



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103792366 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201410026997. 8

(22) 申请日 2014. 01. 21

(73) 专利权人 内蒙古必威安泰生物科技有限公司

地址 010176 内蒙古自治区呼和浩特市和林  
县盛乐经济开发区师大东路

(72) 发明人 赵炳武 赵宏凯 任美荣 刘金萍  
王永伟 吕宏亮 张澍

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理  
有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨 费碧华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 16/06(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5149627 A, 1992. 09. 22, 说明书第 2、3、7  
栏, 表 3, 附图 2A.

WO 2005/071410 A1, 2005. 08. 04, 说明书  
[0051]、[0052]、[0066]、[0067] 段.

US 5149627 A, 1992. 09. 22, 说明书第 2、3、7  
栏, 表 3, 附图 2A.

WO 2005071410 A1, 2005. 08. 04, 说明书  
[0066]、[0067] 段.

CN 101570566 A, 2009. 11. 04, 全文.

JP 昭 61-51571 A, 1986. 03. 14, 全文.

WO 2004/094989 A2, 2004. 11. 04, 全文.

审查员 苗君叶

权利要求书1页 说明书8页

### (54) 发明名称

口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫  
检测试剂盒及使用方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种用于检测口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫试剂盒, 所述双抗夹心酶联免疫试剂盒包括: 标准品, 兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体包被的 96 孔酶标板, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG, 抗 BHK21 细胞蛋白抗体液, 稀释液, 封闭液, 洗液, 终止液 2M  $H_2SO_4$ , 显色液, 其中, 所述的标准品为幼仓鼠肾细胞蛋白, 包被抗体和检测抗体均为兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体。本发明检测试剂盒中包被抗体量更加稳定均一、对微量抗原的乳化更加简便充分、结合抗体与检测抗体为同一抗体在制作试剂盒过程中更加便捷高效, 避免不同抗体之间的交叉影响。

1. 一种用于检测口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述双抗夹心酶联免疫试剂盒包括:标准品,兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体包被的 96 孔酶标板,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,抗 BHK21 细胞蛋白抗体液,稀释液,封闭液,洗液,终止液  $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ ,显色液,其中,所述的标准品为幼仓鼠肾细胞蛋白,包被抗体和检测抗体均为兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体;

快速充分乳化少量抗原蛋白液,方法为硅胶管两端分别加装 5 号针头,硅胶管处加蠕动泵作为乳化动力源,两针头放入同一装有抗原液与佐剂混合的混合液的离心管,一端插入蛋白液另一端在液面上,抽吸 40min 后乳化完成;

酶标板处理方法用 10%硫酸鱼精蛋白溶液每孔  $100\ \mu\text{l}$   $37^\circ\text{C}$  2 小时处理酶标板,抗体效价对照稀释包被,即将间接 ELISA 检测效价为 1:2048 的抗体液稀释 32 倍后加入酶标板每孔  $100\ \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$  包被过夜,后封闭 2 小时,封存。

2. 根据权利要求 1 中所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体的制备方法为:

首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化抗原,家兔背部脊柱两侧四点注射,注射 BHK21 蛋白总量  $1000\ \mu\text{g}/\text{只}$ ;首次免疫后 14 天后进行二次免疫,步骤及剂量与首次免疫相同,二次免疫采用弗氏不完全佐剂乳化抗原;二次免疫后 21 天进行三次免疫,步骤及剂量与二次免疫相同;之后每隔 21 天检测抗体效价,免疫一次,效价超过 1:32000 进行心脏大量采血。

3. 根据权利要求 1 中所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述幼仓鼠肾细胞蛋白的制备方法如下:

将 BHK21 细胞用 DMEM 培养基加马血清培养传代,待细胞长满培养瓶底用 pH 为 7.2 的  $10\times\text{PBS}$  洗涤 5 次,将培养基洗涤干净,胰酶消化细胞待细胞脱落,后再用  $10\times\text{PBS}$  洗涤 5 次后装入截留分子量为 8000-14000Da 的透析袋,在 100 倍体积  $10\times\text{PBS}$  缓冲液中  $4^\circ\text{C}$  透析 12 小时,而后将细胞放入离心管中, $-80^\circ\text{C}$  反复冻融 5 次,镜下观察无完整细胞后进行  $7500\text{r}/\text{min}$  离心,去除细胞碎片,取上层溶液,此溶液为所需抗原蛋白溶液,考马斯亮蓝法检测蛋白含量。

4. 使用如权利要求 1-3 任一项所述的双抗夹心酶联免疫试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 加入待测样品:取出酶标板加入稀释后的待测样品, $100\ \mu\text{l}$  每孔, $37^\circ\text{C}$ ,2 小时;
- (2) 加入检测抗体:取出检测抗体稀释 32 倍,每孔加入  $100\ \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$ ,1.5 小时;
- (3) 加酶标二抗:将酶标二抗稀释 10000 倍后每孔加入  $100\ \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$ ,20 分钟;
- (4) 显色:每孔加入显色液  $100\ \mu\text{l}$ , $37^\circ\text{C}$ ,4 分钟;
- (5) 终止:每孔加入  $40\ \mu\text{l}$ , $2\text{M}$  硫酸溶液;
- (6) 酶标仪测量在波长为 450nm 的值,计算 BHK21 细胞蛋白含量;

其中,所述计算的方法为:

采用样品读取值与阴性值作差后引入公式  $y = Z(4925.2x - 702.52)$  中计算细胞蛋白含量,其中  $y$  代表细胞蛋白含量,单位  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , $x$  值为阳性吸光值与阴性吸光值之差, $Z$  为稀释倍数。

## 口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及 使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及使用方法,具体涉及一种用于检测口蹄疫疫苗中宿主细胞(即幼仓鼠肾细胞)残留蛋白的双抗体夹心酶联免疫试剂盒及其使用方法,属于生物检测领域。

### 背景技术

[0002] 口蹄疫是猪、牛、羊等主要家畜和其它家养、野生偶蹄动物共患的一种急性、热性、高度接触性传染病,易感动物达 70 多种。临床特征是在口腔黏膜、蹄部和乳房皮肤发生水疱性疹。该病传播途径多、速度快,曾多次在世界范围内暴发流行,造成巨大政治、经济损失。鉴于此,世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类传染病之首。目前,有三分之二的 OIE 成员国流行口蹄疫,时刻威胁着无口蹄疫国家和地区的家畜安全和畜产品贸易。口蹄疫病毒属于微核糖核酸病毒科口蹄疫病毒属。其最大颗粒直径为 23 纳米,最小颗粒直径为 7-8 纳米,是目前所知病毒中最细微的一级。

[0003] 牛尤其是犊牛对口蹄疫病毒最易感,骆驼、绵羊、山羊次之,猪也可感染发病。本病具有流行快、传播广、发病急、危害大等流行病学特点,疫区发病率可达 50% -100%,犊牛死亡率较高,其他则较低。病畜和潜伏期动物是最危险的传染源。病畜的水疱液、乳汁、尿液、口涎、泪液和粪便中均含有病毒。该病人侵途径主要是消化道,也可经呼吸道传染。本病传播虽无明显季节性,且春秋两季较多,尤其是春季。风和鸟类也是远距离传播的因素之一。

[0004] 口蹄疫是目前我国最具影响的动物传染病之一。口蹄疫病毒型多易变,宿主广泛,致病性强,而免疫原性又相对较弱。该病传播方式及感染途径多而复杂,康复动物可长期带毒排毒,致使口蹄疫的防控十分困难。因此对口蹄疫疫苗质量要求越来越高,致使用以衡量疫苗质量,检测其他无关蛋白方法及相关产品呼之欲出。随着无血清细胞培养技术的产生和应用,宿主细胞残留蛋白成为影响疫苗的主要因素,所以对宿主细胞残留蛋白的检测尤为重要。与这一需求相矛盾的情况是,口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白检测相关产品的缺失,这为疫苗的检测监督造成了缺口和漏洞。在这种供求矛盾面前显得这一发明尤为重要。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的之一提供一种口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及使用方法。

[0006] 本发明的目的之二提供一种微量抗原乳化的方法

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一种用于检测口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫试剂盒,所述双抗夹心酶联免疫试剂盒包括:标准品,兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体包被的 96 孔酶标板,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,稀释液,抗 BHK21 细胞蛋白抗体液,封闭液,洗液,终止液

2M  $H_2SO_4$  显色液, 其中, 所述的标准品为幼仓鼠肾细胞蛋白, 包被抗体和检测抗体均为兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体。

[0009] 1、兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体的制备

[0010] 首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化抗原, 家兔背部脊柱两侧四点注射, 注射 BHK21 细胞蛋白总量 1000ug/ 只; 首次免疫后 14 天后进行二次免疫, 步骤及剂量与首次免疫相同, 二次免疫采用弗氏不完全佐剂乳化抗原; 二次免疫后 21 天进行三次免疫, 步骤及剂量与二次免疫相同; 之后每隔 21 天检测抗体效价, 免疫一次, 效价超过 1:32000 可以心脏大量采血。

[0011] 2、BHK21 细胞 (幼仓鼠肾细胞) 蛋白的制备

[0012] BHK21 细胞 (幼仓鼠肾细胞) 购自中检所, 应用 DMEM 培养基加马血清培养传代, 待细胞长满培养瓶底用 pH7.2 的 10×PBS 洗涤 5 次, 将培养基洗涤干净, 胰酶消化细胞待细胞脱落, 后再用 10×PBS 洗涤 5 次后装入截留分子量为 8000-14000Da 的透析袋, 在 100 倍体积 10×PBS 缓冲液中 4℃透析 12 小时, 而后将细胞放入离心管中, -80℃反复冻融 5 次, 镜下观察无完整细胞后进行 7500r/min 离心, 去除细胞碎片, 取上层溶液, 此溶液为所需抗原蛋白溶液, 考马斯亮蓝法检测蛋白含量。

[0013] 3、抗原蛋白溶液的乳化方法

[0014] 将 2 中获得的抗原蛋白溶液用 10×PBS 稀释成所需浓度, 再与蛋白液等体积的弗氏佐剂混合后乳化。做冰水点滴试验, 冰水中超过 10min 不扩散即达到乳化标准。本发明的乳化方法可以快速充分乳化少量抗原蛋白液, 具体操作方法为硅胶管两端分别加装 5 号针头, 硅胶管处加蠕动泵作为乳化动力源, 两针头放入同一装有抗原液与佐剂混合的混合液的离心管, 一端插入蛋白液另一端在液面上, 抽吸 40min 后乳化完成。

[0015] 5、包被抗体血清的制备

[0016] 应用 3 中获得的乳化抗原进行免疫, 首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化抗原, 家兔背部脊柱两侧四点注射, 注射 BHK21 细胞蛋白总量 1000ug/ 只; 首次免疫后 14 天后进行二次免疫, 二次免疫采用弗氏不完全佐剂乳化抗原, 步骤及剂量与首次免疫相同; 二次免疫后 21 天进行三次免疫, 步骤及剂量与二次免疫相同; 之后每隔 21 天免疫一次并且采血检测抗体效价, 当效价超过 1:32000 可以大量采血, 置于血凝管中离心制备血清。

[0017] 6、间接 ELISA 法检测抗体效价

[0018] 用 2 中提取的蛋白以 10ug/ml 量包被后, 用 0.1% BSA 封闭 90 分钟, 然后将 4 中制备的血清稀释 16 倍后加入第一列, 然后依次两倍稀释, 结合 110 分钟, 加入稀释到工作浓度的酶标二抗 20 分钟, 之后显色终止, 酶标仪设定波长为 450nm, 读取数据, 每个步骤完成后用洗涤液洗涤 3 到 5 次。

[0019] 7、包被抗体的纯化

[0020] (1) 辛酸硫酸铵法粗提抗体

[0021] 首先动物血清用 4 倍体积的乙酸乙酸钠缓冲液稀释, 0.1mol/LNaOH 调 pH 至 4.5, 室温下搅拌并缓慢加入辛酸, 10000r/min 离心 20min, 取上清, 量体积, 按 1/10 体积加入 10×PBS, 并用 5mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.4, 在 4℃按 277g/L 缓慢加入硫酸铵粉末, 加完后继续搅拌 30min, 离心弃上清, 收集沉淀, 沉淀用 10×PBS 溶解, 透析过夜, 透析后的抗体溶液在 50-55℃水浴中加热 20min, 5000r/min 离心 20min, 取上清液放置 -20℃保存。

[0022] (2) 亲和层析柱纯化抗体

[0023] 用结合缓冲液稀释 4 中获得的抗体, 至 pH 接近 7.0, 然后将蛋白 A 填料装入柱子, 用 5 倍体积结合缓冲液平衡柱子。上样, 结合缓冲液洗柱子, 收集洗脱缓冲液洗下的结合在柱料上的抗体, 然后用结合缓冲液复生柱料。

[0024] 8、酶标板的处理

[0025] 用 10% 硫酸鱼精蛋白溶液每孔 100ul 37℃ 2 小时处理酶标板, 后用抗体效价对照稀释包被, 即将间接 ELISA 检测效价为 1:2048 的抗体液稀释 32 倍后加入酶标板每孔 100ul, 37℃ 包被过夜, 后封闭 2 小时, 封存。

[0026] 9、使用本发明双抗夹心酶联免疫试剂盒的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

[0027] (1) 加入待测样品: 取出酶标板加入稀释后的待测样品, 100ul 每孔, 37℃, 2 小时;

[0028] (2) 加入检测抗体: 取出检测抗体稀释 32 倍, 每孔加入 100ul, 37℃, 1.5 小时;

[0029] (3) 加酶标二抗: 将酶标二抗稀释 10000 倍后每孔加入 100ul, 37℃, 20 分钟;

[0030] (4) 显色: 每孔加入显色液 100ul 37℃ 4 分钟;

[0031] (5) 终止: 每孔加入 40ul 2M 硫酸溶液;

[0032] (6) 酶标仪测量在波长为 450nm 的值, 计算 BHK21 细胞蛋白含量;

[0033] 其中, 所述的计算方法为:

[0034] 采用样品读取值与阴性值作差后引入公式  $y = Z(4925.2x - 702.52)$  中计算细胞蛋白含量, 其中 Y 代表细胞蛋白含量, 单位 ug/ml, X 值为阳性吸光值与阴性吸光值之差, Z 为稀释倍数。

[0035]  $Y = Z(4925.2X - 702.52)$  的确立过程如下:

[0036] 依照双抗夹心 ELISA 体系对 BHK21 细胞蛋白液进行检测, 具体方法如下:

[0037] (1) 将提取的 BHK21 细胞破碎提取蛋白;

[0038] (2) 用考马斯亮蓝法定量蛋白液中蛋白含量;

[0039] (3) 稀释蛋白液使蛋白含量分别为 100ug/ml 200ug/ml 300ug/ml 400ug/ml 四个梯度, 完成 ELISA;

[0040] (4) 进行多次实验分别得到四个蛋白含量梯度阳性吸光值与阴性吸光值差值的平均值, 依照得到的四个平均值确定标准曲线建立方程。

[0041] 试验阳性吸光值与阴性吸光值的差平均值如下:

[0042]

| 蛋白含量        | 100      | 200     | 300     | 400      |
|-------------|----------|---------|---------|----------|
| 阳性与阴性差 OD 值 | 0.163208 | 0.18275 | 0.20375 | 0.223875 |

[0043] 根据以上四点做标准曲线得到方程  $Y = Z(4925.2X - 702.52)$

[0044] 本发明优点在于, 目前唯一针对且只针对 BHK21 细胞蛋白的检测试剂盒、包被抗体量更加稳定均一、对微量抗原的乳化更加简便充分、结合抗体与检测抗体为同一抗体在制作试剂盒过程中更加便捷高效, 避免不同抗体之间的交叉影响。

## 具体实施方式

[0045] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0046] 实施例 1BHK21 细胞细胞蛋白的制备

[0047] 材料:10×磷酸盐-NaCl 缓冲液:100mmol/LPBS, pH7.2。称 NaCl 80g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  29g、KCl 2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,加蒸馏水溶解,加入 100mmol/L EDTA 20ml,用去离子水定容至 1000mL;

[0048] BHK21 细胞(幼仓鼠肾细胞)购自中检所、DMEM 培养基、马血清、透析袋(8000nm-14000nm)。

[0049] 提取步骤:

[0050] BHK21 细胞(幼仓鼠肾细胞)购自中检所,应用 DMEM 培养基加马血清培养传代,待细胞长满培养瓶底用 pH 为 7.2 的 10×PBS 洗涤 5 次,将培养基洗涤干净,胰酶消化细胞待细胞脱落,后再用 pH 为 7.2 的 10×PBS 洗涤 5 次后装入截留分子量为 8000-14000Da 的透析袋,在 100 倍体积缓冲液中 4℃透析 12 小时,而后将细胞放入离心管中, -80℃反复冻容 5 次,镜下观察无完整细胞后进行 7500r/min 离心,去除细胞碎片,取上层溶液,此溶液为所需抗原蛋白溶液,考马斯亮蓝法检测蛋白含量。

[0051] 考马斯亮蓝法操作步骤:

[0052] (1) 浓染液的配制:将 100mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50ml 95%乙醇,加入 100ml85%的磷酸,然后,用蒸馏水补充至 1000ml,此染液放 4℃至少 6 个月保持稳定;

[0053] (2) 标准曲线蛋白质样本的准备:尽量使用与待测样本性质相近的蛋白质作为标准品,例如测定抗体,可用纯化的抗体作为标准。如果待测样本是未知的,也可用抗体作为标准蛋白。通常在 20ug-150ug/100ul 之间绘制标准曲线;

[0054] (3) 将待测样本溶于缓冲溶液中,该缓冲溶液应与制作标准曲线的缓冲溶液相同;

[0055] (4) 按 1:5 用蒸馏水稀释浓染料结合溶液,用滤纸滤去沉淀;

[0056] (5) 每个 1ml 样本加 5ml 稀释的染料结合溶液,作用 5-30min。染液与蛋白质结合后,将由红色变为蓝色,在 595nm 波长下测定其吸光度。注意,显色反应不得超过 30min;

[0057] (6) 根据标准曲线公式计算蛋白的浓度。注释:每次配制考马斯亮蓝染液做一次标准曲线;

[0058] 标准曲线公式为  $Y = (X - 0.048) / 0.0082$ 。

[0059] 实施例 2 抗原乳化

[0060] 材料:弗氏佐剂、实施例 1 获得的抗原蛋白溶液

[0061] 操作步骤:

[0062] (1) 按需要量稀释蛋白液(BHK21 细胞蛋白液 500ug/ml,10ml 加入 10ml 弗氏佐剂);

[0063] (2) 与蛋白液等体积混合弗氏佐剂;

[0064] (3) 细硅胶管两端连接 5 号针头并且用扎带扎住;

[0065] (4) 中间加一个小型蠕动泵,其转速为 2ml/min;

- [0066] (5) 装有抗原佐剂混合液的离心管置于冰袋中；
- [0067] (6) 将管的两端同时放入离心管中一端伸入管底；
- [0068] (7) 打开蠕动泵循环抽吸 40min, 待冰水滴定试验不扩散为乳化完成。
- [0069] 实施例 3 包被抗体血清的制备：
- [0070] 材料：实施例 2 获得的乳化抗原、2ml 注射器、10ml 注射器、采血管、镊子、剪刀、酒精棉。
- [0071] 操作步骤：
- [0072] (1) 保定家兔（新西兰大耳兔）；
- [0073] (2) 剔除家兔耳缘静脉处皮肤上的兔毛；
- [0074] (3) 用 2ml 注射器采血, 1ml/ 只；
- [0075] (4) 应用实施例 2 获得的乳化抗原进行免疫, 首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化抗原, 家兔背部脊柱两侧四点注射, 注射总量 1000ug/ 只。首次免疫后 14 天后进行二次免疫, 步骤及剂量与首次免疫相同, 二次免疫采用弗氏不完全佐剂乳化抗原。二次免疫后 21 天进行三次免疫, 步骤及剂量与二次免疫相同。之后每隔 21 天检测抗体效价, 免疫一次, 效价超过 1:32000 可以心脏大量采血, 置于血凝管中离心制备血清, -80℃ 保存。
- [0076] 实施例 4 间接 ELISA 检测抗体效价
- [0077] 试剂配制
- [0078] 包被缓冲液 (pH9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液) :  $\text{NaCO}_3$  1.59 克、 $\text{NaHCO}_3$  2.93 克、加蒸馏水至 1000ml；
- [0079] 洗涤缓冲液 (pH7.4) : 0.15M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 克、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 克、 $\text{NaCl}$  8.0 克、 $\text{KCl}$  0.2 克、0.05% 的 Tween-20 0.7ml、加蒸馏水至 1000ml；
- [0080] 稀释液：牛血清白蛋白 (BSA) 0.1 克加洗涤缓冲液至 100ml；
- [0081] 终止液 (2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) : 蒸馏水 178.3ml, 逐滴加入浓硫酸 21.7ml；
- [0082] TMB (四甲基联苯胺) 使用液：
- [0083] A 液：醋酸钠 13.6g, 柠檬酸 1.6g,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.3ml, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml；
- [0084] B 液：EDTA-Na 0.2g, 柠檬酸 0.95g, 甘油 50ml, TMB 0.2g, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml；
- [0085] 实施例 3 检测获得的血清效价。
- [0086] 操作步骤：
- [0087] (1) 包被：用 0.05M pH9.6 碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在每个板的反应孔中加 0.1ml, 4℃ 过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 5 次, 每次 3min；
- [0088] (2) 每孔加入 0.1ml 的 0.1% BSA 封闭, 37℃ 温浴 90min, 洗 5 次, 每次 3min；
- [0089] (3) 加样：稀释方法第一孔 1:16, 后面孔稀释倍数以二倍增加, 加稀释的待检血清 0.1ml 于上述已包被之反应孔中, 置 37℃ 孵育 110min。然后洗涤 5 次, 每次 3min；
- [0090] (4) 加酶标抗体：于各反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标抗体 0.1ml。37℃ 孵育 60min, 洗涤；
- [0091] (5) 加底物液显色：于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1ml, 37℃ 6min；
- [0092] (6) 终止反应：于各反应孔中加入 2M 硫酸 0.05ml。

[0093] 阴性阳性判定

[0094] 在 ELISA 检测仪上,于 450nm 处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值。以 P/N 值(阳性孔 OD 值 - 空白值 / 阴性孔 OD 值 - 空白值)大于或等于 2.1 为阳性;P/N 值小于 2.1,但大于 1.5 为可疑阳性需重复试验;P/N 小于 1.5 为阴性。

[0095] 实施例 5 纯化抗体(IgG)的制备

[0096] 1、辛酸硫酸铵粗提抗体(IgG)

[0097] 试剂:

[0098] 乙酸-乙酸钠缓冲液:60mmol 乙酸钠,用乙酸将 pH 调至 4.0,最终定容到 1L;

[0099] 10×磷酸盐-NaCl 缓冲液:100mmol/LPBS, pH7.4。称 NaCl 80g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  29g、KCl 2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,加蒸馏水溶解,加入 100mmol/L EDTA 20ml,用去离子水定容至 1000mL;

[0100] 透析液:缓冲液即 10mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液含 15mmol/L NaCl, pH7.2;

[0101] 硫酸铵;

[0102] 辛酸;

[0103] 操作步骤:

[0104] (1) 将动物血清用 3 倍体积的乙酸乙酸钠缓冲液稀释,用 0.1mol/L NaOH 调 pH 至 4.5;

[0105] (2) 置于 4℃ 环境搅拌并缓慢加入辛酸(每升血清稀释液加入 25ml 辛酸),加完继续搅拌 30min,然后静置 2 小时,12000r/min 离心 30min,取上清并且测量体积。按 1/10 体积加入 10×PBS,并用 5mol/L 的 NaOH 调至 7.4;

[0106] (3) 上清置于 4℃ 冷遇 10min,在 4℃ 条件下按 277g/L,缓慢加入硫酸铵粉末(终浓度达到 45% 饱和度)边加边搅拌,加完后继续搅拌 30min,后静置 1.5 小时;

[0107] (4) 10000r/min 离心 20min,弃上清收集沉淀;

[0108] (5) 沉淀用原血清体积的 1/10 的溶解后装入透析袋,放入 100 倍体积的透析液中,4℃ 条件下透析过夜;

[0109] (6) 12000r/min 离心 20min 取上清液放置 -20℃ 保存。

[0110] 2、亲和层析纯化抗体

[0111] 缓冲液

[0112] 结合缓冲液:用 50mM Tris-HCl pH 7.0 做缓冲液;

[0113] 洗脱缓冲液:0.1M 甘氨酸缓冲液 pH 3.0;

[0114] 再生缓冲液:同洗脱缓冲液;

[0115] 灭菌清洁液:75%酒精;

[0116] 柱料贮存液:20%酒精。

[0117] 准备纯化抗体样品的准备

[0118] 抗体样品经硫酸铵粗提后,用结合缓冲液稀释 5-10 倍,以保证样品液的成分及 pH 和结合缓冲液接近。若上样体积过大,可以采取调节样品 pH 和盐浓度的方式,使样品中的缓冲体系与结合缓冲液相同。细胞培养液中大量的血清蛋白会对亲和层析造成一定的干扰,去血清处理或稀释样品将提高纯化抗体收率。样品在上柱前需 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

[0119] 操作步骤

- [0120] 平衡 :填料装柱后,用结合缓冲液洗 5-10 个柱床体积洗掉乙醇并平衡柱子 ;
- [0121] 上样 :将样品上柱,上样流速 $\leq 60\text{cm/h}$  ;
- [0122] 清洗 :平衡缓冲液洗 5-10 个柱床体积,洗至基线 ;
- [0123] 洗脱 :洗脱缓冲液洗脱,收集洗脱峰,洗脱液立即用中和缓冲液中和到中性 ;
- [0124] 再生 :再生缓冲液流洗 2-3 个柱床体积 ;
- [0125] 保存 :先后用结合缓冲液、体积分数为 20%乙醇分别流洗 3-5 个柱床体积,层析柱内保留适当体积的体积分数为 20%乙醇,置于 4-8℃保存。
- [0126] 实施例 6 口蹄疫疫苗残留蛋白(BHK21 细胞蛋白)检测试剂盒构成及制备方法
- [0127] 1、BHK21 细胞蛋白检测试剂盒包括 :标准品 5ml,兔抗 BHK21 细胞蛋白多克隆抗体包被的 96 孔酶标板 10 块,10000 $\times$  辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 2 $\times$ 500u1,10 $\times$  稀释液 100ml,封闭液 100ml,10 $\times$  抗 BHK21 细胞蛋白抗体液 100ml,10 $\times$  洗液 50ml,终止液 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50ml,显色液包括 A 液 150ml, B 液 150ml。
- [0128] 2、ELISA 相关溶液配制
- [0129] 酶标板处理液 :10mg 硫酸鱼精蛋白溶解于 100ml 蒸馏水中 ;
- [0130] 包被缓冲液 (PH9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液) : $\text{NaCO}_3$  1.59 克, $\text{NaHCO}_3$  2.93 克加蒸馏水至 1000ml ;
- [0131] 洗涤缓冲液 (PH7.4 10 $\times$ PBS) :0.15M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 克, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 克, $\text{NaCl}$  8.0 克, $\text{KCl}$  0.2 克,Tween-20 0.05% 0.7ml,加蒸馏水至 1000ml ;
- [0132] 稀释液 :牛血清白蛋白 (BSA)0.2 克加洗涤缓冲液至 100ml ;
- [0133] 终止液 (2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) :蒸馏水 178.3ml,逐滴加入浓硫酸 21.7ml。
- [0134] TMB(四甲基联苯胺)使用液 :
- [0135] A 液 :醋酸钠 13.6g,柠檬酸 1.6g, $\text{H}_2\text{O}_2$  0.3ml,补 dd $\text{H}_2\text{O}$  至 500ml ;
- [0136] B 液 :EDTA-Na 0.2g,柠檬酸 0.95g,甘油 50ml,TMB0.2g,补 dd $\text{H}_2\text{O}$  至 500ml。
- [0137] 3、抗体酶标板的制备
- [0138] 首先用 10%硫酸鱼精蛋白溶液每孔 100u1 处理酶标板 37℃ 2 小时,然后将实施例 5 制备的间接 ELISA 检测效价为 1:2048 的抗体液,用包被缓冲液稀释 32 倍后按 100u1/ 孔加入到酶标板中,放置 4℃冰箱 12 小时,弃包被液,每孔加入洗涤缓冲液 100u1 洗涤 3 次,加入封闭液 100u1/ 孔于 37℃ 2h,弃封闭液风干后装入专用锡箔袋,抽真空,热压封口,后 4℃条件保存。
- [0139] 实施例 7 口蹄疫疫苗残留蛋白(BHK21 细胞蛋白)检测步骤 :
- [0140] (1) 从 4℃冰箱取出试剂盒,平衡各组至室温 ;
- [0141] (2) 稀释待测样品(疫苗的阻断样或破乳样用稀释液稀释),确保蛋白浓度在 50ug-1000ug/ml 之间。后每孔加入稀释后待检测样 100ml,封口膜封口,置 37℃温箱中 2 小时取出弃去检测液体 ;
- [0142] (3) 每孔加 100u1 洗涤液洗涤 3 次后加入稀释到工作浓度的一抗,100u1/ 孔,分别加入阳性和阴性,置 37℃温箱 1.5 小时 ;
- [0143] (4) 取出,弃一抗,每孔加 100u1 洗涤液洗 3 次后加入稀释到工作浓度的酶标二抗,置 37℃温箱 20 分钟后取出 ;
- [0144] (5) 弃二抗每孔加 100u1 洗涤液洗 5 次后风干 ;

[0145] (6) 加入显色液每孔 100ul, 置 37℃温箱 4 分钟;

[0146] (7) 加入终止液 40ul/ 孔终止反应;

[0147] (8) 立即放入酶标仪读取, 酶标仪设定波长为 450nm。

[0148] 结果计算: 在加入一抗时, 分别加入阳性和阴性。这样就出现阳性值和阴性值。接下来用公式  $y = Z(4925.2x - 702.52)$  (公式经过增加重复试验数据进行校正更改如下) 计算细胞蛋白含量, 其中 Y 代表细胞蛋白含量, 单位 ug/ml。X 值为阳性吸光值与阴性吸光值之差, Z 为稀释倍数。

[0149] 具体步骤如下

[0150] (1) 取口蹄疫疫苗阻断样稀释 5 倍;

[0151] (2) 按照上述检测步骤完成夹心 ELISA, 稀释后阻断样为待测样品, 检测阻断样中 BHK21 细胞蛋白残留量;

[0152] (3) 分别重复 3 组检测, 根据公式要求计算阳性吸光值与阴性吸光值的差值为 0.1575、0.1607、0.1560, 三者平均值为 0.1581;

[0153] (4) 带入  $y = Z(4925.2x - 702.52)$  计算得到口蹄疫疫苗中含 BHK21 细胞蛋白量为 380.7ug/ml。

|         |                                                           |         |            |
|---------|-----------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及使用方法                             |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN103792366B</a>                              | 公开(公告)日 | 2015-09-23 |
| 申请号     | CN201410026997.8                                          | 申请日     | 2014-01-21 |
| [标]发明人  | 赵炳武<br>赵宏凯<br>任美荣<br>刘金萍<br>王永伟<br>吕宏亮<br>张澍              |         |            |
| 发明人     | 赵炳武<br>赵宏凯<br>任美荣<br>刘金萍<br>王永伟<br>吕宏亮<br>张澍              |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535 C07K16/18 C07K16/06       |         |            |
| CPC分类号  | C07K16/06 C07K16/18 G01N33/54373 G01N33/54393 G01N33/6803 |         |            |
| 代理人(译)  | 孙皓晨                                                       |         |            |
| 其他公开文献  | CN103792366A                                              |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>            |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种用于检测口蹄疫疫苗宿主细胞蛋白的双抗夹心酶联免疫试剂盒，所述双抗夹心酶联免疫试剂盒包括：标准品，兔抗BHK21细胞蛋白多克隆抗体包被的96孔酶标板，辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG，抗BHK21细胞蛋白抗体液，稀释液，封闭液，洗液，终止液2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，显色液，其中，所述的标准品为幼仓鼠肾细胞蛋白，包被抗体和检测抗体均为兔抗BHK21细胞蛋白多克隆抗体。本发明检测试剂盒中包被抗体量更加稳定均一、对微量抗原的乳化更加简便充分、结合抗体与检测抗体为同一抗体在制作试剂盒过程中更加便捷高效，避免不同抗体之间的交叉影响。

|           |          |         |         |          |
|-----------|----------|---------|---------|----------|
| 蛋白含量      | 100      | 200     | 300     | 400      |
| 阳性与阴性差OD值 | 0.163208 | 0.18275 | 0.20375 | 0.223875 |

根据以上四点做标准曲线得到方程  $y = 2(4925.2x - 702.52)$