



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101957377 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 13

(21) 申请号 201010284324. 4

(22) 申请日 2010. 09. 17

(73) 专利权人 山东省农业科学院畜牧兽医研究所

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路 10 号

(72) 发明人 颜世敢 朱丽萍 李雁冰 张玉忠 周百成 胡北侠 张秀美 许传田 杨少华

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

C07K 16/10 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1396454 A, 2003. 02. 12, 权利要求 1, 3,

14 和 15;说明书第 1 段和第 5 段.

CN 101142485 A, 2008. 03. 12, 全文.

EP 2103937 A1, 2009. 03. 18, 全文.

颜世敢等. 《R-藻红蛋白标记抗体荧光探针的高效制备及其在禽流感病毒检测中的应用》. 《南京农业大学学报》. 2009, 第 32 卷 (第 2 期), 92-96.

颜世敢等. 《藻胆蛋白荧光探针在动物疫病检测中的应用展望》. 《中国动物检疫》. 2009, 第 26 卷 (第 1 期), 36-37.

颜世敢等. 《异型双功能交联剂 SPDP 对 C-藻蓝蛋白的光谱影响》. 《光谱学与光谱分析》. 2008, 第 28 卷 (第 5 期), 1115-1117.

审查员 李宏悦

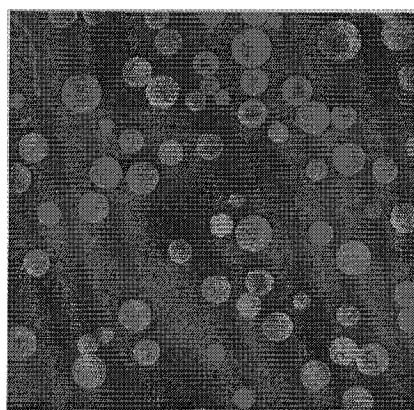
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法
及固相免疫荧光检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒。本发明采用别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, APC) 标记禽流感病毒抗体制备荧光抗体, 分别用化学交联剂 SPDP 将 APC、抗体衍生, 衍生物以适宜摩尔比液相交联, 然后经高压液相色谱纯化制备荧光抗体。荧光抗体与 CNBr 活化的琼脂糖微球、抗禽流感病毒抗体、洗涤液等组装成固相免疫荧光检测试剂盒。试剂盒使用方法为: 微球载体活化后先用抗禽流感病毒抗体包被, 洗涤, 包被抗体的微球与待测样品 (抗原) 结合, 洗涤后与荧光抗体结合, 洗涤去除未结合的荧光抗体, 荧光显微镜下观察、判定结果。本发明制备的荧光抗体交联效率高、纯度高、红色荧光明亮、荧光抗体性质稳定。试剂盒采用的微球固相载体能显著提高荧光检测灵敏度, 适于禽流感病毒的快速检测。



1. 一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法,包括:阴离子交换层析法纯化别藻蓝蛋白 APC,分别用摩尔比 20-50 :1、50-100 :1 的化学交联剂 N-琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯 SPDP 将 APC、抗禽流感病毒抗体衍生,二硫苏糖醇 DTT 以 50-100 :1 的摩尔比还原抗体衍生物产生抗体 -HS,抗体 -HS 与 APC 衍生物以摩尔比 1 :1-3 液相交联,经高效液相色谱 HPLC 纯化制备 APC 标记的抗禽流感病毒荧光抗体,其中 APC 由钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 阴离子交换层析制备,制备步骤为:藻体细胞加入 5 倍体积 v / w 的 20mM pH6.8-7.0 磷酸缓冲液,反复冻融 3 次,离心,上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% w / v,4℃冰箱放置 24h,离心,沉淀溶于 20mM pH7 的磷酸缓冲液中,20mM pH7 的磷酸缓冲液透析,透析液阴离子交换色谱柱层析纯化,离子交换柱经 20mM pH5.0 含 50mM NaCl 醋酸缓冲液预平衡,洗脱液为 20mM pH3.6 含 50mM NaCl 醋酸缓冲液,收集天蓝色洗脱液即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白,纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5-10mg / mL。

2. 一种检测禽流感病毒的固相免疫荧光检测试剂盒,其特征在于包括:权利要求 1 制备的 APC 标记抗禽流感病毒荧光抗体、琼脂糖微球载体、抗禽流感病毒多克隆抗体、稀盐酸溶液、PBS,可用于禽流感病毒的快速免疫荧光检测。

3. 根据权利要求 2 所述的一种检测禽流感病毒的固相免疫荧光检测试剂盒,其特征在于试剂盒的使用方法为:取 1mL 活化凝胶立即与 2mL 浓度为 5mg / ml 的抗禽流感病毒多克隆抗体混匀,20℃缓慢振荡作用 12h,加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭,20℃缓慢振荡作用 4h,离心去上清,用 50mM pH8PBS 反复冲洗凝胶,离心获得偶联有抗体的琼脂糖凝胶,用 100mM pH7.5 的 PBS 配成 10% v / v 的悬浮液,取偶联有抗体的琼脂糖凝胶 50uL,置于洁净的试管中,加待检病毒液 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH7.5 的 PBS 冲洗 10 次,加入 5ug / ml 浓度的荧光标记抗体 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH7.5 的 PBS 冲洗 5 次,吸取少量微球,滴于低荧光背景的玻片上,盖片,甘油缓冲液封片,荧光显微镜下以红光激发,观察、判定结果,阳性微球在红光激发下发射明亮的红色荧光,阴性微球无荧光。

一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒,属于免疫荧光检测领域。

技术背景

[0002] 禽流感是由禽流感病毒引起的一类严重危害家禽、家畜及野生动物的烈性传染病,甚至还威胁人类的健康。快速、灵敏的检测方法对该病的及时确诊、疫情的有效防控及预测预警至关重要。禽流感的检测方法主要有:(1)病毒分离鉴定;(2)血清学检测,如 HA-HI、ELISA 等;(3)分子生物学检测,如 RT-PCR 等。上述方法各有优缺点:有的耗时长,如病毒分离和血清学鉴定;有的需发病初期和康复期双份血清,如血清学检测法;有的灵敏度高,但对实验条件和操作者技术水平要求较高,如荧光 PCR;有的简便易行,但灵敏度低,如 HA-HI。

[0003] 免疫荧光检测法兼具抗原-抗体反应的特异性和荧光检测的灵敏性,灵敏度高达 10^{-6} mg/mL,具有特异、灵敏、快速、简便的特点。免疫荧光检测法广泛应用于传染病诊断,可定性或定位检测。

[0004] 免疫荧光检测法的特异性和敏感性依赖于抗体的特异性、亲和力、滴度以及荧光染料特性。传统的荧光染料(如 FITC 等)具有毒性、易淬灭、受血清和其他生物样品本底荧光干扰大等缺点。荧光检测常受血清和其他生物样品中本底荧光的影响。以血清为例,400-600nm 波段的本底荧光与常用的 FITC 的荧光发射光谱相重叠,干扰过大,影响检测结果,这也是长期以来荧光免疫分析方法相对落后于 ELISA、化学发光法等的重要原因。提高免疫荧光检测法灵敏度和特异性的途径有:(1)寻找优秀的荧光染料,如选用摩尔消光系数大、荧光量子产率高、斯托克位移大、发射荧光波长位于红光区的染料;(2)结合使用单克隆抗体、抗体夹心法、抗体包被技术、微粒富集荧光免疫分析法等免疫学技术;(3)采用固相检测法,如以惰性材料微球、96 孔板等为固相载体;(4)用蛋白 A、亲和素生物素、酶等代替抗体进行标记,通过检测信号的逐级放大来提高灵敏度。

[0005] 别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)是藻胆蛋白的一种,是存在于红藻和蓝藻细胞中的一类水溶性的色素蛋白。APC 的稳定态为 $(\alpha\beta)_3$,分子量约为 110kDa, $\lambda_{\max} = 620-650\text{nm}$, $E_m = 660\text{nm}$,摩尔消光系数为 $7 \times 10^5 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,荧光量子产率为 68%。APC 具有水溶性大、无毒性、稳定性好、荧光量子产率高、斯托克位移大、荧光明亮、荧光不易淬灭等优点,是优秀的荧光染料。APC 是藻胆蛋白中发射荧光波长最大的一类,它能够发射出明亮的红色荧光,极易于生物本底的蓝色或绿色荧光区分,因此 APC 几乎不受生物本底荧光影响,荧光检测灵敏度明显提高。APC 的检测灵敏度是 cy5 的 7 倍。APC 是少有的长波长发射的荧光染料,红光激发红光发射,促进了 633nm 氦氖激光器的应用。国内外尚没有 APC 标记荧光抗体应用于动物疫病检测的报道。

[0006] APC 是优秀的发射红色荧光的染料,但由于 APC 稳定性差,蛋白质交联时难以定量

控制,造成荧光标记物的得率低、生产成本居高不下,交联剂浓度多高还会导致 APC 失活和荧光丧失,因此限制了这一优秀染料在临床检测中的应用。发明人采用温和的异型双功能化学交联剂 SPDP 及适宜的摩尔比进行 APC、抗体的液相交联,研制的 APC 荧光标记物交联得率大于 90%,探针研制效率、质量显著提高,成本大幅降低,使其能够用于禽流感的快速免疫荧光检测。

[0007] 固相免疫荧光检测法是免疫荧光检测法中较常用的一类,可用于检测可溶性抗原或抗体。固相免疫荧光检测中常用的载体有尼龙膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、96 孔板等,但是常用的固相载体具备较低的本底荧光,会降低荧光检测的灵敏度。本发明采用的固相载体为一种微球,由琼脂糖经溴化氰活化制备,冻干保存,微球直径为 60-200um,无本底荧光,购自 Amersia 公司。该微球载体在使用前需用 1mM 稀盐酸溶液溶胀 30min,以同样浓度的盐酸冲洗多次,最后用 50mM pH 8PBS(含 100mM NaCl)快速冲洗得到活化凝胶。活化的微球应立即与抗体或抗原结合。

发明内容

[0008] 本发明涉及一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒。

[0009] 本发明采用的螺旋藻别藻蓝蛋白 (APC) 是优秀的荧光染料,具有无毒性、水溶性大、荧光明亮且不易淬灭等特点,检测灵敏度显著高于传统的荧光染料。APC 在荧光染料中独树一帜,在波长 550-650nm 的光激发下,APC 能发射明亮的红色荧光,是少有的发射长波长荧光染料,APC 等红色荧光染料促使 633nm 氩氦激光器在荧光检测中大量应用。

[0010] APC 的组成和晶体结构特点决定了其稳定性低于其它藻胆蛋白,因此交联时控制使用交联剂的浓度是关键。本发明选择 SPDP 与 APC 和抗抗体的摩尔比分别为 20-50、50-100 : 1,衍生后的 APC 与抗体以摩尔比 1-3 : 1 交联,制备的 APC 标记的荧光抗抗体交联效率高、纯度高、荧光明亮、抗体活性好、稳定性好。

[0011] 本发明的解决方案如下:

[0012] 别藻蓝蛋白 (APC) 的制备:APC 由钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中阴离子交换层析制备。藻体细胞加入 5 倍体积 (v/w) 的 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0),反复冻融 3 次,离心,上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v),4℃冰箱放置 24h,离心,沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 中,20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 透析,透析液上 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱柱层析,离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0,含 50mM NaCl) 预平衡,洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6,含 50mM NaCl),洗脱速度为 60mL/h,收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白。纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5-10mg/mL。

[0013] 禽流感病毒多克隆抗体制备:禽流感病毒 100 倍稀释,尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2mL,37-38℃孵育,收集接种 24-120h 的死胚的尿囊液,红细胞凝集试验检测滴度 > 1 : 256,无菌检验合格,以 0.3% 甲醛 37℃灭活 24h,再按 1 : 3 比例加入灭菌 10 号白油和吐温-80,用胶体磨乳化油包水型油乳剂灭活疫苗。制备的禽流感病毒油乳剂灭活苗免疫 4 周龄 SPF 鸡,颈部皮下注射 1.0mL/只,首免 10 天后相同剂量加强免疫一次,二免 1 周后采血,测定血清中禽流感病毒 HI 抗体,当 HI 效价 > 1 : 256 时采集血清,阴离子

交换层析纯化,电泳鉴定无杂带,即为合格的禽流感病毒多克隆抗体, -20°C 冷冻保存。

[0014] APC 标记荧光抗体的制备:利用异型双功能交联剂 SPDP 分别在 APC、抗体上衍生吡啶二硫基团,然后用 DTT 还原抗体的衍生物引入游离 $-\text{SH}$,将携带吡啶二硫基的 APC 与携带巯基的抗体按一定摩尔比交联制备荧光抗体。交联步骤为:将 SPDP 分别按 20-50 : 1、50-100 : 1 的摩尔比与 APC、抗体混匀,铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 50-100 : 1 的摩尔比与抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT。抗体 $-\text{HS}$ 与 APC 衍生物以摩尔比 1 : 1-3 混匀,铝箔封好后于 $20-25^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 20h。加 NEM 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。

[0015] APC 标记的荧光抗体的纯化和交联效率分析:液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗体的交联效率分析和纯化,流动相为 50mM PBS pH 7.5,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号 TSK G3000sw(规格 7.5mm \times 60cm),荧光抗体最先被洗脱下来。收集洗脱峰,进行光谱学、抗体活性、电泳检测。目标产物的洗脱峰面积占有所有洗脱峰面积的比例即为交联效率。制备的荧光探针得率大于 90%。

[0016] APC 标记荧光抗体的光谱检测:吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定,扫描波长区间 250-700nm。吸收光谱检测可判定交联是否成功及交联反应是否导致 APC 变性。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,激发波长 580nm,荧光扫描范围为 600-700nm。在紫外区,APC 标记荧光抗体的吸光度明显高于对照 APC,吸收峰位置相同,这是因为 APC 表面交联了抗体分子,而抗体在 280nm 有较强的光吸收;在 450-700nm 范围内,交联物的吸收光谱与对照 APC 的吸收峰及吸光度相似,是由于抗体在此范围内无光吸收。APC 标记光抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660nm,没有发生斯托克位移的改变,仍具有 APC 的特征荧光发射光谱,且荧光亮度无明显降低。

[0017] APC 标记荧光抗体的效价检测:抗体效价采用微量血凝抑制试验方法 (HI) 测定。用灭活的对应禽流感病毒制备 4 单位检测抗原,反应在 V 型 96 孔板上进行。以红细胞凝集抑制的最高稀释度为荧光抗体的效价。荧光标记抗体的 HI 效价应 $\geq 1 : 8$ 。

[0018] APC 标记荧光抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%。218V 恒压电泳。用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 APC 标记荧光抗体既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带,电泳结果证实 APC 与抗体交联成功。

[0019] APC 标记荧光抗体的稳定性检测:纯化的 APC 标记荧光抗体中加入 0.02% 叠氮化钠, 4°C 避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价,室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,抗体效价采用血凝抑制试验方法测定,观察荧光亮度和抗体活性的变化。研制的 APC 标记荧光抗体稳定性好,在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4°C 保存 60 天,荧光抗体的荧光强度保持不变,保存至 90 天荧光强度降低 15%。 4°C 保存 60 天荧光抗体的抗体效价维持在 1 : 16,保存至 90 天抗体效价降至 1 : 8。

[0020] 固相免疫荧光检测试剂盒的组装及应用:固相免疫荧光检测试剂盒由溴化氰活化的琼脂糖微球载体、APC 标记的抗禽流感病毒荧光抗体、抗禽流感病毒多克隆抗体、洗涤液、稀盐酸等组成。固相免疫荧光检测过程为:取 0.3g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶冻干粉,置于 1mM 盐酸中溶涨 30min,以同样浓度的盐酸冲洗多次,用 50mM pH 8PBS(含 100mM NaCl)快

速冲洗得到 1mL 活化凝胶,立即与 2mL 浓度为 5mg/ml 的抗禽流感病毒抗体混匀,20℃缓慢振荡作用 12h,加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭,20℃缓慢振荡作用 4h,离心去上清,用 50mM pH 8PBS 反复冲洗凝胶,离心获得偶联有抗体的琼脂糖凝胶,用 100mM pH 7.5 的 PBS 配成 10% (v/v) 的悬浮液。取偶联有抗体的琼脂糖凝胶 50uL,置于洁净的试管中,加待检病毒液 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 10 次。加入 5ug/ml 浓度的荧光抗体 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 5 次。吸取少量微球,滴于低荧光背景的玻片上,盖片,甘油缓冲液封片,荧光显微镜下红光激发观察、判定结果。将荧光强度与背景染色强度以 + 表示,分为 ++++(最强阳性)、+++ (强阳性)、++ (较强阳性)、+ (弱阳性)、- (阴性) 五级。荧光强度达到 ++ 以上判定为阳性。

[0021] 敏感性、特异性、重复性检测:以 PBS 将禽流感病毒连续稀释,用固相免疫荧光检测试剂盒对各稀释度逐一进行荧光检测,以能检测出的病毒最高滴度作为该检测试剂盒的灵敏度。

[0022] 分别以新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病病毒、传染性喉气管炎病毒、鸡痘病毒等取代禽流感病毒,用固相免疫荧光检测试剂盒进行荧光检测,在绿光激发下均未检测到荧光,证明试剂盒的特异性好。试验设 SPF 鸡血清阴性对照和 PBS 空白对照,均未检测到荧光。

[0023] 用固相免疫荧光检测试剂盒对同一个稀释度的禽流感病毒样品重复检测 3 次,结果一致,表明检测试剂盒的重复性较好。

[0024] 与 FITC 标记荧光抗体检测禽流感病毒比较:纯化的禽流感抗体用 50mM pH 9 的碳酸缓冲液透析过夜,调整浓度为 10mg/ml。用上述碳酸缓冲液配制 0.1mg/ml 的 FITC。将抗体置于 10 倍抗体体积的 FITC 溶液中 4℃缓慢搅拌透析 24h,然后迅速将标记抗体置于 50mM pH 7.2 的磷酸缓冲液透析,经常更换缓冲液。以 FITC 标记的抗体探针代替 APC 标记的抗体探针,用固相免疫荧光检测试剂盒对禽流感病毒检测。APC 标记探针比 FITC 标记探针的检测灵敏度高 2-5 倍。

[0025] 综上所述,APC 标记的荧光抗体荧光明亮,4℃保存 60 天荧光、抗体活性无明显衰减,与 FITC 标记的荧光抗体相比,荧光更明亮,灵敏度更高,受生物物质本底荧光干扰小。试剂盒采用微球载体表面积大,自身无本底荧光,能够提高免疫荧光检测的灵敏度,可用于禽流感的快速检测。

附图说明

[0026] 附图 1 为 APC 标记抗禽流感病毒荧光抗体的 HPLC 纯化图。液相柱型号为 TSK G3000sw,流动相为 50mM pH7.5 的 PBS,流速 0.5mL/min,APC 标记抗禽流感病毒荧光抗体、抗禽流感病毒抗体、APC 的洗脱时间为分别为 19.57min、27.32、31.26min。

[0027] 附图 2 为 APC 标记荧光抗体(虚线)及对照 APC(实线)的荧光光谱。APC 标记荧光抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660nm,没有发生斯托克位移改变,仍具有 APC 的特征荧光发射光谱。

[0028] 附图 3 为 APC 标记荧光抗体固相免疫荧光检测结果。APC 标记荧光抗体阳性微球发射明亮红色荧光,而阴性微球检测不到荧光。

具体实施方式

[0029] 实施方式 1 :一种检测 H₉ 亚型禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及其固相免疫荧光检测试剂盒

[0030] 别藻蓝蛋白 (APC) 的制备 :钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 细胞加入 5 倍体积 (v/w) 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0), 反复冻融 3 次, 4℃ 10000rpm 离心, 上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v), 4℃ 冰箱放置 24h, 离心, 沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 中, 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 透析, 透析液上 DEAE SepharoseFast Flow 阴离子交换色谱柱层析, 离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0, 含 50mM NaCl) 预平衡, 洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6, 含 50mM NaCl), 洗脱速度为 60mL/h, 收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白, 纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存, 使用前用 50mM pH7.5 PBS 充分透析除盐, 调整浓度为 5-10mg/mL。

[0031] 禽流感病毒多克隆抗体制备 :禽流感病毒 (A/Chicken/Shandong/6/96, H₉ 亚型) 100 倍稀释, 尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2mL, 37-38℃ 孵育, 收集接种 24-120h 的死胚的尿囊液, 红细胞凝集试验检测滴度 > 1 : 256, 无菌检验合格, 以 0.3% 甲醛 37℃ 灭活 24h, 再按 1 : 3 比例加入灭菌 10 号白油和吐温 -80, 用胶体磨乳化油包水型油乳剂灭活疫苗。制备的禽流感病毒油乳剂灭活苗免疫 4 周龄 SPF 鸡, 颈部皮下注射 1.0mL/只, 首免 10 天后相同剂量加强免疫一次, 二免 1 周后采血, 测定血清中禽流感病毒 HI 抗体, 当 HI 效价 > 1 : 256 时采集血清, 阴离子交换层析纯化, 电泳鉴定无杂带, 即为合格的禽流感病毒多克隆抗体, -20℃ 冷冻保存。

[0032] APC 标记 H₉ 亚型禽流感病毒抗体探针的制备 :将 SPDP 按 20 : 1、100 : 1 的摩尔比分别与 APC、H₉ 亚型禽流感病毒抗体混匀, 铝箔封好后于室温旋转反应 2h, 超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 50 : 1 的摩尔比与 H₉ 亚型禽流感病毒抗体衍生物充分混匀, 室温静置反应 1h, 超滤离心除去多余的 DTT。禽流感病毒抗体 -HS 与 APC 衍生物以摩尔比 1 : 3 混匀, 铝箔封好后于 20-25℃ 振荡反应 20h。用 10mg/ml 的 NEM 溶液 20ul 封闭多余巯基, 室温旋转反应 60min。反应中的 NEM 不用除去。

[0033] APC 标记的荧光抗体的纯化 :液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗体的交联效率分析和纯化, 流动相为 50mM PBS pH 7.5, 流速 0.5mL/min, 检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化, 液相柱型号 TSK G3000sw (规格 7.5mm×60cm), 荧光标记抗体最先被洗脱下来。APC 标记荧光抗体、抗禽流感病毒抗体、APC 的洗脱时间为分别为 19.57min、27.32、31.26min。收集 19.57min 洗脱峰 (附图 1)。目标产物的洗脱峰面积占有所有洗脱峰面积的比例即为交联效率, 荧光探针交联得率为 92%。

[0034] APG 标记荧光抗体的光谱检测 :吸收光谱在紫外 - 可见光分光光度计上测定, 扫描波长区间 250-700nm。吸收光谱检测可判定交联是否成功及交联反应是否导致 APC 变性。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定, 激发波长 580nm, 荧光扫描范围为 600-700nm。在紫外区, APC 标记荧光抗体的吸光度明显高于对照 APC, 吸收峰位置相同, 这是因为 APC 表面交联了抗体分子, 而抗体在 280nm 有较强的光吸收 ;在 450-700nm 范围内, 交联物的吸收光谱与对照 APC 的吸收峰及吸光度相似, 是由于抗体在此范围内无光吸收。APC 标记荧光抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下, 室温荧光发射波长均位于 660nm, 没有发生斯托克位移的改变, 仍具有 APC 的特征荧光发射光谱, 且荧光亮度无明显降低 (附图 2)。

[0035] APC 标记荧光抗体的效价检测 : 抗体效价采用微量血凝抑制试验方法 (HI) 测定。用灭活的对应禽流感病毒制备 4 单位检测抗原, 反应在 V 型 96 孔板上进行。以红细胞凝集抑制的最高稀释度为荧光抗体的效价。荧光标记抗体的 HI 效价应 $\geq 1 : 8$ 。

[0036] APC 标记荧光抗体的电泳检测 : SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行, 分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 5%, 218V 恒压电泳, 用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后观察结果。APC 标记荧光抗体 SDS-PAGE 电泳既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带, 又具有抗体的 H、L 链条带, 电泳结果证实 APC 与抗体交联成功。

[0037] APC 标记荧光抗体的稳定性检测 : 纯化的 APC 标记荧光抗体中加入 0.02% 叠氮化钠, 4°C 避光保存, 每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价, 室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定, 抗体效价采用血凝抑制试验方法测定, 观察荧光亮度和抗体活性的变化。APC 标记的荧光抗体稳定性较好, 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4°C 保存 60 天, 荧光抗体的荧光强度保持不变, 保存至 90 天荧光强度降低 10%。HI 检测结果表明, 4°C 保存 60 天荧光抗体的抗体效价维持在 1 : 16, 保存至 90 天抗体效价降至 1 : 8。

[0038] 固相免疫荧光检测试剂盒的组装及应用 : 固相免疫荧光检测试剂盒由溴化氰活化的琼脂糖微球载体、洗涤液、APC 标记的抗禽流感病毒荧光抗体、抗禽流感病毒多克隆抗体、稀盐酸等组成。固相免疫荧光检测过程为 : 取 0.3g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶冻干粉, 置于 1mM 盐酸中溶胀 30min, 以同样浓度的盐酸冲洗多次, 用 50mM pH 8PBS (含 100mM NaCl) 快速冲洗得到 1mL 活化凝胶, 立即与 2mL 浓度为 5mg/ml 的抗禽流感病毒抗体混匀, 20°C 缓慢振荡作用 12h, 加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭, 20°C 缓慢振荡作用 4h, 离心去上清, 用 50mM pH 8PBS 反复冲洗凝胶, 离心获得偶联有抗体的琼脂糖凝胶, 用 100mM pH 7.5 的 PBS 配成 10% (v/v) 的悬浮液。取偶联有抗体的琼脂糖凝胶 50 μ L, 置于洁净的试管中, 加待检病毒液 100 μ L, 37°C 温育 2h, 用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 10 次。加入 5 μ g/ml 浓度的荧光抗体 100 μ L, 37°C 温育 2h, 用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 5 次。吸取少量微球, 滴于低荧光背景的玻片上, 盖片, 甘油缓冲液封片, 荧光显微镜下观察, 判定结果。将荧光强度与背景染色强度以 + 表示, 分为 ++++ (最强阳性)、+++ (强阳性)、++ (较强阳性)、+ (弱阳性)、- (阴性) 五级。荧光强度达到 ++ 以上判定为阳性。

[0039] 试验设 SPF 鸡血清阴性对照和 PBS 空白对照。

[0040] 制备 H₉ 亚型禽流感病毒尿囊毒, 测定病毒的红细胞凝集价为 1 : 320, EID₅₀ 为 10^{-8.15}, 病毒的蛋白浓度为 23.13mg/mL。以 PBS 将尿囊毒连续稀释, 利用建立的固相免疫荧光法对每个稀释度逐一进行荧光检测, 以能检测出的病毒最高滴度作为该检测试剂盒的灵敏度。检测结果表明, APC 标记的荧光探针进行检测, 在红光激发下阳性微球呈明亮的红色荧光, 阴性结果无荧光 (附图 3), 试剂盒能检测出 H₉ 亚型禽流感病毒的最低浓度为 1.85 $\times 10^{-5}$ mg/ml。

[0041] 特异性、重复性检测 : 分别以新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病毒、传染性喉气管炎病毒、鸡痘病毒等取代禽流感病毒, 用上述固相免疫荧光检测试剂盒进行荧光检测。结果表明试剂盒具有较好的特异性, 除 H₉ 亚型禽流感病毒检测呈阳性外其它病毒检测均无荧光。用固相免疫荧光检测试剂盒对同一个稀释度的禽流感病毒样品重复检测 3 次, 检测结果一致, 表明试剂盒的重复性好。

[0042] FITC 标记抗体荧光探针检测禽流感病毒 : 纯化的禽流感 H₉ 抗体用 50mM pH 9 的碳

酸缓冲液透析过夜,调整浓度为 10mg/ml。用上述碳酸缓冲液配制 0.1mg/ml 的 FITC。将抗体置于 10 倍抗体体积的 FITC 溶液中 4℃ 缓慢搅拌透析 24h,然后迅速将标记抗体置于 50mM pH 7.2 的磷酸缓冲液透析,经常更换缓冲液。以 FITC 标记的抗体探针代替 APC 标记的抗体探针,用固相免疫荧光检测试剂盒对 H₅ 亚型禽流感病毒检测。结果表明, FITC 标记探针检测阳性微球在蓝光激发下发射绿色荧光,能检测出 H₅ 亚型禽流感病毒的最低浓度为 9.26×10^{-5} mg/ml,灵敏度比 APC 标记探针低 5 倍。

[0043] 表 1 APC 标记抗体荧光探针检测 H₅ 亚型病毒

[0044]

Immunofluorescent antibody	Virus detection sensitivity (mg/ml)									
	2.31 × 10 ⁻¹	2.31 × 10 ⁻²	2.31 × 10 ⁻³	4.63 × 10 ⁻⁴	9.26 × 10 ⁻⁵	1.85 × 10 ⁻⁵	3.7 × 10 ⁻⁶	7.41 × 10 ⁻⁷		
APC labeled antibody	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-
FITC labeled antibody	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

[0045] 实施方式 2 :检测 H₅ 亚型禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及其固相免疫荧光检测试剂盒

[0046] 别藻蓝蛋白 (APC) 的制备 :收集钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 藻体细胞,加入 5 倍体积 (v/w) 的 20mM 磷酸缓冲液 (pH6.8-7.0),反复冻融 3 次,4℃ 10000rpm 离心,上清液中加入硫酸铵至终浓度为 60% (w/v),4℃ 冰箱放置 24h,离心,沉淀溶于 20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 中,20mM 的磷酸缓冲液 (pH7) 透析,透析液上 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱柱层析,离子交换柱经 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.0,含 50mMNaCl) 预平衡,洗脱液为 20mM 醋酸缓冲液 (pH3.6,含 50mMNaCl),洗脱速度为 60mL/h,收集天蓝色液体即为纯化的螺旋藻别藻蓝蛋白,纯化的 APC 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5-10mg/mL。

[0047] H₅ 亚型禽流感病毒多克隆抗体制备 :禽流感病毒 (A/Goose/Guangdong/1/96, H₅ 亚型) 100 倍稀释,尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2mL,37-38℃ 孵育,收集接种 24-120h 的死胚的尿囊液,红细胞凝集试验检测滴度 > 1 : 128,无菌检验合格,以 0.3% 甲醛 37℃ 灭活 24h,再按 1 : 3 比例加入灭菌 10 号白油和吐温 -80,用胶体磨乳化油包水型油乳剂灭活疫苗。制备的禽流感病毒油乳剂灭活苗免疫 4 周龄 SPF 鸡,颈部皮下注射 1.0mL/只,间隔 10 天后相同剂量加强免疫一次,二免 1 周后采血,测定血清中禽流感病毒 HI 抗体,当 HI 效价 > 1 : 256 时采集血清,阴离子交换层析纯化,电泳鉴定无杂带,即为合格的禽流感病毒多克隆抗体,-20℃ 冷冻保存。

[0048] APC 标记 H₅ 亚型禽流感病毒荧光抗体的制备 :将 SPDP 按 50 : 1 的摩尔比分别与 APC、H₅ 亚型禽流感病毒抗体混匀,铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 100 : 1 的摩尔比与 H₅ 亚型禽流感病毒抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT。H₅ 亚型禽流感病毒抗体 -HS 与 APC 衍生物以 1 : 1 摩尔比混匀,铝箔封好后于 20-25℃ 振荡反应 20h。用 10mg/ml 的 NEM 溶液 20u1 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min。反应中的 NEM 不用除去。

[0049] APC 标记的荧光抗体的高效纯化和交联效率分析 :液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗体的交联效率分析和纯化,流动相为 50mM PBS pH 7.5,流速 0.5mL/min,检测波长 190-800nm。采用分子筛高压液相色谱柱纯化,液相柱型号 TSK G3000sw (规格

7.5mm×60cm), APC 标记荧光抗体、抗禽流感病毒抗体、APC 的洗脱时间为分别为 19.57min、27.32、31.26min。收集 19.57min 洗脱峰(附图 1)。目标产物的洗脱峰面积占所有洗脱峰面积的比例即为交联效率,荧光探针交联得率为 90%。

[0050] APC 标记荧光抗体的光谱检测:吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定,扫描波长区间 250-700nm。吸收光谱检测可判定交联是否成功及交联反应是否导致 APC 变性。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,激发波长 580nm,荧光扫描范围为 600-700nm。在紫外区,APC 标记荧光抗体的吸光度明显高于对照 APC,吸收峰位置相同,这是因为 APC 表面交联了抗体分子,而抗体在 280nm 有较强的光吸收;在 450-700nm 范围内,交联物的吸收光谱与对照 APC 的吸收峰及吸光度相似,是由于抗体在此范围内无光吸收。APC 标记光抗体与对照 APC 在 580nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 660nm,没有发生斯托克位移的改变,仍具有 APC 的特征荧光发射光谱,且荧光亮度无明显降低。

[0051] APC 标记荧光抗体的效价检测:抗体效价采用微量血凝抑制试验方法(HI)测定。用灭活的对应禽流感病毒制备 4 单位检测抗原,反应在 V 型 96 孔板上进行。以红细胞凝集抑制的最高稀释度为荧光抗体的效价。荧光标记抗体的 HI 效价应 $\geq 1:8$ 。

[0052] APC 标记荧光抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%,218V 恒压电泳,用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。APC 标记荧光抗体 SDS-PAGE 电泳既具有 APC 的 α 、 β 亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带,电泳结果证实 APC 与抗体交联成功。

[0053] APC 标记荧光抗体的稳定性检测:纯化的 APC 标记荧光抗体中加入 0.02% 叠氮化钠,4℃ 避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价,室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,抗体效价采用血凝抑制试验方法测定,观察荧光亮度和抗体活性的变化。APC 标记的荧光抗体稳定性较好,0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 60 天,荧光抗体的荧光强度保持不变,保存至 90 天荧光强度降低 15%。HI 检测结果表明,4℃ 保存 60 天荧光抗体的抗体效价维持在 1:8,保存至 90 天抗体效价降至 1:4。

[0054] 固相免疫荧光检测试剂盒的组装及应用:固相免疫荧光检测试剂盒由溴化氰活化的琼脂糖微球载体、APC 标记的抗禽流感病毒荧光抗体、抗禽流感病毒多克隆抗体、洗涤液、稀盐酸等组成。固相免疫荧光检测过程为:取 0.3g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶冻干粉,置于 1mM 盐酸中溶胀 30min,以同样浓度的盐酸冲洗多次,用 50mM pH 8PBS(含 100mM NaCl)快速冲洗得到 1mL 活化凝胶,立即与 2mL 浓度为 5mg/ml 的抗禽流感病毒抗体混匀,20℃ 缓慢振荡作用 12h,加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭,20℃ 缓慢振荡作用 4h,离心去上清,用 50mM pH 8PBS 反复冲洗凝胶,离心获得偶联有抗体的琼脂糖凝胶,用 100mM pH 7.5 的 PBS 配成 10% (v/v) 的悬浮液。取偶联有抗体的琼脂糖凝胶 50 μ L,置于洁净的试管中,加待检病毒液 100 μ L,37℃ 温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 10 次。加入 5 μ g/ml 浓度的荧光抗体 100 μ L,37℃ 温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 5 次。吸取少量微球,滴于低荧光背景的玻片上,盖片,甘油缓冲液封片,荧光显微镜下观察,判定结果。将荧光强度与背景染色强度以 + 表示,分为 ++++(最强阳性)、+++ (强阳性)、++ (较强阳性)、+ (弱阳性)、- (阴性) 五级。荧光强度达到 ++ 以上判定为阳性。

[0055] 试验设 SPF 鸡血清阴性对照和 PBS 空白对照。

[0056] 制备 H₅ 亚型禽流感病毒尿囊毒,测定病毒的红细胞凝集价为 1:128, EID₅₀ 为

$10^{-7.2}$, 病毒的蛋白浓度为 12.5mg/mL。以 PBS 将尿囊毒连续倍比稀释, 利用建立的固相免疫荧光法对每个稀释度逐一进行荧光检测, 以能检测出的病毒最高滴度作为该检测试剂盒的灵敏度。检测结果表明, APC 标记的荧光探针进行检测, 在红光激发下阳性微球呈明亮的红色荧光, 阴性结果无荧光 (附图 3), 试剂盒能检测出 H₅ 亚型禽流感病毒的最低浓度为 2.5×10^{-5} mg/ml。

[0057] 特异性、重复性检测: 分别以新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病毒、传染性喉气管炎病毒、鸡痘病毒等取代禽流感病毒, 用固相免疫荧光检测试剂盒进行荧光检测。检测结果表明该试剂盒具有较好的特异性, 除 H₅ 亚型禽流感病毒检测呈阳性外其它病毒检测均无荧光。用试剂盒对同一个稀释度的禽流感病毒样品重复检测 3 次, 检测结果一致, 表明该试剂盒的重复性好。

[0058] FITC 标记抗体荧光探针检测禽流感病毒: 纯化的禽流感 H₅ 抗体用 50mM pH 9 的碳酸缓冲液透析过夜, 调整浓度为 10mg/ml。用上述碳酸缓冲液配制 0.1mg/ml 的 FITC。将抗体置于 10 倍抗体体积的 FITC 溶液中 4℃ 缓慢搅拌透析 24h, 然后迅速将标记抗体置于 50mM pH 7.2 的磷酸缓冲液透析, 经常更换缓冲液。以 FITC 标记的抗体探针代替 APC 标记的抗体探针, 用固相免疫荧光检测试剂盒对 H₅ 尿囊毒检测。结果表明, FITC 标记探针检测阳性微球在蓝光激发下发射绿色荧光, 能检测出 H₅ 亚型禽流感病毒的最低浓度为 1.25×10^{-5} mg/ml, 灵敏度比 APC 标记探针低 2 倍。

[0059] 表 2 APC 标记抗体荧光探针检测 H₅ 亚型病毒

[0060]

Immunofluorescent antibody	Virus detection sensitivity (mg/ml)							
	1.25×10^{-1}	1.25×10^{-2}	1.25×10^{-3}	1.25×10^{-4}	1.25×10^{-5}	2.5×10^{-5}	1.25×10^{-6}	2.5×10^{-6}
APC labeled antibody	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—
FITC labeled antibody	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—

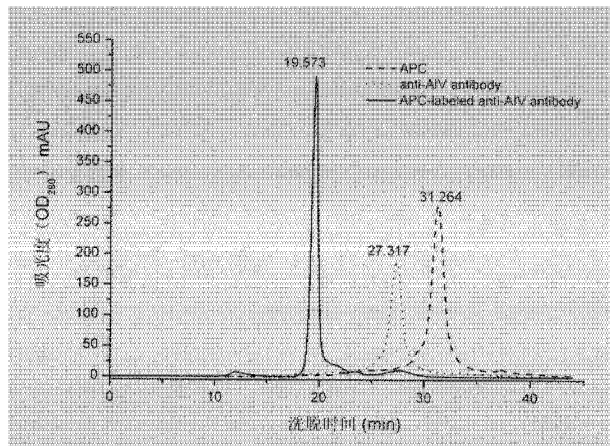


图 1

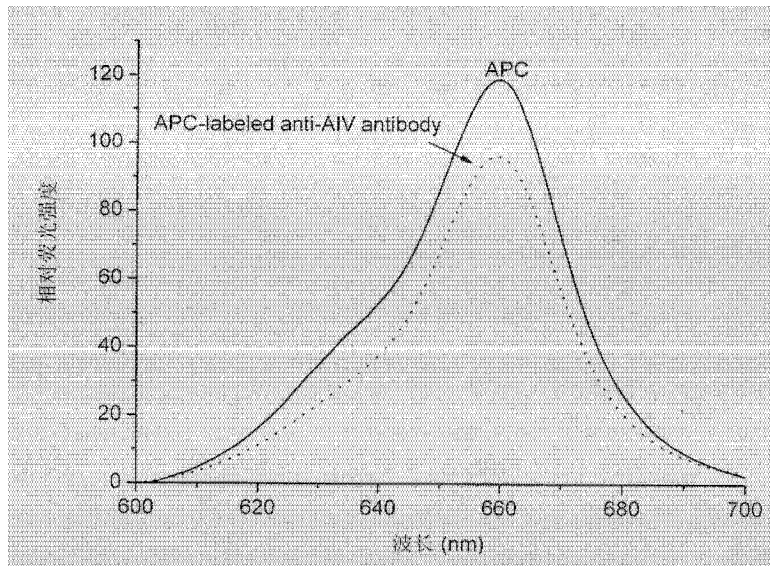


图 2

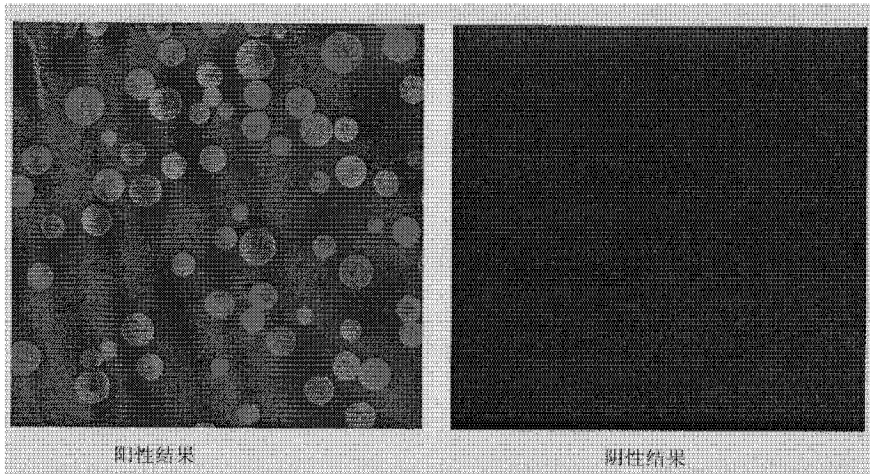


图 3

专利名称(译)	一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101957377B	公开(公告)日	2013-11-13
申请号	CN201010284324.4	申请日	2010-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	颜世敢 朱丽萍 李雁冰 张玉忠 周百成 胡北侠 张秀美 许传田 杨少华		
发明人	颜世敢 朱丽萍 李雁冰 张玉忠 周百成 胡北侠 张秀美 许传田 杨少华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N21/64 C07K16/10 C07K16/06		
其他公开文献	CN101957377A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测禽流感病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒。本发明采用别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)标记抗禽流感病毒抗体制备荧光抗体, 分别用化学交联剂SPDP将APC、抗体衍生, 衍生物以适宜摩尔比液相交联, 然后经高压液相色谱纯化制备荧光抗体。荧光抗体与CNBr活化的琼脂糖微球、抗禽流感病毒抗体、洗涤液等组装成固相免疫荧光检测试剂盒。试剂盒使用方法为: 微球载体活化后先用抗禽流感病毒抗体包被, 洗涤, 包被抗体的微球与待测样品(抗原)结合, 洗涤后与荧光抗体结合, 洗涤去除未结合的荧光抗体, 荧光显微镜下观察、判定结果。本发明制备的荧光抗体交联效率高、纯度高、红色荧光明亮、荧光抗体性质稳定。试剂盒采用的微球固相载体能显著提高荧光检测灵敏度, 适于禽流感病毒快速检测。

