

[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 200910190438.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月17日

[11] 公开号 CN 101672849A

[22] 申请日 2009.9.16

[21] 申请号 200910190438.X

[71] 申请人 花群义

地址 518010 广东省深圳市和平路 2049 号和平大厦检验大楼 702 室

[72] 发明人 花群义 阮周曦 杨俊兴 杨云庆
曾少灵 林庆燕 吕建强 陈兵
秦智锋 陶虹

[74] 专利代理机构 深圳市中知专利商标代理有限公司

代理人 成义生 罗永前

权利要求书 5 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及其制备方法和用途

[57] 摘要

一种鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及其制备方法和用途，该试剂盒包括 EHDV 抗原包被 ELISA 板、单克隆抗体 IgG - HRP 酶结合物、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。制备方法包括：a、制备鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原，并检定鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的安全性；b、制备抗鹿流行性出血病病毒的单克隆抗体，并对抗体辣根过氧化物酶 (HRP) 酶结合物进行制备与鉴定；c、制备阳性血清和阴性血清；d、制备鹿流行性出血病病毒抗原包被的 ELISA 板；e、制备 20 倍浓缩洗涤液和 10 倍浓缩稀释液，并制备底物 I、底物 II、底物 III 及终止液；f、组装试剂盒。本发明的试剂盒用于鹿流行性出血病的诊

断、检疫、检测和流行病学调查，具有特异性强，敏感性高等特点。

1、一种鹿流行性出血病病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括：

EHDV 抗原包被 ELISA 板
 单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物
 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

其中，所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶（HRP）标记的鼠抗鹿流行性出血病病毒的特异性单克隆抗体（McAb）（IgG）；20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 的 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 1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括：

EHDV 抗原包被 ELISA 板	2 板 96 孔酶标板
单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物	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

其中,所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶 (HRP) 标记的鼠抗鹿流行性出血病病毒的特异性单克隆抗体 (McAb) (IgG); 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 的 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 (H_2O_2) 溶液; 终止液为 1mol/ L H_2SO_4 硫酸溶液。

3、一种如权利要求 1 所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,该方法包括:

a、制备鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原,并检定鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的安全性;

b、制备抗鹿流行性出血病病毒的单克隆抗体,并对抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体辣根过氧化酶 (HRP) 酶结合物进行制备与鉴定;

c、制备阳性血清和阴性血清;

d、制备鹿流行性出血病病毒抗原包被的 ELISA 板;

e、制备 20 倍浓缩洗涤液和 10 倍浓缩稀释液,并制备底物 I、底物 II、底物 III 及终止液;

f、将上述制备好的 ELISA 抗原包被板、酶结合物、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,并装入专用的试剂盒外壳内,外壳上贴上试剂盒标签。

4、如权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,步骤 (a) 中,鹿流

行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的制备方法为：将 BHK-21 细胞长成单层后接种 EHDV，无血清的基础培养基培养，细胞病变达 75%以上时，收获病毒，反复冻融 3 次，以 8000 转/分离心 30 分钟，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 20000 转/分 4℃温度超速离心 3 小时，收获提纯的病毒条带作为抗原；鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的安全性检定方法为：将纯化的病毒抗原用维持液作适当稀释接种到已长成单层的 BHK21 细胞上，同时作正常细胞对照，传二代，无 CPE 出现，表明作为包被抗原用的病毒已灭活彻底，纯化的抗原是安全的。

5、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，步骤 (b) 中，抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体的制备方法为：用提纯的鹿流行性出血病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 EHDV 的阳性孔，获得能稳定传代并分泌抗 EHDV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞，利用 BALB/c 小鼠制备抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体腹水；抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体辣根过氧化酶 (HRP) 酶结合物的制备与鉴定方法为：将抗鹿流行性出血病病毒 BALB/c 小鼠腹水 McAb，分别经 1 次 50% 和 2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀提纯，透析除盐；用改良过的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记于单克隆抗体，1mL/管分装，-80℃ 温度保存。

6、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，步骤 (c) 中，阳性血清的制备方法为：挑选体格健壮的山羊 2~3 只，将纯化后 EHDV 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 EHDV 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，1mL/管分装，-80℃ 温度

保存；阴性血清的制备方法为：选择体格健壮的山羊，采血用血清中和试验或酶联免疫吸附试验检测血清中是否有鹿流行性出血病的抗体，证实无鹿流行性出血病抗体的山羊，无菌采血分离血清，1mL/管分装，-80℃温度保存。

7、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，步骤（d）中，鹿流行性出血病病毒抗原包被 ELISA 板的制备方法：将纯化后的鹿流行性出血病病毒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℃温度的冰箱中过夜包被，拍干 ELISA 板；以 200μL/孔加入优化好的封闭液，置 4℃温度的冰箱中封闭过夜；彻底拍干 ELISA 板。将已包被好的 ELISA 板置于铝箔或薄锡纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口，置 4℃温度保存。

8、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，步骤（e）中，20 倍浓缩洗涤液制备方法为：NaCl160g，KH₂PO₄ 4g，Na₂HPO₄·12H₂O 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；10 倍浓缩稀释液制备方法为：NaCl80g，KH₂PO₄ 2g，Na₂HPO₄·12H₂O 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；所述底物 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 1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

9、如权利要求 1 所述试剂盒的检测操作流程为：用稀释液以 1:10 稀释阳性、阴性对照血清和所有被检血清，加入 ELISA 板，每份被检血清样品做两孔，每孔加 50μL；37℃湿盒感作 45 分钟，每孔加 50μLHRP 标记的 McAb 酶结合物，酶标板置 37℃温度湿盒感作 40 分钟；洗板四次，每孔加 100μL 底物液，酶标板置湿盒暗盒 15 分钟；加入 50μL/孔终止液；用酶标仪在波长 450nm 下测定光密度值 (OD 值)，计算抑制百分率 (PI)。

10、权利要求 1 所述鹿流行性出血病病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验

检测试剂盒用于鹿流行性出血病的诊断、检疫、检测和流行病学调查。

鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及其制备方法和用途

【技术领域】

本发明涉及生物技术领域，特别是涉及一种鹿流行性出血病病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒及其制备方法和用途。

【背景技术】

鹿流行性出血病 (epizootic haemorrhagic disease of deer, EHD) 是一种季节性、非接触性的病毒性传染病。鹿流行性出血病病毒 (EHDV) 为呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 环状病毒属 (Orbivirus) 的成员，是通过节肢动物 (主要是库蠓) 传播的双股 RNA 病毒，在形态结构上与蓝舌病病毒 (BTV) 极为相似，血清学上与蓝舌病有明显交叉。在自然条件下，鹿流行性出血病病毒可引起牛、绵羊等家畜及白尾鹿 (*Odocoileus virginianus*)、麋、大角羚羊等多种驯养和野生反刍动物感染。美国已从白尾鹿、黑尾鹿、绵羊、山羊、牛、野牛及库蠓体内分离到了病毒。以白尾鹿最为严重，临床特征为体温短暂升高，呈休克症状，粘膜和浆膜出血，于昏迷状态下死亡。病变呈广泛性充血、出血、严重水肿和血管坏死，有时出现腹膜水肿。绵羊 EHD 与蓝舌病 (bluetongue virus, BTV) 相似，死亡率 2~30%，牛感染后可以检测到抗体，但不表现症状，美国牛群中 EHD 病毒的血清阳性相当普遍。该病在日本、中国台湾、朝鲜都有报道，临床以发热、精神沉郁、吞咽困难、消瘦等为特征，有时还导致怀孕牛流产、死产。

目前 EHD 共发现 8 个血清型，美国大多为 EHDV-2、EHDV-1，澳大利亚有 EHDV-1、EHDV-2、EHDV-5、EHDV-6、EHDV-7、EHDV-8 等 6 个血清型。尼

日利亚¹分离到 EHDV-3、EHDV-4。另外，印度尼西亚、中国台湾省、马来西亚、菲律宾、圭亚等地都分离到 EHDV。本病目前尚无有效疫苗和治疗措施，控制和消灭 EHD 必须花费大量的人力物力，给 EHDV 流行的国家带来很大的经济损失。建立基于单克隆抗体的鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验（c-ELISA）方法，是动物检疫中急需解决的关键技术问题。

【发明内容】

本发明旨在解决上述问题，而提供一种特异性强，敏感性高，适用于鹿流行性出血病的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查的鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒。

本发明的目的还在于提供该鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒的制备方法。

本发明的另一目的在于提供该鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒的用途。

为实现上述目的，本发明提供一种鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒，该试剂盒包括：

EHDV 抗原包被 ELISA 板

单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物

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

其中,所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶 (HRP) 标记的鼠抗鹿流行性出血病病毒的特异性单克隆抗体 (McAb) (IgG); 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 的 PBST (磷酸缓冲液), 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 (H_2O_2) 溶液; 终止液为 1mol/L H_2SO_4 硫酸溶液。

该试剂盒的优选方案包括:

EHDV 抗原包被 ELISA 板	2 板 96 孔酶标板
单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物	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

其中,所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶 (HRP) 标记的鼠抗鹿流行性出血病病毒的特异性单克隆抗体 (McAb) (IgG); 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 的 PBST (磷酸盐缓冲液); 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 (H_2O_2) 溶液; 终止液为 1mol/L H_2SO_4 硫酸溶液。

本发明还提供了所述鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒的制备方法,该方法包括:

a、制备鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原,并检定鹿流行性出血病

病毒 ELISA 包被抗原的安全性;

b、制备抗鹿流行性出血病病毒的单克隆抗体, 并对抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体辣根过氧化酶 (HRP) 酶结合物进行制备与鉴定;

c、制备阳性血清和阴性血清;

d、制备鹿流行性出血病病毒抗原包被的 ELISA 板;

e、制备 20 倍浓缩洗涤液和 10 倍浓缩稀释液, 并制备底物 I、底物 II、底物 III 及终止液;

f、将上述制备好的 ELISA 抗原包被板、酶结合物、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, 并装入专用的试剂盒外壳内, 外壳上贴上试剂盒标签。

步骤 a 中, 鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的制备方法为: 将 BHK-21 细胞长成单层后接种 EHDV, 无血清的基础培养基培养, 细胞病变达 75% 以上时, 收获病毒, 反复冻融 3 次, 以 8000 转/分离心 30 分钟, 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/分钟 4℃超速离心 3 小时, 收获提纯的病毒条带作为抗原; 鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的安全性检定方法为: 将纯化的病毒抗原用维持液作适当稀释接种到已长成单层的 BHK21 细胞上, 同时作正常细胞对照, 传二代, 无 CPE 出现, 表明作为包被抗原用的病毒已灭活彻底, 纯化的抗原是安全的。

步骤 b 中, 抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体的制备方法为: 用提纯的鹿流行性出血病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 EHDV 的阳性孔, 获得能稳定传代并分泌抗 EHDV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞, 利用 BALB/c 小鼠制备抗鹿

流行性出血病病毒单克隆抗体腹水；抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体辣根过氧化酶（HRP）酶结合物的制备与鉴定方法为：将抗鹿流行性出血病病毒 BALB/c 小鼠腹水 McAb，分别经 1 次 50% 和 2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀提纯，透析除盐；用改良过的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶（HRP）标记于单克隆抗体，1mL/管分装，-80℃ 温度保存。

步骤 c 中，阳性血清的制备方法为：挑选体格健壮的山羊 2~3 只，将纯化后 EHDV 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 EHDV 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，1mL/管分装，-80℃ 温度保存；阴性血清的制备方法为：选择体格健壮的山羊，采血用血清中和试验或酶联免疫吸附试验检测血清中是否有鹿流行性出血病的抗体，证实无鹿流行性出血病抗体的山羊，无菌采血分离血清，1mL/管分装，-80℃ 温度保存。

步骤 d 中，鹿流行性出血病病毒抗原包被 ELISA 板的制备方法：将纯化后的鹿流行性出血病病毒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℃ 温度的冰箱中过夜包被，拍干 ELISA 板；以 200μL/孔加入优化好的封闭液，置 4℃ 温度的冰箱中封闭过夜；彻底拍干 ELISA 板。将已包被好的 ELISA 板置于铝薄或薄锡纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口，置 4℃ 温度保存。

步骤 e 中，20 倍浓缩洗涤液制备方法为：NaCl 160g，KH₂PO₄ 4g，Na₂HPO₄·12H₂O 58g，KCl 4g，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；10 倍浓缩稀释液制备方法为：NaCl 80g，KH₂PO₄ 2g，Na₂HPO₄·12H₂O 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；所述底物 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 1mol/L H_2SO_4 硫酸溶液。

本发明的试剂盒的检测操作流程为：用稀释液以 1:10 稀释阳性、阴性对照血清和所有被检血清，加入 ELISA 板，每份被检血清样品做两孔，每孔加 50 μ L；37 $^{\circ}C$ 湿盒感作 45 分钟，每孔加 50 μ LHRP 标记的 McAb 酶结合物，酶标板置 37 $^{\circ}C$ 温度湿盒感作 40 分钟；洗板四次，每孔加 100 μ L 底物液，酶标板置湿盒暗盒 15 分钟；加入 50 μ L/孔终止液；用酶标仪在波长 450nm 下测定光密度值（OD 值），计算抑制百分率（PI）。

本发明还进一步提供了该鹿流行性出血病病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒的用途，该试剂盒用于鹿流行性出血病的诊断、检疫、检测和流行病学调查。

本发明的贡献在于，它解决了鹿流行性出血病病毒快速检测及诊断问题。本发明的鹿流行性出血病病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒具有特异性强，敏感性高等特点，可适用于鹿流行性出血病的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

【具体实施方式】

本发明的鹿流行性出血病病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒的制备方法包括但不限于下述实施例。该方法的具体步骤为：

1、鹿流行性出血病病毒 ELISA 包被抗原的制备：BHK-21 细胞长成单层后接种鹿流行性出血病病毒 EHDV，于 37 $^{\circ}C$ 温度反应 1 小时。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 8000 转/分离心 30 分钟，取上清液，加入终浓度为 1 / 3000 的甲醛灭活病毒。以 28000 转/分 及 4 $^{\circ}C$ 温度超速离心 3 小时。沉淀用 1/100 原体积的 PBS（磷酸缓冲液）溶解，然后采用 20%、60%（w/v）不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分 及 4 $^{\circ}C$ 温度超速离心 3 小时，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℃温度保存备用。

2、鹿流行性出血病病毒 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。在 37℃ 温度培养 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、抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体的制备：首先进行鹿流行性出血病病毒的培养和纯化，用 EHDV 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 8000 转/分离心 30 分钟，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，于-20℃ 温度保存备用；用提纯的鹿流行性出血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 EHDV 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 EHDV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞；将获得的分泌抗 EHDV 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 1:512000，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 $6.12 \times 10^7 \text{mol/L}$ 。用间接 ELISA 方法鉴定制备的单克隆抗体仅与鹿流行性出血病病毒有特异性免疫反应，而与其它相关病毒（如 BTV、VSV、AKV、PPRV、BVDV 等）没有任何免疫反应。

4、抗鹿流行性出血病病毒单克隆抗体辣根过氧化酶（HRP）酶结合物

的制备与鉴定：将抗鹿流行性出血病病毒 BALB/c 小鼠腹水 McAb，分别经 1 次 50% 和 2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀提纯，透析除盐；用改良过的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶（HRP）标记于单克隆抗体。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 2 小时。加 0.75mL 0.1mol/L Na₂CO₃ 混匀。加入 0.75mL 纯化单抗（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，于 4℃ 温度过夜。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 30 分钟；再加入 3/20 体积的 NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 1 小时（或于 4℃ 温度过夜）。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，小量分装于 -20℃ 温度存放。

5、阳性血清的制备：挑选体格健壮的山羊 2~3 只，将纯化后的鹿流行性出血病病毒 EHDV 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 EHDV 相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂（FIA）进行二免和三免；待山羊血清中抗鹿流行性出血病病毒 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℃ 温度加热 30 分钟灭活，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，于 -80℃ 温度保存。不可反复冻融，解冻后只能在 4℃ 温度保存一周。

6、阴性血清的制备：选择体格健壮的山羊，采血用行业标准 SNT1167-2002《鹿流行性出血病琼脂免疫扩散试验操作规程》检测方法确认的血清中是否有鹿流行性出血病的抗体，证实无鹿流行性出血病

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，于-80℃温度保存。

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，用碳酸盐缓冲液 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 5 μ g/ml 和 2.5 μ g/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、1 μ g/ml 两性霉素 B、谷氨酸钠 1%、1% BSA、30 μ g/mL 蛋白酶抑制剂（胰凝乳蛋白酶）等，溶解后过滤除菌，置于 4℃ 温度冰箱，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 0.1 μ g/mL，1.0 μ g/mL，2.0 μ g/mL，4.0 μ g/mL，6.0 μ g/mL，8.0 μ g/mL，10.0 μ g/mL 等 6 个浓度，包被 ELISA 板，每孔 100 μ L，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 μ g/mL ~ 4 μ g/mL。

9、酶标抗体稀释度的优化：抗原包被浓度为 4 μ 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、洗涤及显色终止后，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 20 分钟、25 分钟、30 分钟、35 分钟、40 分钟、45 分钟、50 分钟、60 分钟等 8 个点进行比较，结果表明，当抗原抗体反应时间为 45 分钟、McAb 竞争反应时间为 40 分钟时效果最好，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 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、35 分钟等 7 个时间点进行比较，获得 15 分钟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：

(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。

(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。

(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℃温度冰箱备用；柠檬酸 (B 液) ——柠檬酸 2.1g、水 100mL，溶解后置于 4℃温度冰箱备用。配制：取 B 液约 2mL 至 A 液中调 pH 值至 6.0，置于 4℃温度冰箱备用。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℃~7℃温度保存。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 μL 。工作底物液配制：临用前配制。取底物液 I (37℃) 9.7mL、底物液 II 300 μL 、底物液 III 10 μL 混合。

(4) 终止液的优选：采用 1mol/L H_2SO_4 、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 $1\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 的终止液效果最好。

13、封闭液和封闭方法的优选: 经试验, 选定 $0.01\text{mol/L pH}7.2$ 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 ($1\mu\text{g/ml}$)、庆大霉素 ($20\mu\text{g/ml}$), 过滤除菌。进行 4°C 温度冰箱中封闭过夜与 37°C 温度 2 小时封闭效果对比试验, 封闭和不封闭对比试验, 及封闭后洗板和封闭后不洗板对比试验。结果显示, 4°C 温度冰箱中封闭过夜、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 ($1\mu\text{g/ml}$)、 $20\mu\text{g/ml}$ 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 $30\mu\text{g/mL}$), 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 、 $\text{pH}7.2$ 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 EHDV, 用优化好的上述包被缓冲液稀释成 $4.0\mu\text{g/mL}$, 以 $50\mu\text{L/孔}$ 加入 ELISA 板, 置于 4°C 温度冰箱中过夜包被, 拍干 ELISA 板; 以 $200\mu\text{L/孔}$ 加入优化好的封闭液, 置于 4°C 温度冰箱中封闭过夜; 彻底拍干 ELISA 板。将已包被好的 ELISA 板置于铝箔或簿锡纸中, 内置 2g 硅胶干燥剂, 封口, 于 4°C 温度保存, 定期用 ELISA 测定效果, 以测定保存期。结果表明, 包被 ELISA 板于 4°C 温度下保存至 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 EHDV 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, 置于室温下至少 30 分钟。

(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: 25mL 20 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: 10 μ L 血清+90 μ L 稀释液, 混匀。

(4) HRP 标记的 McAb 酶结合物的稀释 (均按 1:1000 稀释), 如 McAb 稀释: 20 μ L McAb+20mL 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, 于 37 $^{\circ}$ C 温度湿盒感作 45 分钟。

——每孔加 50 μ L HRP 标记的 McAb 酶结合物 (空白对照孔不加), 轻轻混匀。

(6) 酶标板于 37 $^{\circ}$ C 温度湿盒感作 40 分钟。

(7) 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。

(8) 先用洗涤液洗酶标板孔 4 次, 每次 2 分钟。

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

(10) 加终止液: 加入 50 μ L/孔终止液。

(11) 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):

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

(12) 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 SNT1167-2002《鹿流行性出血病琼脂免疫扩散试验操作规程》检测方法确认的 50 份阴性血清和 50 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 EHDV 抗体阳性; $PI < 50\%$ 被检血清 EHDV 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/薄锡纸中, 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, 装入专用的试剂盒外壳内, 外壳上贴上试剂盒标签, 并附上一份详细的试剂盒使用操作说明书。

18、试剂盒中各种试液的配制与分装见表 1:

表 1

试液名称	体积 (ml) 和检测样品数 (T)	标识
EHDV 抗原包被 ELISA 板	2 板 96 孔酶标板 (96T)	铝箔密封
HRP 标记的单克隆抗体酶结合物	0.5ml	1ml 黑盖冻存管
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 (pH6.0 的乙酸-柠檬酸缓冲液)	20ml	黑色平底瓶
底物 II (TMB)	2ml	2ml 棕色冻存管
底物 III (H2O2)	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 SNT1167-2002《鹿流行性出血病琼脂免疫扩散试验操作规程》检测方法确认的 50 份阴性血清和 50 份阳性血清，进行 c-ELISA 试验。统计获得试剂盒的特异性为 96%（阴性结果数/阴性样品总数=48/50），敏感性为 92%（阳性结果数/阳性样品总数=46/50），本试剂盒的特异性、敏感性为良好。

专利名称(译)	鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN101672849A	公开(公告)日	2010-03-17
申请号	CN200910190438.X	申请日	2009-09-16
[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 杨俊兴 杨云庆 曾少灵 林庆燕 吕建强 陈兵 秦智锋 陶虹		
发明人	花群义 阮周曦 杨俊兴 杨云庆 曾少灵 林庆燕 吕建强 陈兵 秦智锋 陶虹		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	罗永前		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种鹿流行性出血病竞争酶联免疫吸附试验试剂盒及其制备方法和用途，该试剂盒包括EHDV抗原包被ELISA板、单克隆抗体IgG - HRP酶结合物、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。制备方法包括：a、制备鹿流行性出血病病毒ELISA包被抗原，并检定鹿流行性出血病病毒ELISA包被抗原的安全性；b、制备抗鹿流行性出血病病毒的单克隆抗体，并对抗体辣根过氧化物酶(HRP)酶结合物进行制备与鉴定；c、制备阳性血清和阴性血清；d、制备鹿流行性出血病病毒抗原包被的ELISA板；e、制备20倍浓缩洗涤液和10倍浓缩稀释液，并制备底物I、底物II、底物III及终止液；f、组装试剂盒。本发明的试剂盒用于鹿流行性出血病的诊断、检疫、检测和流行病学调查，具有特异性强，敏感性高等特点。

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