



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108088991 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(21)申请号 201611022429.6

(22)申请日 2016.11.21

(71)申请人 敖云霞

地址 550001 贵州省贵阳市云岩区中华北路264号附4号

(72)发明人 敖云霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书2页

(54)发明名称

点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法

(57)摘要

本发明公开了一种点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法,把苹果叶片放入0.02M磷酸盐缓冲液中进行研磨,然后加入等量氯仿离心提取抗原液,取兔抗苹果褪绿叶斑病毒血清和兔抗苹果茎沟病毒血清用抗体缓冲液稀释制成抗血清液,辣根过氧化物酶标A蛋白用0.02M磷酸盐溶解,使用时用抗体缓冲液稀释,将硝酸纤维素膜打上圆孔状印迹,在其上滴入2 μ l抗原液,然后再加上抗血清酶标A蛋白液和底物溶液,根据其斑点显色情况判断被检苹果是否带有潜隐病毒。

1. 点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法,其特征是:把待检苹果叶片放入0.019M-0.021M磷酸盐溶液中研磨,然后加入等量氯仿离心10-15分钟取上清液为抗原液;取兔抗苹果褪绿叶斑病毒血清和兔抗苹果茎沟病毒血清用抗体缓冲液稀释制成抗血清液,抗体缓冲液由0.019M-0.021M磷酸盐溶液,0.05%吐温20,2%聚乙烯吡咯烷酮和0.2%牛血清白蛋白制成;辣根过氧化物酶标记的A蛋白用0.02M磷酸盐溶解,使用时用抗体缓冲液稀释制成酶标A蛋白液;将硝酸纤维素膜用打孔器打圆孔状印迹,在圆孔状印迹上滴入2 μ l抗原液,然后浸入封闭缓冲液中30分钟,封闭缓冲液由0.02M磷酸盐,0.05%吐温20,2%聚乙烯吡咯烷酮和2%牛血清白蛋白制成;然后取出硝酸纤维素膜吸干,用0.02M磷酸盐加0.05%吐温20液洗涤,吸干;然后加抗血清液,每圆孔状印迹上加25 μ l,28 $^{\circ}$ C保湿孵育1小时,然后再用0.019M-0.021M磷酸盐溶液加0.05%吐温20液洗涤,吸干;然后浸入抗体缓冲液封闭15分钟,洗涤、吸干;再加入酶标A蛋白液,每圆孔状印迹上加25 μ l,28 $^{\circ}$ C保湿孵育1小时,洗涤、吸干;每圆孔状印迹上加25 μ l底物溶液,保湿避光孵育10-30分钟,带病毒样点显色;底物溶液由二氨基联苯胺四盐酸盐加咪唑制成,用时加过氧化氢;将显色的硝酸纤维素膜用水冲洗,再用蒸馏水洗涤,吸干,如圆孔状印迹上的斑点与硝酸纤维素膜颜色相同为无苹果潜隐病毒,如斑点颜色为黄褐色或褐色为有苹果潜隐病毒。

点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法

技术领域

[0001] 本发明涉及点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法技术领域。

背景技术

[0002] 用酶联免疫技术测试苹果潜隐病毒是当前广泛应用的检测技术,由于该技术检测过程需时较长,灵敏度、准确度和稳定性还不够高,数据重复性差、抗原、抗体和试剂药品用量大,耗资高,检测标本不能保存。

发明内容

[0003] 本发明的目的是发明一种点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法,使检测时间缩短、灵敏度、准确度和稳定性高,重复性好,检测成本低,标本可保存。

[0004] 本发明是这样实现的:把待检苹果叶片放入0.019M-0.021M磷酸盐溶液中研磨,然后加入等量氯仿离心10-15分钟取上清液为抗原液;取兔抗苹果褪绿叶斑病毒血清和兔抗苹果茎沟病毒血清用抗体缓冲液稀释制成抗血清液,抗体缓冲液由0.019M-0.021M磷酸盐溶液,0.05%吐温20,2%聚乙烯吡咯烷酮和0.2%牛血清白蛋白制成;辣根过氧化物酶标记的A蛋白用0.02M磷酸盐溶解,使用时用抗体缓冲液稀释制成酶标A蛋白液;将硝酸纤维素膜用打孔器打圆孔状印迹,在圆孔状印迹上滴入2 μ l抗原液,然后浸入封闭缓冲液中30分钟,封闭缓冲液由0.02M磷酸盐,0.05%吐温20,2%聚乙烯吡咯烷酮和2%牛血清白蛋白制成;然后取出硝酸纤维素膜吸干,用0.02M磷酸盐加0.05吐温20液洗涤,吸干,然后加抗血清液,每圆孔状印迹上加25 μ l,28 $^{\circ}$ C保湿孵育1小时,然后再用0.019M-0.021M磷酸盐溶液加0.05%吐温20液洗涤,吸干;然后浸入抗体缓冲液封闭15分钟,洗涤、吸干;再加入酶标A蛋白液,每圆孔状印迹上加25 μ l,28 $^{\circ}$ C保湿孵育1小时,洗涤、吸干;每圆孔状印迹上加25 μ l底物溶液,保湿避光孵育10-30分钟,带病毒样点显色;底物溶液由二氨基联苯胺四盐酸盐加咪唑制成,用时加过氧化氢;将显色的硝酸纤维素膜用水冲洗,再用蒸馏水洗涤,吸干,如圆孔状印迹上的斑点与硝酸纤维素膜颜色相同为无苹果潜隐病毒,如斑点颜色为黄褐色或褐色为有苹果潜隐病毒。

具体实施方式

[0005] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0006] 实施例1:采苹果叶片时间以春秋二季为宜,每个待检样品采1-2片叶,装入样品袋,再装入塑料袋,保湿存放待检;取待检苹果叶片0.5克加2倍体积的0.02M磷酸盐缓冲液研磨,加等量氯仿离心10-15分钟取上清液为抗原液;取兔抗苹果褪绿叶斑病毒血清和兔抗苹果茎沟病毒血清用抗体缓冲液稀释制成抗血清液,抗体缓冲液由0.019M-0.021M磷酸盐溶液,0.05%吐温20,2%聚乙烯吡咯烷酮和0.2%牛血清白蛋白制成;辣根过氧化物酶标记的A蛋白用0.02M磷酸盐溶解,使用时用抗体缓冲液稀释制成酶标A蛋白液;每种病毒抗血清应单独用1张硝酸纤维素膜,每个重复也可单用1张,硝酸纤维素膜的大小根据等检样品数

确定,按每个斑点占 1cm^2 剪裁,用直径 0.5cm^2 的打孔器在该膜上打圆孔状印迹,按设计要求绘制排列图,在圆孔状印迹上滴入 $2\mu\text{l}$ 抗原液,然后浸入封闭缓冲液中30分钟,封闭缓冲液由 0.02M 磷酸盐, 0.05% 吐温20, 2% 聚乙烯吡咯烷酮和 2% 牛血清白蛋白制成;然后取出硝酸纤维素膜吸干,用 0.02M 磷酸盐加 0.05% 吐温20液洗涤3次,每次5分钟,吸干;然后加抗血清液,每圆孔状印迹上加 $25\mu\text{l}$, 28°C 保湿孵育1小时,然后再用 0.019M - 0.021M 磷酸盐溶液加 0.05% 吐温20洗涤3次,每次5分钟,吸干;然后浸入抗体缓冲液封闭15分钟,洗涤3次,每次5分钟,吸干;再加入酶标A蛋白液,每圆孔状印迹上加 $25\mu\text{l}$, 28°C 保湿孵育1小时,洗涤3次,每次5分钟,吸干;每圆孔状印迹上加 $25\mu\text{l}$ 底物溶液,保湿避光孵育10-30分钟,带病毒样点显色,底物溶液由二氨基联苯胺四盐酸盐加咪唑制成,用时加 0.1% 过氧化氢;将显色地硝酸纤维素膜用水冲洗,再用蒸馏水洗涤,吸干,反应中止,根据样品斑点显色程度判断如下:

阴性:- 样品斑点与白色硝酸纤维素膜颜色相同

+ 样品斑点隐约可见淡黄褐色印迹

阳性 + 样品斑点为淡黄褐色印迹或仅周边显黄褐色

圆环、半圆环、中间不显色

++样品斑点黄褐色

+++样品斑点深黄褐色或褐色

将检测结果记入排列图,写出检测报告,连以硝酸纤维素膜一并归档保存。

专利名称(译)	点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法		
公开(公告)号	CN108088991A	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN201611022429.6	申请日	2016-11-21
[标]发明人	敖云霞		
发明人	敖云霞		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明公开了一种点免疫结合测试苹果潜隐病毒方法，把苹果叶片放入0.02M磷酸盐缓冲液中进行研磨，然后加入等量氯仿离心提取抗原液，取兔抗苹果褪绿叶斑病毒血清和兔抗苹果茎沟病毒血清用抗体缓冲液稀释制成抗血清液，辣根过氧化物酶标A蛋白用0.02M磷酸盐溶解，使用时用抗体缓冲液稀释，将硝酸纤维素膜打上圆孔状印迹，在其上滴入2 μ l抗原液，然后再加上抗血清酶标A蛋白液和底物溶液，根据其斑点显色情况判断被检苹果是否带有潜隐病毒。