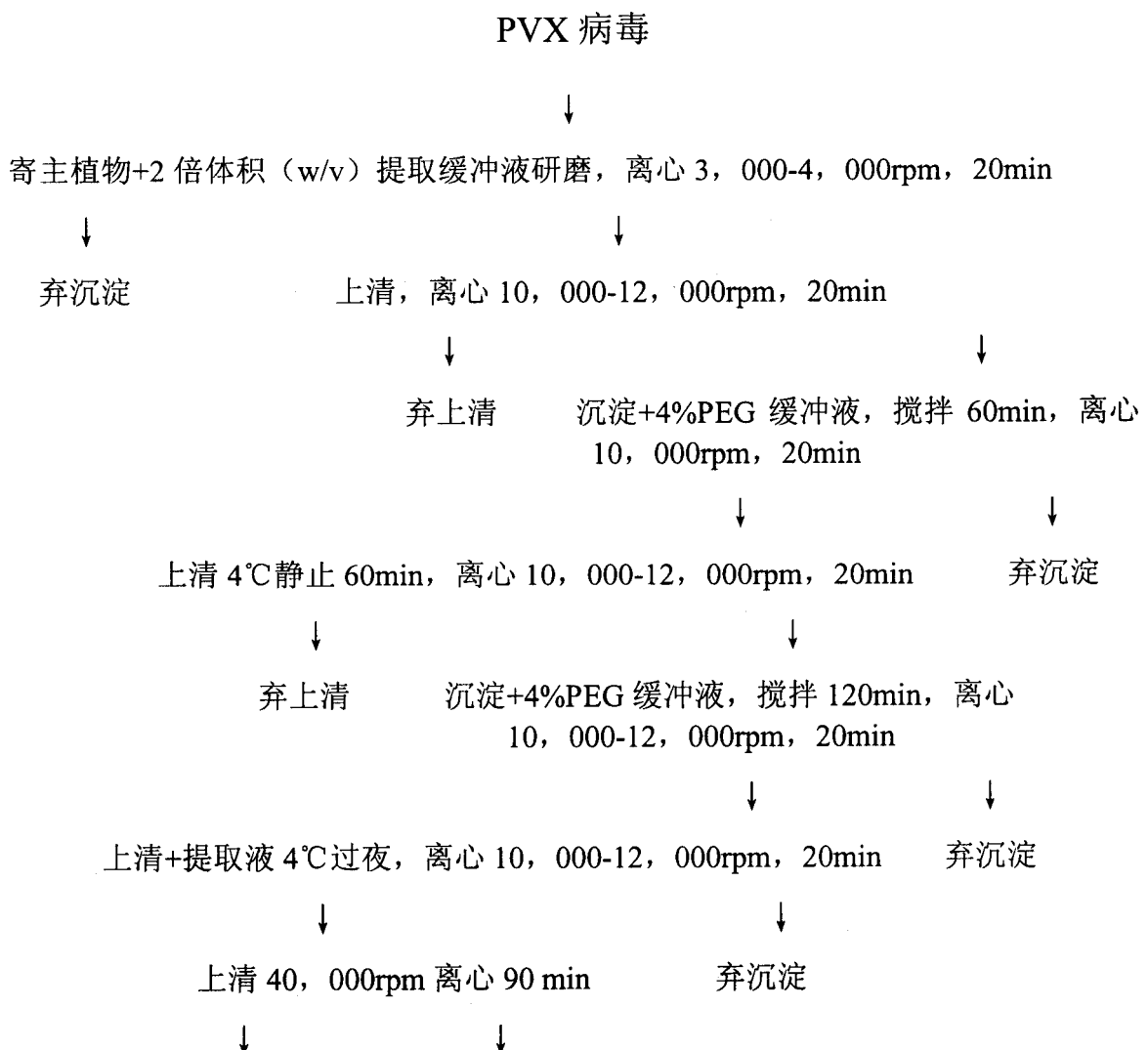
PVS:蚜虫非持久性接种，千日红——毛曼陀罗——苋色藜——德伯尼烟。

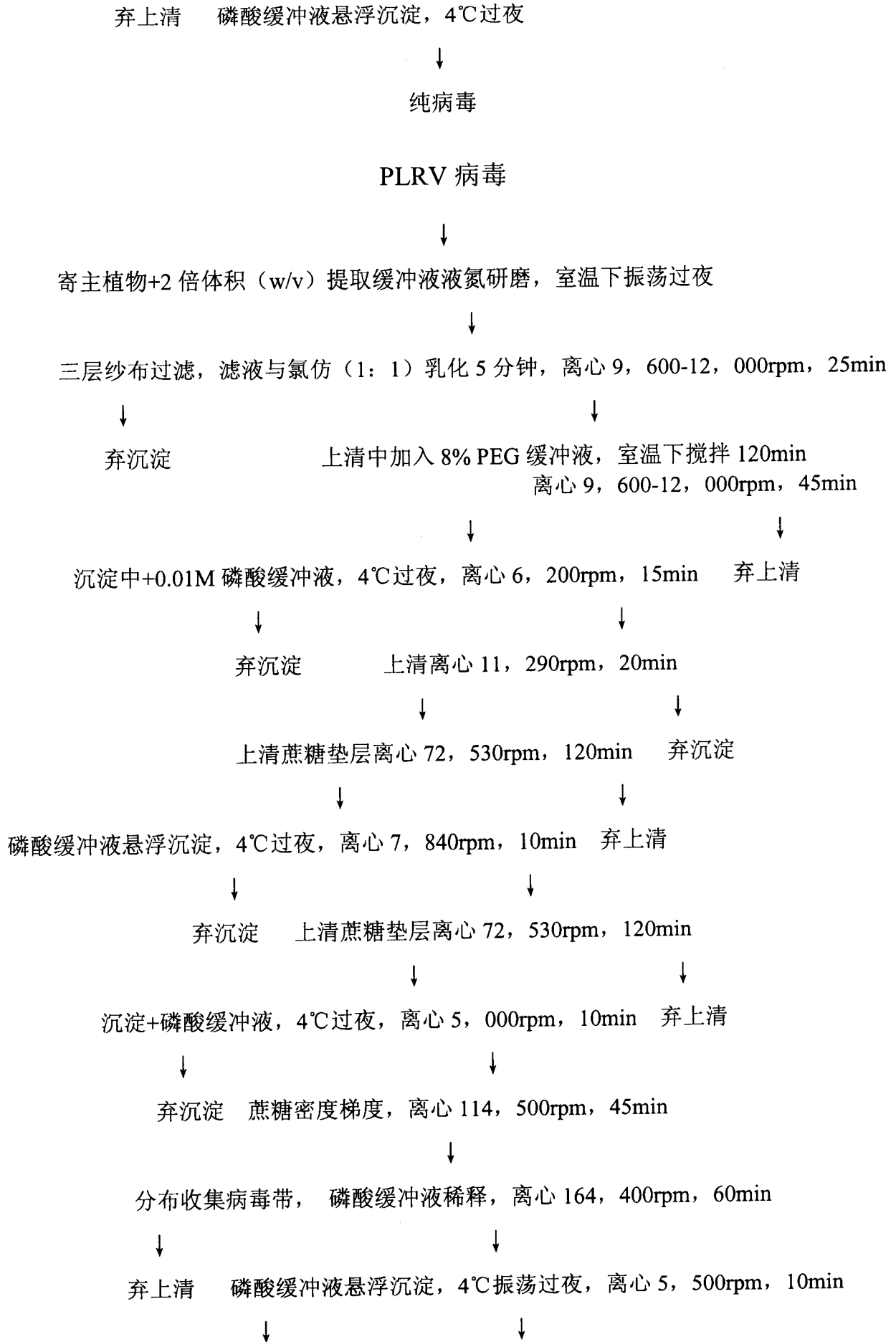
PLRV: 蚜虫持久性接种，洋酸浆——白花刺果曼陀罗。

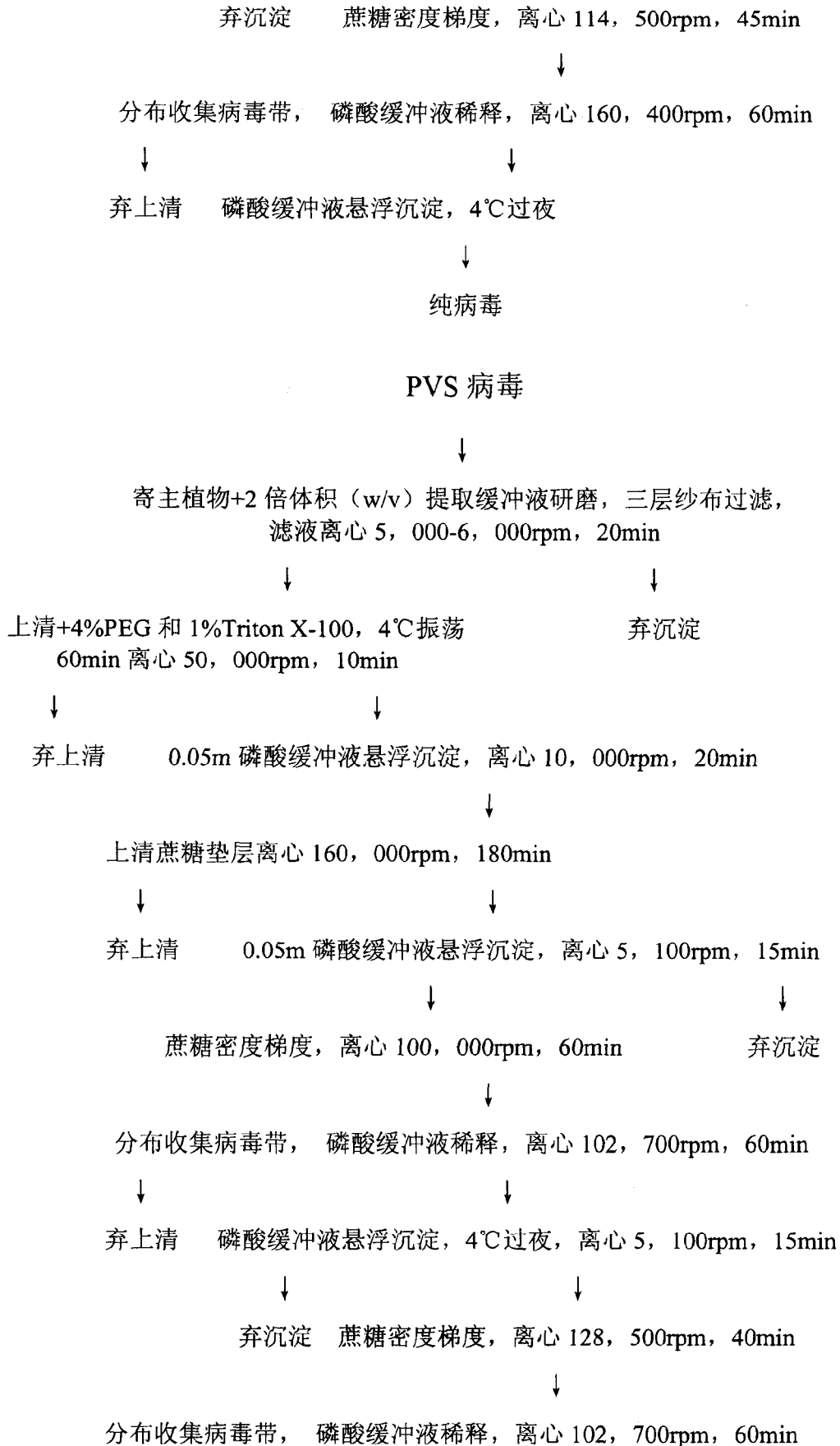
(4) 马铃薯主要病毒的提纯

以差速离心为基础，根据不同病毒特征，采用相应方法进行提纯。

1) 几种病毒提纯路线







$OD_{280}=1.4。$

$$[IgG]=OD_{280} \times 200/1.4$$

	PVX	PVY	PLRV	PVS
OD280	0.125	0.113	0.130	0.107
浓度 mg/ml	17.85	16.14	18.57	15.28

(7) 免疫球蛋白 IgG 酶标记

1) 酶标记免疫球蛋白 IgG- AP 制备

标记物：碱性磷酸酶(AP)。

免疫球蛋白 IgG 浓度：1mg/ml

1mg/ml IgG+24ml AP+2.6ul 25%戊二醛溶液混匀，室温放置 2 小时，4℃透析，透析步骤同上。

2) 酶标记免疫球蛋白 IgG- AP 保存

透析后液体加 5 mg 牛血清白蛋白 (BSA)，混合后放置 4℃或-20℃保存半年~1 年。

(8) 免疫球蛋白 IgG 与酶标记免疫球蛋白 IgG-AP 质量测定

1) 用已知成品免疫球蛋白 IgG 与酶标记免疫球蛋白 IgG-AP 作对照，IgGOK=1:1000, IgG-APOK=1:500

2) 免疫球蛋白与酶标免疫球蛋白的工作浓度的测定：

酶联法测定免疫球蛋白和酶标免疫球蛋白工作浓度，IgG 用包被缓冲液稀释 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000；IgG—AP 用酶标缓冲液稀释 1/500, 1/1000, DAS—ELISA 法测定。确定 IgG 和 IgG—AP 的相应工作浓度。

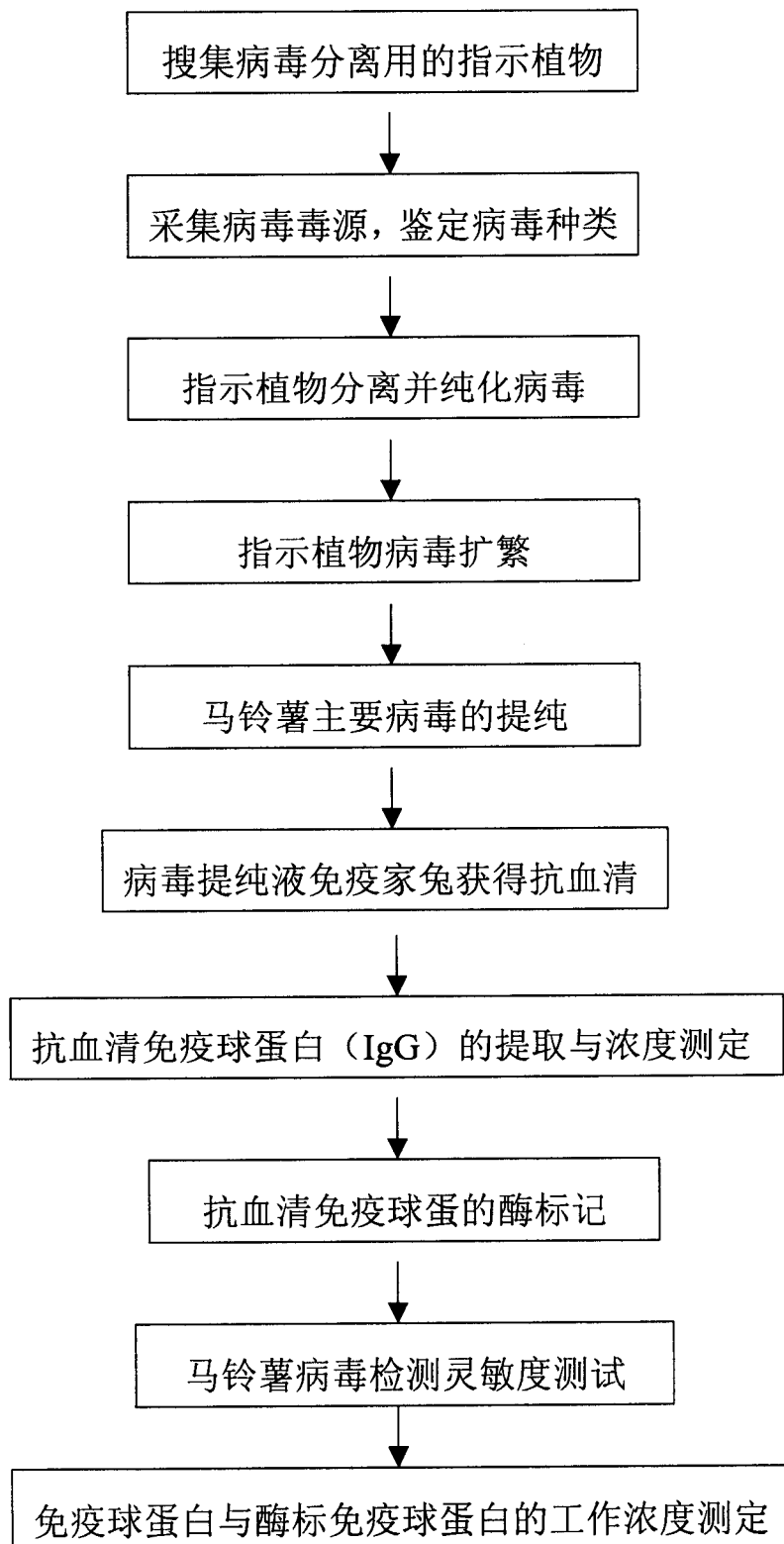


图 1

专利名称(译)	马铃薯PVX、PVY、PLRV、PVS病毒诊断试剂制作工艺方法		
公开(公告)号	CN1869698A	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	CN200410044129.9	申请日	2004-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所		
申请(专利权)人(译)	黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所		
当前申请(专利权)人(译)	黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所		
[标]发明人	李学湛 白艳菊 吕典秋 何云霞 胡林双 于德才 张儒喜 马纪		
发明人	李学湛 白艳菊 吕典秋 何云霞 胡林双 于德才 张儒喜 马纪		
IPC分类号	G01N33/535 G01N1/34 G01N21/33		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及试剂，属于马铃薯PVX、PVY、PLRV、PVS病毒诊断试剂制作工艺方法，其特点是：采集马铃薯生产田中具有典型马铃薯病毒症状的材料，经ELISA鉴定筛选所需毒源材料，选鉴定结果阳性，吸光值较高，再用透射电镜作辅助检验，确定毒源材料。将毒源材料分别接种于温室种植的一系列健康的指示植物进行病毒分离研究，接种后的指示植物须每隔2天调查一次，根据每组指示植物发病情况，筛选分离出需要的病毒，再经过多次接种滤去其它病毒，纯化病毒，然后用纯化的病毒接种在繁毒材料上扩繁病毒，供提纯用。

