



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101581726 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 200910071634.5

(22) 申请日 2009.03.26

(73) 专利权人 张晓艳

地址 150070 黑龙江省哈尔滨市哈尔滨开发区迎宾路集中区综合楼 205 室

(72) 发明人 张晓艳

(74) 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务有限责任公司 23101

代理人 崔东辉

AG-ELISA 的效果评价》.《湖北农业科学》.2008, 第 47 卷(第 6 期), 1.6 节.

Anastasios Minas 等.《Validation of a competitive ELISA for diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats》.《The veterinary Journal》.2008, 第 177 卷(第 3 期), 材料和方法部分, 尤其是竞争 ELISA 部分.

审查员 王丽华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1632585 A, 2005.06.29, 全文.

张东林等.《蛋白 AG 检测多种弓形虫抗体

权利要求书 2 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒

(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种满足我国动物防疫需求、敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病的新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒。它是利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖作抗原包被酶标板,用灭活菌液免疫健康牛或人工感染健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清,用健康非免疫牛血清作阴性对照血清,用新型单克隆抗体作竞争抗体,抗 Fc 受体的蛋白质 AG 酶标物作为二抗,配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液,组装组成。本发明是一种敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病的竞争 ELISA 试剂盒,本发明满足我国动物防疫的需求,借助实验室诊断技术对布鲁氏菌病进行最后确诊。

1. 一种布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒,其特征在于:它是利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖作抗原包被酶标板,用灭活菌液免疫健康牛或人工感染健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清,用健康非免疫牛血清作阴性对照血清,用单克隆抗体作竞争抗体,抗Fc受体的蛋白质AG酶标记物为二抗,配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液A、底物溶液B、 $H_2O_2$ 、终止液,组装组成;所述的抗原包被酶标板是这样制备的:

(1) 包被:无菌条件下,将冻干抗原用蒸馏水悬浮到冻干前的体积,用0.05M pH9.6的碳酸缓冲液按1:1000稀释,以 $100\mu l$ /孔,包被聚苯乙烯96孔板,加盖于 $4^\circ C$ 过夜;

(2) 洗涤:以0.01mol/L, pH值为7.2的PBST作洗涤液,加入足量,室温作用3分钟后甩去,如上重复3次,或用洗板机重复洗3次,拍干至无水印为止;

(3) 封闭:用含1%牛血清白蛋白的0.01mol/L, pH值为6.3的PBST按 $100\mu l$ /孔,加入至酶标板中, $37^\circ C$ 作用1小时,甩去,加入足量洗涤液,室温作用3分钟后甩去,如上重复3次,或用洗板机重复洗3次,拍干至无水印为止,自然干燥;

(4) 包装:将封闭好的酶标板放于铝箔袋中,加入1g包装的干燥剂,用真空包装机将酶标板包装好,贴上标签;

所述的阳性对照血清的制备方法如下:

(1) 制造用动物:制备阳性血清的牛需要经过实验室检测,必须是18月龄性成熟、健康牛,无小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌0:157感染,以及无繁殖系统感染等抗体阴性的健康牛;观察一周;

(2) 免疫原制备:将布氏杆菌S1119.3接种马铃薯浸液琼脂扁瓶,置 $37^\circ C$ 培养48小时,待形成一层菌落时,选取纯净扁瓶,吸弃凝集水,用含0.5%苯酚的灭菌生理盐水将菌苔洗下,倾入中性玻璃瓶中,加甲醛溶液至终浓度为0.2%,置 $37^\circ C$ 振荡灭活48小时,经无菌检验合格,于 $4^\circ C$ 以20000转/分钟离心10分钟,取沉淀,用生理盐水做10倍稀释,用作免疫原,于 $2^\circ C\sim 8^\circ C$ 冰箱保存备用;

(3) 免疫程序:用免疫原按5ml/点分4点肌肉注射,免疫动物,14日后,同法免疫一次,再14日后采血,分离血清,用ELISA检测;血清 $OD_{450nm}$ 和阴性血清 $OD_{450nm}$ 的比值(P/N) $> 1$ 方可大量采血;如检验不合格,应再加强免疫一次;

(4) 血清制造:以常规方法采血,分离其血清,将其作为待检血清,用血清稀释液作1:2,1:4...1:128稀释,用质控强阳性血清作参照进行ELISA试验,取待检血清 $OD_{650nm}$ /质控强阳性血清 $OD_{650nm}$ 值=1时的待检血清稀释度作为血清稀释倍数,用血清稀释液对血清进行稀释;

(5) 分装:将血清用 $0.45\mu m$ 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为0.02%以防腐,然后无菌条件下定量分装、冻干,贴上标签;

(6) 标准弱阳性血清制造:将强阳性血清用血清稀释液作1:1.5稀释;

所述的阴性对照血清的制备方法如下:

(1) 制造用动物 同阳性对照血清的制造用动物;

(2) 血清制造 以常规方法采血,分离其血清;

(3) 血清处理与分装 将血清用 $0.45\mu m$ 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为0.02%以防腐,然后无菌条件下定量分装,贴上标签;

所述的新型动物布鲁氏菌病单克隆抗体制备方法如下:

(1) 杂交瘤细胞株的培养:将杂交瘤细胞株从液氮中取出,置于 37℃ 水浴中迅速融化,1000 转/分钟离心沉淀细胞,去掉冻存液,加入 10ml MEM 培养基,分成两个培养瓶于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养,2-3 天细胞长满培养瓶底后,进行细胞计数;

(2) 腹水新型单克隆抗体的制备:按 0.5ml/只腹腔注射小鼠降植烷,三天后,再按  $5 \times 10^{5-6}$ /只的细胞浓度腹腔注射杂交瘤细胞,约十天后产生腹水,每天采一次,连续采 2-3 次,腹水取出后,3000 转/min 离心 10min,收集上清并混合,于 56℃ 水浴处理 10 分钟,-80℃ 冻存为半成品;

(3) 中间品检验:无菌检验 按“兽药典”进行,应无菌生长;

(4) 效价测定:取出质检过的动物布鲁氏菌病抗原包被酶标板,每孔加入动物布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 诊断试剂盒的样品稀释液 45ul,动物布鲁氏菌病标准阴性血清 5ul,加 2 排孔,标准阳性血清 5ul,加 2 排孔,动物布鲁氏菌病单克隆抗体以 1:10 倍比稀释,每个稀释度加 2 列,26℃ 孵育 30 分钟. 单克隆抗体效价为 OD<sub>450</sub> 为 0.60 至 1.80 时的单抗稀释倍数;

(5) 成品制备:按效价检测结果将单抗稀释,分装成 0.2ml/瓶,密封瓶口,贴好标签,注明批次;

所述的血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液是这样配制的:

(1) 10 倍洗液 PBST 的配制:

氯化钠,8 克;磷酸二氢钾,0.2 克;磷酸氢二钠 12H<sub>2</sub>O,6.29 克;加蒸馏水至 100 毫升,加 0.5 毫升吐温 20;调 pH 值 7.2,10 磅高压 15 分钟;

(2) 10 倍样品稀释液的配制:

氯化钠,8.5 克;磷酸二氢钾,0.2 克;磷酸氢二钠 12H<sub>2</sub>O,6.29 克;0.5 毫升吐温 20, EDTA,5.7 克,加蒸馏水至 100 毫升, pH6.3,10 磅高压 15 分钟;

(3) 10 倍底物 A 溶液的配制:

取柠檬酸 4.2g,醋酸钠 13.5g,过氧化脲 0.5g,加去离子水 100ml,调 pH 值 4.0,过滤除菌;分装:1.2ml/瓶分装,密封瓶口,粘贴标签;

(4) 底物 B 溶液的配制:

取 TMB 0.2192g,二甲基亚砜 20ml,室温下溶解;分装:0.2ml/瓶分装于黑瓶,密封瓶口,粘贴标签;

(5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液的配制:

分装:由美国 VWR 公司生产,0.2ml/瓶分装于黑瓶,密封瓶口,粘贴标签;

(6) 10 倍终止液的配制:

取 55.6 毫升 98% 的浓硫酸加入 80 毫升水中,调至总体积 100 毫升;

分装:1.2 毫升/瓶分装于小瓶,密封瓶口,粘贴标签、批次。

## 新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检验技术,具体说就是新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒。

### (二) 背景技术

[0002] 免疫学检测方法是应用免疫学理论设计的一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及其分泌的细胞因子的实验方法。随着学科间的相互渗透,免疫学涉及的范围不断扩大,新的免疫学检测方法层出不穷。免疫学方法的应用范围亦在日益扩大,不仅成为多种临床疾病诊断的重要方法,也为众多学科的研究提供了方便。

[0003] 抗原与相应抗体相遇可发生特异性结合,并在外界条件的影响下呈现某种反应现象,如凝集或沉淀,藉此可用已知抗原(或抗体)检测未知抗体(或抗原)。试验所采用的抗体常存在于血清中,因此又称之为血清学反应(serological reaction)。抗原种类繁多,按其物理性状可分颗粒性和可溶性两类。前者指细胞性抗原(包括细菌抗原),其制备较为简便,一般用新鲜细胞以无菌生理盐水或磷酸缓冲液洗涤后配成一定浓度。若系细菌抗原,则取新鲜培养物,经集菌作如下处理,H抗原因不耐热用0.3%~0.5%甲醛处理,O抗原耐热可加热100℃ 2h去除H抗原后应用。可溶性抗原可以是细胞膜、细胞浆、细胞核及核膜等细胞组成部分,也可能是经细胞分泌至体液中的一些可溶性因子。细胞组成部分常需经过机械或酶解法等破碎、离心获得粗制抗原,并通过选择性沉淀或层析等方法进一步纯化。而体液中(如血清等)的可溶性抗原则可直接用生化手段获得所需成分。有些可溶性抗原仅具有免疫反应性,而无免疫原性,此类抗原尚需与载体偶联方可成为完全抗原。

[0004] 布鲁氏菌病(Brucellosis)又称地中海弛张热,马尔他热,波浪热或波状热,是由布鲁氏菌引起的人畜共患性全身传染病,其临床特点为长期发热、多汗、关节痛及肝脾肿大等。1886年英国军医Bruce在马尔他岛从死于“马尔他热”的士兵脾脏中分离出“布鲁氏菌”,首次明确了该病的病原体。1897年Wright与其同事发现病人血清与布鲁氏菌的培养物可发生凝集反应,称为Wright凝集反应,从而建立了迄今仍用的血清学诊断方法。我国古代医籍中对本病虽有描述,但直到1905年Boone于重庆对本病作正式报道。目前该病在世界分布,只有几个国家消灭此病,而在中国的东北,华北,西北一带有流行和分布,其它地区有散发,且日益广泛和危害严重。对畜牧业和人类来严重经济损失。布鲁氏菌是一类革兰阴性的短小杆菌,内毒素是重要的致病物质。布鲁氏菌有强侵袭力,细菌可通过完整皮肤和粘膜进入宿主。布鲁氏菌有6个生物型,我国流行的是羊布鲁氏菌,牛布鲁氏菌和猪布鲁氏菌三种,其中以羊布鲁氏菌最常见。自然情况下,有60多种动物可感染布鲁氏菌,其主要是山羊,绵羊,牛和猪,以流产为主,孕期动物最为宜感。人类对布鲁氏菌易感,细菌进入人体后,迁延不愈,反复发作,发热呈波浪式,如不治疗,后果严重。

[0005] 根据临床症状、流行病学特点和特征性病变,不难做出布鲁氏菌病的初步诊断,但由于在临床上小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌O:157感染存在相似的症状,必须借助实验室诊断技术才能对布鲁氏菌病进行最后确诊。

[0006] 为了建立适合本病诊断和流行病学调查的快速、敏感、特异、准确的方法,国内外许多学者进行了大量研究,并取得了显著的成绩。先后建立了病原鉴定、荧光抗体中和检测等检测方法。然而,我国目前应用的虎红平板和试管凝集方法为国际贸易淘汰方法,技术落后,假阳性也相对较高。

### (三) 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种满足我国动物防疫需求、敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病的新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒。

[0008] 本发明的目的是这样实现的:它是利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖作抗原包被酶标板,用灭活菌液免疫健康牛或人工感染健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清,用健康非免疫牛血清作阴性对照血清,用新型单克隆抗体作竞争抗体,抗 Fc 受体的蛋白质 AG 酶标物作为二抗,配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、 $H_2O_2$ 、终止液,组装组成。

[0009] 本发明新一代布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 检测试剂盒,还有以下技术特征:

[0010] 1. 所述的抗原包被酶标板是这样制备的:

[0011] (1) 包被:无菌条件下,将冻干抗原用蒸馏水悬浮到冻干前的体积,用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液按 1:1000 稀释,以  $100 \mu l$ /孔,包被聚苯乙烯 96 孔板,加盖于  $4^\circ C$  过夜;

[0012] (2) 洗涤:以 0.01mol/L, pH 值为 7.2 的 PBST 作洗涤液,加入足量室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止;

[0013] (3) 封闭:用含 1% 牛血清白蛋白的 0.01mol/L, pH 值为 6.3 的 PBST 按  $100 \mu l$ /孔,加入至酶标板中,  $37^\circ C$  作用 1 小时,甩去,加入足量洗涤液,室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止,自然干燥;

[0014] (4) 包装:将封闭好的酶标板放于铝箔袋中,加入 1g 包装的干燥剂,用真空包装机将酶标板包装好,贴上标签。

[0015] 2. 所述的阳性对照血清的制备方法如下:

[0016] (1) 制造用动物:制备阳性血清的牛需要经过实验室检测,必须是 18 月龄性成熟、健康牛,无小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌 0:157 感染,以及无繁殖系统感染等抗体阴性的健康牛;观察一周;

[0017] (2) 免疫原制备:将布氏杆菌牛种 S1119.3 接种马铃薯浸液琼脂扁瓶,置  $37^\circ C$  培养 48 小时,待形成一层菌落时,选取纯净扁瓶,吸弃凝集水,用含 0.5% 苯酚的灭菌生理盐水将菌苔洗下,倾入中性玻璃瓶中,加甲醛溶液至终浓度为 0.2%,置  $37^\circ C$  振荡灭活 48 小时,经无菌检验合格,于  $4^\circ C$  以 20000 转/分钟离心 10 分钟,取沉淀,用生理盐水做 10 倍稀释,用作免疫原。于  $2^\circ C \sim 8^\circ C$  冰箱保存备用;

[0018] (3) 免疫程序:用免疫原按  $5ml$ /点分 4 点肌肉注射,免疫动物,14 日后,同法免疫一次,再 14 日后采血,分离血清,用 ELISA 检测;血清  $OD_{450nm}$  和阴性血清  $OD_{450nm}$  的比值 (P/N) > 1 方可大量采血;如检验不合格,应再加强免疫一次;

[0019] (4) 血清制造:以常规方法采血,分离其血清,将其作为待检血清,用血清稀释液作 1:2, 1:4, ..., 1:128 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清  $OD_{650nm}$ /质控强阳性血清  $OD_{650nm}$  值 = 1 时的待检血清稀释度作为血清稀释倍数,用血清稀

释液对血清进行稀释；

[0020] (5) 分装：将血清用 0.45 μm 的滤器进行抽滤除菌，无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐，然后无菌条件下定量分装、冻干，贴上标签；

[0021] (6) 标准弱阳性血清制造：将强阳性血清用血清稀释液作 1 : 1.5 稀释。

[0022] 3. 所述的阴性对照血清的制备方法如下：

[0023] (1) 制造用动物同阳性对照血清的制造用动物；

[0024] (2) 血清制造以常规方法采血，分离其血清；

[0025] (3) 血清处理与分装将血清用 0.45 μm 的滤器进行抽滤除菌，无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐，然后无菌条件下定量分装，贴上标签。

[0026] 4. 所述的新型动物布鲁氏菌病单克隆抗体制备方法如下：

[0027] (1) 杂交瘤细胞株的培养：将杂交瘤细胞株从液氮中取出，置于 37℃ 水浴中迅速融化，1000 转 / 分钟离心沉淀细胞，去掉冻存液，加入 10ml MEM 培养基，分成两个培养瓶于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养，2-3 天细胞长满培养瓶底后，进行细胞计数；

[0028] (2) 腹水新型单克隆抗体的制备：按 0.5ml / 只腹腔注射小鼠降植烷，三天后，再按  $5 \times 10^5$  / 只的细胞浓度腹腔注射杂交瘤细胞，约十天后产生腹水，每天采一次，可连续采 2-3 次，腹水取出后，3000 转 / min 离心 10min，收集上清并混合，于 56℃ 水浴处理 10 分钟，-80℃ 冻存为半成品；

[0029] (3) 中间品检验：无菌检验按“兽药典”进行，应无菌生长；

[0030] (4) 效价测定：取出质检过的动物布鲁氏菌病抗原包被酶标板，每孔加入动物布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 诊断试剂盒的样品稀释液 45ul，动物布鲁氏菌病标准阴性血清 5ul，加 2 排孔，标准阳性血清 5ul，加 2 排孔，动物布鲁氏菌病单克隆抗体以 1 : 10 倍比稀释，每个稀释度加 2 列，26℃ 孵育 30 分钟。单克隆抗体效价为 OD<sub>450</sub> 为 0.60 至 1.80 时的单抗稀释倍数；

[0031] (5) 成品制备：按效价检测结果将单抗稀释，分装成 0.2ml / 瓶，密封瓶口，贴好标签，注明批次。

[0032] 本发明新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒是一种敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病的竞争 ELISA 试剂盒，本发明满足我国动物防疫的需求，借助实验室诊断技术对布鲁氏菌病进行最后确诊。

#### (四) 具体实施方式

[0033] 下面对本发明作进一步说明。

[0034] 实施例 1，本发明新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒，它是利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖作抗原包被酶标板，用灭活菌液免疫健康牛或人工感染健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清，用健康非免疫牛血清作阴性对照血清，用新型单克隆抗体作竞争抗体，抗 Fc 受体的蛋白质 AG 酶标物作为二抗，配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液，组装组成。

[0035] 本发明新一代布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 检测试剂盒，还有以下技术特征：

[0036] 1. 所述的抗原包被酶标板是这样制备的：

[0037] (1) 包被：无菌条件下，将冻干抗原用蒸馏水悬浮到冻干前的体积，用 0.05M

pH9.6 的碳酸缓冲液按 1 : 1000 稀释,以 100  $\mu$  l/孔,包被聚苯乙烯 96 孔板,加盖于 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0038] (2) 洗涤:以 0.01mol/L, pH 值为 7.2 的 PBST 作洗涤液,加入足量室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止;

[0039] (3) 封闭:用含 1% 牛血清白蛋白的 0.01mol/L, pH 值为 6.3 的 PBST 按 100  $\mu$  l/孔,加入至酶标板中,37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时,甩去,加入足量洗涤液,室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止,自然干燥;

[0040] (4) 包装:将封闭好的酶标板放于铝箔袋中,加入 1g 包装的干燥剂,用真空包装机将酶标板包装好,贴上标签。

[0041] 2. 所述的阳性对照血清的制备方法如下:

[0042] (1) 制造用动物:制备阳性血清的牛需要经过实验室检测,必须是 18 月龄性成熟、健康牛,无小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌 0:157 感染,以及无繁殖系统感染等抗体阴性的健康牛;观察一周;

[0043] (2) 免疫原制备:将布氏杆菌 S1119.3 接种马铃薯浸液琼脂扁瓶,置 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时,待形成一层菌落时,选取纯净扁瓶,吸弃凝集水,用含 0.5% 苯酚的灭菌生理盐水将菌苔洗下,倾入中性玻璃瓶中,加甲醛溶液至终浓度为 0.2%,置 37 $^{\circ}$ C 振荡灭活 48 小时,经无菌检验合格,于 4 $^{\circ}$ C 以 20000 转/分钟离心 10 分钟,取沉淀,用生理盐水做 10 倍稀释,用作免疫原。于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用;

[0044] (3) 免疫程序:用免疫原按 5ml/点分 4 点肌肉注射,免疫动物,14 日后,同法免疫一次,再 14 日后采血,分离血清,用 ELISA 检测;血清 OD<sub>450nm</sub> 和阴性血清 OD<sub>450nm</sub> 的比值 (P/N) > 1 方可大量采血;如检验不合格,应再加强免疫一次;

[0045] (4) 血清制造:以常规方法采血,分离其血清,将其作为待检血清,用血清稀释液作 1 : 2, 1 : 4, ..... 1 : 128 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清 OD<sub>650nm</sub>/质控强阳性血清 OD<sub>650nm</sub> 值 = 1 时的待检血清稀释度作为血清稀释倍数,用血清稀释液对血清进行稀释;

[0046] (5) 分装:将血清用 0.45  $\mu$  m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐,然后无菌条件下定量分装、冻干,贴上标签;

[0047] (6) 标准弱阳性血清制造:将强阳性血清用血清稀释液作 1 : 1.5 稀释。

[0048] 3. 所述的阴性对照血清的制备方法如下:

[0049] (1) 制造用动物同阳性对照血清的制造用动物;

[0050] (2) 血清制造以常规方法采血,分离其血清;

[0051] (3) 血清处理与分装将血清用 0.45  $\mu$  m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐,然后无菌条件下定量分装,贴上标签。

[0052] 4. 所述的新型动物布鲁氏菌病单克隆抗体制备方法如下:

[0053] (1) 杂交瘤细胞株的培养:将杂交瘤细胞株从液氮中取出,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中迅速融化,1000 转/分钟离心沉淀细胞,去掉冻存液,加入 10ml MEM 培养基,分成两个培养瓶于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养,2-3 天细胞长满培养瓶底后,进行细胞计数;

[0054] (2) 腹水新型单克隆抗体的制备:按 0.5ml/只腹腔注射小鼠降植烷,三天后,再按  $5 \times 10^{5-6}$ /只的细胞浓度腹腔注射杂交瘤细胞,约十天后产生腹水,每天采一次,可连续

采 2-3 次,腹水取出后,3000 转 /min 离心 10min,收集上清并混合,于 56℃水浴处理 10 分钟,-80℃冻存为半成品;

[0055] (3) 中间品检验:无菌检验按“兽药典”进行,应无菌生长;

[0056] (4) 效价测定:取出质检过的动物布鲁氏菌病抗原包被酶标板,每孔加入动物布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 诊断试剂盒的样品稀释液 45u1,动物布鲁氏菌病标准阴性血清 5u1,加 2 排孔,标准阳性血清 5u1,加 2 排孔,动物布鲁氏菌病单克隆抗体以 1 : 10 倍比稀释,每个稀释度加 2 列,26℃孵育 30 分钟.单克隆抗体效价为 OD<sub>450</sub> 为 0.60 至 1.80 时的单抗稀释倍数;

[0057] (5) 成品制备:按效价检测结果将单抗稀释,分装成 0.2ml/ 瓶,密封瓶口,贴好标签,注明批次。

[0058] 5. 所述的血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液是这样配制的:

[0059] (1) 10 倍洗液 (PBST) 的配制:

[0060] 氯化钠,8 克;磷酸二氢钾,0.2 克;磷酸氢二钠 (12H<sub>2</sub>O),6.2.9 克;加蒸馏水至 100 毫升,加 0.5 毫升吐温 20;调 pH 值 7.2,10 磅高压 15 分钟;

[0061] (2) 10 倍样品稀释液的配制:

[0062] 氯化钠,8.5 克;磷酸二氢钾,0.2 克;磷酸氢二钠 (12H<sub>2</sub>O),6.29 克;0.5 毫升吐温 20,EDTA,5.7 克,加蒸馏水至 100 毫升,pH6.3,10 磅高压 15 分钟;

[0063] (3) 10 倍底物 A 溶液的配制:

[0064] 取柠檬酸 4.2g,醋酸钠 13.5g,过氧化尿 0.5g,加去离子水 100ml,调 pH 值 4.0,过滤除菌;分装:1.2ml/ 瓶分装,密封瓶口,粘贴标签;

[0065] (4) 底物 B 溶液的配制:

[0066] 取 TMB 0.2192g,二甲基亚砷 20ml,室温下溶解;分装:0.2ml/ 瓶分装于黑瓶,密封瓶口,粘贴标签;

[0067] (5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液的配制:

[0068] 分装:由美国 VWR 公司生产,0.2ml/ 瓶分装于黑瓶,密封瓶口,粘贴标签;

[0069] (6) 10 倍终止液的配制:

[0070] 取 55.6 毫升 98%的浓硫酸加入 80 毫升水中,调至总体积 100 毫升;

[0071] 分装:1.2 毫升 / 瓶分装于小瓶,密封瓶口,粘贴标签、批次。

[0072] 实施例 2,就本发明新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒的有关问题作如下说明:

[0073] 1 关于菌种选择及标准

[0074] 菌种选择及种子代数国内外分离了很多布鲁氏菌,有着不同的血清型。目前我所保存和使用的布鲁氏菌为牛型 S1119.3 株,该菌株为国际制备布鲁氏菌病检测抗原的标准菌株,该菌株易于培养,并且不易发生粗变。冻干保存于 -70℃,保存期至少 10 年。

[0075] 根据该细菌的遗传稳定性研究,细菌经连续传 10 代后,SLPS 抗原位点结构更为稳定。

[0076] 2 关于抗原制备

[0077] 2.1 细菌繁殖条件控制 S1119.3 是国际制备检测布鲁氏菌病抗原的标准菌株,生

长过程中易于判定病菌增殖情况,且不易粗变。但无论哪种血清型菌株,对人和动物都有一定的感染力,因此,细菌繁殖必须在三级生物安全实验室进行。

[0078] 2.2 细菌灭活将细菌灭活可以降低生产的生物安全风险。研究表明,布鲁氏菌 S1119.3 用 0.5% 的石炭酸生理盐水收获细菌培养物,装于灭菌容器内。加热至 80℃ 维持 90 分钟,杀死细菌灭活后,对提取 SLPS 没有影响。

[0079] 2.3 抗原纯化、浓缩抗原的纯度决定包被抗原实际含量和检测限度,因此,必须对抗原进行提纯;纯化、浓缩的方法采用简便易行的常规法,利用布鲁氏菌抗原 sLPS 可存在于有机相石炭酸中的特性,再用醋酸钠甲醛溶液沉淀抗原 sLPS,用水透析,冷冻干燥抗原 sLPS。再经超声波裂解,从而获得纯化的抗原。

[0080] 2.4 效价测定提纯抗原为用于包被酶标板,需用抗 sLPS 的单克隆抗体测定测定抗原效价,根据试验研究,因为单克隆抗体识别单一抗原位点的专一性,按生产规程制备的抗原纯度基本符合试剂盒要求,但每批抗原的制造过程中 sLPS 的量不是确定不变的,所以每批抗原均需进行效价测定。使用经过标定的单克隆抗体,在抗原量足够时,其 OD 应为 1.5 ~ 2.0,这个显色区间是 ELISA 最敏感,抗原量稍有变化,其 OD 即迅速变化,抗原量小于标准时,OD 值可能偏低,试验不灵敏,OD 值偏高(大于 3.0),可能会出现超出酶标仪的检测范围。

[0081] 3 关于新型单克隆抗体

[0082] 3.1 杂交瘤细胞株本竞争 ELISA 使用的单克隆抗体为抗 SLPS 抗原位点的特异性单克隆抗体。杂交瘤细胞株采用为纯化灭活后的 sLPS 免疫 BalB/C 小鼠,待小鼠脾细胞与 SP2/0 瘤细胞融合后,筛选获得,经鉴定为抗 sLPS 的特异单克隆抗体细胞株,经实验鉴定,该细胞与 OIE 公认的新型单克隆抗体的特异性一致,其特点是不与酶标记的抗 FC 受体结合。目前保存于我公司,于液氮中保存,并有专人负责看管。

[0083] 3.2 腹水新型单克隆抗体的处理用单克隆抗体细胞株注射小鼠制备的单克隆抗体浓度很高,在使用时稀释浓度较高,抗体经过 56℃ 灭后,其中的活性酶类被灭活,用差速离心可去除腹水中的悬浮物,经过滤除菌后分装即可测定效价使用。

[0084] 4 关于标准阴性血清和阳性血清制备阴性血清和阳性血清的方法很多,相对而言用本动物制备效果最好,特异性更强。由于目前国内的动物多数被免疫不同的布鲁氏菌疫苗,阴性血清采自临床健康动物,除要求布鲁氏菌抗体阴性外,要求无小肠结肠炎耶氏菌抗体、乙型副伤寒杆菌抗体,大肠杆菌 0:157 抗体,这样更能反应中国健康动物的实际情况。用大剂量热杀死的布鲁氏菌多次免疫的方法制备阳性血清,细菌种量和程序,免疫时间可根据实际检验情况进行。动物感染布鲁氏菌后,开始产生抗 sLPS 抗体,其抗体水平在 30 天左右达到高峰,持续时间长;另外使用经无菌过滤的确诊诊断自然感染布鲁氏菌动物的血清,也有利于反应中国动物的实际感染情况。根据 OIE 制订的阳性血清的质量标准及中国的具体情况进行,从而保证用布鲁氏菌所制备的抗体及将阳性血清作为标准对照血清的准确性。

[0085] 标准阳性血清是试剂盒中验证 ELISA 试验操作是否正确,反应是否特异的一个重要成分,也是反应该试剂是否工作的指标。根据动物布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 试验的灵敏性试验研究,标准阳性血清对新型单抗的竞争抑制率接近 100%,完全显色,在实验阶段 OD 值从没超过 1.80。标准阴性血清对单抗没有竞争抑制,由于血清的影响,在竞争 ELISA 实验中其 OD 值就略小于空白对照。空白对照,在新型竞争 ELISA 实验中其 OD 值为

0.05-0.50。

[0086] 5 关于临界值 (cut off) 的确定,确定阴阳性限值是决定检测结果准确性非常重要的指标,本实验中,应用制备的竞争 ELISA 试剂盒检测了解 30 份布鲁氏菌病准阴性血清,37 份免疫动物布鲁氏菌血清及 16 份 OIE 阳性血清,应用国际上 OIE 已确认准确性的 CELISA 试剂盒,检测结果进行比对,确定了阳性率在 20% 以上。理论上检测限应为检测大量的阴性血清样品,进行阳性率分布研究,以排除非特异性反应影响特异性,但在实际工作上,难以得到大量的确定阴性样品,只能通过和其他的检测试剂进行比对来确定,本实验中检测的 30 份确定阴性样品其阳性率在 20% 以下。

[0087] 6 关于特异性检验特异性是确定诊断结果准确与否的重要指标之一。为验证其特异性,用 OIE 标准阳性血清、标准阴性血清、阴性参考血清、免疫血清作样品检测动物布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒的阴性检出率,结果为 100%。用乙型副伤寒杆菌、小肠结肠炎耶氏菌、大肠杆菌 0:157 阴、阳性血清进行试剂盒的阴性检出率检测,结果为 96.5%。试验结果表明,动物布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 检测试剂盒具有较高的特异性。

[0088] 7 关于敏感性检验 ELISA 是目前检测抗布鲁氏菌病抗体最敏感的方法之一,由于有交叉反应,疫苗型抗体的存在,这使血清学检测方法很难区分诊断。特别是我国大规模强制免疫动物,疫苗型抗体与自然感染抗体的区分,必须借助抗体检测竞争 ELISA 方能区分并最后确诊鲁氏菌病,减少误诊,避免经济损失。在选用间接 ELISA 筛选诊断的基础上,采用竞争 ELISA 对被检样品进行确诊诊断。研究过程中 16 份 OIE 标准阳性血清和 37 份人工感染血清进行检测,阳性检出率达 96.23%。取 5 份国际标准阳性血清,用生理盐水分别作系列倍比稀释,分别做竞争 ELISA、间接 ELISA、虎红平板凝集试验和补体结合试验,其中竞争 ELISA 试验采用 3 个不同批次的试剂盒进行试验,结果显示竞争 ELISA 试验与间接 ELISA 试验相同,血清最大稀释度达 1 : 5120,检测灵敏性远高于虎红平板凝集实验和补体结合实验。这些实验结果能够表明制备的动物布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 检测试剂盒检测敏感性达到国际 OIE 水平,填补了国内空白。

[0089] 8 关于用法与判定试验方法与试验结果密切相关,正确的操作和恰当的判定才能得出正确的结果,ELISA 是非常敏感的检测方法,往往因为实验操作不当造成检测结果差异很大,因此对用法与结果判定方法也做出具体规定:试剂盒在使用前应恢复至室温,因冰冷的诊断试剂加入到酶标板上需要时间才能使反应条件达到 18 ~ 28℃,这样就造成实际反应时间不足,影响抗原抗原结合。在洗板机操作条件下,4 次洗板就足够。结果计算中,设计了两个阴阳性及空白对照以计算平均值,检测试验的准确性。阳性百分率的计算方法为国际上通用的计算方法。

[0090] 9 关于注意事项因为 ELISA 检测试剂盒中的成分均为生物活性成分,其中的抗体等又都是蛋白成分,在室温下及频繁升降温能够造成蛋白变性从而影响试剂盒的检测效果,所以必须按要求存放使用;另外,试剂盒中的显色剂及终止液均含有对人有害的化学物质,实验中应避免皮肤接触。

[0091] 10 关于稳定性、贮存和有效期在进行保存期研究时,分别将布鲁氏菌病抗体竞争 ELISA 检测试剂盒放置于 2 ~ 8℃、室温和 37℃,每隔一定时间取几条包被好的酶标板条进行检验,结果表明检测试剂盒在 2 ~ 8℃ 保存 12 个月,室温保存 6 个月,37℃ 保存 9 日,其物

理性状,检测特异性及灵敏性均不受影响,因此,我们将保存期规定为 2 ~ 8℃保存,有效期 1 年。

[0092] 实施例 3,诊断布鲁氏菌病的初级结合试验,包括荧光偏振检测和酶联免疫吸附试验。荧光偏振法是一种均相法,不需要除去未结合试剂,操作速度快,两分钟便得到结果,可以消除一些疫苗反应。它既可以用于实验室检测,也可以运用于牧场和野外,适合野生动物布鲁氏菌病的检测。FPA 的敏感性高,是优秀的筛选试验。价格相对低廉,准确度与其它的初级结合试验一样。这种类型的测定,也适合自动化。它的原理是测量分子反应率变化,这种改变是由于在试验样品中抗体与可溶性抗原反应引起。如果抗体结合抗原,抗原的旋转率将下降,则可测量这种反应。FPA 的基本原理是分子在溶液中旋转随机利率与其大小成反比(小分子旋转快速,较大的分子更慢)。如果一个小分子通过依附在一个更大的分子上使其变大,就可以测量小分子的旋转速度变化。FPA 使用的是通过水解特异多糖再标记荧光制备的抗原。这种分子的平均相对分子质量为 22kD,使其远小于分子量为 160kD 的抗体分子(如 IgG 抗体)。FPA 的操作方法中,可在玻璃管或 96 孔板内稀释血清、血液或牛奶后,使用 FPA 分析仪去掉本底的荧光读数。这个读数被存储并且在以后的读值中减去它。FPA 分析仪通过偏振光通过特定的角度测量分子的转动速度。然后加入荧光标记的特异多糖抗原,混合后,孵育 2 分钟(血清或牛奶;全血孵育 15 秒),最后用分析仪读取最终数值。如果在被验样品有抗体,抗原分子的旋转时间增加,导致较高的毫偏振单位(mP)读数。毫偏振单位(mP)读数的大小与抗体存在的数量成比例。

[0093] 两种类型的酶联免疫吸附试验用于对抗体的检测。它们是间接酶联免疫吸附试验和竞争酶联免疫吸附试验。间接酶联免疫吸附试验,以抗体结合在固相上,用一种能与所选择的或所有同种型的抗体结合的酶标记试剂的反应。因为疫苗抗体也可能用这个法检测到,所以它主要是用来作为筛选试验。它有几个优点,包括自动化、商业供货、准确性、相对短的检验时间、相对便宜等适应性。间接酶联免疫吸附试验(IELISA)用于检测平滑或粗糙型布鲁氏菌产生的抗体,可用于大部分哺乳动物。此检验法可在 90 分钟内完成也可作为优秀的筛选试验,用于实验室检测。它的敏感性最高,主要有于布鲁氏菌病的消除计划。

[0094] 快速间接酶联免疫吸附试验(RIELISA),用于检测平滑或粗糙型布鲁氏菌产生的抗体,可用于大部分哺乳动物。此检验法可在 15 分钟内完成可作为优秀的筛选试验,最大优点是可以在牧场、田间操作、快捷。

[0095] 奶液间接酶联免疫吸附试验(MIELISA),用于检测反刍动物奶水内的布鲁氏菌抗体,此常规检测法可测出平滑型布鲁氏菌在牛羊奶内的抗体。耗时 90 分钟,为作为混合奶样品的筛选试验。因为检测动物的奶液可以用于布鲁氏菌病的监测,同时也减少了对产奶动物的刺激。

[0096] 竞争酶联免疫吸附试验使用单克隆抗体与检验样品中的抗体竞争。它不仅具有间接酶联免疫吸附试验属性,且有选择合适的亲和力竞争抗体用以消除由于疫苗和交叉反应的抗体引起的血清学反应。竞争酶联免疫吸附试验(CELISA),用于检测平滑型布鲁氏菌产生的抗体,适用于人和几乎全部动物。此检测法以高敏感度的单克隆抗体为基础,是很好的最后布鲁氏菌病的确诊试验,也是用于区分疫苗免疫和野毒感染的唯一方法。

专利名称(译)	新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101581726B</a>	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN200910071634.5	申请日	2009-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	张晓艳		
申请(专利权)人(译)	张晓艳		
当前申请(专利权)人(译)	张晓艳		
[标]发明人	张晓艳		
发明人	张晓艳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	崔东辉		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN101581726A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明的目的在于提供一种满足我国动物防疫需求、敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病的新一代布鲁氏菌病抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒。它是利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖作抗原包被酶标板，用灭活菌液免疫健康牛或人工感染健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清，用健康非免疫牛血清作阴性对照血清，用新型单克隆抗体作竞争抗体，抗Fc受体的蛋白质AG酶标物作为二抗，配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液A、底物溶液B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液，组装组成。本发明是一种敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病的竞争ELISA试剂盒，本发明满足我国动物防疫的需求，借助实验室诊断技术对布鲁氏菌病进行最后确诊。