

[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 200710008890.0

[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 101294962A

[22] 申请日 2007.4.26

[21] 申请号 200710008890.0

[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
罗金水

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

检测兰花病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明的检测兰花病毒系列免疫胶体金试纸条及其制备方法，包括检测兰花 CyMV 病毒和 ORSV 病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法。检测兰花病毒系列免疫胶体金试纸条具有结果准确、快速定性、操作简便、成本低等优点，无需冲洗过程和标准对照，可分批或单个样品及时检测，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。

1、检测兰花CyMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) CyMV多克隆抗体：取纯化的CyMV病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度不小于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的胶体金溶液；

(3) CyMV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7-8.5，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg CyMV多克隆抗体，混合均匀，得CyMV免疫胶体金溶液；

(4) 将所述的CyMV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上；形成CyMV免疫胶体金垫；

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

(6) 分别将样品垫、CyMV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，再在两端粘上不干胶和指示线，然后切割成试纸条；

(7) 将所述试纸条真空干燥，真空泵内的温度为15-25℃、干燥时间为2-5小时；真空泵内的大气压不高于0.1 mba；

(8) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装即可。

2、利用权利要求1的方法制备的检测兰花CyMV病毒的免疫胶体金试纸条。

3、检测兰花ORSV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) ORSV多克隆抗体：取纯化的ORSV病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度不小于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的胶体金溶液；

(3) ORSV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—8.5，按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg ORSV多克隆抗体，混合均匀，得ORSV免疫胶体金溶液；

(4) 将上述的ORSV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上；形成ORSV免疫胶体金垫；

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

(5) 将ORSV多克隆抗体溶液和羊抗兔多克隆抗体，分别点到硝酸纤维素膜上的设置有ORSV多克隆抗体显示区和质控线显示区；

(6) 分别将样品垫、ORSV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，再在两端粘上不干胶和指示线，然后切割成试纸条；

(7) 将所述试纸条真空干燥，真空泵内的温度为15—25℃；干燥时间为2—5小时；真空泵内的大气压不高于0.1 mba；

(8) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装即可。

4、利用权利要求3的方法制备的检测兰花ORSV病毒的免疫胶体金试纸。

检测兰花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兰花花叶病毒(*Cymbium mosaic virus*, CyMV)和齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)的试剂及其制备方法。

背景技术 兰花是世界著名花卉。全球有兰花原生种 3-3.5 万个, 800 个属, 6-8 万个品种, 许多兰科植物都有较高的园艺和观赏价值, 素有“绿色股票”之称, 我国大陆近年来在一些省市开始较大面积栽培兰花, 供出口创汇。我国台湾也种植多种兰花, 其技术和规模均处于国际领先水平。

但在生产过程中, 兰花常常受到病毒病的危害, 可造成兰花植株叶斑、坏死以及花朵变色、畸形等症状, 严重影响其品质, 使其商品价值大大降低, 严重影响兰花产业的发展。这一情况, 早已起了世界各国的注意。国外许多学者对兰花病毒病进行了大量研究, 迄今已报道从兰花上分离到至少 25 种病毒, 其中分布最广、危害最重的为建兰花叶病毒(*Cymbium mosaic virus*, CyMV)和齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)。早在 1997 年, 我国动植物检疫机关就将兰花病毒病列为有潜在危险性的有害生物。但兰花病毒至今尚未有根治的药剂问世, 因此兰花病毒病也被称为“兰花癌症”。

长期的生产实践证明, 兰花脱毒种苗的生产是解决兰花生产中病毒病害危害严重的有效手段之一。近年来, 随着组织培养技术的发展, 我国兰花脱毒苗的生产单位逐渐增多, 脱毒种苗种植面积不断扩大, 部分兰花产品也已出口国外。但是, 其中的大多数种苗生产单位并不具备病毒检测条件, 以至市场上出售的的种苗质量参差不齐。由于进口国对兰花的检疫要求十分严格, 而我国口岸检验检疫部门缺乏有效的检测方法, 常出现退货现象, 给企业和国家造成巨大损失。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。由此, 快速、准确、特异、灵敏的病毒检测手段是提高花卉质量的当务之急和有力保障。

目前对兰花病毒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或则双抗夹心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 本发明的目的是，提供一种适用于兰花病毒CyMV和ORSV的免疫胶体金试剂及其制备方法，以解决现有技术存在的如检测时间长、不能现场检测、检测费用高等缺点。

本发明的检测兰花病毒系列免疫胶体金试剂的制备方法包括检测CyMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法和检测ORSV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法。

1、检测兰花CyMV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) CyMV多克隆抗体：取纯化的CyMV病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度不小于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的胶体金溶液；

(3) CyMV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7-8.5，将胶体金溶液按100ml胶体金溶液中加入0.5mg-2mg CyMV多克隆抗体，混合均匀，得CyMV免疫胶体金溶液；

(4) 将所述的CyMV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上；形成CyMV免疫胶体金垫；

(5) 将CyMV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CyMV多克隆抗体的称为CyMV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) 分别将样品垫、CyMV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，再在两端粘上不干胶和指示线，然后切割成试纸条；

(7) 将所述试纸条真空干燥，真空泵内的温度为15-25℃、干燥时间为2-5小时；真空泵内的大气压不高于0.1 mba；

(8) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装即可。

2、检测兰花ORSV病毒的免疫胶体金试纸条的制备方法，包括以下步骤：

(1) ORSV多克隆抗体：取纯化的ORSV病毒注射兔子，采血，取血清，提纯抗体IgG，纯度不小于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的胶体金溶液；

(3) ORSV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—8.5，按100ml胶体金溶液中加入0.5mg—2mg ORSV多克隆抗体，混合均匀，得ORSV免疫胶体金溶液；

(4) 将上述的ORSV免疫胶体金溶液点到玻璃纤维上；形成ORSV免疫胶体金垫；

(5) 将ORSV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ORSV多克隆抗体的称为ORSV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) 分别将样品垫、ORSV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张不干胶的胶板上，再在两端粘上不干胶和指示线，然后切割成试纸条；

(7) 将所述试纸条真空干燥，真空泵内的温度为15—25℃；干燥时间为2—5小时；真空泵内的大气压不高于0.1 mba；

(8) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装即可。

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兰花病毒系列免疫胶体金试纸条及其制备方法，以下结合实施例加以说明。

实施例 1：利用 CyMV 免疫胶体金试纸条检测兰花 CyMV 病毒的方法，包括以下步骤：

1) 待测样品收集及处理：称取样品叶片 0.5 克放入研钵中，将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 CyMV 免疫胶体金试纸条恢复至室温；

b、在 CyMV 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：

若 CyMV 免疫胶体金试剂条的 CyMV 多克隆抗体显示区不出现红色条带，则样品中没有要检测的兰花 CyMV 病毒或样品中含有病毒的量小于 CyMV 免疫胶体金试纸条的检测下限；若 CyMV 免疫胶体金试剂条的 CyMV 多克隆抗体显示区出现红色条带，则样品中存在要检测的兰花 CyMV 病毒并且病毒含量超过 CyMV 免疫胶体金试纸条的检测下限。

实施例 2：利用 ORSV 免疫胶体金试纸条检测兰花 ORSV 病毒的方法

利用 ORSV 免疫胶体金试纸条检测兰花 ORSV 病毒的方法：将实施例 1 中的 CyMV 免疫胶体金试纸条改为 ORSV 免疫胶体金试纸条，其余检测方法与实施例 1 的检测方法一样。

专利名称(译)	检测兰花病毒系列免疫胶体金试剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN101294962A	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200710008890.0	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 罗金水		
发明人	吴祖建 林志铿 谢联辉 谢荔岩 罗金水		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/532 G01N33/52		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的检测兰花病毒系列免疫胶体金试纸条及其制备方法，包括检测兰花CyMV病毒和ORSV病毒的免疫胶体金试纸条及其制备方法。检测兰花病毒系列免疫胶体金试纸条具有结果准确、快速定性、操作简便、成本低等优点，无需冲洗过程和标准对照，可分批或单个样品及时检测，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。