(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771249 A
(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611262295.5

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 广东华南联合疫苗开发院有限公司
地址 510663 广东省广州市科学城揽月路3号国际企业孵化器F栋715

(72)发明人 谭远贞 彭涛 马书智 许煜华 陈丽云 黄杨波 卢全占 丁东

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
代理人 许飞

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种用于杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法

(57)摘要

本发明公开了杆状病毒GP64蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。试剂盒包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、杆状病毒GP64蛋白标准品和标记的二抗，一抗为豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体，二抗为兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体。本发明的试剂盒，操作简便，检测结果准确可靠，标准曲线线性为R^2=0.9999，线性关系较好，线性范围在2ng/ml-100ng/ml，线性范围较理想。日内、日间准确度在95.3%-101.8%之间，精密度在4.2%-6.7%之间，表明试剂盒具有较好的准确度和精密度。不同批试剂盒对高、中、低浓度质控品进行测定，测定值的准确度在96.4%-100.2%之间，精密度在5.7%-8.6%之间，差异较小。

CN 106771249 A

1.一种用于杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、杆状病毒GP64蛋白标准品和标记的二抗，其特征在于：一抗为哺乳动物抗杆状病毒GP64蛋白抗体，二抗为标记的抗杆状病毒GP64蛋白抗体。

2.根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：哺乳动物抗杆状病毒GP64蛋白抗体的制备方法为：首次免疫采用抗原免疫，注射杆状病毒GP64蛋白；首次免疫后进行加强免疫，进行3～5次加强免疫，最后一次加强免疫后进行取血。

3.根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体的制备方法为：首次免疫采用抗原多点免疫，注射杆状病毒GP64蛋白；首次免疫后进行加强免疫，共进行3～5次加强免疫，最后一次加强免疫后进行取血。

4.根据权利要求1～3任意一项所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：酶标板的处理方法为：将抗杆状病毒GP64蛋白抗体用包被液稀释后加入酶标板，包被过夜，再用封闭液封闭，封存。

5.根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：标记二抗的为HRP。

6.根据权利要求1所述的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：杆状病毒GP64蛋白的制备方法为：

1)使用引物扩增杆状病毒 GP64基因；

2)使用扩增得到的杆状病毒 GP64基因构建杆状病毒 GP64基因原核表达载体并诱导表达；

3)将表达得到的杆状病毒GP64蛋白分离、纯化得到杆状病毒GP64蛋白。

7.一种检测杆状病毒GP64蛋白含量的方法，包括如下步骤：

1)取出包被一抗的酶标板，加入杆状病毒GP64蛋白抗原标准品，孵育完成后弃去孔内液体，洗液清洗后拍干；

2)加入HRP标记的抗杆状病毒GP64蛋白抗体，孵育完成后弃去孔内液体，洗液清洗后拍干；

3)加入TMB显色液，室温反应显色；

4)加入硫酸终止液；

5)在酶标仪上测450nm下的OD值；

6)根据标准曲线得到所述待检样品中杆状病毒GP64蛋白含量。

8.根据权利要求7所述的方法，其特征在于：杆状病毒GP64蛋白抗原标准品浓度为0ng/ml~100ng/ml。

9.根据权利要求7所述的方法，其特征在于：HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体浓度为0.5μg/ml~5μg/ml。

一种用于杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域，尤其是涉及用于检测杆状病毒GP64蛋白残留的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 昆虫细胞/杆状病毒表达系统具有安全性高，对外源基因克隆容量大，重组病毒易于筛选，具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点，已经广泛应用于重组蛋白的表达和研究中。国外公司利用昆虫细胞/杆状病毒表达系统生产的多种人用疫苗或药物已批准上市。

[0003] 膜融合蛋白GP64是杆状病毒的主要糖蛋白，序列高度保守，含512个氨基酸，相对分子质量约为59300Da，主要以二硫键相连三聚体的形式存在于棒状杆状病毒的一端，形成典型的膜粒结构。其具有pH依赖的膜融合活性，介导病毒与宿主细胞的融合，在杆状病毒侵染细胞和子代核衣壳有效出芽释放的过程中均起关键作用。因此，对昆虫细胞/杆状病毒表达系统生产的重组蛋白生物制品中的杆状病毒GP64蛋白进行定量检测，能够对杆状病毒蛋白残余量进行控制。

[0004] 获得高质量的抗体是ELISA法检测蛋白含量的关键，抗原的免疫原性对抗体的效价有着直接的影响，抗体的具体制备方法对效价同样存在巨大的影响。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供用于检测杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。

[0006] 本发明所采取的技术方案是：

[0007] 一种用于检测杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒，包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、杆状病毒GP64蛋白标准品和标记的二抗，一抗为哺乳动物抗杆状病毒GP64蛋白抗体，二抗为标记的抗杆状病毒GP64蛋白抗体。

[0008] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，哺乳动物抗杆状病毒GP64蛋白抗体的制备方法为：首次免疫采用抗原多点免疫，注射杆状病毒GP64蛋白；首次免疫进行加强免疫，共进行3～5次加强免疫，最后一次加强免疫后取血。

[0009] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体的制备方法为：首次免疫采用抗原多点免疫，注射杆状病毒GP64蛋白；首次免疫后进行加强免疫，共进行3～5次加强免疫，最后一次加强免疫后取血。

[0010] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，酶标板的处理方法为：酶标板的处理方法为：将一抗(抗杆状病毒GP64蛋白抗体用包被液稀释后加入酶标板)，包被过夜，再用封闭液封闭，封存。

[0011] 作为上述双抗夹心酶联免疫检测试剂盒的进一步改进，标记二抗的为HRP。

[0012] 杆状病毒GP64蛋白的制备方法为：

[0013] 1)使用引物扩增杆状病毒GP64基因；

[0014] 2)使用扩增得到的杆状病毒GP64基因构建杆状病毒GP64基因原核表达载体并诱导表达；

[0015] 3)将表达得到的杆状病毒GP64蛋白分离、纯化得到杆状病毒GP64蛋白。

[0016] 一种检测杆状病毒GP64蛋白含量的方法，包括如下步骤：

[0017] 1)取出包被一抗的酶标板，加入杆状病毒GP64蛋白抗原标准品，孵育完成后弃去孔内液体，洗液清洗后拍干；

[0018] 2)加入HRP标记的抗杆状病毒GP64蛋白抗体(二抗)，孵育完成后弃去孔内液体，洗液清洗后拍干；

[0019] 3)加入TMB显色液，室温反应显色；

[0020] 4)加入硫酸终止液；

[0021] 5)在酶标仪上测450nm下的OD值；

[0022] 6)根据标准曲线得到所述待检样品中杆状病毒GP64蛋白含量。

[0023] 作为上述方法的进一步改进，杆状病毒GP64蛋白抗原标准品浓度为0ng/ml～100ng/ml。

[0024] 作为上述方法的进一步改进，HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体浓度为0.5μg/ml～5μg/ml。

[0025] 本发明的有益效果是：

[0026] 本发明的试剂盒，操作简便，检测结果准确可靠，标准曲线线性为R^2＝0.9999，线性关系较好，线性范围在2ng/ml-100ng/ml，线性范围较理想。日内、日间准确度在95.3%-101.8%之间，精密度在4.2%-6.7%之间，表明试剂盒具有较好的准确度和精密度。不同批试剂盒对高、中、低浓度质控品进行测定，测定值的准确度在96.4%-100.2%之间，精密度在5.7%-8.6%之间，差异较小。

附图说明

[0027] 图1是杆状病毒基因组中GP64基因扩增结果；

[0028] 图2是pET32a-N工程菌扩增结果；

[0029] 图3是杆状病毒GP64基因工程菌表达蛋白的SDS-PAGE分析；

[0030] 图4是杆状病毒GP64蛋白纯度分析；

[0031] 图5是蛋白含量测定标准曲线图；

[0032] 图6是杆状病毒GP64蛋白抗体纯度；

[0033] 图7是杆状病毒GP64蛋白SDS-PAGE(A)及其抗体Western blot(B)分析；

[0034] 图8是检测限和定量限实验的标准曲线；

[0035] 图9是准确度和精密度实验的标准曲线。

具体实施方式

[0036] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解，下面结合具体实验，进一步阐述本发明。

[0037] 杆状病毒GP64蛋白的制备

[0038] 1材料

[0039] TOP10和DE3感受态细胞;原核表达载体pET-32a(+);病毒DNA提取试剂盒;质粒提取试剂盒;DNA胶回收试剂盒;DNA marker;限制性内切酶和T4DNA连接酶;氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、酶标板、BSA标准品、Bradford蛋白测定试剂盒;KOD FX;HisTrap FF crude镍螯合层析柱;高速冷冻离心机;凝胶成像系统;紫外分光光度计;聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质转印系统;基因扩增仪;超声波破碎仪。

[0040] 2方法

[0041] 2.1杆状病毒GP64基因引物设计及PCR扩增

[0042] 根据GenBank中登录的杆状病毒GP64基因全长序列(NC_001623),采用引物,序列如下:GP64-PF:5′-CGGAATTCGCGGAGCACTGCAACGCGC-3′(引入EcoRI酶切位点),GP64-PR:5′-GGGAAGCTTGCCGCCAAACTTGGTGTTCTC-3′(引入HindⅢ酶切位点)。

[0043] 2.2杆状病毒GP64基因原核表达载体的构建

[0044] 2.2.1提取杆状病毒基因组DNA;

[0045] 2.2.2利用引物扩增GP64蛋白基因;

[0046] 2.2.3胶回收目的条带,用EcoRI和HindⅢ进行酶切,胶回收并纯化,再连入用相同酶消化的原核表达载体pET-32a(+)载体中,转化TOP10感受态细胞,得到pET32a-GP64重组表达载体;

[0047] 2.2.4经酶切鉴定再转化表达菌DE3感受态细胞,该菌种即为表达杆状病毒GP64蛋白的工程菌。

[0048] 2.3杆状病毒GP64基因的诱导表达

[0049] 2.3.1将构建好的pET32a-GP64工程菌接种于含50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37℃振荡培养过夜;

[0050] 2.3.2第二天按1:100的比例接种于新鲜LB培养基中,继续培养至菌液A600值约为0.6时,加入IPTG至终浓度分别为0.5mmol/L,诱导表达4h;

[0051] 2.3.3收集菌体,取1ml样品进行12%SDS-PAGE分析,同时设无GP64基因重组菌作为阴性对照;

[0052] 2.3.4确定杆状病毒GP64蛋白表达后,用PBS(含0.5%Triton X-100)重悬菌体,冰浴中超声裂解,4℃,12000×g离心30min,收集沉淀,于-20℃保存备用。

[0053] 2.4杆状病毒GP64蛋白的纯化及鉴定

[0054] 2.4.1用含2mol/L尿素的磷酸盐缓冲液(含500mmol/L NaCl,20mmol/L磷酸盐,pH7.4)溶解裂解后的菌体沉淀,12000×g离心30min,收集包涵体;

[0055] 2.4.2用含8mol/L尿素的磷酸盐缓冲液溶解包涵体,12000×g离心30min,收集上清,用0.45μm滤膜过滤;

[0056] 2.4.3利用HisTrap FF crude镍螯合层析柱对杆状病毒GP64蛋白进行纯化;

[0057] 2.4.4利用透析袋透析尿素,复性蛋白。

[0058] 2.5杆状病毒GP64蛋白含量测定

[0059] 2.5.1标准曲线制备:用PBS将1mg/ml BSA标准品稀释成:300μg/ml、250μg/ml、200μg/ml、150μg/ml、100μg/ml、50μg/ml、0μg/ml。

[0060] 2.5.2待测样品制备:用PBS将样品按4倍进行稀释。

[0061] 2.5.3取20μl加入96孔板中,做3个复孔,再加入200μl Bradford试剂,然后在酶标仪上测595nm下的OD值。

[0062] 2.5.4以蛋白质浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘制标准曲线并计算待测样品蛋白含量。

[0063] 3结果

[0064] 3.1杆状病毒基因组中GP64基因扩增结果

[0065] 图1是杆状病毒基因组中GP64基因扩增结果。由结果可知,利用杆状病毒GP64基因引物对杆状病毒基因组进行PCR,扩增出1539bp左右的目的条带,与预期大小一致。

[0066] 3.2pET32a-GP64工程菌中GP64基因扩增结果

[0067] 结果如图2所示,由结果可知,利用杆状病毒GP64基因引物对构建的pET32a-GP64工程菌进行PCR,扩增出1539bp左右的目的条带,与预期大小一致,表明载体pET-32a-GP64构建成功。

[0068] 3.3杆状病毒GP64基因工程菌表达蛋白的SDS-PAGE分析

[0069] 结果如图3所示,由结果可知,杆状病毒GP64基因工程菌在75kDa左右位置有大量的表达蛋白,表明该菌体能成功表达杆状病毒GP64蛋白。

[0070] 3.4杆状病毒GP64蛋白纯度分析

[0071] 结果如图4所示,由结果可知,杆状病毒GP64蛋白在75kD左右,SDS-PAGE分析显示纯度较高。

[0072] 3.5杆状病毒GP64蛋白含量测定

[0073] 表1蛋白含量测定标准曲线

[0074]

浓度(μg/ml)	平均OD值	CV(%)
300	1.0113	0.6
250	0.9540	1.1
200	0.8873	1.5
150	0.7927	1.6
100	0.6847	1.7
50	0.5493	0.1
0	0.4780	2.4
杆状病毒GP64蛋白(稀释4倍)	0.8957	0.9

[0075] 其标准曲线如图5所示,由图可知,标准曲线相关系数为0.9939,杆状病毒GP64蛋白浓度为0.8957μg/ml。

[0076] 豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清和兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清的制备

[0077] 1材料

[0078] 离心机、微型搅拌器、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、豚鼠、家兔、注射器、离心管、酒精棉、乌来糖麻醉剂。

[0079] 2方法

[0080] 2.1抗原乳化:佐剂与抗原按1:1体积比例加入离心管,在冰浴中用微型搅拌器快

速搅拌进行乳化，当乳液滴入水中不扩散即可。

[0081] 2.2首次免疫：采用弗氏完全佐剂进行抗原乳化，豚鼠或家兔背部皮下多点免疫，前者注射杆状病毒GP64蛋白0.2mg/只，后者注射杆状病毒GP64蛋白0.5mg/只。

[0082] 2.3皮下注射操作：将豚鼠或家兔固定在手术台上，用酒精棉球消毒给药部位，左手充分提起给药部位皮肤，右手持注射器以45度角将注射针刺入皮下。确定针在皮下后缓缓注入药液。注射完毕后，用手指压住并轻柔刺入部位少许时间。

[0083] 2.4加强免疫：首次免疫14天后进行加强免疫，采用弗氏不完全佐剂进行抗原乳化，其它步骤与首次免疫相同，每次加强免疫间隔时间为10天，共进行3次加强免疫。

[0084] 2.5第三次加强免疫后的第5天进行心脏取血，固定好豚鼠或家兔，每只腹腔注射20％乌来糖麻醉剂进行麻醉。完全麻醉后，用剪刀剪开胸腔，暴露心脏位置，用一次性注射器从心尖处进针，针尖进入心室，缓慢回抽注射器，抽完血，拔掉针头，注射器贴着离心管壁缓慢推动，将注射器的血液沿着管壁流入离心管。

[0085] 2.6采集的血液于4℃过夜，第二天于3000rpm，离心10min，取上层血清于-70℃保存。

[0086] 间接ELISA法测定兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清效价

[0087] 1材料

[0088] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0089] 2溶液配制

[0090] 2.1包被液(碳酸盐缓冲液，pH9.5、0.05M)：称Na_2CO_3 1.59g、$NaHCO_3$ 2.93g加超纯水800ml溶解，调pH9.5后加水至1000ml。

[0091] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS)：称氯化钠8g，氯化钾0.2g，十二水磷酸氢二钠1.42g，磷酸二氢钾0.27g，加超纯水1000ml溶解。

[0092] 2.3洗液：量取0.5ml吐温-20，加，加PBS 1000ml混匀。

[0093] 2.4封闭液：量取NBS 20ml，加洗液100ml溶解。

[0094] 2.5稀释液：量取NBS 2ml，加洗液100ml溶解。

[0095] 2.6终止液：量取超纯水178.3ml，逐滴加入浓硫酸21.7ml。

[0096] 3方法

[0097] 3.1用杆状病毒GP64蛋白以20μg/ml包被于96孔板，每孔加入100μl，置于4℃过夜，用洗液洗3遍，拍干。

[0098] 3.2每孔加入200μl封闭液，于37℃孵育2小时，用洗液洗3遍，拍干。

[0099] 3.3将兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清按1:10000、1:50000、1:100000和1:200000比例稀释(阴性对照血清按相同倍比稀释)，每孔加入100μl，37℃孵育1小时，用洗液洗3遍，拍干。

[0100] 3.4加入HRP标记的羊抗兔1:10000，每孔加100μl，37℃孵育1小时，用洗液洗6遍，拍干。

[0101] 3.5每孔加入100μl TMB显色液，室温显色反应10min。

[0102] 3.6每孔加入50μl终止液终止反应。

[0103] 3.7在酶标仪上测450nm下的OD值。当样品吸光值/阴性吸光值>2.1时，即认为是阳

性，同时计算效价。

[0104] 4结果

[0105] 表2兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清效价

[0106]

稀释比例	兔抗杆状病毒 GP64 蛋白抗体血清（平均 OD 值）	生理盐水组对照血清（平均 OD 值）	效价比
1:10000	1.8510	0.0980	18.9
1:50000	1.8030	0.0635	28.4
1:100000	1.790	0.0590	30.5
1:200000	1.7455	0.0495	35.6

[0107] 表3豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清效价

[0108]

稀释比例	豚鼠抗杆状病毒 GP64 蛋白抗体血清（平均 OD 值）	生理盐水组对照血清（平均 OD 值）	效价比
1:10000	1.4130	0.0590	23.9
1:50000	0.7350	0.0530	13.9
1:100000	0.4470	0.0640	7.0
1:200000	0.26	0.061	4.3

[0109] 由结果可知，兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清和豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清的效价均大于1:200000，具有较高的效价。

[0110] 抗体纯化

[0111] 1材料

[0112] Protein A sepharose，纯化仪，十二水磷酸氢二钠，，二水磷酸二氢钠，氯化钠，柠檬酸，Tris，氯化钾，磷酸二氢钾，0.45μm滤膜，透析袋。

[0113] 2溶液配制

[0114] 2.1 250mM Na_2HPO_4：称取$Na_2HPO_4.12H_2O$ 26.86g，加超纯水250ml，搅拌溶解，再加超纯水定容至300ml。

[0115] 2.2 250mM NaH_2PO_4：称取$NaH_2PO_4.2H_2O$ 2.75g，加超纯水70ml，搅拌溶解，再加超纯水定容至80ml。

[0116] 2.3 250mM PB(pH7.4)：取250mM Na_2HPO_4溶液300ml，加入250mM $NaH_2PO_4$71ml。

[0117] 2.4Buffer A(25mM PB，0.3M NaCl，pH7.4)：取250mM PB缓冲液100ml，称取NaCl 17.53g，加超纯水800ml搅拌溶解，再加超纯水定容至1000ml。

[0118] 2.5Buffer B(0.1M柠檬酸，pH3.0)：称取柠檬酸10.50g，加超纯水400ml搅拌溶解，用1M NaOH溶解，调pH至3.0，再加超纯水定容至500ml。

[0119] 2.6Buffer C(1M Tris-Base)：称取Tris-Base 12.11g，加超纯水80ml搅拌溶解，

调pH8.0，再加超纯水定容至100ml。

[0120] 2.7磷酸盐缓冲液(PBS)：称取氯化钠8g，氯化钾0.2g，十二水磷酸氢二钠1.42g，磷酸二氢钾0.27g，加超纯水1000ml溶解，调pH7.4，再加超纯水定溶至1000ml。

[0121] 3方法

[0122] 3.1将血清样品稀释3倍，补加NaCl浓度至2M，12000×g离心15min，取上清液，再过0.45μm滤膜。

[0123] 3.2Protein A层析柱用Buffer A平衡，流速3ml/min。

[0124] 3.3将处理过的样品以2.5ml/min的流速经过层析柱。

[0125] 3.4用Buffer A缓冲液以3ml/min的流速冲洗层析柱。

[0126] 3.5用Buffe B缓冲液以3ml/min的流速经过层析柱，观察280nm波长吸收值的变化，当280nm呈直线上升时，立即收集洗脱样品，至吸收值回归至基线水平停止收集，按每1ml洗脱液加入40μl Buffer C进行中和pH值至7.0～7.4范围。

[0127] 3.6将洗脱样品，装进透析袋，在PBS pH7.4缓冲液中透析，4℃，过夜。

[0128] 抗体验证

[0129] 1材料

[0130] 电泳仪，电泳槽，电磁炉，台式高速离心机，离心管，海绵，滤纸，PVDF膜，镊子，剪子，计时器，X-光片，X-光片暗夹，托盘，暗室灯，小塑料盒，显影液，定影液，ECL化学发光试剂。

[0131] 2溶液配制

[0132] 2.1电泳缓冲液：Tris Base 3.0g；甘氨酸18.8g；SDS 1g；加超纯水至1000ml。

[0133] 2.2转膜缓冲液：甘氨酸2.9g；Tris 5.8g；SDS 0.37g；甲醇200ml；加超纯水定容至1000ml。

[0134] 2.3PBS(0.01M，pH7.4))：NaCl 8.0g；KCl 0.2g；Na_2HPO_4 1.44g；KH_2PO_4 0.24g；加超纯水至1000ml。

[0135] 2.4PBST：吐温-20 0.5ml，加入PBS 1000ml。

[0136] 2.5膜染色液：考马斯亮兰0.25g；甲醇45ml；乙酸10ml；加超纯水至100ml。

[0137] 2.6封闭液(5％脱脂奶粉，现配)：脱脂奶粉5g溶于1000ml PBST。

[0138] 3方法

[0139] 3.1SDS-PAGE电泳

[0140] 3.1.1制胶：按比例配制8％分离胶及5％浓缩胶，完全聚合后使用。

[0141] 3.1.2预电泳：拔去梳子，加入电泳缓冲液后低电压10V进行预电泳20min。

[0142] 3.1.3样品准备：按样品：上样buffer为4:1体积比加入上样bufer混匀，沸水煮10min，冰上5min。

[0143] 3.1.4加样：预电泳后加入标准品和待分析样品。每个泳道上样10μl。

[0144] 3.1.5电泳：加样完毕，选择90V恒压进行电泳，电泳直至溴酚蓝染料前沿到达两胶交界处，更换至130V恒压电泳，电泳直至溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端处，即停止电泳。

[0145] 3.2染色

[0146] 3.2.1切胶：将电泳完毕的胶割取左半部分去掉浓缩胶部分并放在盛有电转液的玻璃皿中，另外部分放在盛有考马斯亮蓝染色液的玻璃皿中。

[0147] 3.2.2置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动，室温染色1h或更长时间。

[0148] 3.2.3倒出染色液，加入适量考马斯亮蓝染色脱色液，确保脱色液可以充分覆盖凝胶。置于水平摇床或侧摆摇床上缓慢摇动，室温脱色1h。期间更换脱色液2-4次，直至蓝色背景基本上全部被脱去，并且蛋白条带染色效果达到预期。通常蛋白条带在脱色30min后即可出现。

[0149] 3.2.4完成脱色后，用超纯水浸泡，并扫描最终结果。

[0150] 3.3转膜

[0151] 3.3.1切胶：将电泳完毕的胶去掉浓缩胶部分，其余完整的放在盛有电转液的玻璃皿中。

[0152] 3.3.2剪膜和滤纸：按胶的尺寸剪膜和滤纸(滤纸长宽较凝胶小0.5～1mm，PVDF膜长宽较凝胶大0.5～1mm)，膜放入甲醇中10s，然后将两者都放入盛有电转液的玻璃皿中5min。

[0153] 3.3.3向电转槽中倒入部分电转液，将海绵浸入。按如下顺序制作“三明治”，从正极到负极按如下顺序排列：正极-海绵-双层滤纸-PVDF膜-凝胶-双层滤纸-海绵-负极。(其中不能留有气泡)卡紧转膜板，电转槽中倒满电转液，将转膜板浸入电转槽中，注意正负极要正确。插上电源，设定恒流200mA转膜，冰浴电转60min。

[0154] 3.4膜的封闭：用PBST液洗涤印迹膜10s，加入5％脱脂奶粉封闭液，室温轻柔摇动封闭1.5h。

[0155] 3.5一抗孵育：按相应抗体的效价加入PBST稀释一抗，加入一抗约10ml，室温轻柔摇动孵育2h，用PBST洗涤膜4次，每次5min。

[0156] 3.6二抗孵育：按相应抗体的效价加入PBST稀释的二抗，加入二抗约10ml，室温轻柔摇动孵育1h，用PBST洗涤膜4次，每次5min。

[0157] 3.7ECL显色：在避光的容器中按A液:B液＝1:1的比例配制1ml，将ECL工作液覆盖到膜表面，放置1min后在凝胶成像系统中观察拍照或者暗房内显影曝光。

[0158] 4结果

[0159] 结果如图6和图7所示。由结果可知，纯化的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体和豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体纯度较高。纯化的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体能够与杆状病毒GP64蛋白特异性结合，具有较高的特异性。

[0160] 辣根过氧化物酶标记兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体

[0161] 1材料

[0162] 高碘酸钠($NaIO_4$)、硼氢化钠($NaBH_4$)、醋酸钠(NaAc)、醋酸(HAc)、碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠($NaHCO_3$)、硫酸铵、超纯水、透析袋。

[0163] 2溶液配制

[0164] 2.1 0.1M NaIO4：称取241mg高碘酸钠溶于10ml蒸馏水中(需新鲜配制)。

[0165] 2.2 1mM PH4.4醋酸钠缓冲液：取0.2M NaAc(1.361g/50ml)3.7ml，0.2M HAc(0.601ml/50ml)6.3ml，加超纯水至2000ml。

[0166] 2.3 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液：称取Na_2CO_3 0.32g，$NaHCO_3$ 0.586g，加超纯水至50ml，再用超纯水作20倍稀释，即成0.01M pH9.5的碳酸盐缓冲液。

[0167] 2.4$NaBH_4$溶液(4mg/ml)：临用时称取$NaBH_4$ 4mg溶于1ml超纯水中。

[0168] 2.5磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.4):称量KH_2PO_4 0.2g,$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g,NaCl 8.0g,KCl 0.2g加超纯水至1000ml,调pH7.4。

[0169] 2.6 100%饱和硫酸铵:称取767g硫酸铵,加入超纯水1000ml,微波加热溶解,静置过夜,第二天有结晶析出,取上清即可。

[0170] 2.7半饱和硫酸铵:将100%饱和硫酸铵溶液按1:1体积比稀释。

[0171] 3方法

[0172] 3.1称取2mg HRP溶解于2ml超纯水中。

[0173] 3.2于上液中加入0.4ml新配的0.1M $NaIO_4$溶液,室温下避光搅拌20min。

[0174] 3.3将上述溶液装入透析袋中,对1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜。

[0175] 3.4加入40μl 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,然后立即加入约3mg抗体在2ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2h。

[0176] 3.5加入0.2ml新配的4mg/ml $NaBH_4$液,混匀,再置4℃2h。

[0177] 3.6将上述混合液装入透析袋中,在PBS缓冲液中透析,4℃过夜。

[0178] 3.7将混合液从透析袋倒入离心管中,在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1h。

[0179] 3.8于3000rpm,4℃离心30min,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物用3ml PBS溶解。

[0180] 3.9将上述混合液装入透析袋中,对PBS缓冲液透析,去除铵离子后,12,000rpm离心10min去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装后,于-20℃保存。

[0181] 棋盘法确定包被抗体和检测抗体的浓度

[0182] 1材料

[0183] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0184] 2溶液配制

[0185] 2.1包被液(碳酸盐缓冲液,pH9.5、0.05M):称Na_2CO_3 1.59g、$NaHCO_3$ 2.93g加超纯水800ml溶解,调pH9.5后加水至1000ml。

[0186] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS):称氯化钠8g,氯化钾0.2g,十二水磷酸氢二钠1.42g,磷酸二氢钾0.27g,加超纯水1000ml溶解。

[0187] 2.3洗液:量取0.5ml吐温-20,加,加PBS 1000ml混匀。

[0188] 2.4封闭液:量取NBS 20ml,加洗液100ml溶解。

[0189] 2.5稀释液:量取NBS 2ml,加洗液100ml溶解。

[0190] 2.6终止液:量取超纯水178.3ml,逐滴加入浓硫酸21.7ml。

[0191] 3方法

[0192] 3.1包被:用包被液将豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:50、1:100、1:200、1:500和1:1000进行稀释,包被于96孔板,每孔加100μl,放入4℃冰箱过夜。

[0193] 3.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200μl封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0194] 3.3加样:用稀释液将杆状病毒GP64蛋白稀释成500ng/ml和0ng/ml,每份样品加入100μl,做2个复孔,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0195] 3.4加检测抗体：用稀释液将HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:200、1:400和1:600稀释，每孔加100μl，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤6次，拍干。

[0196] 3.5加显色液：每孔加入100μl TMB显色液，室温下避光反应20min。

[0197] 3.6加终止液：每孔加入50μl终止液。

[0198] 3.7检测：15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0199] 4结果

[0200] 表4棋盘法优化结果

[0201]

检测抗体	抗原（ng/ml）	包被抗体				
		1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
1:200	500	2.1275	2.1425	2.1175	2.094	2.071
	0	0.1160	0.037	0.0425	0.0365	0.0325
1:400	500	2.1075	2.153	2.0675	2.0630	2.0525
	0	0.0705	0.0435	0.0400	0.0355	0.0365
1:600	500	1.9755	2.0335	1.9530	1.8765	1.9270
	0	0.0605	0.0435	0.0375	0.0370	0.0350

[0202] 由结果可知，当包被抗体为1:500，检测抗体为1:600时，结果较理想。

[0203] 检测限和定量限

[0204] 1材料

[0205] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0206] 2溶液配制

[0207] 2.1包被液(碳酸盐缓冲液，pH9.5、0.05M)：称Na_2CO_3 1.59g、$NaHCO_3$ 2.93g加超纯水800ml溶解，调pH9.5后加水至1000ml。

[0208] 2.2磷酸盐缓冲液(PBS)：称氯化钠8g，氯化钾0.2g，十二水磷酸氢二钠1.42g，磷酸二氢钾0.27g，加超纯水1000ml溶解。

[0209] 2.3洗液：量取0.5ml吐温-20，加，加PBS 1000ml混匀。

[0210] 2.4封闭液：量取NBS 20ml，加洗液100ml溶解。

[0211] 2.5稀释液：量取NBS 2ml，加洗液100ml溶解。

[0212] 2.6终止液：量取超纯水178.3ml，逐滴加入浓硫酸21.7ml。

[0213] 3方法

[0214] 检测限(灵敏度)是对20份阴性对照样品进行测定，取平均值后加2倍标准差，即X+2S，代入标准方程中，计算出来的浓度即为本试剂盒的灵敏度，重复3次实验。定量限是将杆状病毒GP64蛋白稀释至最低浓度，最低浓度的准确度应在80％-120％，变异系数应小于20％，重复5次实验。

[0215] 3.1包被：用包被液将豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:500进行稀释，包被于96孔板，每孔加100μl，放入4℃冰箱过夜。

[0216] 3.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200μl封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0217] 3.3加样:用稀释液将杆状病毒GP64蛋白稀释成100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml和0ng/ml,每份样品加入100μl,做4个复孔,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0218] 3.4加检测抗体:用稀释液将HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:600稀释,每孔加100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0219] 3.5加显色液:每孔加入100μl TMB显色液,室温下避光反应20min。

[0220] 3.6加终止液:每孔加入50μl终止液。

[0221] 3.7检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0222] 3结果

[0223] 表5检测限

[0224]

实验编号	平均值（X）	标准差（S）	检测限（ng/ml）
1	0.05845	0.006386	0.50
2	0.05874	0.002922	0.51
3	0.05705	0.002704	0.45
平均检测限（ng/ml）			0.49

[0225] 表6定量限

[0226]

实验编号	理论值(ng/ml)	平均测量值(ng/ml)	准确度(%)	CV(%)
1	2	2.23	111.4	2.7
2	2	2.19	109.6	1.9
3	2	1.91	95.4	2.2
4	2	2.10	105.2	2.3
5	2	2.05	102.6	5.1

[0227] 由结果可知,杆状病毒蛋白GP64双抗夹心Elisa法的检测限为0.49ng/ml,定量限为2ng/ml。

[0228] 标准曲线的确定

[0229] 1材料

[0230] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0231] 2方法

[0232] 2.1包被:用包被液将豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:500进行稀释,包被于96孔板,每孔加100μl,放入4℃冰箱过夜。

[0233] 2.2封闭:弃去孔内液体,用洗液洗3遍,拍干。每孔加入200μl封闭液,37℃封闭2h后,弃去孔内液体,用洗液洗涤3次,拍干。

[0234] 2.3加样:用稀释液将杆状病毒GP64蛋白稀释成100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、

10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml和0ng/ml，每份样品加入100μl，做4个复孔，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0235] 2.4加检测抗体：用稀释液将HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:600稀释，每孔加100μl，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤6次，拍干。

[0236] 2.5加显色液：每孔加入100μl TMB显色液，室温下避光反应20min。

[0237] 2.6加终止液：每孔加入50μl终止液。

[0238] 2.7检测：15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0239] 3结果

[0240] 表7标准曲线

[0241]

浓度(ng/ml)	平均OD值	CV(%)
100	1.3598	2.9
50	0.8758	1.6
20	0.4368	3.1
10	0.2500	2.8
5	0.1528	2.9
2	0.0922	3.5
0	0.0515	7.6

[0242] 其标准曲线如图8所示。

[0243] 由结果可知，标准曲线线性为R^2＝0.9999，线性关系较好，线性范围在2ng/ml-100ng/ml，线性范围较理想。

[0244] 准确度和精密度

[0245] 1材料

[0246] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0247] 2方法

[0248] 日内准确度和精密度是一天内分别对高、中、低浓度(60ng/ml、30ng/ml、6ng/ml)进行测定，每个浓度重复20次。日间准确度和精密度是每天分别对高、中、低浓度(60ng/ml、30ng/ml、6ng/ml)进行测定，每个浓度重复4次，测定5天。

[0249] 2.1包被：用包被液将豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:500进行稀释，包被于96孔板，每孔加100μl，放入4℃冰箱过夜。

[0250] 2.2封闭：弃去孔内液体，用洗液洗3遍，拍干。每孔加入200μl封闭液，37℃封闭2h后，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0251] 2.3加样：加入杆状病毒GP64蛋白100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml和0ng/ml标准品溶液和60ng/ml、30ng/ml和6ng/ml质控品，每份样品加入100μl，做4个复孔，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0252] 2.4加检测抗体：加入HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体溶液，每孔加100μl，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤6次，拍干。

[0253] 2.5加显色液：每孔加入100μl TMB显色液，室温下避光反应20min。

[0254] 2.6加终止液:每孔加入50μl终止液。

[0255] 2.7检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0256] 3结果

[0257] 3.1日内准确度和精密度

[0258] 表8标准曲线

[0259]

浓度(ng/ml)	平均OD值	CV(%)
100	1.3628	3.3
50	0.8668	2.7
20	0.4220	1.1
10	0.2543	2.0
5	0.1560	3.4
2	0.0978	2.7
0	0.0561	4.4

[0260] 其标准曲线如图9所示。

[0261] 表9日内准确度和精密度

[0262]

理论值(ng/ml)	实际测定平均值(ng/ml)	准确度(%)	CV(%)
高浓度(60)	57.9	96.5	4.2
中浓度(30)	28.7	95.3	6.0
低浓度(6)	5.7	95.6	6.7

[0263] 3.2日间准确度和精密度

[0264] 表10标准曲线方程

[0265]

时间	标准曲线方程	相关系数(R^2)
1d	$Y=-0.00006X^2+0.0193X+0.0614$	0.9999
2d	$Y=-0.00009X^2+0.024X+0.0756$	0.9996
3d	$Y=-0.00005X^2+0.0169X+0.0713$	0.9992
4d	$Y=-0.00006X^2+0.0176X+0.0672$	0.9998
5d	$Y=-0.00004X^2+0.0155X+0.0607$	0.9999

[0266] 表11日间准确度和精密度

[0267]

理论值(ng/ml)	实际测定平均值(ng/ml)	准确度(%)	CV(%)
高浓度(60)	61.1	101.8	6.1
中浓度(30)	30.3	100.9	6.7
低浓度(6)	5.8	96.1	6.2

[0268] 由结果可知,日内、日间准确度在95.3%-101.8%之间,精密度在4.2%-6.7%之间,表明试剂盒具有较好的准确度和精密度。

[0269] 批间差异

[0270] 1材料

[0271] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0272] 2方法

[0273] 制备3批试剂盒，对高、中、低浓度(60ng/ml、30ng/ml、6ng/ml)进行测定，每个浓度重复4次，分析批间的差异。

[0274] 2.1包被：用包被液将豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:500进行稀释，包被于96孔板，每孔加100μl，放入4℃冰箱过夜。

[0275] 2.2封闭：弃去孔内液体，用洗液洗3遍，拍干。每孔加入200μl封闭液，37℃封闭2h后，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0276] 2.3加样：加入杆状病毒GP64蛋白100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml和0ng/ml标准品溶液和60ng/ml、30ng/ml和6ng/ml质控品，每份样品加入100μl，做4个复孔，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0277] 2.4加检测抗体：加入HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体溶液，每孔加100μl，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤6次，拍干。

[0278] 2.5加显色液：每孔加入100μl TMB显色液，室温下避光反应20min。

[0279] 2.6加终止液：每孔加入50μl终止液。

[0280] 2.7检测：15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0281] 3结果

[0282] 表12批间差异分析

[0283]

理论值(ng/ml)	实际测定平均值(ng/ml)	准确度(%)	CV(%)
高浓度(60)	60.0	100.0	7.2
中浓度(30)	30.1	100.2	8.6
低浓度(6)	5.8	96.4	5.7

[0284] 由结果可知，不同批试剂盒对高、中、低浓度质控品进行测定，测定值的准确度在96.4%-100.2%之间，精密度在5.7%-8.6%之间，差异较小。

[0285] 重组蛋白疫苗中杆状病毒蛋白残留量测定

[0286] 1材料

[0287] 酶标仪、酶标板、涡漩混合器、吐温-20、氯化钠、氯化钾、十二水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、NBS、TMB、浓硫酸。

[0288] 2方法

[0289] 2.1包被：用包被液将豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体按1:500进行稀释，包被于96孔板，每孔加100μl，放入4℃冰箱过夜。

[0290] 2.2封闭：弃去孔内液体，用洗液洗3遍，拍干。每孔加入200μl封闭液，37℃封闭2h后，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0291] 2.3加样：加入杆状病毒GP64蛋白100ng/ml、50ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml和0ng/ml标准品溶液和经过2倍稀释的重组蛋白疫苗纯化样品，每份样品加入100μl，做4个复孔，37℃孵育1h，弃去孔内液体，用洗液洗涤3次，拍干。

[0292] 2.4加检测抗体:加入HRP标记的兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体溶液,每孔加100μl,37℃孵育1h,弃去孔内液体,用洗液洗涤6次,拍干。

[0293] 2.5加显色液:每孔加入100μl TMB显色液,室温下避光反应20min。

[0294] 2.6加终止液:每孔加入50μl终止液。

[0295] 2.7检测:15min内在酶标仪上测450nm下的OD值。

[0296] 3结果

[0297] 经测定,重组蛋白疫苗A中杆状病毒蛋白残留量为1.8ng/ml,重组蛋白疫苗B中杆状病毒蛋白残留量为6.4ng/ml,表明重组蛋白疫苗中杆状病毒蛋白残留量较低。

SEQUENCE LlSTlNG

<110> 广东华南联合疫苗开发院有限公司

<120> 一种用于检测杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法

<130> GP64

<160> 2

<170> Patentln version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 1

cggaattcgc ggagcactgc aacgcgc 27

<210> 2

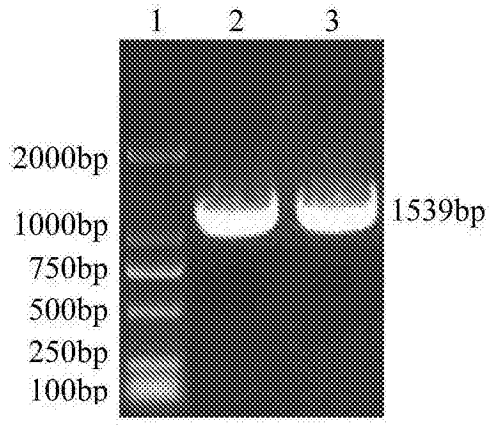
<211> 30

<212> DNA

<213> 人工引物

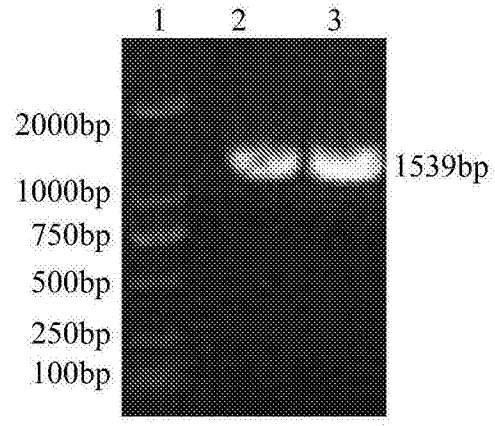
<400> 2

gggaagcttg ccgccaaact tggtgttctc 30



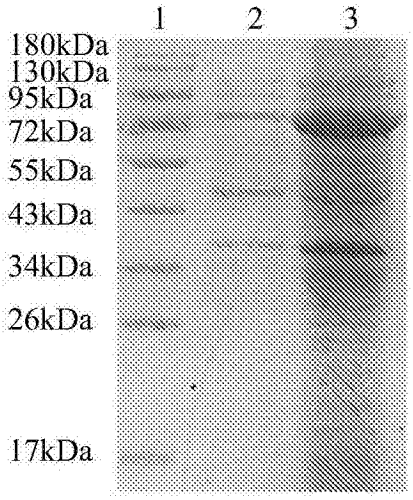
1：Marker；2-3：杆状病毒 GP64 基因

图1



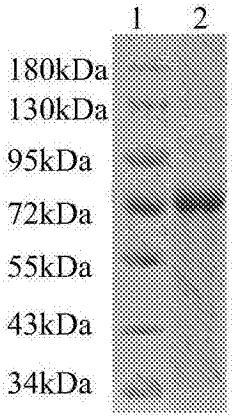
1：Marker；2-3：杆状病毒 GP64 基因

图2



1：Marker；2：无杆状病毒 GP64 工程菌；3：杆状病毒 GP64 工程菌

图3



1：Marker；2：杆状病毒 GP64 蛋白

图4

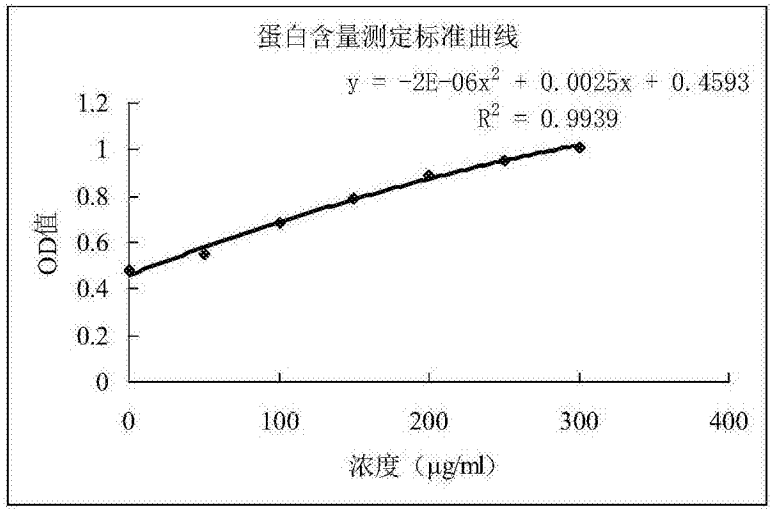
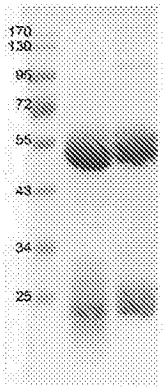


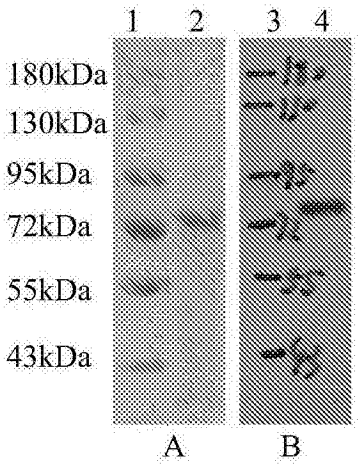
图5



1：Marker；2：兔抗杆状病毒 GP64 蛋白抗体；

3：豚鼠抗杆状病毒 GP64 蛋白抗体

图6



1,3：Marker；2,4：杆状病毒 GP64 蛋白析

图7

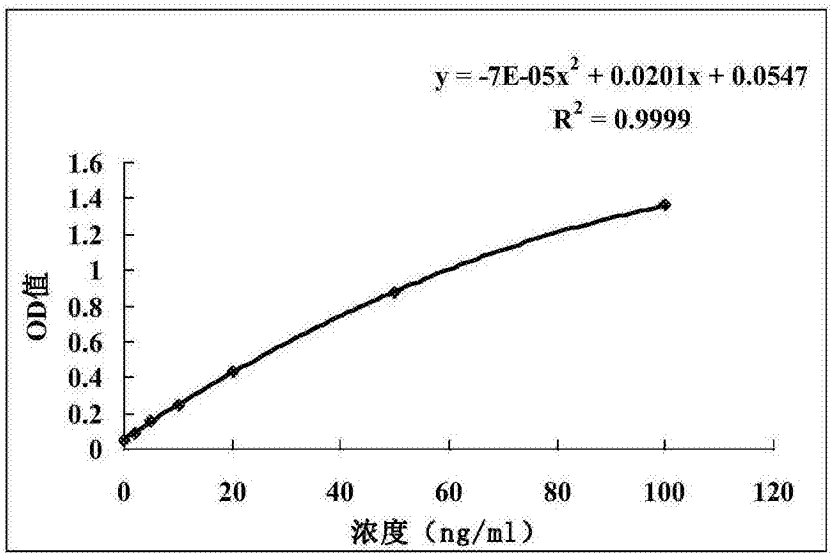

y = -7E-05x² + 0.0201x + 0.0547
R² = 0.9999
OD值
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
浓度（ng/ml）

图8

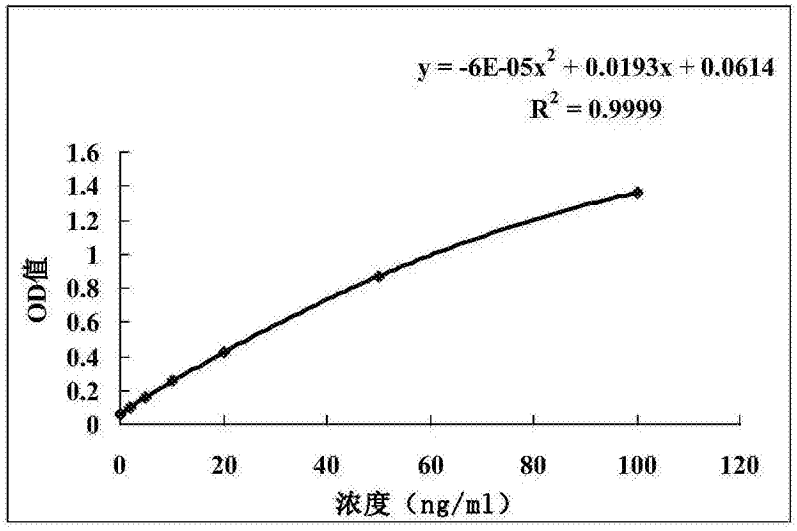

y = -6E-05x² + 0.0193x + 0.0614
R² = 0.9999
OD值
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
20
40
60
80
100
120
浓度（ng/ml）

图9

专利名称(译)	一种用于杆状病毒GP64蛋白的双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN106771249A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611262295.5	申请日	2016-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	广东华南联合疫苗开发院有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东华南联合疫苗开发院有限公司		
[标]发明人	谭远贞 彭涛 马书智 许煜华 陈丽云 黄杨波 卢全占 丁东		
发明人	谭远贞 彭涛 马书智 许煜华 陈丽云 黄杨波 卢全占 丁东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N2333/005		
代理人(译)	许飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了杆状病毒GP64蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒及方法。试剂盒包括稀释液、洗液、显色液、终止液、一抗包被的酶标板、杆状病毒GP64蛋白标准品和标记的二抗，一抗为豚鼠抗杆状病毒GP64蛋白抗体，二抗为兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体。本发明的试剂盒，操作简便，检测结果准确可靠，标准曲线线性为R2=0.9999，线性关系较好，线性范围在2ng/ml-100ng/ml，线性范围较理想。日内、日间准确度在95.3%-101.8%之间，精密度在4.2%-6.7%之间，表明试剂盒具有较好的准确度和精密度。不同批试剂盒对高、中、低浓度质控品进行测定，测定值的准确度在96.4%-100.2%之间，精密度在5.7%-8.6%之间，差异较小。

稀释比例	兔抗杆状病毒GP64蛋白抗体血清（平均OD值）	生理盐水组对照血清（平均OD值）	效价比
1:10000	1.8510	0.0980	18.9
1:50000	1.8030	0.0635	28.4
1:100000	1.790	0.0590	30.5
1:200000	1.7455	0.0495	35.6