



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101881770 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 10

(21) 申请号 200910014999. 4

G01N 33/532 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 05. 08

G01N 33/552 (2006. 01)

(73) 专利权人 青岛农业大学

C12P 19/34 (2006. 01)

地址 266109 山东省青岛市城阳区长城路
700 号

C12N 15/70 (2006. 01)

专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究
所
山东省农业科学院畜牧兽医研究
所

C12P 21/02 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

(72) 发明人 周顺 纪卫宁 崔尚金 李俊
王金宝 袁小远

(56) 对比文件

CN 1866019 A, 2006. 11. 22,

CN 1652815 A, 2005. 08. 10,

CN 1570106 A, 2005. 01. 26,

CN 101017173 A, 2007. 08. 15,

CN 101231290 A, 2008. 07. 30,

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

审查员 刘文瀚

代理人 刘德

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书8页 附图2页

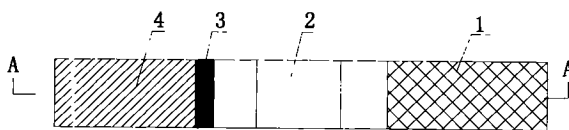
(54) 发明名称

猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法

(57) 摘要

本发明专利涉及一种猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法, 该方法是利用基因工程表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白, 采用酶联免疫原理和膜层析技术制成, 快速检测猪血液或血清中的抗体。该测试纸条可广泛用于临床猪圆环病毒病的检测。与其他病毒无交叉反应, 与 ELISA、中和试验两种方法检测的符合率分别为 98. 63% 和 95. 83%。与 ELISA 相比, 重组抗原免疫胶体金具有明显的优势: 安全性好, 无需培养病毒本身, 避免了因操作病毒造成的病毒扩散; 可以大批量制备, 工艺简单, 生产成本低廉; 抗原成分稳定均一, 操作简便省力, 不用仪器, 检测结果特异性高, 重复性好。整个实验仅需 15 分钟。操作简便、快速、准确、灵敏度高、直观、结果容易判定。

CN 101881770 B



1. 猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法,其特征在于,利用基因工程表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白,采用酶联免疫原理和膜层析技术制成快速检测猪血液或血清中的抗体的试纸条,猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维膜、吸水垫和 PVC 板,按照顺序固定在 PVC 板上,PVC 板一端依次粘附样品垫、结合垫,中间粘附硝酸纤维膜,另一端粘附吸水垫,其特征在于结合垫包被了基因工程表达的猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白-胶体金结合物,将表达蛋白包被在硝酸纤维膜作为检测线 (T),将免抗猪圆环病毒 2 型抗体包被在硝酸纤维膜作为对照线 (C),制备步骤如下:

(1) 基因工程表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白制备

1) 材料和方法:

1. 1ORF2 基因氨基端 737-421nt 的扩增:

参照 PCV2JXL 序列,设计并合成 1 对引物,以重组质粒 pMDT-PCV 为模板,扩增 ORF2 基因的氨基端 737-421nt 部分片段;

引物如下所示:

CapL5' AGC AAG CTT CTT TCG TTTTC3',

PCVF5' GGG AAT TCA ACC TTA ATC TTC CTT A3',

上游引物下划线为 HindIII 序列,核酸位置 739nt;下游引物下划线为 EcoRI 序列,位于 423nt;

PCR 反应条件为,94°C 热启动 5 分钟,94°C 变性 60 秒,55°C 退火 30 秒,72°C 延伸 30 秒,最后 72°C 延伸 10 分钟,扩增产物即为 PCV₇₃₇₋₄₂₁,经 1% 琼脂糖电泳鉴定;

1. 2ORF2 基因氨基端片段在 pMD-18T 中的克隆:

将扩增产物 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 利用胶回收试剂盒大量回收,利用 T-A 原理,与 pMD-18T 载体连接,转化 DH5 α 感受态大肠杆菌,涂布于含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 片板,12 小时后挑取典型白色单菌落少量培养,提质粒 DNA,通过 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定重组克隆,命名为 pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁;

1. 3ORF2 基因氨基端 737-421nt 在 pGEX-6p-1 中的克隆:

原核表达载体 pGEX-6p-1 是上游带有谷胱甘肽 S 转移酶 GST 部分基因的高效表达载体,用 BamHI 和 EcoRI 双酶切重组质粒 pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁,得到 2 条条带,分别为载体 2.7kb 和插入片段 0.3kb,回收其中的 0.3kb,用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 pGEX-6p-1,与带有相同粘端的上述回收 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 连接,转化大肠杆菌 BL21 感受态菌,氨苄青霉素抗性筛选,挑取单菌落至少量培养基中过夜培养,小提质粒 DNA,通过限制性内切酶鉴定重组质粒,得到重组克隆命名为 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁;

1. 4ORF2 基因羧基端 421-37nt 在 pGEX-6p-1 中的克隆:

利用 pMDT-Cap 重组克隆中分别位于引物和载体序列的 EcoRI 和 SalI 位点,用 EcoRI 和 SalI 双酶切 DNA pMDT-Cap,得到 2 条带,分别为 3.0kb 和 0.4kb,其中 3.0kb 为来自 2.7kb 的载体带与 ORF2 基因的氨基端 737-421 部分之和,0.4kb 条带为 ORF2 基因的羧基端 421-37nt 部分 PCV₄₂₁₋₃₇,大量回收上述片段,并与同样用 EcoRI 和 SalI 双酶切的 pGEX-6p-1 载体连接,转化大肠杆菌 BL21 感受态菌,常规筛选重组克隆,得到 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇;

1. 5pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的诱导表达:

按照第 3 版载体说明书 GST Gene Fusion System,将分别含有重组质粒 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁

和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的新鲜大肠杆菌单菌落在 2×YTA 培养基中 37℃ 振荡培养过夜,次日按 1% 体积比转接 5ml 新鲜培养基,37℃ 继续培养,当菌液 OD₆₀₀ 值达 0.6-0.8 时,加入无菌 IPTG 溶液,使终浓度为 0.1mmol/L;诱导 3-4 小时后停止培养;取 1ml 菌液,离心收集菌体,pH7.4 的 PBS 洗涤,用 80 μl PBS 悬浮菌体,与 20 μl 的 5×SDS 裂解缓冲液混合,煮沸变性 5 分钟;利用 BioRAD 公司的蛋白质电泳装置进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),分离胶的丙烯酰胺浓度为 10%,将只含载体的大肠杆菌同样诱导做阴性对照,0.25% 考马斯亮兰染色;

1. 6pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 表达蛋白免疫鼠血清的制备:

分别大量诱导表达上述重组菌,将菌体用原培养液 1/10 体积的 PBS 重悬,超声波破碎至液体清澈,与 5×SDS 上样缓冲液煮沸变性 5 分钟,进行常规 SDS-PAGE,电泳结束后,在考马斯亮蓝染液中染色 2 小时,再经脱色至背景清晰,用去离子水尽量洗去胶上的脱色液,再置胶于一干净玻片上,用干净刀片切下目的条带,放在 1.5ml EP 管中,尽量少混杂无关蛋白,-20℃ 冻存,免疫前,在冷冻状态下尽量碾碎胶条,用适量 PBS 重悬,至胶粒可通过 10 号注射器针头为宜,得到的即为制备好的免疫原;

选择健康活泼的青年雌性 BALB/c 小鼠,用上述制备的免疫原免疫,每只每次 0.5ml,每次免疫间隔 2-3 周,各免疫 5 只小鼠,2 免后每次免疫前分析血清,对 PCV2 病毒感染 PK15 细胞做间接免疫荧光抗体试验 (IFA),观察有无特异性荧光染色;

1. 7pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 表达蛋白与 PCV 感染猪多抗血清的 ELISA 反应性:

将 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 和 pPRO-Rep 重组菌大量诱导表达后,同上制备免疫原,按常规方法进行 ELISA,用 pH = 9.6 的碳酸盐缓冲液分别以 1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 200 稀释后包被酶标板,每个稀释度 3 个重复孔,4℃ 过夜,弃去孔内的液体,同时用洗涤液 PBST 洗 3 次,每次 5 分钟,拍干,每孔加 100 μl 封闭液 37℃ 封闭 2 小时,同上洗涤,将 PCV2 阳性猪血清分别用 PBS 按 1 : 250、1 : 500、1 : 750、1 : 1000、1 : 1500 稀释,各稀释度重复 3 次,每孔加 50 μl,同时设 SPF 猪阴性血清对照和 PBS 空白对照,37℃ 作用 2 小时,洗涤,拍干,加用 PBS 配制的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,每孔 50 μl,37℃ 孵育 1.5 小时,洗涤,拍干,加底物液,每孔加新鲜配制的底物缓冲液 50-100 μl、9mg 邻苯二胺混合后,临时加 30% H₂O₂ 0.15ml,37℃ 静止 10-30 分钟,避光显色,当阴性孔即将显色时,以 50 μl 的 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,在酶联免疫阅读仪上于 492nm 波长下读取 OD 值,结果判定:若阴性对照孔无色或接近无色,阳性对照孔明确显色,则直接用肉眼观察结果;

2) 制备兔猪圆环病毒 2 型高免血清

用猪圆环病毒 2 型抗原,免疫阴性家兔 3 只,每隔 2 周加强免疫 1 次,共进行 3 次,最后一次免疫 10 天后分离血清,纯化后得兔抗猪圆环病毒 2 型 IgG;

3) 胶体金颗粒制备

将氯化金配制成 0.01% 水溶液,取 100ml 煮沸 2min 后,边搅拌边加入 1% 柠檬酸三钠 2ml,煮沸至溶液颜色变成酒红色后,继续煮沸至适宜浓度 OD₅₃₅ = 0.9312,冷却后加入双蒸蒸馏水恢复到原体积,置 4℃ 保存;

4) 胶体金标记 ORF2 蛋白制备及纯化

将待标记蛋白倍比稀释,分别取 100 μl 加入 1ml 胶体金中,10min 后加入 10% NaCl 100 μl,4℃ 静止 1h;取胶体金颜色没有发生改变的最高稀释倍数为准,在此基础上加

30%为最佳标记量,取一定量调配好的胶体金,用 0.2mol/L K_2CO_3 调至 pH = 9.0,按最佳标记量加入表达抗原,室温作用 20min,加入 pH8.0 的浓度为 20mmol/L 的 Tris-HCl 配制的 BSA,使终浓度为 1%,4℃放置 2h 后使用;将金标抗原 3000r/min 离心 30min,取上清,60000g 离心 60min,沉淀用 0.02mol/L 的 pH7.2 的含 0.1% BSA 的 PBS 溶解,恢复到原体积,再超离 1 次,沉淀用少许上述 PBS 溶解,使 $OD_{535nm} = 1.5$,0.22 μm 滤膜过滤,4℃保存备用;

5) 试纸条的组成

用喷膜机将胶体金标记蛋白复合物喷涂在胶体金结合垫上,将表达 ORF2 蛋白和兔抗猪圆环病毒 2 型 IgG 依次间隔 4mm 喷在硝酸纤维膜 NCM 上,分别作为检测带和质控带,将包被好的 NCM 放入含 3% BSA 的 pH7.2、0.01M 的 PBS 中,过夜,封闭其余蛋白结合位点,倒掉封闭液,用 pH7.2、0.01M 的 PBS,洗 2 次,每次 5min,37℃干燥 1h 备用,将硝酸纤维膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫等依次粘在 PVC 板上,即将玻璃纤维连接在 NCM 上端,并将边缘附着在 NCM 上;棉浆垫附着在玻璃纤维上,与 NCM 衔接;吸水滤纸板连接在 NCM 下端,边缘附着在 NCM 上,将粘好的 PVC 材料切成 60mm 长、4mm 宽的试纸条,即制成猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条,将试纸条密封于铝箔袋中,4℃保存;

6) 扩增核苷酸序列

由于 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 片段是通过 PCR 扩增得来,分析测序结果,重组 DNA 的最大读码框覆盖了整个序列,中间未出现无义突变,与亲本毒 JXL 株同源性达 100%,因此,核苷酸序列表示如下;

PCV₇₃₇₋₄₂₁

BamHI

GGATCCGATATGACGTATCTAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGGCCA
GATCCTCCGCCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAAC
ACCCGCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTATCAAGCGAACACAGTCAAAAACGCCCTCTGGGCGGTGGACATGA
TGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAG
AATAAGGAAGATTAAGGTTGAATTCEcoRI。

2. 按照权利要求 1 所述的方法制备的猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条,其特征在于,包括吸水垫、硝酸纤维膜、含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜、金标抗原保护膜、反应支持物 PVC 板,其中,硝酸纤维膜设置在反应支持物 PVC 板的中间,硝酸纤维膜上设置有两个显色区 T 和 C,其中 T 区中包被有基因工程猪伪狂犬表达 gE 蛋白;C 区包被有兔抗猪伪狂犬 IgG,在硝酸纤维膜 T 区的左端部上表面,设置有含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜,含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜上表面设置有金标抗原保护膜,硝酸纤维膜的右端 C 区的上表面设置有吸水垫。

猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种兽医生物技术领域的诊断技术,具体地说是猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus 2, PCV2) 是引起断奶猪多系统衰竭综合征 (post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的病原,已广泛受到了人们的重视。随着对 PCV2 及其致病性的研究的深入,近来发现 PCV2 还与猪的繁殖障碍、断奶猪和育肥猪的呼吸道疾病、皮炎与肾病综合征 (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、幼龄仔猪的先天性震颤等疾病有关。近年来,我国规模化猪场 PCV2 感染以及由此引起的疾病愈来愈普遍,给我国养猪生产造成了较大的经济损失。

[0003] 目前,公知的猪圆环病毒 2 型抗体快速检测试剂盒 (ELISA 法),系采用酶联免疫技术检测样品 (血清) 中猪圆环病毒 2 型抗体的方法。即:采用猪圆环病毒 2 型经纯化、浓缩制成的抗原包被微孔板,在试验中,加入稀释的对照血清和待检血清,经温育后,若样品中含有猪圆环病毒 2 型特异性抗体,则将与微孔板上抗原结合,经洗涤除去未结合的抗体和其他成分后;再加入酶标二抗,与微孔板上抗原抗体复合物发生特异性结合;再经洗涤除去未结合的酶结合物,在孔中加 TMB 或 OPD 底物液,与酶反应形成有色产物,加入终止液反应后,用酶标仪固定波长 (450nm 或 630nm) 测定各反应孔中的 OD 值。ELISA 适合大批样品的检测,成为了一种常规的检测方法。但是,该方法抗原的制备过程必须经过病毒的细胞培养、病毒纯化等繁琐模式,特异性不高、稳定性差,而且成本高;检测时需要专门的仪器设备如酶标仪来配合使用,检测操作人员需要经过专业培训;操作过程相对比较复杂;检测所需要时间比较长;检测所需费用高。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服当前技术在推广使用中存在的缺陷,提供一种猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法。

[0005] 本发明的目的是针对目前我国猪圆环病毒病普遍存在,给养猪业带来严重经济损失及缺乏现场操作简便的试剂盒的现状,提供一种提供一种不需要特定仪器设备辅助的检测试剂,并能有效地降低检测成本,能够应用于大规模现地检样的诊断方法。

[0006] 本发明的猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法是以下技术方案实现的:

[0007] 利用基因工程表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白,采用酶联免疫原理和膜层析技术制成快速检测猪血液或血清中的抗体。猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条包括样品垫、结合垫、硝酸纤维膜 (NCM) 和吸水垫和 PVC 板。按照正确地顺序固定在 PVC 板上。PVC 板一端依次粘附样品垫、结合垫,中间粘附硝酸纤维膜,另一端粘附吸水垫,其特征在于结合垫包被了基因工程表达的猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白-胶体金结合物,将表达蛋白包被在硝

酸纤维膜作为检测线 (T), 将兔抗猪圆环病毒 2 型抗体包被在硝酸纤维膜作为对照线 (C)。可广泛用于临床猪圆环病毒病的检测。与其他病毒无交叉反应, 与 ELISA、中和试验两种方法检测的符合率分别为 98.63% 和 95.83%, 整个实验仅需 15 分钟。操作简便、快速、准确、灵敏度高、直观、结果容易判定。

[0008] 一、基因工程表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 蛋白制备

[0009] 1 材料和方法:

[0010] 1. 2ORF2 基因氨基端 (737-421nt) 的扩增

[0011] 参照 PCV2JXL 序列, 设计并合成 1 对引物, 以重组质粒 pMDT-PCV 为模板, 扩增 ORF2 基因的氨基端 (737-421nt) 部分片段。

[0012] CapL 5' AGC AAG CTT CTT TCG TTT TC3',

[0013] PCVF 5' GGG AAT TCA ACC TTA ATC TTC CTT A 3'

[0014] 上游引物下划线为 HindIII 序列, 核酸位置 739nt; 下游引物下划线为 EcoRI 序列, 位于 423nt。

[0015] PCR 反应条件为, 94°C 热启动 5 分钟, 94°C 变性 60 秒, 55°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 30 秒, 最后 72°C 延伸 10 分钟。扩增产物即为 PCV₇₃₇₋₄₂₁, 经 1% 琼脂糖电泳。

[0016] 1. 2ORF2 基因氨基端片段在 pMD-18T 中的克隆

[0017] 将扩增产物 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 利用胶回收试剂盒 (上海华顺生物工程公司) 大量回收, 按照产品说明书, 利用 T-A 原理, 与 pMD-18T 载体连接。转化 DH5 α 感受态大肠杆菌, 涂布于含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 片板, 12 小时后挑取典型白色单菌落少量培养, 提质粒 DNA。通过 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定重组克隆, 命名为 pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁。

[0018] 1. 3ORF2 基因氨基端 (737-421nt) 在 pGEX-6p-1 中的克隆

[0019] 原核表达载体 pGEX-6p-1 (Amersham Pharmacia Biotech) 是上游带有谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 部分基因的高效表达载体。用 BamHI 和 EcoRI 双酶切重组质粒 pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁, 得到 2 条条带, 分别为载体 2.7kb 和插入片段 0.3kb, 回收其中 0.3kb。用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 pGEX-6p-1, 与带有相同粘端的 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 连接。转

[0020] 化大肠杆菌 BL21 感受态菌, 氨苄青霉素抗性筛选。挑取单菌落少量培养基过夜培养, 小提质粒 DNA, 通过限制性内切酶鉴定重组质粒。得到重组克隆命名为 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁。

[0021] 1. 4ORF2 基因羧基端 (421-37nt) 在 pGEX-6p-1 中的克隆

[0022] 本实验须利用 pMDT-Cap 重组克隆中分别位于引物和载体序列的 EcoRI 和 SalI 位点, 用 EcoRI 和 SalI 双酶切 DNA pMDT-Cap, 得到 2 条带, 分别为 3.0kb 和 0.4kb, 其中 3.0kb 来自 2.7kb 的载体带与 ORF2 基因的氨基端 737-421 部分之和。0.4kb 条带, 即为 ORF2 基因的羧基端 (421-37nt) 部分 PCV₄₂₁₋₃₇。大量回收, 与同样用 EcoRI 和 SalI 双酶切的 pGEX-6p-1 载体连接, 转化大肠杆菌 BL21 感受态菌, 常规筛选重组克隆, 得到 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇。

[0023] 1. 5pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的诱导表达

[0024] 按照载体说明书 (GST Gene Fusion System, 第 3 版) 进行。将分别含有重组质粒 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的新鲜大肠杆菌单菌落在 2 \times YTA 培养基中 37°C 振荡培养过夜, 次日按 1% 体积比转接 5ml 新鲜培养基, 37°C 继续培养。当菌液 OD₆₀₀ 值达 0.6-0.8 时, 加入无菌 IPTG 溶液, 使终浓度为 0.1mmol/L。诱导 3-4 小时后停止培养, 取 1ml 离心收集菌体, PBS (pH7.4) 洗涤, 用 80 μ l PBS 悬浮菌体, 与 20 μ l 5 \times SDS 裂解缓冲液混合, 煮沸变性

5 分钟。利用 BioRAD 公司的蛋白质电泳装置进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 分离胶的丙烯酰胺浓度为 10%。将只含载体的大肠杆菌同样诱导做阴性对照。0.25% 考马斯亮兰染色。

[0025] 1. 6pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 表达蛋白免疫鼠血清的制备

[0026] 分别大量诱导表达上述重组菌, 将菌体用原培养液 1/10 体积的 PBS 重悬, 超声波破碎至液体清澈, 与 5×SDS 上样缓冲液煮沸变性 5 分钟, 进行常规 SDS-PAGE。电泳结束后, 在考马斯亮蓝染液中染色 2 小时, 再经脱色至背景清晰。用去离子水尽量洗去胶上的脱色液, 再置胶于一干净玻片上, 用干净刀片切下目的条带, 放在 1.5ml EP 管中, 尽量少混杂无关蛋白。-20℃ 冻存。免疫前, 在冷冻状态下尽量碾碎胶条, 用适量 PBS 重悬, 至胶粒可通过 10 号注射器针头为宜, 即为制备好的免疫原。

[0027] 选择健康活泼的青年雌性 BALB/c 小鼠, 分别腹腔注射上述制备的免疫物质, 每只每次 0.5ml, 每次免疫间隔 2-3 周。各免疫 5 只小鼠, 2 免后每次免疫前眶下窦采血约 100 μl, 析血清, 对 PCV2 病毒感染 PK15 细胞做间接免疫荧光抗体试验 (IFA), 观察有无特异性荧光染色。

[0028] 1. 7pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 表达蛋白与 PCV 感染猪多抗血清的 ELISA 反应性

[0029] 将 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 和 pPR0-Rep 重组菌大量诱导表达后, 同上制备免疫原。按常规方法进行 ELISA。用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 分别以 1:40、1:80、1:160、1:200 稀释后包被酶标板, 每个稀释度 3 个重复孔, 4℃ 过夜。弃去孔内的液体, 同时用洗涤液 PBST (0.01mol/L PBS+0.05% Tween20) 洗 3 次, 每次 5 分钟, 拍干。每孔加 100 μl 封闭液 (含 5% 脱脂乳的 PBST) 37℃ 封闭 2 小时, 同上洗涤。将 PCV2 阳性猪血清 (中国农业大学动物医学院杨汉春教授提供) 和分别用 PBS 按 1:250、1:500、1:750、1:1000、1:1500 稀释, 各稀释度重复 3 次, 每孔加 50 μl, 同时设 SPF 猪阴性血清对照 (中国农科院哈尔滨兽研所崔尚金副研究员提供) 和 PBS 空白对照, 37℃ 作用 2 小时, 洗涤, 拍干。加用 PBS 配制的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 每孔 50 μl, 37℃ 孵育 1.5 小时, 洗涤, 拍干。加底物液, 每孔加新鲜配制的底物缓冲液 50-100 μl (10ml 磷酸盐-柠檬酸缓冲液) 与 9mg 邻苯二胺混合后, 临时加 30% H₂O₂ 0.15ml, 37℃ 10-30 分钟静止避光显色。当阴性孔即将显色时, 以 50 μl 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 在酶联免疫阅读仪上 492nm 波长下读取 OD 值。结果判定: 若阴性对照孔无色或接近无色, 阳性对照孔明确显色, 则可直接用肉眼观察结果。

[0030] 2) 制备兔猪圆环病毒 2 型高免血清用猪圆环病毒 2 型抗原, 采用多点注射法免疫阴性家兔 3 只, 每隔 2 周加强免疫 1 次, 共进行 3 次, 最后一次免疫 10 天后采血, 分离血清, 纯化后得兔抗猪圆环病毒 2 型 IgG。

[0031] 3) 胶体金颗粒制备将氯化金 (中国医药集团上海化学试剂公司) 配制成 0.01% 水溶液, 取 100ml 煮沸 2min 后, 边搅拌边加入柠檬酸三钠 (1%) 2ml, 煮沸至溶液颜色变成酒红色后, 继续煮沸至适宜浓度 (OD₅₃₅ = 0.9312), 冷却后加入双蒸馏水恢复到原体积, 置 4℃ 保存。

[0032] 4) 胶体金标记 ORF2 蛋白制备及纯化将待标记蛋白倍比稀释, 分别取 100 μl 加入 1ml 胶体金中, 10min 后加入 10% NaCl 100 μl, 4℃ 静止 1h。取胶体金颜色没有发生改变的最高稀释倍数为准, 在此基础上加 30% 为最佳标记量。取一定量调配好的胶体金用 0.2mol/L K₂CO₃ 调至 pH = 9.0, 按最佳标记量加入表达抗原, 室温作用 20min, 加入

Tris-HCl (pH 8.0, 20mmol/L) 配制的 BSA, 使终浓度为 1%, 4°C 放置 2h 后使用。将金标抗原 3000r/min 离心 30min, 取上清, 60000g 离心 60min, 沉淀用 0.02mol/L pH7.2 含 0.1% BSA 的 PBS 溶解, 恢复到原体积。再超离 1 次, 沉淀用少许上述 PBS 溶解, 使 $OD_{535nm} = 1.5$ 。0.22 μm 滤膜过滤, 4°C 保存备用。

[0033] 5) 试纸条的组成用喷膜机将胶体金标记蛋白复合物喷涂在胶体金结合垫上, 将表达 ORF2 蛋白和兔抗猪圆环病毒 2 型 IgG 依次间隔 4mm 喷在硝酸纤维膜 (NCM, 上海华舜生物工程有限公司) 上, 分别作为检测带和质控带, 将包被好的 NCM 放入含 3% BSA 的 pH7.2, 0.01M PBS 中, 过夜, 封闭其余蛋白结合位点。倒掉封闭液, 用 pH7.2, 0.01M PBS, 洗 2 次, 每次 5min, 37°C 干燥 1h 备用。将硝酸纤维膜、胶体金结合垫、样品垫、吸水垫等一次粘在 PVC 板上, 即, 将玻璃纤维连接在 NCM 上端, 边缘并附着在 NCM 上; 棉浆垫附着在玻璃纤维上, 与 NCM 衔接; 吸水滤纸板连接在 NCM 下端, 边缘并附着在 NCM 上。将粘好的 PVC 材料切成 60mm 长、4mm 宽的试纸条。即制成猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条。将试纸条密封于铝箔袋中, 4°C 保存。

(四) 附图说明

[0034] 图 1 是 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 重组克隆的 PCR 鉴定图; 图中的数字分别表示:

[0035] 1: DNA Marker DL 2000;

[0036] 2: 以 pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 为模板;

[0037] 3: 以 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 为模板;

[0038] 4: 水对照。

[0039] 图 2 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 限制性内切酶 PCR 鉴定图; 图中的数字分别表示:

[0040] 1: DNA Marker DL 15 000;

[0041] 2: pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ BamHI/SalI 双酶切;

[0042] 3: pGEX-6p-1 BamHI/SalI 双酶切;

[0043] 图 3: pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 限制性内切酶 PCR 鉴定图

[0044] 1: DNA Marker DL 15 000

[0045] 2, 3: EcoRI/SalI 双酶切

[0046] 4: EcoRI 单酶切

[0047] 图 4 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的 SDS-PAGE 结果 PCR 鉴定图, 图中箭头所指分别为

[0048] 1: 蛋白标准分子量, 97、66、43、35、20、14kDa;

[0049] 2: pGEX-6p-1 载体中 29kDa 的 GST 蛋白;

[0050] 3: pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 中 GST-PCV₄₂₁₋₃₇ 融合蛋白;

[0051] 图 5 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 的 SDS-PAGE 结果 PCR 鉴定图;

[0052] 1, 2: pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 经 IPTG 诱导后产生的 GST-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 蛋白 (箭头所指)

[0053] 3, 4: 未诱导的重组菌

[0054] 图 6 是本发明试纸条的正面示意图;

[0055] 图 7 是本发明试纸条的 A-A 向断面结构示意图;

[0056] 图 8 是 T、C 两条带显色为阳性的检测结果示意图;

[0057] 图 9 是 C 一条带显色为阴性的检测结果示意图;

[0058] 图 10 是 T、C 两条带未显色为无效的检测结果示意图。

[0059] 附图标记说明:吸水垫 1;硝酸纤维膜 2;含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜 3;金标抗原保护膜 4;反应支持物 PVC 板 5;

[0060] 在硝酸纤维膜上 T 区表示包被基因工程猪伪狂犬表达 gE 蛋白;C 区表示包被兔抗猪伪狂犬 IgG。

具体实施方式

[0061] 2 结果

[0062] 1. 3pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁、pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 重组克隆的构建

[0063] 利用 PCR 从重组质粒 pMDT-PCV 中扩增了 PCV2 ORF2 基因的氨基端部分片段。扩增结果显示,获得一条特异性的条带,与标准分子量比较,大约 0.3kb,符合理论值大小。见图 1,根据 T-A 原理将其回收产物与 pMD18T 连接后,通过 BamHI 和 SalI 双酶切质粒 DNA,电泳出现 2 条带,分别为 2.7kb 和 0.3kb,表明已成功将 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 插入克隆载体。再利用 BamHI 和 SalI 将 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 亚克隆入表达载体 pGEX-6p-1,酶切产物经 1% 琼脂糖电泳显示,出现 4.9kb 的载体带和 0.3kb 的外源条带,表明构建成功重组表达质粒 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ (见图 2)。

[0064] 2. 2pMDT-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 的序列分析

[0065] 由于在获得 PCV₇₃₇₋₄₂₁ 片段时是通过 PCR 扩增得来,为避免碱基错配需要测定序列。分析测序结果,重组 DNA 的最大读码框覆盖了整个序列,中间未出现无义突变,与亲本毒 JXL 株同源性达 100%。核苷酸序列如下,起始密码子 ATG 以斜线表示:

[0066] PCV₇₃₇₋₄₂₁ :

[0067] BamHI

[0068] GGATCCGATATGACGTATCTAAGGAGGCGTTACCGAGAAGAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTTGG
CCAGATCCTCCGCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTC
AACACCCGCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTATCAAGCGAACCACAGTCAAAACGCCCTCCTGGGCGGTGGAC
ATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTTCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATAC
TACAGAATAAGGAAGATTAAGGTTGAATTC

[0069] EcoRI

[0070] 2. 3pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 重组克隆的构建

[0071] 通过 EcoRI 和 SalI 双酶切含有完整 PCV2ORF2 基因的重组克隆 pMDT-Cap,将其小片段与同样处理的表达载体 pGEX-6p-1 连接并转化宿主菌。通过 EcoRI 和 SalI 双酶切鉴定,得到 4.9kb 和 0.4kb 的 2 条带;经 EcoRI 单酶切获得 5.3kb 的条带。表明已成功构建 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 重组克隆,见图 3。

[0072] 2. 4pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ 和 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的诱导表达

[0073] 将 2 种重组菌诱导表达,对菌体蛋白进行 SDS-PAGE 分析。与标准蛋白比较,以含载体 pGEX-6p-1 的大肠杆菌作为阴性对照,其诱导产物中明显出现了由载体编码的融合蛋白 GST 的 29kDa 条带,而在含 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ (图 4) 和 pGEX-PCV₇₃₇₋₄₂₁ (图 5) 的重组菌菌体中,各出现一条位于 43kDa 和 35kDa 之间的额外条带。根据序列分析结果可知,PCV₇₃₇₋₄₂₁ 实际有 324bp,编码蛋白实际分子量为 13.9kDa,PCV₄₂₁₋₃₇ 有 363bp,氨基酸实际分子量为 15.2kDa,与载体所含 GST (29kDa) 融合表达后,外源蛋白的分子量均大约为 40kDa。

[0074] 2.5 表达蛋白抗鼠血清的制备及 IFA 结果

[0075] 将表达蛋白分别免疫小白鼠 3 次后, 眶下窦采血, 析血清。用 PBS 1 : 20 稀释, 与 PCV2JXL 感染 PK15 细胞做 IFA, 暗视野下可见胞浆和胞膜特异性荧光, 成空心圆型, 偶尔也出现于胞核。用病毒接种细胞与 1 : 20 稀释的正常 BALB/c 小鼠血清做 IFA, 或以 PBS 代替一抗与正常细胞作用, 均无荧光出现, 表明抗血清中含有抗病毒特异性抗体。见图 6

[0076] 2.6 重组表达蛋白与 PCV2 感染猪血清的 ELISA 反应性

[0077] 将 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 和 pPRO-Rep 重组菌体蛋白经超声波破碎后, 包被酶标板, 与阳性血清和阴性血清做 ELISA 试验。通过比较 OD₄₉₂ 时的 P/N 值, 结果发现 HRP 标记羊抗鼠抗体的最佳作用浓度为 1 : 3000, 而不同浓度的重组蛋白在与同一份 1 : 1000 稀释的血清反应时, Cap 部分基因 (PCV₄₂₁₋₃₇) 蛋白在 1 : 50、Rep 蛋白在 1 : 50 稀释时 P/N 值分别达到最高 2.11、1.57, 表明 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 的反应原性较好, 而 Rep 蛋白的表达量虽高, 但免疫原性较差, 几乎不具有区分抗体阳性血清的能力。

[0078] 通过对的包被浓度进行摸索, 结果在抗原 1 : 80 稀释时, 血清 1 : 750 稀释时的反应孔显色最深, 而在 1 : 1000 时 P/N 比值最大, 各自的 P/N 比值分别达 4.29、4.80。上述结果表明 pGEX-PCV₄₂₁₋₃₇ 蛋白与病毒多抗血清的反应原性较强。ELISA 结果见表 1。

[0079] 表 1 重组蛋白不同稀释度时与不同血清反应的 OD₄₉₀ 值与 P/N 值

[0080]

血清 (1: 1000)	pGEX-PCV ₄₂₁₋₃₇			pPRO-Rep	
	1: 50	1: 100	1: 150	1:50	1:100
1#血清	0.485	0.312	0.266	0.199	0.123
2#血清	0.229	0.268	0.284	0.195	0.179
P/N	2.11	1.77	1.95	1.57	1.37

[0081] 实施例 :

[0082] 本发明的猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条, 其结构是由吸水垫 1、硝酸纤维膜 2、含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜 3、金标抗原保护膜 4、反应支持物 PVC 板 5 组成, 其中, 硝酸纤维膜 2 设置在反应支持物 PVC 板 5 的中间, 硝酸纤维膜 2 上设置有两个显色区 T 和 C, 其中 T 区中包被有基因工程猪伪狂犬表达 gE 蛋白 ;C 区包被有兔抗猪伪狂犬 IgG, 在硝酸纤维膜 2T 区的左端部上表面, 设置有含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜 3, 含有胶体金标记抗原的玻璃纤维膜 3 上表面设置有金标抗原保护膜 4, 硝酸纤维膜 2 的右端 C 区的上表面设置有吸水垫 1。

[0083] 本发明产品的用法及用途

[0084] 1) 操作方法在检测前先将样本和试纸条放在室温条件下放置一段时间 (10 分钟), 使其恢复至室温 ;从铝箔袋中取出检测试纸条 ;在椭圆形加样孔内加入 3-5 滴 (100-200u1) 待检猪血液或血清样品 ;将试纸条平放在桌面上, 在室温下静置 20 分钟判定结果。

[0085] 2) 结果判断

[0086] 无效:如图 10 所示,在对照区 (C) 和检测区 (T) 都不出现色线;

[0087] 阴性:如图 9 所示,在对照区 (C) 出现一条色线,在检测区 (T) 不出现色线;

[0088] 弱阳性:在对照区 (C) 出现一条颜色较深的紫红色线,而在检测区 (T) 出现一条颜色很浅的紫红色线;

[0089] 阳性:如图 8 所示,在对照区 (C) 和检测区 (T) 各出现一条颜色较深的紫红色线,样品中的抗体表达水平越高,检测区 (T) 色线颜色越深。

[0090] 3) 试纸条用途检测猪圆环病毒 2 型感染产生的抗体。

[0091] SEQUENCE LISTING

[0092] <110> 曹莹莹

[0093] <120> 猪圆环病毒 2 型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法

[0094] <160>5

[0095] <170>PatentIn version 3.3

[0096] <210>1

[0097] <211>18

[0098] <212>DNA

[0099] <213> 人工序列

[0100] <220>

[0101] <223> 引物

[0102] <400>1

[0103] agcaagcttc tttcgttt 18

[0104] <210>2

[0105] <211>25

[0106] <212>DNA

[0107] <213> 人工序列

[0108] <220>

[0109] <223> 引物

[0110] <400>2

[0111] gggaattcaa ccttaatctt cctta 25

[0112] <210>3

[0113] <211>324

[0114] <212>DNA

[0115] <213> 人工序列

[0116] <220>

[0117] <223> 重组质粒

[0118] <400>3

[0119] ggatccgata tgacgtatct aaggagcgt taccggagaa gaagacaccg ccccccgcagc 60

[0120] catcttgccc agatcctccg ccgccgcccc tggctcgtec acccccgcca ccgttaccgc 120

[0121] tggagaagga aaaatggcat cttcaacacc cgcctctccc gcaccttcgg atatactatc 180

[0122]	aagcgaacca cagtcaaac gccctcctgg gcggtggaca tgatgagatt caatattaat	240
[0123]	gactttcttc cccaggagg gggetcaaac ccccgctctg tgccctttga atactacaga	300
[0124]	ataaggaaga ttaaggttga attc	324



图 1

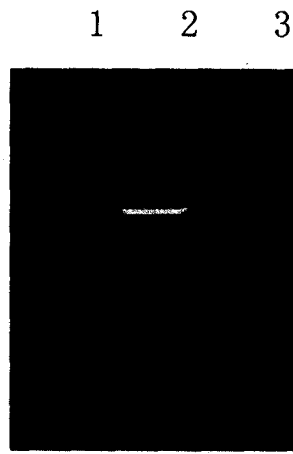


图 2

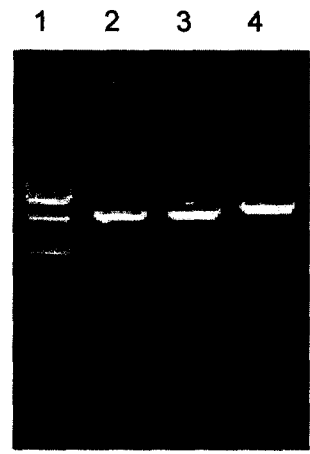


图 3



图 4

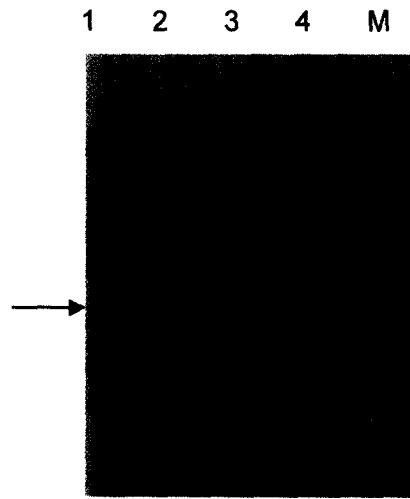


图 5

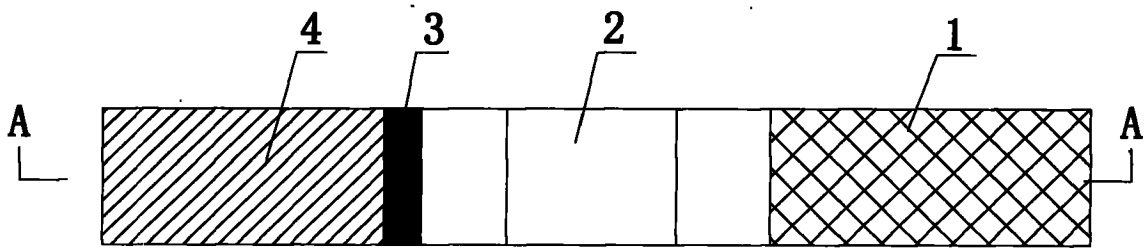


图 6

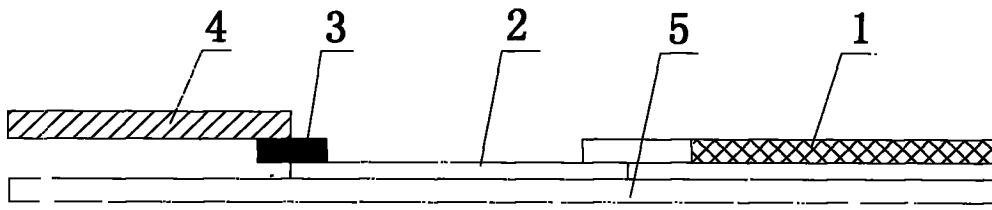


图 7A-A

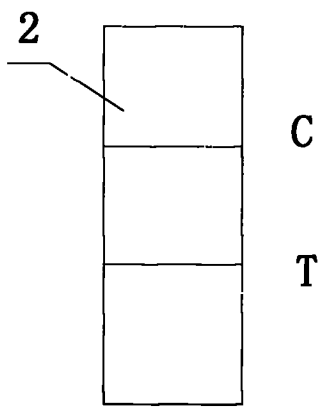


图 8

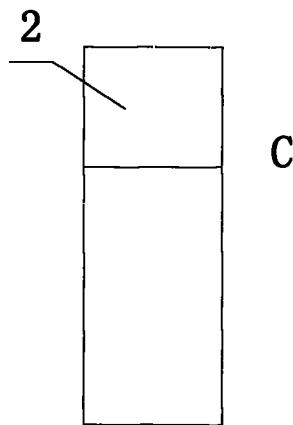


图 9

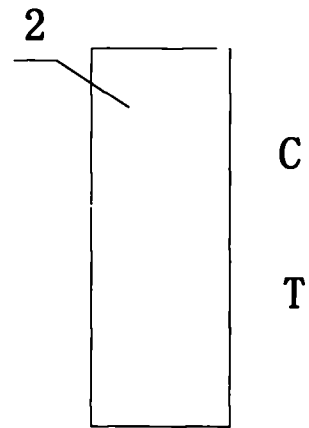


图 10

专利名称(译)	猪圆环病毒2型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN101881770B	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN200910014999.4	申请日	2009-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	青岛农业大学 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	青岛农业大学 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	青岛农业大学 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 山东省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	周顺 纪卫宁 崔尚金 李俊 王金宝 袁小远		
发明人	周顺 纪卫宁 崔尚金 李俊 王金宝 袁小远		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/552 C12P19/34 C12N15/70 C12P21/02 C12R1/19		
代理人(译)	刘德		
审查员(译)	刘文瀚		
其他公开文献	CN101881770A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明专利涉及一种猪圆环病毒2型胶体金抗体快速检测试纸条的制备方法，该方法是利用基因工程表达猪圆环病毒2型ORF2蛋白，采用酶联免疫原理和膜层析技术制成，快速检测猪血液或血清中的抗体。该测试纸条可广泛用于临床猪圆环病毒病的检测。与其他病毒无交叉反应，与ELISA、中和试验两种方法检测的符合率分别为98.63%和95.83%。与ELISA相比，重组抗原免疫胶体金具有明显的优势：安全性好，无需培养病毒本身，避免了因操作病毒造成的病毒扩散；可以大批量制备，工艺简单，生产成本低廉；抗原成分稳定均一，操作简便省力，不用仪器，检测结果特异性高，重复性好。整个实验仅需15分钟。操作简便、快速、准确、灵敏度高、直观、结果容易判定。

