



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872574 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810763876.X

(22)申请日 2018.07.12

(71)申请人 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 吕建亮 潘丽 张中旺 张永光
卢田鑫 李姚尧

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139
代理人 孙皓晨 马鑫

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的
化学发光免疫分析试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒。该试剂盒包括塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原包被的化学发光免疫分析板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标抗体、化学发光底物液、发光增强剂以及浓缩洗涤液。所述塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明的检测试剂盒使用原核表达系统表达的结构蛋白VP1抗原,蛋白产量高,抗原纯度达90%以上,采用酶促化学发光反应系统判定结果,提高了检测灵敏度。本发明检测试剂盒具有操作简单,检测时间短,敏感性高,特异性强等优点,可以用于大量样品的塞尼卡谷病毒检测和流行病学调查,具有良好的市场前景。

1. 一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述试剂盒包括塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原包被的化学发光免疫分析板、阴性对 照血清、阳性对照血清、样品稀释液、酶标抗体、化学发光底物液、发光增强剂以及浓缩洗涤 液。

2. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述塞尼卡谷病毒结构 蛋白VP1抗原经原核表达系统获得,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,将原核表达系统表达获 得的塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1的纯化产物,稀释至2.5 μ g/ml,按照100 μ l/孔包被化学发光 免疫分析板,4 $^{\circ}$ C冰箱包被过夜。

4. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述阳性对照血清是经 塞尼卡谷病毒感染后14天的高感染滴度的猪血清;所述阴性对照血清是未免疫过任何疫苗 的健康猪血清。

5. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述的酶标抗体为辣根 过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗。

6. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述的样品稀释液为含 1w/v%海藻糖、0.01w/v%硫柳汞、0.01v/v%Tween20和0.5w/v%酪蛋白的0.01M磷酸盐溶 液。

7. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述的化学发光底物液 为用Tris-HCl缓冲液配制的含鲁米诺和对碘苯酚的混合液,所述的发光增强剂为用Tris- HCl缓冲液配制的含双氧水以及Tween20的混合液。

8. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述的化学发光底物液 为用0.05M Tris-HCl缓冲液配制的含0.1mmol/L鲁米诺和0.1mmol/L对碘苯酚的混合液,所 述的发光增强剂为用0.05M Tris-HCl缓冲液配制的含7.5mmol/L双氧水、0.005v/v% Tween20的混合液。

9. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,所述的浓缩洗涤液为10 \times PBST溶液,即含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/L PBS溶液,pH 7.4,使用时稀释10倍。

10. 如权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒,其特征 在于,利用所述的试剂盒进 行塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测时,按照以下步骤进行:

(1) 样本稀释

将待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清用样品稀释液按照体积比1:32进行稀 释;

(2) 洗板

从4 $^{\circ}$ C冰箱中取出塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原包被的化学发光免疫分析板,打开包 装袋,取出化学发光免疫分析板,以稀释好的洗涤液洗板3次,吸水纸拍干,每次3min;

(3) 加样

将稀释后的待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清分别加入化学发光免疫分析板 中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育5min;

(4) 洗涤

取出化学发光免疫分析板,甩掉血清样品,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干;

(5) 加入酶标抗体

加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育5min;

(6) 加底物:

甩掉酶标抗体,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干,加入化学发光底物和发光增强剂,混匀,避光静置5min;

(7) 测定发光值、计算和判定:

于化学发光免疫分析仪器上测定发光值,所有待测样品用阳性百分比表示(positive percent,PP),换算公式如下:

$$PP = \frac{\text{待测样品发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值}}{\text{阳性对照血清平均发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值}} \times 100\%$$

临界值定为6.14%,若计算结果 $\geq 6.14\%$ 则判定为阳性,反之则为阴性。

一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒,还涉及该试剂盒的使用方法。本发明属于病毒检测技术领域。

背景技术

[0002] 猪塞尼卡谷病是由塞尼卡谷病毒(Seneca Valley virus,SVV)引起的一种猪原发性疱疹病。该病主要引起猪口鼻黏膜及蹄部出现水泡和溃疡。2008年和2012年,美国、加拿大等部分地区在发病猪群中诊断出SVV,2015年9月,美国某种猪场猪群出现跛足、水泡且伴随初生仔猪死亡,PCR检测排除口蹄疫病毒(FMDV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪轮状病毒、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪呼吸与繁殖综合症病毒(PRRSV)的感染,发病猪的血清、皮肤、粪便、蹄部冠状带的PCR检测结果显示为SVV阳性,最终被确诊为塞尼卡谷病毒感染。同年,我国广东省某猪场相继发生水疱性疾病,母猪发烧厌食、口鼻及蹄部出现水泡,传播速度快,并伴有产房仔猪急性死亡,经检测FMD、SVD、VS检测结果为阴性,SVV显示为阳性,随后分离出了一株塞尼卡谷病毒毒株(CH-01-2015),这是中国首次报道有猪感染SVV。虽然猪塞尼卡谷病不会造成与口蹄疫病毒相同的重大经济损失,但是该病对于新生仔猪也有较高的致死率,其临床症状与口蹄疫、猪水泡病、水泡性口炎等高度相似,给鉴别和区分该病带来了一定的困难,目前,尚无有效的疫苗和诊断试剂用于防控SVV。因此,研制出相应的疫苗和诊断试剂来预防和诊断猪塞尼卡谷病具有重要意义。

[0003] SVV基因组全长约7.2kb,包括5'-UTR、3'-UTR、1个开放阅读框(ORF)以及3'末端poly(A)尾,研究表明,SVV的RNA编码1个长为2181个氨基酸的多聚蛋白,该多聚蛋白可进一步水解为前导蛋白L、结构蛋白P1,非结构蛋白P2和P3,P1进一步被P3前体蛋白中具有蛋白酶活性的3C和一些可能的细胞内切酶切割分解为VP0、VP1和VP3三种结构蛋白,其中VP1是诱导中和抗体的主要成分,是抗原变异的关键结构蛋白,具有重要的抗原位点。

[0004] 化学发光免疫分析技术(chemiluminescence immunoassay,CLIA)是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。是继放免分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。化学发光免疫分析的敏感性和信噪比高,背景荧光信号低,可以在很宽的线性范围内检测极低浓度的分析物,能够通过发光检测仪器定量分析被检样品等诸多优点而在生命科学的各领域广应用,例如检测艾滋病病毒、乙型肝炎病毒、检测肿瘤标记物等,当前该技术在塞尼卡谷病的诊断中的应用还未见报道。

[0005] 本发明以塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1作为候选基因,克隆获得SVV的VP1基因,以大肠杆菌中表达并纯化VP1蛋白作为包被抗原,将CLIA技术应用到猪塞尼卡谷病的诊断中,开发了一种用于检测猪塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体的化学发光免疫分析试剂盒,为今后应对SVV的可能疫情,提前做好技术储备具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测时间短,特异性好、灵敏度高的用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒,旨在解决上述背景技术中,目前尚无有效的、快速的诊断试剂用于SVV的防控的问题,为今后提前应对SVV的可能疫情做好技术储备。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用了以下技术手段:

[0008] 本发明的一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒,所述试剂盒包括塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原包被的化学发光免疫分析板、阴性对照血清、阳性对照血清、样品稀释液、酶标抗体、化学发光底物液、发光增强剂以及浓缩洗涤液。

[0009] 其中,优选的,所述塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原经原核表达系统获得,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 其中,优选的,将原核表达系统表达获得的塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1的纯化产物,稀释至2.5 μ g/ml,按照100 μ l/孔包被化学发光免疫分析板,4 $^{\circ}$ C冰箱包被过夜。

[0011] 其中,优选的,所述阳性对照血清是经塞尼卡谷病毒感染后14天的高感染滴度的猪血清;所述阴性对照血清是未免疫过任何疫苗的健康猪血清。

[0012] 其中,优选的,所述的酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗。

[0013] 其中,优选的,所述的样品稀释液为含1w/v%海藻糖、0.01w/v%硫柳汞、0.01v/v%Tween20和0.5w/v%酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

[0014] 其中,优选的,所述的化学发光底物液为用Tris-HCl缓冲液配制的含鲁米诺和对碘苯酚的混合液,所述的发光增强剂为用Tris-HCl缓冲液配制的含双氧水以及Tween20的混合液。

[0015] 更优选的,所述的化学发光底物液为用0.05M Tris-HCl缓冲液配制的含0.1mmol/L鲁米诺和0.1mmol/L对碘苯酚的混合液,所述的发光增强剂为用0.05MTris-HCl缓冲液配制的含7.5mmol/L双氧水、0.005v/v%的Tween20的混合液。

[0016] 其中,优选的,所述的浓缩洗涤液为10 \times PBST溶液,即含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/L PBS溶液,pH 7.4,使用时稀释10倍。

[0017] 进一步的,本发明还提出了利用所述的试剂盒进行塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的方法,按照以下步骤进行:

[0018] (1) 样本稀释

[0019] 将待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清用样品稀释液按照体积比1:32进行稀释;

[0020] (2) 洗板

[0021] 从4 $^{\circ}$ C冰箱中取出塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原包被的化学发光免疫分析板,打开包装袋,取出化学发光免疫分析板,以稀释好的洗涤液洗板3次,吸水纸拍干,每次3min;

[0022] (3) 加样

[0023] 将稀释后的待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清分别加入化学发光免疫分析板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育5min;

- [0024] (4) 洗涤
- [0025] 取出化学发光免疫分析板,甩掉血清样品,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干;
- [0026] (5) 加入酶标抗体
- [0027] 加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育5min;
- [0028] (6) 加底物:
- [0029] 甩掉酶标抗体,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干,加入化学发光底物和发光增强剂,混匀,避光静置5min;
- [0030] (7) 测定发光值、计算和判定:
- [0031] 于化学发光免疫分析仪器上测定发光值,所有待测样品用阳性百分比表示(positive percent,PP),换算公式如下:
- [0032] $PP = (\text{待测样品发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值}) \times 100\% / (\text{阳性对照血清平均发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值})$
- [0033] 临界值定为6.14%,若计算结果 $\geq 6.14\%$ 则判定为阳性,反之则为阴性。
- [0034] 相较于现有技术,本发明的有益效果在于:
- [0035] (1) 本发明检测试剂盒是将塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1在E.Coli高效表达,蛋白产量高,抗原纯度达90%以上;
- [0036] (2) 本试剂盒采用酶促化学发光反应系统判定结果,提高了检测灵敏度;
- [0037] (3) 当前关于塞尼卡谷病诊断的化学发光免疫分析方法还未见报道,本发明检测试剂盒具有操作简单,检测时间短,敏感性高,特异性强等优点,可以用于大量样品检测和流行病学调查。

附图说明

- [0038] 图1是本发明实施例提供的VP1蛋白表达结果;
- [0039] 图中:泳道M:蛋白分子量标准(116.0/66.2/45.0/35.0/25.0/18.4/14.4kDa);
- [0040] 泳道1:诱导表达破碎后的上清蛋白;泳道2:诱导表达破碎后的不溶蛋白;
- [0041] 图2是本发明实施例提供的复性包涵体蛋白结果;
- [0042] 图中:泳道M:蛋白分子量标准(116.0/66.2/45.0/35.0/25.0/18.4/14.4kDa);
- [0043] 泳道1:复性包涵体蛋白;
- [0044] 图3是本发明实施例提供的纯化复性蛋白结果。
- [0045] 图中:泳道M:蛋白分子量标准(116.0/66.2/45.0/35.0/25.0/18.4/14.4kDa);
- [0046] 泳道1:洗脱蛋白。
- [0047] 图4是本发明实施例提供的VP1-CLIA的ROC分析曲线。

具体实施方式

- [0048] 下面结合具体实施例对本发明做进一步说明,但下述实施例不会在任何方面限制本发明的保护范围。
- [0049] 实施例1用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒的制备及组装
- [0050] (一) 试剂盒的制备:

[0051] 1、塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原的表达：

[0052] 将塞尼卡谷病毒VP1蛋白的编码基因792bp (SEQ ID NO.1所示) 克隆到pET-30a (+) 原核表达载体,经酶切、测序正确后,阳性质粒转化至BL21DE3plysS菌株,卡纳抗性LB平板筛选单克隆,37℃,LB培养基摇菌过夜;将过夜菌液按体积比(v/v) 1:100转接至新鲜LB培养基,37℃,200rpm摇3h至OD600值达到0.6左右,加入终浓度1mmol/L的IPTG继续摇菌3h,6000rpm离心收集菌液。降低培养温度到30℃;加入IPTG诱导剂至终浓度0.5mM,30℃继续震荡培养3-4h;8000rpm离心3min收集菌体,重悬于50mL预冷NTA-0缓冲液中,冰浴30min;超声破碎菌体,16000rpm 4℃离心50min,收集上清以及沉淀;取少量上清及沉淀进行SDS-PAGE检测,蛋白表达结果如图1所示。剩余上清及沉淀置于4℃备用。

[0053] 2、包涵体蛋白纯化、复性：

[0054] 沉淀以50mL NTA-0缓冲液重悬,加入DTT至终浓度1mM,超声促进杂蛋白溶解,离心收集沉淀,重复三次至上清透明,沉淀以PBS重悬,超声,离心去上清,以6M盐酸胍重悬包涵体,加DTT至终浓度5mM;37℃震荡3h至包涵体全部溶解,离心去上清。再用蛋白复性液将蛋白低温透析复性,以2倍体积的3M盐酸胍稀释蛋白溶液,在4℃下逐滴加入到200mL复性液(pH8.0)中,转速调节至最大,搅拌24h,取蛋白溶液于透析袋中,以PEG60000浓缩后以PBS缓冲液透析过夜,复性后的包涵体蛋白SDS-PAGE检测结果如图2所示。复性后的蛋白用阴离子交换柱Ni-NTA再次纯化,收集蛋白。纯化的蛋白SDS-PAGE检测结果如图3所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0055] 3、抗原包被与最佳包被浓度的选择：

[0056] 经该原核表达系统表达的纯化产物,用pH=9.6碳酸盐缓冲液进行一系列稀释5μg/mL,2.5μg/mL,1.25μg/mL,0.625μg/mL,0.312μg/mL,每个浓度包被两列,100μL/孔加到96孔化学发光免疫分析板上,4℃包被过夜。结果表明,包被抗原浓度为2.5μg/mL时P/N的值最大,此时阳性与阴性的发光值比约为160,因此确定该浓度为最佳包被浓度。

[0057] 4、化学发光免疫分析板的封闭：

[0058] 上述化学发光免疫分析板用PBST(含0.05v/v%Tween20的0.01mol/L PBS溶液,pH 7.4)洗4次,每孔加入100μL封闭液(5w/v%脱脂奶粉和0.01w/v%的硫柳汞),37℃放置2h。弃掉洗涤液,PBST洗涤3遍,得到预包被抗原的化学发光免疫分析板,采用铝箔袋真空封口,4℃保存。

[0059] 5、标准血清的制备：

[0060] 用塞尼卡谷病毒按照免疫程序接种70日龄的健康易感仔猪(猪塞尼卡谷病毒血清中和抗体效价不高于1:4,猪塞尼卡谷病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪口蹄疫病毒抗原阴性),采集接种前的猪血清,将该批次样品无菌分装作为阴性对照血清,另外收集接种后14天的血清,将该批次样品无菌分装作为阳性对照血清。标准血清用样品稀释液稀释,稀释比例分别选择1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,采用化学发光仪读取发光值的结果如下表1所示。结果表明,当阳性对照血清用样品稀释液按1:32稀释时,P/N值最大,因此将该稀释度作为最佳血清稀释度。

[0061] 所述样品稀释液为:含1w/v%海藻糖、0.01w/v%硫柳汞、0.01v/v%Tween20和0.5w/v%酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

[0062] 表1不同血清稀释度的化学发光读数

[0063]

血清稀释比例	化学发光的读数		
1:8	SVV 免疫阳性猪血清 (P)	4615000	4408000
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	72370	69210
1:16	SVV 免疫阳性猪血清 (P)	2742000	2668700
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	33140	32680
1:32	SVV 免疫阳性猪血清 (P)	1223600	1296300
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	14720	15490
1:64	SVV 免疫阳性猪血清 (P)	557540	523700
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	10420	10380

[0064]

1:128	SVV 免疫阳性猪血清 (P)	305600	287500
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	6348	5980

[0065] 6、酶标抗体(10×)

[0066] 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗,使用时稀释10倍使用。

[0067] 7、PBST(10×)

[0068] 含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/L PBS溶液,pH 7.4。使用时稀释10倍使用。

[0069] 8、化学发光底物液

[0070] 用0.05M Tris-HCl缓冲液配制的含0.1mmol/L鲁米诺和0.1mmol/L对碘苯酚的混合液。

[0071] 9、发光增强剂

[0072] 用0.05M Tris-HCl缓冲液配制的含7.5mmol/L双氧水、体积分数为0.005%的Tween20的混合液。

[0073] (二) 试剂盒的组装及保存:

[0074] 1、试剂盒的组装:

[0075] 按照表2所列的试剂盒内容,装配试剂盒,组成后装于4℃保存。

[0076] 表2猪塞尼卡谷病毒化学发光免疫分析试剂盒内容

[0077]

编号	内容	数量
1	说明书	1 份
2	预包被抗原的化学发光免疫分析板	1 块 (96 孔)
3	阳性对照血清	500 μ l
4	阴性对照血清	500 μ l
5	酶标抗体 (10 \times)	500 μ l
6	样品稀释液	20 ml
7	PBST (10 \times)	25ml
8	化学发光底物	5ml
9	化学增强剂	5ml

[0078] 2、试剂盒说明书(检测方法)

[0079] (1) 稀释:用灭菌水将PBST(10 \times)洗液稀释至250ml,以样品稀释液将酶标抗体(10 \times)稀释至5ml。

[0080] (2) 洗板:打开包装袋,取出预包被抗原的化学发光免疫分析板,以稀释好的PBST洗板3次,吸水纸拍干,每次3min。

[0081] (3) 加样:将待测血清样品用样品稀释液以1:32倍稀释,按照每孔100 μ l加入到反应板中,加入塞尼卡谷病毒阳性对照血清与阴性对照血清,以1:32倍稀释,100 μ L/孔,该对照血清做两个重复。37 $^{\circ}$ C作用5min。

[0082] (4) 洗涤:甩掉血清样品,用PBST漂洗4次,吸水纸拍干;

[0083] (5) 加酶标抗体:加入稀释好的HRP-兔抗猪的Ig G二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C作用5min。[0084] (6) 加底物:甩掉酶标抗体,用PBST漂洗4次,吸水纸拍干。加入化学发光底物(50 μ L/孔)和发光增强剂(100 μ L/孔)。混匀,避光静置5min。

[0085] (7) 测定发光值、计算和判定:

[0086] 于化学发光免疫分析仪器上测定发光值,所有待测样品用阳性百分比表示(positive percent,PP),换算公式如下:

[0087]
$$PP = \frac{(\text{待测样品发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值}) \times 100\%}{(\text{阳性对照血清平均发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值})}$$
[0088] 临界值定为6.14%,若计算结果 $\geq 6.14\%$ 则判定为阳性,反之则为阴性。

[0089] 实施例2用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒的敏感性、特异性实验

[0090] 1、已知背景血清的稀释:

[0091] (1) 共有30份血清样品来自临床上健康的猪,这些猪没有感染过塞尼卡谷病毒,这些血清用于评价塞尼卡谷病毒结构蛋白抗体化学发光检测方法的特异性。

[0092] (2) 猪水疱病阳性血清、猪瘟病毒阳性血清和猪圆环病毒-2型阳性血清各30份,这

些血清用于评价塞尼卡谷病毒结构蛋白抗体化学发光检测方法的特异性。

[0093] (3) 共有80份血清样品来自实验性地攻过塞尼卡谷病毒的猪。这些猪在进行攻毒之前未进行任何免疫,并且这些血清样品是在攻过毒后收集第14天的血清样品。这些血清用于评价塞尼卡谷病毒结构蛋白抗体化学发光检测方法的敏感性。

[0094] 以上血清用样品稀释液稀释,稀释比例为1:32,所述样品稀释液为:含1w/v%海藻糖、0.01w/v%硫柳汞、0.01v/v%Tween20和0.5w/v%酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

[0095] 2、化学发光免疫分析:

[0096] 利用实施例1制备得到试剂盒检测上述血清样品,方法同实施例1。

[0097] 3、临界值的确定:

[0098] 所有待测样品用阳性百分比表示(positive percent,PP),换算公式如下:

[0099] $PP = (\text{检测样品发光值} - \text{标准阴性样品平均发光值}) \times 100\% / (\text{标准阳性样品平均发光值} - \text{标准阴性样品平均发光值})$ 。

[0100] 获得已知背景血清的PP值后做ROC曲线分析。判断最佳的临界值、诊断敏感性、诊断特异性。结果分析:对于本检测方法来说,当临界值定为6.14%时有最优诊断结果。

[0101] 4、敏感性实验:

[0102] 利用实施例1制备得到试剂盒检测80份血清样品,这些样品是在攻过毒14天后收集的血清样品,这些猪在进行攻毒之前未进行任何免疫,检测方法同实施例1。检测结果表明以上样品VP1抗体有很高的阳性率(96.25%)。说明本发明的试剂盒有较好的敏感性,结果如表3所示。

[0103] 表3化学发光免疫分析试剂盒的敏感性试验

[0104]

检测方法	样品数(份)	阳性数(份)	阴性数(份)	阳性率(%)
化学发光免疫分析	80	77	3	96.25%

[0105] 5、特异性实验:

[0106] 利用实施例1制备得到试剂盒检测了猪水疱病阳性血清、猪瘟病毒阳性血清和猪圆环病毒-2型阳性血清以及猪塞尼卡谷病毒阴性血清各30份,检测方法同实施例1。这些血清用于评价塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体化学发光免疫分析方法的特异性。检测猪水疱病阳性血清、猪瘟病毒阳性血清、猪圆环病毒-2型和猪塞尼卡谷病毒阴性血清的反应均为阴性结果,结果如下表4,表明本发明的试剂盒有很好的特异性,从根本上保证了检测结果的准确和可靠性。

[0107] 表4 ELISA试剂盒特异性试验

[0108]

阳性血清类型	样品数(份)	反应结果
猪瘟病毒	30	-

[0109]

猪圆环病毒-2 型	30	-
猪水疱病毒	30	-
猪塞尼卡谷病毒阴性血清	30	-

[0110] 以上血清初步检测结果表明:选取的蛋白作为诊断抗原具有良好的敏感性和特异性,VP1-CLIA的ROC分析曲线如图4所示。

[0111] 6、重复性的鉴定

[0112] 将5个背景清楚的血清在同一化学发光免疫分析板上各做3个重复,计算其批间变异系数(CV)。同时将这5个背景清楚的血清在不同的3个发光免疫分析板上以及不同的时间做三次重复,计算其批内变异系数(CV)。

[0113] 重复性结果如下表所示(表5),5组不同感染滴度的血清的批内变异系数为1.86%-8.45%。批间变异系数为1.64%-12.31%。因此批间与批内的变异系数全部小于15%,证明该方法具有很好的重复性。

[0114] 表5重复性鉴定

[0115]

血清	批内			批间		
	平均值	标准差	变异系数	平均值	标准差	变异系数
1	89.25	1.66	1.86	92.78	2.58	2.78
2	33.89	1.80	5.32	35.12	1.88	5.35
3	12.65	1.07	8.45	11.56	0.19	1.64
4	6.82	0.19	2.78	5.32	0.51	9.58
5	0.89	0.03	3.37	0.65	0.08	12.31

[0116] 7、稳定性的鉴定

[0117] 为了测定塞尼卡谷病毒结构蛋白抗体化学发光免疫分析板的保存期,将包被好的反应板置于37℃环境下15天。然后测量塞尼卡谷病毒阳性血清。结果塞尼卡谷病毒阳性血清的发光值为2650,000,符合实验成立的标准,且标准阴性血清的PP值没有超过1%。因此该包被板具有很好的稳定性。

[0118] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒

<160>2

<170>Patent-In 3.5

<210>1

<211>792

<212>DNA

<213>Seneca Valley virus

<400>1

```
tccaccgaca acgccgagac tggggttatt gaggcagta aactgacac cgatttctct 60
ggatgaactgg cggtcctgg ctctaaccat actaatgta aattcctgtt tgatcgatcc 120
cgactactga atgtaattaa ggtgctggag aaggacgccg tcttcccccg tctttcccc 180
acagcaacag gtgcacagca ggacgatggt tacttttgtc tctaacacc ccgccaaca 240
gtcgttccc gaccgccac tcgtttcggc ctgtacgta acccgtctga cagtggcggt 300
ctcgccaaca cttcactgga tttcaatfff tacagtttgg cctgtttcac ttactttaga 360
tcagaccttg aagtcacggt ggtctcacta gagccagatt tggaattcgc cgtgggggtg 420
ttcccctctg gcagtgagta tcaggcttct agctttgtct acgaccaact gcatgtacc 480
taccacttca ctgggcgcac tccccgcgct taccagca aggggtgaaa ggtatctttc 540
gtgctccctt ggaactctgt ctcttcctg cttcccgtgc gctggggggg cgcttccaag 600
ctttcttctg ccacgcgggg tctgccgct catgctgact gggggaccat ttacgccttt 660
atccccgcc ctaacgagaa gaaaagcacc gctgtaaac acgtggcggg gtacgttcgg 720
tacaagaacg cgcgtgcctg gtgccccagc atgcttccct ttcgagcta caagcagaag 780
atgctgatgc aa 792
```

<210>2

<211>264

<212>PRT

<213>Seneca Valley virus

<400>2

```
Ser Thr Asp Asn Ala Glu Thr Gly Val Ile Glu Ala Gly Asn Thr 15
Asp Thr Asp Phe Ser Gly Glu Leu Ala Ala Pro Gly Ser Asn His 30
Thr Asn Val Lys Phe Leu Phe Asp Arg Ser Arg Leu Leu Asn Val 45
Ile Lys Val Leu Glu Lys Asp Ala Val Phe Pro Arg Pro Phe Pro 60
Thr Ala Thr Gly Ala Gln Gln Asp Asp Gly Tyr Phe Cys Leu Leu 75
Thr Pro Arg Pro Thr Val Ala Ser Arg Pro Ala Thr Arg Phe Gly 90
Leu Tyr Val Asn Pro Ser Asp Ser Gly Val Leu Ala Asn Thr Ser 105
Leu Asp Phe Asn Phe Tyr Ser Leu Ala Cys Phe Thr Tyr Phe Arg 120
Ser Asp Leu Glu Val Thr Val Val Ser Leu Glu Pro Asp Leu Glu 135
```

Phe Ala Val Gly Trp Phe Pro Ser Gly Ser Glu Tyr Gln Ala Ser 150
Ser Phe Val Tyr Asp Gln Leu His Val Pro Tyr His Phe Thr Gly 165
Arg Thr Pro Arg Ala Phe Thr Ser Lys Gly Gly Lys Val Ser Phe 180
Val Leu Pro Trp Asn Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Val Arg Trp 195
Gly Gly Ala Ser Lys Leu Ser Ser Ala Thr Arg Gly Leu Pro Ala 210
His Ala Asp Trp Gly Thr Ile Tyr Ala Phe Ile Pro Arg Pro Asn 225
Glu Lys Lys Ser Thr Ala Val Lys His Val Ala Val Tyr Val Arg 240
Tyr Lys Asn Ala Arg Ala Trp Cys Pro Ser Met Leu Pro Phe Arg 255
Ser Tyr Lys Gln Lys Met Leu Met Gln 264

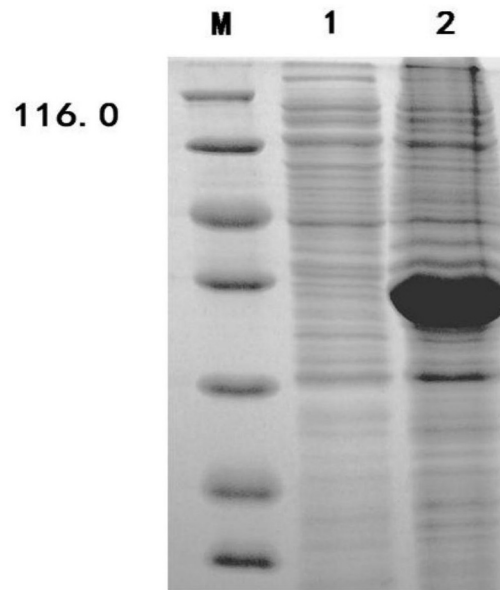


图1

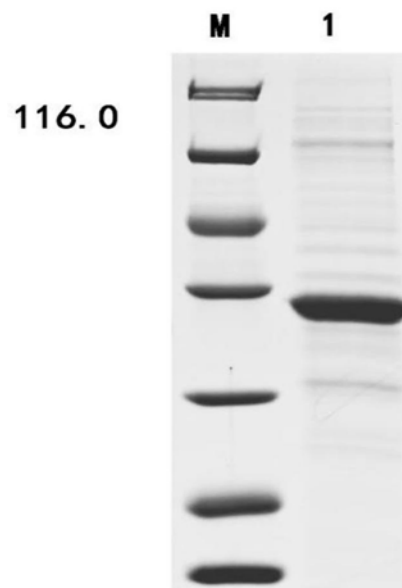


图2

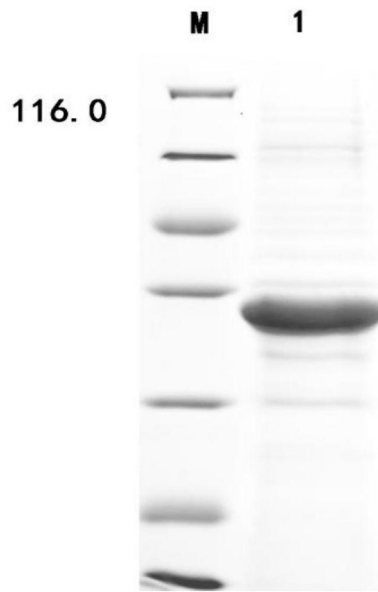


图3

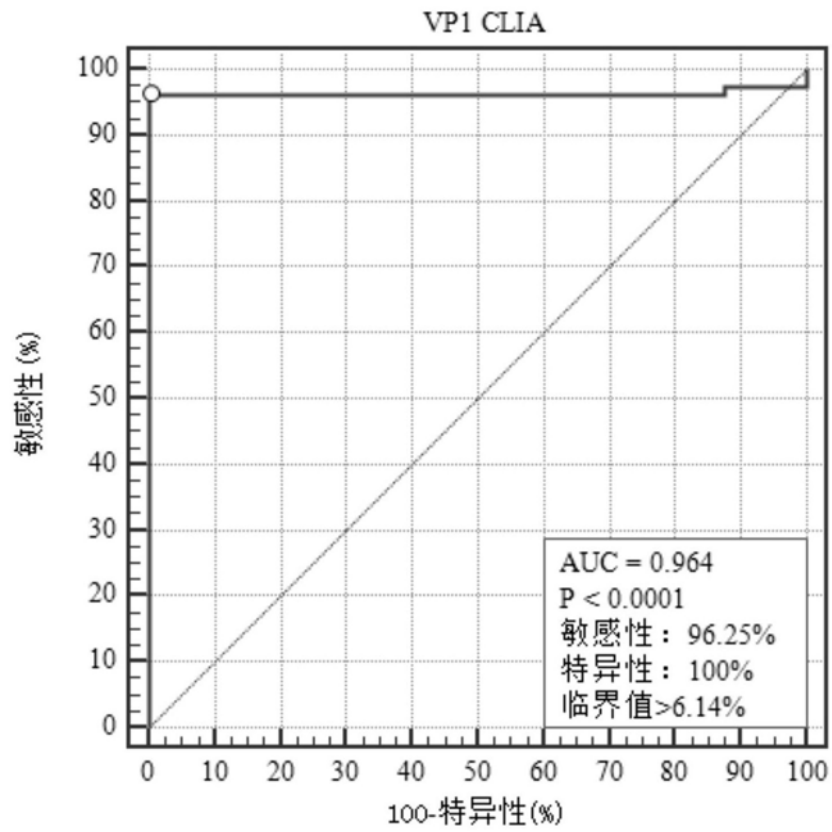


图4

专利名称(译)	一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	CN108872574A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810763876.X	申请日	2018-07-12
[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	吕建亮 潘丽 张中旺 张永光		
发明人	吕建亮 潘丽 张中旺 张永光 卢田鑫 李姚尧		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/535 G01N21/76		
代理人(译)	孙皓晨 马鑫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒。该试剂盒包括塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1抗原包被的化学发光免疫分析板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标抗体、化学发光底物液、发光增强剂以及浓缩洗涤液。所述塞尼卡谷病毒结构蛋白VP1的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明的检测试剂盒使用原核表达系统表达的结构蛋白VP1抗原，蛋白产量高，抗原纯度达90%以上，采用酶促化学发光反应系统判定结果，提高了检测灵敏度。本发明检测试剂盒具有操作简单，检测时间短，敏感性高，特异性强等优点，可以用于大量样品的塞尼卡谷病毒检测和流行病学调查，具有良好的市场前景。

血清稀释比例	化学发光的读数		
	1:8	SVV免疫阳性猪血清 (P)	4615000
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	72370	69210
1:16	SVV免疫阳性猪血清 (P)	2742000	2668700
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	33140	32680
1:32	SVV免疫阳性猪血清 (P)	1223600	1296300
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	14720	15490
1:64	SVV免疫阳性猪血清 (P)	557540	523700
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	10420	10380