



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310111497.6

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1547027A

[22] 申请日 2003.12.2

[21] 申请号 200310111497.6

[71] 申请人 湖北省预防医学科学院

地址 430079 湖北省武汉市洪山区卓刀泉北路 6 号

[72] 发明人 张瑜 徐国景 唐利军 肖红雨
孙凡中 张金明 易平 杨文祥
林乔 龚镇奎

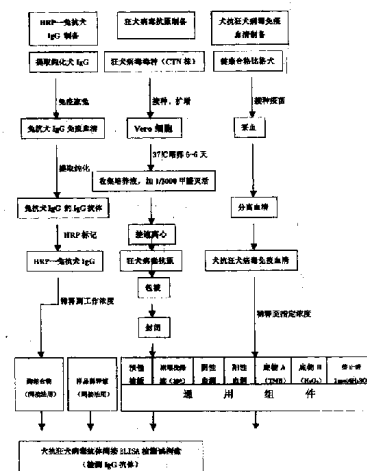
[74] 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司
代理人 周瑾

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测试剂盒及其制备方法，具体地是一种用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒及制备方法。试剂盒组成为：已预包被犬狂犬病毒抗原酶标板，样品稀释液，阳性血清，阴性血清，HRP-抗犬 IgG 酶结合物，浓缩洗涤液，底物和终止液。本发明试剂盒的特异性达到 100%；灵敏度为 1:640；精密性(变异系数 C·V)为 6.98%。本试剂盒采用间接 ELISA 检测犬抗狂犬病毒 IgG 抗体，用于实验犬、宠物犬和普通犬感染狂犬病毒的情况调查和接种狂犬疫苗的效果评价。



ISSN 1008-4274

1、一种用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒，其特征在于：所述试剂盒组成为：

已预包被狂犬病毒抗原酶标板	8×12 孔
样品稀释液	10 ml
阳性血清	0.5 ml
阴性血清	0.5 ml
酶结合物	10ml
浓缩洗涤液	20 ml
底物 A	5 ml
底物 B	5 ml
终止液	5 ml

其中，所述的样品稀释液为 0.01mol/L, pH7.2 的磷酸缓冲盐水；酶结合物为辣根过氧化物酶-抗犬 IgG 酶结合物；浓缩洗涤液为含 0.05%吐温-20 的生理盐水；底物 A 为 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液；底物 B 为双氧水溶液；终止液为用蒸馏水稀释后的 1mol/LH₂SO₄ 硫酸溶液，纯硫酸与蒸馏水比例为 1：17。

2、制备如权利要求 1 所述的试剂盒的方法，其特征在于所述的制备方法如下：

A：RP-兔抗犬 IgG 酶结合物的制备：

兔抗犬 IgG 的制备和辣根过氧化物标记：按常规方法提取纯化犬 IgG；免疫家兔，当兔抗血清双扩效价达 1:16 以上时取血清；经硫酸铵沉淀和 DEAE-Sephadex G200 柱层析纯化；用改良的过碘酸氧化法进行标记；代号为 HRP-兔抗犬 IgG 的酶标记物加入 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；

B：阳性血清的制备：

挑选体格健壮的 6 月龄比格犬 2~3 只，初次免疫用兽用五联苗（狂犬病、犬传染性肝炎、犬副流感、犬瘟热、犬细小病毒），加强免疫用人用狂犬苗，待犬血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 效价达 1：500 以上，即可采血分离血清；用 A 液将冻存的阳性血清稀释到工作浓度，O.D 为 0.5~1.0；

C：阴性血清的制备：用 A 液将冻存的阴性血清作适当稀释，O.D<0.1；

D：样品稀释液的制备：将小牛血清 100ml、甘油 100ml、吐温-20：1ml、聚乙二醇 2 万 10g、叠氮钠 2g、Vero 细胞因子 1ml、33%原装的双氧水配制成 0.01mol/L, pH7.2 的磷酸缓冲盐水；

E：浓缩洗涤液的制备：将氯化钠 170g；吐温-20：10ml；蒸馏水 1000ml 配制成所需的生理盐水浓缩洗涤液；

F：底物 A 的制备：将 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺 270g、无水乙醇 240ml、甘油 6ml、双蒸水 340ml 配制成 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液；

G：底物 B 的制备：将 Na₂HPO₄·12H₂O 的磷酸氢二钠 18.41g、无水 Na₂HPO₄ 的磷酸氢二钠 7.33g、枸橼酸 5.10g、双蒸水 1000ml 及原装 33% 的双氧水 1.0ml 配制成所需双氧水溶液；

H: 终止液的制备: 所述终止液为用蒸馏水稀释后的硫酸溶液, 纯硫酸与蒸馏水为 1: 17;

I: 预包被板的制备: 将狂犬病毒抗原用 0.05mol/L, pH9.6 的磷酸缓冲液即包被液稀释成 5 μ g/ml, 包被酶标板, 每孔 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 倒掉包被液, 每孔加含 10%小牛血清的封闭液 4 $^{\circ}$ C 过夜; 倒掉封闭液, 吹干, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

将上述制备好的酶结合物用 A 液稀释, 与样品稀释液、浓缩洗涤液、底物 A、底物 B、终止液、阳性血清、阴性血清按权利要求 1 所述的定量分装, 再与预包被板分装成检测试剂盒。

3、如权利要求 2 所述的试剂盒的制备方法, 其特征在于所述狂犬病毒抗原用狂犬病毒疫苗株在 Vero 细胞上培养、扩增, 经冻融, 超声波破碎、差速离心提取, -20 $^{\circ}$ C 保存, 作为包被用狂犬病毒用抗原。

4、如权利要求 2 所述的试剂盒的制备方法, 其特征在于所述的包被液即 0.05mol/L, pH9.6 的磷酸缓冲液制备方法为: 将碳酸钠 1.59g、碳酸氢钠 2.93g、叠氮钠 0.20g、蒸馏水 1000ml 配制而成。

5、如权利要求 2 所述的试剂盒的制备方法, 其特征在于所述的封闭液制备方法为: 将氯化钠 8.5g、小牛血清 10.0g、双蒸水 500ml、甘油 500ml 配制而成, 其中, 先将氯化钠和小牛血清溶于双蒸水中, 再加甘油。

6、如权利要求 2 所述的试剂盒的制备方法, 其特征在于所述 A 液制备方法为: 将对乙酰氨基酚 1.5g, 聚乙二醇 2 万 10g, 小牛血清 2g, 吐温-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。

用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒及制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测试剂盒及其制备方法，具体地是一种用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒及制备方法。

技术背景

实验动物是生命科学的重要基础和必备的支撑条件之一。实验动物质量的优劣不仅直接关系到相关科研工作的成败，而且也是一个国家总体相关科研水平的重要标志。实验动物的质量保证除了依赖于饲养管理水平和硬件条件外，还依赖于标准化的检测系统，而检测系统的关键是科学、先进的检测方法和标准化的检测试剂。目前，我国实验动物检测标准与体系尚不完备、不统一、不规范、不标准，与国外发达国家相比也有很大差距，这对我国总体相关科学研究的发展是一大障碍。

随着经济的发展和人民生活水平的提高，宠物犬的数量在不但增加，犬的活动区域也在不断扩大，仅武汉市区就有十万只以上。从宠物医疗市场得到的信息，人们是迫切希望了解宠物接种狂犬疫苗后对犬是否具有保护力，而目前狂犬病毒抗体的检测工作因受检测条件和费用的限制，并没有得到广泛的应用。狂犬病毒 (Rabies Virus) 是狂犬病的病原体，而我国又是狂犬病的高发国家，居世界第二位 (仅次于印度)，由于狂犬病是人畜共患性疾病，95% 的狂犬病是与人类密切接触的犬传播的，其危害已经引起政府和人民的高度关注。犬不仅用于狩猎 (猎犬)、侦破 (警犬)、看门、食肉和作为宠物饲养，犬还是进行生命科学、医学、药学、化工、农业、军事、环保、航天及生物工程领域应用广泛的重要实验动物 (实验犬) 之一。随着我国在生命科学、医学、药学等研究领域发展速度加快，实验犬的使用量不断增大，质量要求不断提高，实验犬的生产基地在不断涌现，但实验犬的检测体系尚未建立，使得狂犬病的危害更加突出，保证犬 (尤其是实验犬) 的质量和工作人员的身体与健康与安全成为十分突出的课题。特别是我国进入 WTO 后，我国生命科学的研究成果、医药、生物制品以及实验犬等将跨出国门走向世界，这些均需要实验犬的质量检测工作标准化作为支撑，以突破发达国家设立的技术壁垒，进入国际市场。

目前，国内外用 ELISA 方法检测人血清中抗狂犬病毒抗体，辅助临床上狂犬病的诊断和用于狂犬疫苗效果的评价方法已经成熟。但用于实验动物 (包括犬、猴、鼠等) 狂犬病毒抗体检测的方法和相应的试剂盒尚未见实验动物狂犬病毒抗体检测方法的研究报道，也未见相应的试剂盒商售。因此建立科学、快速、先进的实验动物狂犬病毒抗体检测方法，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

本发明所要解决的技术问题是提供一种用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒及制备方法。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒，其组成为：

已预包被狂犬病毒抗原酶标板	8×12 孔
样品稀释液	10 ml
阳性血清	0.5 ml
阴性血清	0.5 ml
HRP-抗犬 IgG 酶结合物	10ml

浓缩洗涤液	20 ml
(TMB) 底物 A	5 ml
(H ₂ O ₂) 底物 B	5 ml
2 mol/L (H ₂ SO ₄) 的终止液	5 ml;

其中, 所述的样品稀释液为 0.01mol/L, pH7.2 的磷酸缓冲盐水 (PBS); 酶结合物为辣根过氧化物酶 (HRP) —抗犬 IgG 酶结合物; 浓缩洗涤液为含 0.05%吐温 (Tween) —20 的生理盐水; 底物 A 为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液; 底物 B 为双氧水溶液; 终止液为用蒸馏水稀释后的 1mol/LH₂SO₄ 硫酸溶液, 纯硫酸与蒸馏水比例为 1: 17。

本发明的技术方案不包括上述检测试剂盒的制备方法, 其制备方法包括:

A: HRP-兔抗犬 IgG 酶结合物的制备:

兔抗犬 IgG 的制备和辣根过氧化物标记: 按常规方法提取纯化犬 IgG, 免疫家兔, 当兔抗血清双扩效价达 1:16 以上时取血清; 经硫酸铵沉淀和 DEAE-Sephadex G200 柱层析纯化; 用改良的过碘酸氧化法进行标记。酶标记物 (代号: HRP-兔抗犬 IgG) 加入 1%牛血清白蛋白 (BSA) 和 50%的中性甘油, 测定工作浓度后, -20℃保存备用;

B: 阳性血清的制备:

(1) 挑选体格健壮的 6 月龄比格犬 2~3 只, 初次免疫用兽用五联苗 (狂犬病、犬传染性肝炎、犬副流感、犬瘟热、犬细小病毒), 加强免疫用人用狂犬苗, 待犬血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 效价达 1: 500 以上, 即可采血分离血清; (2) 用 A 液将冻存的阳性血清稀释到工作浓度 (O.D 控制在 0.5~1.0);

C: 阴性血清的制备: 用 A 液将冻存的阴性血清作适当稀释, O.D<0.1;

D: 样品稀释液的制备: 将小牛血清 (BSA) 100ml、甘油 100ml、吐温 (Tween) —20: 1ml、聚乙二醇 2 万 (P) 10g、叠氮钠 (NaN₃) 2g、Vero 细胞因子 1ml、33% 原装的双氧水配制成 0.01mol/L, pH7.2 的磷酸缓冲盐水 (PBS);

E: 浓缩洗涤液的制备: 将氯化钠 (NaCl) 170g; 吐温 (Tween) —20: 10ml; 蒸馏水 1000ml 配制成所需的生理盐水浓缩洗涤液;

F: 底物 A 的制备: 将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 270g、无水乙醇 240ml、甘油 6ml、双蒸水 340ml 配制成 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液;

G: 底物 B 的制备: 将 Na₂HPO₄ · 12H₂O 的磷酸氢二钠 18.41g、无水 Na₂HPO₄ 的磷酸氢二钠 7.33g、枸橼酸 5.10g、双蒸水 1000ml 及原装 33% 的双氧水 1.0ml 配制成所需双氧水溶液;

H: 终止液的制备: 所述终止液为用蒸馏水稀释后的硫酸溶液, 纯硫酸与蒸馏水为 1: 17;

I: 预包被板的制备: 将狂犬病毒抗原用磷酸缓冲液 (0.05mol/L, pH9.6) 即包被液稀释成 5μg/ml, 包被酶标板, 每孔 100μl, 4℃过夜; 倒掉包被液, 每孔加含 10%小牛血清的封闭液 4℃过夜; 倒掉封闭液, 吹干, 4℃保存备用;

将上述制备好的酶结合物用 A 液稀释、与样品稀释液、浓缩洗涤液、底物 A、底物 B、终止液、阳性血清、阴性血清按试剂盒配制定量分装, 再与预包被板分装成检测试剂盒;

所述狂犬病毒抗原用狂犬病毒疫苗株在 Vero 细胞上培养、扩增, 经冻融, 超声波破碎、

差速离心提取，-20℃保存，作为包被用狂犬病毒用抗原；

所述的包被液即 0.05mol/L, pH9.6 的磷酸缓冲液制备方法为：将碳酸钠 1.59g、碳酸氢钠 2.93g、叠氮钠 0.20g、蒸馏水 1000ml 配制而成。

所述的封闭液制备方法为：将氯化钠 8.5g、小牛血清 10.0g、双蒸水 500ml、甘油 500ml 配制而成，其中，先将氯化钠和小牛血清溶于双蒸水中，再加甘油。

所述 A 液制备方法为：将对乙酰氨基酚 1.5g，聚乙二醇 2 万 10g，小牛血清 2g，吐温-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。

本发明检测程序：将待检样本用样本稀释液作 1:100 稀释，每孔加 100μl，同时作阳性、阴性对照血清和空白对照，置 37℃ 反应 30 分钟；洗板 5 次，每孔加酶标抗体（工作浓度 1:500）100μl，37℃ 反应 30 分钟；洗板 5 次；加底物溶液 A（TMB）、B（H₂O₂）各 50μl，37℃ 反应 15 分钟；滴加 50μl 终止液（2mol/l H₂SO₄）终止反应。用酶标检测仪测 O.D₄₅₀ 值。

结果判断：Cutoff=阴性对照平均 O.D₄₅₀ 值（阴性 O.D₄₅₀ 不到 0.1，按 0.1 计算）×2.1 倍。样本 O.D₄₅₀>Cutoff 值判为阳性。

本发明试剂盒质量标准的制定及检定：

特异性：20 份阴性血清、20 份阳性血清，检测符合率不低于 95%。

灵敏性：间接 ELISA 法：抗体阳性犬血清 1μl（即 1μl 血清加到 100μl 的样本稀释液中）能检出。

精密性：变异系数（C·V）≤15%。将同一份血清同步作 10 孔所得 O.D₄₅₀ 值，经统计学处理，计算 C·V 值。

稳定性：将试剂盒置 37℃ 不少于 3 天与 4℃ 存放的试剂盒同步检测 10 样品，其 O.D₄₅₀ 值的总变化率≤25%。

试剂的现场试用：

用间接 ELISA 试剂检测未接种狂犬苗的健康幼犬抗狂犬病毒 IgG 抗体：从湖北某狗场采集了 36 份未接种狂犬苗的幼犬血清样本，按间接 ELISA 检测程序进行检测。

用本发明试剂检测狂犬免疫犬体内 IgG 抗体的动态变化：对本研究中 2 只进行狂犬接种制备抗血清的试验犬（见 4）在最后一次加强免疫后第 2、9、16 天抽血及免疫前的血清样本用间接 ELISA 分别按检测程序进行 IgG 抗体检测。

结果表明：

1、试剂的质量检定

特异性：间接 ELISA 检测犬抗狂犬病毒 IgG 抗体对 20 份阴性、10 份阳性质控血清，符合率均为 100%（结果见表 1）

表₁ 间接 ELISA 试剂特异性检定结果

质控血清	血清序号										对照	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	S ⁻	S ⁺
阴性	0.08	0.09	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.07	0.04
	4	0	5	5	3	4	2	6	4	2	7	2
20份	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	S ⁺	空白
	0.06	0.06	0.10	0.08	0.07	0.08	0.10	0.09	0.09	0.10	0.53	0.00
阳性	7	8	4	4	7	6	4	0	7	4	6	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Cutoff=0.2 10	
10份	0.60	0.70	0.69	0.76	0.63	0.72	0.33	0.35	0.47	0.38		
	3	2	1	8	9	9	2	8	6	1		

灵敏度：两种试剂的灵敏度检定所用质控血清是用狂犬疫苗免疫实验犬（见材料方法4）制备的犬抗狂犬病毒阳性血清。检定结果（表₂）表明：间接 ELISA 法检测灵敏度可达 1:640，

表₂ 间接 ELISA 试剂灵敏度检定结果（Cutoff=0.210）

血清稀释度	1:10	20	40	80	160	320	640	1280	S ⁺	S ⁻	S ⁻	空白
O.D ₄₅₀	2.722	2.780	2.824	2.020	1.308	0.624	0.257	0.089	0.536	0.077	0.042	0.000

精密性：本发明试剂用同一份阳性血清的同一稀释度同步作 10 孔，O.D₄₅₀ 的变异系数（C·V）为 6.98%（表₃）。

表₃ 试剂精密性检定结果

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	变异系数 (C·V)
O.D ₄₅₀	0.412	0.377	0.411	0.410	0.347	0.372	0.352	0.344	0.376	0.349	6.98%

1. 现场试用

1.1 用本发明试剂检测犬抗狂犬病毒 IgG 抗体：从湖北某狗场随机采集的 36 只幼犬（未接种狂犬苗，犬龄 30~45 天）血清进行抗狂犬病毒 IgG 抗体检测，结果均为阴性，平均 O.D₄₅₀ 值为 0.096（见表₄）。

表₄ 36 只幼犬抗狂犬病毒 IgG 抗体检测结果

0.085	0.111	0.033	0.034	0.069	0.072	0.151	0.094	0.137	0.100	0.098	0.095
0.127	0.069	0.036	0.084	0.069	0.078	0.062	0.049	0.121	0.076	0.114	0.127
0.121	0.175	0.114	0.109	0.100	0.122	0.142	0.055	0.128	0.099	0.097	0.099
S ⁺	S ⁻	S ⁻	空白	Cutoff=0.210							
0.616	0.070	0.045	0.000								

实验犬接种狂犬疫苗后抗体产生情况的动态监测：两只实验犬免疫前抗狂犬病毒抗体均为阴性，接种狂犬疫苗后，从最后一次加强免疫后的第2、9、16天采集血清检测抗体，结果表明IgG抗体呈明显上升趋势（见表5）。

表5 用本发明试剂盒检测免疫犬抗狂犬病毒IgG抗体的动态变化

犬号	采血时间	血清稀释度								对照	
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	S ⁻	S ⁺
1号犬	免疫前	0.103	0.067	0.118	0.034	0.032	0.000	0.000	0.000	0.01	0.00
	免后2天	2.683	1.643	0.980	<u>0.317</u>	0.175	0.019	0.050	0.000	6	0
	免后9天	3.011	2.144	1.387	0.566	<u>0.397</u>	0.119	0.050	0.063	S ⁺	空白
	免后16天	2.722	2.780	2.824	2.020	1.308	0.624	<u>0.257</u>	0.089	1.92	0.00
2号犬	免疫前	0.147	0.046	0.023	0.080	0.011	0.000	0.054	0.000	7	0
	免后2天	1.753	0.808	0.505	<u>0.272</u>	0.204	0.144	0.099	0.050	Cutoff=0.210	
	免后9天	2.801	2.274	1.331	0.656	<u>0.430</u>	0.209	0.163	1.058		
	免后16天	2.849	2.824	2.240	1.125	0.614	<u>0.272</u>	0.170	0.119		

经对试生产的试剂盒进行初步质量检定的结果来看，本发明试剂盒的特异性达到100%；灵敏度为1:640；精密性（变异系数C·V）为6.98%。

本试剂盒采用间接ELISA检测犬抗狂犬病毒IgG抗体，用于实验犬、宠物犬和普通犬感染狂犬病毒的情况调查和接种狂犬疫苗的效果评价。

附图说明

图1 为本发明工艺流程图

具体实施方式：

实施例1：

1 HRP-兔抗犬IgG的制备

1.1 犬IgG的提取、纯化

1. 1. 1 选择狂犬病毒抗体阴性的 6 月龄以上的健康合格比格犬 1 只[许可证号为 SCXK(鄂) 2003—0001]], 心脏采血或颈动脉放血, 分离血清。

1. 1. 2 取犬血清 x ml, 加 x ml 生理盐水稀释; 搅拌下滴加 2 x ml 饱和硫酸铵溶液 (终浓度为 50% 饱和硫酸铵), 置 4℃ 30 分钟 (有絮状沉淀出项), 3000rpm 离心 30 分钟, 去上清; 沉淀用 2 x ml 生理盐水溶解, 搅拌下滴加 x ml 饱和硫酸铵 (终浓度为 33% 饱和硫酸铵), 置 4℃ 30 分钟, 5000rpm 离心 30 分钟, 去上清; 用少量 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 A-50 柱层析, 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, 每管 3~5ml; 用紫外分光光度计分别测出 O.D₂₈₀ 值, 绘出洗脱曲线, 第 1 个洗脱峰为 IgG, 收集混合第 1 峰所含各管的洗脱液, 即为纯化的 IgG。

1. 1. 3 纯化的 IgG 检定:

①含量测定: 用紫外分光光度计测出纯化的 IgG 溶液 O.D₂₈₀ 和 O.D₂₆₀ 的值, 按公式 IgG 蛋白 (mg/ml) = (1.45 × O.D₂₈₀ - 0.74 × O.D₂₆₀) × 稀释倍数

②纯度检定: O.D₂₈₀ / O.D₂₆₀ ≥ 1.75

SDS-PAGE 只有一条分子量为 150,000 的蛋白带

1. 2 兔抗犬 IgG 的制备

1. 2. 1 用纯化的犬 IgG 按常规免疫家兔。

1. 2. 2 兔抗犬 IgG 的提取、纯化检定: 同 1.1.1~3。

1. 3 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记

1. 3. 1 准确称取 HRP (RZ ≥ 3.0, Sigma 公司产品) x mg, 溶于 0.2 x ml 的双蒸水中, 电磁搅拌下, 滴加新配制的 0.1mol/L 高碘酸钠 (NaIO₄) 溶液 0.04 x ml, 室温 (25℃) 搅拌 20 分钟。溶液由棕红色转为墨绿色 (醛化的 HRP)。

1. 3. 2 将醛化的 HRP 装入透析袋内, 对 1mmol/L 醋酸缓冲液 (pH4.4) 透析过夜。溶液由墨绿色转为棕红色。

1. 3. 3 用 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 将醛化的 HRP 溶液 pH 调至 9.0~9.5 (每 ml 醛化 HRP 加碳酸盐缓冲液 0.2ml), 立即加入纯化的 IgG (IgG 溶液在加入前也应用 L 碳酸盐缓冲液调 pH 至 9.0~9.5, 碳酸盐缓冲液的加入量约为每 ml 加 0.3ml) 1.5 x mg (IgG 溶液中蛋白含量 × 加入容积), 室温搅拌 2 小时。

1. 3. 4 加入新配制的硼氢化钠溶液 (4mg/ml) 0.02 x ml, 4℃ 放置 2 小时。

1. 3. 5 搅拌下滴加等量饱和硫酸钠溶液, 4℃ 放置 30 分钟, 有絮状沉淀出现。5000rpm 离心 30 分钟, 去上清。上清应无色, 沉淀为棕红色。

1. 3. 6 将沉淀用适量 PBS 溶解, 装入透析袋, 对 PBS 透析 48 小时, 其间换液 5~6 次。即为 HRP-兔抗犬 IgG (酶结合物)。

在标记并检定合格的酶结合物中加入 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 使其充分溶解后, 再加入等体积的中性甘油, -20℃ 保存备用。

1. 3. 7 HRP-兔抗犬 IgG (酶结合物) 检定

①外观：应为澄清透明溶液（浅棕红色），如有不溶物，应离心除去。

②酶结合物中 HRP 与 IgG 的克分子比：用紫外分光光度计测出酶结合物中 O.D₂₈₀ 和 O.D₄₀₃ 之值，按下列公式计算克分子比：

$$\text{HRP 与 IgG 的克分子比} = \frac{\text{O.D}_{403} \times 0.4}{(\text{O.D}_{280} - \text{O.D}_{403} \times 0.3) \times 0.62} \times 4$$

标记合格的酶结合物其 HRP 与 IgG 的克分子比应在 1~2 之间。

③酶结合物工作浓度的测定：取包被有狂犬病毒的酶标板条 3 条，1 条加同一浓度的阳性血清，1 条加阴性血清，1 条加临界值血清，每孔 100 μl，37℃温育 30 分钟，洗板 5 次。将酶结合物用酶标抗体稀释从 1:100 开始做倍比稀释 1:204800，共 12 个稀释度，取各稀释度溶液 100 μl 加到 3 条板条的相应孔中，37℃温育 30 分钟，洗板 5 次，加底物 A、B 各 50 μl，37℃显色 15 分钟，加终止液（2mol/L H₂SO₄）50 μl，在酶标监测仪上测定各孔的 O.D₄₅₀ 值。阳性血清 O.D>0.500、阴性血清 O.D<0.100、临界值血清 O.D/阴性血清 O.D≥2.1 的酶结合物的最高稀释倍数（度）的前 1 个稀释倍数（度）为此批酶结合物的工作浓度。

1.3.8 酶结合物的保存

在标记并检定合格的酶结合物中加入 1%牛血清白蛋白（BSA），使其充分溶解后，再加入等体积的中性甘油，-20℃保存备用。

2、犬抗狂犬病毒免疫血清的制备

挑选体格健壮的 6 月龄比格犬 2~3 只，初次免疫用兽用五联苗（狂犬病、犬传染性肝炎、犬副流感、犬瘟热、犬细小病毒），加强免疫用人用狂犬苗（均按疫苗使用说明书操作），待犬血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 效价达 1:500 以上，即可采血分离血清，备用。

3. 狂犬病毒抗原的制备

3.1 毒种：狂犬病毒 CTN 株（武汉生物所疫苗生产毒株）

3.2 细胞：Vero 细胞

3.3 将复苏活化的狂犬病毒悬液按 1:10（100ml 培养瓶接种 1ml 病毒悬液）接种到已长成单层的 Vero 细胞上，37℃培养 5~6 天（细胞不出现明显病变，但细胞内颗粒增多，纹理紊乱），收取培养液上清（病毒悬液）。

3.4 在收集的病毒悬液中，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒。

3.5 将灭活的病毒悬液 5000rpm 离心 1 小时，去沉淀。

3.6 将含病毒的上清 40,000rpm 离心 1 小时，去上清。沉淀用适量 PBS 悬浮测定蛋白含量（同 1.1.3①），加 50%的中性甘油，-20℃保存，作为包被用狂犬病毒抗原。

3.7 狂犬病毒抗原检定

①病毒活性检测：将狂犬病毒抗原用维持液作适当稀释（不小于 1:10）接种到已成片的 Vero 细胞上，同时作正常细胞对照。37℃培养 6 天接种细胞与正常细胞相同，无病理改变；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狂犬病毒已灭活彻底，不具感染性。

②工作浓度测定：将狂犬病毒抗原用包被液从 1:100 开始作倍比稀释到第 12 管 (1:204800)，每个稀释度取 100 μ l 加到 12 孔板条的相应孔中，共包被 3 条 3：第 1 条加同 1 份阳性血清、第 2 条加阴性血清、第 3 条加临界值血清每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟，洗板 5 次，加酶结合物（每孔 100 μ l），37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟，洗板 5 次，加底物 A、B 各 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 显色 15 分钟，加终止液 50 μ l，用酶标检测仪测各孔 O.D₄₅₀ 值。阳性血清 O.D > 0.500、阴性血清 O.D < 0.100、临界值血清 O.D/阴性血清 O.D \geq 2.1 的抗原最高稀释度倍数为该批抗原的工作浓度。

4 试剂盒组件的制备

4.1 预包被板的制作

4.1.1 将狂犬病毒抗原用碳酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH9.6) 稀释到工作浓度，每孔 100 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜 (不少于 18 小时)。

4.1.2 倒掉包被液，用 1%BSA 的封闭液封闭，每孔 150 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜 (不少于 18 小时)。

4.1.3 倒掉封闭液，拍干。室温电风吹干。装入封口袋，放干燥剂一袋，封口，4 $^{\circ}$ C 保存。

4.1.4 预包被板的检定

①外观：孔底均匀透明，无水气、污点、尘粒。

②均质性检测：随机抽取 1 根预包被板条，同一份阳性血清 (间接法) 同时检测两端和中间共 3 孔 O.D 值的变异系数小于 10%。

5.1 试剂盒中各种试液的配制与分装：按下表进行。

试剂盒中试液的配制分装表

试液名称	配方及配制方法	分装至 (ml)		标识
		48T	96T	
酶结合物	HRP-兔抗犬 IgG (溶液为红色) 用酶标抗体稀释液 (A 液) 稀释到工作浓度	5.0	10.0	棕色滴瓶
样品稀释液 (间接法)	PBS (0.01mol/L, pH7.2, 灭菌) 800ml 溶液为蓝绿色 小牛血清 (灭活: 56 $^{\circ}$ C 30 分钟) 100ml 甘油 100ml Tween-20 1ml P 20 10g NaN ₃ 2g Vc 因子 1ml H ₂ O ₂ (33% 原装) 1ml	5.0	10.0	绿盖滴瓶
阳性血清	用 A 液将冻存的阳性血清稀释到工作浓度	0.5	0.5	0.5ml 离

	(O.D 控制在 0.5~1.0)			心管
阴性血清	用 A 液将冻存的阴性血清作适当稀释 (O.D < 0.1)	0.5	0.5	0.5ml 离心管
浓缩洗涤液 (20×)	NaCl 170g Tween-20 10ml 蒸馏水 10000ml	10.0	20.0	白色平口瓶
底物 A	TMB 270g 无水乙醇 240ml (使 TMB 完全溶解后再加其他) 甘油 6ml 双蒸水 340ml	2.5	5.0	黑色滴瓶
底物 B (pH5.0)	磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 18.41g (无水 Na_2HPO_4 : 7.33g) 枸橼酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.10g 双蒸水 1000ml H_2O_2 (原装 33%) 1.0ml	2.5	5.0	蓝盖滴瓶
终止液 (1mol/L H_2SO_4)	将原装分析纯硫酸按 1 份硫酸, 17 份蒸馏水稀释即成, 注意应在搅拌下缓慢将硫酸滴入水中。	2.5	5.0	红盖滴瓶

注: 1. A 液配方: 将对乙酰氨基酚 1.5g, 聚乙二醇 2 万 10g, 小牛血清 2g, 吐温-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。

生产过程中所用试剂的配制

1. 生理盐水 (0.85% NaCl):

NaCl	170g	85g	8.5g	0.85g
蒸馏水	20000ml	10000ml	1000ml	100ml

2. 饱和硫酸铵溶液

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	156g
蒸馏水	200ml

加热溶解, 趁热过滤, 用 28% 氨水调至 pH7.0, 室温保存。

3. 磷酸缓冲盐水 (PBS, 0.01mol/L pH7.4)

0.2mol/L Na_2HPO_4	81ml
0.2mol/L NaH_2PO_4	19ml
NaCl	17g
蒸馏水 定溶至	2000ml

4. 1mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH4.4)

0.2mol/L NaAc 1.85ml

0.2mol/L HAc 3.15ml

双蒸水 定容至 1000ml

5. 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5)

0.2mol/L Na₂CO₃ 3ml

0.2mol/L NaHCO₃ 7ml

1. 包被液 (0.05mol/L 碳酸盐缓冲液 CB pH9.6)

Na₂CO₃ 1.59g

NaHCO₃ 2.93g

NaN₃ 0.20g

蒸馏水 1000ml

2. 封闭液

NaCl 8.5g

BSA 10.0g

双蒸水 500ml

甘油 500ml

先将 NaCl 和 BSA 溶于双蒸水中，再加甘油。

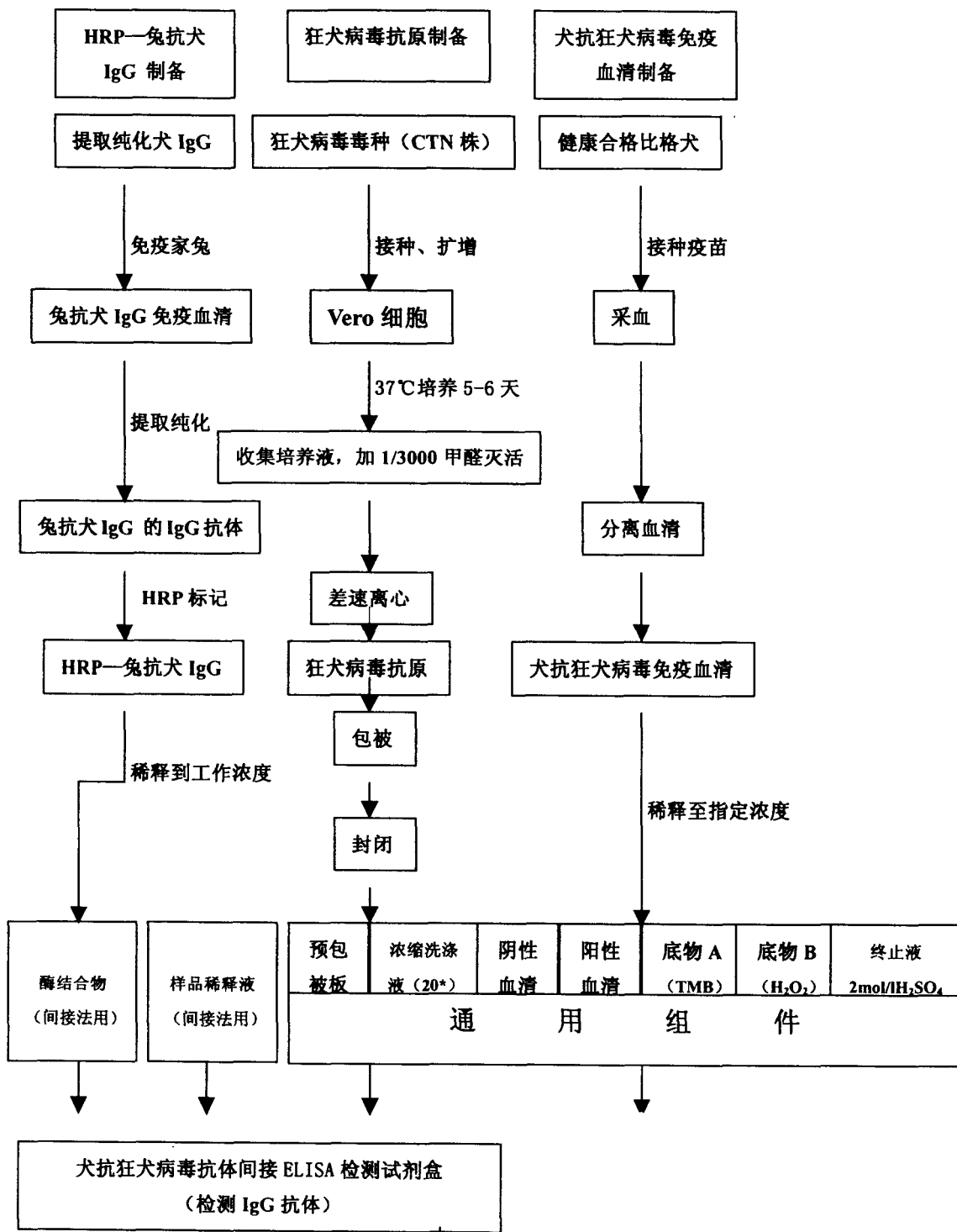


图1

