



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104316688 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201410546445. X

(22) 申请日 2014. 10. 16

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 9310 2014. 05. 28

CGMCC NO. 9311 2014. 05. 28

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 匡华 孔德昭 胥传来 徐丽广
马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103993074 A, 2014. 08. 20,

CN 103627798 A, 2014. 03. 12,

CN 102978215 A, 2013. 03. 20,

WO 2005074685 A1, 2005. 08. 18,

CN 103197073 A, 2013. 07. 10,

种藏文等. 细菌性条斑病稻种带菌快速检测方法研究. 《植物病理学报》. 1992, 第 22 卷 (第 1 期),

审查员 肖吉

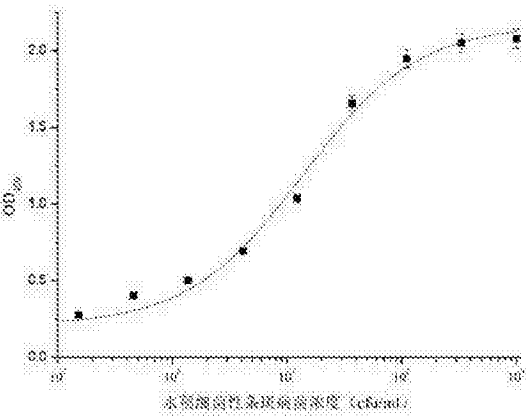
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法

(57) 摘要

一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法,属于免疫分析技术领域。本发明用水稻细菌性条斑病菌免疫小鼠,得 7 株水稻细菌性条斑病菌单抗。分别标记辣根过氧化物酶并以水稻细菌性条斑病菌菌体两两配对。以 3D7 (单克隆细胞株 J 号) 作为包被抗体, 4H6 (单克隆细胞株 K 号) 作为酶标抗体, 以水稻细菌性条斑病菌菌体为标准品建立水稻细菌性条斑病菌的夹心 ELISA 法。本发明采用理化性质高度均一、特异性好、可大量制备的单抗, 建立的夹心法灵敏度高, 成本低, 与丁香假单胞杆菌斑点致病变种, 水稻白叶枯病菌, 水稻细菌性谷枯病菌, 玉米细菌性枯萎病菌, 丁香假单胞菌丁香致病变种无交叉反应, 为水稻种子中细菌性条斑病菌的检测提供了快速高效的分析手段。



1. 一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法,其特征在于步骤为:

(1)水稻细菌性条斑病菌单克隆抗体的制备:

以水稻细菌性条斑病菌NCPPB 1150菌体做为免疫原,免疫8周龄的BALB/c小鼠;经杂交瘤技术融合、筛选得到;

(2)单克隆抗体的配对筛选:

将纯化后的7株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶HRP,直接法鉴定标记成功后进行夹心法配对;配对参数如下:包被抗体 $2\mu\text{g/mL}$;包被液为 0.01M 、 $\text{pH}9.6$ 的碳酸盐缓冲液;标品浓度 $1\times 10^8\text{cfu/mL}$;标品稀释液 0.01M 、 $\text{pH}7.2$ 的PBS;酶标抗体稀释500倍使用;在此条件下,实验成功得到了6对 P/N 值 >5 的配对;

(3)夹心法的建立:选择检测限稳定、灵敏的配对,即以3D7单克隆细胞株J号为包被抗体,4H6单克隆细胞株K号作为酶标抗体建立夹心法;具体参数如下:

包被抗体浓度: $2\mu\text{g/mL}$;

包被液: 0.01M 、 $\text{pH}9.6$ 碳酸盐缓冲液;

标品稀释液: 0.01M 、 $\text{pH}7.2$ PBS+ 0.2% Tween;

酶标抗体浓度: $2.5\mu\text{g/mL}$;

反应时间:包被抗体:封闭 37°C ,反应2h;标准品: 37°C ,反应1h;酶标抗体 37°C ,反应1h;显色时间10min;

3D7单克隆细胞株J号,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号CGMCC NO.9310;

4H6单克隆细胞株K号,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号CGMCC NO.9311。

2. 根据权利要求1检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法,其特征在于:所述检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法的LOD为 $5.1\times 10^4\text{cfu/mL}$ 。

一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法,属于免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 水稻细菌性条斑病菌,学名:*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzicola*(Xooc),英文名 bacterial leaf streak of rice,属于黄单胞菌目,黄单胞菌科,黄单胞菌属。水稻细菌性条斑病于1918年首次发现于菲律宾,目前在东南亚各国和非洲中部都有发生,我国主要发生在南方水稻产区。水稻细菌性条斑病菌主要危害水稻叶片,在秧苗期即可出现典型的条斑型症状,其发生具有流行性、爆发性和毁灭性的特点。水稻细菌性条斑病菌通过侵染种子,借种子调运而远距离传播。因此很多国家和地区已将其列为检疫性细菌,并限制从疫区进口水稻种子。我国也将其作为水稻上的检疫性病害之一。

[0003] 对水稻细菌性条斑病菌的传统检测技术包括产地检疫、育苗生长观察法、分离法、噬菌体检测等,耗时长,且检测结果存在不可靠性。PCR检测方法快速、准确、灵敏,但是技术条件高,设备昂贵,普及推广受到很大限制。血清学检测技术灵敏、快速,如果获得高质量的抗血清或抗体,对于大批量样品的粗筛检测十分适宜。

[0004] 由于对水稻细菌性条斑病菌目前在农业生产上还没有有效的防治方法,并且种子带菌是该病重要的初侵染来源和传播途径,因此,及早检测发现种子上的病原菌对于预防该病并采取相应防治措施,指导生产和减少经济损失有重要意义。所以,建立水稻细菌性条斑病菌的有效而且便捷快速的检测方法有利于水稻病害的检疫,对出入境和国内病源地区水稻种子的检疫工作显得尤为重要。而ELISA方法凭借其灵敏、快速、特异性好、易于推广的特点成为致病菌的常规检测方法。抗体的亲和力、交叉反应、稳定性对于ELISA方法的灵敏度和特异性有着关键性的决定作用。

[0005] 因此,本发明制备了高灵敏的水稻细菌性条斑病菌的单克隆抗体并以此为基础建立了双抗体夹心ELISA法,为水稻种子中水稻细菌性条斑病菌的大批量、快速、准确的检测奠定基础。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于建立一种具有高灵敏度、高特异性、高准确度、高精度度、操作方法简单的酶联免疫吸附检测方法,用于水稻种子中水稻细菌性条斑病菌的大批量、快速、准确检测。

[0007] 本发明的技术方案,本发明建立了一种食品中水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心检测方法,该方法包括对检测方法的优化。

[0008] 一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法,步骤为:

[0009] (1)水稻细菌性条斑病菌单克隆抗体的制备:

[0010] 以水稻细菌性条斑病菌NCPPB 1150菌体(来自湖南省进出口检验检疫局)

[0011] 做为免疫原,免疫8周龄的BALB/c小鼠;免疫程序如下:第一周进行首免, 1×10^8 cfu水稻细菌性条斑病菌菌体/只,弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射;第四周进行二免, 1×10^7 cfu水稻细菌性条斑病菌菌体/只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;第六周进行三免, 1×10^7 cfu水稻细菌性条斑病菌菌体/只,弗氏不完全佐剂乳化后皮下多点注射;

[0012] 第七周尾部采血测效价,分别挑选对水稻细菌性条斑病菌菌体效价最高的老鼠;第九周进行冲刺免疫, 1×10^7 cfu水稻细菌性条斑病菌菌体/只,生理盐水溶解,腹腔注射;冲刺免疫3天后分别眼眶采血后进行融合、筛选,共筛选到7个细胞株;

[0013] (2)单克隆抗体的配对筛选:

[0014] 将纯化后的7株单克隆抗体分别标记辣根过氧化物酶HRP,直接法鉴定标记成功后进行夹心法配对;配对参数如下:包被抗体 $2\mu\text{g/mL}$;包被液为 0.01M 、 $\text{pH}9.6$ 的碳酸盐缓冲液;标品浓度 1×10^8 cfu/mL;标品稀释液 0.01M 、 $\text{pH}7.2$ 的PBS;酶标抗体稀释500倍使用;在此条件下,实验成功得到了6对P/N值 >5 的配对;

[0015] (3)夹心法的建立:选择检测限稳定、灵敏的配对,即以3D7(单克隆细胞株J号)为包被抗体,4H6(单克隆细胞株K号)作为酶标抗体建立夹心法;具体参数如下:

[0016] 包被抗体浓度: $2\mu\text{g/mL}$;包被液: 0.01M 、 $\text{pH}9.6$ 碳酸盐缓冲液;标品稀释液: 0.01M 、 $\text{pH}7.2$ PBS+ 0.2% Tween;酶标抗体浓度: $2.5\mu\text{g/mL}$;

[0017] 反应时间:包被抗体:封闭 37°C ,反应2h;标准品: 37°C ,反应1h;酶标抗体 37°C ,反应1h;显色时间10min,即可。

[0018] 其中,单克隆抗体是采用水稻细菌性条斑病菌菌体经过特定免疫程序免疫BALB/c小鼠,经杂交瘤技术融合、筛选得到的。用于配对的抗体是通过优化参数下夹心法配对,并通过多次试验筛选确定的,具有稳定性好、灵敏度高的特点。建立的夹心法优化了包被抗体的浓度,包被液,封闭液,标准品稀释液,酶标抗体稀释液,酶标抗体稀释浓度。LOD达到了 5.1×10^4 cfu/mL。

[0019] 本发明方法的检测分析原理是:酶标板上包被了捕获抗体3D7,合适的浓度下可以最大限度捕获水稻细菌性条斑病菌;洗板3次,洗去未结合的抗体,加入封闭液 $220\mu\text{L}$ 封闭板孔上多余结合位点;洗板3次,加入样品和对照, 37°C 孵育1h;洗板3次,加入酶标抗体4H6-HRP, 37°C 孵育1h;洗板4次,加入显色液显色12min。如果样品有足够的水稻细菌性条斑病菌,那么水稻细菌性条斑病菌被捕获抗体3D7捕获并与酶标抗体4H6-HRP结合,并催化底物在 450nm 产生吸收值($\text{P/N} \geq 2.1$),并被判定为阳性;如果样品水稻细菌性条斑病菌浓度太低($\text{P/N} \leq 2.1$)那么样品不被捕获或者捕获数量太小不足以引起足够的信号,被判定为阴性。

[0020] 生物材料样品保藏:水稻细菌性条斑病菌NCPPB 1150,来自湖南省进出口检验检疫局。细胞株J号,分类命名单克隆细胞株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,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,保藏编号CGMCC NO.9310,保藏日期2014年5月28日。细胞株K号,分类命名单克隆细胞株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,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,保藏编号CGMCC NO.9311,保藏日期2014年5月28日。

[0021] 本发明的有益效果:本发明提供的水稻细菌性条斑病菌双抗体夹心检测方法采用了理化性质高度均一、特异性好、可以大量制备的水稻细菌性条斑病菌单克隆抗体,建立的夹心法灵敏度高,稳定性好、成本低,样品的前处理过程简单,能同时检测大量样品,适合食

品行业大规模、高通量、快速、灵敏的检测要求,具有推广和应用价值。

附图说明

[0022] 图1 水稻细菌性条斑病菌双抗体夹心法的标准曲线。

[0023] 图2 水稻细菌性条斑病菌双抗体夹心ELISA特异性。

[0024] 1、丁香假单胞杆菌斑点致病变种;2、水稻白叶枯病菌;3、水稻细菌性谷枯病菌;4、水稻细菌性条斑病菌;5、玉米细菌性枯萎病菌;6、丁香假单胞菌丁香致病变种。

具体实施方式

[0025] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0026] 仪器:TGL-40B台式低速离心机,上海安亭科学仪器厂;KFLOW纯水机,凯佛隆公司;ZD-9556水平摇床,太仓科教器材厂;96孔8×12可拆酶标板,厦门怡佳美实验器材有限公司;MuLtiska Mks酶标仪,Thermo Labsystems公司;可调试移液器,Thermo Labsystems公司;涡旋混合器,上海沪西仪器分析厂。

[0027] 试剂:四甲基联苯胺(TMB),上海晶纯实业有限公司;其他试剂均为分析纯试剂。

[0028] 具体步骤如下:

[0029] (1)单抗制备:

[0030] a、实验动物:选5只,8周龄的BALB/c小鼠进行免疫;

[0031] b、抗原配置:将免疫原用生理盐水稀释,配成 1×10^8 cfu/mL的溶液;

[0032] c、乳化:将上述溶液与等量完全或不完全福氏佐剂用混合搅拌法将其乳化,乳化完全后皮下多点注射小鼠;

[0033] d、免疫方法:按照特定免疫流程免疫小鼠,三免后用间接竞争法测定效价,效价达到要求后,进行冲刺免疫;冲免3天后眼眶采血后进行融合;

[0034] e、采血:第三次免疫后1周进行断尾采血,采用间接非竞争酶联免疫法测定抗血清效价;

[0035] f、融合、筛选:采用杂交瘤技术进行融合,采用间接Elisa筛选阳性细胞孔,采用有限稀释法对阳性孔进行亚克隆;

[0036] g、抗体的纯化和保存:采用辛酸-饱和硫酸铵法纯化腹水,透析后得到单克隆抗体,采用微量紫外方法测定其浓度后分装后放入-20℃保存。

[0037] (2)ELISA反应过程:

[0038] 抗体效价测定步骤:将包被原用包被缓冲液作系列稀释包被96孔酶标板,100μL/孔,于4℃冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温,每孔注入200μL PBST溶液,摇床上振荡3min,用力甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,继续洗涤2次。以下洗涤方法相同;

[0039] 充分洗涤后,用封闭缓冲液封闭酶标板,220μL/孔,于37℃温育箱内温育2 h后取出烘干待用。将阳性血清系列稀释对应加入到酶标板的前7行列,第8行加入阴性血清,100μL/孔,37℃孵育1h后洗涤、拍干;

[0040] 每孔加入100μL,1:3000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG,37℃孵育1h后洗涤、拍干。每孔加入100 μL显色液(TMB与底物液比例为1:5),暗处37℃反应15min,取出后每孔加入50μL终止液(2mol/L的硫酸),用酶标仪测定吸光值 A_{450} 。

[0041] (3)水稻细菌性条斑病菌双抗体夹心法测定步骤:

[0042] a、包被:用2 μ g/mL的3D7包被酶标板,100 μ L /孔,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0043] b、洗涤:用PBST洗涤反应板三次,每次3min,200 μ L/孔,然后甩干反应板;

[0044] c、封闭:含0.2%明胶的CBS,220 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0045] d、洗涤:同b;

[0046] e、样品:用PBST将水稻细菌性条斑病菌稀释成 1.0×10^9 、 3.33×10^8 、 1.11×10^8 、 3.70×10^7 、 1.23×10^7 、 4.11×10^6 、 1.37×10^6 、 4.57×10^5 、 1.52×10^5 cfu/mL系列浓度,另设一个PBST空白对照。每孔加入100 μ L样品,于37 $^{\circ}$ C温育1h;

[0047] f、洗涤:同b;

[0048] g、加酶标抗体(4H6-HRP, 2.5 μ g/mL),100 μ L /孔,37 $^{\circ}$ C反应1h。

[0049] h、洗涤:同b;

[0050] i、显色:加底物TMB 100 μ L /孔,显色10min;

[0051] j、终止:加终止液50 μ L /孔;

[0052] k、测定:用酶标仪检测OD_{450nm}。

[0053] (4)交叉率的测定:将丁香假单胞杆菌斑点致病变种,水稻白叶枯病菌,水稻细菌性谷枯病菌,玉米细菌性枯萎病菌,丁香假单胞菌丁香致病变种精确稀释成 1×10^8 cfu/mL,在建立的水稻细菌性条斑病菌双抗体夹心法体系中检测吸光值,并设空白孔和水稻细菌性条斑病菌阳性对照,每个浓度做6次测定平均值,做3次重复实验。

[0054] (5)水稻种子实际样品的检测:水稻种子先用蒸馏水冲洗以除去残片和表面的污染杂菌,清洗后称取10g种子放入0.001 %吐温-磷酸缓冲溶液中低温(5 ~15 $^{\circ}$ C)浸泡4~6h,均质器打碎,制备样品提取液。样品提取液置于22 ~25 $^{\circ}$ C中4~6h,涡旋混匀5min,使用国标免疫分离方法验证悬液为阴性样品,即取用的水稻种子未被水稻细菌性条斑病菌感染。在悬液中添加不同浓度水稻细菌性条斑病菌(1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 cfu/mL)作为阳性质控,使用悬液作为阴性质控,每个浓度做3个重复。

[0055] 试验结果如下:

[0056] 1、标准曲线:本发明所获得的抗原检测的检测范围为 $4.57 \times 10^5 \sim 1.11 \times 10^8$ cfu/mL,具体请见说明书附图1。

[0057] 2、LOD:LOD是空白的平均吸收值加3倍的空白吸收值的标准偏差对应的抗原浓度,水稻细菌性条斑病菌双抗体夹心法LOD为 5.1×10^4 cfu/mL。

[0058] 3、交叉反应率(CR%)

[0059] 结果:水稻细菌性条斑病菌正常显色,而 1×10^8 cfu/mL浓度下的其它测试菌株均不显色(P/N<2.1)。说明建立的水稻细菌性条斑病菌夹心法与丁香假单胞杆菌斑点致病变种,水稻白叶枯病菌,水稻细菌性谷枯病菌,玉米细菌性枯萎病菌,丁香假单胞菌丁香致病变种无交叉反应,具体如图2所示。

[0060] 4、水稻种子实际样品的检测

[0061] 结果:在水稻种子样品的检测中,水稻细菌性条斑病菌回收率为88.6%~95.2%,相对标准偏差低于5.0%。显示出所建立的双抗体夹心ELISA方法在实际样品检测中具有较好的准确性与稳定性,具体如表1所示。

[0062] 表1 双抗体夹心ELISA对水稻种子中水稻细菌性条斑病菌的检测结果(n=3)

[0063]

	添加量 (cfu/ml)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
水稻种子实际样品	0	—	—
	1×10^6	89.3	3.7
	5×10^6	88.6	4.2
	1×10^7	95.2	3.1

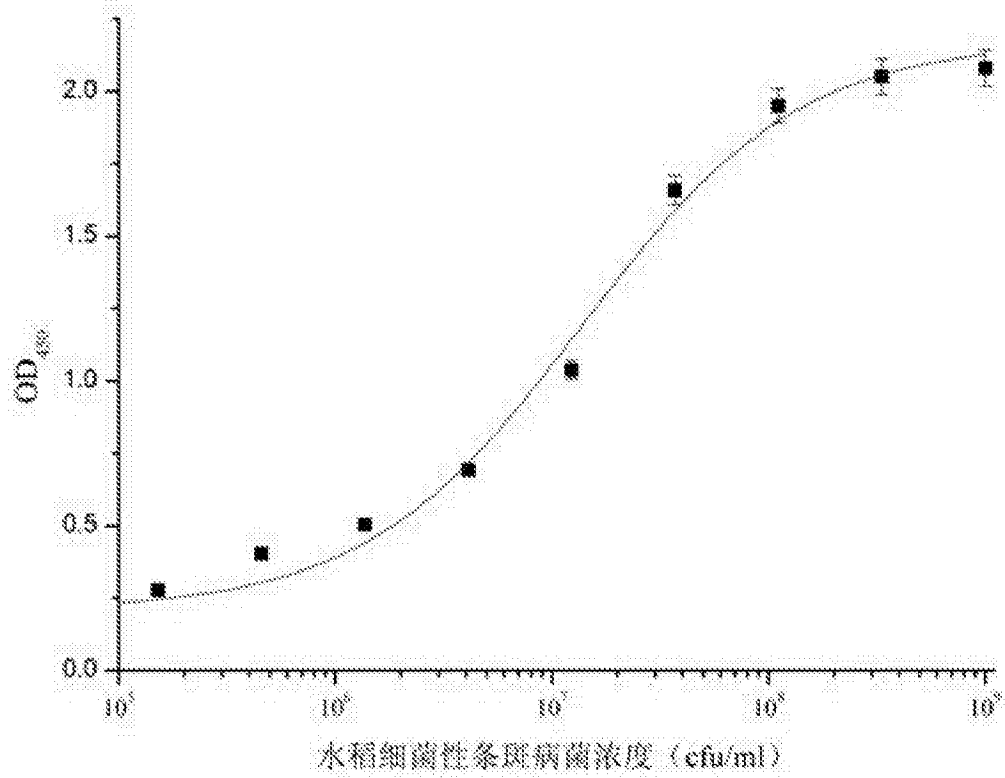


图1

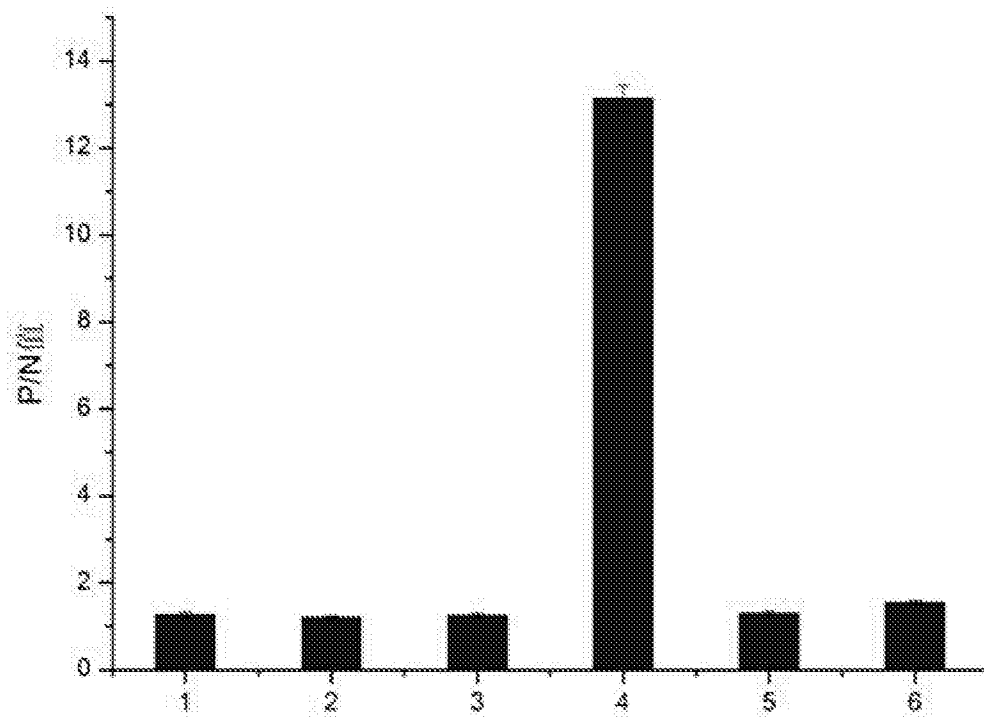


图2

专利名称(译)	一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法		
公开(公告)号	CN104316688B	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201410546445.X	申请日	2014-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	匡华 孔德昭 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	匡华 孔德昭 胥传来 徐丽广 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/56911 G01N2333/195		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN104316688A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测水稻细菌性条斑病菌的双抗体夹心酶联免疫法，属于免疫分析技术领域。本发明用水稻细菌性条斑病菌免疫小鼠，得7株水稻细菌性条斑病菌单抗。分别标记辣根过氧化物酶并以水稻细菌性条斑病菌菌体两两配对。以3D7（单克隆细胞株J号）作为包被抗体，4H6（单克隆细胞株K号）作为酶标抗体，以水稻细菌性条斑病菌菌体为标准品建立水稻细菌性条斑病菌的夹心ELISA法。本发明采用理化性质高度均一、特异性好、可大量制备的单抗，建立的夹心法灵敏度高，成本低，与丁香假单胞杆菌斑点致病变种，水稻白叶枯病菌，水稻细菌性谷枯病菌，玉米细菌性枯萎病菌，丁香假单胞菌丁香致病变种无交叉反应，为水稻种子中细菌性条斑病菌的检测提供了快速高效的分析手段。

