



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107219366 A

(43)申请公布日 2017.09.29

(21)申请号 201710433401.X

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.06.09

G01N 33/535(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 21/78(2006.01)

CCTCC NO:C201779 2017.05.17

G01N 21/31(2006.01)

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市玄武区钟灵街
50号

(72)发明人 张浩明 杨利 于晓明 陈瑾
郑其升 侯继波

(74)专利代理机构 南京汇盛专利商标事务所
(普通合伙) 32238

代理人 袁静

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

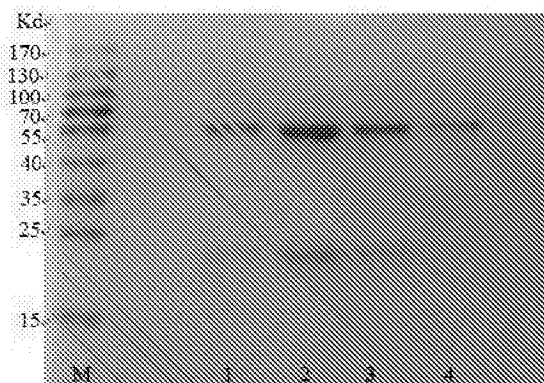
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的
夹心ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒,涉及生物检测试剂领域。分泌抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株10A4,保藏号为:CCTCC NO:C201779。本发明还提供所述杂交瘤细胞株分泌的抗PEDV单克隆抗体10A4'和用于检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒,该试剂盒包括检测板,所述检测板是采用所述抗PEDV单克隆抗体10A4'包被的酶标板。本发明筛选到了具有较高特异性、较高亲和力的抗PEDV单克隆抗体,采用该单克隆抗体制备的试剂盒检测猪初乳,具有较高的灵敏度、特异性和重复性,假阳性率低。



1. 一种分泌抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株10A4, 保藏号为: CCTCC NO: C201779。

2. 权利要求1所述杂交瘤细胞株分泌的抗PEDV单克隆抗体10A4'。

3. 一种用于检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒, 其特征在于包括检测板, 所述检测板是采用权利要求2所述抗PEDV单克隆抗体10A4' 包被的酶标板。

4. 根据权利要求3所述检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒, 其特征在于所述抗PEDV单克隆抗体10A4' 的包被浓度为1-3 μ g/mL。

5. 根据权利要求3或4所述检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒, 其特征在于所述试剂盒还包括将 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL的PEDV病毒液灭活后得到的PEDV夹心抗原。

6. 根据权利要求5所述检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒, 其特征在于所述试剂盒的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgA抗体。

7. 根据权利要求6所述检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒, 其特征在于所述试剂盒还包括阳性对照、阴性对照、样品稀释液、洗涤液、TMB底物显色液A、B液和终止液; 所述阳性对照是从免疫两次TGEV和PEDV二联灭活苗的母猪初乳中分离的乳清; 所述阴性对照是从未接种PEDV疫苗的SPF级猪初乳中分离的乳清; 所述样品稀释液是含有1%BSA的PBST缓冲液; 所述洗涤液为PBST缓冲液; 所述终止液为2M的硫酸水溶液。

8. 采用权利要求7所述试剂盒检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的方法, 其特征在于包括如下步骤:

(1) 夹心抗原孵育: 在检测板的每个孔中加入PEDV夹心抗原, 在37 $^{\circ}$ C孵育1h, 洗涤;

(2) 加入待检样品: 将待检样品用样品稀释液稀释40倍, 以100 μ L/孔加入待检样品反应孔, 阴性对照孔内加入阴性对照, 阳性对照孔内加入阳性对照, 37 $^{\circ}$ C反应30min, 洗涤;

(3) 加入酶标二抗: 每个孔中均加入100 μ L酶标二抗, 37 $^{\circ}$ C反应30min, 洗涤;

(4) 显色与终止: 将TMB底物显色液A、B液等体积混合, 每个孔中均加入100 μ L TMB底物显色液A、B液的等体积混合液, 37 $^{\circ}$ C避光反应10min, 随后每个孔中均加入100 μ L终止液, 终止反应;

(5) 判定: 读取终止反应后的检测板各孔的OD₄₅₀值, 按照如下方法判定结果: 如果阴性对照孔的OD₄₅₀值<0.2、且阳性对照孔的OD₄₅₀值>0.8, 那么当待样品反应孔OD₄₅₀值 $\geq$ 0.250为阳性, 当待检样品反应孔OD₄₅₀值<0.250为阴性。

一种检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测试剂领域,具体涉及一种检测猪初乳中PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)引起的猪的一种急性肠道传染病,以水泻、呕吐和脱水为特征,病理变化主要表现在猪的空肠和回肠部分的肠绒毛的萎缩和脱落。PEDV对猪的危害很大,各种年龄的猪均可发病,对哺乳仔猪的危害最为严重,20日龄以内仔猪死亡率达95%以上,给养猪业带来重大经济损失。

[0003] 仔猪出生时体内无免疫球蛋白,出生后通过吮吸初乳的方式获得母源抗体。初乳中含有大量的IgG和较多的IgA。IgG的分子量较大,不容易穿过肠壁进入肠腔,对胃酸和消化酶的抵抗力较差;而IgA分子量较小,可以抵御胃酸和消化酶的消化,并且与肠黏膜有亲和作用,所以初乳中IgA是在肠道中发挥对仔猪的保护作用的主要成分。通过检测免疫母猪分泌的初乳中抗PEDV特异性IgA抗体,对妊娠母猪流行性腹泻疫苗免疫效果评价、哺乳仔猪免疫程序制定、流行状态监测均具有重要意义。

[0004] 目前使用较多的方法是测定初乳中PEDV的中和抗体,但是初乳中不但含有IgA抗体,还含有大量的抗PEDV特异性IgG抗体,干扰了PEDV特异性IgA抗体检测的准确性。现有技术中,还没有能够准确检测猪初乳中PEDV特异性IgA抗体的方法。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种分泌抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株10A4、采用该细胞株产生的单克隆抗体制备的检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒,对猪初乳样品进行检测,具有较高的特异性、灵敏度和重复性。

[0006] 本发明的目的采用如下技术方案实现:

[0007] 一种分泌抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株10A4,保藏号为:CCTCC NO:C201779。

[0008] 本发明还提供所述杂交瘤细胞株分泌的抗PEDV单克隆抗体10A4'。

[0009] 本发明还提供一种用于检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒,其包括检测板,所述检测板是采用所述抗PEDV单克隆抗体10A4' 包被的酶标板。

[0010] 优选的技术方案中,所述抗PEDV单克隆抗体10A4' 的包被浓度为1-3 μ g/mL。

[0011] 在本发明中,所述试剂盒还包括将 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL的PEDV病毒液灭活后得到的PEDV夹心抗原。

[0012] 在本发明中,所述试剂盒的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgA抗体。

[0013] 在本发明中,所述试剂盒还包括阳性对照、阴性对照、样品稀释液、洗涤液、TMB底物显色液A、B液和终止液;所述阳性对照是从免疫两次TGEV和PEDV二联灭活苗的母猪初乳

中分离的乳清;所述阴性对照是从未接种PEDV疫苗的SPF级猪初乳中分离的乳清;所述样品稀释液是含有1%BSA的PBST缓冲液;所述洗涤液为PBST缓冲液;所述终止液为2M的硫酸水溶液。

[0014] 最后,本发明提供采用所述试剂盒检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的方法,包括如下步骤:

[0015] (1) 夹心抗原孵育:在检测板的每个孔中加入PEDV夹心抗原,在37℃孵育1h,洗涤;

[0016] (2) 加入待检样品:将待检样品用样品稀释液稀释40倍,以100μL/孔加入待检样品反应孔,阴性对照孔内加入阴性对照,阳性对照孔内加入阳性对照,37℃反应30min,洗涤;

[0017] (3) 加入酶标二抗:每个孔中均加入100μL酶标二抗,37℃反应30min,洗涤;

[0018] (4) 显色与终止:将TMB底物显色液A、B液等体积混合,每个孔中均加入100μLTMB底物显色液A、B液的等体积混合液,37℃避光反应10min,随后每个孔中均加入100μL终止液,终止反应;

[0019] (5) 判定:读取终止反应后的检测板各孔的OD₄₅₀值,按照如下方法判定结果:如果阴性对照孔的OD₄₅₀值<0.2、且阳性对照孔的OD₄₅₀值>0.8,那么当待样品反应孔OD₄₅₀值≥0.250为阳性,当待检样品反应孔OD₄₅₀值<0.250为阴性。有益效果:

[0020] PEDV疫苗免疫妊娠母猪,可以在初乳中产生抗PEDV特异性IgA抗体,并通过哺乳进入哺乳仔猪肠道中发挥中和PEDV病毒作用,实现被动免疫。因此检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体,对于评价PEDV疫苗免疫母猪效果、预测初乳对于哺乳仔猪保护力有重要意义。富含抗PEDV特异性IgA抗体的初乳,可用于新生仔猪的PEDV被动免疫。本发明筛选到了具有较高特异性、较高亲和力的抗PEDV单克隆抗体,采用该单克隆抗体制备的试剂盒检测猪初乳,具有较高的灵敏度、特异性和重复性,假阳性率低。

附图说明

[0021] 图1. SDS-PAGE分析纯化后的抗PEDV单克隆抗体10A4', 其中M:蛋白标准样;1-4:纯化后的单隆抗体10A4'。

具体实施方式

[0022] 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而更为清楚。但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。

[0023] 实例一PEDV病毒液的制备

[0024] 在T75细胞培养瓶中,将非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)用10mL含10%(v/v)新生牛血清的DMEM培养液(购自GIBCO)于5%CO₂、37℃条件下培养48h,使细胞融合度达到90%;弃掉上清,用无血清的DMEM培养液洗涤细胞3次,与PEDV CV777株共孵育1h;加入等体积含4%新生牛血清的DMEM培养液继续培养。待80%以上细胞出现病变时,将细胞于-20℃与室温条件下反复冻融三次,8000rpm高速离心30分钟后取上清,得到PEDV CV777株病毒液。该病毒液测定TCID₅₀后,加入终浓度为0.02%(w/w)的β-丙内酯于4℃灭活病毒24h,再于37℃孵育2h水解β-丙内酯,得到灭活的PEDV CV777株病毒液。

[0025] 实例二 抗PEDV单克隆抗体的制备及纯化

[0026] 1. 免疫原制备

[0027] (1) 病毒粗纯化: 将实例一制备的PEDVCV777株病毒液, 以4℃、100000g超速离心2h, 将沉淀用少量重悬液 (pH7.2、10mM的PBS缓冲液中添加有终浓度为0.15M的NaCl和10mM的EDTA) 重悬24h, 即可获得粗纯化病毒。

[0028] (2) 蔗糖密度梯度离心纯化病毒: 用带有长针头的10mL注射器依次将5mL浓度为30%、45%、60% (w/v) 的蔗糖溶液缓缓加入离心管底部, 制成蔗糖梯度溶液。将3mL粗纯化病毒缓缓加在顶部, 采用100000g水平离心4h。用注射器将30%与45%蔗糖溶液之间的白色亮带取出作为纯化病毒, 采用BCA法测定蛋白浓度后, 放于-20℃保存备用。

[0029] 2. 动物免疫程序

[0030] 将纯化病毒用10mM PBS缓冲液 (pH7.2) 稀释至500μg/mL, 与弗氏完全佐剂等体积混匀乳化, 对4周龄BALB/c雌性小鼠腹腔注射200μL, 接种抗原量为50μg/只; 3周后进行二免, 即将纯化病毒 (500μg/mL) 与弗氏不完全佐剂等体积混匀乳化, 取200μL腹腔注射小鼠; 二免两周后, 采用二免方法重复免疫一次; 融合细胞前3天, 以200μL纯化病毒 (125μg/mL) 对小鼠进行腹腔注射。

[0031] 3. 克隆检测方法的建立

[0032] (1) 摘取脾脏前, 采集小鼠血样以及未免疫小鼠的血样, 依次置于37℃、4℃孵育1h, 7000g离心10min后, 分别获得阳性血清和阴性血清。

[0033] (2) 用50mM的碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释纯化病毒至10、5、2.5、1.25、0.625μg/mL 5个浓度, 100μL/孔加入酶标板, 4℃包被过夜。次日弃去ELISA板中液体, 每孔加入洗涤液 (即PBST溶液, 配制方法如下: 取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠3.54g、磷酸二氢钾0.27g溶于800mL去离子水, 调节pH至7.4, 然后去离子水定容至1L, 最后加入500μL吐温-20。) 250μL, 室温静置3min后弃去洗涤液, 重复洗涤三次。每孔加入200μL含1%BSA的PBST溶液 (缩写为1%BSA-PBST), 37℃封闭1h。弃去ELISA板中液体, 按上述方法洗涤3次。阳性血清为一抗, 分别作1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000稀释, 每孔加入100μL, 同时设相同稀释度的阴性血清为对照, 37℃孵育1h后按上述方法洗涤3次。每孔加入用1%BSA-PBST以1:5000稀释的HRP-羊抗鼠IgG抗体 (购自Jackson ImmunoResearch, 货号为115-065-146) 100μL, 37℃孵育1h, 按上述方法洗涤3次。每孔加入TMB底物显色液A、B液 (购自湖州英创生物科技有限公司) 的等体积混合液100μL, 37℃作用15min, 每孔加入100μL终止液 (2M的硫酸溶液), 在酶标仪上读取OD₄₅₀值。阳性血清孔的OD₄₅₀值设为P, 阴性血清孔的OD₄₅₀值设为N, 取P值接近1.0、P/N>2.0时的抗原包被浓度为最适工作浓度。抗原包被浓度为2.5μg/mL。

[0034] 4. 细胞融合

[0035] 免疫鼠摘取脾脏研磨成单细胞与骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量之比5:1混合于50mL无菌离心管内, 采用50%聚乙二醇 (PEG1450) 溶液融合后, 将融合细胞采用含20%胎牛血清和2%HAT (购自Sigma) 的DMEM培养液进行选择培养。

[0036] 5. 单克隆化及扩大培养

[0037] (1) 融合细胞培养15d后, 更换培养液继续培养3d。取细胞培养上清液100μL, 用本实施例标题3中 (2) 的间接ELISA方法筛选分泌抗PEDV单克隆抗体的杂交瘤细胞, 用SP2/0细胞培养上清液作阴性对照, 阳性血清为阳性对照。对于检测阳性的杂交瘤细胞, 取100μL上

清,采用2.5 μ g/mL的Vero细胞裂解液替代纯化病毒包被ELISA板,重复上述检测,保留检测结果为阴性的杂交瘤细胞孔。

[0038] (2) 将步骤(1)中保留的杂交瘤细胞采用有限稀释法进行单克隆化。具体操作如下:将培养孔中杂交瘤细胞集落吹起混匀,取20 μ L细胞悬液用台盼蓝染色计数。取100个细胞,加入到10mL含20%胎牛血清的DMEM培养液中,将此细胞悬液以每孔100 μ L加入到预先加入了饲养细胞(采用DMEM灌洗小鼠腹腔收集的细胞)的96孔细胞培养板中培养。10d后,重复本实施例标题3中(2)的间接ELISA方法对杂交瘤细胞培养液进行检测。经过2-3次克隆化操作,直至所有克隆化细胞孔检测阳性率为100%时,即可确定已获得分泌抗PEDV单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0039] (3) 将确定的分泌抗PEDV单克隆抗体的杂交瘤细胞株分别命名为6F10、6F12、10B2、10A3、10A4和12C4,采用含10%胎牛血清的DMEM培养液扩大培养,分装冻存于液氮。

[0040] 6. 腹水制备

[0041] 分别采用杂交瘤细胞株6F10、6F12、10B2、10A3、10A4和12C4制备腹水。具体方法如下:取8~10周龄雌性BALB/c小鼠,腹腔注射不完全弗氏佐剂0.5mL/只,7天后将状态良好的杂交瘤细胞株以PBS缓冲液重悬,以 5×10^5 个细胞/只腹腔注射小鼠。约10天后采集腹水,离心去除不溶杂质,取腹水上清冻存于-70 $^{\circ}$ C备用。

[0042] 7. 单克隆抗体纯化

[0043] 将本实施例标题6中采用各杂交瘤细胞株制备的腹水,采用GE Hitrap rProteinA FastFlow亲和纯化柱(购自GE生命科学)纯化各单克隆抗体。纯化后的单克隆抗体采用10% SDS-PAGE电泳分析纯度,对于纯度>95%的收集样品,用截留分子量为50kD的超滤管进行浓缩,并将缓冲液置换为PBS缓冲液。杂交瘤细胞株6F10、6F12、10B2、10A3、10A4和12C4产生的抗PEDV单克隆抗体依次命名为6F10'、6F12'、10B2'、10A3'、10A4'和12C4'。其中图1显示了单克隆抗体10A4'的纯化结果,从图中可以看出纯化后的单克隆抗体10A4'的纯度大于95%。

[0044] 8. 单抗的特异性验证

[0045] 抗原板制备:取猪圆环病毒2型(PCV2)、猪瘟病毒(CSFV)、猪乙型脑炎病毒(JEV)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征(PRRSV)、猪O型口蹄疫病毒(FMED)ELISA抗体检测试剂盒(均购自武汉科前生物股份有限公司)中的检测板作为抗原板;按照本实施例标题1密度梯度离心法制备纯化PEDV和猪传染性胃肠炎病毒(TGEV),按照本实施例标题3中(2)的方法以5 μ g/mL制备抗原板。阴阳性对照的制备:未免疫任何抗原的小鼠血清用1%BSA-PBST以1:100稀释后作为阴性对照;高免小鼠血清(免疫相应抗原4次及以上)用1%BSA-PBST以1:100稀释后作为阳性对照。加入待检样本:将本实施例标题7中纯化的单克隆抗体6F10'、6F12'、10B2'、10A3'、10A4'和12C4'用1%BSA-PBST稀释到1 μ g/mL,以100 μ L/孔加入上述9种抗原板的反应孔中,同时设置相应的阴阳性对照孔(分别加入阴、阳性对照),37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST缓冲液洗涤5次。加入酶标二抗、显色和终止:每孔加入100 μ L用1%BSA-PBST以1:5000稀释的HRP-羊抗鼠IgG抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST缓冲液洗涤5次;每孔加入TMB底物显色液A、B液等体积混合溶液100 μ L,37 $^{\circ}$ C作用15min,每孔加入100 μ L终止液(2M的硫酸水溶液),在酶标仪上读取OD₄₅₀值。判断:如果病毒样品反应孔OD₄₅₀值S/阴性对照孔OD₄₅₀值N>2.1表明单克隆抗体与其他病毒有交叉反应,否则没有交叉反应。结果:6F10'、

6F12'、10B2'、10A3'、10A4' 和12C4' 与除PEDV外的其他猪病病毒反应后的OD₄₅₀值/阴性对照孔OD₄₅₀值均小于2.1,表明这几株单抗特异性针对PEDV,与其他猪病病毒无交叉反应。

[0046] 实例三检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的双抗夹心ELISA试剂盒的构建

[0047] 1.捕获抗体的选择

[0048] 为了构建双抗夹心ELISA试剂盒,以HRP标记的羊抗猪IgA抗体为检测抗体,从实施例二中制备的6株抗PEDV单克隆抗体中筛选与检测抗体配对最合适的捕获抗体。各待检奶样在反应前需要以6000g离心10min,取中间的乳清层。将从各奶样分离的乳清加入酶标板中与夹心抗原进行反应。具体方法如下:

[0049] 抗体包被:将实施例二标题7中纯化的6株抗PEDV单克隆抗体分别用pH9.6、50mM的碳酸盐缓冲液稀释至8μg/mL,每孔加入100μL,在4℃包被16-18h,每个稀释度重复两孔;封闭:PBST缓冲液(PBST缓冲液配制方法:取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠3.54g、磷酸二氢钾0.27g溶于800mL水,调节pH至7.4,然后定容至1L,最后加入500μL吐温-20。洗板3次,每孔加入200μL含1% (w/v) BSA的PBST缓冲液(缩写为1%BSA-PBST)于37℃封闭1h;夹心抗原孵育:用1%BSA-PBST将灭活后的PEDV CV777株病毒液(实例一制备)稀释至病毒含量为 $10^{5.7}$ TCID₅₀/mL,每孔加入100μL,37℃孵育1h;PBST缓冲液洗涤5次。检测奶样孵育:将已知PEDV阳性奶样(经TGEV(猪传染性胃肠炎病毒)和PEDV二联灭活苗分娩前2个月跟胎免疫一次、分娩前1个月加强免疫一次的母猪初乳)、阴性奶样(未免疫任何PEDV疫苗的SPF级猪初乳)分离的乳清用1%BSA-PBST按照稀释度为1:100稀释,每孔加入100μL,37℃孵育30min;PBST缓冲液洗涤5次。采用1%BSA-PBST将HRP标记的羊抗猪IgA抗体(购自艾博抗上海贸易有限公司)按照稀释度为1:10000稀释,每孔加入100μL,37℃孵育30min;PBST缓冲液洗涤5次。每孔加入TMB底物显色液A、B液的等体积混合溶液100μL,37℃避光显色10min。每孔加入100μL、2M的硫酸水溶液终止反应,测定各孔OD₄₅₀值(在450nm处的吸光值)。根据各样品OD₄₅₀值及之间差异的大小确定最佳捕获抗体。由表1可知,抗PEDV单克隆抗体10A4' 作为捕获抗体获得的阳性值最高,阴性值较低,为最佳捕获抗体。

[0050] 表1捕获抗体种类选择

单克隆抗体编号	10B2'	6F10'	6F12'	10A3'	10A4'	12C4'
样品号	OD ₄₅₀ 值					
[0051] 阳性 1	1.324	1.212	0.989	1.423	2.872	0.873
阳性 2	0.503	0.241	0.373	0.703	1.302	0.143
阴性	0.069	0.201	0.071	0.067	0.069	0.121

[0052] 抗PEDV单克隆抗体10A4' 是由杂交瘤细胞株10A4分泌的,将该杂交瘤细胞株进行保藏,保藏信息如下:

[0053] 分类命名:杂交瘤细胞株10A4,保藏日期为2017年5月17日,保藏单位全称为中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,保藏单位地址:武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO: C201779。

[0054] 2.捕获抗体包被浓度的确定

[0055] 将抗PEDV单克隆抗体10A4' 用50mM的碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释为8μg/mL、4μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL,分别包被酶标板,其他步骤同本实施例标题1中方法,对已知PEDV阴、阳性奶样进行双抗夹心ELISA实验,根据P/N值最大来确定抗体包被浓度。P为阳性

奶样的OD₄₅₀值,N为阴性奶样的OD₄₅₀值。由表2可知,捕获抗体的最佳包被浓度为2μg/mL。

[0056] 表2捕获抗体包被浓度的确定

抗体包被浓度 (μg/mL)	8	4	<u>2</u>	1	0.5
[0057] P	2.002	2.003	<u>2.004</u>	1.663	1.004
N	0.081	0.073	<u>0.064</u>	0.058	0.053
P/N	24.7	27.4	<u>31.3</u>	28.7	18.9

[0058] 3. 夹心抗原工作浓度与乳清稀释浓度的确定

[0059] 用1%BSA-PBST将夹心抗原(实例一制备的灭活后的PEDV CV777株病毒液)梯度稀释为 $10^{6.6}$ TCID₅₀/mL、 $10^{6.3}$ TCID₅₀/mL、 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL、 $10^{5.7}$ TCID₅₀/mL、 $10^{5.4}$ TCID₅₀/mL。将已知PEDV阳性奶样和阴性奶样分离乳清。将PEDV阳性奶样分离的乳清按照如下稀释度进行梯度稀释:1:10、1:20、1:40、1:80、1:160,按本实施例标题1中ELISA方法进行检测,测定各孔OD₄₅₀值,阴性对照孔中加入阴性奶样分离的乳清,其中捕获抗体为10A4',包被浓度为2μg/mL。根据阳性奶样反应孔OD₄₅₀值(P)值和阴性对照孔OD₄₅₀值(N)之比(即P/N)的最大值,确定夹心抗原工作浓度与乳清稀释浓度。由表3可知,夹心抗原的工作浓度为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL,乳清稀释度为1:40。

[0060] 表3夹心抗原工作浓度和奶样稀释度的确立(表中数据为OD₄₅₀值)

阳性奶样分离的乳 清稀释度		夹心抗原 PEDV 浓度 (TCID ₅₀ /mL)				
		$10^{6.6}$	$10^{6.3}$	<u>$10^{6.0}$</u>	$10^{5.7}$	$10^{5.4}$
1:10	P	2.657	2.599	2.531	2.42	1.854
	N	0.232	0.219	0.206	0.193	0.156
	P/N	11.5	11.9	12.3	12.5	11.9
1:20	P	2.534	2.555	2.537	2.109	1.774
	N	0.199	0.172	0.162	0.132	0.112
	P/N	12.7	14.9	15.7	16.0	15.8
[0061] 1:40	P	2.323	2.302	<u>2.288</u>	1.824	1.117
	N	0.152	0.105	<u>0.084</u>	0.069	0.053
	P/N	15.3	21.9	<u>27.2</u>	26.4	21.1
1:80	P	2.003	1.874	1.764	1.332	0.992
	N	0.116	0.097	0.068	0.054	0.052
	P/N	17.3	19.3	25.9	24.7	19.1
1:160	P	1.643	1.45	1.213	0.864	0.603
	N	0.087	0.063	0.054	0.053	0.054
	P/N	18.9	23.0	22.5	16.3	11.2

[0062] 注:P表示PEDV阳性奶样反应孔OD₄₅₀值;N表示阴性对照孔OD₄₅₀值。

[0063] 4. 检测抗体最佳稀释度的确定

[0064] 用1%BSA-PBST将HRP标记的羊抗猪IgA抗体按照稀释度为1:5000、1:10000、1:20000和1:40000进行稀释,按本实施例标题3中确定的检测条件对已知PEDV阳性奶样和阴性奶样进行检测,根据P/N值的最大值来确定HRP标记的羊抗猪IgA抗体最佳稀释度。由表4可知,HRP标记的羊抗猪IgA抗体最佳稀释度为1:10000。

[0065] 表4 HRP标记的羊抗猪IgA抗体最佳稀释度的确定

[0066]

检测抗体稀释度	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000
P	2.302	<u>2.221</u>	1.852	1.323
N	0.109	<u>0.07</u>	0.064	0.048
P/N	21.1	<u>31.7</u>	28.9	27.6

[0067] 5. 判定标准的确定

[0068] 选择未接种过任何PEDV疫苗的SPF猪的初乳50份,用本实施例标题4确定的夹心ELISA方法进行检测,测定OD₄₅₀值,进行统计学分析,计算出奶样平均OD₄₅₀值和标准差SD。根据公式:样品的平均OD₄₅₀值+3×SD,计算其判定标准的临界值。对50份SPF猪初乳ELISA检测结果(表5)进行统计学分析,计算出奶样平均OD₄₅₀值为0.127,标准差SD为0.041,从而计算出临界值=样品平均OD₄₅₀值+3SD=0.250。因此,判定标准为样品OD₄₅₀值≥0.250时为阳性,样品OD₄₅₀值<0.250为阴性。

[0069] 表5判断标准确定

编号	OD 值	编号	OD 值	编号	OD 值	编号	OD 值	编号	OD 值
1	0.104	13	0.067	25	0.173	37	0.143	49	0.174
2	0.093	14	0.182	26	0.134	38	0.167	50	0.198
3	0.078	15	0.179	27	0.050	39	0.099		
4	0.125	16	0.143	28	0.175	40	0.065	平均值	0.127
5	0.113	17	0.152	29	0.087	41	0.139		
6	0.054	18	0.057	30	0.062	42	0.193		
7	0.166	19	0.112	31	0.154	43	0.112	标准差	0.041
8	0.147	20	0.117	32	0.129	44	0.087		
9	0.144	21	0.132	33	0.136	45	0.099		
10	0.082	22	0.148	34	0.063	46	0.117	临界值	0.250
11	0.179	23	0.165	35	0.100	47	0.145		
12	0.192	24	0.114	36	0.153	48	0.163		

[0071] 6. 夹心ELISA检测方法的特异性

[0072] (1) 分别使用PEDV病毒液(病毒含量为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL)、Vero细胞裂解液上清和封闭液1%BSA-PBST作为夹心抗原,采用本实施例标题4确定的夹心ELISA方法对已知PEDV阳性和阴性奶样进行检测,验证该方法的特异性。表6显示:9份样品与Vero细胞裂解液上清或1%BSA-PBST反应的OD₄₅₀值均匀小于0.2,而阳性样品与PEDV病毒液反应的OD₄₅₀值均较高,阴性样品反应值均较低,说明该检测方法的抗体特异性针对PEDV而非宿主细胞Vero细胞或者1%BSA-PBST。

[0073] 表6夹心法特异性1

[0074]

样品编号	3864	3753	2692	163	146	162	0100	0136	023
夹心抗原种类	OD ₄₅₀ 值								
PEDV	3.003	2.972	2.541	1.397	1.001	1.203	0.121	0.088	0.187
Vero	0.132	0.099	0.089	0.083	0.074	0.09	0.088	0.079	0.074
1%BSA-PBST	0.101	0.088	0.071	0.073	0.072	0.069	0.071	0.07	0.069

[0075] (2) 选择分别免疫过PRRSV、PPV、PRV、JEV、PCV2、FMEV、CSFV疫苗但未免疫过PEDV疫苗的母猪,采集初乳共7份,设置阴阳性对照,用本实施例标题4确定的夹心ELISA方法进行检测,验证本方法与抗其他猪病病毒IgA抗体的交叉反应,确定本方法的对抗PEDV IgA抗体的检测特异性。由表7可知,7份初乳的检测OD₄₅₀值均小于0.250,即为阴性,说明本方法测得的IgA为抗PEDV特异性IgA。

[0076] 表7夹心法特异性2

[0077]

样品编号	606	602	490	520	726
OD ₄₅₀ 值	0.134	0.239	0.104	0.162	0.173
样品编号	622	623	阴性对照	阳性对照	
OD ₄₅₀ 值	0.225	0.126	0.093	2.305	

[0078] 7. 重复性试验

[0079] (1) 批内重复试验 用同一批试剂盒对已知PEDV阳性奶样和阴性奶样进行检测,每份奶样设置5个重复,测定OD₄₅₀值,结果见表8。计算批内变异系数 $CV = (SD/OD_{450} \text{平均值}) \times 100\%$ 。由表8可知,各个样品的批内变异系数为0.34%~4.49%,小于5%。

[0080] 表8批内变异系数

[0081]

样品类型	样品号	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	批内 CV
阳性	1	2.997	2.984	2.976	3.001	2.992	0.34%
	2	1.773	1.769	1.774	1.742	1.753	0.80%
	3	2.308	2.341	2.372	2.365	2.333	1.10%
	4	2.525	2.523	2.497	2.511	2.517	0.45%
	5	1.754	1.753	1.732	1.701	1.778	1.65%
	6	1.111	1.109	1.113	1.123	1.107	0.56%
	7	0.873	0.829	0.855	0.867	0.834	2.29%
	8	0.672	0.653	0.634	0.688	0.637	3.51%
	9	0.909	0.876	0.912	0.913	0.911	1.75%
	10	0.523	0.554	0.557	0.542	0.561	2.81%
阴性	11	0.069	0.07	0.073	0.071	0.076	3.86%
	12	0.112	0.113	0.113	0.108	0.105	3.23%
	13	0.235	0.231	0.23	0.229	0.227	1.29%
	14	0.17	0.172	0.165	0.169	0.166	1.71%
	15	0.099	0.102	0.109	0.103	0.097	4.49%

[0082] (2) 批间重复试验取5个不同批次的试剂盒对已知PEDV阳性奶样和阴性奶样进行检测,测定OD₄₅₀值,计算批间变异系数 $CV = (SD/OD_{450} \text{平均值}) \times 100\%$ 。由表9可知,不同样品

的批间变异系数为1.90%~8.71%，小于10.00%，说明该方法有良好的重复性。

[0083] 表9批间变异系数

[0084]	样品类型	样品号	批次 1	批次 2	批次 3	批次 4	批次 5	批间变异 CV
[0085]	阳性	1	2.973	2.864	3.003	2.997	2.972	1.90%
		2	1.764	1.599	1.703	1.642	1.703	3.77%
		3	2.344	2.103	2.397	2.245	2.333	5.04%
		4	2.543	2.442	2.664	2.444	2.559	3.65%
		5	1.703	1.594	1.779	1.673	1.703	3.94%
		6	1.012	0.923	1.097	1.002	0.985	6.23%
		7	0.883	0.804	0.892	0.801	0.832	5.11%
		8	0.645	0.607	0.702	0.623	0.665	5.73%
		9	0.904	0.842	0.963	0.849	0.915	5.60%
		10	0.503	0.474	0.566	0.501	0.544	7.12%
	阴性	11	0.073	0.069	0.074	0.075	0.077	4.03%
		12	0.114	0.093	0.113	0.109	0.107	7.87%
		13	0.231	0.195	0.233	0.209	0.222	7.33%
		14	0.167	0.141	0.175	0.149	0.164	8.71%
		15	0.099	0.082	0.09	0.093	0.097	7.25%

[0086] 8. 检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的双抗夹心ELISA试剂盒的组成及使用方法

[0087] 检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的双抗夹心ELISA试剂盒由以下组份组成：

[0088] (1) 检测板1块：采用0.05M、pH 9.6的碳酸盐缓冲液将抗PEDV单克隆抗体10A4'（实施例二中标题7中方法制备）稀释至2μg/mL，每孔加入100μL，在4℃条件下包被16-18h，采用PBST缓冲液（PBST缓冲液配制方法：取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠3.54g、磷酸二氢钾0.27g溶于800mL水，调节pH至7.4，然后定容至1L，最后加入500μL吐温-20。）洗涤，拍干；用含1%（质量百分浓度）BSA的PBST缓冲液（PBST缓冲液配制方法同上）在37℃条件下封闭1h，洗涤、干燥、真空封装，得到检测板。

[0089] (2) PEDV夹心抗原：是按照实例一中方法制备的灭活的PEDV CV777株病毒液，其毒价为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL，体积为12mL。

[0090] (3) 酶标二抗：将HRP标记的羊抗猪IgA抗体（购自艾博抗上海贸易有限公司）采用含1%（质量百分浓度）BSA的PBST缓冲液（PBST缓冲液配制方法同上）按照稀释度为1:10000稀释而成，体积为12mL。

[0091] (4) 阳性对照：选取免疫过（分娩前2个月跟胎免疫一次，分娩前1个月加强免疫一次）TGEV和PEDV二联灭活苗的母猪，采集其初乳，以6000g离心10min，取乳清层，采用含1%（质量百分浓度）BSA的PBST缓冲液（配制方法同上）按照稀释度为1:40稀释，得到阳性对照，1管（1mL）。

[0092] (5) 阴性对照：采集未接种过任何PEDV疫苗的SPF级猪初乳，以6000g离心10min，取乳清层，用含1%（质量百分浓度）BSA的PBST缓冲液按照稀释度为1:40稀释，得到阴性对照，1管（1mL）。

[0093] (6) 样品稀释液:1%BSA-PBST (1瓶,50mI),配制方法为:取10g BSA、0.27g磷酸二氢钾、3.54g磷酸氢二钠、8.0g氯化钠、0.2g氯化钾和1mL Tween20溶于水,然后加水定容至1000mL。

[0094] (7) 10×浓缩洗涤液 (30mI):取磷酸二氢钾2.7g、磷酸氢二钠35.4g、氯化钠80g、氯化钾2g和Tween205mL溶于水,然后加水定容至1000mL。使用时,将10×浓缩洗涤液采用水稀释10倍,得到洗涤液。

[0095] (8) TMB底物显色液A、B液:TMB底物显色A液为H₂O₂工作液,TMB底物显色B液为TMB工作液,各6mL;均购自于湖州英创生物技术有限公司(货号EL0009)。

[0096] (9) 终止液 (15mL):2M的硫酸水溶液。

[0097] 上述试剂盒的使用方法如下:

[0098] (1) 检测样品的获得与处理:将采集获得的待测猪初乳以6000g离心10min,取乳清层,保存于-20℃,以便检测;

[0099] (2) 夹心抗原孵育:在检测板的每个孔中分别加入100μL的PEDV夹心抗原,在37℃孵育1h,采用洗涤液洗涤5次;

[0100] (3) 加入待检样品、阴性对照或阳性对照:将处理后的待检样品用样品稀释液按照稀释度为1:40进行稀释,每个待检样品反应孔中加入100μL,37℃反应30min,采用洗涤液洗涤5次;分别向阴性对照孔和阳性对照孔内加入阴性对照和阳性对照,其他步骤同待检样品反应孔。

[0101] (4) 加入酶标二抗:将酶标二抗加入到检测板的各孔中,每个孔100μI,37℃反应30min,以洗涤液洗涤5次;

[0102] (5) 显色与终止:将TMB底物显色液A、B液等体积混合,每个孔中加入100μL混合液,37℃避光反应10min,随后每个孔加入100μL终止液,终止反应;

[0103] (6) 判定:将终止反应后的检测板放入酶标仪中,读取OD₄₅₀值,按照如下方法判定结果:如果阴性对照孔的OD₄₅₀值<0.2、且阳性对照孔的OD₄₅₀值>0.8,那么当待检样品反应孔的OD₄₅₀值≥0.250为阳性,当待检样品反应孔的OD₄₅₀值<0.250为阴性。

[0104] 上述操作过程中,每个孔是指反应孔、阴性对照孔和阳性对照孔中的每个孔。

[0105] 另外,本实施例中,检测前已知是PEDV阳性的奶样,均是指经TGEV(猪传染性胃肠炎病毒)和PEDV二联灭活苗分娩前2个月跟胎免疫一次、分娩前1个月加强免疫一次的母猪初乳;检测前已知为PEDV阴性的奶样是指未免疫任何PEDV疫苗的SPF级母猪初乳。

[0106] 实例四本发明试剂盒检测结果与间接ELISA法的比较

[0107] 本发明试剂盒为实施例三中制备的检测猪初乳中PEDV特异性IgA抗体的双抗夹心ELISA试剂盒。比较本发明试剂盒检测结果与间接ELISA法检测结果的差异。

[0108] 1. 构建检测抗PEDV特异性IgA抗体的间接ELISA法

[0109] 使用纯化后的PEDV CV777株病毒液(实例二标题1中方法制备)作为包被原,按照常规方法构建间接ELISA法。间接ELISA方法具体步骤如下:采用2.5μg/mL的包被原包被酶标板,每孔100μL,在4℃条件下包被16-18h,采用PBST缓冲液(PBST缓冲液配制方法:取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠3.54g、磷酸二氢钾0.27g溶于800mL水,调节pH至7.4,然后定容至1L,最后加入500μL吐温-20。)洗涤,拍干;每孔加入100μL含1%(质量百分浓度)BSA的PBST缓冲液(PBST缓冲液配制方法同上),在37℃条件下封闭1h,洗涤、拍干。分离待检初乳

的乳清,采用含1% (质量百分浓度) BSA的PBST缓冲液按照稀释度为1:40稀释,每个待检样品反应孔加入100 μ L,在37 $^{\circ}$ C条件下孵育30min,PBST缓冲液洗涤、拍干,阴性对照孔中加入阴性对照,阳性对照孔中加入阳性对照,其他步骤同反应孔,阴性对照、阳性对照同实施例三中标题8;加入采用含1% (质量百分浓度) BSA的PBST缓冲液以1:10000 (稀释度) 稀释的HRP标记的羊抗猪IgA抗体,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min。将TMB显色液A液和B液等体积混合后,每孔加入100 μ L混合液,在37 $^{\circ}$ C显色10min,随后每个孔加入100 μ L终止液 (2M的硫酸水溶液),终止反应。按照实例三标题5的方法确定间接ELISA法的判断标准。具体判断标准如下:如果阴性对照孔的OD₄₅₀值<0.2、且阳性对照孔的OD₄₅₀值>0.8,那么当待检样品反应孔的OD₄₅₀值 $\geq$ 0.308为阳性,当待检样品反应孔的OD₄₅₀值<0.308为阴性。

[0110] 2. 本发明试剂盒检测方法与本实施例标题1中间接ELISA法的灵敏度比较

[0111] 选择一份已知PEDV阳性奶样 (经TGEV (猪传染性胃肠炎病毒) 和PEDV二联灭活苗分娩前2个月免疫一次,分娩前1个月加强免疫一次的母猪初乳),取乳清进行梯度稀释,分别用本发明试剂盒和间接ELISA法进行检测,比较两种方法的灵敏度。表10显示:阳性奶样分离乳清的稀释倍数为40960时,采用本发明试剂盒检测的结果仍判断为阳性,而间接法只有稀释倍数小于5120才能判断为阳性,说明本发明试剂盒灵敏度显著高于间接ELISA法。

[0112] 表10本发明试剂盒与间接ELISA法灵敏度比较

[0113]	乳清稀释倍数	本发明试剂盒 OD ₄₅₀ 值	间接 ELISA 法 OD ₄₅₀ 值
	10	3.001	3.01
	20	3.004	2.973
	40	3.022	2.657
	80	3.001	2.004
	160	2.987	1.719
	320	2.543	1.497
	640	2.099	1.102
	1280	1.873	0.773
	2560	1.532	0.537
	5120	1.203	0.366
	10240	0.998	0.207
	20480	0.643	0.099
	40960	0.452	0.067
	81920	0.201	0.073
	163840	0.101	0.07
	327680	0.078	0.072

[0114] 3. 本发明试剂盒与间接ELISA法对样品检测差异性比较

[0115] 用本发明试剂盒和本实施例标题1中间接ELISA法分别对同一批已知PEDV阳性、阴性奶样进行检测,比较二者对不同奶样检测值之间的差异。其中,PEDV阳性奶样是经TGEV (猪传染性胃肠炎病毒) 和PEDV二联灭活苗免疫两次的母猪初乳,阴性奶样是未免疫任何PEDV疫苗的SPF级母猪初乳。由表11可知:与间接ELISA法相比,本发明试剂盒对同一份阴性

奶样的检测值更低,对同一份阳性奶样的检测值更高,阳性和阴性组之间差异更加明显;间接ELISA法检测出两份假阳性奶样(12号和14号奶样)及一份假阴性奶样(10号奶样),本发明试剂盒未出现上述情况,说明本发明试剂盒的检测特异性更好。

[0116] 表11两种方法对同一批奶样测试差异性比较

[0117]

实验组	奶样编号	本发明试剂盒 OD 值	间接 ELISA 法 OD 值
阳奶样	1	3.043	1.69
	2	1.79	1.482
	3	2.973	1.754
	4	1.876	1.473
	5	2.765	1.467
	6	1.339	1.02
	7	1.403	1.213
	8	1.131	0.803
	9	0.886	0.389
	10	0.645	<u>0.307</u>
阴性奶样	11	0.067	0.194
	12	0.237	<u>0.383</u>
	13	0.189	0.279
	14	0.202	<u>0.363</u>
	15	0.122	0.222

。

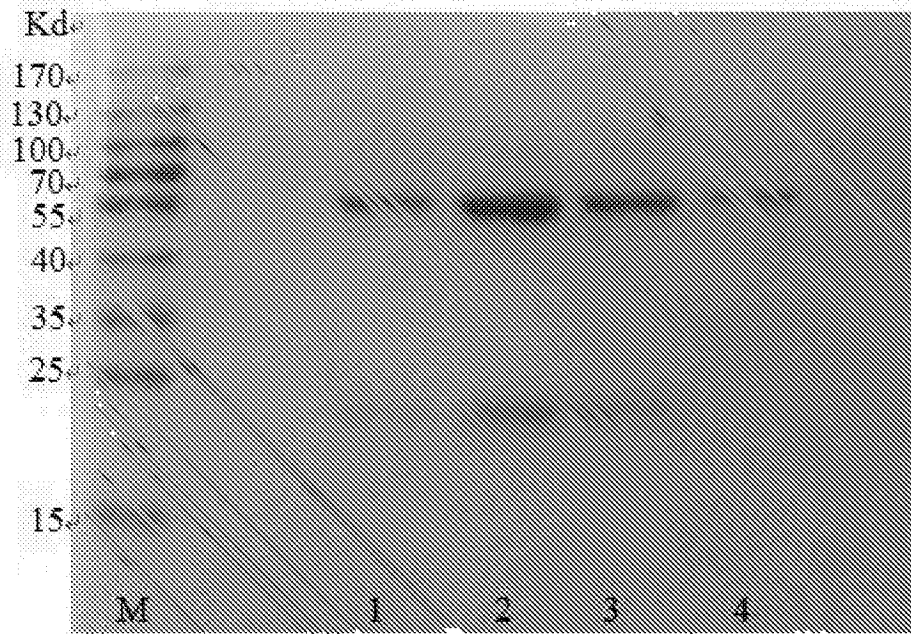


图1

专利名称(译)	一种检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN107219366A	公开(公告)日	2017-09-29
申请号	CN2017110433401.X	申请日	2017-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院		
[标]发明人	张浩明 杨利 于晓明 陈瑾 郑其升 侯继波		
发明人	张浩明 杨利 于晓明 陈瑾 郑其升 侯继波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/78 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N21/78 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56983 G01N33/577 G01N2333/17		
代理人(译)	袁静		
其他公开文献	CN107219366B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒，涉及生物检测试剂领域。分泌抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株10A4，保藏号为：CCTCC NO:C201779。本发明还提供所述杂交瘤细胞株分泌的抗PEDV单克隆抗体10A4'和用于检测猪初乳中抗PEDV特异性IgA抗体的夹心ELISA试剂盒，该试剂盒包括检测板，所述检测板是采用所述抗PEDV单克隆抗体10A4'包被的酶标板。本发明筛选到了具有较高特异性、较高亲和力的抗PEDV单克隆抗体，采用该单克隆抗体制备的试剂盒检测猪初乳，具有较高的灵敏度、特异性和重复性，假阳性率低。

