



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310111498.0

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1547028A

[22] 申请日 2003.12.2

[21] 申请号 200310111498.0

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

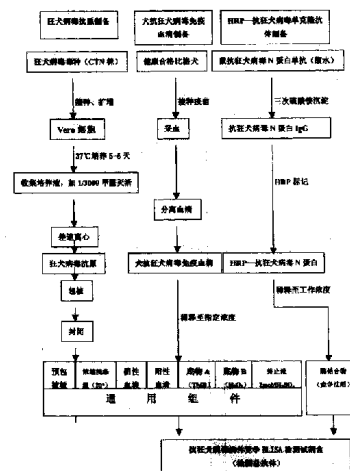
[74] 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司  
代理人 周瑾

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用竞争酶联免疫吸附试验检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法

### [57] 摘要

本发明涉及一种检测试剂盒，具体地是一种用竞争酶联免疫吸附试验(ELISA)检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法。试剂盒组成为：已预包被狂犬病毒抗原的酶标板，酶结合物(HRP-抗狂犬病毒N)，阳性血清，阴性血清，浓缩洗涤液，底物，终止液。经对试生产的试剂盒进行质量鉴定的结果来看，试剂盒的特异性达到100%；灵敏度为1:32稀释后50μl能检出(内控指标为原血清50μl能检出)；精密性(变异系数C·V)为5.10%(内控指标为不大于15%)；本试剂盒采用竞争ELISA检测血清中抗狂犬病毒总抗体，可用于所有实验动物、宠物、普通动物以及人群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、一种用竞争酶联免疫吸附试验检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒，其特征在于所述试剂盒的组成为：

已预包被狂犬病毒抗原的酶标板	8×12 孔
酶结合物	5 ml
阳性血清	0.2 ml
阴性血清	0.2 ml
浓缩洗涤液	10ml
底物 A	5ml
底物 B	5ml
终止液	5ml

其中，所述的酶结合物为辣根过氧化酶—抗狂犬病毒单克隆抗体酶结合物；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/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 硫酸溶液，纯硫酸与蒸馏水比例为 1：17。

2、一种制备如权利要求 1 所述试剂盒的方法，其特征在于所述的方法包括：

A：辣根过氧化酶—抗狂犬病毒单克隆抗体酶结合物的制备：

鼠抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体制备与辣根过氧化酶标记：将抗狂犬病毒核蛋白的腹水经 1 次 50%、2 次 33%饱和硫酸铵沉淀提纯；用改良过的过碘酸氧化法标记辣根过氧化酶；酶标记物中加入 1%小牛血清和 50%甘油，-20℃—30℃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，加强免疫用人用狂犬苗，待犬血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体酶联免疫吸附试验效价达 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至 0.D 值<0.1，即为所需阳性血清；

C：阴性血清的制备：用 A 液将冻存的阴性血清作适当稀释至 0.D > 0.5，即为所需阴性血清；

D：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；

E：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；

F：底物 B 的制备：将 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 的磷酸氢二钠 18.41g、无水 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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；

G：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；

H：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 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，其特征在于所述的狂犬病毒抗原是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。

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。

## 用竞争酶联免疫吸附试验检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测试剂盒，具体地是一种用竞争酶联免疫吸附试验（ELISA）检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法。

### 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加，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。

本发明所要解决的技术问题是提供：一种抗狂犬病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒及其制备方法。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种抗狂犬病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒，其组成为：

已预包装狂犬病毒抗原的酶标板	8×12孔
酶结合物（HRP-抗狂犬病毒N蛋白McAb）	5ml
阳性血清	0.2ml
阴性血清	0.2ml
浓缩洗涤液	10ml
底物A（TMB）	5ml

底物 B (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5ml
终止液 (2 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5ml

其中,所述的酶结合物为辣根过氧化酶—抗狂犬病毒单克隆抗体酶结合物;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/LH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>硫酸溶液,纯硫酸与蒸馏水比例为 1:17。

制备上述检测试剂盒的方法为:

**A: 辣根过氧化酶 (HRP) —抗狂犬病毒单克隆抗体酶结合物的制备**

鼠抗狂犬病毒核蛋白 (N 蛋白) 单克隆抗体 (McAb) 制备与辣根过氧化酶 (HRP) 标记: 将抗狂犬病毒 N 蛋白的腹水 McAb (由武汉生物所细胞工程室提供) 经 1 次 50%、2 次 33% 饱和硫酸铵沉淀提纯; 用改良过的过碘酸氧化法标记 HRP; 酶标记物 (代号: HRP-抗 N) 中加入 1%BSA 和 50%甘油, -20℃—30℃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,加强免疫用人用狂犬苗,待犬血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体酶联免疫吸附试验效价达 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至 0.D 值 < 0.1, 即为所需阳性血清;

**C: 阴性血清的制备:** 用 A 液将冻存的阴性血清作适当稀释至 0.D > 0.5, 即为所需阴性血清;

**D: 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;

**E: 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;

**F: 底物 B 的制备:** 将 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 的磷酸氢二钠 18.41g、无水 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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;

**G: 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;

**H: 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 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、与浓缩洗涤液、底物 A、底物 B、终止液、阳性血清、阴性血清按上述试剂盒中组成的定量分装,再与预包被板分装成检测试剂盒。

所述的狂犬病毒抗原是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 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1.59g、碳酸氢钠 (NaHCO<sub>3</sub>) 2.93g、叠氮钠 (NaN<sub>3</sub>) 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 (NaCl) 8.5g、小牛血清 (BSA) 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 (APAP) 1.5g, 聚乙二醇 2 万 (P) 10g, 小牛血清

(BSA) 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。

本发明试剂盒检测程序: 取待检血清样本、阳性对照血清和阴性对照血清各 50 $\mu$ l 加入孔中, 再加酶结合物 (HRP-抗 N 工作浓度 1:1000) 50 $\mu$ l, 置 37 $^{\circ}$ C 反应 60 分钟; 洗板 5 次, 滴加底物 A、B 液各 50 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟, 用酶标检测仪检测 O.D<sub>450</sub> 值。

结果判断:  $Cutoff = (\text{阴性对照平均 O.D}_{450} \text{ 值} + \text{阳性对照平均 O.D}_{450} \text{ 值}) / 2$ 。样本 O.D<sub>450</sub>  $\leq$  Cutoff 值判为阳性。

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: 抗体阳性血清 50 $\mu$ l (即直接取样本血清 50 $\mu$ l 加到反应孔中) 能检出。

精密性: 变异系数 (C·V)  $\leq$  15%。将同一份血清同步作 10 孔所得 O.D<sub>450</sub> 值, 经统计学处理, 计算 C·V 值。

稳定性: 将试剂盒置 37 $^{\circ}$ C 不少于 3 天与 4 $^{\circ}$ C 存放的试剂盒同步检测 10 样品, 其 O.D<sub>450</sub> 值的总变化率  $\leq$  25%。

试剂的现场试用:

用本发明试剂检测正常人群中抗狂犬病毒抗体: 从本院门诊部随机抽取健康体检人员血清 93 份, 按检测程序进行抗体检测。

用本发明试剂检测狂犬免疫犬体内总抗体的动态变化: 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上述的检测程序进行总抗体检测。

检测结果表明:

#### 1. 试剂的质量检定

1.1 特异性: 检测血清中抗狂犬病毒总抗体试剂对 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 本发明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 <sup>-</sup>	S <sup>-</sup>
阴性 20 份	0.64	0.66	0.76	0.73	0.81	0.54	0.62	0.70	0.61	0.46	0.57	0.61
	4	3	8	7	1	7	1	5	6	5	0	2
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	S <sup>+</sup>	空白
	0.70	0.64	0.74	0.73	0.80	0.64	0.53	0.59	0.62	0.56	0.08	0.00
	4	4	8	0	7	1	9	8	2	6	6	0

阳性 10 份	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Cutoff=0.3 38
	0.09	0.09	0.13	0.08	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	
	0	1	6	0	1	3	6	1	1	9	

1. 2 灵敏度：本发明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制备的犬抗狂犬病毒阳性血清。检定结果（表<sub>2</sub>）表明：检测灵敏度为 1:32。

表<sub>2</sub> 试剂灵敏度检定结果（Cutoff=0.352）

血清稀 释度	1:2	4	8	16	32	64	128	256	S <sup>+</sup>	S <sup>-</sup>	S <sup>-</sup>	空 白
O.D <sub>450</sub>	0.15	0.11	0.15	0.27	0.28	0.51	0.52	0.54	0.09	0.58	0.64	0.00
	8	4	6	4	1	9	5	2	9	7	2	0

1. 3 精密性：试剂用阴性血清同步作 10 孔，O.D<sub>450</sub> 的变异系数（C·V）为 5.10%（表<sub>3</sub>）。

表<sub>3</sub> 本发明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 <sub>450</sub>	0.573	0.587	0.580	0.581	0.587	0.534	0.559	0.525	0.533	0.514	5.10%

4 稳定性：将试剂盒置 37℃温箱存放 4 天、7 天，与 4℃存放的试剂盒同步测阴性血清，其变化率≤±20%。

现场试用：

用本发明试剂检测健康人群抗狂犬病毒抗体：从从业人员健康体检的血清中随机抽取 93 份，用竞争 ELISA 试剂检测抗狂犬病毒抗体，结果（表 4.）90 份为阴性，3 份为阳性。

表 4. 用竞争 ELISA 试剂盒检测健康人群抗狂犬病毒抗体

0.667	0.583	0.790	0.680	0.412	0.825	0.580	0.797	0.828	0.608	0.635	0.500
0.577	0.567	0.584	0.611	0.630	0.701	0.586	0.693	0.785	0.035	0.652	0.684
0.533	0.663	0.596	0.753	0.633	0.553	0.618	0.790	0.739	0.455	0.593	0.585
0.506	0.612	0.573	0.601	0.724	0.499	0.613	0.714	0.622	0.667	0.736	0.508
0.669	0.594	0.611	0.687	0.837	0.619	0.715	0.649	0.942	0.699	0.667	0.667
0.562	0.294	0.693	0.775	0.620	0.679	0.707	0.779	0.851	0.183	0.717	0.556
0.681	0.757	0.721	0.559	0.820	0.672	0.846	0.842	0.767	0.793	0.797	0.577
0.560	0.853	0.473	0.748	0.656	0.538	0.777	0.798	0.788	S <sup>-</sup>	S <sup>+</sup>	空白
									0.612	0.057	0.000

Cutoff=(0.612+0.057)/2=0.334

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，结果表明总抗体及IgG抗体呈明显上升趋势（见表5）。

表5 检测免疫犬抗狂犬病毒总抗体的动态变化

犬号	采血时间	血清稀释度								对照	
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	S <sup>-</sup>	S <sup>+</sup>
1号犬	免疫前	0.66	0.63	0.80	0.73	0.80	0.80	0.73	0.81	0.587	0.624
		2	9	6	5	5	4	9	8		
	免后2天	0.22	<u>0.32</u>	0.42	0.46	0.66	0.68	0.69	0.71	S <sup>+</sup>	空白
		3	<u>5</u>	4	5	3	4	8	5		
免后9天		0.13	0.25	<u>0.31</u>	0.39	0.52	0.60	0.65	0.68	0.099	0.000
		5	6	<u>2</u>	0	0	7	2	8		
免后16天		0.11	0.20	0.25	<u>0.30</u>	0.46	0.64	0.68	0.74		
		4	7	8	<u>1</u>	2	9	9	8		
2号犬	免疫前	0.61	0.52	0.71	0.63	0.80	0.87	0.70	0.74		
		4	4	0	6	6	6	3	8		
	免后2天	0.20	<u>0.24</u>	0.39	0.42	0.53	0.59	0.61	0.69	Cutoff=(0.099+0.606) /2=0.352	
		9	<u>2</u>	2	8	8	9	5	9		
免后9天	0.18	0.23	<u>0.31</u>	0.41	0.59	0.60	0.68	0.71			
	4	0	<u>9</u>	2	4	4	0	0			
免后16天		0.15	0.11	0.15	0.27	<u>0.28</u>	0.51	0.50	0.54		
		0	4	6	4	<u>1</u>	9	5	2		

经对试生产的试剂盒进行质量检定的结果来看，试剂盒的特异性达到100%；灵敏度为1:32稀释后50μl能检出（内控指标为原血清50μl能检出）；精密性（变异系数C·V）为5.10%（内控指标为不大于15%）；

本试剂盒采用竞争ELISA检测血清中抗狂犬病毒总抗体，可用于所有实验动物、宠物、普通动物以及人群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：

##### 一、 实施例：

##### 1 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疫苗（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。为得到充分

的来源一致的阳性血清，免疫犬不要一次采血致死，可多次采血。若抗体滴度下降，可再加强免疫。

## 2 HRP-抗狂犬病毒单克隆抗体的制备

### 2.1 单克隆抗体的纯化

2.1.1 将冻存的鼠抗狂犬病毒 N 蛋白 McAb 腹水从低温冰箱中取出，置 37℃水浴中迅速化过滤除去脂类及不溶性残渣。

2.1.2 取滤过的腹水 xml，加 xml 的 PBS (0.01mol/L pH7.4) 稀释，滴入饱和硫酸铵溶液 2xml (终浓度为 50%饱和硫酸铵)，4℃放置 30 分钟，3000rpm 离心 30 分钟，去上清。

2.1.3 将沉淀用 2xml PBS 溶解，滴加 xml 饱和硫酸铵溶液，4℃放置 30 分钟，5000rpm 离心 30 分钟，去上清。重复 1 次此操作。

2.1.4 将沉淀用适量 PBS 溶解，装入透析袋，对 PBS 透析 48 小时，期间换液 5~6 次。即得到纯化的鼠抗狂犬病毒 N 蛋白 IgG 型单克隆抗体。

### 2.2 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记:

2.2.1 准确称取 HRP (RZ≥3.0, Sigma 公司产品) xmg，溶于 0.2xml 的双蒸水中，电磁搅拌下，滴加新配制的 0.1mol/L 高碘酸钠 (NaIO<sub>4</sub>) 溶液 0.04xml，室温 (25℃) 搅拌 20 分钟。溶液由棕红色转为墨绿色 (醛化的 HRP)。

2.2.2 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。

2.2.3 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 约加碳缓 0.2ml)，立即加入纯化的鼠抗狂犬病毒 N 蛋白单克隆抗体 (在加入前也应用碳缓调 pH 至 9.0~9.5)。

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

2.2.5 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。

2.2.6 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-抗 N (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。

## 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 μl 加到 12 孔板条的相应孔中，共包被 3 条（包被程序见 5.1）：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 μl，37℃ 温育 30 分钟，洗板 5 次，加酶结合物（每孔 100 μl），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 50 μl，用酶标检测仪测各孔 O.D<sub>450</sub> 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 μl，4℃ 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 μl，4℃ 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℃ 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）或和同一份阴性血清（竞争法）同时检测两端和中间共 3 孔 O.D 值的变异系数小于 10%。

5.2 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	配方机配制方法	分装至(ml)		标识
		48T	96T	
酶结合物	HRP-抗狂犬病毒-N 蛋白 McAb 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
阳性血清	用 A 液将冻存的阳性血清稀释到工作浓度 (O.D 控制在 0.1 以下)	0.5	0.5	0.5ml 离心管
阴性血清	用 A 液将冻存的阴性血清作适当稀释 (O.D >	0.5	0.5	0.5ml 离

	0.5)			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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 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 $\text{H}_2\text{O}_2$ (原装 33%) 1.0ml	2.5	5.0	蓝盖滴瓶
终止液 (1mol/L $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	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: 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。

其中, 生产过程中所用试剂的配制如下:

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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	81ml
0.2mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	19ml
NaCl	17g
蒸馏水 定容至	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 定溶至	1000ml

5. 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5)

0.2mol/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3ml
0.2mol/L NaHCO <sub>3</sub>	7ml

1. 包被液 (0.05mol/L 碳酸盐缓冲液 CB pH9.6)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93g
NaN <sub>3</sub>	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。

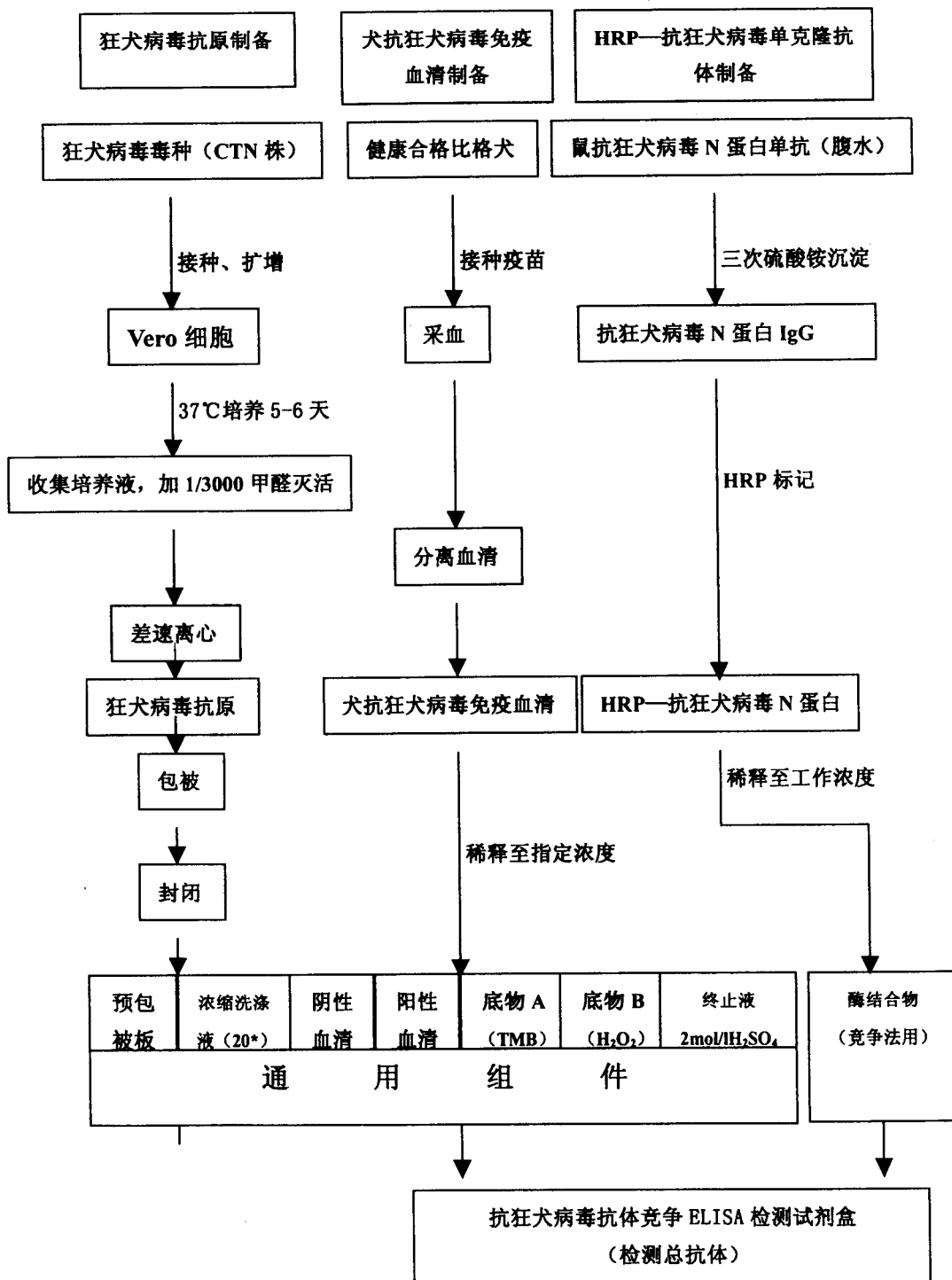


图1

专利名称(译)	用竞争酶联免疫吸附试验检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1547028A</a>	公开(公告)日	2004-11-17
申请号	CN200310111498.0	申请日	2003-12-02
[标]发明人	徐国景 张瑜 唐利军 肖红雨 张金明 孙凡中 易平 杨文祥 林乔 龚镇奎		
发明人	徐国景 张瑜 唐利军 肖红雨 张金明 孙凡中 易平 杨文祥 林乔 龚镇奎		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/547 G01N33/569		
代理人(译)	周瑾		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测试剂盒，具体地是一种用竞争酶联免疫吸附试验(ELISA)检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法。试剂盒组成为：已预包被狂犬病毒抗原的酶标板，酶结合物(HRP - 抗狂犬病毒N)，阳性血清，阴性血清，浓缩洗涤液，底物，终止液。经对试生产的试剂盒进行质量检定的结果来看，试剂盒的特异性达到100%；灵敏度为1:32稀释后50μl能检出(内控指标为原血清50μl能检出)；精密性(变异系数C·V)为5.10%(内控指标为不大于15%)；本试剂盒采用竞争ELISA检测血清中抗狂犬病毒总抗体，可用于所有实验动物、宠物、普通动物以及人群感染狂犬病毒的情况调查和接种狂犬疫苗的效果评价。

