



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103869066 B

(45)授权公告日 2017.01.04

(21)申请号 201410123528.8

审查员 许珊萍

(22)申请日 2014.03.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103869066 A

(43)申请公布日 2014.06.18

(73)专利权人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

(72)发明人 刁有祥 陈浩 唐熠 高绪慧

提金凤

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务

所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

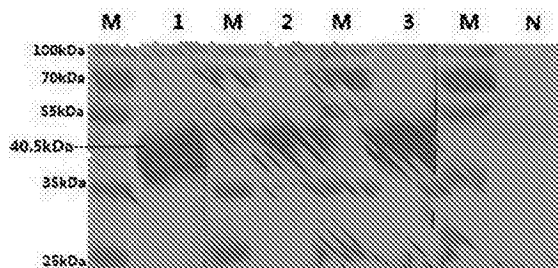
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

## (54)发明名称

一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法

## (57)摘要

本发明提供了一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法;本发明包括单克隆抗体制备、酶标抗体的选择和ELISA检测程序等步骤;本发明建立的坦布苏病毒夹心ELISA检测方法具有快速、稳定、特异性高、灵敏度高,使用本发明只需使用棉拭子采集气管或泄殖腔分泌物或其它含有坦布苏病毒的样品,即可快速检测样品中是否含有坦布苏病毒;本发明适合应用于鸭场对鸭群是否感染坦布苏病毒的大批量检测。本发明首次用血清学方法进行坦布苏病毒的检测。与现有技术相比,本发明更适合于基层进行大规模的病原检测,是一种简便,快速,特异的双抗体夹心ELISA方法。



1. 一种非疾病诊断目的的坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法,其特征在于包括以下步骤:

1)单克隆抗体制备 使用坦布苏病毒作为抗原免疫6周龄雌性BALB/c小鼠,待抗体效价达到 $10^4$ 以上三天后,将小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞采用PEG法进行细胞融合,间接ELISA法检测抗体并筛选阳性杂交瘤细胞,杂交瘤细胞制备的腹水单克隆抗体用辛酸-硫酸铵方法纯化,用 $1 \times \text{pH}9.6$ 碳酸盐缓冲液将单抗溶液稀释为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

2)酶标抗体的选择

利用高碘酸钠法对步骤1)中稀释为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单抗溶液进行HRP标记,并利用ELISA法对HRP标记的单抗溶液进行活性鉴定;鉴定步骤:将步骤1)中稀释为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单抗溶液包被96孔ELISA板,以坦布苏病毒为抗原,以HRP标记的单抗溶液为标记抗体,进行ELISA试验,测定各孔反应液 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值;以 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值最高的为酶标抗体;

3)ELISA检测程序

e1包被 将步骤1)中浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单抗溶液按照 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被96孔酶标板, $4^\circ\text{C}$ 过夜;

e2洗板 包被的酶标板按照 $200\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入PBST稀释液,震荡洗涤5min,重复四次,甩干;

e3封闭 步骤e2甩干的酶标板按照 $200\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入PBST封闭液封闭, $37^\circ\text{C}$ 孵育1h,震荡洗涤5min,重复四次,甩干;

e4加样 将待检样品按照 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入封闭后甩干的酶标板,置于 $37^\circ\text{C}$ 孵育1h,震荡洗涤5min,重复四次,甩干;

e5添加酶标抗体 将步骤2)中选择的酶标抗体用PBST稀释液按照体积比1:1000稀释后,按照 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板, $37^\circ\text{C}$ 孵育1h,震荡洗涤5min,重复四次,甩干;

e6 TMB显色 加入TMB显色液,每孔 $100\mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$ 避光显色15min;

e7终止 每孔加入 $50\mu\text{L}$   $3\text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ 终止液终止显色反应,在酶标仪上读取各孔反应液 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 的值;

f、阴阳性临界值的确定

根据公式:阴阳性临界值=阴性样本 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 平均值+3SD,得到阴阳性临界值,其中SD为标准偏差,当 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 在0.2以上,判断为阳性,即待检样品中含有坦布苏病毒。

## 一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法

### (一)技术领域

[0001] 本发明涉及一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法,属于病原检测技术领域。

### (二)背景技术

[0002] 坦布苏病毒感染是我国于2010年新发生的一种传染性疾病,2010年春夏之交,江浙地区突然出现鸭产蛋下降,之后迅速波及福建、广东、广西、安徽、江苏、江西、河南、山东、河北和北京等地的鸭场,经过病原分离和系统的实验室诊断,该病的病原为黄病毒属中的坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)。

[0003] 黄病毒属(Flavivirus)是一大群具有包膜的单正链RNA病毒,黄病毒科(Flaviviridae)包括3个病毒属,即黄病毒属(flavivirus)、瘟病毒属(pestivirus)和丙型肝炎病毒属(hepacivirus),共有60多种病毒。目前,研究表明,引起鸭感染发病的为黄病毒科、黄病毒属中的的坦布苏病毒。

[0004] 本病夏秋季发生更严重,蛋鸭、肉鸭生产区均有发生;危害多个品种,包括蛋鸭中的绍兴鸭、缙云麻鸭、山麻鸭、金定鸭、康贝尔鸭、台湾白改鸭,肉种鸭中的樱桃谷鸭和北京鸭,野鸭等;该病发病率高,死亡率较低,一般在5%以下,有继发感染时也可高达30%。10~25日龄肉鸭和产蛋鸭更易感。鹅、鸡也有发病的报道。该病一年四季均可发生,但夏秋季节多发,冬季也能发生。发病率80%以上,死亡率在2%~10%,TMUV属蚊传虫媒病毒,可能会经蚊子传播;已从鸭场内死亡麻雀体内检出TMUV,提示病毒可经鸟类传播;带毒蚊子和麻雀可导致病原在不同鸭场间的传播。病鸭组织样品中,卵泡膜的检出率最高,达93%,提示TMUV是否会经卵垂直传播,应该进行研究和引起重视。从泄殖腔拭子也可分离到病毒,表明该病毒可经粪便排毒,从而污染环境、饲料、饮水、器具、运输工具等。带毒鸭在不同地区的调运(或者污染的运输工具)极易成为本病大范围 and 快速传播的渠道。饲养管理不良,气候突变能促进该病的发生。

[0005] 目前,针对鸭坦布苏病毒已建立的检测方法主要是分子生物学检测方法,如套式RT-PCR、LAMP、地高辛、荧光定量PCR等,尚无血清学方法检测坦布苏病毒的相关报道。

### (三)发明内容

[0006] 为了解决上述问题,以便于更简便、快速地对大量样品进行TMUV病毒的检测,本发明提供了一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法。

[0007] 本发明首次用血清学方法进行坦布苏病毒的检测。与现有技术相比,本发明更适合于基层进行大规模的病原检测,是一种简便,快速,特异的双抗体夹心ELISA方法。

[0008] 一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法,包括以下步骤:

[0009] 1、单克隆抗体制备

[0010] 使用坦布苏病毒作为抗原免疫6周龄雌性BALB/c小鼠,待抗体效价达到 $10^4$ 以上三天后,将小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞采用PEG法进行细胞融合,间接ELISA法检测抗体并筛选阳性杂交瘤细胞,杂交瘤细胞制备的腹水单克隆抗体用辛酸-硫酸铵方法纯化,用 $1 \times$

pH9.6碳酸盐缓冲液将单抗溶液稀释为2 $\mu$ g/mL。

[0011] 2、酶标抗体的选择

[0012] 利用高碘酸钠法对步骤1)中稀释为2 $\mu$ g/mL的单抗溶液进行HRP标记,并利用ELISA法对HRP标记的单抗溶液进行活性鉴定。鉴定步骤:将步骤1)中稀释为2 $\mu$ g/mL的单抗溶液包被96孔ELISA板,以坦布苏病毒为抗原,以酶标(HRP)抗体为标记抗体,进行ELISA试验,测定各孔反应液OD<sub>450nm</sub>值。以OD<sub>450nm</sub>值最高的为酶标抗体。

[0013] 3、ELISA检测程序

[0014] e1包被将步骤1)中浓度为2 $\mu$ g/mL的单抗溶液按照100 $\mu$ L/孔包被96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜;

[0015] e2洗板包被的酶标板按照200 $\mu$ L/孔加入PBST稀释液,震荡洗涤5min,重复四次,甩干。

[0016] e3封闭e2甩干的酶标板按照200 $\mu$ L/孔加入PBST封闭液封闭,37 $^{\circ}$ C孵育1h,震荡洗涤5min,重复四次,甩干。

[0017] e4加样将待检样品按照100 $\mu$ L/孔加入封闭后甩干的酶标板,置于37 $^{\circ}$ C孵育1h,震荡洗涤5min,重复四次,甩干。

[0018] e5检测抗体将步骤2)中酶标抗体用PBST稀释液按照体积比1:1000稀释后,按照100 $\mu$ L/孔加入酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育1h,震荡洗涤5min,重复四次,甩干。

[0019] e6TMB显色加入TMB显色液,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15min。

[0020] e7终止每孔加入50 $\mu$ L3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液终止显色反应,在酶标仪上读取各孔反应液OD<sub>450nm</sub>的值。

[0021] f、阴阳性临界值的确定

[0022] 根据公式:阴阳性临界值=阴性样本OD<sub>450</sub>平均值+3SD(标准偏差),得到阴阳性临界值。当OD<sub>450nm</sub>在0.2以上,可判断为阳性,即待检样品中含有坦布苏病毒。

[0023] 本发明的有益效果:

[0024] 本发明建立的坦布苏病毒夹心ELISA检测方法具有快速、稳定、特异性高、灵敏度高,使用本发明只需使用棉拭子采集气管或泄殖腔分泌物或其它含有坦布苏病毒的样品,即可快速检测样品中是否含有坦布苏病毒;本发明适合应用于鸭场对鸭群是否感染坦布苏病毒的大批量检测。

#### (四)附图说明

[0025] 图1是制备的单克隆抗体纯化后western blotting图。

[0026] 其中M泳道为蛋白质标准;第1、2和3泳道为单克隆抗体;N泳道为阴性对照。说明制备的单克隆抗体具有很好的特异性。

#### (五)具体实施方式

[0027] 本发明中所用试剂及其组分如下:

[0028] 包被缓冲液:1 $\times$ 碳酸盐缓冲液(100mL,pH=9.6):Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>0.2756g,NaHCO<sub>3</sub>0.6216g,用蒸馏水溶解并定容至100mL,pH值9.5-9.7,4 $^{\circ}$ C保存;

[0029] PBS溶液:NaCl4.25g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O0.178g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O1.386g,用蒸馏水溶解

并定容至500mL,pH值7.1-7.3;

[0030] PBST稀释液:每1L PBS加入Tween-200.5mL,充分混匀;

[0031] PBST封闭液:将5g drymilk溶解于100mL PBST稀释液中,短期保存于4℃,长期保存于-20℃。

[0032] TMB显色液:

[0033] Buffer A:称取66.5063g柠檬酸钾,用800mL四蒸水溶解并用浓盐酸调节pH值至4.0,加入314μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,用水定容至1L,4℃保存;

[0034] Buffer B:称取0.2956g四甲基联苯胺(TMB),0.0633g四丁基硼氢化铵(TBABH)溶于30mL二甲基乙酰胺(DMA),4℃避光保存;

[0035] 使用时,将Buffer A和Buffer B以体积比39:1的比例混合,现配现用;

[0036] 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液:将浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以体积比1:5的比例加入蒸馏水中,混匀冷却至室温即为3M硫酸溶液。

[0037] 本发明所有使用的SP2/0骨髓瘤细胞可市购得到,坦布苏病毒分离株可根据文献《中国家禽》2011年17期《鸭坦布苏病毒病原的分离鉴定及生物学特性研究》分离得到。

[0038] 实施例1

[0039] 将坦布苏病毒感染鸭的脑组织加0.3mL生理盐水研磨,4000转/分钟离心15分钟后,根据文献《中国家禽》2011年17期《鸭坦布苏病毒病原的分离鉴定及生物学特性研究》中的方法得到坦布苏病毒分离株;取上清经尿囊腔接种9日龄SPF鸡胚,每枚0.2mL,37℃孵育,弃掉24h内死胚,收集24~96小时内死胚或者活胚尿囊液,12000r/min,高速离心30min,取上清,80000r/min,超速离心2h,弃去上清,加入PBS溶解沉淀,得到纯化的坦布苏病毒(TMUV)。TMUV作为免疫用抗原,将其分装保存于-80℃备用。

[0040] 2、单抗的制备与纯化用1)中纯化的坦布苏病毒作为免疫抗原免疫6周龄雌性BALB/c小鼠,80μg/只。第一次免疫加弗氏完全佐剂,第二、三、四次免疫加弗氏不完全佐剂。免疫方式为前两次腹部皮肤多点注射,第三、四次腹腔注射。第四次免疫后14天,尾静脉采血检测效价并建立检测抗体的TMUV-ELISA和E-ELISA方法。选择抗体效价在10<sup>4</sup>以上的小鼠,细胞融合前第3天使用单纯坦布苏病毒为抗原对小鼠进行加强免疫,剂量为100μg/只;三天后将小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞采用PEG法进行细胞融合;待融合细胞长满96孔板底部1/3面积以上时,用TMUV-ELISA和E-ELISA筛选融合细胞,选择TMUV-ELISA和E-ELISA均为阳性的融合细胞用有限稀释法进行克隆化,直至阳性率为100%,即得到杂交瘤细胞。对能稳定分泌单抗的杂交瘤细胞进行腹水制备单抗,用E-ELISA测定效价。单抗原辛酸-硫酸铵方法纯化,用1×pH9.6碳酸盐缓冲液将纯化后的单抗稀释为2μg/mL。

[0041] 3、酶标抗体的选择将步骤2)中稀释为2μg/mL的单抗溶液利用高碘酸钠法进行HRP标记,并利用ELISA对标记好的单抗进行活性鉴定。将步骤2)中稀释为2μg/mL的单抗溶液包被酶标板,以坦布苏病毒(TMUV)为抗原,以酶标(HRP)抗体为标记抗体,进行ELISA试验。测定各孔OD<sub>450nm</sub>值,以OD<sub>450nm</sub>值最高的为酶标抗体。

[0042] 4、最佳反应条件酶标抗体工作浓度是1:1000,封闭液为含5%脱脂奶粉的PBST,抗原、标记抗体最佳工作时间为1h,TMB显色时间为15min。

[0043] 5、交叉反应性用本发明建立的方法对DPV、AIV、NDV、IBDV、EDS-76、TMUV阳性血清及阴性血清进行检测,该方法只与TMUV阳性血清反应呈阳性,说明该方法具有很好的特异

性。

[0044] 6、检测程序

[0045] 6.1包被将步骤1)中稀释为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单抗溶液按照 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被96孔酶标板,  $4^{\circ}\text{C}$ 过夜;

[0046] 6.2洗板步骤6.1中包被的酶标板按照 $200\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入PBST稀释液, 震荡洗涤5min, 重复四次, 甩干;

[0047] 6.3封闭步骤6.2中甩干的酶标板按照 $200\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入含1%(体积比)牛血清蛋白(BSA)的PBST封闭液封闭,  $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h, 震荡洗涤5min, 重复四次, 甩干;

[0048] 6.4加样待检样品按照 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入6.3孵育后的酶标板, 置于 $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h, 震荡洗涤5min, 重复四次, 甩干;

[0049] 6.5检测抗体将步骤3)中酶标抗体用含1%BSA的PBST稀释液按照体积比1:1000稀释, 按照 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板,  $37^{\circ}\text{C}$ 孵育1h, 震荡洗涤5min, 重复四次, 甩干;

[0050] 6.6TMB显色加入新鲜配制的TMB显色液, 每孔 $100\mu\text{L}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 避光显色15min;

[0051] 6.7终止、读数每孔加入 $50\mu\text{L} 3\text{M H}_2\text{SO}_4$ 终止显色反应, 在酶标仪上读取各孔反应液 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 的值。

[0052] 7、阴阳性判定根据发明内容中f步骤计算得到的阴阳性临界值进行判定。

[0053] 反应液 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 在0.2以上, 判断为阳性, 即待检样品中含有坦布苏病毒;

[0054] 反应液 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 在0.18~0.2之间, 判断为疑似, 按照步骤6重新检测;

[0055] 反应液 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 低于0.18, 判断为阴性, 即待检样品中不含有坦布苏病毒。

[0056] 本发明仅用于坦布苏病毒的检测。

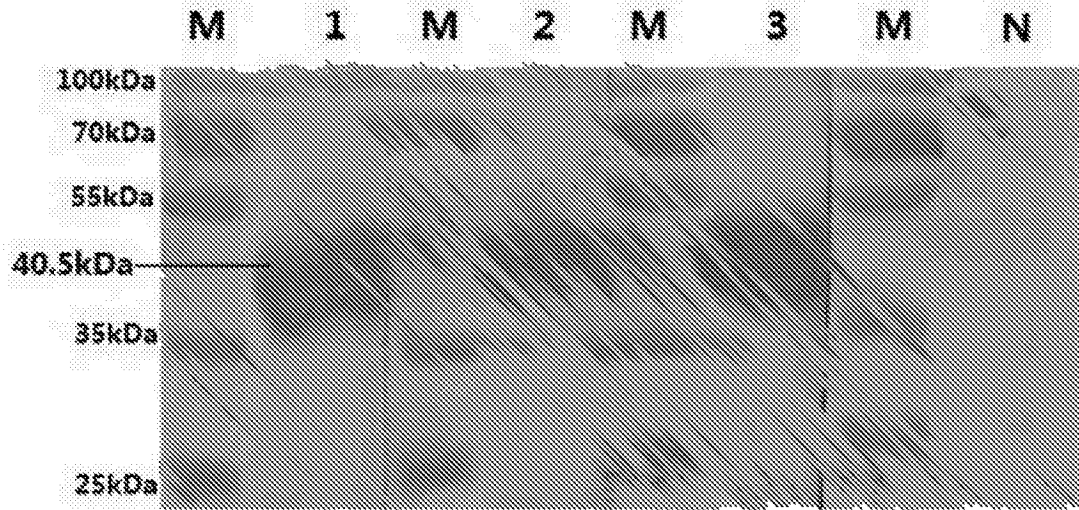


图1

专利名称(译)	一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103869066B</a>	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201410123528.8	申请日	2014-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	刁有祥 陈浩 唐熠 高绪慧 提金凤		
发明人	刁有祥 陈浩 唐熠 高绪慧 提金凤		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/581 G01N2333/185		
其他公开文献	CN103869066A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种坦布苏病毒双抗体夹心ELISA检测方法；本发明包括单克隆抗体制备、酶标抗体的选择和ELISA检测程序等步骤；本发明建立的坦布苏病毒夹心ELISA检测方法具有快速、稳定、特异性高、灵敏度高，使用本发明只需使用棉拭子采集气管或泄殖腔分泌物或其它含有坦布苏病毒的样品，即可快速检测样品中是否含有坦布苏病毒；本发明适合应用于鸭场对鸭群是否感染坦布苏病毒的大批量检测。本发明首次用血清学方法进行坦布苏病毒的检测。与现有技术相比，本发明更适合于基层进行大规模的病原检测，是一种简便，快速，特异的双抗体夹心ELISA方法。

