

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610052284.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月13日

[11] 公开号 CN 1877334A

[22] 申请日 2006.7.4

[21] 申请号 200610052284.4

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 吴旧生 刘月环

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒。本发明中的试剂盒内装有阳性血清 1 支，阴性血清 1 支，酶标二抗 1 支，底物 1 支，底物缓冲液 1 瓶，洗液 1 瓶，样品稀释液 1 瓶，终止液 1 支，封板膜 2 张及真空包装的抗原包被板 1 块。其中阳性血清为含 0.05% 的叠氮钠和 MHV 抗体的实验长爪沙鼠血清，阴性血清为含 0.05% 的叠氮钠同时不含 MHV 抗体的实验长爪沙鼠血清；抗原包被板是使用四价抗原的细胞培养液包被 ELISA96 孔板。本发明中盒内建立一种间接酶联免疫吸附试验方法，提供检测实验长爪沙鼠血清中小鼠肝炎病毒抗体的方法及判断标准，可检测样品 48 只。

1、长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒，其特征在于该试剂盒内装有阳性血清 1 支，阴性血清 1 支，酶标二抗 1 支，底物 1 支，底物缓冲液 1 瓶，洗液 1 瓶，样品稀释液 1 瓶，终止液 1 支，封板膜 2 张及真空包装的抗原包被板 1 块。

2、如权利要求 1 所述的长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒，其特征在于所述的阳性血清为含 0.05 % 的叠氮钠和 MHV 抗体的实验长爪沙鼠血清，阴性血清为含 0.05 % 的叠氮钠同时不含 MHV 抗体的实验长爪沙鼠血清；底物为邻苯二胺，底物缓冲液为含 0.004 % 过氧化氢的磷酸盐—柠檬酸缓冲液，洗液为含 0.05 % Tween-20 的磷酸盐缓冲液，样品稀释液为含 0.05 % 硫柳汞和 10% 小牛血清的洗液，终止液为 2mol / L 的硫酸。

3、如权利要求 1 所述的长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒，其特征在于所述的酶标二抗是采用饱和硫酸铵法和 Q sepharose high performance 阴离子交换层析柱法纯化的沙鼠血清 IgG，并以之为抗原对新西兰白兔进行常规免疫，再分离血清纯化后用双向免疫琼扩法和间接 ELISA 法进行效价测定，然后用过碘酸钠法进行酶标，得到该酶标二抗。

4、如权利要求 1 所述的长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒，其特征在于所述的抗原包被板是使用四价抗原 10 μ g/ml 的细胞培养液包被 ELISA96 孔板；板内 A-H 行 1, 3, 5, 7, 9, 11 列为正常抗原，A-H 行 2, 4, 6, 8, 10, 12 列为特异抗原。

长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒

技术领域

本发明属于检测技术领域，特别是涉及实验长爪沙鼠的病毒质量控制领域，尤其是涉及一种长爪沙鼠小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)抗体检测试剂盒。

背景技术

长爪沙鼠属于啮齿目—仓鼠种—沙鼠亚科—沙鼠属，体形大小介于大鼠与小鼠之间。它从野生到驯养，再到实验动物化乃至将其用作动物实验迄今已有 70 余年历史，日本、欧美学者对长爪沙鼠形态学、解剖学、生理学和繁殖方法及生物学特性进行了研究，发现长爪沙鼠是研究脂类代谢的理想动物模型，同时也是研究丝虫病、线虫病等寄生虫病、糖尿病、自发性癫痫等疾病的理想动物模型。随着现代医学的飞速发展，长爪沙鼠被广泛地用于药理学、血清学和细菌学、内分泌学、行为学等领域的研究，国外将长爪沙鼠看作一种正在被开发的“多能性”的实验动物，进一步加快了它的应用研究步伐，拓宽了它的应用范围。

1983 年，朱智勇使用实验长爪沙鼠在国内外首次证明了实验长爪沙鼠对流行性出血热病毒（EHFV）敏感，是研究 EHFV 特性和研制流行性出血热疫苗的首选实验动物。近年来杭州天元药业公司又用实验长爪沙鼠研制出双价苗，供应社会。卫生部上海生物制品所亦用长爪沙鼠生产出出血热疫苗。迄今为止，作为实验动物的长爪沙鼠质量（微生物、寄生虫、遗传）的国际标准、国家标准及检测方法均是空白，鉴于实验长爪沙鼠的应用范围日益扩大，对其质量进行标准化控制的研究，制订相应的规范，开发相应的检测试剂盒就成为亟待解决的问题。

技术内容

本发明的目的就是针对现有技术的不足，提供一种长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒。

本试剂盒内装有阳性血清 1 支，阴性血清 1 支，酶标二抗 1 支，底物 1 支，底物缓冲液 1 瓶，洗液 1 瓶，样品稀释液 1 瓶，终止液 1 支，封板膜 2 张及真空包装的抗原包被板 1 块。

盒内的阳性血清为含 0.05 % 的叠氮钠和 MHV（小鼠肝炎病毒）抗体的实验长爪沙鼠血清（其 OD 值大于 0.2），阴性血清为含 0.05 % 的叠氮钠同时不含 MHV（小鼠肝炎病毒）抗体的实验长爪沙鼠血清（其 OD 值小于 0.1）；盒内的底物为 OPD（邻苯二胺），底物缓冲液为含 0.004% 过氧化氢的磷酸盐-柠檬酸缓冲液（pH5.0），洗液为含 0.05 % Tween-20 的磷酸盐缓冲液（PBS, 0.01mol / L, pH7.4），样品稀释液为含 0.05 % 硫柳汞和 10% 小牛血清的洗液，终止液为 2mol / L 的硫酸。

所述酶标二抗是采用饱和硫酸铵法和 Q sepharose high performance 阴离子交换层析柱法纯化的长爪沙鼠 IgG，并以之为抗原对新西兰白兔进行常规免疫，再分离血清纯化后用双向免疫琼扩法和间接 ELISA 法进行效价测定，然后用过碘酸钠法进行 HRP（辣根过氧化物酶）标记，得到该酶标二抗。

所述的抗原包被板是使用四价抗原（包括 MHV-1、MHV-3、MHV-JHM 和 A59）10 μ g/ml 的细胞培养液包被 ELISA96 孔板。板内 A-H 行 1, 3, 5, 7, 9, 11 列为正常抗原，A-H 行 2, 4, 6, 8, 10, 12 列为特异抗原。

本发明中盒内建立一种间接酶联免疫吸附试验方法，提供检测实验长爪沙鼠血清中小鼠肝炎病毒抗体的方法及判断标准，可检测样品 48 只。

本发明实施（使用）中按以下步骤进行：

(1)取出抗原包被板，室温平衡 10 分钟。

(2)加样：阴阳性血清对照各加入两孔（一个正常抗原孔，一个特异抗原孔），每孔两滴；其余各孔各加 100 μ l 稀释液，每份待检血清加入相邻的两孔（一个为正常抗原孔，一个为特异抗原孔），各 5.0 μ l。

(3)孵育：用封板膜封板，震荡混匀，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

(4)洗涤：弃去孔内液体，洗液注满各孔，静置 1.5 分钟，甩干，重复 3 次后叩干。

(5)将酶标二抗溶于10 ml 稀释液中，每孔 100 μ l，用封板膜封板，置37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

(6)洗涤：同(4)。

(7)显色：将酶底物溶于底物缓冲液中，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 避光放置 10 分钟。

(8)终止：每孔加终止液 1 滴。

(9)用酶标仪读数：在 490nm 读取各孔 OD 值。

(10)结果判定：

A.目测法

(A1)待检血清与正常抗原反应孔和待检血清与特异抗原反应孔均呈无色或极浅黄色，判为阴性。

(A2)待检血清与正常抗原反应孔呈无色或极浅黄色，而待检血清与特异抗原反应孔呈桔黄色，判为阳性。

B.比色法

(B1) 待检血清与特异抗原反应孔的 OD 值/ 阴性血清与特异抗原反应孔的 OD 值 \geq 2.1；

(B2) 待检血清与特异抗原反应孔的 OD 值 \geq 0.2；

(B3) 待检血清与正常抗原反应孔和待检血清与特异抗原反应孔应有明显的颜色区别。

本发明可用于抗原工作浓度测定，包被抗原浓度与抗原结合的最适浓度测定，抗体工作浓度测定，酶标二抗的制备及工作浓度确定，酶标二抗的稳定剂及有效时间、各成份有效期测定，试剂盒敏感性与特异性的比较。

本发明还可用于实验动物质检机构对于实验长爪沙鼠的病毒质量检测及实验长爪沙鼠繁育生产单位（企业）对动物质量跟踪监测。

本发明（试剂盒）具有携带方便，检测迅速省时，检测结果敏感可靠，操作规范标准等特点。配合高等级实验长爪沙鼠病毒学质量国家标准的制订与实施，为其提供检测手段与方法，具有重大而深远的意义。

本发明在确定长爪沙鼠对小鼠肝炎病毒易感的基础上，利用四价抗原

（目前及以前国内曾流行或正在流行的小鼠肝炎病毒的四个代表性毒株，包括 MHV-1、MHV-3、MHV-JHM 和 A59）包被 96 孔酶标板，自行制备并纯化了兔抗实验长爪沙鼠 IgG，进一步用 HRP 标记后滴定其工作浓度，结合其它试剂制成长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒。

具体实施方式

试剂盒内装有阳性血清 1 支（200 μ l），阴性血清 1 支（200 μ l），酶标二抗 1 支（10 μ l），底物 1 支（4mg），底物缓冲液 1 瓶（10ml），样品稀释液 1 瓶（20ml），洗液 1 瓶（30ml 20 倍浓缩液），终止液 1 支（5ml），封板膜 2 张及真空包装的抗原包被板 1 块。抗原包被板是使用四价抗原 10 μ g/ml 的细胞培养液包被 ELISA96 孔板。

做 13 个样品，来自两个单位两种微生物控制级别，10 只(1-10)为 A 单位屏障系统饲养的实验长爪沙鼠，第 11 为 B 单位开放环境饲养的实验长爪沙鼠，第 12-13 为 B 单位屏障环境饲养的实验长爪沙鼠。

(1)取出抗原包被板，室温平衡 10 分钟，打开外包装。

(2)加样：阴、阳性血清对照各加入两孔（一个正常抗原孔，一个特异抗原孔），每孔两滴（约 100 μ l）；其余各孔各加 100 μ l 稀释液，每份待检血清加入相邻的两孔（一个为正常抗原孔，一个为特异抗原孔），各 5.0 μ l，同时设立稀释液对照（除稀释液外不加任何液体）。

(3)孵育：用封板膜封板，震荡混匀，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

(4)洗涤：弃去孔内液体，洗液注满各孔，静置 1.5 分钟，甩干，重复 3 次后叩干。

(5)将酶标二抗溶于 10 ml 稀释液中，每孔 100 μ l，用封板膜封板，置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

(6)洗涤：同(4)。

(7)显色：将底物溶于底物缓冲液中，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 避光放置 10 分钟。

(8)终止：每孔加终止液 1 滴。

(9)用酶标仪读数：取 490nm，读取各孔 OD 值。

加样示意图:

列 行	1(正常抗原)	2 (特异抗原)	3 (正常抗原)	4 (特异抗原)
A	1 (样品号, 下同)	1	9	9
B	2	2	10	10
C	3	3	11	11
D	4	4	12	12
E	5	5	13	13
F	6	6	14 (稀释液对照)	14 (稀释液对照)
G	7	7	15 (阴性对照)	15 (阴性对照)
H	8	8	16 (阳性对照)	16 (阳性对照)

上述样品酶标仪测定结果:

列 行	1(正常抗原)	2 (特异抗原)	3(正常抗原)	4 (特异抗原)
A	0.181	0.429	0.102	0.608
B	0.114	0.438	0.074	0.282
C	0.248	0.804	0.288	0.680
D	0.164	0.303	0.097	0.651
E	0.092	0.444	0.104	0.380
F	0.104	0.477	0.051	0.058
G	0.128	0.477	0.061	0.076
H	0.073	0.220	0.104	0.845

根据判断标准判定: A 单位中 1-10 为小鼠肝炎病毒抗体阳性, B 单位三个样品均为小鼠肝炎病毒抗体阳性。

专利名称(译)	长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1877334A	公开(公告)日	2006-12-13
申请号	CN200610052284.4	申请日	2006-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	吴旧生 刘月环		
发明人	吴旧生 刘月环		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种长爪沙鼠小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒。本发明中的试剂盒内装有阳性血清1支，阴性血清1支，酶标二抗1支，底物1支，底物缓冲液1瓶，洗液1瓶，样品稀释液1瓶，终止液1支，封板膜2张及真空包装的抗原包被板1块。其中阳性血清为含0.05%的叠氮钠和MHV抗体的实验长爪沙鼠血清，阴性血清为含0.05%的叠氮钠同时不含MHV抗体的实验长爪沙鼠血清；抗原包被板是使用四价抗原的细胞培养液包被ELISA96孔板。本发明中盒内建立一种间接酶联免疫吸附试验方法，提供检测实验长爪沙鼠血清中小鼠肝炎病毒抗体的方法及判断标准，可检测样品48只。

列 行	1(正常抗原)	2(特异抗原)	3(正常抗原)	4(特异抗原)
A	1(样品号,下同)	1	9	9
B	2	2	10	10
C	3	3	11	11
D	4	4	12	12
E	5	5	13	13
F	6	6	14(稀释液对照)	14(稀释液对照)
G	7	7	15(阴性对照)	15(阴性对照)
H	8	8	16(阳性对照)	16(阳性对照)