



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101881774 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 10

(21) 申请号 201010206469. 2

G01N 21/31 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 22

G01N 33/531 (2006. 01)

(71) 申请人 浙江普康生物技术股份有限公司

地址 310013 浙江省杭州市西湖区天目山路
182 号

(72) 发明人 高孟 周康凤 姜云水 罗永能

唐彩华 高丽美 朱莲 王平

毛子安 毛江森

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司

司 33200

代理人 韩介梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种测定肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,特别是用于一种测定肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度的酶联免疫检测方法。该方法,以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G 抗体作为抗体,有助于放大显色信号,提高检测的灵敏度,通常能检测到病毒滴度为 $3.7-4.3 \text{LogTCID}_{50}/\text{ml}$ 的病毒抗原,并且在 对 EV71 灭活疫苗抗原进行检测时,由于不需要进行细胞培养等一系列复杂费时的工作,从而缩短了检测时间,由通常的数天缩短为 4 小时,并且采用该方法进行酶联免疫反应时,具有低背景的优点,通常阴性对照孔的 A 值小于 0.08。本发明所建立的检测方法是一种特异性好、灵敏度高、重复性好、简单方便的测定 EV71 病毒灭活疫苗抗原滴度的检测方法。

1. 一种测定肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度的检测方法,其特征在于具有如下步骤:
 - A. 酶标板的预制
 - A. 1 酶标板的包被:用碳酸盐缓冲液将兔抗 EV71 血清抗体稀释至 5 ~ 20 微克 / 毫升,按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,加入酶标板的空中,放于 4℃ 孵育过夜,用磷酸盐缓冲液洗液洗板 3 ~ 5 次;
 - A. 2 酶标板的封闭:用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入封闭液,37℃ 孵育 1 ~ 2 小时,磷酸盐缓冲液洗液洗板 3 ~ 5 次,晾干,冰箱 4℃ 保存备用;
 - B. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 1 的预制酶标板的孔中,加入不同稀释度的待检抗原,并设阴性对照和空白调零孔,放入湿盒中,放入 37℃ 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 1 ~ 2 小时后,磷酸盐缓冲液洗液洗板 3 ~ 5 次;
 - C. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2. 1 的酶标板的各孔中,加入稀释度为 1 : 800 ~ 1 : 1500 的鼠抗 EV71 病毒单克隆抗体,放入湿盒中,放入 37℃ 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 1 ~ 2 小时,磷酸盐缓冲液洗液洗板 3 ~ 5 次;
 - D. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2. 2 的酶标板的各孔中,加入稀释度为 1 : 1000 ~ 1 : 2000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G 抗体,放入 37℃ 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 0. 5 ~ 1 小时,磷酸盐缓冲液洗液洗板 3 ~ 5 次;
 - E. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2. 3 的酶标板的各孔中,加入 OPD 显色液,放入湿盒中,于 37℃ 保温 10 ~ 20 分钟;
 - F. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2. 4 的酶标板的各孔中,加入终止液,而后置于酶标仪上,在 492 纳米波长下,用空白孔调零后检测吸光度 A 值,即得到检测结果。
2. 根据权利要求 1 所述的肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度检测方法,其特征在于 A 步骤所述的兔抗 EV71 血清抗体经过下列方法制备:
 - a、将病毒的浓度稀释成感染滴度 LogTCID₅₀/ml 为 7. 0 ~ 8. 0,吸取 1 ~ 2 毫升的病毒接种于大耳白兔子,分 3 ~ 4 个部位皮下注射;
 - b、12 ~ 15 天后,以同样的剂量进行加强免疫;
 - c、在初次注射免疫后的第 4 ~ 6 周采血,处理血清;
 - d、用市售的亲化和纯化柱纯化血清中的抗体。
3. 根据权利要求 1 所述的肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度检测方法,其特征在于洗板用磷酸盐缓冲液洗液在洗板机上洗板或手工洗板。
4. 根据权利要求 1 所述的肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度检测方法,其特征在于磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液洗液、碳酸盐缓冲液、终止液、OPD 显色液、封闭液为常规用液。

一种测定肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别是用于肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 的一种灵敏特异的测定肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原滴度的酶联免疫检测方法

背景技术

[0002] 近年来,手足口疾病肆虐我国大部分地区,给人们带来了巨大的危害。大量的流行病学研究表明,肠道病毒 71 型是引发手足口病的主要病原体之一。EV71 属于小 RNA 病毒科,肠道病毒属成员。该病毒的感染疾病,多发生于 5 岁以下的婴幼儿,可引起手、足、口腔等部位的疱疹,个别患者可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症,具有较高的致残和致死率。因此研制安全、有效的 EV71 疫苗来防控手足口疾病的传播,具有非常重要的意义。目前,在市场上还未见有相关的疫苗,而在研发的疫苗主要包括甲醛灭活疫苗、类病毒颗粒 (VLP) 疫苗和 DNA 疫苗等,其中又以甲醛灭活疫苗的进展最快。

[0003] 在 EV71 灭活疫苗的研制过程中,均需要进行 EV71 病毒抗原 (EV71Ag) 的检测,尽管 EV71 病毒能产生细胞病变 (CPE),能够通过病毒感染组织培养细胞检测来进行 EV71 抗原含量的测定。但是该方法周期较长,往往需要数天时间才能得到结果,并且由于 CPE 只能检测有感染活性的病毒使得其无法正确检测出灭活疫苗中的抗原含量,如空泡病毒,失活病毒等,因此无法在疫苗的生产过程中进行有效、即时、正确的监控,从而给 EV71 灭活疫苗的生产工艺研发带来了一些不便和瓶颈。

发明内容

[0004] 本发明的目的是要克服 CPE 只能检测有感染活性的病毒使得其无法正确检测出灭活疫苗中的抗原含量状况 (情况),利用双抗体夹心酶联免疫法 (ELISA),提供一种特异性好、灵敏度高、使用方便、检测快速的肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原的检测方法,可以应用于肠道病毒 71 型灭活疫苗生产及质量检定。

[0005] 本发明通过下列技术方案完成:一种肠道病毒 71 型灭活疫苗抗原的检测方法,其特征在于经过下列步骤:

[0006] A. 酶标板的预制

[0007] A. 1 酶标板的包被:用碳酸盐缓冲液 (pH9.0) 将免抗 EV71 血清抗体稀释至 5 ~ 20 微克/毫升,按 50 ~ 100 微升/孔的量,加入酶标板的空中,放于 4℃ 孵育过夜,用 PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;

[0008] A. 2 酶标板的封闭:用封闭液按 200 微升/孔的量加入封闭液,37℃ 孵育 1 ~ 2 小时, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次,晾干,冰箱 4℃ 保存备用;

[0009] B. 按 50 ~ 100 微升/孔的量,在步骤 1 的预制酶标板的孔中,加入不同稀释度的待检抗原,并设阴性对照和空白调零孔,放入湿盒中,放入 37℃ 摇床,180 转/分钟震荡培养 1 ~ 2 小时后, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;

[0010] C. 按 50 ~ 100 微升/孔的量,在步骤 2.1 的酶标板的各孔中,加入稀释度为

1 : 800 ~ 1 : 1500 的鼠抗 EV71 病毒单克隆抗体,放入湿盒中,放入 37℃ 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 1 ~ 2 小时,PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;

[0011] D. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2.2 的酶标板的各孔中,加入稀释度为 1 : 1000 ~ 1 : 2000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG) 抗体,放入 37℃ 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 0.5 ~ 1 小时,PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;

[0012] E. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2.3 的酶标板的各孔中,加入 OPD 显色液,放入湿盒中,于 37℃ 保温 10 ~ 20 分钟;

[0013] F. 按 50 ~ 100 微升 / 孔的量,在步骤 2.4 的酶标板的各孔中,加入终止液,而后置于酶标仪上,在 492nm 波长下,用空白孔调零后检测吸光度 A 值,即得到检测结果。

[0014] 根据检测的结果按下列条件进行判定:

[0015] 域值 (Cut off) = $2.1 \times N$ (N 为阴性对照平均 A 值,阴性对照的平均值大于 0.05,按实际值计算;若阴性对照的平均值小于 0.05 则按 0.05 计算),标本 A 值小于 Cut off 值为阴性,大于等于 Cut off 值为阳性。

[0016] 所述 A.1 步骤中的兔抗 EV71 血清抗体按下面的方法制备:

[0017] a、将病毒的浓度稀释成 LogTCID₅₀/ml (感染滴度) 为 7.0 ~ 8.0 (即将病毒作 $10^{7.0} \sim 10^{8.0}$ 稀释,每孔接种 1 毫升,可使半数的组织细胞发生病变),吸取 1 ~ 2 毫升的病毒接种于大耳白兔子,分 3 ~ 4 个部位皮下注射;

[0018] b、12 ~ 15 天后,以同样的剂量进行加强免疫;

[0019] c、在初次注射免疫后的第 4 ~ 6 周采血,处理血清;

[0020] d、用市售的亲纯化柱纯化血清中的抗体。

[0021] 所述 B 步骤中的鼠抗 EV71 病毒单克隆抗体为市购。

[0022] 所述 C 步骤中的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG) 抗体为市购。

[0023] 所述磷酸盐缓冲液 (PBS)、磷酸盐缓冲液洗液、碳酸盐缓冲液、OPD 显色液、终止液、封闭液为常规用液。

[0024] 所述洗板为用 PBS 洗液在洗板机上洗板或者手工洗板。

[0025] 本发明具有以下优点和效果:采用上述方案,以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G 抗体作为抗抗体有助于放大显色信号,提高检测的灵敏度,通常能检测到 3.7 ~ 4.3 LogTCID₅₀/ml 的病毒抗原,并且在对 EV71 灭活疫苗抗原进行检测时,由于不需要进行细胞培养等一系列复杂费时的工作,从而缩短了检测时间,即由通常的数天缩短为 4 小时,并且采用该方法进行酶联免疫反应时,具有低背景的优点,通常阴性对照孔的 A 值在小于 0.08 (空白孔调零后)。本发明所建立的检测方法是一种特异性好、灵敏度高、重复性好、简单方便的测定 EV71 病毒灭活疫苗抗原滴度的检测方法。

具体实施方式

[0026] 以下实施例用来解释说明本发明,而不是对本发明进行限制,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改和改变,都落入本发明的保护范围。

[0027] 实施例 1:兔抗肠道病毒 71 型病毒血清抗体的制备与纯化

[0028] 1) 将病毒的浓度稀释成 LogTCID₅₀/ml (感染滴度) 为 8.0 吸取 2 毫升的病毒接种于新西兰大耳白兔子,分 4 个部位皮下注射;

[0029] 2) 14 天后,以同样的剂量进行加强免疫;

[0030] 3) 在初次注射免疫后的第 4 周采血;

[0031] 4) 分离血清, -20°C 以下保存待用;

[0032] 5) 取市购的 Protein A 亲和抗体纯化柱于室温放置平衡 30 分钟,用五倍柱体积的平衡液(20 毫摩尔浓度磷酸盐缓冲液)对层析柱进行平衡,将 4) 中的血清融化后上样过柱,用 10 倍柱体积的平衡液洗脱杂蛋白,保留目的蛋白,用 3 个柱体积的洗脱液(0.1 摩尔浓度的柠檬酸, pH 值为 3.0) 将目的蛋白从柱上洗脱下来,收集洗脱液。

[0033] 1) 取 1 摩尔浓度的三羟甲基氨基甲烷(pH 值为 9.0) 以 1 : 9 的比例加入收集的洗脱液中,中和过多的柠檬酸,用 lowry 法测定蛋白含量, -20°C 以下保存待用。

[0034] 实施例 2 酶标板的预包被

[0035] 1) 酶标板的包被 :用碳酸盐缓冲液(pH9.0) 将兔抗 EV71 血清抗体稀释至 10 微克 / 毫升,按 100 微升 / 孔的量,加入酶标板的空中,放于 4°C 孵育 20 小时以上,PBS 洗液洗板 3 次;

[0036] 2) 酶标板的封闭 :用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入封闭液, 37°C 孵育 1 小时,PBS 洗液洗板 3 次,晾干,冰箱 4°C 保存备用。

[0037] 实施例 3 肠道病毒 71 型病毒抗原的测定

[0038] 1) 先将待检抗原样品用 PBS 稀释液进行不同稀释度的系列稀释 :1 : 90、1 : 270、1 : 810、1 : 2430、1 : 7290、1 : 14580、1 : 29160、1 : 58320 具体稀释方法如下 :取 100 微升待检 EV71 病毒抗原样品加入 900 微升 PBS 稀释液,混匀即成 1 : 10 样品 ;取 100 微升 1 : 10 样品加入 800 微升 PBS 稀释液,混匀即成 1 : 90 样品,如此类推稀释 ;用微量移液器将稀释好的 EV71 病毒抗原样品从低稀释 (1 : 90) 开始依次加入预包被的酶标板孔中,100 微升 / 孔,每个稀释样品加两孔,同时在酶标板的另外孔中设立阴性孔 2 个,并留 2 孔作空白调零孔,放入 37°C 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 1 小时,用 PBS 洗液洗板 4 次;

[0039] 2) 在上述酶标板的各孔中加入稀释度为 1 : 1000 的鼠抗 EV71 病毒单克隆抗体,100 微升 / 孔,放入 37°C 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 1 小时,用 PBS 洗液洗板 4 次;

[0040] 3) 在上述酶标板的各孔中加入稀释度为 1 : 1500 的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG) 抗体,100 微升 / 孔,放入 37°C 摇床,180 转 / 分钟震荡培养 0.5 小时,用 PBS 洗液洗板 5 次;

[0041] 4) 在上述酶标板的各孔中加入 OPD 显色液,100 微升 / 孔,放入湿盒中,于 37°C 保温 15 分钟;

[0042] 5) 在上述酶标板的各孔中加入终止液,50 微升 / 孔,置于酶标仪在 490nm 波长下,用空白孔调零后检测吸光度 A 值,结果见表 1;

[0043] 6) 判定结果 :

[0044] 7) 阴性对照孔平均 A 值 :0.060

[0045] 8) Cutoff 值 = $0.060 \times 2.1 = 0.1260$, (阴性对照平均 A 值大于 0.05,按实际值计算)。

[0046] 9) 按照样品的 A 值 \geq Cutoff 值,该样品判定为阳性样品 ;样品的 A 值 $<$ Cutoff 值,该样品判为阴性。则本样品 1 : 90 ~ 1 : 29160 稀释度均为阳性、1 : 58320 为阴性,因此,该样品中的 EV71 病毒抗原滴度价为 1 : 29160。

[0047] 所用溶液如下：

[0048] 1、包被缓冲液 (0.05M 碳酸盐缓冲液, PH9.6) :碳酸钠 1.59 克,碳酸氢钠 2.93 克,加蒸馏水至 1000 毫升。

[0049] 2、磷酸盐缓冲液 (PBS, PH7.4) :磷酸二氢钾 0.2 克,磷酸氢二钠 2.9 克,氯化钠 8.0 克,氯化钾 0.2 克, Tween-200.5 毫升,加蒸馏水至 1000 毫升。

[0050] 3、PBS 洗液 :1000 毫升磷酸盐缓冲液中,加入 0.5 毫升吐温 20。

[0051] 4、封闭液 :100 毫升 PBS 洗液中加入 1 克牛血清白蛋白,溶解混匀。

[0052] 5、OPD 显色液 :称取 20mg 邻苯二胺,溶于 50 毫升 0.1 摩尔浓度 / 升 pH 5.0 的柠檬酸钠 - 磷酸盐缓冲液,再加入 20 微升双氧水,混匀后避光保存。

[0053] 6、终止液 (2N 硫酸) :取浓硫酸 10 毫升,缓慢加入 80 毫升水中,冷却待用。

[0054] 表一、实施例 1 的检测 A 值

[0055]

	1	2	A 值 CV (%)
A	EV711 : 90 2.819	EV711 : 90 2.823	0.10%
B	EV711 : 270 2.116	EV711 : 270 2.173	1.88%
C	EV711 : 810 1.276	EV711 : 810 1.298	1.21%
D	EV711 : 2430 0.622	EV711 : 2430 0.612	1.15%
E	EV711 : 7290 0.284	EV711 : 7290 0.285	0.25%
F	EV711 : 14580 0.192	EV711 : 14580 0.189	1.11%
G	EV711 : 29160 0.139	EV711 : 29160 0.141	1.01%

	1	2	A 值 CV (%)
H	EV711 : 58320 0.125	EV711 : 58320 0.118	4.07%
	阴性孔 0.061	阴性孔 0.059	
	空白 0.005	空白 0	

[0056] 实施例 4 本发明的灵敏度分析

[0057] 以通过细胞病变法 (CPE) 检测得到新鲜的病毒抗原样品为检测对象, 将其灭活后, 运用本发明进行检测。结果见表一:

[0058] 表一

[0059]

	CPE 检测结果 (LogTCID ₅₀ /ml)	本发明检测结果 滴度	本发明灵敏度检测限* (LogTCID ₅₀ /ml)
1	8.4	29160	3.94
2	6.6	640	3.79
3	6.8	320	4.29

[0060] * 灵敏度检测限换算公式为: 灵敏度检测限 = CPE 检测结果 - Log₁₀(滴度)

[0061] 由以上结果可以看出, 运用本发明检测疫苗样品中的抗原滴度含量, 可以检测出相当于病毒滴度 (LogTCID₅₀/ml) 为 4.006 ± 0.257 时样品中的抗原滴度含量, 具有较好的灵敏度。

[0062] 实施例 5 本发明的重复性分析

[0063] 运用本方法对同一样品在不同时间进行检测, 结果见表二:

[0064] 表二

[0065]

检测时间	Cutoff 值	所测滴度	所测滴度对应 A 值	A 值 CV (%) 区间
2010.05.22	0.136	29160	0.148	0.06% - 3.01%
2010.05.23	0.1260	29160	0.140	0.1% - 4.07%
2010.05.25	0.1260	29160	0.151	0.08% - 3.92%
2010.05.26	0.1365	29160	0.159	0.09% - 4.71%

检测时间	Cutoff 值	所测滴度	所测滴度对应 A 值	A 值 CV(%) 区间
2010.06.04	0.1507	29160	0.173	0-6.97%

[0066] 通过以上结果可以看出,每次实验中数据的变异系数(CV%)小于10%,不同时间所得的检测结果具有很好的一致性。因此,运用本发明来检测肠道病毒71型灭活疫苗抗原滴度具有非常良好的可重复性。

专利名称(译)	一种测定肠道病毒71型灭活疫苗抗原滴度的检测方法		
公开(公告)号	CN101881774A	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	CN201010206469.2	申请日	2010-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	浙江普康生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江普康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江普康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	高孟 周康凤 姜云水 罗永能 唐彩华 高丽美 朱莲 王平 毛子安 毛江森		
发明人	高孟 周康凤 姜云水 罗永能 唐彩华 高丽美 朱莲 王平 毛子安 毛江森		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/543 G01N21/31 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，特别是用于一种测定肠道病毒71型灭活疫苗抗原滴度的酶联免疫检测方法。该方法，以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白G抗体作为抗体，有助于放大显色信号，提高检测的灵敏度，通常能检测到病毒滴度为3.7-4.3LogTCID50/ml的病毒抗原，并且在EV71灭活疫苗抗原进行检测时，由于不需要进行细胞培养等一系列复杂费时的工作，从而缩短了检测时间，由通常的数天缩短为4小时，并且采用该方法进行酶联免疫反应时，具有低背景的优点，通常阴性对照孔的A值小于0.08。本发明所建立的检测方法是一种特异性好、灵敏度高、重复性好、简单方便的测定EV71病毒灭活疫苗抗原滴度的检测方法。

	1	2	A 值 CV (%)
A	EV711 : 90 2.819	EV711 : 90 2.823	0.10%
B	EV711 : 270 2.116	EV711 : 270 2.173	1.88%
C	EV711 : 810 1.276	EV711 : 810 1.298	1.21%
D	EV711 : 2430 0.622	EV711 : 2430 0.612	1.15%
E	EV711 : 7290 0.284	EV711 : 7290 0.285	0.25%
F	EV711 : 14580 0.192	EV711 : 14580 0.189	1.11%
G	EV711 : 29160 0.139	EV711 : 29160 0.141	1.01%