



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106226519 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610564220.6

(22)申请日 2016.07.18

(71)申请人 洛阳现代生物技术研究有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛龙区科技园
开元大道西S8号

(72)发明人 李秀梅 耿玉静 李权伟 刘玉宝
张鹏翼 杨志

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 程茗

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

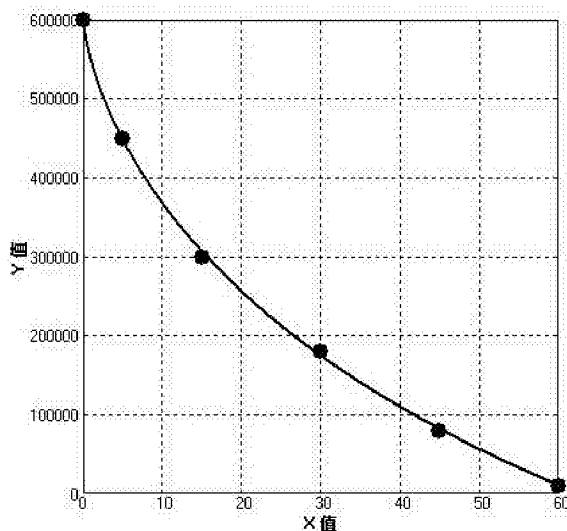
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,包括包被抗原聚苯乙烯板、单克隆抗体、标准品、发光底物A液和发光底物B液;所述包被抗原聚苯乙烯板为包被O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的不透明聚苯乙烯板所述单克隆抗体为述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体;所述发光底物A液由鲁米诺,羟基香豆素,没食子酸,Tris-Hcl缓冲液和水组成;所述标准品为采用校准品稀释液分别进行稀释的口蹄疫O型病毒抗体,稀释度分别为0 NU/mL、2NU/mL、5 NU/mL、10 NU/mL、30 NU/mL和60NU/mL。本发明试剂盒可用于检测O型口蹄疫病毒抗体,具有灵敏度高、检测范围宽的优点,且实现了口蹄疫抗体的定量检测。



1. 一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,包括包被抗原聚苯乙烯板、单克隆抗体、标准品、发光底物A液和发光底物B液,其特征在于:

所述包被抗原聚苯乙烯板为包被O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的不透明聚苯乙烯板,其制备方法为,将O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白作为包被抗原,按照包被抗原和包被缓冲液的体积比为1:5000的比例,对包被抗原进行稀释;以100 μ l/孔的加样量将稀释后的包被抗原加入48孔或96孔的不透明的白色微孔板中,4 $^{\circ}$ C条件下包被20h,洗涤液洗涤2-3次,再加入封闭液150 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C条件下封闭16h后甩液,于37 $^{\circ}$ C干燥3h,装袋封口;

所述单克隆抗体为述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体,工作浓度为1:600;

所述发光底物A液由以下成分组成:鲁米诺0.15mmol/L,羟基香豆素0.59mmol/L,没食子酸0.35mmol/L,Tris-Hcl缓冲液0.2mol/L,余量为水;

发光底物B液由下列成分组成:氨基酸氧化酶0.85mmol/L,吐温-20体积浓度 0.8%,DTPA 0.5mmol/L,维生素C 0.12mmol/L和乙酸-乙酸盐缓冲液0.2mol/L,余量为水;

所述标准品为采用校准品稀释液分别进行稀释的口蹄疫O型病毒抗体,稀释度分别为0 NU/mL、2NU/mL、5 NU/mL、10 NU/mL、30 NU/mL和60NU/mL。

2. 如权利要求1所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述封闭液,每升封闭液中含三羟基氨基甲烷1.21 g、酪蛋白1 g、海藻糖10 g、蔗糖50 g和proclin300 1 ml,余量为水。

3. 如权利要求1所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述包被缓冲液,每升包被缓冲液中含有8 g氯化钠、0.2 g的氯化钾、2.9 g十二水磷酸氢二钾、0.2 g磷酸二氢钾和0.5 ml吐温20,余量为水,PH 9.7。

4. 如权利要求1所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的制备方法,包括以下步骤:

(1)、根据GenBank上口蹄疫病毒分离株O/HK/02的VP1基因序列,选择VP1蛋白的200-213的氨基酸序列为优势抗原表位即RE2,设计多表位基因表达盒,构建重组质粒pUC-18-RE2,即含有RE基因的重组质粒;

(2)、将含有RE基因的重组质粒和表达载体质粒pCold-SUM0,用内切酶BamHI和HindIII分别进行双酶切,得到RE基因片段和酶切后的表达载体质粒pCold-SUM0;

(3)、将RE基因片段分别克隆于大肠杆菌表达载体pCold-SUM0,阳性重组质粒命名为pCold-SUM0- RE2,将该重组质粒转化至大肠杆菌BL21/(DE3)PlysS感受态细胞,获得重组大肠杆菌,命名为E.coli-FMDV-RE2;

(4)、重组大肠杆菌E.coli-FMDV-RE2经IPTG诱导进行目的蛋白的表达,将诱导后的菌液经离心、超声破碎方法进行纯化,既得到口蹄疫O型病毒RE2重组蛋白。

5. 如权利要求1所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述O型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备方法为:将O型口蹄疫病毒作为抗原免疫Balb/c小鼠,通过经方阵滴定间接ELISA法确定抗原包被浓度检测小鼠血清,效价达到 $1:4.096 \times 10^4$,取其脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合制备口蹄疫O型单克隆抗体;通过采用有限稀释法和已建立的间接ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞株,最终阳性值最高细胞株中再经4次亚克隆筛选,获得能稳定分泌单克隆抗体的特异性杂交瘤细胞株;对特异性杂交瘤细胞株进行培养,得到O型口

蹄疫病毒单克隆抗体。

6.如权利要求5所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述抗原包被浓度为2.5mg/L。

7.如权利要求1所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒检测O型口蹄疫病毒抗体的方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)将包被抗原聚苯乙烯板放置在支架上;

(2)分别向反应微孔中依次加入50 μ l标准品和待测标本;再向每孔加入50 μ l单克隆抗体,轻轻震荡微孔支架,充分混匀;贴封膜后,在37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C条件下,温育60分钟;

(3)用洗涤液连续洗反应板5次,在洗水纸上甩干;每孔加混合后的底物100 μ l,室温反应5分钟;

(4)在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度;

(5)结果判定:以校准品发光值为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,绘制校准品的四参数标准曲线,四参数模式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$;将样本的发光值代入四参数标准曲线中,从标准曲线上直接读出样品中O型口蹄疫病毒抗体的含量。

8.如权利要求1所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒检测O型口蹄疫病毒的方法,其特征在于:所述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体的标记方法为,将单克隆抗体、戊二醛和辣根过氧化物酶进行交联,透析除去过量的戊二醛。

一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,具体的说是一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫(foot-and-mouth disease,FMD)是口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus,FMDV)引起的牛、猪、羊等多种偶蹄动物的急性、热性、高度接触性传染病,主要病状为口、蹄、乳头等处出现水疱,水疱破裂后形成溃烂。该病的暴发和流行常常给畜牧业生产和经济发展造成巨大的损失,主要是由于患病动物死淘率增加、生产性能下降、种用价值丧失,更重要的是任何国家和地区都不与有口蹄疫国家进行贸易往来,严重影响了经济贸易与畜牧业的发展,并造成相关的政治、经济和社会问题,因而倍受世界各国的关注。

[0003] 口蹄疫病毒是属于小RNA病毒科口蹄疫病毒属的成员,血清型众多,有A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2和SAT3七个血清型,血清型间无交叉免疫现象。FMDV的抗原结构十分复杂,存在广泛的抗原变异,即使是免疫动物在接触新病毒后也可形成隐性感染而持续带毒。该病毒的多血清型性和抗原易变性给口蹄疫的诊断带来了极大的困难。其诊断分为临床诊断和实验室诊断。在临床上,口蹄疫与有类似症状的疾病不易区分,如水疱性口炎、猪水疱病、猪水疱疹等。因此,任何可疑病料必须经过实验室技术进行确诊。实验室诊断包括从最早的病毒分离与鉴定、补体结合试验、病毒中和试验到酶联免疫吸附实验以及基因芯片技术,逐渐向更敏感、特异、方便、快速的方向发展。

[0004] 传统的口蹄疫诊断和检疫方法主要有补体结合试验、琼脂扩散试验、中和试验、间接血凝试验、酶联免疫吸附试验等血清学方法,所用的抗体是免疫动物的抗血清制备而成,这些抗血清实际上是抗体复合物,用它作为诊断试剂时容易产生很强的非特异性。目前,大多研究都在试图将针对不同抗原表位的单抗混合,用于开发诊断试剂。

[0005] 1982年,McCllogh(1982年)和Butcher(1982年)首次研究成功抗O型口蹄疫病毒单抗,这一研究不仅在诊断和株系差异鉴别方面得到广泛应用,而且在分子生物学上的应用方面开展了大量的探索研究,开拓了一个将细胞工程和基因工程很好结合的新的研究领域。

发明内容

[0006] 本发明目的是为解决上述技术问题的不足,提供一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,利用竞争法与学发光法相结合制备,灵敏度高、检测范围宽,且实现了口蹄疫抗体的定量检测。

[0007] 本发明为解决上述技术问题所采用的技术方案是:

一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒,包括包被抗原聚苯乙烯板、单克隆抗体、标准品、发光底物A液和发光底物B液;

所述包被抗原聚苯乙烯板为包被O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的不透明聚苯乙烯板,其

制备方法为,将O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白作为包被抗原,按照包被抗原和包被缓冲液的体积比为1:5000的比例,对包被抗原进行稀释;以100 μ l/孔的加样量将稀释后的包被抗原加入48孔或96孔的不透明的白色微孔板中,4℃条件下包被20h,洗涤液洗涤2-3次,再加入封闭液150 μ l/孔,4℃条件下封闭16h后甩液,于37℃干燥3h,装袋封口;

所述单克隆抗体为述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体,工作浓度为1:600;

所述发光底物A液由以下成分组成:鲁米诺0.15mmol/L,羟基香豆素0.59mmol/L,没食子酸0.35mmol/L,Tris-Hcl缓冲液0.2mol/L,余量为水;

发光底物B液由下列成分组成:氨基酸氧化酶0.85mmol/L,吐温-20体积浓度 0.8%,DTPA 0.5mmol/L,维生素C 0.12mmol/L和乙酸-乙酸盐缓冲液0.2mol/L,余量为水;

所述标准品为采用校准品稀释液分别进行稀释的口蹄疫O型病毒抗体,稀释度分别为0 NU/mL、2NU/mL、5 NU/mL、10 NU/mL、30 NU/mL和60NU/mL。

[0008] 所述剂量单位NU/mL的建立方法为,根据血清的细胞中和试验结果,挑选效价分别为全阴血清、1:2、1:20、1:80、1:960、1:2560的血清,建立起和中和试验血清效价相对应的线性关系,并且建立起和中和试验血清效价分别为全阴血清、1:2、1:20、1:80、1:960、1:2560相对应的校准品,校准品分别为0、2、5、10、30、60,并且建立剂量单位NU/ml;

所述封闭液,每升封闭液中含三羟基氨基甲烷1.21 g、酪蛋白1 g、海藻糖10 g、蔗糖50 g和proclin300 1 ml,余量为水。

[0009] 所述包被缓冲液,每升包被缓冲液中含有8 g氯化钠、0.2 g的氯化钾、2.9 g十二水磷酸氢二钾、0.2 g磷酸二氢钾和0.5 ml吐温20,余量为水,PH 9.7。

[0010] 所述O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的制备方法,包括以下步骤:

(1)、根据GenBank上口蹄疫病毒分离株O/HK/O2的VP1基因序列,选择VP1蛋白的200-213的氨基酸序列为优势抗原表位即RE2,设计多表位基因表达盒,构建重组质粒pUC-18-RE2,即含有RE基因的重组质粒;

(2)、将含有RE基因的重组质粒和表达载体质粒pCold-SUMO,用内切酶BamH1和HindIII分别进行双酶切,得到RE基因片段和酶切后的表达载体质粒pCold-SUMO;

(3)、将RE基因片段分别克隆于大肠杆菌表达载体pCold-SUMO,阳性重组质粒命名为pCold-SUMO- RE2,将该重组质粒转化至大肠杆菌BL21/(DE3)PlysS感受态细胞,获得重组大肠杆菌,命名为E.coli-FMDV-RE2;

(4)、重组大肠杆菌E.coli-FMDV-RE2经IPTG诱导进行目的蛋白的表达,将诱导后的菌液经离心、超声破碎方法进行纯化,既得到口蹄疫O型病毒RE2重组蛋白。

[0011] 所述O型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备方法为:将O型口蹄疫病毒作为抗原免疫Balb/c小鼠,通过经方阵滴定间接ELISA法确定抗原包被浓度检测小鼠血清,效价达到1:4.096 $\times 10^4$,取其脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合制备口蹄疫O型单克隆抗体;通过采用有限稀释法和已建立的间接ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞株,最终阳性值最高细胞株株中再经4次亚克隆筛选,获得能稳定分泌单克隆抗体的特异性杂交瘤细胞株;对特异性杂交瘤细胞株进行培养,得到O型口蹄疫病毒单克隆抗体。

[0012] 所述抗原包被浓度为2.5mg/L。

[0013] 所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒检测O型口蹄疫病毒抗体的方法,包

括以下步骤：

(1)将包被抗原聚苯乙烯板放置在支架上；

(2)分别向反应微孔中依次加入50 μ l标准品和待测标本；再向每孔加入50 μ l单克隆抗体，轻轻震荡微孔支架，充分混匀；贴封膜后，在37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C条件下，温育60分钟；

(3)用洗涤液连续洗反应板5次，在洗水纸上甩干；每孔加混合后的底物100 μ l，室温反应5分钟；

(4)在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度；

(5)结果判定：以校准品发光值为纵坐标，对应的校准品浓度为横坐标，绘制校准品的四参数标准曲线，四参数模式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ；其中a--吸光度上限值，b--吸光度增长速率参数，相当于曲线的斜率；c--吸光度增长速度开始发生变化的浓度值，相当于半数反应浓度(EC50)；d--吸光度下限值；y--发光值，x--最终得到的实际含量；将样本的发光值代入四参数标准曲线中，从标准曲线上直接读出样品中O型口蹄疫病毒抗体的含量。

[0014] 所述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体的标记方法为，将单克隆抗体、戊二醛和辣根过氧化物酶进行交联，透析除去过量的戊二醛。

[0015] 有益效果是：

1、本发明O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒采用竞争法与学发光法相结合制备，首次将化学发光方法应用于动物检测中；采用的发光底物，相较传统的显色底物，致癌性和危害性较小，更为安全；校准品的建立，最先实现O型口蹄疫病毒抗体的定量；口蹄疫O型单克隆抗体的制备，具有特异性强，批次间差异性小的优点；本发明中O型口蹄疫病毒单克隆抗体的标记，一步法步标记，简便快速；可以微量标记，节省昂贵的抗原抗体；无需透析，即时使用；标记率极高，可大于95%；敏感性一般是传统过碘酸法标记3~5倍。

[0016] 2、本发明O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒，不仅具有高灵敏度、检测范围宽、操作简便快速、标记物稳定、无污染、仪器简单经济等优点，而且实现了口蹄疫抗体的定量检测，整个检测过程仅需要30min。

附图说明

[0017] 图1是本发明实施例2中的标准曲线图。

具体实施方式

[0018] 以下通过实施例对本发明作进一步说明。

[0019] 实施例1

一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒，包括包被抗原聚苯乙烯板、单克隆抗体、标准品、发光底物A液和发光底物B液；

所述包被抗原聚苯乙烯板为包被O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的不透明聚苯乙烯板，其制备方法为，将O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白作为包被抗原，按照包被抗原和包被缓冲液的体积比为1:5000的比例，对包被抗原进行稀释；以100 μ l/孔的加样量将稀释后的包被抗原加入48孔或96孔的不透明的白色微孔板中，4 $^{\circ}$ C条件下包被20h，洗涤液洗涤2~3次，再加入封闭液150 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C条件下封闭16h后甩液，于37 $^{\circ}$ C干燥3h，装袋封口；

所述单克隆抗体为述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体，工作浓度为

1:600;

所述发光底物A液由以下成分组成:鲁米诺0.15mmol/L,羟基香豆素0.59mmol/L,没食子酸0.35mmol/L,Tris-Hcl缓冲液0.2mol/L,余量为水;发光底物B液由下列成分组成:氨基酸氧化酶0.85mmol/L,吐温-20体积浓度 0.8%,DTPA 0.5mmol/L,维生素C 0.12mmol/L和乙酸-乙酸盐缓冲液0.2mol/L,余量为水;

所述标准品为采用校准品稀释液分别进行稀释的口蹄疫O型病毒抗体,稀释度分别为0 NU/mL、2NU/mL、5 NU/mL、10 NU/mL、30 NU/mL和60NU/mL。

[0020] 所述剂量单位NU/mL的建立方法为,根据血清的细胞中和试验结果,挑选效价分别为全阴血清、1:2、1:20、1:80、1:960、1:2560的血清,建立起和中和试验血清效价相对应的线性关系,并且建立起和中和试验血清效价分别为全阴血清、1:2、1:20、1:80、1:960、1:2560相对应的校准品,校准品分别为0、2、5、10、30、60,并且建立剂量单位NU/ml;剂量单位NU/mL的建立,首先实现了定量、快速检测,可以快速的定量检测大批样本。

[0021] 所述封闭液,每升封闭液中含三羟基氨基甲烷1.21 g、酪蛋白1 g、海藻糖10 g、蔗糖50 g和proclin300 1 ml,余量为水。

[0022] 所述包被缓冲液,每升包被缓冲液中含有8 g氯化钠、0.2 g的氯化钾、2.9 g十二水磷酸氢二钾、0.2 g磷酸二氢钾和0.5 ml吐温20,余量为水,PH 9.7。

[0023] 所述O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的制备方法,包括以下步骤:

(1)、根据GenBank上口蹄疫病毒分离株O/HK/O2的VP1基因序列,选择VP1蛋白的200-213的氨基酸序列为优势抗原表位即RE2,设计多表位基因表达盒,构建重组质粒pUC-18-RE2,即含有RE基因的重组质粒;

(2)、将含有RE基因的重组质粒和表达载体质粒pCold-SUMO,用内切酶BamHI和Hind III分别进行双酶切,得到RE基因片段和酶切后的表达载体质粒pCold-SUMO;

(3)、将RE基因片段分别克隆于大肠杆菌表达载体pCold-SUMO,阳性重组质粒命名为pCold-SUMO- RE2,将该重组质粒转化至大肠杆菌BL21/(DE3)PlysS感受态细胞,获得重组大肠杆菌,命名为E.coli-FMDV-RE2;

(4)、重组大肠杆菌E.coli-FMDV-RE2经IPTG诱导进行目的蛋白的表达,将诱导后的菌液经离心、超声破碎方法进行纯化,既得到口蹄疫O型病毒RE2重组蛋白。

[0024] 所述O型口蹄疫病毒单克隆抗体的制备方法为:将O型口蹄疫病毒作为抗原免疫Balb/c小鼠,通过经方阵滴定间接ELISA法确定抗原包被浓度检测小鼠血清,效价达到 $1:4.096 \times 10^4$,取其脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合制备口蹄疫O型单克隆抗体;通过采用有限稀释法和已建立的间接ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞株,最终阳性值最高细胞株中再经4次亚克隆筛选,获得能稳定分泌单克隆抗体的特异性杂交瘤细胞株;杂交瘤细胞通过体外传代试验、连续冻存复苏试验、腹水连续传代试验;在对产生的单克隆抗体进行特异型检测后,发现这些细胞株产生的抗体与口蹄疫O型病毒呈阳性反应,而与口蹄疫病毒A型、亚洲1型、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征病毒重组蛋白及大肠杆菌菌体蛋白不发生特异性反应。对特异性杂交瘤细胞株进行培养,得到O型口蹄疫病毒单克隆抗体。

[0025] 所述抗原包被浓度为2.5mg/L。

[0026] 所述O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒检测O型口蹄疫病毒抗体的方法,包括以下步骤:

- (1)将包被抗原聚苯乙烯板放置在支架上;
- (2)分别向反应微孔中依次加入50 μ l标准品和待测标本;再向每孔加入50 μ l单克隆抗体,轻轻震荡微孔支架,充分混匀;贴封膜后,在37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C条件下,温育60分钟;
- (3)用洗涤液连续洗反应板5次,在洗水纸上甩干;每孔加混合后的底物100 μ l,室温反应5分钟;
- (4)在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度;
- (5)结果判定:以校准品发光值为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,绘制校准品的四参数标准曲线,四参数模式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ 将样本的发光值代入四参数标准曲线中,从标准曲线上直接读出样品中O型口蹄疫病毒抗体的含量。

[0027] 所述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体的标记方法为,将单克隆抗体、戊二醛和辣根过氧化物酶进行交联,透析除去过量的戊二醛。

[0028] 实施例2

一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒的制备:

1. 将口蹄疫O型重组蛋白作为抗原免疫Balb/c小鼠,通过经方阵滴定间接ELISA法确定最佳的抗原包被浓度(2.5mg/L)检测小鼠血清,效价达到 $1:4.096 \times 10^4$,取其脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合制备口蹄疫O型单克隆抗体。通过采用有限稀释法和已建立的间接ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞株,最终从阳性值最高的细胞株中再经4次亚克隆筛选,获得能稳定分泌单克隆抗体的特异性杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞通过体外传代试验、连续冻存复苏试验、腹水连续传代试验,均具有良好的稳定性;在对产生的单克隆抗体进行特异型检测后,发现这些细胞株产生的抗体与口蹄疫O型病毒呈阳性反应,而与口蹄疫病毒A型、亚洲1型、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征病毒重组蛋白及大肠杆菌菌体蛋白不发生特异性反应。

[0029] 2.包被口蹄疫O型重组抗原的反应板的制备:以口蹄疫O型重组抗原为包被抗原,经包被缓冲液稀释到1:5000,以100 μ L/孔的加样量加入96孔反应板,4 $^{\circ}$ C条件下包被20h,洗涤液洗涤3次,再加入封闭液150 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C条件下封闭16h后甩液,于37 $^{\circ}$ C干燥5h,装袋封口。

[0030] 3.所用辣根过氧化物酶酶标记单克隆抗体,采用戊二醛方法进行,即将口蹄疫O型单克隆抗体、戊二醛、酶、一起加入进行交联。透析除去过量的戊二醛,在标记好的口蹄疫O型抗体-HRP溶液中,等体积比加入甘油于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0031] 4. 辣根过氧化物酶标记口蹄疫O型单克隆抗体的稀释液由磷酸盐缓冲液5%、牛血清白蛋白和0.1% proclin 300组成。

[0032] 5.按照已有的技术配置相应的洗涤液、发光底物液等。口蹄疫O型重组抗原为本实验室制备;标准品购于中国农业科学院兰州兽医研究所。

[0033] 一种口蹄疫O型化学发光抗体检测试剂盒检测样品中口蹄疫O型抗体:

向已包被口蹄疫O型重组抗原的96孔不透明白板上,加入待测血清和标准品;接着向96孔板加入50 μ L/孔酶标单克隆抗体,然后封板,37 $^{\circ}$ C 温育60min。用洗涤液连续洗酶标板5次,在洗水纸上甩干。加100 μ L/孔发光底物溶液,避光室温5min;在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度(RLU)。

[0034] 以标准品发光值为纵坐标,对应的标准品浓度为横坐标,绘制标准品的四参数标准曲线,如图1所示,标准曲线为: $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ($a=60$, $b=0.69$, $c=124.86$, $d=-$

968913.6);其中相关系数: $r^2=99.97\%$,将样本的发光值代入标准曲线中,从标准曲线上直接读出样品中口0型蹄疫病毒抗体含量。

[0035] 实验例

1. 特异性检验

分别用试制的3批0型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒检测口蹄疫A型、亚洲-1型、猪瘟、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒、大肠杆菌阳性血清。

血清	2014001 批		2014002 批		2014003 批	
	发光值	相对含量	发光值	相对含量	发光值	相对含量
口蹄疫A型	352559	10.6	387815	8.4	387039	8.4
口蹄疫亚I型	358815	10.2	401873	7.6	361284	10.0
猪瘟病毒	383276	8.6	375610	9.1	395518	7.9
PRRS 病毒	380201	8.8	361191	10.0	433429	5.9
大肠杆菌	439356	5.6	47011	52.2	46588	52.3

[0036] 2. 敏感性检验

将敏感性阳性质控血清按1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048进行稀释,从试制的3批试剂盒中,每批随机取1个试剂盒进行检测,确定0型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒的敏感性。

血清	2014001 批		2014002 批		2014003 批	
	发光值	相对含量	发光值	相对含量	发光值	相对含量
1:16	150410	31.2	180492	26.9	164248	29.1
1:32	168730	28.5	195355	25.0	152127	30.9
1:64	257864	18.1	278493	16.2	258999	18.0
1:128	275792	16.5	288760	15.4	160322	29.7
1:256	333442	11.9	307763	13.8	199453	24.5
1:512	353851	10.5	317850	13.0	298615	14.5
1:1024	415913	6.8	328571	12.2	322000	12.7
1:2048	483774	3.7	396695	7.9	392728	8.1
弱性质控血清	580000	0.43	591254	0.16	589458	0.20

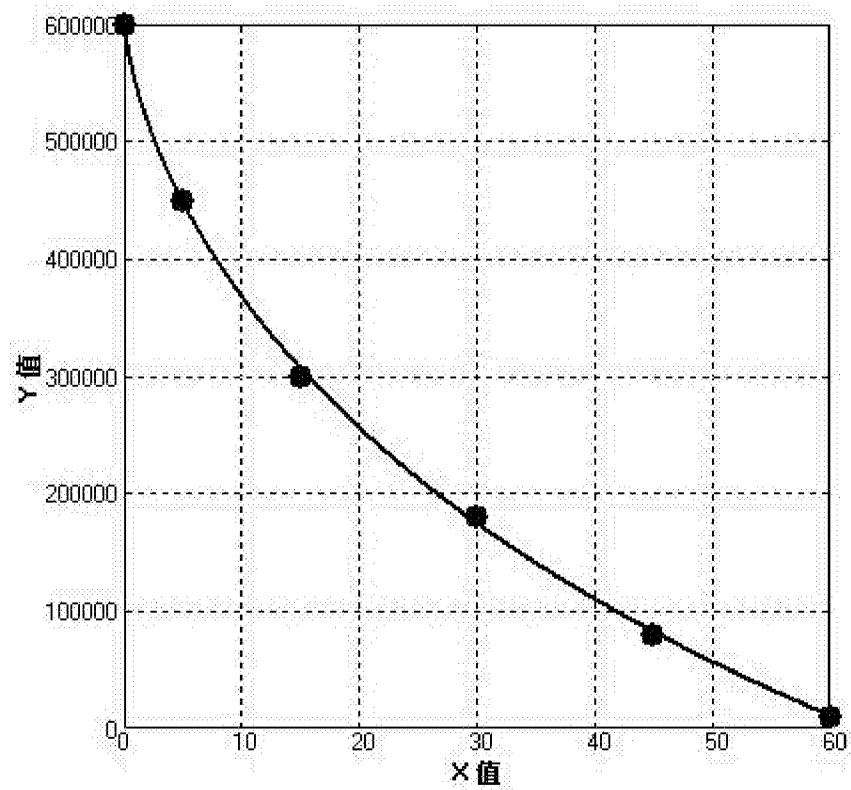


图1

专利名称(译)	一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106226519A	公开(公告)日	2016-12-14
申请号	CN201610564220.6	申请日	2016-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究院有限公司		
[标]发明人	李秀梅 耿玉静 李权伟 刘玉宝 张鹏翼 杨志		
发明人	李秀梅 耿玉静 李权伟 刘玉宝 张鹏翼 杨志		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N21/76 G01N33/531 G01N33/54306		
代理人(译)	程茗		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种O型口蹄疫病毒抗体化学发光检测试剂盒，包括包被抗原聚苯乙烯板、单克隆抗体、标准品、发光底物A液和发光底物B液；所述包被抗原聚苯乙烯板为包被O型口蹄疫病毒RE2重组蛋白的不透明聚苯乙烯板所述单克隆抗体为述辣根过氧化物酶标记的O型口蹄疫病毒单克隆抗体；所述发光底物A液由鲁米诺，羟基香豆素，没食子酸，Tris-Hcl缓冲液和水组成；所述标准品为采用校准品稀释液分别进行稀释的口蹄疫O型病毒抗体，稀释度分别为0 NU/mL、2NU/mL、5 NU/mL、10 NU/mL、30 NU/mL和60NU/mL。本发明试剂盒可用于检测O型口蹄疫病毒抗体，具有灵敏度高、检测范围宽的优点，且实现了口蹄疫抗体的定量检测。

