



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103487579 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201310402974. 8

CN 103060476 A, 2013. 04. 24,

(22) 申请日 2013. 09. 07

KR 20050097299 A, 2005. 10. 07,

(73) 专利权人 福建省农业科学院果树研究所

审查员 李倩

地址 350013 福建省福州市晋安区新店镇埔  
党村

(72) 发明人 范国成 林雄杰 林志铿 胡菡青  
陈庆河 翁启勇

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限  
公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102994455 A, 2013. 03. 27,

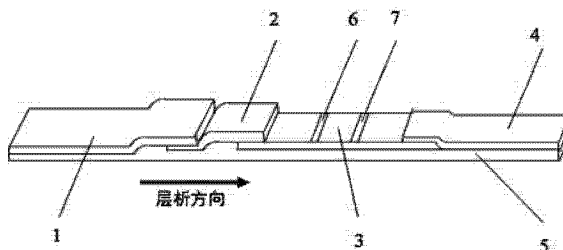
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种检测黄瓜绿斑驳花叶病毒(CGMMV)的免疫胶体金试纸条及其制备方法。将纯化的CGMMV多克隆抗体溶液点在硝酸纤维素膜的检测线上,羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维素膜的质控线上;分别将吸水滤纸制成的样品垫、CGMMV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的PVC胶板上,制成试纸条。本发明的试纸条可检测出葫芦科植物中的CGMMV,适用于由CGMMV引起的病毒病检测和诊断。该方法简便、快速、成本低廉,5-10分钟即出结果,便可肉眼直接观察。适用于基层各级农业部门、农户和出入境检验部门开展病害的快速大量筛选检测,有助于及时有效的控制和扑灭疫情,具有广阔的应用前景。



1. 一种快速检测黄瓜绿斑驳花叶病毒 CGMMV 的试纸条,由标记好质控线和检测线的硝酸纤维素膜、样品垫、免疫胶体金垫、吸水纸和 PVC 胶板构成,依次将样品垫、免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上,确保接头处有叠压,使层析能顺利进行;其中所述的质控线的成分是羊抗兔多克隆抗体,检测线的成分是纯化的 CGMMV 多克隆抗体;所述的免疫胶体金垫是载有胶体金标记的 CGMMV 多克隆抗体的玻璃纤维;所述的 CGMMV 多克隆抗体是 CGMMV 外壳蛋白经原核可溶表达、并纯化浓缩后注射大耳白兔获得的 CGMMV 多克隆抗体;

包括以下步骤:

(1) CGMMV 多克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 CGMMV 外壳蛋白基因,构建 CGMMV-pET32aCP 原核表达载体,转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 菌株,在 0.1 mmol/L 的 IPTG 终浓度、23 °C 恒温、90 rpm 摇床转速下诱导 25 小时,获得 CGMMV-CP 外源融合蛋白的可溶表达,将表达上清用 Ni 琼脂糖凝胶 FF 柱纯化,经超滤离心管离心浓缩目的蛋白,以纯化蛋白为抗原注射大耳白兔,采血,取血清,提纯抗体 IgG,纯度不小于 95%;

(2)胶体金溶液:将 100 mL 0.01% 氯化金用 2-3 mL 的 1% 柠檬三钠还原成 15 nm-60 nm 的胶体金颗粒溶液;

(3)CGMMV 免疫胶体金溶液:用 0.1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 将胶体金溶液 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100 mL 胶体金溶液中加入 0.5 mg-2 mg 步骤(1)的 CGMMV 多克隆抗体,混合均匀,再加入 10%BSA 至终浓度为 0.5-2% 进行封闭,12000rpm 离心 20min,去上清,取沉淀即获得 CGMMV 免疫胶体金溶液;

(4) 将上述的 CGMMV 免疫胶体金溶液用 PBS 缓冲液进行稀释到工作浓度,并加入 5-25% 的蔗糖,混匀后用喷金机喷涂到聚酯膜或玻璃纤维标记垫介质上,形成 CGMMV 免疫胶体金垫;

(5) 将 CGMMV 多克隆抗体用 0.01M 的 PBS 溶液进行稀释到工作浓度,加入 2% 的蔗糖,用划膜机点在硝酸纤维素膜检测线上,羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维素膜质控线上;

(6) 将吸水滤纸制成的样品垫、CGMMV 免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上,并贴上带有插入液体面最高限位的指示线 MAX 的胶带,然后切割成试纸条;

(7) 将组装好的试纸条密封包装保存。

## 一种快速检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物中黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测试纸条及制备方法,特别是一种检测葫芦科中黄瓜绿斑驳花叶病毒的免疫胶体金试纸条及制备方法。

### 背景技术

[0002] 黄瓜绿斑驳花叶病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) 属于芜菁花叶病毒科 (*Tymoviridae*) 烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*), 是葫芦科的重要病毒之一, 主要侵染黄瓜、西瓜、甜瓜、葫芦、南瓜等葫芦科植物。该病毒于 1935 年在英国的黄瓜上被首次发现, 随后在希腊、以色列、法国、印度、日本、韩国、印度尼西亚和巴基斯坦均有发生, 对葫芦科作物的生产造成严重的经济损失。CGMMV 在我国的发生相对较晚, 1987 年在台湾的冬瓜、西瓜、甜瓜和黄瓜上分离鉴定出该病毒, 2003 年报道在广西观赏南瓜发生。2005 年在辽中地区发现该病毒在西瓜上大面积发生, 是中国大陆地区首次在大田上发生该病毒报道, 给该地区的西瓜造成严重的损失。目前, CGMMV 在我国台湾、辽宁、广西、河北、北京、山东、甘肃、湖北、云南、四川、广东、浙江、湖南等省市多个地区发现, 可经种子、汁液、病株残体, 以及被污染的土壤、水体、啮齿动物粪便、菟丝子等多种方式传播, 给葫芦科作物的生产造成严重威胁, 已列入我国新修订的禁止进境有害生物名录。近年来厦门出入境检验检疫局曾多次从进境的南瓜种子检出该病毒。

[0003] 植物病毒诊断鉴定方法主要包括指示植物法、电子显微镜法、血清学法和分子生物学法等。由于 CGMMV 的寄主范围、粒体形态与大小等特性很难与同类病毒相区分, 症状多样并常有隐症现象, 株系多、血清型多给常规诊断带来困难。CGMMV 可通过接种以苋色藜、蔓陀罗、矮牵牛等指示植物来鉴定, 但与同属其他病毒表现的症状十分相似, 而且不同的病毒株系产生不同的症状, 因而可靠性不高, 且检测周期长。电子显微镜可观察受感染细胞的结构变化以及病毒粒体的形态和大小, 但设备要求高、前处理复杂, 通常只能起辅助鉴定的作用。分子生物学检测法具有灵敏、快速、特异性强等优点, 但由于 CGMMV 为 RNA 病毒, RNA 容易降解, 提取和操作过程对于环境和技术要求较高, 需要昂贵的试剂和特殊的设备, 只能在实验室内进行, 不利于普及。血清学方法多适用于大量样品的检测, 不能实现单一样品检测, 且需要专门的仪器设备和专业的技术人员, 操作过程也相对复杂, 检测时间要 4-12 小时不等, 不利于推广。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是解决上述存在诸如检测时间长、不能现场检测、检测费用高等不足, 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黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 的胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。

[0005] 本发明提供的技术方案为:

[0006] 一种快速检测黄瓜绿斑驳花叶病毒 CGMMV 的试纸条, 由标记好质控线和检测线的硝酸纤维素膜、样品垫、免疫胶体金垫、吸水纸和 PVC 胶板构成, 依次将样品垫、免疫胶体金

垫、硝酸纤维素膜和吸水纸贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上,确保接头处有叠压,使层析能顺利进行;其中所述的质控线的成分是羊抗兔多克隆抗体,检测线的成分是纯化的 CGMMV 多克隆抗体;所述的免疫胶体金垫是载有胶体金标记的 CGMMV 多克隆抗体的玻璃纤维;所述的 CGMMV 多克隆抗体是 CGMMV 外壳蛋白经原核可溶表达、并纯化浓缩后注射大耳白兔获得的 CGMMV 多克隆抗体。

[0007] 具体的制备方法包括如下步骤:

[0008] (1) CGMMV 多克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 CGMMV 外壳蛋白基因,构建 CGMMV-pET32aCP 原核表达载体,转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 菌株,在 0.1 mmol/L 的 IPTG 终浓度、23 °C 恒温、90 rpm 摇床转速下诱导 25 小时,获得 CGMMV-CP 外源融合蛋白的可溶表达,将表达上清用 Ni 琼脂糖凝胶 FF 柱纯化,经超滤离心管离心浓缩目的蛋白,以纯化蛋白为抗原注射大耳白兔,采血,取血清,提纯抗体 IgG,纯度不小于 95%;

[0009] (2)胶体金制备:将 100 mL 0.01%氯化金用 2-3 mL 的 1%柠檬三钠还原成 15 nm-60 nm 的颗粒溶液;

[0010] (3)CGMMV 免疫胶体金溶液制备:用 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100 mL 胶体金溶液中加入 0.5 mg-2 mg 步骤(1)的 CGMMV 多克隆抗体,混合均匀,再加入 10%BSA 至终浓度 0.5-2% 进行封闭,12000rpm 离心 20min,去上清,取沉淀即获得 CGMMV 免疫胶体金溶液。

[0011] (4)将上述的 CGMMV 免疫胶体金溶液用 PBS 缓冲液进行稀释到工作浓度,并加入 5-25% 蔗糖,混匀后用喷金机喷涂到聚酯膜或玻璃纤维标记垫介质上,形成 CGMMV 免疫胶体金垫;

[0012] (5)将 CGMMV 多克隆抗体用 0.01M 的 PBS 溶液进行稀释到工作浓度,加入 2% 的蔗糖,用划膜机点在硝酸纤维素膜检测线上,羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维素膜质控线上;

[0013] (6)将吸水滤纸制成的样品垫、CGMMV 免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上,并贴上带有插入液体面最高限位的指示线 MAX 的胶带,然后切割成试纸条;

[0014] (7)将组装好的试纸条密封包装保存。

[0015] 制备出来的试纸条示意图见图 1。

[0016] 本发明的有益效果是,本发明所用的免疫抗原为原核表达抗原,是针对 CGMMV 外壳蛋白设计并表达纯化的抗原,其免疫原性高,所制备的抗体能特异识别 CGMMV 外壳蛋白,从而提高了检测的灵敏度和准确性;用本发明检测葫芦科 CGMMV 病毒,检测时间短,成本低廉,检测灵敏度可以达到 10ng/ml,与 WMV:西瓜花叶病毒(Watermelon mosaic virus);ZYMV:小西葫芦黄花叶病毒(Zucchini yellow mosaic virus);TMV:烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus);CMV:黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus);SqMV:南瓜花叶病毒(Squash mosaic virus)不交叉。

[0017] 本发明适用于基层各级农业部门、农户和出入境检验部门开展病害的快速大量筛选检测,有助于及时有效的控制和扑灭疫情,具有广阔的应用前景。

## 附图说明

[0018] 图 1. 本发明示意图；

[0019] 1. 表示吸水滤纸制成的样品垫, 2. CGMMV 免疫胶体金垫, 3. 硝酸纤维素膜,

[0020] 4. 吸水纸, 5. PVC 胶板, 6. CGMMV 多克隆抗体点在检测线, 7. 羊抗兔多克隆抗体点在质控线。

[0021] 图 2. 试纸条的样板图。

[0022] 图 3. 试纸条检测结果图解。

[0023] 图 4. 试纸条特异性试验 ; 取 CGMMV、WMV、ZYMV、TMV、CMV、SqMV 六种病毒阳性叶片进行研磨, 按实施方式 3 所述步骤进行检测。并判读结果。

## 具体实施方式

[0024] 本发明中所使用的术语, 除非另有说明外, 一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0025] 提供下述实例是为了更好的进一步理解本发明, 而非以任何方式限制本发明的范围。

[0026] 实施例 1

[0027] 本发明所述检测黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫胶体金试纸条的制备方法, 如图 1、2 所示, 包括如下步骤:

[0028] (1) CGMMV 多克隆抗体的制备: 利用 RT-PCR 方法扩增黄瓜绿斑驳花叶病毒广西分离物外壳蛋白 *cp* 基因, 并克隆到 pMD-18T 载体上。将 *cp* 基因插入原核表达载体 pET-32a (+), 构建成重组质粒 CGMMVpET-32aCP, 并确证性序列测定, 随后将 CGMMVpET-32aCP 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 菌株。在 0.1 mmol/L 的 IPTG 终浓度、23 °C 恒温、90 rpm 摇床转速下诱导 25 小时, 获得 CGMMV-CP 外源融合蛋白的可溶表达, 将表达上清用 Ni 琼脂糖凝胶 FF 柱纯化, 经超滤离心管离心浓缩目的蛋白, 以纯化蛋白为抗原注射大耳白兔, 采血, 取血清, 提纯抗体 IgG, 纯度不小于 95%;

[0029] (2) 胶体金制备: 将 100 mL 0.01% 氯化金用 2-3 mL 的 1% 柠檬三钠还原成 15 nm-60 nm 的颗粒溶液;

[0030] (3) CGMMV 免疫胶体金溶液制备: 用 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  将胶体金溶液 pH 值调至 7-8.5, 将胶体金溶液按 100 mL 胶体金溶液中加入 0.5 mg-2 mg 步骤(1) 的 CGMMV 多克隆抗体, 混合均匀, 再加入 10%BSA 至终浓度 0.5-2% 进行封闭, 12000rpm 离心 20min, 去上清, 取沉淀即获得 CGMMV 免疫胶体金溶液。

[0031] (4) 将上述的 CGMMV 免疫胶体金溶液用 PBS 缓冲液进行稀释到工作浓度, 并加入 5-25% 蔗糖, 混匀后用喷金机喷涂到聚酯膜或玻璃纤维等标记垫介质上, 形成 CGMMV 免疫胶体金垫;

[0032] (5) 将 CGMMV 多克隆抗体用 0.01M 的 PBS 溶液进行稀释到工作浓度, 加入 2% 的蔗糖, 用划膜机点在硝酸纤维素膜检测线上, 羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维素膜质控线上;

[0033] (6) 将吸水滤纸制成的样品垫、CGMMV 免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上, 并贴上带有插入液体面最高限位的指示线 MAX 的胶带, 然后切割成试纸条;

[0034] (7) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装保存。

[0035] 实施例 2

[0036] 用本发明检测黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫胶体金试纸条检测黄瓜绿斑驳花叶病毒方法,包括以下步骤:

[0037] (1) 待测样品收集及处理:称取葫芦科植物叶片(或根、茎) 0.5 g 于 2 mL 样品管中,加入 0.01 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液,用玻棒捣碎,然后 8000 rpm 离心 5 分钟,取上清,即为待测样品溶液;

[0038] (2) 检测前将检测黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫胶体金试纸条恢复室温之后开袋使用;

[0039] (3) 将检测黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫胶体金试纸条从铝箔袋中取出,并在本试纸条样品垫上滴入步骤(1)的样品溶液,或将本试纸条插入步骤(1)制备的样品溶液,液面不超过指示线 MAX;

[0040] (4) 反应 5-10 分钟后判定检测结果:如图 3 所示,若检测试纸条在质控线位置和检测线位置各出现一条红色线,说明样品中含有 CGMMV,判定为阳性;若检测试纸条仅在质控线位置出现一条红色线,说明样品中不含有 CGMMV,判定为阴性;若检测线出现而质控线未出现红色条带,或质控线和检测线均未出现红色条带,检测无效,说明试纸条出现质量问题或操作不当,应重新检测或更换试纸条。

[0041] 实施例 3

[0042] 特异性实验

[0043] 用本发明检测黄瓜绿斑驳花叶病毒、西瓜花叶病毒(Watermelon mosaic virus)、小西葫芦黄花叶病毒(Zucchini yellow mosaic virus)、烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus)和南瓜花叶病毒(Squash mosaic virus)阳性样品,已证明本试纸的特异性,包括以下步骤:

[0044] (1) 待测样品收集及处理:称取经鉴定的上述病毒阳性植物叶片 0.5 g 于 2 mL 样品管中,加入 0.01 mol/L pH7.4 磷酸缓冲液,用玻棒捣碎,然后 8000 rpm 离心 5 分钟,取上清,即为待测样品溶液;

[0045] (2) 检测前将检测黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫胶体金试纸条恢复室温之后开袋使用;

[0046] (3) 将检测黄瓜绿斑驳花叶病毒免疫胶体金试纸条从铝箔袋中取出,并在本试纸条样品垫上滴入步骤(1)的样品溶液,或将本试纸条插入步骤(1)制备的样品溶液,液面不超过指示线 MAX;

[0047] (4) 反应 5-10 分钟后判定检测结果:如图 3 所示,若检测试纸条在质控线位置和检测线位置各出现一条红色线,判定为阳性;若检测试纸条仅在质控线位置出现一条红色线,判定为阴性;若检测线出现而质控线未出现红色条带,或质控线和检测线均未出现红色条带,检测无效,说明试纸条出现质量问题或操作不当,应重新检测或更换试纸条。

[0048] (5) 检测结果如图 4 所示。

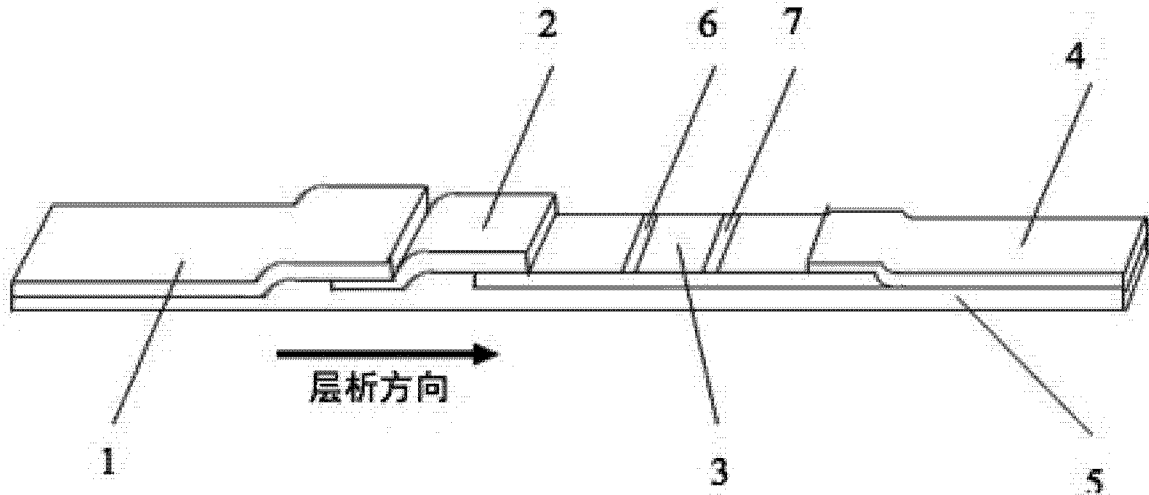


图 1

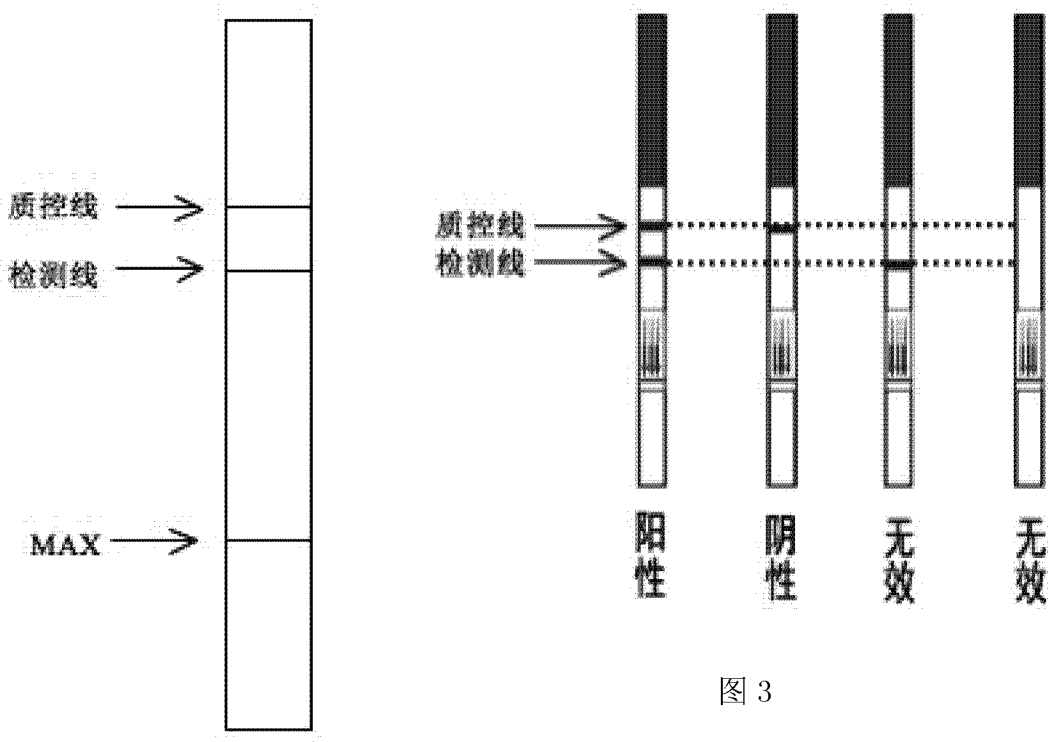


图 2

图 3



图 4

专利名称(译)	一种快速检测黄瓜绿斑驳花叶病毒的试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN103487579B</a>	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201310402974.8	申请日	2013-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院果树研究所		
申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院果树研究所		
当前申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院果树研究所		
[标]发明人	范国成 林雄杰 林志铿 胡茵青 陈庆河 翁启勇		
发明人	范国成 林雄杰 林志铿 胡茵青 陈庆河 翁启勇		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	蔡学俊		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN103487579A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV) 的免疫胶体金试纸条及其制备方法。将纯化的CGMMV多克隆抗体溶液点在硝酸纤维素膜的检测线上,羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维素膜的质控线上;分别将吸水滤纸制成的样品垫、CGMMV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次贴到一张带不干胶的PVC胶板上,制成试纸条。本发明的试纸条可检测出葫芦科植物中的CGMMV,适用于由CGMMV引起的病毒病检测和诊断。该方法简便、快速、成本低廉,5-10分钟即出结果,便可肉眼直接观察。适用于基层各级农业部门、农户和出入境检验部门开展病害的快速大量筛选检测,有助于及时有效的控制和扑灭疫情,具有广阔的应用前景。

