



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108020664 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201711274976.8

(22)申请日 2017.12.06

(71)申请人 中国水产科学研究院珠江水产研究所

地址 510000 广东省广州市荔湾区芳村西朗兴渔路1号

(72)发明人 王庆 曾伟伟 王英英 常藕琴
刘春 李莹莹 尹纪元 任燕

(74)专利代理机构 佛山帮专知识产权代理事务所(普通合伙) 44387

代理人 颜春艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

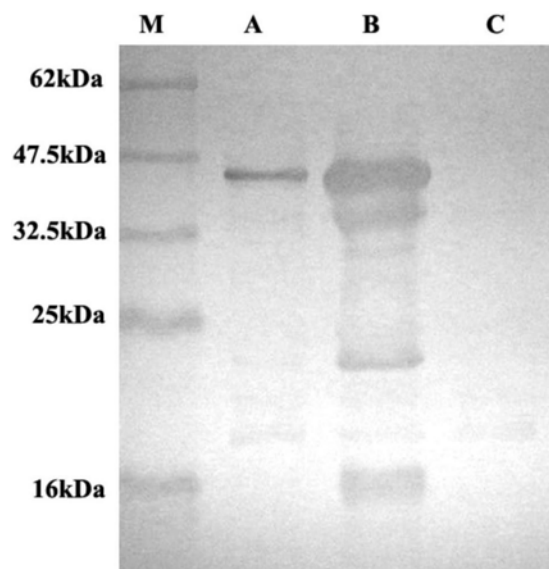
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法,进一步地涉及活疫苗或灭活疫苗(病毒灭活前)的病毒含量的测定,所述试剂盒包括用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体、FITC标记的羊抗兔IgG、阳性对照样品、固定液和PBS洗液。检测方法为将活疫苗或灭活疫苗(病毒灭活前)进行梯度稀释后接种于PSF细胞,连续培养完成后再用本发明所述的试剂盒进行免疫荧光检测,将检测结果进行计算得出相应的病毒含量。本发明的试剂盒及方法灵敏度高、特异性强,且能定量检测活病毒。



1. 一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒,其特征在于,包括用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体、FITC标记的羊抗兔IgG、阳性对照样品、固定液和PBS洗液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体在工作浓度为1:100倍稀释。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体的制备过程如下:将GCRV VP41的基因克隆到pET-32a(+)表达载体中,再将表达载体转化到大肠杆菌表达菌进行诱导表达;纯化表达产物后免疫兔,取兔血收集血清,制备出用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述FITC标记的羊抗兔IgG的工作浓度为1:500倍稀释。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述阳性对照样品为GCRV HZ08株;

所述固定液为丙酮与甲醇体积比3:2配置的固定液;

所述PBS洗液为磷酸盐缓冲液:按NaCl 8.0g;KCl 0.2g;Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g;KH₂PO₄ 0.24g定容至1L制备,调pH至7.2。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括封闭液1%BSA/PBS溶液。

7. 一种运用权利要求1~6任一所述的检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒对活疫苗中或病毒灭活前的灭活疫苗中病毒含量进行检测的方法,其特征在于,包括如下步骤:将活疫苗或病毒灭活前的灭活疫苗进行梯度稀释后接种于PSF细胞,连续培养完成后再用权利要求1~6任一所述的试剂盒进行免疫荧光检测,将检测结果进行计算得出相应的病毒含量。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述计算采用Karber法进行。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述PSF细胞为长成85%的单层PSF细胞;

所述连续培养的天数为7天;

所述梯度稀释是指进行连续10倍梯度稀释,共稀释6个梯度,梯度范围为 10^{-1} ~ 10^{-6} 。

10. 一种权利要求1~6任一所述的检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒在检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中活病毒含量的用途。

检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明属于水生动物病毒检测技术领域,具体涉及一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法,进一步地涉及基因II型草鱼呼肠孤病毒活疫苗或灭活疫苗(病毒灭活前)中病毒含量的测定方法。

背景技术

[0002] 草鱼(*Ctenopharyngodonidellus*)是中国淡水养殖的主要品种之一,除西藏、青海零星养殖外,在我国各地均有一定规模养殖。2017年全国渔业统计年鉴显示,我国淡水鱼类养殖产量为2815.54万吨,其中草鱼的养殖产量达589.88万吨,为我国所有养殖鱼类之首。草鱼养殖为保障我国农产品市场供给和人民生活水平的提高做出了重要贡献。然而草鱼也是水产养殖动物中病害最为多发的一种鱼类,主要病害包括草鱼出血病、肠炎病、赤皮病、烂鳃病、车轮虫等,全年最高发病率在8月,据不完全统计由疾病造成的经济损失约5亿元。在感染草鱼的所有病原中,草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV),俗称草鱼出血病病毒(GCHV),感染导致的草鱼出血病危害最大,成为我国淡水水产养殖中最为突出的问题之一。

[0003] 草鱼呼肠孤病毒(GCRV),隶属于水生呼肠孤病毒属,是水生呼肠孤病毒属中危害最大的病原之一,也是中国分离的第一株水生动物病毒,其发现可以追溯到1953年,因为草鱼发病的症状有“红肌肉型”、“肠炎型”、“红鳍红鳃盖型”,所以称此病为草鱼出血病。1995年,病毒分类命名委员会对该病毒正式命名为草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)。由GCRV引起的出血病严重危害当年草鱼鱼种,流行范围广,发病季节长,发病率高,死亡率可高达90%以上,给水产养殖业造成巨大损失。该病害自上世纪50年代发现以来,相继在湖北、湖南、广东、广西、江苏、浙江、安徽、福建、上海、四川等省、市、自治区主养区流行。目前草鱼出血病有加重蔓延趋势,发病以后极难控制。

[0004] 到目前为止草鱼出血病还没有特效药物治疗,免疫预防是控制草鱼出血病最有效的防治方法。从上世纪土法疫苗到细胞灭活疫苗,再到现在的弱毒疫苗,草鱼出血病疫苗是水产动物中研发得最成功、应用得最广泛的疫苗产品。从已有的流行病学调查数据来看,GCRV的流行情况复杂,目前已经分离的毒株超过40余株,在感染细胞和宿主致病性方面存在较大差异,对已有毒株的全基因和部分基因组进行分析后发现,GCRV至少存在三个基因型,分别有三个代表株GCRV JX0901(I型)、HZ08(II型)和104(III型),目前以基因II型为主要流行株。不同基因型GCRV的生物学特性比较显示,属于基因I型的GCRV JX0901可以感染多种细胞并产生典型的细胞融合性病变,而属于基因II型的HZ08株感染现有的各种鱼类细胞都未能观察到明显的致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。Nibert和Duncan通过基因组分析比较,发现归为Aqua-C亚型的GCRV标准株(基因I型)基因组有FAST(Fusion associated small transmembrane protein)蛋白编码基因,而基因II型HZ08株缺乏编码FAST蛋白的基因,因此不能在细胞上产生病变效应。

[0005] 目前基因II型GCRV已经成为草鱼出血病的主要流行基因型,该病毒可以感染多种

草鱼细胞,但是无法形成细胞病变,因此病毒定量检测主要依赖分子生物学方法。分子生物学方法检测灵敏度高,操作简便,但不能区分感染性和非感染性的病毒,因此到目前为止,对基因II型草鱼出血病活疫苗和灭活疫苗(病毒灭活前)中病毒含量测定还没有一种稳定性、重复性好的定量方法,还不能进行感染性病毒含量测定。因此,有必要提供一种操作更方便,检测更精确的可进行GCRV感染性病毒含量测定的方法。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明提供一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法,进一步地涉及活疫苗或灭活疫苗(病毒灭活前)的病毒含量的测定,检测的方法灵敏度高、特异性强,且能定量检测活病毒。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供如下技术方案:

[0008] 一方面,本发明提供一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒,包括用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体、FITC标记的羊抗兔IgG、阳性对照样品、固定液和PBS洗液。

[0009] 进一步地,所述用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体工作浓度为1:100倍稀释。

[0010] 进一步地,所述用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体的制备过程如下:将GCRV VP41的基因克隆到pET-32a(+)表达载体中,再将表达载体转化到大肠杆菌表达菌进行诱导表达;纯化表达产物后免疫兔,取兔血收集血清,制备出用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体。

[0011] 更进一步地,所述GCRV VP41的基因克隆到pET-32a(+)表达载体的过程如下:用GCRV HZ08感染PSF细胞后提取RNA,再经反转录获得cDNA;将cDNA进行PCR扩增回收后与pET-32a(+)表达载体连接得到连接产物。

[0012] 更进一步地,所述诱导表达过程如下:将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆后转化至大肠杆菌表达菌进行诱导表达。

[0013] 更进一步地,所述取兔血收集血清的具体过程如下:取兔血静置后离心得到血清,用亲和纯化的方式进行纯化即可。

[0014] 进一步地,所述FITC标记的羊抗兔IgG的工作浓度为1:500倍稀释。

[0015] 进一步地,所述阳性对照样品为GCRV HZ08株。

[0016] 进一步地,所述固定液为丙酮与甲醇体积比3:2配置的固定液。

[0017] 进一步地,所述PBS洗液为磷酸盐缓冲液:按NaCl 8.0g;KCl 0.2g;Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g;KH₂PO₄ 0.24g定容至1L制备,调pH至7.2。

[0018] 进一步地,所述试剂盒还包括封闭液1%BSA/PBS溶液。

[0019] 另一方面,本发明提供一种运用本发明所述的检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒对活疫苗中病毒含量进行检测的方法,包括如下步骤:将活疫苗进行梯度稀释后接种于PSF细胞,连续培养完成后再用本发明所述的检测试剂盒进行免疫荧光检测,将检测结果进行计算得出相应的病毒含量。

[0020] 进一步地,所述计算采用Karber法进行。

[0021] 优选地,所述Karber法的计算公式为: $\lg TCID_{50} = L - D \times (S - 0.5)$

[0022] 其中,L:最高稀释倍数的对数;D:稀释度对数之间的差;S:阳性孔比率总和。

[0023] 进一步地,所述PSF细胞为长成85%的单层PSF细胞。

[0024] 进一步地,所述连续培养的天数为7天。

[0025] 进一步地,所述梯度稀释是指进行连续10倍梯度稀释,共稀释6个梯度,梯度范围为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 。

[0026] 另一方面,本发明提供一种运用本发明所述的检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒对灭活疫苗中病毒灭活前的病毒含量进行检测的方法,包括如下步骤:将病毒灭活前的灭活疫苗进行梯度稀释后接种于PSF细胞,连续培养完成后再用本发明所述的检测试剂盒进行免疫荧光检测,将检测结果进行计算得出相应的病毒含量。

[0027] 进一步地,所述计算采用的Karber法进行。

[0028] 优选地,所述Karber法的计算公式为: $\lg TCID_{50} = L - D \times (S - 0.5)$

[0029] 其中,L:最高稀释倍数的对数;D:稀释度对数之间的差;S:阳性孔比率总和。

[0030] 进一步地,所述PSF细胞为长成85%的单层PSF细胞。

[0031] 进一步地,所述连续培养的天数为7天。

[0032] 进一步地,所述梯度稀释是指进行连续10倍梯度稀释,共稀释6个梯度,梯度范围为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 。

[0033] 另一方面,本发明提供一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒在检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中活病毒含量的用途。优选地,所述疫苗包括灭活疫苗(病毒灭活前)和活疫苗。

[0034] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0035] 本发明提供一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法,通过构建检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒并运用间接免疫荧光检测技术对疫苗中病毒含量进行检测。本发明的试剂盒利用活的呼肠孤病毒粒子在PSF细胞能够进行繁殖这一特性,即能够有效检测到有复制能力的能出现特异性绿色荧光的活病毒粒子,同样死亡的病毒粒子接种PSF后不能繁殖复制且不能出现特异性绿色荧光,进行检测。本检测方法具有灵敏度高、特异性强和重复性好的特点,且能定量检测活病毒。

附图说明

[0036] 图1GCRV VP41的Western blot检测;M:蛋白Marker;A:纯化的GCRV HZ08;B:感染HZ08的PSF细胞;C:未感染的PSF细胞;

[0037] 图2GCRV VP41抗体的特异性检测;A:感染GCRV JX0901(I型);B:感染GCRV HZ08(II型);C:感染GCRV 104(III型);D:未感染的空白对照。

具体实施方式

[0038] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0039] 本发明选用草鱼呼肠孤病毒(GCRV)易感的细胞,且细胞能够对草鱼呼肠孤病毒进

行传代培养;通过将基因II型草鱼呼肠孤病毒疫苗进行连续10倍的梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-6}$)接种于长成单层的PSF 96孔细胞培养板,继续培养7天后,利用构建的检测基因II型草鱼呼肠孤病毒的荧光免疫试剂盒进行间接免疫荧光法(IFA)检测,通过计算显微镜下视野中阳性(出现特异性绿色荧光)细胞的孔数计算疫苗中的病毒滴度。

[0040] 下面结合具体实施例对本发明进行详细的描述。

[0041] 实施例1:用于检测基因II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中基因II型草鱼呼肠孤病毒的荧光免疫试剂盒的构建

[0042] 步骤1) 基因II型GCRV VP41血清抗体的制备方法

[0043] 本发明所制备的用于检测基因II型GCRV的荧光免疫试剂盒主要成分为抗基因II型GCRV VP41的血清抗体。

[0044] 根据GCRV HZ08株的VP41蛋白序列(GenBank序列登录号GU350745.1)用Primer Premier5.0设计特异性引物(上游引物VP41 F 5' -acgaattcatgtatctggaactgttcat-3',下游引物F5' -cgaagcttcgggctcttagcctttgcct-3',划线部分分别为限制性内切酶EcoR I和HindIII酶切位点)。GCRV HZ08感染PSF细胞7天后,取200 μ l上清液提取RNA,然后根据TAKARA反转录试剂盒说明进行反转录获得cDNA。

[0045] 以cDNA为模板进行PCR扩展,PCR体系:12.5uL rTaq Mix、引物各1uL(10umol/L)和1uL cDNA模板,补灭菌水至25uL。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C,5min;94 $^{\circ}$ C,30s,55 $^{\circ}$ C,30s,72 $^{\circ}$ C,2min,30个循环;72 $^{\circ}$ C,7min。将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收后与pET-32a(+)载体连接,连接体系:T4 Liqase 1.5uL,10 $\times$ T4 Liqase buffer 1.5uL,pET-32a(+) 3uL,目的片段9uL连接产物转化至DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆进行菌液PCR和双酶切鉴定并由生工生物公司测序验证,将鉴定正确的重组原核载体转化至大肠杆菌Rosetta(DE3)中,筛选阳性克隆,接种于含有氨苄的LB培养基中,在37 $^{\circ}$ C下摇床培养至OD₆₀₀为0.4,加入终浓度为0.8mmol/L的IPTG进行表达诱导,4h后10000rpm/min离心5min收集菌体。将收集的菌体用PBS清洗2次后重悬,在冰上超声波破碎,10000rpm/min离心5min,分别收集上清和包涵体沉淀,运用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定。参照Ni-凝胶纯化试剂盒的方法对包涵体蛋白进行纯化。

[0046] 纯化后的表达产物,首次免疫按照400 μ g/只的剂量免疫新西兰大白兔,加强免疫按照200 μ g/次 $\cdot$ 只的剂量,加强免疫三次,每次免疫间隔2周。最后一次免疫2周后,取血收集血清,将血液于37 $^{\circ}$ C静置1h后,3000rpm/min离心10min,收集血清,用亲和纯化的方式对抗血清进行纯化,于-80 $^{\circ}$ C下保存。

[0047] 采用SDS-PAGE与免疫印迹分析(Western blot)进行抗体验证。聚丙烯酰胺凝胶由12%的分离胶和4%的浓缩胶组成,将纯化的HZ08病毒液、感染HZ08的PSF细胞以及未感染的PSF细胞分别与5 $\times$ 蛋白上样缓冲液按比例混合后在沸水中加热5min,冷却后点样进行电泳分析(200V,35min)。将SDS-PAGE分离后的凝胶用湿转的方法转移至硝酸纤维素膜,5%的脱脂奶粉室温封闭1h,然后用封闭剂1:500稀释的GCRV VP41多克隆抗体室温下孵育1h,接着用0.05%的PBST清洗3次,每次10min;最后用封闭剂1:10000稀释的HRP标记羊抗兔IgG室温孵育1h,用0.05%的PBST清洗3次后进行DAB显色。结果显示,制备的抗体可以特异性识别GCRV VP41蛋白(见图1)。

[0048] 步骤2) 间接免疫荧光法(IFA)鉴定基因II型GCRV VP41的血清抗体特异性

[0049] (1) 选取状态良好的PSF细胞,使用完全培养基重悬细胞,制备成 $6 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液,24孔板每个孔中种入300 μl 细胞,28℃培养过夜(至细胞85%贴壁)。

[0050] (2) 吸弃培养基,以1×PBS轻轻的冲洗细胞3次,加入GCRV HZ08(基因II型),GCRV JX0901(基因I型)和GCRV 104(基因III型)病毒,每种病毒加150 μl ,重复三个孔。28℃孵育60分钟。

[0051] (3) 吸弃病毒液,加入细胞维持液,持续观察一周。

[0052] (4) 吸弃细胞维持液,加入丙酮与甲醇体积比3:2配置的固定液(-20℃),200 μl /孔,固定10分钟。

[0053] (5) 吸弃固定液,在室温自然晾干。

[0054] (6) 加入0.5%Triton 100进行细胞透化,室温下作用5分钟。

[0055] (7) 用1×PBS轻轻的冲洗细胞3次,加入5%牛血清白蛋白(BSA)进行封闭,37℃孵育30分钟。

[0056] (8) 用1×PBS轻轻的冲洗细胞3次,三个病毒感染组分别加入1:100倍稀释的基因II型GCRVVP41血清抗体,150 μl /孔,37℃孵育1小时。

[0057] (9) 使用1×PBS轻轻的冲洗细胞3次,每次5分钟。加入1:500倍稀释的商品化FITC标记的羊抗兔IgG抗体,150 μl /孔,37℃孵育1小时。

[0058] (10) 在倒置显微镜下用蓝色激发光(波长490nm)放大100×~200×观察计算阳性细胞孔数。

[0059] (11) 结果判定标准当待检孔中出现特异性绿色荧光,阴性对照孔未出现特异性绿色荧光时,试验成立。待检孔被判为阳性。

[0060] (12) 结果显示GCRV VP41血清可与基因II型GCRV发生特异性反应,并且因子血清在1:100倍稀释效果较好(见图2)。

[0061] 步骤3)以VP41血清为基础构建的GCRV荧光免疫检测试剂盒

[0062] 主要成分包括:

[0063] 1) 用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体(一抗,工作浓度为1:100倍稀释);

[0064] 2) 二抗:FITC标记的羊抗兔IgG(工作浓度1:500倍稀释);

[0065] 3) 阳性对照样品:GCRV HZ08株;

[0066] 4) 固定液:按丙酮与甲醇体积比3:2配置的固定液;

[0067] 5) PBS洗液:磷酸盐缓冲液,按NaCl 8.0g;KCl 0.2g;Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g;KH₂PO₄ 0.24g定容至1L,调pH至7.2。

[0068] 6) 封闭液:1%BSA/PBS溶液

[0069] 实施例2:检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒对活疫苗中病毒含量测定

[0070] 步骤1)病毒滴度测定

[0071] 将不同批次的2瓶基因II型草鱼呼肠孤病毒HZ08株活疫苗进行连续10倍梯度稀释,共稀释6个梯度($10^{-1} \sim 10^{-6}$),每个梯度接种4个孔(96孔细胞培养板),每孔取100 μl 稀释的疫苗液接种于长成85%的单层PSF细胞,设4个培养孔作为阴性对照,连续培养7天后,利用构建的检测基因II型GCRV的荧光免疫检测试剂盒进行IFA,计算显微镜下视野中阳性细胞(出现特异性绿色荧光)的孔数。

[0072] 步骤2) 病毒滴度计算结果

[0073] 根据不同稀释倍数下, 出现特异性荧光的孔数, TCID₅₀ (单位/ml) 按照Karber法进行计算, 计算公式如下:

[0074] $\lg \text{TCID}_{50} = L - D \times (S - 0.5)$

[0075] 其中, L: 最高稀释倍数的对数; D: 稀释度对数之间的差; S: 阳性孔比率总和。

[0076] 第1瓶活疫苗在稀释倍数为 10^{-2} 的时候, 阳性孔数4个, 稀释倍数为 10^{-3} 的时候, 阳性孔数为1个; 第2瓶活疫苗在稀释倍数为 10^{-2} 的时候, 阳性孔数3个, 稀释倍数为 10^{-3} 的时候, 阳性孔数为1个。按照表1进行TCID₅₀换算, 结果如下: 1号瓶活疫苗的TCID₅₀为 3.6×10^3 /ml, 2号瓶活疫苗的TCID₅₀为 3.6×10^3 /ml。

[0077] 表1: TCID₅₀ (单位/ml) 换算值

[0078]

1:10 ⁿ	1:10 ⁿ⁺¹	TCID ₅₀ (单位/ml)
4 ^a /4 ^b	0/4	$3.16 \times 10^{n+1}$
4/4	1/4	$3.6 \times 10^{n+1}$
3/4	0/4	$2.15 \times 10^{n+1}$
3/4	1/4	$3.16 \times 10^{n+1}$
2/4	1/4	$1.0 \times 10^{n+1}$

[0079] n: 表示稀释倍数; a: 出现特异性荧光的孔数; b: 检测的总孔数。

[0080] 从结果可以看出, 本发明制备的检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒能够有效检测草鱼呼肠孤病毒活疫苗中病毒含量, 且结果准确度高, 重复性高。

[0081] 实施例3: 检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒对病毒灭活疫苗(病毒灭活前)中病毒含量测定

[0082] 步骤1) 病毒滴度测定和RT-qPCR检测

[0083] 将不同生产批次GCRV HN1307株灭活疫苗的制苗用病毒液进行连续10倍梯度稀释, 共稀释6个梯度($10^{-1} \sim 10^{-6}$), 每个梯度接种8个孔(96孔细胞培养板), 每孔取100μl稀释的疫苗液接种于长成85%的单层PSF细胞, 设8个培养孔作为阴性对照, 连续培养7天后, 其中4个孔利用构建的检测基因II型GCRV的荧光免疫检测试剂盒进行IFA, 计算显微镜下视野中阳性细胞(出现特异性绿色荧光)的孔数。

[0084] 平行的另外4个孔进行RT-qPCR检测, 其中两个孔用RNase I进行处理, 尽可能消除游离的病毒核酸, 降低qPCR扩增出非感染性病毒颗粒的结果, 每100μL病毒液按照说明书推荐剂量加入65个单位的RNase (Life Technologies, Grand Island, NY), 37℃孵育30分钟, 然后95℃5分钟灭活酶。病毒样品按照RNA提取试剂盒进行RNA提取后, 反转录成cDNA, 进行qPCR扩增, 其中

[0085] 上游引物GCRV II F: 5'-TGATGAGTTCAGTGCCTACG-3',

[0086] 下游引物GCRV II R: 5'-GAGCCATGAGGTGTGTCTAC-3',

[0087] 扩增序列大小为198bp。

[0088] GCRV II探针: 5'-ATCATAGCAGCCGCCGTCCGTAT-3', 5'由FAM标记, 3'由Eclipse标记。

[0089] 扩增体系为Premix (Takara) Ex Taq™ 12.5μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.5μ

L, PCR上游引物和PCR下游引物各0.5 μ L (终浓度均为0.2 μ mol/L), TaqMan探针1 μ L (终浓度为0.12 μ mol), DNA模板1 μ L, ddH₂O 8 μ L, 总体系为25 μ L。

[0090] 两步法PCR扩增标准程序: 预变性1个循环, 95℃ 30s; PCR反应, 45个循环, 95℃ 5s, 60℃ 34s。

[0091] 步骤2) 病毒滴度和拷贝数测定结果

[0092] 根据不同稀释倍数下, 出现特异性荧光的孔数, TCID₅₀ (单位/ml) 按照Karber法进行计算 (方法如实施例2), 荧光定量检测结果按照刘宝芹等 (2012, 中国水产科学) 方法进行。病毒滴度和拷贝数测定结果见表2。

[0093] 表2: 草鱼呼肠孤病毒灭活疫苗HN1307株制苗病毒液的滴度和拷贝数测定结果

	疫苗株	检测方法	批次	
			1#	2#
[0094]	GCRV	qPCR RNase-	4.50 $\times 10^6$	4.90 $\times 10^6$
	HN1307	(GC/ml) RNase+	4.45 $\times 10^5$	6.77 $\times 10^5$
		TCID50 (units/ml)	3.16 $\times 10^4$	3.60 $\times 10^4$

[0095] 从表2可以看出, 相比RT-qPCR检测方法, 本发明制备的检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒不仅能够有效检测草鱼呼肠孤病毒灭活疫苗 (病毒灭活前) 中病毒含量, 且结果准确度高, 检测数据更接近真实值, 且方法简单高效。

[0096] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下, 本发明还会有各种变化和改进, 这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

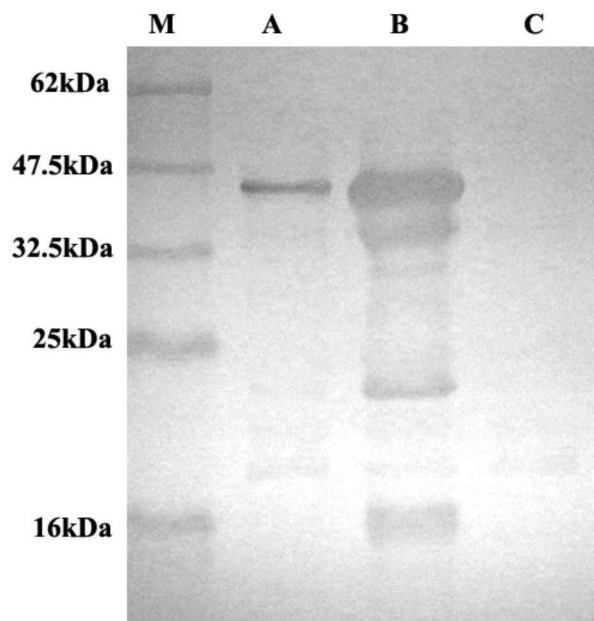


图1

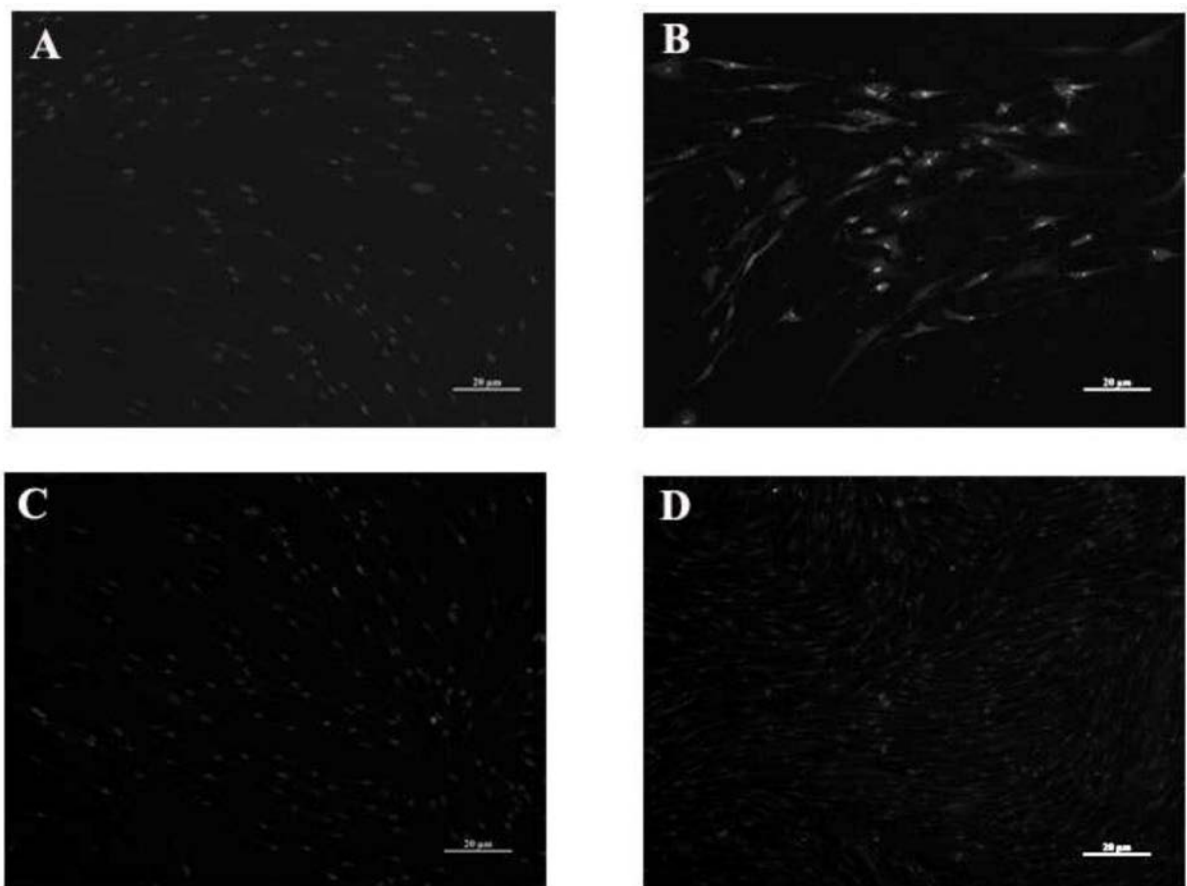


图2

专利名称(译)	检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN108020664A	公开(公告)日	2018-05-11
申请号	CN201711274976.8	申请日	2017-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院珠江水产研究所		
申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院珠江水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院珠江水产研究所		
[标]发明人	王庆 曾伟伟 王英英 常藕琴 刘春 李莹莹 尹纪元 任燕		
发明人	王庆 曾伟伟 王英英 常藕琴 刘春 李莹莹 尹纪元 任燕		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56983		
代理人(译)	颜春艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测II型草鱼呼肠孤病毒疫苗中病毒含量的试剂盒及方法，进一步地涉及活疫苗或灭活疫苗(病毒灭活前)的病毒含量的测定，所述试剂盒包括用于检测基因II型GCRV VP41的血清抗体、FITC标记的羊抗兔IgG、阳性对照样品、固定液和PBS洗液。检测方法为将活疫苗或灭活疫苗(病毒灭活前)进行梯度稀释后接种于PSF细胞，连续培养完成后再用本发明所述的试剂盒进行免疫荧光检测，将检测结果进行计算得出相应的病毒含量。本发明的试剂盒及方法灵敏度高、特异性强，且能定量检测活病毒。

