



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112798787 A

(43)申请公布日 2021.05.14

(21)申请号 201911114462.5

(22)申请日 2019.11.14

(71)申请人 安徽智飞龙科马生物制药有限公司

地址 230088 安徽省合肥市高新区浮山路  
100号

申请人 重庆智飞生物制品股份有限公司  
北京智飞绿竹生物制药有限公司

(72)发明人 谭小东 李杰玉 周沛 杨世龙

(74)专利代理机构 北京知联天下知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11594

代理人 张陆军 张迎新

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

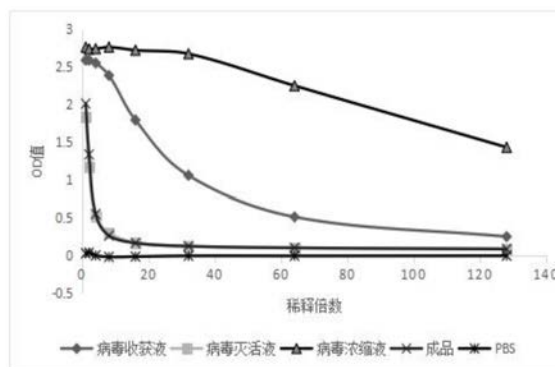
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

### (54)发明名称

狂犬病疫苗抗原含量检测方法及试剂或试剂盒

### (57)摘要

本发明提供了一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法及试剂或试剂盒,所述检测方法包括:制备单克隆抗体包被酶标板,并固相化所述单克隆抗体;将待测疫苗、标准疫苗分别按照倍比梯度稀释,加入所述单克隆抗体包被酶标板中,孵育;再加入鼠多克隆抗体作为一抗,再加入适宜稀释度的辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物作为二抗,获取所述标准疫苗和所述待测疫苗在波长450nm处的OD值,计算所述待测疫苗的浓度。本发明通过设置人源化单克隆抗体包被酶标板、多克隆抗体作为一抗进行酶联免疫吸附实验检测狂犬病疫苗的抗原含量,且本发明的检测方法检测周期短、检测原料可长期储存,疫苗效价的检测结果简单易得。



1. 一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法,其特征在于,所述检测方法包括:  
制备单克隆抗体包被酶标板,并固相化所述单克隆抗体;  
将待测疫苗、标准疫苗分别按照倍比梯度稀释,将所述单克隆抗体包被酶标板洗板、拍干,将不同梯度稀释的所述待测疫苗和所述标准疫苗分别加入所述单克隆抗体包被酶标板中,37℃孵育1h;  
将含有所述待测疫苗和标准疫苗的酶标板洗板拍干,再加入鼠多克隆抗体作为一抗,将含有所述一抗的酶标板封口后置于37℃孵育1h~2h;  
将所述含有一抗的酶标板洗板拍干,再加入适宜稀释度的辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物作为二抗,得到含有二抗的酶标板,37℃孵育1h~2h;  
将所述含有二抗的酶标板的洗板后,加入显色液,室温下避光反应设定时间,再加入终止液终止反应;  
将所述终止反应的酶标板放入酶标仪中,获取所述标准疫苗和所述待测疫苗在波长450nm处的OD值,计算所述待测疫苗的浓度。
2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,制备所述单克隆抗体包被酶标板包括:  
取所述单克隆抗体稀释后,加入酶标板中,2-8℃孵育过夜;  
将所述单克隆抗体包被酶标板洗板3次后,加入封闭液封闭所述抗体,  
再加入磷酸缓冲盐溶液将所述单克隆抗体固相化,制得所述单克隆抗体包被酶标板。
3. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述单克隆抗体为针对狂犬病病毒糖蛋白抗原表位的人源化单克隆抗体。
4. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述单克隆抗体包被酶标板内单克隆抗体添加量为100 $\mu$ l/孔,所述单克隆抗体浓度为1-20 $\mu$ g/ml。
5. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述封闭液为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖和葡萄糖中的一种,所述封闭液添加量为300 $\mu$ l/孔。
6. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述磷酸缓冲盐溶液内含有蔗糖和果糖。
7. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述多克隆抗体采用鼠脑来源狂犬病病毒制备。
8. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,计算所述待测疫苗的浓度包括:  
获取所述标准疫苗和所述待测疫苗在酶标仪中波长450nm处的OD值;  
依据所述标准疫苗波长450nm处的OD值建立浓度—OD值标准曲线;  
将所述待测疫苗450nm处的OD值带入所述标准曲线计算出所述待测疫苗的浓度。
9. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述酶标仪中还设置波长630nm,用于检测杂质干扰对照值。
10. 一种狂犬病疫苗抗原含量检测试剂或试剂盒,其特征在于,所述试剂或试剂盒包括:人源化单克隆抗体、鼠多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物、显色液、终止液及医学上可接受的辅助材料。

## 狂犬病疫苗抗原含量检测方法及试剂或试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物制剂领域,特别涉及一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法及试剂或试剂盒。

### 背景技术

[0002] 狂犬病是一种由狂犬病毒引起的人兽共患传染病,一旦发病,死亡率几乎达100%。狂犬病病毒糖蛋白(GP)是狂犬病毒的主要保护性抗原,能诱导机体产生中和抗体,同时还与病毒的毒力、神经嗜性,神经和脑内的运输、侵染和分布等有关。狂犬病疫苗的效价与病毒的糖蛋白密切关联,而现行版药典推荐NIH法体外检测作为狂犬病疫苗效价评价的标准方法。

[0003] NIH法是采用小鼠体内注射疫苗后,再用CVS攻击毒攻毒,经过与标准抗原比较后计算疫苗效价。NIH法检测需要大量小鼠,且每个实验周期约一个月时间,导致狂犬疫苗检测周期延长。且实验过程中由于活体参与,对小鼠状态和表现需要密切观察,导致检测成本高,疫苗效价计算繁琐。

### 发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明提供了一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法及试剂或试剂盒。

[0005] 一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法,所述检测方法包括:

[0006] 制备单克隆抗体包被酶标板,并固相化所述单克隆抗体;

[0007] 将待测疫苗、标准疫苗分别按照倍比梯度稀释,将所述单克隆抗体包被酶标板洗板、拍干,将不同梯度稀释的所述待测疫苗和所述标准疫苗分别加入所述单克隆抗体包被酶标板中,37℃孵育1h;

[0008] 将含有所述待测疫苗和标准疫苗的酶标板洗板拍干,再加入鼠多克隆抗体作为一抗,将含有所述一抗的酶标板封口后置于37℃孵育1h~2h;

[0009] 将所述含有一抗的酶标板洗板拍干,再加入适宜稀释度的辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物作为二抗,得到含有二抗的酶标板,37℃孵育1h~2h;

[0010] 将所述含有二抗的酶标板的洗板后,加入显色液,室温下避光反应设定时间,再加入终止液终止反应;

[0011] 将所述终止反应的酶标板放入酶标仪中,获取所述标准疫苗和所述待测疫苗在波长450nm处的OD值,计算所述待测疫苗的浓度。

[0012] 进一步地,制备所述单克隆抗体包被酶标板包括:

[0013] 取所述单克隆抗体稀释后,加入酶标板中,2-8℃孵育过夜;

[0014] 将所述单克隆抗体包被酶标板洗板3次后,加入封闭液封闭所述抗体,

[0015] 再加入磷酸缓冲盐溶液将所述单克隆抗体固相化,制得所述单克隆抗体包被酶标板。

[0016] 进一步地,所述单克隆抗体为针对狂犬病病毒糖蛋白抗原表位的人源化单克隆抗体。

[0017] 进一步地,所述单克隆抗体包被酶标板内单克隆抗体添加量为100 $\mu$ l/孔,所述单克隆抗体浓度为1-20 $\mu$ g/ml。

[0018] 进一步地,所述封闭液为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖和葡萄糖中的一种,所述封闭液添加量为300 $\mu$ l/孔。

[0019] 进一步地,所述磷酸缓冲盐溶液内含有蔗糖和果糖。

[0020] 进一步地,所述多克隆抗体采用鼠脑来源狂犬病病毒制备。

[0021] 进一步地,计算所述待测疫苗的浓度包括:

[0022] 获取所述标准疫苗和所述待测仪表在酶标仪中波长450nm处的OD值;

[0023] 依据所述标准疫苗波长450nm处的OD值建立浓度—OD值标准曲线;

[0024] 将所述待测疫苗450nm处的OD值带入所述标准曲线计算出所述待测疫苗的浓度。

[0025] 进一步地,所述酶标仪中还设置波长630nm,用于检测杂质干扰对照值。

[0026] 一种狂犬病疫苗抗原含量检测试剂或试剂盒,所述试剂或试剂盒包括:人源化单克隆抗体、鼠多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物、显色液、终止液及医学上可接受的辅助材料。

[0027] 本发明通过设置人源化单克隆抗体包被酶标板、多克隆抗体作为一抗按照酶联免疫吸附实验(ELISA法)的步骤检测狂犬病毒疫苗的抗原含量,检测周期短,能够快速获知检测结果;且检测过程中无需活体参与,即可获得疫苗效价结果,且所用检测原料可长期储存,疫苗效价的检测结果简单易得。

[0028] 本发明的其它特征和优点将在随后的说明书中阐述,并且,部分地从说明书中变得显而易见,或者通过实施本发明而了解。本发明的目的和其他优点可通过在说明书、权利要求书以及附图中所指出的结构来实现和获得。

## 附图说明

[0029] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0030] 图1示出了本发明实施例中各待测样品在不同稀释浓度下的OD值变化图;

[0031] 图2A示出了本发明实施例不同标准品浓度对应的OD值曲线;

[0032] 图2B示出了本发明实施例标准品的期望值与依据标准曲线计算出标准品浓度值关系曲线;

[0033] 图3示出了本发明实施例根据ELISA法检测得到的GP含量与NIH法测得的效价值分散图;

[0034] 图4示出了本发明实施例ELISA法检测结果与NIH法效价结果之间的关系图。

## 具体实施方式

[0035] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例

中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地说明,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0036] 狂犬病毒糖蛋白是唯一暴露于病毒包膜外的病毒蛋白,属于I类跨膜糖蛋白,成熟糖蛋白以三聚棘突(长8.3nm)形式位于狂犬病毒双层脂膜上,在病毒的细胞粘附、膜融合及轴浆运输过程中发挥重要作用。成熟糖蛋白由505个氨基酸组成,分成3个区域:膜外区1~439位氨基酸,跨膜区440~461位氨基酸,膜内区462~505位氨基酸。

[0037] 糖蛋白上至少存在3个主要中和抗体结合位点:抗原位点I~III,此外,还有一些次要线性表位。其中抗原位点I位于218~240位氨基酸区域,是一个次要线性中和表位,其最小结合区为KLCGVL(226~231位),核心残基为K-CGV-。II号位点是由第34~42位和第198~200位氨基酸两个位点通过二硫键C35-C207形成的一个保守性较高的空间表位,其中34~42位、147位、184位和198~200位氨基酸至关重要。III号位点位于330~357位氨基酸,也是一个空间表位,其中333~338位氨基酸区段是中和抗体主要结合部位,位于342~343位的 $\alpha$ 表位是次要的中和位点,第330位、333位、336位及338位氨基酸是关键残基。II号和III号抗原位点是主要病毒中和表位,两位点在空间上十分接近,其中一些关键残基突变可对病毒的毒力、宿主范围或传播速度产生影响。实验发现,糖蛋白上260~267位(LHDFRSDE)为一线性中和表位,单独或与T细胞表位联用可在小鼠体内诱生抗狂犬抗体,有效抵抗病毒攻击。

[0038] 使用针对I号位点或者II号位点或者III号位点的人源化单克隆抗体,或者针对I/II联合位点,或者I/III联合位点,或者II/III联合位点,或者I/II/III联合位点的人源化单克隆抗体。该单抗应该可以特异性的结合狂犬病病毒活性糖蛋白,有效的避免非活性或可溶性糖蛋白的干扰。

[0039] 根据上述狂犬病病毒糖蛋白的特异性结合,本发明提供了一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法,检测方法包括如下步骤:

[0040] (1) 制备单克隆抗体包被酶标板,并固相化所述单克隆抗体。

[0041] 单克隆抗体包被酶标板的制备包括:取所述单克隆抗体稀释至适宜浓度后,加入酶标板中,2~8℃孵育过夜;

[0042] 将单克隆抗体包被酶标板洗板3次,加入封闭液封闭所述抗体;

[0043] 再加入磷酸缓冲盐溶液(PBS溶液)将单克隆抗体固相化,制得单克隆抗体包被酶标板。

[0044] 单克隆抗体包被酶标板内单克隆抗体添加量为100 $\mu$ l/孔,所述单克隆抗体浓度为5 $\mu$ g/ml。

[0045] 所述封闭液为牛血清白蛋白、蔗糖、海藻糖和葡萄糖中的一种,所述封闭液添加量为300 $\mu$ l/孔。

[0046] 洗板时,洗液添加量100~300 $\mu$ l/孔。

[0047] 所用单克隆抗体为人源化单克隆抗体:采用针对狂犬病病毒糖蛋白(GP)抗原表位的人源化单克隆抗体包被酶标板,相较于成分复杂人免疫球蛋白,特异性更高,因为人免疫球蛋白成分复杂。

[0048] 所用PBS溶液内还含有5%的蔗糖和果糖,向封闭后的酶标板中添加含蔗糖和果糖的PBS溶液对封闭液进行固定,进一步提高封闭液的封闭效果,同时便于单克隆抗体包被酶

标板预制后易保存,稳定性更好。

[0049] (2) 将待测疫苗、标准疫苗分别按照倍比梯度稀释,将所述单克隆抗体包被酶标板洗板、拍干,洗液100-300 $\mu$ l/孔,将不同梯度稀释的所述待测疫苗和所述标准疫苗分别加入所述单克隆抗体包被酶标板中,37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0050] (3) 将含有待测疫苗和标准疫苗的酶标板洗板拍干,洗液100-300 $\mu$ l/孔,再加入1:100~1:6400稀释的鼠多克隆抗体作为一抗,添加量为100 $\mu$ l/孔,将含有一抗酶标板封口后置于37 $^{\circ}$ C孵育1h~2h。

[0051] 待测疫苗和标准疫苗的添加量为100 $\mu$ l/孔。

[0052] 其中,鼠多克隆抗体为鼠脑来源的狂犬病病毒制备得到的多克隆抗体。由于多克隆抗体可识别任一抗原上的多个表位,具有高亲和性;由于疫苗靶蛋白上的多个表位能够结合不止一个抗体分子,多克隆抗体可放大低水平糖蛋白信号;

[0053] 与单克隆抗体相比,使用多抗具有灵敏度和检出率上的优势。

[0054] 使用鼠脑来源的狂犬病病毒制备多克隆抗体:能够减少外源杂质蛋白,针对狂犬病病毒抗体纯度更高。制备小鼠多克隆抗体使用的狂犬病病毒或者抗原在生产过程中会使用宿主细胞(细菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞等),或者牛血清,或者牛血清蛋白(BSA),或者人血白蛋白等,成分复杂,注射小鼠后会产生针对外源蛋白强烈的免疫反应,制备的多克隆抗体不仅有针对狂犬病病毒的多抗,还有更多的针对外源杂蛋白的多克隆抗体,纯度不高,检测病毒抗原蛋白时特异性差。本发明使用的病毒为鼠脑生产,杂质主要为鼠脑成分,与小鼠同源,不会产生针对牛血清蛋白(BSA)或人血白蛋白等成分的多克隆抗体,有效的避免特异性差的问题。

[0055] 综上,采用鼠脑来源狂犬病病毒制备多克隆抗体在检测时的检测灵敏度 and 准确性得到根本改善。

[0056] (4) 将含有一抗酶标板洗板拍干,洗液100-300 $\mu$ l/孔,再加入适宜稀释度的辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物作为二抗,添加量100 $\mu$ l/孔,得到含有二抗酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育1h~2h。

[0057] (5) 将所述含有二抗酶标板的洗板后,加入显色液100 $\mu$ l,室温下避光反应适宜时间,再加入终止液终止反应;

[0058] (6) 将终止反应的酶标板放入酶标仪中,获取所述标准疫苗和所述待测疫苗的在波长450nm处的OD值,计算所述待测疫苗的浓度。

[0059] 获取所述标准疫苗和所述待测仪表在酶标仪中波长450nm处的OD值;

[0060] 依据所述标准疫苗波长450nm处的OD值建立浓度—OD值标准曲线;

[0061] 将所述待测疫苗450nm处的OD值带入标准曲线计算出所述待测疫苗的浓度。

[0062] 所述酶标仪中还设置波长630nm,波长630nm处的OD值作为杂质干扰对照值。

[0063] 采用本发明的体外酶联免疫吸附实验(ELISA法)的操作步骤检测狂犬病病毒糖蛋白,操作简便、耗时短,检测人员无需特殊培训,检测过程中无需动物参与符合动物福利保护趋势。

[0064] 在本发明人源化单克隆抗体与小鼠多克隆抗体的组合中,小鼠多克隆抗体可以被使用针对不同病毒株的多克隆抗体替代,也可以使用针对不同种属的多克隆抗体替代。

[0065] 本发明所采用的人源化单克隆抗体与小鼠多克隆抗体的组合可以被小鼠或其他

种属来源单克隆抗体与人源化单克隆抗体的组合替代。

[0066] 本发明所采用的人源化单克隆抗体与小鼠多克隆抗体的组合可以被小鼠或其他种属来源单克隆抗体与人免疫球蛋白组合替代。

[0067] 本发明组合中可以使用HRP或者生物素标记的单克隆抗体作为一抗并直接显色。

[0068] 本发明还涉及一种狂犬病疫苗抗原含量检测方法的应用,该应用能够基于上述检测方法制备狂犬病疫苗抗原含量检测试剂或试剂盒。

[0069] 本发明还涉及一种狂犬病疫苗抗原含量检测试剂或试剂盒,检测试剂或试剂盒包括:人源化单克隆抗体、鼠多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物、显色液、终止液及检疫领域可接受的辅助材料。

[0070] 采用本发明的狂犬病疫苗抗原含量检测试剂或试剂盒能够方便快捷的检测出抗原含量。

[0071] 实施例狂犬病疫苗抗原含量检测

[0072] 实验材料及来源

[0073] 人源化单克隆抗体为重组CHO细胞表达产物,小鼠多克隆抗体为鼠脑毒免疫小鼠后经纯化获得。

[0074] 酶标板,购自Costar公司,

[0075] HRP标记羊抗鼠二抗,购自Thermo公司,

[0076] TMB显色液和终止液m购自Soblarbio公司,

[0077] 待测样品:取Vero细胞培养的狂犬病病毒液、灭活液、浓缩液、狂犬病疫苗成品、人血白蛋白和蔗糖溶液,均为本公司自制;

[0078] 洗涤液:PBST溶液,本实施例使用量300 $\mu$ l/孔。

[0079] 固定液:含5%蔗糖和果糖的PBS溶液。

[0080] PBST溶液和PBS溶液按照《分子克隆》中规定的方法和步骤进行自制。

[0081] 1、待测样品检测方法

[0082] 1) 取浓度为100 $\mu$ g/ml人源化单克隆抗体,添加磷酸缓冲盐溶液作为包被液,用包被液将人源化单克隆抗体稀释至5 $\mu$ g/ml,稀释后的单克隆抗体100 $\mu$ l/孔加入酶标板条中,其中设置仅加入包被液做为检测包被抗体的空白对照,2-8 $^{\circ}$ C过夜。

[0083] 2) 用洗涤液(PBST溶液)洗涤含有包被抗体的酶标板3次, $\mu$ 拍干,再加入300 $\mu$ l/孔封闭液室温下封闭1小时;洗涤液洗板3次,拍干,加入含5%蔗糖和果糖的PBS溶液固定后待用;

[0084] 3) 取Vero细胞培养的狂犬病病毒液、灭活液、浓缩液、狂犬病疫苗成品、人血白蛋白和蔗糖溶液,分别倍比稀释,按照梯度稀释,100 $\mu$ l/孔加入含有抗体的微孔板中,37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0085] 4) 对加入待测样品的微孔板用洗涤液洗板3次,拍干,再加入1:100~1:6400稀释的鼠多克隆抗体作为一抗,添加量为100 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h。孵育时间可延长至2h,但为了减少检测时间,在本实施例中选用1h。

[0086] 5) 继续向上步中的微孔板中加入HRP酶标记的二抗100 $\mu$ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,孵育时间可延长至2h,但为了减少检测周期,在本实施例中选用1h。

[0087] 之后加入TMB显色液在避光下催化反应至显色,显色后加入100 $\mu$ l终止液(含硫

酸)。

[0088] 6) 置于预热好的酶标仪中,将终止反应的酶标板同时在波长450nm和630nm处读取OD值。

[0089] 待测样品ELISA检测的可行性验证:病毒收获液、病毒浓缩液、病毒灭活液及疫苗成品在450nm处的OD值如图1所示,由图1可知各待测液在不同稀释倍数下OD值均呈梯度趋势,从而可知采用ELISA法能够进行抗原蛋白检测,且对不同处理后的抗原蛋白均能够差异性反应,说明该方法检测样品中抗原蛋白含量可行。

[0090] 2、标准曲线的建立

[0091] 自制标准品:自制标准品为使用PM株狂犬病病毒接种细胞,经过纯化后冻干而成。自制标准品使用WHO提供的狂犬病病毒糖蛋白国际标准品 (07/162) 自行标定。

[0092] 实验方法:

[0093] 步骤1)~2) 制备封闭好的人源化单克隆抗体包被酶标板,将糖蛋白标准品按照不同浓度进行稀释,终浓度分别为110、83、66、55、47、41mU/ml。将不同浓度的标准品加入单抗包被的酶标板中,37℃孵育培养1h。再进行实施例1中步骤4)~6),检测不同浓度下450nm的OD值,每个浓度实验重复6次,根据抗原标准品浓度与对应的OD值平均值绘制标准曲线。

[0094] 实验结果:抗原标准品的标准曲线如图2所示,图2A为不同标准品浓度对应的OD值曲线。

[0095] 图2B为标准品的期望值与依据标准曲线计算出标准品浓度值关系曲线。

[0096] 由图2A可知标准品浓度与OD值呈正相关,ELISA标准曲线的线性关系良好, $R^2=0.995$ ,能够形成 $Y=aX+b$ 形式的一次方程。

[0097] 由图2B可知,在41~110mIU/ml范围内,将所得OD值带入标准曲线中计算出标准品浓度,所计算得到标准品的实测值与标准品的期望值即准备浓度差异较小,变异系数在0.030~0.076之间。

[0098] 因此,将待测样品的OD值带入标准曲线能够计算出待测样品的浓度。

[0099] 3、待测样品浓度计算

[0100] 选择高、中、低三个浓度的待测样品,检测其糖蛋白含量。以不同浓度的标准品作为横坐标X轴,以相应的OD值作为纵坐标Y轴,得到线性回归方程: $y=0.011x+0.2743$ , $R^2=0.9988$ 。将待测样品OD值代入方程,求得y值结果乘以稀释样品稀倍数即为待测样品含量。结果见表1。

[0101] 表1待测样品浓度的计算

| 待测样品  | 稀释倍数 | OD值平均值 | 糖蛋白含量 (mU/ml) |
|-------|------|--------|---------------|
| 高浓度样品 | 原倍   | 1.4955 | 110.02        |
| 终浓度样品 | 原倍   | 1.0383 | 69.45         |
| 低浓度样品 | 原倍   | 0.8070 | 48.43         |

[0103] 储存稳定性测试

[0104] 实验方法

[0105] 按照实施例中的步骤1)~2) 制备包被封闭好的酶标板,置2~8℃条件储存。分别在第0天、第1天、第7天、第10天、第14天和第28天,取包被封闭好的酶标板检测糖蛋白。将糖

蛋白标准品稀释至0.066IU/ml,在不同储存天数下按照实施例1中的步骤3)~6)进行OD值检测。再采用实施例2中的标准曲线计算测试结果浓度。

[0106] 采用上述实验方法评估2~8℃条件储存是否对检测结果产生影响,将糖蛋白含量已知的样品(0.066IU/ml)分别用放置不同天数的酶标板进行实验,每个样品重复测定8次,对检测数据进行统计学处理,考察变异系数。

[0107] 实验结果:

[0108] 不同储存天数下检测得到的样品糖蛋白值如表2所示:

[0109] 表2

[0110]

| 测定次数  | 0 天           | 1 天           | 7 天           | 10 天          | 14 天          | 28 天          |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|       | 含量<br>(IU/ml) | 含量<br>(IU/ml) | 含量<br>(IU/ml) | 含量<br>(IU/ml) | 含量<br>(IU/ml) | 含量<br>(IU/ml) |
| 1     | 0.0648        | 0.0644        | 0.0763        | 0.0764        | 0.0720        | 0.0692        |
| 2     | 0.0659        | 0.0655        | 0.0768        | 0.0772        | 0.0705        | 0.0676        |
| 3     | 0.0632        | 0.0634        | 0.0719        | 0.0723        | 0.0675        | 0.0647        |
| 4     | 0.0657        | 0.0656        | 0.0731        | 0.0732        | 0.0681        | 0.0653        |
| 5     | 0.0673        | 0.067         | 0.0713        | 0.0714        | 0.0695        | 0.0666        |
| 6     | 0.0662        | 0.0664        | 0.0706        | 0.071         | 0.0710        | 0.0681        |
| 7     | 0.0661        | 0.0658        | 0.0724        | 0.0728        | 0.0717        | 0.0689        |
| 8     | 0.064         | 0.0641        | 0.0772        | 0.0781        | 0.0722        | 0.0693        |
| 平均值   | 0.069         |               |               |               |               |               |
| 理论值   | 0.066         |               |               |               |               |               |
| 回收率   | 105%          |               |               |               |               |               |
| 标准差   | 0.004         |               |               |               |               |               |
| RSD 值 | 5.92%         |               |               |               |               |               |

[0111] 由表1可知,按照本发明实施例的制备方法制备好的酶标板置2~8℃条件储存时,在28天后用于检测狂犬病病毒糖蛋白,变异系数为5.92%,表明试剂盒稳定性良好。

[0112] 与NIH法检测结果的一致性检测

[0113] 实验材料及来源:

[0114] 12-14g昆明小鼠,购自安徽医科大学实验动物中心;

[0115] NIH法狂犬病疫苗效价标准品,购自中国食品药品检定研究院。

[0116] 实验方法:

[0117] 根据现行版中国药典方法(NIH法),使用PBS溶液将供试品和参考疫苗分别按照1:25、1:125、1:625系列稀释,每个稀释样免疫16只昆明小鼠,体重12-14g,每只小鼠腹腔注射0.5ml,间隔1周再免疫1次。小鼠于第2次免疫后第14天,使用预先滴定的CVS攻击毒(病毒滴度为 $10^{3-4}$ LD<sub>50</sub>/ml)进行脑内攻毒,每只0.03ml。观察14天后,统计死亡及发病小鼠数量并计算结果。

[0118] 按照实施例1中的实验方法制备ELISA法检测所需试剂,并按照实验步骤检测狂犬病疫苗成品。

[0119] ELISA法检测冻干疫苗样品,同时采用NIH法在小鼠体内检测样品效价。

[0120] 实验结果:

[0121] 检测19只死亡及发病小鼠的疫苗效价,得出对应疫苗样品NIH法测得的效价值,对于同一编号的疫苗样品,再采用ELISA法检测得到的GP含量。19组疫苗样品的NIH法测得的效价值和ELISA法检测得到的GP含量值,如图3所示。

[0122] 由图3可知,对于同一编号的疫苗样品,NIH法测得的效价值和ELISA法检测得到的GP含量值不完全相同,为找出NIH法测得的效价值和ELISA法检测得到的GP含量值之间的关系,还需要验证ELISA法检测结果与NIH法效价结果的相关性。

[0123] 为了验证ELISA法检测结果与NIH法效价结果的相关性,对于同一编号的疫苗样品:ELISA法检测结果与NIH法效价结果之间的关系如图4所示。

[0124] 由图4可知,19个同一编号的ELISA法检测结果与NIH法效价结果分布在一条直线上或该直线周围,通过分析可知:ELISA法检测结果与NIH法效价结果之间的Pearson值 $r=0.9112$ , $P=0.0006$ 。由 $r$ 值可知,ELISA法检测结果和NIH法效价结果具有较强的相关性,即可以通过ELISA法检测结果来代替NIH法效价结果。

[0125] 本发明实施例的ELISA法能够准确检测检测狂犬病疫苗中糖蛋白的浓度继而得出狂犬病疫苗效价,实验过程简单方便,制备的检测原料能够长期储存。

[0126] 狂犬病疫苗抗原含量检测试剂或试剂盒:

[0127] 该检测试剂或试剂盒内分别设置:人源化单克隆抗体、鼠多克隆抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠过氧化物、显色液、终止液及医学上可接受的辅助材料。其中,医学上可接受的辅助材料可为缓冲液、洗涤液、密封包装盒等物质。

[0128] 利用试剂或试剂盒内物质按照本实施例中待测样品检测方法中的步骤依次使用各试剂,得出待检测样品的OD值,再通过建立的标准曲线得出待测样品的糖蛋白含量。

[0129] 尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

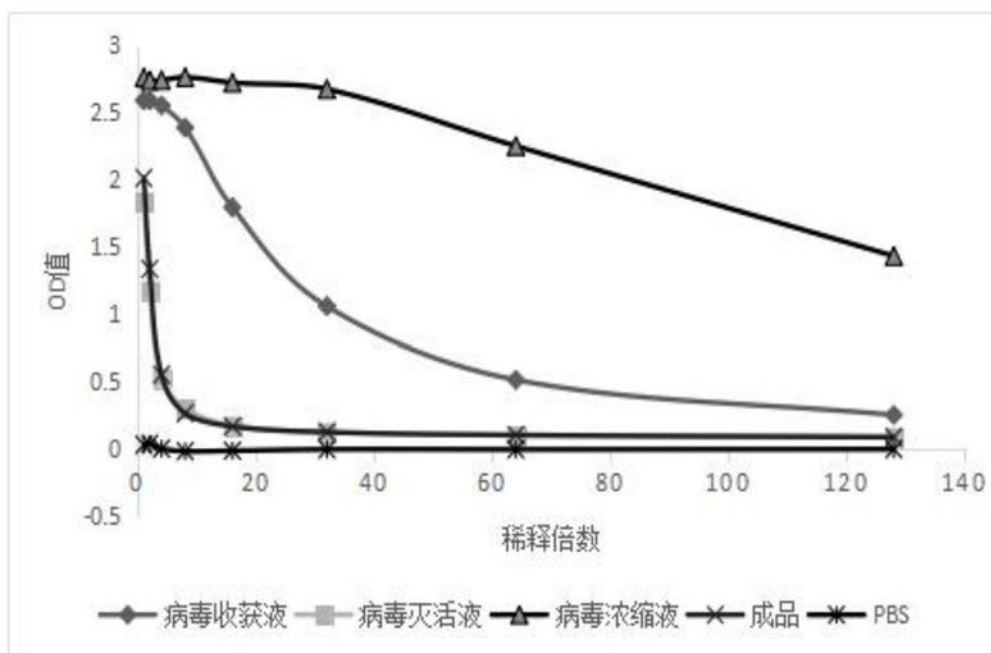


图1

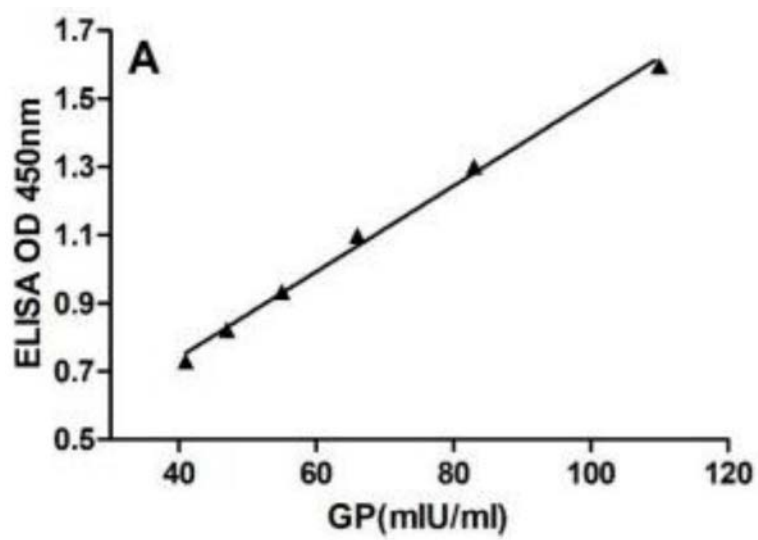


图2A

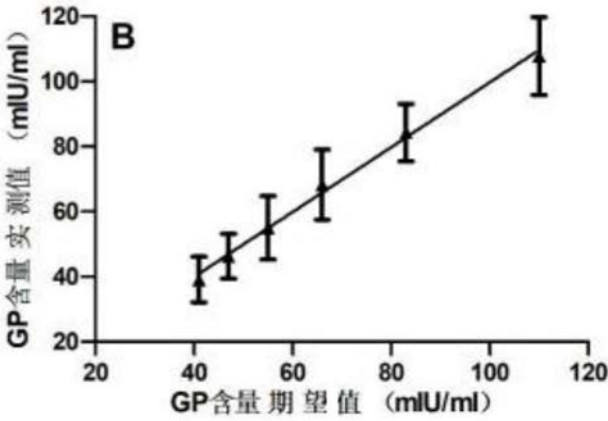


图2B

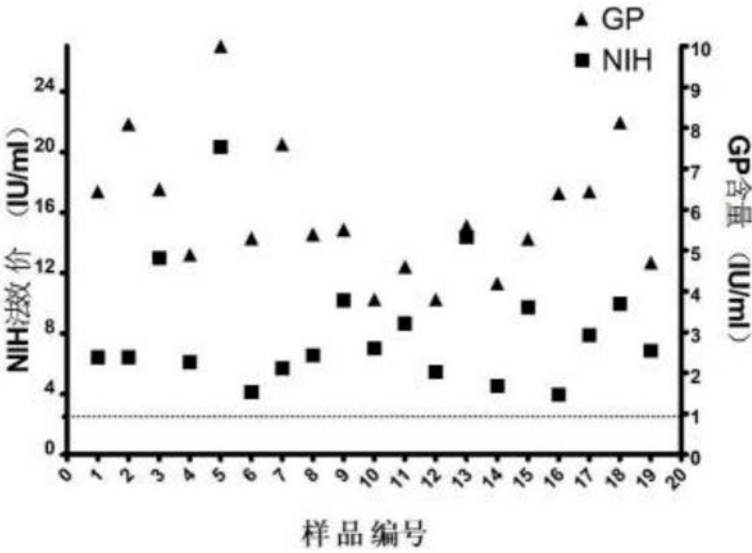


图3

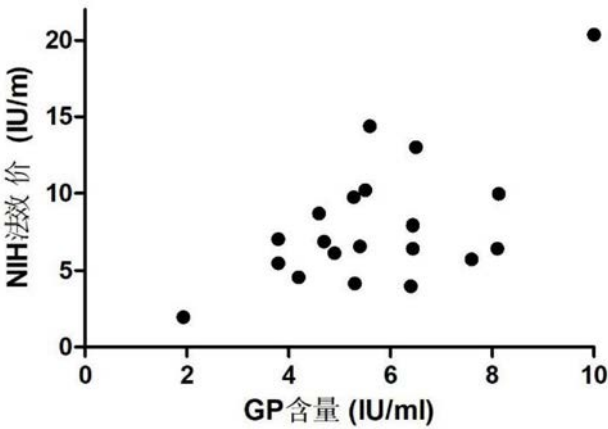


图4