



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104211803 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201310462516. 3

(22) 申请日 2013. 09. 30

(71) 申请人 郑州后羿制药有限公司

地址 451162 河南省郑州市郑州航空港区新
港大道东侧

(72) 发明人 王卫芳 徐进 李建正

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限
公司 411119

代理人 牛爱周

(51) Int. Cl.

C07K 16/08(2006. 01)

C07K 1/13(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

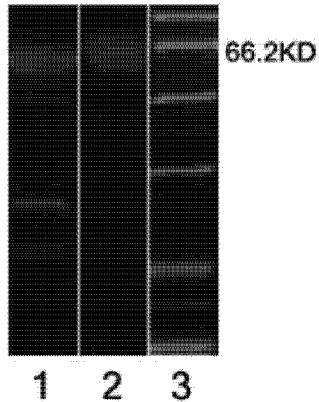
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗
体、制备方法及检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于猪细小病毒 ELISA 检
测的酶标抗体、制备方法及检测试剂盒，属于生物
技术领域。该酶标抗体为采用辣根过氧化酶标记
的兔抗猪 IgG 抗体。本发明将猪细小病毒免疫猪
血清获得的猪细小病毒 IgG 抗体，通过辛酸 - 饱和
硫酸铵沉淀分离后纯度较高。同时采用亲和层析
法对从高免兔血清中获得的二抗进行纯化，大大
提高了二抗质量，保证了标记酶的结合效率。本发
明的酶标抗体对猪细小病毒抗体具有敏感的特异
结合作用，灵敏度高，专一性强，作用浓度稀释倍
数高，在 PPV 发病的初期通过疑似感染猪血清学
抗体 ELISA 实验即能对猪细小病毒病做出诊断，
为该病预防治疗提供依据。



1. 一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体, 其特征在于, 将兔抗猪 IgG 抗体用辣根过氧化酶标记, 作为酶标二抗。

2. 一种如权利要求 1 所述的用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤: 用猪细小病毒免疫猪血清, 采用辛酸 - 硫酸铵沉淀法制备得到猪细小病毒 IgG 抗体粗品, 然后利用 Sephadex G100 凝胶柱纯化, 得到纯化的猪细小病毒 IgG 抗体; 再将猪细小病毒 IgG 抗体免疫大白兔, 得到兔抗猪 IgG 抗体, 辣根过氧化酶标记即得。

3. 根据权利要求 2 所述的用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体的制备方法, 其特征在于, 具体包括以下步骤:

(1) 猪细小病毒 IgG 抗体的制备:

取猪细小病毒免疫猪血清 5mL, 加入 0.05mol/L pH4.5 乙酸钠 - 乙酸缓冲液 10mL, 调 pH 至 5; 加入 325 μL 正辛酸, 室温搅拌 30~40min, 4℃ 澄清 2h, 10000r/m 离心 30~35min, 去沉淀, 上清液加入两倍体积 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 磷酸盐缓冲液, 再加入 pH6.0~7.0 饱和硫酸铵 20mL, 使硫酸铵浓度为 30~35%, 4℃ 静置 1h, 4℃ 下 5000r/m 离心 20 分钟, 弃上清; 将沉淀溶于 1.2mL 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 中透析过夜, 收集透析袋内液体, 4℃ 下 2000r/m 离心 10~15min, 取上清液, 得到猪细小病毒 IgG 抗体粗品;

(2) 用 Sephadex G-100 凝胶柱纯化上清液, 得到纯化的猪细小病毒 IgG 抗体;

(3) 兔抗猪 IgG 抗体的制备:

将纯化的猪细小病毒 IgG 抗体免疫兔, 制备兔抗猪 IgG 抗体; 初次免疫剂量为每只家兔注射 1mL 含弗式完全佐剂 0.5mL 的猪细小病毒 IgG 抗体, 选择背部多点注射法对兔进行皮下注射; 两周后用 1mL 含弗式不完全佐剂 0.5mL 的猪细小病毒 IgG 抗体连续加强免疫 3 次, 末次免疫 1 周后采集耳缘静脉血, 分离血清, 琼脂扩散实验检测血清抗体效价, 再心脏采血收集血清保存于 -20℃ 备用;

(4) 纯化兔抗猪 IgG 抗体;

(5) 兔抗猪 IgG 抗体的酶标:

取 5mg 辣根过氧化酶溶于 0.5mL 蒸馏水, 加入 1% 2,4- 二硝基氟苯无水乙醇溶液 0.1mL, 室温下轻微搅拌 1h, 加入 0.06mol/L 的 NaIO₄ 1mL, 室温下避光搅拌 30min; 加入 1mL 0.16mol/L 乙二醇, 室温下轻搅作用 1h, 终止氧化反应; 加入 5mg 纯化后的兔抗猪 IgG 抗体, 装入透析袋, 置于 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 1000mL 中, 4℃ 下透析过夜, 更换 3 次; 取出透析袋中液体, 加入 5mg/mL NaHB₄ 0.2mL, 置于 4℃ 下 2h 或过夜; 加 6mL 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀结合物, 置于 4℃ 下 30min 后, 3000r/m 离心 30min, 取沉淀; 将沉淀物溶于 pH7.4 的 PBS 溶液中, 装入透析袋, 并以此缓冲液透析平衡 6~12h, 换液 3 次; 在结合物内加入 BSA 至蛋白浓度为 10mg/mL, 或加等量 60% 甘油, 测定工作效价, 低温保存即得。

4. 根据权利要求 3 所述的用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(5)中测定工作效价的方法为: 分别用 50 倍稀释猪细小病毒 IgG 抗体包被酶标板, 每孔 100 μL, 4℃ 过夜, 取出后洗涤, 再用 1% BSA 37℃ 封闭 3h 后洗涤; 加入酶标抗体, 兔抗猪 IgG 抗体按 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 系列稀释, 每个稀释度 2 个孔, 每孔 100 μL, 37℃ 孵育 1h 后洗板, 每孔加新鲜配制的底物溶液 100 μL, 37℃ 显色 20min; 加入 50 μL 2mol/L 浓 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 以 OD 值为 1.0 的稀释度为最适工作浓度。

5. 一种用于猪细小病毒抗体的 ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 主要包括采用辣根过氧化酶标记的兔抗猪 IgG 抗体。

一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体、制备方法及检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体，同时还涉及该酶标抗体的制备方法及使用该酶标抗体的 ELISA 检测试剂盒，属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 猪细小病毒病 (Porcine parvovirus, PPV) 是由猪细小病毒引起的以母猪繁殖障碍为特征的传染病，也是导致易感母猪发生繁殖障碍的主要传染病之一，主要表现为受感染的母猪，特别是初产母猪及血清学阴性经产母猪发生流产，产死胎、畸形胎、木乃伊胎、弱仔及屡配不孕等，而其他年龄的猪感染后一般不表现明显的临床症状。病变母猪肉眼病变不明显，可见轻度子宫内膜炎。胎儿可见不同程度的发育障碍和生长不良，皮下充血或水肿，胸腹腔有淡红色或淡黄色渗出液。1967 年 Cartwright 等存对猪的不孕症和流产、产死胎的病原学研究中，从病料中分离猪细小病毒。从而首次证明了它的致病作用。此后相继从欧美和亚洲检查到阳性率比较高的该病毒抗体。我国已先后从北京、上海等地分离到该病毒，血清学调查阳性率为 80%。近年来，湖北和河南也相继报道该病的发生和流行，给我国养猪业造成巨大的经济损失。因此对猪细小病毒病实施免疫监测非常必要。

[0003] 应用间接 ELISA 法可快捷、方便地检测猪群抗体水平。间接 ELISA 是检测抗体常用的方法，其原理是利用酶标抗体作为与固相抗原结合的受检抗体，所以说酶标抗体是间接 ELISA 检测试剂盒的重要组成部分，酶标抗体的质量直接关系到检测结果的准确性。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体。

[0005] 本发明的目的还在于提供一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体的制备方法。

[0006] 本发明的目的还在于提供一种用于猪细小病毒抗体的 ELISA 检测试剂盒。

[0007] 为了实现以上目的，本发明所采用的技术方案是一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体，将兔抗猪 IgG 抗体用辣根过氧化酶标记，作为酶标二抗。

[0008] 本发明所采用的技术方案还在于提供一种用于猪细小病毒 ELISA 检测的酶标抗体的制备方法，用猪细小病毒免疫猪血清，采用辛酸 - 硫酸铵沉淀法制备得到猪细小病毒 IgG 抗体粗品，然后利用 Sephadex G100 凝胶柱纯化，得到纯化的猪细小病毒 IgG 抗体；再将猪细小病毒 IgG 抗体免疫大白兔，得到兔抗猪 IgG 抗体，辣根过氧化酶标记即得。具体步骤如下：

[0009] (1) 猪细小病毒 IgG 抗体的制备：

[0010] 取猪细小病毒免疫猪血清 5mL，加入 0.05mol/L pH4.5 乙酸钠 - 乙酸缓冲液 10mL，调 pH 至 5；加入 325 μL 正辛酸，室温搅拌 30-40min，4℃ 澄清 2h，10000r/m 离心 30-35min，去沉淀，上清液加入两倍体积 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 磷酸盐缓冲液，再加入 pH6.0-7.0 饱

和硫酸铵 20mL, 使硫酸铵浓度为 30–35%, 4℃静置 1h, 4℃下 5000r/m 离心 20 分钟, 弃上清; 将沉淀溶于 1.2mL 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 中透析过夜, 收集透析袋内液体, 4℃下 2000r/m 离心 10–15min, 取上清液, 得到猪细小病毒 IgG 抗体粗品;

[0011] (2) 用 Sephadex G-100 凝胶柱纯化上清液, 得到纯化的猪细小病毒 IgG 抗体;

[0012] (3) 兔抗猪 IgG 抗体的制备:

[0013] 将纯化的猪细小病毒 IgG 抗体免疫兔, 制备兔抗猪 IgG 抗体; 初次免疫剂量为每只家兔注射 1mL 含弗式完全佐剂 0.5mL 的猪细小病毒 IgG 抗体, 选择背部多点注射法对兔进行皮下注射; 两周后用 1mL 含弗式不完全佐剂 0.5mL 的猪细小病毒 IgG 抗体连续加强免疫 3 次, 末次免疫 1 周后采集耳缘静脉血, 分离血清, 琼脂扩散实验检测血清抗体效价, 再心脏采血收集血清保存于 -20℃ 备用;

[0014] (4) 纯化兔抗猪 IgG 抗体;

[0015] (5) 兔抗猪 IgG 抗体的酶标:

[0016] 取 5mg 辣根过氧化酶溶于 0.5mL 蒸馏水, 加入 1% 2,4-二硝基氟苯无水乙醇溶液 0.1mL, 室温下轻微搅拌 1h, 加入 0.06mol/L 的 NaIO₄ 1mL, 室温下避光搅拌 30min; 加入 1mL 0.16mol/L 乙二醇, 室温下轻搅作用 1h, 终止氧化反应; 加入 5mg 纯化后的兔抗猪 IgG 抗体, 装入透析袋, 置于 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 1000mL 中, 4℃下透析过夜, 更换 3 次; 取出透析袋中液体, 加入 5mg/mL NaHB₄ 0.2mL, 置于 4℃下 2h 或过夜; 加 6mL 50% 饱和硫酸铵溶液沉淀结合物, 置于 4℃下 30min 后, 3000r/m 离心 30min, 取沉淀; 将沉淀物溶于 pH7.4 的 PBS 溶液中, 装入透析袋, 并以此缓冲液透析平衡 6–12h, 换液 3 次; 在结合物内加入 BSA 至蛋白浓度为 10mg/mL, 或加等量 60% 甘油, 测定工作效价, 低温保存即得。

[0017] ELISA 法测定酶标二抗工作效价的方法为:

[0018] 分别用 50 倍稀释猪细小病毒 IgG 抗体包被酶标板, 每孔 100 μL, 4℃过夜, 取出后洗涤, 再用 1% BSA 37℃ 封闭 3h 后洗涤; 加入酶标抗体, 兔抗猪 IgG 抗体按 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 系列稀释, 每个稀释度 2 个孔, 每孔 100 μL, 37℃ 孵育 1h 后洗板, 每孔加新鲜配制的底物溶液 100 μL, 37℃ 显色 20min; 加入 50 μL 2mol/L 浓 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 以 OD 值为 1.0 的稀释度为最适工作浓度。

[0019] 本发明所采用的技术方案还在于提供一种用于猪细小病毒抗体的 ELISA 检测试剂盒, 主要包括采用辣根过氧化酶标记的兔抗猪 IgG 抗体。

[0020] 本发明将猪细小病毒免疫猪血清获得的猪细小病毒 IgG 抗体, 通过辛酸 - 饱和硫酸铵沉淀分离后纯度较高。同时采用亲和层析法对从高免兔血清中获得的二抗进行纯化, 大大提高了二抗质量, 保证了标记酶的结合效率。本发明的酶标抗体对猪细小病毒抗体具有敏感的特异结合作用, 灵敏度高, 专一性强, 作用浓度稀释倍数高, 在 PPV 发病的初期通过疑似感染猪血清学抗体 ELISA 实验即能对猪细小病毒病做出诊断, 为该病预防治疗提供依据。

附图说明

[0021] 图 1 为猪细小病毒 IgG 抗体的 SDS-PAGE 图。

具体实施方式

[0022] 本发明中所用新西兰大白兔购自河南中医学院临床动物实验室。猪细小病毒免疫毒株由河南农业大学牧医工程学院传染病实验室提供。

[0023] 实施例 1

[0024] 猪细小病毒 IgG 抗体的制备：

[0025] (1) 取猪细小病毒免疫猪血清 5mL, 加入 0.05mol/L pH4.5 乙酸钠 - 乙酸缓冲液 10mL, 调 pH 至 5; 加入 325 μL 正辛酸, 室温搅拌 40min, 4℃ 澄清 2h, 10000r/m 离心 35min, 去沉淀, 上清液加入两倍体积 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 磷酸盐缓冲液, 再加入 pH7.0 饱和硫酸铵 20mL, 使硫酸铵浓度为 35%, 4℃ 静置 1h, 4℃, 5000r/m 离心 20 分钟, 弃上清; 将沉淀溶于 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 1.2mL 中透析过夜, 收集透析袋内液体, 4℃, 2000r/m 离心 15min, 取上清液, 得到猪细小病毒 IgG 抗体粗品。

[0026] (2) 用 Sephadex G100 凝胶柱纯化上清液, 得到纯化的猪细小病毒 IgG 抗体。

[0027] (3) 纯化后猪细小病毒 IgG 抗体的检测

[0028] 用紫外分光光度计分别测定提取前后蛋白 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 蛋白质含量按下式(1)进行计算。

$$[\text{LgG mg/mL}] = 1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74 \times A_{260\text{nm}} \quad (1)$$

[0029] 计算结果为 LgG=0.7663mg/mL; 对纯化前后的猪细小病毒 IgG 抗体采用 SDA-PAGE 电泳。电泳完毕后, 采用常规考马斯亮蓝 R-250 染色法染色 15min, 再置脱色液中脱色至条带清晰可见, 观察纯化结果, 如图 1 所示, 图中 1 为纯化前的猪细小病毒 IgG 抗体, 2 为纯化后的猪细小病毒 IgG 抗体, 3 为蛋白 Marker。

[0030] 实施例 2

[0031] 兔抗猪 IgG 抗体的制备：

[0032] 将实施例 1 纯化的猪细小病毒 IgG 抗体作为抗原, 对新西兰大白兔进行免疫。

[0033] 用两个无菌玻璃注射器分别抽取 1mL 抗原和 1mL 弗式完全佐剂, 外接一次性无菌三通管, 反复推动、混匀数次, 待成为乳白色粘稠的油包水乳剂时, 将抗原佐剂滴入冷水表面, 滴入后应保持完整不分散时, 即为合格。

[0034] 初次免疫剂量为每只家兔注射 1mL (含弗式完全佐剂 0.5mL), 选择背部多点注射法对兔进行皮下注射。两周后用等体积抗原(含弗式不完全佐剂 0.5mL)加强免疫, 再隔两周进行第三次加强, 10 天后进行第四次加强, 所用剂量与第一次加强相同。末次免疫 1 周后采集耳缘静脉血, 分离血清。琼脂扩散实验检测血清抗体效价, 再心脏采血收集血清保存于 -20℃ 备用, 纯化即得, 兔抗猪 IgG 抗体的纯化方法同实施例 1 猪细小病毒 IgG 的纯化方法。

[0035] 实施例 3

[0036] 兔抗猪 IgG 抗体的酶标：

[0037] (1) 取 5mg 辣根过氧化酶溶于 0.5mL 蒸馏水, 加入 1% 2,4-二硝基氟苯无水乙醇溶液 0.1mL, 室温下轻微搅拌作用 1h;

[0038] (2) 加入 0.06mol/L 的 NaIO₄ 1mL, 室温下避光轻搅 30min, 溶液呈黄绿色;

[0039] (3) 加入 0.16mol/L 乙二醇 1mL, 室温下轻搅作用 1h, 终止氧化反应;

[0040] (4) 加入 5mg 兔抗猪 IgG 抗体, 装入透析袋, 置于 1000mL 0.05mol/L pH9.6 的碳酸

盐缓冲液(无水碳酸钠 1.5g, 碳酸氢钠 2.93g, 蒸馏水加至 1000mL) 中, 4℃透析过夜, 更换 3 次;

[0042] (5) 取出透析袋中液体(约 3mL), 加入 5mg/mLNaHB40.2mL, 置于 4℃下 2h 或过夜;

[0043] (6) 加 6mL50% 的饱和硫酸铵溶液(硫酸铵 850g, 蒸馏水加至 1000mL, 以 30% 氨水调 pH7.2) 沉淀结合物, 置于 4℃下 30min 后, 3000r/m 离心 30min, 取沉淀;

[0044] (7) 将沉淀物溶于 PBS (0.02M pH7.4) 中, 装入透析袋, 并以此缓冲液透析平衡 6-12h, 换液 3 次;

[0045] (8) 在结合物内加入 BSA 至蛋白浓度为 10mg/mL, 或加等量 60% 甘油, 测定工作效价, 低温保存。

[0046] 实施例 4

[0047] ELISA 法初步测定酶标二抗工作效价:

[0048] 分别用 50 倍稀释猪 PPV 血清 1gG 包被酶标板, 每孔 100uL, 4℃过夜, 取出后洗涤, 再用 1%BSA37℃封闭 3h 后洗涤。加入酶标抗体, 兔抗猪 PPV 酶标抗抗体按 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 系列稀释, 每个稀释度 2 个孔, 每孔 100uL, 37℃孵育 1h 后洗板, 每孔加新鲜配制的底物溶液 100uL。37℃显色 20min, 再加入 50uL2mol/L 浓 H₂SO₄, 终止液终止反应, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 以 OD 值为 1.0 的稀释度为最适工作浓度。经初步鉴定酶标二抗的工作效价在 1:64000 以上, 效价较高, 与猪 PPV 血清 1gG 结合的特异性极强。

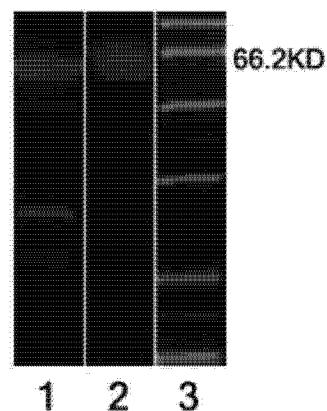


图 1

专利名称(译)	一种用于猪细小病毒ELISA检测的酶标抗体、制备方法及检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104211803A	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201310462516.3	申请日	2013-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	郑州后羿制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州后羿制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州后羿制药有限公司		
[标]发明人	王卫芳 徐进 李建正		
发明人	王卫芳 徐进 李建正		
IPC分类号	C07K1/13 G01N33/535 C07K16/08 G01N33/569		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种用于猪细小病毒ELISA检测的酶标抗体、制备方法及检测试剂盒，属于生物技术领域。该酶标抗体为采用辣根过氧化酶标记的兔抗猪IgG抗体。本发明将猪细小病毒免疫猪血清获得的猪细小病毒IgG抗体，通过辛酸-饱和硫酸铵沉淀分离后纯度较高。同时采用亲和层析法对从高免兔血清中获得的二抗进行纯化，大大提高了二抗质量，保证了标记酶的结合效率。本发明的酶标抗体对猪细小病毒抗体具有敏感的特异结合作用，灵敏度高，专一性强，作用浓度稀释倍数高，在PPV发病的初期通过疑似感染猪血清学抗体ELISA实验即能对猪细小病毒病做出诊断，为该病预防治疗提供依据。

