



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105647914 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201610089044. 5

(22) 申请日 2016. 02. 17

(71) 申请人 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心

地址 570311 海南省海口市秀英区海秀西路  
165号海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心东13楼

(72) 发明人 李丹丹 高慎阳 徐义刚 邱索平

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C12N 15/66(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

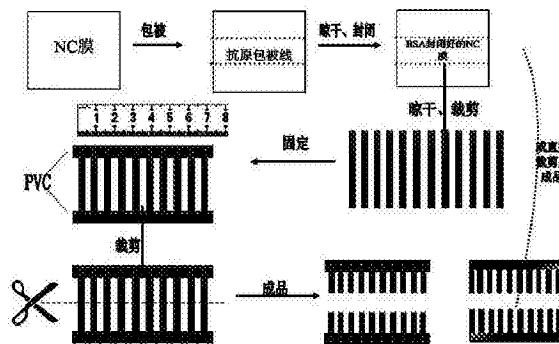
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

猴 SRV1 病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种猴 SRV1 病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用。用于制建免疫梳的重组质粒 pGEX-4T-SRV1, 如序列表 Seq No. 3 所示。用于构建重组质粒的引物对, 上引物 SRV1F : 如序列表 Seq No. 1 所示; 下引物 SRV1R : 如序列表 Seq No. 2 所示。构建方法, 包括如下步骤: 根据猴 SRV1 病毒的核苷酸序列设计 SOE-PCR 引物对; 进行 SOE-PCR 扩增猴 SRV1 基因; 构建重组质粒 pGEX-4T-SRV1。最后利用酶联免疫原理和膜层析技术制成快速检测实验猴血液或血清中的抗体的免疫梳。免疫梳具有良好的稳定性、特异性、敏感性及重复性。



1. 一种用于构建猴SRV1病毒抗体的免疫梳的SOE-PCR引物组,其特征在于,引物SRV1F:如序列表Seq No.1所示,引物SRV1R:如序列表Seq No.2所示。

2. 一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T- SRV1,其特征在于,序列如序列表Seq No.3所示。

3. 一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T- SRV1的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)根据猴SRV1病毒的基因序列,设计SOE-PCR扩增引物,引物SRV1F:如序列表Seq No.1所示,引物SRV1R:如序列表Seq No.2所示;

(2)进行SOE-PCR扩增猴SRV1病毒基因;

(3)猴SRV1病毒基因的回收;

(4)克隆质粒pMD18T- SRV1的构建及测序;

(5)表达载体pGEX-4T- SRV1的构建,序列如序列表Seq No.3所示。

4. 根据权利要求3所述的一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T- SRV1的构建方法,其特征在于,所述的步骤(2)采用SOE-PCR反应的具体步骤如下:

将混合液在95 °C预变性5 min,94 °C变性1 min,63 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,30个循环,72 °C总延伸10 min;

上述混合液如下所示:

SRV1F 引物	2 $\mu$ L
SRV1R 引物	2 $\mu$ L
2×Taq MasterMix	15 $\mu$ L
超纯水	补足至 30 $\mu$ L

5. 根据权利要求3所述的一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T-SRV1的构建方法,其特征在于,所述的步骤(5)pGEX-4T-SRV1的构建方法具体步骤如下:利用EcoRI与XhoI分别将pMD18T-SRV1和pGEX-4T-1进行双酶切,并胶回收酶切的目的片段,将回收的目的片段进行连接,将连接产物转化到BL21(DE3)pLysS感受态细胞中,利用氨苄青霉素抗性筛选阳性菌落,并提取质粒进行SmaI和EcoRI双酶切鉴定,将鉴定阳性的质粒命名为pGEX-4T-SRV1。

6. 一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)以重组表达载体pGEX-4T-SRV1表达猴SRV1病毒蛋白;

(2)猴SRV1蛋白的纯化与定量;

(3)免疫梳检测试纸的制备:

(3.1)将步骤(1)中表达的猴SRV1病毒蛋白以0.1 mg/mL的浓度进行线性包被NC膜,将膜晾干;

(3.2)用0.05g/mL 的BSA封闭液封闭NC膜过夜,弃去封闭液后再次晾干;

(3.3) 将包被好的NC膜裁剪成标准尺寸的试纸条,依次按一定间距整齐固定于PVC板上,十二条为一组或直接裁剪包被好的NC膜制成免疫梳检测试纸,最终于自封袋中低温保存备用。

7. 根据权利要求6所述的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸的制备方法制备的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸。

8. 根据权利要求7所述的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸,其特征在于,其检测方法如下:

(1) 将1:25倍稀释的待检血清样品转移至96孔酶标反应板中,标记顺序号;

(2) 将免疫梳检测齿依次伸入各反应孔内的血清液面之下, 37 °C轻轻震荡30-60 min;

(3) 取出免疫梳用TBS-T缓冲液冲洗三次,每次3-5 min,同时将稀释好的碱性磷酸酶标记1:500兔抗猴二抗溶液顺次加入另一排酶标反应板孔中,每孔≥300 μL,将洗过的免疫梳依次伸入各反应孔中,37 °C震荡30-60 min;

(4) 取出免疫梳按上述方法冲洗3次后置于干净的方盒中加入显色液,静止、闭光显色1-15 min,最后用蒸馏水冲洗免疫梳并观察记录反应结果;

(5) 上述操作过程中设立阳性对照与阴性对照各1孔;

(6) 阳性对照免疫梳齿上有明显的肉眼可见反应条带,蓝紫或黑色,且阴性对照梳齿上无反应条带,说明检测有效,在此基础上进行下一步待测样品的判定;

(7) 待测样品检测的免疫梳齿上与阳性对照梳齿上相同位置处出现可见反应条带的判定为阳性检测结果,若待测样品检测的免疫梳齿上无反应条带出现则判定为阴性检测结果。

9. 根据权利要求7所述的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸在检测猴SRV1病毒抗体中的应用。

## 猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物技术领域的检测方法及抗原技术领域,具体涉及一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 猴D型反转录病毒(simian type-Dretro virus, SRV)属反转录病毒科、D型反转录病毒属,与猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)同为猴获得性免疫缺陷综合征(SAIDS)的一种致病病毒。目前已发现的SRV有5个血清型:SRV-1,2,3,4,5。SRV主要的靶细胞是淋巴细胞,感染后可造成淋巴细胞耗竭,诱发免疫缺陷。各型SRV的发生有其种属性和群体性,一旦传入易感猴群,可使80%以上的猴发病致死。SRV自然宿主是猕猴,而我国是世界上猕猴的一个主要分布区,遍及东南各省,尤其是海南、云南、广西、四川、贵州和福建等省区,每年都有一定数量的猕猴出口欧美地区,同时也从东南亚地区进口一定数量的猕猴。自美国从中国进口的猴子中分离到SRV-5病毒以来,我国也开始了对国内猕猴SRV的检测。SRV感染的诊断除了检查临床症状,还要结合实验室诊断方法,常用的实验室诊断方法有聚合酶链式反应(PCR)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接免疫荧光(IFA)、免疫印迹(Western Blot)、病毒分离等。

[0003] 免疫梳方法是能够对病毒血清抗体进行定性、定量检测的一项新型体外诊断技术,这种技术突破性地将病毒抗原点布在具有极强蛋白吸附力的硝酸纤维膜上,把包被好的抗原膜贴附于PVC板以增加膜的强度和硬度,经机器裁切制成免疫梳。将此免疫梳插入稀释好的待检血清样本时,特异性抗体与抗原结合并固着于膜上,再通过酶标二抗底物反应,染色后,抗体阳性的样本表现为肉眼可见的红色斑点,阴性则无颜色变化。膜经过图像处理系统数据化后可以进行定量分析。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服当前技术在推广使用中存在的缺陷,提供一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用。

[0005] 本发明是通过以下的技术方案实现的:

1、一种用于构建猴SRV1病毒抗体的免疫梳的SOE-PCR引物组,引物SRV1F:如序列表Seq No.1所示,引物SRV1R:如序列表Seq No.2所示。

[0006] 2、一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T- SRV1,序列如序列表Seq No.3所示。

[0007] 3、一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T- SRV1的构建方法,包括如下步骤:

(1)根据猴SRV1病毒的基因序列,设计SOE-PCR扩增引物,引物SRV1F:如序列表Seq No.1所示,引物SRV1R:如序列表Seq No.2所示;

(2)进行SOE-PCR扩增猴SRV1病毒基因;

- (3) 猴SRV1病毒基因的回收；
- (4) 克隆质粒pMD18T- SRV1的构建及测序；
- (5) 表达载体pGEX-4T- SRV1的构建，序列如序列表Seq No.3所示。

[0008] 4、如上所述的一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T-SRV1的构建方法，所述的步骤(2)采用SOE-PCR反应的具体步骤如下：

将混合液在95 °C预变性5 min, 94 °C变性1 min, 63 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环, 72 °C总延伸10 min；

上述混合液如下所示：

SRV1F引物	2 $\mu$ L
SRV1R引物	2 $\mu$ L
2 $\times$ Taq MasterMix	15 $\mu$ L
超纯水	补足至30 $\mu$ L。

5、如上所述的一种用于制备猴SRV1病毒抗体的免疫梳的重组表达载体pGEX-4T-SRV1的构建方法，所述的步骤(5)pGEX-4T-SRV1的构建方法具体步骤如下：利用EcoRI与XhoI分别将pMD18T-SRV1和pGEX-4T-1进行双酶切，并胶回收酶切的目的片段，将回收的目的片段进行连接，将连接产物转化到BL21(DE3)pLysS感受态细胞中，利用氨苄青霉素抗性筛选阳性菌落，并提取质粒进行SmaI和EcoRI双酶切鉴定，将鉴定阳性的质粒命名为pGEX-4T-SRV1。

[0009] 6、一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 以重组表达载体pGEX-4T-SRV1表达猴SRV1病毒蛋白；
- (2) 猴SRV1蛋白的纯化与定量；
- (3) 免疫梳检测试纸的制备：

(3.1) 将步骤(1)中表达的猴SRV1病毒蛋白以0.1 mg/mL的浓度进行线性包被NC膜，将膜晾干；

(3.2) 用0.05g/mL 的BSA封闭液封闭NC膜过夜，弃去封闭液后再次晾干；

(3.3) 将包被好的NC膜裁剪成标准尺寸的试纸条，依次按一定间距整齐固定于PVC板上，十二条为一组或直接裁剪包被好的NC膜制成免疫梳检测试纸，最终于自封袋中低温保存备用。

[0010] 7、如上所述的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸的制备方法制备的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸。

[0011] 8、如上所述的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸，其检测方法如下：

- (1) 将1:25倍稀释的待检血清样品转移至96孔酶标反应板中，标记顺序号；
- (2) 将免疫梳检测齿依次伸入各反应孔内的血清液面之下，37 °C轻轻震荡30-60 min；
- (3) 取出免疫梳用TBS-T缓冲液冲洗三次，每次3-5 min，同时将稀释好的碱性磷酸酶标记1:500兔抗猴二抗溶液顺次加入另一排酶标反应板孔中，每孔 $\geq$ 300  $\mu$ L，将洗过的免疫梳依次伸入各反应孔中，37 °C震荡30-60 min；
- (4) 取出免疫梳按上述方法冲洗3次后置于干净的方盒中加入显色液，静止、闭光显色1-15 min，最后用蒸馏水冲洗免疫梳并观察记录反应结果；

(5)上述操作过程中设立阳性对照与阴性对照各1孔；

(6)阳性对照免疫梳齿上有明显的肉眼可见反应条带，蓝紫或黑色，且阴性对照梳齿上无反应条带，说明检测有效，在此基础上进行下一步待测样品的判定；

(7)待测样品检测的免疫梳齿上与阳性对照梳齿上相同位置处出现可见反应条带的判定为阳性检测结果，若待测样品检测的免疫梳齿上无反应条带出现则判定为阴性检测结果。

[0012] 9、如上所述的一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸在检测猴SRV1病毒抗体中的应用。

[0013] 本发明提供了一种不需要特定仪器设备辅助的检测试纸，解决了目前进出口实验猴SRV1病毒抗体检测缺乏现场操作简便的试剂盒的现状，能够应用于大规模现地检样的检测。该试纸具有快速、简便、经济、不需任何特殊仪器，保留了常规ELISA的敏感、特异的优点，又克服了许多繁琐的操作，节省了操作时间，缩短了实验周期，完全可在野外进行实地诊断检测，达到快速诊断的目的，能够满足口岸机场、码头的快速通关检测，具有良好的运用推广前景。

## 附图说明

[0014] 图1为猴SRV1病毒抗原表位基因的PCR扩增结果图，

其中，M:DNA Marker 2000；1:水对照；2:猴SRV1病毒抗原表位编码基因PCR扩增结果。

[0015] 图2为猴SRV1病毒抗原表位基因重组表达载体的酶切鉴定结果图，

其中，M:DNA Marker DS 5000 Ladder；1:SmaI+EcoRI 双切质粒pGEX-4T-SRV1；2:质粒pGEX-4T-SRV1

图3为猴SRV1病毒表位抗原蛋白的SDS-PAGE分析结果图，

其中，1-3:空载体菌诱导对照；M:蛋白Marker(kDa)位置；4:诱导的pGEX-4T-SRV1

图4为猴SRV1病毒表位抗原蛋白的纯化结果图，

其中，M:蛋白分子量Marker位置；1:切胶纯化后的猴SRV1病毒的重组表达蛋白SRV1-30

图5为重组猴SRV1病毒SRV1-30蛋白最佳包被量确定图，

其中，1-7分别代表SRV1-30包被浓度即，1mg/mL、0.1mg/mL、0.01mg/mL、1μg/mL、100ng/mL、10ng/mL和1ng/mL

图6为 Western-blot分析重组猴SRV1病毒SRV1-30蛋白特异性结果图，

其中，1-5分别代表SRV1-30蛋白与猴SRV1病毒阳性血清、猴B病毒阳性血清、猴SIV病毒阳性血清、猴STLV1病毒阳性血清以及猴MeV病毒阳性血清免疫反应结果。

[0016] 图7为重组猴SRV1病毒SRV1-30蛋白敏感性分析结果图，

其中，1-6分别代表SRV1-30蛋白与1:25/50/100/200/400/800倍稀释的猴SRV1病毒阳性血清反应结果。

[0017] 图8为免疫梳制作流程图。

[0018] 图9制备的猴SRV1病毒抗体免疫梳的特异性检测结果图，

其中，“+”代表1:50猴SRV1病毒阳性血清对照，“-”阴性血清对照，1代表1:50抗猴SRV1病毒阳性血清，2-5分别代表抗猴1:25的BV、SIV、STLV1和MeV病毒阳性血清参照，6为PBS对照，7-10分别代表1:50的抗猴BV、SIV、STLV1和MeV病毒阳性血清参照。

[0019] 图10制备的猴SRV1病毒抗体抗检测免疫梳的敏感性检验结果图，

其中，“+”代表1:50猴SRV1病毒阳性血清对照，“-”阴性血清对照，1-9分别代表1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200以及1:6400倍的抗猴SRV1病毒阳性血清，10代表空白对照。

## 具体实施方式

[0020] 实施例1 SOE-PCR引物的设计与合成

根据猴SRV1病毒的基因序列，利用交叠延伸PCR(SOE-PCR)的原理设计SOE-PCR扩增引物，引物序列如下所示：

SRV1F: 5'- GAATTCAATAATCAAAACCTCATTATAGCAGGCTGTCCGA

AAATAAAAAGGGCAATAA -3'

SRV1R: 5'- CTCGAGGCCCTTTATTTCGGGACAGCCTGCTA

TAATGAGGTTTGATTATTGCCCT-3'

实施例2 猴SRV1病毒SRV1-30基因的克隆和测序

(1) 猴SRV1病毒SRV1-30基因的克隆

以实施例1设计合成的引物进行SOE-PCR，PCR反应体系如下：

将混合液在95 °C预变性5 min, 94 °C变性1 min, 63 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环, 72 °C总延伸10 min。

[0021] 上述混合液如下所示：

SRV1F引物	2 μL
SRV1R引物	2 μL
2×Taq MasterMix	15 μL
超纯水	补足至30 μL

经琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果，如图1所示，表明实验获得了与预期相符的特异DNA片段。

[0022] (2) PCR产物的回收

用DNA回收试剂盒回收交叠式PCR扩增产物。具体操作见试剂盒说明书。

[0023] (3) 克隆载体的构建及基因测序

将回收的PCR产物连接pMD18-T载体，并将其转化到DH5α感受态细胞中，在含氨苄青霉素的LB培养基平皿中培养18 h，挑取单个菌落，37 °C、200 r/min震荡培养至OD<sub>600</sub>为0.5-1时，用质粒小提试剂盒提取质粒DNA，经酶切鉴定的阳性质粒送生工生物工程股份公司测序。将测序正确的阳性质粒命名为pMD18T-SRV1。

[0024] 实施例3 表达载体的构建

利用EcoRI与XhoI分别将pMD18T-SRV1和pGEX-4T-1进行双酶切，并胶回收酶切的目的片段。将回收的目的片段进行连接，连接体系如下所示：

目的片段	5 μL
pGEX-4T-1	2 μL
T4 DNALigase	1 μL
10×Ligase Buffer	1 μL

ddH <sub>2</sub> O	1 μL
--------------------	------

16℃过夜连接。

[0025] 将连接产物转化到BL21(DE3)pLysS感受态细胞中,利用氨苄青霉素抗性筛选阳性菌落,并提取质粒进行Sma I和EcoRI双酶切鉴定。结果如图2所示。将鉴定阳性的质粒命名为pGEX-4T- SRV1。

[0026] 实施例4 目的基因的表达及分析

(1)目的基因的诱导表达

取重组阳性菌株10 μL接种到5 mL含有25 μg的氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 °C、200 r/min摇菌培养至对数期OD<sub>600</sub>为0.5-1.0值时,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG继续同条件下诱导培养5 h。

[0027] (2)目的基因的分析

参照《分子克隆实验指南》(第三版),对表达产物进行SDS-PAGE电泳检测。将诱导后和对照组的菌液分别1 2000 r/min离心1 min收集菌体,用等体积2 倍蛋白电泳上样缓冲液悬浮菌体后,置沸水浴中煮5-10 min,以5 %的浓缩胶和12 %的分离胶进行SDS-PAGE分析表达情况。结果如图3所示。目的基因获得了表达。

[0028] 实施例5目的蛋白的纯化与定量

采用KCl染色切胶纯化方法进行表达产物的纯化。将诱导后的重组菌pGEX-4T-SRV1/BL21(DE3)进行SDS-PAGE电泳,然后用0.25 mol/L的KCl溶液染色胶片5 min,小心切下染成银白色的目的条带并用PBS洗3次,最后将胶条碾碎后置于EP管中,加500 μLPBS振荡混匀,-20 °C反复冻溶3次,12 000 r/min离心2 min,取上清即为纯化的融合表达蛋白。纯化后的蛋白如图4所示。采用BAC方法进行蛋白定量,并分装于-20°C保存备用。

[0029] 实施例6 Western-blot确定最佳抗原包被量

固定阳性血清浓度(1:50),将纯化定量后的目的蛋白调整至1 mg/mL作为起始检测量,进行10<sup>0</sup>-10<sup>6</sup>梯度稀释包被NC膜,然后进行Western-blot分析,筛选最佳抗原包被量。

[0030] 先将纯化蛋白分别进行SDS-PAGE电泳,再并按常规方法进行蛋白转印。将电转后NC膜置于5 % BSA 封闭液(PBS-T)中,37 °C摇动封闭2 h,用TBS-T洗膜3次后,加阳性血清(一抗)37 °C 摆动孵育1 h;取出,用TBS-T洗5次,加入碱性磷酸酶标记兔抗猴IgG二抗溶液(Rabbit Anti-monkey IgG/AP,1:500 稀释),37 °C 摆动孵育1 h,用TBS-T洗5次。将NC膜浸入碱性磷酸酶显色底物液(BICP/NBT,Schleicher and Schueler公司)中,静止,闭光显色1min后每隔30s观察一次,至条带明显或本底出现时终止显色,用去离子水漂洗后置吸水纸上晾干观察、拍照记录结果。如图5所示,最大检测极限为10<sup>3</sup>稀释倍数的量浓度。从肉眼可见度判定,以10<sup>1</sup>稀释倍数的量浓度(0.1 mg/mL)确定为最佳包被量。

[0031] 实施例7 表达蛋白的Western-blot特异性检测

以上述抗原最佳包被量0.1 mg/mL为标准,进行表达蛋白的特异性检验。选择将五种猴病毒(猴B病毒、猴SIV、猴SRV1、猴STLV1、猴MeV)阳性血清分别交叉用作待检一抗进行Western-blot特异性检测。如图6所示,SRV1病毒SRV1-30能够特异地识别猴SRV1病毒阳性血清而不与其它参考的猴病毒阳性血清发生交叉反应,由此说明重组猴SRV1病毒SRV1-30抗原特异性良好。

[0032] 实施例8 重组SRV1病毒SRV1-30蛋白敏感性分析

将猴SRV1病毒阳性血清进行2倍倍比稀释(1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800)，以纯化回收的重组猴SRV1病毒SRV1-30蛋白以0.1 mg/mL量浓度的最佳包被量进行Western-blot敏感性分析。如图7所示，重组猴SRV1病毒SRV1-30能够敏感地检测到1:200倍稀释的猴SRV1病毒阳性血清，由此说明重组SRV1病毒SRV1-30蛋白敏感性良好，达到了预期要求。

#### [0033] 实施例9免疫梳检测试纸的制备

根据上述试验方法确定的抗原最佳包被浓度参数，将猴SRV1病毒抗原进行线性包被NC膜，将膜晾干。用5% BSA封闭液封闭NC膜过夜，弃去封闭液后再次晾干。将包被好的NC膜裁剪成 $10.5 \times 4$  mm标准尺寸的试纸条，依次按4.5 mm间距整齐固定于 $150 \times 1$  mm的PVC板上，十二条为一组或直接裁剪包被好的NC膜制成免疫梳，最终于自封袋中4℃保存备用。具体制备的流程如图8所示。

#### [0034] 实施例10 免疫梳的使用方法与判定方法

将1:25倍稀释的待检血清样品转移至96孔酶标反应板中，标记顺序号。将免疫梳检测齿依次伸入各反应孔内的血清液面之下，以37℃条件下轻轻震荡作用30-60 min。取出免疫梳用TBS-T缓冲液冲洗免疫梳三次、每次3-5 min；同时将稀释好的碱性磷酸酶标记兔抗猴二抗(1:500)溶液顺次加入另一排酶标反应板孔中( $\geq 300 \mu\text{L}/\text{孔}$ )，将洗过的免疫梳依次伸入各反应孔中、37℃条件下轻轻震荡作用30-60 min；取出免疫梳按上述方法(7)冲洗3次后置于干净的方盒中加入显色液，静止、闭光显色1-15 min，最后用蒸馏水冲洗免疫梳并观察记录反应结果。上述操作过程中设立阳性对照与阴性对照各1孔。判定方法如下：(1)阳性对照免疫梳齿上有明显的肉眼可见反应条带(蓝紫或黑色)且阴性对照梳齿上无反应条带，说明检测有效，在此基础上进行下一步待测样品的判定；(2)待测样品检测的免疫梳齿上与阳性对照梳齿上相同位置处出现可见反应条带的判定为阳性检测结果，若待测样品检测的免疫梳齿上无反应条带出现则判定为阴性检测结果。

#### [0035] 实施例11猴SRV1病毒血清抗体免疫梳检测的特异性与敏感性分析

先将10倍样品稀释液用去离子水稀释至1倍工作浓度，然后放于EP管中，依次分别以1:50稀释阳性、阴性以及待检血清至EP管中各0.5 mL作为一抗，室温放置备用。将阳性对照和阴性对照血清进行1:50倍稀释各0.5 mL，再将猴SRV1病毒阳性血清1:25-1:6400倍稀释用于敏感性检验；将其它猴病毒(BV、SIV、STLV1和MeV)阳性血清稀释1:25和1:50倍用作特异性检验；然后将各稀释血清样品依次转移至96孔酶标反应板中( $\geq 300 \mu\text{L}/\text{孔}$ )，标记顺序号。取免疫梳依次插入各反应孔内的血清液面之下，以37℃条件下轻轻震荡作用30-60 min。取出免疫梳用TBS-T缓冲液冲洗免疫梳三次、每次3-5 min，然后放置于吸水纸上吸干。用样品稀释液将碱性磷酸酶标记兔抗猴二抗(1:500)稀释，并顺次加入另一排酶标反应板孔中( $\geq 300 \mu\text{L}/\text{孔}$ )，将免疫梳依次伸入各反应孔中、37℃条件下轻轻震荡作用30-60 min。取出免疫梳按上述方法冲洗5次，然后放置于吸水纸上吸干。将BCIP/NBT显色片剂一片溶于30 mL去离子水中溶解后。取10 mL显色液加入一干净方盒中，然后将免疫梳浸于显色液中，静止、闭光显色1-15 min，最后用蒸馏水冲洗终止显色，并观察记录免疫梳上反应结果。

[0036] 特异性检验结果如图9所示，猴SRV1病毒抗体免疫梳均能够特异性检测到猴SRV1病毒的阳性血清而不与其它病毒阳性血清间发生交叉反应，由此说明设计制备的猴SRV1病毒免疫梳特异性良好。

[0037] 敏感性检验结果如图10所示,猴SRV1病毒抗体免疫梳的最大血清阳性检测稀释度为1:400,说明设计制备的猴SRV1病毒免疫梳敏感性良好达到了预期。

[0038] 实施例12 免疫梳的重复性与稳定性检测

(1) 免疫梳的重复性检测

在同一批试验中每份样品平行作3次(批内),在3个不同试验日重复测定6份样品(批间)。分别统计分析批内和批间重复试验变异系数情况。结果显示,批内重复试验变异系数(CV)小于7 %,批间重复试验CV 小于10 %。说明免疫的重复性良好。

[0039] (2) 免疫梳的稳定性检测

将同一批次3条4 ℃保存,分别在1、3和6个月的间隔与新制备的免疫梳同时对猴SRV1病毒的阴、阳性血清进行检测,统计分析免疫梳的特异性与敏感性没有明显变化,并再次对同一份样品平行作3次进行比较分析其稳定性。结果显示,免疫梳的特异性与敏感性没有明显变化,对同一份样品平行作3次进行比较,CV 均小于10 %。说明免疫梳的稳定性良好。

[0040] 实施例13 免疫梳实践应用比较检测评价

根据上述免疫梳的使用描述方法和判定标准,将混有已知猴SRV1病毒病的阳性血清与阴性血清分装标记后,利用制备的免疫梳检测方法与参考的ELISA方法分别进行检测比较,以此验证其可靠性。在对40份可疑猴血清样品比较检测结果进行Kappa一致性统计分析发现,新建立的免疫梳(IC-猴SRV1-Ab)方法与参考的ELISA检测结果一致率为100.0%,Kappa=1.000,这说明建立的免疫梳(IC-猴SRV1-Ab)方法与参考方法一致性很好,显示出良好的实用性和可靠性。

<110>海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心  
 <120>猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用  
 <160> 3  
 <210> 1  
 <211>59  
 <212> DNA  
 <213> SRV1F  
 <400> 1  
 GAATTCAATA ATCAAAACCT CATTATAGCA GGCTGTCCCG AAAATAAAAA GGGCAATAA  
 <210> 2  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> SRV1R  
 <400> 2  
 CTCGAGGCC CTTTTATTT CGGGACAGCC TGCTATAATG AGGTTTGAT TATTGCCCT  
 <210> 3  
 <211> 5056  
 <212> DNA  
 <213> pGEX-4T- SRV1  
 <400> 3  
 ACGTTATCGA CTGCACGGTG CACCAATGCT TCTGGCGTCA GGCAGCCATC GGAAGCTGTG 60  
 GTATGGCTGT GCAGGTCGTA AATCACTGCA TAATTCGTGT CGCTCAAGGC GCACTCCCGT 120  
 TCTGGATAAT GTTTTTGCG CCGACATCAT AACGGTTCTG GCAAATATTG TGAAATGAGC 180  
 TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT ACAATTCA 240  
 CACAGGAAAC AGTATTCTAG TCCCCTATAC TAGGTTATTG GAAAATTAAG GGCCTTGTGC 300  
 AACCCACTCG ACTTCTTTG GAATATCTT AAGAAAAATA TGAAGAGCAT TTGTATGAGC 360  
 GCGATGAAGG TGATAATGG CGAAACAAAA AGTTGAATT GGGTTGGAG TTTCCAATC 420  
 TTCCTTATTA TATTGATGGT GATGTTAAAT TAACACAGTC TATGGCCATC ATACGTTATA 480  
 TAGCTGACAA GCACAACATG TTGGGTGGTT GTCCAAAAGA GCGTGCAGAG ATTTCAATGC 540  
 TTGAAGGAGC GGTTTGGAT ATTAGATACG GTGTTTCGAG AATTGCATAT AGTAAAGACT 600  
 TTGAAACTCT CAAAGTTGAT TTTCTTAGCA AGCTACCTGA AATGCTGAAA ATGTTCGAAG 660  
 ATCGTTATG TCATAAAACA TATTAAATG GTGATCATGT AACCCATCCT GACTTCATGT 720  
 TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT GTGCCCTGGAT GCGTTCCCAA 780  
 AATTAGTTG TTTAAAAAAA CGTATTGAAG CTATCCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT 840  
 CCAGCAAGTA TATAGCATGG CCTTGCAGG GCTGGCAAGC CACGTTGGT GGTGGCGACC 900  
 ATCCTCCAAA ATCGGATCTG GTTCCCGGTG GATCCCCGGA ATTCAATAAT CAAACCTCA 960  
 TTATAGCAGG CTGTCCCGAA AATAAAAAGG GCAATAATCA AAACCTCATT ATAGCAGGCT 1020  
 GTCCCGAAAA TAAAAAGGGC CTCGAGCGGC CGCATCGTGA CTGACTGACG ATCTGCCTCG 1080

CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTACAG 1140  
 CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCAGGTGTTG 1200  
 GCGGGTGTGCG GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATAATTCTT 1260  
 GAAGACGAAA GGGCCTCGTG ATACGCCTAT TTTTATAGGT TAATGTCATG ATAATAATGG 1320  
 TTTCTTAGAC GTCAGGTGGC ACTTTCGGG GAAATGTGCG CGGAACCCCT ATTTGTTTAT 1380  
 TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC 1440  
 AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTGCC CTTATTCCCT 1500  
 TTTTGCGGC ATTTGCCTT CCTGTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG AAAGTAAAAG 1560  
 ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACCGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC AACAGCGGTA 1620  
 AGATCCTTGA GAGTTTCCGC CCCGAAGAAC GTTTCCAAT GATGAGCACT TTTAAAGTTC 1680  
 TGCTATGTGG CGCGGTATTA TCCCGTGTG ACGCCGGCA AGAGCAACTC GGTCGCCGCA 1740  
 TACACTATTG TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCAGT CACAGAAAAG CATCTTACGG 1800  
 ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT AACACTGCGG 1860  
 CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGTTTT TTGCACAACA 1920  
 TGGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAACCGGA GCTGAATGAA GCCATACCAA 1980  
 ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCCTGCAG CAATGGCAAC AACGTTGCGC AACTATTAA 2040  
 CTGGCGAACT ACTTACTCTA GCTTCCCGGC AACAAATTAAAT AGACTGGATG GAGGCGGATA 2100  
 AAGTTGCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCC CTTCCGGCTGG CTGGTTTATT GCTGATAAAAT 2160  
 CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA GATGGTAAGC 2220  
 CCTCCCGTAT CGTAGTTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT GAACGAAATA 2280  
 GACAGATCGC TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTG GTAAGTGTCA GACCAAGTTT 2340  
 ACTCATATAT ACTTTAGATT GATTAAAAC TTCATTTTA ATTAAAAGG ATCTAGGTGA 2400  
 AGATCCTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG 2460  
 CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTT CTGCGCGTAA 2520  
 TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTTGTTTG CCGGATCAAG 2580  
 AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAACTG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG 2640  
 TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT 2700  
 ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA 2760  
 CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGG 2820  
 GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC 2880  
 GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG TATCCGGTAA 2940  
 GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC 3000  
 TTTATAGTCC TGTCGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTGGT TGATGCTCGT 3060  
 CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTACGG TTCCCTGGCCT 3120  
 TTTGCTGGCC TTTGCTCAC ATGTTCTTC CTGCGTTATC CCCTGATTCT GTGGATAACC 3180  
 GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTCGCCCGAG CGAACGACCC GAGCGCAGCG 3240  
 AGTCAGTGAG CGAGGAAGCG GAAGAGCGCC TGATGCGGTA TTTTCTCCTT ACGCATCTGT 3300  
 GCGGTATTTC ACACCGCATA AATTCCGACA CCATCGAATG GTGAAAACC TTTCGCGGTA 3360  
 TGGCATGATA GCGCCCGGAA GAGAGTCAAT TCAGGGTGGT GAATGTGAAA CCAGTAACGT 3420

TATACGATGT CGCAGAGTAT GCCGGTGTCT CTTATCAGAC CGTTCCCGC GTGGTGAACC	3480
AGGCCAGCCA CGTTTCTGCG AAAACGCGG AAAAAGTGA AGCGCGATG GCGGAGCTGA	3540
ATTACATTCC CAACCGCGTG GCACAACAAC TGGCGGGCAA ACAGTCGTTG CTGATTGGCG	3600
TTGCCACCTC CAGTCTGGCC CTGCACGCGC CGTCGAAAT TGTCGCGCG ATTAAATCTC	3660
GCGCCGATCA ACTGGGTGCC AGCGTGGTGG TGTCGATGGT AGAACGAAGC GGCGTCAAG	3720
CCTGTAAAGC GGCGGTGCAC AATCTCTCG CGAACGCGT CAGTGGCTG ATCATTAACT	3780
ATCCGCTGGA TGACCAGGAT GCCATTGCTG TGGAAAGCTGC CTGCACTAAT GTTCCGGCGT	3840
TATTCTTGA TGTCTCTGAC CAGACACCCA TCAACAGTAT TATTTCCTCC CATGAAGACG	3900
GTACCGACT GGGCGTGGAG CATCTGGTCG CATTGGTCA CCAGCAAATC GCGCTGTTAG	3960
CGGGCCCATT AAGTTCTGTC TCGGCGCGTC TGCGTCTGGC TGGCTGGCAT AAATATCTCA	4020
CTCGCAATCA AATTCAAGCCG ATAGCGAAC GGGAAAGCGA CTGGAGTGCC ATGTCCGGTT	4080
TTCAACAAAC CATGCAAATG CTGAATGAGG GCATCGTTCC CACTCGATG CTGGTTGCCA	4140
ACGATCAGAT GGCGCTGGGC GCAATGCGCG CCATTACCGA GTCCGGGCTG CGCGTTGGTG	4200
CGGATATCTC GGTAGTGGGA TACGACGATA CCGAAGACAG CTCATGTTAT ATCCC GCCGT	4260
TAACCACCAT CAAACAGGAT TTTCCGCTGC TGGGGCAAAC CAGCGTGGAC CGCTTGCTGC	4320
AACTCTCTCA GGGCCAGGGC GTGAAGGGCA ATCAGCTGTT GCCCGTCTCA CTGGTAAAAA	4380
GAAAAACAC CCTGGCGCCC AATACGCAA CCGCCTCTCC CGCGCGTTG GCGGATTTCAT	4440
TAATGCAGCT GGCACGACAG GTTTCCCGAC TGGAAAGCGG GCAGTGAGCG CAACGCAATT	4500
AATGTGAGTT AGCTCACTCA TTAGGCACCC CAGGCTTAC ACTTTATGCT TCCGGCTCGT	4560
ATGTTGTGTG GAATTGTGAG CGGATAACAA TTTCACACAG GAAACAGCTA TGACCATGAT	4620
TACGGATTCA CTGGCCGTCG TTTTACAACG TCGTGAATGG GAAAACCCTG GCGTTACCCA	4680
ACTTAATCGC CTTGCAGCAC ATCCCCCTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCG	4740
CACCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCT TTGCCTGGTT	4800
TCCGGCACCA GAAGCGGTGC CGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTCCTG AGGCCGATAC	4860
TGTCGTCGTC CCCTCAAACG GGCAGATGCA CGGTTACGAT GCGCCCATCT ACACCAACGT	4920
AACCTATCCC ATTACGGTCA ATCCGCCGTT TGTTCACCG GAGAACCGA CGGGTTGTTA	4980
CTCGCTCACA TTTAATGTTG ATGAAAGCTG GCTACAGGAA GGCCAGACGC GAATTATTTT	5040
TGATGGCGTT GGAATT	5056

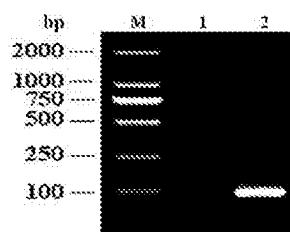


图1

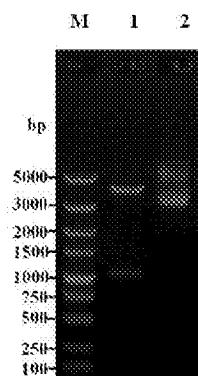


图2

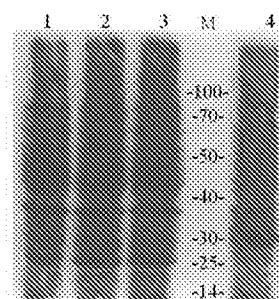


图3



图4

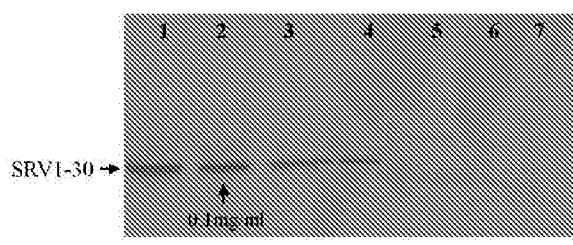


图5

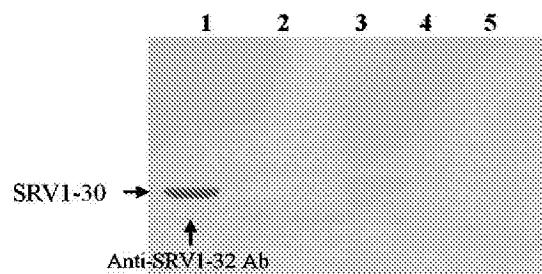


图6

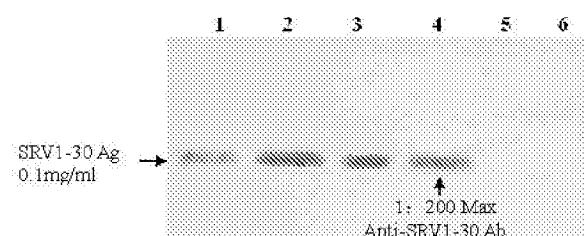


图7

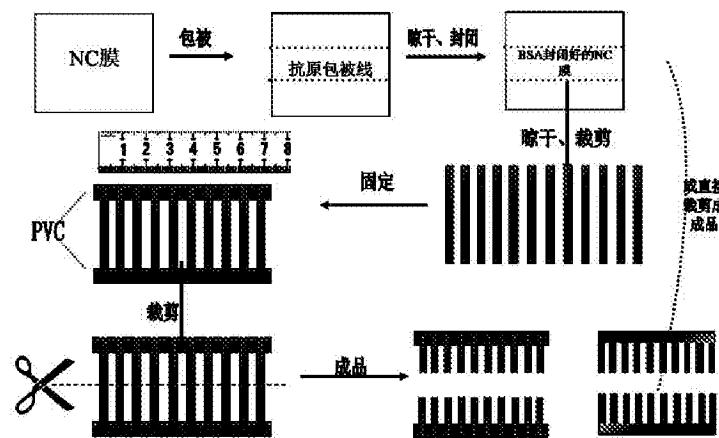


图8

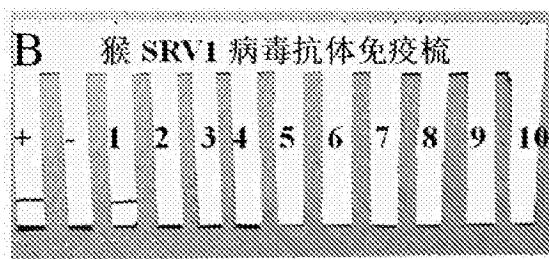


图9

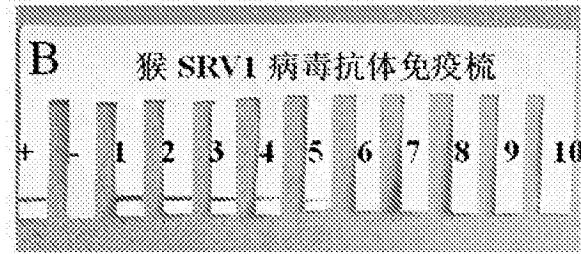


图10

专利名称(译)	猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105647914A</a>	公开(公告)日	2016-06-08
申请号	CN201610089044.5	申请日	2016-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	李丹丹 高慎阳 徐义刚 邱索平		
发明人	李丹丹 高慎阳 徐义刚 邱索平		
IPC分类号	C12N15/11 C12N15/70 C12N15/66 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	C12N15/11 C12N15/66 C12N15/70 C12N2800/101 G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/68 G01N2333/15 G01N2469/20		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIP0</a>		

### 摘要(译)

本发明提供一种猴SRV1病毒抗体的免疫梳检测试纸及制备方法和应用。用于制建免疫梳的重组质粒pGEX-4T-SRV1，如序列表Seq ? No.3所示。用于构建重组质粒的引物对，上引物SRV1F：如序列表Seq ? No.1所示；下引物SRV1R：如序列表Seq ? No.2所示。构建方法，包括如下步骤：根据猴SRV1病毒的核苷酸序列设计SOE-PCR引物对；进行SOE-PCR扩增猴SRV1基因；构建重组质粒pGEX-4T-SRV1。最后利用酶联免疫原理和膜层析技术制成快速检测实验猴血液或血清中的抗体的免疫梳。免疫梳具有良好的稳定性、特异性、敏感性及重复性。

