



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459160 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410839738. 7

(22) 申请日 2014. 12. 30

(71) 申请人 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司
地址 471003 河南省洛阳市高新区翠微路

(72) 发明人 田克恭 姬郭彪

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 陈伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表4页

(54) 发明名称

试剂盒及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒,其包括:酶标板、底物显色液、酶标二抗、终止液、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清;其中,所述酶标板包被有猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白包括猪繁殖与呼吸综合征 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白、GP5 蛋白中的至少两种蛋白的混合物。本发明还涉及该试剂盒的制备方法,以及该试剂盒的使用方法。

1. 一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒,其包括:酶标板、底物显色液、酶标二抗、终止液、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清;

其中,所述酶标板包被有猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白包括猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白、GP5 蛋白中的至少两种蛋白的混合物。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括洗涤液和/或样品稀释液;所述洗涤液优选含有磷酸盐缓冲液和/或 Tween-20,更优选为含有 pH4-10 的磷酸盐缓冲液和 Tween-20 的混合液,尤其优选为含有 pH6-8 的磷酸盐缓冲液和 Tween-20 的混合液,最优选为含有 pH7.4 的磷酸盐缓冲液和 Tween-20 的混合液;所述样品稀释液优选为含有牛血清白蛋白(BSA)、脱脂奶和犊牛血清中的任意一种或多种的磷酸盐缓冲液,更优选为含有 1% (M/V) 牛血清白蛋白、1% (M/V) 脱脂奶和 3% (V/V) 犊牛血清中的任意一种或多种的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白中的至少一种为分泌蛋白,优选地,所述 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白中的至少一种为分泌蛋白,更优选地,所述 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白均为分泌蛋白。

4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述 GP2 蛋白为氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的蛋白,和/或

所述 GP3 蛋白为氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示的蛋白,和/或

所述 GP4 蛋白为氨基酸序列如 SEQ ID No. 6 所示的蛋白,和/或

所述 GP5 蛋白为氨基酸序列如 SEQ ID No. 8 所示的蛋白。

5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白中含有 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白和 GP5 蛋白中的两种或多种,并且其中每种蛋白的含量均为 100-500ng。

6. 根据权利要求 1-5 中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述底物显色液包括底物显色液 A 和底物显色液 B,所述底物显色液 A 含有 3,3",5,5"-四甲基联苯胺、无水乙醇和 ddH₂O,所述底物显色液 B 含有柠檬酸、无水 Na₂HPO₄、0.75% (V/V) 的过氧化氢尿素以及 ddH₂O,优选地,所述底物显色液 A 含有 3,3",5,5"-四甲基联苯胺 20mg、无水乙醇 10ml 以及定容至 100ml 的 ddH₂O,所述底物显色液 B 含有柠檬酸 2.1g、无水 Na₂HPO₄ 2.82g、0.75% (V/V) 的过氧化氢尿素 0.64ml 以及定容至 100ml 的 ddH₂O;

并且所述终止液为 H₂SO₄ 溶液,优选为 2M 的 H₂SO₄ 溶液;

并且所述酶标二抗优选为兔抗猪酶标二抗。

7. 一种根据权利要求 1-6 中任意一项所述的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

1) 克隆表达所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白,定量,配制包被原,并包被酶标板,并对酶标板用封闭液进行封闭;

2) 制备或配制底物显色液、酶标二抗、终止液、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清和猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清,优选地还制备或配制洗涤液和/或样品稀释液;以及

3) 将步骤 1) 与步骤 2) 所制备的成分组装成试剂盒。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原

性蛋白为 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白和 GP5 蛋白中的两种或多种,其优选包括氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的 GP2 蛋白、氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示的 GP3 蛋白、氨基酸序列如 SEQ ID No. 6 所示的 GP4 蛋白以及氨基酸序列如 SEQ ID No. 8 所示的 GP5 蛋白中的两种或多种;

更优选地,所述克隆表达采用杆状病毒表达系统来表达所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的制备方法,其特征在于,所述步骤 1) 中封闭液为 1% (M/V) BSA 溶液、5% (M/V) 脱脂奶粉溶液、1.5% (M/V) 明胶溶液和 5% (V/V) 犊牛血清中的任意一种或多种;优选为 1% (M/V) BSA 溶液。

10. 一种根据权利要求 1-6 中任意一项所述的试剂盒或者根据权利要求 7-9 中任意一项所述的制备方法制得的试剂盒的使用方法,其包括如下步骤:

1) 用样品稀释液将被检血清进行稀释后,优选以 1:50 (V/V) 的比例进行稀释后,每一血清样品添加酶标板的两孔,每孔加入 100 μ l,同时设立猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清对照和阳性血清对照,各添加两孔;室温下作用 15-60min,弃去反应孔中的液体;将每个孔用 200 μ l 的洗涤液充分清洗 3-5 次,每次持续 1-5min,优选 4-5min,在每次洗涤后将反应孔中的液体除去,最后一次除去洗涤液后,除去残留的液体;

2) 用样品稀释液将酶标二抗按 1:200-1:1600 (V/V) 进行稀释,并将稀释后的酶标二抗加入酶标板,100 μ l/孔,室温下作用 45min,洗涤 3-5 次;

3) 每孔加入 100 μ l 底物显色液,室温下作用 10-30min;

4) 向每孔中加入 20-100 μ l 终止液终止反应,优选加入 50 μ l 终止液终止反应;

5) 在 450nm 波长下测定各孔吸光度 OD 值,根据判定标准对结果进行判定。

试剂盒及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,尤其涉及一种酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒。本发明还涉及该试剂盒的制备方法,以及该试剂盒的使用方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)引起的猪的一种急性、高度传染病毒性疾病,是目前引起猪场繁殖障碍的主要疫病之一。主要临床特征有怀孕母猪发生流产、早产和死胎等严重的繁殖障碍以及仔猪与育肥猪的呼吸道疾病。1987年,首先在美国发现,随后迅速传播到世界各地。我国于1996年在北京首次发现该病,并分离出国内第一株PRRSV毒株。2006年夏季我国南方多个省份爆发猪无名高热病,最后证明引发此次疫病爆发的最主要病原就是高致病性猪繁殖与呼吸综合征(HP-PRRSV)。根据病毒基因组核苷酸序列的差异,将其分为两个基因型:北美洲型和欧洲型。猪繁殖与呼吸综合征病毒属于动脉炎病毒属(Arterivirus),动脉炎病毒科(Arteriviridae),套式(又称“巢状”)病毒目(Nidovirales)。基因组为不分节段的单股正链RNA,包含5'非编码区、3'非编码区和至少8个不分首尾重叠开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)的蛋白编码区,即ORF1a、ORF1b、ORF2、ORF3、ORF4、ORF5、ORF6、ORF7。其中,ORF1a和ORF1b分别编码具有病毒复制酶和RNA聚合酶功能的两个多聚蛋白pp1a和pp1b,ORF2a、ORF2b、ORF3和ORF4分别编码GP2a、GP2b、GP3、GP4等小囊膜蛋白,ORF5、ORF6和ORF7分别编码病毒主要囊膜蛋白GP5、膜基质蛋白M和核衣壳蛋白N。目前,猪繁殖与呼吸综合征的诊断方法主要包括病毒的分离鉴定、血清学方法及分子生物学检测方法。其中,病毒的分离鉴定和分子生物学方法主要用于病原诊断,而血清学方法主要用于针对病原抗体诊断。血清学方法中的ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)方法又因其敏感性和特异性强、操作简单、检测快速等特点,被广泛用于动物疫病检测、流行病学调查、免疫抗体水平监测和疫苗免疫效力评价。市场上应用较为广泛的检测PRRSV抗体的ELISA试剂盒为IDEXX公司,但IDEXX公司的试剂盒主要应用于猪群早期感染PRRSV抗体诊断。因此,本领域亟需一种对于猪繁殖与呼吸综合征病毒效果更好的试剂盒。

发明内容

[0003] 为了解决上述现有技术中存在的问题,本发明提供了一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒,其包括:酶标板、底物显色液、酶标二抗、终止液、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清;其中,所述酶标板包被有猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白包括猪繁殖与呼吸综合征病毒GP2蛋白、GP3蛋白、GP4蛋白、GP5蛋白中的至少两种蛋白的混合物。

[0004] 术语“猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白”是指具有免疫原性的猪繁殖与呼吸

综合征病毒蛋白片段,包括但不限于猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP2 蛋白、猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP3 蛋白、猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP4 蛋白、猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白。术语“猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP2 蛋白”是猪繁殖与呼吸综合征病毒中的 GP2 蛋白的免疫原性片段,优选由 168 个氨基酸组成;术语“猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP3 蛋白”是猪繁殖与呼吸综合征 GP3 蛋白的免疫原性片段,优选由 155 个氨基酸组成;术语“猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP4 蛋白”是猪繁殖与呼吸综合征病毒中 GP4 蛋白的免疫原性片段,优选由 134 个氨基酸组成;术语“猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白”是猪繁殖与呼吸综合征病毒中 GP5 蛋白的免疫原性片段,优选由 169 个氨基酸组成(本发明的优选的情况可参加 Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. Arch Virol. 2000, 145:659-688)。

[0005] 与现有技术中只具有单一一种蛋白作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白的试剂盒相比,本发明的具有至少两种蛋白的混合物作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白的试剂盒的检测效果更好。这是由于:第一,目前对猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究还不充分,许多猪繁殖与呼吸综合征病毒的一些蛋白的功能还不完全确定,使用至少两种蛋白的混合物作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白能够避免由于研究不充分带来的检测结果不稳定或不灵敏的风险;第二,单一一种蛋白作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白的面比较窄,而使用至少两种蛋白的混合物作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白的面更宽;第三,由于猪繁殖与呼吸综合征病毒容易变异,使用至少两种蛋白的混合物作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白比使用单一一种蛋白作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白能够使得由于病毒变异带来的试剂盒失效的风险呈指数级别地减小。

[0006] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述试剂盒中还包括洗涤液和/或样品稀释液;所述洗涤液优选含有磷酸盐缓冲液和/或 Tween-20,更优选为含有 pH4-10 的磷酸盐缓冲液和 Tween-20 的混合液,尤其优选为含有 pH6-8 的磷酸盐缓冲液和 Tween-20 的混合液,最优选为含有 pH7.4 的磷酸盐缓冲液和 Tween-20 的混合液;所述样品稀释液优选为含有牛血清白蛋白(BSA)、脱脂奶和犊牛血清中的任意一种或多种的磷酸盐缓冲液,更优选为含有 1% (M/V) 牛血清白蛋白、1% (M/V) 脱脂奶和 3% (V/V) 犊牛血清中的任意一种或多种的磷酸盐缓冲液。

[0007] 术语“磷酸盐缓冲液”是指含有磷酸或其盐并被调至理想 pH 值的溶液,是生物化学研究中使用最为广泛的一种缓冲液。一般地,磷酸盐缓冲液是从磷酸或磷酸盐(包括但不限于钠和钾盐)制备的。本领域已经知道一些磷酸盐,例如磷酸二氢钠和磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和磷酸氢二钾、磷酸钠和磷酸钾。已经知道磷酸盐是以盐的水合物形式存在的。由于缓冲液的二级解离作用,缓冲的 pH 值范围很宽,例如约 pH4 至约 pH10 的范围,优选约 pH5 至 pH9 的范围,更有选约 pH6 至约 pH8 的范围,最优选约 pH7.4。进一步优选地,所述磷酸盐缓冲液为含氯化钠和氯化钾的磷酸盐缓冲液。

[0008] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白中的至少一种为分泌蛋白。在本发明的一个更加优选的实施方式中,所述 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白中的至少一种为分泌蛋白。在本发明的一个尤其更加优选的实施方式中,所述 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白均为分泌蛋白。与现有技术中未使用分泌蛋白作为猪繁殖与呼吸

综合征病毒抗原性蛋白的试剂盒相比,本发明的试剂盒中至少含有一种分泌蛋白作为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白,使得猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白更易溶于水,蛋白的结构更加稳定,检测结果更好。

[0009] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述 GP2 蛋白为氨基酸序列如 SEQ IDNo. 2 所示的蛋白。

[0010] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述 GP3 蛋白为氨基酸序列如 SEQ IDNo. 4 所示的蛋白。

[0011] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述 GP4 蛋白为氨基酸序列如 SEQ IDNo. 6 所示的蛋白。

[0012] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述 GP5 蛋白为氨基酸序列如 SEQ IDNo. 8 所示的蛋白。

[0013] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白为含有 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白和 GP5 蛋白中的两种或多种,并且其中每种蛋白的含量均为 100-500ng。

[0014] 在本发明的一个优选实施方式中,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白中 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白和 GP5 蛋白中至少两种蛋白可以串联表达。

[0015] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述底物显色液包括底物显色液 A 和底物显色液 B,所述底物显色液 A 含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺、无水乙醇和 ddH₂O,所述底物显色液 B 含有柠檬酸、无水 Na₂HPO₄、0.75% (V/V) 的过氧化氢尿素以及 ddH₂O,优选地,所述底物显色液 A 含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 20mg、无水乙醇 10ml 以及定容至 100ml 的 ddH₂O,所述底物显色液 B 含有柠檬酸 2.1g、无水 Na₂HPO₄ 2.82g、0.75% (V/V) 的过氧化氢尿素 0.64ml 以及定容至 100ml 的 ddH₂O;

[0016] 并且所述终止液为 H₂SO₄ 溶液,优选为 2M 的 H₂SO₄ 溶液;

[0017] 并且所述酶标二抗优选为兔抗猪酶标二抗。

[0018] 本发明进一步提供了上述的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0019] 1) 克隆表达所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白,定量,配制包被原,并包被酶标板,并对酶标板用封闭液进行封闭;

[0020] 2) 制备或配制底物显色液、酶标二抗、终止液、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清和猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清,优选地还制备或配制洗涤液和 / 或样品稀释液;以及

[0021] 3) 将步骤 1) 与步骤 2) 所制备的成分组装成试剂盒。

[0022] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白为 GP2 蛋白、GP3 蛋白、GP4 蛋白和 GP5 蛋白中的两种或多种,其优选包括氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的 GP2 蛋白、氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示的 GP3 蛋白、氨基酸序列如 SEQ ID No. 6 所示的 GP4 蛋白以及氨基酸序列如 SEQ IDNo. 8 所示的 GP5 蛋白中的两种或多种。

[0023] 在本发明的一个还更加优选的实施方式中,所述克隆表达采用杆状病毒表达系统来表达所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白。

[0024] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述步骤 1) 中封闭液为 1% (M/V) BSA 溶液、5% (M/V) 脱脂奶粉溶液、1.5% (M/V) 明胶溶液和 5% (V/V) 犊牛血清 (FCS) 中的任意一种

或多种；优选为 1% (M/V) BSA 溶液。

[0025] 本发明还提供了一种上述试剂盒的使用方法，其包括如下步骤：

[0026] 1) 用样品稀释液将被检血清进行稀释后，优选以 1:50 (V/V) 的比例进行稀释后，每一血清样品添加酶标板的两孔，每孔加入 100 μ l，同时设立猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清对照和阳性血清对照，各添加两孔；室温下作用 15-60min，弃去反应孔中的液体；将每个孔用 200 μ l 的洗涤液充分清洗 3-5 次，每次持续 1-5min，优选 4-5min，在每次洗涤后将反应孔中的液体除去，最后一次除去洗涤液后，除去残留的液体；

[0027] 2) 用样品稀释液将酶标二抗按 1:200-1:1600 (V/V) 进行稀释，并将稀释后的酶标二抗加入酶标板，100 μ l/孔，室温下作用 45min，洗涤 3-5 次；

[0028] 3) 每孔加入 100 μ l 底物显色液，室温下作用 10-30min；

[0029] 4) 向每孔中加入 20-100 μ l 终止液终止反应，优选加入 50 μ l 终止液终止反应；

[0030] 5) 在 450nm 波长下测定各孔吸光度 OD 值，根据判定标准对结果进行判定。

[0031] 本发明的有益效果在于：

[0032] 1. 能够灵敏、有效、稳定、可靠地检测猪繁殖与呼吸综合征抗体，检测效果好，尤其是在猪繁殖与呼吸综合征病毒存在一定变异的情况下；

[0033] 2. 本发明的试剂盒中的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白更易溶于水，结构更加稳定，更易于保存，检测结果更灵敏、稳定；

[0034] 3. 成本较为低廉。

具体实施方式

[0035] 以下结合具体的非限制性实施例来对本发明进行进一步的说明，本发明的优点和特点将会随着进一步的描述更加清楚。但这些实施例仅是示例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下，可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0036] 本发明的某些实施例中所用的碳酸盐缓冲液，pH 值为 9.6，其 1L 体积配方为： Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g，但该实施方式无论在任何情况下均不构成对本发明的限定。

[0037] 在本发明的某些实施方式（如在下列实施例）中所用的化学试剂均为分析纯，购自国药集团。

[0038] 本实例中所用的猪繁殖与呼吸综合征抗体 ELISA 试剂盒检测方法的判定标准为：

[0039]

$$S/P = \frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{阴性血清}}}{OD_{\text{阳性血清}} - OD_{\text{阴性血清}}}$$

[0040] （其中，OD 值表示在 450nm 时酶标仪测定的吸光度值）

[0041] 当 $OD_{\text{阳性血清}} - OD_{\text{阴性血清}} > 0.15$ ， $OD_{\text{阴性血清}} < 0.20$ 时结果成立；

[0042] 当血清样品的 S/P 值 ≥ 0.40 时为阳性，当 S/P 值 < 0.40 时为阴性。

[0043] 为使本发明更加容易理解，下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于本发明而不用于限制本发明的范围。本发明实施例中所述的实验方法，若无特殊说明，均为常规方法；所述的生物材料，若无特殊说明，均可从商业途径获得。

[0044] 实施例 1 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP2 蛋白的制备、纯化及定量

[0045] 1. 1GP2 蛋白引物设计

[0046] 根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中报道的猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株 (登录号为 AF066183) 中 GP2 蛋白的基因序列 (见序列表 SEQ ID No. 1) 设计一对特异性引物, 引物序列如下:

[0047] GP2-F: 5' TCACCATCGCCGTTGG3'

[0048] GP2-R: 5' TTGCTGAAAATCATGAAGCTTTG3'

[0049] 1. 2GP2 蛋白基因克隆载体构建

[0050] 1. 2. 1PCR 扩增: 按核酸提取试剂盒操作步骤提取 VR-2332 疫苗株基因组做模板, 扩增 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 扩增 GP2 基因片段。反应体系 50 μ l: 5 \times PrimeSTAR PCR buffer: (Mg²⁺Plus) 10 μ l, dNTP (each 2.5mM) 4 μ l, 上游引物 (20 μ mol/L): 1 μ l, 下游引物 (20 μ mol/L): 1 μ l, 模板: 1 μ l, ddH₂O: 32 μ l, PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 (2.5U/ μ l): 1 μ l。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 40S, 55 $^{\circ}$ C 50S, 72 $^{\circ}$ C 30S, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应结束后用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 反应产物, 条带大小为 501bp。

[0051] 1. 2. 2 胶回收: 按天根胶回收试剂盒的使用说明, 胶回收纯化上述酶切片段。

[0052] 1. 2. 3 连接反应: 将 PCR 产物 GP2 胶回收后, 连接体系如下:

[0053] PCR 胶回收产物 4 μ l, Salt Solution 1 μ l, pFastBacTM TOPO[®] vector 1 μ l 轻柔混合后, 22 $^{\circ}$ C 金属浴连接 30min。

[0054] 1. 2. 4 转化 One Shot[®] MachTM T1R 感受态细胞: 按照 Bac To Bac TOPO Cloning Kit 说明书进行, 具体操作如下: 将要转化的连接产物 6 μ l 加入到 100 μ l One Shot[®] Mach1TM T1R 感受态细胞的离心管中, 轻柔混匀, 冰浴 30min; 将离心管放入 42 $^{\circ}$ C 水浴中, 热激 90s, 忌晃动; 快速将管转移到冰浴中, 冷却 2-3min; 在离心管中加入 250 μ l SOC 培养基 (恢复室温), 然后将管转移到 37 $^{\circ}$ C 摇床上 225rpm 水平震荡培养 1h; 无菌条件下, 将 25-100 μ l 的已转化的感受态细胞涂布到含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 平板上 (可以涂两种不同体积以保证至少有一个有足够的空间长的好); 将平板倒置放入 37 $^{\circ}$ C 温箱过夜培养 (12-16h)。

[0055] 1. 2. 5 阳性克隆鉴定: 从上述平板上挑选至少 10 个菌落, 在含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养, 先用菌液 PCR 方法鉴定, 然后再按照质粒小提试剂盒 (天根) 说明书对阳性菌液提取质粒, 用 PCR 方法对插入目的片段进行方向鉴定。反应体系为 50 μ l: 10 \times LA Taq Buffer 5.0 μ l, 质粒 1.0 μ l, Polyhedrin forward primer (为 Bac to bac HBM TOPO Cloning Kit 中自带) 1.0 μ l, GP2 基因下游引物 1.0 μ l, LA Taq Polymerase 0.5 μ l, dNTP Mixture 4.0 μ l, ddH₂O 37.5 μ l。反应条件同 1.2.1。所得 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。目的片段为 700bp, 鉴定为阳性的 pFastBac/HBM-GP2 质粒送测序公司测序再次鉴定无核苷酸或氨基酸突变。

[0056] 1. 3 重组 Bacmid 质粒构建

[0057] 1. 3. 1 转化 DH10BacTM 感受态细胞: 将重组 pFastBac/HBM-GP2 质粒 5 μ l 加入 100 μ l DH10BacTM 感受态细胞中, 轻柔混合, 冰上孵育 30min; 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90s; 迅速将离心管放置冰上 2-3min; 每管加入 900 μ l 的 SOC 培养基 (恢复室温); 含 pFastBac/HBM-GP2 质粒的离心管在 37 $^{\circ}$ C, 225rpm 的摇床中培养 4h; 用 SOC 培养基将培养的感受态细胞进行 10 倍稀释 (10⁻¹), 然后分别取原液和 10 倍稀释后的菌液各 100 μ l, 在含 50 μ g/mL 卡那霉素、

7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素以及 100 μ g/mL X-gal 和 40 μ g/mL IPTG 的 LB 平板上涂布；将所有平板在 37°C 温箱中正置 30min 使表面液体完全吸收，然后倒置培养 48h。

[0058] 1.3.2 阳性克隆的筛选：挑取 2 个白色菌落，重新划线接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素以及 100 μ g/mL X-gal 和 40 μ g/mL IPTG 的新的 LB 平板上，在 37°C 温箱中过夜培养；挑取单个的、白色的克隆在含 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素的液体 LB 培养基中，37°C 摇床，250rpm 培养 12-16h。

[0059] 1.3.3 重组 Bacmid 质粒鉴定：先用菌液 PCR 对重组 Bacmid 质粒进行鉴定，然后根据 PureLink™ HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit 试剂盒说明书从鉴定为阳性的菌液中提取重组转座子 DNA，以质粒 DNA 为模板再次进行 PCR 鉴定。反应体系如下：10 \times LA Taq Buffer 5.0 μ l，菌液 / 质粒 1.0 μ l，pUC/M13 上游引物 1.0 μ l，pUC/M13 下游引物 1.0 μ l，LA Taq Polymerase 0.5 μ l，dNTP Mixture 4.0 μ l，ddH₂O 37.5 μ l。反应条件 94°C 5min；94°C 45s，55°C 45s，72°C 3min，30 个循环后；72°C 7min。所得 DNA 产物在 0.8-1.0% 琼脂糖凝胶电泳中鉴定。目的条带大小约为 3200bp。阳性重组质粒即为 Bacmid-GP2 质粒。

[0060] 1.4 拯救并扩大培养重组杆状病毒

[0061] 1.4.1 拯救重组杆状病毒：取处于对数期的 sf9 细胞 ($1.5 \times 10^6 - 2.5 \times 10^6$ cells/mL，细胞活性在 95% 以上)，铺一个 6 孔板，每孔加入 2mL SF-900 培养基（不含抗生素和血清），每孔含 8×10^5 cell，室温吸附至少 1h。将 A：8 μ l Cellfectin® II（用之前 4°C 保存）和 100 μ l SF-900，混匀，室温放置 30min；B：10 μ l (1 μ g) Bacmid-GP2+100 μ l SF-900，轻柔混匀；再轻柔混匀 A 和 B，总体积约 210 μ l，室温孵育 15-30min；将混合物滴加到六孔板中，在 27°C 培养箱中孵育 3-5h；移去培养液与转染混合物，再加 2mL 新的 SF-900 培养基；27°C 培养箱培养 72h 或看到病毒感染信号后，将上清收获至 EP 管中，为 P1 病毒株，4°C 避光保存。

[0062] 1.4.2 重组杆状病毒扩大培养：按 0.1MOI 进行 P2 和 P3 代毒株的培养。收获的病毒液上清 4°C 避光保存。其中 P3 代毒株用来进行蛋白表达。

[0063] 1.4.3 将 Sf9 细胞放大至 250mL 摇瓶悬浮培养，以 5MOI 的感染剂量接种细胞，96h 收获培养液，5000g 离心 10min，收集细胞上清，用于纯化。另在离心前取出少量上清用于 GP2 蛋白的 Western blot 鉴定。分别以 His 单抗和 PRRSV 高免血清为一抗，再分别以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗鼠和抗猪二抗孵育，结果在约 25kDa 处出现目的条带。

[0064] 1.5 GP2 蛋白的纯化、定量

[0065] 按 GE 公司 His 纯化试剂盒说明书进行。将蛋白纯化后，纯化样品在 pH7.4 的 1 \times PBS 磷酸盐缓冲液中透析过夜。透析后样品按照碧云天 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行定量。结果表明：GP2 蛋白的浓度为 150 μ g/ml。

[0066] 实施例 2 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP3、GP4、GP5 蛋白的制备、纯化及定量

[0067] 2.1 GP3 蛋白

[0068] 根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中报道的猪繁殖与呼吸综合征病毒株 VR2332 疫苗株（登录号为 AF066183）中 GP3 蛋白的基因序列（见序列表 SEQ ID No. 3）设计一对特异性引物，引物序列如下：

[0069] GP3-F: 5' TCCAATACTACGTACTGTTTTGG3'

[0070] GP3-R: 5' TTCTAGGTGAAACCAATTGCC3'

[0071] 按核酸提取试剂盒操作步骤提取猪呼吸与繁殖综合征病毒 VR-2332 疫苗株基因

组做模板,按照实施例 1.2-1.5 部分依次制备、纯化、定量 GP3 蛋白结果表明:GP3 蛋白的浓度为 256 μ g/ml。

[0072] 2.2GP4 蛋白

[0073] 根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中报道的猪繁殖与呼吸综合征病毒株 VR2332 疫苗株 (登录号为 AF066183) 中 GP4 蛋白的基因序列 (见序列表 SEQ ID No. 5) 设计一对特异性引物,引物序列如下:

[0074] GP4-F:5' GCCTGCAAACCATGTTTCAGTT3'

[0075] GP4-R:5' ATGGAGCAACCGCACATGG3'

[0076] 按核酸提取试剂盒操作步骤提取猪呼吸与繁殖综合征病毒 VR-2332 疫苗株基因组做模板,按照实施例 1.2-1.5 部分依次制备、纯化、定量 GP4 蛋白,结果表明:GP4 蛋白的浓度为 250 μ g/ml。

[0077] 2.3GP5 蛋白

[0078] 根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中报道的猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR2332 疫苗株 (登录号为 AF066183) 中 GP5 蛋白的基因序列 (见序列表 SEQ ID No. 7) 设计一对特异性引物,引物序列如下:

[0079] GP5-F:5' CGCGGATCCGCGAGCAACGACAGCAGCTCCC3'

[0080] GP5-R:5' CCGCTCGAGCGGAGGACGACCCCATTTGTTCC3'

[0081] PCR 扩增 GP5 基因后,胶回收目的片段后,用 BamH I 和 Xho I 分别双酶切胶回收产物和 pFastBacTM HT A 载体,37 $^{\circ}$ C 反应 3h,胶回收酶切片段,将回收 GP5 连接到 pFastBacTMHT A 载体上。酶切体系:10 \times Buffer 2 μ L, ddH₂O12 μ L, DNA 5 μ L, BamH I 0.5 μ L, Xho I 0.5 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 30min。连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞。挑取单克隆进行扩大培养后进行 PCR 鉴定和测序鉴定,鉴定为阳性的质粒为 pFastBac HT-GP5。

[0082] 重组 Bacmid-GP5 质粒构建、重组杆状病毒 rAcV-GP5 的拯救及扩增和 GP5 蛋白的表达、纯化、定量操作方法依次参照实施例 1.3-1.5 进行操作。在纯化 GP5 蛋白用的是细胞裂解上清;蛋白纯化后,纯化样品在 1 \times PBS (pH7.4) 中透析过夜;透析后样品按照碧云天 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行定量,结果表明:GP5 蛋白的浓度为 320 μ g/ml。

[0083] 实施例 3 用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒的制备

[0084] 3.1 包被原的制备、酶标板的包被与封闭

[0085] 用 pH9.6 碳酸盐缓冲液将实施例 1-2 所制备的猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP2、GP3、GP4、GP5 蛋白按表 1 所示各包被原编号所对应的成分进行配制。

[0086] 表 1 试剂盒及对比盒编号和其对应包被原编号及其成分

[0087]

试剂盒 编号	包被原 编号	包被原所含成分 (ng)			
		GP2 蛋白	GP3 蛋白	GP4 蛋白	GP5 蛋白
试剂盒 1	包被原 1	100	128	0	0
试剂盒 2	包被原 2	0	128	200	0
试剂盒 3	包被原 3	0	0	200	160
试剂盒 4	包被原 4	100	0	0	160
试剂盒 5	包被原 5	0	128	0	160
试剂盒 6	包被原 6	100	128	200	0
试剂盒 7	包被原 7	0	128	200	160
试剂盒 8	包被原 8	100	0	200	160
试剂盒 9	包被原 9	100	128	0	160
试剂盒 10	包被原 10	100	128	200	160
对比盒 1	对比原 1	100	0	0	0
对比盒 2	对比原 2	0	128	0	0

[0088]

对比盒 3	对比原 3	0	0	200	0
对比盒 4	对比原 4	0	0	0	160

[0089] 将表 1 所示的包被原 1-10 及对比原 1-4 分别用 pH9.6 的碳酸盐溶液稀释后包被于 96 孔 Costar 高吸附型酶标板上, 100 μ l/孔, 于 4 $^{\circ}$ C 保存过夜。之后用 1% BSA 溶液进行封闭, 于 4 $^{\circ}$ C 保存 1h。

[0090] 3.2 其它组分的制备

[0091] 样品稀释液: pH7.4 的磷酸盐缓冲液中含有 0.05% (V/V) Tween-20 和 10% (M/V) 脱脂奶, 混合均匀。

[0092] 洗涤液: pH7.4 的磷酸盐缓冲液中含有 0.05% (V/V) Tween-20, 混合均匀。

[0093] 底物显色液 A 液: 含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 20mg、无水乙醇 10ml, 然后用 ddH₂O 定容至 100ml。

[0094] 底物显色液 B: 含有柠檬酸 2.1g、无水 Na₂HPO₄ 2.82g、0.75% (V/V) 的过氧化氢尿素 0.64ml, 然后用 ddH₂O 定容至 100ml。

[0095] 终止液: 配制 2M H₂SO₄。

[0096] 酶标二抗: 购自中国军事医学科学院的兔抗猪酶标二抗。

[0097] 猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清包括 PRRSV 经典美洲株阳性血清、PRRSV 经典欧洲株阳性血清、PRRSV 变异株阳性血清, 其中, PRRSV 经典美洲株阳性血清为选择 PRRSV 抗原、抗体均为阴性的健康易感猪, 肌肉注射 PRRSVVR2332 疫苗株而制备得到的阳性血清; PRRSV 经典欧洲株阳性血清为选择 PRRSV 抗原、抗体均为阴性的健康易感猪, 肌肉注射 PRRSV LV 疫苗株而制备得到的阳性血清; PRRSV 变异株阳性血清为选择 PRRSV 抗原、抗体均为阴性的健康易感猪, 肌肉注射 PRRSV JXA1-R 株而制备得到的阳性血清。

[0098] 猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清: 采集 PRRSV 抗原、抗体均为阴性的健康易感猪的血清。

[0099] 3.3 试剂盒的组装

[0100] 将实施例 3.1-3.2 部分制备的试剂及材料组装成猪繁殖与呼吸综合征抗体试

剂盒及对比盒,按包被原的不同组装成不同的试剂盒,编号依次为试剂盒 1-10 及对比盒 1-4(见表 1)。

[0101] 实施例 4 用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒的使用方法

[0102] 用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒的使用方法包括以下步骤:

[0103] (1) 加入血清样品:用样品稀释液将待检血清、阳性血清和阴性血清作 1:50 倍 (V/V) 稀释,按酶标板样品添加模式于每孔中加入 100 μ l,每个样品重复一次,于室温下作用 45min 后弃去反应空中液体,每孔用 200 μ l 的洗涤液清洗 3-5 次,每次 3min;

[0104] (2) 加入兔抗猪酶标二抗:每孔加入 100 μ l 用样品稀释液按 1:800 倍 (V/V) 稀释的兔抗猪酶标二抗,室温作用 40min,洗涤 3-5 次;

[0105] (3) 每孔中加入 100 μ l 底物显色液,室温下避光作用 15min;

[0106] (4) 每孔中加入 50 μ l 2M H_2SO_4 终止液终止反应;

[0107] (5) 用酶标仪测定 OD 值:在 450nm 波长下测定各孔的 OD 值,根据判定标准对结果进行判定。

[0108] 实施例 5 用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒的特性的研究

[0109] 5.1 三种不同阳性血清的检测

[0110] 将实施例 3 制备的三种阳性血清即 PRRSV 经典美洲株阳性血清、PRRSV 经典欧洲株阳性血清、PRRSV 变异株阳性血清分别用稀释液进行 1:50 (V/V) 稀释,按照实施例 4 所建立的方法进行检测,检测结果见表 2。

[0111] 表 2 不同阳性血清的检测结果

[0112]

试剂盒	不同阳性血清 1:50 (V/V) 所对应的 OD ₄₅₀ 值		
	经典美洲株	经典欧洲株	变异株
试剂盒1	1.458	1.456	1.461
试剂盒2	1.460	1.455	1.460
试剂盒3	1.466	1.457	1.462
试剂盒4	1.468	1.460	1.465
试剂盒5	1.472	1.461	1.468
试剂盒6	1.480	1.463	1.469
试剂盒7	1.481	1.462	1.470
试剂盒8	1.490	1.465	1.470
试剂盒9	1.495	1.467	1.471
试剂盒10	1.498	1.470	1.472

[0113] $OD_{\text{阴性血清}} = 0.125$

[0114] 由表 2 结果可知:用试剂盒 1-10 检测三种不同的阳性血清时,检测结果均为阳性。

[0115] 以下以 PRRSV 变异株阳性血清作为本发明的试剂盒中的猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清来对酶联免疫吸附测定试剂盒的特性进行研究。

[0116] 5.2 敏感性试验

[0117] 将猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清做 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1660、1:3200、1:6400 (V/V) 8 个稀释度,同时设猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清对照。

按照实施例 4 所述的方法用实施例 3 制备的猪繁殖与呼吸综合征抗体 ELISA 试剂盒 1-10 与对比盒 1-4 分别进行检测,测定结果见表 3。

[0118] 表 3 用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒的灵敏度试验结果

[0119]

试剂盒	阳性血清不同稀释度 (V/V) 所对应的OD ₄₅₀ 值							
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
试剂盒1	1.458	1.231	1.102	0.925	0.756	0.463	0.325	0.176
试剂盒2	1.563	1.302	1.136	0.953	0.723	0.521	0.336	0.189
试剂盒3	1.516	1.312	1.063	0.889	0.701	0.523	0.298	0.176
试剂盒4	1.503	1.297	1.103	0.913	0.744	0.526	0.329	0.175
试剂盒5	1.612	1.463	1.256	1.023	0.846	0.618	0.396	0.181
试剂盒6	1.462	1.258	1.012	0.856	0.636	0.489	0.279	0.163
试剂盒7	1.623	1.458	1.289	1.058	0.799	0.562	0.356	0.185
试剂盒8	1.523	1.359	1.120	0.862	0.617	0.405	0.256	0.168
试剂盒9	1.463	1.212	1.053	0.819	0.601	0.426	0.285	0.161
试剂盒10	1.625	1.491	1.268	1.087	0.863	0.599	0.398	0.200
对比盒1	1.129	1.009	0.892	0.652	0.423	0.297	0.103	0.076
对比盒2	1.152	0.997	0.867	0.621	0.398	0.278	0.111	0.069
对比盒3	1.128	0.981	0.854	0.612	0.389	0.257	0.099	0.068
对比盒4	1.139	0.972	0.861	0.598	0.401	0.271	0.094	0.059

[0120] OD_{阴性血清} = 0.127

[0121] 由表 4 可知:依据判定标准,当猪繁殖与呼吸综合征病毒株阳性血清稀释到 1:3200 (V/V) 时,试剂盒 1-10 的检出结果仍为阳性,且远远高于对比盒 1-4,表明试剂盒 1-10 的灵敏度较高,以及包被的抗原性蛋白至少含 2 种免疫原性蛋白的检测效果优于包被单一免疫原性的蛋白,且具备一定的协同作用。

[0122] 5.3 特异性试验

[0123] 在同一条件下,用实施例 3 制备的用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒 1-10,分别对猪圆环病毒 2 型阳性血清、猪细小病毒阳性血清、猪瘟阳性血清、猪传染性乙型脑炎阳性血清、猪伪狂犬病阳性血清进行 ELISA 检测,每份血清重复检测 2 孔。通过 OD 值判定阴阳性结果。在两次重复实验中,试剂盒 1-10 检测结果(见表 4)均显示为阴性,表明试剂盒 1-10 特异性较好。

[0124] 表 4 用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒的特异性试验结果

[0125]

所用阳性血清	所用试剂盒	OD1 孔值	OD2 孔值	所用试剂盒	OD1 孔值	OD2 孔值
猪圆环病毒 2 型阳性血清	试剂盒 1	0.041	0.036	试剂盒 11	0.041	0.039
	试剂盒 2	0.089	0.081	试剂盒 12	0.091	0.083
	试剂盒 3	0.072	0.065	试剂盒 13	0.073	0.065
	试剂盒 4	0.088	0.091	试剂盒 14	0.089	0.092
	试剂盒 5	0.072	0.061	试剂盒 15	0.068	0.059
	试剂盒 6	0.082	0.075	试剂盒 16	0.081	0.075
	试剂盒 7	0.078	0.082	试剂盒 17	0.077	0.083
	试剂盒 8	0.083	0.076	试剂盒 18	0.082	0.076
	试剂盒 9	0.044	0.039	试剂盒 19	0.079	0.067
	试剂盒 10	0.038	0.032	试剂盒 20	0.081	0.076
猪细小病毒阳性血清	试剂盒 1	0.091	0.085	试剂盒 11	0.079	0.082
	试剂盒 2	0.075	0.067	试剂盒 12	0.073	0.065
	试剂盒 3	0.083	0.079	试剂盒 13	0.084	0.079
	试剂盒 4	0.062	0.069	试剂盒 14	0.062	0.069
	试剂盒 5	0.063	0.072	试剂盒 15	0.061	0.072
	试剂盒 6	0.076	0.072	试剂盒 16	0.076	0.079
	试剂盒 7	0.071	0.069	试剂盒 17	0.075	0.069
	试剂盒 8	0.072	0.065	试剂盒 18	0.072	0.063
	试剂盒 9	0.073	0.069	试剂盒 19	0.061	0.049
	试剂盒 10	0.055	0.057	试剂盒 20	0.072	0.069
猪瘟阳性血清	试剂盒 1	0.052	0.061	试剂盒 11	0.052	0.049
	试剂盒 2	0.095	0.096	试剂盒 12	0.087	0.092
	试剂盒 3	0.078	0.083	试剂盒 13	0.078	0.079
	试剂盒 4	0.077	0.068	试剂盒 14	0.072	0.068
	试剂盒 5	0.075	0.069	试剂盒 15	0.071	0.069
	试剂盒 6	0.079	0.068	试剂盒 16	0.075	0.068
	试剂盒 7	0.081	0.069	试剂盒 17	0.073	0.069
	试剂盒 8	0.071	0.068	试剂盒 18	0.072	0.068
	试剂盒 9	0.081	0.076	试剂盒 19	0.065	0.059
	试剂盒 10	0.081	0.069	试剂盒 20	0.049	0.047
猪传染性乙型脑炎阳性血清	试剂盒 1	0.058	0.054	试剂盒 11	0.062	0.056
	试剂盒 2	0.049	0.053	试剂盒 12	0.053	0.049
	试剂盒 3	0.073	0.081	试剂盒 13	0.083	0.079
	试剂盒 4	0.052	0.049	试剂盒 14	0.052	0.049
	试剂盒 5	0.054	0.059	试剂盒 15	0.057	0.061
	试剂盒 6	0.058	0.067	试剂盒 16	0.072	0.067
	试剂盒 7	0.055	0.059	试剂盒 17	0.061	0.059
	试剂盒 8	0.063	0.058	试剂盒 18	0.063	0.058
	试剂盒 9	0.059	0.071	试剂盒 19	0.071	0.069
	试剂盒 10	0.069	0.075	试剂盒 20	0.072	0.069
猪伪狂	试剂盒 1	0.058	0.052	试剂盒 11	0.043	0.036

[0126]

犬病阳性血清	试剂盒 2	0.047	0.062	试剂盒 12	0.032	0.041
	试剂盒 3	0.049	0.053	试剂盒 13	0.046	0.049
	试剂盒 4	0.071	0.059	试剂盒 14	0.031	0.029
	试剂盒 5	0.063	0.058	试剂盒 15	0.063	0.049
	试剂盒 6	0.059	0.053	试剂盒 16	0.057	0.047
	试剂盒 7	0.051	0.063	试剂盒 17	0.048	0.043
	试剂盒 8	0.071	0.065	试剂盒 18	0.051	0.072
	试剂盒 9	0.063	0.071	试剂盒 19	0.061	0.047
	试剂盒 10	0.072	0.069	试剂盒 20	0.063	0.072

[0127] 注 : $OD_{\text{阳性血清}} = 1.530$, $OD_{\text{阴性血清}} = 0.159$

[0128] 5.4 重复性试验

[0129] 5.4.1 批内重复试验

[0130] 用试剂盒 1 对 5 份阳性和 5 份阴性抗体水平不同的 PRRS 血清,在同一批试验中按照实施例 4 所述的方法对每份样品重复 3 次检测。结果表明 :10 份血清的 OD_{450} 值变异系数在 2.1% -9.6% 之间,均具有较好的重复性。

[0131] 同样,分别用试剂盒 2-10 对以上 10 个样品做测定,测定结果表明 :该检测方法重复性好。

[0132] 5.4.2 批间重复试验

[0133] 用 3 个批次的试剂盒 1 对 5 份阳性和 5 份阴性抗体水平不同 PRRS 血清,检测结果经统计学进行分析后发现 :3 个批次的试验结果差异不显著,变异系数均在 5.6% -8.1% 之间,说明该检测方法重复性好。

[0134] 同样,分别用 3 个批次的试剂盒 2-10 对以上 10 个样品做测定,测定结果表明 :该检测方法重复性好。

[0135] 5.5 包被抗原保存期的确定

[0136] 将分别用包被原 1-10 包被好的酶标板一式四份用封闭液封闭后洗涤吸干水分,再用包装袋封好置于 4℃ 分别保存 6、9、12、15 个月,即试剂盒的实时稳定性试验。对不同保存条件下的酶标板用 5 份被检样品进行检测。经统计学分析,结果显示 :各酶标板对每一样品进行检测时,6、9、12 个月的结果均无显著差异,而与 15 个月的结果由显著差异,说明所有试剂盒在 4℃ 可保存 12 个月。

[0137] 实施例 6 猪繁殖与呼吸综合征抗体 ELISA 试剂盒的临床应用

[0138] 将经中和抗体鉴定为阳性的 200 份临床感染猪繁殖与呼吸综合征病毒的猪血清样品,分别用 i) 试剂盒 1-10 (实施例 5) 以及实施例 6 所述的方法、ii) GP2-ELISA 检测方法 (其中 GP2 按照刘明莉的文献制备而成,参考文献具体为 :刘明莉,李伟娟,王中明等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 Hn-1/06 株 GP2 蛋白的原核表达.江西农业学报,2009,21(3):4-7; ELISA 方法参照实施例 6),以及 iii) PRRS 试剂盒 (购自 IDEXX 公司,该试剂盒所用包被原为 N 蛋白) 对样品进行检测对比。检测结果为 :试剂盒 1-10 阳性检出率依次为 90.0%、93.2%、93.8%、92.5%、93.5%、94.3%、96.8%、95.4%、94.9%、98.2% ;而 GP2-ELISA 试剂盒的阳性检出率为 71.2%, IDEXX 试剂盒的阳性检出率为 84.7%。

[0139] 因而,本实施例所制备的试剂盒 1-10 检测时阳性检测率与中和抗体检测结果的吻合率均更高,具有较好的应用前景。

[0140] 以上所述仅是本发明的优选实施例而已,并非对本发明做任何形式上的限制,虽然本发明已以优选实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案的范围内,当可利用上述揭示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,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、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

[0001]

序列表

<110> 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司
 <120> 试剂盒及其制备方法和使用方法
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 504
 <212> DNA
 <213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株的 GP2 蛋白的核苷酸序列
 <400> 1

```
tcaccatogc oggttggctg gtggtetttt gcatcagatt ggtttgetcc gcgatactcc      60
gtacggcggc tgccattcac tctgagcaat tacagaagat cttatgaggc ctttccttcc      120
cagtggcaag tggacattcc cacctgggga actaaacatc ctttggggat gctttggcac      180
cataaggtgt caaccctgat tgatgaaatg gtgtcgogtc gaatgtaccg catcatggaa      240
aaagcagggc aggetgcctg gaaacaggtg gtgagcgagg ctacgctgtc tcgcattagt      300
agtttggatg tgggtgctca ttttcagcat ctagccgccca ttgaagccga gacctgtaa      360
tatttggcct cccggctgcc catgctaac aacctgogca tgacaggttc aaatgtaacc      420
atagtgtata atagcacttt gaatcaggtg ttigtatttt ttccaacccc tggttcccgg      480
ccaaagcttc atgattttca gcaa                                             504
```

<210> 2
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株的 GP2 蛋白的氨基酸序列
 <400> 2

```
Ser Pro Ser Pro Val Gly Trp Trp Ser Phe Ala Ser Asp Trp Phe Ala
1           5           10           15
Pro Arg Tyr Ser Val Arg Ala Leu Pro Phe Thr Leu Ser Asn Tyr Arg
                20           25           30
Arg Ser Tyr Glu Ala Phe Leu Ser Gln Cys Gln Val Asp Ile Pro Thr
                35           40           45
Trp Gly Thr Lys His Pro Leu Gly Met Leu Trp His His Lys Val Ser
                50           55           60
Thr Leu Ile Asp Glu Met Val Ser Arg Arg Met Tyr Arg Ile Met Glu
65           70           75           80
Lys Ala Gly Gln Ala Ala Trp Lys Gln Val Val Ser Glu Ala Thr Leu
                85           90           95
Ser Arg Ile Ser Ser Leu Asp Val Val Ala His Phe Gln His Leu Ala
                100           105           110
```

[0002]

Ala Ile Glu Ala Glu Thr Cys Lys Tyr Leu Ala Ser Arg Leu Pro Met
 115 120 125

Leu His Asn Leu Arg Met Thr Gly Ser Asn Val Thr Ile Val Tyr Asn
 130 135 140

Ser Thr Leu Asn Gln Val Phe Ala Ile Phe Pro Thr Pro Gly Ser Arg
 145 150 155 160

Pro Lys Leu His Asp Phe Gln Gln
 165

<210> 3

<211> 465

<212> DNA

<213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株的 GP3 蛋白的核苷酸序列

<400> 3

tccaatacta cgtactgttt ttgtttccg ctggtaggg gcaatttttc ttcgaactc 60
 acagtgaatt acaagggtg tocaocttgc ctacccggc aagcagccac agagatctac 120
 gaaccggta ggtctctttg gtgcaggata gggtatgaoc gatgtgagga ggatgatcat 180
 gacgagctag ggtttatgat accgctggc ctctccagcg aaggccactt gactagtgtt 240
 tacgcttggg ttggcttctt gtccttcagc tacacggccc agttccatcc cgagatattc 300
 gggatagggg atgtgagtcg agtttatgtt gacatcaaac atcaactcat ctgcgccgaa 360
 catgacgggc agaacaccac cttgcctogt catgacaaca tttcagccgt gtttcagacc 420
 tattaccaac atcaagtoga cggcggcaat tggtttcacc tagaa 465

<210> 4

<211> 155

<212> PRT

<213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株的 GP3 蛋白的氨基酸序列

<400> 4

Ser Asn Thr Thr Tyr Cys Phe Trp Phe Pro Leu Val Arg Gly Asn Phe
 1 5 10 15

Ser Phe Glu Leu Thr Val Asn Tyr Thr Val Cys Pro Pro Cys Leu Thr
 20 25 30

Arg Gln Ala Ala Thr Glu Ile Tyr Glu Pro Gly Arg Ser Leu Trp Cys
 35 40 45

Arg Ile Gly Tyr Asp Arg Cys Glu Glu Asp Asp His Asp Glu Leu Gly
 50 55 60

Phe Met Ile Pro Pro Gly Leu Ser Ser Glu Gly His Leu Thr Ser Val
 65 70 75 80

Tyr Ala Trp Leu Ala Phe Leu Ser Phe Ser Tyr Thr Ala Gln Phe His
 85 90 95

Pro Glu Ile Phe Gly Ile Gly Asn Val Ser Arg Val Tyr Val Asp Ile
 100 105 110

Lys His Gln Leu Ile Cys Ala Glu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Leu

[0003]

<211> 507
 <212> DNA
 <213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株的 GP5 蛋白的核苷酸序列
 <400> 7
 agcaacgaca gcagctccca tetacagctg atttacaact tgacgctatg tgagctgaat 60
 ggcacagatt ggctagotaa caaatttgat tgggcagtgg agagttttgt catctttccc 120
 gttttgactc acattgtctc ctatggtgcc ctcaactacca gccatttccct tgacacagtc 180
 gcttttagtea ctgtgtctac cgccgggttt gttcaogggc ggtatgtcct aagtagcacc 240
 taogcggctt gtgocctggc tgcgttgact tgcttctgca ttaggtttgc aaagaattgc 300
 atgtcctggc gctacgcgtg taccagatat accaactttc ttctggacac taagggcgga 360
 ctctatcggt ggoggtcggc tgtcatcata gagaaaagg gcaaagtga ggtcgaaggt 420
 catctgatcg acotcaaaag agttgtgctt gatggttccg tggcaacccc tataaccaga 480
 gtttcagcgg aacaatgggg tgcctct 507

<210> 8
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> 猪繁殖与呼吸综合征病毒 VR-2332 疫苗株的 GP5 蛋白的氨基酸序列
 <400> 8
 Ser Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Cys Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp Ala
 20 25 30
 Val Glu Ser Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr
 35 40 45
 Gly Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Ala Leu Val Thr
 50 55 60
 Val Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile
 65 70 75 80
 Tyr Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Thr Cys Phe Val Ile Arg Phe
 85 90 95
 Ala Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ala Cys Thr Arg Tyr Thr Asn
 100 105 110
 Phe Leu Leu Asp Thr Lys Gly Gly Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val
 115 120 125
 Ile Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp
 130 135 140
 Leu Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg
 145 150 155 160
 Val Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
 165

专利名称(译)	试剂盒及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN104459160A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410839738.7	申请日	2014-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
[标]发明人	田克恭 姬郭彪		
发明人	田克恭 姬郭彪		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	陈伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征抗体的酶联免疫吸附测定试剂盒，其包括：酶标板、底物显色液、酶标二抗、终止液、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性血清；其中，所述酶标板包被有猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白，所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原性蛋白包括猪繁殖与呼吸综合征GP2蛋白、GP3蛋白、GP4蛋白、GP5蛋白中的至少两种蛋白的混合物。本发明还涉及该试剂盒的制备方法，以及该试剂盒的使用方法。

$$S/P = \frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{阴性血清}}}{OD_{\text{阳性血清}} - OD_{\text{阴性血清}}}$$