



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109900903 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910249606.1

(22)申请日 2019.03.29

(71)申请人 中牧实业股份有限公司

地址 100070 北京市丰台区南四环西路188号八区16-19号楼

(72)发明人 董春娜 张蕾 李静 李玲 王飞  
肖进 齐鹏

(74)专利代理机构 北京惟诚致远知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11536

代理人 王慧凤 李巍

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页  
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标猪伪狂犬病毒单克隆抗体、样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液，其中所述酶标板包被有利用杆状病毒表达系统及细胞悬浮培养工艺表达的猪伪狂犬病毒gE蛋白，将其纯化后作为包被抗原，同时用作免疫原，制备并筛选出伪狂犬病毒gE蛋白的特异性单克隆抗体并进行过氧化物酶标记作为阻断酶标单抗。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷，结果判定采用S/N比值法，准确度高，与进口试剂盒相比，检测符合率达98%以上。

1. 一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,包括酶联反应板和酶标抗体,其中所述酶联反应板包被有猪伪狂犬病毒gE蛋白,酶标二抗为用辣根过氧化物酶标记的抗猪伪狂犬病毒gE蛋白的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板;所述猪伪狂犬病毒gE蛋白为利用杆状病毒表达系统以及昆虫细胞悬浮培养工艺表达获得;所述猪伪狂犬病毒gE蛋白的序列为序列表中序列6。

3. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述抗猪伪狂犬病毒gE蛋白的单克隆抗体,含有重链可变区(PRV-Mc2-V<sub>H</sub>)和轻链可变区(PRV-Mc2-V<sub>L</sub>);所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和PRV-Mc2-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示;

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第52~59位氨基酸所示;

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第94~108位氨基酸所示;

所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;

所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第50~59位氨基酸所示;

所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第94~100位氨基酸所示。

4. 根据权利要求3所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~123位所示;其PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~117位所示。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述酶联反应板的获得方法是将所述猪伪狂犬病毒gE蛋白溶于100 $\mu$ l的pH9.6的碳酸盐溶液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔0.1 $\mu$ g~1 $\mu$ g猪伪狂犬病毒gE蛋白,2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时,使包被抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后4 $^{\circ}$ C密封保存。

6. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括底物液A、底物液B和终止液;所述底物液A为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液,使用时两者以1:1的比例混合;所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

7. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括样品稀释液和20倍浓缩洗涤液;样品稀释液为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液;浓缩洗涤液为含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液;

和/或,所述阳性对照血清为猪伪狂犬病毒人工感染后采集的猪血清;所述阴性对照血清为无猪伪狂犬病毒病原体感染且无疫苗接种的猪血清。

8. 权利要求1~7所述的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒在制备检测猪伪狂犬病毒感染或疫苗接种的待测样品的试剂中的应用;待测样品为感染野毒株或应用过非gE基因缺失病毒疫苗的猪只血清。

9. 一株单克隆抗体,其可与猪伪狂犬病毒gE蛋白特异性结合,是下述任意一项所述的

单克隆抗体：

1) 含有重链可变区 (PRV-Mc2-V<sub>H</sub>) 和轻链可变区 (PRV-Mc2-V<sub>L</sub>) ; 所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和PRV-Mc2-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成；

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成；

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示；

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第52~59位氨基酸所示；

所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第94~108位氨基酸所示；

所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示；

所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第50~59位氨基酸所示；

所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第94~100位氨基酸所示。

2) 含有重链可变区PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和轻链可变区PRV-Mc2-V<sub>L</sub>；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~123位所示；其PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~117位所示。

10. 权利要求9所述的单克隆抗体在制备检测伪狂犬病毒gE抗体的试剂盒中的应用。

## 一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,更具体地,本发明涉及一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用,适用于种猪伪狂犬病毒gE抗体的特异、快速、准确检测。

### 背景技术

[0002] 伪狂犬病(Pseudorabies),又名奥耶斯基病(Aujeszky's disease,AD),是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)引起的一种急性传染病。该病能够侵害包括猪、牛、绵羊、兔、狐狸、犬猫、雪貂、鼠、水貂等多种动物。猪是天然宿主和储存者,除了猪,其余动物发病后均出现瘙痒、高热和脑脊髓炎症状,甚至可导致死亡。猪感染PRV后主要引起妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎与种猪不育,哺乳仔猪出现神经症状后死亡率高,育成育肥猪呼吸道症状,PRV病毒感染易形成潜伏感染,导致长期带毒、向外界排毒;另外,PRV在应激条件下易被激活,可引起反复感染和散毒,因而该病的净化和根除对整个养猪业非常重要。

[0003] PRV病毒颗粒呈150~180nm的椭圆形或球状病毒颗粒,是典型的疱疹病毒结构,其由核蛋白核心、拥有162个壳粒的二十面体核衣壳、蛋白壳皮与脂质双层膜四部分组成。gE是非PRV复制必须的囊膜蛋白,含有577个氨基酸残基,是一种异二聚体的膜蛋白,在 $\alpha$ 疱疹病毒中高度保守,介导PRV与受感染动物细胞之间的融合,促使PRV扩散与PRV的释放,促进嗜神经向性。

[0004] 在我国,预防、控制和根除伪狂犬病是当前面临的一项艰巨的任务,目前市场上使用的猪伪狂犬疫苗绝大多数是缺失gE基因与TK基因的弱毒疫苗。疫苗免疫后,动物体内检测不到针对gE的抗体,而感染野毒株后,由于野毒株含有gE基因,因此感染野毒株的动物体内能够检测到gE抗体,从而可以通过检测血清样品中是否存在gE抗体来判断动物是否感染野毒。

[0005] 目前,酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assays,ELISA)是市场上主流的免疫测定技术,已广泛应用于临床检测,快速便捷且灵敏度高,且不需要特殊的仪器设备,可用于猪伪狂犬病毒的抗体检测。目前市场上,用于检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒多为间接ELISA抗体检测试剂盒,该方法的敏感性和特异性在检测猪伪狂犬病毒抗体水平上有一定的局限性,对于包被抗原纯度的要求比较高,否则容易出现假阳性和假阴性。

[0006] 本发明是基于针对猪伪狂犬病毒gE的特异性单克隆抗体的阻断ELISA抗体检测方法,使得该试剂盒具有很好的敏感性和特异性。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种敏感性高、特异性强、能够快速、简便地检测猪伪狂犬病毒gE抗体的阻断ELISA试剂盒。

[0008] 该试剂盒的优点之一是使用了辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体,提高了检测的敏感性和特异性。

[0009] 基于上述目的,本发明的猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒,包括以猪伪

狂犬病毒gE蛋白为包被抗原的酶联反应板和酶标抗体；所述酶标抗体为与猪伪狂犬病毒gE蛋白特异性结合的单克隆抗体 (PRV-Mc2) 制成的酶标抗体。所述酶标抗体优选为经辣根过氧化物酶标记抗体，所述辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体上。

[0010] 优选的，所述猪伪狂犬病毒gE蛋白为利用杆状病毒表达系统以及昆虫细胞悬浮培养工艺表达获得猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白。猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白的序列为序列表中序列6。

[0011] 优选的，所述猪伪狂犬病毒gE蛋白特异性结合的单克隆抗体 (PRV-Mc2) 含有重链可变区PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和轻链可变区PRV-Mc2-V<sub>L</sub>；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和PRV-Mc2-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第52~59位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第94~108位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第50~59位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第94~100位氨基酸所示。

[0012] 优选的，所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~123位所示；其PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~117位所示。

[0013] 所述酶联反应板的最佳包被制备方法及条件是将所述猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白溶于100 $\mu$ l的pH 9.6的碳酸盐溶液，然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板，每孔0.1 $\mu$ g~1 $\mu$ g gE纯化蛋白，2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时，使包被抗原与酶联反应板充分结合，然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液，37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时，甩干后，待酶联反应板干燥后4 $^{\circ}$ C密封保存。

[0014] 优选的，所述试剂盒还包括阳性对照血清和阴性对照血清，所述阳性对照血清为所述猪伪狂犬病毒人工感染后采集的猪血清；所述阴性对照血清为无特定病原体 (无猪伪狂犬病毒病原体感染且无疫苗接种) 的猪血清。

[0015] 更进一步的，所述试剂盒还包括样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液。所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板。所述样品稀释液为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。所述20倍浓缩洗涤液为含有浓度为0.8%~1.2% (ml/ml) 的Tween-20的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。所述底物液A为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液，所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液，使用时两者以1:1的比例混合。所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0016] 本发明还要求保护单克隆抗体，其可与猪伪狂犬病毒特异性结合，是下述任意一项所述的单克隆抗体：

[0017] 1) 含有重链可变区PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和轻链可变区PRV-Mc2-V<sub>L</sub>；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和PRV-Mc2-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第52~59位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第94~108位氨基酸所示；所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示；所述

PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第50~59位氨基酸所示;所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第94~100位氨基酸所示。

[0018] 2) 所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~123位所示;其PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~117位所示。

[0019] 通过上述重链可变区和轻链可变区序列,可以与动物源恒定区(如鼠抗体重链和轻链恒定区)连接,制备得到可与猪伪狂犬病毒特异性结合的单克隆抗体。

[0020] 上述酶联免疫试剂盒在猪伪狂犬病毒gE阻断抗体检测中的应用也属于本发明的保护范围。

[0021] 上述可以与猪伪狂犬病毒特异性结合的单克隆抗体在制备检测猪伪狂犬病毒的试剂盒中的应用也是本发明的保护范围。特别是在制备检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒中的应用。

[0022] 上述猪伪狂犬病毒gE蛋白为利用杆状病毒表达系统以及昆虫细胞悬浮培养工艺表达获得猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白,可包括下述步骤:

[0023] 1) 猪伪狂犬病毒总RNA提取:取病毒液250μl,加入750μl的Trizol,上下颠倒混匀,加入200μl的氯仿,混匀,4℃12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600μl的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20μl无RNA酶水溶解RNA。

[0024] 2) 反转录、PCR扩增及基因测序:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得cDNA,根据GenBank报道(M17321.1)序列设计引物(F1:5'-ATGCGGCCCTTCTGCTGC-3';R1:5'-TTAAGCGGGCGGGACAT-3'),利用引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取gE基因序列信息。

[0025] 3) gE基因序列的合成、穿梭载体的构建、重组Bacmid的筛选与提取、重组杆状病毒的拯救:①基因序列的合成:根据测得gE胞外域基因序列,后加入His标签,送北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化。②穿梭载体的构建:根据gE序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物(F2:5'-CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCATGAGGCCTTTCCTGCTCA-3';R2:5'-CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTAGTGATGATGATGATGATGCAGACCTCCTGGA-3'),扩增gE胞外域的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体PH启动子下,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37℃培养箱培养48h后挑取白斑,利用引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为1308bp,选取阳性克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 $2 \times 10^6$ 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5μg和2.5μg的量进行转染,转染试剂用量为8μl,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0026] 4) gE蛋白的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 $2 \times 10^6$ 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22μm滤膜过滤备用。20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0溶液平衡His柱,然后细胞培养的上清挂柱,20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0 300mmol/L咪唑溶液洗脱,进行亲和层析纯化并鉴定,进而获得纯化

的猪伪狂犬病毒gE蛋白。

[0027] 上述的可以与猪伪狂犬病毒gE蛋白特异性结合的单克隆抗体的获得方法如下:按照本领域已知的常规方法筛选本发明猪伪狂犬病毒特异性单克隆细胞株,再采用基因测序的方法测定特异性单克隆细胞株的基因序列,利用基因合成,构建重组表达载体的方法制备稳定表达的单克隆抗体作为本发明的酶标单克隆抗体。具体来讲,本发明猪伪狂犬病毒的特异性单克隆抗体的获得方法,可包括下述步骤:

[0028] 1) 以杆状病毒表达系统表达并纯化的gE蛋白为免疫原,纯度不低于80%,调整抗原浓度至100 $\mu$ g/ml;

[0029] 2) 连续免疫4次,每次间隔14天,前3次采用多点皮下免疫方式,第4次采取腹腔注射的免疫方式,每次10 $\mu$ g/只动物;

[0030] 3) 分离免疫动物的脾细胞,将其与骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞,对杂交瘤细胞上清用间接ELISA方法进行筛选特异性阳性克隆;当被免疫动物的血清抗体水平用间接ELISA进行检测效价超过1:50000时,可分离动物的脾细胞并制备成单细胞悬液,并在适当的融合剂(如聚乙二醇)的诱导下与骨髓瘤细胞(优选为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0)融合以形成杂交瘤;经检测,优选分泌PRV-Mc1的单克隆细胞株能够特异性与猪伪狂犬病毒gE蛋白反应。

[0031] 4) 特异性阳性克隆杂交瘤细胞株总RNA提取:取杂交瘤细胞悬液250 $\mu$ l,加入750 $\mu$ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 $\mu$ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600 $\mu$ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 $\mu$ l无RNA酶水溶解RNA。

[0032] 5) 反转录、PCR扩增及基因测序:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得杂交瘤细胞的cDNA。针对重链( $V_H-1:5'$ -GTGAATTCATGCAGGTCAGCTGTTGGAGTCTGG-3'; $V_H-2:5'$ -ATGTCGACTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC-3')和轻链( $V_L-1:5'$ -GTGAATTCATGGACATTGTGATGACCCAGTCTCC-3'; $V_L-2:5'$ -CAGTCGACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3')可变区设计通用引物,利用扩增引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取单克隆抗体重链和轻链可变区序列信息。

[0033] 6) 特异性单克隆抗体的基因序列的合成、穿梭载体的构建、重组Bacmid的筛选与提取、重组杆状病毒的拯救:①基因序列的合成:根据已测得单抗PRV-Mc2的重链和轻链可变区的序列,将鼠抗体重链和轻链恒定区的序列补充在可变区部分,然后送往北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化。②穿梭载体的构建:根据重链和轻链的序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物,针对重链(Mc2-HF:5'-TCATACATCTACGCGCCGCTAGCGAAGTTCAGCTGCAA-3';Mc2-HR:5'-TCCCCATCTCCCGGTACCCTTGCAGGAGAGAG-3')和轻链(Mc2-LF:5'-CTGCCTTTCGCGCGGATGAATTCCAATCATATCTCACACAAC-3';Mc2-LR:5'-CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTGAGCATTTCGGTTGG-3'),扩增重链和轻链全长的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体中,其中pFastBacDual载体含有两个启动子,即PH启动子和P10启动子,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37 $^{\circ}$ C培养箱培养48h后挑取白斑,进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为4600bp,阴性克隆为300bp,选取完全无300bp条带的克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉

淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 $2 \times 10^6$ 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按 $5\mu\text{g}$ 和 $2.5\mu\text{g}$ 的量进行转染,转染试剂用量为 $8\mu\text{l}$ ,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0034] 7) 特异性单克隆抗体的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 $2 \times 10^6$ 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤备用。用Na<sub>3</sub>P<sub>0</sub>4pH值为7.0溶液平衡ProteinA预装柱,平衡3~5个柱体积,然后将细胞上清结合ProteinA预装柱,样品结合完后用Glycine-HCL pH值为3.0洗脱液进行洗脱,即获得纯化的猪伪狂犬病毒gE特异性单克隆抗体PRV-Mc2。

[0035] 本发明试剂盒的检测程序为:

[0036] 1) 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0037] 2) 配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0038] 3) 样品稀释:在血清稀释板中将待检血清用样品稀释液进行2倍稀释,阴、阳性对照血清已稀释,可直接使用。

[0039] 4) 加样:取出所需板条,剩余板条装入铝箔袋中封好,置于2~8℃保存备用。将稀释好的待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清加入到抗原包被板中, $100\mu\text{l}$ /孔。每份待检血清设1孔,阴性对照和阳性对照各设2孔,加样过程时间跨度应尽量短。如图1所示加样:N:表示加阴性对照血清;P:表示加阳性对照血清;S1、S2、S3、S4等表示加各待检血清。

[0040] 5) 温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应60min。

[0041] 6) 洗板:弃去反应液,每孔加 $300\mu\text{l}$ 稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续洗板4次后拍干。

[0042] 7) 加酶:各孔加入酶标二抗 $100\mu\text{l}$ 。

[0043] 8) 温育:置37℃温箱,反应30min。

[0044] 9) 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液 $300\mu\text{l}$ ,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0045] 10) 显色每孔加入 $100\mu\text{l}$ 底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37℃温箱中,避光反应15min。

[0046] 11) 每孔加入显色终止液 $50\mu\text{l}$ ,振荡混匀终止反应,15分钟内测定结果。

[0047] 12) 试验成立条件:阴性对照OD<sub>450nm</sub>值均应 $\geq 1.0$ 。阳性对照孔S/N值应 $\leq 0.5$ 。

[0048] 13) 判定:在酶标仪上测各孔OD<sub>450nm</sub>值。 $S/N = \text{样本OD}_{450\text{nm}} / \text{阴性对照OD}_{450\text{nm}}$ 。通过计算每个样品的S/N值,判定其抗体的有无。阴性: $S/N \geq 0.7$ ;可疑 $0.6 < S/N < 0.7$ ;阳性 $S/N \leq 0.6$ 。

[0049] 本发明的积极效果在于:本发明提供了猪伪狂犬病毒gE抗体检测的酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒是采用猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白和针对gE特异性单克隆抗体制备的阻断法酶联免疫抗体检测试剂盒,可通过检测酶催化底物产生的信号变化来测定样品中猪伪狂犬病毒gE的特异性抗体的含量,且与目前其他病原如猪口蹄疫病毒O型、猪口蹄疫病毒A型、猪圆环病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清均不发生交叉反应。

[0050] 综上所述,本试剂盒采用猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白和针对gE特异性单克隆抗体制备的阻断法酶联免疫抗体检测试剂盒,灵敏度高、特异性强,可以有效地检测样品中猪伪狂

犬病毒gE的特异性抗体的含量,与进口试剂盒符合率达98%以上,具有广阔的市场前景和良好的经济、社会效益。

## 附图说明

[0051] 图1为本发明试剂盒酶联免疫板加样示意图。

## 具体实施方式

[0052] 下述实施例中的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0053] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和伦理道德可获取的生物材料都可按照实施例中的提示替换使用。

[0054] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,实施例将有助于理解本发明,但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0055] 实施例1、制备猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白

[0056] 包括下述步骤:

[0057] 1) 取病毒液250 $\mu$ l,加入750 $\mu$ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 $\mu$ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600 $\mu$ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 $\mu$ l无RNA酶水溶解RNA。

[0058] 2) 利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得cDNA,根据GenBank报道(AF207700.1)序列设计引物(F1:5'-ATGCGGCCCTTTCTGCTGC-3';R1:5'-TTAAGCGGGCGGGACAT-3'),利用引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取gE基因序列信息。

[0059] 3) 根据测得gE胞外域基因序列,后加入His标签,送北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化,gE蛋白的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.3(全长序列即为编码序列)所示。

[0060] 4) 根据gE序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物(F2:5'-CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCATGAGGCCTTTCCTGCTCA-3';R2:5'-CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTAGTGTGATGATGATGATGCAGACCTCCTGGA-3'),扩增gE胞外域的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体PH启动子下,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。

[0061] 5) 将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37 $^{\circ}$ C培养箱培养48h后挑取白斑,利用引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为1308bp,选取阳性克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。

[0062] 6) 重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 $2 \times 10^6$ 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 $\mu$ g和2.5 $\mu$ g的量进行转染,转染试剂用量为8 $\mu$ l,转染后4~6h进行换液,28 $^{\circ}$ C培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0063] 7) 将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 $2 \times 10^6$ 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 $\mu$ m滤膜过滤备用。20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0溶液平衡His柱,然后细胞培养的上清挂柱,20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0 300mmol/L咪唑溶液洗脱,进行亲和层析纯化并鉴定,进而获得纯化的猪伪狂犬病毒gE蛋白。

[0064] 实施例2、猪伪狂犬病毒gE蛋白特异性杂交瘤细胞株的筛选

[0065] 猪伪狂犬病毒gE蛋白特异性杂交瘤细胞株的筛选,包括以下步骤:

[0066] 1) 以实施例1获得的杆状病毒表达系统表达并纯化的gE蛋白为免疫原,纯度不低于80%,调整抗原浓度至100 $\mu$ g/ml;

[0067] 2) 免疫动物为BALB/c小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),连续免疫4次,每次间隔14天,前3次采用多点皮下免疫方式,第4次采取腹腔注射的免疫方式,每次每只小鼠注射gE蛋白10 $\mu$ g;

[0068] 3) 末次免疫后7天,取小鼠尾血分离血清后,用间接ELISA进行检测,效价 $>1:50000$ 后,分离免疫动物的脾细胞,将其与生长状态良好的骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,用HAT选择性培养基筛选获得杂交瘤细胞;

[0069] 4) 对杂交瘤细胞上清用间接ELISA方法进行筛选特异性阳性克隆,经检测,最终获得分泌PRV-Mc2的单克隆细胞株能够特异性与猪伪狂犬病毒gE蛋白反应。具体操作步骤:用猪伪狂犬病毒gE蛋白溶于100 $\mu$ l的pH 9.6的碳酸盐溶液稀释浓度至2 $\mu$ g/ml,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔100 $\mu$ l,2~8℃下放置8~12小时,使特异性单克隆抗体与酶联反应板充分结合,然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后用铝箔纸进行封袋,置2~8℃保存备用。

[0070] 取细胞培养上清加入包被有病毒抗原的酶标板中,37℃反应30分钟,用洗涤液(含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,使用时用双蒸水稀释20倍。)洗板4次,拍干后,向每孔加入1:5000稀释的兔抗鼠IgG-HRP标记物(购自美国Sigma公司),37℃反应30分钟,用洗涤液4次,拍干后,向每孔加入底物液A(为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液)和底物液B(为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液)各50 $\mu$ l底物工作液,37℃避光反应15分钟。向每孔加入50 $\mu$ l终止液(2mol/L的硫酸溶液),振荡混匀终止反应。15分钟内测定每孔的OD<sub>450nm</sub>值。以吸光度值 $>$ 阴性对照(即洗板培养液) $\times 2.1$ 倍为阳性判定标准,测定细胞培养上清中特异性单克隆抗体效价,最后获得1株特异性细胞克隆,与猪伪狂犬病毒gE蛋白有强烈信号反应,将这株编号为PRV-Mc2。

[0071] 实施例3、猪伪狂犬病毒gE的特异性杂交瘤细胞株的基因测序、单克隆抗体重组表达系统的建立及单克隆抗体的纯化

[0072] 猪伪狂犬病毒gE的特异性杂交瘤细胞株的基因测序、单克隆抗体重组表达系统的建立及单克隆抗体的纯化,包括以下步骤:

[0073] 1) 特异性阳性克隆杂交瘤细胞株总RNA提取、反转录、PCR及序列测定:

[0074] ①总RNA提取:取杂交瘤细胞悬液250 $\mu$ l,加入750 $\mu$ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 $\mu$ l的氯仿,混匀,4℃12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5mlEP管中,加入600 $\mu$ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用

20 $\mu$ l 无RNA酶水溶解RNA。

[0075] ②反转录:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得杂交瘤细胞的cDNA。

[0076] ③PCR反应及其产物的克隆测序:针对重链和轻链可变区设计通用引物,序列信息如下:

[0077] 表1重链及轻链可变区通用引物

[0078]

名称	序列(5' -3')
V <sub>H</sub> -1(正向)	GTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG
V <sub>H</sub> -2(反向)	ATGTCGACTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
V <sub>L</sub> -1(正向)	GTGAATTCATGGACATTGTGATGACCCAGTCTCC
V <sub>L</sub> -2(反向)	CAGTCGACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC

[0079] 利用扩增引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取单克隆抗体重链和轻链可变区序列信息。

[0080] 单克隆抗体PRV-Mc2含有重链可变区PRV-Mc2-V<sub>H</sub>、轻链可变区PRV-Mc2-V<sub>L</sub>,其PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~123位所示;其PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~117位所示。

[0081] 所述重链可变区PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和轻链可变区PRV-Mc2-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>和所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示;所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第52~59位氨基酸所示;所述PRV-Mc2-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第94~108位氨基酸所示;所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第50~59位氨基酸所示;所述PRV-Mc2-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第94~100位氨基酸所示。

[0082] 2) 特异性单克隆抗体的基因序列的合成及重组表达系统的建立

[0083] ①基因序列的合成:根据已测得单抗PRV-Mc2的重链和轻链可变区的序列,将鼠抗体重链和轻链恒定区的序列补充在可变区部分,然后送往北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化,PRV-Mc2重链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.4(全长序列即为编码序列)所示,轻链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.5(全长序列即为编码序列)所示。

[0084] ②穿梭载体的构建:根据重链和轻链的序列信息以及pFastBacdual(购自Thermo Fisher公司,货号10712024)载体序列信息,设计相应引物(序列见下表2),扩增重链和轻链全长的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacdual载体中,其中pFastBacdual载体含有两个启动子,即PH启动子和P10启动子,并且在PH启动子序列后面含有GP67信号肽序列信息,P10启动子序列后面含有HDM信号肽序列信息,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。

[0085] 表2表达载体构建引物序列信息

[0086]

名称	序列 (5' -3')
PRV-Mc2-HF	TCATACATCTACGCGGCCGCTAGCGAAGTTCAGCTGCAA
PRV-Mc2-HR	TCCCCATCTCCCGGTACCCTTGCCAGGAGAGAG
PRV-Mc2-LF	CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCCAATCATATCTCACACAAC
PRV-Mc2-LR	CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTGAGCATTTCGGTTGG

[0087] ③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37℃培养箱培养48h后挑取白斑,利用M13引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为4600bp,阴性克隆为300bp,选取完全无300bp条带的克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。

[0088] ④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 $2 \times 10^6$ 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 $\mu$ g和2.5 $\mu$ g的量进行转染,转染试剂用量为8 $\mu$ l,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0089] 3) 特异性单克隆抗体的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 $2 \times 10^6$ 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 $\mu$ m滤膜过滤备用。用Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>pH值为7.0溶液平衡ProteinA预装柱,平衡3~5个柱体积,然后将细胞上清结合ProteinA预装柱,样品结合完后用Glycine-HCL pH值为3.0洗脱液进行洗脱,即获得纯化的猪伪狂犬病毒gB特异性单克隆抗体PRV-Mc2。用紫外分光光度计测定OD<sub>280nm</sub>值,用该OD<sub>280nm</sub>值除以经验系数1.48即为单克隆抗体的浓度,单位为mg/ml。结果显示,PRV-Mc1分泌的单克隆抗体浓度为2.45mg/ml。

[0090] 实施例4、制备猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒

[0091] 1) 用猪伪狂犬病毒gE纯化蛋白制备抗原包被板:将gE纯化蛋白用pH 9.6的碳酸盐溶液稀释成1 $\mu$ g/ml的包被工作液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,100 $\mu$ l/孔,2~8℃下放置8~12小时,使包被抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后2~8℃密封保存。

[0092] 2) 制备辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒gE特异性单克隆抗体

[0093] 将猪伪狂犬病毒gE特异性单克隆抗体用戊二醛氧化法与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联,用pH7.4的PBS缓冲液充分透析,加等量的优质丙三醇,-20℃以下保存。具体步骤如下:

[0094] ①将5mg HRP溶于0.2ml含有1.25%戊二醛的0.1mol/L pH值6.8的PBS缓冲液中,置室温偶联18个小时,充分透析出去多余戊二醛;

[0095] ②加生理盐水至1ml,然后加入2.5mg纯化的猪伪狂犬病毒gE的特异性单克隆抗体及0.1ml pH值9.6的1mol/L碳酸盐缓冲液,置于2~8℃放置24小时;

[0096] ③加入0.1ml 0.3mol/L的赖氨酸溶液,室温放置2小时;

[0097] ④用pH7.4的PBS缓冲液充分透析,通过离心除去沉淀,上清即为酶结合物。用酶标记物稀释液按一定比例稀释后即酶标记物的工作液(0.5 $\mu$ g/ml)。

[0098] 3) 阳性对照血清:是以猪伪狂犬病毒人工感染后采集猪血清,作为试剂盒的阳性

对照血清(1管,1.5ml/管)。

[0099] 4) 阴性对照血清:是无特定病原体(SPF)猪血清,作为试剂盒的阴性对照血清(1管,1.5ml/管)。

[0100] 5) 样品稀释液的制备为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,1瓶(24ml/瓶)。

[0101] 6) 底物液A的制备为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液(1瓶,12ml/瓶)

[0102] 7) 底物液B的制备为0.2mg/ml的四甲基联苯胺(TMB)溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0103] 8) 20倍浓缩洗涤液的制备为含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液(50ml/瓶,2瓶)。

[0104] 9) 终止液的制备2mol/L的硫酸溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0105] 10) 根据需要,试剂盒中还可以有样品稀释板(2块,96孔/块),用于样品的稀释。

[0106] 实施例5、猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒的使用方法

[0107] 1) 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0108] 2) 配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0109] 3) 样品稀释:在血清稀释板中将待检血清用样品稀释液进行2倍稀释,阴、阳性对照血清已稀释,可直接使用。

[0110] 4) 加样:取抗原包被板,将稀释好的待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清加入到抗原包被板中,100 $\mu$ l/孔。每份待检血清设1孔,阴性对照和阳性对照各设2孔,加样过程时间跨度应尽量短。如图1所示加样:N:表示加阴性对照血清;P:表示加阳性对照血清;S1、S2、S3、S4等表示加各待检血清。

[0111] 5) 温育:震荡混匀,置37 $^{\circ}$ C温箱中,反应60min。

[0112] 6) 洗板:弃去反应液,每孔加300 $\mu$ l稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续洗板4次后拍干。

[0113] 7) 加酶:各孔加入实施例4中制备的酶标记物的工作液100 $\mu$ l。

[0114] 8) 温育:置37 $^{\circ}$ C温箱,反应30min。

[0115] 9) 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液300 $\mu$ l,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0116] 10) 显色每孔加入100 $\mu$ l底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37 $^{\circ}$ C温箱中,避光反应15min。

[0117] 11) 每孔加入显色终止液50 $\mu$ l,振荡混匀终止反应,15分钟内测定结果。

[0118] 12) 试验成立条件:阴性对照OD<sub>450nm</sub>值均应 $\geq 1.0$ 。阳性对照孔S/N值应 $\leq 0.5$ 。

[0119] 13) 判定:在酶标仪上测各孔OD<sub>450nm</sub>值。 $S/N = \text{样本OD}_{450\text{nm}} / \text{阴性对照OD}_{450\text{nm}}$ 值。通过计算每个样品的S/N值,判定其抗体的有无。阴性: $S/N \geq 0.7$ ;可疑 $0.6 < S/N < 0.7$ ;阳性 $S/N \leq 0.6$ 。

[0120] 实施例6、敏感性试验

[0121] 使用按照实施例4的方法制备的3批猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒(批次ZM2018001、ZM2018002、ZM2018003),按照实施例5的使用方法对猪伪狂犬病毒野毒感染猪血清32份进行检测,实验结果见表3,本发明的试剂盒共检测出31份阳性,有1份未检

出,结果表明本试剂盒对30份野毒感染血清的敏感性为96.9%。

[0122] 表3敏感性检测结果

[0123]

试剂盒批号	检出率	敏感性
ZM2018001	31/32	96.9%
ZM2018002	31/32	96.9%
ZM2018003	31/32	96.9%

[0124] 实施例7、特异性试验

[0125] 使用按照实施例4的方法制备的3批猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒(批次ZM2018001、ZM2018002、ZM2018003),按照实施例5的使用方法对50份健康猪血清、20份猪伪狂犬病毒gE缺失弱毒疫苗免疫血清、2份猪口蹄疫病毒0型(FMD-O)阳性血清、2份猪口蹄疫病毒A型(FMD-A)阳性血清、2份猪圆环病毒阳性血清(PCV2)、2份猪繁殖与呼吸综合征阳性血清(PRRS),分别进行检测。

[0126] 试剂盒的特异性检测结果如下表(表4)显示,对50份健康猪血清的检测结果均为阴性,3批试剂盒的特异性均为100.0%;对20份gE缺失弱毒疫苗免疫血清检测结果均为阴性,3批试剂盒的特异性均为100.0%;对2份猪口蹄疫病毒0型(FMD-O)阳性血清、2份猪口蹄疫病毒A型(FMD-A)阳性血清、2份猪圆环病毒阳性血清(PCV2)、2份猪繁殖与呼吸综合征阳性血清(PRRS)的检测结果显示为阴性,因此3批试剂盒对这8份相关病原阳性血清检测的特异性均为100%。

[0127] 表4猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒特异性检测结果

[0128]

血清种类	总份数	试剂盒批号	阳性份数	阴性份数	特异性
健康猪血清	50	ZM2018001	0	50	100%
		ZM2018002	0	50	100%
		ZM2018003	0	50	100%
gE 缺失苗免疫血清	20	ZM2018001	0	20	100%
		ZM2018002	0	20	100%
		ZM2018003	0	20	100%
FMD-O	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
FMD-A	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PCV2	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PRRS	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%

[0129] 实施例8、符合率试验

[0130] 采用美国进口试剂盒IDEXX的猪伪狂犬病毒gE抗体检测试剂盒和本发明的试剂盒同时对30份健康猪血清、15份病毒感染血清、20份gE缺失弱毒疫苗免疫血清同时进行检测，比较2种试剂盒检测结果的符合率。

[0131] 美国进口试剂盒操作方法(采取“短期孵育模式”)：

[0132] 1) 分别加100 $\mu$ l稀释好的阴性对照(2倍稀释)至合适的双孔中。

[0133] 2) 分别加100 $\mu$ l稀释好的阳性对照(2倍稀释)至合适的双孔中。

[0134] 3) 加100 $\mu$ l稀释好样品(2倍稀释)至相应的孔。

[0135] 4) 血清或血浆样本可在18~26 $^{\circ}$ C孵育60分钟( $\pm$ 5分钟) (“短期孵育模式”)。

[0136] 5) 每孔用大约300 $\mu$ l洗涤溶液洗涤微孔3~5次。每次洗涤后，甩掉孔内的液体。每次洗涤之间和加入酶标抗体前，避免板孔变干。在最后一次甩板后，在吸水材料上扣板，彻底去掉剩余的液体。

[0137] 6) 每孔加入100 $\mu$ l酶标抗体。

[0138] 7) 在18~26 $^{\circ}$ C条件下孵育20分钟( $\pm$ 1分钟)。

[0139] 8) 重复步骤6。

[0140] 9) 每孔加入100 $\mu$ lTMB底物溶液，18~26 $^{\circ}$ C条件下孵育15分钟( $\pm$ 1分钟)。

[0141] 10) 每孔加入50 $\mu$ l终止液终止反应，在650nm下测量记录样品和对照的吸光值A(650)。

[0142] 11) 计算结果:分别计算阴性对照和阳性对照均值,要求阴性对照均值-阳性对照均值差大于等于0.3。短期孵育模式:样品 $S/N > 0.7$ ,判为阴性; $0.6 < S/N \leq 0.7$ ,判为可疑, $S/N \leq 0.6$ 判为阳性。

[0143] 本发明试剂盒和美国进口试剂盒IDEXX的猪伪狂犬病毒gE抗体检测试剂盒对30份健康猪血清、15份病毒感染血清、20份gE缺失弱毒疫苗免疫血清的检测结果见表5,本发明试剂盒和美国进口试剂盒IDEXX的猪伪狂犬病毒gE抗体检测试剂盒检测为阳性的血清份数均为13份,检测为阴性的血清份数均为51份。65份待检血清中,两种试剂盒检测结果一致的血清份数是64份,符合率为98.5%。

[0144] 表5符合率试验结果

检测类型	进口试剂盒			
		阳性	阴性	合计
本发明试剂盒				
	阳性	13	1	14
	阴性	0	51	51
	合计	13	52	65

## 序列表

- <110> 中牧实业股份有限公司  
 <120> 一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒  
 <130> WHOI190021  
 <160> 6  
 <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 <210> 1  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 1

```

Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Ala Gly Ser Ser Lys Pro Ser Leu
1           5           10           15
Thr Trp Ser Leu Thr Cys Val Tyr Ser Pro Arg Thr Arg Tyr Tyr Gly
           20           25           30
Tyr Gln Trp Tyr Arg Gln Gly Ser Gly Lys Gly Ser Glu Trp Ile Glu
           35           40           45
Ser Ile Asn Ser Ser Ala Lys Leu Tyr Gln Trp Pro Gly Leu Lys Ser
           50           55           60
Arg Val Thr Pro Ser Val Asp Thr Ser Asp Tyr Gln Phe Ser Trp Lys
65           70           75           80
Leu Ser Val Thr Ala Gly Asp Thr Ala Gln Tyr Cys Ala Ser Gln Ser
           85           90           95
Leu Thr Ile Val Tyr Pro Trp Ser Thr Asp Arg Arg Gln Tyr Gln Leu
           100          105          110
Thr Leu Val Thr Pro Ser Arg Ala Ser Lys Gly
           115          120
  
```

- <210> 2  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 2

```

Gln Ser Tyr Leu Thr Gln Pro Glu Ser Val Pro Tyr Ala Thr Gly Gln
1           5           10           15
Arg Trp Thr Ile Ser Cys Thr Trp Gln Ser Glu Asn Tyr Gly Trp Pro
           20           25           30
Phe Gln Arg Trp Tyr Pro Gln Leu Trp Tyr Gly Thr Ala Pro Lys Ser
           35           40           45
  
```

Leu Ile Tyr Val Asn Phe Trp Val Pro Asp Ser Val Pro Trp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Thr Ser Ala Gln Leu Ile Pro Ala Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Phe Arg Glu Thr Asp Tyr Trp Cys Gln Ser Gly Thr Ala Lys  
 85 90 95  
 Gly Leu Arg Tyr Val Val Phe Gly Arg Gly Gly Arg Leu Thr Arg Leu  
 100 105 110  
 Tyr Gln Pro Thr Ala  
 115

<210> 3

<211> 1308

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

atgaggcctt tctgctcag agccgctcaa ttgctggctc tgttggcact ggccttgtct 60  
 actgaagctc ccagcctgag cgtgagaca actcctggac ccgtgaccga ggtgccctct 120  
 ccttcagccg aggtctggga cctgtcaacc gaggcagatg atgacgacct gaacggcgat 180  
 ctggacggcg acgacagaag ggcaggattt ggctctgctc tggcatcact gcgcgaggct 240  
 cctcctgccc acctggtaa cgtgtccgag ggagcaaact ttaccctcga cgctagaggt 300  
 gatggcgctg ttctggctgg aatctggaca tttctcccag tgagaggttg tgatgccctc 360  
 tcagtcaacta ccgtctgttt cgagacagca tgtcaccag acctcgtgtt gggcagggt 420  
 tgcgtccctg aggtccaga gatgggaatc ggagattact tgccaccaga ggttcctagg 480  
 ttgagaaggg agcctccat cgtgacacc gagaggtgga gcccacatct gatcgttctg 540  
 agggctactc caaacgatac cggactgtac actctccacg acgcttcagg tccatagagcc 600  
 gtgttcttcg tggccgtggg cgacaggcca ccagctccag ccgaccagt tggcccagca 660  
 aggcaagcgc ccaggtttca cgccctcggg ttccactctc agttgttcag cccaggcgac 720  
 accttcgatc tgatgcccag ggttgtagc gacatgggag actcacgca gaatttcacc 780  
 gctactctgg actggtacta cgtagggca ccaccagct gcttgttgta ctacgtttac 840  
 gagccctgta tctaccacc aagggcacc gaatgctca ggctgttga cccagcatgt 900  
 agcttcacct ctccagctag agctaggctc gtcgcacgca gagcatacgc tcatgcagc 960  
 cctctgctgg gtgataggtg gctgaccgcc tgtectttg acgattcgg cgaagaggtg 1020  
 cataactaacg ctaccgctga tgaatcaggt ctgtacgtcc tegtgatgac tcataaggga 1080  
 cacgtcgcta cctgggacta taccctggtg gctacagccg ctgaatacgt caccgtgatt 1140  
 aaggagctga ccgtcctgc acgcctcct ggcactcctt ggggaccgg aggaggtgac 1200  
 ggtgctatct atgtggacgg agtcaccact cctgctctc cagctcggcc ttggaatccc 1260  
 tatggcagga ctactccagg aggtctgcat catcatcact atcactaa 1308

<210> 4

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gaagttcagc	tgcaagaatg	gggagctggt	tcatcaaagc	cctccctgac	ctggagcctg	60
acatgtgtct	atagcccaag	gactcgctac	tacggatacc	agtggtatag	acaggggaagc	120
ggaaagggct	ctgagtggat	tgagtcaatc	aattctagcg	ctaaactgta	tcagtggcca	180
ggactgaagt	ccagagtgac	tcctagcggt	gacacatctg	attaccagtt	cagctggaag	240
ctctctgtga	ctgctggcga	cactgcccag	tactgtgcct	cacagagcct	cactattgtt	300
tacccttggg	ctactgacag	aaggcagtac	caactgacc	tggtgactcc	atctagggcc	360
tcaaagggac	cctccgtggt	cccactggca	ccttcagca	aatccacatc	tggaggcacc	420
gcagccctcg	gctgtctcgt	caaggactac	tccctgaac	ctgtcacctg	ctcatggaac	480
tcaggcgcac	tgacttcagg	agtgcacacc	tccctgccg	ttctgcaaag	ctctggctctg	540
tattctctct	cttccgtggg	cacagtccca	tcctctagct	tgggtactca	aacttacatt	600
tgcaacgtta	atcacaagcc	atctaatacc	aaagttgaca	agaaggtcga	acctaagtca	660
tgtgacaaga	cccacacctg	ccctccttgc	ccagcaccg	aactggtggg	aggtccatct	720
gtgttcctct	tcccacccaa	gccaaaggac	actctgatga	tttctcgcac	accagaagtc	780
acttgcgtag	tggtggacgt	tagccatgaa	gatcctgaag	ttaagttcaa	ctggtatgtc	840
gatggcgtcg	aagtccataa	tgccaagacc	aagcccagag	aagagcagta	caattcaact	900
taccgctggg	tgtccgtcct	gaccgttctg	caccaggatt	ggctcaacgg	taaggagtac	960
aaatgcaagg	tgtctaacaa	ggcattgcca	gcacctatcg	agaagactat	ctccaaggct	1020
aaaggccagc	caagggagcc	tcaggtgtat	actctccctc	cttctcgcga	tgagctgaca	1080
aagaatcaag	tgtctctcac	ttgcctgggtg	aagggttct	acctatctga	catcgcagtg	1140
gagtgaggaga	gcaacggcca	acctgagaat	aactataaga	ccactccacc	cgttctggat	1200
agcgacggct	cattcttctt	gtactctaaa	ctgactgtgg	acaagtctag	gtggcagcaa	1260
ggcaacgtgt	tctcctgctc	agtcatgcac	gaagccctgc	acaatcacta	cacacagaag	1320
agcctgtctc	tctctcctgg	caag				1344

<210> 5

<211> 654

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

caatcatatc	tcacacaacc	agagtcagtt	ccatacgcta	caggacagcg	ctggactatc	60
agctgcactt	ggcagtcaga	gaactacggc	tggccattcc	agcgtggta	tctcagctc	120
tggtacggta	ctgtcctaa	gagcttgatc	tacgtcaact	tctgggtgcc	tgattctggt	180
ccctggagg	tctccggatc	ttactcagga	acatctgcac	agctgattcc	cgctggtttg	240
caggcattca	gggagactga	ctactgggtg	caatctggca	cagctaagg	tctgcctac	300
gtcgtgttcg	gcagaggagg	caggctgaca	agactgtatc	agcccaccgc	tgctccaagc	360
gtgacctgt	ttctccctc	ctccgaagaa	ctccaggcta	acaaggcaac	cctcgtgtgt	420
ttgatctcag	acttctacc	tggcgtgtg	accgtggcct	ggaaagctga	ttctctccc	480

```

gtcaaagccg gtgttgaaac caccactcca tcaaagcaaa gcaacaacaa gtacgctgca    540
agcagctacc tctccctgac tctgaacag tggaagtccc atcgctccta ctcttgccaa    600
gtcacacatg aaggatctac cgtggagaag actgtcgctc caaccgaatg ctca        654
<210> 6
<211> 435
<212> PRT
<213> 伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus)
<400> 6
Met Arg Pro Phe Leu Leu Arg Ala Ala Gln Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1           5           10          15
Leu Ala Leu Ser Thr Glu Ala Pro Ser Leu Ser Ala Glu Thr Thr Pro
          20           25           30
Gly Pro Val Thr Glu Val Pro Ser Pro Ser Ala Glu Val Trp Asp Leu
          35           40           45
Ser Thr Glu Ala Asp Asp Asp Asp Leu Asn Gly Asp Leu Asp Gly Asp
          50           55           60
Asp Arg Arg Ala Gly Phe Gly Ser Ala Leu Ala Ser Leu Arg Glu Ala
65           70           75           80
Pro Pro Ala His Leu Val Asn Val Ser Glu Gly Ala Asn Phe Thr Leu
          85           90           95
Asp Ala Arg Gly Asp Gly Ala Val Leu Ala Gly Ile Trp Thr Phe Leu
          100          105          110
Pro Val Arg Gly Cys Asp Ala Val Ser Val Thr Thr Val Cys Phe Glu
          115          120          125
Thr Ala Cys His Pro Asp Leu Val Leu Gly Arg Ala Cys Val Pro Glu
          130          135          140
Ala Pro Glu Met Gly Ile Gly Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Val Pro Arg
145          150          155          160
Leu Arg Arg Glu Pro Pro Ile Val Thr Pro Glu Arg Trp Ser Pro His
          165          170          175
Leu Ile Val Leu Arg Ala Thr Pro Asn Asp Thr Gly Leu Tyr Thr Leu
          180          185          190
His Asp Ala Ser Gly Pro Arg Ala Val Phe Phe Val Ala Val Gly Asp
          195          200          205
Arg Pro Pro Ala Pro Ala Asp Pro Val Gly Pro Ala Arg His Glu Pro
          210          215          220
Arg Phe His Ala Leu Gly Phe His Ser Gln Leu Phe Ser Pro Gly Asp
225          230          235          240
Thr Phe Asp Leu Met Pro Arg Val Val Ser Asp Met Gly Asp Ser Arg

```

	245	250	255
Glu Asn Phe Thr Ala Thr Leu Asp Trp Tyr Tyr Ala Arg Ala Pro Pro			
	260	265	270
Arg Cys Leu Leu Tyr Tyr Val Tyr Glu Pro Cys Ile Tyr His Pro Arg			
	275	280	285
Ala Pro Glu Cys Leu Arg Pro Val Asp Pro Ala Cys Ser Phe Thr Ser			
	290	295	300
Pro Ala Arg Ala Arg Leu Val Ala Arg Arg Ala Tyr Ala Ser Cys Ser			
305	310	315	320
Pro Leu Leu Gly Asp Arg Trp Leu Thr Ala Cys Pro Phe Asp Ala Phe			
	325	330	335
Gly Glu Glu Val His Thr Asn Ala Thr Ala Asp Glu Ser Gly Leu Tyr			
	340	345	350
Val Leu Val Met Thr His Lys Gly His Val Ala Thr Trp Asp Tyr Thr			
	355	360	365
Leu Val Ala Thr Ala Ala Glu Tyr Val Thr Val Ile Lys Glu Leu Thr			
	370	375	380
Ala Pro Ala Arg Ala Pro Gly Thr Pro Trp Gly Pro Gly Gly Gly Asp			
385	390	395	400
Gly Ala Ile Tyr Val Asp Gly Val Thr Thr Pro Ala Pro Pro Ala Arg			
	405	410	415
Pro Trp Asn Pro Tyr Gly Arg Thr Thr Pro Gly Gly Leu His His His			
	420	425	430
His His His			
	435		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1											
B	S2											
C	S3											
D	S4											
E												P
F												P
G												N
H												N

图1

专利名称(译)	一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109900903A</a>	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN201910249606.1	申请日	2019-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
[标]发明人	董春娜 张蕾 李静 李玲 王飞 肖进 齐鹏		
发明人	董春娜 张蕾 李静 李玲 王飞 肖进 齐鹏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	李巍		
其他公开文献	CN109900903B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种猪伪狂犬病毒gE阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标猪伪狂犬病毒单克隆抗体、样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液，其中所述酶标板包被有利用杆状病毒表达系统及细胞悬浮培养工艺表达的猪伪狂犬病毒gE蛋白，将其纯化后作为包被抗原，同时用作免疫原，制备并筛选出伪狂犬病毒gE蛋白的特异性单克隆抗体并进行过氧化物酶标记作为阻断酶标单抗。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷，结果判定采用S/N比值法，准确度高，与进口试剂盒相比，检测符合率达98%以上。

血清种类	总份数	试剂盒批号	阳性份数	阴性份数	特异性
健康猪血清	50	ZM2018001	0	50	100%
		ZM2018002	0	50	100%
		ZM2018003	0	50	100%
gE缺失苗免疫血清	20	ZM2018001	0	20	100%
		ZM2018002	0	20	100%
		ZM2018003	0	20	100%
FMD-O	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
FMD-A	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PCV2	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PRRS	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%