



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105606801 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201510951206. 7

(22) 申请日 2015. 12. 19

(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 320 号

(72) 发明人 张玉宝 王亚军 谢忠奎 王若愚
王乐 郭志鸿

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

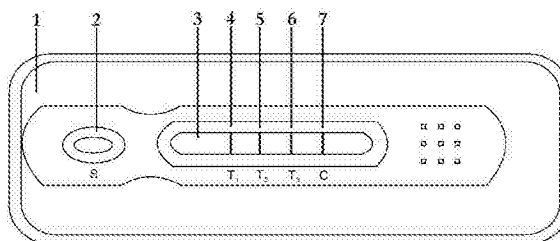
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种百合 X 病毒半定量检测金标卡及制备方法

(57) 摘要

一种百合 X 病毒半定量检测金标卡及制备方法,为了提高胶体金免疫层析检测方法的使用效率和田间普及率,实现对百合病毒的快速且半定量检测,将检测线增加至三条,再将已知量的有浓度差异的抗体分别包被于检测线,研制能快速半定量检测 LVX 的金标卡,满足百合大规模脱毒及田间对百合病毒快速半定量检测的需求;所述金标卡检测针对性强,操作简便,准确性高,灵敏性强,无需借助任何仪器和设备,就可以准确检测样品之间病毒含量的差异。



1. 一种百合X病毒半定量检测金标卡,其特征在于包括金标卡槽(1)、衬板(12)、样品垫(8)、胶体金结合垫(9)、硝酸纤维素膜(10)和吸水滤纸(11),其中金标卡槽(1)包括上壳体和下壳体,上壳体和下壳体通过卡扣连接,上壳体设有加样孔(2)和反应窗(3),样品垫(8)置于加样孔(2)下方,硝酸纤维素膜(10)置于反应窗(3)下方,胶体金结合垫(9)上含有金标探针,衬板(12)固定于金标卡槽(1)中,样品垫(8)、胶体金结合垫(9)、硝酸纤维素膜(10)和吸水滤纸(11)依次排列连接于衬板(12)上表面,硝酸纤维素膜(10)上设有第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)和对照线(7),第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)上分别包被的是不同浓度的兔抗LVX IgG,对照线(7)上包被的是羊抗兔IgG,第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)上LVX IgG包被量分别为1.0~1.5 pg、0.5~0.75 μ g 和1.0~1.5 μ g蛋白,金标探针抗体标记量为16 μ g/mL,羊抗兔IgG包被量为2.0~2.5 μ g蛋白;

用所述金标卡检测时,在所述加样孔(2)处加入百合样品的待检溶液,对比反应窗(3)内第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)和对照线(7)的颜色,即可判定被检测百合是否感染了百合X病毒;

将待检溶液加入到金标卡的加样孔内,若待检溶液中含有LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)方向渗移,当接触到所述第一检测线(4)时发生抗原抗体结合反应而被全部截留下来,形成可见的淡红色条带;金标垫上剩余的金标多克隆抗体继续向所述第二检测线(5)、第三检测线(6)方向渗移,当接触到所述第二检测线(5)和第三检测线(6)时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线(7)方向渗移,当接触到所述对照线(7)时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第二检测线(5)、第三检测线(6)没有颜色变化,而第一检测线(4)出现淡红色、对照线(7)出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,病毒含量低,田间防治以杀灭蚜虫为主;

若待检溶液中含有LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)方向渗移,当接触到所述第一检测线(4)时发生抗原抗体结合反应而被部分截留下来,形成淡红色条带;剩余的复合物继续往所述第二检测线(5)、第三检测线(6)方向渗移,当接触到所述第二检测线(5)时发生抗原抗体结合反应被全部截留下来,形成淡红色条带;剩余的金标多克隆抗体继续向所述第三检测线(6)和对照线(7)方向渗移,当接触到所述第三检测线(6)时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线(7)方向渗移,当接触到所述对照线(7)时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第三检测线(6)没有颜色变化,而第一检测线(4)和第二检测线(5)出现淡红色、对照线(7)出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,田间防治采取杀灭蚜虫并喷施抗病毒药剂;

若待检溶液中含有LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)方向渗移,当接触到所述第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)时分别发生抗原抗体结合反应而被截留下来,第一检测线(4)、第二检测线(5)形成淡红色、而第三检测线(6)形成棕红色条带;剩余的金标多克隆抗体继续向所述对照线(7)方向渗移,当接触到所述对照线(7)时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第一检测线(4)、第

二检测线(5)出现淡红色、第三检测线(6)和对照线(7)均出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,且病毒含量高,田间防治应增加抗病毒药剂的使用量和使用频次,同时杀灭蚜虫;

若检溶液中不含LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,则不能与金标垫上的金标多克隆抗体结合,当接触到所述第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线(7)方向渗移,当接触到所述对照线(7)时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)均没有颜色变化而仅对照线(7)出现棕红色的条带时,则判定被检样品没有感染百合X病毒。

2. 一种如权利要求1所述的百合X病毒半定量检测金标卡的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

①兔抗LVX IgG的制备:从感染了LVX的百合叶片中提取总RNA进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),扩增LVX的CP基因片段;通过双酶切克隆至pET-28a 载体;重组质粒转化入E. coli BL21 (DE3),37℃震荡培养,IPTG诱导表达,Ni-NTA柱纯化获得大小22.0 kDa的高纯度LVX CP重组蛋白;用0.5mg的LVX CP重组蛋白作为免疫原免疫日本大耳白兔,获得抗血清;所得抗血清依次通过20%、50%、33%三个饱和度的硫酸铵沉淀粗提后,透析至pH 7.8的磷酸缓冲液,然后使用Protein G柱进行纯化而获得高纯度兔抗LVX IgG;

②胶体金标记兔抗LVX IgG的方法:分别取半径为30nm的胶体金100mL及兔抗LVX IgG 1.6mg(1mg/mL),在pH7.8的条件下通过磁力搅拌器缓慢搅拌1h使其结合,加牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂,使得终浓度为1%,采用高速离心法除去未结合的多克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及去凝聚物,将沉淀缓慢悬浮于一定体积的缓冲液中,继续离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,反复3次,在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-抗体结合物;

③胶体金结合垫的制备:用1/10标记前胶体金溶液体积的缓冲液悬浮胶体金-抗体结合物,离心,上清液用喷涂设备涂于玻璃纤维素膜上,室温下晾干,制成胶体金结合垫;

④免疫层析膜的包被:第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)上分别包被的是已知量的不同浓度的兔抗LVX IgG,对照线(7)上包被的是羊抗兔IgG,每条线宽2mm,第一检测线(4)、第二检测线(5)、第三检测线(6)上兔抗LVX IgG包被量分别为1.0~1.5 pg、0.5~0.75 μg和1.0~1.5 μg蛋白,羊抗兔IgG包被量为2.0~2.5μg蛋白;

⑤金标卡的组装:聚氯乙烯衬板作为支撑载体固定于金标卡槽下壳体中,然后样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸依次排列连接于聚氯乙烯衬板上表面,再将金标卡槽上壳体与下壳体通过卡扣连接,就得到LVX半定量检测金标卡。

3. 根据权利要求2所述的百合X病毒半定量检测金标卡的制备方法,其中LVX为百合X病毒。

一种百合X病毒半定量检测金标卡及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种对百合病毒快速半定量检测的金标卡及制备方法,具体指运用胶体金免疫层析法研制出能快速半定量检测百合X病毒(LVX)的金标卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 百合(*Lilium* spp.)是百合科(*Liliaceae*)百合属(*Lilium*)多年生宿根单子叶草本植物,是世界著名的球根花卉,栽培历史悠久,集观赏、食用和药用于一体;荷兰作为世界上最大的花卉种植大国,其百合的切花及种球产业发展较为成熟;截止2005年,荷兰的切花百合种植面积达3800公顷,占全球百合种球生产的72%左右,产值达到了1.5亿欧元;而在中国,近年来食用和药用百合产业发展较好,主要产区在甘肃、湖南和湖北,主要品种分别为兰州百合、龙牙百合(野百合)等;对于切花百合,尽管上世纪80年代末我国就开始了百合切花生产,但由于种球繁育以及病毒检测技术的落后,导致自繁种球质量差、增重慢、感病严重,生产中使用的种球90%以上依赖进口,耗资巨大;更重要的是,进口种球价格高,病毒病普遍发生,导致我国百合切花生产成本居高不下而切花质量却参差不齐,严重影响了百合产业的健康、高效发展;食用百合种植一茬至少需要3年时间,受主产区土地面积的限制,重茬严重;重茬引发的病害尤其病毒病严重影响了食用百合的生产,使百合产量和品质双重下降。

[0003] 目前文献报道侵染百合的病毒有20多种,除百合斑驳病毒(*Lily mottle virus*, LMoV),黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)和百合隐症病毒(*Lily symptomless virus*, LSV)外,百合X病毒(*Lily virus X*, LVX)也是分布和发生较为普遍的病毒,该病毒也是我国公布的三类禁止进境检疫的有害生物;LVX为马铃薯X病毒属(*Potexvirus*)成员,LVX粒子无包膜,呈弯曲纤丝状,长470nm,直径13nm,外壳蛋白呈螺旋状,其上有模糊的沟状结构;LVX以百合科植物为自然寄主,单独侵染百合无症状,与其他病毒复合侵染时可造成黄条纹、叶畸形、矮化,有的早熟而死;LVX基因组由5823个核苷酸组成,3'-末端具有poly(A)尾巴,是已知全序列的马铃薯X病毒成员中基因组最小的;LVX CP亚基由201aa组成,大小为22.0 kDa左右。

[0004] 目前关于LVX的检测研究,仅有酶联免疫法(ELISA)和聚合酶链式反应(PCR)的相关报道,但都还停留在研究和实验室阶段,无法满足百合种植现场及田间快速检测的需求,从而无法掌握田间病毒感染的准确信息。此外,这两种传统的实验室检测方法都需要专业人员用专门的仪器设备在实验室花很长时间才能完成,其程序复杂,检测费用高、对仪器设备和检测条件要求高,因此使用范围受到很大的局限。

[0005] 胶体金免疫层析是以硝酸纤维素膜为载体,通过液体的渗移,利用抗原抗体的结合,以及胶体金呈现颜色反应来检测抗原或抗体;该方法可以避免以上几种检测方法的缺点,以其特异性强、成本低、操作简便、不需任何仪器、适合现场快速检测等优点已被广泛接受,已用于包括烟草斑驳病毒、南瓜花叶病毒等多种植物病毒的检测。

[0006] 对于百合病毒,目前已有用胶体金免疫层析法检测LMoV和LSV等的相关报道

(Zhang et al., 2015, J ViroI Methods, 220),但是其只能进行定性检测,也就是说检测结果只能定性判断病毒的有或无,对于阳性结果无法得知被检样品病毒含量的差异,田间防治病毒时依旧盲目而缺乏科学依据,从而阻碍了该方法的广泛普及与推广。

[0007] 近年来,通过我们对感病毒程度不同的百合叶片叶绿体超微结构、光合色素含量、防御酶活性等生理生化指标的测定和分析,结合田间生长观察,发现许多阳性植株通常无明显症状,其叶绿体结构、光合色素含量以及株高、茎粗、叶片形状等生长指标与健康植株没有差异;而部分阳性植株叶片形成了轻微的斑驳条纹,叶绿体结构被部分破坏,光合色素含量以及株高、茎粗等生长指标显著低于健康植株;也发现少量的阳性植株出现了明显的斑驳条纹或坏死斑,叶片严重变小,植株严重矮化,生理测定发现其叶绿体结构被严重破坏,光合色素含量显著低于健康植株(Zhang et al., 2014, Philipp Agric Scientist, 97(1));进一步通过对病毒含量的Real-time PCR检测,证实出现严重症状的阳性植株,其病毒相对含量是无症状阳性植株的1000倍以上(Zhang et al., 2014, Philipp Agric Scientist, 97(2));以上实验结果说明病毒含量的差异对百合生长影响的差异较大,所以对于感病程度不同的阳性植株应该采取不同的策略,科学管理、合理防治,最大程度降低病毒对百合生长的危害;可见,检测病毒含量的差异将对田间病毒管理起到非常重要的指导意义。

[0008] 此外,目前对于百合病毒的防治主要以杀灭传播介体-蚜虫为主,对于如何科学地喷施抗百合病毒药剂,喷施抗病毒药剂后百合病毒增殖是否被抑制,若已抑制,抑制的程度如何等问题均没有相关报道,而这些问题的解决首先依赖于半定量检测;因此,实现半定量检测的意义重大。

[0009] 本发明为了进一步提高胶体金免疫层析检测方法的使用效率和田间普及率,实现对百合病毒的快速且半定量检测,通过一系列优化试验,将半定量检测应用于胶体金免疫层析试验,首先将检测线增加至三条,再将已知量的有浓度差异的抗体分别包被于检测线,研制能快速半定量检测LVX的金标卡,满足百合大规模脱毒及商业和田间对百合病毒快速半定量检测的需求。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种用胶体金免疫层析法半定量检测LVX的金标卡及其制备方法。

[0011] 本发明金标卡检测准确率高,特异性强,重复性好,操作简便,无需借助其他仪器和设备,5~10分钟便可以判定被检样品LVX含量的差异。

[0012] 本发明的技术方案如下:

一种半定量检测百合X病毒的金标卡,包括:金标卡槽1,衬板12,样品垫8,胶体金结合垫9,硝酸纤维素膜10,吸水滤纸11,金标卡槽1包括上壳体 and 下壳体,上壳体和下壳体通过卡扣连接,上壳体设有加样孔2和反应窗3,样品垫8置于加样孔2下方,硝酸纤维素膜10置于反应窗3下方,胶体金结合垫9上含有金标探针,衬板12固定于金标卡槽1中,样品垫8、胶体金结合垫9、硝酸纤维素膜10和吸水滤纸11依次排列连接于衬板12上表面,硝酸纤维素膜10上设有第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6和对照线7,第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6上分别包被的是不同浓度的兔抗LVX IgG,对照线7上包被的是羊抗兔IgG,第一

检测线4、第二检测线5、第三检测线6上LVX IgG包被量分别为1.0~1.5 pg、0.5~0.75 μg和1.0~1.5 μg蛋白,金标探针抗体标记量为16μg/mL,羊抗兔IgG包被量为2.0~2.5μg蛋白。

[0013] 其中在用所述金标卡检测时,在所述加样孔处加入百合样品的待检溶液,对比反应窗内检测线4、5、6和对照线7的颜色,即可判定被检测百合是否感染了百合X病毒;若已感染,可以进一步判定被检测样品之间病毒含量的差异。

[0014] 其中将待检溶液加入到金标卡的加样孔内,若待检溶液中含有LVX,检测样品溶液经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第一检测线4时发生抗原抗体结合反应而被全部截留下来,形成可见的淡红色条带;金标垫上剩余的金标多克隆抗体继续向所述第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第二检测线5和第三检测线6时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第二检测线5、第三检测线6没有颜色变化,而第一检测线4出现淡红色、对照线7出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,病毒含量低,田间防治以杀灭蚜虫为主;

若待检溶液中含有LVX,检测样品溶液经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第一检测线4时发生抗原抗体结合反应而被部分截留下来,形成淡红色条带;剩余的复合物继续往所述第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第二检测线5时发生抗原抗体结合反应被全部截留下来,形成淡红色条带;剩余的金标多克隆抗体继续向所述第三检测线6和对照线7方向渗移,当接触到所述第三检测线6时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第三检测线6没有颜色变化,而第一检测线4和第二检测线5出现淡红色、对照线7出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,田间防治采取杀灭蚜虫并喷施抗病毒药剂;

若待检溶液中含有LVX,检测样品溶液经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6时分别发生抗原抗体结合反应而被截留下来,第一检测线4、第二检测线5形成淡红色、而第三检测线6形成棕红色条带;剩余的金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第一检测线4、第二检测线5出现淡红色、第三检测线6和对照线7均出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,且病毒含量高,田间防治应增加抗病毒药剂的使用量和使用频次,同时杀灭蚜虫;

若待检溶液中不含LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,则不能与金标垫上的金标多克隆抗体结合,当接触到所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6均没有颜色变化而仅对照线7出现棕红色的条带时,则判定被检样品没有感染百合X病毒。

[0015] 一种百合X病毒半定量检测金标卡的制备方法,按以下步骤进行:1、兔抗LVX IgG

的制备:从感染了LVX的百合叶片中提取总RNA进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),扩增LVX的CP基因片段;通过双酶切克隆至pET-28a 载体;重组质粒转化入E. coli BL21 (DE3),37℃震荡培养,IPTG诱导表达,Ni-NTA柱纯化获得大小22.0 kDa的高纯度LVX CP重组蛋白;用0.5mg的LVX CP重组蛋白作为免疫原免疫日本大耳白兔,获得抗血清;所得抗血清依次通过20%、50%、33%三个饱和度的硫酸铵沉淀粗提后,透析至pH 7.8的磷酸缓冲液,然后使用Protein G柱进行纯化而获得高纯度兔抗LVX IgG;2、胶体金标记兔抗LVX IgG的方法:分别取半径为30nm的胶体金100mL及兔抗LVX IgG 1.6mg(1mg/mL),在pH 7.8的条件下通过磁力搅拌器缓慢搅拌1h使其结合,加牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂,使得终浓度为1%,采用高速离心法除去未结合的多克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及去凝聚物,将沉淀缓慢悬浮于一定体积的缓冲液中,继续离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,反复3次,在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-抗体结合物;3、胶体金结合垫的制备:用1/10标记前胶体金溶液体积的缓冲液悬浮胶体金-抗体结合物,离心,上清液用喷涂设备涂于玻璃纤维素膜上,室温下晾干,制成胶体金结合垫;4、免疫层析膜的包被:第一检测线4、第二检测线5及第三检测线6上均包被的是兔抗LVX IgG,对照线上包被的是羊抗兔IgG;5、金标卡的组装:将聚氯乙烯衬板作为支撑载体固定于金标卡槽下壳体中,然后样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸依次排列连接于衬板上表面,再将金标卡槽上壳体与下壳体通过卡扣连接,就得到LVX半定量检测的金标卡。

[0016] 本发明检测针对性强,操作简便,快速,结果直观,准确性高,灵敏性强,相比于其他的只能进行定性的检测方法,本发明无需借助任何仪器和设备,就可以准确检测样品之间病毒含量的差异,实现病毒半定量检测的目的。

附图说明

[0017] 图1为本发明百合X病毒半定量检测金标卡平面结构示意图

图2为本发明百合X病毒半定量检测金标卡内部结构示意图。

具体实施方式

[0018] 如图1和图2所示的LVX半定量检测金标卡,包括金标卡槽1,衬板12,样品垫8,胶体金结合垫9,硝酸纤维素膜10,吸水滤纸11,其中金标卡槽1包括上壳体和下壳体,上壳体和下壳体通过卡扣连接,上壳体设有加样孔2和反应窗3,样品垫8置于加样孔2下方,硝酸纤维素膜10置于反应窗3下方,胶体金结合垫9上含有金标探针,衬板12固定于金标卡槽1中,样品垫8、胶体金结合垫9、硝酸纤维素膜10和吸水滤纸11依次排列连接于衬板12上表面,硝酸纤维素膜10上设有第一检测线4、第二检测线 5、第三检测线 6 和对照线7,第一检测线4、第二检测线 5、第三检测线 6 上包被的是不同浓度的兔抗LVX IgG,对照线7上包被的是羊抗兔IgG,第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6上兔抗LVX IgG包被量分别为1.0~1.5 pg、0.5~0.75 μg和1.0~1.5 μg蛋白,金标探针抗体标记量为16μg/mL,羊抗兔IgG包被量为2.0~2.5μg蛋白。

[0019] 其中,样品垫和胶体金结合垫材质均为玻璃纤维素膜,衬板为聚氯乙烯材质做成,起支持作用。

[0020] 在本实施例中,通过我们前期对不同阳性植株百合叶片病毒含量的检测,结合田

间症状的差异,发现出现严重症状的阳性植株,病毒相对含量是无症状阳性植株的1000倍以上,据此,我们设计了3条检测线,即第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6,分别代表病毒含量的低、居中、高;第一检测线4上抗体包被量分别是第二检测线5和第三检测线6上抗体包被量的1/500和1/1000;根据优化实验,最终确定了第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6上兔抗LVX IgG的包被量分别为1.0~1.5 pg、0.5~0.75 μ g和1.0~1.5 μ g蛋白。

[0021] 本发明金标卡的制备方法:

1、本发明中兔抗LVX IgG的制备方法

从感染了LVX的百合叶片中提取总RNA进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),扩增LVX的CP基因片段。通过双酶切克隆至pET-28a 载体。重组质粒转化入E. coli BL21 (DE3),37℃震荡培养,IPTG诱导表达,Ni-NTA柱纯化获得大小22.0 kDa的高纯度LVX CP重组蛋白。用0.5mg的LVX CP重组蛋白作为免疫原免疫日本大耳白兔。初次免疫中,将蛋白抗原与弗氏完全佐剂等体积充分混匀,进行皮下多点注射。两周后进行加强免疫,将蛋白抗原与弗氏不完全佐剂等体积充分混匀,进行皮下多点注射。以后每两周加强免疫一次,在第4次加强免疫后的5~7天颈动脉采血,静置,离心,收集到的血清加入质量百分比浓度0.02%的叠氮钠,1-20℃保存。所得抗血清依次通过20%、50%、33%三个饱和度的硫酸铵沉淀粗提后,透析至pH 7.8的磷酸缓冲液,然后使用Protein G柱进行纯化而获得高纯度兔抗LVX IgG。

[0022] 2、兔抗LVX IgG的标记

分别取半径为30nm的胶体金100mL和兔抗LVX IgG 1.6mg(1mg/mL),在pH 7.8的条件下通过磁力搅拌器缓慢搅拌1h使其结合,加牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂,使得终浓度为1%,采用高速离心法除去未结合的多克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及去凝聚物,将沉淀缓慢悬浮于一定体积的缓冲液中,继续离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,反复3次,在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-抗体结合物。

[0023] 3、胶体金结合垫的制备

用1/10标记前胶体金溶液体积的缓冲液悬浮胶体金-抗体结合物,离心,上清液喷涂到玻璃纤维素膜上,室温晾干,制成胶体金结合垫。

[0024] 4、免疫层析膜的包被

第一检测线4、第二检测线 5、第三检测线 6 上包被的是不同浓度的兔抗LVX IgG,对照线7上包被的是羊抗兔IgG,每条线宽2mm,第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6上兔抗LVX IgG包被量分别为1.0~1.5 pg、0.5~0.75 μ g和1.0~1.5 μ g蛋白,羊抗兔IgG包被量为2.0~2.5 μ g蛋白。

[0025] 5、金标卡的组装

聚氯乙烯衬板作为支撑载体固定于金标卡槽下壳体中,然后样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜和吸水滤纸依次排列连接于聚氯乙烯衬板上表面,再将金标卡槽上壳体与下壳体通过卡扣连接。

[0026] 6、金标卡的使用及结果判定

把待检溶液加入到金标卡的加样孔内,若待检溶液中含有LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第一检测线4时发生抗原抗体结合反应而被全部截留下来,形成可见的淡红色条带;金标垫上剩余的金标多克隆抗体继续向所述

第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第二检测线5和第三检测线6时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第二检测线5、第三检测线6没有颜色变化,而第一检测线4出现淡红色、对照线7出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,且病毒含量低,田间防治以杀灭蚜虫为主;

若待检溶液中含有LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第一检测线4时发生抗原抗体结合反应而被部分截留下来,形成淡红色条带;剩余的复合物继续往所述第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第二检测线5时发生抗原抗体结合反应被全部截留下来,形成淡红色条带;剩余的金标多克隆抗体继续向所述第三检测线6和对照线7方向渗移,当接触到所述第三检测线6时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第三检测线6没有颜色变化,而第一检测线4和第二检测线5出现淡红色、对照线7出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,且病毒含量居中,田间防治采取杀灭蚜虫并喷施抗病毒药剂;

若待检溶液中含有LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,LVX与金标垫上的金标多克隆抗体形成复合物,然后继续向所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6方向渗移,当接触到所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6时分别发生抗原抗体结合反应而被截留下来,第一检测线4、第二检测线5形成淡红色、而第三检测线6形成棕红色条带;剩余的金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第一检测线4、第二检测线5出现淡红色、第三检测线6和对照线7均出现棕红色条带时,则判定被检样品感染了百合X病毒,且病毒含量高,田间防治应增加抗病毒药剂的使用量和使用频次,同时杀灭蚜虫;

若待检溶液中不含LVX,检测样品经过所述胶体金结合垫时,则不能与金标垫上的金标多克隆抗体结合,当接触到所述第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6时不发生反应,金标多克隆抗体继续向所述对照线7方向渗移,当接触到所述对照线7时与羊抗兔IgG结合而被截留下来,形成可见的棕红色条带;当第一检测线4、第二检测线5、第三检测线6均没有颜色变化而仅对照线7出现棕红色的条带时,则判定被检样品没有感染百合X病毒。

[0027] 上述实施例可以看出,本发明可直接对LVX进行半定量检测,一般人员即可操作,无需借助任何仪器和设备,5~10分钟就可知道检测样品之间LVX含量的差异,达到快速、简便检测该病毒的目的。

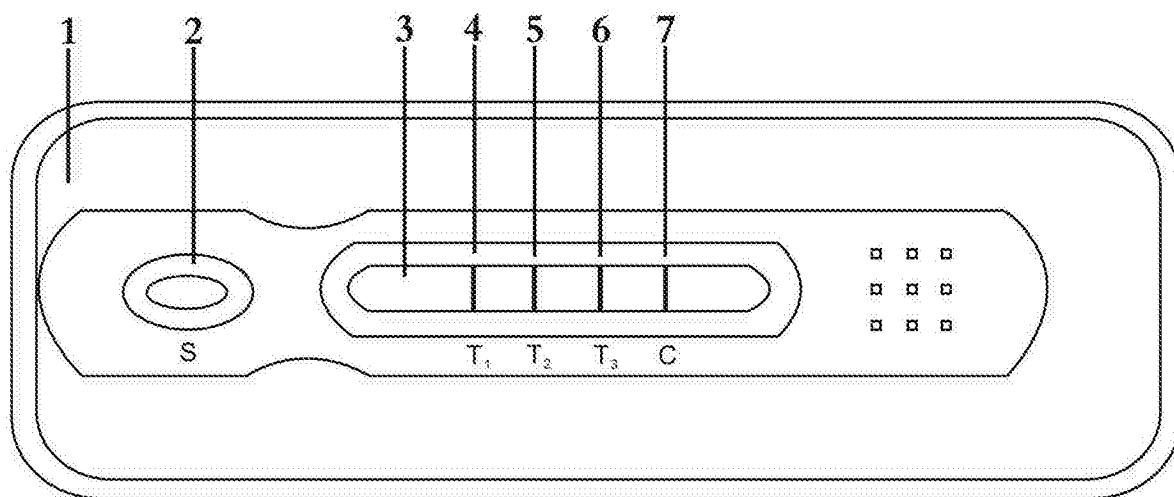


图1

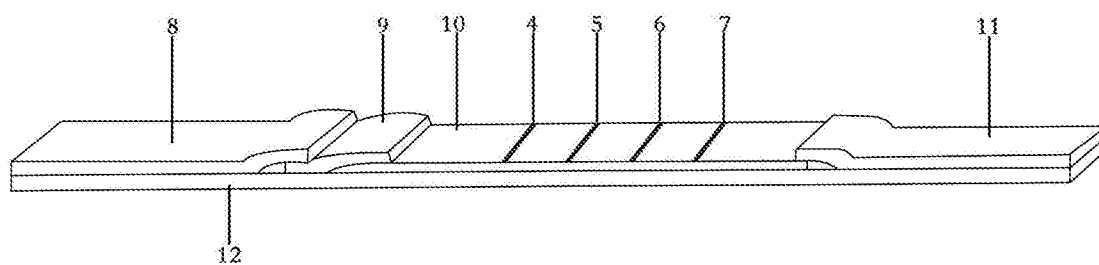


图2

专利名称(译)	一种百合X病毒半定量检测金标卡及制备方法		
公开(公告)号	CN105606801A	公开(公告)日	2016-05-25
申请号	CN201510951206.7	申请日	2015-12-19
[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	张玉宝 王亚军 谢忠奎 王若愚 王乐 郭志鸿		
发明人	张玉宝 王亚军 谢忠奎 王若愚 王乐 郭志鸿		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/532 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56983		
其他公开文献	CN105606801B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种百合X病毒半定量检测金标卡及制备方法，为了提高胶体金免疫层析检测方法的使用效率和田间普及率，实现对百合病毒的快速且半定量检测，将检测线增加至三条，再将已知量的有浓度差异的抗体分别包被于检测线，研制能快速半定量检测LVX的金标卡，满足百合大规模脱毒及田间对百合病毒快速半定量检测的需求；所述金标卡检测针对性强，操作简便，准确性高，灵敏性强，无需借助任何仪器和设备，就可以准确检测样品之间病毒含量的差异。

