



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106405092 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610776713.6

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2016.08.31

C07K 16/10(2006.01)

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730046 甘肃省兰州市城关区徐家坪1号

(72)发明人 郑海学 田宏 杨帆 石正旺

刘华南 朱紫详 曹伟军 张克山

靳野 郭建宏 何继军 冯霞

刘湘涛

(74)专利代理机构 深圳市中知专利商标代理有限公司 44101

代理人 吕晓蕾

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒。含有HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗。本发明的试剂盒可用于O型口蹄疫病毒抗体水平监测。替代现有ELISA中口蹄疫兔抗、豚鼠抗血清及抗豚鼠酶标抗体,简化ELISA方法步骤,提高稳定性、大幅度缩短检测时间,从24h缩短至1.5小时内,突破了原来ELISA需要一抗和二抗等反应过程。

1. 一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,含有HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗。

2. 权利要求1所述固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,所述HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗制备方法为,

脾细胞的细胞悬液的制备:采用常规免疫方法对BaIb/c小鼠进行免疫,共4次,首先用卡介苗致敏小鼠,200 μ I/只;一周后将纯化的O型口蹄疫病毒灭活抗原与福氏完全佐剂等质量混匀、充分乳化后,按0.3mI/只免疫小鼠,腋窝,腹股沟注射,共免疫5只;初次免疫后每间隔3周再免疫一次,免疫的O型口蹄疫病毒灭活抗原与福氏不完全佐剂等质量混匀,在小鼠颈背部皮下分次多点注射,细胞融合前3天腹腔加强免疫一次;3天后摘该小鼠眼球取血,得到脾细胞的细胞悬液;

细胞融合:将处于对数生长期的骨髓瘤细胞和所述脾细胞的细胞悬液混匀,离心弃上清;将融合管置手掌中来回摩擦,使细胞块松动,用滴管往玻璃管中缓慢加入0.7mI 37 $^{\circ}$ C预热的50%PEG1000,90s内加完,静置60s,在5min内先慢后快逐滴加入37 $^{\circ}$ C预热的无血清DMEM,共加10mI,轻摇混匀后,离心弃上清;用HAT培养液重悬细胞,随即移入60mIHAT培养液中,轻轻混匀,然后按100 μ I/孔转入96孔细胞培养板中,置于5%CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养;

杂交瘤细胞的筛选:培养第六天用HAT培养液进行半量换液,待细胞长到孔底的1/4~1/3时吸出上清进行间接ELISA检测;P/N $\geq$ 2.1的细胞即为杂交瘤细胞;

杂交瘤细胞的克隆化培养;

单克隆抗体的制备:每只小鼠腹腔注入0.5mL $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ /mL的杂交瘤细胞,待小鼠腹部慢慢隆起,小鼠精神沉郁、不走动、濒临死亡时,颈椎脱臼处死小鼠,收集腹水,室温、10000r/min离心10min,收集中间透亮液体即为单克隆抗体;

HRP标记纯化的单克隆抗体:将饱和硫酸铵纯化之后浓度为5.284mg/mI的单克隆抗体0.3mL与0.1mL过氧化物酶加入管中,轻轻吹打混匀,4 $^{\circ}$ C过夜;再加入40 μ L的三乙醇胺,混匀,加入50 μ L的硼氢化钠,混匀,4 $^{\circ}$ C放置30min后,加入10 μ L甘氨酸混匀;之后将混合液置于透析袋中透析,透析液为PH 7.2的PBS,所得即为HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗。

3. 权利要求2所述固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,所述细胞融合步骤中,脾细胞数与骨髓瘤细胞数的比例为5:1到10:1。

4. 使用权利要求1-3任一所述固相竞争ELISA试剂盒进行O型口蹄疫病毒抗体水平监测的用途。

一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物试剂盒领域,尤其涉及一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的偶蹄类动物共患的急性、热性、接触性传染病,会给畜牧业生产和进出口贸易造成巨大的经济损失,该病不仅严重影响畜牧业的发展,也对人类健康构成很大危害。我国作为一个牛羊养殖大国,口蹄疫是危害牛羊养殖极为重要疾病,加强对口蹄疫的诊断和检测新技术的研究和开发,突破口蹄疫诊断试剂产业化关键技术与工艺,是解决制约我国畜牧业快速发展的瓶颈问题的重大国家和社会需求,必将对提高我国畜牧业的整体发展水平和总体疫病防控能力,推动畜牧业的健康发展产生积极、深远的影响,而且对食品安全和人类健康有着特殊的意义。并且要从根本上控制口蹄疫的发生与流行,必须首先加强对本病的诊断学的研究,为控制我国口蹄疫提供技术支撑。

[0003] 目前,口蹄疫病毒的血清型多,持续感染无症状带毒严重,准确诊断血清型和精准监测隐性带毒,是防控该病的首要环节。与生命领域的诊断监测技术发展同步,口蹄疫诊断监测技术的发展历程可分为3个阶段,即早期的补体结合试验和病毒中和试验,随后以酶联免疫吸附反应(ELISA)为核心的病原和抗体检测方法,现今的以聚合酶链反应(PCR)为基础的多种分子诊断技术。然而,随着生物技术的发展,已有方法表现出了这样或那样的不足,或烦琐费时,或没有达到十分精准的程度。目前应用于口蹄疫诊断有病毒分离、ELISA、PCR、凝集试验、免疫胶体金层析技术等,应用最广泛的是液相阻断ELISA,但LPB-ELISA程序较多、操作步骤复杂,检测至少需要一天的时间才能获得结果,因此在疫情突发时无法实现大量的样品的即时检测。要克服现状就必须研制新型ELISA诊断技术。

[0004] 固相竞争ELISA方法是OIE推荐的标准方法。通过筛选和制备诊断关键标识物(型特异性单抗),解决型间交叉、稳定性差的问题,突破了使用多抗交叉、不稳定的问题;通过HRP标记单抗,替代现有液相阻断ELISA中的口蹄疫兔抗、豚鼠抗血清及抗豚鼠酶标抗体,简化ELISA方法步骤,这样就减少可实验操作步骤,底物直接和一抗反应,节省了时间,提高了敏感性和特异性。提高稳定性,突破了原来ELISA需要一抗和二抗等反应过程,大幅度缩短检测时间。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,含有HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗。

[0007] 进一步,所述HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗制备方法为,

[0008] 脾细胞的细胞悬液的制备:采用常规免疫方法对BaIb/c小鼠进行免疫,共4次,首先用卡介苗致敏小鼠,200 μ I/只;一周后将纯化的O型口蹄疫病毒灭活抗原与福氏完全佐剂等质量混匀、充分乳化后,按0.3mI/只免疫小鼠,腋窝,腹股沟注射,共免疫5只;初次免疫后每间隔3周再免疫一次,免疫的O型口蹄疫病毒灭活抗原与福氏不完全佐剂等质量混匀,在小鼠颈背部皮下分次多点注射,细胞融合前3天腹腔加强免疫一次;3天后摘该小鼠眼球取血,得到脾细胞的细胞悬液;

[0009] 细胞融合:将处于对数生长期的骨髓瘤细胞和所述脾细胞的细胞悬液混匀,离心弃上清;将融合管置手掌中来回摩擦,使细胞块松动,用滴管往玻璃管中缓慢加入0.7mI 37℃预热的50%PEG1000,90s内加完,静置60s,在5min内先慢后快逐滴加入37℃预热的无血清DMEM,共加10mI,轻摇混匀后,离心弃上清;用HAT培养液重悬细胞,随即移入60mIHAT培养液中,轻轻混匀,然后按100 μ I/孔转入96孔细胞培养板中,置于5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养;

[0010] 杂交瘤细胞的筛选:培养第六天用HAT培养液进行半量换液,待细胞长到孔底的1/4~1/3时吸出上清进行间接ELISA检测;P/N $\geq$ 2.1的细胞即为杂交瘤细胞;

[0011] 杂交瘤细胞的克隆化培养;

[0012] 单克隆抗体的制备:每只小鼠腹腔注入0.5mL $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ /mL的杂交瘤细胞,待小鼠腹部慢慢隆起,小鼠精神沉郁、不走动、濒临死亡时,颈椎脱臼处死小鼠,收集腹水,室温、10000r/min离心10min,收集中间透亮液体即为单克隆抗体;

[0013] HRP标记纯化的单克隆抗体:将饱和硫酸铵纯化之后浓度为5.284mg/mI的单克隆抗体0.3mL与0.1mL过氧化物酶加入管中,轻轻吹打混匀,4℃过夜;再加入40 μ L的三乙醇胺,混匀,加入50 μ L的硼氢化钠,混匀,4℃放置30min后,加入10 μ L甘氨酸混匀;之后将混合液置于透析袋中透析,透析液为PH 7.2的PBS,所得即为HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗。

[0014] 进一步,所述细胞融合步骤中,脾细胞数与骨髓瘤细胞数的比例为5:1到10:1。

[0015] 本发明还保护使用所述固相竞争ELISA试剂盒进行O型口蹄疫病毒抗体水平监测的用途。

[0016] 本发明所涉及的检测方法以轻简化或精准为目标的新型定性定量技术。

[0017] 本发明针对口蹄疫现有诊断技术存在费时、交叉严重、稳定性差等技术缺陷,通过筛选和制备诊断关键标识物(型特异性单抗),解决型间交叉、稳定性差、费时、步骤繁琐等问题,突破了使用多抗交叉、不稳定、费时、步骤繁琐的问题;通过HRP标记该单抗,替代现有ELISA中口蹄疫兔抗、豚鼠抗血清及抗豚鼠酶标抗体,简化ELISA方法步骤,提高稳定性、大幅度缩短检测时间,从24h缩短至1.5小时内,突破了原来ELISA需要一抗和二抗等反应过程。该方法可为检测O型口蹄疫的免疫和感染状况提供一种更好的确诊方法。

[0018] 本发明所制备的检测试剂可为O型口蹄疫流调及抗体水平监测提供支持。

附图说明

[0019] 图1是抗体效价测定(定量)检测10份样品布局图。

[0020] 图2是抗体测定(定性)检测20份样品布局图。

[0021] 图3是检测实施例1中腹水单抗的特异性结果图。

[0022] 图4是未纯化和纯化的腹水单抗的SDS-PAGE电泳图。

- [0023] 图5是5E5-HRP的特异性的ELISA检测结果图。
- [0024] 图6是5E5-HRP的效价的检测结果图。
- [0025] 图7是型特异性单抗5E5的抗原反应谱检测结果图。

具体实施方式

[0026] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出,其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0027] 实施例1:

[0028] 1.1材料

[0029] 1.1.1实验动物、抗原及细胞

[0030] 8周龄SPF级BALB/c雌鼠,购买于中国农业科学院兰州兽医研究所;SP/20及BHK-21细胞购自中科院武汉病毒所国家典藏物保存中心。0型口蹄疫病毒灭活抗原,A型口蹄疫病毒灭活抗原,Asia1型口蹄疫病毒灭活抗原均购自中农威特生物科技股份有限公司。

[0031] 1.1.2主要试剂

[0032] 液体石蜡,山羊抗小鼠IgG-HRP购自Sigma公司,96孔酶标板购自Costar公司,2mol/L的H₂SO₄由兰州兽医研究所检测组提供,胎牛血清购自GIBICO公司,TMB购自SurModics公司,改良型RPMI-1640购自Hyclone公司,碳酸盐缓冲液胶囊购自Sigma公司,未预染蛋白Marker购自Fermentas。

[0033] 1.2方法

[0034] 1.2.1动物免疫

[0035] 采用常规免疫方法对BALB/c小鼠进行免疫,共4次,首先用卡介苗致敏小鼠,200μl/只。一周后将纯化的0型口蹄疫病毒灭活抗原与福氏完全佐剂等质量混匀、充分乳化后,按0.3ml/只免疫小鼠,腋窝,腹股沟注射,共免疫5只;初次免疫后每间隔3周再免疫一次,免疫的0型口蹄疫病毒灭活抗原与福氏不完全佐剂等质量混匀,在小鼠颈背部皮下分次多点注射,细胞融合前3天腹腔加强免疫一次。

[0036] 1.2.2筛选方法的建立

[0037] 筛选时采用间接ELISA检测法,用方阵滴定试验选择最佳抗原包被浓度。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠IgG作为二抗,最佳二抗浓度采用本实验室通用工作浓度1:1000。具体步骤如下:

[0038] (1)将抗原作1:250,1:500和1:1000的稀释,100μl/孔包被,37℃作用2h,4℃过夜。

[0039] (2)次日,将酶标板中包被液拍干,用封闭液按120μl/孔封闭,37℃作用2h后,拍干待测。

[0040] (3)阳性血清自1:40开始倍比稀释至第9列(1:10240),同时设1组阴性对照(即为未免疫0型口蹄疫抗原的老鼠血清),一组空白对照(即为不加任何血清的对照孔);加样后37℃作用0.5h,洗涤3次。

[0041] (4) 加入酶标辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG二抗,50 μ I/孔,37℃作用30min,洗涤3次。

[0042] (5) 加入底物A,B各50 μ I/孔,于37℃下显色10min,用终止液终止反应,50 μ I/孔。用酶标检测仪测定OD450值。

[0043] 用间接ELISA检测法筛选时,选择阳性血清和阴性血清的比值最大,且OD450值接近于1的抗原稀释度作为间接ELISA反应体系的最佳工作浓度。筛选杂交瘤细胞时用该体系对细胞上清液进行检测,当P/N $\geq$ 2.1时,判为阳性。

[0044] 1.2.3小鼠效价的测定

[0045] 间接ELISA方法建立后,选用最佳包被浓度检测免疫小鼠的抗体效价。选取免疫效价检测值最高的小鼠腹腔追加免疫一次,三天后取该鼠的脾脏进行细胞融合。

[0046] 1.2.4.杂交瘤细胞株的建立

[0047] 1.2.4.1骨髓瘤细胞的准备

[0048] 于融合前两周复苏骨髓瘤细胞SP/20(购自中科院武汉病毒所国家典藏物保存中心)。

[0049] 将冻存管自液氮中取出,立即放到37℃温水中,让其溶解,待完全溶解后,1000rpm离心10min,弃上清,沉淀用含20%胎牛血清的DMEM完全培养液小心混悬,混匀后加入细胞培养瓶中,置于5%CO₂、37℃恒温培养箱中传代培养。培养过程在培养液中加入8-氮鸟嘌呤,按100 μ I/瓶细胞加入,每日处理一次,连续处理三次。使SP/20细胞对HAT培养液更加敏感。传至8瓶,并使融合当天的骨髓瘤细胞处于对数生长期,备用。

[0050] 1.2.4.2饲养细胞的准备

[0051] 细胞融合当天准备饲养细胞,方法如下:

[0052] (1) 取一只8~10周龄健康BaIb/c小鼠,摘眼球取血,制备阴性血清。断颈处死,用75%的酒精消毒处理。

[0053] (2) 将小鼠置于超净工作台中,腹面向上,用镊子提起小鼠腹部皮肤,在下腹部剪一小口,纵向剥离,充分暴露腹膜,并用酒精消毒。

[0054] (3) 用一次性灭菌注射器抽取5mI HAT培养液注入小鼠腹腔内,右手注射器保持不动,轻摇小鼠,随后抽取细胞悬液。

[0055] (4) 将细胞悬液加入60mI HAT培养基中,混匀后计数,调整细胞浓度至1~5 $\times$ 10⁵个/mI。如细胞数量过少,可再按上述步骤制备饲养细胞。

[0056] (5) 按100 μ I/孔转入到96孔细胞培养板中,置于5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养备用。

[0057] 1.2.4.3脾细胞的准备

[0058] (1) 取三天前加强免疫的小鼠,摘眼球取血,制备阳性血清。断颈处死,用75%的酒精消毒处理。

[0059] (2) 在超净工作台内,无菌摘取脾脏,去除脂肪和结缔组织,置于200目灭菌金属网上,用灭菌玻璃注射器芯轻轻研磨脾脏,同时缓慢滴加无血清DMEM。

[0060] (3) 收集脾细胞悬液,并转移到10mI离心管中,1 000rpm离心5min,弃上清,重悬于5mI无血清DMEM培养液中,脾细胞计数后备用。

[0061] 1.2.4.4细胞的融合

[0062] (1) 选择状态良好且呈对数生长的SP/20细胞6~8瓶,将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来并转移到50mI离心管中,1 000rpm离心10min。弃上清,用5mI无血清DMEM悬浮,计数。

[0063] (2) 将上述所得SP/20细胞和脾细胞悬液混匀,脾细胞数与骨髓瘤细胞数的比例应维持在5:1到10:1之间。

[0064] (3) 1 000rpm离心5min,弃上清。

[0065] (4) 将融合管置手掌中来回摩擦,使细胞块松动,此步为融合关键步骤。

[0066] (5) 用滴管往玻璃管中缓慢加入0.7mI 37℃预热的50%PEG (1000),90s内加完,静置60s。

[0067] (6) 在5min内先慢后快逐滴加入37℃预热的无血清DMEM,共加10mI,轻摇混匀后,1 000rpm离心5min,弃上清。

[0068] (7) 用HAT培养液重悬细胞,随即移入60mIHAT培养液中,轻轻混匀,然后按100μI/孔转入96孔细胞培养板中,置于5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养。

[0069] 1.2.4.5杂交瘤细胞的筛选

[0070] 融合后注意观察杂交瘤细胞生长状况,一般培养三天左右即有小克隆出现。第六天用HAT培养液进行第1次半量换液,第8~10天左右,待细胞长到孔底的1/4~1/3时吸出上清进行间接ELISA检测。以P/N≥2.1作为阳性判断标准,用SP/20细胞培养上清及正常小鼠血清作阴性对照。对检测为阳性的细胞进行扩大培养,同时进行克隆化培养。第一次亚克隆时换用HT培养液,两周后换为普通完全培养液。

[0071] 1.2.4.6杂交瘤细胞的克隆化培养

[0072] 对ELISA检测阳性的杂交瘤细胞及时进行克隆化培养,采用有限稀释法。步骤如下:

[0073] (1) 制备饲养细胞,方法如前所述。HT培养液中,制备饲养细胞层,每孔100μI。

[0074] (2) 用移液器将ELISA检测阳性孔中杂交瘤细胞轻轻吹打混匀,取样,于血细胞计数板上作细胞计数,然后用HT培养液调整细胞数。首次亚克隆时一般调整细胞数至15~20个/mI,第二、第三次亚克隆时一般调整细胞数至10个/mI。

[0075] (3) 将杂交瘤细胞悬液接种于含饲养细胞层的96孔细胞培养板中,每孔100μI。

[0076] 在37℃,5%CO₂及饱和湿度条件下培养。

[0077] (4) 每天观察并记录每孔细胞克隆数,待细胞长到孔底的1/4~1/3时半量换液,并对细胞上清进行间接ELISA检测。

[0078] (5) 选择克隆数少、OD₄₅₀值高的阳性孔,将其再次克隆。经3~4次克隆化操作,直至所有克隆化细胞孔检测阳性率达100%时,即可确定获得分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株即抗O型FMDV单克隆抗体的杂交瘤细胞(5E5),应及时扩大培养并冻存。

[0079] 1.2.5杂交瘤细胞的复苏

[0080] 从液氮罐中取出一支抗O型FMDV单克隆抗体的杂交瘤细胞(5E5)冻存管,用镊子夹住后迅速放入37℃水浴锅中,不停的晃动使细胞迅速融化,无菌打开冻存管,将管内细胞液移入盛有10mL改良型RPMI-1640培养基中,置于含5%CO₂的37℃培养箱中等杂交瘤细胞完全贴壁后对细胞进行换液。

[0081] 1.2.6单克隆抗体的大量制备

[0082] 选取8周龄的BaIb/c雌鼠,在无菌条件下,每只腹腔注射0.5mL灭菌的液体石蜡。两

周后,将准备好的杂交瘤细胞培养液(改良型RPMI-1640)注入小鼠的腹腔内。

[0083] 杂交瘤细胞的准备:挑选生长状况良好的杂交瘤细胞采用培养瓶传代培养,无菌条件下,倒掉细胞瓶内培养基,加入适量的胰酶消化细胞使其脱落,加入5mL无血清改良型RPMI-1640培养基,轻轻吹起细胞,全部移入离心管中,室温、1000r/min离心10min,弃上清,加入适量无血清改良型RPMI-1640培养基悬起细胞,台盼兰细胞计数,调整细胞数量至 $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ /mL,每只小鼠腹腔注入0.5mL所得细胞,每天观察小鼠,小鼠腹部慢慢隆起,约7~10d小鼠精神沉郁、不走动、濒临死亡时,颈椎脱臼处死小鼠,收集腹水,室温、10000r/min离心10min,收集中间透亮液体即为5E5也即为单克隆抗体。

[0084] 1.2.7腹水特异性的检测

[0085] 将灭活的抗原O(0.31 μ g/mL)、A(0.36 μ g/mL)和Asia-I(0.29 μ g/mL)包被于酶标板,100 μ L/孔,4℃过夜。采用间接ELISA方法对腹水的特异性进行测定:每孔加入100 μ L PBS稀释的所述5E5(1:2000),37℃孵育1h。洗板,每孔加入100 μ L PBS稀释好的山羊抗小鼠IgG-HRP(1:10000),37℃孵育1h。洗板,每孔加入50 μ L TMB,37℃孵育15min,加入2M H_2SO_4 ,用酶标仪读取OD450值。

[0086] 1.2.8型特异性单抗5E5的反应谱分析

[0087] 将今年来我国流行的O型口蹄疫灭活抗原(购自中农威特生物科技有限公司)包被ELISA板,100 μ L/孔,4℃过夜。采用间接ELISA方法对O型单抗的型内反应谱进行测定:每孔加入100 μ L PBS稀释的5E5(1:2000),37℃孵育1h。洗板,每孔加入100 μ L PBS稀释好的山羊抗小鼠IgG-HRP(1:10000),37℃孵育1h。洗板,每孔加入50 μ L TMB,37℃孵育15min,加入2M H_2SO_4 ,用酶标仪读取OD450值。

[0088] 1.2.9HRP标记纯化的单克隆抗体

[0089] 将饱和硫酸铵纯化之后浓度为5.284mg/mL的5E5 0.3mL与0.1mL过氧化物酶加入1.5mL的EP管中,轻轻吹打混匀,4℃过夜。向混合物中加入40 μ L的三乙醇胺,混匀,加入50 μ L的硼氢化钠,混匀,4℃放置30min。再次加入10 μ L甘氨酸溶液,混匀。之后将混合液置于透析袋中透析(PH 7.2的PBS)。

[0090] 1.2.10O型口蹄疫病毒兔抗血清的制备

[0091] 1.2.10.1病毒纯化用无RNase的蔗糖(Sigma公司生产)制备150、250、350、450g/L的蔗糖密度梯度,4℃静置平衡过夜。次日将样品加于顶部,10℃35000r/min(日立CP70VB离心机)离心150min,以0.5mL为1个级分,从低浓度到高浓度进行收集。根据Bachrach等的研究,取蔗糖密度处于350~450g/L,此处为口蹄疫病毒有效灭活抗原富集区域,-80℃保存备用

[0092] 1.2.10.2免疫程序取上述充分乳化的弗氏完全佐剂抗原,于每只兔两后腿足部皮下,腭淋巴结处及背部皮下多点接种,接种总量为2mL,14日后仍以上述抗原和剂量由背部皮下多点接种,进行第二次免疫;11日后,以上述弗氏不完全佐剂抗原,由每只兔肩部肌肉两点,背部皮下多点接种,接种总量为2mL,为其第三次免疫。

[0093] 1.2.10.3试血第三次免疫之后采血,通过O型口蹄疫液相阻断ELISA测定兔抗血清效价,若效价达到1:1024,则采用颈动脉分离兔抗血清,若没有达到,则进行第四次免疫,直到血清效价达到1:1024,采血分离血清备用。

[0094] 1.3基于酶标抗体的固相竞争ELISA方法的建立

[0095] 1.3.1各试剂最佳使用浓度的确定

[0096] 本发明利用O型口蹄疫病毒兔抗血清(1.2.10制备的O型兔抗血清)和HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗(也就是1.2.9制备得到的HRP标记纯化的单克隆抗体)建立固相竞争ELISA方法。采用方阵滴定法确立该方法中包被的多抗、抗原和竞争抗体的最佳使用浓度。

[0097] 1.3.2O型口蹄疫固相竞争ELISA方法的建立

[0098] ◆准备

[0099] 根据不同的需要,选择表1-2中的一种布局来设定相应的检测目的。图1.抗体效价测定(定量)检测10份样品布局图;图2.抗体测定(定性)检测20份样品布局图。

[0100] ◆稀释血清

[0101] 建议在血清稀释板上按照实验需求稀释血清,之后整体移至包被板反应板中。

[0102] 在血清稀释板中,以60μL/孔的量用样品稀释液2倍连续稀释血清,被检血清在第1~10列从1:4(即A1~A10孔,75μL样品稀释液加25μL被检血清)稀释至1:512;在第11列稀释阳性对照血清,方法同稀释待检血清;在第12列稀释阴性对照血清,从A12~D12,方法同稀释待检血清;E12~H12为空白对照(仅为样品稀释液)。

[0103] 注:由于本方法是竞争ELISA方法,当稀释血清移至反应板后,再加入等量的酶标抗体工作液,此时血清的稀释度加倍,被检血清从1:8~1:1024,由于阳性对照血清已经预先做了1:8倍稀释,则变为1:32~1:4096。

[0104] ◆加样

[0105] 将稀释板整体平移至包被反应板中,每孔50μL;随后给所有反应孔加50μL,标抗体工作液,轻轻震荡,37℃反应30分钟。

[0106] ◆洗涤取出酶标板,将其甩干,用洗涤液洗涤3~5次,在吸水纸上甩干。

[0107] ◆显色每孔加入底物溶液50μL,于37℃温箱静置避光反应5~10分钟。

[0108] ◆终止每孔加入50μL终止液。

[0109] ◆结果计算及判定在酶标仪450nm波长处,测定酶标板的每孔光吸收值,求出每份被检血清和同板单抗对照的平均光吸收值,根据公式计算各样品抑制率(PI)值, $PI = [1 - \text{样品孔OD} / \text{竞争抗体对照孔OD}] \times 100\%$ 。以竞争抗体对照孔平均OD₄₅₀值介于0.9~2.2,阴性对照血清PI值<40%,阳性对照血清PI值>50%时,空白对照PI值<5%,试验成立。

[0110] 判断标准:PI>60%,抗体阳性;PI<60%,抗体阴性;PI=60%,判定阳性可疑,重复检测一次,如果仍然为60,判定为阳性,如果不等于60需再次检测,或用其它方法检测。

[0111] 1.3.2固相竞争临界值的确定

[0112] 对56份阳性血清样品和27份阴性血清样品分别进行和倍稀释,用已建立的竞争ELISA方法检测,统计每个样品不同稀释度的PI值(抑制率),确定血清也就是抗原的最佳稀释倍数。根据结果中各个样品的每个稀释度的检测结果,最终确定为最佳临界值。

[0113] 1.3.3固相竞争ELISA方法的特异性

[0114] 利用所建立的ELISA方法检测口蹄疫A型、Asia1型、猪瘟、猪蓝耳及羊口疮等传染病阳性血清样品。同时,用该ELISA方法检测已知O型口蹄疫阳性的血清(10份),统计检测结果,分析试剂盒特异性。

[0115] 1.3.4固相竞争ELISA方法的符合率

[0116] 应用商品化检测O型口蹄疫病毒血清抗体试剂盒检测O型口蹄疫阴、阳性血清,共

计60份,商品化的试剂盒为荷兰的PrioCHECK及韩国的VDpro 0型口蹄疫抗体检测试剂盒。

[0117] 1.3.5固相竞争ELISA方法的重复性

[0118] 批内重复:用同一批次制备的多抗、抗原、HRP标记的竞争抗体及其他同试剂,在相同条件下用所建立的方法对7份血清样品进行检测独立检测5次,统计检测结果,计算标准差和变异系数。

[0119] 批间重复:用三个批次制备的多抗、抗原、HRP标记的竞争抗体及其他同试剂,在相同条件下用所建立的方法对7份血清样品进行检测独立检测1次,统计检测结果,计算标准差和变异系数

[0120] 2.结果

[0121] 2.1检测腹水特异性结果

[0122] 经间接ELISA的检测,制备的Mab与0型抗原反应性很好,与A和Asia-I型抗原及BHK-21细胞均不反应,具有良好的特异性,结果见图3。

[0123] 2.2纯化后5E5的SDS-PAGE分析

[0124] 将经饱和硫酸铵沉淀纯化的5E5进行SDS-PAGE电泳分析,结果见图4,其中泳道M为蛋白分子Marker;泳道1为未纯化的5E5腹水电泳结果;泳道2为纯化后的5E5腹水电泳结果。从图中可以看出,纯化后的5E5有两条带,分别是IgG的重链和轻链,大小分别约为45kDa和25kDa,与预期结果相符,使用紫外分光光度计测得抗体的浓度为5.284mg/mL。

[0125] 2.3标记后Mab特异性及效价的检测结果

[0126] 结果见图5和图6。从图5中可以看出,0型特异性单抗标记HRP后,只与0型口蹄疫病毒发生反应,与A型、Asia1型口蹄疫及BHK细胞培养上清均不发生反应,说明该标记抗体特异性很高。从图6中可以看出,标记后的0型单抗在稀释到1:12800时,其OD450值仍接近1.5。

[0127] 2.4抗0型口蹄疫的型特异性单抗5E5的反应谱分析

[0128] 从图7中可以看出5E5可以与近年来流行的0型口蹄疫病毒均能发生反应,由此可以看出5E5不但具有良好的型间特异性,而且在同一型内具有很好的反应广谱性,是作为检测用的最佳抗体。图5的X轴代表0型不同抗原,Y轴代表492nm处的OD值。

[0129] 2.5各试剂最佳使用浓度及临界值的确定

[0130] 应用兔抗0型口蹄疫多抗血清及HRP酶标单抗建立的固相竞争ELISA方法。用方阵滴定法确定的兔抗多抗(效价1:1024)最佳使用浓度(1:1000),抗原(TCID₅₀ 0.1mI=7.2)的最佳稀释度为1:15检测单克隆抗体的最佳使用浓度稀释(1:7000)。

[0131] 用已建立的方法对56份阳性血清样品和27份阴性血清样品进行检测分别进行,根据结果中各个切点的敏感性 & 特异性结果,所以最终确定为最佳临界值为:当抗体稀释度 ≥ 1:64,且PI大于60%,判定抗体阳性;小于60%,判定抗体阴性。

[0132] 2.6固相竞争ELISA方法的特异性

[0133] 利用所建立的ELISA方法检测口蹄疫0型、A型、Asia1型、猪瘟、猪蓝耳及羊口疮等传染病阳性血清样品,根据判定方法均为阴性(表1)。这些数据表明,所建立的ELISA方法具有良好的特异性,血清抗体之间不存在交叉反应。同时,用该ELISA方法检测已知0型口蹄疫阳性的血清(10份)均为阳性。由此可见所建立的0型口蹄疫血清抗体检测方法具有良好的特异性。

[0134] 表1.特异性检测结果表

	抗血清	阻断率 (%)	判定结果
[0135]	A 型口蹄疫	<40	-
	Asial 型口蹄疫	<40	-
	猪瘟	<40	-
	猪蓝耳	<40	-
	羊口疮	<40	-
	O 型口蹄疫(+)	>60	+

[0136] 2.7固相竞争ELISA方法的符合率

[0137] 应用商品化检测O型口蹄疫病毒血清抗体试剂盒检测O型口蹄疫阴、阳性血清,共计60份,商品化的试剂盒为荷兰的PrioCHECK的符合率为96.7%,商品化的试剂盒为韩国的VDpro O型口蹄疫抗体检测试剂盒的符合率为91.7%。符合率=两种相互比对的试剂盒检测结果一致的血清数/待检血清数×100%。具体见表2。

[0138] 表2.符合率实验结果表

[0139]

	PrioCHECK	VDpro O	O型SPEC
阳性份数	15	11	17
阴性份数	45	49	43
总计	60	60	60
O型SPEC符合率	96.7%	91.7%	

[0140] 2.8固相竞争ELISA方法的重复性

[0141] 批内重复:用同一批次制备的多抗、抗原、HRP标记的竞争抗体及其他同试剂,在相同条件下用所建立的方法对7份血清样品(其中阳性血清5份,阴性血清2份)进行独立检测,统计检测结果,计算标准差和变异系数。结果见表3。从表3可以看出,本发明的试剂盒批内重复性好。

[0142] 表3.批内重复实验结果表

[0143]

样品	编号	重复孔(P1 值)					平均 值	标准 差	变异 系数
		1	2	3	4	5			
阳性	1	80.22	80.39	81.02	81.35	80.56	80.71	0.46	5.78
	2	83.35	83.12	83.56	83.39	83.11	83.31	0.19	2.29 ⁵
	3	79.95	80.02	80.15	79.9	79.87	79.98	0.11	1.39
	4	90.25	89.67	89.17	90.13	89.96	89.83	0.43	4.79
	5	77.21	78.05	77.11	77.56	78.06	77.59	0.45	5.79
阴性	1	22.13	21.95	22.17	22.19	22.07	22.10	0.09	4.34
	2	19.92	20.1	20.16	19.82	20.35	20.07	0.21	2.3 ¹⁰

[0144] 批间重复:用三个批次制备的多抗、抗原、HRP标记的竞争抗体及其他同试剂,在相同条件下用所建立的方法对7份血清样品(其中阳性血清5份,阴性血清2份)进行独立检测,统计检测结果,计算标准差和变异系数,结果见表4,从表4可以看出,批间变异系数小于10%,说明本发明的试剂盒批间重复性好。

[0145] 表4.批间重复结果表

样品	编号	3 个不同批次制备的试剂盒 (PI 值)			平均值	标准差	变异系数
		1	2	3			
		1	2	3			
[0146] 阳性	1	80.95	81.02	80.72	80.89	0.15	1.98
	2	81.35	82.12	81.56	81.67	0.39	4.77
	3	79.65	80.02	79.73	79.80	0.19	2.38
	4	89.25	89.67	90.17	89.69	0.46	5.13
	5	79.21	79.05	78.91	79.06	0.15	1.89
阴性	1	21.13	20.95	21.07	21.05	0.09	4.27
	2	19.32	19.17	19.26	19.25	0.07	3.89

[0147] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:8	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	- 1:32	- 1:8
B	1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:64	1:16
C	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:128	1:32
D	1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:256	1:64
E	1:128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:512	混 凝
F	1:256	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:1024	
G	1:512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:2048	
H	1:1024	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:4096	

+ 阳性血清; - 阴性血清

图1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:8	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	- 1:32	- 1:8
B										0		
C	1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:64	1:16
D	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:128	1:32
E	1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:256	1:64
F	S11 1:8	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	1:512	混 凝
G												
H	1:16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:1024	
	1:32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:2048	
	1:64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:4096	

+ 阳性血清; - 阴性血清

图2

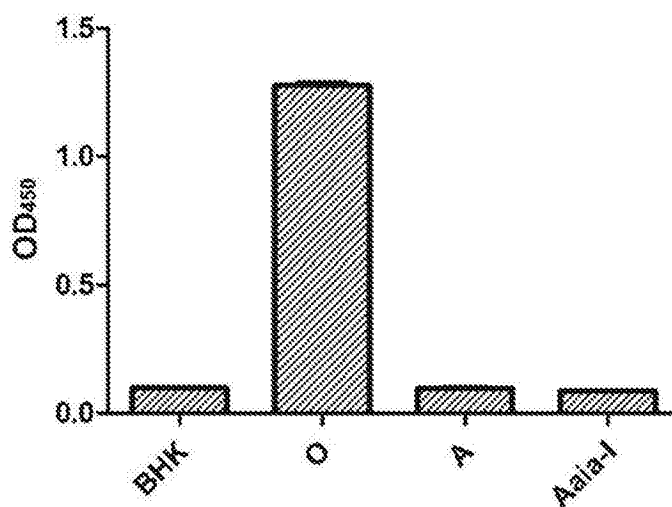


图3

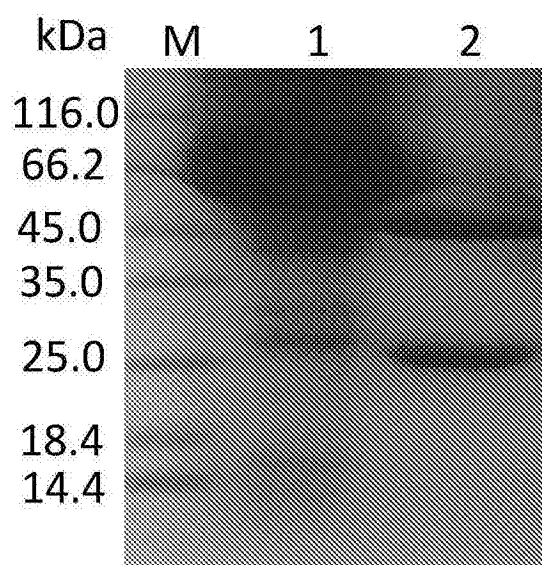


图4

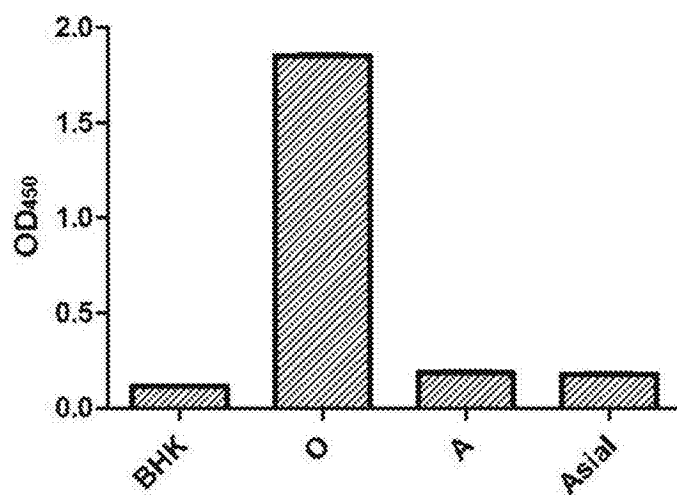


图5

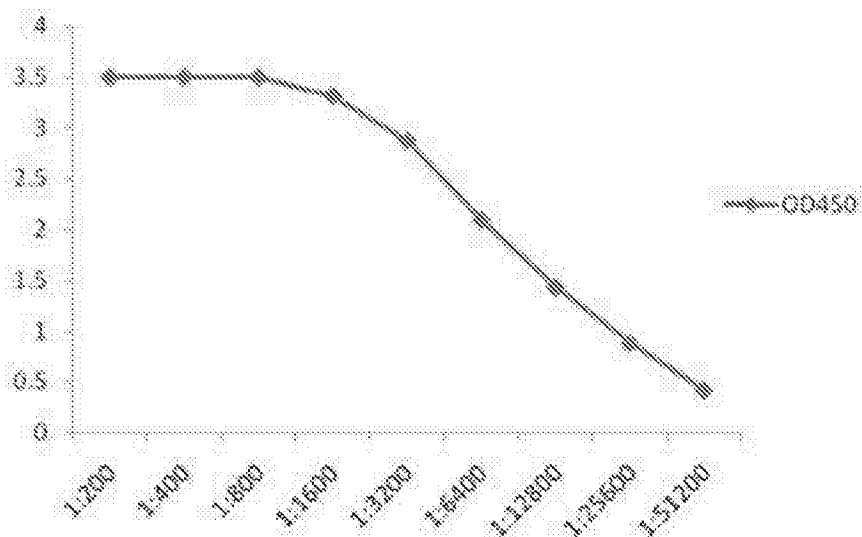


图6

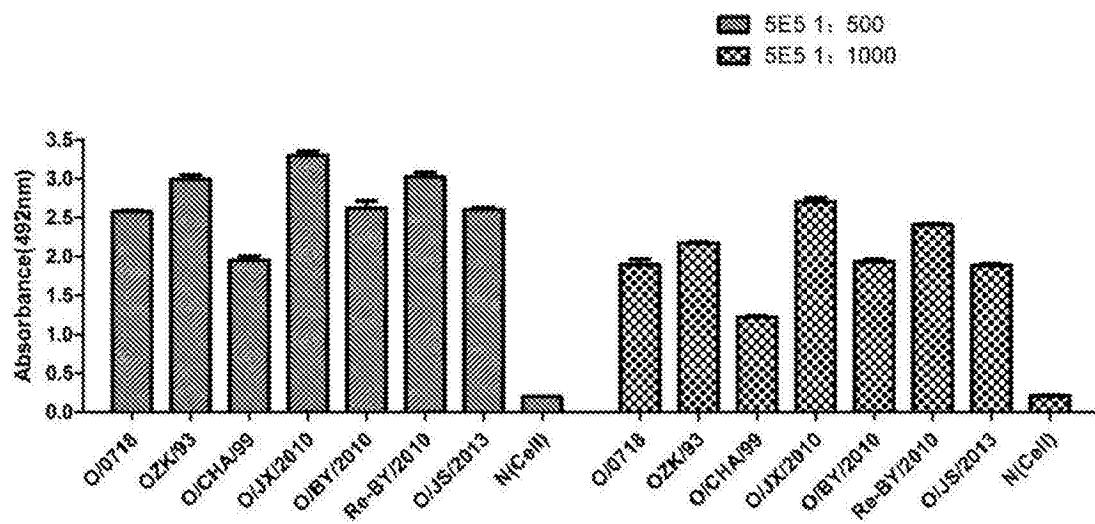


图7

专利名称(译)	一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN106405092A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201610776713.6	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	郑海学 田宏 杨帆 石正旺 刘华南 朱紫详 曹伟军 张克山 靳野 郭建宏 何继军 冯霞 刘湘涛		
发明人	郑海学 田宏 杨帆 石正旺 刘华南 朱紫详 曹伟军 张克山 靳野 郭建宏 何继军 冯霞 刘湘涛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531 C07K16/10		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K16/1009 G01N33/531 G01N33/577 G01N2333/09		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于型特异性单抗的O型口蹄疫病毒抗体固相竞争ELISA试剂盒。含有HRP标记的O型口蹄疫特异性单抗。本发明的试剂盒可用于O型口蹄疫病毒抗体水平监测。替代现有ELISA中口蹄疫兔抗、豚鼠抗血清及抗豚鼠酶标抗体，简化ELISA方法步骤，提高稳定性、大幅度缩短检测时间，从24h缩短至1.5小时内，突破了原来ELISA需要一抗和二抗等反应过程。

抗血清	阻断率 (%)	判定结果
A 型口蹄疫	<40	-
Asial 型口蹄疫	<40	-
猪瘟	<40	-
猪蓝耳	<40	-
羊口疮	<40	-
O 型口蹄疫(+)	>60	+