



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105424928 B

(45)授权公告日 2017.05.17

(21)申请号 201510764619.4	CN 104548084 A,2015.04.29,全文.
(22)申请日 2015.11.11	CN 103641920 A,2014.03.19,全文.
(65)同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 105424928 A	CN 103733067 A,2014.04.16,全文. CN 104447975 A,2015.03.25,全文. UniProt.UniProtKB-Q06W57(Q06W57_
(43)申请公布日 2016.03.23	PRRSV).《http://www.uniprot.org/uniprot/ Q06W57》.2006,
(73)专利权人 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 专利权人 吕宏亮 张澍	Sheng-hua Zhou,et al.Development and validation of an immunogold chromatographic test for on-farm detection of PRRSV.《Journal of Virological Methods》.2009,第160卷
(72)发明人 张澍 吕宏亮	全利剑 等.猪蓝耳病病毒抗体双抗原夹心 ELISA方法的建立及初步应用.《中国兽医学报》 .2010,第30卷(第10期),
(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理 有限责任公司 11139 代理人 孙皓晨 马鑫	Shangjin Cui,et al.A simple and rapid immunochromatographic strip test for detecting antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.《Journal of Virological Methods》 .2008,第152卷
(51)Int.Cl. G01N 33/569(2006.01) G01N 33/558(2006.01) G01N 33/531(2006.01)	审查员 许珊萍
(56)对比文件 CN 101216488 A,2008.07.09,权利要求1- 3,7,说明书第2-7页,图1-3. CN 101363858 A,2009.02.11,权利要求1- 4,说明书第4-5页,实施例1-3,图1A-1B.	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。

CN 105424928 B

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;

其中,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)得到的细菌培养物融化,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 NaH₂PO₄,100mM NaCl,1μM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75-100 μ g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Sephacryl 4亲和层析纯化

镍离子柱洗脱液和抗麦芽糖抗体偶联的Sephacryl 4亲和介质混合后,4 $^{\circ}$ 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 2000 2/150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。

2. 根据权利要求1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 1D NO:1和SEQ 1D NO:2所示;步骤(2)中所述的引物的序列为SEQ 1D NO:3和SEQ 1D 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)。

3. 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 $^{\circ}$ 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。

4. 根据权利要求3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 \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。

5. 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 $\text{OD}_{523\text{nm}}=2.0$ 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。

6. 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。

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蛋白的氨基酸序列如SEQ 1D NO.6所示。

8. 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蛋白的制备方法以及由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 NaH₂PO₄,100mM NaCl,1μM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 Ni²⁺ 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)-R1LP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:CGMCCNO.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(Q1Aamp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 11 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11(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 $^{\circ}$ C15分钟、99 $^{\circ}$ C5分钟、5 $^{\circ}$ C5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11(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 $^{\circ}$ C5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1PRRSV 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HindIII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)-R1LP、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)-R1LP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,R1LP)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 $^{\circ}$ C培养4-6小时,离心收集细菌,-80 $^{\circ}$ C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 μ M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800μl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, 45μl转移到另一分析用96孔板, 对照孔只加入裂解剂, 每孔加入5μl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50μl溶解缓冲液, 取10μl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] 1.4PRRSV-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)、膜抽取物、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, 0.45μm)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、100μg/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,1PTG)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100μg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500μL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TrtonX-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综合征病毒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PRRSVM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0.1mL10%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 K₂CO₃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×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±0.7nm,适合

制备胶体金标记的M蛋白。M蛋白的浓度40 μ 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OD523nm=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 μ l血清直接上样样品孔,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,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PRRSV10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 $^{\circ}$ 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7.01 \log TCID₅₀/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℃灭活30分钟,PBS1:10稀释。MARC-145细胞在96孔板上培养,以MOI=0.01接种HP-PRRSV-JXM-F5各孔,,37℃、5%CO₂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℃潮湿孵箱孵育30分钟,300μI PBS洗涤三次,加入荧光异硫酸丙酯结合的抗猪IgG抗体,37℃潮湿孵箱孵育30分钟,300μI 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3PRRSV 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	IFA	M	ELISA	IFA	M	ELISA	IFA	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5 PRRSV 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。

序列表

序列表

<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> KLP1150599

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 27bp

<212> DNA

<213> MF1引物

<400> 1
gcatgcatgg ggtcgtccit agatgac 27

<210> 2

<211> 29bp

<212> DNA

<213> MR1引物

<400> 2
aagcttttat ttggcatatt tgacaagca 29

<210> 3

<211> 22bp

<212> DNA

<213> MR2引物

<400> 3
ggatccccca cggccactgc ta 22

<210> 4

<211> 47bp

<212> DNA

<213> MF2引物

<400> 4
aagcttttat ttgcatatt tgacaagcac accaccacca ccaccac 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
atggggtcat ccttagatga cttctgcat gatagcacag ccccacaaaa ggtgctcttg 60
gcgttttcta tcaectaac gccagtgatg atatacgecc taaaggtaa tcgcgccga 120
ctgctagggc ttttgacct ttgatcttc ctgaattgtg cttteacett cgggtatatg 180
acattcatgc acttcagag taaaaataag gtcgcgtca etatgggagc agtagtgga 240
ctcctttggg ggggtgactc agccatagaa acctggagat tcatcacctc cagatgccgt 300
ttgtgcttgc taggcgcgaa gtacattctg gccctgccc accaegtiga aagtgcgca 360
ggctttcatc cgatcgcgcc aatgataac caccgatttg tcgtccggcg tcccgctct 420
actacggcca acggcacatt ggtgccgggg ttgaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa 480
gctgtaaac agggagtggg aaacctgttt aatatgcca 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 ***

[0001]

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	CN105424928B	公开(公告)日	2017-05-17
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	CN105424928A		
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，以及免抗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。

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	14809	