



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655841 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510059274. 2

(22) 申请日 2015. 02. 05

(71) 申请人 深圳市康百得生物科技有限公司
地址 518054 广东省深圳市南山区南油天安
工业区 3 栋 4B

(72) 发明人 邓凤林 胡绍良

(74) 专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事
务所 44268
代理人 王永文 刘杰

(51) Int. Cl.
G01N 33/569(2006. 01)
G01N 33/531(2006. 01)

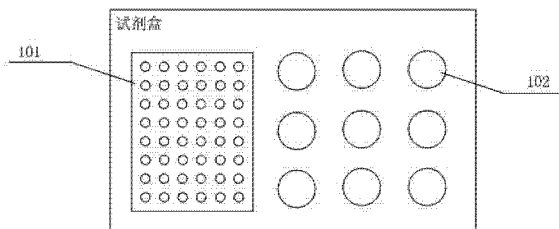
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法

(57) 摘要

本发明公开了检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法,盒体内设置酶联反应板、酶标结合物、浓缩洗涤液、底物液、显色液、浓缩样品稀释液、终止液;其特征在于,所述酶联反应板包被了抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的多克隆抗体;所述酶标结合物为辣根过氧化酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体的酶标结合物。通过利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性,本发明的优点主要表现在操作简便、快速、结果判断客观可靠,可作为一种方便的初筛工具,其敏感度达金标准方法 PCR 的 90%。



1. 一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的 ELISA 试剂盒,其盒体内设置酶联反应板、酶标结合物、浓缩洗涤液、底物液、显色液、浓缩样品稀释液、终止液;其特征在于,所述酶联反应板包被了抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体;所述酶标结合物为辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的酶标结合物。

2. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述酶联反应板是在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体,然后在 4℃ 静置 12 ~ 24 小时,冷冻真空干燥后装袋封口制成;其中,所述抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体是用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所得抗血清或腹水经蛋白 A 柱纯化后获得;包被液为 10 μg/ml 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的缓冲液,所述缓冲液是 0.01mol/L ~ 0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5 ~ pH9.5。

3. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述酶标结合物为用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所制得的抗体采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成。

4. 根据权利要求 3 所述的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述酶标结合物是含 0.05% ~ 1% 的辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的 0.01mol/L ~ 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。

5. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒,其特征在于,其还至少包括阴性对照品、阳性对照品其中之一。

6. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述洗涤液为包含有 0.1% ~ 1% 表面活性剂的 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;底物液为 0.1% ~ 0.5% 过氧化氢溶液;显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;样品稀释液为 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;终止液为 1 mol/L ~ 2 mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

7. 一种用于权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒的检测方法,其包括步骤:

A1、用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所得抗血清或腹水经蛋白 A 柱纯化,获得抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体,在通用聚苯乙烯微孔板上包被所述抗体,然后在 4℃ 静置 12 ~ 24 小时,冷冻真空干燥后制成酶联反应板,并装袋封口保存;其中,包被液是含有 0.01%~1% 所述抗体的缓冲液,所述缓冲液是 pH7.5 ~ pH9.5 的 0.01 mol/L ~ 0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液;

A2、用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所制得的抗体采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成酶标结合物;

A3、所述酶联反应板每孔分别加工作浓度的样品稀释液 50 μl,再加入待检的样本 50ul,混匀;其中,所述样品稀释液为 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;

A4、充分反应后甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加 250 μl)工作浓度洗涤液洗涤 6 次,每次均需停留 1 分钟;最后一次甩净,拍干;其中,所述洗涤液为包含有 0.1% ~ 1% 表面活性剂的 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8;

A5、每孔加酶标结合物 100 μl,充分反应后甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加 250 μl)工作浓度洗涤液洗涤 3 次,每次均需停留 1 分钟;最后一次甩净,拍干;

A6、按所需用量,临用前取等体积底物液和显色液充分混匀后每孔加 100 μl,盖好封板膜,充分显色反应后加终止液 50 μl,混匀,终止反应;其中,所述底物液为 0.1% ~ 0.5% 过氧化氢溶液;所述显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述终止液为 1 mol/L ~ 2 mol/L

的硫酸或氢氧化钠。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,步骤A3中,还包括步骤:设置阴性孔、阳性孔及空白对照孔,阴性孔、阳性孔分别加工作浓度的样品稀释液 $50\mu\text{l}$,然后分别加入阴性对照品、阳性对照品各 $50\mu\text{l}$,空白对照孔加入工作浓度的样品稀释液 $100\mu\text{l}$ 。

9. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述充分反应为 37°C 避光反应30-60分钟,所述充分显色反应为 37°C 避光反应15分钟。

10. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,步骤A1中,在 4°C 静置12~24小时之后,还包括步骤:采用0.1%~5%卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭2小时,经冷冻真空干燥后制成所述酶联反应板。

检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及的是,检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 又称猪蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的, 以母猪发热、厌食和流产、死产、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道征状和高死亡率为特征。该病 1987 年首次爆发于美国后, 迅速蔓延至全球所有养猪国家和地区, 给养猪业造成了巨大的经济损失。因此, 建立快速简便的方法来对病毒进行检测已成为该病检测的迫切需要。

[0003] 现有的检测方法有病毒分离鉴定、免疫荧光试验、PCR 等常规技术, 但病毒分离及免疫荧光试验存在敏感性差、耗时长等不足; PCR 诊断因其操作相对繁琐、对实验场地和实验人员要求较高, 不适于基层单位开展工作。

[0004] 因此, 现有技术没有检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的有效工具。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法, 从而提供一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测工具和方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:

一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的 ELISA 试剂盒, 其盒体内设置酶联反应板、酶标结合物、浓缩洗涤液、底物液、显色液、浓缩样品稀释液、终止液; 其中, 所述酶联反应板包被了抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体; 所述酶标结合物为辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的酶标结合物。

[0007] 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述酶联反应板是在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体, 然后在 4℃ 静置 12 ~ 24 小时, 冷冻真空干燥后装袋封口制成; 其中, 所述抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体是用重组 N 蛋白免疫实验动物后, 所得抗血清或腹水经蛋白 A 柱纯化后获得; 包被液为 10 μg/ml 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的缓冲液, 所述缓冲液是 0.01mol/L ~ 0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5 ~ pH9.5。

[0008] 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述酶标结合物为用重组 N 蛋白免疫实验动物后, 所制得的抗体采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成。

[0009] 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 所述酶标结合物是含 0.05% ~ 1% 的辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的 0.01mol/L ~ 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8; 并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。

[0010] 所述的 ELISA 试剂盒, 其中, 其还至少包括阴性对照品、阳性对照品其中之一。

[0011] 所述的 ELISA 试剂盒,其中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1% 表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;底物液为 0.1%~0.5% 过氧化氢溶液;显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;样品稀释液为 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;终止液为 1 mol/L~2 mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

[0012] 一种用于所述的 ELISA 试剂盒的检测方法,其包括步骤:

A1、用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所得抗血清或腹水经蛋白 A 柱纯化,获得抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体,在通用聚苯乙烯微孔板上包被所述抗体,然后在 4℃ 静置 12~24 小时,冷冻真空干燥后制成酶联反应板,并装袋封口保存;其中,包被液是含有 0.01%~1% 所述抗体的缓冲液,所述缓冲液是 pH7.5~pH9.5 的 0.01 mol/L~0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液;

A2、用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所制得的抗体采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成酶标结合物;

A3、所述酶联反应板每孔分别加工作浓度的样品稀释液 50 μl,再加入待检的样本 50 μl,混匀;其中,所述样品稀释液为 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;

A4、充分反应后甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加 250 μl)工作浓度洗涤液洗涤 6 次,每次均需停留 1 分钟;最后一次甩净,拍干;其中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1% 表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;

A5、每孔加酶标结合物 100 μl,充分反应后甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加 250 μl)工作浓度洗涤液洗涤 3 次,每次均需停留 1 分钟;最后一次甩净,拍干;

A6、按所需用量,临用前取等体积底物液和显色液充分混匀后每孔加 100 μl,盖好封板膜,充分显色反应后加终止液 50 μl,混匀,终止反应;其中,所述底物液为 0.1%~0.5% 过氧化氢溶液;所述显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述终止液为 1 mol/L~2 mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

[0013] 所述的检测方法,其中,步骤 A3 中,还包括步骤:设置阴性孔、阳性孔及空白对照孔,阴性孔、阳性孔分别加工作浓度的样品稀释液 50 μl,然后分别加入阴性对照品、阳性对照品各 50 μl,空白对照孔加入工作浓度的样品稀释液 100 μl。

[0014] 所述的检测方法,其中,所述充分反应为 37℃ 避光反应 30-60 分钟,所述充分显色反应为 37℃ 避光反应 15 分钟。

[0015] 所述的检测方法,其中,步骤 A1 中,在 4℃ 静置 12~24 小时之后,还包括步骤:采用 0.1%~5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,经冷冻真空干燥后制成所述酶联反应板。

[0016] 采用上述方案,采用本发明的猪繁殖与呼吸综合征病毒检测盒,开辟猪繁殖与呼吸综合征病毒检测的新途径,利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性,建立了猪繁殖与呼吸综合征病毒快速免疫检测方法;实现了猪繁殖与呼吸综合征病毒检测技术商品化,有力促进猪繁殖与呼吸综合征病毒监测水平的全面提高,推动了猪繁殖与呼吸综合征病毒防控工作。这不仅大大方便了用户操作,而且还提高了检测指标的一致性,实用性和可靠性均得到改善。

附图说明

[0017] 图 1 是本发明产品的结构示意图；
图 2 是本发明方法的流程示意图。

具体实施方式

[0018] 以下对本发明的较佳实施例加以详细说明。

[0019] 如图 1 所示,本发明提供了一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的 ELISA 试剂盒,其盒体内设置酶联反应板 101 和各种试剂 102,各种试剂具体包括酶标结合物、浓缩洗涤液、底物液、显色液、浓缩样品稀释液、终止液等等;其中,所述酶联反应板为包被了抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体所制得的酶联反应板;所述酶标结合物为辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体的酶标结合物。

[0020] 以下对本发明试剂盒的酶联反应板和各种试剂进行详细说明。

[0021] 所述酶联反应板是在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的抗体,其中抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,下面以多克隆抗体为例进行说明,但显然对于单克隆抗体同样可实现本发明的目的,然后在 4℃ 静置 12~24 小时,冷冻真空干燥后装袋封口制成。在 4℃ 静置 12~24 小时之后,还可以采用 0.1%~5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,然后再冷冻真空干燥后装袋封口制成所述酶联反应板。其中,通用聚苯乙烯微孔板,可以是 48 孔板或 96 孔板,或其他板;所述抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的多克隆抗体是用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所得抗血清经蛋白 A 柱纯化后获得;包被液为含 10 μg/ml 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的缓冲液,所述缓冲液是 0.01 mol/L~0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5~pH9.5。

[0022] 所述酶标结合物为用重组 N 蛋白免疫实验动物(如小鼠)后,所制得的单克隆抗体(当然,亦可采用多克隆抗体)采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成。例如,所述酶标结合物是 pH6~8 的 0.01mol/L~0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液,其中含有 0.05%~1% 的经过辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的单克隆抗体;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。例如,所述防腐剂是 0.01%~0.1% 的硫柳汞(Thimerosal,也称柳硫汞、水杨乙汞)。本发明对防腐剂的种类和用量没有额外的限制,只要能够抑制细菌生长即可。其中,磷酸盐缓冲液最好为 0.05 mol/L, pH7.0。

[0023] 所述的试剂盒还可以包括阴性对照品(negative control)和/或阳性对照品(positive control),为便于用户使用,最好是同时具备阴性对照品和阳性对照品。所述阴性对照品为正常猪组织标本,所述阳性对照品为含有猪繁殖与呼吸综合征病毒的猪组织标本。一般来说,阳性对照品和阴性对照品是检验试验有效性的控制品,同时也作为判断结果的对照,因此对照品,特别是阳性对照品的基本组成应尽量与检测标本的组成相一致。阴性对照品须先行检测,确定其中不含待测物质。阳性对照品多以含蛋白保护剂的缓冲液为基质,其中加入一定量的待检物质,此量最好在试剂说明书中标明;加入的量应与试剂的敏感度相称,在测定中得到的吸光值与受检标本吸光值比较,可对标本中受检物质的量有一个粗略的估计。在对照品中一般加入抗生素和防腐剂,以利保存。

[0024] 所述试剂盒中,所述洗涤液为包含有 0.1%~1% 表面活性剂的 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~8;底物液为 0.1%~0.5% 过氧化氢溶液;显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;样品稀释液为 0.01mol/L~0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6~

8 ;终止液为 1 mol/L ~ 2 mol/L 的硫酸或氢氧化钠。

[0025] 并且,如图 2 所示,本发明还提出了一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测方法,其包括以下步骤。

[0026] A1、用重组 N 蛋白免疫实验动物后,所得抗血清经蛋白 A 柱纯化,获得抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的多克隆抗体。在通用聚苯乙烯微孔板上包被所述多克隆抗体,然后在 4℃ 静置 12 ~ 24 小时,冷冻真空干燥后制成酶联反应板,并装袋封口保存;其中,包被液是含有 0.01%~1% 所述多克隆抗体的缓冲液,所述缓冲液是 pH7.5 ~ pH9.5 的 0.01 mol/L ~ 0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液。

[0027] 在 4℃ 静置 12 ~ 24 小时之后,还可以包括步骤:采用 0.1% ~ 5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时,经冷冻真空干燥后制成所述酶联反应板。

[0028] A2、用重组 N 蛋白免疫小鼠(也可以是其他实验动物)后,所制得的单克隆抗体采用辣根过氧化物酶进行免疫标记制成酶标结合物。一般地,所述酶标结合物是含 0.05% ~ 1% 的辣根过氧化物酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体的 0.01mol/L ~ 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8 ;并且添加含量足以抑制细菌生长的防腐剂。例如,所述防腐剂是 0.01% 的硫柳汞。

[0029] A3、所述酶联反应板每孔分别加工作浓度的样品稀释液 50 μ l,再加入待检的样本 50 μ l,混匀;其中,所述样品稀释液为包含有 0.1% ~ 1% 表面活性剂的 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8 ;更好的是,所述样品稀释液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH7.0。

[0030] 并且,步骤 A3 中,还可以包括步骤:设置阴性孔、阳性孔及空白对照孔,阴性孔、阳性孔分别加工作浓度的样品稀释液 50 μ l,然后分别加入阴性对照品、阳性对照品各 50 μ l,空白对照孔加入工作浓度的样品稀释液 100 μ l。

[0031] A4、充分反应后甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加 250 μ l)工作浓度洗涤液洗涤 6 次,每次均需停留 1 分钟;最后一次甩净,拍干。其中,所述洗涤液为包含有 0.1% ~ 1% 表面活性剂的 0.01mol/L ~ 0.5mol/L 磷酸盐缓冲液, pH6 ~ 8。一般的,采用纯净水洗涤至少四次或以上,效果更好一些。其中,充分反应一般为 37℃ 避光反应 30~60 分钟。

[0032] A5、每孔加酶标结合物 100 μ l,充分反应后甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加 250 μ l)工作浓度洗涤液洗涤 3 次,每次均需停留 1 分钟;最后一次甩净,拍干。一般的,采用纯净水洗涤至少四次或以上,效果更好一些。其中,充分反应一般为 37℃ 避光反应 30 分钟。

[0033] A6、按所需用量,临用前取等体积底物液和显色液充分混匀,每孔加 100 μ l,盖好封板膜,充分显色反应后加终止液 50 μ l,混匀,终止反应;其中,所述底物液为 0.1% ~ 0.5% 过氧化氢溶液;所述显色剂为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺;所述终止液为 1 mol/L ~ 2 mol/L 的硫酸或氢氧化钠。例如,所述终止液为 1.5mol/L 的硫酸。所述充分显色反应一般为 37℃ 避光反应 10~15 分钟。

[0034] 然后,判断加入待检样本的孔内液体是否显色。

[0035] 以下对本发明所述的试剂盒和检测方法进行具体说明。为达到上述目的,本发明采用了以下技术方案。

[0036] 一、抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的制备,具体包括:

1.1 免疫实验动物；

1.2 试取血进行测试,看是否成功免疫；

1.3 如果成功免疫,则处死实验动物,采集全部血清；

1.4 采用层析等方法纯化抗体；

1.5 鉴定纯化的抗体,鉴定方法可以包括:测定蛋白含量;蛋白电泳观察抗体成份;ELISA 测定抗体活性。

[0037] 二、抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备,具体包括以下步骤:

2.1 免疫动物 用重组抗原免疫小鼠,使小鼠产生致敏 B 淋巴细胞。一般选用 6-8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,按照预先制定的免疫方案进行免疫注射。抗原通过血液循环或淋巴循环进入外周免疫器官,刺激相应 B 淋巴细胞,使其活化、增殖,并分化成为致敏 B 淋巴细胞。

[0038] 2.2 细胞融合 采用二氧化碳气体处死小鼠,无菌操作取出脾脏,在平皿内挤压研磨,制备脾细胞悬液。将准备好的同系骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按一定比例混合,并加入促融合剂聚乙二醇。在聚乙二醇作用下,各种淋巴细胞可与骨髓瘤细胞发生融合,形成杂交瘤细胞。

[0039] 2.3 选择性培养 选择性培养的目的是筛选融合的杂交瘤细胞,一般采用 HAT 选择性培养基。

[0040] 2.4 杂交瘤阳性克隆的筛选与克隆化 在 HAT 培养基中生长的杂交瘤细胞,只有少数是分泌预定特异性单克隆抗体的细胞,因此,必须进行筛选和克隆化。通常采用有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化培养。

[0041] 2.5 单克隆抗体的大量制备 单克隆抗体的大量制备主要采用动物体内诱生法和体外培养法。

[0042] (1) 体内诱生法 取 Balb/c 小鼠,首先腹腔注射 0.5ml 液体石蜡或降植烷进行预处理。1-2 周后,腹腔内接种杂交瘤细胞。杂交瘤细胞在小鼠腹腔内增殖,并产生和分泌单克隆抗体。约 1-2 周,可见小鼠腹部膨大。用注射器抽取腹水,即可获得大量单克隆抗体。

[0043] (2) 体外培养法 将杂交瘤细胞置于培养瓶中进行培养。在培养过程中,杂交瘤细胞产生并分泌单克隆抗体,收集培养上清液,离心去除细胞及其碎片,即可获得所需要的单克隆抗体。但这种方法产生的抗体量有限。各种新型培养技术和装置不断出现,大大提高了抗体的生产量。

[0044] 三、抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体的纯化与标记,具体包括以下步骤。

[0045] 3.1 抗体的纯化:采用层析等方法纯化抗体。

[0046] 3.2 抗体的鉴定:包括测定蛋白含量和进行电泳分析等,例如,采取 BRADFORD 微量蛋白测定法测定蛋白浓度;采取 SDS-PAGE 对纯化的抗体进行成分分析,纯化后的抗体仅有 55KD 左右重链和 23KD 左右轻链两条带型,无明显其它杂带;

3.3 抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体的标记:例如采用改良过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记,然后分离纯化并进行鉴定。改良过碘酸钠法,是取 5mgHRP 溶于 0.2mol/L pH5.6 的乙酸缓冲液 0.5ml 中,再加入 0.1mol/L 0.25ml 的过碘酸钠混匀。加入抗猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体约 5mg 混匀,调 pH 为 9.0,4℃ 过夜,加入硼氢化钠 0.5mg 混匀,透析过夜。在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀,

4℃ 30min, 离心, 去上清, 沉淀以少许 0.02mol/L pH7.4 PBS 液溶解, 装入透析袋, 以同样液体在 4℃ 透析除盐过夜; 次日取出离心, 以除去不溶物, 即得酶-抗体结合物, 以 0.02mol/L pH 7.4 PBS 液加至 5ml; 效价测定合格后, 加入等量优质甘油, 分装小瓶, 低温保存。当然, 也可以采用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)、葡萄糖氧化酶、β-D-半乳糖苷酶和脲酶等标记抗猪繁殖与呼吸综合征 N 蛋白单克隆抗体。本发明对具体的改良过碘酸钠法、辣根过氧化物酶标记方法等均无额外限制。

[0047] 四、建立猪繁殖与呼吸综合征病毒检测试剂盒

4.1 抗体包被板: 采用快速包被工艺, 预先在通用聚苯乙烯微孔板上包被多克隆抗体。包被液为含适量抗体的 0.01—0.15 mol/L 的磷酸盐、硼酸盐或碳酸盐缓冲液, pH7.5—9.5; 4℃ 静置 12-24 小时; 用 0.1%—5% 卵清蛋白或牛血清白蛋白封闭 2 小时; 冷冻真空干燥; 真空装袋封口, 并在板袋外标示。

[0048] 包被量一般为缓冲液的 0.01%~1%, 在实际测定条件下一般进行“滴定”, 以选择能达到高敏感度的最大稀释度作为试剂盒中的工作浓度。例如, 在实际选择中, 可以用方阵滴定法来测定最适包被量; 即将多克隆抗体用包被缓冲液进行一系列稀释, 如 1:100, 1:200, 1:400……1:25600, 与一定浓度的酶标结合物反应, 选择 OD (Optical Density, 光密度, 也称吸光度) 值在 1.2 左右的稀释度为包被最适浓度。

[0049] 4.2 酶标结合物液: 磷酸盐缓冲液, pH7.0, 0.05 mol/L, 加含量足以抑制细菌生长的适量防腐剂, 如重量百分比为 0.01% 的硫柳汞, 以及重量百分比为 0.05%~1% 的抗猪繁殖与呼吸综合征单克隆抗体-辣根过氧化物酶标记结合物。例如, 如上所述, 标记物采用过碘酸钠法将辣根过氧化物酶标记到抗猪繁殖与呼吸综合征单克隆抗体上。

[0050] 4.3 洗涤剂: 采用 0.5% Triton-X100 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 还可以添加适量的防腐剂, 例如 0.01%~1% 的柳硫汞。

[0051] 4.4 底物液及显色剂: 底物液为过氧化氢溶液; 显色剂为对人体无害的 TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺) 溶液, 也可以为 ABTS (2, 2'-边氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-6 磺酸)) 或邻苯二胺 (O-phenylenediamine, OPD) 等等。

[0052] 4.5 样品稀释液: 磷酸盐缓冲液, pH7.0, 0.1 mol/L。

[0053] 4.6 终止液: 1—2 mol/L 硫酸或氢氧化钠。

[0054] 4.7 以上组分包括了除纯净水之外的检测所需要的全部试剂, 其中液体组分均已调整到工作浓度并装入塑料瓶内, 无须稀释可以直接使用; 阴阳对照放入带盖的塑料管内, 可以直接使用; 包被板拆封后也可直接使用。

[0055] 本发明所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒检测试剂盒, 通过免疫实验动物获得多克隆抗体, 进行预试验, 测定并选择合适的抗体包被浓度。用碳酸盐缓冲液稀释抗体包被 96 孔聚苯乙烯微孔板, 100 微升/孔; 4℃ 过夜; 甩去孔内液体, 用同样体积含 1% 的卵清蛋白的磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 0.05 mol/L) 室温封闭 2 小时; 冷冻真空干燥; 真空条件下装袋, 板袋上贴相应标示。

[0056] 然后用磷酸盐缓冲液稀释抗猪繁殖与呼吸综合征 N 蛋白的单克隆抗体-辣根过氧化物酶标记结合物。配制含有 0.5% Triton-X100 的洗涤液。配制过氧化氢作为底物, 配制 TMB 溶液作为显色剂。样品稀释液为磷酸盐缓冲液。终止液为 2 mol/L 硫酸溶液。以上液体成分, 装入塑料瓶内。

[0057] 将抗体包被板与液体试剂瓶依次装入试剂盒内,平行站立放置;检查内容后,封盖,即为猪繁殖与呼吸综合征病毒检测试剂盒。

[0058] 本发明所述试剂盒采用快速免疫检测技术检测猪繁殖与呼吸综合征病毒。本试剂灵敏度高,特异性强,重复性好,操作方便快捷,可分多次使用。

[0059] 例如,试剂盒的试剂组成如下:1. 抗体包被板,96T/192T;2. 酶标结合物(1号液)1支;3. 浓缩洗涤液(2号液)1支;4. 底物(3号液)1支;5. 显色剂(4号液)1支;6. 浓缩样品稀释液(5号液)1支;7. 终止液(6号液)1支;8. 阳性对照品1支;9. 阴性对照品1支;还可以包括使用说明书1份。

[0060] 操作程序具体说明如下:

【试剂准备】

1、洗涤液配制:用蒸馏水或去离子水将浓缩洗涤液(2号液)按1:10稀释(如取100ml浓缩洗涤液加900ml蒸馏水或去离子水),充分混匀即为工作浓度洗涤液。

[0061] 2、样品稀释液配制:用蒸馏水或去离子水将浓缩样品稀释液(5号液)按1:1稀释(如取100ml浓缩样品稀释液,加100ml蒸馏水或去离子水),充分混匀即为工作浓度样品稀释液。

【样品制备】

1、样品采集:病死或扑杀的猪,取肺、扁桃体和脑等组织,肝脏除外;待检活猪,用注射器取血5mL。立即检测或短期内2~8℃保存,如需长期保存,应置于-20℃以下。

【0063】 2、样品处理

2.1 组织样品的处理:称取组织250mg,用剪刀剪成小块;将剪碎的组织置于适当的离心管中,加入1ml工作浓度样品稀释液,漩涡振荡1分钟,18-26℃条件下静置1-2小时;8000rpm离心5分钟,取50μl上清液按照说明书进行检测。

[0064] 2.2 全血样品的处理:待血凝后取50μl血清按照说明书进行检测。

【0065】 【检验方法】

1、加样品稀释液:每孔加工作浓度的样品稀释液50μl。

[0066] 2、加样反应:每次试验设空白对照、阴性对照、阳性对照各2孔,分别加入样品稀释液、阴性对照、阳性对照各50μl;样品检测孔分别加组织或血清样品50μl。盖好封板膜,37℃避光反应60分钟。甩去孔内液体,每孔注满(若用洗板机每孔加250μl)工作浓度洗涤液洗涤6次,每次均需停留1分钟;最后一次甩净,拍干。

[0067] 3、加酶反应:除空白对照孔外,其余每孔加酶标结合物(1号液)100μl,盖好封板膜,37℃避光反应30分钟。甩去孔内液体,如上洗涤3次,拍干。

[0068] 4、显色反应:按所需用量,临用前取等体积底物液(3号液)和显色液(4号液)充分混匀,每孔加100μl,盖好封板膜,37℃下避光反应15分钟。

[0069] 5、终止反应:加终止液(6号液)50μl,以空白对照调零,用酶标仪于450nm波长(630nm作为参比波长)读取OD值。

[0070] 结果判断具体说明如下。

【0071】 【参考值】

1、Cut-off 值 (COV)= 阴性对照平均OD值 × 2.1 (阴性对照孔OD值 < 0.05时,按0.05计)。

[0072] 2、有效性判定：

阴性对照孔 OD 值 ≤ 0.25 (若大于 0.25 则实验无效)；

阳性对照孔 OD 值 ≥ 0.50 (若小于 0.50 则实验无效)。

[0073] 【检验结果的解释】

样品 OD 值 $\geq COV$, 判为猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性；

样品 OD 值 $< COV$, 判为猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性。

[0074] 需要注意的是：

1、试剂盒各组份从冷藏环境中取出时,必须平衡至室温后,方可开封启用。未使用完的试剂组份应及时放回 2~8℃ 密封保存。

[0075] 2、加试剂前应将试剂轻摇、混匀。

[0076] 3、孵育时必须用封板膜密封板孔,封板膜不可以重复使用。

[0077] 4、不同批次试剂盒的试剂组份或说明书不可混用。瓶盖每次使用后要盖紧,各瓶之间瓶盖不可混用。

[0078] 5、用弃的试剂盒及样品都应按污染物妥善处理。试剂盒内终止液有腐蚀性,须小心使用。

[0079] 采用本发明的猪繁殖与呼吸综合征病毒检测盒,开辟猪繁殖与呼吸综合征病毒检测的新途径,利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性,建立了猪繁殖与呼吸综合征病毒快速免疫检测方法;实现了猪繁殖与呼吸综合征病毒检测技术商品化,有力促进猪繁殖与呼吸综合征病毒监测水平的全面提高,推动了猪繁殖与呼吸综合征病毒防控工作。这不仅大大方便了用户操作,而且还提高了检测指标的一致性,实用性和可靠性均得到改善。

[0080] 本发明的试剂盒方便实用、安全环保,试剂盒不仅配备了检测所必须的试剂组分,而且均为即开即用型,用户不必另行配制,使操作简单易行。本发明采用了无害的 TMB 试剂,避免了常规方法所带来的危害和污染。

[0081] 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。

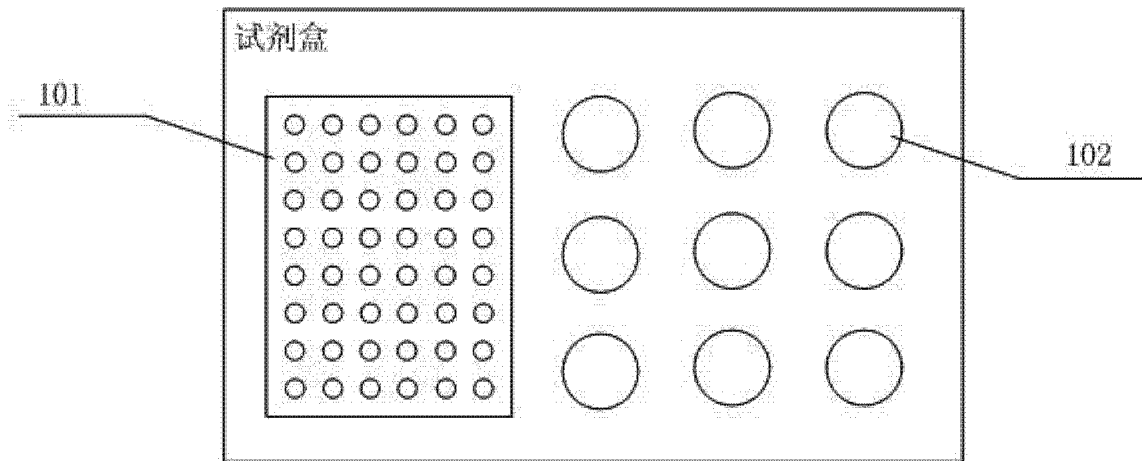


图 1

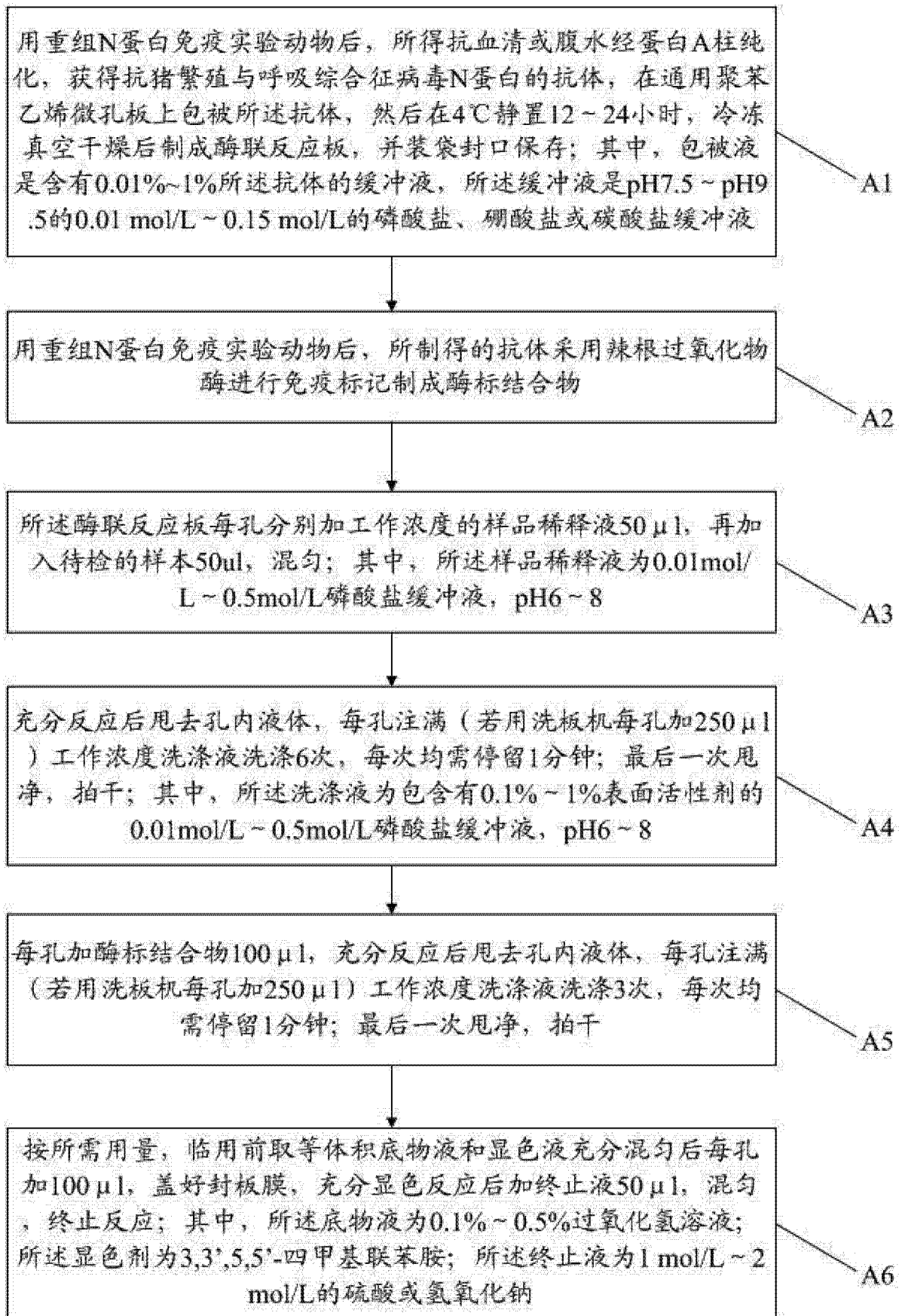


图2

专利名称(译)	检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法		
公开(公告)号	CN104655841A	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201510059274.2	申请日	2015-02-05
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
[标]发明人	邓凤林 胡绍良		
发明人	邓凤林 胡绍良		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	王永文 刘杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的试剂盒和检测方法，盒体内设置酶联反应板、酶标结合物、浓缩洗涤液、底物液、显色液、浓缩样品稀释液、终止液；其特征在于，所述酶联反应板包被了抗猪繁殖与呼吸综合征病毒N蛋白的多克隆抗体；所述酶标结合物为辣根过氧化酶标记的抗猪繁殖与呼吸综合征病毒N蛋白单克隆抗体的酶标结合物。通过利用快速免疫检测技术的敏感性、特异性以及实用性、经济性，本发明的优点主要表现在操作简便、快速、结果判断客观可靠，可作为一种方便的初筛工具，其敏感度达金标准方法PCR的90%。

