



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110161229 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201910531328.9

(22)申请日 2019.06.19

(71)申请人 中国医学科学院医学生物学研究所

地址 650106 云南省昆明市茭菱路935号

申请人 艾美康淮生物制药(江苏)有限公司

(72)发明人 李琦涵 蒋国润 张莹 王丽春

姜莉 杨二霞 范胜涛 徐兴丽

廖芸

(74)专利代理机构 昆明人从众知识产权代理有

限公司 53204

代理人 沈艳尼

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂及应用

(57)摘要

本发明提供了一种能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂及应用,该试剂包括辣根过氧化物酶标记的CA16特异性抗体;本发明酶联免疫试剂适用于识别柯萨奇病毒A组16型的不同病毒颗粒中具有免疫原性的抗原颗粒;通过比较目前商用检测CA16抗原的酶联免疫试剂和本发明所述试剂,结果显示本发明试剂可以特异、有效的识别CA16病毒的免疫原性抗原颗粒,是一种特异性好、灵敏度高、方便快捷的,针对CA16病毒免疫原性抗原颗粒的检测试剂。

1. 一种能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂,其特征在于:包括辣根过氧化物酶标记的CA16特异性抗体。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂,其特征在于,辣根过氧化物酶标记的CA16特异性抗体的制备方法如下:

(1) 采用柱层析或离心法将组织培养增殖的CA16病毒液进行初步纯化;

(2) 利用碘克沙醇密度梯度离心的方法对经初步纯化的CA16病毒液离心,获得密度明确两个病毒带,即P带和R带,P带是由大部分的空心颗粒少部分的实心颗粒形成的上带,R带是由大部分的实心完整的病毒颗粒和少部分空心颗粒形成的下带,收集R带;

(3) 测定R带总蛋白含量后,用蛋白浓度为5-8ng/0.5mL的R带混合吸附铝佐剂;

(4) 以0、28、42天的程序,经肌肉途径免疫家兔,全程免疫后第7天取血制备血清;

(6) 经微量中和抗体检测后,过层析柱纯化,获得纯化的特异性抗R带的CA16-IgG,测定蛋白含量置-20℃备用;

(7) 用辣根过氧化物酶溶液标记特异性抗R带的CA16-IgG,获得辣根过氧化物酶标记的CA16特异性抗体。

3. 权利要求1或2所述的酶联免疫试剂在规模化制备的CA16免疫原性抗原的质量控制中的应用。

能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂及应用

技术领域

[0001] 本发明属于人类预防医学的技术领域,更具体的说,本发明涉及一种特异识别CA16病毒颗粒中具备最佳免疫原性的抗原颗粒的检测技术,适用于规模化制备的CA16免疫原性抗原的质量控制。

背景技术

[0002] 人类肠道病毒柯萨奇病毒A16型(Coxsackievirus A16,CA16),是一种单股正链的小RNA病毒,其与人类肠道病毒71型(Enterovirus type 71,EV71)均是引起人类儿童手足口病(Human hand-foot and mouth disease;HFMD)的主要病原。这一曾在全球各地区流行并作为亚洲-太平洋地区近期以来的主要儿童病毒性传染病,在临床及公共卫生领域中均引起广泛的关注。鉴于针对这一类病毒至今尚无特效的治疗药物,因而其疫苗的研究极其重要。尽管中国医学科学院医学生物学研究所于2015年批准了全球首个EV71灭活疫苗的上市并已在全国范围内广泛使用,但CA16疫苗至今尚无疫苗问世,因而导致了HFMD仍未得到全面控制的流行病学状况。

[0003] CA16作为一个与EV71具有类似结构及生物学特性的病毒之所以尚无疫苗问世的重要技术原因之一就是以前不同方法制备的CA16抗原,难以在确定剂量的前提下,能够稳定地诱导机体产生免疫反应,尤其在以规模化工厂进行疫苗抗原制备(通常为灭活病毒抗原)条件下,如何控制病毒抗原所应该具有的稳定的免疫原性,并刺激机体产生稳定的,以中和抗体为指标的免疫反应,是一个重要的技术挑战。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种有效、准确的能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂,其包括辣根过氧化物酶标记的CA16特异性抗体;

[0005] 本发明酶联免疫试剂还包括常规的酶联免疫检测试剂,如显色剂、终止液等。

[0006] CA16病毒在组织培养细胞体系中增殖时,可以产生两种类型的病毒颗粒,它们分别在密度梯度离心中形成两个不同浮力密度的条带,即P带(位于较小密度的上部,其由大部分的空心颗粒少部分的实心颗粒形成)和R带(位于较大密度的下部,其由大部分的实心完整的病毒颗粒和少部分空心颗粒形成),并表现出不同的结构组成特征和有差异的免疫原性特征。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0008] 1、有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒(R条带)的IgG抗体的制备

[0009] (1) 细胞培养:根据KMB-17细胞或Vero细胞生产检定规程,挑选生长致密的第28代KMB-17细胞或第150代Vero细胞,弃去培养液,以质量浓度0.1%-0.25%的胰蛋白酶液消化,弃去胰酶液,以原培养液体积4%的MEM悬浮细胞,得到细胞悬液;

[0010] (2) 病毒接种及培养:将上述细胞悬液加入细胞工厂(培养液为含5-10%小牛血

清、终浓度100U/mL的硫酸卡那霉素、0.06%的谷氨酰胺的MEM培养液)中,混匀后置于37℃培养3-4天;长成致密单层后,弃去培养液;然后加入CA16病毒毒种,接种量moi为0.02-0.05;混匀后置于37℃,轻轻晃动;30min后,加入细胞维持培养液(含0.06%的谷氨酰胺MEM培养液),置于37℃培养3-4天;待细胞完全病变后,收集病毒收获液;

[0011] (3) 浓缩:将上述病毒收获液用SAS单芯过滤装置过滤,去除细胞碎片;使用MasterFlex超滤浓缩仪进行超滤浓缩,得到病毒浓缩液;

[0012] (4) 纯化:将病毒浓缩液上样于Sepharose 6FF柱层析纯化,浓缩后再经碘沙醇密度梯度离心纯化,收集下层纯化后的病毒颗粒峰带(R带);

[0013] (5) 蛋白含量测定:采用Lowry法检测总蛋白含量,调整蛋白浓度为5-8ng/0.5mL;

[0014] (6) 吸附:用蛋白浓度为5-8ng/0.5mL的R带混合吸附铝佐剂(铝佐剂终浓度为0.25-0.5mg/mL);

[0015] (7) 制备血清:以0、28、42天程序,经肌肉途径免疫家兔,全程免疫后第7天取血制备血清;

[0016] (8) 纯化IgG:经微量中和抗体检测后,过层析柱纯化,获得纯化的特异性抗R带的CA16-IgG,以Lowry法测定其蛋白含量-20℃保存备用。

[0017] 2、酶标板预处理

[0018] (1) 酶标板包被:将上述特异性抗R带的CA16-IgG用碳酸盐缓冲液稀释至5~20μL/mL,按50~150μL/孔的量加入到聚苯乙烯板中,2~8℃过夜,洗板3~5次;

[0019] (2) 酶标板封闭:按照100~250μL/孔的量加入封闭液,2~8℃过夜,对酶标板进行封闭,洗板3~5次,晾干,冰箱保存备用;

[0020] 3、辣根过氧化物酶标记CA16抗体制备

[0021] (1) 按照辣根过氧化物酶:CA16抗体的摩尔比=1:5~20的比例,将辣根过氧化物酶用注射用水溶解后,与CA16-IgG抗体混合,得混合物,于室温下放置0.5~1小时,或2~8℃放置1~3小时;

[0022] (2) 用磷酸缓冲液于2~8℃透析上述步骤的混合物,过夜,加入与混合物等体积的甘油混匀,得辣根过氧化物酶标记CA16抗体,-20℃以下保存备用;

[0023] (3) 将上述步骤的辣根过氧化物酶标记CA16抗体按1:100、1:200、1:400……1:5000的稀释度进行稀释,用常规棋盘法实验确定它们的最佳使用稀释度,得辣根过氧化物酶标记CA16抗体的稀释度为1:500~3000。

[0024] 4、待检CA16样本的获得:将经过常规组织培养的CA16病毒收获液或者经柱层析法初步纯化的纯化病毒液,直接加到步骤2的酶标板中检测;

[0025] 5、检测:将待检CA16抗原样品用PBS稀释液进行不同稀释度的系列稀释:1:4、1:8、1:16、1:32……;用微量移液器将稀释好的待检CA16病毒抗原不同稀释度液体,从高稀释度(1:6400)开始依次加入酶标板中,100μL/孔,同时在酶标板的另外孔中加入抗原阳性对照、抗原阴性对照,每个对照各加2孔,并留1孔作为空白调零孔,放入湿盒中,37℃保温1小时,用PBS洗液在洗板机上洗板5次;然后加入步骤3制备的稀释度为1:1000的辣根过氧化物酶标记CA16抗体,100μL/孔,放入湿盒中,37℃保温1小时,用PBS洗液在洗板机上洗板5次;各孔中分别加入TMB显色液A和B各50μL/孔,混匀,放入湿盒中,37℃保温10min;加入终止液50μL/孔,置于酶标仪在450nm波长下,用空白孔调零后检测吸光度A值。

[0026] 6、检测结果判定

[0027] 阳性对照平均A值-阴性对照平均A值 ≥ 0.4 时,则试验成立,反之应重试;

[0028] Cutoff值=阴性对照的平均A值 $\times 2.1$ (当阴性对照的平均A值大于0.05时,则按实际值计算;当阴性对照的平均A值小于0.05时,则按0.05计算)。

[0029] 样品A值 \geq Cutoff值,该样品孔判定为CA16免疫性抗原阳性,样品A值 $<$ Cutoff值,该样品孔判定为CA16免疫性抗原阴性。

[0030] 本发明相比现有技术的有益效果为:

[0031] 1、本发明技术方案的提出是基于目前市场上现有的CA16抗原检测用酶联免疫试剂盒尚无标准制品,属于各研究及开发生产单位自行制备;其基本原理为,以组织培养增殖的CA16病毒经柱层析或是离心方法纯化后,免疫家兔,在获得具有一定中和抗体滴度的血清后,即可以将该血清纯化得到相应的IgG成分,该IgG成分可作为包被抗原试剂的酶联板和检测抗原的酶标抗体,根据纯化抗体IgG的蛋白定量方法,确定酶标试剂的制备模式,这一技术存在的一个重要的不确定问题即是:既然CA16在组织培养细胞中制备时可以产生两种类型的病毒颗粒,且两种病毒颗粒的比率可随病毒生长条件的差异而有所不同,其中的R颗粒作为具有完整病毒结构的颗粒更能表现其免疫原性,但二者均可以为现有的酶联免疫抗原检测试剂盒非特异性识别。本发明针对具有免疫原性R颗粒为主要识别主体,尽管在本检测中反映的是抗原反应活性,但该反应识别的对象是CA16不同病毒颗粒中具有完整免疫原性的R颗粒,因此其所反映的抗原量能够更准确地表示CA16病毒抗原的免疫原性意义。

[0032] 2、本发明提供了一种的有效识别CA16病毒的免疫原性抗原颗粒的方法。目前通用的CA16病毒抗原检测试剂的制备基于病毒自组织培养细胞增殖收获后纯化形成病毒抗原,以此免疫动物(主要是家兔),获得抗血清后纯化的IgG用于包被酶标板和制备酶标检测抗体而构成,尽管该抗原检测试剂盒能准确识别CA16病毒,但无法区分R和P颗粒,亦无法以具有较好免疫原性的R颗粒为主要识别对象。因此,对准备作为能够有效诱导机体免疫反应的疫苗抗原的病毒,难以准确定义其中具有免疫原性意义的抗原量。这在某种程度上,尤其是病毒增殖过程中因各种因素出现P/R颗粒比例发生变化时,不能做到对抗原含量的描述可以客观准确地反映其实际的免疫原性,从而导致CA16灭活病毒疫苗制备过程中关键质量检测环节的不确定。本发明主要以识别R颗粒所表现的抗原量做为病毒疫苗抗原的定量基准的技术方法,可以客观准确的反映产品中具有有效免疫原性的病毒颗粒的抗原含量。

附图说明

[0033] 图1为不同检测方法对病毒P带和R带的检测A值结果示意图,其中A图为P带,B图为R带;

[0034] 图2不同检测方法对病毒收获液(A图)、P带和R带混合液(1:1)(B图)、柱层析纯化液(C图)的检测A值结果示意图。

具体实施方式

[0035] 下面通过实施例对本发明作进一步详细说明,但本发明保护范围不局限于所述内容,实施例中使用的试剂和方法,如无特殊说明,均采用常规试剂和使用常规方法;

[0036] 本实施例中使用的试剂如下:

[0037] ①0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS:磷酸氢二钠2.9g,磷酸二氢钾0.2g,氯化钠8g,加注射用水至1000mL;

[0038] ②PBS洗液:在1000mL 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS中,加入终浓度为0.05%的吐温20;

[0039] ③碳酸缓冲液:无水碳酸钠1.6g,碳酸氢钠2.93g,加注射用水至1000mL;

[0040] ④TMB显色液A:TMB 50ng,二甲基亚砷50mL,加注射用水50mL;

[0041] ⑤TMB显色液B:醋酸钠6g,冰醋酸0.2mL,双氧水2.5mL,加注射用水至500mL;

[0042] ⑥终止液:浓硫酸54mL,加注射用水至500mL。

[0043] ⑦封闭液:1000mL 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS中,加入20g牛血清白蛋白,溶解混匀。

[0044] 实施例1:有效识别CA16病毒免疫原性抗原的IgG抗体的分离纯化方法

[0045] (1) 根据KMB-17细胞生产检定规程,挑选生长致密的第28代KMB-17细胞,T225瓶细胞8瓶,弃去培养液,各瓶加PBS缓冲液100mL洗细胞表面后弃去,以质量浓度0.1% (活力1:200) 的胰蛋白酶液12mL/瓶消化细胞,弃去胰酶液,待细胞完全分散脱离瓶壁后,每瓶添加100mL细胞培养液 (培养液为含5%小牛血清、终浓度100U/mL的硫酸卡那霉素、0.06%的谷氨酰胺,PH7.2-7.5的MEM培养液) 悬浮细胞,得到细胞悬液;

[0046] (2) 将上述细胞悬液加入一个细胞工厂中,用细胞培养液补加至2000mL混匀后置于37℃培养,4天长成致密单层后,弃去培养液;在细胞工厂中加入CA16病毒液100mL,病毒接种MOI为0.03;将工厂置于37℃,其间轻轻晃动,使病毒液与细胞面充分接触;30min后,加入细胞维持培养液1500mL (含0.06%的谷氨酰胺MEM培养液),置于37℃培养;待细胞完全病变后,收集病毒收获液;

[0047] (3) 将上述病毒收获液用带有0.65μm滤膜的SAS单芯过滤装置过滤澄清后,使用带有100KD滤膜的MasterFlex超滤浓缩仪超滤浓缩至10mL,得到15倍浓缩的病毒浓缩液;

[0048] (4) 将病毒浓缩液10mL上样于凝胶介质为Sephrose 6FF的柱层析进行纯化,获得纯化液125mL,使用100KD滤膜超滤浓缩至5mL;而后再经碘克沙醇密度梯度超速离心纯化,得到病毒颗粒峰带 (P带和R带);收集P带为500μL,R带为450μL;

[0049] (5) 蛋白含量测定:采用Lowry法检测总蛋白含量,P带蛋白含量为400μg/mL,R带蛋白含量为420μg/mL,均稀释调整蛋白浓度为5ng/0.5mL;

[0050] (6) 用同等蛋白含量 (5ng/0.5mL) 的P带和R带分别吸附铝佐剂,氢氧化铝佐剂终浓度为0.50mg/mL;

[0051] (7) 以0、28、42天程序,用P带和R带样品分别经双腿肌肉途径免疫不同的清洁级新西兰雌性兔,明确标记兔子为P带免疫兔和R带免疫兔;全程免疫后第7天取兔全血制备血清,各获得血清60mL;

[0052] (8) 经Vero细胞微量中和抗体法检测分别确定P带和R带的CA16抗体中和效价水平,各取血清10mL,分别经亲和层析柱层析纯化收获IgG,以Lowry法测定其蛋白含量P带收获IgG为10.29mg/mL和R带收获IgG为9.98mg/mL,分别标明名称、含量后-20℃以下保存备用。

[0053] 实施例2:特异性IgG抗体检测CA16病毒纯化P带和R带中免疫原性抗原的分析方法

[0054] 1、酶标板预处理

[0055] (1) 酶标板包被:将实施例1中纯化的两种特异性CA16-IgG用碳酸盐缓冲液稀释至10 μ L/mL,按100 μ L/孔的量加入到聚苯乙烯板中,5 $^{\circ}$ C过夜,洗板4次;

[0056] (2) 酶标板封闭:按照150 μ L/孔的量加入封闭液,5 $^{\circ}$ C过夜,对酶标板进行封闭,洗板3次,晾干,冰箱保存备用;

[0057] 2、辣根过氧化物酶标记CA16抗体制备

[0058] (1) 按照辣根过氧化物酶:CA16抗体摩尔比=1:10比例,将辣根过氧化物酶用注射用水溶解后,与CA16抗体混合,得混合体,于室温下放置1小时;

[0059] (2) 用0.01mol/L磷酸缓冲液于5 $^{\circ}$ C透析上述步骤的混合体,过夜,加等体积甘油混匀,得辣根过氧化物酶标记CA16抗体,-20 $^{\circ}$ C以下保存备用;

[0060] (3) 将上述步骤的辣根过氧化物酶标记CA16抗体按1:100、1:200、1:400……1:5000的稀释度用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS试剂进行稀释,用常规棋盘法实验确定它们的最佳使用稀释度,得辣根过氧化物酶标记CA16抗体的稀释度为1:500~3000。

[0061] 3、待检CA16抗原病毒P带及R带的获得

[0062] 将经过常规组织培养的CA16病毒收获液,经柱层析方法初步纯化,再利用碘沙醇的密度梯度离心的方法,对经初步纯化的CA16病毒获得密度明确两个病毒带,即P带(上带则由大部分的空心颗粒少部分的实心颗粒形成)和R带(下带由大部分的实心完整的病毒颗粒和少部分空心颗粒形成);同等蛋白含量的P带和R带分别加到CA16免疫原性抗原检测试剂中检测。

[0063] 4、检测:

[0064] (1) 将待检CA16抗原样品用0.01mol/L的磷酸盐缓冲液PBS进行不同稀释度的系列稀释:1:50、1:100、1:200、1:400……1:6400,具体稀释如下:取0.1mL待检CA16抗原样品,在其中加入4.9mL PBS稀释液,混匀,即成1:50样品;取0.1mL 1:50样品,在其中加入0.9mL PBS稀释液,混匀,即成1:100样品;取0.1mL 1:100样品,在其中加入0.9mL PBS稀释液,混匀,即成1:200样品;如此依次对倍稀释至1:6400;

[0065] (2) 用微量移液器将稀释好的待检CA16病毒抗原不同稀释度液体,从高稀释度(1:6400)开始依次加入酶标板中,100 μ L/孔,同时在酶标板的另外孔中加入抗原阳性对照、抗原阴性对照,每个对照各加2孔,并留1孔作为空白调零孔,放入湿盒中,37 $^{\circ}$ C保温1小时,用PBS洗液在洗板机上洗板5次;

[0066] (3) 在上述步骤1的酶标板的各孔中,加入步骤2制备的稀释度为1:1000的辣根过氧化物酶标记CA16抗体,100 μ L/孔,放入湿盒中,37 $^{\circ}$ C保温1小时,用PBS洗液在洗板机上洗板5次;

[0067] (4) 在上述酶标板的各孔中分别加入TMB显色液A和B各50 μ L/孔,混匀,放入湿盒中,37 $^{\circ}$ C保温10min;

[0068] (5) 在上述酶标板的各孔中加入终止液50 μ L/孔,置于酶标仪在450nm波长下,用空白孔调零后检测吸光度A值。

[0069] 5、检测结果判定

[0070] 阳性对照平均A值-阴性对照平均A值 \geq 0.4时,则试验成立,反之应重试。

[0071] Cutoff值=阴性对照的平均A值 \times 2.1(当阴性对照的平均A值大于0.05时,则按实际值计算;当阴性对照的平均A值小于0.05时,则按0.05计算)。

[0072] 样品A值 \geq Cutoff值,该样品孔判定为CA16免疫性抗原阳性,样品A值 $<$ Cutoff值,该样品孔判定为CA16免疫性抗原阴性;结果见图1、表1;

[0073] 表1实施例2不同检测方法对病毒P带和R带的检测A值

[0074]

分组	P 带			R 带		
	商用对照	方法 1	方法 2	商用对照	方法 1	方法 2
1:50	2.773	2.205	3.120	1.684	0.950	2.751
1:100	2.745	2.075	2.847	1.507	0.631	2.178
1:200	2.123	1.698	2.188	1.228	0.371	1.640
1:400	1.659	1.233	1.695	0.610	0.242	1.052
1:800	1.123	0.787	1.072	0.412	0.146	0.658
1:1600	0.649	0.487	0.667	0.278	0.105	0.382
1:3200	0.389	0.301	0.372	0.143	0.084	0.228
1:6400	0.031	0.048	0.000	0.027	0.055	0.000

商用对照 vs 方法 1	t 值=3.943, P 值=0.006*			t 值=3.231, P 值=0.014*		
商用对照 vs 方法 2	t 值=-1.305, P 值=0.233			t 值=-2.945, P 值=0.022*		
方法 1 vs 方法 2	t 值=-3.300, P 值=0.013*			t 值=-3.248, P 值=0.014*		

[0075] 注:商用对照为普通方法制备的抗体包被酶标板,即病毒收获液经过滤、浓缩、纯化(不分上层P带和下层R带),纯化后蛋白吸附铝佐剂,以0、28、42天程序,经肌肉途径免疫家兔,全程免疫后第7天取血制备血清,层析纯化IgG。纯化IgG包被酶标板。

[0076] 方法1为病毒上层P带纯化吸附铝佐剂,以上述程序免疫家兔制备抗P带血清,并经层析纯化IgG,包被酶标板。

[0077] 方法2为病毒下层R带纯化吸附铝佐剂,以上述程序免疫家兔制备抗P带血清,并经层析纯化IgG,包被酶标板。*代表 $P < 0.05$,有统计学意义。

[0078] 实施例3:利用实施例1中制备的特异性IgG抗体检测CA16病毒收获液、P带和R带混合液、柱层析纯化液中免疫原性抗原的方法

[0079] 步骤1,同实施例2中步骤1;

[0080] 步骤2:同实施例2中步骤2;

[0081] 步骤3:待检CA16样品获得

[0082] (1) 培养病毒收获液的获得

[0083] 将经过常规组织培养的CA16病毒收获液,直接用于检测;

[0084] (2) 经柱层析纯化病毒液的获得

[0085] 将经过常规组织培养的CA16病毒收获液,经柱层析方法初步纯化后,直接用于检测;

[0086] (3) 病毒P+R(蛋白质质量比1:1)液的获得

[0087] 将经过常规组织培养的CA16病毒收获液,经柱层析方法初步纯化,再利用碘沙醇

的密度梯度离心的方法,对经初步纯化的CA16病毒获得密度明确两个病毒带,即P带(上带则由大部分的空心颗粒少部分的实心颗粒形成)和R带(下带由大部分的实心完整的病毒颗粒和少部分空心颗粒形成)。同等蛋白含量的P带和R带以1:1的方式混合,得到病毒P+R(1:1)液,加到CA16免疫原性抗原检测试剂中检测,得出待检CA16免疫原性抗原含量。

[0088] 步骤4:同实施例2中步骤4;结果见图2、表2;

[0089] 表2不同检测方法对病毒收获液、P带和R带混合液(1:1)、柱层析纯化液的检测A值
[0090]

分组	收获液				P+R (1:1)				柱层析			
	稀释度	商用	方法 1	方法 2	稀释度	商用	方法 1	方法 2	稀释度	商用	方法 1	方法 2
	1:8	2.654	1.388	1.705	1:50	1.460	0.898	1.504	1:4	0.902	0.322	0.469
	1:16	2.024	1.016	1.407	1:100	0.967	0.468	1.037	1:8	0.650	0.285	0.345
	1:32	1.343	0.669	0.934	1:200	0.534	0.323	0.587	1:16	0.413	0.210	0.199
	1:64	0.749	0.384	0.537	1:400	0.306	0.181	0.336	1:32	0.243	0.147	0.141
	1:128	0.446	0.207	0.297	1:800	0.256	0.094	0.183	1:64	0.162	0.109	0.096
	1:256	0.230	0.122	0.155	1:1600	0.100	0.054	0.091	1:128	0.140	0.093	0.081
	1:512	0.130	0.065	0.129	1:3200	0.024	0.023	0.048	1:256	0.080	0.085	0.073
	1:1028	0.041	0.044	0.046	1:6400	0.010	0.020	0.000	1:512	0.000	0.000	0.000
商用对照 vs 方法 1	t 值=2.799, P 值=0.027*				t 值=2.579, P 值=0.037*				t 值=2.283, P 值=0.056			
商用对照 vs 方法 2	t 值=2.523, P 值=0.040*				t 值=-1.000, P 值=0.351				t 值=2.700, P 值=0.031*			
方法 1 vs 方法 2	t 值=-3.240, P 值=0.014*				t 值=-2.481, P 值=0.042*				t 值=-0.946, P 值=0.376			

[0091] 注:商用对照为普通方法制备的抗体包被酶标板,即病毒收获液经过滤、浓缩、纯化(不分上层P带和下层R带),纯化后蛋白吸附铝佐剂,以0、28、42天程序,经肌肉途径免疫家兔,全程免疫后第7天取血制备血清,层析纯化IgG。纯化IgG包被酶标板。

[0092] 方法1为病毒上层P带纯化吸附铝佐剂,以上述程序免疫家兔制备抗P带血清,并经层析纯化IgG,包被酶标板。

[0093] 方法2为病毒下层R带纯化吸附铝佐剂,以上述程序免疫家兔制备抗P带血清,并经层析纯化IgG,包被酶标板。

[0094] *代表 $P < 0.05$,有统计学意义。

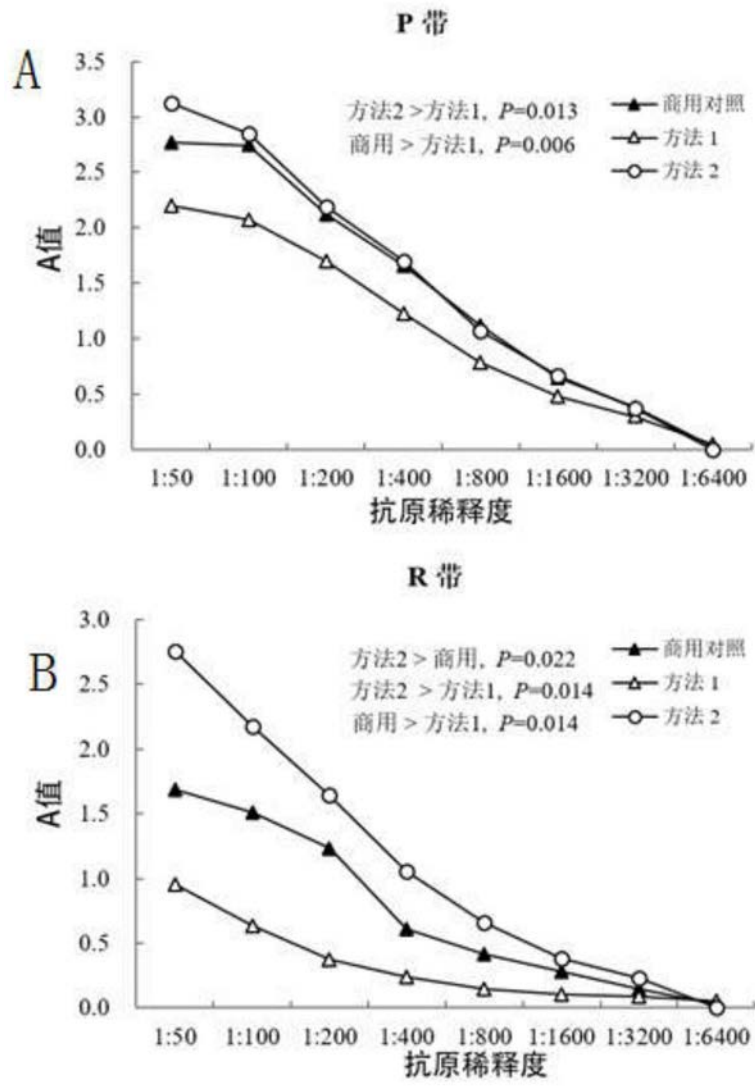


图1

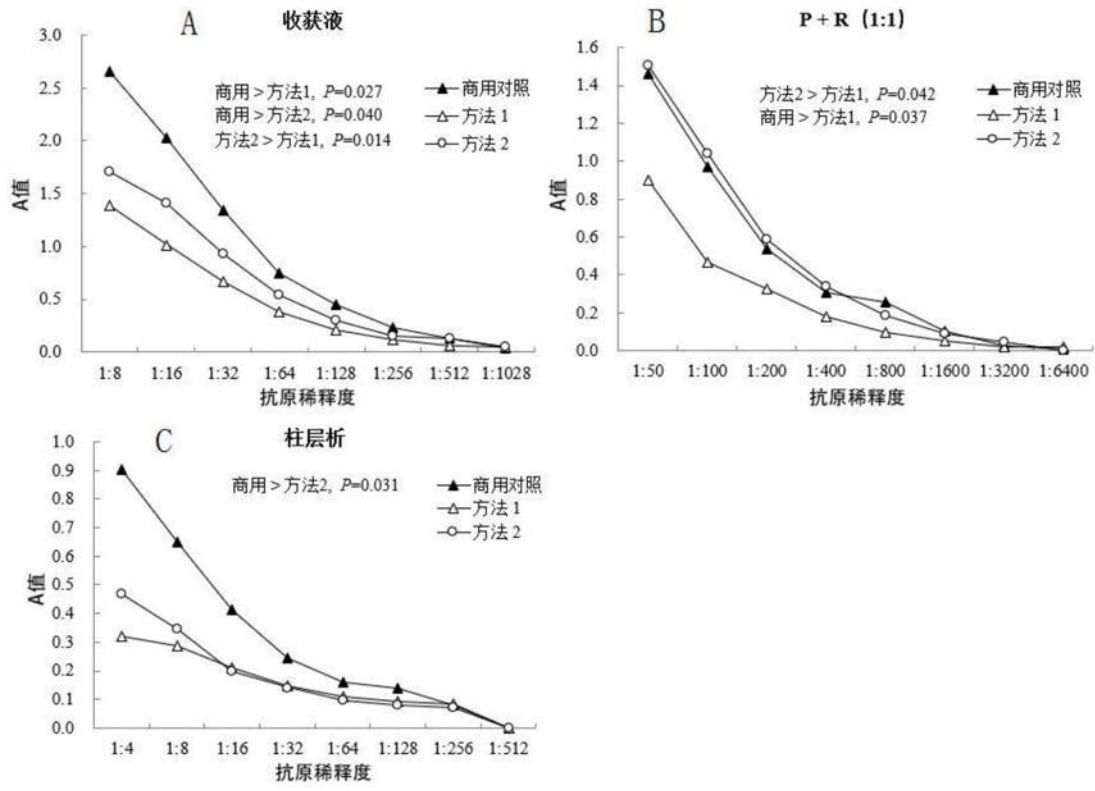


图2

专利名称(译)	能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂及应用		
公开(公告)号	CN110161229A	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201910531328.9	申请日	2019-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院医学生物学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院医学生物学研究所		
[标]发明人	李琦涵 张莹 王丽春 姜莉 杨二霞 范胜涛 徐兴丽 廖芸		
发明人	李琦涵 蒋国润 张莹 王丽春 姜莉 杨二霞 范胜涛 徐兴丽 廖芸		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/6854		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译) 本发明提供了一种能有效识别CA16病毒免疫原性抗原颗粒的酶联免疫试剂及应用，该试剂包括辣根过氧化物酶标记的CA16特异性抗体；本发明酶联免疫试剂适用于识别柯萨奇病毒A组16型的不同病毒颗粒中具有免疫原性的抗原颗粒；通过比较目前商用检测CA16抗原的酶联免疫试剂和本发明所述试剂，结果显示本发明试剂可以特异、有效的识别CA16病毒的免疫原性抗原颗粒，是一种特异性好、灵敏度高、方便快捷的，针对CA16病毒免疫原性抗原颗粒的检测试剂。	分组	P 带			R 带		
		商用对照	方法 1	方法 2	商用对照	方法 1	方法 2
	1:50	2.773	2.205	3.120	1.684	0.950	2.751
	1:100	2.745	2.075	2.847	1.507	0.631	2.178
	1:200	2.123	1.698	2.188	1.228	0.371	1.640
	1:400	1.659	1.233	1.695	0.610	0.242	1.052
	1:800	1.123	0.787	1.072	0.412	0.146	0.658
	1:1600	0.649	0.487	0.667	0.278	0.105	0.382
	1:3200	0.389	0.301	0.372	0.143	0.084	0.228
	1:6400	0.031	0.048	0.000	0.027	0.055	0.000
	商用对照 vs 方法 1	<i>t</i> 值=3.943, <i>P</i> 值=0.006*			<i>t</i> 值=3.231, <i>P</i> 值=0.014*		
	商用对照 vs 方法 2	<i>t</i> 值=-1.305, <i>P</i> 值=0.233			<i>t</i> 值=-2.945, <i>P</i> 值=0.022*		
	方法 1 vs 方法 2	<i>t</i> 值=-3.300, <i>P</i> 值=0.013*			<i>t</i> 值=-3.248, <i>P</i> 值=0.014*		