



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104535764 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201410745718. 3

(22) 申请日 2014. 12. 07

(71) 申请人 青岛易邦生物工程有限公司

地址 266114 山东省青岛市红岛经济区红岛
街道泉大路东大洋社区岙东南路 21 号

(72) 发明人 张恒 范根成 杜元钊 孙永科
刘蕾

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗病毒
含量测定方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种用于猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒含量测定方法,可以更灵敏、更特异的检测到该疫苗中的活病毒的含量,从而弥补现有技术的不足。本发明通过构建 CSFV 的荧光免疫试剂盒,将猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗接种 HEK293 细胞,采用间接免疫荧光检测技术进行该疫苗病毒含量检测。本发明的检测方法能够具体检测到猪瘟活病毒粒子感染的单个细胞,通过计算活病毒粒子感染单个细胞的数目来评价新型猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒的含量,该方法具有灵敏度高、特异性强和重复性好的特点。

1. 一种用于检测猪瘟病毒的荧光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含有如下的组分:

- 1) 一抗:用于检测 CSFV 的单因子血清抗体;
- 2) 二抗:FITC 标记的山羊抗兔 IgG;
- 3) 阳性对照样品:猪瘟兔化弱毒株;
- 4) 固定液:按丙酮与甲醇体积比 1:1 配置;
- 5) PBS 洗液:NaCl 8.0g/L;KCl 0.2g/L;Na₂HPO₄3.58g/L;KH₂PO₄0.24g/L。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的检测 CSFV 的单因子血清抗体,其制备方法如下:将 CSFV 基因重组腺病毒载体疫苗强化免疫 SPF 兔后,用猪瘟兔化弱毒株进行攻毒,选择攻毒后无反应热的 SPF 兔采集血清制备而成。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒在检测猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中的病毒含量的应用。

4. 一种检测猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中的病毒含量的方法,其特征在于,所述的方法是将猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗进行连续 10 倍梯度稀释,在培养板每孔逐滴取 100 μ l 稀释的疫苗液接种于在 5% CO₂、37℃ 孵育 2~3 小时的 HEK293 细胞上,继续培养 48 小时后,利用构建的检测 CSFV 的荧光免疫检测试剂盒进行间接免疫荧光检测,通过计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数计算疫苗中的病毒含量。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的阳性细胞为出现绿色荧光的细胞。

6. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的计算疫苗中的病毒含量的步骤如下:

- 1) 计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数。选择一个梯度,此梯度视野中有 5-50 个阳性细胞,随机选择至少 5 个区域计数;
- 2) 计算 24 孔板中每孔视野数;
- 3) 按疫苗病毒滴度 (IFU/ml) = (平均阳性细胞数 / 每孔视野数) $\times$ (稀释比例) / (0.1ml) 进行计算疫苗中病毒含量。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述的 24 孔板中每孔视野数为 79。

一种猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗病毒含量测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于家畜病毒检测技术领域,具体涉及一种新型猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗病毒含量测定方法。

背景技术

[0002] 猪瘟 (CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的一种猪的高度接触性传染病,死亡率极高,给世界养猪业造成了巨大的经济损失。猪瘟已被世界动物卫生组织 (OIE) 列为家畜 A 类传染病,我国也将其列为一类动物疫病。临床以稽留高烧、皮肤和黏膜出现大量出血点为特征。多年的实践证明,疫苗接种是预防和控制动物疫病的主要手段。20 世纪 60 年代,我国研制出经人工诱变获得的猪瘟兔化弱毒株 (又称 C 株) 疫苗在 CSFV 防控中起到了决定性作用,有效的控制了猪瘟在我国乃至世界范围内大规模的流行。因此,疫苗的质量至关重要,疫苗效价是评价疫苗质量的关键指标。

[0003] 到目前为止,对于猪瘟活疫苗中病毒含量测定还没有一种稳定性、重复性好的定量方法,还不能进行病毒含量测定。过去,一直采用兔体定型热反应法来检测疫苗效力。但是该方法周期长,兔体个体的反应会影响结果的稳定性。近几年,一些学者采用实时荧光定量 PCR 方法快速检测猪瘟活疫苗中病毒含量 (Hoffmann B, et al. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. J Virol Methods, 2005, 130 (1-2) :36-44;高博,等. 快速检测猪瘟兔化弱毒疫苗株的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的建立应用. 西南民族大学学报:自然科学版, 2009, 35 (1) :92-97) 和 RT-PCR 方法 (罗廷荣,等. RT-PCR 诊断 CSFV 的应用研究. 中国预防兽医学报, 2003, 25 (3) :219-222), 这些方法虽然灵敏度很高,但都不能进行完全定量,并且不能区分活疫苗中有复制能力的活病毒粒子和死亡的病毒粒子,因此,实时荧光定量 PCR 方法和 RT-PCR 方法不能对疫苗中活病毒进行定量。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种用于猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒含量测定方法,可以更灵敏、更特异的检测到该疫苗中的活病毒的含量,从而弥补现有技术的不足。

[0005] 本发明首先提供一种用于检测猪瘟病毒的荧光免疫检测试剂盒,包含有如下的组分:

[0006] 1) 一抗:用于检测 CSFV 的单因子血清抗体;

[0007] 2) 二抗:FITC 标记的山羊抗兔 IgG;

[0008] 3) 阳性对照样品:猪瘟兔化弱毒株 (C 株);

[0009] 4) 固定液:按丙酮与甲醇体积比 1:1 配置固定液;

[0010] 5) PBS 洗液:NaCl 8.0g/L;KCl 0.2g/L;Na₂HPO₄ 3.58g/L;KH₂PO₄ 0.24g/L。

[0011] 其中兔抗 CSFV 蛋白的单因子血清抗体,其制备方法如下:将 CSFV 基因重组腺病毒载体疫苗强化免疫 SPF 兔后,用猪瘟兔化弱毒株进行攻毒,选择攻毒后无反应热的 SPF 兔采

集血清制备的。

[0012] 上述的试剂盒用于检测猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中的病毒含量；其一种具体操作步骤如下：通过将猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗进行连续 10 倍梯度稀释，在培养板每孔逐滴取 100 μ l 稀释的疫苗液接种于在 5% CO_2 、37℃ 孵育 2 ~ 3 小时的 HEK293 细胞上，继续培养 48 小时后，利用构建的检测 CSFV 的荧光免疫检测试剂盒进行间接免疫荧光检测，通过计算显微镜下视野中阳性（出现绿色荧光）细胞的平均个数计算疫苗中的病毒含量。

[0013] 其中计算病毒含量的方法如下：

[0014] 1) 计算显微镜下视野中阳性细胞的平均个数。选择一个梯度，此梯度视野中有 5-50 个阳性细胞，随机选择至少 5 个区域计数；

[0015] 2) 计算 24 孔板中每孔视野数；

[0016] 对于多数显微镜，标准 10× 目镜与 10× 物镜所观察到的视野直径为 1.8mm，因此：每个视野的面积 = $3.14 \times (D/2)^2 = 3.14 \times 0.9^2 = 2.54\text{mm}^2$ ；对于一个标准 24 孔板，培养面积为 2.0cm^2 ，因此：每孔视野数 = $2.0\text{cm}^2 / 2.54\text{mm}^2 = 2.0\text{cm}^2 / 2.54 \times 10^{-2}\text{cm}^2 = 79$ ；

[0017] 3) 按疫苗病毒滴度 (IFU/ml) = (平均阳性细胞数 / 每孔视野数) × (稀释比例) / (0.1ml) 进行计算疫苗中病毒含量。

[0018] 本发明通过构建 CSFV 的荧光免疫试剂盒，将猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗接种 HEK293 细胞，采用间接免疫荧光检测技术 (IFA) 进行该疫苗病毒含量检测。本发明方法能够具体检测到猪瘟活病毒粒子感染的单个细胞（出现特异性绿色荧光），通过计算活病毒粒子感染单个细胞（出现特异性绿色荧光）的数目来评价新型猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒的含量，具有灵敏度高、特异性强和重复性好的特点。

具体实施方式

[0019] 下面结合实施例对本发明的方法进行详细的描述。

[0020] 实施例 1：用于检测 CSFV 的荧光免疫试剂盒的构建

[0021] 1.1 针对 CSFV 单因子血清抗体的制备方法

[0022] 用于检测 CSFV 的荧光免疫试剂盒主要成分为兔抗 CSFV 蛋白的单因子血清抗体，是将云南农大构建、青岛易邦生物工程有限公司技术中心繁殖保存的重组猪瘟病毒基因腺病毒载体疫苗颈部皮下注射免疫 7 只 SPF 兔，每只 1ml ($3.95 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ / 只)；14d 后用进行第二次免疫，1ml / 只；再经 14d 后第三次免疫（方法同第二次），其中 3 只未免疫 SPF 兔作为阴性对照组。第三次免疫后 10d，用猪瘟兔化弱毒耳静脉注射 1ml 进行攻毒，攻毒后 72 小时之内未出现稽留热反应（而对照兔出现稽留热反应），将 7 只免疫兔心脏采血致死，析出的血清 -20℃ 保存。其制备出的抗体能够与 CSFV 发生特异性反应。以此单因子血清构建的 CSFV 的荧光免疫检测试剂盒，可以检测猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中的抗原，判定该疫苗的病毒含量，也可以检测临床上 CSFV 感染猪病料组织中的抗原，判定是否感染 CSFV，其特异性强、灵敏度高、可重复性好且检测速度快，与以往的 RT-PCR、实时荧光定量 PCR 及动物回归试验检测方法相比，利用该试剂盒通过 IFA 检测更方便、更准确。

[0023] 1.2 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定单因子血清

[0024] 1.2.1 选取状态良好的 HEK293 细胞（商品化专门用来繁殖猪瘟病毒基因重组腺

病毒载体疫苗),使用完全培养基重悬细胞,制备成 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,24 孔板中接入 1ml,37℃ 5% CO₂ 培养 2 ~ 3 小时。

[0025] 1.2.2 将该疫苗 ($3.95 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) 按 10^{-2} 接种比例加入 HEK293 细胞中,37℃ 5% CO₂ 感染 2 天。

[0026] 1.2.3 轻轻去除培养液,沿 24 孔板侧壁缓缓加入 -20℃ 预冷的固定液 0.5ml (枪头不要触及到细胞),-20℃ 固定 20min。

[0027] 1.2.4 使用 1mlPBS 轻轻冲洗细胞 3 次,每次 5min (切忌将细胞冲起)。

[0028] 1.2.5 按 0.3ml/孔加入含 1% BSA 的 PBS 37℃ 封闭 1 小时。

[0029] 1.2.6 将析出的兔血清分别用 PBS 按 1:50、1:100、1:200、1:500 作 4 个稀释度加到固定好的 HEK293 细胞上,37℃ 湿盒孵育 1 小时。

[0030] 1.2.7 使用 1mlPBS 轻轻冲洗细胞 3 次,每次 5min (切忌将细胞冲起)。

[0031] 1.2.8 加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗 (Sigma),100 μl/孔,37℃ 湿盒孵育 1 小时。

[0032] 1.2.9 使用 1mlPBS 轻轻冲洗细胞 3 次,每次 5min (切忌将细胞冲起)。

[0033] 1.2.10 在倒置显微镜下用蓝色激发光 (波长 490nm) 放大 100× ~ 200× 观察。

[0034] 1.2.11 结果判定当待检孔中出现特异性绿色荧光,阴性对照空未出现特异性绿色荧光时,试验成立。待检孔被判为阳性。

[0035] 1.2.12 结果单因子血清可与 CSFV 基因重组腺病毒载体疫苗发生特异性反应,并且因子血清在 1:100 倍稀释效果较好。

[0036] 1.3 以此单因子血清为基础构建的 CSFV 荧光免疫检测试剂盒主要成分包括:

[0037] (1) 用于检测 CSFV 的单因子血清抗体 (兔源),工作浓度 100 倍稀释;

[0038] (2) 二抗:FITC 标记的山羊抗兔 IgG,工作浓度 200 倍稀释;

[0039] (3) 阳性对照样品:猪瘟疫化弱毒 C 株;

[0040] (4) 固定液:按丙酮与甲醇体积比 1:1 配置固定液;

[0041] (5) PBS 洗液:磷酸盐缓冲液,按 NaCl 8.0g;KCl 0.2g;Na₂HPO₄3.58g;KH₂PO₄0.24g 定容至 1L。

[0042] 实施例 2:猪瘟疫病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒含量测定方法及结果

[0043] 2.1 病毒滴度测定

[0044] 随机选择不同批次冻干的 2 瓶猪瘟疫病毒基因重组腺病毒载体疫苗 (20 头份/瓶,分别命名为疫苗 1 和疫苗 2) 进行连续 10 倍梯度稀释,共稀释 5 个梯度 ($10^{-3} \sim 10^{-7}$),每个梯度接种 4 个孔 (24 孔细胞培养板),每孔取 100 μl 稀释的疫苗液接种于 2.5×10^5 个细胞/孔 5% CO₂ 37℃ 孵育 2 ~ 3 小时的 HEK293 细胞上,剩余 4 个培养孔作为阴性对照,继续培养 48 小时后,利用构建的检测 CSFV 的荧光免疫检测试剂盒进行 IFA,计算显微镜下视野中阳性细胞 (出现特异性绿色荧光) 的个数。

[0045] 2.2 病毒滴度计算方法

[0046] 2.2.1 选择 10^{-4} 稀释梯度,此梯度视野中至少有 5 个阳性细胞,随机选择至少 5 个区域计数。

[0047] 2.2.2 每孔视野数计算标准 10× 目镜与 10× 物镜所观察到的视野直径为 1.8mm,因此:每个视野的面积 = $3.14 \times (D/2)^2 = 3.14 \times 0.9^2 = 2.54 \text{mm}^2$ 对于一个标准 24 孔板,培

养面积为 2.0cm^2 , 因此: 每孔视野数 = $2.0\text{cm}^2 / 2.54\text{mm}^2 = 2.0\text{cm}^2 / 2.54 \times 10^{-2}\text{cm}^2 = 79$ 。

[0048] 2.2.3 疫苗病毒滴度疫苗病毒滴度 (IFU/ml) = (阳性细胞数 / 区域) × (稀释比例) / (0.1ml), 疫苗 1 在显微镜下 5 个视野中计算的平均阳性细胞平均数为 7, 此孔疫苗稀释了 10^5 倍, 则疫苗病毒滴度 = $7 \times 79 \times 10^5 / 0.1 = 5.53 \times 10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, 详见下表 1; 疫苗 2 在显微镜下 5 个视野中计算的阳性细胞平均数为 6, 此孔疫苗稀释了 10^5 倍, 则疫苗病毒滴度 = $6 \times 79 \times 10^5 / 0.1 = 4.74 \times 10^7 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, 详见表 2。

[0049] 表 1: 疫苗 1 不同稀释梯度下每个视野中的平均阳性细胞数

[0050]

稀释梯度 接种孔数	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	阳性对照
1	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	5	1	0	>50
2	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	8	2	0	>50
3	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	9	0	0	>50
4	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	6	1	0	>50

[0051] 表 2 疫苗 2 不同稀释梯度下每个视野中的平均阳性细胞数

[0052]

稀释梯度 接种孔数	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	阳性对照
1	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	7	2	0	>50
2	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	7	3	0	>50
3	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	5	1	0	>50
4	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	5	0	0	>50

专利名称(译)	一种猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗病毒含量测定方法		
公开(公告)号	CN104535764A	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201410745718.3	申请日	2014-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
[标]发明人	张恒 范根成 杜元钊 孙永科 刘蕾		
发明人	张恒 范根成 杜元钊 孙永科 刘蕾		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N2333/183		
其他公开文献	CN104535764B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种用于猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒含量测定方法，可以更灵敏、更特异的检测到该疫苗中的活病毒的含量，从而弥补现有技术的不足。本发明通过构建CSFV的荧光免疫试剂盒，将猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗接种HEK293细胞，采用间接免疫荧光检测技术进行该疫苗病毒含量检测。本发明的检测方法能够具体检测到猪瘟活病毒粒子感染的单个细胞，通过计算活病毒粒子感染单个细胞的数目来评价新型猪瘟病毒基因重组腺病毒载体疫苗中病毒的含量，该方法具有灵敏度高、特异性强和重复性好的特点。

稀释梯度 接种孔数	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	阳性对照
1	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	5	1	0	>50
2	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	8	2	0	>50
3	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	9	0	0	>50
4	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野	平均阳性细胞数/视野
	>50	>20	6	1	0	>50