



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102565408 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 04

(21) 申请号 201110446009. 1

(22) 申请日 2011. 12. 28

(73) 专利权人 河南工业大学

地址 450001 河南省郑州市高新区莲花街 1 号

(72) 发明人 吴兴泉 陈士华 曹健 时妍
曹成 伊艳杰 杨庆东 张晓婷
张海燕 张慧聪

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司
41110
代理人 姜振东

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101865921 A, 2010. 10. 20,

CN 101307355 A, 2008. 11. 19, 全文.

CA 2223705 A, 1999. 08. 25, 全文.

杜志游. 马铃薯病毒和类病毒的分子诊断方法研究. 《中国优秀博硕士学位论文全文数据库农业科技专辑》. 2007, (第 04 期),

审查员 刘迎鸣

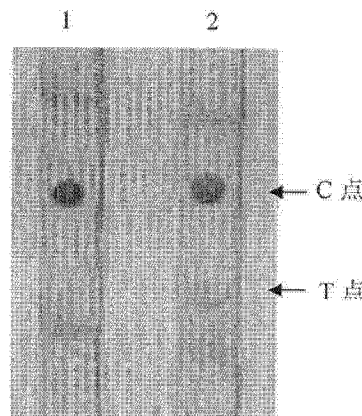
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法

(57) 摘要

一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法, 其特征在于: 包括马铃薯块茎 RNA 的提取、RT-PCR 反应和 PCR 产物的核酸胶体金层析试纸条检测等步骤。本发明是在优化马铃薯块茎病毒 RNA 提取方法的前提下, 将 RT-PCR 技术与核酸胶体金免疫层析技术相结合, 建立的适用于马铃薯块茎病毒的快速检测方法。其最大特点是: 首先研制出一种 RNA 提取液, 在马铃薯待测样本研磨后可直接进行 RT-PCR 检测, 省去了现有方法中的 RNA 提取步骤, 解决了由于马铃薯块茎淀粉含量高, 其 RNA 提取困难的问题。其次, 所研制的核酸胶体金层析试纸条在 10min 内即可完成 PCR 产物的检测, 不需要电泳和溴化乙锭的染色, 更为快速实用, 且安全无污染。



1. 一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法,待测马铃薯病毒为 PVS、PVY 或 PVA,其特征在于:包括马铃薯块茎 RNA 的提取、RT-PCR 反应和 PCR 产物的核酸胶体金层析试纸条检测步骤,具体如下:

(1) 取待测马铃薯块茎组织样本,在所研制的马铃薯块茎 RNA 提取缓冲液中研磨,研磨所得汁液即可作为病毒 RNA 进行反转录,所述提取缓冲液配方为:焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液,含有 2 % w/v 的聚乙烯吡咯烷酮 PVP-40,0.2 % w/v 的卵清蛋白和 1 % w/v 的 Na_2SO_3 ;

(2) 取研磨后的汁液,并加入随机引物、无 RNA 水解酶(RNase)的水、反转录酶、缓冲液、dNTPs、RNA 酶抑制剂进行反转录;以反转录产物为模板,加入待测马铃薯病毒的特异性引物、缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、无 RNase 的水进行 PCR 扩增,所述特异性引物的上游引物、下游引物分别标记了生物素、荧光素;

(3) 采用常规方法制备胶体金溶液、胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物、层析试纸条,在检测点加入荧光素的单克隆抗体,在质控点加入羊抗兔多克隆抗体;

(4) 将步骤(2)所得 PCR 产物与胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物混合后插入试纸条,10 min 后,检测点和质控点均显色为阳性,仅质控点显色为阴性。

2. 根据权利要求 1 所述马铃薯块茎病毒的快速检测方法,其特征在于:马铃薯病毒 PVS、PVY、PVA 的特异性引物分别为:

(1) 马铃薯 S 病毒引物对:

上游引物:5' -aattcaacattgagcaacatctc-3'

下游引物:5' -tgattgcgcaaatctcagc-3'

扩增片段长度为 680 bp;

(2) 马铃薯 Y 病毒引物对:

上游引物:5' -gcaactcaatcacagtttga-3'

下游引物:5' -gtagagtatgcatacttgga-3'

扩增片段长度为 532 bp;

(3) 马铃薯 A 病毒引物对:

上游引物:5' -gatgtcgatttaggtactgc-3'

下游引物:5' -gccttaaagaaggctttgcatg-3'

扩增片段长度为 376 bp;

上游引物的 5' 端标记生物素,下游引物的 5' 端标记荧光素。

3. 根据权利要求 1 所述马铃薯块茎病毒的快速检测方法,其特征在于:所述胶体金溶液制备方法如下:

取 1% 氯金酸 0.6 mL,加 30 mL 超纯水加热煮沸;

加 37°C 预热的 1% 柠檬酸钠溶液 0.9 mL,快速一次加入,溶液由蓝逐渐变为紫红色,煮沸 3-5 min,补水至总体积 31.5 mL;

冷却后,用 0.2 mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.0-8.2,用 0.45 μm 滤膜过滤,4°C 保存。

4. 根据权利要求 1 所述马铃薯块茎病毒的快速检测方法,其特征在于:所述胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物的制备方法如下:

取纯化好的兔抗生物素多克隆抗体 400 μg ,在磁力搅拌下缓慢加入胶体金液 20 mL,

室温搅拌 30 min；

加入 10% 牛血清白蛋白(BSA) 0.8 mL, 室温搅拌 5 min；

加入 10% 聚乙二醇(PEG) 0.4 mL, 室温搅拌 5 min；

10,000 r/min, 离心 40 min, 去上清, 加入 2 mL 保存液悬浮沉淀；

加入 8 mL 稀释液, 取少量进行检定, 其余置 4℃ 保存。

一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法,主要是利用 RT-PCR 联合核酸免疫胶体金层析试纸条法快速检测马铃薯块茎病毒的方法。

背景技术

[0002] 马铃薯是继小麦、玉米、水稻之后的第四大粮食作物,它分布广泛、适应性强、产量高、营养丰富、具有多种用途。我国马铃薯的播种面积和总产均居世界第一位,但我国马铃薯的单产水平却排名第 40 位,处于相对落后的地位,其原因主要是由于病毒(类病毒)的危害造成。近年来,以茎尖组培脱毒技术为代表的马铃薯脱毒种薯生产技术已广泛应用,对病毒病害的防治起到了非常显著的作用。马铃薯脱毒苗和脱毒种薯的生产过程中病毒的快速、灵敏的检测是关键技术之一。

[0003] 目前用于马铃薯病毒的检测方法主要是指示植物法、电镜观察法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、核酸杂交法(NASH)、往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法等。其中指示植物法需要种植鉴别寄主植物,一些蚜传病毒还需要饲养无毒蚜虫,耗时耗力。电镜观察快速但对仪器的要求较高。核酸杂交法和往复双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法步骤繁多、耗时。目前在产生实践中最常用的是 ELISA 法,该方法简便、快速,但其灵敏度远低于 RT-PCR 法。RT-PCR 法是目前灵敏度最高、最快速的方法。但由于马铃薯块茎中淀粉含量较高,其 RNA 提取较困难,因此在马铃薯块茎病毒的检测中有一定的应用难度。另外,PCR 产物的检测常规方法是采用琼脂糖凝胶电泳进行,电泳后需要进行溴化乙锭染色后在紫外光下观察,溴化乙锭对人具有中等毒性和致癌性,易造成环境污染,这也严重限制了此方法的推广。

发明内容

[0004] 本发明的目的正是针对上述现有技术所存在的问题而专门研制的一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法,该方法是在优化马铃薯块茎病毒 RNA 提取方法的前提下,将 RT-PCR 技术与核酸胶体金免疫层析技术相结合,建立的适用于马铃薯块茎病毒的快速检测方法。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0006] 一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法,包括马铃薯块茎 RNA 的提取、RT-PCR 反应和 PCR 产物的核酸胶体金层析试纸条检测三大步骤,具体如下:

[0007] (1) 取待测马铃薯块茎组织样本,在所研制的马铃薯块茎 RNA 提取缓冲液中研磨,研磨所得汁液即可作为病毒 RNA 进行反转录;

[0008] (2) 取一定量的研磨后的汁液,并加入随机六聚体引物、无 RNase 的水、反转录酶、缓冲液、dNTPs、RNA 酶抑制剂等进行反转录;以反转录产物为模板,加入待测马铃薯病毒的特异性引物(上游引物、下游引物分别标记了生物素、荧光素)、缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、无 RNase 的水进行 PCR 扩增;

[0009] (3) 采用常规方法制备胶体金溶液、胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物、层析试纸条,在检测点加入荧光素单克隆抗体,在质控点加入羊抗兔多克隆抗体;

[0010] (4) 将步骤 2 中所得 PCR 产物与胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物混合后插入试纸条,检测点和质控点均显色为阳性,仅质控点显色为阴性。

[0011] 所述待测马铃薯病毒为 PVS、PVY 或 PVA。一次检测只能加一种病毒,仅能检测出携带有该病毒的马铃薯,若需对三种病毒都进行检测,需分别进行三次。

[0012] 在本发明中,所述马铃薯病毒 PVS、PVY、PVA 的特异性引物分别为:

[0013] (1) 马铃薯 S 病毒引物对:

[0014] 上游引物:5' -aattcaacattgagcaacatctc-3'

[0015] 下游引物:5' -tgattgcgcaaatctcagc-3'

[0016] 扩增片段长度为 680 bp。

[0017] (2) 马铃薯 Y 病毒引物对:

[0018] 上游引物:5' -gcaactcaatcacagtttga-3'

[0019] 下游引物:5' -gtagagtatgcatacttgga-3'

[0020] 扩增片段长度为 532 bp。

[0021] (3) 马铃薯 A 病毒引物对:

[0022] 上游引物:5' -gatgtcgatttaggtactgc-3'

[0023] 下游引物:5' -gccttaaagaaggctttgcatg-3'

[0024] 扩增片段长度为 376 bp。

[0025] 上游引物的 5' 端标记生物素,下游引物的 5' 端标记荧光素。

[0026] 所述胶体金溶液制备方法如下:

[0027] a) 取 1% 氯金酸 0.6 mL,加 30 mL 超纯水加热煮沸;

[0028] b) 加 37°C 预热的 1% 柠檬酸钠溶液 0.9 mL,快速一次加入,溶液由蓝逐渐变为紫红色,煮沸 3-5 min,补水至总体积 31.5 mL。

[0029] c) 冷却后,用 0.2 mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.0-8.2,用 0.45 μm 滤膜过滤,4°C 保存。

[0030] 所述胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物的制备方法如下:

[0031] (1) 取纯化好的兔抗生物素多克隆抗体 400 μg ,在磁力搅拌下缓慢加入胶体金液 20 mL,室温搅拌 30 min;

[0032] (2) 加入 10% BSA 0.8 mL,室温搅拌 5 min;

[0033] (3) 加入 10% PEG 0.4 mL,室温搅拌 5 min;

[0034] (4) 10,000 r/min,离心 40 min,去上清,加入 2 mL 保存液(取四硼酸钠 0.1 g,BSA 0.25 g,溶于 250 mL 蒸馏水)悬浮沉淀;

[0035] (5) 加入 8 mL 稀释液(取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.1 g,NaCl 8.5 g,PVP40 5 g,硼酸 2.1 g,PEG 1 g,10% BSA 50 mL,溶于 1000 mL 蒸馏水),取少量进行检定,其余置 4°C 保存。

[0036] 上述试剂均可在生物公司购得,生物素、荧光素标记的病毒特异性引物可在生物公司合成。

[0037] 本发明的优点:首先,本发明研制出一种 RNA 提取液,在马铃薯待测样本研磨后可直接进行 RT-PCR 检测,省去了现有方法中的 RNA 提取步骤,解决了由于马铃薯块茎淀粉含量高,其 RNA 提取困难的问题。其次,本发明所研制的核酸胶体金层析试纸条在 10min 内即

可完成 PCR 产物的检测,不需要电泳和溴化乙锭的染色,更为快速实用,简便、灵敏,且安全无污染。

附图说明

- [0038] 图 1 为本发明试纸条组装图。
[0039] 图中 :1、玻璃纤维素膜 ;2、硝酸纤维素膜 ;3、吸水纸 ;4、双面胶塑料板。
[0040] 图 2 为试纸条中 T 点和 C 点示意图
[0041] 图 3 为 RT-PCR 产物的核酸层析试纸条检测结果示意
[0042] a、阴性结果 ;b、阳性结果

具体实施方式

- [0043] 本发明以下做更为具体的描述
[0044] 一、PCR 扩增病毒目的基因
[0045] 1. PCR 引物的设计
[0046] 从 NCBI 库中搜索已提交的 PVS, PVY, PVA 的所有序列,根据 CLUSTAL 序列分析的结果,应用引物设计软件,分别设计引物。
[0047] 本发明中所设计的 PCR 引物为 ;
[0048] (1) 马铃薯 S 病毒引物对 :
[0049] 上游引物 :5' -aattcaacattgagcaacatctc-3'
[0050] 下游引物 :5' -tgattgcgcacaaatctcagc-3'
[0051] 扩增片段长度为 680 bp。
[0052] (2) 马铃薯 Y 病毒引物对 :
[0053] 上游引物 :5' -gcaactcaatcacagtttga-3'
[0054] 下游引物 :5' -gtagagtatgcatacttggga-3'
[0055] 扩增片段长度为 532 bp。
[0056] (3) 马铃薯 A 病毒引物对 :
[0057] 上游引物 :5' -gatgtcgatttaggtactgc-3'
[0058] 下游引物 :5' -gccttaaagaaggctttgcatg-3'
[0059] 扩增片段长度为 376 bp。
[0060] 上游引物的 5' 端标记生物素,下游引物的 5' 端标记荧光素。
[0061] 2. 样品总 RNA 的提取
[0062] 取待测的马铃薯块茎 0.1 g,加入 500 μ L 的提取缓冲液 [配方 :DEPC 处理过的 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4),含有 2 % PVP-40 (w/v),0.2 % 卵清蛋白 (w/v) 和 1 % Na_2SO_3 (w/v)],在研钵中将其研磨成汁液。
[0063] 3. RNA 反转录合成 cDNA
[0064] 取上述马铃薯块茎汁液 4 μ L,随机六聚体引物 1 μ L,无 RNase 水 4 μ L,加入到一个 PCR 管中混均,70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后,迅速在冰上冷却 2 min。再向其中加入 5 \times M-MLV 反转录酶缓冲液 4 μ L,dNTPs (各 10 mmol/L)1 μ L,RNA 酶抑制剂 0.5 μ L,M-MLV 反转录酶 0.5 μ L,用无 RNase 水 5 μ L。混匀后置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h,然后于 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后,冰上

冷却 2 min。

[0065] 4. PCR 检测

[0066] PCR 反应体系:反转录产物 3 μ L、10 \times PCR Buffer 2 μ L、dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μ L、待测马铃薯病毒(PVS 或 PVY 或 PVA)的上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L、下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L、Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L、RNase-free 水 11.5 μ L。

[0067] PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

[0068] 上述试剂均可在生物公司购得,生物素、荧光素标记的病毒特异性引物可在生物公司合成。

[0069] 二、PCR 产物的胶体金核酸免疫层析检测

[0070] 1、需用的溶液配制

[0071] 1% 氯金酸:取氯金酸 1 g 加 2 mL 蒸馏水溶解后补加蒸馏水至 100 mL。

[0072] 1% 柠檬酸钠:取柠檬酸三钠 1 g 加蒸馏水 100 mL 溶解。

[0073] 0.2 mol/L K_2CO_3 :取 K_2CO_3 6 g 加蒸馏水 100 mL 溶解。

[0074] 10% BSA:取 BSA 10 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,置 56 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,10,000 r/min 离心 30 min,4-8 $^{\circ}$ C 保存。

[0075] 10% PEG:取 PEG (分子量 20,000) 10 g,加蒸馏水 100 mL 溶解。

[0076] 保存液:取四硼酸钠 0.1 g,BSA 0.25 g,溶于 250 mL 蒸馏水。

[0077] 稀释液:取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 6.1 g,NaCl 8.5 g,PVP40 5 g,硼酸 2.1 g,PEG 1 g,10% BSA 50 mL,溶于 1000 mL 蒸馏水。

[0078] 2、胶体金溶液的制备

[0079] (1). 取 1% 氯金酸 0.6 mL,加 30 mL 超纯水加热煮沸。

[0080] (2). 加 37 $^{\circ}$ C 预热的 1% 柠檬酸钠溶液 0.9 mL,快速一次加入,溶液由蓝逐渐变为紫红色,煮沸 3-5 min,补水至总体积 31.5 mL。

[0081] (3). 冷却后,用 0.2 mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.0~8.2,用 0.45 μ m 滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0082] 3、胶体金-兔抗生物素多克隆抗体结合物的制备

[0083] (1) 取纯化好的兔抗生物素多克隆抗体 400 μ g,在磁力搅拌下缓慢加入胶体金液 20 mL,室温搅拌 30 min。

[0084] (2) 加入 10% BSA 0.8 mL,室温搅拌 5 min。

[0085] (3) 加入 10% PEG 0.4 mL,室温搅拌 5 min。

[0086] (4) 10,000 r/min,离心 40 min,去上清,加入 2 mL 保存液悬浮沉淀。

[0087] (5) 加入 8 mL 稀释液,取少量进行检定,其余置 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0088] 4、空白试纸条的组装

[0089] (1). 在 80 mm \times 300 mm 双面胶塑料板内侧粘附 25 mm \times 300 mm 硝酸纤维素膜。

[0090] (2). 在双面胶塑料板粘附 20 mm \times 300 mm 玻璃纤维素膜,并与硝酸纤维素膜重合 2 mm,再粘贴一层胶带。

[0091] (3). 同样在另一侧粘贴一张 39 mm \times 300 mm 的吸水纸,也与硝酸纤维素膜重合 2

mm (图 1)。

[0092] (4). 用切条机将组装好的塑料板切成 4 mm 宽的试纸条。

[0093] 5、核酸胶体金层析试纸条检测 PCR 产物

[0094] 在试纸条抗体固相硝酸纤维素层析膜(NC膜)上靠近玻璃纤维素膜的一端点上 1 μ L 的荧光素单克隆抗体作为检测点(T点)。在 NC 膜上靠近吸水纸一端点上 1 μ L 羊抗兔多克隆抗体作为质控点(C点)。

[0095] 在离心管中加入 100 μ L 胶体金 - 兔抗生物素多克隆抗体溶液、100 μ L PBS 缓冲液,然后加入 5 μ L 的标记生物素和荧光素引物的 PCR 产物。插入试纸条,15 min 内观察显色结果。

[0096] T 点显色 :PCR 产物两端标记上生物素和荧光素 ;胶体金上则标记兔抗生物素多克隆抗体 ;试纸条 T 点上喷有小鼠抗荧光素单克隆抗体。检测时,将 PCR 产物加入胶体金中,PCR 链上标记的生物素能够和兔抗生物素多克隆抗体结合,形成复合物胶体金 - 兔抗生物素抗体 -PCR 产物 ;而 PCR 产物链上标记荧光素可以和 T 点上小鼠抗荧光素单克隆抗体结合,则层析时该复合物可以被 T 点所捕获,形成胶体金 - 兔抗生物素抗体 -PCR 产物 - 小鼠抗荧光素单克隆抗体的结构而使 T 点显色。

[0097] C 点显色 :试纸条的 C 点上喷上羊抗兔多克隆抗体,则能形成胶体金 - 兔抗生物素抗体 - 羊抗兔多克隆抗体或胶体金 - 兔抗生物素多克隆抗体 - (PCR 产物)- 羊抗兔多克隆抗体的复合物。检测带毒材料时,形成的胶体金 - 兔抗生物素多克隆抗体 -PCR 产物先被 T 点上荧光素抗体所捕获,多余的复合物或没有完全被 T 点捕获的,则被随后的 C 点所捕获形成胶体金 - 兔抗生物素多克隆抗体 - (PCR 产物) - 羊抗兔多克隆抗体的复合物使 C 点显色。而检测健康的材料或缓冲液时,C 点所捕获的只是胶体金 - 兔抗生物素多克隆抗体,形成胶体金 - 兔抗生物素多克隆抗体 - 羊抗兔多克隆抗体而显色。

[0098] 因此,如果 C、T 点都显色,结果为阳性 ;阴性和空白对照应仅 C 点显色, T 点不显色,结果为阴性和空白对照(参见图 3)。C, T 点都不显色,则试剂条失效,结果不能判定。

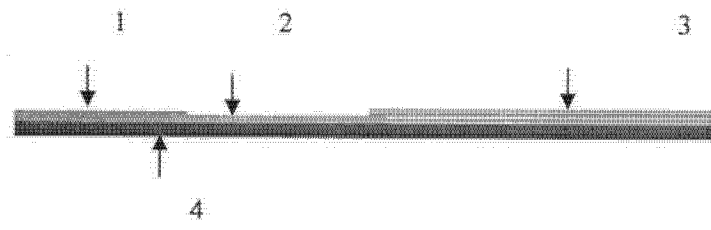


图 1

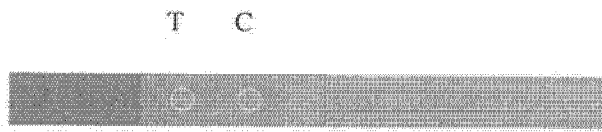


图 2

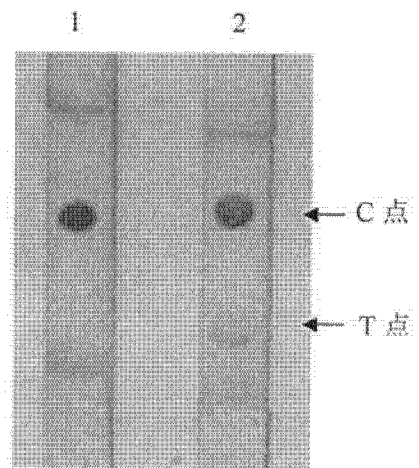


图 3

专利名称(译)	一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法		
公开(公告)号	CN102565408B	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201110446009.1	申请日	2011-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	河南工业大学		
申请(专利权)人(译)	河南工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南工业大学		
[标]发明人	吴兴泉 陈士华 曹健 时妍 曹成 伊艳杰 杨庆东 张晓婷 张海燕 张慧聪		
发明人	吴兴泉 陈士华 曹健 时妍 曹成 伊艳杰 杨庆东 张晓婷 张海燕 张慧聪		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	姜振东		
其他公开文献	CN102565408A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种马铃薯块茎病毒的快速检测方法，其特征在于：包括马铃薯块茎RNA的提取、RT-PCR反应和PCR产物的核酸胶体金层析试纸条检测等步骤。本发明是在优化马铃薯块茎病毒RNA提取方法的前提下，将RT-PCR技术与核酸胶体金免疫层析技术相结合，建立的适用于马铃薯块茎病毒的快速检测方法。其最大特点是：首先研制出一种RNA提取液，在马铃薯待测样本研磨后可直接进行RT-PCR检测，省去了现有方法中的RNA提取步骤，解决了由于马铃薯块茎淀粉含量高，其RNA提取困难的问题。其次，所研制的核酸胶体金层析试纸条在10min内即可完成PCR产物的检测，不需要电泳和溴化乙锭的染色，更为快速实用，且安全无污染。

