

[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 200710066319.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/27 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月12日

[11] 公开号 CN 101140281A

[22] 申请日 2007.10.26

[21] 申请号 200710066319.4

[71] 申请人 云南省畜牧兽医科学研究所

地址 650224 云南省昆明市盘龙区金殿青龙山

[72] 发明人 李 乐 李华春 廖德芳 高 林

权利要求书 1 页 说明书 2 页

[54] 发明名称

口蹄疫 146S 抗原快速定量方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用酶连免疫吸附实验方式快速定量口蹄疫 146S 抗原的方法，属于生物制品质检技术领域。该方法采用标准抗原按不同稀释度的光吸收值，利用计算机程序建立回归方程，再根据待检抗原的光吸收值计算出待检抗原的含量，解决了用动物接种检测抗原的方法实验周期长，用层析提纯定量成本高的难题。

-
1. 一种用酶连免疫吸附实验方式快速定量口蹄疫 146S 抗原的方法，其特征是，先用标准抗原不同稀释度的光吸收值建立回归方程，再通过待检抗原的光吸收值计算出待检抗原的含量。
 2. 根据权利要求 1 所述方法，其特征在于，建立回归方程以及计算待检抗原的含量都是由计算机程序完成。
 3. 根据权利要求 1 所述方法，其特征在于，标准抗原要至少分为 4 个稀释度才能建立回归方程。

口蹄疫 146S 抗原快速定量方法

所属技术领域

本发明涉及一种检测口蹄疫 146S 抗原的快速方法，属生物制品质检技术领域。

背景技术

口蹄疫 146S 抗原是口蹄疫疫苗的主要抗原成分，其含量高低直接决定疫苗质量的好坏，在疫苗生产中，快速准确地检测不同批次生产的疫苗中 146S 抗原的含量，可以确定该批次疫苗是否可用于动物免疫。国内疫苗生产厂家对口蹄疫疫苗质量检测主要是通过两个手段：灭活前对活病毒液进行毒价检测，灭活后进行动物免疫实验检测免疫效果，这些方法所需时间周期长，不能对灭活后的病毒进行快速有效的检测，无法满足生产的实际需要。国外某些口蹄疫疫苗生产厂家通过层析的方法提纯 146S 抗原，并使用超速离心机对抗原进行定量，根据定量的结果做成成品疫苗，有效的保证了疫苗的质量，但是这种方法对技术要求较高，一般实验室不可能进行，并且由于涉及到技术保密，国内目前还不能获得该项技术。

发明内容

本发明的目的是，提供一种口蹄疫疫苗中 146S 抗原的快速检测方法。

本发明的技术方案是，利用酶连免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 的快速敏感特性建立口蹄疫 146S 抗原的定量方法。首先使用超速离心方法，准确定量的抗原作为标准对照，并进行倍比稀释，同时对待检样品进行几个稀释度的稀释，把稀释好的标准对照和样品一起进行酶连免疫吸附实验检测，酶连免疫吸附实验结果用光吸收值 (optical density, OD) 表示，把标准抗原对照的光吸收值和抗原含量进行回归计算，回归方程用于待检样品抗原含量的计算。由于每次计算都要进行大量的统计，因此建立计算机程序进行自动回归，并把待检样品抗原含量的光吸收值代入进行计算就可算出 146S 抗原的含量。

下面进行具体说明：

首先确保具有检测抗原的酶连免疫吸附实验试剂盒（口蹄疫抗原检测酶连免疫吸附实验试剂盒可以购买），酶连免疫吸附实验的操作按说明书进行，保证抗原检测的酶连免疫吸附实验工作正常

按下面方法准备抗原对照，采用常规方法提取口蹄疫 146S 抗原，用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质定量试剂盒或其它方法进行蛋白定量，作为标准 146S 抗原对照，并分装保存于 -70°C 可多次使用。

进行样品检测时，先倍比稀释标准抗原对照，稀释为 5—6 个稀释度，然后把样品和标准抗原对照同时采用所购的酶连免疫吸附实验试剂盒进行检测，酶连免疫吸附实验结果用酶标仪读取光吸收值，通过计算机把光吸收值和标准抗原的稀释度的关系进行回归分析，归纳出

回归方程，然后根据样品抗原的光吸收值，代入该方程计算出样品的抗原含量。为了减少计算量，我们采用编好公式的电子表格（Microsoft Excel）文件进行自动计算。

本发明提供了口蹄疫疫苗质量检测的新方法。与常规方法相比，本方法方便快捷，成本较低，可提高抗原检测实验的方便性，准确性，安全性，可以一次检测大量的样品。

实验证明，口蹄疫 146S 抗原含量在 1-10 微克/毫升间时，和其对应的酶连免疫吸附实验的光吸收值的对数有明显线性关系，相关系数 $r=0.98$ 。本发明的抗原检测结果和直接的超速离心机纯化定量方法相比误差小于 5 微克。

具体实施方式

本发明可在口蹄疫疫苗生产部门或研究机构使用，146S 抗原的定量可以快速检测灭活后抗原含量的变化，在疫苗厂可用于疫苗质量控制和监测，在相关研究部门可以研究口蹄疫的灭活方法和抗原损失量的关系。

实施例

如疫苗厂灭活口蹄疫抗原后，采样进行酶连免疫吸附实验检测得以下数据。

	光吸收值 1	光吸收值 2	光吸收平均值
标准抗原 1/2 稀释	1.438	1.647	1.543
标准抗原 1/4 稀释	1.389	1.397	1.393
标准抗原 1/8 稀释	1.153	1.136	1.145
标准抗原 1/16 稀释	0.816	0.734	0.775
标准抗原 1/32 稀释	0.533	0.590	0.562
标准抗原 1/64 稀释	0.353	0.238	0.296
样品 1	0.862	0.788	0.825
样品 2	0.831	0.841	0.836
样品 3	0.772	0.905	0.839

标准抗原进行统计分析后得到回归方程： $Y=2^{11.5774X-8.828}$ (X: 光吸收值；Y:146S 抗原含量)，把样品的光吸收值，分别代入该方程后得到结果为：

	抗原含量计算结果（微克/毫升）
样品 1	1.65
样品 2	1.75
样品 3	1.47

专利名称(译)	口蹄疫146S抗原快速定量方法		
公开(公告)号	CN101140281A	公开(公告)日	2008-03-12
申请号	CN200710066319.4	申请日	2007-10-26
[标]发明人	李乐 李华春 廖德芳 高林		
发明人	李乐 李华春 廖德芳 高林		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/27		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用酶连免疫吸附实验方式快速定量口蹄疫146S抗原的方法，属于生物制品质检技术领域。该方法采用标准抗原按不同稀释度的光吸收值，利用计算机程序建立回归方程，再根据待检抗原的光吸收值计算出待检抗原的含量，解决了用动物接种检测抗原的方法实验周期长，用层析提纯定量成本高的难题。

如疫苗厂灭活口蹄疫抗原后，采样进行酶连免疫吸附实验检测得以下数据。

	光吸收值 1	光吸收值 2	光吸收平均值
标准抗原 1/2 稀释	1.438	1.647	1.543
标准抗原 1/4 稀释	1.389	1.397	1.393
标准抗原 1/8 稀释	1.153	1.136	1.145
标准抗原 1/16 稀释	0.816	0.734	0.775
标准抗原 1/32 稀释	0.533	0.590	0.562
标准抗原 1/64 稀释	0.353	0.238	0.296
样品 1	0.862	0.788	0.825
样品 2	0.831	0.841	0.836
样品 3	0.772	0.905	0.839