



王春琼,刘凯,谢永辉,等. 烟草花叶病毒胶体金检测试纸条的制备与性能评价[J]. 轻工学报,2025,40(1):90-97.
WANG C Q, LIU K, XIE Y H, et al. Preparation and performance evaluation of colloidal gold test strips for tobacco mosaic virus detection[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(1): 90-97. DOI: 10. 12187/2025. 01. 011

烟草花叶病毒胶体金检测试纸条的制备与性能评价

王春琼¹, 刘凯¹, 谢永辉², 张轲¹, 刘春明³, 张晓伟¹, 孙浩巍¹, 陈丹¹

1. 云南省烟草质量监督检测站, 云南 昆明 650106;
2. 云南省烟草公司昆明市公司, 云南 昆明 650000;
3. 云南省烟草公司红河州公司, 云南 弥勒 652300

摘要: 针对传统烟草花叶病毒(TMV)检测方法耗时较长、应用受限的问题,基于双抗夹心法研发快速定性检测TMV的胶体金检测试纸条,并对其制备条件进行优化,考查其检测限、准确性和特异性。结果表明:该试纸条的适宜制备条件为缓冲液添加量4 μL 、抗体质量浓度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、NC膜选择CN140型、样本提取液0.02 mol/L PBS;该试纸条对TMV-CP蛋白的检测限为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与烟草丛顶病毒、番茄斑萎病毒、马铃薯Y病毒无交叉反应,特异性良好;将其进行实际样品检测,与PCR的总符合率为95.0%,阳性符合率为93.3%,准确性良好。此试纸条在10 min内即可显示检测结果,且操作简单,可用于烟田TMV的快速检测。

关键词: 烟草花叶病毒;单克隆抗体;胶体金免疫层析技术;试纸条

中图分类号: S432.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 2096-1553(2025)01-0090-08

0 引言

烟草是我国重要经济作物之一,种植面积广泛,但烟叶的产量和品质易受烟草花叶病(Tobacco Mosaic Virus, TMV)威胁,从而造成一定的经济损失^[1-2]。TMV是烟叶病毒属的典型代表,寄主范围广泛,可侵染的植物多达150个属,主要以草本双子叶植物(包括烟草、蔬菜、花卉等)为主^[3]。TMV引起的病害在全世界烟叶种植地区均有发生,我国云南、四川、黑龙江、吉林、福建等省份受害较为严重^[4-9]。

快速、准确地检测TMV,对提高烟叶生产效益具有重要意义。目前,常用的TMV检测方法有电子显微镜观察法^[1]、酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)^[10-11]、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)^[12-13]等。然而,这些方法存在检测仪器昂贵、操作人员专业性要求高、耗时长等问题,限制了其在烟叶生产实践中的广泛应用。胶体金免疫层析技术作为一种固相标记检测技术,通过体外检测对目标物质进行定性、半定量及定量检测,结合了胶体金标记、免疫检

收稿日期:2024-01-23;修回日期:2024-03-21;出版日期:2025-02-15

基金项目:云南省烟草专卖局重大科技项目(2021530000241021)

作者简介:王春琼(1990—),女,云南省昆明市人,云南省烟草质量监督检测站高级工程师,主要研究方向为烟草化学。

E-mail: wangchunqiong_ytqs@outlook.com

通信作者:陈丹(1987—),女,云南省昆明市人,云南省烟草质量监督检测站高级工程师,主要研究方向为烟草化学。E-mail:

chen_dana@qq.com

测、层析分析、单/多克隆抗体等多种技术,具有特异性高、反应迅速、操作简单、成本低等优点^[14-16],已广泛应用于动物病毒、植物病毒和水生生物病毒的检测中。例如,刘国华等^[17]利用胶体金免疫层析技术制备了安眠酮快速检测试纸条,并将其用于检测猪肉等动物源性食品中安眠酮的残留,发现该试纸条可在 5 min 内显示检测结果,且特异性良好。岳绪辉等^[18]基于竞争抑制免疫层析原理制备了用于快速检测茶叶中草甘膦的试纸条,发现此试纸条操作简便,仅需 10 min 即可显示检测结果。韩金治等^[19]采用胶体金免疫层析法建立了水产品中河豚毒素的快速检测方法,此方法的相对标准差为 3.7%~7.1%,检测结果与 LC-MS/MS 法一致,具有一定的可行性和实用性。

胶体金免疫层析技术同样也适用于快速检测烟草上的某些病毒和病菌。例如,姜宁等^[20]利用胶体金标记特异性识别技术制备了用于检测烟草中番茄环纹斑点病毒的胶体金快速检测试纸条,该试纸条可在 5 min 内完成病毒检测,且与烟草上常见的其他病毒无交叉反应。杨洋等^[21]建立了烟草黑胫病菌胶体金免疫层析技术,在 5~10 min 内便可以检测到病原菌,检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。目前,关于 TMV 检测试纸条的研发鲜见报道。鉴于此,本研究拟基于双抗夹心法^[22]制备一种快速定性检测 TMV 的胶体金试纸条,并对其测试性能进行评价,以期实现对 TMV 的精准监测及早期预警,防止病害从苗田扩散至大田,同时为进一步开发其他烟草病毒胶体金试纸条提供参考。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

烟叶,采自云南,共 23 份实验样本,其中 15 份实验样本有明显的花叶症,经 PCR 确认感染 TMV,为阳性样本;5 份为未感染 TMV 的阴性样本;3 份经 PCR 确认分别感染烟草丛顶病毒、番茄斑萎病毒和马铃薯 Y 病毒。

BALB/c 小鼠(许可证号:SCXK2019-0010),斯贝福(北京)生物技术有限公司;TMV-CP 蛋白,北京勤邦科技股份有限公司;pET28a-TMV-CP 重组质

粒,通用生物(安徽)股份有限公司;大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞,全式金生物技术股份有限公司;酶联免疫(ELISA)试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)羊抗鼠 IgG,德国 Sigma 公司;柠檬酸三钠,国药集团化学试剂北京有限公司;硝酸纤维素膜(NC 膜),上海捷宁生物科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

TH2-072HT 型恒温摇床,上海博彩生物科技有限公司;GL-21 M 型高速冷冻离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;IMAGING-GB 型凝胶成像仪,北京昊诺斯科有限公司;DHP-500 型恒温培养箱,天津中环实验电炉有限公司;ETC811 型 PCR 仪,北京东胜创新生物科技有限公司;GT-710 型胶体金分析仪,北京勤邦科技股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胶体金检测试纸条制备路径 胶体金检测试纸条制备路径示意图如图 1 所示。通过构建 TMV-CP 蛋白表达质粒 pET28a-TMV-CP,将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中诱导表达获得目标蛋白,并进一步纯化后作为免疫原,通过杂交瘤技术筛选能分泌针对 TMV-CP 蛋白的单克隆抗体,标记于胶体金,制备金标抗体溶液,均匀涂布于金标垫上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 2 h,备用。用 0.01 mol/L、pH 值为 7.2 的磷酸缓冲液分别将 TMV 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 稀释到 1 mg/mL,包被于 NC 膜上作为检测线(T 线)和质控线(C 线),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 16~18 h,备用。将制备的 NC 膜粘贴到 PVC 底板中心,再将金标垫、样品垫和吸水垫叠加粘贴到底板上,将其切割成 3 mm 宽的条带,装在特制的塑料制卡中,即得胶体金检测试纸条。

1.3.2 实验溶液配制 固体 LB 培养基:称取蛋白胨 10 g、酵母浸出物 5 g、NaCl 10 g、琼脂 20 g,定容至 1 L。若为液体 LB 培养基,则不需要添加琼脂。

平衡液:称取三羟甲基氨基甲烷 2.42 g、咪唑 1.36 g、NaCl 29.22 g,调节 pH 值至 7.4,定容至 1 L。

洗脱液:称取咪唑 10.212 g,加入 500 mL 平衡液,调节 pH 值至 7.4。

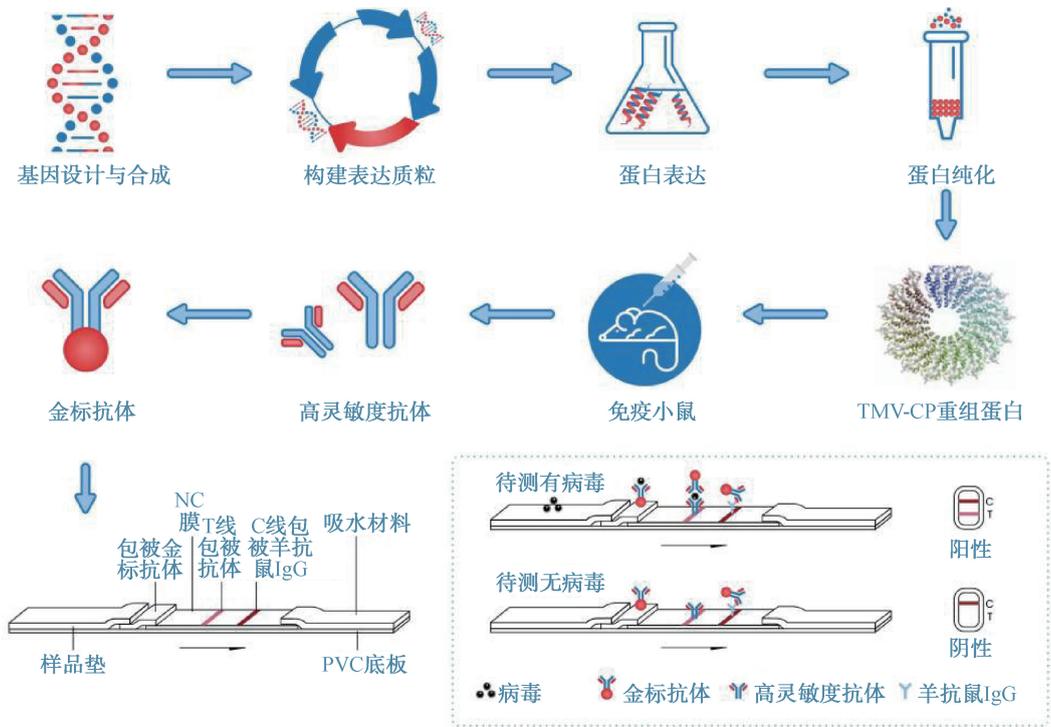


图1 胶体金检测试纸条制备路径示意图

Fig. 1 Schematic diagram of preparation path for colloidal gold test strips

1.3.3 重组蛋白表达、纯化及鉴定 取 1.0 μL pET28a-TMV-CP 重组质粒加入 100 μL 大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,冰浴 30 min,于 42 ℃ 条件下热击 60 s,继续冰浴 3 min,加入 500 μL 无抗浸提 LB 培养基,于 37 ℃、180 r/min 条件下振荡培养 45 min,取 100 μL 培养液涂布于含有卡那霉素 (50 μg/mL)的固体 LB 平板上进行过夜筛选培养;次日挑取生长状态良好的单菌落接种于 3 mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中,于 37 ℃、220 r/min 条件下振荡培养过夜;将培养的细菌以 1:100 接种到 200 mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的液体 LB 培养基中,于 37 ℃、220 r/min 摇床中振荡培养 3~5 h;待 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时,加入 20 μL 1 mol/L IPTG 至最终浓度为 0.1 mmol/L,于 16 ℃、200 r/min 条件下诱导表达 16 h。

取一定量的菌液于 4 ℃、8000 r/min 条件下离心 10 min,弃上清液,保留菌体沉淀,向沉淀中加入 100 mL 平衡液进行重悬浮,用高压均质仪进行菌体破碎,于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min,分离上清液和细菌碎片,将上清液进行 Ni 柱亲和层析纯化分离目的蛋白。收集不同阶段的蛋白样品进

行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.3.4 单克隆抗体制备及免疫特性鉴定 选择健康的 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,参照文献[23]的方法,以纯化 TMV-CP 蛋白为免疫原对其进行免疫激活,得到小鼠血清;采用间接 ELISA 法^[24] 确定血清效价最优的小鼠脾细胞,将其与骨髓瘤细胞融合,经过筛选和亚克隆后,获得稳定分泌 TMV 单克隆抗体的细胞株;通过体内诱导制备腹水,用辛酸饱和硫酸铵法^[25] 纯化获得单克隆抗体,使用 ELISA 试剂盒对抗体进行亚类鉴定。

1.3.5 金标抗体制备 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒^[26],再将 TMV 单克隆抗体标记到纳米金表面,具体方法为:吸取 1 mL 胶体金溶液于离心管中,加入 4 μL 0.2 mol/L 碳酸钾缓冲液,振荡摇匀;加入 10 μg/mL TMV 单克隆抗体原液,混匀后室温反应 30 min;加入 50 μL 质量分数为 10%的 BSA 溶液,混合后室温反应 30 min 进行封闭;于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,沉淀用浓度为 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲液(含 1% BSA、2% 蔗糖、0.05% 聚山梨醇酯-20,若无特指,百分数均指质量分数)复溶后,于 4 ℃ 保存,备用。

1.3.6 烟叶中 TMV 检测 将新鲜叶片剪成 1 cm 见方的碎片,取(0.06±0.01) g 置于离心管底部,使用研磨棒充分研磨;加入 0.3 mL 样本提取液(0.02 mol/L PBS(pH 值为 7.2)、0.05 mol/L BB(硼酸缓冲液,pH 值为 8.0)、0.05 mol/L Tris-HCl(pH 值为 8.0)),重复研磨使样本与提取液充分混匀;研磨完成后静置 1 min 以上,所得上清液即为待检液。用一次性吸管吸取待检液,垂直缓慢滴加 3 滴(约 90 μL)于试纸条样品垫上,反应 10 min 后判定结果。

若试纸条 C 线和 T 线同时显色,判为阳性(+);C 线显色、T 线不显色,判为阴性(-);C 线不显色代表试纸条已失效。同时,使用胶体金分析仪读取 T 线显色数值(*T*值), $T \geq 100$,判为阳性(+); $T < 100$,判为阴性(-)。

1.3.7 胶体金试纸条性能指标评价 1) 检测限:取阴性样本,按 1.3.6 所述方法进行前处理后,在待检液中添加 TMV-CP 蛋白,使蛋白质量浓度分别达到 0.01 μg/mL、0.10 μg/mL、1.00 μg/mL、10.00 μg/mL、100.00 μg/mL,再用试纸条进行检测,以 $T \geq 100$ 的最低质量浓度作为试纸条的检测限。

2) 准确性:使用试纸条对 20 份经 PCR 确认的烟草样品(编号为 S01~S20,其中 S01~S05 为阴性样本,S06~S20 为阳性样本)进行检测,根据阴性、阳性样本的检出情况,考查其检测的准确性。

3) 特异性:用试纸条对经 PCR 确认分别感染烟草丛顶病毒、番茄斑萎病毒、马铃薯 Y 病毒的烟草样本进行检测,并以 TMV 阴性和阳性质控样品为对照,考查其对烟草中常见病毒检测的特异性。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白表达结果分析

TMV-CP 表达结果如图 2 所示,其中, M 表示蛋白质标记,01、02、03 和 04 表示选取的 4 个单克隆抗体,-表示 IPTG 诱导前,+表示 IPTG 诱导后。由图 2 可知,与未诱导对照相比,经 IPTG 诱导后,含重组质粒的 4 个单克隆抗体在约 20 kDa 处均出现 1 条明显的条带,相对分子质量与预期的重组蛋白大小一致;其中 01 号单克隆抗体的条带最深最粗,说明含目标重组蛋白最多^[27]。因此,后续采用 01 号单克隆抗体进行蛋白纯化。

2.2 重组蛋白纯化结果分析

TMV-CP 蛋白纯化,结果如图 3 所示,其中, M 表示蛋白质标记,流穿表示流过的样品,1—5 表示洗脱液。由图 3 可知,上样前存在大量杂带,经平衡液和洗脱液清除杂蛋白后,条带变得单一。使用 Image J 对条带进行灰度分析,结果显示其纯度达到 90%,即重组蛋白的纯化效果良好^[28]。

2.3 单克隆抗体免疫特性分析

抗体效价反映有效抗体浓度,是衡量抗体质量的重要指标^[29],通常由能够结合一定量的抗原所需的抗体稀释倍数来表示^[30],即对抗体进行连续梯度稀释,当稀释倍数达到一定数值后,待测孔会从阳性转为阴性,最后一个阳性孔的稀释倍数即为抗体效价,抗体效价越高,有效抗体浓度越高。通过 ELISA 法测定的腹水效价为 1:27 000,表明腹水中有效抗体浓度较高;使用 IgG 亚类检测试剂盒检测 TMV 单克隆抗体的亚类,结果显示为 IgG_{1(κ)}。

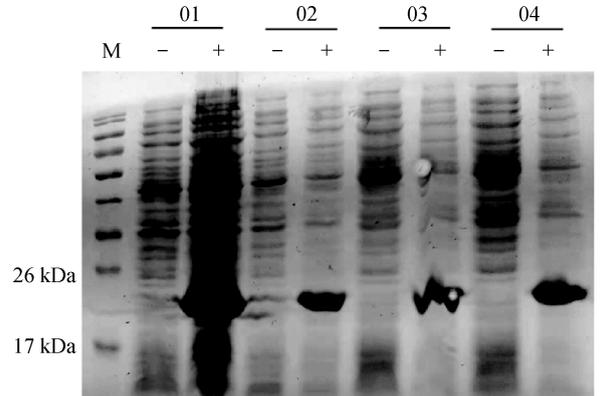


图 2 TMV-CP 蛋白表达结果

Fig. 2 TMV-CP protein expression results

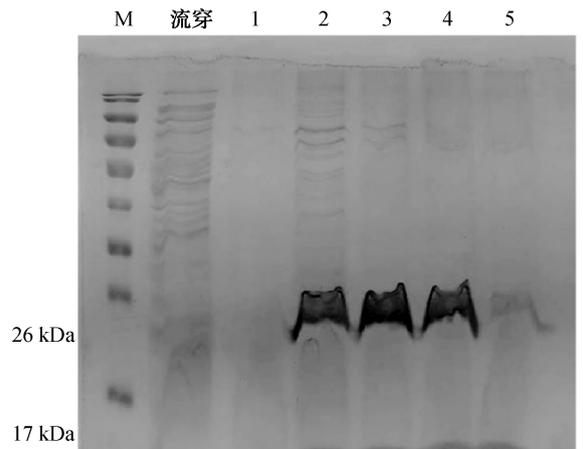


图 3 TMV-CP 蛋白纯化结果

Fig. 3 TMV-CP protein purification results

2.4 金标抗体制备条件优化结果分析

2.4.1 缓冲液添加量的确定 胶体金通过静电吸附作用将抗体结合在其表面,标记体系的 pH 值对二者的结合效率及抗体的生物活性有较大影响^[31]。本研究通过向 1 mL 胶体金溶液中分别加入 1 μL 、2 μL 、3 μL 、4 μL 、5 μL 的 0.2 mol/L 碳酸钾缓冲液来调节体系的 pH 值,并将所得胶体金试纸条用于阳性烟草质控样品检测,结果见表 1。由表 1 可知,当碳酸钾缓冲液添加量为 4 μL 时,金标抗体呈亮红色,且稳定性较强; T 值最大,表明此时胶体金的 pH 值在抗体蛋白的等电点处,二者能充分结合,不易发生聚集或沉淀。因此,选择 4 μL 为适宜的缓冲液添加量。

2.4.2 抗体质量浓度的确定 抗体质量浓度也会影响抗体与胶体金的结合效率及金标抗体的稳定性^[32]。基于前文优化结果,改变 TMV 单克隆抗体质量浓度(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),并将所得胶体金试纸条用于阳性烟草质控样品检测,结果见表 2。由表 2 可知,随着抗体质量浓度增加,试纸条 T 线显色逐渐增强,当抗体质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, T 值最大, T 线显色最深,且金标抗体稳定性较好。因此,选择 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为适宜的抗体质量浓度。

2.4.3 试纸条 NC 膜的确定 NC 膜是胶体金试纸条中必不可少的材料,其表面孔径大小决定着液体在膜表面的层析速度、免疫反应发生的效率及灵敏度^[33]。本研究比较了 3 种类型的 NC 膜对阳性样品($T \geq 100$)的显色情况,结果如图 4 所示。由图 4 可知,3 种类型 NC 膜对阳性样品的 T 线显色及 T 值差异不显著,但变异系数(Coefficient of Variation, CV)存在显著性差异。因此,选择 CV 最小的 CN140 为适宜的 NC 膜。

2.4.4 样本提取液的确定 不同的样本提取液会影响金标抗体与抗原的免疫结合,进而影响试纸条显色效果^[34]。本研究比较了 3 种样本提取液对稀释倍数不同的阳性样本的显色情况,结果如图 5 所示。由图 5 可知,使用 0.02 mol/L PBS 作为样本提取液时,阳性样本分别稀释 8 倍和 16 倍的显色情况均较其余 2 种提取液明显。因此,选择 0.02 mol/L PBS 作为适宜的样本提取液。

表 1 缓冲液添加量优化结果

添加量/ μL	金标抗体 状态	0.5 h 后的 稳定性	彩色显影	T 值
1	紫灰色	紫色变浅并沉淀	/	/
2	灰色	少量沉淀	/	/
3	紫灰色	出现黑点	/	/
4	亮红色	相对稳定	酒红色,正常显色	394
5	亮红色	相对稳定	酒红色,颜色略浅	264

注:/表示金标抗体颜色不符合要求,未进行烟草质控检测。

表 2 抗体质量浓度优化结果

抗体 质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	金标抗体 状态	0.5 h 后的 稳定性	彩色显影	T 值
5	亮红色	稳定	颜色较浅	256
10	亮红色	稳定	酒红色,正常显色	566
20	亮红色	稳定	酒红色,正常显色	466

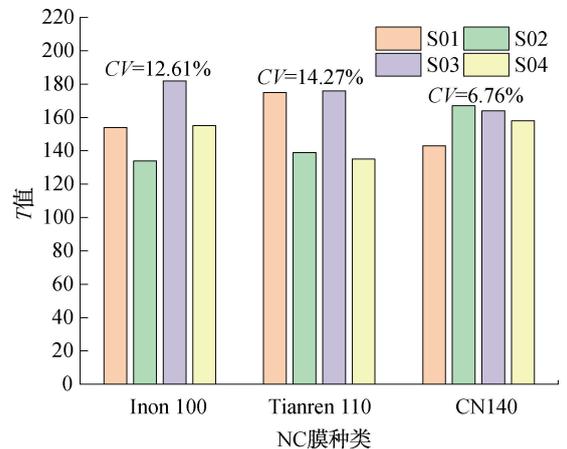


图 4 NC 膜优化结果

Fig. 4 NC membrane optimization results

2.5 试纸条性能指标评价结果分析

2.5.1 检测限 检测限实验结果如图 6 所示。由图 6 可知,随着 TMV-CP 蛋白质量浓度的下降, T 线显色逐渐变浅, T 值逐渐减小;当 TMV-CP 蛋白质量浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, T 值下降至 100 以下,检测结果为阴性。因此,以 $T > 100$ 的最低 TMV-CP 蛋白质量浓度 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为试纸条的检测限。

2.5.2 准确性 准确性实验结果见表 3。由表 3 可知,5 份阴性样本检测结果均为阴性;15 份阳性样本中仅 S11 呈阴性,其余均为阳性,阳性符合率 93.3%,

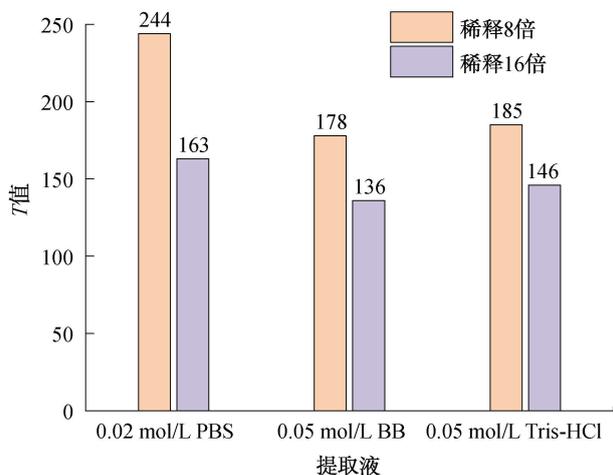


图5 样本提取液优化结果

Fig. 5 Sample extract ion solution optimization results

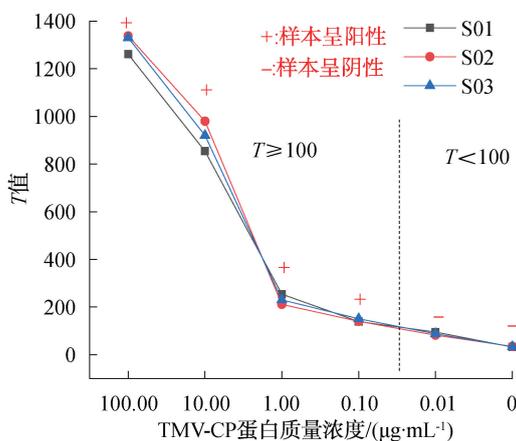


图6 检测限实验结果

Fig. 6 Detection limit experiment results

总符合率 95.0%, 准确性较好。

2.5.3 特异性 特异性实验结果见表4。由表4可知,用本试纸条检测感染烟草丛顶病毒、番茄斑萎病毒、马铃薯Y病毒的烟草样本,结果均为阴性,表明其对烟草中其他常见病毒无交叉反应,特异性较好。

刘欣^[35]采用纯化的烟草花叶病毒免疫家兔产生抗体,并建立了TMV胶体金试纸条方法,检测出病毒颗粒的最低质量浓度为18.3 ng/mL,但采用病毒研发的抗体可能存在不同来源的病毒株检测敏感性低、假阳性、特异性不强等问题^[36]。TMV-CP蛋白在引起烟草花叶病感染中起决定性作用,感染TMV的烟草叶绿体中存在大量的TMV-CP蛋白^[37],本研究将其作为免疫原制备抗体,有助于提高检测方法的准确性和特异性。

表3 准确性实验结果

Table 3 Accuracy experiment results

样品	测试结果
S01, S02, S03, S04, S05, S11	- ($T < 100$)
S06, S07, S08, S09, S10, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20	+ ($T \geq 100$)

表4 特异性实验结果

Table 4 Specificity experiment results

样品	T值	T值			测试结果
		第1次检测	第2次检测	第3次检测	
烟草花叶病毒	阳性质控样品	243	190	254	+
	阴性质控样品	32	31	33	-
感染烟草丛顶病毒烟草样本		32	30	28	-
感染番茄斑萎病毒烟草样本		30	39	34	-
感染马铃薯Y病毒烟草样本		40	38	36	-

3 结论

本研究基于双抗夹心法研发了TMV胶体金检测试纸条,其适宜制备条件为缓冲液添加量4 μL、抗体质量浓度10 μg/mL、NC膜选择CN140型、样本提取液0.02 mol/L PBS。将TMV-CP蛋白的质量浓度由100 μg/mL减至0.01 μg/mL,确定此试纸条的检测限为0.1 μg/mL;使用试纸条检测经PCR确认感染烟草丛顶病毒、番茄斑萎病毒、马铃薯Y病毒的烟草样本,无交叉反应,证明此试纸条特异性良好。本文所制备的TMV胶体金检测试纸条的操作简单,10 min内能快速显示结果,可用于田间大批量样品检测,对TMV的精准监测及早期预警有积极作用,也可为其他动植物病毒的快速检测提供参考。

参考文献:

- [1] 吴彦辉,蒲团卫,张生杰,等.烟草花叶病毒实时荧光定量PCR检测体系的构建[J].安徽农业科学,2023,51(12):171-175.
- [2] 付一峰.烟草花叶病毒病的研究进展[J].北京农业,2015(12):115-117.
- [3] 刘羽丰,徐晨曦,吴泽,等.北京市昌平地区园林植物烟草花叶病毒的检测[J].北京农学院学报,2022,37(1):28-31.
- [4] 台莲梅,靳学慧,张亚玲,等.黑龙江烟草病害种类鉴定及发生情况[J].贵州农业科学,2014,42(10):124-126.

- [5] 姜瀚林,郭兆奎,刘永中,等. 3个黑龙江烟区烟草花叶病毒分离物的全基因组序列测定与分析[J]. 中国烟草学报,2019,25(1):77-85.
- [6] 白静科,何雷,吴彦辉,等. 河南烟草主要病毒发生种类及侵染类型分析[J]. 中国烟草科学,2022,43(1):49-54.
- [7] 万晴姣,张晓霞,李欲轲,等. 贵州辣椒烟草花叶病毒的分子鉴定[J]. 贵州农业科学,2015,43(10):181-184.
- [8] 蹇军友,刘开兴,耿召良,等. 黔产乌头中的生物碱成分及其抗烟草花叶病毒(TMV)活性[J]. 农药,2017,56(10):767-770,777.
- [9] 李丽珠. 云南烟草主要病虫害分类及防治技术[J]. 热带农业工程,2019,43(2):14-16.
- [10] KUMAR S, PRAKASH H S. Detection of tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus in pepper seeds by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2016, 49 (1/2/3/4):59-63.
- [11] XU T Z, LIN X W, ZHANG X L, et al. Triplex visual detection of tobacco potyviruses using reverse transcription recombinase polymerase amplification assay combined with lateral flow dipstick [J]. Crop Protection, 2023, 174:106397.
- [12] LI Y Y, TAN G L, LAN P X, et al. Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers [J]. Journal of Virological Methods, 2018, 259:122-128.
- [13] 任锡毅,刘永翔,黄永会,等. 试管捕捉实时荧光 RT-PCR 法同时检测烟草花叶病毒病和马铃薯 Y 病毒病[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):96-100.
- [14] 董旭旭,孙威,曹攀,等. 胶体金免疫层析试纸条技术在病毒检测领域的应用研究现状[J]. 生物工程学报,2022,38(9):3243-3254.
- [15] 赵少若,黄甜,郝丽影,等. 犬轮状病毒单克隆抗体制备及胶体金试纸条检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医,2022,49(11):4429-4437.
- [16] SHYAM K U, JEONG H N, OH M J, et al. Development of a lateral flow immuno-chromatic strip assay for the detection of nervous necrosis virus (NNV, RGNNV genotype) [J]. Aquaculture, 2020, 520:734944.
- [17] 刘国华,蒋永青,陈彤,等. 安眠酮胶体金免疫快速检测试纸条的研制[J]. 国外畜牧学(猪与禽),2023,43(6):64-70.
- [18] 岳绪辉,杜斌,林栋,等. 草甘膦胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 食品科技,2021,46(12):301-307.
- [19] 韩金治,李亚茹,罗林,等. 胶体金免疫层析法快速检测水产品中河豚毒素的研究[J]. 分析测试学报,2023,42(12):1598-1606.
- [20] 姜宁,夏振远,卢灿华,等. 烟草番茄环纹斑点病毒快速检测试纸条的研制及应用[J]. 烟草科技,2023,56(11):10-15,53.
- [21] 杨洋,羊国根,杨懿德,等. 烟草黑胫病菌胶体金免疫层析快速检测技术的建立与评价[J]. 安徽农业科学,2022,50(17):128-131,137.
- [22] 周立娟,井申荣,苑荣亮,等. 夹心 ELISA 检测新冠病毒及其抗原方法的建立和验证[J]. 云南大学学报(自然科学版),2022,44(4):870-876.
- [23] 刘云翔,高鹏超,詹志来,等. 基于酶联免疫分析的中药薏苡仁玉米赤霉烯酮残留快速检测技术研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(11):2919-2924.
- [24] 张文劲,李庆妮,唐定,等. 恒河猴血清 SARS-CoV-2 变异株特异性 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志,2023,36(11):1341-1346,1352.
- [25] KUANG H, XING C R, HAO C L, et al. Rapid and highly sensitive detection of lead ions in drinking water based on a strip immunosensor [J]. Sensors, 2013, 13 (4):4214-4224.
- [26] 曹滌非,薛佳莹,崔向红,等. 柠檬酸三钠法制备胶体金及其应用[J]. 化学工程师,2019,33(12):12-14,24.
- [27] 刘靖. 非洲猪瘟病毒 CD2v、p30 和 pK205R 蛋白的表达纯化与 p30、pK205R 蛋白单克隆抗体的制备[D]. 北京:中国农业科学院,2021.
- [28] 侯浩宇,郑南南,吴宏举,等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体制备和鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2023,50(3):1241-1249.
- [29] 王志超,马秋敏,叶彦雄,等. 番茄 II 型 metacaspase 蛋白 SIMC7 抗体效价检测及其在果实中表达特性分析[J]. 北方园艺,2017(16):50-55.
- [30] 孔卫青,凌君,杨金宏. 桑花叶卷叶病相关病毒外壳蛋白抗体的制备及利用[J]. 西北农业学报,2021,30(7):1077-1082.
- [31] HU J, ZHOU S, ZENG L F, et al. Hydrazide mediated oriented coupling of antibodies on quantum dot beads for enhancing detection performance of immunochromatographic assay [J]. Talanta, 2021, 223 (Pt 1):121723.
- [32] 王康,余璞,陈孔,等. 应用胶体金免疫层析法检测饲料中恩拉霉素残留的方法建立[J]. 生物工程学报,2024,40(7):2346-2356.
- [33] TANG R H, ALAM N, LI M, et al. Dissolvable sugar barriers to enhance the sensitivity of nitrocellulose membrane lateral flow assay for COVID-19 nucleic acid [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 268:118259.
- [34] 柯童炜,骆骄阳,秦家安,等. 胶体金免疫层析法快速检测中药材中除草剂百草净残留[J]. 药物分析杂志,2024,44(1):174-184.
- [35] 刘欣. 烟草花叶病毒胶体金检测试纸条的研制[D]. 郑州:河南农业大学,2009.
- [36] 张敏,李建,舒金秀,等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的研制及胶体金试纸条检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2022,56(12):16-24.
- [37] 吕琦,吴峰,林洁,等. 烟草花叶病毒单克隆抗体的制备和鉴定[J]. 云南大学学报(自然科学版),2013,35(1):93-98.

Preparation and performance evaluation of colloidal gold test strips for tobacco mosaic virus detection

WANG Chunqiong¹, LIU Kai¹, XIE Yonghui², ZHANG Ke¹, LIU Chunming³,
ZHANG Xiaowei¹, SUN Haowei¹, CHEN Dan¹

1. Yunnan Tobacco Quality Supervision and Test Station, Kunming 650106, China;

2. Yunnan Tobacco Company Kunming City Company, Kunming 650000, China;

3. Yunnan Tobacco Company Honghe Prefecture, Mile 652300, China

Abstract: To address the problems of the time-consuming and limited application of traditional tobacco mosaic virus (TMV) detection methods, colloidal gold test strips for rapid and qualitative detection of TMV were developed based on the double antibody sandwich method, and its preparation conditions were optimized. In addition, the limit, accuracy, and specificity of the test strip were detected. The results showed that the suitable preparation conditions for the test strip were buffer addition of 4 μL , antibody mass concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and NC membrane of CN140 type and sample extraction solution of 0.02 mol/L PBS; The detection limit of this test strip for TMV-CP protein was 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with no cross reactivity with tobacco bush top virus, tomato spot wilt virus, and potato Y virus, and good specificity; Applied to actual sample detection, the total coincidence rate with PCR was 95.0%, the positive coincidence rate was 93.3%, and the accuracy was good. This test strip could display the detection results within 10 min and was easy to operate. It could be used for rapid detection of TMVs in tobacco field.

Key words: tobacco mosaic virus; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatographic technique; test strips

[责任编辑:王晓波 贾学伟]