



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110256538 A

(43)申请公布日 2019.09.20

(21)申请号 201910457333.X

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2019.05.29

G01N 33/569(2006.01)

(71)申请人 湖南省植物保护研究所

G01N 33/68(2006.01)

地址 410125 湖南省长沙市远大二路726号

C12R 1/19(2006.01)

(72)发明人 刘勇 张松柏 张德咏 罗香文  
彭静 张卓 张宇 燕飞 陶小荣  
李凡 何自福 王福祥 李兴华  
张战泓

(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.

C07K 14/08(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 16/10(2006.01)

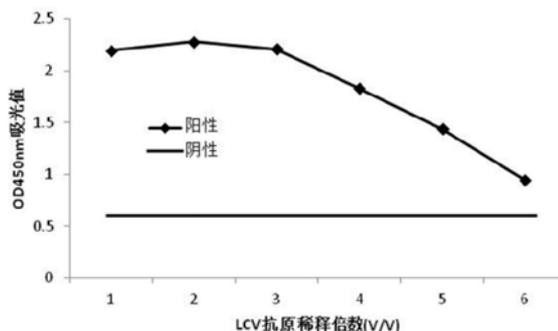
权利要求书2页 说明书7页  
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用

(57)摘要

本发明公开了一种抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用,抗生菜褪绿病毒的重组蛋白为LCV CPm重组蛋白,以LCV CPm基因为模板,通过PCR扩增得到扩增产物、酶切、连接、转化、分离得到。多克隆抗体由LCV CPm重组蛋白作为免疫原免疫大白兔得到。由多克隆抗体组成的检测试剂盒可应用于生菜褪绿病毒的血清学检测,该方法可以实现快速、高通量检测。



1. 一种抗生菜褪绿病毒的重组蛋白,其特征在于,所述重组蛋白为LCV CPm重组蛋白,所述LCV CPm重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 一种权利要求1所述的重组蛋白的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 以LCV CPm基因为模板设计引物对,对感染LCV植物的cDNA进行PCR扩增得到扩增产物;

(2) 酶切载体和所述扩增产物,用连接酶连接得到重组载体;

(3) 将所述重组载体转化至感受态细胞中得到转化产物;

(4) 从所述转化产物分离出LCV CPm重组蛋白。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中所述引物对包括上游引物和下游引物,所述上游引物为SEQ ID NO.2所示的DNA序列;所述下游引物为SEQ ID NO.3所示的DNA序列;

和/或,所述步骤(2)中所述载体为pET-32 $\alpha$ 。

4. 一种抗生菜褪绿病毒多克隆抗体,其特征在于,所述多克隆抗体以权利要求1所述的LCV CPm重组蛋白作为免疫原免疫大白兔得到。

5. 一种权利要求4所述的抗生菜褪绿病毒多克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述制备方法为:将权利要求1所述的LCV CPm重组蛋白免疫大白兔获得多克隆抗体。

6. 一种用于检测生菜褪绿病毒的检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求4所述的抗生菜褪绿病毒多克隆抗体。

7. 根据权利要求6所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒还包括PBST缓冲液、封闭液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、第一显色液和显色终止液;

所述封闭液为含1%BSA的PBST缓冲液;所述第一显色液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述显色终止液为用无菌水配制的浓度为2M的硫酸溶液。

8. 根据权利要求6所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒还包括封闭液、碱性过氧化物酶标记羊抗兔二抗和第二显色液;

所述第二显色液包括0.1M的NaHCO<sub>3</sub>、0.001M的MgCl<sub>2</sub>、0.3g/L的四唑氮兰和0.15g/L的5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐;所述封闭液为含1%BSA的PBST缓冲液。

9. 一种权利要求7所述的检测试剂盒在制备检测生菜褪绿病毒的检测试剂盒中的应用,其特征在于,所述应用为ID-ELISA检测,具体为:

S1-1、10 $\times$ PBST缓冲液包被待测物,加入到酶标板中,用封闭液封闭;

S1-2、在酶标板中加入含有抗生菜褪绿病毒多克隆抗体的一抗溶液,进行孵育;

S1-3、在酶标板中加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗的溶液,进行孵育;

S1-4、加入第一显色液进行显色,用酶标仪检测OD<sub>450nm</sub>吸光值,OD<sub>450nm</sub>吸光值 $\geq$ 2.5倍为阳性,反应孔OD<sub>450nm</sub>吸光值 $<$ 2.5倍为阴性。

10. 一种权利要求8所述的检测试剂盒在制备检测生菜褪绿病毒的检测试剂盒中的应用,其特征在于,所述应用为Dot-ELISA检测,具体为:

S2-1、将待测物研磨后点到PVDF膜上,置于封闭液中温育;

S2-2、将PVDF膜置于含有抗生菜褪绿病毒多克隆抗体的一抗溶液中温育;

S2-3、将PVDF膜置于含碱性过氧化物酶标记羊抗兔二抗的溶液中温育;

S2-4、将PVDF膜置于第二显色液中显色,若感染生菜褪绿病毒,则显示深蓝色或蓝紫

色;若没有感染生菜褪绿病毒,则显示浅绿色或无色。

## 抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物病毒的血清学检测技术领域,尤其涉及抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用。

### 背景技术

[0002] 生菜褪绿病毒(Lettuce chlorosis virus,LCV)属长线形病毒科(Closteroviridae)毛形病毒属(Crinivirus),由烟粉虱传播。该病毒最早报道能够侵染藜科作物甜菜和豆科作物绿豆,最近在我国的番茄上检测到该病毒,表明该病毒的寄主范围与其他Crinivirus属病毒一样较广。藜科作物甜菜和茄科作物番茄,经济附加值高,在我国种植范围广,是我国农业结构调整、农业提质增效中最重要的经济作物。LCV侵染甜菜,导致甜菜叶片黄化,块根变小;侵染番茄导致番茄叶片黄化、番茄果实出现褐色斑点。不但影响甜菜和番茄产量,更严重的是导致甜菜和番茄商品性丧失,严重影响这些经济作物的种植效益。

[0003] 植物病毒病,目前生产上还缺乏有效的防控技术措施;预防是控制植物病毒病的最佳方法。建立高通量、快速的检测方法是预防植物病毒病最关键的技术之一。血清学方法具有这些优点,且广泛的应用于植物病毒的检测与病害诊断。由于侵染我国番茄的LCV不同地区分离物的核苷酸同源性高达99%,但与其他国家的,比如美国LCV分离物的核苷酸同源性仅为76%。因此,目前国外的研究成果无法应用于检测我国LCV分离物的快速血清学检测,需要寻求一种适用于国内的LCV的血清学检测方法。

### 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,提供一种抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用,利用抗生菜褪绿病毒的重组蛋白作为抗原制备的LCV CPm蛋白多克隆抗体,利用间接ELISA和Dot-ELISA法进行检测样本中的生菜褪绿病毒,该方法可以实现快速、高通量检测。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种抗生菜褪绿病毒的重组蛋白,所述重组蛋白为LCV CPm重组蛋白,所述LCV CPm重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0006] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种所述的重组蛋白的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0007] (1)以LCV CPm基因为模板设计引物对,对感染LCV植物的cDNA进行PCR扩增得到扩增产物;

[0008] (2)酶切所述扩增产物和载体,用连接酶连接得到重组载体;

[0009] (3)将所述重组载体转化至感受态细胞中得到转化产物;

[0010] (4)从所述转化产物分离出LCV CPm重组蛋白。

[0011] 上述的制备方法,优选的,所述步骤(1)中所述引物对包括上游引物和下游引物,

所述上游引物为SEQ ID NO.2所示的DNA序列;所述下游引物为SEQ ID NO.3所示的DNA序列。

[0012] 上述的制备方法,优选的,所述步骤(2)中所述载体为pET-32 $\alpha$ 。

[0013] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种抗生菜褪绿病毒多克隆抗体,所述多克隆抗体以所述的LCV CPm重组蛋白作为免疫原免疫大白兔得到。

[0014] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种所述的抗生菜褪绿病毒多克隆抗体的制备方法,所述制备方法为:将所述LCV CPm重组蛋白免疫大白兔获得多克隆抗体。

[0015] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种用于检测生菜褪绿病毒的检测试剂盒,包括所述的抗生菜褪绿病毒多克隆抗体。

[0016] 上述的检测试剂盒,优选的,所述检测试剂盒包括抗生菜褪绿病毒多克隆抗体、PBST缓冲液、封闭液、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、第一显色液和显色终止液。

[0017] 上述的检测试剂盒,优选的,所述封闭液为含1%BSA的PBST缓冲液。

[0018] 上述的检测试剂盒,优选的,所述第一显色液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0019] 上述的检测试剂盒,优选的,所述显色终止液为用无菌水配制的浓度为2 M的硫酸溶液。

[0020] 上述的检测试剂盒,优选的,包括抗生菜褪绿病毒多克隆抗体、封闭液、碱性过氧化物酶标记羊抗兔二抗和第二显色液。

[0021] 上述的检测试剂盒,优选的,所述第二显色液包括0.1M的NaHCO<sub>3</sub>、0.001 M的MgCl<sub>2</sub>、0.3g/L的四唑氮兰和0.15g/L的5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐。

[0022] 上述的检测试剂盒,优选的,所述封闭液为含1%BSA的PBST缓冲液。

[0023] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种所述的检测试剂盒在制备检测生菜褪绿病毒的检测试剂盒中的应用,所述应用方法为ID-ELISA检测,具体为:

[0024] S1-1、10 $\times$ PBST缓冲液包被待测物,加入到酶标板中,用封闭液封闭;

[0025] S1-2、在酶标板中加入含有抗生菜褪绿病毒多克隆抗体的一抗溶液,进行孵育;

[0026] S1-3、在酶标板中加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗的溶液,进行孵育;

[0027] S1-4、加入第一显色液进行显色,用酶标仪检测OD<sub>450nm</sub>吸光值,OD<sub>450nm</sub>吸光值 $\geq$ 2.5倍为阳性,反应孔OD<sub>450nm</sub>吸光值 $<$ 2.5倍为阴性。

[0028] 做为一个总的技术构思,本发明还提供了一种所述的检测试剂盒在制备检测生菜褪绿病毒的检测试剂盒中的应用,所述应用方法为Dot-ELISA检测,具体为:

[0029] S2-1、将待测物研磨后点到PVDF膜上,置于封闭液中温育;

[0030] S2-2、将PVDF膜置于含有抗生菜褪绿病毒多克隆抗体的一抗溶液中温育;

[0031] S2-3、将PVDF膜置于含碱性过氧化物酶标记羊抗兔二抗的溶液中温育;

[0032] S2-4、将PVDF膜置于第二显色液中显色,若感染生菜褪绿病毒,则显示深蓝色或蓝紫色;若没有感染生菜褪绿病毒,则显示浅绿色或无色。

[0033] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0034] (1) 本发明提供了一种抗生菜褪绿病毒的重组蛋白LCV CPm,以我国山东番茄的LCV分离物相对保守的CPm基因为模板,进行原核表达、纯化得到重组蛋白,利用纯化的重组蛋白作为抗原,制备LCV专一型抗血清。以制备的LCV抗血清,建立LCV特异性ELISA和Dot-ELISA快速检测方法,为该病毒的早期诊断以及田间大规模样本大规模检测提供技术方法。

[0035] (2) 本发明提供一种抗生菜褪绿病毒多克隆抗体,可以特异性的用于我国LCV病毒的检测。

[0036] (3) 本发明提供一种生菜褪绿病毒的检测试剂盒,采用ID-ELISA检测,具有高通量的特点。

[0037] (4) 本发明提供一种生菜褪绿病毒的检测试剂盒,采用Dot-ELISA检测,具有操作简单、通量高的特点。

### 附图说明

[0038] 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。

[0039] 图1为本发明实施例1中LCV CPm重组蛋白诱导表达SDS-PAGE图。图中1为蛋白Marker,泳道2~3为LCV CPm重组蛋白。

[0040] 图2为本发明实验例1中LCV CPm多克隆抗体灵敏度检测结果。图中横坐标是LCV抗原稀释梯度,纵坐标是OD 450nm吸光值。

[0041] 图3为本发明实验例2中LCV CPm多克隆抗体特异性检测结果。图中点1为健康番茄,点2为感染LCV番茄,点3为感染ToCV番茄,点4为感染TYLCV番茄。

### 具体实施方式

[0042] 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。

[0043] 以下实施例中所采用的材料和仪器均为市售。

[0044] 实施例1:

[0045] 一种本发明的抗生菜褪绿病毒的重组蛋白:LCV CPm重组蛋白,表达LCV CPm重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示,具体为:

[0046] atggatagagaagatttttatgaggatggtgatggccagatcatgataagggtgacaataacatgtggtgtcagagtcattggtatgagatcctggatatagaagatcttactttcaattacttacattctgctgaagtgaacgattccaaattcatttttcaaataaagataaccatacctgatggtcatttagtgatgaattcaagtttaatatgatttaaatcacacacattccgtcaagccggaggaaagacatggagtaatgcttatgatgtgataggaacacctagagcacttagagttggagtcaccaaagtatcaatctgaagaaggagagaggagattggatactgactattaatggtttcaggatatataaaaaataaaagggtgtttacagtccaaccgatgtagctttatcttttagcttaccatttggttaacaccacttttgatcgcaaaaagttgtacataactgactttgtgagattcaaaaagtggtttcaaagcatctcggttaaatggaatgagtttcaaccgaagtcgatcaggacttacacgttgaacttaaacaccaatgatgcaatgaacatgaagataggcaaaccgttggagctttaaacttaaaagcttaaccgatttcaacatcagagaggaagacaaaacgcaaaaacctgtgcaaaaaccgatgatgatctaccactgaggttgagaagaaaccaatccctcagcctgaaccggtaagaccaaacctgatgtcccgaaccaaatagataatccaaaaccaagtggagtgatccacctaatccaattccaccattttccagagaataaaaatcccaataaaacaatcagatgtcacagatgtgagtgagaatattaaatcaaatatccaggctgttgagagattcaaaactcaccataccgagatagaagacatattttcaaaaatgtgtgaagcattatgttgataagggttttcagccggtcaagcggagttgatcgtatatcagatgggtatatcctttgtacgagcaaaaacagtatggagatcttactctcatcttattttgaaacgtgacgatggtaaacctgatcagattgaaaaagtcgatcacgtca

agcttctaattctctatccagacgtgcttgtaatggttgagagaatagctttaaggtactacagtgatagaattct  
tgagctattaaagaaggagctctcatgccagatatcatcatgctaaaagaagaggggtaagcaagagtatgct  
tatttagtaactgatttcttcgattacggtaagttgaggctgtcagatcaggaattgcaggatcatgacgtcagatt  
tcaactatgtgttggtgaagaacaacacaaacgcctctattgtaaattgtaaatcagttgtactaa。

[0047] 本实施例的LCV CPm重组蛋白采用以下方法制备得到:

[0048] (1) 引物的设计和合成:

[0049] 以LCV CPm基因为模板(LCV CPm基因是在GenBank上报道的生菜褪绿病毒(Lettuce chlorosis virus, LCV)基因组中完成的CPm基因)。LCV CPm基因序列如SEQ ID NO.1所示。使用Primer5.0在线设计引物,引物由包括上游引物和下游引物。

[0050] 其中上游引物F:cgggatccatggatagagaagatttttat (SEQ ID NO.2);

[0051] 下游引物R:cgctcgaggtacaactgattcacatttac (SEQ ID NO.3)。

[0052] (2) 原核表达载体构建

[0053] 利用上述引物对感染LCV的番茄cDNA进行PCR扩增,得到完整的LCV CPm基因的扩增产物。

[0054] 具体的扩增体系为:10×PCR buffer:5μL;

[0055] dNTP (10mM):1μL;

[0056] 上游引物(10μM):1μL;

[0057] 下游引物(10μM):1μL;

[0058] ddH<sub>2</sub>O:12μL;

[0059] 总体积为20μL。

[0060] 扩增程序为94℃预变性5min,94℃变性45s,58℃复性30s,72℃延伸60s,30个循环,最后72℃延伸10min。

[0061] 将扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,显示在1400bp有单一条带,与预期序列大小一致。

[0062] (3) 重组质粒的构建:将步骤(2)中得到的扩增产物和pET-32α通过BamH I和Xho I进行双酶切,分别纯化后,用T4连接酶连接,得到重组表达载体pET-32α-CPm。

[0063] (4) 重组蛋白的表达和分析:

[0064] 4.1、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)。

[0065] 4.2、将转化产物涂布于含100μg/L的氨苄青霉素的LB平板,37℃过夜培养。挑取平板上的阳性单菌落,采用菌落PCR验证,得到含有pET-32α-CPm重组子的工程菌:Rosetta-pET-32α-CPm。

[0066] 4.3、将Rosetta-pET-32α-CPm在含有100μg/mL氨苄青霉素的LB培养基中37℃培养过夜的得到培养液。

[0067] 4.4、诱导组:将上述培养液以1:100体积比接种于20mL的LB培养基中培养至OD<sub>600</sub>为0.6~0.7(培养时间一般为2~4h),加入诱导剂:异丙基-β-d-硫代半乳糖苷至终浓度为0.8mM,于28℃继续培养,并在培养时间为2~3h内取菌液检测。

[0068] 对照组:在诱导前取1mL菌液作为对照。

[0069] 分别取诱导组和对照组1mL菌液,离心收集菌体。

[0070] 4.5、分别诱导组和对照组的菌体中加入400 $\mu$ L裂解液(裂解液的组分为:50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、300mM  $\text{NaCl}$ 、10mM imidazol (pH8.0)、10 $\mu$ g/ml溶菌酶),煮沸10min,然后以12000rpm离心5min,分别收集上清和沉淀。沉淀用8M尿素溶解,5000rpm,离心5min。

[0071] 4.6、将上清和8M尿素溶解的沉淀用15% (v/v) SDS-PAGE凝胶在100 V,25mA的电泳条件下电泳5h,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) 考马斯亮蓝,45% (v/v) 甲醇,10% (v/v) 冰醋酸、余量的ddH<sub>2</sub>O)染色15min,最后用脱色液(脱色液的成分包括:40v/v%甲醇,10v/v%冰醋酸,50v/v%无菌水)脱色1h后观察电泳结果。电泳结果参见图1。

[0072] 从图1的电泳结果中可知:在沉淀组分有约70kDa的蛋白表达,此大小与CPm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LCV CPm重组蛋白。

[0073] (5) LCV CPm重组蛋白纯化和浓度测定

[0074] 采用GE公司的Ni-NTA琼脂糖试剂盒从总蛋白中纯化His和CPm重组蛋白,该试剂盒能够特异性结合His,利用该特异性结合His特点纯化重组蛋白。表达的CPm重组蛋白含有His标记,便于纯化,表达重组CPm蛋白以不可溶形式存在,用8M尿素溶解。纯化蛋白用15% (v/v) SDS-PAGE凝胶电泳检测,在70kDa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LCV CPm,即为LCV CPm重组蛋白抗原。LCV CPm重组蛋白抗原采用梯度缓冲液4 $^{\circ}$ C进行透析,其中梯度缓冲液为含浓度分别为6M、4M、3M、2M、1M、0M尿素的甘油、精氨酸和甘氨酸,透析后抗原的浓度为500 $\mu$ g/ml。

[0075] 实施例2:

[0076] 一种本发明的抗生菜褪绿病毒多克隆抗体,以实施例1的LCV CPm重组蛋白作为免疫原免疫大白兔得到的LCV CPm多克隆抗体。其制备方法包括以下步骤:

[0077] 取纯化好的LCV CPm重组蛋白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LCV CPm多克隆抗体的浓度为500 $\mu$ g/ml。获得的LCV CPm多克隆抗体用于灵敏度检测和特异性检测实验。

[0078] 实验例1:LCV CPm蛋白多克隆抗体灵敏度检测

[0079] 本实验采用ID-ELISA法检测实施例2中LCV CPm多克隆抗体的灵敏度。具体的实验过程如下:

[0080] (1) 包被:用10 $\times$  PBST缓冲液包被LCV抗原:将实施例1中所述的浓度为500 $\mu$ g/ml LCV CPm重组蛋白抗原,用抗体稀释液(抗体稀释液为含1% BSA的10 $\times$  PBST缓冲液(pH7.4))进行梯度稀释,依次稀释为250倍、1000倍、4000倍、16000倍、64000倍、256000倍的LCV抗原梯度稀释液,在酶标板的各孔中依次加入100 $\mu$ l LCV抗原(用抗体稀释液稀释),4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C温育2~3h。用含1% BSA的10 $\times$  PBST缓冲液(pH7.4)作为阴性对照。所述BSA为牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum,BSA)。

[0081] (2) 封闭:将已包被的酶标板用洗涤液洗涤3次后,每孔加入100 $\mu$ l封闭液,37 $^{\circ}$ C温育1h,然后用洗涤液洗涤3次。所述洗涤液为的10 $\times$  PBST缓冲液(pH7.4);所述封闭液为含的1% BSA的PBST缓冲液。

[0082] (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LCV抗原的各孔中加入200 $\mu$ l一抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育1h,然后用洗涤液洗涤3次,所述洗涤液为10 $\times$  PBST缓冲

液;所述一抗稀释液是将实施例2获得的浓度为500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的LCV CPm多克隆抗体,用抗体稀释液稀释为2000倍的LCV CPm多克隆抗体(即浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的LCV CPm多克隆抗体),所述抗体稀释液为含1%BSA的10 $\times$ PBST缓冲液(pH7.4)。

[0083] (4) 加二抗:每孔加入二抗稀释液200 $\mu\text{l}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1h,用10 $\times$ PBST缓冲液(pH7.4)洗涤4次。所述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。

[0084] (5) 显色:加入第一显色液:TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,室温下显色5min。

[0085] (6) 终止:加入显色终止液50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,酶标仪检测OD450nm吸光值,以各孔的OD450nm吸光值为纵坐标,以本实施例步骤(1)中所述的LCV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OD450nm吸光值的2.5倍为临界值,反应孔OD450nm吸光值 $\geq$ 2.5倍为阳性,反应孔OD450nm吸光值 $<$ 2.5倍为阴性,所述显色终止液为用无菌水配制的浓度为2 M的硫酸溶液。

[0086] 图2表明,在LCV多克隆抗体稀释2000倍时(浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),抗原的最大稀释倍数为256000倍,即抗原的浓度为1.95ng/ml,此时LCV多克隆抗体仍能特异性的识别LCV抗原,表明其LCV CPm多克隆抗体的灵敏度高。

[0087] 实验例2:LCV CPm蛋白多克隆抗体特异性检测

[0088] 本实验采用Dot-ELISA法检测LCV CPm多克隆抗体的特异性。测试以下3种病毒:LCV、番茄褪绿病毒(Tomato chlorosis virus,ToCV),和番茄黄花曲叶病毒(Tomato Yellow Leaf Curl virus,TYLCV)。LCV、ToCV和TYLCV阳性样品为分别感染这三种病毒的番茄样品(叶片,保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ )。

[0089] Dot-ELISA法的实验步骤包括:

[0090] (1) 样本制备:0.1 $\mu\text{g}$ 番茄叶片,加入100 $\mu\text{L}$ 的0.03M NaAc研磨,静置5min,取5 $\mu\text{L}$ 点到PVDF膜。

[0091] (2) 封闭:PVDF膜置于5mL封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1h,然后用洗涤液洗涤3次。所述洗涤液为的10 $\times$ PBST缓冲液(pH7.4);所述封闭液为含的1%BSA的PBST缓冲液。

[0092] (3) 加一抗:PVDF膜置于5mL一抗稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,然后用洗涤液洗涤3次,所述洗涤液为10 $\times$ PBST缓冲液;所述一抗稀释液是将实施例2获得的浓度为500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的LCV CPm多克隆抗体,用抗体稀释液稀释为2000倍的LCV CPm多克隆抗体(即浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的LCV CPm多克隆抗体),所述抗体稀释液为含1%BSA的10 $\times$ PBST缓冲液(pH7.4)。

[0093] (4) 加二抗:PVDF膜置于二抗稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1h,用10 $\times$ PBST缓冲液(pH7.4)洗涤4次。所述二抗稀释液为将碱性过氧化物酶(Alkaline Peroxidase,AP)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。

[0094] (5) 显色:PVDF膜置于5mL第二显色液中,室温下显色10min。第二显色液的成分为:含0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.001 M MgCl<sub>2</sub>、0.3g/L NBT(四唑氮兰)和0.15g/L BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐)。

[0095] 结果判定:颜色为深蓝色至蓝紫色为阳性,若没有感染生菜褪绿病毒,则显示浅绿色或无色。

[0096] 图3结果表明,仅感染LCV的番茄样本显示深蓝色,其余均显示浅绿色或无色,表明

LCV CPm多克隆抗体特异性强。

[0097] 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。

## 序列表

<110> 湖南省植物保护研究所

<120> 抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1425

<212> DNA

<213> 生菜褪绿病毒 (Lettuce chlorosis virus)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (1425)

<223> 根据实验要求设计,作为LCV CPm基因序列。

<400> 1

```

atggatagag aagatTTTTa tgaggatgTT gatggccaga tcatgataag ggctgacaat 60
aacatgtggT gtcagagtca tggtatgagT atcctggata tagaagatct tactttcaat 120
tacttacatt ctgctgaagT gaacgattcc aaattcattt ttcaaataaa gataaccata 180
cctgatggTc atttagtgTa tgaattcaag tttaatgatg ttaaatcaca cacattccgt 240
caagccggag gaaagacatg gagtaatgct tatgatgtga taggaacacc tagagcactt 300
agagttggag tcaaccaaag tatcaatctg aagaaggaga gaggagattg gatactgact 360
attaatggTt tcaggtatat aaaaataaaa ggtgtttaca gtccaaccga tgtagcttta 420
tctttagctt acccaattgg taacaccact tttgatcgca aaaagttgTa cataactgac 480
tttgtgagat tcaaaagtgt gtttcaaagc atctcgTtaa atgggaatga gtttcaaccg 540
aagtcgatca ggacttacac gttgaactta aacaccaatg atgcaatgaa catgaagata 600
ggcaaaccgt tggagcttgt aaacattaaa agcttaaccg atttcaacat cagagaggaa 660
gacaaaacgc aaaaacctgt gccaaaacc gatgatgatc taccacctga ggttgagaag 720
aaaccaatcc ctCagcctga accggtAaga cccaaacctg atgtcccga acccaatgat 780
aatccaaaac caagtggaag tggtgatcca ctaatccaa ttccaccatt tccagagaat 840
aaaatcccaa taaaacaatc agatgtcaca gatttgagTg aagatattaa atcaaatac 900
caggctgttg agagattcaa acttcaccat accgagatag aagacatatt ttcaaatgt 960
gtgaagcatt atgttgataa agggTTTTca gccggTcaag cggagttgat cgtatatcag 1020
atgggtatat cttttgtac gagcaaaaac agtatgggag atcttcactc tcatcttatt 1080
tggaaacgtg acgatggTaa actgatcaga ttgaaaaagt gcgatcacgt caagcttcta 1140
aattctctat ccagacgtgc ttgtaatgtt gagagaatag tcttaaggTa ctacagtgat 1200
agaattcttg agctattaaa gaagggagct ctcatgccag gatatcatca tgctaaaaga 1260
agaggggtta agcaagagTa tgcttattta gtaactgatt tcttcgatta cggtAagttg 1320
aggctgtcag atcaggaatt gcaggtcatg acgtcagatt tcaactatgt gttgttgaag 1380

```

aacaaacaca aacgctctat tgtaaattgt aatcagttgt actaa 1425

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (29)

<223> 根据实验要求而设计,作为上游引物F。

<400> 2

cgggatccat ggatagagaa gatttttat 29

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (29)

<223> 根据实验要求而设计,作为下游引物R。

<400> 3

cgctcgaggt acaactgatt cacatttac 29

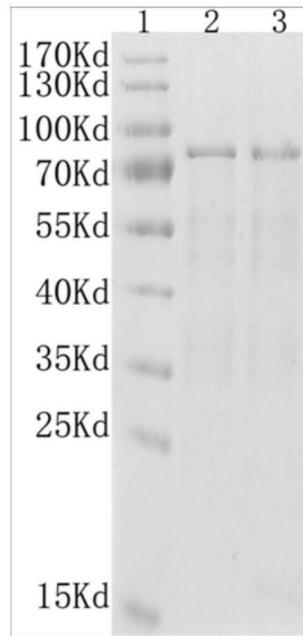


图1

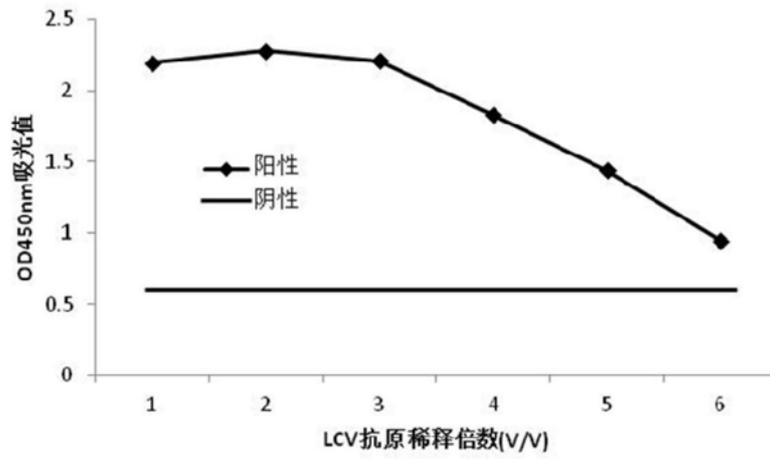


图2

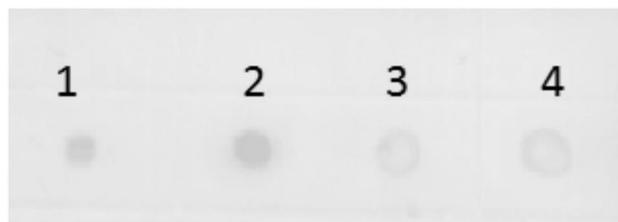


图3

专利名称(译)	抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110256538A</a>	公开(公告)日	2019-09-20
申请号	CN201910457333.X	申请日	2019-05-29
[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	刘勇 张松柏 张德咏 罗香文 彭静 张卓 张宇 燕飞 陶小荣 李凡 何自福 王福祥 李兴华 张战泓		
发明人	刘勇 张松柏 张德咏 罗香文 彭静 张卓 张宇 燕飞 陶小荣 李凡 何自福 王福祥 李兴华 张战泓		
IPC分类号	C07K14/08 C12N15/70 C07K16/10 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/68 C12R1/19		
CPC分类号	C07K14/005 C07K16/10 C12N15/70 C12N2770/00022 G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/6854 G01N2333/08		
代理人(译)	陈晖		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种抗生菜褪绿病毒的重组蛋白及其制备方法、多克隆抗体及制备方法、检测试剂盒及应用，抗生菜褪绿病毒的重组蛋白为LCV CPm重组蛋白，以LCV CPm基因为模板，通过PCR扩增得到扩增产物、酶切、连接、转化、分离得到。多克隆抗体由LCV CPm重组蛋白作为免疫原免疫大白兔得到。由多克隆抗体组成的检测试剂盒可应用于生菜褪绿病毒的血清学检测，该方法可以实现快速、高通量检测。

