



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102297969 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 201110135753. X

代理人 林天凯

(22) 申请日 2011. 05. 25

(51) Int. Cl.

(83) 生物保藏信息

CCTCC C201122 2011. 04. 15

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

C07K 16/10 (2006. 01)

(71) 申请人 福建省农业科学院畜牧兽医研究所

地址 350011 福建省福州市晋安区新店埔党

申请人 陈仕龙

陈少莺

林锋强

程晓霞

朱小丽

王劭

李兆龙

(72) 发明人 陈仕龙 陈少莺 林锋强 程晓霞

朱小丽 王劭 李兆龙

(74) 专利代理机构 福州展晖专利事务所 35201

权利要求书 2 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法,采用仅能识别传统美洲型 PRRSV 毒株的单抗 Mab-B47,以及能够识别包括传统美洲型和变异型在内的所有美洲型 PRRSV 毒株的单抗;应用单抗能识别不同类型 PRRSV 毒株的特性,分别标记 FITC,挑选不同的荧光单抗建立能区分传统美洲型 PRRS 和变异型 PRRS 的免疫荧光诊断方法,该方法的检测时间为 40min,与病毒分离符合率达 92.5%,与 RT-PCR 检测试剂盒的符合率达 92.2%。本发明的优点在于:表明该方法试验结果准确、可靠,可用于传统美洲型和变异型 PRRS 的鉴别诊断,具有很好的临床应用价值。

1. 一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法, 其特征在于: 将一种仅能识别传统美洲型 PRRSV 的杂交瘤细胞 Mab-B47 株, 和一株能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株, 分别进行复苏、扩大培养, 并制备相应的腹水, 将腹水进行分离, 取上清液为腹水单克隆抗体, 测定其 IFA 效价腹水单抗 IFA 效价在 1×10^3 以上, 分装后 -40°C 保存, 备用;

将两种腹水单克隆抗体测定蛋白浓度后, 蛋白含量应大于 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别以 pH9.2-PH9.5 碳酸盐缓冲液稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后, 各自装入透析袋中, 根据待标记蛋白质的总量, 取需要量的荧光素, 荧光素的用量相当与蛋白质含量的 1/20, 其计量单位是重量计, 用 pH9.2-PH9.5 碳酸盐缓冲液溶解, 其量为待标记蛋白液体积的 10 倍, 溶解时轻轻搅拌, 避免气泡, 而后将透析袋置于荧光素溶解液中, 搅拌器上 4°C 闭光搅拌标记 24 h;

将上述两种已标记好的荧光单抗分别加入 Sephadex G50 柱, 用灭菌 PBS 洗脱, 收集有荧光的第一峰, 测定第一峰各收集液的荧光效价, 将阳性管合并, 即为鉴别传统美洲型 PRRS 和变异型 PRRS 的免疫荧光诊断试剂, -40°C 保存。

2. 根据权利要求 1 所述的鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法, 其特征在于: 所述的免疫荧光诊断试剂的技术指标为: (1) Mab-B47、和能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株荧光抗体的效价应 $\geq 1:32$;

(2) Mab-B47 荧光抗体仅与传统美洲型 PRRSV 反应, 与正常 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应, 能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株荧光抗体能够与所有的美洲型 PRRSV 反应, 与正常 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应;

(3) 荧光抗体在 -20°C 条件下保存期为 6 个月;

(4) 荧光抗体 DFA 与 IFA 检测的符合率在 95% 以上;

(5) DFA 与 VI 总符合率在 90% 以上, DFA 与 RT-PCR 之间的总符合率在 90% 以上;

(6) 诊断试剂的检测时间为 30-60min。

3. 根据权利要求 2 所述的鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法, 其特征在于: 两种腹水单克隆抗体的制备方法具体为取杂交瘤细胞 Mab-B47、和一株能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株, 分别复苏后经扩大培养, 腹腔注射 10 ~ 12 周龄 Balb/c 小鼠, 预先用灭菌液体石蜡诱导, 每只小鼠 1×10^6 个细胞, 待小鼠腹部明显膨大时, 引流收集腹水, 于 10000 r/min 离心 15 min, 取上清液即为腹水单克隆抗体, 测定其 IFA 效价, 分装后 -40°C 保存, 备用。

4. 根据权利要求 3 所述的鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法, 其特征在于: 所述的搅拌器为磁力搅拌器。

5. 根据权利要求 1 至 4 任何一项所述的鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法, 其特征在于: 所述的能够识别包括传统美洲型和变异型在内的所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株为 Mab-C65、Mab-D4。

6. 根据权利要求 5 所述的鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法, 其特征在于: 所述的免疫荧光诊断试剂在临床鉴别诊断中的最佳应用为: 组织冷冻切片厚度为 0.1-0.3mm, 采用甲醇 / 丙酮固定法(即先经 100% 冷冻甲醇作用 5min 后, 再经 100% 冰冻丙酮作用 5min; 或者先用冰丙酮固定再用冰甲醇固定的固定方法),

抗体稀释液为 1%BSA-PBS, 荧光抗体经 1:32 倍稀释为最佳反应条件。

一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的 免疫荧光试剂的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的试剂,特别是一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(俗称猪蓝耳病, 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,以成年母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为主要症状的猪传染病。分为美洲型和欧洲型两个基因型。我国自 1996 年以来流行的是美洲型 PRRSV。变异型猪繁殖与呼吸综合征是 2006 年以来流行于中国,由美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株引起的一种急性高致死性疫病,主要表现为猪高热(41℃以上)、高发病率、高死亡率、低治愈率,对任何日龄的猪都敏感。现有免疫学快速诊断方法不能区分传统 PRRSV 和变异型 PRRSV;只有 RT-PCR 试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒可用于传统 PRRSV 和变异型 PRRSV 的鉴别诊断,但操作繁琐、试验条件要求高,不适合兽医临床和基层对 PRRS 的快速诊断。

[0003]

发明内容

[0004] 本发明目的在于克服现有技术不同之处而提供一种快速、简便、易于基层推广应用的鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法。

[0005] 本发明是通过如下技术方案来实现的:

一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法,将一种仅能识别传统美洲型 PRRSV 的杂交瘤细胞 Mab-B47 株,保藏在 CCTCC(中国典型培养物保藏中心),保藏日 2011 年 4 月 15 日,保藏编号:CCTCC C201122,和一株能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株,分别进行复苏、扩大培养,并制备相应的腹水,将腹水进行分离,取上清液为腹水单克隆抗体,测定其 IFA 效价,腹水单抗的 IFA 效价在 1×10^3 以上,分装后 -40°C 保存,备用;

将两种腹水单克隆抗体测定蛋白浓度后,蛋白浓度应大于 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别以 pH9.2-PH9.5 碳酸盐缓冲液稀释成稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,各自装入透析袋中,根据待标记蛋白质的总量,取需要量的荧光素,荧光素的用量相当与蛋白质含量的 1/20(其计量单位是重量计),用 pH9.2-PH9.5 碳酸盐缓冲液溶解,其量为待标记蛋白液体积的 10 倍,溶解时轻轻搅拌,避免气泡,而后将透析袋置于荧光素溶解液中,搅拌器上 4°C 闭光搅拌标记 24 h。

[0006] 将上述两种已经标记的荧光单抗分别加入 Sephadex G50 柱,用灭菌 PBS 洗脱,收集有荧光的第一峰,测定第一峰各收集液的荧光效价,将阳性管合并,即为鉴别传统美洲型 PRRS 和变异型 PRRS 的免疫荧光诊断试剂, -40°C 保存。

[0007] 采用本方法制备的试剂具有特异性好、敏感性高、操作简便、快速等特点,能对疑似 PRRS 的病猪进行准确诊断。

[0008] 所述的免疫荧光诊断试剂的特性为:

(1) Mab-B47、和能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株荧光抗体的效价应 $\geq 1:32$ 。

[0009] (2) Mab-B47 荧光抗体仅与传统美洲型 PRRSV 反应,与正常 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应。能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株荧光抗体能够与所有的美洲型 PRRSV 反应,与正常 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应。

[0010] (3) 荧光抗体在 -20°C 条件下保存期为 6 个月。

[0011] (4) 荧光抗体 DFA 与 IFA 检测的符合率在 95% 以上。

[0012] (5) DFA 与 VI 总符合率在 90% 以上,DFA 与 RT-PCR 之间的总符合率在 90% 以上。

[0013] (6) 诊断试剂的检测时间为 30-60min。

[0014] 两种腹水单克隆抗体的制备方法具体为取杂交瘤细胞 Mab-B47、和一株能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株,分别复苏后经扩大培养,腹腔注射 10 ~ 12 周龄 Balb/c 小鼠,预先用灭菌液体石蜡诱导,每只小鼠 1×10^6 个细胞,待小鼠腹部明显膨大时,引流收集腹水,于 10 000r/min 离心 15 min,取上清液即为腹水单克隆抗体,测定其 IFA 效价,分装后 -40°C 保存,备用。

[0015] 所述的搅拌器为磁力搅拌器。

[0016] 本发明的鉴别传统美洲型 PRRS 和变异型 PRRS 的免疫荧光诊断试剂可应用于检测染毒细胞以及临床鉴别诊断。

[0017] 所述的能够识别包括传统美洲型和变异型在内的所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株为 Mab-C65、Mab-D4。

[0018] 本发明免疫荧光诊断试剂在临床鉴别诊断中的最佳应用为:组织冷冻切片厚度为 0.1-0.3mm,采用甲醇/丙酮固定法(即先经 100% 冷冻甲醇作用 5min 后,再经 100% 冰冻丙酮作用 5min;或者先用冰丙酮固定再用冰甲醇固定的固定方法),抗体稀释液为 1%BSA-PBS,荧光抗体经 1:32 倍稀释为最佳反应条件。

[0019] 综上所述,本发明相比现有技术具有如下优点:

采用仅能识别传统美洲型 PRRSV 毒株的单抗 Mab-B47,以及能够识别包括传统美洲型和变异型在内的所有美洲型 PRRSV 毒株的单抗;应用单抗能识别不同类型 PRRSV 毒株的特性,分别标记 FITC,挑选不同的荧光单抗建立能区分传统美洲型 PRRS 和变异型 PRRS 的免疫荧光诊断方法,该方法的检测时间为 40min,与病毒分离符合率达 92.5%,与 RT-PCR 检测试剂盒的符合率达 92.2%。应用该诊断方法对 87 份临床疑似病例和 12 份人工感染病例进行检测,表明该方法试验结果准确、可靠,可用于传统美洲型和变异型 PRRS 的鉴别诊断,具有很好的临床应用价值。

[0020] 为了更好的说明本发明效果,申请人还对荧光单抗在鉴别人工感染病例及临床病例中进行初步应用,以下是应用情况:

1:人工感染猪及病料的采集

28 日龄、PRRSV 抗体阴性健康仔猪 12 头,随机分成 3 组,4 头/组。第一组用变异株

PRRSV-FJ0605 第 7 代病毒培养物 ($10^{4.0}$ TCID₅₀/mL) 经滴鼻、肌注途径接种, 剂量为 2mL/ 头; 第二组用传统美洲株 PRRSV-FZ ($10^{4.5}$ TCID₅₀/mL) 经滴鼻、肌注途径接种, 剂量为 2mL/ 头; 第三组为未攻毒健康对照猪。三组隔离饲养, 每日观察临床反应, 于病毒接种后 8 d 每组迫杀 2 头, 14d 剖杀 2 头, 采集肺、肺门淋巴结, 制作冰冻切片和组织匀浆, 用于病毒分离、免疫荧光检测、RT-PCR 检测的符合率比较。

[0021] 2 人工感染猪组织样品的 DFA 检测结果

变异株攻毒组中, 肺门淋巴结和肺脏检出率为 100%, 且荧光信号很强; 传统美洲猪攻毒组在肺脏和肺门淋巴结中检测到阳性抗原, 但荧光信号比变异株攻毒组弱; 健康对照猪各组织样品检测结果均为阴性。

[0022] 3 人工感染猪 DFA、RT-PCR、VI 三种检测方法的符合率比较

分别采集每头攻毒猪的肺脏、淋巴结、肾脏等组织, 制成匀浆在 Marc145 细胞中进行病毒分离, 待出现细胞病变时, 用 PRRSV 单抗进行免疫荧光验证; 取攻毒猪内脏匀浆, 提取核酸, 按照 PRRSV RT-PCR 鉴别诊断试剂盒进行检测。结果, 变异株攻毒组 4 头猪病毒分离和 RT-PCR 均为阳性, DFA、RT-PCR、VI 三者之间的符合率为 100%。传统美洲株攻毒组 4 头猪 RT-PCR 均为阳性, 而只有 3 头攻毒猪 VI 及 DFA 检测均是阳性。DFA 与 RT-PCR 之间的符合率为 75%, DFA 与 VI 的符合率为 100%。

[0023] 4 人工感染和确诊病料 DFA 检测与 VI 及 RT-PCR 检测的总符合率比较

本研究共对 12 份人工感染病料及 15 份临床确诊病料进行了 VI 和 DFA 符合率统计。变异型 PRRS 9 份, 病毒分离、RT-PCR 和 DFA 检测均为阳性。传统型 PRRS 9 份, 病毒分离阳性数 7 份, 阴性 2 份; DFA 检测阳性数 8 份, 阴性 1 份; RT-PCR 检测都是阳性。9 份阴性病料三种方法检测都是阴性。DFA 与 VI 的阳性符合率为 94%(16/17), 阴性符合率为 91%(10/11), DFA 与 VI 的总符合率为 92.5%。DFA 与 RT-PCR 之间的阳性符合率为 94% (17/18), 阴性符合率为 90% (9/10), DFA 与 RT-PCR 之间的总符合率为 92.2%。

[0024] 临床应用效果评价: 应用试剂盒对 87 份临床疑似病例和 12 份人工感染病例进行检测, 结果该试剂盒与 VI 或 RT-PCR 的符合率在均在 90% 以上, 检测时间为 30-60min。显示该试剂盒试验结果准确、可靠, 可用于传统美洲型和变异型 PRRS 的鉴别诊断, 具有很好的临床应用价值。

[0025] 抗美洲型 PRRSV 杂交瘤细胞 Mab-B47 株, 保藏在 CCTCC (中国典型培养物保藏中心, 地址: 湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学), 保藏日 2011 年 4 月 15 日, 保藏编号: CCTCC C201122。

具体实施方式

[0026] 以下结合具体实施例对本发明进一步说明。

[0027] 实施例 1

抗 PRRSV 的杂交瘤细胞 Mab-B47 株, 具有如下特性: 该细胞株特异性单克隆抗体仅传统美洲型 PRRSV 反应, 与 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应, 杂交瘤细胞上清液和腹水的抗体的 IFA 效价分别在 2^4 和 10^3 以上。Mab-B47 保藏在 CCTCC (中国典型培养物保藏中心), 保藏日 2011 年 4 月 15 日, 保藏编号: CCTCC C201122。

[0028] 本发明所述的上述抗 PRRSV 的杂交瘤细胞 Mab-B47 株、Mab-C65 联合应用于传统

美洲型 PRRS 和变异型 PRRS 的免疫荧光诊断的制备方法：

(1) 从液氮中取出杂交瘤细胞 Mab-B47 株、Mab-C65 株，复苏后经扩大培养，腹腔注射 10 ~ 12 周龄 Ba1b/c 小鼠(预先用灭菌液体石蜡诱导)，每只小鼠 1×10^6 个细胞，待小鼠腹部明显膨大时，用 12 号针头引流收集腹水，于 10 000r/min 离心 15 min，取上清液即为腹水单克隆抗体，分别测定其 ELISA 和 IFA 效价，分装后 -40℃ 保存，备用。

[0029] (2) 单抗的荧光标记

将 Mab-B47、Mab-C65 腹水单克隆抗体测定蛋白浓度后，以 pH9.2-PH9.5 碳酸盐缓冲液稀释成一定浓度后，装入透析袋中。根据待标记 IgG 的总量，取需要量的荧光素(相当与蛋白质含量的 1/20)，用 pH9.2-PH9.5 碳酸盐缓冲液溶解在烧杯中，其量为待标记蛋白液体积的 10 倍，溶解时轻轻搅拌，避免气泡。将透析袋置于烧杯中，磁力搅拌器上 4℃ 闭光搅拌标记 24 h；将透析袋取出于 $0.01 \text{ Mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.2 PBS 中 4℃ 透析 4 h ~ 5 h，中间换液数次，充分除盐。

[0030] (3) 荧光抗体纯化

应用 Sephadex G50 柱除去游离 FITC。将上述已透析除盐的 FITC 标记抗体加入 Sephadex G50 柱，用灭菌 PBS 洗脱，收集有荧光的第一峰，测定第一峰各收集液的荧光效价，将阳性管合并，即为标记抗体，保存于 -40℃ 备用。

[0031] 所述的免疫荧光诊断试剂的特性为：

(1) Mab-B47、和能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株荧光抗体的效价应 $\geq 1:32$ 。

[0032] (2) Mab-B47 荧光抗体仅与传统美洲型 PRRSV 反应，与正常 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应。能够识别所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株荧光抗体能够与所有的美洲型 PRRSV 反应，与正常 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒均无交叉反应。

[0033] (3) 荧光抗体在 -20℃ 条件下保存期为 6 个月。

[0034] (4) 荧光抗体 DFA 与 IFA 检测的符合率在 95% 以上。

[0035] (5) DFA 与 VI 总符合率在 90% 以上，DFA 与 RT-PCR 之间的总符合率在 90% 以上。

[0036] (6) 诊断试剂的检测时间为 30-60min。

[0037] 下面说明免疫荧光诊断试剂在检测染毒细胞的操作程序。

[0038] (1)：PRRSV 感染细胞的制备

将 Marc-145 细胞培养于 96 孔细胞板，37℃ 5%CO₂ 条件下培养至细胞单层后，分别接种传统美洲型及变异型 PRRSV 毒株，接种量为 100 个 TCID₅₀。当细胞病变达 30 % 左右时，弃上清液，PBS 洗涤 1 次，每孔加入冷甲醇 100 μL，4℃ 固定 30 min，甩干，PBS 洗涤 1 次，-40℃ 冻存储备用。同时设正常 Marc-145 细胞为阴性对照。

[0039] (2) DFA 检测

取染毒细胞板，用 PBS 孔浸洗后，每孔加入一定量用 1%BSA-PBS 稀释的荧光标记抗体工作液，置于湿盒内，37℃ 感作 30min 后取出。轻轻倒掉荧光抗体染液并用滤纸吸干，用 PBS 200 μL/孔洗几次，最后每孔加抗荧光衰减封片剂(50% 甘油 -PBS)，于荧光倒置显微镜下观察结果，拍照。同设未接种病毒的正常 Marc-145 细胞孔作为阴性对照。

[0040] (3) 荧光抗体效价测定

将荧光抗体用含 1%BSA 的 PBS 进行 2 倍比梯度稀释后,分别加入 PRRSV 毒株感染的 Marc145 细胞进行荧光抗体染色,同时设未染毒的阴性细胞对照。以出现清晰明亮的特异性荧光(++) 的最大稀释度,即为该荧光抗体的效价。结果,荧光抗体的效价为 1:64~1:128。为保证荧光抗体的特异性强度,并且能够消除正常组织细胞的非特异性荧光反应,实际工作浓度为 1:32。

[0041] (4) 荧光抗体特异性测定

在 96 孔细胞培养板中进行。将荧光抗体适当稀释后,分别与 PRRSV、PRV、PPV、CSFV、TGEV、PCV2、MPV、NDRV 等感染细胞及正常细胞作用 30min 后,以生理盐水洗涤 3 次,每孔加 50% 甘油 -PBS 50 μ l,倒置荧光显微镜下观察。结果显示:PRRS 荧光抗体与 PRRSV 感染细胞呈阳性反应,在胞浆中呈现特异的亮绿色荧光,DFA 的荧光特性与 IFA 相同;而其它病毒感染细胞及正常 Marc145 细胞均无交叉反应。初步表明制备的荧光抗体与其它多种猪病毒抗原无特异性交叉,有较好的特异性,可用于 PRRSV 感染细胞的鉴定。

[0042] (5) DFA 与 IFA 检测染毒细胞的符合率比较

分别取 B47 和 C65 荧光抗体在 PRRSV 感染细胞和正常对照细胞中进行直接免疫荧光试验(DFA),同时用相同的单抗进行相应的 IFA 试验,并进行 3 次重复。结果,DFA 检测特性与 IFA 相符,在 Marc145 染毒细胞进行重复试验,两中方法的符合率为 100%,表明荧光标记抗体的联合应用,可用于各类 PRRSV 感染细胞的鉴定。

[0043] (6) 荧光抗体的保存期测定

取 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存荧光抗体,每个月进行一次 DFA 试验,观察抗体效价变化,测定荧光抗体在 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存期为 6 个月。

[0044] 下面说明免疫荧光诊断试剂在临床诊断中的操作程序。

[0045] 一: PRRSV DFA 反应条件的优化

(1) 冰冻切片的制备

制作病料切片,采取疑似 PRRS 病料,切取黄豆大小肺脏和肺门淋巴结组织块,放置于组织固着器上并冷冻,待组织块冷冻后将其装到切片机上,调整好位置后,切取 0.1~0.3mm 的组织薄片,粘附在载玻片上。

[0046] (2) 固定剂和固定方法的选择

制备健康猪及 PRRS 感染猪的肺门淋巴结切片,分别用冰甲醇和冰丙酮采用以下 4 种固定方法进行固定:(1) 100% 冰冻甲醇,作用 10min;(2) 50% 冰冻甲醇 /50% 冰冻丙酮混合液,作用 10min;(3) 100% 冰冻甲醇,作用 5min,移出后,冰冻丙酮,作用 5min;或者先用冰丙酮作用 5min 再冰甲醇作用 5min (4) 100% 冰冻丙酮,作用 10min。固定好的切片加入用 1%BSA-PBS 稀释的荧光单抗,37 $^{\circ}$ C 作用 30min 后,用 PBS 充分洗涤,加入甘油 -PBS 进行封片后荧光显微镜观察。比较不同固定剂和固定方法染色效果及非特异染色情况,从而确定出最佳固定条件。结果,采用(2) 方法即:100% 冰冻甲醇,作用 5min,移出后,100% 冰冻丙酮,作用 5min 或者先用冰丙酮固定后再用冰甲醇作用的固定方法,切片 DFA 检测背景好、无非特异荧光染色,组织细胞形态完整、阳性荧光病灶视野清晰。而其它三组固定方法有一定的非特异荧光染色,容易造成假阳性的判定。

[0047] (3) 荧光抗体最佳稀释液的选择

组织切片中除了目的抗原以外,还可能存在类属抗原,可与组织中特异性抗原以外的

相应抗体结合,这就需要在试验时用稀释液来封闭能和组织中有交叉反应的位点。分别采用 PBS、0.5%BSA-PBS、1%BSA-PBS、2%BSA-PBS 将荧光抗体稀释成最佳工作浓度,分别对健康猪及 PRRS 感染猪的肺门淋巴结切片进行 DFA 荧光染色,确定荧光抗体的最佳稀释液。结果,荧光抗体用 PBS 稀释,切片的非特异性假阳性荧光染色较多,不易与阳性病灶的阳性区分;用含不同浓度牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 稀释后,非特异性荧光随着 BSA 浓度的提高而减少,但荧光抗体的敏感度随着 BSA 浓度的提高而略有下降,所以实际工作时,选择 1%BSA-PBS 作为荧光抗体的稀释液。

[0048] 通过反复试验,最终确定组织冷冻切片采用甲醇/丙酮固定法,抗体稀释液为 1%BSA-PBS,荧光抗体经 1:32 倍稀释为最佳反应条件。

[0049] 实施例 2

实施例 2 与实施例 1 大致相同,就是将能够识别包括传统美洲型和变异型在内的所有美洲型 PRRSV 毒株的杂交瘤细胞株 Mab-D4 替换 Mab-C65。

专利名称(译)	一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法		
公开(公告)号	CN102297969A	公开(公告)日	2011-12-28
申请号	CN201110135753.X	申请日	2011-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院畜牧兽医研究所 陈仕龙 陈少莺 林锋强 程晓霞 朱小丽 王劲 李兆龙		
申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院畜牧兽医研究所 陈仕龙 陈少莺 林锋强 程晓霞 朱小丽 王劲 李兆龙		
当前申请(专利权)人(译)	福建省农业科学院畜牧兽医研究所 陈仕龙 陈少莺 林锋强 程晓霞 朱小丽 王劲 李兆龙		
[标]发明人	陈仕龙 陈少莺 林锋强 程晓霞 朱小丽 王劲 李兆龙		
发明人	陈仕龙 陈少莺 林锋强 程晓霞 朱小丽 王劲 李兆龙		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 C07K16/10		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鉴别诊断传统美洲型和变异型猪繁殖与呼吸综合症的免疫荧光试剂的制备方法，采用仅能识别传统美洲型PRRSV毒株的单抗Mab-B47，以及能够识别包括传统美洲型和变异型在内的所有美洲型PRRSV毒株的单抗；应用单抗能识别不同

类型PRRSV毒株的特性，分别标记FITC，挑选不同的荧光单抗建立能区分传统美洲型PRRS和变异型PRRS的免疫荧光诊断方法，该方法的检测时间为40min，与病毒分离符合率达92.5%，与RT-PCR检测试剂盒的符合率达92.2%。本发明的优点在于：表明该方法试验结果准确、可靠，可用于传统美洲型和变异型PRRS的鉴别诊断，具有很好的临床应用价值。