



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105424928 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201510764619. 4

G01N 33/531(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 11. 11

(71) 申请人 山西隆克尔生物制药有限公司

地址 030801 山西省晋中市太谷县山西农业大学南

申请人 吕宏亮 张澍

(72) 发明人 张澍 吕宏亮

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139

代理人 孙皓晨 马鑫

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

权利要求书3页 说明书15页
序列表1页

(54) 发明名称

一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用。所述层析条是由样品垫、胶体金结合的垫、硝酸纤维素膜、吸收垫在 PVC 板上顺次相互搭接而成,其中所述胶体金结合的垫为喷涂有胶体金标记的 PRRSV M 蛋白的玻璃纤维纸,所述硝酸纤维素膜上具有作为捕获抗原的 PRRSV M 蛋白喷涂的检测线,以及兔抗 PRRSV M 蛋白多克隆抗体喷涂的控制线。PRRSV M 蛋白采用原核表达系统,通过融合使其可溶性表达以及方便纯化的标签、不同裂解剂筛选和组合,细菌膜抽提、镍离子亲和层析、抗麦芽糖抗体偶联的亲亲和层析纯化、凝胶层析纯化步骤使其纯度达 98% 以上并具有生物活性。本发明的免疫层析条可以快速、准确、特异地检测 PRRSV 抗体,灵敏度高,检测费用低廉。

1. 一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条,所述层析条是由样品垫、胶体金结合的垫、硝酸纤维素膜、吸收垫在 PVC 板上顺次相互搭接而成,其特征在于:所述胶体金结合的垫为喷涂有胶体金标记的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的玻璃纤维纸,所述硝酸纤维素膜上具有作为捕获抗原的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白喷涂的检测线,以及兔抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白多克隆抗体喷涂的控制线。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析条,其特征在于:所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白采用以下方法制备得到:

(1) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列的克隆

以猪繁殖与呼吸综合征病毒 RNA 为模板,RT-PCR 法合成猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列,RT-PCR 产物酶切后,与同样酶切的 pGEM-T 质粒连接,获得 pGEM-T-PRRSV-M 质粒;

(2) 合成带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列

以 pGEM-T-PRRSV-M 质粒为模板,设计引物合成带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列,合成的带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列酶切后,与同样酶切的表达质粒 pMAL-p2X 或 pMAL-c2X 连接;

(3) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白大肠杆菌中的表达

连接产物转化大肠杆菌,挑选阳性克隆,测序正确后,得到重组质粒 pMAL-p2X MBP-M-6×His;将含有重组质粒 pMAL-p2X MBP-M-6×His 的大肠杆菌接种 LB 培养基,按 1:200 ~ 1:1000 (V/V) 转接到含有 18L LB 培养基的 20L 的发酵罐中,以 250rpm 转速 37℃ 培养 4 ~ 6h,菌液 OD600 达到 0.5 ~ 0.7 时,按浓度 0.5 ~ 0.7mmol/L 加入 IPTG 诱导 4 ~ 6h,4000rpm 离心 25min,获得湿重为 110 ~ 120g/L 的细菌培养物;

(4) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的抽提和纯化

a 裂解剂筛选和细菌膜蛋白抽提

将步骤 (3) 得到的菌体培养物融化,重悬于缓冲液 1,用超声仪在冰浴中破碎细胞壁,超声液 100,000g、4-8℃ 离心 1 小时分离上清和沉淀,沉淀用溶解液溶解,加入裂解剂在 4℃ 搅拌 2h 抽提大肠杆菌膜蛋白,测定抽提物的活性,以确定总蛋白和裂解剂的比例,抽提物以 100,000g 超速离心 1 小时,获得可溶性上清,再用缓冲液 1 稀释至最终裂解剂浓度为 0.5-1.0% (w/v) 以便于后续纯化;

其中,所述的缓冲液 1 含有 20mM NaH_2PO_4 , 100mM NaCl, 1 μM 蛋白酶抑制剂 E-64、0.3mM 三羧甲基磷酸, pH 7.5;

所述的溶解液含有 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, pH 8.0;所述的裂解剂为 Triton X-100 和十二烷基- β -D-麦芽糖苷 (DDM) 的混合物,使用浓度均为 5.0-10% (w/v);

b 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白纯化

在 4℃ 条件下,10-20mL 直链淀粉介质装柱、用 3-5 倍柱体积的平衡溶液 1 平衡,含猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白的上清液以 2mL/min 的速度进行虹吸上样,上样后用 10 倍柱体积的平衡溶液 1 洗涤,再用 3 倍柱体积的不含 EDTA 的平衡溶液 1 洗涤,最后用 10 倍柱体积的洗脱溶液洗脱,收集洗脱液,测定蛋白含量、纯度;

其中,所述的平衡溶液 1 含有 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, 1mM EDTA,

1. 0% (w/v) Triton-X100, pH 8.0 ;

所述的洗脱溶液含有 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, 10mM 麦芽糖, pH 8.0, ;

c 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白的酶切

按 75-100ug 蛋白加入 1 单位的 Xa 因子进行常温反应 36-48h, 使酶切程度达到 90-95% ;

d 镍离子亲和层析纯化猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白

10mL Ni^{2+} 介质装柱, 用 5 倍柱体积的蒸馏水洗涤, 用 10 倍柱体积的缓冲液 2 平衡, 步骤 c 得到的酶切反应液上样于层析柱, 上样后用 10 倍柱体积的缓冲液 2 洗涤, 最后用含 0.25mmol 咪唑的缓冲液 2 洗脱, 收集镍离子柱洗脱液, 纯度检测达 90% 以上 ;

其中, 所述的缓冲液 2 含有 50mM 磷酸钠, 0.3mM NaCl, pH8.0 ;

e 抗麦芽糖抗体 Sepharose 4 亲和层析纯化

镍离子柱洗脱液和抗麦芽糖抗体偶联的 Sepharose 4 亲和介质混合后, 4°C 孵育 18-24 小时, 吸附除去 MBP, 收集流穿液, 流穿液室温 4000rpm 离心后收获上清液 ;

f 凝胶层析纯化

在步骤 e 得到的上清液中, 加入 Triton X-100 使其终浓度为 0.031% (w/v), 用截留值为 50kDa 的滤器离心浓缩至含 5-10mg/mL 蛋白, 使用 2500mL Superdex 20002/150 柱进行层析, 浓缩蛋白注射上样, 层析柱用平衡液 2 洗脱, 分步收集洗脱液, 检测纯度和含量, 合并收集第一峰洗脱液并用截留值为 100kDa 的超滤器透析浓缩, 获得高度纯化的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白, 纯度检测可达 98.0% 以上 ;

其中, 所述的平衡液 2 含有 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.3mM TCEP, 0.031% (w/v) Triton X-100, pH 7.2。

3. 根据权利要求 2 所述的免疫层析条, 其特征在于: 步骤 (1) 中所述的 RT-PCR 法的引物序列为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示; 步骤 (2) 中所述的引物的序列为 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示; 步骤 (3) 中所述的大肠杆菌为 B834-pRARE2; 步骤 (4) 中所述的总蛋白和裂解剂的比例为 1:4 (w/w)。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫层析条, 其特征在于: 胶体金标记的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白按照以下方法制备得到: 用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值为 6.5, 按照 40 μ g/ml 比例加入猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白, 混合 10min 后, 再加入 5% (w/w) 的牛血清白蛋白, 使其终浓度为 1% (w/v), 室温搅拌 20min, 在 4°C 2000g 离心 10min, 弃去沉淀, 4°C 12000g 离心 60min, 移去上清, 沉淀用 0.01M pH7.2PBS 缓冲液洗涤 2 次, 用 0.01M pH7.2PBS 缓冲液稀释备用。

5. 根据权利要求 4 所述的免疫层析条, 其特征在于: 胶体金颗粒的平均直径为 40.06 ± 0.7 nm, 所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的标记浓度为 40 μ g/ml。

6. 根据权利要求 1 所述的免疫层析条, 其特征在于: 所述的胶体金结合的垫是将浓度为 $OD_{523nm} = 2.0$ 的胶体金标记的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白以 15 μ l/cm 的速度喷涂到玻璃纤维纸上得到的, 所述的检测线是将浓度为 0.8mg/ml 的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白以 1.0 μ l/cm 的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的, 所述的控制线是将浓度为 1.0mg/ml 的兔抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白多克隆抗体以 1.0 μ l/cm 的速度喷涂到硝酸纤维膜

上得到的,检测线和控制线相隔 8mm。

7. 根据权利要求 1 所述的免疫层析条,其特征在于:所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白为 1 型猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白或 2 型猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白。

8. 根据权利要求 1 所述的免疫层析条,其特征在于:所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示。

9. 权利要求 1 所述的免疫层析条在制备检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体试剂中的应用。

一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫层析条,特别涉及一种简单、快速检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是最能危害猪养殖业病毒。猪感染 PRRSV 引起猪的呼吸衰竭,母猪流产、死胎。国内外上市猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗有灭活和减毒疫苗。

[0003] 猪繁殖与呼吸综合征病毒分欧洲型和美洲型,两型病毒核苷酸同源性达 60%,属于动脉炎病毒科,是正链单股 RNA 病毒。PRRSV 基因组含 10 个开放读码框架 (open readingframes, ORFs), ORF1a 和 ORF1b 编码非结构蛋白,包括复制酶, ORF2a、ORF3、ORF4、ORF5 分别编码膜相关的 N 糖基化结构蛋白 GP2a、GP3、GP4、GP5, ORF2b、ORF6 分别编码非糖基化膜蛋白 E 和 M, ORF7 编码核衣壳蛋白 N。在感染细胞里,主要的结构蛋白 GP5、M 中通过二硫键形成异源二聚体复合体是形成 PRRSV 颗粒的先决条件,单独 M 蛋白或 GP5 不能形成病毒 PRRSV 粒子,其他小的囊膜蛋白也是传染性病毒颗粒形成的必须条件。GP5 和 M 蛋白涉及 PRRSV 病毒组装和出芽生殖、涉及中和抗体生成,涉及与细胞表面受体结合而感染。

[0004] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 基因编码的 M 蛋白在各基因型和遗传谱系之间高度保守,和 GP5 蛋白形成异源二聚体形。猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白在猪繁殖与呼吸综合征病毒 2 型基因型上高度保守,具有广谱抗原性。

[0005] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白由于其高度疏水,且在病毒和细胞中含量甚微,所以抽提或制备难度大,尚无猪繁殖与呼吸综合征病毒全长 M 蛋白制备方法,为研究 M 蛋白的结构、抗原性以及免疫学作用,本发明提出了全长猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的制备方法及由 M 蛋白制备的简单、快速检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条。

发明内容

[0006] 目前有许多方法检测猪血清中 PRRSV 特异性抗体,包括间接免疫荧光抗体法 (IFA)、酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),尽管这些方法准确灵敏检测 PRRSV 抗体,但这些方法样品准备和处理操作步骤繁多,必须有高端精密设备和仪器的实验室使用。

[0007] 针对以上问题,本发明提供了一种简单、快速检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条,所述层析条是由样品垫、胶体金结合的垫、硝酸纤维素膜、吸收垫在 PVC 板上顺次相互搭接而成,其特征在于:所述胶体金结合的垫为喷涂有胶体金标记的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的玻璃纤维纸,所述硝酸纤维素膜上具有作为捕获抗原的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白喷涂的检测线,以及兔抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白多克隆抗体喷涂的控制线。

[0008] 在本发明中,优选的,胶体金标记的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白按照以下方法制备得到:用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液的 pH 值为 6.5,按照 40 μ g/ml 比例加入猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白,混合 10min 后,再加入 5% (w/w) 的牛血清白蛋白,使其终浓度为 1% (w/v),室温搅拌 20min,在 4 $^{\circ}C$ 2000g 离心 10min,弃去沉淀,4 $^{\circ}C$ 12000g 离心 60min,移去上清,沉淀用 0.01M pH7.2PBS 缓冲液洗涤 2 次,用 0.01M pH7.2PBS 缓冲液稀释备用。

[0009] 在本发明中,优选的,胶体金颗粒的平均直径为 40.06 \pm 0.7nm,所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的标记浓度为 40 μ g/ml。

[0010] 在本发明中,优选的,所述的胶体金结合的垫是将浓度为 OD_{523nm} = 2.0 的胶体金标记的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白以 15 μ l/cm 的速度喷涂到玻璃纤维纸上得到的,所述的检测线是将浓度为 0.8mg/ml 的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白以 1.0 μ l/cm 的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的,所述的控制线是将浓度为 1.0mg/ml 的兔抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白多克隆抗体以 1.0 μ l/cm 的速度喷涂到硝酸纤维膜上得到的,检测线和控制线相隔 8mm。

[0011] 在本发明中,优选的,所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白为 1 型猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白或 2 型猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白。更优选的,所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

[0012] 进一步的,本发明还提出了一种使用该免疫层析条检测血清的方法,包括以下步骤:10 μ l 血清直接上样样品垫,1 分钟后加入 100 μ l 显影液在显影槽中,沿膜移动,在检测线形成 PRRSV M 蛋白-特异抗体复合体使颜色变红。该法在 15 分钟内完成,当检测线和控制线明显都为红色,结果阳性,当只有控制线为红色,结果阴性,当控制线显红色,检测线暗红,结果中性不能确定,如控制线不显色,结果无效。结果中性不能确定的,如果弱阳染色可判为阴性。条带干燥后检测的结果尽管稍微增加了阳性和背景染色的密度,但结果较稳定。

[0013] 本发明公开了一种简易的及时检测方法,用横向流免疫层析条快速检测猪繁殖与呼吸道病毒的保守膜蛋白 M 抗体,并进行了评估。该法用大肠杆菌可溶性的表达猪繁殖与呼吸综合征病毒全长 M 蛋白检测猪血清的 PRRSV 抗体,并对临床采集的样本、试验性感染仔猪血清进行检测。用标准的商用抗体检测 ELISA 试剂盒 (HerdChekt PRRS ELISA) 和间接免疫荧光法检测同一样本比较,该法可检测所有已知含 PRRSV 抗体的血清,检测试验性感染猪的灵敏度为 93.2%,检测临床样本血清的灵敏度 98.7%,对不含 PRRSV 抗体临床样本和试验性感染样本血清检测,检测的特异性分别为 98.5%和 99.2%。

[0014] 在本发明中,优选的,所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白采用以下方法制备得到:

[0015] 在本发明中,优选的,所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白采用以下方法制备得到:

[0016] (1) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列的克隆

[0017] 以猪繁殖与呼吸综合征病毒 RNA 为模板,RT-PCR 法合成猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 基因,RT-PCR 产物酶切后,与同样酶切的 pGEM-T 质粒连接,获得 pGEM-T-PRRSV-M 质粒;

[0018] (2) 合成带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列

[0019] 以 pGEM-T-PRRSV-M 质粒为模板,设计引物合成带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列,合成的带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列酶切后,与同样酶切的表达质粒 pMAL-p2X 或 pMAL-c2X 连接;

[0020] (3) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白大肠杆菌中的表达

[0021] 连接产物转化大肠杆菌,挑选阳性克隆,测序正确后,得到重组质粒 pMAL-p2X MBP-M-6×His;将含有重组质粒 pMAL-p2X MBP-M-6×His 的大肠杆菌接种 LB 培养基,按 1:200 ~ 1:1000 (V/V) 转接到含有 18L LB 培养基的 20L 的发酵罐中,以 250rpm 转速 37℃ 培养 4 ~ 6h,菌液 OD600 达到 0.5 ~ 0.7 时,按浓度 0.5 ~ 0.7mmol/L 加入 IPTG 诱导 4 ~ 6h,4000rpm 离心 25min,获得湿重为 110 ~ 120g/L 的细菌培养物;

[0022] (4) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的抽提和纯化

[0023] a 裂解剂筛选和细菌膜蛋白抽提

[0024] 将步骤 (3) 得到的菌体培养物融化,重悬于缓冲液 1,用超声仪在冰浴中破碎细胞壁,超声液 100,000g、4-8℃ 离心 1 小时分离上清和沉淀,沉淀用溶解液溶解,加入裂解剂在 4℃ 搅拌 2h 抽提大肠杆菌膜蛋白,测定抽提物的活性,以确定总蛋白和裂解剂的比例,抽提物以 100,000g 超速离心 1 小时,获得可溶性上清,再用缓冲液 1 稀释至最终裂解剂浓度为 0.5-1.0% (w/v) 以便于后续纯化;

[0025] 其中,所述的缓冲液 1 含有 20mM NaH_2PO_4 , 100mM NaCl, 1 μM 蛋白酶抑制剂 E-64、0.3mM 三羧甲基磷酸, pH 7.5;

[0026] 所述的溶解液含有 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, pH 8.0;所述的裂解剂为 Triton X-100 和十二烷基- β -D-麦芽糖苷 (DDM) 的混合物,使用浓度 5.0-10% (w/v);

[0027] b 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白纯化

[0028] 在 4℃ 条件下,20mL 直链淀粉介质装柱、用 3-5 倍柱体积的平衡溶液 1 平衡,含猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白的上清液以 2mL/min 的速度进行虹吸上样,上样后用 10 倍柱体积的平衡溶液 1 洗涤,再用 3 倍柱体积的不含 EDTA 的平衡溶液 1 洗涤,最后用 10 倍柱体积的洗脱溶液洗脱,收集洗脱液,测定蛋白含量、纯度;

[0029] 其中,所述的平衡溶液 1 含有 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, 1mM EDTA, 1.0% (w/v) Triton-X100, pH 8.0;

[0030] 所述的洗脱溶液含有 20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, 10mM 麦芽糖, pH 8.0,;

[0031] c 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MBP-M 蛋白的酶切

[0032] 按 75-100ug 蛋白加入 1 单位的 Xa 因子进行常温反应 36-48h,使酶切程度达到 90-95%;

[0033] d 镍离子亲和层析纯化猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白

[0034] 10mL Ni^{2+} 介质装柱,用 5 倍柱体积的蒸馏水洗涤,用 10 倍柱体积的缓冲液 2 平衡,步骤 c 得到的酶切反应液上样于层析柱,上样后用 10 倍柱体积的缓冲液 2 洗涤,最后用含 0.25mmol 咪唑的缓冲液 2 洗脱,收集镍离子柱洗脱液,纯度检测达 90% 以上;

[0035] 其中,所述的缓冲液 2 含有 50mM 磷酸钠, 0.3mM NaCl, pH8.0,;

[0036] e 抗麦芽糖抗体 Sepharose 4 亲和层析纯化

[0037] 镍离子柱洗脱液和抗麦芽糖抗体偶联的 Sepharose 4 亲和介质混合后,4℃ 孵育 18-24 小时,吸附除去 MBP,收集流穿液,流穿液室温 4000rpm 离心后收获上清液;

[0038] f 凝胶层析纯化

[0039] 在步骤 e 得到的上清液中,加入 Triton X-100 使其终浓度为 0.031% (w/v),用截留值为 50kDa 的滤器离心浓缩至含 5-10mg/mL 蛋白,使用 2500mL Superdex 20002/150 柱进行分子筛层析,浓缩蛋白注射上样,层析柱用平衡液 2 洗脱,分步收集洗脱液,收集液检测纯度和含量,合并收集第一峰洗脱液并用截留值为 100kDa 的超滤器透析浓缩,获得高度纯化的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白,纯度检测可达 98.0% 以上;

[0040] 其中,所述的平衡液 2 含有 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.3mM TCEP, 0.031% (w/v) Triton X-100, pH 7.2。

[0041] 在本发明中,优选的,步骤 (1) 中所述的 RT-PCR 法的引物序列为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示;步骤 (2) 中所述的引物的序列为 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示;步骤 (3) 中所述的大肠杆菌为 B834-pRARE2;步骤 (4) 中所述的总蛋白和裂解剂的比例为 1:4(w/w)。

[0042] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白在感染细胞和病毒颗粒中的含量少且高度疏水性,普通制备困难,多采用基因工程方法制备,常采用真核系统进行表达,且其表达、抽提、纯化的步骤多,收率低、成本费用昂贵。针对以上问题,本发明公开了一种制备猪繁殖与呼吸综合征病毒全长 M 蛋白的方法。本发明采取原核表达系统,融合了提高疏水蛋白可溶性表达、方便分离的纯化标签,对大肠杆菌膜蛋白抽提能力不同裂解剂进行筛选和组合,通过大量融合表达、细菌破碎、细菌膜抽提、麦芽糖直链淀粉亲和层析、酶切除去融合伴侣反应,镍离子亲和层析、抗麦芽糖抗体偶联的亲和层析纯化,最后采用分子筛层析,使猪繁殖与呼吸综合征全长 M 蛋白纯度达 98% 以上并具有生物活性(非包涵体形式不经变性、复性,可溶性)。

[0043] 用发明公开的猪繁殖与呼吸病毒全长 M 的制备方法,20 升的发酵罐发酵诱导培养均可得 4~6mg 的 M 蛋白,纯度在 98% 以上,可用于猪繁殖与呼吸综合征病毒全长 M 蛋白的亲亲和层析纯化的多克隆抗体制备。

[0044] 在本发明的一个具体实施例中,对表达细菌和裂解剂进行了筛选,结果发现:稀有密码子补充的大肠杆菌 E. coli B834-pRARE2. 是大量表达制备、具有生物活性的全长猪繁殖与呼吸综合征病毒膜蛋白 M 的最佳细菌,含 MBP-M 质粒转化稀有密码子补充菌 BL21(DE3)-RILP 并不能改善 MBP-M 融合蛋白有活性高水平表达,另外的稀有密码子补充菌株 C41(DE3)-pRARE2、C43(DE3)-pRARE2 表达 MBP-M 的水平与 E. coli B834-pRARE2 一样; Triton X-100 和 DDM 的混合极大降低了总蛋白的抽提所需裂解剂的用量,降低了裂解剂对 M 蛋白生物学、理化性质以及后处理的影响,改善了有活性的 PRRSV 膜蛋白的抽提和纯化。后续 2 步亲和层析和分子筛凝胶层析纯化产生了高活性、高收率的猪繁殖与呼吸综合征病毒膜蛋白 M,可用于细胞受体或病毒膜蛋白结构、功能以及病毒抗原、抗体诊断试剂、更重要的是猪繁殖与呼吸高效、安全疫苗的研究。

[0045] 进一步的,本发明还提供了所述的免疫层析条在制备检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体试剂中的应用。

[0046] 在本发明中,公开了 PRRSV 的保守蛋白 M 的可溶性大肠杆菌大量表达、高度纯化的

方法,并公开了以 PRRSV M 蛋白制备免疫层析条,对制备的免疫条检测试验性猪感染 PRRSV 的抗体和临床样本抗体进行了评估、验证。通过用商用标准间接 ELISA 和自家间接免疫荧光法 (IFA) 双盲检测同一样本的结果比较,包括双盲重复检测模糊结果,表明这三种方法都能检测 PRRSV 抗体。

[0047] 商用间接 ELISA 测定 PRRSV N 蛋白抗体作为感染阳性,本发明测定猪血清的 M 蛋白抗体作为感染阳性。PRRSV 感染的体液免疫动力学研究表明猪感染后细胞主要产生大量产生 N 蛋白,血清主要为 N 蛋白抗体,常采用联合传统方法进行 PRRSV 诊断。近期的 PRRSV 基因组学以及全序列测序表明,PRRSV M 蛋白在美洲型和欧洲型 PRRSV 的基因组中高度保守,且受到的突变压力小,是 PRRSV 广谱免疫的最佳候选抗原,因此 PRRSV M 蛋白的性质也适合检测 PRRSV 感染。

[0048] 目前 PRRSV 感染主要是根据临床症状、宏观损伤以及实验室病毒分离、ELISA、RT-PCR、免疫组化确证综合方法进行诊断。快速、特异的现场 PRRSV 检测有足于早期假设诊断、提前布防防止病毒扩散,更重要的是本发明的层析条和 PRRSV 抗体的金标准 ELISA 检测的 1080 份样本,结果高度一致。见表 2 和表 3,但有一些结果不一致,主要因为免疫层析条的模糊不清的结果(最后判定为阴性)。标准 ELISA 检测,88% 的样品 S/P 比在 0.35-0.45 之间,接近标准的临界值。主要的是标准间接 ELISA,采用 PRRSV N 蛋白为抗原,检测的血清中 N 抗体,本发明采用间接 ELISA,采用 PRRSV M 抗体为抗原,检测 PRRSV 感染血清中的 M 蛋白抗体。也揭示了 PRRSV 感染的 M 蛋白抗体反应和 N 蛋白抗体动力学的一致性。为自主 PRRSV 抗体胶体金试剂盒的创制打下深厚基础。

[0049] 与现有技术相比,本发明的有益效果体现在:

[0050] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白在欧洲型和美洲型 PRRSV 中高度保守且具有多重免疫表位,本发明用大肠杆菌实现了全长 M 蛋白的可溶性高水平表达且高度纯化。用 PRRSV M 蛋白制成层析条,具有猪 PRRSV 抗体筛选的简单灵敏特异性。除了快速、准确、特异外,此法不需人员培训,检测费用低廉,每份样品检测费用不高于 30 元;另外在密封的包装中不需冷链,有效稳定;不仅可检测自然感染的抗 PRRSV 抗体,而且可检测试验性感染的猪血清,具有灵敏、特异、准确,特别是准确性为 95%,该层析条可在简易条件操作不需复杂设备,进一步可结合扫描仪,实现床旁检验 (Point of Care Test) 或及时 ((Pen-side) 检验。

具体实施方式

[0051] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0052] 实施例 1 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) M 膜蛋白基因克隆

[0053] 1.1 病毒和细胞培养

[0054] HP-PRRSV-JXM-F5 毒株,为在 MARC-145 细胞上传至 5 代的适应株,猪繁殖与呼吸综合征病毒,其保藏号是 :CGMCCN0.9453,已被公开,专利申请号 :201410842421.9,专利名称 :一种广谱粘膜免疫防控猪繁殖与呼吸综合征的疫苗组合物及其应用。属于美洲型 (2 型) PRRSV 病毒,其培养和滴定采用 MARC-145 细胞,培养基为 DMEM 培养基,含 10% 灭活胎牛

血清、100 μ g/ml 链霉素、100IU/ml 青霉素,培养条件 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂环境。

[0055] 1. 2PRRSV M 蛋白 RNA 抽提和 cDNA 克隆

[0056] PRRSV 病毒液 280 μ l 加入 1120 μ l 缓冲液 AVL(QIAamp 病毒 RNA 分离试剂盒, Qiagen),在室温涡旋混合 10 分钟,加入 1120 μ l 乙醇,反复颠倒几次,1 分钟 6000g 离心使病毒 RNA 吸附到旋转分离柱子上,用试剂盒中缓冲液 AW 洗涤,60 μ l 二乙基焦碳酸水洗脱。

[0057] Superscript II RNase H. sup.-reverse transcriptase(RT) 逆转录酶 (LifeTechnologies, Inc.)、PRRSV 随机引物、纯化病毒 RNA 67 $^{\circ}$ C 加热 7 分钟。40 μ l 的反应体系包括 5mM MgCl₂、1 \times 标准缓冲液 II(Perkin Elmer Corp.),1mM dNTP、1 单位 RNA 酶抑制剂、2 单位逆转录酶、1 μ l RNA,42 $^{\circ}$ C 15 分钟、99 $^{\circ}$ C 5 分钟、5 $^{\circ}$ C 5 分钟孵育。

[0058] 多聚酶链 25 μ l 反应混合物:10 μ l cDNA 产物、2mM MgCl₂、1 \times 标准缓冲液 II(Perkin Elmer Corp.),0.2mM dNTP、0.375 单位 Taq 酶、0.3 μ M 5' 端引物 MF1、0.3 μ M 3' 端引物 MR1,见表 1。多聚酶链反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 分钟变性,进入 30 次循环反应,每次循环 95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、50 $^{\circ}$ C 退火 30 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 秒,30 个循环后产物 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟,置于 4 $^{\circ}$ C。PCR 产物纯化可用商用试剂盒按说明书进行。按表 1 所示的酶切位点分别酶切消化质粒 pGEM-T 质粒、纯化的 RT-PCR 产物,连接获得 pGEM-T-PRRSV-M 质粒。

[0059] 表 1 PRRSV M 蛋白基因扩增引物、酶切位点、产物

[0060]

引物名称	序列	酶切位点	在开放读码框架的核苷酸位置	PCR 产物
MF1	GCA TGC ATG GGG TCG TCC TTA GAT GAC	SphI	14375	537bp
MR1	AAG CTT TTA TTT GGC ATA TTT GAC AAG CA	HindIII	14899	

[0061] pGEM-T-PRRSV-M 质粒,经酶切获得 537bp 的片段,测序结果表明序列准确。

[0062] 实施例 2 猪繁殖与呼吸综合征病毒全长 MBP-M 蛋白可溶性、大量表达和抽提

[0063] 1.1 表达质粒构建和筛选

[0064] 大肠杆菌可溶性表达质粒的 PRRSV M 蛋白构建和筛选;以 pGEM-T-PRRSV-M 质粒为模板,设计引物合成带有组氨酸标签的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白 cDNA 序列,在上游引物的 3' 端引入 BamHI 酶切位点,在下游引物的 3' 端引入 Hind III 酶切位点及 6 个组氨酸纯化标签序列,引物 MF2:5' -GGATCCCCACGGCCACTGCTA-3',引物 MR2:5' -AAGCTTTTA TTT GGC ATA TTT GAC AAG CACACCACCACCACCACCAC-3',产物与用同样酶切后的表达质粒片段连接,所选表达质粒为 pMAL-c2X 或 pMAL-p2X。

[0065] 1.2 表达细菌的筛选

[0066] 构建的 MBP-M 不同表达质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)、B834-pRARE2、BL21(DE3)-RILP、C41(DE3)-pRARE2、C43(DE3)-pRARE2。其中, BL21(DE3)、B834-pRARE2 活化细胞购自德国 Novagen 公司, BL21(DE3)-RILP 购自美国 Stratagene 公司, C41(DE3)-pRARE2、C43(DE3)-pRARE2 购自 Lucigen 公司。稀有密码子补充质粒 pRARE2 来自大肠杆菌 Rosetta 2 在应用中转入适当细菌增强表达(购自 Novagen 公司),培养基加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素,在培养含稀有密码子增强表达质粒(pRARE2, RILP)转化菌中按 34 μ g/mL 加入氯霉素。细菌种子用 3mL LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD600 达 0.5-0.6 时,接种到 100mL 的 LB 培养基中;25 $^{\circ}$ C 过夜摇动培养,接种 1L 有 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD600 为 0.7

时,加入 0.7mM IPTG 在 37℃培养 4-6 小时,离心收集细菌,-80℃保存。取 0.1g 细菌作为样品进行电泳分析。

[0067] 1.3 裂解剂溶解、优化和筛选

[0068] 0.2g 细菌沉淀物重悬 35mL 缓冲液 1(20mM NaH₂PO₄, 100mM NaCl, 1 μM 蛋白酶抑制剂 E-64, 0.3mM 三羧甲基磷酸 (TCEP), pH 7.5), 在冰浴上超声 15 分钟, 超声 2s, 停顿 2s, 输出设置为 7, 超声仪 Misonix 3000。超声液 100,000g、4-8℃离心 1 小时, 沉淀用 800 μl 溶解液 (20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇, pH 8.0) 溶解。总蛋白含量用兼容还原试剂的 BCA 试剂盒测定, 盒中稀释液用蒸馏水代替, 所有标准和稀释液用去离子水配制, 其他操作按说明书进行。

[0069] 加入裂解剂在 4℃搅拌 2h 抽提大肠杆菌膜蛋白, 测定抽提物的活性, 以确定总蛋白和裂解剂的比例, 抽提物以 100,000g 超速离心 1 小时, 获得可溶性上清, 再用缓冲液 1 稀释至最终裂解剂浓度为 0.5-1.0% (w/v) 以便于后续纯化。

[0070] 所用裂解剂 Triton X-100、N-乙基-N-全氟辛基磺酰基-氨基乙醇 (FC-10)、2-羟基-N,N,N-三甲基-2-膦酰基-1-十四烷基铵 (FC-12)、月桂基二甲基氧化胺 (LDAO)、3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸盐 (CHAPS)、十二烷基-β-D-麦芽糖苷 (DDM)、胆酸钠、八烷基葡萄糖苷 (β-OG), 使用浓度为 5% 或 10% w/v。

[0071] 用 96 孔板筛选, 每次选 5 种裂解剂在 96 孔板中稀释, 45 μl 转移到另一分析用 96 孔板, 对照孔只加入裂解剂, 每孔加入 5 μl 重悬的细菌液, 4℃过夜或在室温放置 3 小时, 分析板 10℃ 5,500rpm 离心 1 小时, 含溶解蛋白上清转入到另一新的微孔板, 原来板孔沉淀加入 50 μl 溶解缓冲液, 取 10 μl 上清溶解液 (S) 和非溶解蛋白沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。通过比较沉淀和溶解液获得各裂解剂的溶解效率, 当上清溶解液 (S) 的溶解效率大于 50%, 则选用裂解剂单独或联合使用, 提高优化裂解剂的溶解膜蛋白的效率。

[0072] 1.4 PRRSV-M 蛋白纯化

[0073] 2.2cm 直径含 10mL 直链淀粉介质的柱用平衡溶液 1(20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇、1mM EDTA、1% (w/v) Triton X-100, pH 8.0) 平衡, 含融合蛋白 MBP-M 的上清液在 4℃以 2mL/min 流速上样, 上样后用 10 倍柱体积的平衡溶液 1 洗涤, 3 倍柱体积的不含 EDTA 的平衡溶液 1 洗涤, 用 10 倍柱体积洗脱溶液 (20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM 2-巯基乙醇、10mM 麦芽糖, pH 8.0) 洗脱, 收集 5mL 洗脱液, 用 4-20% 梯度 SDS-PAGE 胶检测纯度, 蛋白含量用兼容还原试剂的 BCA 试剂盒检测。免疫印迹测定分子量, 具体细菌裂解液 (100mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2% Triton-X 100, 0.5M KCl, pH7.2)、膜提取物、MBP 亲和层析纯化产物、凝胶层析经 12% SDS-PAGE 电泳, 转到 CAPS [10mM 3-(环己胺)-1-丙磺酸 (CAPS), 0.5% W/V DTT, 15% V/V 甲醇, pH10.5) 缓冲液浸泡的 PVDF 膜 (Milliporo, 0.45 μm) 上, 电压 65V, 时间 1h。PVDF 膜在 4℃用 Superblock PBS (Pierce 产品, 含 0.05% Tween 20) 封闭过夜, 用 PBST (PBS 含 0.05% Tween 20) 洗涤 3 次。一抗为兔抗 PRRSV-M 纯化多克隆抗体, 用 PBS 稀释 5000 或 10000 倍, 和 PVDF 膜室温下一起反应 1h, 再用 PBST 洗涤 3 次, 再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:10000 稀释) 室温下反应 1h, HRP (辣根过氧化物酶) 用 ECL (Enhanced chemiluminescence) 试剂检测。

[0074] 2 结果

[0075] 2.1 表达质粒和表达细菌的筛选结果

[0076] 采用PCR法构建携带MBP-M不同表达质粒,PRRSV M蛋白在大肠杆菌单独或和(谷胱甘肽-S-转移酶,GST)、Intein(内含肽)融合表达,产生不溶性的包涵体,结构和活性丧失。为使猪繁殖与呼吸综合征病毒M蛋白可溶性表达,进行MBP-M融合蛋白表达,利用引物使PRRSV M的N端和MBP融合,插入质粒pMal p2X和质粒pMal c2X,转化大肠杆菌E. coli BL21(DE3),发现PRRSV在pMAL-p2X MBP-M-6×His产生了可溶性表达,pMAL-c2X MBP-M-6×His表达产生了不溶性的包涵体。pMAL-p2X MBP-M-6×His在BL21(DE3)和B834-pRARE2表达MBP-M。用直链淀粉层析柱纯化后检测融合蛋白MBP-M,SDS-PAGE分析其分子量为62-64kDa。pMAL-p2X MBP-M-6×His在B834-pRARE2表达MBP-M的量高于BL21(DE3),达到10-12mg/L,而BL2(DE3)表达MBP-M的量为5mg/L。pMAL-p2X MBP-M-6×His在C41(DE3)-pRARE2、C43(DE3)-pRARE2、菌、C41(DE3)、C43(DE3)均表达、纯化后的量和B834-pRARE2表达纯化量比较,MBP-M的表达水平并未提高。因此猪繁殖与呼吸综合征病毒M蛋白的表达质粒为pMAL-p2X MBP-M-6×His,优选大肠杆菌B834-pRARE2。所选培养基LB培养基(1.0%蛋白胨、0.5%酵母抽提物、0.5%氯化钠、0.2%蔗糖、100 μg/m氨苄),诱导用IPTG的终浓度0.7mM。

[0077] pMAL-p2X MBP-M-6×His/B834-pRARE2按1:1000体积比接种20L发酵罐,工作体积18L,转速250rpm,37℃培养,OD600达到0.7时,加入(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷,IPTG)使终浓度达到0.7mM,继续培养4小时后4000rpm离心25分钟收集菌体,获得菌体称湿重110-120g/L。

[0078] 2.2 大肠杆菌膜裂解剂筛选和组合

[0079] 裂解剂CHAPS(3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸盐,CHAPS)、LDAO(月桂基二甲基氧化胺,LDAO)、TritonX-100、洋地黄皂苷(Digitonin)可有效抽提融合蛋白,裂解剂和蛋白比例4:1(w/w),其中TritonX-100抽提MBP-M蛋白的效率高且价格低廉,因此发明采用裂解剂TritonX-100。

[0080] Triton X-100对有活性的PRRSV膜蛋白具有稳定作用,单独使用Triton X-100抽提大肠杆菌膜上MBP-M的蛋白总量小于50%,Triton X-100混合其他裂解剂抽提膜的能力检测和筛选表明:Triton X-100(5%或10% w/v)和另外裂解剂(FC-10、FC-12、CHAPS、LDAO、β-OG、DDM、胆酸钠)混合物中有几种组合提高了MBP-M的稳定作用,Triton X-100/DDM、Triton X-100/FC-10组合的抽提能力达90%,但DDM的临界微粒浓度为0.009% w/v,FC-10临界微粒浓度的0.35% w/v,以及价格低廉,容易结晶,所以选择Triton X-100/DDM混合物为抽提PRRSV M膜蛋白的裂解剂,也就是5-10% (w/v)Triton X-100和5-10% DDM(w/v)的混合物。

[0081] 按每克菌体加入2-3mL蛋白酶抑制剂。用Branson超声仪250在冰浴中菌体悬浮液超声破碎15分钟,1cm探头输出50%,超声2s,停顿2s。菌体破碎后100000g超速离心1h分离颗粒物和可溶性蛋白,沉淀重悬于240-300mL的溶解液中溶解,加入裂解剂在4℃搅拌2h抽提膜蛋白,总蛋白和裂解剂的比例为1:4(w/w)。100000g离心1h获得可溶性上清,用层析缓冲液1稀释至最终裂解物的浓度为0.5-1.0% (w/v)以便于后续纯化。

[0082] 优选的裂解剂按4:1(w/w)加入到超声后的菌体离心沉淀悬浮液中,100000g超速离心1小时,MBP-M就存在于超速离心的上清液中,上样直链淀粉亲和层析柱,10-15倍柱体积的缓冲液洗涤后除去层析柱的非特异结合蛋白,含10mM麦芽糖的洗脱溶液洗脱,洗脱液

经 12% SDS-PAGE 检测分子量为 61-62kDa, 纯度为 90% 以上。

[0083] 对纯化 MBP-M 进行总结描述, 4L 大肠杆菌培养液产生湿重为 23g 细菌, 经菌体裂解, 离心、优化的 2 种裂解剂混合物制成的裂解液抽取, 除去 75% 的细菌蛋白, 活性提高 5 倍, 经直链淀粉亲和层析柱纯化, 活性提高 30 倍, 纯度 90% 以上。

[0084] 实施例 3 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白的酶切和进一步纯化

[0085] 1. 1MBP-M 融合蛋白的酶切

[0086] Xa 因子用缓冲液配制 (20mM Tris, 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂, pH 8.0) 按 100 μg 蛋白 (实施例 2 制备) 加入 1 单位 Xa 因子, 室温作用 36-48 小时, 90-95% 的蛋白酶切消化。

[0087] 1. 2Ni²⁺ 离子亲和柱纯化 M 蛋白

[0088] HIS-Select HC Nickel 亲和介质 10mL 装入层析柱 (20mL), 用 5 倍柱体积的蒸馏水洗涤, 用 10 倍体积的缓冲液 2 (50mM 磷酸钠, 0.3M NaCl, pH 8.0) 平衡, Xa 因子酶切产物上样 HIS-Select HC 亲和层析柱, 10 倍体积缓冲液 2 洗涤后, 用含 0.25mmol 咪唑的缓冲液 2 洗脱, 收集 Ni²⁺ 离子柱洗脱液。

[0089] 1. 3 抗麦芽糖抗体 Sepharose 4 亲和介质纯化

[0090] 镍离子柱洗脱液和 5mL 抗麦芽糖抗体偶联 Sepharose 4 亲和介质混合后 4℃ 孵育 18-24 小时, 每 1mL 介质吸附 0.5mg MBP, 收集流穿液, 流穿液室温 4000rpm 离心后收获上清。

[0091] 1. 4 凝胶层析纯化

[0092] 在上步流穿液离心后的上清液中, 加入 Triton X-100 使其终浓度为 0.031% (w/v), 用截留值为 50kDa 的滤器离心浓缩至含 5-10mg/mL 蛋白, 使用 2500mL Superdex 20002/150 柱进行分子筛层析, 浓缩蛋白注射上样, 层析柱用平衡液 2 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.3mM TCEP, 0.031% (w/v) Triton X-100, pH 7.2) 洗脱, 分步收集洗脱液, 收集液检测纯度和含量, 合并收集第一峰洗脱液并用截留值截留值为 100kDa 的超滤器透析浓缩, 获得高度纯化的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白, 纯度检测可达 98.0% 以上;

[0093] 酶切、纯化中蛋白采用 12% SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色分析以及实施例 1 免疫印迹分析, 用实施例 2 所采用方法测定蛋白含量。

[0094] 2 结果

[0095] 2. 1Xa 裂解因子剪切

[0096] 室温进行反应蛋白酶解反应, 反应时间 36-48 小时, 有 90-95% MBP-M 剪切为 M 蛋白, 分子量为 19-20kDa。

[0097] 2. 2PRRSV M 蛋白纯化

[0098] Xa 因子剪切反应物通过镍离子层析柱, 由于 MBP 无组氨酸表位, 多部分 MBP 从层析柱流穿, PRRSV M 蛋白、和少量未消化的 MBP-M 蛋白结合到层析柱上, 通过剧烈洗涤除去结合的在柱上 MBP, 层析柱用大量的洗液多次洗涤除去结合在层析柱的 MBP, 用 0.25M 咪唑洗脱获得 M 蛋白和少量的 MBP-M 蛋白杂质, 纯度为 90%。经 MBP 抗体偶联的 Sepharose 4 介质处理, 在流穿液获得纯化的 PRRSV M 蛋白。

[0099] 纯化的猪繁殖与呼吸综合征膜蛋白, 加入 Triton X-100 使终浓度 0.031% (w/v), 用 50kDa 截留值的滤器离心浓缩使含 5-10mg/mL 蛋白, 使用 2500mL Superdex 20002/150 柱进行分子筛层析。层析所用平衡液 2 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.3mM TCEP, 0.031% (w/v) Triton X-100, pH 7.2), 浓缩蛋白 500 μL 注射上样, 用平衡液 2 洗脱, 分步收集洗脱液,

收集液检测纯度和含量。合并收集洗脱液并用 100kDa 截留值的浓缩仪浓缩。获得高度纯化的猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白,纯度检测可达 98.0% 以上。

[0100] 在凝胶过滤纯化中测定了 MBP-M 蛋白-裂解剂复合体的分子量 450kDa, M-裂解剂复合体分子量为 130kDa, 纯化前蛋白浓缩使其浓度 10mg/mL, 缓冲液含 0.031% (w/v) 的 TritonX-100。MBP-M 纯度提高 175 倍, 并在 -80℃ 保存稳定, 在 4℃ 保存 4 月, 其活性仍为原来的 98%。同时表明猪繁殖与呼吸征病毒 M 蛋白的融合蛋白 MBP-M、以及 M 蛋白是以多聚体形式存在, 在本发明中 M 蛋白和 Triton X-100、DDM 形成 7 聚体复合体。

[0101] 实施例 4 猪繁殖与呼吸综合征病毒纯化全长 M 蛋白亲和层析纯化多克隆抗体的制备

[0102] 1.1 抗血清的制备

[0103] 初次免疫原的制备采用纯化 MBP-M(浓度 10mg/ml)+ 弗氏完全佐剂, 按 1:1 制成, 再次免疫抗原采用纯化 M 蛋白(浓度 1mg/ml)+ 弗氏不完全佐剂乳化而成。

[0104] 4~5kg 新西兰白兔 5~6 只, 静脉注射 1ml 的初次免疫原, 在 7、14、22、36、50、64、78、92 天注射再次免疫抗原, 最后一次免疫 12 天后, 对兔子进行心脏采血, 分离血清, -20℃ 备用。

[0105] 1.2 抗体或抗血清效价测定

[0106] (1) 血清效价测定采用 ELISA 法, 具体如下:

[0107] 100 μ l 含 1 μ g 纯化 PRRSV M 蛋白碳酸钠溶液包被 96 孔板, 置 4℃ 过夜, 按 150 μ l/孔加入洗液 PBST (PBS, 0.5% Tween-20) 洗涤 3 次, 用含 3% 牛血清白蛋白的 PBS (pH7.4) 37℃ 封闭 1h, 加入不同稀释度 (1:100、1:1000、1:10⁴、1:10⁵) 的抗血清在 37℃、5% CO₂ 温箱中孵化 2h, 用洗液洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体, 该抗体按 1:5000 或 1:1000 用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 稀释, 在 37℃ 作用 1h, PBST 洗涤 3 次, 加入四甲基联苯胺 (TMB) 底物进行显色反应 10 分钟。2M 硫酸终止反应, 用 ELISA 读数仪在 450nm 读取 OD 值。

[0108] (2) 血清效价的测定也可用蛋白印记的方法, 具体如下:

[0109] 用微型电泳 (Miniprotein II ;Bio-Rad) 对纯化 PRRSV M 蛋白进行电泳 (200V 电压, 室温 45min), 在 100V 电压 4℃ 条件下转移 1h, 转移的膜用含 3% BSA 的 PBS (pH7.4) 在 37℃ 封闭 1h, 用含 0.05% Tween-20 的 PBST 洗涤 3 次, 分别加入 1:5000、1:10000、1:20000、1:50000 稀释的抗血清在室温孵育 1h, PBST 洗涤 3 次, 加入按 1:5000 或 1:3000 稀释的碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体, 室温作用 1h, 洗涤 3 次, 加入底物显色。

[0110] 1.3 抗血清的初步纯化

[0111] 取 5ml 血清, 4℃ 以 10000rpm 离心 30min, 上清转入 50ml 的离心管中, 一边轻轻搅拌, 一边加入饱和硫酸铵至终浓度 50%, 用膜封口冰上放置 4h 后, 4℃ 以 10000rpm 离心 30min, 将上清移入到干净的 50ml 的管中, 获得多克隆抗体, 然后用 12~14kD 的透析袋或管 4℃ 过夜透析, 透析液 (PBS, pH7.5) 体积应为抗体的 1000~10000 倍。

[0112] 1.4M 蛋白亲和层析柱的制备

[0113] 取 1~2g CNBr 活化的介质 Sepharose 4B, 用 250~500ml 的 1mM HCl 溶液洗涤, 再用 500ml 的蒸馏水膨胀介质, 用 500mL 的结合缓冲液 (0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH8.3) 洗涤, 加入含纯化 PRRSV 3.4M 蛋白或 MBP 蛋白、或 MBP-M 蛋白溶液进行偶联, 4℃ 过夜, 偶联

条件为 1ml 介质结合 2mg 纯化 M 蛋白或 MBP 蛋白或 MBP - M 蛋白。用结合缓冲液洗去未结合 M 蛋白,加入 0.2M 甘氨酸液 (pH8.0) 4℃ 封闭 12h,再用结合缓冲液 (pH 8.5) 洗涤 1 次,用醋酸缓冲液 (0.1M 醋酸,0.5M NaCl, pH4.0) 洗涤 4 次,加入 0.1% 的 SDS 进行变性后,用于纯化抗体或加入适量叠氮化钠置 2 ~ 8℃ 备用。

[0114] 1.5M 蛋白抗体纯化

[0115] 3ml 或 5ml 透析好的抗体与 3ml 亲和层析介质充分混合,置 4℃ 摇床震荡过夜,用 3 倍柱体积的结合缓冲液 (75mM Tris, pH7.5) 充分洗涤后,再用 10ml 洗脱液 (0.1M 甘氨酸, pH2.7) 洗脱收集,收集液立即加入 30 μ l 的碱性缓冲液的 (3M Tris, pH8.8),使 pH 至 6.8 ~ 7.0。纯化抗体溶液浓缩后加入后 30% v/v 甘油,使纯化抗体浓度为 250 μ g/ml,在 -20℃ 保藏备用。

[0116] 实施例 5 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 蛋白为基础的胶体金免疫层析条的制备和验证

[0117] 1.1 免疫胶体金标记的 M 蛋白抗原制备

[0118] M 蛋白系列稀释至 10、20、30、40、50、60、70、80 μ g/ml,分别取 0.1mL 加到 1mL 胶体金溶液中,5 分钟后,每个试管加 0.1mL 10% NaCl,混合放置 2 小时。优化的标记 M 的浓度为颜色未变的最高稀释度加 20% 的蛋白。当蛋白的等电点 (PI) 和胶体金的 pH 接近相等时,蛋白有效吸附到胶体金颗粒表面。用 0.1M K_2CO_3 溶液 (pH = 6) 分别调节胶体金的 pH 为 9.5、9.0、8.5、8.0、7.5、7.0、6.5,标记物按优化的浓度分别加到不同 pH 的胶体金溶液中混合 10 分钟。5% BSA 加入使终浓度为 1%,混合 10 分钟,在 OD523 处有最大吸收值,此时对应的 pH 为优选吸附 pH。

[0119] 按优化的 M 抗原浓度, M 蛋白稀释到胶体金悬液中,搅拌 30 分钟,按最终浓度 1% BSA 加入 5% 的 BSA,室温搅拌 20 分钟,4℃、2000g 离心 10 分钟,弃去沉淀,4℃、12000g 离心 60 分钟,移去上清,沉淀用 0.01M pH7.2PBS 洗涤 2 次,用体积用 0.01M pH7.2PBS 调整到需要的体积。

[0120] 1.2M 蛋白抗原工作浓度和兔抗体工作浓度的确定

[0121] 胶体金标记的 M 蛋白抗原系列稀释,使在 OD523nm 的吸光值为 3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5,分别喷在粘着在 PVC 上玻璃纤维纸上,检测阳性或阴性参考品,以 M 蛋白抗原和硝酸纤维素膜背景显色时间对比确定胶体金标记的 M 抗原浓度。为检测在检测线上胶体金标记 M 蛋白抗原的工作浓度, M 抗原倍比稀释至 3.2mg/ml、1.6mg/ml、0.8mg/ml、0.4mg/ml,分别点样硝酸纤维素膜的检测线上,确定检测线上的显色时间、颜色深度。为检测在玻璃纤维上和检测线上胶体金标记 M 蛋白抗原工作浓度,兔抗 M 蛋白抗体倍比系列稀释 4.0mg/ml、2.0mg/ml、1.0mg/ml、0.5mg/ml,并分别点样到粘着在 PVC 板上硝酸纤维素膜的控制线上测定阳性参考血清,确定检测线上显色位置。

[0122] 1.3 免疫层析条制备和检测程序

[0123] 胶体金标记的 M 蛋白用 XYZ-3000 分散仪 (Bio-Dot) 以 15 μ l/cm 的速度喷到玻璃纤维纸上,在干燥箱室温干燥保存。

[0124] M 蛋白抗原和兔抗 M 蛋白多克隆抗体按工作浓度以 1.0 μ l/cm 的速度分别喷射到 NC 膜上 (20mm \times 300mm) 形成检测线和控制线,检测线和控制线距离 8mm,膜用含 10% BSA 的 0.02M PBS (pH 7.2) 封闭,室温干燥并保存在干燥箱中。用样品垫、标记结合的垫、NC 膜、吸

附垫组装成层析条并固定在 PVC 架上,用切割器 CM-4000 (Bio-Dot) 切成长 21mm、宽 4.1mm 的重叠条。样品垫浸入血清样品 (不能超过标记最大浸泡线) 30-60 秒,当整个 NC 膜湿透移出条,15 分钟内观察结果。当检测线和控制线明显都为红色,阳性,当只有控制线为红色,结果阴性,当控制线显色红,检测线暗红,结果中性,如控制线不显色,结果无效。

[0125] 重组全长的 PRRSV M 蛋白作为捕获抗原点样到硝酸纤维素膜,胶体金结合的 G 和蛋白 A 作为指示制备免疫层析条:胶体金颗粒在显微镜下观察平均直径为 $40.06 \pm 0.7\text{nm}$, 适合制备胶体金标记的 M 蛋白。M 蛋白的浓度 $40 \mu\text{g/ml}$, pH 6.5 时, M 蛋白最大吸附到胶体金上。制备免疫层析条带,胶体金标记的 M 蛋白工作浓度为 $OD_{523\text{nm}} = 2.0$, 检测线上的 M 蛋白抗原浓度为 0.8mg/ml , 控制线上兔抗 M 蛋白抗体工作浓度为 1.0mg/ml 。

[0126] 免疫层析条检测血清的方法: $10 \mu\text{l}$ 血清直接上样样品孔, 1 分钟后加入 $100 \mu\text{l}$ 显影液在显影槽中, 沿膜移动, 在检测线形成 PRRSV M 蛋白-特异抗体复合体使颜色变红。该法在 15 分钟内完成, 当检测线和控制线明显都为红色, 阳性, 当只有控制线为红色, 结果阴性, 当控制线显红色, 检测线暗红, 结果中性不能确定, 如控制线不显色, 结果无效。结果中性不能确定, 如果弱阳染色可判为阴性。条带干燥后检测的结果尽管稍微增加了阳性和背景染色的密度, 但结果较稳定。

[0127] 2 结果

[0128] 猪感染 PRRSV 10 天后的 10 份阳性血清作为对照, 从感染猪的血清、鼻咽拭子通过 RT-PCR 法和 PRRSV 病毒分离确证了试验性猪感染 PRRSV 病毒。对阳性对照样品, 每个样品在检测线和控制线都显红色, 为 2 条红色的, 显示检测到 PRRSV M 蛋白抗体, 没有出现只有 1 条显色带。

[0129] 从国内江西和山西收集猪血清用常规标准商用间接 ELISA 方法检测 PRRSV 抗体, 其中来自江西 250 份血清用商用的标准间接 ELISA 试剂盒检测 PRRSV 抗体, 其特异性为 97.4% -99.6% (HerdChekt PRRSELISA package insert), 来自山西 560 份血清用同样试剂盒检测也检测到 PRRSV 抗体。

[0130] 来自感染后 1-3 天或贮存于 -20°C 血清融化后用免疫层析条检测, 810 份临床血清检测的阳性率 99.1%, 但有部分血清结果模糊, 对所有结果模糊的样本进行二次检测, 结果仍含糊则判为阴性。本发明公开的方法检测结果和标准间接 ELISA 法结果比较见表 2, 715 份血清用层析条检测与标准间接 ELISA 检测比较, 其灵敏性、特异性、准确性 (真阳性与正阴性之和除以待测的样本数) 分别为 96.7%、98.2%、97.1%。这是因为层析条增强了阳性样本染色强度。

[0131] 表 2 本发明的试剂盒与商用 ELISA 试剂盒的比较

[0132]

	检测 PRRSV M 蛋白抗体的免疫层析条	商用标准 ELISA 试剂盒
阳性	465	474
阴性	230	241
中性	4	-

弱阳性	16	-
-----	----	---

[0133] 为获得已知感染时间的血清,挑选 3-4 周龄无特定病原的仔猪,在感染前取血,确证无 PRRSV 抗体,用中国 PRRSV 分离毒 HP-PRRSV-JXM-F5 感染。HP-PRRSV-JXM-F5 是 HP-PRRSV-JXM 在 MARC-145 细胞上连续传至 5 代获得。

[0134] 18 头仔猪鼻内感染 0.5mL,滴度为 $7.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,2 头猪用 MARC-145 细胞培养上清接种,在感染后 0、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、18、20、23、26 天取血,用本发明的层析条和商用的间接 ELISA 测定结果并进行比较,270 份血清检测的结果见表 3,与商用标准的间接 ELISA 试剂盒相比,层析条的灵敏性、特异性、准确度分别为 93.2%、99.2%、95.9%。层析条和标准商用间接 ELISA 在感染后 5 天,2 头猪就可检测到猪抗体阳转。使用层析条,检测感染 7-26 天的猪血清,检测感染 7、10、12、16 后的结果和用标准间接免疫荧光法的结果一致。

[0135] 所用的方法简单描述,待检测血清在 56°C 灭活 30 分钟, PBS1:10 稀释。MARC-145 细胞在 96 孔板上培养,以 $\text{MOI} = 0.01$ 接种 HP-PRRSV-JXM-F5 各孔,, 37°C 、5% CO_2 培养 24 小时,每个孔用 300 微升 PBS 洗涤三次,加入待测稀释血清, 37°C 潮湿孵箱孵育 30 分钟, 300 μl PBS 洗涤三次,加入荧光异硫氰酸丙酯结合的抗猪 IgG 抗体, 37°C 潮湿孵箱孵育 30 分钟, 300 μl PBS 洗涤三次,在荧光显微镜下观察,可观察到不同程度染色的阳性反应。间接免疫荧光抗体观察和猪病状态不符或与层析条检测不符或与标准间接 ELISA 不符的结果见表 4 和表 5。

[0136] 表 3 PRRSV M 蛋白抗体检测层析条和商用标准试剂盒检测 PRRSV 试验性感染猪

[0137]

	PRRSV M 蛋白抗体检测层析条	商用标准 ELISA 试剂盒
阳性	139	140
阴性	120	130
中性	1	-
弱阳性	10	-

[0138]

表4 PRRSV M蛋白抗体检测层析条、商用标准ELISA试剂盒、免疫荧光抗体检测试验性感染猪血清

猪编号	第4天		第5天		第7天		第10天		第12天		第16天	
	ELISA	M	ELISA	M	ELISA	M	ELISA	M	ELISA	M	ELISA	M
1	— (0.10)	—	— (0.09)	—	— (0.71)	—	— (1.76)	—	— (1.31)	—	— (0.96)	—
2	— (0.02)	—	— (0.04)	—	— (0.39)	—	— (0.78)	—	— (1.60)	—	— (1.10)	—
3	— (0.09)	—	— (0.39)	—	— (0.41)	—	— (0.50)	—	— (0.59)	—	— (0.65)	—
4	— (0.03)	—	— (0.02)	—	— (0.13)	—	— (0.11)	—	— (0.81)	—	— (0.60)	—
5	— (0)	—	— (0.50)	—	— (0.50)	—	— (0.70)	—	— (0.30)	—	— (0.70)	—
6	— (0.10)	—	— (0.11)	—	— (0.45)	—	— (0.55)	—	— (0.55)	—	— (0.34)	—
7	— (0.21)	—	— (0.46)	—	— (0.70)	—	— (1.52)	—	— (1.12)	—	— (1.85)	—
8	— (0.15)	—	— (0.11)	—	— (0.15)	—	— (0.80)	—	— (0.97)	—	— (1.30)	—
9	— (0.05)	—	— (0.46)	—	— (0.64)	—	— (0.70)	—	— (1.36)	—	— (1.32)	—
10	— (0.15)	—	— (0.11)	—	— (0.45)	—	— (0.38)	—	— (0.95)	—	— (1.93)	—
11	— (0.01)	—	— (0.01)	—	— (0.50)	—	— (0.65)	—	— (1.90)	—	— (0.75)	—
12	— (0)	—	— (0.01)	—	— (0.10)	—	— (1.06)	—	— (1.31)	—	— (1.06)	—
13	— (0.05)	—	— (0.07)	—	— (0.65)	—	— (1.90)	—	— (1.76)	—	— (0.89)	—
14	— (0.04)	—	— (0.03)	—	— (0.45)	—	— (0.61)	—	— (0.07)	—	— (0.01)	—
15	— (0.01)	—	— (0.15)	—	— (0.56)	—	— (0.56)	—	— (0.90)	—	— (0.92)	—
16	— (0)	—	— (0.07)	—	— (0.65)	—	— (0.65)	—	— (0.65)	—	— (1.09)	—
17	— (0.09)	—	— (0.08)	—	— (0.69)	—	— (0.69)	—	— (0.69)	—	— (0.70)	—
18	— (0.04)	—	— (0.11)	—	— (0.04)	—	— (0.04)	—	— (0.04)	—	— (0.04)	—
19	— (0.10)	—	— (0.07)	—	— (0.01)	—	— (0.06)	—	— (0.14)	—	— (0.09)	—
20	— (0.07)	—	— (0.11)	—	— (0.05)	—	— (0.15)	—	— (0.02)	—	— (0.15)	—

表注：“—”表示阴性结果；“+”表示阳性结果；“+—”表示模糊结果；S:P 比值大于或等于0.4，判为阳性。

[0139] 表5PRRSV M蛋白抗体检测层析条和免疫荧光、标准间接ELISA检测PRRSV 试验性感染猪血清

[0140]

	免疫荧光	商用标准 ELISA 试剂盒	PRRSV M 蛋白抗体检测层析条
阳性	39	57	55
阴性	31	13	15

[0141] 表注：模糊结果判为阴性。

[0001]

<110> 北京健翔和牧生物科技有限公司;
吕宏亮;
张澍。

<120> 一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用

<130> KLPI150599

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 27bp

<212> DNA

<213> MF1引物

<400> 1

gcatgcatgg ggtcgtcctt agatgac 27

<210> 2

<211> 29bp

<212> DNA

<213> MR1引物

<400> 2

aagcttttat ttgcatatt tgacaagca 29

<210> 3

<211> 22bp

<212> DNA

<213> MR2引物

<400> 3

ggatcccca cggccactgc ta 22

<210> 4

<211> 47bp

<212> DNA

<213> MF2引物

<400> 4

aagcttttat ttgcatatt tgacaagcac accaccacca ceaccac 47

<210> 5

<211> 525bp

<212> DNA

<213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒(HP-PRRSV-JXM-F5)全长M蛋白基因序列

<400> 5

atggggatcat	ccttagatga	cttctgccat	gatagcacag	ceccacaaaa	ggtgctcttg	60
gcgtttteta	tcacctacac	gccagtgatg	atatacgecc	taaaggtaag	tcgcggccga	120
ctgctagggc	ttttgcacct	tttgatcttc	ctgaattigt	ctttcacctt	cgggtatatg	180
acattcatgc	actttcagag	tacaaataag	gtcgcgctca	ctatgggagc	agtagtgcca	240
ctcctttggg	gggtgtactc	agccatagaa	acctggagat	teatcacctc	cagatgcccgt	300
ttgtgtctgc	taggccgcaa	gtacattctg	gcccttgecc	accacgttga	aagtgccgca	360
ggcttttcac	cgattgcggc	aaatgataac	cacgcatttg	tegtccggcg	tcccggctct	420
actacggatc	acggcacatt	ggtgcccggg	ttgaaaagcc	tegtgttggg	tggcagaaaa	480
gctgttaaac	agggagtggt	aaaccttggt	aaatatgcc	aataa		525

<210> 6

<211> 174AA

<212> PRT

<213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒(HP-PRRSV-LZ-F5)全长M蛋白氨基酸序列

<400> 6

1	MET Gly Ser Ser Leu Asp Asp Phe Cys His Asp Ser Thr Ala Pro
16	Gln Lys Val Leu Leu Ala Phe Ser Ile Thr Tyr Thr Pro Val MET
31	Ile Tyr Ala Leu Lys Val Ser Arg Gly Arg Leu Leu Gly Leu Leu
46	His Leu Leu Ile Phe Leu Asn Cys Ala Phe Thr Phe Gly Tyr MET
61	Thr Phe MET His Phe Gln Ser Thr Asn Lys Val Ala Leu Thr MET
76	Gly Ala Val Val Ala Leu Leu Trp Gly Val Tyr Ser Ala Ile Glu
91	Thr Trp Arg Phe Ile Thr Ser Arg Cys Arg Leu Cys Leu Leu Gly
106	Arg Lys Tyr Ile Leu Ala Pro Ala His His Val Glu Ser Ala Ala
121	Gly Phe His Pro Ile Ala Ala Asn Asp Asn His Ala Phe Val Val
136	Arg Arg Pro Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Thr Leu Val Pro Gly
151	Leu Lys Ser Leu Val Leu Gly Gly Arg Lys Ala Val Lys Gln Gly
166	Val Val Asn Leu Val Lys Tyr Ala Lys ***

专利名称(译)	一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105424928A	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	CN201510764619.4	申请日	2015-11-11
[标]申请(专利权)人(译)	山西隆克尔生物制药有限公司 吕宏亮 张澍		
申请(专利权)人(译)	山西隆克尔生物制药有限公司 吕宏亮 张澍		
当前申请(专利权)人(译)	山西隆克尔生物制药有限公司 吕宏亮 张澍		
[标]发明人	张澍 吕宏亮		
发明人	张澍 吕宏亮		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N33/56983 G01N2469/20		
代理人(译)	孙皓晨 马鑫		
其他公开文献	CN105424928B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫层析条及其制备方法和应用。所述层析条是由样品垫、胶体金结合的垫、硝酸纤维素膜、吸收垫在PVC板上顺次相互搭接而成，其中所述胶体金结合的垫为喷涂有胶体金标记的PRRSV?M蛋白的玻璃纤维纸，所述硝酸纤维素膜上具有作为捕获抗原的PRRSV?M蛋白喷涂的检测线，以及兔抗PRRSV?M蛋白多克隆抗体喷涂的控制线。PRRSV?M蛋白采用原核表达系统，通过融合使其可溶性表达以及方便纯化的标签、不同裂解剂筛选和组合，细菌膜抽提、镍离子亲和层析、抗麦芽糖抗体偶联的亲和层析纯化、凝胶层析纯化步骤使其纯度达98%以上并具有生物活性。本发明的免疫层析条可以快速、准确、特异地检测PRRSV抗体，灵敏度高，检测费用低廉。