



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810050463.3

[43] 公开日 2008年8月27日

[11] 公开号 CN 101251537A

[22] 申请日 2008.3.12
[21] 申请号 200810050463.3
[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院军事
兽医研究所
地址 130062 吉林省长春市青龙路1068号
[72] 发明人 扈荣良 刘 晔 张守峰 张 菲

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限
责任公司
代理人 陈宏伟

权利要求书1页 说明书30页 附图2页

[54] 发明名称

人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒

[57] 摘要

本发明公开一种人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒，该试剂盒利用标记的狂犬病中和性抗体、标准血清和包被抗原，能够简单快速准确地定量地检测人和动物血清中的狂犬病中和抗体。采用狂犬病病毒颗粒或病毒糖蛋白包被酶联板，将酶标记的狂犬病中和抗体按一定比例与待检血清及标准血清分别混合，与包被在酶联板上的狂犬病病毒糖蛋白抗原反应，显色后根据标准血清反应的 OD 值与已知中和效价绘制标准曲线，根据待检血清反应的 OD 值，在标准曲线上获得相应的中和抗体效价。该试剂盒可以准确地定量测定狂犬病病毒中和抗体，其操作简单，所用时间短，和 WHO、OIE 推荐的中和试验方法检测结果具有良好的一致性。

1、一种人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：以含有狂犬病病毒糖蛋白的溶液作为包被抗原，以酶标记的抗狂犬病病毒糖蛋白抗体作为指示，待检血清和标记抗体混合并与包被抗原反应后，通过与已知人或动物标准血清对比，计算人或动物血清中狂犬病中和抗体水平的竞争 ELISA。

2、权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：包被抗原可以是狂犬病病毒颗粒或单一的病毒糖蛋白。

3、权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述的狂犬病病毒培养液为 BHK-21 细胞等可以支撑狂犬病病毒生长的细胞培养出的病毒液。

4、权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：其酶标抗体指的是抗狂犬病病毒糖蛋白的中和抗体。

5、权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：使用的已知中和效价的标准血清，指的是采用狂犬病疫苗免疫人和动物，分别收获其血清后，与 WHO 和 OIE 标准血清比对标定，用于标准曲线绘制的标准血清。

6、权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：使用的标准血清，针对检测对象的不同，分别来自人和动物的狂犬病抗血清。

人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒

技术领域：

本发明公开一种人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒，通过酶标抗体与血清抗体的竞争反应来准确定量检测人和动物血清中狂犬病中和抗体效价，属于生物疫苗制备技术领域。

背景技术：

狂犬病是一种重要的人兽共患传染病，狂犬病感染人或动物后，病死率 100%。对动物进行狂犬病的主动预防和对狂犬病暴露人群进行暴露后治疗（疫苗和免疫球蛋白注射）是防止狂犬病发生的关键。狂犬病疫苗在机体内可以诱导针对其结构蛋白的五种抗体产生，其中针对糖蛋白的中和抗体是目前唯一公认的抗感染抗体。世界卫生组织（WHO）和动物世界卫生组织（或国际兽疫局，OIE）规定，狂犬病病毒中和抗体在达到 0.5 IU/ml 时，机体就可足以抵抗狂犬病病毒的自然感染，中和抗体水平越高，机体具备的抗狂犬病感染能力越强，在低于该水平时，有必要对人或动物进行加强免疫，以提高机体的抗狂犬病感染能力。

目前，广为采用的检测狂犬病病毒中和抗体的方法包括 WHO 推荐的快速荧光灶抑制试验（RFFIT）、OIE 推荐的荧光抗体病毒中和试验（FAVN）。虽然二者可以精确测定狂犬病中和抗体水平的高低，但是，二者均采用活的细胞和病毒进行测定，操作复杂，需要时间长，影响因素较多。近年来，先后发展了多种狂犬病中和抗体检测技术，如流式细胞计数方法、间接 ELISA 技术、层析诊断试纸条技术等，这些技术和上述两种推荐方法相比，敏感性和特异性均较差，获得的抗体效价值差异较大，且不能准确定量，尤其是对中和抗体临界值（0.5IU/ml）左右的抗体水平测定效果难以做出准确的测定。因此，开发一种可以简单快速且准确测定狂犬病中和抗体的方法具有重要的实际应用价值。

发明内容:

本发明公开一种人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒, 该试剂盒利用标记的狂犬病中和性抗体、标准血清和包被抗原, 能够简单快速准确定量地检测人和动物血清中的狂犬病中和抗体。

本发明提供了上述检测试剂盒的制备和应用。

本发明的技术方案是:

以含有狂犬病病毒糖蛋白的溶液作为包被抗原, 以酶标记的抗狂犬病病毒糖蛋白抗体作为指示, 待检血清和标记抗体混合并与包被抗原反应后, 通过与已知人或动物标准血清对比, 计算人或动物血清中狂犬病中和抗体水平的竞争 ELISA。

包被抗原可以是狂犬病病毒颗粒或单一的病毒糖蛋白。

所述的狂犬病病毒培养液为 BHK-21 细胞等可以支撑狂犬病病毒生长的细胞培养出的病毒液。

其酶标抗体指的是抗狂犬病病毒糖蛋白的中和抗体。

使用的已知中和效价的标准血清, 指的是采用狂犬病疫苗免疫人和动物, 分别收获其血清后, 与 WHO 和 OIE 标准血清对标定, 用于标准曲线绘制的标准血清。

使用的标准血清, 针对检测对象的不同, 分别来自人和动物的狂犬病抗血清。

具体制备工艺包括以下步骤:

采用狂犬病病毒颗粒或病毒糖蛋白包被酶联板, 以中和效价分别为 0、0.25、0.5、1、2、4 和 8IU/ml 的血清作为标准, 将酶标记的狂犬病中和抗体按一定比例与待检血清混合, 与包被在酶联板上的狂犬病抗原反应, 显色后根据 OD 值和标准血清中和抗体效价, 计算待检血清的中和抗体效价, 从而定量确定人和动物的狂犬病免疫水平。其中采用的包被抗原溶液, 可以是狂犬病病毒颗粒, 也可以是单一的狂犬病病毒糖蛋白。狂犬病病毒颗粒是通过 BHK-21 细胞培养的全病毒, 狂犬病病毒糖蛋白由狂犬病病毒颗粒纯化而来或是基因工程表达产物。酶标抗体来自狂犬病病毒糖蛋白高度免疫的动物抗血清、或抗糖蛋白单克隆抗体、或采用细胞系生产的基因工程抗狂犬病糖蛋白抗体。标准血清为狂犬病疫苗免疫的人或动物的血清, 是通过与 WHO 和 OIE 标准血清对标定的针对不同检测宿主(人或动物)的血清。

狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒的制备与应用方法

1. 包被抗原的制备和包被

包被用抗原包括以下3类：(1) 将狂犬病病毒接种 BHK-21 细胞后，孵育 72~96h 后，收获培养液。包被时用包被液将病毒稀释成总蛋白浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ ，取 $100 \mu\text{l}$ 加到酶联板上， 4°C 包被过夜；(2) 将上述培养的病毒通过梯度离心和裂解的方法，破坏狂犬病病毒的结构，通过层析分离获得糖蛋白。包被时用包被液将糖蛋白稀释成 $4 \mu\text{g/ml}$ ，取 $100 \mu\text{l}$ 加到酶联板上， 4°C 包被过夜；(3) 利用狂犬病病毒糖蛋白基因表达盒转染 BHK-21 细胞系，获得稳定表达糖蛋白的细胞系，将收获培养的细胞系后，用包被液将糖蛋白稀释成 $4 \mu\text{g/ml}$ ，按 $100 \mu\text{l/孔}$ 的量， 4°C 包被酶联板过夜。

2. 酶联板的封闭和保存

上述包被的酶联板取出后，以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 $100 \mu\text{l}$ 封闭液（含 5% 脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞）， 37°C 放置 1h。弃封闭液后，采用铝箔袋真空封口， 4°C 保存。

3. 标准血清的制备

分别以市售的疫苗按照免疫程序免疫人、犬和猫，采集免疫前及免疫后 2 周的血清，分离血清，采用 FAVN 技术分别测定血清中的狂犬病中和抗体效价，根据效价水平，进行适当稀释后，制成 0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 国际单位 (IU)/ml 的标准血清，再次利用 FAVN 对稀释的血清进行效价确定。无菌分装保存备用。

4. 中和性抗体的制备和标记

中和性抗体的制备包括下 3 种方法：(1) 抗糖蛋白中和性单克隆抗体杂交瘤细胞，腹腔接种 BALB/c 小鼠腹腔，约两周后，待小鼠腹部明显膨大时，穿刺采取腹水，获得单克隆抗体。(2) 将纯化的狂犬病病毒糖蛋白高度免疫动物后，采集血清，获得血清中和性抗体。(3) 通过基因工程手段，利用细胞系表达中和性抗体。

对以上方法获得的抗体以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，进行抗体纯化。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液 (pH3.0) 溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，稀释至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良的过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 和等体积甘油， -20°C 保存。

5. 试剂盒的其他成分、组装及保存

TMB 显色液购自 Invitrogen 公司、终止液为 0.2M 的硫酸、洗液为 Sigma 公司的 PBS-吐温 20 缓冲液 (pH7.4)。真空包装铝箔塑料袋定做。坐标纸一张。说明书一份。

试剂盒保存在 4℃冰箱中。

6. 血清中狂犬病中和抗体效价的测定程序

取人或动物血清 50 μ l，在 Eppendorf 管中混合等量的酶标记的中和性单克隆抗体工作液，加入 96 孔板中以后，放在 37℃湿盒中反应 1h，取出甩掉反应液，利用 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗 3 遍，3min/次，加入显色液，放置 37℃湿盒中反应 15min，取出加入终止液 100 μ l，在酶联检测仪上读取 OD₄₅₀ 数值。

以标准血清的 OD₄₅₀ 值为横轴，已知中和效价为纵轴，在坐标纸上绘制标准曲线，然后根据待检血清样品测定的 OD₄₅₀ 值，在标准曲线上得出对应的中和效价 (IU/ml)。

本发明的积极效果在于：该试剂盒可以准确地定量测定狂犬病病毒中和抗体，其操作简单，所用时间短，和 WHO、OIE 推荐的中和试验方法检测结果具有良好的一致性。

附图说明

图 1 人血清 OD₄₅₀ 值与相应中和效价的标准曲线；

图 2 犬血清 OD₄₅₀ 值与相应中和效价的标准曲线；

图 3 猫血清 OD₄₅₀ 值与相应中和效价的标准曲线。

具体实施方式：

下面结合实施例，对本发明做进一步描述。其作用被理解为是对本发明的阐释而非对本发明的任何形式的限制。

实施例 1：

试剂盒的制备方法 (一)

1. 狂犬病病毒的制备和包被

狂犬病病毒接种 BHK-21 单层细胞，培养 3~4 天后，冻融 2 次，裂解细胞，收获培养液。包被时用包被液将病毒稀释成总蛋白浓度为 100 μ g/ml，取 100 μ l 加到酶联板上，4℃包被过夜；以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 100 μ l 封闭液 (含 5%脱脂奶粉和 0.01%硫柳汞)，37℃放置 1h 后，弃封闭液，采用铝箔袋真空封口，4℃保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗 (大连金港安迪生物制品有限公司)，按照暴露前免疫程

序,对志愿者进行3次免疫,免疫前及末次免疫后14天,分别采取血液,分离血清。以荧光抗体中和试验(FAVN)检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为0,免疫后14天,血清中和抗体效价为40.5IU/ml,以免疫前血清将40.5 IU/ml的免疫后血清稀释成0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以FAVN法检测上述稀释血清1次,结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清,无菌分装入Eppendorf管,每管60 μ l,作为标准血清,于-20 $^{\circ}$ C保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗(美国富道动物保健公司),对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行1次免疫,免疫前及免疫后14天,分别采取血液,分离血清。以荧光抗体中和试验(FAVN)检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以FAVN法检测上述稀释血清1次,结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清,无菌分装入Eppendorf管,每管60 μ l,分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清,于-20 $^{\circ}$ C保存。

3. 抗糖蛋白中和性单克隆抗体的标记

抗糖蛋白中和性单克隆抗体杂交瘤细胞,腹腔接种BALB/c小鼠腹腔,约两周后,待小鼠腹部明显膨大时,穿刺采取腹水。以Amersham公司的nProtein A Sepharose 4F亲和层析凝胶,按说明书操作,纯化腹水内抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液(pH3.0)溶解,紫外分光光度计测定其蛋白浓度,稀释至5mg/ml后,参考有关文献,以改良的过碘酸钠法对上述两株单抗分别进行辣根过氧化物酶(HRP)标记。标记后的抗体,以Sephadex G75凝胶过柱纯化后,加入终浓度10 mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)和等体积甘油,-20 $^{\circ}$ C保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法ELISA试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度,包被酶标板,每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应,以酶标仪读取各孔OD₄₅₀值,当OD₄₅₀值为1.0时,抗原抗体用量较少,此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定,直接竞争ELISA中酶标抗体的工作浓度为1:3200,相应的抗原包被浓度为100 μ g/ml(如表1所示)。

表1 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的OD₄₅₀值

抗原包被浓度 $\mu\text{g/ml}$	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
50	2.100	1.432	0.968	0.466
100	2.245	1.679	1.021	0.634
150	2.361	1.847	1.211	0.778
200	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表2所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于4℃保存。

表2 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μl / 管	
4	酶标抗体 (10 \times)	500 μl	
5	抗体稀释液	5ml	
6	PBS-T 洗液 (10 \times)	25ml	
7	显色液	10ml	
8	终止液	10ml	
9	坐标纸	1 张	

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10 \times) 稀释至 250ml；将酶标抗体稀释 (10 \times) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋，取出预包被抗原的酶标板，以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 不同效价的标准血清混合，按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 待检血清混合，加入酶标板其它孔内，作好记录，37℃温育 1h。

(4) 甩去孔内液体，以 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液，每孔 $100\ \mu\text{l}$ ， 37°C 湿盒中显色 15min，每孔加 $100\ \mu\text{l}$ 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD_{450} 值。

(7) 在坐标纸上，绘制标准参照血清的中和效价（纵轴）与相应 OD_{450} 值（横轴）间的曲线，作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD_{450} 值的对应点，该点对应的纵轴坐标，即为待测血清的狂犬病中和效价（IU/ml）。

实施例 2:

试剂盒的制备方法（二）

1. 狂犬病病毒的制备和包被

狂犬病病毒接种 BHK-21 单层细胞，培养 3~4 天后，冻融 2 次，裂解细胞，收获培养液。包被时用包被液将病毒稀释成总蛋白浓度为 $100\ \mu\text{g/ml}$ ，取 $100\ \mu\text{l}$ 加到酶联板上， 4°C 包被过夜；以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 $100\ \mu\text{l}$ 封闭液（含 5% 脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞）， 37°C 放置 1h 后，弃封闭液，采用铝箔袋真空封口， 4°C 保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗（大连金港安迪生物制品有限公司），按照暴露前免疫程序，对志愿者进行 3 次免疫，免疫前及末次免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0，免疫后 14 天，血清中和抗体效价为 40.5 IU/ml，以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 $60\ \mu\text{l}$ ，作为标准血清，于 -20°C 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗（美国富道动物保健公司），对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行 1 次免疫，免疫前及免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成 0.25、

0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清，于 -20℃ 保存。

3. 抗糖蛋白血清抗体的标记

将纯化的狂犬病病毒糖蛋白高度免疫动物后，采集血清，以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化血清内抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液 (pH3.0) 溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，稀释至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良过碘酸钠法对抗体进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10 mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 和等体积甘油，-20℃ 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值，当 OD₄₅₀ 值为 1.0 时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 100 μ g/ml (如表 3 所示)。

表 3 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μ g/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
50	2.100	1.432	0.968	0.466
100	2.245	1.679	1.021	0.634
150	2.361	1.847	1.211	0.778
200	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 4 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 4 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
-----	-----	-----	-----

1	说明书	1份
2	预包被抗原的酶标板	1块(96孔)
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各7管(0~8IU/ml), 60 μ l/管
4	酶标抗体(10 \times)	500 μ l
5	抗体稀释液	5ml
6	PBS-T洗液(10 \times)	25ml
7	显色液	10ml
8	终止液	10ml
9	坐标纸	1张

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10 \times) 稀释至 250ml; 将酶标抗体稀释 (10 \times) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋, 取出预包被抗原的酶标板, 以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μ l 与 50 μ l 不同效价的标准血清混合, 按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μ l 与 50 μ l 待检血清混合, 加入酶标板其它孔内, 作好记录, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。

(4) 甩去孔内液体, 以 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 湿盒中显色 15min, 每孔加 100 μ l 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

(7) 在坐标纸上, 绘制标准参照血清的中和效价 (纵轴) 与相应 OD₄₅₀ 值 (横轴) 间的曲线, 作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD₄₅₀ 值的对应点, 该点对应的纵轴坐标, 即为待测血清的狂犬病中和效价 (IU/ml)。

实施例 3:

试剂盒的制备方法 (三)

1. 狂犬病病毒的制备和包被

狂犬病病毒接种 BHK-21 单层细胞，培养 3~4 天后，冻融 2 次，裂解细胞，收获培养液。包被时用包被液将病毒稀释成总蛋白浓度为 100 μ g/ml，取 100 μ l 加到酶联板上，4 $^{\circ}$ C 包被过夜；以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 100 μ l 封闭液（含 5%脱脂奶粉和 0.01%硫柳汞），37 $^{\circ}$ C 放置 1h 后，弃封闭液，采用铝箔袋真空封口，4 $^{\circ}$ C 保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗（大连金港安迪生物制品有限公司），按照暴露前免疫程序，对志愿者进行 3 次免疫，免疫前及末次免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0，免疫后 14 天，血清中和抗体效价为 40.5IU/ml，以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，作为标准血清，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗（美国富道动物保健公司），对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行 1 次免疫，免疫前及免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. 抗糖蛋白基因工程抗体的标记

通过基因工程手段，利用细胞系表达中和性抗体。以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化基因工程表达的抗糖蛋白抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液（pH3.0）溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，结果为 2.0mg/ml。超滤浓缩至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良过碘酸钠法对抗体进行辣根过氧化物酶（HRP）标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10 mg/ml 的牛血清白蛋白（BSA）和等体积甘油，-20 $^{\circ}$ C 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值，当 OD₄₅₀ 值为 1.0 时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 100μg/ml（如表 5 所示）。

表 5 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μg/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
50	2.100	1.432	0.968	0.466
100	2.245	1.679	1.021	0.634
150	2.361	1.847	1.211	0.778
200	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 6 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 6 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μ l / 管	
4	酶标抗体 (10×)	500 μ l	
5	抗体稀释液	5ml	
6	PBS-T 洗液 (10×)	25ml	
7	显色液	10ml	
8	终止液	10ml	
9	坐标纸	1 张	

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10×) 稀释至 250ml; 将酶标抗体稀释 (10×) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋, 取出预包被抗原的酶标板, 以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 不同效价的标准血清混合, 按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 待检血清混合, 加入酶标板其它孔内, 作好记录, 37℃温育 1h。

(4) 甩去孔内液体, 以 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液, 每孔 100 μl, 37℃湿盒中显色 15min, 每孔加 100 μl 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

(7) 在坐标纸上, 绘制标准参照血清的中和效价 (纵轴) 与相应 OD₄₅₀ 值 (横轴) 间的曲线, 作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD₄₅₀ 值的对应点, 该点对应的纵轴坐标, 即为待测血清的狂犬病中和效价 (IU/ml)。

实施例 4:

试剂盒的制备方法 (四)

1. 纯化的狂犬病病毒糖蛋白的制备和包被

实施例 1 中的细胞培养病毒液, 通过梯度离心和裂解的方法, 破坏狂犬病病毒的结构, 通过层析等方法, 分离获得糖蛋白, 将糖蛋白溶解到磷酸盐缓冲液中, 包被时用包被液将糖蛋白稀释成 4 μg/ml, 取 100 μl 加到酶联板上, 4℃包被过夜后取出, 以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍, 每孔内加入 100 μl 封闭液 (含 5%脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞), 37℃放置 1h 后, 弃封闭液, 采用铝箔袋真空封口, 4℃保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗 (大连金港安迪生物制品有限公司), 按照暴露前免疫程序, 对志愿者进行 3 次免疫, 免疫前及末次免疫后 14 天, 分别采取血液, 分离血清。以荧光抗体中和试验 (FAVN) 检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0, 免疫后 14 天, 血清中和抗体效价为 40.5 IU/ml, 以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后

血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，作为标准血清，于 -20℃ 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗（美国富道动物保健公司），对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行 1 次免疫，免疫前及免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清，于 -20℃ 保存。

3. 抗糖蛋白中和性单克隆抗体的标记

抗糖蛋白中和性单克隆抗体杂交瘤细胞，腹腔接种 BALB/c 小鼠腹腔，约两周后，待小鼠腹部明显膨大时，穿刺采取腹水。以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化腹水内抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液（pH3.0）溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，稀释至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良的过碘酸钠法对上述两株单抗分别进行辣根过氧化物酶（HRP）标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10 mg/ml 的牛血清白蛋白（BSA）和等体积甘油，-20℃ 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值，当 OD₄₅₀ 值为 1.0 时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 4 μ g/ml（如表 7 所示）。

表 7 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μ g/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
3	2.100	1.432	0.968	0.466

4	2.245	1.679	1.021	0.634
5	2.361	1.847	1.211	0.778
6	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 8 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 8 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μl / 管	
4	酶标抗体 (10×)	500 μl	
5	抗体稀释液	5ml	
6	PBS-T 洗液 (10×)	25ml	
7	显色液	10ml	
8	终止液	10ml	
9	坐标纸	1 张	

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10×) 稀释至 250ml；将酶标抗体稀释 (10×) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋，取出预包被抗原的酶标板，以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 不同效价的标准血清混合，按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 待检血清混合，加入酶标板其它孔内，作好记录，37℃ 温育 1h。

(4) 甩去孔内液体，以 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液，每孔 100 μl，37℃ 湿盒中显色 15min，每孔加 100 μl 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD_{450} 值。

(7) 在坐标纸上, 绘制标准参照血清的中和效价 (纵轴) 与相应 OD_{450} 值 (横轴) 间的曲线, 作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD_{450} 值的对应点, 该点对应的纵轴坐标, 即为待测血清的狂犬病中和效价 (IU/ml)。

实施例 5:

试剂盒的制备方法 (五)

1. 纯化的狂犬病病毒糖蛋白的制备和包被

实施例 1 中的细胞培养病毒液, 通过梯度离心和裂解的方法, 破坏狂犬病病毒的结构, 通过层析等方法, 分离获得糖蛋白, 将糖蛋白溶解到磷酸盐缓冲液中, 包被时用包被液将糖蛋白稀释成 $4 \mu\text{g/ml}$, 取 $100 \mu\text{l}$ 加到酶联板上, 4°C 包被过夜后取出, 以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍, 每孔内加入 $100 \mu\text{l}$ 封闭液 (含 5% 脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞), 37°C 放置 1h 后, 弃封闭液, 采用铝箔袋真空封口, 4°C 保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗 (大连金港安迪生物制品有限公司), 按照暴露前免疫程序, 对志愿者进行 3 次免疫, 免疫前及末次免疫后 14 天, 分别采取血液, 分离血清。以荧光抗体中和试验 (FAVN) 检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0, 免疫后 14 天, 血清中和抗体效价为 40.5 IU/ml, 以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次, 结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清, 无菌分装入 Eppendorf 管, 每管 $60 \mu\text{l}$, 作为标准血清, 于 -20°C 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗 (美国富道动物保健公司), 对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行 1 次免疫, 免疫前及免疫后 14 天, 分别采取血液, 分离血清。以荧光抗体中和试验 (FAVN) 检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次, 结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清, 无菌分装入 Eppendorf 管, 每管 $60 \mu\text{l}$, 分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清, 于 -20°C 保存。

3. 抗糖蛋白血清抗体的标记

将纯化的狂犬病病毒糖蛋白高度免疫动物后，采集血清，以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化血清内抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液 (pH3.0) 溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，稀释至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良过碘酸钠法对抗体进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10 mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 和等体积甘油，-20℃ 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值，当 OD₄₅₀ 值为 1.0 时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 4μg/ml (如表 9 所示)。

表 9 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μg/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
3	2.100	1.432	0.968	0.466
4	2.245	1.679	1.021	0.634
5	2.361	1.847	1.211	0.778
6	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 10 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 10 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μ l/	

	清	管
4	酶标抗体 (10×)	500 μ l
5	抗体稀释液	5ml
6	PBS-T 洗液 (10×)	25ml
7	显色液	10ml
8	终止液	10ml
9	坐标纸	1 张

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10×) 稀释至 250ml; 将酶标抗体稀释 (10×) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋, 取出预包被抗原的酶标板, 以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μ l 与 50 μ l 不同效价的标准血清混合, 按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μ l 与 50 μ l 待检血清混合, 加入酶标板其它孔内, 作好记录, 37℃温育 1h。

(4) 甩去孔内液体, 以 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液, 每孔 100 μ l, 37℃湿盒中显色 15min, 每孔加 100 μ l 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

(7) 在坐标纸上, 绘制标准参照血清的中和效价 (纵轴) 与相应 OD₄₅₀ 值 (横轴) 间的曲线, 作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD₄₅₀ 值的对应点, 该点对应的纵轴坐标, 即为待测血清的狂犬病中和效价 (IU/ml)。

实施例 6:

试剂盒的制备方法 (六)

1. 纯化的狂犬病病毒糖蛋白的制备和包被

实施例 1 中的细胞培养病毒液, 通过梯度离心和裂解的方法, 破坏狂犬病病毒的结构, 通过层析等方法, 分离获得糖蛋白, 将糖蛋白溶解到磷酸盐缓冲液中, 包被时用包被液将糖蛋白稀释成 4 μ g/ml, 取 100 μ l 加到酶联板上, 4℃包被过夜后取出,

以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 100 μ l 封闭液（含 5%脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞），37 $^{\circ}$ C 放置 1h 后，弃封闭液，采用铝箔袋真空封口，4 $^{\circ}$ C 保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗（大连金港安迪生物制品有限公司），按照暴露前免疫程序，对志愿者进行 3 次免疫，免疫前及末次免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0，免疫后 14 天，血清中和抗体效价为 40.5IU/ml，以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，作为标准血清，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗（美国富道动物保健公司），对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行 1 次免疫，免疫前及免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 60 μ l，分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. 抗糖蛋白基因工程抗体的标记

通过基因工程手段，利用细胞系表达中和性抗体。以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化基因工程表达的抗糖蛋白抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液（pH3.0）溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，结果为 2.0mg/ml。超滤浓缩至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良过碘酸钠法对抗体进行辣根过氧化物酶（HRP）标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10 mg/ml 的牛血清白蛋白（BSA）和等体积甘油，-20 $^{\circ}$ C 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值，当

OD₄₅₀ 值为 1.0 时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 4μg/ml（如表 11 所示）。

表 11 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μg/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
3	2.100	1.432	0.968	0.466
4	2.245	1.679	1.021	0.634
5	2.361	1.847	1.211	0.778
6	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 12 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 12 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μl / 管	
4	酶标抗体 (10×)	500 μl	
5	抗体稀释液	5ml	
6	PBS-T 洗液 (10×)	25ml	
7	显色液	10ml	
8	终止液	10ml	
9	坐标纸	1 张	

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10×) 稀释至 250ml；将酶标抗体稀释 (10×) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋，取出预包被抗原的酶标板，以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3

次，每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 $50\ \mu\text{l}$ 与 $50\ \mu\text{l}$ 不同效价的标准血清混合，按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 $50\ \mu\text{l}$ 与 $50\ \mu\text{l}$ 待检血清混合，加入酶标板其它孔内，作好记录， 37°C 温育 1h。

(4) 甩去孔内液体，以 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液，每孔 $100\ \mu\text{l}$ ， 37°C 湿盒中显色 15min，每孔加 $100\ \mu\text{l}$ 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD_{450} 值。

(7) 在坐标纸上，绘制标准参照血清的中和效价（纵轴）与相应 OD_{450} 值（横轴）间的曲线，作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD_{450} 值的对应点，该点对应的纵轴坐标，即为待测血清的狂犬病中和效价（IU/ml）。

实施例 7:

试剂盒的制备方法（七）

1. 表达狂犬病病毒糖蛋白细胞系的制备和包被

利用狂犬病病毒糖蛋白基因表达盒转染 BHK-21 细胞系，获得稳定表达糖蛋白的细胞系，将收获培养的细胞系后，通过层析等方法，分离获得糖蛋白，将糖蛋白溶解到磷酸盐缓冲液中，包被时用包被液将糖蛋白稀释成 $4\ \mu\text{g/ml}$ ，取 $100\ \mu\text{l}$ 加到酶联板上， 4°C 包被过夜后取出，以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 $100\ \mu\text{l}$ 封闭液（含 5% 脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞）， 37°C 放置 1h 后，弃封闭液，采用铝箔袋真空封口， 4°C 保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗（大连金港安迪生物制品有限公司），按照暴露前免疫程序，对志愿者进行 3 次免疫，免疫前及末次免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0，免疫后 14 天，血清中和抗体效价为 40.5 IU/ml，以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管

60 μ l, 作为标准血清, 于 -20°C 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗(美国富道动物保健公司), 对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行1次免疫, 免疫前及免疫后14天, 分别采取血液, 分离血清。以荧光抗体中和试验(FAVN)检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以FAVN法检测上述稀释血清1次, 结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清, 无菌分装入Eppendorf管, 每管60 μ l, 分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清, 于 -20°C 保存。

3. 抗糖蛋白中和性单克隆抗体的标记

抗糖蛋白中和性单克隆抗体杂交瘤细胞, 腹腔接种BALB/c小鼠腹腔, 约两周后, 待小鼠腹部明显膨大时, 穿刺采取腹水。以Amersham公司的nProtein A Sepharose 4F亲和层析凝胶, 按说明书操作, 纯化腹水内抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液(pH3.0)溶解, 紫外分光光度计测定其蛋白浓度, 稀释至5mg/ml后, 参考有关文献, 以改良的过碘酸钠法对上述两株单抗分别进行辣根过氧化物酶(HRP)标记。标记后的抗体, 以Sephadex G75凝胶过柱纯化后, 加入终浓度10 mg/ml的牛血清白蛋白(BSA)和等体积甘油, -20°C 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法ELISA试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度, 包被酶标板, 每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应, 以酶标仪读取各孔 OD_{450} 值, 当 OD_{450} 值为1.0时, 抗原抗体用量较少, 此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定, 直接竞争ELISA中酶标抗体的工作浓度为1:3200, 相应的抗原包被浓度为4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (如表13所示)。

表13 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD_{450} 值

抗原包被浓度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
3	2.100	1.432	0.968	0.466
4	2.245	1.679	1.021	0.634
5	2.361	1.847	1.211	0.778

6	2.404	1.911	1.342	0.876
---	-------	-------	-------	-------

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 14 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 14 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μl/管	
4	酶标抗体 (10×)	500 μl	
5	抗体稀释液	5ml	
6	PBS-T 洗液 (10×)	25ml	
7	显色液	10ml	
8	终止液	10ml	
9	坐标纸	1 张	

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10×) 稀释至 250ml；将酶标抗体稀释 (10×) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋，取出预包被抗原的酶标板，以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 不同效价的标准血清混合，按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μl 与 50 μl 待检血清混合，加入酶标板其它孔内，作好记录，37℃ 温育 1h。

(4) 甩去孔内液体，以 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液，每孔 100 μl，37℃ 湿盒中显色 15min，每孔加 100 μl 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

(7) 在坐标纸上，绘制标准参照血清的中和效价 (纵轴) 与相应 OD₄₅₀ 值 (横轴)

间的曲线，作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD_{450} 值的对应点，该点对应的纵轴坐标，即为待测血清的狂犬病中和效价 (IU/ml)。

实施例 8:

试剂盒的制备方法 (八)

1. 表达狂犬病病毒糖蛋白细胞系的制备和包被

利用狂犬病病毒糖蛋白基因表达盒转染 BHK-21 细胞系，获得稳定表达糖蛋白的细胞系，将收获培养的细胞系后，通过层析等方法，分离获得糖蛋白，将糖蛋白溶解到磷酸盐缓冲液中，包被时用包被液将糖蛋白稀释成 $4 \mu\text{g/ml}$ ，取 $100 \mu\text{l}$ 加到酶联板上， 4°C 包被过夜后取出，以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍，每孔内加入 $100 \mu\text{l}$ 封闭液 (含 5% 脱脂奶粉和 0.01% 硫柳汞)， 37°C 放置 1h 后，弃封闭液，采用铝箔袋真空封口， 4°C 保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗 (大连金港安迪生物制品有限公司)，按照暴露前免疫程序，对志愿者进行 3 次免疫，免疫前及末次免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验 (FAVN) 检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为 0，免疫后 14 天，血清中和抗体效价为 40.5 IU/ml，以免疫前血清将 40.5 IU/ml 的免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 $60 \mu\text{l}$ ，作为标准血清，于 -20°C 保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗 (美国富道动物保健公司)，对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行 1 次免疫，免疫前及免疫后 14 天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验 (FAVN) 检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以 FAVN 法检测上述稀释血清 1 次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入 Eppendorf 管，每管 $60 \mu\text{l}$ ，分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清，于 -20°C 保存。

3. 抗糖蛋白血清抗体的标记

将纯化的狂犬病病毒糖蛋白高度免疫动物后，采集血清，以 Amersham 公司的 nProtein A Sepharose 4F 亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化血清内抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液 (pH3.0) 溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，稀释至 5mg/ml 后，参考有关文献，以改良过碘酸钠法对抗体进行辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。标记后的抗体，以 Sephadex G75 凝胶过柱纯化后，加入终浓度 10 mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 和等体积甘油，-20℃ 保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法 ELISA 试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔 OD₄₅₀ 值，当 OD₄₅₀ 值为 1.0 时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 4μg/ml (如表 15 所示)。

表 15 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μg/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
3	2.100	1.432	0.968	0.466
4	2.245	1.679	1.021	0.634
5	2.361	1.847	1.211	0.778
6	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 16 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4℃ 保存。

表 16 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μ l/管	

4	酶标抗体 (10×)	500 μ l
5	抗体稀释液	5ml
6	PBS-T 洗液 (10×)	25ml
7	显色液	10ml
8	终止液	10ml
9	坐标纸	1 张

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10×) 稀释至 250ml; 将酶标抗体稀释 (10×) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋, 取出预包被抗原的酶标板, 以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 50 μ l 与 50 μ l 不同效价的标准血清混合, 按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 50 μ l 与 50 μ l 待检血清混合, 加入酶标板其它孔内, 作好记录, 37℃温育 1h。

(4) 甩去孔内液体, 以 PBS-T 洗液洗板 3 次, 每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液, 每孔 100 μ l, 37℃湿盒中显色 15min, 每孔加 100 μ l 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD₄₅₀ 值。

(7) 在坐标纸上, 绘制标准参照血清的中和效价 (纵轴) 与相应 OD₄₅₀ 值 (横轴) 间的曲线, 作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD₄₅₀ 值的对应点, 该点对应的纵轴坐标, 即为待测血清的狂犬病中和效价 (IU/ml)。

实施例 9: 试剂盒的制备方法 (九)

1. 表达狂犬病病毒糖蛋白细胞系的制备和包被

利用狂犬病病毒糖蛋白基因表达盒转染 BHK-21 细胞系, 获得稳定表达糖蛋白的细胞系, 将收获培养的细胞系后, 通过层析等方法, 分离获得糖蛋白, 将糖蛋白溶解到磷酸盐缓冲液中, 包被时用包被液将糖蛋白稀释成 4 μ g/ml, 取 100 μ l 加到酶联板上, 4℃包被过夜后取出, 以 PBS-吐温 20 缓冲液淋洗三遍, 每孔内加入 100 μ l 封闭液 (含 5%脱脂奶粉和 0.01%硫柳汞), 37℃放置 1h 后, 弃封闭液, 采用铝箔袋真空封口, 4℃

保存。

2. 标准血清的制备

2.1 人标准血清的制备

购买市售人用狂犬病疫苗（大连金港安迪生物制品有限公司），按照暴露前免疫程序，对志愿者进行3次免疫，免疫前及末次免疫后14天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。结果免疫前中和效价为0，免疫后14天，血清中和抗体效价为40.5 IU/ml，以免疫前血清将40.5 IU/ml的免疫后血清稀释成0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以FAVN法检测上述稀释血清1次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入Eppendorf管，每管60 μ l，作为标准血清，于-20℃保存。

2.2 动物标准血清的制备

购买市售兽用狂犬病疫苗（美国富道动物保健公司），对狂犬病抗体阴性的犬和猫分别进行1次免疫，免疫前及免疫后14天，分别采取血液，分离血清。以荧光抗体中和试验（FAVN）检测血清中和抗体效价。以免疫前血清将免疫后血清稀释成0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 IU/ml。再以FAVN法检测上述稀释血清1次，结果与计算数值完全符合。上述稀释后血清，无菌分装入Eppendorf管，每管60 μ l，分别作为犬科动物和猫科动物的标准血清，于-20℃保存。

3. 抗糖蛋白基因工程抗体的标记

通过基因工程手段，利用细胞系表达中和性抗体。以Amersham公司的nProtein A Sepharose 4F亲和层析凝胶，按说明书操作，纯化基因工程表达的抗糖蛋白抗体。纯化后抗体以甘氨酸缓冲液（pH3.0）溶解，紫外分光光度计测定其蛋白浓度，结果为2.0mg/ml。超滤浓缩至5mg/ml后，参考有关文献，以改良过碘酸钠法对抗体进行辣根过氧化物酶（HRP）标记。标记后的抗体，以Sephadex G75凝胶过柱纯化后，加入终浓度10 mg/ml的牛血清白蛋白（BSA）和等体积甘油，-20℃保存。

4. 抗原、抗体最适工作浓度的选择

用方阵法对直接竞争法ELISA试剂盒中抗原抗体最适工作浓度进行选择。以0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液为包被介质将包被抗体稀释成不同浓度，包被酶标板，每一种包被浓度均与不同浓度的酶标抗体进行结合反应，以酶标仪读取各孔OD₄₅₀值，当OD₄₅₀值为1.0时，抗原抗体用量较少，此时抗原和抗体的浓度即为工作浓度。

经方阵法测定，直接竞争 ELISA 中酶标抗体的工作浓度为 1:3200，相应的抗原包被浓度为 4 μ g/ml（如表 17 所示）。

表 17 不同稀释度的酶标抗体和包被抗原组合的 OD₄₅₀ 值

抗原包被浓度 μ g/ml	酶标抗体稀释倍数			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
3	2.100	1.432	0.968	0.466
4	2.245	1.679	1.021	0.634
5	2.361	1.847	1.211	0.778
6	2.404	1.911	1.342	0.876

5. 试剂盒的组成和使用方法

5.1 试剂盒的组成

按表 18 所列试剂盒内容，装配试剂盒，组装后于 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 18 狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒内容

编 号	内 容	数 量	备 注
1	说明书	1 份	
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)	
3-1~3-7	人和动物标准参照血清	各 7 管 (0~8IU/ml), 60 μ l/管	
4	酶标抗体 (10 \times)	500 μ l	
5	抗体稀释液	5ml	
6	PBS-T 洗液 (10 \times)	25ml	
7	显色液	10ml	
8	终止液	10ml	
9	坐标纸	1 张	

5.2 试剂盒操作说明

(1) 以灭菌蒸馏水将 PBS-T 洗液 (10 \times) 稀释至 250ml；将酶标抗体稀释 (10 \times) 至 5ml。

(2) 打开铝塑复合袋，取出预包被抗原的酶标板，以稀释好的 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(3) 以稀释好的酶标抗体 $50\ \mu\text{l}$ 与 $50\ \mu\text{l}$ 不同效价的标准血清混合，按效价梯度依次加入酶标板的 A1~G1 孔内。以稀释好的酶标抗体 $50\ \mu\text{l}$ 与 $50\ \mu\text{l}$ 待检血清混合，加入酶标板其它孔内，作好记录， 37°C 温育 1h。

(4) 甩去孔内液体，以 PBS-T 洗液洗板 3 次，每次 3min。

(5) 加 TMB 显色液，每孔 $100\ \mu\text{l}$ ， 37°C 湿盒中显色 15min，每孔加 $100\ \mu\text{l}$ 终止液终止反应。

(6) 在酶标仪上测定各孔的 OD_{450} 值。

(7) 在坐标纸上，绘制标准参照血清的中和效价（纵轴）与相应 OD_{450} 值（横轴）间的曲线，作为标准曲线。

(8) 在标准曲线横轴上找到待测血清 OD_{450} 值的对应点，该点对应的纵轴坐标，即为待测血清的狂犬病中和效价（IU/ml）。

实施例 10：试剂盒检测人血清中和抗体的应用

20 份待检人血清，编号分别为 1~20，按实施例 5 进行狂犬病中和抗体检测，人标准血清及待检人血清 OD_{450} 值见表 19，绘制标准平滑曲线如图 1，所有血清 OD_{450} 值与其中和效价的对应关系见表 19。

表 19 标准血清、待检人血清 OD_{450} 值及其中和抗体效价

血清编号	OD_{450} 值	中和效价	血清编号	OD_{450} 值	中和效价	血清编号	OD_{450} 值	中和效价
标 3-1	0.985	0	001	0.978	0	011	0.445	0.38
标 3-2	0.506	0.25	002	0.562	0.22	012	0.586	0.20
标 3-3	0.426	0.5	003	0.235	>8.0	013	0.863	0.06
标 3-4	0.376	1.0	004	0.505	0.25	014	0.951	0
标 3-5	0.309	2.0	005	0.652	0.18	015	0.225	>8.0
标 3-6	0.279	4.0	006	0.875	0.05	016	0.352	1.50
标 3-7	0.251	8.0	007	0.520	0.24	017	0.298	2.70
			008	0.368	1.23	018	0.289	3.10
			009	0.489	0.30	019	0.332	1.65
			010	0.721	0.12	020	0.265	5.60

参见图 1 人血清 OD_{450} 值与相应中和效价的标准曲线。

实施例 11:**动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒的应用****1. 犬狂犬病中和抗体的检测**

24 份待检犬血清，编号分别为 1~24，按实施例 5 进行狂犬病中和抗体检测，犬科动物标准血清及待检犬血清 OD₄₅₀ 值见表 20，绘制标准平滑曲线如图 2，所有血清 OD₄₅₀ 值与其中和效价的对应关系见表 20。

表 20 标准血清、待检犬血清 OD₄₅₀ 值及其中和抗体效价

血清编号	OD ₄₅₀ 值	中和效价	血清编号	OD ₄₅₀ 值	中和效价	血清编号	OD ₄₅₀ 值	中和效价
标 3-1	0.995	0	001	0.222	>8.0	013	0.586	0.20
标 3-2	0.526	0.25	002	0.532	0.22	014	0.298	2.70
标 3-3	0.436	0.5	003	0.661	0.18	015	0.863	0.06
标 3-4	0.366	1.0	004	0.525	0.25	016	0.951	0
标 3-5	0.319	2.0	005	0.991	0	017	0.332	1.65
标 3-6	0.269	4.0	006	0.886	0.05	018	0.352	1.50
标 3-7	0.241	8.0	007	0.710	0.12	019	0.445	0.38
			008	0.348	1.23	020	0.289	3.10
			009	0.469	0.30	021	0.265	5.60
			010	0.529	0.24	022	0.225	>8.0
			011	0.240	7.89	023	0.320	2.05
			012	0.271	4.31	024	0.366	1.0

参见图 2 犬血清 OD₄₅₀ 值与相应中和效价的标准曲线

2. 猫狂犬病中和抗体的检测

22 份待检猫血清，编号分别为 1~22，按实施例 5 进行狂犬病中和抗体检测，猫科动物标准血清及待检猫血清 OD₄₅₀ 值见表 21，绘制标准平滑曲线如图 3，所有血清 OD₄₅₀ 值与其中和效价的对应关系见表 21。

表 21 标准血清、待检猫血清 OD₄₅₀ 值及其中和抗体效价

血清编号	OD ₄₅₀ 值	中和效价	血清编号	OD ₄₅₀ 值	中和效价	血清编号	OD ₄₅₀ 值	中和效价
------	---------------------	------	------	---------------------	------	------	---------------------	------

标 3-1	0.988	0	001	0.987	0	012	0.986	0
标 3-2	0.512	0.25	002	0.489	0.29	013	0.225	>8.0
标 3-3	0.433	0.5	003	0.719	0.13	014	0.863	0.06
标 3-4	0.384	1.0	004	0.513	0.25	015	0.466	0.37
标 3-5	0.320	2.0	005	0.661	0.18	016	0.530	0.21
标 3-6	0.280	4.0	006	0.892	0.07	017	0.342	1.48
标 3-7	0.261	8.0	007	0.515	0.24	018	0.291	2.70
			008	0.369	1.22	019	0.278	3.14
			009	0.523	0.22	020	0.332	1.65
			010	0.205	>8.0	021	0.275	5.57
			011	0.262	8.0	022	0.322	1.96

参见图 3 猫血清 OD₄₅₀ 值与相应中和效价的标准曲线

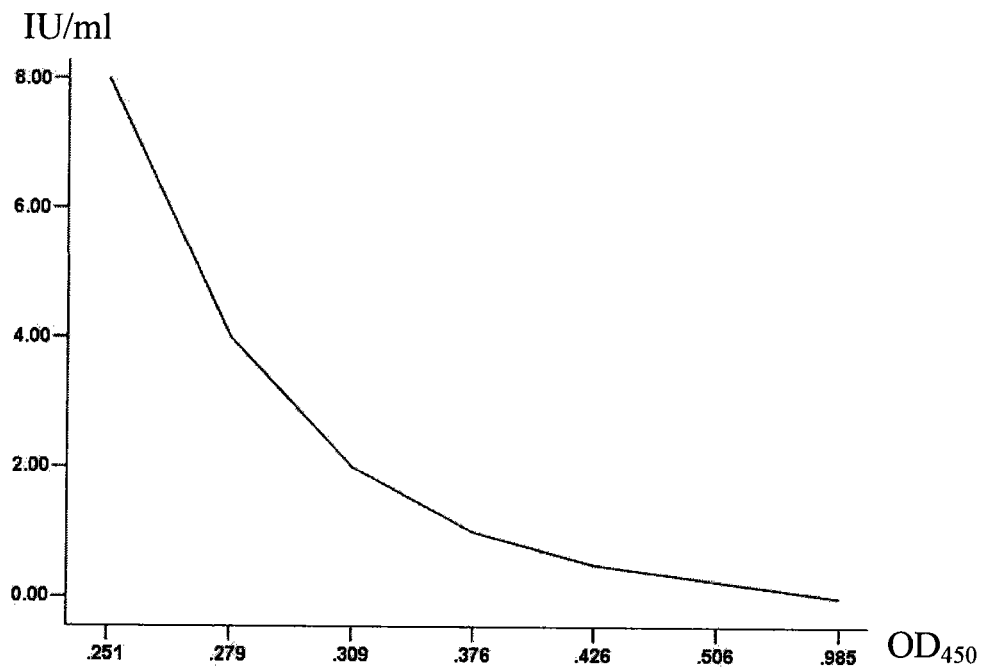


图 1

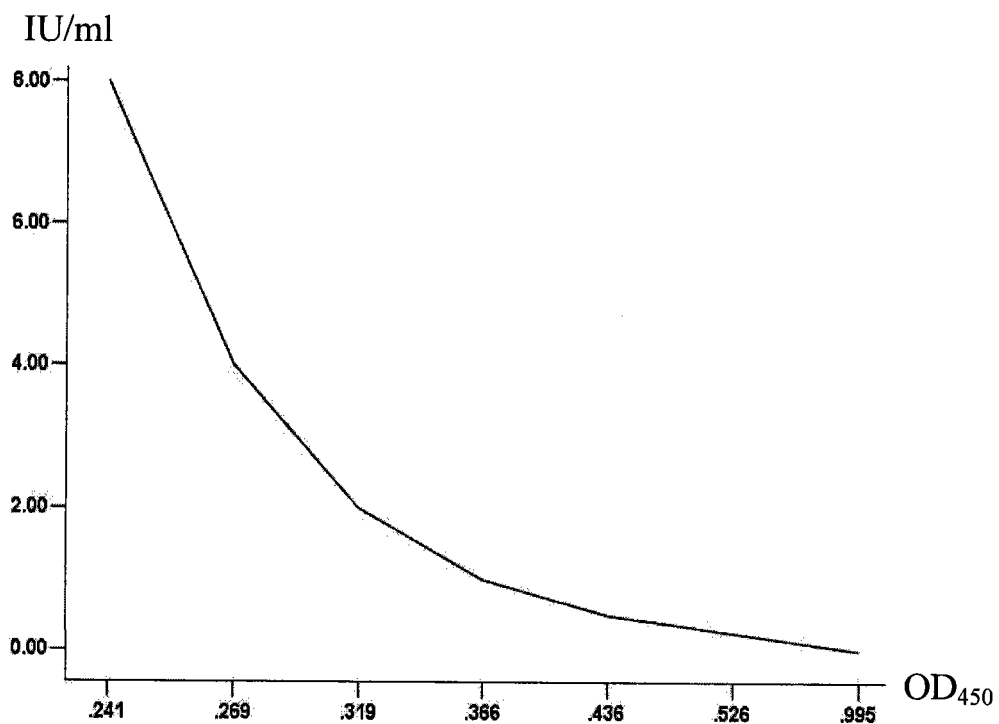


图 2

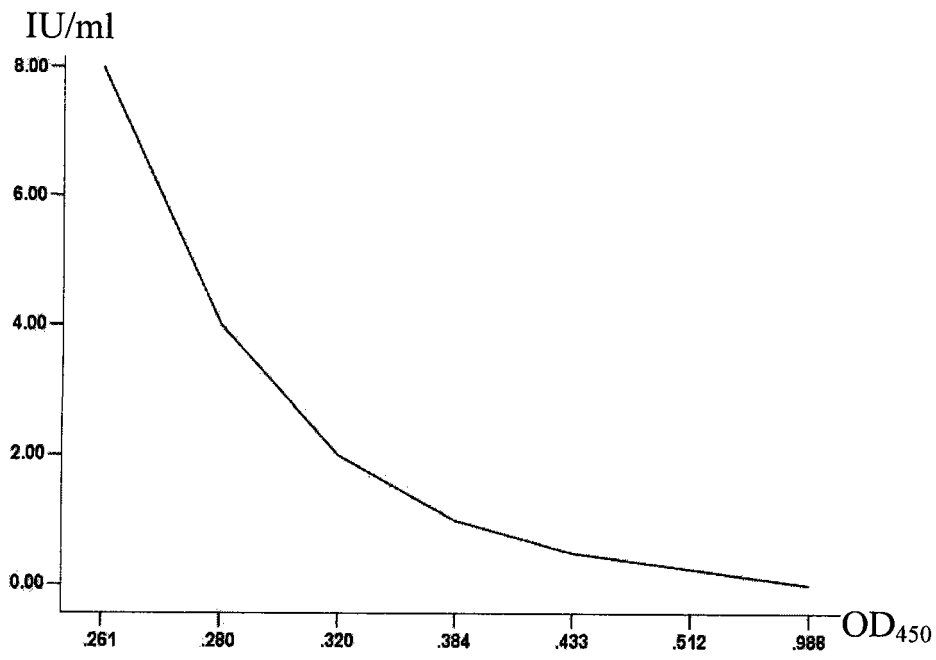


图 3

专利名称(译)	人和动物狂犬病中和抗体竞争ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101251537A	公开(公告)日	2008-08-27
申请号	CN200810050463.3	申请日	2008-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
[标]发明人	扈荣良 刘晔 张守峰 张菲		
发明人	扈荣良 刘晔 张守峰 张菲		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种人和动物狂犬病中和抗体竞争ELISA检测试剂盒，该试剂盒利用标记的狂犬病中和性抗体、标准血清和包被抗原，能够简单快速准确地检测人和动物血清中的狂犬病中和抗体。采用狂犬病病毒颗粒或病毒糖蛋白包被酶联板，将酶标记的狂犬病中和抗体按一定比例与待检血清及标准血清分别混合，与包被在酶联板上的狂犬病病毒糖蛋白抗原反应，显色后根据标准血清反应的OD值与已知中和效价绘制标准曲线，根据待检血清反应的OD值，在标准曲线上获得相应的中和抗体效价。该试剂盒可以准确地定量测定狂犬病病毒中和抗体，其操作简单，所用时间短，和WHO、OIE推荐的中和试验方法检测结果具有良好的—致性。

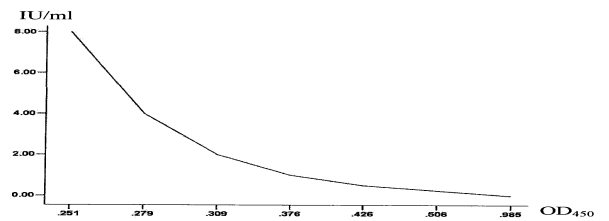


图 1

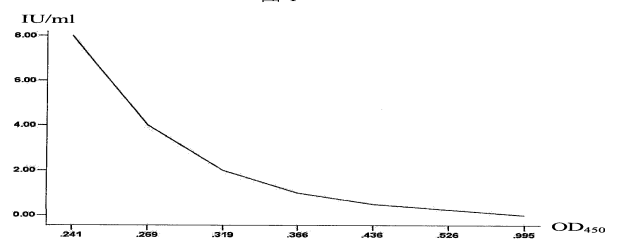


图 2