



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109061161 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201811353672.5

(22)申请日 2018.11.14

(71)申请人 湖南省植物保护研究所

地址 410125 湖南省长沙市远大二路726号

(72)发明人 张松柏 刘勇 张德咏 彭静

张卓 张宇 燕飞 李凡 陶小荣

何自福 缪武 李兴华

(74)专利代理机构 湖南兆弘专利事务所(普通合伙) 43008

代理人 陈晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

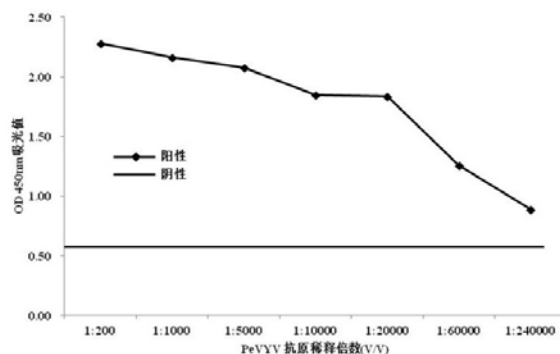
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用,其中用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒包括PeVYV P4蛋白多克隆抗体。利用间接ELISA法,将PeVYV P4蛋白多克隆抗体进行样本中的辣椒脉黄病毒检测,具有特异性强、灵敏度高等优点。还公开了上述检测试剂盒在检测辣椒脉黄病毒中的应用,可以实现快速、高通量检测,所用仪器简单,操作简便。



1. 一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒,其特征在于,包括PeVYV P4蛋白多克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,还包括封闭液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、显色液和显色终止液。

3. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于,所述封闭液为含1% BSA的10×PBST缓冲液;

和/或,所述显色液为TMB四甲基联苯二胺;

和/或,所述显色终止液为2 mol/L的硫酸溶液。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的检测试剂盒,其特征在于,所述PeVYV P4蛋白多克隆抗体采用以下方法制备得到:

S1、以PeVYV P4基因为模板设计引物,对感染PeVYV的辣椒cDNA进行PCR扩增得到扩增产物;

S2、将所述扩增产物重组到pDEST17载体上得到pDEST17-P4;

S3、将所述pDEST17-P4转化至感受态细胞得到转化产物;

S4、将所述转化产物进行阿拉伯糖诱导得到诱导产物;

S5、将所述诱导产物进行裂解、纯化得到PeVYV P4蛋白;

S6、将所述PeVYV P4蛋白进行动物免疫的得到PeVYV P4蛋白多克隆抗体。

5. 根据权利要求4所述的检测试剂盒,其特征在于,所述引物包括上游引物和下游引物组成,所述上游引物的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所示下游引物的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

6. 一种权利要求1至5中任一项所述检测试剂盒在检测辣椒脉黄病毒中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用方法包括以下步骤:

(1) 包被:将植物样本的上清液加入酶标板中进行包被;

(2) 封闭:将已包被的酶标板封闭液,37℃温育1 h;

(3) 加一抗:在封闭好的酶标板中加入一抗稀释液,在37℃孵育1 h,所述一抗稀释液为一抗稀释5000倍的溶液;

(4) 加二抗:每孔加入二抗稀释液,37℃温育1 h,所述二抗稀释液为二抗稀释5000倍的溶液;

(5) 加显色液:每孔加入TMB四甲基联苯二胺显色底物溶液进行显色;

(6) 终止反应:每孔加入显色终止液,酶标仪测定450 nm吸光值;450 nm吸光值 ≥ 2.5 倍为阳性即样品感染了辣椒脉黄病毒,样品的450 nm吸光值 < 2.5 倍为阴性。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述一抗稀释液为PeVYV P4多克隆抗体与抗体稀释液按PeVYV P4多克隆抗体:抗体稀释液的体积比为1:5000混合而成的混合液,所述抗体稀释液为含1% BSA的10×PBST缓冲液。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述二抗稀释液为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗与抗体稀释液以1:5000体积比稀释后的溶液,所述抗体稀释液为含1% BSA的10×PBST缓冲液。

用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸检测技术领域,尤其涉及一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 辣椒脉黄病毒(*Pepper vein yellows virus*, PeVYV)是黄征病毒科(*Luteoviridae*)马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)的新成员,由蚜虫传播,能够侵染多种重要的茄科作物。侵染辣椒导致辣椒叶脉黄化、叶卷曲,影响辣椒正常生长。因此,建立该病毒的快速检测技术体系,为监测该病毒的发生、分布及危害,提供技术手段,为科学评估该病毒对农业生产的危害提供科学依据。

[0003] 目前报道的PeVYV的检测方法仅有RT-PCR和RT-LAMP技术,这些方法都需要具有较好技术背景的操作人员、以及昂贵的仪器如冷冻高速离心机、PCR仪、浊度仪和凝胶成像系统等,同时检测过程需要复杂的样品处理过程,如总RNA抽提、反转录;以及超过2 h的扩增过程,和繁琐的电泳紫外观察过程。缺乏一种可以实现快速、高通量检测辣椒脉黄病毒的方法。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种快速检测辣椒脉黄病毒的血清学方法,该方法可以实现快速、高通量检测;在进行血清学检测是利用制备的PeVYV P4蛋白多克隆抗体,利用间接ELISA法进行检测样本中的辣椒脉黄病毒。

[0005] 一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒,包括PeVYV P4蛋白多克隆抗体。

[0006] 上述的检测试剂盒,优选的,还包括封闭液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、显色液和显色终止液。

[0007] 上述的检测试剂盒,优选的,所述封闭液为含1% BSA的的10×PBST缓冲液;

和/或,所述显色液为TMB四甲基联苯二胺;

和/或,所述显色终止液为2 mol/L的硫酸溶液。

[0008] 上述的检测试剂盒,优选的,所述PeVYV P4蛋白多克隆抗体采用以下方法制备得到:

S1、以PeVYV P4基因为模板设计引物,对感染PeVYV的辣椒cDNA进行PCR扩增得到扩增产物;

S2、将所述扩增产物重组到pDEST17载体上得到pDEST17-P4;

S3、将所述pDEST17-P4转化至感受态细胞得到转化产物;

S4、将所述转化产物进行阿拉伯糖诱导得到诱导产物;

S5、将所述诱导产物进行裂解、纯化得到PeVYV P4蛋白;

S6、将所述PeVYV P4蛋白进行动物免疫的得到PeVYV P4蛋白多克隆抗体。

[0009] 上述的检测试剂盒,优选的,所述引物包括上游引物和下游引物组成,所述上游引

物的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所示下游引物的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种上述检测试剂盒在检测辣椒辣椒脉黄病毒中的应用。

[0011] 上述的应用,优选的,所述应用方法包括以下步骤:

- (1) 包被:将植物样本的上清液加入酶标板中进行包被;
- (2) 封闭:将已包被的酶标板封闭液,37℃温育1 h;
- (3) 加一抗:在封闭好的酶标板中加入一抗稀释液,在37℃孵育1 h,所述一抗稀释液为一抗稀释5000倍的溶液;
- (4) 加二抗:每孔加入二抗稀释液,37℃温育1 h,所述二抗稀释液为二抗稀释5000倍的溶液;
- (5) 加显色液:每孔加入TMB四甲基联苯二胺显色底物溶液进行显色;
- (6) 终止反应:每孔加入显色终止液,酶标仪测定450 nm吸光值;450 nm吸光值 ≥ 2.5 倍为阳性即样品感染了辣椒脉黄病毒,样品的450 nm吸光值 < 2.5 倍为阴性。

[0012] 上述的应用,优选的,所述一抗稀释液为PeVYV P4多克隆抗体与抗体稀释液按PeVYV P4多克隆抗体:抗体稀释液的体积比为1:5000混合而成的混合液,所述抗体稀释液为含1% BSA的10×PBST缓冲液。

[0013] 上述的应用,优选的,所述二抗稀释液为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗与抗体稀释液以1:5000体积比稀释后的溶液,所述抗体稀释液为含1% BSA的10×PBST缓冲液。

[0014] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

(1) 本发明提供了一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒,黄征病毒科包含三个属:黄征病毒属(*Luteovirus*)、马铃薯卷叶病毒属(*Pterovirus*)和豌豆耳突花叶病毒属(*Enamovirus*),其中*Luteovirus*和*Pterovirus*病毒编码P4蛋白,而*Enamovirus*病毒不编码P4蛋白。*Luteovirus*和*Pterovirus*病毒编码P4蛋白,在序列同源性和分子量大小,存在明显差异,因此,通过分子生物学方法大量表达PeVYV编码的P4蛋白,并以此作为抗原,制备多克隆抗体,利用间接ELISA法进行检测样本中的辣椒脉黄病毒,建立检测PeVYV的血清学检测方法,具有操作简便、快速、特异性强、灵敏度高等优点,可以广泛的应用于植物病毒的检测与病害诊断。

[0015] (2) 本发明提供了一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒在就按测辣椒脉黄病毒中的应用,与RT-PCR和RT-LAMP等分子生物学方法相比,具有检测通量大、快速、特异性强的优点。同时,所用仪器简单,操作简便,可用于茄科作物田间样品PeVYV的侵染率进行大规模调查,早期预警。

附图说明

[0016] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述。

[0017] 图1 PeVYV P4蛋白诱导表达SDS-PAGE图。图中,M为蛋白Marker,泳道1为PeVYV P4重组蛋白;泳道2为BSA(0.5 mg/mL)。

[0018] 图2 PeVYV P4多克隆抗体灵敏度检测结果。

具体实施方式

[0019] 以下结合说明书附图和具体优选的实施例对本发明作进一步描述,但并不因此而限制本发明的保护范围。

实施例

[0020] 以下实施例中所采用的材料和仪器均为市售。

[0021] 实施例1:

一种本发明的用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒,包括PeVYVP4蛋白多克隆抗体、辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)标记羊抗兔二抗、TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)、含1% BSA的PBST缓冲液和2 M的硫酸溶液。

[0022] 其中PeVYVP4蛋白多克隆抗体采用以下方法制备得到:

(1)PeVYV P4蛋白抗原的制备

1.1特异性引物设计与合成

PeVYV P4基因是以在GenBank上报道的辣椒脉黄病毒(Pepper vein yellows virus, PeVYV)(登录号:KP326573)基因组中完成的P4基因为模板,使用Primer 5.0在线设计引物,引物由上游引物和下游引物组成,上游引物的碱基序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物的碱基序列的碱基序列如SEQ ID NO.2所示。引物序列如下:

F:GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAATGGTGGATCACGTAAC (SEQ ID NO.1);

R:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCCCGTTAATCTGCGAAGC (SEQ ID NO.2)。

[0023] 1.2 原核表达载体构建

1.2.1 利用上述引物对感染PeVYV的辣椒cDNA进行PCR扩增,得到完整的P4基因的扩增产物。

[0024] 具体的扩增体系为:10×PCR buffer:5 μL; dNTP(10 mM):1 μL;上游引物/下游引物(10 μM)各1 μL;ddH₂O 12 μL;总体积为20 μL。

[0025] 扩增程序为94℃预变性5 min,94℃变性45 s,58℃复性30 s,72℃延伸60 s,30个循环,最后72℃延伸10 min。

[0026] 1.2.2 将扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,显示在500 bp有单一条带,与预期序列大小一致。

[0027] 1.2.3 重组质粒的构建采用Gateway技术,参照说明书进行:将P4基因PCR产物通过BP反应重组到入门载体pDONR221,然后通过LR反应到P4基因PCR产物重组到pDEST17载体,得到重组表达载体pDEST17-P4。

[0028] 1.3 重组蛋白的表达和分析

1.3.1 在42℃热激50 S,使重组载体转化至*E. coli*感受态细胞Rosetta得到转化产物(转化方法参照[美]J.萨姆布鲁克等,分子克隆实验指南(第三版),科学出版社,2002)。

[0029] 1.3.2 将得到的转化产物涂布于含100 μg/L的氨苄青霉素的LB平板,37℃过夜培养。

[0030] 1.3.3 挑取平板上的阳性单菌落,采用菌落PCR验证。

[0031] 1.3.4 含有pDEST17-P4重组子的工程菌Rosetta-pDEST17-P4在含有100 μg/mL氨

苜蓿青霉素的LB培养基中37℃培养过夜的得到培养液。

[0032] 1.3.5 将上述培养液以1:100体积比接种于20 mL的LB培养基中培养至OD₆₀₀为0.6~0.7(培养时间一般为2~4 h),加入诱导剂阿拉伯糖至终浓度为0.5 mM,于37℃继续培养,并在培养时间为4~6 h内取菌液检测。取1 mL菌液,离心收集菌体。在诱导前取1 mL菌液作为对照。

[0033] 1.3.6 分别在经过诱导的菌体和对照组的菌体中加入400 μL裂解液(裂解液的组分为:50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10 mM imidazol (pH8.0)、10 μg/ml溶菌酶),煮沸10 min,然后以12000 rpm离心5 min,分别收集上清。

[0034] 1.3.7 将上清用15%(v/v) SDS-PAGE凝胶在100 V,25 mA的电泳条件下电泳5 h,然后用考马斯亮蓝染液(考马斯亮蓝染液的成分包括:0.1%(w/v)考马斯亮兰,45%(v/v)甲醇,10%(v/v)冰醋酸、余量的ddH₂O)染色15 min,最后用脱色液(脱色液的成分包括:40 v/v%甲醇,10 v/v%冰醋酸,50 v/v%无菌水)脱色1 h后观察电泳结果。

[0035] 电泳结果参见图1。从图1的电泳结果中可知:在约25 kDa处有可溶蛋白表达,此大小与P4蛋白氨基酸序列加上标签His基因融合蛋白的氨基酸分子大小基本一致,认为此蛋白为融合表达P4蛋白。

[0036] 1.4 重组蛋白纯化和浓度测定

采用GE公司的Ni-NTA琼脂糖试剂盒从总蛋白中纯化His和P4融合蛋白;该试剂盒能够特异性结合His,利用该特异性结合His特点纯化融合蛋白。表达的P4蛋白蛋白含有His标记,便于纯化,可溶形式的诱导表达蛋白纯化。

[0037] 纯化蛋白用15%(v/v) SDS-PAGE凝胶电泳检测,在25 kDa处可见单一条带的表达蛋白(图1),证明此蛋白为含标签His的PeVYV P4,即为PeVYV P4蛋白抗原,浓度为200 μg/ml。

[0038] (2) PeVYVP4蛋白多克隆抗体制备

取纯化好的蛋白质3-4mg用干冰包装好,寄往杭州华安生物技术有限公司免疫健康的大耳白兔(两只)最终得到多克隆抗体和抗血清,所得的PeVYV P4多克隆抗体的浓度为500 μg/ml。

[0039] 实施例2:

一种实施例1的检测试剂盒在检测辣椒脉黄病毒中的应用,采用ID-ELISA法检测PeVYV P4多克隆抗体的灵敏度。具体的实验过程如下:

(1) 包被:用10×PBST缓冲液包被PeVYV抗原,将实施例1步骤1.4中浓度为200 μg/ml PeVYV P4蛋白抗原,用抗体稀释液进行梯度稀释,依次稀释为200倍、1000倍、5000倍、10000倍、20000倍、60000倍、240000倍的各PeVYV抗原梯度稀释液,在酶标板的各孔中依次加入100 μl前述各PeVYV抗原梯度稀释液,4℃过夜或37℃温育2 h。用含1%BSA的10×PBST缓冲液(pH 7.4)作为阴性对照。

[0040] 所述BSA为牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)。

[0041] (2) 封闭:将已包被的酶标板用洗涤液洗涤3次后,每孔加入100μl封闭液,37℃温育

1h,然后用洗涤液洗涤3次。所述洗涤液为的10×PBST缓冲液(pH 7.4);所述封闭液为含的1% BSA的PBST缓冲液。

[0042] (3) 加一抗:在步骤(2)封闭后的酶标板按原加有不同稀释倍数的PeVYV抗原的各

孔中加入200 μ l一抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育1h,然后用洗涤液洗涤3次。洗涤液为10 $\times$ PBST缓冲液;一抗稀释液是将实施例1获得的浓度为500 μ g/ml的PeVYV P4多克隆抗体,用抗体稀释液稀释为2000倍的PeVYV P4多克隆抗体(即浓度为0.25 μ g/ml的PeVYV P4多克隆抗体),抗体稀释液为含1% BSA的10 $\times$ PBST缓冲液(pH 7.4)。

[0043] (4)加二抗:每孔加入二抗稀释液200 μ l,37 $^{\circ}$ C温育1h,用10 $\times$ PBST缓冲液(pH 7.4)洗涤4次。二抗稀释液为将辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)标记羊抗兔二抗用抗体稀释液稀释至5000倍,所述抗体稀释液为含1% BSA的PBST缓冲液。

[0044] (5)显色:加入TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物溶液100 μ l/孔,室温下显色5 min。

[0045] (6)终止:加入终止液50 μ l/孔,酶标仪OD450nm吸光值,以各孔的OD 450nm吸光值为纵坐标,以本实施例步骤(2)中PeVYV抗原梯度稀释液的稀释度为横坐标,结果见图2。取阴性对照OD 450nm吸光值的2.5倍为临界值,反应孔OD 450nm吸光值 $\geq$ 2.5倍为阳性,反应孔OD 450nm吸光值 $<$ 2.5倍为阴性,显色终止液为用无菌水配制的浓度为2 M的硫酸溶液。

[0046] 图2表明,在PeVYV P4多克隆抗体稀释2000倍时(浓度为0.25 μ g/ml),抗原的最大稀释倍数为240000倍,即抗原的浓度为0.83 ng/ml,此时PeVYV多克隆抗体仍能特异性的识别PeVYV抗原,表明其PeVYV P4多克隆抗体的灵敏度高。

[0047] 实施例3:PeVYV P4蛋白多克隆抗体特异性检测

本实验采用ID-ELISA法检测PeVYV P4多克隆抗体的特异性。测试以下3种病毒:PeVYV、辣椒脉扭病毒(Tobacco vein distorting virus,TVDV),和大豆褪绿病毒(Beet chlorosis virus,BCV)。PeVYV、TVDV和BCV阳性样品为分别感染这三种病毒的辣椒样品(叶片,保存于-80 $^{\circ}$ C)。ID-ELISA法的实验过程与实施例2不同之处是:PeVYV、TVDV和BCV阳性样品为植株叶片,加液氮研磨、双层纱布过滤。后续步骤与实施例2相同。

[0048] 试验结果表明,PeVYV P4抗体,仅与识别感染PeVYV植株叶片,表明其PeVYV P4多克隆抗体的特异性强。

[0049] 实施例4:田间辣椒样品检测

按照实施例2的方法,对2012-2017年在湖南、山东等省采集的30份辣椒叶片样本进行了检测。

[0050] 其中湖南采集样本18份,阳性率为44.4%,山东采集样本12份,阳性率为25.0%。

[0051] 以上实施例表明:本发明能对辣椒脉黄进行快速检测,检测特异性好,灵敏度高,同时可以实现对样品大批量的检测(一般用96孔板,一次至少可做几百个样本),缩短了检测时间和检测成本(检测时间约为6-8h,成本的话,一个样本仅需要约1-2元),有利于实现对辣椒脉黄病毒的快速检测。

[0052] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制。虽然本发明已以较佳实施例揭示如上,然而并非用以限定本发明。任何熟悉本领域的技术人员,在不脱离本发明的精神实质和技术方案的情况下,都可利用上述揭示的方法和技术内容对本发明技术方案做出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施例。因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同替换、等效变化及修饰,均仍属于本发明技术方案保护的范围内。

<110> 湖南省植物保护研究所

<120> 用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 54

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt catggaaatg gtggatcacg taac 54

<210> 2

<211> 49

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ccccgttaat ctgcgaagc 49

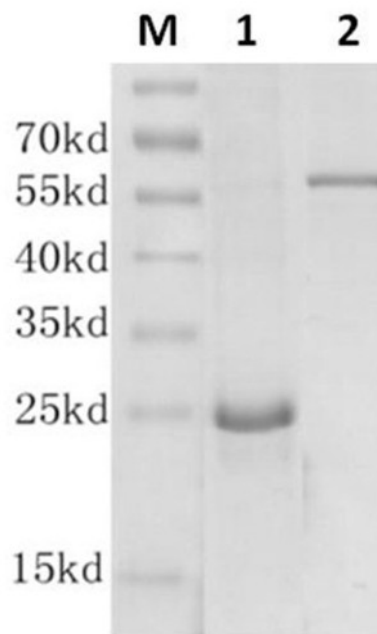


图1

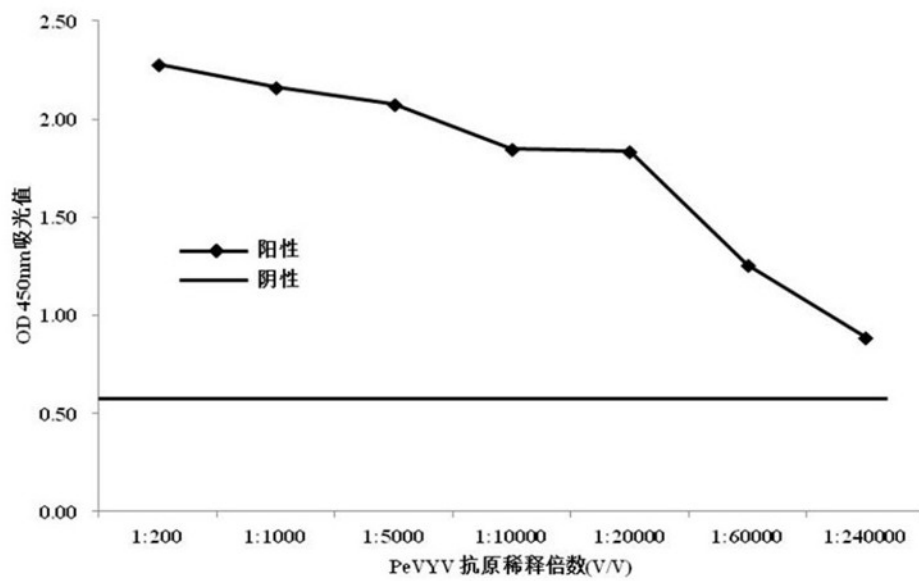


图2

专利名称(译)	用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109061161A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201811353672.5	申请日	2018-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	湖南省植物保护研究所		
申请(专利权)人(译)	湖南省植物保护研究所		
当前申请(专利权)人(译)	湖南省植物保护研究所		
[标]发明人	张松柏 刘勇 张德咏 彭静 张卓 张宇 燕飞 李凡 陶小荣 何自福 缪武 李兴华		
发明人	张松柏 刘勇 张德咏 彭静 张卓 张宇 燕飞 李凡 陶小荣 何自福 缪武 李兴华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983		
代理人(译)	陈晖		
其他公开文献	CN109061161B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒及其应用，其中用于检测辣椒脉黄病毒的检测试剂盒包括PeVYV P4蛋白多克隆抗体。利用间接ELISA法，将PeVYV P4蛋白多克隆抗体进行样本中的辣椒脉黄病毒检测，具有特异性强、灵敏度高等优点。还公开了上述检测试剂盒在检测辣椒脉黄病毒中的应用，可以实现快速、高通量检测，所用仪器简单，操作简便。

