



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105486863 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201510980540. 5

(22) 申请日 2015. 12. 24

(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徐家坪 1 号

(72) 发明人 兰喜

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350
代理人 黄浩威

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

C07K 14/08(2006. 01)

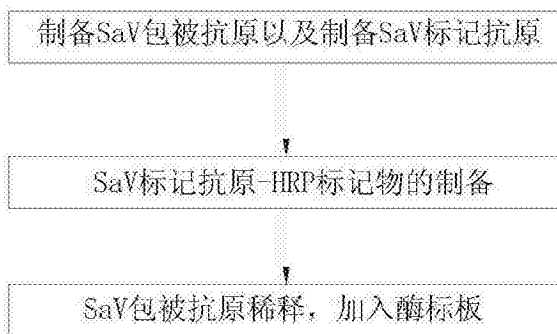
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种猪札幌病毒总抗体 ELISA 检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种猪札幌病毒总抗体 ELISA 检测试剂盒及其制备方法,所述检测试剂盒包括含有 SaV 包被抗原的酶标板和 SaV 标记抗原-HRP(辣根过氧化物酶)标记物,制备方法包括制备 SaV 包被抗原以及制备 SaV 标记抗原;SaV 标记抗原-HRP 标记物的制备;采用碳酸盐缓冲液以一定比例将 SaV 包被抗原稀释,100 μL/孔加入到酶标板,封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕。本发明基于双夹心 ELISA 原理,操作步骤简便,试剂成本较低,检测灵敏度较高,尤其适合于猪血清标本的快速批量检测,为猪 SaV 流行病学调查奠定基础。



1. 一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,包括含有SaV包被抗原的酶标板和SaV标记抗原-HRP(辣根过氧化物酶)标记物,其中,所述SaV包被抗原为SaV swCH430株P蛋白片段,SaV标记抗原为SaV swCH430株S蛋白片段。

2. 一种制备权利要求1所述的猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1制备SaV包被抗原以及制备SaV标记抗原,所述SaV包被抗原为SaV swCH430株P蛋白片段,SaV标记抗原为SaV swCH430株S蛋白片段;

S2通过SaV标记抗原和HRP的偶联,制备得到SaV标记抗原-HRP标记物;

S3采用碳酸盐缓冲液以一定比例将SaV包被抗原稀释,100 μ L/孔加入到酶标板,封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤S1具体方法如下:

1.1) PCR扩增猪源swCH430株SaV ORF2基因部分的两个片段:SaV swCH430株S片段和SaV swCH430株P片段;

SaV swCH430株S片段设计引物为:

FS 5'-GGAATTCATATGGAGGCGCCTGCCC-3' 5140-5156;

RS 5'-CCGCTCGAGGTTTGGAGGCTTGAGCAGGGTGA-3' 5775-5798;

FS为S片段上游引物,带有Nde I酶切位点,RS为片段下游引物,带有Xho I酶切位点;

SaV swCH430株P片段设计引物为:

FP 5'-CGGGATCCATGCAAACCATGGAAGCAGGGCTTGACCCT-3' 5799-5826;

RP 5'-CGGAATTCCTCGTGAGCTGTGAAGGGAC-3' 6755-6774;

FP为P片段上游引物,带有BamH I酶切位点,RP为P片段下游引物,带有EcoR I酶切位点;

1.2) PCR扩增S片段和P片段后回收,采用相应的内切酶分别进行双酶切,获得的酶切片段分别连接到pMD18-T载体,并转化大肠杆菌DH5 α ,挑取转化子,小提质粒,用相应的内切酶分别酶切鉴定并进行测序,将测序正确的阳性克隆质粒分别命名为T-S和T-P;

1.3) 将pET30a(+)与步骤1.2)中鉴定得到的测序正确的阳性克隆质粒T-S和T-P分别以相应的内切酶消化,进行琼脂糖电泳,胶回收目的片段后分别进行连接,将连接产物分别转化大肠杆菌JM109,挑取转化子,小提质粒,用相应的限制性内切酶进行酶切鉴定,构建得到可在大肠杆菌中表达的重组质粒,命名为pET-S和pET-P;

1.4) 阳性重组质粒pET-S和pET-P分别转化BL21(DE3)感受态细胞,挑选单克隆菌落于卡那霉素LB培养液中培养10h;再各自取过夜培养液100 μ L,以1:100的比例接种于10mL卡那霉素抗性的LB中进行菌体活化,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀=0.8时,加入终浓度为0.8mmol/L的IPTG分别诱导表达6h;然后将培养物4 $^{\circ}$ C 6000rpm离心15分钟收集菌体,菌体采用20mL 1% Triton-X-100的PBS悬浮,超声波破碎,4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心30分钟,收集沉淀得到表达的重组蛋白;

1.5) 对步骤1.4)得到的重组蛋白分别进行纯化,得到目的蛋白;

1.6) 目的蛋白进行SDS-PAGE,当条带与预期大小相一致,则分别命名为P蛋白和S蛋白,P蛋白即为SaV包被抗原,S蛋白即SaV标记抗原。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤1.6)具体为:

1.6.1)取50mL步骤1.4)中经诱导表达6h得到的表达产物,分别在4℃下12000g离心2min收集菌体沉淀,加入5mL 1mmol/L、PH7.4的PBS充分悬浮,在4℃下以6000rpm/min的速度离心15min,保留沉淀,如此反复离心3次;

1.6.2)分别用5mL PBS重悬菌体进行超声破碎,破碎条件为功率40%,超声3s,间歇3s;破碎10min;然后将裂解液12000g离心30min,收集包涵体沉淀,然后用结合缓冲液溶解沉淀,其中所述结合缓冲液包含8mol/L尿素、1mmol/L EDTA和20mmol/L Tris;

1.6.3)先用结合缓冲液平衡Ni Sepharose™6 Fast Flow重力柱,再将步骤1.6.2)溶解得到的包涵体溶液过三遍平衡的Ni²⁺重力柱;

1.6.4)分别用10倍柱体积的PH8.0的磷酸盐缓冲液和PH7.8的磷酸盐缓冲液先后经过重力柱;

1.6.5)用洗脱液洗脱Ni²⁺重力柱上的蛋白,同时将纯化的蛋白和各自的镍柱进行蛋白电泳分析结果,其中,所述洗脱液通过250mmol咪唑溶解于1L PH8.0的磷酸盐缓冲液获得。

5.根据权利要求3或4所述的制备方法,其特征在于,步骤1.6)中,采用GE公司Ni Sepharose™6 Fast Flow蛋白纯化柱纯化。

6.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S2中,SaV标记抗原和HRP的偶联具体采用NaIO₄氧化法,包括步骤如下:

2.1)将步骤S1中所得的SaV标记抗原于PBS溶液中4℃透析过夜;

2.2)紫外分光光度计测定SaV标记抗原浓度;

2.3)采用分析天平称取10mg HRP溶于2mL超纯水中制备终浓度为5mg/mL的HRP溶液,分析天平称取NaIO₄,溶于超纯水中制备终浓度为20mg/mL的NaIO₄溶液备用;

2.4)缓慢滴加225 μL NaIO₄溶液于2mL HRP溶液中,室温下避光静置20分钟;

2.5)加入20μL乙二醇于HRP混合溶液中,之后室温下静置30分钟,得到活化好的HRP溶液;

2.6)取1mL 2.1mg/mL的SaV标记抗原缓慢逐滴加入到活化好的HRP溶液中,得到SaV标记抗原-HRP结合物;

2.7)将SaV标记抗原-HRP结合物于50mM CB pH9.6的溶液中4℃避光透析2.5个小时;

2.8)分析天平称量NaBH₄溶于水,制备终浓度为4mg/mL的NaBH₄溶液;

2.9)向步骤2.7)的透析袋中加入162μL的NaBH₄溶液,室温下在摇床上轻轻震动2个小时;

2.10)在PBS溶液中4℃透析过夜;

2.11)透析结束后1:1比例加入甘油,-20度保存,即为SaV标记抗原-HRP标记物。

7.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S3的具体步骤如下:

采用50mmol/L、pH9.5的碳酸盐缓冲液将SaV包被抗原稀释至6μg/mL,然后1:2000倍稀释加入SaV包被抗原,100μL/孔加入到酶标板,4℃包被过夜;次日采用PBST洗涤液洗板三次,所述PBST洗涤液包括10mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.05% Tween-20, pH7.4;最后一次拍干,150μL/孔加入含30%新生牛血清,8%蔗糖,5%牛血清白蛋白,150mmol/L NaCl的PH7.4,10mmol/L PB封闭液,4℃封闭12小时,次日甩掉孔内液体,拍干,置室温20-25℃、湿度20%-25%、有通风设备的干燥房间内风干过夜;封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕。

一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体涉及一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 札幌病毒(Sapovirus, SaV)属于杯状病毒科(Caliciviridae)、札幌样病毒属(Sappora-like virus),是一种单股正链RNA病毒。能够引起人和动物的急性病毒性胃肠炎及腹泻,通常以粪-口途径传播。

[0003] 猪SaV分布广泛,包括欧洲、亚洲及美洲都检测到了该病毒,可以感染各年龄阶段的猪,1月龄左右断奶仔猪最易感,成年猪感染后很少出现临床症状,对养猪业造成了一定的威胁和损失。最新研究显示,对于不同基因型的人源和动物源的SaV在遗传上和抗原特性上有相似之处,且已发现人源和猪源的SaV重组毒株^[X],说明SaV可能存在跨种传播能力,对人类公共卫生构成潜在的威胁。因此对札幌病毒进行流行病学监测就显得尤为重要。

[0004] 目前,国内外对于猪源札幌病毒的检测方法还不成熟,还没有检测猪SaV抗体的商品化试剂盒,而是主要集中在病毒形态及病毒RNA的检测等方法上。电镜诊断用于病毒粒子结构观察,可直接检测标本,但机器价格昂贵,技术要求高,不适用于大量的病毒诊断;RT-PCR技术用于检测病毒RNA,灵敏度较高,但技术要求高,设备及操作环境要求也较高;ELISA技术广泛应用于检测病毒的抗原抗体,特异性强、重复性好,可用于大范围的流行病学监测。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明旨在提供一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒的制备方法,操作步骤简便,试剂成本较低,检测灵敏度较高,尤其适合于猪血清标本的快速批量检测,为猪SaV流行病学调查奠定基础。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒,包括含有SaV包被抗原的酶标板和SaV标记抗原-HRP(辣根过氧化物酶)标记物,其中,所述SaV包被抗原为SaV swCH430株P蛋白片段,SaV标记抗原为SaV swCH430株S蛋白片段。

[0008] 一种制备上述猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒的方法,包括如下步骤:

[0009] S1制备SaV包被抗原以及制备SaV标记抗原,所述SaV包被抗原为SaV swCH430株P蛋白片段,SaV标记抗原为SaV swCH430株S蛋白片段;

[0010] S2通过SaV标记抗原和HRP的偶联,制备得到SaV标记抗原-HRP标记物;

[0011] S3采用碳酸盐缓冲液以一定比例将SaV包被抗原稀释,100 μ L/孔加入到酶标板,封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕。

[0012] 需要说明的是,所述步骤S1具体方法如下:

[0013] 1.1)PCR扩增猪源swCH430株SaV ORF2基因部分的两个片段:SaV swCH430株S片段

和SaV swCH430株P片段；

[0014] SaV swCH430株S片段设计引物为：

[0015] FS 5'-GGAATTCCATATGGAGGCGCCTGCCC-3' 5140-5156；

[0016] RS 5'-CCGCTCGAGGTTTGGAGGCTTGAGCAGGGTGA-3' 5775-5798；

[0017] FS为S片段上游引物，带有Nde I酶切位点，RS为片段下游引物，带有Xho I酶切位点；

[0018] SaV swCH430株P片段设计引物为：

[0019] FP 5'-CGGGATCCATGCAAACCATGGAAGCAGGGCTTGACCCT-3' 5799-5826；

[0020] RP 5'-CGGAATTCTCGTGAGCTGTGAAGGGAC-3' 6755-6774；

[0021] FP为P片段上游引物，带有BamH I酶切位点，RP为P片段下游引物，带有EcoR I酶切位点；

[0022] 1.2)PCR扩增S片段和P片段后回收，采用相应的内切酶分别进行双酶切，获得的酶切片段分别连接到pMD18-T载体，并转化大肠杆菌DH5 α ，挑取转化子，小提质粒，用相应的内切酶分别酶切鉴定并进行测序，将测序正确的阳性克隆质粒分别命名为T-S和T-P；

[0023] 1.3)将pET30a(+)与步骤1.2)中鉴定得到的测序正确的阳性克隆质粒T-S和T-P分别以相应的内切酶消化，进行琼脂糖电泳，胶回收目的片段后分别进行连接，将连接产物分别转化大肠杆菌JM109，挑取转化子，小提质粒，用相应的限制性内切酶进行酶切鉴定，构建得到可在大肠杆菌中表达的重组质粒，命名为pET-S和pET-P；

[0024] 1.4)阳性重组质粒pET-S和pET-P分别转化BL21(DE3)感受态细胞，挑选单克隆菌落于卡那霉素LB培养液中培养10h；再各自取过夜培养液100 μ L，以1:100的比例接种于10mL卡那霉素抗性的LB中进行菌体活化，37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀=0.8时，加入终浓度为0.8mmol/L的IPTG分别诱导表达6h；然后将培养物4 $^{\circ}$ C6000rpm离心15分钟收集菌体，菌体采用20mL 1% Triton-X-100的PBS悬浮，超声波破碎，4 $^{\circ}$ C12000rpm离心30分钟，收集沉淀得到表达的重组蛋白；

[0025] 1.5)对步骤1.4)得到的重组蛋白分别进行纯化，得到目的蛋白；

[0026] 1.6)目的蛋白进行SDS-PAGE，当条带与预期大小相一致，则分别命名为P蛋白和S蛋白，P蛋白即为SaV包被抗原，S蛋白即SaV标记抗原。

[0027] 进一步需要说明的是，步骤1.6)具体为：

[0028] 1.6.1)取50mL步骤1.4)中经诱导表达6h得到的表达产物，分别在4 $^{\circ}$ C下12000g离心2min收集菌体沉淀，加入5mL 1mmol/L、PH7.4的PBS充分悬浮，在4 $^{\circ}$ C下以6000rpm/min的速度离心15min，保留沉淀，如此反复离心3次；

[0029] 1.6.2)分别用5mL PBS重悬菌体进行超声破碎，破碎条件为功率40%，超声3s，间歇3s；破碎10min；然后将裂解液12000g离心30min，收集包涵体沉淀，然后用结合缓冲液溶解沉淀，其中所述结合缓冲液包含8mol/L尿素、1mmol/L EDTA和20mmol/L Tris；

[0030] 1.6.3)先用结合缓冲液平衡Ni SepharoseTM 6 Fast Flow重力柱，再将步骤1.6.2)溶解得到的包涵体溶液过三遍平衡的Ni²⁺重力柱；

[0031] 1.6.4)分别用10倍柱体积的PH8.0的磷酸盐缓冲液和PH7.8的磷酸盐缓冲液先后经过重力柱；

[0032] 1.6.5)用洗脱液洗脱Ni²⁺重力柱上的蛋白，同时将纯化的蛋白和各自的镍柱进行

蛋白电泳分析结果,其中,所述洗脱液通过250mmol咪唑溶解于1L PH8.0的磷酸盐缓冲液获得。

[0033] 进一步需要说明的是,步骤1.6)中,采用GE公司Ni Sepharose™ 6 Fast Flow蛋白纯化柱纯化。

[0034] 需要说明的是,步骤S2中,SaV标记抗原和HRP的偶联具体采用NaIO₄氧化法,包括步骤如下:

[0035] 2.1)将步骤S1中所得的SaV标记抗原于PBS溶液中4℃透析过夜;

[0036] 2.2)紫外分光光度计测定SaV标记抗原浓度;

[0037] 2.3)采用分析天平称取10mg HRP溶于2mL超纯水中制备终浓度为5mg/mL的HRP溶液,分析天平称取NaIO₄,溶于超纯水中制备终浓度为20mg/mL的NaIO₄溶液备用;

[0038] 2.4)缓慢滴加225μL NaIO₄溶液于2mL HRP溶液中,室温下避光静置20分钟;

[0039] 2.5)加入20μL乙二醇于HRP混合溶液中,之后室温下静置30分钟,得到活化好的HRP溶液;

[0040] 2.6)取1mL 2.1mg/mL的SaV标记抗原缓慢逐滴加入到活化好的HRP溶液中,得到SaV标记抗原-HRP结合物;

[0041] 2.7)将SaV标记抗原-HRP结合物于50mmol/L CB pH9.6的溶液中4℃避光透析2.5个小时;

[0042] 2.8)分析天平称量NaBH₄溶于水中,制备终浓度为4mg/mL的NaBH₄溶液;

[0043] 2.9)向步骤2.7)的透析袋中加入162μL的NaBH₄溶液,室温下在摇床上轻轻震动2个小时;

[0044] 2.10)在PBS溶液中4℃透析过夜;

[0045] 2.11)透析结束后1:1比例加入甘油,-20度保存,即为SaV标记抗原-HRP标记物。

[0046] 需要说明的是,步骤S3的具体步骤如下:

[0047] 采用50mmol/L、pH9.5的碳酸盐缓冲液将SaV包被抗原稀释至6μg/mL,然后1:2000倍稀释加入SaV包被抗原,100μL/孔加入到酶标板,4℃包被过夜;次日采用PBST洗涤液洗板三次,所述PBST洗涤液包括10mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.05% Tween-20, pH7.4;最后一次拍干,150μL/孔加入含30%新生牛血清,8%蔗糖,5%牛血清白蛋白,150mmol/L NaCl的PH7.4,10mmol/L PB封闭液,4℃封闭12小时,次日甩掉孔内液体,拍干,置室温20-25℃、湿度20%-25%、有通风设备的干燥房间内风干过夜;封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕。

[0048] 本发明的有益效果在于:基于双夹心ELISA原理,操作步骤简便,试剂成本较低,检测灵敏度较高,尤其适合于猪血清标本的快速批量检测,为猪SaV流行病学调查奠定基础。

附图说明

[0049] 图1为本发明的实施流程图;

[0050] 图2为S、P基因PCR扩增示意图;

[0051] 图3和图4分别为pET30a-S双酶切产物和pET30a-P双酶切产物;

[0052] 图5为重组蛋白纯化SDS-PAGE分析示意图。

具体实施方式

[0053] 以下将结合附图对本发明作进一步的描述,需要说明的是,本实施例以本技术方案为前提,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围并不限于本实施例。

[0054] 一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒,包括含有SaV包被抗原的酶标板和SaV标记抗原-HRP(辣根过氧化物酶)标记物,其中,所述SaV包被抗原为SaV swCH430株P蛋白片段,SaV标记抗原为SaV swCH430株S蛋白片段。

[0055] 如图1所示,一种制备上述猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒的方法,包括如下步骤:

[0056] S1制备SaV包被抗原以及制备SaV标记抗原;

[0057] 1.1)首先PCR扩增猪源swCH430株SaV ORF2(兰州兽医研究所传染病室保存)基因部分的两个片段,上下游引物设计如图2所示,分别带有酶切位点,其中其中M表示DL5000marker,1表示S基因扩增片段,2表示P基因扩增片段。

[0058] SaV swCH430株S片段设计引物为:

[0059] FS 5'-GGAATTCATATGGAGGCGCCTGCCC-3' 5140-5156;

[0060] RS 5'-CCGCTCGAGGTTTGGAGGCTTGAGCAGGGTGA-3' 5775-5798;

[0061] FS为S片段上游引物,带有Nde I酶切位点,RS为片段下游引物,带有Xho I酶切位点;

[0062] SaV swCH430株P片段设计引物为:

[0063] FP 5'-CGGGATCCATGCAAACCATGGAAGCAGGGCTTGACCCT-3' 5799-5826;

[0064] RP 5'-CGGAATTCTCGTGAGCTGTGAAGGGAC-3' 6755-6774;

[0065] FP为P片段上游引物,带有BamH I酶切位点,RP为P片段下游引物,带有EcoR I酶切位点;

[0066] 1.2)PCR片段扩增后回收,采用相应的内切酶进行双酶切,获得的酶切片段连接到pMD18-T载体(大连宝生物,货号D103A),将连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,挑取转化子,小提质粒,用相应的内切酶酶切鉴定并测序,将鉴定正确的阳性克隆分别命名为T-S和T-P;

[0067] 1.3)将pET30a(+)(兰州兽医研究所传染病室保存)与步骤S2中鉴定得到的合适的克隆质粒分别以相应的内切酶消化,进行琼脂糖电泳,胶回收目的片段后进行连接,构建可在大肠杆菌中表达的重组质粒,命名pET-S(如图3所示,其中M表示5000DNA分子质量标准,1表示pET-S)和pET-P(如图4所示,其中M表示5000DNA分子质量标准,2表示pET-P);将连接产物转化大肠杆菌JM109,挑取转化子,小提质粒,用相应的限制性内切酶进行酶切鉴定。

[0068] 1.4)阳性重组质粒pET-S和pET-P转化BL21(DE3)感受态细胞,挑选单克隆菌落于卡那霉素LB培养液中培养10h;菌液以1:100的比例加入到1L含100 μ g/mL卡那霉素抗性的LB培养基37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀=0.8左右,加入的终浓度为0.5mmol/L的IPTG;

[0069] 1.5)挑取单菌落培养过夜,再取过夜培养液100 μ L以1:100的比例接种于10mL卡那霉素抗性的LB中进行菌体活化,37 $^{\circ}$ C培养OD₆₀₀至0.6-0.8之间,加入0.8mmol/L的IPTG分别诱导表达6h;4 $^{\circ}$ C6000rpm离心15分钟收集菌体,菌体采用20mL 1%Triton-X-100的PBS悬浮,超声波破碎,4 $^{\circ}$ C12000rpm离心30分钟,分别取上清和沉淀进行SDS-PAGE,分析确定表达

产物在大肠杆菌的存在形式；结果发现重组蛋白主要以包涵体的形式存在。

[0070] 1.6)蛋白纯化；

[0071] 步骤1.6)中,采用GE公司Ni Sepharose™ 6 Fast Flow蛋白纯化柱纯化。包括如下步骤：

[0072] 1.6.1)取50mL加入IPTG浓度为0.8mmol诱导6h的菌液,4℃12000×g离心2min收集菌体沉淀,加入5mL 1mmol/L PH7.4的PBS充分悬浮,4℃6000rpm/min15min离心,保留沉淀,如此反复离心3次；

[0073] 1.6.2)用5mL PBS重悬菌体进行超声破碎(功率40%,超声3s,间歇3s;破碎10min),然后将裂解液12000×g离心30min,收集包涵体沉淀,然后用结合缓冲液(8mol/L尿素、1mmol/L EDTA、20mmol/L Tris)溶解沉淀；

[0074] 1.6.3)先用结合缓冲液(8mol/L尿素、1mmol/L EDTA、20mmol/L Tris)平衡Ni Sepharose™ 6 Fast Flow重力柱,再将溶解的包涵体溶液过三遍平衡的Ni²⁺重力柱；

[0075] 1.6.4)分别用10倍柱体积PH8.0的磷酸盐缓冲液和PH7.8的磷酸盐缓冲液先后经过重力柱；

[0076] 1.6.5)用洗脱液(250mmol咪唑溶解于1L PH8.0的磷酸盐缓冲液)洗脱Ni²⁺重力柱上的蛋白。同时将纯化的蛋白和各自的镍柱进行蛋白电泳分析结果。

[0077] 1.7)目的蛋白进行SDS-PAGE,条带与预期大小相一致,分别命名为P蛋白和S蛋白,P蛋白即为SaV包被抗原,S蛋白即SaV标记抗原。如图5所示,M表示蛋白质标准分子量;1表示纯化的P蛋白;2表示纯化的S蛋白。

[0078] S2 SaV标记抗原-HRP标记物的制备；

[0079] 需要说明的是,步骤S2中,SaV标记抗原和HRP的偶联采用NaIO₄氧化法,具体包括步骤如下：

[0080] 2.1)首先将步骤S1得到的纯化SaV标记抗原于PBS溶液中4℃透析过夜；

[0081] 2.2)紫外分光光度计测定SaV标记抗原浓度；

[0082] 2.3)分析天平称取HRP 10mg溶于2mL超纯水中制备终浓度为5mg/mL的HRP溶液,分析天平称取NaIO₄,溶于超纯水中制备终浓度为20mg/mL的NaIO₄溶液备用；

[0083] 2.4)缓慢滴加225μL NaIO₄溶液于2mL HRP溶液中,室温下避光静置20分钟；

[0084] 2.5)加入20μL乙二醇于HRP混合溶液中,之后室温下静置30分钟,得到活化好的HRP溶液；

[0085] 2.6)取1mL 2.1mg/mL的SaV标记抗原缓慢逐滴加入到活化好的HRP溶液中,得到S蛋白-HRP结合物；

[0086] 2.7)将S蛋白-HRP结合物于50mmol/L CB pH9.6的溶液中4℃避光透析2.5个小时；

[0087] 2.8)分析天平称量NaBH₄溶于水中,制备终浓度为4mg/mL的NaBH₄溶液；

[0088] 2.9)向步骤2.7)的透析袋中加入162μL的NaBH₄溶液,室温下在摇床上轻轻震动2个小时；

[0089] 2.10)标记物在PBS溶液中4℃透析过夜；

[0090] 2.12)透析结束后1:1比例加入甘油,-20度保存。

[0091] S3采用碳酸盐缓冲液以一定比例将P抗原稀释,100μL/孔加入到酶标板,封装于加有干燥剂的铝膜袋中,包被完毕。

[0092] 以下通过实验进一步描述本发明的试剂盒的性能：

[0093] 酶标板中每孔加入100 μ L样品稀释液(PH7.4PB,150mmol/L NaCl,5%牛血清白蛋白,0.5%鱼明胶,2%Tween-20,0.1% Triton X-100,0.1%硫柳汞),加入50 μ L待测样品、阴性参照样品(健康猪阴性血清)、阳性参照样品(HEV抗体猪阳性血清)对照,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;用PBST洗涤液洗板五次,最后一次拍干。100 μ L/孔加入含有20%新生牛血清,以一定比例稀释的HRP-S溶液,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;用PBST洗涤液洗板五次,拍干。

[0094] 每孔加入含0.5%过氧化氢尿素(生工,货号UB1753)、4.76%三水合乙酸钠、0.9%冰醋酸的显色剂A及含0.32%TMB(生工,货号TB0514)、5mmol/L柠檬酸、0.5mmol/L EDTA-2Na、5%甲醇、2%二甲基甲酰胺的显色剂B各50 μ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟。每孔加50 μ L,含2M硫酸的终止液终止反应,酶标仪450nm波长(参考波长630nm)空白孔校零后读取OD值。

[0095] 临界值(Cutoff Value(COV))计算:COV=阴性对照平均OD值 \times 1.5(阴性对照OD值低于0.065按0.075计算,高于0.065按实际OD值计算),待测样品OD值 \geq COV为阳性,待测样品OD值 $<$ COV为阴性。

[0096] 检测结果

[0097] 选用经过RIBA 2.0(Ortho-Clinical Diagnostics)验证的200份猪HEV阳性血清和3000份猪阴性血清,采用本发明的猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒检测300份猪血清,其灵敏度为97.3%,特异性为97.5%,准确率为98%。

[0098] 对于本领域的技术人员来说,可以根据以上的技术方案和构思,作出各种想要的改变和变形,而所有的这些改变和变形都应该包括在本发明权利要求的保护范围之内。

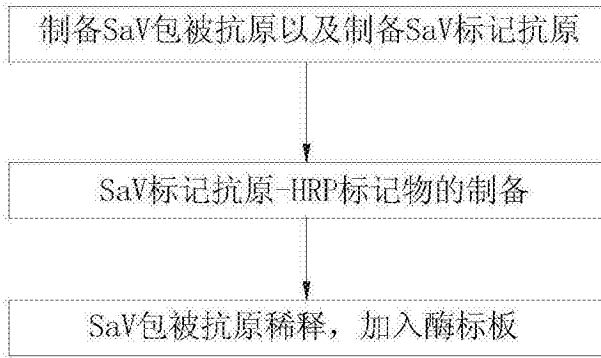


图1

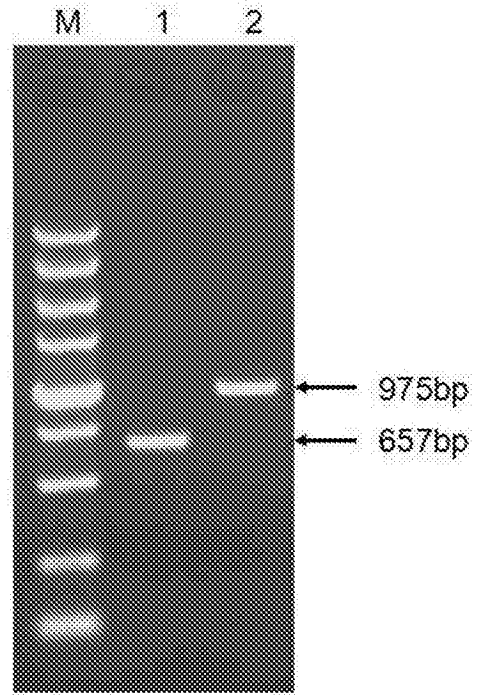


图2

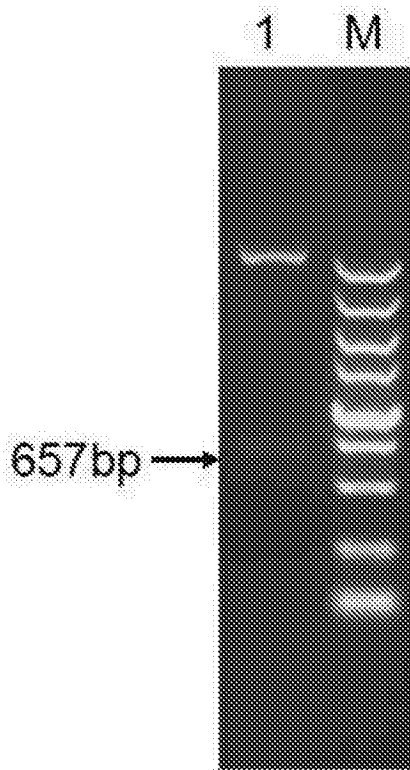


图3

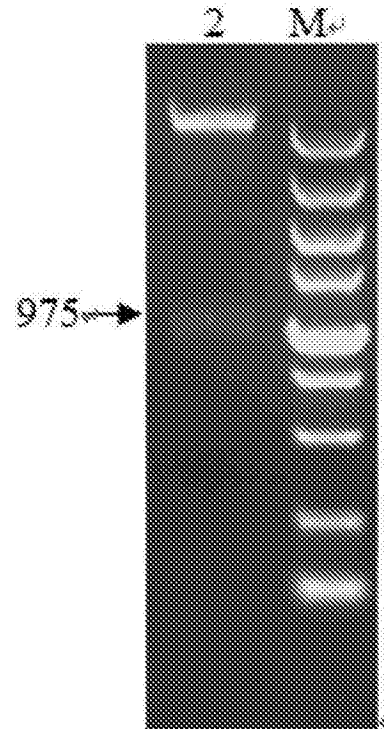


图4

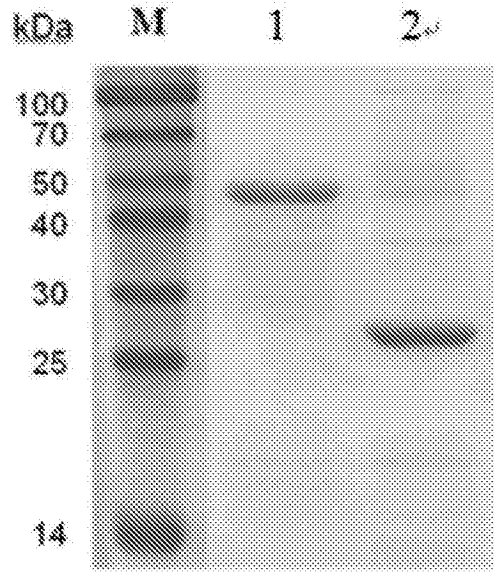


图5

专利名称(译)	一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN105486863A	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	CN201510980540.5	申请日	2015-12-24
[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	兰喜		
发明人	兰喜		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 C07K14/08		
CPC分类号	C07K14/005 C12N2770/16022 G01N33/535 G01N33/56983 G01N2333/08		
代理人(译)	黄浩威		
其他公开文献	CN105486863B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪札幌病毒总抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法，所述检测试剂盒包括含有SaV包被抗原的酶标板和SaV标记抗原-HRP(辣根过氧化物酶)标记物，制备方法包括制备SaV包被抗原以及制备SaV标记抗原；SaV标记抗原-HRP标记物的制备；采用碳酸盐缓冲液以一定比例将SaV包被抗原稀释，100μL/孔加入到酶标板，封装于加有干燥剂的铝膜袋中，包被完毕。本发明基于双夹心ELISA原理，操作步骤简便，试剂成本较低，检测灵敏度较高，尤其适合于猪血清标本的快速批量检测，为猪SaV流行病学调查奠定基础。

