



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104991057 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510380894. 6

(22) 申请日 2015. 07. 02

(71) 申请人 山东省滨州畜牧兽医研究院

地址 256600 山东省滨州市黄河二路 169 号

(72) 发明人 王玉茂 沈志强 武玉香 唐世云

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公司 37205

代理人 徐槐

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

权利要求书2页 说明书4页

### (54) 发明名称

一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒及其制备方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒及其制备方法,步骤包括:(1)阿留申病毒培养;(2)阿留申病毒纯化;(3)兔抗水貂二抗的制备及酶标二抗的制备;(4)快速检测试剂盒的制备。本发明可以快速、灵敏、准确的检测水貂阿留申病毒抗体,克服了国内检测水貂阿留申抗体主要以双流向电泳法和 PCR 法的问题。

1. 一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

(1) 阿留申病毒培养:

将 10 日龄仔貂,取出睾丸和肾脏制备细胞悬液,细胞密度为  $1\sim 5\times 10^4$  个 /ml,37℃ 培养,营养液采用 DMEM 培育基,按 DMEM 培育基的体积加入 5% 新生牛血清,细胞经 4 天长成单层后,弃去营养液,加入除菌的连续通过貂体的第三代反应毒,接毒量为 1%,加入维持液,维持液采用不加血清的 DMEM 培养液,接毒后一周出现病变并收集病毒,冷冻冻融三次待用;

(2) 阿留申病毒纯化:

称取凝胶干粉 G-200 10-12 克,缓慢地倒入 20 倍凝胶体积的蒸馏水中,在室温条件下浸泡三小时或在沸水中浸泡 4-5 小时,轻轻搅拌,在室温静止 30 分钟,将上层液体倾出,再用蒸馏水浮洗 4 次,然后装柱加样;收集时将每管洗脱液依次排列,逐份用 S P A 菌体 (+) 血清试剂作特异性测定,根据特异性和峰值收集,第一峰为纯化的阿留申病毒蛋白,第二峰为非特异蛋白;经 s e p h a d e x-G 200 分离后,将样品装入透析袋中、用聚乙二醇 20000 浓缩成要求的蛋白含量、透析、平衡、分装、4℃ 保存,即得纯化的病毒抗原。

2. 根据权利要求 1 所述水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述快速检测试剂盒中兔抗水貂二抗的制备及酶标二抗的制备:

将水貂血清用辛酸-硫酸铵法纯化,将纯化血清与 501 佐剂按体积比 1:0.5-1.5 的比例混合,对 2-3 月龄新西兰白兔进行免疫,腿部肌肉注射,1mg/只,以后每隔两周免疫一次,免疫剂量、部位同上;5 免后心脏采血,即得到兔抗水貂二抗,然后用蛋白 A 柱纯化兔血清,计算蛋白浓度,用过碘酸钠氧化法制备酶标二抗。

3. 根据权利要求 2 所述水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述快速检测试剂盒中用过碘酸钠氧化法制备酶标二抗的具体步骤如下:

称取 10mg 辣根过氧化物酶,溶于 1mL 纯水中;加入 1mL 新鲜配制的 0.06mol/L 高碘酸钠溶液,室温避光搅拌 30min;加入 1mL 溶解了 5mg 纯化后的兔抗水貂二抗的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,室温避光轻搅 2-3h;加新鲜配制的 0.2mL 5mg/mL 硼氢化钠,4℃ 放置 2h,以稳定结合物;再移入透析袋,于 pH 为 7.2 的 PBS 透析过夜,-20℃ 保存备用。

4. 根据权利要求 2 所述水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于,将水貂血清用辛酸-硫酸铵法纯化,将纯化的血清与 501 佐剂按体积比 1:1 的比例混合。

5. 根据权利要求 1 所述水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述快速检测试剂盒中酶标板的制备:

在聚乙烯微孔板上预包被纯化的病毒抗原,该包被使用 pH 为 9.6 的 10mM 碳酸盐缓冲液,在 4℃ 下包被过夜;然后使用 PBST 洗涤两次,PBST 为 10mMPBS+0.05%Tween20,再加入封闭液,封闭液为 10mM PBS+2% 牛血清白蛋白,BSA,37℃ 封闭 2 小时,干燥后真空抽干包装成成品试剂盒酶标板。

6. 根据权利要求 1 所述水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述快速检测试剂盒中其他成分的配置:

A) 酶标二抗:用酶稀释液(10mM PBS+1% 牛血清白蛋白 +0.05%Tween20)配制成 1:500

( $V_{\text{酶标二抗}}:V_{\text{酶稀释液}}$ ) 的使用浓度；

- B) 样品稀释液 :10mM PBS ;
- C) 阳性对照 :10mM PBS+ 阳性血清 ;
- D) 阴性对照 :10mM PBS+ 阴性血清 ;
- E) 显示剂 A 液 :0.5% 过氧化物尿素 +5mM PBS ;
- F) 显示剂 B 液 :1% 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 +5mM PBS ;
- G) 终止液 :5mM 硫酸 ;
- H) 20× 浓缩洗涤液 :1M PBS+0.2%Tween20。

7. 如权利要求 1-6 任一项所述的制备方法制得的水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒。

8. 如权利要求 7 所述的水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒在水貂阿留申病毒抗体的检测方面的应用。

## 一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒及其制备方法,属于免疫检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 水貂阿留申是由水貂阿留申病毒引起的一种急性、进行性的传染病。随着时间的延长,隐性变成显性,给貂群造成严重损失,因此建立定期净化制度是非常必要的。

[0003] 目前,水貂阿留申病毒抗体的检测方法有双流向电泳法和 PCR 法,双流向电泳法需要双流向免疫电泳抗原,抗原必须在  $-20^{\circ}\text{C}$  以下保存,保存期不足一年,保存条件苛刻,检测结果的假阳性较高;PCR 法需要昂贵的 PCR 检测仪,并且检测时间长,3-5 小时,并且需要专业的技术人员操作,与水貂阿留申病双流向电泳相比,本发明试剂盒可以快速、灵敏、准确的检测水貂阿留申病毒抗体水平,保存期长,灵敏度更高;与 PCR 检测试剂盒相比,此试剂盒不需要阿贵的 PCR 仪,成本低,检测时间短,易于操作。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒及其制备方法,为快速、灵敏、准确的检测水貂阿留申病毒抗体减少了时间和成本。

[0005] 本发明是通过下述的技术方案来实现的:

一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

(1) 阿留申病毒培养:

将 10 日龄仔貂,取出睾丸和肾脏制备细胞悬液,细胞密度为  $1\sim 5\times 10^4$  个 /ml,  $37^{\circ}\text{C}$  培养,营养液采用 DMEM 培养基(上海西宝生物科技有限公司,型号为 R10-013-CV),按 DMEM 培养基的体积加入 5% 新生牛血清(天津康源生物技术有限公司),细胞经 4 天长成单层后,弃去营养液,加入除菌的连续通过貂体的第三代反应毒,接毒量为 1%,加入维持液,维持液采用不加血清的 DMEM 培养液,接毒后一周出现病变并收集病毒,冷冻冻融三次待用;

(2) 阿留申病毒纯化:

称取凝胶干粉 G-200(上海弘顺生物科技有限公司,型号为 GR-F1031) 10-12 克,缓慢地倒入 20 倍凝胶体积的蒸馏水中,在室温条件下浸泡三小时或在沸水中浸泡 4-5 小时,轻轻搅拌,在室温静止 30 分钟,将上层液体倾出,再用蒸馏水浮洗 4 次,然后装柱加样;收集时将每管洗脱液依次排列,逐份用 S P A 菌体 (+) 血清试剂作特异性测定,根据特异性和峰值收集,第一峰为纯化的阿留申病毒蛋白,第二峰为非特异蛋白;经 s e p h a d e x-G 200 分离后,将样品装入透析袋中、用聚乙二醇 20000(济南永泰化工有限公司)浓缩成要求的蛋白含量、透析、平衡、分装、 $4^{\circ}\text{C}$  保存,即得纯化的病毒抗原;

(3) 兔抗水貂二抗的制备及酶标二抗的制备

将水貂血清用辛酸-硫酸铵法纯化,将纯化的血清与 501 佐剂按体积比 1:0.5-1.5 的

比例混合,优选的体积比为 1:1,对 2-3 月龄新西兰白兔进行免疫,腿部肌肉注射,1mg/只,以后每隔两周免疫一次,免疫剂量、部位同上;5 免后心脏采血,即得到兔抗水貂二抗,然后用蛋白 A 柱纯化兔血清,计算蛋白浓度,用过碘酸钠氧化法制备酶标二抗,具体步骤如下:称取 10mg 辣根过氧化物酶(Sigma 公司,HRP),溶于 1mL 纯水中;加入 1mL 新鲜配制的 0.06mol/L 高碘酸钠溶液(北京化学试剂公司),室温避光搅拌 30min;加入 1mL 溶解了 5mg 纯化后的兔抗水貂二抗的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,室温避光轻搅 2-3h;加新鲜配制的 0.2mL 5mg/mL 硼氢化钠(北京化学试剂公司),4℃放置 2h,以稳定结合物;再移入透析袋,于 pH 为 7.2 的 PBS 透析过夜,-20℃保存备用;

#### (4) 快速检测试剂盒的制备

##### ①酶标板的制备:

在聚乙烯微孔板(上海生工)上预包被纯化的病毒抗原,该包被使用 pH 为 9.6 的 10mM 碳酸盐缓冲液(北京化学试剂公司),在 4℃下包被过夜;然后使用 PBST 洗涤两次,PBST 为 10mMPBS+0.05%Tween20,再加入封闭液,封闭液为 10mM PBS+2%牛血清白蛋白,BSA,37℃封闭 2 小时,干燥后真空抽干包装成成品试剂盒酶标板;

##### ②试剂盒其他成分的配置:

A) 酶标二抗:用酶稀释液(10mM PBS+1%牛血清白蛋白+0.05%Tween20)配制成 1:500 ( $V_{\text{酶标二抗}}:V_{\text{酶稀释液}}$ ) 的使用浓度;

B) 样品稀释液:10mM PBS;

C) 阳性对照:10mM PBS+ 阳性血清;

D) 阴性对照:10mM PBS+ 阴性血清;

E) 显示剂 A 液:0.5% 过氧化物尿素 +5mM PBS;

F) 显示剂 B 液:1% 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 +5mM PBS;

G) 终止液:5mM 硫酸;

H) 20× 浓缩洗涤液:1M PBS+0.2%Tween20。

[0006] 本发明的保护范围还包括制备的水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒及其应用。

[0007] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

本发明可以快速、灵敏、准确的检测水貂阿留申病毒抗体,克服了国内检测水貂阿留申抗体主要以双流向电泳法和 PCR 法的问题。

## 具体实施方式

[0008] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0009] 实施例 1 一种水貂阿留申病毒抗体 ELISA 快速检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

#### (1) 阿留申病毒培养:

将 10 日龄仔貂,取出睾丸和肾脏制备细胞悬液,细胞密度为  $1\sim 5\times 10^4$  个 /ml,37℃培

养,营养液采用 DMEM 培养基(上海西宝生物科技有限公司,型号为 R10-013-CV),按 DMEM 培养基的体积加入 5% 新生牛血清(天津康源生物技术有限公司),细胞经 4 天长成单层后,弃去营养液,加入除菌的连续通过貂体的第三代反应毒,接毒量为 1%,加入维持液,维持液采用不加血清的 DMEM 培养液,接毒后一周出现病变并收集病毒,冷冻冻融三次待用;

#### (2) 阿留申病毒纯化:

称取凝胶干粉 G-200(上海弘顺生物科技有限公司,型号为 GR-F1031)10-12 克,缓慢地倒入 20 倍凝胶体积的蒸馏水中,在室温条件下浸泡三小时或在沸水中浸泡 4-5 小时,轻轻搅拌,在室温静止 30 分钟,将上层液体倾出,再用蒸馏水浮洗 4 次,然后装柱加样;收集时将每管洗脱液依次排列,逐份用 S P A 菌体 (+) 血清试剂作特异性测定,根据特异性和峰值收集,第一峰为纯化的阿留申病毒蛋白,第二峰为非特异蛋白;经 sephadex-G 200 分离后,将样品装入透析袋中、用聚乙二醇 20000(济南永泰化工有限公司)浓缩成要求的蛋白含量、透析、平衡、分装、4℃ 保存,即得纯化的病毒抗原;

#### (3) 兔抗水貂二抗的制备及酶标二抗的制备

将水貂血清用辛酸-硫酸铵法纯化,将纯化血清与 501 佐剂按体积比 1:0.5-1.5 的比例混合,对 2-3 月龄新西兰白兔进行免疫,腿部肌肉注射,1mg/只,以后每隔两周免疫一次,免疫剂量、部位同上;5 免后心脏采血,即得到兔抗水貂二抗,然后用蛋白 A 柱纯化兔血清,计算蛋白浓度,用过碘酸钠氧化法制备酶标二抗;

#### (4) 快速检测试剂盒的制备

##### ① 酶标板的制备:

在聚乙烯微孔板(上海生工)上预包被纯化的病毒抗原,该包被使用 pH 为 9.6 的 10mM 碳酸盐缓冲液(北京化学试剂公司),在 4℃ 下包被过夜;然后使用 PBST 洗涤两次,PBST 为 10mMPBS+0.05%Tween20,再加入封闭液,封闭液为 10mM PBS+2% 牛血清白蛋白,BSA,37℃ 封闭 2 小时,干燥后真空抽干包装成成品试剂盒酶标板;

##### ② 试剂盒其他成分的配置:

A) 酶标二抗:用酶稀释液(10mM PBS+1% 牛血清白蛋白 +0.05%Tween20)配制成 1:500 ( $V_{\text{酶标二抗}}:V_{\text{酶稀释液}}$ ) 的使用浓度;

B) 样品稀释液:10mM PBS;

C) 阳性对照:10mM PBS+ 阳性血清;

D) 阴性对照:10mM PBS+ 阴性血清;

E) 显示剂 A 液:0.5% 过氧化物尿素 +5mM PBS;

F) 显示剂 B 液:1% 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 +5mM PBS;

G) 终止液:5mM 硫酸;

H) 20× 浓缩洗涤液:1M PBS+0.2%Tween20。

[0010] 实施例 2 在实施例 1 的基础上,用过碘酸钠氧化法制备酶标二抗,具体步骤如下:

称取 10mg 辣根过氧化物酶(Sigma 公司,HRP),溶于 1mL 纯水中;加入 1mL 新鲜配制的 0.06mol/L 高碘酸钠溶液(北京化学试剂公司),室温避光搅拌 30min;加入 1mL 溶解了 5mg 纯化后的兔抗水貂二抗的 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,室温避光轻搅 2-3h;加新鲜配制的 0.2mL 5mg/mL 硼氢化钠(北京化学试剂公司),4℃ 放置 2h,以稳定结合物;再移入透析袋,于 pH 为 7.2 的 PBS 透析过夜,-20℃ 保存备用。

[0011] 试验例 1 本发明快速检测试剂盒的检测方法及结果判定

- (1) 设置两个孔分别加入 100  $\mu$ L 阳性对照；
- (2) 另设置两个孔分别加入 100  $\mu$ L 阴性对照；
- (3) 取 100  $\mu$ L 经 1:100 稀释好的待检样品加入其他孔中,并做好记录；
- (4) 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min；
- (5) 将各孔的液体弃入废液桶,每孔加 250  $\mu$ L 的洗涤液进行洗板,重复 3 次,每次 30s,用毛巾或者纸巾拍干孔内残余液体；
- (6) 每孔加 100  $\mu$ L 酶标结合物；
- (7) 37 $^{\circ}$ C 孵育 20min;重复步骤(5)；
- (8) 每孔先加 50  $\mu$ L 底物液 A,再加 50  $\mu$ L 底物液 B；
- (9) 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min (避光显色);每孔再加 50  $\mu$ L 终止液终止反应；
- (10) 立刻于 450nm 波长处测定各孔的吸光度值,即 OD<sub>450</sub>值。

[0012] 试验有效性判断：

- (1) 阴性对照：正常情况下,阴性对照孔 OD<sub>450</sub> 值  $\leq 0.3$ ；
- (2) 阳性对照：正常情况下,阳性对照孔 OD<sub>450</sub> 值  $> 0.3$ ；
- (3)  $P/N = \text{样本 OD} / N \text{ 值}$ ，若阴性对照均值小于等于 0.1,则 N 值 = 0.2+ 阴性对照均值；若阴性对照均值大于 0.1,则 N 值 = 阴性对照均值。

[0013] (4) 结果判定： $P/N \geq 2$ ，判定该检测样品为阳性； $2 \leq P/N < 3$ ，判定该检测样品为弱阳性， $P/N \geq 3$ ，判定该检测样品为强阳性。

[0014] 试验例 2 本发明快速检测试剂盒与双流向免疫电泳针对水貂阿留申病毒抗体进行敏感性和特异性对比,对比结果见表 1 和表 2

表 1 与水貂阿留申双流向免疫电泳(CIE)进行敏感性对比

	样品数量	本发明	双流向免疫电泳(CIE)
阳性结果	99	-	+
	1	-	+
敏感性	100	99/100(99%)	100/100

表 2 与水貂阿留申双流向免疫电泳(CIE)进行特异性对比

	样品数量	本发明	双流向免疫电泳(CIE)
阴性结果	98	-	-
	2	-	-
特异性	100	98/100(98%)	100/100

注：以上 + 代表阳性；- 代表阴性。

专利名称(译)	一种水貂阿留申病毒抗体ELISA快速检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104991057A</a>	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201510380894.6	申请日	2015-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	山东省滨州畜牧兽医研究院		
申请(专利权)人(译)	山东省滨州畜牧兽医研究院		
当前申请(专利权)人(译)	山东省滨州畜牧兽医研究院		
[标]发明人	王玉茂 沈志强 武玉香 唐世云		
发明人	王玉茂 沈志强 武玉香 唐世云		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种水貂阿留申病毒抗体ELISA快速检测试剂盒及其制备方法，步骤包括：(1)阿留申病毒培养；(2)阿留申病毒纯化；(3)兔抗水貂二抗的制备及酶标二抗的制备；(4)快速检测试剂盒的制备。本发明可以快速、灵敏、准确的检测水貂阿留申病毒抗体，克服了国内检测水貂阿留申抗体主要以双流向电泳法和PCR法的问题。