

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710113727.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 3 月 4 日

[11] 公开号 CN 101377489A

[22] 申请日 2007.8.31

[21] 申请号 200710113727.0

[71] 申请人 张训海

地址 233100 安徽省凤阳县府城镇东华路 1
号安徽科技学院

[72] 发明人 张训海

[74] 专利代理机构 蚌埠鼎力专利商标事务所有限
公司
代理人 倪 波

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料
及其筛选方法

[57] 摘要

本发明提供一种制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料及其筛选方法，采用马立克氏病疫苗培养废弃液作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料，应用免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术对马立克氏病疫苗株合格培养后的废弃液进行检测评价和筛选，筛选出可采用能够分泌与 MDV 强毒抗原具有交叉反应性病毒性抗原的 MD 疫苗 CVI988/Rispens 株、HVT Fc - 126 株等商业化培养后的废弃液作为 MDV 检测抗原的生产原料，从而大大简化了生产工艺与流程，缩短了生产周期，并可节约原料液生产成本 50% 以上，同时消除了致病性 MDV 的散毒威胁，提高了资源利用率，降低了对环境的污染。

1、制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料，其特征在于：采用马立克氏病疫苗培养废弃液作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料。

2、制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原新原料的筛选方法，其特征在于：应用免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术对马立克氏病疫苗株合格培养后的废弃液进行检测评价和筛选。

3、根据权利要求2所述的筛选方法，其特征在于：所述的免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术是指采用琼扩试验、酶联免疫试验、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分析和/或结合固定化蛋白质的免疫学测定进行检测评价与筛选。

4、根据权利要求3所述的筛选方法，其特征在于：所述琼扩试验筛选法的具体步骤如下：

a. 对不同血清型马立克氏病毒疫苗株进行细胞培养，收集其细胞培养后的废弃液；

b. 将疫苗株细胞培养液或弃液中的主要可溶性分泌物浓缩 10 ~ 100 倍；

c. 以单纯马立克氏病毒致病株感染鸡或细胞而制备的马立克氏病毒琼扩阳性抗原和马立克氏病毒琼扩阳性抗体，作为阳性反应体系的对照，采用琼扩试验并以马立克氏病毒琼扩阳性抗体检测上述各浓缩液中马立克氏病毒抗原的有无及其含量；

d. 能够与马立克氏病毒阳性抗体形成明显的琼扩沉淀线，并且该沉淀线与阳性反应体系或 MDV 致病株的沉淀线完全吻合并能融合的浓缩液，判定为马立克氏病毒抗原阳性，其所源于的疫苗株为马立克氏病毒抗原生产的候选株；

e. 以上述检测结果作为初选依据，实地收集候选疫苗株的细胞培养液，即已收获疫苗病毒后的细胞培养液，按 b、c 和 d 步骤对疫苗生产液中有无 MDV 抗原再进行检测与含量评价，以单位弃液中的目的抗原含量高者为佳，进而最终确定出鸡马立克氏病毒感染检测抗原的生产原料。

5、根据权利要求1所述制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料，其特征在于：以马立克氏病毒血清 1 型的 CVI988/Rispens 株及其低代次种毒

进行疫苗毒的增殖培养，在收获合格的感染细胞后，其病毒培养的上清液即培养后的废弃液，作为鸡马立克氏病毒感染检测抗原制备的原料。

6、根据权利要求1所述制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料，其特征在于：以马立克氏病毒血清3型的火鸡疱疹病毒Fc-126株及其低代次种毒进行火鸡疱疹病毒疫苗的增殖培养，在收获合格的感染细胞后，其上清废弃液作为鸡马立克氏病毒感染检测抗原制备的原料。

7、根据权利要求1所述制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料，其特征在于：以CVI988作为重组疫苗的载体，若其增殖培养液中分泌有一定含量的目的马立克氏病毒抗原，其细胞培养上清废弃液作为鸡马立克氏病毒感染检测抗原制备的原料。

制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料及其筛选方法

技术领域：

本发明涉及禽病检测试剂领域，尤其是鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料及其筛选方法。

背景技术：

马立克氏病（MD）是世界上首例通过疫苗控制的倍受兽医界、医学界和生物界关注的致瘤性和免疫抑制性传染病，其病原为马立克氏疱疹病毒（MDV）。由于该病严重损害鸡免疫系统，除本身可招致长达数月及累计高达70%以上的致死外，常导致各种“鸡瘟”疫苗的免疫失败或继发感染而造成重大损失。鉴于MDV污染严重，毒力不断增强，加之MD致瘤潜伏期长和隐蔽性极强，即使免疫后也不能阻断其侵入与传播，因此，MDV强毒污染监测不仅是MD防制的源头，也是确保其它禽用疫苗免疫效果的前提和评价养禽生物安全状况有效方法。

检测鸡群MDV强毒感染的方法有多种，如病毒的分离与鉴定、血清学检查及MDV特异DNA的检测等。MDV的分离与鉴定，虽有其特别的用途，但其分离的难度较大，易受污染的影响且费时，故不适于常规检测和流行病学调查。MDV分子水平的特异性检测，如核酸探针和聚合酶链反应（PCR），虽然由于其特异性强、敏感性高等优点已成功地用于MDV的检测，但其严格的物质技术条件限制和高昂的检测费用，因而难以推广和普及。

鸡MDV强毒感染的血清学检查，特别是琼脂凝胶免疫扩散试验即简称为琼扩试验，因特异、敏感、简便、直观和可重复性强及检测费用相对低廉而广泛应用（NY/T 905-2004）。其主要是用标准MDV阳性抗原和MDV阳性抗体，来检测鸡群体内有无明显反应性的MDV抗体和/或MDV抗原，从而得出鸡群是否有MDV强毒的感染或污染。目前，国内外制备的MDV阳性琼扩抗原，主要是源于MDV强毒细胞培养后的感染细胞及其培养液，或是源于MDV强毒感染鸡羽囊液及皮肤，或源于MDV抗原基因（gC、gB）的原核或真核表达产物。这种方法进行生产的主要缺点是需要有一定的生产工艺、流程和周期，即都需要有细胞生长的条件与MDV强毒增殖的过程，或含目的抗原

基因的原核或真核表达条件与过程，从而才能在培养细胞中产生出 MDV 的病毒性抗原，并须对生产过程中的生物安全控制要求很严，进一步加大了生产成本。而标准 MDV 阳性抗原的生产成本，则是构成鸡 MDV 强毒感染的血清学检测成本的主要因素。

发明内容：

本发明的目的是根据 MD 疫苗能够产生可与致病性 MDV 强毒抗原具有交叉反应性的主要可溶性分泌抗原，以该 MD 疫苗的培养废弃液作为制备 MDV 检测抗原的原料。

本发明的另一目的在于提供这种新原料的筛选方法。

MDV 是细胞结合性病毒，其有三个血清型，从温和型到毒力很强的致瘤株及其致弱株，均归为血清 1 型 MDV，天然不致瘤的病毒株为血清 2 型，异源的火鸡疱疹病毒（HVT）则属于血清 3 型。三个血清型中只有血清 1 型中的强毒株对鸡是致瘤或致病性的，且三个血清型的非致病毒株都可用作 MD 的疫苗。由于 MD 疫苗的广泛使用，不同血清型 MD 疫苗均有不同程度的商业化生产。鉴于三个血清型 MDV 之间存在很强的群特异性抗原，并且这种群特异性抗原是可溶性分泌抗原。因此，在其增殖或疫苗生产过程中，是能够产生与 MDV 强毒抗原具有交叉反应性的病毒性抗原，如能从以上各种商业化生产的 MD 疫苗中，筛选出可替代 MDV 强毒的增殖来制备 MDV 阳性抗原的疫苗培养液，将是一种十分经济、安全和有效制备 MDV 抗原的原料来源。

本发明采用马立克氏病疫苗培养废弃液作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料。

本发明以 MDV 血清 1 型的 CVI988/Rispens 株及其低代次种毒进行疫苗的增殖培养，在收获合格的感染细胞后，其病毒培养的上清液即培养后的废弃液作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料。

本发明以 MDV 血清 3 型的火鸡疱疹病毒 Fc-126 株及其低代次种毒进行 HVT 疫苗的增殖培养，在收获合格的感染细胞后，其培养上清液作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料。

本发明以 CVI988 作为重组疫苗的载体，若其增殖培养液中分泌有一定

含量的目的 MDV 抗原,其细胞培养上清废弃液可作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料。

本发明所提供的新原料的筛选方法是:应用免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术对马立克氏病疫苗株合格培养后的废弃液进行检测评价和筛选。

上述筛选方法中所述的免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术是指采用琼扩试验、酶联免疫试验、SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳技术分析和/或结合固定化蛋白质的免疫学测定(Western 印迹法)进行检测评价与筛选。

其中琼扩试验筛选法的具体筛选步骤如下:

a. 对不同血清型马立克氏病毒疫苗株进行细胞培养,收集其细胞培养后的废弃液;

b. 将疫苗株细胞培养液或弃液中的主要可溶性分泌物浓缩 10~100 倍;

c. 以单纯马立克氏病毒致病株感染鸡或细胞而制备的马立克氏病毒琼扩阳性抗原和马立克氏病毒琼扩阳性抗体,作为阳性反应体系的对照,采用琼扩试验并以马立克氏病毒琼扩阳性抗体检测上述各浓缩液中马立克氏病毒抗原的有无及其含量;

d. 能够与马立克氏病毒阳性抗体形成明显的琼扩沉淀线,并且该沉淀线与阳性反应体系或 MDV 致病株的沉淀线完全吻合并能融合的浓缩液,判定为马立克氏病毒抗原阳性,其所源于的疫苗株为马立克氏病毒抗原生产的候选株;

e. 以上述检测结果作为初选依据,实地收集候选疫苗株的细胞培养液,即已收获疫苗病毒后的细胞培养液,按 b、c 和 d 步骤对疫苗生产液中有无 MDV 抗原再进行检测与含量评价,以单位弃液中的目的抗原含量高者为佳,进而最终确定出鸡马立克氏病毒感染检测抗原的生产原料。

将收集来的疫苗细胞培养废弃液,经适当纯化分离和浓缩与定量后,即可作为 MDV 感染免疫学检测试剂盒和检测试纸的反应组份,如琼扩试验、酶联免疫试验、试纸条等的检测抗原或试剂组分。

由于本发明利用 MD 疫苗商业化培养后的废弃液作为 MDV 检测抗原的生产原料,降低了对环境的污染,提高了资源利用率,同时也消除了致病性 MDV 的散毒威胁,大大简化了生产工艺与流程,缩短了生产周期,并可节约原料液生产成本 50%以上。

具体实施方式:

本发明是根据 MD 疫苗能够产生可与致病性 MDV 强毒具有交叉反应性的病毒性抗原,以该 MD 疫苗的生产培养废弃液替代 MDV 强毒的感染物或病毒性抗原的各种表达系统表达产物,来作为制备 MDV 检测抗原的原料。

本发明所提供的筛选方法是:应用免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术,即:琼扩试验、酶联免疫试验、SDS-PAGE 电泳技术分析和/或结合 Western 印迹法,对马立克氏病疫苗株合格培养后的废弃液进行检测评价和筛选。

下面以琼扩试验法为例(其它方法均为行业技术人员熟知的经典方法,因而不必一一举例描述)进行详细描述,具体步骤如下:

- a. 对不同血清型 MDV 疫苗株进行细胞培养,收集其细胞培养后的弃液(含血清和无血清的)。
- b. 采用物理和/或化学的方法,将疫苗株细胞培养弃液或弃液中的主要可溶性分泌物浓缩 10~100 倍。
- c. 以单纯 MDV 致病株感染鸡或细胞而制备的 MDV 琼扩阳性抗原(羽囊抗原)和 MDV 琼扩阳性抗体(血清),作为阳性反应体系的对照,采用琼扩试验并以 MDV 琼扩阳性抗体检测上述各浓缩液中 MDV 抗原的有无及其含量。
- d. 能够与 MDV 阳性抗体形成明显的琼扩沉淀线,并且该沉淀线与阳性反应体系或源于 MDV 致病株的阳性抗原的沉淀线完全吻合并能融合的浓缩液,判定为 MDV 抗原阳性,其所源于的疫苗株为 MDV 抗原生产的候选株。
- e. 以上述检测结果作为初选依据,实地收集候选疫苗株(含其重组疫苗)的细胞培养弃液,即已收获疫苗病毒后的细胞培养液,按 b、c 和 d 步骤对疫苗生产弃液中有无 MDV 抗原再进行检测与含量评价,以单位液体中的目的抗原含量高者为佳,进而最终确定出 MDV 抗原的生产原料来源。

采用酶联免疫试验,或采用 SDS-PAGE 电泳技术分析和/或结合 Western

印迹法进行检测与评价，同样可以确定出 MDV 抗原的生产原料来源。

实施例一

以 MDV 血清 1 型的 CVI988/Rispens 株及其低代次种毒进行疫苗毒的增殖培养，在收获合格的感染细胞后，其病毒培养的上清液即培养后的废弃液（含血清或无血清），采用过滤或离心等方法，以除去废弃液中细胞碎片等而使之澄清，将已澄清的液体或直接将上清液，经物理法（如超滤法、冻干法）和/或化学法（如 20 ~ 60% 的饱和硫酸铵，等）进行初步除杂，并浓缩 10 ~ 100 倍后，以 MDV 琼扩阳性抗原和 MDV 琼扩阳性抗体作为阳性反应体系的对照，采用琼扩试验并以 MDV 琼扩阳性抗体检测上述各浓缩液中 MDV 抗原的有无及其含量，以单位弃液中的目的抗原含量高者为佳（也可采用酶联免疫试验进行更为准确的定量）。此外，也可以采用 SDS-PAGE 电泳技术分析和/或结合 Western 印迹法，对疫苗培养后的废弃液或其浓缩液处理液进行目的抗原的检测，通过目的抗原蛋白的分子量分析、识别和/或阳性对照的比较，从而确定被检液中是否有目的抗原及其含量的高低。若待检液中含有可检出的目的抗原成分，即为本发明所需要的可进行生产 MDV 检测抗原的原料液。

实施例二

以 MDV 血清 3 型的火鸡疱疹病毒（HVT）Fc-126 株及其低代次种毒进行 HVT 疫苗的增殖培养，其病毒培养合格后的培养上清废弃液。采用与实施例 1 同样的处理、检测与判定。

实施例三

以 CVI988 作为重组疫苗的载体，若其增殖培养液中分泌有一定含量的目的 MDV 抗原，采用与实施例 1 同样的处理与检测，并判定其中确有一定含量的目的 MDV 抗原存在，其细胞培养上清液也可作为进行生产 MDV 检测抗原的原料液。

将收集来的疫苗细胞培养废弃液，经适当纯化分离和浓缩与定量后，即可作为 MDV 感染免疫学检测试剂盒和检测试纸的反应组份，如 琼扩试验、酶联免疫试验、检测试纸条等的检测抗原或试剂组分。

专利名称(译)	制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料及其筛选方法		
公开(公告)号	CN101377489A	公开(公告)日	2009-03-04
申请号	CN200710113727.0	申请日	2007-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	张训海		
申请(专利权)人(译)	张训海		
当前申请(专利权)人(译)	张训海		
[标]发明人	张训海		
发明人	张训海		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569 G01N33/561		
代理人(译)	倪波		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的新原料及其筛选方法，采用马立克氏病疫苗培养废弃液作为制备鸡马立克氏病毒感染检测抗原的原料，应用免疫学检测技术和/或蛋白质电泳分析技术对马立克氏病疫苗株合格培养后的废弃液进行检测评价和筛选，筛选出可采用能够分泌与MDV强毒抗原具有交叉反应性病毒性抗原的MD疫苗CVI988/Rispens株、HVT Fc - 126株等商业化培养后的废弃液作为MDV检测抗原的生产原料，从而大大简化了生产工艺与流程，缩短了生产周期，并可节约原料液生产成本50%以上，同时消除了致病性MDV的散毒威胁，提高了资源利用率，降低了对环境的污染。