



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101852807 A

(43) 申请公布日 2010.10.06

(21) 申请号 201010172279.3

C07K 16/06(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.14

(71) 申请人 云南省农业科学院生物技术与种质
资源研究所

地址 650223 云南省昆明市学云路9号

(72) 发明人 张仲凯 董家红 苏晓霞 丁铭
方琦 李婷婷 张丽珍

(74) 专利代理机构 昆明正原专利代理有限责任
公司 53100

代理人 陈左

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 7/02(2006.01)

C07K 16/10(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒,试剂盒包含阳性对照、阴性对照、高粱花叶病毒多克隆抗体、高粱花叶病毒单克隆抗体、酶标抗体及其他材料和药品,其中,高粱花叶病毒多克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后,通过家兔免疫分离血清得到;高粱花叶病毒单克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后,通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到;本发明制备的 TAS-ELISA 检测试剂盒检测灵敏度高、特异性强,并具有较高的可重复性、经济实用性。

1. 一种高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒, 该试剂盒包括阳性对照、阴性对照、高粱花叶病毒多克隆抗体、高粱花叶病毒单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品, 将阳性对照、阴性对照、高粱花叶病毒多克隆抗体、高粱花叶病毒单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品组装得到试剂盒, 所说的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, 其特征在于高粱花叶病毒多克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后, 通过家兔免疫分离血清得到; 高粱花叶病毒单克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后, 通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到;

所述的高粱花叶病毒通过采集含有高粱花叶病毒的甘蔗病株样品、经检测提纯得到;

采集检测过程为: 在田间采集甘蔗病株样品, 经电子显微镜和标准抗体检测含有大量高粱花叶病毒, 且只含有该病毒, 样品采集后放入 -80°C 冰箱中保存备用;

高粱花叶病毒提纯的过程为:

感病甘蔗叶片, 加 PB 抽提缓冲液, 病叶与 PB 抽提缓冲液的重量体积比为 1 : 2, 单位为克 / 毫升; 电动搅拌机充分匀浆, 双层纱布过滤; 滤液中加入 20% 氯仿, 在 4°C 搅拌 15min; 在 8000g 离心力、 4°C 下离心 15min; 弃沉淀, 收集上清液; 上清液中加入其体积 5% 重量的工业级纤维素酶, 单位为克 / 毫升, 37°C 搅拌温育 45min; 在 8000g 离心力、 4°C 下离心 15min; 弃沉淀, 收集上清液; 上清液中加入 6% PEG 和 3% NaCl, 搅拌溶解后 4°C 静置 4h 或过夜; 在 10000g 离心力、 4°C 下离心 20min; 弃上清液, 沉淀用 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤; 在 10000g 离心力、 4°C 下离心 20min; 收集上清液; 沉淀重新悬浮离心 3 遍; 合并上清液, 在 80000g 离心力、 4°C 下离心 120min; 弃上清液, 沉淀用 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤; 在 10000g 离心力、 4°C 下离心 20min; 收集上清液; 沉淀重新悬浮离心 3 遍; 合并上清液, 上清液即为病毒粗提纯液; 清液加入加有 10% -50% 的蔗糖垫的离心管中, 在 80000g 离心力、 4°C 下, 水平离心 120min; 收集含有病毒层液体, 在 80000g 离心力、 4°C 下离心 120min; 弃上清液, 沉淀用 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液充分悬浮洗涤; 沉淀悬浮液即为病毒精提纯液;

所述的高粱花叶病毒多克隆抗体由以下过程制备得到:

1) 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物, 将提纯的高粱花叶病毒稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4°C 下保存;

2) 进行免疫注射, 将 1ml 提纯的高粱花叶病毒加 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 提纯的高粱花叶病毒加 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 提纯的高粱花叶病毒耳静脉注射; 一周后, 取 2ml 提纯的高粱花叶病毒, 耳静脉注射; 7-10 天后, 心脏全采血, 分离血清, 得高粱花叶病毒多克隆抗体;

所述的高粱花叶病毒单克隆抗体由以下过程制备得到:

1) 选用 Balb/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, 将高粱花叶病毒提纯液稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4°C 下保存;

2) 高粱花叶病毒单克隆抗体制备, 提纯的高粱花叶病毒免疫雌性小鼠, 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, 得高粱花叶病毒单克隆抗体。

2. 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)、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;

2)、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;

3)、高粱花叶病毒多克隆抗体:上述制备的多克隆抗体中加 0.1% 叠氮化钠作为防腐,无菌分装后,密封、-80℃ 冷贮备用,每个试剂盒中装有按 1 : 500 稀释的多克隆抗体 100 μ l ;

4)、高粱花叶病毒单克隆抗体:上述制备的单克隆抗体中加 0.1% 叠氮化钠作为防腐,无菌分装后密封,4℃ 保存备用;每个试剂盒中装有按 1 : 500 稀释的单克隆抗体 100 μ l ;

5)、酶标抗体:Sigma 公司购买,分装,4℃ 保存备用;每个试剂盒中装有按 1 : 10000 稀释的酶标抗体 5 μ l ;

6) 其他主要材料及药品:按溶液体积称量分装,常温下保存。

3. 根据权利要求 1 或 2 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:每个试剂盒中包括 1.59g Na_2CO_3 和 2.93g NaHCO_3 ;使用时,加 1000ml 双蒸水,将 1.59g Na_2CO_3 和 2.93g 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 1000ml PBST 含有 8.0g NaCl 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g KCl 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 或者 8.0g NaCl 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g 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,由 10ml PBST 中溶解 1.3g Na_2SO_3 和 0.2g NaN_3 得到,按 1 : 100 使用;使用时,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,由 pH 为 9.8 的 10ml 的 10% 乙二醇胺溶解 500mg 底物得到,底物为硝基苯磷酸盐,500mg/ 试剂盒;

⑥ PB 抽提缓冲液:0.2mol/L 磷酸盐缓冲液,含 0.01mol/L EDTA-Na 和 0.1% 巯基乙醇, pH7.6。

高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 高粱花叶病毒 *Sorghum mosaic virus, SrMV*, 属于马铃薯 Y 病毒科马铃薯 Y 病毒属成员, 病毒粒子长 750nm, 单链正义 RNA, 外壳蛋白分子量为 36kDa, 在感病组织内形成风轮状内涵体。由高粱花叶病毒引起的甘蔗花叶病在我国浙江、云南发生普遍且危害严重。感病植株节间缩短、含糖量下降、品质退化。该病毒可随种蔗和蚜虫传播, 爆发流行的风险较高, 是甘蔗生产上为害较大的病毒病害之一。因此需要建立快速、准确、灵敏的检测方法。目前报道高粱花叶病毒的检测主要以电镜观察、RT-PCR 检测为主, 这些方法存在特异性、准确率不高等不足。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒, 利用提纯的高粱花叶病毒制备高效价、高特异性、高灵敏度的多克隆抗体和单克隆抗体建立的 TAS-ELISA 检测试剂盒, 具有准确性强、灵敏度高和规模化生产等优点, 克服了上述现有技术存在的缺点。

[0004] 本发明的另一目的在于提供一种高粱花叶病毒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。

[0005] 本发明提出的这种试剂盒包括阳性对照、阴性对照、高粱花叶病毒多克隆抗体、高粱花叶病毒单克隆抗体、酶标抗体及其它材料和药品, 将阳性对照、阴性对照、高粱花叶病毒多克隆抗体、高粱花叶病毒单克隆抗体、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, 其特征在于所述的高粱花叶病毒多克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒后, 通过家兔免疫分离血清得到; 所述的高粱花叶病毒单克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后, 通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到。

[0006] 上述的高粱花叶病毒通过采集含有高粱花叶病毒的甘蔗病株样品、经检测提纯得到;

[0007] 上述的病毒抽提缓冲液的制备: 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高粱花叶病毒且只含有该病毒, 样品采集后放入 -80°C 冰箱中保存备用; 所得抽提缓冲液为 0.2M 的 PBS, 其 pH7.4、含 0.5% 巯基乙醇, 0.01M EDTA。

[0008] 病毒精提纯液的提纯:

[0009] 感病甘蔗叶片, 加 PB 抽提缓冲液, 病叶与 PB 抽提缓冲液的重量体积比为 1 : 2, 单位为克 / 毫升; 电动搅拌机充分匀浆, 双层纱布过滤; 滤液中加入 20% 氯仿, 4°C , 搅拌 15min; 在 8000g 离心力、 4°C 下, 离心 15min; 弃沉淀, 收集上清液。上清液中加入其体积 5% 重量的工业级纤维素酶, 单位为克 / 毫升, 37°C 搅拌温育 45min; 在 8000g 离心力、 4°C 下, 离

心 15min ;弃沉淀,收集上清液。上清液中加入 6% PEG,3% NaCl,搅拌溶解后 4℃静置 4h 或过夜 ;在 10000g 离心力、4℃下,离心 20min ;弃上清液,沉淀用 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤 ;在 10000g 离心力、4℃下,离心 20min ;收集上清液 ;沉淀重新悬浮离心 3 遍 ;合并上清液,在 80000g 离心力、4℃下,离心 120min ;弃上清液,沉淀用 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤 ;在 10000g 离心力、4℃下,离心 20min ;收集上清液 ;沉淀重新悬浮离心 3 遍 ;合并上清液,上清液即为病毒粗提纯液 ;清液加入加有 10% -50% 的蔗糖垫的离心管中,在 80000g 离心力、4℃下,水平离心 120min ;收集含有病毒层液体,在 80000g 离心力、4℃下,离心 120min ;弃上清液,沉淀用 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液充分悬浮洗涤 ;沉淀悬浮液即为病毒精提纯液。

[0010] 该病毒精提纯液电镜下观察含较大量的高粱花叶病毒病毒粒子,未见杂质 ;紫外分光光度仪上测定 $A_{260}/A_{280} = 0.869$ 。经紫外分光光度仪检测,200nm-400nm 全波长扫描图显示为典型病毒扫描图,提纯样品稀释 10 倍液中 $A_{260} = 0.8539$, $A_{280} = 0.5457$, $A_{260}/A_{280} = 1.5678$, 病毒浓度 = $A_{280} \times 1.5 - A_{260} \times 0.75 = 1.78125\text{mg/ml}$ 。

[0011] 高粱花叶病毒多克隆抗体的制备步骤 :

[0012] 1) 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物,将高粱花叶病毒精提纯液稀释至 1mg/ml,作为免疫抗原,4℃下保存 :

[0013] 2) 进行免疫注射 :取上一步骤获得的 1ml 高粱花叶病毒抗原,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,取 1ml 高粱花叶病毒抗原,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,取 1ml 高粱花叶病毒抗原在家兔耳静脉注射 ;一周后,取 2ml 高粱花叶病毒抗原,在家兔耳静脉注射 ;7-10 天后,心脏全采血,分离血清,加入 0.1% NaN_3 , -70℃保存,得高粱花叶病毒多克隆抗体。

[0014] 3) 抗体效价的测定 :稀释提纯的高粱花叶病毒至 0.1mg/ml,备用。将上述得到的多克隆抗体倍比稀释为 :1/100、1/500、1/1000..... 1/100000,以间接 ELISA 法测定抗体效价。

[0015] 4) 抗体灵敏度的测定 :稀释多克隆抗体至 1mg/ml,备用。将提纯的高粱花叶病毒稀释为 :1mg/ml、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。

[0016] 结果与分析 :经四次免疫家兔后采血,分离得到 40ml 抗血清,间接 ELISA 法测的效价为 1 : 20000,工作效价为 1 : 5000。最低检出浓度,即检测灵敏度达 0.01ng/ml。高粱花叶病毒单克隆抗体的制备步骤 :

[0017] 1) 选用 B a1 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,将提纯的高粱花叶病毒稀释至 1mg/ml 作为免疫抗原,4℃下保存 ;

[0018] 2) 高粱花叶病毒单克隆抗体制备,提纯的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,得高粱花叶病毒单克隆抗体。

[0019] 结果 :筛选出一个高粱花叶病毒广谱单克隆抗体细胞株,间接 ELISA 测定抗体效价为 1 : 5000 ~ 10000。

[0020] 试剂盒的组装 :

[0021] 1)、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°C 保存, 使用时向管中加入 2ml PEST 或蒸馏水溶解、稀释;

[0022] 2)、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°C 保存, 使用时向管中加入 2ml PBST 或蒸馏水溶解、稀释;

[0023] 3)、高粱花叶病毒多克隆抗体:上述制备的多克隆抗体中加 0.1% 叠氮化钠 NaN_3 作为防腐, 无菌分装后, 密封、 -80°C 冷贮、备用。使用单位购买后, 可保存于 4°C 中, 不宜反复冻融, 有效期 2 年。每个试剂盒中装有按 1 : 500 稀释的多克隆抗体 $100\ \mu\text{l}$;

[0024] 4)、单克隆抗体:上述制备的单克隆抗体中加 0.1 叠氮化钠 NaN_3 作为防腐, 无菌分装后密封, 4°C 保存, 备用。每个试剂盒中装有按 1 : 500 稀释的单克隆抗体 $100\ \mu\text{l}$;

[0025] 5)、酶标抗体:Sigma 公司购买, 分装, 4°C 保存, 备用。每个试剂盒中装有按 1 : 10000 稀释的酶标抗体 $5\ \mu\text{l}$;

[0026] 6)、其他主要材料及药品:按溶液体积称量分装, 常温下保存, 具体用量如下:

[0027] ①包被缓冲液:每个试剂盒中装有由 1.59g Na_2CO_3 +2.93g NaHCO_3 组成的包被缓冲液 4.52g, 使用时, 加 1000ml 双蒸水, 将包被缓冲液溶解于 1000ml 双蒸水中, 调 pH 值为 9.6;

[0028] ②PBST:每个试剂盒中装有 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 NaCl 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g KCl 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 或者含有 8.0g NaCl 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g KCl 、7.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$;

[0029] ③病毒抽提缓冲液:每个试剂盒中装有 10ml, 该 10ml PBST 中溶解 1.3g Na_2SO_3 和 0.2g NaN_3 , 使用时按 1 : 100 溶解于 1000ml 双蒸水中, 调 pH 值为 7.4;

[0030] ④封闭缓冲液:PBST 中加入 5% 的脱脂奶粉, 溶解, 即用即配;

[0031] ⑤底物缓冲液:每个试剂盒中有 10ml, 该 10ml 的底物缓冲液中有 $\text{pH} = 9.8$ 的 10% 乙二醇胺和溶解 500mg 底物, 使用时按 1 : 10 用 100ml $\text{pH} = 9.8$ 的 10% 乙二醇胺稀释;底物为硝基苯磷酸盐 p-NPP, 500mg/ 试剂盒;

[0032] ⑥PB 抽提缓冲液:0.2mol/L 磷酸盐缓冲液, 含 0.01mol/L EDTA-Na 和 0.1% 巯基乙醇, $\text{pH}7.6$ 。

[0033] 本发明制备的 TAS-ELISA 检测试剂盒检测灵敏度高、特异性强, 并具有较高的可重复性、经济实用性。

[0034] 高粱花叶病毒的 TAS-ELISA 检测试剂盒的检测规程

[0035] 1) 高粱花叶病毒多克隆抗血清按 1 : 500 稀释后, 加入酶标板或包被缓冲液稀释, 每孔 $100\ \mu\text{l}$, 37°C 下放置 3h。

[0036] 2)PBST 洗板 6 次, 快速 3 次, 慢速 3 次, 3min/ 次, 拍干。

[0037] 3) 样品按 5-10 倍加入病毒抽提缓冲液, 研磨样品, 加入酶标板, 每孔 $100\ \mu\text{l}$, 4°C 下放置过夜。

[0038] 4) 同上洗板。

[0039] 5) 每孔加入 150ul 封闭缓冲液, 37°C 下放置 30min。

[0040] 6) 抛弃孔中液体, 拍干。

[0041] 7) 高粱花叶病毒多克隆抗体按 1 : 500 稀释及 PBST 稀释后, 加入酶标板, 每孔 100ul, 37°C 下放置 3h。

[0042] 8) 同上洗板。

[0043] 9) 羊抗鼠 AP-IgG 用 PBST 按 1 : 10000 稀释, 稀释后, 加入酶标板, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 下放置 3h.

[0044] 10) 同上洗板。

[0045] 11) 用底物缓冲液按 1mg/ml 溶解底物, 加入酶标板, 每孔 100 μ l, 在 25 $^{\circ}$ C 室温下至充分显色, 每孔加入 50 μ l 1N NaOH 终止显色 ; 肉眼或酶标仪读数。

[0046] 阴阳性判别、检测灵敏度与准确率比较 :

[0047] 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 倍范围时, 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。

[0048] 检测灵敏度达到 0.01ng/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 100 倍。

[0049] 本发明的优点是 : 1) 提供的高粱花叶病毒的特异性抗体, 运用 TAS-ELISA 能够高度特异、准确、灵敏的检测高粱花叶病毒 ; 2) 利用本发明所制备的试剂盒可有效地检测田间作物高粱花叶病毒的检测。

[0050] 本发明制备了高粱花叶病毒的特异性强、灵敏度高、效价高的抗体, 并应用其建立了能够特异、准确、灵敏地检测高粱花叶病毒的特异性 TAS-ELISA 检测试剂盒。

具体实施方式

[0051] 1. 高粱花叶病毒的分离提纯

[0052] 在田间采集典型甘蔗病株样品, 经电子显微镜和 PCR 检测含有大量 SrMV, 且不含其它病毒, 采集后接种无毒甘蔗植株, 含 SrMV 样品产生典型花叶症状后, 采集叶片, 去叶脉后放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

[0053] 高粱花叶病毒的提纯步骤及条件为 :

[0054] (1) -80 $^{\circ}$ C 冻存的感病叶片, 加 PB 抽提缓冲液, 病叶与 PB 抽提缓冲液的重量体积比为 1 : 2, 单位为克 / 毫升 ; PB 抽提缓冲液中含 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液, 磷酸盐缓冲液含 0.01mol/L EDTA-Na 和 0.1% 巯基乙醇, pH7.6 ;

[0055] (2) 电动搅拌机充分匀浆, 双层纱布过滤 ;

[0056] (3) 滤液中加入 20% 氯仿, 4 $^{\circ}$ C, 搅拌 15min ;

[0057] (4) 在 8000g 离心力、4 $^{\circ}$ C 下, 离心 15min ;

[0058] (5) 弃沉淀, 收集上清液。上清液中按 W : V 的比例加入 5% 的工业级纤维素酶, 37 $^{\circ}$ C 下搅拌 45min ;

[0059] (6) 在 8000g 离心力、4 $^{\circ}$ C 下, 离心 15min ;

[0060] (7) 弃沉淀, 收集上清液。上清液中加入 6% PEG, 3% NaCl, 搅拌溶解后 4 $^{\circ}$ C 静置

4h 或过夜；

[0061] (8) 在 10000g 离心力、4℃下，离心 20min；

[0062] (9) 弃上清液，沉淀用含有 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液、0.01mol/L $MgCl_2$ 和 0.5mol/L 脲，pH7.6 的 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤；

[0063] (10) 在 10000g 离心力、4℃下，离心 20min；

[0064] (11) 收集上清液；

[0065] (12) 重复步骤 9-11 三次；

[0066] (13) 合并上清液，在 80000g 离心力、4℃下，离心 120min；

[0067] (14) 弃上清液，沉淀用含有 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液、0.01mol/L $MgCl_2$ 和 0.5mol/L 脲，pH7.6 的 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤；

[0068] (15) 在 10000g 离心力、4℃下，离心 20min；

[0069] (16) 收集上清液；

[0070] (17) 重复步骤 15-16 三次；

[0071] (18) 合并上清液，上清液即为病毒粗提纯液；

[0072] (19) 上清液加入加有 10% -50% 的蔗糖垫的离心管中，在 80000g 离心力、4℃下，水平离心 120min；其中蔗糖垫的浓度为 10% 7mL、20% 7mL、30% 8mL、40% 8mL 和 50% 3mL。

[0073] (20) 收集含有病毒层液体，在 80000g 离心力、4℃下，离心 120min；

[0074] (21) 弃上清液，沉淀用含有 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.6 的 PB 抽提缓冲液充分悬浮洗涤；

[0075] (22) 沉淀悬浮液即为病毒精提纯液。

[0076] 对所独得的病毒精提纯液的纯度及含量采用电镜负染法及紫外分光光度仪进行检测，在电镜下观察，可见其含大量的高粱花叶病毒粒子，未见杂质；提纯样品稀释 10 倍液中 $A_{260} = 0.8539$ ， $A_{280} = 0.5457$ ， $A_{260}/A_{280} = 1.5678$ ，病毒浓度 = $A_{280} \times 1.5 - A_{260} \times 0.75 = 1.78125\text{mg/ml}$ 。

[0077] 2. 高粱花叶病毒多克隆抗体的制备

[0078] 选用 2 公斤以上健康雄性家兔作为免疫动物，将高粱花叶病毒精提纯液稀释至 1mg/ml，作为免疫抗原，4℃下保存；

[0079] 进行免疫注射，将 1ml 高粱花叶病毒加 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 高粱花叶病毒加 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 高粱花叶病毒抗静脉注射；一周后，取 2ml 高粱花叶病毒抗原，耳静脉注射；7-10 天后，心脏全采血，分离血清，加入 0.1% NaN_3 ，-70℃保存，得高粱花叶病毒多克隆抗体。

[0080] 抗体效价的测定：稀释病毒提纯液至 0.1mg/ml，备用。将上述抗血清倍比稀释为：1/100、1/500、1/1000..... 1/100000，以间接 ELISA 法测定抗体效价。

[0081] 抗体灵敏度的测定：稀释抗血清至 1mg/ml，备用。将病毒提纯液稀释为：1mg/ml、1mg/ml0.01mg/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。

[0082] 结果，经四次免疫家兔后采血，分离得到 40ml 抗血清，间接 ELISA 法测的效价为 1 : 20000，工作效价为 1 : 5000。最低检出浓度，即检测灵敏度达 0.01ng/ml。

[0083] 3. 高粱花叶病毒单克隆抗体的制备

[0084] 选用 Balb/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, 将高粱花叶病毒精提纯液稀释至 1mg/ml, 作为免疫抗原, 4℃ 下保存;

[0085] 高粱花叶病毒单克隆抗体制备, 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, 单克隆抗降类鉴定, 纯化, 真空冷冻干燥, 得 PVY 单克隆抗体。

[0086] 对所得单克隆抗体进行分析, 筛选出一个高粱花叶病毒广谱单克隆抗体细胞株, 间接 ELISA 测定抗体效价为 :1 : 5000。

[0087] 4. 试剂盒的组装

[0088] 1)、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 PEST 或蒸馏水溶解、稀释;

[0089] 2)、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;

[0090] 3)、高粱花叶病毒多克隆抗体: 上述制备的抗血清中加 0.1% 叠氮化钠 NaN_3 作为防腐, 无菌分装后, 密封、-80℃ 冷贮、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。每个试剂盒中有 100 μ l 按 1 : 500 稀释的高粱花叶病毒多克隆抗体;

[0091] 4)、单克隆抗体: 上述制备的单克隆抗体中加 0.1 叠氮化钠 NaN_3 作为防腐, 无菌分装后, 密封, 4℃ 保存, 备用。每个试剂盒中有 100 μ l 按 1 : 500 稀释的单克隆抗体;

[0092] 5) 酶标抗体: Sigma 公司购买, 分装, 4℃ 保存, 备用。每个试剂盒中有 5 μ l 按 1 : 10000 稀释的酶标抗体;

[0093] 6) 其他主要材料及药品: 按溶液体积称量分装, 常温下保存。具体用量如下:

[0094] ①包被缓冲液: 每个试剂盒中有 4.52g 由 1.59g Na_2CO_3 +2.93g NaHCO_3 构成的包被缓冲液;

[0095] 使用时, 加 1000ml 双蒸水, 将 1.59g Na_2CO_3 和 2.93g NaHCO_3 溶解于 1000ml 双蒸水中, 调 pH 值为 9.6;

[0096] 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 1000ml PBST 含有 8.0g NaCl 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g KCl 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 或者含有 8.0g NaCl 、0.2g KH_2PO_4 、0.2g KCl 、7.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$;

[0097] ③病毒抽提缓冲液: 每个试剂盒中 10ml, 为 10ml PBST 中溶解 1.3g Na_2SO_3 和 0.2g NaN_3 , 按 1 : 100 使用; 使用时, 加入 1000ml PBST, 调 pH 值为 7.4;

[0098] ④封闭缓冲液: PBST 中加入 5% 的脱脂奶粉, 溶解, 即用即配;

[0099] ⑤底物缓冲液: 每个试剂盒中 10ml 的 10% pH = 9.8 的乙二醇胺溶解 500mg 底物, 按 1 : 10 使用; 使用时用 100ml 的 10% pH = 9.8 的乙二醇胺稀释;

[0100] ⑥底物为硝基苯磷酸盐, 500mg/ 留试剂盒;

[0101] ⑦酶标板 5 块, 一次性滴管 20 个。

[0102] 5. 本试剂盒的田间检测高粱花叶病毒的应用

[0103] 利用制备的高粱花叶病毒 TAS-ELISA 检测试剂盒对田间甘蔗进行检测。从云南甘蔗种植区采集呈花叶、褪绿等病毒病症状的病样, 研磨至汁液产生, 按 1 : 5 倍稀释, 然后用本发明所述的试剂盒检测, 用健康株作阴性对照, 用高粱花叶病毒感染的病株作阳性对照。

[0104] 结果表明,表现为病毒病症状的甘蔗病样均检测到了高粱花叶病毒,结果与电镜观察结果和 RT-PCR 检测结果一致,表明本发明所制备的高粱花叶病毒 TAS-ELISA 检测试剂盒能很好的用于田间高粱花叶病毒检测。

专利名称(译)	高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101852807A	公开(公告)日	2010-10-06
申请号	CN201010172279.3	申请日	2010-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所		
申请(专利权)人(译)	云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所		
当前申请(专利权)人(译)	云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所		
[标]发明人	张仲凯 董家红 苏晓霞 丁铭 方琦 李婷婷 张丽珍		
发明人	张仲凯 董家红 苏晓霞 丁铭 方琦 李婷婷 张丽珍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 C12N7/02 C07K16/10 C07K16/06		
代理人(译)	陈左		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种高粱花叶病毒三抗夹心酶联免疫吸附检测试剂盒，试剂盒包含阳性对照、阴性对照、高粱花叶病毒多克隆抗体、高粱花叶病毒单克隆抗体、酶标抗体及其他材料和药品，其中，高粱花叶病毒多克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后，通过家兔免疫分离血清得到；高粱花叶病毒单克隆抗体在分离提纯高粱花叶病毒甘蔗分离物后，通过小鼠免疫、细胞融合、克隆纯化得到；本发明制备的TAS-ELISA检测试剂盒检测灵敏度高、特异性强，并具有较高的可重复性、经济实用性。