



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109900902 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910249603.8

(22)申请日 2019.03.29

(71)申请人 中牧实业股份有限公司

地址 100070 北京市丰台区南四环西路188
号八区16-19号楼

(72)发明人 张蕾 董春娜 李静 李玲 王飞
肖进 齐鹏

(74)专利代理机构 北京惟诚致远知识产权代理
事务所(普通合伙) 11536

代理人 王慧凤 李巍

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页
序列表7页 附图1页

(54)发明名称

一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标猪伪狂犬病毒单克隆抗体、样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液，其中所述酶标板包被有利用杆状病毒表达系统及细胞悬浮培养工艺表达的猪伪狂犬病毒gB蛋白，将其纯化后作为包被抗原，同时用作免疫原，制备并筛选出伪狂犬病毒gB蛋白的特异性单克隆抗体并进行过氧化物酶标记作为阻断酶标单抗。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷，结果判定采用S/N比值法，准确度高，与进口试剂盒相比，检测符合率达98%以上。

1. 一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,包括酶联反应板和酶标抗体;其中,所述酶联反应板包被有猪伪狂犬病毒gB蛋白,酶标抗体为用酶标记的抗猪伪狂犬病毒gB蛋白的单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板;所述猪伪狂犬病毒gB蛋白为利用杆状病毒表达系统以及昆虫细胞悬浮培养工艺表达获得;所述猪伪狂犬病毒gB蛋白的序列为序列列表中序列6。

3. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述抗猪伪狂犬病毒gB蛋白的单克隆抗体,含有重链可变区(PRV-Mc1-V_H)和轻链可变区(PRV-Mc1-V_L);所述PRV-Mc1-V_H和PRV-Mc1-V_L均由决定簇互补区和框架区组成;

所述PRV-Mc1-V_H和所述PRV-Mc1-V_L的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;

所述PRV-Mc1-V_H的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第26~35位氨基酸所示;

所述PRV-Mc1-V_H的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第53~60位氨基酸所示;

所述PRV-Mc1-V_H的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第95~109位氨基酸所示;

所述PRV-Mc1-V_L的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;

所述PRV-Mc1-V_L的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;

所述PRV-Mc1-V_L的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第93~98位氨基酸所示。

4. 根据权利要求3所述的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述PRV-Mc1-V_H的氨基酸序列如序列列表中SEQ ID No.1的第1~124位所示;其PRV-Mc1-V_L的氨基酸序列如序列列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶联反应板的获得方法是将所述猪伪狂犬病毒gB蛋白溶于100 μ l的pH 9.6的碳酸盐溶液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔0.1 μ g~1 μ g猪伪狂犬病毒gB蛋白,2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时,使包被抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300 μ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后4 $^{\circ}$ C密封保存。

6. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括底物液A、底物液B和终止液;所述底物液A为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液,使用时两者以1:1的比例混合;所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

7. 根据权利要求1所述的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括样品稀释液和20倍浓缩洗涤液;样品稀释液为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液;浓缩洗涤液为含有浓度为0.8%~1.2% (ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液;

和/或,所述酶联免疫试剂盒还包括阳性对照血清和阴性对照血清;所述阳性对照血清为猪伪狂犬病毒人工感染后采集的猪血清;所述阴性对照血清为无猪伪狂犬病毒病原体且无疫苗接种的猪血清。

8. 根据权利要求1~7所述的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒在制备检测猪伪狂犬病毒感染或疫苗接种的待测样品的试剂中的应用,其中,待测样品为感染野毒株或应用过普通的弱毒疫苗、灭活疫苗或应用过非gE缺失疫苗猪只血清。

9. 一株单克隆抗体,其可与猪伪狂犬病毒gB蛋白特异性结合,是下述任意一项所述的

单克隆抗体：

1) 含有重链可变区PRV-Mc1-V_H和链可变区PRV-Mc1-V_L；所述重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L均由决定簇互补区和框架区组成；

所述PRV-Mc1-V_H和所述PRV-Mc1-V_L的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成；

所述PRV-Mc1-V_H的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第26~35位氨基酸所示；

所述PRV-Mc1-V_H的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第53~60位氨基酸所示；

所述PRV-Mc1-V_H的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第95~109位氨基酸所示；

所述PRV-Mc1-V_L的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示；

所述PRV-Mc1-V_L的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示；

所述PRV-Mc1-V_L的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第93~98位氨基酸所示。

2) 含有重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L；所述PRV-Mc1-V_H的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~124位所示；其PRV-Mc1-V_L的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示。

10. 权利要求9所述的单克隆抗体在制备检测伪狂犬病毒gB抗体的试剂盒中的应用。

一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,更具体地,本发明涉及一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用,适用于种猪伪狂犬病毒gB抗体的特异、快速、准确检测。

背景技术

[0002] 伪狂犬病(Pseudorabies),又名奥耶斯基病(Aujeszky's disease,AD),是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)引起的一种急性传染病。该病能够侵害包括猪、牛、绵羊、兔、狐狸、犬猫、雪貂、鼠、水貂等多种动物。猪是天然宿主和储存者,除了猪,其余动物发病后均出现瘙痒、高热和脑脊髓炎症状,甚至可导致死亡。猪感染PRV后主要引起妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎与种猪不育,哺乳仔猪出现神经症状后死亡率高,育成育肥猪呼吸道症状,PRV病毒感染易形成潜伏感染,导致长期带毒、向外界排毒;另外,PRV在应激条件下易被激活,可引起反复感染和散毒,给全球养猪业造成了巨大的经济损失。

[0003] 在我国,预防、控制和根除伪狂犬病是当前面临的一项艰巨的任务,目前市场上使用的猪伪狂犬疫苗绝大多数是缺失gE基因与TK基因的弱毒疫苗。gB和gD囊膜蛋白是伪狂犬病毒必须的结构蛋白,起着重要的作用,免疫后能产生保护性中和抗体,gB抗体效价与攻毒保护具有明显的相关性。在伪狂犬病防制工作中,监测和检测猪血清中伪狂犬病毒抗体水平是非常重要的环节,对于未接种疫苗的猪只,血清中的猪伪狂犬病毒抗体既可以反映母源抗体的影响,也能够反映隐性感染的情况,这两种抗体的存在都会影响到减毒活疫苗的接种,甚至会使得苗无效,无法产生对病毒的免疫保护,导致免疫失败产生。对于已经接种了疫苗的猪只,猪血清中的伪狂犬病毒抗体水平反应了疫苗的免疫效果,是评价疫苗品质和免疫是否成功的重要指标。

[0004] 目前,酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assays,ELISA)是市场上主流的免疫测定技术,已广泛应用于临床检测,快速便捷且灵敏度高,且不需要特殊的仪器设备,可用于猪伪狂犬病毒的抗体检测。目前市场上,用于检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒多为间接ELISA抗体检测试剂盒,该方法的敏感性和特异性在检测猪伪狂犬病毒抗体水平上有一定的局限性,对于包被抗原纯度的要求比较高,否则容易出现假阳性和假阴性。

[0005] 本发明是基于针对猪伪狂犬病毒gB的特异性单克隆抗体的阻断ELISA抗体检测方法,使得该试剂盒具有很好的敏感性和特异性。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种敏感性高、特异性强、能够快速、简便地检测猪伪狂犬病毒gB抗体的阻断ELISA试剂盒。

[0007] 该试剂盒的优点之一是使用了辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗猪伪狂犬病毒gB的单克隆抗体,提高了检测的敏感性和特异性。

[0008] 基于上述目的,本发明的猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒,包括以猪伪狂犬病毒gB蛋白为包被抗原的酶联反应板和酶标抗体;所述酶标抗体为与猪伪狂犬病毒

gB蛋白特异性结合的单克隆抗体 (PRV-Mc1) 制成的酶标抗体。所述酶标抗体优选为经辣根过氧化物酶标记抗体,所述辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体上。

[0009] 优选的,所述猪伪狂犬病毒gB蛋白的序列为序列表中序列6,为利用杆状病毒表达系统以及昆虫细胞悬浮培养工艺表达获得猪伪狂犬病毒gB纯化蛋白。

[0010] 优选的,与猪伪狂犬病毒gB蛋白特异性结合的单克隆抗体含有重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L;所述重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L均由决定簇互补区和框架区组成;所述PRV-Mc1-V_H和所述PRV-Mc1-V_L的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述PRV-Mc1-V_H的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第26~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_H的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第53~60位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_H的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第95~109位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第93~98位氨基酸所示。

[0011] 优选的,所述PRV-Mc1-V_H的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~124位所示;其PRV-Mc1-V_L的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示。

[0012] 所述酶联反应板的最佳包被制备方法及条件是将所述猪伪狂犬病毒gB蛋白溶于100 μ l的pH 9.6的碳酸盐溶液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔0.1 μ g~1 μ g猪伪狂犬病毒gB蛋白,2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时,使包被抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300 μ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后4 $^{\circ}$ C密封保存。

[0013] 优选的,所述试剂盒还包括阳性对照血清和阴性对照血清,所述阳性对照血清为所述猪伪狂犬病毒人工感染后采集的猪血清;所述阴性对照血清为无特定病原体(无猪伪狂犬病毒病原体且无疫苗接种)的猪血清。

[0014] 更进一步的,所述试剂盒还包括样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液。所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板。所述样品稀释液为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。所述20倍浓缩洗涤液为含有浓度为0.8%~1.2% (ml/ml)的Tween-20的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。所述底物液A为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液,使用时两者以1:1的比例混合。所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0015] 本发明还要求保护单克隆抗体,其可与猪伪狂犬病毒特异性结合,是下述任意一项所述的单克隆抗体:

[0016] 1) 含有重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L;所述重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L均由决定簇互补区和框架区组成;所述PRV-Mc1-V_H和所述PRV-Mc1-V_L的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述PRV-Mc1-V_H的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第26~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_H的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第53~60位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_H的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第95~109位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第93~98位氨基酸所示。

[0017] 2) 含有重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L;所述PRV-Mc1-V_H的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~124位所示;其PRV-Mc1-V_L的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示。

[0018] 通过上述重链可变区和轻链可变区序列,可以与动物源恒定区(如鼠抗体重链和轻链恒定区)连接,制备得到可与猪伪狂犬病毒特异性结合的单克隆抗体。

[0019] 上述酶联免疫试剂盒在猪伪狂犬病毒gB阻断抗体检测中的应用也属于本发明的保护范围。

[0020] 上述可以与猪伪狂犬病毒特异性结合的单克隆抗体在制备检测猪伪狂犬病毒的试剂盒中的应用也是本发明的保护范围。特别是在制备检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒中的应用。

[0021] 上述猪伪狂犬病毒gB蛋白为利用杆状病毒表达系统以及昆虫细胞悬浮培养工艺表达获得猪伪狂犬病毒gB纯化蛋白,可包括下述步骤:

[0022] 1) 猪伪狂犬病毒总RNA提取:取病毒液250 μ l,加入750 μ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 μ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600 μ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 μ l无RNA酶水溶解RNA。

[0023] 2) 反转录、PCR扩增及基因测序:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得cDNA,根据GenBank报道(M17321.1)序列设计引物(F1:5' -CCGCCGTGCGGCGGGCG-3';R1:5' -CAGGGCGTCGGGTCCTC-3'),利用引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取gB基因序列信息。

[0024] 3) gB基因序列的合成、穿梭载体的构建、重组Bacmid的筛选与提取、重组杆状病毒的拯救:①基因序列的合成:根据测得gB胞外域基因序列,后加入His标签,送北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化。②穿梭载体的构建:根据gB序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物(F2:5' -CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCCCTCCTTGTTGGTCT-3';R2:5' -CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTAGTGATGATGATGATGATGAAAGGATTGGACAGG-3'),扩增gB胞外域的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体PH启动子下,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37 $^{\circ}$ C培养箱培养48h后挑取白斑,利用引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为2256bp,选取阳性克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 2×10^6 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 μ g和2.5 μ g的量进行转染,转染试剂用量为8 μ l,转染后4~6h进行换液,28 $^{\circ}$ C培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0025] 4) gB蛋白的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 2×10^6 的Hi5细胞,28 $^{\circ}$ C培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 μ m滤膜过滤备用。20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0溶液平衡His柱,然后细胞培养的上清挂柱,20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0 300mmol/L咪唑溶液洗脱,进行亲和层析纯化并鉴定,进而获得纯化的猪伪狂犬病毒gB蛋白。

[0026] 上述的可以与猪伪狂犬病毒gB蛋白特异性结合的单克隆抗体的获得方法如下:按照本领域已知的常规方法筛选本发明猪伪狂犬病毒特异性单克隆细胞株,再采用基因测序的方法测定特异性单克隆细胞株的基因序列,利用基因合成,构建重组表达载体的方法制备稳定表达的单克隆抗体作为本发明的酶标单克隆抗体。具体来讲,本发明猪伪狂犬病毒的特异性单克隆抗体的获得方法,可包括下述步骤:

[0027] 1) 以杆状病毒表达系统表达并纯化的gB蛋白为免疫原,纯度不低于80%,调整抗原浓度至100 μ g/ml;

[0028] 2) 连续免疫4次,每次间隔14天,前3次采用多点皮下免疫方式,第4次采取腹腔注射的免疫方式,每次10 μ g/只动物;

[0029] 3) 分离免疫动物的脾细胞,将其与骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞,对杂交瘤细胞上清用间接ELISA方法进行筛选特异性阳性克隆;当被免疫动物的血清抗体水平用间接ELISA进行检测效价超过1:50000时,可分离动物的脾细胞并制备成单细胞悬液,并在适当的融合剂(如聚乙二醇)的诱导下与骨髓瘤细胞(优选为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0)融合以形成杂交瘤;经检测,优选分泌PRV-Mc1的单克隆细胞株能够特异性与猪伪狂犬病毒gB蛋白反应。

[0030] 4) 特异性阳性克隆杂交瘤细胞株总RNA提取:取杂交瘤细胞悬液250 μ l,加入750 μ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 μ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600 μ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 μ l无RNA酶水溶解RNA。

[0031] 5) 反转录、PCR扩增及基因测序:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得杂交瘤细胞的cDNA。针对重链($V_H-1:5' -GTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG-3'$; $V_H-2:5' -ATGTCGACTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC-3'$)和轻链($V_L-1:5' -GTGAATTCATGGACA TTGTGATGACCCAGTCTCC-3'$; $V_L-2:5' -CAGTCGACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3'$)可变区设计通用引物,利用扩增引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取单克隆抗体重链和轻链可变区序列信息。

[0032] 6) 特异性单克隆抗体的基因序列的合成、穿梭载体的构建、重组Bacmid的筛选与提取、重组杆状病毒的拯救:①基因序列的合成:根据已测得单抗PRV-Mc1的重链和轻链可变区的序列,将鼠抗体重链和轻链恒定区的序列补充在可变区部分,然后送往北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化。②穿梭载体的构建:根据重链和轻链的序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物,针对重链(Mc1-HF:5' -TCATACATCTACGCGCCGCTAGCGAATTGACTTTGCAAG-3'; Mc1-HR:5' -TCCCCATCTCCCGGTACCCTTACCTGGGCTGA-3')和轻链(Mc1-LF:5' -CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCAATTCTGCTTTGACAC-3'; Mc1-LR:5' -CTAGTACTTCTCGACAAGCTTAGAGCATTCGGTGGGA-3'),扩增重链和轻链全长的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体中,其中pFastBacDual载体含有两个启动子,即PH启动子和P10启动子,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37 $^{\circ}$ C培养箱培养48h后挑取白斑,进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为4600bp,阴性克隆为300bp,选取完全无300bp条带的克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。④重组杆状病毒的拯救:转染前

将密度为 2×10^6 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按 $5 \mu\text{g}$ 和 $2.5 \mu\text{g}$ 的量进行转染,转染试剂用量为 $8 \mu\text{l}$,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0033] 7) 特异性单克隆抗体的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 2×10^6 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤备用。用Na₃P₀₄pH值为7.0溶液平衡ProteinA预装柱,平衡3~5个柱体积,然后将细胞上清结合ProteinA预装柱,样品结合完后用Glycine-HCL pH值为3.0洗脱液进行洗脱,即获得纯化的猪伪狂犬病毒gB特异性单克隆抗体PRV-Mc1。

[0034] 本发明试剂盒的检测程序为:

[0035] 1) 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0036] 2) 配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0037] 3) 样品稀释:在血清稀释板中将待检血清用样品稀释液进行2倍稀释,阴、阳性对照血清已稀释,可直接使用。

[0038] 4) 加样:取出所需板条,剩余板条装入铝箔袋中封好,置于2~8℃保存备用。将稀释好的待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清加入到抗原包被板中, $100 \mu\text{l}$ /孔。每份待检血清设1孔,阴性对照和阳性对照各设2孔,加样过程时间跨度应尽量短。如图1所示加样:N:表示加阴性对照血清;P:表示加阳性对照血清;S1、S2、S3、S4等表示加各待检血清。

[0039] 5) 温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应60min。

[0040] 6) 洗板:弃去反应液,每孔加 $300 \mu\text{l}$ 稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续洗板4次后拍干。

[0041] 7) 加酶:各孔加入辣根过氧化物酶标记的抗猪伪狂犬病毒gB蛋白的单克隆抗体 $100 \mu\text{l}$ (浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)。

[0042] 8) 温育:置37℃温箱,反应30min。

[0043] 9) 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液 $300 \mu\text{l}$,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0044] 10) 显色每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37℃温箱中,避光反应15min。

[0045] 11) 每孔加入显色终止液 $50 \mu\text{l}$,振荡混匀终止反应,15分钟内测定结果。

[0046] 12) 试验成立条件:阴性对照 $OD_{450\text{nm}}$ 值均应 ≥ 1.0 。阳性对照孔S/N值应 ≤ 0.5 。

[0047] 13) 判定:在酶标仪上测各孔 $OD_{450\text{nm}}$ 值。 $S/N = \text{样本}OD_{450\text{nm}}\text{值}/\text{阴性对照}OD_{450\text{nm}}\text{值}$ 。通过计算每个样品的S/N值,判定其抗体的有无。阴性: $S/N \geq 0.7$;可疑 $0.6 < S/N < 0.7$;阳性 $S/N \leq 0.6$ 。

[0048] 本发明的积极效果在于:本发明提供了猪伪狂犬病毒gB抗体检测的酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒是采用猪伪狂犬病毒gB纯化蛋白和针对gB特异性单克隆抗体制备的阻断法酶联免疫抗体检测试剂盒,可通过检测酶催化底物产生的信号变化来测定样品中猪伪狂犬病毒gB的特异性抗体的含量,且与目前其他病原如猪口蹄疫病毒O型、猪口蹄疫病毒A型、猪圆环病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清均不发生交叉反应。

[0049] 综上所述,本试剂盒采用猪伪狂犬病毒gB纯化蛋白和针对gB特异性单克隆抗体制备的阻断法酶联免疫抗体检测试剂盒,灵敏度高、特异性强,可以有效地检测样品中猪伪狂

犬病毒gB的特异性抗体的含量,与进口试剂盒符合率达98%以上,具有广阔的市场前景和良好的经济、社会效益。

附图说明

[0050] 图1为本发明试剂盒酶联免疫板加样示意图。

具体实施方式

[0051] 下述实施例中的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0052] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和伦理道德可获取的生物材料都可按照实施例中的提示替换使用。

[0053] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,实施例将有助于理解本发明,但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0054] 实施例1、制备猪伪狂犬病毒gB纯化蛋白

[0055] 包括下述步骤:

[0056] 1) 取病毒液250 μ l,加入750 μ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 μ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600 μ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 μ l无RNA酶水溶解RNA。

[0057] 2) 利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得cDNA,根据GenBank报道(M17321.1)序列设计引物(F1:5'-CCGCCGTGCGGCGCGGCG-3';R1:5'-CAGGGCGTCGGGTCCTC-3'),利用引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取gB基因序列信息。

[0058] 3) 根据测得gB胞外域基因序列,后加入His标签,送北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化,gB蛋白的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.3(全长序列即为编码序列)所示。

[0059] 4) 根据gB序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物(F2:5'-CTGCCTTTGCGGCGGATGAATCCCTCCTTGTGGTGCT-3';R2:5'-CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTAGTGATGATGATGATGGAAAGGATTGGACAGG-3'),扩增gB胞外域的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体PH启动子下,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。

[0060] 5) 将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37 $^{\circ}$ C培养箱培养48h后挑取白斑,利用引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为2256bp,选取阳性克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。

[0061] 6) 重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 2×10^6 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 μ g和2.5 μ g的量进行转染,转染试剂用量为8 μ l,转染后4~6h进行换液,28 $^{\circ}$ C培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0062] 7) 将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 2×10^6 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 μ m滤膜过滤备用。20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0溶液平衡His柱,然后细胞培养的上清挂柱,20mmol/L Tris 50mmol/L NaCl PH8.0 300mmol/L咪唑溶液洗脱,进行亲和层析纯化并鉴定,进而获得纯化的猪伪狂犬病毒gB蛋白,猪伪狂犬病毒gB蛋白的序列如序列表中序列6所示。

[0063] 实施例2、猪伪狂犬病毒gB蛋白特异性杂交瘤细胞株的筛选

[0064] 猪伪狂犬病毒gB蛋白特异性杂交瘤细胞株的筛选,包括以下步骤:

[0065] 1) 以实施例1获得的杆状病毒表达系统表达并纯化的gB蛋白为免疫原,纯度不低于80%,调整抗原浓度至100 μ g/ml;

[0066] 2) 免疫动物为BALB/c小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),连续免疫4次,每次间隔14天,前3次采用多点皮下免疫方式,第4次采取腹腔注射的免疫方式,每次每只小鼠注射gB蛋白10 μ g;

[0067] 3) 末次免疫后7天,取小鼠尾血分离血清后,用间接ELISA进行检测,效价 $>1:50000$ 后,分离免疫动物的脾细胞,将其与生长状态良好的骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,用HAT选择性培养基筛选获得杂交瘤细胞;

[0068] 4) 对杂交瘤细胞上清用间接ELISA方法进行筛选特异性阳性克隆,经检测,最终获得分泌PRV-Mc1的单克隆细胞株能够特异性与猪伪狂犬病毒gB蛋白反应。具体操作步骤:用猪伪狂犬病毒gB蛋白溶于100 μ l的pH 9.6的碳酸盐溶液稀释浓度至2 μ g/ml,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔100 μ l,2~8℃下放置8~12小时,使特异性单克隆抗体与酶联反应板充分结合,然后按照300 μ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后用铝箔纸进行封袋,置2~8℃保存备用。

[0069] 取细胞培养上清加入包被有病毒抗原的酶标板中,37℃反应30分钟,用洗涤液(含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,使用时用双蒸水稀释20倍。)洗板4次,拍干后,向每孔加入1:5000稀释的兔抗鼠IgG-HRP标记物(购自美国Sigma公司),37℃反应30分钟,用洗涤液4次,拍干后,向每孔加入底物液A(为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液)和底物液B(为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液)各50 μ l底物工作液,37℃避光反应15分钟。向每孔加入50 μ l终止液(2mol/L的硫酸溶液),振荡混匀终止反应。15分钟内测定每孔的OD_{450nm}值。以吸光度值 $>$ 阴性对照(即洗板培养液) $\times 2.1$ 倍为阳性判定标准,测定细胞培养上清中特异性单克隆抗体效价,最后获得1株特异性细胞克隆,与猪伪狂犬病毒gB蛋白有强烈信号反应,将这株编号为PRV-Mc1。

[0070] 实施例3、猪伪狂犬病毒gB的特异性杂交瘤细胞株的基因测序、单克隆抗体重组表达系统的建立及单克隆抗体的纯化

[0071] 猪伪狂犬病毒gB的特异性杂交瘤细胞株的基因测序、单克隆抗体重组表达系统的建立及单克隆抗体的纯化,包括以下步骤:

[0072] 1) 特异性阳性克隆杂交瘤细胞株总RNA提取、反转录、PCR及序列测定:

[0073] ①总RNA提取:取杂交瘤细胞悬液250 μ l,加入750 μ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 μ l的氯仿,混匀,4℃12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5ml EP管中,加入600 μ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,

用20 μ l无RNA酶水溶解RNA。

[0074] ②反转录:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得杂交瘤细胞的cDNA。

[0075] ③PCR反应及其产物的克隆测序:针对重链和轻链可变区设计通用引物,序列信息如下:

[0076] 表1重链及轻链可变区通用引物

[0077]

名称	序列(5' -3')
V _H -1(正向)	GTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG
V _H -2(反向)	ATGTCGACTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
V _L -1(正向)	GTGAATTCATGGACATTGTGATGACCCAGTCTCC
V _L -2(反向)	CAGTCGACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC

[0078] 利用扩增引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取单克隆抗体重链和轻链可变区序列信息。

[0079] 单克隆抗体PRV-Mc1含有重链可变区PRV-Mc1-V_H、轻链可变区PRV-Mc1-V_L,其PRV-Mc1-V_H的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~124位所示;其PRV-Mc1-V_L的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示。

[0080] 所述重链可变区PRV-Mc1-V_H和轻链可变区PRV-Mc1-V_L均由决定簇互补区和框架区组成;所述PRV-Mc1-V_H和所述PRV-Mc1-V_L的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述PRV-Mc1-V_H的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第26~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_H的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第53~60位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_H的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第95~109位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;所述PRV-Mc1-V_L的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第93~98位氨基酸所示。

[0081] 2) 特异性单克隆抗体的基因序列的合成及重组表达系统的建立

[0082] ①基因序列的合成:根据已测得单抗PRV-Mc1的重链和轻链可变区的序列,将鼠抗体重链和轻链恒定区的序列补充在可变区部分,然后送往北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化,PRV-Mc1重链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.4(全长序列即为编码序列)所示,轻链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.5(全长序列即为编码序列)所示。

[0083] ②穿梭载体的构建:根据重链和轻链的序列信息以及pFastBacdual(购自Thermo Fisher公司,货号10712024)载体序列信息,设计相应引物(序列见下表2),扩增重链和轻链全长的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacdual载体中,其中pFastBacdual载体含有两个启动子,即PH启动子和P10启动子,并且在PH启动子序列后面含有GP67信号肽序列信息,P10启动子序列后面含有HDM信号肽序列信息,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。

[0084] 表2表达载体构建引物序列信息

[0085]

名称	序列(5' -3')
PRV-Mc1-HF	TCATACATCTACGCGGCCGCTAGCGAATTGACTTTGCAAG
PRV-Mc1-HR	TCCCCATCTCCCGGTACCCTTACCTGGGCTGA
PRV-Mc1-LF	CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCAATTCTGCTTTGACAC
PRV-Mc1-LR	CTAGTACTTCTCGACAAGCTTAGAGCATTCGGTGGGA

[0086] ③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37℃培养箱培养48h后挑取白斑,利用M13引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为4600bp,阴性克隆为300bp,选取完全无300bp条带的克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。

[0087] ④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 2×10^6 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 μ g和2.5 μ g的量进行转染,转染试剂用量为8 μ l,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0088] 3) 特异性单克隆抗体的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 2×10^6 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 μ m滤膜过滤备用。用Na₃PO₄pH值为7.0溶液平衡ProteinA预装柱,平衡3~5个柱体积,然后将细胞上清结合ProteinA预装柱,样品结合完后用Glycine-HCL pH值为3.0洗脱液进行洗脱,即获得纯化的猪伪狂犬病毒gB特异性单克隆抗体PRV-Mc1。用紫外分光光度计测定OD_{280nm}值,用该OD_{280nm}值除以经验系数1.48即为单克隆抗体的浓度,单位为mg/ml。结果显示,PRV-Mc1分泌的单克隆抗体浓度为3.11mg/ml。

[0089] 实施例4、制备猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒

[0090] 1) 用猪伪狂犬病毒gB纯化蛋白制备抗原包被板:将gB纯化蛋白用pH 9.6的碳酸盐溶液稀释成1 μ g/ml的包被工作液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,100 μ l/孔,2~8℃下放置8~12小时,使包被抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300 μ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后2~8℃密封保存。

[0091] 2) 制备辣根过氧化物酶标记的猪伪狂犬病毒gB特异性单克隆抗体

[0092] 将猪伪狂犬病毒gB特异性单克隆抗体用戊二醛氧化法与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联,用pH7.4的PBS缓冲液充分透析,加等量的优质丙三醇,-20℃以下保存。具体步骤如下:

[0093] ①将5mg HRP溶于0.2ml含有1.25%戊二醛的0.1mol/L pH值6.8的PBS缓冲液中,置室温偶联18个小时,充分透析出去多余戊二醛;

[0094] ②加生理盐水至1ml,然后加入2.5mg纯化的猪伪狂犬病毒gB的特异性单克隆抗体及0.1ml pH值9.6的1mol/L碳酸盐缓冲液,置于2~8℃放置24小时;

[0095] ③加入0.1ml 0.3mol/L的赖氨酸溶液,室温放置2小时;

[0096] ④用pH7.4的PBS缓冲液充分透析,通过离心除去沉淀,上清即为酶结合物。用酶标记物稀释液按一定比例稀释后即酶标记物的工作液(0.5 μ g/ml)。

[0097] 3) 阳性对照血清:是以猪伪狂犬病毒人工感染后采集猪血清,作为试剂盒的阳性

对照血清(1管,1.5ml/管)。

[0098] 4) 阴性对照血清:是无特定病原体(SPF)猪血清,作为试剂盒的阴性对照血清(1管,1.5ml/管)。

[0099] 5) 样品稀释液的制备为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,1瓶(24ml/瓶)。

[0100] 6) 底物液A的制备为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液(1瓶,12ml/瓶)

[0101] 7) 底物液B的制备为0.2mg/ml的四甲基联苯胺(TMB)溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0102] 8) 20倍浓缩洗涤液的制备为含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液(50ml/瓶,2瓶)。

[0103] 9) 终止液的制备2mol/L的硫酸溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0104] 10) 根据需要,试剂盒中还可以有样品稀释板(2块,96孔/块),用于样品的稀释。

[0105] 实施例5、猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒的使用方法

[0106] 1) 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0107] 2) 配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0108] 3) 样品稀释:在血清稀释板中将待检血清用样品稀释液进行2倍稀释,阴、阳性对照血清已稀释,可直接使用。

[0109] 4) 加样:取出所需板条,剩余板条装入铝箔袋中封好,置于2~8℃保存备用。将稀释好的待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清加入到抗原包被板中,100μl/孔。每份待检血清设1孔,阴性对照和阳性对照各设2孔,加样过程时间跨度应尽量短。如图1所示加样:N:表示加阴性对照血清;P:表示加阳性对照血清;S1、S2、S3、S4等表示加各待检血清。

[0110] 5) 温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应60min。

[0111] 6) 洗板:弃去反应液,每孔加300μl稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续洗板4次后拍干。

[0112] 7) 加酶:各孔加入实施例4中制备的酶标记物的工作液100μl。

[0113] 8) 温育:置37℃温箱,反应30min。

[0114] 9) 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液300μl,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0115] 10) 显色每孔加入100μl底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37℃温箱中,避光反应15min。

[0116] 11) 每孔加入显色终止液50μl,振荡混匀终止反应,15分钟内测定结果。

[0117] 12) 试验成立条件:阴性对照OD_{450nm}值均应≥1.0。阳性对照孔S/N值应≤0.5。

[0118] 13) 判定:在酶标仪上测各孔OD_{450nm}值。S/N=样本OD_{450nm}值/阴性对照OD_{450nm}值。通过计算每个样品的S/N值,判定其抗体的有无。阴性:S/N≥0.7;可疑0.6<S/N<0.7;阳性S/N≤0.6。

[0119] 实施例6、敏感性试验

[0120] 使用按照实施例4的方法制备的3批猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒(批次ZM2018001、ZM2018002、ZM2018003),按照实施例5的使用方法对猪伪狂犬病毒感染猪血清20份、猪伪狂犬病毒弱毒疫苗免疫血清20份进行检测,实验结果见表3,本发明的试剂

盒共检测出39份,有1份未检出,结果表明本试剂盒对40份已知阳性血清的敏感性为97.5%。

[0121] 表3敏感性检测结果

[0122]

试剂盒批号	检出率	敏感性
ZM2018001	39/40	97.5%
ZM2018002	39/40	97.5%
ZM2018003	39/40	97.5%

[0123] 实施例7、特异性试验

[0124] 使用按照实施例4的方法制备的3批猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒(批次ZM2018001、ZM2018002、ZM2018003),按照实施例5的使用方法对50份健康猪血清、2份猪口蹄疫病毒O型(FMD-O)阳性血清、2份猪口蹄疫病毒A型(FMD-A)阳性血清、2份猪圆环病毒阳性血清(PCV2)、2份猪繁殖与呼吸综合征阳性血清(PRRS),分别进行检测。

[0125] 试剂盒的特异性检测结果如下表(表4)显示,对50份健康猪血清的检测结果显示,3批试剂盒的特异性均为100.0%。对2份猪口蹄疫病毒O型(FMD-O)阳性血清、2份猪口蹄疫病毒A型(FMD-A)阳性血清、2份猪圆环病毒阳性血清(PCV2)、2份猪繁殖与呼吸综合征阳性血清(PRRS)的检测结果显示均为阴性,因此3批试剂盒对这8份相关病原阳性血清检测的特异性均为100%。

[0126] 表4猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒特异性检测结果

[0127]

血清种类	总份数	试剂盒批号	阳性份数	阴性份数	特异性
健康猪血清	50	ZM2018001	0	50	100%
		ZM2018002	0	50	100%
		ZM2018003	0	50	100%
FMD-O	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
FMD-A	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PCV2	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PRRS	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%

[0128] 实施例8、符合率试验

[0129] 采用美国进口试剂盒IDEXX的猪伪狂犬病毒gB抗体检测试剂盒和本发明的试剂盒

同时对50份健康猪血清、25份病毒感染血清、30份疫苗免疫血清同时进行检测,比较2种试剂盒检测结果的符合率。

[0130] 美国进口试剂盒操作方法(采取“短期孵育模式”):

[0131] 1) 分别加100 μ l稀释好的阴性对照(2倍稀释)至合适的双孔中。

[0132] 2) 分别加100 μ l稀释好的阳性对照(2倍稀释)至合适的双孔中。

[0133] 3) 加100 μ l稀释好样品(2倍稀释)至相应的孔。

[0134] 4) 血清或血浆样本可在18~26 $^{\circ}$ C孵育60分钟(\pm 5分钟) (“短期孵育模式”)。

[0135] 5) 每孔用大约300 μ l洗涤溶液洗涤微孔3~5次。每次洗涤后,甩掉孔内的液体。每次洗涤之间和加入酶标抗体前,避免板孔变干。在最后一次甩板后,在吸水材料上扣板,彻底去掉剩余的液体。

[0136] 6) 每孔加入100 μ l酶标抗体。

[0137] 7) 在18~26 $^{\circ}$ C条件下孵育20分钟(\pm 1分钟)。

[0138] 8) 重复步骤5。

[0139] 9) 每孔加入100 μ lTMB底物溶液,18~26 $^{\circ}$ C条件下孵育15分钟(\pm 1分钟)。

[0140] 10) 每孔加入50 μ l终止液终止反应,在650nm下测量记录样品和对照的吸光值A(650)。

[0141] 11) 计算结果:分别计算阴性对照和阳性对照均值,要求阴性对照均值-阳性对照均值差大于等于0.3。短期孵育模式:样品S/N>0.7,判为阴性;0.6<S/N \leq 0.7,判为可疑,S/N \leq 0.6判为阳性。

[0142] 本发明试剂盒和美国进口试剂盒IDEXX的猪伪狂犬病毒gB抗体检测试剂盒对50份健康猪血清、25份病毒感染血清、30份疫苗免疫血清的检测结果见表5,本发明试剂盒和美国进口试剂盒IDEXX的猪伪狂犬病毒gB抗体检测试剂盒检测为阳性的血清份数均为54份,检测为阴性的血清份数均为51份。105份待检血清中,两种试剂盒检测结果一致的血清份数是103份,符合率为98.1%。

[0143] 表5符合率试验结果

检测类型		进口试剂盒		
[0144] 本发明试剂盒		阳性	阴性	合计
	阳性	53	1	54
	阴性	1	50	51
	合计	54	51	105

序列表

<110> 中牧实业股份有限公司
 <120> 一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用
 <130> WHOI190020
 <160> 6
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 1
 Glu Leu Thr Leu Gln Glu Trp Gly Ala Gly Val Val Lys Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Gly Val Tyr Gln Arg Thr Thr Arg Pro Tyr
 20 25 30
 Ala Tyr Phe Trp Tyr Arg Gln Gly Ser Gly Lys Gly Ser Glu Trp Ile
 35 40 45
 Glu Ser Ile Asn Pro Gly Ser Ala Leu Tyr Glu Trp Pro Gly Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ser Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Arg Tyr Cys Ala Ser Lys
 85 90 95
 Ser Leu Ala Ile Val Tyr Tyr Trp Asn Thr Asp Trp Arg Gln Gly Gln
 100 105 110
 Leu Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Lys Gly
 115 120
 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 2
 Asn Ser Ala Leu Thr Gln Pro Glu Ser Val Pro Gly Ala Thr Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Tyr Ser Glu Asn Phe Gly Trp Gln
 20 25 30
 Phe Gln Val Trp Tyr Pro Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Lys Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Phe Phe Val Pro Thr Ser Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ile Ile Ala Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ala Phe Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Thr Lys Gly Leu
 85 90 95
 Arg Gly Val Val Phe Gly Arg Gly Thr Arg Leu Thr Arg Leu Tyr Gln
 100 105 110
 Pro Thr Tyr
 115

<210> 3

<211> 2256

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

cctccttggtg gtgctgctgc tgttacacgc gctgcttctg catctcctac tcccgaaca 60
 ggagcaactc ctaacgatgt gtctgccgag gcctctttgg aagagattga ggctttcagc 120
 cctggtcctt ctgaggctcc tgatggagaa tatggcgact tggacgccag gacagcagtt 180
 agagccgcag ccacagaaag agacaggttc tacgtgtgtc cacctccttc tggttccaca 240
 gtggttagat tggagcctga acaggcctgt cccgagtact cacagggtag aaacttcaca 300
 gagggtatcg ccgttctctt caaggagaac atcgtctccac acaagttcaa agccccatc 360
 tactacaaga atgtgatcgt gaccaccgtc tggagcggct caacctatgc cgcaattacc 420
 aataggttca cagaccgcgt cccagttccc gtccaggaga ttactgacgt tatcgaccgc 480
 agaggaaagt gtgtgagcaa agccgagtac gttaggaata accataaggt gactgctttc 540
 gaccgcgacg agaaccaggt ggaggtggac ttgaggcctt caagactgaa cgctctggga 600
 accagaggat ggcatactac caacgacact tacaccaaga tcggagctgc tggcttctat 660
 cactactggca cttcagtcaa ttgtatcgtc gaagaggtcg aagctcgag cgtctatcca 720
 tacgattctt tcgctctgtc tacaggtgac atcgtgtaca tgtctccctt ctatggattg 780
 cgcaaggag cccacgggta acacattggc tatgcaccgc gtagatttca acaggtcgaa 840
 cactactacc ctattgatct cgatagcaga ttgagggtt cggagagcgt caccaggaac 900
 ttcttgagga caccacactt cacagtcgct tgggactggg ctccaagac aagaagggtt 960
 tgctccctcg ccaaattggag ggaggccgag gaaatgacca gggacgaaac taggatggt 1020
 agcttcagat tcaccagcag agccctgggt gcatectttg tttctgacgt cacacaactg 1080
 gacctccagc gcgtgcatct cgggtgattgc gtgctgagag aggcttccga agcaatcgac 1140
 gctatctata ggaggaggta taactcaacc catgtgctgg caggcgacag accagaagtc 1200
 tacctcgcta gaggaggctt cgtggttgcc tttagacctc tcattctcaa tgagctggcc 1260
 cagctgtacg ctagggaact ggagaggctg ggtctggcag gagttgttg cctgctgca 1320
 cccgctgccg caagaagagc acgcaggagc ccaggaccag ctggcactcc cgagccacca 1380
 gctgttaacg gcacaggcca cctgcgcac accactggta gcgcagaatt tgcaaggttg 1440

caattcactt acgaccacat ccaggcacac gtgaacgaca tgctgggaag gattgccgct	1500
gcctgggtgcg aattgcagaa taaggacaga actctgtggt cagaaatgtc tcgacctaac	1560
ccttctgccg tggcaacagc agctctcggc cagagggtgt ctgctagaat gctgggtgac	1620
gtgatggcca ttagcagatg cgtggaagtg agaggtggtg tgtacgttca gaactcaatg	1680
cgcgttcctg gagaaagagg cacatgctac tctcgcccac tcgtgacctt tgaacacaac	1740
ggctactgggtg tcattgaggg tcaactcggg gacgacaatg aactgctcat ttctagggat	1800
ctgatcgagc catgtaccgg caaccacaga cgctacttca agctgggctc cggctatgtg	1860
tactacgagg attacaacta cgttagaatg gtggaggctc ctgagacaat ttccactaga	1920
gtcacattga acttgacctt gctcgaagat cgcgaatttc tgccattgga ggtctacaca	1980
cgcgaggaat tggctgacac aggcttctg gattacagcg agatccagag gagaaatcag	2040
ctccatgctc tcaagttcta tgacattgac aggggtggtta aggtggacca taacgtcgtg	2100
ttgctgagag gaatcgcaaa cttcttccaa ggctggggcg atgttggtgc agccgtggga	2160
aaggtgttc tgggtgctac tgggtctgtt atctcagctg ttggcggaat ggtgagcttc	2220
ctgtccaatc ctttccatca tcatcatcat cactaa	2256
<210> 4	
<211> 1347	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 4	
gaattgactt tgcaagaatg gggagcaggt gtcgttaagc cttctctgac attgtccctg	60
acatgcggag tctaccagag gactaccagg ccatacgctt acttctggta tcgccagggc	120
agcggcaaaag gatctgaatg gattgagagc attaaccag gatcagctct gtatgagtgg	180
cctggattga agagcagagt cacctctcc gtcgatacta gcgacaacca gttctcactg	240
aaattgtcag tgaccgctgc tgatacagca agatactgtg cctcaaagtc actggctatt	300
gtctactact ggaacaccga ctggaggcag ggccagctga ccttggtgac agtgtcctca	360
gcttccaagg gtccatctgt gttccctttg gctccatcta gcaagagcac tagcggagga	420
acagctgccc tcggttgttt ggtgaaggac tacttccctg agcctgtgac cgtttctctg	480
aactccggag cactgacctc tgggtttcac acctcccag ccgtcttgca gtccctcaggt	540
ctgtattccc tgcatccgt cgtgacagtt ctttctctc cctgggaac tcagacctat	600
atctgcaacg tcaaccacaa gccatccaat actaaggctg ataagaaagt tgaaccaaag	660
tcatgtgaca agaccatac ctgcctcca tgcccagctc ctgaactgct ggggtgtcca	720
tctgtgttcc tgttcccacc aaagcctaaa gacacctga tgatttccag aacaccagaa	780
gtcacatgcg tcgtcgttga cgtctcacat gaggaccag aagttaagtt caactggtac	840
gtcgaatggtg ttgaggtcca caacgctaag acaaagccaa gggaggaaca gtacaattca	900
acttacaggg tggtttcagt cctcaccgtc ctccaccaag actggctgaa cggcaaagag	960
tataagtgca aagtgtcaaa caaggcaactg cctgcaccaa ttgagaagac catctccaaa	1020
gctaagggcc agcccagaga acctcaagtg tatacattgc ctccatccag ggacgaactg	1080
accaagaacc aggtgagcct gacttgctg gtcaaagct tctacccttc cgatattgcc	1140
gtcgaatggg agtccaacgg acagcccag aataactaca agaccacacc tcccgtgttg	1200

gattctgacg gctccttctt tctgtattct aagctcactg tggataagag ccgctggcag	1260
caaggaaacg tctttagctg ttcagtcatg cagcaggctc tgcacaacca ctacaccag	1320
aagagcttga gcctcagccc aggtaag	1347
<210> 5	
<211> 648	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 5	
aattctgctt tgacacaacc tgaatccgtg cctgggtgcta ctgggtcaaag agtgacaatc	60
tcttgtacca ggtactccga gaacttcggg ttggcagtttc aggtctggta tccacagttg	120
ccaggaactg ctcccaagaa attgatctat ggaaacttct ttgtgcccac ttcctgcccc	180
gacagattct ccggtcagg ctctggcacc tcagcateac tgattatcgc aggtctgcaa	240
gcctttgacg agacagatta ctactgcca tccggaacta aaggactgag aggagtgggtg	300
ttcggtcgcg gtactagget caccaggttg taccagecca catacgtcc ttcagtcact	360
ctgttccctc cctctagcga agaactccag gctaacaagg ctaccttggg gtgtttgatt	420
tccgacttct accctgggtg cgtcacctgc gcttgaaag ctgatagctc tcccgtgaag	480
gctggcgtgg agacaaccac accaagcaag caaagcaaca acaaatacgc agcatcatcc	540
tacctgtcac tgacaccgga acagtggaaa tctcacagat cctattcttg ccaggtcaca	600
catgaaggct caactgtgga gaagactgtg gctcccaccg aatgctct	648
<210> 6	
<211> 751	
<212> PRT	
<213> 伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus)	
<400> 6	
Pro Pro Cys Gly Ala Ala Ala Val Thr Arg Ala Ala Ser Ala Ser Pro	
1 5 10 15	
Thr Pro Gly Thr Gly Ala Thr Pro Asn Asp Val Ser Ala Glu Ala Ser	
20 25 30	
Leu Glu Glu Ile Glu Ala Phe Ser Pro Gly Pro Ser Glu Ala Pro Asp	
35 40 45	
Gly Glu Tyr Gly Asp Leu Asp Ala Arg Thr Ala Val Arg Ala Ala Ala	
50 55 60	
Thr Glu Arg Asp Arg Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Ser Gly Ser Thr	
65 70 75 80	
Val Val Arg Leu Glu Pro Glu Gln Ala Cys Pro Glu Tyr Ser Gln Gly	
85 90 95	
Arg Asn Phe Thr Glu Gly Ile Ala Val Leu Phe Lys Glu Asn Ile Ala	
100 105 110	
Pro His Lys Phe Lys Ala His Ile Tyr Tyr Lys Asn Val Ile Val Thr	

115	120	125
Thr Val Trp Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Ala Ile Thr Asn Arg Phe Thr		
130	135	140
Asp Arg Val Pro Val Pro Val Gln Glu Ile Thr Asp Val Ile Asp Arg		
145	150	155
Arg Gly Lys Cys Val Ser Lys Ala Glu Tyr Val Arg Asn Asn His Lys		
165	170	175
Val Thr Ala Phe Asp Arg Asp Glu Asn Pro Val Glu Val Asp Leu Arg		
180	185	190
Pro Ser Arg Leu Asn Ala Leu Gly Thr Arg Gly Trp His Thr Thr Asn		
195	200	205
Asp Thr Tyr Thr Lys Ile Gly Ala Ala Gly Phe Tyr His Thr Gly Thr		
210	215	220
Ser Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Glu Ala Arg Ser Val Tyr Pro		
225	230	235
Tyr Asp Ser Phe Ala Leu Ser Thr Gly Asp Ile Val Tyr Met Ser Pro		
245	250	255
Phe Tyr Gly Leu Arg Glu Gly Ala His Gly Glu His Ile Gly Tyr Ala		
260	265	270
Pro Gly Arg Phe Gln Gln Val Glu His Tyr Tyr Pro Ile Asp Leu Asp		
275	280	285
Ser Arg Leu Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Arg Asn Phe Leu Arg Thr		
290	295	300
Pro His Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Ala Pro Lys Thr Arg Arg Val		
305	310	315
Cys Ser Leu Ala Lys Trp Arg Glu Ala Glu Glu Met Thr Arg Asp Glu		
325	330	335
Thr Arg Asp Gly Ser Phe Arg Phe Thr Ser Arg Ala Leu Gly Ala Ser		
340	345	350
Phe Val Ser Asp Val Thr Gln Leu Asp Leu Gln Arg Val His Leu Gly		
355	360	365
Asp Cys Val Leu Arg Glu Ala Ser Glu Ala Ile Asp Ala Ile Tyr Arg		
370	375	380
Arg Arg Tyr Asn Ser Thr His Val Leu Ala Gly Asp Arg Pro Glu Val		
385	390	395
Tyr Leu Ala Arg Gly Gly Phe Val Val Ala Phe Arg Pro Leu Ile Ser		
405	410	415
Asn Glu Leu Ala Gln Leu Tyr Ala Arg Glu Leu Glu Arg Leu Gly Leu		
420	425	430

Ala Gly Val Val Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Ala Arg Arg Ala Arg
435 440 445

Arg Ser Pro Gly Pro Ala Gly Thr Pro Glu Pro Pro Ala Val Asn Gly
450 455 460

Thr Gly His Leu Arg Ile Thr Thr Gly Ser Ala Glu Phe Ala Arg Leu
465 470 475 480

Gln Phe Thr Tyr Asp His Ile Gln Ala His Val Asn Asp Met Leu Gly
485 490 495

Arg Ile Ala Ala Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn Lys Asp Arg Thr Leu
500 505 510

Trp Ser Glu Met Ser Arg Leu Asn Pro Ser Ala Val Ala Thr Ala Ala
515 520 525

Leu Gly Gln Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Ile
530 535 540

Ser Arg Cys Val Glu Val Arg Gly Gly Val Tyr Val Gln Asn Ser Met
545 550 555 560

Arg Val Pro Gly Glu Arg Gly Thr Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Thr
565 570 575

Phe Glu His Asn Gly Thr Gly Val Ile Glu Gly Gln Leu Gly Asp Asp
580 585 590

Asn Glu Leu Leu Ile Ser Arg Asp Leu Ile Glu Pro Cys Thr Gly Asn
595 600 605

His Arg Arg Tyr Phe Lys Leu Gly Ser Gly Tyr Val Tyr Tyr Glu Asp
610 615 620

Tyr Asn Tyr Val Arg Met Val Glu Val Pro Glu Thr Ile Ser Thr Arg
625 630 635 640

Val Thr Leu Asn Leu Thr Leu Leu Glu Asp Arg Glu Phe Leu Pro Leu
645 650 655

Glu Val Tyr Thr Arg Glu Glu Leu Ala Asp Thr Gly Leu Leu Asp Tyr
660 665 670

Ser Glu Ile Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Ala Leu Lys Phe Tyr Asp
675 680 685

Ile Asp Arg Val Val Lys Val Asp His Asn Val Val Leu Leu Arg Gly
690 695 700

Ile Ala Asn Phe Phe Gln Gly Leu Gly Asp Val Gly Ala Ala Val Gly
705 710 715 720

Lys Val Val Leu Gly Ala Thr Gly Ala Val Ile Ser Ala Val Gly Gly
725 730 735

Met Val Ser Phe Leu Ser Asn Pro Phe His His His His His His

740

745

750

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1											
B	S2											
C	S3											
D	S4											
E												P
F												P
G												N
H												N

图1

专利名称(译)	一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109900902A	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN201910249603.8	申请日	2019-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
[标]发明人	张蕾 董春娜 李静 李玲 王飞 肖进 齐鹏		
发明人	张蕾 董春娜 李静 李玲 王飞 肖进 齐鹏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	李巍		
其他公开文献	CN109900902B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪伪狂犬病毒gB阻断ELISA抗体检测试剂盒及其应用。该试剂盒包括酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标猪伪狂犬病毒单克隆抗体、样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液，其中所述酶标板包被有利用杆状病毒表达系统及细胞悬浮培养工艺表达的猪伪狂犬病毒gB蛋白，将其纯化后作为包被抗原，同时用作免疫原，制备并筛选出伪狂犬病毒gB蛋白的特异性单克隆抗体并进行过氧化物酶标记作为阻断酶标单抗。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷，结果判定采用S/N比值法，准确度高，与进口试剂盒相比，检测符合率达98%以上。

血清种类	总份数	试剂盒批号	阳性份数	阴性份数	特异性
健康猪血清	50	ZM2018001	0	50	100%
		ZM2018002	0	50	100%
		ZM2018003	0	50	100%
FMD-O	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
FMD-A	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PCV2	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%
PRRS	2	ZM2018001	0	2	100%
		ZM2018002	0	2	100%
		ZM2018003	0	2	100%