



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101825633 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 201010154032.9

G01N 33/543 (2006.01)

(22) 申请日 2010.04.23

G01N 33/535 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

3771 2010.04.22

(71) 申请人 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

地址 300461 天津市保税区京门大道 158 号

(72) 发明人 董志珍 赵祥平 肖妍 侯艳梅
王涛 张瑞 栾慎顺

(74) 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司 12108

代理人 王晓红

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

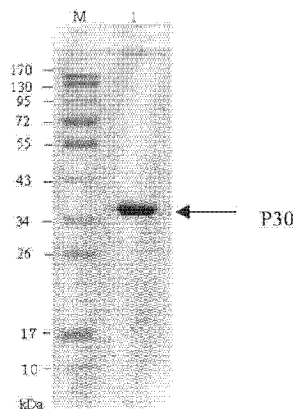
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒及其用途,属于生物技术领域。试剂盒采用原核表达的重组 P30 蛋白作为包被抗原,依据竞争 ELISA 原理检测猪血清中非洲猪瘟病毒的抗体。试剂盒中 96 孔板中的包被抗原为原核表达的重组 P30 蛋白,其具有良好的抗原性。本发明提供的酶联免疫试剂盒包括 P30 蛋白包被的 96 孔板、阳性对照、阴性对照、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体、浓缩洗涤液、血清稀释液、TMB 底物、终止液。本发明试剂盒可用于大批样品的筛查,试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供,使用方便。



1. 一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括由保藏号为 CGMCC NO. 3771 杂交瘤细胞系分泌的抗非洲猪瘟病毒单克隆抗体的酶标记物。

2. 根据权利要求 1 所述的用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于,还包括 ELISA 板条、血清稀释液和浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、阳性对照、阴性对照。

3. 根据权利要求 2 所述的用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒,其特征在于,

所述 ELISA 板条:每个试剂盒装有 2 块或 5 块 ELISA 微孔板,每块 ELISA 板条为能自行拆卸的已包被抗原的 ELISA 微孔板,包被抗原为原核表达的 P30 蛋白,规格为 8 孔 × 12 条;

所述血清稀释液和浓缩洗涤液:血清稀释液为即用型,洗涤液为 25 倍浓缩,使用前稀释;

所述底物显色液:即用型 TMB 显色液,50mL;

所述终止液:2mol/L 的 H_2SO_4 溶液,50mL;

所述酶标单克隆抗体:所述辣根过氧化物酶标记的鼠抗 P30 单克隆抗体,使用前 100 倍稀释;

阳性对照;

阴性对照。

4. 权利要求 1 所述的竞争 ELISA 试剂盒在检测非洲猪瘟病毒中的应用。

用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒及其用途

技术领域

[0001] 本发明为检测非洲猪瘟病毒 (ASFV) 抗体检测试剂盒,属于生物技术领域。具体而言,本发明涉及一种动物检疫中检测抗体的 ELISA 试剂盒及其用途。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (ASFV) 引起的猪的一种急性、热性、高度接触的烈性传染性疾病。其特征为病程短、病死率高率,可高达 100%,临床症状和病理变化均类似于急性猪瘟,在诊断时极易误诊,表现高热、皮肤充血发绀、流产、水肿及脏器出血。(William, Hess Adv. African swine fever :a reassessment[J]. Vet Sci Comp Med, 1981, 25 :39 ~ 69) 世界动物组织 (OIE) 列为 A 类疫病,我国规定为动物一类疫病,受到世界各国的高度重视 (孙怀昌. 中国预防兽医学报, 1999, 21 (2) :117 ~ 119)。

[0003] 本病自 1921 年在肯尼亚发现以来,一直存在于撒哈拉以南的非洲国家,1957 年先后流传至西欧和拉美国家,多数被及时扑灭,单在葡萄牙,西班牙西南部和意大利的撒丁岛仍有流行,截至目前已在非洲、欧洲和美洲等数十个国家流行,而且有不断蔓延趋势。2007 年,亚美尼亚连续发生六起非洲猪瘟,我国尚无该病。

[0004] 非洲猪瘟在国际病毒分类委员会第四次报告中归于虹彩病毒科,在该委员会第五次报告中将其列在痘病毒科之下,置于该科的脊椎动物痘病毒亚科及昆虫痘病毒亚科之外。但 DNA 序列分析表明,ASF 病毒具有介于痘病毒和虹彩病毒之间的特征,ASFV 的这一特性表明它不属于国际病毒分类委员会所核定的任何一科,是个新科,1995 年第 9 次国际病毒分类委员第六次报告,将非洲猪瘟病毒列入“类非洲猪瘟病毒属”,非洲猪瘟是唯一已知的代表种。

[0005] 非洲猪瘟病毒是一种大的、有囊膜的双链 DNA 病毒,是唯一的虫媒 DNA 病毒。其基因组为末端共价闭合的单分子线状双链 DNA,病毒基因组全长为 170kb ~ 190kb,中央有 125kb 左右的保守区,两端为可变区,含有末端反转重复序列,这些重复序列的增加或者缺失是造成不同分离株基因组长度差异的主要原因 (Rafacl, Yancz, Javier M, et al. Analysis of the complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus[J]. Virology, 1995, 208 :249 ~ 279)。ASF 病毒基因组有 5 个编码基因,包括假定膜蛋白、分泌性蛋白、参与核苷酸和核酸代谢 (DNA 修复) 以及蛋白修饰的酶,整个基因组含有 151 个 ORF,可以编码 150 ~ 200 种蛋白质,已从 ASFV 感染的细胞中分离鉴定出 86 种病毒蛋白多肽 (曲连东,于康震,非洲猪瘟研究进展,中国兽医科技,1998, 28 (11) :42 ~ 43)。

[0006] 非洲猪瘟病毒大多数毒株的毒力都很强,但是免疫原性很低,只有少数几个蛋白具有免疫原性。实验证明,P30 蛋白为具有较好抗原性的蛋白之一,蛋白分子量约为 36KD。

发明内容

[0007] 本发明的目的是以原核表达的重组蛋白为基础,通过酶联免疫技术研制一种检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒,所述的试剂盒包括由保藏号为 CGMCC NO. 3771 杂交瘤细胞系分泌的抗非洲猪瘟病毒单克隆抗体的酶标记物。

[0009] 还包括 ELISA 板条、血清稀释液和浓缩洗涤液、底物显色液、终止液、阳性对照、阴性对照。

[0010] 上述用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争 ELISA 试剂盒包括:

[0011] 所述 ELISA 板条:每个试剂盒装有 2 块或 5 块 ELISA 微孔板,每块 ELISA 板条为能自行拆卸的已包被抗原的 ELISA 微孔板,包被抗原为原核表达的 P30 蛋白,规格为 8 孔 × 12 条;

[0012] 所述血清稀释液和浓缩洗涤液:血清稀释液为即用型,洗涤液为 25 倍浓缩,使用前稀释;

[0013] 所述底物显色液:即用型 TMB 显色液,50mL;

[0014] 所述终止液:2mol/L 的 H₂SO₄ 溶液,50mL;

[0015] 所述酶标单克隆抗体:所述辣根过氧化物酶标记的鼠抗 P30 单克隆抗体,使用前 100 倍稀释;

[0016] 阳性对照;

[0017] 阴性对照。

[0018] 所述的竞争 ELISA 试剂盒在检测非洲猪瘟病毒中的应用。

[0019] 本发明的有益效果是:建立一种准确、快速、可进行大量筛查的非洲猪瘟病毒抗体检测的方法,为动物检验检疫部门提供了一套实用性强、效果可靠的诊断试剂盒产品。

附图说明

[0020] 图 1 为重组 P30 蛋白纯化后 SDS-PAGE 图。

[0021] 图 2 为重组 P30 蛋白纯化后 western blotting 图。

具体实施方式

[0022] 抗非洲猪瘟病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC NO. 3771,保藏日:2010-04-22,分类命名:杂交瘤细胞株。

[0023] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明:

[0024] 本发明的技术方案如下:

[0025] 一、建立细胞系

[0026] 1. 抗原制备

[0027] a) 非洲猪瘟 P30 蛋白的表达

[0028] 根据 GenBank 中非洲猪瘟 (ASFV)P30 基因序列,设计合成了 1 对引物,采用 PCR 方法从 ASFV DNA 中扩增出 P30 基因片段,将其克隆到表达载体 pET28b 中,构建了重组质粒 pET-P30,测序验证后转化入表达宿主菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导表达。

[0029] 设计的引物为:

[0030] P30-1-5' -GCGGATCCTAATTTTAAAATTGAATGGAT-3'

[0031] P30-2-5' -GTCTCGAGCCCAATCAAATTAGATAACT-3'

[0032] 下划线部分为引入的酶切位点, P30-1 为 ASFV P30 基因上游扩增引物, 引入的酶切位点为 BamHI ;P30-2 为 ASFV P30 基因下游扩增引物, 引入的酶切位点为 XhoI。

[0033] b) 非洲猪瘟 P30 蛋白的纯化

[0034] 诱导结束后, 离心收集诱导后菌体, 用 PBS 洗涤重悬菌体, 超声裂解 (超声 1s, 间隔 1s, 共 10min), 12000rpm 离心, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析。蛋白纯化时使用镍离子亲和层析柱, 纯化后, 经 SDS-PAGE、western blotting 鉴定, 获取到单一条带, 并具备较好的抗原性 (见附图 1, 2)。使用 BCA 法测定纯化后蛋白含量, 标准品浓度及其对应的 OD 值见表 1。纯化后 P30 蛋白的 OD 值为 2.25, 与标准品比较后, 其浓度为 1700 μ g/ml。

[0035] 表 1BCA 法测定标准品蛋白含量

[0036]

样品名称	A ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	D ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	E ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	F ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	G ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
浓度	2000	1500	1000	750	500	250	125	25	0
OD 值	2.6894	2.2378	1.6493	1.3278	1.0414	0.6454	0.4062	0.1893	0.1251

[0037] 2. 抗原免疫

[0038] 以纯化的非洲猪瘟病毒 P30 蛋白为抗原, 常规方法免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠, 首次基础免疫皮下注射抗原 $200 \mu\text{g}$, 使用完全弗氏佐剂; 每隔 3 周进行一次免疫, 共三次, $50 \mu\text{g}/\text{只}/\text{次}$, 最后一次基础免疫后 3 周后脾内注射加强免疫, $25 \mu\text{g}/\text{只}$, 免疫完成。

[0039] 3. 杂交瘤细胞的制备

[0040] a) 饲养细胞的制备

[0041] 以 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞。融合前 1 天,将小鼠拉颈处死,体表消毒和固定后,用消毒剪镊从后腹掀起腹部皮肤,暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。用注射器注射 10ml RPMI 1640 培养液至腹腔,反复冲洗,回收冲洗液,1000r/min 离心 10 分钟,弃上清。用含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬沉淀,调整细胞浓度为 2×10^5 /ml。将上述细胞悬液加入 96 孔板,每孔 0.1ml,置 37℃,6% CO₂ 的培养箱中培养过夜。

[0042] b) 免疫脾细胞的制备

[0043] 取免疫完成后的 BALB/c 小鼠,通过颈脱位致死小鼠,浸泡于 75%酒精中 5 分钟,无菌条件下取出脾脏,至于平皿中,RPMI 1640 培养液清洗 1 次。将脾脏移入另一盛有 10ml RPMI 1640 培养液平皿中,使脾细胞进入培养液。用吸管吹打数次。过滤,收获脾细胞悬液,1000r/min 离心 10 分钟,用 RPMI 1640 培养液离心洗涤 2 次,然后将细胞重悬,计数,用于细胞融合。

[0044] c) 骨髓瘤细胞

[0045] 于融合前 48-36 小时,将骨髓瘤细胞扩大培养,融合当天,用弯头滴管将细胞从瓶壁轻轻吹下,收集于 50ml 离心管。1000r/min 离心 10 分钟,弃去上清。加入 30ml 不完全培养基,同法离心洗涤一次。然后将细胞重悬浮于 10ml 不完全培养基,混匀。取骨髓瘤细胞悬液,计数,用于细胞融合。

[0046] d) 细胞融合及 HAT 选择杂交瘤

[0047] 将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞按 1 : 10 比例混合,在 50ml 离心管内用 RPMI1640 培养液洗 1 次,1200r/min,离心 10min,弃上清,用滴管小心吸出残留液体。在手掌上轻击融合管底,使沉淀细胞松散均匀,置 40℃水浴中预热。在 45 秒时加入预热至 40℃的 50% PEG(PH 8.0)1ml,作用 90 秒。加入 20ml 预热至 37℃的 RPMI 1640 培养液,室温静置 10 分钟。1000r/min,离心 5min,弃去上清。加入 5ml HAT 培养基,轻轻吹吸沉淀细胞,使其悬浮并混匀,然后补加含饲养细胞的 HAT 培养基至 80ml。分装 96 孔细胞培养板,每孔 0.1ml,然后将培养板置 37℃,6% CO₂ 培养箱内培养。

[0048] 24 小时后用 HAT 培养基换出 1/2 培养基,48 小时后完全换液。两周后用 HT 培养基换出 HAT 培养基,再维持两周后,改用 RPMI 1640 培养液。

[0049] 4. 杂交瘤细胞的筛选

[0050] 杂交瘤细胞融合两周后,按照常规免疫酶技术进行杂交瘤细胞的筛选。筛选出能分泌抗非洲猪瘟病毒抗体的杂交瘤孔。

[0051] 5. 杂交瘤的克隆化和冻存

[0052] a) 杂交瘤细胞的克隆

[0053] 克隆化方案为有限稀释法,按照常规杂交瘤细胞克隆方法进行,同法克隆进行三次。

[0054] b) 杂交瘤细胞的冻存

[0055] 细胞冻存液 :50%小牛血清 +40% RPMI 1640 培养液 +10%二甲基亚砷

[0056] 将杂交瘤细胞离心,重新悬浮于预冷的冻存液中,浓度为 10^6 - 10^7 /ml,转移至冻存管中,每瓶 1ml。置于 -70℃冰箱中,次日转入液氮中。

[0057] 将制备的抗非洲猪瘟病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞系保藏于中国微生物菌种保

藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC NO. 3771, 保藏日: 2010-04-22, 分类命名: 杂交瘤细胞株。

[0058] 二、单克隆抗体制备

[0059] 本发明中, 大量生产单克隆抗体的方案为小鼠腹水法, 步骤如下:

[0060] 本方案将上述获得的杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔内, 在小鼠腹腔内生长杂交瘤, 并产生腹水, 得到大量的腹水单抗。

[0061] 具体方法为: BALB/c 小鼠腹腔接种液体石蜡, 每只小鼠 0.5ml。两周后, 腹腔接种用无血清培养基稀释的杂交瘤细胞, 每只小鼠 $5 \times 10^5 / 0.2\text{ml}$ 。间隔 5 天后, 每天观察小鼠腹水产生情况, 待腹水尽可能多而小鼠濒于死亡时, 处死小鼠, 无菌条件下将腹水吸出。室温静止 30min, 1000r/min, 离心 10min, 收集上清, 分装, -70°C 冻存备用。

[0062] 三、单克隆抗体纯化及辣根过氧化酶标记

[0063] 1. 单克隆抗体的纯化

[0064] 上述获得的腹水单抗的纯化方案为辛酸-硫酸铵沉淀法。

[0065] 取 1 份预处理过的腹水加 2 份 0.06mol/L pH5.0 醋酸缓冲液, 用 1mol/L HCl 调 pH 至 4.8; 按每毫升稀释腹水加 11 μl 辛酸的比例, 室温搅拌下逐滴加入辛酸, 于 30 分钟内加完, 4°C 静置 2 小时, 取出 12000r/min 离心 30min, 弃沉淀; 上清经尼龙筛过滤 (125 μm), 加入 1/10 体积的 0.01mol/L PBS, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.2; 在 4°C 下加入饱和硫酸铵至 45% 饱和度, 轻轻混匀 30min, 静置 1 小时; 12000r/min 离心 30 分钟, 弃上清; 沉淀溶于适量 PBS 中, 对 50-100 倍体积的 PBS 透析, 4°C 过夜; 取出 12000r/min 离心 30min, 除去不溶性沉淀, 分装, 冻存备用。

[0066] 2. 单克隆抗体的辣根过氧化酶标记

[0067] 纯化后的单克隆抗体的酶标记物的制备方案为过碘酸钠法, 具体步骤如下:

[0068] 称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中; 向其中加入 0.2ml 新配的 0.1M NaIO_4 溶液, 室温避光搅拌 20 分钟; 对 1M pH4.4 的醋酸钠缓冲液中透析, 4°C 过夜; 向其中再加入 20 μl 0.2M pH9.5 的碳酸盐缓冲液, 使以上醛化物的 pH 升高到 9.0, 然后立即加入溶于 0.01M 碳酸盐缓冲液的单克隆抗体纯品 5mg (10mg/ml), 室温避光轻柔搅拌 2 小时; 加入 0.1ml 新配的 4mg/ml NaBH_4 , 混匀, 4°C 放置 2 小时; 所得产物对 0.15M pH7.4 PBS 中 4°C 透析过夜。

[0069] 透析完成后, 在搅拌中逐滴加入等体积饱和硫酸铵, 置 4°C 1 小时。3000r/min 离心 30min, 弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次, 最后沉淀物溶于少量 0.15M pH 7.4 的 PBS 中。将上述溶液装入透析袋中, 对 0.15M pH7.4 的 PBS 缓冲液透析, 取出铵离子, 10000r/min 离心 30min 去除沉淀, 上清液即为酶结合物, 分装后, 冻存。

[0070] 四、标准 ASFV 阳性血清及标准 ASFV 阴性血清的制备

[0071] 在 ELISA 检测过程中, 不同的操作人员和不同的检测批次间会存在一定的误差, 操作误差会导致检测样品 OD 值的误差。本发明研制了标准 ASFV 抗体阳性对照血清和标准 ASFV 抗体阴性对照血清, 用于检测条件的优化和检测结果的判定。

[0072] a) 标准阳性血清的制备

[0073] 取健康成年家兔, 体重 2-3kg, 剪去两后脚掌的部分兔毛, 用碘酒消毒皮肤。第一次免疫, 用注射器吸取弗式完全佐剂 (FCA) 乳化的抗原 (纯化后重组 P30) (以下称 FCA-P30) 液 1ml, 每侧脚掌皮下各注入 0.5ml。间隔 10-14 天后, 进行第二次免疫, 与两侧腭窝及鼠蹊

部肿大的淋巴结内注入弗式不完全佐剂 (FIA-P30), 每个淋巴结 0.1ml, 其余注入淋巴结附近的皮下共 1ml。间隔 7-10 天后, 从耳静脉采血 0.5-1.0ml, 分离血清, 采用 ELISA 方法检测血清效价, 抗体效价可达到 1 : 100 以上。

[0074] 采用心脏采血法采血, 将抽取的血液立即注入无菌三角烧瓶中。将三角烧瓶的血置 37℃温箱 1 小时, 再置 4℃冰箱 3 小时。待血液凝固血块收缩后, 用滴管吸取血清, 3000r/min 离心 15min, 取上清, 加入终浓度为 0.01% 的硫柳汞防腐, 分装后, -20℃保存。

[0075] b) 标准阴性血清的制备

[0076] 取经检验合格的 SPF 兔, 心脏采血, 分离血清, 加入万分之一的硫柳汞防腐。以 0.5ml 分装于无菌管中, -20℃保存。

[0077] 五、试剂盒的建立

[0078] a) 本发明试剂盒的检测原理

[0079] 采用竞争法, 将重组的非洲猪瘟病毒结构蛋白 P30 包被于微孔板中, 然后用 1% BSA 将酶标板封闭, 加入待测样本及标准阳性对照、阴性对照。样本或标准品中的非洲猪瘟病毒抗体能与酶标板中包被的 P30 抗原反应, 加入针对 P30 的酶标单克隆抗体后参与结合表位的竞争。随后, 加入辣根过氧化物酶底物 TMB 显色, 终止液终止反应, 通过酶标仪在 450nm 波长下, 测定各孔吸光度值, OD 值的大小 (终止显色反应后颜色的深浅) 与待测样本中非洲猪瘟病毒抗体的含量成反比。

[0080] b) 本发明试剂盒的组成

[0081] a) 酶标板的最佳制备方法

[0082] 用 pH9.60.05M 的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液, 将上述制备的纯化后重组 P30 蛋白稀释后, 按 100u1/孔加入微孔板中, 保证每孔中的 P30 含量为 0.2ug。4℃包被过夜, 次日, 弃去包被液, 按 200u1/孔加入 1% BSA 的封闭液, 37℃静置 2 小时, 洗涤甩干。室温干燥后装入包装袋, 加入干燥剂, 真空保存。

[0083] b) 工作试剂的配置

[0084] 洗涤液 (pH 7.4, 0.15M PBS) : KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Tween-20 (0.05%) 0.5ml, 加蒸馏水至 1000ml。浓缩成 25 倍作为存储液。

[0085] 血清稀释液 : 牛血清白蛋白 0.1g, 加洗涤缓冲液至 100ml

[0086] 底物缓冲液 (pH 5.0 磷酸柠檬酸) : 0.2M Na_2HPO_4 25.7ml, 0.1M 柠檬酸 24.3ml, 加蒸馏水 50ml

[0087] TMB (四甲基联苯胺) 使用液 : TMB (10mg/5ml 无水乙醇) 0.5ml, 底物缓冲液 10ml, 0.75% H_2O_2 32u1

[0088] 终止液 (2M H_2SO_4) : 蒸馏水 178.3ml, 逐滴加入浓硫酸 (98%) 21.7ml

[0089] c) 检测非洲猪瘟的竞争 ELISA 试剂盒的组建

[0090] 组建检测非洲猪瘟的酶联免疫试剂盒, 包含以下组分 :

[0091] 96 孔酶标板

[0092] 辣根过氧化物酶标记的单抗

[0093] 标准阳性对照

[0094] 标准阴性对照

[0095] 浓缩洗涤液

[0096] 血清稀释液

[0097] TMB 底物

[0098] 终止液

[0099] 产品说明书

[0100] 六、样品中非洲猪瘟病毒抗体的检测

[0101] a) 用上述制备的试剂盒进行检测

[0102] 1) 将待测血清、阳性对照及阴性对照用抗体稀释液按比例稀释,每孔 100 μ l 加入酶标板,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗涤液清洗 3-5 次。

[0103] 2) 每孔加入稀释后酶标单克隆抗体 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,洗涤液清洗 3-5 次。

[0104] 3) 每孔加入 TMB 底物液 100 μ l,室温避光反应 10-15 分钟。

[0105] 4) 每孔加入 100 μ l 2M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪检测 450nm 吸光度值。

[0106] b) 检测结果分析

[0107] i. 测中阴性对照血清 (NC) 的 OD 值至少是阳性对照血清 (PC) 的 4 倍时,

[0108] 检测被认为有效。

[0109] $NC/PC \geq 4$

[0110] 阳性 Cut Off = $NC - [(NC-PC) \times 0.5]$

[0111] 阴性 Cut Off = $NC - [(NC-PC) \times 0.4]$

[0112] 其中 NC = 阴性对照血清 OD 值

[0113] PC = 阳性对照血清 OD 值

[0114] ii. 检测时使用复孔,最终使用 OD 值为两个的平均值。

[0115] 当血清样本的 OD 值低于阳性 Cut Off 值时,该样本为 ASFV 抗体阳性。

[0116] 当血清样本的 OD 值高于阴性 Cut Off 值是,该样本为 ASFV 抗体阴性。

[0117] 当血清样本的 OD 值在两个 Cut Off 值之间时,被认为可疑,对于该样本应重新测试,或者采用其他检测方法确认。

[0118] 综上所述,本发明的内容并不局限在上述的实施例中,相同领域内的有识之士可以在本发明的技术指导思想之内可以轻易提出其他的实施例,但这种实施例都包括在本发明的范围之内。

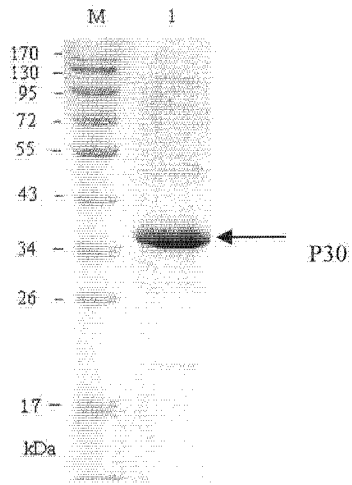


图 1

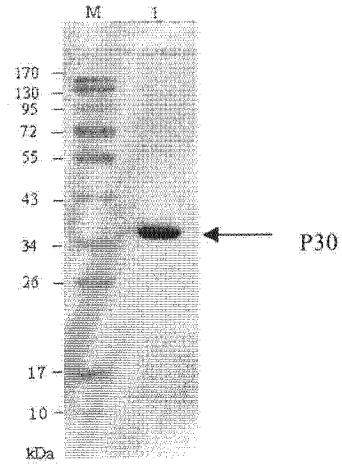


图 2

专利名称(译)	用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争ELISA试剂盒及其用途		
公开(公告)号	CN101825633A	公开(公告)日	2010-09-08
申请号	CN201010154032.9	申请日	2010-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
当前申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
[标]发明人	董志珍 赵祥平 肖妍 侯艳梅 王涛 张瑞 栾慎顺		
发明人	董志珍 赵祥平 肖妍 侯艳梅 王涛 张瑞 栾慎顺		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	王晓红		
其他公开文献	CN101825633B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的竞争ELISA试剂盒及其用途，属于生物技术领域。试剂盒采用原核表达的重组P30蛋白作为包被抗原，依据竞争ELISA原理检测猪血清中非洲猪瘟病毒的抗体。试剂盒中96孔板中的包被抗原为原核表达的重组P30蛋白，其具有良好的抗原性。本发明提供的酶联免疫试剂盒包括P30蛋白包被的96孔板、阳性对照、阴性对照、辣根过氧化酶标记的单克隆抗体、浓缩洗涤液、血清稀释液、TMB底物、终止液。本发明试剂盒可用于大批样品的筛查，试剂盒中的主要试剂均以工作液的形式提供，使用方便。

