



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107064488 B

(45)授权公告日 2019.04.16

(21)申请号 201710303456.9

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2017.05.02

审查员 马立楠

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107064488 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(73)专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 尹双辉 杨顺利 尚佑军 吴锦艳

袁莉 刘湘涛 蔡建平

(74)专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心

62100

代理人 张克勤

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,属于生物领域,方法是将CSFV疫苗株C-株细胞培养抗原灭活、浓缩、不同截留分子量层析柱纯化全抗原,稳定包被酶标板作为检测抗原,结合辣根过氧化物酶标记羊抗CSFV高免血清抗体作为阻断抗体,TMB底物和终止液的联合使用,使用完整CSFV粒子作为抗原用于检测抗猪瘟病毒血清总抗体的固相阻断ELISA检测方法。可以系统、真实、完整描述猪瘟疫苗免疫过程中抗体产生的特征规律,对猪瘟疫苗接种和防疫具有重要意义。

1. 一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,其特征在于:将CSFV疫苗株C-株细胞培养抗原灭活、纯化全抗原,稳定包被酶标板作为检测抗原,结合辣根过氧化物酶标记羊抗CSFV高免血清IgG抗体作为阻断抗体,TMB底物和终止液的联合使用,使用完整CSFV粒子作为抗原用于抗猪瘟病毒血清总抗体的固相阻断ELISA检测;

抗原纯化过程为,用无菌0.45 μ m滤膜将抗原过滤后转移至滤膜截留分子量5kDa容积为15mL层析柱中,4 $^{\circ}$ C温度,3400rpm/min转速下离心至体积为1-2ml;加入5mL 0.45 μ m滤膜过滤0.01M的pH值为7.0的PBS缓冲液,相同条件下离心,反复加入PBS缓冲液,直至滤过液pH值达到6.9-7.4;

阶梯式分子量截留方法纯化CSFV抗原:根据CSFV病毒分子量、病毒粒子大小和编码囊膜蛋白的特征,采用不同截留分子量的层析柱纯化目的抗原;

(1) 10kDa层析柱除去杂蛋白将10mL上步骤获得抗原移至截留分子量为10kDa层析柱中,3400rpm/min,4 $^{\circ}$ C离心30min,加入0.01M PBS的pH7.0的缓冲液5ml,重复3次,直到5 μ l流穿液体加入到200 μ l/管蛋白指示剂中,即Bradford蛋白指示剂:100mg G-250,50ml 95%乙醇,100ml浓磷酸,补去离子水至1000ml,200 μ l/管分装,常温避光保存,不显示蓝色,说明分子量低于10kDa的蛋白已被移除,收集最后一次的50 μ l流穿液作为待检测样品,其余弃去;

(2) 阶梯式截留分子量层析柱移除杂蛋白依次使用截留分子量为15kDa、20kDa、25kDa、30kDa层析柱去除杂蛋白,操作方法同步骤(1),收集最后一次50 μ l流穿液作为待检测样品,其余弃去;

(3) 截留分子量45kDa和60kDa层析柱收集E0蛋白操作方法同上,但需将两种层析柱流穿液和截留液体均留存,以待SDS-PAGE电泳检测;

(4) 截留分子量100kDa层析柱收集CSFV粒子方法同上,将层析柱流穿液和截留液体保留。

2. 根据权利要求1所述的一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,其特征在于:抗原是利用CSFV活疫苗作为原料,在PK-15细胞上增殖,效价为 $5 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ 兔体反应/mL,RT-PCR扩增CSFV编码E2基因阳性。

3. 根据权利要求2所述的一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,其特征在于:CSFV抗原灭活过程为,反复冻融5次,4000rpm/min转速,4 $^{\circ}$ C温度下离心30分钟,弃去沉淀,收集上清液,在56 $^{\circ}$ C温度下水浴,灭活10分钟。

4. 根据权利要求3所述的一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,其特征在于:羊抗CSFV高免血清IgG抗体纯化方法为质量浓度为10%-50%硫酸铵沉淀法。

5. 根据权利要求4所述的一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,其特征在于:辣根过氧化物酶标记纯化IgG抗体的方法为摩尔浓度0.05-0.1M过碘酸钠法。

一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物领域,具体涉及一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法。

背景技术

[0002] 猪瘟(CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的一种严重威胁养猪业安全的、具有重要经济意义的烈性病毒性疾病之一,被我国列为一类传染病。CSFV可感染各生长阶段猪,给养猪业造成了巨大经济损失。欧洲部分国家和美国等养猪大国已消灭猪瘟,成为“无猪瘟”国家,禁止使用猪瘟疫苗免疫,通过严格监测措施防止猪瘟发生。我国目前主要采用接种兔化弱毒疫苗(C-株)预防猪瘟发生。猪瘟兔化弱毒疫苗不会在免疫动物过程中发生垂直传播和水平传播,不会在宿主体内发生毒力变异,是举世公认的、安全、高效的疫苗株。

[0003] 国务院办公厅印发的《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020年)》将猪瘟列为优先防治和重点防范的16种动物疫病名录中,位列5种重点防控动物疫病之一。为实现“规划”中关于猪瘟防控的目标,需要通过开展严格的病原学和血清学监测与跟踪调查,为疫情预警、防疫决策及疫苗研制与应用提供科学依据。CSFV血清抗体动态监测是评估疫苗免疫效果、制定合理防疫策略的关键环节。由于缺乏诊断试剂研发的核心技术,国内商品化CSFV血清抗体诊断试剂盒主要来自国外进口,价格昂贵,且均以抗体定性作为判定结果判定依据,不符合我国猪瘟免疫现状。

[0004] 目前,由于CSFV病毒为“囊膜包被衣壳的结构(即E0-E1-E2形成的囊膜结构包被在衣壳蛋白表面后形成完整的病毒粒子)”,在利用常规的蔗糖梯度超速离心或氯化铯超速离心方法纯化CSFV时几乎难以获得完整的病毒颗粒。学者推测,超速离心时,病毒粒子在通过蔗糖或氯化铯过程中,囊膜结构和衣壳发生物理性分离,破坏了完整的病毒粒子,因此获得完整CSFV粒子成为本研究领域的技术难题。直到今天,尚无通过上述方法获得完整CSFV粒子的报道。

发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,以解决现有方法不能获得完整CSFV粒子的问题。

[0006] 本发明技术方案如下:一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法,将CSFV疫苗株C-株细胞培养抗原灭活、纯化全抗原,稳定包被酶标板作为检测抗原,结合辣根过氧化物酶标记羊抗CSFV高免血清IgG抗体作为阻断抗体,TMB底物和终止液的联合使用,使用完整CSFV粒子作为抗原用于抗猪瘟病毒血清总抗体的固相阻断ELISA检测。

[0007] 优选地,抗原是利用CSFV活疫苗作为原料,在PK-15细胞上增殖,效价为 $5 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$ 兔体反应/mL,RT-PCR扩增CSFV编码E2基因阳性。鉴定CSFV抗原的滴度。

[0008] 优选地,CSFV抗原灭活过程为,反复冻融5次,4000rpm/min转速,4℃温度下离心30分钟,弃去沉淀,收集上清液,在56℃温度下水浴,灭活10分钟。制备灭活抗原,同时灭活过程可以起到灭活补体和细菌的作用,防止抗原被污染,保持抗原纯净性。

[0009] 优选地,抗原纯化过程为,用无菌0.45μm滤膜将抗原过滤后转移至滤膜截留分子量5KDa容积为15mL层析柱中,4℃温度,3400rpm/min转速下离心至体积约为1-2ml;加入5mL 0.45μm滤膜过滤0.01M的pH值为7.0的PBS缓冲液,相同条件下离心,反复加入PBS缓冲液,直至滤过液pH值达到6.9-7.4。再次除去可能存在的细菌污染,溶蚀除去分子量<5KDa的杂蛋白。

[0010] 优选地,纯化CSFV粒子层析柱的截留分子量为5kDa-150Kda。利用不同截留分子梯度的层析柱逐步除去培养基中的杂蛋白,从而获得纯度较高的CSFV抗原。

[0011] 优选地,羊抗CSFV高免血清IgG抗体纯化方法为质量浓度为10%-50%硫酸铵沉淀法。获得可用于HRP标记的高纯度抗CSFV的多克隆羊抗CSFV的IgG抗体。

[0012] 优选地,辣根过氧化物酶标记纯化IgG抗体的方法为摩尔浓度0.05-0.1M过碘酸钠法。用HRP标记羊抗CSFV-IgG抗体,制备酶标记竞争抗体。

[0013] 本发明在探索CSFV纯化方法过程中发现,以不同截留分子量梯度的层析柱作为纯化工具,在低速离心条件下可以获得完整的CSFV颗粒,从而解决了CSFV抗原纯化的技术难题。

[0014] 本发明所涉及的猪瘟抗原制备方法是研制猪瘟病毒血清总抗体阻断ELISA试剂盒的关键材料,本方法操作简便,过程简单易行,以其作为抗原研制的试剂盒具有敏感性和特异性好、质量稳定、检测结果能够反应疫苗免疫效果的优点,具有广阔的市场应用前景。

[0015] CSFV是有囊膜的RNA病毒,基因组长约12.3kb,含一个开放式阅读框架(ORF),翻译成大小约3898个氨基酸的前体蛋白,推测病毒粒子大小在38-60nm之间,分子量在438kDa左右,编码C、Erns (E0, gp44-48kDa)、E1 (gp33kDa)、E2 (gp51-55kDa)等4个结构蛋白,其中E0、E1和E2蛋白组成病毒囊膜,E1不会刺激产生抗体。CSFV感染细胞过程中,E0蛋白在内质网积累,在囊膜表面形成97kDa的同源二聚体,由于其分子内缺乏疏水区,与囊膜结合能力很弱,从而容易脱落,随后分泌到细胞外。E2和C均可诱导血清抗体产生。

[0016] 本发明利用CSFV疫苗株(C-株)细胞培养病毒灭活、浓缩、不同截留分子量层析柱纯化全抗原,稳定包被酶标板的微孔中作为检测抗原,结合辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗CSFV高免血清抗体作为阻断抗体,TMB底物和终止液的联合使用,包被抗原为纯化的完整猪瘟病毒粒子抗原。研制一种使用完整CSFV粒子作为抗原用于检测抗猪瘟病毒血清总抗体的固相阻断ELISA检测方法,可以系统、真实、完整描述猪瘟疫苗免疫过程中抗体产生的特征规律,对猪瘟疫苗接种和防疫具有重要意义。

[0017] 本发明涉及包被抗原为纯化的完整猪瘟病毒粒子抗原。鉴定纯化完整CSFV粒子的方法为间接ELISA法。间接法的目的是为了进一步鉴定层析柱截留的蛋白是CSFV抗原。检测猪瘟病毒血清抗体的反应模式为固相阻断ELISA法。用本方法制备的抗原研制的猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所检测PRRSV、PRV、FMDV O型和A型、PCV2和牛源BVDV血清时,不会产生交叉反应。

附图说明

[0018] 图1是一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法的原理图。

具体实施方式

[0019] 下面对本发明做进一步详细的说明,但不以任何方式限制本发明。

[0020] 1. CSFV抗原制备

[0021] 1.1 CSFV活疫苗(传代细胞源)抗原制备:

[0022] 按照《中国兽药典》所述方法,由本实验室在PK-15细胞上增殖,抗原效价为 8×10^3 兔体反应/mL,RT-PCR扩增CSFV编码E2基因阳性。

[0023] 1.2 CSFV活疫苗抗原灭活:

[0024] 收获CSFV抗原反复冻融5次,4000rpm/min,4℃离心30分钟,弃去沉淀,收集上清液56℃水浴中灭活10分钟,以其作为纯化原料。

[0025] 1.3 CSFV活疫苗抗原纯化程序

[0026] 1.3.1 替换缓冲液用无菌0.45μm滤膜将“1.2”抗原过滤,液体转移至滤膜截留分子量5kDa、容积15mL层析柱中,4℃,3400rpm/min离心至体积约为1-2ml(眼观液体颜色为淡黄色);多次重复加入“1.2”抗原,离心直至层析柱内残留体积达6-8mL,且长时间离心体积不发生改变为止(加50mL左右抗原,即可达到要求);加入5mL 0.45μm滤膜过滤0.01M PBS(pH7.0)缓冲液,相同条件下离心,反复加入PBS缓冲液,直至滤过液pH值为7.0(加40mLPBS即达到目的);此时抗原为缓冲液为0.01M PBS(pH7.0)。

[0027] 1.3.2 阶梯式分子量截留方法纯化CSFV抗原

[0028] 根据CSFV病毒分子量、病毒粒子大小和编码囊膜蛋白的特征,采用不同截留分子量的层析柱纯化目的抗原。

[0029] 1) 10kDa层析柱除去杂蛋白将10mL“1.3.1”获得抗原移至截留分子量为10kDa层析柱中,3400rpm/min,4℃离心30min,加入0.01M PBS(pH7.0)缓冲液5ml,重复3次,直到5μl流穿液体加入到200μl/管蛋白指示剂(Bradford蛋白指示剂:100mg G-250,50ml 95%乙醇,100ml浓磷酸,补去离子水至1000ml,200μl/管分装,常温避光保存)中,不显示蓝色,说明分子量低于10kDa的蛋白已被移除,收集最后一次的50μl流穿液作为待检测样品,其余弃去。

[0030] 2) 阶梯式截留分子量层析柱移除杂蛋白依次使用截留分子量为15kDa、20kDa、25kDa,30kDa层析柱去除杂蛋白,操作方法同“1)”,收集最后一次50μl流穿液作为待检测样品,其余弃去。

[0031] 3) 截留分子量45kDa和60kDa层析柱收集E0蛋白基本操作方法同上。但需将两种层析柱流穿液和截留液体均留存,以待SDS-PAGE电泳检测。

[0032] 4) 截留分子量100kDa层析柱收集CSFV粒子基本方法同上。将层析柱流穿液和截留液体保留,以待SDS-PAGE电泳检测。

[0033] 1.3.3 检测纯化结果

[0034] 1) SDS-PAGE电泳检测纯化结果:利用SDS-PAGE蛋白电泳检测10kDa、15kDa、20kDa、25kDa,30kDa、45kDa、60kDa、100kDa流穿液和45kDa、60kDa、100kDa层析柱截留液体。

[0035] 检测结果,10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的流穿液中未检测到CSFV粒子和E0

蛋白,在45kDa、60kDa、100kDa层析柱截留液体和流穿液中均发现与目的蛋白分子量一至的蛋白条带。3个分子量的流穿液和截留液体再次用截留分子量为10kDa层析柱浓缩至2-3mL,分装50 μ l/管分装,加入50%甘油存于-70 $^{\circ}$ C,并留样用于测浓度和进一步检测。

[0036] 2) 间接ELISA实验

[0037] 利用间接ELISA方法检测靶抗原纯化效果。基本操作方法如下:将45kDa、60kDa、100kDa截留液体和流穿液体用碳酸盐缓冲液(pH9.6)做稀释液,进行系列稀释,1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640,50 μ l/孔包被酶标板,室温孵育过夜,1 \times PBST洗板5次,加入1:20稀释的CSFV抗体阳性血清和阴性血清,37 $^{\circ}$ C孵育1h,洗板,加入羊抗猪HRP-IgG酶标记抗体,37 $^{\circ}$ C孵育45min,洗板,加入TMB底物缓冲液,室温避光孵育12-15min,加入1.5M H₂SO₄终止反应,在450nm波长条件下读取吸光度值,以截留分子45kDa作为实例,结果见表1。截留分子量60kDa、100kDa层析柱的间接ELISA结果与45kDa接近,截留液和流穿液中均含有目的抗原,测浓度后分装保存-70 $^{\circ}$ C。

[0038] 表1间接ELISA检测截留分子量45kDa层析柱流穿液和截留液目的抗原

截留分子 量 45kDa	1:10		1:20		1:40		1:80		1:160		1:320		1:640	
	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
CSFV+	1.6	2.9	1.3	2.5	1.2	2.3	1.0	2.4	0.6	2.1	0.4	1.8	0.4	1.2
CSFV-	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
P/N	5.3	9.7	6.5	8.3	4.0	7.7	2.5	6.0	2.0	7.0	1.0	6.0	1.3	4.0
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
备注	F: 流穿液, R: 截留液, P/N 阳性/阴性值; CSFV+: 猪瘟阳性血清, CSFV-: 猪瘟阴性血清													

[0039] 3) 小结:根据已有文献报道,利用蔗糖梯度离心和氯化铯浓缩分离等方式纯化CSFV抗原,超速离心和高强度粒子浓度导致病毒囊膜与衣壳物理性分离,无法获得完整的病毒粒子,病毒的生物学功能受到影响,是一直困扰CSFV纯化的难题。本发明所涉及利用层析柱截留分子量梯度的方法纯化猪瘟病毒具有简单易行、低速离心、中性缓冲液下操作,可获得结构完整、生物学活性良好的目的抗原,并且整个实验操作不需要大型仪器、常规实验室即可完成。纯化CSFV抗原过程中,利用低分子量层析柱除去杂质蛋白,而靶抗原主要分布在截留分子量45kDa、60kDa、100kDa的流穿液和截留液中,其中截留液中的目的蛋白浓度高于流穿液。

[0041] 1.4羊抗CSFV高免血清的制备、多克隆IgG抗体纯化、定量和HRP标记

[0042] 1.4.1羊抗CSFV抗原高免血清制备。

[0043] 动物实验过程严格遵守《中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物管理及伦理委员会章程》和相关的管理办法,贯彻执行国家和地方有关动物福利伦理规定。

[0044] 选用兰州兽医研究所实验动物中心提供的30kg左右健康山羊2只,首免用弗氏完全佐剂乳化500 μ g/只纯化后CSFV抗原,背部皮下和后肢肌肉等部位多点接种。加强免疫的剂量约为首次剂量为300 μ g),弗式不完全佐剂乳化。每2~3周加强免疫一次。检测每次免疫前,前腔静脉收集血清的检测抗体效价,当琼脂糖扩散实验达到1:64时,即可放血,分离血清用于抗体纯化。

[0045] 1.4.2多克隆IgG抗体纯化、鉴定和定量

[0046] 1) IgG抗体纯化取20ml血清,加生理盐水20ml,再逐滴加入(NH₄)₂SO₄饱和溶液10ml,使成20% (NH₄)₂SO₄溶液,边加边搅拌,充分混合后,静置30min。4℃,3000r/min,离心20min,弃去沉淀,此时即为除去纤维蛋白的血清,加(NH₄)₂SO₄饱和溶液30ml,使成50% (NH₄)₂SO₄溶液,充分混合,静置30min,而后3000r/min,4℃离心20min,弃上清。于沉淀中加20ml生理盐水,使之溶解,加入保存于4℃的(NH₄)₂SO₄饱和溶液10ml,使成33% (NH₄)₂SO₄4℃溶液,充分混合后,静置30min。4℃,3000r/min,离心20min,弃上清,以除去白蛋白。重复此步骤,2-3次。用10ml生理盐水溶解沉淀,装入透析袋。在生理盐水中于4℃透析24h,中间换液数次。离心去沉淀(去除杂蛋白),上清液即为粗提IgG。过DEAE-纤维素层析柱,以0.01mol/LPBS(pH7.4)和0.03mol/L NaCl洗脱,收集洗脱液即为纯化的IgG抗体。

[0047] 2) IgG的纯度鉴定—免疫电泳鉴定孔内加待测样品,电泳后,在槽内加抗IgG血清,琼脂扩散24h,观察结果。如果提取的IgG纯的话,则只出现一条弧形的沉淀线,且沉淀线位于γ-球蛋白区。此鉴定同时进行全血清及抗血清抗体的免疫电泳,以资比较。

[0048] 3) 羊抗CSF病毒抗原IgG定量及保存

[0049] 利用BSA方法定量纯化IgG抗体,计算含量。分装纯品IgG 1mg/ml冻干4℃保存。

[0050] 1.4.3过碘酸钠法制备HRP-IgG(ELISA阻断抗体,即:酶结合物)

[0051] a.称取5mg HRP溶解于1ml蒸馏水中。

[0052] b.于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20分钟。

[0053] c.将上述溶液装入透析袋,对1mM的醋酸钠(pH4.4)缓冲液4℃过夜透析。

[0054] d.加20μl 0.2M碳酸盐(pH9.5)缓冲液,使HRP的pH值升高到9.0~9.5,然

[0055] 后立即加入5mg IgG,在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2小时。

[0056] e.加0.1ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再置4℃2小时。

[0057] f.将上述液装入透析袋中,对0.15MPBS(pH7.4)透析,4℃过夜。

[0058] g.在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1小时。

[0059] h.3000rpm离心半小时,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀

[0060] 物溶于少量0.15M的PBS(pH7.4)中。

[0061] i.将上述溶液装入透析袋中,对0.15M的PBS(pH7.4)缓冲液透析,去除铵离子后(用蔡氏试剂检测),10,000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为HRP标记的酶结合物,加入40%甘油于-10℃下保存。

[0062] h.结果判定测定吸光度值,利用公式计算IgG量。

[0063] $IgG量(mg/ml) = (OD_{280nm} - OD_{403nm} \times 0.3) \times 0.62$

[0064] 将定量的酶标记抗体,1ml/瓶分装标定好效价的HRP-IgG抗体,标签上注明批次、效价、制备时间和数量,置于-70℃保存备用。

[0065] 2.猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA建立

[0066] 2.1抗原包被

[0067] 用碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释纯化CSFV抗原成1.2nng/mL,100μl/孔加入酶标板中,封口膜密封,置4℃过夜孵育。弃去孔内液体,300μl/孔洗涤液洗涤3次,最后一次拍干。加入200μl/孔封闭液(5%马血清,3%的明胶,5%海藻糖,0.01mol/L PBS pH7.4)室温作用30分钟,洗涤3次后拍干。然后干燥,加入干燥剂,抽真空后密封,即为抗原包被板。

- [0068] 2.2加入阴、阳性对照血清和待检测血清样品
- [0069] 抗原包被板中分别加入100 μ l/孔的阴、阳性对照血清,各加4孔,而后将反应板置于微量振荡器上震荡30秒,封板膜封板后,37 $^{\circ}$ C孵育90min,洗涤3次后拍干。
- [0070] 2.3加入HRP标记阻断抗体
- [0071] 100 μ l/孔加入HRP标记羊抗猪瘟病毒抗体(12.3ng/ml),37 $^{\circ}$ C孵育90min,洗涤3次后拍干。
- [0072] 2.4显色
- [0073] 100 μ l/孔加入TMB显色液,置于室温(18~25 $^{\circ}$ C)避光环境静置反应30分钟。2.5终止反应和读取吸光度OD450nm
- [0074] 50 μ l/孔加入终止液,轻微混匀终止反应。利用酶标仪读取吸光度值OD450nm。终止反应后,应在30分钟内完成吸光度值测量。
- [0075] 2.6结果判定
- [0076] (1)实验成立条件
- [0077] 阴性对照血清吸光度值OD450>0.5,阳性对照血清阻断率 \geq 40%时,实验成立。
- [0078] (2)结果判定公式
- [0079] 阻断率计算公式:[(阴性OD值-样品OD值) \div 阴性OD值] \times 100%
- [0080] (3)血清判定标准
- [0081] 阴性样品:样品阻断率<40%,免疫失败。
- [0082] 阳性样品:样品阻断率 \geq 40%,免疫合格。
- [0083] 3.猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA建立特异性实验
- [0084] 3.1目的
- [0085] 用于验证猪瘟病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒的特异性。
- [0086] 3.2实验材料
- [0087] 猪瘟病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒、猪瘟病毒抗体阴、阳性对照血清、待检猪血清样品:PRRSV、PRV、FMDV 0型和A型、PCV2和牛源BVDV各3份。
- [0088] 3.3检验步骤
- [0089] (1)加入阴、阳性对照血清和待检验血清样品
- [0090] 抗原包被板中分别加入100 μ l/孔的阴、阳性对照血清、猪瘟病毒抗体阴、阳性对照血清、待检猪血清样品:PRRSV、PRV、FMDV 0型和A型、PCV2和牛源BVDV,各加2孔,而后将反应板置于微量振荡器上震荡30秒,封板膜封板后,37 $^{\circ}$ C孵育60分钟,洗涤3次后拍干。
- [0091] (2)加入辣根过氧化物酶标记抗体
- [0092] 100 μ l/孔加入辣根过氧化物酶标记抗体,37 $^{\circ}$ C孵育120分钟,洗涤3次后拍干。
- [0093] (3)显色
- [0094] 100 μ l/孔加入TMB显色液(显色剂A和显色剂B按照1:1比例充分混匀),置于室温(18~25 $^{\circ}$ C)避光环境中静置30分钟。
- [0095] (4)终止反应和读取吸光度OD450nm
- [0096] 50 μ l/孔加入终止液,轻微混匀终止反应。利用酶标仪读取吸光度值OD450。终止反应后,应在30分钟内完成吸光度值测量。
- [0097] (5)结果判定

[0098] 按照6.6所述方法判定结果。表2检测结果表明,本发明所涉及方法与猪群中常见的传染性疫病的致病原,包括PRRSV、PRV、FMDV O型和A型、PCV2所产生的血清抗体不会发生交叉反应,具有良好的CSFV血清抗体特异性,尤其需要强调的是,与牛源BVDV阳性血清呈阴性反应,说明本方法所使用抗原与BVDV感染所产生的抗体不存在交叉反应。

[0099] 表2猪瘟病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒的特异性实验

病原	样品			结果
	S1	S2	S3	
PRV	Neg ^b	Neg	Neg	Neg
FMDV/O	Neg	Neg	Neg	Neg
FMDV/A	Neg	Neg	Neg	Neg
PCV2	Neg	Neg	Neg	Neg
BVDV	Neg	Neg	Neg	Neg

[0101] Neg^b表示检测结果阴性

[0102] 4. 猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA比较研究

[0103] 目前,国内最常用的商品化猪瘟血清抗体检测ELISA试剂盒是IDEXX公司销售的IDEXX CSFV Ab Kit,本发明选择该试剂盒作为比较研究的产品,通过检测47份来自田间的猪血清样品,计算二者的阳、阴性检出率,比较两种方法的优缺点。检测结果见表3,本发明所涉及的猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA(简称LZCSFVAb kit)的阳性检出率为70.21%(33/47),IDEXX CSFV Ab Kit为55.31%(26/47),本发明所涉及试剂盒的阳性检出率高于进口的IDEXX公司的产品;同时,阴性检出率为29.79%(14/47),IDEXX公司的为30.04%(14/47),可疑样品数为10.64%(5/47);二者阳性符合数为17份样品,阴性符合数为5份样品。

[0104] 表3猪瘟病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒的比较研究

项目	阳性 检出率%	阴性 检出率%	可疑%	阳性 符合数	阴性 符合数	BVDV 阳性血清	备注
LZCSFVAb kit	70.21 (33/47)	29.79 (14/47)	—	—	—	—(3/3)	阻断法
IDEXX CSFV Ab kit	55.31 (26/47)	34.04 (16/47)	10.64 (5/47)	17 (33+26)	5	+(2/3) ±(1/3)	阻断法

[0106] 通过两种方法的比较后发现,本发明所涉及试剂盒的阳性检出率与临床猪瘟血清抗体的实际情况高度吻合,推测原因可能与使用检测抗原相关。由于知识产权保护原因,进口IDEXX试剂盒所使用的检测抗原未知,所以无法明晰阐述阳性检出率相差近15%的原因。因为本发明使用猪瘟羊化弱疫苗毒株完整病毒作为检测抗原,而我国采取猪瘟疫苗强制免疫政策控制猪瘟,疫苗覆盖率几乎达到100%,国内免疫猪群的总体血清抗体阳性率在70%以上,“表3”的结果应该更加符合我们猪瘟防控实际,所以本发明所涉及检测方法是我

国猪瘟防控政策中可依赖的、可靠的检测工具。

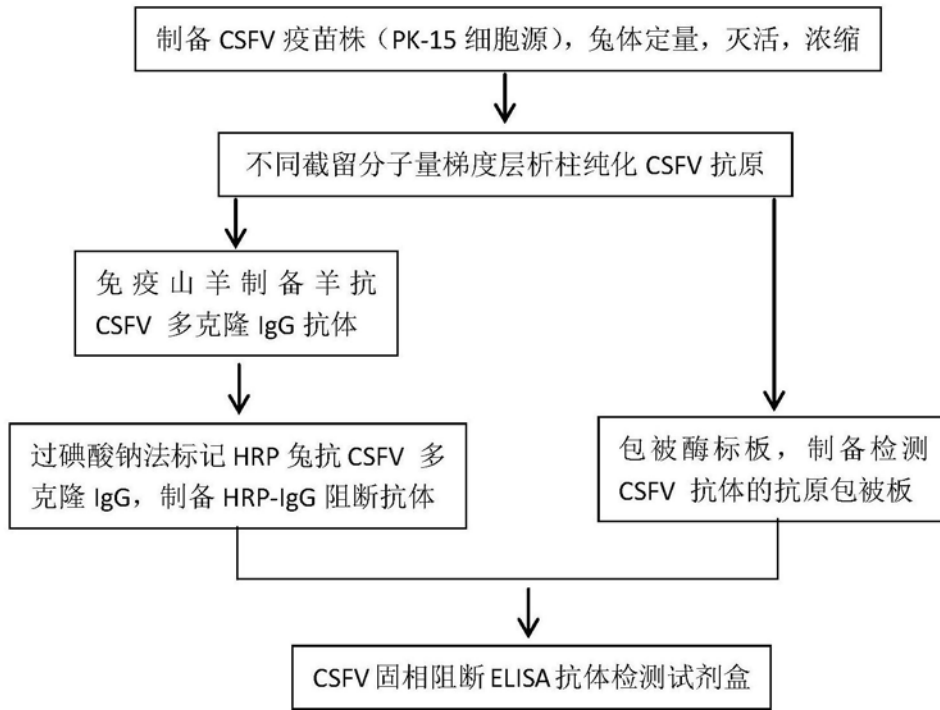


图1

专利名称(译)	一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN107064488B	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201710303456.9	申请日	2017-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	尹双辉 杨顺利 尚佑军 吴锦艳 袁莉 刘湘涛 蔡建平		
发明人	尹双辉 杨顺利 尚佑军 吴锦艳 袁莉 刘湘涛 蔡建平		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	张克勤		
其他公开文献	CN107064488A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪瘟病毒血清总抗体固相阻断ELISA试剂盒所用抗原的制备方法，属于生物领域，方法是将CSFV疫苗株C-株细胞培养抗原灭活、浓缩、不同截留分子量层析柱纯化全抗原，稳定包被酶标板作为检测抗原，结合辣根过氧化物酶标记羊抗CSFV高免血清抗体作为阻断抗体，TMB底物和终止液的联合使用，使用完整CSFV粒子作为抗原用于检测抗猪瘟病毒血清总抗体的固相阻断ELISA检测方法。可以系统、真实、完整描述猪瘟疫苗免疫过程中抗体产生的特征规律，对猪瘟疫苗接种和防疫具有重要意义。

截留分子 量 45kDa	1:10		1:20		1:40		1:80		1:160		1:320		1:640	
	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R
CSFV+	1.6	2.9	1.3	2.5	1.2	2.3	1.0	2.4	0.6	2.1	0.4	1.8	0.4	1.2
CSFV-	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
P/N	5.3	9.7	6.5	8.3	4.0	7.7	2.5	6.0	2.0	7.0	1.0	6.0	1.3	4.0
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
备注	F: 流穿液, R: 截留液, P/N 阳性/阴性值; CSFV+: 猪瘟阳性血清, CSFV-: 猪瘟阴性血清													