



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101571540 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 200910085946. 1

(22) 申请日 2009. 06. 01

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 3110 2009. 05. 26

(73) 专利权人 北京望尔生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信息  
产业基地高新四街 8 号

(72) 发明人 万宇平 高东微 王雅静 马孝斌

刘中勇 蔡克周 余厚美 陈永红

李明

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101329339 A, 2008. 12. 24, 摘要、权利要

求书、说明书第 3-15 页.

US 2005233390 A1, 2005. 10. 20, 说明书第 1  
页、权利要求书.

WO 2006009880 A2, 2006. 01. 26, 全文.

吴胜昔. 抗猪 SIgA、IgM 单克隆抗体及其酶标  
记抗体的研制. 《中国优秀硕士学位论文全文数  
据库》. 2004, (第 3 期), 44-52.

审查员 石剑平

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒及其  
应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测猪免疫球蛋白 G 的酶  
联免疫试剂盒,它含有:包被有包被原的酶标板,  
酶标记物,猪免疫球蛋白 G 特异性抗体工作液(当  
酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或  
酶标板上包被抗体且酶标记物为酶标记抗原时  
含有),猪免疫球蛋白 G 标准品溶液,底物显色液,  
终止液,浓缩洗涤液,浓缩复溶液。本发明还公开  
了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测猪免疫球  
蛋白 G 的方法,它包括:首先进行样品前处理,然  
后用试剂盒进行检测,最后分析检测结果。本发  
明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测猪血浆蛋  
白粉等样品中猪免疫球蛋白 G 的含量,其操作  
简便、费用低廉能够现场监控且适合大量样  
本的筛查。

CN 101571540 B

1. 一种检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒,其特征在于它含有:

- (1) 包被有包被原的酶标板;
- (2) 酶标记物;
- (3) 猪免疫球蛋白 G 标准品溶液;
- (4) 底物显色液;
- (5) 终止液;
- (6) 浓缩洗涤液;
- (7) 浓缩复溶液,

所述包被原为猪免疫球蛋白 G 抗原、抗体或抗抗体,所述酶标记物为酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原、酶标记猪免疫球蛋白 G 抗体或酶标记抗抗体,

当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原时还含有猪免疫球蛋白 G 特异性抗体工作液,

所述猪免疫球蛋白 G 抗体为单克隆抗体,由杂交瘤细胞株 C-4-2CGMCCNo. 3110 分泌产生。

2. 如权利要求书 1 所述的试剂盒,其特征在于所用包被缓冲液为 pH 值为 7.2,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,所用封闭液为含有 0.5% 脱脂奶粉、0.2% 蔗糖、pH 值为 7.2,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,底物显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲,底物显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,终止液为 1 ~ 2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时,底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 1 ~ 2mol/L 氢氧化钠。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:浓缩洗涤液为 0.5% ~ 1.0% 吐温 20 和 0.1-0.3% 硫柳汞防腐剂、pH 为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液;浓缩复溶液为含有 5-8% 卵清蛋白, pH 值为 6.4-6.7 的磷酸盐缓冲液,猪免疫球蛋白 G 标准品溶液的浓度分别为 0mg/L, 0.2mg/L, 0.6mg/L, 1.8mg/L, 5.4mg/L, 16.2mg/L, 所述百分比为重量百分比。

5. 权利要求 1 ~ 4 任一项所述的试剂盒在检测猪免疫球蛋白 G 含量的应用。

6. 一种检测样品中猪免疫球蛋白 G 含量的方法,包括步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 用权利要求 1 ~ 4 任一项所述的试剂盒进行检测;
- (3) 分析检测结果。

## 检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒,其特别适于猪血浆蛋白粉中猪免疫球蛋白 G 的测定。

### 技术背景

[0002] 血浆蛋白粉作为一种新型蛋白饲料,具有营养全面、易消化吸收、适口性好、富含免疫球蛋白等特点,在仔猪饲料中广泛添加。按照其血液原料来源和加工方法主要有以下几类:猪血浆蛋白粉(spray-dried plasma protein, SDPP)、低灰分猪血浆蛋白粉(LAPP)、母猪血浆蛋白粉(SDSPP)和牛血浆蛋白粉(SDBP),作用效果大体相同,其中以 SDPP 较多且最为常用,因此一般情况下血浆蛋白粉多指 SDPP。

[0003] 大量研究表明,SDPP 对仔猪的免疫保健作用主要是由于其富含的大量免疫球蛋白。早期断奶仔猪免疫系统尚未发育成熟,机体抵抗能力低,SDPP 则可以提高其抵抗能力,加强免疫保健。因此免疫球蛋白含量是判定血浆蛋白粉质量和品质的重要指标。因此,一种能够检测 SDPP 中猪免疫球蛋白 G 含量的方法显得特别重要。

[0004] 目前主要采用琼脂双向或单向免疫扩散法,此外还有免疫电泳法、高压液相色谱法等等来测定猪免疫球蛋白 G 含量。由于上述方法所用技术难以系统化和标准化、仪器设备复杂和操作繁琐等因素,不适合现场查验和大量样本筛查。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对上述不足提供一种用于猪免疫球蛋白 G 含量测定的酶联免疫试剂盒,其操作简单适合现场大批量样品的筛选。

[0006] 本发明试剂盒,它含有:

[0007] (1) 包被有包被原的酶标板(包被原为抗原、抗体或抗抗体);

[0008] (2) 酶标记物(为酶标记抗原、酶标记抗体或酶标记抗抗体);

[0009] (3) 猪免疫球蛋白 G 特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗抗体或酶标板上包被抗抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有);

[0010] (4) 猪免疫球蛋白 G 标准品溶液;

[0011] (5) 底物显色液;

[0012] (6) 终止液;

[0013] (7) 浓缩洗涤液;

[0014] (8) 浓缩复溶液。

[0015] 本发明所提供的检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒,包括猪免疫球蛋白 G 特异性抗体工作液及预包被包被原的酶标板和酶标记物工作液;所述酶标记物为酶标记的抗抗体,酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原或酶标记猪免疫球蛋白 G 特异性抗体;所述抗抗体为羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体。

[0016] 所述酶标记物的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化

物酶；酶标记的羊抗鼠抗抗体或羊抗兔抗抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与抗抗体进行偶联得到的；酶标记抗原是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与猪免疫球蛋白 G 偶联得到的；酶标记特异性抗体是采用戊二醛法或过碘酸钠法将标记酶与特异性抗体偶联得到的，辣根过氧化物酶可采用现有技术中的多种方法将其与抗抗体进行偶联，如戊二醛法，过碘酸钠法等，本发明经过长期的劳动创造将过碘酸钠法进行了改良，使其省时、降低辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗抗体的浓度比率，节省了原材料。

[0017] 所述猪免疫球蛋白 G 特异性抗体可为猪免疫球蛋白 G 单克隆抗体或猪免疫球蛋白 G 多克隆抗体；它们均是用猪免疫球蛋白 G 作为免疫原得到的；所述猪免疫球蛋白 G 多克隆抗体可为鼠源、马源、羊源、兔源或豚鼠源抗体，所述猪免疫球蛋白 G 单克隆抗体优选为猪免疫球蛋白 G 鼠单克隆抗体，所述猪免疫球蛋白 G 多克隆抗体优选为猪免疫球蛋白 G 兔多克隆抗体。

[0018] 所述猪免疫球蛋白 G 单克隆抗体优选为猪免疫球蛋白 G 的单克隆杂交瘤细胞株 C-4-2CGMCC No. 3110 分泌的单克隆抗体。

[0019] 所述猪免疫球蛋白 G 单克隆杂交瘤细胞株 C-4-2CGMCC No. 3110 (分类命名：对猪 IgG 单克隆抗体杂交瘤细胞株) 已于 2009 年 05 月 26 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址：北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101)。

[0020] 以上抗体均可以用猪免疫球蛋白 G 作为免疫原制备。

[0021] 为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括猪免疫球蛋白 G 标准品溶液、显色剂、终止液、浓缩洗涤液、浓缩复溶液。

[0022] 所述浓缩洗涤液优选为 0.5%~1.0%吐温 20 和 0.1-0.3%硫柳汞防腐剂、pH 为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量百分比。

[0023] 当标记酶为辣根过氧化物酶时，显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺，终止液为 1~2mol/L 的硫酸或盐酸缓冲液；当标记酶为碱性磷酸酯酶时，显色液为对硝基磷酸盐缓冲液、终止液为 1~2mol/L 氢氧化钠溶液。

[0024] 所述浓缩复溶液优选为含有 5-8%卵清蛋白，pH 值为 6.4-6.7 的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量百分比。

[0025] 其中酶标板在制备过程中所用的包被缓冲液优选为 pH 值为 7.2, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液，所用封闭液为含有 0.5%脱脂奶粉、0.2%蔗糖、pH 值为 7.2, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量百分比。

[0026] 本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将包被原稀释成 0.1~0.2 $\mu$ g/ml，每孔加入 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 2 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 150~200 $\mu$ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 温育 1~2h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0027] 本发明中抗体的合成过程为：

[0028] 1. 猪免疫球蛋白 G 抗体的制备

[0029] 猪免疫球蛋白 G 鼠单克隆抗体的制备

[0030] 动物免疫程序：采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物，以猪免疫球蛋白 G 为免疫原，得到

较好的多抗血清后,取出脾脏进行细胞融合。

[0031] 细胞融合与克隆化:取免疫 Balb/c 小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,筛选细胞株,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0032] 猪免疫球蛋白 G 兔多克隆抗体的制备

[0033] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以猪免疫球蛋白 G 为免疫原对新西兰大白兔进行免疫,多次免疫后测定血清抗体效价得到多克隆抗体。

[0034] 本发明抗抗体的制备过程:羊抗鼠抗抗体是以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;羊抗兔抗抗体是以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病菌体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0035] 本发明所述试剂盒中猪免疫球蛋白 G 标准品溶液:标准品溶液 6 瓶,0mg/L,0.2mg/L,0.6mg/L,1.8mg/L,5.4mg/L,16.2mg/L。

[0036] 本发明的检测原理为:

[0037] 当在微孔条上预包被猪免疫球蛋白 G 抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入猪免疫球蛋白 G 特异性抗体溶液,样本中的猪免疫球蛋白 G 与酶标板上包被的猪免疫球蛋白 G 抗原竞争猪免疫球蛋白 G 特异性抗体,加入酶标记抗抗体进行放大作用,用显色液显色,样本吸光值与猪免疫球蛋白 G 的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中猪免疫球蛋白 G 的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的猪免疫球蛋白 G 标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中猪免疫球蛋白 G 的浓度范围。

[0038] 当在微孔条上预包被猪免疫球蛋白 G 特异性抗体时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原溶液,样本中含有的猪免疫球蛋白 G 与酶标记抗原竞争包被在酶标板上的猪免疫球蛋白 G 特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与猪免疫球蛋白 G 的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中猪免疫球蛋白 G 的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的猪免疫球蛋白 G 标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中猪免疫球蛋白 G 的浓度范围。

[0039] 当在微孔条上预包被猪免疫球蛋白 G 抗原时,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入酶标记猪免疫球蛋白 G 特异性抗体溶液,样本中的猪免疫球蛋白 G 与酶标板上包被的猪免疫球蛋白 G 抗原竞争猪免疫球蛋白 G 特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与猪免疫球蛋白 G 的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中猪免疫球蛋白 G 的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的猪免疫球蛋白 G 标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中猪免疫球蛋白 G 的浓度范围。

[0040] 当在微孔条上预包被抗抗体时,加入猪免疫球蛋白 G 抗体孵育后,加入样本溶液或标准品溶液后,再加入猪免疫球蛋白 G 抗原溶液,样本中猪免疫球蛋白 G 与酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原竞争猪免疫球蛋白 G 特异性抗体,用显色液显色,样本吸光值与猪免疫球蛋白 G 的含量呈负相关,与标准曲线比较即可得出样本中猪免疫球蛋白 G 的含量。同时根据酶标板上颜色的深浅,与系列浓度的猪免疫球蛋白 G 标准品溶液颜色的比较可粗略判断样品中猪免疫球蛋白 G 的浓度范围。

[0041] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测猪免疫球蛋白 G 的方法,它包括步骤:

[0042] (1) 样品前处理;

[0043] (2) 用试剂盒进行检测；

[0044] (3) 分析检测结果。

[0045] 样品的前处理主要是为了从样品中获得猪免疫球蛋白 G 溶液,从而用于后续的检测。下面是样品的前处理方法：

[0046] 称取待测样品 20mg,溶于 40mL 去离子水中,使最终溶液浓度为 0.5mg/mL,溶解后振荡混匀,再将其与已稀释好的样本复溶液按照 1 : 49 的比例充分混匀备用。取 50  $\mu$  l 用于分析。

[0047] 本发明中用试剂盒检测时:当包被原为猪免疫球蛋白 G 抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入抗体,温育后洗涤拍干,再加入酶标抗抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为猪免疫球蛋白 G 抗原时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记抗体,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为猪免疫球蛋白 G 特异性抗体时,向酶标板微孔中加入标准品溶液或样本溶液再加入酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值;当包被原为抗抗体时,向酶标板微孔中加入猪免疫球蛋白 G 抗体,温育后洗涤拍干,再加入标准品溶液或样品溶液后加入酶标记猪免疫球蛋白 G 抗原,温育后洗涤拍干,显色、终止,用酶标仪测定吸光度值。

[0048] 本发明中检测结果分析过程为:用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准溶液 (0 标准) 的吸光度值 ( $B_0$ ) 再乘以 100%,即百分吸光度值。计算公式为:

[0049] 百分吸光度值 (%) =  $(B/B_0) \times 100\%$

[0050] 以猪免疫球蛋白 G 标准品溶液的浓度 (mg/L) 的半对数值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度则可从标准曲线上读出样本中猪免疫球蛋白 G 的含量。

[0051] 本发明中检测结果的分析也可以采用回归方程法,计算出样品溶液浓度。

[0052] 本发明中检测结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析,整个检测过程只需 45 分钟可以完成。

[0053] 本发明检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒主要采用间接竞争 ELISA 方法定性或定量检测样品中猪免疫球蛋白 G 的含量;对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品;采用高特异性的猪免疫球蛋白 G 单克隆抗体,主要试剂以工作液的形式提供,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒,结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。本发明的试剂盒在猪免疫球蛋白 G 的检测中发挥重要作用。

## 附图说明

[0054] 图 1:猪免疫球蛋白 G 为包被原、酶标抗抗体为酶标记物的试剂盒的标准曲线图。

## 具体实施方式

[0055] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本

发明,而不用来限制本发明的范围。

[0056] 实施例 1 试剂盒组分的制备

[0057] 1. 单克隆抗体的制备

[0058] a. 动物免疫

[0059] 将免疫原注入到 Balb/c 小鼠体内,免疫剂量为  $100 \mu\text{g}$ /只,使其产生多克隆抗体血清。

[0060] b. 细胞融合和克隆化

[0061] 小鼠血清测定结果较高后,取其脾细胞,按 9 : 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争 ELISA 测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0062] 经筛选得到猪免疫球蛋白 G 的单克隆杂交瘤细胞株 C-4-2CGMCC No. 3110。猪免疫球蛋白 G 的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量地产生猪免疫球蛋白 G 特异性抗体,且该抗体特异性是针对猪免疫球蛋白 G 的,灵敏度能达到  $0.2\text{mg/L}$ 。

[0063] c. 细胞冻存和复苏

[0064] 将猪免疫球蛋白 G 的单克隆杂交瘤细胞株用冻存液制成  $1 \times 10^6$  个 /ml 的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入  $37^\circ\text{C}$  水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0065] d. 单克隆抗体的生产与纯化

[0066] 将 Balb/c 小鼠腹腔注入灭菌石蜡油  $0.5\text{ml}$ /只,7 天后腹腔注射猪免疫球蛋白 G 的单克隆杂交瘤细胞株  $5 \times 10^7$  个 /只,7 天后采集腹水。用辛酸 - 饱和硫酸铵法进行腹水纯化,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

[0067] 2. 多克隆抗体的制备

[0068] 采用新西兰大白兔作为免疫动物,以猪免疫球蛋白 G 为免疫原,免疫剂量为  $1.5\text{mg/kg}$ ,首免时将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混合制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 3 ~ 4 周取相同剂量免疫原加等量弗氏不完全佐剂混合乳化,加强免疫一次,共免疫 5 次,最后一次不加佐剂。最后一次免疫 10 天后采血,测定血清抗体效价,心脏采血,用硫酸铵分级沉淀得到纯化的多克隆抗体。

[0069] 3. 羊抗鼠抗抗体的制备过程:以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体;羊抗兔抗抗体的制备:以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗兔抗抗体。

[0070] 4. 酶标板的制备

[0071] 用包被缓冲液将猪免疫球蛋白 G 抗原、抗体或抗抗体稀释成  $0.1-0.2 \mu\text{g/ml}$ ,每孔加入  $100 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 2h 或  $4^\circ\text{C}$  过夜,倾去包被液,用稀释 20 倍的浓缩洗涤液洗涤 2 次,每次 30 秒,拍干,然后再每孔中加入  $200 \mu\text{l}$  封闭液,  $37^\circ\text{C}$  温育 2h,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0072] 5. 酶标记羊抗鼠抗抗体的制备

[0073] 将抗抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 采用改良后的过碘酸钠法进行偶联。传统的过碘酸钠法要求反应体系中酶与抗抗体的摩尔浓度比为 4 : 1;由于辣根过氧化物酶在强氧化的作用下产生许多与抗抗体结合的位点,这样活化的辣根过氧化物酶分子充当了连接各

分子的桥梁,降低了酶标记物的酶活性,使制备的偶联物中混有许多聚合物,为了解决这个问题,我们将传统的方法进行了改良,即:

[0074] 1) 省去了氨基的封闭过程,因为能产生自身氨基连接的氨基实际很少。

[0075] 2) 降低了辣根过氧化物酶:抗体的摩尔浓度比率至 2:1,改良后的方法比传统的方法简便,对酶的活性的损失减少。

[0076] 实施例 2 检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒的组建

[0077] 组建检测猪免疫球蛋白 G 的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0078] (1) 包被猪免疫球蛋白 G 偶联抗原的酶标板;

[0079] (2) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0080] (3) 猪免疫球蛋白 G 单克隆抗体工作液;

[0081] (4) 猪免疫球蛋白 G 标准品溶液 6 瓶,浓度分别为 0mg/L、0.2mg/L、0.6mg/L、1.8mg/L、5.4mg/L、16.2mg/L;

[0082] (5) 底物显色液由 A 液和 B 液组成,底物显色液 A 液为过氧化脲,底物显色液 B 液四甲基联苯胺;

[0083] (6) 终止液为 2mol/L 盐酸;

[0084] (7) 浓缩洗涤液为 0.5%~1.0%吐温 20 和 0.1-0.3%硫柳汞防腐剂、pH 为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0085] (8) 浓缩复溶液为含有 5-8%卵清蛋白,pH 值为 6.4-6.7 的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量百分比。

[0086] 实施例 3 样品中猪免疫球蛋白 G 的检测

[0087] 1. 样品前处理

[0088] 称取待测样品 20mg,溶于 40mL 去离子水中,使最终溶液浓度为 0.5mg/mL,溶解后振荡混匀,再将其与已稀释好的样本复溶液按照 1:49 的比例充分混匀备用。取 50 $\mu$ l 用于分析。

[0089] 2. 用试剂盒检测

[0090] 向包被有猪免疫球蛋白 G 抗原的酶标板微孔中加入猪免疫球蛋白 G 标准品溶液或样品溶液 50 $\mu$ l,再加入猪免疫球蛋白 G 单克隆抗体工作液 50 $\mu$ l,随即加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体工作液 50 $\mu$ l,用盖板模封板,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 30min,倒出孔内液体,每孔加入 250 $\mu$ l 洗涤液,30s 后倒出孔内液体,如此重复操作共洗板 5 次,用吸水纸拍干,每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲,底物显色液 B 液四甲基联苯胺 (TMB),轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温箱避光显色 15min,每孔加入 2mol/L 终止液盐酸 50 $\mu$ l,轻轻振荡混匀,用酶标仪波长设定在 450nm 处,测定每孔吸光度值 (OD 值)。

[0091] 3. 检测结果分析

[0092] 用所获得的每个浓度的标准品溶液的吸光度平均值 (B) 除以第一个标准品溶液 (0 标准) 的吸光度值 (B<sub>0</sub>) 再乘以 100%,得到百分吸光度值。以猪免疫球蛋白 G 标准品浓度 (mg/L) 的半对数值为 X 轴,百分吸光度值为 Y 轴,绘制标准曲线图。用同样的办法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出猪免疫球蛋白 G 的含量。

[0093] 实验例 1 标准品精密度试验:

[0094] 分别从三个不同的时间段制备的酶标板中各抽出一批酶标板,每批各抽取 10 个试剂盒,每板各抽出 20 个微孔,测定 1.8mg/L 标准溶液的吸光度值,计算变异系数。

[0095] 表 1 标准可重复性试验 (CV%)

酶标板编号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0096]	CV% 1批	3.9	9.3	4.5	4.1	3.4	5.5	3.1	7.7	5.8	6.4
	2批	5.3	6.0	3.6	4.5	7.2	8.0	2.5	3.5	5.6	7.2
	3批	3.3	4.9	8.2	7.6	3.3	4.6	6.0	3.7	4.2	6.3

[0097] 通过上述试验结果可以得出,每批试剂盒各 10 次标准品变异系数在 2.5% -9.3% 之间,符合农医发【2005】17 号文件关于精密度的规定。

[0098] 实验例 2 样本精密度和准确度试验

[0099] 1. 样品精密度试验:

[0100] 向不含猪免疫球蛋白 G 的阴性猪血浆蛋白粉中添加猪免疫球蛋白 G 标准品,使猪免疫球蛋白 G 在猪血浆蛋白粉中的含量为 30% (30mg/g),分别取三个不同批次的试剂盒各三个,每个浓度重复 5 次,分别计算变异系数,结果见表 2。

[0101] 表 2 猪血浆蛋白粉样本可重复性试验

[0102]

批号	实测值 (%)					CV%
1批	28.6	29.8	34.7	31.5	35.8	9.7
	30.5	28.1	32.7	27.0	30.0	7.5
	29.4	30.4	31.8	26.9	27.4	7.0
2批	32.4	30.6	35.7	34.5	32.7	5.9
	28.0	27.4	32.6	33.7	30.9	9.1
	32.0	28.5	31.9	30.0	26.7	7.6
3批	29.8	27.4	32.7	33.1	34.5	9.1
	32.0	28.6	30.5	25.7	28.3	8.2
	31.5	30.7	32.6	27.4	28.5	7.1

[0103] 结果表明猪血浆蛋白粉样本的变异系数均在 5.9% -9.7% 之间,符合了《农业部文件》农医发【2005】17 号附件 2 试剂盒备案参考评判标准中第四点精密度标准。

[0104] b. 样本准确度试验

[0105] 分别向不含猪免疫球蛋白 G 的阴性猪血浆蛋白粉样本中添加猪免疫球蛋白 G 标准品,使猪免疫球蛋白 G 在样本中的终浓度为分别为 20mg/g、40mg/g 和 80mg/g,分别对样本进行回收试验,每个浓度做四个平行,分别计算准确度。根据公式计算准确度。结果如表 4 所示。结果表明,试验结果准确度在 86.5% -116.4% 之间。

实际检测值 (%)

$$[0106] \quad \text{准确度 (\%)} = \frac{\text{实际检测值 (\%)}}{\text{添加样本浓度 (\%)}} \times 100\%$$

[0107] 表 3、样本添加回收试验结果

样本		阳性猪血浆蛋白粉 (mg/g)		
添加水平 (%)		20	40	80
[0108] 实测值%	1	101.5	86.5	94.5
	2	98.6	105.7	87.7
	3	105.7	112.4	102.6
	4	90.2	116.4	96.3
平均值%		99.0	105.3	95.3

[0109] 实验例 3 交叉反应率试验：

[0110] 选择与猪免疫球蛋白 G 有类似功能的 2 种药物测定交叉反应率, 通过各种药物的标准曲线分别得到其 50% 抑制浓度。用下式计算试剂盒对其它药物的交叉反应率。交叉反应率越大, 那么此试剂盒对猪免疫球蛋白 G 的检测的特异性就越好。

[0111] 交叉反应率 (%) = (引起 50% 抑制猪免疫球蛋白 G 的浓度 / 引起 50% 抑制的类似物浓度) × 100%

[0112] 表 4 试剂盒的特异性

[0113]

竞争物	交叉反应率 (%)
猪 IgG	100
牛 IgG	<0.1
酪蛋白	<0.1

[0114] 实验例 4

[0115] 试剂盒保存条件为 2 ~ 8℃, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制浓度、猪免疫球蛋白 G 添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中, 会有非正常保存条件出现, 将试剂盒在 37℃ 保存条件下放置 6 天, 进行加速老化实验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入 -20℃ 冰箱冷冻 5 天, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在 2 ~ 8℃ 至少可以保存 6 个月以上。

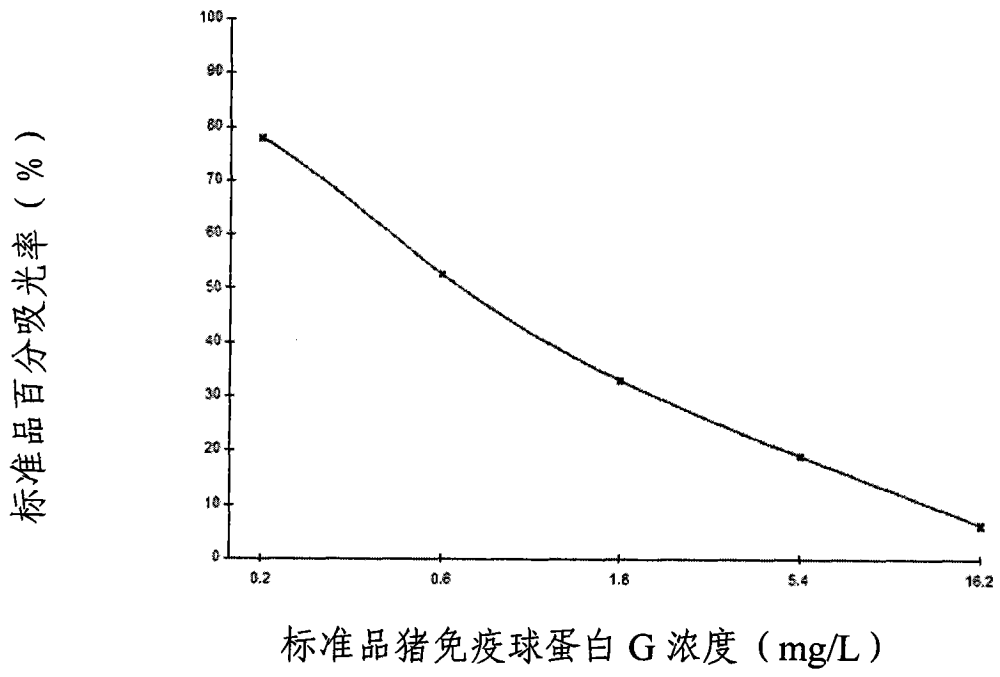


图 1

专利名称(译)	检测猪免疫球蛋白G的酶联免疫试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101571540B</a>	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN200910085946.1	申请日	2009-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京望尔康泰生物技术有限公司 北京望尔生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京望尔生物技术有限公司		
[标]发明人	万宇平 高东微 王雅静 马孝斌 刘中勇 蔡克周 余厚美 陈永红 李明		
发明人	万宇平 高东微 王雅静 马孝斌 刘中勇 蔡克周 余厚美 陈永红 李明		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535		
其他公开文献	CN101571540A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种检测猪免疫球蛋白G的酶联免疫试剂盒，它含有：包被有包被原的酶标板，酶标记物，猪免疫球蛋白G特异性抗体工作液(当酶标板上包被抗原且酶标记物为酶标记抗体或酶标板上包被抗体且酶标记物为酶标记抗原时含有)，猪免疫球蛋白G标准品溶液，底物显色液，终止液，浓缩洗涤液，浓缩复溶液。本发明还公开了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测猪免疫球蛋白G的方法，它包括：首先进行样品前处理，然后用试剂盒进行检测，最后分析检测结果。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测猪血浆蛋白粉等样品中猪免疫球蛋白G的含量，其操作简便、费用低廉能够现场监控且适合大量样本的筛查。

酶标板编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1批	3.9	9.3	4.5	4.1	3.4	5.5	3.1	7.7	5.8	6.4
2批	5.3	6.0	3.6	4.5	7.2	8.0	2.5	3.5	5.6	7.2
3批	3.3	4.9	8.2	7.6	3.3	4.6	6.0	3.7	4.2	6.3