(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106940371 A
(43)申请公布日 2017.07.11

(21)申请号 201710239185.5

(22)申请日 2017.04.13

(71)申请人 中国兽医药品监察所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街8号

(72)发明人 范学政 丁家波 王琴 徐璐 赵启祖 蒋卉 沈青春 朱良全 彭小薇 许冠龙

(74)专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所(普通合伙) 11305
代理人 郑明

(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
C12N 7/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种瘟病毒培养及活病毒定量检测方法。本发明的瘟病毒培养方法，能显著提高病毒感染效率，提高猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒的抗原产量；在对活病毒定量检测时，能显著提高病毒感染效率，提高免疫荧光染色敏感性，同时降低免疫荧光背景，提高免疫荧光质量，准确测定猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒的活病毒滴度($TCID_{50}$)。

CN 106940371 A

1.一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于瘟病毒培养的方法包括以下步骤：准备敏感细胞；接种瘟病毒，同时加入适当浓度的PEG，提高病毒感染率；更换培养液，细胞培养箱中培养；收获病毒液。

2.如权利要求1所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于瘟病毒活病毒测定方法($TCID_{50}$)包括以下步骤：在48孔板中准备敏感细胞；将瘟病毒用培养液梯度稀释；加入适当浓度的PEG；接种敏感细胞，37℃，5％CO_2细胞培养箱中培养；优化一抗种类；优化二抗种类；在荧光倒置显微镜下观察阳性空数，计算病毒滴度。

3.如权利要求1所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于所述瘟病毒包括猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒。

4.如权利要求1，2所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于所述一抗种类包括及，包括：CSFV E2蛋白IgG纯化；纯化BVDV E2蛋白IgG；二抗种类为：FITC标记的抗兔IgG。

5.如权利要求1，2所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于该方法可用于常见病毒如牛鼻气管炎病毒(IBRV)，猪呼吸与繁殖综合症病毒(PRRS)，猪流行性腹泻病毒(PEDV)，猪胃肠炎病毒(TGEV)等培养与活病毒的定量。

一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种瘟病毒培养及病毒定量检测方法，属于生物制品领域。

背景技术

[0002] 猪瘟病毒(Hog cIoIera virus,HCV又称CIassicaI swine fever virus,CSFV)、牛病毒性腹泻病毒(Bovine viraI diarrhea virus,BVDV)同属黄病毒科瘟病毒属。

[0003] 猪瘟(Hog choIera)是由猪瘟病毒引起的一种急性传染病，各种年龄猪只均可发病，病程从急性到慢性等多种多样。一年四季流行，传染性极强，具有高度发病率和死亡率。但是，猪瘟病毒培养因难，因不引起细胞病变，临床分离和鉴定都非常困难。目前我国仍然采用免疫预防为主的综合控制措施，使用的猪瘟病毒兔化弱毒株(CVCC AV1412)是国际公认的最佳猪瘟疫苗生产用毒株，已被很多国家采用，它有效的控制了猪瘟的流行。

[0004] 猪瘟兔化弱毒活疫苗抗原生产目前仍然采用转瓶为主的贴壁生产工艺，生物反应器生产猪瘟兔化弱毒活疫苗技术尽管已在开发阶段(如:CN102453698A，悬浮培养传代细胞及利用其生产猪瘟疫苗的方法)，但尚不成熟，没有商品化产品上市。由于猪瘟病毒及制苗细胞的生物学特性，经常出现病毒抗原效价低、批间差异大，经常出现疫苗质量不稳定等问题。因此，优化猪瘟病毒抗原生产方法十分必要。

[0005] 另外，目前我国猪瘟活疫苗效力检测采用兔体反应热方法。但是该方法存在很多弊端，不仅需要很多大耳白兔，检测结果易受兔体个体差异和环境因素影响、费时费力并且成本较高，更重要的是我国大耳白兔已没有纯系品种，品系越来越杂，不同来源的大耳白兔检测结果差异很大，因此很难用兔体反应热来准确检测活疫苗的效力，急需建立新的猪瘟活疫苗效力检测方法。

[0006] 在猪瘟兔化弱毒培养和猪瘟活疫苗效力检测方法等方面，我国研究人员进行了大量尝试，也取得了可喜进展，如，武华(中国专利CN 101879311 A)、瑞普(保定))生物药业有限公司公司(中国专利CN 104940922 A)等在猪瘟兔化弱毒的培养及疫苗生产工艺进行了探索，山东滨州博莱威生物技术有限公司(中国专利CN 103698518 A)、新疆天康畜牧生物技术股份有限公司(中国专利CN 103105493 A)、洛阳普莱柯生物工程有限公司(中国专利CN 101846683 A)等建立了一系列新的猪瘟兔化弱毒$TCID_{50}$的方法，但均存在相应的不足。目前在免疫荧光染色时多使用猪瘟阳性血清作为一抗，FITC标记的兔抗猪IgG作为二抗，猪瘟阳性血清是用猪瘟病毒感染猪制备的，效价低、非特异性反应强、加上FITC标记兔抗猪IgG后导致非特异染色强，背景深，结果难判断，因此，有必要进一步优化。

[0007] 另外，对于猪瘟田间野毒的培养方法和活毒测定方法，缺少相应的研究，仍然采用最为传统的方法，针对田间野毒分离和滴度测定难的问题，也迫切需要建立敏感的培养方法和测定方法。

[0008] 而牛病毒性腹泻(Bovine viraI diarrhea,BVD)是由牛病毒性腹泻病毒(BVDV)引起的以发热、粘膜糜烂溃疡、白细胞减少、腹泻、咳嗽及怀孕母牛流产或产出畸形胎儿为主要特征的一种传染病。目前，该病在世界上广泛存在。近年来从我国多个发病牛场分离到了

BVDV，给我国养牛业带来巨大的经济损失。对我国部分省份的牛血清样品进行检测，结果表明，该病在我国呈上升态势。疫苗是防控该病的有效措施之一。但是，关于该病病毒的培养、滴度测定方法等一直采用传统的方法，多年来没有改进，同样需要建立针对牛病毒性腹泻病毒敏感的培养方法和测定方法。

发明内容

[0009] 本发明的目的是：建立新的猪瘟病毒的培养方法和活病毒测定方法；建立新的牛病毒性腹泻病毒培养方法和活病毒测定方法，以提高猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒培养液中抗原含量；提高猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒活病毒测定方法的准确性和敏感性。

[0010] 本发明的主要技术原理

[0011] 在一定浓度高分子聚合物聚乙二醇(PEG)等的作用下，可使病毒沉降，细胞膜融胀，从而增加细胞感染病毒粒子的敏感性，大大提高病毒粒子感染细胞的几率，从而大幅度提高细胞产毒能力；在$TCID_{50}$测定时，通过优化抗体种类与质量，优化染色方法，提高免疫荧光的染出率和染色质量，从而提高活病毒定量的准确性。

[0012] 本发明的技术方案

[0013] 1.一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于瘟病毒培养的方法包括以下步骤：准备敏感细胞；接种瘟病毒，同时加入适当浓度的PEG，提高病毒感染率；更换培养液，细胞培养箱中培养；收获病毒液。

[0014] 2.本发明的所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于瘟病毒活病毒滴度测定方法($TCID_{50}$)包括以下步骤：在48孔板中准备敏感细胞；瘟病毒用培养液梯度稀释；加入适当浓度的PEG；接种敏感细胞，37℃，5％CO_2细胞培养箱中培养；优化一抗种类(利用杆状病毒表达的E2蛋白制备并纯化抗体)和二抗种类；在荧光倒置显微镜下观察阳性空数，计算病毒滴度。

[0015] 3.本发明所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于所述瘟病毒包括猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒。

[0016] 4.本发明所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于所述一抗种类包括及，包括：CSFV E2蛋白IgG纯化；纯化BVDV E2蛋白IgG；二抗种类为：FITC标记的抗兔IgG。

[0017] 5.本发明所述一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法，其特征在于该方法可用于常见病毒如牛鼻气管炎病毒(IBRV)，猪呼吸与繁殖综合症病毒(PRRS)，猪流行性腹泻病毒(PEDV)，猪胃肠炎病毒(TGEV)等培养与活病毒的定量。

[0018] 本发明具体实施方式

[0019] 1.瘟病毒E2蛋白IgG的制备纯化(本发明中作为一抗使用)：

[0020] 用杆状病毒表达并纯化的E2蛋白[CSFV E2(猪瘟抗体ELISA诊断试剂盒，200810223406.0，CGMCC No.2671)、BVDV E2(牛病毒性腹泻病毒I型E2蛋白的表达及应用，申请号201610518191X，CGMCC No.12544)]免疫日本大耳白兔，首次免疫用完全弗氏完全佐剂乳化，皮下多点免疫200μg/只。30天后二次免疫，弗氏不完全佐剂佐剂乳化，皮下多点免疫200μg/只。再过30天后用纯化的E2蛋白腹腔注射免疫200μg/只。7天后采血分离血清。将血清用Protein A抗体纯化柱纯化，用SDS-PAGE电泳分析，用Bradford法测定蛋白浓度，加入20％甘油PBS后分装冻存。测定工作浓度，使用前用PBS稀释至一定浓度。

[0021] 2.PEG培养液的配制：

[0022] 称取100～140g PEG6000，加800ml MEM或DMEM培养基，充分溶解后用MEM或DMEM定量至1000mL，PEG浓度为10％～14％。用0.22μm滤膜滤菌，4℃保存备用。

[0023] 3.细胞生长液配制：

[0024] 含8％～10％FBS的MEM或含8％～10％FBS的DMEM。

[0025] 4.细胞维持液配制：

[0026] 含2％FBS的MEM或含2％FBS的DMEM。

[0027] 5.病毒培养过程：

[0028] (1)细胞准备：将长满细胞培养瓶的敏感细胞用0.25％EDTA-胰酶消化分散，然后加入适量细胞生长液，按1:3比例分散至新的细胞培养瓶。细胞长至80％～90％满时使用。

[0029] (2)病毒的稀释与接种：用MEM或DMEM培养液将病毒液适当稀释，将PEG培养液按1:1(v/v)比例加至病毒液中，混匀。吸干培养液，将含PEG的病毒液加至细胞瓶中，于37℃，5％CO_2细胞培养箱中孵育2～4h；孵育结束后，弃掉病毒液，加入适量细胞维持液，置于37℃，5％CO_2细胞培养箱继续培养72～96h；

[0030] 注：对于非致细胞病变的病毒，如猪瘟病毒(含猪瘟兔化弱毒疫苗株)，培养72～96h后吸出维持液，更换新的维持液，置37℃，5％CO_2细胞培养箱继续培养，每隔72～96h后更换一次，连续4至6次。每次吸出的维持液均冻存，并标记收次，测定每个收次的病毒抗原含量。

[0031] 6.病毒的$TCID_{50}$测定过程：

[0032] (1)细胞细胞培养板的准备：将长满细胞培养瓶的敏感细胞用0.25％EDTA-胰酶消化分散，然后加入适量细胞生长液，分散至48孔细胞培养板(按75cm^2细胞培养瓶分散4～8块细胞培养板的比例进行)。置37℃，5％CO_2细胞培养箱培养，细胞长至80％～90％满时使用。

[0033] (2)病毒的稀释与接种：细胞长至80％～90％满时，用MEM或DMEM培养液将病毒液进行梯度稀释，然后将PEG培养液按1:1(v/v)比例加至稀释好的各梯度病毒液中，混匀；吸干细胞生长液，尽快加入稀释好的各梯度病毒液，每孔200μl，于37℃，5％CO_2细胞培养箱中孵育2～4h；孵育结束后，吸干病毒液，尽快加入细胞维持液，每孔500μl，置37℃，5％CO_2细胞培养箱继续培养60～72h；

[0034] (3)免疫荧光检测

[0035] 培养结束后，吸干细胞维持液，每孔加入约500μl预冷的固定液(丙酮:甲醇＝1:1)固定20min以上，至通风柜中吸净晾干，每孔加入500μl PBS漂洗一遍，加入稀释的纯化E2蛋白IgG(即：一抗)(用含3％～5％马血清的PBS溶液稀释)，每孔200μl，37℃培养箱中孵育40～60min，吸干，用PBS漂洗三遍，每次每孔加入500μl，吸干，加入稀释好的FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(即：二抗)(用含3％～5％马血清的PBS溶液稀释)，每孔200μl，37℃培养箱中孵育40～60min，吸干，用PBS漂洗三遍，每次每孔加入500μl，吸干，最后每孔加入300μl～500μl PBS，在荧光显微镜下进行观察和计数。

[0036] 7.本分明所述的方法可用于常见病毒如牛鼻气管炎病毒(IBRV)，猪呼吸与繁殖综合症病毒(PRRS)，猪流行性腹泻病毒(PEDV)，猪胃肠炎病毒(TGEV)等培养与活病毒的定量。

附图说明

[0037] 图1猪瘟病毒增殖试验，图中：A图为猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株(CVCC AV1412)；B图为猪瘟病毒辽宁株(CVCC AV280)。

[0038] 图2分步接种法72h后细胞状态，图中A.分步接种法72h后细胞状态；B.PEG同步接种法72h后细胞状态。

[0039] 图3不同抗体组合荧光染色结果，图中A.本发明抗体组合：纯化CSFV E2蛋白IgG(一抗)FITC标记的山羊抗兔IgG(二抗)组合；B.公开专利抗体组合：猪瘟阳性血清和FITC标记兔抗猪IgG组合；C.猪瘟单抗和FITC标记的羊抗鼠IgG组合。

[0040] 图4牛病毒性腹泻病毒增殖试验。

[0041] 本发明涉及生物材料资源信息

[0042] 1.表达CSFV E2基因的重组杆状病毒VFBMEL-SE2M-HIS(CGMCC No.2671)(见：猪瘟抗体ELISA诊断试剂盒200810223406.0)，已提交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0043] 猪瘟兔化弱毒疫苗株(CVCC AV1412)，猪瘟病毒辽宁株(CVCC AV280)，猪瘟病毒郑州株(CVCC AV279)；

[0044] 2.表达BVDV E2基因的重组杆状病毒BacVME2-His(CGMCC No.12544)(见：牛病毒性腹泻病毒I型E2蛋白的表达及应用，申请号201610518191X)，已提交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0045] 牛病毒性腹泻病毒(BVDV)OregonC24v株又称BA株(CVCC AV69)、BVDV NADL株(CVCC AV67)、BVDV牦牛株(CVCC AV68)。

[0046] 以上编号为CVCC的微生物菌种来自北京市海淀区中关村南大街8号中国兽医药品监察所，中国兽医微生物菌种保藏管理中心。其菌种编号请见该所网站http://www.ivdc.org.cn。

[0047] 本发明的积极意义

[0048] 本发明涉及一种瘟病毒培养及活病毒定量检测方法。本发明的瘟病毒培养方法，能显著提高病毒感染效率，提高猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒病毒的抗原产量；在对测定活病毒定量检测时，能显著提高病毒感染效率，提高免疫荧光染色敏感性，同时降低免疫荧光背景，提高免疫荧光质量，准确测定猪瘟野毒、猪瘟兔化弱毒、牛病毒性腹泻病毒病毒的活毒滴度($TCID_{50}$)。

实施例

[0049] 以下实施例为进一步说明本发明，不对本发明请求保护的技术方案构成限制。

[0050] 实施例1

[0051] ——CSFV E2蛋白IgG的制备与纯化

[0052] 用杆状病毒表达并纯化的蛋白(CSFV E2(猪瘟抗体ELISA诊断试剂盒200810223406.0,CGMCC No.2671)免疫日本大耳白兔，首次免疫用完全弗氏完全佐剂乳化，皮下多点免疫200μg/只。30天后二次免疫，弗氏不完全佐剂佐剂乳化，皮下多点免疫200μg/只。再过30天后用纯化的E2蛋白腹腔注射免疫200μg/只。7天后采血分离血清。将血清用

Protein A抗体纯化柱纯化，用SDS-PAGE电泳分析，用Bradford法测定蛋白浓度，加入20％甘油PBS后分装冻存。测定工作浓度，使用前用PBS稀释至工作浓度(本实验测定为200～400倍)。

[0053] 实施例2

[0054] ——猪瘟病毒的培养

[0055] 1.细胞准备：将长满细胞培养瓶(以25cm^{2}细胞培养瓶为例)的敏感细胞(ST、PK15)用0.25％EDTA-胰酶消化分散，然后加入18mI细胞生长液，按1:3比例分散至新的细胞培养瓶。细胞长至80％～90％满时使用。

[0056] 2.病毒的稀释与接种：用MEM或DMEM培养液将病毒液[以猪瘟兔化弱毒疫苗株(CVCC AV1412)和猪瘟病毒辽宁株(CVCC AV280)为例]分别稀释，将PEG培养液按1:1(v/v)比例至病毒液中，混匀；(同时设不加PEG的对照组，改为按1:1(v/v)比例加入MEM培养液，称为无PEG组)。于37℃，5％CO_2细胞培养箱中孵育2～4h；孵育结束后，吸干病毒液，每瓶加入6mI细胞维持液，置于37℃，5％CO_2细胞培养箱继续培养72～96h，吸出维持液，更换新的维持液，置37℃，5％CO_2细胞培养箱继续培养，每隔72～96h后更换一次，连续4至6次。每次吸出的维持液均冻存，并标记收次。用CSFV Ag ELISA试剂盒(IDEXX公司产品)测定病毒抗原含量。

[0057] 结果：无论是猪瘟兔化弱毒疫苗株还是猪瘟病毒辽宁株，加入PEG后，各收次的病毒抗原含量均明显高于无PEG组。见图1。

[0058] 实施例3

[0059] ——细胞铺板与PEG稀释病毒液接种同步与分步操作对细胞的影响

[0060] 按照本发明实施例2——猪瘟病毒的培养中的方法培养猪瘟兔化弱毒；同时，对比专利(瑞普，申请号201510380369.4)所述猪瘟活疫苗的制备方法，将猪瘟病毒毒种与细胞悬液同步接入转瓶中，补入细胞生长液进行培养，在接入猪瘟病毒的同时加入聚乙二醇(PEG)，PEG的使用浓度为2％(m:V)。观察两种操作方法对ST细胞生长状态的影响。

[0061] 结果：分步操作对细胞状生长状态无明显影响，而文献的同步接种法易造成细胞活性下降，后期细胞拉网病变，严重者死亡脱落；因此，在本发明中，采用先准备细胞，待生长至对数期时，再接种PEG稀释病毒液，孵育2～4h后更换细胞维持液，见图2。

[0062] 实施例4

[0063] ——不同抗体组合的比较

[0064] (1)细胞细胞培养板的准备：将长满细胞培养瓶的敏感细胞(以ST细胞为例)用0.25％EDTA-胰酶消化分散，然后加入适量细胞生长液，分散至48孔细胞培养板(按75cm^{2}细胞培养瓶分散4～8块48孔细胞培养板的比例进行)。置37℃，5％CO_2细胞培养箱培养，细胞长至80％～90％满时使用。

[0065] (2)病毒的稀释与接种：细胞长至80％～90％满时，用MEM或DMEM培养液将病毒液(猪瘟兔化弱毒疫苗株(CVCC AV1412))进行10倍梯度稀释，然后将PEG培养液按1:1(v/v)比例加至稀释好的各梯度病毒液中，混匀；吸干细胞板各孔中生长液，尽快加入稀释好的各梯度病毒液，每孔200μI，于37℃，5％CO_2细胞培养箱中孵育2～4h；孵育结束后，吸干病毒液，尽快加入细胞维持液，每孔500μI，置37℃，5％CO_2细胞培养箱继续培养60～72h；

[0066] (3)免疫荧光检测：培养结束后，吸干细胞维持液，每孔加入约500μI预冷的固定液

(丙酮:甲醇＝1:1)固定20min以上,至通风柜中吸净晾干,每孔加入500μl PBS漂洗一遍,加入工作浓度的纯化CSFV E2蛋白IgG(一抗,来自实施例1,用含3%～5%马血清的PBS溶液稀释),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40～60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,加入稀释好的FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(KPL公司产品072-03-15-06)(二抗,用含3%～5%马血清的PBS溶液稀释),每孔200ul,37℃培养箱中孵育40～60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,最后每孔加入300～500μl PBS,在荧光显微镜下进行观察和计数。

[0067] 同时,对比专利(瑞普,申请号201310663187.9)使用的猪瘟阳性血清和FITC标记兔抗猪IgG组合,对部分样本孔进行染色,比较抗体组合的染色效果。

[0068] 另外,按市售单克隆抗体试剂组合进行染色,48孔板固定晾干后,每孔加入500μl PBS漂洗一遍,加入猪瘟单抗(AHVLA产品),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40～60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,加入稀释好的FITC标记的羊抗鼠IgG抗体(sigma公司F4018)(二抗),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40～60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,最后每孔加入300～500μl PBS,在荧光显微镜下进行观察。

[0069] 结果:可以看出,本发明采用的纯化CSFV E2蛋白IgG(一抗,实施例1)FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(KPL公司产品072-03-15-06)(二抗)组合荧光染色效果良好,背景低,阴阳性区分明显,与市售单克隆抗体试剂组合染色效果一致;而猪瘟阳性血清和FITC标记兔抗猪IgG组合进行染色,免疫荧光背景深,易造成假阳性结果。因此,本发明创造的抗体组合免疫效果好于其它已公开的方法,见图3。

[0070] 实施例5

[0071] ——猪瘟兔化弱毒疫苗株的$TCID_{50}$测定

[0072] (1)细胞细胞培养板的准备:将长满细胞培养瓶的敏感细胞(以ST细胞为例)用0.25%EDTA-胰酶消化分散,然后加入适量细胞生长液,分散至48孔细胞培养板(按75cm^2细胞培养瓶分散4～8块48孔细胞培养板的比例进行)。置37℃,5%CO_2细胞培养箱培养,细胞长至80%～90%满时使用。

[0073] (2)病毒的稀释与接种:细胞长至80%～90%满时,用MEM或DMEM培养液将病毒液(CVCC AV1412猪瘟兔化弱毒疫苗株)进行10倍梯度稀释,然后将PEG培养液按1:1(v/v)比例加至稀释好的各梯度病毒液中,混匀;吸干细胞板各孔中生长液,尽快加入稀释好的各梯度病毒液,每孔200μl,于37℃,5%CO_2细胞培养箱中孵育2～4h;孵育结束后,吸干病毒液,尽快加入细胞维持液,每孔500μl,置37℃,5%CO_2细胞培养箱继续培养60～72h;

[0074] 同时,将稀释好的猪瘟兔化弱毒疫苗各梯度抗原液接种日本大耳白兔,按《中国兽药典》三部(二〇一五年版)方法测定抗原液兔体感染量(RID)。

[0075] (3)免疫荧光检测:培养结束后,吸干细胞维持液,每孔加入约500μl预冷的固定液(丙酮:甲醇＝1:1)固定20min以上,至通风柜中吸净晾干,每孔加入500μl PBS漂洗一遍,加入工作浓度的纯化CSFV E2蛋白IgG(一抗,来自实施例1,用含3%～5%马血清的PBS溶液稀释),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40～60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,加入稀释好的FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(KPL公司产品072-03-15-06)(二抗,用含3%～5%马血清的PBS溶液稀释),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40～60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,最后每孔加入300～500μl PBS,在荧光显微镜下进行观

察和计数。并与兔体感染量(RID)进行比较。

[0076] 结果:可以看出,本发明创建的$TCID_{50}$法与《中国兽药典》规定的兔体反应热法测定的结果有高度一致性。见表1。

[0077] 表1兔体反应热法与本发明$TCID_{50}$法比较

[0078]

样品代号	样品类型	兔体反应热法(RID/ml)	本发明 $TCID_{50}$ 法
S1	猪瘟病毒疫苗株 ST 细胞培养液(本实验室制备)	200 万~400 万	$10^{5.63}$≈422 万/ml
S2	猪瘟病毒疫苗株 ST 细胞培养液(本实验室制备)	100 万~200 万	$10^{4.84}$≈70 万/ml
S3	猪瘟活疫苗(传代细胞源)(来自企业 1)	30000~60000	$10^{3.50}$≈3.2 万/ml
S4	猪瘟活疫苗(传代细胞源) (来自企业 1)	30000~60000	$10^{3.50}$≈3.2 万/ml
S5	猪瘟活疫苗(细胞源) (来自企业 2)	15000~30000	$10^{3.40}$≈2.5 万/ml
S6	猪瘟活疫苗(细胞源) (来自企业 2)	15000~30000	$10^{3.50}$≈3.2 万/ml

[0079] 实施例6

[0080] ——猪瘟病毒分离株的$TCID_{50}$测定

[0081] (1)细胞细胞培养板的准备:将长满细胞培养瓶的敏感细胞(以PK15细胞为例)用0.25%EDTA-胰酶消化分散,然后加入适量细胞生长液,分散至48孔细胞培养板(按75cm^2细胞培养瓶分散4~8块细胞培养板的比例进行)。置37℃,5%CO_2细胞培养箱培养,细胞长至80%~90%满时使用。

[0082] (2)病毒的稀释与接种:细胞长至80~90%满时,用MEM或DMEM培养液将病毒液([以猪瘟病毒郑州株(CVCC AV279)猪瘟病毒辽宁株(CVCC AV280)为例]进行梯度稀释,然后将PEG培养液按1:1(v/v)比例加至稀释好的各梯度病毒液中,混匀;吸干细胞生长液,尽快加入稀释好的各梯度病毒液,每孔200μl,于37℃,5%CO_2细胞培养箱中孵育2~4h;孵育结束后,吸干病毒液,尽快加入细胞维持液,每孔500μl,置37℃,5%CO_2细胞培养箱继续培养60~72h;

[0083] (3)免疫荧光检测:培养结束后,吸干细胞维持液,每孔加入约500μl预冷的固定液(丙酮:甲醇=1:1)固定20min以上,至通风柜中吸净晾干,每孔加入500μl PBS漂洗一遍,加入工作浓度的纯化CSFV E2蛋白IgG(一抗,来自实施例1,用含3%~5%马血清的PBS溶液稀释),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40~60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,加入稀释好的FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(KPL公司产品072-03-15-06)(二抗,用含3%~5%马血清的PBS溶液稀释),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40~60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,最后每孔加入300μl~500μl PBS,在荧光显微镜下进行观察和计数。

[0084] 另外,按市售单克隆抗体试剂组合进行染色,48孔板固定晾干后,每孔加入500μl PBS漂洗一遍,加入猪瘟单抗(AHVLA产品),每孔200ul,37℃培养箱中孵育40~60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,加入稀释好的FITC标记的羊抗鼠IgG抗体(sigma公司F4018),每孔200μl,37℃培养箱中孵育40~60min,吸干,用PBS漂洗三遍,每次每孔加入500μl,吸干,最后每孔加入300~500μl PBS,在荧光显微镜下进行观察。

[0085] 结果:可以看出,本发明创建的猪瘟$TCID_{50}$法,测定的猪瘟病毒滴度明显高于市售

抗体组合。见表2。

[0086] 表2猪瘟病毒分离株$TCID_{50}$测定结果

[0087]

样品代号	样品类型	$TCID_{50}$法 PEG组		$TCID_{50}$法 不加PEG组	
		本发明抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml	市售抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml	本发明抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml	市售抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml
S7	猪瘟病毒郑州株(CVCC AV279)	$10^{3.50}$	$10^{2.75}$	$10^{2.40}$	$10^{2.00}$
S8	猪瘟病毒辽宁株(CVCC AV280)	$10^{4.00}$	$10^{3.75}$	$10^{2.50}$	$10^{2.00}$

[0088] 实施例7

[0089] ——BVDV E2蛋白IgG的制备与纯化

[0090] 用杆状病毒表达的纯化的BVDV E2蛋白(牛病毒性腹泻病毒I型E2蛋白的表达及应用,中国专利,申请号201610518191X,CGMCC No.12544)免疫日本大耳白兔,首次免疫用完全弗氏完全佐剂乳化,皮下多点免疫200μg/只。30天后二次免疫,弗氏不完全佐剂佐剂乳化,皮下多点免疫200μg/只。再过30天后用纯化的E2蛋白腹腔注射免疫200μg/只。7天后采血分离血清。将血清用Protein A抗体纯化柱纯化,用SDS-PAGE电泳分析,用Bradford法测定蛋白浓度,加入20%甘油PBS后分装冻存。测定工作浓度,使用前用PBS稀释至工作浓度(本实验测定为200～400倍)。

[0091] 实施例8

[0092] ——BVDV的培养

[0093] (1)细胞准备:将长满细胞培养瓶(以25cm^2细胞培养瓶为例)的敏感细胞(以MDBK细胞为例)用0.25%EDTA-胰酶消化分散,然后加入适量细胞生长液,按1:3比例分散至新的细胞培养瓶。细胞长至80%～90%满时使用。

[0094] (2)病毒的稀释与接种:用MEM或DMEM培养液将病毒液[以BVDVOregonC24v株BVDV OregonC24v(CVCC AV69)、BVDV NADL(CVCC AV67)、BVDV牦牛株(CVCC AV68)为例]稀释,将PEG培养液按1:1(v/v)比例至病毒液中,混匀;(同时设不加PEG的对照组,改为按1:1(v/v)比例加入培养液)。于37℃,5%CO_2细胞培养箱中孵育2～4h;孵育结束后,吸干病毒液,每瓶加入6mI细胞维持液,置于37℃,5%CO_2细胞培养箱继续培养72～120h,观察细胞病变情况,待约40%～60%的面积出现细胞病变引起的空洞,吸出维持液冻存。用BVDV Ag ELISA试剂盒(IDEXX公司产品)测定病毒抗原含量。

[0095] 结果:对于牛病毒性腹泻各毒株,加入PEG后,培养液中病毒抗原含量均明显高于无PEG组。见图4。

[0096] 实施例9

[0097] ——BVDV的$TCID_{50}$测定

[0098] (1)细胞细胞培养板的准备:将长满细胞培养瓶的敏感细胞(以MDBK细胞为例)用0.25%EDTA-胰酶消化分散,然后加入适量细胞生长液,分散至48孔细胞培养板(按75cm^2细胞培养瓶分散4～8块48孔细胞培养板的比例进行)。置37℃,5%CO_2细胞培养箱培养,细胞长至80%～90%满时使用。

[0099] (2)病毒的稀释与接种:细胞长至80%～90%满时,用MEM或DMEM培养液将病毒液

[以BVDV OregonC24v(CVCC AV69)、BVDV NADL(CVCC AV67)、BVDV牦牛株(CVCC AV68)为例]进行梯度稀释，然后将PEG培养液按1:1(v/v)比例加至稀释好的各梯度病毒液中，混匀；吸干细胞生长液，尽快加入稀释好的各梯度病毒液，每孔200μl，于37℃，5%CO_2细胞培养箱中孵育2～4h；孵育结束后，吸干病毒液，尽快加入细胞维持液，每孔500μl，置37℃，5%CO_2细胞培养箱继续培养60～72h；

[0100] (3)免疫荧光检测：培养结束后，吸干细胞维持液，每孔加入约500μl预冷的固定液(丙酮:甲醇＝1:1)固定20min以上，至通风柜中吸净晾干，每孔加入500μl PBS漂洗一遍，加入工作浓度的纯化BVDV E2蛋白IgG(一抗来自实施例7，用含3%～5%马血清的PBS溶液稀释)，每孔200μl，37℃培养箱中孵育40～60min，吸干，用PBS漂洗三遍，每次每孔加入500μl，吸干，加入稀释好的FITC标记的山羊抗兔IgG抗体(KPL公司产品)(二抗，用含3%～5%马血清的PBS溶液稀释)，每孔200μl，37℃培养箱中孵育40～60min，吸干，用PBS漂洗三遍，每次每孔加入500μl，吸干，最后每孔加入300μl～500μl PBS，在荧光显微镜下进行观察和计数。

[0101] 同时，按市售抗体试剂组合进行染色，48孔板固定晾干后，每孔加入500μl PBS漂洗一遍，加入BVD抗体工作液(AHVLA产品RAE2020)，37℃培养箱中孵育40～60min，吸干，用PBS漂洗三遍，每次每孔加入500μl，吸干，加入稀释好的FITC标记的羊抗鼠IgG抗体(sigma公司F4018)，37℃培养箱中孵育40～60min，吸干，用PBS漂洗三遍，每次每孔加入500μl，吸干，最后每孔加入300～500μl PBS，在荧光显微镜下进行观察和计数。

[0102] 结果：可以看出，本发明创建的牛病毒性腹泻病毒$TCID_{50}$法，测定的牛病毒性腹泻病毒滴度明显高于市售抗体组合的$TCID_{50}$法。见表3。

[0103] 表3牛病毒性腹泻病毒测定结果

[0104]

样品类型	$TCID_{50}$法/PEG组		$TCID_{50}$法/不加PEG组	
	本发明抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml	市售抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml	本发明抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml	市售抗体组合 $TCID_{50}$/0.1ml
BVDV OregonC24v(CVCC AV69)	$10^{5.75}$	$10^{5.00}$	$10^{4.50}$	$10^{4.25}$
BVDV NADL(CVCC AV67)	$10^{5.75}$	$10^{5.25}$	$10^{4.25}$	$10^{4.00}$
BVDV 牦牛株(CVCC AV68)	$10^{3.75}$	$10^{3.25}$	$10^{3.00}$	$10^{2.25}$

[0105] 实施例10

[0106] 本发明所述的方法可用于常见病毒如牛鼻气管炎病毒(IBRV)，猪呼吸与繁殖综合症病毒(PRRS)，猪流行性腹泻病毒(PEDV)，猪胃肠炎病毒(TGEV)等培养与活病毒的定量。

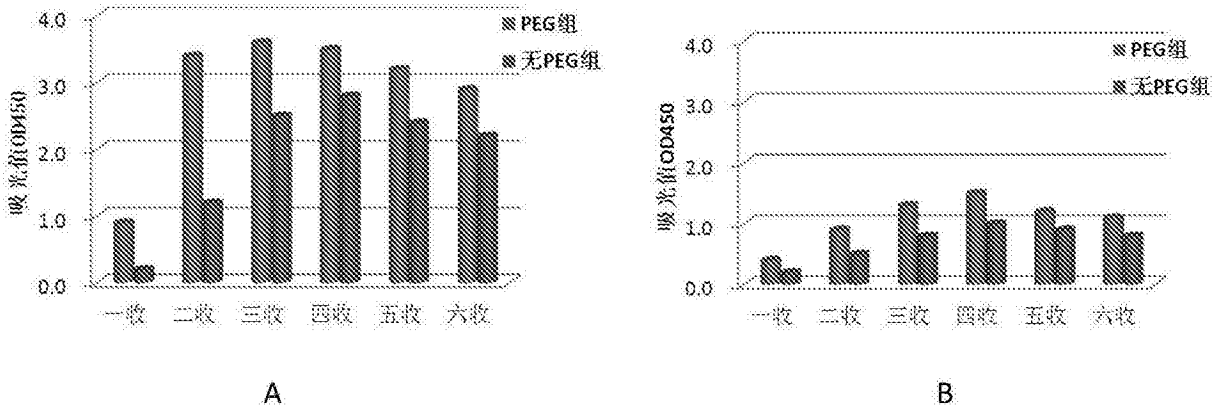

图1

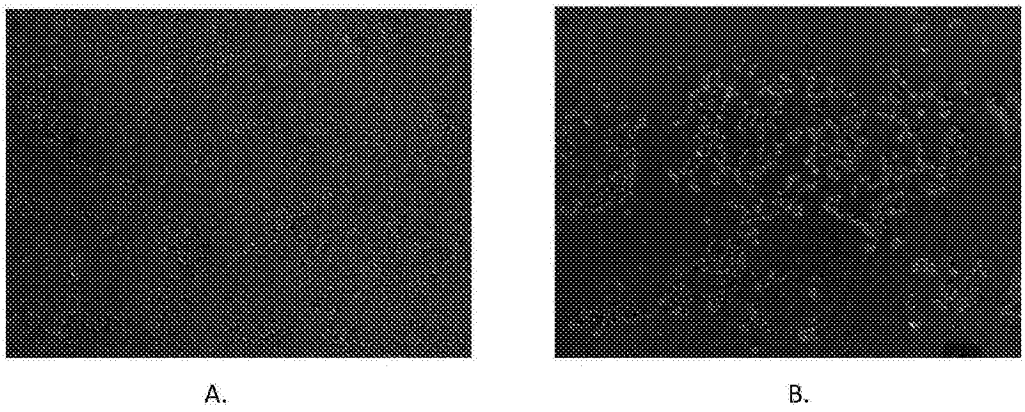

图2

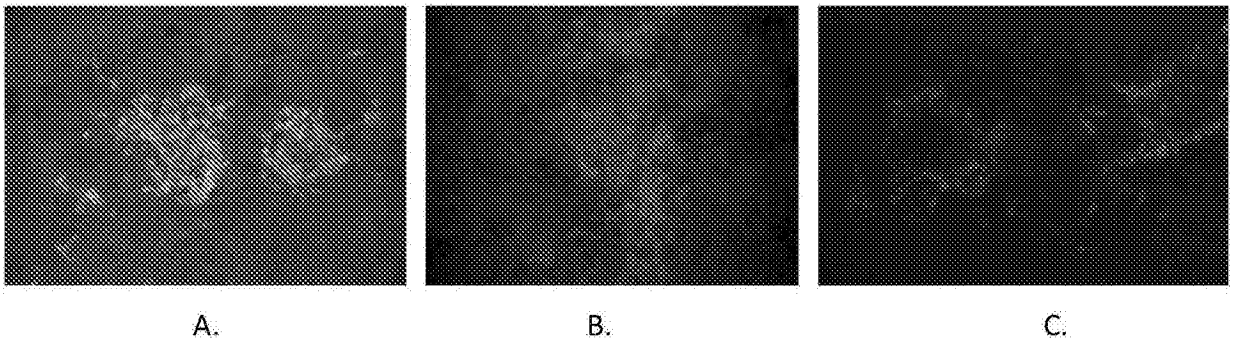

图3

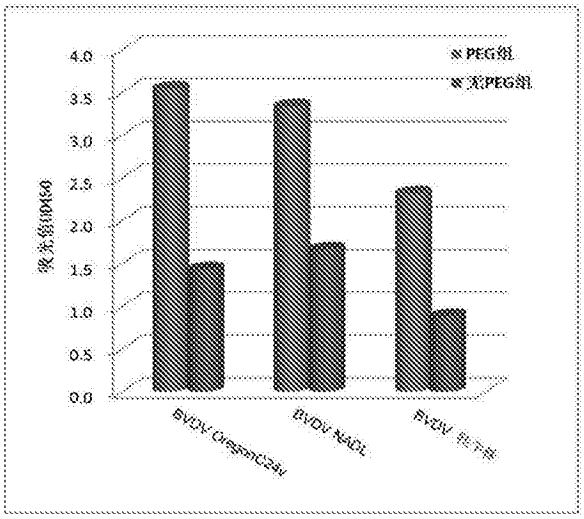

图4

专利名称(译)	一种瘟病毒培养及活毒定量检测方法		
公开(公告)号	CN106940371A	公开(公告)日	2017-07-11
申请号	CN201710239185.5	申请日	2017-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	范学政 丁家波 王琴 徐璐 赵启祖 蒋卉 沈青春 朱良全 彭小薇 许冠龙		
发明人	范学政 丁家波 王琴 徐璐 赵启祖 蒋卉 沈青春 朱良全 彭小薇 许冠龙		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 C12N7/00		
CPC分类号	G01N33/56983 C12N7/00 C12N2770/24351 G01N33/533 G01N2333/183		
代理人(译)	郑明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种瘟病毒培养及活病毒定量检测方法。本发明的瘟病毒培养方法，能显著提高病毒感染效率，提高猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒的抗原产量；在对活病毒定量检测时，能显著提高病毒感染效率，提高免疫荧光染色敏感性，同时降低免疫荧光背景，提高免疫荧光质量，准确测定猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒的活病毒滴度(TCID50)。

样品代号	样品类型	兔体反应热法(RID/ml)	本发明 $TCID_{50}$ 法
S1	猪瘟病毒疫苗株 ST 细胞培养液(本实验室制备)	200 万~400 万	$10^{5.63}$≈422 万/ml
S2	猪瘟病毒疫苗株 ST 细胞培养液(本实验室制备)	100 万~200 万	$10^{4.84}$≈70 万/ml
S3	猪瘟活疫苗(传代细胞源)(来自企业 1)	30000~60000	$10^{3.50}$≈3.2 万/ml
S4	猪瘟活疫苗(传代细胞源)(来自企业 1)	30000~60000	$10^{3.50}$≈3.2 万/ml
S5	猪瘟活疫苗(细胞源)(来自企业 2)	15000~30000	$10^{3.40}$≈2.5 万/ml
S6	猪瘟活疫苗(细胞源)(来自企业 2)	15000~30000	$10^{3.50}$≈3.2 万/ml