



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101936997 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010257264. 7

G01N 33/543 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 19

G01N 33/535 (2006. 01)

C07K 14/145 (2006. 01)

(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 刘汉平 廖园园 刘洁 王威

彭杏 漆世华 温文生 谢红玲

(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 33/569 (2006. 01)

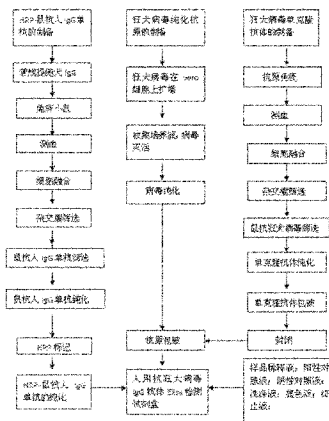
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及人用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒, 酶标板预先包被抗狂犬病毒单克隆抗体, 包被缓冲液 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% 牛血清白蛋白 BSA 和含有质量浓度 0.01-0.05% NaN₃ 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 - 小鼠抗人 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。本试剂盒用于人接种狂犬疫苗后的免疫效果评价。



1. 一种人用抗狂犬病毒 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 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,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-小鼠抗人 IgG 单抗酶结合物;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 所述的人用抗狂犬病毒 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存,作为包被用狂犬病毒用抗原。

人用抗狂犬病毒 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,具体涉及一种人用抗狂犬病毒 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%。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,用于人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,也有一定的产品上市。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。宁波天润生物药业有限公司产品“人狂犬病病毒 IgG 抗体测定试剂盒(酶联免疫法),国药准字 20060008”采用的狂犬病毒全病毒抗原包被微孔板。中国专利公开号为 CN101251537 的专利申请公开了一种人和动物狂犬病中和抗体竞争 ELISA 检测试剂盒。上述专利所用检测板包被方法为抗原直接包被法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种人用抗狂犬病毒 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] 一种人用抗狂犬病毒 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 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,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 – 小鼠抗人 IgG 单抗酶结合物 ;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。

[0007] 辣根过氧化物酶标记的是小鼠抗人 IgG 单克隆抗体。

[0008] 人用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法,其步骤是:(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) HRP-小鼠抗人 IgG 酶结合物的制备:按常规方法提取纯化人 IgG ;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 方法鉴定抗人 IgG 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人 IgG 的单克隆抗体;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°C 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 400ul 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。

[0009] 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。

[0010] 本发明实验结果及分析:

[0011] 1. 特异性检测:用本发明制造的试剂盒分别检测人狂犬病毒免疫血清,人阴性血清,人乙脑疫苗免疫血清,操作和判定按照具体实施方式中人用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的操作步骤进行,结果显示,人狂犬病毒免疫血清检测为阳性,其他样品检测为阴性,特异性为 100%。

[0012] 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人用抗狂犬病毒 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

[0013] 图 1 为本发明工艺流程图。

具体实施方式

[0014] 一. 人用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法

[0015] 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 ;

[0016] 2. HRP- 小鼠抗人 IgG 酶结合物的制备 :按常规方法提取纯化人 IgG ;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 方法鉴定抗人 IgG 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人 IgG 的单克隆抗体 ;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 ;

[0017] 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 ;

[0018] 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 0.1-1ug ;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 0.1-1ug ;

[0019] 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 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 400ul 即得 ;④ 终止液 :取 54.3ml 浓度为 95% 浓硫酸加蒸馏水至 1000ml 即可。

[0020] 二. 人用抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒的操作步骤 :

[0021] 1. 将待检样本用样本稀释液 10 倍稀释,每孔加 100ul,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 100ul, 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。

[0022] 2. 结果判定 :Cutoff (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。

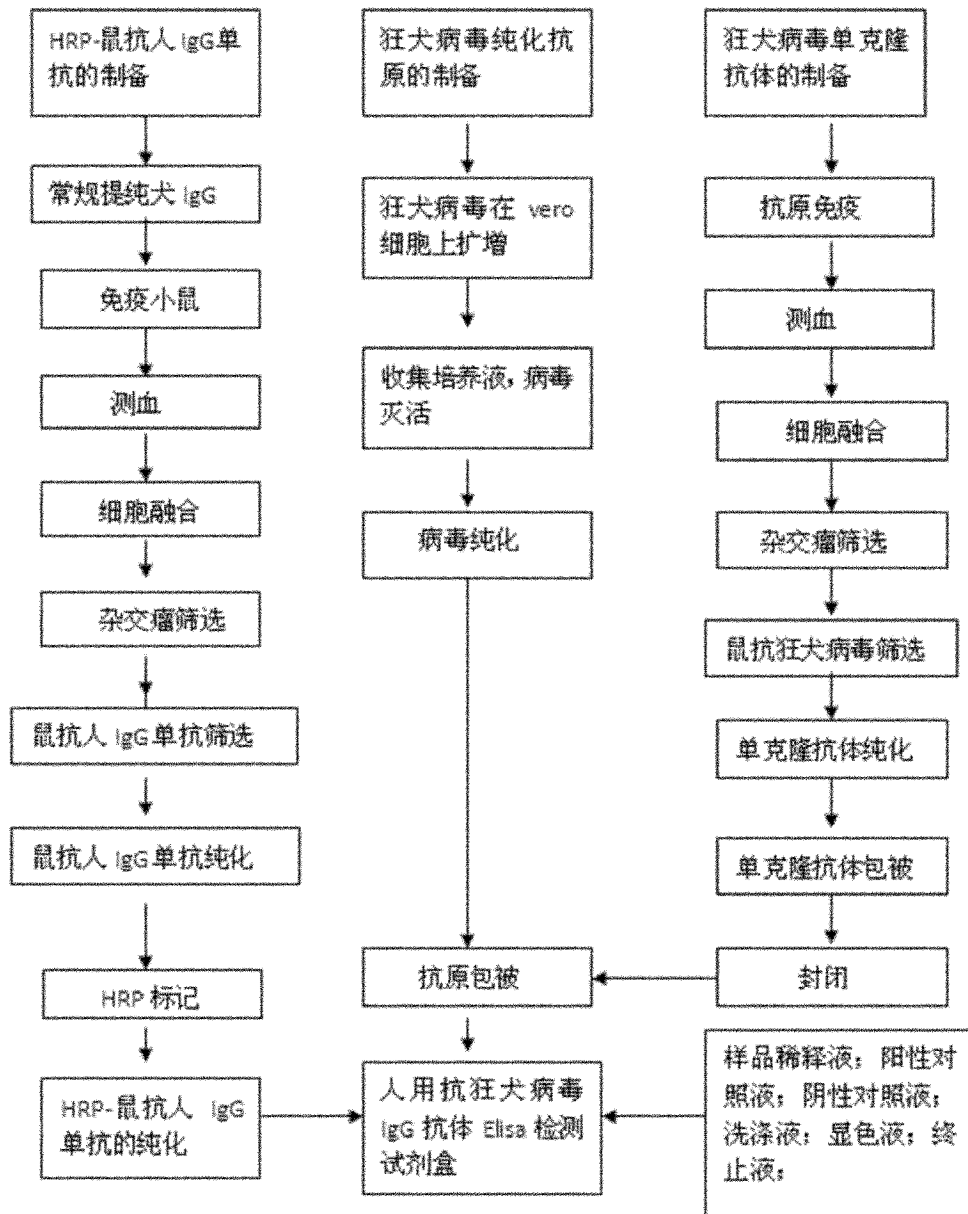


图 1

专利名称(译)	人用抗狂犬病毒IgG抗体ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101936997A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010257264.7	申请日	2010-08-19
申请(专利权)人(译)	武汉中博生物股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉中博生物股份有限公司		
[标]发明人	刘汉平 廖园园 刘洁 王威 彭杏 漆世华 温文生 谢红玲		
发明人	刘汉平 廖园园 刘洁 王威 彭杏 漆世华 温文生 谢红玲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535 C07K14/145		
其他公开文献	CN101936997B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及人用抗狂犬病毒IgG抗体ELISA检测试剂盒，酶标板预先包被抗狂犬病毒单克隆抗体，包被缓冲液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%牛血清白蛋白BSA和含有质量浓度0.01-0.05%NaN3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-小鼠抗人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。本试剂盒用于人接种狂犬疫苗后的免疫效果评价。

