



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 113125726 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 201911393759.X

(22)申请日 2019.12.30

(71)申请人 镇江华维检测技术有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十
五路99号11幢

(72)发明人 洪霞 袁超 秦悦

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫
试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测葡萄灰霉病的时间
荧光分辨荧光免疫分析试剂盒。所述检测葡萄灰
霉病的时间分辨荧光免疫分析检测试剂盒是由
多孔包被板、缓冲液、葡萄灰霉病标准品、葡萄灰
霉病的抗体冻干品、销标记的羊抗鼠抗体、洗涤
液和增强液所组成。所述检测葡萄灰霉病的时间
荧光免疫分析试剂盒的检测方法包括下列步骤：
(1)免疫原的制备；(2)包被原的制备；(3)单克隆
抗体的制备；(4)样品的前处理及检测。本发明检
测时间短、平均回收率高、样品前处理简单、能现
场操作检测，应用广泛，检测成本低，同时具有检
测特异性强，批内和批间差异小、灵敏度高和操
作简单快速，且特别适合于大批量样品的检测等
优点。

1. 一种检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其特征在于:由多孔包被板,缓冲液,葡萄灰霉病标准品,葡萄灰霉病的抗体冻干品,钕标记的羊抗鼠抗体,洗涤液和增强液所组成。

2. 一种根据权利要求1所述检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,包括免疫原、包被原和单克隆抗体的制备以及样品前处理,其特征在于:

(1) 将葡萄灰霉病与牛血清白蛋白偶联,得到免疫原;

(2) 将葡萄灰霉病与卵血清蛋白偶联,得到包被原;

(3) 用步骤(1)的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗葡萄灰霉病的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

(4) 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用Protein G柱进行纯化,获得抗葡萄灰霉病的单克隆抗体

(5) 用步骤(2)的包被原包被固相载体;

(6) 将动物组织先经过酸解提取后,再过MAX柱净化,最后加入衍生试剂和催化剂进行处理,得到待测产物;

(7) 将步骤(6)的待检物进行测量荧光强度cps,对照标准曲线计算样品中的葡萄灰霉病葡萄灰霉病含量。

3. 根据权利要求1所述检测葡萄灰霉病的时间荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述的固相载体是多孔包被板,采用96孔的多微孔包被板作为固相载体。

4. 根据权利要求1所述检测葡萄灰霉病的时间荧光分辨免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述的衍生试剂是丁胺。

5. 根据权利要求1所述检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述的催化剂是膦基磷酸二乙酯。

6. 根据权利要求1所述检测葡萄灰霉病的时间荧光免疫分析法试剂盒,其特征在于:所述步骤(6)和(7)具体为取包被有葡萄灰霉病-OVA的微孔包被板,加入50 μ L处理好的样品到各自的微孔中,加入50 μ L以缓冲液稀释的葡萄灰霉病抗体,25~37 $^{\circ}$ C振荡0.5~1小时,洗涤液洗三次,加以缓冲液稀释的100 μ L Eu^{3+} -羊抗鼠抗体,25~37 $^{\circ}$ C振荡0.5~1小时,洗涤液洗六次,加200 μ L增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps,从标准曲线计算样品中的葡萄灰霉病含量。

一种检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体的说,涉及一种检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

背景技术

[0002] 灰霉病是由葡萄孢属真菌引起的病害,菌丝褐色,有隔膜,分生孢子梗灰黑色、坚实、直立、细长,呈树状分枝,分枝顶端膨大,其巨生有多个小梗,小梗上着生分生孢子,整体看似葡萄穗状。灰霉菌对寄主的致病机制比较复杂的,主要是降解酶和毒素的作用。

[0003] 病原菌会产生胞壁降解酶降解细胞壁多糖并利用其来作为生长发展的碳源,侵染过程中所产生的毒素可对愈伤组织细胞造成严重破坏,导致细胞中毒死亡。葡萄灰霉病主要危害花冠、花序和果实,在田间通常造成落花落果和果实腐烂。灰霉病是个非常难缠的主,所以必须重视预防,综合防治。简而言之,加强果园管理,提高树体抗病能力是防治的基础;及时清除病原物产生源和传播途径是防治的关键;适时使用化学药剂杀灭病菌,是防治灰霉病危害的必要措施。

[0004] 而时间分辨荧光免疫分析法(TR-FIA)由于其特异性强、灵敏度高、操作简单、廉价,且特别适于大批量样品的检测等优点而越来越被人们所重视和采用。目前还没有针对葡萄灰霉病检测的时间荧光免疫分析法的专利和文献报道。

发明内容

[0005] 为解决以上技术问题,本发明的目的在于提供一种蔬菜水果中葡萄灰霉病残留的检测时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

[0006] 本发明的目的之二在于提供一种快速简便地检测蔬菜水果中葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,用于定量或定性地检测农作物中葡萄灰霉病残留量。

[0007] 本发明目的之一是这样实现的:检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,其关键在于由多孔包被板、缓冲液、葡萄灰霉病标准品溶液、抗葡萄灰霉病的抗体冻干品、钕标记的兔抗鼠抗体、洗涤液和增强液体所组成。

[0008] 本发明目的之二是这样实现的:检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒的检测方法,包括免疫原、包被原和单克隆抗体的制备以及样品前处理及检测,其关键在于:

(1) 免疫原的制备:将半抗原葡萄灰霉病与牛血清白蛋白(BSA)偶联,得到免疫原(葡萄灰霉病-BSA);

(2) 包被原的制备:将半抗原葡萄灰霉病与卵血清白蛋白(OVA)偶联,得到包被原(葡萄灰霉病-OVA);

(3) 单克隆抗体的制备:

a. 用步骤(1)的免疫原(葡萄灰霉病-BSA)免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗葡

萄灰霉病的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

b. 以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用Protein G柱进行纯化,获得抗葡萄灰霉病的单克隆抗体IgG;

c. 用步骤(2)的包被原包被96孔包被板;

(4) 样品的前处理及检测:

取包被有包被原(葡萄灰霉病-OVA)的多孔包被板,加入50 μ L的葡萄灰霉病到各自的微孔中,加50 μ L以缓冲液稀释的抗葡萄灰霉病抗体,25 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C振荡0.5~1小时,洗涤液洗3次,加以缓冲液稀释的100 μ L Eu^{3+} -兔抗鼠抗体,25 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C振荡0.5~1小时,洗涤液洗6次,加200 μ L增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps,根据标准曲线计算样品中的葡萄灰霉病含量。

[0009] 上述的固相载体是多孔包被板,采用96孔的多孔包被板作为固相载体。

[0010] 本发明主要采用时间分辨荧光免疫分析方法检测葡萄灰霉病。采用时间分辨荧光免疫分析的技术主要有两个方面:第一,特异性单克隆抗体制备,用偶联的免疫原免疫小鼠,通过杂交瘤技术,得到分泌抗葡萄灰霉病的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;以体内诱生腹水法大量制备抗体,使用Protein G柱进行纯化,获得抗葡萄灰霉病的单克隆抗体IgG。第二, Eu^{3+} 标记抗体的制备。

[0011] 本发明测定方法:测定的基础是标记免疫反应。包被有葡萄灰霉病-OVA的多孔包被板,加入测试样品到各自的微孔中,再加入抗葡萄灰霉病抗体,振荡反应,游离的葡萄灰霉病与微孔板上的葡萄灰霉病-OVA竞争抗葡萄灰霉病抗体,洗涤液洗涤,没有连接的葡萄灰霉病抗体在洗涤步骤中被除去。加入 Eu^{3+} -兔抗鼠抗体,进行标记免疫反应,再用洗涤液洗涤,反应后没有连接的 Eu^{3+} -兔抗鼠抗体在洗涤步骤中被除去。加增强液振荡后,在紫外灯的激发下发射很强的荧光,用时间分辨荧光仪测定其荧光强度cps,荧光强度与样品中的浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中葡萄灰霉病的量。

[0012] 本发明检测方法不需要昂贵的仪器,样品前处理简单、能现场操作检测,应用广泛,该方法灵敏、准确、快速,操作简便、特异性强,适用于大批样品的快速检测。

具体实施方式

实施例

[0013] 1、免疫原与包被原制备

本发明免疫原(葡萄灰霉病-BSA)的合成:准确称取葡萄灰霉病324mg溶解在2mL N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌下逐滴加入 γ -氨基丁酸溶液,搅拌反应3小时,调节反应液pH 10左右。离心除掉沉淀物。将上述反应逐滴加入BSA溶液中(320mg BSA溶解于5mL生理盐水),再加入N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 23mg, N,N-二环己基碳二亚胺(DCC) 45.4mg, 4 $^{\circ}$ C反应过夜,离心除去沉淀,取上清液用磷酸缓冲液(PBS)透析3天,每6小时更换透析液,将所得产物低压冻干,于-20 $^{\circ}$ C保存备用;

包被原(葡萄灰霉病-OVA)的合成:在上述反应中,将BSA换成OVA后,得到反应偶联物葡萄灰霉病-OVA,该偶联物作为TR-FIA检测时作为包被原使用。

[0014] 2、单克隆抗体制备

2.1 动物免疫

用步骤1制备的免疫原分别免疫6周龄雌性Balb/c小鼠,每只小鼠的免疫剂量为100 μ g/0.2mL。首次免疫,用无菌0.01mol/L pH7.4 PBS溶解免疫原(葡萄灰霉病-BSA),再与等量弗氏完全佐剂混合,完全乳化,劲背部皮下分2~3点注射;加强免疫,用0.01mol/L pH7.4 PBS溶解免疫原与等量弗氏完全佐剂混合,充分乳化,小鼠腹腔注射。每次间隔14~21天,第3次免疫后7~10天开始对免疫小鼠尾静脉采血,收集血清,用ELISA检测小鼠血清效价。末次免疫后间隔4周以上,在细胞融合前3~4天,腹腔注射葡萄灰霉病-BSA抗原100 μ g/0.2mL/只,注射后每天注意观察,保证融合前小鼠状态良好。

[0015] 2.2 单克隆抗体制备

分离免疫小鼠的脾细胞,并进行匀浆制备免疫脾细胞。取1只免疫的Balb/c小鼠,从眼眶放血分离血清作为阴性血清,处死。小鼠用75%酒精浸泡5min,进行整体消毒。将小鼠四肢固定,然后用镊子夹住小鼠下腹部皮肤,剪开一小口,再用镊子撕开皮肤,露出腹膜,换一套镊子和剪刀,在腹部中央腹膜上用剪刀剪开一小口。换一套镊子和剪刀,用剪刀剪开腹膜,露出脾脏,再换一套器械用镊子夹住脾脏,用剪刀将脾脏外膜剪破,然后放入事先灭菌的匀浆器中。加适量基础培养基(RPMI-1640)于匀浆器中,进行研磨,挤压出脾细胞,取出匀浆器的匀浆棒,再补加适量基础培养基(RPMI-1640),静置2min,将上层细胞液吸取后,放入腹腔巨噬细胞离心管中,重复上述操作1次。1200r/min离心10min,除去上清。将10⁸个免疫脾细胞与1~2 $\times$ 10⁷个SP2/0骨髓瘤细胞按照1:10或1:5的比例加入离心管中,进行混匀,然后于1500r/min水平离心10min,弃去上清。将离心管倒扣在灭菌的吸水纸上,把管中液体吸干。用手指或桌面轻轻敲击管底,让沉淀的细胞松动,再把离心管置于37℃水浴锅中。在1min内缓慢将50% PEG 0.8mL滴入离心管中,边加边轻轻用吸管尖搅拌沉淀细胞。再继续搅拌30s后,静置1min,然后慢慢加入事先进行37℃预温的40mL基础培养基(RPMI-1640)。加基础培养基方法为:第1min内逐滴滴入1mL,第2min内逐滴滴入2mL,第3min内逐滴滴入3mL,第4min内逐滴滴入4mL,在每次加培养基时需缓慢加入,并轻轻地搅拌培养基,最后将剩余的RPMI-1640培养基慢慢加入。1000r/min离心5min,除去上清。然后用HAT培养基悬浮混合的细胞,再加入饲养脾细胞。根据需要补加适量的HAT培养基,混合均匀,再将含有饲养细胞的细胞融合液滴加到96孔细胞培养板上,滴加量约为150 μ L/孔。将培养板置于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中,进行培养。用建立的间接ELISA筛选阳性细胞克隆。选择强阳性集落生长的孔,用有限稀释法进行克隆。并对其他阳性孔,进行24孔扩大培养,用间接ELISA和间接竞争ELISA对扩大培养孔的上清液进行检测,对间接ELISA和间接竞争ELISA均为阳性孔的细胞进行液氮冷冻保存。通过融合检测,并进行3次亚克隆后获得杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株经过多次传代、冻存、复苏,杂交瘤细胞分泌抗体稳定。进行杂交瘤细胞染色体的计数,将每株杂交瘤细胞随机选择20个细胞,进行细胞染色体条数的计数,再计算细胞染色体条数的平均值。小鼠脾细胞染色体数为40条,SP2/0细胞的染色体数目平均数为62~68条,而本试验获得的20株杂交瘤细胞染色体数目都在92~103条之间,平均为96.8条。本杂交瘤细胞染色体数目高于两亲本细胞的染色体数目,说明是两种细胞的杂交产物。取细胞株细胞分泌的培养上清液,进行1:10稀释后,用夹心ELISA方法测定抗体亚型,该细胞株分泌的抗体亚型为IgG1。采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化。该单克隆抗体可用于制备时间分辨荧光检测试剂盒。

[0016] 2.3单克隆抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵法对小鼠腹水进行纯化:取小鼠腹水10mL,加入等体积的巴比妥缓冲液,适量的二氧化硅混合,室温振荡30min。室温静置15min后,取上清于洁净离心管中,4℃,1800r/min离心20min;取上清液18mL,加入36mL 0.06mol/L醋酸钠缓冲液,用HCl调pH值至4.5,充分搅拌下在30min内缓慢加入辛酸297 μ L;继续搅拌10min,然后转入4℃冰箱静置2h,4℃,15000r/min离心30min,上清液经0.45 μ m滤膜过滤后体积为50mL;加入5mL 0.1mol/L的磷酸缓冲液,用NaOH调pH值至7.6,搅拌下缓缓加入硫酸铵至终浓度为0.277g/mL;4℃冰箱静置2h后,4℃,12000r/min离心30min,弃上清;沉淀用5mL 0.1mol/L的磷酸缓冲液重悬,装入透析袋,用5000mL 0.01mol/L pH7.2 PBS缓冲液充分透析后,再用2000 mL蒸馏水透析,最后用3000mL三蒸去离子水透析;然后4℃,12000r/min离心30min,弃沉淀,收集上清液,测蛋白浓度。做SDS-PAGE电泳,鉴定单克隆抗体的纯度。

[0017] 2.4兔抗鼠IgG抗体的制备

用Balb/C小鼠IgG免疫健康新西兰大白兔,制备高效价的兔抗鼠IgG高免血清,采用饱和硫酸铵沉淀法对血清进行粗提,经G-200过柱后得到高纯度的兔抗鼠IgG。

[0018] 3.1、制备试剂盒和检测样品

取溶解于50 mmol/L PBS pH7.0的5g/L兔抗鼠抗体1~2mL,经PD-10柱转换缓冲条件,洗脱液为含0.155mmol/L NaCl的50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ pH8.5缓冲液。收集蛋白峰,经紫外吸收分析定量(1.46A280-0.74A260),用上述洗脱液稀释兔抗鼠抗体至2g/L。取500~1000 μ L稀释后的兔抗鼠抗体加入含0.2~0.4mg的Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸(Eu³⁺-DTTA)的小瓶中,30℃磁力搅拌反应20小时。反应液经用80mmol/L Tris-HCl pH7.8缓冲液平衡的Sephacrose CL-6B柱(1×40cm)层析,A₂₈₀监测收集蛋白峰,稀释分装备用。

[0019] 3.2包被板固相抗原制备

将葡萄灰霉病-OVA用50mmol/LNa₂CO₃-NaHCO₃ pH9.6缓冲液稀释至1mg/L的包被液,96孔包被板各孔加100 μ L,4℃放置过夜。弃去包被液,冲洗三次,加150 μ L含3g/L OVA的上述缓冲液封闭,4℃放置过夜。弃去封闭液,真空抽干,板条密封后置-20℃冷冻保存。

[0020] 3.3试剂的配制

(1)葡萄灰霉病标准品溶液配制:将葡萄灰霉病标准品,稀释成为0ng/mL,0.01ng/mL,0.025ng/mL,0.1ng/mL,0.25ng/mL,1ng/mL,2.5ng/mL,10ng/mL,25ng/mL,100ng/mL系列浓度,稀释液为0.1mol/L pH7.5磷酸盐缓冲液;

(2)缓冲液:8mmol/L NaCl、0.2% OVA、50 μ mol/L二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、0.1mL/L Tween-80和0.1%NaN₃的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

(3)洗涤液为:14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80和0.2%NaN₃的50mmol/L Tris-HCl pH7.8;

(4)增强液的配制:由15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮、50 μ mol三正辛基氧化膦和1mL曲拉通X-100加入pH3.2邻苯二甲酸氢钾缓冲液中,再定容至1L配制而成。

[0021] 3.4试剂盒提供的试剂

基于上述制备的试剂,本发明用于检测葡萄灰霉病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒包括如下材料:

(1) 96孔酶标板×1块;

- (2) 葡萄灰霉病标准品1mg/mL/瓶；
- (3) 抗葡萄灰霉病抗体冻干品，用时用0.5 mL蒸馏水溶解；
- (4) Eu^{3+} -兔抗鼠抗体冻干品，用时用0.5 mL蒸馏水溶解；
- (5) 增强液:15mL；
- (6) 10×洗涤液:30mL；
- (7) 缓冲液:30 mL。

[0022] 3.5测定之前注意事项：

- A. 使用之前将所有试剂回升至室温(18-30℃)；
- B. 使用之后立即将所有试剂放回2-8℃；
- C. 如果样品量大建议使用多通道移液器；
- D. 在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，用盖子盖住微孔；
- E. 取出需用数量的微孔板及框架，将不用的微孔板放进原锡箔袋中并且与提供的干燥剂一起重新密封，保存于2-8℃。

[0023] 3.6具体检测步骤如下：

取葡萄灰霉病-OVA板条，加入50 μL 的葡萄灰霉病到各自的微孔中，加50 μL 以缓冲液稀释的抗葡萄灰霉病抗体，25℃~37℃振荡0.5~1小时，洗涤液洗3次，加以缓冲液稀释的100 μL Eu^{3+} -兔抗鼠抗体，25℃~37℃振荡0.5~1小时，洗涤液洗6次，加200 μL 增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps，从标准曲线计算样品中的葡萄灰霉病含量。

[0024] 3.7按下列步骤制备试剂盒和检测苹果、玉米、蔬菜样品：

- (1) 制备试剂盒同实施例；
- (2) 具体检测步骤如下：

取葡萄灰霉病-OVA板条，加入50 μL 的葡萄灰霉病到各自的微孔中，加50 μL 以缓冲液稀释的抗葡萄灰霉病抗体，25℃~37℃振荡0.5~1小时，洗涤液洗3次，加以缓冲液稀释的100 μL Eu^{3+} -兔抗鼠抗体，25℃~37℃振荡0.5~1小时，洗涤液洗6次，加200 μL 增强液振荡5分钟后测量荧光强度cps，根据标准曲线计算样品中的葡萄灰霉病含量。