



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101357945 B

(45) 授权公告日 2010. 12. 15

(21) 申请号 200810118570. 5

(22) 申请日 2008. 08. 19

(73) 专利权人 中国动物疫病预防控制中心
地址 100026 北京市朝阳区麦子店街 20 号楼

(72) 发明人 王传彬 田克恭 曹振 陈西钊
金萍

(74) 专利代理机构 北京金阙华进专利事务所
(普通合伙) 11224

代理人 吴鸿维

(51) Int. Cl.

C07K 17/02 (2006. 01)

C07K 14/795 (2006. 01)

C07K 7/08 (2006. 01)

C07K 7/06 (2006. 01)

C07K 1/04 (2006. 01)

C07K 1/10 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

审查员 贾涛

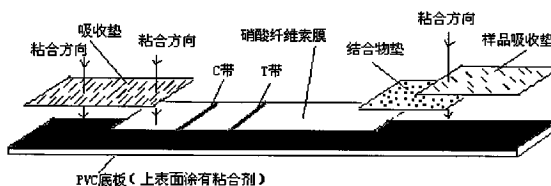
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测猪圆环病毒 2 型特异性抗体的合成肽偶联抗原及试剂

(57) 摘要

本申请涉及一种猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原, 以及用合成肽偶联抗原研制的 ELISA 试剂盒和免疫微球检测试剂, 用于特异性地检测猪圆环病毒 2 型抗体。



1. 一种猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原,包含载体蛋白和以下氨基酸序列的多肽:
SEQ ID NO :1 :Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe LeuPro Pro Gly Gly Gly Ser
SEQ ID NO :2 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp AsnpHe Val Thr Lys Ala Thr
SEQ ID NO :3 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp AsnpHe pHe Pro Lys Ala Ser,和
SEQ ID NO :4 :Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val。
2. 如权利要求 1 所述的猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原,其特征在于所述载体蛋白是 KLH 血兰素蛋白。
3. 一种检测猪圆环病毒 2 型抗体的 ELISA 试剂盒,其中包含权利要求 1 所述的合成肽偶联抗原包被的 ELISA 反应板。
4. 一种猪圆环病毒 2 型抗体的免疫微球快速检测试剂,其中包含权利要求 1 所述的合成肽偶联抗原和微球颗粒。
5. 如权利要求 4 所述的一种猪圆环病毒 2 型抗体的免疫微球快速检测试剂,其中微球颗粒是胶体金颗粒或塑胶微粒。
6. 如权利要求 4 或 5 所述的猪圆环病毒 2 型抗体的免疫微球快速检测试剂,其特征在于包括免疫微球凝集试剂或免疫微球快速检测试纸条。
7. 如权利要求 1 所述的猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原的制备方法,包括:
 - (1) 按照 SEQ ID NO :1 ~ SEQ ID NO :4 的氨基酸序列,采用 F-moc 固相合成法分别合成四条多肽;
 - (2) 采用戊二醛偶联法,将这四条多肽分别与载体蛋白连接,形成四种偶联抗原;
 - (3) 将这四种偶联抗原按等体积混合,获得猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原。
8. 如权利要求 1 或 2 所述的猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原在制备检测猪圆环病毒 2 型感染试剂盒中的用途。
9. 如权利要求 1 或 2 所述的猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原在制备检测猪圆环病毒 2 型感染免疫微球快速检测试剂中的用途。

检测猪圆环病毒 2 型特异性抗体的合成肽偶联抗原及试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及动物检疫,尤其涉及一种猪圆环病毒 2 型的合成肽偶联抗原制备,以及基于合成肽偶联抗原的猪圆环病毒 2 型抗体检测方法和检测试剂。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 是新近发现的一种圆环病毒,可导致断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS)。世界许多国家都有该病发生,近几年我国也有该病流行。PMWS 主要侵害 6~8 周龄的仔猪,发病率一般为 10%~20%,病死率高达 50%~100%,并能造成免疫抑制降低抗病力,给养猪业带来了严重的经济损失。成年猪一般为隐性感染,不表现任何症状,但可以传染给仔猪。目前,针对该病尚未开发出商品化的疫苗,通过检疫排除感染猪是最有效的防控措施。因此,建立一种准确、快速检测 PCV2 感染的方法,是当前该病防控工作中急待解决的问题。

[0003] 猪圆环病毒包括两种血清型:PCV1 和 PCV2。猪群中 PCV1 感染非常普遍(尤其是在我国),感染率远超过 PCV2,虽不引起发病,但会交叉干扰 PCV2 感染的检测。免疫学试验表明,PCV1 病毒与 PCV2 病毒有明显的交叉反应。因此,检测 PCV2 感染的关键技术在于如何尽可能地排除 PCV1 的干扰。

[0004] 研究表明,PCV2 基因组有两个主要阅读框 ORF1 和 ORF2。ORF1 编码与病毒复制有关的 Rep 蛋白,ORF2 编码的结构蛋白 Cap 蛋白是病毒的主要免疫原性物质,并含有型特异性的抗原表位,这些表位在 Cap 蛋白 65 位~87 位,113 位~139 位和 193 位~207 位氨基酸区域内。因此,ORF2 编码的 Cap 蛋白最有希望用于 PCV2 抗体的特异性检测。但是,国内外研究表明,PCV1 和 PCV2 的 Cap 蛋白的氨基酸序列同源性为 62%,两者的部分抗原表位相同。

[0005] 此前,国内外运用基因工程技术获得的重组表达 PCV2 Cap 蛋白,可以检测出 PCV2 抗体,但未见重组 PCV2 Cap 蛋白与 PCV1 抗体的交叉试验数据。实际应用表明,用这种表达蛋白作为抗原来检测 PCV2 抗体,其结果与猪群实际发病情况及病原学诊断结果往往出现较大差异,存在较多的假阳性结果。

[0006] 申请人研究发现,重组表达的 PCV2 Cap 蛋白(包括截短的 Cap 蛋白及以此开发的试剂盒),与 PCV1 抗体有明显的交叉反应,因此,检测结果会受到 PCV1 的干扰。这是由于重组表达的 PCV2 Cap 蛋白肽链较长(长度一般在 30 个氨基酸以上),其中包含与 PCV1 相似的抗原表位。

[0007] 为了寻找更为特异的 PCV2 抗体检测方法,尽量排除普遍存在的 PCV1 抗体的交叉干扰,申请人针对我国流行的 PCV2 毒株的 Cap 蛋白氨基酸序列,采用人工合成肽技术,合成了多条备选的短肽(长度在 20 个氨基酸以下),并与 KLH 血兰素蛋白偶联,制成大分子偶联抗原;采用 PCV1 和 PCV2 分别感染实验猪,制备了可靠的 PCV1 血清抗体和 PCV2 血清抗体;在此基础上,用 ELISA 方法筛选出型特异好、反应活性优良的合成肽偶联抗原 PCV2-Mix;用 PCV2-Mix 抗原研制成检测 PCV2 抗体的 ELISA 试剂盒和免疫微球快速检测试剂。

[0008] 原有的重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原及基于重组抗原的 PCV2 抗体检测试剂,存在以下技术缺陷:

[0009] 1、重组表达的 PCV2 Cap 蛋白抗原与 PCV1 抗体存在交叉反应,因此,用重组抗原检测 PCV2 抗体,会受到普遍存在的 PCV1 感染的影响,出现大量的假阳性结果;

[0010] 2、重组的 PCV2 Cap 蛋白抗原含有表达系统的细胞等杂质成份,远不如合成肽抗原纯净,容易出现非特异性反应,需要用较高的提纯工艺来降低非特异反应。

[0011] 3、表达的重组 PCV2 Cap 蛋白抗原,批次之间质量的稳定性受多种因素影响,不易控制,不如用仪器自动化生产的合成肽抗原的质量均一。

[0012] 因此,采用经筛选获得的人工合成短肽,制备合成肽偶联抗原,研制高度特异的 PCV2 抗体检测试剂,具有良好的应用前景。

发明内容

[0013] 本发明所解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种能特异性地检测猪圆环病毒 2 型抗体的合成肽偶联抗原(命名为 PCV2-Mix)以及使用该抗原制成的 ELISA 试剂盒和免疫微球快速检测试剂,其特异性优于常见的重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原及其试剂盒。

[0014] 本发明提供的合成肽偶联抗原 PCV2-Mix 包含以下氨基酸序列或其截短序列的多肽,以及载体蛋白。

[0015] SEQ ID NO :1 :Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe LeuPro Pro Gly Gly Gly Ser

[0016] SEQ ID NO :2 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp AsnpHe Val Thr Lys Ala Thr

[0017] SEQ ID NO :3 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp AsnpHe pHe Pro Lys Ala Ser

[0018] SEQ ID NO :4 :Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val

[0019] 进一步地,载体蛋白优选 KLH 血兰素蛋白。

[0020] 本发明提供的检测猪圆环病毒 2 型抗体的 ELISA 试剂盒,其中包含合成肽偶联抗原 PCV2-Mix 包被的 ELISA 反应板,进一步地包括 ELISA 试剂盒常用的其他组分如:样品稀释液、酶结合物、洗涤液、底物溶液和终止液。

[0021] 本发明提供的检测猪圆环病毒 2 型抗体的免疫微球快速检测试剂,其中包含合成肽偶联抗原 PCV2-Mix 和微球颗粒(可以是金属颗粒、塑胶微粒),进一步包括免疫学试剂常用的其他组分如:样品稀释液、纤维素膜等组分。

[0022] 本申请还提供一种制备猪圆环病毒 2 型合成肽偶联抗原 PCV2-Mix 的方法。

[0023] 本申请还涉及上述合成肽偶联抗原在制备检测猪圆环病毒 2 型感染的试剂盒中的应用。

[0024] 本申请还涉及上述合成肽偶联抗原在制备检测猪圆环病毒 2 型感染的免疫微球凝集试剂中的应用。

[0025] 本申请还涉及上述合成肽偶联抗原在制备检测猪圆环病毒 2 型感染的免疫微球快速检测试纸条中的应用。

[0026] 本发明是通过以下技术途径实现的：

[0027] 一、所用材料和试剂：

[0028] 1、兔抗猪酶标抗体：辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG, 购自 Sigma 公司；

[0029] 2、ELISA 板：96 孔聚苯乙烯微量反应板, 购自厦门怡新美公司；

[0030] 3、胶体金：按《现代免疫学实验技术》第二版 (湖北科学技术出版社, 2002 年 1 月) 所述方法制备；

[0031] 4、塑胶微粒：直径约 $1\ \mu\text{m}$ 的聚苯乙烯胶乳微粒, 见《现代免疫学实验技术》0 第二版。

[0032] 二、短肽合成

[0033] 参考国内外检测到的 PCV-2ORF2 的基因序列, 推导 ORF2 的氨基酸序列, 并用计算机辅助分析其主要抗原表位, 设计多肽的氨基酸序列。多肽采用 FMOC 固相合成法, 参见《现代免疫学实验技术》第二版和《多肽的固相合成法研究进展》(安徽农业科学, 2006 年 22 期), 由多肽合成仪自动完成。其合成过程包括：

[0034] (1) 氨基酸活化；

[0035] (2) 去 F-moc 保护反应；

[0036] (3) 肽链合成反应；

[0037] (4) 纯化；

[0038] (5) 与固相载体分离；

[0039] (6) 冻干保存。

[0040] 三、制备偶联抗原

[0041] 采用戊二醛偶联法制备偶联抗原 (参见《现代免疫学实验技术》第二版)。取载体蛋白和多肽, 共同溶解在硼酸溶液中, 加入戊二醛溶液混合后反应 2h, 再加甘氨酸溶液封闭未反应的戊二醛, 然后用硼酸透析纯化。

[0042] 四、筛选偶联抗原

[0043] 用 PCV1、PCV2 标准毒株分别感染 SPF 试验猪, 在感染后 0、7、14、21、35、49 天采集猪血清, 作为评价用血清。将制备的所有偶联抗原, 包被在 ELISA 板上, 分别与 PCV1、PCV2 感染猪血清反应, 用兔抗猪酶标抗体和 TMB (四甲基联苯胺) 底物进行检测, 筛选出 4 个反应活性较好、能明确区分 PCV1、PCV2 感染的偶联抗原。将筛选出的偶联抗原按等体积混合, 获得偶联抗原 PCV2-Mix。

[0044] 五、制备 ELISA 试剂盒

[0045] 将偶联抗原 PCV2-Mix 包被 ELISA 板, 并用兔抗猪酶标抗体作为第二抗体, 经方阵试验优化 ELISA 反应体系, 建立了检测 PCV-2 抗体的间接 ELISA 方法。用该方法检测 PCV-1 和 PCV-2 人工感染猪, 测定抗体消长曲线, 结果表明, 与基因工程表达的抗原介导的 ELISA 相比, 该合成肽抗原 ELISA 方法能特异地检测 PCV-2 血清抗体, 与 PCV-1 阳性血清无交叉反应, 可用于两者的鉴别检测。

[0046] 将配制好的 ELISA 反应试剂, 包括合成肽偶联抗原 PCV2-Mix 包被的 ELISA 反应板, 以及 ELISA 试剂盒常用的其他组分: 样品稀释液、酶结合物、洗涤液、底物溶液和终止液按一定的规格分装、包装, 加入说明书, 组装成试剂盒。

[0047] 六、制备免疫微球快速检测试剂

[0048] 方法 1 制备免疫微球凝集试剂

[0049] 将 PCV2-Mix 包被到胶体金或塑胶微粒表面,在缓冲液中制成均匀的悬液。该悬液可以作为凝集抗原试剂,与被检血清混合后,通过观察悬液中是否产生凝集块,判定血清中是否存在 PCV2 抗体。该试剂可与 PCV2 阴性、阳性对照血清配套使用。

[0050] 方法 2 制备免疫微球快速检测试纸条

[0051] 制备结合物垫:将 PCV2-Mix 包被到胶体金或塑胶微粒表面,在缓冲液中制成均匀的悬液,将标记好的胶体金结合物均匀地喷在条状的玻璃纤维膜上,冷冻干燥。

[0052] 喷制检测膜:在同一块硝酸纤维膜上,用 Bio-dot XYZ3000 喷膜机将稀释好的兔抗猪 IgG 喷成检测线(T带),在间隔 2~10mm 处,平行地喷上 PCV2 抗体作为质控线(C带)。放于温箱内干燥,取出后密封保存备用。

[0053] 组装试纸条:将样品吸收垫(玻璃纤维膜)、结合物垫、喷有检测线(T带)和对照线(C带)的硝酸纤维素膜、吸收垫(吸水纸)依次粘贴在 PVC 底板(PVC 等硬质薄板)上,用 Bio-dot 切割机将组装好的试纸切成 3~6mm 宽的试纸条,装入有干燥剂的铝箔袋内,密封,室温保存。

[0054] 七、PCV2 抗体检测方法

[0055] 方法 1 ELISA 检测方法

[0056] 取猪全血样品,按常规方法分离血清,在稀释板上稀释待检血清。分别在 ELISA 板相应孔中加入阳性对照血清、阴性对照血清、稀释好的待检猪血清。置 20~38℃ 孵育 30~60 分钟;弃去各孔中液体,洗涤;每孔加入酶结合物液 100uL,贴上封板膜,置 20~38℃ 孵育 30~60 分钟;弃去各孔中液体,洗涤;每孔加入底物液 A50~100uL,再加入底物液 B50~100uL,置 20~38℃ 避光显色 10~15 分钟;每孔加入终止液 50~100uL,用酶标仪测定各孔的吸光度值,根据吸光度值判定结果。

[0057] 方法 2 免疫微球凝集试验

[0058] 取猪全血样品,按常规方法分离血清。取凝集抗原一滴、被检血清一滴,充分混合后,在 20 分钟内观察悬液中是否产生凝集块。出现肉眼可见的凝集块,判定血清中存在 PCV2 抗体,说明猪被 PCV2 感染;否则,判定血清中不存在 PCV2 抗体,说明猪未被感染或在急性感染期。

[0059] 方法 3 快速检测试纸条

[0060] 取猪全血样品,按常规方法分离血清。取被检血清一滴,滴在试纸条的样品吸收垫上,在 20 分钟内观察纸条上是否同时出现检测线和对照线。同时出现检测线和对照线,判定血清中存在 PCV2 抗体,说明猪被 PCV2 感染;仅出现对照线,判定血清中不存在 PCV2 抗体,说明猪未被感染或在急性感染期;对照线未出现,判定试验失败,可能是试剂失效。

[0061] 下列实施方式仅用于举例说明本发明的目的,但不构成对本发明的限制。

附图说明

[0062] 附图 1 试纸条组装方式示意图。

具体实施方式

[0063] 实施例 1

[0064] 备选短肽合成

[0065] 参考国内外检测到的PCV-2 ORF2的基因序列,推导ORF2的一级结构氨基酸序列,并用计算机辅助分析其主要抗原表位,设计一系列的多肽氨基酸序列。包括SEQ ID NO :5~SEQ ID NO :26.

[0066] SEQ ID NO :5 :Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser

[0067] SEQ ID NO :6 :Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr

[0068] SEQ ID NO :7 :Trp Ala Val Asp Met Met ArgpHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu Pro Pro Gly

[0069] SEQ ID NO :8 :Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu

[0070] SEQ ID NO :9 :Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn

[0071] SEQ ID NO :10 :Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser

[0072] SEQ ID NO :11 :Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser

[0073] SEQ ID NO :12 :Ile Asn Asp pHe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser

[0074] SEQ ID NO :13 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala Thr

[0075] SEQ ID NO :14 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe pHe Pro Lys Ala Ser

[0076] SEQ ID NO :15 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr

[0077] SEQ ID NO :16 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

[0078] SEQ ID NO :17 :Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu

[0079] SEQ ID NO :18 :Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala Thr

[0080] SEQ ID NO :19 :Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala Thr

[0081] SEQ ID NO :20 :Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala Thr

[0082] SEQ ID NO :21 :Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala

[0083] SEQ ID NO :22 :Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys

[0084] SEQ ID NO :23 :Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr

[0085] SEQ ID NO :24 :Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val

[0086] SEQ ID NO :25 :Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val

[0087] SEQ ID NO :26 :Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe

[0088] 多肽采用F-moc固相合成法,由多肽合成仪自动完成,其合成过程如下:

[0089] 1、氨基酸活化:氨基酸与1-羟基苯并三唑(简称HOBT)合成氨基酸-HOBT酯。

[0090] 2、去保护反应:用哌啶清洗氨基酸-OBTE酯数次,以除去F-moc保护基。用二氮己

环 (NMP) 清洗, 除去残余的哌啶。

[0091] 3、合成反应: 启动多肽合成仪自动合成程序, 仪器自动加入活化的氨基酸与二异丙基碳二亚胺至反应器中, 合成的过程是由 C 端开始至 N 端, 依照上述序列不断地重复合成步骤。反应完成后, 用 NMP 清洗, 以除去残余的氨基酸。

[0092] 4、纯化: 加入 2.5% 乙酰咪唑, 对未合成的肽链进行乙酰化处理, 终止多余的肽链生成, 并使肽链纯化。用 NMP 清洗, 除去剩余的乙酰咪唑。按步骤 2 的方法, 除去多肽氨基酸端的 F-moc 保护基。用 NMP 洗涤固相板, 干燥备用。

[0093] 5、多肽与固相载体分离反应

[0094] 配制含 90% 三氟乙酸 (TFA)、4% 异硫氨酸丙酯、5% 苯酚和 1% 去离子水的反应溶液。将干燥的肽-树脂放入玻璃烧杯内。将反应溶液缓慢加入烧杯内, 匀速搅拌。将烧杯置 0°C 下反应 10 分钟, 反应结束后取出, 置室温下, 使其逐渐恢复至室温 (20~25°C)。用分液漏斗将 TFA/肽混合物从树脂中萃取出来。利用真空挥发技术将 TFA 及其余保护试剂分离除去。将所有成分移至漏斗内, 用叔丁基甲醚及二乙醚洗涤肽, 以除去保护剂及其它杂质。

[0095] 6、冻干及保存: 将多肽在真空干燥机中冷冻干燥 3 日, 形成冻干品, -20°C 保存。

[0096] 用此方法, 共合成 22 条短肽。

[0097] 实施例 2

[0098] 偶联抗原制备

[0099] 采用戊二醛偶联法制备偶联抗原, 具体方法如下:

[0100] 1、取载体蛋白 10mg, 以 0.1mol/L pH10 的硼酸溶液充分溶解, 加入多肽 15mg 混匀;

[0101] 2、边振荡边加新鲜配制的 0.3% (V/V) 戊二醛溶液, 室温作用 2h, 倒转试管数次;

[0102] 3、加 1mol/L 甘氨酸, 以封闭未反应的戊二醛, 继续反应 30min;

[0103] 4、0.1mol/L pH8.5 的硼酸透析过夜, 换透析液, 继续透析 4h, -20°C 保存备用。

[0104] 用此方法, 将实施例 1 的 22 个多肽制备成 22 个偶联抗原备选。

[0105] 实施例 3

[0106] 筛选和制备 PCV2-Mix 偶联抗原

[0107] 阳性血清制备: 取 PCV 抗原及抗体阴性的 SPF 试验猪 10 头, 分成 5 头/组, 各组分别隔离饲养。用 PCV1、PCV2 标准毒株分别感染一组猪 (5 头), 在感染后 0、7、14、21、35、49 天采集猪血清, 作为评价抗原用的血清。

[0108] 用 ELISA 试验方法筛选抗原: 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液, 将备选的偶联抗原稀释成 5 μ g/mL, 分别包被 ELISA 板, 25°C 过夜反应。将不同时间采集的猪血清, 用含 2% BSA 的 PBST (0.02mol/L, pH7.2) 稀释 5 倍, 按每孔加入 100 μ L 的量, 分别加入到各种 ELISA 抗原板中, 37°C 反应 60 分钟。PBST 洗板 5 次。用含 2% BSA 的 PBST 按 1:10000 稀释兔抗猪酶标抗体, 每孔加入 100 μ L, 37°C 反应 60 分钟。PBST 洗板 5 次。每孔加入 TMB 底物 100 μ L, 37°C 显色反应 15 分钟。每孔加入 50 μ L 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。

[0109] 结果: 筛选出 4 个反应活性较好、能明确区分 PCV1、PCV2 感染的偶联抗原 (PC1、PC9、PC10、PC21)。将筛选出的偶联抗原按等体积混合, 获得偶联抗原 PCV2-Mix。

[0110] 筛选出 4 个偶联抗原检测 5 头 PCV1 感染猪的血清, 结果均为阴性; 检测 PCV2 感染猪的血清结果见表 1:

[0111] 表 1 4 个偶联抗原在感染后不同时间对 PCV2 抗体的检出比例

[0112]

感染时间 抗原编号	0d	7d	14d	28d	35d	49d	抗原所含多肽的氨基酸序列
PC1	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5	5/5	Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu Pro

[0113]

							Pro Gly Gly Gly Ser
PC9	0/5	1/5	2/5	4/5	5/5	5/5	Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala Thr
PC10	0/5	1/5	3/5	3/5	4/5	4/5	Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe pHe Pro Lys Ala Ser
PC21	0/5	1/5	2/5	3/5	5/5	5/5	Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val

[0114] 实施例 4

[0115] 用偶联抗原 PCV2-Mix 制备 ELISA 试剂盒

[0116] 1、建立 ELISA 方法：

[0117] 将偶联抗原 PCV2-Mix 包被微量反应板，并用兔抗猪酶标抗体作为第二抗体，经 ELISA 方阵试验，优选 ELISA 反应体系，建立了检测 PCV-2 抗体的间接 ELISA 方法。确定的 ELISA 反应体系如下：

[0118] PCV2-Mix 抗原板制备方法：用 PH9.6 的碳酸盐缓冲液，将 PCV2-Mix 抗原稀释成 5 μ g/mL，按 100 μ L/孔的量包被 ELISA 板，在室温下 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) 过夜反应。用含 2% BSA 的 PBST (0.02mol/L, PH7.2) 在室温下 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) 过夜封闭。弃去 ELISA 板中的封闭液，PBST 洗涤一次，室温下充分晾干，装入铝箔袋，密封保存。

[0119] ELISA 反应条件：将被检猪血清用样品稀释液作 5 倍稀释，按 100 μ L/孔的量，分别加入到 PCV2-Mix 抗原板中，同时设立 PCV2 阴性和 PCV2 阳性猪血清对照孔，37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。PBST 洗板 5 次。按 100 μ L/孔加入兔抗猪酶标抗体溶液，37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。PBST

洗板 5 次。每孔加入 TMB 底物 A 溶液和 B 溶液各 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 显色反应 15 分钟。每孔加入终止液 50 μ L。在酶标仪上, 测定 ELISA 板孔的 OD450nm 值。

[0120] 判定结果: 被检样品 OD450 值 < 阳性对照孔 OD450nm 值 \times 0.25, 为 PCV-2 抗体阴性; 样品 OD450 值 \geq 阳性对照孔 OD450nm 值 \times 0.25, 为 PCV-2 抗体阳性。

[0121] 2、溶液配制:

[0122] PCV2 阴性猪血清: 无菌采集 SPF 猪的血液, 分离血清, 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 分钟。用 0.2 μ m 滤膜滤过, 无菌分装, 每瓶 1.2mL;

[0123] PCV2 阳性猪血清: 取感染后 14 ~ 28 天的 5 头猪的血清等体积混合均匀, 进行系列稀释后用 ELISA 方法检测, 选择 OD450nm 值在 1.5 左右的稀释度, 用 0.2 μ m 滤膜过滤, 无菌分装, 每瓶 1.2mL;

[0124] 样品稀释液: 0.02mol/L, PH7.2PBST 含 2% BSA, 加入万分之一叠氮钠, 分装成每瓶 15mL;

[0125] 20 倍 PBST 浓缩洗涤液的制备: 称取 Na₂HPO₄ 358.1g, KH₂PO₄ 24.5g, NaCl 818.2g, KCl 20.1g, 硫柳汞 5g, 加入 4000mL 去离子水, 用磁力搅拌器混合, 使其充分溶解, 加入 100mL Tween20, 再加水定容至 5000mL 用, 分装成每瓶 30.0mL。使用时稀释 20 倍。

[0126] 兔抗猪酶标抗体溶液: 用 0.02mol/L, PH7.2PBST 含 2% BSA 的溶液, 按 1:10000 稀释兔抗猪酶标抗体 (Sigma 公司产品), 加入万分之一叠氮钠, 分装成每瓶 12mL;

[0127] TMB 底物 A 溶液: 往容器内依次加入 1000mL 甲醇和 5g 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB), 混合均匀, 分装成每瓶 8.0mL;

[0128] TMB 底物 B 溶液: 往容器内加入 600mL 的无菌去离子水, 持续搅拌的同时, 加入 16.7g 醋酸钠、2g 柠檬酸和 3.4g 过氧化脲, 混合溶解后, 用去离子水定容至 1000mL, 分装成每瓶 8.0mL;

[0129] 终止液: 用去离子水将硫酸稀释成 2mol/L, 分装成每瓶 8.0mL。

[0130] 3、组装 ELISA 试剂盒:

[0131] 将配制好的 ELISA 反应试剂各组分, 按表 2 组装成试剂盒。组装试剂盒的环境必须洁净无尘, 室温应低于 25 $^{\circ}$ C, 组装好的试剂盒应及时放入 4 $^{\circ}$ C 冰库保存。

[0132] 表 2 试剂盒的组份、规格和数量

[0133]

试剂盒组份	规格	单位	数量
1. PCV2-Mix 抗原板	96 孔	块	1
2. 20 倍 PBST 浓缩洗涤液	30mL	瓶	1
3. PCV2 阴性猪血清	1.2mL	支	1
4. PCV2 阳性猪血清	1.2mL	支	1
5. 样品稀释液	15mL	瓶	1
6. 兔抗猪酶标抗体	12mL	瓶	1
7. TMB 底物 A 溶液	8mL	瓶	1
8. TMB 底物 B 溶液	8mL	瓶	1
9. 终止液	8mL	瓶	1
10. 一次性封板膜	11.5cm \times 8cm	张	2
11. 自封袋 (干燥剂)	2g	个	1

[0134]

12. 说明书	A4	份	1
13. 样品稀释板	96 孔	块	1

[0135] 实施例 5

[0136] 制备免疫微球（胶体金）凝集试剂

[0137] 将 PCV2-Mix 包被到胶体金微粒表面，在缓冲液中制成均匀的悬液。具体方法为：取 2ml 的 1% HAuCl₄ 溶液加热沸腾，加入 2.5ml 的 1% 柠檬酸三钠水溶液，继续加热 5min，冷却后于 4℃ 保存备用。按 2 μl/ml 的量加入 0.2mol/L K₂CO₃，搅拌 10min。用 0.01M pH7.4 PBS 稀释 PCV2-Mix 多肽抗原，按 3.75 μg/ml 的量加入胶体金溶液中，继续搅拌 30min。按 5 μl/ml 的量加入 20% BSA 水溶液，搅拌 5min；按 10 μl/ml 加入 10% PEG20000 水溶液，搅拌 5min，4℃ 静置过夜。以 17000rpm 离心 20min，再用悬浮液（含 5% BSA、5% PVP40 的 PBST 溶液）悬浮至原体积的 1/2。该悬液可以作为凝集抗原试剂，与被检血清混合后，通过观察悬液中是否产生凝集块，判定血清中是否存在 PCV2 抗体。该试剂可与 PCV2 阴性、阳性对照血清配套使用。

[0138] 以塑胶颗粒为载体时，按《现代免疫学实验技术》（第二版），采用常规的 EDCI 法将 PCV2-Mix 多肽抗原与塑胶颗粒连接，用悬浮液（含 5% BSA、5% PVP40 的 PBST 溶液）制成悬液。

[0139] 实施例 6

[0140] 制备免疫微球（胶体金）快速检测试纸条

[0141] 制备结合物垫：将 PCV2-Mix 包被到胶体金微粒表面，在缓冲液中制成均匀的悬液，将标记好的胶体金结合物均匀地喷在条状的玻璃纤维膜上，冷冻干燥。

[0142] 喷制检测膜：在同一块硝酸纤维膜上，用 Bio-dot XYZ3000 喷膜机将稀释好的兔抗猪 IgG 喷成检测线，在间隔 3 ~ 7mm 处，平行地喷上 PCV2 抗体作为质控线。放于温箱内干燥，取出后密封保存备用。

[0143] 组装试纸条：按图 1 所示的方式，将样品吸收垫（玻璃纤维膜）、结合物垫、喷有检测线（T 带）和对照线（C 带）的硝酸纤维素膜、吸收垫（吸水纸）依次粘贴在 PVC 底板（PVC 等硬质薄板）上，用 Bio-dot 切割机将组装好的试纸切成 3 ~ 6mm 宽的试纸条，装入有干燥剂的铝箔袋内，密封，室温保存。

[0144] 实施例 7

[0145] 合成肽偶联试剂与市售重组抗原试剂的应用效果比较

[0146] 1. 被检血清：采用实施实例 3 中制备的，PCV1、PCV2 标准毒株分别感染 5 头猪、在其后 0、7、14、21、35、49 天采集的猪血清，作为被检血清。

[0147] 2. 试剂：偶联抗原 PCV2-Mix 制备的 ELISA 试剂盒、免疫胶体金凝集试剂、免疫胶体金快速检测试纸条；市售重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原制备的 ELISA 试剂盒。

[0148] 3. 检测方法：

[0149] (1) 用偶联抗原 PCV2-Mix 制备的 ELISA 试剂盒来检测

[0150] 洗涤液配制使用前将 20 倍 PBST 浓缩洗涤液恢复至室温，并摇动使沉淀的盐溶解，然后用去离子水或双蒸水作 20 倍稀释。洗涤工作液应在配制后尽快使用，在 2 ~ 8℃ 下可

保存 2d,再次使用时应恢复到室温。

[0151] 样品稀释取出试剂盒中提供的样品稀释板,在稀释板孔中按 1:5 的体积比稀释待检血清(120 μ L 样品稀释液+30 μ L 待检血清)和对照猪血清。

[0152] 操作步骤

[0153] ①剪开抗原反应板的包装袋,取出 PCV2-Mix 抗原板,在记录表上记录阳性对照、阴性对照和样品的位置。

[0154] ②别在相应孔中加入 PCV2 阴性猪血清对照(2 孔)原液和 PCV2 阳性猪血清对照(2 孔)、稀释好的待检血清各 100 μ L。充分混匀后,贴上封板膜,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

[0155] ③小心揭掉封板膜,弃去各孔中液体、拍净。每孔加满洗涤液,静置约 30 秒,重复洗涤 5 次,最后在吸水纸上拍净。

[0156] ④每孔加入兔抗猪酶标抗体 100 μ L,贴上封板膜,置 37 $^{\circ}$ C,孵育 30 分钟;

[0157] ⑤重复步骤③。

[0158] ⑥每孔加入 TMB 底物 A 溶液 50 μ L,再加入 TMB 底物 B 溶液 50 μ L,轻振混匀,置 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟。

[0159] ⑦每孔加入终止液 50 μ L,轻振混匀,立即置酶标仪 450nm 波长处测定各孔 A450nm 值(注意:加终止液后应在 15 分钟内读取 A450nm 值)。

[0160] 判定结果

[0161] a. 试验结果同时符合下列条件,方为有效:

[0162] ①两孔阴性对照 A450nm 平均值应 <0.15;

[0163] ②每孔阳性对照 A450nm 值均 \geq 0.60;

[0164] b. 临界值的计算:

[0165] 临界值 = 阳性对照孔 A450nm 均值 \times 0.25

[0166] c. 结果判定:

[0167] ①被检样品 A450nm 值 < 临界值,判为 PCV-2 抗体阴性;

[0168] ②样品 A450nm 值 \geq 临界值,判为 PCV-2 抗体阳性。

[0169] (2) 用免疫胶体金凝集试剂检测

[0170] 操作方法:用一次性塑料吸管,吸取凝集抗原一滴(约 30 μ L)、被检血清一滴(约 30 μ L),用一次性牙签在玻片上搅拌,充分混合,在 20 分钟内观察悬液中是否产生凝集块。同时设阴性、阳性血清对照。

[0171] 判定方法:当阴性、阳性血清对照成立,样品出现肉眼可见的凝集块,判定血清中存在 PCV2 抗体,说明猪被 PCV2 感染;否则,判定血清中不存在 PCV2 抗体,说明猪未被感染或处在急性感染期。

[0172] (3) 用免疫胶体金快速检测试纸条检测

[0173] 操作方法:用一次性塑料吸管,吸取被检血清一滴(约 100 μ L),滴在试纸条的样品吸收垫上,在 20 分钟内观察纸条上是否同时出现检测线和对照线。

[0174] 判定方法:同时出现检测线和对照线,判定血清中存在 PCV2 抗体,说明猪被 PCV2 感染;仅出现对照线,判定血清中不存在 PCV2 抗体,说明猪未被感染或处在急性感染期;未出现对照线,判定试验失败,可能是试剂失效。

[0175] (4) 用市售重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原制备的 ELISA 试剂盒检测

[0176] 市售 ELISA 试剂盒购自北京测迪生物技术公司,按试剂盒的说明书操作、判定结果。

[0177] 4. 检测结果

[0178] 四种试剂盒对 PCV1、PCV2 感染猪的检测结果见表 3、表 4。

[0179] 特异性比较:从对 PCV1、PCV2 感染猪的检测结果来看,市售重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原制备的 ELISA 试剂盒,能检出 PCV1、PCV2 感染,因此与 PCV1 存在交叉反应;偶联抗原 PCV2-Mix 制备的 ELISA 试剂盒、免疫胶体金凝集试剂、免疫胶体金快速检测试纸条仅能检出 PCV2 感染,因此特异性较好。

[0180] 敏感性比较:从 PCV2 感染后不同时间的检出结果来看,重组表达 PCV2Cap 蛋白抗原制备的 ELISA 试剂盒与偶联抗原 PCV2-Mix 制备的 ELISA 试剂盒敏感性相似;免疫胶体金凝集试剂、免疫胶体金快速检测试纸条的检出时间较晚,因此敏感性较低。但后者具有操作简单、适合在现场操作的优点。

[0181] 表 3 各种试剂盒在 PCV1 感染后不同时间的检出情况

[0182]

间 抗原编号	感 染 时	0d	7d	14d	28d	35d	49d
市售重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原制备的 ELISA 试剂盒 (进口)		0/5	1/5	2/5	5/5	5/5	5/5
偶联抗原 PCV2-Mix 制 备的 ELISA 试剂盒		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[0183]

免疫胶体金凝集试剂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
免疫胶体金快速检测 试纸条	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[0184] 表 4 各种试剂盒在 PCV2 感染后不同时间的检出情况

[0185]

感染时 间 抗原编号	0d	7d	14d	28d	35d	49d
市售重组表达 PCV2 Cap 蛋白抗原制备的 ELISA 试剂盒	0/5	1/5	4/5	5/5	5/5	5/5
偶联抗原 PCV2-Mix 制 备的 ELISA 试剂盒	0/5	1/5	4/5	5/5	5/5	5/5
免疫胶体金凝集试剂	0/5	0/5	2/5	3/5	4/5	4/5
免疫胶体金快速检测 试纸条	0/5	1/5	3/5	4/5	5/5	5/5

[0186] 序 列 表

[0187] <110> 中国动物疫病预防控制中心

[0188] <120> 一种检测猪圆环病毒 2 型特异性抗体的合成肽偶联抗原及试剂

[0189] <160>4

[0190] <170>Patent In Version 3.0

[0191] <210>1

[0192] <211>20

[0193] <212>PRT

[0194] <213> 人工序列

[0195] <400>1

[0196]

Trp Ala Val Asp Met Met Arg pHe Asn Ile Asn Asp pHe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser

[0197] <210>2

[0198] <211>20

[0199] <212>PRT

[0200] <213> 人工序列

[0201] <400>2

[0202]

Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val Thr Lys Ala
Thr

[0203] <210>2

[0204] <211>20

[0205] <212>PRT

[0206] <213> 人工序列

[0207] <400>3

[0208]

Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe pHe Pro Lys Ala

[0209]

Ser

[0210] <210>2

[0211] <211>11

[0212] <212>PRT

[0213] <213> 人工序列

[0214] <400>4

[0215]

Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn pHe Val

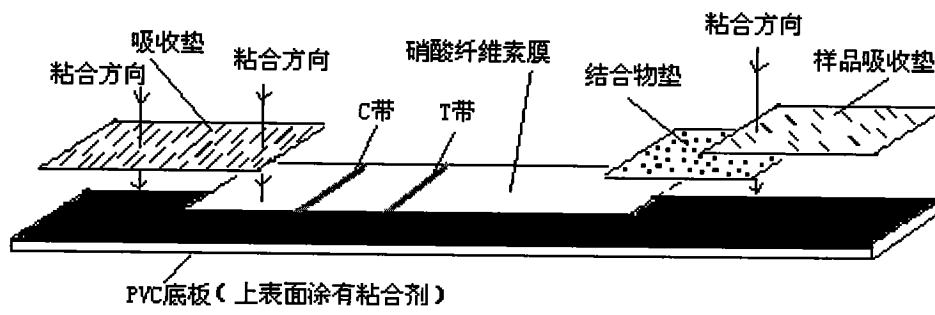


图 1

专利名称(译)	检测猪圆环病毒2型特异性抗体的合成肽偶联抗原及试剂		
公开(公告)号	CN101357945B	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN200810118570.5	申请日	2008-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	中国动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	王传彬 田克恭 曹振 陈西钊 金萍		
发明人	王传彬 田克恭 曹振 陈西钊 金萍		
IPC分类号	C07K1/04 C07K14/795 C07K7/08 G01N33/569 C07K1/10 G01N33/53 C07K17/02 C07K7/06		
审查员(译)	贾涛		
其他公开文献	CN101357945A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及一种猪圆环病毒2型的合成肽偶联抗原，以及用合成肽偶联抗原研制的ELISA试剂盒和免疫微球检测试剂，用于特异性地检测猪圆环病毒2型抗体。