



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102207500 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 05

(21) 申请号 201110059551. 1

(22) 申请日 2011. 03. 11

(71) 申请人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街 8
号

(72) 发明人 毛开荣 丁家波 蒋玉文 蒋颖
程君生 王楠 刘轶秋

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务
所 11305

代理人 郑明

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006. 01)

G01N 33/96 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 13 页

(54) 发明名称

补体结合酶联免疫吸附试验

(57) 摘要

本发明涉及一种补体结合酶联免疫吸附试验 (CF-ELISA)。本发明通过利用酶标记抗豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体及酶显色剂作为指示系统, 来显示是否存在有补体参与的抗原抗体特异性反应。本发明的技术方法是以抗原或抗体包被 ELISA 板、加入待检测样品、加入豚鼠补体、加入酶标记抗豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体及酶显色剂, 通过显色判定是否存在抗原抗体特异性结合。与现行补体结合 (CF) 试验技术相比, CF-ELISA 技术在保持了 CF 试验高特异的同时, 方便了使用操作, 便于技术的标准化, 提高了试验点敏感性。

1. 一种补体结合酶联免疫吸附试验,其特征在于该方法建立在补体结合试验和酶联免疫吸附试验的基础上,采用酶标记豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体及酶显色剂作为指示系统,来显示是否存在有补体参与的抗原抗体特异性反应的免疫学检测方法。

2. 如权利要求 1 所述的一种补体结合酶联免疫吸附试验,其特征在于该方法主要包括:

- 1) 包被抗原和抗体制备及包被酶联反应板;
- 2) 阴性和阳性血清标准品的制备;
- 3) 酶标豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体的制备;
- 4) 反应用试剂样品稀释液、底物液 A、底物液 B、终止液、20 倍浓缩洗涤液的配制。

3. 如权利要求 1 所述的一种补体结合酶联免疫吸附试验,其特征在于该方法反应后的结果是读取测定的 OD_{450} 值。

4. 如权利要求 1 所述的补体结合联免疫吸附试验,其特征在于该方法最后的结果判定是:试验成立条件为阴性对照血清的 OD_{450} 值 < 0.30 , 强阳性对照血清的 OD_{450} 或 OD_{630} 值应 ≥ 1.00 , 弱阳性对照血清的 OD_{450} 值应在 $0.3 \sim 0.60$ 之间;

样本 OD_{450} 值 / C.0 ≥ 1 为阳性, < 1 为阴性;

C.0 = $0.8 \times$ 弱阳性血清 OD_{450} 平均值 + 阴性血清 OD_{450} 平均值。

5. 如权利要求 1 所述的补体结合联免疫吸附试验,其特征在于包括补体结合酶联免疫吸附试验的检测试剂。

6. 如权利要求 1 所述的补体结合联免疫吸附试验,其特征在于包括补体结合酶联免疫吸附试验的检测试剂盒。

7. 如权利要求 1 所述的补体结合联免疫吸附试验,其特征在于包括补体结合酶联免疫吸附试验的检测试剂的应用。

8. 如权利要求 1 所述的补体结合联免疫吸附试验,其特征在于包括包补体结合酶联免疫吸附试验的检测试剂盒应用。

补体结合酶联免疫吸附试验

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于补体结合的抗原抗体免疫学检测方法,属免疫学技术领域。

技术背景

[0002] 任何抗原抗体复合物具有激活、固定补体的特性,以此建立的补体参与的免疫学检测技术,具有高度的特异性。而酶标记的显色系统可用于揭示抗原抗体反应,具有极高的灵敏度,已广泛应用于特异性免疫学检测。基于补体参与的补体结合 (complementary fixation, CF) 试验和以酶标记显色系统作为指示系统的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 技术已广泛应用与抗原抗体特异性反应的免疫学检测。

[0003] CF 试验是用免疫溶血机制做指示系统,来检测另一反应系统的抗原与抗体特异性反应的试验。早在 1906 年 Wassermann 就将其应用于梅毒的诊断,即著名的华氏反应。这一传统的试验经不断改进,除了用于传染病诊断和流行病学调查以外,在一些自身抗体、肿瘤相关抗原以及 HLA 的检测和分析中也有应用。

[0004] 该试验中有 5 种成分参与反应,分属于 3 个系统:①反应系统,即已知的抗原(或抗体)与待测的抗体(或抗原);②补体系统;③指示系统,即绵羊红血球与相应抗血清(溶血素),试验时常将其预先结合在一起,形成致敏红细胞。反应系统与指示系统争夺补体系统,先加入反应系统给其以优先结合补体的机会。如果反应系统中存在待测的抗体(或抗原),则抗原抗体发生反应后可结合补体;再加入指示系统时,由于反应液中已没有游离的补体而不出现溶血,是为补体结合试验阳性。如果反应系统中不存在待测的抗体(或抗原),则在液体中仍有游离的补体存在,当加入指示系统时会出现溶血,是为补体结合试验阴性。因此补体结合试验可用已知抗原来检测相应抗体,或用已知抗体来检测相应抗原。

[0005] CF 试验是一种补体参与的传统免疫学技术,人和动物许多疫病的诊断采用此方法。CF 试验主要应用在以下几方面:①传染病诊断。包括病原性抗原及相应抗体的检测。②其他抗原的检测。例如肿瘤相关抗原、血迹中的蛋白质鉴定、HLA 分型等。③自身抗体检测。

[0006] CF 试验方法的主要优点有:①特异性强。出现交叉反应的机率较小。②应用面广。可用于检测多种类型的抗原或抗体。

[0007] CF 试验方法的主要缺点是技术操作繁琐、难以标准化和灵敏度不高。

[0008] ELISA 也已是一种广泛使用的免疫学技术。该技术是用酶标记物参与抗原或抗体的特异性免疫反应,以酶底物显色,通过显色程度来揭示抗原抗体特异性反应的程度。

[0009] ELISA 广泛用于检测一切抗原、抗体及半抗原。已成为免疫检测中的主要技术之一。

[0010] ELISA 的主要优点有:①具有高灵敏度和良好特异性。②操作简便,可实现高通量检测,试剂易于标准化。③应用面广。可用于检测多种类型的抗原或抗体。

[0011] 补体结合试验与 ELISA 的主要不同在于:补体结合试验有补体参与,抗原抗体的特异性反应程度通过有否剩余补体参与溶血系统反应导致红血球溶血而体现;ELISA 无补

体参与,指示系统是酶显色系统,而不是溶血系统。

发明内容

[0012] 1. 要解决的技术问题

[0013] 本发明是建立一种基于补体结合的检测抗原抗体特异性反应的免疫学试验技术——补体结合酶联免疫吸附试验(CF-ELISA)技术。

[0014] 本发明通过利用酶标记抗补体单克隆抗体或多克隆抗体及酶显色剂作为指示系统,来显示是否存在有补体参与的抗原抗体特异性反应,可用已知抗原来检测相应抗体,或用已知抗体来检测相应抗原。

[0015] 本技术发明利用了CF试验和ELISA的优点,达到建立一种高特异、高敏感、便于标准化和使用方便的新型免疫学检测技术的目的。

[0016] 2. 解决其技术问题采用的技术方案

[0017] 包被抗原或抗体制备,及用抗原或抗体包被酶联反应板;阴性和阳性血清标准品的制备;

[0018] 补体和酶标补体抗体的制备;试剂的配制(包括样品稀释液、底物液A、底物液B、终止液、20倍浓缩洗涤液)。

[0019] 本发明详细描述

[0020] 1. 试验所需组分及其制备

[0021] (1)CF-ELISA板的包被

[0022] 本发明试验中所涉及的抗原和抗体有布鲁氏菌、炭疽杆菌、鼻疽杆菌、钩端螺旋体、牛结核分枝杆菌、副结核分枝杆菌、禽结核分枝杆菌、耶尔辛氏菌0:9等病原微生物及其感染动物的血清。由以上病原菌按常规方法制备的包被用抗原,以上的感染动物血清为包被用抗体。

[0023] 抗原或抗体用0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6,含0.01%的硫柳汞)适当稀释(1~10 μ g/ml),加入到酶标板,每孔100 μ l,2~8 $^{\circ}$ C包被18小时以上,弃去孔中的抗原包被液,加入0.01mol/L磷酸盐-吐温缓冲液(PBST:0.05% Tween-20溶于PBS中)洗涤酶标板4次。弃去洗涤液,用3%鱼皮明胶(G7041, Sigma,溶于pH 7.4PBS,含0.01%的硫柳汞)或其它ELISA用封闭剂200 μ l/孔在2~8 $^{\circ}$ C封闭18小时以上。用0.01mol/L磷酸盐-吐温缓冲液洗板4次,弃去洗涤液后37 $^{\circ}$ C干燥2h,加干燥剂一起放入锡箔袋中,抽真空密封。2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0024] (2)对照品制备

[0025] 阴性对照血清按常规法由健康牛血清制成,用作阴性对照。

[0026] 阳性对照血清采用现有技术用抗原免疫家兔、羊、猪或牛等动物获得的血清,或采集自发病动物的血清,经过标定制成。用作阳性对照(参见《兽医生物制品规程》二000年版)。

[0027] (3)豚鼠补体制备

[0028] 选取健康豚鼠采血,提取血清或将血清冻干制成。

[0029] (4)酶标豚鼠补体C3、C1抗体制备

[0030] 采用菊糖激活吸附豚鼠补体C3,获得菊糖-豚鼠补体C3聚合物。采用不同浓度

EDTA 溶液透析、离心豚鼠血清,获得豚鼠补体 C1。(参见马雪云“抗鸡补体 C3 抗体的制备及其应用”中国兽医学报 2007 年 5 月第 27 卷第 3 期 359 ~ 362 和第三军医大学学报 1984 年第 6 卷第 4 期 345 ~ 350)

[0031] 经免疫兔或羊等动物,制备豚鼠补体 C3、C1 多克隆抗体。或用豚鼠 C3、C1 作为抗原免疫 BALB/c 小鼠,将其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合建立豚鼠 C3、C1 单克隆抗体细胞系。

[0032] 以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记获得酶标豚鼠补体 C3、C1 多克隆或单克隆抗体。

[0033] (5) 样品稀释液、底物液、终止液、20 倍浓缩洗涤液配制

[0034] 1) 样品稀释液 在 pH 7.4PBS 中加入最终浓度为 0.1% 鱼皮明胶、0.05% Tween-20 和 0.01% 硫柳汞。

[0035] 2) 底物 底物液 A 的制备 Na_2HPO_4 14.6g, 柠檬酸 9.33g, 过氧化氢脲 0.52g, 加纯化水定容至 1000ml, 调至 pH 值 5.0 ~ 5.4, 无菌分装。

[0036] 底物液 B 的制备 TMB 20mg, 无水乙醇 10ml, 加纯化水定容至 1000ml。无菌分装。

[0037] 3) 终止液 终止液的制备 0.25% 氢氟酸 (HF) 溶液或 2M H_2SO_4 制成。无菌分装。

[0038] 4) 20 倍浓缩洗涤液 20 倍浓缩洗涤液的制备 NaCl 160g、 KCl 4g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58g、 KH_2PO_4 4g, Tween-20 10ml 加纯化水定容至 1000ml, 无菌分装。

[0039] (6) CF-ELISA 试剂盒组装

[0040] 本发明针对不同疫病需要,可以用相应的致病病原和抗体包被反应板,与相应的阴性和阳性血清、补体、HRP 标记兔或羊等抗豚鼠 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体及试剂组装成检测试剂盒。

[0041] 表 1 试剂盒组份

[0042] CF-ELISA 抗原包被板 /CF-ELISA 抗体包被板

[0043] CF-ELISA 阴性对照血清

[0044] CF-ELISA 阳性对照血清

[0045] 豚鼠补体

[0046] HRP 标记抗豚鼠 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体

[0047] 样品稀释液

[0048] 底物液 A

[0049] 底物液 B

[0050] 终止液

[0051] 20 倍浓缩洗涤液

[0052] 将表 1 中各组分装入试剂盒内包装中,再加上外包装即组装成 CF-ELISA 试剂盒成品。

[0053] 2. 试验操作方法

[0054] (1) 检测抗体

[0055] 1) 取抗原包被板,将 20 倍浓缩洗涤液用无菌蒸馏水稀释 20 倍后,200 μ l/ 孔洗板一次;

[0056] 2) 用样品稀释液将待检血清样品 1 : 100 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。将阴性血清、强阳性对照血清、弱阳性对照血清 1 : 100 稀释后各加两孔,每孔 100 μ l。另设空

白对照各两孔。置 37℃ 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0057] 3) 用样品稀释液将豚鼠补体待 1 : 10 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37℃ 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0058] 4) 用样品稀释液将 HRP 标记抗豚鼠 C3、C1 抗体 1 : 100 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37℃ 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0059] 5) 每孔加底物 A、B 液各 50 μ l,混匀,室温避光显色 10min;

[0060] 6) 每孔加入终止液 50 μ l,混匀后测定 OD₄₅₀ 或 630。

[0061] (2) 检测抗原

[0062] 1) 取抗体包被板,将 20 倍浓缩洗涤液用无菌蒸馏水稀释 20 倍后,200 μ l/ 孔洗板一次;

[0063] 2) 用样品稀释液将待检抗原样品(样品应经过适当处理,以使得被检抗原释放至溶液中)适当稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。将阴性血清、强阳性对照血清、弱阳性对照血清 1 : 100 稀释后各加两孔,每孔 100 μ l。另设空白对照各两孔。置 37℃ 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0064] 3) 用样品稀释液将豚鼠补体待 1 : 10 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37℃ 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0065] 4) 用样品稀释液将 HRP 标记抗豚鼠 C3、C1 抗体 1 : 100 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37℃ 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0066] 5) 每孔加底物 A、B 液各 50 μ l,混匀,室温避光显色 10min;

[0067] 6) 每孔加入终止液 50 μ l,混匀后测定 OD₄₅₀ 值。

[0068] (3) 结果判定

[0069] 试验成立条件为阴性对照血清的 OD₄₅₀ 值 < 0.30,强阳性对照血清的 OD₄₅₀ 值应 ≥ 1.00,弱阳性对照血清的 OD₄₅₀ 值应在 0.3 ~ 0.60 之间。

[0070] 样本(S)/C.O ≥ 1 为阳性,< 1 为阴性。

[0071] $C.O = 0.8 \times \text{弱阳性血清 } OD_{450} \text{ 平均值} + \text{阴性血清 } OD_{450} \text{ 平均值}$

[0072] (参见:王蕾,许静,高锋测定乙型肝炎病毒表面抗原 S/C.O 值的临床应用评价上海医学检验杂志 2003 年第 18 卷第 5 期;岳希全,石宏,李迎 ELISA 法检测 HBsAg 影响结果的重要因素的分析中国实验诊断学 2007 年第 11 卷第 02 期)。

[0073] 本发明的有益效果

[0074] 本发明涉及一种补体结合酶联免疫吸附试验。本发明通过利用酶标记抗豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体及酶显色剂作为指示系统,来显示是否存在有补体参与的抗原抗体特异性反应。本发明的技术方法是以抗原或抗体包被 ELISA 板、加入待检测样品、加入豚鼠补体、加入酶标记抗豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体及酶显色剂,通过显色判定是否存在抗原抗体特异性结合。与现行 CF 试验技术相比,CF-ELISA 技术在保持了补体结合试验高特异的同时,方便了使用操作,便于技术的标准化,提高了试验点敏感性。

[0075] 具体实施方式(以布鲁氏菌病 CF-ELISA 试验技术为例):

[0076] 实施例 1

[0077] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒制备

[0078] 1. 布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原包被板

[0079] (1) 布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原制备

[0080] 将布鲁氏菌纯培养物经过 80℃ 4 小时灭活后,7000r/min 离心洗涤,取 50g 湿菌体,以 170ml 蒸馏水悬浮,加热至 66℃,再加入 190ml 66℃的 90% (V/V) 苯酚溶液,连续搅拌混合 15min,10,000g 4℃离心 15min,以细长吸管(或长针头)吸取位于底层的酚相,用定性滤纸过滤除去细胞壁碎片至溶液清亮。

[0081] 加 500ml 冷甲醇(含饱和醋酸钠的甲醇 5ml)沉淀 LPS,4℃置 2 小时后,10,000g 离心 10min 弃上清,以 80ml 蒸馏水悬浮沉淀物,搅拌 18h,10,000g 离心 10min,收集上清液 4℃存放,沉淀用 80ml 蒸馏水 4℃搅拌 2h,如前离心,收集上清液与先前收集的上清液合并。

[0082] 在上述 160ml 粗提的 LPS 中加入 8g 三氯乙酸。搅拌 10min,离心去除沉淀,半透明上清液用 0.05M、pH 9.6 碳酸盐缓冲液(CBS)透析(每次 4000ml,至少 3 遍),在冰浴中约 6 瓦特超声 3 次,每次 1min。分装安瓶(1ml/支)冻干,室温或低温保存。

[0083] 每批取至少 6 支冻干 LPS 称重,确定每瓶装量。

[0084] (2) 布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原包被板

[0085] 冻干布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原用灭菌蒸馏水复原至 1mg/ml,用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6,含 0.01%的硫柳汞)稀释抗原至 1:1000,加入到酶标板(Corning, 2592),每孔 100 μ l,2~8℃包被 18h 以上,弃去孔中的抗原包被液,加入 0.01mol/L 磷酸盐-吐温缓冲液(PBST:0.05% Tween-20 溶于 PBS 中)洗涤液清洗酶标板 4 次。弃去清洗液,用 3%鱼皮明胶(G7041, Sigma,溶于 pH 7.4PBS,含 0.01%的硫柳汞)200 μ L/孔在 2~8℃封闭 18 小时以上。用 0.01mol/L 磷酸盐-吐温缓冲液洗板 4 次,弃去洗涤液后 37℃干燥 2h,加干燥剂一起放入锡箔袋中,抽真空密封。2~8℃保存。

[0086] 2. 布鲁氏菌病 CF-ELISA 阴性对照血清、阳性对照血清制备

[0087] 阴性对照血清由健康无布鲁氏菌病牛血清冻干制成。

[0088] 选取抗体类型为 IgG 的布鲁氏菌病阳性牛血清,用布鲁氏菌病阳性血清国家标准品标定效价至 1000IU/ml,冻干制成布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒强阳性对照血清。将效价为 1000IU/ml 的布鲁氏菌病阳性血清用布鲁氏菌病阴性血清 100 倍稀释,冻干制成布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒弱阳性对照血清。

[0089] 3. 豚鼠补体制备

[0090] 选取健康豚鼠采血,冻干制成。

[0091] 4. 酶标豚鼠补体 C3、C1 抗体制备

[0092] 本发明人采用菊糖激活吸附豚鼠补体 C3、C1,获得菊糖-豚鼠补体 C3、C1 聚合物。经免疫兔和羊,获得了豚鼠补体 C3、C1 多克隆抗体。并用豚鼠 C3、C1 作为抗原免疫 BALB/c 小鼠,将其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合建立豚鼠 C3、C1 单克隆抗体细胞系。以辣根过氧化物酶(HRP)标记获得酶标豚鼠补体 C3、C1 多克隆和单克隆抗体。

[0093] 具体操作方法如下:

[0094] (1) 豚鼠补体 C3、C1 提纯

[0095] 菊糖经过充分洗涤,以补体结合试验确定菊糖与豚鼠血清混合比例后,与适量豚鼠补体混合,37℃作用 1 小时,离心去除杂蛋白,沉淀为制备好的菊糖-豚鼠补体 C3、C1 聚合物。

- [0096] (2) 制备豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体。
- [0097] 1) 制备豚鼠补体 C3、C1 多克隆抗体。
- [0098] 用提纯豚鼠补体 C3、C1 多次免疫兔或羊等动物,用琼扩试验或 ELISA 试验检测特异性抗体,当琼扩试验抗体效价达到 1 : 4 以上,即可采血分离血清,冷藏备用。或经冷冻干燥,制备成可长期保存的豚鼠补体 C3、C1 多克隆抗体。
- [0099] 2) 制备豚鼠补体 C3b 单克隆抗体
- [0100] 用提纯的豚鼠 C3、C1 作为抗原免疫 BALB/c 小鼠,以豚鼠 C3、C1 包被酶标反应板,检测 BALB/c 小鼠血清 C3、C1 抗体,筛选抗 C3、C1 阳性 BALB/c 小鼠,将其脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合并用 HAT 培养基作选择性培养,通过检测杂交瘤上清中分泌 C3、C1 单抗情况,筛选阳性杂交瘤细胞,经扩增和多次亚克隆,直至所有单个细胞形式的克隆培养上清均呈 C3、C1 抗体阳性,确定为单克隆抗体细胞系建立。
- [0101] 培养单克隆抗体细胞系,或用单克隆抗体细胞系接种大鼠腹腔,取细胞培养液或腹水制备豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体。当琼扩试验抗体效价达到 1 : 8 以上,即可收集单抗液,冷藏备用。或经冷冻干燥,制备成可长期保存的豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体。
- [0102] 3) 酶标记豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体
- [0103] 以 HRP 标记豚鼠补体 C3、C1 单克隆抗体或多克隆抗体。
- [0104] 5. 样品稀释液、底物液、终止液、20 倍浓缩洗涤液配制
- [0105] (1) 样品稀释液
- [0106] 在 pH 7.4PBS 中加入最终浓度为 0.1% 鱼皮明胶、0.05% Tween-20 和 0.01% 硫柳汞。
- [0107] (2) 底物
- [0108] 底物液 A 的制备 Na₂HPO₄ 14.6g, 柠檬酸 9.33g, 过氧化氢脲 0.52g, 加纯化水定容至 1000ml, 调至 pH 值 5.0 ~ 5.4, 无菌分装。
- [0109] 底物液 B 的制备 TMB 20mg, 无水乙醇 10ml, 加纯化水定容至 1000ml。无菌分装。
- [0110] (3) 终止液
- [0111] 终止液的制备 0.25% 氢氟酸 (HF) 溶液制成。无菌分装。
- [0112] (4) 20 倍浓缩洗涤液
- [0113] 20 倍浓缩洗涤液的制备 NaCl 160g、KCl 4g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 58g、KH₂PO₄ 4g, Tween-20 10ml 加纯化水定容至 1000ml, 无菌分装。
- [0114] 6. 布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒组装
- [0115] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒的各组分如下 :
- [0116] 表 2 试剂盒组份
- [0117] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原包被板
- [0118] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 阴性对照血清
- [0119] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 强阳性对照血清
- [0120] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 弱阳性对照血清
- [0121] 豚鼠补体
- [0122] HRP 标记兔或羊抗豚鼠 C3、C1 多克隆抗体或多克隆抗体
- [0123] 样品稀释液

[0124] 底物液 A

[0125] 底物液 B

[0126] 终止液

[0127] 20 倍浓缩洗涤液

[0128] 将表 1 中各组分装入试剂盒内包装中,再加上外包装即组装成布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒成品。

[0129] 实施例 2

[0130] 布鲁氏菌病 CF-ELISA 试剂盒使用

[0131] 1. 试验方法

[0132] (1) 取抗原包被板,将 20 倍浓缩洗涤液用无菌蒸馏水稀释 20 倍后,200 μ l/ 孔洗板一次;

[0133] (2) 用样品稀释液将待检血清样品 1 : 100 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。将阴性血清、强阳性对照血清、弱阳性对照血清 1 : 100 稀释后各加两孔,每孔 100 μ l。另设空白对照各两孔。置 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0134] (3) 用样品稀释液将豚鼠补体待 1 : 10 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0135] (4) 用样品稀释液将 HRP 标记抗豚鼠 C3、C1 抗体 1 : 100 稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次;

[0136] (5) 每孔加底物 A、B 液各 50 μ l,混匀,室温避光显色 10min;

[0137] (6) 每孔加入终止液 50 μ l,混匀后测定 OD_{450 或 630} 值。

[0138] 2. 结果判定

[0139] 试验成立条件为阴性对照血清的 OD_{450 或 630} 值 < 0.30,强阳性对照血清的 OD₆₃₀ 值应 \geq 1.00,弱阳性对照血清的 OD_{450 或 630} 值应在 0.3 ~ 0.60 之间。

[0140] 样本 (S)/C.O \geq 1 为阳性,< 1 为阴性。

[0141] C.O = 0.8 \times 弱阳性血清 OD_{450 或 630} 平均值 + 阴性血清 OD_{450 或 630} 平均值

[0142] 实施例 3

[0143] CF-ELISA 试验技术的质量控制 (以布鲁氏菌病 CF-ELISA 试验技术为例)

[0144] 1. 布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原包被板效价检测

[0145] (1) 取抗原包被板,将 20 倍浓缩洗涤液用无菌蒸馏水稀释 20 倍后,200 μ l/ 孔洗板一次。

[0146] (2) 用样品稀释液将阴性血清、强阳性对照血清、弱阳性对照血清 1 : 100 稀释后每孔加入 100 μ l,并另设空白对照孔。置 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次。

[0147] (3) 用样品稀释液将 HRP 标记抗牛 IgG 抗体按商品说明书稀释后加入板孔中,每孔 100 μ l。置 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后,用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次。

[0148] (4) 每孔加底物 A、B 液各 50 μ l,混匀,室温避光显色 10min。

[0149] (5) 每孔加入终止液 50 μ l,混匀后测定 OD₆₃₀。

[0150] 当阴性对照血清的 OD₆₃₀ 值 < 0.30,强阳性对照血清的 OD₆₃₀ 值应 \geq 1.00,弱阳性对照血清的 OD₆₃₀ 值应在 0.3 ~ 0.60 之间,为质量合格的布鲁氏菌病 CF-ELISA 抗原包被板。

- [0151] 2. 布鲁氏菌病 CF-ELISA 阴性对照血清、阳性对照血清检测
- [0152] (1) 布鲁氏菌病 CF-ELISA 阴性对照血清检测
- [0153] 用布鲁氏菌病试管凝集试验检测 1 : 10 至 1 : 80 倍数稀释布鲁氏菌病 CF-ELISA 阴性对照血清, 结果应为阴性反应。
- [0154] (2) 布鲁氏菌病 CF-ELISA 强阳性对照血清检测
- [0155] 用布鲁氏菌病试管凝集试验检测 1 : 500 倍稀释布鲁氏菌病 CF-ELISA 强阳性对照血清, 结果应达到 50% 左右凝集反应。
- [0156] (3) 布鲁氏菌病 CF-ELISA 弱阳性对照血清检测
- [0157] 用布鲁氏菌病试管凝集试验检测 1 : 5 倍稀释布鲁氏菌病 CF-ELISA 弱阳性对照血清, 结果应达到 50% 左右凝集反应。
- [0158] 3. 豚鼠补体检测
- [0159] 用布鲁氏菌病补体结合试验检测 1 : 20 倍稀释豚鼠补体, 结果在阴性对照管 100% 溶血同时, 阳性管应接近 100% 抑制溶血。
- [0160] 4. 酶标豚鼠补体 C3、C1 抗体检测
- [0161] (1) 用 1 : 10 稀释豚鼠补体包被酶标板, 每孔 100 μ l, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 包被 18 小时以上, 用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次。弃洗涤液, 用 3% 鱼皮明胶 200 μ l/ 孔在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 封闭 18 小时以上。200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次。
- [0162] (2) 用样品稀释液将待测酶标豚鼠补体 C3b 抗体样品 1 : 1000 稀释后加入板孔中, 每孔 100 μ l。置 37 $^{\circ}$ C 反应 30min 后, 用 200 μ l/ 孔洗涤液洗涤 5 次。
- [0163] (3) 每孔加底物 A、B 液各 50 μ l, 混匀, 室温避光显色 10min。
- [0164] (4) 每孔加入终止液 50 μ l, 混匀后测定 OD_{450 或 630} 值, 应 \geq 1.00。
- [0165] 实施例 4
- [0166] CF-ELISA 试验与补体结合试验和 ELISA 试验的比较 (以布鲁氏菌病试验技术为例)
- [0167] 1. 敏感性比较
- [0168] (1) 灵敏度比较试验
- [0169] 倍数稀释度的布鲁氏菌病阳性血清国家标准品用于 CF-ELISA 试验的灵敏度检测, 并且与 iELISA 和补体结合试验 (CFT)、试管凝集试验 (SAT) 比较。结果见下表 3:
- [0170] 表 3 灵敏度比较试验
- [0171]

阳性血清稀释 (IU/ml)		100	50	25	12.5	6.30	3.20	1.60	0.80	0.40	0.20	0.10	0.05
CF-ELISA													
阳性血清	用 HRP 标记 C3 抗体	1.591	1.350	1.132	1.084	1.058	0.783	0.520	0.463	0.354	0.280	0.204	0.211
OD 值	用 HRP 标记 C1 抗体	1.279	1.184	1.198	1.089	0.961	0.808	0.595	0.528	0.452	0.264	0.219	0.169
阴性血清	用 HRP 标记 C3 抗体	0.028	0.015	0.001	0.015	0.061	0.023	0.031	0.074	0.021	0.039	0.056	0.006
OD 值	用 HRP 标记 C1 抗体	0.025	0.013	0.017	0.013	0.035	0.041	0.015	0.053	0.023	0.044	0.022	0.032
CFT													
阳性血清溶血%		0	30	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100
阴性血清溶血%		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
iELISA													
阳性血清 OD 值		1.673	1.411	1.157	1.141	1.213	1.043	0.689	0.638	0.435	0.320	0.264	0.208
阴性血清 OD 值		0.038	0.017	0.002	0.035	0.021	0.043	0.011	0.054	0.041	0.019	0.046	0.016
SAT													
阳性血清凝集%		100	100	100	100	100	100	75	25	0	0	0	0
阴性血清凝集%		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0172] 以上结果表明, CF-ELISA 试验的敏感性与 iELISA 一致, 根据试验结果显示, 两者灵敏度至少可达到检测 0.05IU 血清抗体 (S/P 阳性与阴性的临界 OD 值 = $[(0.3-0.002) \times 0.4] + 0.002 = 0.12$, 对应血清 IU 至少可检测到每毫升含 0.05IU), 是 CFT (可检测到每毫升血清含 10IU) 的 200 倍和 SAT (可检测到每毫升血清含 1IU) 的 20 倍以上。

[0173] (2) 对布鲁氏菌病阳性血清敏感性比较试验

[0174] 349 份确诊的布鲁氏菌病感染群牛、羊血清用于 CF-ELISA 试验的敏感性检测, 并且与 iELISA 和 CFT、SAT、虎红平板凝集试验 (RBPT) 比较。结果见下表 4:

[0175] 表 4 敏感性比较试验

[0176]

		CF-ELISA	iELISA	CFT	SAT	RBPT
CF-ELISA	阳性数	125/349				
	阳性率	35.82%				
	与 CF-ELISA 阳性符合数		123/125	111/125	100/125	120/125
	与 CF-ELISA 阳性符合率		98.4%	88.8%	80.0%	90.6%
iELISA	阳性数		127/349			
	阳性率		36.39%			
	与 iELISA 阳性符合数	123/127		110/127	101/127	123/127
	与 iELISA 阳性符合率	96.9%		86.6%	79.5%	96.9%
CFT	阳性数			111/349		
	阳性率			31.81%		
	与 CFT 阳性符合数	111/111	110/111		98/111	111/111
	与 CFT 阳性符合率	100%	99.1%		88.3%	100%
SAT	阳性数				105/349	
	阳性率				30.09%	
	与 SAT 阳性符合数	100/105	101/105	98/105		98/105
	与 SAT 阳性符合率	95.2%	96.2%	93.3%		93.3%
RBPT	阳性数					126/349
	阳性率					36.1%
	与 RBPT 阳性符合数	120/126	123/126	118/126	98/126	
	与 RBPT 阳性符合率	95.2%	97.6%	93.7%	77.7%	

[0177] 2. 特异性比较试验

[0178] 490 份确诊的无布鲁氏菌感染牛、羊血清用于 CF-ELISA 试验的特异性检测,并且与 iELISA 和 CFT、SAT、RBPT 比较,结果见下表 5。

[0179] 表 5 特异性比较试验

[0180]

		CF-ELISA	iELISA	CFT	SAT	RBPT
CF-ELISA	阴性数	490/490				
	阴性率	100%				
	与 CF-ELISA 阴性符合数		488/490	490/490	487/490	489/490
	与 CF-ELISA 阴性符合率		99.6%	100%	99.4%	99.8%

[0181]

iELISA	阴性数		488/490			
	阴性率		99.6%			
	与 iELISA 阴性符合数	488/488		488/488	485/488	488/488
	与 iELISA 阴性符合率	100%		100%	99.4%	100%
CFT	阴性数			490/490		
	阴性率			100%		
	与 CFT 阴性符合数	490/490	488/490		487/490	489/490
	与 CFT 阴性符合率	100%	99.6%		99.4%	99.8%
SAT	阴性数				487/490	
	阴性率				99.4%	
	与 SAT 阴性符合数	487/487	485/487	487/487		486/487
	与 SAT 阴性符合率	100%	99.6%	100%		99.8%
RBPT	阴性数					489/490
	阴性率					99.8%
	与 RBPT 阴性符合数	489/489	489/489	489/489	486/489	
	与 RBPT 阴性符合率	100%	100%	100%	99.4%	

[0182] 实施例 5

[0183] CF-ELISA 试验炭疽杆菌包被抗原的制备

[0184] 开启炭疽菌种 (CVCC40202、CVCC40218、CVCC2、CVCC3、CVCC5), 移植至普通琼脂斜面, 36℃~37℃培养 16~18 小时。洗脱扁瓶培养物, 121℃高压 30min, 冷暗处浸泡 5 个月后用滤纸过滤, 收集滤过液加入 0.02% 叠氮钠防腐, 高压灭菌即为炭疽 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0185] 实施例 6

[0186] CF-ELISA 试验鼻疽杆菌包被抗原的制备

[0187] 开启鼻疽菌种 (CVCC67001、CVCC67002), 移植至甘油琼脂斜面, 36℃~37℃培养 16~18 小时。洗脱扁瓶培养物, 121℃高压 30min, 冷暗处浸泡 4 个月后收集上清液, 加入 0.02% 叠氮钠防腐即为鼻疽 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0188] 实施例 7

[0189] CF-ELISA 试验钩端螺旋体包被抗原的制备

[0190] 开启钩端螺旋体菌种 (CVCC70091、CVCC56133、CVCC56606、CVCC56609、CVCC56607), 柯托夫培养基, 28℃~32℃培养 5~7 天。收集培养物, 加入甲醛至 0.3% 浓度, 灭活培养物。7000rpm/min 离心, 收集沉淀, 加入含 0.3% 甲醛浓度的生理盐水悬浮沉淀物, 即为钩端螺旋体 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0191] 实施例 8

[0192] CF-ELISA 试验副结核分枝杆菌包被抗原的制备

[0193] 开启副结核分枝杆菌菌种 (CVCC320), 接种 W-R 液体培养基, 36℃~37℃培养 60 天。收集培养物, 用氢氧化钠调 pH 至 7.2~7.3, 121℃高压 30min。用蒸馏水洗涤菌体 4 次, 干燥后按每克加丙酮 50ml 浸泡 21 天, 过滤除去丙酮。菌体按 1g 加蒸馏水 15ml 的比例悬浮, 加入玻璃珠用沸水水浴震荡 1 小时, 滤纸过滤收集滤液, 煮沸蒸发至原体积的 1/15, 除菌过滤后加入苯酚至终浓度 0.3%。即为副结核 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0194] 实施例 9

[0195] CF-ELISA 试验牛结核分枝杆菌包被抗原的制备

[0196] 开启牛结核分枝杆菌菌种 (CVCC68001、CVCC68002), 接种苏通合成培养基, 36℃~37℃培养 90 天。121℃高压 30min 后浸泡 1 个月。除菌过滤, 滤液加入三氯乙酸至 4%, 2℃~8℃沉淀 24 小时以上, 收集沉淀并离心洗涤 3 次。以氢氧化钠 (1mol/L) 溶解沉淀物后调至 pH7.4 加入 pH7.4 磷酸缓冲液, 沉淀并调整蛋白含量至 3.0mg/ml。即为牛结核 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0197] 实施例 10

[0198] CF-ELISA 试验耶尔辛氏菌 0:9 包被抗原的制备

[0199] 开启耶尔辛氏菌 0:9 菌种 (Ye 0:9 M1), 移植至胰琼脂斜面, 36~37℃培养 24~48 小时。洗脱扁瓶培养物, 121℃高压 30min, 超声破碎细胞, 除菌过滤后收集滤液, 加入终浓度为 0.02%叠氮钠防腐, 即为耶尔辛氏菌 0:9 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0200] 实施例 11

[0201] CF-ELISA 试验禽结核分枝杆菌包被抗原的制备

[0202] 开启禽结核分枝杆菌菌种 (CVCC68201、CVCC68202、CVCC68203), 接种苏通合成培养基, 36℃~37℃培养 90 天。121℃高压 30min 后浸泡 1 个月。除菌过滤, 滤液加入三氯乙酸至 4%, 2℃~8℃沉淀 24 小时以上, 收集沉淀并离心洗涤 3 次。以氢氧化钠 (1mol/L) 溶解沉淀物后调至 pH7.4 加入 pH7.4 磷酸缓冲液, 沉淀并调整蛋白含量至 3.0mg/ml。即为禽结核 CF-ELISA 试验包被抗原。

[0203] 实施例 12

[0204] CF-ELISA 试验技术应用

[0205] 除上述举例中提及的用 CF-ELISA 检测布鲁氏菌病抗体外, 还对其它一些抗体和抗原进行了检测, 以验证 CF-ELISA 检测抗体和抗原的普遍适用性。

[0206] 1. 用 CF-ELISA 检测抗体

[0207] 以上述实施例 5~11 的炭疽杆菌、鼻疽杆菌、钩端螺旋体、副结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、耶尔辛氏菌 0:9、禽结核分枝杆菌 CF-ELISA 试验包被抗原作为抗原包被 ELISA 板, 用 CF-ELISA 检测相应感染血清 (抗体), 以 S/N (样品 / 阴性血清) ≥ 2.1 为阳性。结果见下表 6:

[0208] 表 6CF-ELISA 检测 7 种病原细菌感染血清

[0209]

血清稀释	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	空白
炭疽	1.565	0.693	0.566	0.363	0.363	0.366	0.399	0.348	0.337	0.323	0.335	0.036
鼻疽	1.870	1.849	1.776	1.758	1.789	1.783	1.785	1.813	1.875	1.867	1.862	0.091
钩端螺旋体	1.201	1.175	1.095	0.864	0.651	0.832	0.438	0.317	0.307	0.261	0.256	0.049
副结核	0.400	0.354	0.356	0.371	0.363	0.307	0.344	0.357	0.354	0.319	0.327	0.052
牛结核	0.549	0.503	0.424	0.415	0.365	0.307	0.299	0.278	0.314	0.265	0.266	0.049
耶尔辛氏菌 0:9	1.844	2.069	1.931	1.827	1.812	1.707	1.396	1.138	0.951	0.858	0.858	0.043
禽结核	0.722	0.390	0.302	0.273	0.245	0.256	0.248	0.271	0.280	0.275	0.261	0.079
阴性血清	0.022	0.012	0.009	0.096	0.001	0.075	0.000	0.007	0.088	0.005	0.099	0.076

[0210] 表中结果显示, 试验的 7 种病原菌抗体检测均为阳性 ($S/N \geq 2.1$)。表明 CF-ELISA 可普遍用于特异性抗体的检测。

[0211] 2. 用 CF-ELISA 检测抗原

[0212] 以炭疽杆菌、鼻疽杆菌、钩端螺旋体、副结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、耶尔辛氏菌 0:9、禽结核分枝杆菌 7 种特异血清 (抗体) 包被 ELISA 板, 用 CF-ELISA 检测相应细菌 (抗原), 当 S/N (样品 / 阴性血清) ≥ 2.1 判为阳性。结果见下表 7:

[0213] 表 7 CF-ELISA 检测 7 种病原细菌

[0214]

抗原稀释	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	空白
炭疽	0.546	0.468	0.495	0.500	0.473	0.518	0.457	0.431	0.446	0.484	0.498	0.040
鼻疽	0.506	0.529	0.614	0.883	0.711	0.790	0.613	0.572	0.556	0.439	0.431	0.045
钩端螺旋体	0.318	0.815	0.305	0.306	0.297	0.333	0.298	0.314	0.293	0.281	0.292	0.041
副结核	0.347	0.356	0.367	0.364	0.328	0.346	0.350	0.350	0.336	0.331	0.327	0.045
牛结核	1.377	1.414	1.455	1.469	1.404	1.429	1.408	1.290	1.303	1.336	1.280	0.037
耶尔辛氏菌 0:9	0.455	0.407	0.372	0.376	0.341	0.350	0.326	0.355	0.336	0.377	0.340	0.043
禽结核	0.258	0.246	0.256	0.238	0.236	0.271	0.238	0.240	0.231	0.226	0.237	0.043
阴性血清	0.061	0.046	0.054	0.053	0.038	0.087	0.092	0.060	0.075	0.071	0.077	0.038

[0215] 表中结果显示, 检测 7 种病原菌均为阳性 ($S/N \geq 2.1$)。表明 CF-ELISA 可普遍用于特异性抗原的检测。

[0216] 本发明技术方案中所涉及的微生物菌种及其阳性血清和阴性血清均取自北京市海淀区中关村南大街 8 号中国兽医药品监察所; 所用培养基、试剂及器材均为市售商品, 由试剂公司购得。

