



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102043056 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 201010539205. 9

(22) 申请日 2010. 11. 10

(71) 申请人 福建省亚热带植物研究所

地址 361000 福建省厦门市嘉禾路 780-800 号

(72) 发明人 郭莺

(74) 专利代理机构 厦门原创专利事务所 35101

代理人 陈建华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

C12N 5/18(2006. 01)

C12N 15/33(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

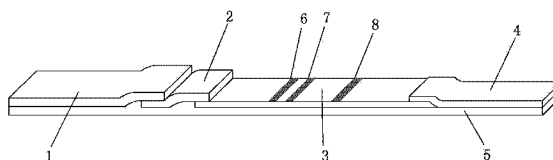
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法

(57) 摘要

本发明所述同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法, 将 CyMV 和 ORSV 单克隆抗体溶液分别按顺序点在硝酸纤维膜的检测线上, 羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维膜的质控线上; 分别将吸水滤纸制成的样品垫、CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上, 成为试纸条。本发明具有操作简单快速、结果准确、成本低廉的优点, 减少多次采样对兰花样品的污染, 也可以减少不必要的耗材浪费。



1. 同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法,包括如下步骤:

a) CyMV 单克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 CyMV 病毒外壳蛋白基因,构建原核表达载体,通过诱导表达获得 CyMV-CP 的外源融合蛋白,或者将表达纯化好的外源融合蛋白注射小鼠,制备融合细胞,并通过筛选,制备特异性高的单克隆抗体,提纯抗体,纯度不小于 95%;

b) ORSV 单克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 ORSV 病毒外壳蛋白基因,构建原核表达载体,通过诱导表达获得 ORSV-CP 的外源融合蛋白,或者将表达纯化好的外源融合蛋白注射小鼠,制备融合细胞,并通过筛选,制备特异性高的单克隆抗体,提纯抗体,纯度不小于 95%;

c) 胶体金:将 100ml 0.01% 氯化金用 2-3ml 的 1% 柠檬酸三钠还原成 15nm-60nm 的胶体金溶液;

d) 胶体金复溶液:1% 牛血清白蛋白,0.5% 脱脂干奶粉,0.05% 叠氮化钠 NaN_3 , 1% 吐温 -20, 0.01M pH7.0 磷酸缓冲液, 0.22U 膜过滤,置 2—8°C 备用;

e) CyMV 免疫胶体金溶液:用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg-2mg CyMV 单克隆抗体,混合均匀,并加入牛血清白蛋白进行封闭,使其终浓度为 0.5%-2%,离心去上清液,加入十分之一体积的胶体金复溶液,得到 CyMV 免疫胶体金溶液;

f) ORSV 免疫胶体金溶液:用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg-2mg ORSV 单克隆抗体,混合均匀,并加入牛血清白蛋白进行封闭,使其终浓度为 0.5%-2%,离心去上清液,加入十分之一体积的胶体金复溶液,得到 ORSV 免疫胶体金溶液;

g) 将 e) 步骤的 CyMV 免疫胶体金溶液和 f) 步骤的 ORSV 免疫胶体金溶液混合并加入一定量的胶体金复溶液,直至在电子显微镜下观察到 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金溶液均匀混合,将上述混合溶液每毫升均匀铺在 22-50cm² 的玻璃纤维上,干燥后形成 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫;

h) 将 CyMV 和 ORSV 单克隆抗体溶液分别按顺序点在硝酸纤维膜的检测线上,羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维膜的质控线上;

i) 分别将吸水滤纸制成的样品垫、CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上,成为试纸条;并在试纸条上粘上带有插入液体液面最高限位的指示线 MAX 的透明不干胶;

j) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装保存。

同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫胶体金试纸条的制备方法,特别是一种可同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 兰花由于其品种丰富、花色艳丽、花期长等特点,深受民众喜爱,成为盆花中最流行的品种,近几年来,兰花在我国的发展速度之快,远远超出了人们的预计。但是兰花及易染上病毒病,病毒在兰花植株上造成全身系统性感染,使兰株生长缓慢,叶片出现条纹、斑块、坏疽或绿色分布不均的嵌纹病征。人工栽培蝴蝶兰时所采取的任何可以造成机械性伤口的机会、栽培过病株的盆钵、甚至灌溉水均可以导致病毒的传播,加上近年来兰花产业逐渐规模化以后,为了达到快速繁殖种苗所采用的组培技术,更加速了病毒的全面蔓延。

[0003] 在各种已知的兰花病害中以病毒病 (Virusdiseases) 特别容易随无性分生繁殖而散布到后代种苗。可以感染兰花之病毒种类至少有 29 种。但普遍发生的只有建兰花叶病毒 (Cymbidium mosaic virus, 简称 CymMV)、齿兰轮斑病毒 (Odontoglossum ringspot virus, 简称 ORSV)、和黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, 简称 CMV) 等三种。不过多项调查报告显示感染情况最普遍,对全球兰花产业影响最严重的是 CyMV 及 ORSV。据估计,当前我国生产者使用的蝴蝶兰种苗几乎 90% 以上携带这两种病毒,台湾地区生产的蝴蝶兰种苗中,这两种病毒的携带率也在 70% 左右。因此能有效提高兰花病毒的检测效率,不仅可以提高兰花种苗的经济效益,也可以提高国内兰花产业的竞争力。

[0004] 目前对兰花病毒的检测方法主要包括指示植物法、电镜观察法、血清学方法和分子检测技术的研究,包括 RT-PCR、分子探针等。

[0005] 1. 指示植物法:指示植物法虽然简单,但存在很多不足。在实际鉴定中多为几种病毒复合侵染,症状表现变化较大,且不同时期指示植物上的症状表现也有差异,从而增加了检测难度;检测速度慢,周期性长,需要时间 3-20 几天不等,且灵敏度较低;接种后的症状表现受季节的限制和外界环境的影响较大,维护指示植物园费用也高。

[0006] 2. 电镜观察法:这种方法简便快捷,适用于大量样品的检测,但由于电镜技术需要较高倍数的电子显微镜,而且样品的制备费用较高,提取病毒难度较大,所以电子显微镜技术受到一定的限制。

[0007] 3. 血清学方法:利用抗原抗体的免疫学反应来检测植物是否带病毒的方法。目前主要是采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和点免疫结合试验 (DIBA),存在以下缺点:a 只适用于大量样品的检测,不能实现单一样品的检测;b 需要专门的仪器设备和专业的技术操作人员,不利于推广;c 操作过程相对复杂,检测时间长,4-12 小时不等。现也有开发了兰花病毒胶体金检测试剂纸,这是血清学方法的一种,是近年来兰花检测中较新的一种方法。由于只能进行病毒的单一检测,成本较高,没有得到推广。

[0008] 4. 分子检测技术:目前常用的分子生物学技术包括核酸分子杂交技术和 RT-PCR

方法。RT—PCR 方法检测植物病毒具有灵敏、快速、特异性强等优点,其专一性和灵敏性则优于免疫学方法,且目前已开发了两种病毒的多重检测。但由于兰花病毒为 RNA 病毒, RNA 很容易降解,提取和操作过程对于环境和技术要求较高,实验时需要昂贵的试剂和特殊的设备,只能在较好的实验室内进行,不利于普及。

[0009] 5. 国内 2007 年福建农林大学的林志铿、吴祖建等曾发明应用于兰花病毒的单种病毒检测试纸条,虽然其采用相同的原理,但是其采用的多克隆抗体,灵敏度较单克隆抗体要弱,特异性较差,同时不能同时检测两种病毒,需要分开检测,整体耗时长,并浪费耗材。

发明内容

[0010] 本发明的目的是要提供一种可同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 的免疫胶体金试纸的制备方法,该试纸可以一次性快速检测 CyMV 和 ORSV 两种病毒,减少多次采样对兰花样品的污染,也可以减少不必要的耗材浪费。

[0011] 本发明是这样实现的,所述同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法,包括如下步骤:

a) CyMV 单克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 CyMV 病毒外壳蛋白基因,构建原核表达载体,通过诱导表达获得 CyMV-CP 的外源融合蛋白,或者将表达纯化好的外源融合蛋白注射小鼠,制备融合细胞,并通过筛选,制备特异性高的单克隆抗体,提纯抗体,纯度不小于 95%;

b) ORSV 单克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 ORSV 病毒外壳蛋白基因,构建原核表达载体,通过诱导表达获得 ORSV-CP 的外源融合蛋白,或者将表达纯化好的外源融合蛋白注射小鼠,制备融合细胞,并通过筛选,制备特异性高的单克隆抗体,提纯抗体,纯度不小于 95%;

c) 胶体金:将 100ml 0.01% 氯化金用 2-3ml 的 1% 柠檬酸三钠还原成 15nm-60nm 的胶体金溶液;

d) 胶体金复溶液:1% 牛血清白蛋白,0.5% 脱脂干奶粉,0.05% 叠氮化钠 NaN_3 , 1% 吐温 -20, 0.01M pH7.0 磷酸缓冲液,0.22U 膜过滤,置 2—8℃ 备用,有效期 15 天;

e) CyMV 免疫胶体金溶液:用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg-2mg CyMV 单克隆抗体,混合均匀,并加入牛血清白蛋白进行封闭,使其终浓度为 0.5%-2%,离心去上清液,加入十分之一体积的胶体金复溶液,得到 CyMV 免疫胶体金溶液;

f) ORSV 免疫胶体金溶液:用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg-2mg ORSV 单克隆抗体,混合均匀,并加入牛血清白蛋白进行封闭,使其终浓度为 0.5%-2%,离心去上清液,加入十分之一体积的胶体金复溶液,得到 ORSV 免疫胶体金溶液;

g) 将 e) 步骤的 CyMV 免疫胶体金溶液和 f) 步骤的 ORSV 免疫胶体金溶液混合并加入一定量的胶体金复溶液,直至在电子显微镜下观察到 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金溶液均匀混合,将上述混合溶液每毫升均匀铺在 22-50cm² 的玻璃纤维上,干燥后形成 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫;

h) 将 CyMV 和 ORSV 单克隆抗体溶液分别按顺序点在硝酸纤维膜的检测线上,羊抗兔多

克隆抗体点在硝酸纤维膜的质控线上；

i) 分别将由吸水滤纸制成的样品垫、CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张带不干胶的 PVC 胶板上,成为试纸条;并在试纸条上粘上带有插入液体液面最高限位的指示线 MAX 的透明不干胶;

j) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装保存。

[0012] 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,是针对特异的病毒外壳蛋白设计并表达的抗原,其免疫原性高,所制备的抗体能特异性识别病毒外壳蛋白,从而提高检测的灵敏度和准确性;用本发明检测兰花病毒,检测时间短,检测成本低,检测精度高。

附图说明

[0013] 图 1 为本发明示意图。

[0014] 图 2、3 为本发明包装上的样板图。

[0015] 图中:1. 吸水滤纸制成的样品垫,2. CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫,3. 硝酸纤维素膜,4. 吸水纸,5. PVC 胶板,6. CyMV 单克隆抗体溶液点在检测线,7. ORSV 单克隆抗体溶液点在检测线,8. 羊抗兔多克隆抗体点在质控线。

具体实施方式

[0016] 本发明所述同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的制备方法,如图 1、2、3 所示,包括如下步骤:

a) CyMV 单克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 CyMV 病毒外壳蛋白基因,构建原核表达载体,通过诱导表达获得 CyMV-CP 的外源融合蛋白,或者将表达纯化好的外源融合蛋白注射小鼠,制备融合细胞,并通过筛选,制备特异性高的单克隆抗体,提纯抗体,纯度不小于 95%;

b) ORSV 单克隆抗体的制备:通过同源克隆方法获得 ORSV 病毒外壳蛋白基因,构建原核表达载体,通过诱导表达获得 ORSV-CP 的外源融合蛋白,或者将表达纯化好的外源融合蛋白注射小鼠,制备融合细胞,并通过筛选,制备特异性高的单克隆抗体,提纯抗体,纯度不小于 95%;

c) 胶体金:将 100ml 0.01% 氯化金用 2-3ml 的 1% 柠檬酸三钠还原成 15nm-60nm 的胶体金溶液;

d) 胶体金复溶液:1% 牛血清白蛋白,0.5% 脱脂干奶粉,0.05% 叠氮化钠 NaN_3 , 1% 吐温-20,0.01M pH7.0 磷酸缓冲液,0.22U 膜过滤,置 2—8℃ 备用,有效期 15 天;

e) CyMV 免疫胶体金溶液:用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg-2mg CyMV 单克隆抗体,混合均匀,并加入牛血清白蛋白进行封闭,使其终浓度为 0.5%-2%,离心去上清液,加入十分之一体积的胶体金复溶液,得到 CyMV 免疫胶体金溶液;

f) ORSV 免疫胶体金溶液:用 0.1mol/L K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 值调至 7-8.5,将胶体金溶液按 100ml 胶体金溶液中加入 0.5mg-2mg ORSV 单克隆抗体,混合均匀,并加入牛血清白蛋白进行封闭,使其终浓度为 0.5%-2%,离心去上清液,加入十分之一体积的胶体金复溶液,

得到 ORSV 免疫胶体金溶液；

g) 将 e) 步骤的 CyMV 免疫胶体金溶液和 f) 步骤的 ORSV 免疫胶体金溶液混合并加入一定量的胶体金复溶液,直至在电子显微镜下观察到 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金溶液均匀混合,将上述混合溶液每毫升均匀铺在 22-50cm² 的玻璃纤维上,干燥后形成 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫；

h) 将 CyMV 和 ORSV 单克隆抗体溶液分别按顺序点在硝酸纤维膜的检测线上,羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维膜的质控线上；

i) 分别将吸水滤纸制成的样品垫 1、CyMV 和 ORSV 免疫胶体金垫 2、硝酸纤维素膜 3 和吸水纸 4 依次粘贴到一张带不干胶的 PVC 胶板 5 上,成为试纸条；并在试纸条上粘上带有插入液体液面最高限位的指示线 MAX 的透明不干胶；

j) 将干燥的试纸条用铝箔密封包装保存。

[0017] 图 1 中在硝酸纤维膜 3 上标有 CyMV 单克隆抗体溶液点在检测线 6 上和 ORSV 单克隆抗体溶液点在检测线 7 上,以及羊抗兔多克隆抗体点在质控线 8 上。

[0018] 用本发明同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条检测兰花病毒的方法,包括以下步骤：

1、待测样品收集及处理：称取兰花叶片(或是花、根) 0.5g 于 2ml 样品管子里,加入 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液,用玻棒捣碎,然后 8000rpm 离心 5 分钟,取上清,即为待测样品溶液。

[0019] 2、检测前将同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条恢复至室温；

3、在同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的样品区滴入 3 滴步骤 1 制备的样品溶液,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(如图 2、3)；

4、反应 3-30 分钟后判定结果。

[0020] 在本发明包装物上设有样板图,如图 2、图 3 所示,图 2 中仅有质控线红色条带,为没有病毒的样板图；图 3 的左侧图中分别标有 CyMV 单克隆抗体显示区的红色条带、ORSV 单克隆抗体显示区的红色条带、质控线的红色条带,表明同时带有 CyMV 和 ORSV 病毒；图 3 的右侧图中标有 ORSV 单克隆抗体显示区的红色条带、质控线的红色条带,表明仅有 ORSV 病毒。

[0021] 若在同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的质控线显红色条带、CyMV 单克隆抗体显示区内没有红色条带,说明样品溶液中没有 CyMV 病毒或是样品溶液中所含的 CyMV 病毒量低于同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条检测下限。

[0022] 若在同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条的质控线显红色条带、ORSV 单克隆抗体显示区内没有红色条带,说明样品溶液中没有 ORSV 病毒或是样品溶液中所含的 ORSV 病毒量低于同时检测兰花病毒 CyMV 和 ORSV 免疫胶体金试纸条检测下限。

[0023] 若在 CyMV 单克隆抗体显示区和 ORSV 单克隆抗体显示区均出现红色条带,则说明样品溶液中含有 CyMV 和 ORSV 两种病毒,且含量均超过了检测下限。

[0024] 若仅在 CyMV 单克隆抗体显示区有红色条带或是 ORSV 单克隆抗体显示区有红色条带,则说明样品溶液中含有其中一种病毒且病毒量超过检测下线。

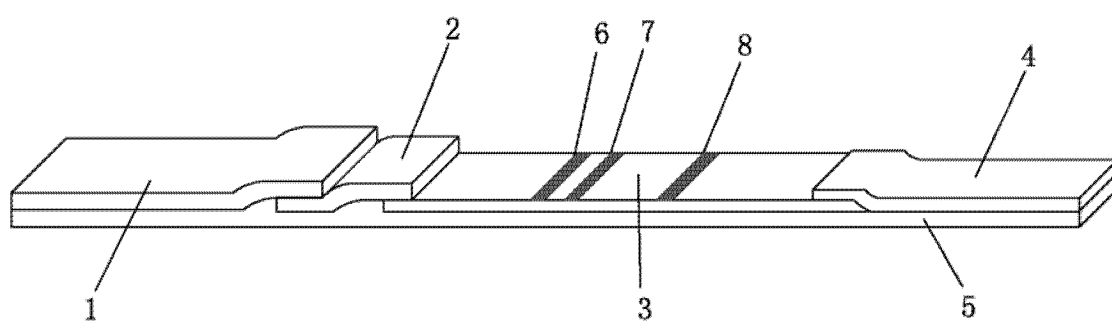


图 1

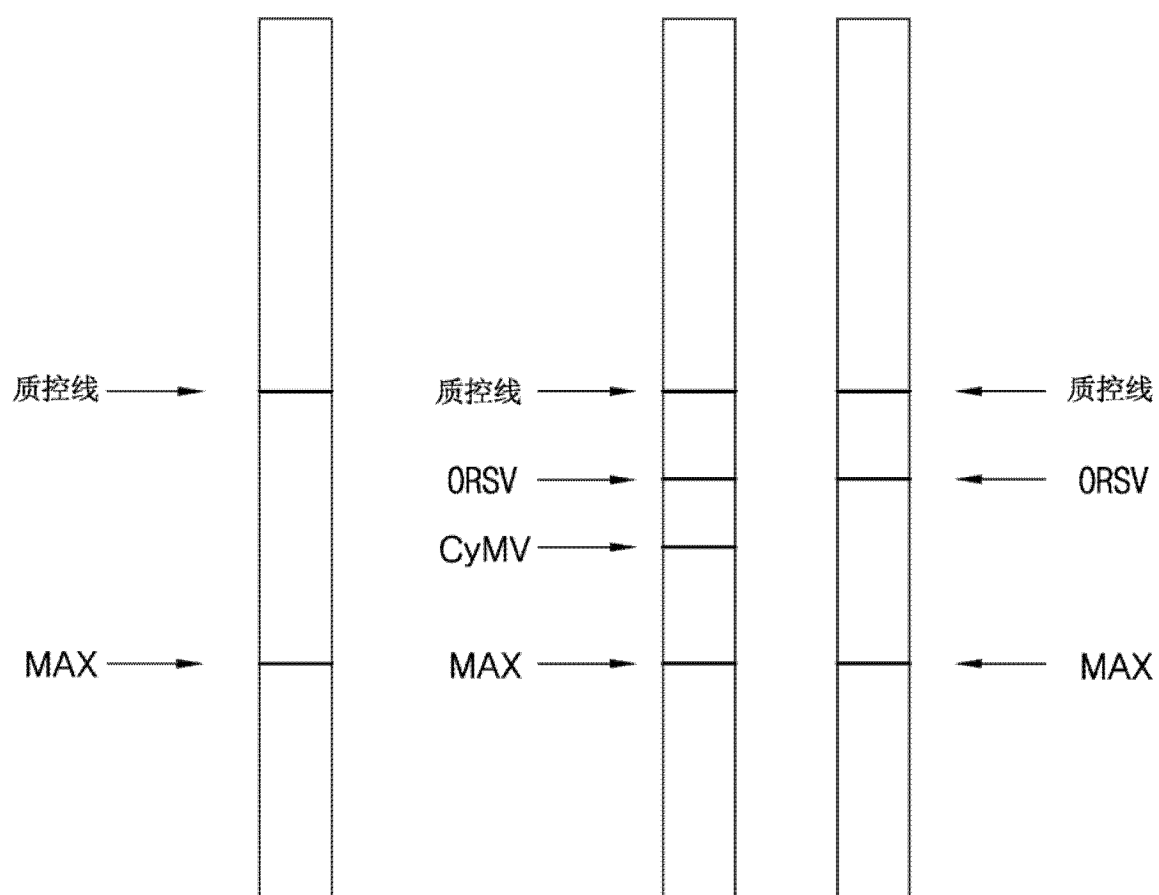


图 2

图 3

专利名称(译)	同时检测兰花病毒CyMV和ORSV免疫胶体金试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN102043056A	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN201010539205.9	申请日	2010-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	福建省亚热带植物研究所		
申请(专利权)人(译)	福建省亚热带植物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	福建省亚热带植物研究所		
[标]发明人	郭莺		
发明人	郭莺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531 C12N5/18 C12N15/33 C07K16/18		
代理人(译)	陈建华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明所述同时检测兰花病毒CyMV和ORSV免疫胶体金试纸条的制备方法，将CyMV和ORSV单克隆抗体溶液分别按顺序点在硝酸纤维膜的检测线上，羊抗兔多克隆抗体点在硝酸纤维膜的质控线上；分别将吸水滤纸制成的样品垫、CyMV和ORSV免疫胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸依次粘贴到一张带不干胶的PVC胶板上，成为试纸条。本发明具有操作简单快速、结果准确、成本低廉的优点，减少多次采样对兰花样品的污染，也可以减少不必要的耗材浪费。

