

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102353778 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 15

(21) 申请号 201110189010. 0

(22) 申请日 2011. 07. 07

(71) 申请人 贵州大学

地址 550025 贵州省贵阳市贵州大学花溪北校区科技处

(72) 发明人 王开功 陈军义 程振涛 文明 周碧君 方英

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所 52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

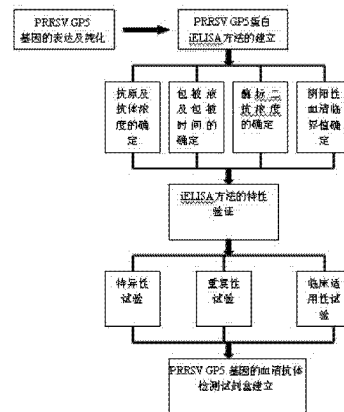
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于 PRRSVGP5 蛋白的 iELISA 试剂盒及制备方法,其组成包括:重组蛋白包被 50~200 μL、包被缓冲液 25mL-40mL、酶标二抗 300-500 μL、1×PBST 缓冲液 800mL-1000mL、阳性对照 1mL、阴性对照 1mL、封闭缓冲液 25mL-40mL、底物液 A10mL-15mL、底物液 B10mL-15mL 和终止液 10mL-15mL。本发明能监测猪血清 PRRSVGP5 蛋白抗体,将为 PRRS 疫苗免疫效果的评价,提供一种更加客观和有效的指标,减少了生产中 PRRS 疫苗免疫的盲目性,为 PRRS 的免疫防控提供技术支持。



1. 一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:其组成包括:重组蛋白包被 50~200 μ L、包被缓冲液 25mL-40mL、酶标二抗 300-500 μ L、1 \times PBST 缓冲液 800mL-1000mL、阳性对照 1mL、阴性对照 1mL、封闭缓冲液 25mL-40mL、底物液 A 10mL-15mL、底物液 B 10mL-15mL 和终止液 10mL-15mL。

2. 根据权利要求 1 所述一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:所述重组蛋白包被为重组蛋白使用包被缓冲液稀释为 1.8 mg/100 μ L ~ 3 mg/100 μ L;重组蛋白为 PRRSV GP5 基因通过大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达系统获得 GP5 蛋白,并通过 His • Bind Purification Kit 进行重组蛋白纯化,经 SDS-PAGE 分析后得到纯化目的蛋白;包被缓冲液为:Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g 溶于去离子水中,定容至 1000 mL,调至 pH 9.5~9.8。

3. 根据权利要求 1 所述一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:所述的酶标二抗为:羊抗猪 IgG-HRP。

4. 根据权利要求 1 所述一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:所述的 1 \times PBST 缓冲液为: NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、KH₂PO₄ 0.2 g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 2.9 g 和 Tween-20 0.5 mL 溶于 800 mL 蒸馏水,调整 pH 为 7.2~7.6,定容至 1000 mL。

5. 根据权利要求 1 所述一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:所述的阳性对照为通过 PRRS 分离毒临床感染猪获得的高免血清,使用时用血清稀释液按 1:10~1:200 倍稀释;所述的阴性对照为未感染且未免 PRRS 疫苗的猪血清,稀释度为 1:10~1:200。

6. 根据权利要求 1 所述一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:所述的封闭缓冲液为:BSA 0.3 g (0.1~0.5 g)溶于 100 mL PBST 缓冲液;所述底物液 A 为:Na₂HPO₄ 14.60 g、柠檬酸 9.33 g 和过氧化氢脲 0.52 g,溶于三蒸水,并定容至 1000 mL,调至 pH 5.0~5.4;所述底物液 B 为:TMB 20mg 和无水乙醇 10 mL,加双蒸水至 1 000 mL,过滤除菌,无菌分装。

7. 根据权利要求 1 所述一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒,其特征在於:所述的终止液为:0.2%~0.3% HF 溶液。

8. 如权利要求 1-7 任一项所述的一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒的制备方法,其特征在於:它包括以下步骤:

原核表达系统表达融合蛋白 His-dGP5,并经 His • Bind Purification Kit

纯化得到融合蛋白,应用 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析其纯化效果及反应原性;

第二,步骤一的纯化融合蛋白 His-dGP5 作为包被抗原,进行抗原包被液浓度、抗原包被条件、封闭液、血清稀释度、封闭时间、酶标二抗稀释浓度和显色反应时间 iELISA 的条件优化;

第三,取 40 份已知 PRRS 抗体阴性的猪血清,按步骤二确定的最佳反应条件,进行 iELISA 反应;样本 OD₆₃₀ 值 \geq 阴性样本 OD₆₃₀ 值的平均值(X) + 3 (标准差),可在 99% 的水平上判为阳性,当样本 OD₆₃₀ 值 < 阴性样本 OD₆₃₀ 值的平均值(X) + 3 (标准差)时,判为阴性。

一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪的一种高度传染性疾病。自 2006 年我国爆发了由 PRRSV 变异株引起的高致病性猪繁殖与呼吸综合征(Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, HP-PRRS),其与经典猪繁殖与呼吸综合征相比,主要表现为:发病猪持续高温 41℃ 以上;各年龄段猪均可出现急性死亡;母猪流产率可达 30% 以上;仔猪表现为发病率高达 100%,死亡率高达 50% 以上。我国农业部于 2008 年底将其列为一类动物传染病。

[0003] 目前国内对 PRRS 的防控主要采取疫苗免疫为主,使猪群产生免疫抗体以抵御 PRRS 侵袭,降低养猪场的风险。而当前部分猪场在免疫 PRRS 疫苗后,猪群仍有 PRRS 发生。因此能合理客观及时评估猪场 PRRS 疫苗免疫效果,为猪群 PRRS 防控提供科学依据显得尤为重要。PRRS 疫苗免疫机体后产生中和抗体及非中和抗体,其中中和抗体能够与病毒表面的抗原结合,从而阻止该病毒黏附机体靶细胞受体。故猪体内始终保持一定水平的 PRRSV 中和抗体,对于维持猪群健康具有重要意义。目前已经证明 PRRSV 结构蛋白中可以产生特异性中和抗体的有 GP3、GP4 和 GP5 蛋白,M 蛋白也可能产生中和抗体,其中 GP5 蛋白被公认为是机体产生保护性体液免疫的主要蛋白。

[0004] 通过对国内市场使用的 PRRS 血清抗体检测试剂盒调查显示,主要有 PRRS 全病毒蛋白和 N 蛋白为抗原包被的 ELISA 检测试剂盒。前者可检测 PRRSV 的各种抗体水平,能够全面体现 PRRSV 抗体总水平;后者则检测 PRRSV N 蛋白的抗体,可以体现早期抗体及主要结构蛋白 N 抗体水平,但是均不能有效说明机体内特异性中和抗体水平,不能客观地体现机体抵抗病毒的能力和疫苗免疫效果。因此有必要开发出一种能检测 PRRSV GP5 蛋白产生的特异性抗体的商品化试剂盒。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题在于,选取核苷酸同源性较高的 HP PRRSV GZJL 株,通过 PRRSV GP5 基因原核表达载体的构建与表达,建立基于表达产物 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 方法,并进行条件优化,以便制备成商品化 iELISA 试剂盒。该 iELISA 试剂盒的发明,将为 PRRS 疫苗免疫效果的评价,提供一种更加客观和有效的指标,减少了生产中 PRRS 疫苗免疫的盲目性,为 PRRS 的免疫防控提供技术支撑。

[0006] 基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒其组成包括:50~200 μL 重组蛋白包被、包被缓冲液 25mL-40mL、酶标二抗 300-500 μL、1×PBST 缓冲液 800mL-1000mL、阳性对照 1mL、阴性对照 1mL、封闭缓冲液 25mL-40mL、底物液 A10mL-15mL、底物液 B10mL-15mL 和终止液

10mL-15mL。

[0007] 所述的重组蛋白包被为重组蛋白使用包被缓冲液稀释为 1.8 mg/100 μ L ~3 mg/100 μ L;重组蛋白为 PRRSV GP5 基因通过大肠杆菌 BL21 (DE3)表达系统获得 GP5 蛋白,并通过 His • Bind Purification Kit 进行重组蛋白纯化,经 SDS-PAGE 分析后得到纯化目的蛋白;包被缓冲液为:Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g溶于去离子水中,定容至 1000 mL,调至 pH 9.5 ~ 9.8。

[0008] 所述的酶标二抗为:羊抗猪 IgG-HRP。

[0009] 所述的 1×PBST 缓冲液为: NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、KH₂PO₄ 0.2 g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 2.9 g、Tween-20 0.5 mL溶于 800 mL 蒸馏水,调整 pH 为 7.2 ~ 7.6,定容至 1000 mL。

[0010] 所述的阳性对照为通过 PRRS 分离毒临床感染猪获得的高免血清,使用时用血清稀释液按 1:10 ~ 1:200 倍稀释;所述的阴性对照为未感染且未免 PRRS 疫苗的猪血清,稀释度为 1:10 ~ 1:200。

[0011] 所述的封闭缓冲液为:BSA0.3 g (0.1 ~ 0.5 g)溶于 100 mL PBST 缓冲液;所述底物液 A 为:Na₂HPO₄ 14.60 g、柠檬酸 9.33 g 和过氧化氢脲 0.52 g,溶于三蒸水,并定容至 1000 mL,调至 pH 5.0 ~ 5.4;所述底物液 B 为:TMB 20mg 和无水乙醇 10 mL,加双蒸水至 1 000 mL,过滤除菌,无菌分装。

[0012] 所述的终止液为:0.2 % ~ 0.3% HF 溶液。

[0013] 基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒的制备方法,它包括以下步骤:

第一,原核表达系统表达融合蛋白 His-dGP5,并经 His • Bind Purification Kit 纯化得到融合蛋白,应用 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析其纯化效果及反应原性;

第二,步骤一的纯化融合蛋白 His-dGP5 作为包被抗原,进行抗原包被液浓度、抗原包被条件、封闭液、血清稀释度、封闭时间、酶标二抗稀释浓度和显色反应时间 iELISA 的条件的优化;

第三,取 40 份已知 PRRS 抗体阴性的猪血清,按步骤二确定的最佳反应条件,进行 iELISA 反应。样本 OD₆₃₀ 值 \geq 阴性样本 OD₆₃₀ 值的平均值 (X) +3 (标准差),可在 99% 的水平上判为阳性,当样本 OD₆₃₀ 值 < 阴性样本 OD₆₃₀ 值的平均值 (X) +3 (标准差) 时,判为阴性。

[0014] 本发明有益效果:本发明方法适用于检测猪血清 PRRSV GP5 IgG,能够体现机体内中和抗体水平,将为 PRRS 疫苗免疫效果的评价,提供一种更加客观和有效的指标,减少了生产中 PRRS 疫苗免疫的盲目性,为 PRRS 的免疫防控提供技术支撑。本发明与现有技术相比,具有以下技术优势和积极效果:

(1) 效果好:GP5 抗体水平能够较好的体现机体抵抗 PRRSV 侵袭和疫苗免疫效果,减少了生产中 PRRS 疫苗免疫的盲目性,降低猪场的生产成本。

[0015] (2) 相对于进口的全病毒包被 ELISA 试剂盒约 5000 元的销售价格,本发

明的 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒单个成本价仅 500 元,能够极大降低 PRRS 血清抗体监测成本。

附图说明

[0016] 图 1 为本发明的 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒制备生产流程图。

具体实施方式

[0017] 本发明的实施例：

基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒原料组成为：

PRRS 标准阳性和标准阴性血清；重组蛋白为 PRRSV GP5 基因通过大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达系统获得 GP5 蛋白，并通过 His·Bind Purification Kit 进行重组蛋白纯化，经 SDS-PAGE 分析后得到纯化目的蛋白，使用包被缓冲液稀释为 1.8 mg/100 μ L ~3 mg/100 μ L；包被缓冲液：Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g 溶于去离子水中，定容至 1000mL，调至 pH 9.6；酶标二抗：羊抗猪 IgG-HRP；1×PBST 缓冲液：NaCl 8.0g、KCl 0.2g、KH₂PO₄ 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、Tween-20 0.5mL 溶于 800mL 蒸馏水，调整 pH 为 7.4，定容至 1000mL；封闭缓冲液：BSA 0.3g 溶于 10mL PBST 缓冲液；底物液 A：Na₂HPO₄ 14.60g、柠檬酸 9.33 g、过氧化氢脲 0.52 g，溶于三蒸水，并定容至 1 000 mL，调至 pH 5.2；底物液 B：TMB 20mg、无水乙醇 10 mL，加双蒸水至 1 000 mL，过滤除菌，无菌分装；终止液：0.25% HF 溶液；

如图 1 所示意，本发明的 iELISA 试剂盒的制备方法为：

第二，原核表达系统表达融合蛋白 His-dGP5，并经 His·Bind Purification Kit

纯化得到融合蛋白浓度为 2.4 mg/mL，应用 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析其纯化效果及反应原性；

第二，步骤一的纯化融合蛋白 His-dGP5 作为包被抗原 iELISA 的条件优化为：iELISA 方法最佳反应条件为：抗原包被液浓度 1.0 μ g/100 μ L；血清稀释度 1:10；抗原包被条件 37℃ 1h 再室温 12h；封闭液 0.1%BSA，封闭时间 1h；酶标二抗稀释浓度 1:2000；显色反应时间 15min；

第三，取 40 份已知 PRRS 抗体阴性的猪血清，按步骤二确定的最佳反应条件，进行 iELISA 反应。样本 OD₆₃₀ 值 \geq 阴性样本 OD₆₃₀ 值的平均值 (X)+3 (标准差)= 0.285，可在 99% 的水平上判为阳性；因此当样本 OD₆₃₀ 值 \geq 0.285 时，判为阳性；当样本 OD₆₃₀ 值 < 0.285 时，判为阴性；

第四，基于重组 PRRSV GP5 蛋白间接 ELISA 试剂盒的最佳使用步骤与方法确定

①以 2.4 mg/100 μ L 重组 PRRSV GP5 蛋白包被 ELISA 反应板，4℃ 作用 12h-16h 后，应用 PBST 洗涤 ELISA 反应板 5 次；②以 0.3mg/100 μ L 的 BSA 溶液封闭 ELISA 反应板，37℃，封闭 1h-3h 后，应用 PBST 洗涤 ELISA 反应板 5 次；③将待检血清用 PBST 做 1：10 倍稀释，按 100 μ L 加入 ELISA 反应板，37℃ 作用 1h 后，应用 PBS 洗涤 ELISA 反应板 5 次；④将羊抗猪 IgG-HRP 用 PBST 做 1:2000 倍稀释，按 100 μ L 加入 ELISA 反应板，37℃ 作用 1h 后，应用 PBST 洗涤 ELISA 反应板 5 次；⑤将底物液 A 和 B 各 50 μ L 加入 ELISA 反应板，避光室温显色 15min，加入 50 μ L 终止液，立即在酶标仪 630nm 波长下读取 OD 值。⑥试验结果判定标准为样本 OD₆₃₀ 值 (样本 OD₆₃₀ 值 > 阴性样本 OD₆₃₀ 值的平均值 (X) + 3 标准差 (SD)) \geq 0.285 为阳性，OD₆₃₀ 值 < 0.285 为阴性；

第五，应用步骤三建立的 iELISA 方法，检测 PRRS 标准阳性血清的 OD₆₃₀ 值为 1.232；猪圆环病毒病标准阳性血清、猪瘟标准阳性血清、猪伪狂犬病标准阳性血清、猪细小病毒病标准阳性血清、猪乙型脑炎标准阳性血清的 OD₆₃₀ 值为 0.112 ~ 0.245，确定特异性良好；

第六，应用步骤三建立的 iELISA 方法，批内及批间重复性试验变异系数为均 \leq 15.0%，

确定该 iELISA 批内重复性及批间重复性良好；

第七,应用步骤三建立的 iELISA 方法,检测 368 份中和试验检测的临床猪血清样本,阳性率为 55.4% (204/368),确定其临床适用性良好；

第八,步骤五、步骤六和步骤七合格即制得基于 PRRSV GP5 蛋白的 iELISA 试剂盒
以上第一至第七步骤中按照原料配比进行。

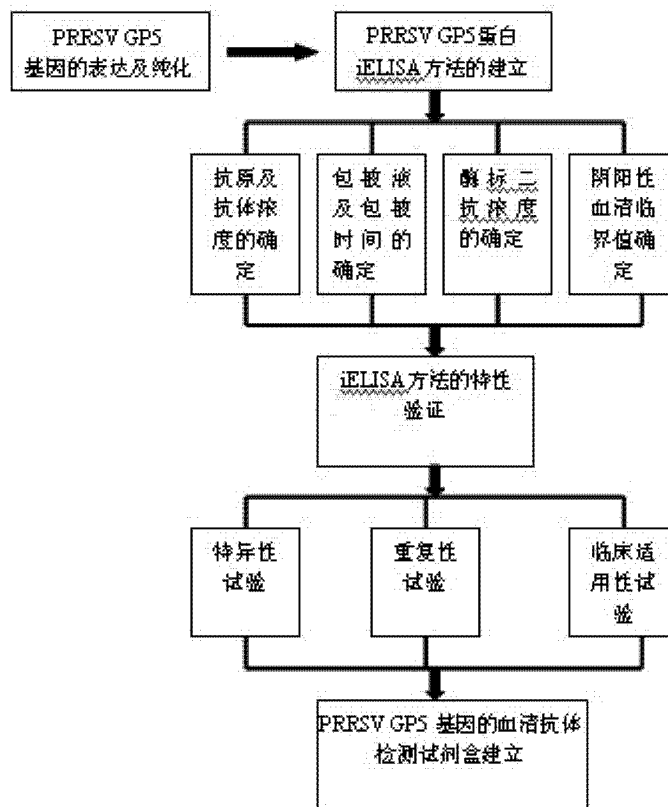


图 1

专利名称(译)	一种基于PRRSV GP5蛋白的iELISA试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN102353778A	公开(公告)日	2012-02-15
申请号	CN201110189010.0	申请日	2011-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	贵州大学		
申请(专利权)人(译)	贵州大学		
当前申请(专利权)人(译)	贵州大学		
[标]发明人	王开功 陈军义 程振涛 文明 周碧君 方英		
发明人	王开功 陈军义 程振涛 文明 周碧君 方英		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于PRRSV GP5蛋白的iELISA试剂盒及制备方法，其组成包括：重组蛋白包被50~200 μ L、包被缓冲液25mL-40mL、酶标二抗300-500 μ L、1 \times PBST缓冲液800mL-1000mL、阳性对照1mL、阴性对照1mL、封闭缓冲液25mL-40mL、底物液A10mL-15mL、底物液B10mL-15mL和终止液10mL-15mL。本发明能监测猪血清PRRSV GP5蛋白抗体，将为PRRS疫苗免疫效果的评价，提供一种更加客观和有效的指标，减少了生产中PRRS疫苗免疫的盲目性，为PRRS的免疫防控提供技术支撑。

