



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109856387 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201910065715.8

(22)申请日 2019.01.23

(71)申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗1号

(72)发明人 杨倩 王永恒 李昱辰

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 王艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

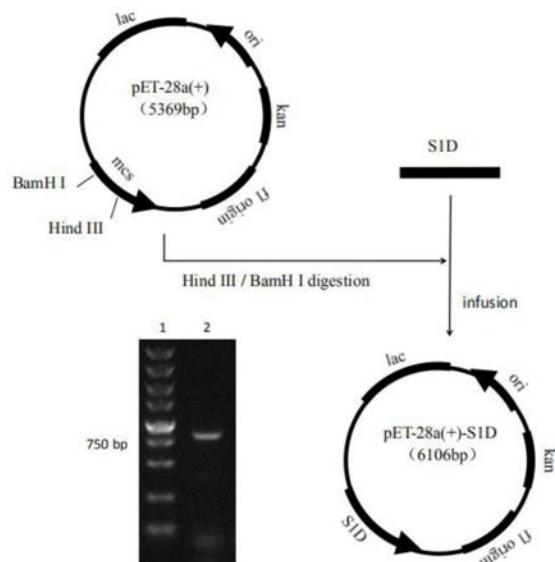
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用,检测试剂盒包括重组蛋白S1D。本发明还公开基于S1D蛋白检测鼻液和唾液中猪流行性腹泻病毒SIgA的间接ELISA方法,通过基因克隆表达技术成功构建重组质粒,蛋白纯化亲和层析技术获取猪流行性腹泻病毒S1D蛋白,以S1D蛋白为包被抗原建立间接ELISA检测黏液中猪流行性腹泻病毒SIgA抗体方法。可用于猪群中猪流行性腹泻病毒特异性SIgA抗体检测,判断猪群中猪流行性腹泻病毒特异性SIgA抗体水平。该方法具有较好的特异性和敏感性,可应用于猪流行性腹泻病毒SIgA抗体的临床检测及黏膜免疫评价。本发明操作简单,应用范围广。



1. 猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括重组蛋白S1D。

2. 根据权利要求1所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述重组蛋白S1D是通过PCR方法从猪流行性腹泻病毒ZJ-08株全基因组扩增得到的S1D基因片段克隆到pET28a (+) 中,然后转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞中,并表达纯化获得该重组蛋白。

3. 根据权利要求2所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述PCR方法中的引物序列如下:

F: 5' -AGTCGGCCGCAAGCTTACTAAAGTTGGTGGAAATACTAATATTCCCAGTAACC-3' ,

R: 5' -AAATGGGTCGCGGATCCGGGTTAGTTCTTCTGTGTTGACACTAGAC-3' 。

4. 根据权利要求1或2所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述重组蛋白S1D的浓度为0.5~4 μ g/mL。

5. 根据权利要求1或2所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒还包括辣根过氧化物酶标记羊抗猪IgA抗体、包被液、磷酸盐缓冲液、洗涤液、封闭液、稀释液、底物显色液和终止液。

6. 根据权利要求3所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述包被液的组成为:碳酸钠和碳酸氢钠加蒸馏水混合,调pH值到9.6。

7. 根据权利要求3所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液的组成为:氯化钠、磷酸二氢钾、氯化钾和十二水合磷酸氢二钠,加蒸馏水混合,调pH值到7.4。

8. 根据权利要求3所述的ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述封闭液为PBS稀释的脱脂奶粉或PBS稀释的牛血清白蛋白。

9. 一种基于S1D蛋白检测鼻液和唾液中猪流行性腹泻病毒SIgA的间接ELISA方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

1) 包被抗原重组蛋白S1D的制备;

2) 用碳酸盐缓冲液稀释包被抗原,包被96孔ELISA包被板,4℃条件下包被12-14 小时后甩干,采用PBST洗涤3-4次,拍干;鼻拭子封闭采用PBS稀释的脱脂奶粉,口腔拭子封闭采用PBS稀释的牛血清白蛋白,37℃条件下封闭后甩干,用PBST洗涤3-4次,拍干;以PBS稀释的牛血清白蛋白作为样品稀释液进行稀释,37℃条件下孵育90 min后甩干,用PBST洗涤3-4次,拍干;HRP标记羊抗猪IgA抗体用样品稀释液稀释,37℃条件下孵育后甩干,用PBST洗涤3-4次,每次5 min,拍干;加入底物TMB显色液,37℃条件下作用7-15 min后加硫酸终止液终止反应;采用酶标仪OD450nm吸光度下读取数据;

3) 利用以上ELISA方法检测PEDV阴性鼻拭子,口腔拭子样品,测定OD450nm值,计算阴性样品平均值 \bar{X} 和标准差SD,当待检样品OD450nm值 $\geq \bar{X}+3SD$,即可判定为阳性,其他判定为阴性。

10. 根据权利要求9所述的间接ELISA方法,其特征在于,所述鼻拭子稀释比例为1:1,口腔拭子稀释比例为1:2。

猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于兽医生物技术领域,具体涉及猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用,本发明基于猪流行性腹泻病毒S1D蛋白为包被抗原,建立检测鼻液 和唾液中猪流行性腹泻病毒SIgA抗体的间接ELISA方法。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种以猪水样腹泻、呕吐、脱水为特征的急性肠 道传染病。该病对哺乳仔猪危害最大,呈现高发病率、高死亡率等特点,其他年龄段的 猪也易感染,且可持续带毒。目前,PED在全世界广泛流行和迅速传播,给各国养猪业带来了巨大的经济损失。

[0003] PEDV为冠状病毒,其病毒粒子共包含4个结构蛋白:纤突蛋白 (S)、囊膜蛋白 (E) 、膜蛋白 (M) 以及核衣壳蛋白 (N)。其中S蛋白是位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白,病 毒粒子可以通过S蛋白与细胞表面受体结合,借助细胞膜融合机制从而侵入宿主细胞, 该蛋白还可以激发感染宿主产生中和抗体,在病毒的预防机制中发挥着重要的生物学作 用。根据其不同部位的功能,分为具有识别结合宿主特异性受体位点的S1亚基(1~ 789aa) 和介导病毒与宿主细胞膜融合的S2亚基(790~1383aa)。其中,S1亚基的S1D 区(534-789aa),携带了 PEDV主要的B细胞抗原表位,能够给动物机体提供免疫保 护作用。因此选取该区域基因构 建表达载体,表达的蛋白可以作为良好的制备抗体检 测 试剂盒的备选包被抗原。

[0004] PEDV主要通过消化道入侵并主要引起小肠发生病变。通过黏膜免疫可直接切断 PEDV的主要入侵途径,有效防止PED的发生。黏膜免疫的主要效应因子是分泌型 IgA (Secretory immunoglobulin A, SIgA),主要存在于消化道,呼吸道以及生殖道黏液中, 其具有多种生物学功能,如抑制病原体粘附、抗病毒感染、免疫清除等,尤其SIgA通 过与病毒结合并能阻止病毒的入侵受到高度关注。SIgA已成为检测和判断黏膜免疫和 抗病毒的重要指标。目前,口服免疫和鼻腔免疫(黏膜免疫)是预防PED的最佳免疫 途径。但现在应用的 检测主要针对血清IgG和乳汁IgA,少量检测肠道黏液IgA,而且 所用的ELISA方法主要通过 PEDV全病毒包被。至今还没有评价黏液中PEDV特异性 抗体的标准,因此限制了黏膜免疫的 应用。

[0005] 试验表明血清中IgG的抗体效价不能代表PEDV黏膜免疫水平,而乳汁的采集比较 繁琐困难,且有一定的时间局限性;肠道黏液的采集需要处死动物,不利于活体检测, 采集更为繁琐局限。相比之下,鼻液和唾液采集方便,无时间局限性,且不同黏膜处 SIgA水平具 有一定相关性。此外PEDV全病毒包被因其病毒的扩繁和纯化操作复杂, 试验要求高、成本 昂贵、耗时长产率低,不能被广泛应用,从而限制了PEDV抗体的检 测。大肠杆菌原核表达系 统简便,可广泛应用。因此,本发明建立了一种检测鼻液和唾 液中PEDV特异性SIgA抗体水 平的方法,从而评估猪群PEDV黏膜免疫力水平。

发明内容

[0006] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供了猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供了一种基于猪流行性腹泻病毒S1D蛋白建立的间接ELISA检测方法,可用于猪群中黏膜处猪流行性腹泻病毒特异性SIgA抗体检测,以此判断猪群中特异性黏膜免疫水平。

[0008] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案是猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒,所述检测试剂盒包括重组蛋白S1D。

[0009] 其中,所述重组蛋白S1D是通过PCR方法从猪流行性腹泻病毒ZJ-08株全基因组扩增得到的S1D基因片段克隆到pET28a (+) 中,然后转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞 中,然后表达纯化获得该重组蛋白。

[0010] 其中,所述PCR方法中的引物序列如下:

[0011] F: 5' -AGTGC~~GG~~CCGCAAGCTTACTAAAGTTGGTGGAAACTAATATTCCCAGTA ACC-3' ,

[0012] R: 5' -AAATGGGT~~CG~~GGATCCGGTTAGTTCTTCTGTGTTGACACTAGAC-3' 。

[0013] 其中,所述包被抗原重组蛋白S1D的浓度为0.5~4 μ g/mL。作为优选,包被抗原重组蛋白S1D的浓度为2 μ g/mL。

[0014] 其中,所述检测试剂盒还包括辣根过氧化物酶标记羊抗猪IgA抗体、包被液、磷酸盐缓冲液、洗涤液、封闭液、稀释液、底物显色液和终止液。

[0015] 其中,所述包被液的组成为:碳酸钠和碳酸氢钠加蒸馏水混合,调pH值到9.6。

[0016] 其中,所述磷酸盐缓冲液的组成为:氯化钠、磷酸二氢钾、氯化钾和十二水合磷酸氢二钠,加蒸馏水混合,调pH值到7.4。

[0017] 其中,所述封闭液为PBS稀释的脱脂奶粉或PBS稀释的牛血清白蛋白。

[0018] 本发明内容还包括一种基于S1D蛋白检测鼻液和唾液中猪流行性腹泻病毒SIgA的间接ELISA方法,所述方法包括如下步骤:

[0019] 1)包被抗原重组蛋白S1D的制备;

[0020] 2)用碳酸盐缓冲液稀释包被抗原,包被96孔ELISA包被板,4℃条件下包被12-14小时后甩干,采用PBST洗涤3-4次,拍干;鼻拭子封闭采用PBS稀释的脱脂奶粉,口腔拭子封闭采用PBS稀释的牛血清白蛋白,37℃条件下封闭后甩干,用PBST洗涤3-4次,拍干;以PBS稀释的牛血清白蛋白作为样品稀释液进行稀释,37℃条件下孵育90min后甩干,用PBST洗涤3-4次,拍干;HRP标记羊抗猪IgA抗体用样品稀释液稀释,37℃条件下孵育后甩干,用PBST洗涤3-4次,每次5min,拍干;加入底物TMB显色液,37℃条件下作用7-15min后加硫酸终止液终止反应;采用酶标仪OD450nm吸光度下读取数据;

[0021] 3)利用以上ELISA方法检测PEDV阴性鼻拭子,口腔拭子样品,测定OD450nm值,计算阴性样品平均值(\bar{x})和标准差(SD),当待检样品OD450nm值 $\geq \bar{x}+3SD$,即可判定为阳性,其他判定为阴性。

[0022] 具体地,针对鼻液:OD450nm>0.1375判为阳性;OD450nm \leq 0.1375判为阴性;针对唾液:OD450nm>0.1442判为阳性;OD450nm \leq 0.1442判为阴性。

[0023] 其中,所述鼻拭子稀释比例为1:1,口腔拭子稀释比例为1:2。

[0024] 有益效果:本发明相对于现有技术,具有以下优点:

[0025] 1、本发明建立了一种用于检测唾液和鼻液中猪流行性腹泻特异性SIgA抗体的ELISA检测试剂盒和检测方法,为检测预防猪流行性腹泻黏膜免疫的效果提供的一种简便方法。本发明中所用的包被抗原PEDV S1D蛋白是利用基因克隆PCR方法,扩增PEDV ZJ-08株纤突S蛋白B细胞抗原表位区域S1D,将S1D基因插入大肠杆菌表达载体 pET28a (+) 中构建重组质粒pET28a (+)-S1D,再将该重组质粒转入大肠杆菌BL21中进行原核表达,经过变性、纯化、复性后而形成的抗原蛋白。

[0026] 2、本发明使用PEDV S1D蛋白作为包被抗原,一方面是由于是PEDV S蛋白B细胞抗原表位区域,在感染或免疫后第一时间机体能分泌针对其特异性抗体反应,从而可以为该病原的感染或免疫作检测;另一方面,该蛋白具有一定种属特异性,与其他病毒不存在血清学交叉干扰,从而可以保证该检测方法的特异性。

[0027] 3、本发明建立的ELISA检测试剂盒和检测方法是通过大肠杆菌原核表达目的蛋白进行检测,相对于PEDV全病毒检测方法操作简单,表达量高,适用于大规模推广应用。而且本发明具有较好的敏感性、特异性、重复性,可以快速,批量检测猪鼻液和唾液中 PEDV特异性SIgA抗体水平,从而较好的评价猪群中黏膜免疫水平。

附图说明

[0028] 图1:重组载体质粒pET28a (+)-S1D图谱;S1D基因PCR电泳图(1号泳道为Marker, 2号泳道为目的基因条带);

[0029] 图2:重组质粒蛋白表达SDS-PAGE图谱(M为Marker,1号泳道为原始质粒,2号泳道为重组质粒)。

具体实施方式

[0030] 下面结合附图对本发明作更进一步的说明。

[0031] 实施例1 ELISA检测试剂盒的制备

[0032] 1、包被抗原的制备

[0033] 根据Cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus strain Zhejiang08 provides effective immune protection attributed to dendritic cell stimulation [J]. Vaccine, 2017:S0264410X17314603中PEDV ZJ 08 S1基因序列,设计两条引物,引物序列如下:

[0034] F:5' -AGTGC GGCGCAAGCTTACTAAAGTTGGTGGAAACTAATATTCCAG TAACC-3' ,

[0035] R:5' -AAATGGGT CGCGATCCGGTTAGTTCTTCTGTGTTGACACTA GAC-3' ;

[0036] 通过PCR方法从猪流行性腹泻病毒ZJ-08株全基因组(大北农集团兽医研究中心馈赠)中扩增到长度约为750bp基因序列(序列表SEQ ID NO:1所示),将其通过同源重组方法克隆到本实验室保存的原核表达载体pET28a (+) 中,并命名为pET28a (+)-S1D (如图1);将重组原核表达载体化学转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞中,经0.5mmol/L IPTG诱导高效表达该重组蛋白,SDS-PAGE验证该蛋白主要以包涵体形式表达,蛋白大小为32kd(如图2);采用8mol/L尿素变性,镍离子亲和层析纯化蛋白,6mol/L,4 mol/L,2mol/L,1mol/L,PBS梯度复性获取纯化后蛋白,制得包被抗原。

[0037] 2、试剂盒中包含的其他检测用试剂及溶液

[0038] 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗猪IgA抗体,艾博抗(上海)贸易有限公司

[0039] 包被液(碳酸盐缓冲液):碳酸钠1.5g,碳酸氢钠2.9g,加蒸馏水定容至1 000mL,调pH值到9.6;

[0040] 0.02mol/L磷酸盐缓冲液:氯化钠8g,磷酸二氢钾0.2g,氯化钾0.2g,十二水合磷酸氢二钠2.9g,加蒸馏水定容至1 000mL,调pH值到7.4;

[0041] 洗涤液:含有0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液;

[0042] 3%BSA封闭液:3g牛血清白蛋白(BSA)用0.02mol/L磷酸盐缓冲液稀释,定容至100mL;

[0043] 5%脱脂奶封闭液:5g脱脂牛奶用0.02mol/L磷酸盐缓冲液稀释,定容至100mL;

[0044] 稀释液:0.1g牛血清白蛋白(BSA)用0.02mol/L磷酸盐缓冲液稀释,定容至100 mL;

[0045] 底物显色液:TMB单组分显色液,索莱宝生物科技有限公司;

[0046] 终止液:ELISA终止液,索莱宝生物科技有限公司。

[0047] 实施例2 ELISA检测试剂盒的检测应用

[0048] 1、样品的采集

[0049] 1.1鼻拭子采集选取无菌医用棉签,轻旋进入猪鼻腔,待猪出现2个喷嚏后轻旋取出,置于存有1mL无菌0.01mol/LPBS的1.5mL离心管中,4℃静置过夜,充分震荡 后取出鼻拭子,悬液4℃12000r/min离心10min,取上清即为鼻拭子样品,置于-70℃ 保存备用。

[0050] 1.2口腔拭子采集选取无菌医用棉签,轻旋进入猪口腔,让猪咀嚼10次,取出拭子,置于存有1mL无菌0.01mol/LPBS的1.5mL离心管中,4℃静置过夜,充分震荡 后取出拭子,悬液4℃12 000r/min离心10min,取上清即为口腔拭子样品,置于-70℃ 保存备用。

[0051] 2、以实施例1制备纯化的S1D蛋白作为包被抗原优化间接ELISA方法

[0052] 2.1抗原最佳包被浓度和样品稀释度选择:

[0053] 不同浓度包被抗原和不同稀释度的PEDV特异性阴、阳性样品按方正滴定方法进行组合,每组设置2个重复取平均值。由表1可知在抗原包被浓度为2 μ g/mL,PEDV特 异性鼻腔黏液阴、阳性样品1:1稀释时,P/N值最大,非特异性最小,实验的灵敏度较 高,所以确定包被抗原浓度为2 μ g/mL,PEDV特异性鼻腔黏液阴、阳性样品1:1稀释 时检测效果最佳。表2数据显示,当包被抗原浓度为2 μ g/mL,口腔黏液阴、阳性样品 1:2稀释时检测效果最佳。

[0054] 表1检测鼻腔黏液样品抗原包被浓度及样品稀释度的确定

| Dilution | 样品 Sample | 4 μ g/mL | 2 μ g/mL | 1 μ g/mL | 0.5 μ g/mL |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| [0055] | 阴 Negative | 0.283 | 0.126 | 0.106 | 0.071 |
| | 阳 Positive | 1.265 | 1.255 | 0.707 | 0.552 |
| | P/N | 4.470 | 9.960 | 6.700 | 7.775 |
| | 阴 Negative | 0.108 | 0.067 | 0.046 | 0.023 |
| | 阳 Positive | 0.320 | 0.198 | 0.136 | 0.112 |
| | P/N | 2.963 | 2.955 | 2.957 | 4.870 |
| 1:4 | 阴 Negative | 0.077 | 0.043 | 0.024 | 0.014 |
| | 阳 Positive | 0.246 | 0.162 | 0.113 | 0.076 |
| | P/N | 3.195 | 3.767 | 4.708 | 5.429 |

[0056] 表2检测口腔黏液样品抗原包被浓度及样品稀释度的确定

| 稀释度 Dilution | 样品 Sample | 4 μ g/mL | 2 μ g/mL | 1 μ g/mL | 0.5 μ g/mL |
|-----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| [0057] | 阴 Negative | 0.416 | 0.232 | 0.231 | 0.174 |
| | 1:1 阳 Positive | 1.062 | 0.744 | 0.692 | 0.506 |
| | P/N | 2.553 | 3.207 | 2.996 | 2.908 |
| | 阴 Negative | 0.254 | 0.128 | 0.130 | 0.117 |
| | 1:2 阳 Positive | 0.902 | 0.631 | 0.508 | 0.454 |
| | P/N | 3.551 | 4.930 | 3.908 | 3.880 |
| | 阴 Negative | 0.148 | 0.105 | 0.096 | 0.071 |
| | 1:4 阳 Positive | 0.684 | 0.511 | 0.404 | 0.333 |
| | P/N | 4.622 | 4.857 | 4.208 | 4.690 |

[0058] 2.2最佳封闭液和酶标抗体稀释度的确定

[0059] 在包被2 μ g/mL PEDV S1D蛋白抗原后,用3% BSA、5% 脱脂乳、20mg/mL海藻糖进行封闭,鼻腔黏液样品阴、阳性区分明显,其中以5% 脱脂乳作为封闭液,酶标抗体稀释度为1:2 000的P/N值最大,非特异性最小(见表3),所以确定封闭液为5% 脱脂乳,酶标抗体稀释度为1:2 000时检测效果最佳。表4显示,当选用3% BSA封闭,酶标抗体稀释度为1:2 000时,口腔黏液样品检测效果最佳。

[0060] 表3检测鼻腔黏液样品最佳封闭液和酶标抗体稀释度的确定

| 稀释度 Dilution | 样品 Sample | 封闭液 Blocking solution | | |
|-----------------|-------------------|-----------------------|---------|--------------|
| | | 3 % BSA | 5 % 脱脂乳 | 20 mg/mL 海藻糖 |
| [0061] | 阴 Negative | 0.303 | 0.197 | 0.319 |
| | 1:1000 阳 Positive | 1.534 | 1.424 | 1.704 |
| | P/N | 5.063 | 7.228 | 5.342 |
| | 阴 Negative | 0.287 | 0.143 | 0.272 |
| | 1:2000 阳 Positive | 1.367 | 1.044 | 1.525 |
| | P/N | 4.763 | 7.306 | 5.607 |
| | 阴 Negative | 0.123 | 0.104 | 0.134 |
| | 1:4000 阳 Positive | 0.270 | 0.358 | 0.374 |
| | P/N | 2.195 | 1.530 | 2.791 |

[0062] 表4检测口腔黏液样品最佳封闭液和二抗稀释度的确定

| 稀释度 Dilution | 样品 Sample | 封闭液 Blocking solution | | |
|-----------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| | | 3 % BSA | 5 % 脱脂乳 5 % Skim milk | 20 mg/mL 海藻糖 20 mg/mL Trehalose |
| | | | | |
| [0063] | 阴 Negative | 0.198 | 0.264 | 0.282 |
| | 1:1000 阳 Positive | 0.609 | 0.766 | 0.617 |
| | P/N | 3.076 | 2.902 | 2.188 |
| | 阴 Negative | 0.153 | 0.180 | 0.229 |
| | 1:2000 阳 Positive | 0.603 | 0.569 | 0.455 |
| | P/N | 3.941 | 3.161 | 1.987 |
| [0064] | 阴 Negative | 0.125 | 0.105 | 0.122 |
| | 1:4000 阳 Positive | 0.412 | 0.413 | 0.422 |
| | P/N | 3.296 | 3.933 | 3.459 |

[0064] 3.以实施例1制备纯化的S1D蛋白作为包被抗原建立间接ELISA方法

[0065] 3.1包被用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释包被抗原,选用96孔ELISA包被板(购自依科赛生物科技(太仓)有限公司),蛋白包被量为2 μ g/mL,100 μ L/孔,4℃条件下包被12-14小时后甩干,采用PBST,pH为7.4作为洗涤液,室温下洗涤3-4次,每次5min,拍干;

[0066] 3.2封闭鼻拭子封闭采用5%脱脂奶粉,口腔拭子封闭采用3%牛血清白蛋白(BSA),400 μ L/孔,37℃条件下封闭2h后甩干,用洗涤液洗涤3-4次,每次5min,拍干;

[0067] 3.3样品作用条件样品稀释液稀释黏液样品(鼻拭子1:1;口腔拭子1:2),100 μ L/孔,37℃条件下孵育90min后甩干,用洗涤液洗涤3-4次,每次5min,拍干;

[0068] 3.4HRP标记羊抗猪抗体作用条件HRP标记羊抗猪抗体,用样品稀释液稀释,其中鼻拭子酶标抗体1:2 000稀释后,100 μ L/孔,37℃条件下孵育1h后甩干;口腔拭子二抗1:2 000稀释后,100 μ L/孔,37℃条件下孵育0.5h后甩干,用洗涤液洗涤3-4次,每次5min,拍干;

[0069] 3.5底物显色底物TMB显色液,100 μ L/孔,37℃条件下作用7-15min后加硫酸终止液,50 μ L/孔,终止反应;

[0070] 3.6读数采用酶标仪OD450nm吸光度下读取数据,计算结果。

[0071] 4、间接ELISA结果判定标准

[0072] 利用以上ELISA方法检测16份PEDV阴性鼻拭子,口腔拭子样品,测定OD450nm值,计算平均值(\bar{x})和标准差(SD),当待检样品OD450nm值 $\geq \bar{x}+3SD$,即可判定为阳性,其他判定为阴性。

[0073] 鼻液:OD450nm >0.1375 判为阳性;OD450nm ≤ 0.1375 判为阴性;

[0074] 唾液:OD450nm >0.1442 判为阳性;OD450nm ≤ 0.1442 判为阴性。

[0075] 实施例3 ELISA检测试剂盒敏感性试验

[0076] 将3份不同SIgA效价的阳性鼻拭子从1:1进行倍比稀释,采用本发明所建立的ELISA检测试剂盒和检测方法进行检测,同时设阴性对照,评价该检测试剂盒和检测方法的敏感性。结果如表5,3份阳性样品当稀释度达到1:16时,测得值均大于临界值0.1375,且阴性样品值均为大于临界值,表明该检测试剂盒和该检测方法检测鼻拭子抗体具有较好的敏感性。

[0077] 同时,取2份不同SIgA效价的阳性口腔拭子从1:1进行倍比稀释,采用本发明所建立的ELISA检测试剂盒和检测方法进行检测,同时设阴性对照,评价该方法的敏感性。结果

如表6,样品当稀释度达到1:16时,测得值均大于临界值0.1442,且阴性样品 值均为大于临界值,表明该方法检测口腔拭子也具有较好的敏感性。

[0078] 表5鼻拭子敏感性试验结果

[0079]

| 样品 | OD450nm | 样品稀释度 Sample Dilution | | | | |
|--------|---------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 |
| | 1 | 1.048 | 0.617 | 0.367 | 0.211 | 0.165 |
| | | | | | | 0.124 |
| [0080] | | | | | | |
| | 2 | 0.811 | 0.415 | 0.312 | 0.201 | 0.162 |
| 鼻拭子 | 3 | 0.918 | 0.54 | 0.333 | 0.220 | 0.196 |
| | 阴性 | 0.091 | 0.078 | 0.067 | 0.043 | 0.032 |
| | | | | | | 0.028 |

[0081] 表6口腔拭子敏感性试验结果

[0082]

| 样品 | OD450nm | 样品稀释度 Sample Dilution | | | | |
|------|---------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 |
| | 1 | 0.811 | 0.455 | 0.301 | 0.226 | 0.167 |
| 口腔拭子 | 2 | 1.453 | 0.989 | 0.702 | 0.652 | 0.251 |
| | 阴性 | 0.104 | 0.095 | 0.087 | 0.073 | 0.062 |
| | | | | | | 0.054 |

[0083] 实施例4特异性试验

[0084] 用该方法分别对猪流行性腹泻病毒、猪圆环病毒的阳性样品进行特异性检测,每份 样品做3个重复,同时设立阴性对照,观察该检测试剂盒和检测方法的特异性。结果如表7,表8所示,除猪流行性腹泻病毒阳性鼻拭子、口腔拭子样品值大于临界值外,其 余如猪 圆环病毒口腔及鼻拭子样品,猪流行性腹泻病毒阴性样品检测结果均呈阴性,表 明该 ELISA检测试剂盒和检测方法具有较好的特异性。

[0085] 表7鼻拭子特异性试验结果

[0086]

| 样品 Samples | PCV | 阳性对照 Positive control | | 阴性对照 Negative control |
|---------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|
| | | | | |
| OD450nm | 0.110 | | 1.079 | 0.117 |
| 结果判定 | — | | + | — |

表 8 口腔拭子特异性试验结果

| 样品 Samples | PCV | 阳性对照 Positive control | | 阴性对照 Negative control |
|---------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|
| | | | | |
| OD450nm | 0.121 | | 1.432 | 0.095 |
| 结果判定 | — | | + | — |

[0087] 实施例5重复性试验

[0088] 各取份3份鼻拭子,口腔拭子样品,用两批纯化蛋白S1D包被96孔酶联板,各重 复检测3次,应用统计学软件SPSS计算标准偏差及变异系数,对该ELISA检测试剂盒 和检测方法的重复性及稳定性进行统计分析。结果如表9,表10所示,3份鼻拭子样品 的OD450nm变异系数(CV) 平均值为9.2%,3份口腔拭子样品的OD450nm变异系数 (CV) 平均值为8.7%,均< 10%, 表明该ELISA检测试剂盒和检测方法检测鼻拭子, 口腔拭子样品具有良好的重复性。

[0089] 表9鼻拭子重复性试验结果

| Test | Nasal | 1 | 2 | 3 |
|----------|-------|-------|-------|-------|
| 第一批 | 1 | 0.889 | 0.373 | 1.204 |
| | 2 | 0.872 | 0.265 | 1.166 |
| | 3 | 0.881 | 0.319 | 1.185 |
| [0090] | 1 | 0.812 | 0.320 | 0.992 |
| | 2 | 0.734 | 0.306 | 1.349 |
| | 3 | 0.704 | 0.313 | 1.171 |
| 平均值 | | 0.815 | 0.316 | 1.178 |
| 标准偏差 | | 0.073 | 0.032 | 0.104 |
| 变异系数 (%) | | 8.9 | 9.9 | 8.8 |

[0091] 表10口腔拭子重复性试验结果

| Test | Oral | 1 | 2 | 3 |
|----------|------|-------|-------|-------|
| 第一批 | 1 | 0.061 | 0.471 | 1.791 |
| | 2 | 0.069 | 0.536 | 1.864 |
| | 3 | 0.063 | 0.586 | 1.807 |
| [0092] | 1 | 0.061 | 0.573 | 1.543 |
| | 2 | 0.053 | 0.603 | 1.557 |
| | 3 | 0.056 | 0.584 | 1.616 |
| 平均值 | | 0.061 | 0.558 | 1.696 |
| 标准偏差 | | 0.006 | 0.048 | 0.140 |
| 变异系数 (%) | | 9.2 | 8.6 | 8.3 |

[0093] S1D蛋白包被对疫苗免疫评价试验

[0094] 采用本发明建立的以S1D蛋白包被的间接ELISA检测试剂盒以及检测方法对免疫猪群和未免疫猪群进行黏液(鼻拭子和口腔拭子) 样品猪流行性腹泻病毒特异性SIgA 抗体进行检测对比。结果如表11所示,本次试验共采集免疫猪群的84份鼻拭子和口腔 拭子样品,应用本发明检测其中70份样品为阳性,抗体阳性率为83.33%。采集未免疫 猪群共26份鼻拭子和口腔拭子样品,未检测出抗体阳性样品。本发明与以PEDV全病 毒包被的检测方法比较,均显示免疫猪群有较好的抗体阳性率,其符合率达94.58%。表明本发明可以作为检测黏液中猪流行性腹泻病毒SIgA抗体方法,评价猪群黏膜免疫 水平。

[0095] 表11疫苗免疫评价比较试验结果

| [0096] | 猪群背景 | 抗原 | 样品数 | 鼻拭子阳性 | 口腔拭子阳性 | 抗体阳性率 |
|--------|-------------------|----------|----------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Imuune background | Antigen | Sample numbers | 样品 Positive samples of nasal | 样品 Positive samples of oral | (%) Antibody positive rate |
| | 免疫 | PEDV S1D | 84 | 70 | 70 | 83.3 |
| | 未免疫 | PEDV S1D | 26 | 0 | 0 | 0 |

[0097] 上述实施例主要是通过对鼻腔黏液,口腔黏液中猪流行性腹泻病毒特异性SIgA抗体的检测,主要是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动(如检测样品的选择,可以是肠道黏液、乳汁、血清等)。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举,而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

[0098] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 南京农业大学

<120> 猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 756

<212> DNA

<213> PEDV ZJ-08 S1D基因序列 (PEDV ZJ-08 S1D)

<400> 1

actaaagttg gtggaaatac taatattccc agtaaccatg ggtcaatct tgacttggcc 60
atcctgaagt gggacatagc caatactgcc agatttacag acacctatgt tactatacac 120
caacacaggc tctgtacaat tggagccatc attagaatgg tagaagaaac caggcaactc 180
cctggattt ttaaaaagtgg agttagacaa actagaaata acacccacta tatcatcatc 240
aacatatgca gcctgctctg aaaaagaaca tggcgtaaaca gaataaacag caccactagt 300
gacattctta aaggctaaca actgtccaga atcagatgta taataaacac ctgccaaaaaa 360
gctagaattt gtaaggtaa taataccctc acctttaaag ccatagatag tataactggt 420
acacacatcc agagtcataa aagaaacgtc cgtgacacct tgaagtgggt taggcgtgcc 480
agtaatcaac tcacccttg tgaattgaaa ataaaggac gtaaacttaa caccactacc 540
gaactcaggg taacccaaaaa gatctatggt acaagcacca gccaaaaggc tgggtgaaac 600
acaaaattt ctaaaagaca ggtatcatt aacagattgc aagggtaaag ggcaattact 660
atcctgtgac ttagacacat aaccataact gtttgtaaacg ttataaaaca gtgaaatggt 720
aaattgtcta gtgtcaacac agaaagaact aaaccc 756

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> 上游引物 (Artificial Sequence)

<400> 2

agtgcggccg caagcttact aaagttggtg ggaataactaa tattccagt aacc 54

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> 下游引物 (Artificial Sequence)

<400> 3

aaatgggtcg cggatccggg tttagttctt tctgtgttga cactagac 48

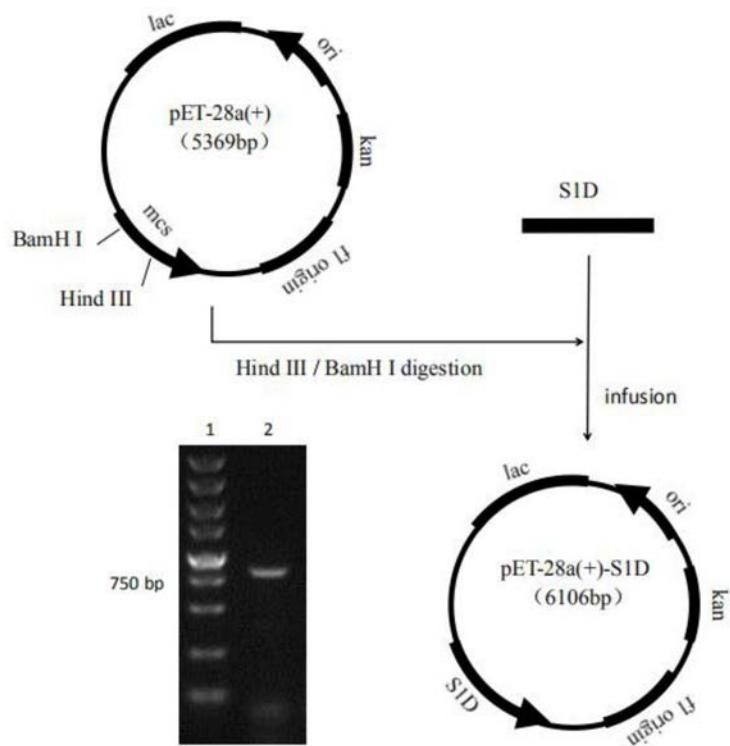


图1

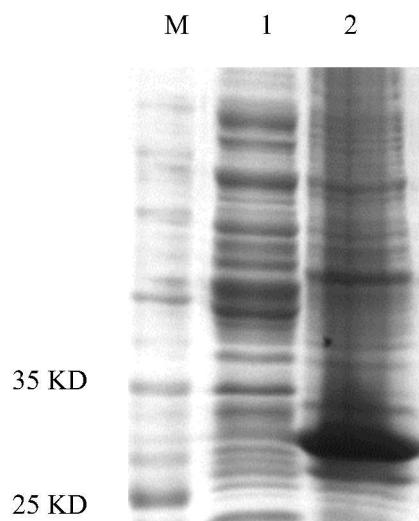


图2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN109856387A | 公开(公告)日 | 2019-06-07 |
| 申请号 | CN201910065715.8 | 申请日 | 2019-01-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南京农业大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 南京农业大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 南京农业大学 | | |
| [标]发明人 | 杨倩 王永恒 李昱辰 | | |
| 发明人 | 杨倩 王永恒 李昱辰 | | |
| IPC分类号 | G01N33/535 G01N33/569 | | |
| 代理人(译) | 王艳 | | |
| 外部链接 | Espacenet Sipo | | |

摘要(译)

本发明公开猪流行性腹泻特异性SIgA抗体ELISA检测试剂盒及其应用，检测试剂盒包括重组蛋白S1D。本发明还公开基于S1D蛋白检测鼻液和唾液中猪流行性腹泻病毒SIgA的间接ELISA方法，通过基因克隆表达技术成功构建重组质粒，蛋白纯化亲和层析技术获取猪流行性腹泻病毒S1D蛋白，以S1D蛋白为包被抗原建立间接ELISA检测黏液中猪流行性腹泻病毒SIgA抗体方法。可用于猪群中猪流行性腹泻病毒特异性SIgA抗体检测，判断猪群中猪流行性腹泻病毒特异性SIgA抗体水平。该方法具有较好的特异性和敏感性，可应用于猪流行性腹泻病毒SIgA抗体的临床检测及黏膜免疫评价。本发明操作简单，应用范围广。

