



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568177 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910878439.7

(22)申请日 2019.09.18

(71)申请人 中国检验检疫科学研究院  
地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术  
开发区荣华南路11号

(72)发明人 杨宇 聂聪 侯宝翠 王静

(74)专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限  
公司 11429

代理人 杨永莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

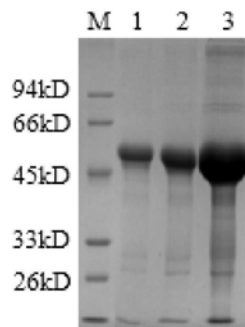
权利要求书1页 说明书7页  
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试  
剂中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种寨卡病毒E抗原及其在荧光  
免疫层析试剂中的应用,所述寨卡病毒E抗原的  
氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。应用为采用寨  
卡病毒E抗原制备检测寨卡病毒抗体的荧光免疫  
层析试剂,其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、  
吸收垫依次搭接并贴在底衬卡,所述标记物垫为  
包被有荧光微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻  
璃纤维,所述包被垫为包被有羊抗鼠IgG的抗体  
作为质控线和包被有寨卡病毒E蛋白的检测线的  
硝酸纤维素膜。本发明提供的检测寨卡病毒IgG  
抗体的荧光免疫层析试剂,其特异性强,检测灵  
敏度高,检测结果判定简单、方便。



1. 一种寨卡病毒E抗原,其特征在於,所述寨卡病毒E抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 如权利要求1所述的寨卡病毒E抗原,其特征在於,所述寨卡病毒E抗原的表达采用的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 如权利要求1所述的寨卡病毒E抗原在制备荧光免疫层析试剂中的应用,其特征在於,所述应用为采用寨卡病毒E抗原制备检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂,其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡,所述标记物垫为包被有荧光微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻璃纤维,所述包被垫为包被有羊抗鼠IgG的抗体作为质控线和包被有寨卡病毒E蛋白的检测线的硝酸纤维素膜。

4. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂由如下方法制备:

S1、将荧光微球活化后加入鼠抗人IgG单克隆抗体进行标记,获得荧光微球标记抗体;

S2、将荧光微球标记抗体以稀释液稀释,包被在玻璃纤维上,干燥,获得标记物垫;

S3、硝酸纤维素膜上设有质控线和检测线,质控线上包被有羊抗鼠IgG的抗体,检测线上包被有所述寨卡病毒E蛋白,获得包被垫;

S4、将样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡组成,按包被垫靠近质控线的一端覆盖上吸收垫,靠近检测线的另一端覆盖标记物垫进行贴条。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,在步骤S1中,所述荧光微球活化的过程为:将荧光微球用0.15~0.3mol/LPBS洗涤后,重悬;加入N-羟基琥珀酰亚胺溶液和N-羟基琥珀酰亚胺溶液,震荡混匀,避光反应30分钟。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在於,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液的浓度为10mg/mL,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液为6mg/mL,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液:所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液:荧光微球溶液的体积比为1:1:3。

7. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,在步骤S1中,所述荧光微球活化后离心、弃上清后,加入标记缓冲液复溶,同时加入0.3mg/mL鼠抗人IgG单克隆抗体反应后,离心、弃上清后,标记稀释液复溶;获得荧光微球标记抗体。

8. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,所述标记缓冲液的配方为:碳酸钠4.33g、碳酸氢钠2.96g,1000mL水;所述标记稀释液的配方为:柠檬酸三钠7.33g、柠檬酸4.44g、氢氧化钠1g,1000mL水。

9. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,在步骤S2中,荧光微球标记抗体在玻璃纤维上的包被浓度为 $0.65\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

10. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,在步骤S3中,所述羊抗鼠IgG的抗体的浓度为1.8~2.2mg/mL,所述寨卡病毒E蛋白的浓度为1.2~1.8mg/mL。

## 一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试剂中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试剂中的应用,属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域。

### 背景技术

[0002] 寨卡病毒病(Zika Virus Disease)是由寨卡病毒(Zika)引起的一种自限性急性传染病,临床特征主要为发热、皮疹、关节痛或结膜炎,极少引起死亡。主要通过埃及伊蚊叮咬传播,有可能通过性传播,人群普遍易感,预后良好,重症与死亡病例少见。但该病对孕妇威胁极大,导致胎儿流产、新生儿小头畸形甚至死亡。寨卡病毒感染不仅能引起发热等症状和新生儿小头症,还会引起格林-巴利综合征(GBS),GBS是一种自身免疫性周围神经病,会引发腿部、手臂与上半身逐渐麻木无力,严重时可导致瘫痪甚至死亡。寨卡病毒病主要在全球热带及亚热带地区流行。

[0003] 根据监测,国内有与传播寨卡病毒有关的伊蚊种类主要为埃及伊蚊和白纹伊蚊,其中埃及伊蚊主要分布于海南省、广东省雷州半岛以及云南省的西双版纳州、德宏州、临沧市等地区;白纹伊蚊则广泛分布于河北、山西、陕西以南广大区域。可见存在寨卡病毒传播的可能,如何能有效检测出寨卡病毒,预防寨卡病毒的传播,可通过对血清中寨卡病毒的抗体进行检测,判断是否感染寨卡病毒。但寨卡病毒与黄病毒属其他病毒具有较强的血清学交叉反应,所以对于抗原的选择尤其重要,目前现有的抗原存在有特异性不强,用于免疫学检测时,有假阳性检测结果的弊端。现有的寨卡病毒E抗原蛋白的制备表达量极少,产量低。亟需开发能产生表达量大的抗原制备方法及能特异性强的抗原。

### 发明内容

[0004] (一)要解决的技术问题

[0005] 为了解决现有技术的上述问题,本发明提供一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试剂中的应用,该寨卡病毒E抗原的表达量较大,且用于制备的荧光免疫层析试剂具有较强的特异性,能有效避免假阳性。

[0006] (二)技术方案

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用的主要技术方案包括:

[0008] 一种寨卡病毒E抗原,所述寨卡病毒E抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0009] 如上所述的寨卡病毒E抗原,优选地,所述寨卡病毒E抗原的表达采用的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 一种寨卡病毒E抗原在制备荧光免疫层析试剂中的应用,所述应用为采用寨卡病毒E抗原制备检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂,其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡,所述标记物垫为包被有荧光微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻璃纤维,所述包被垫为包被有羊抗鼠IgG的抗体作为质控线和包被有寨卡病毒E蛋白的检测线的硝酸纤维素膜。

- [0011] 如上所述的应用,所述检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂由如下方法制备:
- [0012] S1、将荧光微球活化后加入鼠抗人IgG单克隆抗体进行标记,获得荧光微球标记抗体;
- [0013] S2、将荧光微球标记抗体以稀释液稀释,包被在玻璃纤维上,干燥,获得标记物垫;
- [0014] S3、硝酸纤维素膜上设有质控线和检测线,质控线上包被有羊抗鼠IgG的抗体,检测线上包被有寨卡病毒E蛋白,获得包被垫,其中寨卡病毒E蛋白的基因序列如SEQ ID NO.1所示;
- [0015] S4、将样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡组成,按包被垫靠近质控线的一端覆盖上吸收垫,靠近检测线的另一端覆盖标记物垫进行贴条。
- [0016] 如上所述的应用,优选地,在步骤S1中,所述荧光微球活化的过程为:将荧光微球用0.15~0.3mol/LPBS洗涤后,重悬;加入N-羟基琥珀酰亚胺溶液和N-羟基琥珀酰亚胺溶液,震荡混匀,避光反应30分钟。
- [0017] 如上所述的应用,优选地,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液的浓度为10mg/mL,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液为6mg/mL,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液:所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液:荧光微球溶液的体积比为:1:1:3。
- [0018] 如上所述的应用,优选地,在步骤S1中,所述荧光微球活化后离心、弃上清后,加入标记缓冲液复溶,同时加入0.3mg/mL鼠抗人IgG单克隆抗体反应后,离心、弃上清后,标记稀释液复溶;获得荧光微球标记抗体。
- [0019] 进一步地,所述标记缓冲液的配方为:碳酸钠4.33g、碳酸氢钠2.96g,1000mL水;所述标记稀释液的配方为:柠檬酸三钠7.33g、柠檬酸4.44g、氢氧化钠1g,1000mL水。
- [0020] 如上所述的应用,优选地,在步骤S2中,荧光微球标记抗体在玻璃纤维上的包被浓度为0.65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。
- [0021] 如上所述的应用,优选地,在步骤S3中,所述羊抗鼠IgG的抗体的浓度为1.8~2.2mg/mL,所述寨卡病毒E蛋白的浓度为1.2~1.8mg/mL。
- [0022] (三)有益效果
- [0023] 本发明的有益效果是:
- [0024] 本发明提供的一种寨卡病毒E抗原,其对应的核酸用于制备蛋白的表达量大大提高,特异性强。用寨卡病毒E抗原制备的检测寨卡病毒Ig G抗体的荧光免疫层析试剂,采用荧光标记抗体,配套荧光检测仪,荧光免疫检测仪YG10,实现对检测结果的智能化运算,可减少人工检测的误判,提高检测灵敏度。而且,荧光免疫层析法操作简单、耗时短,只需加样即可智能读取检测结果。
- [0025] 本发明提供的检测寨卡病毒Ig G抗体的荧光免疫层析试剂,可用于对血清、血浆或全血的检测,检测特异性强,检测灵敏度高,结果判定简单、方便,避免了检测样品单一的限制性,比其他现有技术针对的检测样品有较宽的检测范围。

## 附图说明

- [0026] 图1为诱导表达的蛋白电泳图;
- [0027] 图2为纯化后的蛋白电泳图;
- [0028] 图3为检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂的结构示意图;

- [0029] 图4为阳性人血清检测结果；  
[0030] 图5为本发明制备的荧光免疫层析试剂与胶体金检测试纸的对比结果；  
[0031] 图6为重复性检测结果。

## 具体实施方式

[0032] 为了更好的解释本发明，以便于理解，下面结合附图，通过具体实施方式，对本发明作详细描述。

[0033] 实施例1寨卡病毒E抗原的制备

[0034] 1、重组质粒的构建

[0035] 选择寨卡病毒E蛋白，其核苷酸序列(GenBank序列号:HM133639.1)，依据大肠杆菌 *Escherichia coli* 0127:H6偏爱密码子对基因序列进行改造，并通过生物信息学对重组蛋白二级结构筛选，经试验将GenBank序列号:HM133639.1所所示的核苷酸序列进行连接入表达载体PGEX-4T-2，获得连接产物即重组质粒，转化于DH5 $\alpha$ 感受态细胞，并不能获得相应蛋白。

[0036] 经过大量实验验证后，挑选了20个克隆表达，最后选择表达量最大的单克隆确定的基因序列如SEQ ID NO.1所示，对应的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示，将其基因序列委托上海英俊公司合成，连接入表达载体PGEX-4T-2，获得连接产物即重组质粒，转化于DH5 $\alpha$ 感受态细胞；用PCR扩增引物:pGEX5' (SEQ ID NO.3):ATTCGTTGTATTGGCGTCAGCAA和pGEX3' (SEQ ID NO.4):ACCGCTACGATGCCAGTGATGGGTA进行扩增，扩增产物用ECORI、NOTI双酶切鉴定重组质粒，筛选阳性克隆送上海英俊公司测序。

[0037] 2、重组蛋白的表达及鉴定

[0038] 将测序正确的重组质粒PGEX-4T-2-TBE转化大肠杆菌BL21，将鉴定正确的单菌落接种到含氨苄青霉素的LB液体培养基中，37℃震荡培养过夜，次日按1:100接种于新的含氨苄青霉素的LB液体培养基中震荡培养至OD600达0.5~0.8后，冷却菌液温度至22℃，加入终浓度为0.8mM的IPTG，在22℃进行诱导表达；并分别于1、2、3、4、5、6小时时吸取1mL菌液，超声裂解，收集菌液，100℃煮沸10min，4℃、12000r/min离心3min，冰上放置，吸取上清进行12%的SDS-PAGE电泳检测；电泳结束后，胶用考马斯亮兰染色80min，再脱色2h后观察蛋白诱导表达情况。结果表明从诱导后1h起就有分子量约为55KD的目的蛋白表达，6h时产量最高。结果如图1，图中从左至右四条条带的上样样品依次为：分子量标准M、全菌液、诱导表达上清液、诱导菌沉淀。

[0039] 3、重组蛋白的提取纯化

[0040] 吸取2ml诱导表达6小时的菌液做SDS-PAGE，初步确定蛋白是否表达，及其表达量，4℃，12000r/min离心30分钟，收集细胞沉淀，用0.01M pH7.4的PBS洗涤三次，加入pH8.0裂解液(Tris-NaCl)悬浮，超声，离心后分别取10 $\mu$ L上清和沉淀做SDS-PAGE，电泳后用考马斯亮蓝R-250进行凝胶染色，脱色液进行脱色后检查特异性目的蛋白条带。结果表明重组蛋白以包涵体的形式表达，收集超声离心后的细胞沉淀(主要含有一些细胞碎片和包涵体)，加入pH8.0浓度为8M的尿素悬浮，置于冰上摇2小时溶解包涵体，12000r/min，离心30分钟，上清液经0.22 $\mu$ m的滤膜过滤后用His Trap TMHP(组氨酸)亲和和吸附柱纯化系统进行纯化，SDS-PAGE鉴定纯度，最后将纯化的蛋白透析到0.01mol/L，pH7.4的PBS中，PEG-20000浓缩，

得到分子量约55KD的纯化重组蛋白;结果如图2所示,其中条带M:Marker,1:10倍稀释后的纯化后的蛋白;2:5倍稀释后的纯化后的蛋白;3:纯化后的蛋白。

[0041] 实施例2检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂制备

[0042] 1、荧光微球标记抗体蛋白

[0043] (1) 微球活化:1.取200 $\mu$ L荧光微球(bangs羧基微球),加入1mL0.2mol/L PBS,通过12000rpm离心10分钟。吸弃上清,重复离心两次后加入600 $\mu$ L 0.2mol/LPBS重悬待用,取200 $\mu$ L10mg/mL的EDC (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液和200 $\mu$ L 6mg/mL的NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液。加入重悬的荧光微球,震荡混匀,放在旋转反应架上避光反应30分钟。

[0044] (2) 活化荧光微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的制备:上述制备方法得到的活化后的荧光微球在12000g离心5min,弃上清液后用0.5mL标记缓冲液复溶,并且同时加入0.3mg/ml鼠抗人IgG单克隆抗体0.2mL搅拌反应30min,然后12000g离心5min,弃上清液,最后用0.5mL标记稀释液复溶,获得荧光微球标记抗体;其中,所述标记缓冲液的配制为将碳酸钠4.33g、碳酸氢钠2.96g,溶于1000mL水中;标记稀释液的配制为将柠檬酸三钠7.33g、柠檬酸4.44g、氢氧化钠1g,溶于1000mL水中。

[0045] 2、标记物垫制备

[0046] 将步骤1获得的荧光微球标记抗体,以含1%BSA的PBS缓冲液的荧光微球标记抗体稀释液稀释后,按照荧光微球标记抗体0.7 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>喷涂于玻璃纤维之上,37 $^{\circ}$ C干燥烘干;密封保存。

[0047] 3、包被垫制备

[0048] 硝酸纤维素膜上设有质控线和检测线,质控线上包被有羊抗鼠IgG的抗体2.0mg/mL,检测线上包被有寨卡病毒E蛋白1.5mg/mL,37 $^{\circ}$ C烘干3小时,干燥保存。

[0049] 4、组装

[0050] 将干燥好的标记物垫和剪裁好的吸收垫,吸收垫可采用吸水纸,将玻璃纤维素膜制成的样品垫;将样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡组成,按包被垫(即硝酸纤维素膜)靠近质控线的一端覆盖上吸收垫,靠近检测线的另一端覆盖标记物垫的要求进行贴条,如图3所示。按切条机标准操作规程进行操作,切成4mm $\pm$ 0.1mm宽的检测卡。

[0051] 5、检测

[0052] 往样品垫上加入标准品或待测血样,标准品或待测血样会流到标记物垫上,抗原就会与标记物混合反应并沿着硝酸纤维素膜层析,分别与测试线和质控线反应。通过荧光免疫检测仪YG10分别扫描读取T、C信号值;当测试结果有效时,质控线显示一定光强度。

[0053] 判断结果用肉眼在紫外线下看有两条条带的为阳性,只在质控线有显示条带为阴性或采用荧光免疫检测仪YG10进行检测,需要检测50份正常人血清,荧光层析试剂分析仪检测收集1000份正常人血清T/C值,计算标准差(Standard Deviation)和平均值(AVERAGE),平均值与3倍SD的和作为阳性判断值,即:T/C $\geq$ AVERAGE+3SD为阳性,通过对50份正常人血清的检测,获得判断值为0.05。

[0054] 6、验证

[0055] 为了保证检测结果的准确性、有效,一般先将制备好的荧光免疫层析试剂进行验证:将寨卡IgG阳性标本取80 $\mu$ L滴加在样品垫上,质控带和检测带8分钟后判断结果,用紫外线照射时,质控带和检测带均出现荧光条带,可如图4中所示;将样品稀释液(PBS)80 $\mu$ L滴加

在样品垫上,8分钟后判断结果,用紫外线照射时,仅质控带出现荧光;说明荧光免疫层析试剂合格,可进行寨卡病毒抗体的检测。

[0056] 在进行抗体的检测时,取80 $\mu$ L血清样品滴加在样品垫上,若仅质控带出现荧光,结果为阴性,说明待检血清样品中不含有寨卡病毒抗体;若质控带和检测带均出现荧光,结果为阳性,说明待血清检样品中含有寨卡抗体;若两条带都没有荧光或者只有检测带有荧光,则说明此试纸条已经失效,结果无效。

[0057] 实施例3荧光免疫层析试剂灵敏度的检测

[0058] 采用实施例2制备的试剂分别检测寨卡IgG阳性标本(由长春海关检验检疫中心提供),用稀释液PBS稀释为1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000,同时将阴性血清作为阴性对照,取80 $\mu$ L血清样品加样品垫,8min判断结果。检测结果检测灵敏度为1:100000稀释度的阳性标本。

[0059] 采用本实施例1制备的E抗原,用于制备胶体金免疫层析试纸,采用常规方法制备,采用SPA标记胶体金颗粒,硝酸纤维素膜上的检测带包被有NS1抗原蛋白,质控带包被羊抗鼠IgG;获得的胶体金免疫层析试纸,采用上述稀释液PBS稀释为1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000的寨卡IgG阳性标本进行检测,其检测灵敏度为1:10000稀释度的阳性标本,结果见图5。可见本发明制备的免疫层析试剂的灵敏度高于现有技术制备的免疫层析试剂。

[0060] 实施例4荧光免疫层析试剂特异性的检测

[0061] 采用实施例2制备的寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂进行寨卡病毒抗体的检测时,取80 $\mu$ L血清样品滴加在检测试剂的样品垫上,8min后判断结果。若仅质控带出现荧光,结果为阴性,说明待检血清样品中不含有寨卡病毒抗体;若质控带和检测带均出现荧光,结果为阳性,说明待血清检样品中含有寨卡病毒抗体;若两条带都没有荧光显色或者只有检测带荧光显色,则说明此试纸条已经失效,结果无效。

[0062] 通过对黄热病毒阳性血清、布鲁氏菌抗体阳性血清、土拉热抗体阳性血清、军团菌抗体阳性血清的检测(以上阳性血清由中国检验检疫科学研究卫生检疫研究所提供),检测结果表明只有寨卡病毒阳性血清为阳性结果,其余样品为阴性结果,说明本发明的寨卡病毒抗体检测试剂的特异性强,结果准确可靠。

[0063] 实施例5全血、血浆样本检测

[0064] 取肝素抗凝剂的全血和血浆样本、血清样本,各20份;将三份寨卡阳性样本,分别以血清、血浆、全血10 $\times$ 稀释,抽取按实施例2方法制备的三个批次的检测试剂进行依次测定,验证全血、血浆的检测结果是否一致。

[0065] 表1血清、血浆、全血样本检测

样本编号	样本类型		
	血清	血浆	全血
1	0.02 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
2	0.03 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
3	0.04 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
4	0.02 (-)	0.01 (-)	0.03 (-)
5	0.04 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
6	0.01 (-)	0.03 (-)	0.03 (-)
7	0.02 (-)	0.03 (-)	0.03 (-)
8	0.03 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
9	0.01 (-)	0.02 (-)	0.03 (-)
10	0.02 (-)	0.04 (-)	0.02 (-)
11	0.02 (-)	0.03 (-)	0.03 (-)
12	0.02 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
13	0.02 (-)	0.02 (-)	0.03 (-)
14	0.03 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
15	0.02 (-)	0.04 (-)	0.04 (-)
16	0.02 (-)	0.02 (-)	0.03 (-)
17	0.02 (-)	0.03 (-)	0.03 (-)
18	0.02 (-)	0.03 (-)	0.03 (-)
19	0.02 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)
20	0.02 (-)	0.01 (-)	0.03 (-)
寨卡 1	0.06 (+)	0.07 (+)	0.05 (+)
寨卡 2	0.08 (+)	0.08 (+)	0.07 (+)
寨卡 3	0.07 (+)	0.06 (+)	0.09 (+)

[0067] 结果表明,20份正常人血清样本、血浆样本、全血样本经过检测均为阴性结果;将三份寨卡阳性样本,分别以血清、血浆、全血的10×稀释后,检测结果均为阳性结果。说明血清样本、血浆样本、全血样本检测结果一致,表明本发明制备的试剂可用于检测血清样本、血浆样本、全血样本的检测,且检测结果不会有假阴性或假阳性结果,突破了现有的免疫层析试剂只适用于血清的检测。

[0068] 实施例6样品检测

[0069] 3份寨卡IgG阳性标本和9份正常人血清(来自广州机场局),将样本加入样本口对应的样品垫上,15分钟后插入仪器判断结果。9份正常人血清的结果全部为阴性;3份人血清样本为阳性,采用紫外线检测结果见图4,采用荧光免疫检测仪YG10的检测结果显示见表2。

[0070] 表2样品检测结果

[0071]	血清编号	T/C	结果
--------	------	-----	----

正常人血清1	0.03	阴性
正常人血清2	0.02	阴性
正常人血清3	0.03	阴性
正常人血清4	0.05	阴性
正常人血清5	0.02	阴性
正常人血清6	0.03	阴性
正常人血清7	0.04	阴性
正常人血清8	0.01	阴性
正常人血清9	0.03	阴性
寨卡1	0.51	阳性
寨卡2	0.78	阳性
寨卡3	0.62	阳性

[0072] 上述结果说明本发明方法检测结果准确、可靠，灵敏度高。

[0073] 实施例7荧光免疫层析试剂的重复性

[0074] 采用实施例2制备的荧光免疫层析试剂分别对在阳性样本进行稀释三个浓度 $2\times$ 、 $10\times$ 、 $50\times$ （表示50倍稀释的阳性样本，阳性样本由长春海关检验检疫中心提供），检测同一个浓度时，T浮动明显，C基本保持不变，如图五；将每个浓度检测15次，分别将获得的T、C、T/C的方差与平均值的比值作为变异系数，即(CV)，结果发现T、C的信号值的 $CV\geq 15\%$  T/C的 $CV\leq 8\%$ ，结果如图6，所以T/C对T起到了矫正的作用。利用T/C的拟合曲线计算3个批次检测试纸条的批内和批间浓度的变异系数，批内、批间CV均不大于8%，重复性较好。

[0075] 以上所述，仅是本发明的较佳实施例而已，并非是对本发明做其它形式的限制，任何本领域技术人员可以利用上述公开的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例。但是凡是未脱离本发明技术方案内容，依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型，仍属于本发明技术方案的保护范围。

## 序列表

<110> 中国检验检疫科学研究院

<120> 一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试剂中的应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

attcgttgta ttggcgtcag caaccgcgat tttgtcgaag gtatgtctgg cggtagctgg 60
gttgatgtag ttctggaaca cggcggttgc gttaccgta tggcacagga taaaccgacc 120
gttgatatcg aactggttac caccaccgtg tctaocatgg cggaagtctg cagctattgc 180
tacgaagctt ccatctctga tatggcgagc gattcacgtt gtccgacca aggcaagca 240
tatctggaca aacagagcga caccagtagc gtttgcaaac gtacgctggg agatcgcggt 300
tggggtaacg gttgcggtct gtttgcaaaa ggtagtctgg ttacctgcgc gaaatttacc 360
tgctcaaaaa agatgaccgg caaaagcatc cagccgaaa acctggaata ccgtatcatg 420
ctgagcggtc acggtagtca acattctggt atgatcggt acgaaaccga cgaagatcgc 480
gcgaaagtgt aagtaccac gaatagtccg cgcgcagaag caaccctggg cggttttggt 540
tctctgggtc tggattgcga accgcgtacc ggtctggatt ttagcgacct gtactacctg 600
accatgaaca acaaactctg gctggtccac aaagagtggg ttcacgatat tccgctgccg 660
tggcatgcag gcgcagatac cggtagcccg cattggaaca acaaagaagc gctggtcgag 720
ttcaaagacg cacacgcaaa acgtcagacc gttgttggtc tgggtagtca agaaggcgca 780
gttcataccg cactggcagg cgctctggaa gcagaaatgg acggggcaaa aggtcgtctg 840
ttttctggcc acctgaaatg ccgcctgaaa atggacaaac tgcgcctgaa aggcgtttct 900
tatagcctgt gcaccgcagc gtttaccttt accaaagttc cggcagaaac cctgcacggt 960
accgttaccg ttgaagtcca gtacgcaggt accgacggtc cgtgtaaaat tccggttcag 1020
atggccggtg atatgcaaac cctgaccccg gttggtcgtc tgattaccgc aaatccggtt 1080
atcaccgaga gcaccgagaa ctccaaaatg atgctggaac tggatccgcc gtttggcgat 1140
agctatatcg taatcggcgt cggcgacaaa aagattacc atcactggca tcgtagcggt 1200

```

<210> 5

<211> 400

<212> PRT

<213> 寨卡病毒E抗原(Zika Virus E)

<400> 5

```

Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser
1           5           10           15
Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

```



Ile Pro Val Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly  
 340 345 350  
 Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser  
 355 360 365  
 Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val  
 370 375 380  
 Ile Gly Val Gly Asp Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly  
 385 390 395 400

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

attcgttgta ttggcgtcag caa 23

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

accgctacga tgccagtgat gggtta 25

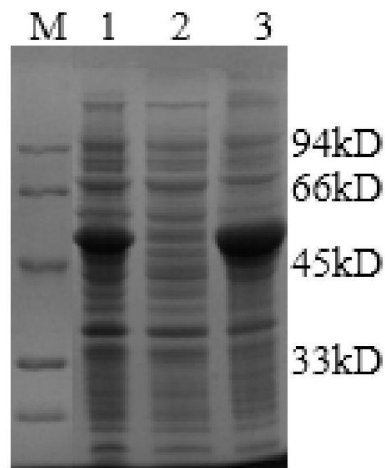


图1

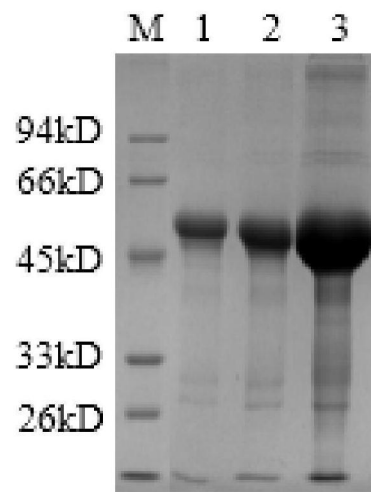


图2

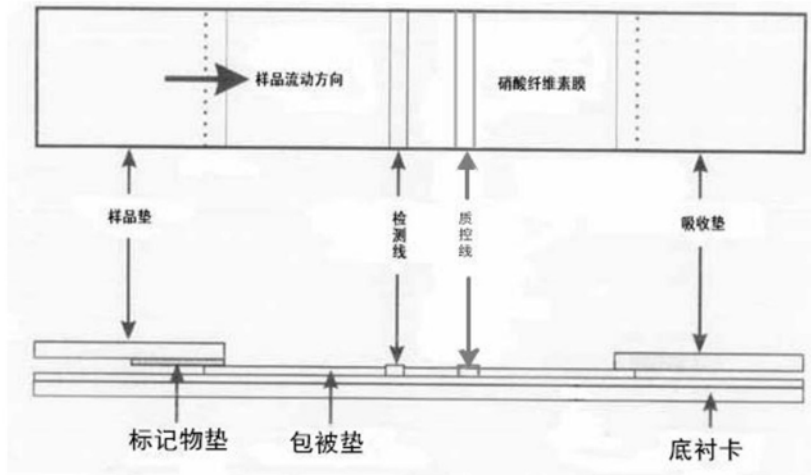


图3

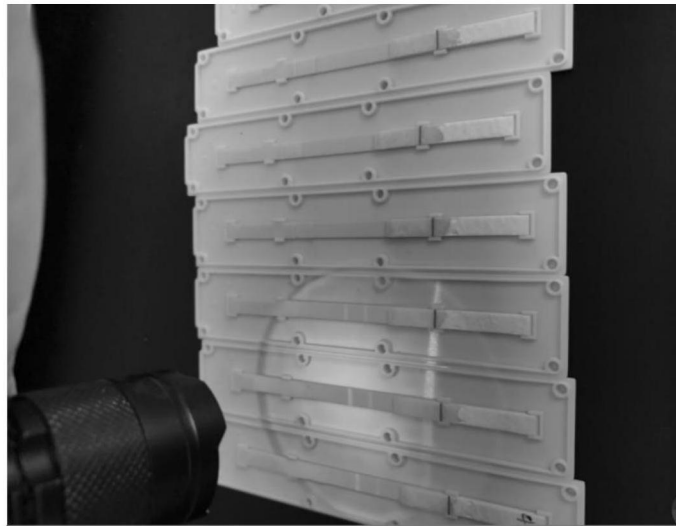


图4

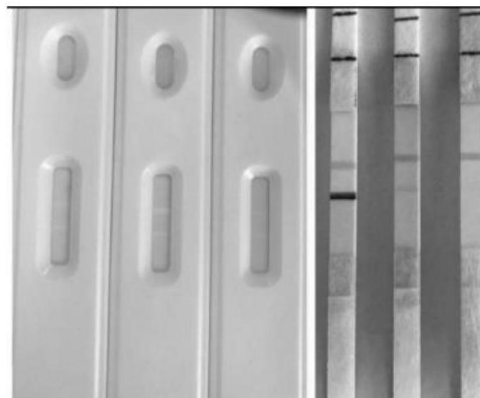


图5

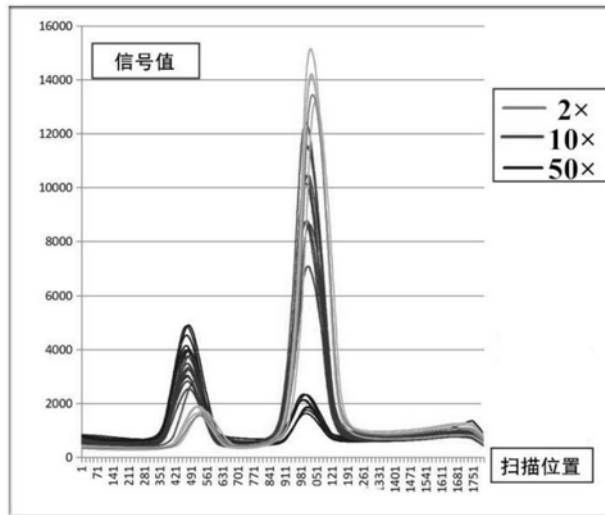


图6

专利名称(译)	一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试剂中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110568177A</a>	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910878439.7	申请日	2019-09-18
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	杨宇 聂聪 王静		
发明人	杨宇 聂聪 侯宝翠 王静		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/56983 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种寨卡病毒E抗原及其在荧光免疫层析试剂中的应用，所述寨卡病毒E抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。应用为采用寨卡病毒E抗原制备检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂，其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡，所述标记物垫为包被有荧光微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻璃纤维，所述包被垫为包被有羊抗鼠IgG的抗体作为质控线和包被有寨卡病毒E蛋白的检测线的硝酸纤维素膜。本发明提供的检测寨卡病毒IgG抗体的荧光免疫层析试剂，其特异性强，检测灵敏度高，检测结果判定简单、方便。

