



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872601 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810751155.7

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2018.07.10

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 安徽九川生物科技有限公司

地址 241000 安徽省芜湖市经济技术开发区
衡山路35号汽车电子创业园孵化器
大楼4楼

(72)发明人 许高涛 凡玉芳 单雪芹 蒋敏之
王亚男 刘家炉 徐文俊 赵雨
高耀辉 夏兵兵

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 尹婷婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

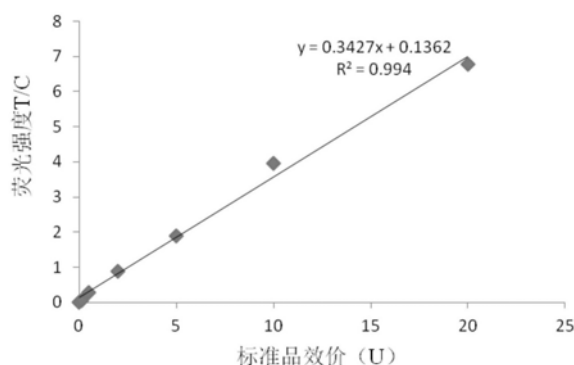
权利要求书2页 说明书9页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法。由试纸卡、稀释液和标准品组成,所述试纸卡是在PVC板上顺次相互搭接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述硝酸纤维素膜上包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋白(GP5蛋白)的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体,所述结合垫上包被有稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体。本发明公开的检测试剂盒采用间接法实现血清中抗体水平的定量检测,检测抗原采用自制的重组N蛋白和重组GP5蛋白混合液作为抗原池,与单一抗原作为检测抗原相比,灵敏度显著提升。与传统的ELISA相比,其特异性、灵敏度、重复性及稳定性较高。



1. 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒, 由试纸卡、稀释液和标准品组成, 其特征在于, 所述试纸卡是由PVC板上顺次相互搭接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成, 所述硝酸纤维素膜上包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋白(GP5蛋白)的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的免疫荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述试纸卡的制备方法包括以下步骤:

A、样品垫的制备;

B、结合有稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体的结合垫制备;

C、包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白和囊膜糖蛋白的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体的硝酸纤维素膜的制备;

D、试纸卡的组装。

3. 根据权利要求1所述的免疫荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述试纸卡的制备方法具体包括以下步骤:

A、将玻璃纤维膜于pH8.0的含1.0% Tween-20, 1% BSA的0.05M TB缓冲液中, 4℃浸泡4小时, 然后置于烘箱中, 37℃烘干8~12小时; 得到样品垫;

B、将聚酯膜浸泡于0.05M TB缓冲液中, 4℃浸泡4小时, 然后取出37℃烘箱烘干, 用点膜喷金仪器将2~5μg/mL的稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体喷到聚酯膜上, 喷量2~5 μL/cm, 37℃烘干8~12小时, 得到结合垫;

C、将重组PRRSV衣壳蛋白和GP5蛋白的混合物、羊抗鼠IgG抗体分别作为检测线和质控线平行包被于硝酸纤维素膜上, 检测线和质控线间隔为5mm, 37℃烘干8~12小时, 得到包被好的硝酸纤维素膜;

D、在PVC底板中央贴上包被好的硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸, 硝酸纤维素膜下缘粘贴结合垫, 结合垫下缘粘贴样品垫, 完成后用裁切机将贴好的试纸板切成4mm宽的试纸条, 将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

4. 根据权利要求2或3所述的免疫荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述步骤B中, 稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体的制备方法为:

(1) 稀土荧光微球的醛基化: 取10~20mg稀土荧光微球, 用0.1M pH9.0的碳酸盐缓冲液, 采用离心法洗涤3遍, 离心速度为8000~12000rpm, 时间为5~10分钟, 最后重悬于100μL的上述碳酸盐缓冲液中; 加入100μL醛基化的葡聚糖, 混匀, 室温下暗反应4~6小时; 采用同样的离心法洗涤并重悬于100μL的上述碳酸盐缓冲液中, 即可得到醛基化后的稀土荧光微球;

(2) 将醛基化的稀土荧光微球按照10~100μg抗体/1mg微球比例加入抗猪IgG单克隆抗体, 混合后4℃反应过夜; 然后加入硼氢化钠至终浓度10~20mM, 4℃过夜; 再加入等体积的封闭液, 4℃封闭过夜; 最后用0.05M TB缓冲液洗涤3遍, 重悬于pH8.0的100μL的含0.05%叠氮钠、1% BSA、0.5% Tween-20、2% 蔗糖的0.05M TB缓冲液中, 即可得到所述稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体;

所述抗猪IgG单克隆抗体的效价为 $1:3.2 \times 10^6$ 。

5. 根据权利要求2或3所述的免疫荧光定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述步骤C具体包括以下步骤: 用包被稀释液将重组PRRSV衣壳蛋白、囊膜糖蛋白按照质量比1:1~3的比例进

行混合并稀释至终浓度1~4mg/mL,用包被稀释液将羊抗鼠IgG抗体稀释到0.5~1.0mg/mL,利用划膜仪以1 μ L/cm的喷量将它们分别作为检测线和质控线平行包被于硝酸纤维素膜上,检测线和质控线间隔为5mm,于37℃烘干8~12小时。

6.根据权利要求5所述的免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述包被稀释液为pH7.0的含2%蔗糖,8%乙二醇的0.05M HEPES缓冲液。

7.根据权利要求1所述的免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述稀释液为pH7.5的含1%BSA、2%蔗糖的0.05M TB缓冲液。

8.根据权利要求1所述的免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述标准品的制备方法为:取多份感染了PRRSV的猪阳性血清混合后,经Protein A管柱亲和层析纯化后浓缩至终浓度为1.0mg/mL,其效价为20U。

9.根据权利要求1所述的猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将标准经稀释液稀释至系列浓度,分别吸取100 μ L标准品,分别加入到试纸卡的样品垫的孔中,15分钟后用荧光免疫层析分析仪进行检测,以标准品效价为横坐标,检测线和质控线的荧光信号值比值为纵坐标构建标准曲线得到线性方程;

S2、将待测血清加入到试纸卡的样品垫的孔中,15分钟后用荧光免疫层析分析仪检测检测线和质控线的荧光强度,将两者的比值代入线性方程即可定量检测出待测血清中的抗体效价。

10.一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的定量检测方法,其特征在于,使用权利要求1所述的试剂盒进行检测。

一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及猪繁殖与呼吸综合征抗体的定量检测,具体涉及一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由动脉炎病毒科的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种严重危害养猪业的烈性传染病,以妊娠母猪早产、流产、死胎等繁殖障碍及仔猪呼吸系统疾病为主要特征。因部分发病猪耳部发绀变紫,又称之为“蓝耳病”。该病蔓延极快,且致死率高,给畜牧业生产带来巨大的经济损失,早发现、早确诊对该病的防治意义重大。要做到早确诊就需要快速、敏感、特异的诊断方法。

[0003] 目前,检测PRRSV抗体的方法临床多采用传统的ELISA检测方法,耗时较长,且特异性、灵敏度均不高;分子诊断方法虽然具有高灵敏度和特异性,但不适用于临床快速诊断,费时费力;新兴的免疫发光方法需要昂贵的仪器设备和经验丰富的操作人员,不适合养殖场使用。

[0004] 以上方法存在耗时费力、灵敏度差等缺点。开发灵敏度更高、准确快速、成本低廉的PRRS检测试剂是亟需解决的重要问题。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法。本发明通过构建并表达重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋白(GP5蛋白),采用N蛋白和GP5蛋白混合构建重组抗原池作为试纸卡的检测限,与单一抗原作为检测抗原相比,灵敏度显著提升;本发明通过将试纸卡、标准品、稀释液、荧光免疫层析分析仪组建试剂盒,通过稀释液稀释标准品成系列浓度,以试纸卡检测标准品构建线性曲线,以实现PRRS抗体的定量检测,相比于其它方法学检测试剂盒,其特异性、灵敏度、重复性、稳定性更好,适用于猪繁殖与呼吸综合征抗体的快速检测以及疫苗接种效果的评价。

[0006] 本发明采取的技术方案为:

[0007] 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒,由试纸卡、稀释液和标准品组成,所述试纸卡是由PVC板上顺次相互搭接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述硝酸纤维素膜上包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋白(GP5蛋白)的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体。

[0008] 进一步地,所述稀释液为pH7.5的含1%BSA、2%蔗糖的0.05M TB缓冲液。

[0009] 进一步地,所述标准品的制备方法为:取多份感染了PRRSV的猪阳性血清混合后,经Protein A管柱亲和层析纯化后浓缩至终浓度为1.0mg/mL,其效价为20U。

[0010] 所述试纸卡的制备方法,包括以下步骤:

[0011] A、样品垫的制备；

[0012] B、结合有稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体的结合垫制备；

[0013] C、包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白和囊膜糖蛋白的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体的硝酸纤维素膜的制备；

[0014] D、试纸卡的组装。

[0015] 进一步地，所述试纸卡的制备方法优选为具体包括以下步骤：

[0016] A、将玻璃纤维膜于pH8.0的含1.0%Tween-20,1%BSA的0.05M TB缓冲液中，4℃浸泡4小时，然后置于烘箱中，37℃烘干8~12小时；得到样品垫；

[0017] B、将聚酯膜浸泡于0.05M TB缓冲液中，4℃浸泡4小时，然后取出37℃烘箱烘干，用点膜喷金仪器将2~5μg/mL的稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体喷到聚酯膜上，喷量2~5μL/cm，37℃烘干8~12小时，得到结合垫；

[0018] C、将重组PRRSV衣壳蛋白和GP5蛋白的混合物、羊抗鼠IgG抗体分别作为检测线和质控线平行包被于硝酸纤维素膜上，检测线和质控线间隔为5mm，37℃烘干8~12小时，得到包被好的硝酸纤维素膜；

[0019] D、在PVC底板中央贴上包被好的硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸，硝酸纤维素膜下缘粘贴结合垫，结合垫下缘粘贴样品垫，完成后用裁切机将贴好的试纸板切成4mm宽的试纸条，将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0020] 所述步骤B中，稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体的制备方法为：

[0021] (1) 稀土荧光微球的醛基化：取10~20mg稀土荧光微球，用0.1M pH9.0的碳酸盐缓冲液，采用离心法洗涤3遍，离心速度为8000~12000rpm，时间为5~10分钟，最后重悬于100μL的上述碳酸盐缓冲液中；加入100μL醛基化的葡聚糖，混匀，室温下暗反应4~6小时；采用同样的离心法洗涤并重悬于100μL的上述碳酸盐缓冲液中，即可得到醛基化后的稀土荧光微球；

[0022] (2) 将醛基化的稀土荧光微球按照10~100μg抗体/1mg微球比例加入抗猪IgG单克隆抗体，混合后4℃反应过夜；然后加入硼氢化钠至终浓度10~20mM，4℃过夜；再加入等体积的封闭液，4℃封闭过夜；最后用0.05M TB缓冲液洗涤3遍，重悬于pH8.0的100μL的含0.05%叠氮钠、1%BSA、0.5%Tween-20、2%蔗糖的0.05M TB缓冲液中，即可得到所述稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体。

[0023] 进一步地，所述抗猪IgG单克隆抗体的效价为 $1:3.2 \times 10^6$ 。

[0024] 所述步骤C具体包括以下步骤：用包被稀释液将重组PRRSV衣壳蛋白、囊膜糖蛋白按照质量比1:1~3的比例进行混合并稀释至终浓度1~4mg/mL，用包被稀释液将羊抗鼠IgG抗体稀释到0.5~1.0mg/mL，利用划膜仪以1μL/cm的喷量将它们分别作为检测线和质控线平行包被于硝酸纤维素膜上，检测线和质控线间隔为5mm，于37℃烘干8~12小时。

[0025] 进一步地，所述包被稀释液为pH7.0的含2%蔗糖，8%乙二醇的0.05M HEPES缓冲液。

[0026] 本发明还提供了所述猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒的使用方法，包括以下步骤：

[0027] S1、将标准品经稀释液稀释至系列浓度，分别吸取100μL标准品，分别加入到试纸卡的样品垫的孔中，15分钟后用荧光免疫层析分析仪进行检测，以标准品效价为横坐标，检

测线和质控线的荧光信号值比值为纵坐标构建标准曲线得到线性方程;

[0028] S2、将待测血清加入到试纸卡的样品垫的孔中,15分钟后用荧光免疫层析分析仪检测检测线和质控线的荧光强度,将两者的比值代入线性方程即可定量检测出待测血清中的抗体效价。

[0029] 本发明提供的PRRSV抗体的免疫荧光定量检测试剂盒,以重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋白(GP₅蛋白)混合构建重组抗原池作为检测线,PRRSV衣壳蛋白是由ORF7编码的,该蛋白含量最高,免疫原性好,是体液免疫应答的主要抗原,在感染PRRSV后,最先产生针对此蛋白的抗体。PRRSV GP₅蛋白是由ORF5编码的糖基化囊膜蛋白,可以诱导机体产生特异性的中和抗体。这两种蛋白都是PRRSV的主要结构蛋白,将其以一定比例混合作为抗原池,能够显著提升检测灵敏度,从而更加准确地进行常规抗体检测以及疫苗接种效果评价。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0031] 本发明公开的试纸卡的制备步骤中,各条件及参数均是优化筛选过的配方,能够保证试纸卡的各项性能指标均为最优。

[0032] 本发明所用的捕获抗体抗猪IgG单克隆抗体、检测抗原重组N蛋白和重组GP₅蛋白,以及质控抗体羊抗鼠IgG均为申请人自行制备,原材料质量稳定,且成本更低。

[0033] 本发明公开的检测试剂盒采用间接法检测血清中的抗体水平,检测抗原采用自制的重组N蛋白和重组GP₅蛋白混合液作为抗原池,与单一抗原作为检测抗原相比,灵敏度显著提升,表明该发明采用的混合抗原池能够弥补假阴性造成的漏检。

[0034] 本发明结合时间分辨荧光免疫分析和免疫层析技术,得到了可定量检测PRRS抗体的试剂盒,并建立一套高效精准的检测方法,应用于猪繁殖与呼吸综合征抗体的定量检测,与传统的ELISA相比,其特异性、灵敏度、重复性及稳定性较高,不需特殊条件,室温放置60天仍有效。

附图说明

[0035] 图1为重组BL21/pET-32a-PRRSV-N工程菌诱导表达得到的蛋白的SDS-PAGE图;泳道M:蛋白Marker、泳道空载:空载体泳道、1~5:分别为表达菌1~5号;

[0036] 图2为重组PRRSV N蛋白的Western-blot鉴定图;泳道M:蛋白Marker、泳道1~6:6组PRRSV N蛋白、泳道7:空载体;

[0037] 图3为重组BL21/pET-32a-PRRSV-GP₅工程菌诱导表达得到的蛋白的SDS-PAGE图;泳道M:蛋白Marker、泳道1:重组菌诱导后沉淀、泳道2:重组菌诱导后上清;泳道3:空载体;

[0038] 图4为重组PRRSV GP₅蛋白的Western-blot鉴定图;泳道M:蛋白Marker、泳道1:空载体、泳道2:重组PRRSV GP₅蛋白;

[0039] 图5为试剂盒的标准曲线。

具体实施方式

[0040] 实施例1

[0041] 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒,由试纸卡、稀释液和标准品组成,所述试纸卡是由PVC板上顺次相互搭接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,所述硝酸纤维素膜上包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋

白(GP5蛋白)的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体。

[0042] 所述稀释液为pH7.5的含1%BSA、2%蔗糖的0.05M TB缓冲液;所述标准品的制备方法为:取多份感染了PRRSV的猪阳性血清混合后,经Protein A管柱亲和层析纯化后浓缩至终浓度为1.0mg/mL,其效价为20U。

[0043] 所述试纸卡的制备方法包括以下步骤:

[0044] A、将玻璃纤维膜于pH8.0的含1.0%Tween-20,1%BSA的0.05M TB缓冲液中,4℃浸泡4小时,然后置于烘箱中,37℃烘干12小时;得到样品垫;

[0045] B、将聚酯膜浸泡于0.05M TB缓冲液中,4℃浸泡4小时,然后取出37℃烘箱烘干,用点膜喷金仪器将5μg/mL的稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体喷到聚酯膜上,喷量2μL/cm,37℃烘干12小时,得到结合垫;

[0046] C、用包被稀释液将重组PRRSV衣壳蛋白、囊膜糖蛋白按照质量比1:2的比例进行混合并稀释至终浓度4mg/mL,用包被稀释液将羊抗鼠IgG抗体稀释到1.0mg/mL,利用划膜仪以1μL/cm的喷量将它们分别作为检测线和质控线平行包被于硝酸纤维素膜上,检测线和质控线间隔为5mm,于37℃烘干12小时,得到包被好的硝酸纤维素膜;所述包被稀释液为pH7.0的含2%蔗糖,8%乙二醇的0.05M HEPES缓冲液;

[0047] D、在干燥间内准备好吸水滤纸、样品垫、PVC底板,在PVC底板中央贴上包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上缘粘贴吸水滤纸,硝酸纤维素膜下缘粘贴结合垫,结合垫下缘粘贴样品垫,完成后用裁切机将贴好的试纸板切成4mm宽的试纸条,将试纸条装入塑料卡内形成试纸卡。再将试纸卡密封于铝箔袋中,完成产品的组装。

[0048] 进一步地,所述步骤B中,稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体的制备方法为:

[0049] (一)制备抗猪IgG单克隆抗体,包括以下步骤:

[0050] (1)采用辛酸-硫酸铵法提取猪血清IgG,DEAE-52纤维素离子交换层析法对粗提的猪血清IgG进行纯化;

[0051] (2)将纯化的猪IgG免疫Balb/c小鼠,分4次免疫,以间接ELISA检测小鼠血清中抗猪IgG抗体的效价,效价高者选为下一步细胞融合的对象;

[0052] (3)取经最后强化免疫的Balb/c小鼠,收集血清,消毒,无菌取出小鼠脾脏、分离脾细胞,与新鲜制备、生长良好的小鼠骨髓瘤细胞融合,HAT培养基稀释融合细胞悬液,加入已预先铺有饲养细胞的96孔板中,100μL/孔,于培养箱中培养,筛选单克隆抗体杂交瘤细胞;

[0053] (4)腹腔内注射液体石蜡,6~8d后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞悬液;7~10d后观察小鼠腹部膨胀程度收集腹水,经离心去沉淀后以辛酸-饱和硫酸铵粗纯,再以DEAE阴离子交换层析纯化单抗,经ELISA测定抗体效价达到 $1:3.2 \times 10^6$ 。

[0054] (二)将抗猪IgG单克隆抗体与稀土荧光微球偶联制备稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体

[0055] (1)稀土荧光微球的醛基化:取10mg镧系荧光微球,用0.1M pH9.0的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100μL的上述碳酸盐缓冲液中;加入100μL醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时;采用同样的离心法洗涤并重悬于100μL的上述碳酸盐缓冲液中,即可得到醛基化后的稀土荧光微球;

[0056] (2)将醛基化的稀土荧光微球按照80μg抗体/1mg微球比例加入步骤(一)中的抗猪IgG单克隆抗体,混合后4℃反应过夜;然后与步骤(1)得到的醛基化后的镧系荧光微球混

合,4℃反应过夜;然后加入硼氢化钠至终浓度20mM,4℃过夜;再加入等体积的封闭液,4℃封闭过夜;最后用0.05M TB缓冲液洗涤3遍,重悬于pH8.0的100μL的含0.05%叠氮钠、1%BSA、0.5%Tween-20、2%蔗糖的0.05M TB缓冲液中,即可得到所述稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体。

[0057] 进一步地,所述步骤C中,所述重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)的制备方法为:

[0058] (1) 根据GenBank中PRRSV的N蛋白的基因序列设计引物,所述PRRSV的N蛋白的基因序列如SEQUENCE LISTING<400>1所示;以PRRSV cDNA为模板,扩增目的基因,与pET32a载体连接后转至BL21(DE3)中得到BL21/pET-32a-PRRSV-N工程菌,并对工程菌诱导表达,表达完成后对蛋白进行鉴定,鉴定图谱如图1所示,从图1可以看出,5株重组BL21/pET-32a-PRRSV-N工程菌中2号、3号、4号、5号菌诱导后在33KDa出现目的表达条带,经鉴定为可溶性表达,得到了PRRSV重组N蛋白。

[0059] (2) PRRSV重组N蛋白的纯化:层析柱:Ni Sepharose FF,200mL;平衡液(A液):PBS;洗脱液(B液):PBS+500mM咪唑;洗脱方式:梯度洗脱;上样量:500mL;洗脱峰:在30%B和50%B两个浓度下分别出现两个洗脱峰,SDS-PAGE结果显示,经过两步梯度洗脱后,在峰50%B处收集的蛋白纯度较高,纯度达到90%以上。

[0060] Western-blot检测结果显示,在33KDa处有目的蛋白,由此说明制备的PRRSV重组N蛋白具有抗原性。

[0061] 进一步地,所述步骤C中,所述重组PRRSV囊膜糖蛋白(GP₅蛋白)的制备方法为:

[0062] (1) 根据GenBank中PRRSV的GP₅蛋白的基因序列设计引物,所述PRRSV的GP₅蛋白的基因序列如SEQUENCE LISTING<400>2所示;以PRRSV cDNA为模板,扩增目的基因,与pET32a载体连接后转至BL21(DE3)中得到BL21/pET-32a-PRRSV-GP₅工程菌,并对工程菌诱导表达,表达完成后对蛋白进行鉴定,鉴定图谱如图3所示,从图3可以看出,工程菌诱导后在38KDa出现目的表达条带,表明重组BL21/pET-32a-PRRSV-GP₅成功表达,主要是包涵体表达。

[0063] (2) PRRSV重组GP₅蛋白的纯化:层析柱:Ni Sepharose FF;用Binding Buffer(20mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O,500mmol/L NaCl,45mmol/L咪唑,pH8.0)平衡层析柱至A_{280nm}吸收值稳定后开始上样,样品以30~60cm/h线性流速通过层析柱,再用Binding Buffer过层析柱,洗去未与层析柱结合的杂蛋白,直到A_{280nm}稳定。用Elution Buffer(20mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O,500mmol/L NaCl,500mmol/L咪唑,pH 8.0)洗脱并收集洗脱峰对应的蛋白。

[0064] Western-blot检测结果显示,如图4所示,在38KDa处有目的蛋白,由此说明制备的PRRSV重组GP₅蛋白具有抗原性。

[0065] 该试纸卡检测的原理:待测血清或血浆滴加在样品垫上,向结合物垫层析,若样本中含有待测抗体,则与结合物垫中的稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体结合,该复合物沿着硝酸纤维素膜移动至检测线时,与病毒抗原发生特异性结合,即可通过荧光数值反应样本中的抗体含量。

[0066] 实施例2

[0067] 实施例1中的猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0068] (1) 构建标准曲线:将标准品经稀释液稀释至系列浓度,依次为0.01mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.25mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL,所对应的效价分别为0.1U、0.5U、

2U、5U、10U、20U；精确吸取100μL标准品样本，加入到试纸卡的样品垫孔中，15分钟后用荧光免疫层析分析仪进行检测。每个浓度标准品检测2次，取检测线和质控线荧光强度比值(T/C)的平均值。以标准品效价为横坐标，T/C的平均值为纵坐标，得到的标准曲线如图5所示，线性方程为 $y=0.3427x+0.1362$ ，其中y表示T/C，x表示标准品效价。由此表明，实施例2制备的试剂盒在0.1~20U范围内线性良好，线性相关系数 $R^2=0.994$ 。

[0069] (2)取下单份检测条，撕开铝箔包装，将检测条水平放置，准确滴加100μl待测样本在试纸条的样品垫孔中。在室温下层析15min后，用荧光免疫层析分析仪进行检测读取结果，每个待测样本检测2次，取T/C值的平均值，带入标准曲线中，即得到待测样本中的抗体效价。

[0070] 实施例3

[0071] 试剂盒性能指标及临床检测

[0072] 1.特异性和灵敏度测定

[0073] 使用实施例1中的试剂盒对100例阴性血清进行测定，取其 $M+3\times SD$ 为阴阳临界值，其中M为100例阴性血清的效价的平均值，SD为100例阴性血清的效价的标准差，由此得到该试剂盒的Cut-off值为0.24U。

[0074] (1)特异性

[0075] 特异性：临床阴性血清中检测结果小于Cut-off值的样本数占临床阴性样本总数的比例。

[0076] 用实施例1制备的检测试剂盒和单一抗原作为检测线制备的试剂盒同时测定30份临床阴性血清，比较几种试剂盒的特异性检测结果。所述单一抗原作为检测线制备的试剂盒制备过程同实施例1，只是其中包被于硝酸纤维素膜上的检测线是单一蛋白N蛋白或GP5蛋白，包被浓度与混合抗原包被终浓度相同。

[0077] 结果显示，30例阴性血清中，各试剂盒检测结果均各有一例大于Cut-off值，即特异性为96.7%。

[0078] (2)灵敏度

[0079] 灵敏度：临床阳性血清中检测结果大于Cut-off值的样本数占临床阳性样本总数的比例。

[0080] 用实施例1制备的检测试剂盒和单一抗原作为检测线制备的试剂盒同时测定30份临床阳性血清，比较几种试剂盒的灵敏度检测结果；所述单一抗原作为检测线制备的试剂盒制备过程同实施例1，只是其中包被于硝酸纤维素膜上的检测线是单一蛋白N蛋白或GP5蛋白GP5蛋白，包被浓度与混合抗原包被终浓度相同。

[0081] 结果显示，单一N蛋白抗原制备的试剂盒灵敏度为86.6%，单一GP5蛋白抗原制备的试剂盒灵敏度为83.3%，而本发明制备的试剂盒灵敏度为93.3%。

[0082] 2.重复性测定

[0083] 配制低、中、高浓度标准品，对该试剂盒进行重复性测定。具体如下：

[0084] 取30个试纸条，将各浓度标准品分别混匀并恢复至室温后，按照实施例3的方法分别进行测定，每个浓度标准品重复测定10次。结果如表1所示，表明本发明制备的试剂盒重复性良好，CV均不高于8%。

[0085] 表1试剂盒重复性检测结果

[0086]

效价 (U) 测定次数	低浓度质控品 (0.1U)	中浓度质控品 (2U)	高浓度质控品 (15U)
1	0.09	1.88	15.38

[0087]

2	0.09	1.93	15.24
3	0.08	2.07	14.83
4	0.08	2.11	15.64
5	0.08	2.25	15.77
6	0.09	1.74	15.27
7	0.08	1.98	14.86
8	0.08	2.06	14.62
9	0.1	1.96	14.51
10	0.09	2.15	14.86
平均值 (M)	0.086	2.013	15.098
偏差 (SD)	0.007	0.146	0.426
变异系数 (CV)	8%	7%	3%

[0088] 3. 稳定性检测

[0089] 将试剂盒连同铝箔袋包装置于室温分别放置0天、7天、14天、30天、60天,采用实施例2方法分别利用放置不同天数的试剂盒对标准品进行检测。检测结果显示,放置60天后,试剂盒的各项性能指标均与放置0天的无显著性差异。

[0090] 4. 临床测定

[0091] 取10例已知PRRS抗体阴性的样本和10例已知PRRS抗体阳性样本,其阴阳性的判定采用武汉科前生物ELISA检测试剂盒进行判定,混匀并恢复至室温后,采用实施例2的方法进行检测。

[0092] 结果如表2所示,除5#样本测定结果不一致外,其余19例临床样本的阴阳性判定结果与对比试剂盒一致,符合率95%。由此可见,实施例1制备的试剂盒准确度高,检测背景值

低,阴阳性判定无误。

[0093] 表2 20例临床样本测定结果

[0094]

样本编号	武汉科前生物 ELISA 检测试剂盒测定结果	实施例 2 制备的试剂盒 测定结果 (U)
1	阴性	0.08
2	阴性	0.13
3	阴性	0.05
4	阴性	0.22
5	阴性	0.25
6	阴性	0.10
7	阴性	0.06
8	阴性	0.15
9	阴性	0.09
10	阴性	0.19
11	阳性	2.63
12	阳性	6.94
13	阳性	1.41
14	阳性	2.08
15	阳性	3.52
16	阳性	11.23
17	阳性	1.96

[0095]	18	阳性	0.49
	19	阳性	9.84
	20	阳性	5.11

[0096] 上述参照实施例对一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 安徽九川生物科技有限公司

<120> 一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法

<130> 1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> 重组PRRSV N蛋白

<400> 1

```
atgccaaata acaacggcaa gcagcagaag agaaagaagg gggatggcca gccagtcaat 60
cagctgtgcc aaatgctggg taagatcatc gctcagcaaa accagtccag aggcaaggga 120
ccgggaaaga aaaataagaa gaaaaacccg gagaagcccc atttcctctt agcgactgaa 180
gatgatgtca gacatcactt tacccttagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcaatccag 240
accgccttta atcaaggcgc tgggacttgc accctgtcag attcaggag gataagttac 300
actgtggagt ttagtttgcc tacgcatcat actgtgcgcc tgatccgcgt tacagcatca 360
ccctcagcat ga 372
```

<210> 2

<211> 603

<212> DNA

<213> 重组PRRSV GP5蛋白

<400> 2

```
atgttgggga agtgcttgac cgcgtgttac tactcgcaat tgcctttttt gtggtatata 60
gtgccattct gttttgctgc gctcgtcaac gccagcagca acagcagctc ccatttacag 120
ttgatttata acctgacgat atgtgagctg aatggcacag attggctgag cacaaaattt 180
gactgggcag tggagacttt cgttatcttt cctgtgttga ctcatattgt ctcttacggc 240
gcccttacca ctagccattt tcttgacacg gtcggcctga tcaactgtgtc caccgccggt 300
tattatcaca agcggatatgt attgagtagc atctacgctg tctgtgccct ggctgcgttg 360
gtttgcttcg ccattagggt ggcgaaaaat tgcatgtcct ggcgctactc atgcaccaga 420
tataccaatt ttcttctgga tactaagggc aaactctacc gctggcggtc acccgatcatc 480
attgagaagg ggggtaaaagt tgatgttgaa ggtcatttaa tcgacctcaa gacagttgtg 540
cttgatggtt ccgcggcaac ccctgtaacc aagatttcag cggagcaatg gggtcgtctc 600
tag 603
```

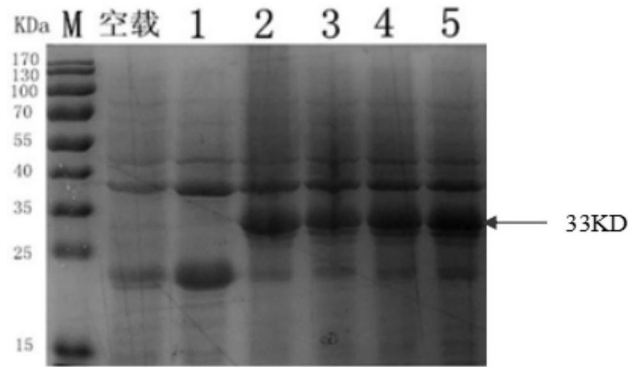


图1

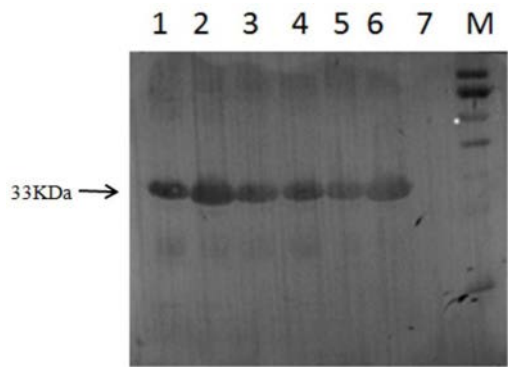


图2

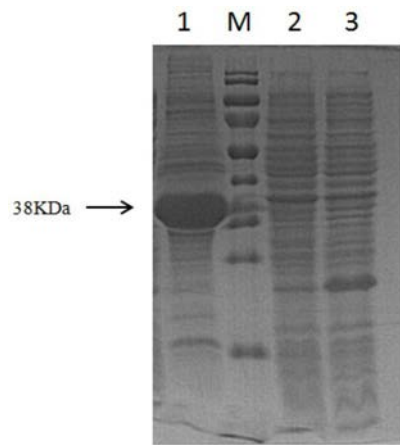


图3

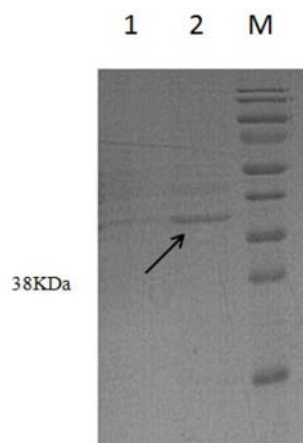


图4

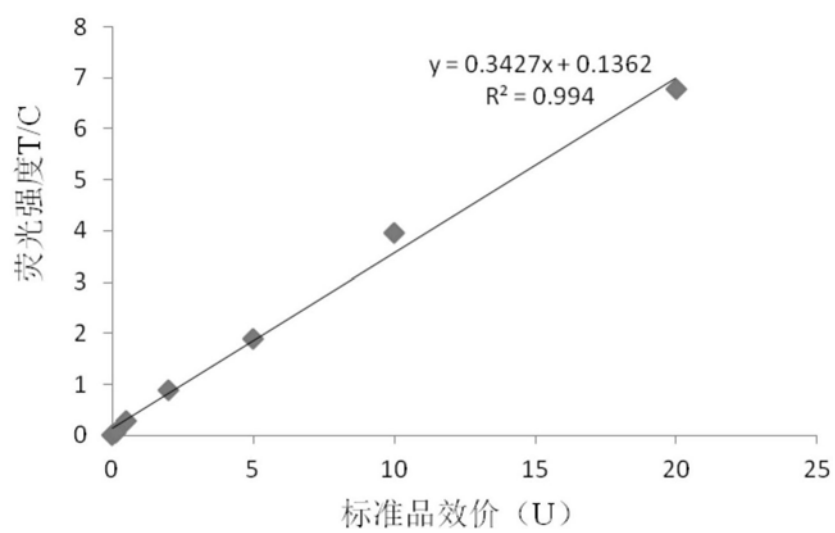


图5

专利名称(译)	一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN108872601A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810751155.7	申请日	2018-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	安徽九川生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽九川生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽九川生物科技有限公司		
[标]发明人	许高涛 凡玉芳 单雪芹 蒋敏之 王亚男 刘家炉 徐文俊 赵雨 高耀辉 夏兵兵		
发明人	许高涛 凡玉芳 单雪芹 蒋敏之 王亚男 刘家炉 徐文俊 赵雨 高耀辉 夏兵兵		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/26		
代理人(译)	尹婷婷		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪繁殖与呼吸综合征抗体的免疫荧光定量检测试剂盒及其使用方法。由试纸卡、稀释液和标准品组成，所述试纸卡是在PVC板上顺次相互搭接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成，所述硝酸纤维素膜上包被有作为检测线的重组PRRSV衣壳蛋白(N蛋白)和囊膜糖蛋白(GP5蛋白)的混合物和作为质控线的羊抗鼠IgG抗体，所述结合垫上包被有稀土荧光微球标记的抗猪IgG单克隆抗体。本发明公开的检测试剂盒采用间接法实现血清中抗体水平的定量检测，检测抗原采用自制的重组N蛋白和重组GP5蛋白混合液作为抗原池，与单一抗原作为检测抗原相比，灵敏度显著提升。与传统的ELISA相比，其特异性、灵敏度、重复性及稳定性较高。

