



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110105436 B

(45)授权公告日 2020.05.26

(21)申请号 201910281613.X

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2019.04.09

G01N 33/569(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/535(2006.01)

申请公布号 CN 110105436 A

G01N 33/543(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

(43)申请公布日 2019.08.09

审查员 陈晋

(73)专利权人 长江大学

地址 434023 湖北省荆州市南环路1号

(72)发明人 荣俊 李国攀 匡红艳 徐保娟
王席

(74)专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231

代理人 黄君军

(51)Int.Cl.

C07K 14/01(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

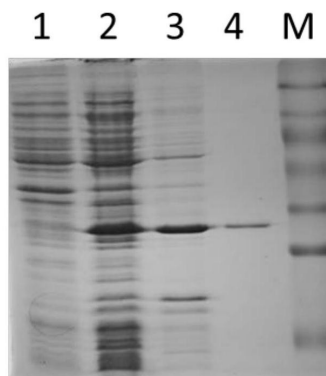
权利要求书2页 说明书23页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

猪圆环病毒3型抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供了重组猪圆环病毒3型(PCV3) Cap蛋白、ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用。该重组PCV3Cap蛋白的制备包括重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因的克隆及目的基因的筛选;重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因改造;构建重组PCV3Cap蛋白表达质粒载体、工程菌;重组PCV3Cap蛋白的诱导表达及纯化;再用重组PCV3Cap蛋白制备猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体ELISA检测试剂盒;该检测试剂盒可准确测定猪体内抗PCV3Cap蛋白抗体。该试剂盒可用于猪场中PCV3流行病学监测,也可用于疫苗免疫后猪血清抗体的检测以协助判断疫苗的免疫效果。



1. 一种重组猪圆环病毒3型Cap蛋白,其特征在于,所述的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 一种重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1、重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因的克隆及目的基因的筛选:筛选得到基因序列如SEQ ID NO.2所示的PCV3野毒感染猪病料,经过DNA提取和PCR扩增构建得到PCV3 Cap蛋白基因克隆载体;

步骤2、重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因改造:设计剪切引物对,上游引物使得步骤1中的PCV3 Cap蛋白基因5' -端的58个氨基酸编码基因被剪切掉;下游引物使得在PCV3 Cap蛋白基因的3' 端融合连接一段来自猪载脂蛋白E的C端氨基酸编码基因序列;其中,所述设计剪切引物对为:

PCV3 Cap Nd58上游引物:其引物序列如SEQ ID NO.3所示,

PCV3 Cap基因3' 端融合连接Apo E 3' 端15肽下游引物:其引物序列如SEQ ID NO.4所示;

步骤3、构建重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达质粒载体:以步骤1所得的PCV3 Cap蛋白基因PCR扩增产物为模板,用步骤2所得的剪切引物对进行扩增后,将扩增产物插入表达质粒载体pET28a的多克隆位点的BamH I/Hind III切点间,得到重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达质粒载体,该质粒载体的表达区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

步骤4、构建重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达工程菌;

步骤5、重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的诱导表达及纯化,得到该重组猪圆环病毒3型Cap蛋白。

3. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1中PCR扩增所用的引物如下:

PCV3 Cap外套上游引物PF:核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,

PCV3 Cap外套下游引物PR:核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

4. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤5中具体为:将所述重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达工程菌在培养基中培养,并加入 α -乳糖诱导表达后,收菌体,加PBS液后超声波裂解,然后用硫酸铵进行分级沉淀,再收集10%-30%饱和度的硫酸铵沉淀,用PBS液复溶后依次用凝胶柱层析、离子交换层析进行纯化。

5. 一种猪圆环病毒3型Cap蛋白表达载体,其特征在于,所述表达载体的表达区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

6. 一种猪圆环病毒3型Cap蛋白表达工程菌,其特征在于,该工程菌包含权利要求5所述的猪圆环病毒3型Cap蛋白表达载体。

7. 一种猪圆环病毒3型Cap蛋白的抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的ELISA检测试剂盒包括:

(A) 包被有权利要求1所述的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的ELISA酶标板;

(B) 标准阴性血清:PCV3抗体阴性的猪血清;

(C) 标准阳性血清:PCV3抗体阳性的猪血清;

(D) 辣根过氧化物酶标记的酶标二抗:抗猪IgG抗体;

(E) 样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA酶标板洗涤液、抗体稀释液、显色液和终止液。

8.如权利要求7所述的猪圆环病毒3型Cap蛋白的抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于,重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的包被浓度为10 μ g/ml。

9.权利要求7所述的ELISA检测试剂盒在制备兽医临床产品中的应用,其特征在于,所述兽医临床产品包括PCV3疫苗免疫猪的血清中抗PCV3 Cap蛋白抗体的检测产品。

猪圆环病毒3型抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药技术领域,尤其涉及重组猪圆环病毒3型Cap蛋白、以及重组猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒(Porcine Circovirus,PCV)属于圆环病毒科、圆环病毒属,病毒无囊膜、是单链负股环状DNA病毒,是最小的动物病毒之一。到目前为止,已经发现猪圆环病毒存在3个基因型:猪圆环病毒1型(PCV1)、猪圆环病毒2型(PCV2),和猪圆环病毒3型(PCV3)。其中PCV2和PCV3有致病性,而PCV1无致病性。PCV1和PCV2的氨基酸序列同源性较高,病毒粒子直径约17nm,呈20面体对称结构。基因组大小约为1.76kb,含有2个主要开放性阅读框架(ORF),其中ORF1基因产物与病毒复制酶相关(involved in virus Caplication,Cap),ORF2基因产物是构成病毒衣壳蛋白(Capsid protein,简称:Cap)的成分。

[0003] 猪圆环病毒3型是2015年6月,在美国北卡罗来纳州某猪场患有猪皮炎肾病综合征(PDNS)疫病的病猪体内分离得到的。PCV2与PCV3 Cap蛋白氨基酸同源性仅为30%,两者间不存在交叉免疫保护。PCV3与猪圆环病毒1、2型相似,病毒粒子呈二十面体结构,无囊膜,直径为17-20nm。基因组为单股DNA,全长2 000bp,包含3个主要开放阅读框(ORF)。其中,ORF1编码由297个氨基酸(aa)组成的复制酶蛋白Rep。ORF3编码一个由231个aa组成的蛋白质,编码方向与ORF1基因相同,其功能未知。ORF2编码由214个aa组成的衣壳蛋白Cap,其编码方向与ORF1和ORF3的复制方向相反。PCV3Cap蛋白N端富含精氨酸,为病毒核定位信号区域,与病毒在细胞核内定位有关。PCV3 Cap蛋白为其主要结构蛋白,能够诱导动物机体产生特异性免疫应答,也是病毒感染后检测血清抗体的主要抗原蛋白。

[0004] 2016年,在我国湖北、广东等地发生繁殖障碍的母猪、以及急性死亡的仔猪病料中检测出PCV3。PCV3感染可导致母猪出现厌食症状,皮肤出现多灶性丘疹、斑点和浅表性皮炎,生产性能下降;妊娠母猪发生繁殖障碍,产弱胎、死胎、木乃伊胎和弱仔猪,病情严重甚至造成急性死亡;不同胎龄胎儿均可发生流产。截至目前,我国已有13个省的猪场存在PCV3感染与流行。鉴于PCV3的流行和对养猪业的危害,建立一种PCV3感染和疫苗免疫后抗体的检测方法十分重要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供重组猪圆环病毒3型Cap蛋白、ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用。本发明首先制备得到重组猪圆环病毒3型Cap蛋白,重组PCV3 Cap蛋白分子量约为24kD,经过硫酸铵沉淀,凝胶过滤层析和阴离子交换层析后,目的蛋白纯度达到96%以上。用纯化蛋白包被酶标板后,可通过间接ELISA的方法测定猪体内抗PCV3 Cap蛋白抗体。该试剂盒可用于猪场中PCV3流行病学监测,也可用于疫苗免疫后猪血清抗体的检测以协助判断疫苗的免疫效果。

[0006] 本发明是这样实现的:

[0007] 本发明的目的之一,在于提供一种重组猪圆环病毒3型Cap蛋白,所述的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 本发明的目的之二,在于提供重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 步骤1、重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因的克隆及目的基因的筛选:筛选得到基因序列如SEQ ID NO.2所示,该基因序列是PCV3野毒感染猪病料经过DNA提取和PCR扩增后加载到质粒载体上获得的;

[0010] 步骤2、重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因改造:设计剪切引物对,上游引物使得步骤1中的PCV3 Cap蛋白基因5'-端的58个氨基酸编码基因被剪切掉;下游引物使得在PCV3 Cap蛋白基因的3'端融合连接一段来自猪载脂蛋白E(Apo E)的C端的15个氨基酸的编码基因序列;其中,所述设计剪切引物对为:

[0011] PCV3 Cap Nd58上游引物:其引物序列如SEQ ID NO.3所示,

[0012] PCV3 Cap基因3'端融合连接Apo E 3'端15肽下游引物:其引物序列如SEQ ID NO.4所示;

[0013] 步骤3、构建重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达质粒载体:以步骤1所得的PCV3 Cap蛋白基因PCR扩增产物为模板,用步骤2所得的2条剪切引物进行扩增后,扩增产物插入表达质粒载体pET28a多克隆位点的BamH I/Hind III切点间,得到重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达质粒载体,该质粒载体的表达区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

[0014] 步骤4、构建重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达工程菌;

[0015] 步骤5、重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的诱导表达及纯化,得到该重组猪圆环病毒3型Cap蛋白。

[0016] 本发明的目的之三,在于提供一种重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达载体,所述表达载体表达区的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0017] 本发明的目的之四,在于提供一种重组猪圆环病毒3型Cap蛋白表达工程菌,该工程菌包含所述的猪圆环病毒3型Cap蛋白表达载体。

[0018] 本发明的目的之五,在于提供一种猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的ELISA检测试剂盒,所述的ELISA检测试剂盒包括:

[0019] (A)用所述的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白包被的ELISA酶标板;

[0020] (B)标准阴性血清:PCV3抗体阴性的猪血清;

[0021] (C)标准阳性血清:PCV3抗体阳性的猪血清;

[0022] (D)辣根过氧化物酶标记的酶标二抗:抗猪IgG抗体;

[0023] (E)样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA酶标板洗涤液、抗体稀释液、显色液和终止液。

[0024] 本发明的目的之六,在于提供猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的检测方法,所述的检测方法包括以下步骤:

[0025] (1)制备检测用ELISA酶标板:用包被缓冲液将所述的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白稀释后加到酶标板中吸附,空干包被液,加封闭液封闭酶标板孔;

[0026] (2)待检血清、阴性血清、阳性血清分别作为一抗加样至ELISA酶标板孔中进行孵育;

[0027] (3) 酶标二抗的孵育:辣根过氧化物酶标记的酶标二抗,抗猪IgG,加入ELISA酶标板孔中孵育,洗涤液洗涤,甩干;

[0028] (4) 加入显色液,室温避光孵育,加入终止液终止反应;在酶标仪上450nm波长下测定OD值。

[0029] 本发明的目的之七,在于提供所述的ELISA检测试剂盒在兽医临床中的应用,包括PCV3感染猪血清的检测和PCV3疫苗免疫猪血清的抗PCV3 Cap蛋白抗体的检测。

[0030] 本发明具有的有益效果是:

[0031] 1、本发明提供猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的ELISA检测试剂盒,本发明首先制备得到重组猪圆环病毒3型Cap蛋白,重组PCV3 Cap蛋白分子量约为24kD,经过硫酸铵沉淀,凝胶过滤层析和阴离子交换层析后,目的蛋白纯度达到96%以上。用纯化蛋白包被酶标板后,可通过间接ELISA的方法测定猪体内抗PCV3 Cap蛋白抗体。

[0032] 该ELISA试剂盒及检测方法可用于猪场中PCV3流行病学监测,有利临床快速判断、检测猪场中的猪群是否存在PCV3抗体,以确定该猪群是否被感染;

[0033] 该ELISA试剂盒及检测方法还可用于疫苗免疫后猪血清抗体的检测以协助判断疫苗的免疫效果;可以准确检测出PCV3自然感染猪或含有PCV3 Cap蛋白的全病毒灭活疫苗,弱毒活疫苗,和PCV3 cap蛋白基因工程亚单位疫苗等疫苗免疫后体内的抗体变化;从而便于了解该病在动物群中发生的特征,便于对疫病进行诊断和防控。

[0034] 2、本发明提供的猪圆环病毒3型Cap蛋白的制备方法,

[0035] 通过设计引物,将PCV3 Cap蛋白原基因的N端58个氨基酸的编码基因删除,同时在PCV3 Cap蛋白原基因的C端融合连接一段15个氨基酸编码序列(5'-GGT GGC GAA GCC GTG AGC ATC AGC TCC TCC ACC TCT GCG CCC AGT GAT AAT CAG TAA AAG CTT-3')通过此步的基因改造,使表达蛋白的表达量提高,同时表达蛋白也变的可溶于水溶液,为后续纯化过程提供了方便。

附图说明

[0036] 图1为本发明实施例提供的重组PCV3 Cap蛋白表达工程菌E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 Cap M诱导表达产物电泳图;其中,泳道1、E.coli BL21/pET28a全菌样品;泳道M、Blue Plus Protein Marker(14-100kDa),从下向上分别为:14,25,30,40,50,70,100kDa;泳道3、E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 Cap M全菌样品;泳道4、E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 Cap M上清样品;

[0037] 图2为本发明实施例提供的重组PCV3 Cap诱导表达产物纯化电泳图;其中,泳道1、E.coli BL21/pET28a全菌样品(阴性对照);泳道2、E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 Cap M上清样品;泳道3、PCV3 Nd58 Cap M Sepharose 6 Fast Flow 层析柱纯化洗脱液;泳道4、PCV3 Nd58 Cap M Macro Cap Q离子交换柱纯化洗脱液;泳道M、Blue Plus Protein Marker(14-100kDa),从下向上分别为:14,25,30,40,50,70,100kDa。

具体实施方式

[0038] 实施例1 PCV3 Cap蛋白基因的克隆及筛选

[0039] 一、病样采集

[0040] 收集到湖北、广西、江苏、福建、广东、山东、河北、安徽等地猪场,疑似病猪血清,提取总DNA。

[0041] 二、从血样中提取总DNA操作过程:

[0042] 1、取50 μ L血清,加入450 μ L灭菌的PBS进行稀释。

[0043] 2、加入500 μ L等体积的Tris-饱和酚,剧烈震荡,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min。

[0044] 3、将上清小心转移至灭菌的1.5mL的Ep管中,加入等体积的(约400 μ L)的25:24:1的酚:氯仿:异戊醇,震荡混匀;4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min。

[0045] 4、取上清(约250 μ L)转移至灭菌的1.5mL的Ep管中,加入2.5倍体积的预冷无水乙醇,混匀后,放置于-20 $^{\circ}$ C沉淀1h;4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min。

[0046] 5、弃上清,沉淀用1mL的70%乙醇进行清洗,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min

[0047] 6、弃上清,带有核酸沉淀的Ep管放置到65 $^{\circ}$ C的金属浴中干燥10min左右,使残余的乙醇完全挥发。

[0048] 7、加入25 μ L的5mM Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液,溶解DNA,并用Quawell 5000超微量分光光度计进行DNA含量的测定和纯度的分析。

[0049] 三、通过巢式PCR扩增并克隆PCV3 Cap蛋白基因

[0050] 1、根据山东省农业科学院畜牧兽医研究所(Animal Science and Veterinary Medicine,Shandong Academy of Agricultural Sciences)发布的PCV3序列(ACCESSION: KY778777)设计PCV3 Cap基因扩增引物如表1所示;扩增体系如表2所示;按照扩增体系中试剂的序号顺序先后依次添加上述试剂,其中血样总DNA为病料DNA提取步骤中提取得到的产物。其中PCR扩增采用的温度循环参数:94 $^{\circ}$ C,5min $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C,30S, $\rightarrow$ 64 $^{\circ}$ C,45S, $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C,60S) $\times$ 35 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C,10min。

[0051] 表1

引物	引物序列 (5'-3')
PCV3 Cap 外套上游引物	ttc cga ggt gcc ggg taa tac tag ccc(如SEQ ID NO.6所示)
PCV3 Cap 外套下游引物	gaa gcg cag cgg gag cgc gcg cga (如SEQ ID NO.7所示)

[0053] 表2

样品序	试剂名	加样量
1	水	12.7 μ L
2	10 $\times$ PCR Buffer	2 μ L
3	dNTPs (10 μ mol/L)	0.2 μ L
4	外套引物 PF(10 μ mol/L)	1.0 μ L
5	外套引物 PR(10 μ mol/L)	1.0 μ L
6	Taq 酶 (5U/ μ L)	0.1 μ L
7	血样总 DNA	3 μ L

[0055] 2、PCV3 Cap全基因测序:全基因测序所用引物如表3所示;扩增体系如表4所示。温

度循环参数:94℃,5min→(94℃,30S,→64℃,45S,→72℃,60S)×35→72℃,10min。利用琼脂糖凝胶电泳回收扩增带,连接到pTOP0-TA质粒载体上,转化大肠杆菌DH5α,经PCR鉴定后送上海生物工程有限公司进行序列测定。

[0056] 表3

引物	引物序列 (5'-3')
PCV3 Cap全基因测序上游引物	gcc ggg taa tac tag ccc ggc acc aaa atg aga(如SEQ ID NO.8所示)
PCV3 Cap全基因测序下游引物	att tac ttt cac tta gag aac gga ctt gta gcg(如SEQ ID NO.9所示)

[0058] 表4

样品序	试剂名	加样量
1	水	15.5μl
2	10×PCR Buffer	2μl
3	dNTPs (10μmol/L)	0.2μl
4	PCV3 Cap 全基因测序上游引物 (10μmol/L)	1.0 μl
5	PCV3 Cap 全基因测序下游引物 (10μmol/L)	1.0μl
6	Taq 酶 (5U/μl)	0.1μl
7	外套引物扩增产物	0.2μl

[0060] 测序结果显示,湖北、江苏、福建、广东、河北、安徽、山东诸城、山东齐河、广西均克隆到PCV3 Cap基因。用测序DNA序列推导氨基酸序列后比对分析表明,湖北、江苏、福建、广东、河北、安徽、山东诸城、山东齐河、的PCV3 Cap蛋白的氨基酸序列相同。而广西的样本与湖北等地的氨基酸序列相差2个氨基酸残基,分别是第24位氨基酸由Ala变为Val,27位氨基酸由Arg变为Lys。为此,我们选择湖北的PCV3 Cap蛋白DNA序列作为本试剂盒抗原蛋白表达序列,其DNA序列如SEQ ID NO.2所示。其克隆质粒命名为:pTOP0-PCV3 Cap HB strain。

[0061] 实施例2 ELISA用PCV3 Cap包被抗原蛋白表达基因的优化

[0062] 一、PCV3 Cap蛋白N端剪切优化

[0063] 1、设计PCV3 Cap蛋白N端剪切优化系列引物如表5所示:

[0064] 表5-PCV3 Cap蛋白N端剪切优化系列引物

	名称	引物序列
	PCV3 Cap Nd0(上游引物)	<u>ggatcc</u> atg aga cac aga gct ata ttc aga(如 SEQ ID NO.10 所示)
	PCV3 Cap Nd12(上游引物)	<u>ggatcc</u> cca agg aga cga cga cgc cac ag 如 SEQ ID NO.11 所示)
	PCV3 Cap Nd22(上游引物)	<u>ggatcc</u> tat gcc aga aga agg cta ttc att agg 如 SEQ ID NO.12 所示)
[0065]	PCV3 Cap Nd32(上游引物)	<u>ggatcc</u> ccc aca gct ggc aca tac tac ac如SEQ ID NO.13所示)
	PCV3 Cap Nd45(上游引物)	<u>ggatcc</u> atg aac gtc att tcc gtt gga act cc 如 SEQ ID NO.14 所示)
	PCV3 Cap Nd58(上游引物)	<u>ggatcc</u> atg ccc tgg cac gcc aac cac ttc att acc(如 SEQ ID NO.3 所示)
	PCV3 Cap C(下游引物)	<u>aag ctt</u> gag aac gga ctt gta acg aat cc(如 SEQ ID NO.15 所示)

[0066] 2、以PCV3克隆质粒载体pTOP0-PCV3 Cap HB strain为模板,分别用不同的PCV3 Cap蛋白N端剪切上游引物与PCV3 Cap C下游引物配对,扩增不同剪切长度的PCV3 Cap基因。插入表达质粒载体pET28a的多克隆位点的Bam H I/Hind III切点间。

[0067] 3、用连接产物转化大肠杆菌BL21 (DE3),筛选转化子。构建成6种PCV3抗原蛋白表达工程菌。分别命名为:E.coli BL21/pET28a PCV3 cap,E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd12 cap,E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd22 cap,E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd32 cap,E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd45 cap,E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 cap。

[0068] 4、进行诱导表达实验,诱导剂为 α -乳糖,工作浓度为:0.03mol/L。诱导产物用SDS-PAGE电泳进行检测。结果显示:

[0069] E.coli BL21 pET28a PCV3 cap不表达,

[0070] E.coli BL21 pET28a PCV3 Nd12 cap不表达,

[0071] E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd22 cap不表达,

[0072] E.coli BL21 pET28a/PCV3 Nd32 cap微量表达,表达量约为总蛋白量的10%,表达产物微量可溶。

[0073] E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd45 cap高效表达,表达量约为总蛋白量的20%,表达产物不可溶。

[0074] E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 cap高效表达,表达量约为总蛋白量的25%,表达产物不可溶。

[0075] 二、PCV3 Cap蛋白基因序列的融合改造

[0076] 1、为了提高表达蛋白的可溶性,本发明在PCV3 Nd58 Cap蛋白的C末端添加了一段源于猪血清载脂蛋白E (Apo E) 的C末端15个氨基酸残基的序列,在PCV3 Nd58 Cap与APO E的C末端15肽之间加一个由GGE组成的3肽的连接肽。通过设计一个长片段下游引物来实现上述改造的目的。引物如下表6所示。

[0077] 表6-PCV3Nd58 Cap与APO E的C末端15肽融合表达引物序列

	引物	引物序列 (5'-3')
[0078]	上游引物	<i>ggatcc</i> atgccctggcagccaaccacttcattacc(如SEQ ID NO.3所示)
	下游引物	<i>aag ctt</i> tta ctg att atc act ggg cgc aga ggt gga gga gct gat gct cac ggc ttc gcc acc gag aac gga ctt gta acg aat cca aac(如 SEQ ID NO.4 所示)

[0079] 2、以质粒pET28a PCV3 Nd58 cap为模板,用表6引物进行PCR扩增,将扩增产物用Bam H I/Hind III酶切后插入pET28a的多克隆位点的相同酶切位点中。连接产物转化大肠杆菌BL21。转化菌命名为:E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 Cap M。进行诱导表达实验,诱导剂为 α -乳糖,诱导剂工作浓度为:0.03mol/L。诱导产物用SDS-PAGE电泳进行检测。结果显示:表达产物分子量约为24kD。上清液中的目的蛋白含量与全菌基本相同,表明该表达产物为可溶性蛋白,见图1。将转化菌E.coli BL21/pET28a PCV3 Nd58 Cap M送上海生物工程公司进行质粒DNA序列测定。测序结果如SEQ ID NO.5所示。

[0080] 实施例3 ELISA用重组PCV3 Cap包被抗原蛋白的纯化

[0081] 1、发酵培养及诱导表达

[0082] 用LB液体培养基培养工程菌Escherichia coli BL21 (DE3) /pET28a-PCV3 Nd58 Cap M。待OD600值(在600nm处的吸光值)达1.0左右时加入诱导剂 α -乳糖至工作浓度为0.03mol/L。诱导培养5小时。

[0083] 2、菌体裂解

[0084] 用PBS缓冲液将表达菌体重悬(湿菌体:PBS=1:10),使用超声波裂解仪(型号:宁波新芝生物科技股份有限公司,JY98-III超声波细胞粉碎机)裂解598次,功率65%,裂解5S,间隔20S,裂解完毕后,进行显微镜检查,确定裂解完全。裂解液置12000rpm离心10min。去沉淀。上清液进入纯化过程。

[0085] 3、硫酸铵沉淀

[0086] 将表达蛋白上清液用硫酸铵进行分级沉淀,收集10%-30%饱和度的硫酸铵沉淀,用PBS液复溶后继续以下纯化过程。

[0087] 4、凝胶柱层析

[0088] 将上述PCV3蛋白液上样于Sepharose™6Fast Flow层析柱,收集目的蛋白峰。

[0089] 5、离子交换层析分离

[0090] 将凝胶柱层析收集的蛋白液用Macro Cap Q离子交换柱进行纯化。洗脱液A:0.02M PBS缓冲液;洗脱液B:0.02M PBS缓冲液,pH7.4,含有1mol氯化钠。进行线性梯度洗脱,收集抗原蛋白的洗脱峰。

[0091] 通过SDS-PAGE电泳检测蛋白纯化结果见附图2。经过PCV3 Nd58 Cap M Macro Cap Q离子交换柱纯化后,目的蛋白纯度为:96%以上,该重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0092] 实施例4猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的ELISA检测试剂盒的制备及使用方法

[0093] 一、猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的ELISA检测试剂盒包括:

[0094] (A) 包被有所述的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白的ELISA酶标板;

[0095] (B) 标准阴性血清:PCV3抗体阴性的猪血清;

[0096] (C) 标准阳性血清:PCV3抗体阳性的猪血清;

- [0097] (D) 辣根过氧化物酶标记的酶标二抗:抗猪IgG抗体;
- [0098] (E) 样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、ELISA酶标板洗涤液、抗体稀释液、显色液和终止液。
- [0099] 二、猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的ELISA检测试剂盒的制备及使用方法为:
- [0100] 1、包被酶标板
- [0101] (1) 包被液:0.05M pH 9.5碳酸缓冲液
- [0102] Na_2CO_3 1.50g
- [0103] NaHCO_3 2.94g
- [0104] 戊二醛 0.10ml
- [0105] 调pH至9.5,定容至1000ml。
- [0106] (2) 包被用洗液:0.01M pH7.2磷酸钾缓冲液
- [0107] $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.56g
- [0108] KH_2PO_4 0.38g
- [0109] 调pH至7.2,定容至1000ml。
- [0110] (3) 包被方法:取实施例2中纯化的重组蛋白PCV3 Cap,用包被液稀释至适当的蛋白含量,96孔酶标板中每孔加100 μL ,置2-8℃吸附24小时。空去包被液,包被用洗液洗板3次。
- [0111] (4) 抗原蛋白包被浓度确定,先用包被液将纯化的重组PCV3 Cap蛋白稀释至蛋白含量为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,30 $\mu\text{g}/\text{ml}$,40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加至96孔酶标板的微孔中,每孔加100 μL ,置2-8℃吸附24小时。从中选择一个优化的包被浓度,即10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- [0112] 2、封闭:
- [0113] (1) 包被用封闭液:
- | | |
|--|--------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 3.582g |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1.561g |
| NaCl | 9.0g |
| BSA | 20g |
| 木糖 | 10g |
- [0115] 调pH至7.2,定容至1000ml。
- [0116] (2) 封闭操作:空干包被洗液,加包被用封闭液150 μL /孔,置2-8℃过夜。去除封闭液后自然干燥24小时。
- [0117] 3、血清的孵育(一抗孵育)
- [0118] 待检猪血清(或标准阴、阳性血清)用PBS液作血清稀释液,按1:400的比例稀释,加入包被板孔中,100 μL /孔。将酶标板置于37℃孵育30min。
- [0119] 空净血清稀释液后用洗涤液洗板5次。
- [0120] 洗涤液:(10倍浓度)

- | | | |
|--------|--|---------------|
| | K₂HPO₄•3H₂O | 79.1g |
| | KH₂PO₄ | 14.9 g |
| [0121] | NaCl | 8.0g |
| | Triton X-100 | 50ml |
| [0122] | 调pH至7.2,定容至1000ml。 | |
| [0123] | 4、酶标二抗的孵育 | |
| [0124] | 用血清稀释液将辣根过氧化物酶标记的酶标二抗(抗猪IgG抗体)稀释至工作浓度,向酶标板孔中加入100μL/孔,置37℃,30min。 | |
| [0125] | 5、显色: | |
| [0126] | 加入50μL底物液A,50μL底物液B,轻摇混合,37℃反应10min。 | |
| [0127] | (1) 底物溶液A | |
| [0128] | 柠檬酸 | 4.2g |
| [0129] | 醋酸钠 | 13.6g |
| [0130] | 过氧化氢脲 | 0.5g |
| [0131] | 调pH至5.0,定容至1000ml。 | |
| [0132] | (2) 底物溶液B | |
| | 四甲基联苯胺 | 1.0g |
| | 甲醇 | 100ml |
| [0133] | 二甲亚砜 | 50ml |
| | 聚乙烯吡咯烷酮 | 16.0g |
| [0134] | 调pH至5.0,定容至1000ml。 | |
| [0135] | 6、终止: | |
| [0136] | 终止液:2mol/L H ₂ SO ₄ 。 | |
| [0137] | 显色结束后加终止液100μL/孔。 | |
| [0138] | 7、读板: | |
| [0139] | 在450nm波长下,读取酶标板光吸收值。 | |
| [0140] | 需要说明的是,本发明提供的重组猪圆环病毒3型Cap蛋白应用于制备ELISA试剂盒,也可用于制备免疫胶体金检测试纸条、免疫荧光、免疫比浊、化学发光等各种形式的产品。 | |
| [0141] | 8、该试剂盒的判定标准为: | |
| [0142] | 试验有效性判定:阳性对照孔平均值 ≥ 0.506 ;阴性对照平均值 ≤ 0.254 ; | |
| [0143] | 临界值(标准阳性样本阈值) = 阴性样本OD ₄₅₀ 平均值 + 3 × 标准差 = $0.254 + 3 \times 0.021 = 0.317$ | |
| [0144] | 阴性判定:样品OD值 < 临界值者(0.317)为PCV3 Cap抗体阴性; | |

[0145] 阳性判定:样品OD值 $\geq$ 临界值者(0.317)为PCV3 Cap抗体阳性。

[0146] 9、该试剂盒的性能指标:

[0147] (1) 特异性:除阳性血清外,其他检测样品均为阴性。这些数据表明,本发明提供的试剂盒与其他血清抗体之间不存在交叉反应。

[0148] (2) 灵敏性:阳性血清12800倍稀释能检出(即1 μ L血清加到12800 μ L样品稀释液中,取其中100 μ L加入样品检测孔)能检出。

[0149] (3) 稳定性:将试剂盒置于37 $^{\circ}$ C不少于2天与4 $^{\circ}$ C存放的试剂盒同步检测20份样品,其符合率为100%。

[0150] (3) 精密度:取浓度呈梯度的7种血清标本,分别稀释,分别同批测定10次,批内变异系数为均低于4%;同样7份血清,隔天再测定10次,变异均低于5%;符合试剂盒精密度要求。

[0151] 实施例5猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体的ELISA检测试剂盒的应用

[0152] 一、兽医临床猪血清抗体检测中的应用

[0153] (一) ELISA阴性血清的制备

[0154] PCV3抗体阴性的母猪所产仔猪,剥离胎衣后进行人工喂养至4-5周龄,采血并分离血清。30份血清样本,经过荧光定量PCR检测PCV3基因均为阴性,将血清作1:400倍稀释,进行ELISA检测。各样本OD₄₅₀值用SPSS统计分析软件计算平均值和标准差,结果如表7所示:

[0155] 表7

	N	Mean	Std. Deviation
[0156]	30	0.254	0.021

[0157] (二) ELISA阳性标准的确定:

[0158] 1、标准差阳性标准确定法:

[0159] 标准阳性样本阈值=阴性样本OD₄₅₀平均值+3 $\times$ 标准差=0.254+3 $\times$ 0.021=0.317;猪血清样本ELISA检测的OD₄₅₀值大于或等于0.317为阳性血清。

[0160] 2、S/N值阳性标准确定法:

[0161] 用本实施例所述的方法测定3个或以上PCV3抗体阴性猪血清样本,计算出其平均值。测定待检猪血清,用待检猪血清样本所得的OD₄₅₀值除以猪阴性血清样的OD₄₅₀平均值,即为:S/N值。

[0162] 若样本的S/N值大于或等于2.1,即判定血清样本为PCV3阳性;若样本的S/N值小于2.1,大于或等于1.6判断为可疑;S/N小于1.6判断为阴性。

[0163] 本发明同时提供了2种标准判定方法。批间阴性变异较大时,适合用S/N值的判断标准。

[0164] (三) 标准阳性血清制备:

[0165] 1、取兽医临床ELISA检测PCV3抗体滴度较高的抗血清,用血清稀释液稀释至ELISA检测的OD₄₅₀值达到阴性平均值+12倍标准差附近,即:0.254+12 $\times$ 0.021=0.506。加上适量的防腐剂冷藏保存。

[0166] 2、取兽医临床ELISA检测PCV3抗体滴度较高的抗血清,用血清稀释液稀释至ELISA检测的S/N值为3.1附近。加上适量的防腐剂冷藏保存。

[0167] (四) 阳性符合率检测

[0168] 1、PCV3阳性血清的证实

[0169] 为了确认阳性血清样本的准确性,我们用realtime PCR的方法对临床送检疑似血清进行了病毒基因拷贝的测定。具体方法如下:

[0170] (1) 标准品的制备:

[0171] 质粒为pTOP0 PCV3 Nd24Cap

[0172] 分子量为 $(1865+594) \text{ bp} \times 660 \text{ Da/bp} = 1622940 \text{ Da}$

[0173] 测定的质粒浓度为 $300 \text{ ng}/\mu\text{L} = 0.3 \text{ g/L}$

[0174] 摩尔浓度为 $0.3/1622940 = 1.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

[0175] 拷贝数为: $1.8 \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23} = 1.0836 \times 10^{18} \text{ copy/L} = 1 \times 10^{12} \text{ copy}/\mu\text{L}$

[0176] 用Tris缓冲液将模板稀释成 $1 \times 10^{10} \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^8 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^7 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^5 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^4 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^2 \text{ copy}/\mu\text{L}$, $1 \times 10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$ 。

[0177] (2) realtime PCR样本的准备:

[0178] 从血样中提取总DNA,具体步骤为:取50 μL 血清,加入450 μL 灭菌的PBS进行稀释。加入500 μL 等体积的Tris-饱和酚,剧烈震荡,4 $^{\circ}\text{C}$,12000rpm离心10min。将上清小心转移至灭菌的1.5mL的Ep管中,加入等体积的(约400 μL)的25:24:1的酚:氯仿:异戊醇,震荡混匀;4 $^{\circ}\text{C}$,12000rpm离心10min。取上清(约250 μL)转移至灭菌的1.5mL的Ep管中,加入2.5倍体积的预冷无水乙醇,混匀后,放置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀1h;4 $^{\circ}\text{C}$,12000rpm离心10min。弃上清,沉淀用1mL的70%乙醇进行清洗,4 $^{\circ}\text{C}$,12000rpm离心10min。弃上清,带有核酸沉淀的Ep管放置到65 $^{\circ}\text{C}$ 的金属浴中干燥10min左右,使残余的乙醇完全挥发。加入25 μL 的5mM Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液,溶解DNA。

[0179] (3) 荧光定量PCR:

[0180] A、所需仪器与试剂:荧光定量PCR仪为BIO RAD的CFX Connect;试剂盒为TAKARA的SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus),code:RR420A根据Palinski R,Pineyro P,Shang P,Yuan F,Guo R,Fang Y,Byers E,Hause BM(2017) A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure.J Virol 91:e01879-16报道的PCV3荧光定量PCR引物序列合成引物,具体如下:PCV3 realtime FP:Agt gct ccc cat tga acg;PCV3 realtime RP:Aca cag ccg tta ctt cac;不按原文献合成荧光探针,而用TB Green Premix Ex Taq (RR420A) 试剂盒(TaKaRa产品)中的TB Green荧光物质。

[0181] 表8

[0182]	SYBR Premix Ex Taq	10 μ L
	10 μ M PCV3 real time FP	0.4 μ L
	10 μ M PCV3 real time RP	0.4 μ L
	Template	1 μ L
	dd H ₂ O	8.2 μ L
	TOTAL	20 μ L

[0183] B、两步法扩增：

[0184] 扩增温度参数：94℃, 3min; 40cycles $\times$ (94℃, 10s; 55℃, 35s读板)；

[0185] 融解曲线测定参数：94℃, 10s; 65℃——95℃, 5s读板 (0.5℃递增)。

[0186] (4) 标准曲线建立结果 (技术参数) 见表9。

[0187] 表9

[0188]	Fluor	Efficiency %	Slope	Y-Intercept	R ²
	SYBR	104.25	-3.224	42.213	0.999

[0189] 2、阳性符合率的测定

[0190] 选取兽医临床诊断为猪皮炎肾病综合征母猪血清样本30个, 用上述荧光定量的方法测定病毒基因拷贝数。选取Log Starting Quantity值大于3.0 (相当于每毫升1000个病毒拷贝数) 的猪血清样本20个, 用实施例3所述的方法进行ELISA检测。结果如下表10所示。

[0191] 表10

[0192]	编号	OD450	S/N	编号	OD450	S/N
	1	0.612248	2.410427	11	1.061325	4.178445
	2	2.538938	9.995818	12	0.901541	3.549373
	3	1.183025	4.657578	13	1.467617	5.778021
	4	0.588103	2.315367	14	1.518489	5.978303
	5	3.887953	15.3069	15	1.447769	5.699877
	6	3.260394	12.8362	16	0.623025	2.452854
	7	0.895264	3.524662	17	0.813515	3.202817
	8	2.209687	8.699556	18	0.803918	3.165031
	9	0.954945	3.759626	19	1.093838	4.30645
	10	0.612248	2.410427	20	0.792848	3.121448

[0193] 表9中20个血清样本OD₄₅₀值均大于0.317, S/N值均大于2.1, 两种判定标准中PCV3抗体检测结果均可判断为阳性。该ELISA检测试剂盒的阳性率与荧光定量的方法一致, 即临床检测符合率为: 100%。

[0194] (六) 兽医临床血样检测

[0195] 本实验室分别在广东、广西、山东、河北、河南、福建、安徽、湖北等, 国内许多省市

猪场收集到351份PCV3疑似猪血清样本。用本试剂盒进行ELISA检测,按照标准差阳性标准确定法,血清样本OD₄₅₀值小于0.317的阴性血样为173份,大于0.317的阳性血样为178份。按照S/N值阳性标准确定法,S/N值小于1.6的血样有128份;小于2.1样本183份;大于或等于2.1的阳性血样有168份。标准差阳性标准确定法判断的阳性血样数较S/N值阳性标准确定法确定的阳性血样的数字多10份。这10份血样的OD₄₅₀值全部在S/N值阳性标准确定法的可疑值范围内,即大于等于1.6,小于2.1。检测数据进行升值排序后列于表11。

[0196] 表11-兽医临床血样ELISA检测结果

序号	OD450		S/N值	序号	OD450		S/N值	序号	OD450		S/N值
	值				值				值		
[0197]	1	0.089	0.549	25	0.116	0.713	49	0.149	0.918		
	2	0.092	0.570	26	0.119	0.733	50	0.151	0.931		
	3	0.093	0.576	27	0.120	0.742	51	0.152	0.937		
	4	0.095	0.584	28	0.121	0.745	52	0.152	0.938		
	5	0.096	0.591	29	0.123	0.761	53	0.154	0.947		
	6	0.096	0.591	30	0.125	0.772	54	0.157	0.967		
	7	0.096	0.595	31	0.125	0.774	55	0.157	0.971		
	8	0.100	0.617	32	0.126	0.778	56	0.157	0.972		
	9	0.100	0.618	33	0.126	0.781	57	0.159	0.981		
	10	0.101	0.621	34	0.127	0.785	58	0.160	0.985		
	11	0.101	0.624	35	0.129	0.798	59	0.160	0.986		
	12	0.102	0.632	36	0.132	0.818	60	0.160	0.986		
	13	0.104	0.639	37	0.133	0.821	61	0.160	0.990		
	14	0.104	0.640	38	0.133	0.822	62	0.162	1.003		
	15	0.104	0.640	39	0.137	0.848	63	0.163	1.005		
	16	0.107	0.659	40	0.139	0.859	64	0.166	1.025		

[0198]

序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值
17	0.108	0.664	41	0.139	0.860	65	0.168	1.035
18	0.109	0.671	42	0.141	0.868	66	0.168	1.036
19	0.110	0.678	43	0.144	0.887	67	0.171	1.057
20	0.110	0.680	44	0.146	0.902	68	0.173	1.066
21	0.110	0.681	45	0.146	0.905	69	0.174	1.071
22	0.111	0.686	46	0.147	0.907	70	0.174	1.074
23	0.112	0.695	47	0.147	0.908	71	0.174	1.074
24	0.114	0.705	48	0.147	0.909	72	0.175	1.080
73	0.176	1.087	97	0.214	1.323	121	0.247	1.526
74	0.176	1.088	98	0.220	1.358	122	0.247	1.526
75	0.181	1.120	99	0.221	1.366	123	0.249	1.537
76	0.182	1.121	100	0.226	1.394	124	0.250	1.543
77	0.182	1.123	101	0.227	1.399	125	0.250	1.545
78	0.182	1.124	102	0.227	1.399	126	0.251	1.548
79	0.184	1.135	103	0.228	1.410	127	0.259	1.598
80	0.184	1.137	104	0.230	1.422	128	0.259	1.598
81	0.185	1.140	105	0.231	1.426	129	0.260	1.603
82	0.187	1.154	106	0.231	1.427	130	0.263	1.625
83	0.189	1.167	107	0.233	1.441	131	0.269	1.658
84	0.190	1.170	108	0.234	1.446	132	0.269	1.658
85	0.192	1.185	109	0.237	1.464	133	0.270	1.669
86	0.192	1.187	110	0.238	1.4695	134	0.271	1.675
87	0.195	1.201	111	0.239	1.477	135	0.273	1.685
88	0.197	1.218	112	0.240	1.481	136	0.273	1.685
89	0.199	1.229	113	0.240	1.483	137	0.273	1.686
90	0.202	1.245	114	0.243	1.498	138	0.273	1.686
91	0.204	1.262	115	0.243	1.497	139	0.274	1.691
92	0.206	1.270	116	0.244	1.508	140	0.274	1.692
93	0.207	1.277	117	0.244	1.509	141	0.275	1.697
94	0.207	1.278	118	0.245	1.510	142	0.276	1.702
95	0.210	1.298	119	0.246	1.515	143	0.276	1.702
96	0.212	1.306	120	0.246	1.518	144	0.276	1.702

[0199]

序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值
145	0.283	1.747	169	0.310	1.912	193	0.372	2.296
146	0.283	1.748	170	0.311	1.918	194	0.373	2.303
147	0.286	1.763	171	0.312	1.928	195	0.376	2.322
148	0.287	1.772	172	0.316	1.949	196	0.379	2.342
149	0.288	1.780	173	0.316	1.950	197	0.388	2.398
150	0.288	1.780	174	0.321	1.984	198	0.389	2.402
151	0.294	1.813	175	0.324	2.000	199	0.391	2.413
152	0.294	1.818	176	0.328	2.028	200	0.391	2.413
153	0.295	1.824	177	0.329	2.033	201	0.395	2.440
154	0.296	1.825	178	0.333	2.055	202	0.403	2.490
155	0.296	1.829	179	0.333	2.055	203	0.409	2.523
156	0.297	1.835	180	0.335	2.066	204	0.410	2.529
157	0.300	1.853	181	0.336	2.073	205	0.412	2.540
158	0.301	1.856	182	0.337	2.083	206	0.413	2.551
159	0.302	1.863	183	0.339	2.094	207	0.414	2.554
160	0.303	1.868	184	0.347	2.143	208	0.418	2.578
161	0.304	1.873	185	0.351	2.165	209	0.420	2.590
162	0.304	1.874	186	0.352	2.171	210	0.422	2.606
163	0.304	1.876	187	0.358	2.209	211	0.436	2.689
164	0.305	1.881	188	0.360	2.220	212	0.438	2.705
165	0.306	1.890	189	0.364	2.248	213	0.438	2.705
166	0.308	1.901	190	0.366	2.259	214	0.447	2.760
167	0.308	1.903	191	0.366	2.261	215	0.448	2.766
168	0.309	1.907	192	0.366	2.262	216	0.450	2.776
217	0.451	2.782	241	0.529	3.267	265	0.636	3.923
218	0.452	2.787	242	0.533	3.289	266	0.660	4.074
219	0.455	2.810	243	0.538	3.322	267	0.661	4.077
220	0.459	2.832	244	0.548	3.383	268	0.673	4.156
221	0.469	2.893	245	0.548	3.383	269	0.687	4.242
222	0.476	2.937	246	0.548	3.383	270	0.691	4.264
223	0.482	2.975	247	0.553	3.416	271	0.692	4.270
224	0.483	2.981	248	0.564	3.482	272	0.694	4.284

[0200]

序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值
225	0.492	3.036	249	0.568	3.506	273	0.705	4.354
226	0.497	3.069	250	0.570	3.515	274	0.707	4.364
227	0.500	3.085	251	0.570	3.516	275	0.709	4.375
228	0.503	3.105	252	0.572	3.531	276	0.724	4.468
229	0.503	3.105	253	0.580	3.581	277	0.728	4.496
230	0.503	3.107	254	0.583	3.598	278	0.736	4.546
231	0.506	3.124	255	0.584	3.603	279	0.745	4.596
232	0.510	3.148	256	0.594	3.670	280	0.751	4.633
233	0.514	3.174	257	0.606	3.740	281	0.760	4.694
234	0.516	3.186	258	0.622	3.840	282	0.764	4.716
235	0.517	3.190	259	0.623	3.846	283	0.772	4.765
236	0.519	3.204	260	0.623	3.846	284	0.775	4.785
237	0.523	3.229	261	0.627	3.868	285	0.779	4.808
238	0.524	3.234	262	0.629	3.884	286	0.795	4.905
239	0.525	3.240	263	0.630	3.890	287	0.802	4.953
240	0.527	3.251	264	0.636	3.923	288	0.810	4.997
289	0.810	5.003	313	1.038	6.408	337	1.318	8.138
290	0.814	5.025	314	1.056	6.518	338	1.339	8.264
291	0.821	5.069	315	1.073	6.623	339	1.342	8.281
292	0.825	5.091	316	1.075	6.634	340	1.402	8.654
293	0.833	5.140	317	1.112	6.865	341	1.416	8.738
294	0.839	5.179	318	1.118	6.904	342	1.430	8.826
295	0.863	5.328	319	1.139	7.030	343	1.486	9.174
296	0.869	5.366	320	1.145	7.069	344	1.578	9.741
297	0.878	5.422	321	1.151	7.107	345	1.611	9.943
298	0.881	5.438	322	1.151	7.107	346	1.696	10.468
299	0.888	5.478	323	1.170	7.223	347	1.984	12.248
300	0.894	5.515	324	1.179	7.278	348	2.068	12.769
301	0.902	5.565	325	1.184	7.311	349	2.467	15.226
302	0.918	5.670	326	1.187	7.328	350	2.550	15.741
303	0.920	5.680	327	1.194	7.374	351	2.681	16.551
304	0.931	5.748	328	1.199	7.399			

	序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值	序号	OD450 值	S/N值
[0201]	305	0.949	5.856	229	1.212	7.482			
	306	0.957	5.906	330	1.220	7.532			
	307	0.963	5.947	331	1.234	7.614			
	308	0.984	6.077	332	1.275	7.868			
	309	0.984	6.077	333	1.292	7.972			
	310	0.985	6.082	334	1.294	7.989			
	311	1.009	6.226	335	1.311	8.092			
	312	1.024	6.320	336	1.316	8.121			

[0202] 表中加框的数据标记:序号128,标记S/N值小于等于1.6;序号173,标记OD₄₅₀值小于0.317;序号183,标记S/N值小于2.1。

[0203] (七)亚单位疫苗免疫猪血样检测

[0204] 1、材料

[0205] (1) 试验动物PCV3抗体阴性母猪,采用人工配种自然分娩的小猪养至12周龄,用做实验猪。

[0206] (2) PCV3亚单位疫苗制备根据本发明第一发明人,于2018年07月09日申请的申请号为“201810743651.8”,名称为“一种猪圆环病毒3型基因工程亚单位疫苗及其制备方法”中公开的制备方法来制备PCV3基因工程亚单位疫苗。

[0207] 2、免疫方法

[0208] 取14头3月龄左右猪(PCV3抗体检测均为阴性),随机分成2组,第1组7头颈部肌肉注射亚单位疫苗,2ml/头,第2组7头颈部肌肉注射含10%Montanide TM Gel 01ST佐剂生理盐水。免疫二次:一免后21天,各组加强免疫一次,免疫剂量、和免疫方式同第一次。第一次免疫后第21天和第42天,采血检测PCV3 ELISA抗体。

[0209] 3、结果如表12所示。

[0210] 表12

[0211]

组别	编号	免疫前		结果判断	免疫后21天		结果判断	免疫后42天		结果判断
		OD450	S/N		OD450	S/N		OD450	S/N	
亚单位疫苗免疫组	1	0.265	1.044	阴性	0.536	2.110	阳性	1.622	12.598	阳性
	2	0.239	0.942	阴性	0.608	2.395	阳性	1.903	14.764	阳性
	3	0.291	1.146	阴性	0.764	3.009	阳性	0.884	12.047	阳性
	4	0.244	0.962	阴性	0.595	2.344	阳性	1.932	15.000	阳性
	5	0.255	1.003	阴性	0.751	2.958	阳性	1.986	15.433	阳性
	6	0.234	0.921	阴性	0.681	2.682	阳性	1.409	10.945	阳性
	7	0.237	0.931	阴性	0.590	2.324	阳性	1.126	8.740	阳性
		0.252±0.020 ^a	0.993±0.080 [*]	--	0.646±0.087 ^b	2.546±0.343 ^{**}	--	1.552±0.430 ^c	12.790±2.455 ^{***}	--
空白对照组	1	0.221	0.900	阴性	0.225	0.9162	阴性	0.284	1.156	阴性
	2	0.295	1.201	阴性	0.256	1.042	阴性	0.263	1.071	阴性
	3	0.252	1.026	阴性	0.227	0.924	阴性	0.257	1.047	阴性
	4	0.249	1.014	阴性	0.272	1.108	阴性	0.248	1.010	阴性
	5	0.227	0.924	阴性	0.236	0.961	阴性	0.268	1.091	阴性
	6	0.277	1.128	阴性	0.272	1.108	阴性	0.226	0.920	阴性
	7	0.256	1.042	阴性	0.28	1.140	阴性	0.253	1.030	阴性
		0.254±0.026 ^a	1.034±0.106 [*]	--	0.252±0.023 ^a	1.028±0.094 [*]	--	0.257±0.018 ^a	1.046±0.073 [*]	--

[0212] SPSS统计分析软件Student-Newman-Keuls分析。在0.01置信水平,OD₄₅₀平均值后带后a,b,c不同尾标的组间有显著性差异。在0.01置信水平,S/N平均值后带后*,**,***不同尾标的组间有显著性差异。

[0213] 由表12可知,本ELISA试剂盒能检测出实验猪免疫PCV3基因工程亚单位疫苗后,体内的抗体变化。

[0214] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 长江大学

<120> 猪圆环病毒 3 型抗体的 ELISA 检测试剂盒及其制备方法与应用

<160> 15

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

<213> 重组 HCV3 Cap 蛋白(Porcine circovirus)

<400> 1

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg

20 25 30

Gly Ser Met Pro Trp His Ala Asn His Phe Ile Thr Arg Leu Asn Glu

[0215] 35 40 45

Trp Glu Thr Ala Ile Ser Phe Glu Tyr Tyr Lys Ile Leu Lys Met Lys

50 55 60

Val Thr Leu Ser Pro Val Ile Ser Pro Ala Gln Gln Thr Lys Thr Met

65 70 75 80

Phe Gly His Thr Ala Ile Asp Leu Asp Gly Ala Trp Thr Thr Asn Thr

85 90 95

Trp Leu Gln Asp Asp Pro Tyr Ala Glu Ser Ser Thr Arg Lys Val Met

100 105 110

Thr Ser Lys Lys Lys His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Ile Leu

115 120 125

Ala Gly Thr Thr Ser Ala His Pro Gly Gln Ser Leu Phe Phe Phe Ser

130 135 140

Arg Pro Thr Pro Trp Leu Asn Thr Tyr Asp Pro Thr Val Gln Trp Gly

145 150 155 160

Ala Leu Leu Trp Ser Ile Tyr Val Pro Glu Lys Thr Gly Met Thr Asp

	165	170	175
Phe Tyr Gly Thr Lys Glu Val Trp Ile Arg Tyr Lys Ser Val Leu Gly			
	180	185	190
Gly Glu Ala Val Ser Ile Ser Ser Ser Thr Ser Ala Pro Ser Asp Asn			
	195	200	205
Gln			

<210> 2

<211> 645

<212> DNA

<213> Porcine circovirus

<400> 2

[0216] atgagacaca gagctatatt cagaagaaga ccccgcccaa ggagacgacg acgccacaga 60

aggcgctatg ccagaagaag gctattcatt aggaggccca cagctggcac atactacaca 120

aagaaatact ccaccatgaa cgtcatttcc gttggaactc ctcagaataa taagccctgg 180

cacgccaacc acttcattac cgcctaaac gagtgggaaa ctgcaattag ctttgaatat 240

tataagatac taaagatgaa agttacactc agccctgtaa tttctccagc tcagcaaaca 300

aaaactatgt tcgggcacac agccatagat ctagacggcg cctggaccac aaacacttgg 360

ctccaagacg accettatgc ggaaagtcc actcgtaaag ttatgacctc taacacacac 420

cacagccgtt acttcacccc caaaccaatt ctggcgaggaa ctaccagcgc tcaccagga 480

caaagcctct tctttttctc cagaccaccc cgttggtca acacatatga cccaccgtt 540

caatggggag cactgctttg gagcatttat gtcccggaaa aaactggaat gacagacttc 600

tacggcacga aagaagtttg gattcgttac aagtcggttc tctaa 645

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Ggatccatgc cctggcacgcaa ccacttcatt acc

36

	<210> 4	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 4	
	aagcttttac tgattatcac tgggcgcaga ggtggaggag ctgatgctca cggettgcgc	60
	accgagaacg gacttgtaac gaatccaaac	90
	<210> 5	
	<211> 630	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 5	
	atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tgggtccgcg cggcagccat	60
	atggctagca tgactggtgg acagcaaata ggtcgccgat ccatgccctg gcacgccaac	120
[0217]	cacttcatta cccgcctaaa cgagtgggaa actgcaatta gctttgaata ttataagata	180
	ctaaagatga aagttacact cagccctgta atttctccag ctcagcaaac aaaaactatg	240
	ttcgggcaca cagccataga tctagacggc gcctggacca caaacacttg gctccaagac	300
	gacccttatg cggaaagttc cactcgtaaa gttatgacct ctacacacac acacagccgt	360
	tacttcaccc ccaaaccaat tctggcgagg actaccagcg ctcacccagg acaaagcctc	420
	ttctttttct ccagaccac cccgtggctc aacacatatg accccaccgt tcaatgggga	480
	gcactgcttt ggagcattta tgtcccgga aaaactggaa tgacagactt ctacggcacg	540
	aaagaagttt ggattcgta caagtccgtt ctcggtggcg aagccgtgag catcagctcc	600
	tccacctctg cgcccagtga taatcagtaa	630
	<210> 6	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 6	
	ttccgaggtg ccgggtaata ctagecc	27

	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 7	
	gaagcgcagc gggagcgcgc gcga	24
	<210> 8	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 8	
	gccgggtaat actagcccgg caccaaatg aga	33
	<210> 9	
[0218]	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 9	
	atttactttc acttagagaa cggacttgta gcg	33
	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 10	
	ggatccatga gacacagagc tatattcaga	30
	<210> 11	
	<211> 29	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 11	
	ggatccccaa ggagacgacg acgccacag	29
	<210> 12	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 12	
	ggatcctatg ccagaagaag gctattcatt agg	33
	<210> 13	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0219]	<400> 13	
	ggatcccca cagctggcac atactacac	29
	<210> 14	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 14	
	ggatccatga acgtcatttc cgttgaact cc	32
	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 15	
	aagcttgaga acggacttgt aacgaatcc	29

[0001]	序列表
[0002]	<110> 长江大学
[0003]	<120> 猪圆环病毒3型的ELISA抗体检测试剂盒及其制备方法与应用
[0004]	<160> 15
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 209
[0008]	<212> PRT
[0009]	<213> 重组HCV3 Cap蛋白(Porcine circovirus)
[0010]	<400> 1
[0011]	Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
[0012]	1 5 10 15
[0013]	Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
[0014]	20 25 30
[0015]	Gly Ser Met Pro Trp His Ala Asn His Phe Ile Thr Arg Leu Asn Glu
[0016]	35 40 45
[0017]	Trp Glu Thr Ala Ile Ser Phe Glu Tyr Tyr Lys Ile Leu Lys Met Lys
[0018]	50 55 60
[0019]	Val Thr Leu Ser Pro Val Ile Ser Pro Ala Gln Gln Thr Lys Thr Met
[0020]	65 70 75 80
[0021]	Phe Gly His Thr Ala Ile Asp Leu Asp Gly Ala Trp Thr Thr Asn Thr
[0022]	85 90 95
[0023]	Trp Leu Gln Asp Asp Pro Tyr Ala Glu Ser Ser Thr Arg Lys Val Met
[0024]	100 105 110
[0025]	Thr Ser Lys Lys Lys His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Ile Leu
[0026]	115 120 125
[0027]	Ala Gly Thr Thr Ser Ala His Pro Gly Gln Ser Leu Phe Phe Phe Ser
[0028]	130 135 140
[0029]	Arg Pro Thr Pro Trp Leu Asn Thr Tyr Asp Pro Thr Val Gln Trp Gly
[0030]	145 150 155 160
[0031]	Ala Leu Leu Trp Ser Ile Tyr Val Pro Glu Lys Thr Gly Met Thr Asp
[0032]	165 170 175
[0033]	Phe Tyr Gly Thr Lys Glu Val Trp Ile Arg Tyr Lys Ser Val Leu Gly
[0034]	180 185 190
[0035]	Gly Glu Ala Val Ser Ile Ser Ser Ser Thr Ser Ala Pro Ser Asp Asn
[0036]	195 200 205
[0037]	Gln
[0038]	<210> 2

[0039]	<211> 645
[0040]	<212> DNA
[0041]	<213> Porcine circovirus
[0042]	<400> 2
[0043]	atgagacaca gagctatatatt cagaagaaga ccccgcccaa ggagacgacg acgccacaga 60
[0044]	aggcgctatg ccagaagaag gctattcatt aggaggccca cagctggcac atactacaca 120
[0045]	aagaaatact ccacatgaa cgtcatttcc gttggaactc ctcagaataa taagccctgg 180
[0046]	cacgccaacc acttcattac ccgcctaaac gagtgggaaa ctgcaattag ctttgaatat 240
[0047]	tataagatac taaagatgaa agttacactc agccctgtaa tttctccagc tcagcaaaca 300
[0048]	aaaactatgt tcgggcacac agccatagat ctagacggcg cctggaccac aaacacttgg 360
[0049]	ctccaagacg acccttatgc ggaaagtcc actcgtaaag ttatgacctc taaaaaaaaa 420
[0050]	cacagccgtt acttcacccc caaaccaatt ctggcgggaa ctaccagcgc tcaccagga 480
[0051]	caaagcctct tctttttctc cagacccacc ccgtggctca acacatatga cccaccgtt 540
[0052]	caatggggag cactgctttg gagcatttat gtcccggaaa aaactggaat gacagacttc 600
[0053]	tacggcacga aagaagtttg gattcgttac aagtcggttc tctaa 645
[0054]	<210> 3
[0055]	<211> 33
[0056]	<212> DNA
[0057]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058]	<400> 3
[0059]	ggatccccct ggcacgcaa ccacttcatt acc 33
[0060]	<210> 4
[0061]	<211> 90
[0062]	<212> DNA
[0063]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064]	<400> 4
[0065]	aagcttttac tgattatcac tgggcgcaga ggtggaggag ctgatgctca cggttcgcc 60
[0066]	accgagaacg gacttgtaac gaatccaaac 90
[0067]	<210> 5
[0068]	<211> 630
[0069]	<212> DNA
[0070]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0071]	<400> 5
[0072]	atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat 60
[0073]	atggctagca tgactggtgg acagcaaagtg ggctcgggat ccatgccctg gcacgccaac 120
[0074]	cacttcatta cccgcctaaa cgagtgggaa actgcaatta gctttgaata ttataagata 180
[0075]	ctaaagatga aagttacact cagccctgta atttctccag ctcagcaaac aaaaactatg 240
[0076]	ttcgggcaca cagccataga tctagacggc gcctggacca caaacacttg gctccaagac 300
[0077]	gacccttatg cggaaagttc cactcgtaaa gttatgacct ctaaaaaaaaa acacagccgt 360

[0078] tacttcaccc ccaaaccaat tctggcggga actaccagcg ctcacccagg acaaagcctc 420
[0079] ttctttttct ccagaccac cccgtggctc aacacatatg accccaccgt tcaatgggga 480
[0080] gcactgcttt ggagcattta tgtcccgga aaaactggaa tgacagactt ctacggcacg 540
[0081] aaagaagttt ggattcgta caagtccgtt ctcggtggcg aagccgtgag catcagctcc 600
[0082] tccacctctg cgcccagtga taatcagtaa 630
[0083] <210> 6
[0084] <211> 27
[0085] <212> DNA
[0086] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0087] <400> 6
[0088] ttccgaggtg ccgggtaata ctagccc 27
[0089] <210> 7
[0090] <211> 24
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0093] <400> 7
[0094] gaagcgcagc gggagcgcgc gcga 24
[0095] <210> 8
[0096] <211> 33
[0097] <212> DNA
[0098] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0099] <400> 8
[0100] gccgggtaat actagcccgg caccaaatg aga 33
[0101] <210> 9
[0102] <211> 33
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0105] <400> 9
[0106] atttactttc acttagagaa cggacttgta gcg 33
[0107] <210> 10
[0108] <211> 30
[0109] <212> DNA
[0110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0111] <400> 10
[0112] ggatccatga gacacagagc tatattcaga 30
[0113] <210> 11
[0114] <211> 29
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0117]	<400> 11
[0118]	ggatccccaa ggagacgacg acgccacag 29
[0119]	<210> 12
[0120]	<211> 33
[0121]	<212> DNA
[0122]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0123]	<400> 12
[0124]	ggatcctatg ccagaagaag gctattcatt agg 33
[0125]	<210> 13
[0126]	<211> 29
[0127]	<212> DNA
[0128]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0129]	<400> 13
[0130]	ggatcccca cagctggcac atactacac 29
[0131]	<210> 14
[0132]	<211> 32
[0133]	<212> DNA
[0134]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0135]	<400> 14
[0136]	ggatccatga acgtcatttc cgttgaact cc 32
[0137]	<210> 15
[0138]	<211> 29
[0139]	<212> DNA
[0140]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0141]	<400> 15
[0142]	aagcttgaga acggacttgt aacgaatcc 29

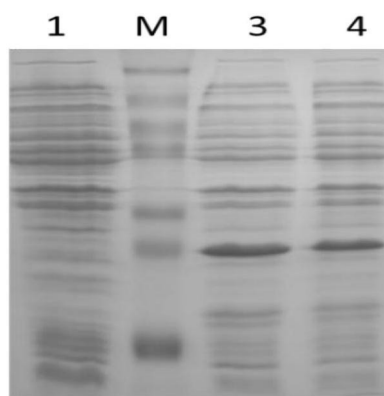


图1

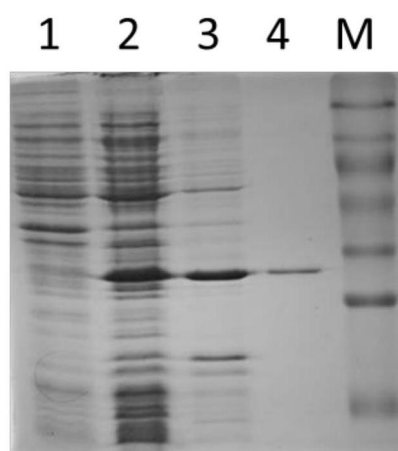


图2

专利名称(译)	猪圆环病毒3型抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110105436B	公开(公告)日	2020-05-26
申请号	CN201910281613.X	申请日	2019-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	长江大学		
申请(专利权)人(译)	长江大学		
当前申请(专利权)人(译)	长江大学		
[标]发明人	荣俊 匡红艳 徐保娟 王席		
发明人	荣俊 李国攀 匡红艳 徐保娟 王席		
IPC分类号	C07K14/01 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/569 G01N33/535 G01N33/543 C12R1/19		
CPC分类号	C07K14/005 C12N15/70 C12N2750/10022 C12N2750/10051 G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/56983 G01N2333/01 G01N2469/20		
审查员(译)	陈晋		
其他公开文献	CN110105436A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了重组猪圆环病毒3型(PCV3)Cap蛋白、ELISA检测试剂盒及其制备方法与应用。该重组PCV3Cap蛋白的制备包括重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因的克隆及目的基因的筛选；重组猪圆环病毒3型Cap蛋白基因改造；构建重组PCV3Cap蛋白表达质粒载体、工程菌；重组PCV3Cap蛋白的诱导表达及纯化；再用重组PCV3Cap蛋白制备猪圆环病毒3型Cap蛋白抗体ELISA检测试剂盒；该检测试剂盒可准确测定猪体内抗PCV3Cap蛋白抗体。该试剂盒可用于猪场中PCV3流行病学监测，也可用于疫苗免疫后猪血清抗体的检测以协助判断疫苗的免疫效果。

