



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101975856 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 201010284336. 7

(22) 申请日 2010. 09. 17

(71) 申请人 颜世敢

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路  
10 号

(72) 发明人 朱丽萍 颜世敢 颜士勇 吕爱杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

C07K 16/10 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

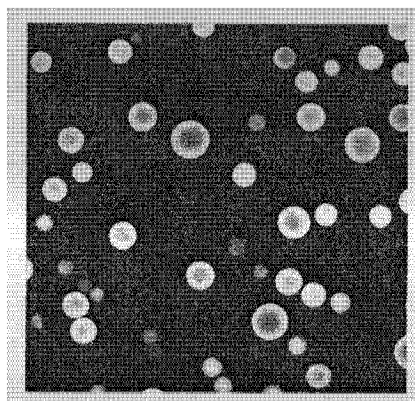
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法  
及固相免疫荧光检测试剂盒

### (57) 摘要

本发明涉及一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒。用交联剂 SPDP 分别将 R- 藻红蛋白 (RPE)、抗新城疫病毒 (NDV) 抗体衍生, 衍生物以适宜摩尔比交联, 经 HPLC 纯化制备 RPE 标记的抗 NDV 荧光抗体。荧光抗体与抗 NDV 抗体、琼脂糖微球、稀盐酸、洗涤液组成固相免疫荧光检测试剂盒。试剂盒的检测流程为: 微球溶胀活化后用抗体包被, 洗涤后与待测样品结合, 洗涤后再与荧光抗体结合, 充分洗涤后荧光显微镜下蓝绿光激发, 观察、判定结果。本发明制备的荧光抗体得率高、纯度高、荧光呈明亮的桔黄色、稳定性好; 试剂盒采用球形载体具有信号富集作用, 能提高检测灵敏度。本发明适于新城疫病毒的快速检测。



1. 一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法,包括:阴离子交换层析法纯化多管藻 RPE,用摩尔比 50-100 : 1 的化学交联剂 SPDP 分别将 RPE、抗新城疫病毒抗体衍生, DTT 以 50-100 : 1 的摩尔比还原抗体衍生物产生游离 -HS, 抗体 -HS 与 RPE 衍生物以摩尔比 1 : 1 液相交联,经 HPLC 纯化制备 RPE 标记的抗新城疫病毒荧光抗体,本发明制备的 RPE 标记的抗新城疫病毒荧光抗体纯度高、桔黄色荧光明亮、性质稳定,可用于新城疫病毒的快速、鉴别检测。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中 RPE 的制备由多管藻中采用阴离子交换层析法分离纯化,制备过程为:取冷冻保存的多管藻,加入 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8),4℃ 下溶胀 24h,多层纱布包裹、挤压、过滤获得褐色浸提液,浸提液加入固体硫酸铵至浓度为 60% (w/v),4℃ 放置 24h,离心收集沉淀,将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 中,然后对 20mM 的醋酸缓冲液 (pH5.8) 透析,透析液加到用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) (含 50mM NaCl) 预平衡的阴离子交换柱,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH5.8) 冲洗掉阴离子交换柱上过量的样品及杂质,用 20mM 醋酸缓冲液 (pH4.0) (含 50mM NaCl) 一步洗脱就可得到大量纯的 RPE,纯化的多管藻 RPE 纯度达电泳纯,纯度指数  $A_{620}/A_{280} > 5.2$ ,结构式为  $(\alpha\beta)_6\gamma$ ,分子量约为 240kDa,最大吸收峰分别位于 498、540、565nm,室温荧光发射峰位于 575nm,纯化的 RPE 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存,使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐,调整浓度为 5mg/mL。

3. 根据权利要求 1 的方法,其中抗新城疫病毒抗体采用灭活的新城疫病毒抗原免疫 SPF 鸡,经阴离子交换层析纯化制备,制备过程为:新城疫病毒  $10^4$  倍稀释,尿囊腔接种 9-11 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2mL,37-38℃ 孵育,收集接种 24-120h 的死胚、存活胚的尿囊液,红细胞凝集试验检测滴度  $> 1 : 256$ ,无菌检验合格,以 0.3% 甲醛 37℃ 灭活 24h,再按 1 : 3 比例加入灭菌 10 号白油和吐温 -80,用胶体磨乳化成油包水型油乳剂灭活疫苗,制备的禽流感病毒油乳剂灭活疫苗免疫 4 周龄 SPF 鸡,颈部皮下注射 1.0mL/ 只,首免 10 天后相同剂量加强免疫一次,二免 1 周后采血,测定血清中新城疫病毒 HI 抗体,当 HI 效价  $> 1 : 256$  时采集血清,阴离子交换层析纯化,电泳鉴定无杂带,即为合格的新城疫病毒多克隆抗体,-20℃ 冷冻保存。

4. 根据权利要求 1 的方法,其中荧光抗体采用化学交联法制备,制备过程为:SPDP 按 50-100 : 1 的摩尔比分别与 RPE、抗体混匀,铝箔封好后于室温旋转反应 2h,超滤离心除去多余的 SPDP, DTT 按 50-100 : 1 的摩尔比与抗体衍生物充分混匀,室温静置反应 1h,超滤离心除去多余的 DTT,抗体 -HS 与 RPE 衍生物以摩尔比 1 : 1 混匀,铝箔封好后于 20-25℃ 振荡反应 20h,加 NEM 封闭多余巯基,室温旋转反应 60min, HPLC 纯化,收集交联物洗脱峰,荧光分光光度计上检测交联物的室温荧光发射光谱,微量血凝抑制法测定交联物的抗体效价,检测合格加 0.02% 叠氮化钠 4℃ 保存。

5. 一种检测新城疫病毒的固相免疫荧光检测试剂盒,其中包括权利要求 1 制备的 RPE 标记的抗新城疫病毒荧光抗体及溴化氰活化的琼脂糖微球载体、抗新城疫病毒多克隆抗体、洗涤液、稀盐酸等,本发明的试剂盒检测灵敏度高,可用于新城疫病毒的快速免疫荧光检测。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中固相载体为微球载体,由琼脂糖经溴化氰活化制备,直径 60-200um,冻干粉,购自 Amersia 公司,使用前用稀盐酸溶液溶胀处理,溶胀处理步骤为:取 0.3g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶冻干粉,置于 1mM 盐酸中溶胀 30min,以同样浓度的稀盐酸

溶液冲洗多次,用 50mM pH 8PBS(含 100mM NaCl)快速冲洗得到 1mL 活化凝胶,活化凝胶应立即与抗体或抗原结合。

7. 根据权利要求 5 的方法,其中固相免疫荧光检测试剂盒的使用方法包括:取 1mL 活化凝胶立即与 2mL 浓度为 5mg/ml 的抗新城疫病毒抗体混匀,20℃缓慢振荡作用 12h,加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭,20℃缓慢振荡作用 4h,离心去上清,用 50mM pH 8PBS 反复冲洗凝胶,离心获得偶联有抗新城疫病毒抗体的琼脂糖凝胶,用 100mM pH 7.5 的 PBS 配成 10% (v/v) 的悬浮液,取偶联有抗新城疫病毒抗体的琼脂糖凝胶 50uL,置于洁净的试管中,加待检新城疫病毒液 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 10 次。加入 5ug/ml 的荧光标记抗体 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 5 次。吸取少量微球,滴于低荧光背景的玻片上,盖片,甘油缓冲液封片,荧光显微镜下以蓝绿光激发,观察、判定结果。阳性微球在蓝绿光激发下发射明亮的桔黄色荧光,阴性微球无荧光。

## 一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒,属于免疫荧光检测领域。

### 技术背景

[0002] 新城疫是严重危害养殖业的烈性传染病,被国际兽医局列为 A 类动物传染病,同时它还是人兽共患病,威胁人类的公共卫生安全。新城疫病毒检测是禽类及其动物性制品出入境检验检疫的必检项目,国际兽医局要求禽类及其动物制品中一旦检出新城疫病毒必须就地销毁。快速、灵敏的检测方法对疫病的及时确诊、疫情的有效防控及预测、预警至关重要。目前新城疫的检测方法主要有:(1) 病毒分离鉴定;(2) 血清学检测,如 HA-HI 等;(3) 分子生物学检测,如 RT-PCR 等。但是,上述检测方法各有优缺点,如病毒分离和血清学鉴定耗时长,血清学检测需要发病初期和康复期双份血清,PCR 检测灵敏度高,对实验条件和操作者技术水平要求较高,常用的 HA-HI 法简便易行,但灵敏度低。

[0003] 免疫荧光检测法是一种历史悠久的标记分析方法,兼具抗原-抗体反应的特异性和荧光检测的灵敏性,灵敏度高达  $10^{-6}$  mg/mL,广泛应用于传染病诊断。免疫荧光检测法的特异性和敏感性依赖于抗体的特异性、亲和力、滴度以及荧光染料特性。荧光检测常受血清和其他生物样品中本底荧光的影响。以血清为例,400-600nm 波段的本底荧光与常用的 FITC 的荧光发射光谱相重叠,干扰过大,影响检测结果;另一方面,传统的荧光染料(如 FITC 等)具有毒性、易淬灭,上述因素造成长期以来免疫荧光分析方法相对落后于 ELISA、化学发光法等标记法。提高免疫荧光检测法灵敏度和特异性的途径有:(1) 寻找优秀的荧光染料,如选用摩尔消光系数大、荧光量子产率高、斯托克位移大、发射红色荧光的染料;(2) 结合使用单克隆抗体、抗体夹心法、抗体包被技术、微粒富集荧光免疫分析法等免疫学技术;(3) 采用固相检测法,如以惰性材料微球、96 孔板等为固相载体。固相免疫荧光检测法可用于检测可溶性抗原或抗体,常规的固相载体如尼龙膜、硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜、96 孔板等通常具备较低的本底荧光,会干扰或降低荧光检测的灵敏度。本发明采用的固相载体为一种微球,由琼脂糖经溴化氰活化制备,无本底荧光,由于球形载体的表面积大,具有信号富集作用,能显著提高荧光检测的灵敏度。

[0004] 藻红蛋白是红藻细胞中的一类主要的水溶性的光合色素蛋白,能够发出明亮的桔黄色荧光,与传统的荧光染料相比,藻红蛋白具有水溶性、无毒性、摩尔消光系数大、荧光量子产率高、斯托克位移大、发射桔黄色荧光、背景光干扰小、不易淬灭等特点,是一类理想的荧光染料。多管藻是我国沿海分布较广的野生海洋红藻,含有大量的典型的三峰型 R-藻红蛋白(R-phycoerythrin, RPE),RPE 的稳定态为  $(\alpha\beta)_6\gamma$ ,RPE 的组成和晶体结构特点决定了其高稳定性。多管藻 RPE 的分子量约为 240kDa,最大吸收波长分别位于 498、540、565nm,最大荧光发射峰位于 575nm。1 个多管藻 RPE 分子含有 34 个色基,摩尔消光系数为  $24.1 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,荧光量子产率为 82%,1 分子的藻红蛋白的荧光强度在可比波长内至少相

当于 30 个 FITC 或 100 个罗丹明分子,藻红蛋白的斯托克位移高达 75nm,且发射荧光位于近红光区,因而背景光干扰小,有助于提高荧光检测的灵敏度,藻红蛋白荧光检测的灵敏度是 FITC 的 5-10 倍。而传统的荧光染料(如 FITC 等)的斯托克位移小,发射荧光与激发光谱部分重叠,生物本底荧光干扰严重。藻红蛋白的发现和运用使免疫荧光检测法的灵敏度显著提高。藻红蛋白优于传统的合成荧光染料,可取代 FITC 用于免疫荧光检测或配合 FITC 使用实现单一激发光源下的双色荧光鉴别检测。

[0005] RPE 等荧光染料用于荧光检测时需与抗体等生物大分子交联成荧光抗体探针,蛋白质交联时普遍存在难以定量控制的缺点,往往造成荧光标记物的得率低,标记物中混杂有大量的未结合的荧光染料,导致标记物的生产成本居高不下,荧光检测灵敏度降低。而且交联剂浓度多高还会导致荧光染料结构改变、蛋白活性损失甚至荧光丧失,同时交联剂浓度过高还会影响抗体的免疫活性,因此选择适宜的交联剂种类、交联剂的浓度、交联方法等直接影响荧光探针的质量,从而影响荧光检测的灵敏度。化学交联剂 SPDP 为异型双功能化学交联剂,反应条件温和,引入的化学基团具有吸光性,利于交联过程的控制。通过控制适宜的摩尔比进行 RPE 与抗体的液相交联,能使研制的荧光标记物交联得率大于 90%,探针的效率、质量显著提高,成本大幅降低,促进其用于疾病的免疫荧光检测。

## 发明内容

[0006] 本发明涉及一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒。

[0007] 本发明设计的检测新城疫病毒的荧光抗体使用的多管藻 R- 藻红蛋白(RPE)为三峰型藻红蛋白,在 498nm 处有强吸光性,最大荧光发射峰位于 575nm,在蓝绿光激发下, RPE 能发射明亮的桔黄色荧光,因此多管藻 RPE 优于其它来源的三峰型和二峰型藻红蛋白,它具有无毒性、水溶性大、荧光明亮且不易淬灭、稳定性高等优点,检测灵敏度显著高于传统的荧光染料,是优秀的荧光染料。以异型双功能化学交联剂 SPDP 将 RPE、抗体衍生后以适当摩尔比液相交联,制备的 RPE 标记的荧光抗体交联效率高、纯度高、荧光明亮、抗体活性好、稳定性好。

[0008] 本发明涉及的固相免疫荧光检测试剂盒使用的固相载体为一种微球,由琼脂糖经溴化氰活化制备,冻干保存,微球直径为 60-200um,无本底荧光,购自 Amersia 公司。该微球载体在使用前需用 1mM 稀盐酸溶液溶胀 30min,以同样浓度的盐酸冲洗多次,最后用 50mM pH 8PBS(含 100mM NaCl)快速冲洗得到活化凝胶。活化的微球应立即与抗体或抗原结合。

[0009] 本发明的解决方案如下:

[0010] RPE 制备:采用阴离子交换层析法从海洋红藻-多管藻中分离纯化。取冷冻保存的多管藻,加入 6 倍体积的 20mM 醋酸缓冲液(pH5.8),4℃下溶胀 24h,多层纱布过滤、挤压获得褐色浸提液,浸提液中加入固体硫酸铵至浓度为 60%(w/v),4℃放置 24h,离心收集沉淀,将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液(pH5.8)中,然后用 20mM 的醋酸缓冲液(pH5.8)透析,透析液阴离子交换纯化,DEAE Sepharose Fast Flow 柱用 20mM 醋酸缓冲液(pH5.8)(含 50mM NaCl)预平衡,用 20mM 醋酸缓冲液(pH5.8)冲洗掉阴离子交换柱上过量的样品和杂质,用 20mM 醋酸缓冲液(pH4.0)(含 50mM NaCl)一步洗脱可得到大量纯的 RPE,纯化的多管藻 RPE 纯度达电泳纯,纯度指数  $A_{620}/A_{280} > 5.2$ ,结构式为  $(\alpha\beta)_6\gamma$ ,分子量约为 240kDa,最大吸

收峰分别位于 498、540、565nm, 室温荧光发射峰位于 575nm, 纯化的 RPE 硫酸铵沉淀 4℃ 避光保存, 使用前用 50mM pH7.5 PBS 充分透析除盐, 调整浓度为 10mg/mL。

[0011] 新城疫病毒多克隆抗体制备: 新城疫病毒 La Sota 株  $10^4$  倍稀释, 尿囊腔接种 9-10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2mL, 37-38℃ 孵育, 收集接种 24-120h 的死胚、存活胚的尿囊液, 红细胞凝集试验检测滴度  $> 1 : 256$ , 无菌检验合格, 以 0.3% 甲醛 37℃ 灭活 24h, 按  $1 : 3$  比例加入灭菌 10 号白油和吐温-80, 用胶体磨乳化成油包水型油乳剂灭活疫苗。制备的新城疫油乳剂灭活苗免疫 4 周龄 SPF 鸡, 颈部皮下注射 1.0mL/只, 首免 10 天后相同剂量加强免疫一次, 二免 1 周后采血, 测定血清中新城疫病毒 HI 抗体, 当 HI 效价  $> 1 : 256$  时采集血清, 阴离子交换层析纯化得到抗新城疫病毒多克隆抗体, -20℃ 冷冻保存。

[0012] RPE 标记荧光抗体的制备: 利用异型双功能交联剂 SPDP 分别在 RPE、抗体上衍生吡啶二硫基团, 然后用 DTT 还原抗体的衍生物引入游离 -SH, 将携带吡啶二硫基的 RPE 与携带巯基的抗体按一定摩尔比交联制备荧光抗体。将 SPDP 按 50-100 : 1 的摩尔比分别与 RPE、抗体混匀, 铝箔封好后于室温旋转反应 2h, 超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 50-100 : 1 的摩尔比与抗体衍生物充分混匀, 室温静置反应 1h, 超滤离心除去多余的 DTT。抗体 -HS 与 RPE 衍生物以摩尔比  $1 : 1$  混匀, 铝箔封好后于 20-25℃ 振荡反应 20h。加 NEM 封闭多余巯基, 室温旋转反应 60min。

[0013] RPE 标记的荧光抗体的纯化: 采用 HPLC 法, 液相色谱工作站上进行。采用分子筛高压液相色谱柱纯化, 液相柱型号 TSK G3000sw (规格 7.5mm×60cm), 流动相为 50mM PBS pH 7.5, 流速 0.5mL/min, 检测波长 190-800nm。荧光标记抗抗体最先被洗脱下来。收集第一个洗脱峰, 进行光谱学、抗体活性、电泳检测。目标产物的洗脱峰面积占所有洗脱峰面积的比例即为交联效率。

[0014] RPE 标记荧光抗体的光谱检测: 吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定, 扫描波长区间 250-700nm。吸收光谱检测可判定交联是否成功及交联反应是否导致 RPE 变性。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定, 激发波长 498nm, 荧光扫描范围为 520-700nm。在紫外区, RPE 标记荧光抗体的吸光度明显高于对照 RPE, 吸收峰位置相同, 这是因为 RPE 表面交联了抗体分子, 而抗抗体在 280nm 有较强的光吸收; 在 400-700nm 范围内, 交联物的吸收光谱与对照 RPE 的吸收峰及吸光度相似, 是由于抗体在此范围内无光吸收。RPE 标记光抗体与对照 RPE 在 498nm 激发光的激发下, 室温荧光发射波长均位于 575nm, 没有发生斯托克位移的改变, 仍具有 RPE 的特征荧光发射光谱, 且荧光亮度无明显降低。

[0015] RPE 标记荧光抗体的效价检测: 抗体效价采用微量血凝抑制试验方法 (HI) 测定。用灭活的对应新城疫尿囊毒制备 4 单位检测抗原, 反应在 V 型 96 孔板上进行。以红细胞凝集抑制的最高稀释度为荧光抗体的效价。荧光标记抗体的 HI 效价应  $\geq 1 : 16$ , 浓度低时可通过离心超滤浓缩。

[0016] RPE 标记荧光抗体的电泳检测: SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行, 分离胶浓度为 12.5%, 浓缩胶浓度为 5%, 218V 恒压电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后观察结果。电泳发现 RPE 标记荧光抗体既具有 RPE 的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基条带, 又具有抗体的 H、L 链条带, 表明 RPE 与抗体交联成功。

[0017] RPE 标记荧光抗体的稳定性检测: 纯化的 RPE 标记荧光抗体中加入 0.02% 叠氮化钠, 4℃ 避光保存, 每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价, 室温荧光发射光谱在荧光分

光光度计上测定,抗体效价采用血凝抑制试验方法测定,观察荧光亮度和抗体活性的变化。RPE 标记的荧光抗体稳定性较好,在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃保存 120 天,荧光抗体的荧光强度未出现降低,荧光抗体的抗体效价维持在 1 : 32。

[0018] 固相免疫荧光检测试剂盒组装及使用:固相免疫荧光检测试剂盒由溴化氰活化的琼脂糖微球载体、RPE 标记的抗新城疫病毒荧光抗体、抗新城疫病毒多克隆抗体、洗涤液、稀盐酸等组成。固相免疫荧光检测试剂盒的使用方法为:微球载体使用时需用稀盐酸溶胀,取 0.3g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶冻干粉,置于 1mM 盐酸中溶胀 30min,以同样浓度的盐酸冲洗 5 次,用 50mM pH 8PBS(含 100mMNaCl)快速冲洗得到 1mL 活化凝胶,立即与 2mL 浓度为 5mg/ml 的抗新城疫病毒多克隆抗体混匀,20℃缓慢振荡作用 12h,加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭,20℃缓慢振荡作用 4h,离心去上清,用 50mM pH 8PBS 反复冲洗凝胶,离心获得偶联有抗体的琼脂糖凝胶,用 100mM pH 7.5 的 PBS 配成 10% (v/v) 的悬浮液。取偶联有抗新城疫病毒抗体的琼脂糖凝胶 50uL,置于洁净的试管中,加待检病毒液 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH7.5 的 PBS 冲洗 10 次。加入 5ug/ml 浓度的荧光抗体 100uL,37℃温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 5 次。吸取少量微球,滴于低荧光背景的玻片上,盖片,甘油缓冲液封片,荧光显微镜下以蓝绿光激发,观察、判定结果。阳性微球在红光激发下发射明亮的桔黄色荧光,阴性微球无荧光。将荧光强度与背景染色强度以 + 表示,分为 ++++(最强阳性)、+++ (强阳性)、++ (较强阳性)、+ (弱阳性)、- (阴性) 五级。荧光强度达到 ++ 以上判定为阳性。试验设 SPF 鸡血清阴性对照和 PBS 空白对照。

[0019] 敏感性、特异性、重复性检测:(1) 以 PBS 将新城疫病毒连续稀释,利用固相免疫荧光检测试剂盒对各稀释度逐一进行荧光检测,以能检测出的病毒最高滴度作为检测的灵敏度。(2) 分别以禽流感病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病病毒、传染性喉气管炎病毒、鸡痘病毒等取代新城疫病毒,按上述固相免疫荧光检测试剂盒进行荧光检测,在蓝绿光激发下均未检测到荧光,证明试剂盒的特异性好。(3) 利用试剂盒对同一个稀释度的新城疫病毒样品重复检测 3 次,结果一致,表明试剂盒的重复性较好。

[0020] 与 FITC 标记荧光抗体检测新城疫病毒比较:纯化的新城疫抗体用 50mM pH 9 的碳酸缓冲液透析过夜,调整浓度为 10mg/ml。用上述碳酸缓冲液配制 0.1mg/ml 的 FITC。将抗体置于 10 倍抗体体积的 FITC 溶液中 4℃缓慢搅拌透析 24h,然后迅速将标记抗体置于 50mM pH 7.2 的磷酸缓冲液透析,经常更换缓冲液。以 FITC 标记的抗体探针代替 RPE 标记的抗体探针,用建立的固相免疫荧光检测法对新城疫病毒检测。

[0021] 总之,RPE 标记的荧光抗体荧光明亮,长期保存无明显衰减,与 FITC 标记的荧光抗体相比,荧光更明亮,灵敏度更高,受生物本底荧光干扰小。本发明采用的微球载体自身无本底荧光,不会干扰荧光检测结果,而且由于球形载体的表面积大,能包被更多的抗体或抗原,从而结合更多的荧光探针,利于信号富集,能够提高免疫荧光检测的灵敏度。与硝酸纤维膜、96 孔板等现有固相载体相比,本底荧光干扰更小,荧光更亮,检测灵敏度更高。

## 附图说明

[0022] 附图 1 为 RPE 标记抗新城疫病毒荧光抗体的 HPLC 纯化图。液相柱型号为 TSK G3000sw,流动相为 50mM pH7.5 的 PBS,流速 0.5mL/min, RPE 标记抗新城疫病毒荧光抗体、抗新城疫病毒抗体、RPE 的洗脱时间为分别为 19.57min、27.32、31.26min。

[0023] 附图 2 为 RPE 标记荧光抗体（虚线）及 RPE（实线）的荧光光谱。RPE 标记荧光抗体与对照 RPE 在 498nm 激发光的激发下，室温荧光发射波长均位于 575nm，没有发生斯托克位移改变，仍具有 RPE 的特征荧光发射光谱。

[0024] 附图 3 为 RPE 标记抗新城疫病毒荧光抗体的 SDS-PAGE 电泳结果。RPE 标记荧光抗体既具有 RPE 的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基条带，又具有抗体的 H、L 链条带。

[0025] 附图 4 为 RPE 标记荧光抗体固相免疫荧光检测结果。RPE 标记荧光抗体阳性微球发射明亮桔黄色荧光，而阴性微球检测不到荧光。

#### 具体实施方式：

[0026] RPE 制备：冷冻保存的多管藻加入 6 倍体积的 20mM 醋酸缓冲液（pH5.8），4℃下溶胀 24h，多层纱布过滤、挤压获得褐色浸提液，浸提液加入固体硫酸铵至浓度为 60%（w/v），4℃放置 24h，离心收集沉淀，将沉淀溶于 20mM 的醋酸缓冲液（pH5.8）中，然后用 20mM 的醋酸缓冲液（pH5.8）4℃透析过夜，透析液加到用 20mM 醋酸缓冲液（pH5.8）（含 50mM NaCl）预先平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱，用 20mM 醋酸缓冲液（pH5.8）冲洗掉阴离子交换柱上过量的样品和杂质，用 20mM 醋酸缓冲液（pH4.0）（含 50mM NaCl）一步洗脱就可得到大量纯的 RPE，纯化的多管藻 RPE 纯度达电泳纯，纯度指数  $A_{620}/A_{280} > 5.2$ ，结构式为  $(\alpha\beta)_6\gamma$ ，分子量约为 240kDa，最大吸收峰分别位于 498、540、565nm，室温荧光发射峰位于 575nm，纯化的 RPE 硫酸铵沉淀 4℃避光保存，使用前用 50mM pH7.5PBS 充分透析除盐，调整浓度为 10mg/mL。

[0027] 新城疫病毒多克隆抗体制备：新城疫病毒 La Sota 株  $10^4$  倍稀释，尿囊腔接种 9-10 日龄 SPF 鸡胚，每胚 0.2mL，37-38℃孵育，收集接种 24-120h 的死胚、存活胚的尿囊液，红细胞凝集试验检测滴度  $> 1 : 256$ ，无菌检验合格，以 0.3% 甲醛 37℃灭活 24h，按 1 : 3 比例加入灭菌 10 号白油和吐温 -80，用胶体磨乳化成油包水型油乳剂灭活疫苗。制备的新城疫油乳剂灭活苗免疫 4 周龄 SPF 鸡，颈部皮下注射 1.0mL/只，首免 10 天后相同剂量加强免疫一次，二免 1 周后采血，测定血清中新城疫病毒 HI 抗体，当 HI 效价  $> 1 : 256$  时采集血清，DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析纯化，50mM pH7PBS+0-1M NaCl 梯度洗脱得到纯的抗新城疫病毒多克隆抗体，-20℃冷冻保存。

[0028] RPE 标记新城疫病毒抗体荧光探针的制备：SPDP 按 100 : 1 的摩尔比分别与 RPE、新城疫病毒抗体混匀，铝箔封好后于室温旋转反应 2h，超滤离心除去多余的 SPDP。取 DTT 按 100 : 1 的摩尔比与新城疫病毒抗体衍生物充分混匀，室温静置反应 1h，超滤离心除去多余的 DTT。新城疫病毒抗体 -HS 与 RPE 衍生物以摩尔比 1 : 1 混匀，铝箔封好后于 20-25℃振荡反应 20h。用 10mg/ml 的 NEM 溶液 20 $\mu$ l 封闭多余巯基，室温旋转反应 60min。反应中的 NEM 不用除去。

[0029] RPE 标记的荧光抗体的纯化和交联效率分析：液相色谱工作站上采用 HPLC 法进行荧光抗体的交联效率分析和纯化，分子筛高压液相色谱柱型号 TSK G3000sw（规格 7.5mm $\times$ 60cm），流动相为 50mM PBS pH7.5，流速 0.5mL/min，检测波长 190-800nm。荧光标记抗体于 19.57min 最先被洗脱下来。收集第一个洗脱峰。目标产物的洗脱峰面积占有所有洗脱峰面积的比例即为交联效率，分析表明荧光探针的交联得率为 95%。

[0030] RPE 标记荧光抗体的光谱检测：吸收光谱在紫外-可见光分光光度计上测定，扫描

波长区间 250–700nm。吸收光谱检测可判定交联是否成功及交联反应是否导致 RPE 变性。室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,激发波长 498nm,荧光扫描范围为 520–700nm。在紫外区,RPE 标记荧光抗体的吸光度高于对照 RPE,吸收峰位置相同,这是因为 RPE 表面交联了抗体分子,而抗体在 280nm 有较强的光吸收;在 400–700nm 范围内,交联物的吸收光谱与对照 RPE 的吸收峰及吸光度相似,是由于抗体在此范围内无光吸收。RPE 标记光抗体与对照 RPE 在 498nm 激发光的激发下,室温荧光发射波长均位于 575nm,没有发生斯托克位移的改变,仍具有 RPE 的特征荧光发射光谱,且荧光亮度无明显降低。

[0031] RPE 标记荧光抗体的效价检测:抗体效价采用微量血凝抑制试验方法(HI)测定。用灭活的对应新城疫病毒制备 4 单位检测抗原,反应在 V 型 96 孔板上进行。以红细胞凝集抑制的最高稀释度为荧光抗体的效价。荧光标记抗体的 HI 效价为 1 : 32。

[0032] RPE 标记荧光抗体的电泳检测:SDS-PAGE 在垂直板不连续电泳装置上进行,分离胶浓度为 12.5%,浓缩胶浓度为 5%。恒压电泳,电压为 218V。用 0.25% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后观察结果。SDS-PAGE 电泳发现 RPE 标记荧光抗体既具有 RPE 的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基条带,又具有抗体的 H、L 链条带,电泳结果证实 RPE 与抗体交联成功。

[0033] RPE 标记荧光抗体的稳定性检测:纯化的 RPE 标记荧光抗体中加入 0.02% 叠氮化钠,4℃ 避光保存,每隔 30 天测定一次荧光光谱和抗体效价,室温荧光发射光谱在荧光分光光度计上测定,抗体效价采用血凝抑制试验方法测定,观察荧光亮度和抗体活性的变化。保存试验证实研制的 RPE 标记的荧光抗体稳定性好。RPE 标记荧光抗体在 0.05mol/L 的磷酸缓冲液中 4℃ 保存 120 天,荧光抗体的荧光强度保持不变,荧光抗体的抗体效价维持在 1 : 32,未出现降低。

[0034] 固相免疫荧光检测试剂盒组装及使用:固相免疫荧光检测试剂盒由溴化氰活化的琼脂糖微球载体、RPE 标记的抗新城疫病毒荧光抗体、抗新城疫病毒多克隆抗体、洗涤液、稀盐酸等组成。固相免疫荧光检测试剂盒的使用方法为:微球载体使用时需用稀盐酸溶胀,取 0.3g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶冻干粉,置于 1mM 盐酸中溶胀 30min,以同样浓度的盐酸冲洗 5 次,用 50mM pH 8PBS (含 100mM NaCl) 快速冲洗得到 1mL 活化凝胶,立即与 2mL 浓度为 5mg/ml 的抗新城疫病毒多克隆抗体混匀,20℃ 缓慢振荡作用 12h,加入 2mL 0.1M 的乙醇胺封闭,20℃ 缓慢振荡作用 4h,离心去上清,用 50mM pH 8PBS 反复冲洗凝胶,离心获得偶联有抗体的琼脂糖凝胶,用 100mM pH 7.5 的 PBS 配成 10% (v/v) 的悬浮液。取偶联有抗体的琼脂糖凝胶 50 $\mu$ L,置于洁净的试管中,加待检病毒液 100 $\mu$ L,37℃ 温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 10 次。加入 5 $\mu$ g/ml 浓度的荧光标记抗体 100 $\mu$ L,37℃ 温育 2h,用 100mM pH 7.5 的 PBS 冲洗 5 次。吸取少量微球,滴于低荧光背景的玻片上,盖片,甘油缓冲液封片,荧光显微镜下以蓝绿光激发,观察、判定结果。阳性微球在红光激发下发射明亮的桔黄色荧光,阴性微球无荧光。将荧光强度与背景染色强度以 + 表示,分为 ++++(最强阳性)、+++ (强阳性)、++ (较强阳性)、+ (弱阳性)、- (阴性) 五级。荧光强度达到 ++ 以上判定为阳性。试验设 SPF 鸡血清阴性对照和 PBS 空白对照。在蓝绿光激发下阳性微球呈明亮的桔黄色荧光,阴性结果无荧光。

[0035] 制备新城疫病毒尿囊毒,测定病毒的红细胞凝集价为  $2^9$ ,EID<sub>50</sub> 为  $10^{-7.2}$ ,病毒的蛋白浓度为 40.3mg/mL。以 PBS 将尿囊毒连续稀释,利用建立的固相免疫荧光法对每个稀释度逐一进行荧光检测。试剂盒能检测出新城疫病毒的最低浓度为  $4.03 \times 10^{-7}$ mg/ml。

[0036] 分别以禽流感病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病病毒、传染性喉气管炎病毒、鸡痘病毒等取代新城疫病毒,按上述固相免疫荧光检测试剂盒进行荧光检测,在蓝绿光激发下均未检测到荧光,证明试剂盒的特异性好。

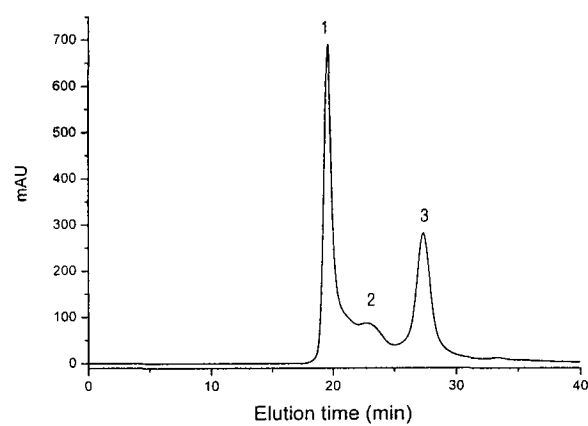
[0037] 利用固相免疫荧光检测试剂盒对同一个稀释度的新城疫病毒样品重复检测 3 次,结果一致,表明检测试剂盒的重复性较好。

[0038] FITC 标记抗体荧光探针检测新城疫病毒:纯化的新城疫病毒抗体用 50mM pH 9 的碳酸缓冲液透析过夜,调整浓度为 10mg/ml。用上述碳酸缓冲液配制 0.1mg/ml 的 FITC。将抗体置于 10 倍抗体体积的 FITC 溶液中 4℃ 缓慢搅拌透析 24h,然后迅速将标记抗体置于 50mM pH 7.2 的磷酸缓冲液透析,经常更换缓冲液。以 FITC 标记的抗体探针代替 RPE 标记的抗体探针,用固相免疫荧光检测试剂盒检测新城疫病毒。FITC 标记探针检测阳性微球在蓝光激发下发射绿色荧光,能检测出新城疫的最低浓度为  $4.03 \times 10^{-6}$  mg/ml,灵敏度比 RPE 标记探针低 10 倍。

[0039] 表 1 RPE 标记抗体荧光探针检测新城疫病毒

[0040]

| Immunofluorescent antibody | Virus detection sensitivity (mg/ml) |   |                          |   |                          |   |                          |   |                          |   |                          |   |                          |   |                          |   |
|----------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|
|                            | 4.03<br>10 <sup>-2</sup>            | × | 4.03<br>10 <sup>-3</sup> | × | 4.03<br>10 <sup>-4</sup> | × | 4.03<br>10 <sup>-5</sup> | × | 4.03<br>10 <sup>-6</sup> | × | 4.03<br>10 <sup>-7</sup> | × | 2.02<br>10 <sup>-7</sup> | × | 4.03<br>10 <sup>-8</sup> | × |
| RPE labeled antibody       | ++++                                |   | ++++                     |   | ++++                     |   | +++                      |   | +++                      |   | ++                       |   | +                        |   | —                        |   |
| FITC labeled antibody      | ++++                                |   | ++++                     |   | +++                      |   | +++                      |   | ++                       |   | +                        |   | —                        |   | —                        |   |



1: 荧光标记抗体; 2: 游离的 RPE; 3: 未标记的抗体

图 1

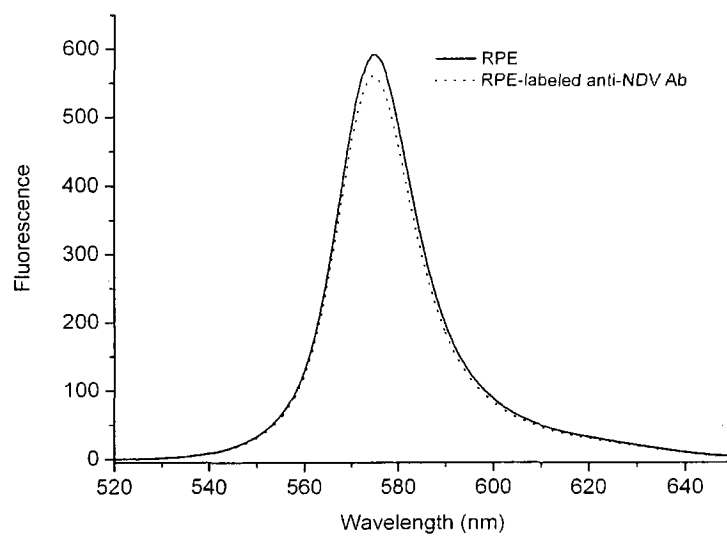


图 2

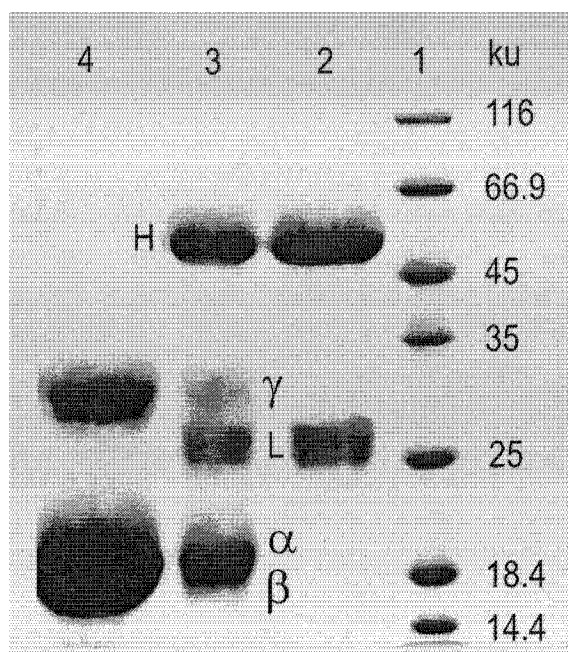


图 3

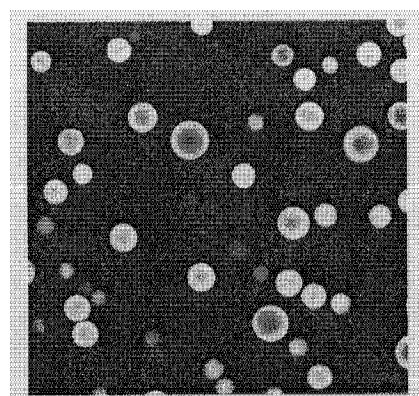


图 4

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101975856A</a>                   | 公开(公告)日 | 2011-02-16 |
| 申请号            | CN201010284336.7                               | 申请日     | 2010-09-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 颜世敢                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 颜世敢                                            |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 山东轻工业学院                                        |         |            |
| [标]发明人         | 朱丽萍<br>颜世敢<br>颜士勇<br>吕爱杰                       |         |            |
| 发明人            | 朱丽萍<br>颜世敢<br>颜士勇<br>吕爱杰                       |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/06 C07K16/10 G01N33/533 G01N33/569      |         |            |
| 其他公开文献         | CN101975856B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种检测新城疫病毒的荧光抗体的制备方法及固相免疫荧光检测试剂盒。用交联剂SPDP分别将R-藻红蛋白(RPE)、抗新城疫病毒(NDV)抗体衍生，衍生物以适宜摩尔比交联，经HPLC纯化制备RPE标记的抗NDV荧光抗体。荧光抗体与抗NDV抗体、琼脂糖微球、稀盐酸、洗涤液组成固相免疫荧光检测试剂盒。试剂盒的检测流程为：微球溶胀活化后用抗体包被，洗涤后与待测样品结合，洗涤后再与荧光抗体结合，充分洗涤后荧光显微镜下蓝绿光激发，观察、判定结果。本发明制备的荧光抗体得率高、纯度高、荧光呈明亮的桔黄色、稳定性好；试剂盒采用球形载体具有信号富集作用，能提高检测灵敏度。本发明适于新城疫病毒的快速检测。

