



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110007080 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201910291423.6

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2019.04.12

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 长春西诺生物科技有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新开发区普天路58号

(72)发明人 刘伟 石晶 殷玉和 夏振强

王慧慧 崔玉梅 丁秋雨 赵玉环
刘洪运 王倩

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理有限公司 22214

代理人 刘微

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书3页 说明书14页
序列表5页 附图4页

(54)发明名称

一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法,属于抗体检测试剂盒技术领域,解决现有技术抗体检测准确度不够高,存在安全隐患的问题。本发明的试剂盒包括免疫层析检测试纸条和样品稀释液,免疫层析检测试纸条由一端至另一端依次包括:包被狂犬病毒抗原的样品垫、包被抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的标记垫、包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜、以及吸水垫,其彼此相互重叠并贴于背板的上表面。本发明采用竞争法检测血中狂犬病毒抗体,同时配合读条设备,根据标准曲线可直接显示出血样中的真实抗体数值,提高检测的准确性和灵敏度。



1. 一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,其特征在于,包括免疫层析检测试纸条和样品稀释液;

所述免疫层析检测试纸条由一端至另一端依次包括:包被狂犬病毒抗原的样品垫、包被抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的标记垫、包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜、以及吸水垫,其彼此相互重叠并贴于背板的上表面;

其中,样品垫包被的狂犬病毒抗原为狂犬病毒样颗粒,检测线包被有抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,质控线包被有金黄色葡萄球菌A蛋白,标记垫包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体由胶体金或荧光微球标记;

样品稀释液为含有10-20mmol/L硼砂,0.2-6%NaCl,0.1-0.5%Tween-20,0.1-0.5%NaN₃,pH值为8.2-8.6的溶液。

2. 如权利要求1所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,其特征在于,样品垫包被的狂犬病毒抗原的蛋白浓度为0.5-2.0g/L。

3. 如权利要求1所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,其特征在于,金标垫包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的蛋白浓度为50μg/ml。

4. 如权利要求1所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,其特征在于,荧光垫包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的蛋白浓度为0.01mg-0.05mg/ml。

5. 如权利要求1所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,其特征在于,检测线包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的蛋白浓度为1.0-2.0g/L。

6. 如权利要求1所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,其特征在于,质控线包被的金黄色葡萄球菌A蛋白的蛋白浓度为1.0-2.0g/L。

7. 如权利要求1-6任一项所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、样品垫制备:制备和纯化狂犬病毒抗原,将纯化后的狂犬病毒抗原用内含2%的Tween-20的20mM四硼酸钠溶液稀释成0.5-2.0mg/ml,喷涂于玻璃纤维素膜上,作为样品垫;

S2、标记垫制备:将固含量为1%的微球悬浮液采用超声分散均匀,用超纯水10倍稀释;按照体积比1:25分别加入浓度为50mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺溶液和浓度为50mg/ml(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液分散均匀,按照蛋白浓度0.01mg-0.05mg/ml加入抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,反应1-2min后,再超声20-40秒,然后再反应1小时;加至BSA终浓度为0.50%,进行封闭1-2小时;以10000r/min离心15-20min,溶于含1%牛血清、4%蔗糖、0.5%酪蛋白、pH6.0的0.01M硼酸缓冲液,喷涂在玻璃纤维上,作为标记垫;

S3、硝酸纤维素膜包被:检测线包被的为1.0-2.0g/L的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;质控线包被的为1.0-2.0g/L的SPA,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;

S4、试纸组装:采用样品单向层析组装方式,在背板上的一端至另一端依次粘贴样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后切条、密封,4-30℃保存。

8. 如权利要求1-6任一项所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、样品垫制备:制备和纯化狂犬病毒抗原,将纯化后的狂犬病毒抗原用内含2%的

Tween-20的20mM四硼酸钠溶液稀释成0.5-2.0mg/ml,喷涂于玻璃纤维素膜上,作为样品垫;

S2、标记垫制备:用0.2mol/L K_2CO_3 将25-40nm的胶体金溶液调节pH值为8.4后,将抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体按照蛋白浓度为50 μ g/ml,加入胶体金溶液中并继续搅拌30分钟;加入10%BSA至终浓度为1%,搅拌30分钟,以10000r/min离心30分钟,吸去上清液,沉淀物即为初步纯化的胶体金标记的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,溶于含3%BSA、3%蔗糖、0.2%Tween-20和0.1%NaN₃的20mmol/L Tris-HCl溶液,喷涂在玻璃纤维上,作为标记垫;

S3、硝酸纤维素膜包被:检测线包被的为1.0-2.0g/L的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;质控线包被的为1.0-2.0g/L的SPA,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;

S4、试纸组装:采用样品单向层析组装方式,在背板上的一端至另一端依次粘贴样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后切条、密封,4-30 $^{\circ}$ C保存。

9.如权利要求1-6任一项所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)标准曲线制作:用效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU标准阳性血清经检测后,通过函数关系式 $y = (ab+cx^d) / (b+x^d)$ 进行四参数拟合,确定检测标准曲线,其中y代表反应值,x代表浓度,a代表曲线上渐近线估值,b代表曲线的斜率,c代表最大结合一半时对应的剂量,d代表曲线下渐近线估值;

(2)将待检全血或血清样本与样品稀释液按1:50~1:100v/v混匀,即如果待检样本为全血,取20 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀;如待测样本为血清,取10 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀,即为待检样品处理液;

(3)取待检样品处理液50~100 μ L加入样品垫上,室温静置10-20分钟内判定结果,结果判断方法为:

(3)取待检样品处理液50~100 μ L加入样品垫上,室温静置10-20分钟内判定结果,结果判断方法为:

狂犬病病毒抗体阳性:将试纸条放入配套的荧光检测仪器中,质控线处,出现一条绿色荧光条带,通过标准曲线比对,读取具体数值,计算T/C线的比值,数值 \geq 0.5IU/ml;

狂犬病病毒抗体阴性:将试纸条放入配套的荧光检测仪器中,在检测线和质控线处,各出现一条绿色荧光条带,通过标准曲线比对,读取具体数值,计算T/C线的比值,数值 $<$ 0.5IU/ml;

无效:仅在检测线显色,而质控线无明显条带出现,视为试纸条检测无效。

10.如权利要求1-6任一项所述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)标准曲线制作:用效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU标准阳性血清经检测后,通过函数关系式为 $y = ax^b$ 进行回归拟合,确定检测标准曲线,其中y代表OD值,x代表浓度,a代表截距,b代表回归系数;

(2)将待检全血或血清样本与样品稀释液按1:50~1:100v/v混匀,即如果待检样本为全血,取20 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀;如待测样本为血清,取10 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀,即为待检样品处理液;

(3)取待检样品处理液50~100 μ L加入样品垫上,室温静置10-20分钟内判定结果,结果

判断方法为：

狂犬病病毒抗体阳性：质控线处，出现一条红色条带；将试纸条放入配套的胶体金读条设备中，通过标准曲线比对，读取具体数值，计算T/C线的比值，数值 ≥ 0.5 IU/ml；

狂犬病病毒抗体阴性：在检测线和质控线处，各出现一条紫红色条带；将试纸条放入配套的胶体金读条设备中，通过标准曲线比对，读取具体数值，计算T/C线的比值，数值 < 0.5 IU/ml；

无效：仅在检测线显色，而质控线无明显条带出现，视为试纸条检测无效。

一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体检测试剂盒技术领域,尤其涉及一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法。

背景技术

[0002] 狂犬病俗称“疯狗病”,是迄今为止人类唯一病死率为100%的急性传染病。狂犬病在世界范围内广泛分布。据报道全世界每年估计因狂犬病导致的死亡人数为4万~7万,近年来,我国狂犬病疫情一直呈上升趋势,病死数居我国37种法定报告传染病首位。1996年全国报告狂犬病发病数曾一度较低,为159例,而2004年全国狂犬病报告发病数上升至2660例,2010年中国官方发布的经有效性确诊的狂犬病发病人数为3300人。许多种类的哺乳动物都与狂犬病的传播有关,犬是发展中国家人狂犬病最主要的储存宿主和传播宿主。人感染狂犬病最常见的方式是通过感染狂犬病毒的犬、猫、野生食肉动物以及食虫和吸血蝙蝠的咬伤、挠抓、舔舐皮肤或粘膜破损处而感染。

[0003] 狂犬病疫苗是控制人和动物狂犬病的关键因素。世界卫生组织(WHO)狂犬病专家委员会认为,血清中的有效结合狂犬病毒的中和抗体效价 ≥ 0.5 国际单位(IU/ml)才具有足够的保护性,如果中和抗体效价 < 0.5 IU/ml,必须给予多个剂量的加强免疫,直到抗体达到要求为止。狂犬病毒G蛋白是唯一诱导机体产生病毒中和抗体的蛋白,因此,利用狂犬病毒G蛋白来检测血清中的中和抗体效价是最科学和直接的方法。

[0004] 根据CFDA医疗器械注册查询结果可知,目前人狂犬病毒抗体(IgG)检测试剂盒已批准的产品有两个,适用范围均为定性检测人血清中狂犬病毒IgG抗体;兽用狂犬病毒抗体检测试剂盒目前尚无获批产品。因此,现有的狂犬病毒抗体检测产品仅用于定性检测,可见目前定量检测的试剂盒存在一定技术难度和技术壁垒。然而,抗体的定性检测存在很大弊端,检测结果不够准确,即使检测结果显示阳性,血清中的中和抗体也未必达到 ≥ 0.5 国际单位(IU/ml)效价,不具足够的保护性,增大了感染狂犬病的风险,存在很大安全隐患。

发明内容

[0005] 本发明针对上述技术问题,提供一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法。该试剂盒可以在机体接受狂犬疫苗接种后,通过对全血或血清的检测,配套检测设备,通过分析检测线显色强度利用回归方程,进行数字化表示抗体效价,能快速准确的检测血液中狂犬抗体水平具体数值,明确是否抗体水平达到0.5IU水平,从而对狂犬疫苗免疫水平进行监测,提示免疫效果,真正评价狂犬疫苗的免疫达到免疫保护,保障犬和人类的安全,具有十分良好的应用前景。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,包括免疫层析检测试纸条和样品稀释液;

[0008] 所述免疫层析检测试纸条由一端至另一端依次包括:包被狂犬病毒抗原的样品垫、包被抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的标记垫、包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜、以

及吸水垫,其彼此相互重叠并贴于背板的上表面;

[0009] 其中,样品垫包被的狂犬病毒抗原为狂犬病毒样颗粒,检测线包被有抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,质控线包被有金黄色葡萄球菌A蛋白,标记垫包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体由胶体金或荧光微球标记;

[0010] 所述样品稀释液为含有15mmol/L硼砂,0.5%NaCl,0.2%Tween-20,0.1%NaN₃,pH值为8.4的溶液。

[0011] 所述样品垫包被的狂犬病毒抗原的蛋白浓度为0.5-2.0g/L。

[0012] 所述标记垫为采用胶体金或荧光微球标记的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体喷涂在玻璃纤维上制成的金标垫或荧光垫。具体地,金标垫包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的蛋白浓度为50μg/ml;荧光垫包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的蛋白浓度为0.01mg-0.05mg/ml,优选0.02mg/ml。

[0013] 免疫胶体金技术(Immune colloidal gold technique)是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术,具有使用方便快速,反应能在15-20分钟内完成,便于基层和现场使用,具有成本低、标记物稳定等特点。而荧光微球是采用时间分辨荧光染料与苯乙烯一起发生共聚而制备出来。因此,荧光微球荧光强度非常稳定,染料不发生泄露与解离,荧光信号强,受外界环境影响小等优点。荧光微球在检测试条的分布情况可以采用荧光检测仪器获取数据,从而实现敏感、稳定的定量检测结果,是免疫荧光定量层析法最理想的标记物。上述两种标记物,可根据临床条件的不同,随意使用。

[0014] 所述检测线包被的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的蛋白浓度为

[0015] 1.0-2.0g/L。

[0016] 所述质控线包被的金黄色葡萄球菌A蛋白的蛋白浓度为1.0-2.0g/L。

[0017] 所述狂犬病毒抗原为狂犬病毒样颗粒,其基本组装元件包括狂犬病毒G蛋白和M蛋白。其中,G蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示,M蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。编码G蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,编码M蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。其中,G蛋白的F引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,G蛋白的R引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。M蛋白的F引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示,M蛋白的R引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0018] 上述狂犬病毒抗原是由狂犬病毒CTN-1株糖蛋白经Bac-to-Bac杆状病毒-Sf9昆虫细胞表达系统表达的病毒样颗粒。具体地,狂犬病毒样颗粒的构建与制备过程如下:

[0019] (1) 重组杆状病毒pFB1-CTNG和pFB1-CTNM质粒的构建:将前述狂犬病毒CTN-1株G和M基因引入到昆虫细胞(Sf9细胞)表达载体pFastBac1(pFB1)中,转化大肠杆菌DH10Bac感受态细胞,提取阳性质粒即为重组杆状病毒pFB1-CTNG和pFB1-CTNM质粒;

[0020] (2) 重组杆状病毒的拯救:用重组杆状病毒pFB1-CTNG和pFB1-CTNM质粒转染昆虫细胞(Sf9细胞),拯救获得重组杆状病毒;

[0021] (3) 狂犬病毒样颗粒的制备:将获得的重组杆状病毒rpFB1-CTNG和rpFB1-CTNM以MOI=3:2比例共感染昆虫细胞,4-5天后收获上清,即得狂犬病毒样颗粒。经细胞匀质机进行细胞破碎后,采用蔗糖密度梯度离心法对病毒样颗粒进行纯化。

[0022] 抗狂犬病毒样颗粒的单克隆抗体的制备过程如下:

[0023] (1) 将纯化后的狂犬病毒样颗粒按照0.1mg/ml的浓度分别在第0d,7d和21d对

Ba1b/c小鼠进行免疫,当小鼠血清ELISA效价达到1:10000以上时,取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞以 $6 \times 10^7:1 \times 10^7$ 的比例进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞;对阳性克隆分别用狂犬病毒样颗粒作为敏感性抗原进行特异性抗原进行挑选,最终获得抗狂犬病毒样颗粒的单克隆细胞株;

[0024] (2) 将步骤(1)制得的狂犬病毒样颗粒的单克隆抗体经饱和硫酸铵沉淀,纯化后制得纯化的抗狂犬病毒样颗粒的单克隆抗体。

[0025] 当采用荧光微球标记抗体时,本发明提供的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0026] S1、样品垫制备:制备和纯化狂犬病毒抗原,将纯化后的狂犬病毒抗原用内含2%的Tween-20的20mM四硼酸钠溶液稀释成0.5-2.0mg/ml,喷涂于玻璃纤维素膜上,作为样品垫;

[0027] S2、标记垫制备:将固含量为1%的微球悬浮液采用超声分散均匀,用超纯水10倍稀释;按照体积比1:25分别加入浓度为50mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺溶液和浓度为50mg/ml 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,混匀,常温下反应0.5小时;将反应后的悬浮液分散均匀,按照蛋白浓度0.01mg-0.05mg/ml加入抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,反应1-2min后,再超声20-40秒,然后再反应1小时;加至BSA终浓度为0.50%,进行封闭1-2小时;以10000r/min离心15-20min,溶于含1%牛血清、4%蔗糖、0.5%酪蛋白、pH 6.0的0.01M硼酸缓冲液,喷涂在玻璃纤维上,作为标记垫;

[0028] S3、硝酸纤维素膜包被:检测线包被的为1.0-2.0g/L的抗狂犬病毒抗原的单克隆,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;质控线包被的为1.0-2.0g/L的SPA,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;

[0029] S4、试纸组装:采用样品单向层析组装方式,在背板上的一端至另一端依次粘贴样品垫、标记、硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后切条、密封,4-30℃保存。

[0030] 当采用胶体金标记抗体时,本发明提供的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0031] S1、样品垫制备:制备和纯化狂犬病毒抗原,将纯化后的狂犬病毒抗原用内含2%的Tween-20的20mM四硼酸钠溶液稀释成0.5-2.0mg/ml,喷涂于玻璃纤维素膜上,作为样品垫;

[0032] S2、标记垫制备:用0.2mol/L K_2CO_3 将25-40nm的胶体金溶液调节pH值为8.4后,将纯化后检验合格的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体按照蛋白浓度为50 μ g/ml,加入胶体金溶液中并继续搅拌30分钟;加入10%BSA至终浓度为1%,搅拌30分钟,以10000r/min离心30分钟,吸去上清液,沉淀物即为初步纯化的胶体金标记的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,溶于含3%BSA、3%蔗糖、0.2%Tween-20和0.1%NaN₃的20mmol/L Tris-HCl溶液,喷涂在玻璃纤维上,作为标记垫;

[0033] S3、硝酸纤维素膜包被:检测线包被的为1.0-2.0g/L的抗狂犬病毒抗原的单克隆,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;质控线包被的为1.0-2.0g/L的SPA,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;

[0034] S4、试纸组装:样品单向层析组装方式为,在背板上的一端至另一端依次粘贴样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,组装后切条、密封,4-30℃保存;

[0035] 其中,上述狂犬病毒抗原为狂犬病毒样颗粒。

[0036] 上述制备方法中,还包括标准品的制备:配制效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU的标准阳性血清作为标准品。

[0037] 当采用荧光微球标记抗体时,上述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0038] (1) 标准曲线制作:用效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU标准阳性血清经检测后,通过函数关系式 $y = (ab+cx^d) / (b+x^d)$ 进行四参数拟合,确定检测标准曲线,其中y代表反应值,x代表浓度,a代表曲线上渐近线估值,b代表曲线的斜率,c代表最大结合一半时对应的剂量,d代表曲线下渐近线估值;

[0039] (2) 将待检全血或血清样本与样品稀释液按1:50~1:100v/v混匀,即如果待检样本为全血,取20 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀;如待测样本为血清,取10 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀,即为待检样品处理液;

[0040] (3) 取待检样品处理液50~100 μ L加入样品垫上,室温静置10-20分钟内判定结果,结果判断方法为:

[0041] (3) 取待检样品处理液50~100 μ L加入样品垫上,室温静置10-20分钟内判定结果,结果判断方法为:

[0042] 狂犬病病毒抗体阳性:将试纸条放入配套的荧光检测仪器中,质控线处,出现一条绿色条带,通过标准曲线比对,读取具体数值,计算T/C线的比值,数值 ≥ 0.5 IU/ml;

[0043] 狂犬病病毒抗体阴性:将试纸条放入配套的荧光检测仪器中,在检测线和质控线处,各出现一条绿色条带,通过标准曲线比对,读取具体数值,计算T/C线的比值,数值 < 0.5 IU/ml;

[0044] 无效:仅在检测线显色,而质控线无明显条带出现,视为试纸条检测无效。

[0045] 当采用胶体金标记抗体时,上述的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0046] (1) 标准曲线制作:用效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU标准阳性血清经检测后,通过函数关系式为 $y = ax^b$ 进行回归拟合,确定检测标准曲线,其中y代表OD值,x代表浓度,a代表截距,b代表回归系数;

[0047] (2) 将待检全血或血清样本与样品稀释液按1:50~1:100v/v混匀,即如果待检样本为全血,取20 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀;如待测样本为血清,取10 μ L待测样本溶于1ml样品稀释液中,充分混匀,即为待检样品处理液;

[0048] (3) 取待检样品处理液50~100 μ L加入样品垫上,室温静置10-20分钟内判定结果,结果判断方法为:

[0049] 狂犬病病毒抗体阳性:质控线处,出现一条红色条带;肉眼观察检测线处,出现较弱的线甚至不显色,将试纸条放入配套的胶体金读条设备中,通过标准曲线比对,读取具体数值,计算T/C线的比值,数值 ≥ 0.5 IU/ml;

[0050] 狂犬病病毒抗体阴性:在检测线和质控线处,各出现一条紫红色条带;肉眼观察检测线越深,说明狂犬病病毒抗体越弱,将试纸条放入配套的胶体金读条设备中,通过标准曲线比对,读取具体数值,计算T/C线的比值,数值 < 0.5 IU/ml;

[0051] 无效:仅在检测线显色,而质控线无明显条带出现,视为试纸条检测无效。

[0052] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0053] 本发明提供的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒,检测时使用抗狂犬病病毒G蛋白的单克隆抗体与血液中的中和抗体进行竞争抗原,采用竞争法提高了检测的灵敏度,抗体效价越高,显色越浅,甚至不显色,抗体效价越低,显色越深,更能引起人们重视,同时配合胶体金读条设备或荧光检测仪器,根据标准曲线可直接显示出血样中的真实抗体数值,提高检测的准确性。采用的标记抗原为昆虫细胞表达的狂犬病病毒样颗粒,仅由G蛋白和M蛋白装配而成,没有核酸成分,消除了采用全病毒作为标记抗原而产生的生物安全隐患。因此,本发明将对狂犬病病毒免疫监控提供切实有效的检测手段,可填补狂犬病毒抗体定量检测的市场空白。

附图说明

[0054] 为了更清楚地说明本申请实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0055] 图1为本发明提供的胶体金免疫层析检测试纸条俯视图;

[0056] 图2为本发明提供的胶体金免疫层析检测试纸条组装示意图;

[0057] 图3为本发明实施例1提供的重组杆状病毒PCR鉴定图;

[0058] 图4为本发明实施例1提供的狂犬病病毒样颗粒间接免疫荧光图;

[0059] 图5为本发明实施例1提供的狂犬病病毒样颗粒电镜图;

[0060] 图6为本发明实施例1提供的狂犬病病毒样颗粒SDS-PAGE图;

[0061] 图7为本发明实施例1提供的狂犬病病毒样颗粒免疫印迹图;

[0062] 图8为本发明实施例3提供的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的标准曲线;

[0063] 图9为本发明实施例4提供的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0064] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面将结合实施例对本发明作进一步的详细介绍。以下实施用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。本发明所采用的供体质粒pFastBac1购自Invitrogen公司,菌种E.coli DH10Bac、昆虫细胞Sf9、狂犬病病毒由长春卓谊生物股份有限公司提供。兔抗RABV MP血清为长春西诺生物科技有限公司采用现有方法自制;Phusion超保真DNA聚合酶和T4DNA连接酶购自NEB公司产品;限制性内切酶、蛋白分子Marker购自Thermo公司;DH5 α 感受态细胞、DNA分子Marker、BacPAK杆状病毒快速滴度检测试剂盒购自Takara公司;质粒小提试剂盒、DNA胶回收试剂盒、基因组提取试剂盒均购自Axygen公司;细胞转染试剂CellfectionII Reagent购自Invitrogen公司;胎牛血清为GIBCO公司产品。

[0065] 实施例1狂犬病毒样颗粒的制备与鉴定

[0066] (1) 病毒基因组的提取

[0067] 将狂犬病毒CTN-1病毒接种vero细胞,接种2天后收取病毒液,根据Genbank的BABV CTN-1株全基因组序列信息(Accession NO.HQ317918.1),利用Primer5.0软件设计特异性

扩增G和M基因引物,引物序列如表1所示。

[0068] 表1狂犬病毒CTN-1株糖蛋白基因G和基质蛋白M特异性扩增引物

[0069]

序列号	引物名称	序列 (5' -3')	酶切位点
SEQ ID 3	CTNG-F	CCCGAATTCATGATTCCTCAAGCTCTGTTGTTTG	EcoR I
SEQ ID 4	CTNG-R	TTTCTGCAGTTACAGCTTGGTCTCACCTCCG	Pst I
SEQ ID 5	CTNM-F	CCCCTCGAGATGAACCTTTCTACGCAAGATAGTGA	Xho I
SEQ ID 6	CTNM-R	CCCGGTACCCTATTCTAGGAGCAGGGAAGAGTC	Kpn I

[0070] 下划线标记为限制性内切酶酶切位点序列。

[0071] (2) CTN-1株目的基因的测定

[0072] 提取RABV CTN-1株病毒RNA,反转录获得cDNA,以此为模板,以CTNG-F、CTNG-R和CTNM-F、CTNM-R为引物,利用超保真DNA聚合酶分别扩增RABV CTN-1株G和M基因,其中G基因序列如SEQ ID NO.1所示,M基因序列如SEQ ID NO.2所示。将目的基因利用Pst I和EcoR I双酶切G基因得到CTNG,Xho I和Kpn I双酶切M基因得到CTNM;载体pFB 1利用Pst I和EcoR I,Xho I和Kpn I分别进行双酶切。分别将目的产物CTNG-PE与pFB1-PE连接,CTNM-XK与pFB1-XK连接。而后将两种链接产物分别转入到DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆进行测序分析,鉴定。

[0073] (3) 重组杆状病毒表达质粒BpFB1-CTNG和BpFB1-CTNM的构建

[0074] 将1 μ l重组质粒加入冰浴融化的DH10Bac感受态细胞,冰浴30min,42 $^{\circ}$ C热激45s,冰浴2min,加入1mL无抗性LB培养基,37 $^{\circ}$ C震荡培养4h,取菌液80 μ L涂LB平板(含卡那霉素、庆大霉素、四环素三种抗生素),37 $^{\circ}$ C培养48h,挑选白斑菌落,加入LB培养基(卡那霉素、庆大霉素、四环素三种抗生素终浓度分别为50 μ g/mL、7 μ g/mL、10 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 200rpm/min摇床培养14h。以碱裂解法提取重组杆粒DNA,分别命名为BpFB1-CTNG和BpFB1-CTNM。提取质粒DNA,进行PCR鉴定,成功扩增出G基因(1575bp)和M基因(609bp),结果见图3,胶回收目的片段。

[0075] (4) 重组杆状病毒的拯救与鉴定

[0076] 转染前,Sf9贴壁细胞置于12孔培养板中,在10%胎牛血清(FBS)TC-100培养基中27 $^{\circ}$ C培养,当细胞密度达到80%以上时用1.5%FBS-TC-100将Sf9细胞传至6孔板,2ml/well(1.0 \times 10⁶cells/well),室温30min。利用8 μ l Cellfectin II Reagent放入100 μ l无血清培养基,混合均匀,室温静置30min;1 μ g重组杆状病毒表达质粒BpFB1-CTNG和BpFB1-CTNM放入100 μ l无血清细胞培养基,混合均匀后与转染剂-培养基复合物混合,形成重组杆粒DNA-脂质复合物,加入6孔板培养细胞,27 $^{\circ}$ C培养,3~5h后吸取上清即为P1代重组杆状病毒,命名为rpFB1-CTNG和rpFB1-CTNM。将拯救获得的P1代杆状病毒感染正常生长的Sf9细胞,培养3~4天,取上清,提取DNA,以CTNG-F、CTNG-R和CTNM-F、CTNM-R为引物,进行PCR鉴定经鉴定,rpFB1-CTNG和rpFB1-CTNM中G基因和M基因序列测定结果均正确。

[0077] (5) 狂犬病病毒样颗粒的装配

[0078] Sf9细胞于无血清SF900II培养基、27 $^{\circ}$ C震荡悬浮培养,3~4天传代一次。调整细胞密度至2.0 \times 10⁶cells/ml,在27 $^{\circ}$ C震荡悬浮培养12h后,将重组杆状病毒rpFB1-CTNG和rpFB1-CTNM以MOI=3:2比例共感染Sf9细胞,接毒后27 $^{\circ}$ C震荡悬浮培养4~5天后收取细胞上清。

[0079] (6) 间接免疫荧光

[0080] 将重组杆状病毒感染Sf9细胞,27℃培养48h后以间接免疫荧光法检测狂犬病病毒样颗粒表达情况,如图4所示,可见大量绿色荧光,表明狂犬病病毒样颗粒大量表达。

[0081] (7) 狂犬病病毒样颗粒含量测定

[0082] 收获Sf9细胞培养液混合物即为狂犬病病毒样颗粒,命名为CTNVLP。利用BacPAK杆状病毒快速滴度检测试剂盒测定重组杆状病毒滴度,结果表明,重组杆状病毒感染Sf9细胞后装配形成的狂犬病病毒样颗粒病毒滴度达 2.3×10^8 IFU/ml。

[0083] (8) 狂犬病病毒样颗粒的纯化

[0084] 采用蔗糖密度梯度离心法,将病毒样颗粒加入含有20%、30%、40%、55%浓度的蔗糖溶液的离心管中,28000rpm,离心90min,抽取40%–55%之间的病毒条带,21000rpm,离心90min去蔗糖,沉淀用STE (1.7532g NaCl,0.05845g EDTA,0.24228g Tris-base,用二馏水定容至200ml,完全溶解后,用HCl调PH至7.5) 溶解,用BCA蛋白浓度试剂盒测定CTNVLP浓度为8.46mg/ml。

[0085] (9) 狂犬病病毒样颗粒的鉴定

[0086] A、利用电镜鉴定CTNVLP形态与大小。将CTNVLP滴加至电镜专用通道,10min后用1%磷钨酸染色3min,进行电镜观察,结果见图5,电镜观察可见大小在180~200nm、纤突明显的圆形或椭圆形rabies VLP。

[0087] B、Western Bot

[0088] 将CTNVLP经SDS-PAGE电泳后转移至聚偏氟乙烯膜(PVDF膜)上,用PBS冲洗1次,用含5%脱脂奶粉的PBS溶液封闭PVDF膜2小时;PBS洗涤膜3次,加入PBS 200倍稀释的狂犬病阳性血清国家标准品,于4℃过夜;PBS洗涤膜3次后,加入PBS 10000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗犬IgG,37℃孵育1小时;PBS洗涤3次;加入显色液,条带应在30分钟左右出现,用去离子水洗膜,终止反应,结果见图6和图7,可见GP(A约60kDa)和MP(B约25kDa)目的蛋白条带,经测序,G蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示,M蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。

[0089] (10) 小鼠免疫及攻毒实验

[0090] 实验材料:实验动物选自市售的6~8周龄雌性BALB/c小鼠,免疫原采用实施例1制备的CTNVLP。Baby hamster kidney-21细胞(BHK-21)由军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所动物病毒学与特种动物疫病学研究室传代并保存。RABV标准攻击株CVS-11由军事医学科学院军事兽医研究所动物病毒学与特种动物疫病学研究室传代并保存;RABV街毒株HuNPB3由军事医学科学院军事兽医研究所动物病毒学与特种动物疫病学研究室分离、鉴定、传代并保存。

[0091] 实验方法:实验小鼠随机分为2组,分别为CTNVLP免疫组和空白对照组。鼠后肢肌肉注射免疫,首次免疫后间隔两周加强免疫一次,免疫剂量均为10μg/只。

[0092] 中和抗体检测:首免后第1、2、4和6周进行眼球静脉丛采血,全血37℃放置1h,4℃静置过夜,4℃、5000rpm离心15min,小心吸取析出血清,56℃灭活30min,分装、-20℃保存备用。利用荧光抗体病毒中和试验(FAVN)方法检测血清内VNA滴度。检测结果显示,CTNVLP免疫组小鼠首免一周后(第1周),在所有免疫rabies VLP小鼠血清内均检测到RABV特异性VNA,此时VNA滴度较低。首免两周后(第2周),CTNVLP免疫组小鼠血清VNA滴度平均值分别为

2.11IU/ml,此时接受加强免疫。加强免疫两周后(第4周),CTNVLP免疫组小鼠体内展现出针对RABV增强的抗体反应,血清VNA滴度明显升高,分别提高至9.13IU/ml。直至加强免疫后四周(第6周),CTNVLP免疫组小鼠血清VNA滴度仍保持相对稳定的趋势,未出现明显下降。空白对照组小鼠血清中始终未检测到RABV特异性VNA。

[0093] 小鼠攻毒:首免后第6周(加强免疫后第4周)进行攻毒,前肢肌肉注射RABV街毒株HuNPB3鼠脑传代毒,100×IMLD₅₀/只。攻毒后21天内观察并记录狂犬病发病情况,如被毛逆立、狂躁不安、行动迟缓、颤抖、痉挛、瘫痪等。当攻毒小鼠出现典型狂犬病症状时,通过乙醚麻醉后断颈方式人道处死。实验结果显示,攻毒后,空白对照组小鼠从攻毒后第5天开始陆续出现狂犬病症状,在攻毒后第7天出现瘫痪小鼠并予以人道处死,到第9天所有小鼠均因瘫痪而人道处死,小鼠存活率为0%。CTNVLP免疫组中的小鼠于在21天观察期中未出现任何狂犬病临床症状,观察期结束时无死亡,小鼠存活率为100%。

[0094] RABV糖蛋白(glycoprotein,GP)是唯一刺激并诱导机体产生病毒中和抗体(virus neutralizing antibody,VNA)的结构蛋白,RABV基质蛋白(matrix protein,MP)决定了RABV合成、出芽,维持病毒形态,且MP上具有GP专一性结合位点,影响GP在病毒包膜表面的构象。因此,本发明采用CTN-1株狂犬病毒GP和MP作为构建rabies VLP的基本组装元件,制备得到的狂犬病毒的病毒样颗粒,是仅含有结构蛋白G和基质蛋白M的空心颗粒,电镜观察可见大小在180~200nm、纤突明显的圆形或椭圆形rabies VLP,Western Blot分析显示rabies VLP由GP和MP组成,不含病毒核酸,不能自主复制,安全性高,可应用在抗体检测等领域,在形态上与真正病毒粒子相同或相似,以正确构象和高度重复的形式展示抗原表位,具有良好的免疫原性,在小鼠体内均诱导产生显著增强的RABV特异性体液和细胞免疫反应,并保护免疫动物远离RABV感染。

[0095] 实施例2狂犬病病毒G蛋白单克隆抗体的制备和鉴定

[0096] (1)选取5只6~8周龄雌性BALB/c小鼠,向小鼠注射前述纯化的狂犬病毒G蛋白病毒样颗粒和等量弗氏完全佐剂乳化物,每只皮下多点注射200μl。两周后进行二免,向小鼠注射狂犬病毒G蛋白病毒样颗粒和等量弗氏不完全佐剂乳化物,注射量和方法同首次免疫。二次免疫两周后进行第三次免疫,免疫方法和病毒注射量同二次免疫。三免两周后选取经剪尾采血后血清ELISA效价达到1:10000以上时,去脾细胞与骨髓瘤细胞以6×10⁷个/ml:1×10⁷个/ml=6:1的比例进行融合;用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞;采用荧光抗体病毒中和试验(FAVN)进行杂交瘤细胞的筛选;将筛选到的阳性杂交瘤细胞,腹腔接种8~10周龄雌性BALB/c鼠,每只1×10⁶个细胞。接种10日后,用注射器吸取小鼠腹水。

[0097] (2)将步骤(1)收集的腹水以2400r/min,离心5分钟,收集上清,均先后加入终浓度为0.2mol/L NaCl和0.025mol/L CaCl₂溶液。滤纸过滤后,加入100倍体积灭菌纯化水,于4℃对滤液进行透析8~15小时,期间换水1~2次。再将滤液以22000r/min,离心30分钟,弃上清;将沉淀重悬于含1mol/L NaCl的0.1mol/L Tris-HCl溶液中(pH 8.0);重复上述透析与离心1次;将沉淀的蛋白浓度调至5~10mg/ml,得到纯化的单克隆抗体。

[0098] 实施例3狂犬病毒抗体定量检测试剂盒(胶体金)的制备

[0099] (1)样品垫的制备

[0100] 将实施例1制备的纯化后的狂犬病毒样颗粒用20mM四硼酸钠溶液稀释成1.0mg/ml,内含2%的Tween-20,喷涂于玻璃纤维素膜上,作为样品垫。

[0101] (2) 标记垫的制备

[0102] 用0.2mol/L K_2CO_3 将25nm的胶体金溶液调节pH值为8.4后,将纯化后检验合格的狂犬病毒样颗粒单克隆抗体按照蛋白浓度为50 μ g/ml,快速搅拌下将狂犬病毒样颗粒单克隆抗体加入胶体金溶液中并继续搅拌30分钟;加入10%BSA至终浓度为1%,搅拌30分钟,以10000r/min离心30分钟,小心吸去上清液,沉淀物即为初步纯化的金标狂犬病毒样颗粒单克隆抗体结合物。金标单克隆抗体保存液为20mmol/L Tris-HCl溶液,含3%BSA、3%蔗糖、0.2%Tween-20和0.1%NaN₃。将含有沉淀物的保存液喷涂在玻璃纤维上,作为标记垫,标记垫最佳干燥方式为-50℃冷冻干燥。

[0103] (3) 硝酸纤维素膜包被

[0104] 检测线T包被的为1.0g/L的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2;质控线C包被的为1.5g/L的SPA,包被液为含3%蔗糖的PBS,pH7.2。

[0105] (4) 试纸条组装

[0106] 采用样品单向层析组装方式,在背板1上的检测样品端依次为狂犬病毒糖蛋白病毒样颗粒包被的样品垫2,吸附与狂犬病毒糖蛋白病毒样颗粒相应的金标单克隆抗体纤维垫简称标记垫3,硝酸纤维素膜4上含有用纯化的抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体溶液包被的检测线5和SPA包被的质控线6,吸水垫7。按图2顺序进行粘贴、组装。

[0107] 具体地,所述背板水平地位于试纸条的最下方,所述硝酸纤维素膜贴于背板的上表面中部,所述金标垫和吸水垫分别贴于硝酸纤维素膜的两侧,所述金标垫位于靠近检测线的一侧并将硝酸纤维素膜的边缘覆盖,所述吸水垫位于靠近质控线的一侧并将硝酸纤维素膜的边缘覆盖,所述样品垫位于金标垫的另一侧并将金标垫的边缘覆盖。

[0108] 组装后切条,如图1所示,密封,4-30℃保存。

[0109] (5) 稀释液的制备

[0110] 为含有15mmol/L硼砂,0.5%NaCl,0.2%Tween-20,0.1%NaN₃,调节pH值为8.4的水溶液。

[0111] (6) 标准品的制备

[0112] 用稀释液将阳性血清稀释成效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU的标准品。

[0113] 实施例4狂犬病毒抗体定量检测试剂盒(荧光微球)的制备

[0114] 其他步骤同实施例3,不同之处在于,步骤(2)单克隆抗体采用荧光微球标记,该荧光微球为含有稀土铕元素的荧光错配物聚苯乙烯微球,功能基团为羧基与磺酸基(羧基含量:-90 μ mol/g),折射率为1.59@589nm(25℃),密度为1.05g/cm³,平均粒径:200nm,固含量为1%(1ml悬浮液中含有10mg微球),荧光激发波长为360-365nm,发射波长为610nm。

[0115] 具体方法为:

[0116] (1) 荧光微球的活化

[0117] 先将购买的微球悬浮液(Bangs laboratories inc.,1%,0.196 μ m)用超声波清洗仪进行超声分散,并结合手工摇匀,超声时间大约为1min,使微球分散均匀;

[0118] 取100 μ l固含为1%的微球悬浮液(同上),用超纯水稀释10倍,即1000 μ l,加入到EP管中;

[0119] 称取50mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)用30%-60%的乙醇溶解,配制成浓度为

50mg/ml的溶液(A液)；

[0120] 称取50mg的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)用30%-60%的乙醇溶解,配制成浓度为50mg/ml的溶液(B液)；

[0121] 取40ul的A液加入1000ul微球悬浮液中混匀,然后接着加入40ul的B液加入微球悬浮液中混匀,常温下反应0.5小时。

[0122] 将反应后的悬浮液用超声波超声(60HZ,15-45min),使管壁上的微球重新悬浮在水溶液中,然后将微球悬浮液离心,离心条件10000r/min、20min；

[0123] 倒掉上清液,加入1ml超纯水,然后用超声波超声分散均匀,否则交联抗体后的微球会团聚,微球跑条带很差。

[0124] (2)活化的微球标记抗体

[0125] 取1ml活化后的微球悬浮液(固含为0.1%),超声分散均匀,然后边搅拌边滴加抗体,0.01mg-0.05mg/ml,最佳标记量一般为0.02mg/ml；

[0126] 加入抗体后,大约反应1-2min后,再到超声波上超声30秒左右,然后再反应1小时；

[0127] 加BSA(终浓度在0.50%)进行封闭1-2小时；

[0128] 将封闭好的微球进行离心,速度为10000r/min,15min；

[0129] 将保存液(牛血清1%,蔗糖4%,酪蛋白0.5%,0.01M硼酸缓冲液,调pH值至6.0)加入到离心后的微球中,使微球分散均匀,喷涂在玻璃纤维上,作为标记垫,标记垫最佳干燥方式为-50℃冷冻干燥。

[0130] 实施例5本发明的狂犬病毒抗体定量检测试剂盒与荧光抗体病毒中和试验(FAVN)的比较

[0131] 分别应用实施例3和实施例4制备的狂犬病病毒抗体定量检测试剂盒,用效价为0.125IU、0.25IU、0.5IU、1.0IU、2IU和4IU标准阳性血清(来自中国兽医药品监察所)经检测后,分别通过函数关系式 $y = ax^b$ (其中y代表反应值,x代表浓度,a代表截距,b代表回归系数)和函数关系式 $y = (ab + cx^d) / (b + x^d)$ (其中y代表OD值,x代表浓度,a代表曲线上渐近线估值,b代表曲线的斜率,c代表最大结合一半时对应的剂量,d代表曲线下渐近线估值)进行回归拟合和四参数拟合,确定检测标准曲线,标准曲线如图8和图9所述,标准曲线可以二维码或者u盘形式进行存储。

[0132] 采用检测血清中和抗体效价的国际标准方法——荧光抗体病毒中和试验法,以及本发明是实施例3和实施例4制备的试剂盒,同时检测犬血清样品50份、犬狂犬病毒抗体阴性血清5份、犬瘟热病毒抗体阳性血清2份、犬细小病毒抗体阳性血清2份、犬腺病毒抗体阳性血清2份和不同稀释度的犬细小病毒抗体阳性参考血清(19.2IU),检测结果见表2。

[0133] 表2本发明的试剂盒与FAVN的检测结果比较

[0134]

血清样品		FAVN 效价 (IU/ml)	试剂盒检测结果			符合率
			胶体金法 抗体效价	荧光微球法 抗体效价	免疫提示	
犬血清样 品 50 份	1	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	98% (胶 体金) /100% (荧光 微球)
	2	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	3	1.50	1.501	1.502	安全	
	4	0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	5	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	6	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	7	1.97	1.965	1.975	安全	
	8	5.92	>4	>4	安全	
	9	1.14	1.138	1.141	安全	

[0135]

10	0.17	0.169	0.181	接种疫苗
11	3.42	3.408	3.426	安全
12	2.60	2.605	2.604	安全
13	7.79	>4	>4	安全
14	0.38	0.381	0.383	接种疫苗
15	0.17	0.173	0.171	接种疫苗
16	13.50	>4	>4	安全
17	0.50	0.501	0.510	加强免疫
18	10.26	>4	>4	安全
19	0.29	0.289	0.298	接种疫苗
20	17.77	>4	>4	安全
21	7.79	>4	>4	安全
22	4.50	>4	>4	安全
23	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗
24	2.60	2.605	2.613	安全
25	0.38	0.383	0.387	接种疫苗
26	1.97	1.965	1.972	安全
27	0.29	0.291	0.285	接种疫苗
28	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗
29	0.29	0.292	0.293	接种疫苗
30	0.38	0.379	0.379	接种疫苗
31	0.50	0.495	0.505	接种疫苗
32	0.38	0.376	0.381	接种疫苗
33	23.38	>4	>4	安全
34	0.87	0.871	0.880	加强免疫
35	7.79	>4	>4	安全
36	17.77	>4	>4	安全
37	10.26	>4	>4	安全
38	0.66	0.664	0.659	加强免疫

[0136]

	39	3.42	3.421	3.423	安全	
	40	0.87	0.867	0.872	加强免疫	
	41	1.97	1.968	1.974	安全	
	42	1.14	1.137	1.143	安全	
	43	3.42	3.416	3.426	安全	
	44	7.79	>4	>4	安全	
	45	0.10	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	46	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	47	0.10	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	48	0.87	0.865	0.878	加强免疫	
	49	13.50	>4	>4	安全	
	50	7.79	>4	>4	安全	
犬狂犬病 毒抗体阴 性血清 5 份	1	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	100%
	2	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	3	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	4	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
	5	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
犬瘟热病 毒抗体阳 性血清 2 份	1	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	100%
	2	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
犬细小病 毒抗体阳 性血清 2 份	1	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	100%
	2	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
犬腺病毒 抗体阳性 血清 2 份	1	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	100%
	2	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗	
不同稀释 度的犬狂 犬病病毒	1: 2	10.26	>4	>4	安全	100%
	1: 4	4.50	>4	>4	安全	
	1: 8	2.60	2.605	2.610	安全	

[0137]

抗体阳性	1: 16	1.14	1.135	1.141	安全
参考血清	1: 32	0.66	0.658	0.661	加强免疫
(19.2IU)	1: 64	0.29	0.286	0.290	接种疫苗
	1: 128	0.13	0.129	0.131	接种疫苗
	1: 256	0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗
	1: 512	<0.06	<0.125	<0.125	接种疫苗

[0138] 本发明的试剂盒,使用抗狂犬病病毒G蛋白的单克隆抗体与血液中的中和抗体进行竞争抗原,配合胶体金读条设备或荧光检测仪器,根据标准曲线可直接显示出血样中的真实抗体数值,提高检测的准确性和灵敏度。与国际标准方法的检测结果的符合性高度一致,而且安全性更高,实用性更好。同时昆虫细胞培养时采用的为无血清培养基,去除了牛血清的干扰,避免假阳性的发生,特异性好。而且病毒样颗粒采用的标记抗原为昆虫细胞表达的狂犬病病毒样颗粒,仅由G蛋白和M蛋白装配而成,没有核酸成分,消除了采用全病毒作为标记抗原而产生的生物安全性隐患。

[0139] 以上只通过说明的方式描述了本发明的某些示范性实施例,毋庸置疑,对于本领域的普通技术人员,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以用各种不同的方式对所描述的实施例进行修正。因此,上述描述在本质上是说明性的,不应理解为对本发明权利要求保护范围的限制。

序列表

<110>	长春西诺生物科技有限公司	
<120>	一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法和检测方法	
<160>	8	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	1575	
<212>	DNA	
<213>	Rabies virus	
<400>	1	
	atgattcctc aagctctgtt gtttgtacct cttctggttt ttccattgtg tttcgggaaa	60
	ttccccattht acacgatacc agacaaaactc ggccccctgga gtcccatcga tatacatcac	120
	ctcagctgtc cgaacaatct ggttgtggag gacgaaggat gtaccaatct gtcaggattc	180
	tcatacatgg agcttaaagt aggatatatt tcggccataa aggtgaacgg gttcacttgt	240
	acgggtgtgg taacggaagc agaaacctac actaactttg tcggttatgt caccaccacg	300
	tttaagagaa agcacttccg accaacaccg gatgcatgca gatcagcata caattggaag	360
	atggcagggtg accccagata tgaagagtct ctgcacaatc cctatcctga ttatcattgg	420
	ctccggactg taaaaaccac caaagagtct gttgttatca tatctccaag tgtggcagac	480
	ttagaccgt acgataaatc acttcattcg agagtttttc ctagaggaaa atgctcagga	540
	ataacggtgt cttctgccta ctgctctacc aaccatgatt ataccatctg gatgcctgaa	600
	aatcctagac tggggacctc ttgtgatatt ttaccaaca gcagaggga gagagcatcc	660
	aaagggagca agacctgtgg atttgtggat gagagaggct tgtacaaatc tctaaaagga	720
	gcatgcaaac tgaagctgtg tggagttctt ggacttaggc ttatggacgg aacctgggtc	780
	gcgattcaga catcaaacga gaccaagtgg tgccctctg atcaactagt gaatctacat	840
	gactttcatt cagatgagat tgaacatctt gttgtggagg agttggttaa gaagaggag	900
	gagtgtctag atgcactgga gtccatcatg accaccaagt ccgtgagttt cagacgtctc	960
	agtcacttga ggaagcttgt gcctggattt ggaaaagcat acaccatatt caacaagacc	1020
	ttaatggagg ctgatgctca ctacaaatcg gtccgaactt ggaatgagat catcccctcg	1080
	aaaggggtgtt taagagtcgg ggggagatgt catcctcatg tgaacggagt atttttcaat	1140
	ggtatcatcc taggcctga cggccatgtc ttaatcccg aatgcagtc atccctctc	1200
	cagcagcata tggagttgtt ggaatcctcg gtcateccct taatgcatcc cttggcagat	1260
	ccatcaacgg tttttaaaga tgggtgacgag gtggaggatt ttgttgaggt tcaccttcca	1320
	gatgtgcata agcaggctctc aggggttgat ctcggtctcc caaactgggg gaaggatgtg	1380
	ttgatggcg caggcgtttt gacggcaactg atgttgatga ttttctaat gacgtgttgc	1440
	cgaaggacta atagagcaga atcaatacaa cacagtcttg gagagacagg gaggaaagtg	1500
	tcggtgacct cccaaagcgg gagggtcata tcttcatggg agtcatataa aagcggaggt	1560
	gagaccaagc tgtaa	1575
<210>	2	

<211>	609	
<212>	DNA	
<213>	Rabies virus	
<400>	2	
	atgaactttc tacgcaagat agtgaaaaac tgtagggatg aggacacca gaagccccc	60
	cctgtatcgg ctccaccaga tgatgatgac ttgtggctgc cccctcctga atatgtccc	120
	ctgaaagaac tcacgggcaa gaagaacatg aggaacttct gcatcaatgg tgaggtaag	180
	gtgtgcagtc caaacggcta ttcattcagg atcttacggc atattctaag atcatttgat	240
	gagatatatt ctggaaatca cagaatgatt ggattagtc aggtagtc tgggcttgct	300
	ttatcagggg ctccggctcc tgagggcatg aactgggtgt acaaattgag gagaactctt	360
	atcttccaat gggetgattc tagaggtccc ctcgaggggg aggagttaga gtactctcaa	420
	gagatcacct gggatgacga tactgagttt gtcggattgc agataagagt gaggcaaga	480
	caatgtcata tccaggtag ggtatgggtg atcaaatga attctagaac atgtcaacta	540
	tggtctgaca tgtctcttca gacacaaagg tcggaggagg acaaggactc ttccctgctc	600
	ctagaatag	609
<210>	3	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Rabies virus	
<400>	3	
	cccgaattca tgattcctca agctctgttg ttg	34
<210>	4	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Rabies virus	
<400>	4	
	tttctgcagt tacagcttgg tctcacctcc g	31
<210>	5	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Rabies virus	
<400>	5	
	cccctcgaga tgaactttct acgcaagata gtga	34
<210>	6	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Rabies virus	
<400>	6	
	cccgtaccc tattctagga gcagggaaga gtc	33

<210> 7
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Rabies virus
 <400> 7
 Met Ile Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
 1 5 10 15
 Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro
 20 25 30
 Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val
 35 40 45
 Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Tyr Met Glu
 50 55 60
 Leu Lys Val Gly Tyr Ile Ser Ala Ile Lys Val Asn Gly Phe Thr Cys
 65 70 75 80
 Thr Gly Val Val Lys Glu Ala Glu Thr Tyr Thr Asn Phe Val Gly Tyr
 85 90 95
 Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro Asp Ala
 100 105 110
 Cys Arg Ser Ala Tyr Asn Trp Thr Met Ala Gly Asp Pro Arg Tyr Glu
 115 120 125
 Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr His Trp Leu Arg Asn Val
 130 135 140
 Lys Thr Thr Lys Glu Ser Val Val Ile Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp
 145 150 155 160
 Leu Asp Pro Tyr Asp Lys Ser Leu His Ser Arg Val Phe Pro Arg Gly
 165 170 175
 Lys Cys Ser Gly Ile Thr Val Ser Ser Ala Tyr Cys Ser Thr Asn His
 180 185 190
 Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg Leu Gly Thr Ser Trp
 195 200 205
 Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Lys Gly Ser Lys
 210 215 220
 Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr Lys Ser Leu Lys Gly
 225 230 235 240
 Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly Leu Arg Leu Met Asp
 245 250 255
 Gly Thr Trp Val Ala Ile Gln Thr Ser Asn Glu Thr Lys Trp Cys Pro
 260 265 270

Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe His Pro Asp Glu Ile Glu
 275 280 285
 His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Lys Lys Arg Glu Glu Cys Leu Asp
 290 295 300
 Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val Ser Phe Arg Arg Pro
 305 310 315 320
 Arg His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly Lys Ala Tyr Thr Ile
 325 330 335
 Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser Val Arg
 340 345 350
 Thr Trp Asn Glu Ile Ile Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val Gly Gly
 355 360 365
 Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe Asn Gly Ile Ile Ile
 370 375 380
 Gly Pro Asp Gly His Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser Leu Leu
 385 390 395 400
 Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val Ile Pro Leu Met His
 405 410 415
 Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Asn Asp Gly Asp Glu Val Glu
 420 425 430
 Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His Lys Gln Val Ser Gly
 435 440 445
 Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Asp Val Leu Met Gly Ala
 450 455 460
 Gly Val Phe Thr Ala Leu Met Leu Met Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys
 465 470 475 480
 Arg Arg Thr Asn Arg Ala Glu Ser Ile Gln His Ser Leu Gly Glu Thr
 485 490 495
 Gly Arg Lys Val Ser Val Thr Ser Lys Ser Gly Arg Val Ile Ser Ser
 500 505 510
 Trp Glu Ser Tyr Lys Ser Gly Gly Glu Thr Lys Leu
 515 520
 <210> 8
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Rabies virus
 <400> 8
 Met Asn Phe Leu Arg Lys Ile Val Lys Asn Cys Arg Asp Glu Asp Thr
 1 5 10 15

Gln Lys Pro Pro Pro Val Ser Ala Pro Pro Asp Asp Asp Asp Leu Cys
 20 25 30
 Leu Pro Pro Pro Glu Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Thr Gly Asn Lys
 35 40 45
 Asn Met Arg Asn Phe Cys Ile Asn Gly Glu Val Lys Val Cys Ser Pro
 50 55 60
 Lys Gly Tyr Ser Phe Arg Ile Leu Arg His Ile Leu Arg Ser Phe Asp
 65 70 75 80
 Glu Ile Tyr Ser Gly Asn His Ser Met Ile Gly Leu Val Lys Val Val
 85 90 95
 Ile Gly Leu Ala Leu Ser Gly Ala Pro Val Pro Glu Gly Met Asn Trp
 100 105 110
 Val Tyr Lys Phe Arg Arg Thr Leu Ile Phe Gln Trp Ala Asp Ser Arg
 115 120 125
 Gly Pro Leu Asp Gly Glu Glu Leu Glu Tyr Ser Gln Glu Ile Thr Trp
 130 135 140
 Asp Asp Asp Thr Glu Leu Val Gly Leu Gln Ile Arg Val Ser Ala Arg
 145 150 155 160
 Gln Cys His Ile Gln Gly Arg Val Trp Cys Ile Lys Met Asn Ser Arg
 165 170 175
 Thr Cys Gln Leu Trp Ser Asp Met Ser Leu Pro Thr Gln Arg Ser Glu
 180 185 190
 Glu Asp Lys Asp Ser Ser Leu Leu Leu Glu
 195 200

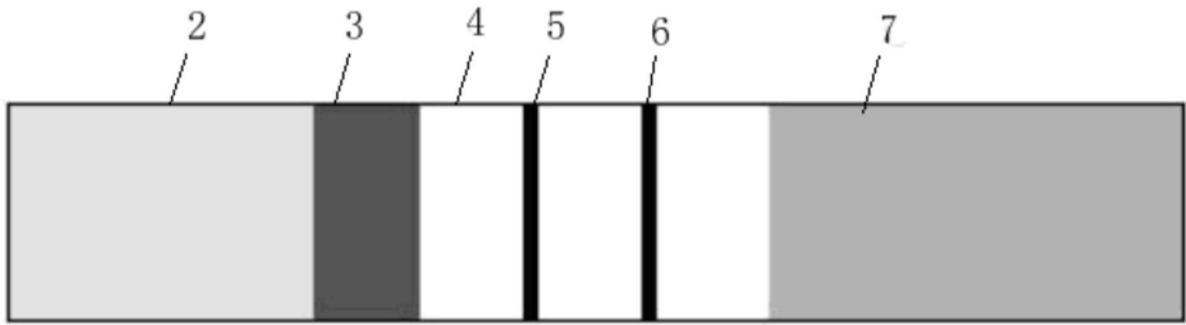


图1

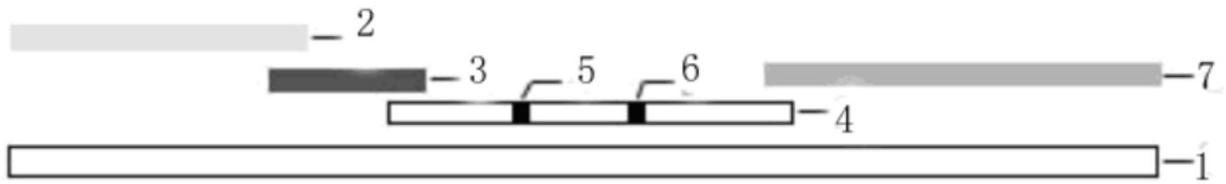


图2

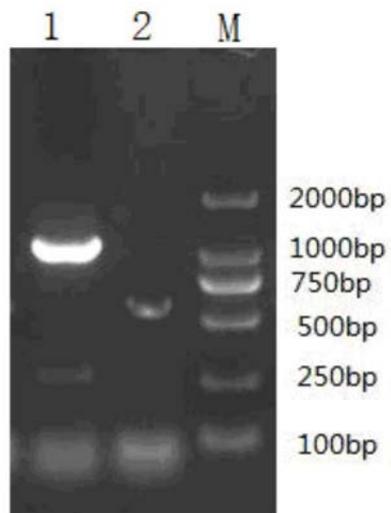


图3

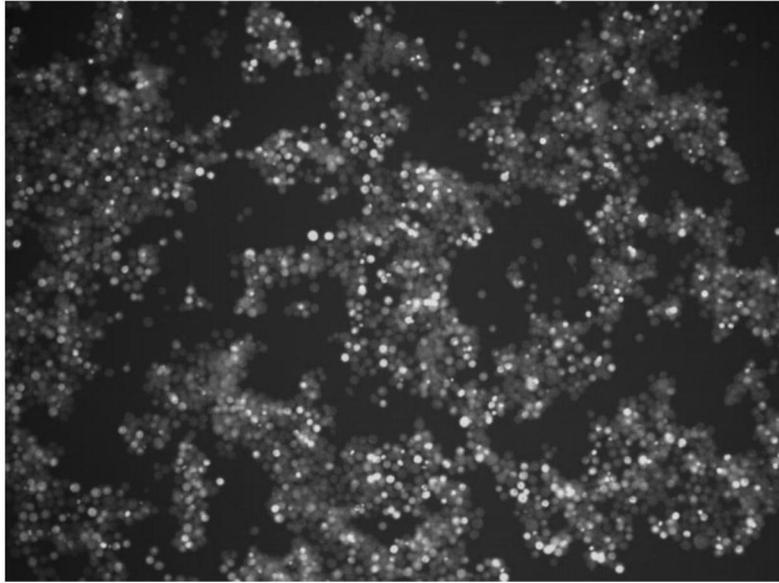


图4

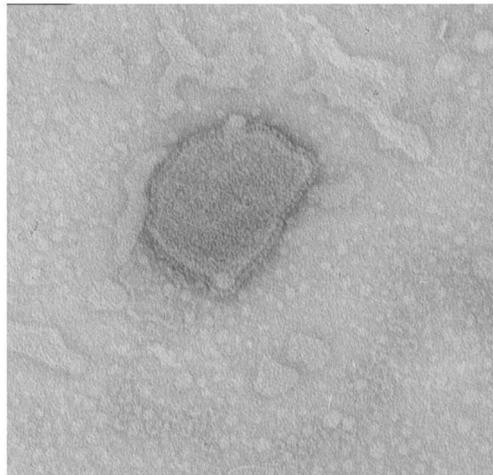


图5

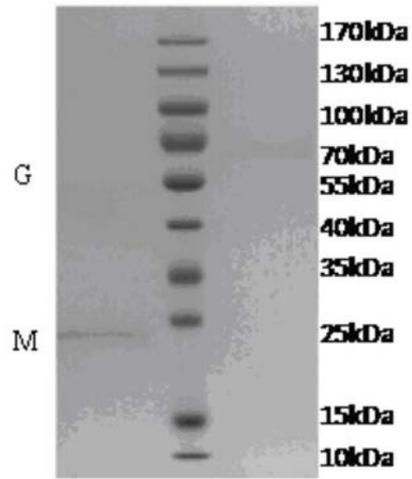


图6

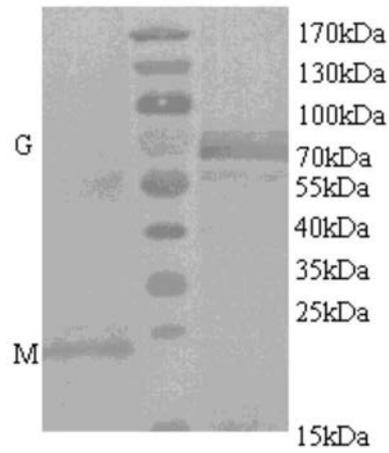


图7

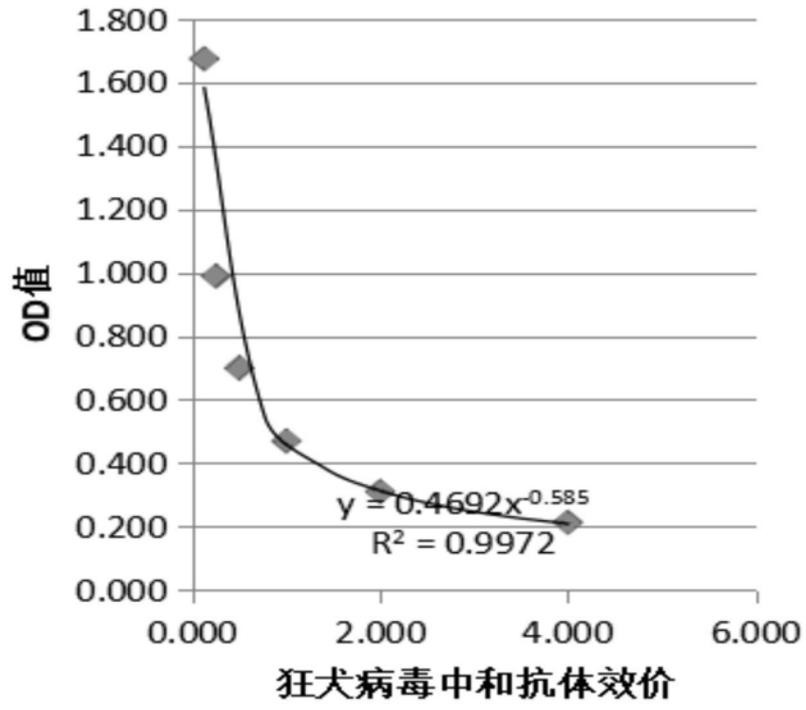


图8

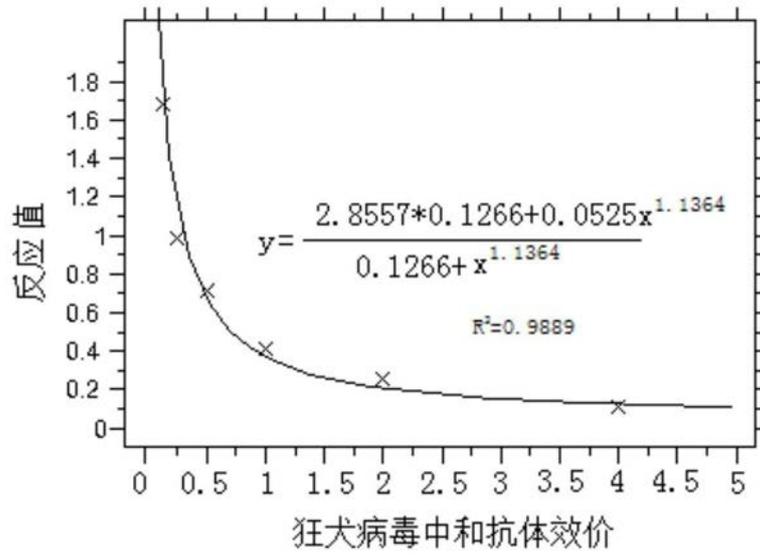


图9

专利名称(译)	一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法		
公开(公告)号	CN110007080A	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201910291423.6	申请日	2019-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	长春西诺生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	长春西诺生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	长春西诺生物科技有限公司		
[标]发明人	刘伟 石晶 殷玉和 夏振强 王慧慧 崔玉梅 丁秋雨 赵玉环 刘洪运 王倩		
发明人	刘伟 石晶 殷玉和 夏振强 王慧慧 崔玉梅 丁秋雨 赵玉环 刘洪运 王倩		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/6854 G01N2333/145		
代理人(译)	刘微		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种狂犬病毒抗体定量检测试剂盒及其制备方法与检测方法，属于抗体检测试剂盒技术领域，解决现有技术抗体检测准确度不够高，存在安全隐患的问题。本发明的试剂盒包括免疫层析检测试纸条和样品稀释液，免疫层析检测试纸条由一端至另一端依次包括：包被狂犬病毒抗原的样品垫、包被抗狂犬病毒抗原的单克隆抗体的标记垫、包被检测线和质控线的硝酸纤维素膜、以及吸水垫，其彼此相互重叠并贴于背板的上表面。本发明采用竞争法检测血中狂犬病毒抗体，同时配合读条设备，根据标准曲线可直接显示出血样中的真实抗体数值，提高检测的准确性和灵敏度。

