



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102608315 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 25

(21) 申请号 201210039359. 0

(22) 申请日 2012. 02. 21

(71) 申请人 武汉科前动物生物制品有限责任公司

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

(72) 发明人 但汉并 王艳伟 刘学刚 卢顺
董晓辉 徐高原 金梅林 陈焕春

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫
试剂盒及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒及应用,包括辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体、猪伪狂犬病毒为伪狂犬病毒鄂 A 株;还包括酶标板、样品稀释液、阴(阳)性对照、显色液、洗涤液、终止液;该试剂盒在检测猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体中的应用,其步骤:a、从试剂盒中取出酶标板,将稀释好的待检血清加入抗原包被板中,同时设阴、阳性对照孔;b、振匀孔中样品,甩掉板孔中的溶液,用洗涤液洗;c、每孔加酶标单抗,洗涤,加显色液,室温避光显色,加终止液,用酶标仪测定每孔 OD_{630nm} 读值。该试剂盒特异性好,灵敏度高。检测时间短;结果判定采用 S/N 比值法,准确性高。

1. 一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒,其特征在于:包括辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒 gE 蛋白的单克隆抗体、猪伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体是以猪伪狂犬病毒为免疫原得到的单克隆抗体、猪伪狂犬病毒为伪狂犬病毒鄂 A 株;

所述的试剂盒还包括酶标板、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、洗涤液、显色液 A、显色液 B、终止液;

所述的酶标板是以猪伪狂犬病毒在包被酶标板时用 0.1mol/L, pH9.6 的碳酸氢钠溶液作为包被缓冲液;

所述的阳性对照为猪伪狂犬病毒感染的猪阳性对照血清;

所述的阴性对照为未感染过猪伪狂犬病毒的健康猪阴性血清;

所述的洗涤液为含有 0.05% 体积比 Tween-20 的 PBS 缓冲液;

所述的终止液为含 0.25% 体积比氢氟酸溶液;

所述的显色液 A 为含有 50mg/mL 过氧化氢脲的柠檬酸盐缓冲液,显色液 B 液为含有 0.2mg/mL TMB pH5.0 的柠檬酸 / 柠檬酸钠缓冲液;

所述的样品稀释液液为含 2.5mg/mL 的明胶的 DMEM 培养基。

2. 根据权利要求 1 所述的一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒,其特征在于:所述的单克隆抗体,其制备过程是采用杂交瘤细胞技术,用纯化的猪伪狂犬病毒鄂 A 株免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合,用 HAT 选择性培养基进行培养后,再用猪伪狂犬病毒鄂 A 株和伪狂犬病毒 gE/ g1 基因缺失株进行间接免疫荧光筛选,筛选的阳性细胞株经有限稀释法克隆,再用猪伪狂犬病毒感染的猪阳性对照血清和猪伪狂犬病毒基因缺失疫苗免疫的阴性对照血清进行阻断 ELISA 筛选,最终筛选出单克隆抗体,分泌此抗体的细胞株命名为 2E6。

3. 权利要求 1 所述的一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒在检测猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫中的应用,其步骤是:

1) 从试剂盒中取出酶标板,用样品稀释液将待检血清做 2 倍稀释:60μL 样品稀释液和 60μL 待检血清混合,取 100μL 混合液加入酶标板中,同时阳性对照和阴性对照各加 2 孔,每孔 100μL;

2) 轻轻振匀孔中样品,置 37°C 温育 45 分钟;

3) 弃去孔中的溶液,加入洗涤液,200μL / 孔,静置 3 分钟倒掉,重复洗板 5 次,最后一次在吸水纸上拍干;

4) 每孔加酶标单抗 100μL,置 37°C 温育 20 分钟后洗板 5 次;

5) 每孔加显色液 A、显色液 B 各一滴,混匀,室温避光显色 10 分钟,每孔加终止液一滴,10 分钟内用酶标仪测定每孔 OD_{630nm} 读值。

一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及动物疫病检测,具体涉及一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫试剂盒,同时还涉及一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒用途,适用于检测猪血清中的伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体水平。

技术背景

[0002] 伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病病毒 (Pseudorabies Virus, PrV) 引起的包括家畜和多种野生动物的一种以发热、奇痒及脑脊髓炎为症状的重要传染病。该病给养猪业造成了巨大的经济损失,猪是本病的天然宿主和储存者。预防、控制和最终根除该病是我国当前面临的一项艰巨任务。在伪狂犬病的根除计划中,监测和检测猪血清中伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体是非常重要的一个环节。因为目前市面上的伪狂犬疫苗基本上都是 gE 基因缺失的疫苗,接种疫苗的猪只,血清中不含有猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体。如果检测出了 gE 蛋白抗体,说明猪已经被伪狂犬病病毒的野毒感染。可将感染的猪淘汰,彻底根除伪狂犬病。

[0003] 目前国内检测猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体一般采用间接 ELISA 方法等,这些方法敏感性不高,因次不可避免会对实际结果造成误判。

[0004] 本发明应用猪伪狂犬病毒 gE 蛋白的单克隆抗体及阻断 ELISA 检测技术,使试剂盒具有很好的敏感性和特异性。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供了一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫试剂盒,该试剂盒的优点是使用了辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的单克隆抗体,提高了检测的灵敏性和特异性。

[0006] 本发明的另一个目的是在于提供了一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫试剂盒的应用。将猪伪狂犬病毒作为抗原包被于 ELISA 板上,然后加待检血清孵育,再加入酶标记的猪伪狂犬病毒 gE 单抗,显色时应出现两种情况,如果待检血清是阳性,那么此时加入的酶标单抗就会被阳性血清中的抗体阻断,酶标仪检测数值就会越低。如果是待检血清阴性,那么酶标单抗就会继续与 ELISA 板上猪伪狂犬病毒抗原反应,得到的数值就会越高。该试剂盒特异性好、敏感性高。与美国 IDEXX 公司猪伪狂犬病毒 g1 蛋白抗体 ELISA 试剂盒的检测符合率为 97%。有着良好的应用前景。

[0007] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0008] 一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒,包括辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒的单克隆抗体,所述的猪伪狂犬病毒单克隆抗体是以猪伪狂犬病毒为免疫原得到的杂交瘤细胞株 2E6 分泌的单克隆抗体,所述的猪伪狂犬病毒为伪狂犬病毒鄂 A 株(该伪狂犬病毒鄂 A 株来源见参考文献:陈焕春等,猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定,畜牧兽医学报,1998 年 02 期)。

[0009] 所述的试剂盒还包括酶标板、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、洗涤液、显色液 A、显色液 B、终止液。

[0010] 所述的酶标板是以猪伪狂犬病毒在包被酶标板时用 0.1mol/L, pH9.6 的碳酸氢钠溶液作为包被缓冲液。

[0011] 所述的阳性对照为猪伪狂犬病毒感染的猪阳性对照血清,所述的阴性对照为未感染过猪伪狂犬病毒的健康猪阴性血清。

[0012] 所述的洗涤液为含有 0.05% 体积比 Tween-20 的 PBS 缓冲液;所述的终止液为含 0.25% 体积比氢氟酸溶液。

[0013] 所述的显色液 A 为含有 50mg/mL 过氧化氢脲的柠檬酸盐缓冲液,显色液 B 液为含有 0.2mg/mL TMB pH5.0 的柠檬酸 / 柠檬酸钠缓冲液。

[0014] 所述的样品稀释液液为含 2.5mg/mL 的明胶的 DMEM 培养基。

[0015] 所述的单克隆抗体,其制备过程是采用杂交瘤细胞技术(参见文献:沈关心、周汝麟,现代免疫学实验技术,武汉:湖北科学技术出版社,,1998),用纯化的猪伪狂犬病毒(鄂 A 株)免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)进行细胞融合,用 HAT(购自 SIGMA 公司)选择性培养基进行培养后,再用猪伪狂犬病毒鄂 A 株和伪狂犬病 gE/gI 基因缺失株(参见中国发明专利申请公开说明书,专利申请号 200510019513.8)进行间接免疫荧光筛选,筛选的阳性细胞株经有限稀释法克隆,再用猪伪狂犬病毒感染的猪阳性对照血清和猪伪狂犬病毒基因缺失疫苗免疫的阴性对照血清进行阻断 ELISA 筛选,最终筛选到一株具有阻断效果的单克隆抗体,分泌此抗体的细胞株命名为 2E6。

[0016] 一种猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒在检测猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫中的应用,其步骤是:

[0017] 1) 从试剂盒中取出酶标板(包被有病毒抗原的检测板),用样品稀释液将待检血清做 2 倍稀释(60 μ L 样品稀释液和 60 μ L 待检血清混合),取 100 μ L 混合液加入酶标板中,同时阳性对照和阴性对照各加 2 孔,每孔 100 μ L。

[0018] 2) 轻轻振匀孔中样品(勿溢出),置 37°C 温育 45 分钟。

[0019] 3) 弃去孔中的溶液,加入洗涤液,200 μ L/孔,静置 3 分钟倒掉,重复洗板 5 次,最后一次在吸水纸上拍干。

[0020] 4) 每孔加酶标单抗 100 μ L,置 37°C 温育 20 分钟后洗板 5 次(方法同步骤 3)。

[0021] 5) 每孔加显色液 A、显色液 B 各一滴(约 50 μ L),混匀,室温(18 ~ 25°C,以下相同)避光显色 10 分钟。每孔加终止液一滴(约 50 μ L),10 分钟内用酶标仪测定每孔 OD_{630nm} 读值。

[0022] 本发明试剂盒判定标准为:试验成立条件是阴性对照孔平均 OD_{630nm} 值与阳性对照孔平均 OD_{630nm} 值之差大于或等于 0.3。 S = 样品孔 OD_{630nm} 值, N = 阴性对照孔平均 OD_{630nm} 值。若 S/N 比值小于或等于 0.35,样品判为 PRV-gE 抗体阳性。若 S/N 比值小于或等于 0.4 但大于 0.35,该样品必须重测,如果结果相同,则过一段时间后重新从动物取样进行检测。若 S/N 比值大于 0.4,样品判为 PRV-gE 抗体阴性。

[0023] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

[0024] 1. 由于酶标单克隆抗体的使用,特异性好,灵敏度高。

[0025] 2. 检测时间短,一般 1.5 个小时内即可出结果;

[0026] 3. 结果判定采用 S/N 比值法,科学合理,准确性高。

[0027] 实施例 1:

[0028] 一种检测猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫试剂盒,包括辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒的单克隆抗体,所述的猪伪狂犬病毒单克隆抗体是以猪伪狂犬病毒为免疫原得到的杂交瘤细胞株 2E6 分泌的单克隆抗体,所述的猪伪狂犬病毒为伪狂犬病毒鄂 A 株(该伪狂犬病毒鄂 A 株来源见参考文献:陈焕春等,猪伪狂犬病毒鄂 A 株的分离鉴定,畜牧兽医学报,1998 年 02 期)。

[0029] 所述的试剂盒还包括酶标板、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、洗涤液、显色液 A、显色液 B、终止液。

[0030] 所述的酶标板是以猪伪狂犬病毒在包被酶标板时用 0.1mol/L, pH9.6 的碳酸氢钠溶液作为包被缓冲液。

[0031] 所述的阳性对照为猪伪狂犬病毒感染的猪阳性对照血清,所述的阴性对照为未感染过猪伪狂犬病毒的健康猪阴性血清。

[0032] 所述的洗涤液为含有 0.05% 体积比 Tween-20 的 PBS 缓冲液;所述的终止液为含 0.25% 体积比氢氟酸溶液。

[0033] 所述的显色液 A 为含有 50mg/mL 过氧化氢脲的柠檬酸盐缓冲液,显色液 B 液为含有 0.2mg/mL TMB pH5.0 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液。

[0034] 所述的样品稀释液为含 2.5mg/mL 的明胶的 DMEM 培养基。

[0035] 所述的单克隆抗体,其制备过程是采用杂交瘤细胞技术(参见文献:沈关心、周汝麟,现代免疫学实验技术,武汉:湖北科学技术出版社,,1998),用纯化的猪伪狂犬病毒(鄂 A 株)免疫 BALB/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)进行细胞融合,用 HAT(购自 SIGMA 公司)选择性培养基进行培养后,再用猪伪狂犬病毒鄂 A 株和伪狂犬病 gE/g1 基因缺失株(参见中国发明专利申请公开说明书,专利申请号 200510019513.8)进行间接免疫荧光筛选,筛选的阳性细胞株经有限稀释法克隆,再用猪伪狂犬病毒感染的猪阳性对照血清和猪伪狂犬病毒基因缺失疫苗免疫的阴性对照血清进行阻断 ELISA 筛选,最终筛选到一株具有阻断效果的单克隆抗体,分泌此抗体的细胞株命名为 2E6。

[0036] 试剂盒组装:

[0037] 试剂盒含 96 孔 ELISA 检测板 2 块,酶标抗伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体 1 瓶(20mL/瓶),阴、阳性对照各 2 管(1.5mL/管),样品稀释液 1 瓶(50mL/瓶),20 倍浓缩洗涤液 1 瓶(30mL/瓶),底物液 A、底物液 B、终止液各 1 瓶(10mL/瓶),附说明书 1 份。

[0038] 20 倍浓缩洗涤液 160 克氯化钠、10ml Tween-20 溶于 1000ml 蒸馏水中。

[0039] 封闭液含 0.5% BSA 的磷酸盐缓冲液。

[0040] 样品稀释液为含有质量百分含量为 0.25% 的明胶的 DMEM 培养基。

[0041] 终止液 0.25% 体积比氢氟酸

[0042] 阳性、阴性对照的制备:

[0043] 将筛选获得的猪伪狂犬病毒标准阳性血清按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素,无菌过滤,作为阳性对照;将筛选获得的猪标准阴性血清,按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素,无菌过滤,作为阴性对照。

[0044] 实施例 2:抗原包被板的制备

[0045] 病毒培养及纯化 :BHK 细胞用含 10% 体积比小牛血清的 DMEM 于 37℃ 培养,细胞长成单层后,倒掉上清,接种少量病毒,加维持液 (含 3% 体积比小牛血清的 DMEM),液体刚盖住细胞层即可,37℃ 吸附 1 小时后,添加维持液至原来培养细胞时的体积,37℃ 温箱继续培养,待 80% 以上细胞出现病变时,将细胞瓶置 -20℃ 冰箱中,反复冻融 3 次,收集病毒液。收集的病毒液 5000r/min 4℃ 离心 30min 去沉淀。上清用 27000r/min 4℃ 离心 1 小时,沉淀用少量 pH7.20.01mol/L PBS 重悬。以 PBS 制备质量分数 20%、35%、45% 和 60% 质量体积比的不连续梯度蔗糖,加样品至梯度界面上,4℃ 27000r/min 离心 90min。收集 45% 浓度处的蛋白带至离心管中,用 PBS 稀释重悬,27000r/min 离心 2 小时脱糖。最后用 PBS 悬浮沉淀。 -20℃ 保存备用。

[0046] 将病毒抗原用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释为 500ng/mL,按 100 μ L/ 孔加于聚苯乙烯微孔板中,4℃ 放置过夜。甩干;按 150 μ L/ 孔用含 0.5% BSA pH7.4 的磷酸盐缓冲液 4℃ 封闭 1 小时、甩干;按 100 μ L/ 孔用含 20% 质量体积比蔗糖 pH7.4 的磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时;置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装中密封保存。

[0047] 实施例 3 :抗伪狂犬病毒 gE 蛋白单克隆抗体的制备及标记

[0048] 饲养细胞的制备

[0049] 在融合前一天,取一只正常雌性 BALB/c 鼠,颈椎脱臼处死,75% 体积比酒精消毒 5min,甩干后移入超净工作台内,固定于经紫外消毒的泡沫板上,用灭菌眼科剪、弯头镊子剪开皮肤 (不可损伤腹膜),经钝性剥离使腹膜充分暴露。用 10mL 一次性注射器吸满含 20% 体积比胎牛血清的 HAT 选择培养液注入小鼠腹腔,右手固定注射器不动,左手用镊子夹取酒精棉轻揉小鼠腹部,再用注射器抽出腹腔内的培养液,注入灭菌平皿中,加上述培养液调整细胞密度至 10^6 个 /mL,用多道移液器分种至 4 块 96 孔细胞培养板,每孔 100uL,置 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

[0050] 制备免疫脾细胞 :

[0051] 取合适浓度的纯化 PRV 病毒抗原与等体积佐剂充分混匀,免疫 5 周龄的 Balb/C 小鼠,注射剂量为 60 ~ 100 微克。每间隔两周皮下免疫一次、连续免疫三次后,融合前 3 天腹腔加强免疫。第一次免疫时使用弗式完全佐剂,第二、三次使用弗式不完全佐剂,加强免疫时不使用佐剂。

[0052] 取经最后加强免疫的 BALB/c 鼠,眼球摘除放血,分离血清作阳性对照用。将小鼠按上法进行消毒和剥离皮肤,无菌取出脾脏,放入已盛有基础培养液的平皿中清洗,剥离结缔组织。将脾脏移入另一盛有 10mL 基础培养液的平皿中,用针头在顶端穿孔,用一次性无菌注射器吸取 5mL 基础培养液,从脾脏一端缓慢注入,使液体从脾脏另一端针孔流出,重复 3 次。将脾细胞悬液转至 10mL 无菌离心管中,1000rpm 离心 10min,细胞沉淀用基础培养基离心洗涤一次,然后将细胞重悬,计数后备用。

[0053] 制备骨髓瘤细胞 :

[0054] 在融合前两周将在液氮中冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞取出复苏,用加有 8- 氮鸟嘌呤的 1640 完全培养基选择培养三代,以保持 HGPRT 缺陷型。选择生长旺盛,形态良好的细胞作种子细胞用 1640 完全培养基进行扩大培养。融合当天,取刚好处于对数生长期,形态良好的细胞 (细胞浑圆、透亮、大小均一、排列整齐,呈半致密分布),1000rpm 离心 10min,弃去培养液,用基础培养液洗 2 次后将细胞重悬,计数后备用。

[0055] 细胞融合：

[0056] 先将免疫脾细胞 1000r/min 离心 5min 去掉上清,于 37℃放置备用。将 1×10^7 个 SP2/0 与 10^8 个免疫脾细胞于 50mL 离心管中混匀,离心 10min。倒空上清,用灭菌的滤纸吸干管壁,轻轻敲击管底,使细胞沉淀略加松动。将装有细胞混合物的离心管放于 37℃水浴中。然后在 1min 内慢慢滴入预温至 37℃的 50% 体积比 PEG 0.8mL (Sigma),边加边轻轻用吸管尖搅拌。继续搅拌 1min。然后慢慢加入 37℃预温的基础液 10mL。具体方法为第一分钟逐滴滴入 1mL。第二分钟加 1mL,第 3-4 分钟加 3mL,第 5 分钟加其余的 5mL,每次加时需缓慢加入,并不断轻轻地搅拌。最后加入 30mL 1640 液,也需慢慢加入。800r/min 离心 5min,去上清于 37℃放置 5min。用 HAT 培养基悬浮,同时也用 HAT 培养基悬浮饲养脾细胞与融合后的细胞混合,根据需要补加适量的 HAT 培养基,分种于 96 孔细胞培养板中,约 250 μ L/孔。一次融合可接种 4 块 96 孔板。于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。融合后第二天开始观察,有无污染,于第 5 天补加 1 滴培养基,第 8 天吸去 100 μ L 培养基换 HT 培养基 100 μ L。待融合细胞集落长至培养孔 1/4,培养基略变黄时,进行抗体检测。

[0057] 阳性细胞的筛选和克隆：

[0058] 阳性细胞用间接免疫荧光的方法初步筛选:将 BHK 细胞培养于 2 块 96 孔细胞培养板中,快长成单层时,一块接种伪狂犬病毒鄂 A 株,另一块接种 gE/gI 基因缺失株伪狂犬病毒。36 小时后,当出现病变时用丙酮固定。然后各加入待筛选的杂交瘤的培养上清,37℃温育 1 小时,用 pH7.20.01mol/L 的 PBS 洗三次,再加入 1 : 200 稀释的羊抗鼠 IgG-FITC,37℃避光反应 30min,洗涤三次后,置荧光显微镜下观察。当接种鄂 A 株伪狂犬病毒的细胞孔有绿色荧光,而对应的接种 gE/gI 基因缺失株伪狂犬病毒的细胞孔没有荧光时,此细胞孔内细胞判为阳性细胞。选取生长旺盛,形态良好的阳性细胞用有限稀释法进行克隆。

[0059] 单抗鉴定：

[0060] 将初步筛选的阳性细胞孔的上清收集起来,在包被好抗原的酶标板上加 100 μ L 稀释好的对照阴、阳性猪血清,于 37℃温育 30min,洗涤三次后,再加上上述阳性细胞孔的上清 100 μ L,37℃反应 30min,洗涤三次,加稀释好的羊抗鼠 IgG-HRP,再洗板三次,加入底物液显色,用 HF 酸终止反应之后,在 630nm 的波长下测值。当加入阳性血清孔的 OD 值明显低于加入阴性血清孔 OD 值时,此单抗既为具有阻断作用的单抗。

[0061] 单克隆抗体生产：

[0062] 用常规培养液培养上述鉴定阳性杂交瘤细胞株。大量生产单克隆抗体,可采用小鼠体内诱生法。通过将上述得到的产生抗伪狂犬病毒抗体的杂交瘤细胞注入经不完全弗式佐剂处理的雌性小鼠 (6 ~ 8 周龄) 腹腔内,10 天后收集腹水,离心除去固体成分,其上清液即含有抗 PRV 病毒 gE 蛋白的单克隆抗体。

[0063] 抗体的纯化采用辛酸-硫酸铵法,具体如下:向一份预处理过的腹水中加入两份 0.06mol/L (pH = 5.0) 的乙酸缓冲液,用 0.1mol/L 的盐酸调 pH 值至 4.7。室温搅拌下在 30min 内逐渐滴加入辛酸 (每毫升稀释前的腹水加 33 μ L),4℃静置 2 小时,12000rpm 离心 30min,弃沉淀。上清经滤纸过滤后调 pH 至 7.4。在 4℃冰浴下缓慢加入 pH 为 7.4 的饱和硫酸铵,使硫酸铵最终饱和度不超过 45%,搅拌 30min,静置 2 ~ 4 小时或 4℃过夜。4℃下 12000r/min 离心 20min 弃去上清。沉淀用 0.01mol/L 的 PBS (pH = 7.4) 重悬,用 pH 为 8.0 的 10mmol/L Tris-HCl 透析过夜。收集抗体后用分光光度计检测其浓度。

[0064] 伪狂犬病毒单克隆抗体的辣根过氧化物酶标记：

[0065] 称取 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 1mL 双蒸水中，加 500 μ L 新配制的 0.06mol/L 的 NaIO₄，4℃ 放置 30min，勿超过此时间，此时溶液呈草绿色，加入 0.5mL 乙二醇 (0.16mol/L) 室温避光反应 30min。再加入 5mg/mL 的纯化抗体 1mL，在 0.05M pH9.5 的碳酸盐缓冲液中 4℃ 透析过夜。吸出后加 5mg/mL 新配的 NaBH₄ 0.2mL 4℃ 放置 2 小时，再加等体积的饱和硫酸铵溶液，4℃ 放置 30min，7000r/min 离心 10min，弃上清，用生理盐水重悬，再在 0.15M pH7.4 的 PBS 中透析过夜。收集透析袋中标记的抗体进行工作浓度标定，然后分装（每个批次的酶标抗体都要进行工作浓度标定）。

[0066] 实施例 4：

[0067] 一种检测猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体的酶联免疫试剂盒的应用，其步骤是：

[0068] 1) 从试剂盒中取出酶标板（包被有病毒抗原的检测板），用样品稀释液将待检血清做 2 倍稀释（60 μ L 样品稀释液和 60 μ L 待检血清混合），取 100 μ L 混合液加入酶标板中，同时阳性对照和阴性对照各加 2 孔，每孔 100 μ L。

[0069] 2) 轻轻振匀孔中样品（勿溢出），置 37℃ 温育 45 分钟。

[0070] 3) 弃去孔中的溶液，加入洗涤液，200 μ L/孔，静置 3 分钟倒掉，重复洗板 5 次，最后一次在吸水纸上拍干。

[0071] 4) 每孔加酶标单抗 100 μ L，置 37℃ 温育 20 分钟后洗板 5 次，（方法同步骤 3）。

[0072] 5) 每孔加显色液 A、显色液 B 各一滴（约 50 μ L），混匀，室温（18 ~ 25℃，以下相同）避光显色 10 分钟。每孔加终止液一滴（约 50 μ L），10 分钟内用酶标仪测定每孔 OD_{630nm} 读值。应用中所使用效果实验的情况如下：

[0073] 1 特异性试验：

[0074] 用猪伪狂犬病病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测猪伪狂犬病、猪瘟、猪口蹄疫（O 型）、猪乙型脑炎和猪繁殖与呼吸综合征等标准阳性血清和猪伪狂犬病阴性血清，除 PRV 标准阳性血清的 S/N 值显著小于 0.35 外，其余血清 S/N 值大于 0.4，符合阴性血清的判定标准，表明这种方法的特异性良好。

[0075] 表 1 特异性血清的检测

[0076]

	PRV	CSFV	FMD	JEV	PRRSV	阴性对照
S/N	0.133	0.972	0.904	0.923	0.845	1
OD ₆₃₀	0.146	1.065	0.991	1.012	0.926	1.096

[0077] 2、敏感性的检测：

[0078] 用自制试剂盒和进口 IDEXX 试剂盒同时检测不同稀释倍数的感染猪伪狂犬病毒的血清，从表 3 中可以看出 948 号血清稀释 20 倍时，两种方法检测抗体均为阳性，950 号和 955 号血清稀释 40 倍时，两种方法检测抗体均为阳性，说明自制的试剂盒和进口 IDEXX 试剂盒敏感性相当。

[0079] 表 3 不同稀释倍数的感染血清检测结果

[0080]

血清编号 稀释倍数	948# (自制)	948# (IDEXX)	950# (自制)	950# (IDEXX)	955# (自制)	955# (IDEXX)
5	0.347	0.447	0.261	0.262	0.265	0.306
10	0.335	0.479	0.233	0.340	0.269	0.370
20	0.345	0.568	0.283	0.419	0.281	0.489
40	0.399	0.642	0.338	0.521	0.333	0.575
80	0.429	0.718	0.356	0.647	0.378	0.671
160	0.481	0.756	0.450	0.693	0.427	0.695
320	0.511	0.799	0.527	0.777	0.475	0.725
640	0.563	0.873	0.583	0.852	0.535	0.790

[0081] 注:IDEXX 试剂盒判定标准:S/N 大于 0.7 判为阴性,S/N 小于或等于 0.6 判为阳性。 $0.6 < S/N \leq 0.7$ 判为可疑。自制试剂盒判定标准为:S/N 大于 0.4 判为阴性,S/N 小于或等于 0.35 判为阳性。 $0.35 < S/N \leq 0.4$ 判为可疑。

[0082] 3、符合率比较:

[0083] 用两种检测试剂盒平行检测来自不同猪场的 979 份血清,结果见表 2。从表中可以看出,两种试剂盒检测样品的阳性符合率为 91%,阴性样品的符合率为 98%,总符合率为 97%。

[0084] 表 2 猪伪狂犬病毒 gE 蛋白抗体检测试剂盒与 IDEXX 公司 PRV-g1 ELISA 抗体检测试剂盒符合率比较

[0085]

		IDEXX (gI-ELISA)		总数
		阳性	阴性	
猪伪狂犬病毒gE 抗体检测试剂盒(阻 断法)	阳性	175	12	187
	阴性	18	774	792
	总数	193	786	979

专利名称(译)	一种猪伪狂犬病毒gE蛋白抗体的酶联免疫试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN102608315A	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201210039359.0	申请日	2012-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	武汉科前动物生物制品有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	武汉科前动物生物制品有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉科前动物生物制品有限责任公司		
[标]发明人	但汉并 王艳伟 刘学刚 卢顺 董晓辉 徐高原 金梅林 陈焕春		
发明人	但汉并 王艳伟 刘学刚 卢顺 董晓辉 徐高原 金梅林 陈焕春		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/78		
代理人(译)	王敏锋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪伪狂犬病毒gE蛋白抗体的酶联免疫的试剂盒及应用，包括辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒gE蛋白单克隆抗体、猪伪狂犬病毒为伪狂犬病毒鄂A株；还包括酶标板、样品稀释液、阴（阳）性对照、显色液、洗涤液、终止液；该试剂盒在检测猪伪狂犬病毒gE蛋白抗体中的应用，其步骤：a、从试剂盒中取出酶标板，将稀释好的待检血清加入抗原包被板中，同时设阴、阳性对照孔；b、振匀孔中样品，甩掉板孔中的溶液，用洗涤液洗；c、每孔加酶标单抗，洗涤，加显色液，室温避光显色，加终止液，用酶标仪测定每孔OD630nm读值。该试剂盒特异性好，灵敏度高。检测时间短；结果判定采用S/N比值法，准确性高。

血清编号	948#	948#	950#	950#	955#	955#
稀释倍数	(自制)	(IDEXX)	(自制)	(IDEXX)	(自制)	(IDEXX)
5	0.347	0.447	0.261	0.262	0.265	0.306
10	0.335	0.479	0.233	0.340	0.269	0.370
20	0.345	0.568	0.283	0.419	0.281	0.489
40	0.399	0.642	0.338	0.521	0.333	0.575
80	0.429	0.718	0.356	0.647	0.378	0.671
160	0.481	0.756	0.450	0.693	0.427	0.695
320	0.511	0.799	0.527	0.777	0.475	0.725
640	0.563	0.873	0.583	0.852	0.535	0.790