



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646614 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201910636369.4

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.07.15

(71)申请人 新乡学院

地址 453003 河南省新乡市金穗大道东段
191号

(72)发明人 王选年 朱艳平 申一兰 岳锋
何勇 刘佳 李鹏 孙国鹏
张艳芳

(74)专利代理机构 北京中建联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11004

代理人 王灵灵 唐晓丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

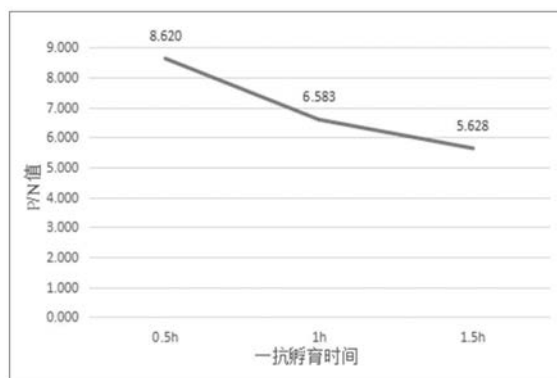
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

IBDV抗体的ELISA试剂盒和测试方法、有效
抗体效价确定方法

(57)摘要

IBDV抗体的ELISA试剂盒和测试方法、有效
抗体效价确定方法,ELISA试剂盒包括,1)包被
IBDV抗原的酶标板;2)1:3000稀释的HRP标记的
羊抗鸡Ig Y;其中,所述包被IBDV抗原的酶标板,
通过IBDV抗原浓度稀释到10ng/孔后,包被上述
稀释液到反应板相应孔后制作而成,IBDV抗原为
由杆状病毒表达系统制备的rVP2蛋白,检测结果
是依据ELISA检测方法的S/P值进行判定。依据
ELISA检测方法的S/P值检测结果是阳性时,检测
结果是阳性时,说明有效抗体水平高,能够中和
IBDV,不需要重新免疫疫苗;检测结果S/P值阴性
时,说明抗体水平较低不具有保护力,容易感染
病毒,需要重新进行疫苗的免疫。因此,本发明建
立的ELISA试剂盒抗体阳性检出率高,并且能够
指导生产上疫苗的免疫,减少经济损失。



1. 一种IBDV抗体的ELISA测试盒,其特征在于:包括,1)包被IBDV抗原的酶标板;2)1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y;其中,所述包被IBDV抗原的酶标板通过IBDV抗原浓度稀释到10ng/孔,包被到反应板制作而成。

2. 如权利要求1所述的一种IBDV抗体的ELISA测试盒,其特征在于:所述IBDV抗原为由杆状病毒表达系统制备的rVP2蛋白。

3. 如权利要求1所述的一种IBDV抗体的ELISA测试盒,其特征在于:还包括以下试剂:标准阳性血清、标准阴性血清、包被液、洗涤液、封闭液、洗涤液、显色液和终止液,所述包被液由1.465 g NaHCO_3 和0.975 g Na_2CO_3 溶于超纯水中,调pH为9.6定容至500mL制备而成,所述洗涤液为 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBST溶液;所述洗涤液和终止液均由2.5 g脱脂奶粉加入PBST中混匀,定容至50 mL制备而成;所述终止液由11 mL浓硫酸缓慢滴入69 mL超纯水中制备而成。

4. 如权利要求4所述的一种IBDV抗体的ELISA测试盒,其特征在于:所述显色液为TMB单组分显色液。

5. 一种IBDV抗体的ELISA测试方法,其特征在于:包括以下步骤,

S1. 包被抗原:取 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的IBDV抗原稀释液到反应板酶标孔中,每孔50~100 μL ,4℃过夜包被,上层为液体,包被抗原吸附在酶标板上,使用时37℃回温1 h;

S2. 弃包被液:用洗涤液冲洗反应板先洗三次洗去表面包被液,再洗3次,后洗时每次5 min,每孔加入100~200 μL 封闭液,置于37℃培养箱,孵育1 h;

S3. 弃封闭液:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5 min,将稀释过的待测标准阴性、阳性血清加入到相应孔中,每孔50~100 μL ,置于37℃培养箱,孵育0.5 h;

S4. 弃一抗:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5 min,每孔加入50 μL 按照1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y,37℃孵育1 h;

S5. 弃二抗:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5 min,每孔加入80~100 μL 的TMB单组份显色液,37℃避光显色时为15min后加入50 μL 的终止液,利用酶标仪测定 OD_{450} 值;

S6. 临界值确定:利用上述方法检测待测阴性血清样品,每个样品两个重复,并设立阳性对照,当样品 $\text{OD}_{450} \leq 0.4$ 时样品为阴性,当样品 $\text{OD}_{450} \geq 0.487$ 时样品为阳性。

6. 如权利要求1所述的一种IBDV抗体的ELISA测试方法,其特征在于:所述步骤S3中待测标准阴性、阳性血清的稀释比均为1:400。

7. 基于ELISA测试方法的IBDV有效抗体效价的测定方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 准备待测样品:取至少10份制备的IBDV阳性血清,每份鸡IBDV阳性血清预先用PBS稀释至AGP效价为1:1;

2) 稀释待测样品:将稀释好的血清以1:400为基础倍比稀释至1:6400,设置阴性、阳性血清对照;

3) 测试:按照所述ELISA测试方法读取稀释后样品的最大稀释度阳性孔的 OD_{450} 值,按照 $S/P = (\text{样品值} - \text{阴性对照值}) / (\text{阳性对照值} - \text{阴性对照值})$,其中S为样品的 OD_{450} 值,P为标准的 OD_{450} 值,当S/P值 ≥ 0.22 且待测样品稀释度大于1:400时判断样品为阳性,该待测样品具有抗IBDV的有效抗体;反之,判断该待测样品为阴性,不具有抗IBDV的有效抗体。

8. 基于ELISA测试方法的母源抗体消长曲线绘制方法,其特征在于:取1 d、6 d、9 d、17 d、25 d、27 d、30 d抽取的鸡血清,各个日龄的血清分别按照1:400和1:800进行稀释后按照

建立的ELISA检测方法进行检测,根据测试结果绘制母源抗体消长曲线。

9.如权利要求书8所述的母源抗体消长曲线在免疫评价中的应用。

IBDV抗体的ELISA试剂盒和测试方法、有效抗体效价确定方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体属于IBDV抗体的ELISA测试盒和测试方法、有效抗体效价确定方法。

背景技术

[0002] IBDV给家禽养殖造成严重经济损失。VP2蛋白是IBDV的主要抗原蛋白,是IBDV分子机制研究和兽药研究的主要靶点,同时也是IBDV的病毒和抗体检测的重要指标之一。免疫学诊断技术被广泛用于IBDV的研究、调查和疫苗免疫效果评估。目前国内IBDV检测相关产品,包括IBDV胶体金抗原检测试纸条、IBDV抗体ELISA检测试剂盒等。胶体金检测试纸条只能用于病毒的检测,不能用于免疫评价。IDEXX抗体检测试剂盒依赖于进口,价格太过昂贵,并且产品不可拆开多次使用,造成使用的不便。此外,在前期研究中,曾尝试采用毕赤酵母表达系统和大肠杆菌表达系统表达IBDV VP2基因,但获得的重组蛋白生物学活性差,不能满足试剂盒的研究需求。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供IBDV抗体的ELISA试剂盒和测试方法、有效抗体效价确定方法,要解决现有技术测试方法复杂、且价昂贵的技术问题;并解决现有技术不能用于免疫评价的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 一种IBDV抗体的ELISA测试盒,其特征在于:包括,1) 包被IBDV抗原的酶标板; 2) 1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y;其中,所述包被IBDV抗原的酶标板通过IBDV 抗原浓度稀释到8个浓度梯度后,包被上述稀释液到反应板相应孔后制作而成。

[0006] 进一步优选地,所述IBDV抗原为由杆状病毒表达系统制备的rVP2蛋白。

[0007] 进一步地,所述包被抗原量是10ng/孔。

[0008] 进一步地,还包括以下试剂:标准阳性血清、标准阴性血清、包被液、洗涤液、封闭液、洗涤液、显色液和终止液,所述包被液由1.465g NaHCO_3 和0.975g Na_2CO_3 溶于超纯水中,调pH为9.6定容至500mL制备而成,所述洗涤液为0.01mol \cdot L⁻¹PBST溶液;所述洗涤液和终止液均由2.5g脱脂奶粉加入PBST中混匀,定容至50mL制备而成;所述终止液由11mL 浓硫酸缓慢滴入69mL超纯水中制备而成。

[0009] 更加优选地,所述显色液为TMB单组分显色液。

[0010] 一种IBDV抗体的ELISA测试方法,其特征在于:包括以下步骤,

[0011] S1、包被抗原:取0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的IBDV抗原稀释液到反应板酶标孔中,每孔50~100 μL , 4℃过夜包被,上层为液体,包被抗原吸附在酶标板上,使用时37℃回温1h;

[0012] S2、弃包被液:用洗涤液冲洗反应板先洗三次洗去表面包被液,再洗3次,后洗时每次5min,每孔加入100~200 μL 封闭液,置于37℃培养箱,孵育1h;

[0013] S3、弃封闭液:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5min,将稀释过的待

测标准阴性、阳性血清加入到相应孔中,每孔50~100 μ L,置于37℃培养箱,孵育0.5h;

[0014] S4、弃一抗:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5min,每孔加入50~100 μ L 按照1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y,37℃孵育1h;

[0015] S5、弃二抗:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5min,每孔加入80~100 μ L的TMB单组份显色液,37℃避光显色时为15min后加入50~100 μ L的终止液,利用酶标仪测定OD₄₅₀值;

[0016] S6、临界值确定:利用上述方法检测待测阴性血清样品,每个样品两个重复,并设立阳性对照,当样品OD₄₅₀≤0.4时样品为阴性,当样品OD₄₅₀≥0.487时样品为阳性。

[0017] 进一步优选地,所述步骤S3中待测标准阴性、阳性血清的稀释比均为1:400。

[0018] 基于ELISA测试方法的IBDV有效抗体效价的测定方法,其特征在于:包括以下步骤:

[0019] 1) 准备待测样品:取至少10份制备的IBDV阳性血清,每份鸡IBDV阳性血清预先用PBS稀释至AGP效价为1:1;

[0020] 2) 稀释待测样品:将稀释好的血清以1:400为基础倍比稀释至1:6400,设置阴性、阳性血清对照;

[0021] 3) 测试:按照所述ELISA测试方法读取稀释后样品的最大稀释度阳性孔的OD₄₅₀值,按照 $S/P = (\text{待测样品值} - \text{阴性对照值}) / (\text{阳性对照值} - \text{阴性对照值})$,其中S为待测样品的OD₄₅₀值,P为标准的OD₄₅₀值,当S/P值≥0.22且待测样品稀释度大于1:400时判断样品为阳性,该待测样品具有抗IBDV的有效抗体;反之,判断该待测样品为阴性,不具有抗IBDV的有效抗体。

[0022] 基于ELISA测试方法的母源抗体消长曲线绘制方法,其特征在于:取1d、6d、9d、17d、25d、27d和30d抽取的鸡血清,各个日龄的血清分别按照1:400和1:800进行稀释后按照建立的ELISA检测方法进行检测,根据测试结果绘制母源抗体消长曲线绘制方法,母源抗体消长曲线在免疫评价中的应用。

[0023] 与现有技术相比本发明具有以下特点和有益效果:

[0024] 本发明基于rVP2重组蛋白成功建立了IBDV VP2抗体的ELISA检测方法,并基于建立的ELISA检测方法确立了有效抗体水平的检测临界值,并绘制母源抗体消长曲线,为免疫评价、免疫检测提供了数据基础。

附图说明

[0025] 图1为最佳待检血清孵育时间的优化图示;

[0026] 图2为最佳二抗稀释比的优化图示;

[0027] 图3为最佳二抗孵育时间的的优化图示;

[0028] 图4最佳封闭时间的优化图示;

[0029] 图5母源抗体水平检测结果回归曲线图。

具体实施方式

[0030] 为使本发明实现的技术手段、创新特征、达成目的与功效易于明白了解,下面对本发明进一步说明。

[0031] 在此记载的实施例为本发明的特定的具体实施方式,用于说明本发明的构思,均是解释性和示例性的,不应解释为对本发明实施方式及本发明范围的限制。除在此记载的实施例外,本领域技术人员还能够基于本申请权利要求书和说明书所公开的内容采用显而易见的其它技术方案,这些技术方案包括采用对在此记载的实施例的做出任何显而易见的替换和修改的技术方案。

[0032] 一种IBDV抗体的ELISA测试盒,其特征在于:包括,1)包被IBDV抗原的酶标板;2)1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y;其中,所述包被IBDV抗原的酶标板通过IBDV 抗原浓度稀释到10ng/孔后,包被上述稀释液到反应板相应孔后制作而成;IBDV抗原为由杆状病毒表达系统制备的rVP2蛋白;包被浓度为10ng/孔。还包括以下试剂:标准阳性血清、标准阴性血清、包被液、洗涤液、封闭液、洗涤液、显色液和终止液,所述包被液由 1.465g NaHCO_3 和0.975g Na_2CO_3 溶于超纯水中,调pH为9.6定容至500mL制备而成,所述洗涤液为0.01mol \cdot L⁻¹PBST溶液;所述洗涤液和终止液均由2.5g脱脂奶粉加入PBST中混匀,定容至50mL制备而成;所述终止液由11mL浓硫酸缓慢滴入69mL超纯水中制备而成,显色液为TMB单组分显色液。

[0033] 一种IBDV抗体的ELISA测试方法,其特征在于:包括以下步骤,

[0034] S1、包被抗原:取0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的IBDV抗原稀释液到反应板酶标孔中,每孔50~100 μL ,4℃过夜包被,上层为液体,包被抗原吸附在酶标板上,使用时37℃回温1h;

[0035] S2、弃包被液:用洗涤液冲洗反应板先洗三次洗去表面包被液,再洗3次,后洗时每次5min,每孔加入100~200 μL 封闭液,置于37℃培养箱,孵育1h(封闭时间);

[0036] S3、弃封闭液:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5min,将稀释过的待测标准阴性、阳性血清加入到相应孔中,每孔50~100 μL ,置于37℃培养箱,孵育0.5h;待测标准阴性、阳性血清的稀释比均为1:400。

[0037] S4、弃一抗:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5min,每孔加入50 μL 按照1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y,37℃孵育1h;

[0038] S5、弃二抗:用洗涤液冲洗反应板冲三次,洗三次,洗时每次5min,每孔加入80~100 μL 的TMB单组份显色液,37℃避光显色时为15min后加入50 μL 的终止液,利用酶标仪测定OD450值;

[0039] S6、临界值确定:利用上述方法检测待测阴性血清样品,每个样品两个重复,并设立阳性对照,当样品OD₄₅₀≤0.4时样品为阴性,当样品OD₄₅₀≥0.487时样品为阳性。

[0040] 本发明涉及的IBDV标准阳性血清和阴性血清的制备方法如下:

[0041] 取刚出壳雏鸡至干净无病菌培养间饲养。在14d和28d时用IBDV S706株疫苗对IBDV 抗体阴性的雏鸡进行滴眼感染免疫,第二次免疫后14d用IBDV-NB株毒加强免疫,加强免疫后14d静脉采血进行琼扩检验。效价合格后心脏采血,分离血清。

[0042] 取刚出壳雏鸡至另一干净无病菌培养间饲养至56d,期间多次采集静脉血利用IDEXX 试剂盒对收集血清进行检测,检测结果合格后心脏采血,收集的血清为阴性血清。

[0043] IBDV标准阳性血清的鉴定:抗体效价测定:取制备好的琼脂板,打1个梅花孔。用注射器针头将孔内的琼脂挑出,酒精灼烧平板底部封底。将样品用PBS溶液按照原液、1:2、1:4、1:8、1:16和1:32进行梯度稀释,分别依次加入边缘孔中并做好标记。中间孔加入IBDV NB株病毒抗原。37℃培养48h,期间注意保持饱和水状态使琼脂板保持湿润,观察结果,以IBDV

NB株病毒为抗原的琼脂扩散结果显示,仅有一条沉淀线出现,说明制备的IBDV阳性血清具有良好的反应性且成分单一。AGP效价显示为1:32,表明制备的IBDV阳性血清抗体浓度较高。

[0044] 标准阴性血清的鉴定:取饲养至56d收集的鸡血清,根据IDEXX IBDV抗体检测试剂盒的说明进行操作,检测鸡血清是否为阴性。根据IDEXX IBDV抗体检测试剂盒的判断方法($S/P \leq 0.20$ 为阴性)对30份阴性血清进行检测。结果如表1所示,制备的阴性血清IBDV 抗体检测结果均为阴性,表明制备的阴性血清不含有IBDV抗体是可以用于试剂盒的标准阴性血清。

[0045] 表1阴性血清检测结果

	阴性血清	测定值	S/P	阴性血清	测定值	S/P
[0046]	1	0.055	0.038	16	0.054	0.030
	2	0.049	-0.007	17	0.072	0.169
	3	0.053	0.023	18	0.069	0.146
	4	0.064	0.108	19	0.062	0.092
	5	0.070	0.154	20	0.053	0.023
	6	0.049	-0.007	21	0.052	0.015
	7	0.065	0.115	22	0.068	0.138
	8	0.062	0.092	23	0.049	-0.007
	9	0.062	0.092	24	0.067	0.131
	10	0.054	0.030	25	0.050	0
	11	0.049	-0.007	26	0.060	0.077
	12	0.065	0.115	27	0.047	-0.023
	13	0.067	0.131	28	0.045	-0.0386
	14	0.056	0.046	29	0.071	0.162
	15	0.056	0.046	30	0.056	0.046
	阴性对照	0.052	0.048	阴性对照平均值		0.050
	阳性对照	0.166	0.193	阳性对照平均值		0.1795

[0047] ELISA反应条件的优化方式如下:

[0048] ELISA实验每一步骤都会影响试验结果,因此本研究在建立过程中对抗原包被浓度、封闭时间、待测血清稀释度和孵育时间、二抗稀释度和孵育时间进行了优化。第一,考虑到昆虫表达系统表达的rVP2蛋白反应性较好,因此尝试了较低浓度的抗原包板浓度。为了使抗原和酶标板结合更加充分,采取了4℃包被过夜和37℃平衡1h后使用,既保证了抗原和酶标板的充分结合,也避免低温对抗原活性的影响从而减少实验误差。第二,封闭液的作用是防止假阳性的产生,防止ELISA实验中干扰物质的再吸附。选用5%的脱脂奶粉,因为其成本低且与实验蛋白无关,不会对抗原和抗体产生影响。选择直至所有条件优化完毕后,最后优化封闭时间是考虑到若封闭不完全,会造成后续实验误差,不利于后续条件的优化。因此,选择最后优化封闭时间。第三,优化待检血清的稀释度,一方面是为了降低背景反应,另一方面是为了能够节约血清。第四,优化二抗稀释比,一方面是为了防止二抗与血清中其他物质结合造成假阳性,另一方面是为了节约使用二抗。第五,优化待检血清孵育时间和二抗孵育时间则是处于对实验时间的控制。若孵育时间太长,ELISA检测的时间优势则不能体现

出来。第六,选择TMB显色液作为底物显色液,是因为其无致癌性、使用方便且敏感性较高。因此,处于安全性和试剂本身特点考虑,选择TMB单组分显色液作为辣根过氧化物酶二抗的显色剂。

[0049] (1) 最佳抗原包被浓度和最佳待检血清稀释比的优化结果

[0050] 棋盘法对抗原浓度和待检血清的稀释比进行探索,计算每组P/N值。以 $P/N \geq 2.1$ 为界限,以P/N值尽可能大且阳性血清的OD450尽可能大于2.0,阴性血清的OD450小于0.3为标准选取适合的抗原包被浓度和待检血清稀释比。结果如表2所示, $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为最佳抗原包被浓度、1:400为最佳待检血清稀释比。

[0051] 表2最佳抗原包被浓度和最佳待检血清稀释比的优化

清稀释度	抗原包被浓度 (μg·mL ⁻¹)								
		0.4	0.3	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.0125
1:50	+	2.542	2.179	2.316	38	2.755	2.045	2.125	1.084
	-	1.484	1.537	1.229	1.669	85	1.231	1.236	1.286
	P/N	1.713	1.418	1.884	1.461	1.855	1.661	1.719	0.843
1:100	+	2.251	2.392	2.337	2.276	2.676	2.036	1.643	1.081
	-	1.266	1.231	0.894	0.953	0.940	0.891	0.939	0.839
	P/N	1.778	1.943	2.614	2.388	2.847	2.285	1.750	1.288
1:200	+	2.518	2.464	2.235	2.196	2.571	1.872	1.460	0.865
	-	0.796	0.680	0.492	0.630	0.611	0.546	0.453	0.508
	P/N	3.163	3.624	4.543	3.864	4.208	3.429	3.223	1.703
1:300	+	2.487	2.321	2.350	2.238	2.493	1.900	1.136	0.831
	-	0.559	0.573	0.404	0.451	0.413	0.553	0.331	0.374
	P/N	4.449	4.051	5.817	4.962	6.036	3.436	3.432	2.222
1:400	+	2.440	2.395	2.199	2.313	2.504	2.046	1.050	0.692
	-	0.842	0.635	0.259	0.426	0.512	0.572	0.305	0.382
	P/N	2.897	3.771	8.490	5.429	4.891	3.577	3.443	1.812
1:500	+	2.361	2.357	2.253	2.287	2.304	2.132	0.891	0.687
	-	0.579	0.355	0.639	0.416	0.256	0.311	0.228	0.261
	P/N	4.077	6.639	3.526	5.498	6.857	6.855	3.907	2.632

[0053] (2) 最佳待检血清孵育时间的优化结果

[0054] $50 \mu\text{L}$ 、 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原进行包板过夜,封闭3h。1:400稀释IBDV阳性血清和阴性鸡血清,37℃分别孵育0.5h、1h和1.5h。1:1000稀释二抗,孵育2h。计算每组P/N值。以 $P/N \geq 2.1$ 为有效数据,以P/N值尽可能大为标准选取最佳一抗孵育时间。结果如表3和图 1所示,最佳待检血清孵育时间为0.5h。

[0055] 表3待检血清孵育时间的优化

	时间	重复				P/N
		+	-	+	-	
[0056]	0.5 h	2.475	0.333	2.305	0.235	8.620
	1.0 h	2.316	0.365	2.285	0.335	6.583
	1.5 h	2.393	0.453	2.330	0.390	5.628

[0057] (3) 最佳二抗稀释比的探索

[0058] 50 μ L、0.2 μ g \cdot mL⁻¹的抗原进行过夜包板,封闭3h。1:400稀释IBDV阳性血清和阴性血清,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h。二抗稀释度设置为1:1000、1:2000、1:3000、1:4000和1:5000,37 $^{\circ}$ C孵育2h。计算每组P/N值,P/N值最大时的二抗稀释为最佳二抗稀释比。结果如表4和图 2所示,最佳二抗稀释比为1:3000。

[0059] 表4最佳二抗稀释比的优化

	重复	稀释比				
		1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
[0060]	+	2.633	2.359	2.368	2.399	2.184
	-	0.377	0.286	0.212	0.258	0.220
	+	2.428	2.434	2.189	2.475	2.122
	-	0.304	0.256	0.268	0.293	0.268
	P/N	7.432	8.843	9.494	8.845	8.823

[0061] (4) 二抗最佳孵育时间的探索

[0062] 50 μ L、0.2 μ g \cdot mL⁻¹的抗原进行过夜包板,封闭3h。1:400稀释IBDV阳性血清和阴性血清,1:3000稀释二抗,37 $^{\circ}$ C分别孵育0.5h、1h和1.5h。计算各组P/N值,当P/N值最大时二抗孵育时间即为最佳二抗孵育时间。结果如表5和图3所示,最佳二抗孵育时间为1 h。

[0063] 表5最佳二抗孵育时间的优化

	时间	重复				P/N
		+	-	+	-	
[0064]	0.5 h	2.748	0.267	2.711	0.250	10.568
	1.0 h	2.735	0.222	2.760	0.185	13.619
	1.5 h	2.717	0.420	2.710	0.294	7843

[0065] (5) 最佳封闭时间的探索

[0066] 50 μ L、0.2 μ g \cdot mL⁻¹的抗原进行过夜包被。设置封闭时间分别为0.5h、1h和1.5h,一抗1:400稀释,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h。二抗1:3000稀释,37 $^{\circ}$ C孵育1h。计算每组P/N值,当P/N 值最大时的时间即为最佳封闭时间。结果如表6和图4所示,最佳封闭时间为1h。

[0067] 表6最佳封闭时间的优化

	时间	重复				P/N
		+	-	+	-	
[0068]	0.5 h	2.749	0.272	2.715	0.261	10.254
	1.0 h	2.746	0.272	2.710	0.221	11.179
	1.5 h	2.788	0.302	2.765	0.254	10.059

[0069] (6) 抗体检测方法临界值的确定

[0070] 按照建立好的ELISA检测方法检测30份制备好的阴性血清。每个样品两个重复,并设立阳性对照。结果如表7所示,经计算,样品平均值为0.226,标准差为0.087。即当样品 $OD_{450} \leq 0.4$ 时判断该样品为阴性。当样品 $OD_{450} \geq 0.487$ 时判断该样品为阳性。

[0071] 表7 ELISA检测阴性血清结果

[0072]	阴性血清		重复		阴性血清 ₁₅		重复		阴性血清		重复	
	1	0.323	0.281		11	0.419	0.191		21	0.112	0.112	
	2	0.254	0.218		12	0.179	0.187		22	0.109	0.119	
	3	0.135	0.154		13	0.372	0.199		23	0.183	0.171	
	4	0.232	0.205		14	0.259	0.218		24	0.334	0.196	
	5	0.302	0.297		15	0.112	0.149		25	0.164	0.185	
	6	0.265	0.179		16	0.377	0.342		26	0.168	0.173	
[0073]	7	0.216	0.227		17	0.341	0.233		27	0.322	0.213	
	8	0.385	0.312		18	0.161	0.260		28	0.278	0.428	
	9	0.142	0.166		19	0.200	0.181		29	0.164	0.075	
	10	0.209	0.202		20	0.367	0.249		30	0.194	0.139	

平均值 0.226

标准差 0.087

阴性临界值=平均值+2×标准差=0.400

[0074] 基于ELISA测试方法的IBDV有效抗体效价的测定方法,其特征在于:包括以下步骤:

[0075] 1) 准备待测样品:取至少10份制备的IBDV阳性血清,每份鸡IBDV阳性血清预先用PBS稀释至AGP效价为1:1;

[0076] 2) 稀释待测样品:将稀释好的血清以1:400为基础进行倍比稀释至1:6400,设置阴性、阳性血清对照;

[0077] 3) 测试:按照所述ELISA测试方法读取稀释后样品的最大稀释度阳性孔的 OD_{450} 值,按照 $S/P = (\text{样品值} - \text{阴性对照值}) / (\text{阳性对照值} - \text{阴性对照值})$,其中S为样品的 OD_{450} 值,P 为

标准的OD₄₅₀值,计算S/P平均值(\bar{X})和标准差(SD)。当样品S/P $\geq \bar{X}+2\times SD$ 时样品判断为阳性,具有有效的抗体水平。结果如表9所示,当S/P值 ≥ 0.22 且样品稀释度大于1:400 时判断样品为阳性,该待测样品具有抗IBDV的有效抗体;反之,判断该待测样品为阴性,不具有抗IBDV的有效抗体。

[0078] 表9 ELISA检测抗体效价结果

[0079]	阳 性 血 清	稀释比例					阳性对照	S/P 值		
	(已稀释)	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400				
	1	0.852	0.593	0.367	0.255	0.202			2.303	0.183
	2	1.144	0.815	0.506	0.323	0.262			2.385	0.136
	3	0.569	0.398	0.287	0.164	0.133			2.415	0.163
	4	0.508	0.395	0.239	0.185	0.129			2.699	0.120
	5	0.916	0.546	0.351	0.293	0.174			2.663	0.137
	6	0.502	0.359	0.249	0.195	0.138			2.702	0.117
	7	1.632	1.106	0.829	0.518	0.370			2.757	0.121
	8	1.142	0.866	0.606	0.309	0.326			2.693	0.159
9	1.292	0.884	0.652	0.392	0.321	2.707	0.177			
10	1.030	0.750	0.402	0.293	0.196	2.707	0.216			
阴性对照		0.210								
S/P 平均值		0.153								
S/P 标准差		0.033								
临界值=S/P 平均值+2×S/P 标准差=0.22										

[0080] 基于ELISA测试方法的母源抗体消长曲线绘制方法,其特征在于:取1d、6d、9d、17d、25d、27d、30d抽取的鸡血清,各个日龄的血清分别按照1:400和1:800进行稀释后按照建立的方法进行检测,根据测试结果绘制母源抗体消长曲线。具体步骤如下:按照ELISA 检测方法读取每个孔的OD₄₅₀值。先计算各个样品的S/P值,再计算S/P的平均值,以S/P 均值绘制回归曲线。如表10所示,分别用两个稀释梯度对1~30d的样品进行稀释,观察不同稀释梯度时抗体水平的变化。可以发现,在1~17d时两个稀释梯度的检测结果均为阳性,说明1~17d时母源抗体水平较高,具有抵抗病毒攻击的能力。25d时两个稀释梯度下的抗体检测结果虽然呈阳性,但是25d的样品在1:800稀释倍数下抗体含量很低,可以认为在 25d时母源抗体已经处于低水平状态容易受到病毒的攻击。在27~30d时两个稀释梯度的检测结果均为阴性,表明此时抗体较低,不具有保护力,鸡群极易受到病毒攻击。结果如图5 所示,在不同稀释梯度下母源抗体消长曲线呈现基本相同的变化的趋势。1~9d时母源抗体水平逐渐下降,且下降幅度较大。在10~17d时母源抗体水平下降缓慢,17~25d时母源抗体水平逐

渐下降,直至30d后母源抗体基本消失。综合上述分析结果,认为在17~25d之间对鸡群进行免疫能够获得较好的免疫效果。本次检测结果仅限于本检测鸡群的抗体水平,针对不同的鸡群,应根据本发明的具体检测方法计算检测结果,综合分析母源抗体的消长规律,制定疫苗的免疫计划。

[0081] 表10母源抗体水平检测结果

	日龄	稀释比例	重复		S/P 平均值
[0082]	1 d	1:400	2.642	2.593	0.994
		1:800	2.488	2.285	0.897
	6 d	1:400	1.029	2.520	0.640
		1:800	0.717	2.399	0.550
	9 d	1:400	1.713	1.751	0.623
		1:800	1.255	1.409	0.455
	17 d	1:400	1.365	2.299	0.664
		1:800	0.884	2.081	0.518
	25 d	1:400	1.743	1.074	0.487
		1:800	1.115	0.701	0.277
	27 d	1:400	0.553	0.802	0.181
		1:800	0.347	0.129	0.112
[0083]	30 d	1:400	0.537	0.238	0.059
		1:800	0.225	0.309	0.009
	阳性对照	2.656	2.610	阳性对照平均值	2.633
	阴性对照	0.249	0.242	阴性对照平均值	0.246

[0084] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

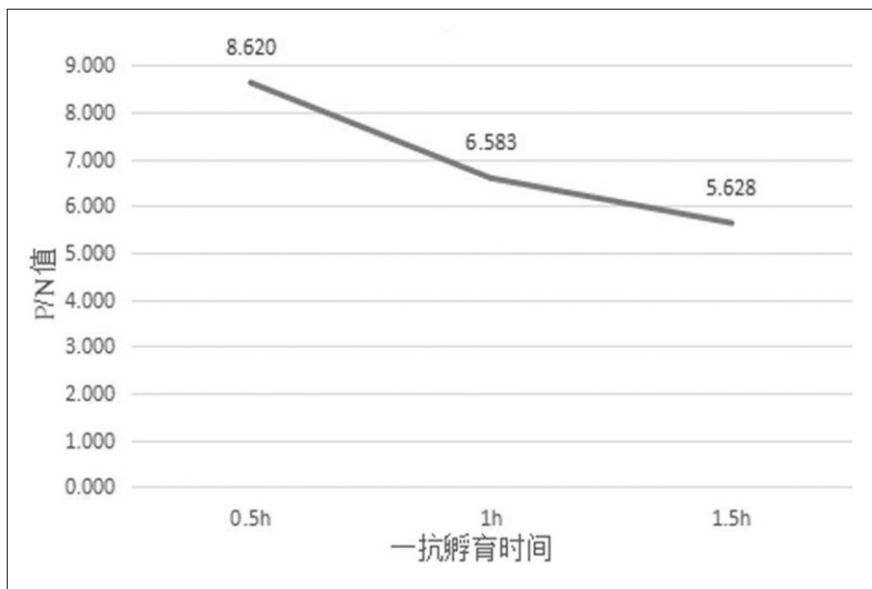


图1

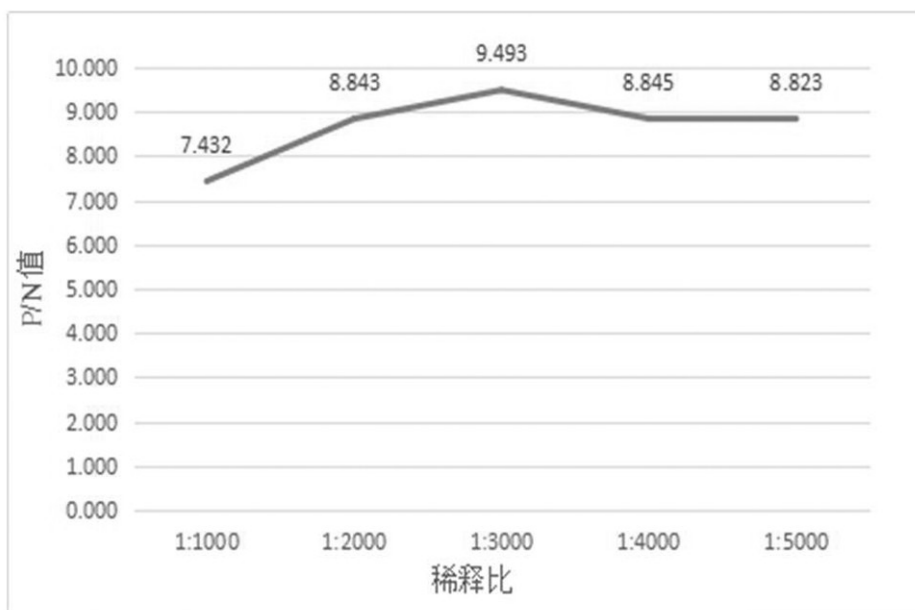


图2

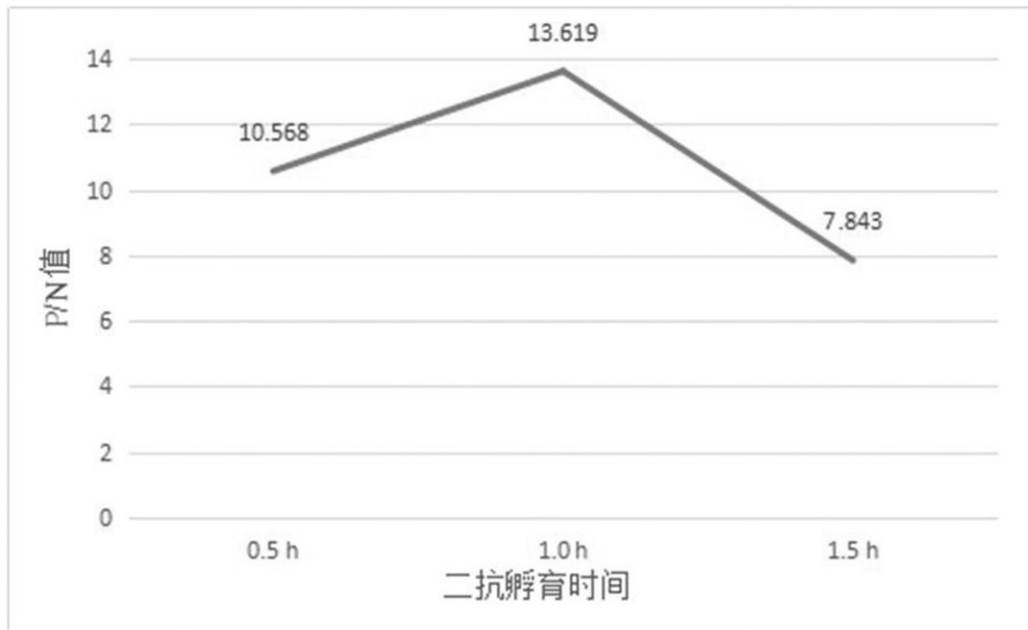


图3

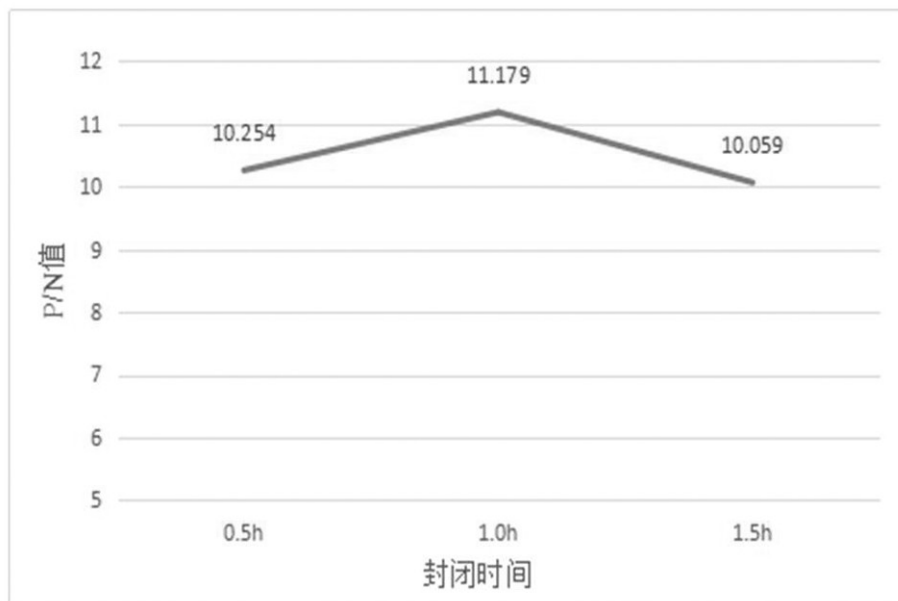


图4

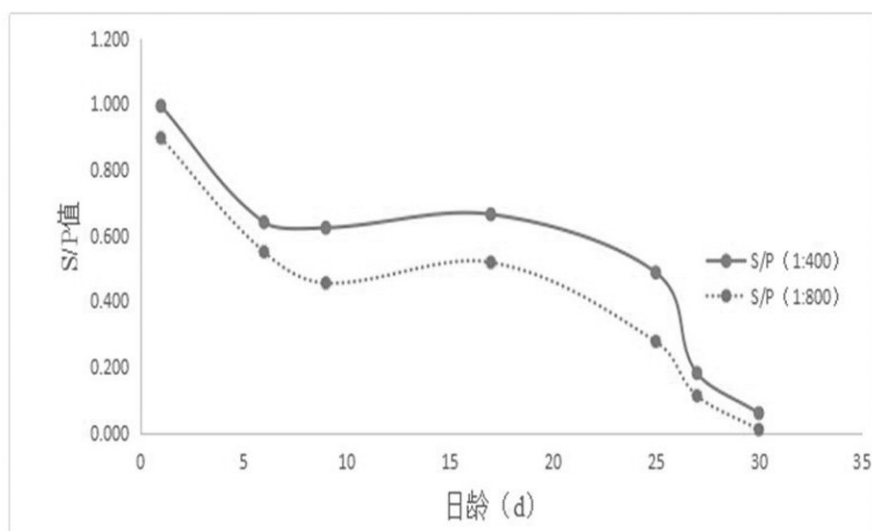


图5

专利名称(译)	IBDV抗体的ELISA试剂盒和测试方法、有效抗体效价确定方法		
公开(公告)号	CN110646614A	公开(公告)日	2020-01-03
申请号	CN201910636369.4	申请日	2019-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	新乡学院		
申请(专利权)人(译)	新乡学院		
当前申请(专利权)人(译)	新乡学院		
[标]发明人	王选年 朱艳平 岳锋 何勇 刘佳 李鹏 孙国鹏 张艳芳		
发明人	王选年 朱艳平 申一兰 岳锋 何勇 刘佳 李鹏 孙国鹏 张艳芳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56983 G01N33/6854 G01N2333/18 G01N2333/47		
代理人(译)	王灵灵 唐晓丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

IBDV抗体的ELISA试剂盒和测试方法、有效抗体效价确定方法，ELISA试剂盒包括，1) 包被IBDV抗原的酶标板；2) 1:3000稀释的HRP标记的羊抗鸡Ig Y；其中，所述包被IBDV抗原的酶标板，通过IBDV抗原浓度稀释到10ng/孔后，包被上述稀释液到反应板相应孔后制作而成，IBDV抗原为由杆状病毒表达系统制备的rVP2蛋白，检测结果是依据ELISA检测方法的S/P值进行判定。依据ELISA检测方法的S/P值检测结果是阳性时，检测结果是阳性时，说明有效抗体水平高，能够中和IBDV，不需要重新免疫疫苗；检测结果是阴性时，说明抗体水平较低不具有保护力，容易感染病毒，需要重新进行疫苗的免疫。因此，本发明建立的ELISA试剂盒抗体阳性检出率高，并且能够指导生产上疫苗的免疫，减少经济损失。

