



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101915835 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 15

(21) 申请号 201010233082. 6

C07K 19/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 22

C07K 16/10 (2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所

地址 730000 甘肃省兰州市东岗西路 320 号

(72) 发明人 童勋章 谢忠奎 王亚军 张玉宝
安丽萍 郭志鸿 张亚娟

(74) 专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心
62100

代理人 鲜林

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

C12N 15/40 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

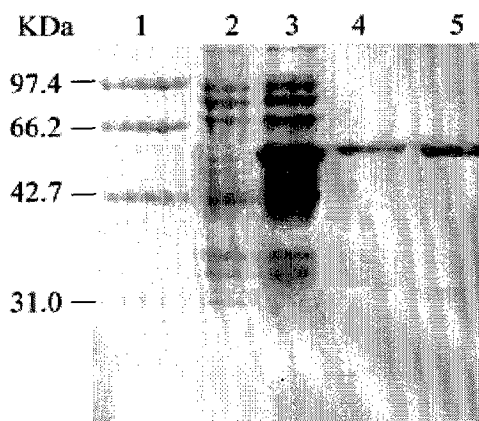
权利要求书 1 页 说明书 8 页 序列表 7 页
附图 1 页

(54) 发明名称

百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒及制备方法

(57) 摘要

一种百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒及制备方法,检测试剂盒包括:96 微孔 ELISA 板,酶标抗体,缓冲液,显色液,终止液,其中 96 孔板上包被有 LMoV 特异的多克隆抗体,酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的 LMoV 特异多克隆抗体。本发明采用的免疫原为基因工程表达的 LMoV 外壳蛋白和细胞质内含体蛋白的融合重组抗原。由此免疫产生的抗体建立的双抗夹心酶联免疫吸附法用于检测百合叶片标本,与其他检测方法相比,检测灵敏度高,可以检出 ng 级别的病毒抗原,并且准确性强,试剂盒的制备方法简便快捷,经济实用。



1. 一种百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒,包括辅助试剂:底物反应液、洗涤缓冲液、提取缓冲液、酶缓冲液、显色剂及反应终止液,其特征在于还包括 96 孔多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶标记多克隆抗体、LMoV 重组融合蛋白 PI200 标准品、质控品。

2. 一种如权利要求 1 所述检测试剂盒的制备方法,包括标准品的制备、多克隆抗体包被板的制备、酶标多克隆抗体的制备、质控品的制备以及辅助试剂的制备,其特征在于所述 LMoV 重组融合蛋白 PI200 标准品的制备,以感染 LMoV 的百合叶片的总 RNA 为模板,使用两对引物 CP-F/CP-R, CI200-F/CI200-R 分别扩增 LMoV 的 CP 基因及 CI200 (CI 基因 C 端 600bp) 片段,中间以 (Gly)₅ 作为柔性连接,共同克隆入 pET-28a 载体得到重组质粒 pET-28a-CP-CI200,表达得到大小 56.5kDa 的融合蛋白 PI200。

3. 如权利要求 2 所述检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述融合蛋白 PI200 的氨基酸序列为:

MGANETLNAGASSSTQASRSTRPEAAIDVAPQQSSEARVRDRDVDAGTVGTYQIPRLKALATKINVPKVKGR
MIVNTGHLVNYNPDQTDISNTRSTQKQFETWYNAVKDEYGLNDESMALAMNGLMVWCIENGTSNPVNGVWLMMDGDQ
QVEFPLRPILHAKPTLRQIMAHFSNLAEAYIEKQNKLEKPYMPRYGLQRNLTDNLRFAFDYFYEVTSTRPARAKEA
HFQMKTAALRGKQSKLFGLDGKVNTQDEDTERHTADDVNKNMHSLLGISMGGGGGASTMHPEVHRILTPYKLRDSEI
ILNKVAIPNKGLMQWPTAKEAYQGFKMNIPDTRVRLPFHSLDIPERLHERMWQIVETHKGDAGFGRITTASACKIAY
TLKTDAASIQRTHILDKLIENELKKQEYFRNITSASCSSSSFSLTITNAIRARHIKDHTVENVSVLQAAKAQILE
FKNVTFDLDHVNRMTEYGALECVQFQGNSSSVDKLAAALEHHHHHHH。

4. 如权利要求 2 所述检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述的重组蛋白 PI200 扩增外壳蛋白 CP 基因的引物设计为:

上游引物:5'-CCATGGGCGCAAATGAGACACTCAATGC-3'

NcoI 下游引物:5'-GAATTCCCCGCTAGCTCCACCTCCTCCACCCATAGAAATTC
CAAGTAAGGAGT-3'

EcoRI NheI (Gly)₅-Linker

5. 如权利要求 2 所述检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述的重组蛋白 PI200 扩增细胞质内含体 CI 基因 C 端 600bp 的引物设计为:

上游引物:5'-GCTAGCACTATGCACCCAGAGGTACA-3'

Nhe I

下游引物:5'-GAATTCCCCTGAAATTGGACACACTCC

EcoRI

6. 如权利要求 2 所述检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述多克隆抗体包被板,用纯化的融合重组蛋白 PI200 免疫获得的多克隆抗体包被酶标板制作。

7. 如权利要求 2 所述检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述多克隆酶标抗体,是用纯化的融合重组蛋白 PI200 免疫兔获得的多克隆抗体标记辣根过氧化物酶制作的。

百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于植物病毒检测的生物技术产品,具体涉及一种可用于对百合斑驳病毒病进行快速灵敏检测的百合斑驳病毒 (LMoV) 双抗体夹心酶联免疫 (DAS-ELISA) 检测试剂盒,本发明还涉及该试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 百合 (*Lilium* spp.) 传统上是药用和食用植物,现已成为国际上重要切花观赏花卉之一。荷兰是世界最大的百合种球生产国,2005 年荷兰百合种球生产面积达 3800hm², 约占世界切花百合生产总面积的 72%。切花百合在我国花卉产业产值中占第四位,同时百合作为食品和药材,也是一种重要的经济作物。随着百合种植面积日益扩大,高密度种植和长期无性繁殖使病毒不断积累,病毒病对百合的危害日趋严重,影响了百合的产量和品质,给百合种植业造成巨大的经济损失。而百合的抗病毒品种极少,加上引种频繁,鲜花进出口频率高,加速了病毒的传播。据报道,现已知百合病毒病原有 14 种,类菌原体 1 种,其中为害严重的病毒有 4 种,即百合无症状病毒 (*Lily symptomless virus*, LSV)、黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、百合斑驳病毒 (*Lily mottle virus*, LMoV) 和百合病毒 X (*Lily virus X*, LVX), 其他各种病毒均为局部地区发生,百合病毒常复合侵染,不同病毒在百合上表现相似症状,同种病毒在不同条件下的症状有很大变异。

[0003] LMoV 可在世界范围内广泛分布,特别是在适合其寄主生长的所有温带地区及蚜虫媒介丰富的地区尤为普遍。侵染百合科植物常造成严重的叶片斑驳症状、植株形态异常和球茎减小。百合斑驳病毒属于马铃薯 Y 病毒科、马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*)。病毒粒子呈弯曲线状且呈螺旋对称,大小 (650 ~ 900) nm × (11 ~ 15) nm。病毒基因组为单分子正链 RNA, 约 9.4 kb, 5' 端缺少帽子结构,连接一个 VPg 蛋白,3' 端带有 Poly(A) 尾。基因组包含一个长 ORF, 编码相对分子质量约 340 kDa 的多聚蛋白,并通过病毒编码的蛋白酶,即 P1、HC-Pro 和 NIa 切割形成十个不同大小的病毒蛋白。其中 CP 是外壳蛋白,分子量为 30 kDa, 它一方面负责组装病毒粒子包裹病毒 RNA, 另一方面参与蚜虫介导的病毒传播,而且靠近外壳蛋白的 N 端的氨基酸序列决定蚜虫的传播能力;CI 是细胞质内含体蛋白,在病理组织细胞质内形成电镜下特征明显的风轮状结构,可能与病毒的胞间运动有关。

[0004] 要减少病毒病在百合种植业中的损失,最便捷的方法是采用脱毒培养。国内现在大量采用脱毒培养技术,但依然存在不少问题,其中之一就是缺少方便快捷、准确可靠的病毒检测方法。

[0005] 目前国内外对百合斑驳病毒的主要检测手段有指示植物检测、电镜检测、分子生物学检测和免疫学检测等。其中指示植物检测为较为传统的检测方法,测试条件受外界环境变化影响会出现不同的检测结果,检测周期也很长,操作十分复杂,检测结果不准确。

[0006] 电镜检测灵敏度不高,需要大量病毒样本,检测过程复杂,并且检测结果受主观影响较大。由于电子显微镜代价昂贵,对大多数检测来说不具备条件。

[0007] 分子生物学检测方法操作较为简单,通过病毒特异性引物进行 RT-PCR 检测,所需

检测时间较短。但由于该病毒是单链正链 RNA 病毒,制备用于检测的样本模板较为复杂,对检测实验条件要求很高,且需要 PCR 仪等贵重仪器,检测试剂昂贵。需要有相当经验的操作者才能获得较为可靠的结果。

[0008] 免疫学检测方法基于病原的一种或多种蛋白质与动物针对抗原产生的抗体间的相互作用。在植物病毒检测中其优势在于:①反应特异;②反应迅速;③一定范围内可量化;④灵敏;⑤抗血清可长期储存;⑥适合批量检测、操作难度低、检测费用低。因此适合作为大规模商业检测方法推广。

[0009] 目前国内外尚无商品化的 LMoV 免疫检测试剂盒,著名植物病毒试剂盒检测公司 Agdia 也仅有马铃薯 Y 病毒属通用免疫试纸条实现了商品化,而没有专一检测 LMoV 的试剂盒,另外国外植物病毒诊断试剂价格昂贵,如 Agdia 公司试剂盒多在人民币 1500 ~ 4000 元之间,很难满足国内花卉及食用百合的脱毒检测需求。因此建立灵敏、稳定、高通量和易操作的百合斑驳病毒检测方法及试剂盒,是生产百合脱毒株的基础,是提高花卉百合品质和食用药用百合产量和质量的前提。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是提供一种准确高效、经济简便、易于推广使用的双抗体夹心酶联免疫检测方法及试剂盒,以及该试剂盒的制备方法。

[0011] 本发明的技术问题通过下述技术方案解决:

[0012] 构建一种 LMoV 双抗夹心法检测试剂盒,由 96 孔多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶标记多克隆抗体、LMoV 重组融合蛋白 PI200 标准品、质控品及底物反应液等辅助试剂组成。

[0013] 本发明试剂盒的制作方法包括标准品的制备、多克隆抗体包被板的制备、酶标多克隆抗体的制备、质控品的制备以及辅助试剂的制备。

[0014] 本发明中 LMoV 重组融合蛋白 PI200 标准品的制备,以感染 LMoV 的百合叶片的总 RNA 为模板,使用两对引物 CP-F/CP-R, CI200-F/CI200-R 分别扩增 LMoV 的 CP 基因及 CI200(CI 基因 C 端 600bp) 片段。通过酶切共同克隆入 pET-28a 载体,并且中间以 (Gly)₅ 作为柔性连接来构建表达质粒。重组质粒转化入大肠杆菌工程菌 BL21, 37℃ 培养, IPTG 诱导表达,镍柱亲和层析纯化得到大小 56.5kDa 的融合蛋白 PI200。

[0015] 所述融合蛋白 PI200 的氨基酸序列为:

[0016] MGANETLNAGASSSTQASRSTRPEAAIDVAPQQSSEARVRDRDAGTVGTYQIPRLKALATKINVPK
VKGRMIVNTGHLVNYNPDQTDISNTRSTQKQFETWYNAVKDEYGLNDESMALAMNGLMVWCIENGTSPTNVNGVWLM
MDGDQQVEFPLRPILHAKPTLRQIMAHF SNLAEAYIEKQNKLEKPYMPRYGLQRNLTDNFNARFAFDYEVTSRTP
ARAKEAHFQMKTAALRGKQSKLFGLDGKVNTQDEDTERHTADDVNKNMHSLLGISMGGGGGASTMHPEVHRILTPYK
LRDSEIILNKVAIPNKGLMQWPTAKEYAYQGFKMNIPDTRVRLPFHSLDIPERLHERMWQIVETHKGDAGFGRITTAS
ACKIAYTLTKTDAASIQRTHILDKLIENELKKQEYFRNITSASCSSSSFSLTITITNAIRARHIKDHTVENVSVLQAA
KAQILEFKNVTFDLHDVNRMTHEYGALECVQFQGNS S SVDKLAAALEHHHHHHH。

[0017] 所述重组蛋白 PI200 扩增外壳蛋白 CP 基因的引物设计为:

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

[0019] Nco I

[0020] 下游引物：

[0021] 5' -GAATTCCCCGCTAGCTCCACCTCCTCCACCCCATAGAAATTCCAAGT

[0022] AAGGAGT-3'

[0023] EcoR I Nhe I (Gly)₅-Linker。

[0024] 所述重组蛋白 PI200 扩增细胞质内含体 CI 基因 C 端 600bp 的引物设计为：

[0025] 上游引物：5' -GCTAGCACTATGCACCCAGAGGTACA-3'

[0026] eI

[0027] 下游引物：5' -GAATTCCCCTGAAATTGGACACACTCC

[0028] EcoRI

[0029] 本发明中的多克隆抗体包被板，可用纯化的融合重组蛋白 PI200 免疫兔获得的多克隆包被酶标板制作。本发明试剂盒采用的酶标板为一种进口 96 孔酶标板 (BIO BASIC 公司)。制备步骤如下：

[0030] 1) 用 1mg/mL 的 PI200 融合蛋白作为免疫原免疫新西兰大白兔。初次免疫中，将蛋白抗原与弗氏完全佐剂等体积充分混匀，进行皮下多点注射。两周后进行加强免疫，将蛋白抗原与弗氏不完全佐剂等体积充分混匀，进行皮下多点注射。以后每两周加强免疫一次，在第 4 次加强免疫后的 5 ~ 7 天颈动脉采血，加入质量百分比浓度 0.02% 的叠氮钠，-20℃ 保存。所得抗血清依次通过 20%、50%、33% 三个饱和度的硫酸铵沉淀粗提后，透析至 pH7.8 的磷酸缓冲液，然后使用 DE52 阴离子交换柱层析法纯化。

[0031] 2) 将纯化的兔抗多克隆抗体用 pH9.6、50mM 碳酸盐缓冲液稀释为终浓度 1 μg/mL，加入酶标板各孔，每孔 100 μL，37℃ 孵育 2 小时。用洗涤缓冲液 PBST 冲洗酶标板，再用封闭液 (含 2% 明胶、0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液) 封闭。甩干后晾干，即获得多克隆抗体包被板。

[0032] 本发明提供了多克隆抗体的辣根过氧化物酶标记方法。辣根过氧化物酶 (HRP) 与多抗的标记比例为摩尔分子比 1 : 1。标记的步骤如下：

[0033] 1) 取 HRP 溶于蒸馏水，加入新配制的 NaIO₄ 水溶液，混匀避光置 4℃ 30min；

[0034] 2) 加入乙二醇水溶液 0.5mL，室温避光放置 30min；

[0035] 3) 加入含纯化抗体的水溶液，混匀并装入透析袋，对 0.05M pH 9.6 碳酸盐缓冲液透析 6h；

[0036] 4) 加入 NaBH₄ 水溶液，混匀，避光置 4℃ 2h；

[0037] 5) 在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀，4℃ 30min，离心，去上清，沉淀以少许 pH7.4、0.02M PBS 液溶解，装入透析袋，以同样液体在 4℃ 透析除盐过夜；

[0038] 6) 离心留上清，即酶 - 抗体结合物，加入等体积优质甘油，分装低温保存。

[0039] 本发明试剂盒中的辅助试剂包括洗涤缓冲液、提取缓冲液、酶缓冲液、显色剂、反应终止液。一种配制辅助试剂的方法如下：

[0040] 1) 提取缓冲液为含 0.87% 硫酸钾、0.5% 聚乙烯吡咯烷酮、0.05% 吐温 -20、0.1% 巯基乙醇、0.58% 氯化钠、0.2% 牛血清白蛋白、0.2% 叠氮钠的 pH7.4 的 Tris 盐酸缓冲液；

[0041] 2) 酶缓冲液为用蒸馏水配制的其内含 1% 聚乙二醇 4000、0.5% 牛血清白蛋白、0.1% 硫柳汞钠、0.5% 吐温 -20 的 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液；

[0042] 3) 洗涤缓冲液为含 0.5% 吐温 -20、pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBST)；

[0043] 4) 显色剂 A 为含 1.46% 磷酸氢二钠, 0.93% 柠檬酸, 0.045% 过氧化氢的水溶液。

[0044] 5) 显色剂 B 为含 0.03% 四甲基联苯胺, 0.096% 柠檬酸, 0.019% 乙二胺四乙酸钠盐, 2% DMSO, 4% 甘油的水溶液。

[0045] 6) 终止液为蒸馏水配制的 2M H_2SO_4 ;

[0046] 本发明试剂盒中的阳性质控品的制备, 先选择百合斑驳病毒 PCR 阳性的百合叶片, 用提取缓冲液研磨后离心留取上清即为阳性质控品。阴性质控品的制备, 先选择百合斑驳病毒 PCR 阴性的百合叶片, 用提取缓冲液研磨后离心留取上清即为阴性质控品。

[0047] 本发明提供了双抗体夹心酶联免疫吸附法的检测步骤: 用提取缓冲液研磨待测百合叶片样品, 离心留取上清, 以 100 μL /孔加入多克隆抗体包被板中, 37°C 温育 30min; 然后与浓度为 1 $\mu g/mL$ 的酶标抗体于 37°C 温育 2h; 显色液 A、B 等体积混匀后, 以 100 μL /孔加入, 37°C 温育 15min; 加入终止液 50 μL /孔, 置酶标仪上 450nm 处测量各孔 OD 值, 根据待测样本 (P) 及阴性质控品 (N) 的 A_{450nm} 值, 如果比值 $P/N \geq 2.1$, 则判定为阳性。

[0048] 采用上述方案后, 本发明组成了包含盒体、酶标板、盒内各种用液的双抗体夹心法酶联免疫检测试剂盒。应用本试剂盒进行病毒检测时采用双抗体夹心酶联免疫吸附方法, 能同时检测到样本中百合斑驳病毒的外壳蛋白和细胞质内含体蛋白。应用在诊断百合属 (*Lilium Spp.*) 植物是否感染百合斑驳病毒的分析中, 待测样本提取自叶片组织。

[0049] 采用这种基于免疫学方法的试剂盒进行检测具有如下优点:

[0050] ①试剂盒使用基因工程表达的高纯度的重组抗原作为免疫原, 能同时检测样本中纳克级水平的百合斑驳病毒抗原, 灵敏度高, 特异性好。

[0051] ②操作简单, 普通工作人员经过简单培训就可以完成。

[0052] ③经济实用, 对仪器要求较低, 仅需要普通恒温水浴箱、酶标仪等。如只需定性检测, 则可直接通过目测获得检测结果, 连酶标仪都不需要。

[0053] 正是基于以上优点, 本发明适于作为大规模商业检测方法推广, 具有良好的市场前景。

附图说明

[0054] 图 1 PI200 蛋白的表达鉴定与纯化电泳图;

[0055] 图 2 LMoV 病毒抗原检测试剂盒检测 PI200 的标准曲线图。

[0056] 图中: 1, 蛋白 Marker; 2, 转化 pET-28a 的 BL21 菌全菌蛋白; 3, 转化 PI200 表达质粒的 BL21 菌全菌蛋白; 4 ~ 5, 纯化的 PI200 蛋白。

[0057] 横坐标为不同稀释度的标准品 PI200 蛋白, 纵坐标为相应的 A_{450nm} 值

具体实施方式

[0058] 下面结合实施例对本发明进行进一步详细说明:

[0059] 实施例 1

[0060] 1、LMoV 重组融合蛋白 PI200 的制备方法:

[0061] 1) Trizol 法提取百合病株叶片总 RNA:

[0062] A. 称取百合病株叶片 40mg, 放入研钵中, 在液氮中迅速研磨为粉末。待液氮挥发后加入 Trizol (Invitrogen 公司) 1mL, 并移入 1.5mL 离心管中, 室温静置 5 分钟。

[0063] B. 加入 200 μ L 氯仿, 上下颠倒混匀数次, 室温放置 2 ~ 3 分钟。4℃, 12,000g 离心 10min。

[0064] C. 取上层水相, 加入 500 μ L 异丙醇, 混匀于 -20℃ 静置 20min, 4℃, 12,000g 离心 10min。

[0065] D. 弃去上清, 沉淀用 1mL 75% 乙醇洗涤, 4℃, 7,500g 离心 5min。

[0066] E. 风干沉淀, 用 20 ~ 40 μ L RNase-Free 水溶解。-70℃ 保存备用。

[0067] 2) 引物设计:

[0068] 根据已报道的 LMoV 序列 (Genbank 序列号 AJ564636), 利用 Oligo 软件设计 2 对特异性引物分别扩增 CP 与 CI200 (即 CI 基因 C 端 600bp) 序列。为便于通过酶切构建 CP 与 CI200 融合的重组质粒, CP 的 5' 端引入 NcoI 位点, 3' 端引入 (Gly)₅-Linker、NheI、EcoRI 位点。CI200 的 5' 端引入 NheI, 3' 端引入 EcoRI 位点。引物序列见下表:

[0069]

引物名称	引物序列	PCR 产物 (bp)
CP-F	CCATGGGCGCAAATGAGACACTCAATGC	
CP-R	GAATTCCCGCTAGCTCCACCTCCTCCAC CCATAGAAATTCCAAGTAAGGAGT	822
CI200-F	GCTAGCACTATGCACCCAGAGGTACA	
CI200-R	GAATTCCCCTGAAATTGGACACACTCC	600

[0070] 3) RT-PCR 扩增:

[0071] 以提取总 RNA 为模版, 参照 Promega 通用 RibocloneR M-MLV (H-) cDNA 合成系统说明书合成 cDNA。再以 cDNA 为模板, rTaq DNA 聚合酶分别扩增 CP 基因和 CI200 序列。扩增的循环参数: 94℃ 预变性 5min; 然后 94℃ 变性 30sec、53.5℃ 复性 30sec、72℃ 延伸 55sec, 22 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖胶电泳检测, 并用胶回收试剂盒 (U-gene 公司) 回收纯化。

[0072] 4) 重组质粒构建:

[0073] 回收纯化的 PCR 产物 CP 和 CI200 分别连接 pUCm-T, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经酶切鉴定获得重组质粒 pUCm-T-CP 和 pUCm-T-CI200。用 NcoI 和 EcoR I 酶切 pUCm-T-CP 并回收 CP 片段, 连入相同酶切处理的 pET-28a(+) 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 酶切鉴定获得重组质粒 pET-28a-CP。用 NheI 和 EcoR I 从 pUCm-T-CI200 切下 CI200 片段, 将其连接到重组质粒 pET-28a-CP 的相应位点, 最终构建了 pET-28a-CP-CI200 重组质粒。

[0074] 5) 重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 37℃ 摇床培养至 OD_{1.2}, 用 1mM IPTG 于 20℃ 诱导 16 小时。然后离心收集菌体, 超声破碎后, 离心收集沉淀。

[0075] 6) 沉淀用含 5mM 咪唑、8M 尿素的 PBS 重悬, 离心留上清为粗纯样品, 按 GE Healthcare 公司的 HisTrap 柱操作说明书进行纯化。优化后的条件为:

[0076] A. 1mL 纯化柱用 20mL 柱平衡液 (含 5mM 咪唑、8M 尿素的 PBS) 平衡, 控制流速 1mL/

S ;

[0077] B. 粗纯样品进样 6mL, 控制进样流速 0.5mL/s ;

[0078] C. 用 20mL 含 10mM 咪唑、8M 尿素的 PBS 洗脱液洗脱, 控制流速 1mL/s ;

[0079] D. 用含 300mM 咪唑、8M 尿素的 PBS 洗脱, 控制流速 1mL/s, 收集洗脱峰 2 ~ 4mL。

[0080] 7) 将收集到的洗脱峰装入透析袋中, 作尿素浓度梯度复性, 依次对含 4M 尿素、2M 尿素、1M 尿素、0.5M 尿素、0M 尿素的 PBS 透析。离心留上清, 即得到复性后的纯化的重组抗原 PI200, 12% SDS-PAGE 胶鉴定纯度后 (图 1), 分装 -20℃ 保存备用。

[0081] 2、LMoV 多克隆抗体制备

[0082] 1) 准备 2 ~ 2.5kg 雄性新西兰大白兔 1 只, 将 -20℃ 保存的 1mg/mL PI200 病毒重组抗原溶液与等体积福氏完全佐剂 (石蜡油 : 羊膜脂 = 7 : 1, 另外加 1mg/mL 灭活的结核分枝杆菌成分) 混合, 充分乳化, 经皮下多点注射做初次免疫, 每点 0.2mL。每只家兔免疫剂量为 PI200 病毒重组抗原 1mg。

[0083] 2) 二周后, 将 -20℃ 保存的 1mg/mL PI200 病毒重组抗原溶液与等体积福氏不完全佐剂 (石蜡油 : 羊膜脂 = 7 : 1) 混合, 充分乳化, 经皮下多点注射做第一次加强免疫, 每点 0.2mL。每只家兔免疫剂量为 PI200 病毒重组抗原 1mg。

[0084] 3) 第一次加强免疫后 2 周, 进行第二次加强免疫, 剂量途径同第一次。每隔 2 周, 重复该步骤一次至抗血清效价符合要求。

[0085] 4) 抗血清效价检测 : 第三次免疫之后 10 天, 自免疫家兔耳缘静脉各采血 200 μ L 至无菌微量离心管中, 于 37℃ 静置 2 小时, 然后 4℃ 过夜。次日 10,000g 离心 2 分钟, 分离血清。经免疫双扩散法检测抗体效价至 1 : 64 以上, 或使用间接 ELISA 法检测抗体效价至 1 : 20000 以上, 即可采血。

[0086] 5) 采血 : 于最后一次免疫后第 7 天, 对试验动物禁食一天。家兔采用颈动脉放血法采血。

[0087] 6) 抗血清的分离 : 采集到的血样, 置灭菌血清分离瓶中, 37℃ 静置 2 小时, 4℃ 静置过夜。次日用灭菌毛细管小心收集析出血清, 剩余样品于 3000g 离心 5 分钟, 继续收集分离出的血清。收集到的血清加入 0.02% 浓度的叠氮钠保存于 -20℃。

[0088] 7) 多克隆抗体 IgG 的粗纯 :

[0089] A. 取抗血清 20mL, 加入等体积 PBS, 冰水浴轻轻搅拌, 缓慢逐滴加入 4℃ 预冷的饱和硫酸铵 10mL, 使饱和度为 20%, 于 4℃ 静置 2 小时以上或过夜。于 4℃、12,000rpm 离心 10min, 留取上清。

[0090] B. 上清继续滴加 30mL 饱和硫酸铵, 使饱和度为 50%, 于 4℃ 静置 2 小时以上。重复上述离心步骤, 弃去上清。

[0091] C. 沉淀继续用 20mL PBS 溶解沉淀, 滴加入 10mL 饱和硫酸铵, 使饱和度为 33%, 4℃ 静置 2 小时。重复上述离心步骤。弃去上清, 沉淀用 12mL PBS 溶解, 4℃ 下对 PBS 透析除去残余硫酸铵, 即得到初纯多克隆抗体。于 -20℃ 保存备用。

[0092] D. 取 5mL 初纯多抗, 预先于 4℃ 透析至 pH7.8、0.02M 磷酸缓冲液中。

[0093] E. 准备一个 1.6cm $\times$ 30cm 的层析柱, 用经过处理的阴离子交换剂 DE52 (Whatman 生产) 50mL 装柱, 室温下以 3 倍柱床体积的 pH7.8、0.02M 磷酸缓冲液平衡。

[0094] F. 吸去柱床表面液体, 沿柱壁小心加入将预先透析的样品。打开出水口, 使样品

缓慢进入柱床内,并用少量洗脱液清洗柱壁,待液体进入柱床内后,以同样的平衡缓冲液洗脱,控制流速在 1mL/min。检测 OD280,待有吸收峰出现时收集,即为纯化的 IgG。

[0095] 3、多克隆抗体的辣根过氧化物酶标记

[0096] 1) 取 5mg HRP 溶于 0.5mL 蒸馏水中,加入新鲜配制的 0.06M NaIO₄ 水溶液 0.5mL,混匀,避光,置 4℃ 30min;

[0097] 2) 加入 0.16M 乙二醇水溶液 0.5mL,室温避光放置 30min;

[0098] 3) 加入含 20mg 纯化抗体 IgG 的水溶液 1mL,混匀,并装入透析袋,对 pH9.5、0.05M 碳酸盐缓冲液透析 6h;

[0099] 4) 加入 5mg/mL NaBH₄ 溶液 0.2mL,混匀,避光置 4℃ 2h;

[0100] 5) 在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀,4℃ 30min,离心,去上清,沉淀以少许 0.02M pH7.4PBS 液溶解,装入透析袋,以同样液体在 4℃ 透析除盐过夜;

[0101] 6) 离心去除沉淀物,留取上清,即酶-抗体结合物,加 pH 7.4、0.02M PBS 至 5mL,再加入等体积优质甘油至终浓度 50%,混匀后分装于 -20℃ 保存。

[0102] 4、百合斑驳病毒的双抗体夹心检测方法

[0103] 1) 各种试剂溶液的配制:

[0104] A. 包被液为 pH9.6、50mM 碳酸缓冲液 (CB);

[0105] B. 封闭液为含 2% 明胶,0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

[0106] C. 提取缓冲液为含 0.87% 硫酸钾、0.5% 聚乙烯吡咯烷酮、0.05% 吐温 -20、0.1% 巯基乙醇、0.58% 氯化钠、0.2% 牛血清白蛋白、0.2% 叠氮钠的 pH7.4 的 Tris 盐酸缓冲液;

[0107] D. 酶缓冲液为用蒸馏水配制的其内含 1% 聚乙二醇 4000、0.5% 牛血清白蛋白、0.1% 硫柳汞钠、0.5% 吐温 -20 的 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液;

[0108] E. 洗涤缓冲液为含 0.5% 吐温 -20、pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBST);

[0109] F. 显色剂 A 为含 1.46% 磷酸氢二钠,0.93% 柠檬酸,0.045% 过氧化氢的水溶液。

[0110] G. 显色剂 B 为含 0.03% 四甲基联苯胺,0.096% 柠檬酸,0.019% 乙二胺四乙酸钠盐,2% DMSO,4% 甘油的水溶液。

[0111] H. 终止液为蒸馏水配制的 2M H₂SO₄;

[0112] I. 阳性质控品为提取缓冲液研磨感染百合斑驳病毒的百合病株叶片制备的溶液;

[0113] J. 阴性质控品为提取缓冲液研磨健康百合叶片制备的溶液。

[0114] 2) 样品处理:将百合新鲜叶片组织 0.4g,加入 2mL 样品提取液在研钵中匀浆,至微量离心管中 10,000g 离心 10 分钟,保留上清液。

[0115] 3) 双抗夹心法检测的具体实施步骤如下:

[0116] A. 包被:用 CB 缓冲液将兔抗多克隆抗体稀释成终浓度 1 μg/mL,100 μL/孔包被于 BioBasic 公司生产的 96 孔酶标板上,37℃ 温育 2 小时,4℃ 过夜。PBST 冲洗 3 次,甩干。

[0117] B. 封闭:以封闭液 200 μL/孔封闭,37℃ 温育 2 小时。

[0118] C. 加样:甩去封闭液,以 100 μL/孔待测样品加入封闭后的多抗板条孔中,同时设空白 (样品提取液) 100 μL、阴性对照 100 μL、阳性对照 100 μL,37℃ 温育 30 分钟。PBST 冲洗 5 次,甩干。

[0119] D. 加酶标抗体:用酶缓冲液将酶标抗体稀释成终浓度 0.7 μg/mL 的酶工作液,每

孔加入 100 μ L, 37℃温育 30 分钟。PBST 冲洗 5 次, 甩干。

[0120] E. 显色: 每孔先后加入显色剂 A、B 各 1 滴, 37℃避光温育 15 分钟。

[0121] F. 终止: 每孔加入 1 滴终止液。

[0122] G. 检测: 于 Thermo MultiSkan 酶标仪上双波长检测 450nm/620nm 吸收值。

[0123] 4) 为检测双抗夹心酶联免疫 (DAS-ELISA) 检测试剂盒的效果, 用该试剂盒检测了 60 份百合叶片样品。同时用实施例 1 中的引物对 CP-F/CP-R 做了 RT-PCR 确定性诊断。检测结果如下:

[0124]

检测方法	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	合计
DAS-ELISA (+)	42	1	43
DAS-ELISA (-)	3	14	17
合计	45	15	60

[0125] 注: “+”代表阳性, “-”代表阴性。

[0126] 45 份由 RT-PCR 检测阳性的样品, DAS-ELISA 试剂盒检出 42 份阳性, 3 份阴性;

[0127] 15 份由 RT-PCR 检测阴性的样品, DAS-ELISA 试剂盒检出 1 份阳性, 14 份阴性。

[0128] 用 SPSS 软件对两种方法的做 χ^2 检验 (McNemar Test), $P > 0.05$, 表明两种方法没有显著差别, 同时初步得出本试剂盒的灵敏度为 93.3%, 特异性为 93.3%。

[0129] 5、双抗夹心法检测质量体系的建立

[0130] 1) 双抗夹心法检测百合斑驳病毒抗原 PI200 标准曲线的确定

[0131] 将基因工程合成的 PI200 抗原用样品提取液分别稀释至 150ng/mL、75ng/mL、37.5ng/mL、18.75ng/mL、9.37ng/mL、4.69ng/mL、2.35ng/mL、1.17ng/mL、0.58ng/mL 10 个梯度浓度, 并以样品提取液作为 0.0ng/mL。每份不同浓度的标准品设 4 个平行孔。

[0132] 按实施例 5 中介绍的方法测定 A_{450nm} 值。以标准抗原 (ng/mL) 为横坐标, 相应 A_{450nm} 值为纵坐标制作标准曲线 (附图 2)。分析曲线发现, 得到的标准拟合线性方程为: $y = 0.0078x + 0.1046$, 并且相关系数 $r = 0.9968$, 大于定义的 0.99。因此当浓度在 0.58ng/mL $\sim$ 150ng/mL 时, 有较好的线性关系。

[0133] 2) 样品检出限的确定

[0134] 以样品提取液作为空白 0.0ng/mL, 测定 15 个空白孔, 计算平均 A_{450nm} 吸光值 ($\bar{x}$) 及标准差 (s)。以 ($\bar{x} + 3s$) 代入标准曲线计算对应的 PI200 浓度, 得检出下限为 0.13ng/mL。因此线性测定范围在 0.13ng/mL $\sim$ 150ng/mL。

[0001]

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所

<120> 百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒及制备方法

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 两端附有多克隆酶切位点的 CP 与 CI200 融合片段，两者之间加入接头肽

<400> 1

Met Gly Ala Asn Glu Thr Leu Asn Ala Gly Ala Ser Ser Ser Thr Gln

1

5

10

15

[0002]

Ala Ser Arg Ser Thr Arg Pro Glu Ala Ala Ile Asp Val Ala Pro Gln

20

25

30

Gln Ser Ser Glu Ala Arg Val Arg Asp Arg Asp Val Asp Ala Gly Thr

35

40

45

Val Gly Thr Tyr Gln Ile Pro Arg Leu Lys Ala Leu Ala Thr Lys Ile

50

55

60

Asn Val Pro Lys Val Lys Gly Arg Met Ile Val Asn Thr Gly His Leu

65

70

75

80

Val Asn Tyr Asn Pro Asp Gln Thr Asp Ile Ser Asn Thr Arg Ser Thr

85

90

95

Gln Lys Gln Phe Glu Thr Trp Tyr Asn Ala Val Lys Asp Glu Tyr Gly

[0003]

100

105

110

Leu Asn Asp Glu Ser Met Ala Leu Ala Met Asn Gly Leu Met Val Trp

115

120

125

Cys Ile Glu Asn Gly Thr Ser Pro Asn Val Asn Gly Val Trp Leu Met

130

135

140

Met Asp Gly Asp Gln Gln Val Glu Phe Pro Leu Arg Pro Ile Leu Glu

145

150

155

160

His Ala Lys Pro Thr Leu Arg Gln Ile Met Ala His Phe Ser Asn Leu

165

170

175

Ala Glu Ala Tyr Ile Glu Lys Gln Asn Leu Glu Lys Pro Tyr Met Pro

180

185

190

[0004]

Arg Tyr Gly Leu Gln Arg Asn Leu Thr Asp Phe Asn Leu Ala Arg Phe

195

200

205

Ala Phe Asp Phe Tyr Glu Val Thr Ser Arg Thr Pro Ala Arg Ala Lys

210

215

220

Glu Ala His Phe Gln Met Lys Thr Ala Ala Leu Arg Gly Lys Gln Ser

225

230

235

240

Lys Leu Phe Gly Leu Asp Gly Lys Val Asn Thr Gln Asp Glu Asp Thr

245

250

255

Glu Arg His Thr Ala Asp Asp Val Asn Lys Asn Met His Ser Leu Leu

260

265

270

Gly Ile Ser Met Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Met His Pro Glu

275

280

285

[0005]

Val His Arg Ile Leu Thr Pro Tyr Lys Leu Arg Asp Ser Glu Ile Ile

290

295

300

Leu Asn Lys Val Ala Ile Pro Asn Lys Gly Leu Met Gln Trp Pro Thr

305

310

315

320

Ala Lys Glu Tyr Ala Tyr Gln Gly Phe Lys Met Asn Ile Pro Asp Thr

325

330

335

Val Arg Leu Pro Phe His Ser Leu Asp Ile Pro Glu Arg Leu His Glu

340

345

350

Arg Met Trp Gln Ile Val Glu Thr His Lys Gly Asp Ala Gly Phe Gly

355

360

365

Arg Ile Thr Thr Ala Ser Ala Cys Lys Ile Ala Tyr Thr Leu Lys Thr

370

375

380

[0006]

Asp Ala Ala Ser Ile Gln Arg Thr Ile His Ile Leu Asp Lys Leu Ile

385

390

395

400

Glu Asn Glu Leu Lys Lys Gln Glu Tyr Phe Arg Asn Ile Thr Ser Ala

405

410

415

Ser Cys Ser Ser Ser Ser Phe Ser Leu Thr Thr Ile Thr Asn Ala Ile

420

425

430

Arg Ala Arg His Ile Lys Asp His Thr Val Glu Asn Val Ser Val Leu

435

440

445

Gln Ala Ala Lys Ala Gln Ile Leu Glu Phe Lys Asn Val Thr Phe Asp

450

455

460

Leu Asp His Val Asn Arg Met Thr Glu Tyr Gly Ala Leu Glu Cys Val

[0007]

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Gln Phe Gln Gly Asn Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu

485

490

495

Glu His His His His His His

500

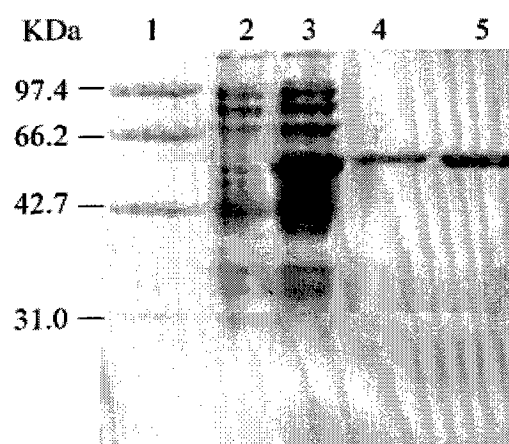


图 1

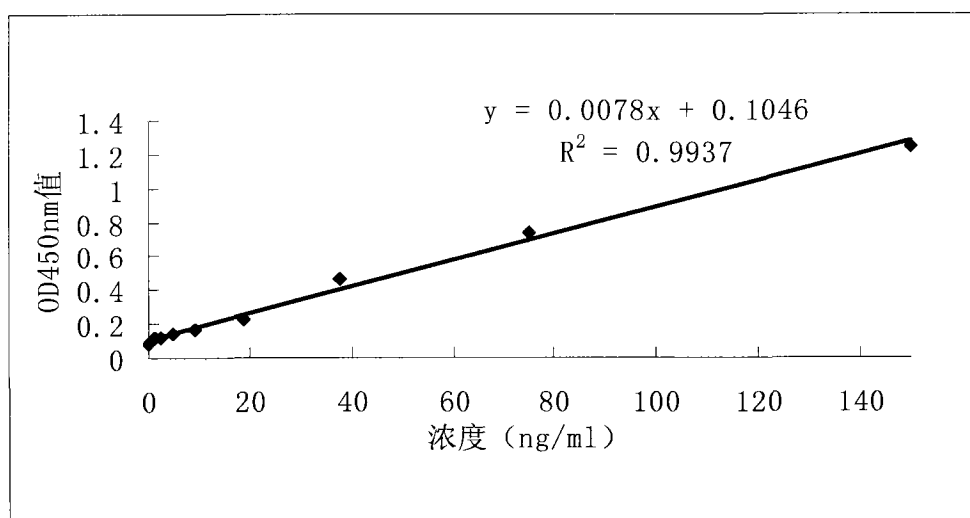


图 2

专利名称(译)	百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN101915835A	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN201010233082.6	申请日	2010-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院寒区旱区环境与工程研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院寒区旱区环境与工程研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院寒区旱区环境与工程研究所		
[标]发明人	童勋章 谢忠奎 王亚军 张玉宝 安丽萍 郭志鸿 张亚娟		
发明人	童勋章 谢忠奎 王亚军 张玉宝 安丽萍 郭志鸿 张亚娟		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 C12N15/40 C12N15/63 C07K19/00 C07K16/10		
代理人(译)	鲜林		
其他公开文献	CN101915835B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种百合斑驳病毒双抗体夹心酶联免疫检测试剂盒及制备方法，检测试剂盒包括：96微孔ELISA板，酶标抗体，缓冲液，显色液，终止液，其中96孔板上包被有LMoV特异的多克隆抗体，酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的LMoV特异多克隆抗体。本发明采用的免疫原为基因工程表达的LMoV外壳蛋白和细胞质内含体蛋白的融合重组抗原。由此免疫产生的抗体建立的双抗夹心酶联免疫吸附法用于检测百合叶片标本，与其他检测方法相比，检测灵敏度高，可以检出ng级别的病毒抗原，并且准确性强，试剂盒的制备方法简便快捷，经济实用。

