



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102305859 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 04

(21) 申请号 201110212152. 4

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 07. 27

(71) 申请人 吉林大学

地址 130000 吉林省长春市西安大路 5333 号

(72) 发明人 丁壮 黄志强 母连志 吴娟
杨闽楠 张泉鹏

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 王薇

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

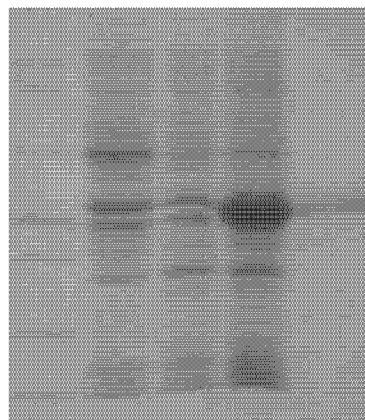
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒,其特征在于:将待检血清用样品稀释液 2 倍稀释后 100 μ l 加入 ELISA 板中 37℃ 孵育 1h, 设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用洗涤液清洗 5 次,每次 2min; 然后加入结合单抗每孔 100 μ l, 37℃ 孵育 1h, 洗涤液清洗 5 次,每次 2min; 然后加入羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物 37℃ 作用 1h, 洗涤液清洗 5 次,每次 2min; 然后加入显色底物溶液,将底物 A 和底物 B 以 1:1 混合, 100 μ l 加入 ELISA 孔中, 避光显色 15min, 加入 50 μ l 终止液, 测其 OD490 值。判定结果是这样设定的:抑制率 PI=(OD 未抑制-OD 样品)/OD 未抑制 *100%, PI>30% 对应的样品为阳性, 小于则为阴性。该试剂盒方法技术成熟, 重复性强, 能够有效区分猪繁殖与呼吸综合征病毒活毒和灭活毒抗体, 一般研究人员即可完成。



1. 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒,其特征在于:将96孔ELISA板、样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、羊抗小鼠IgG-HRP结合物、结合单抗、终止液、A底物、B底物、阳性样品、阴性样品、盖板膜分别用的广口瓶加以封装,贴上标签,组装成试剂盒,具体组装方法按以下步骤完成:

第一步:首先对96孔ELISA板进行包被:96空ELISA板上包被有PRRSV Nsp9蛋白,用包被缓冲液将Nsp9蛋白稀释到1.5ug/mL,每孔100ul包被ELISA板,37°C包被1h后用含5%脱脂奶粉的PBS 37°C封闭1h,然后用PBS洗涤5次干燥后用铝箔真空密封备用;

第二步:配制样品稀释液(PBST PH7.4):NaCl 8.0g;KH₂PO₄ 0.2g;Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g;KCl 0.2g补加二馏水致1000ml;加入0.5ml Tween-20,最后50ml分装;

第三步:配制20倍浓缩洗涤液:NaCl 160.0g;KH₂PO₄ 4g;Na₂HPO₄·12H₂O 58g;KCl 4g补加二馏水致1000ml;加入10ml Tween-20,最后50ml分装;

第四步:将购买的羊抗小鼠IgG-HRP结合物用10ml PBST加入2ul羊抗小鼠IgG-HRP二抗进行稀释,然后加入4%PEG,以25ml分装;

第五步:结合单抗的制备:

首先根据猪繁殖与呼吸综合征病毒BJ-4株及变异毒株(HB-1、SY0608、HN-HW、HuN4等)的核苷酸序列,利用Primer软件设计合成针对PRRSV Nsp9基因保守区域的特异性引物;用RT-PCR方法扩增出猪繁殖与呼吸综合征病毒JL/07/SW株Nsp9基因片段,克隆到pMD18-T载体并测序,基因克隆至表达载体pET-28a(+),得到重组表达载体pET-28a-Nsp9,用经鉴定的阳性重组质粒pET-28a-Nsp9转化BL21(DE3)感受态细胞,涂板挑菌(Kan100 mg/mL),阳性菌在涂加卡那霉素(100 mg/mL)LB液体培养基(Kan 100 mg/mL)中振荡培养过夜后,按1%转接种于含卡那霉素的LB培养基(Kan100 mg/mL),37°C振荡培养至对数生长期(OD_{600nm}=0.6),加入IPTG(终浓度1mmol/L),37°C诱导培养3h;离心沉淀菌体,超声破碎后经电洗脱得到高纯度的重组Nsp9蛋白,于-80°C保存备用;

然后用重组Nsp9蛋白制备单克隆抗体,具体方法如下:

1、动物免疫选择6-8周龄健康Ba1b/C小鼠以弗氏完全佐剂乳化纯化的PRRSV Nsp9蛋白,每只小鼠腹腔注射100μg,14d后以弗氏不完全佐剂乳化蛋白腹腔注射100μg,最后一次加强免疫时,直接腹腔注射100μg纯化的蛋白,融合前3~4d尾静脉注射50μg纯化的蛋白;

2、细胞融合取免疫小鼠的脾细胞与SP2/0混合于融合管内,以300g离心10min,弃去上清,振荡细胞,使两种细胞尽量混合均匀,然后60s内缓慢滴加预热的PEG-4000溶液,再缓慢加入无血清的1640培养基终止融合,静置后再以1000 r/min离心10min,弃去上清后加入HAT培养基,使细胞悬浮并混匀,于96孔培养板中培养,第14d开始换液并开始检测筛选;

3、杂交瘤细胞的筛选和克隆化克隆的筛选采用间接ELISA,用纯化的PRRSV Nsp9蛋白作为包被抗原;对所获阳性杂交瘤细胞的培养上清进行筛选;将ELISA筛选的阳性杂交瘤细胞进行克隆化,将检出的阳性孔再次克隆和亚克隆,直到所有的孔都为阳性;通过三次细胞克隆最终获得杂交瘤细胞株2D6;

4、腹水的制备0.5 mL的高压灭菌的石蜡油注射到小鼠腹腔,7d后注入106个杂交瘤细胞于小鼠腹腔,一周后抽取腹水,将收集好的腹水置37°C 24h,随后置4°C过夜,第

二天将腹水离心，上清 56℃灭活 30 min 即可；

5、单克隆抗体的纯化用 4 倍体积醋酸缓冲液稀释腹水，调至 pH4.5，缓慢滴加 3.3% 的正辛酸，搅拌 30 min，离心取上清，加入 1/10 体积的 10 倍 PBS，调至 pH7.4，4℃预冷后，用 45% 饱和硫酸铵沉淀，离心后取沉淀，用 PBS 稀释后移入透析袋，在 50 倍体积 PBS 中透析，透析期间多次换液，透析结束后，紫外分光光度计 280 nm 测定蛋白浓度并分装冻存；

6 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体的特性鉴定

(1)、腹水效价测定 间接 ELISA 方法测定，细胞培养上清与腹水分别从 10 倍和 100 倍开始做梯度稀释，同时分别以 SP2/0 细胞培养上清和腹水做同等稀释度作为对照；通过检测得知 2D6 单抗的腹水效价为 6.4×10^5 ；

(2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体 IgG 亚类鉴定 按小鼠 mAb IgG 亚类检测试剂盒的说明书进行；具体方法是将纯化的每株单克隆抗体 1000 倍稀释后包被酶标板，每孔 100 μ L，37℃孵育 1 h，洗涤后每孔加入 1000 倍稀释的抗体亚类试剂 100 μ L，37℃孵育 1 h，洗涤 3 遍；然后加入羊抗小鼠 IgG 酶标二抗，37℃孵育 1 h，洗涤后加入底物显色，确定单克隆抗体的亚类为 IgG2a。

(3)、杂交瘤细胞株染色体的分析 采用秋水仙素法对杂交瘤细胞株进行染色体分析，结果显示 2D6 杂交瘤细胞的染色体数目为 101 条；

(4)、猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体特异性鉴定 将所获单克隆抗体分别与猪伪狂犬病毒、猪流感病毒、猪细小病毒进行间接 ELISA，检测所得知制备的单克隆抗体与其它猪病毒均无交叉反应性；

将以上纯化单抗 2D6 以 80000 倍稀释于 PBS 中加入 4%PEG，25ml 分装；

第六步：配制终止液：2mol/L H₂SO₄ 浓硫酸 44.5ml，双蒸水 355.5ml，10ml 分装；

第七步：配制 A 底物：TMB 200mg，无水乙醇 100ml，加双蒸水至 1000ml，10ml 分装；

第八步：配制 B 底物：(0.1ml/L 柠檬酸 -0.2ml/L 磷酸氢二钠，pH5.0-5.4) : Na₂HPO₄ 14.60g，柠檬酸 9.33g，0.75% 过氧化氢 6.4ml，加三蒸水至 1000ml，调至 pH5.0-5.43，10ml 分装；

第九步：配制阳性样品：将标准 PRRSV 阳性血清 1:5 稀释于样品稀释液中，1ml 分装；

第十步：配制阴性样品：将经检测 PRRSV 阴性血清 1:5 稀释于样品稀释液中，1ml 分装。

2. 根据权利要求 1 所述的检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒，其特征在于所述采用试剂盒进行的检测方法如下：将待检血清用样品稀释液 2 倍稀释后 100 μ l 加入 ELISA 板中 37℃孵育 1h，设置阳性对照、阴性对照和空白对照；用洗涤液清洗 5 次，每次 2min；然后加入结合单抗每孔 100 μ l，37℃孵育 1h，洗涤液清洗 5 次，每次 2min；然后加入羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物 37℃作用 1h，洗涤液清洗 5 次，每次 2min；然后加入显色底物溶液，将底物 A 和底物 B 以 1:1 混合，100 μ l 加入 ELISA 孔中，避光显色 15min，加入 50 μ l 终止液，测其 OD₄₉₀ 值；判定结果是样设定的：抑制率 $PI = (OD_{未抑制} - OD_{样品}) / OD_{未抑制} * 100\%$ ，PI > 30% 对应的样品为阳性，小于则为阴性。

检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒,特别是涉及一种能够区分活毒感染和灭活毒免疫猪群的液相阻断 ELISA 制备方法,属于一种新的动物疫病诊断试剂,应用于畜牧兽医学领域。本发明具有深远的研究性和广泛的应用性,包括对地区内猪繁殖与呼吸综合征病毒流行病学调查,以及净化猪场和区分野毒感染和灭活毒免疫的猪群。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS) 由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染引起,主要特征为怀孕母猪发生流产、早产和死胎等严重的繁殖障碍以及仔猪与育肥猪的呼吸道疾病。PRRS 是上世纪 80 年代后期暴发的一种新的传染性疾病,于 1987 年首发于北美地区,在随后的几年内,便迅速地在欧、美大陆的许多国家流行,随后又蔓延至亚洲的一些国家,成世界范围内的大流行,给全球养猪业造成了巨大的经济损失。我国自 1995 年底暴发此病,并迅速传播至全国各地,成为我国规模化养猪场引发繁殖障碍的主要疫病之一。近年来 PRRS 呈持续性感染,并导致继发性感染增加,严重威胁了养猪业的发展。

[0003] PRRS 传播非常迅速,猪群一旦感染即呈持续性,污染猪场可成为疫源地。虽然 PRRSV 流行毒株有美洲型和欧洲型,但至今为止,我国分离到的 PRRSV 流行毒株均为美洲型。由于 PRRS 与其它许多引起猪繁殖障碍综合征的疾病(如猪细小病毒病、猪伪狂犬病、猪瘟等)的临床症状相似,不具有特征性,加上 PRRSV 感染猪群易引起继发感染,发生细菌性或病毒性继发感染,更使得临床表现和病理变化复杂化,猪只个体之间的临床表现差异很大,而且近年来越来越多的 PRRS 是亚临床型和慢性型病例。仅根据临床症状和病变及流行病学特点很难做出诊断,因此 PRRS 的确诊需要借助实验室诊断技术,特别是新发生本病的地区和猪场。

[0004] 目前国内外建立了一系列 PRRS 诊断方法。其中用于 PRRSV 检测方法主要有病毒分离、免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA)、血清中和试验 (SN)、间接荧光抗体试验 (IFA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、乳胶凝集试验 (LAT)、胶体金技术、单克隆抗体技术、反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)、套式 RT-PCR、实时 RT-PCR 和核酸探针原位杂交技术 (ISH)。上述检测 PRRSV 抗体的技术人多针对结构蛋白,而有关 PRRSV 非结构蛋白抗体的检测方法还未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒,其利用固相酶联免疫吸附试验 (ELISA) 原理,以 PRRSV 非结构蛋白 Nsp9 为诊断抗原,结合单抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 及其他配套试剂组成。其反应机理为包被抗原和样品中抗 PRRSV Nsp9 抗体结合导致单抗和抗原的结合量减少,通过酶标抗体形成“包被抗原

+ 结合单抗 + 酶标抗体”复合物,加入显色剂,通过酶催化反应显色。显色深浅与样品中的检测抗体含量成反比,当显色(OD_{490})超过设定的临界值时结果判为阳性,表明有活毒存在。判定结果是这样设定的:抑制率 $PI = (OD_{未抑制} - OD_{样品}) / OD_{未抑制} * 100\%$, $PI > 30\%$ 对应的样品为阳性,小于则为阴性。具有简单、快速、敏感和特异性好等特点;适用于区分临床区分猪繁殖与呼吸综合征病毒活毒和灭活毒抗体。

[0006] 本发明的技术方案是这样实现的:检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒,其特征在于:将 96 孔 ELISA 板、样品稀释液、20 倍浓缩洗涤液、羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物、结合单抗、终止液、底物 A、底物 B、阳性样品、阴性样品、盖板膜(11)分别用的广口瓶加以封装,贴上标签,组装成试剂盒,具体组装方法按以下步骤完成:

第一步:首先对 96 孔 ELISA 板进行包被:96 空 ELISA 板上包被有 PRRSV Nsp9 蛋白,用包被缓冲液将 Nsp9 蛋白稀释到 1.5ug/mL,每孔 100ul 包被 ELISA 板,37°C 包被 1h 后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 37°C 封闭 1h,然后用 PBS 洗涤 5 次干燥后用铝箔真空密封备用;

第二步:配制样品稀释液(PBST PH7.4):NaCl 8.0g; KH_2PO_4 0.2g; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g; KCl 0.2g 补加二馏水致 1000ml; 加入 0.5ml Tween-20,最后 50ml 分装;

第三步:配制 20 倍浓缩洗涤液:NaCl 160.0g; KH_2PO_4 4g; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 58g; KCl 4g 补加二馏水致 1000ml; 加入 10ml Tween-20,最后 50ml 分装;

第四步:将购买的羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物用 10ml PBST 加入 2ul 羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗进行稀释,然后加入 4%PEG,以 25ml 分装;

第五步:结合单抗的制备:

首先根据猪繁殖与呼吸综合征病毒 BJ-4 株及变异毒株(HB-1、SY0608、HN-HW、HuN4 等)的核苷酸序列,利用 Primer 软件设计合成针对 PRRSV Nsp9 基因保守区域的特异性引物。用 RT-PCR 方法扩增出猪繁殖与呼吸综合征病毒 JL/07/SW 株 Nsp9 基因片段,克隆到 pMD18-T 载体并测序,基因克隆至表达载体 pET-28a(+),得到重组表达载体 pET-28a-Nsp9,用经鉴定的阳性重组质粒 pET-28a-Nsp9 转化 BL21(DE3) 感受态细胞,涂板挑菌(Kan100 mg/mL),阳性菌在涂加卡那霉素(100 mg/mL) LB 液体培养基(Kan 100 mg/mL)中振荡培养过夜后,按 1% 转接种于含卡那霉素的 LB 培养基(Kan100 mg/mL),37°C 振荡培养至对数生长期($OD_{600nm} = 0.6$),加入 IPTG(终浓度 1mmol/L),37°C 诱导培养 3 h。离心沉淀菌体,超声破碎后经电洗脱得到高纯度的重组 Nsp9 蛋白,于 -80°C 保存备用;

然后用重组 Nsp9 蛋白制备单克隆抗体,具体方法如下:

1、动物免疫选择 6-8 周龄健康 Ba1b/C 小鼠以弗氏完全佐剂乳化纯化的 PRRSV Nsp9 蛋白,每只小鼠腹腔注射 100 μ g, 14d 后以弗氏不完全佐剂乳化蛋白腹腔注射 100 μ g, 最后一次加强免疫时,直接腹腔注射 100 μ g 纯化的蛋白,融合前 3~4d 尾静脉注射 50 μ g 纯化的蛋白;

2、细胞融合取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 混合于融合管内,以 300g 离心 10 min, 弃去上清,振荡细胞,使两种细胞尽量混合均匀,然后 60s 内缓慢滴加预热的 PEG-4000 溶液,再缓慢加入无血清的 1640 培养基终止融合,静置后再以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清后加入 HAT 培养基,使细胞悬浮并混匀,于 96 孔培养板中培养,第 14d 开始换液并开始检测筛选;

3、杂交瘤细胞的筛选和克隆化克隆的筛选采用间接 ELISA,用纯化的 PRRSV Nsp9 蛋

白作为包被抗原。对所获阳性杂交瘤细胞的培养上清进行筛选；将 ELISA 筛选的阳性杂交瘤细胞进行克隆化，将检出的阳性孔再次克隆和亚克隆，直到所有的孔都为阳性。通过三次细胞克隆最终获得杂交瘤细胞株 2D6；

4、腹水的制备 0.5 mL 的高压灭菌的石蜡油注射到小鼠腹腔，7d 后注入 106 个杂交瘤细胞于小鼠腹腔，一周后抽取腹水，将收集好的腹水置 37℃ 24h，随后置 4℃ 过夜，第二天将腹水离心，上清 56℃ 灭活 30 min 即可；

5、单克隆抗体的纯化用 4 倍体积醋酸缓冲液稀释腹水，调至 pH4.5，缓慢滴加 3.3% 的正辛酸，搅拌 30 min，离心取上清，加入 1/10 体积的 10 倍 PBS，调至 pH7.4，4℃ 预冷后，用 45% 饱和硫酸铵沉淀，离心后取沉淀，用 PBS 稀释后移入透析袋，在 50 倍体积 PBS 中透析，透析期间多次换液，透析结束后，紫外分光光度计 280 nm 测定蛋白浓度并分装冻存；

6 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体的特性鉴定

(1)、腹水效价测定 间接 ELISA 方法测定，细胞培养上清与腹水分别从 10 倍和 100 倍开始做梯度稀释，同时分别以 SP2/0 细胞培养上清和腹水做同等稀释度作为对照。通过检测得知 2D6 单抗的腹水效价为 6.4×10^5 ；

(2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体 IgG 亚类鉴定按小鼠 mAb IgG 亚类检测试剂盒的说明书进行。具体方法是将纯化的每株单克隆抗体 1000 倍稀释后包被酶标板，每孔 100 μ L，37℃ 孵育 1 h，洗涤后每孔加入 1000 倍稀释的抗体亚类试剂 100 μ L，37℃ 孵育 1 h，洗涤 3 遍。然后加入羊抗小鼠 IgG 酶标二抗，37℃ 孵育 1 h，洗涤后加入底物显色，确定单克隆抗体的亚类为 IgG2a；

(3)、杂交瘤细胞株染色体的分析采用秋水仙素法对杂交瘤细胞株进行染色体分析，结果显示 2D6 杂交瘤细胞的染色体数目为 101 条；

(4)、猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体特异性鉴定将所获单克隆抗体分别与猪伪狂犬病毒、猪流感病毒、猪细小病毒进行间接 ELISA，检测所得知制备的单克隆抗体与其它猪病毒病均无交叉反应性；

将以上纯化单抗 2D6 以 80000 倍稀释于 PBS 中加入 4%PEG，25ml 分装；

第六步：配制终止液：2mol/L H₂SO₄ 浓硫酸 44.5ml，双蒸水 355.5ml，10ml 分装；

第七步：配制底物 A：TMB 200mg，无水乙醇 100ml，加双蒸水至 1000ml，10ml 分装；

第八步：配制底物 B：(0.1ml/L 柠檬酸 -0.2ml/L 磷酸氢二钠，pH5.0-5.4)：Na₂HPO₄ 14.60g，柠檬酸 9.33g，0.75% 过氧化氢 6.4ml，加三蒸水至 1000ml，调至 pH5.0-5.43，10ml 分装；

第九步：配制阳性样品：将标准 PRRSV 阳性血清 1:5 稀释于样品稀释液中，1ml 分装；

第十步：配制阴性样品：将经检测 PRRSV 阴性血清 1:5 稀释于样品稀释液中，1ml 分装。

[0007] 所述采用试剂盒进行的检测方法如下：将待检血清用样品稀释液 2 倍稀释后 100 μ l 加入 ELISA 板中 37℃ 孵育 1h，设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用洗涤液清洗 5 次，每次 2min；然后加入结合单抗每孔 100 μ l，37℃ 孵育 1h，洗涤液清洗 5 次，每次 2min；然后加入羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物 37℃ 作用 1h，洗涤液清洗 5 次，每次 2min；然后加入显色底物溶液，将底物 A 和底物 B 以 1:1 混合，100 μ l 加入 ELISA 孔中，避光显色 15min，加入 50 μ l 终止液，测其 OD₄₉₀ 值；判定结果是这样设定的：抑制率 PI=(OD 未抑制 - OD 样品) / OD 未抑

制 *100%, PI>30% 对应的样品为阳性, 小于则为阴性。

[0008] 本发明的积极效果是:

1、具有生物安全性, 其所使用的原核表达的 PRRSV Nsp9 蛋白为抗原、捕获单抗 2D6 为小鼠诱生获得, 不含猪繁殖与呼吸综合征病毒, 因此不存在散毒的危险。

[0009] 2、特异性强, 检测抗体 2D6 为敏感性和特异性较好的单克隆抗体, 因此提高了试剂盒的敏感性和特异性。

[0010] 3、生产成本低, 捕获单抗可由相应的杂交瘤细胞系通过注射 Balb/c 小鼠腹腔, 诱生腹水, 通过辛酸-硫酸铵纯化而大量获得。

[0011] 4、能够良好区分猪繁殖与呼吸综合征病毒活毒和灭活毒抗体, 可应用于猪场的净化, 和流行病学调查。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明的 pET-28a-Nsp9 经诱导表达蛋白, 其中 1. 空 BL-21 2. 空载体 3. pET-28a-Nsp9 4. 纯化蛋白 M. 低分子量蛋白 Marker。

[0013] 图 2 为本发明腹水 SDS 电泳, 其中 1. 纯化腹水 2. 未纯化 M. 低分子量蛋白 Marker。

[0014] 图 3 为本发明的 2D6 染色体计数图谱。

[0015] 图 4 为本发明 ELISA 最佳一抗和二抗工作浓度。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实例对本发明做详细说明。下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。

[0017] 实施例 1 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白的制备及纯化

经鉴定的阳性重组质粒 pET-28a-Nsp9 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂板挑菌 (Kan100 mg/mL), 阳性菌在涂加卡那霉素 (100 mg/mL) LB 液体培养基 (Kan 100 mg/mL) 中振荡培养过夜后, 按 1% 转接种于含卡那霉素的 LB 培养基 (Kan100 mg/mL), 37°C 振荡培养至对数生长期 (OD_{600nm}=0.6), 加入 IPTG (终浓度 1mmol/L), 37°C 诱导培养 3 h。离心沉淀菌体, 超声破碎后经电洗脱得到高纯度的重组蛋白, 于 -80°C 保存备用。鉴定结果见图 1。

[0018] 实施例 2 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体的制备

1、动物免疫 选择 6-8 周龄健康 Balb/C 小鼠以弗氏完全佐剂乳化纯化的 PRRSV Nsp9 蛋白, 每只小鼠腹腔注射 100 μg 左右, 14d 后以弗氏不完全佐剂乳化蛋白腹腔注射 100 μg, 最后一次加强免疫时, 直接腹腔注射 100 μg 纯化的蛋白, 融合前 3~4d 尾静脉注射 50 μg 纯化的蛋白。

[0019] 2、细胞融合 取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 混合于融合管内, 以 300g 离心 10 min, 弃去上清, 振荡细胞, 使两种细胞尽量混合均匀, 然后 60s 内缓慢滴加预热的 PEG-4000 溶液, 再缓慢加入无血清的 1640 培养基终止融合, 静置后再以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清后加入 HAT 培养基, 使细胞悬浮并混匀, 于 96 孔培养板中培养, 第 14d 开始换液并开始检测筛选。

[0020] 3、杂交瘤细胞的筛选和克隆化 克隆的筛选采用间接 ELISA, 用纯化的 PRRSV

Nsp9 蛋白作为包被抗原。对所获阳性杂交瘤细胞的培养上清进行筛选；将 ELISA 筛选的阳性杂交瘤细胞进行克隆化，将检出的阳性孔再次克隆和亚克隆，直到所有的孔都为阳性。通过三次细胞克隆最终获得杂交瘤细胞株 2D6。

[0021] 4、腹水的制备 0.5 mL 的高压灭菌的石蜡油注射到小鼠腹腔，7d 后注入 106 个杂交瘤细胞于小鼠腹腔，一周后抽取腹水，将收集好的腹水置 37℃ 24h，随后置 4℃ 过夜，第二天将腹水离心，上清 56℃ 灭活 30 min 即可。

[0022] 5、单克隆抗体的纯化用 4 倍体积醋酸缓冲液稀释腹水，调至 pH4.5，缓慢滴加 3.3% 的正辛酸，搅拌 30 min，离心取上清，加入 1/10 体积的 10 倍 PBS，调至 pH7.4，4℃ 预冷后，用 45% 饱和硫酸铵沉淀，离心后取沉淀，用 PBS 稀释后移入透析袋，在 50 倍体积 PBS 中透析，透析期间多次换液，透析结束后，紫外分光光度计 280 nm 测定蛋白浓度并分装冻存。

[0023] 6 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体的特性鉴定

1、腹水效价测定 间接 ELISA 方法测定，细胞培养上清与腹水分别从 10 倍和 100 倍开始做梯度稀释，同时分别以 SP2/0 细胞培养上清和腹水做同等稀释度作为对照。通过检测得知 2D6 单抗的腹水效价为 6.4×10^5 。鉴定结果见图 3。

[0024] 2、猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体 IgG 亚类鉴定按小鼠 mAb IgG 亚类检测试剂盒的说明书进行。具体方法是将纯化的每株单克隆抗体 1000 倍稀释后包被酶标板，每孔 100 μ L，37℃ 孵育 1 h，洗涤后每孔加入 1000 倍稀释的抗体亚类试剂 100 μ L，37℃ 孵育 1 h，洗涤 3 遍。然后加入羊抗小鼠 IgG 酶标二抗，37℃ 孵育 1 h，洗涤后加入底物显色，确定单克隆抗体的亚类为 IgG2a。

3、杂交瘤细胞株染色体的分析采用秋水仙素法对杂交瘤细胞株进行染色体分析，结果显示 2D6 杂交瘤细胞的染色体数目为 101 条，鉴定结果见图 2。

[0025] 4、猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体特异性鉴定将所获单克隆抗体分别与猪伪狂犬病毒、猪流感病毒、猪细小病毒进行间接 ELISA，检测所得知制备的单克隆抗体与其它猪病毒病均无交叉反应性，鉴定结果见表二。

[0026] 实施例 3 阻断 ELISA 方法的建立

1. 反应程序的建立

(1) 间接 ELISA 方法的程序：

包被：用 pH9.6 碳酸缓冲液稀释的 ELISA 抗原稀释成 0.2 μ g/孔，以每孔 100 μ L 的量加入酶标板中，4℃ 过夜。甩干包被液，PBST（含 0.05% Tween-20 的 PBS，pH7.2）洗板 3 次。封闭：加入 5% 脱脂牛奶封闭液，300 μ L/孔，37℃ 60min，甩干，洗涤液洗涤 3 次，300 μ L/孔，3min/次。加样：加入抗 PRRSV Nsp9 蛋白单抗 2D6，每孔 100 μ L，37℃ 作用 60 min；洗涤液洗涤 5 次，300 μ L/孔，3min/次。加入 HRP 标记的羊抗鼠 HRP 酶标二抗，每孔 100 μ L，37℃ 作用 45 min；甩去液体、洗板，加入 TMB，每孔 100 μ L，室温作用 15 min；加入 1 mol/L H_2SO_4 50 μ L 终止反应，测定 OD490nm 值。

[0027] (2) 抗原最佳工作浓度的确定：

以已测定浓度的目的重组蛋白为抗原做倍比稀释，浓度分别为 1.6 μ g / mL, 0.8 μ g / mL, 0.4 μ g / mL, 0.2 μ g / mL, 0.1 μ g / mL, 0.05 μ g / mL, 100 μ g / 孔，4℃ 包被酶标板过夜。阴、阳性血清也同时做系列倍比稀释 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 组成方阵，进行间接 ELISA。

各步 37℃ 反应 30 min, 显色 12 ~ 15 min 后终止。在酶联检测仪上 490 nm 波长处测定样本 OD 值。选择阳性血清 OD 值在 1 左右且阳性 OD 值 / 阴性 OD 值 (P / N) 比值最大时的抗原包被浓度和抗体稀释度为最佳工作浓度。确定最佳抗原包被浓度为 0.5ug / mL

2. 重组 Nsp9 蛋白阻断 ELISA 程序:

包被: 用 pH9.6 碳酸缓冲液稀释的 ELISA 抗原稀释成 0.2 μg / 孔, 以每孔 100 μL 的量加入酶标板中, 4℃ 过夜。甩干包被液, PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS, pH7.2) 洗板 3 次。封闭: 加入 5% 脱脂牛奶封闭液, 300 μL / 孔, 37℃ 60min, 甩干, 洗涤液洗涤 3 次, 300 μL / 孔, 3min / 次。加样 1: 加入被检的猪血清, 每孔 100 μL, 37℃ 作用 45 min; 甩去液体、洗板, 洗涤液洗涤 5 次, 300 μL / 孔, 3min / 次。加样 2: 加入抗 PRRSV Nsp9 蛋白单抗 2D6, 80000 倍稀释, 每孔 100 μL, 37℃ 作用 60 min; 洗涤液洗涤 5 次, 300 μL / 孔, 3min / 次。甩去液体、洗板, 加入 HRP 标记的羊抗猪二抗, 每孔 100 μL, 37℃ 作用 60 min; 甩去液体、洗板, 加入 OPD, 每孔 100 μL, 室温作用 15 min; 加入 1 mol/L H₂SO₄ 50 μL 终止反应, 测定 OD_{490nm} 值。

[0028] 3. 阻断 ELISA 最适反应条件的确定

(1) 一抗、二抗最佳工作浓度的确定

用已确定的抗原最适工作浓度进行阻断 ELISA, 方阵滴定法测定 PRRSV 单克隆抗体的最佳工作浓度和酶标抗体的参考工作浓度。将结合单抗和酶标二抗作不同稀释度稀释, 各步 37℃ 反应 60 min, 显色 12 ~ 15 min 后终止。490 nm 波长处测定样本 OD 值。选择 OD 值在 1 左右且阳性 OD 值 / 阴性 OD 值 (P / N) 比值最大时的一抗和二抗稀释度为最佳工作浓度。确定最佳一抗工作浓度为 80000 倍稀释, 二抗为 5000 倍稀释, 鉴定结果见图 4。

[0029] (2) 封闭液及作用时间的确定

用已确定的抗原、抗体及酶标二抗的最适工作浓度进行间接 ELISA。分别用含 2% 脱脂奶粉的 PBS、5% 脱脂奶粉的 PBS、10% 血清、0.05% Tween-20 的 PBS 作为反应的封闭液及抗体稀释液。37℃ 分别封闭 30min、1h、2h。显色 12-15 min 后终止。490 nm 波长处测定各样本 OD 值。比较各组的 OD₄₉₀ 值和 P / N 值, 确定 ELISA 反应的最适封闭液及封闭时间。选择 5% 脱脂奶粉的 PBS 作用 1h 为最佳封闭液和作用时间。

[0030] (3) 阻断 ELISA 敏感性试验

判定标准的确定: 取 20 份经 IDEXX PRRSV 抗体检测试剂盒检测为 PRRSV 抗体阳性的猪血清, 按 1 : 100 稀释后进行间接阻断 ELISA 测定 OD_{490nm} 值, 规定以 20 份血清的平均 OD_{490nm} 加 3 倍标准差作为阴阳性的临界值, 计算其抑制率。结果显示抑制率大于 30% 为抗体阳性, 抑制率小于 30% 为阴性作为判断标准。

$$\text{抑制率公式: 抑制率 (\%)} = \left[\frac{\text{未抑制孔 OD}_{490\text{nm}} - \text{抑制孔 OD}_{490\text{nm}}}{\text{未抑制孔 OD}_{490\text{nm}}} \right] \times 100\%$$

[0031]

ELISA 效价	10	20	40	80	160	320
敏感试验	+	+	+	+	+	-

(4) 阻断 ELISA 特异性试验

与猪伪狂犬病毒、猪流感病毒、猪细小病毒进行 ELISA 交叉检测。结果说明与这些病毒无交叉反应。

表 2 试剂盒特异性试验

检测样品	猪繁殖与呼吸综合征病毒	伪狂犬病毒	蒸馏水	猪流感病毒	猪细小病毒
[0032] 检测结果	+	-	-	-	-

(5) 阻断 ELISA 可重复性性试验

取 4 块不同批次包被的酶标板,每个稀释度设 4 个重复,在同一块酶标板上进行批内重复,不同的酶标板之间进行批间重复,测定 OD 值,计算其变异系数,如果变异系数 <10% 则说明其重复性和稳定性很好。4 个不同批次的酶标板,结果一致。说明检测方法的重复性较好。

[0033] 实施例 4 阻断 ELISA 试剂盒的组装

将建立好的阻断 ELISA 方法中所用到的试剂盒材料:96 空 ELISA 板(1)、样品稀释液(2)、20 倍浓缩洗涤液(3)、羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物(4)、结合单抗(5)终止液(6)、底物 A(7)、底物 B(8)、阳性样品(9)、阴性样品(10)、盖板膜(11)分别用相应的广口瓶加以封装,贴上标签,组装成试剂盒,具体组装方法按以下步骤完成:

第一步:首先对 96 孔 ELISA 板(1)进行包被:96 空 ELISA 板(1)上包被有 PRRSV Nsp9 蛋白,用包被缓冲液将 Nsp9 蛋白稀释到 1.5ug/mL,每孔 100u1 包被 ELISA 板,37℃包被 1h 后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 37℃封闭 1h,然后用 PBS 洗涤 5 次干燥后用铝箔真空密封备用;

第二步:配制样品稀释液(2)(PBST PH7.4):NaCl 8.0g;KH₂PO₄ 0.2g;Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g;KCl 0.2g 补加二馏水致 1000ml;加入 0.5ml Tween-20,最后 50ml 分装;

第三步:配制 20 倍浓缩洗涤液(3):NaCl 160.0g;KH₂PO₄ 4g;Na₂HPO₄ · 12H₂O 58g;KCl 4g 补加二馏水致 1000ml;加入 10ml Tween-20,最后 50ml 分装;

第四步:将购买的羊抗小鼠 IgG-HRP 结合物(4)用 10ml PBST 加入 2u1 羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗进行稀释,然后加入 4%PEG,以 25ml 分装;

第五步:结合单抗(5)的制备:将以上纯化单抗 2D6 以 80000 倍稀释于 PBS 中加入 4%PEG,25ml 分装;

第六步:配制终止液(6):2mol/L H₂SO₄ 浓硫酸 44.5ml,双蒸水 355.5ml,10ml 分装;

第七步:配制底物 A(7):TMB 200mg,无水乙醇 100ml,加双蒸水至 1000ml,10ml 分装;

第八步:配制底物 B(8):(0.1ml/L 柠檬酸-0.2ml/L 磷酸氢二钠,pH5.0-5.4):Na₂HPO₄ 14.60g,柠檬酸 9.33g,0.75% 过氧化氢 6.4ml,加三蒸水至 1000ml,调至 pH5.0-5.43,10ml 分装;

第九步:配制阳性样品(9):将标准 PRRSV 阳性血清 1:5 稀释于样品稀释液中,1ml 分装;

第十步:配制阴性样品(10):将经检测 PRRSV 阴性血清 1:5 稀释于样品稀释液中,1ml 分装。

[0034] 实施例 5 阻断 ELISA 试剂盒的保质期的确定

将组装好的阻断 ELISA 试剂盒 4℃放置一个月、两个月、四个月、半年测定其特异性和敏感性。确定该试剂盒的保质期为 3 个月。

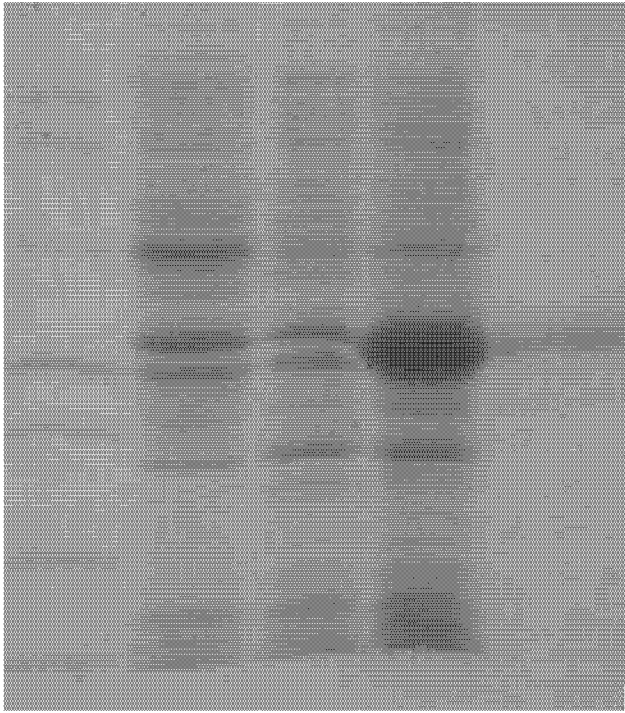


图 1

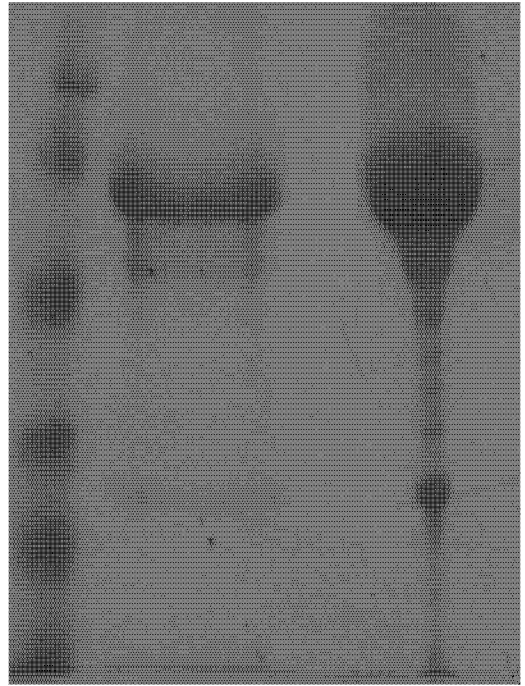


图 2

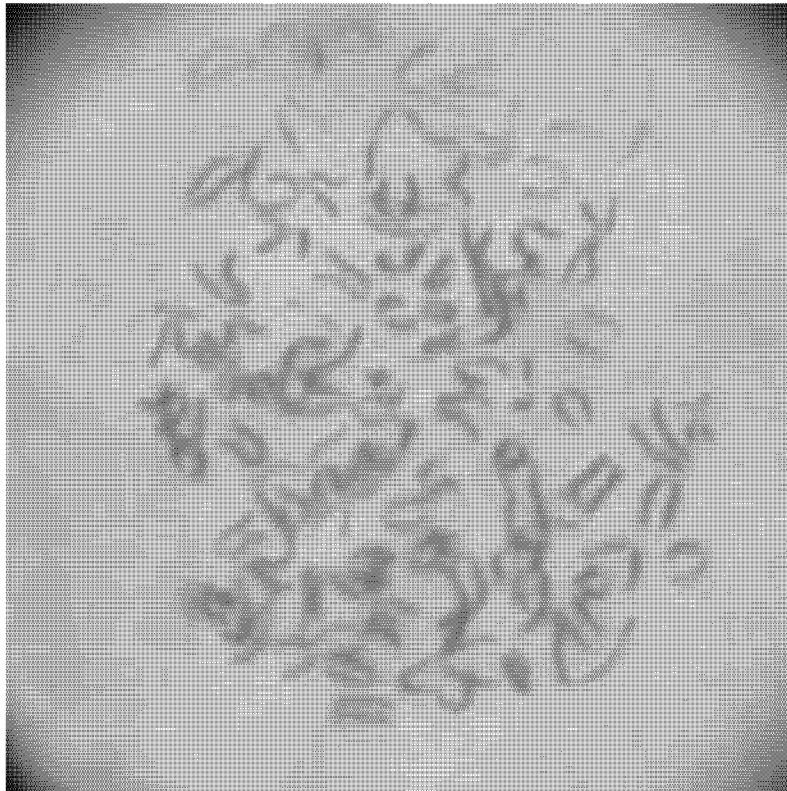


图 3

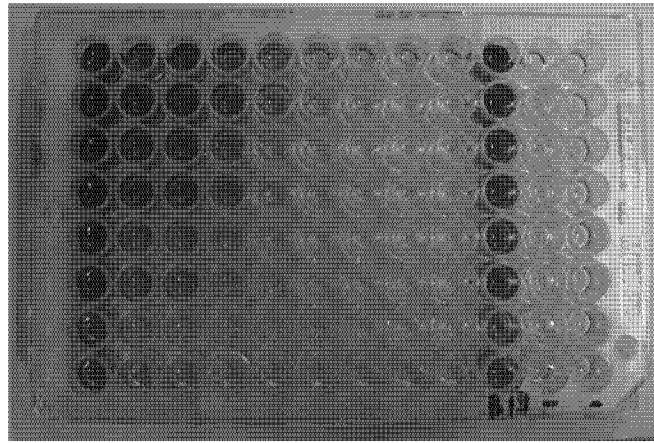


图 4

专利名称(译)	检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒		
公开(公告)号	CN102305859A	公开(公告)日	2012-01-04
申请号	CN201110212152.4	申请日	2011-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	丁壮 黄志强 母连志 吴娟 杨闽楠 张泉鹏		
发明人	丁壮 黄志强 母连志 吴娟 杨闽楠 张泉鹏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	王薇		
其他公开文献	CN102305859B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的活毒抗体试剂盒，其特征在于：将待检血清用样品稀释液2倍稀释后100μl加入ELISA板中37°C孵育1h，设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用洗涤液清洗5次，每次2min；然后加入结合单抗每孔100μl，37°C孵育1h，洗涤液清洗5次，每次2min；然后加入羊抗小鼠IgG-HRP结合物37°C作用1h，洗涤液清洗5次，每次2min；然后加入显色底物溶液，将底物A和底物B以1:1混合，100μl加入ELISA孔中，避光显色15min，加入50μl终止液，测其OD490值。判定结果是这样设定的：抑制率PI=(OD未抑制-OD样品)/OD未抑制*100%，PI>30%对应的样品为阳性，小于则为阴性。该试剂盒方法技术成熟，重复性强，能够有效区分猪繁殖与呼吸综合征病毒活毒和灭活毒抗体，一般研究人员即可完成。

