



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108828210 A

(43)申请公布日 2018.11.16

(21)申请号 201810364446.0

(22)申请日 2018.04.23

(71)申请人 天津津斯特生物技术有限责任公司

地址 300300 天津市东丽区空港经济区天
保工业园4号厂房3层

(72)发明人 王宁 吴冠军 石慧颖

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心
酶联免疫法

(57)摘要

一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心酶联免疫法,属于免疫分析技术领域。本发明以纯化兔抗AdC68抗体为包被抗体,纯化重组ADC68GFP为标准品,HRP酶标记的山羊抗腺病毒HEXON抗体为酶标抗体,含2%羊血清的PBST为样品稀释液,以双抗体夹心法检测黑猩猩腺病毒AdC68抗原、病毒蛋白、滴度、病毒颗粒等。该方法具有很高的特异性、灵敏度和精密度,与常用的紫外法测病毒颗粒和蚀斑法测病毒滴度相比,其适用性更广,适合在重组黑猩猩腺病毒纯化工艺过程中的在线检测。通过该方法能够在AdC68制备过程中快速估算病毒量,以指导上游病毒培养和下游纯化工艺。

1. 一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心酶联免疫法,其主要步骤特征为:

(1) 包被抗体:纯化抗体用包被缓冲液(碳酸钠溶液)稀释,最佳包被浓度为1:50,每孔100ul,4℃过夜;

(2) 封闭:洗涤后,用PBST(含0.1%吐温20的PBS)配制2% BSA,每孔200ul,37℃封闭2hr;

(3) 捕获抗原:标准参考品和待测定样品用含2%羊血清PBST稀释,加样量为100ul,37℃孵育1hr;

(3) 加入酶标抗体:洗涤后,加HRP标记的羊抗腺病毒HEXON(购自Invitrogen),使用浓度为1:500,每孔100ul,37℃孵育1hr;

(4) 显色:洗涤后,用含0.01%TMB的显色液100ul,室温避光显色30min;

(5) 读数:加每孔50ul 2M H₂SO₄溶液终止,450/630nm 波长测定吸收值。

2. 如权利要求1所述,标准参考品是经纯化处理过的非复制型黑猩猩腺病毒68型(AdC68GFP),制备为如下步骤:

(1) 将非复制型黑猩猩腺病毒68型病毒以MOI1~10的比例,接种静置培养的HEK293单层细胞,待细胞完全病变后,收获病变的细胞;

(2) 冻融三次后,剧烈震荡裂解细胞释放病毒;

(3) 再经过两次不连续氯化铯密度梯度超速离心获得纯化病毒,纯化病毒再通过脱盐柱处理后,用含10%甘油的PBS保存于-70℃超低温冰箱中备用。

3. 如权利要求1所述,包被抗体是经纯化过的兔抗AdC68抗体,制备方法如下:以权利要求2中纯化病毒接种家兔,采集免疫家兔血清,测定中和滴度,取不低于中和滴度/1280的抗血清经硫酸铵沉淀粗纯,再经Protein G粗纯,获得纯化抗体。

4. 如权利要求1所述,标准参考品的稀释度为1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640,对应浓度为7.76ug/ml、3.88ug/ml、1.94 ug/ml、0.97 ug/ml、0.48 ug/ml、0.24 ug/ml、0.12 ug/ml、0.06 ug/ml。

5. 如权利要求2所述,用Lorry法测定纯化重组病毒蛋白浓度,标准品蛋白浓度为38.8ug/ml,残留HEK293蛋白含量低于0.3ug/ml。

一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心酶联免疫法

技术领域

[0001] 一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心酶联免疫法,属于免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 由于腺病毒具有宿主范围广、高转基因表达能力的特点,目前有高达300种人用治疗或者预防性重组腺病毒药物正用于临床试验,广泛应用的腺病毒载体是人血清型腺病毒AdHu2和AdHu5型。但由于人群中普遍存在针对常见的人血清型腺病毒的中和抗体,削弱了相应腺病毒载体诱导的免疫反应,阻碍了这些载体在临床上的应用。为避免人群中预存抗体对腺病毒载体疫苗免疫或治疗作用的影响,一批从其他种群来源的型别被越来越多的应用于人类疫苗的研究中,其中就有黑猩猩腺病毒载体AdC68。

黑猩猩腺病毒与其他腺病毒一样,都是先在HEK293细胞或者PER.C6细胞中培养,经过破碎细胞释放病毒和纯化步骤,获得纯化的病毒。本发明采用双抗体ELISA法,建立起快速估算黑猩猩腺病毒AdC68的方法。该方法有很高的特异性、灵敏度和精密度,与常用的紫外法测病毒颗粒和蚀斑法测病毒滴度相比,其适用性更广,能够测定抗原、滴度、病毒颗粒、蛋白含量等,适合在重组黑猩猩腺病毒纯化工艺过程中的在线检测。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种快速检测黑猩猩腺病毒AdC68的Elisa方法,用于该型腺病毒培养过程中的在线检测。

[0004] 本发明以经一定稀释后的纯化重组AdC68GFP为标准品,用Lorry法测定该纯化重组病毒蛋白浓度,标准品蛋白浓度为38.8ug/ml,残留HEK293蛋白含量低于0.3ug/ml其制备方法如下:

(1) 将非复制型黑猩猩腺病毒68型病毒以MOI1~10的比例,接种静置培养的HEK293单层细胞,待细胞完全病变后,收获病变的细胞。冻融三次后,剧烈震荡裂解细胞释放病毒;

(2) 再经过两次不连续氯化铯密度梯度超速离心获得纯化病毒,纯化病毒再通过脱盐柱处理后,用含10%甘油的PBS保存于-70℃超低温冰箱中备用。

[0005] 本发明以纯化过的兔抗AdC68抗体为包被抗体,其制备方法如下:以纯化重组AdC68GFP病毒接种家兔,采集免疫家兔血清,测定中和滴度,取不低于中和滴度/1280的抗血清经硫酸铵沉淀粗纯,再经Protein G粗纯,获得纯化抗体。

[0006] 本发明中酶标抗体为HRP酶标记的山羊抗腺病毒HEXON抗体(购自Invitrogen),含2%羊血清的PBST为样品稀释液,通过双抗体夹心酶联免疫法测定腺病毒。具体实验步骤为:

(1) 包被抗体:纯化抗体用包被缓冲液(碳酸钠溶液)稀释,最佳包被浓度为1:50,每孔100ul,4℃过夜;

(2) 封闭:洗涤后,用PBST(含0.1%吐温20的PBS)配制2% BSA,每孔200ul,37℃封闭2h;

(3) 捕获抗原:标准参考品和待测定样品用含2%羊血清PBST稀释,加样量为100ul,37℃孵育1hr;

(4) 加入酶标抗体:洗涤后,加HRP标记的羊抗腺病毒HEXON(购自Invitrogen),使用浓度为1:500,每孔100ul,37℃孵育1hr;

(5) 显色:洗涤后,用含0.01%TMB的显色液100ul,室温避光显色30min。

(6) 读数:加每孔50ul 2M H₂SO₄溶液终止,OD 450/630nm 波长测定吸收值。

[0007] 本发明筛选并优化了包被抗体的浓度,通过实验确定了参考品的最佳线性范围为1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640,对应浓度为7.76ug/ml、3.88ug/ml、1.94 ug/ml、0.97 ug/ml、0.48 ug/ml、0.24 ug/ml、0.12 ug/ml、0.06 ug/ml。用该方法能够测量黑猩猩腺病毒AdC68抗原、滴度、病毒颗粒、蛋白含量等。

图1是实施例1中标准蛋白浓度对吸光值的标准曲线图。

具体实施例

[0008] 实施例1 绘制标准曲线

1) 操作

纯化抗体用包被缓冲液稀释,最佳包被浓度为1:50,每孔100ul,4℃过夜;洗涤后,用PBST(含0.1%吐温20的PBS)配制2%BSA,每孔200ul,37℃封闭2hr;标准参考品和待测定样品用含2%羊血清PBST稀释,加样量为100ul,37℃孵育1hr;洗涤后,加HRP标记的羊抗腺病毒HEXON,使用浓度为1:500,每孔100ul,37℃孵育1hr;洗涤后,用含0.01%TMB的显色液100ul,室温避光显色30min。

2) 作图

将纯化病毒标准品做1/5、1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640系列稀释,各稀释参考品浓度为7.76ug/ml、3.88ug/ml、1.94 ug/ml、0.97 ug/ml、0.48 ug/ml、0.24 ug/ml、0.12 ug/ml、0.06 ug/ml。按照确定的双抗体ELISA方法,测定标准品。根据各标准品对应的OD450/630值做散点图并直线回归,如图1所示。在3.88ug/ml~0.06 ug/ml的范围内,线性相关性最佳,相关系数 $r=0.9996$ 。

附图说明:横坐标为标准品蛋白浓度,单位ug/ml;纵坐标为OD450/630吸光值。公式为回归方程, r 为相关系数。

图1 标准曲线

[0009] 实施例 2 准确度、精密度验证

按照本发明方法操作,将AdC68标准品稀释,配制高低两个浓度的样品,含蛋白分别为0.776ug/ml、0.388ug/ml,用建立的ELISA法重复测定9次,计算样品回收率、变异系数等(见表),结果显示,测定的回收率在84.38%至102.6%之间,变异系数分别为3.44%、6.72%,说明方法有很好的准确度和精密度,能够准确测定病毒蛋白含量。

表1

	病毒蛋白含量	双抗体夹心 ELISA 测定结果			
	ug/ml	平均值 ug/ml	回收率 %	标准差	变异系数 %
低浓度	0.388	0.3661	89.70~99.89	0.0126	3.44
高浓度	0.776	0.7234	84.38~102.6	0.0486	6.72

[0010] 实施例 3

按照本发明进行实验操作,选取腺病毒AdC68纯化工工艺研究过程中不同的样品,测定抗原病毒蛋白含量。同时测定滴度、病毒颗粒。验证建立的双抗体ELISA方法的适用性。表2中病毒蛋白为本发明方法测得数据。从对病毒纯化过程中的样品检测来看,建立的ELISA方法能很好的检测出重组病毒蛋白的含量,与测得病毒滴度和病毒颗粒数有很好的相关性。并且,通过与样品病毒滴度的对比,计算比活,能大致推算出不同纯化步骤对AdC68病毒纯度的影响,纯化方法1明显优于2、3。

表 2 不同纯化方法比较

	滴度 IFU/ml	病毒颗粒 Vp/ml	病毒蛋白 mg/ml	比活(滴度/病毒蛋白) IFU/mg
裂解液	2.83 E+9	-	21.5	1.31 E+8
粗纯	2.03 E+9	-	18.9	1.07 E+8
精细纯化方法 1	4.20 E+9	1.6 E+12	0.827	5.08 E+9
精细纯化方法 2	2.20 E+9	1.0 E+12	0.547	4.02 E+9
精细纯化方法 3	2.00 E+9	9.3 E+11	1.36	1.47 E+9

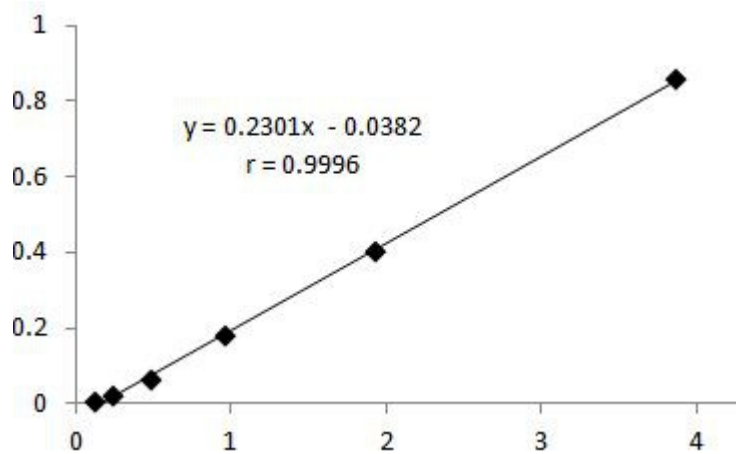


图1

专利名称(译)	一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心酶联免疫法		
公开(公告)号	CN108828210A	公开(公告)日	2018-11-16
申请号	CN201810364446.0	申请日	2018-04-23
[标]发明人	王宁 吴冠军 石慧颖		
发明人	王宁 吴冠军 石慧颖		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测黑猩猩腺病毒AdC68的双抗体夹心酶联免疫法，属于免疫分析技术领域。本发明以纯化兔抗AdC68抗体为包被抗体，纯化重组ADC68GFP为标准品，HRP酶标记的山羊抗腺病毒HEXON抗体为酶标抗体，含2%羊血清的PBST为样品稀释液，以双抗体夹心法检测黑猩猩腺病毒AdC68抗原、病毒蛋白、滴度、病毒颗粒等。该方法具有很高的特异性、灵敏度和精密度，与常用的紫外法测病毒颗粒和蚀斑法测病毒滴度相比，其适用性更广，适合在重组黑猩猩腺病毒纯化工艺过程中的在线检测。通过该方法能够在AdC68制备过程中快速估算病毒量，以指导上游病毒培养和下游纯化工艺。

