



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872602 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810752119.2

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.07.10

(71)申请人 安徽九川生物科技有限公司

地址 241000 安徽省芜湖市经济技术开发区
衡山路35号汽车电子创业园孵化器
大楼4楼

(72)发明人 单雪芹 蒋敏之 王亚男 许高涛
凡玉芳 郭志燕 赵雨 周炜
刘家炉 鲍可兵

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 尹婷婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

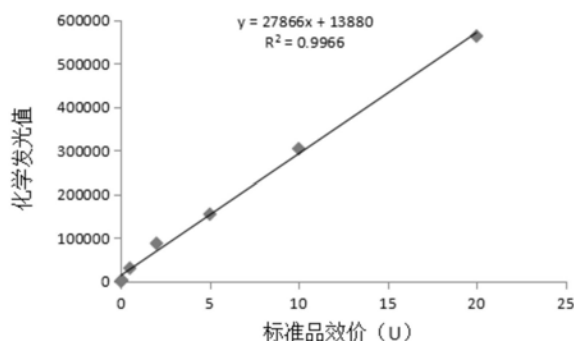
权利要求书2页 说明书10页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法,所述试剂盒包括磁微粒试剂、酶标抗体、底物溶液、洗涤液、标准品、稀释液,所述磁微粒试剂是由偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液和偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3组成。通过包裹着重组PRRSV N蛋白和重组GP5蛋白抗原的磁微粒对待测抗体进行捕获使得反应更彻底,灵敏度更高,可实现待测样品中微量抗体的定量检测。



1. 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒, 包括磁微粒试剂、酶标抗体、底物溶液、洗涤液、标准品、稀释液, 其特征在于, 所述磁微粒试剂是由偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液和偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3组成。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述磁微粒试剂的制备方法包括以下步骤:

(1) 将表面带有羧基的磁珠分散、清洗、EDC/NHS活化后, 分散到缓冲液中; 分别向其中加入重组PRRSV衣壳蛋白30℃涡旋振荡12~16h, 经磁分离、洗涤后分散到MES缓冲液中, 得到偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液;

(2) 用与步骤(1)同样的方法得到偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液;

(3) 将偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液与偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3混合;

(4) 向步骤(3)得到的混合液中加入PBS缓冲液封闭磁珠表面未结合抗原的位点, 经磁分离、洗涤后, 保存于含1%BSA的PBS缓冲液中, 即可得到所述磁微粒试剂。

3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体。

4. 根据权利要求3所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体的制备方法包括以下步骤:

A、将辣根过氧化物酶活化;

B、按照酶与抗原的质量比1:1将活化后的辣根过氧化物酶与抗猪IgG抗体混合均匀, 然后透析, 透析完成后, 加入5mg/ml的NaBH₄反应4h, 再次透析;

C、向步骤B得到的透析液中加入等体积的硫酸铵溶液除盐, 经离心、PBS重悬后, 再次透析, 经离心后, 收集上清液, 并加入50%甘油保存, 即可得到所述辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体。

5. 根据权利要求1-3任意一项所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述底物溶液包括A液和B液, 所述A液为pH为8.6的含10mM鲁米诺和1mM对碘苯酚的0.5M硼酸缓冲液; 所述B液为pH8.6的含1%H₂O₂的0.5M硼酸缓冲液。

6. 根据权利要求1-3任意一项所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述标准品的制备方法为取多份感染了PRRSV的猪阳性血清混合后, 经Protein A管柱亲和层析纯化后浓缩至终浓度为1.0mg/mL, 其效价为20U。

7. 根据权利要求1-3任意一项所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述洗涤液为pH7.6的0.1M PBST缓冲液; 所述稀释液为pH7.4的含1%BSA、0.05%Tween-20的0.1M PBS缓冲液。

8. 根据权利要求1-3任意一项所述的检测试剂盒的使用方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

S1、将标准品经稀释液稀释至系列浓度, 分别放入反应杯中, 加入磁微粒试剂温育, 经磁分离、洗涤后, 再向反应杯中加入酶标二抗, 经磁分离、洗涤后向反应杯中加入底物溶液, 室温避光3min后检测发光值;

S2、以标准品效价为横坐标, 发光值为纵坐标构建标准曲线得到线性方程;

S3、将待测样品采用步骤S1同样的方法测得其发光值, 将发光值代入线性方程, 即可定

量测试出待测样品的效价。

9. 根据权利要求8所述的检测试剂盒的使用方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

S1、将标准品经稀释液稀释至系列浓度,分别取30 μ l放入反应杯中,加入20 μ l磁微粒试剂于37 $^{\circ}$ C孵育20min,经磁分离、并用pH7.6的0.1M PBST缓冲液洗涤后,再向反应杯中加入50 μ l酶标二抗,经磁分离、pH7.6的0.1M PBST缓冲液洗涤后向反应杯中加入底物溶液,所述底物溶液为A、B液各50 μ l混匀;室温避光3后检测发光值;

S2、以标准品效价为横坐标,发光值为纵坐标构建标准曲线得到线性方程;

S3、将待测样品采用步骤S1同样的方法测得其发光值,将发光值代入线性方程,即可定量测试出待测样品的效价。

10. 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的定量检测方法,其特征在于,使用权利要求1-3任意一项所述的试剂盒进行检测。

一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及猪繁殖与呼吸综合征抗体的定量检测,具体涉及一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由动脉炎病毒科的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种严重危害养猪业的烈性传染病,以妊娠母猪早产、流产、死胎等繁殖障碍及仔猪呼吸系统疾病为主要特征。因部分发病猪耳部发绀变紫,又称之为“蓝耳病”。该病蔓延极快,且致死率高,给畜牧业生产带来巨大的经济损失,早发现、早确诊对该病的防治意义重大。要做到早确诊就需要快速、敏感、特异的诊断方法。

[0003] 目前,检测PRRSV抗体的方法临床多采用传统的ELISA检测方法,耗时较长,且特异性、灵敏度均不高;分子诊断方法虽然具有高灵敏度和特异性,但不适用于临床快速诊断,费时费力;新兴的免疫发光方法需要昂贵的仪器设备和经验丰富的操作人员,不适合养殖场使用。

[0004] 以上方法存在耗时费力、灵敏度差等缺点。开发灵敏度更高、准确快速、成本低廉的PRRS检测试剂是亟需解决的重要问题。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒。发明所述试剂盒由磁微粒试剂、酶标抗体、底物溶液、洗涤液、标准品、稀释液构成。其中磁微粒试剂是由在免疫磁珠上分别偶联上重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和重组PRRSV囊膜糖蛋白(GP5 蛋白)以一定比例混合,以捕获样本中不同种类的抗体,实现更加精准的检测。

[0006] 本发明还提供了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒的使用方法。通过试剂盒测试不同浓度的标准品溶液的发光值,构建线性关系,从而可定量检测出待测样品中的抗体效价。

[0007] 本发明采取的技术方案为:

[0008] 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒,包括磁微粒试剂、酶标抗体、底物溶液、洗涤液、标准品、稀释液,所述磁微粒试剂是由偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液和偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3组成。

[0009] 所述磁微粒试剂的制备方法包括以下步骤:

[0010] (1) 将表面带有羧基的磁珠分散、清洗、EDC/NHS活化后,分散到MES 缓冲液中;分别向其中加入重组PRRSV衣壳蛋白30℃涡旋振荡12~16h,将磁分离、洗涤后分散到MES缓冲

液中,得到偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液;

[0011] (2) 用与步骤(1)同样的方法得到偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液;

[0012] (3) 将偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液与偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3混合;

[0013] (4) 向步骤(3)得到的混合液中加入PBS缓冲液封闭磁珠表面未结合抗原的位点,经磁分离、洗涤后,保存于含1%BSA的PBS缓冲液中,即可得到所述磁微粒试剂。

[0014] 进一步地,所述磁微粒试剂的制备方法优选为包括以下步骤:

[0015] (1) 用1ml pH5.0含0.1%Tween-20的25mmol/L MES溶液,分散10mg 表面有羧基的磁珠,分散均匀后置磁力架上磁分离5~10min,去上清,再加入 5~10ml MES溶液洗涤3次,至上清完全澄清透明后,去上清,用1ml MES溶液重悬磁珠,使磁珠终浓度5~10mg/ml;加入50 μ l 50~100mg/ml的EDC和50 μ l 50~100mg/ml的NHS,混匀后,室温涡旋振荡2小时;活化反应完成后,再加入MES洗涤2次,去除溶液中的活化剂,最后用1ml MES重悬活化后的磁珠;取20~50 μ l 1.2mg/ml重组N蛋白与1ml MES混匀,加入到1ml活化后的磁珠溶液中,30℃涡旋振荡12~16h;偶联完成后,磁分离去上清,用MES洗涤2次,再用2ml MES重悬;

[0016] (2) 用与步骤(1)同样的方法得到偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液;

[0017] (3) 将偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液与偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3混合;

[0018] (4) 向步骤(3)得到的混合液中加入2ml含1%BSA、0.02%P-300的PBS 缓冲液,30℃涡旋振荡2h,封闭磁珠表面未结合抗原的位点,经磁分离、PBS 缓冲液洗涤2次后,保存于1ml含1%BSA的PBS缓冲液中,即可得到所述磁微粒试剂。

[0019] 所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体。

[0020] 所述辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体的制备方法包括以下步骤:

[0021] A、将辣根过氧化物酶活化;

[0022] B、按照酶与抗原的质量比1:1将活化后的辣根过氧化物酶与抗猪IgG抗体混合均匀,然后透析,透析完成后,加入5mg/ml的NaBH₄反应4h,再次透析;

[0023] C、向步骤C得到的透析液中加入等体积的硫酸铵溶液除盐,经离心、PBS 重悬后,再次透析,经离心后,收集上清液,并加入50%甘油保存,即可得到所述辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体。

[0024] 进一步地,所述辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体的制备方法优选为包括以下步骤:

[0025] A、取辣根过氧化物酶5mg溶于1ml蒸馏水中,加入0.5~1ml新鲜配制的 0.1M NaIO₄,室温避光搅拌30min,然后加入0.2~0.5M乙二醇水溶液0.5ml,室温避光放置30min;

[0026] B、按照酶与抗原的质量比1:1将活化后的辣根过氧化物酶与5mg抗猪IgG 抗体混合均匀,然后透析,透析液为pH9.5的0.05M碳酸盐缓冲液,透析完成后,加入0.1ml 5mg/ml的NaBH₄反应4h,再次透析,透析液为pH7.4的0.1M PBS缓冲液;

[0027] C、向步骤C得到的透析液中加入等体积的硫酸铵溶液除盐,4℃静置1h, 4℃、8000~10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用1ml PBS重悬,再用pH7.4 的0.1M PBS缓冲液透析过夜,去除铵离子,8000~10000rpm离心30min,弃沉淀,收集上清,加入50%甘油,4℃保存,备用,即可得到所述辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体。

[0028] 所述底物溶液包括A液和B液,所述A液为pH为8.6的含10mM鲁米诺和1mM对碘苯酚的0.5M硼酸缓冲液;所述B液为pH8.6的含1% H_2O_2 的0.5M 硼酸缓冲液。

[0029] 所述洗涤液为pH7.6的0.1M PBST缓冲液。

[0030] 所述标准品的制备方法为取多份感染了PRRSV的猪阳性血清混合后,经 Protein A管柱亲和层析纯化后浓缩至终浓度为1.0mg/mL,其效价为20U。

[0031] 所述稀释液为pH7.4的含1%BSA、0.05%Tween-20的0.1M PBS缓冲液。

[0032] 本发明还提供了所述的检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0033] S1、将标准品经稀释液稀释至系列浓度,分别放入反应杯中,加入磁微粒试剂温育,经磁分离、洗涤后,再向反应杯中加入酶标二抗,经磁分离、洗涤后向反应杯中加入底物溶液,室温避光3min后检测发光值;

[0034] S2、以标准品效价为横坐标,发光值为纵坐标构建标准曲线得到线性方程;

[0035] S3、将待测样品采用步骤S1同样的方法测得其发光值,将发光值代入线性方程,即可定量测试出待测样品的效价。

[0036] 进一步地,所述的检测试剂盒的使用方法,具体包括以下步骤:

[0037] S1、将标准品经稀释液稀释至系列浓度,分别取30 μ l放入反应杯中,加入 20 μ l磁微粒试剂于37 $^{\circ}$ C孵育20min,经磁分离、并用pH7.6的0.1M PBST缓冲液洗涤后,再向反应杯中加入50 μ l酶标二抗,经磁分离、pH7.6的0.1M PBST 缓冲液洗涤后向反应杯中加入底物溶液,所述底物溶液为A、B液各50 μ l混匀;室温避光3后检测发光值;

[0038] S2、以标准品效价为横坐标,发光值为纵坐标构建标准曲线得到线性方程;

[0039] S3、将待测样品采用步骤S1同样的方法测得其发光值,将发光值代入线性方程,即可定量测试出待测样品的效价。

[0040] 本发明还提供了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的定量检测方法,使用上述试剂盒进行检测,其检测灵敏度高达95%以上。

[0041] 本发明公开的检测试剂盒使用羧基磁性微球为固相载体,通过EDC/NHS活化羧基偶联重组蛋白制成免疫磁珠,对样本中PRRS抗体进行捕获,使用HRP 标记二抗进行间接法显色,定量测定血清中的PRRS抗体含量。其中,免疫磁珠上偶联有重组N蛋白或重组GP5蛋白,两者再以一定比例混合而成,以捕获样本中不同种类的抗体,实现更加精准的检测。PRRSV衣壳蛋白是由ORF7编码的,该蛋白含量最高,免疫原性好,是体液免疫应答的主要抗原,在感染PRRSV 后,最先产生针对此蛋白的抗体。PRRSV GP5蛋白是由ORF5编码的糖基化囊膜蛋白,可以诱导机体产生特异性的中和抗体。这两种蛋白都是PRRSV的主要结构蛋白,将其以一定比例混合作为抗原池,能够显著提升检测灵敏度,从而更加准确地进行常规抗体检测以及疫苗接种效果评价。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0043] 本发明公开的试剂盒中各组分的制备步骤中,各条件及参数均是优化筛选过的配方,能够保证试剂盒的各项性能指标均为最优。

[0044] 本发明通过包裹着重组PRRSV N蛋白和重组GP5蛋白抗原的磁微粒对待测抗体进行捕获使得反应更彻底,灵敏度更高,可实现待测样品中微量抗体的定量检测。

[0045] 所述测试试剂盒利用自带的标准品,能够定量测定血清中的抗体含量,且阴阳性判定结果与武汉科前生物的ELISA检测试剂盒结果一致。

[0046] 该检测试剂盒采用间接法检测血清中的抗体水平,检测抗原采用自制的重组N蛋白和重组GP₅蛋白混合液作为抗原池,与单一抗原作为检测抗原相比,灵敏度显著提升,能够弥补假阴性造成的漏检,从而更加准确地进行常规抗体检测以及疫苗接种效果评价。

[0047] 该检测试剂盒只需30min即可读数,更加快速,适用于快速诊断。

附图说明

[0048] 图1为重组BL21/pET-32a-PRRSV-N工程菌诱导表达得到的蛋白的 SDS-PAGE图;泳道M:蛋白Marker、泳道空载:空载体泳道、1~5:分别为表达菌1~5号;

[0049] 图2为重组PRRSV N蛋白的Western-blot鉴定图;泳道M:蛋白Marker、泳道1~6:6组PRRSV N蛋白、泳道7:空载体;

[0050] 图3为重组BL21/pET-32a-PRRSV-GP₅工程菌诱导表达得到的蛋白的SDS-PAGE图;泳道M:蛋白Marker、泳道1:重组菌诱导后沉淀、泳道2:重组菌诱导后上清;泳道3:空载体;

[0051] 图4为重组PRRSV GP₅蛋白的Western-blot鉴定图;泳道M:蛋白Marker、泳道1:空载体、泳道2:重组PRRSV GP₅蛋白;

[0052] 图5为试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0053] 下面结合实施例及说明书附图对本发明进行详细说明。

[0054] 实施例1

[0055] 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒,包括磁微粒试剂、酶标抗体、底物溶液、洗涤液、标准品、稀释液。

[0056] 所述各组成具体如下:

[0057] 一、所述磁微粒试剂是由偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液和偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:2组成,其制备方法为:

[0058] (1) 磁珠的分散与清洗

[0059] 用1ml pH5.0的含0.1%Tween-20的25mmol/L MES溶液分散10mg表面有羧基的磁珠,其粒径1~3 μ m,厂家为日本JSR公司,分散均匀后置磁力架上磁分离10min,去上清,再加入10ml MES溶液洗涤3次,至上清完全澄清透明后,去上清,用1ml MES溶液重悬磁珠,使磁珠终浓度10mg/ml。

[0060] (2) 磁珠的活化

[0061] 取步骤(1)中的磁珠100 μ l,加入50 μ l 50mg/ml的EDC和50 μ l 80mg/ml 的NHS,混匀后,室温涡旋振荡2小时。活化反应完成后,再加入MES洗涤2次,去除溶液中的活化剂。最后用1ml MES重悬活化后的磁珠。

[0062] (3) 磁珠与重组抗原的偶联

[0063] 分别取25 μ l 1.2mg/ml重组N蛋白和重组GP₅蛋白,分别加入1ml MES混匀,加入步骤(2)中的混合液,30℃涡旋振荡12h。偶联完成后,磁分离去上清,用MES洗涤2次,再用2ml MES重悬。将偶联完成的重组N蛋白和重组 GP₅蛋白以1:2的比例混合,即为偶联完成的重组抗原池。

[0064] (4) 封闭与保存

[0065] 向步骤(3)的重组抗原池中加入2ml含1%BSA、0.02%P-300的PBS缓冲液,30℃涡旋振荡2h,封闭磁珠表面未结合抗原的位点。然后置于磁力架上磁分离,去上清,用PBS缓冲液洗涤2次后,保存于1ml含1%BSA的PBS缓冲液中,4℃放置备用。

[0066] 进一步地,所述步骤(3)中,所述重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)的制备方法为:

[0067] (3-1)根据GenBank中PRRSV的N蛋白的基因序列设计引物,所述PRRSV的N蛋白的基因序列如SEQUENCE LISTING<400>1所示;以PRRSV cDNA为模板,扩增目的基因,与pET32a载体连接后转至BL21(DE3)中得到BL21/pET-32a-PRRSV-N工程菌,并对工程菌诱导表达,表达完成后对蛋白进行鉴定,鉴定图谱如图1所示,从图1可以看出,5株重组BL21/pET-32a-PRRSV-N工程菌中2号、3号、4号、5号菌诱导后在33KDa出现目的表达条带,经鉴定为可溶性表达,得到了PRRSV重组N蛋白。

[0068] (3-2)PRRSV重组N蛋白的纯化:层析柱:Ni Sepharose FF,200mL;平衡液(A液):PBS;洗脱液(B液):PBS+500mM咪唑;洗脱方式:梯度洗脱;上样量:500mL;洗脱峰:在30%B和50%B两个浓度下分别出现两个洗脱峰,SDS-PAGE结果显示,经过两步梯度洗脱后,在峰50%B处收集的蛋白纯度较高,纯度达到90%以上。

[0069] Western-blot检测结果显示,在33KDa处有目的蛋白,由此说明制备的PRRSV重组N蛋白具有抗原性。

[0070] 进一步地,所述步骤(3)中,所述重组PRRSV囊膜糖蛋白(GP5蛋白)的制备方法为:

[0071] (3-1')根据GenBank中PRRSV的GP5蛋白的基因序列设计引物,所述PRRSV的GP5蛋白的基因序列如SEQUENCE LISTING<400>2所示;以PRRSV cDNA为模板,扩增目的基因,与pET32a载体连接后转至BL21(DE3)中得到BL21/pET-32a-PRRSV-GP5工程菌,并对工程菌诱导表达,表达完成后对蛋白进行鉴定,鉴定图谱如图3所示,从图3可以看出,工程菌诱导后在38KDa出现目的表达条带,表明重组BL21/pET-32a-PRRSV-GP5成功表达,主要是包涵体表达。

[0072] (3-2')PRRSV重组GP5蛋白的纯化:层析柱:Ni Sepharose FF;用Binding Buffer(20mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O,500mmol/L NaCl,45mmol/L咪唑,pH8.0)平衡层析柱至A_{280nm}吸收值稳定后开始上样,样品以30~60cm/h线性流速通过层析柱,再用Binding Buffer过层析柱,洗去未与层析柱结合的杂蛋白,直到A_{280nm}稳定。用Elution Buffer(20mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O,500mmol/L NaCl,500mmol/L咪唑,pH8.0)洗脱并收集洗脱峰对应的蛋白。

[0073] Western-blot检测结果显示,如图4所示,在38KDa处有目的蛋白,由此说明制备的PRRSV重组GP5蛋白具有抗原性。

[0074] 二、所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的抗猪IgG抗体,其制备方法为:

[0075] A、辣根过氧化物酶活化

[0076] 称取辣根过氧化物酶5mg溶于1ml蒸馏水中,加入0.6ml新鲜配制的0.1M NaIO₄,室温避光搅拌30min。然后加入0.5M乙二醇水溶液0.5ml,室温避光放置30min。

[0077] B、标记二抗

[0078] 按照酶:抗原(w:w)1:1向步骤A溶液中加入抗猪IgG抗体5mg,混匀后装入透析袋中,在pH9.5的0.05M碳酸盐缓冲液中透析,4℃过夜。次日,加入0.1ml 5mg/ml NaBH₄,混匀后,室温静置4h。将此混合液置于透析袋中,用pH7.4的0.1M PBS缓冲液透析,4℃过夜。

[0079] C、透析除盐、保存

[0080] 往步骤B中的透析液中缓慢加入等体积的硫酸铵溶液除盐,4℃静置1h,4℃、10000rpm离心30min,弃上清,沉淀用1ml PBS重悬。再用pH7.4的0.1M PBS缓冲液透析过夜,去除铵离子,10000rpm离心30min,弃沉淀,收集上清,加入50%甘油,4℃保存,备用。

[0081] 所述步骤B中,抗猪IgG抗体的制备方法为:

[0082] (B-1) 采用辛酸-硫酸铵法提取猪血清IgG,DEAE-52纤维素离子交换层析法对粗提的猪血清IgG进行纯化;

[0083] (B-2) 将纯化的猪IgG免疫Balb/c小鼠,分4次免疫,以间接ELISA检测小鼠血清中抗猪IgG抗体的效价,效价高者选为下一步细胞融合的对象;

[0084] (B-3) 取经最后强化免疫的Balb/c小鼠,收集血清,消毒,无菌取出小鼠脾脏、分离脾细胞,与新鲜制备、生长良好的小鼠骨髓瘤细胞融合,HAT培养基稀释融合细胞悬液,加入已预先铺有饲养细胞的96孔板中,100μL/孔,于培养箱中培养,筛选单克隆抗体杂交瘤细胞;

[0085] (B-4) 腹腔内注射液体石蜡,6~8d后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞悬液;7~10d后观察小鼠腹部膨胀程度收集腹水,经离心去沉淀后以辛酸-饱和硫酸铵粗纯,再以DEAE阴离子交换层析纯化单抗,经ELISA测定抗体效价达到 $1:3.2 \times 10^6$ 。

[0086] 三、所述底物溶液包括A液和B液,所述A液为pH为8.6的含10mM鲁米诺和1mM对碘苯酚的0.5M硼酸缓冲液;所述B液为pH8.6的含1% H_2O_2 的0.5M硼酸缓冲液。

[0087] 四、所述洗涤液为pH7.6的0.1M PBST缓冲液。

[0088] 五、所述标准品的制备方法为:取多份感染了PRRSV的猪阳性血清混合后,经Protein A管柱亲和层析纯化后浓缩至终浓度为1.0mg/mL,其效价为20U。

[0089] 六、所述稀释液为pH7.4的含1%BSA、0.05%Tween-20的0.1M PBS缓冲液。

[0090] 实施例2

[0091] 实施例1得到的猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0092] S1、将标准品经稀释液稀释至系列浓度,依次为0.01mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.25mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL,所对应的效价分别为0.1U、0.5U、2U、5U、10U、20U;分别取30μl标准品溶液放入反应杯中,加入20μl磁微粒试剂于37℃孵育20min,经磁分离、并用pH7.6的0.1M PBST缓冲液洗涤后,再向反应杯中加入50μl酶标二抗,经磁分离、pH7.6的0.1M PBST缓冲液洗涤后向反应杯中加入底物溶液,所述底物溶液为A、B液各50μl混匀;室温避光3h后检测发光值;

[0093] S2、以标准品效价为横坐标,发光值为纵坐标构建标准曲线,如图5所示,得到线性方程,所述线性方程为: $y=27866x+13880$,其中y表示发光值,x表示标准品效价,由此表明,实施例1制备的试剂盒在0.1-20U范围内线性良好,线性相关系数 $R^2=0.9966$ 。

[0094] S3、将待测样品采用步骤S1同样的方法测得其发光值,将发光值代入线性方程,即可定量测试出待测样品的效价。

[0095] 实施例3

[0096] 试剂盒性能指标及临床检测

[0097] 1、特异性和灵敏度测定

[0098] 阴阳临界值(Cut-off)测定:

[0099] 对100例阴性血清进行测定,取其M(平均值)+3×SD(标准差)为阴阳临界值,其中M为100例阴性血清的效价的平均值,SD为100例阴性血清的效价的标准差,由此得到该试剂盒的Cut-off值为0.21U。

[0100] (1) 特异性

[0101] 特异性:临床阴性血清中检测结果小于Cut-off值的样本数占临床阴性样本总数的比例。

[0102] 用实施例1制备的检测试剂盒和单一抗原作为免疫磁珠偶合抗原的试剂盒,同时测定40份临床阴性血清,比较两种试剂盒的特异性检测结果。所述单一抗原作为检测线制备的试剂盒制备过程同实施例1,制备过程同实施例5,只是在磁微粒试剂制备步骤中,与磁珠偶联的分别单一蛋白N蛋白或GP₅蛋白。

[0103] 结果显示,单一N蛋白抗原制备的试剂盒与单一GP₅蛋白抗原制备的试剂盒特异性均为95.0%,实施例1得到的试剂盒的特异性为97.5%,特异性无明显差异。

[0104] (2) 灵敏度

[0105] 临床阳性血清中检测结果大于Cut-off值的样本数占临床阳性样本总数的比例。

[0106] 用实施例1制备的检测试剂盒和单一抗原作为检测线制备的试剂盒同时测定40份临床阳性血清,比较两种试剂盒的灵敏度检测结果。所述单一抗原作为检测线制备的试剂盒制备过程同实施例1,制备过程同实施例5,只是在磁微粒试剂制备步骤中,与磁珠偶联的分别单一蛋白N蛋白或GP₅蛋白。

[0107] 结果显示,单一N蛋白制备的试剂盒灵敏度为87.5%,单一GP₅蛋白制备的试剂盒灵敏度为85.0%,而本发明实施例1制备的试剂盒灵敏度为95.0%,灵敏度有显著提升。

[0108] 2、重复性测定

[0109] 配制低、中、高浓度质控品,每个浓度质控品按照实施例2的方法重复测定10次,以此评价本发明实施例1中试剂盒的重复性。结果如表1所示,表明本发明制备的免疫磁微粒化学发光法PRRS抗体检测试剂盒的精密性良好,CV 均不大于8%。

[0110] 表1试剂盒重复性检测结果

[0111]

效价 (U) 测定次数	低浓度质控品 (0.1U)	中浓度质控品 (2U)	高浓度质控品 (15U)
1	0.08	2.18	14.66
2	0.09	2.05	14.93
3	0.08	1.88	15.24
4	0.09	1.9	15.37
5	0.09	1.78	15.24
6	0.1	2.04	14.75
7	0.1	2.15	14.53
8	0.09	2.02	15.06
9	0.08	1.94	15.52
10	0.09	1.92	14.81
AV	0.089	1.986	15.011
SD	0.007	0.125	0.327
变异系数 (CV)	8%	6%	2%

[0112] 3、临床测定

[0113] 取10例已知PRRS抗体阴性的样本和10例已知PRRS抗体阳性的样本(采用武汉科前生物ELISA检测试剂盒判定阴阳性),混匀并恢复至室温后,按照实施例3的方法进行检测,每个样本设置两个平行。

[0114] 结果如表2所示,由此可见实施例1制备的试剂盒与对比试剂盒的阴阳性判定一致,检测准确度高。

[0115] 表2 20例临床样本测定结果

[0116]

样本编号	武汉科前生物 ELISA 检测试剂盒测定结果	本发明试剂盒测定结果 (U)
1	阴性	0.09
2	阴性	0.17
3	阴性	0.11
4	阴性	0.13
5	阴性	0.20
6	阴性	0.08
7	阴性	0.06
8	阴性	0.13
9	阴性	0.18
10	阴性	0.15
11	阳性	3.88
12	阳性	8.45
13	阳性	0.88
14	阳性	2.85
15	阳性	1.64
16	阳性	9.38

[0117]

17	阳性	4.62
18	阳性	0.39
19	阳性	0.56
20	阳性	7.43

[0118] 上述参照实施例对猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 安徽九川生物科技有限公司

<120> 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法

<130> 1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> 重组PRRSV N蛋白

<400> 1

```
atgccaaata acaacggcaa gcagcagaag agaaagaagg gggatggcca gccagtcaat 60
cagctgtgcc aaatgctggg taagatcatc gctcagcaaa accagtccag aggcaaggga 120
ccgggaaaga aaaataagaa gaaaaacccg gagaagcccc atttccctct agcgactgaa 180
gatgatgtca gacatcactt taccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcaatccag 240
accgccttta atcaaggcgc tgggacttgc accctgtcag attcaggag gataagttac 300
actgtggagt ttagtttgcc tacgcatcat actgtgcgc tgatccgcgt tacagcatca 360
ccctcagcat ga 372
```

<210> 2

<211> 603

<212> DNA

<213> 重组PRRSV GP5蛋白

<400> 2

```
atgttgggga agtgcttgac cgcgtgttac tactcgcaat tgcctttttt gtggtatata 60
gtgccattct gttttgctgc gctcgtcaac gccagcagca acagcagctc ccatttacag 120
ttgatttata acctgacgat atgtgagctg aatggcacag attggctgag cacaaaattt 180
gactgggcag tggagacttt cgttatcttt cctgtgttga ctcatattgt ctcttacggc 240
gcccttacca ctagccattt tcttgacacg gtcggcctga tcaactgtgtc caccgccgt 300
tattatcaca agcggtatgt attgagtagc atctacgtg tctgtgccct ggctgcgttg 360
gtttgcttcg ccattagggt ggcgaaaaat tgcatgtcct ggcgctactc atgcaccaga 420
tataccaatt ttcttctgga tactaagggc aaactctacc gctggcggtc acccgatc 480
attgagaagg ggggtaaagt tgatgttgaa ggtcatttaa tcgacctcaa gacagttgtg 540
cttgatggtt ccgcggcaac ccctgtaacc aagatttcag cggagcaatg gggtcgtctc 600
tag 603
```

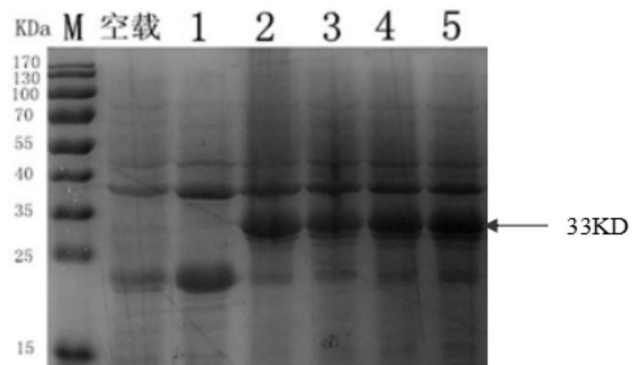


图1

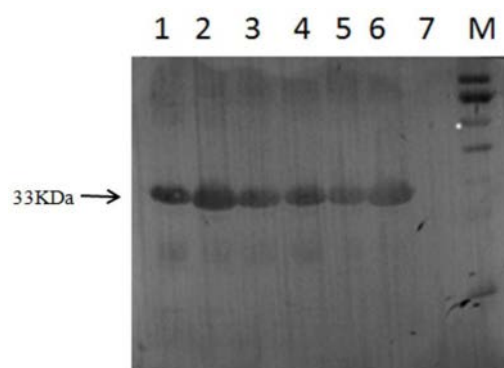


图2

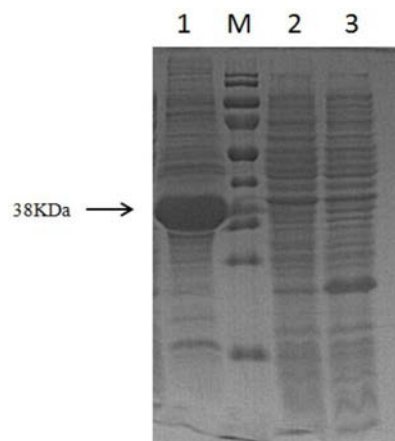


图3

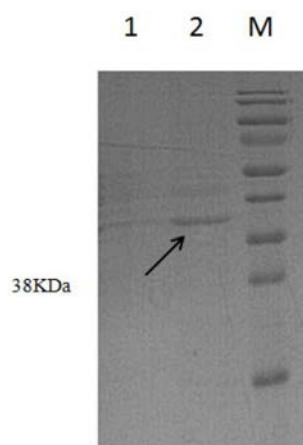


图4

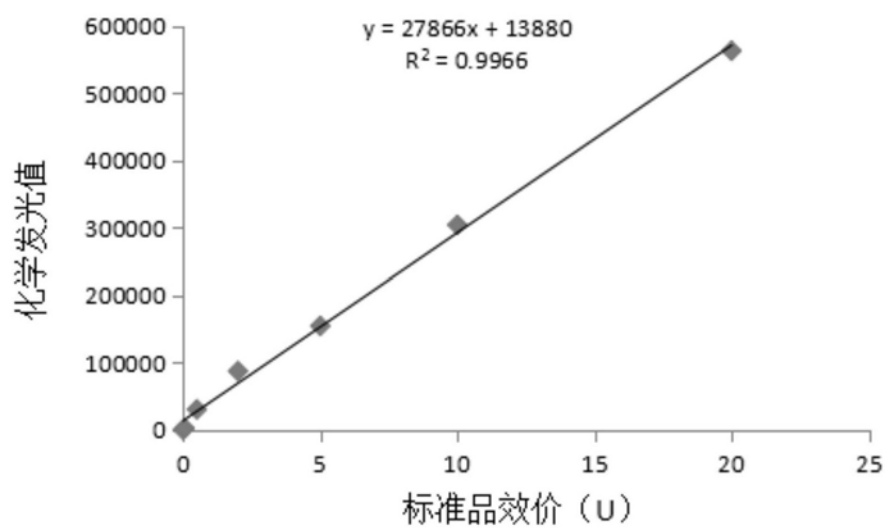


图5

专利名称(译)	一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN108872602A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810752119.2	申请日	2018-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	安徽九川生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽九川生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽九川生物科技有限公司		
[标]发明人	单雪芹 蒋敏之 王亚男 许高涛 凡玉芳 郭志燕 赵雨 周炜 刘家炉 鲍可兵		
发明人	单雪芹 蒋敏之 王亚男 许高涛 凡玉芳 郭志燕 赵雨 周炜 刘家炉 鲍可兵		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/6893 G01N2800/26		
代理人(译)	尹婷婷		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫磁微粒化学发光法定量检测试剂盒及其使用方法，所述试剂盒包括磁微粒试剂、酶标抗体、底物溶液、洗涤液、标准品、稀释液，所述磁微粒试剂是由偶联有重组PRRSV衣壳蛋白的磁珠混悬液和偶联有重组PRRSV囊膜糖蛋白的磁珠混悬液按体积比1:1~3组成。通过包裹着重组PRRSV N蛋白和重组GP5蛋白抗原的磁微粒对待测抗体进行捕获使得反应更彻底，灵敏度更高，可实现待测样品中微量抗体的定量检测。

