



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103901195 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201410118999. X

CN 103558399 A, 2014. 02. 05,

(22) 申请日 2014. 03. 27

CN 102269763 A, 2011. 12. 07, 1-9.

(73) 专利权人 云南省烟草农业科学研究院

WO 2006105111 A2, 2006. 10. 05,

地址 650021 云南省昆明市圆通街 33 号

吴峰等. 烟草花叶病毒快速检测方法的建立和应用. 《云南大学学报(自然科学版)》. 2012, 第 34 卷 (第 S1 期),

专利权人 清华大学深圳研究生院

(72) 发明人 马岚 莫笑晗 吴峰 夏振远

王姝婷等. 氯霉素速测金标试纸条及其保护剂配方研究. 《中国农业科学》. 2008, 第 41 卷 (第 12 期),

袁航 谭仲夏 秦西云 晋艳

(74) 专利代理机构 昆明知道专利事务所 (特殊

审查员 刘彦宁

普通合伙企业) 53116

代理人 姜开侠

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101294963 A, 2008. 10. 29,

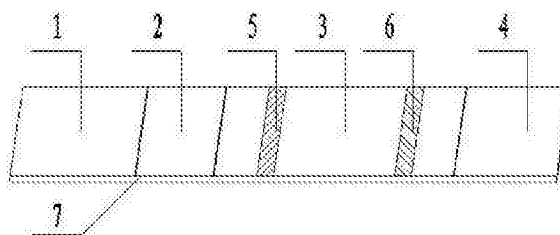
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸及其制备方法,所述试纸为由样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背板组成的检测试纸,且在硝酸纤维素膜上设置有相互分离的检测区和质控区,所述检测区含有烟草花叶病毒包被抗体,所述质控区含有能与烟草花叶病毒标记抗体特异结合的抗抗体;在样品垫加入待测样品后,基于测流免疫层析原理,通过观察检测区是否显色来确定其阳性或是阴性结果,质控区的检测结果则作为该测定方法的质控内标。本发明提供的试纸实现了对烟草花叶病毒的客观化测定,具有灵敏度高、特异性强、快速、简便等优点。本发明提供的制备方法制作步骤简单,节约成本。



1. 一种检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸,该试纸包括样品垫、含有烟草花叶病毒标记抗体的胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背板,所述样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫从上到下依次固定在背板上;其特征在于,所述硝酸纤维素膜上设置有相互分离的检测区和质控区,所述检测区含有烟草花叶病毒包被抗体,所述质控区含有能与所述烟草花叶病毒标记抗体特异结合的抗抗体;

A、制备烟草花叶病毒标记抗体:

1)配制 1% 的氯金酸溶液:称取 1g 氯金酸用 90ml 去离子水溶解,容量瓶定容到 100ml,然后用 0.22 μm 滤膜过滤,4℃ 避光保存;

2)配制 1% 的柠檬酸三钠溶液:称取 1g 柠檬酸三钠用 90ml 去离子水溶解,容量瓶定容到 100ml,然后用 0.22 μm 滤膜过滤;

3)配制 0.1M 的碳酸钾溶液:称取 1.38g 碳酸钾用 90ml 去离子水溶解,容量瓶定容到 100ml,然后用 0.22 μm 滤膜过滤;

4)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金:用量筒量取 495ml 去离子水,倒入玻璃两颈瓶中,准确加入 5ml 1% 的氯金酸溶液;在玻璃两颈瓶中放入一个磁力搅拌子,链接球形冷凝管,用可控温电磁加热搅拌器加热至沸腾;在搅动下准确加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 5ml,金黄色的氯金酸溶液在 2 分钟内变为紫红色,继续煮沸 5 分钟,冷却后以去离子水恢复到原体积,得到胶体金;

5)用胶体金标记烟草花叶病毒抗体:用 0.1M 的碳酸钾溶液将胶体金的 pH 值调至 7.5,然后按照 12 微克抗体每毫升胶体金的量加入烟草花叶病毒抗体,室温搅拌反应 1 小时,再加入浓度为 1% 的 BSA 反应 1 小时;反应完毕后,用离心机以 12000rpm 的转速在 4℃ 的温度下离心 20 分钟,弃去上清,将红色沉淀物重悬后即得到用胶体金标记的烟草花叶病毒标记抗体,4℃ 保存;

B、制备设置有检测区和质控区的硝酸纤维素膜:将所述烟草花叶病毒包被抗体和抗抗体分别喷在硝酸纤维素膜的两端不同区域,形成检测区和质控区,得到含有检测区和质控区的硝酸纤维素膜,然后放入干燥室中干燥;所述烟草花叶病毒包被抗体为烟草花叶病毒单克隆抗体,浓度为 2mg/ml;所述抗抗体为羊抗鼠 IgG 抗体,浓度为 1mg/ml;

C、制备含有烟草花叶病毒标记抗体的胶体金结合垫:将所述烟草花叶病毒标记抗体用缓冲液稀释,得到浓度为 OD1.5 的烟草花叶病毒标记抗体溶液,用上述烟草花叶病毒标记抗体溶液浸泡玻璃纤维膜,得到胶体金结合垫,然后放入干燥室中干燥;所述缓冲液由 2ml TritonX100、10g BSA、50g 蔗糖和 950ml 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液混合得到,调节 pH 至 7.4,并定容到 1000ml;

D、制备样品垫:将玻璃纤维膜在温度为 37℃ 的缓冲液中浸泡 1 小时,得到样品垫,然后放入干燥室中干燥;所述缓冲液由 2ml TritonX100、10g BSA、50g 蔗糖和 950ml 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液混合得到,调节 pH 至 7.4,并定容到 1000ml;

E、将所述样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫从上到下依次固定在背板上,裁切得到检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸,然后将试纸与干燥剂一起放入铝箔袋密封包装,4℃ 贮存。

2. 根据权利要求 1 所述的检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸,其特征在于,所述烟草花叶病毒标记抗体为烟草花叶病毒抗体和胶体金粒子结合形成的聚合物。

3. 根据权利要求 2 所述的检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸,其特征在于,所述烟草花叶病毒标记抗体为烟草花叶病毒单克隆抗体。

一种检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于农业技术领域,具体涉及一种检测烟草中烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)是一类分布广泛,并能够感染多种植物的有害病毒,此病毒最早于 1857 年就被 Swieten 在烟草生长的反常现象中发现,并记载了感染此病毒的植物的病理特征。1886 年 Mayer 首次将此病毒命名为“Mosaic”,并且通过一系列实验证明了此病毒具有传染性。直到 1939 年,德国的科学家 Kausche 等利用电子显微镜技术第一次观察到了烟草花叶病毒(TMV)的杆状病毒颗粒。

[0003] 烟草花叶病毒引起的植物病害在全世界烟叶种植地区均有发生,我国的南北烟叶种植区广泛的存在此病害,尤以南方烟叶种植地区发病率为高。目前对于烟草病毒的诊断主要通过 ELISA(酶联免疫吸附检验技术)检测和应用电子显微镜检测;ELISA 是目前较为广泛的方法,然而该方法必须要使用抗血清,商业渠道购买的抗血清价格昂贵且品种较少,无法满足烟草生产上多种病毒病诊断的需要,自制抗血清程序复杂,产生的抗血清质量往往不高,不宜用于准确的诊断,同时对那些在植物体内含量较低的病毒,该检测方法往往灵敏度不够,无法实现可靠的诊断。

[0004] 由于传统病毒诊断方法往往需要较长的时间,并且每次诊断只能针对单一的病原体,面对病毒复合浸染的情况往往显得束手无策,有时甚至会得出错误的结论,从而导致生产上大面积防治措施不能及时到位。因此急需研究一种灵敏度高、测试准确、稳定性强的烟草花叶病毒诊断试纸。

发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种灵敏度高、稳定性强、测定准确,可应用于烟草花叶病毒检测的胶体金免疫层析试纸。

[0006] 本发明的第一目的是这样实现的,该试纸包括样品垫、含有烟草花叶病毒标记抗体的胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背板,所述样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫从上到下依次固定在背板上,裁切为 0.4cm×5cm 的条,与干燥剂一起放入铝箔袋密封包装,4℃贮存;所述硝酸纤维素膜上设置有相互分离的检测区和质控区,所述检测区含有烟草花叶病毒包被抗体,所述质控区含有能与所述烟草花叶病毒标记抗体特异结合的抗体。

[0007] 所述烟草花叶病毒标记抗体为烟草花叶病毒抗体和胶体金粒子结合形成的聚合物。

[0008] 所述烟草花叶病毒标记抗体为烟草花叶病毒单克隆抗体。

[0009] 所述烟草花叶病毒包被抗体为烟草花叶病毒单克隆抗体;所述抗体为羊抗鼠

IgG 抗体。

[0010] 本发明的第二目的在于提供一种制备上述检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的方法。

[0011] 本发明的第二目的是这样实现的,包括以下步骤:

[0012] A、制备烟草花叶病毒标记抗体:

[0013] 1) 配制 1% 的氯金酸溶液:称取 1g 氯金酸用 90ml 去离子水溶解,容量瓶定容到 100ml,然后用 0.22 μ m 滤膜过滤,4℃ 避光保存;

[0014] 2) 配制 1% 的柠檬酸三钠溶液:称取 1g 柠檬酸三钠用 90ml 去离子水溶解,容量瓶定容到 100ml,然后用 0.22 μ m 滤膜过滤;

[0015] 3) 配制 0.1M 的碳酸钾溶液:称取 1.38g 碳酸钾用 90ml 去离子水溶解,容量瓶定容到 100ml,然后用 0.22 μ m 滤膜过滤;

[0016] 4) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金:用量筒量取 495ml 去离子水,倒入玻璃两颈瓶中,准确加入 5ml 1% 的氯金酸溶液;在玻璃两颈瓶中放入一个磁力搅拌子,链接球形冷凝管,用可控温电磁加热搅拌器加热至沸腾;在搅动下准确加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 5ml,金黄色的氯金酸溶液在 2 分钟内变为紫红色,继续煮沸 5 分钟,冷却后以去离子水恢复到原体积;

[0017] 5) 用胶体金标记烟草花叶病毒抗体:用 0.1M 的碳酸钾溶液将胶体金的 pH 值调至 7.5,然后按照 12 微克抗体每毫升胶体金的量加入烟草花叶病毒抗体,室温搅拌反应 1 小时,再加入浓度为 1% 的 BSA 反应 1 小时;反应完毕后,用离心机以 12000rpm 的转速在 4℃ 的温度下离心 20 分钟,弃去上清,将红色沉淀物重悬后即得到用胶体金标记的烟草花叶病毒标记抗体,4℃ 保存;

[0018] B、制备设置有检测区和质控区的硝酸纤维素膜:

[0019] 将所述烟草花叶病毒包被抗体和抗抗体分别喷在硝酸纤维素膜的两端不同区域,形成检测区和质控区,得到含有检测区和质控区的硝酸纤维素膜,然后放入干燥室中干燥;

[0020] C、制备含有烟草花叶病毒标记抗体的胶体金结合垫:

[0021] 将所述烟草花叶病毒标记抗体用缓冲液稀释,得到浓度为 0.01 的烟草花叶病毒标记抗体溶液,用上述烟草花叶病毒标记抗体溶液浸泡玻璃纤维膜,或是直接喷涂到玻璃纤维膜上,得到胶体金结合垫,然后放入干燥室中干燥;

[0022] D、制备样品垫:将玻璃纤维膜在温度为 37℃ 的缓冲液中浸泡 1 小时,得到样品垫,然后放入干燥室中干燥;

[0023] E、将所述样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫从上到下依次固定在背板上,裁切得到检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸,然后将试纸与干燥剂一起放入铝箔袋密封包装,4℃ 贮存。

[0024] 所述步骤 C 和步骤 D 中的缓冲液由 2ml TritonX100、10g BSA、50g 蔗糖和 950ml 浓度为 0.02M、pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液混合得到,调节 pH 至 7.4,并定容到 1000ml。

[0025] 本发明提供了一种由样品垫、含有烟草花叶病毒标记抗体的胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背板组成的检测试纸,且在硝酸纤维素膜上设置有相互分离的检测区和质控区,所述检测区含有烟草花叶病毒包被抗体,所述质控区含有能与所述烟草花叶病

毒标记抗体特异结合的抗抗体；在样品垫加入待测样品后，基于测流免疫层析原理，样品中的烟草花叶病毒与烟草花叶病毒标记抗体结合后层析到检测区处喷涂的烟草花叶病毒包被抗体，在检测区处形成包被抗体-抗原-胶体金标记抗体免疫复合物；同时，多余的烟草花叶病毒标记抗体则在质控区处与抗抗体结合；通过观察检测区是否显色来确定其阳性或是阴性结果，质控区的检测结果则作为该测定方法的质控内标。本发明提供的试纸实现了对烟草花叶病毒的客观化测定，具有灵敏度高、特异性强、快速、简便等优点。

附图说明

[0026] 图1为本发明中检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的结构示意图。

[0027] 图中：1为样品垫、2为胶体金结合垫、3为硝酸纤维素膜、4为吸水垫、5为检测区、6为质控区、7为背板。

具体实施方式

[0028] 下面对本发明作进一步详细说明，但不以任何方式对本发明加以限制，基于本发明所作的任何变换，均落入本发明保护范围。

[0029] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法；下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到，即属于现有技术。

[0030] 实施例1

[0031] 检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的制备。

[0032] A、制备烟草花叶病毒标记抗体：

[0033] 1) 配制1%的氯金酸溶液：称取1g氯金酸用90ml去离子水溶解，容量瓶定容到100ml，然后用0.22 μm滤膜过滤，4℃避光保存；

[0034] 2) 配制1%的柠檬酸三钠溶液：称取1g柠檬酸三钠用90ml去离子水溶解，容量瓶定容到100ml，然后用0.22 μm滤膜过滤；

[0035] 3) 配制0.1M的碳酸钾溶液：称取1.38g碳酸钾用90ml去离子水溶解，容量瓶定容到100ml，然后用0.22 μm滤膜过滤；

[0036] 4) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金：用量筒量取495ml去离子水，倒入玻璃两颈瓶中，准确加入5ml 1%的氯金酸溶液；在玻璃两颈瓶中放入一个磁力搅拌子，链接球形冷凝管，用可控温电磁加热搅拌器加热至沸腾；在搅动下准确加入1%的柠檬酸三钠溶液5ml，金黄色的氯金酸溶液在2分钟内变为紫红色，继续煮沸5分钟，冷却后以去离子水恢复到原体积（即495+5+5=505ml）；

[0037] 5) 用胶体金标记烟草花叶病毒抗体：用0.1M的碳酸钾溶液将胶体金的pH值调至7.5，然后按照12微克抗体每毫升胶体金的量加入烟草花叶病毒抗体，室温搅拌反应1小时，再加入浓度为1%的BSA反应1小时；反应完毕后，用离心机以12000rpm的转速在4℃的温度下离心20分钟，弃去上清，将红色沉淀物重悬后即得到用胶体金标记的烟草花叶病毒标记抗体，4℃保存；

[0038] B、制备设置有检测区和质控区的硝酸纤维素膜：

[0039] 将所述烟草花叶病毒包被抗体的浓度配制为2mg/ml；采用0.02M PB（pH=7.4）的缓冲液将羊抗鼠IgG抗体（长沙博优生物科技有限公司，ABGAM-0500）的浓度配制为1mg/

ml,采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统中的 BioJet 喷头将上述配置好的烟草花叶病毒包被抗体和羊抗鼠 IgG 抗体分别喷在硝酸纤维素膜的两端不同区域,形成检测区和质控区,得到含有检测区和质控区的硝酸纤维素膜,将上述硝酸纤维素膜放置于相对湿度为 10% 以下的干燥车间抽湿 4 小时后放入干燥室中干燥备用;

[0040] C、制备含有烟草花叶病毒标记抗体的胶体金结合垫:

[0041] 将所述烟草花叶病毒标记抗体用含 0.2% TritonX100、1% BSA、5% 蔗糖的 0.02M PBS (pH=7.4) 缓冲液稀释,得到浓度为 OD1.5 的烟草花叶病毒标记抗体溶液,用上述烟草花叶病毒标记抗体溶液浸泡玻璃纤维膜,或是直接喷涂到玻璃纤维膜上,得到胶体金结合垫,将上述胶体金结合垫放置于相对湿度为 10% 以下的干燥车间抽湿 4 小时后放入干燥室中干燥备用;

[0042] D、制备样品垫:用含 0.2% TritonX100、1% BSA、5% 蔗糖的 0.02M PBS (pH=7.4) 溶液浸泡玻璃纤维膜 1 小时,浸泡温度为 37℃,得到样品垫,将上述样品垫放置于相对湿度为 10% 以下的干燥车间抽湿 4 小时后放入干燥室中干燥备用;

[0043] E、在 10 万级洁净和干燥的车间中将上述干燥好的样品垫、胶体金结合垫和硝酸纤维素膜,以及吸水垫从上到下依次固定在背板上进行搭配组装后,采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切,得到检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸,然后将试纸与干燥剂一起放入铝箔袋密封包装,4℃ 贮存备用。

[0044] 实施例 2

[0045] 测试上述制备好的用于检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的灵敏度。

[0046] 量取烟草花叶病毒提纯样品,选用 0.02M 的 PBS(pH=7.4) 缓冲液进行稀释,配制浓度为 0ng/ml、0.1ng/ml、1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml、1000ng/ml 的烟草花叶病毒标准溶液,使用实施例 1 得到的检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸进行检测;10 分钟观察检测结果;其检测结果如表 1 所示。

[0047] 表 1 不同浓度的烟草花叶病毒样品检测结果

[0048]

浓度 (ng/ml)	0	0.1	1	10	100	1000
检测结果	-	-	+	+	+	+

[0049] 上表中“-”表示检测结果为阴性,“+”表示检测结果为阳性,从检测结果中可以得出实施例 1 得到的检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的灵敏度为 1ng/ml。

[0050] 实施例 3

[0051] 使用实施例 1 制备好的检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸进行田间样品的检测。

[0052] ①样品提取:取待测烟叶 0.1g (约 1cm²),放入样品提取袋(该提取袋为中间夹层带网格的塑料袋,该塑料袋中密封装有 4ml 0.02M 硼酸(pH=8.5)缓冲液)中,并标注样本号;用笔杆或其它平滑的硬物磨擦样品提取袋,确保完全把烟叶磨碎,来回晃动样品袋,使烟叶提取液混匀。

[0053] ②检测方法:将检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的样品垫端插入待测烟叶提取液中,当烟叶提取液层析到试纸中部时将试纸取出,平放,反应 8~10 分钟后判定结果,15 分钟后判定结果无效。

[0054] ③结果判定:若试纸上仅见一条紫红色线条为阴性结果,即只有质控区显色,说明

样本没有感染烟草花叶病毒；若试纸上可见两条紫红色线条为阳性结果，即质控区和检测区皆显色，说明样本感染烟草花叶病毒；无任何线条出现或仅有检测区显色为无效结果，说明检测无效，应重新测试。

[0055] 由云南省烟草科学研究所提供的新鲜烟叶样本，以及从云南省各地州采集到的疑似感染病毒的新鲜烟叶样本共计 842 份，选用美国 Agdia 公司的 TMV 胶体金试剂盒作为对照，对本发明提供的胶体金免疫层析试纸进行特异性、敏感性及准确性检测，检测结果如表 2 所示。

[0056] 表 2 842 份烟叶样本的检测结果

[0057]

		实验组（本发明提供的试纸）		
		阳性结果	阴性结果	合计
对照组 (Agdia 试剂 盒)	阳性结果	711	26	737
	阴性结果	0	105	105
合计		711	131	842

[0058] 从检测结果中可以得出本发明提供的检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸的特异性达 100%，即 $105 / (105 + 0) * 100\% = 100\%$ ；敏感性达 96.6%，即 $737 / (737 + 26) * 100\% = 96.6\%$ ；准确性达 96.9% $(711 + 105 / 737 + 105)$ ，即 $(711 + 105) / (737 + 105) * 100\% = 96.9\%$ 。

[0059] 综上所述，本发明提供的试纸实现了对烟草花叶病毒的客观化测定，具有灵敏度高、特异性强、敏感性强、准确性好、快速、简便等优点；具有很好的推广应用价值。

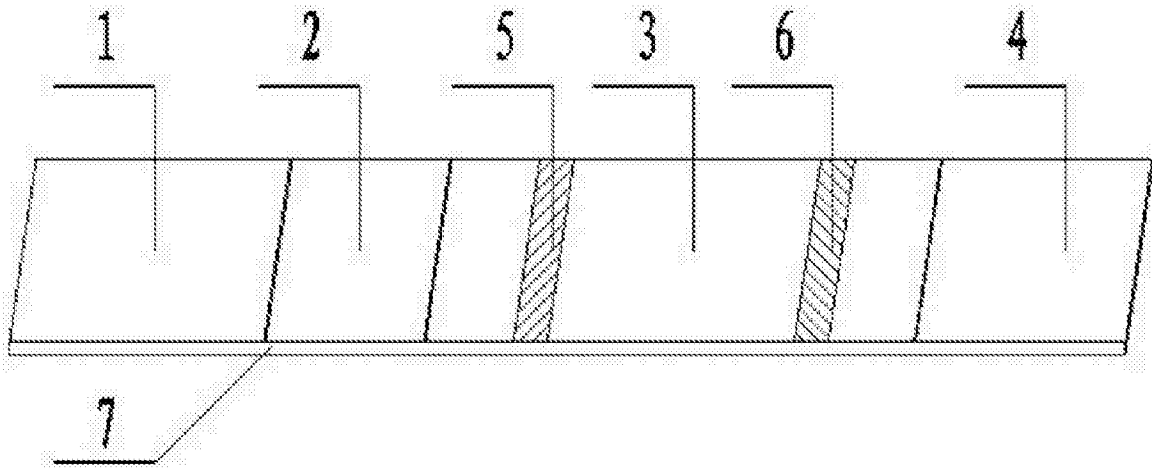


图 1

专利名称(译)	一种检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN103901195B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201410118999.X	申请日	2014-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院 清华大学深圳研究生院		
申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院 清华大学深圳研究生院		
当前申请(专利权)人(译)	云南省烟草农业科学研究院 清华大学深圳研究生院		
[标]发明人	马岚 莫笑晗 吴峰 夏振远 袁航 谭仲夏 秦西云 晋艳		
发明人	马岚 莫笑晗 吴峰 夏振远 袁航 谭仲夏 秦西云 晋艳		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/56983		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN103901195A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测烟草花叶病毒的胶体金免疫层析试纸及其制备方法，所述试纸为由样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和背板组成的检测试纸，且在硝酸纤维素膜上设置有相互分离的检测区和质控区，所述检测区含有烟草花叶病毒包被抗体，所述质控区含有能与烟草花叶病毒标记抗体特异结合的抗抗体；在样品垫加入待测样品后，基于测流免疫层析原理，通过观察检测区是否显色来确定其阳性或是阴性结果，质控区的检测结果则作为该测定方法的质控内标。本发明提供的试纸实现了对烟草花叶病毒的客观化测定，具有灵敏度高、特异性强、快速、简便等优点。本发明提供的制备方法制作步骤简单，节约成本。

