



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1928562 B

(45) 授权公告日 2011.05.18

(21) 申请号 200610113337.9

页.

(22) 申请日 2006.09.22

EP 1593392 A1, 2005.11.09, 全文.

(73) 专利权人 中国科学院微生物研究所

审查员 边昕

地址 100080 北京市海淀区中关村北一条
13 号

(72) 发明人 刘文军 杨利敏

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/547(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1547027 A, 2004.11.17, 说明书1-10页.

CN 1651080 A, 2005.08.10, 说明书1-10

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒。该试剂盒包括包被有包被原的酶标板和酶标记物;包被有包被原的酶标板为包被有狂犬病病毒 N 蛋白的酶标板;所述酶标记物为酶标狂犬病病毒抗体。本发明试剂盒的特异性达到 95%;灵敏度为 0.25IU/ml;精密性(变异系数 C·V)为 8.68%。本发明的试剂盒生产及使用无安全隐患,生产成本大大降低,操作简便快捷,可在 1 小时内完成,较目前市场上的 ELISA 试剂盒更加便于使用。

1. 一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒,包括包被有包被原的酶标板和酶标记物;所述包被原为狂犬病病毒 N 蛋白;所述酶标记物为酶标抗抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述狂犬病病毒 N 蛋白按照包括下述步骤的方法制备:1) 将狂犬病病毒 N 蛋白基因通过表达载体导入宿主细胞,筛选得到表达狂犬病病毒 N 蛋白的工程细胞;2) 培养步骤 1) 得到的工程细胞,表达得到狂犬病病毒 N 蛋白;所述狂犬病病毒 N 蛋白,其氨基酸序列是序列表中序列 1。

3. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述狂犬病病毒 N 蛋白基因的编码区的核苷酸序列为自 GENBANK 号为 X13357 的 5' 端第 70-1422 位脱氧核苷酸。

4. 根据权利要求 3 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述表达载体为 pET-His;所述宿主为大肠杆菌 BL21 (DE3)。

5. 根据权利要求 4 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述狂犬病病毒 N 蛋白的编码基因插入 pET-His 的 BamHI 和 HindIII 的酶切位点间。

6. 根据权利要求 5 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述工程细胞在 37℃ 下,用终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG 诱导表达。

7. 根据权利要求 6 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述狂犬病病毒 N 蛋白的制备方法中还包括下述步骤:将诱导表达后工程细胞菌体经超声破碎,得到包涵体,将包涵体用 pH 8.0,含有 0.02mol/L PB 和 8mol/L 尿素的缓冲液溶解后,用镍柱分离纯化得到纯的狂犬病病毒 N 蛋白。

8. 根据权利要求 1-7 中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标抗抗体以下述动物的 IgG 为免疫原按常规方法制备:犬、人、猫、牛、猪、马、骡、驴、狼、山狗、浣熊、蝙蝠、狐、鼠、猴或獾。

9. 根据权利要求 8 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标抗抗体为酶标抗犬 IgG;所述酶标抗抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶。

10. 根据权利要求 8 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标抗抗体为酶标兔抗犬 IgG。

11. 根据权利要求 1-7 中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括样品稀释液、狂犬病病毒阳性血清、阴性血清、显色剂、终止液和浓缩洗涤液;

所述样品稀释液为含有 2.1% NaCl 和 4% PEG6000 的溶液;所述浓缩洗涤液为 1L 中含有 KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, 吐温 -205ml 的溶液;所述显色剂由显色底物 A 和显色底物 B 组成,所述显色底物 A 为 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液;显色底物 B 为双氧水溶液;所述终止液为 2mol/L 硫酸溶液;所述百分含量均为质量百分含量。

一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 狂犬病是由狂犬病病毒引起的中枢神经系统感染的人兽共患传染病,其发病后死亡率为 100%。我国狂犬病死亡人数高居世界第二位,仅次于印度。狂犬病的病死率和死亡人数在我国甲、乙类传染病中居首位。

[0003] 根据《全国狂犬病监测方案》,国内对狂犬病的检测主要采取①病原检测法:包括免疫荧光法检测抗原和快速狂犬病酶联免疫吸附法检测抗原;② RT-PCR 核酸检测法;③病毒分离法:包括细胞培养法分离病毒和乳小白鼠接种法分离病毒;和④抗体检测法:包括特异性抗体检测和中和抗体检测。由于以上检测方法需要操作实验室固定毒、由病人或动物分离的街毒,以及狂犬病病毒感染的病理材料,因此必须在 P2(实验室固定毒)或 P3(街毒、病毒感染的病理材料)生物安全实验室内进行。而且,以上这些方法必需专业的实验技术和设备,往往需要数日甚至数周才能得到结果,根本无法满足大范围快速诊断的需要。虽然目前国内也有狂犬病 ELISA 检测试剂盒的研究报道,但是它们研究所用的抗原均采用灭活的狂犬病病毒,由于狂犬病病毒极易通过破损的皮肤和粘膜传播,所以无疑增加了操作人员的危险性。而且,如果生产过程中狂犬病病毒灭活不彻底,将会造成更大范围的污染和传播。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒。

[0005] 本发明所提供的检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒,包括包被有包被原的酶标板和酶标记物;所述包被原为狂犬病病毒 N 蛋白;所述酶标记物为包括包被有包被原的酶标板和酶标记物;所述包被原为狂犬病病毒 N 蛋白;所述酶标记物为酶标抗抗体。

[0006] 所述狂犬病病毒 N 蛋白,其制备方法包括以下步骤:1) 将狂犬病病毒 N 蛋白基因通过表达载体导入宿主细胞,筛选得到表达狂犬病病毒 N 蛋白的工程细胞;2) 培养步骤 1) 得到的工程细胞,表达得到狂犬病病毒 N 蛋白;所述狂犬病病毒 N 蛋白,其氨基酸序列是序列表中序列 1。

[0007] 所述狂犬病病毒 N 蛋白基因的编码区的核苷酸序列来自狂犬病病毒株 AV01(N 蛋白基因的编码区是自 GENBANK 号为 X13357 的 5' 端第 70-1422 位脱氧核苷酸)。

[0008] 所述表达载体可为 pBV220, pET 系列, pQE 系列表达载体;优选为 pET-His。

[0009] 所述狂犬病病毒 N 蛋白基因插入 pET-His 的 BamHI 和 HindIII 的酶切位点间。

[0010] 所述宿主细胞为任一可表达外源基因的原核或真核细胞;所述原核细胞可为大肠杆菌,如 E. coli DH5 α 、E. coli TB1 或 E. coli BL21 DE3 等;所述真核细胞可为酵母细胞、哺乳动物细胞或植物细胞等,如酵母菌 SMD1168H、酵母菌 GS115、酵母菌 X-33、酵母菌 KM71H, COS-7、CHO 或 BHK-21 等。

[0011] 所述宿主优选为大肠杆菌 BL21 (DE3)。所述工程细胞在 37℃ 下,用终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG 诱导表达。所述诱导表达后工程细胞菌体经超声破碎,得到包涵体,将包涵体用 pH8.0,含有 0.02mol/L PB($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$) 和 8mol/L 尿素的缓冲液溶解后,用镍柱分离纯化得到纯的狂犬病病毒 N 蛋白。

[0012] 所述酶标抗抗体可以下述动物的 IgG 为免疫原按常规方法制备:犬(如实验犬、宠物犬和普通犬感染狂犬病病毒)、人、猫、牛、猪、马、骡、驴、狼、山狗、浣熊、蝙蝠、狐、鼠、猴或獾。

[0013] 所述酶标抗抗体具体可为酶标抗犬 IgG,优选为酶标兔抗犬 IgG。

[0014] 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;辣根过氧化物酶标记抗抗体可采用现有技术中的多种方法如戊二醛法或过碘酸钠法将酶交联在抗抗体上。

[0015] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括样品稀释液、狂犬病病毒阳性血清、阴性血清、显色剂、终止液和浓缩洗涤液。

[0016] 所述样品稀释液为含有 2.1% NaCl 和 4% PEG6000 的溶液;所述浓缩洗涤液为 1L 中含有 KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, 吐温 -20 5ml 的溶液。

[0017] 所述显色剂由显色底物 A 和显色底物 B 组成;所述显色底物 A 为 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液;显色底物 B 为双氧水溶液。所述终止液为 2mol/L 硫酸溶液。

[0018] 上述百分含量均为质量百分含量。

[0019] 本发明的酶联免疫试剂盒,是利用间接酶联免疫吸附试验检测狂犬病病毒感染的试剂盒。

[0020] 本发明的试剂盒采用狂犬病病毒 N 蛋白作为检测抗原,未涉及狂犬病活病毒,与用灭活病毒作为检测抗原相比,其生产及使用无安全隐患。狂犬病病毒 N 蛋白可通过大肠杆菌和毕赤酵母表达,实现大规模发酵生产,其生产成本大大降低。由于在表达的狂犬病病毒 N 蛋白中排除了其他无关杂蛋白,保证了本发明的酶联免疫试剂盒检测具有较高的特异性,生产及使用也非常安全。本发明的试剂盒的样品稀释液含有聚乙二醇,利于抗原抗体的结合,使孵育时间缩短,加快了检测;实验表明,本发明试剂盒的特异性达到 95%,灵敏度为 0.25IU/ml,精密性(变异系数 C·V)为 8.68%,可用于检测各种犬(如实验犬、宠物犬和普通犬感染狂犬病病毒)、人、猫、牛、猪、马、骡、驴、狼、山狗、浣熊、蝙蝠、狐、鼠、猴和獾等可感染狂犬病病毒的动物是否被狂犬病病毒感染,也可用于狂犬疫苗的效果评价。

[0021] 本发明的试剂盒操作简便快捷,可在 1 小时内完成,较目前市场上的 ELISA 试剂盒更加便于使用。本发明的试剂盒操作简单,不需要在专业实验室进行,一个普通技术人员经过简单培训即可开展,每天可检测上千个样品,非常适合大规模排查工作。

附图说明

[0022] 图 1 为狂犬病病毒 N 蛋白的大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 检测结果

[0023] 图 2 为狂犬病病毒 N 蛋白的大肠杆菌表达产物纯化后的 SDS-PAGE 检测结果

具体实施方式

[0024] 下述实施例中的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0025] 下述实施例中所用百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0026] 实施例 1、检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒的制备

[0027] 一、检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒的制备

[0028] 狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒,其组成为:

[0029] 1) 包被有狂犬病病毒 N 蛋白的酶标板

[0030] 2) 样品稀释液:含有 2.1% NaCl 和 4% PEG6000 的溶液 10ml

[0031] 3) 阳性血清 0.5ml

[0032] 4) 阴性血清 0.5ml

[0033] 5) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗犬 IgG 10ml

[0034] 6) 浓缩洗涤液: 20ml

[0035] 7) 显色剂:显色底物 A:3.3'-5.5'-四甲基联苯胺溶液 5ml;显色底物 B:双氧水溶液 5ml;

[0036] 9) 终止液:用蒸馏水稀释后的 2mol/L 硫酸溶液 5ml

[0037] 上述各组分的制备方法如下:

[0038] 1、包被有狂犬病病毒 N 蛋白的酶标板的制备

[0039] 1) 包被原-狂犬病病毒 N 蛋白的制备:

[0040] A、引物设计

[0041] 根据狂犬病病毒 N 蛋白的基因序列 (GENBANK 号为 X13357) 设计一对引物,分别引入 BamHI 和 HindIII 酶切位点,引物序列如下:

[0042] P1:5'-CAGGATCCGATGCCGACAAGATTGTGTT-3' (BamHI)

[0043] P2:5'-CCGAAGCTTATGAGTCATTCTGAATACGTCTTG-3' (HindIII)

[0044] B、病毒 RNA 的提取

[0045] 取灭活狂犬病病毒株 AV01 病毒液 200 μ l (购自荷兰英特威公司),采用小量病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒 (购自上海华舜生物工程有限公司, W6751) 提取病毒 RNA,具体操作参照产品说明书。

[0046] C、RT-PCR 扩增狂犬病病毒 N 蛋白基因

[0047] 以提取的狂犬病病毒 RNA 为模板,在引物 P1 和引物 P2 的引导下,利用 QIAGENone-step RT-PCR 试剂盒 (QIAGEN 公司) 并参照试剂盒说明书进行 N 蛋白基因的扩增,反应条件为:首先 50°C 30min;其次 94°C 10min;再次 94°C 30sec,50°C 30sec,72°C 2min,共 35 个循环;最后 72°C 5min。将 PCR 产物于 4°C 保存。

[0048] D、测序及序列分析

[0049] 将 PCR 扩增的大小约 1360bp 左右的目的 DNA 亚克隆入 T 载体 pGEM-T (promega 公司) 中,经筛选后挑取单克隆测序,测序结果与 GENBANK 报道序列完全一致 (具有自 GENBANK 号为 X13357 的 5' 端第 70-1422 位脱氧核苷酸),将鉴定表明含有 N 蛋白基因的编码区的质粒命名为 pGEM-T-NP。

[0050] E、表达载体的构建

[0051] 将上述获得的含有狂犬病病毒 N 蛋白基因的质粒 pGEM-T-NP 用 BamHI 和 HindIII 双酶切后插入载体 pET-His (美国基因动力公司产品) 的 BamHI 和 HindIII 酶切位点之间,转化大肠杆菌 DH5 α 。经 PCR 和酶切鉴定后获得阳性重组菌,将经鉴定表明含有 N 蛋白基因

的重组载体命名为 pETHis/N。

[0052] F、N 蛋白的表达和纯化

[0053] 将 pETHis/N 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 涂布于含 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板, 在 37℃ 培养, 待菌落长出后, 挑取单个克隆接种于含 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基试管中, 37℃ 振荡培养菌液 OD₆₀₀ 至 0.6, 加入终浓度为 0.4mM IPTG, 在 37℃ 下诱导 5 小时。培养结束后, 对发酵液 10000g、离心 10 分钟, 取沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测, 检测结果如图 1 所示 (泳道 M 为低分子量蛋白 Marker, 泳道 1 为诱导前全菌, 泳道 2 为诱导后全菌), 结果表明, 在 50kD 左右处出现一条蛋白条带 (箭头示), 与预期结果相符, 表明狂犬病病毒 N 蛋白基因在大肠杆菌中正确表达。将发酵液在 5000g 离心 10 分钟收集菌体, 超声破碎 (300w, 10s/10s) 20 分钟, 然后 10000g 离心 10 分钟, 沉淀为包涵体, 将包涵体分别用 2mol/L 尿素, 1mol/L NaCl 和 PBS 各洗一遍, 用 pH8.0, 含有 0.02mol/L PB (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) 和 8mol/L 尿素的缓冲液溶解包涵体, 10000g 离心 10 分钟, 用相同的缓冲液平衡镍柱, 将已溶解的包涵体过柱, 用 pH8.0, 含有 0.02mol/L PB (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) 和 8mol/L 尿素的缓冲液洗涤除去杂蛋白, 用 pH3.0, 含有 0.02mol/L PB (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) 和 8mol/L 尿素的缓冲液洗脱目的蛋白, 获得纯的狂犬病病毒 N 蛋白, 对纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳检测, 检测结果如图 2 所示 (泳道 M 为低分子量蛋白 Marker, 泳道 1 为纯化产物), 结果表明在得到 52kD 的纯狂犬病病毒 N 蛋白 (箭头示), 作为包被抗原, -20℃ 冻存。

[0054] 2) 包被板的制备:

[0055] 将上述得到的包被原 - 狂犬病病毒 N 蛋白用包被液 (0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6) 稀释成 10 μg/ml, 包被 8×12 孔酶标板, 每孔 100 μl, 4℃ 过夜; 倒掉包被液, 每孔加满封闭液 (含有 1% 牛血清白蛋白, 5% 蔗糖的溶液), 4℃ 过夜, 晾干, 4℃ 保存备用; 包被液的制备方法为: 将碳酸钠 1.59g、碳酸氢钠 2.93g 溶于 1000ml 双蒸水中, 高压灭菌备用。

[0056] 包被板的检定: 观察外观, 结果表明孔底均匀透明, 无水气、污点、尘粒。均质性检测: 随机抽取 1 条预包被后的酶标板条, 同一份阳性血清同时检测两端和中间共 3 孔, 结果表明, 读值变异系数小于 10%。

[0057] 2、HRP 标记兔抗犬 IgG 的制备:

[0058] 兔抗犬 IgG 的制备和辣根过氧化物酶标记: 提取纯化犬 IgG, 免疫家兔, 三免后取血清; 经辛酸 - 硫酸铵法纯化后用过碘酸盐氧化法进行辣根过氧化物酶标记; 标记物加入 1% 牛血清白蛋白和 50% 的中性甘油, 测定工作浓度后, -20℃ 保存备用。具体方法如下所述:

[0059] 1) 犬 IgG 的提取、纯化: 选择狂犬病病毒抗体阴性的 6 月龄健康比格犬, 颈动脉放血, 分离血清。取犬血清, 加同体积的生理盐水稀释: 搅拌下滴加 2 倍体积饱和硫酸铵溶液 (硫酸铵的终浓度为 50%), 置 4℃ 30 分钟, 3000g 离心 30 分钟, 去上清; 沉淀用是犬血清 2 倍体积的生理盐水溶解, 搅拌下滴加与犬血清等体积的饱和硫酸铵溶液 (硫酸铵的终浓度为 33%), 置 4℃ 30 分钟, 5000g 离心 30 分钟, 去上清; 用 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 将沉淀溶解, 装入透析袋, 对 PBS 透析 48 小时, 期间换液 4-5 次; 将透析除盐的 IgG 溶液上 DEAE-Sephadex 层析柱, 上样量不超过柱床体积的 10%, 用 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS 洗脱, 流速为 1ml/min, 分管收集, 第一个洗脱峰为 IgG, 收集洗脱液, 即为纯化的犬 IgG。

[0060] 2) 纯化的 IgG 检定: 含量测定: 用紫外分光光度计测出纯化的 IgG 溶液 OD₂₈₀ 和

OD₂₆₀ 的读值,按公式蛋白浓度 (mg/ml) = (1.45×OD₂₈₀-0.74×OD₂₆₀)×稀释倍数,结果表明纯化的 IgG 浓度为 20mg/ml。纯度检定:用 SDS-PAGE 非还原电泳检测 IgG 纯度,结果得到一分子量为 150KD 的蛋白。

[0061] 3) 兔抗犬 IgG 的制备:用纯化的犬 IgG 常规免疫家兔;兔抗犬 IgG 的提取、纯化检定同犬 IgG 的提取、纯化。

[0062] 4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记:称取 4mg HRP (RZ ≥ 3.0, Sigma) 溶于 1ml 去离子水。加 200 μl 新配制的 0.1M NaIO₄,室温闭光轻搅 20min。此时溶液呈棕绿色。然后于 4℃,在 pH 值为 4.4,1mol/L 的醋酸钠缓冲液中透析过夜或 30min 换液一次,透析 4 小时,每次 1000ml。然后,加入 20 μl 0.2M 碳酸盐缓冲液,使溶液 pH 提升至 9~9.5 (用精密试纸比对即可,视情况可加减缓冲液的量)。立即加入 8mg 待标记抗体兔抗犬 IgG 1ml (用新鲜配制的 0.01M pH 9.5 碳酸盐缓冲液调浓度至 8mg/ml)。室温闭光轻搅 2h。加入新配制的 NaBH₄100 μl,4℃反应 2h。于 4℃,在 pH 值为 7.4,0.01mol/L PBS 缓冲液中透析 24h,期间更换缓冲液 1~2 次。10000g 离心 10min,弃去沉淀的蛋白,上清即为 HRP 标记兔抗犬 IgG 产物。测定 A403nm、A280nm 后加入 BSA 补到 10mg/ml 蛋白浓度,加入 30%~50% 的中性甘油,于 -20℃ 分管保存。

[0063] 5) HRP 标记兔抗犬 IgG 酶标产物检定:外观:应为澄清透明溶液 (浅棕红色),如有不溶物,应离心出去。当标记率 A403nm/A280nm 的比值为 0.3~0.6 时为合格。结果表明上述 HRP 标记兔抗犬 IgG 为澄清透明溶液,标记率 A403nm/A280nm 的比值为 0.45。

[0064] 3、样品稀释液的制备:将质量百分比为 2.1% NaCl 和质量百分比为 4% PEG6000 溶于双蒸水,高压灭菌。

[0065] 4、浓缩洗涤液的制备:

[0066] 将 KH₂PO₄0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g,吐温 -20 5ml,溶于 1000ml 双蒸水。

[0067] 5、显色底物 A 的制备:

[0068] 将 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺 50mg,无水乙醇 5ml,0.1mol/L 柠檬酸 5ml,0.1mol/L EDTA 0.5ml,加蒸馏水至 100ml。

[0069] 6、显色底物 B 的制备:

[0070] 0.2mol/L Na₂HPO₄ 51.4ml,0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml,用 HCl 调 pH 值至 5.0~5.4,加入 30% H₂O₂ 67 μl。

[0071] 7、终止液的制备:将纯硫酸与蒸馏水按体积比为 1:17 的比例混合得到 2mol/L 硫酸溶液。

[0072] 8、阳性血清的制备

[0073] 挑选体格健壮的 6 月龄比格犬 5 只,免疫兽用狂犬疫苗 (购自荷兰英特威公司),待血清抗体 ELISA 效价达到 1:10000 以上 (采用上述制备的试剂盒中的试剂测定),采血分离血清,用小牛血清将分离的阳性血清稀释到工作浓度 (OD₄₅₀ 值控制在 0.5-1.0)。其中,抗原为狂犬病病毒 N 蛋白,浓度为 10 μg/ml。

[0074] 9、阴性血清的制备

[0075] 采集未接种过疫苗,且采用上述制备的试剂盒中的试剂测定 OD₄₅₀ 值小于 0.1 的比格犬血清。其中,抗原为狂犬病病毒 N 蛋白,浓度为 10 μg/ml。

[0076] 将上述制备好的包被板、酶标抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色底物 A、显色底物 B、终止液、阳性血清、阴性血清按试剂盒配制定量分装，制成检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒。

[0077] 二、检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒检测方法

[0078] 将待检样本用样品稀释液作 1 : 100 稀释，加入包被板两孔中，每孔加 100 μ l。同时做阳性血清 (1 孔，每孔加 100 μ l)、阴性血清 (1 孔，每孔加 100 μ l) 对照和空白对照 (直接加入 100 μ l 样品稀释液)，37℃ 孵育 30 分钟；洗涤液 (用蒸馏水稀释 100 倍的浓缩洗涤液) 洗涤酶标板 5 次，然后每孔加上述制备的 HRP 标记兔抗犬 IgG 100 μ l，37℃ 孵育 30 分钟；洗涤液 (用蒸馏水稀释 100 倍的浓缩洗涤液) 洗板 5 次，加显色底物 A、B 各 50 μ l，室温静置 10 分钟；滴加 50 μ l 终止液终止反应。用酶标仪测 OD₄₅₀ 值。

[0079] 结果判断：临界值设为阴性对照值的 2.1 倍，阴性对照值如不到 0.1，按 0.1 计算。样品读值大于临界值判为阳性。

[0080] 实施例 2、检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒的效果实验

[0081] 1、试剂盒特异性检测：

[0082] 分别采集 20 份狂犬病病毒阴性血清和 20 份狂犬病病毒阳性血清，用荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 确定，具体操作参照文献报道 (Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. Journal of Immunological Methods, 1998, 212 : 79-87) 用实施例 1 的方法制备的检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒检测，结果表明，检测阳性血清中有 18 份为阳性，阴性血清中 20 份阴性，表明检测准确率为 95%。

[0083] 2、灵敏度检测：对标准狂犬病病毒阳性血清 (军事医学科学院长春兽医研究所) 用实施例 1 制备的样品稀释液进行梯度稀释，用实施例 1 的方法制备的检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒检测，以样品稀释液为空白对照，以实施例 1 制备的阳性血清为阳性对照，以实施例 1 制备的阴性血清为阴性对照，结果如表 1 所示，表明该酶联免疫试剂盒检测狂犬病抗体的最低检出值 (检测限) 为 0.25 IU/ml，表 1 中 P 表示阳性对照；表 1 中 N 表示阴性对照。

[0084] 表 1. 狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒灵敏度检测

[0085]

标准血清									
抗体滴度 (IU/ml)	4	2	1	0.5	0.25	0.125	P	N	空白 对照
OD ₄₅₀ 读值	2.11	1.58	0.92	0.56	0.33	0.11	0.56	0.06	0.00

[0086] 3、精密度检测：随机抽取按照实施例 1 的方法制备的 10 个不同批次检测狂犬病

病毒的酶联免疫试剂盒对同一份血清 (0.7IU/ml 标准阳性血清) 进行检测,测定吸光度值 OD_{450} , 计算 OD_{450} 的变异系数 (C.V) 值。结果表明如表 2 所示,表明变异系数为 8.68%。

[0087] 表 2. 狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒的精密度检测

[0088]

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	变异系数
OD_{450}	0.65	0.73	0.79	0.70	0.63	0.61	0.68	0.74	0.77	0.66	8.68

[0089] 4、稳定性检测:将 1 个按照实施例 1 的方法制备的试剂盒置 37℃放置 5 天;另将 1 个按照实施例 1 的方法制备的试剂盒在 4℃存放 5 天,同步检测 10 个不同稀释度的标准阳性血清,检测结果如表 3 所示,表明其读值变化率 ≤ 25%,在正常范围内。

[0090] 表 3. 狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒的稳定性检测

[0091]

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4℃ / OD_{450}	1.55	1.40	1.22	0.98	0.85	0.76	0.69	0.57	0.45	0.31
37℃ / OD_{450}	1.49	1.36	1.06	0.93	0.79	0.72	0.63	0.51	0.41	0.29

[0092] 5、检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒现场试用实验:

[0093] 从长春采集 200 份犬血清,同时用文献 (Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. Journal of Immunological Methods, 1998, 212:79-87) 描述的狂犬病抗体检测标准方法荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 和按照实施例 1 的方法制备的试剂盒进行检测,对检测数据进行统计分析。结果表明,荧光抗体病毒中和试验检测结果阳性血清中有 148 份阳性血清,阴性血清中 52 份为阴性;而按照实施例 1 的方法制备的试剂盒进行检测结果阳性血清中有 132 份阳性血清,阴性血清中 45 份为阴性;两种检测方法的相关系数为 0.92。

[0094] 序列表

[0095] <160>1

[0096] <210>1

[0097] <211>450

[0098] <212>PRT

[0099] <213> 狂犬病病毒 (Rabies virus)

[0100] <400>1

[0101] Met Asp Ala Asp Lys Ile Val Phe Lys Val Asn Asn Gln Val Val Ser

[0102] 1 5 10 15

[0103]	Leu	Lys	Pro	Glu	Ile	Ile	Val	Asp	Gln	Tyr	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Ala
[0104]					20				25						30	
[0105]	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Pro	Cys	Ile	Thr	Leu	Gly	Lys	Ala	Pro	Asp
[0106]			35					40					45			
[0107]	Leu	Asn	Lys	Ala	Tyr	Lys	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Met	Asn	Ala	Ala	Lys
[0108]		50						55				60				
[0109]	Leu	Asp	Pro	Asp	Asp	Val	Cys	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Gln	Phe
[0110]	65					70					75				80	
[0111]	Phe	Glu	Gly	Thr	Cys	Pro	Glu	Asp	Trp	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ile	Leu	Ile
[0112]					85				90					95		
[0113]	Ala	Arg	Lys	Gly	Asp	Arg	Ile	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Val	Glu	Ile	Lys
[0114]			100						105					110		
[0115]	Arg	Thr	Asp	Val	Glu	Gly	Asn	Trp	Ala	Leu	Thr	Gly	Gly	Met	Glu	Leu
[0116]			115					120				125				
[0117]	Thr	Arg	Asp	Pro	Thr	Val	Ser	Glu	His	Ala	Ser	Leu	Val	Gly	Leu	Leu
[0118]		130						135				140				
[0119]	Leu	Ser	Leu	Tyr	Arg	Leu	Ser	Lys	Ile	Ser	Gly	Gln	Asn	Thr	Gly	Asn
[0120]	145					150					155				160	
[0121]	Tyr	Lys	Thr	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Ile	Glu	Gln	Ile	Phe	Glu	Thr	Ala
[0122]					165					170				175		
[0123]	Pro	Phe	Val	Lys	Ile	Val	Glu	His	His	Thr	Leu	Met	Thr	Thr	His	Lys
[0124]					180					185				190		
[0125]	Met	Cys	Ala	Asn	Trp	Ser	Thr	Ile	Pro	Asn	Phe	Arg	Phe	Leu	Ala	Gly
[0126]			195					200				205				
[0127]	Thr	Tyr	Asp	Met	Phe	Phe	Ser	Arg	Ile	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile
[0128]		210						215				220				
[0129]	Arg	Val	Gly	Thr	Val	Val	Thr	Ala	Tyr	Glu	Asp	Cys	Ser	Gly	Leu	Val
[0130]	225					230					235				240	
[0131]	Ser	Phe	Thr	Gly	Phe	Ile	Lys	Gln	Ile	Asn	Leu	Thr	Ala	Arg	Glu	Ala
[0132]					245					250				255		
[0133]	Ile	Leu	Tyr	Phe	Phe	His	Lys	Asn	Phe	Glu	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Met
[0134]					260					265				270		
[0135]	Phe	Glu	Pro	Gly	Gln	Glu	Thr	Ala	Val	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ile	His
[0136]			275					280				285				
[0137]	Phe	Arg	Ser	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Lys	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asn	Ala
[0138]		290						295				300				
[0139]	Val	Gly	His	Val	Phe	Asn	Leu	Ile	His	Phe	Val	Gly	Cys	Tyr	Met	Gly
[0140]	305					310					315				320	
[0141]	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Ile	Ala	Ala	Cys	Ala	Pro	His

[0142]		325		330		335
[0143]	Glu Met Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Gly Glu Glu Phe Phe Gly Lys					
[0144]		340		345		350
[0145]	Gly Thr Phe Glu Arg Arg Phe Phe Arg Asp Glu Lys Glu Leu Gln Glu					
[0146]		355		360		365
[0147]	Tyr Glu Ala Ala Glu Leu Thr Lys Ser Asp Val Ala Leu Ala Asp Asp					
[0148]		370		375		380
[0149]	Gly Thr Val Asn Ser Asp Asp Glu Asp Tyr Phe Ser Gly Glu Thr Arg					
[0150]	385		390		395	400
[0151]	Ser Pro Glu Ala Val Tyr Thr ArgIle Met Met Asn Gly Gly Arg Leu					
[0152]		405		410		415
[0153]	Lys Arg Ser His Ile Arg Arg Tyr Val Ser Val Ser Ser Asn His Gln					
[0154]		420		425		430
[0155]	Ala Arg Pro Asn Ser Phe Ala Glu Phe Leu Asn Lys Thr Tyr Ser Asn					
[0156]		435		440		445
[0157]	Asp Ser					
[0158]		450				

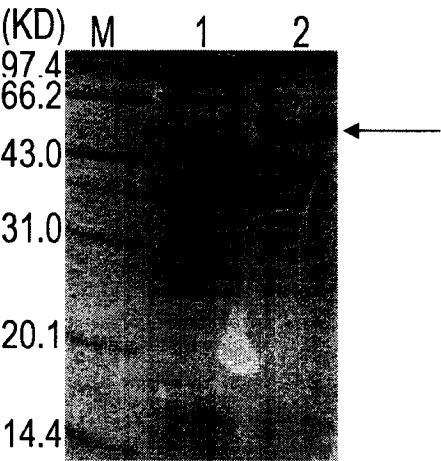


图 1

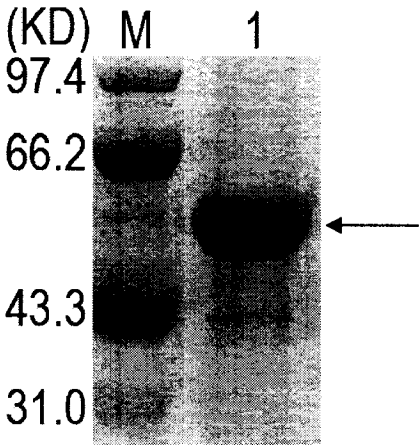


图 2

专利名称(译)	一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN1928562B	公开(公告)日	2011-05-18
申请号	CN200610113337.9	申请日	2006-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院微生物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院微生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院微生物研究所		
[标]发明人	刘文军 杨利敏		
发明人	刘文军 杨利敏		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/53 G01N21/78 C12Q1/68		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1928562A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测狂犬病病毒的酶联免疫试剂盒。该试剂盒包括包被有包被原的酶标板和酶标记物；包被有包被原的酶标板为包被有狂犬病病毒N蛋白的酶标板；所述酶标记物为酶标狂犬病病毒抗体。本发明试剂盒的特异性达到95%；灵敏度为0.25IU/ml；精密性(变异系数C·V)为8.68%。本发明的试剂盒生产及使用无安全隐患，生产成本大大降低，操作简便快捷，可在1小时内完成，较目前市场上的ELISA试剂盒更加便于使用。

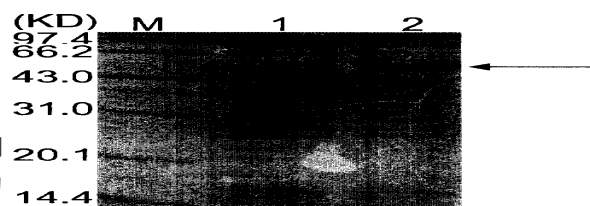


图 1

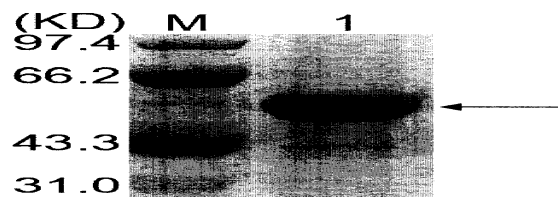


图 2