

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910109418.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月13日

[11] 公开号 CN 101625363A

[22] 申请日 2009.8.17

[21] 申请号 200910109418.5

[71] 申请人 花群义

地址 518010 广东省深圳市和平路 2049 号和平大厦检验大楼 702 室

[72] 发明人 花群义 杨俊兴 张彩虹 阮周曦
曾少灵 曹琛福 林庆燕 秦智锋
陈书琨 陶虹

[74] 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司
代理人 陆军

权利要求书 3 页 说明书 12 页

[54] 发明名称

检测水泡性口炎抗体试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，包括分别放置的试剂 I 和试剂 II，其中所述试剂 I 为水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板，所述试剂 II 为单克隆抗体 IgG - HRP 酶结合物，其中所述单克隆抗体 IgG - HRP 酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗水泡性口炎病毒的特异性单克隆抗体。本发明还提供一种上述试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒采用竞争 ELISA 检测血清中抗水泡性口炎抗体，可用于水泡性口炎的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

1、一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，其特征在于，包括分别放置的试剂 I 和试剂 II，其中所述试剂 I 为水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板，所述试剂 II 为单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物，其中所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗水泡性口炎病毒的特异性单克隆抗体。

2、根据权利要求 1 所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，其特征在于，还包括分别放置的阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩洗涤液、底物 I、底物 II、底物 III 以及终止液。

3、根据权利要求 2 所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，其特征在于，所述 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH 7.4 PBS/PBST；10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1%明胶的 PBST；底物 I 为 pH 6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液；底物 II 为 3.3' -5.5' -四甲基联苯胺溶液；底物 III 为双氧水溶液；终止液为 1mol/ L H₂SO₄ 硫酸溶液。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，其特征在于，各组成部分的体积或数量如下：

试剂盒组成部分名称：	体积或数量：
水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板	2 板 96 孔酶标板
单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物	0.5ml
阳性血清	1ml
阴性血清	1ml
20 倍浓缩洗涤液	50ml
10 倍浓缩稀释液	30ml
底物 I	20ml
底物 II	2ml
底物 III	1ml
终止液	20ml 。

5、根据权利要求 1-3 中任一项所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，其特征在于，所述水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板通过以下

方法制备：将纯化后的水泡性口炎病毒抗原用优化好的包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 50 μL /孔加入酶联免疫吸附试验测定板，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜包被后拍干酶联免疫吸附试验测定板；然后以 200 μL /孔加入优化好的封闭液，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中封闭过夜后彻底拍干。

6、根据权利要求 5 所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，其特征在于，所述水泡性口炎病毒抗原通过以下方法制备：BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒并使用无血清的基础培养基培养，在细胞病变达 75%以上时收获病毒，反复冻融 3 次后以 8000 转/分钟离心 30 分钟，取上清液，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒，采用 20%、60%的不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 3 小时，收获提纯的病毒条带作为抗原。

7、一种如权利要求 1 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，包括：

(1) 使用水泡性口炎病毒制备水泡性口炎病毒抗原；

(2) 使用提纯的水泡性口炎病毒抗原免疫小鼠并取免疫小鼠的脾细胞，将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得杂交瘤细胞，将所述杂交瘤细胞注入小鼠制备抗水泡性口炎病毒单克隆抗体腹水；

(3) 使用抗水泡性口炎病毒单克隆抗体腹水制备抗水泡性口炎病毒单克隆抗体辣根过氧化酶酶结合物；

(4) 制备水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板：将纯化后的水泡性口炎病毒抗原用优化好的包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入酶联免疫吸附试验测定板，置冰箱中过夜包被后拍干酶联免疫吸附试验测定板；然后在酶联免疫吸附试验测定板的孔内加入优化好的封闭液，置冰箱中封闭过夜后彻底拍干。

8、根据权利要求 6 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，所述步骤 (1) 中的水泡性口炎病毒抗原通过以下方法制备：BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒并使用无血清的基础培养基培养，在细胞病变达 75%以上时收获病毒，反复冻融 3 次后以 8000 转/分钟离心 30 分钟，取上清液，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒，采用 20%、60%的不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 3 小时，收获提纯的病毒条带作为抗原。

9、根据权利要求6所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，还包括阳性血清、阴性血清、20倍浓缩洗涤液、10倍浓缩洗涤液、底物I、底物II、底物III以及终止液，并将所述阳性血清、阴性血清、20倍浓缩洗涤液、10倍浓缩洗涤液、底物I、底物II、底物III以及终止液与水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板、单克隆抗体IgG-HRP酶结合物分开放置。

10、根据权利要求9所述的试剂盒的制备方法，其特征在于，所述20倍浓缩洗涤液为20倍浓缩的含0.05% Tween-20的0.01mol/L pH 7.4 PBS/PBST；10倍浓缩稀释液为10倍浓缩的含1%明胶的PBST；底物I为pH 6.0的乙酸—柠檬酸缓冲液；底物II为3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液；底物III为双氧水溶液；终止液为1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

检测水泡性口炎抗体试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及病毒抗体检测领域，尤其涉及一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒及其制备方法。

背景技术

水泡性口炎是由弹状病毒科水泡病毒属的水泡性口炎病毒（Vesicular stomatitis Virus, VSV）引起的人畜共患的重大动物疫病，目前有印第安纳（Indiana, IN 型）和新泽西（New Jersey, NJ 型）两个血清型。牛、猪、马、羊和其它多种野生动物可感染水泡性口炎病毒，人感染该病毒后出现类似流感和登革热的症状。VSV 基因组编码 N, NS, M, G, L 等 5 种病毒蛋白，其中 N 蛋白是该病毒核衣壳的主要蛋白，为 VSV 的群特异性抗原。

由于水泡性口炎的临床症状与口蹄疫（FMD）相似，因此该病的存在和流行直接影响人类及动物健康，造成巨大经济损失，影响社会稳定。1950 年证实此病为人畜共患病。1958 年~1978 年我国陕西省凤县暴发，造成重大经济损失。1995 年美国西南部发生牛、马水泡性口炎，波及到 6 个州的 367 个牧场，造成的损失高达 5000 万美元~1 亿美元。1996 年，拉美有 11 个国家报告发生 VS。2004 年美国发生 259 起水泡性口炎，涉及的易感动物几万头/匹/只，有牛、马、绵羊、山羊和猪等。2006 年 6 月巴拿马有 4 个地区的水泡性口炎发病率突然升高，涉及的易感动物有 19733 头/匹/只。

目前，水泡性口炎最常用的诊断方法是病毒分离鉴定、病毒中和试验（VN）、补体结合试验（CF）、液相阻断 ELISA（LP-ELISA）、竞争酶联免疫吸附试验（c-ELISA）、反转录聚合酶链反应（RT-PCR）等。然而，上述方法普遍存在试验复杂、麻烦、不安全、耗时的问题，不易推广使用。尤其是 VN 和 CF 两种方法，其需在生物安全三级（P3）实验室内进行，且有时产生非特

异性反应，其应用受到极大限制。

发明内容

本发明要解决的技术问题在于，针对上述水泡性口炎诊断中存在的试验复杂、麻烦、不安全、耗时的问题，提供一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒及其制备方法。

本发明解决上述技术问题的技术方案是，提供一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，包括分别放置的试剂 I 和试剂 II，其中所述试剂 I 为水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板，所述试剂 II 为单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物，其中所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗水泡性口炎病毒病毒的特异性单克隆抗体。

在本发明所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒中，还包括分别放置的阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩洗涤液、底物 I、底物 II、底物 III 以及终止液。

在本发明所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒中，所述 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH 7.4 PBS/PBST；10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1%明胶的 PBST；底物 I 为 pH 6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液；底物 II 为 3.3' -5.5' -四甲基联苯胺溶液；底物 III 为双氧水溶液；终止液为 1mol/ L H₂SO₄ 硫酸溶液。

在本发明所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒中，各组成部分的体积或数量如下：

试剂盒组成部分名称：	体积或数量：
水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板	2 板 96 孔酶标板
单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物	0.5ml
阳性血清	1ml
阴性血清	1ml
20 倍浓缩洗涤液	50ml
10 倍浓缩稀释液	30ml
底物 I	20ml
底物 II	2ml
底物 III	1ml
终止液	20ml 。

在本发明所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒中,所述水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板通过以下方法制备:将纯化后的水泡性口炎病毒抗原用优化好的包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以 50 μL /孔加入酶联免疫吸附试验测定板,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜包被后拍干酶联免疫吸附试验测定板;然后以 200 μL /孔加入优化好的封闭液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中封闭过夜后彻底拍干。

在本发明所述的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒中,所述水泡性口炎病毒抗原通过以下方法制备: BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒并使用无血清的基础培养基培养,在细胞病变达 75%以上时收获病毒,反复冻融 3 次后以 8000 转/分钟离心 30 分钟,取上清液,加入终浓度为 1 / 3000 的甲醛灭活病毒,采用 20%、60%的不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 3 小时,收获提纯的病毒条带作为抗原。

本发明还提供一种如上所述的试剂盒的制备方法,包括:

- (1) 使用水泡性口炎病毒制备水泡性口炎病毒抗原;
- (2) 使用提纯的水泡性口炎病毒抗原免疫小鼠并取免疫小鼠的脾细胞,将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得杂交瘤细胞,将所述杂交瘤细胞注入小鼠制备抗水泡性口炎病毒单克隆抗体腹水;
- (3) 使用抗水泡性口炎病毒单克隆抗体腹水制备抗水泡性口炎病毒单克隆抗体辣根过氧化酶酶结合物;

- (4) 制备水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板: 将纯化后的水泡性口炎病毒抗原用优化好的包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入酶联免疫吸附试验测定板,置冰箱中过夜包被后拍干酶联免疫吸附试验测定板;然后在酶联免疫吸附试验测定板的孔内加入优化好的封闭液,置冰箱中封闭过夜后彻底拍干。

在本发明所述的试剂盒的制备方法中,所述步骤(1)中的水泡性口炎病毒抗原通过以下方法制备: BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒并使用无血清的基础培养基培养,在细胞病变达 75%以上时收获病毒,反复冻融 3 次后以 8000 转/分钟离心 30 分钟,取上清液,加入终浓度为 1 / 3000 的甲醛灭活病毒,采用 20%、60%的不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离

心 3 小时，收获提纯的病毒条带作为抗原。

在本发明所述的试剂盒的制备方法中，还包括阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩洗涤液、底物 I、底物 II、底物 III 以及终止液，并将所述阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩洗涤液、底物 I、底物 II、底物 III 以及终止液与水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板、单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物分开放置。

在本发明所述的试剂盒的制备方法中，所述 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH 7.4 PBS/PBST；10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1%明胶的 PBST；底物 I 为 pH 6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液；底物 II 为 3.3' -5.5' -四甲基联苯胺溶液；底物 III 为双氧水溶液；终止液为 1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

本发明的检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒采用竞争 ELISA 检测血清中抗水泡性口炎抗体，可用于水泡性口炎的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

具体实施方式

本发明提供一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，该试剂盒包括分别放置的试剂 I 和试剂 II，其中试剂 I 为水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板，试剂 II 为单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物，其中所述单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗水泡性口炎病毒病毒的特异性单克隆抗体。

此外，在上述试剂盒中，还可包括分别放置的阳性血清、阴性血清、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩洗涤液、底物 I、底物 II、底物 III 以及终止液。其中 20 倍浓缩洗涤液为 20 倍浓缩的含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH 7.4 PBS/PBST；10 倍浓缩稀释液为 10 倍浓缩的含 1%明胶的 PBST；底物 I 为 pH 6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液；底物 II 为 3.3' -5.5' -四甲基联苯胺溶液；底物 III 为双氧水溶液；终止液为 1mol/L H₂SO₄ 硫酸溶液。

为了便于使用，上述试剂盒的各组成部分的体积或数量如下：

试剂盒组成部分名称:	体积或数量:
水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板	2板 96孔酶标板
单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物	0.5ml
阳性血清	1ml
阴性血清	1ml
20倍浓缩洗涤液	50ml
10倍浓缩稀释液	30ml
底物 I	20ml
底物 II	2ml
底物 III	1ml
终止液	20ml

上述试剂盒中的水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板通过以下方法制备：将纯化后的水泡性口炎病毒抗原用优化好的包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 50 μL /孔加入酶联免疫吸附试验测定板，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜包被后拍干酶联免疫吸附试验测定板；然后以 200 μL /孔加入优化好的封闭液，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中封闭过夜后彻底拍干。其中水泡性口炎病毒抗原通过以下方法制备：BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒并使用无血清的基础培养基培养，在细胞病变达 75%以上时收获病毒，反复冻融 3 次后以 8000 转/分钟离心 30 分钟，取上清液，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒，采用 20%、60% 的不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 3 小时，收获提纯的病毒条带作为抗原。

以下提供制备上述试剂盒的具体实例（当然，本领域的技术人员也可在以下方法的启发下，通过其他方法制备包含上述组成部分的试剂盒）：

1、制备水泡性口炎病毒抗体 ELISA（酶联免疫吸附试验）包被抗原：在 BHK-21 细胞长成单层后接种水泡性口炎病毒，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时后加入无血清的基础培养基继续培养，3~4 天后细胞病变（CPE）达 75%以上时，收获病毒。将收获的病毒液反复冻融 3 次，以 8000 转/分钟离心 30 分钟，取上清液，加入终浓度为 1/3000 的甲醛灭活病毒。以 28000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 3 小时。沉淀用 1/100 原体积的 PBS 溶解，然后采用 20%、60%（w/v）不连续蔗糖密度梯度 20000 转/分钟 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 3 小时，收获提纯的病毒条带作为抗

原，用 DU800 核酸蛋白分析仪测定蛋白含量，-20℃保存备用。

2、检定水泡性口炎病毒 ELISA 包被抗原安全性：将纯化的病毒抗原用维持液作适当稀释（1:10~1:100）接种到已长成单层的 BHK-21 细胞上，同时作正常细胞对照。37℃培养 6 天，接种细胞与正常细胞相同，无 CPE 出现；取培养液上清（包括正常细胞培养液上清）包被酶标板，用阳性血清进行检测，病毒培养液和正常细胞培养液显色情况一致，均为无色，表明作为包被抗原用的病毒已灭活彻底，不具感染性，ELISA 包被抗原是安全的。

3、制备抗水泡性口炎病毒单克隆抗体：首先进行水泡性口炎病毒的培养和纯化，即用水泡性口炎病毒接种 BHK-21 细胞长成单层，收获的细胞培养病毒液反复冻融 3 次，以 8000 转/分钟离心 30 分钟，取上清液并经超速离心和不连续蔗糖密度梯度离心，收获提纯的病毒条带，用核酸蛋白分析仪测定蛋白含量为 2.63g/L，-20℃保存备用；用提纯的水泡性口炎病毒抗原分别加等体积弗氏完全佐剂（FCA）乳化和弗氏不完全佐剂（FIA）乳化，先后免疫 BALB/c 小鼠（巴比赛小鼠）三次；取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇（MW4000）融合剂下融合，HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞，用间接 ELISA 方法检测分泌抗 VSV 的阳性孔；用有限稀释法进行细胞克隆，经间接 ELISA 筛选阳性克隆，获得能稳定传代并分泌抗 VSV 的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞；将获得的分泌抗 VSV 的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞注射入 BALB/c 小鼠腹腔制备单克隆抗体腹水。该方法制备的单克隆抗体腹水，其 ELISA 效价高达为 1: 1024000，用核酸蛋白分析仪测定纯化腹水 IgG 的含量为 2.13g/L。亲和力常数高达 8.57×10^7 mol/L。用间接 ELISA 方法鉴定制备的单克隆抗体仅与水泡性口炎病毒抗原有特异性免疫反应，而与其它相关病毒（如 FMDV、SVDV、BTV、EHDV、AKV、PPRV、BVDV 等）没有任何免疫反应。

4、制备与鉴定抗水泡性口炎病毒单克隆抗体辣根过氧化酶（HRP）酶结合物：将抗水泡性口炎病毒 BALB/c 小鼠腹水 McAb 分别经 1 次 50%和 2 次 33%饱和硫酸铵沉淀提纯，透析除盐；用改良过的过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶（HRP）标记于单克隆抗体。标记程序如下：将 5mg HRP 溶于 0.5mL

0.1mol/L NaHCO₃ 溶液中；加 0.5mL 10mmol/L NaIO₄ 溶液，混匀，盖紧瓶塞，室温避光作用 2 小时。加 0.75mL 0.1mol/L Na₂CO₃ 混匀。加入 0.75mL 纯化单抗（15mg/mL），混匀。称取 Sephadex G25 干粉 0.3g，加入一支下口垫玻璃棉的 5mL 注射器外筒内；随后将上述交联物移入注射器外套，盖紧，4℃过夜。用少许 PBS 将交联物全部洗出，收集洗出液，加 1/20 体积的新鲜配制的 5mg/mL NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 30 分钟；再加入 3/20 体积的 NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 1 小时（或 4℃过夜）。将交联物过 Sephadex G200 或 Sepharose 6B（2.6×50cm）层析纯化，分管收集第一峰。测定克分子比值和标记率，鉴定酶结合物质量，用 ELISA 法测定酶活性和抗体活性。HRP 抗体酶结合物的保存时，加入等量甘油（或 1% BSA 和 50% 甘油）后，小量分装 -20℃ 存放。

5、制备阳性血清：挑选体格健壮的山羊 2~3 只，将纯化后 VSV 与等体积弗氏完全佐剂（FCA）乳化，充分混匀后经背部皮下注射，2 mL/只；首免后第 2 周和第 4 周分别用 VSV 相同剂量加等体积弗氏不完全佐剂（FIA）进行二免和三免；待山羊血清中抗水泡性口炎抗体酶联免疫吸附试验效价达 1:500 以上，无菌采血分离血清，离心或过滤除去沉淀，进行 56℃ 加热 30 分钟灭活，用血清保存液配方 I 按 1:2 稀释（能用正常的山羊血清稀释更好，因其成份更接近于检测标本），抽滤除菌，1mL/管分装，贴上标签，-80℃ 保存。不可反复冻融，解冻后只能在 4℃ 保存一周。

6、阴性血清的制备：选择体格健壮的山羊，采血用行业标准 SNT1166.2-2002《水泡性口炎微量血清中和试验操作规程》检测方法确认血清中是否有赤羽病的抗体，证实无水泡性口炎抗体的山羊，无菌采血分离血清。用血清保存液配方 I 按 1:2 稀释，1mL/管分装，贴上标签，-80℃ 保存。

7、包被缓冲液的优化：包被抗原时，为了得到最佳的包被效果，采用了碳酸盐缓冲液（0.05mol/L pH9.6）、磷酸盐缓冲液（0.05mol/L pH7.6）和 Tris 盐酸缓冲液（0.05mol/L pH7.6）三种缓冲液作为包被液，抗原包被浓度为 5μg/ml 和 2.5μg/ml，酶标抗体工作浓度为 1:1000 及 1:500，用自动酶标仪分析，选择最佳的包被缓冲液系统。同时为了保证缓冲液能够长期保存，在包被液中添加了 0.01% 的硫柳汞作为防腐剂。结果获得以下最佳的包被液的配方：0.05mol/L

pH9.6 碳酸盐缓冲液 (NaHCO₃ 1.465g、Na₂CO₃ 0.795g 或 Na₂CO₃·10H₂O 1.2g、水 500mL) 中含 0.01% 的硫柳汞、1μg/ml 两性霉素 B、谷氨酸钠 1%、1% BSA、30μg/mL 蛋白酶抑制剂 (胰凝乳蛋白酶) 等, 溶解后过滤除菌, 置于 4℃ 冰箱, 一周内使用。

8、最适抗原包被浓度的优化: 抗原纯化后要准确测定蛋白质浓度, 用优化好的上述包被缓冲液, 将包被抗原稀释成 0.1μg/mL, 1.0μg/mL, 2.0μg/mL, 4.0 μg/mL, 6.0μg/mL, 8.0μg/mL, 10.0μg/mL 等 6 个浓度, 包被 ELISA 板, 每孔 100μL, 进行 ELISA 测定。经孵育、显色、终止后, 用自动酶标仪分析。显色的强度在一定范围内与包被的抗原量成正比, 但随着包被抗原浓度的增加, 显色的强度反而降低, 选择浓度最低而 OD 值最大的包被抗原量作为最适抗原包被浓度 (测得蛋白质的最适包被浓度为 2.0μg/mL~4μg/mL)。

9、酶标抗体稀释度的优化: 抗原包被浓度为 4μg/mL, 将酶标抗体做系列稀释: 1: 100、1: 200、1: 400、1: 800、1: 1600、1: 3200、1: 6400、1: 12800, 经孵育、洗涤后、显色终止后, 用自动酶标仪分析, 选择 OD 值为 1~1.5 左右的酶标抗体稀释度为最适工作浓度。结果表明, 将酶标抗体做 1: 1000 稀释时, OD 值为 1~1.5 左右。

10、抗原抗体反应时间和 McAb 竞争反应时间的优化: 以反应时间短、效果最好、背景值最低为原则, 反应时间采用 20 分钟、25 分钟、30 分钟、35 分钟、40 分钟、45 分钟、50 分钟、60 分钟等 8 个点进行比较, 结果表明, 抗原抗体反应时间为 45 分钟、McAb 竞争反应时间为 40 分钟时, 效果最好, 背景值低。

11、底物作用时间的优化: 在其它条件相同的情况下, 采用 5 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、25 分钟、30 分钟、35 分钟等 7 个时间点进行比较, 获得 15 分钟为最佳的底物作用时间。

12、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物液、终止液的优选: 本发明通过试验, 选定如下最佳的洗涤液、稀释液、底物液配方。

20 倍浓缩洗涤液配方: NaCl 160g, KH₂PO₄ 4g, Na₂HPO₄·12H₂O 58g, KCl 4g, Tween-20 10mL, 蒸馏水 1000mL, 充分溶解, 另加 0.01% 的硫柳汞作

防腐剂，过滤除菌后分装。用时作 20 倍稀释。

10 倍浓缩稀释液配方：NaCl 80g, KH_2PO_4 2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g, KCl 2g, Tween-20 5mL, 明胶 100g, 蒸馏水 1000mL, 充分溶解，另加 0.01% 的硫柳汞作防腐剂，过滤除菌后分装。用时作 10 倍稀释。

底物液的优选：底物液 I 配方：乙酸—柠檬酸缓冲液 (pH6.0)：乙酸钠 (A 液) ——乙酸钠 1.64g、水 200mL，溶解后置于 4℃ 冰箱备用；柠檬酸 (B 液) ——柠檬酸 2.1g、水 100mL，溶解后置于 4℃ 冰箱备用。配制：取 B 液约 2mL 至 A 液中调 pH 值至 6.0，置于 4℃ 冰箱备用。另加 0.01% 的硫柳汞作防腐剂，过滤除菌分装。底物液 II 配方：TMB 溶液：TMB 350mg、甲醇 100 mL，加温溶解后保存于不透光的棕色瓶中，保存于室温或在 2℃~7℃ 保存。底物液 III 配方：每个 ELISA 试剂盒配一管 0.5mL 的 30% H_2O_2 ，临用时再按每 10ml 底物液 10 μL 。工作底物液配制：临用前配制。取底物液 I (37℃) 9.7mL、底物液 II 300 μL 、底物液 III 10 μL 混合。

终止液的优选：采用 1mol/L H_2SO_4 、1.5% NaF、0.1% 叠氮钠和 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 作为终止液，进行优选，结果以 1mol/L H_2SO_4 的终止效果最好。

13、封闭液和封闭方法的优选：本发明通过试验，选定 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中含 1% 牛血清白蛋白 (BSA)、2% 明胶、0.01% 硫柳汞、两性霉素 B (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、庆大霉素 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，过滤除菌。进行 4℃ 冰箱中封闭过夜与 37℃ 2 小时封闭效果比对试验，封闭和不封闭比对试验，封闭后洗板和封闭后不洗板比对试验。结果 4℃ 冰箱中封闭过夜、封闭后不洗板的方法获得了最佳的试验结果。

14、血清、抗体、单克隆抗体保存液的优选：配方 I：0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中含 0.01% 的硫柳汞、两性霉素 B (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素、谷氨酸钠 1%、1% BSA、1% 乳糖 (或山梨醇甘油)、含蛋白酶抑制剂 (如胰凝乳蛋白酶 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，过滤除菌。配方 II：将对乙酰氨基酚 1.5g，聚乙二醇 (MW20000) 10g，小牛血清 2g，吐温 (Tween) —20 mL，硫柳汞 0.2g 和 0.02mol/L、pH7.2 的盐酸缓冲盐水 1000mL 配制而成，过滤除菌。结果以配方

I 作为保存液的保存效果最好。

15、包被 ELISA 板制备、保存以及保存期限的测定：选择进口优质的可拆 96 孔 ELISA 板，将纯化后的 VSV 抗原，用优化好的上述包被缓冲液稀释成 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 50 μL /孔加入 ELISA 板，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜包被，拍干 ELISA 板；以 200 μL /孔加入优化好的封闭液，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中封闭过夜；彻底拍干 ELISA 板。将已包被好的 ELISA 板置于铝箔或簿锡纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，定期用 ELISA 测定效果，以测定保存期。结果表明，包被 ELISA 板 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存至 8 个月，与新包被的 ELISA 板检测效果完全一致。

16、试剂盒的组装：将按上述方法制备好的水泡性口炎病毒抗原包被的 ELISA 板（封闭于铝箔/簿锡纸中，内置 2g 硅胶干燥剂，封口）、单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物、10 倍浓缩稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液 I、底物液 II、底物液 III、终止液、阳性血清、阴性血清定量分装，分别贴上标签与说明。1 份详细的试剂盒使用操作说明书。装入专用的试剂盒外壳内，外壳上贴上试剂盒标签。

18、试剂盒中各种试液的配制与分装

试剂盒中试液的配制分装表

试液名称	体积 (ml) 和检测样品数 (T)	标识
水泡性口炎病毒抗原包被 ELISA 板	2 板 96 孔酶标板 (96T)	铝箔密封
单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物	0.5ml	1ml 黑盖冻存管
阳性血清	1ml	2ml 蓝盖冻存管
阴性血清	1ml	2ml 黄盖冻存管
20 倍浓缩洗涤液	50ml	白色平底瓶
10 倍浓缩稀释液	30ml	白色平底瓶
底物 I (pH6.0 的乙酸—柠檬酸缓冲液)	20ml	黑色平底瓶
底物 II (TMB)	2ml	2ml 棕色冻存管
底物 III (H2O2)	1ml	2ml 白色冻存管
终止液	20ml	红盖滴瓶
使用说明书	1 份	—

使用上述试剂盒进行检测操作的程序如下

(1)、将试剂盒中的 VSV 抗原包被 ELISA 板、20 倍浓缩洗涤液、10 倍浓缩稀释液、底物液、终止液取出，放置室温至少 30 分钟。

(2)、用双蒸水配制稀释液、洗涤液。如工作稀释液：10mL 10 倍稀释液+90mL 双蒸水，工作洗涤液：25mL 20 倍洗涤液+475mL 双蒸水。

(3)、配制 1:10 的阳性、阴性对照血清和所有被检血清，如方法：10 μ L 血清+90 μ L 稀释液，混匀。

(4)、单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物的稀释（均按 1:1000 稀释），如方法：20 μ L 单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物+20mL 稀释液，混匀。

(5)、加样

——在水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板上设立稀释液空白对照、阴性血清对照、阳性血清对照（每份做两孔）。

——每份被检血清样品做两孔。

——取 100 μ L 稀释液入空白对照孔，取 50 μ L 阴性、阳性血清入相应的对照孔，取 50 μ L 被检血清样品入相邻横行孔内，37 $^{\circ}$ C 湿盒感作 45 分钟。

——每孔加 50 μ L 单克隆抗体 IgG-HRP 酶结合物（空白对照孔不加），轻轻混匀。

(6)、将水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板置 37 $^{\circ}$ C 湿盒感作 40 分钟。

(7)、配制底物液：取出 9.7mL 底物液 I 于棕色瓶中，分别加入底物液 II 300 μ L 和底物液 III 7 μ L，充分混匀。

(8)、先用洗涤液洗水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板孔 4 次，每次 2 分钟。

(9)、加底物液：所有板孔加 100 μ L 底物液，水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板置湿盒暗盒 15 分钟。

(10)、加终止液：加入 50 μ L/孔终止液。

(11)、用酶标仪在波长 450nm 下测定光密度值（OD 值），按下式计算抑制百分率（PI）。

被检血清平均 OD 值

$$\text{抑制百分率 (PI)} = \left(100 - \frac{\text{被检血清平均 OD 值}}{\text{阴性血清平均 OD 值}} \right) \times 100$$

(12)、试剂盒阳性判定值的确定：按照上述试剂盒的检测程序，采用行业标准 SNT1166.2-2002《水泡性口炎微量血清中和试验操作规程》检测方法确认的 30 份阴性血清和 30 份阳性血清，进行 c-ELISA 试验后，结果所有阴性血清的百分抑制率 $\geq 50\%$ ，所有阳性血清的百分抑制率 $< 50\%$ 。因此，获得 c-ELISA 阳性判定值 (cut-off value) 为：PI $\geq 50\%$ 被检血清 VSV 抗体阳性；PI $< 50\%$ 被检血清 VSV 抗体阴性。

试剂盒的临床样品检测与应用以及试剂盒敏感性、特异性的评价：按照上述试剂盒的检测程序，用行业标准 SNT1166.2-2002《水泡性口炎微量血清中和试验操作规程》检测方法确认的 30 份阴性血清和 30 份阳性血清，进行 c-ELISA 试验。统计获得试剂盒的特异性为 93%（阴性结果数/阴性样品总数=28/30），敏感性为 90%（阳性结果数/阳性样品总数=27/30），本试剂盒的特异性、敏感性为良好。

上述具体实施例的实验数据表明，本发明的水泡性口炎病毒抗体竞争酶联免疫吸附试验（c-ELISA）试剂盒特异性强，敏感性高，适用于水泡性口炎的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到的变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应该以权利要求的保护范围为准。

专利名称(译)	检测水泡性口炎抗体试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101625363A	公开(公告)日	2010-01-13
申请号	CN200910109418.5	申请日	2009-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	花群义		
申请(专利权)人(译)	花群义		
当前申请(专利权)人(译)	花群义		
[标]发明人	花群义 杨俊兴 张彩虹 阮周曦 曾少灵 曹琛福 林庆燕 秦智锋 陈书琨 陶虹		
发明人	花群义 杨俊兴 张彩虹 阮周曦 曾少灵 曹琛福 林庆燕 秦智锋 陈书琨 陶虹		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535 C12N15/06 C12P21/08		
代理人(译)	陆军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测水泡性口炎病毒抗体试剂盒，包括分别放置的试剂I和试剂II，其中所述试剂I为水泡性口炎病毒抗原包被酶联免疫吸附试验测定板，所述试剂II为单克隆抗体IgG - HRP酶结合物，其中所述单克隆抗体IgG - HRP酶结合物为辣根过氧化酶标记的鼠抗水泡性口炎病毒的特异性单克隆抗体。本发明还提供一种上述试剂盒的制备方法。本发明的试剂盒采用竞争ELISA检测血清中抗水泡性口炎抗体，可用于水泡性口炎的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

被检血清平均OD值

$$\text{抑制百分率 (PI)} = \left(100 - \frac{\text{被检血清平均OD值}}{\text{阴性血清平均OD值}} \right) \times 100$$

阴性血清平均OD值