



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 106841609 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201710019808.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.01.12

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(83)生物保藏信息

CGMCC No.4481 2010.12.17

CGMCC No.8169 2013.09.18

CGMCC NO.2389 2008.03.04

(71)申请人 江苏南农高科技股份有限公司

地址 214405 江苏省无锡市江阴市锡澄路
890号

申请人 南京农业大学

(72)发明人 缪芬芳 董彦鹏 白娟 王先炜

姜平 王丽敏 徐凤 胡静雅

(74)专利代理机构 北京君智知识产权代理事务

所(普通合伙) 11305

代理人 郑明

权利要求书2页 说明书19页

(54)发明名称

一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种猪圆环病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法。该猪圆环病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒含有：用纯化的重组猪圆环病毒2型核衣壳蛋白CapC蛋白作未抗原制备的包被板、辣根过氧化物酶标记的分泌PCV2的单克隆抗体杂交瘤细胞制备的PCV2酶标抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液(10×)、阳性血清对照、阴性血清对照、TMB底物稀释液、终止液。本发明利用原核表达系统表达CapC蛋白，针对PCV2病毒的单克隆抗体作为酶标抗体建立阻断ELISA，具有特异性好，敏感性高的特点，可用于临床猪血清样品PCV2抗体的检测。

1. 一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒内含有:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)重组菌BL-Cap-C株(保藏编号为CGMCC NO.4481)表达的猪圆环病毒2型CapC蛋白,经纯化后作为包被板抗原制备的抗原包被板,辣根过氧化物酶标记的分泌PCV2抗体的杂交瘤细胞3E5株(保藏编号为CGMCC NO.8169)制备的抗PCV2的单克隆抗体以及样品稀释液、浓缩洗涤液、阳性血清对照、阴性血清对照、显色液、终止液。

2. 如权利要求1所述一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于所述的抗原包被板是用0.1mol/L, pH 9.6的碳酸盐溶液作为包被液,将大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)BL21-Cap-C株重组菌(保藏编号为CGMCC NO.4481)表达并纯化的CapC蛋白稀释至1~3 μ g/ml,包被ELISA酶标板;所述的阳性血清对照为经猪圆环病毒2型SH株免疫的高免猪血清;所述的阴性血清对照为未感染过猪圆环病毒2型和未经猪圆环病毒2型疫苗免疫的猪血清。

3. 权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述猪圆环病毒2型CapC蛋白的制备方法包括以下步骤:

(1) 一级种子制备用接种环取适量菌种,划线接种于含25~100 μ g/ml氨苄青霉素的LB琼脂平板上,置37 $^{\circ}$ C静置培养16~24小时,挑选单个典型菌落,转接到含25~100 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基内,37 $^{\circ}$ C培养10~12小时,即为一级种子;

(2) 二级种子制备将一级种子菌液按1%~2%比例接种于含25~100 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C下振荡培养8~10小时,即为二级种子;

(3) 目的蛋白诱导表达取二级种子按1%~2%量接种于含25~100 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,180~200r/min,37 $^{\circ}$ C摇床振荡培养3~5小时,菌液浓度OD_{600nm}值为0.6~0.8时,向培养物中加入终浓度0.5~1.5mmol/ml的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG),37 $^{\circ}$ C振荡培养6~10小时,收获菌液;

(4) 目的蛋白纯化将诱导表达的细菌于4 $^{\circ}$ C 8000~10000r/min离心5~10min,用PBS缓冲液(0.01mol/L, pH值7.2)洗涤沉淀,重复2次,最后用适量PBS缓冲液重悬细菌沉淀,在200W功率的条件下超声波裂解细菌2~5min,直至菌液变得清澈;4 $^{\circ}$ C 8000~10000r/min离心5~10min,收集沉淀即为包涵体重组蛋白,再经包涵体洗液洗涤纯化。

4. 权利要求1和2所述的一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的制备方法,其特征在于辣根过氧化物酶标记的抗PCV2的单克隆抗体制备方法如下:

(1) 杂交瘤细胞株的筛选利用纯化的猪圆环病毒2型Cap蛋白经3次免疫BALB/c小鼠后,当小鼠血清ELISA效价达到1:6400以上时,取脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,用含有次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)、胸腺(T)和甘氨酸的完全培养基(HAT选择性培养基)筛选杂交瘤细胞,用间接ELISA方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选,将筛选到的阳性杂交瘤细胞经三次有限稀释,获得1株能稳定分泌抗Cap蛋白抗体的杂交瘤细胞株,被命名为分泌抗Cap蛋白抗体的杂交瘤细胞3E5株,该杂交瘤细胞株保藏编号CGMCC NO.8169,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

(2) 小鼠腹水单克隆抗体的制备取10周龄BALB/C小鼠,腹腔内注射入0.5ml液体石蜡。7~10日后,每只小鼠腹腔接种3~5 $\times 10^6$ 杂交瘤细胞,隔离饲养一周后,收集腹水至离心管,3000r/min离心20min,取上清,56 $^{\circ}$ C水浴30min;

(3) 腹水单克隆抗体的纯化与HRP标记取3E5小鼠腹水单克隆抗体,用饱和硫酸铵沉淀

方法和Protein A亲和层析纯化IgG,用戊二醛方法进行HRP标记,获得HRP标记抗体,置-70℃以下保存。

5. 权利要求1所述的一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的应用,其特征在于该试剂盒的检测方法如下:

(1) 使用前应将所有试剂恢复至室温(18~25℃)。将各试剂轻轻旋转或振荡,使之均匀;

(2) 洗涤液配制将10倍浓缩洗涤液恢复至室温,并摇动使沉淀溶解,然后用去离子水作10倍稀释,混匀;

(3) 用血清稀释液在稀释板内将待检血清1:1稀释,即每孔先加50μI样品稀释液,再加50μI待检血清,吸取每份样品时均应换用不同吸头,振荡混匀后,加入抗原板各孔;分别加入阳性血清对照、阴性血清对照,100μI/孔,重复2孔,37℃下孵育2小时;

(4) 洗涤弃去孔中液体,每孔加入洗涤液约300μI,放置1min,弃去孔中洗涤液,重复5次,最后拍干;

(5) 每孔加入100μI PCV2酶标抗体,37℃孵育30min;

(6) 洗涤同步骤(4);

(7) 每孔加入100μI TMB底物液,37℃避光孵育10~15min,至阴性对照显蓝色,阳性对照基本不显色,每孔加入50μI终止液;

(8) 酶联仪在450nm读数,尽量15min内完成;

(9) 结果计算

阴性对照平均OD_{450nm}值(NC_x) $NC_x = (A1孔OD值 + A2孔OD值) / 2$

阳性对照平均OD值(PC_x) $PC_x = (B1孔OD值 + B2孔OD值) / 2$

样品阻断率的计算 $阻断率 = (NC_x - 样品OD值) / NC_x \times 100\%$;

(10) 结果判定NC_x大于0.7,PC_x小于0.4时,试验条件成立;当PI值≥38%判为阳性,PI值≤30%判为阴性,30% < PI值 < 38%判为可疑,对可疑样品重新检测一次;PI低于38%,判为阴性。

一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法,属于兽用生物制品领域。

技术背景

[0002] 猪圆环病毒2型(Procine circovirus type 2, PCV2)是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原。PMWS主要发生在5-12周龄的断奶仔猪,其临床症状主要表现为进行性消瘦、呼吸道症状、发热、苍白及黄疸等。病原学及血清学调查研究表明,该病在许多国家广泛存在,给养猪业造成严重的经济损失。

[0003] PCV2属于圆环病毒科圆环病毒属,是一种单股共价闭合环状DNA病毒,基因组含有1766~1768nt,结构简单,主要含有2个阅读框架(ORFs):ORF1编码病毒复制相关蛋白Rep和Rep',参与病毒复制;ORF2编码病毒衣壳蛋白Cap,是病毒的结构蛋白,与病毒的致病性和免疫原性有关。

[0004] 根据病毒的抗原性和基因组成不停,可分为2种基因型或称血清型,即PCV1(Procine circovirus type 1, PCV1)型和PCV2型,PCV1与PCV2的Rep蛋白之间具有较强交叉免疫反应,对以PCV2全病毒为诊断抗原的检测方法的准确性有一定的影响。Cap蛋白是PCV2唯一的结构蛋白,免疫原性和反应原性都较强,且PCV1和PCV2的Cap蛋白没有交叉免疫反应。因此,针对Cap蛋白诊断试剂的研究已成为热点。

[0005] 自从首例PCV2感染的PMWS病例确诊以后,国内外学者对PCV2的诊断技术做了大量研究,相继研制出了PCR、免疫组化、间接免疫荧光(IFA)、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)和ELISA等检测方法,这些方法在诊断PCV2发挥着重要作用。ELISA检测方法具有诊断速度快、敏感性高、特异性强等优点,适合大规模检测,是一种便于普及的检测技术。本发明利用原核表达系统表达Cap蛋白,针对PCV2病毒的单克隆抗体作为酶标抗体建立阻断ELISA,具有特异性好,敏感性高的特点,可用于临床猪血清样品PCV2抗体的检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种规模化生产的检测猪圆环病毒2型抗体的阻断ELISA试剂盒,为临床检测猪圆环病毒2型提供快速、准确、简便的检测工具。

[0007] 为了实现上述指标,本发明采取了如下技术方案:

[0008] 1. 一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于所述试剂盒内含有:利用重组大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) BL-Cap-C株(保藏编号为CGMCC NO.4481)表达并经纯化的猪圆环病毒2型Cap蛋白作为包被板抗原制备的抗原包被板,辣根过氧化物酶标记的杂交瘤细胞3E5株(保藏编号为CGMCC NO.8169)制备的抗PCV2的单克隆抗体以及,样品稀释液、浓缩洗涤液(10×)、阳性血清对照、阴性血清对照、显色液、终止液。

[0009] 2. 本发明所述试剂盒,其特征在于所述所述的抗原包被板是用0.1mol/L, pH9.6的

碳酸盐溶液作为包被液,将表达并纯化的CapC蛋白稀释至1~3 $\mu\text{g}/\text{mI}$,包被ELISA酶标板;所述辣根过氧化物酶标记的杂交瘤细胞5H7株制备的抗PCV2的单克隆抗体;所述的阳性血清对照为经猪圆环病毒2型(SH株)免疫的高免猪血清;所述的阴性血清对照为未感染过猪圆环病毒2型和未经猪圆环病毒2型疫苗免疫的猪血清;

[0010] 3.本发明所述试剂盒的制备方法,其特征在于所述猪圆环病毒2型CapC蛋白的制备方法包括以下步骤:

[0011] (1)一级种子制备用接种环取适量菌种,划线接种于含25~100 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 氨苄青霉素的LB琼脂平板上,置37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养16~24小时,挑选单个典型菌落,转接到含25~100 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基内,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养10~12小时,即为一级种子;

[0012] (2)二级种子制备将一级种子菌液按1%~2%比例接种于含25~100 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养8~10小时,即为二级种子;

[0013] (3)目的蛋白诱导表达取二级种子按1%~2%量接种于含25~100 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基中,180~200r/min,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养3~5小时,菌液浓度OD_{600nm}值为0.6~0.8时,向培养物中加入终浓度0.5~1.5mmol/mI的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG),37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养6~10小时,收获菌液;

[0014] (4)目的蛋白纯化将诱导表达的细菌于4 $^{\circ}\text{C}$ 8000~10000r/min离心5~10min,用PBS缓冲液(0.01mol/L, pH值7.2)洗涤沉淀,重复2次,最后用适量PBS缓冲液重悬细菌沉淀,在200W功率的条件下超声波裂解细菌2~5min,直至菌液变得清澈。4 $^{\circ}\text{C}$ 8000~10000r/min离心5~10min,收集沉淀即为包涵体重组蛋白,再经包涵体洗液洗涤纯化;

[0015] 4.本发明所述试剂盒的制备方法,其特征在于辣根过氧化物酶标记的抗PCV2的单克隆抗体制备方法如下:

[0016] (1)杂交瘤细胞株的筛选利用纯化的猪圆环病毒2型Cap蛋白经3次免疫BALB/c小鼠后,当小鼠血清ELISA效价达到1:6400以上时,取脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞,用间接ELISA方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选,将筛选到的阳性杂交瘤细胞经三次有限稀释,获得1株能稳定分泌抗Cap蛋白抗体的杂交瘤细胞株,被为抗Cap蛋白单克隆抗体细胞3E5株,该杂交瘤细胞株保藏编号CGMCC NO.8169,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0017] (2)小鼠腹水单克隆抗体的制备取10周龄BALB/C小鼠,腹腔内注射入0.5mI液体石蜡。7~10日后,每只小鼠腹腔接种3~5 $\times 10^6$ 杂交瘤细胞,隔离饲养一周后,收集腹水。将腹水收集至离心管,3000r/min离心20min,取上清,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min;

[0018] (3)腹水单克隆抗体的纯化与HRP标记取5H7小鼠腹水单克隆抗体,用饱和硫酸铵沉淀方法和Protein A亲和层析纯化IgG,用戊二醛方法进行HRP标记,获得HRP标记抗体,置-70 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

[0019] 5.发明本所述试剂盒的检测方法如下:

[0020] (1)使用前应将所有试剂恢复至室温(18~25 $^{\circ}\text{C}$)。将各试剂轻轻旋转或振荡,使之均匀;

[0021] (2)洗涤液配制将10倍浓缩洗涤液恢复至室温,并摇动使沉淀溶解,然后用去离子水作10倍稀释,混匀;

[0022] (3)用血清稀释液在稀释板内将待检血清1:1稀释,即每孔先加50 μI 样品稀释液,

再加50μI待检血清,吸取每份样品时均应换用不同吸头,振荡混匀后,加入抗原板各孔;分别加入阳性血清对照、阴性血清对照,100μI/孔,重复2孔,37℃下孵育2小时;

[0023] (4) 洗涤弃去孔中液体,每孔加入洗涤液约300μI,放置1min,弃去孔中洗涤液,重复5次,最后拍干;

[0024] (5) 每孔加入100μI PCV2酶标抗体,37℃孵育30min;

[0025] (6) 洗涤同步步骤(4)。

[0026] (7) 每孔加入100μI TMB底物液,37℃避光孵育10~15min,至阴性对照显蓝色,阳性对照基本不显色,每孔加入50μI终止液;

[0027] (8) 酶联仪在450nm读数,尽量15min内完成;

[0028] (9) 结果计算

[0029] 阴性对照平均OD_{450nm}值(NC_x) $NC_x = (A1孔OD值 + A2孔OD值) / 2$

[0030] 阳性对照平均OD值(PC_x) $PC_x = (B1孔OD值 + B2孔OD值) / 2$

[0031] 样品阻断率的计算 $阻断率 = (NC_x - 样品OD值) / NC_x \times 100\%$

[0032] (10) 结果判定NC_x大于0.7,PC_x小于0.4时,试验条件成立。当PI值≥38%判为阳性,PI值≤30%判为阴性,30% < PI值 < 38%判为可疑,对可疑样品重新检测一次,PI低于38%,判为阴性。

[0033] 本发明详细实施方式

[0034] 一、包被抗原的制备与检验

[0035] 1. 一级种子繁殖及鉴定

[0036] 用接种环取适量重组大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) BL-Cap-C株菌种(菌种保藏编号为CGMCC NO.4481),划线接种于含50μg/ml氨苄青霉素的LB琼脂平板上,置37℃静置培养24小时,挑选单个典型菌落,转接到含50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基内,37℃培养12小时。

[0037] 2. 二级种子繁殖级鉴定

[0038] 将一级种子(菌液)按2%接种于含50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃下振荡培养10小时,即为二级种子。

[0039] 3. 目的蛋白诱导表达与纯化

[0040] 取上述二级种子按2%量接种于含50μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,200r/min,37℃摇床振荡培养3小时,菌液浓度OD_{600nm}值为0.6~0.8时,向培养物中加入终浓度1.0mmol/ml的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG),37℃振荡培养6小时,2~8℃保存,不超过2日。

[0041] 将上述诱导表达的细菌于4℃8000r/min离心5min,用PBS缓冲液(pH值7.2)重悬,再离心,再用PBS缓冲液重悬,离心后弃上清,用适量PBS缓冲液重悬细菌沉淀,在200W功率的条件下超声波裂解细菌2~5min,直至菌液变得清澈。4℃8000r/min离心10min,收集沉淀即为包涵体重组蛋白,再经包涵体洗液洗涤纯化,步骤如下:(1)以8000r/min离心15min,包涵体洗液I重悬沉淀,4℃2小时,重复1次;(2)以8000r/min离心15min,包涵体洗液II重悬沉淀,4℃2小时,重复1次;(3)以8000r/min离心15min,包涵体洗液III(8M尿素)重悬沉淀,4℃24小时;(4)以8000r/min离心15min,吸取上清,即为纯化后的蛋白,分装后-70℃保存。

[0042] 4. 重组抗原检验

[0043] (1) 抗原纯度

[0044] 取上述纯化的蛋白样品,加入25 μ I的5 $\times$ 蛋白样品上样缓冲液,充分混匀后100 $^{\circ}$ C煮沸5min,立即置冰上1~2min,上样前瞬时离心,吸取上清,用SDS-PAGE鉴定蛋白,出现大小约41kDa的单一清晰条带,用凝胶成像系统扫描分析其纯度为90%以上。

[0045] (2) 抗原浓度

[0046] 用紫外分光光度计测定包被抗原在280nm和260nm波长时的光吸收值(OD),按公式 $1.45 \times OD_{280nm} - 0.74 \times OD_{260nm}$ 计算抗原浓度,浓度达0.8mg/mL以上。

[0047] (3) 抗原性鉴定

[0048] 用pH值9.6的碳酸盐缓冲液将纯化蛋白从1.0 μ g/mL开始稀释至0.2 μ g/mL,包被ELISA酶标板,用1:1稀释的PCV2阴阳性血清进行阻断ELISA检测,以阳性血清阻断率大于38%时的抗原最高稀释倍数作为抗原效价,抗原效价大于0.25 μ g/mL。

[0049] 二、酶标抗体的制备与检验

[0050] 1. 杂交瘤细胞株的筛选

[0051] 利用纯化的猪圆环病毒2型Cap蛋白经3次免疫BALB/c小鼠后,当小鼠血清ELISA效价达到1:6400以上时,取脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞,用间接ELISA方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选,将筛选到的阳性杂交瘤细胞经三次有限稀释,获得1株能稳定分泌抗Cap蛋白抗体的杂交瘤细胞株,被命名为分泌PCV2抗体的杂交瘤细胞3E5株,该细胞株于2013年9月18日保藏于北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。保藏编号CGMCC NO.8169。

[0052] 2. 单抗细胞培养

[0053] 取出液氮罐保存的单克隆抗体细胞5H7株于38 $^{\circ}$ C的水中使之在1min内融化,以1000r/min离心5min后弃上清,用含20%犊牛血清的PRMI-1640营养液重悬,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养2~3日,形成细胞单层后,以1:2比例传代培养2~3日,收集细胞,用无血清R/MINI-1640培养液洗涤两次,然后用无血清1640培养液配成浓度为10⁷个/mL的细胞悬液,用于小鼠腹腔注射。

[0054] 3. 小鼠腹水单克隆抗体的制备

[0055] 取10周龄BALB/C小鼠,腹腔内注射入0.5mL液体石蜡。7~10日后,每只小鼠腹腔接种3~5 $\times$ 10⁶杂交瘤细胞(约0.5mL细胞悬液),隔离饲养一周后,小鼠腹部胀大,触之有波动感即腹腔内出现腹水,此时即可以收集腹水。收集腹水时,抓住小鼠颈部及尾巴,用12号粗针头自腹股沟插入腹腔,让腹水自然流出而收集。2~3日后,腹部再胀大,可再次收集。一般可收集1~3次。将腹水收集至离心管,3000r/min离心20min,取上清(弃离心管最上层的不溶性物质及油状物),56 $^{\circ}$ C水浴30min,用PCV2间接ELISA方法检测PCV2抗体效价,取抗体效价1:10000以上的腹水单抗,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0056] 4. 腹水单克隆抗体的纯化与HRP标记

[0057] 取5H7小鼠腹水单克隆抗体,用饱和硫酸铵沉淀方法和Protein A亲和层析纯化IgG,纯化后单抗再用戊二醛二步交联法进行辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记,具体步骤为:

[0058] (1) 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)醛化:用0.01mol/LpH6.8PBS

将25%戊二醛稀释为1.25%，取10mg HRP溶于0.2mL 1.25%戊二醛，室温（20℃左右）结合18小时；将反应物通过预先用0.15mol/L NaCl平衡的Sephadex G-50凝胶柱，用平衡液洗脱，去除游离的戊二醛，或对0.01mol/L、pH7.2PBS，4℃透析过夜；

[0059] (2) 标记：将5mg抗体IgG溶于1mL 0.15mol/L NaCl溶液，加入上述醛化HRP溶液（10mg/mL）混合，加入0.1mL 1mol/L pH9.6碳酸盐缓冲液，调节pH至9.0~9.5，于4℃电磁搅拌下结合24小时，然后加入0.1mL 0.2mol/L赖氨酸（0.29g溶于10mL蒸馏水），以封闭残留的醛基，终止反应；

[0060] (3) 分离纯化：通过Sephadex G-200凝胶柱层析，用PBS洗脱，收集第1峰洗脱液。最后，加入终浓度为60%的甘油防腐，小量分装，-20℃保存。

[0061] 5. 检验

[0062] (1) 性状无色透明液体，无臭、无味。

[0063] (2) 无菌检验按现行《中国兽药典》（中国兽药典委员会，《中华人民共和国兽药典2010年版》三部，中国农业出版社，2011年，本发明以下称《中国兽药典》）附录进行检验，无菌生长。

[0064] (3) 效价测定用血清样品稀释液将酶标抗体按1:1500、1:3000、1:6000稀释，重复2孔，用直接ELISA方法检测，酶标抗体效价大于1:3000。

[0065] 6、酶标抗体的配制：将检验合格的酶标抗体加入保护剂，按1:3000比例进行稀释，无菌分装于棕黑色瓶内，25mL/瓶。

[0066] 三、对照血清的制备与检验

[0067] 1. 阴性对照血清的制备

[0068] 选用3头6周龄SPF健康仔猪（PCV2和PRRSV抗原阴性，CSFV、PRRSV、PRV抗体阴性），采取颈部动脉采血方式，无菌采集血液，离心分离血清，用样品稀释液适量稀释，用0.45μm滤膜过滤除菌，加入终浓度为0.01%硫柳汞钠，置-70℃以下保存。

[0069] 2. 阳性对照血清的制备

[0070] 选用3头6周龄SPF健康仔猪（PCV2和PRRSV抗原阴性，CSFV、PRRSV、PRV抗体阴性），用钥匙孔血蓝蛋白KHL（弗氏不完全佐剂乳化）肌肉注射，2mL/头，3日后取PCV2SH株（TCID₅₀ ≥ 10^{-6.0}/mL），颈部肌肉注射2mL/头，接种PCV2后3天，再次肌肉注射钥匙孔血蓝蛋白KHL（弗氏不完全佐剂乳化），2mL/头，间隔28日用相同剂量PCV2再次接种，二次免疫后20~40日采血分离血清，用PCV2阻断ELISA方法检测PCV2ELISA抗体，阻断率大于60%，OD_{450nm} < 0.4时，无菌采集血液，离心分离血清，用样品稀释液适量稀释，用0.45μm滤膜过滤除菌，加入终浓度为0.01%硫柳汞钠，置-70℃以下保存。

[0071] 3. 阴阳性对照血清的检验

[0072] (1) 性状淡黄色或无色液体，无臭、无味。

[0073] (2) 无菌检验按《中国兽药典》（中国兽药典委员会，中华人民共和国兽药典，二〇一〇年版三部，中国农业出版社，2011，以下称《中国兽药典》）附录进行检验，无菌生长。

[0074] (3) 效价检验重复2孔进行ELISA检测，用阻断ELISA方法检测PCV2ELISA抗体，阳性对照血清阻断率均大于60%，OD_{450nm}值均低于0.4，阴性对照血清阻断率均低于30%，OD_{450nm}值均大于0.7。

[0075] 四、其余试剂的制备与检验

[0076] 1. 样品稀释液的制备

[0077] 取ween-20 0.5mI、NaCl 8.0g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.9g和KCl 0.2g，溶于灭菌双蒸水中，定容至1000mI，分装22mI/瓶。

[0078] 2. 10倍浓缩洗涤液的制备

[0079] 取NaCl 80g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29g、KCl 2g、Tween-20 5mI，加入灭菌双蒸水，定容至1000mI，分装80mI/瓶。

[0080] 3. TMB底物液的制备与检验

[0081] A液：称取 Na_2HPO_4 14.6g，柠檬酸9.33g，30% H_2O_2 2mI，加双蒸水至1000mI，调pH值至5.0~5.4；

[0082] B液：取3,3',5,5'-四甲基联苯二胺(TMB) 20mg，无水乙醇10mI，加双蒸水至1000mI。

[0083] TMB底物液：将A液与B液等量混合，分装于棕色瓶内，22mI/瓶。

[0084] 4. 终止液的制备与检验

[0085] 取蒸馏水1778mI，缓慢加入 H_2SO_4 (96%) 222mI，分装，15mI/瓶。

[0086] 五、抗原包被板的制备与检验

[0087] 1. 抗原包被板的制备

[0088] (1) 用包被液将CapC蛋白稀释成 $2.0\mu\text{g}/\text{mI}$ ，加入96孔酶标反应板，每孔 $100\mu\text{I}$ ，置 37°C 2小时。

[0089] (2) 洗涤弃去孔中液体，用含0.05% Tween-20的PBS洗涤，每孔 $300\mu\text{I}$ ，洗涤3次，每次3min，最后一次拍干。

[0090] (3) 封闭每孔加入 $200\mu\text{I}$ 1% BSA封闭液，置 37°C 下孵育3小时。

[0091] (4) 加保护剂弃去孔中液体，洗涤3次，加入抗原保护剂， $100\mu\text{I}/\text{孔}$ ，置 37°C 下作用1小时。

[0092] 2. 抗原包被板的检验

[0093] (1) 性状锡箔纸包装，封闭完好，包被板孔底清洁透明，无裂痕。

[0094] (2) 敏感性检验采用6份敏感性性质控样品(PCV2阳性血清)，按照本试剂盒检测方法进行检测，M1和M2血清PI值大于70%，M3和M4血清PI值50%~70%，M5和M6血清PI值38%~50%。

[0095] (3) 特异性检验采用22份特异性性质控样品，其中20份PCV2抗体阴性血清、1份猪瘟病毒抗体阳性血清和1份猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性血清按照本试剂盒检测方法进行检测，PI值均应低于30%。

[0096] 六、试剂盒的组装

[0097] 将检验合格的各试剂盒组分按下列成分和剂量装成试剂盒：抗原包被板(96孔/块×2块)、阳性对照血清($1\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)、阴性对照血清($1\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)、酶标抗体($22\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)、样品稀释液($15\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)、10倍浓缩洗涤液($80\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)、TMB底物液($22\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)、终止液($15\text{mI}/\text{瓶}\times 1\text{瓶}$)，说明书1份。

[0098] 七、猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂成品检验

[0099] 1. 性状试剂盒的外包装应洁净、无破损，标签应符合国家有关规定，内包装应无破损、无裂迹、无渗漏，品名、批号、保存条件、有效期清晰。其中：

[0100] (1) 抗原包被板96孔酶标板,锡箔纸包装,封闭完好,包被板孔底清洁透明,无裂痕,装量为2块。

[0101] (2) 阳性对照血清淡黄色或无色液体,或有少量悬浮物,装量为1mI/瓶×1瓶。

[0102] (3) 阴性对照血清淡黄色或无色液体,或有少量悬浮物,装量为1mI/瓶×1瓶。

[0103] (4) 酶标抗体无色或淡黄色透明液体,装量为22mI/瓶×1瓶。

[0104] (5) 样品稀释液无色透明液体,或有少量沉淀物,装量为15mI/瓶×1瓶。

[0105] (6) 10倍浓缩洗涤液无色透明液体,装量为80mI/瓶×1瓶。

[0106] (7) TMB底物液无色透明液体,装量为22mI/瓶×1瓶。

[0107] (8) 终止液无色透明液体,装量为15mI/瓶×1瓶。

[0108] 2. 无菌检验按《中国兽药典》附录进行检验,试剂盒内阴性对照血清、阳性对照血清和酶标抗体均无菌生长。

[0109] 3. 敏感性检验采用6份敏感性质控样品(PCV2抗体阳性血清),按本试剂盒的检测方法进行检测,M1和M2血清PI值大于70%,M3和M4血清PI值50%~70%,M5和M6血清PI值38%~50%。

[0110] 4. 特异性检验采用22份特性质控样品,其中20份PCV2抗体阴性血清、1份猪瘟病毒抗体阳性血清和1份猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性血清,按本试剂盒的检测方法进行检验,各样品的阻断率均应<30%。

[0111] 八、猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的使用

[0112] 1. 检测方法

[0113] (1) 使用前应将所有试剂恢复至室温(18~25℃)。将各试剂轻轻旋转或振荡,使之均匀。

[0114] (2) 洗涤液配制将10倍浓缩洗涤液恢复至室温,并摇动使沉淀溶解,然后用去离子水作10倍稀释,混匀。

[0115] (3) 用血清稀释液在稀释板内将待检血清1:1稀释,即每孔先加50μI样品稀释液,再加50μI待检血清,吸取每份样品时均应换用不同吸头,振荡混匀后,加入抗原板各孔。分别加入阳性血清对照、阴性血清对照,100μI/孔,重复2孔,37℃下孵育2小时。

[0116] (4) 洗涤弃去孔中液体,每孔加入洗涤液约300μI,放置1min,弃去孔中洗涤液,重复5次,最后拍干。

[0117] (5) 每孔加入100μI PCV2酶标抗体,37℃孵育30min。

[0118] (6) 洗涤同步骤(4)。

[0119] (7) 每孔加入100μI TMB底物液,37℃避光孵育10~15min,至阴性对照显蓝色,阳性对照基本不显色,每孔加入50μI终止液。

[0120] (8) 酶联仪在450nm读数,尽量15min内完成。

[0121] (9) 结果计算和判定

[0122] 阴性对照平均OD_{450nm}值(NC_X) $NC_X = (A1孔OD值 + A2孔OD值) / 2$

[0123] 阳性对照平均OD值(PC_X) $PC_X = (B1孔OD值 + B2孔OD值) / 2$

[0124] 样品阻断率的计算 $阻断率 = (NC_X - 样品OD值) / NC_X \times 100\%$

[0125] NC_X大于0.7,PC_X小于0.4时,试验条件成立。当PI值≥38%判为阳性,PI值≤30%判为阴性,30%<PI值<38%判为可疑,对可疑样品重新检测一次,PI低于38%,判为阴性。

[0126] 本发明涉及的生物材料资源信息

[0127] 本发明涉及的重组大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) BL-Cap-C株菌种由南京农业大学姜平教授提供,该细菌株已申请专利,专利号为2011100535366,保藏编号为:CGMCC No.4481;分泌PCV2抗体的杂交瘤细胞3E5株,该细胞株于2013年9月18日保藏于北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。保藏编号CGMCC NO.8169 (ZL 2013105607618);猪圆环病毒2型 (*Porcine circovirus 2*, PCV2) PCV2SH毒株 (CGMCC NO.2389,保藏日期:2008年3月4日,由南京农业大学姜平教授提供) 该毒株为我国商品化猪圆环病毒2型灭活疫苗 (SH株) 的生产用种毒。

[0128] 本发明的有益效果

[0129] (1) CapC蛋白为PCV2的结构蛋白,PCV1和PCV2的Cap蛋白没有免疫交叉反应,用该蛋白作为包被抗原,可减少非特异性反应。

[0130] (2) 本发明所述的单克隆抗体是以纯化后的CapC蛋白作为免疫原,应用细胞杂交瘤技术制备得到,并经辣根过氧化物酶标记,与PCV2Cap蛋白亲和力高,具有很好的反应原性。

[0131] (3) 本发明试剂盒检测口蹄疫病毒、猪伪狂犬病病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪瘟病毒、猪圆环病毒1型、猪大肠杆菌等阳性血清,均不产生反应。

[0132] (4) 该试剂盒可以配合猪圆环病毒2型灭活疫苗使用,合理优化PCV2疫苗的免疫程序。

实施例

[0133] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例进一步阐述本发明,应理解这些实施例仅用于说明本发明而不局限于本发明的应用范围,下面实施例中未提及的具体实验方法,通常按照常规实验方法进行。

[0134] 实施例1

[0135] ——猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的制备

[0136] 以猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒1603001、1603002、1603003为例

[0137] 1. 包被抗原的制备与检验

[0138] (1) 一级种子制备接种环取适量大肠杆菌 (*E. coli*) 重组菌BL-Cap-C株 (CGMCC No.4481) 菌,划线接种于含50 μ g/ml氨苄青霉素的LB琼脂平板上,置37 $^{\circ}$ C静置培养24小时,挑选单个典型菌落,转接到含50 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基3ml,37 $^{\circ}$ C培养12小时。

[0139] (2) 二级种子制备将一级种子(菌液)2ml接种于含50 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基10ml,37 $^{\circ}$ C下振荡培养10小时,200r/min,即为二级种子。

[0140] (3) 目的蛋白诱导表达与纯化取上述二级种子10ml接种于含50 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基500ml,200r/min,37 $^{\circ}$ C摇床振荡培养3小时,菌液浓度OD_{600nm}值为0.6~0.8时,向培养物中加入终浓度1.0mmol/ml的IPTG,37 $^{\circ}$ C振荡培养6小时,收获菌液,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0141] 将上述诱导表达的细菌于4 $^{\circ}$ C8000r/min离心5min,用PBS缓冲液(0.01mol/L,pH值7.2)重悬,再离心,再用PBS缓冲液重悬,离心后弃上清,用适量PBS缓冲液重悬细菌沉淀,在200W功率的条件下超声波裂解细菌2~5min,直至菌液变得清澈。4 $^{\circ}$ C8000r/min离心10min,

收集沉淀即为包涵体重组蛋白,再经包涵体洗液洗涤纯化,步骤如下:1)以8000r/min离心15min,包涵体洗液I重悬沉淀,4℃2小时,重复1次;2)以8000r/min离心15min,包涵体洗液II重悬沉淀,4℃2小时,重复1次;3)以8000r/min离心15min,包涵体洗液III(8M尿素)重悬沉淀,4℃12~24小时;4)以8000r/min离心15min,吸取上清,即为纯化后的蛋白,分装后-70℃以下保存。

[0142] (4) 重组抗原检验

[0143] 1) 抗原纯度

[0144] 取上述纯化的蛋白样品,加入25μl的5×蛋白样品上样缓冲液,充分混匀后100℃煮沸5min,立即置冰上1~2min,上样前瞬时离心,吸取上清作为电泳样品。Ag001、Ag002、Ag003三批抗原分别取样品进行SDS-PAGE电泳,结果在41kDa左右均出现单一的清晰条带,用凝胶成像系统进行扫描分析,其纯度分别为93%、94%、92%。

[0145] 2) 抗原浓度

[0146] 用紫外分光光度计测定包被抗原在280nm和260nm波长时的光吸收值(OD),按公式 $1.45 \times OD_{280nm} \sim 0.74 \times OD_{260nm}$ 计算抗原浓度,三批抗原Ag001、Ag002、Ag003的浓度分别为2.5mg/ml、2.1mg/ml、2.6mg/ml。

[0147] 3) 抗原性鉴定

[0148] 用pH值9.6的碳酸盐缓冲液将纯化蛋白从1.0μg/ml开始稀释至0.2μg/ml,包被ELISA酶标板,用1:1稀释的PCV2阴阳性血清进行阻断ELISA检测,以阳性血清阻断率大于38%时的抗原最高稀释倍数作为抗原效价,三批抗原Ag001、Ag002、Ag003的抗原效价分别为0.6μg/ml、0.6μg/ml、0.5μg/ml。

[0149] 2. 酶标抗体的制备与检验

[0150] (1) 杂交瘤细胞株的筛选

[0151] 利用纯化的猪圆环病毒2型Cap蛋白经3次免疫BALB/c小鼠后,当小鼠血清ELISA效价达到1:6400以上时,取脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞,用间接ELISA方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选,将筛选到的阳性杂交瘤细胞经三次有限稀释,获得1株能稳定分泌Cap蛋白抗体的杂交瘤细胞株,被命名为分泌Cap蛋白单克隆抗体细胞3E5株,简称3E5细胞,该杂交瘤细胞株保藏编号CGMCC NO.8169,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0152] (2) 单抗细胞培养

[0153] 取出液氮罐里的3E5细胞(保藏编号CGMCC NO.8169)于38℃的水中使之在1min内融化,以1000r/min离心5min后弃上清,用含20%犊牛血清的PRMI1640营养液重悬,37℃、5%CO₂培养箱中培养2~3日,形成细胞单层后,以1:2比例传代培养2~3日,可见细胞形态均一,浑圆透亮,边界清晰。收集细胞,用无血清R/MINI-1640培养液洗涤两次,然后用无血清R/MINI-1640培养液配成浓度为10⁷个/ml的细胞悬液,用于小鼠腹腔注射。

[0154] (3) 小鼠腹水单克隆抗体的制备

[0155] 取10周龄BALB/C小鼠,腹腔内注射入0.5ml液体石蜡。7~10日后,每只小鼠腹腔接种3~5×10⁶杂交瘤细胞(约0.5ml细胞悬液),隔离饲养一周后,小鼠腹部胀大,触之有波动感即腹腔内出现腹水,此时即可以收集腹水。收集腹水时,抓住小鼠颈部及尾巴,用12号粗针头自腹股沟插入腹腔,让腹水自然流出而收集。2~3日后,腹部再胀大,可再次收集。一般

可收集1~3次。将腹水收集至离心管,3000r/min离心20min,取上清(弃离心管最上层的不溶性物质及油状物),56℃水浴30min,用PCV2间接ELISA方法检测PCV2抗体效价,抗体效价1:10000以上的腹水单抗,-20℃保存。

[0156] (4) 腹水单克隆抗体的纯化与HRP标记

[0157] 取3E5小鼠腹水单克隆抗体,用饱和硫酸铵沉淀方法和Protein A亲和层析纯化IgG,纯化后单抗再用戊二醛二步交联法进行HRP标记,具体步骤为:

[0158] 1) HRP醛化:用0.01mol/L pH6.8PBS将25%戊二醛稀释为1.25%,取10mg HRP溶于0.2mL 1.25%戊二醛,室温(20℃左右)结合18h;将反应物通过预先用0.15mol/L NaCl平衡的Sephadex G-50凝胶柱,用平衡液洗脱,去除游离的戊二醛,或对0.01mol/L、pH7.2PBS,4℃透析过夜;

[0159] 2) 标记:将5mg抗体IgG溶于1mL 0.15mol/L NaCl溶液,加入上述醛化HRP溶液(10mg/mL)混合,加入0.1mL 1mol/L pH9.6碳酸盐缓冲液,调节pH至9.0~9.5,于4℃电磁搅拌下结合24h,然后加入0.1mL 0.2mol/L赖氨酸(0.29g溶于10mL蒸馏水),以封闭残留的醛基,终止反应;

[0160] 3) 分离纯化:通过Sephadex G-200凝胶柱层析,用PBS洗脱,收集第1峰洗脱液。最后,加入终浓度为60%的甘油防腐,小量分装,-20℃保存。

[0161] (5) 检验

[0162] 1) 性状无色透明液体,无臭、无味。

[0163] 2) 无菌检验按《中国兽药典》附录进行检验,无菌生长。

[0164] 3) 效价测定用血清样品稀释液将三批酶标抗体按1:1500、1:3000、1:6000稀释,重复2孔,用直接ELISA方法检测,三批酶标抗体Hab01、Hab02、Hab03的效价均为1:6000。

[0165] (6) 酶标抗体的配制

[0166] 将检验合格的酶标抗体加入保护剂,按1:3000比例进行稀释,无菌分装于棕黑色瓶内,25mL/瓶。

[0167] 3. 对照血清的制备与检验

[0168] (1) 阴性对照血清的制备

[0169] 选用3头6周龄SPF健康仔猪(PCV2和PRRSV抗原阴性,CSFV、PRRSV、PRV抗体阴性),选用上述合格仔猪,采取颈部动脉采血方式,无菌采集血液,离心分离血清,用样品稀释液适量稀释,用0.45μm滤膜过滤除菌,加入终浓度为0.01%硫柳汞钠,置-70℃以下保存。

[0170] (2) 阳性对照血清的制备

[0171] 选用3头6周龄SPF健康仔猪(PCV2和PRRSV抗原阴性,CSFV、PRRSV、PRV抗体阴性),用钥匙孔血蓝蛋白KHL(弗氏不完全佐剂乳化)肌肉注射,2mL/头,3日后取PCV2SH株(TCID₅₀ ≥ 10^{-6.0}/mL),颈部肌肉注射2mL/头,接种PCV2后3天,再次肌肉注射钥匙孔血蓝蛋白KHL(弗氏不完全佐剂乳化),2mL/头,间隔28日用相同剂量PCV2再次接种,二次免疫后20~40日采血 分离血清,用PCV2阻断ELISA方法检测PCV2ELISA抗体,阻断率大于60%,OD_{450nm} < 0.4时,采取颈部动脉采血方式,无菌采集血液,离心分离血清,用样品稀释液适量稀释,用0.45μm滤膜过滤除菌,加入终浓度为0.01%硫柳汞钠,无菌分装,1mL/瓶,置2~8℃保存。

[0172] (3) 阴阳性对照血清的检验

[0173] 1) 性状淡黄色或无色液体,无臭、无味。

[0174] 2) 无菌检验按《中国兽药典》附录进行检验, 无菌生长。

[0175] 3) 效价检验重复2孔进行ELISA检测, 用阻断ELISA方法检测PCV2ELISA抗体, 阳性对照血清阻断率均大于60%, OD450nm值均低于0.4, 阴性对照血清阻断率均低于30%, OD450nm值均大于0.7。

[0176] 4. 样品稀释液的制备

[0177] 取ween-20 0.5mI、NaCl 8.0g、KH₂PO₄-2H₂O 0.2g、Na₂HPO₄-2H₂O 2.9g和KCl 0.2g, 溶于灭菌双蒸水中, 定容至1000mI, 分装22mI/瓶。

[0178] 5. 10倍浓缩洗涤液的制备

[0179] 取NaCl 80g、KH₂PO₄-2H₂O 2g、Na₂HPO₄-2H₂O 29g、KCl 2g、Tween-20 5mI, 加入灭菌双蒸水, 定容至1000mI, 分装80mI/瓶。

[0180] 6. TMB底物液的制备与检验

[0181] A液: 称取Na₂HPO₄ 14.6g, 柠檬酸9.33g, 30% H₂O₂ 2mI, 加双蒸水至1000mI, 调pH值至5.0~5.4;

[0182] B液: 取3, 3', 5, 5'-四甲基联苯二胺 (TMB) 20mg, 无水乙醇10mI, 加双蒸水至1000mI。

[0183] TMB底物液: 将A液与B液等量混合, 分装于棕色瓶内, 22mI/瓶。

[0184] 7. 终止液的制备与检验

[0185] 取蒸馏水1778mI, 缓慢加入H₂SO₄ (96%) 222mI, 分装, 15mI/瓶。

[0186] 8. 抗原包被板的制备与检验

[0187] (1) 抗原包被板 (B01、B02、B03) 的制备

[0188] 1) 包被用包被液将CapC蛋白稀释成2.0μg/mI, 加入96孔酶标反应板, 每孔100μI, 置37℃2小时。

[0189] 2) 洗涤弃去孔中液体, 用含0.05% Tween-20的PBS洗涤, 每孔300μI, 洗涤3次, 每次3min, 最后一次拍干。

[0190] 3) 封闭每孔加入200μI 1% BSA封闭液, 置37℃下孵育3小时。

[0191] 4) 加保护剂弃去孔中液体, 洗涤3次, 加入抗原保护剂, 100μI/孔, 置37℃下作用1小时。

[0192] (2) 抗原包被板的检验

[0193] 1) 性状锡箔纸包装, 封闭完好, 包被板孔底清洁透明, 无裂痕。

[0194] 2) 敏感性检验采用6份敏感性性质控样品 (PCV2阳性血清), 按照本试剂盒检测方法进行检测三批抗原板, 检测结果显示, M1和M2血清PI值均大于70%, M3和M4血清PI值50%~70%, M5和M6血清PI值38%~50% (见表1)。

[0195] 表1 三批抗原板 (B01、B02、B03) 敏感性检测

[0196]

名称	PI值 (%)		
	B01	B02	B03
M1	80.9	83.7	78.2
M2	82.3	81.9	75.4
M3	62.1	60.3	60.8
M4	64.7	61.2	57.3
M5	42.3	44.3	42.5
M6	48.7	42.7	44.1

[0197] 3) 特异性检验采用22份特异性质控样品,其中20份PCV2抗体阴性血清、1份猪瘟病毒抗体阳性血清和1份猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性血清按照本试剂盒检测方法进行检测,PI值均应低于30% (见表2)。

[0198] 表2 三批抗原板 (B01、B02、B03) 特异性检测

[0199]

名称	PI值 (%)			名称	PI值 (%)		
	B01	B02	B03		B01	B02	B03
1#	13.5	15.9	11.0	12#	9.3	8.7	12.4
2#	19.0	17.4	15.8	13#	15.8	19.1	14.7
3#	24.8	26.7	20.5	14#	21.5	25.3	19.3
4#	14.3	19.5	9.8	15#	5.7	9.8	6.7
5#	29.1	19.7	24.5	16#	12.3	17.8	13.5
6#	24.6	25.9	19.4	17#	15.9	20.1	18.3
7#	20.3	27.1	17.8	18#	25.4	21.8	20.5
8#	19.4	13.5	21.4	19#	19.3	20.7	16.3
9#	13.9	10.8	8.9	20#	9.9	11.7	15.6
10#	25.6	21.8	24.3	猪瘟抗体阳性	8.29	2.83	10.34
11#	20.1	25.4	18.6	蓝耳抗体阳性	10.04	10.82	7.3

[0200] 6. 试剂盒的组装

[0201] 将检验合格的各试剂盒组分按下列成分和剂量装成试剂盒:抗原包被板 (96孔/块×2块),阳性 对照血清 (1mI/瓶×1瓶)、阴性对照血清 (1mI/瓶×1瓶)、酶标抗体 (22mI/瓶×1瓶)、样品稀释液 (15mI/瓶×1瓶)、10倍浓缩洗涤液 (80mI/瓶×1瓶)、TMB底物液 (22mI/瓶×1瓶)、终止液 (15mI/瓶×1瓶),说明书1份。

[0202] 实施例2

[0203] ——一种规模化生产猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的成品检验

[0204] 以猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒1603001、1603002、1603003为例

[0205] 1. 性状试剂盒的外包装应洁净、无破损,标签应符合国家有关规定,内包装应无破损、无裂迹、无渗漏,品名、批号、保存条件、有效期清晰。其中:

[0206] (1) 抗原包被板96孔酶标板,锡箔纸包装,封闭完好,包被板孔底清洁透明,无裂痕,装量为2块。

[0207] (2) 阳性对照血清淡黄色液体。

[0208] (3) 阴性对照血清淡黄色液体。

- [0209] (4) 酶标抗体无色透明液体。
 [0210] (5) 样品稀释液无色透明液体。
 [0211] (6) 10倍浓缩洗涤液无色透明液体。
 [0212] (7) TMB底物液无色透明液体。
 [0213] (8) 终止液无色透明液体。
 [0214] 表3 抗体检测试剂盒装量检测结果
 [0215]

名称	装量 (ml)		
	1603001	1603002	1603003
阴性对照血清	1.3/1.2/1.2/1.3/1.2	1.3/1.2/1.2/1.3/1.2	1.2/1.2/1.3/1.2/1.3
阳性对照血清	1.3/1.3/1.2/1.2/1.2	1.3/1.3/1.3/1.2/1.3	1.3/1.2/1.2/1.3/1.2
酶标抗体	23.4/24.0/23.5/22.6/24.0	23.4/24.0/23.5/24.4/23.5	23.4/24.0/23.5/24.4/23.5
样品稀释液	16.5/16.8/17.0/17.5/16.5	16.5/17.0/16.8/17.3/17.0	16.5/17.0/16.8/17.2/16.5
10倍浓缩洗涤液	83.0/82.5/83.5/84.0/83.5	83.5/82.9/83.4/84.0/83.5	83.5/84.2/84.0/83.6/84.3
底物液	23.0/23.5/24.0/22.5/24.5	24.0/23.6/24.4/24.0/23.5	23.5/24.0/23.7/24.2/23.6
终止液	16.5/17.0/16.8/17.4/16.5	17.0/17.5/16.8/17.0/16.5	17.5/16.9/16.5/17.4/16.8

[0216] 2. 无菌检验按《中国兽药典》附录进行检验,试剂盒内阴性对照血清、阳性对照血清和酶标 抗体均无菌生长。

[0217] 3. 敏感性检验采用6份敏感性质控样品 (PCV2抗体阳性血清),按本试剂盒的检测方法进行检测,结果显示M1和M2血清PI值均大于70%,M3和M4血清PI值50%~70%,M5和M6血清PI值38%~50%(表4)。

[0218] 表4抗体检测试剂盒检测敏感性血清

名称	PI 值 (%)		
	1603001	1603002	1603003
M1	79.3	77.4	83.6
M2	80.9	82.5	80.9
M3	62.4	60.7	61.4
M4	56.9	58.4	57.8
M5	42.9	42.3	46.3
M6	44.1	44.5	45.7

[0220] 4. 特异性检验采用22份特异性质控样品,其中20份PCV2抗体阴性血清、1份猪瘟疫病毒抗体阳性血清和1份猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性血清,按本试剂盒的检测方法进行检测,各样品的阻断率均应<30%(表5)。

[0221] 表5 抗体检测试剂盒检测特异性血清

[0222]

名称	PI值 (%)			名称	PI值 (%)		
	1603001	1603002	1603003		1603001	1603002	1603003
1#	19.3	14.4	14.6	12#	3.4	24.6	15.6
2#	5.4	20.9	25.4	13#	9.3	20.6	19.8
3#	16.4	15.6	4.6	14#	20.7	9.3	9.4
4#	17.8	7.6	8.7	15#	10.3	25.3	24.5
5#	18.2	15.7	20.7	16#	17.6	21.3	21.3
6#	4.3	21.4	16.8	17#	8.7	21.3	7.6
7#	13.2	13.9	18.9	18#	29.8	10.4	10.8
8#	25.6	19.3	14.3	19#	8.4	8.4	12.6
9#	20.1	8.9	25.6	20#	21.4	25.4	17.5
10#	19.6	17.8	7.3	猪瘟抗体阳性	9.3	8.3	7.4
11#	7.6	12.1	9.3	蓝耳抗体阳性	10.4	14.6	10.3

[0223] 实施例3

[0224] ——猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒的检测方法

[0225] (1) 使用前应将所有试剂恢复至室温 (18~25℃)。将各试剂轻轻旋转或振荡,使之均匀。

[0226] (2) 洗涤液配制将10倍浓缩洗涤液恢复至室温,并摇动使沉淀溶解,然后用去离子水作10倍稀释,混匀。

[0227] (3) 用血清稀释液在稀释板内将待检血清1:1稀释,即每孔先加50μI样品稀释液,再加50μI待检血清,吸取每份样品时均应换用不同吸头,振荡混匀后,加入抗原板各孔。分别加入阳性血清对照、阴性血清对照,100μI/孔,重复2孔,37℃下孵育2小时。

[0228] (4) 洗涤弃去孔中液体,每孔加入洗涤液约300μI,放置1min,弃去孔中洗涤液,重复5次,最后拍干。

[0229] (5) 每孔加入100μI PCV2酶标抗体,37℃孵育30min。

[0230] (6) 洗涤同步骤(4)。

[0231] (7) 每孔加入100μI TMB底物液,37℃避光孵育10~15min,至阴性对照显蓝色,阳性对照基本不显色,每孔加入50μI终止液。

[0232] (8) 酶联仪在450nm读数,尽量15min内完成。

[0233] (9) 结果计算和结果判定

[0234] 阴性对照平均OD_{450nm}值 (NC_X) $NC_X = (A1孔OD值 + A2孔OD值) / 2$

[0235] 阳性对照平均OD值 (PC_X) $PC_X = (B1孔OD值 + B2孔OD值) / 2$

[0236] 样品阻断率的计算 $阻断率 = (NC_X - 样品OD值) / NC_X \times 100\%$

[0237] NC_X大于0.7,PC_X小于0.4时,试验条件成立。当PI值≥38%判为阳性,PI值≤30%判为阴性,30% < PI值 < 38%判为可疑,对可疑样品重新检测一次,PI低于38%,判为阴性。

[0238] 实施例4

[0239] ——猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒与同类产品的比较

[0240] 以猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒1603001、1603002、1603003为例。

[0241] 与荷兰百测PCV2抗体检测试剂盒,同时检测来自不同猪场的100份,结果见表6-7,

从表中看出,1603001、1603002、1603003批次的猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒与商品化试剂盒的符合率分别为88%、87%、91%。

[0242] 说明本发明试剂盒与商品化试剂盒有较高的符合率,可用于PCV2抗体检测。

[0243] 表6 阻断试剂盒与商品化试剂盒符合率的比较结果(1603001批)

		商品化试剂盒			符合率 (%)
		阳性	阴性	总数	
阻断ELISA抗体 检测试剂盒 (1603001批)	阳性	81	4	85	88
	阴性	8	7	15	
	总数	89	11	100	
阻断ELISA抗体 检测试剂盒 (1603002批)	阳性	80	4	85	87
	阴性	9	7	15	
	总数	89	11	100	
阻断ELISA抗体 检测试剂盒 (1603003批)	阳性	84	4	85	91
	阴性	5	7	15	
	总数	89	11	100	

[0245] 表7 血清PCV2ELISA抗体检测结果

[0246]

血清编号	试剂盒批号 (PI值, %)			商品化试剂盒 (S/P值)
	1603001	1603002	1603003	
1	51.0 (-)	54.5 (+)	53.3 (+)	0.684 (+)
2	43.3 (-)	50.4 (+)	48.3 (+)	1.256 (+)
3	45.6 (-)	48.2 (+)	44.5 (+)	0.951 (+)
4	28.9 (-)	15.7 (-)	16.9 (-)	0.544 (+)
5	72.6 (+)	79.4 (+)	78.8 (+)	0.689 (+)
6	30.5/29.5 (-)	33.5/32.5 (-)	39.5 (+)	0.651 (+)
7	45.6 (-)	50.6 (+)	49.8 (+)	0.709 (+)
8	50.6 (+)	47.2 (+)	48.6 (+)	0.856 (+)
9	60.2 (+)	51.5 (+)	50.2 (+)	0.135 (-)
10	92.4 (+)	89.6 (+)	91.7 (+)	1.094 (+)
11	38.9 (+)	40.1 (+)	39.1 (+)	0.251 (-)
12	68.8 (+)	71.6 (+)	70.3 (+)	0.561 (+)
13	76.0 (+)	74.5 (+)	71.9 (+)	0.589 (+)
14	66.8 (+)	80.3 (+)	79.5 (+)	0.628 (+)
15	48.3 (+)	51.6 (+)	55.4 (+)	0.869 (+)
16	50.6 (+)	42.5 (+)	43.4 (+)	0.887 (+)
17	43.4 (-)	47.5 (+)	50.6 (+)	0.673 (+)
18	42.7 (+)	45.2 (+)	46.5 (+)	1.065 (+)

[0247]

19	85.5 (+)	81.6 (+)	80.9 (+)	0.951 (+)
20	63.2 (+)	60.8 (+)	59.6 (+)	0.759 (+)
21	64.2 (+)	58.4 (+)	61.7 (+)	0.957 (+)
22	70.6 (+)	73.6 (+)	70.3 (+)	0.681 (+)
23	55.8 (+)	57.3 (+)	58.9 (+)	0.883 (+)
24	70.5 (+)	74.5 (+)	75.1 (+)	0.289 (-)
25	41.0 (+)	38.5 (+)	39.1 (+)	0.319 (-)
26	65.5 (+)	65.3 (+)	61.2 (+)	1.123 (+)
27	76.5 (+)	82.4 (+)	81.2 (+)	0.984 (+)
28	75.0 (+)	81.3 (+)	78.8 (+)	1.253 (+)
29	64.1 (+)	72.5 (+)	70.3 (+)	0.694 (+)
30	80.4 (+)	88.3 (+)	86.1 (+)	0.871 (+)
31	82.3 (+)	86.4 (+)	87.6 (+)	0.869 (+)
32	48.8 (+)	48.7 (+)	45.3 (+)	0.953 (+)
33	31.0/27.9 (-)	37.3/30.5 (-)	38.9 (+)	0.598 (+)
34	85.9 (+)	89.2 (+)	90.4 (+)	0.894 (+)
35	60.2 (+)	61.5 (+)	63.1 (+)	0.875 (+)
36	60.3 (+)	55.4 (+)	58.6 (+)	1.054 (+)
37	52.2 (+)	53.5 (+)	56.7 (+)	0.211 (-)
38	52.7 (+)	60.7 (+)	59.5 (+)	0.516 (+)
39	72.4 (+)	79.6 (+)	76.5 (+)	0.648 (+)
40	70.3 (+)	71.3 (+)	74.6 (+)	1.234 (+)
41	60.6 (+)	56.7 (+)	54.2 (+)	1.543 (+)
42	55.5 (+)	59.6 (+)	60.3 (+)	0.987 (+)
43	60.5 (+)	56.4 (+)	59.5 (+)	0.667 (+)
44	27.1 (-)	23.9 (-)	25.9 (-)	0.619 (+)
45	38.8 (+)	41.9 (+)	44.4 (+)	0.851 (+)
46	44.7 (+)	42.8 (+)	38.5 (+)	0.419 (+)
47	47.1 (+)	50.7 (+)	51.3 (+)	0.864 (+)
48	16.8 (-)	19.7 (-)	25.4 (-)	0.584 (+)
49	78.1 (+)	75.6 (+)	70.5 (+)	1.087 (+)
50	42.5 (+)	40.6 (+)	41.2 (+)	1.257 (+)
51	58.6 (+)	55.5 (+)	60.1 (+)	0.954 (+)
52	64.5 (+)	61.2 (+)	59.3 (+)	0.561 (+)

[0248]

53	79.4 (+)	73.2 (+)	80.2 (+)	0.982 (+)
54	81.7 (+)	75.3 (+)	72.5 (+)	1.051 (+)
55	39.8 (+)	45.1 (+)	44.4 (+)	1.125 (+)
56	58.1 (+)	56.4 (+)	67.7 (+)	1.341 (+)
57	48.9 (+)	51.7 (+)	52.3 (+)	0.467 (-)
58	76.5 (+)	72.4 (+)	68.8 (+)	0.643 (+)
59	46.5 (+)	48.7 (+)	51.7 (+)	0.668 (+)
60	53.3 (+)	56.8 (+)	48.1 (+)	0.549 (+)
61	1.4 (-)	13.0 (-)	9.6 (-)	0.308 (-)
62	38.8 (+)	40.9 (+)	43.0 (+)	1.420 (+)
63	76.5 (+)	76.8 (+)	81.3 (+)	0.899 (+)
64	41.8 (+)	37.9/36.4 (-)	45.3 (+)	0.566 (+)
65	81.7 (+)	75.3 (+)	72.5 (+)	0.554 (+)
66	39.8 (+)	45.1 (+)	44.4 (+)	0.659 (+)
67	58.1 (+)	56.4 (+)	67.7 (+)	0.797 (+)
68	42.1 (+)	45.7 (+)	40.8 (+)	0.614 (+)
69	51.2 (+)	45.8 (+)	46.9 (+)	1.123 (+)
70	58.3 (+)	49.9 (+)	53.6 (+)	0.872 (+)
71	56.5 (+)	59.5 (+)	62.5 (+)	1.469 (+)
72	76.5 (+)	74.4 (+)	72.4 (+)	1.026 (+)
73	48.2 (+)	46.7 (+)	50.1 (+)	1.159 (+)
74	36.9/37.9 (-)	32.8/30.8 (-)	39.9 (+)	0.812 (+)
75	80.6 (+)	82.7 (+)	83.93 (+)	1.048 (+)
76	63.6 (+)	65.1 (+)	61.90 (+)	1.611 (+)
77	26.1 (-)	19.9 (-)	24.9 (-)	0.784 (+)
78	53.9 (+)	50.9 (+)	53.2 (+)	1.149 (+)
79	52.2 (+)	50.7 (+)	53.2 (+)	0.832 (+)
80	59.9 (+)	59.6 (+)	59.0 (+)	1.041 (+)
81	89.8 (+)	90.8 (+)	90.81 (+)	0.099 (-)
82	83.7 (+)	81.3 (+)	84.1 (+)	1.265 (+)
83	89.5 (+)	90.7 (+)	89.8 (+)	1.043 (+)
84	80.3 (+)	81.0 (+)	86.3 (+)	1.287 (+)
85	77.2 (+)	75.8 (+)	76.8 (+)	0.782 (+)
86	63.3 (+)	65.0 (+)	61.5 (+)	0.689 (+)

[0249]

87	54.6 (+)	52.2 (+)	53.7 (+)	0.518 (+)
88	24.6 (-)	23.4 (-)	20.7 (-)	0.101 (-)
89	81.3 (+)	80.3 (+)	83.3 (+)	1.087 (+)
90	90.4 (+)	91.4 (+)	89.4 (+)	1.076 (+)
91	26.9 (-)	29.3 (-)	27.1 (-)	0.735 (+)
92	52.3 (+)	54.3 (+)	55.4 (+)	0.672 (+)
93	62.6 (+)	59.6 (+)	60.7 (+)	1.257 (+)
94	29.3 (-)	26.4 (-)	26.7 (-)	0.491 (-)
95	84.0 (+)	85.3 (+)	81.8 (+)	1.106 (+)
96	64.5 (+)	65.6 (+)	59.2 (+)	0.987 (+)
97	53.3 (+)	55.6 (+)	54.0 (+)	0.740 (+)
98	51.5 (+)	51.5 (+)	51.6 (+)	0.553 (+)
99	90.5 (+)	91.4 (+)	89.3 (+)	1.222 (+)
100	56.9 (+)	60.4 (+)	55.8 (+)	0.489 (-)

[0250] 注：商品化试剂盒结果判定：S/P值 ≥ 0.5 判为阳性，S/P值 < 0.5 时判为阴性。

[0251] 附注

[0252] 包涵体洗液的配制：

[0253] (1) 包涵体洗液 I

[0254] Tris-HCl 6g、NaCl 5.8g、EDTA 2.92g、TritonX-100 10mI，用去离子水定容至1L。

[0255] (2) 包涵体洗液 II

[0256] Tris-HCl 6g、NaCl 5.8g、EDTA 2.92g、TritonX-100 5mI，用去离子水定容至1L。

[0257] (3) 包涵体洗液 III (8M尿素)

[0258] 脲48.48g，用去离子水定容至100mI。

专利名称(译)	一种猪圆环病毒2型阻断ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106841609A	公开(公告)日	2017-06-13
申请号	CN201710019808.8	申请日	2017-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	江苏南农高科技股份有限公司 南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	江苏南农高科技股份有限公司 南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏南农高科技股份有限公司 南京农业大学		
[标]发明人	缪芬芳 董彦鹏 白娟 王先炜 姜平 王丽敏 徐凤 胡静雅		
发明人	缪芬芳 董彦鹏 白娟 王先炜 姜平 王丽敏 徐凤 胡静雅		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/531 G01N2333/01		
代理人(译)	郑明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种猪圆环病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法。该猪圆环病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒含有：用纯化的重组猪圆环病毒2型核衣壳蛋白CapC蛋白作未抗原制备的包被板、辣根过氧化物酶标记的分泌PCV2的单克隆抗体杂交瘤细胞制备的PCV2酶标抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液(10×)、阳性血清对照、阴性血清对照、TMB底物稀释液、终止液。本发明利用原核表达系统表达CapC蛋白，针对PCV2病毒的单克隆抗体作为酶标抗体建立阻断ELISA，具有特异性好，敏感性高的特点，可用于临床猪血清样品PCV2抗体的检测。

名称	PI值 (%)		
	B01	B02	B03
M1	80.9	83.7	78.2
M2	82.3	81.9	75.4
M3	62.1	60.3	60.8
M4	64.7	61.2	57.3
M5	42.3	44.3	42.5
M6	48.7	42.7	44.1