[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/53
G01N 33/535 G01N 33/573
G01N 33/569

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03113002. X

[43] 公开日 2003 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 1437023A

[22] 申请日 2003.3.20 [21] 申请号 03113002. X
[71] 申请人 扬州大学
地址 225009 江苏省扬州市文汇路 27 号
[72] 发明人 秦爱建 叶建强 刘岳龙 金文杰
[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所
代理人 胡锡瑜

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 禽白血病病毒 J 亚群诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明属于禽病毒检测诊断技术领域。J 亚群禽白血病病毒(ALV－J)是 90 年代鉴定出的一个新的禽白血病病毒亚群，是肉鸡髓细胞瘤(ML)的病原。本发明用 PCR 方法扩增出 ALV－J 囊膜蛋白 env 基因，并进行克隆，然后用昆虫杆状病毒表达系统表达 ALV－J env 基因产物，以此重组基因产物作为免疫源免疫 BALB/C 小鼠，研制出特异性单克隆抗体。再以单克隆抗体研制出了独特酶联免疫试验检测试剂盒，以其检测感染鸡血清、脏器及羽囊中抗原抗体复合物，判定是否感染 ALV－J。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1．一种禽白血病病毒J亚群诊断试剂盒，其特征在于应用群特异性单克隆抗体制备检测ALV-J ELISA试剂盒；

2．一种禽白血病病毒J亚群诊断试剂盒的制备方法，其特征在于应用ALV-J特异性单克隆抗体作包被抗体制备检测ALV-J ELISA试剂盒；

3．一种禽白血病病毒J亚群诊断试纸，其特征在于应用群特异性单克隆抗体制备检测ALV-J检测试纸；

4．一种禽白血病病毒J亚群诊断试纸的制备方法，其特征在于其特征在于应用ALV-J特异性单克隆抗体作包被抗体制备检测ALV-J 检测试纸；

5．根据权利要求1或权利要求3所述禽白血病病毒J亚群诊断试剂盒或试纸的应用，其特征在于可以检测感染鸡血清、脏器及羽囊中的ALV-J抗原。

禽白血病病毒 J 亚群诊断试剂盒

一、 技术领域

本发明属于禽病毒检测诊断技术领域。

二、 背景技术

J 亚群禽白血病病毒（ALV-J）是 90 年代鉴定出的一个新的禽白血病病毒亚群（Payne 1991）；是肉鸡髓细胞瘤（ML）的病原。十多年来，该病毒已迅速蔓延到许多国家，在英国（Payne 1991）、美国（Benson1998）、非洲（Aly 2000）、中美洲（Neumann 2000）、南美洲（Buscaglia2000）、澳大利亚（Bagust2000）、欧洲（Dren2000）、中国（秦爱建 1999、2002）等国家地区都有相关病毒感染报道，使养鸡业面临一个严重的问题。目前对该病的诊断有直接 ELISA、抗体检测、PCR 和病毒分离等方法。直接 ELISA 检测的是病毒上的 gp27 蛋白，而 gp27 蛋白在外源性和内原性病毒中均存在。故直接 ELISA 不能直接区别病毒亚群。在 ALV-J 抗体检测中，目前国外有二个商品化的抗体诊断试剂盒，均以昆虫细胞表达产物为基础，但检测结果不尽相同，且鸡群中 10%的阳性率被认为是正常的背景。故抗体阳性也不能告诉我们鸡群是否感染 ALV-J 病毒。PCR 虽然具有较强的灵敏度，但是决定 ALV-J 亚群特异性的 env-gp85 基因变异迅速，而且 env 基因与在所有鸡系中都存在的内原性 EAV-HP 序列有 75-97%的同源性（Smith1999），故 PCR 常导致假阳性。病毒分离是诊断 ALV-J 的最经典、最可靠的方法，但是这种方法费时、费力、费钱；很繁琐，不易推广，不适合于田间大规模样品检测。

ALV-J 是反转录病毒，其前病毒基因组 DNA 可整合到宿主细胞，与宿主细胞长期共存；而且 ALV-J 病毒既可水平传播，又可垂直传播。故 ALV-J 病毒在鸡体内引起持续性感染，鸡体产生的抗原抗体复合物，不象正常情况很快被血液中巨噬细胞和枯否细胞等构成的免疫系统清除掉，抗原抗体复合物可在血液中循环，并可在肾、肺、皮肤、关节或血管等组织中沉积，引起炎症，组织损伤。 因此，检测 ALV-J 病毒抗原抗体复合物可以反应鸡体 ALV-J 的感染情况，是一种有效的诊断方法。

三、 发明内容：

本发明的目的是利用酶联免疫吸附试验检测诊断鸡 ALV-J 的感染，应用于进

出口种鸡的检验检疫，兽医站疾病的诊断，种鸡场 ALV-J 的检测与该病的根除等。

本发明的技术方案是：应用群特异性单克隆抗体制备检测 ALV-JELISA 试剂盒或试纸。其制备方法为应用 ALV-J 特异性单克隆抗体作包被抗体制备检测 ALV-J 试剂盒或试纸。具体步骤为：

1. ALV-J 病毒的分离鉴定：采用鸡胚成纤维细胞分离培养，并通过免疫荧光技术鉴定。
2. 用 PCR 方法扩增 ALV-J 囊膜蛋白 env 基因，并进行克隆。
3. 用昆虫杆状病毒表达系统表达 ALV-J env 基因产物。
4. 以重组基因产物作为免疫源免疫 BALB/C 小鼠，研制特异性单克隆抗体。
5. 以单克隆抗体建立独特酶联免疫试验检测试剂盒或检测试纸。
6. 检测试剂盒或检测试纸检测感染鸡血清、脏器及羽囊中抗原抗体复合物。
7. 抗原抗体复合物阳性者判定为 ALV-J 感染。

本发明的效果：

利用该试剂盒检或检测试纸测血清、脏器、羽囊等样本中 ALV-J 的存在情况，其特异性强、灵敏性高、检测速度快、成本低廉。检出率达 100%，比用细胞分离鉴定病毒快 6-7 天，与病毒分离和 PCR 检测结果的符合率大于 90%。

四、具体实施方式

方式 1.

1. 抗 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9 包被 96 孔聚苯乙烯酶标板：

用 0.02M pH9.6 的碳酸盐缓冲液将单克隆抗体稀释为 3.25ug/ml, 包被 96 孔聚苯乙烯酶标板, 每孔 100ul，37℃温浴 4hr；洗液（含 0.05%Tween-20 的 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液）洗涤 3 遍。

2. 抗体包被孔聚苯乙烯酶标板的封闭：

用封闭液（含 50mM 甘氨酸的 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液）于 37℃下封闭 1hr；洗液洗涤 3 遍干燥后即为反应板，置 4℃或-20℃备用。

3. 样品处理：

1) 血清样品 1：40 稀释（稀释液为 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液，即 PBS。）后直接作为加样稀释液。

2) 内脏样品包括肝、脾、肾、胸腺等，处理如下：取 0.10g 内脏于 400 ul PBS 中碾磨后, 10000rpm 离心 5min, 取上清 1:10 稀释后直接作为加样稀释液。

3) 羽囊样品处理如下：0.10g 羽囊于 400 ul PBS 中碾磨后, 10000rpm 离心 5min, 取上清 1:5 稀释后作为加样稀释液。

4. ELISA 检测操作步骤：

1) 将被待检样本加入包被有 ALV-J 特异性的单克隆抗体的 96 孔聚苯乙烯酶标板，每孔 100ul，每个样加 2 孔，并设阳性样本、正常样本和空白对照；置 37℃45min 后，用洗液洗涤 3 遍；

2) 每孔加酶标抗体（工作浓度）100ul；置 37℃45min，用洗液洗涤 5 遍；

3) 每孔加底物显色液 100ul，室温避光显色 30min 后，每孔加 100ul 的终止液；

4) 用酶标仪测定每孔的 OD490 值，OD490 值超过 0.20，且 P/N≥2.1 者判为阳性, 否则为阴性。

方式 2

1. 抗 ALV-J 特异性单克隆抗体 JE9 包被硝酸纤维素纸片：

将单克隆抗体 JE9 作适当稀释，直接点加硝酸纤维素纸片上；自然干燥后，洗液洗涤 3 遍。

2. 非特异性封闭：

将点加单克隆抗体的硝酸纤维素纸片，再以封闭液于 37℃下封闭 60min；洗液洗涤 3 遍，自然干燥后 4℃保存。

3. 样品处理：

同试验方式 1

4. 检测操作步骤：

1) 将上述硝酸纤维素纸片放入待检样本中，置 37℃30min 后，用洗液洗涤 3 遍；

2) 将洗涤后的硝酸纤维素纸片放入金标记抗体溶液中；置 37℃30min，用洗液洗涤 5 遍；

3) 出现条带的为阳性，否则为阴性。

附试剂配方

1 稀释液：磷酸盐缓冲液 PBS(pH:7.2)

Nacl	8g
$Na_2HPO_4$12H2O	2.9g
KH_2PO4	0.2g
Kcl	0.2g
双蒸水	1000ml

2 封闭液

脱脂乳	10g
PBS(pH:7.2)	100ml

3 洗涤液

Tween-20	0.5ml
PBS(pH:7.2)	999.5ml

4 酶标抗体使用液

HRP 标记的兔抗鸡 IgG 抗体	4ul
PBS(pH:7.2)	10ml

5 底物显色液

0.1M 的柠檬酸($C_6H_6O_7.H_20$ 10.5g，双蒸水 500ml)	4.86ml
0.2M 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 . $12H_2O$ 71.6g，双蒸水 1000ml)	5.14ml
邻苯二胺	4mg
H_2O_2	100ul

6 2M 的硫酸溶液

98%浓 H_2SO_4	21.7ml
双蒸水	178.3ml

patsnap

专利名称(译)	禽白血病病毒J亚群诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN1437023A	公开(公告)日	2003-08-20
申请号	CN03113002.X	申请日	2003-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	秦爱建 叶建强 刘岳龙 金文杰		
发明人	秦爱建 叶建强 刘岳龙 金文杰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/573		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于禽病毒检测诊断技术领域。J亚群禽白血病病毒(ALV - J)是90年代鉴定出的一个新的禽白血病病毒亚群，是肉鸡髓细胞瘤(ML)的病原。本发明用PCR方法扩增出ALV - J囊膜蛋白env基因，并进行克隆，然后用昆虫杆状病毒表达系统表达ALV - J env基因产物，以此重组基因产物作为免疫源免疫BALB/C小鼠，研制出特异性单克隆抗体。再以单克隆抗体研制出了独特酶联免疫试验检测试剂盒，以其检测感染鸡血清、脏器及羽囊中抗原抗体复合物，判定是否感染ALV - J。