



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115927204 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202211515177.6

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.30

G01N 33/577 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2022281 2022.09.01

CCTCC NO:C2022282 2022.09.01

(71) 申请人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72) 发明人 吕典秋 杨宇 琚熙三 吴林

王开周 王文华 于洪涛 张国栋

(74) 专利代理机构 重庆航图知识产权代理事务

所(普通合伙) 50247

专利代理师 王贵君

(51) Int. Cl.

G12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

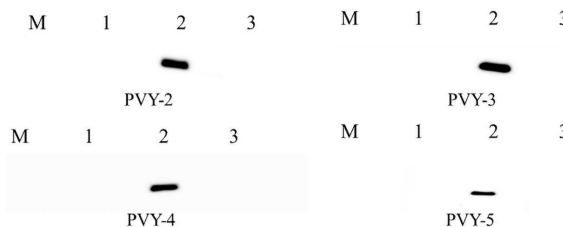
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株及其单抗和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株及其单抗和应用,所述杂交瘤细胞株4F1B2G11能分泌抗马铃薯Y病毒单抗,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC NO:C2022281,所述单抗PVY-2与马铃薯Y病毒的外壳蛋白有特异性免疫反应,单抗PVY-2的重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,利用直接ELISA方法检测对感染马铃薯Y病毒病叶的灵敏度达到1:5120倍稀释,所述单抗PVY-2还可用于制备ELISA试剂盒,或胶体金试剂盒,或纳米模拟酶试剂盒,能快速、灵敏、经济、准确的对马铃薯Y病毒病进行检测。



1. 一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株4F1B2G11,其特征在于,所述杂交瘤细胞株能分泌抗马铃薯Y病毒单抗,所述杂交瘤细胞株保存于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2022281。

2. 一种由权利要求1所述杂交瘤细胞株4F1B2G11分泌产生的单抗PVY-2。

3. 根据权利要求2所述的单抗PVY-2,其特征在于,所述单抗PVY-2的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。

4. 根据权利要求2所述的单抗PVY-2,其特征在于,所述单抗PVY-2与马铃薯Y病毒的外壳蛋白有特异性免疫反应,所述马铃薯Y病毒的外壳蛋白基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;所述单抗PVY-2的抗体类型及亚类为IgG1,链型为Kappa轻链,利用直接ELISA方法检测对感染马铃薯Y病毒病叶的灵敏度达到1:5120倍稀释。

5. 权利要求3或4任一项所述单抗PVY-2在检测马铃薯PVY病毒中的应用。

6. 含有权利要求3或4任一项所述单抗PVY-2的试剂盒。

7. 根据权利要求6所述的含有单抗PVY-2的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为ELISA试剂盒,或胶体金试剂盒,或纳米模拟酶试剂盒。

8. 根据权利要求7所述的含有单抗PVY-2的试剂盒,其特征在于,所述纳米模拟酶试剂盒中纳米模拟酶为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒。

## 一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株及其单抗和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物病原体检测技术领域,尤其涉及一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株及其单抗和应用。

### 背景技术

[0002] 我国是世界上马铃薯生产第一大国,马铃薯种植面积及总产量均居世界首位,但单产水平居较落后,远低于欧美发达国家。马铃薯病毒病(PVX、PVY、PVS、PLRV等)引起的种薯退化,是造成马铃薯单产水平低的主要原因之一。在荷兰、英国及美国等欧美发达国家早在70多年前就开展了马铃薯种薯质量检测工作。实施严格的种薯质量检测认证与市场准入制度,是保障其种薯质量及单产水平的关键因素。目前,欧美等发达国家马铃薯脱毒种薯普及率超过90%以上,而我国仅为30~50%。随着国家马铃薯主粮化战略的实施,马铃薯战略地位的到进一步提升,而提高脱毒种薯质量及普及率成为马铃薯产业健康发展的重要保障。而病毒作为影响马铃薯种薯质量的主要有害生物,是判定种薯质量的是否合格的关键指标,与此同时,急需建立适合我国马铃薯种薯质量检测认证技术体系。

[0003] 按照现行国家标准规定,马铃薯种薯繁殖从原原种到生产用种需要4年左右的时间,期间要经过严格的田间检测、库房检测和实验室检测等环节,最终判定种薯的质量。因此,不同于其他大田作物种子质量检测,马铃薯种薯质量检测人员需要具备更专业的技术和丰富经验。因此需要建立和研发快速、准确、灵敏的检测技术及检测产品,以辅助检测人员对种薯质量作出科学、准确、及时的评判。

[0004] PVY是最常见、危害最重的马铃薯病毒之一,是马铃薯第二重要病害,造成了严重的经济损失。是马铃薯Y病毒属(Potyvirus)的代表成员,寄主范围较广,可侵染茄科、豆科、藜科等多种植物,并且造成严重的经济损失。PVY作为影响马铃薯种薯质量的主要有害生物之一,是判定马铃薯种薯质量是否合格的关键指标之一。

[0005] 因此,亟需建立简便、快速、灵敏、经济、准确的马铃薯病毒病PVY检测抗体,满足马铃薯种薯田间质量检测服务的需要,为马铃薯种薯质量检测认证工作的全面推进提供技术支持。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株4F1B2G11;本发明的目的之二在于提供一种所述杂交瘤细胞株4F1B2G11分泌产生的单抗PVY-2;本发明的目的之三在于提供所述单抗PVY-2在检测马铃薯PVY病毒中的应用;本发明的目的之四在于提供含有所述单抗PVY-2的试剂盒。

[0007] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0008] 1、一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株4F1B2G11,述杂交瘤细胞株能分泌抗马铃薯Y病毒单抗,所述杂交瘤细胞株保存于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO: C2022281。

- [0009] 2、一种由所述杂交瘤细胞株4F1B2G11分泌产生的单抗PVY-2。
- [0010] 本发明优选的,所述单抗PVY-2的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示。
- [0011] 本发明优选的,所述单抗PVY-2与马铃薯Y病毒外壳蛋白有特异性免疫反应,所述马铃薯Y病毒的外壳蛋白基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;所述单抗PVY-2的抗体类型及亚类为IgG1,链型为Kappa轻链,利用直接ELISA方法检测对感染马铃薯Y病毒病叶的灵敏度达到1:5120倍稀释。
- [0012] 3、所述单抗PVY-2在检测马铃薯PVY病毒中的应用。
- [0013] 4、含有所述单抗PVY-2的试剂盒。
- [0014] 本发明优选的,所述试剂盒为ELISA试剂盒,或胶体金试剂盒,或纳米模拟酶试剂盒。
- [0015] 本发明优选的,所述纳米模拟酶试剂盒中纳米模拟酶为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒。
- [0016] 本发明的有益效果在于:本发明公开了一种分泌单抗PVY-2的杂交瘤细胞株及其单抗和应用,所述杂交瘤细胞株4F1B2G11能分泌抗马铃薯Y病毒单抗,所述杂交瘤细胞株的保藏号为C2022281,所述单抗PVY-2与马铃薯Y病毒30KDa的外壳蛋白有特异性免疫反应,抗体类型及亚类为IgG1,链型为Kappa轻链,利用直接ELISA方法检测对感染马铃薯Y病毒病叶的灵敏度达到1:5120倍稀释,所述单抗PVY-2还可用于制备ELISA试剂盒,或胶体金试剂盒,或纳米模拟酶试剂盒,能快速、灵敏、经济、准确的对马铃薯Y病毒病进行检测。

## 附图说明

- [0017] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图进行说明:
- [0018] 图1为本发明技术路线;
- [0019] 图2为PVY-CP基因片段扩增;
- [0020] 其中,M:2K plusII marker,1、2:PVY-CP基因片段(807bp);
- [0021] 图3为PVY-CP原核表达结果;
- [0022] 其中,M:Marker,1:菌体沉淀,2:菌体上清,3:菌体总蛋白;
- [0023] 图4为PVY-CP纯化结果;
- [0024] 其中,A:不同浓度咪唑洗脱PVY-CP,M:marker,1:50mM咪唑洗脱液,2:100mM咪唑洗脱液,3:300mM咪唑洗脱液;B:PVY-CP纯化结果,M:marker,4:浓缩后蛋白);
- [0025] 图5为Western blot分析PVY单克隆抗体特异性;
- [0026] 其中,M:蛋白marker,1:健康马铃薯组培苗,2:感染PVY的马铃薯组培苗,3:感染PVX的马铃薯组培苗;
- [0027] 图6为PVY单克隆抗体灵敏度分析;
- [0028] 图7为PVY纳米模拟酶试纸条特异性检测;
- [0029] 其中,1:PVA,2:PVM,3:PVS,4:PVX,5:PLRV,6:PVY,7:健康植株;
- [0030] 图8为PVY纳米模拟酶试纸条灵敏度检测;
- [0031] 其中,1:1:10倍稀释,2:1:10<sup>2</sup>倍稀释,3:1:10<sup>3</sup>倍稀释,4:1:10<sup>4</sup>倍稀释,5:1:10<sup>5</sup>倍稀释,6:阴性对照。

[0032] 生物保藏:

[0033] 将2株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏地址为中国武汉武汉大学,分别命名为4F1B2G11、4B4D8C3;4F1B2G11保藏日为2022年9月1日,保藏号为CCTCC NO:C2022281,分类命名为杂交瘤细胞株4F1B2G11;4B4D8C3保藏日为2022年9月1日,保藏号为CCTCC NO:C2022282,分类命名为杂交瘤细胞株4B4D8C3。

### 具体实施方式

[0034] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好的理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0035] 实施例所需生物材料及试剂:马铃薯健康试管苗,感染PVX、PVY、PVA、PVS、PVM与PLRV的马铃薯试管苗均是本实验室留存;纳米模拟酶( $Fe_3O_4$ ,10mg/mL)由中科院生物物理所段德民研究员提供(制备方法参见文献Duan D,Fan K,Zhang D,et al.Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola);Balb/c小鼠,购买于江南实验动物基地;Tizol、尿素、咪唑、青霉素与链霉素购买于生工生物工程(上海)股份有限公司;反转录试剂盒购买于翌圣生物科技(上海)有限公司;胶回收试剂盒购买于北京全式金生物公司;E.Coli BL21感受态细胞、表达蛋白重组质粒(pET28a)、LB培养基、Tris缓冲溶液、IgG-HRP与SDS-PAGE蛋白胶购买于艾柏森生物公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG1450、HT与HAT购买于Sigma公司;新生牛血清购买于草原绿野公司;DMEM(Glu 4.5g/L)购买于大连美仑生物技术有限公司;透析袋、ELISA包被液、ELISA终止液、TMB显色液与DAB显色液购买于北京索莱宝科技有限公司;抗体亚型检测试剂盒购买于Sino Biological;超滤浓缩管购买于Millipore;亲和层析柱与Protein A纯化柱购买于武汉汇研生物科技股份有限公司;酶标板购买于Costar;硝酸纤维素膜、吸水纸、玻璃纤维素膜与PVC底板购买于上海金标生物科技有限公司。

[0036] 本发明技术路线如图1所示。

[0037] 实施例1、马铃薯Y病毒CP蛋白原核表达载体构建

[0038] 一、引物设计与合成

[0039] 在生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)上检索PVY的基因序列,根据PVY的外壳蛋白(coat protein,CP)基因全长序列设计扩增CP蛋白基因全长的引物(表1),将引物在NCBI上进行比对,比对后由上海生工生物工程技术有限公司合成。用PVY-CP-F与PVY-CP-R的引物扩增PVY-CP基因,扩增产物长度为807bp,编码PVY-CP基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3。

[0040] 表1.PVY-CP-F与PVY-CP-R的引物序列

引物	引物序列(5'-3')
[0041] PVY-CP-F	GCAAATGACACAATTGATGCA (SEQ ID NO.1)
PVY-CP-R	TCACATGTTCTTGACTCCAAG (SEQ ID NO.2)

[0042] 二、病毒基因组的提取

[0043] (1) 将样品置于研钵中,加液氮研磨成粉末,转至1.5mL离心管,加入1mL TRIzol混匀;

- [0044] (2) 4℃, 14000g离心5min;
- [0045] (3) 取上清, 加入200μL三氯甲烷, 振荡混匀, 室温放置15min;
- [0046] (4) 4℃, 12000g离心15min; 吸取上层水相至新1.5mL离心管中, 加入0.5mL异丙醇, 混匀, 室温放置10min;
- [0047] (5) 4℃, 12000g离心10min;
- [0048] (6) 弃上清, 留沉淀, 加入1mL 75%乙醇, 温和振荡离心管, 悬浮沉淀;
- [0049] (7) 4℃, 7500g离心5min, 弃上清, 将离心管倒置于滤纸上, 自然干燥;
- [0050] (8) 加入25~100μL DEPC水溶解沉淀, 即得到RNA。

### [0051] 三、扩增病毒CP基因

#### [0052] (1) cDNA的合成

[0053] 以提取植物病毒总RNA为模板, 按照试剂盒的说明进行操作

#### [0054] (2) PCR扩增

[0055] 以合成的cDNA为模板, 以表1中的引物进行扩增, 反应体系为系为50μL, cDNA模板2μL, 病毒上、下游引物(0.1μmol·L<sup>-1</sup>)各2μL, 2×taq酶25μL, ddH<sub>2</sub>O补足至50μL。反应条件为: 94℃预变性5min; 94℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸1min, 循环35次; 72℃延伸10min。

#### [0056] (3) 琼脂糖凝胶电泳检测:

[0057] 配置1%的琼脂糖凝胶, 按比例加入GoldView<sup>TM</sup>核酸显色染料(按照每20ml TAE溶液加入1μL的GoldView<sup>TM</sup>), 摇晃均匀。缓慢的倒入模具中, 放置冷却至其成胶块状为可用, 选择合适的位置点入DNA Maker与PCR产物进行电泳(电泳时电压为140V, 20分钟), 结束后利用凝胶成像仪观察目的条带, 将目的条带切下, 放入离心管进行回收。

#### [0058] (4) PCR产物的回收纯化:

[0059] 按照全式金DNA凝胶回收试剂盒中的说明书对PCR产物回收与纯化。

### [0060] 四、病毒CP蛋白基因与pET28a载体连接

[0061] 将胶回收纯化后的PVY的CP蛋白基因片段与pET28a载体连接, 连接体系如下(表2), 37℃链接30min。

#### [0062] 表2. pET28a载体连接体系

	组分	体积
	CP 蛋白基因片段	4 μL
[0063]	pET28a 载体	1 μL
	ddH <sub>2</sub> O	5 μL
	总体积	10 μL

### [0064] 五、大肠杆菌转化

[0065] 将BL21感受态细胞从超低温冰箱取出放置于冰盒上, 待其融化后加入10μL连接产物(PET28a-PVY-CP), 吹打混合均匀后, 冰浴30min。42℃热击90s, 冰浴2min。加入500μL不含抗生素的LB液体培养基, 放入37℃恒温摇床180r/min进行复苏1.5h。室温4000g离心5min, 弃多余上清液, 将菌体吹打混匀后, 将浓缩后的菌液均匀涂在LB/Kan<sup>+</sup>固体培养基上, 当菌液完全被固体培养基吸收后, 将平板封好倒置于37℃恒温培养箱中过夜培养, 第二天挑取

单克隆菌斑,放入LB/Kan<sup>+</sup>液体培养基进行摇菌后送至上海生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

[0066] 六、病毒CP蛋白基因在大肠杆菌中表达

[0067] (1) 将测序正确的大肠杆菌菌液加入5mL的LB液体培养基中,放入37℃恒温振荡培养箱,250rpm/min过夜培养16-18h,作为种子液;

[0068] (2) 按1:100转接到新鲜的200mL LB培养基中,37℃,250rpm/min条件培养,当菌液 $OD_{600}=0.6$ 时,补加IPTG诱导剂,于18℃继续诱导培养;

[0069] (3) 4℃,5000rpm/min,15min,收集菌体;

[0070] (4) 将菌体用裂解buffer(50mM Tris、0.5M NaCl,pH 8.0)重悬后进行超声破碎。超声条件为:work 3s,off 2s,时间15min,重复一遍;

[0071] (5) 超声后的样品,4℃,5000rpm/min,15min,分别取上清液和沉淀用SDS-PAGE胶进行蛋白分析。

[0072] 七、病毒CP蛋白纯化

[0073] (1) 取培养后的菌体,加入裂解buffer(50mM Tris、0.5M NaCl,pH 8.0)重悬后进行超声破碎。超声条件为:work 3s,off 2s,时间15min,重复一遍;

[0074] (2) 将超声破碎后的菌液于低温离心机内离心,4℃,5000rpm/min,15min,收集上清,在上清中加入变性剂尿素,终浓度为8M,溶解后,于4℃静置1h,离心取上清;

[0075] (3) 将上述获得的上清液,用0.45μm滤膜过滤,通过Ni亲和层析柱进行蛋白纯化。

[0076] 步骤如下:

[0077] a) 用5倍柱体积的去离子水洗涤,去除空气和20%乙醇;

[0078] b) 5~10倍柱体积Buffer A平衡柱子,(Buffer A:50mM Tris、0.15M NaCl、8M尿素,pH 8.0);

[0079] c) 将样品以0.5mL/min的速度流穿Ni柱;

[0080] d) 用Buffer A平衡柱子;

[0081] e) 分别用50mM咪唑、100mM、300mM咪唑洗脱。

[0082] f) 将洗脱下来的样品分别进行SDS-PAGE胶分析是否有目的蛋白。

[0083] 八、结论

[0084] (1) PVY-CP基因原核表达载体构建结果

[0085] PVY-CP基因经PCR扩增后,利用琼脂糖凝胶电泳分析,检测到长度为807bp的DNA片段(图2),通过胶回收得到PVY-CP基因片段,将其连接到pET28a载体上,并转入BL21感受态细胞中,37℃倒置平板过夜培养后,挑选单克隆菌斑送至生工进行测序,经过序列比对,选择测序结果正确的菌液进行蛋白表达。

[0086] (2) PVY-CP表达结果

[0087] 将测序正确的菌液按照推荐添加IPTG诱导剂,经SDS-PAGE胶进行蛋白分析,重组蛋白PVY-CP可以表达,如图3所示,其中泳道1为菌体沉淀,泳道2为菌体上清,泳道3为菌体总蛋白,说明重组蛋白PVY-CP以可溶性形式主要存在于菌体上清中,部分以包涵体形式存在于菌体沉淀中。

[0088] (3) PVY-CP纯化结果

[0089] 将培养后的菌体裂解后进行超声破碎,低温离心后收集上清液,加入尿素使其变

性后,用0.45 $\mu$ m滤膜过滤,分别用50mM咪唑、100mM、300mM咪唑洗脱,分别进行SDS-PAGE胶分析是否有目的蛋白,结果如图4,A所示,泳道1为50mM咪唑洗脱液,泳道2为100mM咪唑洗脱液,泳道3为300mM咪唑洗脱液。将100mM、300mM咪唑洗脱的蛋白稀释透析后浓缩,并用SDS-PAGE胶检测目的蛋白纯度,结果如图4,B所示,泳道4为浓缩后的目的蛋白,显示纯度很高。

[0090] 实施例2、马铃薯Y病毒单克隆抗体血清制备

[0091] 一、免疫小鼠

[0092] (1) 将实施例1制备的原核表达纯化后的重组蛋白PVY-CP为免疫原,选取健康Balb/c小鼠3只。首次免疫使用PVY抗原50 $\mu$ g,每只与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,腹部多点皮下注射免疫小鼠;

[0093] (2) 第一次免疫后,每隔14d,用PVY抗原50 $\mu$ g,每只和等体积的弗氏不完全佐剂乳化后,腹部多点皮下注射免疫小鼠,免疫3次;

[0094] (3) 第三次免疫开始,每次免疫后7d进行小鼠眼眶静脉丛(或尾静脉)取血,通过间接ELISA测定小鼠血液抗体效价;

[0095] (4) 免疫至小鼠血清效价合格后,选取效价较高的小鼠,腹腔注射50 $\mu$ g PVY抗原加强免疫。

[0096] 二、免疫小鼠血清效价检测

[0097] (1) 蛋白包被:实验组用ELISA包被液稀释PVY抗原蛋白至5 $\mu$ g/mL,对照组加ELISA包被液,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST清洗2遍;

[0098] (2) 封闭:配制3%脱脂奶粉,380 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0099] (3) 加样:取血清稀释至指定浓度,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0100] (4) 二抗:兔抗鼠IgG-HRP 1:1000,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗3遍;

[0101] (5) 显色:TMB显色液,A液:B液=1:1,100 $\mu$ L/孔,室温反应20min;

[0102] (6) 终止:ELISA终止液,50 $\mu$ L/孔;

[0103] (7) 读值:酶标仪主波长450nm,副波长630nm测定结果。

[0104] 以PVY-CP为免疫原对小鼠进行免疫,第一次免疫后,每隔14天进行加强免疫,共免疫3次,第四次通过间接ELISA方法测定小鼠血清效价(表3),其中3号小鼠免疫效价最高,加强免疫3~7天,进行细胞融合实验。

[0105] 表3. 小鼠血清效价

小鼠编号	1#	2#	3#
一免日期	2020/6/8	2020/6/8	2020/6/8
二免日期	2020/6/17	2020/6/17	2020/6/17
三免日期	2020/7/1	2020/7/1	2020/7/1
血清效价	9000	9000	27000

[0107] 实施例3、病毒单克隆杂交瘤细胞制备

[0108] 一、细胞融合

[0109] (1) 在生物安全柜中,收集生长旺盛、形态良好的骨髓瘤细胞(Sp2/0)约 $10^7$ 个于50mL离心管中,不添加血清的DMEM(Glu 4.5g/L)培养基重悬,37 $^{\circ}$ C培养箱预热;

[0110] (2) 加强免疫后3至7天的免疫合格小鼠,无菌条件下,取脾脏研磨过筛后离心收集



脾细胞；

[0111] (3) 脾细胞与Sp2/0混匀离心后,用融合剂PEG1450进行化学融合,添加DMEM终止反应；

[0112] (4) 离心收集融合细胞,用添加NBS(新生牛血清)和HAT的高糖DMEM进行培养和筛选,约8天后用间接ELISA进行融合初筛,阳性细胞孔进行融合复筛；

[0113] (5) 选择稳定表达抗体的单克隆杂交瘤细胞,细胞扩大培养后,取细胞进行腹水生产,并冻存细胞。

[0114] 二、融合细胞筛选

[0115] 采用BSA竞争ELISA方法检测,步骤如下：

[0116] (1) 蛋白包被:分别用ELISA包被液稀释PVY抗原或Y病毒研磨液至指定浓度,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST清洗2遍；

[0117] (2) 封闭:配制3%脱脂奶粉,380 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍；

[0118] (3) 加样:原倍加入细胞上清,80 $\mu$ L,室温孵育1h,PBST清洗2遍；

[0119] (4) 二抗:兔抗鼠IgG-HRP 1:1000,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗3遍；

[0120] (5) 显色:TMB显色液A液:B液=1:1,100 $\mu$ L/孔,室温反应20min；

[0121] (6) 终止:ELISA终止液,50 $\mu$ L/孔；

[0122] (7) 读值:酶标仪主波长450nm,副波长630nm测定结果；

[0123] (8) 选择生活力良好,进行第一次亚克隆。

[0124] 本次细胞融合获得16株阳性细胞(表4),继续进行细胞亚克隆实验。

[0125] 表4.3号小鼠融合筛选

序号	克隆号	PVY 病毒	PVX 病毒	
1	1A11	1.7545	0.2296	
2	1B9	1.4536	0.2183	
3	1D3	1.6785	0.1357	
4	2B3	1.4094	0.1776	
5	2B6	1.5496	0.1686	
6	3B5	1.5341	0.1663	
7	4B4	1.754	0.2476	
[0126]	8	4C1	1.7426	0.1516
	9	4D6	1.5496	0.1388
	10	4D12	1.5537	0.2366
	11	4F1	1.4375	0.1958
	12	4F10	1.7629	0.1882
	13	4H1	1.7305	0.3145
	14	5C7	1.9273	0.1496
	15	5F4	2.1857	0.1591
	16	6D10	1.4017	0.2037

[0127] 三、细胞亚克隆筛选

[0128] 用有限稀释法进行细胞克隆化。将阳性细胞重悬取细胞计数,以每200 $\mu$ L培养基含1个细胞为准则,按计数结果将阳性细胞稀释,每孔200 $\mu$ L加入96孔板中。7至9天后镜检观察,标记出现单一细胞簇孔。进行间接ELISA法检测阳性细胞。检测方法如下:

[0129] (1) 蛋白包被:实验组分别用ELISA包被液稀释PVY抗原蛋白至1 $\mu$ g/mL,对照组加ELISA包被液,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST清洗2遍;

[0130] (2) 封闭:配制3%脱脂奶粉,380 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0131] (3) 加样:取原倍细胞上清,80 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0132] (4) 二抗:兔抗鼠IgG-HRP 1:1000,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗3遍;

[0133] (5) 显色:TMB显色液A液:B液=1:1,100 $\mu$ L/孔,室温反应20min;

[0134] (6) 终止:ELISA终止液,50 $\mu$ L/孔;

[0135] (7) 读值:酶标仪主波长450nm,副波长630nm测定结果;

[0136] (8) 选择稳定表达抗体的单克隆杂交瘤细胞,细胞扩大培养后,取细胞进行腹水生产,并冻存细胞。

[0137] 经过2次细胞亚克隆,仅挑选镜检单克隆和二克隆进行检测,获得4株阳性单克隆杂交瘤细胞株(表5),进行细胞扩大培养,取细胞进行腹水生产,并冻存细胞。

[0138] 表5. 亚克隆结果

	杂交瘤细胞编号	抗体编号	抗体类型	抗体亚类	链形
	4F1B2G11	PVY-2	IgG	IgG1	Kappa
[0139]	3G2F5A11	PVY-3	IgG	IgG1	Kappa
	4F1B3B8	PVY-4	IgG	IgG1	Kappa
	4B4D8C3	PVY-5	IgG	IgG1	Kappa

[0140] 实施例4、马铃薯病毒单克隆抗体制备

[0141] 一、腹水制备

[0142] 腹腔注射致敏剂液体石蜡0.5mL/只,7天后腹腔注射阳性杂交瘤细胞,每株细胞打一只小鼠。每只小鼠注射 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞,离心收集的细胞用 $1 \times$  PBS缓冲液重悬后进行注射。直至第8天起可观察到小鼠腹腔微隆,继续饲养至腹腔涨圆到行动不便时,用引流法多次收集腹水,离心后于-80 $^{\circ}$ C冻存。

[0143] 二、腹水纯化

[0144] (1) 取腹水,用PBS稀释并过滤(0.22 $\mu$ m)。

[0145] (2) 取过滤后的样品,通过Protein G柱进行蛋白纯化。步骤如下:

[0146] a) 用5倍柱体积的去离子水洗涤,去除空气和20%乙醇;

[0147] b) 5~10倍柱体积buffer平衡柱子,buffer:PB缓冲液;

[0148] c) 将样品以0.5mL/min的速度流穿Protein G柱;

[0149] d) 用上述buffer平衡柱子;

[0150] e) 用甘氨酸洗脱,并用Tris中和。

[0151] (3) 收集上述甘氨酸洗脱的样品,于4 $^{\circ}$ C透析(透析Buffer:PBS)过夜。

[0152] (4) 取透析后的样品,用超滤法(超滤管)浓缩,并用SDS-PAGE胶检测目的蛋白纯度。

- [0153] (5) 对纯度达到要求的抗体进行性能检测。
- [0154] 三、单克隆抗体检测
- [0155] A. 单克隆抗体性能检测
- [0156] (1) 蛋白包被:用ELISA包被液稀释PVY-CP、Y病毒研磨液、X病毒研磨液、健康组织研磨液,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST清洗2遍;
- [0157] (2) 封闭:配制3%脱脂奶粉,380 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;
- [0158] (3) 加样:取PVY单克隆抗体稀释至指定浓度,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;
- [0159] (4) 一抗:兔抗鼠IgG-HRP 1:1000,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗3遍;
- [0160] (5) 显色:TMB显色液A液:B液=1:1,100 $\mu$ L/孔,室温反应20min;
- [0161] (6) 终止:ELISA终止液,50 $\mu$ L/孔;
- [0162] (7) 读值:酶标仪主波长450nm,副波长630nm测定结果。
- [0163] B. 单克隆抗体特异性检测
- [0164] (1) 总蛋白提取:分别取0.1g植物组织,液氮研磨,加入250 $\mu$ L总蛋白提取液与5 $\mu$ L 50 $\times$ 蛋白酶抑制剂;
- [0165] (2) 13000rpm,4 $^{\circ}$ C离心15min,吸取上清液;
- [0166] (3) 上清液加入loading buffer后混匀,沸水煮10min,冷却5min,4 $^{\circ}$ C 13000rpm离心10min;
- [0167] (4) 配制10%SDS-PAGE分离胶和5%浓缩胶,加样后180V电泳至loading buffer跑出;
- [0168] (5) 电泳结束前将PVDF膜在甲醇中浸泡15s;
- [0169] (6) 电泳结束后,将胶在转膜液中浸泡15min,进行转膜。100V转膜1~1.5h;
- [0170] (7) 转好膜后用TBST清洗一次,用丽春红染色拍照,再用TBST清洗几次后,用TBST配制的5%脱脂奶粉进行封闭,室温封闭1h;
- [0171] (8) 封闭完后加入1:5000稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;
- [0172] (9) 一抗反应完全后,用TBST进行洗膜,4次,每次15min;
- [0173] (10) 加入1:5000稀释的二抗,室温孵育1h;
- [0174] (11) 二抗反应完全后用TBST洗膜,4次,每次10min;
- [0175] (12) 加入ECL显色液进行拍照。
- [0176] 采用Western Blot方法分别对PVY-2、PVY-3、PVY-4与PVY-5单克隆抗体进行特异性分析,均可以与感染PVY的马铃薯组培苗的蛋白提取液发生特异性免疫反应,不与感染PVX的马铃薯组培苗蛋白提取液发生特异性免疫反应,也不与健康的马铃薯组培苗蛋白提取液发生特异性免疫反应(图5),可以说明4株PVY单克隆抗体的特异性较好。
- [0177] C. 单克隆抗体配对检测
- [0178] (1) 蛋白包被:用ELISA包被液稀释PVY单克隆抗体至1 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST清洗2遍;
- [0179] (2) 封闭:配制3%脱脂奶粉,380 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;
- [0180] (3) 加样:PVY组织500倍稀释,阴性组织500倍稀释,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0181] (4) 一抗:将标生物素的PVY抗体稀释至1 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0182] (5) 二抗:Avidin-HRP 1:10000,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗3遍;

[0183] (6) 显色:TMB显色液A液:B液=1:1,100 $\mu$ L/孔,室温反应20min;

[0184] (7) 终止:ELISA终止液,50 $\mu$ L/孔;

[0185] (8) 读值:酶标仪主波长450nm,副波长630nm测定结果。

[0186] 当吸光值大于阴性对照2倍及以上,认为配对成功。根据DAS-ELISA结果(表6)显示,PVY单克隆抗体仅一对抗体配对成功,包被抗体为PVY-5时,检测抗体为PVY-2配对成功。

[0187] 表6.PVY单克隆抗体配对结果

包被抗体	PVY-2		PVY-3		PVY-4		PVY-5	
	+	-	+	-	+	-	+	-
一抗↓								
PVY-2-bio	1.2647	0.2352	0.314	0.2574	0.194	0.1324	1.8372*	0.1898
PVY-3-bio	0.3199	0.1996	0.2617	0.233	0.2082	0.2519	0.4684	0.3469
PVY-4-bio	0.3032	0.2064	0.2154	0.2008	0.1568	0.1966	0.4134	0.2033
PVY-5-bio	0.2171	0.2262	0.1824	0.2099	0.1594	0.2197	0.2441	0.2284

[0188] 注:\*为配对成功抗体

[0189] D. 单克隆抗体灵敏度检测

[0190] (1) 蛋白包被:用ELISA包被液稀释马铃薯Y病毒组培苗研磨液(1g/mL),1:10~1:163840倍梯度稀释,阴性对照组加ELISA包被液稀释健康马铃薯组织提取液,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST清洗2遍;

[0191] (2) 封闭:配制3%脱脂奶粉,380 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0192] (3) 加样:取PVY单克隆抗体稀释至指定浓度,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗2遍;

[0193] (4) 二抗:兔抗鼠IgG-HRP 1:1000,100 $\mu$ L/孔,室温孵育1h,PBST清洗3遍;

[0194] (5) 显色:TMB显色液A液:B液=1:1,100 $\mu$ L/孔,室温反应20min;

[0195] (6) 终止:ELISA终止液,50 $\mu$ L/孔;

[0196] (7) 读值:酶标仪主波长450nm,副波长630nm测定结果。

[0197] 结果如图6所示,用PVY进行包被,应用直接ELISA方法检测,PVY单克隆抗体灵敏度可以达到1:5120倍稀释。

[0198] 将单克隆抗体PVY-2和PVY-5送艾柏森生物科技有限公司进行测序,PVY-2重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,PVY-2轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;PVY-5重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,PVY-5轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0199] 将2株分泌单克隆抗体PVY-2、PVY-5的杂交瘤细胞株送中国典型培养物保藏中心保藏,保藏地址为中国武汉武汉大学,分别命名为4F1B2G11、4B4D8C3;4F1B2G11保藏日为2022年9月1日,保藏号为CCTCC NO:C2022281,分类命名为杂交瘤细胞株4F1B2G11;4B4D8C3

保藏日为2022年9月1日,保藏号为CCTCC NO:C2022282,分类命名为杂交瘤细胞株4B4D8C3。

[0201] 实施例5、PVY纳米模拟酶试纸条制备

[0202] 一、PVY单克隆抗体纳米模拟酶标记筛选

[0203] (1) 取所需用量的纳米酶溶液,加入纯化水,配制成0.5mg/mL浓度,超声1~2min (53kHz);

[0204] (2) 13000rpm,室温离心5~10min;

[0205] (3) 吸去上清,加入纯化水,配制成0.5mg/mL浓度,重悬后,超声1~2min;

[0206] (4) 13000rpm,室温离心5~10min,吸去上清;

[0207] (5) 称取10倍纳米酶质量的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),加入MES溶液(50mM,pH 6.0)混匀,配制成10mg/mL NHS溶液;称取10倍纳米酶质量的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),加入MES溶液(50mM,pH 6.0)混匀,配制成10mg/mL浓度EDC溶液,注意避光;

[0208] (6) 等体积吸取步骤5配好的两溶液加至步骤4洗过的纳米酶中,配制成0.5mg/mL浓度,重悬混匀,超声30~60s,共超声3~5次,在混合器上室温反应30~40min(注意避光);

[0209] (7) 13000rpm,室温离心5~10min,吸去上清;

[0210] (8) 加入MES溶液(50mM,pH 6.0),配制成0.5mg/mL浓度,震荡混匀,然后超声1~2min;13000rpm,室温离心5~10min,吸去上清;

[0211] (9) 取100 $\mu$ g的PVY单克隆抗体加入到MES溶液中(50mM,PH 8.0)混匀,配制成0.1mg/mL浓度的抗体溶液;

[0212] (10) 吸取步骤9中配好的抗体加至步骤8洗过的纳米酶中,配制成1mg/mL浓度的纳米酶溶液,重悬混匀,超声10~20s,共超声5~10次,2~8 $^{\circ}$ C混合器上反应14~18h;

[0213] (11) 将反应完的溶液放置到磁力架上,吸取澄清液体到新的离心管,用超微量蛋白检测仪检测澄清液体抗体标记效率。往离心管中加入Tris-buffer(50mM,pH 7.4),配制成0.5mg/mL纳米酶溶液,重悬混匀,超声10~20s,5~10次,室温反应30~40min;

[0214] (12) 将反应完的溶液放置到磁力架上,吸去上清液,加入5%BSA-PBS溶液,配制成1mg/mL纳米酶溶液,重悬,超声10~20s,5~10次,超声清洗仪温度控制在2~8 $^{\circ}$ C。重悬后,放在2~8 $^{\circ}$ C混合器上封闭2~4h;

[0215] (13) 磁吸附,弃上清,加入1%BSA-PBS处理液,配制成1mg/mL纳米酶溶液,重悬,超声10~20s,5~10次,超声清洗仪温度控制在2~8 $^{\circ}$ C。重悬后2~8 $^{\circ}$ C保存,贴签备用。

[0216] 二、结合垫、样品垫与吸水垫预处理

[0217] A、结合垫预处理

[0218] (1) 将玻璃纤维膜用仪器切割成宽为7mm规格的结合垫;

[0219] (2) 配置结合垫预处理液(1%Triton X-100,50mM硼酸钠,pH 8.0);

[0220] (3) 取适量切割好的结合垫放置于结合垫预处理盒子中,用移液枪吸取结合垫预处理液滴加在结合垫上,使其全部浸湿,浸泡25~35min;

[0221] (4) 镊子将浸泡好的结合垫夹至干燥网上,整齐排开,于40 $^{\circ}$ C烘箱干燥2h,至完全烘干;

[0222] (5) 将烘干的结合垫放至密封袋中,放入适量干燥剂,写好标签,保存于除湿柜中备用。

[0223] B、样品垫预处理

- [0224] (1) 将玻璃纤维膜用仪器切割成宽为11mm规格的样品垫；
- [0225] (2) 配置样品垫预处理液(10mM PBS,1%Tween 20,0.1g/L PVP K30,pH 7.4)；
- [0226] (3) 取适量切割好的样品垫放置于样品垫预处理盒子中,用移液枪吸取样品垫预处理液滴加在样品垫上,使其全部浸湿,浸泡25~35min；
- [0227] (4) 用镊子将浸泡好的样品垫夹至干燥网上,整齐排开,于40℃烘箱干燥2.5h,至完全烘干；
- [0228] (5) 将烘干的样品垫放至密封袋中,放入适量干燥剂,写好标签,保存于除湿柜中备用。
- [0229] C、吸水垫处理
- [0230] (1) 将吸水纸用仪器切割成宽为22mm规格的吸水垫；
- [0231] (2) 将切割好的吸水垫放置干燥网上,整齐排开,于40℃烘箱干燥2.5h；
- [0232] (3) 将干燥好的吸水垫放至密封袋中,放入适量干燥剂,写好标签,保存于除湿柜中备用。
- [0233] D、NC膜划线操作
- [0234] (1) 取一定量PVY抗体,加入包被缓冲溶液,稀释至浓度为1.5mg/mL的包被抗体溶液；
- [0235] (2) 取一定量羊抗鼠IgG,加入包被缓冲溶液,稀释至浓度为1mg/mL的羊抗鼠IgG溶液；
- [0236] (3) 打开划线喷膜仪,执行清洗程序,清洗完成后将泵1的导管放入稀释后的PVY(检测线)抗体溶液中,将泵3的导管放入稀释后的羊抗鼠IgG(质控线)溶液中；
- [0237] (4) 将贴好NC膜的PVC背衬板放置在划线喷膜仪正确位置,按照1 $\mu$ L/cm的划膜速度,执行划线程序；
- [0238] (5) 划线完成后执行清洗程序并关机,将PVC背衬板做好标记,放入烘箱干燥1h,温度37℃。
- [0239] E、结合垫喷金操作
- [0240] (1) 取标记了PVY抗体的纳米酶,放入离心管,用磁力架吸附,弃去溶液,加入一定量纳米酶标记抗体稀释液(50mM Tris,10%海藻糖,5%BSA,1%Triton X-100,1%Tween 20,0.05%proclin,1% PVP K30,pH 8.5),稀释至纳米酶浓度为1mg/mL；
- [0241] (2) 将稀释好的纳米酶标记抗体溶液置于超声仪,超声5~10次,每次10~20秒；
- [0242] (3) 打开划线喷膜仪,执行清洗程序,清洗完成后将泵2的导管放入超声后的纳米酶标记抗体溶液中；
- [0243] (4) 将经过预处理的结合垫放置在划线喷膜仪正确位置,按照5 $\mu$ L/cm的喷膜速度,执行喷垫程序；
- [0244] (5) 喷垫完成后执行清洗程序并关机,将结合垫做好标记后,放入烘箱干燥1h,温度37℃。
- [0245] 三、PVY纳米模拟酶试纸条组装
- [0246] (1) 打开贴板机,将PVC板往里贴紧贴板机工作板位置,按启动吸气固定PVC板,PVC板尽量放在中间位置,以免掀开离型纸时处于活动状态；
- [0247] (2) 按照选定的组合进行试纸条组装；

[0248] (3) 按启动键,将干燥后的NC膜、结合垫,吸水垫、预处理好的样品垫,按照吸水垫压NC膜2mm,结合垫压NC膜2mm,样品垫压结合垫2mm的设定,贴在背衬板上;

[0249] (4) 贴板程序结束后,关闭贴板机。将试剂条大板放置在湿度 $\leq 30\%$ 避光环境下储存备用;

[0250] (5) 将贴好的PVC板放置在斩切机上,打开电源和开关,抬起翻转架,调整置物板的位置,将成品大板卡住,成品大板左端对齐刀片处,放下翻转架;

[0251] (6) 设定试纸条斩切宽度为0.4cm,点击开始进行斩切;

[0252] (7) 将切好的试纸条装入试剂卡壳中;打开自动压壳机电源,将装好壳的试剂条放在压壳机传送带上,点击“运行”按钮,机器运行,直至所有试剂卡壳压壳结束,关闭压壳机;

[0253] (8) 将试纸条装入放有干燥剂的热封袋中进行热封;

[0254] (9) 热封结束后,做好标记,将试纸条保存在湿度不高于30%的除湿柜中。

#### [0255] 四、PVY纳米模拟酶试纸条性能检测

##### [0256] A、可用PVY纳米模拟酶试纸条筛选

[0257] (1) 将感染PVY的组培苗用液氮研磨成粉,加入提取缓冲液,涡旋混匀,室温离心4000g,2min;

[0258] (2) 将按照组装好的试纸条分别滴加阳性对照与空白对照;

[0259] (3) 将样品滴加至样品孔后,室温计时15min;

[0260] (4) 观察试纸条检测是否出现假阳性,并记录未出现假阳性试纸条编号。

[0261] 制备PVY纳米模拟酶试纸条根据DAS-ELISA配对结果进行选择抗体。

[0262] PVY单克隆抗体仅有一对配对成功,为PVY-2与PVY-5,分别对PVY-2与PVY-5进行标记,PVY-5与PVY-2进行包被,以PVY-2作为标记抗体,PVY-5作为包被抗体制备的PVY纳米模拟酶试纸条滴入阳性样品后,C线(质控线)与T线(检测线)同时出现条带,能够检测到阳性结果,但加入阴性对照后,C线与T线也同时出现条带,表现出假阳性。以PVY-5作为标记抗体,PVY-2作为包被抗体制备的PVY纳米模拟酶试纸条滴入阳性样品后,C线与T线同时出现条带,能够检测到阳性结果,加入阴性对照后,仅出现C线,为阴性结果。

[0263] 最终,选择以PVY-5作为标记抗体,PVY-2作为包被抗体制备的PVY纳米模拟酶试纸条。

##### [0264] B、PVY纳米模拟酶试纸条特异性检测

[0265] (1) 将未出现假阳性试纸条进行特异性检测,

[0266] (2) 分别将感染PVA、PVM、PVS、PVY、PVX与PLRV的植株和健康植株用液氮研磨成粉,加入提取缓冲液,涡旋混匀;

[0267] (3) 室温离心4000g,2min,取上清液;

[0268] (4) 将样品滴加至样品孔后,室温计时15min,观察并记录实验结果。

[0269] 结果如图7所示,将PVA、PVM、PVS、PVX、PLRV和健康的植株汁液滴入到试纸条中,试纸条仅出现C线,为阴性结果,说明试纸条不与PVA、PVM、PVS、PVX、PLRV和健康的植株发生免疫反应,将PVY植株汁液滴入试纸条中,C线与T线均出现,为阳性结果,说明试纸条与PVY发生免疫反应,具有较好的特异性。

##### [0270] C、PVY纳米模拟酶试纸条灵敏度检测

[0271] (1) 将感染PVY的组培苗用液氮研磨成粉,按照0.1g植物组织加入1ml提取缓冲液,

涡旋混匀；

[0272] (2) 室温离心4000g,2min；

[0273] (3) 将上清液按照1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>梯度进行稀释；

[0274] (4) 将稀释后的样品涡旋混匀后滴加至样品孔，室温计时15min，观察并记录实验结果。

[0275] 结果如图8所示，PVY纳米模拟酶试纸条能够在1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>稀释后，同时出现C线与T线，检测结果为阳性，能够检测出PVY，当稀释倍数为1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>稀释后，仅出现C线，未出现T线，结果为阴性，不能检测到PVY。

[0276] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例，本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换，均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。



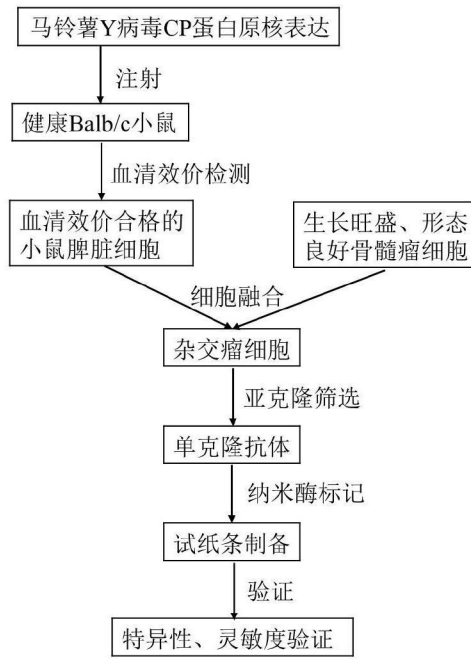


图1

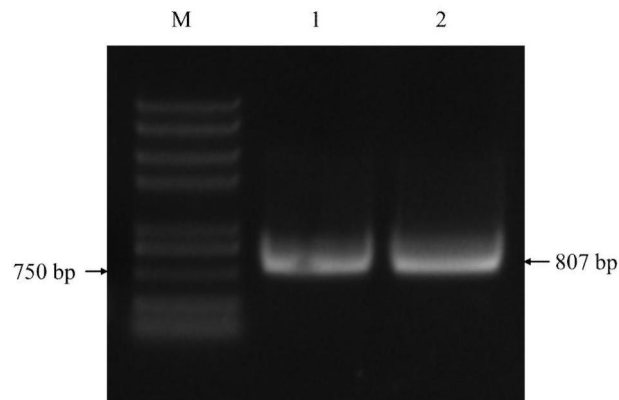


图2

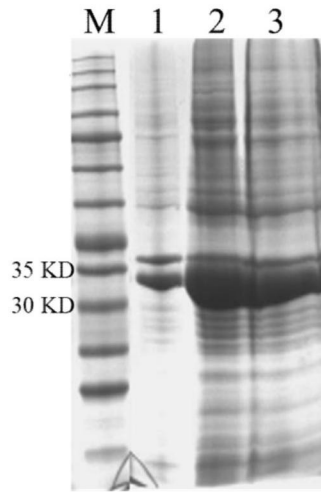


图3

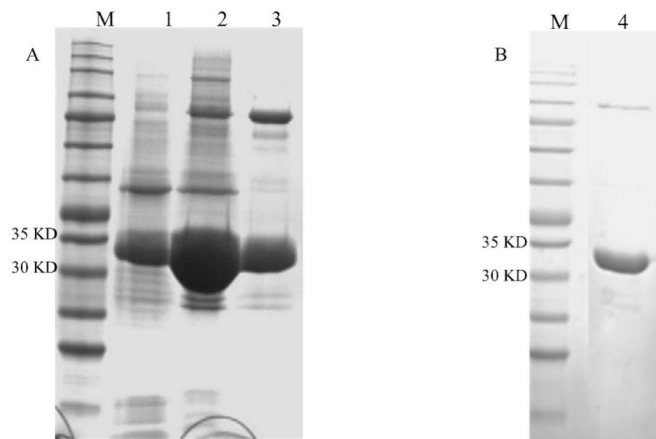


图4

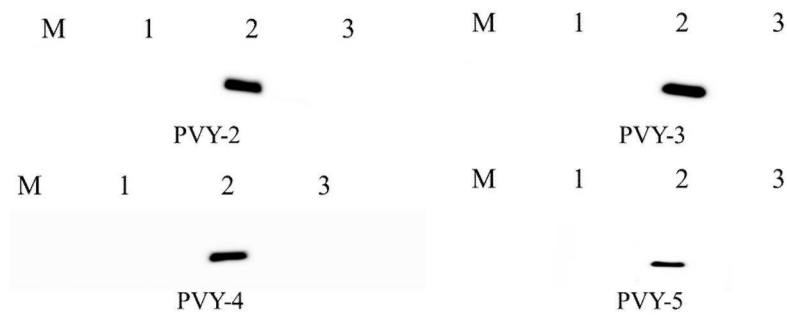
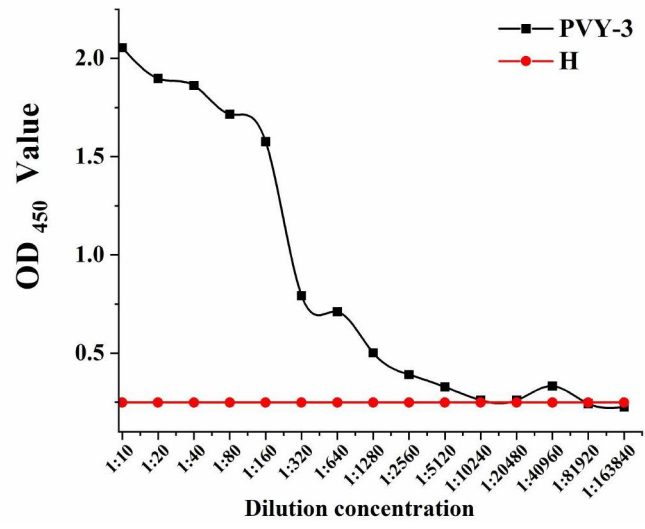
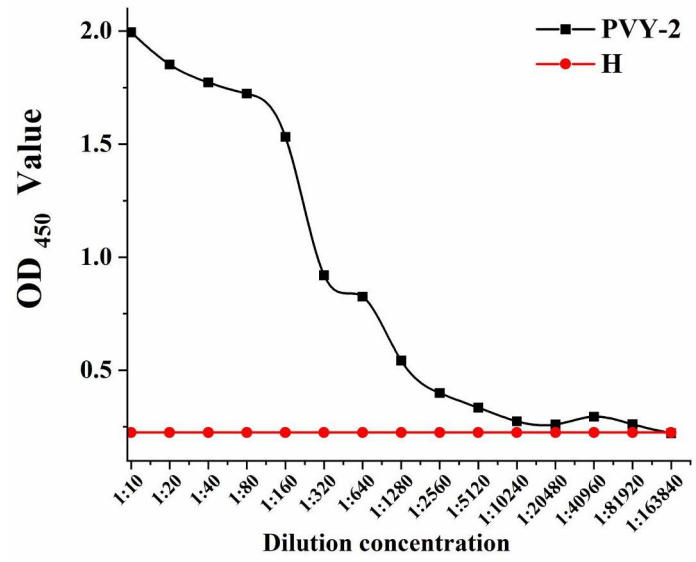


图5



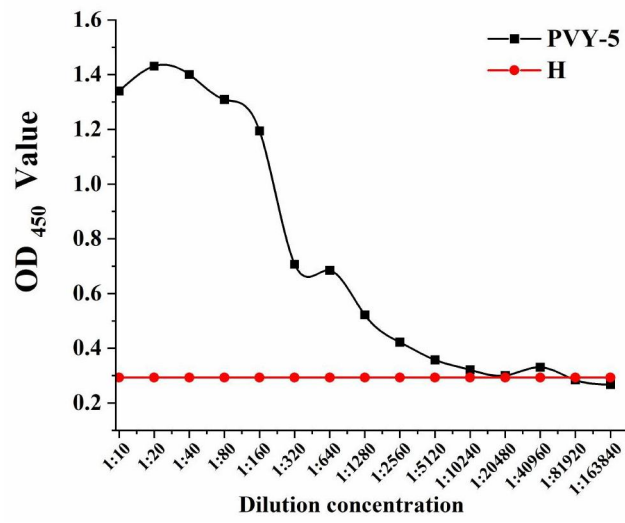
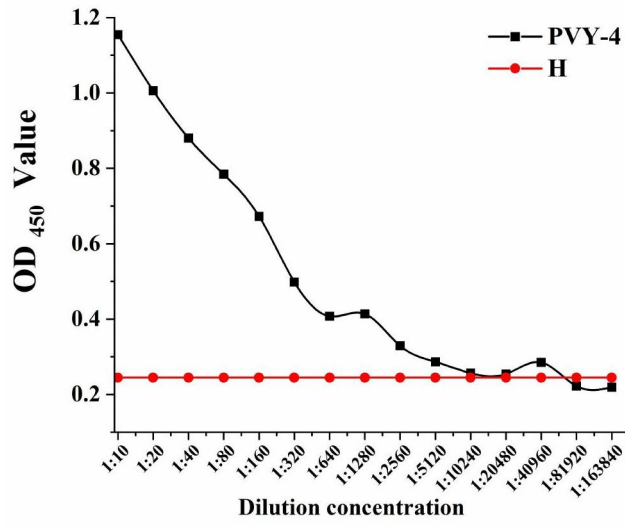


图6

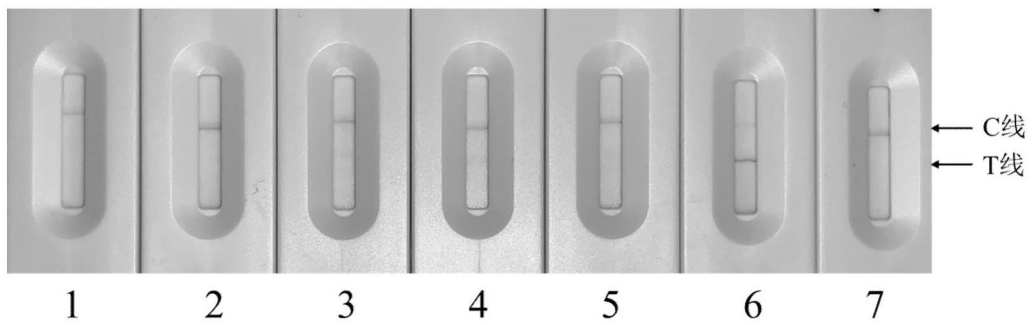


图7

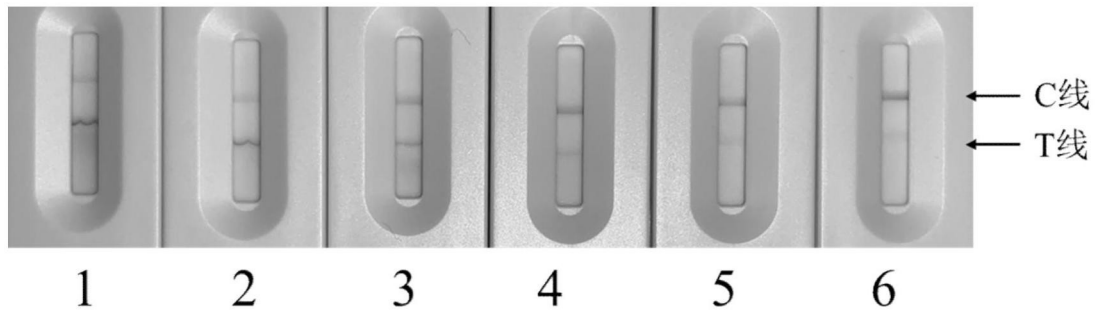


图8