



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308678 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310212975. 6

(22) 申请日 2013. 05. 31

(71) 申请人 艾军

地址 650228 云南省昆明市滇池路 429 号

申请人 杨俊兴

聂福平

(72) 发明人 艾军 杨云庆 杨俊兴 聂福平

叶玲玲 周晓黎 花群义 成亚

李应国 董俊 尹尚莲

(74) 专利代理机构 昆明大百科专利事务所

53106

代理人 何健

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂及其制备、使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂及其制备、使用方法,包括分别放置的小反刍兽疫多抗,小反刍兽疫单抗。本发明的有益效果为,可快速进行临床样品中小反刍兽疫病毒检测,与现通用的小反刍兽疫病毒 PCR 核酸检测方法相比,检测环境条件要求低,检测时间短,检测通量高,检测费用低,可广泛应用于各个基层畜牧兽医站等相关检测机构。

1. 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂,包括单抗和多抗,其特征在于,单抗为小反刍兽疫单抗;多抗为小反刍兽疫多抗;该检测试剂还包括:稀释液、HRP 羊抗鼠二抗、小反刍兽疫病毒阳性对照、小反刍兽疫病毒阴性对照、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液、酶联免疫吸附板。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂,其特征在于,所述的稀释液配方为含有质量分数为 0.5%~3% 的 BSA 和质量分数为 0.05%~1.0% Tween-20 的 PBS。

3. 根据权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂,其特征在于,所述的 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含有质量分数为 0.05%~1.0% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.0~7.5 的 PBS。

4. 根据权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂,其特征在于,所述的终止液为 1mol/L~2mol/L H_2SO_4 溶液。

5. 根据权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂,其特征在于,所述的酶链免疫吸附板为高分子吸附板。

6. 如权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的制备方法,其特征在于,所述小反刍兽疫单抗制备方法包括:使用纯化的小反刍兽疫病毒免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞,将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得的小反刍兽疫单抗。

7. 如权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的制备方法,其特征在于,所述小反刍兽疫多抗通过以下方法制备:利用商品化的小反刍兽疫疫苗加等体积弗氏完全佐剂乳化和弗氏不完全佐剂免疫 18 月龄山羊,分离血清;依次用硫酸铵、ProteinG 柱进行纯化制备的小反刍兽疫多抗。

8. 如权利要求 1 所述的一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的使用方法,其特征在于,操作步骤为,

1) 试剂工作液的配置:

PBST 洗液:利用提供的 20 倍浓缩洗涤液,洗液中如出现沉淀,请 37℃ 加热使其溶解,用去离子水或蒸馏水进行 20 倍稀释,即为 PBST 洗液;

PPRV 多抗原液:在 PPRV 多抗冻干瓶中加入 500 μ L 去离子水,混匀,即为 PPRV 多抗原液,-20℃ 保存;

PPRV 多抗工作液:用包被液 1:50 稀释 PPRV 多抗原液,即为 PPRV 多抗工作液;

PPRV 单抗工作液:用提供的稀释液按 1:50 稀释,即为 PPRV 单抗工作液;

HRP 羊抗鼠二抗工作液:用提供的稀释液进行 1:100 稀释 HRP 羊抗鼠二抗,即为 HRP 羊抗鼠二抗工作液;

PPRV 阳性对照:在 PPRV 阳性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水,混匀,即为 PPRV 阳性对照工作液,-20℃ 保存;

PPRV 阴性对照:在 PPRV 阴性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水,混匀,即为 PPRV 阴性对照工作液,-20℃ 保存;

2) 操作步骤:

计算测试样品数量,取所需测试 ELISA 板条,进行试验;

(1) ELISA 板每孔加入 100 μ L PPRV 多抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 连续震荡作用 1h 或 4 $^{\circ}$ C 连续震荡包被过夜;

(2) 用 PBST 洗液, 每孔加 300 μ L, 洗板 3 次, 甩干;

(3) 每孔分别加入:

a: 加 50 μ L 稀释液到 A1, A2, B1, B2 孔;

b: 加 50 μ L 阳性对照到 C1, C2, D1, D2 孔;

c: 加 50 μ L 阴性对照到 E1, E2, F1, F2 孔;

d: 加 50 μ L 样品到测试孔中, 每样作一个重复;

e: 每孔加入 50 μ L PPRV 单抗工作液;

37 $^{\circ}$ C 连续震荡反应 1h;

(4) 用 PBST 洗液, 每孔加 300 μ L, 洗板 3 次, 甩干;

(5) 每孔加入 HRP 羊抗鼠二抗工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 连续震荡反应 1h;

(6) 用 PBST 洗液, 每孔加 300 μ L, 洗板 3 次, 甩干;

(7) 每孔加入底物液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光静置 10min ~ 15min;

(8) 加终止液 100 μ L, 在 15min 之内, 用 ELISA 仪, 在 450nm 波长下读数;

3) 结果判定:

(1) 计算公式:

$$PP = \text{样品孔平均 OD 值} / \text{阳性对照孔平均 OD 值} \times 100$$

(2) 判定标准:

PP	结果
≥ 12	阳性
< 12	阴性

注: 每份样品加样两孔, 在结果判定时如出现 1 孔 PP 值大于等于 12, 1 孔 PP 值小于 12 时, 需重复检测;

4) 结果判定成立条件

检测结果在下列条件同时成立时进行检测结果判定

(1) PPRV 阳性对照, OD 值大于 12;

(2) PPRV 阴性对照, PP 值小于 12;

(3) CC: HRP 羊抗鼠二抗对照, 孔 PP 值小于 12。

一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂及其制备、使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测领域,尤其涉及一种检测小反刍兽疫病毒的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 小反刍兽疫病毒(pestes des petits ruminants virus,PPRV)对绵羊和山羊的发病率和死亡率分别高达 100% 和 90%,在发展中国家引起严重的社会经济问题,被世界动物卫生组织(OIE)列为重要动物疾病。该病首次报道在科特迪瓦,现发生在撒哈拉以南和赤道以北的多数非洲国家,中东到土耳其的几乎全部国家,在印度、南亚、西亚也广泛传播。2007 年 7 月,该疫病首次传入我国西藏地区。

[0003] 小反刍兽疫病毒检测方法,世界动物卫生组织推荐使用的方法为琼脂凝胶免疫扩散试验、捕获酶联免疫吸附试验、核酸检测、对流免疫电泳、组织培养和病毒分离方法等。其中由于捕获 ELISA 法或夹心 ELISA 法,实验环境要求低,能同时进行大量样品的检测,因此在上述检测方法中尤为重要。

[0004] 小反刍兽疫病毒夹心 ELISA 检测试剂盒,国内尚未见商品化的相关产品。在国际上与之检测原理相关的为法国 BIRAD 实验室研制的小反刍兽疫病毒捕获 ELISA 试剂盒(Libeau. et al., 1994)。本专利研制的夹心 ELISA 检测方法,区别于 OIE 推介的捕获 ELISA 检测方法,但其检测灵敏性、特异性等指标均与捕获 ELISA 检测方法相同。参考文献: G. Libeau, A. Diallo, F. Colas, et al. Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. 1994, 300-304)。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题在于,利用免疫山羊制备小反刍兽疫多抗;研制针对小反刍兽疫核蛋白的特异性单抗;组装的试剂盒,检测指标达到国际认可的检测值。

[0006] 本发明采用如下技术方案实现。

[0007] 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂,包括单抗和多抗,本发明单抗为小反刍兽疫单抗;多抗为小反刍兽疫多抗;该检测试剂还包括:稀释液、HRP 羊抗鼠二抗、小反刍兽疫病毒阳性对照、小反刍兽疫病毒阴性对照、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液、酶联免疫吸附板。

[0008] 本发明所述的稀释液配方为含有质量分数为 0.5% ~ 3% 的 BSA 和质量分数为 0.05% ~ 1.0% Tween-20 的 PBS。

[0009] 本发明所述的 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含有质量分数为 0.05% ~ 1.0% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.0 ~ 7.5 的 PBS。

[0010] 本发明所述的终止液为 1mol/L ~ 2mol/L H_2SO_4 溶液。

[0011] 本发明所述的酶链免疫吸附板为高分子吸附板。

[0012] 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的制备方法,本发明小反刍兽疫单抗制备方法包括:使用纯化的小反刍兽疫病毒免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞,将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得的小反刍兽疫单抗。筛选过程为将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得杂交瘤细胞株 5B11,取杂交瘤细胞,注射小鼠腹腔,制备腹水,利用 ProteinG 柱纯化的 5B11 单抗。

[0013] 本发明所述小反刍兽疫多抗通过以下方法制备:利用商品化的小反刍兽疫疫苗加等体积弗氏完全佐剂(FCA)乳化和弗氏不完全佐剂(FIA)免疫 18 月龄山羊,分离血清;依次用硫酸铵(SAS)、ProteinG 柱进行纯化制备的小反刍兽疫多抗。

[0014] 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的使用方法,其操作步骤为,

[0015] 1) 试剂工作液的配置:

[0016] PBST 洗液:利用提供的 20 倍浓缩洗涤液,洗液中如出现沉淀,请 37℃ 加热使其溶解,用去离子水或蒸馏水进行 20 倍稀释,即为 PBST 洗液;

[0017] PPRV 多抗原液:在 PPRV 多抗冻干瓶中加入 500 μ L 去离子水,混匀,即为 PPRV 多抗原液,-20℃ 保存;

[0018] PPRV 多抗工作液:用包被液 1:50 稀释 PPRV 多抗原液(如:10 μ L 多克隆抗体原液+490 μ L 包被液),即为 PPRV 多抗工作液;

[0019] PPRV 单抗工作液:用提供的稀释液按 1:50 稀释,即为 PPRV 单抗工作液;

[0020] HRP 羊抗鼠二抗工作液:用提供的稀释液进行 1:100 稀释 HRP 羊抗鼠二抗,即为 HRP 羊抗鼠二抗工作液;

[0021] PPRV 阳性对照:在 PPRV 阳性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水,混匀,即为 PPRV 阳性对照工作液,-20℃ 保存;

[0022] PPRV 阴性对照:在 PPRV 阴性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水,混匀,即为 PPRV 阴性对照工作液,-20℃ 保存;

[0023] 2) 操作步骤:

[0024] 计算测试样品数量,取所需测试 ELISA 板条,进行试验;

[0025] (1)ELISA 板每孔加入 100 μ L PPRV 多抗工作液,37℃ 连续震荡作用 1h 或 4℃ 连续震荡包被过夜;

[0026] (2)用 PBST 洗液,每孔加 300 μ L,洗板 3 次,甩干;

[0027] (3)每孔分别加入:

[0028] a:加 50 μ L 稀释液到 A1, A2, B1, B2 孔;

[0029] b:加 50 μ L 阳性对照到 C1, C2, D1, D2 孔;

[0030] c:加 50 μ L 阴性对照到 E1, E2, F1, F2 孔;

[0031] d:加 50 μ L 样品到测试孔中,每样作一个重复;

[0032] e:每孔加入 50 μ L PPRV 单抗工作液;

[0033] 37℃ 连续震荡反应 1h;

[0034] (4)用 PBST 洗液,每孔加 300 μ L,洗板 3 次,甩干;

[0035] (5)每孔加入 HRP 羊抗鼠二抗工作液 100 μ L,37℃ 连续震荡反应 1h;

[0036] (6)用 PBST 洗液,每孔加 300 μ L,洗板 3 次,甩干;

[0037] (7)每孔加入底物液 100 μ L,37℃ 避光静置 10min ~ 15min;

[0038] (8) 加终止液 100 μ L, 在 15min 之内, 用 ELISA 仪, 在 450nm 波长下读数;

[0039] 3) 结果判定:

[0040] (1) 计算公式:

[0041] $PP = \text{样品孔平均 OD 值} / \text{阳性对照孔平均 OD 值} \times 100$

[0042] (2) 判定标准:

[0043]

PP	结果
≥ 12	阳性
< 12	阴性

[0044] 注: 每份样品加样两孔, 在结果判定时如出现 1 孔 PP 值大于等于 12, 1 孔 PP 值小于 12 时, 需重复检测;

[0045] 4) 结果判定成立条件

[0046] 检测结果在下列条件同时成立时进行检测结果判定

[0047] (1) PPRV 阳性对照 OD 值大于 12;

[0048] (2) PPRV 阴性对照 PP 值小于 12;

[0049] (3) CC (HRP 羊抗鼠二抗对照) 孔 PP 值小于 12。

[0050] 本发明的有益效果为, 可快速进行临床样品中小反刍兽疫病毒检测, 与现通用的小反刍兽疫病毒 PCR 核酸检测方法相比, 检测环境条件要求低, 检测时间短, 检测通量高, 检测费用低, 可广泛应用于各个基层畜牧兽医站等相关检测机构。

具体实施方式

[0051] 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂, 包括单抗和多抗, 本发明单抗为小反刍兽疫单抗; 多抗为小反刍兽疫多抗; 该检测试剂还包括: 稀释液、HRP 羊抗鼠二抗、小反刍兽疫病毒阳性对照、小反刍兽疫病毒阴性对照、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液、酶联免疫吸附板。

[0052] 本发明所述的稀释液配方为含有质量分数为 0.5% ~ 3% 的 BSA 和质量分数为 0.05% ~ 1.0% Tween-20 的 PBS。

[0053] 本发明所述的 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含有质量分数为 0.05% ~ 1.0% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.0 ~ 7.5 的 PBS。

[0054] 本发明所述的终止液为 1mol/L ~ 2mol/L H_2SO_4 溶液。

[0055] 本发明所述的酶链免疫吸附板为高分子吸附板。

[0056] 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的制备方法, 本发明小反刍兽疫单抗制备方法包括: 使用纯化的小反刍兽疫病毒免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠的脾细胞, 将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得的小反刍兽疫单抗。筛选过程为将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得杂交瘤细胞株 5B11, 取杂交瘤细胞, 注射小鼠腹腔, 制备腹水, 利用 ProteinG 柱纯化的 5B11 单抗。

[0057] 本发明所述小反刍兽疫多抗通过以下方法制备: 利用商品化的小反刍兽疫疫苗加

等体积弗氏完全佐剂(FCA)乳化和弗氏不完全佐剂(FIA)免疫 18 月龄山羊,分离血清;依次用硫酸铵(SAS)、ProteinG 柱进行纯化制备的小反刍兽疫多抗。

[0058] 一种检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂的使用方法,其操作步骤为,

[0059] 1) 试剂工作液的配置:

[0060] PBST 洗液:利用提供的 20 倍浓缩洗涤液,洗液中如出现沉淀,请 37℃加热使其溶解,用去离子水或蒸馏水进行 20 倍稀释,即为 PBST 洗液;

[0061] PPRV 多抗原液:在 PPRV 多抗冻干瓶中加入 500 μL 去离子水,混匀,即为 PPRV 多抗原液,-20℃保存;

[0062] PPRV 多抗工作液:用包被液 1:50 稀释 PPRV 多抗原液(如:10 μL 多克隆抗体原液+490 μL 包被液),即为 PPRV 多抗工作液;

[0063] PPRV 单抗工作液:用提供的稀释液按 1:50 稀释,即为 PPRV 单抗工作液;

[0064] HRP 羊抗鼠二抗工作液:用提供的稀释液进行 1:100 稀释 HRP 羊抗鼠二抗,即为 HRP 羊抗鼠二抗工作液;

[0065] PPRV 阳性对照:在 PPRV 阳性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水,混匀,即为 PPRV 阳性对照工作液,-20℃保存;

[0066] PPRV 阴性对照:在 PPRV 阴性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水,混匀,即为 PPRV 阴性对照工作液,-20℃保存;

[0067] 2) 操作步骤:

[0068] 计算测试样品数量,取所需测试 ELISA 板条,进行试验;

[0069] (1)ELISA 板每孔加入 100 μL PPRV 多抗工作液,37℃连续震荡作用 1h 或 4℃连续震荡包被过夜;

[0070] (2)用 PBST 洗液,每孔加 300 μL,洗板 3 次,甩干;

[0071] (3)每孔分别加入:

[0072] a:加 50 μL 稀释液到 A1, A2, B1, B2 孔;

[0073] b:加 50 μL 阳性对照到 C1, C2, D1, D2 孔;

[0074] c:加 50 μL 阴性对照到 E1, E2, F1, F2 孔;

[0075] d:加 50 μL 样品到测试孔中,每样作一个重复;

[0076] e:每孔加入 50 μL PPRV 单抗工作液;

[0077] 37℃连续震荡反应 1h;

[0078] (4)用 PBST 洗液,每孔加 300 μL,洗板 3 次,甩干;

[0079] (5)每孔加入 HRP 羊抗鼠二抗工作液 100 μL,37℃连续震荡反应 1h;

[0080] (6)用 PBST 洗液,每孔加 300 μL,洗板 3 次,甩干;

[0081] (7)每孔加入底物液 100 μL,37℃避光静置 10min ~ 15min;

[0082] (8)加终止液 100 μL,在 15min 之内,用 ELISA 仪,在 450nm 波长下读数;

[0083] 3) 结果判定:

[0084] (1) 计算公式:

[0085] $PP = \text{样品孔平均 OD 值} / \text{阳性对照孔平均 OD 值} \times 100$

[0086] (2) 判定标准:

[0087]

PP	结果
≥ 12	阳性
< 12	阴性

[0088] 注：每份样品加样两孔，在结果判定时如出现 1 孔 PP 值大于等于 12，1 孔 PP 值小于 12 时，需重复检测；

[0089] 4) 结果判定成立条件

[0090] 检测结果在下列条件同时成立时进行检测结果判定

[0091] (1) PPRV 阳性对照 OD 值大于 12；

[0092] (2) PPRV 阴性对照 PP 值小于 12；

[0093] (3) CC (HRP 羊抗鼠二抗对照) 孔 PP 值小于 12。

[0094] 本发明的检测试剂可以以试剂盒的形式组装，本发明采用夹心 ELISA 法检测血液、唾液、分泌物中小反刍兽疫病毒，组装后的产品可用于小反刍兽疫病毒的快速检测和流行病学调查。

[0095] 实施例：

[0096] 本发明组装的试剂盒包括有：小反刍兽疫单抗、小反刍兽疫多抗、稀释液、包被液、HRP 标记的羊抗鼠二抗、小反刍兽疫病毒阳性对照、小反刍兽疫病毒阴性对照、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液、酶联免疫吸附板。其中稀释液配方为含 0.5%BSA,0.05%Tween-20 的 PBS；20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 的 PBS；终止液为 1mol/L H_2SO_4 溶液。

[0097] 根据本发明技术方案内容准备制成的产品——检测小反刍兽疫病毒的夹心 ELISA 检测试剂盒，参考体积或数量如下：

试剂盒主要组成部分名称	体积或数量
小反刍兽疫多抗	1 瓶, 相当于 0.5mL
小反刍兽疫单抗	0.3mL
稀释液	50 mL
包被液	25mL
PPRV 阳性对照	1 瓶, 相当于 1.5mL
PPRV 阴性对照	1 瓶, 相当于 1.5mL
[0098] HRP 羊抗鼠二抗	0.3mL
20 倍浓缩洗涤液	60mL
底物液	25 mL
终止液	25 mL
酶联免疫吸附板	2 块
说明书	1 份
封板纸	6 张

[0099] 以下提供制备上述试剂盒的具体实例：

[0100] 1. 制备小反刍兽疫病毒多抗：

[0101] 商品化的小反刍兽疫疫苗加等体积弗氏完全佐剂(FCA)乳化和弗氏不完全佐剂(FIA)乳化,先后免疫18月龄山羊三次,第一次免疫为FCA和病毒混合物,第二、第三次免疫为FIA和病毒混合物;在末次免疫结束后的第7天,颈静脉取少量血,分离血清,采用竞争ELISA分析血清中抗体效价,如检测为阳性,则颈部大量取血,分离血清。

[0102] 取所述小反刍兽疫阳性血清20ml,加生理盐水20ml,再逐滴加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液10ml,使成20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,边加边搅拌,充分混合后,静置30min;3000r/min离心20min,弃去沉淀,以除去纤维蛋白;在上清液中再加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液30ml,使成50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,充分混合,静置30min;3000r/min离心20min,弃上清;于沉淀中加20ml生理盐水,使之溶解,再加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和溶液10ml,使成33% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,充分混合后,静置30min;3000r/min离心20min,弃上清,以除去白蛋白。重复步骤5,2至3次;用10ml(原体积的1/2)生理盐水溶解沉淀,装入透析袋;透析除盐,在常水或者缓冲液中透析过夜,再在生理盐水中于4℃透析24h,中间换液数次;以1%BaCl₂检查透析液中的 SO_4^{2-} 或以纳氏试剂检查 NH_4^+ 离子(取3~4ml透析液,加试剂1-2滴,出现砖红色即认为有 NH_4^+ 离子存在),直至无 SO_4^{2-} 或 NH_4^+ 出现为止;离心去沉淀(去除杂蛋白),上清液即为粗提IgG。

[0103] 取粗提IgG,4℃8000rpm离心,取上清,利用ProteinG柱进行纯化,纯化后,稀释成0.32mg/mL4℃进行保存。

[0104] 2. 制备小反刍兽疫单抗

[0105] 用纯化的小反刍兽疫病毒,分别加等体积弗氏完全佐剂(FCA)乳化和弗氏不完全

佐剂(FIA)乳化,先后免疫 BALB/c 小鼠三次;取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50%聚乙二醇(MW1500)融合剂下融合,HAT 培养基筛选杂交瘤细胞,用间接 ELISA 方法检测分泌抗 PPRV 核蛋白的阳性孔;用有限稀释法进行细胞克隆,经间接 ELISA 筛选阳性克隆,获得能稳定传代并分泌抗 PPRV N 蛋白的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞。用间接 ELISA 方法鉴定制备的单克隆抗体仅与小反刍兽疫核蛋白抗原具有特异性免疫反应,而与其它相关病毒(如 RPV、BTV、CDV、AKV、BVDV 等)没有任何免疫反应。

[0106] 3. 制备小反刍兽疫病毒阳性对照

[0107] Vero 细胞长成单层后接种小反刍兽疫 Nigeria75/1 疫苗株,在细胞病变达 75% 以上时收获病毒,反复冻融 3 次后以 8000rpm 离心 30 分钟,取上清液,冻干保存。

[0108] 4. 制备小反刍兽疫病毒阴性对照

[0109] Vero 细胞长成单层,反复冻融 3,以 8000rpm 离心 30 分钟,取上清液,冻干保存。

[0110] 5. 包被缓冲液:0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液(NaHCO_3 1.465g、 Na_2CO_3 0.795g 或 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1.2g、水 500mL)。溶解后过滤除菌,置于 4℃ 冰箱,一周内使用。

[0111] 6、小反刍兽疫单抗制备:取 5B11 杂交瘤细胞株,利用 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基进行培养,收集细胞上清,8000rpm 离心,取上清利用 ProteinG 柱进行纯化,纯化后,稀释成 0.7mg/mL 进行保存。

[0112] 7、底物液:TIANGEN (中国),可溶性单组份 TMB (货号:PA107-01)。

[0113] 8、20 倍浓缩洗涤液、稀释液、底物液、终止液的优选:本发明通过试验,选定如下最佳的洗涤液、稀释液,终止液配方。

[0114] 20 倍浓缩洗涤液配方:NaCl160g, KH_2PO_4 4.8g, Na_2HPO_4 29g, KCl4g, Tween-2010mL, 蒸馏水 1000mL,充分溶解,过滤除菌后分装。用时作 20 倍稀释。

[0115] 9、稀释液配方:NaCl8g, KH_2PO_4 0.24g, Na_2HPO_4 1.44g, KCl0.2g, 蒸馏水 1000mL,充分溶解,加入 1% 山羊 PPRV 阴性血清,3%BSA,过滤除菌后分装。

[0116] 10、终止液:将 10.87mL 初始浓度为 95%~98% 的硫酸缓慢加入到 89.13mL 的去离子水中混匀,即为终止液。

[0117] 11. 羊抗鼠二抗:采用商品化的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(USA, KPL 公司,货号 074-1806,1.0mg),作 1:50 稀释。

[0118] 12. 酶联免疫吸附板:选用商品化的 Costar92592 酶联免疫吸附板(Corning Incorporated, Lot No. 14609006)。

[0119] 13. 试剂盒的组装:将按上述方法制备好的小反刍兽疫多抗、单抗、羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物、稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液、小反刍兽疫病毒阳性对照、小反刍兽疫病毒阴性对照定量分装,酶联免疫吸附板,分别贴上标签与说明。1 份详细的试剂盒使用操作说明书。6 张贴板纸。装入专用的试剂盒外壳内,外壳上贴上试剂盒标签。

[0120] 14. 试剂盒中各种试液的配制与分装

	试剂盒主要组成部分名称	体积或数量
	小反刍兽疫多抗	1 瓶, 相当于 0.5mL
	小反刍兽疫单克隆抗体	0.3mL
	稀释液	50 mL
	包被液	25mL
	PPRV 阳性对照	2 瓶, 相当于 1.5mL
	PPRV 阴性对照	2 瓶, 相当于 1.5mL
[0121]	HRP 羊抗鼠二抗	0.3mL
	20 倍浓缩洗涤液	60mL
	底物液	25 mL
	终止液	25 mL
	酶联免疫吸附板	2 块
	说明书	1 份
	封板纸	6 张

[0122] 使用上述试剂盒进行检测操作的程序如下：

[0123] 1. 试剂工作液的配置

[0124] PBST 洗液：利用试剂盒提供的 20× 洗液（洗液中如出现沉淀，请 37℃ 加热使其溶解），用去离子水或蒸馏水进行 20 倍稀释，即为 PBST 洗液。

[0125] PPRV 多抗原液：在 PPRV 多抗冻干瓶中加入 500 μL 去离子水，混匀，即为 PPRV 多抗原液，-20℃ 保存。

[0126] PPRV 多抗工作液：用包被液 1:50 稀释 PPRV 多抗原液（如：10 μL 多克隆抗体原液 + 490 μL 包被液），即为 PPRV 多抗工作液。

[0127] PPRV 单抗工作液：用试剂盒提供的稀释液按 1:50 稀释（如：10 μL 单抗 + 490 μL 试剂盒提供稀释液），即为 PPRV 单抗工作液。

[0128] HRP 羊抗鼠二抗工作液：用试剂盒提供的稀释液进行 1:100 稀释 HRP 羊抗鼠二抗（如：10 μL HRP 羊抗鼠二抗 + 990 μL 稀释液），即为 HRP 羊抗鼠二抗工作液。

[0129] PPRV 阳性对照：在 PPRV 阳性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水，混匀，即为 PPRV 阳性对照工作液，-20℃ 保存。

[0130] PPRV 阴性对照：在 PPRV 阴性对照冻干瓶中加入 0.75mL 去离子水，混匀，即为 PPRV 阴性对照工作液，-20℃ 保存。

[0131] 2. 操作步骤：

[0132] 计算测试样品数量，取所需测试 ELISA 板条，进行试验。

[0133] (1) ELISA 板每孔加入 100 μL PPRV 多抗工作液，37℃ 连续震荡作用 1h（或 4℃ 连续震荡包被过夜）。说明：连续震荡非常重要！

- [0134] (2) 用 PBST 洗液, 每孔加 300 μ L, 洗板 3 次, 甩干。
- [0135] (3) 每孔分别加入 :
- [0136] a : 加 50 μ L 稀释液到 A1, A2, B1, B2 孔 ;
- [0137] b : 加 50 μ L 阳性对照到 C1, C2, D1, D2 孔 ;
- [0138] c : 加 50 μ L 阴性对照到 E1, E2, F1, F2 孔 ;
- [0139] d : 加 50 μ L 样品到测试孔中, 每样作一个重复 ;
- [0140] e : 每孔加入 50 μ L PPRV 单抗工作液。
- [0141] 37 $^{\circ}$ C 连续震荡反应 1h ;
- [0142] (4) 用 PBST 洗液, 每孔加 300 μ L, 洗板 3 次, 甩干。
- [0143] (5) 每孔加入 HRP 羊抗鼠二抗工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 连续震荡反应 1h。说明 : 连续震荡非常重要 !
- [0144] (6) 用 PBST 洗液, 每孔加 300 μ L, 洗板 3 次, 甩干。
- [0145] (7) 每孔加入底物液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光静置 10min ~ 15min。
- [0146] (8) 加终止液 100 μ L, 在 15min 之内, 用 ELISA 仪, 在 450nm 波长下读数。
- [0147] 3. 结果判定 :
- [0148] (1) 计算公式 :
- [0149] $PP = \text{样品孔平均 OD 值} / \text{阳性对照孔平均 OD 值} \times 100$
- [0150] (2) 判定标准 :
- [0151]

PP	结果
≥ 12	阳性
< 12	阴性

[0152] 注 : 每份样品加样两孔, 在结果判定时如出现 1 孔 PP 值大于等于 12, 1 孔 PP 值小于 12 时, 需重复检测。

[0153] 4. 结果判定成立条件

[0154] 试剂盒检测结果在下列条件同时成立时进行检测结果判定

[0155] (1) PPRV 阳性对照 OD 值大于 12 ;

[0156] (2) PPRV 阴性对照 PP 值小于 12 ;

[0157] (3) CC (HRP 羊抗鼠二抗对照) 孔 PP 值小于 12。

[0158] 5. 注意事项

[0159] (1) PPRV 多克隆抗体冻干后吸附于瓶底或瓶底周围, 易溶于去离子水, 使用时加入去离子水, 混匀即可。溶解抗原 -20 $^{\circ}$ C 保存, 反复冻融至少 30 次, 不影响实验结果。

[0160] (2) 实验中所用震荡器震荡速度以 ELISA 板不溢出液体为准, 约 300rpm/min。

[0161] 试剂盒阳性判定值的确定 : 按照上述试剂盒的检测程序, 采用 OIE (2010)《小反刍兽疫病毒中和试验》检测方法确认的 42 份阴性样品和 10 份阳性样品, 进行夹心 ELISA 试验后, 结果所有阳性样品的 $PP \geq 12\%$, 所有阴性血清 $PP < 12\%$ 。因此, 获得 ELISA 阴性判定值 (cut-off value) 为 : $PP < 12\%$ 被检样品为 PPRV 病毒阴性 ; $PP \geq 12\%$ 被检样品为 PPRV 病

毒阳性。

[0162] 试剂盒的临床样品检测与应用以及试剂盒敏感性、特异性的评价：按照上述试剂盒的检测程序，用 OIE（2010）《小反刍兽疫病毒中和试验》检测方法确认的 30 份阳性样品和 30 份阴性样品，进行夹心 ELISA 试验。统计获得试剂盒的特异性为 97%（阴性结果数 / 阴性样品总数 = 29/30），敏感性为 90%（阳性结果数 / 阳性样品总数 = 27/30），本试剂盒的特异性、敏感性为良好。

[0163] 应用上述试剂盒检测西藏地区采集 150 份临床样品，检出阳性 10 份，阴性 140 份，同时用国际公认的法国 CIRAD 实验室研制的捕获 ELISA 试剂进行检测，发现本专利所发明检测试剂盒与 CIRAD 发明检测试剂盒检测结果均相同。

[0164] 上述具体实施例的实验数据表明，本发明的小反刍兽疫病毒夹心酶联免疫吸附试验（夹心 ELISA）试剂盒特异性强，敏感性高，适用于小反刍兽疫的快速检测和流行病学调查。

[0165] 以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到的变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0166] 本发明技术方案中：名称解释如下：

[0167] ELISA：酶联免疫吸附分析；

[0168] HRP：辣根过氧化物酶；

[0169] BSA：牛血清白蛋白；

[0170] PBS：磷酸盐缓冲液；

[0171] Tween-20：吐温 -20；

[0172] BALB/c：一种商品化的近交系小鼠；

[0173] SP2/0：商品化骨髓瘤细胞；

[0174] 5B11：分泌小反刍兽疫单抗的杂交瘤细胞株，由商品化的 SP/0 细胞和商品化的小鼠脾细胞融合而获得；

[0175] ProteinG 柱：蛋白 G 柱；

[0176] FCA：弗氏完全佐剂；

[0177] FIA：弗氏不完全佐剂；

[0178] SAS：硫酸铵；

[0179] PBST：含吐温 -20 的磷酸盐缓冲液；

[0180] PPRV：商品化的小反刍兽疫弱毒疫苗株；

[0181] Vero 细胞长成单层：非洲绿猴肾细胞在培养瓶中生长，形成覆盖细胞瓶的单层；

[0182] Nigeria75/1：小反刍兽疫一种病毒株；

[0183] IMDM 培养基：一种细胞培养基；

[0184] TMB：3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺；

[0185] OD 值：光密度。

专利名称(译)	一种检测小反刍兽疫病毒的夹心ELISA检测试剂及其制备、使用方法		
公开(公告)号	CN103308678A	公开(公告)日	2013-09-18
申请号	CN201310212975.6	申请日	2013-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	艾军 聂福平		
申请(专利权)人(译)	艾军 杨俊兴 聂福平		
当前申请(专利权)人(译)	艾军 杨俊兴 聂福平		
[标]发明人	艾军 杨云庆 杨俊兴 聂福平 叶玲玲 周晓黎 花群义 成亚 李应国 董俊 尹尚莲		
发明人	艾军 杨云庆 杨俊兴 聂福平 叶玲玲 周晓黎 花群义 成亚 李应国 董俊 尹尚莲		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	何健		
其他公开文献	CN103308678B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测小反刍兽疫病毒的夹心ELISA检测试剂及其制备、使用方法，包括分别放置的小反刍兽疫多抗，小反刍兽疫单抗。本发明的有益效果为，可快速进行临床样品中小反刍兽疫病毒检测，与现通用的小反刍兽疫病毒PCR核酸检测方法相比，检测环境条件要求低，检测时间短，检测通量高，检测费用低，可广泛应用于各个基层畜牧兽医站等相关检测机构。

试剂盒主要组成部分名称	体积或数量
小反刍兽疫多抗	1 瓶, 相当于 0.5mL
小反刍兽疫单抗	0.3mL
稀释液	50 mL
包被液	25mL
PPRV 阳性对照	1 瓶, 相当于 1.5mL
PPRV 阴性对照	1 瓶, 相当于 1.5mL
HRP 羊抗鼠二抗	0.3mL
20 倍浓缩洗涤液	60mL
底物液	25 mL
终止液	25 mL
酶联免疫吸附板	2 块
说明书	1 份
封板纸	6 张