

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710008891.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月29日

[11] 公开号 CN 101294963A

[22] 申请日 2007.4.26

[21] 申请号 200710008891.5

[71] 申请人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市金山福建农林大学产业处

[72] 发明人 吴祖建 林志铿 谢联辉 谢荔岩

权利要求书2页 说明书5页

[54] 发明名称

检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明的检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法包括检测 TMV 病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法、检测 CMV 病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法和检测 PVY 病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法。其制备方法具有生产流程简单、成本低；产品的灵敏度高、重复性好；检测费用只需要 RT-PCR 的 1/5 ~ 1/10，比酶标试剂盒也要便宜得多；检测速度快，全过程只需 30 分钟，可以现场检测；结果准确、快速，操作简便，易于推广使用。

1、检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

- (1) 多克隆抗体：取纯化的烟草花叶病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度>95%；
- (2) 胶体金：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒溶液；
- (3) TMV免疫胶体金溶液：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7-8，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg步骤(1)的TMV多克隆抗体，混合均匀，得TMV免疫胶体金溶液；
- (4) 将上述的TMV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上，形成TMV胶体金；
- (5) 将TMV多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点在硝酸纤维膜的不同位置上；
- (6) 将滤样纸、胶体金、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，然后切割成试纸条；
- (7) 真空干燥：真空泵内的温度控制在15-25℃；真空干燥的时间控制在2-5小时；真空泵内的大气压不高于0.1毫巴。

2、根据权利要求1的方法制备的检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条。

3、检测CMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

- (1) 多克隆抗体：取纯化的黄瓜花叶病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度>95%；
- (2) 胶体金：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒溶液；
- (3) CMV免疫胶体金溶液：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7-8，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg步骤(1)的CMV多克隆抗体，混合均匀，得CMV免疫胶体金溶液；
- (4) 将上述的CMV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上，形成CMV胶体金；
- (5) 将CMV多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点在硝酸纤维膜的不同位置上；
- (6) 将滤样纸、胶体金、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不

干胶的胶板上，然后切割成试纸条；

(7) 真空干燥：真空泵内的温度控制在15—25℃；真空干燥的时间控制在2—5小时；真空泵内的大气压不高于0.1毫巴。

4、根据权利要求3的方法制备的检测CMV病毒的免疫胶体金试纸条。

5、检测PVY病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 多克隆抗体：取纯化的马铃薯Y病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度>95%；

(2) 胶体金：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒溶液；

(3) PVY免疫胶体金溶液：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7—8，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg步骤(1)的PVY多克隆抗体，混合均匀；得PVY免疫胶体金溶液；

(4) 将上述的PVY免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上，形成PVY胶体金；

(5) 将PVY多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点在硝酸纤维膜的不同位置上；

(6) 将滤样纸、胶体金、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，然后切割成试纸条；

(7) 真空干燥：真空泵内的温度控制在15—25℃；真空干燥的时间控制在2—5小时；真空泵内的大气压不高于0.1毫巴。

6、根据权利要求5的方法制备的检测PVY病毒的免疫胶体金试纸条。

## 检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法

**技术领域** 本发明涉及一种用免疫胶体金方法检测烟草花叶病毒 (TMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的试剂及其制备方法。

**背景技术** 烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV), 是危害烟草的一种重要的植物病毒, 其寄主范围很广. 至少可以侵染 30 个种的 199 种植物. 潜在的可以侵染的植物种类更广. 其发生遍及各烟区, 不仅造成烟草产量的损失, 而且使烟草品质严重下降, 特别是中上等烟比例和内在质量下降, 经济损失严重. 但现在还没有根治的药剂问世, 因此建立快速检测病毒的程序, 找出发病株, 进行人为毁灭或隔离, 已成为防止病毒病进一步传播、扩散的行之有效的措施之一. 黄瓜花叶病毒 (CMV) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) 也是对植物具有严重危害性的病毒。

目前对烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒 (CMV) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的检测方法主要包括生物学鉴定、酶联免疫吸附法、RT-PCR 法。

1、生物学鉴定是一种十分准确和可靠的方法, 但也存在如下缺点:  
(1) 不同病毒和不同的寄主, 需要采用一些特殊的接种措施才能成功, 技术要求难度较高; (2) 整个鉴定过程周期太长, 比如接种后症状表现的时间较长, 一般要 3 天以上, 有些寄主症状表现需要 20 至 24 天; (3) 接种后症状的表现还受外界环境因素影响; (4) 需要经过专业培训的技术人员操作, 操作人员要有丰富的相关经验, 还需了解生物鉴定的各种干扰因素, 了解和判断生物症状的正确与否, 才能获得可靠的分析结果; (5) 虽不需要贵重的仪器设备, 但需要相对独立和洁净的植物培养空间, 以避免不同病毒之间感染。

2、酶联免疫吸附法是以间接 ELISA 或夹心 ELISA 为检测原理, 以双抗夹心法为例, 其是以烟草花叶病毒抗体包被酶标板, 检测时将被检测样品加入酶标板, 反应后用再加入酶标二抗, 最后通过显色测 OD 值。存在的缺点是: (1) 需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用, 不利于在基层单位进行推广和使用; (2) 检测操作人员需要经过专业培训; (3) 操作过程相对比较复杂, 检测所需时间比较长, 全程需要 4h-8h; (4) 检测所需费用较高, 不能实现单个样品检测。

3、RT-PCR 法是以 PCR 技术为基础, 直接对病毒的核酸序列进行检

测。RT-PCR法以该病毒衣壳病毒基因作为引物模板，合成一由20个碱基对组成的引物。然后对病毒核苷酸进行扩增，以反应体系中是否产生这种扩增产物来判断样品中是否存在该病毒。所以这种方法灵敏度较前述方法均有很大程度的提高，灵敏度可达10fg。所需样品量少，适合于检测低含量样品，但同时RT-PCR法也存在如下缺点：（1）需要专门的仪器设备如PCR仪配合使用，不利于在基层单位进行推广和使用；（2）实验要求相对比较严格，检测操作人员需要经过专业培训；（3）操作过程相对比较复杂，全程需要3h-5h；（4）检测所需费用较高，不能实现单个样品检测。

**发明内容** 本发明的任务是解决上述存在原如检测时间长、不能现场检测、检测费用高等缺点，提供一种特异性强、敏感性高、简易快速、费用低廉、能现场检测的适用于烟草花叶病毒（TMV）、黄瓜花叶病毒（CMV）和马铃薯Y病毒（PVY）的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。

本发明的检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂的制备方法包括检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法、检测CMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法和检测PVY病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法。

1、检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

（1）多克隆抗体：取纯化的烟草花叶病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度>95%；

（2）胶体金：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒溶液；

（3）TMV免疫胶体金溶液：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7-8，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg步骤（1）的TMV多克隆抗体，混合均匀，得TMV免疫胶体金溶液；

（4）将上述的TMV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上，形成TMV胶体金；

（5）将TMV多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点在硝酸纤维膜的不同位置上；滴有TMV多克隆抗体的称为TMV多克隆抗体显示区，滴有羊抗兔多克隆抗体的位置称为质控线显示区；所述羊抗兔多克隆抗体可于商店购买；

（6）将滤样纸、胶体金、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，然后切割成试纸条；

（7）真空干燥：真空泵内的温度控制在15-25℃；真空干燥的时间控制在2-5小时；真空泵内的大气压不高于0.1毫巴（mba）；

(8) 铝箔密封包装，完成一个TMV病毒检测试剂盒。

2、检测CMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 多克隆抗体：取纯化的黄瓜花叶病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度>95%；

(2) 胶体金：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒溶液；

(3) CMV免疫胶体金溶液：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7-8，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg步骤(1)的CMV多克隆抗体，混合均匀，得CMV免疫胶体金溶液；

(4) 将上述的CMV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上，形成CMV胶体金；

(5) 将CMV多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点在硝酸纤维膜的不同位置上；滴有CMV多克隆抗体的称为CMV多克隆抗体显示区，滴有羊抗兔多克隆抗体的位置称为质控线显示区；所述羊抗兔多克隆抗体可于商店购买；

(6) 将滤样纸、胶体金、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，然后切割成试纸条；

(7) 真空干燥：真空泵内的温度控制在15-25℃；真空干燥的时间控制在2-5小时；真空泵内的大气压不高于0.1毫巴（mba）；

(8) 铝箔密封包装，完成一个CMV病毒检测试剂盒。

3、检测PVY病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) 多克隆抗体：取纯化的马铃薯Y病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度>95%；

(2) 胶体金：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒溶液；

(3) PVY免疫胶体金溶液：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7-8，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg步骤(1)的PVY多克隆抗体，混合均匀，得PVY免疫胶体金溶液；

(4) 将上述的PVY免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上，形成PVY胶体金；

(5) 将PVY多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点在硝酸纤维膜的不同位置上；滴有PVY多克隆抗体的称为PVY多克隆抗体显示区，滴有羊抗兔多克隆抗体的位置称为质控线显示区；所述羊抗兔多克隆抗体可于商店购买；

(6) 将滤样纸、胶体金、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，然后切割成试纸条；

(7) 真空干燥：真空泵内的温度控制在15—25℃；真空干燥的时间控制在2—5小时；真空泵内的大气压不高于0.1毫巴（mba）；

(8) 铝箔密封包装，完成一个PVY病毒检测试剂盒。

本发明的积极效果在于：

(1) 低价格：产品生产流程简单，生产成本低，检测的费用只需要RT-PCR的1/5-1/10，比酶标试剂盒也要便宜得多（RT-PCR通常检测一个样品需要200元-300元，酶标试剂盒通常一个样品检测也需要50元-80元，而本发明制备的免疫胶体金试剂盒通常只需15元-50元）；

(2) 检测速度快：全过程只需30分钟，可以实现自我检测；

(3) 可以现场检测；

(4) 高质量：本方法制备而成的试剂盒特异性好、灵敏度高、重复性好；

(5) 操作简便：本方法制备而成的试剂盒以胶体金为指示标记，快速定性，结果准确、快速，操作简便，无需冲洗过程和标准对照，可分批或单个样品及时检测；

(6) 易于推广使用：操作人员无需专业培训，按说明书即可完成操作。

(7) 即可进行单个病毒的检测，也可同时进行多个病毒的检测，缩短了检测时间和步骤，也节约了材料。

具体实施方案 为了充分公开本发明的检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法，以下结合结合例加以说明。

实施例：检测 TMV 病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

1) 多克隆抗体：取纯化的烟草花叶病毒注射兔子，采血，取血清，以亲和层析法提纯多克隆抗体；

2) 胶体金制备：将100ml 0.01%氯化金用2-3ml的1%柠檬酸三钠还原成15nm-40nm的颗粒；

3) 多克隆抗体胶体金标记物：用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 将胶体金溶液的pH值调至7.8左右，将胶体金溶液与多克隆抗体按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg多克隆抗体的比例混合均匀，使胶体金与抗体形成稳定的胶体

金复合物，再通过离心、弃上清、清洗、再浓缩后形成胶体金标记物，冷藏备用；

4) 羊抗兔IgG:用烟草花叶病毒注射兔子,提取抗血清免疫山羊,纯化后得羊抗兔IgG; 或则可以找商家购买;

5) 用Biodot点膜仪将多克隆抗体胶体金标记物喷涂在胶体金结合垫上,用Biodot点膜仪将抗TMV抗体和羊抗兔IgG喷涂在硝酸纤维素膜的不同位置上,在37℃干燥箱烘干;也可以采用低温真空干燥后备用;

6) 将硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫、不干胶等依次粘在PVC背衬上;

7) 用 Biodot 切割机将粘好的 PVC 材料切成条状,即为检测烟草花叶病毒的免疫胶体金试纸条。

如果将制成的试剂条装至一定大小的塑料模具内,即制作成检测烟草花叶病毒的免疫胶体金试剂板(盒)。

使用方法:

1) 待测样品收集及处理:称取样品叶片 0.5 克放入研钵中,剪开样品研磨袋,将里面样品缓冲液倒入研钵中研磨,研磨完毕后取样品溶液 10000rpm 离心 5 分钟,取上清,即待检测样品溶液备用。

2) 检测: a、测试前将免疫胶体金试纸条放在室温下恢复至室温;

b、在免疫胶体金试剂条的多克隆抗体显示区滴加 3-5 滴待检测样品溶液;

c、反应 5 分钟~30 分钟后判定结果。

3) 结果判读:如果样品中存在所要检测的烟草花叶病毒并且病毒含量超过免疫胶体金试剂条的检测下限,则免疫胶体金试剂条的多克隆抗体显示区为红色。

检测CMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法和检测PVY病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法与检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法只需改变病毒的种类,其他方法类同,使用方法亦可参考检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条的使用方法。

专利名称(译)	检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101294963A</a>	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200710008891.5	申请日	2007-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
[标]发明人	吴祖建 林志铿 谢联辉 谢荔岩		
发明人	吴祖建 林志铿 谢联辉 谢荔岩		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/532 G01N33/52		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明的检测烟草病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法包括检测TMV病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法、检测CMV病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法和检测PVY病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法。其制备方法具有生产流程简单、成本低；产品的灵敏度高、重复性好；检测费用只需要RT - PCR的1/5 ~ 1/10，比酶标试剂盒也要便宜得多；检测速度快，全过程只需30分钟，可以现场检测；结果准确、快速，操作简便，易于推广使用。