



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102331501 A

(43) 申请公布日 2012.01.25

(21) 申请号 201110167550.9

(22) 申请日 2011.06.21

(71) 申请人 郑州大学

地址 450001 河南省郑州市科学大道 100 号

(72) 发明人 王中全 崔晶 井丰军 姜鹏

王烨 付光宇 李旭旭

(74) 专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

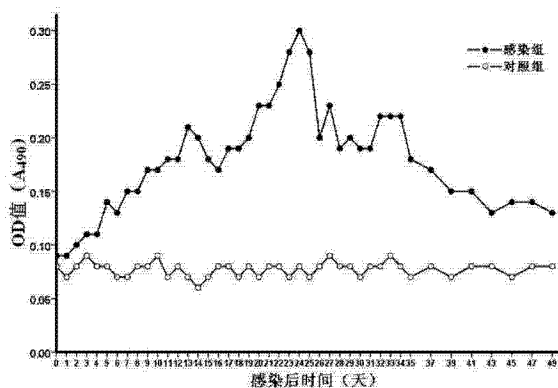
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

IgY - McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 IgY - McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法,它是... 将旋毛虫肌幼虫加入培养基中无菌培养,上清纯化透析后浓缩干燥即得 ES 抗原,测定蛋白浓度后用其免疫罗曼蛋鸡,所产鸡蛋卵黄用饱和硫酸铵沉淀法收集 IgY,纯化后测定浓度即可分装备用;所述 McAb 的制备方法为:建立分泌抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的杂交瘤细胞株,使用有限稀释法进行克隆化,应用辛酸 - 硫酸铵法纯化 McAb,测定浓度后分装备用。本发明的优点在于为感染动物血清中旋毛虫 CAg 的早期检测提供了一种具有高度敏感性和特异性且具有广泛应用前景的新方法。



1. 一种 IgY - McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法,其特征在于:它是以抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 作为捕获抗体,以抗旋毛虫 ES 抗原 McAb 作为检测抗体;所述旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 和抗旋毛虫 ES 抗原 McAb 分别通过下述方法制备而成:

(A) 制备抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY:

将旋毛虫肌幼虫加入培养基中无菌培养,上清纯化透析后浓缩干燥即得 ES 抗原,测定蛋白浓度后分装待用;用上述旋毛虫肌幼虫 ES 抗原免疫罗曼蛋鸡,所产鸡蛋卵黄用饱和硫酸铵沉淀法收集 IgY,纯化后测定浓度,即得抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY,分装后备用;

(B) 制备抗旋毛虫 ES 抗原 McAb:

建立分泌抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的杂交瘤细胞株,使用有限稀释法进行克隆化,应用辛酸 - 硫酸铵法纯化 McAb,测定浓度后分装备用。

## IgY — McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学、寄生虫学、血清学及免疫学技术,尤其是涉及鸡卵黄免疫球蛋白(Egg Yolk Immunoglobulin, IgY) — 单克隆抗体(Monoclonal Antibody, McAb) 夹心 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测血清中旋毛虫循环抗原的方法。

### 背景技术

[0002] 旋毛虫病(trichinellosis)是一种呈世界性分布的严重危害人体健康的人兽共患寄生虫病,主要因生食或半生食含有旋毛虫感染性幼虫的肉类及其制品所致。已知 150 多种动物可自然感染旋毛虫(*Trichinella spiralis*),流行于 66 个国家(或地区)。我国除海南省以外,其他省、市、自治区均有动物感染旋毛虫的报道,近年来我国已发生多起人体旋毛虫病暴发。由于旋毛虫感染的传统检测方法主要依靠肌肉活检,该法检出率低且实施困难,近年来,国内外学者试图通过检测血清中的旋毛虫抗体来实现对旋毛虫感染的检测,但是通常只能在感染后 3~4 周才能检出旋毛虫抗体,而此时部分重度感染者可能已因急性期并发症而死亡,故检测旋毛虫抗体不能用于旋毛虫病的早期诊断。研究表明,旋毛虫幼虫在宿主体内移行和发育过程中所产生的排泄 — 分泌(Excretory-Secretory, ES)物及虫体表面脱落物可进入血液而成为循环抗原(Circulating Antigens, CAg),此类抗原含量与感染强度成正比,且出现时间早于特异性抗体,其半衰期亦明显短于特异性抗体,因而,检测血清中旋毛虫 CAg 有望用于对旋毛虫感染的早期检测、既往和现症感染的鉴别以及疗效考核;然而,血清中的 CAg 含量通常较低,应用常规方法时检出率仅为 19%~54%,极大地限制了检测 CAg 的推广应用,因此,目前亟需建立一种敏感性高、特异性强的检测旋毛虫 CAg 的新方法。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种具有高度敏感性和特异性的 IgY-McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法。

[0004] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的 IgY — McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法,它是以抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 作为捕获抗体,以抗旋毛虫 ES 抗原 McAb 作为检测抗体;所述抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 和抗旋毛虫 ES 抗原 McAb 分别通过下述方法制备而成:

(A) 制备抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY:

将旋毛虫肌幼虫加入培养基中无菌培养,上清纯化透析后浓缩干燥即得 ES 抗原,测定蛋白浓度后分装待用;用上述旋毛虫肌幼虫 ES 抗原免疫罗曼蛋鸡,所产鸡蛋卵黄用饱和硫酸铵沉淀法收集 IgY,纯化后测定浓度,既得抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY,分装后备用;

(B) 制备抗旋毛虫 ES 抗原 McAb:

建立分泌抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的杂交瘤细胞株,使用有限稀释法进行克隆化,应用辛酸-硫酸铵法纯化 McAb,测定浓度后分装备用。

[0005] 检测时,采用棋盘滴定法确定 IgY 最适包被浓度,用碳酸盐包被缓冲液将最适浓度的 IgY 包被到酶标板的反应孔中作为捕获抗体;加入最佳比例稀释的待检血清;将作为检测抗体的 McAb 和辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 依次加入反应孔,最后加底物显色并判定检测结果。

[0006] 本发明的优点在于为感染动物血清中旋毛虫 CAg 的早期检测提供了一种敏感性更高且具有广泛应用前景的新方法,克服了常规方法由于血清中 CAg 含量低而难于检出的缺点,有利于血清中旋毛虫 CAg 检测在实践中的推广应用。本发明经体外培养收集旋毛虫肌幼虫 ES 抗原,并使用抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原 IgY 和 McAb 分别作为捕获抗体和检测抗体,建立了血清中旋毛虫 CAg 检测的 IgY-McAb 夹心 ELISA 方法,可实现对旋毛虫感染的早期检测,与已有方法相比,在很大程度上提高了早期检测的灵敏度和特异度,本发明亦可用于既往和现症感染的甄别以及疗效考核。

[0007] IgY (鸡卵黄免疫球蛋白)是鸡血液中的 IgG 被选择性转移到卵黄中形成的,而且是卵黄中唯一的免疫球蛋白类,其结构虽与 IgG 相似,但在血清学检测方面比哺乳动物源性的 IgG 更具优势,可避免与类风湿因子等结合发生交叉反应,特异性更高;此外, IgY 能与更多的抗原表位结合而起到信号放大作用,可提高检测的敏感性;目前国内外尚未有将 IgY 用于旋毛虫病诊断的报道。McAb 是由 B 细胞杂交瘤细胞株产生的、只针对一种抗原决定簇的单一抗体,可为旋毛虫感染的检测提供高度特异、敏感的工具。

#### 附图说明

[0008] 图 1 是 IgY-McAb 夹心 ELISA 检测感染旋毛虫小鼠不同时间血清中 CAg 变化。

[0009] 图 2 是 IgY-McAb 夹心 ELISA 检测感染旋毛虫小鼠治疗后不同时间血清 CAg 变化。

#### 具体实施方式

[0010] 本发明所述的 IgY-McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原的方法,它是以抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 作为捕获抗体,以抗旋毛虫 ES 抗原 McAb 作为检测抗体;所述旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 和抗旋毛虫 ES 抗原 McAb 分别通过下述方法制备而成:

(1) 制备抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY:

(1.1) 旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的制备

将改良贝氏法收集的旋毛虫肌幼虫按 5 000 条幼虫/mL 的比例加入 1640 培养基中,培养时加入青霉素(100U/mL)和链霉素(100U/mL),37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18h,高速离心机 4℃离心,将上清 4℃透析 3 d,快速真空浓缩系统浓缩干燥即得 ES 抗原,测定浓度后分装,置-80℃保存备用。整个过程必须严格无菌操作。

[0011] (1.2) 抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原鸡卵黄抗体 IgY 的制备

取 100 μg 旋毛虫肌幼虫 ES 抗原与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后经翅下静脉免疫罗曼蛋鸡,间隔 2 周以同样剂量加弗氏不完全佐剂静脉免疫,共免疫 4 次。首次免疫 7d 后开始收集鸡蛋,取卵黄与蒸馏水以 1:9 混合后充分搅拌 15min,4℃过夜;取上清,4℃

10 000g 离心 25min;50%、33% 饱和硫酸铵沉淀 2 次,弃上清,适量 PBS 将沉淀洗下,置透析袋中以消毒蒸馏水透析 3d,6h 换水 1 次,收集上清液,快速真空浓缩系统干燥浓缩后,Bradford 法测其浓度,分装后置 -80℃ 备用。

[0012] (2) 制备抗旋毛虫 ES 抗原 McAb :

(2.1) 旋毛虫肌幼虫 ES 抗原免疫 BALB/c 小鼠

选择 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,取旋毛虫肌幼虫 ES 抗原 50 μg 与等量弗氏完全佐剂充分乳化后腹股沟及颈背部皮下多点注射,此后每间隔 3 周以 25 μg ES 抗原与弗氏不完全佐剂等体积充分混合乳化后用相同方式注射,共免疫 3 次;末次免疫 2 周后,于融合前 3d 直接对免疫小鼠脾内注射无佐剂 ES 抗原 50 μg 加强免疫。

[0013] (2.2) 杂交瘤细胞株的建立

(2.2a) 免疫脾细胞的制备:用 RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) 不完全培养基冲洗出上述免疫鼠脾细胞,将脾细胞转移至 50mL 离心管内,1 000g 离心 5min,用培养基洗涤 2 次后适当稀释,计数备用。

[0014] (2.2b) SP2/0 细胞的复苏和制备:融合前 2 周复苏冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞株,加入 8-AG (20 μg/mL),5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 连续培养 3 代以上,以筛选并保持次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷型。融合前 24~48h,选择生长良好、形态完整的处于对数分裂期的 SP2/0 细胞进行半传代培养。

[0015] (2.2c) 细胞融合:取对数生长期的 SP2/0 和免疫脾细胞,分别 1 000g 离心 5min,弃上清后,用 RPMI-1640 不完全培养基混悬细胞后计数,将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:10~1:5 的比例混合在一起;用培养基洗涤 1 次,1 000g 离心 10min,尽弃上清,将离心管置于 37℃ 水浴中,逐滴缓慢滴入 1mL 37℃ 预温的融合剂 50% 聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG, 分子量 4 000, 30s 内加完),使其与细胞混匀;终止 PEG 作用,将反应终止的细胞悬液 1 000g 离心 5min,弃上清后轻悬于含 20% 胎牛血清的 HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine, HAT) 培养液中,将融合后细胞悬液加入已铺有饲养细胞的 96 孔板中,100 μL/孔,5%CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 培养。

[0016] (2.3) 有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化

将抗体分泌阳性的杂交瘤细胞集落(强阳性孔)轻轻吹起,混匀,进行活细胞计数,计算细胞密度;取混匀的细胞悬液,用完全培养基准确进行系列稀释,将细胞稀释至 5、10、50 个细胞/mL;将稀释好的细胞悬液分别加入已铺好饲养细胞的 96 孔培养板中,每孔 100 μL,使每孔分别含 0.5、1 和 5 个细胞;置 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 37℃ 培养,注意观察细胞的生长状况,待细胞集落生长到孔底 1/10~1/5 面积时半换液;当肉眼可见细胞克隆时,吸取适当培养液上清进行抗体检测;初次克隆化的杂交瘤细胞需要在完全培养基中加 HT (Hypoxanthine-Thymidine, HT);每次克隆化的同时将剩余细胞进行扩大培养并及时冻存,直至所有克隆化细胞孔检测阳性率达到 100%;一般经过 2~3 次克隆化操作,即可确定已获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0017] (2.4) 体内诱生腹水法制备腹水

取 8 周龄 BALB/c 小鼠,每只小鼠经腹腔注射灭菌液体石蜡 0.5mL 进行预处理,1 周后再腹腔注射 0.5mL 处于对数生长期的杂交瘤细胞悬液( $1\sim 2 \times 10^6$  个/mL),10d 后小鼠腹部明显膨大,无菌条件下收集腹水。

[0018] (2.5) 辛酸-硫酸铵法纯化腹水中的单克隆抗体

将收集的腹水在高速低温离心机中 4℃ 10 000g 离心 20min, 弃去表面油脂后收集上清, 用 4 倍体积醋酸缓冲液稀释, 缓慢逐滴加入 2.5 倍体积的正辛酸, 4℃ 静置 1h 后 10 000g 离心 30min; 取上清, 加入 1/10 体积的 10×PBS, 4℃ 预冷后逐滴加入 45% 饱和硫酸铵沉淀, 4℃ 静置 1h, 10 000g 离心 20min; 弃上清, 将沉淀悬浮于少量 PBS 中, 稀释后转入透析袋, 在 100 倍体积的 PBS 中 4℃ 透析 3d, 每 6h 换液 1 次; 回收透析产物, 4℃ 10 000g 离心 30min, 除去不溶性沉渣即得所制备抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的 McAb, 用考马斯亮蓝 G-250 法测定其浓度并分装, -80℃ 保存备用。

[0019] (3) IgY-McAb 夹心 ELISA 检测旋毛虫循环抗原:

(3.1) 包被 IgY: 棋盘滴定法确定 IgY 最适包被浓度及血清最佳稀释度; 用碳酸盐包被缓冲液 (PH9.6) 将已测浓度的 IgY 稀释至最适包被浓度, 100μL/孔包被酶标板, 4℃ 过夜。

[0020] (3.2) 洗涤: 垂直倒空酶标板孔中的液体, 拍干, 孔内加满洗涤液 (PBST), 静置 4min, 反复 3 次, 最后将酶标板倒置在吸水纸上, 拍干。

[0021] (3.3) 封闭: 用 5% 脱脂奶粉封闭, 200μL/孔, 37℃ 1h。

[0022] (3.4) 洗涤: 同上。

[0023] (3.5) 加被检血清: 用稀释液将被检血清以最佳比例稀释, 取 100μL 稀释血清加入酶标板, 每板均设阳性、阴性及空白对照, 37℃ 1h。

[0024] (3.6) 洗涤: 同上。

[0025] (3.7) 加一抗: 用稀释液将单克隆抗体以最佳稀释度稀释, 100μL/孔, 37℃ 1h。

[0026] (3.8) 洗涤: 同上。

[0027] (3.9) 加酶标二抗: 用稀释的 HRP-羊抗小鼠 IgG 为二抗, 每孔加入酶标山羊抗小鼠 IgG 100μL, 37℃ 1h。

[0028] (3.10) 洗涤: 同上。

[0029] (3.11) 加底物: 各反应孔中加入新鲜配制的底物溶液 100μL, 37℃ 20min。

[0030] (3.12) 加终止液: 各反应孔中加入终止液 50μL, 立即测 OD 值。

[0031] (3.13) 观察结果: 肉眼观察后用酶联免疫检测仪 ( $\lambda = 490\text{nm}$ ) 测吸光值 (A490 值)。

[0032] (3.14) 结果判定: 肉眼观察淡黄色为阴性, 桔红色为阳性。用酶联免疫检测仪测 OD 值, 以待测样品 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值  $\geq 2.1$  者为阳性。

[0033] 本发明的有益效果主要体现在:

1、本发明所涉及抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的 IgY 和 McAb 均由旋毛虫肌幼虫 ES 抗原免疫动物制备, 针对性强, 对血清中旋毛虫 CAg 进行捕获时具有高度的特异性。

[0034] 2、本发明所涉及 ELISA 法为成熟技术, 易于掌握, 在生物医学领域应用广泛, 可大范围推广。

[0035] 3、本发明所涉及 IgY-McAb 夹心 ELISA 方法在对血清中旋毛虫 CAg 进行检测时不仅具有高度的敏感性和特异性, 而且稳定性和重复性良好; 可实现对旋毛虫感染的早期、快速检测, 并可用于既往和现症感染的鉴别、疗效考核及血清流行病学调查。

[0036] 夹心 ELISA 方法在对血清中旋毛虫 CAg 检测的敏感性:

取已知浓度的旋毛虫肌幼虫 ES 抗原, 按一定梯度依次倍比稀释, 按照本发明说明书中所述 IgY-McAb 夹心 ELISA 法步骤操作, 注意同时设置阴性对照和空白对照。测定结果表

明,当旋毛虫肌幼虫 ES 抗原稀释至 1ng/mL 时,其 S/N 值仍大于 2.1,结果仍为阳性,说明本发明对 ES 抗原的最小检出量可低至 1ng/mL,具有较高的敏感性,如表 1 所示。

[0037] 表 1 IgY-McAb 夹心 ELISA 敏感性检测(S/N 值)

ES 抗原含量 (ng/mL)	OD 值		S/N 值
	阳性	阴性	
25	0.42	0.10	4.20
20	0.40	0.10	4.00
15	0.39	0.11	3.55
10	0.37	0.09	4.11
5	0.34	0.09	3.78
4	0.31	0.09	3.44
3	0.29	0.10	2.90
2	0.26	0.11	2.36
1	0.22	0.10	2.20

[0038] IgY-McAb 夹心 ELISA 方法检测旋毛虫感染小鼠血清中 CAg 的动态变化:

用建立的 IgY- 单抗夹心 ELISA 检测旋毛虫感染小鼠血清中 CAg 变化情况,按照本发明说明书中所述的 IgY-McAb 夹心 ELISA 法步骤操作。检测结果发现,感染小鼠血清中的 CAg 在感染后 3d 首次检出,阳性率为 6% (1/15),随着感染时间的延长,感染小鼠血清中 CAg 也随之增高,感染后 24d 达到高峰(阳性率 100%),然后逐渐减低,感染后 32d 出现第 2 个峰值,随后迅速降低,如表 2 和图 1 所示。说明本发明可用于科研中动态监测感染动物血清中的 CAg 水平变化,在实施过程中于感染后 3d 即检测到血清中的 CAg,这一时间远较目前已有方法提前,提示本发明可实现对旋毛虫感染的早期诊断。

[0039] 表 2 IgY-McAb 夹心 ELISA 检测感染旋毛虫小鼠不同时间血清中 CAg 变化

感染时间 (天)	检测数 (只)	OD 值 (平均值)	阳性数 (只)	阳性率 (%)
1	15	0.06±0.02	0	0
2	15	0.10±0.03	0	0
3	15	0.11±0.04	1	6.7
4	15	0.12±0.04	1	6.7
5	15	0.14±0.04	2	13.3
6	15	0.15±0.05	2	13.3
7	15	0.15±0.05	3	20
8	15	0.15±0.05	3	20
9	15	0.17±0.05	3	20
10	15	0.17±0.06	4	26.7
11	15	0.18±0.06	5	33.3
12	15	0.18±0.06	5	33.3
13	15	0.21±0.06	6	40
14	15	0.20±0.06	6	40
15	15	0.19±0.06	6	40
16	15	0.17±0.06	7	46.7
17	15	0.18±0.06	7	46.7
18	15	0.18±0.07	8	53.3
19	15	0.20±0.07	9	60
20	15	0.22±0.06	9	60
21	15	0.21±0.06	11	73.3
22	15	0.22±0.06	11	73.3
23	15	0.22±0.06	14	93.3
24	15	0.20±0.07	13	86.7
25	15	0.20±0.06	13	86.7
26	15	0.20±0.06	8	53.3
27	15	0.21±0.06	8	53.3
28	15	0.19±0.06	9	60
29	15	0.20±0.06	6	40
30	15	0.18±0.05	6	40
31	15	0.19±0.12	4	26.7
32	15	0.22±0.06	9	60
33	15	0.22±0.06	9	60
34	15	0.22±0.06	5	33.3
35	15	0.18±0.10	2	13.3
37	15	0.17±0.06	2	13.3
39	15	0.15±0.07	2	13.3
41	15	0.15±0.06	3	20
43	15	0.13±0.06	2	13.3
45	15	0.14±0.06	2	13.3
47	15	0.14±0.06	1	6.7
49	15	0.13±0.06	1	6.7

[0040] IgY-McAb 夹心 ELISA 方法用于阿苯达唑对旋毛虫感染小鼠治疗的疗效考核：

用阿苯达唑对感染旋毛虫后 7 周的小鼠进行治疗，治疗后 2d 开始尾静脉采血检测血清中 CAg 变化情况，结果发现，治疗后小鼠血清中 CAg 迅速升高，在治疗后 8d 达到峰值，然后逐渐减低，在治疗后 42d，治疗组小鼠血清中全部检测不到 CAg，而未使用药物治疗的对照组小鼠中则仍可检出血清中的 CAg，两组之间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，提示本发明可通过检测血清中的 CAg 而实现对旋毛虫感染治疗后的疗效考核，如表 3 和图 2 所示。

[0041] 表 3 IgY-McAb 夹心 ELISA 检测感染旋毛虫小鼠治疗后不同时间血清中 CAg 变化

治疗时间 (天)	检测小鼠数 (只)	OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	阳性数 (只)	阳性率 (%)
2	10	0.21±0.02	6	60
4	10	0.24±0.05	7	70
6	10	0.23±0.03	7	70
8	10	0.27±0.04	10	100
10	10	0.24±0.05	7	70
12	10	0.21±0.05	6	60
14	10	0.22±0.06	6	60
16	10	0.22±0.07	5	50
18	10	0.20±0.05	4	40
20	10	0.19±0.05	4	40
22	10	0.20±0.05	4	40
24	10	0.18±0.05	4	40
26	10	0.16±0.03	2	20
28	10	0.15±0.06	1	10
30	10	0.14±0.05	1	10
32	10	0.13±0.06	2	20
34	10	0.13±0.05	1	10
36	10	0.13±0.05	1	10
38	10	0.12±0.04	1	10
40	10	0.09±0.03	0	0
42	10	0.09±0.04	0	0

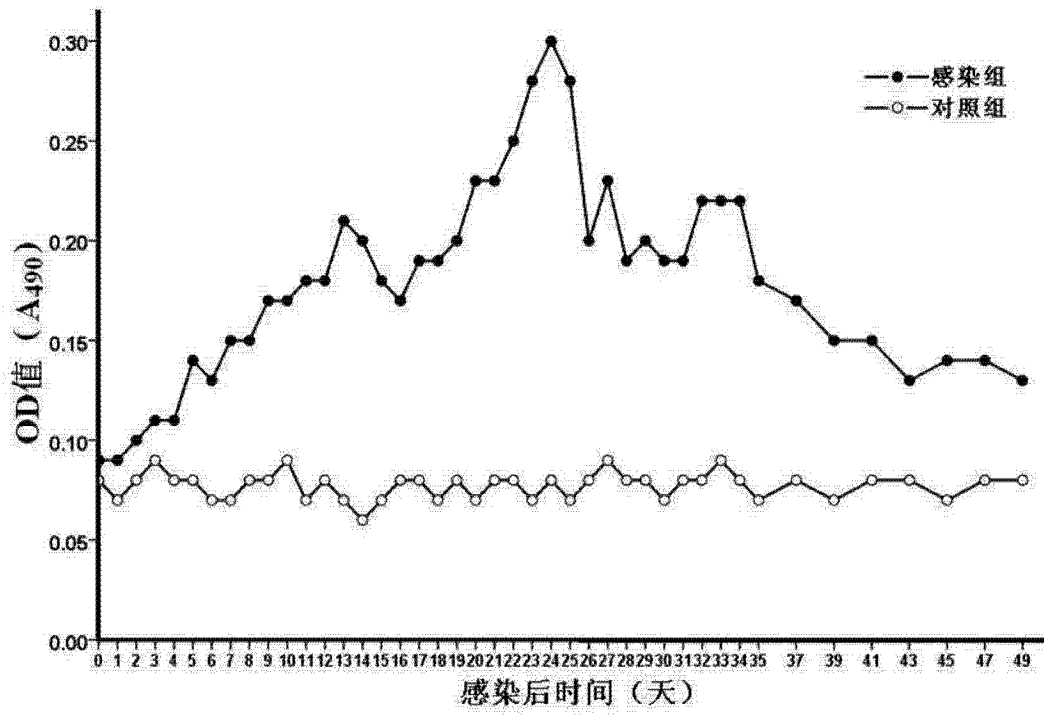


图 1

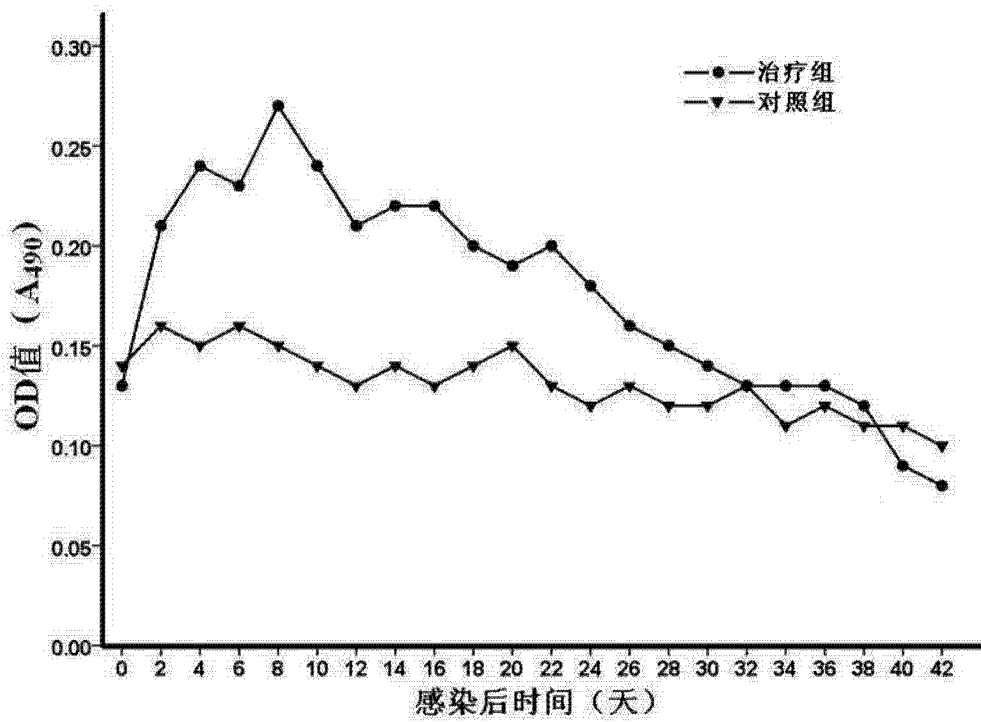


图 2

专利名称(译)	IgY-McAb夹心ELISA检测旋毛虫循环抗原的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102331501A</a>	公开(公告)日	2012-01-25
申请号	CN201110167550.9	申请日	2011-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	郑州大学		
申请(专利权)人(译)	郑州大学		
当前申请(专利权)人(译)	郑州大学		
[标]发明人	王中全 崔晶 井丰军 姜鹏 王焯 付光宇 李旭旭		
发明人	王中全 崔晶 井丰军 姜鹏 王焯 付光宇 李旭旭		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	王霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种IgY - McAb夹心ELISA检测旋毛虫循环抗原的方法，它是以抗旋毛虫肌幼虫ES抗原鸡卵黄抗体IgY作为捕获抗体，以抗旋毛虫ES抗原McAb作为检测抗体；所述IgY的制备方法为：将旋毛虫肌幼虫加入培养基中无菌培养，上清纯化透析后浓缩干燥即得ES抗原，测定蛋白浓度后用其免疫罗曼蛋鸡，所产鸡蛋卵黄用饱和硫酸铵沉淀法收集IgY，纯化后测定浓度即可分装备用；所述McAb的制备方法为：建立分泌抗旋毛虫肌幼虫ES抗原的杂交瘤细胞株，使用有限稀释法进行克隆化，应用辛酸-硫酸铵法纯化McAb，测定浓度后分装备用。本发明的优点在于为感染动物血清中旋毛虫CAg的早期检测提供了一种具有高度敏感性和特异性且具有广泛应用前景的新方法。

