



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102621305 A

(43) 申请公布日 2012.08.01

(21) 申请号 201210042330.8

(22) 申请日 2012.02.21

(71) 申请人 四川农业大学

地址 625014 四川省雅安市新康路 46 号

(72) 发明人 徐志文 朱玲 刘骁 郭万柱

(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

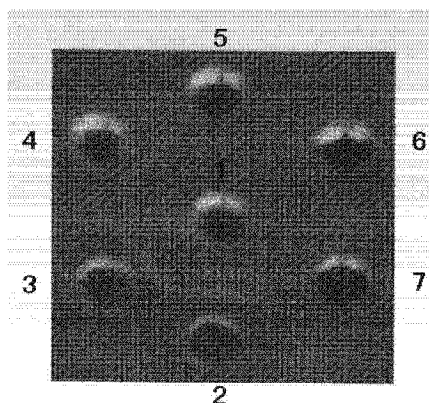
序列表 2 页 附图 3 页

(54) 发明名称

猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒。试剂盒内设有抗体检测板, 酶结合物工作液, 阻断抗体, 样品稀释液, 洗涤液, 显色液 A, 显色液 B, 终止液。该试剂盒的检测板为猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原包被的可拆卸 96 孔酶标板, 酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体, 阻断抗体为兔抗猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白多克隆抗体。本发明有益的积极效果是: 特异性强、灵敏度高、操作简单, 适合于临床大规模推广应用, 具有广阔的市场前景。



1. 一种猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒,其特征在於:包括抗体检测板,酶结合物工作液,样品稀释液,显色液 A,显色液 B,终止液;阻断抗体,洗涤液;所述的阻断抗体为使用纯化后的猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白免疫家兔后,从家兔体内获得的多克隆抗体;

所述酶结合物工作液为:商品化的辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体,进行 1 : 10000 稀释的稀释液,酶标二抗直接加入酶标二抗稀释液中,酶标二抗稀释液为: KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 29g, KCl 0.2g, PEG6000 40g, 加 ddH_2O 定容至 1000ml, 加入 0.01% ~ 0.05% 硫柳汞, 调 pH 至 7.4;

所述样品稀释液为: KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 29g, KCl 0.2g, PEG6000 40g, 加 ddH_2O 定容至 1000ml, 加入 0.01% ~ 0.05% 叠氮钠, 调 pH 至 7.4;

所述显色液 A 为: 0.2mol/L Na_2HPO_4 51.4ml, 0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml, 用 HCl 调 pH 值至 5.0 ~ 5.4, 加 30% H_2O_2 67 μl ;

所述显色液 B 为: TMB 50mg, 加无水乙醇 5ml, 搅拌溶解后加 0.1mol/L 柠檬酸 5ml, 0.1mol/L EDTA 0.5ml, 加 ddH_2O 定容至 100ml;

所述终止液为 2mol/L H_2SO_4 溶液;

所述抗体检测板为猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原包被的可拆卸 96 孔酶标反应板, 酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体, 阻断抗体为兔抗猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在於:所述阻断抗体的制备:使用纯化后的 PCMV gB 优势抗原表位区蛋白与弗氏佐剂制成油乳剂,对体重在 2kg 左右的健康公兔进行免疫,使其产生抗体;第一次免疫取 1mL 纯化产物,与 1mL 完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔;14 天后进行第二次免疫,取 2mL 纯化产物与 2mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔;7 天后进行第三次免疫,取 3mL 纯化产物与 3mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔;7 天后进行第四次免疫,取 0.5mL 纯化产物注射入耳缘静脉免疫家兔;一周后无菌采取心血,分离出的血清即为阻断抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在於:所述猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备方法为:

猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备:选择猪巨细胞病毒囊膜糖蛋白 B(gB) 基因 ORF (GenBank :FJ595497. 1) 中一段优势抗原表位区的 270 个碱基序列,进行密码子优化以后,在 invitrogen 公司合成优化后的基因序列,而后将其克隆到 pET32a(+) 表达载体,并分别转化到受体菌 DH5 α 和 Rosetta (DE3) 中,将两株重组菌分别命名为:大肠埃希氏菌 DH5 α -pET-gB 株和大肠埃希氏菌 Rosetta-pET-gB 株,将 Rosetta-pET-gB 经 IPTG 诱导表达,经裂解、纯化后获得。

4. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在於:所述抗体检测板的制备方法为:使用 pH = 9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液作为包被液,将纯化的 gB 优势抗原表位区蛋白作为抗原按照 1 : 320 的体积比例稀释后,每个样孔加入 100 μL 抗原,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 ~ 20h, 进行包被,使用样品稀释液覆盖后抽空封装,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒的检测方法,其特征在於,包括以下步骤:

1) 将 10 \times 洗涤缓冲液加入 ddH_2O 稀释成 1 \times 洗涤工作液,将阻断抗体用样品稀释液进

行 1600 倍稀释,将待检样品进行 1 : 5 稀释 ;

2) 在抗原包被板上设定阻断抗体对照孔,加入阻断抗体,每孔 100 μ l ;

3) 将待检样品加入检测样孔中,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h ;

4) 将各样孔中的液体倒掉后用 1 \times 洗涤工作液洗涤,每孔 300 μ l,洗涤 4 次,每次 2min ;

5) 将稀释后的阻断抗体加入检测样孔,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,重复步骤 4) ;

6) 加入酶标二抗工作液,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min,重复步骤 4) ;

7) 每孔按顺序加入显色液 A 50 μ l,再向每孔中加入显色液 B 50 μ l,室温显色 10min ;

8) 每孔按顺序加入终止液 (2M H_2SO_4) 50 μ l 终止反应,450nm 单波长测定 OD 值,计算抑制率 ;

9) 检测样品的判断标准为 :

$$\text{抑制率}(\%) = \left[\frac{\text{阻断抗体 OD 值} - \text{样品 OD 值}}{\text{阻断抗体 OD 值}} \right] \times 100\%$$

当样品抑制率 $\geq 24.5\%$ 时为 PCMV 抗体阳性,当样品抑制率 $< 19.8\%$ 时为 PCMV 抗体阴性,抑制率在两者之间的样品需要重复检测一次。

猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种动物传染病检测用试剂盒及其检测方法,尤其是猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒,属于兽用生物制品领域。

背景技术

[0002] 猪巨细胞病毒 (Porcine cytomegalovirus, PCMV) 是一种引起猪包涵体鼻炎 (porcine inclusion-body rhinitis) 或猪巨细胞包涵体病 (porcine cytomegalic inclusion disease) 的病毒。猪巨细胞病毒又称为猪疱疹病毒 2 型,属于疱疹病毒科, β 疱疹病毒亚科,巨细胞病毒属,该病毒粒子直径为 150 ~ 200nm,具有电子致密核心,其外围是由衣壳蛋白构成的二十面体核衣壳,基因组为双链 DNA。PCMV 培养较困难,只有 3 ~ 5 周龄的猪肺巨噬细胞高度敏感,接种后 3 ~ 14d 出现巨细胞,形成核内包涵体和偶尔有小的胞浆内涵体。感染细胞增大到正常细胞的 6 倍左右时,线粒体、内质网和高尔基体肿胀,可见大的嗜碱性核内包涵体。

[0003] PCMV 感染的潜伏期大约为 10 天到 20 天,常感染 1 ~ 3 周龄的仔猪,病猪表现出轻度鼻炎,严重时可见仔猪颤抖、呼吸困难或死亡,易感妊娠母猪有病毒血症时表现倦怠、拒食,产出死胎或弱仔,存活者矮小、苍白,且增重缓慢,该病的仔猪死亡率高达 50% 以上。

[0004] 死亡猪皮下有水肿液析出,跗关节水肿,淋巴结肿大、坏死;肺部有明显的充血和肉质化病变,间质性明显增宽;气管内有脓性分泌物,毛细血管周围有环状出血;脾脏感染导致标志性的裂口病变,并卷曲变形。肝脏有明显肿大梗死,有坏死灶;心肌无力,呈现单侧心衰;胃部严重的卡它性炎症,肠道变薄并在毛细血管周边有明显的出血,肾脏有明显不规则的弥漫性出血,有的肾脏变形,肾盂水肿充血。

[0005] 自 1955 年 Done 首次报道该病以来,欧洲、日本、美国、澳大利亚先后报道了该病的存在,目前该病广泛存在于世界各地,中国各地区也有流行。

[0006] 日本学者曾克隆和表达了 PCMV 主要衣壳蛋白,结果发现人工感染 PCMV 的猪血清不与细菌表达的主要衣壳蛋白发生特异性反应,表明 PCMV 主要衣壳蛋白可能与感染 PCMV 后的体液免疫应答无关,而疱疹病毒囊膜糖蛋白 B (gB) 在病毒感染和诱导体液免疫方面起着重要作用。因此基于对猪巨细胞病毒囊膜糖蛋白 B (gB) 的研究对猪巨细胞病毒的检测方法建立意义重大。

[0007] 目前,国内外对于 PCMV 检测方法建立的研究较少。Assaf 和 Tjima 等分别以全病毒作为包被抗原,建立了 PCMV 抗体的免疫荧光抗议技术和酶联免疫吸附试验等血清学检测方法,但其所建立方法有一定局限性,很难大面积应用推广。而目前国内外所建立的 PCMV PCR 诊断方法由于检测成本过高,在生产上无法大规模应用。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒及其

检测方法,及猪巨细胞病毒囊膜糖蛋白 B(gB) 基因优势抗原表位区所表达蛋白(在本发明申请中以下简称 gB 蛋白)作为抗原(在本发明申请中以下简称为重组抗原)包被酶标反应板的制备方法。

[0009] 本发明技术方案:

[0010] 一种猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒,包括抗体检测板,酶结合物工作液,样品稀释液,显色液 A,显色液 B,终止液;阻断抗体,洗涤液;所述的阻断抗体为使用纯化后的猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白免疫家兔后,从家兔体内获得的多克隆抗体;

[0011] 所述酶结合物工作液为:商品化的辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体,进行 1:10000 稀释的稀释液,酶标二抗直接加入酶标二抗稀释液中,酶标二抗稀释液为: KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 29g, KCl 0.2g, PEG6000 40g, 加 ddH₂O 定容至 1000ml,加入 0.01%~0.05%硫柳汞,调 pH 至 7.4;

[0012] 所述样品稀释液为: KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 29g, KCl 0.2g, PEG6000 40g, 加 ddH₂O 定容至 1000ml,加入 0.01%~0.05%叠氮钠,调 pH 至 7.4;

[0013] 所述显色液 A 为: 0.2mol/L Na_2HPO_4 51.4ml, 0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml, 用 HCl 调 pH 值至 5.0~5.4, 加 30% H_2O_2 67 μ l;

[0014] 所述显色液 B 为: TMB 50mg, 加无水乙醇 5ml, 搅拌溶解后加 0.1mol/L 柠檬酸 5ml, 0.1mol/L EDTA 0.5ml, 加 ddH₂O 定容至 100ml;

[0015] 所述终止液为 2mol/L H_2SO_4 溶液;

[0016] 所述抗体检测板为猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原包被的可拆卸 96 孔酶标反应板,酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体,阻断抗体为兔抗猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白多克隆抗体。

[0017] 所述的检测试剂盒,所述阻断抗体的制备:使用纯化后的 PCMV gB 优势抗原表位区蛋白与弗氏佐剂制成油乳剂,对体重在 2kg 左右的健康公兔进行免疫,使其产生抗体;第一次免疫取 1ml 纯化产物,与 1ml 完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔;14 天后进行第二次免疫,取 2ml 纯化产物与 2ml 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔;7 天后进行第三次免疫,取 3ml 纯化产物与 3ml 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔;7 天后进行第四次免疫,取 0.5ml 纯化产物注射入耳缘静脉免疫家兔;一周后无菌采取心血,分离出的血清即为阻断抗体。

[0018] 所述的检测试剂盒,所述猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备方法为:

[0019] 猪巨细胞病毒 gB 优势抗原表位区蛋白重组抗原的制备:选择猪巨细胞病毒囊膜糖蛋白 B(gB) 基因 ORF (GenBank :FJ595497.1) 中一段优势抗原表位区的 270 个碱基序列,进行密码子优化以后,在 invitrogen 公司合成优化后的基因序列,而后将其克隆到 pET32a(+) 表达载体,并分别转化到受体菌 DH5 α 和 Rosetta(DE3) 中,将两株重组菌分别命名为:大肠埃希氏菌 DH5 α -pET-gB 株和大肠埃希氏菌 Rosetta-pET-gB 株,将 Rosetta-pET-gB 经 IPTG 诱导表达,经裂解、纯化后获得。

[0020] 所述的检测试剂盒,所述抗体检测板的制备方法为:使用 pH = 9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液作为包被液,将纯化的 gB 优势抗原表位区蛋白作为抗原按照 1:320 的体积

比例稀释后,每个样孔加入 100 μ L 抗原,置于 4 $^{\circ}$ C 10 ~ 20h,进行包被,使用样品稀释液覆盖后抽空封装,置 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0021] 本发明还提供一种引用上述检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0022] 1) 将 10 \times 洗涤缓冲液加入 ddH₂O 稀释成 1 \times 洗涤工作液,将阻断抗体用样品稀释液进行 1600 倍稀释,将待检样品进行 1 : 5 稀释;

[0023] 2) 在抗原包被板上设定阻断抗体对照孔,加入阻断抗体,每孔 100 μ l ;

[0024] 3) 将待检样品加入检测样孔中,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h ;

[0025] 4) 将各样孔中的液体倒掉后用 1 \times 洗涤工作液洗涤,每孔 300 μ l,洗涤 4 次,每次 2min ;

[0026] 5) 将稀释后的阻断抗体加入检测样孔,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,重复步骤 4) ;

[0027] 6) 加入酶标二抗工作液,每孔 100 μ l,封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min,重复步骤 4) ;

[0028] 7) 每孔按顺序加入显色液 A 50 μ l,再向每孔中加入显色液 B 50 μ l,室温显色 10min ;

[0029] 8) 每孔按顺序加入终止液 (2M H₂SO₄) 50 μ l 终止反应,450nm 单波长测定 OD 值,计算抑制率;

[0030] 9) 检测样品的判断标准为:

[0031]

$$\text{抑制率}(\%) = \left[\frac{(\text{阻断抗体 OD 值} - \text{样品 OD 值})}{\text{阻断抗体 OD 值}} \right] \times 100\%$$

[0032] 当样品抑制率 \geq 24.5% 时为 PCMV 抗体阳性,当样品抑制率 $<$ 19.8% 时为 PCMV 抗体阴性,抑制率在两者之间的样品需要重复检测一次。

[0033] 为临床检测猪巨细胞病毒抗体提供快速、准确、简便的检测工具,本发明特异性强、灵敏度高、操作简单,适合于临床大规模推广应用,具有广阔的市场前景。

附图说明

[0034] 图 1 猪巨细胞病毒 gB 基因抗原表位区蛋白 SDS-PAGE

[0035] 1 泳道. 蛋白质 Marker, 2 泳道. Rosetta-pET-gB 诱导前, 3 泳道. Rosetta-pET-gB 诱导后, 4 泳道. Rosetta-pET-gB 诱导后上清液, 5 泳道. Rosetta-pET-gB 诱导后沉淀, 6 泳道. Rosetta-pET-gB 诱导后纯化产物。

[0036] 图 2 Western blotting 电泳图谱

[0037] 1 泳道. 预染蛋白质 Marker, 2 泳道. gB 优势抗原表位区蛋白, 3 泳道. Rosetta-pET32 空载体诱导后产物。

[0038] 图 3 抗原抗体琼脂扩散试验

[0039] 1 号孔. 猪巨细胞病毒 gB 基因抗原表位区蛋白, 2 号孔. 多克隆抗体原液, 3 号孔. 1 : 2 稀释多克隆抗体, 4 号孔. 1 : 4 稀释多克隆抗体, 5 号孔. 1 : 8 稀释多克隆抗体, 6 号孔, 1 : 16 稀释多克隆抗体, 7 号孔, 阴性血清对照。

[0040] 图 4 抗原包被液的选择。

[0041] 图 5 酶标抗体工作浓度的确定。

[0042] 图 6 阴性样本符合率试验。

[0043] 图 7 敏感性实验。

具体实施方式

[0044] 以下结合具体实施例,对本发明进行详细说明。

[0045] 实施例 1

[0046] 1. 溶液的配制

[0047] (1) 0.05mol/L 碳酸盐包被缓冲液的配制 : Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g,加蒸馏水至 1000mL,调 pH 为 9.6。

[0048] (2) 封闭液的配制 :BSA 30g、 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 加蒸馏水至 1000mL,置 -20°C 。

[0049] (3) 酶结合物工作液的配制 :商品化的辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体 (艾美捷科技有限公司,美国),按试验结果直接加入酶标二抗稀释液中进行 1 : 10000 稀释而成的稀释液。酶标二抗稀释液为 : KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 29g, KCl 0.2g, PEG6000 40g,加 ddH_2O 定容至 1000ml,加入 0.01%~0.05%硫柳汞,调 pH 至 7.4。

[0050] (4) 样品稀释液的配制 : KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 29g, KCl 0.2g, PEG6000 40g,加 ddH_2O 定容至 1000ml,加入 0.01%~0.05%叠氮钠,调 pH 至 7.4。

[0051] (5) 10× 洗涤缓冲液的配制 : 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 0.5ml,0.05%硫柳汞,加 ddH_2O 定容至 100ml,调 pH 至 7.4。

[0052] (6) 显色液 A 的配制 :0.2mol/L Na_2HPO_4 51.4ml,0.1mol/L 柠檬酸 48.6ml,用 HCl 调 pH 值至 5.0~5.4,加 30% H_2O_2 67 μl 。

[0053] (7) 显色液 B 的配制 :TMB 50mg,加无水乙醇 5ml,搅拌溶解后加 0.1mol/L 柠檬酸 5ml,0.1mol/L EDTA 0.5ml,加 ddH_2O 定容至 100ml。

[0054] (8) 终止液为 2mol/L H_2SO_4 溶液。

[0055] 2. 阻断抗体的制备

[0056] 使用纯化后的 PCMV gB 优势抗原表位区蛋白与弗氏佐剂制成油乳剂,对体重在 2kg 左右的健康公兔进行免疫,使其产生抗体。第一次免疫取 1mL 纯化产物 (含 0.62mg 蛋白质) 与 1mL 完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔 ;14 天后进行第二次免疫,取 2mL 纯化产物 (含蛋白质 1.24mg) 与 2mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔 ;7 天后进行第三次免疫,取 3mL 纯化产物 (含蛋白质 1.85mg) 与 3mL 不完全弗氏佐剂混合制成油乳剂,皮下多点免疫家兔 ;7 天后进行第四次免疫,取 0.5mL 纯化产物 (含蛋白质 0.31mg) 注射入耳缘静脉免疫家兔。一周后无菌采取心血,分离出的血清即为阻断抗体。(图 2-3)

[0057] 3. 包被用重组抗原的制备

[0058] 取 Rosetta-pET-gB 菌株接入 1000ml LB(氨苄青霉素)液体培养基,振荡培养至 OD 值至 0.6,加入 IPTG 分别至 0.2mmol/L,继续培养 3h,离心,弃上清,加入 5~10mL 结合缓冲液 (20mM 磷酸钠,0.5M 氯化钠,30mM 咪唑, pH7.4),反复冻融 3 次后进行 10min 超声波裂解,离心后收集上清液,用 0.45 μm 的滤膜除去上清液中细胞碎片和其他块状物质。将上

清用 GE 公司 HisTrapFF 组氨酸标签融合蛋白纯化株进行过柱,纯化后的蛋白质即为包被用重组抗原。(图 1)

[0059] 4. PCMV 抗体间接阻断 ELISA 的建立:

[0060] (1) 抗原包被液的选择:以不同浓度的 gB 蛋白,分别以柠檬酸盐缓冲液 (pH = 4.6, 0.05mol/L)、磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4, 0.01mol/L)、碳酸盐缓冲液 (pH = 9.6, 0.05mol/L)、氢氧化钠 (pH = 12.0, 0.01mol/L) 进行包被,以矩阵法进行间接 ELISA,选择碳酸盐缓冲液 (pH = 9.6, 0.05mol/L) 为最佳抗原包被液。(图 4)

[0061] (2) 封闭液的选择:纯化蛋白以合适稀释度包被 96 孔板,37℃ 1h,4℃ 过夜,分别加入封闭液 5% 脱脂奶粉、1% 明胶、3% BSA,100 微升每孔,每个样重复 4 孔,进行间接 ELISA,测定其 OD 值,选择 P/N 值最大的 3% BSA 为底物的封闭液。

[0062] (3) 抗原和阻断抗体最佳反应条件确定:使用方阵法,将重组抗原 gB 蛋白以 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 稀释(体积比例),并进行包被,多克隆抗体作 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 稀释后方阵法进行间接 ELISA,选择重组抗原 gB 蛋白 1:320 稀释(蛋白质含量 0.62mg/ml) 为抗原最佳工作浓度,阻断抗体 1:1600 稀释为阻断抗体最佳工作浓度。

[0063] (4) 酶标抗体工作浓度和作用时间的确定:将羊抗兔酶标抗体分别作 1:8000、1:10000、1:12000、1:14000、1:16000、1:18000 倍稀释,分别 37℃ 作用 20min、30min、40min、60min,每个条件多克隆抗体和阴性血清分别重复 4 孔,进行间接 ELISA,测定其 OD 值,选择 1:10000 为最佳酶标抗体工作浓度,40min 为二抗最佳作用时间。(图 5)

[0064] (5) 反应模式的选择:采用竞争和阻断两种反应模式进行对比,将猪待检血清按 1:2 至 1:160 进行倍比稀释,一组进行间接竞争 ELISA(将阻断抗体和猪待检血清同时加到酶标板中);另一组进行间接阻断 ELISA(先将猪血清加到酶标板中作用一段时间,再加阻断抗体)。作出两种反应模式的标准曲线,选择抑制率高的间接阻断 ELISA 作为本试验的反应模式。

[0065] (6) 待检猪血清最佳稀释度的选择:按照优化好的条件进行间接阻断 ELISA,血清分别作 1:2.5、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 和 1:160 倍稀释,根据抑制率公式计算出不同稀释倍数的阴阳性血清抑制率,并进行对比,选择 1:5 为最佳血清稀释度。

[0066] (7) 猪待检血清和阻断抗体作用时间的选择:待检血清分别 37℃ 作用 30min、40min、1h、1.5h,进行间接阻断 ELISA,对比阴阳性抑制率选择 1.5h 为待检血清最佳血清反应时间;阻断抗体分别 37℃ 作用 0.5h、1.0h、1.5h、2.0h,进行间接阻断 ELISA,对比阴阳性抑制率后选择 1h 为阻断抗体最优反应时间。

[0067] (8) 其它反应条件的选择:分别以 4℃ 过夜、37℃ 1.0h、37℃ 2.0h、37℃ 3.0h 包被 gB 抗原表位区蛋白,进行间接阻断 ELISA,选择 4℃ 过夜为最优抗原蛋白包被条件;分别以 37℃ 1.0h、37℃ 1.5h、37℃ 2.0h、37℃ 3.0h 封闭,进行 ELISA,选择 37℃ 1.5h 为最优封闭条件;分别以室温 10min、15min、20min 和 37℃ 10min、37℃ 15min、37℃ 20min 显色,进行 ELISA,选择室温 10min 为最优显色条件。

[0068] (9) 临界值的确定:用已经优化好的间接阻断 ELISA 对 20 份阴性临床样品进行检测,计算抑制率,并根据公式:临界值 = 阴性样本平均抑制率 + 3(或 2) × 标准偏差,计算出阴阳性判定标准的临界值。当样本抑制率 ≥ 阴性样品平均抑制率 + 3 × 标准偏差时为阳

性,当抑制率<阴性样品平均抑制率+2×标准偏差时为阴性。抑制率在二者之间的样本,重复检测一次。

[0069] (10) 特异性实验

[0070] a. 阴性样本符合率试验:用建立的 gB2 间接阻断 ELISA 来检测 246 份阴性血清样本,同时设立阳性感染对照,阴性样品符合率为 97.97%。(图 6)

[0071] b. 特异性交叉反应试验:用建立的 aB2 间接阻断 ELISA 来检测 PRV、PRRSV、CSFV 的阳性血清。同时设立 PCMV 感染、阴性对照、免疫对照,实验结果显示 gB 优势抗原表位区蛋白不与其他病毒阳性血清发生特异性反应,特异性良好。

[0072] (11) 敏感性实验:用建立的 gB2 间接阻断 ELISA 来检测 138 份 PCMV 感染血清样本,同时设立阴性对照,实验结果显示本方法的敏感性为 97.83%。(图 7)

[0073] (12) 重复性实验

[0074] a. 以 gB2 蛋白最适浓度包被的同一块酶标板内对同一份感染血清和免疫血清进行检测。

[0075] b. 用 4 块 gB2 蛋白最适浓度包被好的酶标板,在相同条件下的不同时间内对同一份感染血清和免疫血清进行检测。

[0076] c. 分别计算板内和板间变异系数,实验结果显示该方法批内变异系数为 2.4%,批间变异系数为 6.2%,均小于 10%,表明本方法重复性良好。

[0077] (13) 临床样品检测:应用优化好的 PCMV 抗体间接阻断 ELISA 对尽量多的临床阳性阴性样品进行检测,并与 Western-blot 试验结果进行对比,试验结果显示本方法对 PCMV 阳性血清敏感性高于 Western-blot。

[0078] 5. 包板

[0079] 使用碳酸盐包被缓冲液 (pH = 9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液),将纯化的重组抗原按照 1 : 320 (1.94 μg/ml) 的体积比例稀释后,进行包板,每个样孔 100 μL 抗原,置 4℃ 保存 10 ~ 20h,进行包被,使用样品稀释液覆盖后抽空封装,置 4℃ 保存。

[0080] 6. 猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒的装配

[0081] 将猪巨细胞病毒囊膜糖蛋白 B(gB) 优势抗原表位区蛋白按照每孔 0.194 μg 包被酶标反应板,加入 5%蔗糖保护剂覆盖,真空包装。配置酶结合工作液、样品稀释液、阻断抗体、显色液 A、显色液 B、终止液。

[0082] 最后将以上各组分成分装配成猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒

[0083] 实施例 2

[0084] 1. 试剂盒检测操作程序

[0085] (1) 试验前准备程序:将 10× 洗涤缓冲液 (配制方法在实施例 1 中) 加入 ddH₂O 稀释成 1× 洗涤工作液;将阻断抗体用样品稀释液按 1 : 1600 稀释;将待检样品按 1 : 5 稀释。

[0086] (2) 在抗原包被板上设定阻断抗体对照孔,加入稀释后的阻断抗体,每孔 100 μL。

[0087] (3) 将待检样品加入检测样孔中,每孔 100 μL,封装于封口袋中 37℃ 孵育 1.5h。

[0088] (4) 将各样孔中的液体倒掉后用 1× 洗涤工作液洗涤,每孔 300 μL,洗涤 4 次,每次 2min。

[0089] (5) 将稀释后的阻断抗体加入检测样孔,每孔 100 μL,封装于封口袋中 37℃ 孵育

1h, (重复步骤 4)。

[0090] (5) 加入酶结合物工作液 (配制方法在实施例 1 中), 每孔 100 μ l, 封装于封口袋中 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min, (重复步骤 4)。

[0091] (6) 每孔按顺序加入显色液 A 50 μ l, 再向每孔中加入显色液 B 50 μ l, 室温显色 10min。

[0092] (7) 每孔按顺序加入终止液 (2M H_2SO_4) 50 μ l 终止反应, 450nm 单波长测定 OD 值, 计算抑制率。

[0093] 2. 结果判断

[0094]

$$\text{抑制率}(\%) = \left[\frac{\text{阻断抗体 OD 值} - \text{样品 OD 值}}{\text{阻断抗体 OD 值}} \right] \times 100\%$$

[0095] 当样品抑制率 $\geq 24.5\%$ 时为 PCMV 抗体阳性, 当样品抑制率 $< 19.8\%$ 时为 PCMV 抗体阴性, 抑制率在两者之间的样品需要重复检测一次。

[0096] 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。

[0097] 实施例 3

[0098] 1. 猪巨细胞病毒囊膜糖蛋白 B(gB) 抗原表位区基因表达载体的构建:

[0099] (1) PCMV gB 基因抗原表位分析: 通过 DNASTAR 及在线生物信息学软件进行 PCMV gB 基因 (GenBank : FJ595497. 1) 蛋白信号肽、疏水性、跨膜区、二级结构分析, 进行 gB 蛋白抗原表位预测, 选择一段长度为 270bp (核苷酸序列见 SEQ ID NO : 1) 编码 90 个氨基酸的优势抗原表位区作为目的基因进行密码子优化, 并在 invitrogen 公司进行合成。

[0100] (2) gB 基因主要抗原表位区 TA 克隆: 根据 gB 基因主要抗原表位区设计合成引物, 以合成的优势抗原表位区基因片段为模板, PCR 扩增 gB 基因优势抗原表位区。

[0101] 引物设计如下:

[0102] 上游引物: 5' -GAATTCATGAGTTCTTCGGGAAGCTG-3' (见 SEQ ID NO : 2)

[0103] 下游引物: 5' -AAGCTTCTACACGTCCTCGGTGGAT-3' (见 SEQ ID NO : 3)

[0104] 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后进入循环, 94 $^{\circ}$ C, 30s ; 54 $^{\circ}$ C, 30s ; 72 $^{\circ}$ C, 35s ; 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min。

[0105] 将 PCR 产物用 1% 溴乙锭琼脂糖电泳, 在紫外灯下将目的条带切下, 用胶回收试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 回收, 将回收的优势抗原表位区 DNA 片段与克隆载体 pMD18-T simple (宝生物工程 (大连) 有限公司) 连接, 并转化入克隆菌 DH5 α (宝生物工程 (大连) 有限公司)。抽取质粒后酶切鉴定并送往 invitrogen 公司进行测序鉴定, 结果表明目的片段成功转化入克隆载体菌, 片段大小为 270bp 与预计相同, 且片段无移码和突变情况。将克隆载体菌命名为大肠埃希氏菌 DH5 α -pMD18-T simple-gB 株。

[0106] (3) gB 基因主要抗原表位区重组 pET-32a(+) (EMD Biosciences) 表达载体构建: 分别扩大培养 DH5 α -pMD18-T simple-gB 和 DH5 α -pET-32a(+) 表达载体菌, 使用质粒抽提试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京) 抽取 pMD18-T simple-gB 和 pET-32a(+) 质粒, 并分别用 Eco I 和 HindIII 进行双酶切, 将回收目的片段与已酶切回收的 pET-32a(+) 表达载体用连接酶连接, 将连接产物转化 Rosetta(DE3) (宝生物工程 (大连) 有限公司) 表达

菌,铺于含 50mg/L 氨苄青霉素平板 (Amp) 的 LB 固体培养基上。37℃ 培养 12h 后,挑取单个菌落扩大培养后提取重组质粒,用 Eco I 和 HindIII 双酶切后电泳鉴定,将该质粒命名为 pET-gB,电泳结果同样显示酶切 DNA 片段大小与预计 270bp 相符合,由此表明 PCMV gB 基因抗原表位区序列已克隆到 pET32a(+) 载体中。将含有 pET-gB 质粒的 Rosetta 大肠埃希菌送 invitrogen 公司进行测序鉴定,结果进一步表明目的片段成功转化入表达菌,片段大小为 270bp 与预计相同,且片段无移码和突变情况,符合表达要求。将该表达菌命名为大肠埃希氏菌 Rosetta-pET-gB 株。

[0107] 2. PCMV gB 基因抗原表位区的表达 :将 Rosetta-pET-gB 菌株接入 20ml LB(氨苄青霉素) 液体培养基,37℃ 振荡培养至 OD 值为 0.6 左右,加入 IPTG 诱导液至浓度为 0.2mmol/L,振荡培养 2 ~ 3h。离心弃上清,用 pH7.4 结合缓冲液 (20mM 磷酸钠,0.5M 氯化钠,30mM 咪唑) 将细菌悬浮,反复冻融 3 次后,超声波裂解 10min,离心,取上清,并将沉淀复原体积。分别取 IPTG 诱导前的 Rosetta-pET-gB 菌、诱导后的 Rosetta-pET-gB 菌、诱导后的 Rosetta-pET-gB 菌裂解上清和沉淀、经 IPTG 诱导后的 pET32a(+) 转化的 Rosetta 受体菌制样,并进行 SDS-PAGE 电泳。试验结果显示 Rosetta-pET-gB 菌诱导后成功表达了 28.3KDa 的 PCMV gB 基因抗原表位区蛋白质, Rosetta-pET-gB 菌诱导后,所表达蛋白质绝大部分在细菌裂解离心后的上清液中。(图 1)

[0108] 3. 表达产物的纯化 :取 Rosetta-pET-gB 菌株接入 1000ml LB(氨苄青霉素) 液体培养基,振荡培养至 OD 值至 0.6,加入 IPTG 分别至 0.2mmol/L,继续培养 3h,离心,弃上清,加入 5 ~ 10mL 结合缓冲液 (20mM 磷酸钠,0.5M 氯化钠,30mM 咪唑,pH7.4),反复冻融 3 次后进行 10min 超声波裂解,离心后收集上清液,用 0.45 μ m 的滤膜除去上清液中细胞碎片和其他块状物质。将上清用 GE 公司 HisTrapFF 组氨酸标签融合蛋白纯化柱进行过柱,纯化目的蛋白。纯化结果表明,蛋白质纯化效果良好(图 1)。

[0001]

序 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> 四川农业大学

<120> 猪巨细胞病毒抗体间接阻断 ELISA 检测试剂盒及其检测方法

<130>

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 270

<212> DNA

<213> 优势抗原表位区

<400> 1

agttcttcgg gaactgeaat atctaatacgc cattcctatt atgagacaga caataaacag 60

gagtttgaga atgacaggaa acctgatacgc tccaatgccg tctctgaggg cagtgecaat 120

aagtaactctc aagaagatgc cgtctgcatg ttaatggcta taaagaacct gggggatgcg 180

tacaggcgga agaatgccac aaagcctagc cggagcgtat tagataagat acgtcacttg 240

[0002]

gaatatcagc agttatccac cgaggacgtg

270

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 上游引物

<400> 2

gaattcatga gttcttcggg aactg

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 下游引物

<400> 3

aagcttctac acgtcctcgg tggat

25

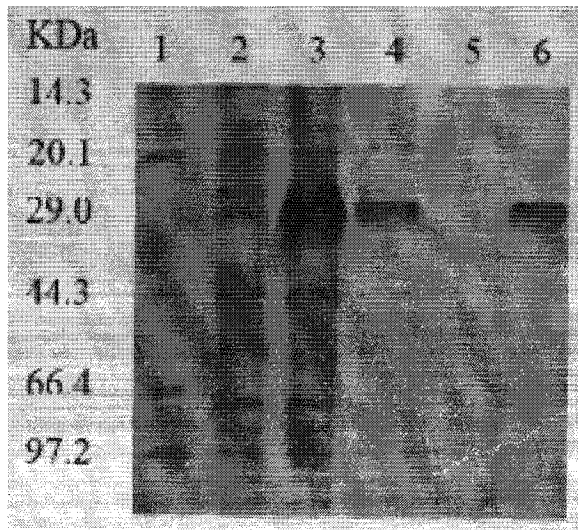


图 1

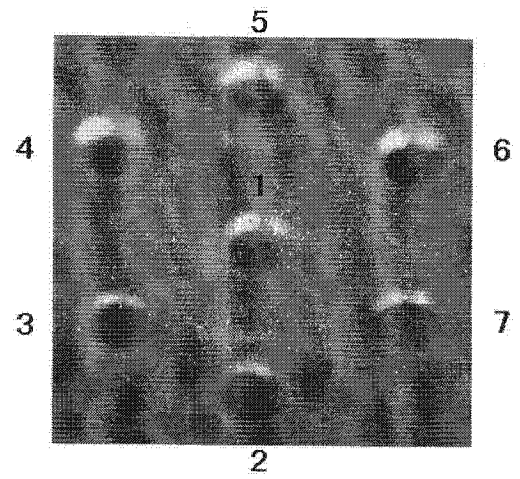


图 2

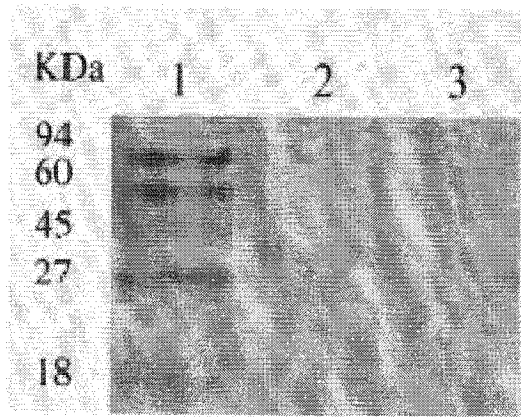


图 3

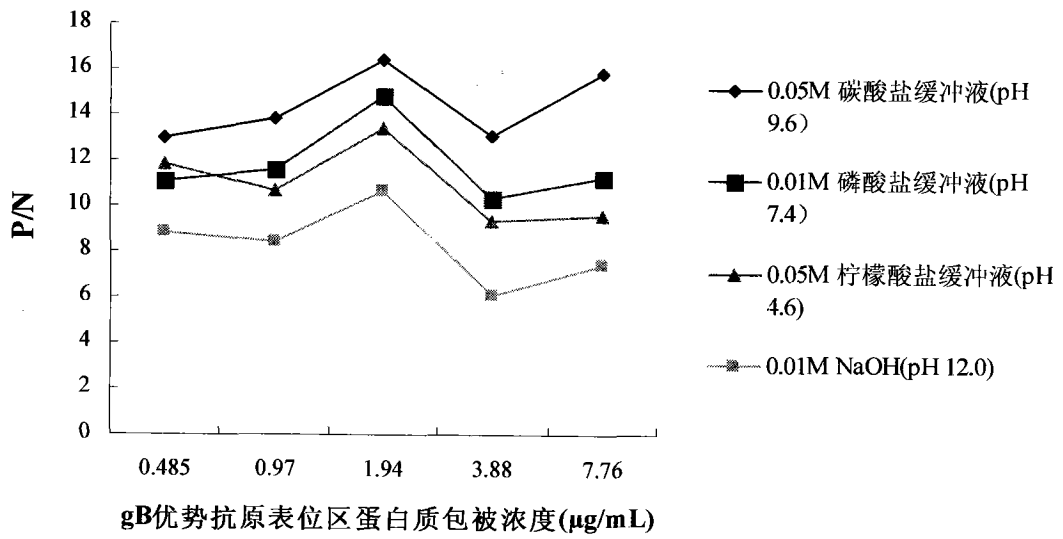


图 4

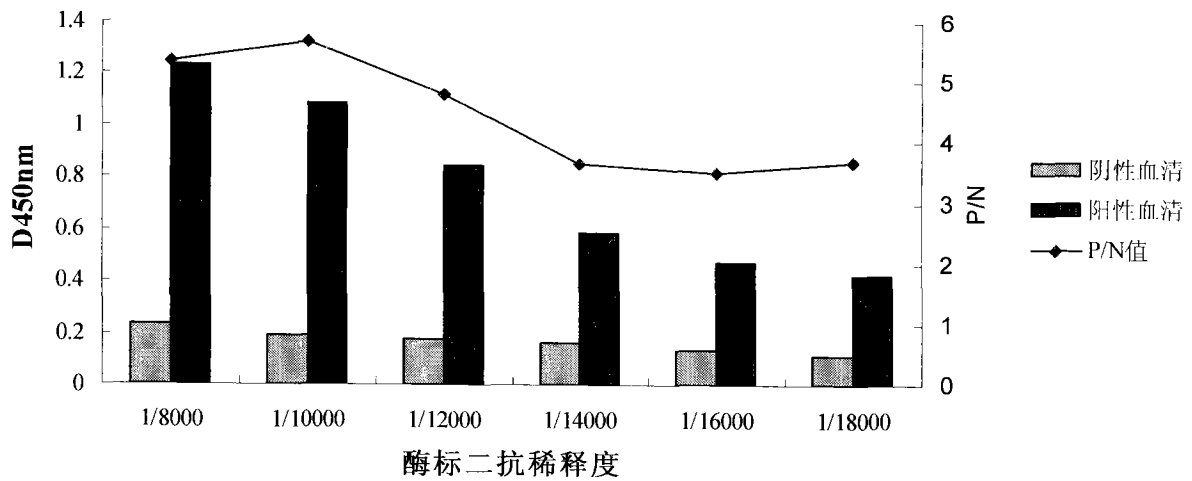


图 5

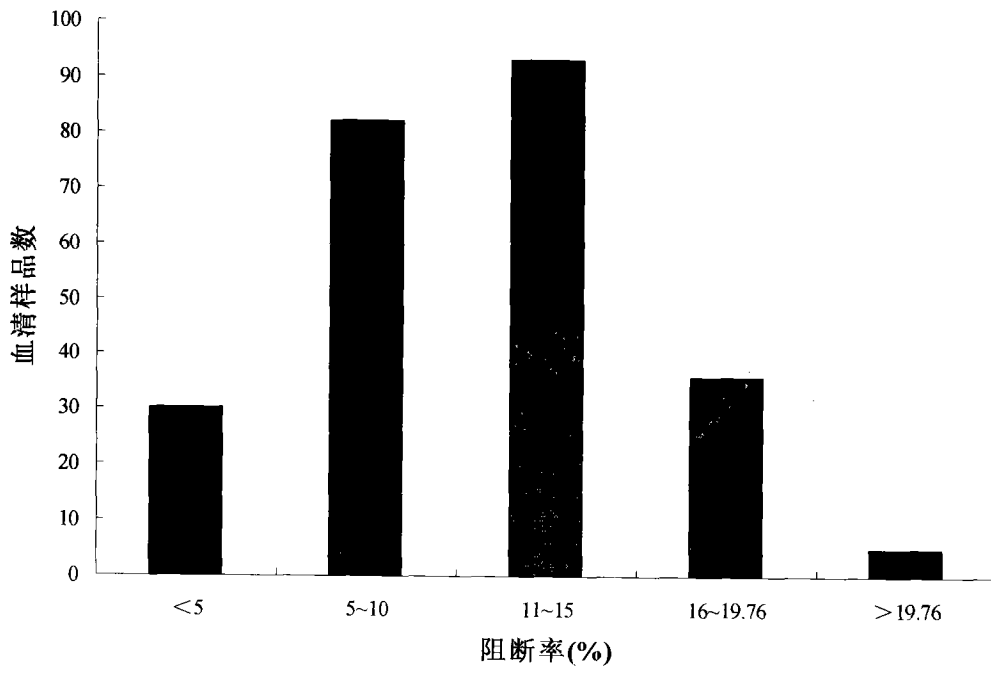


图 6

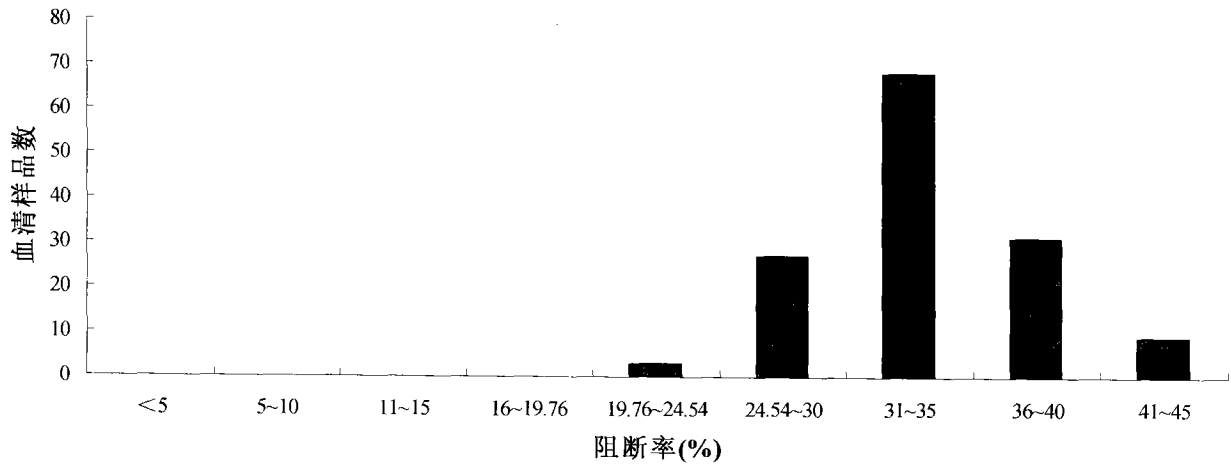


图 7

专利名称(译)	猪巨细胞病毒抗体间接阻断ELISA检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN102621305A	公开(公告)日	2012-08-01
申请号	CN201210042330.8	申请日	2012-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	徐志文 朱玲 刘骁 郭万柱		
发明人	徐志文 朱玲 刘骁 郭万柱		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
其他公开文献	CN102621305B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪巨细胞病毒抗体间接阻断ELISA检测试剂盒。试剂盒内设有抗体检测板，酶结合物工作液，阻断抗体，样品稀释液，洗涤液，显色液A，显色液B，终止液。该试剂盒的检测板为猪巨细胞病毒gB优势抗原表位区蛋白重组抗原包被的可拆卸96孔酶标板，酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体，阻断抗体为兔抗猪巨细胞病毒gB优势抗原表位区蛋白多克隆抗体。本发明有益的积极效果是：特异性强、灵敏度高、操作简单，适合于临床大规模推广应用，具有广阔的市场前景。

