



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105542001 A

(43) 申请公布日 2016.05.04

(21) 申请号 201610014199.2

(22) 申请日 2016.01.11

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市朝阳区前进大街
2699号

(72) 发明人 王新平 邢泽黎 朱利塞 郭昌明
盖小春 王明月 鲁海冰 曹玉峰
刘亚静 张群

(74) 专利代理机构 长春市东师专利事务所
22202

代理人 张铁生

(51) Int. Cl.

G07K 16/10(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

检测 E 种肠道病毒病原的双抗体夹心 ELISA
试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了检测 E 种肠道病毒病原的双抗体夹心 ELISA 试剂盒,它采用其碱基序列如序列表 SEQ ID NO.1 所示的 *VP1* 基因,表达的 VP1 蛋白,免疫 BALB/C 小鼠后制备的多克隆抗体为捕获抗体,采用其碱基序列如序列表 SEQ ID NO.3 所示的 *VP2* 基因,表达的 VP2 蛋白,免疫 BALB/C 小鼠后制备的单克隆抗体,并标记了辣根过氧化物酶(HRP)。安全性、与 RT-PCR 检测结果具有 100% 符合率。试剂盒 4℃ 保存 6 个月,检测结果与常规方法无明显差异。

1. 一种E种肠道病毒抗原捕获抗体,它是采用其碱基序列如序列表SEQ ID NO.1所示的VP1基因,表达VP1蛋白,免疫BALB/C小鼠制备的多克隆抗体。

2. 一种E种肠道病毒酶标抗体,是采用其碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示的VP2基因,表达VP2蛋白,免疫BALB/C小鼠后制备的单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的一种E种肠道病毒酶标抗体,其特征在于:所述的酶标抗体标记了辣根过氧化物酶。

4. 检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒,它的抗原捕获抗体为权利要求1所述的一种E种肠道病毒抗原捕获抗体,酶标抗体为权利要求2所述的一种E种肠道病毒酶标抗体。

检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属生物技术领域,具体涉及检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 牛肠道病毒(Bovine enterovirus, BEV)与人脊髓灰质炎病毒、人柯萨奇病毒、人肠道致细胞病变孤儿病毒,猪肠道病毒等同属小RNA病毒科肠道病毒属中的成员,它所引起的传染病给养牛业造成严重的经济损失。牛肠道病毒感染临床上以发热、流泪、咳嗽、流鼻涕、呼吸困难和严重腹泻为主要特征。本病自上世纪50年代首次由Mo11等报道以来,其他国家也相继报道有本病发生。国内李英利等于2011年首次从内蒙某奶牛场的犊牛粪便样品中分离到一株F种肠道病毒,证实国内牛群中存在BEV感染。彭小微等于2013年从北京地区某发生严重腹泻的奶牛也分离出一株F种牛肠道病毒。申请人于2012年从吉林长春地区爆发的一种临床上以呼吸困难和严重腹泻,高发病率和高致死率为主要特征的不明疫病中首次发现分离出E种肠道病毒HY12,确定了国内牛群存在E种肠道病毒感染。该病在国内为新发传染病,严重威胁养牛业的健康发展。有关BEV感染的诊断方法,尤其是具有特异、敏感、快速与简便、适于在基层牛场应用的检测肠道病毒抗原的方法和试剂盒鲜有报道。

发明内容

[0003] 本发明目的是提供一种检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒。

[0004] 一种E种肠道病毒抗原捕获抗体,它是采用其碱基序列如序列表SEQ ID NO.1所示的VP1基因,表达VP1蛋白,免疫BALB/C小鼠后制备的多克隆抗体。

[0005] 一种E种肠道病毒酶标抗体,是采用其碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示的VP2基因,表达VP2蛋白,免疫BALB/C小鼠后制备的单克隆抗体。

[0006] 所述的一种E种肠道病毒酶标抗体标记了辣根过氧化物酶。

[0007] 检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒,它的抗原捕获抗体为上述的一种E种肠道病毒抗原捕获抗体,酶标抗体为上述的一种E种肠道病毒酶标抗体。

[0008] 本发明提供了检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒,它采用其碱基序列如序列表SEQ ID NO.1所示的VP1基因,表达的VP1蛋白,免疫BALB/C小鼠后制备的多克隆抗体为捕获抗体,采用其碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示的VP2基因,表达的VP2蛋白,免疫BALB/C小鼠后制备的单克隆抗体,并标记了辣根过氧化物酶(HRP)。安全性、与RT-PCR检测结果具有100%符合率。试剂盒4℃保存6个月,检测结果与常规方法无明显差异。

[0009] 本发明的优点:

1、具有生物安全性。试剂盒所用的抗E种肠道病毒VP1和VP2的高免抗体为原核载体表达的重组蛋白诱导BALB/C小鼠产生,不含E种肠道病毒,因此不存在散毒危险;

2、敏感性高。捕获抗体和HRP标记二抗均具有很高的免疫效价,因此提高了试剂盒的敏感性和特异性。试剂盒检测E种肠道病毒阳性和阴性粪便样品与RT-PCR检测结果具有100%

符合率；

3、特异性强。试剂盒与其他病原体无交叉反应，只检出E种肠道病毒抗原，具有很高特异性；

4、稳定性好。试剂盒4℃保存6个月，检测结果与常规方法无明显差异，具有很好的稳定性；

5、快速简便。试剂盒2.0-2.5 h 即可报告结果，使用方便，一般技术人员按说明书即可操作，条件一般实验室均可进行；

6、不影响动物正常生产。待检样品为粪便，采集容易、方便、不影响动物正常生产，容易被基层牛场接受；

7、价格便宜。约3元/头份，HRP标记二抗和抗体制备技术成熟，均可大规模获得。

附图说明

[0010] 图1 pGEX-4T-1-VP1和pGEX-4T-1-VP2重组质粒酶切鉴定(泳道2、3:pGEX-4T-1-VP1;泳道5、6:pGEX-4T-1-VP2;泳道1、7:pGEX-4T-1质粒阴性对照;泳道4:DNA分子marker);

图2 重组蛋白的SDS-PAGE检测结果(泳道3:pGEX-4T-1-VP1重组菌未诱导总蛋白;泳道2:pGEX-4T-1-VP1重组菌诱导后总蛋白;泳道4:pGEX-4T-1-VP2重组菌未诱导总蛋白;泳道5:pGEX-4T-1-VP2重组菌诱导后总蛋白;泳道1、6:蛋白分子marker);

图3 纯化重组蛋白的SDS-PAGE检测结果(VP1重组蛋白 BSA;VP2重组蛋白 BSA);

图4 E种肠道病毒 VP1和VP2抗体免疫荧光鉴定;

图5 试剂盒各组分((1)包被有VP1捕获抗体及预处理的96孔ELISA板;(2)样品稀释液;(3)20倍浓缩洗涤液;(4)HRP标记抗VP2 IgG;(5)终止液;(6)底物A;(7)底物B;(8)阳性对照样品;(9)阴性对照样品)。

具体实施方式

[0011] 实施例1 E种肠道病毒结构蛋白VP1和VP2原核表达重组质粒的构建

1、引物设计

根据目标序列的碱基组成，分别设计引物扩增VP1和VP2基因的引物，上下游分别含有BamHI、EcoRI酶切位点。引物序列如下：

扩增VP1序列引物：

E-VP1-F CGCGGATCCGAAACAAGCGTGGAGA (BamHI)

E-VP1-R CCGGAATTCGTACGAGGTGAGGCT (EcoRI)

扩增VP2序列引物：

E-VP2-F CGCGGATCCTCTCCGTCAGCAGAAG (BamHI)

E-VP2-R CCGGAATTCTGATGCAATAGCCCG (EcoRI)

2、基因扩增

常规Trizol法提取E种肠道病毒的基因组RNA，采用市售常规反转录试剂盒，按照说明操作获得cDNA，并以其为模板分别扩增了VP1基因和VP2基因，PCR反应体系：

ExTaq 10×Buffer	2.5 μL
dNTP mixture	2.5 μL
F	1.0 μL
R	1.0 μL
cDNA 模板	1.5 μL
ExTaq DNA 聚合酶	0.5 μL
ddH ₂ O	16 μL
总体积	25.0 μL

PCR运行条件:94℃预变性2min;94℃变性1min、54℃退火30sec、72℃延伸30sec,共30个循环;72℃再延伸5min。反应结束后,取1μL进行0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

[0012] 3、目标基因与pGEX-4T-1的连接、转化

采用分子生物学领域中的常规酶切、连接等技术,构建重组质粒pGEX-4T-1-VP1和pGEX-4T-1-VP2,并采用CaCl₂法将重组质粒转化大肠杆菌DH5α感受态中。利用含100 μg/mL氨苄霉素的LB培养平板筛选阳性克隆,并进行常规增菌培养,收获菌体,提取质粒,进行BamHI/EcoRI双酶切鉴定,如图1所示。

[0013] 实施例2 VP1和VP2重组蛋白的表达及纯化

将鉴定的阳性重组质粒pGEX-4T-1-VP1和pGEX-4T-1-VP2转化BL21(DE3)感受态细胞后,挑取单个菌落接种到3 mL含有100 μg/mL氨苄霉素的LB液体培养基中培养过夜,然后取1 mL上述培养物接种到200 mL含有100 μg/mL氨苄霉素的LB液体培养基中37℃振荡培养至对数生长期(OD₆₀₀=0.6~0.8),加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,20℃诱导培养3 h,经SDS-PAGE检测,获得了重组目标蛋白VP1和VP2,如图2所示。离心沉淀菌体,超声破碎后以尿素纯化包涵体方法获得高纯度的重组蛋白,如图3所示。

[0014] 实施例3抗VP1鼠源多克隆抗体和VP2单克隆抗体的制备与纯化

1、抗VP1鼠源多抗制备:选择6-8周龄健康BALB/C小鼠,以弗氏完全佐剂乳化纯化的VP1重组蛋白,每只小鼠多点皮下注射共100 μg,之后每间隔14 d按照同样方法加强免疫一次,同时采集血清检测效价。最后一次加强免疫采用直接腹腔注射100 μg纯化的蛋白,3~5 d后采集血液收集血清,即为抗VP1鼠源多抗;

2、抗VP2单克隆抗体制备:免疫方法同抗VP1鼠源多抗制备,取免疫小鼠的脾细胞与SP2/0混合于融合管内,以300 g离心10 min,弃去上清,振荡细胞,使两种细胞尽量混合均匀,然后于60 sec内缓慢滴加预热的PEG-4000溶液,再缓慢加入无血清的1640培养基终止融合,静置后再以1 000 r/min离心10 min,弃去上清后加入HAT培养基,使细胞混匀悬浮,于96孔培养板中培养,第14 d开始换液并开始检测筛选分泌抗体的杂交瘤细胞。杂交瘤细胞的筛选采用间接ELISA,用纯化的VP2蛋白作为包被抗原包被反应板,加入杂交瘤细胞的培养上清进行ELISA筛选;对ELISA阳性的杂交瘤细胞进一步克隆至所有孔都为阳性。通过3次细胞克隆最终获得杂交瘤细胞株4E6。取高压灭菌的石蜡油0.5 mL,注射到小鼠腹腔,7 d后腹腔注入10⁶个杂交瘤细胞,一周后抽取腹水,并置37℃ 24 h后4℃过夜,然后离心腹水,取上清,即为抗VP2单抗;

3、VP2 IgG纯化:取单抗腹水5 mL,加入等体积pH7.2,10 mmol/L的PBS缓冲液,混匀后

缓慢加入10 mL饱和硫酸铵,边加边搅拌;混合物4℃放置30 min后,以3 000 rpm离心30 min。沉淀物以10 mL PBS溶解后,缓慢加入5 mL饱和硫酸铵,边加边搅拌,混合物4℃放置30 min后,3 000 rpm 离心30 min,重复两次。最后沉淀溶于4 mL PBS缓冲液中,4℃透析24 h,蔗糖浓缩后分装-80℃保存。提取的抗E种肠道病毒 VP1和VP2抗体以免疫荧光技术(IF)进行鉴定,如图4所示。

[0015] 实施例4 HRP标记抗VP2 IgG制备

应用郭春祥法对纯化的IgG进行HRP标记:将5 mg HRP溶于去离子H₂O,并与0.5 mL的0.1 M NaIO₄溶液混匀,4℃静置30 min。然后加入0.5 mL的0.16 M乙二醇溶液混匀、室温静置30 min后,加入纯化的IgG 1 mL(约10 mg),混匀后装入透析袋,以pH9.5的碳酸盐缓冲液4℃透析12~18 h。透析后所得溶液加入0.2 mL的5 mg/mL NaBH₄溶液,于4℃静置2 h。然后采用饱和硫酸铵沉淀法沉淀HRP标记的IgG,PBS 4℃透析24~48 h,蔗糖浓缩后,使用紫外分光光度计测定浓度,分装-80℃保存。

[0016] 实施例5双抗体夹心ELISA方法的建立

1、反应程序的建立

(1)双抗体夹心ELISA方法程序

以pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释纯化的抗VP1的IgG抗体,4℃包被过夜,每孔包被1 μg。以PBST(含0.05 % Tween-20的PBS,pH7.2)洗涤液洗板3次后,加入5 % 脱脂奶粉37℃封闭60 min。以PBST洗涤液洗涤3次后,加入1:5(W/V)预处理样品100 μl,37℃感作60 min,然后以洗涤液洗涤5次,加入HRP标记的二抗,每孔100 μL,37℃感作45 min。以同样方法洗涤后,加入OPD显色试剂,每孔100 μL。室温避光作用15 min后,加入2 mol/L H₂SO₄ 50 μL终止反应,测定OD₄₉₀值;

(2)HRP标记抗VP2 IgG的最佳孵育量确定

应用直接ELISA方法确定HRP标记抗VP2 IgG的最佳孵育量。用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释VP2抗原,每空包被0.1 μg,4℃过夜。以PBST(含0.05 % Tween-20的PBS,pH7.2)洗涤液洗板3次后,加入5 % 脱脂奶粉37℃封闭60 min。然后以PBST洗涤液洗涤3次,加入预稀释的HRP标记抗VP2 IgG(100×,200×,500×,1000×,2000×,3000×,3500×,4000×,4500×,5000×,5500×,6000×),37℃感作45 min。以PBST洗板3次后,加入OPD显色试剂,室温避光显色15 min,然后加入2 mol/L H₂SO₄ 50 μL终止反应,测定OD₄₉₀值。选择OD值在0.2左右且阳性OD值/阴性OD值(P/N)比值最大时的一抗和二抗稀释度为最佳工作浓度,最终确定最佳孵育量为3500倍稀释;

(3)捕获抗体最佳包被量的确定

应用双抗体夹心ELISA方法对捕获抗体最佳包被量进行确定。每孔加入以pH9.6的碳酸盐包被缓冲液稀释的100 μl的捕获抗体,稀释度分别为1 μg/mL,2 μg/mL,5 μg/mL,10 μg/mL,20 μg/mL,30 μg/mL,40 μg/mL,60 μg/mL,80 μg/mL 和100 μg/mL,按照前述操作方法进行试验,选择OD值在0.2左右且阳性OD值/阴性OD值(P/N)比值最大时的一抗稀释度为最佳工作浓度,最终捕获抗体最佳包被量为1 μg/孔;

(4)封闭液及作用时间的确定

应用确定的捕获抗体及酶标二抗的最适工作浓度进行双抗体夹心ELISA试验。分别以2 % 脱脂奶粉、5 % 脱脂奶粉、1 % BSA、2 % BSA 和5 % BSA于37℃分别封闭30 min、1 h和2

h.显色15 min后终止反应。测定各样本OD₄₉₀值,比较各组的OD₄₉₀值和P/N值。确定ELISA反应的最适封条件为1 % BSA 37°C封闭1 h;

(5)双抗体夹心ELISA灵敏性试验

判定标准的确定:取40份背景清晰经RT-PCR鉴定为BEV病原检测阴性的牛粪样品,按1:5(W/V)将样品以PBS稀释,3 000 rpm 离心15 min后,上清液用于双抗体夹心ELISA检测,确定OD₄₉₀值,以此40份样品的平均OD₄₉₀加上3倍标准差作为阴性与阳性样品的临界值,以此作为判定标准,即 $OD_{490} \geq OD_{490(\text{阴性})} + 3SD_{\text{阴性}} = 0.145$ 时样品为阳性;

灵敏性试验:另取56份未知样品按已建立的双抗体夹心ELISA方法进行试验,判定结果,并对该系列样品进行RT-PCR鉴定,两者试验结果一致,表明所建立的双抗体夹心ELISA方法具有很好的敏感性;

(6)双抗体夹心ELISA方法特异性试验

与BVDV、BPV、FMDV阳性样品进行双抗体夹心ELISA交叉试验检测,结果显示上述样品均为阴性,说明所建立的双抗体夹心ELISA方法与这些病毒无交叉反应,特异性较好;

表1 试剂盒特异性试验

表1 试剂盒特异性试验

检测样品	牛肠道病毒 (BEV)	口蹄疫病毒 (FMDV)	PBS	牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)	牛细小病毒 (BPV)
检测结果	+	-	-	-	-

(7)ELISA的重复性性试验

取4块不同批次包被的酶标板,每个稀释度设4个重复,在同一块酶标板上进行批内重复,不同的酶标板之间进行批间重复,测定OD值,计算其变异系数,如果变异系数< 5%则说明其重复性和稳定性好。4个不同批次的酶标板,结果一致,说明检测方法的重复性较好。

[0017] 实施例6双抗体夹心ELISA试剂盒组装

将建立好的夹心ELISA方法中所用到的试剂盒材料:96孔ELISA板(1)、样品稀释液(2)、20倍浓缩洗涤液(3)、HRP标记抗VP2 IgG(4)、终止液(5)、底物A(6)、底物B(7)、阳性样品(8)、阴性样品(9)分别用相应的广口瓶加以封装,贴上标签,组装成试剂盒,如图5所示。具体操作如下:

(1)96孔ELISA板:将VP1抗体以pH9.5的碳酸盐缓冲稀释包被反应板,每空包被1 μg,4 °C包被过夜,洗涤后,以1 % BSA的PBST溶液37°C封闭1 h,洗净后塑封;

(2)样品稀释液(PBST pH7.4):取NaCl8.0 g,KH₂PO₄ 0.2 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g, KCl0.2 g,加入到800 ml去离子水,加入加入0.5 mL Tween-20后,以去离子水补至1000 mL,50 mL分装备用;

(3)20倍浓缩洗涤液:取NaCl160.0 g,KH₂PO₄ 4 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 58 g,KCl4g,溶于去离子水中,加入10 mL Tween-20后,以去离子水补加至1000 mL,50 mL分装备用;

(4)HRP标记的抗VP2 IgG:将 HRP标记抗VP2 IgG按照1:3500稀释,无菌分装,每瓶10 mL;

(5)终止液:2 mol/L H₂SO₄ 取浓硫酸44.5 mL与355.5 mL去离子水混合后分装,每瓶5mL;

(6)底物A:取OPD 200 mg,加双蒸水至1000 mL,10 mL分装;

(7)底物B:0.1 mol/L柠檬酸,0.2 mol/L磷酸氢二钠,0.75 %过氧化氢6.4 mL,加三蒸水至1000 mL,调至pH5.0-5.43,10 mL分装;

(8)阳性对照样品:将确定为BEV阳性粪样,以样品稀释液按1:5稀释、离心,上清液经过灭活后,1 mL分装;

(9)阴性粪便样品:将经检测BEV阴性粪样1:5稀释于样品稀释液中,离心后取上清液,1 mL分装。

[0018] 实施例7双抗体夹心ELISA试剂盒的保质期的确定

将组装好的双抗体夹心ELISA试剂盒4℃放置一个月、两个月、四个月、半年和九个月测定其特异性和敏感性。结果该试剂盒4℃保存6个月后,检测效果与常规ELISA方法无明显差异,表明该试剂盒保质期至少6个月。

[0019] 实施例8

用人工合成其碱基序列如序列表SEQ ID NO.1所示的VP1基因、其碱基序列如序列表SEQ ID NO.3所示的VP2基因,构建原核表达重组质粒,分别表达的蛋白VP1、VP2(序列表SEQ ID NO2、4)、按上述方法制备抗体、组装的双抗体夹心ELISA试剂盒,其检测效果与PCR方法获得的基因制备的试剂盒相符。

Cys Asn Pro Ser Val Ile Ala Asp Thr Glu Gly Pro Pro Val Gln Phe
 100 105 110
 Ser Val Pro Phe Met Ser Thr Ala Asn Ala Tyr Ser Thr Val Tyr Asp
 115 120 125
 Gly Tyr Ala Arg Phe Met Asn Thr Asp Pro Asp Lys Tyr Gly Ile Leu
 130 135 140
 Pro Ser Asn Phe Leu Gly Leu Met Tyr Phe Arg Cys Leu Glu Asp Thr
 145 150 155 160
 His Thr Gln Met Arg Phe Arg Ile Tyr Ala Lys Ile Lys His Thr Gln
 165 170 175
 Cys Trp Ile Pro Arg Ala Pro Arg Gln Ala Pro Tyr Lys Lys Arg Tyr
 180 185 190
 His Leu Val Phe Gly Gly Pro Asn Phe Gln Asp Lys Ile Cys Ala Asp
 195 200 205
 Arg Ala Ser Leu Thr Ser Tyr
 210 215

<210> 3
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> 人工
 <400> 3

tctccgtcag cagaagcgtg tggatatagt gaccgggtgg ctcaactgac tttaggtaac 60
 agcactatca ctacgcagga ggctgcgaat atctgtgtgg cttacggaac gtggccttcc 120
 aagctcagtg acaccgacgc aacatcagtc gataaaccaa ccgaaccagg tgtgtcagcc 180
 gagcggttct acacactacg ctccaaagca tgggagtcaa caagcactgg ttggtattgg 240
 aagctgccgg atgcccttaa caacaccggg atgttcggac aaaatgcaca gttccactat 300
 atataccgtg gcggttgggc cgttcacgtt caatgcaatg ccacaaagtt ccaccagga 360
 accttgtag tggttgcaat accggaacac caaattgcga cacaggaaca accggacttc 420
 aacagaacaa tgcccgggtga ccagggggga acgttccaag aagcattctg gctagaggat 480
 gggactagtc taggaaatgc acttatttat ccacaccaat ggatcaatct caggaccaac 540
 aattctgcca ctctaatttt accatacgtg aatgetatte ccatggatte agcgatcaga 600
 cattcaaaact ggacattgga aataatccet attgetccac tcaaataatgc agcggaaacc 660
 accccgttgg tgccgataac tgtgacaatc gcaccaatgg agactgagta caacggttta 720
 aggcgggcta ttgcatca 738

<210> 4
 <211> 245

<212> PRT
 <213> 人工
 <400> 4

Ser Pro Ser Ala Glu Ala Cys Gly Tyr Ser Asp Arg Val Ala Gln Leu
 5 10 15
 Thr Leu Gly Asn Ser Thr Ile Thr Thr Gln Glu Ala Ala Asn Ile Cys
 20 25 30
 Val Ala Tyr Gly Thr Trp Pro Ser Lys Leu Ser Asp Thr Asp Ala Thr
 35 40 45
 Ser Val Asp Lys Pro Thr Glu Pro Gly Val Ser Ala Glu Arg Phe Tyr
 50 55 60
 Thr Leu Arg Ser Lys Ala Trp Glu Ser Thr Ser Thr Gly Trp Tyr Trp
 65 70 75 80
 Lys Leu Pro Asp Ala Leu Asn Asn Thr Gly Met Phe Gly Gln Asn Ala
 85 90 95
 Gln Phe His Tyr Ile Tyr Arg Gly Gly Trp Ala Val His Val Gln Cys
 100 105 110
 Asn Ala Thr Lys Phe His Gln Gly Thr Leu Leu Val Val Ala Ile Pro
 115 120 125
 Glu His Gln Ile Ala Thr Gln Glu Gln Pro Asp Phe Asn Arg Thr Met
 130 135 140
 Pro Gly Asp Gln Gly Gly Thr Phe Gln Glu Ala Phe Trp Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Thr Ser Leu Gly Asn Ala Leu Ile Tyr Pro His Gln Trp Ile Asn
 165 170 175
 Leu Arg Thr Asn Asn Ser Ala Thr Leu Ile Leu Pro Tyr Val Asn Ala
 180 185 190
 Ile Pro Met Asp Ser Ala Ile Arg His Ser Asn Trp Thr Leu Ala Ile
 195 200 205
 Ile Pro Ile Ala Pro Leu Lys Tyr Ala Ala Glu Thr Thr Pro Leu Val
 210 215 220
 Pro Ile Thr Val Thr Ile Ala Pro Met Glu Thr Glu Tyr Asn Gly Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Ala Ile Ala Ser
 245

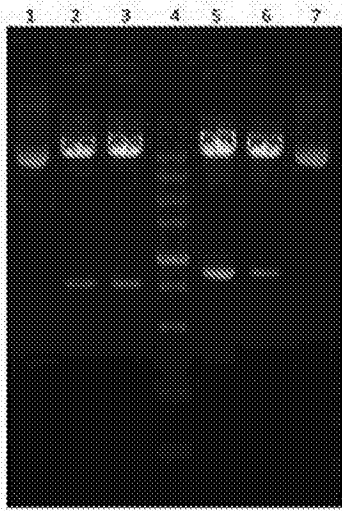


图1

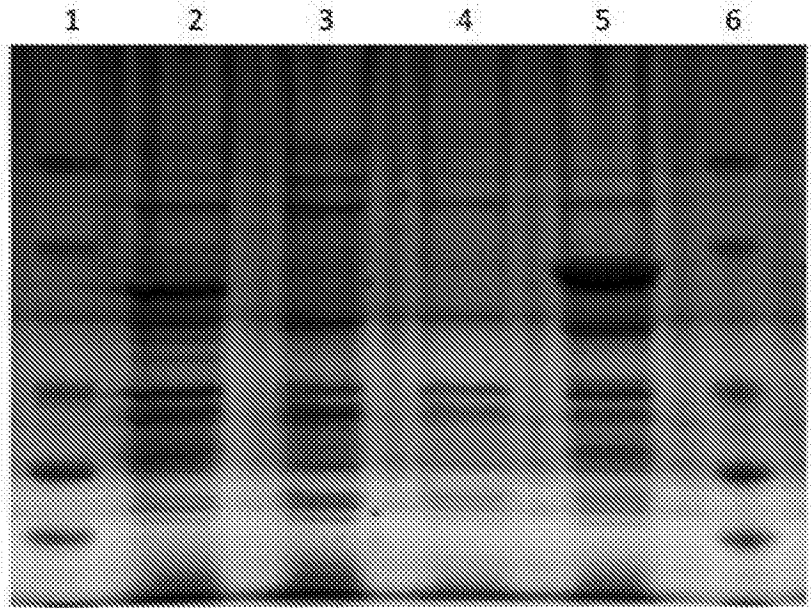


图2

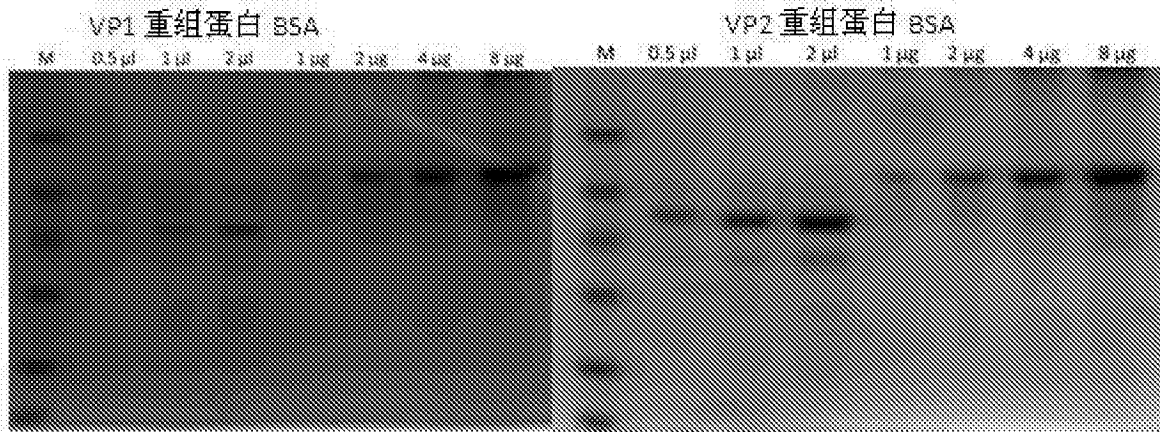


图3

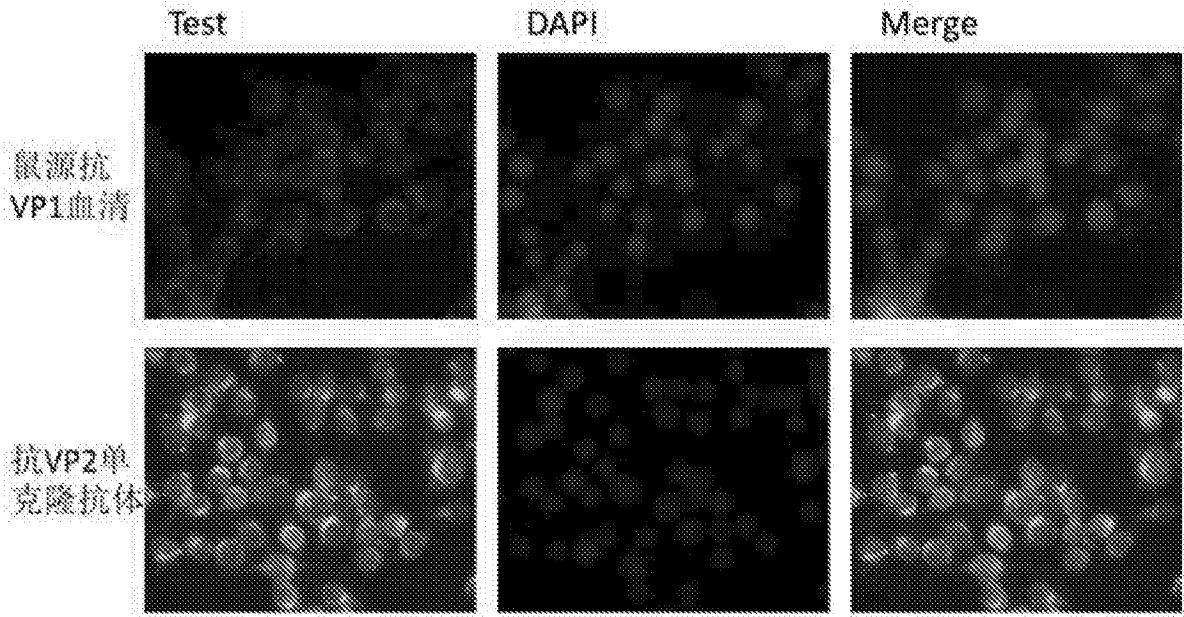


图4

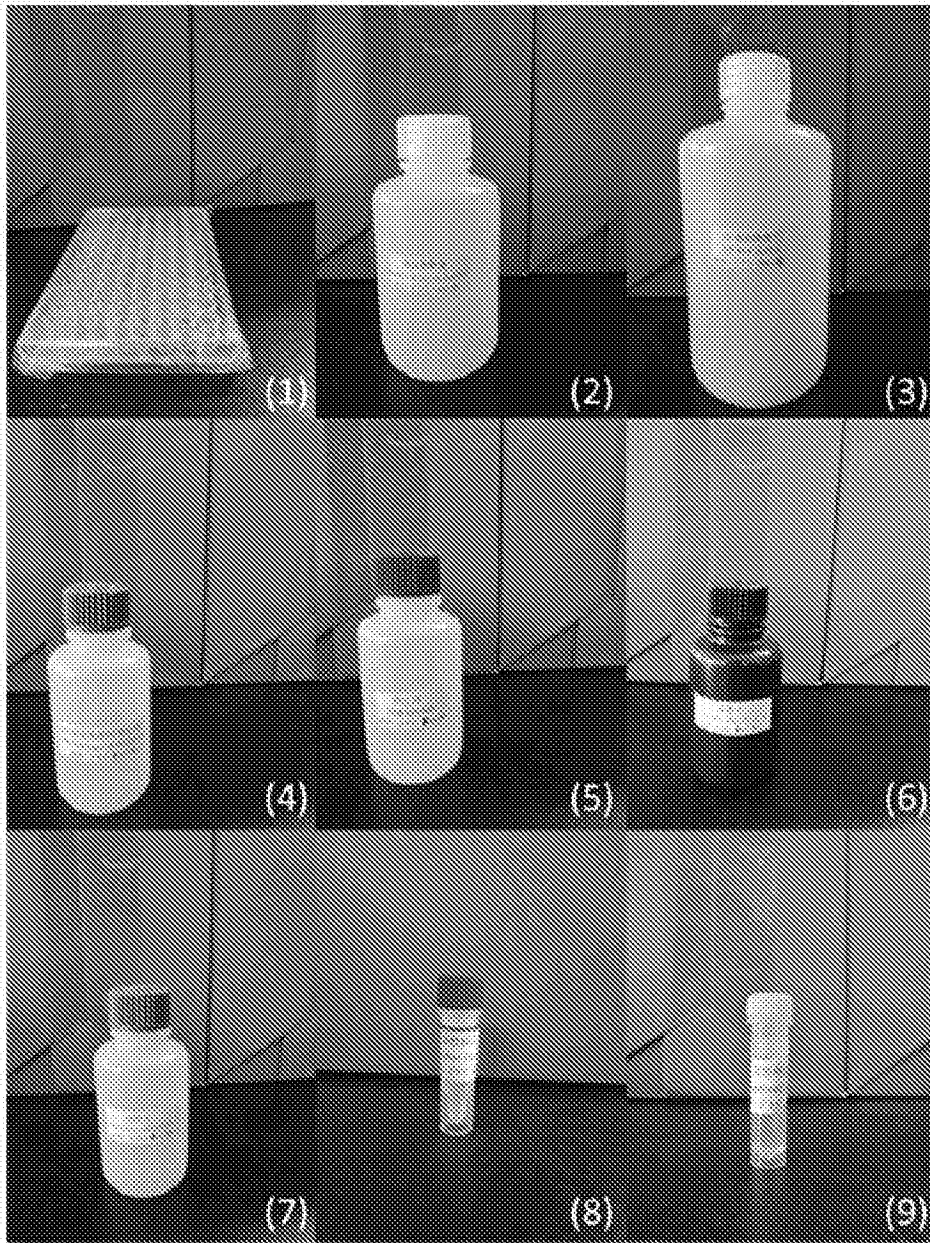


图5

专利名称(译)	检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN105542001A	公开(公告)日	2016-05-04
申请号	CN201610014199.2	申请日	2016-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	王新平 邢泽黎 朱利塞 郭昌明 盖小春 王明月 鲁海冰 曹玉峰 刘亚静 张群		
发明人	王新平 邢泽黎 朱利塞 郭昌明 盖小春 王明月 鲁海冰 曹玉峰 刘亚静 张群		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	C07K16/1009 G01N33/535 G01N33/56983 G01N2333/085		
代理人(译)	张铁生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了检测E种肠道病毒病原的双抗体夹心ELISA试剂盒，它采用其碱基序列如序列表SEQ? ID? NO.1所示的VP1基因，表达的VP1蛋白，免疫BALB/C小鼠后制备的多克隆抗体为捕获抗体，采用其碱基序列如序列表SEQ? ID? NO.3所示的VP2基因，表达的VP2蛋白，免疫BALB/C小鼠后制备的单克隆抗体，并标记了辣根过氧化物酶(HRP)。安全性、与RT-PCR检测结果具有100%符合率。试剂盒4℃保存6个月，检测结果与常规方法无明显差异。

