

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510044139.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

[43] 公开日 2006年1月4日

[11] 公开号 CN 1715924A

[22] 申请日 2005.7.25

[21] 申请号 200510044139.7

[71] 申请人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市金山福建农林大学产业处

[72] 发明人 吴祖建 陈良华 王 盛 林奇英
谢联辉

[74] 专利代理机构 福州元创专利代理有限公司

代理人 蔡学俊 林友明

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法

[57] 摘要

一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 的方法, 使用的材料由藻红蛋白荧光探针、硝酸纤维素膜、TMV 多克隆抗体、阳性阴性对照品、封闭缓冲液和洗涤缓冲液组成。主要运用藻红蛋白标记抗体和硝酸纤维素膜包被的固相抗体两种抗体。检测时固相抗体通过抗原反应捕获待测抗原, 形成免疫复合物, 加入藻红蛋白荧光探针, 与免疫复合物充分反应, 洗涤后在倒置荧光显微镜下检测判定结果。藻红蛋白直接免疫荧光法具有特异性强、试剂用量少、方法简单、相对经济等优点。

1、一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 的方法, 其特征在于使用的材料由藻红蛋白荧光探针、硝酸纤维素膜、TMV 多克隆抗体、阳性阴性对照品、封闭缓冲液和洗涤缓冲液组成; 检测方法如下:

(1)包被: 在硝酸纤维素膜上, 滴加 2-6 μ l TMV 抗体, 各点间相隔 1-2 cm 的距离, 置于 4°C, 吸附 0.5-3h;

(2) 封闭: 将硝酸纤维素膜直接浸入 20-100mmol/L pH7.5 PBS+0.5-3%BSA 封闭缓冲液内, 37°C温育 0.5-3h;

(3)洗涤 A: 配制 50-200mmol/L pH7.5 PBS+0.05-0.3%Tween20 的洗涤缓冲液, 并用洗涤缓冲液清洗硝酸纤维素膜至少三次, 静置干燥;

(4)点样: 滴加阳、阴性样品和待测样品, 每孔 2-6 μ l;

(5)洗涤 B: 待样品液完全渗入硝酸纤维素膜, 室温静置 10-30min, 用所述的洗涤缓冲液清洗膜片至少三次, 静置干燥;

(6)荧光标记示踪: 加入藻红蛋白荧光探针 2-6 μ l, 在 37°C温育 0.5-3h;

(7)洗涤 C: 用所述的洗涤缓冲液清洗硝酸纤维素膜至少三次, 取出膜片用干净的吸水纸去除表面残余的液体;

(8)检测判定: 将硝酸纤维素膜平铺在干净的玻璃片上, 在倒置荧光显微镜下检测观察判定结果。

2、根据权利要求 1 所述的一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法, 其特征在于藻红蛋白荧光探针的制备方法如下:

(1) 交联蛋白: 交联的两种蛋白分别为 6mg/ml, 1.25ml 的藻红蛋白与 4mg/ml, 0.75ml 烟草花叶病毒(TMV)多克隆抗体, 二者的摩尔比为 1:1~2:1;

(2) 异功能试剂活化蛋白: 用异功能试剂 SPDP 活化藻红蛋白, 二者摩尔比为 80:1~200:1, 反应时间为 15~60min; 异功能试剂 2-IT 巯基化 TMV 多克隆抗体, 二者摩尔比为 160:1~320:1, 反应时间为 0.5~3h;

(3) 混合反应: 异功能试剂活化反应后, 脱盐去除未反应活化试剂; 取

等体积反应物混合反应，4℃，反应 6 h；

(4) 中止反应：加入终止液 NEM 80mmol/L 100 μ l 中止交联反应，4℃ 反应 1h，将反应物装入透析夹中，透析浓缩；

(5) 纯化分离交联混合物：将交联混合物上样于 Superdex200HR 凝胶层析柱（1.6×60cm），以 0.15ml/min 流速，用 0.15M NaCl +100mmol/L pH7.0 PBS 缓冲液洗脱。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法，其特征在于藻红蛋白的制备方法是在研碎机中充分磨碎海藻，用 0.01M PBS pH7.0 缓冲液浸提过夜，三层纱布过滤后，4℃下 10000rpm 离心 15min，取上清液；然后用饱和度 30%-45%硫酸铵分级沉淀蛋白，得粗制藻红蛋白红色沉淀；红色沉淀溶于 0.01M PBS pH7.0 缓冲液，然后上样于 Superdex G-15 脱盐柱，脱盐；收集的脱盐液即可上样于预先已用 0.15M NaCl+ 0.01M PBS pH7.0 缓冲液平衡好的羟基磷灰石柱，继续用缓冲液冲洗 30min 后，再用 0.15M NaCl+ 0.01M~0.2M pH7.0 PBS 缓冲液作线性梯度洗脱；洗脱液收集、浓缩、离心。

4、根据权利要求 1 所述的一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法，其特征在于所述的封闭，是将硝酸纤维素膜直接浸入 50mmol/L pH7.5 PBS+2%BSA 封闭液内，37℃，温育 1h 。

5、根据权利要求 1 所述的一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法，其特征在于所述的洗涤，是用 100mmol/L pH7.5 PBS +0.1% Tween20 的洗涤缓冲液。

一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法

技术领域 本发明涉及一种荧光探针，以及利用荧光探针检测病毒的方法，特别涉及一种藻红蛋白荧光探针，以及利用藻红蛋白荧光探针快速检测烟草花叶病毒的方法。

背景技术 植物病毒检测常用酶联免疫吸附测定（ELISA）方法，酶免疫分析是将抗原抗体结合的特异性与酶的高效催化性相结合的技术，具有灵敏度高，特异性强等特点，但操作步骤多，耗时长，且需要相对昂贵的酶标抗体和 96 孔酶标板。

荧光免疫分析是利用各种荧光物作为探针分子的一种标记免疫分析方法，目前在核酸、蛋白质、多肽、氨基酸、酶、激素、生长因子、细胞因子、细胞表面标志物、肿瘤特异性抗原、受体、药物、传染源等各种微量生物活性物质的分析中得到广泛应用。传统的荧光探针包括荧光素、异硫氰酸荧光素（FITC）、罗丹明（Rodam）等。荧光测定的检测限值常受血清和其他生物样品中本底荧光的制约，加之，传统荧光探针非特异性吸附，严重影响检测的敏感性，阻碍荧光免疫分析方法发展。藻红蛋白是一种新型的荧光探针，已经在医学诊断、细胞生物学和分子生物学等诸多领域中得到广泛应用。

闫凤英等 2004 年在中华医药杂志第 4 卷第 10 期发表文为“荧光染料 R-藻红蛋白标记小鼠抗人 CD 系列单克隆抗体”，用 R-藻红蛋白（R-PE）标记小鼠抗人 CD 系列单克隆抗体的荧光试剂，应用于流式细胞仪分析，分析表明 R-PE 标记的抗体特异性保持完好，且荧光强度高，还可配伍成双标试剂。1997 年美国的 Iannelli, D 等在病毒学方法杂志上发表文为“利用流式细胞仪同时检测黄瓜花叶病毒（CMV）、烟草花叶病毒（TMV）和马铃薯 Y 病毒（PVY）”，将 PVY、CMV、TMV 三种病毒侵染的植物组织汁液分别与大小不同的乳胶颗粒一起孵育，洗涤后依次在第一抗体和第二抗体中孵育，其中第二抗体分别用藻红蛋白和荧光素这两种可发不同荧光的染料进行标记。根据产生荧光的不同和捕捉到病毒的乳胶颗粒的大小来判断病毒的种类，从而实现了对这三种病毒的同时检测。

目前，藻红蛋白荧光探针的试剂化和商品化程度不高，尚未开发出普及型诊断试剂，对植物病毒的检测研究更是鲜有报道。

发明内容 本发明的目的是利用藻红蛋白的优良荧光特性，开发藻红蛋白荧光探针，并用于烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)的检测。

本发明是通过以下方法实现的：

一、材料

所用的主要试剂：藻红蛋白为福建农林大学植物病毒研究所制备；交联试剂 SPDP、2-IT、以及终止剂 NEM 购自 Peirce 公司；介质 Superdex200HR 为 Amersham 公司的产品；牛血清白蛋白 (BSA) 为 Sigma 产品；硝酸纤维素膜 0.45 μ 为 Amersham 公司产品；试验中所使用的其他常规药品和试剂均为一般的国产分析纯或化学纯试剂。

1、藻红蛋白的制备

在研碎机中充分磨碎叉节藻(*Amphiroa ephdraea*)或珊瑚藻(*Corallina officinalis*)，用 0.01M PBS pH7.0 缓冲液浸提过夜，三层纱布过滤后，4℃下 10000rpm 离心 15min，取上清液；然后用饱和度 30%-45%硫酸铵分级沉淀蛋白，得粗制藻红蛋白红色沉淀；红色沉淀溶于 0.01M PBS pH7.0 缓冲液，然后上样于 Superdex G-15 脱盐柱，脱盐；收集的脱盐液即可上样于预先已用 0.15M NaCl+ 0.01M PBS pH7.0 缓冲液平衡好的羟基磷灰石柱，继续用缓冲液冲洗 30min 后，再用 0.15M NaCl+ 0.01M~0.2M pH7.0 PBS 缓冲液作线性梯度洗脱；洗脱液收集、浓缩、离心。

2、TMV 多克隆抗体的制备

取 4ml 抗血清加 8ml 0.06M pH4.0 的醋酸缓冲液，用 NaOH 校正 pH 值至 4.8，在振荡条件下缓慢加入 120 μ l 正辛酸，在室温中振荡混合 30min，在 4℃中 10000rpm 离心 15min，去沉淀，上清液装入透析袋中，在 0.01M pH7.4 PBS 缓冲液中，透析 12h，然后缓慢加等体积饱和硫酸铵，在 4℃静置 30min，12000rpm 离心 20min，取沉淀，透析后使用。

3、阳性、阴性样品的制备

阳性样品为纯化的烟草花叶病毒，浓度在 0.1 μ g-100 μ g/ml 范围；阴性样品为封闭缓冲溶液。

4. 封闭缓冲液和洗涤缓冲液的配制

封闭缓冲溶液：20-100mmol/L pH7.5 PBS+0.5-3%BSA

洗涤缓冲溶液：50-200mmol/L pH7.5 PBS+0.05-0.3%Tween20

二、藻红蛋白荧光探针的制备

(1) 交联蛋白：交联的两种蛋白分别为 6mg/ml, 1.25ml 的藻红蛋白与 4mg/ml, 0.75ml 烟草花叶病毒(TMV)多克隆抗体, 二者的摩尔比为 1:1~2:1;

(2) 异功能试剂活化蛋白：用异功能试剂 SPDP 活化藻红蛋白, 二者摩尔比为 80:1~200:1, 反应时间为 15~60min; 异功能试剂 2-IT 巯基化 TMV 多克隆抗体, 二者摩尔比为 160:1~320:1, 反应时间为 0.5~3h;

(3) 混合反应：异功能试剂活化反应后, 脱盐去除未反应活化试剂; 取等体积反应物混合反应, 4℃, 反应 6 h。

(4) 中止反应：加入终止液 NEM 80mmol/L 100 μl 中止交联反应, 4℃ 反应 1h, 将反应物装入透析夹中, 透析浓缩。

(5) 纯化分离交联混合物：将交联混合物上样于 Superdex200HR 凝胶层析柱 (1.6×60cm), 以 0.15ml/min 流速, 用 0.15M NaCl +100mmol/L pH7.0 PBS 缓冲液洗脱。

三、检测方法

检测使用的材料由藻红蛋白荧光探针、硝酸纤维素膜、TMV 多克隆抗体、阳性阴性对照品、封闭缓冲溶液和洗涤缓冲溶液组成。

检测方法如下：

(1) 包被：在硝酸纤维素膜上, 滴加 2-6 μl TMV 抗体, 各点间相隔 1-2 cm 的距离, 置于 4℃, 吸附 0.5-3h;

(2) 封闭：将硝酸纤维素膜直接浸入 20-100mmol/L pH7.5 PBS+0.5-3%BSA 封闭缓冲液内, 37℃温育 0.5-3h;

(3) 洗涤 A：配制 50-200mmol/L pH7.5 PBS+0.05-0.3% Tween20 的洗涤缓冲液, 并用洗涤缓冲液清洗硝酸纤维素膜至少三次, 静置干燥;

(4) 点样：滴加阳、阴性样品和待测样品, 每孔 2-6 μl;

(5) 洗涤 B：待样品液完全渗入硝酸纤维素膜, 室温静置 10-30min, 用所述的洗涤缓冲液清洗膜片至少三次, 静置干燥;

(6) 荧光标记示踪：加入藻红蛋白荧光探针 2-6 μl, 在 37℃温育 0.5-3h;

(7) 洗涤 C：用所述的洗涤缓冲液清洗硝酸纤维素膜至少三次, 取出膜片用干净的吸水纸去除表面残余的液体;

(8) 检测判定：将硝酸纤维素膜平铺在干净的玻璃片上, 在倒置荧光显微镜下检测观察判定结果。

藻红蛋白荧光探针免疫荧光检测主要运用两种抗体，藻红蛋白标记抗体和硝酸纤维素膜包被的固相抗体。检测时固相抗体通过抗原反应特异性捕获待测抗原，形成免疫复合物，加入藻红蛋白荧光探针，与免疫复合物充分反应后，经洗涤去除非特异性物质，即可检测判定结果。

为检验藻红蛋白荧光探针直接免疫荧光法（DFIA）的检测效果，用该方法检测了 55 份 TMV 样品，检测结果与 ELISA 的检测结果相比较(见附表 1)。

附表 1 藻红蛋白直接免疫荧光法与 ELISA 检测结果的比较

	ELISA (+)	ELISA (+/-)	ELISA (-)	合计
DFIA (+)	41	2	0	43
DFIA (+/-)	0	6	1	7
DFIA (-)	0	0	5	5
合计	41	8	6	55

注：“+”代表阳性；“+/-”代表假阳性；“-”代表阴性。

41 份由 ELISA 检测为阳性的样品，直接免疫荧光检测也都为阳性；

8 份由 ELISA 检测为假阳性的样品，直接免疫荧光检测其中的 6 份为假阳性，另 2 份为阳性；

6 份由 ELISA 检测为阴性的样品，直接免疫荧光检测其中的 5 份为阴性，另 1 份为假阳性；

从上述检测的结果来看，藻红蛋白直接免疫荧光检测检测具有较好的特异性，与 ELISA 检测结果相比较，阳性的检出率为 100%、假阳性的检出率为 75%、阴性检出率为 83.3%、总体检出率为 94.55%，说明 NC 膜为固相载体的藻红蛋白直接免疫荧光法与 ELISA 具有高的符合度。

利用藻红蛋白荧光探针直接免疫荧光检测烟草花叶病毒，具有选择性强、试样量少和方法简便等优点，与目前植物病毒常用的检测方法 ELISA 相对比，直接免疫荧光检测法以硝酸纤维素膜为载体，膜片状载体操作简单、方便、步骤少，检测所用的时间短，同时不需要比较昂贵的酶标抗体，相对经济。此外，藻红蛋白来自天然海藻，作为荧光探针安全无害，克服传统化学合成的荧光素类荧光探针的合成所带来的危害，蛋白本身荧光强度高，长期保存无明显衰减的荧光特性，这都预示的藻红蛋白作为荧光探针在检测上应用具有巨大潜力。

具体实施方式 为了充分公开本发明的一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法，现结合实施例加以说明。

实施例：一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法，包括以下步骤：

1. 包被：在硝酸纤维素膜上滴加 3 μ l TMV 抗体，各点间相隔 1cm，置 4 $^{\circ}$ C，吸附 2h。
2. 封闭：将硝酸纤维素膜直接浸入 50mmol/L pH7.5 PBS+2%BSA 封闭液内，37 $^{\circ}$ C，温育 1h。
3. 洗涤 A：配制 100mmol/L pH7.5 PBS+0.1%Tween20 的洗涤缓冲液，并用洗涤缓冲液清洗硝酸纤维素膜至少三次，静置干燥。
4. 点样：滴加阳、阴性和待测样品，各点 3 μ l。
5. 洗涤 B：待样品液完全渗入硝酸纤维素膜，室温静置 15min，用所述的洗涤缓冲液清洗膜片至少三次，静置干燥。
6. 荧光示踪：加入藻红蛋白荧光探针 3 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。
7. 洗涤 C：用所述的洗涤缓冲液清洗硝酸纤维素膜至少三次，取出膜片用干净的吸水纸去除残余的液体。
8. 检测判定：在倒置荧光显微镜下检测仪器上观察判定结果。

荧光免疫检测仪器与判定标准：

以 Leica 倒置式荧光显微镜为检测仪器，用肉眼观察判定时，荧光信号的强度按以下标准判断：

“—” 表示无荧光；

“—+” 表示荧光较弱；

“+” 表示荧光清晰可见；

“++” 表示荧光明显可见，强度大

“+++~++++” 表示荧光非常明亮；

“—” 定为阴性，“—+” 定为假阳性，“+” 及 “+” 以上的结果，均定为阳性。

待测样品按以上标准，定性判断分析样品检测结果的阴、阳性。

根据上述方法，配置所用的相应试剂和材料，也可以组装成检测烟草花叶病毒的试剂盒，方便使用。

专利名称(译)	一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒的方法		
公开(公告)号	CN1715924A	公开(公告)日	2006-01-04
申请号	CN200510044139.7	申请日	2005-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建农林大学		
[标]发明人	吴祖建 陈良华 王盛 林奇英 谢联辉		
发明人	吴祖建 陈良华 王盛 林奇英 谢联辉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/533 G01N21/64 B01D15/08		
代理人(译)	蔡学俊 林友明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种利用藻红蛋白荧光探针检测烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的方法,使用的材料由藻红蛋白荧光探针、硝酸纤维素膜、TMV多克隆抗体、阳性阴性对照品、封闭缓冲液和洗涤缓冲液组成。主要运用藻红蛋白标记抗体和硝酸纤维素膜包被的固相抗体两种抗体。检测时固相抗体通过抗原反应捕获待测抗原,形成免疫复合物,加入藻红蛋白荧光探针,与免疫复合物充分反应,洗涤后在倒置荧光显微镜下检测判定结果。藻红蛋白直接免疫荧光法具有特异性强、试剂用量少、方法简单、相对经济等优点。

附表1 藻红蛋白直接免疫荧光法与ELISA 检测结果的比较

	ELISA (+)	ELISA (+/-)	ELISA (-)	合计
DFIA (+)	41	2	0	43
DFIA (+/-)	0	6	1	7
DFIA (-)	0	0	5	5
合计	41	8	6	55

注：“+”代表阳性；“+/-”代表假阳性；“-”代表阴性。