



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872576 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810765363.2

(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非结构蛋白3ABC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非结构蛋白3ABC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非结构蛋白3ABC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、样品稀释液、化学发光底物液、发光增强剂以及浓缩洗涤液。所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明所述的试剂盒使用原核表达系统表达的非结构蛋白3ABC抗原包被反应板,抗原用量少,可以高效地检测猪血清中是否存在塞尼卡谷病毒,且与猪水疱病毒、猪瘟病毒和猪圆环病毒-2型不反应。采用酶促化学发光反应系统判定结果,提高了检测灵敏度。本发明试剂盒特异性好、敏感、高效,具有良好的市场前景。

1. 一种用于塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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非结构蛋白3ABC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、样品稀释液、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,所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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,所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的化学发光免疫分析板按照以下方法制备得到:

(1) 包被抗原的制备和包被

原核表达系统表达获得的重组蛋白包涵体经复性及Ni-NTA纯化得到塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,包被时用碳酸盐缓冲液稀释至 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$,按照 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 包被到化学发光免疫分析板上, 4°C 冰箱静置过夜;

(2) 化学发光免疫分析板的封闭与保存

化学发光免疫分析板以PBST洗涤3次,每孔加入 $100\mu\text{l}$ 含有 $5\text{w}/\text{v}\%$ 脱脂奶粉和 $0.01\text{w}/\text{v}\%$ 硫柳汞的封闭液, 37°C 封闭2h,弃掉封闭液,PBST洗涤3次,采用铝箔袋真空封口, 4°C 保存。

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 $1\text{w}/\text{v}\%$ 海藻糖、 $0.01\text{w}/\text{v}\%$ 硫柳汞、 $0.01\text{v}/\text{v}\%$ Tween20和 $0.5\text{w}/\text{v}\%$ 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 $0.1\text{mmol}/\text{L}$ 鲁米诺和 $0.1\text{mmol}/\text{L}$ 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 $7.5\text{mmol}/\text{L}$ 双氧水、 $0.005\text{v}/\text{v}\%$ 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 $0.5\text{v}/\text{v}\%$ Tween20的 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 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非结构蛋白3ABC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℃冰箱中取出塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的化学发光免疫分析板,打开铝箔袋,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100μL,37℃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,100μL/孔,37℃工作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:

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

临界值定为7.27%,若计算结果 $\geq 7.27\%$ 则判定为阳性,反之则为阴性。

一种用于塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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非结构蛋白3ABC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鉴别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'-U TR、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。对于猪塞尼卡谷病的诊断来说,检测非结构蛋白或其抗体可以有效区分疫苗免疫动物与野毒感染动物。

[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。当前关于猪塞尼卡谷病诊断的化学发光免疫分析方法还未见报道。

[0005] 本发明以塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC作为候选基因,克隆获得3ABC基因,以大肠杆菌中表达并纯化3ABC蛋白作为包被抗原,建立塞尼卡谷病毒的快速鉴别诊断的化学发光免疫分析试剂盒,为今后应对塞尼卡谷病毒的可能疫情,提前做好技术储备具有重要意义。

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非结构蛋白3ABC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、快速的鉴别诊断试剂用于塞尼卡谷病毒的防控的问题,为今后提前应对塞尼卡谷病毒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] 本发明提供一种用于塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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非结构蛋白3ABC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,样品稀释液,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,所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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,所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的化学发光免疫分析板按照以下方法制备得到:

[0011] (1) 包被抗原的制备和包被

[0012] 原核表达系统表达获得的重组蛋白包涵体经复性及Ni-NTA纯化得到塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,包被时用碳酸盐缓冲液稀释至2.5μg/ml,按照100μl/孔包被到化学发光免疫分析板上,4℃冰箱静置过夜;

[0013] (2) 化学发光免疫分析板的封闭与保存

[0014] 化学发光免疫分析板以PBST洗涤3次,每孔加入100μl含有5w/v%脱脂奶粉和0.01w/v%硫柳汞的封闭液,37℃封闭2h,弃掉封闭液,PBST洗涤3次,采用铝箔袋真空封口,4℃保存。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。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0.05M 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。

[0019] 其中,优选的,所述的浓缩洗涤液为10×PBST溶液,即含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/LPBS溶液,pH 7.4,使用时稀释10倍。

[0020] 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非结构蛋白3ABC抗体检测的方法,按照以下步骤进行:

[0021] (1) 样本稀释

- [0022] 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;
- [0023] (2) 洗板
- [0024] 从4℃冰箱中取出塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的化学发光免疫分析板,打开铝箔袋,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;
- [0025] (3) 加样
- [0026] 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100μL,37℃孵育5min;
- [0027] (4) 洗涤
- [0028] 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;
- [0029] (5) 加入酶标抗体
- [0030] 加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗,100μL/孔,37℃工作5min;
- [0031] (6) 加底物:
- [0032] 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;
- [0033] (7) 测定发光值、计算和判定:
- [0034] 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:
- [0035] $PP = (\text{待测样品发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值}) \times 100\% / (\text{阳性对照血清平均发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值})$
- [0036] 临界值定为7.27%,若计算结果 $\geq 7.27\%$ 则判定为阳性,反之则为阴性。
- [0037] 相较于现有技术,本发明的有益效果在于:
- [0038] (1) 本发明检测试剂盒是将塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC在E.Coli高效表达,蛋白产量高,抗原纯度达90%以上;
- [0039] (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;
- [0040] (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

- [0041] 图1是本发明实施例提供的3ABC蛋白表达结果;
- [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);泳道1:宿主菌全菌蛋白;泳道2: IPTG诱导全菌蛋白;
- [0043] 图2是本发明实施例提供的表达的菌体破碎上清及沉淀SDS-PAGE电泳图;
- [0044] 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);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;
- [0045] 图3是本发明实施例提供的纯化重组蛋白结果;
- [0046] 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);泳

道1:洗脱蛋白。

[0047] 图4是本发明实施例提供的3ABC-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用于塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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、塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原的表达:

[0052] 将塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC的编码基因969bp (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,卡那霉素抗性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。表达的菌体破碎上清及沉淀SDS-PAGE电泳图如图2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: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。复性后的蛋白用阴离子交换柱Ni-NTA再次纯化,收集蛋白。蛋白纯化结果如图3所示,塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0054] 3、抗原包被与最佳包被浓度的选择:

[0055] 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。

[0056] 4、化学发光免疫分析板的封闭:

[0057] 上述化学发光免疫分析板用PBST(含0.05v/v% Tween20的0.01mol/LPBS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℃封闭2h。弃掉洗涤液,PBST洗涤3次,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。

[0058] 5、标准血清的制备:

[0059] 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,当阳性对照血清用血清稀释液按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。

[0060] 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%的酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

[0061] 表1不同血清稀释度的化学发光读数

[0062]

血清稀释比例	化学发光的读数		
1:8	SVV免疫阳性猪血清 (P)	4723000	4654000

[0063]

	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	81370	71210
1:16	SVV免疫阳性猪血清 (P)	2463000	2552400
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	38130	31680
1:32	SVV免疫阳性猪血清 (P)	1346000	1356000
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	14350	14230
1:64	SVV免疫阳性猪血清 (P)	627540	578700
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	11420	10480
1:128	SVV免疫阳性猪血清 (P)	32450	297500
	无任何免疫与感染阴性猪血清 (N)	7248	6480

[0064] 6、酶标抗体(10×)

[0065] 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。

[0066] 7、PBST(10×)

[0067] 含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/LPBS溶液,pH 7.4。使用时稀释10倍使用。

[0068] 8、化学发光底物液

[0069] 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。

[0070] 9、发光增强剂

[0071] 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。

[0072] (二)试剂盒的组装及保存:

[0073] 1、试剂盒的组装：

[0074] 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。

[0075] 表2塞尼卡谷病毒化学发光免疫分析试剂盒的内容

编号	内容	数量
1	说明书	1份
[0076] 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 μl
4	阴性对照血清	500 μl
5	酶标抗体(10×)	500 μl
[0077] 6	样品稀释液	20 ml
7	PBST(10×)	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×)洗液稀释至250ml，以样品稀释液将酶标抗体(10×)稀释至5ml。

[0080] (2) 洗板：打开铝箔袋，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，每孔100μl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，100μL/孔，该对照血清做两个重复。37℃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，100μL/孔，37℃工作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A(50μL/孔)和发光增强剂B(100μL/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7.27%，若计算结果 $\geq 7.27\%$ 则判定为阳性，反之则为阴性。

[0089] 实施例2用于塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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非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非结构蛋白3ABC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SVV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毒后收集的血清样品。这些血清用于评价塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC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] $PP = (\text{待测样品发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值}) \times 100\% / (\text{阳性对照血清平均发光值} - \text{阴性对照血清平均发光值})$ 。

[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。

[0101] 结果分析:对于本检测方法来说,当临界值定为7.27%时有最优诊断结果。

[0102] 4、敏感性实验:

[0103] 利用实施例1制备得到试剂盒检测80份血清样品,这些样品是在攻毒后收集的血清样品,这些猪在进行攻毒之前未进行任何免疫,通过计算阳性检出率分析方法的敏感性,检测方法同实施例1。检测结果表明以上样品3ABC抗体有很高的阳性率(97.5%)。说明本发明的试剂盒有较好的敏感性,结果如表3所示。

[0104] 表3化学发光免疫分析试剂盒的敏感性试验

[0105]

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	78	2	97.5%

[0106] 5、特异性实验:

[0107] 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非结构蛋白3ABC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。以上血清初步检测结果表明:选取的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC蛋白作为诊断抗原具有良好的敏感性和特异性。3ABC-CLIA的ROC分析曲线如图4所示。

[0108] 表4ELISA试剂盒特异性试验

[0109]

阳性血清类型	样品数(份)	反应结果
猪瘟病毒	30	-
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] 6、重复性的鉴定

[0111] 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)。

[0112] 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1.83%-9.82%。批间变异系数为1.77%-13.15%。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。

[0113] 表5重复性鉴定

[0114]

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	90.15	1.65	1.83	93.18	3.06	3.28
2	35.83	3.52	9.82	32.12	2.12	6.6
3	11.65	0.76	6.52	13.56	0.24	1.77
4	7.12	0.35	4.92	6.32	0.43	6.81
5	2.89	0.09	3.11	3.65	0.48	13.15

[0115] 7、稳定性的鉴定

[0116] 为了测定塞尼卡谷病毒非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2950,000,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。

[0117] 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,表明本发明检测试剂盒检测时间短,重复性好、敏感性高,特异性强。

[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非结构蛋白3ABC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>969

<212>DNA

<213>Seneca Valley virus

<400>1

```

agccccaacg agaatgatga cacccccgtc gacgaggcgt tgggtagagt tctctcccc 60
gctgcggtcg atgaggeget tgtcgacctc actccagagg cggaccgggt tggccgtttg 120
gctattcttg ccaagctagg tcttgcccta gctgcggtca ccctggtct gataatcttg 180
gcagtgggac tctacaggta cttctctggc tctgatgcag accaagaaga aacagaaagt 240
gagggatctg tcaaggcacc caggagcgaa aatgcttatg acggcccgaa gaaaaactct 300
aagccccctg gagcactctc tctcatggaa atgcaacagc ccaacgtgga catgggcttt 360
gaggctgcgg tcgctaagaa agtggtcgtc ccattacct tcatggttcc caacagacct 420
tctgggctta cacagtccgc tcttctggtg accggccgga ctttctaata caatgaacat 480
acatggtcca atccctcctg gaccagcttc acaatccgcg gtgaggtaca cactcgtgat 540
gagcccttcc aaacggttca tttcactcac cacggtatc ccacagatct gatgatggta 600
cgtctcggac cgggcaattc tttccctaac aatctagaca agtttgact tgaccagatg 660
ccggcacgca actcccgtgt ggttggcggt tcgtccagtt acggaaactt cttcttctct 720
ggaaatttcc tcggatttgt tgattccatc acctetgaac aaggaactta cgcaagactc 780
tttaggtaca gggtgacgac ctacaaagga tggtgcggct cggccctggt ctgtgaggcc 840
ggtggcgctc gacgcatcat tggcctgcat tctgctggcg ccgccggtat cggcgccggg 900
acctatatct caaaattagg actaatcaaa gcctgaaac acctcgggtga acctttggcc 960
acaatgcaa 969

```

<210>2

<211>323

<212>PRT

<213>Seneca Valley virus

<400>2

```

Ser Pro Asn Glu Asn Asp Asp Thr Pro Val Asp Glu Ala Leu Gly 15
Arg Val Leu Ser Pro Ala Ala Val Asp Glu Ala Leu Val Asp Leu 30
Thr Pro Glu Ala Asp Pro Val Gly Arg Leu Ala Ile Leu Ala Lys 45
Leu Gly Leu Ala Leu Ala Ala Val Thr Pro Gly Leu Ile Ile Leu 60
Ala Val Gly Leu Tyr Arg Tyr Phe Ser Gly Ser Asp Ala Asp Gln 75
Glu Glu Thr Glu Ser Glu Gly Ser Val Lys Ala Pro Arg Ser Glu 90

```

Asn Ala Tyr Asp Gly Pro Lys Lys Asn Ser Lys Pro Pro Gly Ala 105
 Leu Ser Leu Met Glu Met Gln Gln Pro Asn Val Asp Met Gly Phe 120
 Glu Ala Ala Val Ala Lys Lys Val Val Val Pro Ile Thr Phe Met 135
 Val Pro Asn Arg Pro Ser Gly Leu Thr Gln Ser Ala Leu Leu Val 150
 Thr Gly Arg Thr Phe Leu Ile Asn Glu His Thr Trp Ser Asn Pro 165
 Ser Trp Thr Ser Phe Thr Ile Arg Gly Glu Val His Thr Arg Asp 180
 Glu Pro Phe Gln Thr Val His Phe Thr His His Gly Ile Pro Thr 195
 Asp Leu Met Met Val Arg Leu Gly Pro Gly Asn Ser Phe Pro Asn 210
 Asn Leu Asp Lys Phe Gly Leu Asp Gln Met Pro Ala Arg Asn Ser 225
 Arg Val Val Gly Val Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Phe Phe Phe Ser 240
 Gly Asn Phe Leu Gly Phe Val Asp Ser Ile Thr Ser Glu Gln Gly 255
 Thr Tyr Ala Arg Leu Phe Arg Tyr Arg Val Thr Thr Tyr Lys Gly 270
 Trp Cys Gly Ser Ala Leu Val Cys Glu Ala Gly Gly Val Arg Arg 285
 Ile Ile Gly Leu His Ser Ala Gly Ala Ala Gly Ile Gly Ala Gly 300
 Thr Tyr Ile Ser Lys Leu Gly Leu Ile Lys Ala Leu Lys His Leu 315
 Gly Glu Pro Leu Ala Thr Met Gln 323

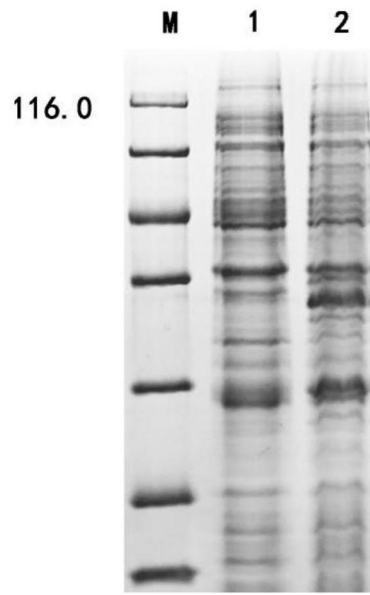


图1

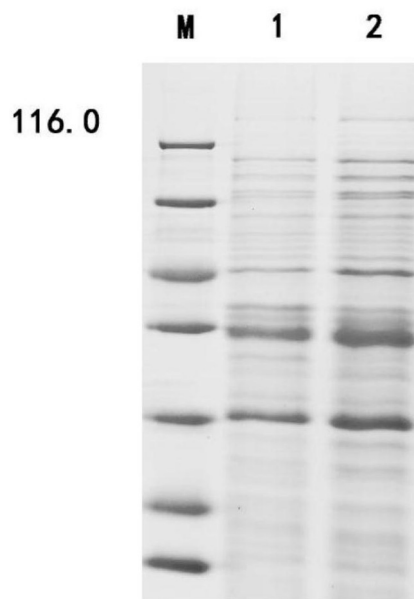


图2

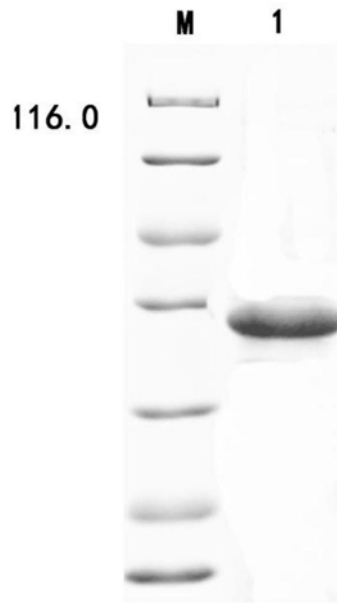


图3

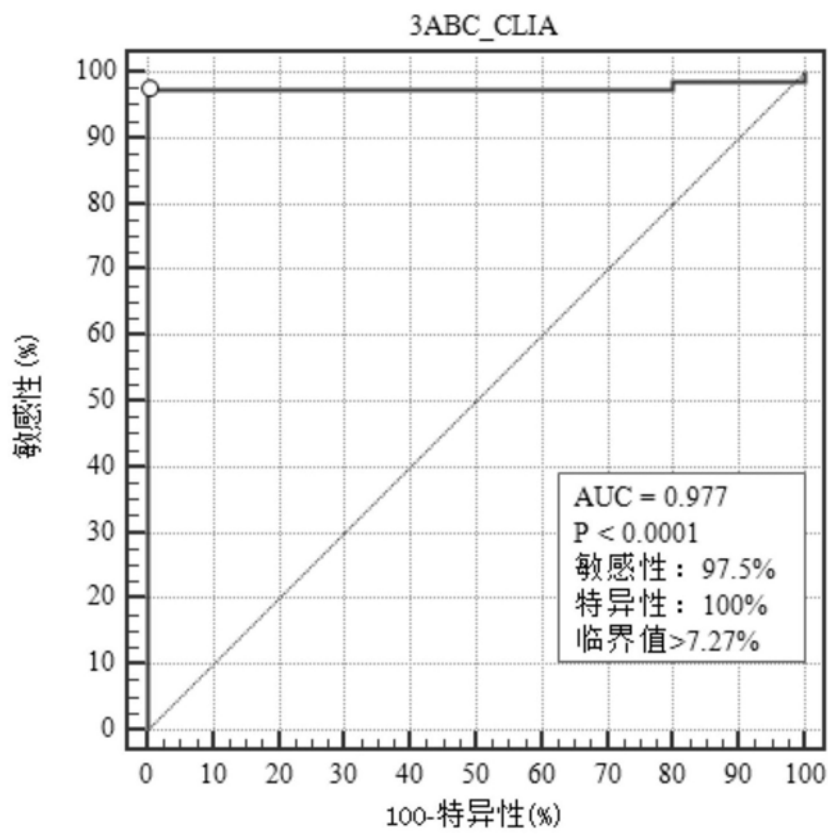


图4

专利名称(译)	一种用于塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体检测的化学发光免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	CN108872576A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810765363.2	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		
CPC分类号	G01N21/763 G01N33/535 G01N33/56994 G01N33/6854 G01N2333/03 G01N2333/47		
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非结构蛋白3ABC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非结构蛋白3ABC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、样品稀释液、化学发光底物液、发光增强剂以及浓缩洗涤液。所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明所述的试剂盒使用原核表达系统表达的非结构蛋白3ABC抗原包被反应板，抗原用量少，可以高效地检测猪血清中是否存在塞尼卡谷病毒，且与猪水疱病毒、猪瘟病毒和猪圆环病毒-2型不反应。采用酶促化学发光反应系统判定结果，提高了检测灵敏度。本发明试剂盒特异性好、敏感、高效，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)	4723000	4654000