



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102426237 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 04

(21) 申请号 201110263488. 3

(22) 申请日 2011. 09. 07

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军
医科学院微生物流行病研究所

(72) 发明人 康晓平 李裕昌 杨银辉 林方
范丽 魏婧靖 户义 李靖
常国辉 祝庆余

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅

(56) 对比文件

CN 101493455 A, 2009. 07. 29, 全文.

CN 1563989 A, 2005. 01. 12, 全文.

孙婷婷等. 单克隆抗体 2A10 在蛋白质芯片技
术检测黄病毒属病毒中的应用. 《中华微生物学和
免疫学杂志》. 2010, 第 30 卷 (第 8 期), 775-778.

审查员 李宏悦

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

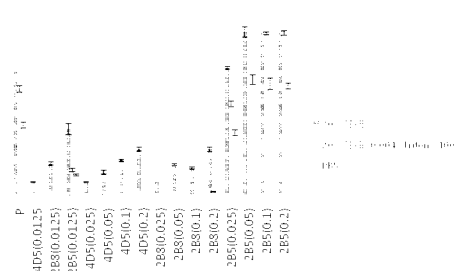
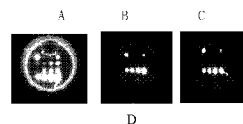
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 6 页

(54) 发明名称

检测脑炎类病毒的 ELISA-Array 方法及其专
用试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测脑炎类病毒的
ELISA-Array 方法及其专用试剂盒。本发明提供
的试剂盒,包括 6 种捕获抗体,每种所述捕获抗体
为将抗体与点样液混合得到的混合液,每种所述
捕获抗体中所述抗体在对应的所述捕获抗体溶液
中的浓度均为 0.05mg/ml。本发明的实验证明,本
发明制备了 6 种脑炎病毒的特异性单克隆抗体,
通过利用该 ELISA-Array 技术平台,并进行实验
条件的优化,建立了可同时检测 6 种脑炎类病毒
的 Array-ELISA 技术,可用于 6 种脑炎相关病毒
的检测,该技术方法与普通 ELISA 相比,特异性相
当,灵敏性高,最高可达 10 倍以上,具有较高的临
床应用前景。



1. 一种检测脑炎类病毒的抗体组,包括 6 种捕获抗体;

所述 6 种捕获抗体分别为抗日本乙型脑炎病毒的抗体 4D5、抗蜱传脑炎病毒的抗体 2B5、抗辛德比斯病毒的抗体 1F1、抗登革病毒 2 型的抗体 2B8、抗登革病毒 4 型的抗体 4F9 和抗东部马脑炎病毒的抗体 4E11;

所述每种捕获抗体均以捕获抗体溶液的形式存在;

每种所述捕获抗体溶液均按照如下方法制备:将捕获抗体与点样液混合得到的捕获抗体溶液,所述捕获抗体在对应的所述捕获抗体溶液中的浓度为 0.025mg/ml-0.2mg/ml;

所述点样液按照如下方法制备:将甘油、Triton-X100 和浓度为 0.01M、pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液混合,得到点样液,所述甘油在所述点样液中的体积百分含量浓度为 15%-25%,所述 Triton-X100 在所述点样液中的体积百分含量浓度为 0.001%-0.006%。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体组,其特征在于:

所述捕获抗体 2B8、4D5、2B5、1F1 和 4E11 在对应的所述捕获抗体溶液中的浓度均为 0.05mg/ml,所述捕获抗体 4F9 在对应的所述捕获抗体溶液中的浓度为 0.1mg/ml;

所述甘油在所述点样液中的体积百分含量浓度为 20%,所述 Triton-X100 在所述点样液中的体积百分含量浓度为 0.004%。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体组,其特征在于:

所述抗体组还包括 3 种检测抗体:抗乙型脑炎病毒、蜱传脑炎病毒和登革病毒中至少一种病毒的抗体 2A10、抗辛德比斯病毒的抗体 1F1 和抗东部马脑炎病毒的抗体 4E11。

4. 根据权利要求 3 所述的抗体组,其特征在于:

所述 2A10、1F1 和 4E11 的效价分别为 1:320、1:80、1:80;

每种所述检测抗体均以标记物标记检测抗体的形式存在;

所述标记物标记检测抗体中的标记物为生物素;

所述抗体组由所述 6 种捕获抗体和所述 3 种检测抗体组成;

所述抗体组中每种抗体均为独立包装;

所述抗体组中每种抗体均为单克隆抗体;

所述脑炎类病毒为如下 6 种脑炎病毒中的至少一种:日本乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒(Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒(Sindbis Virus)、登革病毒 2 型(Dengue2virus) 和登革病毒 4 型(Dengue4virus)。

5. 一种用于检测脑炎类病毒的试剂盒,包括权利要求 1-4 所述的抗体组;

所述脑炎类病毒为如下 6 种脑炎病毒中的至少一种:日本乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒(Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒(Sindbis Virus)、登革病毒 2 型(Dengue2virus) 和登革病毒 4 型(Dengue4virus)。

6. 一种检测脑炎类病毒的酶标板,按照如下方法制备:在酶标板的每个孔中加入如下 6 种捕获抗体:抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5、抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5、抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1、抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8、抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9 和抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11,每种所述捕获抗体以捕获抗体溶液的形式加入;

所述抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5 的溶液中,溶剂是点样液,溶质是抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5,溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml;每个孔中加入抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5 的溶液 30nl;

所述抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5 的溶液中,溶剂是点样液,溶质是抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5,溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml;每个孔中加入抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5 的溶液 30nl;

所述抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1 的溶液中,溶剂是点样液,溶质是抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1,溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml;每个孔中加入抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1 的溶液 30nl;

所述抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8 的溶液中,溶剂是点样液,溶质是抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8,溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml;每个孔中加入抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8 的溶液 30nl;

所述抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9 的溶液中,溶剂是点样液,溶质是抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9,溶质在溶液中的浓度是 0.1mg/ml;每个孔中加入抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9 的溶液 30nl;

所述抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11 的溶液中,溶剂是点样液,溶质是抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11,溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml;每个孔中加入抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11 的溶液 30nl;

所述点样液按照如下方法制备:将甘油、Triton-X100 和浓度为 0.01M、pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液混合,得到点样液,所述甘油在所述点样液中的体积百分含量浓度为 20%,所述 Triton-X100 在所述点样液中的体积百分含量浓度为 0.004%。

7. 一种检测脑炎类病毒的试剂盒,包括权利要求 6 所述的酶标板和检测抗体混合液;

所述检测抗体的混合液按照如下方法制备:将抗乙型脑炎病毒、蜱传脑炎病毒和登革病毒中至少一种病毒的抗体 2A10、抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1、抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11 与抗体稀释液混合,得到检测抗体的混合液,所述 2A10:1F1:4E11:抗体稀释液的体积比为 1:4:4:320;

所述 2A10、1F1 和 4E11 的效价分别为 1:320、1:80、1:80;

所述 2A10、1F1 和 4E11 均以标记物标记抗体的形式存在;

所述标记物具体为生物素。

8. 权利要求 1-4 中任一所述的抗体组或权利要求 6 所述的酶标板或权利要求 5 或 7 所述的试剂盒在制备检测脑炎类病毒产品中的应用;

所述脑炎类病毒为如下 6 种脑炎病毒中的至少一种:日本乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒(Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒(Sindbis Virus)、登革病毒 2 型(Dengue 2 virus) 和登革病毒 4 型(Dengue 4 virus)。

检测脑炎类病毒的 ELISA-Array 方法及其专用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种检测脑炎类病毒的 ELISA-Array 方法及其专用试剂盒。

背景技术

[0002] 我国是脑炎类病毒危害严重的国家,正确诊断致病菌是有效控制其传播的基础,也是进行有效治疗的关键。我国所流行的脑炎类病毒性病原体,主要包括:日本乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis virus, JEV)、蜱传脑炎病毒 (Tick borne encephalitis virus, TBE)、东部马脑炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus, EEEV)、辛德比斯病毒 (Sindbis Virus)、登革病毒 (Dengue virus, DV) 等,均为虫媒传播的病毒,其中日本乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis virus, JEV)、蜱传脑炎病毒 (Tick borne encephalitis virus, TBE)、东部马脑炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus, EEEV) 可引起严重的脑炎症状,并具有较高的致死率,辛德比斯病毒 (Sindbis Virus) 和登革病毒 (Dengue virus, DV) 的临床症状较为轻微,针对以上病原体,临床上应采取不同的治疗手段和防控措施,但以上病毒均为虫媒传播,早期均有相似的症状,因此,建立准确的早期诊断方法,对于脑炎类病毒病的防控具有重要价值。

[0003] 目前已有多种可同时检测多种抗原的技术方法,包括双相凝胶电泳、蛋白芯片、质谱、液相悬浮芯片技术等。然而,由于操作复杂、成本高,这些技术难以进行临床应用。

[0004] ELISA-Array 技术是一种新型检测系统,它在传统 ELISA 技术基础上发展而来,集合了酶联免疫分析 (ELISA) 和微阵列 (Array) 技术而形成的新一代检测技术体系。既秉承了蛋白芯片技术高通量、高平行的特点;同时该技术还保持 ELISA 方法的成熟、操作简便、成本低的优势,针对病原体的 ELISA-Array 技术检测,国内尚无其他单位研究。

[0005] 该技术将各种抗体由大规模全自动点样设备以微阵列的形式排布于微孔板板孔内,可用于同时检测多种病原体,数十倍提高了 ELISA 检测的通量。由于每个微孔实现了一份样本的多种检测,使用中减少了临床标本和检测试剂的用量。

[0006] 在操作技术上,该技术流程与传统 ELISA 方法基本相同,所用耗材为 96 孔酶联板,仪器为酶联自动洗板仪、酶联反应仪,可用排枪加样,反应过程中所用试剂也与传统 ELISA 相同。仅在显色和结果读取过程与传统 ELISA 有差异。以化学发光试剂代替了传统 ELISA 中所使用的 TMB (或 DAB) 底物,从而进一步放大信号,以芯片阅读器检测实验结果,代替了酶联检测仪。因此,使用单位可沿用大部分已有的 ELISA 相关仪器,且技术人员不需要很高的专业背景和复杂的操作培训,易于基层检测单位的接受和推广。

[0007] 目前,国内外仅有 ELISA-Array 技术用于肿瘤标志物的研究报道,尚未用于传染病的检测。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种检测脑炎类病毒的抗体组。

- [0009] 本发明提供的抗体组,包括6种捕获抗体;
- [0010] 所述6种捕获抗体分别为抗日本乙型脑炎病毒的抗体4D5、抗蜱传脑炎病毒的抗体2B5、抗辛德比斯病毒的抗体1F1、抗登革病毒2型的抗体2B8、抗登革病毒4型的抗体4F9和抗东部马脑炎病毒的抗体4E11。
- [0011] 所述每种捕获抗体均以捕获抗体溶液的形式存在;
- [0012] 每种所述捕获抗体溶液均按照如下方法制备:将所述捕获抗体与点样液混合得到的捕获抗体溶液,所述捕获抗体在对应的所述捕获抗体溶液中的浓度为0.025mg/ml-0.2mg/ml;
- [0013] 所述点样液按照如下方法制备:将甘油、Triton-X100和浓度为0.01M、PH为7.2的磷酸盐缓冲液混合,得到点样液,所述甘油在所述点样液中的浓度为15%-25%(体积百分含量),所述Triton-X100在所述点样液中的浓度为0.001%-0.006%(体积百分含量)。
- [0014] 所述捕获抗体2B8、4D5、2B5、4E11和1F1在对应的所述捕获抗体溶液中的浓度均为0.05mg/ml,所述捕获抗体4F9在对应的所述捕获抗体溶液中的浓度为0.1mg/ml;
- [0015] 所述甘油在所述点样液中的浓度为20%(体积百分含量),所述Triton-X100在所述点样液中的浓度为0.004%(体积百分含量)。
- [0016] 所述抗体组还包括3种检测抗体:抗乙型脑炎病毒、蜱传脑炎病毒和/或登革病毒的抗体2A10、抗辛德比斯病毒的抗体1F1和抗东部马脑炎病毒的抗体4E11。
- [0017] 所述2A10、1F1和4E11的效价分别为(1:320)、(1:80)、(1:80);
- [0018] 每种所述检测抗体均以标记物标记检测抗体的形式存在;
- [0019] 所述标记物标记检测抗体中的标记物为生物素。
- [0020] ELISA实验检测中3株检测抗体:生物素标记2A10,生物素标记1F1和生物素标记4E11的效价,分别采用的抗原为蜱传脑炎病毒灭活抗原、辛德比斯病毒灭活抗原、东部马脑炎病毒灭活抗原,病毒滴度分别为: 2×10^6 PFU/ml, 2×10^7 PFU/ml, 2.5×10^6 PFU/ml,检测体积均为50 μ L。
- [0021] 所述抗体组由所述6种捕获抗体和所述3种检测抗体组成;
- [0022] 所述抗体组中的每种抗体均为独立包装;
- [0023] 所述抗体组中的每种抗体均为单克隆抗体;
- [0024] 所述脑炎类病毒为如下6种脑炎病毒中的至少一种:日本乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒(Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒(Sindbis Virus)、登革病毒2型(Dengue 2virus)和登革病毒4型(Dengue 4virus)。
- [0025] 本发明的另一个目的是提供一种用于检测脑炎类病毒的试剂盒。
- [0026] 本发明提供的试剂盒,包括所述的抗体组;
- [0027] 所述脑炎类病毒为如下6种脑炎病毒中的至少一种:日本乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒(Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒(Sindbis Virus)、登革病毒2型(Dengue 2virus)和登革病毒4型(Dengue 4virus)。
- [0028] 本发明的第三个目的是提供一种检测脑炎类病毒的酶标板。
- [0029] 本发明提供的酶标板,按照如下方法制备:在酶标板的每个孔中加入以下6种捕

获抗体：抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5、抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5、抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1、抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8、抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9 和抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11，每种所述捕获抗体以捕获抗体溶液的形式加入；

[0030] 所述抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5 的溶液中，溶剂是点样液，溶质是抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5，溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml；每个孔中加入抗日本乙型脑炎病毒的单克隆抗体 4D5 的溶液 30nl；

[0031] 所述抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5 的溶液中，溶剂是点样液，溶质是抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5，溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml；每个孔中加入抗蜱传脑炎病毒的单克隆抗体 2B5 的溶液 30nl；

[0032] 所述抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1 的溶液中，溶剂是点样液，溶质是抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1，溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml；每个孔中加入抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1 的溶液 30nl；

[0033] 所述抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8 的溶液中，溶剂是点样液，溶质是抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8，溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml；每个孔中加入抗登革病毒 2 型的单克隆抗体 2B8 的溶液 30nl；

[0034] 所述抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9 的溶液中，溶剂是点样液，溶质是抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9，溶质在溶液中的浓度是 0.1mg/ml；每个孔中加入抗登革病毒 4 型的单克隆抗体 4F9 的溶液 30nl；

[0035] 所述抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11 的溶液中，溶剂是点样液，溶质是抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11，溶质在溶液中的浓度是 0.05mg/ml；每个孔中加入抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11 的溶液 30nl；

[0036] 所述点样液按照如下方法制备：将甘油、Triton-X100 和浓度为 0.01M、PH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液混合，得到点样液，所述甘油在所述点样液中的浓度为 20%（体积百分含量），所述 Triton-X100 在所述点样液中的浓度为 0.004%（体积百分含量）。

[0037] 本发明的第四个目的是提供一种检测脑炎类病毒的试剂盒。

[0038] 本发明提供的试剂盒，包括所述的酶标板和检测抗体混合液；

[0039] 所述检测抗体的混合液按照如下方法制备：将抗乙型脑炎病毒、蜱传脑炎病毒和 / 或登革病毒的单克隆抗体 2A10、抗辛德比斯病毒的单克隆抗体 1F1、抗东部马脑炎病毒的单克隆抗体 4E11 与抗体稀释液混合，得到检测抗体的混合液，所述 2A10：1F1：4E11：抗体稀释液的体积比为 1：4：4：320；

[0040] 所述 2A10、1F1 和 4E11 的效价分别为 (1：320)、(1：80)、(1：80)；

[0041] 所述 2A10、1F1 和 4E11 均以标记物标记抗体的形式存在；

[0042] 所述标记物具体为生物素。

[0043] 所述的抗体组或所述的试剂盒在制备检测脑炎类病毒产品和 / 或检测脑炎类病毒中的应用也是本发明保护的范围；

[0044] 所述脑炎类病毒为如下 6 种脑炎病毒中的至少一种：日本乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒 (Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒 (Sindbis Virus)、登

革病毒 2 型 (Dengue 2virus) 和登革病毒 4 型 (Dengue 4virus)。

[0045] 本发明的第五个目的是提供一种检测待测样本中脑炎类病毒的方法。

[0046] 本发明提供的方法,包括如下步骤:

[0047] 1) 将所述的抗体组或所述的试剂盒中 6 种捕获抗体均点样在点样孔中,得到含有捕获抗体的点样孔;

[0048] 2) 向步骤 1) 得到的点样孔中加入待测样本,孵育,得到加样后点样孔;

[0049] 3) 向步骤 2) 得到的加样后点样孔中加入所述的抗体组或所述的试剂盒中的 3 种检测抗体的混合液,孵育,得到一抗结合点样孔;

[0050] 4) 向步骤 3) 得到的一抗结合点样孔中加入 HRP 标记的亲合素,孵育,得到二抗结合点样孔;

[0051] 5) 向步骤 4) 得到的 HRP 标记的亲合素结合点样孔中加入化学发光液,进行扫描检测,若检测到在对应捕获抗体的所在位置无相互作用,则样品不含有或不候选含有对应的脑炎类病毒;若检测到在对应捕获抗体所在位置有相互作用,确定样品中含有或候选含有对应的脑炎类病毒。

[0052] 步骤 1) 中,所述 6 种捕获抗体的加入体积比为 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1;每一种捕获抗体点样量均为 30nl/ 每孔;

[0053] 步骤 2) 中,所述孵育的温度为 37℃,所述孵育的时间为 2h;待测样本的加入量为 50ul/ 孔;

[0054] 步骤 3) 中,所述检测抗体的混合液按照如下方法制备:将所述 3 种检测抗体与抗体稀释液混合,得到 3 种检测抗体的混合液,所述 2A10 : 1F1 : 4E11 : 抗体稀释液的体积比为 1 : 4 : 4 : 320;

[0055] 所述抗体稀释液为含 5% 小牛血清的浓度为 0.01M、PH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液;

[0056] 所述孵育的温度为 37℃,所述孵育的时间为 2h;

[0057] 步骤 4) 中,所述孵育的温度为 37℃,所述孵育的时间为 1h;

[0058] 在步骤 1) 和步骤 2) 之间还包括封闭、洗涤的步骤。

[0059] 所述待测样本为离体血清、脑脊液或脑炎类病毒培养物;

[0060] 所述脑炎类病毒为如下 6 种脑炎病毒中的至少一种:日本乙型脑炎病毒 (Japanese Encephalitis virus)、蜱传脑炎病毒 (Tick borne encephalitis virus)、东部马脑炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus)、辛德比斯病毒 (Sindbis Virus)、登革病毒 2 型 (Dengue 2virus) 和登革病毒 4 型 (Dengue 4virus)。

[0061] 本发明的实验证明,本发明制备了 6 种脑炎病毒的特异性单克隆抗体,通过利用该 ELISA-Array 技术平台,并进行实验条件的优化,建立了可同时检测 6 种脑炎类病毒的 Array-ELISA 技术,可用于 6 种脑炎相关病毒 (日本乙型脑炎病毒、蜱传脑炎病毒、东部马脑炎病毒、辛德比斯病毒、登革病毒 2 型、登革病毒 4 型) 的检测,该技术方法与普通 ELISA 相比,特异性相当,灵敏性高,最高可达 10 倍以上,具有较高的临床应用前景。

附图说明

[0062] 图 1 为不同点样液及 2B5 抗体不同点样浓度的检测结果

[0063] 图 2 为 4D5、2B8、1F1、4E11、4F9 抗体不同点样浓度的检测结果

- [0064] 图 3 为六种脑炎病毒的 ELISA-Array 检测结果
[0065] 图 4 为多种脑炎病毒同时检测的 ELISA-Array 结果
[0066] 图 5 为利用无关抗原对阵列 3 的特异性检测结果
[0067] 图 6 为 3 份 TBEV 感染病人血清的检测结果

具体实施方式

- [0068] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0069] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0070] 实施例 1、ELISA-Array 的条件摸索
- [0071] 一、抗体点样条件的优化
- [0072] 1、单克隆抗体的制备和纯化
- [0073] 单克隆抗体 4D5, 2B5, 1F1, 2B8, 4F9, 4E11 和 2A10 (均记载在单克隆抗体 2A10 在蛋白芯片技术检测黄病毒属病毒中的应用, 孙婷婷, 李裕昌, 刘洪, 康晓平, 林方, 祝庆余, 杨银辉, 鲁承, 中华微生物和免疫学杂志, 2010 年 30 卷第 8 期, 775-778, 公众均可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得。登革病毒单克隆抗体血清学性质研究, 刘景兰, 陈万荣, 崔振民, 辛颜彬, 杨保安, 徐品芳, 祝庆余, 阎国珍, 中国免疫学杂志, 1985 年 02 期, 3-6 页, 公众均可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得。登革 2 型病毒单克隆抗体的制备与鉴定, 辛颜彬, 杨保安, 徐品芳, 祝庆余, 阎国珍, 军事医学科学院院刊, 1986 年第 10 卷第 1 期, 59-62 页, 公众均可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得。) 均通过杂交瘤技术制备获得, 并通过亲和层析进行纯化, 得到 7 种抗体。其中, 4D5, 2B5, 1F1, 2B8, 4F9, 4E11 为捕获抗体。
- [0074] 每株抗体所靶向的病原体如下表 2 中所示, 具体如下:
- [0075] 4D5 为抗日本乙型脑炎病毒 (JEV) 的单克隆抗体; 2B5 为抗蜚传脑炎病毒 (TBEV) 的单克隆抗体; 1F1 为抗辛德比斯病毒 (SV) 的单克隆抗体; 2B8 为抗登革病毒 2 型 (DV-2) 的单克隆抗体; 4F9 为抗登革病毒 4 型 (DV-4) 的单克隆抗体; 4E11 为抗东部马脑炎病毒的 (EEEV) 单克隆抗体;
- [0076] 单抗 2A10 靶向黄病毒属病毒的保守序列, 可作为乙型脑炎病毒、蜚传脑炎病毒及登革病毒的共同检测抗体, 1F1 和 4E11 既作为捕获抗体, 又作为检测抗体。利用生物素标记试剂盒 (biotin-NHS ester, Pierce, Germany, 产品目录号: 1854210) 对 3 株检测抗体 (2A10, 1F1 和 4E11) 进行生物素标记, 标记过程按照说明书操作进行, 得到 3 种检测抗体: 生物素标记 2A10, 生物素标记 1F1 和生物素标记 4E11, 通过普通 ELISA 实验可特异检测到该 3 株抗体与病毒抗原结合后可分别与亲和素特异性结合, 说明该 3 株抗体已成功标记生物素。
- [0077] ELISA 实验检测中 3 株检测抗体: 生物素标记 2A10, 生物素标记 1F1 和生物素标记 4E11 的效价, 分别采用的抗原为蜚传脑炎病毒灭活抗原 (制备方法见后面)、辛德比斯病毒灭活抗原 (制备方法见后面)、东部马脑炎病毒灭活抗原 (制备方法见后面), 病毒滴度分别为: 2×10^6 PFU/ml, 2×10^7 PFU/ml, 2.5×10^6 PFU/ml, 检测体积均为 50 μ L。结果为生物素标记 2A10, 生物素标记 1F1 和生物素标记 4E11 这 3 株抗体的效价分别为: 1 : 320、1 : 80、1 : 80。

[0078] 2、病毒培养

[0079] 日本乙型脑炎病毒 (JEV) (公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得, 记载过该材料的非专利文献是: 杨银辉, 朱晓光, 张永国, 康晓平等。利用基因芯片技术对一株未知病毒的筛查与鉴定。中华检验医学杂志, 2007, 30(12):1360-1363)、登革病毒 2 型 (公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得, 记载过该材料的非专利文献是: Murthy HM, Clum S, Padmanabhan R. Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. J Biol Chem, 1999, 274(9):5573-5580.) 和登革病毒 4 型 (Microarray hybridization for assessment of the genetic stability of chimeric West Nile/dengue 4 virus, Laassri M, Bidzhieva B, Speicher J, Pletnev AG, Chumakov L., J. Med. Virol., 2011 May; 83(5):910-920, 公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得。) 接种 C6/36 (购自 ATCC, CRL-1660) 进行培养;

[0080] 辛德比斯病毒 (公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得, 记载过该材料的非专利文献是: 熊鸿燕, 刘育京等, 短波紫外线与交联淀粉碘对血浆中辛德比斯病毒灭活的研究, 中国消毒学杂志, 1998 年第四期)、蜚传脑炎病毒 (TBEV, 公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得, 记载过该材料的非专利文献是: 胡玉洋, 杨银辉, 刘洪, 康晓平, 朱晓光, 司炳银, 祝庆余, 森林脑炎病毒 (TBEV) 实时定量 TaqMan PCR 检测方法的建立, 解放军医学杂志 2006, 31, 745-748) 和 EEEV (东部马脑炎病毒 EEEV 毒株 SSP. North American Variant, GenBank 登录号: X63135, 公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得, 记载过该材料的非专利文献是: Volchkov. V E, Volchkova. V. A. and Netesov SV, Complete nucleotide sequence of the Eastern equine encephalitis virus genome. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 1991, 5, 8-15) 接种 BHK-21 细胞 (购自 ATCC, CAT. CCL 10) 进行培养。

[0081] 培养过程均在 BSL-2 或者 BSL-3 实验室内进行, 具体培养如下: 分别接种病毒 3-4 天, 待细胞出现病变后收集细胞培养上清液, 进行空斑试验以确定病毒滴度 (操作步骤参照: 医用实验病毒学, 1985 年, 北京, 人民军医出版社出版), 6 种培养上清的病毒滴度分别为: 日本乙型脑炎病毒 (JEV) 培养物 10^6 PFU/ml、登革病毒 2 型培养物 10^6 PFU/ml、登革病毒 4 型培养物 1.5×10^6 PFU/ml、辛德比斯病毒培养物 2×10^7 PFU/ml、TBEV 蜚传脑炎病毒培养物 2×10^6 PFU/ml、EEEV 培养物 10^7 PFU/ml。

[0082] 分别向 5 种病毒培养上清中加入 β -丙内酯至终浓度为 0.025%, 4°C 过夜进行病毒灭活。第二天于 37°C 放置 1h, 将 β -丙内酯分解掉, 分别得到灭活日本乙型脑炎病毒 (JEV) 培养物、灭活登革病毒 2 型培养物、灭活登革病毒 4 型培养物、灭活辛德比斯病毒培养物 (辛德比斯病毒灭活抗原)、灭活 TBEV 蜚传脑炎病毒培养物 (蜚传脑炎病毒灭活抗原)、灭活 EEEV 培养物 (东部马脑炎病毒灭活抗原)。

[0083] 3、抗体点样条件的优化

[0084] 在点样过程中, 对不同点样液及点样浓度的使用效果均进行了评估, 用以摸索最佳的点样条件。分别将上述 6 种捕获抗体用 3 种不同的点样液进行稀释点样: 1、PBS (0.01M 的磷酸盐缓冲液, PH7.2 (配方如下: 1L 水中含 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.86g, NaCl 8.5g,

NaH₂PO₄·2H₂O 0.312g, 2、含 20% (体积百分含量) 甘油的 PBS, 3、含 20% 甘油及 0.004% (体积百分含量) Triton-X100 的 PBS。

[0085] 通过观察及分析结果中每个检测点的形状及信号强度来确定最适的点样液及抗体的点样浓度：

[0086] 1) 分别取 3 种不同的抗体点样液稀释捕获抗体, 2 倍系列稀释, 浓度为 0.0125、0.025、0.05、0.1 和 0.2mg/ml, 共 5 个不同的点样浓度；

[0087] 2) 利用点样仪 (BD6000 ;California,USA) 将 6 种捕获抗体均点样在点样孔中, 每个孔中点 6 个捕获抗体, 且每个孔的点样阵列 1 如表 1A 所示, 点于 ELISA 板中 (每一种捕获抗体点样量均为 30nl/ 每孔)；

[0088] 3) 点样后用含 3% BSA 的 PBS 进行封闭, 置 37℃ 孵箱中 1h, 然后用含 0.1% 的 Tween-20 的 PBS (PBST) 洗涤 3 次。然后将 ELISA 板进行干燥, 密封, 置 4℃ 保存待用；

[0089] 4) 采用双抗体夹心的模式进行检测。将由上述步骤 2 得到的已灭活的 TBEV 病毒培养物用 PBS 稀释为 5×10⁵PFU/ml, 加入 ELISA-Array 微孔板中, 50ul/ 孔, 37℃ 孵育 2h。PBS-T 洗涤三次；

[0090] 5) 加入用抗体稀释液稀释的生物素标记抗体混合液 (生物素标记 2A10, 生物素标记 1F1, 生物素标记 4E11 和抗体稀释液的体积比分别为 1 : 4 : 4 : 320, 抗体稀释液为含 5% 小牛血清的 PBS), 37℃ 孵育 2h。PBS-T 洗涤三次；

[0091] 6) 加入 1 : 50 稀释的 HRP 标记的亲合素 (康为世纪公司产品, CW0124), 50ul/ 孔, 37℃ 孵育 1h。PBS-T 洗涤三次；

[0092] 7) 加入化学发光液, 50ul/ 孔, 将微孔板置生物芯片阅读仪中扫描检测。并用 Monster 软件进行结果分析。

[0093] 表 1A 抗体点样阵列 1

[0094]

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16

[0095] 表 1B 抗体点样阵列 2

[0096]

1	17	18	19
20	21	22	23
24	25	26	27
28	29	30	31

[0097] 表 2 抗体点样阵列 1 及阵列 2 中捕获抗体所靶向的病原体

Spot ID	IgG(mg/ml)	virus
1	抗体羊抗鼠 IgG (0.035)	positive control
2	4D5(0.0125)	JEV
3	2B8(0.0125)	DV-2
4	2B5(0.0125)	TBEV
5	4D5(0.025)	JEV
6	4D5(0.05)	JEV
7	4D5(0.1)	JEV
8	4D5(0.2)	JEV
9	2B8(0.025)	DV-2
10	2B8(0.05)	DV-2
11	2B8(0.1)	DV-2
12	2B8(0.2)	DV-2
13	2B5(0.025)	TBEV
14	2B5(0.05)	TBEV
[0098] 15	2B5(0.1)	TBEV
16	2B5(0.2)	TBEV
17	4E11 (0.0125)	EEEV
18	1F1 (0.0125)	SV
19	4F9 (0.0125)	DV-4
20	4E11 (0.025)	EEEV
21	4E11 (0.05)	EEEV
22	4E11 (0.1)	EEEV
23	4E11 (0.2)	EEEV
24	1F1 (0.025)	SV
25	1F1 (0.05)	SV
26	1F1 (0.1)	SV
27	1F1 (0.2)	SV
28	4F9 (0.025)	DV-4
29	4F9 (0.05)	DV-4
30	4F9 (0.1)	DV-4
31	4F9 (0.2)	DV-4

[0099] 检测结果如图 1 所示,其中, A 为含 20%甘油的 PBS 作为点样液的检测结果图 ;B 为含 20%甘油及 0.004% Triton-X100 的 PBS 作为点样液的检测结果图 ;C 为以 PBS 作为点样液的检测结果图 ;D 为 3 种不同点样液及不同捕获抗体浓度的检测结果分析, D 图的横坐标为不同浓度捕获抗体,纵坐标为检测结果信号强度, P 为阳性对照抗体羊抗鼠 IgG(北京康为世纪公司产品,目录号为 CW0147),用以作为检测的体系质控点。

[0100] 从图 A-C 可以看出,首先对点的形态进行观察,其中 PBS(图 C)和含 20%甘油及 0.004% Triton-X100 的 PBS(图 B)两种点样液所点样形态较为圆润、规则,而含 20%甘油的 PBS 点样液所点样形态有较为严重的拖尾,形态不规则(图 A)。

[0101] 进而比较 3 种不同点样液所点样的检测结果,3 种不同的点样液的使用效果存在

明显差异,相同的 TBE 病毒检测量,使用 PBS 点样液的 2B5 (TBEV 的特异抗体) 信号强度明显低于其他两种,而含 20%甘油的 PBS 点样液所点的捕获抗体形态较差,易产生拖尾,不利于结果分析,且在检测结果中 4D5 和 2B8 的点样抗体位置出现较高的非特异信号,因此综合点样形态观察与检测信号强度的结果,取含 20%甘油 +0.004% Triton-X100 的 PBS 作为本研究最适的点样液。

[0102] 利用抗体阵列 1,通过检测蜚传脑炎病毒以确定合适的抗体点样浓度,在该实验中,2B5 为特异捕获抗体,2B8 及 4D5 作为阴性对照抗体,结果如图 1D 所示,可以看出,以 20%甘油 +0.004% Triton-X100 的 PBS 作为点样液的抗体,2B5 抗体的点样浓度从 0.0125mg/ml 至 0.2mg/ml,信号值随点样浓度增高而增强,至 0.05mg/ml,信号值达到饱和,而 2B8 及 4D5 两个阴性对照抗体的信号值均为阴性,因此,取 0.05mg/ml 作为合适捕获抗体浓度。

[0103] 进而利用阵列 1(表 1A) 检测 DV-2 及 JEV,用以摸索 2B8 和 4D5 的最适点样浓度,检测方法同前,检测的病毒量为 JEV 2×10^5 PFU/ML, DV-2 2×10^5 PFU/ML, 50μ l/孔检测,结果如图 2A(2B8 抗体不同点样浓度的检测结果)及图 2B(4D5 抗体不同点样浓度的检测结果)所示,图中以横坐标代表捕获抗体不同点样浓度,以纵坐标代表信号强度,结果表明检测信号强度随捕获抗体浓度增高而增强,至 0.05mg/ml,信号达到饱和,因此,0.05mg/ml 为 2B8 和 4D5 的最适点样浓度。

[0104] 利用阵列 2(表 1B) 摸索 4E11、1F1 及 4F9 的最适点样浓度,检测方法同前,检测的病毒量分别为,EEEV 2.5×10^6 PFU/ml, SV 5×10^6 PFU/ml, DV-4 10^6 PFU/ml, 50μ l/孔结果如图 2C-2E 所示,图 2C 为 4E11 不同点样浓度的检测结果,图 2D 为 1F1 不同点样浓度的检测结果,图 2E 为 4F9 不同点样浓度的检测结果,可以看出,4F9 的最适点样浓度为 0.1mg/ml, 1F1 及 4E11 的最适点样浓度为 0.05mg/ml。

[0105] 二、ELISA-Array 技术检测的灵敏性及特异性

[0106] 灵敏性及特异性是评估一种检测方法优劣的重要指标。为了确定该 ELISA-Array 技术的检测灵敏性及特异性,对 DV-2, DV-4, JEV, TBE, SV, EEEV 等病原体的检测灵敏度均进行了测定。检测微孔板上的抗体排列阵列如表 3 和表 4 所示。

[0107] 表 3 抗体排列阵列 3

[0108]

1	2	3
4	5	6
7		

[0109] 表 4 抗体排列阵列 3 及抗体所靶向的病原体

[0110]

Spot ID	IgG(mg/ml)	virus
1	羊抗鼠 IgG	Positive control
2	4D5(0.05)	JEV
3	2B5(0.05)	TBE
4	4F9(0.1)	DV4
5	1F1(0.05)	SV
6	4E11(0.05)	EEEV
7	2B8(0.05)	DV2

[0111] A、ELISA-Array 技术检测方法

[0112] 1、利用芯片点样仪点 ELISA 微孔板,用含 20%甘油 +0.004% Triton-X100 的 PBS 分别将 6 种捕获抗体 (由实施例 1 步骤一的 1 获得的捕获抗体) 分别稀释为表 4 中所示浓度,采用利用微阵列 3(表 4) 进行病毒样本的检测,点样方法同实施例 1 的步骤一的 3;

[0113] 2、分别将由实施例 1 步骤一的 2 得到的已灭活的病毒培养物 (JEV, TBEV、SV、DV-2、DV-4、EEEV) 2 倍系列稀释,每种病毒共稀释 8 个浓度,分别加入 ELISA-Array 微孔板中,50u1/孔,37℃孵育 2h。PBS-T 洗涤三次;

[0114] 3、加入抗体稀释液稀释的生物素标记抗体 (由实施例 1 步骤一的 1 得到的生物素标记 2A10,生物素标记 1F1、生物素标记 4E11 和抗体稀释液的体积比分别为: 1 : 4 : 4 : 320,抗体稀释液为含 5%小牛血清的 PBS),37℃孵育 2h。PBS-T 洗涤三次;

[0115] 4、加入 1 : 50 稀释的 HRP 标记的亲合素 (康为世纪公司产品,产品目录号: CW0124),50u1/孔,37℃孵育 1h。PBS-T 洗涤三次;

[0116] 5、加入化学发光液,50u1/孔,将微孔板置生物芯片阅读仪中扫描检测。并用 Monster 软件进行结果分析。

[0117] B、普通 ELISA 技术检测方法

[0118] 1、用包被液 (碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液,PH9.6) 分别将 6 种捕获抗体稀释为 2ug/ml,50u1/孔,4℃包被过夜;

[0119] 2、PBS-T 洗涤 3 次后,加入封闭液 (含 3% BSA 的 PBS),200u1/孔;置 37℃孵箱中作用 1h;

[0120] 3、将已灭活的病毒培养物 (JEV, TBEV、SV、DV-2、DV-4、EEEV) 2 倍系列稀释,每种病毒稀释 8 个浓度,分别加入 ELISA-Array 微孔板中,50u1/孔,37℃孵育 2h。PBS-T 洗涤三次;

[0121] 4、加入抗体稀释液稀释的生物素标记抗体 (由实施例 1 步骤一的 1 得到的生物素标记 2A10,生物素标记 1F1、生物素标记 4E11 和抗体稀释液的体积比分别为: 1 : 4 : 4 : 320,抗体稀释液为含 5%小牛血清的 PBS),37℃孵育 2h。PBS-T 洗涤三次;

[0122] 5、加入 1 : 50 稀释的 HRP 标记的亲合素 (康为世纪公司产品,产品目录号: CW0124),50u1/孔,37℃孵育 1h。PBS-T 洗涤三次;

[0123] 6、加入底物显色液,50u1/孔,避光放置 5-15min,然后加入 2M 的硫酸终止反应,50u1/孔;

[0124] 7、酶联检测仪检测 OD450。

[0125] C、灵敏性结果的比较

[0126] ELISA 是目前临床进行病原体抗原测定的最常用的检测方法,因此,本研究同时进行了普通 ELISA 实验,进行检测灵敏性的比较,两种方法所能检测到的最低病毒量如表 5 所示。

[0127] 表 5 两种 ELISA 方法所能检测到的最低病毒量

	ELISA-Array (PFU/ml)	普通 ELISA(PFU/ml)
JEV	1.5×10^4	6×10^4
TBEV	8×10^3	8×10^4
[0128] DV2	6.25×10^4	1.25×10^5
EEEV	8×10^4	1.6×10^5
DV4	6×10^4	6×10^5
SV	2.5×10^6	1.25×10^6

[0129] 结果表明,除了辛德比斯病毒两种方法检测的灵敏性大体相当外,其余 5 种病毒,ELISA-Array 的检测灵敏度均比普通 ELISA 高 5-10 倍,该检测结果表明,总体上 ELISA-Array 的检测灵敏度显著高于普通 ELISA。

[0130] D、特异性的检测结果

[0131] ELISA-Array 实验(阵列 3)中每种病毒特异性结果如图 3(纵坐标为荧光强度)所示,其中,A 为日本乙型脑炎病毒(JEV);B 为蜱传脑炎病毒(TBEV);C 为辛德比斯病毒(SV);D 为登革-4 型病毒(DV-4);E 为登革病毒 2 型(DV-2);F 为东部马脑炎病毒(EEEV),每个图中的 p 为阳性对照抗体羊抗鼠 IgG,特异性检测实验中,五种待测病毒抗原均为将病毒培养上清 4 倍稀释后所得。

[0132] 从每种病毒的检测结果图,可以看出,仅有左上角的阳性对照抗体和待测病毒的特异抗体出现阳性信号,其他捕获抗体的位置均为出现阳性信号,说明该抗体阵列检测结果特异,用于检测的五种病原体相互之间未出现交叉反应。

[0133] 同时为了进一步确定该 ELISA-Array 方法对其他无关抗原检测的特异性,利用 Vero 细胞(购自 ATCC, CAT. CCL-81)培养上清、BHK-21 细胞(购自 ATCC, CAT. CCL 10)培养上清、黄热病毒(Yellow fever virus, YFV, 黄热病毒的一步 RT-PCR 法检测,彭文明,邓永强,于曼,范宝昌,祝庆余,秦鄂德,微生物杂志,2003 年第四期,公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得。)培养物、基孔肯亚病毒培养物(基孔肯亚病毒记载在施华芳,张海林,自登云,李兆祥等,云南首次从患者体内分离到基孔肯亚病毒,中国人兽共患病杂志,1990 年第一期,公众可从中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所获得。)作为阴性抗原进行反应。黄热病毒、基孔肯亚病毒均通过接种 BHK-21 细胞所培养获得。病毒培养上清采用病毒空斑测定的方法进行毒力滴定,黄热病毒的培养上清滴度为 5×10^6 PFU/ml,基孔肯亚病毒的滴度为 2×10^6 PFU/ml,两种病毒在进行 ELISA-Array 实验检测前均用 β -丙内酯进行灭活处理(具体同实施例 1 中相关内容),检测方法同 A。

[0134] 结果如图 4 所示,实验中所有的阴性对照抗原的使用浓度均为 1mg/ml,所有的阴

性对照检测结果仅有左上角 1 的位置有亮点（阳性），其它位置没有阳性信号出现。

[0135] 上述阴性抗原在 ELISA-Array 及普通 ELISA 均未出现阳性检测结果，说明 ELISA-Array 及普通 ELISA 均具有较高的检测特异性。

[0136] 实施例 2、多种病毒混合物的检测

[0137] 为了确定该 ELISA-Array 技术是否可用于混合感染病毒的检测，取适量 JEV、TBEV、DV2、EEEV、DV4 及 SV 病毒培养上清两种或三种病毒混合后（在多重病毒混合物的检测中，每种病毒的使用量均为 4 倍稀释的病毒培养上清），按照实施例 1 的步骤二的 A 的 ELISA-Array 技术检测方法加入微孔板中进行检测，

[0138] 结果如图 5 所示，A 为 DV-2 和 EEEV；B 为 TBEV 和 DV2；C 为 TBEV 和 EEEV；D 为 JEV、TBEV 和 DV-4；E 为 DV-2、DV-4 和 TBEV，使用的是阵列 3，如表 3 及表 4 所示。可以看出，均在所测病原体靶向的抗体出现了阳性信号，表明该技术可用于多种病原体混合感染的检测。

[0139] 实施例 3、临床样本接种鸡胚培养物的检测

[0140] 为了验证 ELISA-Array 技术对临床样本的检测效果，取 3 个 TBEV 感染的阳性病人血清（牡丹江林业中心医院，患者知情，该 3 份血清已用免疫荧光法检测为 TBEV 感染阳性）接种鸡胚尿囊腔，置 37℃ 孵箱中培养 3 日，收集尿囊腔中液体，用 β -丙内酯灭活病毒后，得到 TBEV 蝉传脑炎病毒样本 1、2、3，分别进行实时定量 RT-PCR 检测（上游引物 5-GGG CGG TTC TTC TCC-3，下游引物 5-ACA CAT CAC CTC CTT GTCAGA CT-3，探针序列 5-FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA-3，模板为 TBEV 蝉传脑炎病毒样本 1、2、3 的 RNA 提取物）和按照实施例 1 的步骤二的 A 中的 ELISA-Array 技术进行检测，以 Vero 细胞（购自 ATCC, CAT. CCL-81）培养上清为阴性对照、以 TBEV 的灭活抗原为阳性对照。

[0141] 结果如图 6 所示，其中，A 为普通实时定量 RT-PCR 的检测；B 为 ELISA-Array 实验检测，从图 6B 中可以看出，在 TBEV 的特异抗体 2B5 的位置出现了显著的阳性信号，而在其它病毒的检测抗体位置未出现信号，表明该样本为 TBEV 感染样本，与 RT-PCR 检测结果相同，说明本发明的 ELISA-Array 技术检测方法检测结果正确。

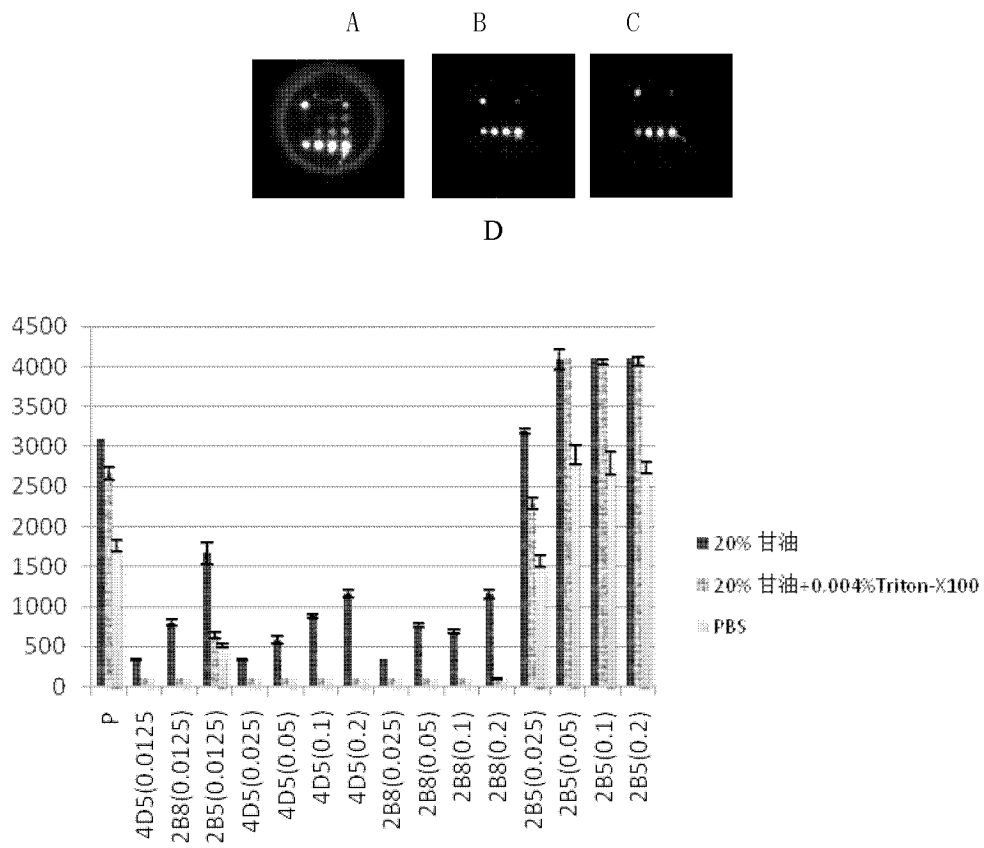
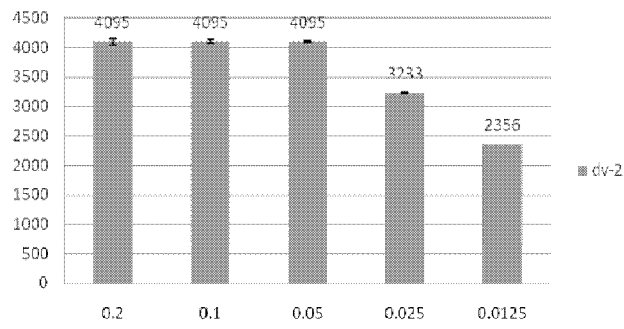
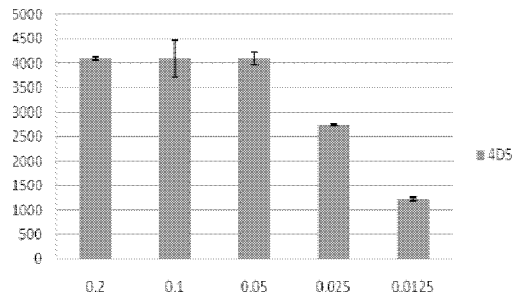


图 1

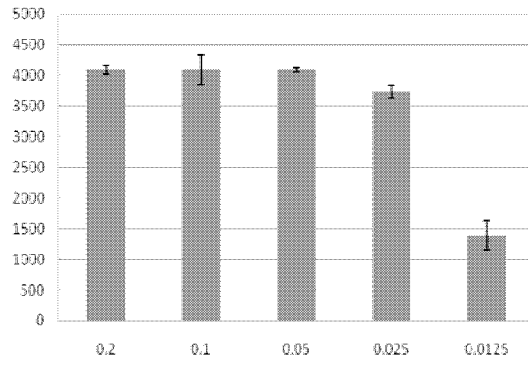
A



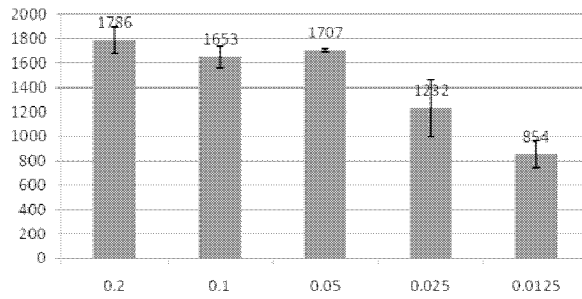
B



C



D



E

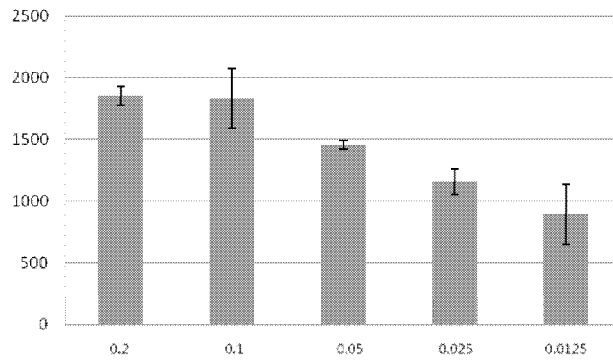


图 2

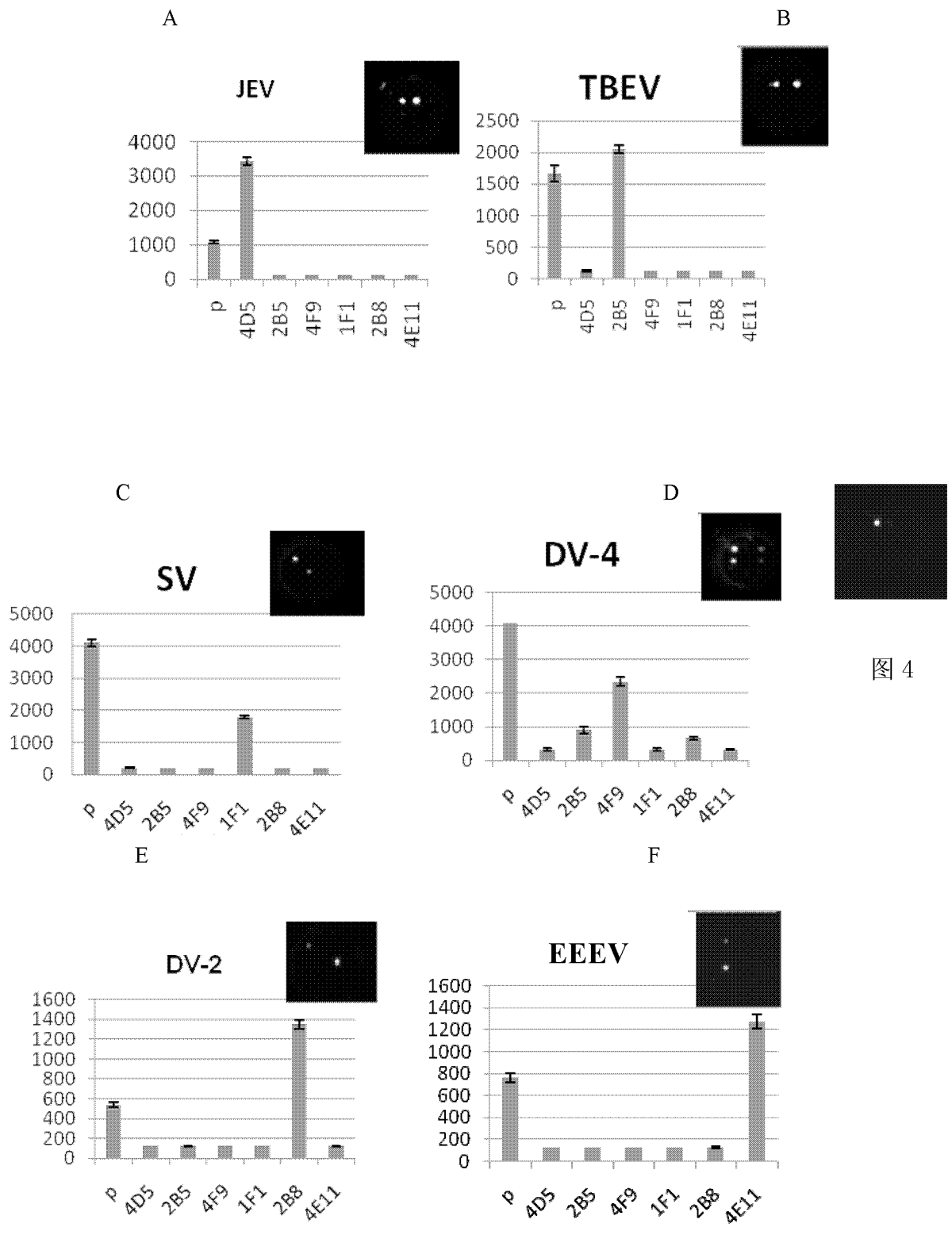


图 4

图 3

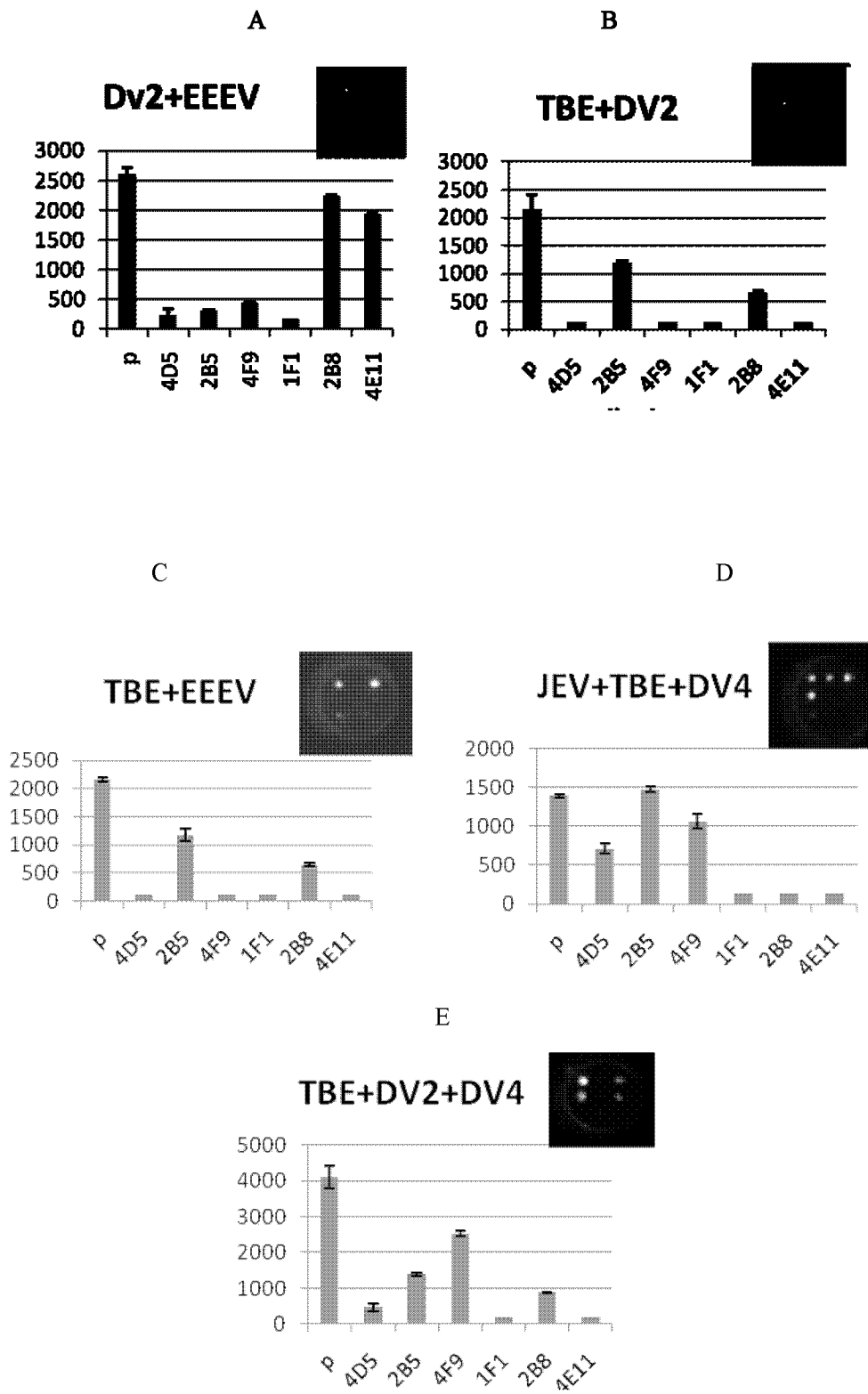
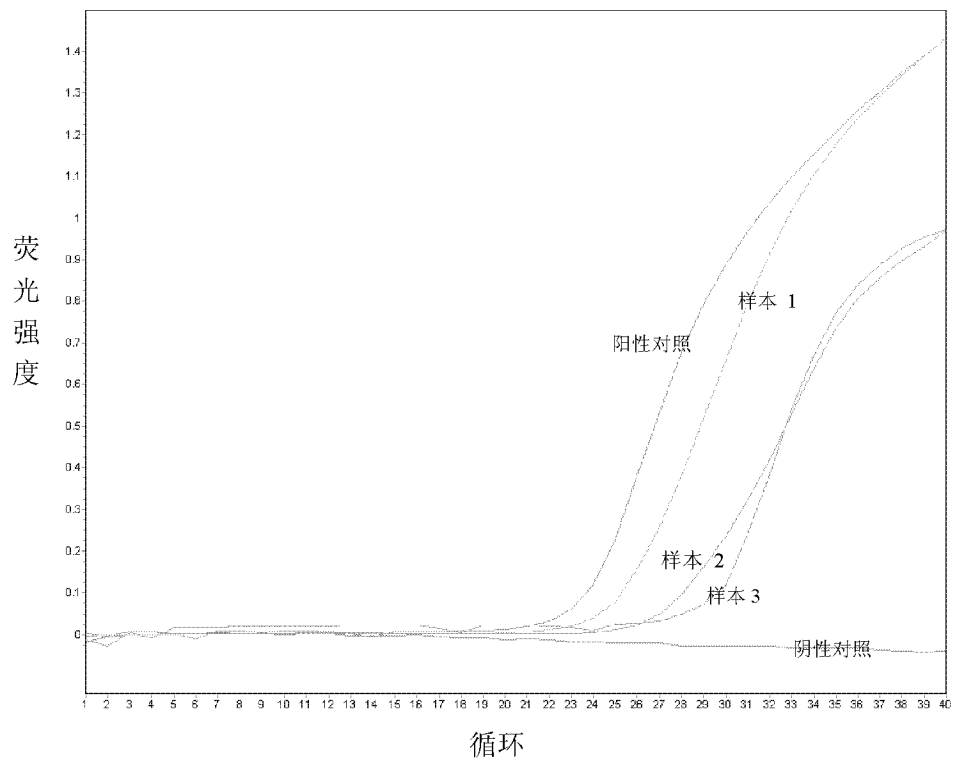


图 5

A



B

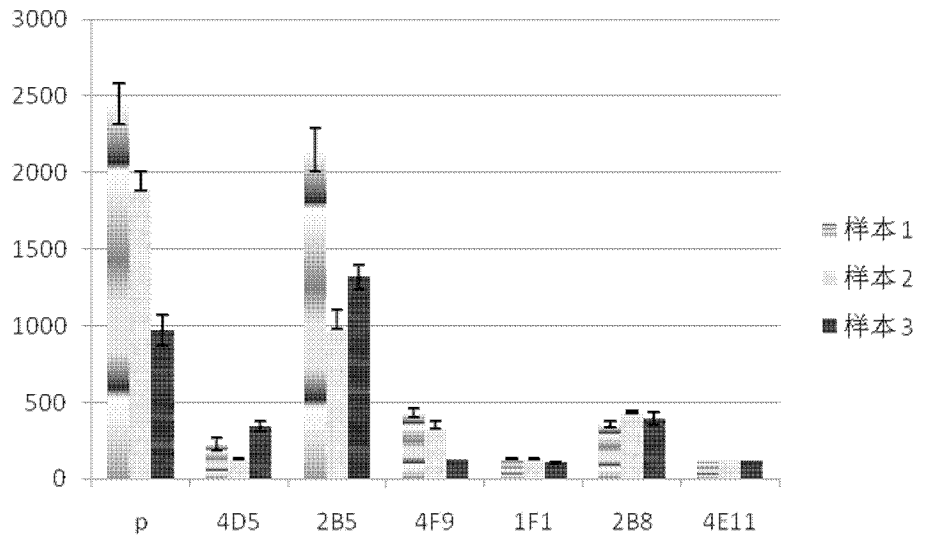


图 6