



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105675873 B

(45)授权公告日 2017. 11. 10

(21)申请号 201610002984.6

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2016.01.04

G01N 33/558(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/531(2006.01)

申请公布号 CN 105675873 A

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

(43)申请公布日 2016.06.15

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:C2014198 2014.11.03

CCTCC NO:C2014199 2014.11.03

(73)专利权人 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司

地址 471000 河南省洛阳市高新区翠微路

(72)发明人 田克恭 韩水仲

(74)专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

(56)对比文件

CN 203630140 U, 2014.06.04,

CN 103033622 A, 2013.04.10,

CN 101768218 A, 2010.07.07,

CN 1584599 A, 2005.02.23,

CN 1584597 A, 2005.02.23,

翟淑燕.猪圆环病毒2型单克隆抗体研制与
夹心ELISA抗原检测方法的建立.《中国优秀硕士
学位论文全文数据库农业科技辑》.2015,

审查员 黄晓丽

权利要求书3页 说明书18页

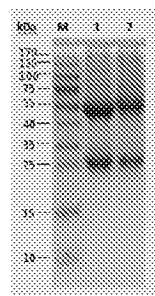
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供了含两个抗猪圆环病毒2型单克隆抗体、两个抗猪瘟病毒单克隆抗体和/或两个抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体的检测试剂盒,该试剂盒可用于非诊断目的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原同时检测中的应用,并且同时检测两种或三种病毒的试剂盒的检测灵敏度高于单独检测病毒的,避免了假阳性结果。



1. 一种试剂盒,所述试剂盒包括有效量的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或有效量的抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;

其中,所述单克隆抗体PCV2-McAB1为保藏号为CCTCC NO:C2014199的2F8株分泌的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8,所述单克隆抗体PCV2-McAB2重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.2和轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.4;所述单克隆抗体PCV2-McAB1固定在支持介质上,所述单克隆抗体PCV2-McAB2溶解于反应液中;

所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4能同时与猪瘟病毒产生抗原抗体结合反应,所述单克隆抗体CSFV-McAB3固定在支持介质上,所述单克隆抗体CSFV-McAB4溶解于反应液中;

所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6能同时与高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒产生抗原抗体结合反应,所述单克隆抗体PRRSV-McAB5固定在支持介质上,所述单克隆抗体PRRSV-McAB6溶解于反应液中,以及

所述用于检测抗原抗体反应的检测试剂通过酶显色、或胶体金进行测定。

2. 根据权利要求1所述试剂盒,其中,所述单克隆抗体PCV2-McAB2可以为嵌合单克隆抗体、改形单克隆抗体、猪源单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述试剂盒,其中,所述单克隆抗体 PCV2-McAB1、CSFV-McAB3、PRRSV-McAB5的含量均为25-1000 μ g/ml,所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4、PRRSV-McAB6的含量均为50-2000 μ g/ml。

4. 根据权利要求1所述试剂盒,其中,所述抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4分别选自下列抗猪瘟病毒单克隆抗体1B9、1D4、3G11、5B6、CSFV7、CSFV14、C7、C9、G9、G10、4E8、4A4、C3、A1、2D1、3D5、3D7、3F8、4B2、AC9、CF8,且所述单克隆抗体CSFV-McAB3与CSFV-McAB4不同;

所述抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6分别选自下列抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体3C3、N35、N36、N51、N4D2、N3H12、1A2、1D9、1F6、2C7、3B9、3H2、4D2、4E2、2E9、3G2、4E3、B7D3、D5、D7、D10、E9、B5,且所述单克隆抗体PRRSV-McAB5与PRRSV-McAB6不同。

5. 根据权利要求1所述试剂盒,其中,所述单克隆抗体CSFV-McAB3为抗猪瘟病毒单克隆抗体G10,所述单克隆抗体CSFV-McAB4为抗猪瘟病毒单克隆抗体4E8;所述单克隆抗体PRRSV-McAB5为抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体B7D3,所述单克隆抗体PRRSV-McAB6为抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体N4D2。

6. 根据权利要求1所述试剂盒,其中,所述支持介质为滴定板、磁颗粒、乳胶颗粒、硝酸纤维素膜中的任一种。

7. 一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,所述PCV2-McAB1为保藏号为CCTCC NO:C2014199的2F8株分泌的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8,所述单克隆抗体PCV2-McAB2重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.2和轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.4,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有

效量的抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或有效量的抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;

其中,所述试剂盒包括胶体金检测试纸条,所述胶体金检测试纸条包括底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向依次有滤纸、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述硝酸纤维素膜与金标垫接触或与样品垫、金标垫接触使得抗原与所述单克隆抗体PCV2-McAB2的结合体、抗原与单克隆抗体CSFV-McAB4的结合体和/或抗原与单克隆抗体PRRSV-McAB6的结合体能在其上向底板第二端迁移;所述金标垫上是含有胶体金标记的所述单克隆抗体PCV2-McAB2、胶体金标记的所述单克隆抗体CSFV-McAB4和/或胶体金标记的所述单克隆抗体PRRSV-McAB6,所述硝酸纤维素膜上有两条或三条检测线和一条质控线,所述检测线分别固定化有所述单克隆抗体PCV2-McAB1、所述单克隆抗体CSFV-McAB3和/或所述单克隆抗体PRRSV-McAB5,所述质控线上固定化有羊抗鼠二抗或羊抗鼠多抗。

8. 一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,所述PCV2-McAB1为保藏号为CCTCC NO:C2014199的2F8株分泌的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8,所述单克隆抗体PCV2-McAB2重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.2和轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.4,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或有效量的抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;

其中,所述试剂盒包括缓冲液供应单元和酶免疫层析检测试纸条;所述缓冲液供应单元用于将缓冲液供给所述酶免疫层析检测试纸条;所述酶免疫层析检测试纸条包括硝酸纤维素膜(1),所述酶免疫层析检测试纸条在纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区;所述底物供应区包括底物垫(3),其上吸附有干燥的酶底物,所述底物垫(3)与硝酸纤维素膜(1)接触,所述酶底物溶于缓冲液中并在硝酸纤维素膜(1)上向距所述缓冲液供应单元的远端迁移;所述样品供应区包括酶标垫(2),其上吸附有酶标记所述单克隆抗体PCV2-McAB2、酶标记所述单克隆抗体CSFV-McAB4和/或酶标记所述单克隆抗体PRRSV-McAB6,所述酶底物能与所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4和/或PRRSV-McAB6上标记的酶产生显色反应,所述酶标垫(2)与硝酸纤维素膜(1)接触,所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4和/或PRRSV-McAB6溶于缓冲液中并在硝酸纤维素膜(1)上向距所述缓冲液供应单元的远端迁移;以及所述检测区依次固定化有所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5;

其中,所述缓冲液供应单元包括展开液垫(5)、底物缓冲液槽(8)、底物缓冲液(9)和缓冲液按钮,所述底物缓冲液(9)放置于底物缓冲液槽(8)中,所述缓冲液按钮位于底物缓冲液槽(8)的上方,按下可将所述展开液垫(5)浸入缓冲液(9)中;所述检测区包括检测线(6)、质控线(7),其中,所述质控线(7)较检测线(6)更远离所述样品供应区,在所述检测线(6)分贝固定化有所述单克隆抗体PCV2-McAB1、所述单克隆抗体CSFV-McAB3和/或所述单克隆抗

体PRRSV-McAB5,在所述质控线(7)固定化有羊抗鼠二抗或羊抗鼠多抗,且吸附在酶标垫(2)上的酶标记所述单克隆抗体PCV2-McAB2、所述单克隆抗体CSFV-McAB4和/或所述单克隆抗体PRRSV-McAB6分别对于固定在检测线(6)的固定所述单克隆抗体PCV2-McAB1、所述单克隆抗体CSFV-McAB3和/或所述单克隆抗体PRRSV-McAB5而言是过量的;所述硝酸纤维素膜(1)全段粘附在支撑物(10)上,支撑物(10)连接所述缓冲液供应单元,底物供应区,样品供应区,检测区以及吸水垫(4),所述吸水垫(4)在距所述缓冲液供应单元的最远端;以及检测样品(11)加入的位置为所述酶标垫(2)的位置。

9. 权利要求1-8中任一项所述试剂盒在用于非诊断目的的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测中的应用。

10. 根据权利要求9所述应用,其中,所述非诊断目的的检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测以及定性和定量鉴别检验含猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的检测。

一种检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒2型(Porcine circovirus 2type,PCV2)可引发一系列猪圆环病毒病包括断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)、仔猪A2型先天震颤(A2CT)、猪繁殖障碍、猪皮炎肾炎综合征、增生性坏死性肺炎和呼吸道疾病综合征,特别是PMWS的主要病原。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;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。这些疾病的广泛流行严重影响了养猪业的发展,给许多国家和地区带来了巨大的损失。

[0003] 猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)又称经典猪瘟或古典猪瘟,家猪和野猪是猪瘟病毒唯一的自然宿主,可引发猪瘟。其中,猪瘟是一种急性、热性、高度接触性传染病,可表现为急性、慢性、非典型或母猪繁殖障碍的病程,被世界动物卫生组织OIE列为A类疫病,在我国也被列为I类动物传染病。

[0004] 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(Highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,HP-PRRSV)引发的高致病性猪繁殖与呼吸综合征(HP-PRRS)于2006年在我国大规模爆发,之后在越南、老挝等国家爆发,以高热、高发病率、高死亡率、较低的低治愈率为主要临床特征,给养猪业造成了极其严重的打击。

[0005] 随着规模化猪场的增加,猪疫病的种类也不断增加,旧的疫病没有消灭,新的疫病不断出现,并且随着病毒株的变异使猪的疫病日益呈现复杂化和严重化趋势。PCV2、CSFV、HP-PRRSV均能不同程度的导致妊娠母猪的繁殖障碍,并且经常混合感染,引起母猪流产、胚胎死亡、胎儿畸形、胎儿木乃伊化及不孕等,在猪群中具有传播快、胚胎致死率高、流行范围广、传播途径多、病原体顽固等特点,每年给养猪业造成了巨大损失。因此,亟需研发能实现PCV2、CSFV、HP-PRRSV的检测方法。

[0006] 目前,检测这几种病毒的方法包括病毒分离鉴定,但操作过程繁琐、耗时过长;PCR或基因芯片检测,但需要专门的仪器和专业的操作人员,这些方法均不适合基层或现场快速检测。因而,亟需研制一种能简单、快速、准确、同时检测这几种病毒的方法。

发明内容

[0007] 为了解决现有技术的不足,本发明提供了一种检测试剂盒,该试剂盒可简单、快速、灵敏度高并同时检测出至少两种病毒。

[0008] 本发明涉及一种检测试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或有效量的抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体

PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;其中,所述单克隆抗体PCV2-McAB1为抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8或3G12,所述单克隆抗体PCV2-McAB2重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.2和/或轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.4;所述单克隆抗体PCV2-McAB1固定在支持介质上,所述单克隆抗体PCV2-McAB2溶解于反应液中;所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4能同时与猪瘟病毒产生抗原抗体结合反应,所述单克隆抗体CSFV-McAB3固定在支持介质上,所述单克隆抗体CSFV-McAB4溶解于反应液中;所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6能同时与高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒产生抗原抗体结合反应,所述单克隆抗体PRRSV-McAB5固定在支持介质上,所述单克隆抗体PRRSV-McAB6溶解于反应液中。

[0009] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或与有效量的所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;其用于检测抗原抗体反应的检测试剂为胶体金。

[0010] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或与有效量的所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;其用于检测抗原抗体反应的检测试剂为酶-底物。

[0011] 本发明还涉及所述试剂盒在用于非诊断目的的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测中的应用。

[0012] 本发明所提供的试剂盒可用于非诊断目的的猪圆环病毒2型、猪瘟病毒和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒同时检测中的应用,简单、快速并且灵敏度高。

附图说明

[0013] 图1为单克隆抗体3H11的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定图,其中泳道M为蛋白Marker;泳道1、2均为单克隆抗体3H11,包括上端的重链和下端的轻链。

[0014] 图2为酶免疫层析检测试纸条的侧面示意图,图中:1-硝酸纤维素膜,2-酶标垫,3-底物垫,4-吸水垫,5-展开液垫,6-检测线,7-质控线,8-底物缓冲液槽,9-底物缓冲液,10-支撑物,11-检测样品;图2A为检测猪圆环病毒2型、猪瘟病毒或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒时的检测试纸条的侧向示意图;图2B为检测猪圆环病毒2型、猪瘟病毒和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒时的检测试纸条的侧向示意图。

具体实施方式

[0015] 本发明涉及一种检测试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原

抗体反应的检测试剂;和/或有效量的抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;其中,所述单克隆抗体PCV2-McAB1为抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8或3G12,所述单克隆抗体PCV2-McAB2重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.2和/或轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID No.4;所述单克隆抗体PCV2-McAB1固定在支持介质上,所述单克隆抗体PCV2-McAB2溶解于反应液中;所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4能同时与猪瘟病毒产生抗原抗体结合反应,所述单克隆抗体CSFV-McAB3固定在支持介质上,所述单克隆抗体CSFV-McAB4溶解于反应液中;所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6能同时与高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒产生抗原抗体结合反应,所述单克隆抗体PRRSV-McAB5固定在支持介质上,所述单克隆抗体PRRSV-McAB6溶解于反应液中。

[0016] 术语“单克隆抗体”是指获自基本上同源的抗体群的抗体,即组成该群体的抗体个体都相同,除了可能存在少量可能的自发突变。因此,修饰语“单克隆”是指该抗体的性质不是离散抗体的混合物。优选地,所述单克隆抗体包括单价的或是单链抗体、双链抗体、嵌合抗体、猪源化抗体以及上述抗体的衍生物、功能等同物和同源物,也包括抗体片段和含有抗原结合结构域的任何多肽。抗体为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任意特异性结合因子,因而,这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物、猪源化抗体以及抗体的功能等同物和同源物,也包括含有抗原结合结构域的任何多肽,无论是天然的还是合成产生的。抗体的实例是免疫球蛋白亚型(如IgG, IgE, IgM, IgD和IgA)及其亚型亚类;也可以是包含抗原结合结构域的片段如Fab、scFv、Fv、dAb、Fd;和双链抗体(diabodies)。融合至另一多肽的、包含抗原结合结构域的嵌合体分子或者等同物也包括在其中。嵌合抗体的克隆与表达在EP.A.0120694和EP.A.0125023中描述。抗体可以通过许多方式修饰,可用DNA重组技术来产生保留原来抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。这种技术可以包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补性决定区(CDRs)的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区,参见EP.A.184187,GB2188638A或EP.A.239400。还可以对杂交瘤细胞或产生抗体的其它细胞进行遗传突变或其它改变,这可以改变或者不改变所产生抗体的结合特异性。用于本发明的“单克隆抗体”也可用杂交瘤方法制得,因为编码本发明鼠源化抗体的DNA序列可用本领域技术人员熟知的常规手段,如根据本发明公开的氨基酸序列人工合成或用PCR法扩增得到,因而也可用重组DNA方法,可用本领域熟知的各种方法将该序列连入合适的表达载体中。最后,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞,然后本领域技术人员应用熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的单克隆抗体。抗体包含通过二硫桥连接在一起的多肽链几何体,称为轻链和重链的两条多肽主链构成抗体的所有主要结构类别(同型物)。重链和轻链都进一步可分为称作可变区和恒定区的一些亚区。重链包括单个的可变区和三个不同的恒定区,轻链则包括单个可变区(不同于重链的可变区)和单个恒定区(不同于重链的恒定区)。重链和轻链的可变区负责抗体的结合特异性。

[0017] 术语“重链可变区”是指一种多肽,其长度为110至125个氨基酸,其氨基酸顺序相应于本发明单克隆抗体从重链N末端氨基酸开始的重链氨基酸顺序。同样,术语“轻链可变区”是指一种多肽,其长度为95至115个氨基酸,其氨基酸顺序相应于本发明单克隆抗体从轻链N末端氨基酸开始的轻链氨基酸顺序。本领域普通技术人员显然知晓,在本发明所具体公开的单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列基础上,可以通过常规基因工程

和蛋白质工程方法进行一个或多个氨基酸的添加、删除、替换等修饰,获得其活性片段或保守性变异体,而仍能够保持与猪圆环病毒2型特异性结合。本发明中的单克隆抗体还包括其活性片段或保守性变异体。

[0018] 术语“有效量”当理解为“诊断有效量”时是指能够利用本发明所述单克隆抗体有效检测样品中是否存在猪圆环病毒2型、猪瘟病毒、高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的量。根据已知的免疫化学检测方法,本领域技术人员能够知晓,所用单克隆抗体的量随采用的具体免疫检测方法的不同而不同,根据公知文献的教导,本领域技术人员知晓如何选择适当的本发明所述单克隆抗体的用量,以用于待检样品中是否存在猪圆环病毒2型、猪瘟病毒、高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒。本领域技术人员知晓,运用该单克隆抗体开发的检测诊断试剂盒中还应当包括适当的载体,缓冲液/剂,和用于检测产生信号的试剂及使用说明书。本发明所述试剂盒有效检测待检样品中是否存在猪圆环病毒2型、猪瘟病毒、高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的量时所采用的检测方法可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)、酶免疫层析检测、化学发光免疫检测、放射免疫检测、荧光免疫检测、免疫色谱法及类似检测方法。

[0019] 术语“抗猪瘟病毒单克隆抗体”包括单克隆抗体1B9、1D4、3G11、5B6(李娅丽.分泌抗猪瘟病毒单克隆抗体异源杂交瘤细胞株的建立.河南农业大学硕士学位论文,2009),CSFV7、CSFV14(毛燕.广西猪瘟病毒分子流行病学调查及单克隆抗体的制备.广西大学硕士学位论文,2012),C7、C9、G9、G10、4E8(许保疆,陈陆,游一等.抗猪瘟病毒单克隆抗体的制备及其生物学特性鉴定.华北农学报,2009,24(3):64-68),4A4(夏照和.特异性识别猪瘟病毒野毒株的单克隆抗体的制备.中国农业科学院学位论文,2008),C3、A1(张春玲.猪瘟病毒E2蛋白单克隆抗体的制备及其生物学特性的研究.安徽农业大学硕士学位论文,2009),2D1(朱蓓蓓.猪瘟病毒单克隆抗体的制备及其初步应用.华中农业大学硕士学位论文,2009),3D5、3D7、3F8、4B2(朱妍.猪瘟病毒特异性单克隆抗体的研究.吉林农业大学硕士学位论文,2005),AC9、CF8(陆芹章,罗廷荣,温和心等.猪瘟单克隆抗体的制备及ACI-ELISA检测猪瘟病毒的研究.中国预防兽医学报,2004,26(5):368-372)。

[0020] 术语“抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体”包括单克隆抗体3C3(中国专利CN10199512A),N35、N36、N51(中国专利CN101661042A),N4D2、N3H12(中国专利CN103044544A),1A2、1D9、1F6、2C7、3B9、3H2、4D2、4E2(卢炜.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒GP5和N蛋白单克隆抗体的制备及新型亚单位疫苗研究.华中农业大学硕士学问论文,2011),2E9、3G2、4E3(李琳.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒HuN4株N蛋白单克隆抗体的制备及其抗原区域的鉴定.黑龙江八一农垦大学硕士学位论文,2014),B7D3(张军杰.华南地区猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子流行病学研究及N蛋白单克隆抗体的制备.河南农业大学硕士学位论文,2013),D5、D7、D10、E9、B5(周盛华,崔尚金,张超范等.抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备与鉴定.第三届猪病防控学术研讨会会议论文集,185-189)。

[0021] 作为本发明的一种实施方式,在本发明所述试剂盒中,所述单克隆抗体PCV2-McAB2可以为嵌合单克隆抗体、改形单克隆抗体、猪源单克隆抗体。

[0022] 作为本发明的一种实施方式,在本发明所述试剂盒中,所述单克隆抗体PCV2-McAB2为抗猪圆环病毒2型单克隆抗体3H11。

[0023] 所述抗猪圆环病毒2型单克隆抗体3H11的相对亲和力常数为7.81ng/ml,也就是说,所述单克隆抗体与抗原的抗原决定簇的结合强度适中;所述单克隆抗体的中和抗体效价大于1:512,也就是说所述单克隆抗体具有良好的中和活性,可抑制猪圆环病毒2型重复感染靶细胞。

[0024] 作为本发明的一种实施方式,在本发明所述试剂盒中,所述单克隆抗体PCV2-McAB1为抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8或3G12。

[0025] 所述单克隆抗体2F8是由小鼠骨髓杂交瘤细胞2F8株分泌产生,该小鼠骨髓杂交瘤细胞2F8株(Hybridoma-BaIb/c mouse spleen cells and Sp2/0, strain 2F8)由猪圆环病毒2型Cap蛋白(根据NCBI登录号KF524259.1制备)抗原免疫小鼠后,取其脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞融合,经筛选获得小鼠骨髓杂交瘤细胞2F8株,其保藏号为CCTCC NO:C2014199,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉武汉大学,保藏日期为2014年11月3日。

[0026] 所述单克隆抗体3G12是由小鼠骨髓杂交瘤细胞3G12株分泌产生,该小鼠骨髓杂交瘤细胞3G12株(Hybridoma-BaIb/c mouse spleen cells and Sp2/0, strain 3G12)由猪圆环病毒2型Cap蛋白(根据NCBI登录号KF524259.1制备)抗原免疫小鼠后,取其脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞融合,经筛选制得小鼠骨髓杂交瘤细胞3G12株,其保藏号为CCTCC NO:C2014198,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉武汉大学,保藏日期为2014年11月3日。作为本发明的一种实施方式,在本发明所述试剂盒中,所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3、PRRSV-McAB5的含量均为25-1000 μ g/ml,所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4、PRRSV-McAB6的含量均为50-2000 μ g/ml。

[0027] 作为本发明的一种实施方式,在本发明所述试剂盒中,所述抗猪瘟病毒单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4分别选自下列抗猪瘟病毒单克隆抗体1B9、1D4、3G11、5B6、CSFV7、CSFV14、C7、C9、G9、G10、4E8、4A4、C3、A1、2D1、3D5、3D7、3F8、4B2、AC9、CF8,且所述单克隆抗体CSFV-McAB3与CSFV-McAB4不同。

[0028] 作为本发明的一种实施方式,在本发明所述试剂盒中,所述抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6分别选自下列抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体3C3、N35、N36、N51、N4D2、N3H12、1A2、1D9、1F6、2C7、3B9、3H2、4D2、4E2、2E9、3G2、4E3、B7D3、D5、D7、D10、E9、B5,且所述单克隆抗体PRRSV-McAB5与PRRSV-McAB6不同。

[0029] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述试剂盒中,所述单克隆抗体CSFV-McAB3为抗猪瘟病毒单克隆抗体G10,所述单克隆抗体CSFV-McAB4为抗猪瘟病毒单克隆抗体4E8;所述单克隆抗体PRRSV-McAB5为抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体B7D3,所述单克隆抗体PRRSV-McAB6为抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体N4D2。

[0030] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述试剂盒中,所述支持介质为滴定板、磁颗粒、乳胶颗粒、硝酸纤维素膜中的任一种,所述用于检测抗原抗体反应的检测试剂可通过酶显色、胶体金、荧光、化学发光中的任一种方法进行测定。

[0031] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;

和/或有效量的所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;其中,所述试剂盒包括胶体金检测试纸条,所述胶体金检测试纸条包括底板,所述底板具有第一端和第二端,并且沿所述第一端向第二端的方向上依次有滤纸、样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述硝酸纤维素膜与金标垫接触或与样品垫、金标垫接触使得抗原与所述单克隆抗体PCV2-McAB2的结合体、抗原与所述单克隆抗体CSFV-McAB4的结合体和/或抗原与所述单克隆抗体PRRSV-McAB6的结合体能在其上向底板第二端迁移;所述金标垫上是含有胶体金标记的所述单克隆抗体PCV2-McAB2、胶体金标记的所述单克隆抗体CSFV-McAB4和/或胶体金标记的所述单克隆抗体PRRSV-McAB6,所述硝酸纤维素膜上有两条或三条检测线和一条质控线,所述检测线上分别固定化有所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5,所述质控线固定化上有羊抗鼠二抗或羊抗鼠多抗。

[0032] 本发明还涉及一种试剂盒,其中,所述试剂盒包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,以及用于检测猪圆环病毒2型抗原抗体反应的检测试剂;有效量的所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,以及用于检测猪瘟病毒抗原抗体反应的检测试剂;和/或有效量的所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6,以及用于检测高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原抗体反应的检测试剂;其中,所述试剂盒包括缓冲液供应单元和酶免疫层析检测试纸条;所述缓冲液供应单元用于将缓冲液供给所述酶免疫层析检测试纸条;所述酶免疫层析检测试纸条包括硝酸纤维素膜(1),所述酶免疫层析检测试纸条在纵向上依次包括底物供应区、样品供应区、检测区;所述底物供应区包括底物垫(3),其上吸附有干燥的酶底物,所述底物垫(3)与硝酸纤维素膜(1)接触,所述酶底物溶于缓冲液中并在硝酸纤维素膜(1)上向距所述缓冲液供应单元的远端迁移;所述样品供应区包括酶标垫(2),其上吸附有酶标记所述单克隆抗体PCV2-McAB2、酶标记所述单克隆抗体CSFV-McAB4和/或酶标记所述单克隆抗体PRRSV-McAB6,所述酶底物能与所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4和/或PRRSV-McAB6上标记的酶产生显色反应,所述酶标垫(2)与硝酸纤维素膜(1)接触,所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4和/或PRRSV-McAB6溶于缓冲液中并在硝酸纤维素膜(1)上向距所述缓冲液供应单元的远端迁移;以及所述检测区依次固定化有所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5;其中,所述缓冲液供应单元包括展开液垫(5)、底物缓冲液槽(8)、底物缓冲液(9)和缓冲液按钮,所述底物缓冲液(9)放置于底物缓冲液槽(8)中,所述缓冲液按钮位于底物缓冲液槽(8)的上方,按下可将所述展开液垫(5)浸入缓冲液(9)中;所述检测区包括两条或三条检测线(6)、一条质控线(7),其中,所述质控线(7)较检测线(6)更远离所述样品供应区,在所述检测线(6)依次固定化有固定所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5,在所述质控线(7)固定化有羊抗鼠二抗或羊抗鼠多抗,且吸附在酶标垫(2)上的酶标记所述单克隆抗体PCV2-McAB2、CSFV-McAB4和/或PRRSV-McAB6分别对于固定在检测线(6)的固定化所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5而言是过量的;所述硝酸纤维素膜(1)全段粘附在所述支撑物(10)上,支撑物(10)连接所述缓冲液供应单元,底物供应区,样品供应区,检测区以及吸水垫(4),所述吸水垫(4)在距所述缓冲液供应单元的最远端;以及检测样品(11)加入的位置为所述酶标垫(2)的位置。

[0033] 作为本发明的一种实施方式,所述试剂盒中的所述酶免疫层析检测试纸条包括固

相的硝酸纤维素膜1、含有标记试剂的酶标垫2、底物垫3、吸水垫4、展开液垫5、检测线6、质控线7、底物缓冲液槽8、底物缓冲液9、支撑物10,其中2属于样品供应区,3属于底物供应区,5、8属于缓冲液供应单元,6、7属于检测区。检测样品11加入的位置为酶标垫2的位置。所述检测试纸条固定在塑料外壳中,其上从左到右依次固定展开液垫5、底物垫3、酶标垫2、吸水垫4。硝酸纤维素膜1粘附在支撑物10的全段;吸水垫4卡在硝酸纤维素膜1的顶端,且与硝酸纤维素膜1有重叠;酶标垫2位于硝酸纤维素膜1的中段,上面干燥有酶标记所述单克隆抗体PCV2-McAB2、酶标记所述单克隆抗体CSFV-McAB4和/或酶标记所述单克隆抗体PRRSV-McAB6;底物垫3卡在硝酸纤维素膜1的底端,其上有干燥的酶底物。展开液垫5的上端覆盖了底物垫3,且其下端位于底物缓冲液槽8的底端。底物缓冲液槽8的上面覆盖了一层铝箔纸,以防止底物缓冲液9渗漏,其上有缓冲液按钮,按下缓冲液按钮可刺破铝箔纸,并将展开液垫5的下端浸入到底物缓冲液9中。检测线6位于硝酸纤维素膜1的中上端,其上依次固定化有所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5。质控线7位于硝酸纤维素膜1的中上端、检测线6的上游,其上固定化有羊抗鼠二抗或羊抗鼠多抗。

[0034] 术语“检测样品”包括但不限于动物或患者的血清及组织样品、动物细胞培养的完整病毒或裂解病毒液等。

[0035] 本发明还涉及所述试剂盒检测样品中病毒的方法,所述方法包括:(1)将检测样品与所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,和/或所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6进行接触,(2)检测所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4,和/或所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6与样品中病毒的反应;其中,所述方法步骤(1)中的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3和/或PRRSV-McAB5附着在支持介质上,所述支持介质优选为微滴定板、磁颗粒、乳胶颗粒、硝酸纤维素膜中的任一种;其中,所述方法步骤(2)中所述反应可通过酶显色、胶体金、荧光、化学发光中的任一种方法进行测定。

[0036] 作为本发明的一种实施方式,所述方法包括:在步骤(1)前,将采集的微生物拭子插入到样品处理管中,使样品尽可能溶解在溶液中,将处理后的样品滴加至检测试纸条加样孔中心,10分钟或30分钟判定结果:若质控线显色即试验成立,检测线显色即可判为阳性,检测线不显色即可判为阴性;若质控线未显色即试验不成立,无论检测线是否显色,均则判定为无效结果,需重测。

[0037] 本发明还涉及所述试剂盒在用于非诊断目的的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测中的应用。

[0038] 作为本发明的一种实施方式,本发明提供了包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2和有效量的所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4的试剂盒在用于非诊断目的的猪圆环病毒2型抗原和猪瘟病毒抗原检测中的应用。

[0039] 作为本发明的一种实施方式,本发明提供了包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2和有效量的所述单克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6的试剂盒在用于非诊断目的的猪圆环病毒2型抗原和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测中的应用。

[0040] 作为本发明的一种实施方式,本发明提供了包括有效量的所述单克隆抗体PCV2-McAB1、PCV2-McAB2,有效量的所述单克隆抗体CSFV-McAB3、CSFV-McAB4和有效量的所述单

克隆抗体PRRSV-McAB5、PRRSV-McAB6的试剂盒在用于非诊断目的的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原、高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测中的应用。

[0041] 作为本发明的一种实施方式,所述非诊断目的的检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测以及定性和定量鉴别检验含猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的检测。

[0042] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0043] 本实施例中所用的磷酸盐缓冲液为pH值7.4的PBS,其1L体积配方为:NaCl 8.0g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.24g,但该实施方式无论在任何情况下均不构成对本发明的限定。

[0044] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例来进一步描述本发明。应理解,这些实施例仅用于本发明而不适用于限制本发明的范围。本发明所述的实验方法,若无特殊说明,均为常规方法;所述的生物材料,若无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0045] 实施例1抗猪圆环病毒2型单克隆抗体的制备、纯化、鉴定及检验

[0046] 1.1 PCV2Cap全蛋白的制备、纯化及含量测定

[0047] 根据NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中报道的猪圆环病毒2型PCV2-Nanjing株(登录号为KF524259.1)中Cap全蛋白的基因序列设计引物对Cap-F:5' CATATGATGACGTATCCAAGGAGGC3', Cap-R:5' CTCGAGTTAAGGGTTAAGTGGGGGGT3'。并按李廷栋(李廷栋,轮状病毒结构蛋白在大肠杆菌中的表达及其类病毒颗粒的体外组装,2009)文献的操作方法原核表达PCV2Cap全蛋白,并通过离子交换层析方法进行纯化,使用12%SDS-PAGE进行蛋白电泳鉴定,结果表明:所获蛋白分子量与预期相符。将纯化后的蛋白样品在1×PBS (pH7.4)中透析过夜,透析后样品按照碧云天BCA蛋白定量试剂盒说明书进行定量,结果表明PCV2-Cap全蛋白2的浓度为2mg/mL。

[0048] 1.2单克隆抗体2F8、3G12、3H11的制备和纯化

[0049] 将0.5mL PCV2-Cap全蛋白与等量的弗氏佐剂经充分乳化后免疫与所用骨髓瘤细胞同源的6-8周龄BALB/c健康小鼠2只,每只皮下多点注射乳化后的猪圆环病毒2型Cap全蛋白300μL,间隔2周加强一次,加强免疫使用弗氏不完全佐剂;用间接ELISA法测定其抗血清,血清效价达到1:20000后方可融合。间接ELISA方法包括:包被,以20mmol/L、pH9.6的碳酸盐缓冲液将猪圆环病毒2型Cap全蛋白1:4000V/V稀释,包被96孔聚乙烯板,然后用洗涤液洗涤,拍干后,在4℃下真空抽干,其中聚乙烯板包被规格为200μL/孔,洗涤采用含0.05%的Tween-20磷酸盐缓冲液洗涤3次;封闭,每孔加入pH为7.4内含10% (V/V) 小牛血清的磷酸盐缓冲液200μL,在37℃下封闭2小时,然后洗涤1次;加样,每板设阴性对照、阳性对照及磷酸盐缓冲液空白对照,每孔加入第三次免疫后的第3天的1:5000 (V/V) 稀释后小鼠外周血清50μL,在37℃下孵育1小时,洗涤3次;加二抗,每孔加入酶标羊抗鼠二抗100μL,在37℃下孵育1小时,洗涤3次;显色,每孔加入底物显色液A和底物显色液B的混合液100μL;室温下反应15分钟,然后使用终止液终止反应;比色,以空白调零,经酶标仪在波长450nm处读取光密度

值;结果判断, $P/N = \text{测定标本OD均值} / \text{阴性血清OD均值}$, $P/N \geq 2.1$ 为阳性。

[0050] 分离脾细胞:取未免疫的BALB/c健康小鼠腹腔巨噬细胞,铺96孔培养板,将换液后15小时的Sp2/0细胞调整为 2×10^7 个/毫升细胞悬液,分离免疫的小鼠脾细胞并制成细胞悬液。

[0051] 细胞融合:将处于对数期的Sp2/0骨髓瘤细胞与脾细胞悬液按细胞数10:1比例混合,加入PEG-1500使细胞彼此融合,在两种细胞的混合细胞悬液中,第1分钟滴加4.5mI培养液;间隔2分钟滴加5mI培养液,然后加培养液50mI,以HAT选择培养基按36%的孔为1个细胞/孔进行细胞培养。

[0052] 筛选杂交瘤细胞:待融合的细胞培养至第7天时,即细胞培养至覆盖10%孔底时,吸取96孔培养板的孔中出现克隆细胞簇的培养上清用间接ELISA法检测抗体含量,经有限稀释进行三次亚克隆筛选,依抗体的分泌情况筛选出高效价、高特异性的细胞株,扩大培养,并将高效价、高特异性的细胞株冻存。最终筛选出三株杂交瘤细胞,分别为杂交瘤细胞1、2、3。

[0053] 腹水的制备、纯化:选用BALB/c小鼠或其亲代小鼠,先用液体石蜡对小鼠腹腔注射,两周后将 5×10^5 杂交瘤细胞接种到小鼠腹腔中,在接种一周后收集小鼠的腹水,每只小鼠可收集5mI的腹水,使用AKTA蛋白纯化仪及DE-52离子交换柱将小鼠IgG单克隆抗体腹水纯化。

[0054] 最终获得3株小鼠骨髓杂交瘤细胞2F8、3G12、3H11株,其中小鼠骨髓杂交瘤细胞2F8株的保藏号为CCTCC NO:C2014199,其分泌抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8;小鼠骨髓杂交瘤细胞3G12株的保藏号为CCTCC NO:C2014198,保藏于中国典型培养物保藏中心,其分泌抗猪圆环病毒2型单克隆抗体3G12;小鼠骨髓杂交瘤细胞3H11株分泌抗猪圆环病毒2型单克隆抗体3H11。

[0055] 1.3单克隆抗体2F8、3G12、3H11类型和亚类的鉴定

[0056] 将单克隆抗体的细胞培养上清分别加入包被有抗鼠重链或轻链抗体的酶标板,50 μ I/孔,每个样品加8孔。按照Koenig R. (Koenig R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses (J). Journal of General Virology, 1981, 55 (1): 53-62) 文献中的间接ELISA法,每孔分别加入稀释的HRP-IgM、HRP-IgG1、HRP-IgG2a、HRP-IgG2b和HRP-Ig G3抗体酶标二抗,结果见表1。

[0057] 表1各单克隆抗体类型的鉴定

[0058]

抗体类型	HRP-IgM	HRP-IgG1	HRP-IgG2a	HRP-IgG2b	HRP-IgG3	重链亚型
2F8	—	—	+	—	—	IgG2a

[0059]

3G12	—	—	—	+	—	IgG2b
3H11	—	—	+	—	—	IgG2a

[0060] 注:+表示阳性,—表示阴性。

[0061] 由表1可知,单克隆抗体2F8、3H11的亚类为IgG2a,单克隆抗体3G12的亚类为IgG2b。

[0062] 1.4单克隆抗体2F8、3G12、3H11特异性的鉴定

[0063] 将纯化的单克隆抗体分别加入猪圆环病毒2型PCV2SH株、猪圆环病毒1型PCV1、猪瘟病毒CSFV C株、猪繁殖与呼吸综合征病毒PRRSV JXA1-R株、猪伪狂犬病病毒PRV Bartha K-61株、猪细小病毒PPV WH-1株感染的细胞,固定后,加入FITC标记的羊抗鼠二抗,置荧光显微镜观察。测定单克隆抗体3H11与PCV1、CSFV、PRRSV、PRV、PPV是否具有交叉反应性。结果:单克隆抗体2F8、3G12、3H11与PCV1、CSFV、PRRSV、PRV、PPV接种细胞均未出现特异性荧光,无交叉反应;而与PCV2接种细胞在细胞核及细胞质部位出现特异性荧光着染。表明:这三株单克隆抗体均是抗圆环病毒2型的特异性单克隆抗体。

[0064] 1.5单克隆抗体2F8、3G12亲和力常数Kd的测定

[0065] 按照郭杰标(郭杰标等,以抗体竞争结合抗原测定单抗亲和力常数的研究,南方医科大学学报,2006,26(7):1057-1059)文献中的竞争ELISA方法进行,分别测定单克隆抗体2F8、3G12的OD₄₅₀值以计算各个反应溶液的抗原结合率,并计算亲和力常数。分别计算单克隆抗体2F8、3G12的抗原结合率B/(1-抗原结合率B),然后作图求得斜率(亲和力常数)分别为 $4.10 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ 和 $3.65 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ 。

[0066] 1.6单克隆抗体3H11相对亲和力的测定

[0067] 将制备的单克隆抗体3H11按照宋帅等(宋帅,林彤,邵军军,常惠芸.抗O型口蹄疫病毒单克隆抗体相对亲和力的测定.兽医免疫学,2009,25(4):333-335)中的操作方法测定其相对亲和力。其中抗原的包被浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$,酶标二抗的稀释度为1:10000,测定纯化后的单克隆抗体3H11的相对亲和力。计算结果表明:单克隆抗体3H11的相对亲和力为 7.81ng/mL 。

[0068] 1.7纯化单克隆抗体2F8、3G12、3H11的检验

[0069] 外观检验:室温下,肉眼观察可见纯化的单克隆抗体2F8、3G12、3H11呈无色澄清状态,均未见絮状物沉淀。

[0070] 无菌试验:按二〇一〇年版《中国兽药典》附录42进行检验,结果表明:纯化后单克隆抗体2F8、3G12、3H11均无菌。

[0071] 1.8单克隆抗体2F8、3G12、3H11的纯度

[0072] 对纯化后的单抗进行纯度的检测,使用12% SDS-PAGE蛋白电泳法,每泳道的上样量为 $10 \mu\text{g}$,检测结果表明:单克隆抗体2F8、3G12的纯度均不低于80%,单克隆抗体3H11的纯度不低于90%。

[0073] 1.9单克隆抗体2F8、3G12、3H11效价的测定

[0074] 按照实施例1.2测定单克隆抗体2F8、3G12的ELISA效价,结果分别为1:40000、1:45000。按刘长明等(刘长明,张超范,危艳武.猪圆环病毒2型免疫过氧化物酶单层细胞试验抗体检测试剂盒的研究与应用.中国预防兽医学报,2007,29(8):621-624)的免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)方法进行效价测定,单克隆抗体2F8、3G12、3H11的IPMA效价均不低于1:10240。

[0075] 1.10单克隆抗体2F8、3G12、3H11含量的测定

[0076] 用BCA蛋白定量试剂盒(购自Pierce公司)按照说明书对纯化后单克隆抗体2F8、3G12、3H11分别进行定量分析,测定结果表明:单克隆抗体2F8、3G12、3H11的蛋白含量分别为2.80、3.20、3.25mg/mL。

[0077] 1.11单克隆抗体3H11中和活性的测定

[0078] 将单克隆抗体3H11用PBS作10倍系列稀释,将各稀释度单克隆抗体与200TCID₅₀的PCV2SH株于37℃作用2小时,分别接种长满单层的PK-15细胞,每个稀释度接种3孔,37℃、5%CO₂下培养72小时,试验中设立阳性对照和阴性对照。用IPMA方法检测,每孔选择5个视野,记录每个视野中的阳性细胞数,以相对于未中和的阳性对照,待检孔中阳性细胞数减少大于90%判为有中和能力。以能中和病毒的单克隆抗体的最高稀释倍数作为单抗的中和效价。结果,单克隆抗体3H11中和抗体效价不低于1:10^{4.5}。

[0079] 1.12单克隆抗体3H11可变区序列的测定

[0080] 根据鼠源单克隆抗体的序列特征,设计重链可变区引物序列:

[0081] P1:5'-GTGAAGCTGGTGGAGTCTGG-3'

[0082] P2:5'-TGCAGAGACAGTGACCTGAG-3'

[0083] 设计轻链可变区引物序列:

[0084] P3:5'-TCAGTCTCCAGCCTCCCTAT-3'

[0085] P4:5'-TTGATTTCCAGCTTGGTGCC-3'

[0086] 按照张爱华等(张爱华,闭兰,王志友等.系列鼠抗CD分子单克隆抗体轻、重链可变区基因的克隆和序列分析.中国生物制品学杂志,2001,15(2):65-68)建立的可变区序列测定方法,通过分子克隆技术分别获得单克隆抗体3H11的可变区序列,选取对应的克隆质粒送至苏州金维智生物科技有限公司进行测序。测定单克隆抗体3H11的重链可变区、轻链可变区的基因序列分别如SEQ ID No.1、SEQ ID No.3所示,由其推导的氨基酸序列分别为SEQ ID No.2、SEQ ID No.4。

[0087] 实施例2试剂盒的制备及方法、质量研究及应用

[0088] 2.1试剂盒之胶体金检测试纸条

[0089] 2.1.1试剂盒之胶体金检测试纸条的制备及应用

[0090] 试剂盒包括胶体金检测试纸条、样品处理液(即含2%CHAPS的pH7.4的磷酸盐缓冲液)、样品处理管、样品保存液,样品保存液(即pH7.4的磷酸盐缓冲液)在样品保存瓶中,其中胶体金检测试纸条的制备如下:按照中国CN101614737A建立的胶体金制备方法制备胶体金溶液,并分别标记单克隆抗体PCV2-McAB2(实施例1制备的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体3H11,用pH7.4磷酸盐缓冲液稀释至标记浓度为80μg/ml)、单克隆抗体CSFV-McAB4(抗猪瘟病毒单克隆抗体4E8,标记浓度为150μg/ml)和/或单克隆抗体PRRSV-McAB6(抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体N4D2,标记浓度为160μg/ml),分别包被金标垫。单克隆抗体PCV2-McAB1(实施例1制备的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8,固定包被浓度为60μg/ml)、单克隆抗体CSFV-McAB3(抗猪瘟病毒单克隆抗体G10,用pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释至固定浓度为80μg/ml)和/或单克隆抗体PRRSV-McAB5(抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体B7D3,用pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释至固定浓度为100μg/ml),以及羊抗鼠二抗(即羊抗鼠IgG,购自Sigma公司)喷涂固定在硝酸纤维素膜上分别作为检测线和质控线,将该硝酸纤维素膜和浸润有胶体金标记的单克隆抗体PCV2-McAB2、单克隆抗体CSFV-McAB4和/或单克隆抗体PRRSV-McAB6的金标垫用塑料外壳包装起来,做成胶体金检测试纸条。

[0091] 其中,当检测线固定的单克隆抗体从左到右依次为单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3时作为胶体金检测试纸条1;当检测线固定的单克隆抗体从左到右依次为单克隆抗体PCV2-McAB1、PRRSV-McAB5时作为胶体金检测试纸条2;当检测线固定的单克隆抗体从左到

右依次为单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3、PRRSV-McAB5时作为胶体金检测试纸条3。

[0092] 检测时,将样品与样品处理液混合,将2-3滴(约80 μ l)混合液滴加于胶体金检测试纸条的加样孔处,同时迅速按下缓冲液按钮,静置10分钟后在检测试纸条的检测区观察记录结果。结果判定标准:若质控线显色即试验成立,检测线显色即可判为阳性,检测线不显色即可判为阴性;若质控线未显色即试验不成立,无论检测线是否显色,均则判定为无效结果,需重测。

[0093] 2.1.2胶体金检测试纸条的质量研究

[0094] 灵敏度检验:将病毒含量为 $10^{5.8}$ TCID₅₀/ml的PCV2SH株(参考中国专利CN101240264A)病毒液、病毒含量为 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml的CSFV Shimen株(购自中国兽药监察所)病毒液、病毒含量为 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml的HP-PRRSV JXA1株(参见Kegong Tian,Xiu ling Yu, Tiezhu Zhao,et al.Emergence of Fatal PRRSV Variants:Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark.Plos One,2007,2(6):e526)病毒液分别作10倍系列稀释,稀释度依次为10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴。然后分别用胶体金检测试纸条1、2、3对各病毒进行检测,以确定胶体金检测试纸条1、2、3对各种病毒的检测下限。结果(见表2)表明:胶体金检测试纸条1、2、3对PCV2的检测下限均为 $10^{3.8}$ TCID₅₀/ml,胶体金检测试纸条1、3对CSFV的检测下限均为 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml,胶体金检测试纸条2、3对HP-PRRSV的检测下限均为 $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml。

[0095] 表2胶体金检测试纸条1、2、3灵敏度检验结果

[0096]

PCV2 含量 (TCID ₅₀ /ml)	金 标 1	金 标 2	金 标 3	CSFV 含量 (TCID ₅₀ /ml)	金 标 1	金 标 3	HP-PRRSV 含量 (TCID ₅₀ /ml)	金 标 2	金 标 3
$10^{5.8}$	+	+	+	$10^{6.0}$	+	+	$10^{6.5}$	+	+
$10^{4.8}$	+	+	+	$10^{5.0}$	+	+	$10^{5.5}$	+	+
$10^{3.8}$	+	+	+	$10^{4.0}$	+	+	$10^{4.5}$	+	+
$10^{2.8}$	-	-	-	$10^{3.0}$	+	+	$10^{3.5}$	+	+
$10^{1.8}$	-	-	-	$10^{2.0}$	-	-	$10^{2.5}$	-	-

[0097] 注:金标1、2、3依次表示胶体金检测试纸条1、2、3;“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0098] 特异性测定:用胶体金检测试纸条1、2、3分别检测猪源其它病毒包括猪细小病毒、猪伪狂犬病毒、猪乙型脑炎病毒,结果均为阴性,说明胶体金检测试纸条1、2、3特异性均良好。

[0099] 重复性试验:批内重复性,分别取同批胶体金检测试纸条1、2、3,每批各抽15条,分别检测试纸条上检测线固定单克隆抗体对应的靶标病毒溶液各5次,如胶体金检测试纸条1检测PCV2、CSFV,结果:各相应样品检测均为阳性,且同批试纸条间显色强度一致,表明批内重复性良好。批间重复性,分别取3批胶体金检测试纸条1、2、3,每批试纸条各抽6条,分别检测试纸条上检测线固定单克隆抗体对应的靶标病毒溶液,结果,不同批试纸条间检测结果均为阳性,且显色强度一致,表明批间重复性良好。

[0100] 保存期研究:分别将胶体金检测试纸条1、2、3按照以下要求进行检测,将三个连续批号试纸条分别于37℃放置6天后进行热稳定性试验;将试纸条在室温分别存放6个月、9个月、12个月和15个月,进行试纸条的实时稳定性试验。将试纸条1、2、3分别检测不同稀释度

的PCV2、CSFV、HP-PRRSV病毒液,比较保存前后各试纸条的检测限。结果,胶体金检测试纸条1、2、3保存15个月,试纸条1、2、3分别对PCV2的检测下限均为 $10^{3.8}$ TCID₅₀/ml,对CSFV的检测下限为 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml,对HP-PRRSV的检测下限为 $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml,各试纸条间显色强度一致,表明胶体金检测试纸条1、2、3在37℃条件下保存可贮存6天,在室温条件下保存可贮存15月,表明试纸条的保存期至少均可达12个月。

[0101] 2.1.3样品检测及比对试验

[0102] 将采集的猪圆环病毒2型SH株不同时期采集的猪血清样品、某猪瘟发病场采集的猪扁桃体样品和某高致病性猪繁殖与呼吸综合征发病场感染猪肺脏组织,其中血清样品与样品处理液混合制得10份(样品编号为11-20)后直接检测,组织样品经研磨后,取研磨上清,加样品处理液混合后检测。并用实施例2.1.2的PCV2SH株病毒液、CSFV Shimen株病毒液、HP-PRRSV JXA1株制得三种不同病毒含量的混合液10份(样品编号为1-10)。检测时,将样品处理管盖子头部折断,滴加2-3滴混匀后的样品(约80μl)分别加至实施例2.1.1制备的胶体金检测试纸条1、2、3加样孔中心;10分钟后在胶体金检测试纸条的检测区(即检测线、质控线处)观察,根据结果判定标准记录结果。

[0103] 同时,将20份样品按照中国专利CN102382905A对PCV2、CSFV、HP-PRRSV进行PCR检测,同时分别用PCV2胶体金检测试纸条(作为对比试纸条1,参见中国专利CN1584599A)、CSFV胶体金快速诊断试纸条(作为对比试纸条2,参见杨明.猪瘟C株单克隆抗体制备和猪瘟胶体金快速诊断试纸条的研制.甘肃农业大学硕士学位论文,2009)、HP-PRRSV胶体金试纸条(作为对比试纸条3参见中国专利CN101979512A)进行对比检测,结果见表3-5。

[0104] 表3胶体金检测试纸条1、酶免疫层析检测试纸条1检测及与现有技术比对结果

[0105]

样品	PCV2					CSFV				
	含量 TCID ₅₀ /ml	金标 1	酶免 1	PCR	对比试 纸条 1	含量 TCID ₅₀ /ml	金标 1	酶免 1	PCR	对比试 纸条 2
1	$10^{4.5}$	+	+	+	+	$10^{2.2}$	-	-	+	-
2	$10^{4.2}$	+	+	+	+	$10^{3.0}$	+	+	+	-
3	$10^{4.0}$	+	+	+	-	$10^{2.6}$	-	+	+	-
4	$10^{4.5}$	+	+	+	+	$10^{2.3}$	-	+	+	-
5	$10^{2.5}$	-	+	+	-	$10^{3.8}$	+	+	+	+
6	$10^{3.2}$	+	+	+	-	$10^{3.3}$	+	+	+	-
7	$10^{5.5}$	+	+	+	+	$10^{4.2}$	+	+	+	+

[0106]

8	$10^{3.6}$	+	+	+	-	$10^{1.8}$	-	-	+	-
9	$10^{5.4}$	+	+	+	+	$10^{1.2}$	-	-	-	-
10	$10^{3.8}$	+	+	+	-	$10^{1.6}$	-	-	+	-
11	/	+	+	+	+	/	-	+	+	-
12	/	-	+	+	-	/	-	-	+	-
13	/	+	+	+	-	/	-	+	-	-
14	/	-	-	+	-	/	+	+	+	-
15	/	-	+	+	-	/	-	+	+	-
16	/	+	+	+	-	/	-	-	+	-
17	/	-	-	+	-	/	-	-	+	-
18	/	+	+	+	+	/	-	+	+	-
19	/	-	-	+	-	/	-	-	+	-
20	/	-	+	+	-	/	+	+	+	+

[0107] 表4胶体金检测试纸条2、酶免疫层析检测试纸条2检测及与现有技术比对结果

[0108]

样 品	PCV2					HP-PRRSV				
	含量 TCID ₅₀ /ml	金 标 2	酶免 2	PCR	对比试 纸条 1	含量 TCID ₅₀ /ml	金标 2	酶免 2	PCR	对比试 纸条 3
1	$10^{4.5}$	+	+	+	+	$10^{2.2}$	-	+	+	-
2	$10^{4.2}$	+	+	+	+	$10^{2.0}$	-	-	+	-
3	$10^{4.0}$	+	+	+	+	$10^{2.8}$	-	+	+	+
4	$10^{4.5}$	+	+	+	+	$10^{2.7}$	-	+	+	-
5	$10^{2.5}$	-	+	+	-	$10^{3.9}$	+	+	+	+
6	$10^{3.2}$	+	+	+	-	$10^{3.7}$	+	+	+	-
7	$10^{5.5}$	+	+	+	+	$10^{4.6}$	+	+	+	+
8	$10^{3.6}$	+	+	+	-	$10^{2.6}$	-	+	+	-
9	$10^{5.4}$	+	+	+	+	$10^{2.7}$	-	+	+	-
10	$10^{3.8}$	+	+	+	-	$10^{2.5}$	-	+	+	-
11	/	+	+	+	+	/	-	-	+	-
12	/	-	+	+	-	/	+	+	+	+
13	/	+	+	+	-	/	-	+	+	-
14	/	-	+	+	+	/	+	+	+	+
15	/	-	-	+	+	/	+	+	+	-
16	/	+	+	+	-	/	-	-	+	-
17	/	-	+	+	-	/	-	-	+	-
18	/	+	+	+	-	/	+	+	+	-
19	/	-	+	+	+	/	-	+	+	-
20	/	-	+	+	-	/	-	-	+	-

[0109] 表5胶体金检测试纸条3、酶免疫层析检测试纸条3检测及与现有技术比对结果

[0110]

样	PCV2	CSFV	HP-PRRSV
---	------	------	----------

[0111]

品	含量 TCID ₅₀ /ml	金 标 3	酶 免 3	PC R	对 比 试 纸 条 1	含量 TCID ₅₀ /ml	金 标 3	酶 免 3	PCR	对 比 试 纸 条 2	含量 TCID ₅₀ /ml	金 标 3	酶 免 3	PC R	对 比 试 纸 条 3
1	10 ^{4.5}	+	+	+	+	10 ^{2.2}	-	+	+	-	10 ^{2.2}	-	+	+	-
2	10 ^{4.2}	+	+	+	+	10 ^{3.0}	+	+	+	-	10 ^{2.0}	-	-	+	-
3	10 ^{4.0}	+	+	+	-	10 ^{2.6}	-	+	+	-	10 ^{2.8}	-	+	+	+
4	10 ^{4.5}	+	+	+	+	10 ^{2.3}	-	+	+	-	10 ^{2.7}	-	+	+	-
5	10 ^{2.5}	-	+	+	-	10 ^{3.8}	+	+	+	+	10 ^{3.9}	+	+	+	+
6	10 ^{3.2}	-	+	+	-	10 ^{3.5}	+	+	+	-	10 ^{3.7}	+	+	+	+
7	10 ^{5.5}	+	+	+	+	10 ^{4.2}	+	+	+	-	10 ^{4.6}	+	+	+	+
8	10 ^{3.6}	+	+	+	+	10 ^{1.8}	-	+	+	-	10 ^{2.6}	-	+	+	-
9	10 ^{5.4}	+	+	+	+	10 ^{1.2}	-	-	-	-	10 ^{2.7}	-	+	+	-
10	10 ^{3.8}	+	+	+	-	10 ^{1.6}	-	+	+	-	10 ^{2.5}	-	+	+	-
11	/	-	-	+	-	/	-	+	+	-	/	-	+	+	-
12	/	-	+	+	-	/	-	+	+	-	/	+	+	+	+
13	/	-	+	+	-	/	-	-	+	-	/	-	-	+	-
14	/	-	-	+	-	/	-	+	+	-	/	+	+	+	+
15	/	-	+	+	-	/	-	+	+	-	/	-	+	+	-
16	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+	/	-	-	+	+
17	/	-	+	+	-	/	-	-	+	-	/	-	-	+	-
18	/	-	+	+	-	/	-	+	+	-	/	+	+	+	-
19	/	-	-	+	-	/	-	+	+	+	/	-	+	+	-
20	/	-	+	+	-	/	+	-	+	+	/	-	-	+	-

[0112] 注：“+”表示检测结果为阳性，“-”表示检测结果为阴性，“/”表示临床样品的未知浓度；金标1、2、3依次表示胶体金检测试纸条1、2、3，酶免1、2、3依次表示酶免疫层析检测试纸条1、2、3。

[0113] 由表3可知：胶体金检测试纸条1可同时检测PCV2、CSFV两种病毒。通过检测不同病毒滴度的PCV2样品，PCR最低检测限为10^{2.5}TCID₅₀/ml，胶体金试纸条检测10^{3.2}TCID₅₀/ml样品为阳性，用胶体金试纸条1检测临床样品，检出率为4/10；用PCR检测不同病毒滴度的CSFV样品，PCR最低检测限为10^{1.6}TCID₅₀/ml，胶体金试纸条检测10^{3.0}TCID₅₀/ml样品为阳性，用胶体金试纸条1检测临床样品，检出率为6/10。

[0114] 由表4可知：胶体金检测试纸条2可同时检测PCV2、HP-PRRSV两种病毒，并且胶体金检测试纸条2检测PCV2的结果与胶体金检测试纸条1的结果相当；检测不同滴度的PRRSV病毒，PCR检测限为10^{2.0}TCID₅₀/ml，胶体金试纸条2检测10^{3.7}TCID₅₀/ml为阳性，检测临床样品，4/10为阳性。

[0115] 由表5可知：胶体金检测试纸条3可同时检测PCV2、CSFV、HP-PRRSV三种病毒，并且胶体金检测试纸条3检测PCV2的结果与胶体金检测试纸条1、2的结果相当；胶体金检测试纸条3检测CSFV的结果与胶体金检测试纸条1的结果相当；胶体金检测试纸条3检测HP-PRRSV的结果与胶体金检测试纸条2的结果相当。

[0116] 2.2试剂盒之酶免疫层析检测试纸条的制备及应用

[0117] 2.2.1试剂盒之酶免疫层析检测试纸条的制备

[0118] 试剂盒包括酶免疫层析检测试纸条、样品处理液(即含2%CHAPS的pH7.4的磷酸盐缓冲液)、样品处理管、样品保存液,样品保存液(即pH7.4的磷酸盐缓冲液)在样品保存瓶中,其中酶免疫层析检测试纸条的制备如下:按照中国CN104062430A制备酶免疫层析检测试纸条,先将单克隆抗体PCV2-McAB2(实施例1制备的猪圆环病毒2型单克隆抗体3H11,用pH7.4磷酸盐缓冲液稀释至标记浓度为80 μ g/ml)、单克隆抗体CSFV-McAB4(抗猪瘟病毒单克隆抗体4E8,标记浓度为150 μ g/ml)、单克隆抗体PRRSV-McAB6(抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体N4D2,标记浓度为160 μ g/ml)分别用辣根过氧化物酶HRP进行标记,将单克隆抗体PCV2-McAB1(实施例1制备的抗猪圆环病毒2型单克隆抗体2F8,固定包被浓度为60 μ g/ml)、单克隆抗体CSFV-McAB3(抗猪瘟病毒单克隆抗体G10,用pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释至固定浓度为80 μ g/ml)和/或单克隆抗体PRRSV-McAB5(抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征单克隆抗体B7D3,用pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释至固定浓度为100 μ g/ml),以及羊抗鼠二抗(即羊抗鼠IgG,购自Sigma公司)喷涂固定在硝酸纤维素膜上分别作为检测线和质控线,将该硝酸纤维素膜和浸润有酶标记的单克隆抗体PCV2-McAB2、单克隆抗体CSFV-McAB4和/或单克隆抗体PRRSV-McAB6的酶标垫用塑料外壳包装起来,做成酶免疫层析检测试纸条。

[0119] 其中,当检测线固定的单克隆抗体从左到右依次为单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3时作为酶联免疫检测试纸条1,如图2A所示;当检测线固定的单克隆抗体从左到右依次为单克隆抗体PCV2-McAB1、PRRSV-McAB5时作为酶联免疫检测试纸条2,如图2A所示;当检测线固定的单克隆抗体从左到右依次为单克隆抗体PCV2-McAB1、CSFV-McAB3、PRRSV-McAB5时作为酶联免疫检测试纸条3,如图2B所示。

[0120] 检测时,将样品与样品处理液混合,将2-3滴(约80 μ l)混合液滴加于酶联免疫检测试纸条的加样孔处,同时迅速按下缓冲液按钮,静置30分钟后在检测试纸条的检测区观察记录结果。结果判定标准:质控线显色即试验成立,检测线显色即可判为阳性,检测线不显色即可判为阴性;质控线未显色则试验不成立,判定为无效结果,需重测。

[0121] 2.2.2酶免疫层析检测试纸条的质量研究

[0122] 灵敏度检验:将实施例2.1制备的分别含PCV2SH株病毒液、含CSFV Shimen株病毒液、含HP-PRRSV JXA1株病毒液不同浓度病毒溶液的混合溶液,然后分别用酶免疫层析检测试纸条进行检测,分别确定酶免疫层析检测试纸条1、2、3对各种病毒液的检测下限。结果(见表6),酶免疫层析检测试纸条1、2、3对PCV2的检测下限均为 $10^{2.8}$ TCID₅₀/ml;酶免疫层析检测试纸条1、3对CSFV的检测下限均为 $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml;酶免疫层析检测试纸条2、3对HP-PRRSV的检测下限均为 $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml。

[0123] 表6酶免疫层检测试纸条灵敏度检验结果

[0124]

PCV2 含量 (TCID ₅₀ /ml)	酶 标 1	酶 标 2	酶 标 3	CSFV 含量 (TCID ₅₀ /ml)	酶 标 1	酶 标 3	HP-PRRSV 含量 (TCID ₅₀ /ml)	酶 标 2	酶 标 3
10 ^{5.8}	+	+	+	10 ^{6.0}	+	+	10 ^{6.5}	+	+
10 ^{4.8}	+	+	+	10 ^{5.0}	+	+	10 ^{5.5}	+	+
10 ^{3.8}	+	+	+	10 ^{4.0}	+	+	10 ^{4.5}	+	+
10 ^{2.8}	+	+	+	10 ^{3.0}	+	+	10 ^{3.5}	+	+
10 ^{1.8}	-	-	-	10 ^{2.0}	+	+	10 ^{2.5}	+	+

[0125] 注:酶免1、2、3依次表示酶免疫层析检测试纸条1、2、3;“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0126] 特异性测定:用酶免疫层析检测试纸条1、2、3分别检测猪源其它病毒包括猪细小病毒、猪伪狂犬病毒、猪乙型脑炎病毒,结果均为阴性,说明酶免疫层析检测试纸条1、2、3特异性均良好。

[0127] 重复性试验:批内重复性,分别取同批酶免疫层析检测试纸条1、2、3,每批各抽15条,分别检测试纸条上检测线固定单克隆抗体对应的靶标病毒溶液3份,每份各检测5次,如酶免疫层析检测试纸条1检测PCV2、CSFV,结果:各不同浓度样品检测均为阳性,且同批试纸条间显色强度一致,表明批内重复性良好。批间重复性,分别取3批酶免疫层析检测试纸条1、2、3,每批试纸条各抽6条,分别检测试纸条上检测线固定单克隆抗体对应的靶标病毒溶液,结果,不同批试纸条间检测结果均为阳性,且显色强度一致,表明批间重复性良好。

[0128] 保存期研究:分别将酶免疫层析检测试纸条1、2、3按照以下要求进行检测,将三个连续批号试纸条分别于37℃放置6天后进行热稳定性试验;将试纸条在2~8℃分别存放6个月、9个月、12个月和15个月,进行试纸条的实时稳定性试验。将试纸条分别检测不同稀释度的PCV2、CSFV、HP-PRRSV病毒液,比较保存前后各试纸条的检测限,结果,试纸条于37℃保存6天,2~8℃保存15个月,试纸条对PCV2的检测下限均为10^{2.8}TCID₅₀/ml,对CSFV的检测下限均为10^{2.0}TCID₅₀/ml,对HP-PRRSV的检测下限均为10^{2.5}TCID₅₀/ml,各试纸条间显色强度一致,表明酶免疫层析检测试纸条1、2、3在37℃条件下保存可贮存6天,在2~8℃规定条件下保存可贮存15月,表明试纸条的保存期至少均可达12个月。

[0129] 2.2.3样品检测及比对试验

[0130] 将2~3滴(约80μl)实施例2.1制备的30份样品滴加于酶免疫层析检测试纸条的加样孔处,同时迅速按下缓冲液按钮,静置30分钟后在酶免试纸条的检测区观察,根据结果判定标准记录各检测结果,结果见表3-5。

[0131] 由表3可知:酶免疫层析检测试纸条1可同时检测PCV2、CSFV两种病毒,并且酶免疫层析检测试纸条1检测PCV2的检测结果优于胶体金检测试纸条1、2、3的和对比试纸条1;酶免疫层析检测试纸条1检测CSFV的检测结果优于胶体金检测试纸条1、3和对比试纸条2的。

[0132] 由表4可知:酶免疫层析检测试纸条2可同时检测PCV2、HP-PRRSV两种病毒,并且酶免疫层析检测试纸条2检测PCV2的结果与酶免疫层析检测试纸条1的结果相当,且优于胶体金检测试纸条1、2、3及对比试纸条1;酶免疫层析试纸条2检测HP-PRRSV的灵敏度优于胶体金检测试纸条2、3和对比试纸条3。

[0133] 由表5可知:酶免疫层析检测试纸条3可同时检测PCV2、CSFV、HP-PRRSV三种病毒,

并且酶免疫层析检测试纸条3检测PCV2的结果与酶免疫层析检测试纸条1、2的结果相当,优于胶体金检测试纸条1、2、3的;检测CSFV的结果与酶免疫层析检测试纸条1的结果相当,优于胶体金检测试纸条1、3及对比试纸条2的;检测HP-PRRSV的结果与酶免疫层析检测试纸条2的结果相当,优于胶体金检测试纸条2、3及对比试纸条3的。

[0134] 综上所述,本发明制备的胶体金检测试纸条、酶免疫层析检测试纸条可同时检测两种或三种病毒;并且所制备的试纸条同时检测两种或三种病毒时所检测各病毒的灵敏度高于单独检测时的灵敏度,推测是由于多种单克隆抗体混合使用具有协同效应。

[0135] 以上所述仅为本发明的具体实施例,本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案的范围内,当可利用上述揭示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

<110> 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司

<120> 一种检测试剂盒及其应用

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<400> 1

[0001] gaagtgaagc tggaggagtc tgggggaggt ttagtgaagc ctggagggtc ccggaaactc 60
tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagagaaga ggctggagtg ggttgcaacc attagtagtg gtgtagtgc catctactat 180
ccagacacag tgaaggtccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaggatgg 300
gacgggacct gggttgcctt ctggggccaa gggactcagg tcaactgttc tgca 354

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<400> 2

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0003] Arg Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

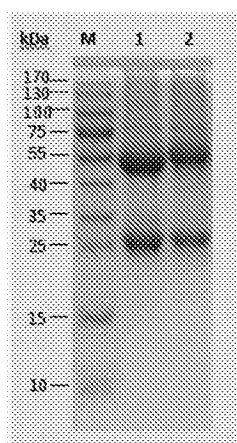


图1

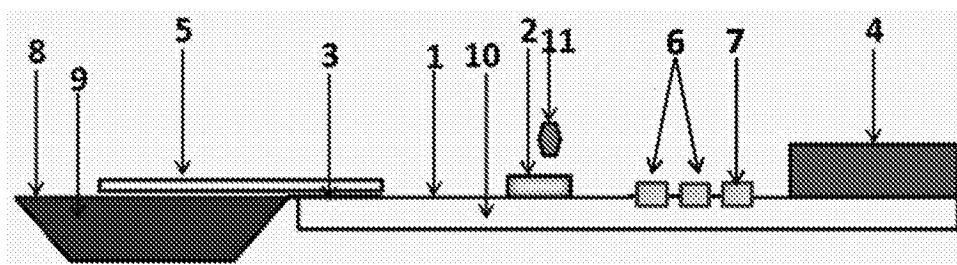


图2A

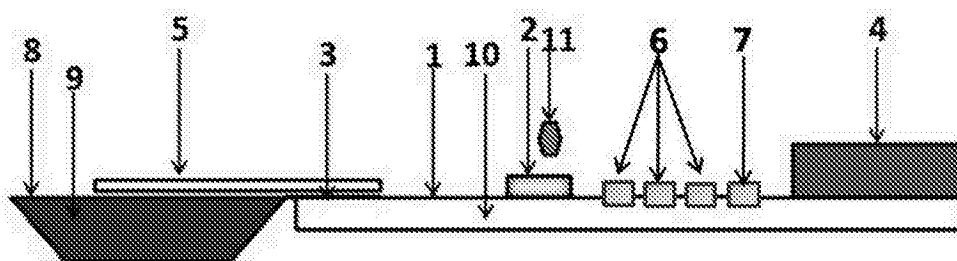


图2B

专利名称(译)	一种检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105675873B	公开(公告)日	2017-11-10
申请号	CN201610002984.6	申请日	2016-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
[标]发明人	田克恭 韩水仲		
发明人	田克恭 韩水仲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/531 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/577		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN105675873A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了含两个抗猪圆环病毒2型单克隆抗体、两个抗猪瘟病毒单克隆抗体和/或两个抗高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体的检测试剂盒，该试剂盒可用于非诊断目的猪圆环病毒2型抗原、猪瘟病毒抗原和/或高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原同时检测中的应用，并且同时检测两种或三种病毒的试剂盒的检测灵敏度高于单独检测病毒的，避免了假阳性结果。

