



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103777009 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201210396578. 4

(22) 申请日 2012. 10. 18

(73) 专利权人 辽宁成大动物药业有限公司

地址 117000 辽宁省本溪市溪湖区石桥子仙榆路 1 号

(72) 发明人 钱浩洲 陈中秋

(74) 专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限公司 21107

代理人 韩辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1636054 A, 2005. 07. 06,

CN 102191224 A, 2011. 09. 21,

CN 1196394 A, 1998. 10. 21,

WO 03/004605 A2, 2003. 01. 16,

CN 102455359 A, 2012. 05. 16,

CN 102294029 A, 2011. 12. 28,

王镇等. 猪瘟病毒的形态结构与形态发生. 《微生物学报》. 2000, 第 40 卷 (第 3 期),

审查员 舒霏霏

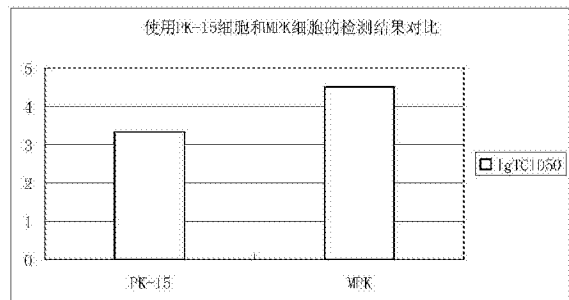
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种使用辣根过氧化物酶标抗体检测猪瘟病毒病毒滴度的方法

(57) 摘要

一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法,其特点是将传代贴壁细胞MPK细胞接种到96孔培养板中,用适宜的生长培养基维持其生长,MPK细胞在96孔板中快速增殖,当细胞长为单层后接种猪瘟病毒,并继续培养令病毒增殖,若干天后加入辣根过氧化物酶标抗体和底物,经过孵育使细胞培养物显色。本发明采用辣根过氧化物酶免疫技术,可在MPK细胞中标记出病毒的存在,使用PEG增加病毒与细胞的聚合度从而促进其感染,其灵敏度高于药典规定的动物实验测定病毒滴度的方法,可以作为企业质量内控的方法。



1. 一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法,其特征在于挑选出对猪瘟弱毒株高度敏感的 MPK 传代细胞,将此细胞在 96 孔培养板中培养至长满单层,之后接种不同稀释度的猪瘟病毒,持续培养后,加入辣根过氧化物酶标记的抗体共同孵育,最后加入底物使受到感染的细胞培养物显色,通过显色的孔数占总孔数的百分比计算病毒滴度,具体步骤为:

- (1) 使 MPK 细胞在 96 孔培养板中长成单层;
- (2) 将待测病毒液进行梯度稀释,接种于细胞单层,用维持培养基维持细胞生长;
- (3) 持续培养 72 ~ 120 小时后,将细胞培养物热固定,加入辣根过氧化物酶标抗体在 37℃ 下孵育,再加入底物于常温下孵育;
- (4) 在显微镜下观察细胞培养物的显色情况,根据显色孔数的百分比计算病毒的滴度;

所述步骤(1)中使用的细胞生长培养基是经过优化的,适合 MPK 细胞生长的培养基,其中每升液体培养基含有 5 ~ 8 克 gibco 公司生产的高糖 DMEM, 3.5 ~ 5.5 克 gibco 公司生产的 M199, 1.5 ~ 3 克上海沪试化工有限公司生产的 NaHCO_3 , 50 ~ 120 毫升太原润生生物材料有限公司生产的牛血清,培养基的 pH 为 7.2 ~ 7.4;

所述步骤(2)中细胞培养基为经优化的维持培养基,其中每升液体培养基含有 5 ~ 8 克 gibco 公司生产的高糖 DMEM, 3.5 ~ 5.5 克 gibco 公司生产的 M199, 1.5 ~ 3 克上海沪试化工有限公司生产的 NaHCO_3 , 10 ~ 40 毫升太原润生生物材料有限公司生产的牛血清,培养基的 pH 为 7.2 ~ 7.4;

所述 MPK 细胞在 96 孔培养板内生长时的温度为 36.5 ~ 37.5℃,培养时的 pH 为 7.0 ~ 7.5, CO_2 浓度为 2% ~ 4%,接种病毒前培养时间为 96 ~ 144 小时,接种病毒后培养时间为 72 ~ 120 小时;

所述步骤(2)中接种病毒时使用 Sigma 公司生产的分子量为 600 ~ 1500 的聚乙二醇来提高病毒对细胞的感染率,聚乙二醇浓度为 1% ~ 4%。

2. 根据权利要求 1 所述的一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法,其特征不在于步骤(1)中细胞接种的密度为 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个 / 孔。

3. 根据权利要求 1 所述的一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法,其特征不在于使用的酶标抗体为 PrioCON 公司的 HRP021.2。

4. 根据权利要求 1 所述的一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法,其特征不在于使用的底物为 Sigma 公司生产的 3-氨基-9-乙基-咪唑用 N,N-二甲基甲酰胺按照 4mg/ml 的浓度溶解配置而成的。

一种使用辣根过氧化物酶标抗体检测猪瘟弱毒病毒滴度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种快速灵敏的检测方法,特别是涉及一种使用辣根过氧化物酶标抗体快速高效地检测猪瘟弱毒株病毒滴度作为猪瘟疫苗生产质量内控的方法,属于兽用生物制品检测技术领域。

背景技术

[0002] 目前国内药典规定的检测猪瘟活疫苗滴度的方法中使用兔子作为实验动物,通过静注不同稀释倍数的疫苗液使实验动物产生体温升高免疫反应,再根据实验动物体温升高的情况计算兔体感染量 (RID),从而确定疫苗所含的病毒滴度。在疫苗研制阶段,对病毒滴度的检测不仅限于疫苗成品的效力检测,还要贯穿于生产的各关键环节,尤其是在配苗前,需要评估病毒的滴度,以确定疫苗中有效病毒的含量。动物实验中,每个样品通常需要三组实验动物来检测,每组实验动物不少于四只,因此每个试验周期至少需要上百只实验动物来支持,仅花费于实验动物的购买、运输和饲养的成本就需要 4-5 万元人民币,在试验过程中,还需要 4-6 名饲养人员和实验人员,会花费大量的人力物力。另外,用动物作为试验的受体,难以排除动物的个体差异和实验人员的操作对试验的影响,可能给试验带来较大的误差。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于找出替代动物实验的方法,在节省人力物力的基础上,提高实验效率,减小实验误差,提供一种创新的猪瘟病毒弱毒滴度的检测方法,即采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法。

[0004] 不同于相关文献中描述的使用 PK-15 细胞作为检测猪瘟病毒滴度的细胞系,本发明选用了与疫苗生产相同的细胞系,这是一种完全不同的传代细胞系,小型猪肾细胞 (MPK)。经病毒适应驯化,猪瘟病毒可以很好地在该细胞系内快速增殖,远高于使用 PK-15 细胞作为检测用细胞的灵敏度;同时使用该细胞系作为检测细胞可以保持与研发环节相统一的实验条件。另一种检测猪瘟病毒滴度的方法为免疫荧光法,但这种方法对于猪瘟弱毒株相对不敏感,很难获得阳性结果^[1]。

[0005] 本发明由于采用辣根过氧化物酶免疫技术,灵敏度可达到与体内检测(即动物实验)相当的水平,且重复性高,实验结果真实,而实验成本是动物实验的二十分之一,只需一名操作人员和一名复核人员即可完成,因此显著提高了猪瘟病毒弱毒滴度的检测效率,同时也降低了实验成本,增加了实验的稳定性,减小了实验误差,得到了更为快速有效的检测结果。

[0006] 为了达到本发明的目的,本发明给出的技术解决方案是:这种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法,其特点是:挑选出对猪瘟弱毒株高度敏感的 MPK 传代细胞,将此细胞在 96 孔培养板中培养至长满单层,之后接种不同稀释度的猪瘟病

毒,持续培养后,加入辣根过氧化物酶标记的抗体共同孵育,最后加入底物使受到感染的细胞培养物显色,通过显色的孔数占总孔数的百分比计算病毒滴度,具体步骤为:

[0007] (1) 使 MPK 细胞在 96 孔培养板中长成单层;

[0008] (2) 将待测病毒液进行梯度稀释,接种于细胞单层,用维持培养基维持细胞生长;

[0009] (3) 持续培养 72 ~ 120 小时后,将细胞培养物热固定,加入辣根过氧化物酶标抗体在 37℃ 下孵育,再加入底物于常温下孵育;

[0010] (4) 在显微镜下观察细胞培养物的显色情况,根据显色孔数的百分比计算病毒的滴度。

[0011] 本发明提及的 MPK 细胞为 Minipig Kidney Cell,是一种传代贴壁细胞系。经贴壁适应性驯化,得到适应在 96 孔培养板上贴壁生长的特异性 MPK 细胞。

[0012] 为更好的实现本发明的目的,所述步骤 (1) 中使用的细胞生长培养基是经过优化的,适合 MPK 细胞生长的培养基。每升液体培养基含有 5 ~ 8 克 gibco 公司生产的高糖 DMEM, 3.5 ~ 5.5 克 gibco 公司生产的 M199, 1.5 ~ 3 克上海沪试化工有限公司生产的 NaHCO_3 , 50 ~ 120 毫升太原润生生物材料有限公司生产的牛血清;培养基的 pH 为 7.2 ~ 7.4。所述步骤 (2) 中细胞培养基为经优化的维持培养基。每升液体培养基含有 5 ~ 8 克 gibco 公司生产的高糖 DMEM, 3.5 ~ 5.5 克 gibco 公司生产的 M199, 1.5 ~ 3 克上海沪试化工有限公司生产的 NaHCO_3 , 10 ~ 40 毫升太原润生生物材料有限公司生产的牛血清;培养基的 pH 为 7.2 ~ 7.4。

[0013] 为更好的实现本发明的目的,MPK 细胞在 96 孔培养板内适宜生长的温度为 36.5 ~ 37.5℃,适宜培养的 pH 为 7.0 ~ 7.5,适宜的 CO_2 浓度为 2% ~ 4%。接种病毒前最佳培养时间为 96 ~ 144 小时,接种病毒后最佳培养时间为 72 ~ 120 小时。

[0014] 为更好的实现本发明的目的,所述步骤 (2) 中接种病毒时使用 Sigma 公司生产的分子量为 600 ~ 1500 的聚乙二醇 (PEG) 来提高病毒对细胞的感染率,最适宜的 PEG 浓度为 1% ~ 4%。

[0015] 为更好的实现本发明的目的,所述步骤 (1) 中细胞接种的最佳密度为 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个/孔。

[0016] 为更好的实现本发明的目的,使用的酶标抗体为 PrioCON 公司的 HRP021.2,使用的底物为 Sigma 公司生产的 3-氨基-9-乙基-咪唑 (AEC) 用 N,N-二甲基甲酰胺按照 4mg/ml 的浓度溶解配置而成的。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:提供了一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒的方法,通过此种方法可快速有效地检测猪瘟病毒弱毒的滴度。其优势特点集中为:

[0018] (1) 灵敏度较高;

[0019] (2) 检测较为迅速,在准备好细胞单层的情况下,四天可出结果;

[0020] (3) 节省人力和成本,显著提高实验效率;

[0021] (4) 结果容易观察,易排除抗原抗体非特异性结合所带来的干扰。

附图说明

[0022] 图 1:使用不同细胞进行滴度检测的结果对照;

[0023] 图 2 :使用不同病毒稀释培养基进行滴度检测的结果对照。

具体实施方式

[0024] 为使本发明的优点和特点更加容易理解,下面通过对实验条件的优化,对比动物实验的结果,结合具体实施例,进一步阐述本发明。但这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围,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者替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围。

[0025] 下列实施例中未提及的具体实验方法,通常按照常规实验方法进行。

[0026] 实施例 1

[0027] 1. 选择接毒方式 :单层接毒。

[0028] 2. 选择细胞 :PK-15 细胞和 MPK 细胞。

[0029] 3. 本实施例中分别将 PK-15 细胞和 MPK 细胞用生长培养基按 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个 / 孔的密度接种在 96 孔细胞培养板中,每孔 $200 \mu\text{l}$ 。细胞培养板置于恒温培养箱中,调整条件为 :生长温度 $36.5 \sim 37.5^\circ\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 $2\% \sim 4\%$ 。96 ~ 144 小时内,细胞长为紧密贴壁的单层,此时可以接毒。

[0030] 4. 将待测病毒用含 $1\% \sim 4\%$ PEG 的培养基进行 10 倍稀释,分别将不同稀释倍数的病毒液接种到已有单层细胞的培养板中,每孔 $100 \mu\text{l}$,每个稀释倍数 8 孔。病毒在 2 小时内完成对细胞的吸附,此时将培养板中的培养液换为维持培养基。72 ~ 120 小时内病毒在细胞内的增殖达到预期水平,可以进行免疫过氧化物酶实验。

[0031] 5. 将细胞培养板中的培养基弃去,用生理盐水清洗一遍,放入 80°C 恒温干燥箱中热固定 1 小时,固定后每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 进行 100 倍稀释的 HRP021.2 酶标抗体, 37°C 孵育 1 小时,用含 0.1% Tween20 的 PBS 清洗 5 次,每孔再加入 $50 \mu\text{l}$ AEC 底物,室温孵育 30min,显微镜下观察。

[0032] 6. 将阳性孔数记录下来,按照中国兽药典中规定的方法计算滴度。其滴度的对比见图 1。

[0033] 实施例 2

[0034] 1. 选择接毒方式 :单层接毒。

[0035] 2. 选择细胞 :MPK 细胞。

[0036] 3. 选择稀释病毒用培养基 :含 $1\% \sim 4\%$ PEG 和不含 PEG 的培养基。

[0037] 4. 本实施例中将 MPK 细胞用生长培养基按 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个 / 孔的密度接种在 96 孔细胞培养板中,每孔 $200 \mu\text{l}$ 。细胞培养板置于恒温培养箱中,调整条件为 :生长温度 $36.5 \sim 37.5^\circ\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 $2\% \sim 4\%$ 。96 ~ 144 小时后,细胞长为紧密贴壁的单层,此时可以接毒。

[0038] 5. 将待测病毒分别用含 $1\% \sim 4\%$ PEG 的培养基和不含 PEG 的培养基进行 10 倍稀释,分别将不同稀释倍数的病毒液接种到已有单层细胞的培养板中,每孔 $100 \mu\text{l}$,每个稀释倍数 8 孔。病毒在 2 小时内完成对细胞的吸附,此时将培养板中的培养液换为维持培养基。72 ~ 120 小时后病毒在细胞内的增殖达到预期水平,可以进行免疫过氧化物酶实验。

[0039] 6. 将细胞培养板中的培养基弃去,用生理盐水清洗一遍,放入 80°C 恒温干燥箱中热固定 1 小时,固定后每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 进行 100 倍稀释的 HRP021.2 酶标抗体, 37°C 孵育 1 小时,用含 0.1% Tween20 的 PBS 清洗 5 次,每孔再加入 $50 \mu\text{l}$ AEC 底物,室温孵育 30min,

显微镜下观察。

[0040] 7. 将阳性孔数记录下来,按照中国兽药典中规定的方法计算滴度。其滴度的对比见图 2。

[0041] 实施例 3

[0042] 1. 选择接毒方式:单层接毒。

[0043] 2. 选择细胞:MPK 细胞。

[0044] 3. 本实施例中将 MPK 细胞用生长培养基按 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个/孔的密度接种在 96 孔细胞培养板中,每孔 $200 \mu\text{l}$ 。细胞培养板置于恒温培养箱中,调整条件为:生长温度 $36.5 \sim 37.5^\circ\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 $2\% \sim 4\%$ 。96 ~ 144 小时后,细胞长为紧密贴壁的单层,此时可以接毒。

[0045] 4. 将待测病毒分别用含 $1\% \sim 4\%$ PEG 的培养基稀释到 750RID_{50} ,将稀释的病毒液接种到已有单层细胞的培养板中,每孔 $100 \mu\text{l}$,接种 8 孔。病毒在 2 小时内完成对细胞的吸附,此时将培养板中的培养液换为维持培养基。72 ~ 120 小时后病毒在细胞内的增殖达到预期水平,可以进行免疫过氧化物酶实验。

[0046] 5. 将细胞培养板中的培养基弃去,用生理盐水清洗一遍,放入 80°C 恒温干燥箱中热固定 1 小时,固定后每孔加入 $50 \mu\text{l}$ 进行 100 倍稀释的 HRP021.2 酶标抗体, 37°C 孵育 1 小时,用含 0.1% Tween20 的 PBS 清洗 5 次,每孔再加入 $50 \mu\text{l}$ AEC 底物,室温孵育 30min,显微镜下观察。

[0047] 6. 观察显示,所有孔均有显色,说明此方法的灵敏度可以达到兽药典对病毒效力检测的规定。

[0048] 上述实施例中使用的生长培养基是经过优化的,适合 MPK 细胞生长的培养基。每升液体培养基含有 5 ~ 8 克的高糖 DMEM,3.5 ~ 5.5 克的 M199,1.5 ~ 3 克的 NaHCO_3 ,50 ~ 120 毫升的牛血清,培养基的 pH 为 7.2 ~ 7.4。上述实施例中使用的细胞培养基为经优化的维持培养基,每升液体培养基含有 5 ~ 8 克的高糖 DMEM,3.5 ~ 5.5 克的 M199,1.5 ~ 3 克的 NaHCO_3 ,10 ~ 40 毫升的牛血清;培养基的 pH 为 7.2 ~ 7.4。

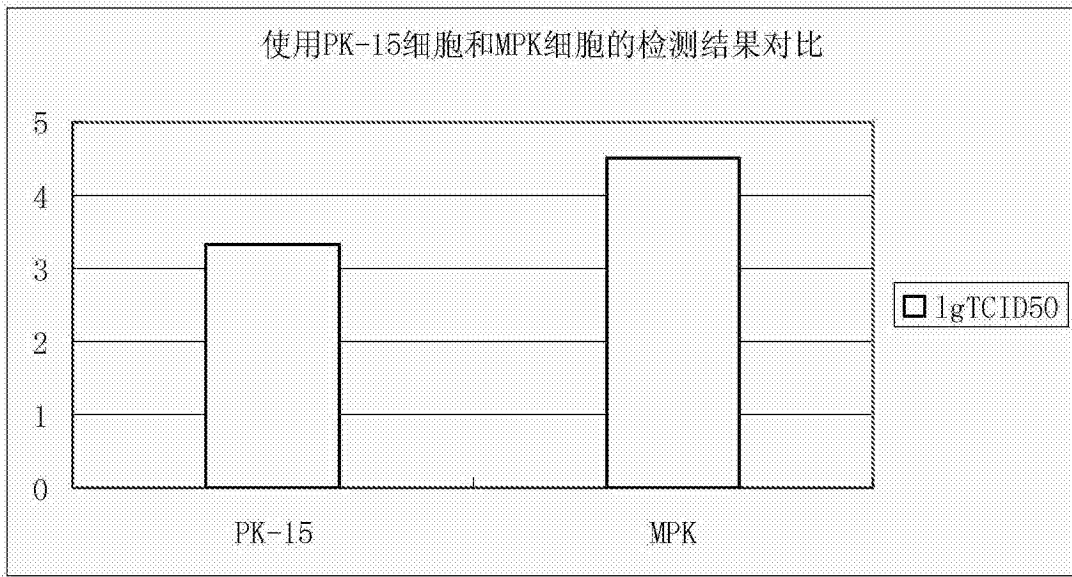


图 1

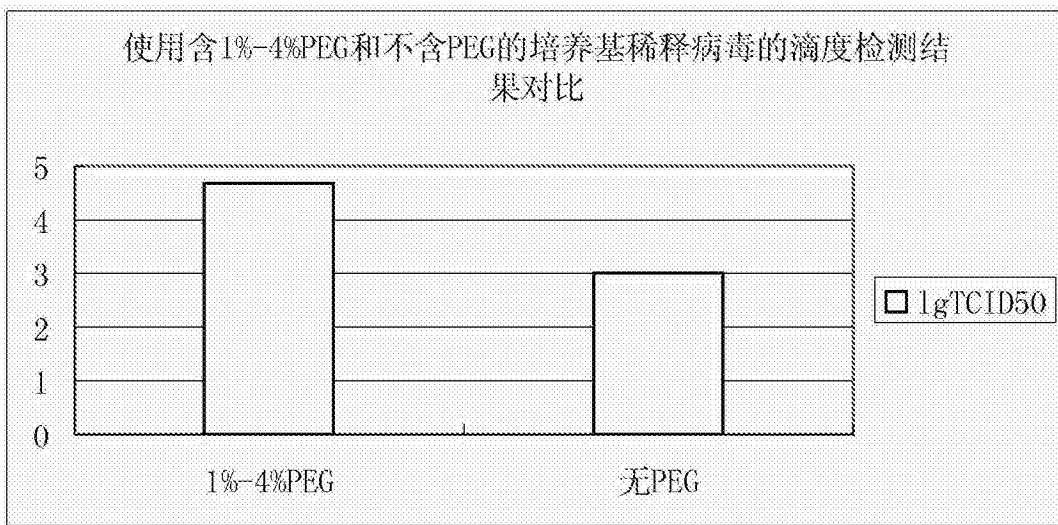


图 2

专利名称(译)	一种使用辣根过氧化物酶标抗体检测猪瘟弱病毒滴度的方法		
公开(公告)号	CN103777009B	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201210396578.4	申请日	2012-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	辽宁成大动物药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	辽宁成大动物药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	辽宁成大动物药业有限公司		
[标]发明人	钱浩洲 陈中秋		
发明人	钱浩洲 陈中秋		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N33/56983		
代理人(译)	韩辉		
其他公开文献	CN103777009A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种采用辣根过氧化物酶免疫技术检测猪瘟病毒弱毒滴度的方法，其特点是将传代贴壁细胞MPK细胞接种到96孔培养板中，用适宜的生长培养基维持其生长，MPK细胞在96孔板中快速增殖，当细胞长为单层后接种猪瘟病毒，并继续培养令病毒增殖，若干天后加入辣根过氧化物酶标抗体和底物，经过孵育使细胞培养物显色。本发明采用辣根过氧化物酶免疫技术，可在MPK细胞中标记出病毒的存在，使用PEG增加病毒与细胞的聚合度从而促进其感染，其灵敏度高于药典规定的动物实验测定病毒滴度的方法，可以作为企业质量内控的方法。

