



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101936998 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010257527. 4

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 19

(71) 申请人 武汉中博生物股份有限公司

地址 430070 湖北省武汉市东湖开发区珞狮南路 517 号

(72) 发明人 廖园园 刘汉平 刘洁 王威

彭杏 漆世华 温文生 王小红

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 唐正玉

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

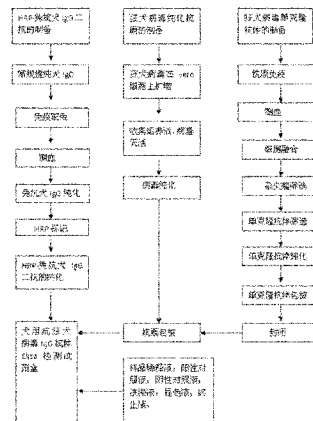
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体试剂盒, 试剂盒内: 酶标板预先包被抗狂犬病毒单克隆抗体, 包被缓冲液为 0. 05M pH9. 6 的碳酸盐缓冲液, 包被量为每孔 0. 1-1ug ; 封闭液为质量浓度是 1-10% 的 BSA 或脱脂牛奶; 封闭完再包被狂犬病毒纯化抗原, 包被量为每孔 0. 1-1ug ; 样品稀释液为含有质量浓度 0. 1-10% BSA 和含有质量浓度 0. 01-0. 05% Na₂S₂O₃ 的 0. 01mol/L 及 pH7. 2-7. 4 的 PBS ; 酶结合物为辣根过氧化物酶-兔抗犬 IgG 酶结合物; 浓缩洗涤液为含体积浓度 0. 05% 吐温-20 的 0. 01mol/L 及 pH7. 2-7. 4 的 PBS ; 酶底物 A 溶液为 3, 3'-5, 5'-四甲基联苯胺溶液, 酶底物 B 溶液为双氧水溶液; 终止液为 1mol/L H₂SO₄ 溶液, 阳性对照、阴性对照放置在盒内。本发明试剂盒的特异性达 100%; 灵敏度为 1 : 640, 本试剂盒用于实验犬、宠物犬和普通犬接种狂犬疫苗后的免疫效果评价。



1. 一种犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒,所述检测试剂盒包含有:预包被狂犬病毒抗原酶标板、封闭液、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、酶结合物、浓缩洗涤液、酶底物溶液和终止液,其特征在于:酶标板预先包被抗狂犬病毒单克隆抗体,包被缓冲液为 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,即 1 升溶液中含 1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 ,包被量为每孔 0.1-1 μg ;封闭液为质量浓度是 1-10%的 BSA 或脱脂牛奶;封闭完再包被狂犬病毒纯化抗原,包被量为每孔 0.1-1 μg ;样品稀释液为含有质量浓度 0.1-10%牛血清白蛋白 BSA 和含有质量浓度 0.01-0.05% NaN_3 的 0.01mol/L 及 pH7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS);酶结合物为辣根过氧化物酶-兔抗犬 IgG 酶结合物;浓缩洗涤液为含体积浓度 0.05%吐温-20 的 0.01mol/L 及 pH7.2-7.4 的 PBS;酶底物 A 溶液为 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液,酶底物 B 溶液为双氧水溶液;终止液为 1mol/L H_2SO_4 溶液,阳性对照、阴性对照放置在盒内。

2. 根据权利要求 1 所述的犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒,其特征在于所述狂犬病毒抗原用狂犬病毒疫苗株在 Vero 细胞上培养、扩增,经冻融,超声波破碎、差速离心提取和 Sepharose 4FF 柱过滤纯化, -20°C 保存,作为包被用狂犬病毒用抗原。

犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,具体涉及一种犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒。

背景技术

[0002] 狂犬病是由狂犬病毒 (Rabies virus, RV) 引起的人畜共患传染病,其主要宿主为犬、猫等动物。典型症状为恐水症,又称:恐水病。本病极为凶险,病死率几乎为 100%。犬不仅用于狩猎、侦破、看门、食肉和作为宠物饲养,犬还是进行生命科学、医学、药学、化工、农业、军事、环保、航天及生物工程领域应用广泛的重要实验动物之一。随着经济的发展和人民生活水平的提高,宠物犬的数量在不但增加,犬的活动区域也在不断扩大。从宠物医疗市场得到的信息,人们迫切希望了解宠物犬接种狂犬疫苗后犬只是否获得保护力,而目前狂犬病毒抗体的检测工作因受检测条件和费用的限制,没有得到广泛的应用。狂犬病毒是狂犬病的病原体,而我国又是狂犬病的高发国家,居世界第二位,仅次于印度。由于狂犬病是人畜共患性疾病,多数的人狂犬病是由与人类密切接触的带毒犬传播的,其危害已经引起政府和人民的高度关注。

[0003] 目前,用于实验动物包括犬、猴、鼠等狂犬病毒抗体检测的方法和相应的试剂盒,有一定的研究和报道。但是现有检测狂犬病毒抗体的方法包括普通 ELISA 方法、荧光免疫法、放射免疫法及化学发光法等都存在相应的弱点。普通 ELISA 试剂盒多用原核表达的重组蛋白或培养的全病毒做包被抗原。重组蛋白存在复性困难,缺乏空间构象表位的缺点,全病毒存在不易纯化的缺点,这些都会导致检测灵敏度低下。荧光免疫法、放射免疫法及化学发光法需要一定的实验仪器,且放射免疫法还存在放射性同位素污染的问题。而胶体金免疫层析法虽然有操作简单的优点,但是灵敏度比较低。中国专利公开号为 CN1547027A 的专利申请公开了一种用间接酶免疫吸附试验检测犬狂犬病毒 IgG 试剂盒及制备方法,中国专利公开号为 CN1547028A 的专利申请公开了一种用竞争酶联免疫吸附试验检测犬狂犬病毒总抗体试剂盒及制备方法,中国专利公开号为 CN101413948 的专利申请公开了一种犬狂犬病毒 NP-ELISA 抗体检测试剂盒,上述专利所用检测板包被方法均为抗原直接包被法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒。本发明采用单克隆抗体包被法间接包被抗原制备反应板,进而组成用间接免疫吸附实验检测犬抗狂犬病毒 IgG 抗体的试剂盒,本试剂盒除了具有普通 ELISA 试剂盒的优点外,还弥补了由于抗原问题而致的灵敏度低的缺点,从而提高检测的灵敏度和特异性。

[0005] 本发明的技术方案为:

[0006] 一种犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒,所述检测试剂盒包含有:预包被狂犬病毒抗原酶标板、封闭液、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、酶结合物、浓缩洗涤液、酶底物溶液和终止液,其特征在于:酶标板预先包被抗狂犬病毒单克隆抗体,包被缓冲液为

0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,即 1 升溶液中含 1.59g Na_2CO_3 ,2.93g NaHCO_3 ,包被量为每孔 0.1-1 μg ;封闭液为质量浓度是 1-10%的 BSA 或脱脂牛奶;封闭完再包被狂犬病毒纯化抗原,包被量为每孔 0.1-1 μg ;样品稀释液为含有质量浓度 0.1-10%牛血清白蛋白 BSA 和含有质量浓度 0.01-0.05% NaN_3 的 0.01mol/L 及 pH7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS);酶结合物为辣根过氧化物酶-兔抗犬 IgG 酶结合物;浓缩洗涤液为含体积浓度 0.05%吐温-20 的 0.01mol/L 及 pH7.2-7.4 的 PBS;酶底物 A 溶液为 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺溶液,酶底物 B 溶液为双氧水溶液;终止液为 1mol/L H_2SO_4 溶液,阳性对照、阴性对照放置在盒内。辣根过氧化物酶标记的是兔抗犬 IgG 抗体。

[0007] 犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法,按以下步骤进行:(1) 抗狂犬病毒单克隆抗体的制备:用纯化的狂犬病毒抗原免疫 BALB/c 小鼠,得到抗原刺激的脾脏细胞,融合该脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞系,利用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞,用 ELISA 方法和 IFA(间接免疫荧光)方法鉴定抗狂犬病毒的杂交瘤细胞株,进行三次亚克隆化后得到分泌高特异性的单克隆抗体的细胞株,通过小鼠腹水生产抗狂犬病毒的单克隆抗体;(2) 兔抗犬 IgG 的制备和辣根过氧化物标记:按常规方法提取纯化犬 IgG;免疫家兔,当兔抗血清 ELISA 效价达 1:32 以上时取血清;硫酸铵沉淀纯化;用改良的过碘酸氧化法进行标记;最后酶标记物加入 0.1-10%牛血清白蛋白、0.1-10%酪蛋白和 50%的中性甘油,测定工作浓度后,-20℃保存备用;(3) 上述各种溶液的配制:①样品稀释液:0.1-10% BSA,0.01-0.05% NaN_3 的 0.01mol/L, pH7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS);②洗涤液:在 1000ml 的 0.01M PBS 溶液中加入 0.5ml 吐温-20(Tween-20);③酶底物 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶液:i) 底物 A 液:称取 TMB100mg 加入 10ml 二甲基亚砷 (DMSO) 中,使之完全溶解后即得一百倍的 TMB 底物浓缩液;ii) 底物 B 液:称取乙酸钠 10g 溶于 1L 纯化水,用乙酸调 pH 值为 5.0,加入浓度为 30% H_2O_2 400 μl 即得;④终止液:取 54.3ml 浓度为 95-98% 浓硫酸加蒸馏水至 1000ml 即可。

[0008] 所述狂犬病毒抗原用狂犬病毒疫苗株在 Vero 细胞上培养、扩增,经冻融,超声波破碎、差速离心提取和 Sepharose 4FF 柱过滤纯化,-20℃保存,作为包被用狂犬病毒用抗原。

[0009] 本发明实验结果及分析:

[0010] 1. 特异性检测:用本发明制造的试剂盒分别检测狂犬病毒免疫犬血清,犬阴性血清,犬六联疫苗(犬温热病,犬细小病毒病,犬钩端螺旋体病,传染性肝炎,传染性支气管炎和副流感病)免疫犬血清,操作和判定按照具体实施方式中犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的操作步骤进行,结果显示,狂犬病毒免疫犬血清检测为阳性,其他样品检测为阴性,特异性为 100%。

[0011] 2. 灵敏度检测:用本发明制造的试剂盒检测不同稀释度的阳性参考血清,操作和判定按照具体实施方式中犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的操作步骤进行,检测结果为:最高检测到阳性参考样品的稀释度为 1:640。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明工艺流程图。

具体实施方式

[0013] 一. 犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法

[0014] 1. 狂犬病毒单克隆抗体的制备 :用纯化的狂犬病毒抗原免疫 BALB/c 小鼠,得到抗原刺激的脾脏细胞,融合该脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞系,利用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞,用 ELISA 方法和 IFA 方法鉴定抗狂犬病毒的杂交瘤细胞株,进行三次亚克隆化后得到分泌高特异性的单克隆抗体的细胞株,通过小鼠腹水生产抗狂犬病毒的单克隆抗体 ;

[0015] 2. 辣根过氧化物酶标记兔抗犬 IgG 二抗的制备 :按常规方法提取纯化犬 IgG ;免疫家兔,当兔抗血清 ELISA 效价达 1 : 32 以上时取血清 ;硫酸铵沉淀纯化 ;用改良的过碘酸氧化法进行标记 ;最后酶标记物加入 1% 牛血清白蛋白、1% 酪蛋白和 50% 的中性甘油,测定工作浓度后, -20℃ 保存备用 ;

[0016] 3. 所述狂犬病毒抗原用狂犬病毒疫苗株在 Vero 细胞上培养、扩增,经冻融,超声波破碎、差速离心提取和 Sepharose 4FF 柱过滤纯化, -20℃ 保存,作为包被用狂犬病毒用抗原 ;

[0017] 4. 将狂犬病毒单克隆抗体均匀的包被在酶标板孔上,包被缓冲液为 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,即 1 升溶液中含 1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 ,包被量为每孔 0.1-1 μg ;封闭液为 BSA 或脱脂牛奶,浓度是 1-10% ;封闭完再包被的是狂犬病毒纯化抗原,包被量为每孔 0.1-1 μg ;

[0018] 5. 试剂盒其他溶液配制 :①样品稀释液 :1% BSA,0.05% NaN_3 的 0.01mol/L, pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS) ;②洗涤液 :在 1000ml 的 0.01M PBS 溶液中加入 0.5ml 吐温 -20 (Tween-20) ;③酶底物 3,3'-5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶液 :i) 底物 A 液 :称取 TMB100mg 加入 10ml 二甲基亚砷 (DMSO) 中,使之完全溶解后即得一百倍的 TMB 底物浓缩液 ;ii) 底物 B 液 :称取乙酸钠 10g 溶于 1L 纯化水,用乙酸调 pH 值为 5.0,加入浓度为 30% H_2O_2 400 μl 即得 ;④终止液 :取 54.3ml 浓度为 95% 浓硫酸加蒸馏水至 1000ml 即可。

[0019] 二、犬用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的操作步骤 :

[0020] 1. 将待检样品用样品稀释液 10 倍稀释,每孔加 100 μl ,同时加入阳性和阴性对照液,设空白对照。置 37℃ 孵育 1 小时,洗涤液洗板 5 次,甩干,每孔加酶标抗体 100 μl ,37℃ 孵育 1 小时 ;洗涤液洗板 5 次,甩干,加入酶底物溶液,每孔 100 μl ,避光显色 5-10 分钟,加入终止液,每孔 50 μl 。利用酶标仪在 450nm 测定光吸收值 A450nm。

[0021] 2. 结果判定 :Cut off (CO 值) = 阴性对照光吸收值 A450nm \times 2.1 倍,样品值 = 样品光吸收值 A450nm / CO 值,样品值大于 1 判为阳性 ;样品值小于 1 判为阴性。

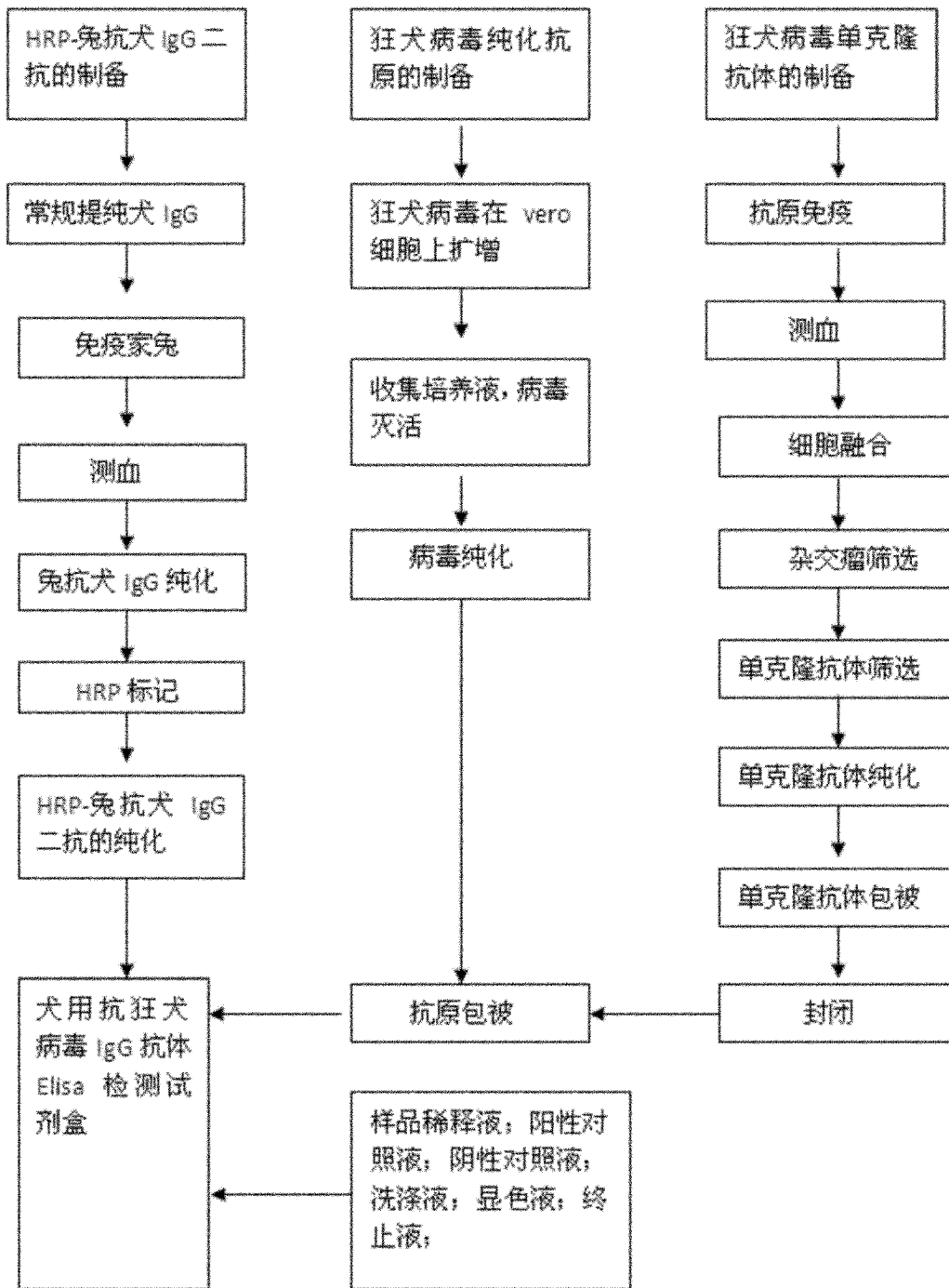


图 1

