



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104101705 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201410319878. 1

(22) 申请日 2014. 07. 07

(71) 申请人 贵州师范大学

地址 550001 贵州省贵阳市云岩区宝山北路  
116 号

(72) 发明人 乙引 洪鲲 万晴姣 张宇斌

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

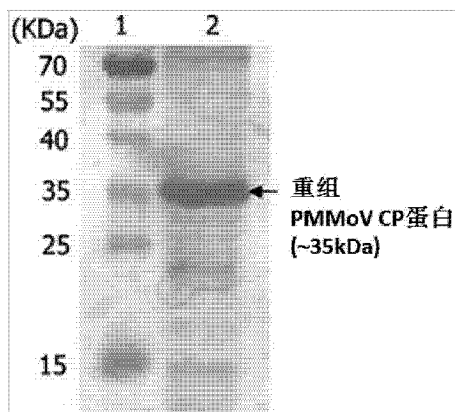
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

### (54) 发明名称

一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒  
及其制备方法与应用

### (57) 摘要

本发明提供了一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒及其制备方法与应用,通过自制的 PMMoV 抗血清(第一抗体)作为主要试剂组装了 PMMoV 的 ID-ELISA 检测试剂盒,可应用于辣椒中 PMMoV 的检测。该试剂盒具体包含阳性对照、阴性对照、PMMoV 特异性抗血清、酶标二抗、显色底物 PNPP、封闭液、包被缓冲液、PBST 洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、底物缓冲液、5 块 96 孔酶标板和使用说明书 1 份。以待检测抗原如病毒颗粒体免疫家兔等脊椎动物可在动物体内诱导产生特异性的抗血清(多克隆抗体),抗血清可特异性识别并与抗原结合,因此可用于检测样品是否含抗原,填补了国内在 PMMoV 抗血清制备及相应 ELISA 检测应用方面的空白。



1. 一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒,其特征在于,包括:阳性对照、阴性对照、PMMoV 特异性抗血清、酶标二抗、显色底物、封闭液、包被缓冲液、PBST 洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、底物缓冲液以及 96 孔酶标板;其中,PMMoV 特异性抗血清的制备包括以下具体步骤:

(1) 根据 GenBank 中公布的 PMMoV 各地分离物的 CP 序列设计一对 RT-PCR 引物:

正向引物:5'-CTACCCATGGCATACACAGTTACCAGTG,

反向引物:5'-GGAATTCAGGAGTTGTAGCCACGTAA;

(2) 以感染 PMMoV 贵州辣椒分离物的组织总 RNA 作为模板,进行 RT-PCR 扩增、纯化以及回收,,得到 CP 基因片段;

(3) 将所述 CP 基因片段和原核表达载体 pET32a(+) 以 Nco I 和 EcoR I 两种 DNA 限制性内切酶进行双酶切处理、片段回收、连接、重组质粒转化大肠杆菌、重组 CP 蛋白表达以及重组 CP 蛋白回收;

(4) 将所述重组 CP 蛋白作为抗原免疫家兔制备特异性 PMMoV 抗血清,免疫后取兔血,即得到 PMMoV 特异性抗血清。

2. 如权利要求 1 所述的 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒,其特征在于,所述阳性对照为含 PMMoV 病毒的辣椒叶片冷冻干燥后研磨成的细粉;所述阴性对照为健康无毒辣椒叶片冷冻干燥后研磨成的细粉;所述酶标二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液。

3. 权利要求 2 所述的 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒在辣椒 PMMoV 的检测方面的应用。

## 一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒及其制备方法 与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于酶学、免疫学或生物学技术领域,尤其涉及一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 植物病毒病又被称为“植物癌症”,目前没有有效的治疗方法。对植物病毒病快速、准确的检测有助于病株的早期发现、隔离和销毁,也是植物抗病育种和脱毒苗的培育所必须的。诊断植物病毒的方法有传统生物学方法、电镜观察法、血清学方法和分子生物学方法等。

[0003] 血清学方法是检测植物病毒最为常用和有效的手段之一。目前应用最广泛的血清学检测方法是酶联免疫吸附法 (ELISA) 和斑点免疫结合测定法 (DIBA),DIBA 法操作程序比 ELISA 法要简单,但其检测灵敏度低于 ELISA 法。

[0004] ELISA 检测方法的基本原理是:以酶催化的颜色反应指示抗原抗体的结合。利用酶标抗体、抗原或次抗原作为一个检测体系,其灵敏度较高,可检测到纳克 (ng) 水平的病毒,并且可以减少检测时间,进行大规模样品调查,使常规病毒诊断变得非常容易,特别适合脱毒苗的检测。目前,应用最多的是双抗体夹心 ELISA (DAS-ELISA) 和间接 ELISA (ID-ELISA) 等方法。

[0005] DAS-ELISA 检测法将已知抗体吸附于固相载体,加入待检样品(含相应抗原)与之结合,温育后洗涤,加入酶标抗体和底物,使抗体/抗原/酶标记抗体复合物与底物反应,呈现深浅不同的颜色反应。这种方法的优点:专业性强,灵敏度高、应用广泛,在国外已形成商业化生产。但是 DAS-ELISA 存在一定的缺点:(1) 检测每种病毒都需要制备相应的酶标记特异性抗体,标记过程比较复杂,对技术和成本要求均高;(2) 生产单克隆抗体存在杂交瘤细胞系的退化和某些杂交瘤细胞系在大鼠腹腔中不能诱生腹水的问题。

[0006] ID-ELISA 检测法将待检样品(含相应抗原)吸附于固相载体,加入第一抗体(抗血清)与之结合,温育后洗涤,加入能识别第一抗体的酶标第二抗体和底物,使抗原/一抗/酶标二抗复合物与底物反应,呈现深浅不同的颜色反应。ID-ELISA 的缺点:对病毒检测的特异性和灵敏度比 DAS-ELISA 的要低;优点:(1) 无需针对每种待检病毒都制备相应的酶标记特异性抗体,降低成本和时间;(2) 抗血清的制备方法容易,来源广泛。

[0007] 目前,国内未见有辣椒轻斑驳病毒 (PMMoV) 特异性抗血清制备、ELISA 检测方法的建立和相应试剂盒制备的相关文献报道。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒。

[0009] 本发明的再一目的在于提供上述 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒的制备方法,尤其是其中 PMMoV 特异性抗血清的制备方法。

[0010] 本发明的另一目的在于提供上述 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒在检测辣椒 PMMoV 的检测方面的应用,旨在解决辣椒轻斑驳病毒 (PMMoV) 的血清学检测尚属空白的问题。

[0011] 本发明是这样实现的,一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒,包括:阳性对照、阴性对照、PMMoV 特异性抗血清、酶标二抗、显色底物、封闭液、包被缓冲液、PBST 洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、底物缓冲液以及 96 孔酶标板;其中, PMMoV 特异性抗血清的制备包括以下具体步骤:

[0012] (1) 根据 GenBank 中公布的 PMMoV 各地分离物的 CP 序列设计一对 RT-PCR 引物:

[0013] 正向引物:5'-CTACCCATGGCATACACAGTTACCACTG,

[0014] 反向引物:5'-GGAATTCAGGAGTTGTAGCCACGTAA;

[0015] (2) 对感染 PMMoV 贵州辣椒分离物的组织进行 RT-PCR 扩增、纯化以及回收,得到 CP 基因片段;

[0016] (3) 将所述 CP 基因片段和原核表达载体 pET32a(+) 以 Nco I 和 EcoR I 两种 DNA 限制性内切酶进行双酶切处理、片段回收、连接、重组质粒转化大肠杆菌、重组 CP 蛋白表达以及重组 CP 蛋白回收;

[0017] (4) 将所述重组 CP 蛋白作为抗原免疫家兔制备特异性 PMMoV 抗血清,免疫后取兔血,即得到 PMMoV 特异性抗血清。

[0018] 优选地,所述阳性对照为含 PMMoV 病毒的辣椒叶片冷冻干燥后研磨成的细粉;所述阴性对照为健康无毒辣椒叶片冷冻干燥后研磨成的细粉;所述酶标二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液。

[0019] 本发明进一步提供了上述 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒在辣椒 PMMoV 的检测方面的应用。

[0020] 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 是检测生物样品中是否含有特定蛋白质 (或特定病毒) 的一种常规方法,其准确性和灵敏度都较高。间接 ELISA 法的基本原理为:将待检样品中所有蛋白固定 (吸附、或包被) 在一支持表面上,加入能识别并与待检抗原结合的抗体 (抗血清),样品中若有抗原则抗体 (第一抗体) 与其结合,再加入能识别第一抗体的酶标记第二抗体 (酶标二抗),最后加入过量的该酶的底物 (反应物),则底物在酶的催化下不断转变为有颜色的产物,最终将抗原存在的信号放大。本发明利用自制的 PMMoV 抗血清 (第一抗体) 作为主要试剂组装了 PMMoV 的 ID-ELISA 检测试剂盒,可应用于辣椒中 PMMoV 的检测。该试剂盒具体包含阳性对照、阴性对照、PMMoV 特异性抗血清、酶标二抗、显色底物 PNPP、封闭液、包被缓冲液、PBST 洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、底物缓冲液、5 块 96 孔酶标板和使用说明书 1 份。以待检测抗原如病毒粒体免疫家兔等脊椎动物可在动物体内诱导产生特异性的抗血清 (多克隆抗体),抗血清可特异性识别并与抗原结合,因此可用于检测样品是否含抗原。

[0021] 与现有技术的不足相比,本发明所具有的有益效果为:

[0022] (1) 本发明采用 pET32a(+) 和 BL21 (DE3) 原核表达系统,使得所制备的抗原 (重组 PMMoV 外壳蛋白) 是高度可溶的,便于采用亲和层析纯化抗原,同时也保证了抗原的质量。与通过提纯完整的病毒粒体作为抗原来制备抗血清的方法比较,采用原核表达制备抗原具有成本低和步骤简单的优点。

[0023] (2) 本发明 PMMoV 特异性抗血清具有高特异性,针对待测病汁液的效价达 1:8000。

[0024] (3) 本发明的试剂盒可对辣椒样品中的 PMMoV 检测灵敏度达 0.31mg/mL PMMoV 病汁液(即病叶提取液在稀释 3200 倍后仍可被检测到);同一样品在一块酶标板上重复测定,测得结果( $OD_{405}$  值)变异系数小于 5%;同一样品在 5 块酶标板上重复测定,测得结果( $OD_{405}$  值)变异系数小于 10%;该试剂盒检测结果具有良好的板内和板间重复性;试剂盒提供完成该 ELISA 检测所需的几乎所有试剂、缓冲液和说明书,使用者只需按照说明书操作即可完成检测;在 4℃ 保存,该试剂盒有效期达 1 年,填补了国内在 PMMoV 抗血清制备及相应 ELISA 检测应用方面的空白。

## 附图说明

[0025] 图 1 是本发明实施例中 PMMoV CP 基因的 RT-PCR 扩增产物的电泳图;其中,1:DNAMarker;2、3:RT-PCR 产物;

[0026] 图 2 是本发明实施例中 PMMoV CP 基因的原核表达产物的检测结果图;其中,1:蛋白质分子量标准;2:含 pET32a(+) 空载体的大肠杆菌细胞诱导培养后的裂解样品;3:未诱导过夜培养的细胞裂解样品;4~10:IPTG 诱导后培养 1、3、6、9、12、15 和 18h 后全细胞裂解样品;

[0027] 图 3 是本发明实施例中重组 PMMoV CP 蛋白可溶性分析结果图;其中,1:全细胞裂解样;2:裂解后的上清;3:裂解后的沉淀;

[0028] 图 4 是本发明实施例中自制抗血清的 Western Blot 分析结果图;其中,1:预染蛋白分子量标准;2:IPTG 诱导表达 PMMoV CP 重组菌全细胞样。

## 具体实施方式

[0029] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0030] 实施例 1 抗原(重组 PMMoV CP 蛋白)的制备

[0031] 1、PMMoV 贵州分离物外壳蛋白基因(CP 基因,大小为 474bp)的 RT-PCR 扩增

[0032] (1) 根据 GenBank 中公布的 PMMoV 各地分离物的 CP 序列设计一对 RT-PCR 引物:

[0033] 正向引物:5'-CTACCCATGGCATACACAGTTACCAGTG,

[0034] 反向引物:5'-GGAATTCAGGAGTTGTAGCCACGTAA。

[0035] (2) 从感染 PMMoV 贵州辣椒分离物的新鲜植物叶片中提取总 RNA(Trizol 试剂提取法提取)。

[0036] (3) 以第(2)步中提取的总 RNA 为模板,以第(1)步中设计的引物通过一步 RT-PCR 法(使用商品化试剂盒“PrimeScript™One Step RT-PCR Kit Ver. 2”,宝生物大连公司,货号:RR055A,或其它公司同类产品)扩增获得 PMMoV 的 CP 基因,操作按试剂盒说明书进行(退火温度:50℃)。取 1 μL RT-PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析,如图 1 所示,在约 474bp 左右观察到 DNA 条带。

[0037] 2、PMMoV CP 基因原核表达载体的构建(常规分子生物学方法)

[0038] (1) 采用“普通产物纯化试剂盒”(北京天根生化科技有限公司,货号:DP204,或其

它公司同类产品)将上步获得的 RT-PCR 产物进行纯化,将纯化的 CP 基因片段和原核表达载体 pET32a(+)(德国 Novagen 公司)均同时以 Nco I 和 EcoR I 两种 DNA 限制性内切酶进行双酶切处理(宝生物大连公司,货号:1160A,1040A,或其它公司同类产品),具体操作按照限制酶说明书进行。

[0039] (2) 对 CP 基因酶切产物和 pET32a(+) 酶切产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳(常规分子生物学操作),CP 基因酶切产物应该 474bp 左右有 DNA 条带,pET32a(+) 酶切产物应该在 5,900bp 处有 DNA 条带。用洁净刀片切下这两处胶条并分别放入 2 支 1.5mL 塑料带盖离心管中,采用“琼脂糖凝胶回收试剂盒”(北京天根生化科技有限公司,货号:DP209,或其它公司同类产品)对 CP 基因和 pET32a(+) 载体进行回收,具体操作按照试剂盒说明书进行。

[0040] (3) 测定上步中回收的 CP 基因片段和 pET32a(+) 载体片段的浓度( $\text{ng DNA}/\mu\text{L}$ ),并按照 3:1 的摩尔比(CP:pET32a(+)=3:1)进行混合,加入 T4DNA 连接酶(宝生物大连公司,货号:2011A,或其它公司同类产品)进行连接,具体操作按照连接酶说明书进行。

[0041] (4) 用 10  $\mu\text{L}$  上步中的连接反应产物以热激法转化 100  $\mu\text{L}$  大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞(可购自宝生物大连公司、上海生工等多家公司),并将 100  $\mu\text{L}$  转化后的细胞涂于含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板上在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 16h(常规分子生物学操作)。

[0042] (5) 随机挑取平板上的大肠杆菌单菌落若干分别转入 5mL 含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中进行振荡培养 16h(37 $^{\circ}\text{C}$ , 200rpm)。采用菌液 PCR 的方法对各培养物进行阳性重组子的筛选(PCR 条件:正向引物 S·Tag\_Fw:5' -GAACGCCAGCACATGGAC;反向引物 T7Rv:5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGGT,退火温度 50 $^{\circ}\text{C}$ :循环次数:25)(常规分子生物学操作)。

[0043] (6) 对上步检测到含有阳性重组子(pET32a(+)-PMMoVCP)的菌液进行重组质粒(即 pET32a(+)-PMMoVCP)的提取(常规分子生物学操作)。

[0044] 3、PMMoV CP 基因的原核表达和表达产物 CP 蛋白的获得(常规分子生物学方法)

[0045] (1) 用 1  $\mu\text{L}$  提取到的重组质粒热激法转化 100  $\mu\text{L}$  大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞(可购自北京天根生化科技有限公司,货号:CB105;Novagen 公司等),并于含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板上在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 16h(常规分子生物学操作)。

[0046] (2) 从上述平板上挑取任一单菌落转入 5mL 含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中进行震荡培养 16h(37 $^{\circ}\text{C}$ , 200rpm),按 1:50(V/V) 将培养后菌液接种于 200mL 含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基中进行震荡培养(37 $^{\circ}\text{C}$ , 200rpm)。待细胞培养到对数生长期,即菌液在 600nm 的吸光度值( $\text{OD}_{600}$ )达 0.5~0.7 时,向菌液中加入异丙基硫代半乳糖甘(IPTG)使其终浓度达 0.5mmol/L 以诱导 PMMoV CP 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞中的表达,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、200rpm 继续振荡培养 12h 使 CP 基因表达量(即 CP 蛋白合成量)达最大(如图 2 所示)。可溶性分析表明重组 PMMoV CP 蛋白是可溶的(如图 3 所示)。

[0047] (3) 将菌液离心,收集菌体,重悬于裂解缓冲液中采用超声方法破碎细胞释放重组的 CP 蛋白,离心除去细胞碎片,采用固定化金属亲和层析法(IMAC,镍柱,  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA) 对上清液中的重组 CP 蛋白进行纯化,紫外法测定蛋白浓度后备用(常规分子生物学操作)。

[0048] 实施例 2

[0049] 1、PMMoV 抗血清的制备

[0050] 以实施例 1 中得到的表达产物即重组 CP 蛋白(PMMoV 病毒的外壳蛋白)作为抗原

免疫家兔制备特异性 PMMoV 抗血清。初次免疫使用弗式完全佐剂,加强免疫使用弗式不完全佐剂。

[0051] 初次免疫:采用背部皮下多点注射的方式对健康的约 2kg 重的新西兰雄兔进行免疫,每点约 0.2 ~ 0.5mL,总量约 500  $\mu$ g 重组 CP 蛋白。

[0052] 加强免疫:初次免疫后 1 周,对家兔进行再次免疫,方法如前。每隔一周免疫一次,总共再次免疫 4 次。

[0053] 抗血清制备:对家兔进行心脏取血,常规方法制备的血清分装后于 -20℃ 保存待用。

[0054] 2、PMMoV 抗血清质量评价

[0055] Western blot 分析表明 PMMoV 抗血清对重组 CP 蛋白具有强的特异性(如图 4 所示)。采用 ID-ELISA 法测定,所制备的 PMMoV 抗血清针对重组 CP 蛋白的效价(抗血清稀释度)达 1:25600,针对 PMMoV 病汁液效价达 1:8000;抗血清在 1:1000 的稀释度下能检测到以 1:3200 倍稀释的 PMMoV 辣椒病汁液中的 PMMoV(即检测灵敏度达 0.31mg/mL 病汁液,病汁液为新鲜病叶按 1:10 的研磨提取液);该抗血清只与 PMMoV 产生阳性反应,不与同属的 TMV、ORSV 和 ToMV 发生交叉反应,也不与其它能侵染辣椒的病毒如 CMV、PVX 和 PVY 发生交叉反应,具有强的特异性。以上抗血清各项指标完全能够满足对 PMMoV 病毒的 ID-ELISA 检测。

[0056] 实施例 3PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒

[0057] 1、PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒包含以下组分:

[0058] (1) 阳性对照:将含 PMMoV 病毒的辣椒叶片冷冻干燥后研磨成细粉并装入小瓶(1g)。

[0059] (2) 阴性对照:将健康无毒辣椒叶片冷冻干燥后研磨成细粉并装入小瓶(1g)。

[0060] (3) A1 液:将制备的 PMMoV 抗血清 100  $\mu$ L 装入小管盖紧(4℃ 可保存一年)。

[0061] (4) A2 液:酶标二抗溶液:碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液(购自碧云天生物技术有限公司,货号:A0239,或其它公司同类产品,4℃ 保存一年)100  $\mu$ L 装入小管盖紧。

[0062] (5) 显色底物:1g 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)(购自北京索来宝公司,或其他公司同类产品)。

[0063] (6) 96 孔酶标板 5 块(购自美国 Corning 公司,或其它公司同类产品)。

[0064] (7) 包被缓冲液:1.59g 碳酸钠,2.93g 碳酸氢钠,0.20g 叠氮化钠,溶于 900mL 去离子水,用盐酸调节 pH 至 9.6,加水至 1L。

[0065] (8) PBST 洗涤缓冲液:8.0g 氯化钠,1.15g 磷酸氢二钠,0.2g 磷酸二氢钾,0.2g 氯化钾,溶于 800mL 去离子水后调节 pH 至 7.4,加入 0.5g 吐温-20 后,加水 1L。

[0066] (9) 封闭液:脱脂奶粉溶于 0.1MTBST 缓冲液至终浓度为 5%,完全溶解,过 0.2  $\mu$ m 滤膜后 4℃ 保存。

[0067] (10) 抗体稀释缓冲液:含 2% PVP 的 PBST 缓冲液,4℃ 保存。

[0068] (11) 底物缓冲液:MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1g,叠氮化钠 0.2g、乙二醇胺 97mL,加 800mL 去离子水后用盐酸调节 pH 至 9.8,定容至 1000mL,4℃ 保存。

[0069] 2、PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒试剂准备

[0070] (1) 包被缓冲液:取一袋包被缓冲液(1.59g 碳酸钠,2.93g 碳酸氢钠,0.20g 叠氮

化钠),加水溶解,用盐酸调节 pH 至 9.6,加水至 1L。

[0071] (2)PBST 洗涤液:取一袋 PBS(8.0g 氯化钠,1.15g 磷酸氢二钠,0.2g 磷酸二氢钾,0.2g 氯化钾),加水溶解,调节 pH 至 7.4,加入一管 Tween(吐温)-20,加水至 1L。

[0072] (3) 抗体稀释缓冲液:取上步配好的 PBST 洗涤液 30mL,加入 1 袋 PVP,溶解。

[0073] (4) 封闭液:取 30mLPBST 洗涤液,加入 1.5g 封闭用脱脂奶粉,溶解。

[0074] 3、PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒的应用方法

[0075] (1) 阳性对照和阴性对照的预处理:第一次使用本试剂盒时,将阳性对照(带毒叶片冻干粉末)和阴性对照(健康叶片冻干粉末)打开,各加入 10mL 包被缓冲液,充分重悬混匀后分装至 1.5mL 塑料带盖离心管(每管 1mL), $-20^{\circ}\text{C}$  保存待用。

[0076] (2) 待检样品预处理:向 0.5g ~ 1g 待检样品中加入 5 ~ 10mL 包被缓冲液( $w/v = 1/10$ ),在研钵中研磨充分。

[0077] 注:可先加少量缓冲液,待研磨细后再加入剩余缓冲液继续研磨,以防叶片飘浮导致的研磨困难。

[0078] (3) 包被:向酶标板孔中加入 100  $\mu\text{L}$  待测样品溶液,每次测定均应同时包被至少一个孔的阳性对照(100  $\mu\text{L}$ )、一个空的阴性对照(100  $\mu\text{L}$ ) 和一个孔的空白对照(100  $\mu\text{L}$  包被缓冲液),建议做一个重复。将酶标板放于湿盒(带盖微波炉饭盒,底部垫上吸水后的纸)中, $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,或  $37^{\circ}\text{C}$  2 ~ 4h。

[0079] (4) 洗涤:将酶标板各孔中的液体倒出,可直接翻转倾倒。用 8 道或 12 道排枪向各孔中加满 PBST 洗涤缓冲液,放置 3min 后再次倒掉,此时可将酶标板翻转在吸水纸上进行拍打尽量除去液体,重复洗涤 3 次。

[0080] (5) 封闭:向每孔加入 200  $\mu\text{L}$  5% 脱脂奶粉封闭溶液, $37^{\circ}\text{C}$  湿盒中封闭 2h。

[0081] (6) 洗涤:按步骤“4”方法用 PBST 洗涤各孔 3 次。

[0082] (7) 一抗孵育:取 12  $\mu\text{L}$  (可做 96 孔样,可根据具体样品数增减) A1 溶液加入到 12mL 抗体稀释缓冲液中(1:1000 稀释),于加样槽中轻柔混匀(在第“5”步结束前 10 分钟内配制),向酶标板各孔中加入 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 A1 溶液, $37^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育 1h。

[0083] (8) 洗涤:按步骤“4”方法用 PBST 洗涤各孔 8 次。

[0084] (9) 酶标二抗孵育:将 24  $\mu\text{L}$  A2 溶液按 1:500 比例用抗体稀释缓冲液稀释,于加样槽中轻柔混匀(在第“7”步结束前 10 分钟内配制),向酶标板各孔中加入 100  $\mu\text{L}$  稀释后的 A2 溶液, $37^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育 1h。

[0085] (10) 准备底物溶液:取 2 片 PNPP,加入 11mL 底物缓冲液溶解(浓度:约 1mg/mL,在第(9)步结束前 15 分钟内配制),避光保存。

[0086] (11) 洗涤:按步骤“4”方法用 PBST 洗涤酶标板各孔 8 次。

[0087] (12) 底物显色:向各孔中加入现配的 PNPP 底物溶液,每孔 100  $\mu\text{L}$ , $37^{\circ}\text{C}$  湿盒中显色 1h。

[0088] 4、结果分析:

[0089] (1) 通过肉眼观察,阳性对照应为黄色,阴性对照应无色或浅黄色,空白对照应无色,样品孔若为黄色则基本判断为 PMMoV 阳性,无色则为 PMMoV 阴性。

[0090] (2) 在酶标仪上测定各孔 405nm 的吸光度值(OD405),若样品 OD405 值  $\geq 2$  倍阴性对照 OD405 值则判断样品为 PMMoV 阳性,否则判断为 PMMoV 阴性。若阴性对照 OD405 值小



于 0.05, 则阴性对照 OD405 值均按 0.05 计, 即样品的 OD405 值  $\geq 2 \times 0.05$  才能判定为阳性。

[0091] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

[0092]

## 序 列 表

### SEQUENCE LISTING

<110> 贵州师范大学

<120> 一种 PMMoV 贵州分离物 ID-ELISA 检测试剂盒及其制备方法与应用

<130> 2014

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 正向引物

<400> 1

ctacccatgg

catacacagt

taccagtg

28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 反向引物

<400> 2

ggaattcagg

agttgtagcc

cacgtaa

27

[0093]

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 正向引物 STag\_Fw

<400> 3

gaacgccagc

acatggac

18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 反向引物 T7\_Rv

<400> 4

gctagttatt

gctcagcggc

20

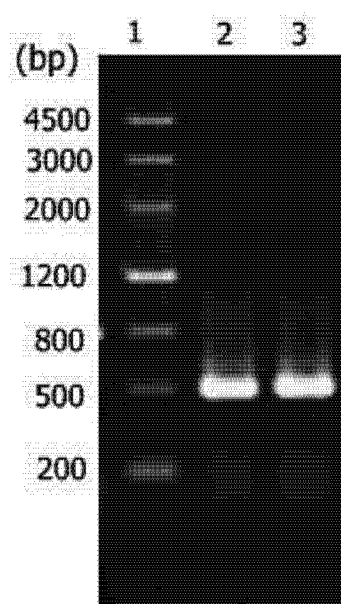


图 1

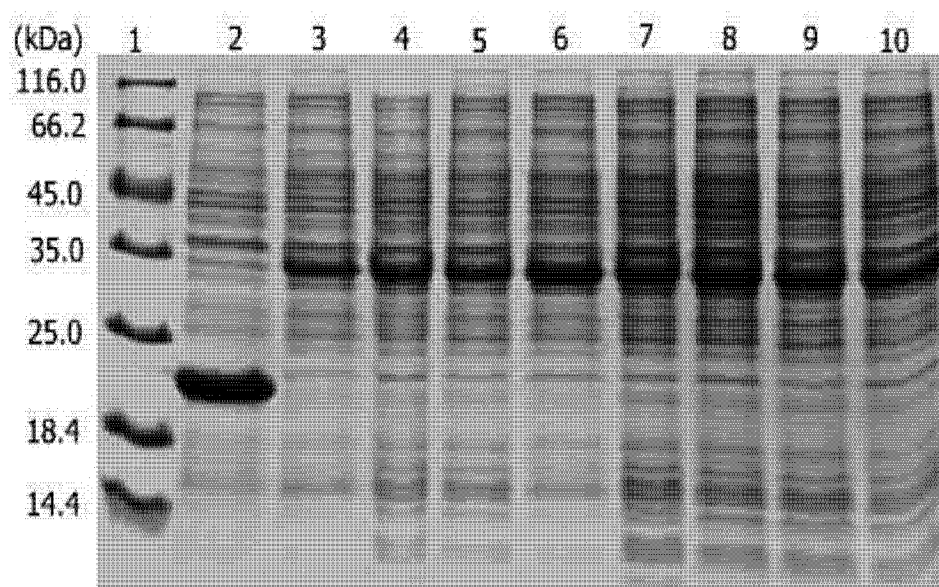


图 2

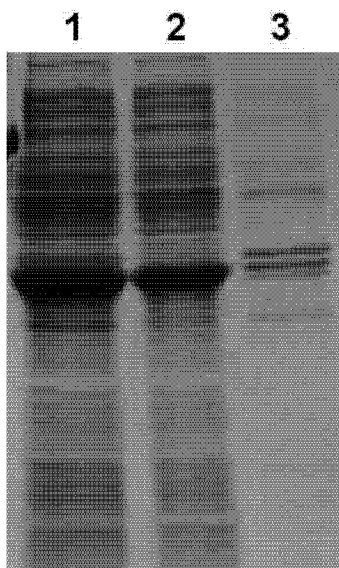


图 3

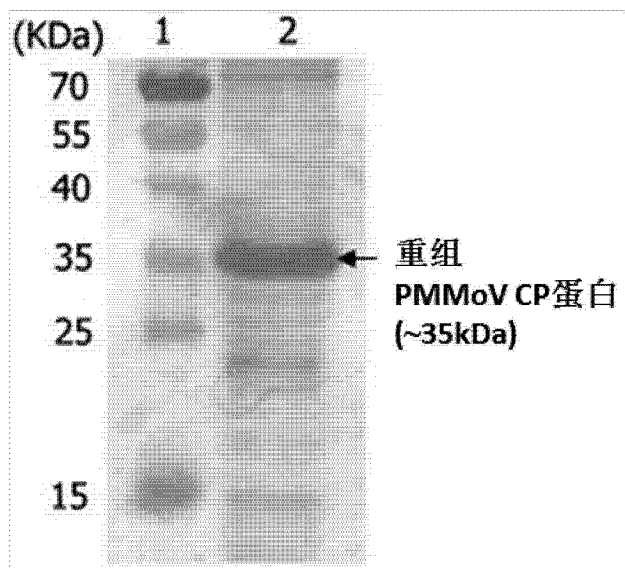


图 4

专利名称(译)	一种PMMoV贵州分离物ID-ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104101705A</a>	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	CN201410319878.1	申请日	2014-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	贵州师范大学		
申请(专利权)人(译)	贵州师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	贵州师范大学		
[标]发明人	乙引 洪鲲 万晴姣 张宇斌		
发明人	乙引 洪鲲 万晴姣 张宇斌		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K16/06 C07K16/10		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

## 摘要(译)

本发明提供了一种PMMoV贵州分离物ID-ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用，通过自制的PMMoV抗血清(第一抗体)作为主要试剂组装了PMMoV的ID-ELISA检测试剂盒，可应用于辣椒中PMMoV的检测。该试剂盒具体包含阳性对照、阴性对照、PMMoV特异性抗血清、酶标二抗、显色底物PNPP、封闭液、包被缓冲液、PBST洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、底物缓冲液、5块96孔酶标板和使用说明书1份。以待检测抗原如病毒粒体免疫家兔等脊椎动物可在动物体内诱导产生特异性的抗血清(多克隆抗体)，抗血清可特异性识别并与抗原结合，因此可用于检测样品是否含抗原，填补了国内在PMMoV抗血清制备及相应ELISA检测应用方面的空白。

