



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109406778 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811193686.5

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.10.15

G01N 33/543(2006.01)

(71)申请人 国家烟草质量监督检验中心

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

(72)发明人 范子彦 胡利伟 邓惠敏 张艳玲

李中皓 牟文君 杨飞 郭建华

刘珊珊 薛超群 边照阳 戴华鑫

唐纲岭 宋纪真 王颖 尹启生

(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 33/569(2006.01)

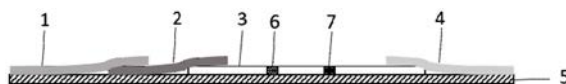
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

### (54)发明名称

一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条及其制备方法和应用

### (57)摘要

本发明涉及烟草中青枯病菌的检测,具体是一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条及其制备方法和应用。该试纸条构成依次包括样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述的结合物释放垫上喷涂有时间分辨荧光微球标记的检测抗体;所述的硝酸纤维素膜上包被有捕获抗体的检测线和羊抗鼠二抗的质控线;本发明以时间分辨荧光微球标记检测抗体,采用免疫层析技术,实现烟叶中青枯病菌的快速免疫分析。本发明还提供一种应用上述试纸条检测烟叶中青枯病菌含量的方法。本发明的优点是灵敏度高,可准确定量,检测快速、操作方便,经济实用,能够实现大批量的烟叶样品进行快速检测和现场检测。



1. 一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述的结合物释放垫上喷涂有时间分辨荧光微球标记的青枯病菌检测抗体;所述的硝酸纤维素膜上包被有青枯病菌捕获抗体的检测线和羊抗鼠二抗的质控线;所述青枯病菌捕获抗体及青枯病菌检测抗体是由青枯病菌或青枯病菌外泌蛋白为免疫原制备获得具有不同表位的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在底板上,且结合物释放垫3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

3. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述时间分辨荧光微球是直径为100 nm~500 nm的稀土离子作为标记物的荧光微球,其表面修饰有合适密度的羧基或其他功能基团,用于蛋白、抗体和核酸的共价偶联。

4. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:所述青枯病菌外泌蛋白是通过构建质粒,利用大肠杆菌表达体系表达、纯化制备获得。

5. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:制备青枯病抗体的免疫原为青枯病菌时,是指青枯病亚洲分支(演化型I)序列变种13、15、17和34,是通过平板培养纯化所得。

6. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于:制备青枯病抗体的免疫原为外泌蛋白时,是指多聚半乳糖醛酸内切酶、果胶酶、外多聚半乳糖醛酸酶、海藻酸裂解酶、鞭毛蛋白,是通过权利要求4所描述方法制备所得。

7. 一种制备权利要求1-6任一项所述试纸条的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 制备喷涂有青枯病菌检测抗体-荧光微球标记物的结合物释放垫;

2) 制备包被有青枯病菌捕获抗体的检测线和包被有羊抗鼠二抗的质控线的硝酸纤维素膜;

3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、硝酸纤维素膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

8. 根据权利要求7所述的试纸条的方法,其特征在于,在步骤1)中,在喷涂青枯病菌检测抗体-荧光微球标记物之前,结合物释放垫用含0.2~1w/w%牛血清白蛋白、pH 7.4的0.02~0.05 mol/L Tris-HCl(含0.1~5 %的海藻糖和0.02~0.1% Tween-20)缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h。

9. 一种应用权利要求1-7任一项所述试纸条检测烟叶中青枯病菌的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 对烟叶进行前处理;

2) 用权利要求1-7任一项所述的试纸条进行检测,可给出烟叶中青枯病菌的准确定量结果;

3) 分析检测结果:定量试纸条硝酸纤维素膜上荧光信号可被免疫荧光分析仪快速读取;

4) 免疫荧光分析仪可准确读取365 nm激发、610 nm发射的荧光信号,具体形式分为台式检测和手持式检测。

## 一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及烟叶中青枯病菌的检测,具体是一种利用时间分辨荧光微球免疫层析技术定量检测烟叶中青枯病菌含量的试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 烟草青枯病又称“烟瘟”,是由青枯假单孢杆菌引起的一种重要的维管束病害,近年来在我国主要产烟区呈加重发生趋势,对烟叶产量和质量造成无法挽回的巨大损失,是制约我国烟草生产最具威胁的病害之一。

[0003] 目前青枯病菌的检测方法主要有常规检测法,血清学方法如酶联免疫吸附法(ELISA),分子生物学检测方法如核酸分子杂交、PCR扩增,胶体金法等。常规测定法的优点在于简便易行,其缺点是检测周期长初学者误判率高,难以达到“快速、准确、经济”的要求;分子生物学检测方法比如定量PCR检测能够准确获得烟叶中青枯病的数量,但是过程较为复杂,技术难度高,对操作者要求比较高;胶体金法能对烟草中青枯病菌进行定性分析,操作简单,检测时间较短,但检测灵敏度低,人为因素干扰较大。

[0004] 综上,在生产中有必要建立简便有效、操作性强的烟草青枯病早期检测方法,以满足基层技术人员及田间工作实际需要,为烟草青枯病防治工作提供准确及时的依据。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的正是基于上述现有技术难题而开发了一种适用于烟叶中青枯病菌定量检测的一种免疫层析试纸条以及检测方法,该方法具有灵敏度高,操作简单快捷,成本低等优点,适用于烟叶中青枯病菌的快速检测。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板;其特征在于:所述的结合物释放垫上喷涂有时间分辨荧光微球标记的青枯病菌检测抗体;所述的硝酸纤维素膜上包被有青枯病菌捕获抗体的检测线和羊抗鼠二抗的质控线;所述青枯病菌捕获抗体及青枯病菌检测抗体是由青枯病菌或青枯病菌外泌蛋白为免疫原制备获得具有不同表位的单克隆抗体。

[0007] 所述时间分辨荧光微球是直径为100 nm~500 nm的稀土离子作为标记物的荧光微球,其表面修饰有合适密度的羧基或其他功能基团,用于蛋白、抗体和核酸的共价偶联。

[0008] 所述青枯病菌外泌蛋白是通过构建质粒,利用大肠杆菌表达体系表达、纯化制备获得

制备青枯病抗体的免疫原为青枯病菌时,是指青枯病亚洲分支(演化型I)序列变种13、15、17和34,是通过平板培养纯化所得。

[0009] 制备青枯病抗体的免疫原为外泌蛋白时,是指多聚半乳糖醛酸内切酶、果胶酶、外多聚半乳糖醛酸酶、海藻酸裂解酶、鞭毛蛋白,是通过构建质粒,利用大肠杆菌表达体系表

达、纯化制备获得。

[0010] 一种制备上述试纸条的方法,包括以下步骤:

1) 制备喷涂有青枯病菌检测抗体-荧光微球标记物的结合物释放垫:用荧光微球标记检测抗体,并将其喷涂在结合物释放垫上。

[0011] 2) 制备包被有青枯病菌捕获抗体的检测线和包被有羊抗鼠二抗的质控线的硝酸纤维素膜;即将捕获抗体和羊抗鼠二抗分别喷涂于硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线;

3) 组装和剪切:将1)和2)制备好的喷涂有荧光微球的结合物释放垫、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装后剪切成所需宽度即成为免疫层析试纸条。

[0012] 更具体地说,步骤包括:

1) 取出荧光微球进行活化,然后加入检测抗体进行共价偶联,结束后加入封闭缓冲液进行封闭,离心洗涤后4℃保存备用。

[0013] 2) 将结合物释放垫用含0.2~1%牛血清白蛋白(质量分数)、pH 7.4的0.02~0.05 mol/L Tris-HCl(含0.1~5 %的海藻糖和0.02~0.1% Tween-20)缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h,置于干燥环境中保存备用;

3) 将荧光微球标记的检测抗体喷涂在结合物释放垫上,37℃烘1 h后取出,置于干燥环境中保存备用;

4) 分别将捕获抗体和羊抗鼠二抗包被于硝酸纤维素膜的检测线(T)和质控线(C)上;

5) 在底板上依次粘贴上样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫,硝酸纤维素膜从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖。最后切成4 mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,室温干燥条件下可保存12个月。结合物释放垫的1/3被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与抗体充分反应,从而减少误差。

[0014] 应用上述试纸条检测烟叶中青枯病菌的方法,包括如下步骤:

(1) 将试纸条和待测样品回复至室温。

[0015] (2) 开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线。

[0016] (3) 向试纸条的加样孔中加入待测样本60~120μL,反应5~10min后,将检测卡插入免疫荧光分析仪;

(4) 截留在检测线和质控线的荧光微球在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;

(5) 采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中青枯病菌的数量,并判断阴阳性。

[0017] 本发明与现有技术相比,有如下优点:

(1) 本发明能够准确定量待测样本中的青枯病菌的数量。

[0018] (2) 本发明采用独立的质控线和检测线的反应系统,互不干扰和影响,并采用T/C值的方式进行标定,保证了测试结果的准确性。

[0019] (3) 本发明采用时间分辨荧光微球,由于其Stokes位移大(>150 nm)且荧光寿命比本底物质荧光寿命高5~6个数量级,能够有效地消除各种非特异性荧光的干扰,提高检测的灵敏度。

[0020] 本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、不受检测设备限制、储存简单、保质期长的优点。用本发明试纸条检测烟叶中青枯病菌数量的方

法,简便、快速、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

### 附图说明

[0021] 图1是免疫层析试纸条结构示意图,图中:1、样品吸收垫;2、结合物释放垫;3、硝酸纤维素膜;4、吸水垫;5、底板;6、检测线;7、质控线;

图2是免疫层析检测卡结构示意图,图中:8、检测窗;9、样品孔。

[0022] 图3是试纸条样品检测结果示意图;

图4为青枯病菌的培养及PCR鉴定;

图5为所表达的示例外泌蛋白SDS-Page,图中:1、蛋白marker;2、PglA;3、FliA。

[0023] 图6 是本发明试纸条的标准曲线。

### 具体实施方式

[0024] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰同样应落入发明的保护范围。

[0025] 下面分步详细叙述:

实施例1 烟草青枯病菌抗体制备

#### 1、青枯病菌的分离及鉴定

使用牛肉膏蛋白胨琼脂对青枯病菌进行增菌培养,结果如图4所示。图4A为青枯病在平板上的生长状态,表明菌落比较单一,没有杂菌,对培养的青枯病菌进行了PCR鉴定,结果如图4B所示,在200 bp-300 bp之间有清晰的单一DNA条带,表明菌落为青枯病菌,即权利要求5中所述是指青枯病亚洲分支(演化型I)序列变种13、15、17和34。

[0026] 2、青枯病分泌蛋白iTRAQ分析

在青枯病菌液体培养基中,使用红花大金元,云南87和K326的烟沫进行刺激培养,以未加烟叶刺激青枯病菌培养组为参考,使用iTRAQ技术对液体培养基上清液中的分泌蛋白进行分析。iTRAQ分析在培养基上清液中共鉴定到727个蛋白,按照 $up\_regulate \geq 1.5$ 和 $down\_regulate \leq 0.67$ , $P\_value \leq 0.05$ 的规则进行筛选,红花大金元,云南87和K326烟沫刺激组相比较参考组分别有60,59和62个蛋白被显著差异表达,其中有22个蛋白在三种烟叶刺激后均被差别表达,结果如表1所示。

[0027] 表1. 两两样品间蛋白显著差异数量

类型	Hongda/CK	Yun87/CK	K326/CK
总定量数	727	727	727
上调蛋白数量	26	31	20
下调蛋白数量	34	28	42
总差异数量	60	59	62

#### 3、外泌靶标蛋白的确定

针对鉴定出的所有蛋白进行GO功能注释分析,分别描述分子功能和参与的生物过程。结合GO的分析结果,从22种均被显著差异表达的蛋白中,按照表达的丰度以及种间的特异性,挑选出被上调表达的外泌蛋白,以结构蛋白鞭毛蛋白(Flagellin protein, FliA)和青

枯病侵染过程关键蛋白果胶酶蛋白 (Endopolygalacturonase, PglA) 为例, 根据PglA和FliA的氨基酸序列及上游基因序列, 设计质粒转染大肠杆菌表达, 使用SDS-Page对纯化后的表达蛋白进行表征, 结果如图5所示, PglA的分子量在56 kDa附近, FliA在34 kDa附近, 蛋白纯度较高。

#### [0028] 4、青枯病菌单克隆捕获和检测抗体的制备

##### (1) 杂交瘤细胞的获得

1) 首次免疫: 将青枯病亚洲分支(演化型I) 序列变种13、15、17和34以及外泌蛋白多聚半乳糖醛酸内切酶、果胶酶、外多聚半乳糖醛酸酶、海藻酸裂解酶、鞭毛蛋白(免疫抗原) 与等量的弗氏完全佐剂充分乳化, 皮下注射6周龄的Balb/c小鼠, 剂量50ug (抗原)/只;

2) 加强免疫两次: 从首次免疫开始, 每两周加强免疫一次, 用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂, 方法和剂量同首次免疫;

3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制, 有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫: 腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1 mL, 三天后处死小鼠, 取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

4) 以青枯病亚洲分支(演化型I) 序列变种13、15、17和34以及外泌蛋白多聚半乳糖醛酸内切酶、果胶酶、外多聚半乳糖醛酸酶、海藻酸裂解酶、鞭毛蛋白为包被原, 以1ug/ml的浓度包被, 4℃过夜包, 抗血清用PBS以1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000等稀释度稀释, 添加商品化羊抗鼠二抗后筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化, 得到并建立稳定分泌青枯病菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液, 分装于冻存管, 在液氮中长期保存。

##### [0029] (2) 单克隆抗体的制备

1) 细胞复苏: 取出青枯病菌单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管, 立即放入37℃水浴中速融, 离心去除冻存液后, 移入培养瓶内培养;

2) 制备腹水与抗体纯化: 采用体内诱生法, 将Balb/c小鼠(8周龄) 腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只, 7天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5$ 个/只, 7天后采集腹水。用ProteinA亲和层析柱进行纯化, 用间接ELISA法测定抗体的效价为1: (100000~200000), 得到青枯病菌单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0030] 3) 制备的青枯病菌单克隆抗体含有多种效价和表位的抗体, 后续将开展表位测定和配对, 以确定捕获抗体和检测抗体。

#### [0031] 5、表位测定及抗体配对

##### (1) 检测抗体生物素标记

将待标记物用PBS稀释液稀释为1mg/ml, 体积200μL~500μL。将生物素溶于二甲亚砜(DMSO) 浓度中, 终浓度为10mg/ml, 按照蛋白: 生物素摩尔比=1:10将生物素加入青枯病菌抗体溶液中混匀, 37℃摇床温育, 反应产物用聚丙烯酰胺纯化柱纯化。

##### [0032] (2) 抗体配对

将步骤4中制备的多种青枯病菌抗体按照2ug/ml浓度进行包被, 37℃2h或者4℃过夜, 用2%BSA或者5%的脱脂牛奶按照200μL/孔的剂量, 37℃1小时或4℃过夜封闭, PBST洗4遍, 将青枯病菌按照100μL/孔添加到96孔中37℃条件下反应2小时, 标记有生物素的检测抗体按照1:4000稀释后每孔添加100μL, 37℃条件下反应2小时后加入Avidin-HRP, 37℃反应1小

时后进行测定,根据测定的吸光度值确定捕获抗体,并与检测抗体配对用于试纸条的开发。

#### [0033] 实施例2 时间分辨荧光纳米颗粒(即荧光微球)的制备

将 10 mmol 的苯乙烯和 0.83 mmol 的丙烯酸, 0.63 mmol 的十二烷基硫酸钠溶于 10 mL 水后置入圆底烧瓶,通入氮气 20 分钟除氧,加入 0.1 mmol 过硫酸钾引发聚合,在 65 °C 油浴条件下密封搅拌 5 个小时。反应产物滤纸过滤后,用纯水透析 7 天,用正己烷多次提取备用。取 300  $\mu$ L 聚苯乙烯纳米颗粒正己烷溶于 1650  $\mu$ L 碳酸钠缓冲溶液(pH 9.5, 10 mM, 含有 1.8 mM  $\text{EuCl}_3$ , 5.5 mM 2-NTA, 和 5.5 mM TPO), 包被过夜后,用硼酸缓冲溶液透析过夜,使用 DLS 和 SEM 表征聚苯乙烯纳米颗粒的粒径和均一度,使用稳态分子荧光仪表征纳米颗粒荧光效应,激发波长 340 nm,发射波长 610 nm。

#### [0034] 实施例3 烟叶中青枯病菌时间分辨荧光定量试纸条的制备

##### 1、荧光微球标记物的制备:

荧光微球标记检测抗体的制备:取 1 mg 荧光微球 15000 rpm 离心 10 min,收集沉淀,用 1 mL 偶联缓冲液重悬沉淀。然后按 1:2~1:20 的摩尔比加入 EDC 和 NHS,涡旋震荡后室温孵育 20~30 min, 15000 rpm 离心 10 min,收集沉淀。加入偶联缓冲液重悬微球,向该溶液中加入 40~150  $\mu$ g 检测抗体,充分混匀后,室温搅拌反应 2~4 h, 10000 rpm 离心 10 min 去上清,加入 1 mL 封闭缓冲液,混匀后室温反应 1~2 h,用封闭缓冲液离心洗涤 3 次后,用 0.02 M pH 7.4 的 PBS (含 0.1~1% BSA 和 0.1~5% 海藻糖) 重悬沉淀,即为制备好的荧光微球标记的检测抗体,放置于 4 °C 备用。

##### [0035] 2、荧光微球结合垫的制备:

将结合物释放垫用含 0.1~0.5 % 牛血清白蛋白(质量分数)、pH 7.4 的 0.01~0.05 M Tris-HCl (含 0.1~5 % 的海藻糖和 0.01~1 % Tween-20) 缓冲液浸泡 2 h, 37 °C 下烘干 2 h 备用。用喷膜仪将荧光微球标记的检测抗体喷涂至结合物释放垫上,每 1 cm 结合物释放垫喷涂 0.01~0.1 mL 荧光微球标记的检测抗体, 37 °C 干燥 1~2 h,置于干燥环境中备用。

##### [0036] 3、NC膜(硝酸生物素膜)的制备:

将捕获抗体和羊抗鼠二抗分别包被于 NC 膜上:用 0.02 M pH 7.4 的 PBS 将捕获抗体调节至 0.5~2 mg/mL,包被在 NC 膜上形成检测线,包被量为 5~10  $\mu$ L/cm;用 0.01 M pH 7.4 的 PBS 将羊抗鼠二抗调节至 0.1~0.5 mg/mL,包被在 NC 膜上形成质控线,包被量为 5~10  $\mu$ L/cm。将包被好的硝酸纤维素膜置于 37 °C 干燥 1~2 h,置于干燥环境中备用。

##### [0037] 4、时间分辨荧光微球免疫检测卡的制备

在 PVC 底板上依次粘贴样品吸收垫,喷涂有荧光微球标记的检测抗体的结合物释放垫,喷涂有捕获抗体作为检测线和羊抗鼠二抗作为质控线的硝酸纤维素膜,吸水垫;其中,结合物释放垫从起始端有 1/3 区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与硝酸纤维素膜的始端连接,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与 PVC 底板的始端对齐,吸水垫的末端与 PVC 底板的末端对齐;所述硝酸纤维素膜上的检测线和质控线与所述试纸条的长相呈垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;组装完成后剪切成 4 mm 的宽度,即成为免疫层析试纸条。

[0038] 把免疫层析试纸条固定在塑料底卡上,试纸条表面用面卡压紧,面卡在对应试纸条样品吸收垫和 NC 膜的部分分别预留加样孔和检测窗。该检测卡组装好后装入铝箔袋,加入干燥剂封口,放置于室温干燥环境下可保存 12 个月。

## [0039] 实施例4 烟叶中青枯病菌数量的检测

## 1、烟叶中青枯病菌检测试纸条标准曲线的建立

取空白烟叶样品,剪碎加入提取液后超声,在超声后的溶液中分别添加青枯病菌数量为 $4 \times 10^2$ 、 $8 \times 10^2$ 、 $1.6 \times 10^3$ 、 $3.2 \times 10^3$ 、 $6.4 \times 10^3$ 、 $1.28 \times 10^4$ 、 $2.56 \times 10^4$ 、 $5.12 \times 10^4$  个/mL,取试纸条进行检测,每个样品重复测定五次,将测定的五次重复结果取平均值后,在免疫荧光分析仪上进行标定。

## [0040] 2. 烟叶样本中青枯病菌数量的检测

## (1) 烟叶样本的前处理

- ①检测前将样本恢复至室温20~25 °C;
- ②称取20~50 mg烟叶样本剪碎至聚苯乙烯离心管中;
- ③加入1 mL样品提取液,水浴超声3 min;

## (2) 用试纸条进行检测

- ①开启免疫荧光分析仪,插入对应ID卡,读取标准曲线。

[0041] ②正面朝上平放检测卡,向试纸条的加样孔中加入待测样本60~120  $\mu$ L,室温反应5-10 min后,将检测卡放入免疫荧光分析仪中进行检测

- ③截留在检测线和质控线的FITC在最佳激发光下,发出强烈的荧光条带;

④采用免疫层析分析仪读取检测线和质控线的荧光强度,并给出T/C值,分析仪可通过内置的标准曲线计算出样品中青枯病菌的数量,并判断阴阳性。

## [0042] 实施例5 基本参数的建立

检出限:用空白样品进行重复测定5次,计算5次结果的均值M与标准差SD,以空白均值加三倍标准差(M+3SD)报告方法的检测限,结果为72cell/mL。

[0043] 线性范围:取青枯病菌数量为 $4 \times 10^2$ 、 $8 \times 10^2$ 、 $1.6 \times 10^3$ 、 $3.2 \times 10^3$ 、 $6.4 \times 10^3$ 、 $1.28 \times 10^4$ 、 $2.56 \times 10^4$ 、 $5.12 \times 10^4$  个/mL的样本进行测定,每个浓度重复测量五次,将测定浓度平均值与理论值进行线性分析,得到线性方程 $y=0.0003x+0.1383$ , $R^2=0.998$ (实验结果及分析见表2、图6)。

## [0044] 表2 青枯病菌标准曲线检测结果

数量 (个/mL)		4 $\times 10^2$	8 $\times 10^2$	1.6 $\times 10^3$	3.2 $\times 10^3$	6.4 $\times 10^3$	1.28 $\times 10^4$	2.56 $\times 10^4$	5.12 $\times 10^4$
信号 (T/C)	1	0.329	0.545	0.670	1.091	1.721	3.449	6.576	15.361
	2	0.280	0.390	0.673	1.145	1.655	3.514	7.425	13.877
	3	0.353	0.493	0.632	0.960	1.762	3.574	9.669	15.328
	4	0.312	0.440	0.636	1.168	1.750	3.420	8.063	13.486
	5	0.287	0.309	0.613	1.046	1.622	3.684	7.719	14.403
平均值		0.312	0.435	0.645	1.081	1.702	3.528	7.890	14.691
标准差		0.027	0.082	0.023	0.074	0.055	0.094	0.443	0.755

准确度:用样品提取液配制浓度为 $2 \times 10^4$ 个/mL青枯病菌的样品,用前面实施例中所制



备试纸条进行检测,重复检测三次,检测结果取平均值进行计算。回收率=检测浓度/实际加入浓度 $\times 100\%$ ,计算得样品回收率为102.3%。

[0045] 精密度:取三批实施例中所制备的时间分辨荧光定量青枯病菌检测试纸条检测 $2 \times 10^4$ 个/mL青枯病菌的样品,每批试纸条标品平行检测10次,结果显示三批批次内CV值分别为8.032%,6.914%,4.089%,三批批次间CV值为8.920%。

[0046] 从上述数据可以看出,本发明所述试纸条,相比现有的检测烟叶中青枯病菌的方法,具有更灵敏、更快速、可准确定量的特点,不受操作地点的限制,且配套的检测仪器小巧轻便,人员要求更低,适合大范围的推广使用。

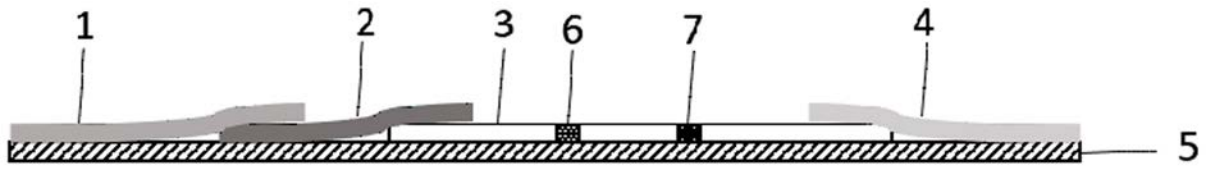


图1

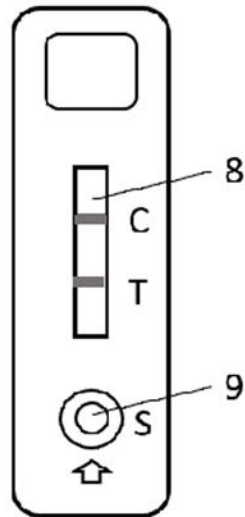


图2

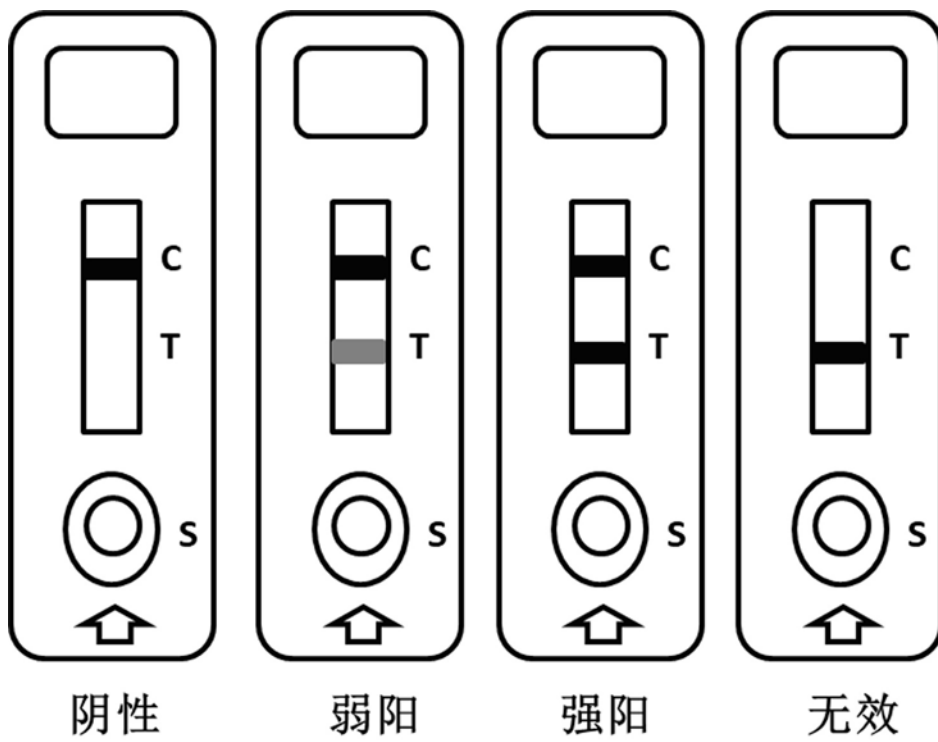


图3

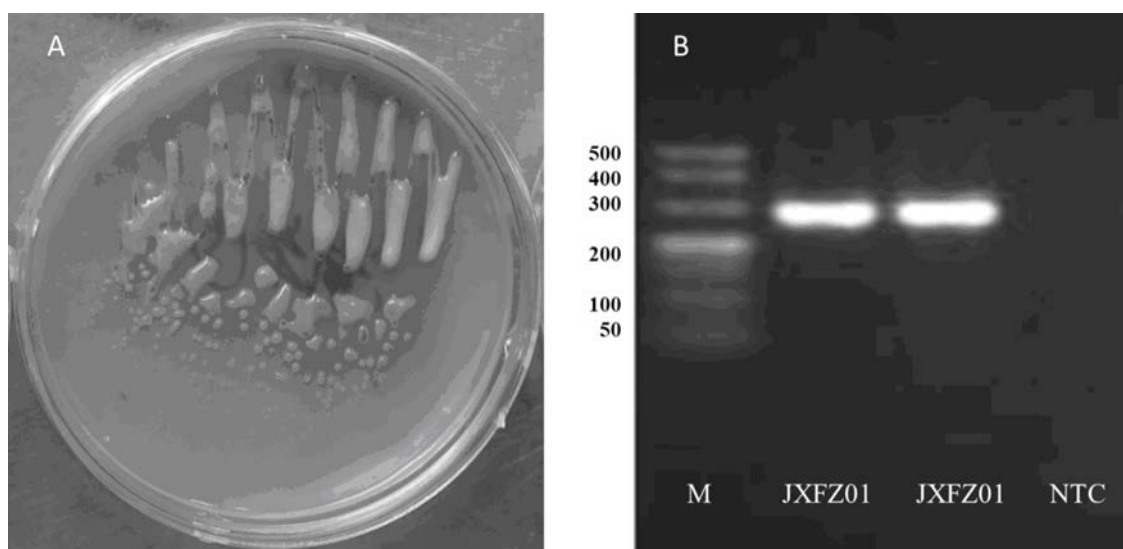


图4

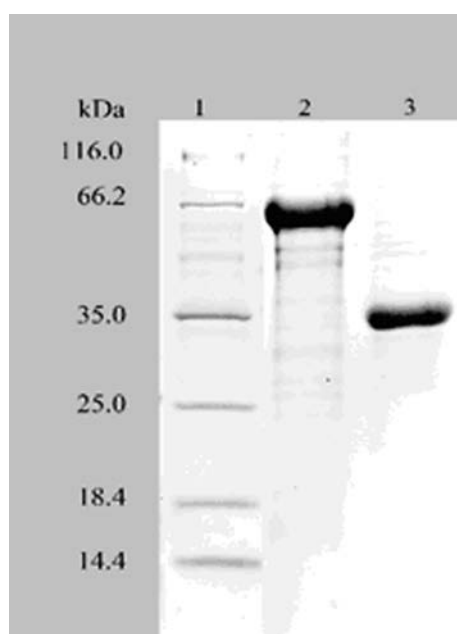


图5

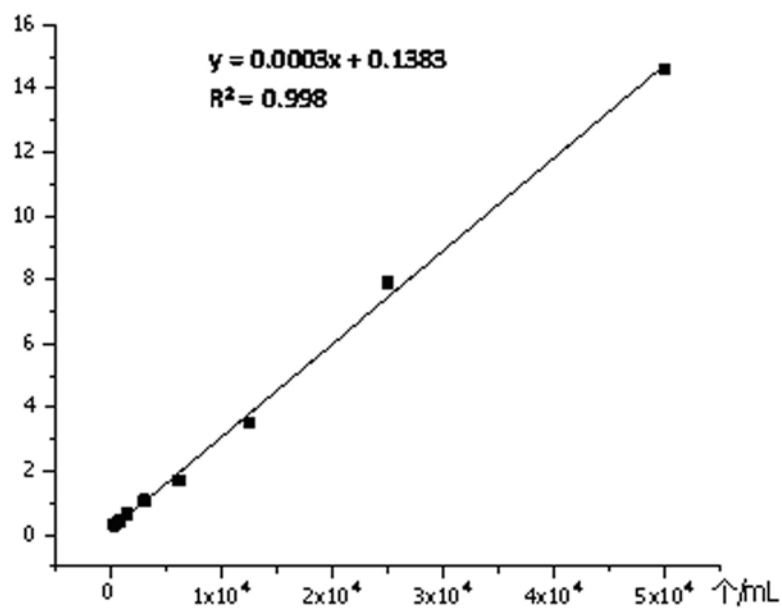


图6

专利名称(译)	一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109406778A</a>	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201811193686.5	申请日	2018-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	国家烟草质量监督检验中心 中国烟草总公司郑州烟草研究院		
申请(专利权)人(译)	国家烟草质量监督检验中心 中国烟草总公司郑州烟草研究院		
当前申请(专利权)人(译)	国家烟草质量监督检验中心 中国烟草总公司郑州烟草研究院		
[标]发明人	范子彦 胡利伟 邓惠敏 张艳玲 李中皓 牟文君 杨飞 郭建华 刘珊珊 薛超群 边照阳 戴华鑫 唐纲岭 宋纪真 王颖 尹启生		
发明人	范子彦 胡利伟 邓惠敏 张艳玲 李中皓 牟文君 杨飞 郭建华 刘珊珊 薛超群 边照阳 戴华鑫 唐纲岭 宋纪真 王颖 尹启生		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/533 G01N33/54346		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及烟草中青枯病菌的检测，具体是一种检测烟叶中青枯病菌的时间分辨荧光定量试纸条及其制备方法和应用。该试纸条构成依次包括样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板；其特征在于：所述的结合物释放垫上喷涂有时间分辨荧光微球标记的检测抗体；所述的硝酸纤维素膜上包被有捕获抗体的检测线和羊抗鼠二抗的质控线；本发明以时间分辨荧光微球标记检测抗体，采用免疫层析技术，实现烟叶中青枯病菌的快速免疫分析。本发明还提供一种应用上述试纸条检测烟叶中青枯病菌含量的方法。本发明的优点是灵敏度高，可准确定量，检测快速、操作方便，经济实用，能够实现对大批量的烟叶样品进行快速检测和现场检测。

