



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106908611 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(21)申请号 201710120098.8

(22)申请日 2017.03.02

(71)申请人 安徽威尔试剂盒科技有限责任公司

地址 237000 安徽省六安市六安集中示范
园区(六安大学科技园内)

(72)发明人 韦传宝

(74)专利代理机构 安徽合肥华信知识产权代理
有限公司 34112

代理人 方琦

(51)Int.Cl.

G01N 33/96(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种制备侵染生姜黄瓜花叶病毒抗血清的制备方法及其应用,包括以下步骤:粗病毒的提取和纯化、制备黄瓜花叶病毒外壳蛋白的凝胶、将含外壳蛋白的凝胶加生理盐水磨细后免疫注射小鼠,获得抗血清。本发明用不同剂量的黄瓜花叶病毒颗粒,采用5-20% SDS-PAGE梯度凝胶制备电泳分离外壳蛋白,外壳蛋白连同聚丙烯酰胺凝胶免疫小鼠,均获得高效价的抗血清,说明该技术实用、可靠。将用此方法获得的抗血清在侵染生姜的黄瓜花叶病毒检测上的应用,可以快速检测出侵染的生姜黄瓜花叶病毒,大大方便该病毒的检测。

1. 一种制备侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清的方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、粗病毒的提取将黄瓜花叶病毒侵染的生姜病叶匀浆,过滤和低速离心去除大的固体杂质,四氯化碳去除叶绿素,加入聚乙二醇6000 (PEG6000)、NaCl和Triton-X 100后静置使病毒粒子沉淀,用20%蔗糖垫进一步纯化获得的黄瓜花叶病毒颗粒,将其溶解于PBS中,得到病毒悬液,于-80℃储存备用;

b、黄瓜花叶病毒外壳蛋白的5-20% SDS-PAGE梯度分离纯化将病毒悬液与等体积的1.5-2.5倍SDS上样缓冲液混合,沸水浴加热8-12分钟,冷却后离心除去沉淀,然后将样品加入制备型的5-20% SDS-PAGE梯度凝胶板中电泳,完毕后凝胶用4℃的0.25M KCl浸泡染色,切下乳白色的黄瓜花叶病毒外壳蛋白条带,平分3-5份;

c、将含外壳蛋白的凝胶加生理盐水磨细后,免疫注射3-5只小鼠,4次免疫注射,两次之间间隔6-7天,第一次注射方式为皮下注射0.24-0.26 mL,腹腔注射0.24-0.26 mL,第二、第三和第四次注射均腹腔注射0.48-0.52 mL,第四次注射后第3天断头取血,6小时后离心获得抗血清。

2. 权利要求1所述的抗血清制备方法制得的抗血清。

3. 权利要求2所述的抗血清在侵染生姜黄瓜花叶病毒检测上的应用。

一种侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清的制备方法

技术领域

[0001] 一种制备侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清的制备方法,属免疫技术领域。

背景技术

[0002] 黄瓜花病毒 (CMV) 是雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucurnovirus*) 的典型成员,具有典型的三分体正义单链RNA (ssRNA) 病毒的特点。CMV的寄主范围十分广泛,它能侵染包括茄科、十字花科、豆科等1000多种植物,对经济作物产生严重危害。CMV侵染生姜后出现花叶、矮化或者褪绿,且这些症状往往是复合出现。CMV因其发生的普遍性和所引起病害的严重性,是目前研究最多的植物RNA病毒之一。

[0003] 生姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 为姜科姜属多年生宿根草本植物,侵染生姜并引起严重危害的病毒主要是黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)。由于生姜采用无性繁殖,病毒逐年积累,病毒危害也逐年加重,病毒病可导致生姜减产30-50%,且影响品质。目前没有防治病毒病的有效药物,解决病毒病的途径是通过筛选无病毒生姜进行繁育,建立种子基地,用无病毒良种栽培。

[0004] 虽然检测植物病毒的方法有多种,但间接ELISA法是最常用的方法,每次可以检测几十乃至上百个样品,是一种经济、实用的方法,成本也低。由于市场上没有能检测侵染生姜的黄瓜花叶病毒的抗血清,脱毒生姜种苗的质量多通过目测或者指示植物方法确定是否脱毒完全,既缺乏科学性又费时。本发明制备检测侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清,可大大方便该病毒的检测。

发明内容

[0005] 本发明用感染黄瓜花叶病毒的生姜叶片为材料,首先粗提取病毒颗粒,然后通过5-20%梯度SDS-PAGE分离其外壳蛋白,切下乳白色外壳蛋白 (CP) 条带,将含CP的凝胶磨细后免疫注射小鼠,获得高效价的抗黄瓜花叶病毒血清。

[0006] 本发明的具体技术方案如下:

一种制备侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清的方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、粗病毒的提取将黄瓜花叶病毒侵染的生姜病叶匀浆,过滤和低速离心去除大的固体杂质,四氯化碳去除叶绿素,加入聚乙二醇6000 (PEG6000)、NaCl和Triton-X 100后静置使病毒粒子沉淀,用20%蔗糖垫进一步纯化获得的黄瓜花叶病毒颗粒,将其溶解于PBS中,得到病毒悬液,于-80℃储存备用;

b、黄瓜花叶病毒外壳蛋白的5-20% SDS-PAGE梯度分离纯化将病毒悬液与等体积的1.5-2.5倍SDS上样缓冲液混合,沸水浴加热8-12分钟,冷却后离心除去沉淀,然后将样品加入制备型的5-20% SDS-PAGE梯度凝胶板中电泳,完毕后凝胶用4℃的0.25M KCl浸泡染色,切下乳白色的黄瓜花叶病毒外壳蛋白条带,平分3-5份;

c、将含外壳蛋白的凝胶加生理盐水磨细后,免疫注射3-5只小鼠,4次免疫注射,两次之间间隔6-7天,第一次注射方式为皮下注射0.24-0.26 mL,腹腔注射0.24-0.26 mL,第二、第

三和第四次注射均腹腔注射0.48-0.52 mL,第四次注射后第3天断头取血,6小时后离心获得抗血清。

[0007] 所述的抗血清制备方法制得的抗血清。

[0008] 所述的抗血清在侵染生姜黄瓜花叶病毒检测上的应用。

[0009] 本发明技术效果体现在几个方面:

1、制备的抗血清特异性强

由于采用梯度制备电泳的方法纯化黄瓜花叶病毒的外壳蛋白(CP),纯化的CP特别纯,不含其他蛋白,因此制备的抗血清只与黄瓜花病毒CP作用,特异性很强;

2、不使用昂贵的福氏佐剂,降低抗血清的生产成本

本发明将外壳蛋白(CP)包埋在网状的聚丙烯酰胺凝胶中,外壳蛋白(CP)从网状的聚丙烯酰胺凝胶中缓慢释放到动物体内,抗原在动物体内停留时间长,充分刺激免疫系统,用聚丙烯酰胺凝胶替代了昂贵的福氏佐剂。

具体实施方式

[0010] 实施例一:

第一步:粗病毒的提取

(1)取100 g黄瓜花叶病毒侵染的生姜病叶匀浆,加入400 mL的Buffer A (0.5 mol/L磷酸钾缓冲液,含0.1 % 2-巯基乙醇,0.01 mol/L EDTA,pH 7.0),用4层纱布过滤,经低速离心(5,000 g)15 分钟去除固体杂质;

(2)将上清液加1/4体积的四氯化碳(CCl_4)剧烈搅拌5 分钟,低速离心(5,000 g)20 分钟去除沉淀的叶绿素;

3、将上清加入聚乙二醇6000(PEG6000)、NaCl和Triton-X 100,分别至终浓度6%(W/V)、3%(W/V)和1%(V/V),搅拌30 分钟使PEG6000完全溶解,4°C静置6 h使病毒粒子沉淀完全;

4、弃上清,沉淀部分离心(8,000 rpm) 30 分钟,弃上清;将沉淀重新悬浮于15-20 mL Buffer B (0.5 mol/L尿素的Buffer A),低速离心(8,000 g)20 分钟,将上清转至84 mL超速离心管中,沉淀重新悬浮于15-20 mL Buffer B,按相同的步骤重复2次,合并上清液于超速离心管中;

5、在超速离心管底部铺上20%蔗糖垫Buffer C(即Buffer A 100 mL,蔗糖 40 g,加去离子水到200 mL),23,000 g 超速离心1.5 小时,弃上清,沉淀即是黄瓜花叶病毒颗粒,用2.0-3.0 mL PBS溶解,于-80°C储存备用;

第二步:黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CP)的分离纯化

(1)配制5-20% SDS-PAGE梯度凝胶

(2)取0.5 mL粗病毒液加0.5 mL 2倍SDS上样缓冲液混合,沸水浴加热10分钟,冷却后离心除去沉淀;

(3)将样品加入5-20% SDS-PAGE梯度制备凝胶板中,常规电泳,电泳完毕后用预冷(4°C)的0.25M KCl浸泡染色30 分钟,取出凝胶,用手术刀切下乳白色的黄瓜花叶病毒外壳蛋白,平均分成4份,冷冻保存;

第三步:注射免疫小鼠,获得抗血清

取1份上述胶体,加2.0 mL生理盐水,于研钵内充分磨细,吸入到5mL规格的一次性注射

器中,总体积约2.0mL,免疫注射4只小鼠,共注射4次,二次之间间隔7天,第一次注射方式为皮下注射0.25mL,腹腔注射0.25mL,第二、第三和第四次注射均腹腔注射0.5mL,第四次注射后第3天断头取血,6小时后离心获得抗血清,冷冻保存。

[0011] 第四步:抗血清效价的测定

抗血清效价的测定与ELISA方法相似。

[0012] 将粗病毒液用包被液(0.1mol/L pH 9.5的碳酸盐缓冲液)稀释10倍作为抗原样品,将获得的抗血清进行倍比稀释,以不含病毒的包被液代替抗原样品为空白,以正常小鼠血清(未免疫的小鼠血清)替代待测抗血清作为阴性对照,用制备的抗血清作为一抗,羊抗小鼠IgG-碱性磷酸酶为二抗,1 mg/mL的p-NPP为底物,显色45分钟后在酶标仪上测定OD₄₀₅值,以空白对照调零,待测抗血清的吸光值2倍于阴性对照吸光值的效价定为1,抗血清的稀释倍数即为抗血清的效价。

[0013] (1)抗原包被:酶标板每孔加100μL包被抗原,酶标板置4℃冰箱过夜。

[0014] (2)封闭:加封闭液,每孔120 μL,37℃孵育1小时。

[0015] (3)加一抗:加入倍比稀释的抗血清(ELISA缓冲液稀释),阴性为未免疫的小鼠血清,37℃孵育1h。

[0016] (4)加酶标二抗:加入1/10000的羊抗小鼠IgG-碱性磷酸酶(Sigma,ELISA缓冲液稀释),37℃孵育1小时。

[0017] (5)加底物:1 mg/mL的p-NPP(Sigma,溶于底物缓冲液,pH 9.8),37℃黑暗中孵育45分钟,测OD₄₀₅值。

[0018] 注:每一步完成后均用PBST洗3次,每次5分钟以上。

[0019] 经过计算,实施例一制备的抗血清效价达到480。

[0020] 实施例二:

第一步:粗病毒的提取

与“实施例一”第一步相同。

[0021] 第二步:黄瓜花叶病毒CP的分离纯化

本步骤用的粗病毒液比“实施例一”少,除了取0.4 mL粗病毒液加0.4 mL 2倍SDS上样缓冲液混合外,其他与“实施例一”第二步相同。

[0022] 第三步:注射免疫小鼠,获得抗血清

与“实施例一”第三步相同。

[0023] 第四步:抗血清效价的测定

检测过程与“实施例一”第四步相同。

[0024] 经过计算,实施例二制备的抗血清效价达到473。

[0025] 实施例三:

第一步:粗病毒的提取

与“实施例一”第一步相同。

[0026] 第二步:黄瓜花叶病毒CP的分离纯化

本步骤用的粗病毒液比“实施例一”多,除了取0.6 mL粗病毒液加0.6 mL 2倍SDS上样缓冲液混合外,其他与“实施例一”第二步相同。

[0027] 第三步:注射免疫小鼠,获得抗血清

与“实施例一”第三步相同。

[0028] 第四步：抗血清效价的测定

检测过程与“实施例一”第四步相同。

[0029] 经过计算，实施例一制备的抗血清效价达到478。

[0030] 本发明用不同剂量的黄瓜花叶病毒颗粒，采用5-20% SDS-PAGE梯度凝胶电泳分离外壳蛋白，外壳蛋白连同聚丙烯酰胺凝胶免疫小鼠，均获得高效价抗血清，说明该技术实用、可靠。

专利名称(译)	一种侵染生姜的黄瓜花叶病毒抗血清的制备方法		
公开(公告)号	CN106908611A	公开(公告)日	2017-06-30
申请号	CN201710120098.8	申请日	2017-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	安徽威尔试剂盒科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	安徽威尔试剂盒科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	皖西学院 韦传宝		
[标]发明人	韦传宝		
发明人	韦传宝		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/96 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/56983		
代理人(译)	方琦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种制备侵染生姜黄瓜花叶病毒抗血清的制备方法及其应用，包括以下步骤：粗病毒的提取和纯化、制备黄瓜花叶病毒外壳蛋白的凝胶、将含外壳蛋白的凝胶加生理盐水磨细后免疫注射小鼠，获得抗血清。本发明用不同剂量的黄瓜花叶病毒颗粒，采用5-20% SDS-PAGE 梯度凝胶制备电泳分离外壳蛋白，外壳蛋白连同聚丙烯酰胺凝胶免疫小鼠，均获得高效价的抗血清，说明该技术实用、可靠。将用此方法获得的抗血清在侵染生姜的黄瓜花叶病毒检测上的应用，可以快速检测出侵染的生姜黄瓜花叶病毒，大大方便该病毒的检测。