

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/547

G01N 33/531

G01N 1/28



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410033669.7

[43] 公开日 2005 年 5 月 4 日

[11] 公开号 CN 1611945A

[22] 申请日 2004. 4. 15

[21] 申请号 200410033669.7

[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 汪继玲 李艳芳
周雪平 方 琦

[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 王明霞 张庆敏

权利要求书 5 页 说明书 15 页 附图 2 页

[54] 发明名称 烟草花叶病毒云南分离物 TAS -
ELISA 检测试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种烟草花叶病毒云南分离物 TAS - ELISA 检测试剂盒, 包括盒体、设在盒体内的酶标板和设在盒体内的用液, 盒体内的用液包括阳性对照、阴性对照、酶标抗体、缓冲液和底物, 盒体内的用液还包括烟草花叶病毒云南分离物的多克隆抗体、烟草花叶病毒云南分离物的单克隆抗体, 所述的烟草花叶病毒云南分离物多克隆抗体和所述的烟草花叶病毒云南分离物单克隆抗体由 20 ~ 30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原, 分别采用免疫注射法、单克隆抗体法制备而成; 本发明所述的检测试剂盒检测灵敏度高, 检测灵敏度可达到 0.01 ~ 0.001ng/ml, 比间接 ELISA 和 DAS - ELISA 检测灵敏度提高 100 ~ 1000 倍。

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

1. 烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒, 包括盒体、设在盒体内的酶标板和设在盒体内的用液, 盒体内的用液包括阳性对照、阴性对照、酶标抗体、缓冲液和底物, 其特征在于, 盒体内的用液还包括烟草花叶病毒多克隆抗体、烟草花叶病毒单克隆抗体, 所述的烟草花叶病毒多克隆抗体和所述的烟草花叶病毒单克隆抗体由 20~30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原, 分别采用免疫家兔和免疫小鼠法制备而成。

2. 根据权利要求 1 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 所述的烟草花叶病毒提取液的制备方法为: 先将含有烟草花叶病毒的病叶破碎, 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1: 1~3 (克/毫升), 匀浆, 过滤, 滤液中加入滤液体积 20~30% 的氯仿, 搅拌, 收集上清液; 然后在上清液中加入聚乙二醇至浓度为 4~8% (克/毫升), 氯化钠终浓度为 0.1M, 溶解后静置取沉淀, 沉淀用 0.01M 磷酸盐缓冲液悬浮, 重复沉淀、悬浮处理 1~3 次, 取上清液加入离心管离心, 沉淀用含 0.01M $MgCl_2$ 的 0.02M 磷酸钾盐缓冲液悬浮, 离心, 上清液即为病毒提纯液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 所述的烟草花叶病毒提取液的制备方法为:

1) 病叶剪碎, 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1: 1 (克/毫升), 搅拌充分匀浆, 过滤;

2) 滤液中加入滤液体积 25~30% 氯仿, 搅拌 5~20min, 4℃ 下 6000rpm 离心 5-20min, 收集上清;

3) 上清液中加入 PEG 至浓度为 6~8% (克/毫升), NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃ 下放置 4h~24h; 4℃ 下离心力为 10000g 下离心 10~30min;

4) 沉淀用 0.01M PBS 在 pH7.4~7.5 下悬浮;

5) 悬浮液中加入 PEG 至浓度为 4~8% (克/毫升), NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃ 放置 4h~24h; 4℃ 下离心力为 10000g 下离心 10~30min;

6) 沉淀用 0.01M PBS 在 pH7.4~7.5 下悬浮;

7) 在 4℃、6000rpm 离心转速下 5~20min, 取上清液;

8) 加入铺有 10ml 25% 蔗糖垫的离心管, 于 4℃ 下 33000rpm 离心 2~3h, 沉淀用 pH7.4~7.5, 含 0.01M $MgCl_2$ 的 0.02M 磷酸钾盐缓冲液悬浮, 低速离心, 取上清液即为病毒提纯液。

4. 根据权利要求 3 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 所述的抽提缓冲液为 0.02M 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.4~7.5, 含 0.1% 巯基乙醇。

5. 根据权利要求 1 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 所述的烟草花叶病毒云南分离物多克隆抗体由 20~30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原, 采用免疫家兔制备而成, 其制备方法为:

选用健康雄性家兔作为免疫动物, 将提纯病毒稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃ 保存; 然后进行免疫注射程序, 将 1ml 免疫抗原加 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，用 1ml 免疫抗原加 1ml 福氏完全佐剂，充分混合，在家兔双后足足垫注射，每点 1ml；一周后，用 1ml 免疫抗原耳静脉注射；一周后，用 2ml 免疫抗原耳静脉注射；7-10 天后，心脏全采血，分离血清，加入 0.1% NaN₃，在-70℃下保存，得 TMV 云南分离物多克隆抗体。

5 6. 根据权利要求 1 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒，其特征在于，所述的烟草花叶病毒单克隆抗体由 20~30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原，采用克隆抗体法制备而成，其制备方法：

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，将所述的病毒提纯液稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃保存；

10 单克隆抗体制备流程为将提纯病毒液免疫抗原细胞融合，ELISA 筛选，克隆，然后进行单克隆抗体亚类鉴定，纯化，真空冷冻干燥得单克隆抗体。

7. 根据权利要求 1 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒，其特征在于，所述的阳性对照采用含烟草花叶病毒的病叶，加入病毒抽提缓冲液研磨，离心力 2000g 下离心 10min，取上清在冷冻干燥机制成粉末状而成，可分装成
15 1000mg/每管，-20℃保存，使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用；

所述的阴性对照采用无病毒烟叶，同制备阳性对照方法制备而成；分装成 1000mg/每管，-20℃保存，使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用。

8. 根据权利要求 1 所述的烟草花叶病毒云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定检测试剂盒，其特征在于，所述的缓冲液包括包被缓冲液、病毒抽提缓冲液、
20 PBST、封闭缓冲液、底物缓冲液，具体用量如下：

1) 包被缓冲液：每个试剂盒中 4.52g，加 1000ml 双蒸水使用

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

溶解于 1000ml 双蒸水中，调 pH 值为 9.6；

25 2) PBST：每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g，加 8000ml 双蒸水使用
每 1000ml PBST 中含有：

NaCl 8.0g

KH₂PO₄ 0.2g

Na₂HPO₄·2H₂O 2.9g 或 Na₂HPO₄·12H₂O 7.2g

30 KCl 0.2g

溶解于 1000ml 双蒸水中，加入 0.5% tween20 充分混合；

3) 病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1:100 使用

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

35 溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；

或 PVP 10.0g

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；用时加入 1%脱脂奶粉 (W/V)；

4) 封闭缓冲液: PBST 中加入 5%的脱脂奶粉, 溶解;
或连接缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 1:100 使用

BAS 2.0g

PVP 10.0g

5 NaN₃ 0.2 g

溶解于 1000ml PBST 中, 调 pH 值为 7.4;

5) 底物缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 含 500mg 底物, 1:10 使用
10% 乙二醇胺(pH9.8)

6) 底物: 硝基苯磷酸盐。

10 9. 制备权利要求 1 所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的方法, 其特征在于, 包括如下步骤: 先将烟草花叶病毒进行分离提纯得病毒提取液, 然后采用病毒提取液进行烟草花叶病毒多克隆抗体及单克隆抗体的制备, 再对阳性对照、阴性对照、多克隆抗体、单克隆抗体、酶标抗体、缓冲液和底物进行制备组装而成。

15 10. 根据权利要求 9 述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

1) 所述的烟草花叶病毒的分离提纯

20 先将含有烟草花叶病毒的病叶破碎, 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重重量体积比为 1: 1~3, 匀浆, 过滤, 滤液中加入滤液体积 20~30%的氯仿, 搅拌, 收集上清液; 然后在上清液中加入聚乙二醇和氯化钠, PEG 在溶液中的浓度为 4~8% (克/毫升), NaCl 的终浓度为 0.1mol/L, 溶解后静置取沉淀, 沉淀用 0.01M 磷酸盐缓冲液悬浮, 重复沉淀、悬浮处理 1~3 次, 取上清液加入离心管离心, 沉淀用含 0.01M MgCl₂ 的 0.02M 磷酸钾盐缓冲液悬浮, 离心, 上清液即为病毒提纯液, 所得病毒浓度为 20-30mg/ml;

25 2). TMV 多克隆抗体的制备

选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物, 将提纯病毒稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃保存;

然后进行免疫注射程序, 将 1ml 免疫抗原加 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;

30 一周后, 用 1ml 免疫抗原加 1ml 福氏完全佐剂, 充分混合, 在家兔双后足足垫注射, 每点 1ml;

一周后, 用 1ml 免疫抗原耳静脉注射;

一周后, 用 2ml 免疫抗原耳静脉注射;

35 7-10 天后, 心脏全采血, 分离血清, 加入 0.1% NaN₃, 在-70℃下保存, 得 TMV 云南分离物多克隆抗体;

3) TMV 单克隆抗体的制备

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, 将所述的病毒提纯液稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃保存;

单克隆抗体制备流程为将提纯病毒液免疫抗原细胞融合, ELISA 筛选, 克隆,

然后进行单克隆抗体亚类鉴定，纯化，真空冷冻干燥得单克隆抗体；

4). 试剂盒的组装

(1) 阳性对照

5 采用含烟草花叶病毒的病叶，加入病毒抽提缓冲液研磨，离心力 2000g 下离心 10min，取上清在冷冻干燥机制成粉末状而成，可分装成 1000mg/每管，-20℃保存，使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用；

(2) 阴性对照

采用无病毒烟叶，同制备阳性对照方法制备而成；分装成 1000mg/每管，-20℃保存，使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用；

10 (3) 多克隆抗体

· 将所得的多克隆抗血清中加防腐剂 0.1%叠氮化钠，无菌分装后，密封、-70℃冷贮、备用；每个试剂盒中 100ul，使用时可用 PBST 或蒸馏水按 1：500 稀释；

(4) 单克隆抗体

15 将制备的抗体中加防腐剂 0.1%叠氮化钠，无菌分装后，密封，4℃保存，备用；每个试剂盒中 100ul，使用时可用 PBST 或蒸馏水按 1：500 稀释；

(5) 酶标抗体

酶标抗体为羊抗鼠 AP-IgG，分装，4℃保存，备用；每个试剂盒中 5ul，使用时可用 PBST 或蒸馏水按 1：500 稀释；

(6) 其他主要材料及药品

20 ① 包被缓冲液：每个试剂盒中 4.52g，加 1000ml 双蒸水使用

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

溶解于 1000ml 双蒸水中，调 pH 值为 9.6；

25 ② PBST：每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g，加 8000ml 双蒸水使用
每 1000ml PBST 中含有：

NaCl 8.0g

KH₂PO₄ 0.2g

Na₂HPO₄·2H₂O 2.9g 或 Na₂HPO₄·12H₂O 7.2g

KCl 0.2g

30 溶解于 1000ml 双蒸水中，加入 0.5% tween20 充分混合；

③ 病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：100 使用

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；

35 或 PVP 10.0g

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；用时加入 1%脱脂奶粉 (W/V)；

④ 封闭缓冲液：PBST 中加入 5%的脱脂奶粉，溶解；

或连接缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1 : 100 使用

BAS 2.0g

PVP 10.0g

NaN₃ 0.2 g

5 溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；

⑤ 底物缓冲液：每个试剂盒中 10ml，含 500mg 底物，1 : 10 使用
10% 乙二醇胺(pH9.8)

⑥ 底物：硝基苯磷酸盐。

烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒及其制备方法

5 技术领域

本发明涉及一种生物技术产品，具体涉及一种烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)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。

10 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 BIOREBA 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。本发明的技术人员近年来用 TAS-ELISA 检测了双生病毒云南分离物(已发表多篇相关论文), 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 and 我国台湾分别报道了 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。目前从现有的文献报道来看, 有关 TAS-ELISA 方法研究植物病毒的研究近年虽然有所增加, 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发现, 同时市场中尚无 TAS-ELISA 检测试剂盒的出现。

15 发明内容

本发明的目的在于提供一种灵敏度高、准确性强、高效的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒。

本发明的再一目的在于提供一种烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的制备方法, 该方法简便易行、易于规模化生产。

20 为了实现本发明目的, 本发明的烟草花叶病毒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, 包括盒体、设在盒体内的酶标板和设在盒体内的用液, 盒体内的用液包括阳性对照、阴性对照、酶标抗体、缓冲液和底物, 其特征在于, 盒体内的用液还包括烟草花叶病毒多克隆抗体、烟草花叶病毒单克隆抗体, 所述的烟草花叶病毒多克隆抗体和所述的烟草花叶病毒单克隆抗体由 20~
25 30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原, 分别采用免疫家兔和免疫小鼠法制备而成。

所述的烟草花叶病毒提取液的制备方法为: 先将含有烟草花叶病毒的病叶破碎, 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1: 1~3 (克/毫升), 匀浆, 过滤, 滤液中加入滤液体积 20~30%的氯仿, 搅拌, 收集上清液; 然后在上清液中加入聚乙二醇(PEG)至浓度为 4~8% (克/毫升), 氯化钠终浓度为 0.1M, 溶解后静置取沉淀, 沉淀用 0.01M 磷酸盐缓冲液悬浮, 重复沉淀、悬浮处理 1~3 次, 取上清液加入离心管离心, 沉淀用含 0.01M $MgCl_2$ 的 0.02M 磷酸钾盐缓冲液(KPB)悬浮, 离心, 上清液即为病毒提纯液。

具体地说, 所述的烟草花叶病毒提取液的制备方法为:

35 1) 病叶剪碎, 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1: 1 (克/毫升), 搅拌充分匀浆, 过滤;

2) 滤液中加入滤液体积 25~30%氯仿, 搅拌 5~20min, 4℃下 6000rpm 离心 5~20min, 收集上清;

3) 上清液中加入 PEG 至浓度为 6~8% (克/毫升), NaCl 终浓度为 0.1M, 溶

解后 4℃下放置 4h~24h; 4℃下离心力为 10000g 下离心 10~30min;

4) 沉淀用 0.01M PBS 在 pH7.4~7.5 下悬浮;

5) 悬浮液中加入 PEG 至浓度为 4~8%, NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃放置 4h~24h; 4℃下离心力为 10000g 下离心 10~30min;

5 6) 沉淀用 0.01M PBS 在 pH7.4~7.5 下悬浮;

7) 在 4℃、6000rpm 离心转速下 5~20min, 取上清液;

8) 加入铺有 10ml25%蔗糖垫的离心管, 于 4℃下 33000rpm 离心 2-3h, 沉淀用 pH7.4~7.5, 含 0.01M MgCl₂ 的 0.02M 磷酸钾盐缓冲液 (KPB) 悬浮, 低速离心, 取上清液即为病毒提纯液。

10 所述的抽提缓冲液为 0.02M 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 为 7.4~7.5, 含 0.1% 巯基乙醇。

本发明所述的匀浆、过滤、离心和悬浮, 均为本领域技术人员公知技术。

经检测, 本发明所述的病毒提纯液为乳白色液体, 病毒浓度为 20~30mg/ml。本发明所述的病毒提纯液纯度及含量采用电镜负染法及紫外分光光度仪进行检测, 15 具体方法为:

1. 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。在电镜下观察, 可见其含大量的 TMV 病毒粒子, 未见杂质。

20 2. 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。

病毒提纯液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, 所得病毒浓度为 20~30mg/ml。其中优选的提纯样品稀释 100 倍液中 25 $A_{260}=0.741$, $A_{280}=0.5935$, $A_{260}/A_{280}=1.25$, 病毒浓度 = $A_{260}/A_{280}^{0.01\%} \times 10=27.44\text{mg/ml}$ 。每克病叶得病毒 0.274 mg。

其中, 所述的烟草花叶病毒 (TMV) 云南分离物多克隆抗体由 20~30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原, 采用免疫家兔法制备而成。其制备方法为:

30 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物, 将提纯病毒稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃保存。

然后进行免疫注射程序, 将 1ml 免疫抗原加 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, 用 1ml 免疫抗原加 1ml 福氏完全佐剂, 充分混合, 在家兔双后足足垫 35 注射, 每点 1ml;

一周后, 用 1ml 免疫抗原耳静脉注射;

一周后, 用 2ml 免疫抗原耳静脉注射;

7-10 天后, 心脏全采血, 分离血清, 加入 0.1% NaN₃, 在 -70℃下保存, 得 TMV 云南分离物多克隆抗体。

对所采集的 TMV 云南分离物多克隆抗体进行检测分析，将病毒提纯液稀释至 0.01mg/ml，备用。将多克隆抗体倍比稀释为：1/10、1/20、1/40 1/20480，以间接 ELISA 法测定抗体效价。结果，经四次免疫家兔后采血，分离得到 35ml 抗血清，间接 ELISA 法测的效价为 1：10000-12000。

- 5 将多克隆抗体稀释至 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。结果，经四次免疫家兔后采血，分离得到 35ml 抗血清，最低检出浓度（检测灵敏度）达 0.01-0.001ng/ml。

- 10 在组装本发明所述的试剂盒时，所述的多克隆抗体可将所得的多克隆抗血清中加防腐剂 0.1%叠氮化钠（NaN₃），无菌分装后，密封、冷贮（-70℃）、备用。在使用时可保存于 4℃中，不宜反复冻融，有效期 2 年。每个试剂盒中 100ul，使用时可用洗涤液或蒸馏水按 1：500 稀释。

所述的烟草花叶病毒单克隆抗体由 20-30mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原，采用克隆抗体法制备而成。其制备方法：

- 15 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，将所述的病毒提纯液稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃保存。

单克隆抗体制备流程为将提纯病毒液免疫抗原细胞融合，ELISA 筛选，克隆，然后进行单克隆抗体亚类鉴定，纯化，真空冷冻干燥得单克隆抗体。

- 20 对所得单克隆抗体进行分析，筛选出一个 TMV 广谱单克隆抗体细胞株，间接 ELISA 测定抗体效价为：1：10000-12000。

在组装本发明所述的试剂盒时，所述的单克隆抗体可将制备的抗体中加防腐剂 0.1%叠氮化钠（NaN₃），无菌分装后，密封，4℃保存，备用。每个试剂盒中 100ul，使用时可用洗涤液或蒸馏水按 1：500 稀释。

- 25 本发明所述的烟草花叶病毒云南分离物三抗体夹心酶联免疫吸附测定（TAS-ELISA）检测试剂盒中，所述的阳性对照采用含烟草花叶病毒的病叶，加入病毒抽提缓冲液研磨，离心力 2000g 下离心 10min，取上清在冷冻干燥机制成粉末状而成，可分装成 1000mg/每管，-20℃保存，使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用。

- 30 所述的阴性对照采用无病毒烟叶，同制备阳性对照方法制备而成；分装成 1000mg/每管，-20℃保存，使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用。

本发明所述的试剂盒中所述的酶标抗体为羊抗鼠 AP-IgG，分装，4℃保存，备用。每个试剂盒中 5ul，使用时可用洗涤液或蒸馏水按 1：1000 稀释，可由 Sigma 公司购买。

其他主要材料及药品可按溶液体积称量分装，常温下保存。

- 35 所述的缓冲液包括包被缓冲液、病毒抽提缓冲液、封闭缓冲液、底物缓冲液，具体用量如下：

① 包被缓冲液：每个试剂盒中 4.52g，加 1000ml 双蒸水使用

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

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，加 8000ml 双蒸水使用

NaCl 8.0g

KH₂PO₄ 0.2g

5 Na₂HPO₄·2H₂O 2.9g 或 Na₂HPO₄·12H₂O 7.2g

KCl 0.2g

溶解于 1000ml 双蒸水中，加入 0.5% tween20（吐温-20）充分溶解；

③ 病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：100 使用

Na₂SO₃ 1.3g

10 NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；

或 PVP（聚乙烯吡咯烷酮） 10.0g

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

15 溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；用时加入 1%脱脂奶粉（W/V）；

④ 封闭缓冲液：PBST 中加入 5%的脱脂奶粉，溶解；

或连接缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：100 使用

BAS 2.0g

PVP 10.0g

20 NaN₃ 0.2 g

溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；

⑤ 底物缓冲液：每个试剂盒中 10ml，含 500mg 底物，1：10 使用

10% 乙二醇胺(pH9.8)

⑥ 底物：硝基苯磷酸盐（p-NPP）。

25 本发明所述的试剂盒可根据应用单位的实际需求，可组装成每个试剂盒检测 500 个样次的抗体及药品试剂量，可备用适量的滴管，比如 20 个一次性滴管，本发明所述的试剂盒可采用常规检测和快速检测。

30 采用常规检测时，所用的病毒抽提缓冲液为：Na₂SO₃1.3g，NaN₃0.2g，溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；所用的封闭缓冲液为：PBST 中加入 5%的脱脂奶粉，溶解。

采用快速检测时，所用病毒抽提缓冲液为：PVP 10.0g，Na₂SO₃1.3g，NaN₃0.2g，溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；用时加入 1%脱脂奶粉（W：V）；所用连接缓冲液为：BAS2.0g，PVP10.0g，NaN₃0.2g，溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4。

35 本发明所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：先将烟草花叶病毒进行分离提纯得病毒提取液，然后采用病毒提取液进行烟草花叶病毒多克隆抗体及单克隆抗体的制备，再对阳性对照、阴性对照、多克隆抗体、单克隆抗体、酶标抗体、缓冲液和底物进行制备组装而成。

具体地说，所述的试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

1. 所述的烟草花叶病毒的分离提纯:

先将含有烟草花叶病毒的病叶破碎,加抽提缓冲液,病叶与抽提缓冲液的重
量体积比为1:1~3(克/毫升),匀浆,过滤,滤液中加入滤液体积20~30%的氯仿,
搅拌,收集上清液;然后在上清液中加入聚乙二醇(PEG)至浓度为4~8%(克/
5 毫升),氯化钠终浓度为0.1M,溶解后静置取沉淀,沉淀用0.01M磷酸盐缓冲液悬
浮,重复沉淀、悬浮处理1~3次,取上清液加入离心管离心,沉淀用含0.01M MgCl₂
的0.02M磷酸钾盐缓冲液(KPB)悬浮,离心,上清液即为病毒提纯液,所得病毒
浓度为20~30mg/ml。

2. TMV 多克隆抗体的制备

10 选用2公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物,将提纯病毒稀释至1mg/ml,作
为免疫抗原,4℃保存。

然后进行免疫注射程序,将1ml免疫抗原加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;

15 一周后,用1ml免疫抗原加1ml福氏完全佐剂,充分混合,在家兔双后足足垫
注射,每点1ml;

一周后,用1ml免疫抗原耳静脉注射;

一周后,用2ml免疫抗原耳静脉注射;

7-10天后,心脏全采血,分离血清,加入0.1%NaN₃,在-70℃下保存,得TMV
云南分离物多克隆抗体。

20 3. TMV 单克隆抗体的制备

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,将所述的病毒提纯液稀释至1mg/ml,作为免疫抗原,4℃保存。

单克隆抗体制备流程为将提纯病毒液免疫抗原细胞融合,ELISA筛选,克隆,
然后进行单克隆抗体亚类鉴定,纯化,真空冷冻干燥得单克隆抗体。

25 4. 试剂盒的组装

(1) 阳性对照

采用含烟草花叶病毒的病叶,加入病毒抽提缓冲液研磨,离心力2000g下离心
10min,取上清在冷冻干燥机制成粉末状而成,可分装成1000mg/每管,-20℃保存,
使用时加入2ml PBST或蒸馏水溶解、稀释即可用。

30 (2) 阴性对照

采用无病毒烟叶,同制备阳性对照方法制备而成;分装成1000mg/每管,-20
℃保存,使用时加入2ml PBST或蒸馏水溶解、稀释即可用。

(3) 多克隆抗体

35 将所得的多克隆抗血清中加防腐剂0.1%叠氮化钠(NaN₃),无菌分装后,密封、
冷贮(-70℃)、备用。在使用时可保存于4℃中,不宜反复冻融,有效期2年。每
个试剂盒中100ul,使用时可用PBST或蒸馏水按1:500稀释。

(4) 单克隆抗体

将制备的抗体中加防腐剂0.1%叠氮化钠(NaN₃),无菌分装后,密封,4℃保
存,备用。每个试剂盒中100ul,使用时可用PBST或蒸馏水按1:500稀释。

(5) 酶标抗体

酶标抗体为羊抗鼠 AP-IgG, 分装, 4℃保存, 备用。每个试剂盒中 5ul, 使用时可用 PBST 或蒸馏水按 1:500 稀释。

(6) 其他主要材料及药品

5 ① 包被缓冲液: 每个试剂盒中 4.52g, 加 1000ml 双蒸水使用

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

溶解于 1000ml 双蒸水中, 调 pH 值为 9.6。

10 ②PBST: 每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g, 加 8000ml 双蒸水使用
每 1000ml PBST 中含有:

NaCl 8.0g

KH₂PO₄ 0.2g

Na₂HPO₄·2H₂O 2.9g 或 Na₂HPO₄·12H₂O 7.2g

KCl 0.2g

15 加水至 1000ml, 加入 0.5% tween20 (吐温-20) 充分溶解。

③ 病毒抽提缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 1:100 使用

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中, 调 pH 值为 7.4;

20 或 PVP 10.0g

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中, 调 pH 值为 7.4; 用时加入 1%脱脂奶粉 (W/V)。

④ 封闭缓冲液: PBST 中加入 5%的脱脂奶粉, 溶解;

25 或连接缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 1:100 使用

BAS 2.0g

PVP 10.0g

NaN₃ 0.2 g

溶解于 1000ml PBST 中, 调 pH 值为 7.4。

30 ⑤ 底物缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 含 500mg 底物, 1:10 使用
10% 乙二醇胺(pH9.8)

⑥ 底物: 硝基苯磷酸盐 (p-NPP)。

其中, 所述的烟草花叶病毒分离提纯的方法为:

35 1) 病叶剪碎, 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1:1, 搅拌充分匀浆, 过滤;

2) 滤液中加入滤液体积 25~30%氯仿, 搅拌 5~20min, 4℃下 6000rpm 离心 5~20min, 收集上清;

3) 上清液中加入 PEG 至浓度为 6~8%, NaCl 终浓度为 0.1M,, 溶解后 4℃下放置 4h~24h; 4℃下离心力为 10000g 下离心 10~30min;

- 4) 沉淀用 0.01M PBS 在 pH7.4~7.5 下悬浮;
- 5) 悬浮液中加入 PEG 至浓度为 4~8%, NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃ 放置 4h~24h; 4℃ 下离心力为 10000g 下离心 10~30min;
- 6) 沉淀用 0.01M PBS 在 pH7.4~7.5 下悬浮;
- 5 7) 在 4℃、6000rpm 离心转速下 5~20min, 取上清液;
- 8) 加入铺有 10ml25%蔗糖垫的离心管, 于 4℃ 下 33000rpm 离心 2~3h, 沉淀用 pH7.4~7.5, 0.02M KPB (含 0.01M MgCl₂) 悬浮, 低速离心, 取上清液即为病毒提纯液。

本发明的研究人员在已有 ELISA 检测试剂盒的基础上, 经过多年的研究, 研
10 制出 TAS-ELISA 检测试剂盒, 采用本发明所述的烟草花叶病毒云南分离物
TAS-ELISA 检测试剂盒, 检测灵敏度高, 检测灵敏度可达到 0.01~0.001ng/ml, 比
间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测灵敏度提高 100~1000 倍。而且采用本发明所述
的方法制备的 TAS-ELISA 检测试剂盒, 试剂成本便宜, 易于实现批量化生产, 仅 2
元人民币/样次, 在性价比上具有明显的市场竞争力, 对于研究、免疫和防治烟草病
15 毒有很大帮助, 可应用于脱病毒种苗(薯)、种球、工厂化育苗检测及种质材料进
出口检疫。

附图说明

- 图 1 多克隆抗体免疫注射程序
- 20 图 2 单克隆抗体克隆制备流程

具体实施方式

下面实施例进一步描述本发明, 但所述实施例仅用于说明本发明而不是限制本
发明。

25 实验例 1

本实验例的目的在于研究 TMV 云南分离物的 TAS-ELISA 检测试剂盒的常规
检测方法。

本发明的研究人员对试剂盒的常规检测方法进行研究, 总结出本发明所述的
TAS-ELISA 检测试剂盒进行烟草病毒检测时的检测方法, 具体如下:

- 30 1. TMV 多克隆抗体以 1:500 倍用包被缓冲液稀释, 加入酶标板, 每孔 100ul,
37℃ 下放置 3h。
2. PBST 洗板 6 次, 快速 3 次, 慢速 3 次, 3min/次, 拍干。
3. 样品加入 5~10 倍病毒抽提缓冲液研磨样品, 加入酶标板, 每孔 100ul, 每
个样品加两个孔, 4℃ 下放置过夜。同时如法设置阳性、阴性、空白对照。
- 35 4. 同上洗板。
5. 每孔加入 150ul 封闭缓冲液, 37℃ 下放置 30min。
6. 抛弃孔中液体, 拍干。
7. TMV 单抗以 1:500 倍用 PBST 稀释, 加入酶标板, 每孔 100ul, 37℃ 下放
置 3h。

8. 同上洗板。
9. 酶标抗体羊抗鼠 AP-IgG 以 1 : 10000 倍用 PBST 稀释, 加入酶标板, 每孔 100ul, 37℃ 下放置 3h。
10. 同上洗板。
- 5 11. 用底物缓冲液溶解底物至 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 405nm 读数判别检测结果。

实验例 2

- 10 本实验例的目的在于研究 TMV 云南分离物的 TAS-ELISA 检测试剂盒的快速检测方法。

本发明的研究人员对试剂盒的快速检测方法进行研究, 总结出本发明所述的 TAS-ELISA 检测试剂盒进行烟草病毒检测时的检测方法, 具体如下:

- 15 阳性对照、阴性对照、多克隆抗体、单克隆抗体、酶标抗体同常规检测方法制备、保存。

缓冲液略有改变:

① 包被缓冲液: 每个试剂盒中 4.52g, 加 1000ml 双蒸水使用

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

- 20 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, 加 8000ml 双蒸水使用

每 1000ml PBST 中含有:

NaCl 8.0g

KH₂PO₄ 0.2g

- 25 Na₂HPO₄·2H₂O 2.9g 或 Na₂HPO₄·12H₂O 7.2g

KCl 0.2g

加水至 1000ml, 加入 0.5% tween20 (吐温-20) 充分溶解。

③ 病毒抽提缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 1 : 100 使用

PVP 10.0g

- 30 Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

溶解于 1000ml PBST 中, 调 pH 值为 7.4; 用时加入 1% 脱脂奶粉 (W/V)。

④ 连接缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 1 : 100 使用

BAS 2.0g

- 35 PVP 10.0g

NaN₃ 0.2 g

溶解于 1000ml PBST 中, 调 pH 值为 7.4。

⑤ 底物缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 含 500mg 底物, 1 : 10 使用 10% 乙二醇胺(pH9.8)

⑥ 底物： 硝基苯磷酸盐 (p-NPP)。

快速检测流程为：

1. TMV 多克隆抗体以 1 : 500 倍用包被缓冲液稀释，加入酶标板，每孔 100ul，室温 (25℃) 下放置 2h。

5 2. PBST 快速洗板 6 次，拍干。

3. 样品中加入 5-10 倍病毒抽提缓冲液研磨样品，加入酶标板，每孔 100ul，每个样品加两个孔，室温 (25℃) 下放置 2.5h。同时设置阳性、阴性、空白对照。

4. PBST 快速洗板 6 次，拍干。

10 5. TMV 单抗以 1 : 500 倍与羊抗鼠 AP-IgG 以 1 : 10000 倍用连接缓冲液稀释，混合放置 10min，加入酶标板，每孔 100ul，室温 25℃ 下放置 2h。

6. PBST 快速洗板 8 次，拍干。

7. 用底物缓冲液溶解底物至 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 405nm 读数判别检测结果。

15

实验例 3

本实验例验证阴阳性判别、检测灵敏度与准确率比较。

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。

25 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。

本发明所述的 TAS-ELISA 检测试剂盒检测灵敏度达到 0.01-0.001ng/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。

30

实施例 1

本实施例所述的烟草花叶病毒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，包括箱体、设在箱体内的酶标板和设在箱体内的用液，箱体内的用液包括阳性对照、阴性对照、酶标抗体、缓冲液和底物，及烟草花叶病毒多克隆抗体和烟草花叶病毒单克隆抗体，所述的烟草花叶病毒多克隆抗体和所述的烟草花叶病毒单克隆抗体由 27.4mg/ml 病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原，分别采用免疫家兔和免疫小鼠法制备而成。

35

所述的烟草花叶病毒云南分离物 TAS-ELISA 检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

1. 烟草花叶病毒的分离提纯:

在田间采集病株样品, 经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 TMV, 且只含有该病毒, 样品采集后放入-70℃冰箱中保存备用。抽提缓冲液为 0.02M PBS (pH7.4 含 0.1%巯基乙醇)。

5 提纯方法:

1) 病叶剪碎。

2) 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重体积比为 1:1 (克/毫升), 电动搅拌机充分匀浆, 双层纱布过滤。

3) 滤液中加入滤液体积 30%氯仿, 搅拌 10min, 4℃ 6000rpm 离心 10min, 10 收集上清。

4) 上清中加入 PEG 至浓度为 6% (克/毫升), NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃放置 4h。

5) 4℃下, 离心力为 10000g 离心 20min。

6) 沉淀用 0.01M PBS(pH7.4)悬浮。

7) 悬浮液中加入至 PEG 浓度为 4%, NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃放置 24h。 15

8) 4℃下, 离心力为 10000g 离心 20min。

9) 沉淀用 0.01M PBS(pH7.4)悬浮。

10) 离心 6000rpm, 4℃, 10min。

11) 上清液即为粗提纯液。 20

12) 加入铺有 10ml25%蔗糖垫的离心管, 于 4℃下 33000rpm 离心 2h, 沉淀用 pH7.5, 0.02M KPB (含 0.01M MgCl₂) 悬浮, 低速离心, 上清液乳白色液体即为病毒提纯液。

对所述的病毒提纯液纯度及含量采用电镜负染法及紫外分光光度仪进行检测, 25 在电镜下观察, 可见其含大量的 TMV 病毒粒子, 未见杂质; 提纯样品稀释 100 倍液中 $A_{260}=0.741$, $A_{280}=0.5935$, $A_{260}/A_{280}=1.25$, 病毒浓度= $A_{260}/A_{280}^{0.01} \times 10=27.44\text{mg/ml}$; 每克病叶得病毒 0.274 mg。

2. TMV 多克隆抗体的制备

30 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物, 将提纯病毒稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃保存。

然后进行免疫注射程序, 将 1ml 免疫抗原加 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, 用 1ml 免疫抗原加 1ml 福氏完全佐剂, 充分混合, 在家兔双后足足垫注射, 每点 1ml;

35 一周后, 用 1ml 免疫抗原耳静脉注射;

一周后, 用 2ml 免疫抗原耳静脉注射;

7-10 天后, 心脏全采血, 分离血清, 加入 0.1% NaN₃, 在-70℃下保存, 得 TMV 云南分离物多克隆抗体。

对所采集的 TMV 云南分离物多克隆抗体进行检测分析, 将病毒提纯液稀释至

0.01mg/ml, 备用。将多克隆抗体倍比稀释为: 1/10、1/20、1/40 1/20480, 以间接 ELISA 法测定抗体效价。

结果, 经四次免疫家兔后采血, 分离得到 35ml 抗血清, 间接 ELISA 法测的效价为 1: 10240。

- 5 将多克隆抗体稀释至 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。

结果, 经四次免疫家兔后采血, 分离得到 35ml 抗血清, 最低检出浓度 (检测灵敏度) 达 0.01ng/ml。

10 3. TMV 单克隆抗体的制备

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, 将所述的病毒提纯液稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃ 保存。

单克隆抗体制备流程为将提纯病毒液免疫抗原细胞融合, ELISA 筛选, 克隆, 然后进行单克隆抗体亚类鉴定, 纯化, 真空冷冻干燥得单克隆抗体。

- 15 对所得单克隆抗体进行分析, 筛选出一个 TMV 广谱单克隆抗体细胞株, 间接 ELISA 测定抗体效价为: 1: 10000。

4. 试剂盒的组装

(1) 阳性对照

- 20 采用含烟草花叶病毒的病叶, 加入病毒抽提缓冲液研磨, 2000g 离心 10min, 取上清在冷冻干燥机制成粉末状而成, 可分装成 1000mg/每管, -20℃ 保存, 使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用。

(2) 阴性对照

采用无病毒烟叶, 同制备阳性对照方法制备而成; 分装成 1000mg/每管, -20℃ 保存, 使用时加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释即可用。

- 25 (3) 多克隆抗体

将所得的多克隆抗血清中加防腐剂 0.1% 叠氮化钠 (NaN_3), 无菌分装后, 密封、冷贮 (-70℃)、备用。在使用时可保存于 4℃ 中, 不宜反复冻融, 有效期 2 年。每个试剂盒中 100ul, 使用时可用 PBST 洗涤液或蒸馏水按 1: 500 稀释。

(4) 单克隆抗体

- 30 将制备的抗体中加防腐剂 0.1% 叠氮化钠 (NaN_3), 无菌分装后, 密封, 4℃ 保存, 备用。每个试剂盒中 100ul, 使用时可用 PBST 洗涤液或蒸馏水按 1: 500 稀释。

(5) 酶标抗体

酶标抗体为羊抗鼠 AP-IgG, 由 Sigma 公司购买。分装, 4℃ 保存, 备用。每个试剂盒中 5ul, 使用时可用 PBST 洗涤液或蒸馏水按 1: 1000 稀释。

- 35 (6) 其他主要材料及药品

① 包被缓冲液: 每个试剂盒中 4.52g, 加 1000ml 双蒸水使用

Na_2CO_3 1.59g

NaHCO_3 2.93g

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，加 8000ml 双蒸水使用
每 1000ml PBST 中含有：

	NaCl	8.0g	
	KH ₂ PO ₄	0.2g	
5	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2.9g 或 Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.2g
	KCl	0.2g	

加水至 1000ml，加入 0.5% tween20（吐温-20）充分溶解。

③ 病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：100 使用

	Na ₂ SO ₃	1.3g
10	NaN ₃	0.2g

溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；

④ 封闭缓冲液：PBST 中加入 5% 的脱脂奶粉，溶解；

⑤ 底物缓冲液：每个试剂盒中 10ml，含 500mg 底物，1：10 使用
10% 乙二醇胺(pH9.8)

15 ⑥ 底物：硝基苯磷酸盐（p-NPP）。

本实施例所述的试剂盒可组装成每个试剂盒检测 500 个样次的抗体及药品试剂量，备用 5 个酶标板，20 个一次性滴管；可用于常规规程检测，检测灵敏度可达到 0.001ng/ml，比间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测灵敏度提高 1000 倍。

20 实施例 2

其他同实施例 1，不同的是，烟草花叶病毒的分离提纯：

在田间采集病株样品，经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 TMV，且只含有该病毒，样品采集后放入 -70℃ 冰箱中保存备用。抽提缓冲液为 0.02M PBS（pH7.4 含 0.1% 巯基乙醇）。

25 提纯方法：

1) 病叶剪碎。

2) 加抽提缓冲液，病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1：2，电动搅拌机充分匀浆，双层纱布过滤。

30 3) 滤液中加入滤液体积 20% 氯仿，搅拌 20min，4℃ 6000rpm 离心 15min，收集上清。

4) 上清中加入 PEG 至浓度为 8%，NaCl 终浓度为 0.1M，溶解后 4℃ 放置 24h。

5) 4℃ 下，离心力为 10000g 离心 30min。

6) 沉淀用 0.01M PBS(pH7.5) 悬浮。

7) 悬浮液中加入至 PEG 浓度为 5%，NaCl 终浓度为 0.1M，溶解后 4℃ 放置
35 12h。

8) 4℃ 下，离心力为 10000g 离心 25min。

9) 沉淀用 0.01M PBS(pH7.5) 悬浮。

10) 离心 6000rpm，4℃，5min。

11) 上清液即为粗提纯液。

12) 加入铺有 10ml25%蔗糖垫的离心管, 于 4℃下 33000rpm 离心 2.5h, 沉淀用 pH7.5, 0.02M KPB (含 0.01M MgCl₂) 悬浮, 低速离心, 上清液乳白色液体即为病毒提纯液。

对所述的病毒提纯液纯度及含量采用电镜负染法及紫外分光光度仪进行检测, 病毒浓度为 29.8mg/ml。

由此病毒提纯液所得多克隆抗体进行检测分析, 间接 ELISA 法测的效价为 1:11850, 最低检出浓度 (检测灵敏度) 达 0.001ng/ml。

所得单克隆抗体进行分析, 筛选出一个 TMV 广谱单克隆抗体细胞株, 间接 ELISA 测定抗体效价为: 1:12000。

该试剂盒的检测灵敏度可达到 0.06ng/ml, 比间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测灵敏度提高 800 倍。

实施例 3

其他同实施例 1, 不同的是, 烟草花叶病毒的分离提纯:

在田间采集病株样品, 经电子显微镜和标准抗体检测含有大量 TMV, 且只含有该病毒, 样品采集后放入-70℃冰箱中保存备用。抽提缓冲液为 0.02M PBS (pH7.4 含 0.1%巯基乙醇)。

提纯方法:

- 1) 病叶剪碎。
- 2) 加抽提缓冲液, 病叶与抽提缓冲液的重量体积比为 1: 3, 电动搅拌机充分匀浆, 双层纱布过滤。
- 3) 滤液中加入滤液体积 25%氯仿, 搅拌 5min, 4℃ 6000rpm 离心 5min, 收集上清。
- 4) 上清中加入 PEG 至浓度为 7%, NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃放置 12h。
- 5) 4℃下, 离心力为 10000g 离心 10min。
- 6) 沉淀用 0.01M PBS(pH7.5)悬浮。
- 7) 悬浮液中加入至 PEG 浓度为 4%, NaCl 终浓度为 0.1M, 溶解后 4℃放置 8h。
- 8) 4℃下, 离心力为 10000g 离心 15min。
- 9) 沉淀用 0.01M PBS(pH7.5)悬浮。
- 10) 离心 6000rpm, 4℃, 15min。
- 11) 上清液即为粗提纯液。
- 12) 加入铺有 10ml25%蔗糖垫的离心管, 于 4℃下 33000rpm 离心 3h, 沉淀用 pH7.5, 0.02M KPB (含 0.01M MgCl₂) 悬浮, 低速离心, 上清液乳白色液体即为病毒提纯液。

对所述的病毒提纯液纯度及含量采用电镜负染法及紫外分光光度仪进行检测, 病毒浓度为 21.3mg/ml。

由此病毒提纯液所得多克隆抗体进行检测分析, 间接 ELISA 法测的效价为 1:10950, 最低检出浓度 (检测灵敏度) 达 0.005ng/ml。

所得单克隆抗体进行分析，筛选出一个 TMV 广谱单克隆抗体细胞株，间接 ELISA 测定抗体效价为：1:1150。

该试剂盒的检测灵敏度可达到 0.01ng/ml，比间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测灵敏度提高 100 倍。

5

实施例 4

本实施例所述的试剂盒用于快速规程检测，其中阳性对照、阴性对照、多克隆抗体、单克隆抗体、酶标抗体同常规检测方法制备、保存，即同实施例 1。

各用液具体为：

10 ① 包被缓冲液：每个试剂盒中 4.52g，加 1000ml 双蒸水使用

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

溶解于 1000ml 双蒸水中，调 pH 值为 9.6。

15 ② PBST：每个试剂盒中 90.4g 或 124.8 g，加 8000ml 双蒸水使用

每 1000ml PBST 中含有：

NaCl 8.0g

KH₂PO₄ 0.2g

Na₂HPO₄·2H₂O 2.9g 或 Na₂HPO₄·12H₂O 7.2g

KCl 0.2g

20 加水至 1000ml，加入 0.5% tween20（吐温-20）充分溶解。

③ 病毒抽提缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：100 使用

PVP 10.0g

Na₂SO₃ 1.3g

NaN₃ 0.2g

25 溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4；用时加入 1%脱脂奶粉（W/V）。

④连接缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：100 使用

BAS 2.0g

PVP 10.0g

NaN₃ 0.2 g

30 溶解于 1000ml PBST 中，调 pH 值为 7.4。

⑤ 底物缓冲液：每个试剂盒中 10ml，1：10 使用

10% 乙二醇胺(pH9.8)

⑥ 底物： 硝基苯磷酸盐（p-NPP）。

35 本实施例的检测灵敏度可达到 0.001ng/ml，比间接 ELISA 和 DAS-ELISA 检测灵敏度提高 1000 倍。

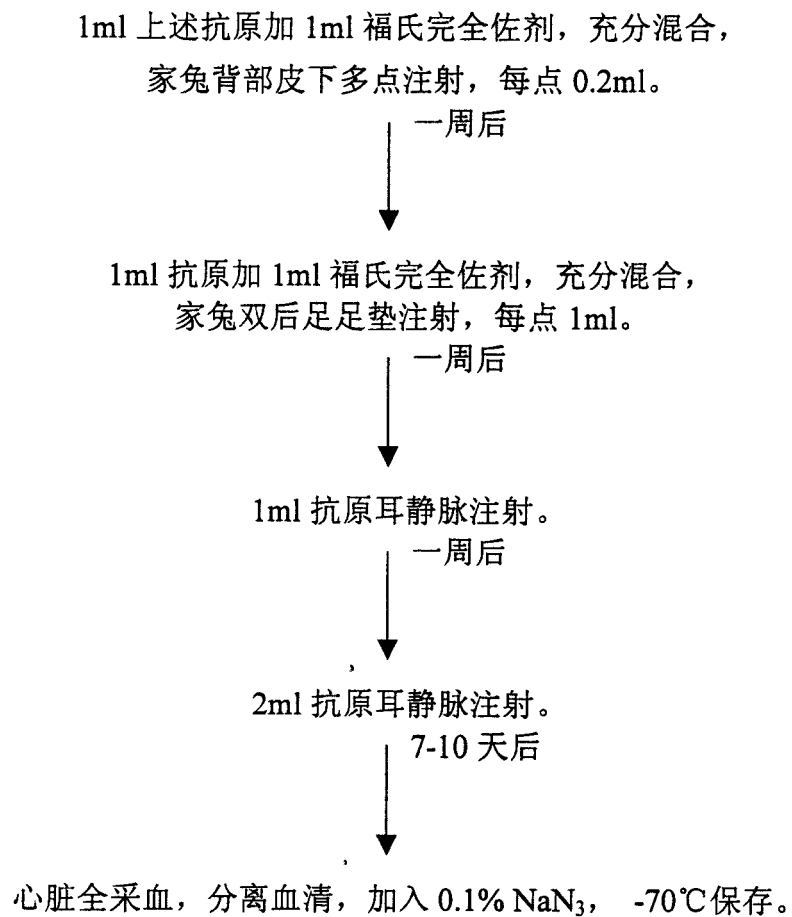


图1

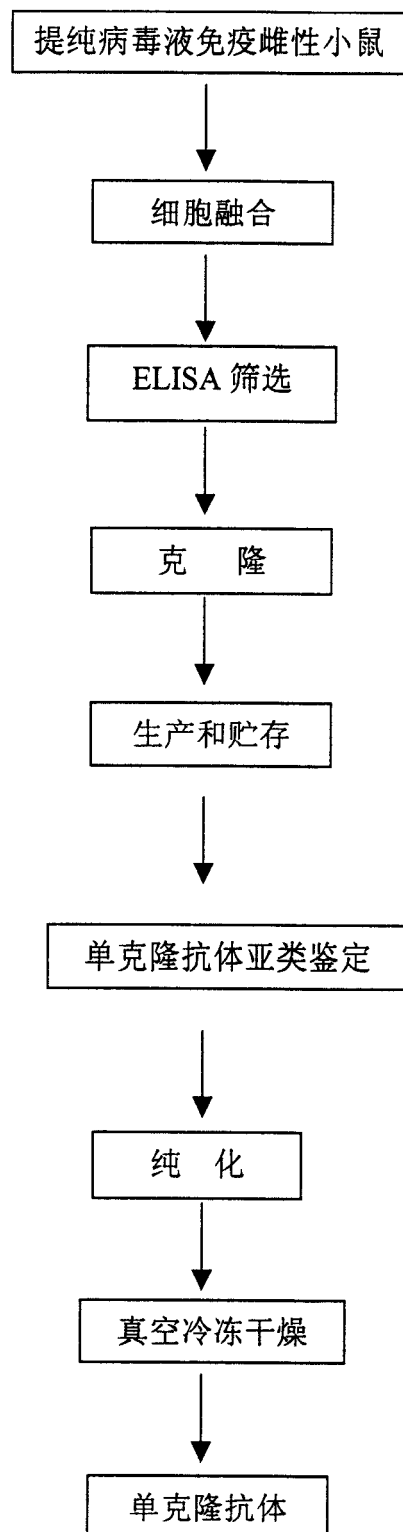


图 2

专利名称(译)	烟草花叶病毒云南分离物TAS - ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN1611945A	公开(公告)日	2005-05-04
申请号	CN200410033669.7	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 汪继玲 李艳芳 周雪平 方琦		
发明人	张仲凯 丁铭 汪继玲 李艳芳 周雪平 方琦		
IPC分类号	G01N1/28 G01N33/531 G01N33/547		
代理人(译)	王明霞 张庆敏		
其他公开文献	CN1281959C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种烟草花叶病毒云南分离物TAS - ELISA检测试剂盒，包括盒体、设在盒体内的酶标板和设在盒体内的用液，盒体内的用液包括阳性对照、阴性对照、酶标抗体、缓冲液和底物，盒体内的用液还包括烟草花叶病毒云南分离物的多克隆抗体、烟草花叶病毒云南分离物的单克隆抗体，所述的烟草花叶病毒云南分离物多克隆抗体和所述的烟草花叶病毒云南分离物单克隆抗体由20~30mg/ml病毒浓度的烟草花叶病毒提取液作为免疫抗原，分别采用免疫注射法、单克隆抗体法制备而成；本发明所述的检测试剂盒检测灵敏度高，检测灵敏度可达到0.01~0.001ng/ml，比间接ELISA和DAS - ELISA检测灵敏度提高100~1000倍。

