

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510022791.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1996020A

[22] 申请日 2005.12.31

[21] 申请号 200510022791.9

[71] 申请人 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所

地址 730000 甘肃省兰州市东岗西路322号

[72] 发明人 王若愚 谢忠奎 安黎哲 王建辉

[74] 专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任公司

代理人 张晋

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

黄瓜花叶病毒双抗体夹心酶联免疫吸附检测
试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明公开黄瓜花叶病毒检测试剂盒以及制备方法。本发明的检测盒包括：反应板、酶标抗体、缓冲液、显色液、终止液及洗涤剂。其中：反应板上包被有CMV病毒多克隆抗体；酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的CMV抗体。本发明采用的免疫源为CMV病毒衣壳蛋白。采用由此免疫源产生的抗体，不仅对完整病毒有特异敏感性，而且对尚未形成完整病毒的病毒蛋白亚单位也有相当的敏感性。

1、百合黄瓜花叶病毒的双抗体酶联免疫吸附检测试剂盒，包括：反应板、酶标抗体、缓冲液、显色液、终止液及洗涤剂，其特征在于：

反应板上包被有 CMV 病毒多克隆抗体；

酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的 CMV 抗体；

缓冲液为用蒸馏水配制的其内含 1%聚乙二醇 4000，0.5%蛋白胨，0.5%硫柳汞钠以及 1%吐温-20 的 pH=7.4，0.07M 的磷酸盐缓冲液；

洗涤剂为含 1%吐温-20，pH=7.2 的磷酸缓冲液；

稀释液为生理盐水；

显色剂 A 为内含 0.5%，pH=5.0 的过氧化脲醋酸水溶液；

显色剂 B 为：甲醇中溶入 1.6%四甲基联苯胺，并在溶解后加一倍的甘油；

终止液为用蒸馏水配制的 2M 硫酸溶液。

2、根据权利要求 1 所述的检测试剂盒中反应板上包被的 CMV 病毒多克隆抗体与酶标抗体的制备方法，其特征是：

a 反应板上包被的 CMV 病毒多克隆抗体制备方法是：将健康的雄性兔或豚鼠或羊或鸡中任一种动物致敏后，在肌肉内注射 CMV 病毒的衣壳蛋白使动物产生免疫，检测抗体滴度大于 1:64 以上后即对实验动物进行采血，并将所采血进行抗血清的分离，再将保存的血清进行柱层析，得到纯化的 CMV 病毒多克隆体 IgG，再将经纯化 CMV 病毒多克隆体包被于检测反应板上；

b 辣根过氧化物酶标记的 CMV 抗体制备方法是：将不同于制备 CMV 病毒多克隆抗体的健康雄性兔或豚鼠或羊或鸡中的任一种动物致敏后，在肌肉内注射 CMV 病毒的衣壳蛋白使动物产生免疫，再对实验动物进行采血，将所采血进行抗血清的分离，收集到的血清加入千分之一浓度的叠氮钠保存于 4℃，再将保存的血清进行柱层析，得到纯化的待标记的 CMV 病毒多克隆体 IgG，再将辣根过氧化物酶溶于戊二醛溶液中，静置使体系充分反应后，再进行柱层析得酶溶液，将待标记的抗体用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中，再在其中加入 0.2M 赖氨酸 0.25ml，混匀后在室温静置使体系反就充分，然后再滴加等体积的饱和硫酸铵，再经静置后离心处理，弃去上清物，留沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤，再将其 0.15M PH7.4 的磷酸缓冲液中，再进行透析处理，将经透析所得液体离心处理，取上清液为酶标抗体。

3、根据权利要求 2 所述的检测试剂盒中反应板上包被的 CMV 病毒多克隆抗体与酶标抗体的制备方法，其特征是：

包被的 CMV 病毒多克隆抗体与酶标抗体的待标记的 CMV 病毒多克隆体 IgG 制备方法是：将分离出的 CMV 病毒衣壳蛋白悬于用注射水配置的 pH=7.2，0.02M 的磷酸盐缓冲液中，再将其用磷酸缓冲液稀释至浓度为 200~500ug/ml，然后用等体积的弗氏完全佐剂混合并充分乳化，再给动物皮下多点注射免疫；两周后，将分离出的 CMV 病毒衣壳蛋白重悬于注射用水配置的 pH=7.2，0.02M 的磷酸盐缓冲液 PBS 中，再将其稀释至浓度为 200~500ug/ml，与等体积的由石蜡油：羊膜脂=7:1 的弗氏不完全佐剂混合并充分乳化，给前述动物皮下多点注射免疫；两周后再次重复前述步骤 2 次，在测定效价大于 1:64 时采血，进行抗体分离。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的检测试剂盒中反应板上包被的 CMV 病毒多克隆抗体与酶标抗体的制备方法，其特征是：将分离所得 25ml 多抗血清中再加入等体积无菌生理盐水混匀，在搅拌下缓慢加入硫酸铵固体粉末至浓度为 18%，再于 25℃下温浴 10~30 分钟后，进行离心处理，弃去上清液，将沉淀溶解于去离子水中至体积为 25ml，再在体系中加入硫酸铵粉末至浓度为 14%，25℃温浴 10~30min 后再离心处理，弃去上清液，将沉淀溶解于 15ml 去离子水中，在 pH 为 6.3 浓度为 0.07M 的磷酸缓冲液 PBS 中透析至无铵离子，再进行柱层析，同时检测 OD280，待有吸收峰出现，收集最先流出的 10ml 组分，即得到纯化 IgG。

黄瓜花叶病毒双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒及制备方法

技术领域

本发明涉及百合黄瓜花叶病毒双抗体酶联免疫吸附检测试剂盒，以及这种检测试剂盒的制备方法。本发明所述的双抗体酶联免疫吸附特别指双抗体夹心法酶联免疫吸附。

背景技术

百合(*Lilium spp.*) 传统上是药用和食用植物，现已成为国际上重要切花观赏花卉之一。荷兰1997年百合种植面积达3560万 hm^2 ，每年生产鳞茎18亿个，70%以上出口，在荷兰根花卉生产中名列第二位。但随着百合种植面积日益扩大，高密度种植和长期无性繁殖使病毒不断积累，病毒病对百合的危害日趋严重，影响了百合的产量和品质，给百合种植业造成巨大的经济损失。但人们对百合受病毒危害的重视不够，百合的抗病毒品种极少。百合的引种频繁，鲜花进出口频率高，加速了病毒的传播。据报道，百合病毒病在19世纪后期几乎把百合栽培种和品种推向绝灭境地，现已知百合病毒病原有14种，类菌原体1种，其中为害严重的病毒有4种，即百合无症状病毒(Lily symptomless virus, LSV)、黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、郁金香碎锦病毒(Tulip breaking virus, TBV, 异名Lily mottle virus, LMoV)和百合丛簇病毒(Lily rosette virus, LRV)，其他各种病毒均为局部地区发生，百合病毒常复合侵染，不同病毒在百合上表现相似症状，同种病毒在不同条件下的症状有很大变异。

当前切花百合在我国花卉产业产值中占第四位，同时作为食品和药材，百合也是一种重要的经济作物。我国是百合病毒病流行较为严重的国家，其中主要是由于LSV和CMV等病毒引起的。减少病毒病在百合种植业中的损失，最便捷的方法是采用脱毒培养。国内现在大量采用脱毒培养技术，但依然存在不少问题，最主要的是缺少LSV和CMV的方便快捷、准确可靠的检测方法。

黄瓜花叶病毒百合株(CMV-Li)可侵染百合科植物的病毒，是百合科植物的主要病毒病害之一，广泛分布于世界各地。黄瓜花叶病毒经常与百合隐症病毒(LSV)、百合斑驳病毒(LMoV)等复合侵染百合科植物。单一CMV感染通常有轻微花叶症状，CMV通常和LSV等病毒复合侵染，造成严重的花叶症状、不开花、植株形态异常和球茎减小，每年在全世界范围内的园艺和农业生产中造成几十亿美元的重大损失。在我国，每年因CMV感染造成的经济损失也有十多亿元。

1896年Stewart首次报道了侵染百合的CMV，而后1937年Price也进行了报道，之后很多学者对侵染百合的CMV进行了研究。Benetti(1988)的调查研究表明CMV在意大利百合中广泛发生，并常和LSV符合侵染百合。Hagita(1989)通过酶联免疫方法检测百合CMV。Kim在1994研究报道了病毒唑对CMV的作用效果，在1995年通过组织吸附免疫的方法检测侵染百合的CMV等病毒，在1996年研究CMV的血清型与致病性的相关性时指出，CMV分离物的致病性与其血清型紧密相关，并将血清型分为Y(亚组I)与P(亚组II)两型，而来自百合的分离物不能使茄科和葫芦科等易被CMV侵染的作物发病，是相对独立的一个类群，同时对韩国光州等地区的百合植物进行病毒检测与调查，认为CMV为三种主要病毒之一。Cohen(1996)在以色列百合的病毒病一文中报道CMV的为主要病毒之一。Lee(1998)利用RT-PCR检测了侵染东方百合的CMV。Korbin(1998)等研究了CMV分离物的特性，利用ELISA和生物学实验，对波兰12种观赏植物的250个样品进行了CMV调查，发现病毒的侵染伴随着生物学形状而出现，并且在被病毒侵染的植物样品种，90%以上是多种病毒的符合侵染。在进行生物学实验时，大部分植物上的CMV分离物科通过汁液摩擦接种使这些长剑的CMV系统与鉴别寄主发病，丧失了通过汁液摩擦接种传播的特性。Niimi(1999)利用ELISA和DIBA检测田间样品种的CMV，在550个*Lilium X Enchantment*样品种的发生情况，在5个样品中检测到了CMV的存在，侵染率为0.9%。Chikara(2002)报道了来自日本与韩国的CMV分离物HL-CMV与Ly2-CMVs，它们具有共同的生物学特性，寄主范围相同，只侵染百合植物，根据它们的RNA3核苷酸序列分析表明尽管两个分离物来自不同的国家，但它们具有很高的同源性，达97%，据3a蛋白基因核CP基因序列树状进化图分析表明，

这两种分离物在进化种单独成簇,说明它们来源于同一个祖先。Niimi等(2003)利用RT-PCR检测了侵染百合的CMV,并同时进行了ELISA检测,比较了两种检测方法的灵敏度。

CMV-Li属于黄瓜花叶病毒组,为三分体单正链RNA病毒,病毒颗粒呈正20面体,直径28~30nm。一般有RNA1、RNA2、RNA3和RNA4四条单正链线性核酸,长度分别为3300nt, 3050nt, 2200nt和1000nt左右。CMV衣壳蛋白只有一种亚基,分子量为24kDa。已有报道对该病毒进行了全序列测序并分析了基因组结构。

目前国内尚无成熟的CMV-Li免疫检测方法,很难满足花卉及食用百合的脱毒检测需求。建立灵敏、稳定、高通量和易操作的CMV-Li的检测方法,是生产百合脱毒株的基础,是提高花卉百合品质和食用药用百合产量和质量的前提。

国内外现在对黄瓜花叶病毒百合株的主要检测手段有指示植物检测、电镜检测、分子生物学检测和免疫学检测等。

其中指示植物检测为较为传统的检测方法,测试条件受外界环境变化影响会出现不同的检测结果,检测周期也很长,操作十分复杂,检测结果不准确。

电镜检测灵敏度不高,需要大量病毒样本,检测过程复杂,并且检测结果受主观影响较大。由于电子显微镜代价昂贵,对大多数检测来说不具备条件。

分子生物学检测方法较为操作较为简单,通过病毒特异性引物进行RT-PCR检测,所需检测时间较短。但由于该病毒是单链正链RNA病毒,制备用于检测的样本模板较为复杂,对检测实验条件要求很高,且需要PCR仪等贵重仪器,检测试剂昂贵。需要有相当经验的操作者才能获得较为可靠的结果。

以上检测手段由于灵敏度、检测费用和操作难度等原因,都不适合作为大规模商业检测方法推广。

此外,现有技术制备ELISA检测试剂盒时,是用CMV全病毒免疫制备多克隆抗体,由此产生的抗体对全病毒具有特异性,但不一定对病毒衣壳蛋白亚单位单体表现高灵敏度。因此当被检植株尚未复制组装形成完整病毒颗粒,而仅含有尚未组装的衣壳蛋白亚单位游离单体时,利用现有技术将很难检测出来。

在现有技术中也没有对食用百合黄瓜花病毒检测的披露。

发明内容

本发明的目的是建立一种基于特异性多克隆抗体的CMV双抗体夹心酶联免疫检测(DAS-ELISA)方法,并研制出试剂盒,为CMV检测提供一种准确简便的技术手段。本发明所提供的这种试剂盒可以克服现有技术的不足,不仅可以快速得出被检植株是否染病,而且可以在病毒感染早期尚未组装形成完整病毒颗粒时就可检测出病毒感染情况。

本发明所述的检测盒是:包括:反应板、酶标抗体、缓冲液、显色液、终止液及洗涤剂,其中:

反应板上包被有CMV病毒多克隆抗体;

酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的CMV抗体;

缓冲液为用蒸馏水配制的其内含1%聚乙二醇4000,0.5%蛋白胍,0.5%硫柳汞钠以及1%吐温-20的pH=7.4,0.07M的磷酸盐缓冲液;

洗涤剂为含1%吐温-20,pH=7.2的磷酸缓冲液;

稀释液为生理盐水;

显色剂A为内含0.5%,pH=5.0的过氧化脲醋酸水溶液;

显色剂B为:甲醇中溶入1.6%四甲基联苯胺,并在溶解后加一倍的甘油;

终止液为用蒸馏水配制的2M硫酸溶液。

本发明的检测试剂盒中反应板上包被的CMV病毒多克隆抗体与酶标抗体的制备方法如下:

反应板上包被的CMV病毒多克隆抗体制备方法是:将健康的雄性兔或豚鼠或羊或鸡等动物中的任何一种动物致敏后,在皮下或肌肉内注射经分离、纯化后所得CMV病毒衣壳蛋白使动物产生特异免疫反应,

对产生抗体的实验动物进行采血，将所采血进行抗血清的分离。再对抗血清进行盐析、透析、离子交换层析等纯化步骤，得到纯化的 CMV 病毒多克隆体 IgG，再将经纯化的 CMV 病毒多克隆 IgG 包被于检测反应板上；如收集到血清不能及时后述的处理时，可在其中加入千分之一浓度的叠氮钠保存于-20℃或加入等体积饱和硫酸铵保存于 4℃。

辣根过氧化物酶标记的 CMV 抗体制备方法是：将不同于制备 CMV 病毒多克隆抗体动物的健康雄性兔或豚鼠或羊或鸡中的任一种动物致敏后，肌肉或皮下内注射纯化 CMV 病毒衣壳蛋白使动物产生免疫，再对产生抗体的实验动物进行采血，将所采血进行抗血清的分离，再对所得的抗血清进行盐析、透析、离子交换层析等纯化步骤，得到纯化的待标记的 CMV 病毒多克隆抗体。利用戊二醛二步法对该纯化的多克隆抗体进行辣根过氧化物酶标记，获得酶标抗体。这里所述的不同于制备 CMV 病毒多克隆抗体动物的健康雄性兔或豚鼠或羊或鸡中的任一种动物是指在制备用于酶标抗体时采用的动物，应当与制备用于包被的 CMV 病毒多克隆抗体所采用的动物不同。如制备用于包被的 CMV 病毒多克隆抗体采用家兔时，制备辣根过氧化物酶标记的 CMV 抗体应当采用豚鼠，或山羊，或鸡等，而不能再使用兔子。如收集到的抗血清不能及时进行后续处理，可加入等体积灭菌甘油，保存于-20℃。

本发明中用于包被的 CMV 病毒多克隆抗体与用于酶标的待标记的 CMV 病毒多克隆抗体的制备方法是：

用现有技术得到 CMV 衣壳蛋白亚单位溶液，即将经分离纯化所得的 CMV 病毒经裂解，层析或电泳得到 CMV 病毒衣壳蛋白亚单位溶液。将此溶液透析于注射用水配置的 pH=7.2，0.02M 的磷酸盐缓冲液 PBS 中，透析后，再用 pH=7.2，0.02M 的磷酸盐缓冲液 PBS 将 CMV 衣壳蛋白浓度稀释至 400ug/ml。

将前述的制备好的 400ug/ml 的 CMV 衣壳蛋白溶液与等体积的弗氏完全佐剂混合并充分乳化成基础免疫抗原，给动物皮下多点注射，做基础免疫；基础免疫中 CMV 衣壳蛋白的剂量为：家兔 200ug/只，豚鼠 50ug/只，鸡 200ug/只，山羊 1mg/只。

三周后，将经前述方法处理的 400ug/ml 的 CMV 病毒衣壳蛋白溶液与弗氏不完全佐剂混合并充分乳化，对前述已做基础免疫的动物经皮下多点注射做第一次加强免疫；第一次加强免疫中 CMV 衣壳蛋白的剂量为：家兔 200ug/只，豚鼠 50ug/只，鸡 200ug/只，山羊 1mg/只。

第一次加强免疫后，每隔两周后再次重复加强免疫一次，剂量途径与第一次加强免疫相同。

第二次加强免疫之后 10 天少量采血，检测抗体效价大于 1:64 时即可大量采血。采血前动物禁食 12 小时以上。

本发明的检测试剂盒中用于包被的 CMV 病毒多克隆抗体与用于酶标的多克隆抗体的制备方法是：将抗血清温浴于 25℃，在搅拌下缓慢加入硫酸铵固体粉末至浓度为 18%，再于 25℃下温浴数十分钟后，进行离心处理，弃去上清液，将沉淀溶解于去离子水中，再加入硫酸铵粉末至浓度为 14%，25℃温浴 30min 后再离心处理，弃去上清液，将沉淀溶解于 15ml 去离子水中，再在 pH 为 6.3 浓度为 0.07M 的磷酸缓冲液 PBS 中透析至无铵离子，再进行离子交换层析，同时检测洗脱液 280 纳米处的光吸收值 (OD280)，待有吸收峰出现，收集最先流出的 10ml 组分，即为纯化的 IgG。

本发明所采用的动物最好为家兔、山羊和豚鼠。

本发明提供了双抗体夹心法酶联免疫检测盒，采用这种属于免疫学方法进行检测具有如下优点：

- 1、灵敏度高，可以检测到样品中 ng 级水平的病毒。
- 2、操作简单，普通工作人员经过简单培训就可以完成。
- 3、可重复性好，检测结果稳定可靠。
- 4、对仪器要求较低，仅需要普通恒温水浴箱、酶标仪等。如只需定性检测，则可直接通过目测获得检测结果，连酶标仪都不需要。
- 5、由于本发明的 CMV 病毒多克隆抗体所用的毒株为黄瓜花叶病毒兰州百合分类株，因此，它不但可以用于花卉百合，也可用于食用百合。

6、本发明采用的免疫源为 CMV 病毒衣壳蛋白，因此采用由此免疫源产生的抗体，不仅对完整病毒有特异敏感性，而且对尚未形成完整病毒的病毒蛋白亚单位也有相当的敏感性。用这种抗体制备的检测试剂盒可以检测出已染病但尚未形成完整病毒的植株。本发明的这一优点可以在感染早期就检测出植株是否已经感染，以及及时采取隔离、拔除等措施，避免病毒感染范围在大田种群中扩大，从而避免或减小损失，无疑这对相关花卉及食用百合的种植生产是有极为积极的作用。

正是基于以上优点，本发明适于作为大规模商业检测方法推广，具有良好的市场前景。

附图说明

附图 1 为用本发明的方法检测已知感染 CMV 样品的结果。其中 1 至 8 样品中每组样品的：第一个柱状线（即左边第一个柱状线）为 100 倍稀释；第二个柱状线为 200 倍稀释；第三个柱状线为 400 倍稀释；第四个柱状线为 800 倍稀释；第五个柱状线为 1600 倍稀释，第六个柱状线为 3200 倍稀释，第七个柱状线为 6400 倍稀释。

附图 2 为本发明与全病毒多抗 DAS-ELISA 的比较。其中各被测样品（样品 1 至 14，以及阴性样品和阳性样品）中的第一个柱状线（即每个样品左边第一个柱状线）为本发明的结果；而第二个柱状线（即每个样品左边第二个柱状线）为全病毒多抗 DAS-ELISA 的检测结果。

具体实施方式

本发明以下提供一个实施例，并根据实施例详细解说本发明的有关内容。在本实施例中是用兔和豚鼠为免疫动物。其抗体及检测试剂盒的制备如下：

步骤一：实验动物致敏

准备 2.5kg 左右雄性日本大耳兔若干只，200g 左右雄性豚鼠 20 只，禁食一天。用弗氏完全佐剂（石蜡油：羊毛脂=7：1，加入灭活的分枝杆菌至 4mg/ml）致敏，家兔剂量为 1ml/只，豚鼠剂量为 0.2ml/只，致敏途径为腹腔注射。

步骤二：一次免疫

一周后，将 -20℃ 保存的 400ug/ml CMV 病毒衣壳蛋白溶液与等体积与弗氏完全佐剂混合，充分乳化，经皮下多点注射做基础免疫。每只家兔免疫剂量为 CMV 衣壳蛋白 200ug，每只豚鼠免疫剂量为 CMV 衣壳蛋白 50ug。

步骤三：加强免疫

三周后，将 -20℃ 保存的 400ug/ml CMV 病毒衣壳蛋白溶液与等体积与弗氏不完全佐剂（石蜡油：羊毛脂=7：1）混合，充分乳化，经皮下多点注射做第一次加强免疫。每只家兔免疫剂量为 CMV 衣壳蛋白 200ug，每只豚鼠免疫剂量为 CMV 衣壳蛋白 50ug。

步骤四：二次加强免疫

第一次加强免疫后 2 周，进行第二次加强免疫，剂量途径同第一次。每隔 2 周，重复该步骤一次至抗血清效价符合要求。

步骤五：抗血清滴度检测

第三次免疫之后 10 天，自免疫家兔耳缘静脉及豚鼠腿部静脉各采血 200ul 至无菌微量离心管中，6000g 离心 2 分钟。分离血清。经免疫双扩散法检测抗体滴度应不低于 1：64。

步骤六：采血

于最后一次免疫后第 10 天，对试验动物禁食一天。家兔采用颈动脉放血法采血，豚鼠采用心脏采血。

步骤七：抗血清的分离

采集到的血样，置灭菌血清分离瓶中，37℃ 静置 2 小时，4℃ 静置过夜。第二天，用灭菌毛细管小心收集析出血清，剩余样品于 3000g 离心 5 分钟，继续收集分离出的血清。收集到的血清在不能及时进行后

述处理时可加入千分之一浓度的叠氮钠保存于-20℃。

步骤八：多克隆 IgG 的粗分离

将血清温浴于 25℃，加入等体积无菌生理盐水，混匀。搅拌下，以每 100ml 血清稀释物缓慢加入硫酸铵固体粉末 18g 至浓度为 18%，25℃下温浴 30min，3000g 离心 30min。弃去上清液，将沉淀溶解于去离子水中至体积为 25ml，此时多克隆抗体浓度与原抗血清中相等。搅拌下，加入硫酸铵粉末至 14%（不可忽略第一次沉淀处理残留的硫酸铵量）。25℃温浴 30min。3000g 离心 30min，弃去上清液。将沉淀溶解于 15ml 去离子水中，在 PBS (pH6.3 0.07M) 中透析至无铵离子。准备一个 1.6cm×30cm 的层析柱，用经过处理的 DE52 (Whatman) 50ml 装柱，室温下以 PBS (pH6.3 0.07M) 平衡 3 个柱床体积。将样品加入该离子交换柱中，用同样的缓冲液洗脱，流速控制在 1ml / 1 分钟。检测 OD280，待有吸收峰出现，收集最先流出的 10ml 组分，即为初步纯化 IgG。此方法对于羊、兔抗血清和豚抗血清都适用。

步骤九：辣根过氧化物酶(HRP)标记的豚抗CMV抗体的制备

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记豚抗 CMV 抗体。称取 HRP25mg 溶于 0.5ml 的 1.25%戊二醛溶液中，于室温静置过夜。反应后的酶溶液经 Sephadex G-25 层析柱，用生理盐水洗脱。流速控制在 1ml / 1 分钟，收集棕色流出液。如体积大于 5ml，则以 PEG 12000 浓缩至 5ml。放置 25ml 小烧杯中，缓慢搅拌。将待标记的抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml，搅拌下逐滴加入酶溶液中。然后加入 1M pH9.5 碳酸缓冲液 0.25ml，继续搅拌 3 小时。加 0.2M 赖氨酸 0.25ml，混匀后，置室温 2 小时。在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，4℃置 1 小时。3000g 离心半小时，弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次，最后沉淀物溶于少量 0.15M PH7.4 的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中，对 0.15M PH7.4 的 PB 缓冲盐水透析，去除铵离子后(用蔡氏试剂检测)，10,000g 离心 30 分钟去除沉淀，上清液即为酶结合物，分装后，冰冻保存。

步骤十：兔抗CMV多克隆IgG预包被条的制备：经由包被、封闭、干燥过程

A. 包被：用 CB(pH 9.6, 0.05M)将兔抗 CMV 多克隆抗体稀释至 50 或 100ug/ml，100ul/孔包被于酶标检测板上，37℃温浴 2 小时，4℃过夜。

B. 封闭：用含有 0.2%明胶，5%小牛血清，2%蔗糖的 Tris-HCl(pH 8.0)以 150ul/孔封闭，37℃温浴 3 小时。

C. 干燥：37℃下尽量干燥。

步骤十一：酶工作液配制

A. 缓冲液配制：以蒸馏水配制磷酸盐缓冲液(pH7.4, 0.07M)，内含 1%聚乙二醇 4000 作为增敏剂；0.5%蛋白胨；0.5%硫柳汞钠以及 1%吐温-20。

B. 以所配的缓冲液按适当浓度稀释冻存的酶标记抗体。

步骤十二：其他试剂的配制

A. 洗涤液：PBST 洗液(PBS, pH7.2 含 1%吐温-20)

B. 样品提取液：1000ml PBST 中含有亚硫酸钠 1.3g、聚乙烯吡咯烷酮 20g、叠氮钠 0.2g、牛血清白蛋白 2g 和吐温-20 20g。

C. 显色剂 A：以蒸馏水配制的醋酸缓冲液 pH5.0，内含 0.5%过氧化脲。

D. 显色剂 B：用甲醇配制的 1.6%四甲基联苯胺(TMB)，溶解后对倍加甘油。

E. 终止液：蒸馏水配制的 2M 硫酸溶液。

F. 阳性对照：适当浓度稀释的 CMV 纯化样品。

G. 阴性对照：适当稀释的健康百合组织蛋白提取液。

步骤十三：检测方法

A. 样品处理：将样品新鲜叶片组织 0.1g，加入样品提取液 1ml，在研钵中匀浆，至微量离心管中 8000g 离心 5 分钟，保留上清液。

B. 加样：将上述上清液以 100ul/孔，加入预包被的多抗板条孔中，同时设空白(只加 100ul 样品稀释

液)、阴性对照(加 100ul, 不加样品稀释液)、阳性对照(加 100ul, 不加样品稀释液), 37℃温浴 60 分钟。PBST 冲洗 4 次, 甩干。

C. 加酶标抗体: 每孔加入 100ul 上述酶工作液, 37℃温浴 20 分钟, PBST 冲洗加样孔 4-6 次, 尽量甩干。

D. 显色: 先后加入显色剂 A、B 各 50ul, 37℃避光温浴 15 分钟。

E. 终止: 加入一滴终止液。

F. 检测: 于酶标仪上检测 405nm 吸收值。

检测实例1

称取经过 CMV 接种的植物样品各 0.1g, 分别加样品提取液 1ml, 于组织匀浆器或研钵中匀浆。匀浆液在 8000g 离心 5 分钟, 吸取上清液 100ul 用样品提取液稀释至 1ml, 取 100ul 分别加入第一列检测孔中, 并在随后的加样孔中倍比稀释直至 6400 倍。同时阴性对照液 100ul, 加入最后一列的检测孔中。覆盖上密封膜, 在 37℃孵育 60 分钟。倾去孔内液体, PBST 冲洗加样孔 4-6 次, 尽量甩干。每检测孔中加入酶工作液 100ul, 覆盖上密封膜, 37℃孵育 60 分钟。倾去孔内液体, PBST 冲洗加样孔 4-6 次, 尽量甩干。每孔分别加入底物 A 和底物 B 各 50ul, 覆盖上封闭膜, 37℃避光孵育 15 分钟。加入终止液 50ul 终止反应。于酶标仪上检测 405 纳米吸光值, 结果参见附图 1。

结果说明本发明方法对阳性样品提取物一般可检测到 800-1600 倍稀释度。

为对比起见, 同时用 TRizol 法对同批样品各取样 100mg 提取总 RNA, 利用简并引物进行 RT-PCR 扩增后用伯乐 iCycler PCR 仪进行检测。检测结果表明, 当模板稀释度大于 320 倍以上均无检出。实际的检测结果如下表。

编号 稀释倍 数	1	2	3	4	5	6	7
原倍	++	+++	+++	++	+++ +	+++	++
10	++	++	+++	+	+++	++	++
20	+	++	++	+	++	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	-	+	+	-
160	-	+	+	-	+	-	-
320	-	-	-	-	-	-	-

上述对比实验的结果说明, 本发明方法对 CMV 的检出率优于 RT-PCR 方法。

检测实例2

对疑似 CMV 感染情况样品 14 份, 分别取叶片组织 0.1g, 加入 1ml 样品提取液, 匀浆, 8000g 离心 5 分钟, 取上清 100ul 加入加样孔中。经与前相同的处理, 用本发明的方法及全病毒免疫多克隆抗体 DAS-ELISA 检测, 结果见图 2。

结果显示, 对于感染晚期样品 1、2、3、4 感染中期样品 10、11、12、13、14 本发明方法与全病毒多抗 DAS-ELISA 检测结果相当。对于感染早期样品 5、6、7、8、9, 本发明方法检出率更高。

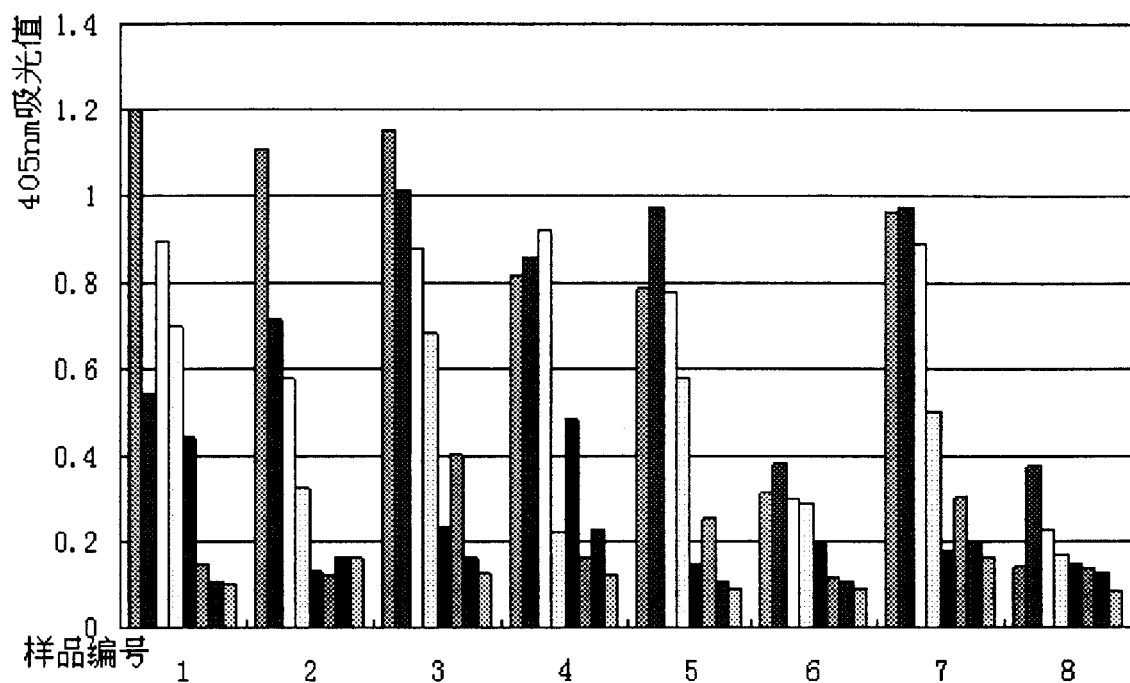


图 1

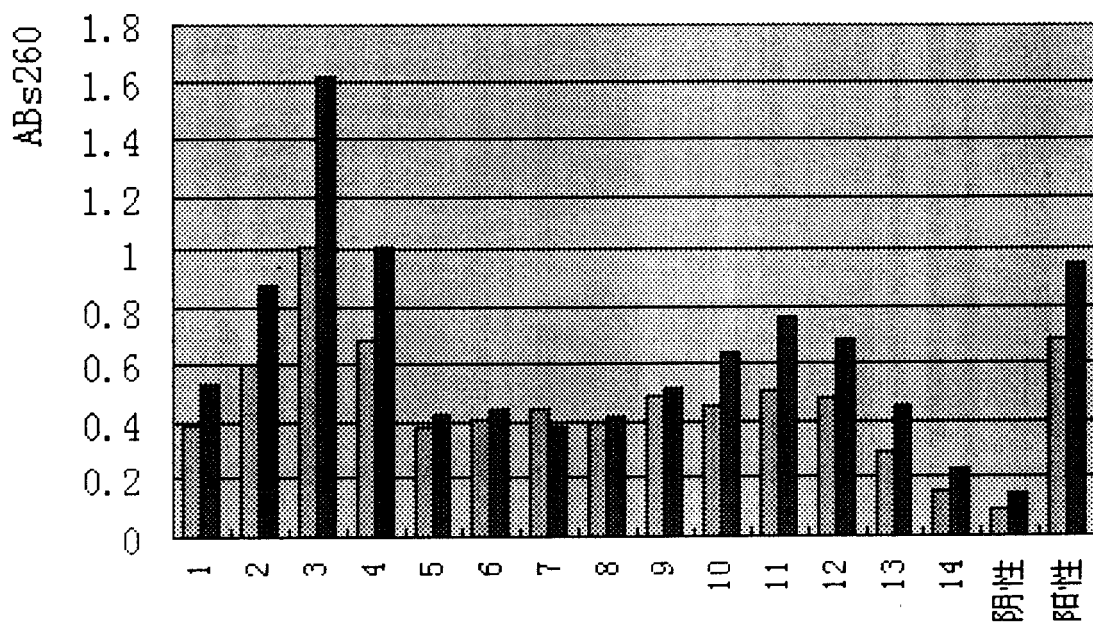


图 2

专利名称(译)	黄瓜花叶病毒双抗体夹心酶联免疫吸附检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1996020A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200510022791.9	申请日	2005-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院寒区旱区环境与工程研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院寒区旱区环境与工程研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院寒区旱区环境与工程研究所		
[标]发明人	王若愚 谢忠奎 安黎哲 王建辉		
发明人	王若愚 谢忠奎 安黎哲 王建辉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N21/78 G01N33/532		
代理人(译)	张晋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开黄瓜花叶病毒检测试剂盒以及制备方法。本发明的检测盒包括：反应板、酶标抗体、缓冲液、显色液、终止液及洗涤剂。其中：反应板上包被有CMV病毒多克隆抗体；酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的CMV抗体。本发明采用的免疫源为CMV病毒衣壳蛋白。采用由此免疫源产生的抗体，不仅对完整病毒有特异敏感性，而且对尚未形成完整病毒的病毒蛋白亚单位也有相当的敏感性。

编号 稀释倍数	1	2	3	4	5	6	7
原倍	++	+++	+++	++	+++ +	+++	++
10	++	++	+++	+	+++	++	++
20	+	++	++	+	++	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	-	+	+	-
160	-	+	+	-	+	-	-
320	-	-	-	-	-	-	-