

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910094815.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月13日

[11] 公开号 CN 101625362A

[22] 申请日 2009.8.7

[21] 申请号 200910094815.X

[71] 申请人 花群义

地址 518010 广东省深圳市罗湖区和平路
2049 号和平大厦检验楼 702 室

[72] 发明人 花群义 阮周曦 詹爱军 杨俊兴
林庆燕 宗卉 曾少灵 曹琛福
秦智锋 吕建强

[74] 专利代理机构 云南派特律师事务所
代理人 张怡

权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明所属的领域为生物技术领域。本发明所述的赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒由以下组分分装后组成：AKV 抗原包被 ELISA 板、羊抗鼠 IgG - HRP 酶结合物、单克隆抗体、阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物 I、底物 II、底物 III、终止液，所述的羊抗鼠 IgG - HRP 酶结合物为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (IgG)；所述的单克隆抗体为鼠抗赤羽病病毒的特异性单克隆抗体 (McAb)；所述的 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween - 20 的 0.01 mol/L pH7.4 PBS (PBST)；所述的 10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1% 明胶的 PBST；所述的底物 I 为 pH6.0 的乙酸 - 柠檬酸缓冲液；所述的底物 II 为 3.3' - 5.5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 溶液；所述的底物 III 为

双氧水 (H₂O₂) 溶液；所述的终止液为 1 mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。本发明的 c - ELISA 试剂盒特异性强，敏感性高，适用于赤羽病的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

1、一种赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒，其特征在于是由以下组分分装后组成：AKV 抗原包被 ELISA 板、羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物、单克隆抗体、阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物 I、底物 II、底物 III、终止液，所述的羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶标记的羊抗鼠抗体 IgG；所述的单克隆抗体为鼠抗赤羽病病毒的特异性单克隆抗体 McAb；所述的 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 PBS；所述的 10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1% 明胶的 PBST；所述的底物 I 为 pH6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液；所述的底物 II 为 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液；所述的底物 III 为双氧水溶液；所述的终止液为 1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

2、如权利要求 1 所述的赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒，其特征在于其各组分的数量为：

AKV 抗原包被 ELISA 板	2 板 96 孔酶标板
羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物	0.5ml
单克隆抗体	0.5ml
阳性血清	1ml
阴性血清	1ml
20 倍浓缩洗涤液	50ml
10 倍浓缩稀释液	30ml
底物 I	20ml
底物 II	2ml
底物 III	1ml
终止液	20ml。

3、如权利要求 1 和 2 任意一项所述的赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒的制备方法，其特征在于由以下步骤组成：

一、赤羽病病毒 ELISA 包被抗原的制备：BHK-21 细胞长成单层后接种 AKV，无血清的基础培养基继续培养，3~4d 后细胞病变达 75% 以上时，收获病毒，反复冻融 3 次，以 8000r/min 离心 30 min，取上清液，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒。采用 20%、60% (w/v) 不连续蔗糖密度梯度 20000r/min 4℃ 超速离心 3h，收获提纯的病毒条带作为 AKV 抗

原;

二、AKV 抗原包被 ELISA 板的制备: 将纯化后的 AKV 抗原, 用包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g/mL}$, 以 50 μL /孔包被 ELISA 板; 以 200 μL /孔加入封闭液封闭, 所述的封闭液为含 1% BSA、2%明胶、0.01%硫柳汞的 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液;

三、羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物的制备: 利用常规方法从健康的 BALB/c 小鼠血清中提取 IgG, 与等体积弗氏完全佐剂乳化, 充分混匀后经背部皮下注射健康的 18 个月以上的山羊, 2 mL/只; 首免后第 2 周和第 4 周分别用相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂 FIA 进行二免和三免后, 无菌采血分离血清, 分别经 1 次 50%和 2 次 33%饱和硫酸铵沉淀提纯羊抗鼠 IgG, 透析除盐; 用改良的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶 HRP 标记于羊抗鼠 IgG, 1mL/管分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

四、单克隆抗体的制备: 用提纯的赤羽病病毒抗原分别加等体积弗氏完全佐剂乳化和弗氏不完全佐剂乳化, 先后免疫 BALB/c 小鼠三次; 取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50%聚乙二醇 MW4000 融合剂下融合, HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞, 用间接 ELISA 方法检测分泌抗 AKV 的阳性孔, 获得能稳定传代并分泌抗 AKV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞, 利用 BALB/c 小鼠制备抗赤羽病病毒单克隆抗体腹水;

五、阳性血清的制备: 挑选体格健壮的山羊 2~3 只, 将纯化后 AKV 与等体积弗氏完全佐剂乳化, 充分混匀后经背部皮下注射, 2 mL/只; 首免后第 2 周和第 4 周分别用 AKV 相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂 FIA 进行二免和三免后, 无菌采血分离血清; 用血清保存液配方 I 按 1: 2 稀释, 1mL/管分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

六、阴性血清的制备: 选择体格健壮的山羊, 采血检测确认无赤羽病的抗体, 无菌采血分离血清, 用血清保存液配方 I 按 1: 2 稀释, 1mL/管分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

七、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物 I、底物 II、底物 III、终止液的优选: 通过试验选定 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 PBS; 10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1%明胶的 PBST; 底物 I 为 pH6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液; 底物 II 为 3.3'-5.5'-四甲基联苯胺溶液; 底物 III 为双氧水溶液; 终止液为 1mol/L H_2SO_4 硫酸溶液;

八、试剂盒的组装: 将按上述方法制备好的 ELISA 抗原包被板封闭于铝簿/簿锡纸中, 内置 2g 硅胶干燥剂, 封口, 羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物、单克隆抗体、10 倍浓缩稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液 I、底物液 II、底物液 III、终止液、阳性血清、阴性血清定量分装, 分别贴上标签与说明, 装入专用的试剂盒外壳内, 外壳上贴上试剂盒标签。

赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法

技术领域

本发明所属的领域为生物技术领域。

背景技术

赤羽病是由布尼病毒属辛波病毒群的阿卡斑病毒 (Akabane virus, AKV) 引起的牛、绵羊、山羊和其它多种野生动物的以流产、早产、死产、畸形产以及先天性关节弯曲—积水性无脑综合征(AH 综合征)为特征的病毒性传染病。此病给畜牧业造成巨大经济损失, 是国际动物贸易中检疫的重点疫病之一。AKV 的基因组由三个负链 RNA 环状分子所组成, 即: 大 RNA(LRNA)、中 RNA(MRNA)、小 RNA(SRNA)。M RNA 编码 G1 和 G2 两种蛋白; L RNA 可能编码 L 蛋白, S RNA 编码核衣壳(N)蛋白, N 是核衣壳的大蛋白, 为群的特异性抗原, 赤羽病于 20 世纪 30 年代在澳大利亚的牛、绵羊、山羊群中流行。1959 年首次在日本群马县阿卡斑村分离病毒。1972~1973 年, 在日本关东以西的牛群中发生原因不明的流产、早产、死产以及先天性关节弯曲—积水性无脑综合征(AH 综合征)。1973-1975 年又出现两次同样的流行, 因发生异常产而损失犊牛 5 万头以上。同年在澳大利亚的流行, 损失犊牛在数千头以上。中村孝次等(1987)发现 5 家专门饲养绵羊农户的 30 头临产母羊中, 21 头发生了异常流产或死产。2002 年以色列一奶年场由 AKV OBE-1 株引起 54 头奶牛流产。Horikita 等 2005 年对 11 个奶牛场感染过 AKV 的 33 头奶牛进行了研究, 奶产量下 14.9%~26.6%。澳大利亚在 2004 年至 2005 年对 7 个州的血清学调查表明, 牛群中的血清阳性率在 6%~19.54%之间。曾对国内一些奶牛场进行过血清学调查, 抗体阳性率为 12%。AKAV 可能广泛分布于热带和温带的广大地区。AKV 的血清学诊断方法有补体结合试验 (CF)、间接免疫荧光 (IF)、血凝抑制试验 (HI)、琼脂扩散试验 (AGDP)、微量血清中和试验 (VN) 和 ELISA。最常用的方法是 VN 和 ELISA, 应用间接 ELISA 可快速和准确地进行血清群定群(SG-ELISA)和进行辛波(Simbu)群中血清型定型 (ST-ELISA)。已有报道用 PCR 和基因芯片方法进行病原检测。AKV N 核蛋白上存在抗原表位, 具有群特异性, 可刺激机体产生抗体, 通过检测核蛋白抗体来诊断此病。由于核衣壳蛋白是 AKV 与辛波群中的其他成员的共同的群抗原, 而中和试验具有很高的特异性, 不出现交叉反应。因此, 在确诊时 ELISA 试验和中和试验联合应用于此病血清抗体的检测。研究并制备高特异性、可与相关病毒区别的快速检测方法仍是 AKV 检疫中急待解决的

问题,按规范程序生产相应的标准化试剂盒是当务之急。

发明内容

本发明的目的是提供一种用竞争酶联免疫吸附试验检测赤羽病抗体的试剂盒。

本发明的另一目的是提供这种试剂盒的制备方法。

本发明所述的赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒由以下组分分装后组成: AKV 抗原包被 ELISA 板、羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物、单克隆抗体、阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物 I、底物 II、底物 III、终止液,所述的羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (IgG); 所述的单克隆抗体为鼠抗赤羽病病毒的特异性单克隆抗体 (McAb); 所述的 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 PBS (PBST); 所述的 10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1% 明胶的 PBST; 所述的底物 I 为 pH6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液; 所述的底物 II 为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶液; 所述的底物 III 为双氧水 (H₂O₂) 溶液; 所述的终止液为 1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

本发明所述的赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒的制备方法由以下步骤组成:

一、赤羽病病毒 ELISA 包被抗原的制备: BHK-21 细胞长成单层后接种 AKV, 无血清的基础培养基继续培养, 3~4d 后细胞病变达 75% 以上时, 收获病毒, 反复冻融 3 次, 以 8000r/min 离心 30 min, 取上清液, 加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒。采用 20%、60% (w/v) 不连续蔗糖密度梯度 20000r/min 4℃ 超速离心 3h, 收获提纯的病毒条带作为 AKV 抗原;

二、AKV 抗原包被 ELISA 板的制备: 将纯化后的 AKV 抗原, 用包被缓冲液稀释成 4.0 μg/mL, 以 50μL/孔包被 ELISA 板; 以 200μL/孔加入封闭液封闭, 所述的封闭液为含 1% BSA、2% 明胶、0.01% 硫柳汞的 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS);

三、羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物的制备: 利用常规方法从健康的 BALB/c 小鼠血清中提取 IgG, 与等体积弗氏完全佐剂乳化, 充分混匀后经背部皮下注射健康的 18 个月以上的山羊, 2 mL/只; 首免后第 2 周和第 4 周分别用相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂 (FIA) 进行二免和三免后, 无菌采血分离血清, 分别经 1 次 50% 和 2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀提纯羊抗鼠 IgG, 透析除盐; 用改良的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记于羊抗鼠 IgG, 1mL/管分装, -80℃ 保存;

四、单克隆抗体的制备：用提纯的赤羽病病毒抗原分别加等体积弗氏完全佐剂乳化和弗氏不完全佐剂乳化，先后免疫 BALB/c 小鼠三次；取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇 (MW4000) 融合剂下融合，HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞，用间接 ELISA 方法检测分泌抗 AKV 的阳性孔，获得能稳定传代并分泌抗 AKV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，利用 BALB/c 小鼠制备抗赤羽病病毒单克隆抗体腹水；

五、阳性血清的制备：挑选体格健壮的山羊 2~3 只，将纯化后 AKV 与等体积弗氏完全佐剂乳化，充分混匀后经背部皮下注射，2 mL/只；首免后第 2 周和第 4 周分别用 AKV 相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂 (FIA) 进行二免和三免后，无菌采血分离血清；用血清保存液配方 I 按 1: 2 稀释，1 mL/管分装，-80℃ 保存；

六、阴性血清的制备：选择体格健壮的山羊，采血检测确认无赤羽病的抗体，无菌采血分离血清，用血清保存液配方 I 按 1: 2 稀释，1 mL/管分装，-80℃ 保存；

七、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物 I、底物 II、底物 III、终止液的优选：通过试验选定 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L pH7.4 PBS (PBST)；10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1% 明胶的 PBST；底物 I 为 pH6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液；底物 II 为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶液；底物 III 为双氧水 (H₂O₂) 溶液；终止液为 1 mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液；

八、试剂盒的组装：将按上述方法制备好的 ELISA 抗原包被板封闭于铝箔/薄锡纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口，羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物、单克隆抗体、10 倍浓缩稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液 I、底物液 II、底物液 III、终止液、阳性血清、阴性血清定量分装，分别贴上标签与说明，装入专用的试剂盒外壳内，外壳上贴上试剂盒标签。

本发明涉及一种用竞争酶联免疫吸附试验 (c-ELISA) 检测赤羽病病毒抗体试剂盒，经实验数据表明，本发明的 c-ELISA 试剂盒特异性强，敏感性高，适用于赤羽病的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

具体实施方式

实施例：

1、赤羽病病毒 ELISA 包被抗原的制备：BHK-21 细胞长成单层后接种 AKV，37℃ 反应 1h。加入无血清的基础培养基继续培养，3~4d 后细胞病变 (CPE) 达 75% 以上时，收获病毒。将收获的病毒液反复冻融 3 次，以 8000r/min 离心 30 min，取上清液，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒。以 28000r/min 4℃ 超速离心 3h。沉淀用 1/100 原体积的 PBS 溶解，然后采

用 20%、60% (w/v) 不连续蔗糖密度梯度 20000r/min 4℃超速离心 3h, 收获提纯的病毒条带作为抗原, 用 DU800 核酸蛋白分析仪测定蛋白含量, -20℃保存备用。

2、赤羽病病毒 ELISA 包被抗原安全性检定: 将纯化的病毒抗原用维持液作适当稀释 (1:10~1:100) 接种到已长成单层的 BHK21 细胞上, 同时作正常细胞对照。37℃培养 6d, 接种细胞与正常细胞相同, 无 CPE 出现; 取培养液上清 (包括正常细胞培养液上清) 包被酶标板, 用阳性血清进行检测, 病毒培养液和正常细胞培养液显色情况一致, 均为无色, 表明作为包被抗原用的病毒已灭活彻底, 不具感染性, ELISA 包被抗原是安全的。

3、抗赤羽病病毒单克隆抗体的制备: 首先进行赤羽病病毒的培养和纯化, 用 AKV 病毒接种 BHK-21 细胞长成单层, 收获的细胞培养病毒液反复冻融 3 次, 以 8000r/min 离心 30 min, 取上清液, 超速离心和不连续蔗糖密度梯度离心, 收获提纯的病毒条带, 用核酸蛋白分析仪测定蛋白含量为 2.85g/L, -20℃保存备用; 用提纯的赤羽病病毒抗原分别加等体积弗氏完全佐剂 (FCA) 乳化和弗氏不完全佐剂 (FIA) 乳化, 先后免疫 BALB/c 小鼠三次; 取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇 (MW4000) 融合剂下融合, HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞, 用间接 ELISA 方法检测分泌抗 AKV 的阳性孔; 用有限稀释法进行细胞克隆, 经间接 ELISA 筛选阳性克隆, 获得能稳定传代并分泌抗 AKV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞; 将获得的分泌抗 AKV 的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞注射入 BALB/c 小鼠腹腔制备单抗腹水; 采集单克隆抗体腹水, 测定抗体效价、蛋白含量和亲和力, 腹水 ELISA 效价高达为 1: 1024000, 用核酸蛋白分析仪测定纯化腹水 IgG 的含量为 1.56g/L。亲和力分常数高达 6.12×10^7 mol/L。用间接 ELISA 方法鉴定制备的单克隆抗体仅与 赤羽病病毒及其 N 蛋白有特异性免疫反应, 而与其它相关病毒 (如 BTV、EHDV、VSV、PPRV、BVDV 等) 没有任何免疫反应。

4、羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物的制备与鉴定: 利用常规方法从健康的 BALB/c 小鼠血清中提取 IgG, 与等体积弗氏完全佐剂乳化, 充分混匀后经背部皮下注射健康的 18 个月以上的山羊, 2 mL/只; 首免后第 2 周和第 4 周分别用相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂 (FIA) 进行二免和三免后, 无菌采血分离血清, 分别经 1 次 50% 和 2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀提纯羊抗鼠 IgG, 透析除盐; 用改良的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记于羊抗鼠 IgG。标记程序如下: 将 5mg HRP 溶于 0.5mL 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液中; 加 0.5mL 10mmol/L NaIO₄ 溶液, 混匀, 盖紧瓶塞, 室温避光作用 2h。加 0.75mL 0.1mol/L Na₂CO₃ 混匀。加入 0.75mL

纯化的羊抗鼠 IgG (15mg/mL), 混匀。称取 Sephadex G25 干粉 0.3g, 加入一支下口垫玻璃棉的 5mL 注射器外筒内; 随后将上述交联物移入注射器外套, 盖紧, 4°C 过夜。用少许 PBS 将交联物全部洗出, 收集洗出液, 加 1/20 体积的新鲜配制的 5mg/mL NaBH₄ 溶液, 混匀, 室温作用 30min; 再加入 3/20 体积的 NaBH₄ 溶液, 混匀, 室温作用 1h (或 4°C 过夜)。将交联物过 Sephadex G200 或 Sepharose 6B (2.6×50cm) 层析纯化, 分管收集第一峰。测定克分子比值和标记率, 鉴定酶结合物质量, 用 ELISA 法测定酶活性和抗体活性。HRP 抗体酶结合物的保存时, 加入等量甘油 (或 1% BSA 和 50% 甘油) 后, 小量分装 -20°C 存放。

5、阳性血清的制备: 挑选体格健壮的山羊 2~3 只, 将纯化后 AKV 与等体积弗氏完全佐剂 (FCA) 乳化, 充分混匀后经背部皮下注射, 2 mL/只; 首免后第 2 周和第 4 周分别用 AKV 相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂 (FIA) 进行二免和三免; 待山羊血清中抗赤羽病病毒 IgG 抗体酶联免疫吸附试验效价达 1:500 以上, 无菌采血分离血清, 离心或过滤除去沉淀, 进行 56°C 加热 30min 灭活, 用血清保存液配方 I 按 1: 2 稀释 (能用正常的山羊血清稀释更好, 因其成份更接近于检测标本), 抽滤除菌, 1mL/管分装, 贴上标签, -80°C 保存。不可反复冻融, 解冻后只能在 4°C 保存一周。

6、阴性血清的制备: 选择体格健壮的山羊, 采血用行业标准 SNT1128-2002 《赤羽病微量血清中和试验操作规程》和 SNT1128-2007 《赤羽病检疫技术规范》检测方法确认血清中是否有赤羽病的抗体, 证实无赤羽病抗体的山羊, 无菌采血分离血清。用血清保存液配方 I 按 1: 2 稀释, 1mL/管分装, 贴上标签, -80°C 保存。

7、包被缓冲液的优化: 包被抗原时, 为了得到最佳的包被效果, 采用了碳酸盐缓冲液 (0.05mol/L pH9.6)、磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L pH7.6) 和 Tris 盐酸缓冲液 (0.05mol/L pH7.6) 三种缓冲液作为包被液, 抗原包被浓度为 5μg/ml 和 2.5μg/ml, 酶标抗体工作浓度为 1:1000 及 1:500, 用自动酶标仪分析, 选择最佳的包被缓冲液系统。同时为了保证缓冲液能够长期保存, 在包被液中添加了 0.01% 的硫柳汞作为防腐剂。结果获得以下最佳的包被液的配方: 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 (NaHCO₃ 1.465g、Na₂CO₃ 0.795g 或 Na₂CO₃·10H₂O 1.2g、水 500mL) 中含 0.01% 的硫柳汞、1μg/ml 两性霉素 B、谷氨酸钠 1%、1% BSA、30μg/mL 蛋白酶抑制剂 (胰凝乳蛋白酶) 等, 溶解后过滤除菌, 置于 4°C 冰箱, 一周内使用。

8、最适抗原包被浓度的优化: 抗原纯化后要准确测定蛋白质浓度, 用优化好的上述包被缓冲液, 将包被抗原稀释成 0.1μg/mL, 1.0μg/mL, 2.0μg/mL, 4.0 μg/mL, 6.0μg/mL, 8.0μg/mL, 10.0μg/mL 等 6 个浓度, 包被 ELISA 板, 每孔 100μL, 进行 ELISA 测定。经孵育、显色、终

止后，用自动酶标仪分析。显色的强度在一定范围内与包被的抗原量成正比，但随着包被抗原浓度的增加，显色的强度反而降低，选择浓度最低而 OD 值最大的包被抗原量作为最适抗原包被浓度（测得蛋白质的最适包被浓度为 $2.0\mu\text{g/mL}\sim 4\mu\text{g/mL}$ ）。

9、酶标抗体稀释度的优化：抗原包被浓度为 $4\mu\text{g/mL}$ ，将酶标抗体做系列稀释：1：100、1：200、1：400、1：800、1：1600、1：3200、1：6400、1：12800，经孵育、洗涤后、显色终止后，用自动酶标仪分析，选择 OD 值为 1~1.5 左右的酶标抗体稀释度为最适工作浓度。结果表明，将酶标抗体做 1：1000 稀释时，OD 值为 1~1.5 左右。

10、抗原抗体反应时间和 McAb 竞争反应时间的优化：以反应时间短、效果最好、背景值最低为原则，反应时间采用 20min、25min、30min、35min、40min、45min、50min、60min 等 8 个点进行比较，结果表明，抗原抗体反应时间为 45min、McAb 竞争反应时间为 40min 时，效果最好，背景值低。

11、底物作用时间的优化：在其它条件相同的情况下，采用 5min、10min、15min、20min、25min、30min、35min 等 7 个时间点进行比较，获得 15min 为最佳的底物作用时间。

12、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物液、终止液的优选：本发明通过试验，选定如下最佳的洗涤液、稀释液、底物液配方。

12.1 20 倍浓缩洗涤液配方：NaCl160g， KH_2PO_4 4g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58g，KCl4g，Tween-20 10mL，蒸馏水 1000mL，充分溶解，另加 0.01%的硫柳汞作防腐剂，过滤除菌后分装。用时作 20 倍稀释。

12.2 10 倍浓缩稀释液配方：NaCl80g， KH_2PO_4 2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g，KCl 2g，Tween-20 5mL，明胶 100g，蒸馏水 1000mL，充分溶解，另加 0.01%的硫柳汞作防腐剂，过滤除菌后分装。用时作 10 倍稀释。

12.3 底物液的优选：底物液 I 配方：乙酸—柠檬酸缓冲液（pH6.0）：乙酸钠（A 液）——乙酸钠 1.64g、水 200mL，溶解后置于 4°C 冰箱备用；柠檬酸（B 液）——柠檬酸 2.1g、水 100mL，溶解后置于 4°C 冰箱备用。配制：取 B 液约 2mL 至 A 液中调 pH 值至 6.0，置于 4°C 冰箱备用。另加 0.01%的硫柳汞作防腐剂，过滤除菌分装。底物液 II 配方：TMB 溶液：TMB350mg、甲醇 100 mL，加温溶解后保存于不透光的棕色瓶中，保存于室温或在 $2^\circ\text{C}\sim 7^\circ\text{C}$ 保存。底物液 III 配方：每个 ELISA 试剂盒配一管 0.5mL 的 30% H_2O_2 ，临用时再按每 10ml 底物液 $10\mu\text{L}$ 。工作底物液配制：临用前配制。取底物液 I（ 37°C ）9.7mL、底物液 II $300\mu\text{L}$ 、底物液 III $10\mu\text{L}$ 混合。

12.4 终止液的优选：采用 1mol/L H₂SO₄、1.5%NaF、0.1%叠氮钠和 1%十二烷基硫酸钠 (SDS) 作为终止液，进行优选，结果以 1mol/L H₂SO₄ 的终止效果最好。

13、封闭液和封闭方法的优选：本发明通过试验，选定 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中含 1%牛血清白蛋白 (BSA)、2%明胶、0.01%硫柳汞、两性霉素 B (1μg/ml)、庆大霉素 (20μg/ml)，过滤除菌。进行 4℃冰箱中封闭过夜与 37℃ 2 小时封闭效果比对试验，封闭和不封闭比对试验，封闭后洗板和封闭后不洗板比对试验。结果 4℃冰箱中封闭过夜、封闭后不洗板的方法获得了最佳的试验结果。

14、血清、抗体、单克隆抗体保存液的优选：配方 I：0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中含 0.01%的硫柳汞、两性霉素 B (1μg/ml)、20μg/ml 庆大霉素、谷氨酸钠 1%、1% BSA、1%乳糖 (或山梨醇甘油)、含蛋白酶抑制剂 (如胰凝乳蛋白酶 30μg/mL)，过滤除菌。配方 II：将对乙酰氨基酚 1.5g，聚乙二醇(MW20000) 10g，小牛血清 2g，吐温 (Tween) -20 1mL，硫柳汞 0.2g 和 0.02mol/L、pH7.2 的盐酸缓冲盐水 1000mL 配制而成，过滤除菌。结果以配方 I 作为保存液的保存效果最好。

15、包被 ELISA 板制备、保存以及保存期限的测定：选择进口优质的可拆 96 孔 ELISA 板，将纯化后的 AKV，用优化好的上述包被缓冲液稀释成 4.0 μg/mL，以 50μL/孔加入 ELISA 板，置 4℃冰箱中过夜包被，拍干 ELISA 板；以 200μL/孔加入优化好的封闭液，置 4℃冰箱中封闭过夜；彻底拍干 ELISA 板。将已包被好的 ELISA 板置于铝箔或锡箔纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口，置 4℃保存，定期用 ELISA 测定效果，以测定保存期。结果表明，包被 ELISA 板 4℃下保存至 8 个月，与新包被的 ELISA 板检测效果完全一致。

16、试剂盒检测操作程序

(1)、将试剂盒中的 AKV 抗原包被 ELISA 板、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物液、终止液取出，放置室温至少 30min。

(2)、用双蒸水配制稀释液、洗涤液。如工作稀释液：10mL 10 倍稀液+90mL 双蒸水，工作洗涤液：25mL20 倍洗涤液+475mL 双蒸水。

(3)、配制 1:10 的阳性、阴性对照血清和所有被检血清，如方法：10μL 血清+90μL 稀释液，混匀。

(4)、McAb 和羊抗鼠 IgG-HRP 的稀释 (均按 1:1000 稀释)，如 McAb 稀释：20μL McAb+20mL 稀释液，混匀；羊抗鼠 IgG-HRP 稀释：20μL 羊抗鼠 IgG-HRP+20 mL 稀释液混匀。

(5)、加样

——在酶标板上设立稀释液空白对照、阴性血清对照、阳性血清对照（每孔做两孔）。

——每份被检血清样品做两孔。

——取 100 μ L 稀释液入空白对照孔，取 50 μ L 阴性、阳性血清入相应的对照孔，取 50 μ L 被检血清样品入相邻横行孔内，37 $^{\circ}$ C 湿盒感作 45min。

——每孔加 50 μ L McAb（空白对照孔不加），轻轻混匀。

(6)、酶标板置 37 $^{\circ}$ C 湿盒感作 40min。

(7)、加酶结合物：除空白对照孔外，其它所有孔每孔加 50 μ L 羊抗鼠 IgG-HRP，轻轻混匀，酶标板置 37 $^{\circ}$ C 湿盒中感作 40min。

(8)、配制底物液：取出 9.7mL 底物液 I 于棕色瓶中，分别加入底物液 II 300 μ L 和底物液 III 7 μ L，充分混匀。

(9)、先用洗涤液洗酶标板孔 5 次，每次 2min。

(10)、加底物液：所有板孔加 100 μ L 底物液，酶标板置湿盒暗盒 15min。

(11)、加终止液：加入 50 μ L/孔终止液。

(12)、用酶标仪在波长 450nm 下测定光密度值（OD 值），按下式计算抑制百分率（PI）。

$$\text{抑制百分率 (PI)} = \left(100 - \frac{\text{被检血清平均 OD 值}}{\text{阴性血清平均 OD 值}} \right) \times 100$$

(13)、试剂盒阳性判定值的确定：按照上述试剂盒的检测程序，采用行业标准 SNT1128-2002《赤羽病微量血清中和试验操作规程》和 SNT1128-2007《赤羽病检疫技术规范》检测方法确认的 136 份阴性血清和 87 份阳性血清，进行 c-ELISA 试验后，结果所有阴性血清的百分抑制率 \geq 50%，所有阳性血清的百分抑制率 $<$ 50%。因此，获得 c-ELISA 阳性判定值（cut-off value）为：PI \geq 50% 被检血清 AK 抗体阳性；PI $<$ 50% 被检血清 AK 抗体阴性。

17、试剂盒的组装：将按上述方法制备好的 ELISA 抗原包被板（封闭于铝箔/箔锡纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口）、酶结合物、单克隆抗体、10 倍浓缩稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液 I、底物液 II、底物液 III、终止液、阳性血清、阴性血清定量分装，分别贴上标签与说明。1 份详细的试剂盒使用操作说明书。装入专用的试剂盒外壳内，外壳上贴上试剂盒标签。

18、试剂盒中各种试液的配制与分装：

试剂盒中试液的配制分装表		
试液名称	体积 (ml)和检测样品数 (T)	标识
AKV抗原包被ELISA板	2板96孔酶标板 (96T)	铝箔密封
羊抗鼠IgG-HRP酶结合物	0.5ml	1ml 黑盖冻存管
单克隆抗体	0.5ml	1ml 红盖冻存管
阳性血清	1ml	2ml 蓝盖冻存管
阴性血清	1ml	2ml 黄盖冻存管
20倍浓缩洗涤液	50ml	白色平底瓶
10倍浓缩稀释液	30ml	白色平底瓶
底物 I	20ml	黑色平底瓶
底物 II	2ml	2ml 棕色冻存管
底物 III	1ml	2ml 白色冻存管
终止液	20ml	红盖滴瓶
使用说明书	1份	

19、试剂盒的临床样品检测与应用以及试剂盒敏感性、特异性的评价：按照上述试剂盒的检测程序，采用行业标准 SNT1128-2002《赤羽病微量血清中和试验操作规程》和 SNT1128-2007《赤羽病检疫技术规范》检测方法确认的 136 份阴性血清和 87 份阳性血清，进行 c-ELISA 试验。统计获得试剂盒的特异性为 97%（阴性结果数/阴性样品总数=132/136），敏感性为 94%（阳性结果数/阳性样品总数=82/87），本试剂盒的特异性、敏感性为良好。

上述具体实施例的实验数据表明，本发明的 c-ELISA 试剂盒特异性强，敏感性高，适用于赤羽病的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

专利名称(译)	赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN101625362A	公开(公告)日	2010-01-13
申请号	CN200910094815.X	申请日	2009-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	花群义		
申请(专利权)人(译)	花群义		
当前申请(专利权)人(译)	花群义		
[标]发明人	花群义 阮周曦 詹爱军 杨俊兴 林庆燕 宗卉 曾少灵 曹琛福 秦智锋 吕建强		
发明人	花群义 阮周曦 詹爱军 杨俊兴 林庆燕 宗卉 曾少灵 曹琛福 秦智锋 吕建强		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	张怡		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明所属的领域为生物技术领域。本发明所述的赤羽病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒由以下组分分装后组成：AKV抗原包被ELISA板、羊抗鼠IgG - HRP酶结合物、单克隆抗体、阳性血清、阴性血清、20倍浓缩洗涤液、10倍浓缩稀释液、底物I、底物II、底物III、终止液，所述的羊抗鼠IgG - HRP酶结合物为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠抗体(IgG)；所述的单克隆抗体为鼠抗赤羽病病毒的特异性单克隆抗体(McAb)；所述的20倍浓缩洗涤液为20倍浓缩的含0.05% Tween - 20的0.01mol/L pH7.4 PBS(PBST)；所述的10倍浓缩稀释液为10倍浓缩的含1%明胶的PBST；所述的底物I为pH6.0的乙酸 - 柠檬酸缓冲液；所述的底物II为3.3' - 5.5' - 四甲基联苯胺(TMB)溶液；所述的底物III为双氧水(H2O2)溶液；所述的终止液为1mol/L H2SO4硫酸溶液。本发明的c - ELISA试剂盒特异性强，敏感性高，适用于赤羽病的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

被检血清平均OD值

$$\text{抑制百分率 (PI)} = \left(100 - \frac{\text{被检血清平均OD值}}{\text{阴性血清平均OD值}} \right) \times 100$$

阴性血清平均OD值