

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710113039.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101408542A

[22] 申请日 2007.10.9

[21] 申请号 200710113039.4

[71] 申请人 张平仄

地址 233100 安徽省凤阳县府城镇东华路1
号安徽科技学院

共同申请人 张训海

[72] 发明人 张平仄 张训海

[74] 专利代理机构 蚌埠鼎力专利商标事务所有限
公司
代理人 倪波

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法

[57] 摘要

本发明公开一种诊断鸡马立克氏病毒感染的琼扩检测抗原的制备方法，涉及禽病检测试剂领域，首先通过对目的病毒抗原进行分离效果的实验评价，进而从不同切割分子量的超滤膜元件中筛选出其透过型滤膜元件和截留型滤膜元件；然后以筛选出的透过型滤膜元件和截留型滤膜元件分别对含有目的病毒抗原的料液进行纯化与浓缩处理；最后通过对该纯化浓缩液进行检测与定量，即为制备的鸡马立克氏病毒感染琼扩检测抗原；由于超滤处理过程中毋须添加任何试剂，因此，在生产过程中不仅不会产生二次污染或新的污染，而且是对排放液实际上又作了进一步的净化处理而降低了对环境的污染，并提高了资源利用率，真正实现了变废为宝的目的，本发明还具有无相态变化、条件温和、操作简便、成本低廉、回收率高等优点。

1、鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法，其特征在于：首先通过对目的病毒抗原进行分离效果的实验评价，进而从不同切割分子量的超滤膜元件中筛选出其透过型滤膜元件和截留型滤膜元件；然后以透过型滤膜元件和截留型滤膜元件分别对含有目的病毒抗原的料液进行纯化与浓缩处理；最后通过对该纯化浓缩液进行检测与定量，即确定为鸡马立克氏病毒感染琼扩检测抗原。

2、根据权利要求1所述的鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法，其特征在于：所述超滤膜元件筛选的具体操作步骤如下：

a.取没有污染的已知的马立克氏病检测抗原液或含有目的病毒抗原的马立克氏病疫苗培养液，使其温度调控至工作室的温度，并按超滤膜元件的运行要求，开启安装有超滤膜元件的超滤设备；

b.待超滤的透过液减少至无法运行时或料液浓缩达到设计的倍数时，暂停运行，对透过液进行取样；

c.加入不少于设备容量或浓缩液3倍的纯水，以进行循环冲洗后，继续运行到上述b的状态，重复该步骤2-3次后，可暂停运行，对浓缩液进行取样；

d.按照所装超滤膜元件使用与保养的要求，进行纯水物理清洗、化学清洗与保养液的灌注，终止设备运行，拆下超滤膜元件并进行湿态密封保存；

e.按a、b、c、d步骤，对已获得的不同切割分子量的超滤膜元件分别进行实验，将收集的各透过液样品与浓缩液样品，采用琼脂扩散试验等免疫学检测技术或SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳等检测分析技术进行评价分析；

以目的病毒蛋白抗原有效通过的最小切割分子量的超滤膜元件，作为目的病毒蛋白抗原的最佳透过型滤膜元件；以目的病毒蛋白抗原有效截留的最大切割分子量的超滤膜元件，作为目的病毒蛋白抗原截留的最佳截留型滤膜元件。

3、根据权利要求1所述的鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法，其特征在于：所述马立克氏病疫苗培养液纯化与浓缩的具体操作如下：

a.参照权利要求2中a、b、c、d的操作程序，以透过型滤膜元件对原料液进行超滤，收集其所有的透过液；

b.参照权利要求 2 中 a、b、c、d 的操作程序，再以截留型滤膜元件对上述的透过液进行超滤处理，收集其截留液，即是所需要的目的病毒抗原的提纯浓缩液；

4、根据权利要求 1 所述的鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法，其特征在于：所述鸡马立克氏病毒感染琼扩检测抗原的标定是指采用琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等免疫学检测技术和/或 SDS-PAGE 等电泳检测分析技术，对超滤提纯浓缩液进行检测与定量，其病毒抗原琼扩效价达到 1:2~8 或其进行 1:160 倍以上的稀释后目的病毒抗原条带仍能够为 SDS-PAGE 清晰检出，即可用作鸡马立克氏病强毒感染临床诊断使用的 MDV 琼扩检测抗原。

鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法

技术领域：

本发明涉及禽病检测试剂领域，尤其是鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法。

背景技术：

马立克氏病（MD）是世界上首例通过疫苗控制的备受兽医界、医学界和生物界关注的致瘤性和免疫抑制性传染病，其病原为马立克氏疱疹病毒（MDV）。MDV 是细胞结合性病毒，其有三个血清型，从温和型到毒力很强的致瘤株以及它们的致弱株，均归为血清 1 型 MDV，天然不致瘤的病毒株为血清 2 型，火鸡疱疹病毒（HVT）属于血清 3 型；三个血清型中只有血清 1 型中的强毒株对鸡有致瘤或致病性。由于该病严重损害鸡免疫系统，除本身可招致长达数月及累计高达 70%以上的致死率外，该其间，常导致各种“鸡瘟”疫苗的免疫失败或继发感染而造成重大损失。鉴于 MDV 污染严重，毒力不断增强，加之 MD 致瘤潜伏期长和隐蔽性极强，即使免疫后也不能阻断其侵入与传播，因此，MDV 强毒污染监测不仅是 MD 防制的源头，也是确保其它禽用疫苗免疫效果的前提和评价养禽生物安全状况有效方法。

检测鸡群 MDV 强毒感染的方法有多种，如病毒的分离与鉴定、血清学检查及 MDV 特异 DNA 的检测等。MDV 的分离与鉴定，虽有其特别的用途，但其分离的难度较大，易受污染的影响且费时，故不适于常规检测和流行病学调查。MDV 分子水平的特异性检测，如核酸探针和聚合酶链反应（PCR），虽然由于其特异性强、敏感性高等优点已成功地用于 MDV 的检测，但其严格的物质技术条件限制和高昂的检测费用，因而难以推广和普及。

鸡 MDV 强毒感染的血清学检查，特别是琼脂凝胶免疫扩散试验即简称为琼扩试验，因特异、敏感、简便、直观和可重复性强及检测费用相对低廉而广泛应用（NY/T 905-2004）。其主要是用标准 MDV 阳性抗原和 MDV 阳性抗体，来检测鸡群体内有无明显反应性的 MDV 抗体和/或 MDV 抗原，从而得出鸡群是否有 MDV 强毒的感染或污染。目前，国内外制备的 MDV 阳性琼扩抗原，主要是源于 MDV 强毒细胞培养后的感染细胞及其培养液，或是源于

MDV 强毒感染阳性鸡羽毛囊及皮肤，或可能源于 MDV 的 A 抗原基因（gC）的原核或真核表达产物。这种方法进行生产的主要缺点是都需要有细胞生长的条件与 MDV 强毒增殖的过程，或含目的抗原基因的原核或真核表达条件与过程等，从而才能在感染细胞中产生出 MDV 的病毒性抗原。同时，由于是 MDV 强毒的增殖，前两种制备方法始终存在着散毒的危险性，后者也须有一定生产工艺的要求，均必须对其生产过程进行严格的生物安全控制，因而进一步增加了生产成本。

由于 MDV 所产生的抗原成分十分复杂，为减少非目的蛋白抗原成分的干扰，提高目的蛋白抗原试剂的质量，对 MDV 感染细胞的抽提物、或感染细胞上清或工程表达液中的目的蛋白抗原进行分离纯化是基本的要求。利用免疫沉淀方法可从 MDV 的感染细胞抽提物中已鉴定出多达 46 种病毒特异性多肽，其中，通过琼扩试验能够鉴定出 3 个主要 MDV 抗原，并分别命名为 MDV A 抗原、B 抗原和 C 抗原。A 抗原由于大量表达而成为琼扩试验最易检出的 MDV 抗原。A 抗原是一种可溶性糖蛋白，其为分子量 57~65KD，由 gC 基因所编码，也称之为 MDV gC 抗原。A 抗原存在于感染细胞的表面和细胞浆内，且能从感染细胞中分泌出来，因此，在感染鸡的羽毛囊（羽囊液）及皮肤、血清以及感染细胞及感染细胞上清中也都能够检测出来。MDV gC 抗原与单纯疱疹病毒（HSV）gC 同源，并与火鸡疱疹病毒（HVT）的 gC 有很强的交叉反应。

目前，MDV 阳性琼扩抗原主要有以下二种制备方法。一种是源于 MDV 强毒的感染细胞或感染鸡羽毛囊及皮肤的 MDV 阳性琼扩抗原制备方法，即收集 MDV 强毒的感染细胞或富含羽液的阳性鸡羽毛根或羽毛囊及皮肤，加入适量的常规缓冲液（若是病毒感染细胞物，也可留适量的培养液来代替缓冲液），经反复冻融与浸提或进行裂解后，提取其水溶物即可用作 MDV 阳性琼扩抗原。另一种是源于 MDV 强毒感染细胞的上清液或 MDV A 抗原基因（gC）的表达产物的 MDV 阳性琼扩抗原制备方法，则采用盐析沉淀法进行制备（可采用离心除杂的前处理），即：取该上清液，通过一定的程序与方法加入特定的化学试剂如硫酸铵或其饱和溶液等，离心收集其目的沉淀物，再加入适量的溶液进行溶解或脱盐后，也可用作 MDV 阳性琼扩抗原。

除此之外，MDV 琼扩抗原其它制备方法尚未见报道。

发明内容：

本发明的目的在于提供一种鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法，该制备方法采用含有目的病毒抗原的马立克氏病疫苗培养液为原料，通过无相变的简便物理分离纯化法进行制备，不仅免除了 MDV 增殖过程，制备工艺极为简单，而且在抗原制备过程中不会产生污染与散毒，并且变废为宝。

为实现本发明目的所采取的技术方案是：首先通过对目的病毒抗原进行分离效果的实验评价，进而从不同切割分子量的超滤膜元件中筛选出其透过型滤膜元件和截留型滤膜元件；然后以透过型滤膜元件和截留型滤膜元件分别对含有目的病毒抗原的料液进行纯化与浓缩处理；最后通过对该纯化浓缩液进行免疫学和/或电泳检测分析技术的检测与定量，即确定为鸡马立克氏病毒感染琼扩检测抗原。

更具体的操作步骤如下：

(1) 不同超滤膜元件对 MDV 琼扩检测抗原分离效果的评价与筛选：

a. 取没有污染的已知的马立克氏病琼扩检测抗原液或含有目的病毒抗原的马立克氏病疫苗培养液，使其温度调控至工作室的温度，并按超滤膜元件的运行要求，开启安装有超滤膜元件的超滤设备；

b. 待超滤的透过液减少至无法运行时或料液浓缩达到设计的倍数时，暂停运行，对透过液进行取样；

c. 加入不少于设备容量或浓缩液 3 倍量的纯水或缓冲液，以进行循环冲洗后，继续运行到上述 b 的状态，重复该步骤 2-3 次后，可暂停运行，对浓缩液进行取样；

d. 按照所装超滤膜元件使用与保养的要求，进行纯水物理清洗、化学清洗与保养液的灌注，终止设备运行，拆下超滤膜元件并进行湿态密封保存；

e. 按 a、b、c、d 步骤，对已获得的不同切割分子量的超滤膜元件分别进行实验；将收集的各透过液样品与浓缩液样品，采用免疫学检测技术如琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等或 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳等检测分析技术进行检测评价与分析；在同一系列超滤膜元件中，以目的蛋白分子有效通过的最小切割分子量的超滤膜元件，作为目的病毒蛋白抗原的

最佳透过型滤膜元件；以目的病毒蛋白抗原有效截留的最大切割分子量的超滤膜元件，作为目的病毒蛋白抗原截留的最佳截留型滤膜元件。

(2) 将筛选出的透过型滤膜元件和截留型滤膜元件对含有目的 MDV 抗原分子的原料液进行如下处理：

a. 参照步骤(1)中 a、b、c、d 的操作程序，以提纯型滤膜元件对原料液进行超滤处理，收集其所有的透过液；

b. 参照步骤(1)中 a、b、c、d 的操作程序，再以浓缩型滤膜元件对上述的透过液进行超滤，收集其截留液，即是所需要的目的病毒抗原的提纯浓缩液；

对以上的操作步骤，也可以先以截留型滤膜元件进行浓缩，后以提透过滤膜元件作进一步提纯，最后再将收集的所有透过液超滤浓缩至规定容积。

(3) MDV 检测抗原的标定

采用免疫学检测技术如琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等和/或电泳检测分析技术如 SDS-PAGE 等，对超滤提纯浓缩液进行检测与定量，其病毒抗原琼扩效价达到 1:2~8 或其进行 1:160 倍以上的稀释后目的病毒抗原条带仍能够为 SDS-PAGE 清晰检出，即可用作鸡马立克氏病强毒感染临床诊断使用的 MDV 琼扩检测抗原。

本发明所采取的技术方案是依据超滤原理，选择不同分子量切割孔径的滤膜，在一定压力驱动下，使含有目的病毒抗原及各种杂质的水溶性液体，有选择性地通过上述半渗透滤膜，即非目的大分子溶质被截留而去除，非目的小分子溶质及大部分的水也被滤除，而目的病毒抗原分子及其相近分子大小的杂质得到截留或富集，从而使溶液中的目的病毒抗原得到提纯与浓缩。

本发明的制备方法是以前 MD 疫苗商业化培养后的废弃液或其他含有 MDV 目的病毒抗原的料液为原料，免除了 MDV 增殖过程，降低了 MDV 目的抗原的生产成本。通过在常温下进行无相态变化和条件温和的超滤处理，能较好地保持 MDV 目的蛋白的生物活性；迅速达到了对 MDV 目的病毒抗原提纯与浓缩的双重目的，并具有工作效率高、操作简便、成本低廉、回收率高等优点；由于超滤处理过程中毋须添加任何试剂，因此，在生产过程中不仅不会产生二次污染或新的污染，而且是对排放液实际上又作了进一步的净化处理而降

低了对环境的污染，提高了资源利用率，真正实现了变废为宝的目的。

本发明不仅适用于 MDV 琼扩抗原（A 抗原）的制备，同时也适用于 MDV 的其他病毒性成分或其它蛋白质、多糖等分子水平上的生物活性物质的浓缩提取与纯化制备。

具体实施方式：

MDV 琼扩抗原（A 抗原）的制备：

实施例一：（先截大，后除小与浓缩）

a、将经检验定制的可允许 MDV A 抗原有效透过的筛选膜组件，如标记为 7.5 万截留分子量的中空纤维超滤膜组件、15 万截留分子量的卷式超滤膜组件等，取下密封堵板，放尽灌注其内的保养液后，安装于适配的超滤装置中；

b、打开进液阀、浓缩液回流调节阀、透液阀至最大通量位置，开启增压泵，用室温（20~30℃）的清洁水冲洗 20~30 分钟，并通过浓缩液回流调节阀控制运行压力在工作范围（0.02~0.1Mpa）内；

c、将含有 MDV A 抗原的原料液，如 MDV 血清 1 型的 CVI988 株及其低代次种毒培养的上清液即培养后的废弃液，MDV 血清 3 型的火鸡疱疹病毒（HVT）Fc-126 株及其低代次种毒的培养上清液废弃液等，如为冷藏则须升温至室温后，倾入进料箱，调节运行压力为最适工作压力（如最大工作压力为 0.1Mpa，则控制在 0.05~0.1Mpa，）进行超滤处理，弃去截留液，收集所有的透过液；

d、待透过液减少至无法运行时，将该超滤膜组件进行纯水物理清洗、化学清洗与保养液的灌注，终止设备运行，拆下膜组件并进行湿态密封保存；

e、将定制的能够有效截留 MDV A 抗原的筛选膜组件，如标记为 5 万截留分子量的中空纤维超滤膜组件等，再按 a、b、c 和 d 的步骤与方法对收集的透过液进行超滤处理，弃去本次超滤的透过液，收集其截留液及其膜上残留物，采用琼脂扩散试验等免疫学检测技术和/或 SDS-PAGE 等电泳技术对其进行检测与定量，其病毒抗原琼扩效价达到 1:2~8 或其进行 1:160 倍以上的稀释后目的病毒抗原条带仍能够清晰检出，即可用作鸡马立克氏病强毒感染临床诊断使用的 MDV 琼扩检测抗原。

实施例二：（先除小与浓缩，后去大提纯，再浓缩）

参照实施例一的程序、参数与工艺条件等，先采用定制的能够有效截留 MDV A 抗原的最大截留分子量膜组件，对含有 MDV A 抗原的稀薄原料液进行超滤浓缩与小分子杂质的去除，待浓缩至规定倍数或透过液减少至流量很低时，弃去透过液，收集其截留液。设备中的残留物用纯净水（或生理盐，或 PBS 缓冲液）进行循环冲洗后，也并入到截留液中。然后，将在该液中加入不少于 3 倍容积的洁净水或生理盐或 PBS 缓冲液进行混匀，改用经检验定制的可允许 MDV A 抗原有效透过的最小截留分子量的超滤膜组件，对其进行超滤，重复该步骤 3 次，弃去截留液，收集其所有的透过液。再用能够完全截留住 MDV A 抗原的超滤膜，对收集的透过液进行浓缩处理（为减少膜吸附，可改用小型号的膜组件及适配的超滤装置），弃去透过液，收集其截留液，经琼脂扩散试验等免疫学检测技术和/或 SDS-PAGE 等电泳技术对其进行检测与定量，其病毒抗原琼扩效价达到 1: 2~8 或其进行 1: 160 倍以上的稀释后目的病毒抗原条带仍能够清晰检出，即可用作鸡马立克氏病强毒感染临床诊断使用的 MDV 琼扩检测抗原。

专利名称(译)	鸡马立克氏病毒感染检测抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN101408542A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200710113039.4	申请日	2007-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	张训海		
申请(专利权)人(译)	张训海		
当前申请(专利权)人(译)	张训海		
[标]发明人	张平仄 张训海		
发明人	张平仄 张训海		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
代理人(译)	倪波		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种诊断鸡马立克氏病毒感染的琼扩检测抗原的制备方法，涉及禽病检测试剂领域，首先通过对目的病毒抗原进行分离效果的实验评价，进而从不同切割分子量的超滤膜元件中筛选出其透过型滤膜元件和截留型滤膜元件；然后以筛选出的透过型滤膜元件和截留型滤膜元件分别对含有目的病毒抗原的料液进行纯化与浓缩处理；最后通过对该纯化浓缩液进行检测与定量，即为制备的鸡马立克氏病毒感染琼扩检测抗原；由于超滤处理过程中毋须添加任何试剂，因此，在生产过程中不仅不会产生二次污染或新的污染，而且是对排放液实际上又作了进一步的净化处理而降低了对环境的污染，并提高了资源利用率，真正实现了变废为宝的目的，本发明还具有无相态变化、条件温和、操作简便、成本低廉、回收率高等优点。