



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101762695 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 200910241493.7

(22) 申请日 2009.12.09

(71) 申请人 中国农业科学院蔬菜花卉研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72) 发明人 石延霞 李宝聚 朱辉 谢学文

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种辣(甜)椒根腐型疫病的快速检测方法

(57) 摘要

本发明为“一种辣(甜)椒根腐型疫病的快速检测方法”,属于生物技术领域。本发明涉及的辣(甜)椒根腐型疫病的快速检测方法,其特征是该方法应用 ELISA 的改进新技术斑点 ELISA(Dot-ELISA) 技术,其试剂用量少;操作简便快速,不需要特殊设备条件,适合基层单位使用;抗原膜保存期长,20%可保存半年,不影响其活性;并可邮寄供现场流行病学调查使用;检测结果可长期保存,便于复查,适宜现场检测和该病害流行性发生的快速预测。本发明还涉及到检测程序、工作条件、可检测量,检测用到的药品、器具。

1. 一种辣（甜）椒根腐型疫病的快速检测方法,其特征主要包括:常温条件下,利用间接 Dot-ELISA 方法,对辣（甜）椒根腐型疫病具体检测程序为:

- (1) 分别以辣（甜）椒根腐型疫病菌菌丝体的可溶性蛋白抗原免疫家兔获得抗血清;
- (2) 采用饱和硫酸铵沉淀法和 DEAE 纤维素离子交换层析法对抗血清进行纯化;
- (3) 对纯化抗体进行间接 Dot-ELISA 方法最佳工作条件筛选。

(4) 现场检测:取健康植株和待测植株组织,把待检测组织用眼科剪刀剪成小块,放入 50mL 离心管中;

- (5) 向离心管中加 1 号试剂,以浸没组织块为宜;
- (6) 用玻璃研磨器把待检测组织块研碎;
- (7) 用取液针取待检测组织液,点于固相膜上;
- (8) 待膜干后,反复用取液针进行点样 5-7 次,待最后一次膜干
- (9) 将膜浸于 2 号试剂中 1 小时;
- (10) 用 3 号试剂摇荡洗三次,每次 5min;
- (11) 将膜浸于疫霉菌免疫抗血清中,室温放置 2 小时;
- (12) 用 3 号试剂摇荡洗三次,每次 5min;
- (13) 将膜浸于 4 号试剂中,于室温放置 2 小时;
- (14) 用 3 号试剂摇荡洗三次,每次 5min;

(15) 将膜浸于 6 号试剂中,于室温避光反应 10min;流水冲洗终止反应,目视法判断结果:凡显示黑紫色斑点的表明检测样品为疫霉菌,无色或斑点颜色极浅者表明检测样品非该种病害。

2. 根据权利要求书 1 所述,间接 Dot-ELISA 方法最佳工作条件为菌丝体体外抗原最适封闭时间为 1.5h,菌丝体体外抗原抗体的工作浓度均为 $1.56 \mu\text{g/mL}$,选择菌体体外抗原抗体工作最适时间为 2.0h;菌丝体体外抗原的酶标二抗最佳孵育 2.5h 时;检测纯培养辣椒疫霉菌的灵敏度为 2000 倍,即 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 。

3. 根据权利要求书 1 所述,1 号试剂为磷酸盐缓冲溶液 (PBS): 0.01mol/L ,pH7.4,具体配制由 NaCl,8.000g; KH_2PO_4 ,0.200g;KCl,0.200g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,2.900g 溶于 900mL 去离子水后,调节 pH 至 7.4,定容到 1000mL, 121°C 下高压灭菌 20min 后,室温贮藏;

4. 根据权利要求书 1 所述,固相膜为硝酸纤维素膜 (NC 膜);取液针为 1mL 一次性注射器;

5. 根据权利要求书 1 所述,2 号试剂为 5% 脱脂奶粉封闭液,用 PBS 配制 5% (m/V) 的脱脂牛奶、0.5% BSA、1% BSA, 4°C 贮藏;3 号试剂为洗涤缓冲液: 0.01mol/L ,pH7.4 磷酸盐-吐温缓冲液 (PBST),即 1000mL PBS 中加入 Tween-20 0.5mL、柳硫汞钠 0.1g,室温贮藏;抗体稀释缓冲液为 PBST (含 2% PVP);

6. 根据权利要求书 1 所述,4 号试剂为碱性磷酸酶 (AP) 标记的羊抗兔 IgG 溶液,该溶液为酶标二抗溶液,使用时用 AP 标记羊抗兔 IgG 稀释液,即 10mM HEPES、0.15M NaCl、pH7.5、0.1% 的 Tween-20、0.1% 的结晶牛血清白蛋白配制而成的溶液稀释成浓度 600 倍液;

7. 根据权利要求书 1 所述,6 号试剂为底物溶液 (PNPP),即 10mg 的 PNPP 溶于 10ml 0.05M pH9.8 碳酸盐缓冲液中,并含 0.5mM MgCl_2 。

8. 根据权利要求书 1 所述,抗血清纯化所用溶液的配制:

饱和硫酸铵溶液 :取去离子水 500. 0mL, 加热至 80℃, 称取 400. 0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 缓慢加入水中并不断搅拌, 直到 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 完全溶解且溶液变澄清透明后, 置 4℃ 过夜至结晶析出, 用前取上清, 用氨水将 pH 调至 7. 0。

DE-52 纤维素 :称取 5g DE-52 溶于 25ml 蒸馏水, 沸水反复煮开三次, 去掉杂质后装入层析柱。

0. 01mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PB) : KH_2PO_4 , 0. 200g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2. 900g, 溶于 900mL 去离子水后, 调节 pH 至 7. 4, 定容到 1000mL, 室温贮藏。

20% 磺基水杨酸溶液 :称取 2g 磺基水杨酸溶于 10mL 蒸馏水中, 室温保存。

氯化钡溶液 (2%) :取 0. 2g BaCl_2 溶于 10. 0mL 去离子水中。

9. 一种辣 (甜) 椒根腐型疫病的快速检测方法, 其主要特征包括, 所有检测过程均在常温下进行, 适宜田间现场检测。

10. 一种辣 (甜) 椒根腐型疫病的快速检测方法, 其主要特征包括, 辣 (甜) 椒根腐型疫病病原菌为 *Phytophthora capsici*。

一种辣（甜）椒根腐型疫病的快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及辣（甜）椒生产上一种重要土传真菌病害的快速检测方法。

背景技术

[0002] 近年来,随着我国设施蔬菜栽培面积的增加,轮作倒茬困难,土传病害越来越严重。2004 年以来,在山东、辽宁、北京、河北等我国北方设施辣椒主产区,普遍发生辣椒根腐型疫病 (*Capsicum Phytopathora Root Rot*),这是一种由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 引起的毁灭性病害,当地菜农在不清楚病原的情况下,按传统的镰刀菌引起的根腐病进行防治,收效甚微,该病已经成为当地辣椒生产的“癌症”。辣椒根腐型疫病的防治重在发病早期快速、准确的诊断,进而制定有效地防治措施。辣椒一旦发病严重后再进行防治为时已晚,再加上许多根部病害症状相似,生产上难以区分,给病害防治带来了困难,造成难以对症下药,容易造成误诊误治,防治效果不显著。因此生产上迫切需要明确辣椒根腐病的病原并建立起一种快速、准确的检测辣椒根腐病的方法,为病害的早期诊断与防治、病害的监测和预测预报提供支持和服务。基于此,本发明从解决我国设施栽培生产实际问题出发,运用现代免疫学技术,研究开发了适用于辣椒疫霉检测的特异性强、灵敏度高的间接 ELISA 快速诊断试剂盒,为辣椒的安全生产提供服务。

[0003] 我国植物病原生物的检测、鉴定体系还不完善,检测技术薄弱,现有的技术与国际上相比有相当的差距。随着科学技术的快速发展,生物技术为植物病原微生物的检测和鉴定提供了新途径,分子生物学检测技术由于其灵敏、快速以及灵活多样而受到生命科学各个研究领域的广泛重视,但由于其所需试剂价格昂贵、对实验人员的要求较高以及实验药品对操作人员和环境有毒害作用等原因,从而限制了它在农业上的广泛应用。而免疫学技术,已在医学上对有害病原微生物和农业上对植物病毒的检测得到了广泛的应用,检测的方法和技术体系日渐成熟。辣椒根腐型疫病的检测方法在国内外研究较少,我国尚未建立起对这种病害快速、有效的检测方法,从而给我国辣椒生产留下了重大的隐患,因此建立快速、准确的检测技术方法迫在眉睫、意义重大。

[0004] 1982 年 Hawkes 等仿照分子生物学中点杂交 (Dot Hybridization) 的方法发展起来了点免疫结合测试技术 (Dot immunobinding assay, DIBA),该方法同酶联免疫吸附测定 (ELISA) 反应原理相似,故也将这种方法称为 Dot-ELISA。这种方法与 ELISA 相比具有所需试剂少,不需特别的仪器,省时,适合于现场检测,具有与 ELISA 相同的灵敏度等优点,应用范围越来越广。为适应辣（甜）椒根腐型疫病快速、准确检测的要求,本发明建立了该种病害的快速检测方法程序。

发明内容

[0005] 本发明旨在建立辣（甜）椒根腐型疫病的快速检测方法,通过制备高效价特异性抗血清和优化斑点-酶联免疫吸附 (dot-ELISA) 方法实现对目标蛋白的检测,具体方法和

步骤为：

[0006] 1. 兔抗辣（甜）椒根腐型疫病菌抗血清制备：先将保存在斜面上的辣椒疫霉 NSGP 菌株转移至胡萝卜培养基上培养一周，然后挑取菌块移入装有 100mL 马铃薯葡萄糖液体培养基的三角瓶中，25℃ 120r/min 振荡培养 14 天，将其中的菌丝滤出，用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.0 ~ 7.4）反复冲洗多次后，-20℃ 冰箱内冰冻，冻后取出加入少许金刚砂，采用反复冻融的方法将菌丝中的可溶性蛋白充分释放出来，考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质浓度后用于家兔免疫。以辣椒疫霉菌丝体可溶性蛋白作免疫原免疫家兔，首次免疫剂量为 1mg 免疫原加等体积福氏完全佐剂充分乳化，背部皮下多点注射两只健康雄性兔子；免疫前耳缘静脉采血 1mL，做为阴性血清；此后每隔 7d 以免疫剂量 1.5mg 与福氏不完全佐剂充分乳化作为加强免疫，共免疫四次，最后一次免疫 10d 后耳缘静脉注射菌液 1mL。测定效价达到 1 : 10000 后采用饱和硫酸铵沉淀法和 DEAE 纤维素离子交换层析法进行纯化，纯化后的抗体经考马斯亮蓝 G-250 法测定浓度后置于 -20℃ 贮存备用。

[0007] 3. 反应中所用到的缓冲液：

[0008] 包被缓冲液：0.05mol/L，pH9.6 碳酸盐缓冲液（CBS），Na₂CO₃，1.590g；NaHCO₃，2.930g，加去离子水至 1000mL，调 pH 值至 9.6，4℃ 贮藏。

[0009] 磷酸盐缓冲溶液（抗原稀释液）（PBS）：0.01mol/L，pH7.4，NaCl，8.000g；KH₂PO₄，0.200g；KCl，0.200g；Na₂HPO₄·12H₂O，2.900g 溶于 900mL 去离子水后，调节 pH 至 7.4，定容到 1000mL，121℃ 下高压灭菌 20min 后，室温贮藏。

[0010] 洗涤缓冲液：0.01mol/L，pH7.4 磷酸盐 - 吐温缓冲液（PBST），1000mL PBS 中加入 Tween-20 0.5mL、柳硫汞钠 0.1g，室温贮藏。

[0011] 封闭缓冲液：5%（m/V）的脱脂牛奶，用 PBS 配制，100mL 0.01mol/L PBS 中加入 5g 脱脂奶粉和 0.01g 柳硫汞钠，4℃ 贮藏。

[0012] 抗体稀释缓冲液（洗涤液）：0.01mol/L PBST（含 2% PVP），200mL PBST 中加入 PVP 4.0g，室温贮藏。

[0013] AP 标记羊抗兔 IgG 稀释液：10Mm HEPES、0.15M NaCl、pH7.5、0.1% 的 Tween-20、0.1% 的结晶牛血清白蛋白。

[0014] 酶标二抗溶液：用酶标二抗稀释液适当稀释碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG。

[0015] 底物缓冲溶液（PNPP）：10mg 的 PNPP 溶于 10ml 0.05M pH9.8 碳酸盐缓冲液中，并含 0.5mM MgCl₂。

[0016] 终止液（2mol/LNaOH）：取 8g NaOH 加蒸馏水 100mL 即为 100mL 2M NaOH。

[0017] 底物溶液：取 NBT83mg，BCIP43mg，分别溶于 1mL 的二甲基甲酰胺，混匀后各取 20mL 加入 5mL 底物缓冲液中，冻存 -20℃ 保存 20 天左右。

[0018] 4. 抗体纯化所用溶液的配制

[0019] 饱和硫酸铵溶液：取去离子水 500.0mL，加热至 80℃，称取 400.0g（NH₄）₂SO₄，缓慢加入水中并不断搅拌，直到（NH₄）₂SO₄ 完全溶解且溶液变澄清透明后，置 4℃ 过夜至结晶析出，用前取上清，用氨水将 pH 调至 7.0。

[0020] DE-52 纤维素：称取 5g DE-52 溶于 25ml 蒸馏水，沸水反复煮开三次，去掉杂质后装入层析柱。

[0021] 0.01mol/L 磷酸盐缓冲溶液（PB）：KH₂PO₄，0.200g；Na₂HPO₄·12H₂O，2.900g，溶于

900mL 去离子水后,调节 pH 至 7.4,定容到 1000mL,室温贮藏。

[0022] 20% 磺基水杨酸溶液:称取 2g 磺基水杨酸溶于 10mL 蒸馏水中,室温保存。

[0023] 氯化钡溶液(2%):取 0.2g BaCl₂ 溶于 10.0mL 去离子水中。

[0024] 5. 透析袋的处理及使用

[0025] 将透析袋剪裁成适当长度(10~15cm)的小段,在 2%(W/V)NaHCO₃ 和 EDTA(pH8.0)中将透析袋煮沸 10 分钟,用蒸馏水彻底清洗透析袋,再于 1mmol/L 的 EDTA(pH8.0)中煮沸 10min,冷却后存放于 4℃,必须确保透析袋始终浸没在溶液内。用前在透析袋内装满水,然后排出并清洗干净。

[0026] 将透析袋一端打好结,装入生理盐水,稍用压力试一下是否漏水,若不漏,则倒出生理盐水,挤出气泡,将待透析的样品装入袋中,充分挤压使透析袋与溶液接触,成一条水柱,然后将另一端打好结,放入透析液中,加入小转子,置于 4℃ 冰箱中慢慢搅拌,透析 72 小时,期间更换透析液数次。透析完毕后,将透析袋内的液体小心注入已湿热灭菌的离心管中。

[0027] 6. 粗提抗体 IgG 的纯化与浓度测定

[0028] 将粗提的抗体通过 DE-52 纤维素柱层析,用 0.01M pH7.2PB 洗脱除盐,具体方法如下:

[0029] 1) 取出 1 支层析柱,垂直固定于支架上。将已经溶胀好的 DE-52(放入蒸馏水浸泡)中的水倾倒入去,加入 2 体积的 0.01M pH7.4 的 PB 缓冲液,并搅拌成悬浮液,然后灌装入柱,打开柱的下端出口,继续加入搅拌的 DE-52,使凝胶自然沉降到柱子高度的 4/5 左右,关闭出口。待凝胶柱形成后,在洗脱瓶中加入 PB 缓冲液以 3 倍柱体积的磷酸盐缓冲液流过凝胶柱,以平衡凝胶。

[0030] 2) 凝胶平衡后,除去凝胶表面的溶液,将盐析所得全部样品加到凝胶柱表面,打开柱下口,控制流速让样品溶液慢慢进入凝胶内。凝胶柱面上加一层 PB 缓冲液,并用此缓冲液洗脱,控制流速 0.5mL/min 左右,用试管收集洗脱液。

[0031] 3) 在开始收集洗脱液的同时检查蛋白质是否已经开始流出。由每支收集管中取出 1 滴溶液于黑色比色盘中,加 1 滴 20% 磺基水杨酸,若呈现白色絮状沉淀,则证明有蛋白质,直到检查不出白色沉淀时,停止收集。将收集到的抗体按考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford, 1976)测定其浓度,少量分装后置 -20℃ 保存备用。

[0032] 具体检测方法为:

[0033] 1. 取健康植株和待测植株组织,把待检测组织剪成小块,放入提取管中

[0034] 2. 向提取管中加 1 号试剂,以浸没组织块为宜

[0035] 3. 用玻璃研磨器把待检测组织块研碎

[0036] 4. 用取液针取待检测组织液,点于固相膜上

[0037] 5. 待膜干后,反复用取液针进行点样 5-7 次,待最后一次膜干

[0038] 6. 将膜浸于 2 号试剂中 1 小时;

[0039] 7. 用 3 号试剂摇荡洗三次,每次 5min;

[0040] 8. 将膜浸于疫霉菌免疫抗血清中,室温放置 2 小时;

[0041] 9. 用 3 号试剂摇荡洗三次,每次 5min;

[0042] 10. 将膜浸于 4 号试剂中,于室温放置 2 小时;

- [0043] 11. 用 3 号试剂摇荡洗三次,每次 5min ;
- [0044] 12. 将膜浸于 6 号试剂中,于室温避光反应 10min ;
- [0045] 13. 流水冲洗终止反应,目视法判断结果:凡显示黑紫色斑点的表明检测样品为疫霉病,无色或斑点颜色极浅者表明检测样品非该两种病害。

附图说明

[0046] 图 1 间接 Dot-ELISA 的特异性检测

[0047] 特异性检测结果表明,本实验所建立的间接 Dot-ELISA 方法与辣椒疫霉能够形成明显的斑点反应(见说明书附图,图 1),除与致病疫霉能够形成颜色较弱的斑点外,与其它侵染茄果类根部的病原菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、大丽轮枝菌、瓜果腐霉菌均不形成斑点,呈阴性反应,表明本实验所建立的间接 ELISA 检测方法对辣椒疫霉不同菌株间无特异性,而对不同种病原菌则具有较高的特异性。

[0048] 图 2 间接 Dot-ELISA 对纯培养菌体蛋白的灵敏度检测

[0049] 采用以上建立起的间接 Dot-ELISA 工作条件,将纯培养的辣椒疫霉抗原作 10×、100×、200×、400×、600×、800×、1000×、1200×、1500× 稀释,以考察所建立检测方法的灵敏度。结果表明,随着抗原稀释度的增加, Dot-ELISA 所形成的斑点颜色越来越浅,当抗原稀释 1000 倍时仍然能够呈现出明显的斑点(见说明书附图,图 2),因此本实验检测纯培养辣椒疫霉的灵敏度为 1000 倍,即 1 μg/mL。

[0050] 图 3 间接 Dot-ELISA 的田间模拟检测效果评价

[0051] 共采集病样 12 株检验,结果表明,采用本实验所建立的间接 Dot-ELISA 方法对发病辣椒植株进行检测,12 株发病植株在 NC 膜上均能够形成明显的斑点(见说明书附图,图 3),表现为阳性反应,健康植株则表现为阴性反应,此结果与间接 ELISA 检测结果相一致。

具体实施方式:

[0052] 通过对辣椒根腐型疫病、黄瓜枯萎病的 Dot-ELISA 快速检测条件的优化,制定了田间用于该两种病害快速诊断的试剂盒,田间预测病害的准确率达到 95%,灵敏性达到 95%。

[0053] 1. 辣椒根腐型疫病田间快速检测技术

[0054] 间接 Dot-ELISA 最佳工作条件的确定:

[0055] 按照间接 Dot-ELISA 方法,确定抗体的工作浓度为 160 倍(8.69 μg/mL)。抗原抗体最佳孵育时间为 1.5h ~ 2.0h。酶标二抗最佳工作浓度为 600×。按照以上建立的间接 Dot-ELISA 优化反应程序,测得酶标二抗的最佳孵育时间为 1.5h。

[0056] 2. 小结

[0057] 以硝酸纤维素膜为固相载体,以辣椒疫霉为抗原,通过优化 Dot-ELISA 反应条件,建立了辣椒疫霉的间接 Dot-ELISA 检测体系。硝酸纤维素膜不仅比酶联板便宜,而可以根据试验需要裁减成不同大小,在进行病害田间诊断和调查时,硝酸纤维素膜体积小,便于携带,在很小的体积上可以进行大量样品检测,使用十分方便。用样量少,只需要 3 ~ 5 μL 即可。反应的底物以非容性的固体形式沉淀在硝酸纤维素膜上,结果可以长期保存。试验表明,本实验所建立的 Dot-ELISA 检测方法特异性强(与致病疫霉有轻微交叉反应),灵敏度

高,该方法简化了 ELISA 的反应时间和步骤,在辣椒根腐病的病害诊断中将具有广阔的前景。

[0058] 3. 结论

[0059] 经过对茄果类蔬菜疫霉根腐病 (*Phytophthora capsici*) 的 DOT-ELISA 检测条件的优化和特异性鉴定,获得了田间快速检测该两类病害的诊断程序,检测准确率达到 95%。可以在发病初期预测病害的流行趋势,以采取相应的预防措施,达到减少农药的使用量,提高生态效益,减少农民损失的目的。

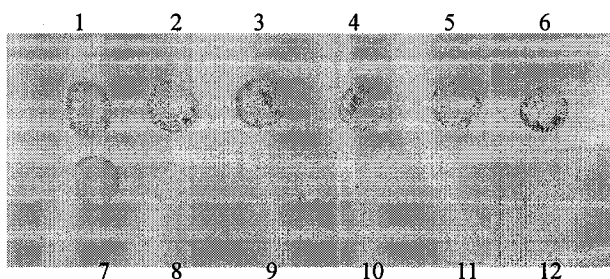


图 1 间接 Dot-ELISA 的特异性检测结果

注：图 1 中 1-6 分别为辣椒疫霉辽 A2、辽 C2、JDP、SGP、NJDP、NSGP 7-12 分别为致病疫霉菌、立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌、大丽轮枝菌、瓜果腐霉菌。

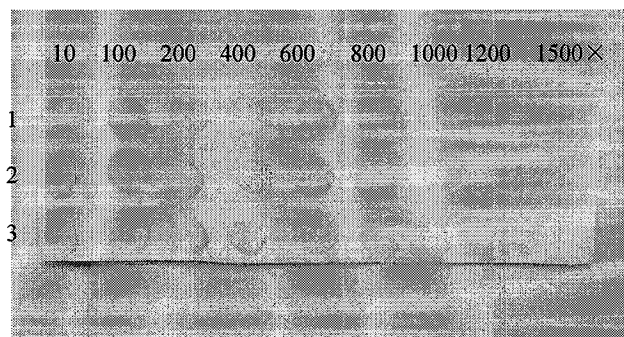


图 2 间接 Dot-ELISA 的灵敏度检测

注：图 2 中 1-3 为三次重复，10 ~ 1000x 为稀释倍数。

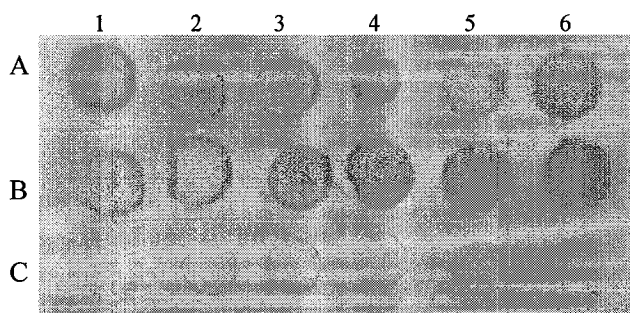


图 3 间接 Dot-ELISA 对发病辣椒植株的检测

注：图 3 中 A1-A6、B1-B6 为 12 株病样，C1-C6 为健康植株的阴性对照

专利名称(译)	一种辣(甜)椒根腐型疫病的快速检测方法		
公开(公告)号	CN101762695A	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	CN200910241493.7	申请日	2009-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蔬菜花卉研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蔬菜花卉研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院蔬菜花卉研究所		
[标]发明人	石延霞 李宝聚 朱辉 谢学文		
发明人	石延霞 李宝聚 朱辉 谢学文		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为“一种辣(甜)椒根腐型疫病的快速检测方法”，属于生物技术领域。本发明涉及的辣(甜)椒根腐型疫病的快速检测方法，其特征是该方法应用ELISA的改进新技术斑点ELISA(Dot-ELISA)技术，其试剂用量少；操作简便快速，不需要特殊设备条件，适合基层单位使用；抗原膜保存期长，20%可保存半年，不影响其活性；并可邮寄供现场流行病学调查使用；检测结果可长期保存，便于复查，适宜现场检测和该病害流行性发生的快速预测。本发明还涉及到检测程序、工作条件、可检测量，检测用到的药品、器具。