



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102221611 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

(21) 申请号 201110103515. 0

(22) 申请日 2011. 04. 25

(71) 申请人 河南科技学院

地址 453003 河南省新乡市华兰大道东段河南科技学院动物科学学院

(72) 发明人 刘兴友 刘明成 王丽荣 胡建和

(74) 专利代理机构 郑州大通专利商标代理有限公司 41111

代理人 樊羿

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒及其应用。该试剂盒包括洗涤液、封闭液、底物显色液、终止液、包被抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗的酶标板、捕获抗体及酶标抗体；其检测方法为将待检样品放入包被抗体的酶标板，再依次添加捕获抗体、酶标抗体反应后加显色剂显色，测 OD 值。本发明中所用的包被抗体为单克隆抗体，有力地排除了多种非特异性的干扰，特异性强，精确度高；本发明仅涉及的简单的检测仪器，操作步骤简便，普通技术人员也易于操作使用，易于推广普及；本发明适用于大量样品的检测，快速便捷，且检测成本低。

1. 一种鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒,包括洗涤液、封闭液、底物显色液、终止液,其特征在于,它还包括:

(1) 包被抗体的酶标板:以抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗作为包被抗体,用包被液将单抗稀释到 10 μ g/ml,每孔加入 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜,用洗涤液 PBST 洗涤 2~4 次,再向酶标板中加入 5% 的 BSA 封闭液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 下反应 2h,洗涤液 PBST 洗涤 2~4 次;

(2) 捕获抗体:兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗;

(3) 酶标抗体:HRP 标记的羊抗兔 IgG。

2. 根据权利要求 1 所述的鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗由保藏编号为 CGMCC NO. 4171 的杂交瘤细胞株 3H10 分泌制得。

3. 根据权利要求 1 所述的鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗的制备方法如下:

将病毒进行纯化,选择 2.0~2.5 kg 之间的大白兔进行四次免疫,时间分别为第 1 天,第 14 天,第 28 天和第 30 天,第 4 次免疫后一周进行心脏采血,分离血清,即得兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗。

4. 权利要求 1 所述的鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒的应用方法,包括以下步骤:

(1) 加待检样品:取试剂盒中的包被抗体的酶标板,向其中加入经过处理的待检样品,100 μ L/孔,同时分别设立阳性对照和阴性对照,37 $^{\circ}$ C 下反应 25~35min,洗涤液 PBST 洗涤 2~4 次;

(2) 添加捕获抗体:取试剂盒中的捕获抗体,按 1:100 的体积比稀释后加入到上述酶标板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 下反应 25~35min,洗涤液 PBST 洗涤 2~4 次;

(3) 添加酶标抗体:取试剂盒中的酶标抗体,用洗涤液 PBST 按照 1:1000 的比例进行稀释并混匀,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 下反应 25~35min,以洗涤液 PBST 洗涤 2~4 次;

(4) 显色:加入 TMB 显色液,100 μ L/孔,在室温下显色 8~12min,用 2M 的 H₂SO₄ 为终止液终止显色;

(5) 测 OD 值:用酶标仪进行测量,测 OD 值。

5. 根据权利要求 4 所述的鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒的应用方法,其特征在于,所述待检样品的前处理方法如下:

采集相应的待检组织器官 1.0g,进行研磨,加入 1ml 灭菌的 PBS 缓冲液,1000rpm 离心 10min,取上清,8000rpm 离心 10min,取上清。

6. 根据权利要求 5 所述的鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒的应用方法,其特征在于,在所述步骤(5)中,当 P/N 值 > 2 时,待检样品为阳性,其中 P 为待检样品的 OD 值,N 为阴性对照的 OD 值。

鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测技术,具体涉及一种鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 河南省郑州某养殖场 2004 年 5 月发生了以腹泻和生长迟缓为主要症状的疑似 IB 疾病,感染鸡主要表现精神沉郁,下痢,生长缓慢及抵抗力下降,发病率为 100%,死亡率达 10% 以上,感染鸡群的生产性能显著降低。调查中显示,与鸡舍相距仅 150 米左右处有一个 1700 只的肉鸭群,在第一批鸡发病前约 10 天左右鸭群发生过类似症状的疾病。死亡鸡病变主要为小肠出血,肠壁变薄,有的有溃疡,小肠绒毛脱落,腺胃乳头肿大、粘膜脱落,有的肌胃和腺胃交界处有出血,肌胃有出血或溃疡,肾脏肿大,呈“花斑肾”,肺脏无明显变化,法氏囊、胸腺等免疫器官萎缩;病鸭剖检以肾脏肿大,苍白兼有出血、腿肌及肝脏出血为主要特征。在同地区的其他鸡场也发生了同样症状的疾病,虽然经过多种 IBV 疫苗的免疫但疫情未得到有效控制。河南科技学院动物科学学院开展了对该疫病的研究工作,结果从发病鸭体内分离到一株病毒,鉴定为 IBV,命名为鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株(保藏编号:CGMCC NO. 3842),其专利文献公开号为 CN 101906404A,此为首次有关家鸭感染 IBV 的报道。本病毒分离株 ZZ2004 来自鸡鸭混养的养殖场,其不仅引起鸡的大批发病及死亡,还感染了鸭群,严重影响了家鸭的生长发育并导致鸭的死亡。与其它禽类的冠状病毒相比,鸭源性冠状病毒 ZZ2004 变异的程度较大,对动物的感染谱更广。

[0003] 目前,国内外已建立了许多 IBV 相关的诊断技术,主要分为抗体检测和抗原检测两大类。抗体检测方法包括间接免疫荧光法、ELISA 法、免疫过氧化物酶单层细胞试验、中和试验等。目前所有针对抗体的检测方法都无法区分免疫鸡群和感染鸡群,从而影响疫病的及时、有效防控。而抗原检测方法则结果较直接,能明确病毒感染。针对 IBV 抗原检测的方法主要有 RT-PCR 法、病毒分离、免疫组化等,各方法均存在一些不足之处。例如,病毒分离方法耗时、费力;免疫组化方法操作繁琐,影响因素较多,并且结果判断具有一定的主观性;RT-PCR 方法对检测人员实验操作技能要求较严格,且成本较高。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种特异性强、精确度高、操作简便、检测快速的鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒,并公开了其应用方法。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

一种鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒,包括洗涤液、封闭液、底物显色液、终止液,其还包括:

(1) 包被抗体的酶标板:以抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗作为包被抗体,用包被液将单抗稀释到 10 μ g/ml,每孔加入 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜,用洗涤液 PBST 洗涤 2~4 次,再向酶标板中加入 5% (g/mL) 的 BSA 封闭液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 2h,洗涤液 PBST 洗涤 2~

4 次；

(2) 捕获抗体：兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗；

(3) 酶标抗体：HRP 标记的羊抗兔 IgG。

[0006] 所述抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗由保藏编号为 CGMCC NO. 4171 的杂交瘤细胞株 3H10 分泌制得。

[0007] 所述兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗的制备方法如下：

将病毒进行纯化，选择 2.0 ~ 2.5 kg 之间的大白兔进行四次免疫，时间分别为第 1 天，第 14 天，第 28 天和第 30 天，第 4 次免疫后一周进行心脏采血，分离血清，即得兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗。

[0008] 所述鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒的应用方法，包括以下步骤：

(1) 加待检样品：取试剂盒中的包被抗体的酶标板，向其中加入经过处理的待检样品，100 μ L/孔，同时分别设立阳性对照和阴性对照，37 $^{\circ}$ C 下反应 25 ~ 35min，洗涤液 PBST 洗涤 2 ~ 4 次；

(2) 添加捕获抗体：取试剂盒中的捕获抗体，按 1:100 倍稀释后加入到上述酶标板中，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 反应 25 ~ 35min，洗涤液 PBST 洗涤 2 ~ 4 次；

(3) 添加酶标抗体：取试剂盒中的酶标抗体，用洗涤液 PBST 按照 1:1000 的比例进行稀释并混匀，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 下反应 25 ~ 35min，以洗涤液 PBST 洗涤 2 ~ 4 次；

(4) 显色：加入 TMB 显色液，100 μ L/孔，在室温下显色 8 ~ 12min，用 2M 的 H₂SO₄ 为终止液终止显色；

(5) 测 OD 值：用酶标仪进行测量，测 OD 值。

[0009] 所述待检样品的前处理方法如下：

采集相应的待检组织器官 1.0g，进行研磨，加入 1ml 灭菌的 PBS 缓冲液，1000rpm 离心 10min，取上清，8000rpm 离心 10min，取上清。

[0010] 在所述步骤(5)中，当 P/N 值 > 2 时，待检样品为阳性，其中 P 为待检样品的 OD 值，N 为阴性对照的 OD 值。

[0011] 本发明具有积极有益的效果：

1. 本发明中所用的包被抗体为单克隆抗体，有力地排除了多种非特异性的干扰，特异性强，精确度高；

2. 本发明仅涉及的简单的检测仪器，操作步骤简便，普通技术人员也易于操作使用，易于推广普及；

3. 本发明适用于大量样品的检测，快速便捷，且检测成本低。

具体实施方式

[0012] 以下结合具体实施例进一步阐述本发明。下述实施例中的试验方法，如无特别说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料及试剂，如无特别说明，均购自常规生化试剂商店。

[0013] 实施例 1 一种鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒，包括洗涤液、封闭液、底物显色液、终止液，以及：

(1) 包被抗体的酶标板：用抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗作为包被抗体，用包被

液将单抗稀释到 10 μ g/ml, 每孔加入 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 用洗涤液 PBST 洗涤 3 次; 向酶标板中加入 5% 的 BSA 封闭液, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 反应 2h, 洗涤液 PBST 洗涤 3 次;

上述抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的单抗由保藏编号为 CGMCC NO. 4171 的杂交瘤细胞株 3H10 分泌制得, 详细制备方法可参见发明人的另一项专利文献 CN 101993856A。

[0014] (2) 捕获抗体: 兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗; 其制备方法为: 将病毒进行纯化, 选择 2.0 ~ 2.5 kg 之间的日本大白兔进行免疫, 免疫分四次, 时间分别为第 1 天, 第 14 天, 第 28 天和第 30 天, 第 4 次免疫后一周进行心脏采血, 分离血清, 即为兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗。

[0015] (3) 酶标抗体: HRP 标记的羊抗兔 IgG (购于宝赛生物公司);

以上述鸭源性冠状病毒夹心 ELISA 试剂盒应用方法如下:

(1) 加待检样品: 分别采集人工感染鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的鸡的心脏、肝脏和肾脏组织 1.0g, 进行研磨, 加入 1ml 灭菌的 PBS 缓冲液, 1000rpm 离心 10min, 取上清, 8000rpm 离心 10min, 取上清; 取试剂盒中的包被抗体的酶标板, 向其中加入上步所得上清, 每孔中加入 100 μ L, 同时分别设立阳性对照和阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 洗涤液 PBST 洗涤 3 次。

[0016] (4) 添加捕获抗体: 用兔抗鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株的多抗作为捕获抗体, 1:100 倍稀释, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 下反应 30min, 洗涤液 PBST 洗涤 3 次。

[0017] (5) 添加酶标抗体: 取 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 用 PBST 按照 1:1000 的比例进行稀释并混匀, 100 μ L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 下反应 30min, 洗涤液 PBST 洗涤 3 次。

[0018] (6) 显色: 每孔中加入 TMB 显色液 100 μ L, 在室温下显色 10 分钟, 用 2M 的 H₂SO₄ 终止显色。

[0019] (7) 测 OD 值: 用酶标仪进行测量, 测 OD 值, 测得各样品及阳性对照、阴性对照的 OD 值如表 1 所示。

[0020] 其阳性判定标准为: P/N 大于 2 即为阳性 (其中 P 为待检样品的 OD 值, N 为阴性对照的 OD 值), 从表 1 中可知, 人工感染的鸡的心脏、肝脏和肾脏中均含有鸭源性冠状病毒 ZZ2004 株。

[0021] 表 1 各待检样品及阳性对照、阴性对照酶标仪测量的 OD 值

	OD 值	OD 值	OD 值	OD 值	OD 值	OD 值	阳性对照	阴性对照
心脏	2.4839	2.3219	2.2244	2.4030	2.5105	2.2869	2.3153	0.2381
肝脏	2.3012	2.3118	2.1827	2.0924	2.6296	2.1196	2.4047	0.3125
肾脏	2.2354	2.2587	2.5461	2.0476	2.3258	2.8451	2.5204	0.2579

专利名称(译)	鸭源性冠状病毒夹心ELISA试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN102221611A	公开(公告)日	2011-10-19
申请号	CN201110103515.0	申请日	2011-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技学院		
[标]发明人	刘兴友 刘明成 王丽荣 胡建和		
发明人	刘兴友 刘明成 王丽荣 胡建和		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种鸭源性冠状病毒夹心ELISA试剂盒及其应用。该试剂盒包括洗涤液、封闭液、底物显色液、终止液、包被抗鸭源性冠状病毒ZZ2004株的单抗的酶标板、捕获抗体及酶标抗体；其检测方法为将待检样品放入包被抗体的酶标板，再依次添加捕获抗体、酶标抗体反应后加显色剂显色，测OD值。本发明中所用的包被抗体为单克隆抗体，有力地排除了多种非特异性的干扰，特异性强，精确度高；本发明仅涉及的简单的检测仪器，操作步骤简便，普通技术人员也易于操作使用，易于推广普及；本发明适用于大量样品的检测，快速便捷，且检测成本低。

表1 各待检样品及阳性对照、阴性对照酶标仪测量的OD值

	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值	OD值	阳性对照	阴性对照
心脏	2.4839	2.3219	2.2244	2.4030	2.5105	2.2869	2.3153	0.2381
肝脏	2.3012	2.3118	2.1827	2.0924	2.6296	2.1196	2.4047	0.3125
肾脏	2.2354	2.2587	2.5461	2.0476	2.3258	2.8451	2.5204	0.2579