



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105259347 B

(45)授权公告日 2017. 11. 14

(21)申请号 201510497502.4

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2015.08.13

G01N 21/76(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 肖吉

申请公布号 CN 105259347 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(73)专利权人 杭州雅盛生物科技有限公司

地址 310000 浙江省杭州市西湖区文三路
388号钱江科技大厦903室

(72)发明人 毕爱国 刘诚 毛慧慧

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 曾少丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页

(54)发明名称

一种肠道病毒71的检测方法及其试剂盒

(57)摘要

本发明公布了一种肠道病毒71双抗体夹心ELISA试剂盒,该试剂盒包括:已包被有抗VP1多克隆抗体的酶标板;酶标抗VP1多克隆抗体;VP1抗原。本发明还公布了该试剂盒的制备方法及检测方法。本发明预先将抗VP1多克隆抗体和酶标抗VP1多克隆抗体制备试剂盒,制备方法简单,能够实现快速检测及标准化,采用抗VP1多克隆抗体对EV71各种基因型均有高结合效价,检测结果更加准确。

1. 一种肠道病毒71双抗体夹心ELISA试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括:已包被有兔抗VP1多克隆抗体的酶标板;酶标鸡抗VP1多克隆抗体;VP1抗原;VP1抗原可以稀释成系列浓度建立标准曲线;

还包括:洗涤液、稀释液、终止液、底物显示液、阳性对照血清和阴性对照血清的一种或多种;

所述洗涤液是由吐温-20与浓度为0.01mol/L、pH 为7.4 的磷酸盐缓冲液按照体积比1:1900~2200 混合配制而成;

所述VP1抗原为灭活VP1蛋白;

所述肠道病毒71双抗体夹心ELISA 试剂盒的制备方法包括以下步骤:

(1) 包被酶标板:采用包被液包被兔抗VP1多克隆抗体,4℃包被过夜,包被浓度为4.8~5.2μg/mL,100~120μL/孔,包被液为50mM碳酸盐缓冲液;

(2) 封闭酶标板:甩去包被液,于吸水纸上扣干酶标板,每孔加入100~250μL封闭液,4℃封闭过夜,甩去封闭液,用洗涤液洗板3次,于吸水纸上扣干酶标板;

(3) 酶标板包装:将封闭的酶标板用铝箔袋真空包装,得到包被有兔抗VP1抗体的酶标板 ;

(4) 试剂盒制备:将酶标鸡抗VP1多克隆抗体IgY置于瓶中封口后和包装好的酶标板一起放置到包装盒中得到EV71双抗体夹心 ELISA 试剂盒;

试剂盒检测方法包括以下步骤:

1) 分别加入待测样品、阳性对照血清和阴性对照血清,100~150μL/孔,37℃孵育50~150min ;

2) 甩去样品液,用洗涤液冲洗干净,加入1 :2000 稀释的酶标鸡抗EV71多克隆抗体,100~120μL/孔,37℃孵育30min ;

3) 加入底物进行显色,100~200μL/孔,37℃反应15min;

4) 加入终止液终止反应;

5) 用酶标仪测定OD值,根据Cut-off 值判断阴性、阳性;

所述多克隆抗体的制备包括以下步骤:

1.1 免疫原的制备

1.1.1 设计 EV71VP1 基因序列引物

根据 GenBank登录号 :EU024958.1查询到的 EV71 衣壳蛋白 VP1 基因序列,自行设计引物,引物序列为 :上游引物的序列为

5'-TTCCATATGGGAGATAGGGTGGCDGATGTGATY GA-3' ;

下游引物的序列为

5'-CCGCTCGAGGAGDGTGGTGATRGCRGTGCGACT-3' ;

1.1.2 提取 EV71 病毒的 RNA

提取由浙江 CDC 惠赠 的EV71 病毒的RNA为模板:使用美国 Roche 公司的病毒 RNA 抽提试剂盒,直接从培养的病毒中提取 RNA,操作步骤按试剂盒中的说明书进行,方法如下:

1) 取1.5mL离心管,做好标记后加入 409μL 已经混均的工作液;

2) 用带滤芯无 RNase的吸头加入 200μL需抽提处理的样本,漩涡混合器上振荡混匀,

短暂离心后,室温静置10min;

- 3) 用带滤芯吸头加入 400 μ L 无水乙醇,漩涡混合器上振荡混匀,短暂离心;
- 4) 将核酸抽提柱放置在2mL离心管上,取500 μ L步骤 3)的液体转移入核酸提取柱,12000rpm离心30s;
- 5) 重复 4),将步骤 3)中的剩余液体移入核酸提取柱,12000rpm 离心30s;
- 6) 弃2mL离心管中的废液,在每个核酸抽提柱内加入500 μ L洗涤液 WA,12000rpm离心30s;
- 7) 弃2mL离心管中的废液,在每个核酸抽提柱内加入 500 μ L 洗涤液WB,12000rpm离心30s;
- 8) 弃2mL离心管中的废液,以最大转速离心2min;
- 9) 弃2mL离心管,将核酸抽提柱置于一个无RNase的1.5mL离心管,在抽提柱的膜中央小心地加入30 μ L EB,静置1min,12000rpm 离心2min;
- 10) 弃纯化柱,将离心回收的核酸暂时储存于4 $^{\circ}$ C备用;

1.1.3 RT-PCR扩增目的基因vp1

通过RT-PCR扩增目的基因vp1 :

- 1) RNA扩增的 RT-PCR 体系如下:
- 2) PCR扩增体系为 2 $\times$ RT-PCR Buffer 25.0 μ L、5U/ μ L Taq 酶 1.0 μ L、RT酶1.0 μ L、10 μ M Primer-F1.0 μ L、10 μ M Primer-R1.0 μ L、模板RNA 4.0 μ L、RNase Free ddH₂O 17.0 μ L;
- 3) RT-PCR扩增反应条件如下:
RT-PCR反应条件为Pattern 1 反转录反应42 $^{\circ}$ C、15min、95 $^{\circ}$ C 2min;Pattern 2 PCR反应Cyc1e 45、95 $^{\circ}$ C 15sec;

获得目的基因后,构建重组质粒,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,获得目的重组基因工程菌,获得重组工程菌后诱导表达目的蛋白,并收集包涵体;

1.1.4 包涵体的复性与纯化

①包涵体溶解 称取5g包涵体,重悬于100mL增溶缓冲液中,室温搅拌2h;13500rpm离心10min,弃沉淀,上清取样测蛋白浓度;所述增溶缓冲液为50mM Tris-HCl,6M Gnd-HCl,10mM DTT,1mM EDTA,pH8.5;

②包涵体复性 在4 $^{\circ}$ C环境中,上清中缓慢加入10L复性液,加完以后调整复性液pH到8.0,调节温度到4 $^{\circ}$ C,搅拌复性 48h;复性完成后,复性液10000rpm离心30min,收集上清液,保存备用;所述复性液为10mM PB,0.1M Arg,10% Gly,1mM DTT,pH7.2;

③包涵体纯化

亲和层析柱采用平衡缓冲液进行平衡,平衡稳定后上样,上样完成后用平衡缓冲液中再次进行平衡5个柱体积,平衡缓冲液为20mM PB,0.5M NaCl,pH7.4,之后进行洗脱,洗脱缓冲液为20mM Tris,0.5M NaCl,0.5M 咪唑,pH8.0;洗脱时采用线性洗脱方式进行洗脱,即Buffer B 经过 30min从 0上升至100%,大约10个柱体积;洗脱过程中收集单峰进行 SDS-PAGE分析;获得高纯度抗原蛋白VP1;

1.2 酶标鸡抗VP1多克隆抗体的制备

1.2.1 动物免疫

选取6-8月龄刚开始产蛋的鸡种,采用重组蛋白VP1进行蛋鸡免疫,免疫程序如下:

1) 首次免疫:采用高纯度抗原蛋白VP1与弗氏完全佐剂按体积比1:1 进行混合,充分乳化,进行翅下皮下注射,免疫量100 μ g/ 只;

2) 二次免疫:间隔15天后进行第二次免疫,采用高纯度抗原蛋白VP1与弗氏不完全佐剂按体积比 1:1 混合,充分乳化,进行翅下皮下注射,免疫量50 μ g/ 只;

3) 采血:第二次免疫之后7天进行采血,采用ELISA间接法检测抗体效价并收集鸡蛋;

4) 加强免疫:第二次免疫之后间隔15天采用不完全佐剂与抗原进行加强免疫,继续收集鸡蛋直到抗体效价开始下降;

1.2.2 多克隆抗体的提取与纯化

采用水稀释法进行卵黄的粗提,提取液进行超滤浓缩之后,进行饱和硫酸铵沉淀,离心收集沉淀,PBS缓冲液复溶,再采用亲和层析进行纯化,最后将纯化后的鸡抗VP1多克隆抗体IgY冷冻干燥成冻干粉,置于-80℃保存,备用;

1.2.3 酶标抗体的制备

经纯化的鸡抗VP1多克隆抗体,采用经典过碘酸钠法进行辣根过氧化酶标记,之后加等量无菌甘油置于-80℃保存;

1.3 兔抗 VP1 多克隆抗体的制备与纯化

1) 首次免疫:用VP1 抗原免疫兔子,背部多点皮下注射,免疫量200 μ g/ 只;

2) 二次免疫:间隔21天进行二免,100 μ g/ 只 ;

3) 加强免疫:间隔21天进行加强免疫,100 μ g/ 只;

4) 收集血清:第3次加强免疫后1周,心脏取血,收集血清 ; 5) 纯化并保存:采用Protein A柱进行亲和层析,收集高纯度抗 VP1多克隆血清体,-20℃保存。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

一种肠道病毒71的检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子免疫学领域,具体涉及肠道病毒71的检测方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 手足口病(hand,foot and mouth disease;HFMD)是由肠道病毒引起的一种急性传染病。该病自1957年首次报道以来,曾多次大范围流行,世界卫生组织(World Health Organization;WHO)于2006年曾将本病列为第四位引起死亡的疾病。美国、澳大利亚、意大利、法国、荷兰、西班牙、罗马尼亚、巴西、加拿大、德国等国家经常发生由各型柯萨奇、埃可病毒和肠道病毒71型(EV71)引起的手足口病。1998年,台湾地区暴发EV71的大流行,约有12万以上的人被感染,死亡78人。1998-2001年手足口病在新加坡的流行以及2007年该病在中国发生了大规模的疾病暴发。手足口病是全球性传染病,近年来手足口病已经成为越来越威胁国内外儿童健康的广泛流行性疾病之一。为指导全国各地做好手足口病的预防控制,2008年卫生部发布《手足口病预防控制指南》;规定自2008年5月2日起,手足口病纳入丙类传染病管理。

[0003] 引起手足口病的病原体有20多种,其中以柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A 16;CA16)和肠道病毒71型(Human Enterovirus 71;EV71)最为常见,均为小RNA病毒科。有研究显示不同病毒引起者可有不同的并发症与预后,如CA16引起的HFMD预后较好,多为散发,极少导致HFMD的大规模暴发;而EV71感染患儿临床症状常较重,死亡率高。因此,有关EV71的病毒生物学特性、致病机理、诊断和预防等的研究日益受到人们的重视。

[0004] EV71属于小RNA病毒科肠道病毒属的成员。EV71的病毒颗粒为二十面体立体对称的球形结构,无包膜和突起,直径大约24~30nm,核酸为单股正链RNA。EV71基因组编码四个多肽VP1(α)、VP2(β)、VP3(γ)、VP4(δ),四个多肽首先构成原聚体,再由5个原聚体拼装成具有五聚体样结构的亚单位,60个亚单位相互连接形成病毒的外壳。四种结构蛋白中,VP1、VP2和VP3三个多肽暴露在病毒外壳的表面,而VP4包埋在病毒外壳的内侧与病毒核心紧密连接,因而抗原表位基本上位于VP1~VP3上。VP1作为主要的衣壳蛋白,具有最多的型特异性中和位点,其基因序列与病毒血清型具有较高的相关性。

[0005] EV71病毒衣壳蛋白VP1是该病毒主要的中和决定因子,它直接决定病毒的抗原性。VP1基因具有与病毒血清型完全对应的遗传多样性,VP1基因序列不仅可作为肠道病毒属内不同血清型分类的依据。并可作为小RNA病毒科内不同属的分类参考,因此VP1基因成了EV71基因分型和遗传进化分析的最重要的对象。目前基于VP1核苷酸序列的差异,可将EV71分为A、B、C等三个基因型,A型仅包括原型株BrCr-CA-70;B型和C型又可进一步分为B1、B2、B3、B4以及C1、C2、C3和C4亚型。Brown等曾对113株世界各地的EV71分离株的VP1基因的核苷酸序列进行同源性分析,显示同一型内毒株间序列同源性大于92%,而不同型间毒株的同源性为78%~83%。自1997-2001年期间在马来西亚、新加坡、中国台湾和澳大利亚西部等地流行期间分离到2个新亚型,即B3和B4亚型,其中B3亚型为东南亚地区的流行株。B4亚型曾在新加坡(1997-1998年)和中国台湾(1998年)小规模流行,但2000年在马来西亚和新加

坡大规模流行,成为流行株。B基因型主要包括美国、澳大利亚、哥伦比亚、新加坡、部分中国大陆与中国台湾地区、部分马来西亚的毒株;而C基因型主要包括美国、澳大利亚、中国大陆与中国台湾、加拿大和部分马来西亚的毒株。B和C基因型在系统发生树上遗传距离较远。中国台湾1998年EV71大爆发是由2个基因型,即B和C2同时引起的,但Shih等比较了其流行期间从死亡病例中分离的18株毒株。结果表明,有17株分离毒株为C2亚型,仅1株为B型。近年来在中国上海、重庆、浙江和深圳等多个地区分离的EV71病毒有较高的同源性,均属于C4亚型,提示该C4亚型EV71病毒在中国大陆可能有较广泛的分布和传播。EV71病毒衣壳蛋白VP2和VP4是肠道病毒外壳蛋白的主要组成部分,它们与病毒的抗原性密切相关,基于VP1与VP4的基因分型具有很高的相关性。

[0006] 目前,EV71疫苗、特异性治疗药物等防控手段尚不成熟。EV71病原体的快速诊断、疫苗的抗原含量检测、保护性表位研究,具有广泛的临床应用和社会需求。高质量的EV71多克隆抗体可用于研制EV71患者病原体诊断以及EV71疫苗的抗原含量检测,因此具有重要的应用价值。本申请以EV71病毒的C4亚型为基础,利用重组抗原VP1免疫兔与鸡分别制备多克隆抗体,并运用该配对抗体对EV71采用酶联免疫夹心法进行检测。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于解决现有技术中的EV71检测方法耗时、繁琐,成本高昂的缺陷,提供一种快速高效、准确灵敏、制作成本低的EV71病毒检测方法及其试剂盒。

[0008] 本发明的技术方案是这样实现的:一种肠道病毒71双抗体夹心ELISA试剂盒,该试剂盒包括:已包被有抗VP1多克隆抗体的酶标板;酶标抗VP1多克隆抗体;VP1抗原。

[0009] 进一步地,所述酶标板上包被的抗VP1多克隆抗体为兔抗VP1多克隆抗体,所述酶标抗VP1多克隆抗体为酶标鸡抗VP1多克隆抗体。

[0010] 进一步地,还包括:洗涤液、稀释液、终止液、底物显示液、阳性对照血清和阴性对照血清的一种或多种。

[0011] 进一步地,所述洗涤液是由吐温-20与浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液按照体积比1:1900~2200混合配制而成。

[0012] 进一步地,所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0013] 进一步地,所述酶标抗VP1多克隆抗体的标记酶为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、丙酮酸激酶和葡萄糖氧化酶标记的一种。

[0014] 进一步地,所述VP1抗原为灭活VP1蛋白。

[0015] 肠道病毒71双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 包被酶标板:采用包被液包被兔抗VP1多克隆抗体,4℃包被过夜,包被浓度为4.8~5.2μg/mL,100~120μL/孔,所述包被液为50mM碳酸盐缓冲液;

[0017] (2) 封闭酶标板:甩去包被液,于吸水纸上扣干酶标板,每孔加入100~250μL封闭液,4℃封闭过夜,甩去封闭液,用洗涤液洗板并扣干;

[0018] (3) 酶标板包装:将封闭的酶标板用铝箔袋真空包装,得到包被有兔抗EV71多克隆抗体的酶标板。

[0019] (4) 试剂盒制备:分别将酶标鸡抗VP1多克隆抗体和VP1抗原封装后和包装好的酶标板一起放置到包装盒中,得到肠道病毒71双抗体夹心ELISA试剂盒。

[0020] 进一步地,步骤(2)所述封闭液为质量分数为1~5%的明胶或质量分数为1~5%的牛血清蛋白或质量分数为0.1~0.5%的脱脂奶。

[0021] 试剂盒检测EV71的检测方法,包括以下步骤:

[0022] 1) 分别加入待测样品、阳性对照血清和阴性对照血清,100~150 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育50~150min;

[0023] 2) 甩去样品液,用洗涤液冲洗干净,加入1:2000稀释的酶标鸡抗EV71多克隆抗体,100~120 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0024] 3) 加入底物进行显色,100~200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应15min;

[0025] 4) 加入终止液终止反应;

[0026] 5) 用酶标仪测定OD值,根据Cut-off值判断阴性、阳性。

[0027] 本发明预先将抗VP1多克隆抗体和酶标抗VP1多克隆抗体制备试剂盒,制备方法简单,能够实现快速检测及标准化,尤其是采用鸡抗VP1多克隆抗体对EV71各种基因型均有高结合效价,检测更加灵敏、高效,检测结果更加准确。

具体实施方式

[0028] 下面将结合本发明的实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例1

[0030] 1.多克隆抗体的制备

[0031] 1.1免疫原的制备

[0032] 1.1.1设计EV71VP1基因序列引物

[0033] 根据GenBank(登录号:EU024958.1)查询到的EV71衣壳蛋白VP1基因序列,自行设计引物,引物序列为:上游引物Primer-F:5'-TTCCATATGGGAGATAGGGTGGCDGATGTGATYGA-3'和下游引物Primer-F:5'-CCGCTCGAGGAGDGTGGTGATRGCRGTGCGACT-3'。

[0034] 1.1.2提取EV71病毒的RNA

[0035] 提取EV71病毒(由浙江CDC惠赠)的RNA为模板:

[0036] 使用美国Roche公司的病毒RNA抽提试剂盒,直接从培养的病毒中提取RNA,操作步骤按试剂盒中的说明书进行,方法如下:

[0037] 1) 取1.5mL离心管,做好标记后加入409 μ L已经混匀的工作液;

[0038] 2) 用带滤芯无RNase的吸头加入200 μ L需抽提处理的样本,漩涡混合器上振荡混匀,短暂离心后,室温静置10min;

[0039] 3) 用带滤芯吸头加入400 μ L无水乙醇,漩涡混合器上振荡混匀,短暂离心;

[0040] 4) 将核酸抽提柱放置在2mL离心管上,取500 μ L步骤3)的液体转移入核酸提取柱,12000rpm离心30s;

[0041] 5) 重复4),将步骤3)中的剩余液体移入核酸提取柱,12000rpm离心30s;

[0042] 6) 弃2mL离心管中的废液,在每个核酸抽提柱内加入500 μ L洗涤液WA,12000rpm离心30s;

[0043] 7) 弃2mL离心管中的废液,在每个核酸抽提柱内加入500 μ L洗涤液WB,12000rpm离心30s;

[0044] 8) 弃2mL离心管中的废液,以最大转速离心2min;

[0045] 9) 弃2mL离心管,将核酸抽提柱置于一个无RNase的1.5mL离心管,在抽提柱的膜中央小心地加入30 μ L EB,静置1min,12000rpm离心2min;

[0046] 10) 弃纯化柱,将离心回收的核酸暂时储存于4℃备用。

[0047] 1.1.3RT-PCR扩增目的基因vp1

[0048] 通过RT-PCR扩增目的基因vp1:

[0049] 1) RNA扩增的RT-PCR体系如下:

[0050] PCR扩增体系:

	试剂	用量
	2 $\times$ RT-PCR Buffer	25.0 μ L
	Taq 酶 (5U/ μ L)	1.0 μ L
	RT 酶	1.0 μ L
[0051]	Primer-F(10 μ M)	1.0 μ L
	Primer-R(10 μ M)	1.0 μ L
	模板 RNA	4.0 μ L
	RNase Free ddH ₂ O	17.0 μ L
	Total	50.0 μ L

[0052] 2) RT-PCR扩增反应条件如下:

[0053] RT-PCR反应条件:

[0054]

步骤	反应时间
Pattern 1	反转录反应
	Hold
	42℃
	15min
	95℃
	2min
Pattern 2	PCR 反应
	Cycle
	45
	95℃
	15sec

[0055] 获得目的基因后,构建重组质粒,并转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,获得目的重组基因工程菌,获得重组工程菌后诱导表达目的蛋白,并收集包涵体。1.1.4包涵体的复性与纯化

[0056] ①包涵体溶解

[0057] 称取5g包涵体,重悬于100mL增溶缓冲液(50mM Tris-HCl,6M Gnd-HCl,10mM DTT,

1mM EDTA, pH8.5) 中, 室温搅拌2h。13500rpm离心10min, 弃沉淀, 上清取样测蛋白浓度。

[0058] ②包涵体复性

[0059] 在4℃环境中, 上清中缓慢加入10L复性液(10mM PB, 0.1M Arg, 10%Gly, 1mM DTT, pH7.2), 加完以后调整复性液pH到8.0, 调节温度到4℃, 搅拌复性48h。复性完成后, 复性液10000rpm离心30min, 收集上清液, 保存备用。

[0060] ③包涵体纯化

[0061] 亲和层析柱采用平衡缓冲液(20mMPB, 0.5M NaCl, pH7.4)进行平衡, 平衡稳定后上样, 上样完成后用平衡缓冲液中再次进行平衡大约5个柱体积, 之后进行洗脱, 洗脱缓冲液为20mM Tris, 0.5M NaCl, 0.5M咪唑, pH8.0。洗脱时采用线性洗脱方式进行洗脱, 即Buffer B经过30min从0上升至100%, 大约10个柱体积。洗脱过程中收集单峰进行SDS-PAGE分析。获得高纯度抗原蛋白VP1。

[0062] 1.2酶标鸡抗VP1多克隆抗体的制备

[0063] 1.2.1动物免疫

[0064] 选取6-8月龄刚开始产蛋的鸡种, 采用重组蛋白VP1进行蛋鸡免疫, 免疫程序如下:

[0065] 1) 首次免疫: 采用高纯度抗原蛋白VP1与弗氏完全佐剂按体积比1:1进行混合, 充分乳化, 进行翅下皮下注射, 免疫量100μg/只;

[0066] 2) 二次免疫: 间隔15天后进行第二次免疫, 采用高纯度抗原蛋白VP1与弗氏不完全佐剂按体积比1:1混合, 充分乳化, 进行翅下皮下注射, 免疫量50μg/只;

[0067] 3) 采血: 第二次免疫之后7天进行采血, 采用ELISA间接法检测抗体效价并收集鸡蛋;

[0068] 4) 加强免疫: 第二次免疫之后间隔15天采用不完全佐剂与抗原进行加强免疫, 继续收集鸡蛋直到抗体效价开始下降。

[0069] 1.2.2多克隆抗体的提取与纯化

[0070] 采用水稀释法进行卵黄的粗提, 提取液进行超滤浓缩之后, 进行饱和硫酸铵沉淀, 离心收集沉淀, PBS缓冲液复溶, 再采用亲和层析进行纯化, 最后将纯化后的鸡抗VP1多克隆抗体IgY冷冻干燥成冻干粉, 置于-80℃保存, 备用。

[0071] 1.2.3酶标抗体的制备

[0072] 经纯化的鸡抗VP1多克隆抗体(纯化方法见实施例1), 采用经典过碘酸钠法进行辣根过氧化酶(HRP)标记, 之后加等量无菌甘油置于-80℃保存。

[0073] 1.3兔抗VP1多克隆抗体的制备与纯化

[0074] 1) 首次免疫: 用本实验室制备的VP1抗原(见实施例1)免疫兔子, 背部多点皮下注射, 免疫量200μg/只;

[0075] 2) 二次免疫: 间隔21天进行二免, 100μg/只;

[0076] 3) 加强免疫: 间隔21天进行加强免疫, 100μg/只;

[0077] 4) 收集血清: 第3次加强免疫后1周, 心脏取血, 收集血清;

[0078] 5) 纯化并保存: 采用Protein A柱进行亲和层析, 收集高纯度抗VP1多克隆血清抗体(兔抗), -20℃保存。

[0079] 2.EV71双抗体夹心ELISA试剂盒及其制备

[0080] EV71双抗体夹心ELISA试剂盒包括: 已包被有兔抗VP1多克隆抗体的酶标板; 酶标

鸡抗VP1多克隆抗体;VP1抗原。其中VP1抗原为灭活抗原;酶标板包被的抗VP1多克隆抗体为兔抗VP1多克隆抗体;酶标抗VP1多克隆抗体为酶标鸡抗VP1多克隆抗体。VP1抗原可以稀释成系列浓度建立标准曲线。

[0081] 其制备如下:

[0082] (1) 包被酶标板:采用包被液包被兔抗VP1多克隆抗体,4℃包被过夜,包被浓度为4.8~5.2μg/mL,100~120μL/孔,包被液为50mM碳酸盐缓冲液;

[0083] (2) 封闭酶标板:甩去包被液,于吸水纸上扣干酶标板,每孔加入100~250μL封闭液(封闭液可以为封闭液为质量分数为1~5%的明胶、质量分数为1~5%的牛血清蛋白、质量分数为0.1~0.5%的脱脂奶,也可以为其他可作为封闭液的溶液),4℃封闭过夜,甩去封闭液,用洗涤液洗板3次,于吸水纸上扣干酶标板;

[0084] (3) 酶标板包装:将封闭的酶标板用铝箔袋真空包装,得到包被有兔抗VP1抗体的酶标板;

[0085] (4) 试剂盒制备:将酶标鸡抗VP1多克隆抗体IgY置于瓶中封口后和包装好的酶标板一起放置到包装盒中得到EV71双抗体夹心ELISA试剂盒,酶标鸡抗VP1抗体的标记酶为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、丙酮酸激酶和葡萄糖氧化酶标记的一种。

[0086] 制备好的试剂盒可以置于4℃保存。试剂盒中还可以加入洗涤液、稀释液、终止液、底物显示液、标准阳性血清和标准阴性血清的一种或多种。

[0087] 实施例3

[0088] 1.1利用制备好的试剂盒进行样品的检测

[0089] 检测方法如下:

[0090] 1) 分别加入待测样品、阳性对照血清和阴性对照血清,100μL~150μL/孔,37℃孵育50~150min;

[0091] 2) 甩去样品液,用洗涤液洗板3次,加入1:2000稀释的辣根过氧化物酶标记过的鸡抗VP1多克隆抗体IgY,100~120μL/孔,37℃孵育30min,其中洗涤液是由吐温-20与浓度为0.01mol/L、pH为7.4的磷酸盐缓冲液按照体积比1:1900~2200混合配制而成;

[0092] 3) 加入底物进行显色,100μL~200μL/孔,37℃黑暗条件下反应15min;

[0093] 4) 加入2mol/L的硫酸溶液作为终止液终止反应,50μL/孔;

[0094] 5) 用酶标仪测定OD值,根据Cut-off值判断阴性、阳性。

[0095] 1.2ELISA双抗体夹心法试剂盒检测样本

[0096] 采用30例粪便浸出液作为样本,按照上述建立的EV71检测方法进行检测,并与中山大学达安基因股份有限公司的肠道病毒核酸试剂盒(荧光PCR法)对比,结果如表3所示:

[0097] 表3 ELISA双抗体夹心法与荧光PCR法检测EV71结果的比较

[0098]

样本编号	ELISA (OD450)	检测结果 (ELISA)	PCR (Ct 值)	检测结果 (PCR)
1	1.523	阳性	18.95	阳性
2	0.532	阳性	24.33	阳性
3	0.932	阳性	26.40	阳性
4	1.424	阳性	19.28	阳性

[0099]

5	1.102	阳性	29.77	阳性
6	0.847	阳性	21.80	阳性
7	0.393	阳性	阴性	阴性
8	1.077	阳性	26.76	阳性
9	0.601	阳性	28.41	阳性
10	1.267	阳性	23.96	阳性
11	0.460	阳性	22.90	阳性
12	0.780	阳性	21.38	阳性
13	0.690	阳性	24.99	阳性
14	0.920	阳性	19.43	阳性
15	1.342	阳性	20.81	阳性
16	0.587	阳性	27.16	阳性
17	0.271	阳性	32.02	阳性
18	0.563	阳性	25.89	阳性
19	1.629	阳性	18.87	阳性
20	0.839	阳性	30.72	阳性
21	0.130	阴性	阴性	阴性
22	0.065	阴性	阴性	阴性
23	0.199	阴性	33.27	阳性
24	0.025	阴性	阴性	阴性
25	0.016	阴性	阴性	阴性
26	0.037	阴性	阴性	阴性
27	0.081	阴性	阴性	阴性
28	0.028	阴性	阴性	阴性
29	0.170	阴性	阴性	阴性
30	0.030	阴性	阴性	阴性

[0100] 采用本发明制备的ELISA双抗体夹心法试剂盒检测结果统计符合率为93.33%。相比PCR法检测来说,更加灵敏、可靠。

[0101] 同时,利用本发明制备的ELISA双抗体夹心法试剂盒检测了CA16阳性样本20例和其他肠道病毒阳性样本30例,结果均为阴性。说明本多克隆抗体IgY特异性良好,与CA16和其他肠道病毒无交叉反应。

[0102] 本发明制备抗原的VP1基因为EV71特有基因,VP1基因具有与EV71病毒血清型完全对应的遗传多样性,因此,采用蛋白VP1进行免疫制备的多克隆抗体可以对不同基因型的EV71有很高的结合效价,同时可以避免采用病毒作为抗原所制备的多克隆抗体产生假阳性,检测结果更加准确,更加灵敏可靠。同时,也不需要制备单克隆抗体,节省了大量的时间和生产成本。

[0103] 还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种肠道病毒71的检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN105259347B	公开(公告)日	2017-11-14
申请号	CN201510497502.4	申请日	2015-08-13
[标]发明人	毕爱国 刘诚 毛慧慧		
发明人	毕爱国 刘诚 毛慧慧		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/536 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/536 G01N33/56983		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN105259347A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公布了一种肠道病毒71双抗体夹心ELISA试剂盒，该试剂盒包括：已包被有抗VP1多克隆抗体的酶标板；酶标抗VP1多克隆抗体；VP1抗原。本发明还公布了该试剂盒的制备方法及检测方法。本发明预先将抗VP1多克隆抗体和酶标抗VP1多克隆抗体制备试剂盒，制备方法简单，能够实现快速检测及标准化，采用抗VP1多克隆抗体对EV71各种基因型均有高结合效价，检测结果更加准确。

试剂	用量
2×RT-PCR Buffer	25.0μL
Taq 酶 (5U/μL)	1.0μL
RT 酶	1.0μL
Primer-F(10μM)	1.0μL
Primer-R(10μM)	1.0μL
模板 RNA	4.0μL
RNase Free ddH2O	17.0μL
Total	50.0μL