



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118359708 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 19

(21) 申请号 202410431956.0

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.11

G01N 33/58 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心哈
尔滨分中心)

地址 150069 黑龙江省哈尔滨市香坊区哈
平路678号

(72) 发明人 王倩 田志军 张洪亮 彭金美
周国辉 许浒

(74) 专利代理机构 北京盛询知识产权代理有限
公司 11901

专利代理师 张浩伟

(51) Int. Cl.

G07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

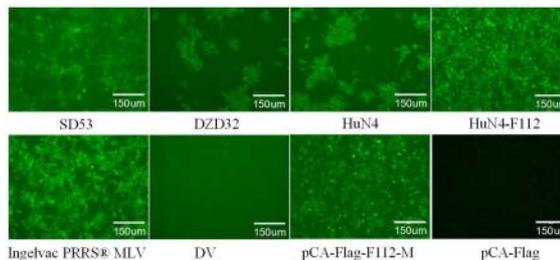
权利要求书1页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒的单
克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种北美型猪繁殖与呼吸综合
征病毒的单克隆抗体及其应用,涉及生物检测
技术领域。该单克隆抗体包括氨基酸序列如SEQ
ID NO.3所示的轻链CDR1、氨基酸序列如SEQ
ID NO.4所示的轻链CDR2、氨基酸序列如SEQ
ID NO.5所示的轻链CDR3、氨基酸序列如SEQ
ID NO.6所示的重链CDR1、氨基酸序列如SEQ
ID NO.7所示的重链CDR2和氨基酸序列如SEQ
ID NO.8所示的重链CDR3。该单克隆抗体可以特异性
识别北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒,从而为鉴
别北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体提
供了有力的技术支持。



1. 一种北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒的单克隆抗体,其特征在于,包括氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示的轻链CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示的轻链CDR2、氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的轻链CDR3、氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的重链CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示的重链CDR2和氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示的重链CDR3。

2. 一种如权利要求1所述的单克隆抗体在制备检测北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗体的试剂盒中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述ELISA检测试剂盒为阻断ELISA检测试剂盒。

5. 一种检测北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗体的试剂盒,其特征在于,包括权利要求1所述的单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述ELISA检测试剂盒为阻断ELISA检测试剂盒。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述阻断ELISA检测试剂盒还包括包被抗原的ELISA包被板。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述抗原在所述ELISA包被板中的包被浓度为500ng/孔。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述阻断ELISA检测试剂盒还包括TMB底物显色液。

一种北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,特别是涉及一种北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种以妊娠母猪繁殖障碍以及仔猪呼吸道疾病为主要特征的高度接触性传染疾病。起初依据基因组的同源性特征及血清学上的差别可将PRRSV分为2种基因型,即北美型和欧洲型。研究发现,虽然这两种基因型的毒株感染所致疫病的临床特征基本一致,但在基因组同源性、抗原性和毒力等方面均存在明显的不同,核苷酸水平上的同源性在60.0%左右。因此,国际病毒分类委员会(ICTV)最新分类已将PRRSV的两个基因型分别划分到动脉炎病毒属的两个亚属之中,欧洲型(PRRSV-1)和北美型(PRRSV-2)被分别重新命名为Betaarterivirus suid 1和Betaarterivirus suid 2两个种,这标志着PRRSV-1和PRRSV-2正式被定义为两个不同的病原。因此对这两类不同病原的诊断、监测和防控要区分开来。

[0003] 目前,IDEXX或金诺研发的针对核衣壳蛋白(N蛋白)抗体的ELISA检测方法在临床血清学诊断中应用最广,但此类方法并不能区分PRRSV-1或PRRSV-2的N蛋白抗体,检测结果与中和抗体的水平也没有相关性,随着PRRSV-1在我国的报道越来越多,PRRSV-1与PRRSV-2混合感染也时有发生,为了能够特异性诊断PRRSV-1和PRRSV-2病毒及其抗体,真实评价我国猪群中PRRSV-2的流行现状,亟需一种可鉴别诊断的单抗及在此基础上建立的特异性抗体检测的ELISA产品。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒的单克隆抗体及其应用,以解决上述现有技术存在的问题,该单克隆抗体可以特异性识别北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒,从而为鉴别北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体提供了有力的技术支持。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0006] 本发明提供一种北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒的单克隆抗体,包括氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示的轻链CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示的轻链CDR2、氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示的轻链CDR3、氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示的重链CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示的重链CDR2和氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示的重链CDR3。

[0007] 本发明还提供上述的单克隆抗体在制备检测北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗体的试剂盒中的应用。

[0008] 进一步地,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒。

[0009] 进一步地,所述ELISA检测试剂盒为阻断ELISA检测试剂盒。

[0010] 本发明还提供一种检测北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒或其抗体的试剂盒,包括上述的单克隆抗体。

[0011] 进一步地,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒。

[0012] 进一步地,所述ELISA检测试剂盒为阻断ELISA检测试剂盒。

[0013] 进一步地,所述阻断ELISA检测试剂盒还包括包被抗原的ELISA包被板。

[0014] 进一步地,所述抗原在所述ELISA包被板中的包被浓度为500ng/孔。

[0015] 进一步地,所述阻断ELISA检测试剂盒还包括TMB底物显色液。

[0016] 本发明公开了以下技术效果:

[0017] 本发明以北美型PRRS疫苗株HuN4-F112免疫小鼠,制备得到了一种特异性针对北美型PRRSV蛋白的单克隆抗体,间接免疫荧光试验显示该单克隆抗体仅与北美型PRRSV代表株反应,与欧洲型PRRSV不反应。亚类鉴定结果表明,该单克隆抗体为IgG2a亚类。本发明以全病毒为包被抗原,单抗为阻断抗体,通过条件优化,建立了阻断ELISA抗体检测方法并组装为试剂盒。本发明为特异性鉴别北美型猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体提供了有力的技术支持。

附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0019] 图1为单克隆抗体3D6与各种毒株及表达M蛋白的293T细胞的IFA反应检测图;

[0020] 图2为杂交瘤细胞株3D6的染色体鉴定图;其中,A为获得的杂交瘤细胞株;B为小鼠骨髓瘤细胞株;

[0021] 图3为单克隆抗体3D6的Western Blot鉴定结果图;

[0022] 图4为阴性血清PI值分布图;

[0023] 图5为本发明阻断ELISA方法的特异性试验结果统计图;

[0024] 图6为利用本发明阻断ELISA方法检测PRRSV阳性血清的敏感性试验结果统计图;

[0025] 图7为利用IDEXX试剂盒检测PRRSV阳性血清的敏感性试验结果统计图。

具体实施方式

[0026] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0027] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值,以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0028] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的

实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。

[0029] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0030] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0031] 实施例1

[0032] 1材料与方法

[0033] 1.1病毒和血清

[0034] HP-PRRSV HuN4及其弱毒疫苗株HuN4-F112、PRRSV经典疫苗株Ingelvac PRRS® MLV、NADC30-like株SD53、NADC34-like株DZD32和PRRSV-1DV株及以上毒株对应的血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。PRRSV标准阴阳性血清、猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)、猪圆环病毒二型(PCV2)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)等常见猪病毒阳性血清均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

[0035] HuN4-F112株病毒培养上清由哈尔滨维科生物技术有限公司提供。

[0036] 1.2主要试剂

[0037] 小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用ELISA试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司;DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自内蒙古金源康生物工程有限公司;山羊抗小鼠IgG-HRP(ZB5305)抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;TMB显色液购自abm公司。

[0038] 1.3抗原的制备及纯化

[0039] HuN4-F112株病毒培养上清反复冻融三次后,将 β -丙内酯按1:2000的比例加入到细胞培养上清中,4°C过夜灭活,高速离心机5000rpm预离心30min后取上清液,用超速冷冻离心机40000rpm离心4h,弃去上清并无害化处理,沉淀用500 μ L的PBS浸泡置于4°C冰箱过夜,待沉淀完全脱离瓶底后重悬混匀,再次离心取上清,使用0.22 μ m过滤处理,上样分子筛层析柱,取不同阶段上样流出液跑SDS-PAGE,同时Western Blot使用抗PRRSVN蛋白抗体验证,将验证含有病毒的收集液混合,使用超滤管浓缩处理,最终则为纯化的病毒抗原,测定纯化病毒蛋白浓度,2mL的EP管分装后于-80°C保存,以防超离的病毒降解。

[0040] 1.4小鼠免疫及细胞融合

[0041] 取4~6周龄大小的BALB/C小鼠,第一次免疫使用弗式完全佐剂与抗原1:1混合(100 μ g纯化抗原蛋白含量),腹腔注射多点免疫200 μ L/只,间隔两周后,使用弗式不完全佐剂免疫相同剂量,待第三次免疫两周后,尾静脉采血,使用间接免疫荧光法检测鼠血清效价。细胞融合前一周,用20%血清的DMEM培养基复苏SP/20细胞,转移至15cm²的细胞培养瓶中,将其放入5%的CO₂37°C恒温培养箱,对SP2/0细胞进行观察,且在该细胞达到指数生长期时,取抗体效价最高的小鼠脾细胞,使用PEG融合剂进行融合,用含有HAT的20%血清培养基将融合后的细胞混匀,铺在含有饲养层替代物的96板中,放入37°C恒温培养箱中,定期观察细胞状态。

[0042] 1.5杂交瘤细胞的筛选及克隆

[0043] 融合结束后第3天,在HAT选择性培养基的作用下没有融合成功的细胞会死亡,待到10天左右的时候,融合的细胞团在显微镜的观察下占满整个视野后,进行杂交瘤细胞筛

选。吸取96孔板100 μ L上清作为一抗加入到IFA细胞涂片(含有感染PRRSV的MARC-145细胞),放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱孵育1h,用PBS清洗三遍,然后FITC标记的抗小鼠IgG二抗孵育1h,结束后清洗三遍,将96孔板放入倒置荧光显微镜下面进行观察,筛选阳性孔。对筛选出来阳性杂交瘤细胞以有限稀释法进行亚克隆,进行5次左右的亚克隆,便可获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。

[0044] 1.6真核细胞转染

[0045] 在转染前1天将293T细胞提前铺置6孔板中,待细胞密度为80%时即可进行转染。在转染之前弃掉原来的培养基,换成新鲜的含10%FBS的DMEM培养基。在生物安全柜中将4 μ g的PRRSV不同结构蛋白的真核表达质粒分别加入到200 μ L的无血清DMEM中混匀,然后再分别加入10 μ L的X-tremeGENE HP DNA转染试剂,混匀后室温放置15min。将上述混合液体分别加入到不同六孔板中的细胞培养液中,在加的过程中缓慢均匀的滴加到培养基中,继续培养48h后,弃上清,用PBS洗2遍,使用预冷的无水乙醇室温固定30min,弃上清,用PBS洗2遍,置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0046] 1.7杂交瘤细胞的染色体鉴定

[0047] 重悬生长状态良好的杂交瘤细胞,1000r/min离心10min,弃去上清,加入含终浓度0.2 μ g/mL秋水仙素的新鲜培养基培养2h;1000r/min离心8min,弃上清,加入37 $^{\circ}$ C预热的0.075mol/LKCl溶液8mL,低渗处理20min;加入2min先配置的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),预固定2min;弃上清,加入8min固定液,静止固定20min,1000r/min离心8min,弃上清(固定),固定好的细胞悬液视细胞多少留下0.5mL~1mL的固定液,悬浮细胞,在-20 $^{\circ}$ C预冷的载玻片上垂直滴加1~2点,自然阴干,Giemsa法染色20min后油镜镜检。

[0048] 1.8单克隆抗体特性的鉴定

[0049] 1.8.1Ig亚类的鉴定

[0050] 用抗体亚型鉴定试剂盒,按照说明书要求,对筛选出来的阳性杂交瘤细胞分泌抗体进行亚型检测。

[0051] 1.8.2Western blot分析

[0052] 将PRRSV HuN4-F112接种MARC-145细胞,并设细胞对照,48h时收获细胞,用细胞裂解液裂解细胞后,连同超离纯化病毒进行SDS-PAGE,电泳后转置NC膜上,用含5%脱脂乳的PBS封闭处理2h,弃上清,用TBST洗三遍,每次大约10min;随后,用单抗上清室温孵育2h,弃上清,TBST洗三遍;用1:10000倍稀释的DyLight 800标记的抗鼠IgG二抗室温孵育1h(需要避光),弃上清,TBST洗三遍,用红外光扫描成像仪扫描,根据条带大小分析可能识别的病毒蛋白。

[0053] 1.8.3IFA效价的测定

[0054] 取收集的单克隆抗体上清液及小鼠腹水,使用DMEM进行2倍倍比稀释,取分别加到IFA细胞涂片(含有感染HP-PRRSV的MARC-145细胞)上,放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱孵育1h,用PBS清洗三遍,然后FITC标记的抗小鼠IgG二抗孵育1h,结束后清洗三遍,放入倒置荧光显微镜下面进行观察,筛选阳性孔,确定抗体效价。

[0055] 1.9单抗测序

[0056] 将冻存的杂交瘤细胞复苏后,1000r/min离心10min,弃上清,利用Trizol法提取总RNA,反转录获得cDNA,利用可变区序列引物扩增重链和轻链可变区序列,并将PCR产物进行

测序,获得该单抗重链和轻链及可变区序列。

[0057] 1.10阻断ELISA抗体检测试剂盒的组建

[0058] 1.10.1抗原和单抗最佳稀释度的确定

[0059] 纯化的灭活全病毒用碳酸盐包被液依次做连续稀释,以100 μ L孔的量加到ELISA包被板上,每个稀释度至少两列,4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜后弃去包被液用PBST洗涤3次,加入300 μ L的1%牛血清白蛋白,37 $^{\circ}$ C封闭1.5h,同样洗涤处理,以棋盘法先确定最佳抗原包被浓度及单抗稀释浓度:将标准阴阳性血清二倍稀释,取100 μ L加到包被好的不同抗原稀释度的孔中,置于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min,弃上清,每孔加300 μ L PBST,放于震荡板上震荡3min,洗涤三次,最后一次尽量甩干以减少对后续实验影响;用单抗稀释液将PRRSV单抗做连续稀释,每个稀释度取100 μ L加到包被好的不同抗原稀释度的孔上,置于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min,同样洗涤三次;每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:5000),置于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30min,洗涤三次;每孔加入100 μ L的TMB底物显色液,置于37 $^{\circ}$ C温箱孵育15min,每孔迅速加入50 μ L的终止液以终止反应,依据酶标仪测定OD_{450nm}的读值结果使用EXCEL 2017软件统计分析,计算N/P值(N/P值=阴性血清样品OD_{450nm}均值/阳性血清样品OD_{450nm}均值),取N/P最大值所对应条件作为最佳抗原包被浓度和单克隆抗体稀释度。

[0060] 1.10.2酶标抗体最佳稀释度的确定及其他反应条件的优化

[0061] 根据已确定的各个条件,按照同样的方法确定酶标抗体最佳稀释度及优化其他反应条件(最佳包被液及包被时间、最佳封闭液及封闭时间、血清稀释液及血清孵育时间、单抗稀释液及单抗孵育时间、酶标抗体稀释液及酶标抗体孵育时间、显色液及显色时间),最终确定本阻断ELISA的各个反应条件。

[0062] 1.10.3阴阳性临界值的确定

[0063] 本实验室保存的41份已知阴性血清,依照最终优化的阻断ELISA方法检测,测定的OD_{450nm}结果按如下公式转换为PI,PI=(1-OD_{450nm}被检血清/OD_{450nm}标准阴性血清) \times 100%,将所有阴性血清的PI值进行统计分析,确定临界值。

[0064] 1.10.4特异性试验

[0065] 依据优化的阻断ELISA方法,检测PRV、PPV、CSFV、PCV2、PEDV、TGEV等常见猪病毒阳性血清,设立标准的北美型PRRSV阳性血清(HuN4-F112株)对照及标准阴性血清对照,根据检测的OD_{450nm}结果转换为PI值,根据临界值判定检测血清样本的阴阳性,评估本方法对其他常见猪病毒阳性血清的特异性。

[0066] 按照优化的阻断ELISA方法检测PRRSV-1代表株DV株、PRRSV-2代表株HuN4(高致病性)、Ingelvac PRRS[®] MLV株(经典株)、SD53株(NADC30-like株)、DZD32株(NADC34-like株)猪PRRSV阳性血清,设立标准的PRRSV-2阳性血清(HuN4-F112株)对照及标准阴性血清对照,判定结果阴阳性,评估本方法对PRRSV不同基因型阳性血清的特异性。

[0067] 1.10.5敏感性试验

[0068] 将PRRSV标准阳性血清以2倍倍比(1:2~1:2048)稀释,依据优化的阻断ELISA方法检测,根据临界值判定阴阳性,评估本发明阻断ELISA方法的敏感性,同时应用美国IDEXX PRRSV试剂盒对稀释的血清进行检测,比较二者的敏感性差异。

[0069] 1.10.6重复性试验

[0070] 以优化的阻断ELISA方法,从同一批次包被的ELISA板和不同批次包被的ELISA板

中各挑取3块,分别检测5份血清样本,每份样品重复3次,进行批内及批间重复性试验,对本发明阻断ELISA方法检测结果使用EXCEL 2017软件进行汇总统计分析。

[0071] 2结果

[0072] 2.1PRRSVMAb制备及IFA检测结果(包括单抗的亚类,与不同毒株的反应性,上清和腹水效价)

[0073] 将小鼠脾细胞与SP2/0细胞融合后经过4次亚克隆纯化,通过IFA方法筛选出1株稳定分泌MAb的杂交瘤细胞株,命名为3D6。

[0074] 如表1所示,经IgG抗体亚类鉴定试剂盒检测,该单克隆抗体3D6为IgG2a亚类,轻链为 κ 链。将不同PRRSV感染MARC-145细胞后进行IFA,结果显示,单克隆抗体3D6只能识别北美型PRRSV,不识别欧洲型PRRSV;与转染PRRSV各结构蛋白的293T细胞IFA检测结果显示,3D6 MAb仅与PRRSV M蛋白反应,结果见图1;将杂交瘤细胞培养上清和制备的腹水分别系列稀释后进行IFA检测,结果显示细胞MAb上清和腹水效价分别为1:128和1:51200。

[0075] 表1单克隆抗体的类型鉴定结果

MAb	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	κ	λ
3D6	0.041	1.319	0.113	0.122	0.108	0.048	0.436	0.041

[0077] 2.2杂交瘤细胞的染色体鉴定

[0078] 经秋水仙素法检测,SP2/0细胞的平均染色体数为55~65,BALB/c小鼠脾细胞的染色体数为40,而杂交瘤细胞的平均染色体数为95~105。结果证实,获得的杂交瘤细胞为融合所得(图2)。

[0079] 2.3MAb的Western Blot鉴定结果

[0080] 用PRRSV HuN4-F112接种MARC-145细胞,并设细胞对照,48h时收获细胞,用细胞裂解液裂解细胞后,BCA测细胞总蛋白浓度,将相同的蛋白量进行SDS-PAGE及Western blot,分别用 β -action单抗和制备的3D6单克隆抗体进行检测,结果显示,3D6单克隆抗体能特异性地识别HuN4-F112的M蛋白(图3)。

[0081] 2.43D6单克隆抗体的序列鉴定结果

[0082] 轻链序列:

[0083] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNILHSNGYTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKFSNR FSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIKR (SEQ IDNO.1)。

[0084] 重链序列:

[0085] QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDFGIHWVKQAPGKGLKWMGRIDTKTGVP VYAEFEKGRFAFSLETSASTAYLQINSLKNEDSATFFCAGRMDFWGQSSVTVSS (SEQ ID NO.2)。

[0086] 轻链CDR1:RSSQNILHSNGYTYLE (SEQ ID NO.3);

[0087] 轻链CDR2:KFSNRFS (SEQ ID NO.4);

[0088] 轻链CDR3:FQGSHPFT (SEQ ID NO.5);

[0089] 重链CDR1:DFGIH (SEQ ID NO.6);

[0090] 重链CDR2:RIDTKTGVPVYAEFEKGR (SEQ ID NO.7);

[0091] 重链CDR3:RDMF (SEQ ID NO.8)。

[0092] 2.5阻断ELISA抗体检测试剂盒的组装

[0093] 2.5.1 阻断ELISA抗体检测方法的建立及反应条件的确定

[0094] 采用棋盘法,按照阻断ELISA方法确定最佳纯化的全病毒抗原包被浓度,结果显示,当酶标抗体稀释度(1:5000)固定时,在不同单克隆抗体浓度下,随着抗原包被量的增加,最终抗原稀释度为1:200时N/P比值达到最大;最佳单抗稀释度为1:8及最佳酶标抗体稀释度为1:10000时的N/P比值达到最大值,各个ELISA的最优反应条件汇总见表2所示。

[0095] 表2阻断ELISA检测方法反应条件优化

	包被浓度	封闭条件	待检样品	单克隆抗体	羊抗鼠 IgG-HRP	显色底物
[0096] 最佳稀释度	500ng/孔	5%脱脂乳	1:2	1:8	1:10000	100 μ L
反应条件	4 $^{\circ}$ C/12h	37 $^{\circ}$ C/1.5h	37 $^{\circ}$ C/0.5h	37 $^{\circ}$ C/0.5h	37 $^{\circ}$ C/0.5h	37 $^{\circ}$ C/15min

[0097] 2.5.2 阻断ELISA方法临界值的确定

[0098] 41份阴性猪血清样品,经阻断ELISA检测,以PI为横坐标,以各组(分6组)阴性血清样品百分数为纵坐标,得到阴性血清的分布直方图(图4)。可以看出,阴性血清样品的PI值主要分布在0~12%之间,占样品总数的87.8%,数据分布合理,可以作为判定标准的依据。计算得到血清样品平均数X为5.6%,标准差SD为4.4%, $X+3SD=18.8\%$ 。以 $X+3SD$ 为临界值,血清样品 $PI \geq X+3SD$ 判定为阳性, $PI < X+3SD$ 判定为阴性。得到阻断ELISA的判定标准,即血清样品 $PI \geq 20\%$ 为阳性, $PI < 20\%$ 为阴性。

[0099] 2.5.3 阻断ELISA方法特异性试验结果

[0100] 用本阻断ELISA方法检测PRV、PPV、CSFV、PCV2、PEDV、TGEV等常见的猪病毒阳性血清,以及不同PRRSV基因型代表株的猪阳性血清:PRRSV-2代表株经典疫苗株Ingelvac PRRS[®]MLV、高致病性株HuN4及其疫苗株HuN4-F112、NADC30-like株SD53、NADC34-like株DZD32,PRRSV-1代表株DV株阳性血清。结果显示,仅PRRSV-2阳性血清PI值高于临界值20%,其它常见的猪病毒阳性血清及PRRSV-1DV株阳性血清的PI值均低于临界值20%(图5),表明本发明建立的阻断ELISA方法具有较强的特异性。

[0101] 2.5.4 阻断ELISA方法敏感性试验结果

[0102] 利用本发明建立的阻断ELISA方法检测2倍倍比稀释的各PRRSV阳性血清,同时用IDEXX试剂盒进行N蛋白抗体检测,结果见表3和图6~7。结果显示,阻断ELISA检测各PRRSV阳性血清的效价均大于或等于IDEXX效价,表明本发明建立的阻断ELISA方法具有较高的敏感性。

[0103] 表3敏感性试验结果

	9#	42#	71#	27#
[0104] 阻断 ELISA	1:8	1:2	1:64	1:32
IDEXX	1:4	1:2	1:128	1:32

[0105] 注:表中的比例为PRRSV阳性血清的2倍倍比稀释比例。

[0106] 2.5.5 阻断ELISA方法重复性试验结果

[0107] 利用本发明的阻断ELISA方法,对5份血清样本分别进行批内重复性试验和批间重复性试验,结果见表4。结果显示,批内和批间重复试验变异系数CV值均小于10%,表明本发明的阻断ELISA方法具有较好的重复性。

[0108] 表4重复性实验

血清编号	批内重复试验(PI%)		批间重复试验(PI%)	
	平均数	变异系数 CV(%)	平均数	变异系数 CV(%)
	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	
[0109] 1	91.29±0.49	0.54	88.44±4.03	4.55
2	47.73±0.98	2.05	46.82±1.28	2.74
3	51.59±1.27	2.45	50.02±2.22	4.44
4	90.08±0.19	0.21	87.79±3.25	4.70
5	85.60±0.15	0.17	86.53±1.32	1.53

[0110] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

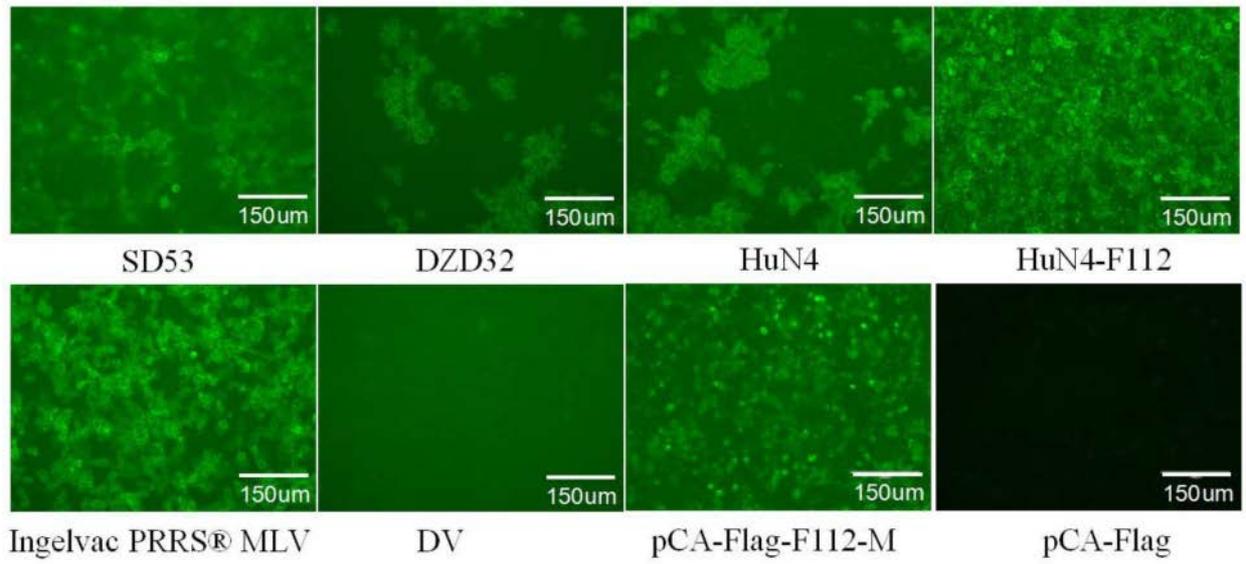


图1

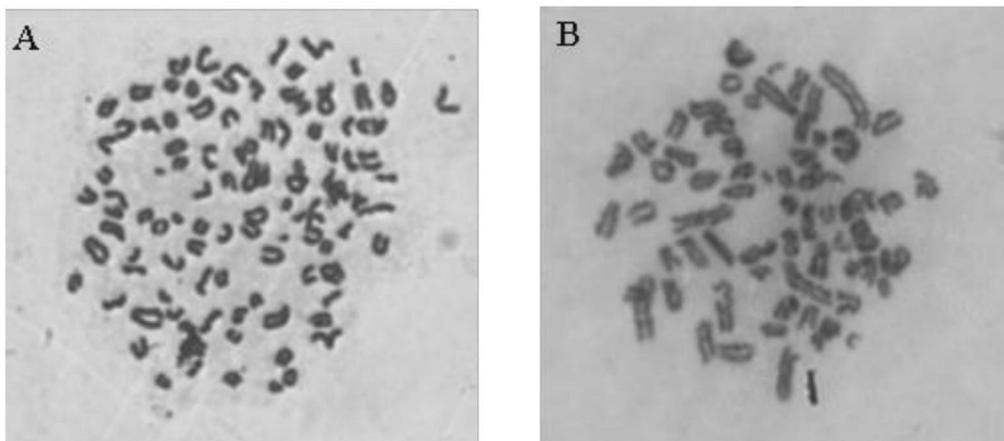


图2

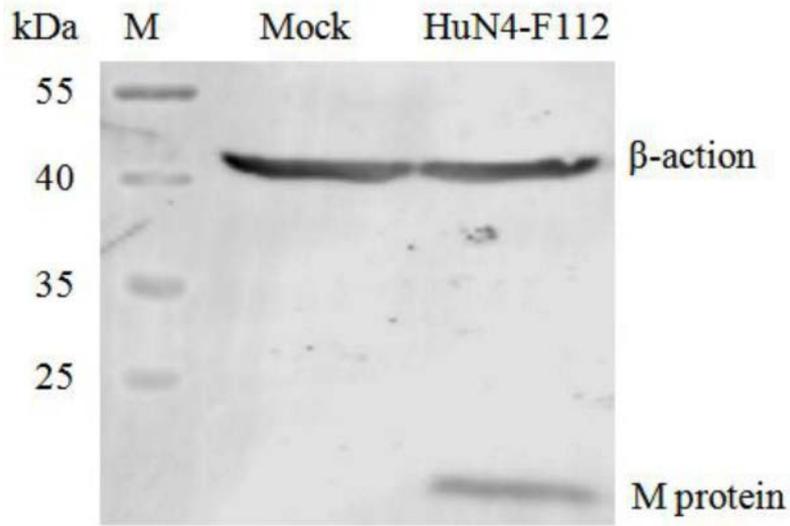


图3

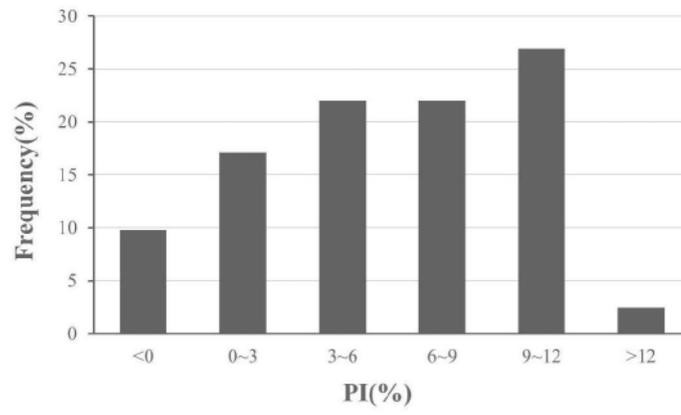


图4

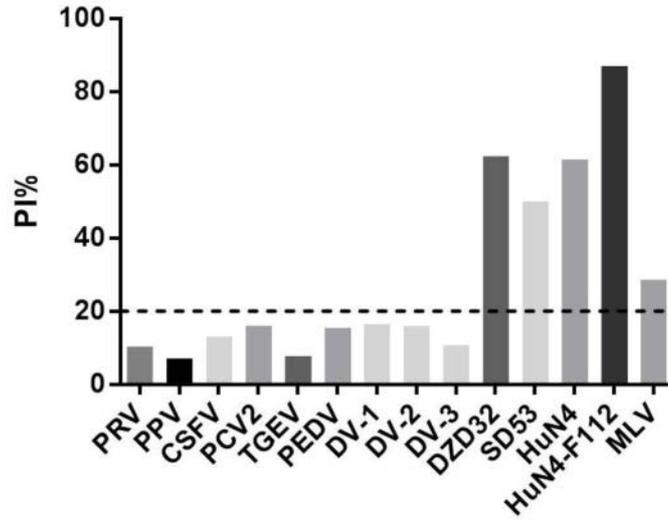


图5

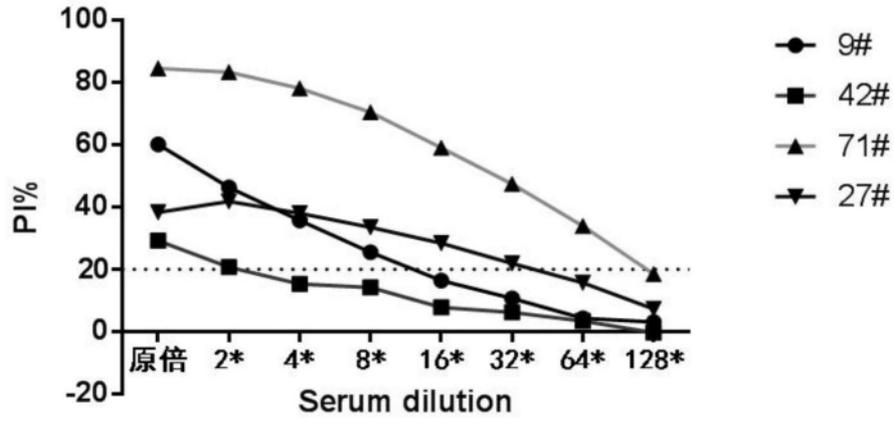


图6

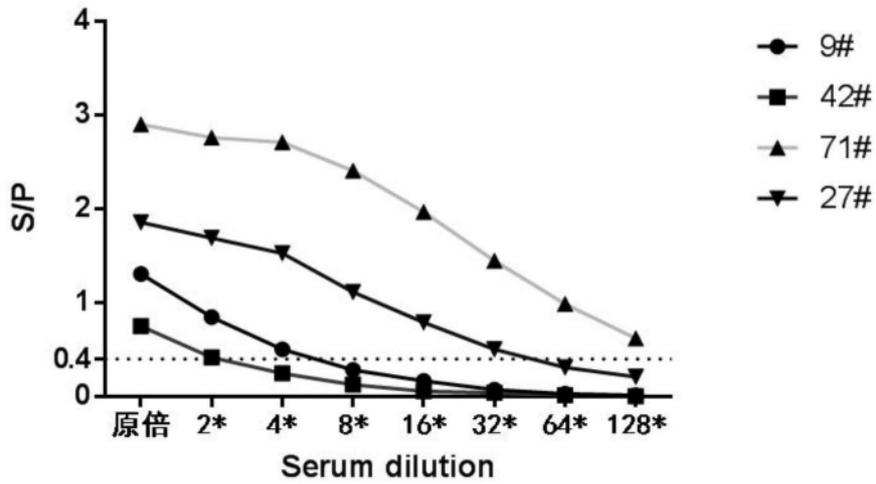


图7