



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102236019 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 09

(21) 申请号 201010153717. 1

(22) 申请日 2010. 04. 23

(71) 申请人 陈文刚

地址 300457 天津市滨海新区国际生物医药
联合研究院 S604

(72) 发明人 陈文刚 董志珍 王涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种用于检测非洲猪瘟病毒的间接 ELISA 试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒及其用途,属于生物技术领域。试剂盒采用原核表达的重组 P54 蛋白作为包被抗原,依据间接 ELISA 原理检测猪血清中非洲猪瘟病毒的抗体。试剂盒中 96 孔板中的包被抗原为原核表达的重组 P54 蛋白,其具有良好的抗原性。本发明提供的酶联免疫试剂盒包括 P54 蛋白包被的 96 孔板、阳性对照、阴性对照、辣根过氧化酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体、浓缩洗涤液、血清稀释液、TMB 底物、终止液。本发明试剂盒可用于大批样品的筛查,试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便。

1. 一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体,借助该酶标记抗体,建立间接 ELISA 法检测非洲猪瘟病毒抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征在于,还包括 ELISA 板条、血清稀释液和浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、阳性对照、阴性对照。

3. 根据权利要求 2 所述的用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征在于,

所述 ELISA 板条:每个试剂盒装有 2 块或 5 块 ELISA 微孔板,每块 ELISA 板条为能自行拆卸的已包被抗原的 ELISA 微孔板,包被抗原为原核表达的 P54 蛋白,规格为 8 孔 × 12 条;

所述血清稀释液和浓缩洗涤液:血清稀释液为即用型,洗涤液为 25 倍浓缩,使用前稀释;

所述底物显色液:即用型 TMB 显色液,50mL;

所述终止液:2mol/L 的 H_2SO_4 溶液,50mL;

所述酶标单克隆抗体:所述辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体,使用前 100 倍稀释;

阳性对照;

阴性对照。

4. 权利要求 1 所述的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体的制备工艺,其特征在于:

采用辛酸-硫酸铵法纯化猪血清 IgG,制备纯化的猪 IgG,并用此纯化 IgG 免疫家兔,制备兔抗猪 IgG 多克隆抗体;采用过碘酸钠法对上述多克隆抗体进行辣根过氧化物酶标记。

5. 权利要求 1 所述的间接 ELISA 试剂盒在检测非洲猪瘟病毒抗体中的应用。

一种用于检测非洲猪瘟病毒的间接 ELISA 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明为检测非洲猪瘟病毒 (ASFV) 抗体检测试剂盒,属于生物技术领域。具体而言,本发明涉及一种动物检疫中检测抗体的 ELISA 试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (ASFV) 引起的猪的一种急性、热性、高度接触的烈性传染性疾病。其特征为病程短、病死率高率,可高达 100%,临床症状和病理变化均类似于急性猪瘟,在诊断时极易误诊,表现高热、皮肤充血发绀、流产、水肿及脏器出血。(William, Hess Adv. African swine fever :a reassessment[J]. Vet Sci Comp Med, 1981, 25 :39 ~ 69) 世界动物组织 (OIE) 列为 A 类疫病,我国规定为动物一类疫病,受到世界各国的高度重视 (孙怀昌. 中国预防兽医学报, 1999, 21 (2) :117 ~ 119)。

[0003] 本病自 1921 年在肯尼亚发现以来,一直存在于撒哈拉以南的非洲国家,1957 年先后流传至西欧和拉美国家,多数被及时扑灭,单在葡萄牙,西班牙西南部和意大利的撒丁岛仍有流行,截至目前已在非洲、欧洲和美洲等数十个国家流行,而且有不断蔓延趋势。2007 年,亚美尼亚连续发生六起非洲猪瘟,我国尚无该病。

[0004] 非洲猪瘟在国际病毒分类委员会第四次报告中归于虹彩病毒科,在该委员会第五次报告中将其列在痘病毒科之下,置于该科的脊椎动物痘病毒亚科及昆虫痘病毒亚科之外。但 DNA 序列分析表明,ASF 病毒具有介于痘病毒和虹彩病毒之间的特征,ASFV 的这一特性表明它不属于国际病毒分类委员会所核定的任何一科,是个新科,1995 年第 9 次国际病毒分类委员第六次报告,将非洲猪瘟病毒列入“类非洲猪瘟病毒属”,非洲猪瘟是唯一已知的代表种。

[0005] 非洲猪瘟病毒是一种大的、有囊膜的双链 DNA 病毒,是唯一的虫媒 DNA 病毒。其基因组为末端共价闭合的单分子线状双链 DNA,病毒基因组全长为 170kb ~ 190kb,中央有 125kb 左右的保守区,两端为可变区,含有末端反转重复序列,这些重复序列的增加或者缺失是造成不同分离株基因组长度差异的主要原因 (Rafacl, Yancz, Javier M, et al. Analysis of the complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus[J]. Virology, 1995, 208 :249 ~ 279)。ASF 病毒基因组有 5 个编码基因,包括假定膜蛋白、分泌性蛋白、参与核苷酸和核酸代谢 (DNA 修复) 以及蛋白修饰的酶,整个基因组含有 151 个 ORF,可以编码 150 ~ 200 种蛋白质,已从 ASFV 感染的细胞中分离鉴定出 86 种病毒蛋白多肽 (曲连东,于康震,非洲猪瘟研究进展,中国兽医科技,1998, 28 (11) :42 ~ 43)。

[0006] 非洲猪瘟病毒大多数毒株的毒力都很强,但是免疫原性很低,只有少数几个蛋白具有免疫原性,其中 P54 蛋白为具有较好抗原性的蛋白之一。

[0007] ASFV P54 蛋白是由 E183L 基因编码的,约 25kD 的多肽,含有一段跨膜区域,主要集中在衍生的内质网膜处。P54 蛋白可以在体外培养,并能感染细胞。而且在感染细胞后在内质网膜处短暂表达。P54 蛋白的跨膜结构在病毒蛋白经内质网膜转化成病毒包膜前体时起着十分重要的作用 (Rodriguez JM, Garcia Escudero African Swine Fever Virus

Structural Protein p54 Is Essential for the Recruitment of Envelope Precursors to Assembly Sites. *Journal of Virology*, 2004, 78(8) :4299 ~ 4313)。另外 ASFV P54 蛋白与 8kD 的轻链细胞质动力蛋白 DLC8 存在特殊的交叉反应,并在细胞内摄作用及病毒加工过程中起重要作用。感染病毒后复制早期,病毒可激活细胞凋亡蛋白酶而诱发细胞脱噬作用 (Alonso C, J Miskin African Swine Fever Virus Protein p54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to Light-Chain Dynein. *Journal of Virology* 2001, 75 :9819 ~ 9827)。为了分析结构蛋白 P54 在细胞脱噬中所起的作用,2004 年 Hernaez B 和 Diaz-Gil G 将其在非洲绿猴肾细胞内短暂表达,实验表明可激活细胞凋亡蛋白酶,诱发细胞脱噬作用 (Hernaez B, Diaz Gil G The African swine fever virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis. *FEBS Letters* 2004, 569(123) :224 ~ 228)。但 P54 的突变体缺失 13aa 而失去激活细胞凋亡蛋白酶的功能 (Alejo A, G Andrés, ML Salas. African Swine Fever Virus Proteinase Is Essential for Core Maturation and Infectivity *Journal of Virology*, 2003, 77 :5571 ~ 5575)。

发明内容

[0008] 本发明公开了一种检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 方法,可用于非洲猪瘟病毒抗体的大量筛查。

[0009] 本发明还提供了一种 P54 基因载体构建、蛋白的表达及纯化的工艺。

[0010] 本发明还提供了一种兔抗猪 IgG 多克隆抗体的制备工艺及辣根过氧化物酶标记方法。

[0011] 本发明的目的是以原核表达的重组蛋白为基础,通过酶联免疫技术研制一种检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒。

[0012] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,所述的试剂盒包括由辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体。

[0013] 还包括 ELISA 板条、血清稀释液和浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、阳性对照、阴性对照。

[0014] 上述用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒包括:

[0015] 所述 ELISA 板条:每个试剂盒装有 2 块或 5 块 ELISA 微孔板,每块 ELISA 板条为能自行拆卸的已包被抗原的 ELISA 微孔板,包被抗原为原核表达的 P54 蛋白,规格为 8 孔 × 12 条;

[0016] 所述血清稀释液和浓缩洗涤液:血清稀释液为即用型,洗涤液为 25 倍浓缩,使用前稀释;

[0017] 所述底物显色液:即用型 TMB 显色液,50mL;

[0018] 所述终止液:2mol/L 的 H₂SO₄ 溶液,50mL;

[0019] 所述酶标多克隆抗体:所述辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体,使用前 100 倍稀释;

[0020] 阳性对照;

[0021] 阴性对照。

[0022] 所述的间接 ELISA 试剂盒在检测非洲猪瘟病毒中的应用。

[0023]

[0024]

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明：

[0026] 本发明的技术方案如下：

[0027] 一、抗原制备

[0028] 1. 非洲猪瘟 P54 蛋白的表达

[0029] 根据 GenBank 中非洲猪瘟 (ASFV) P54 基因序列, 设计合成了 1 对引物, 采用 PCR 方法从 ASFV DNA 中扩增出 P54 基因片段, 将其克隆到表达载体 pET28b 中, 构建了重组质粒 pET-P54, 测序验证后转化入表达宿主菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达。

[0030] 设计的引物为：

[0031] P54-1-5' -GCGGATCCCATTATTATCATCGTT-3'

[0032] P54-2-5' -AGCTCGAGCAAGGAGTTTTCTA-3'

[0033] 下划线部分为引入的酶切位点, P54-1 为 ASFV P54 基因上游扩增引物, 引入的酶切位点为 BamHI, P54-2 为 ASFV P54 基因下游扩增引物, 引入的酶切位点为 XhoI。

[0034] 2. 非洲猪瘟 P54 蛋白的纯化。

[0035] 诱导结束后, 离心收集诱导后菌体, 用 PBS 洗涤重悬菌体, 超声裂解 (超声 1s, 间隔 1s, 共 10min), 12000rpm 离心, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析。蛋白纯化时使用镍离子亲和层析柱, 纯化后, 经 SDS-PAGE、western blotting 鉴定, 获取到单一条带, 并具备较好的抗原性。使用 BCA 法测定纯化后蛋白含量, 标准品浓度及其对应的 OD 值见表 1。纯化后 P54 蛋白的 OD 值为 1.583, 与标准品比较后, 其浓度为 900 μ g/ml。

[0036] 表 1 BCA 法测定标准品蛋白含量

[0037]

样品名称	A (μ g/ml)	B (μ g/ml)	C (μ g/ml)	D (μ g/ml)	E (μ g/ml)	F (μ g/ml)	G (μ g/ml)	H (μ g/ml)	O (μ g/ml)
浓度	2000	1500	1000	750	500	250	125	25	0
OD 值	2.6894	2.2378	1.6493	1.3278	1.0414	0.6454	0.4062	0.1893	0.1251

[0038] 二、辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 的制备

[0039] 1. 纯化猪 IgG 的制备

[0040] 取经检验合格的肥育猪作为采血用猪, 采血前体况较好, 体温、食欲、大小便正常, 无其他疾病。消毒后, 颈静脉与动脉采血, 分离血清, 纯化 IgG 方案为辛酸-硫酸铵沉淀法。

[0041] 取 1 份预处理过的血清加 2 份 0.06mol/L pH5.0 醋酸缓冲液, 用 1mol/L HCl 调 pH 至 4.8; 按每毫升稀释血清加 11 μ l 辛酸的比例, 室温搅拌下逐滴加入辛酸, 于 30 分钟内加完, 4 $^{\circ}$ C 静置 2 小时, 取出 12000r/min 离心 30min, 弃沉淀; 上清经尼龙筛过滤 (125 μ m), 加入 1/10 体积的 0.01mol/L PBS, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.2; 在 4 $^{\circ}$ C 下加入饱和硫酸铵至 45% 饱和度, 轻轻混匀 30min, 静置 1 小时; 12000r/min 离心 30 分钟, 弃上清; 沉淀溶于适量 PBS 中, 对 50-100 倍体积的 PBS 透析, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 取出 12000r/min 离心 30min, 除去不溶性沉淀, 分装, 冻存储用。

[0042] 2. 兔抗猪 IgG 多克隆抗体的辣根过氧化物酶标记

[0043] 上述制备的纯化猪 IgG 作为免疫原,免疫成年健康家兔,心脏采血后,纯化获得兔抗猪 IgG 多克隆抗体。

[0044] 纯化后的多克隆抗体的酶标记物的制备方案为过碘酸钠法,具体步骤如下:

[0045] 称取 5mg HR 溶解于 1ml 蒸馏水中;向其中加入 0.2ml 新配的 0.1M NaIO₄ 溶液,室温避光搅拌 20 分钟;对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液中透析,4℃ 过夜;向其中再加入 20 μl 0.2M pH9.5 的碳酸盐缓冲液,使以上醛化物的 pH 升高到 9.0,然后立即加入溶于 0.01M 碳酸盐缓冲液的多克隆抗体纯品 5mg (10mg/ml),室温避光轻柔搅拌 2 小时;加入 0.1ml 新配的 4mg/ml NaBH₄,混匀,4℃ 放置 2 小时;所得产物对 0.15M pH7.4PBS 中 4℃ 透析过夜。

[0046] 透析完成后,在搅拌中逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置 4℃ 1 小时。3000r/min 离心 30min,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中,对 0.15M pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析,取出铵离子,10000r/min 离心 30min 去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装后,冻存。

[0047] 三、标准 ASFV 阳性血清及标准 ASFV 阴性血清的制备

[0048] 在 ELISA 检测过程中,不同的操作人员和不同的检测批次间会存在一定的误差,操作误差会导致检测样品 OD 值的误差。本发明研制了标准 ASFV 抗体阳性对照血清和标准 ASFV 抗体阴性对照血清,用于检测条件的优化和检测结果的判定。

[0049] 1. 标准阳性血清的制备

[0050] 取健康成年家兔,体重 2-3kg,剪去两后脚掌的部分兔毛,用碘酒消毒皮肤。第一次免疫,用注射器吸取弗式完全佐剂 (FCA) 乳化的抗原 (纯化后重组 P30) (以下称 FCA-P30) 液 1ml,每侧脚掌皮下各注入 0.5ml。间隔 10-14 天后,进行第二次免疫,与两侧腠窝及鼠蹊部肿大的淋巴结内注入弗式不完全佐剂 (FIA-P30),每个淋巴结 0.1ml,其余注入淋巴结附近的皮下共 1ml。间隔 7-10 天后,从耳静脉采血 0.5-1.0ml,分离血清,采用 ELISA 方法检测血清效价,抗体效价可达到 1 : 100 以上。

[0051] 采用心脏采血法采血,将抽取的血液立即注入无菌三角烧瓶中。将三角烧瓶的血置 37℃ 温箱 1 小时,再置 4℃ 冰箱 3 小时。待血液凝固血块收缩后,用滴管吸取血清,3000r/min 离心 15min,取上清,加入终浓度为 0.01% 的硫柳汞防腐,分装后,-20℃ 保存。

[0052] 2. 标准阴性血清的制备

[0053] 取经检验合格的肥育猪作为采血用猪,采血前体况较好,体温、食欲、大小便正常,无其他疾病。消毒后,颈静脉与动脉采血,分离血清,加入万分之一的硫柳汞防腐。以 0.5ml 分装于无菌管中,-20℃ 保存。

[0054] 四、试剂盒的建立

[0055] 1. 本发明试剂盒的检测原理

[0056] 采用间接法,将重组的非洲猪瘟病毒结构蛋白 P54 包被于微孔板中,然后用 1% BSA 将酶标板封闭,加入待测样本及标准阳性对照、阴性对照。样本或标准品中的非洲猪瘟病毒抗体能与酶标板中包被的 P54 抗原反应,加入酶标兔抗猪 IgG 多克隆抗体后,酶标抗体与上一步反应结束的 P54 抗原-抗体复合物结合。随后,加入辣根过氧化物酶底物 TMB 显色,终止液终止反应,通过酶标仪在 450nm 波长下,测定各孔吸光度值,OD 值的大小 (终止显色反应后颜色的深浅) 与待测样本中非洲猪瘟病毒抗体的含量成正比。

[0057] 2. 本发明试剂盒的组成

[0058] a) 酶标板的最佳制备方法

[0059] 用 pH9.60.05M 的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液,将上述制备的纯化后重组 P54 蛋白稀释后,按 100u1/孔加入微孔板中,保证每孔中的 P54 含量为 0.2ug。4℃包被过夜,次日,弃去包被液,按 200u1/孔加入 1% BSA 的封闭液,37℃静置 2 小时,洗涤甩干。室温干燥后装入包装袋,加入干燥剂,真空保存。

[0060] b) 工作试剂的配置

[0061] 洗涤液 (pH 7.4,0.15M PBS) : KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Tween-20 (0.05%) 0.5ml,加蒸馏水至 1000ml。浓缩成 25 倍作为存储液。

[0062] 血清稀释液 :牛血清白蛋白 0.1g,加洗涤缓冲液至 100ml

[0063] 底物缓冲液 (pH 5.0 磷酸柠檬酸) :0.2M Na_2HPO_4 25.7ml,0.1M 柠檬酸 24.3ml,加蒸馏水 50ml

[0064] TMB(四甲基联苯胺)使用液 :TMB(10mg/5ml 无水乙醇)0.5ml,底物缓冲液 10ml,0.75% H_2O_2 32u1 终止液 ($2\text{MH}_2\text{SO}_4$) :蒸馏水 178.3ml,逐滴加入浓硫酸 (98%)21.7ml

[0065] c) 检测非洲猪瘟的间接 ELISA 试剂盒的组建

[0066] 组建检测非洲猪瘟的酶联免疫试剂盒,包含以下组分 :

[0067] P54 重组蛋白包被的 96 孔酶标板

[0068] 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 多克隆抗体

[0069] 标准阳性对照

[0070] 标准阴性对照

[0071] 浓缩洗涤液

[0072] 血清稀释液

[0073] TMB 底物

[0074] 终止液

[0075] 产品说明书

[0076] 五、样品中非洲猪瘟病毒抗体的检测

[0077] 1. 用上述制备的试剂盒进行检测

[0078] 1) 将待测血清、阳性对照及阴性对照用抗体稀释液按比例稀释,每孔 100 μ l 加入酶标板,37℃孵育 1 小时。洗涤液清洗 3-5 次。

[0079] 2) 每孔加入稀释后酶标兔抗猪 IgG 多克隆抗体 100 μ l,37℃孵育 30min,洗涤液清洗 3-5 次。

[0080] 3) 每孔加入 TMB 底物液 100 μ l,室温避光反应 10-15 分钟。

[0081] 4) 每孔加入 100 μ l 2M H_2SO_4 终止反应,酶标仪检测 450nm 吸光度值。

[0082] 2. 检测结果分析

[0083] 1) 测中阳性对照血清 (PC) 的 OD 值与阴性对照血清 (NC) 的 OD 值之差必须大于 0.4 时,检测被认为有效。

[0084] $\text{PC}-\text{NC} \geq 0.4$

[0085] 阳性 Cut Off = $\text{NC}+0.05$

[0086] 其中 NC = 阴性对照血清 OD 值

[0087] PC = 阳性对照血清 OD 值

[0088] 2) 检测时使用复孔, 最终使用 OD 值为两个的平均值。

[0089] 当血清样本的 OD 值低于阳性 Cut Off 值时, 该样本为 ASFV 抗体阴性。

[0090] 当血清样本的 OD 值高于阴性 Cut Off 值是, 该样本为 ASFV 抗体阳性。

[0091] 综上所述, 本发明的内容并不局限在上述的实施例中, 相同领域内的有识之士可以在本发明的技术指导思想之内可以轻易提出其他的实施例, 但这种实施例都包括在本发明的范围之内。

专利名称(译)	一种用于检测非洲猪瘟病毒的间接ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN102236019A	公开(公告)日	2011-11-09
申请号	CN201010153717.1	申请日	2010-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	陈文刚		
申请(专利权)人(译)	陈文刚		
当前申请(专利权)人(译)	陈文刚		
[标]发明人	陈文刚 董志珍 王涛		
发明人	陈文刚 董志珍 王涛		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接ELISA试剂盒及其用途，属于生物技术领域。试剂盒采用原核表达的重组P54蛋白作为包被抗原，依据间接ELISA原理检测猪血清中非洲猪瘟病毒的抗体。试剂盒中96孔板中的包被抗原为原核表达的重组P54蛋白，其具有良好的抗原性。本发明提供的酶联免疫试剂盒包括P54蛋白包被的96孔板、阳性对照、阴性对照、辣根过氧化酶标记的兔抗猪IgG多克隆抗体、浓缩洗涤液、血清稀释液、TMB底物、终止液。本发明试剂盒可用于大批样品的筛查，试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便。

样品名称	A($\mu\text{g/ml}$)	B($\mu\text{g/ml}$)	C($\mu\text{g/ml}$)	D($\mu\text{g/ml}$)	E($\mu\text{g/ml}$)	F($\mu\text{g/ml}$)	G($\mu\text{g/ml}$)	H($\mu\text{g/ml}$)	I($\mu\text{g/ml}$)
浓度	2000	1500	1000	750	500	250	125	25	0
OD值	2.6894	2.2378	1.6493	1.3278	1.0414	0.6454	0.4062	0.1893	0.1251