



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 202903671 U

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 201220612865. X

(22) 申请日 2012.11.20

(73) 专利权人 黑龙江省林业科学研究所
地址 150081 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平
路 134 号

(72) 发明人 李丽丽

(51) Int. Cl.

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

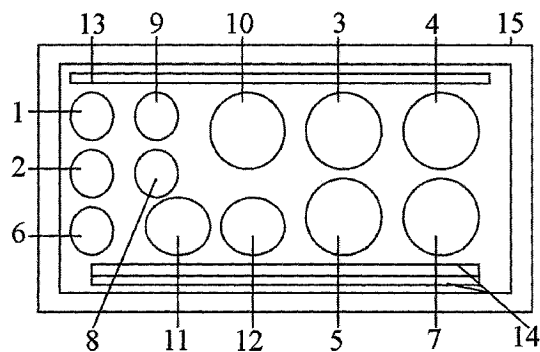
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 实用新型名称

苹果茎沟病毒检测试剂盒

(57) 摘要

苹果茎沟病毒检测试剂盒,它包括一个箱体,盒体内装有:密封包装的反应板、A 蛋白稀释溶液、抗苹果茎沟病毒多肽抗体、100 倍浓缩的稀释缓冲液、提取缓冲液、100 倍浓缩的洗涤缓冲液、酶标抗体、NBT/BCIP 底物缓冲液、显色液 A、显色液 B、终止液、病毒阳性样品对照、病毒阴性样品对照和操作说明书,使用方法见具体实施方式。该试剂盒是以抗苹果茎沟病毒多肽抗体为主体设计的,该抗体效价高、特异性好。操作说明书印制了应用 A 蛋白酶联免疫吸附试验方法检测苹果茎沟病毒的操作步骤和判定标准。本试剂盒实现了对苹果茎沟病毒快速、简便、灵敏的检测,易于大规模应用。



1. 苹果茎沟病毒的检测试剂盒,其特征在于:试剂盒包括一个箱体(15),箱体(15)内装有密封包装的反应板(14)、A蛋白稀释溶液(1)、抗苹果茎沟病毒多肽抗体(2)、100倍浓缩的稀释缓冲液(3)、提取缓冲液(4)、100倍浓缩的洗涤缓冲液(5)、酶标抗体(6)、NBT/BCIP底物缓冲液(7)、显色液A(8)、显色液B(9)、终止液(10)、苹果茎沟病毒阳性样品对照(11)、苹果茎沟病毒阴性样品对照(12)和操作说明书(13),箱体内的液体试剂均以小瓶包装。

苹果茎沟病毒检测试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型属于生物技术领域,涉及一种病毒的快速检测器具,具体是苹果茎沟病毒的检测试剂盒。

背景技术

[0002] 苹果茎沟病毒 (Apple stem grooving virus, ASGV) 是严重危害苹果生产的主要病毒之一,广泛分布于苹果种植区。苹果茎沟病毒感染严重影响果树产量,导致果树长势衰退,产量锐减,品质下降。为了控制苹果茎沟病毒的传播及危害,迫切需要快速、灵敏、稳定的检测技术。

[0003] 血清学方法是检测植物病毒的主要方法。传统抗体的制备一般首先提纯病毒粒子,然后免疫动物,再通过单克隆或多克隆抗体技术制备抗体;其存在较多弊端,如一些病毒在寄主体内含量较低,难以提纯获得足够的抗原;还有一些病毒分离提纯困难,不易得到纯化的病毒粒子。苹果茎沟病毒在果树植株内病毒含量较低,提纯病毒粒子较困难,所以应用传统的提纯病毒粒子的方法难以制备高效价抗体,且检测灵敏度较差。

[0004] 免疫学最新进展显示,在抗原抗体的结合反应中,抗原表位 (Epitope),又称抗原决定簇 (Antigenic determinant),是关键的免疫学因子,它是存在于抗原分子表面的能够决定抗原特异性的数个氨基酸残基组成的特殊序列及其空间结构,是蛋白质抗原性的基础,根据抗原表位区氨基酸序列直接合成多肽,之后免疫动物,即可制备抗病毒多肽的抗体。由于其受其他与抗原表位无关的序列干扰较少,因而制备的抗体效价较高,特异性较强。因此,研制开发以抗苹果茎沟病毒多肽抗体为主体设计的检测试剂盒,不仅为应用血清学方法检测苹果茎沟病毒提供了一种效价较高、特异性较强的抗体,而且可以实现有效、灵敏、快捷、简便的检测苹果茎沟病毒,对苹果病毒病的预防和控制具有重要意义。

发明内容

[0005] 本实用新型的目的在于为了解决目前缺乏检测苹果茎沟病毒的有效器具的问题,而提供一种以抗苹果茎沟病毒多肽抗体为主体设计的苹果茎沟病毒的检测试剂盒,可快速、方便、有效地检测出苹果待测样品是否感染苹果茎沟病毒。

[0006] 本实用新型的目的是这样实现的:本设计的苹果茎沟病毒检测试剂盒包括一个盒体 (15),盒体 (15) 内装有密封包装的反应板 (14)、A 蛋白稀释溶液 (1)、抗苹果茎沟病毒多肽抗体 (2)、100 倍浓缩的稀释缓冲液 (3)、提取缓冲液 (4)、100 倍浓缩的洗涤缓冲液 (5)、酶标抗体 (6)、NBT/BCIP 底物缓冲液 (7)、显色液 A (8)、显色液 B (9)、终止液 (10)、苹果茎沟病毒阳性样品对照 (11)、苹果茎沟病毒阴性样品对照 (12) 和操作说明书 (13);该试剂盒是以抗苹果茎沟病毒多肽抗体为主体设计的,该抗体效价高、特异性好,盒体内的液体试剂均以小瓶包装。

[0007] 本实用新型的优点与效果:

[0008] 1、灵敏度高,可对无明显症状植株中的病毒进行有效检测。

- [0009] 2、操作简单,普通工作人员经过简单培训即可完成。
- [0010] 3、可重复性好,检测结果稳定可靠。
- [0011] 4、对仪器要求较低,仅需要普通的恒温水浴锅、酶标仪等。
- [0012] 5、本实用新型的抗体制备成本低,只有用重组抗原制备抗体成本的十分之一,并且安全可靠高于重组抗原制备的抗体。
- [0013] 6、本实用新型中的抗苹果茎沟病毒多肽抗体效价高,特异性好,可与苹果茎沟病毒的外壳蛋白基因原核表达产物及天然的苹果茎沟病毒阳性植物材料产生免疫反应,为应用血清学方法检测苹果茎沟病毒提供了有效、实用的抗体,具有良好的应用前景。

附图说明

- [0014] 图 1 是苹果茎沟病毒检测试剂盒的外观主视图。
- [0015] 图 2 是苹果茎沟病毒检测试剂盒横截面剖视图,即盒内设置的组成及位置示意图。图中,A 蛋白稀释溶液 (1)、抗苹果茎沟病毒多肽抗体 (2)、100 倍浓缩的稀释缓冲液 (3)、提取缓冲液 (4)、100 倍浓缩的洗涤缓冲液 (5)、酶标抗体 (6)、NBT/BCIP 底物缓冲液 (7)、显色液 A (8)、显色液 B (9)、终止液 (10)、苹果茎沟病毒阳性样品对照 (11)、苹果茎沟病毒阴性样品对照 (12) 和操作说明书 (13)、密封包装的反应板 (14) 和箱体 (15)。

具体实施方式

- [0016] 苹果茎沟病毒检测试剂盒的使用方法如下：
- [0017] 1、将 1 号管中的 A 蛋白稀释溶液加入反应板中,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,倒掉孔中液体后,用蒸馏水将 5 号管中的洗涤液稀释 100 倍,然后用其洗涤反应孔 3 次,每次 3min。
- [0018] 2、用蒸馏水将 3 号管中的稀释缓冲液稀释 100 倍,然后用其稀释 2 号管中的抗苹果茎沟病毒多肽抗体,抗体的工作浓度为 1 : 1000,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗涤。
- [0019] 3、待检抗原样品用 4 号管中的提取缓冲液 1 : 5 倍 (W/V) 研磨,8000rpm 离心 8min,每孔加上清液 100 μ L,同时分别在相应孔中加入苹果茎沟病毒阳性样品对照和苹果茎沟病毒阴性样品对照,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗涤。
- [0020] 4、2 号管中的抗苹果茎沟病毒多肽抗体用 3 号管中稀释后的缓冲液稀释,抗体的工作浓度为 1 : 500,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗涤。
- [0021] 5、6 号管中酶标抗体用 3 号管中稀释后的缓冲液稀释,工作浓度 1 : 1000,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,洗涤。
- [0022] 6、将 8、9 号两管中的显色液均以 1 : 20 的比例加入 7 号管中的底物缓冲液中,配制成底物溶液,然后加入反应板中,每孔 100 μ L,室温下遮光放置 30min 显色。
- [0023] 7、加 10 号管中的反应终止液,每孔 25 μ L,目测比色后,利用酶标仪在 405nm 波长下测定每孔吸光值 (OD_{405} 值)。
- [0024] 8、结果判定：
- [0025] 1) 试验结果同时符合下列条件方为有效:两孔阳性对照 OD_{405} 值平均值 ≥ 0.6 ;阴性对照平均值 ≤ 0.25 ;
- [0026] 2) 临界值的计算:临界值上限 = (阳性对照孔 OD_{405} 均值 - 阴性对照 OD_{405} 均值) $\times 0.20$ + 阴性对照 OD_{405} 平均值;临界值下限 = (阳性对照孔 OD_{405} 均值 - 阴性对照 OD_{405} 均值)

均值) $\times 0.15 +$ 阴性对照 OD_{405} 平均值;

[0027] 3) 结果判定: 被检样品 OD_{405} 平均值 $<$ 临界值下限, 为苹果茎沟病毒阴性; 被检样品 OD_{405} 平均值 \geq 临界值上限, 为苹果茎沟病毒阳性; 介于二者之间, 判为可疑, 应复检, 复检 OD_{405} 平均值 \geq 临界值上限 (复检时), 判为苹果茎沟病毒阳性, 反之判为阴性。

[0028] 备注: 试剂盒不使用时, 应于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 开封后, 应在 3 个月内用完。

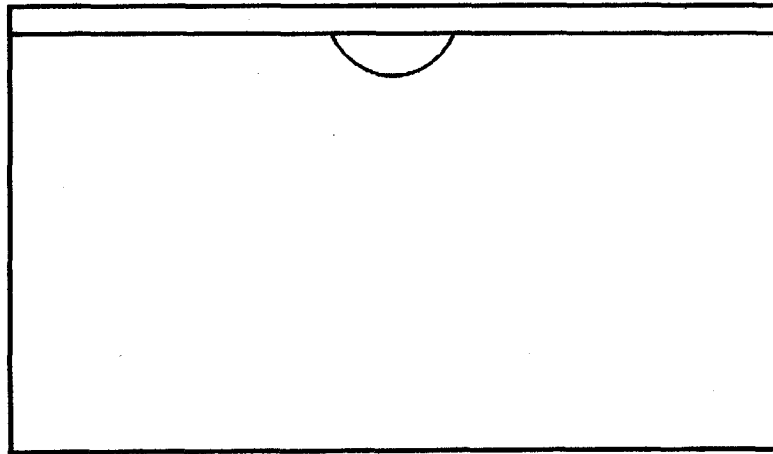


图 1

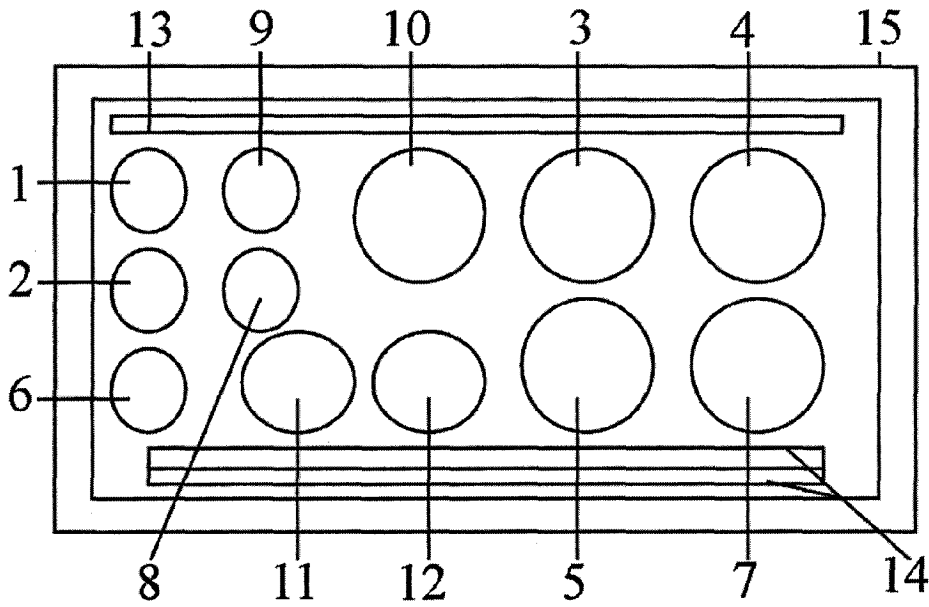


图 2

专利名称(译)	苹果茎沟病毒检测试剂盒		
公开(公告)号	CN202903671U	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201220612865.X	申请日	2012-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	黑龙江省林业科学研究所		
申请(专利权)人(译)	黑龙江省林业科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	黑龙江省林业科学研究所		
[标]发明人	李丽丽		
发明人	李丽丽		
IPC分类号	G01N21/31 G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

苹果茎沟病毒检测试剂盒，它包括一个箱体，箱体内存有：密封包装的反应板、A蛋白稀释溶液、抗苹果茎沟病毒多肽抗体、100倍浓缩的稀释缓冲液、提取缓冲液、100倍浓缩的洗涤缓冲液、酶标抗体、NBT/BCIP底物缓冲液、显色液A、显色液B、终止液、病毒阳性样品对照、病毒阴性样品对照和操作说明书，使用方法见具体实施方式。该试剂盒是以抗苹果茎沟病毒多肽抗体为主体设计的，该抗体效价高、特异性好。操作说明书印制了应用A蛋白酶联免疫吸附试验方法检测苹果茎沟病毒的操作步骤和判定标准。本试剂盒实现了对苹果茎沟病毒快速、简便、灵敏的检测，易于大规模应用。

