



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103881980 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201410111292. 6

C07K 16/12 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 24

G01N 33/577 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/535 (2006. 01)

CGMCC No. 8960 2014. 03. 19

C12R 1/91 (2006. 01)

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100121 北京市朝阳区双桥中路临甲
11 号

(72) 发明人 李桂芬 马洁 田茜 魏梅生
赵文军

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用。本发明所提供的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体是由分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6 分泌产生的, 该小鼠杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为 CGMCC No. 8960。本发明所提供的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的特异性好, 效价高, 与瓜类果斑病菌不同分离物均起反应, 具有较好的广谱性。应用于瓜类果斑病菌血清学诊断试剂中, 特异性好, 避免了交叉反应。本发明研制的瓜类果斑病菌的单克隆抗体可用于研制瓜类果斑病菌的免疫学诊断试剂, 如酶联诊断试剂, 胶体金免疫试纸条, 抗体芯片, 生物传感器等。

1. 分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6, 在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为 CGMCC No. 8960。

2. 抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体, 其特征在于: 所述单克隆抗体是由权利要求 1 所述的分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 分泌产生的。

3. 将权利要求 2 所述的单克隆抗体用标记酶进行标记后形成的酶标抗体, 其特征在于: 所述标记酶为碱性磷酸酯酶。

4. 权利要求 1 所述的分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960, 或权利要求 2 所述的单克隆抗体, 或权利要求 3 所述的酶标抗体在如下(a1) 或(a2) 中的应用:

(a1) 检测或辅助检测瓜类果斑病菌;

(a2) 制备检测或辅助检测瓜类果斑病菌的试剂或试剂盒。

5. 一种检测或辅助检测瓜类果斑病菌的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒中含有独立包装的权利要求 2 所述的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体或权利要求 3 所述的酶标抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒中还含有独立包装的瓜类果斑病菌包被抗体和 / 或瓜类果斑病菌标准品。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒中还含有独立包装的如下 1) -6) 试剂中的至少一种:

1) 包被缓冲液: 溶剂为水, 溶质为碳酸钠、碳酸氢钠; 所述碳酸钠和所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的终浓度分别为 1.59g/L 和 2.93g/L;

2) 封闭液: 含 20g/L 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

3) 洗涤缓冲液: 含有体积分数 0.05% 的吐温 20 的磷酸盐缓冲液;

4) 样品抽提缓冲液: 溶剂为所述洗涤缓冲液, 溶质为亚硫酸钠和聚乙烯基吡咯烷酮; 所述亚硫酸钠和所述聚乙烯基吡咯烷酮在所述样品抽提缓冲液中的终浓度分别为 1.3g/L 和 20g/L;

5) 酶标抗体稀释缓冲液: 溶剂为所述洗涤缓冲液, 溶质为聚乙烯基吡咯烷酮和牛血清白蛋白; 所述聚乙烯基吡咯烷酮和所述牛血清白蛋白在所述酶标抗体稀释缓冲液中的终浓度分别为 20g/L 和 2g/L;

6) 底物溶液: 溶剂为水, 溶质为二乙醇胺; 所述二乙醇胺在所述底物溶液中的终浓度为 97mL/L。

8. 一种检测或辅助检测瓜类果斑病菌的方法, 包括使用权利要求 5-7 中任一所述的试剂盒对待测样品进行检测的步骤。

9. 权利要求 5-7 中任一所述的试剂盒在定性或定量检测瓜类果斑病菌中的应用。

一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 瓜类果斑病是西瓜、甜瓜上的一种毁灭性病害,由噬酸菌属燕麦种西瓜亚种(*Acidovorax citrulli*)引起,是我国对内和对外的重点植物检疫性有害生物。该病主要通过种子带菌传播。苗期和成株均可发病。瓜苗染病沿中脉出现不规则褐色病变,有的扩展到叶缘,从叶背面看呈水渍状,种子带菌的瓜苗在发病后 1~3 周即死亡。西瓜果实染病,初在果实上部表面现数个几毫米大小灰绿色至暗绿色水渍状斑点,后迅速扩展成大型不规则的水浸状斑,变褐或龟裂,致果实腐烂,分泌出一种粘质琥珀色物质,进一步发展,细菌透过瓜皮进入果内。该病多始于成瓜向阳面,与地面接触处未见发病,瓜蔓不萎蔫,病瓜周围病叶上现褐色小斑,病斑通常在叶脉边缘,有时被一个黄色组织带包围,病斑周围呈水渍状是该病区别于其他细菌病害的重要特征。

[0003] 对于该细菌病害,较为可行的控制措施是实行检疫控制其扩展,而这有赖于准确、快速、灵敏的检测技术的应用。酶联检测技术是一种较为快速准确的检测方法,而瓜类果斑病菌单克隆抗体的研制是酶联检测方法的基础。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用。

[0005] 所述抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体是由分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6 分泌产生的,该小鼠杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为 CGMCC No. 8960。

[0006] 上述分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 分泌产生的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体,也属于本发明的保护范围。

[0007] 将所述抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体用标记酶进行标记后形成的酶标抗体,也属于本发明的保护范围。

[0008] 在本发明中,所述标记酶具体为碱性磷酸酯酶。

[0009] 本发明所提供的分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCCNo. 8960,或所述抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体,或所述酶标抗体在如下(a1)或(a2)中的应用也属于本发明的保护范围:

[0010] (a1) 检测或辅助检测瓜类果斑病菌;

[0011] (a2) 制备检测或辅助检测瓜类果斑病菌的试剂或试剂盒中。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种检测或辅助检测瓜类果斑病菌的试剂盒。

[0013] 本发明所提供的试剂盒中含有独立包装的所述抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体或所述酶标抗体。

[0014] 本发明所提供的试剂盒中,还可含有独立包装的瓜类果斑病菌包被抗体和/或瓜

类果斑病菌标准品。

[0015] 其中,所述瓜类果斑病菌包被抗体可为抗瓜类果斑病菌的多抗;在本发明中,所述瓜类果斑病菌包被抗体具体为 ACD 公司生产的抗瓜类果斑病菌的多抗,其产品目录号为 B260-C1。

[0016] 本发明所提供的试剂盒中,还可含有独立包装的如下 1)-6) 试剂中的至少一种:

[0017] 1) 包被缓冲液:溶剂为水,溶质为碳酸钠、碳酸氢钠;所述碳酸钠、所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的终浓度分别为 1.59g/L、2.93g/L, pH 值为 9.6;

[0018] 2) 封闭液:含 20g/L 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

[0019] 3) 洗涤缓冲液:含有体积分数 0.05% 的吐温 20 的磷酸盐缓冲液;

[0020] 4) 样品抽提缓冲液:溶剂为洗涤缓冲液,溶质为亚硫酸钠和聚乙烯基吡咯烷酮;所述亚硫酸钠和所述聚乙烯基吡咯烷酮在所述样品抽提缓冲液中的终浓度分别为 1.3g/L 和 20g/L;

[0021] 5) 酶标抗体稀释缓冲液:溶剂为所述洗涤缓冲液,溶质为聚乙烯基吡咯烷酮和牛血清白蛋白;所述聚乙烯基吡咯烷酮和所述牛血清白蛋白在所述酶标抗体稀释缓冲液中的终浓度分别为 20g/L 和 2g/L;

[0022] 6) 底物溶液:溶剂为水,溶质为二乙醇胺;所述二乙醇胺在所述底物溶液中的终浓度分别为 97mL/L, pH 值为 9.8。

[0023] 在本发明中,以上 1)-6) 试剂中的所述聚乙烯基吡咯烷酮的分子量为 24000 ~ 40000。

[0024] 在本发明中,以上 1)-6) 试剂中的所述磷酸盐缓冲液的溶剂为水,溶质为氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和氯化钾;所述氯化钠、所述磷酸二氢钾、所述磷酸氢二钠和所述氯化钾在所述洗涤缓冲液中的终浓度分别为 8.0g/L、0.2g/L、1.15g/L、0.2g/L, pH 值为 7.4。

[0025] 本发明的还一个目的是提供一种检测或辅助检测瓜类果斑病菌的方法。

[0026] 本发明所提供的用于检测或辅助检测瓜类果斑病菌的方法,包括使用所述试剂盒对待测样品(如植物样品)进行检测的步骤。

[0027] 所述试剂盒在定性或定量检测瓜类果斑病菌中的应用,也属于本发明的保护范围。

[0028] 在本发明中,以上所有的所述瓜类果斑病菌均可具体为瓜类果斑病菌(*Acidovorax citrulli*) ATCC29625。

[0029] 实验证明,本发明所提供的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的特异性好,效价高,与瓜类果斑病菌不同分离物均起反应,具有较好的广谱性。应用于瓜类果斑病菌血清学诊断试剂中,特异性好,避免了交叉反应。本发明研制的瓜类果斑病菌的单克隆抗体可用于研制瓜类果斑病菌的免疫学诊断试剂,如酶联诊断试剂,胶体金免疫试纸条,抗体芯片,生物传感器等。

[0030] 保藏说明

[0031] 参据的生物材料(株):4C6

[0032] 科学描述:分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株

[0033] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

- [0034] 保藏机构简称 :CGMCC
[0035] 地址 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号
[0036] 保藏日期 :2014 年 3 月 19 日
[0037] 保藏中心登记入册编号 :CGMCC No. 8960

具体实施方式

- [0038] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0039] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0040] 瓜类果斑病菌(*Acidovorax citrulli*):引自 ATCC,其 ATCC 编号为 29625。
- [0041] Balb/c 小鼠 :6-8 周龄,雌性,购自中国军事科学院。
- [0042] SP2/0 骨髓瘤细胞 :记载于“李桂芬、马洁、魏梅生等,番茄环斑病毒单克隆抗体的制备及检测. 植物检疫,2009,23 (6):16-18”一文,公众可从中国检验检疫科学研究院获得。
- [0043] 弗氏完全佐剂 :Sigma 公司,产品目录编号为 F5881。
- [0044] 弗氏不完全佐剂 :Sigma 公司,产品目录编号为 F5506。
- [0045] 下述实施例中 ELISA 检测中所用到的各溶液配方具体如下 :
- [0046] 包被缓冲液 :将碳酸钠 1.59g,碳酸氢钠 2.93g 溶于水,用水定容至 1L ;pH 值为 9.6。
- [0047] 封闭液 :含 20g/L 牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液。其中,磷酸盐缓冲液的配方为 :将氯化钠 8.0g,磷酸二氢钾 0.2g,磷酸氢二钠 1.15g,氯化钾 0.2g,溶于水中,用水定容至 1L ;pH 值为 7.4。
- [0048] 洗涤缓冲液 :含有体积分数 0.05% 的吐温 20 的磷酸盐缓冲液。其中,磷酸盐缓冲液的配方为 :将氯化钠 8.0g,磷酸二氢钾 0.2g,磷酸氢二钠 1.15g,氯化钾 0.2g,溶于水中,用水定容至 1L ;pH 值为 7.4。
- [0049] 样品抽提缓冲液 :将亚硫酸钠 1.3g 和聚乙烯基吡咯烷酮 20g 溶于所述洗涤缓冲液中,用所述洗涤缓冲液定容至 1L。
- [0050] 酶标抗体稀释缓冲液 :将聚乙烯基吡咯烷酮 20g 和牛血清白蛋白(BSA) 2g 溶于所述洗涤缓冲液中,所述用洗涤缓冲液定容至 1L。
- [0051] 底物溶液 :将二乙醇胺 97mL 溶于水中,调节 pH 值至 9.8,然后用水定容至 1L。
- [0052] 如上各溶液中的聚乙烯基吡咯烷酮的分子量为 24000 ~ 40000。
- [0053] 实施例 1、小鼠杂交瘤细胞株的获得及抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的制备
- [0054] 一、动物免疫
- [0055] 1、细菌培养
- [0056] 挑取 KB 平板培养基上的瓜类果斑病菌(*Acidovorax citrulli*)ATCC29625 的单菌落,划线于 KB 平板培养基上,26℃ 培养 48h,用生理盐水洗涤菌落至 2ml 离心管中,生理盐水洗涤 2 次,调浓度至 10^8 CFU/mL,用于小鼠免疫试验。
- [0057] 2、小鼠免疫
- [0058] 第一次免疫 :取等体积的弗氏完全佐剂与步骤 1 获得的瓜类果斑病菌的菌悬液,乳化完全后腹腔注射 Balb/c 小鼠,每只小鼠用量为 10^8 CFU 瓜类果斑病菌。

[0059] 第二次免疫：第一次免疫 2 周后进行第二次免疫，取等体积的弗氏不完全佐剂与步骤 1 获得的瓜类果斑病菌的菌悬液，乳化后进行腹腔注射，每只小鼠用量同第一次免疫。

[0060] 第三次免疫：第二次免疫 2 周后，进行第三次免疫，方法和剂量同第二次免疫。

[0061] 加强免疫：第三次免疫后 1 周尾静脉采血进行血清效价测定（间接 ELISA 法），当血清效价达到 $1:10^4$ 以上时用步骤 1 获得的瓜类果斑病菌的菌悬液直接腹腔注射 Balb/c 小鼠加强免疫，用量为 10^8 CFU 瓜类果斑病菌。

[0062] 上述间接 ELISA 法测定血清效价的步骤具体如下：

[0063] 1) 包被：在 96 孔酶标板中加入 $100\ \mu\text{L}$ 浓度 10^8 CFU/ml 的瓜类果斑病菌的菌悬液（溶剂为包被缓冲液）， 37°C 孵育 2 小时，用洗涤缓冲液洗涤 3 次。

[0064] 2) 封闭：用封闭液封板， 37°C 孵育 30min，用洗涤缓冲液洗涤 3 次。

[0065] 3) 加待测样本：将 $100\ \mu\text{L}$ 按一定比例稀释的待测的免疫后小鼠血清样本加至酶标板中，置湿盒中 37°C 条件下 2 小时，洗板 4 次。同时设置以未经免疫的小鼠血清作为待测样品的对照孔。

[0066] 4) 加酶标抗体：将马抗小鼠酶标抗体（购自中山金桥公司 - 美国 VECTOR 公司产品，商品目录号为 W0426）用酶标抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，每孔加 $100\ \mu\text{L}$ ，置湿盒中 37°C 条件下 2 小时，用洗涤缓冲液洗板 3 次。

[0067] 5) 显色：将底物对硝基苯磷酸二钠（p NPP，现配现用）按 1mg/mL 的浓度溶于底物溶液中，混匀，加入到酶标板孔中，每孔 $100\ \mu\text{L}$ 。

[0068] 6) 读数：以 405nm 单波长测定各待测孔 OD 值，以与阴性对照孔（以未经免疫的小鼠血清作为待测样品的对照）OD 值的比值（P/N）大于 2.1 为限，作为判断血清效价的临界点。ELISA 结果判定方法：效价用 $P/N > 2.1$ 的血清的最大稀释倍数表示。

[0069] 二、细胞融合和克隆化

[0070] 在加强免疫后 80 小时进行细胞融合试验。将免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合（脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞的数量比例为 9:1）。采用有限稀释法筛选分泌单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞株；用浓度为 10^8 CFU/ml 的瓜类果斑病菌的菌悬液包被酶标板，采用间接 ELISA 进行测定，筛选分泌抗体效价高且与对照菌不发生反应（见实施例 2 特异性实验）的阳性单克隆细胞株。对阳性孔的细胞用有限稀释法克隆 3 次，使阳性率达 100%。

[0071] 上述间接 ELISA 法筛选阳性细胞及测定抗体效价的步骤具体如下：

[0072] 1) 包被：在 96 孔酶标板中加入 $100\ \mu\text{L}$ 浓度 10^8 CFU/ml 的瓜类果斑病菌的菌悬液（溶剂为包被缓冲液）， 37°C 孵育 2 小时，用洗涤缓冲液洗涤 3 次。

[0073] 2) 封闭：用封闭液封板， 37°C 孵育 30min，用洗涤缓冲液洗涤 3 次。

[0074] 3) 加待测样本：将 $100\ \mu\text{L}$ 待测的杂交瘤细胞培养液加至酶标板中，置湿盒中 37°C 条件下 2 小时，洗板 4 次。同时设置以 SP2/0 细胞培养上清代替待测样品的对照孔。

[0075] 4) 加酶标抗体：将马抗小鼠酶标抗体（购自中山金桥公司 - 美国 VECTOR 公司产品，商品目录号为 W0426）用酶标抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，每孔加 $100\ \mu\text{L}$ ，置湿盒中 37°C 条件下 2 小时，用洗涤缓冲液洗板 3 次。

[0076] 5) 显色：将底物对硝基苯磷酸二钠（p NPP）按 1mg/mL 的浓度溶于底物溶液中，混匀，加入到酶标板孔中，每孔 $100\ \mu\text{L}$ 。

[0077] 6) 读数 :以 405nm 单波长测定各待测孔 OD 值, 以与阴性对照孔 (以 SP2/0 细胞培养上清代替待测样品的对照) OD 值的比值 (P/N) 大于 2.1 为限, 作为判断为阳性或确定效价的临界点。ELISA 结果判定方法 :若 $P/N > 2.1$, 则判别为阳性细胞 ;效价用 $P/N > 2.1$ 的细胞培养液上清的最大稀释倍数表示。

[0078] 经间接 ELISA 法筛选, 3 次亚克隆化获得了 1 株能稳定分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 4C6。该小鼠杂交瘤细胞株已于 2014 年 3 月 19 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏编号为 CGMCC No. 8960。

[0079] 三、细胞冻存和复苏

[0080] 用冻存液将分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 制成 5×10^6 个 /mL 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时, 取出冻存管, 立即放入 37℃ 水浴中速融, 离心去除冻存液后移入培养瓶内培养。

[0081] 四、单克隆抗体的制备、纯化及亚型鉴定

[0082] 1、增量培养制备单克隆抗体及效价测定

[0083] 细胞培养基的制备方法 :向 DMEM 培养基中添加小牛血清 (购自 GIBCOBRL, 产品目录号为 26170-043), 小牛血清的终浓度为 20% (体积分数), pH 为 7.0。

[0084] 将分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 置于上述细胞培养基中, 37℃ 培养, 期间每天观察, 并及时扩增培养。采用间接 ELISA 法对培养上清进行效价测定, 具体操作参见步骤二中“间接 ELISA 法筛选阳性细胞及测定抗体效价”。实验重复三次。

[0085] 结果显示, 分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 细胞培养上清的抗体效价为 1 :4000。

[0086] 2、单克隆抗体的纯化

[0087] 用 G 蛋白柱 (GE 公司产品, 其产品目录号为 17-0404-01) 对步骤 1 获得的细胞培养液上清中抗体进行纯化 (具体操作参见产品说明书进行), 纯化后的抗体 (即分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 分泌的单克隆抗体) -20℃ 保存。

[0088] 3、单克隆抗体 Ig 类型的鉴定

[0089] 将步骤 2 得到分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 分泌的单克隆抗体溶液采用 Sigma 公司单抗分型试剂 (产品编号为 IS02) 检测单克隆抗体的 Ig 类型, 具体操作参见试剂盒说明书。

[0090] 结果显示, 分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCC No. 8960 分泌的单克隆抗体的免疫球蛋白亚类为 IgG1 型。

[0091] 实施例 2、实施例 1 获得的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的检测

[0092] 一、实施例 1 获得的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的特异性检测

[0093] 1、供试菌株

[0094] 瓜类果斑病菌 (*Acidovorax citrulli*) ATCC29625 和表 1 中的对照菌。

[0095] 表 1 抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体特异性检测所用对照菌

[0096]

序号	学名	中文名
1	<i>Acidovorax cattleyae</i>	燕麦食酸菌卡特莱兰亚种 ATCC10200
2	<i>Acidovorax konjaci</i>	食酸菌魔芋亚种 ATCC33996
3	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	细菌性叶缘枯病菌 NCPPB247
4	<i>Pseudomonas syringae</i>	细菌性角斑病菌 ATCC9004
5	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	细菌性白枯病菌 ATCC13222
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	黄瓜细菌性角斑病 NCPPB227
7	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	细菌性叶斑病菌 NCPPB2567
8	<i>Xanthomonas melonis</i>	甜瓜黄单胞病菌 NCPPB3434
9	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	柑橘溃疡病菌 QB0045
10	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	核果类叶斑病菌 ATCC15924
11	<i>Erwinia tracheiphila</i>	黄瓜细菌性萎蔫病菌 NCPPB2133
12	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	菊欧文氏菌 ATCC11662
13	<i>Erwinia persicinus</i>	桃红欧文氏菌 DSMZ19328
14	<i>Burkholderia andropogonis</i>	禾本科作物条纹病 ATCC23060
15	<i>Burkholderia gladioli</i>	洋葱腐烂病 ATCC10248
16	<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i>	番茄溃疡病菌 ATCC14456
17	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	菜豆细菌性萎蔫病菌 ICMP2584

[0097]

[0098] 2、单克隆抗体的特异性检测

[0099] (1) 碱性磷酸酯酶标记的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的制备

[0100] 取 100 μ L 碱性磷酸酯酶(Sigma 公司, 产品目录号为 :P6774-10KU)加入到 300 μ L 的 0.01M PBS (pH7.2) 中, 再加入 10 μ L25% 的戊二醛(Alfa Aesar 公司, 产品目录号为 : A17876) 混匀, 室温(25 $^{\circ}$ C) 孵育活化 1h, 再加入 0.5mg 实施例 1 中得到的纯化后的单克隆抗体(即分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4C6CGMCCNo. 8960 分泌的单克隆抗体) 室温反应 2h, 即获得碱性磷酸酯酶标记的单克隆抗体。

[0101] (2) 特异性检测

[0102] 采用 DAS-ELISA 方法, 检测实施例 1 获得的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体分别与对照菌有无交叉反应。具体步骤为:

[0103] ①包被 :采用瓜类果斑病菌包被抗体(购自 ACD 公司,其产品目录号为 B260-C1)按照使用浓度(2 μ g/mL)包被酶标板,100 μ L/孔,溶剂为包被缓冲液;37℃孵育 2h,用洗涤缓冲液洗酶标板。

[0104] ②加供试菌 :分别加入用样品抽提缓冲液稀释的瓜类果斑病菌、对照菌的 10^8 CFU/ml 浓度的菌液,100 μ L/孔,4℃冰箱过夜,用洗涤缓冲液洗酶标板。

[0105] ③加酶标单抗 :将按照体积比 1:1000 稀释的瓜类果斑病菌碱性磷酸酯酶标记的单克隆抗体(即步骤(1)制备得到的碱性磷酸酯酶标记的单克隆抗体)加入到酶标板中,100 μ L/孔,37℃孵育 4h,用洗涤缓冲液洗酶标板。

[0106] ④显色 :将底物对硝基苯磷酸二钠(p -NPP)按 1mg/mL 的浓度溶于底物溶液中,混匀,加入到酶标板孔中,每孔 100 μ L,37℃避光放置,80min 后进行 405nm 读数。

[0107] 实验重复三次,结果取平均值。

[0108] 结果见表 2。从表 2 可以看出,瓜类果斑病菌的 OD_{405nm} 值为 3.031,而其余对照菌的 OD_{405nm} 值均小于 0.2。可见,实施例 1 获得的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体特异性好,与实验所用对照菌没有交叉反应。

[0109] 表 2 单克隆抗体的特异性

[0110]

病菌种类	OD_{405nm} 值
瓜类果斑病菌	3.031
燕麦食酸菌卡特莱兰亚种	0.092
食酸菌魔芋亚种	0.085
细菌性叶缘枯病菌	0.096
细菌性角斑病菌	0.096
细菌性白枯病菌	0.103
黄瓜细菌性角斑病	0.106
细菌性叶斑病菌	0.085
甜瓜黄单胞病菌	0.083
柑橘溃疡病菌	0.091
核果类叶斑病菌	0.088
黄瓜细菌性萎蔫病菌	0.094
菊欧文氏菌	0.197

桃红欧文氏菌	0.086
禾本科作物条纹病	0.084
洋葱腐烂病	0.084
番茄溃疡病菌	0.087
菜豆细菌性萎蔫病菌	0.086

[0111] 二、实施例 1 获得的单克隆抗体与瓜类果斑病菌不同分离物的反应

[0112] 1、瓜类果斑病菌分离物的制备

[0113] 分别从内蒙、新疆、海南和甘肃地区,分别采集西瓜发病叶片、分离纯化并按照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准“西瓜细菌性果斑病菌检疫鉴定方法(SN/T1465-2004)”进行鉴定得到当地的瓜类果斑病菌(*Acidovorax citrulli*),分别记为如下:分离物 QB0062(内蒙分离物)、QB0065(新疆分离物)、QB0066(海南分离物)和 QB0076(甘肃分离物)。

[0114] 2、单克隆抗体与瓜类果斑病菌不同分离物的反应

[0115] 采用 DAS-ELISA 方法,检测实施例 1 获得的瓜类果斑病菌单克隆抗体与步骤 1 获得的瓜类果斑病菌不同分离物的反应。具体操作参见步骤一 2(2),仅将步骤②中加入的供试菌改为步骤 1 获得的瓜类果斑病菌不同分离物,其用量为 10^8 CFU/ml(以瓜类果斑病菌量计),每孔 100 μ L。同时以瓜类果斑病菌(*Acidovorax citrulli*)ATCC29625 作为阳性对照。

[0116] 实验重复三次,结果取平均值。

[0117] 结果见表 3,从表 3 可以看出,瓜类果斑病菌不同分离物的 OD_{405nm} 值均大于 4.2。可见,实施例 1 获得的瓜类果斑病菌单克隆抗体与瓜类果斑病菌不同分离物的反应均呈阳性反应,具有较好的广谱性。

[0118] 表 3 单抗与瓜类果斑病菌不同分离物的反应

[0119]

处理	OD _{405nm} 值
瓜类果斑病菌 ATCC29625	3.031
QB0062	4.295
QB0065	4.251
QB0066	4.397
QB0076	4.427

专利名称(译)	一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN103881980A	公开(公告)日	2014-06-25
申请号	CN201410111292.6	申请日	2014-03-24
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	李桂芬 马洁 田茜 魏梅生 赵文军		
发明人	李桂芬 马洁 田茜 魏梅生 赵文军		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/12 G01N33/577 G01N33/535 C12R1/91		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN103881980B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体及其应用。本发明所提供的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体是由分泌瓜类果斑病菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株4C6分泌产生的，该小鼠杂交瘤细胞株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No. 8960。本发明所提供的抗瓜类果斑病菌的单克隆抗体的特异性好，效价高，与瓜类果斑病菌不同分离物均起反应，具有较好的广谱性。应用于瓜类果斑病菌血清学诊断试剂中，特异性好，避免了交叉反应。本发明研制的瓜类果斑病菌的单克隆抗体可用于研制瓜类果斑病菌的免疫学诊断试剂，如酶联诊断试剂，胶体金免疫试纸条，抗体芯片，生物传感器等。

序号	学名	中文名
1	<i>Acidovorax cattleyae</i>	燕麦食酸菌卡特莱兰亚种 ATCC10200
2	<i>Acidovorax konjaci</i>	食酸菌魔芋亚种 ATCC33998
3	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	细菌性叶缘枯病菌 NCPPB247
4	<i>Pseudomonas syringae</i>	细菌性角斑病菌 ATCC9004
5	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	细菌性白枯病菌 ATCC13222
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	黄瓜细菌性角斑病 NCPPB227
7	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	细菌性叶斑病菌 NCPPB2567
8	<i>Xanthomonas melonis</i>	甜瓜黄单胞病菌 NCPPB3434
9	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	柑橘溃疡病菌 QB0045
10	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	核果类叶斑病菌 ATCC15924
11	<i>Erwinia tracheiphila</i>	黄瓜细菌性萎蔫病菌 NCPPB2133
12	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	菊欧文氏菌 ATCC11662
13	<i>Erwinia persicius</i>	桃红欧文氏菌 DSMZ19328
14	<i>Burkholderia andropogonis</i>	禾本科作物条纹病 ATCC23060
15	<i>Burkholderia gladioli</i>	洋葱腐烂病 ATCC10248
16	<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i>	番茄溃疡病菌 ATCC14456
17	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	菜豆细菌性萎蔫病菌 ICMP2584