

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/531

G01N 1/34



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410033664.4

[43] 公开日 2005年5月4日

[11] 公开号 CN 1611942A

[22] 申请日 2004.4.15

[21] 申请号 200410033664.4

[71] 申请人 云南省农业科学院

地址 650231 云南省昆明市江岸小区云南省  
农科院综合楼

共同申请人 红河卷烟厂 浙江大学

[72] 发明人 张仲凯 丁 铭 杨录明 普耀芳  
方 琦 张丽珍 周雪平

[74] 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限责任  
公司

代理人 俞昌华 李 慧

权利要求书5页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称 CMV 云南分离物 TAS - ELISA 检测  
试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定(TAS - ELISA)检测试剂盒及其制备方法,属于酶学或生物学装置领域。本发明试剂盒包含阳性对照、阴性对照、CMV多克隆抗体、CMV单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品,其中,CMV多克隆抗体在分离提纯CMV云南分离物后,通过家兔免疫分离血清得到;CMV单克隆抗体在分离提纯CMV云南分离物后,通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到。本发明制备的TAS - ELISA检测试剂盒试剂成本仅2元人民币/样次,最低检出浓度达到0.01ng/ml,在性价比上具有明显的市场竞争力。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、一种 CMV 云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒，包含阳性对照、阴性对照、CMV 多克隆抗体、CMV 单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品，通过将阳性对照、阴性对照、CMV 多克隆抗体、CMV 单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品组装，  
5 得到试剂盒；其它材料和药品包括包被缓冲液、PBST、病毒抽提缓冲液、封闭缓冲液、底物缓冲液、底物、5 块酶标板及 20 个一次性滴管，其特征在于，CMV 多克隆抗体在分离提纯 CMV 云南分离物后，通过家兔免疫分离血清得到；CMV 单克隆抗体在分离提纯 CMV 云南分离物后，通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到。
- 10 2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于所述的 CMV 多克隆抗体由以下制备过程得到：
- 1) 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物，将 CMV 病毒提纯液稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃下保存；
  - 2) 进行免疫注射，将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，在家兔  
15 背部皮下多点注射，每点 0.2ml；一周后，将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，家兔双后足足垫注射，每点 1ml；一周后，将 1ml CMV 抗原耳静脉注射；一周后，取 2ml CMV 抗原，耳静脉注射；7-10 天后，心脏全采血，分离血清，加入 0.1% NaN<sub>3</sub>，-70℃保存，得 CMV 多克隆抗体。
- 20 3、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于所述的 CMV 单克隆抗体由以下制备过程得到：
- 1) 选用 Bal b/c 小白鼠 STU 系 3 月龄雌鼠用作病毒免疫，并取它们的脾细胞作细胞融合，将 CMV 提纯病毒稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃下保存；
  - 2) CMV 单克隆抗体制备，提纯病毒液免疫雌性小鼠，经细胞融合、ELISA 筛选、克隆，生产和贮存，单克隆抗体亚类鉴定，纯化，真空冷冻干燥，得  
25 CMV 单克隆抗体。
- 4、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于所述的分离提纯 CMV 云南分离物通过采集含有 CMV 样品病株的枯斑、接种后采集病株经提纯得到。
- 5、根据权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于所述的采集病株的过程为：取典型病株样品，经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 CMV，采集后接种曼陀罗，  
30 含 CMV 样品产生枯斑，取枯斑加缓冲液接种无病毒烟苗，7-15 天表现出典型症

状后采集放入-70℃冰箱中保存备用。

6、根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于所述的提纯过程为：

- 1) 取病叶，加1-3倍体积单位的抽提缓冲液，电动搅拌机充分匀浆，双层纱布过滤。滤液中加入30%氯仿，4℃，搅拌30min，3000rpm离心15min，收集上清；
- 2) 上清中加入7%PEG,0.15M NaCl,溶解后在4℃下放置4h或过夜，然后在4℃下进行离心，离心转速10000rpm，离心时间为20min，收集沉淀；
- 3) 将沉淀用0.02M柠檬酸缓冲液(pH7.4)悬浮，然后在4℃下离心，转速10000rpm,时间为10min，取上清液；
- 4) 将上清液在110000rpm下离心，时间为2h；沉淀用0.02M柠檬酸缓冲液(pH7.4)悬浮过夜；使用分子筛过滤，在254nm峰处收集，将收集液离心，转速110000rpm，离心时间为2h，得到上清液，即病毒提纯液。

7、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于所述的试剂盒的组装为：

- 1) 选择每个试剂盒可检测500个样次的抗体及药品试剂量进行组装；
- 2) 阳性对照：采用温室中盆栽保存的病株采集病叶，加入病毒抽提缓冲液研磨，2000g离心10min，取上清在冷冻干燥机中制备成粉末状，作为阳性对照，分装为1000mg/每管，-20℃保存，使用时向管中加入2ml PBST或蒸馏水溶解、稀释；
- 3) 阴性对照：应用试管苗保存的无病毒烟叶作为阴性对照，制备方法同阳性对照；分装为1000mg/每管，-20℃保存，使用时向管中加入2ml PBST或蒸馏水溶解、稀释；
- 4) CMV多克隆抗体：上述制备的抗血清中加0.1%叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>)，作为防腐，无菌分装后，密封、冷贮(-70℃)、备用。使用单位购买后，可保存于4℃中，不宜反复冻融，有效期2年。每个试剂盒中100ul(按1:500稀释)。
- 5) 单克隆抗体：上述制备的抗体中加0.1%叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>)，作为防腐，无菌分装后，密封，4℃保存，备用。每个试剂盒中100ul(按1:500稀释)。
- 6) 酶标抗体：Sigma公司购买，分装，4℃保存，备用。每个试剂盒中5ul(按1:10000稀释)。
- 7) 其他主要材料及药品：按溶液体积称量分装，常温下保存。
- 8、根据权利要求7所述的试剂盒，其特征在于所述的其他主要材料及药品具体用量如下：

- ① 包被缓冲液：每个试剂盒中 4.52g (1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+2.93g NaHCO<sub>3</sub>)；使用时，加 1000ml 双蒸水，将 1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 2.93g NaHCO<sub>3</sub> 溶解于 1000ml 双蒸水中，调 pH 值为 9.6；
- ② PBST：每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g，使用时加 8000ml 双蒸水，加入 0.5% 的 tween20；每 1000ml PBST 含有 (8.0g NaCl、0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2g KCl、2.9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 或者 (8.0g NaCl、0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2g KCl、7.2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)；
- ③ 病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml (10ml PBST 中溶解 1.3g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 和 0.2g NaN<sub>3</sub>)，按 1:100 使用；使用时，加入 1000ml PBST，调 pH 值为 7.4。
- ④ 封闭缓冲液：PBST 中加入 5% 的脱脂奶粉，溶解，即用即配；
- ⑤ 底物缓冲液：每个试剂盒中 10ml (10ml 的 10% 乙二醇胺 (pH=9.8) 溶解 500mg 底物)，按 1:10 使用；使用时用 100ml 的 10% 乙二醇胺 (pH=9.8) 稀释；底物为硝基苯磷酸盐 (p-NPP)，500mg/试剂盒；
- ⑥ 酶标板 5 块，一次性滴管 20 个。
- 9、一种 CMV 云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的制备方法，通过将阳性对照、阴性对照、CMV 多克隆抗体、CMV 单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品组装，得到试剂盒，其它材料和药品包括包被缓冲液、PBST、病毒抽提缓冲液、封闭缓冲液、底物缓冲液、底物、5 块酶标板及 20 个一次性滴管，其特征在于，CMV 多克隆抗体在分离提纯 CMV 云南分离物后，通过家兔免疫分离血清得到；CMV 单克隆抗体在分离提纯 CMV 云南分离物后，通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到。
- 10、根据权利要求 9 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于所述的 CMV 多克隆抗体由以下制备过程得到：
- 1) 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物，将 CMV 病毒提纯液稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃ 下保存；
  - 2) 进行免疫注射，将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，在家兔背部皮下多点注射，每点 0.2ml；一周后，将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，家兔双后足足垫注射，每点 1ml；一周后，将 1ml CMV 抗原耳静脉注射；一周后，取 2ml CMV 抗原，耳静脉注射；7-10 天后，心脏全采血，分离血清，加入 0.1% NaN<sub>3</sub>，-70℃ 保存，得 CMV 多克隆抗体；

所述的 CMV 单克隆抗体由以下制备过程得到：

- 1) 选用 Bal b/c 小白鼠 STU 系 3 月龄雌鼠用作病毒免疫，并取它们的脾细胞作细胞融合，将 CMV 提纯病毒稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃下保存；
- 2) CMV 单克隆抗体制备，提纯病毒液免疫雌性小鼠，经细胞融合、ELISA 筛选、克隆，生产和贮存，单克隆抗体亚类鉴定，纯化，真空冷冻干燥，得 CMV 单克隆抗体；

所述的分离提纯 CMV 云南分离物通过采集含有 CMV 样品病株的枯斑、接种后采集病株经提纯得到；

- 所述的采集病株的过程为：取典型病株样品，经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 CMV，采集后接种曼陀罗，含 CMV 样品产生枯斑，取枯斑加缓冲液接种无病毒烟苗，7-15 天表现出典型症状后采集放入-70℃冰箱中保存备用；

所述的提纯过程为：

- 1) 取病叶，加 2 倍体积抽提缓冲液，电动搅拌机充分匀浆，双层纱布过滤。滤液中加入 30%氯仿，4℃，搅拌 30min，3000rpm 离心 15min，收集上清；
- 2) 上清中加入 7%PEG,0.15M NaCl,溶解后在 4℃下放置 4h 或过夜，然后在 4℃下进行离心，离心转速 10000rpm，离心时间为 20min，收集沉淀；
- 3) 将沉淀用 0.02M 柠檬酸缓冲液(pH7.4)悬浮，然后在 4℃下离心，转速 10000rpm，时间为 10min，取上清液；
- 4) 将上清液在 110000rpm 下离心，时间为 2h；沉淀用 0.02M 柠檬酸缓冲液(pH7.4)悬浮过夜；使用分子筛过滤，在 254nm 峰处收集，将收集液离心，转速 110000rpm，离心时间为 2h，得到上清液，即病毒提纯液；

所述的试剂盒的组装为：

- 1) 选择每个试剂盒可检测 500 个样次的抗体及药品试剂量进行组装；
- 2) 阳性对照：采用温室中盆栽保存的病株采集病叶，加入病毒抽提缓冲液研磨，2000g 离心 10min，取上清在冷冻干燥机中制备成粉末状，作为阳性对照，分装为 1000mg/每管，-20℃保存，使用时向管中加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释；
- 3) 阴性对照：应用试管苗保存的无病毒烟叶作为阴性对照，制备方法同阳性对照；分装为 1000mg/每管，-20℃保存，使用时向管中加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释；
- 4) CMV 多克隆抗体：上述制备的抗血清中加 0.1%叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>)，作为防

- 腐，无菌分装后，密封、冷贮 (-70℃)、备用。使用单位购买后，可保存于 4℃中，不宜反复冻融，有效期 2 年。每个试剂盒中 100ul (按 1: 500 稀释)；
- 5) 单克隆抗体：上述制备的抗体中加 0.1%叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>)，作为防腐，无菌分装后，密封，4℃保存，备用。每个试剂盒中 100ul (按 1: 500 稀释)；
- 5 6) 酶标抗体：Sigma 公司购买，分装，4℃保存，备用。每个试剂盒中 5ul (按 1: 10000 稀释)；
- 7) 其他主要材料及药品：按溶液体积称量分装，常温下保存；

所述的其他主要材料及药品具体用量如下：

- ① 包被缓冲液：每个试剂盒中 4.52g (1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+2.93g NaHCO<sub>3</sub>)；使用时，  
10 加 1000ml 双蒸水，将 1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 2.93g NaHCO<sub>3</sub> 溶解于 1000ml 双蒸水中，调 pH 值为 9.6；
- ② PBST：每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g，使用时加 8000ml 双蒸水，加入 0.5% 的 tween20；每 1000mlPBST 含有 (8.0g NaCl、0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2g KCl、2.9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 或者 (8.0g NaCl、0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2g KCl 、7.2g  
15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)；
- ③病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml(10ml PBST 中溶解 1.3g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 和 0.2g NaN<sub>3</sub>)，按 1: 100 使用；使用时，加入 1000ml PBST，调 pH 值为 7.4。
- ④ 封闭缓冲液：PBST 中加入 5%的脱脂奶粉，溶解，即用即配；
- ⑤底物缓冲液：每个试剂盒中 10ml(10ml 的 10%乙二醇胺(pH=9.8)溶解 500mg  
20 底物)，按 1:10 使用；使用时用 100ml 的 10% 乙二醇胺(pH=9.8)稀释；底物为硝基苯磷酸盐 (p-NPP)，500mg/试剂盒；
- ⑥ 酶标板 5 块，一次性滴管 20 个。

## CMV 云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域：

本发明涉及一种黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus, CMV*) 云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定 (TAS-ELISA) 检测试剂盒及其制备方法, 属于酶学或生物学装置领域。

### 背景技术：

植物病毒是农作物病毒病害的重要病原, 随着植物脱病毒种苗产业化的发展和现代设施农业的兴起, 植物病毒的检测与防控技术日益受到重视。目前植物病毒的检测技术有血清学技术、指示植物测定、电子显微镜检测、分子检测 (包括对病毒核酸及蛋白的检测) 4 个方面的方法。各种方法相互印证, 同时又存在检测的灵敏度、专化性、设备设施条件及成本等因素的局限。各国都在探索简便、快速、准确而又经济的检测办法, 其中以血清学反应原理为基础的酶联免疫吸附测定 (Enzyme—Linked immunosorbent assay, ELISA) 是被广泛改进和应用的方法。

1969 年, Avrameas 将酶联抗体应用于血清学技术中, 1971 年, Engvall 和 Perlmann 将该方法进一步完善发明了 ELISA 方法。1974 年, Voller 等将 ELISA 技术应用于人和动物的抗体检测, Voller 等和 Clark、Adams 分别于 1976 年和 1977 年将 ELISA 方法应用于植物病毒的检测。之后, ELISA 方法得到进一步发展, 并广泛应用于人和动植物病毒的检测中。与其它检测方法相比, ELISA 方法具有成本显著降低, 检测的设备设施简单, 快速高效的特点, 并始终在不断被改进中, 有直接 ELISA、间接 ELISA (I-ELISA)、单抗体 ELISA (SPA-ELISA)、微波 ELISA、双抗体夹心 ELISA (Double-antibody sandwich-ELISA, DAS-ELISA) 等。目前市售的 ELISA 检测试剂盒主要有 I-ELISA 和 DAS-ELISA。如美国的 Agdia 公司, 英国的 PD 公司、意大利的 Agritest 公司、德国的 Loewe 生物技术公司、瑞士的 BIORBEA 公司是植物病毒检测试剂盒的主要营销公司。我国的植物病毒检测试剂盒销售公司大多为这些公司的代理或进口试剂盒分装销售, 也有自行研制的报道, 但涉及植物病毒种类较少。

目前市售的 ELISA 检测试剂盒可用于脱毒种苗和植物病毒样品的批量化检测，但同时也存在非特异性反应（即假阳性或假阴性反应）、检测灵敏度不够高（一般为 1ng/ml—10ng/ml 病毒浓度）。尤其在我国，许多种类的植物病毒抗体依赖于进口，一方面受到进口血液制品的限制，难以稳定供应，另一方面国外的抗体生产成本高而导致价格昂贵，未能满足生产的需求。近年来国外的相关公司对植物病毒检测试剂盒进行了改进，进一步简化了操作程序，如英国 PD 公司的试纸条检测方法已实现商品化生产，但价格高昂，每样次的检测需 100 多元人民币。国内外生产中规模化应用的仍然是 I-ELISA 和 DAS-ELISA 检测试剂盒，根据病毒种类的不同，每样次的试剂成本约 10—30 元人民币不等。

Roggero 和 Ogliara 等 1996 年在 DAS-ELISA 基础上，加入单克隆抗体，开展了番茄班萎病毒 (TSWV) 的三抗体夹心 ELISA (Triple-antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA) 检测，继承了 DAS-ELISA 简便快速的优势，同时结合了单克隆抗体专化性强、灵敏度高的特点，可高效、快速和灵敏地检测待测样中的病毒抗原。

近年来，已经用 TAS-ELISA 检测了双生病毒云南分离物，郭兴启等 (2003) 应用 TAS-ELISA 检测了马铃薯 X 病毒 (PVX) 和马铃薯 Y 病毒 (PVY)、美国和中国台湾分别报道了 TAS-ELISA 检测康乃馨蚀环病毒 (CarERV) 和坏死病毒 (LNV)，Franconi (2002) 报道了 TAS-ELISA 检测 PVX，Bowman 等 (2002) 应用该办法检测黄瓜花叶病毒 (CMV)，Tavert 等 (2002) 应用 TAS-ELISA 检测烟草花叶病毒 (TMV) 运动蛋白。

迄今为止，TAS-ELISA 方法研究植物病毒的研究近年有所增加，但专门研制 TAS-ELISA 检测试剂盒应用于植物病毒的规模化检测尚未见报道，而且市场上尚无 TAS-ELISA 检测试剂盒。

## 发明内容：

本发明的目的在于提供一种黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定 (TAS-ELISA) 检测试剂盒。

本发明的另一目的在于提供一种黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定 (TAS-ELISA) 检测试剂盒的制备方法。

本发明试剂盒包含阳性对照、阴性对照、CMV 多克隆抗体、CMV 单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品，将阳性对照、阴性对照、CMV 多克隆抗体、CMV 单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品组装，得到试剂盒；其它材料和药品包括包被缓冲液、PBST、病毒

抽提缓冲液、封闭缓冲液、底物缓冲液、底物、5 块酶标板及 20 个一次性滴管；其中，CMV 多克隆抗体在分离提纯 CMV 云南分离物后，通过家兔免疫分离血清得到；CMV 单克隆抗体在分离提纯 CMV 云南分离物后，通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到。

CMV 云南分离物通过采集含有 CMV 样品病株的枯斑、接种后采集病株经提纯得到。

- 5 采集病株的过程为：取典型病株样品，经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 CMV，采集后接种曼陀罗，含 CMV 样品产生枯斑，取枯斑加缓冲液接种无病毒种苗，7-15 天表现出典型症状后采集放入-70℃冰箱中保存备用。

同时，制备抽提缓冲液，为 0.2M 的柠檬酸缓冲液（pH7.2，含 0.2%巯基乙醇）。

提纯过程为：

- 10 1) 取病叶，加 1-3 倍体积单位的抽提缓冲液（W:V，即 1mg 病叶加 1-3mL 抽提缓冲液），电动搅拌机充分匀浆，双层纱布过滤。滤液中加入 30%氯仿，4℃，搅拌 30min，3000rpm 离心 15min，收集上清；
- 2) 上清中加入 7%PEG, 0.15M NaCl, 溶解后在 4℃下放置 4h 或过夜，然后在 4℃下进行离心，离心转速 10000rpm，离心时间为 20min，收集沉淀；
- 15 3) 将沉淀用 0.02M 柠檬酸缓冲液（pH7.4）悬浮，然后在 4℃下离心，转速 10000rpm，时间为 10min，取上清液；

将上清液在 110000rpm 下离心，时间为 2h；沉淀用 0.02M 柠檬酸缓冲液（pH7.4）悬浮过夜；使用分子筛过滤，在 254nm 峰处收集，将收集液离心，转速 110000rpm，离心时间为 2h，得到上清液，即病毒提纯液。

- 20 对病毒纯度及含量进行检测。具体内容如下：

- ✓ 电镜负染法检测病毒的纯度：病毒提纯液上置电镜铜网吸附 3min，2% 钨酸铵染色 3min，放置 5min，置于 JEM100CX-II 型透射电子显微镜下观察。
  - ✓ 紫外分光光度仪检测病毒的纯度及含量：病毒提纯液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍于 BECKMAN DU640 型紫外分光光度仪上测定 190nm-450nm 全波长扫描图、260nm 和 280nm 吸收值。
- 25 ✓ 病毒提纯液为乳白色液体，电镜下观察含较大量的 CMV 病毒粒子，未见杂质，经紫外分光光度仪检测，190nm-450nm 全波长扫描图显示为典型病毒扫描图，提纯样品稀释 100 倍液中  $A_{260}=0.495$ ， $A_{280}=0.424$ ， $A_{260}/A_{280}=0.858$ ，病毒浓度= $A_{260}/A_{260}^{0.1\%}=4.087$  mg/ml。

CMV 多克隆抗体的制备：

- 30 1) 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物，将 CMV 病毒提纯液稀释至 1mg/ml，作为

免疫抗原，4℃下保存；

- 2) 进行免疫注射，将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，在家兔背部皮下多点注射，每点 0.2ml；一周后，将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，家兔双后足足垫注射，每点 1ml；一周后，将 1ml CMV 抗原耳静脉注射；一周后，取 2ml CMV 抗原，耳静脉注射；7-10 天后，心脏全采血，分离血清，加入 0.1%  $\text{NaN}_3$ ，-70℃保存，得 CMV 多克隆抗体。

CMV 多克隆抗体效价测定：稀释病毒提纯液至 0.01mg/ml，备用；将上述抗血清倍比稀释为：1/10、1/20、1/40 ..... 1/20480，以间接 ELISA 法测定抗体效价为 1：2560。

- CMV 多克隆抗体灵敏度测定：稀释抗血清至 1mg/ml，备用。将病毒提纯液稀释为：1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml、0.001mg/ml、0.0001mg/ml、0.00001mg/ml、0.000001mg/ml，以间接 ELISA 法测定抗体灵敏度，即最低检出浓度达 0.01ng/ml。

CMV 单克隆抗体的制备：

- 1) 选用 Bal b/c 小白鼠 STU 系 3 月龄雌鼠用作病毒免疫，并取它们的脾细胞作细胞融合，将 CMV 提纯病毒稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃下保存；
- 2) CMV 单克隆抗体制备，提纯病毒液免疫雌性小鼠，经细胞融合、ELISA 筛选、克隆，生产和贮存，单克隆抗体亚类鉴定，纯化，真空冷冻干燥，得 CMV 单克隆抗体。

CMV 单克隆抗体效价测定：筛选出一个 CMV 广谱单克隆抗体细胞株，间接 ELISA 测定抗体效价为 1：10000。

试剂盒的组装：

- 1) 选择每个试剂盒可检测 500 个样次的抗体及药品试剂量进行组装；
- 2) 阳性对照：采用温室中盆栽保存的病株采集病叶，加入病毒抽提缓冲液研磨，2000g 离心 10min，取上清在冷冻干燥机中制备成粉末状，作为阳性对照，分装为 1000mg/每管，-20℃保存，使用时向管中加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释；
- 3) 阴性对照：应用试管苗保存的无病毒烟叶作为阴性对照，制备方法同阳性对照；分装为 1000mg/每管，-20℃保存，使用时向管中加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释；
- 4) CMV 多克隆抗体：上述制备的抗血清中加 0.1%叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ )，作为防腐，无菌分装后，密封、冷贮 (-70℃)、备用。使用单位购买后，可保存于 4℃中，不宜反复冻融，有效期 2 年。每个试剂盒中 100ul (按 1：500 稀释)；
- 5) 单克隆抗体：上述制备的抗体中加 0.1%叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ )，作为防腐，无菌分装后，密封，4℃保存，备用。每个试剂盒中 100ul (按 1：500 稀释)；

- 6) 酶标抗体: Sigma 公司购买, 分装, 4℃保存, 备用。每个试剂盒中 5ul (按 1: 10000 稀释);
- 7) 其他材料及药品: 按溶液体积称量分装, 常温下保存。具体用量如下:
- ① 包被缓冲液: 每个试剂盒中 4.52g(1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+2.93g NaHCO<sub>3</sub>); 使用时, 加 1000ml 双蒸水, 将 1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 2.93g NaHCO<sub>3</sub> 溶解于 1000ml 双蒸水中, 调 pH 值为 9.6;
- ② PBST: 每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g, 使用时加 8000ml 双蒸水, 加入 0.5%的 tween20; 每 1000mlPBST 含有 (8.0g NaCl、0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2g KCl、2.9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 或者 (8.0g NaCl、0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2g KCl、7.2g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O);
- ③ 病毒抽提缓冲液: 每个试剂盒中 10ml (10ml PBST 中溶解 1.3g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>和 0.2g NaN<sub>3</sub>), 按 1: 100 使用; 使用时, 加入 1000ml PBST, 调 pH 值为 7.4;
- ④ 封闭缓冲液: PBST 中加入 5%的脱脂奶粉, 溶解, 即用即配;
- ⑤ 底物缓冲液: 每个试剂盒中 10ml (10ml 的 10%乙二醇胺 (pH=9.8) 溶解 500mg 底物), 按 1:10 使用; 使用时用 100ml 的 10% 乙二醇胺(pH=9.8)稀释; 底物为硝基苯磷酸盐 (p-NPP), 500mg/试剂盒;
- ⑥ 酶标板 5 块, 一次性滴管 20 个。
- CMV 云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的检测规程:
- A. CMV 多抗血清 (1: 500) 加入酶标板(包被缓冲液稀释), 每孔 100ul, 37℃下放置 3h。
- B. PBST 洗板 6 次, 快速 3 次, 慢速 3 次 (3min/次), 拍干。
- C. 样品加入病毒抽提缓冲液 (约 5-10 倍) 研磨样品, 加入加入酶标板, 每孔 100ul, 4℃下放置过夜。
- D. 同上洗板。
- E. 每孔加入 150ul 封闭缓冲液, 37℃下放置 30min。
- F. 抛弃孔中液体, 拍干。
- G. CMV 单抗 (1: 500) (PBST 稀释), 加入酶标板, 每孔 100ul, 37℃下放置 3h。
- H. 同上洗板。
- I. 羊抗鼠 AP-IgG (1:10000) (PBST 稀释), 加入酶标板, 每孔 100ul, 37℃下放置 3h。
- J. 同上洗板。
- K. 用底物缓冲液溶解底物 (1mg/ml), 加入酶标板, 每孔 100ul, 室温 (25℃) 下至充分显色 (每孔加入 50ul 1N NaOH 终止显色)。肉眼或酶标仪读数。
- 应用酶标仪进行检测结果判别时, 记录酶标仪在 405nm 波长下酶标板每孔的 OD 数值,

首先进行空白孔系统调零，若空白孔出现明显的颜色反应，或经空白孔调零后，系统检测出现大量的负值时，整个系统测定无效；每一样品测定双孔的 OD 值应基本一致，若两孔测定值差别较大(一般指同一样品相同稀释度两孔的 OD 值超过其均值的 0.5-1.5 倍范围)，该酶标板测定无效。若阳性对照 OD 值低于或接近阴性对照 OD 值时，测定也无效。待测样品 OD 值与阴性对照 OD 值检测之比大于等于 2.1 时，待测样品为阳性，否则为阴性。

肉眼判别检测结果时，首先也是观察空白孔、阴性孔、阳性孔的颜色，若空白孔、阴性孔颜色较深或阳性孔无颜色或颜色较浅时，则本块酶标板测定无效。目测待测样品颜色反应与阴性对照颜色反应深浅对比，较深则为阳性，较浅则为阴性。

检测灵敏度达到 0.001ng/ml，与电镜检测结果比较准确率相符，比间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测灵敏度提高 1000 倍。

本发明制备的 TAS-ELISA 检测试剂盒试剂成本仅 2 元人民币/样次，最低检出浓度(检测灵敏度)达到 0.01ng/ml，准确度通过了电子显微镜和多聚酶链式反应(PCR)以及同类病毒进口的 DAS-ELISA 检测试剂盒的印证试验，在性价比上具有明显的市场竞争力。

## 附图说明：

15 图 1：CMV 多克隆抗体的免疫流程图

图 2：CMV 单克隆抗体的制备流程图

## 具体实施方式：

采集病株的过程为：取典型病株样品，经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 CMV，采集后接种曼陀罗，含 CMV 样品产生枯斑，取枯斑加缓冲液接种无病毒烟苗，7-15 天表现出典型症状后采集放入-70℃冰箱中保存备用。

同时，制备抽提缓冲液，为 0.2M 的柠檬酸缓冲液 (pH7.2，含 0.2%巯基乙醇)。

提纯过程为：

- 1) 取病叶 50g，加 100mL 抽提缓冲液，电动搅拌机充分匀浆，双层纱布过滤。滤液中加入 30%氯仿，4℃，搅拌 30min，3000rpm 离心 15min，收集上清；
- 25 2) 上清中加入 7%PEG, 0.15M NaCl, 溶解后在 4℃下放置 4h 或过夜，然后在 4℃下进行离心，离心转速 10000rpm，离心时间为 20min，收集沉淀；
- 3) 将沉淀用 0.02M 柠檬酸缓冲液 (pH7.4) 悬浮，然后在 4℃下离心，转速 10000rpm，

时间为 10min, 取上清液;

4) 将上清液在 110000rpm 下离心, 时间为 2h; 沉淀用 0.02M 柠檬酸缓冲液(pH7.4) 悬浮过夜; 使用分子筛过滤, 在 254nm 峰处收集, 将收集液离心, 转速 110000rpm, 离心时间为 2h, 得到上清液, 即病毒提纯液。

5 对病毒纯度及含量进行检测。具体内容如下:

✓ 电镜负染法检测病毒的纯度: 病毒提纯液上置电镜铜网吸附 3min, 2% 钼酸铵染色 3min, 放置 5min, 置于 JEM100CX-II 型透射电子显微镜下观察。

✓ 紫外分光光度仪检测病毒的纯度及含量: 病毒提纯液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍于 BECKMAN DU640 型紫外分光光度仪上测定 190nm-450nm 全波长扫描图、260nm 和 280nm 吸收值。

10 ✓ 病毒提纯液为乳白色液体, 电镜下观察含较大量的 CMV 病毒粒子, 未见杂质, 经紫外分光光度仪检测, 190nm-450nm 全波长扫描图显示为典型病毒扫描图, 提纯样品稀释 100 倍液中  $A_{260}=0.495$ ,  $A_{280}=0.424$ ,  $A_{260}/A_{280}=0.858$ , 病毒浓度 =  $A_{260}/A_{260}^{0.1\%} = 4.087$  mg/ml。

CMV 多克隆抗体的制备:

15 1) 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物, 将 CMV 病毒提纯液稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4°C 下保存;

2) 进行免疫注射, 将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂, 充分混合, 在家兔背部皮下多点注射, 每点 0.2ml; 一周后, 将 1ml CMV 抗原加 1ml 福氏完全佐剂, 充分混合, 家兔双后足足垫注射, 每点 1ml; 一周后, 将 1ml CMV 抗原耳静脉注射; 一周后, 取 2ml CMV

20 抗原, 耳静脉注射; 7-10 天后, 心脏全采血, 分离血清, 加入 0.1%  $\text{NaN}_3$ , -70°C 保存, 得 CMV 多克隆抗体。

CMV 多克隆抗体效价测定: 稀释病毒提纯液至 0.01mg/ml, 备用; 将上述抗血清倍比稀释为: 1/10、1/20、1/40 ..... 1/20480, 以间接 ELISA 法测定抗体效价为 1: 2560。

25 CMV 多克隆抗体灵敏度测定: 稀释抗血清至 1mg/ml, 备用。将病毒提纯液稀释为: 1mg/ml、0.1mg/ml 0.01mg/ml、0.001mg/ml、0.0001mg/ml、0.00001mg/ml、0.000001mg/ml, 以间接 ELISA 法测定抗体灵敏度, 即最低检出浓度达 0.01ng/ml。

CMV 单克隆抗体的制备:

1) 选用 Bal b/c 小白鼠 STU 系 3 月龄雌鼠用作病毒免疫, 并取它们的脾细胞作细胞融合, 将 CMV 提纯病毒稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4°C 下保存;

30 2) CMV 单克隆抗体制备, 提纯病毒液免疫雌性小鼠, 经细胞融合、ELISA 筛选、克

隆,生产和贮存,单克隆抗体亚类鉴定,纯化,真空冷冻干燥,得CMV单克隆抗体。

CMV单克隆抗体效价测定:筛选出一个CMV广谱单克隆抗体细胞株,间接ELISA测定抗体效价为1:10000。

5 试剂盒的组装:

- 1) 选择每个试剂盒可检测500个样次的抗体及药品试剂量进行组装;
- 2) 阳性对照:采用温室中盆栽保存的病株采集病叶,加入病毒抽提缓冲液研磨,2000g离心10min,取上清在冷冻干燥机中制备成粉末状,作为阳性对照,分装为1000mg/每管,-20℃保存,使用时向管中加入2ml PBST或蒸馏水溶解、稀释;
- 10 3) 阴性对照:应用试管苗保存的无病毒烟叶作为阴性对照,制备方法同阳性对照;分装为1000mg/每管,-20℃保存,使用时向管中加入2ml PBST或蒸馏水溶解、稀释;
- 4) CMV多克隆抗体:上述制备的抗血清中加0.1%叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ),作为防腐,无菌分装后,密封、冷贮(-70℃)、备用。使用单位购买后,可保存于4℃中,不宜反复冻融,有效期2年。每个试剂盒中100ul(按1:500稀释)。
- 15 5) 单克隆抗体:上述制备的抗体中加0.1%叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ),作为防腐,无菌分装后,密封,4℃保存,备用。每个试剂盒中100ul(按1:500稀释)。
- 6) 酶标抗体:Sigma公司购买,分装,4℃保存,备用。每个试剂盒中5ul(按1:10000稀释)。
- 20 7) 其他材料及药品:按溶液体积称量分装,常温下保存。具体用量如下:
  - ① 包被缓冲液:每个试剂盒中4.52g(1.59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ +2.93g  $\text{NaHCO}_3$ );使用时,加1000ml双蒸水,将1.59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和2.93g  $\text{NaHCO}_3$ 溶解于1000ml双蒸水中,调pH值为9.6;
  - ② PBST:每个试剂盒中90.4g或124.8g,使用时加8000ml双蒸水,加入0.5%的tween20;每1000mlPBST含有(8.0g  $\text{NaCl}$ 、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.2g  $\text{KCl}$ 、2.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )或者(8.0g  $\text{NaCl}$ 、0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.2g  $\text{KCl}$ 、7.2g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ );
  - ③病毒抽提缓冲液:每个试剂盒中10ml(10ml PBST中溶解1.3g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 和0.2g  $\text{NaN}_3$ ),按1:100使用;使用时,加入1000ml PBST,调pH值为7.4。
  - ④ 封闭缓冲液:PBST中加入5%的脱脂奶粉,溶解,即用即配;
  - 30 ⑤底物缓冲液:每个试剂盒中10ml(10ml的10%乙二醇胺(pH=9.8)溶解500mg底

物), 按 1:10 使用; 使用时用 100ml 的 10% 乙二醇胺(pH=9.8)稀释; 底物为硝基苯磷酸盐 (p-NPP), 500mg/试剂盒;

⑥ 酶标板 5 块, 一次性滴管 20 个。

CMV 云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的检测规程:

- 5 A. CMV 多抗血清 (1: 500) 加入酶标板 (包被缓冲液稀释), 每孔 100ul, 37°C 下放置 3h。
- B. PBST 洗板 6 次, 快速 3 次, 慢速 3 次 (3min/次), 拍干。
- C. 样品加入病毒抽提缓冲液 (约 5-10 倍) 研磨样品, 加入加入酶标板, 每孔 100ul, 4°C 下放置过夜。
- D. 同上洗板。
- 10 E. 每孔加入 150ul 封闭缓冲液, 37°C 下放置 30min。
- F. 抛弃孔中液体, 拍干。
- G. CMV 单抗 (1: 500) (PBST 稀释), 加入酶标板, 每孔 100ul, 37°C 下放置 3h。
- H. 同上洗板。
- I. 羊抗鼠 AP-IgG (1:10000) (PBST 稀释), 加入酶标板, 每孔 100ul, 37°C 下放置 3h。
- 15 J. 同上洗板。
- K. 用底物缓冲液溶解底物 (1mg/ml), 加入酶标板, 每孔 100ul, 室温 (25°C) 下至充分显色 (每孔加入 50ul 1N NaOH 终止显色)。肉眼或酶标仪读数。

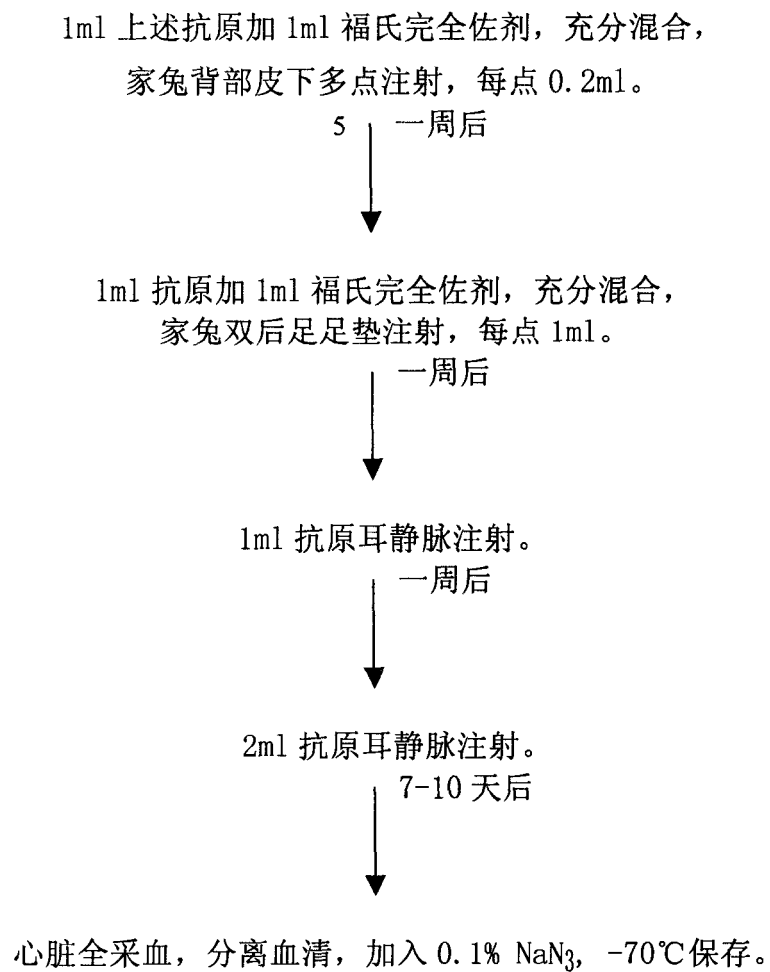


图 1

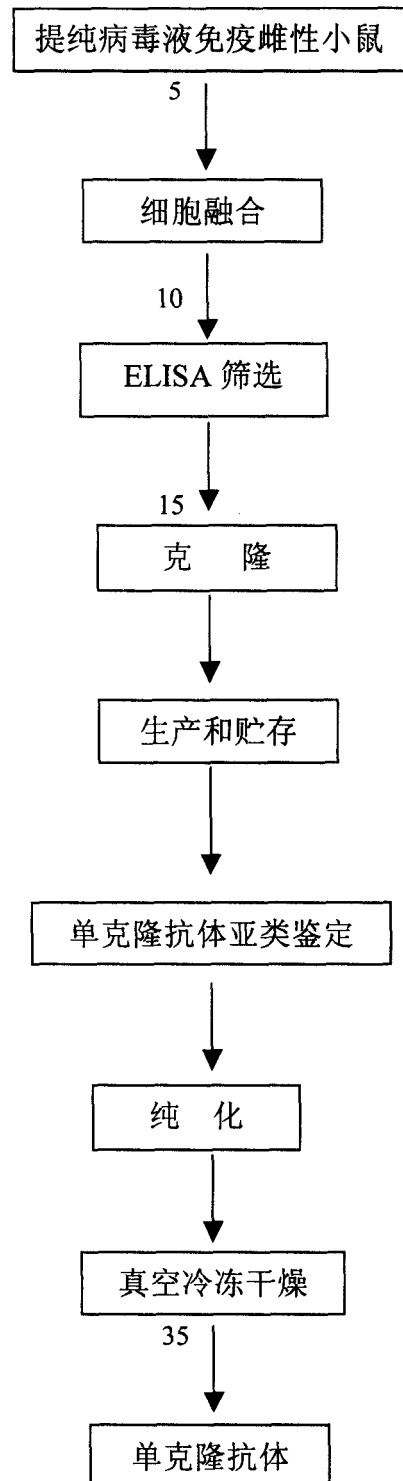


图 2

专利名称(译)	CMV云南分离物TAS - ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1611942A</a>	公开(公告)日	2005-05-04
申请号	CN200410033664.4	申请日	2004-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	云南省农业科学院 浙江大学		
申请(专利权)人(译)	云南省农业科学院 红河卷烟厂 浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	云南省农业科学院 红河卷烟厂 浙江大学		
[标]发明人	张仲凯 丁铭 杨录明 普耀芳 方琦 张丽珍 周雪平		
发明人	张仲凯 丁铭 杨录明 普耀芳 方琦 张丽珍 周雪平		
IPC分类号	G01N1/34 G01N33/531		
代理人(译)	李慧		
其他公开文献	CN1303424C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaicvirus, CMV)云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定(TAS - ELISA)检测试剂盒及其制备方法,属于酶学或生物学装置领域。本发明试剂盒包含阳性对照、阴性对照、CMV多克隆抗体、CMV单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品,其中,CMV多克隆抗体在分离提纯CMV云南分离物后,通过家兔免疫分离血清得到;CMV单克隆抗体在分离提纯CMV云南分离物后,通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到。本发明制备的TAS - ELISA检测试剂盒试剂成本仅2元人民币/样次,最低检出浓度达到0.01ng/ml,在性价比上具有明显的市场竞争力。

