



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102590503 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201210018567. 2

(22) 申请日 2012. 01. 20

(71) 申请人 四川农业大学

地址 625014 四川省雅安市新康路 46 号

(72) 发明人 徐志文 朱玲 李淞 刘骁

郭万柱 廖珊

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页

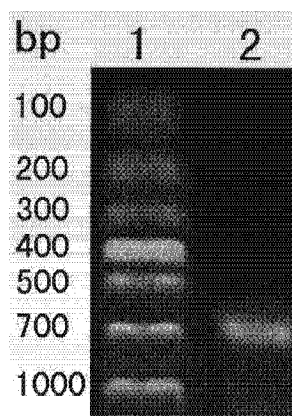
序列表 2 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

一种猪细小病毒 II 型抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒

### (57) 摘要

本发明公开了一种猪细小病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒。包括抗体检测板, 酶结合物工作液, 样品稀释液, 显色液 A, 显色液 B, 终止液; 阻断抗体, 洗涤缓冲液; 所述的阻断抗体为使用纯化后的 TTV2-ORF1 基因抗原表位区蛋白免疫家兔后, 从家兔体内获得的多克隆抗体。本发明有益的技术效果是: 特异性强、操作简单, 适合于临床大规模推广应用, 具有良好的市场前景。



1. 一种猪细小环病毒 II 型抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒,其特征在于:包括抗体检测板,酶结合物工作液,样品稀释液,显色液 A,显色液 B,终止液;阻断抗体,洗涤缓冲液;所述的阻断抗体为使用纯化后的 TTV2-ORF1 基因抗原表位区蛋白免疫家兔后,从家兔体内获得的多克隆抗体;

所述酶结合物工作液为:商品化的辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体,进行 1 : 12000 稀释的稀释液,酶标二抗直接加入酶标二抗稀释液中,酶标二抗稀释液为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  29g,  $\text{KCl}$  0.2g, PEG6000 40g, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000ml, 加入 0.01% ~ 0.05% 硫柳汞, 调 pH 至 7.4;

所述样品稀释液为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  29g,  $\text{KCl}$  0.2g, PEG6000 40g, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000ml, 加入 0.01% ~ 0.05% 叠氮钠, 调 pH 至 7.4;

所述显色液 A 为: 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  51.4ml, 0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml, 用 HCl 调 pH 值至 5.0 ~ 5.4, 加 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  67  $\mu\text{l}$ ;

所述显色液 B 为: TMB 50mg, 加无水乙醇 5ml, 搅拌溶解后加 0.1mol/L 柠檬酸 5ml, 0.1mol/L EDTA 0.5ml, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 100ml;

所述终止液为 2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液;

所述抗体检测板为猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白重组抗原包被的可拆卸 96 孔酶标反应板, 酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体, 阻断抗体为兔抗猪细小环病毒 II 型 (TTV2) ORF1 基因优势抗原表位区蛋白多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于: 所述阻断抗体的制备: 使用纯化后的猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白与弗氏佐剂制成油乳剂, 对体重在 2kg 左右的健康公兔进行免疫, 使其产生抗体; 第一次免疫取 1mL 纯化产物, 与 1mL 完全弗氏佐剂混合制成油乳剂, 皮下多点免疫家兔; 14 天后进行第二次免疫, 取 2mL 纯化产物与 2mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂, 皮下多点免疫家兔; 7 天后进行第三次免疫, 取 3mL 纯化产物与 3mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂, 皮下多点免疫家兔; 7 天后进行第四次免疫, 取 0.5mL 纯化产物注射入耳缘静脉免疫家兔; 一周后无菌采取心血, 分离出的血清即为阻断抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于: 所述猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备方法为:

猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备: 猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因 (GU570197.1) 优势抗原表位区, 中一段优势抗原表位区的 696 个碱基序列, 进行密码子优化以后, 在宝生物公司合成优化后的基因序列, 而后将其克隆到 pET32a(+) 表达载体, 并分别转化到受体菌 DH5  $\alpha$  和 Rosetta (DE3) 中, 将两株重组菌分别命名为: 大肠埃希氏菌 DH5  $\alpha$  -pET-ORF1 株和大肠埃希氏菌 Rosetta-pET-ORF1 株, 将 Rosetta-pET-ORF1 经 IPTG 诱导表达, 经裂解、纯化后获得。

4. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒, 其特征在于: 所述抗体检测板的制备方法为: 使用 pH = 9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液作为包被液, 将纯化的猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白作为抗原按照 1 : 320 的体积比例稀释后, 每个样孔加入 100  $\mu\text{L}$  抗原, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  10 ~ 20h, 进行包被, 使用样品稀释液覆盖后抽空封装, 置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

5. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒的检测方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

- 1) 将 10× 洗涤缓冲液加入 ddH<sub>2</sub>O 稀释成 1× 洗涤工作液,将阻断抗体用样品稀释液进行 2000 倍稀释,将待检样品进行 1 : 5 稀释 ;
- 2) 在抗原包被板上设定阻断抗体对照孔,加入阻断抗体,每孔 100 μ l ;
- 3) 将待检样品加入检测样孔中,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37℃ 孵育 1h ;
- 4) 将各样孔中的液体倒掉后用 1× 洗涤工作液洗涤,每孔 300 μ l,洗涤 3 次,每次 3min ;
- 5) 将稀释后的阻断抗体加入检测样孔,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37℃ 孵育 1h,重复步骤 4) ;
- 6) 加入酶标二抗工作液,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37℃ 孵育 30min,重复步骤 4) ;
- 7) 每孔按顺序加入显色液 A50 μ l,再向每孔中加入显色液 B50 μ l,室温显色 10min ;
- 8) 每孔按顺序加入终止液 (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 μ l 终止反应,450nm 单波长测定 OD 值,计算抑制率 ;
- 9) 检测样品的判断标准为 :

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ \frac{\text{阻断抗体 OD 值} - \text{样品 OD 值}}{\text{阻断抗体 OD 值}} \right] \times 100\%$$

当样品抑制率 ≥ 30% 时为 PCMV 抗体阳性,当样品抑制率 < 20% 时为 PCMV 抗体阴性,抑制率在两者之间的样品需要重复检测一次。

## 一种猪细小环病毒 II 型抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及猪的一种病毒抗体检测方法,具体说是猪细小环病毒 II 型 (TTV2) 抗体的间接 ELISA 检测方法。

### 背景技术

[0002] 养猪业是我国畜牧养殖业的重要组成部分,在我国的农业经济中占有着非常重要的地位,然而猪病的肆虐不但制约着我国养殖业向规模化、集约化方向的迈进,而且影响着我国畜牧类产品的进出口等国际化多边贸易的发展,同时会给国家和地区带来巨大的社会、经济和人类生命财产损失。猪细小环病毒常与猪圆环病毒、蓝耳病毒发生混合感染,给猪的生产带来了严重的影响和危害。猪细小环病毒的防控直接影响着我国养猪业的发展,是我国畜牧业生产所关注的重点。

[0003] 1997年12月,日本学者Nishizawa等利用代表性差异分析法 (representational difference analysis),首次从一位名为 Torque Tero 的输血后非甲 - 非庚型肝炎病人的血清中克隆获得了一种新的不明病原 DNA (N22),克隆的病毒 DNA 序列并不与任何一条参考序列相同或相近,因此证明此病毒可能是一个新的病毒。近十五年来,学术界对 TTV 的研究取得了一定的进展,对该病毒有了较深的认识。2005年国际病毒分类命名委员会将该病毒分类为圆环病毒科指环病毒属,并统一命名为 Torque Tero 病毒,而不称其为输血传播病毒 (transfusion transmitted virus TTV),我国学者也将其翻译为细小环病毒。该病毒为一种小的十二面体的无囊膜的单股环状负链 DNA 病毒,能感染多种脊椎动物,包括人和猪。根据基因序列差异,将猪的 TTV 分为两种不同的基因型,即基因 I 型和基因 II 型 (TTV1 和 TTV2)。

[0004] 2002年,日本学者 Okamoto 首次从猪体内检测到了种属特异的猪 TTV 病毒的存在,与人 TTV 属于同一类,此后世界各地陆续报道该病毒的发现。目前已经证明 TTVs 与 PRRSV、PCV 等混合感染会加重猪皮炎和肾病综合症 (PDNS) 和断奶和多系统衰竭综合征 (PMWS) 的症状。

[0005] TTV 在猪群中的感染呈全球性分布,包括美国、加拿大、中国、台湾、韩国、法国、意大利和西班牙等国都有不同程度的感染,其感染率在 24%~100%。通常在同一猪群中 TTV2 的感染率较 TTV1 高,母猪较公猪易感。同一国家不同地区或不同猪场中 TTV 感染存在很大的差异。对意大利不同猪场的调查发现,一些猪场不存在 TTV1 的感染,然而另外一些猪场的感染率却高达 53%。对我国广东、福建、江西、河北、安徽、浙江和河南 7 省 258 份猪血样品的 TTV 检测结果表明:TTV 感染率在 24.1%~100%之间。此病毒感染一旦发生,就很难控制和消灭,因此及时准确的检测 TTV,预防和控制该病毒的感染,对于畜牧业特别是养猪业具有重大的意义。

[0006] 目前猪 TTV 的检测主要依赖 PCR 技术,但也有人应用双抗原夹心酶联免疫法 (ELISA)。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种猪细环病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒及猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区所表达蛋白（在本发明申请中以下简称 ORF1 蛋白）作为抗原（在本发明申请中以下简称为重组抗原）包被酶标反应板的制备方法，为临床检测猪细环病毒抗体提供快速、准确、简便的检测工具。

[0008] 本发明技术方案：

[0009] 一种猪细环病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒，包括抗体检测板，酶结合物工作液，样品稀释液，显色液 A，显色液 B，终止液；阻断抗体，洗涤缓冲液；所述的阻断抗体为使用纯化后的 TTV2-ORF1 基因抗原表位区蛋白免疫家兔后，从家兔体内获得的多克隆抗体；

[0010] 所述酶结合物工作液为：商品化的辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体，进行 1：12000 稀释的稀释液，酶标二抗直接加入酶标二抗稀释液中，酶标二抗稀释液为： $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g，NaCl 29g，KCl 0.2g，PEG6000 40g，加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000ml，加入 0.01%~0.05% 硫柳汞，调 pH 至 7.4；

[0011] 所述样品稀释液为： $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g，NaCl 29g，KCl 0.2g，PEG6000 40g，加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000ml，加入 0.01%~0.05% 叠氮钠，调 pH 至 7.4；

[0012] 所述显色液 A 为：0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  51.4ml，0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml，用 HCl 调 pH 值至 5.0~5.4，加 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  67  $\mu\text{l}$ ；

[0013] 所述显色液 B 为：TMB 50mg，加无水乙醇 5ml，搅拌溶解后加 0.1mol/L 柠檬酸 5ml，0.1mol/L EDTA 0.5ml，加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 100ml；

[0014] 所述终止液为 2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液；

[0015] 所述抗体检测板为猪细环病毒 II 型 ORF1 抗原表位区蛋白重组抗原包被的可拆卸 96 孔酶标反应板，酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体，阻断抗体为兔抗猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白多克隆抗体。

[0016] 所述的检测试剂盒，所述的阻断抗体的制备：使用纯化后的猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白与弗氏佐剂制成油乳剂，对体重在 2kg 左右的健康公兔进行免疫，使其产生抗体；第一次免疫取 1mL 纯化产物，与 1mL 完全弗氏佐剂混合制成油乳剂，皮下多点免疫家兔；14 天后进行第二次免疫，取 2mL 纯化产物与 2mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂，皮下多点免疫家兔；7 天后进行第三次免疫，取 3mL 纯化产物与 3mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂，皮下多点免疫家兔；7 天后进行第四次免疫，取 0.5mL 纯化产物注射入耳缘静脉免疫家兔；一周后无菌采取心血，分离出的血清即为阻断抗体。

[0017] 所述的检测试剂盒，所述猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备方法为：

[0018] 猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备：选择猪细环病毒 II 型 ORF1 (GU570197.1) 中一段优势抗原表位区的 696bp 的碱基序列，进行密码子优化以后，在宝生物公司合成优化后的基因序列，而后将其克隆到 pET32a(+) 表达载体，并分别转化到受体菌 DH5  $\alpha$  和 Rosetta (DE3) 中，将两株重组菌分别命名为：大肠埃希氏菌 DH5  $\alpha$  -pET-ORF1 株和大肠埃希氏菌 Rosetta-pET-ORF1 株，将 Rosetta-pET-ORF1 经 IPTG 诱导表达，经裂解、纯化后获得。

[0019] 所述的检测试剂盒,所述抗体检测板的制备方法为:使用 pH = 9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液作为包被液,将纯化的 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白作为抗原按照 1 : 320 的体积比例稀释后,每个样孔加入 100 μL 抗原,置于 4℃ 10 ~ 20h,进行包被,使用样品稀释液覆盖后抽空封装,置 4℃ 保存。

[0020] 本发明还提供一种引用上述检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 将 10× 洗涤缓冲液加入 ddH<sub>2</sub>O 稀释成 1× 洗涤工作液,将阻断抗体用样品稀释液进行 2000 倍稀释,将待检样品进行 1 : 5 稀释;

[0022] 2) 在抗原包被板上设定阻断抗体对照孔,加入阻断抗体,每孔 100 μL;

[0023] 3) 将待检样品加入检测样孔中,每孔 100 μL,封装于封口袋中 37℃ 孵育 1h;

[0024] 4) 将各样孔中的液体倒掉后用 1× 洗涤工作液洗涤,每孔 300 μL,洗涤 3 次,每次 3min;

[0025] 5) 将稀释后的阻断抗体加入检测样孔,每孔 100 μL,封装于封口袋中 37℃ 孵育 1h,重复步骤 4);

[0026] 6) 加入酶标二抗工作液,每孔 100 μL,封装于封口袋中 37℃ 孵育 30min,重复步骤 4);

[0027] 7) 每孔按顺序加入显色液 A 50 μL,再向每孔中加入显色液 B 50 μL,室温显色 10min;

[0028] 8) 每孔按顺序加入终止液 (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 μL 终止反应,450nm 单波长测定 OD 值,计算抑制率;

[0029] 9) 检测样品的判断标准为:

[0030]

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ \frac{(\text{阻断抗体 OD 值} - \text{样品 OD 值})}{\text{阻断抗体 OD 值}} \right] \times 100\%$$

[0031] 当样品抑制率 ≥ 30% 时为 PCMV 抗体阳性,当样品抑制率 < 20% 时为 PCMV 抗体阴性,抑制率在两者之间的样品需要重复检测一次。

[0032] 为临床检测猪细小环病毒 II 型抗体提供快速、准确、简便的检测工具,本发明特异性强、灵敏度高、操作简单,适合于临床大规模推广应用,具有广阔的市场前景。

### 附图说明

[0033] 图 1 猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区 PCR 扩增电泳图谱;1 泳道 . DNAMarker, 2 泳道 . 猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区 PCR 扩增产物。

[0034] 图 2 Western blotting 电泳图谱;1 泳道 . 预染蛋白质 Marker, 2 泳道 . ORF1 优势抗原表位区蛋白, 3 泳道 . Rosetta-pET32 空载体诱导后产物。

[0035] 图 3 抗原抗体琼脂扩散试验;1 号孔 . 猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白, 2 号孔 . 多克隆抗体原液, 3 号孔 . 1 : 2 稀释多克隆抗体, 4 号孔 . 1 : 4 稀释多克隆抗体, 5 号孔 . 1 : 8 稀释多克隆抗体, 6 号孔, 1 : 16 稀释多克隆抗体, 7 号孔, 阴性血清对照。

### 具体实施方式

[0036] 以下结合具体实施例,对本发明进行详细说明。

[0037] 实施例 1

[0038] 1. 溶液的配制

[0039] (1) 0.05mol/L 碳酸盐包被缓冲液的配制:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g、 $\text{NaHCO}_3$  2.93g, 加蒸馏水至 1000mL, 调 pH 为 9.6。

[0040] (2) 封闭液的配制: BSA 30g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{KCl}$  0.2g 加蒸馏水至 1000mL, 置  $-20^\circ\text{C}$ 。

[0041] (3) 酶结合物工作液的配制: 商品化的辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体 (艾美捷科技有限公司, 美国), 按试验结果直接加入酶标二抗稀释液中进行 1 : 12000 稀释而成的稀释液。酶标二抗稀释液为:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  29g,  $\text{KCl}$  0.2g, PEG6000 40g, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000ml, 加入 0.01% ~ 0.05% 硫柳汞, 调 pH 至 7.4。

[0042] (4) 样品稀释液的配制:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  29g,  $\text{KCl}$  0.2g, PEG6000 40g, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1000ml, 加入 0.01% ~ 0.05% 叠氮钠, 调 pH 至 7.4。

[0043] (5) 10× 洗涤缓冲液的配制:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g,  $\text{NaCl}$  8.0g,  $\text{KCl}$  0.2g, Tween-20 0.5ml, 0.05% 硫柳汞, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 100ml, 调 pH 至 7.4。

[0044] (6) 显色液 A 的配制: 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  51.4ml, 0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml, 用  $\text{HCl}$  调 pH 值至 5.0 ~ 5.4, 加 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  67  $\mu\text{l}$ 。

[0045] (7) 显色液 B 的配制: TMB 50mg, 加无水乙醇 5ml, 搅拌溶解后加 0.1mol/L 柠檬酸 5ml, 0.1mol/L EDTA 0.5ml, 加  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 100ml。

[0046] (8) 终止液为 2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

[0047] 2. 阻断抗体的制备

[0048] 使用纯化后的猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白与弗氏佐剂制成油乳剂, 对体重在 2kg 左右的健康公兔进行免疫, 使其产生抗体。第一次免疫取 1mL 纯化产物 (含 0.5mg 蛋白质) 与 1mL 完全弗氏佐剂混合制成油乳剂, 皮下多点免疫家兔; 14 天后进行第二次免疫, 取 2mL 纯化产物 (含蛋白质 1mg) 与 2mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂, 皮下多点免疫家兔; 7 天后进行第三次免疫, 取 3mL 纯化产物 (含蛋白质 1.5mg) 与 3mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂, 皮下多点免疫家兔; 7 天后进行第四次免疫, 取 0.5mL 纯化产物 (含蛋白质 0.25mg) 注射入耳缘静脉免疫家兔。一周后无菌采取心血, 分离出的血清即为阻断抗体。(图 3)

[0049] 3. 包被用重组抗原的制备

[0050] 取 Rosetta-pET-ORF1 菌株接入 1000ml LB (氨苄青霉素) 液体培养基, 振荡培养至 OD 值至 0.6, 加入 IPTG 分别至 0.2mmol/L, 继续培养 3h, 离心, 弃上清, 加入 5 ~ 10mL 结合缓冲液 (20mM 磷酸钠, 0.5M 氯化钠, 30mM 咪唑, pH7.4), 反复冻融 3 次后进行 10min 超声波裂解, 离心后收集上清液, 用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜除去上清液中细胞碎片和其他块状物质。将上清液用 GE 公司 HisTrapFF 组氨酸标签融合蛋白纯化株进行过柱, 纯化后的蛋白质即为包被用重组抗原。

[0051] 4. TTV2 抗体间接阻断 ELISA 的建立:

[0052] (1) 抗原包被液的选择: 以不同浓度的猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白, 分别以柠檬酸盐缓冲液 (pH = 4.6, 0.05mol/L)、磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4,

0.01mol/L)、碳酸盐缓冲液 (pH = 9.6, 0.05mol/L)、氢氧化钠 (pH = 12.0, 0.01mol/L) 进行包被,以矩阵法进行间接 ELISA,选择碳酸盐缓冲液 (pH = 9.6, 0.05mol/L) 为最佳抗原包被液。

[0053] (2) 封闭液的选择:纯化蛋白以合适稀释度包被 96 孔板,37℃ 1h,4℃ 过夜,分别加入封闭液 5% 脱脂奶粉、1% 明胶、3% BSA,100 微升每孔,每个样重复 4 孔,进行间接 ELISA,测定其 OD 值,选择 P/N 值最大的 3% BSA 为底物的封闭液。

[0054] (3) 抗原和阻断抗体最佳反应条件确定:使用方阵法,将重组抗原 TTV2-ORF1 基因抗原表位区蛋白以 1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1280 稀释 (体积比例,下同),并进行包被,多克隆抗体作 1 : 100、1 : 200、1 : 500、1 : 1000、1 : 1500、1 : 2000、1 : 2500、1 : 3000 稀释后方阵法进行间接 ELISA,选择重组猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白 1 : 320 稀释 (蛋白质含量 0.62mg/ml) 为抗原最佳工作浓度,阻断抗体 1 : 2000 稀释为阻断抗体最佳工作浓度。

[0055] (4) 酶标抗体工作浓度和作用时间的确定:将羊抗兔酶标抗体分别作 1 : 8000、1 : 10000、1 : 12000、1 : 14000、1 : 16000、1 : 18000、1 : 20000 倍稀释,分别 37℃ 作用 20min、30min、40min、60min,每个条件多克隆抗体和阴性血清分别重复 4 孔,进行间接 ELISA,测定其 OD 值,选择 1 : 10000 为最佳酶标抗体工作浓度,30min 为二抗最佳作用时间。

[0056] (5) 反应模式的选择:采用竞争和阻断两种反应模式进行对比,将猪待检血清按 1 : 2 至 1 : 160 进行倍比稀释,一组进行间接竞争 ELISA (将阻断抗体和猪待检血清同时加到酶标板中);另一组进行间接阻断 ELISA (先将猪血清加到酶标板中作用一段时间,再加阻断抗体)。作出两种反应模式的标准曲线,选择抑制率高的间接阻断 ELISA 作为本试验的反应模式。

[0057] (6) 待检猪血清最佳稀释度的选择:按照优化好的条件进行间接阻断 ELISA,血清分别作 1 : 2.5、1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80 和 1 : 160 倍稀释,根据抑制率公式计算出不同稀释倍数的阴阳性血清抑制率,并进行对比,选择 1 : 5 为最佳血清稀释度。

[0058] (7) 猪待检血清和阻断抗体作用时间的选择:待检血清分别 37℃ 作用 30min、40min、1h、1.5h,进行间接阻断 ELISA,对比阴阳性抑制率选择 1.5h 为待检血清最佳血清反应时间;阻断抗体分别 37℃ 作用 0.5h、1.0h、1.5h、2.0h,进行间接阻断 ELISA,对比阴阳性抑制率后选择 1h 为阻断抗体最优反应时间。

[0059] (8) 其它反应条件的选择:分别以 4℃ 过夜、37℃ 1.0h、37℃ 2.0h、37℃ 3.0h 包被 gB 抗原表位区蛋白,进行间接阻断 ELISA,选择 4℃ 过夜为最优抗原蛋白包被条件;分别以 37℃ 1.0h、37℃ 1.5h、37℃ 2.0h、37℃ 3.0h 封闭,进行 ELISA,选择 37℃ 1.5h 为最优封闭条件;分别以室温 10min、15min、20min 和 37℃ 10min、37℃ 15min、37℃ 20min 显色,进行 ELISA,选择室温 10min 为最优显色条件。

[0060] (9) 临界值的确定:用已经优化好的间接阻断 ELISA 对 20 份阴性临床样品进行检测,计算抑制率,并根据公式:临界值 = 阴性样本平均抑制率 + 3 (或 2) × 标准偏差,计算出阴阳性判定标准的临界值。当样本抑制率 ≥ 阴性样品平均抑制率 + 3 × 标准偏差时为阳性,当抑制率 < 阴性样品平均抑制率 + 2 × 标准偏差时为阴性。抑制率在二者之间的样本,重复检测一次。

[0061] (10) 特异性实验

[0062] a. 阴性样本符合率试验 :用建立的猪细小环病毒抗体间接阻断 ELISA 来检测 450 份阴性血清样本,同时设立阳性感染对照,阴性样品符合率为 97.53%。

[0063] b. 特异性交叉反应试验 :用建立的猪细小环病毒抗体间接阻断 ELISA 来检测 PRV、PRRSV、CSFV 的阳性血清。同时设立 TTV2 感染、阴性对照、免疫对照,实验结果显示 TTV2-ORF1 优势抗原表位区蛋白不与其他病毒阳性血清发生特异性反应,特异性良好。

[0064] (11) 敏感性实验 :用建立的猪细小环病毒抗体间接阻断 ELISA 来检测 200 份 TTV2 感染血清样本,同时设立阴性对照,实验结果显示本方法的敏感性为 97.12%。

[0065] (12) 重复性实验

[0066] a. 以 TTV2-ORF1 优势抗原表位区蛋白最适浓度包被的同一块酶标板内对同一份感染血清和免疫血清进行检测。

[0067] b. 用 4 块 TTV2-ORF1 优势抗原表位区蛋白最适浓度包被好的酶标板,在相同条件下的不同时间内对同一份 感染血清和免疫血清进行检测。

[0068] c. 分别计算板内和板间变异系数,实验结果显示该方法批内变异系数为 2.6%,批间变异系数为 7.4%,均小于 10%,表明本方法重复性良好。

[0069] (13) 临床样品检测 :应用优化好的 TTV2-ORF1 抗体间接阻断 ELISA 对尽量多的临床阳性阴性样品进行检测,并与 Western-blot 试验结果进行对比,试验结果显示本方法对 PCMV 阳性血清敏感性高于 Western-blot。(图 2)

[0070] 5. 包板

[0071] 使用碳酸盐包被缓冲液 ( $\text{pH} = 9.6, 0.05\text{mol/L}$  的碳酸盐缓冲液),将纯化的重组抗原按照 1 : 320 ( $1.94 \mu\text{g/ml}$ ) 的体积比例稀释后,进行包板,每个样孔  $100 \mu\text{L}$  抗原,置  $4^\circ\text{C}$  保存 10 ~ 20h,进行包被,使用样品稀释液覆盖后抽空封装,置  $4^\circ\text{C}$  保存。

[0072] 6. 猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区间接阻断 ELISA 检测试剂盒的装配

[0073] 将猪细小环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区优势抗原表位区蛋白按照每孔  $0.194 \mu\text{g}$  包被酶标反应板,加入 5% 蔗糖保护剂覆盖,真空包装。配置酶结合工作液、样品稀释液、阻断抗体、显色液 A、显色液 B、终止液。

[0074] 最后将以上各组分成分装配成猪细小环病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒

[0075] 实施例 2

[0076] 1. 试剂盒检测操作程序

[0077] (1) 试验前准备程序 :将  $10\times$  洗涤缓冲液 (配制方法在实施例 1 中) 加入  $\text{ddH}_2\text{O}$  稀释成  $1\times$  洗涤工作液;将阻断抗体用样品稀释液按 1 : 1600 稀释;将待检样品按 1 : 5 稀释。

[0078] (2) 在抗原包被板上设定阻断抗体对照孔,加入稀释后的阻断抗体,每孔  $100 \mu\text{L}$ 。

[0079] (3) 将待检样品加入检测样孔中,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,封装于封口袋中  $37^\circ\text{C}$  孵育 1.5h。

[0080] (4) 将各样孔中的液体倒掉后用  $1\times$  洗涤工作液洗涤,每孔  $300 \mu\text{L}$ ,洗涤 4 次,每次 2min。

[0081] (5) 将稀释后的阻断抗体加入检测样孔,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,封装于封口袋中  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h, (重复步骤 4)。

[0082] (5) 加入酶结合物工作液 (配制方法在实施例 1 中),每孔  $100 \mu\text{L}$ ,封装于封口袋

中 37℃ 孵育 30min, (重复步骤 4)。

[0083] (6) 每孔按顺序加入显色液 A50 μl, 再向每孔中加入显色液 B50 μl, 室温显色 10min。

[0084] (7) 每孔按顺序加入终止液 (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 μl 终止反应, 450nm 单波长测定 OD 值, 计算抑制率。

[0085] 2. 结果判断

[0086]

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ \frac{\text{阻断抗体 OD 值} - \text{样品 OD 值}}{\text{阻断抗体 OD 值}} \right] \times 100\%$$

[0087] 当样品抑制率 ≥ 30% 时为 PCMV 抗体阳性, 当样品抑制率 < 20% 时为 PCMV 抗体阴性, 抑制率在两者之间的样品需要重复检测一次。

[0088] 应当理解的是, 对本领域普通技术人员来说, 可以根据上述说明加以改进或变换, 而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

[0089] 实施例 3

[0090] 1. 猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区基因表达载体的构建:

[0091] (1) 猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位分析: 通过 DNASTAR 及在线生物信息学软件进行猪细环病毒 II 型 ORF1 基因 (GenBank :GU570197.1) 蛋白信号肽、疏水性、跨膜区、二级结构分析, 进行 ORF1 基因抗原表位预测, 选择一段长度为 696bp (核苷酸序列见 SEQ ID NO :1) 编码 232 个氨基酸的优势抗原表位区作为目的基因进行密码子优化, 并在宝生物公司进行合成。

[0092] (2) ORF1 基因主要抗原表位区 TA 克隆: 根据 ORF1 基因主要抗原表位区设计合成引物, 以合成的优势抗原表位区基因片段为模板, PCR 扩增 ORF1 基因优势抗原表位区。

[0093] 引物设计如下:

[0094] 上游引物: 5' -TGAATTC ATG CCTTACAGACGCTATCGC-3' (见 SEQ ID NO :2)

[0095] 下游引物: 5' -CTCGAG TTATCCCAACCTTCTACCCAT-3' (见 SEQ ID NO :3)

[0096] 反应条件为: 94℃ 预变性 5min 后进入循环, 95℃, 30s ; 56℃, 45s ; 72℃, 45s ; 35 个循环后 72℃ 延伸 10min。

[0097] 将 PCR 产物用 1% 溴乙锭琼脂糖电泳, 在紫外灯下将目的条带切下, 用胶回收试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 回收, 将回收的优势抗原表位区 DNA 片段与克隆载体 pMD18-T simple (宝生物工程 (大连) 有限公司) 连接, 并转化入克隆菌 DH5 α (宝生物工程 (大连) 有限公司)。抽取质粒后酶切鉴定并送往宝生物公司进行测序鉴定, 结果表明目的片段成功转化入克隆载体菌, 片段大小为 696bp 与预计相同, 且片段无移码和突变情况。将克隆载体菌命名为大肠埃希氏菌 DH5 α -pMD18-T simple-ORF1 株。(图 1)

[0098] (3) 猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区重组 pET-32a(+) (EMD Biosciences) 表达载体构建: 分别扩大培养 DH5 α -pMD18-T simple-ORF1 和 DH5 α -pET-32a(+) 表达载体菌, 使用质粒抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 抽取 pMD18-T simple-gB 和 pET-32a(+) 质粒, 并分别用 Ecor I 和 Xho I 进行双酶切, 将回收目的片段与已酶切回收的 pET-32a(+) 表达载体用连接酶连接, 将连接产物转化 Rosetta (DE3) (宝生物工程 (大连) 有限公司) 表达菌, 铺于含 50mg/L 氨苄青霉素平板 (Amp) 的 LB 固

体培养基上。37℃培养 12h 后,挑取单个菌落扩大培养后提取重组质粒,用 Ecor I 和 Xho I 双酶切后电泳鉴定,将该质粒命名为 pET-ORF1,电泳结果同样显示酶切 DNA 片段大小与预计 696bp 相符合,由此表明猪细环病毒 II 型 ORF1 基因抗原表位区序列已克隆到 pET32a(+) 载体中。将含有 pET-ORF1 质粒的 Rosetta 大肠埃希菌送宝生物公司进行测序鉴定,结果进一步表明目的片段成功转化入表达菌,片段大小为 696bp 与预计相同,且片段无移码和突变情况,符合表达要求。将该表达菌命名为大肠埃希氏菌 Rosetta-pET-ORF1 株。

[0099] 2. 猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区的表达:将 Rosetta-pET-ORF1 菌株接入 20ml LB(氨苄青霉素)液体培养基,37℃振荡培养至 OD 值为 0.6 左右,加入 IPTG 诱导液至浓度为 0.2mmol/L,振荡培养 2~3h。离心弃上清,用 pH7.4 结合缓冲液(20mM 磷酸钠,0.5M 氯化钠,30mM 咪唑)将细菌悬浮,反复冻融 3 次后,超声波裂解 10min,离心,取上清,并将沉淀复原体积。分别取 IPTG 诱导前的 Rosetta-pET-ORF1 菌、诱导后的 Rosetta-pET-ORF1 菌、诱导后的 Rosetta-pET-ORF1 菌裂解上清和沉淀、经 IPTG 诱导后的 pET32a(+) 转化的 Rosetta 受体菌制样,并进行 SDS-PAGE 电泳。试验结果显示 Rosetta-pET-ORF1 菌诱导后成功表达了 232KDa 的猪细环病毒 II 型 ORF1 基因优势抗原表位区蛋白质,Rosetta-pET-ORF1 菌诱导后,所表达蛋白质绝大部分在细菌裂解离心后的上清液中。

[0100] 3. 表达产物的纯化:取 Rosetta-pET-ORF1 菌株接入 1000ml LB(氨苄青霉素)液体培养基,振荡培养至 OD 值至 0.6,加入 IPTG 分别至 0.2mmol/L,继续培养 3h,离心,弃上清,加入 5~10ml 结合缓冲液(20mM 磷酸钠,0.5M 氯化钠,30mM 咪唑,pH7.4),反复冻融 3 次后进行 10min 超声波裂解,离心后收集上清液,用 0.45 μm 的滤膜除去上清液中细胞碎片和其他块状物质。将上清用 GE 公司 HisTrapFF 组氨酸标签融合蛋白纯化柱进行过柱,纯化目的蛋白。纯化结果表明,蛋白质纯化效果良好。

[0001]

## 序 列 表

## SEQUENCE LISTING

- <110> 四川农业大学
- <120> 一种猪细小病毒 II 型抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒
- <130>
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 696
- <212> DNA
- <213> 优势抗原表位区序列
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| ccttacagac gctatcgag acgccgaagg agaccgaca gaagatggag gcaccggagg    | 60  |
| tggagacgct actttcgata tcggtatcga cgcgctcctc gccgccgccc cgcaaaggta  | 120 |
| aggagacgga ggaggaaagc tccggtcata caatggaacc ctccctagccg gaggacctgc | 180 |
| ctcatagagg gcttctggcc gttgagctac ggacactggt tccgtacctg tctccccctt  | 240 |
| aggcggttaa acggactagt gttcccggga ggaggttg accggactca atggagtttg    | 300 |
| caaaccttt ttcacgaaaa actaaactgg agaaatat ggacagctag taatgttgga     | 360 |
| atggaatcg ctagattctt aagaggaaaa ttctactttt ttagacatcc ttggagaaac   | 420 |
| tatattatta cttgggatca ggacattcct tgtaaaccgc taccatatca aaacttacat  | 480 |
| ccactattaa tgctactaaa aaaacagcat aaactgtac tatctcaaca aaactgtaac   | 540 |
| ccaaaccgaa agcaaatcc agtaacatta aaattcaaac caccaccgaa attaacttca   | 600 |
| caatggagac taagcaggga attagctaaa acgccactca ttagactagg aataagcttt  | 660 |
| atagacctct cagaacctg ggtagaaggt tgggga                             | 696 |
- <210> 2
- <211> 28
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> 上游引物
- <400> 2
- |                                |    |
|--------------------------------|----|
| tgaattcatg ccttacagac gctatcgc | 28 |
|--------------------------------|----|

[0002]

---

<210> 3  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 下游引物

<400> 3  
ctcgagttat ccccaacctt ctacccat

28

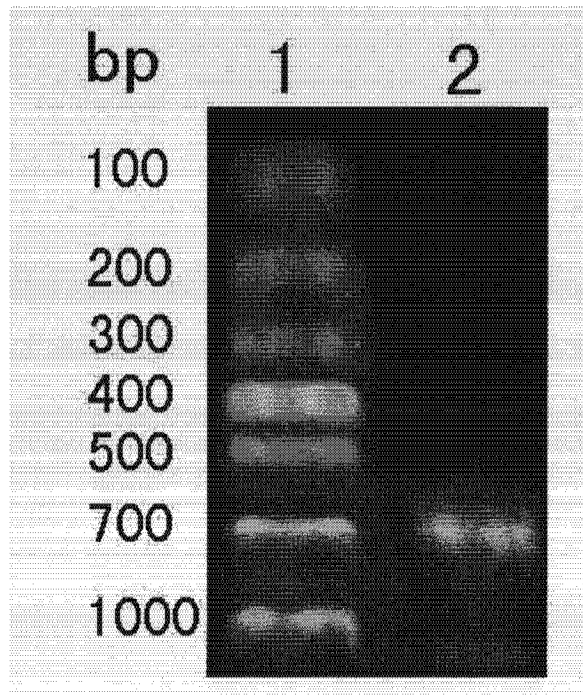


图 1

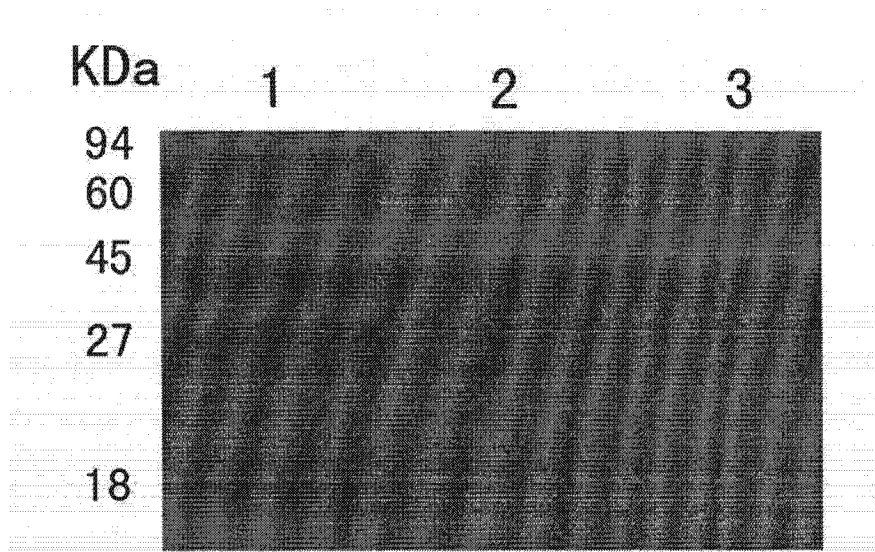


图 2

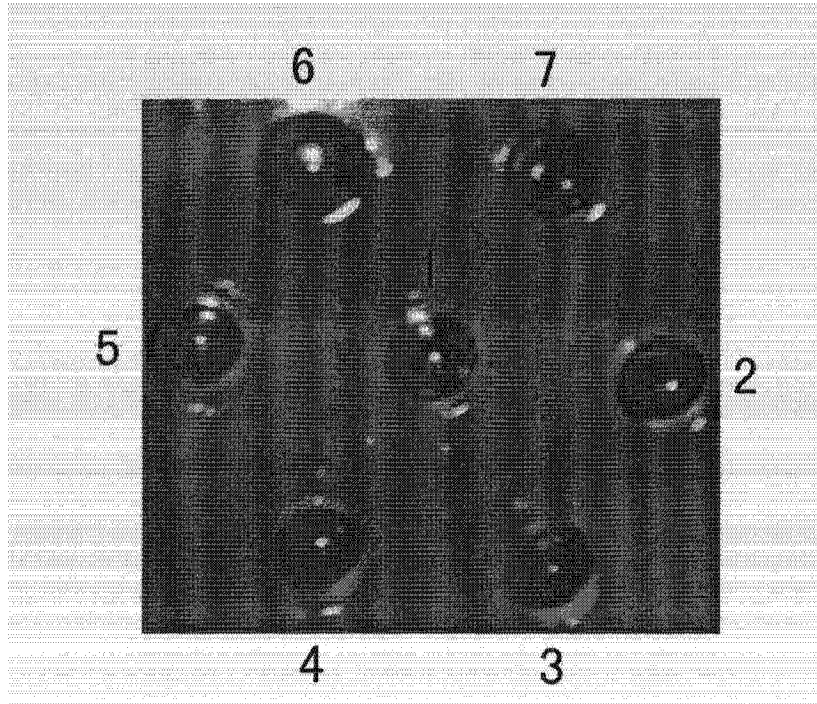


图 3

专利名称(译)	一种猪细小病毒II型抗体间接阻断ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102590503A</a>	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201210018567.2	申请日	2012-01-20
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	徐志文 朱玲 李崧 刘骁 郭万柱 廖珊		
发明人	徐志文 朱玲 李崧 刘骁 郭万柱 廖珊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
其他公开文献	CN102590503B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种猪细小病毒抗体间接阻断ELISA检测试剂盒。包括抗体检测板，酶结合物工作液，样品稀释液，显色液A，显色液B，终止液；阻断抗体，洗涤缓冲液；所述的阻断抗体为使用纯化后的TTV2-ORF1基因抗原表位区蛋白免疫家兔后，从家兔体内获得的多克隆抗体。本发明有益的积极效果是：特异性强、操作简单，适合于临床大规模推广应用，具有良好的市场前景。

