



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106632618 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611015845.3

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2016.11.18

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

(72)发明人 王衡 张桂红 纪方晓 陈济档  
梁焕斌 朱婉君 古洪浪

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

C07K 14/08(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

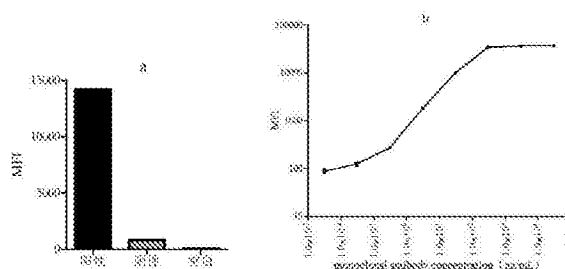
权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图2页

### (54)发明名称

一种猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白的制备方法及其ORF2蛋白和检测试剂盒

### (57)摘要

本发明以表达HEV ORF2 C段第337个到第645个氨基酸片段的核苷酸序列为目的片段,利用引物扩增该目的片段;连接pMAL-c5X载体,获得pMAL-c5X-ORF2重组质粒,原核表达获得重组蛋白。该蛋白能与猪戊型肝炎病毒抗体发生反应,利用该蛋白建立液相芯片检测技术,对猪常见的其他疾病阳性血清无交叉反应,其批内、批间变异系数分别为5%、6.6%。对102份临床血清样本检测结果显示,该方法与商品化ELISA试剂盒符合率为93.1%,关联性卡方检验显示两个方法具有一致性( $P<0.01$ )。本研究为临床HEV血清抗体的检测提供了一种特异、灵敏的新型快速检测技术,为建立猪病多重检测方法提供了基础。



1. 一种猪戊型肝炎病毒重组蛋白的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 以表达HEV ORF2 C段第337个到第645个氨基酸片段的核苷酸序列为目的片段,利用上游引物F和下游引物R扩增该目的片段;上游引物F和下游引物R的序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示;

S2. 连接pMAL-c5X载体,获得pMAL-c5X-ORF2重组质粒,转入原核表达菌诱导表达即可。

2. 根据权利要求1所述的猪戊型肝炎病毒重组蛋白的制备方法,其特征在于,S2所述诱导表达条件为: IPTG终浓度0.8 mmol/L,温度30℃,时间5h。

3. 权利要求1或2所述方法获得的猪戊型肝炎病毒重组蛋白。

4. 权利要求3所述猪戊型肝炎病毒重组蛋白作为免疫原在制备检测猪戊型肝炎病毒的试剂中的应用。

5. 一种检测猪戊型肝炎病毒的羧基化荧光微球12-ORF2,其特征在于,是将权利要求3所述猪戊型肝炎病毒重组蛋白与羧基化荧光微球012偶联获得。

6. 权利要求5所述猪戊型肝炎病毒的羧基化荧光微球12-ORF2的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 羧基化荧光微球的活化:将清洗后的羧基化荧光微球012分别依次重悬于磷酸氢二钠缓冲液、SuIfu-NHS溶液和EDC溶液中进行活化;

S2. 活化后的羧基化荧光微球012悬液中加入猪戊型肝炎病毒重组蛋白进行孵育,并用PBS-TBN重悬即得。

7. 一种检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求3所述的猪戊型肝炎病毒重组蛋白。

8. 一种检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求5所述的猪戊型肝炎病毒的羧基化荧光微球12-ORF2。

9. 根据权利要求8所述的检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还含有生物标记的鸡抗鼠IgG抗体或者兔抗猪IgG抗体、链霉素-藻红蛋白。

10. 根据权利要求9所述的检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒,其特征在于,所述生物标记的鸡抗鼠IgG抗体的稀释度为1:1000,兔抗猪IgG抗体的稀释度为1:5000,链霉素-藻红蛋白的稀释度为1:1000。

## 一种猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白的制备方法及其ORF2蛋白和检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测技术领域,更具体地,涉及一种猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白的制备方法及其ORF2蛋白和检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 戊型肝炎(Hepatitis E,HE)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus,HEV)引起的以黄疸为主要表现的急性病毒性肝炎,主要经粪-口途径传播。该病主要流行于卫生设施不完善的发展中国家(如亚洲和非洲),在发达国家(如美国和一些欧洲国家)也存在散发的情况。戊型肝炎的致死率(1~4%)比甲型肝炎(0.1~2%)的致死率要高,并且对孕妇的致死率能高达30%。

[0003] HEV具有一个血清型,四个基因型,基因1和2型只感染人,主要流行于亚洲、非洲、墨西哥。基因3、4型宿主范围较广,除了可感染人和家猪外,也可感染鸡、鹿、兔子、老鼠等其他动物。基因3型主要流行于美国、加拿大、阿根廷、西班牙、法国、澳大利亚、荷兰、新西兰等。基因4型分布在中国,日本,印度和越南。因此,戊型肝炎已经是一个重要的公共卫生问题而不只是食物安全和人畜共患病等潜在的风险。

[0004] Luminex xMAP(Flexible multi-analyte profiling)液相芯片技术有机整合了激光分析技术、流式细胞技术等多项最新科技成果,可用于蛋白、核酸和配体受体等荧光生物学反应的检测,具有高通量、准确性高、重复性好、灵敏度高、线性范围广等优势。其原理是以不同荧光编码的微球为载体,进行抗原-抗体、受体-配体、酶-底物结合反应以及核酸杂交反应,通过红、绿两束激光判断微球的荧光编码及报告分子的荧光强度,从而达到快速准确的定性和定量检测的目的。目前,液相芯片检测技术已被广泛应用于医疗保健、食品生产、环境卫生等领域的微生物检测领域,并在在呼吸道、虫媒介等病毒检测方面也广泛应用。

[0005] 实验室检测HEV主要采用分子生物学和血清学。PCR是检测HEV RNA最常用的方法,核酸存在于血清、胆汁、粪便中的时间非常短暂,出现临床症状1~2周前可以检测到HEV RNA,粪便容易受到污染,病毒载量低,该检测方法出现不稳定结果。12周龄的猪感染HEV出现病毒血症3周后可检测出IgM,可持续5~7周。当IgM升高3周后,IgG抗体为阳性,可持续至4~5个月,因此,实验室常采用ELISA监测HEV抗体。目前,商品化的ELISA试剂盒以1型 HEV抗原为主,很少有以4型HEV作为抗原建立检测方法的研究,且国内没有猪HEV液相蛋白检测方法的报道。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术存在的上述缺陷,提供一种猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白的制备方法。

[0007] 本发明的第二个目的是提供上述方法制备得到的猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白。

[0008] 本发明的第三个目的是提供所述猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白作为免疫原在制备检测猪戊型肝炎病毒的试剂中的应用。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒。

[0010] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的：

一种猪戊型肝炎病毒重组蛋白的制备方法，包括以下步骤：

S1. 以表达HEV ORF2 C段第337个到第645个氨基酸片段的核苷酸序列为目的片段，利用上游引物F和下游引物R扩增该目的片段；上游引物F和下游引物R的序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示；

S2. 连接pMAL-c5X载体，获得pMAL-c5X-ORF2重组质粒，转入原核表达菌诱导表达即可。

[0011] HEV基因组为单股正链RNA，大小约7.2kb，具有3个开放阅读框(open reading frame, ORF)：ORF1、ORF2和ORF3。ORF2为HEV主要的结构基因编码区，编码衣壳蛋白，该蛋白富含多个抗原表位，结构复杂，除N端有少数几个外，其余抗原表位主要分布在C端2/3处。

[0012] ORF2 C 末端编码的452aa~617aa是HEV中和抗原表位的位置，且不同基因型能够发生交叉中和反应，提示存在共同中和抗原表位。因此，本研究选取ORF2 C段337~654aa片段进行原核表达，成功表达了具有免疫原型的ORF2蛋白，以期建立猪戊型肝炎病毒检测方法。

[0013] 使用pMAL-C5X载体的目的是增加目的重组蛋白的可溶性，借以保持其天然空间结构及抗原性。但用于纯化含有MBP标签重组蛋白的Amylose 树脂纯化效率较低(即重组蛋白的纯化效率和纯化度低)，因此在上述pMAL-c5X重组质粒的基础上，在ORF2基因下游引入6\*His标签基因。其目的是在后期纯化过程中使用Ni<sup>2+</sup>纯化填料，提高目的蛋白的纯化效率。

[0014] 优选地，S2所述诱导表达条件为：IPTG终浓度0.8 mmol/L，温度30℃，时间5h。

[0015] 本发明还提供所述方法获得的猪戊型肝炎病毒重组蛋白。

[0016] 本发明还提供所述猪戊型肝炎病毒重组蛋白作为免疫原在制备检测猪戊型肝炎病毒的试剂中的应用。

[0017] 本发明以液相芯片技术为基础，以ORF2重组蛋白作为抗原，建立一种检测猪戊型肝炎病毒的新方法，因此，本发明还提供一种检测猪戊型肝炎病毒的羧基化荧光微球12-ORF2，是将所述猪戊型肝炎病毒重组蛋白与羧基化荧光微球012偶联获得。

[0018] 具体地，所述猪戊型肝炎病毒的羧基化荧光微球12-ORF2的制备方法，包括以下步骤：

S1. 羧基化荧光微球的活化：将清洗后的羧基化荧光微球012分别依次重悬于磷酸氢二钠缓冲液、SuIfon-NHS溶液和EDC溶液中进行活化；

S2. 活化后的羧基化荧光微球012悬液中加入猪戊型肝炎病毒重组蛋白进行孵育，并用PBS-TBN重悬即得。

[0019] 本发明还提供一种检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒，所述试剂盒含有所述的猪戊型肝炎病毒重组蛋白，该重组蛋白可用于基于抗原抗体原理的免疫反应。

[0020] 优选地，所述检测猪戊型肝炎病毒的试剂盒含有所述的猪戊型肝炎病毒的羧基化荧光微球12-ORF2。

[0021] 具体地，针对利用羧基化荧光微球12-ORF2进行液相芯片检测的技术，所述试剂盒

还含有生物标记的鸡抗鼠IgG抗体或者兔抗猪IgG抗体、链霉素-藻红蛋白。

[0022] 优选地,所述生物标记的鸡抗鼠IgG抗体的稀释度为1:1000,兔抗猪IgG抗体的稀释度为1:5000,链霉素-藻红蛋白的稀释度为1:1000。

[0023] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

本发明首先提供了猪戊型肝炎病毒重组蛋白的制备方法:以表达HEV ORF2 C段第337个到第645个氨基酸片段的核苷酸序列为目的片段,利用上游引物F和下游引物R扩增该目的片段;上游引物F和下游引物R的序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示;连接pMAL-c5X载体,获得pMAL-c5X-ORF2重组质粒,转入原核表达菌诱导表达获得重组蛋白。该蛋白能够与猪戊型肝炎病毒抗体发生反应,说明了重组蛋白具有良好的抗原性,利用该重组蛋白建立液相芯片检测技术,液相蛋白芯片检测方法对猪常见的其他疾病阳性血清无交叉反应,其批内、批间变异系数分别为5%、6.6%。对102份临床血清样本检测结果显示,该方法与商品化ELISA试剂盒符合率为93.1%,关联性卡方检验显示两个方法具有一致性( $P < 0.01$ )。本研究为临床HEV血清抗体的检测提供了一种特异、灵敏的新型快速检测技术,为建立猪病多重检测方法提供了基础。

## 附图说明

[0024] 图1为ORF2基因的PCR扩增结果,其中,M:DL-2000Marker,1:PCR扩增产物。

[0025] 图2为重组质粒pMAL-c5X-ORF2酶切鉴定,其中,M:1kb Marker,1:pMAL-c5X-ORF2双酶切。

[0026] 图3为重组蛋白表达的SDS-PAGE结果,其中,M:蛋白分子量标准,1:pMAL-c5X空载体诱导前,2. pMAL-c5X空载体诱导后,3. 重组质粒pMAL-c5X-ORF2诱导前,4. 重组质粒pMAL-c5X-ORF2诱导后,5. 菌液超声后上清,6. 菌液超声后沉淀。

[0027] 图4为ORF2蛋白的纯化,其中,M:蛋白分子量标准;1:诱导后全菌液;2:ORF2蛋白纯化后。

[0028] 图5为ORF2蛋白 Western Blotting分析,其中M:蛋白分子量标准;1:重组质粒pMAL-c5X-ORF2未诱导;2:重组质粒pMAL-c5X-ORF2诱导后。

[0029] 图6为液相检测方法可行性结果。

[0030] 图7为血清最佳稀释浓度检测图。

[0031] 图8为液相蛋白芯片检测方法的特异性试验。

## 具体实施方式

[0032] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换,均属于本发明的范围;若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0033] 实施例1 抗原的制备

### 一、重组表达质粒pMAL-c5X-ORF2的构建和鉴定

应用0Iigo7.0生物学软件,选取ORF2蛋白C段337~654aa片段,根据ORF2基因的序列(accession No. JX855794,第1009 bp到第1926 bp的序列)设计一对特异性引物,上游引

物F加入Not I 酶切位点,下游引物R加入Sal I酶切位点和6×HIS标签,以 pET32a-ORF2质粒为模板,经PCR扩增ORF2基因,PCR产物经纯化、酶切后连接至pMAL-c5X原核表达载体,并转化至Rosetta (DE3)感受态细胞,挑取单菌落进行PCR鉴定,对阳性菌进行酶切鉴定,并送英潍捷基贸易有限公司测序。

[0034] 上游引物F:5'-GGGGTCGACTATTCG AGTAGTGC GCGTC-3'

下游引物R:

5'-GAGGAATTCATGATGATGATGATGATGGAAGGCACAGCCCTGGAGG -3'

PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后可见与目的条带一致大小为990 bp的条带(图1),pMAL-c5X-ORF2质粒用Not I、Sal I双酶切后经琼脂糖凝胶电泳后与目的条带一致(图2),且将质粒送公司测序结果与目的序列一致,说明原核表达质粒构建成功。

[0035] 二、重组表达质粒pMAL-c5X-ORF2的诱导表达和可溶性分析

将阳性菌于37℃培养至OD<sub>600 nm</sub>为0.5~0.6时,加入IPTG至终浓度为0.8 mmol/L于30℃进行诱导5 h,离心收集菌体冰浴条件下超声破碎,取上清和沉淀进行SDS-PAGE电泳分析。

[0036] 菌液经IPTG诱导后,SDS-PAGE电泳分析在约74 KD处有一条目的条带,与预期相符,且目的蛋白在上清和沉淀中均有表达,说明该蛋白具有可溶性(图3)。

[0037] 三、目的蛋白的纯化

采用GE填料填充的Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱进行蛋白纯化,具体操作按其产品说明书进行。主要操作步骤如下:诱导后的菌液超声破碎、离心后,上清用滤器(0.45 μm)过滤;用6倍柱体积的去离子水冲洗层析柱;用6倍柱体积的结合缓冲液过柱;上清过柱,3遍;用10倍柱体积的洗脱缓冲液A和B洗脱杂蛋白;最后用5倍柱体积的洗脱缓冲液C洗脱目的蛋白,分段收集洗脱液,流速均为1 mL/min。测定目的蛋白的浓度并做SDS-PAGE进行纯度分析。

[0038] 上清经Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱后,收集的洗脱液经SDS-PAGE电泳分析可见一条74 KD的特异性条带即ORF2蛋白(图4)。

[0039] 四、Western Blotting验证目的蛋白的抗原性

ORF2目的蛋白经SDS-PAGE后转印至硝酸纤维素膜(NC)上,用5%脱脂奶粉于37℃封闭2 h,与1:1 000 000稀释的鼠源抗体4℃过夜孵育,再与1:8 000稀释的羊抗鼠二抗室温孵育1 h,将NC膜放入双色激光分析系统Odyssey (LI-COR公司生产)中进行扫膜分析。

[0040] ORF2蛋白与单抗反应后在NC膜上有一条约为74KD的特异性条带,且阴性对照没有条带(图5),说明了ORF2蛋白具有反应原型。

[0041] 实施例2 应用ORF2蛋白建立HEV液相蛋白芯片检测方法

一、ORF2蛋白与微球的偶联

参照Luminex公司的xMAP®技术大全:两步酰胺反应:首先磷酸化微球经磷酸氢二钠缓冲液、SuIfon-NHS和EDC溶液成为活化状态,其次利用实施例1制备得到的ORF2蛋白作为抗原与12号微球形成共价酰胺键,偶联上抗原的微球用PBS-TBN 溶液重悬于4℃避光保存,具体操作步骤如下:

(1)漩涡仪振荡微球悬液1 min,使微球均匀散开;

(2)取微球100 μL 转移到1.5 mL离心管中,8000 g/min,2 min离心,并放于磁力架上,轻轻移走上清(不要吸走微球);

(3) 加入100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 涡旋1min, 再8000 g/min, 2 min离心, 并放于磁力架上, 轻轻移走上清;

(4) 加入80  $\mu\text{L}$  100 mMol/L、pH=6.2的磷酸二氢钠盐溶液(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 涡旋1 min, 重悬微球;

(5) 加入10  $\mu\text{L}$ 、50 mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt-Sulfo-NHS, N-Sulfo-NHS), 和10  $\mu\text{L}$  50mg/mL 1-乙基-3-[3-(二甲氨基) 丙基] 碳二亚胺[1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride, EDC], 涡旋1min。

[0042] (6) 室温孵育20 min(每隔10 min用漩涡仪轻振), 8000 g/min, 2 min离心, 并放于磁力架上, 轻轻移走上清;

(7) 加入250  $\mu\text{L}$  50 mMol/L、pH=5.0的2-(N-吗啡啉) 乙磺酸2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, MES), 涡旋1min, 并放于磁力架上, 轻轻移走上清;

(8) 步骤(7)一次;

(9) 将上述活化后的微球中加入100  $\mu\text{L}$  50 mMol/L、pH=5.0的MES, 涡旋1min, 在混匀的微球中加入10  $\mu\text{g}$ 的ORF2蛋白抗原, 再用MES定容至500  $\mu\text{L}$ , 涡旋1min;

(10) 在室温下放在摇床上孵育2 h, 8000 g/min, 2~3 min离心, 并放于磁力架上, 轻轻移走上清;

(11) 并放于磁力架上, 轻轻移走上清, 涡旋1min, 再在摇床上孵育30 min, 8000 g/min, 2~3 min离心, 并放于磁力架上, 轻轻移走上清;

(12) 再加入1 mL PBS-TBN, 8000 g/min, 2~3 min离心, 沉淀微球, 弃上清, 再重复一次;

(13) 加入1 mL PBS-TBN, 重悬微球, 即得偶联抗原的微球: 12-ORF2(即第12号羧基化微球, 或者羧基化荧光微球012与ORF2蛋白偶联), 4℃避光保存。

[0043] 液相蛋白芯片检测方法的操作流程: 参照Luminex公司的xMAP®技术大全, 每孔加入50  $\mu\text{L}$  (2 500个/孔) 已偶联上抗原的12号微球和50  $\mu\text{L}$  ORF2单抗或待检测已稀释的血清(1:200), 室温震荡(500 r/min)避光孵育1 h; 用PBST洗涤96孔板, 300  $\mu\text{L}$ /孔, 2次; 加入生物素标记的鸡抗鼠(1:1 000)或兔抗猪(1:5 000) IgG抗体100  $\mu\text{L}$ /孔, 室温震荡(500 r/min)避光孵育1 h, 洗涤; 加入1:1 000稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE) 100  $\mu\text{L}$ /孔, 室温震荡(500 r/min)避光孵育0.5 h, 洗涤; 每孔加入125  $\mu\text{L}$ 鞘液重悬, 于FLEX 3D液相芯片检测系统读取每孔微球的平均荧光强度(Median Fluorescent Intensity, MFI)。

## [0044] 二、偶联效率的验证

HEV阳性血清、HEV阴性血清、PBS作为阳性对照、阴性对照、空白对照以验证偶联是否成功。

[0045] ORF2鼠源单抗1:10梯度稀释检测偶联效率, 3个重复, 同时确定抗体的最低检测量。

[0046] 偶联上ORF2抗原的微球分别于HEV标准阳、阴性血清、PBS进行杂交, 结果表明阳性对照的MFI大于10 000, 空白对照的MFI小于100(图6a), 说明该偶联方法和检测方法是可行的。

[0047] 将ORF2单抗从0.03 mg/mL开始进行10倍梯度稀释, 用液相蛋白芯片检测方法检

测,结果采用SPSS软件进行拟合三次方程,其 $R^2=0.994$ , $S=0.117$ ,说明了曲线相关性好。当单抗浓度低至0.003 ng/mL时,该方法仍具有高灵敏度(图6b)。

#### [0048] 四、临界值的确定

取20份HEV阴性血清,每份血清3个重复,根据其MFI计算平均数( $\bar{x}$ )和标准差(SD), $Cutoff=\bar{x}+3SD$ ,MFI值大于Cutoff为阳性。

[0049] 结果显示,其平均值 $\bar{x}=2579.0$ ,标准差 $SD=737.9$ ,临界值=4793,即当样品的MFI大于等于4793时为阳性。

#### [0050] 五、HEV血清稀释度的确定

HEV阳、阴性血清用PBS-1%BSA进行1:2梯度稀释,每个稀释度3个重复,以确定血清最佳稀释倍数。

[0051] HEV标准阳、阴性血清不同倍数的稀释结果显示血清的最佳稀释倍数为1:200,当血清稀释至1:800时,阳性血清的MFI大于Cutoff值,仍可检测出阳性(图7)。

#### [0052] 六、特异性试验

采用建立的检测方法检测猪戊型肝炎、蓝耳病、猪瘟、圆环、口蹄疫、伪狂犬、猪流感阳性血清和猪戊型肝炎阴性血清,每组3个重复,以验证该检测方法的特异性。

[0053] 本检测方法对猪常见疾病的阳性血清和猪戊型肝炎阴性血清检测结果为阴性,戊型肝炎阳性血清为阳性(图8),说明该检测方法特异性好,无交叉反应,可与猪常见的其他疾病区分。

#### [0054] 七、重复性试验

批内重复:取4份阳性血清、1份阴性血清,每份血清10个重复,通过计算其变异系数以评价该方法的批内精密度。

[0055] 批间重复:取11份阳性血清、1份阴性血清,每份血清3个重复,不同时间做3次。通过计算变异系数以评价该方法的批间精密度。

[0056] 结果表明:液相蛋白芯片检测方法的批内变异系数为3.3%~8.3%(表1),批间变异系数为2.3%~11.8%(表2)。符合Luminex精密度的要求:批内CV为不大于10%,批间CV不大于20%,说明本研究建立的该检测方法具有良好的重复性。

表1 液相蛋白芯片检测方法批内重复试验

样品编号	$\bar{x} \pm s(MFI)$	CV%
1	14330.6 $\pm$ 1187.0	8.3
2	10834.6 $\pm$ 589.2	5.4
3	20648.9 $\pm$ 840.4	4.1
4	5455.1 $\pm$ 182.4	3.3
5	2941 $\pm$ 236.6	8.0



表 2 液相蛋白芯片检测方法批内重复试验

样品 编号	$\bar{x} \pm s(\text{MFI})$	CV%	样品 编号	$\bar{x} \pm s(\text{MFI})$	CV%
1	21865.2 $\pm$ 2571.5	11.8	7	4304.1 $\pm$ 243.5	5.7
2	20297.6 $\pm$ 927.8	4.6	8	11071.1 $\pm$ 958.1	8.7
3	31847.9 $\pm$ 2571.4	8.1	9	17935.3 $\pm$ 1191.5	6.6
4	8084.7 $\pm$ 370.2	4.6	10	22252.3 $\pm$ 501.4	2.3
5	7160.0 $\pm$ 632.8	8.8	11	8997.0 $\pm$ 378.4	4.2
6	9274.4 $\pm$ 893.4	9.6	12	2428.4 $\pm$ 112.6	4.6

## [0057] 八、液相蛋白芯片与ELISA的比较

采用本研究建立的液相蛋白芯片法和ELISA(北京万泰)同时检测临床102份血清,评价其符合率。

[0058] 结果表明:其阳性符合率为90.5%,阴性符合率为95%,总符合率为93.1%(表3)。同时关联性卡方检验结果说明液相蛋白芯片法与ELISA的关联极著(卡方值=71.58,  $P < 0.01$ ),两个方法均可反应同一指标。

表 3 液相蛋白芯片和 ELISA 的检测结果

检测方法		ELISA		总计
		阳	阴	
液相蛋白芯片	阳	38	3	41
	阴	4	57	61
总计		42	60	102

[0059] 本研究首次建立了液相蛋白芯片检测方法,该检测方法具有较好的灵敏度,当血清稀释至1:800时仍可检测为阳性;此外,MFI值随着血清浓度降低呈先升高后降低的趋势,液相蛋白芯片和ELISA试剂盒对102份临床血清样品的检测阳性率分别为40.2%、41.2%,表明液相蛋白芯片的灵敏度低于ELISA。同时优势卡性方检验结果( $P > 0.05$ )说明:与ELISA相比,液相蛋白芯片法没有优势。理论上液相蛋白芯片的灵敏度高,阳性率应高于ELISA检测结果,这可能是由于以1型HEV作为抗原的双抗原夹心法ELISA试剂盒检测的是血清中的总抗体(IgM和IgG),而以4型HEV为抗原建立的液相蛋白芯片法检测的是IgG。此外,目前无HEV检测的“金标准”,以至于特异性和灵敏度的评价没有参照标准,因此,不同检测方法具有差异性是无法避免的。但是两者的符合率为93.1%,且关联性卡方检验说明液相蛋白芯片法和ELISA可反应同一指标。因此,液相蛋白芯片检测方法可以应用于HEV抗体检测,并为下一步建立猪病多重检测提供了基础。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 华南农业大学

&lt;120&gt; 一种猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白的制备方法及其ORF2蛋白和检测试剂盒

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 上游引物F

&lt;400&gt; 1

ggggtcgact attcgagtag tgcgcgtc 28

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 下游引物R

&lt;400&gt; 2

gagggaattca tgatgatgat gatgatggaa ggcacagccc tggagg 46

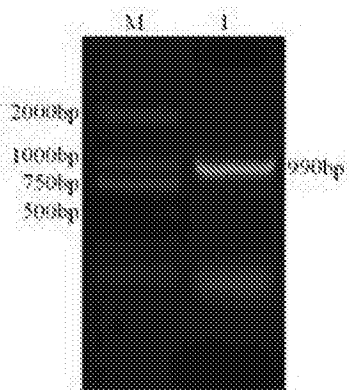


图1

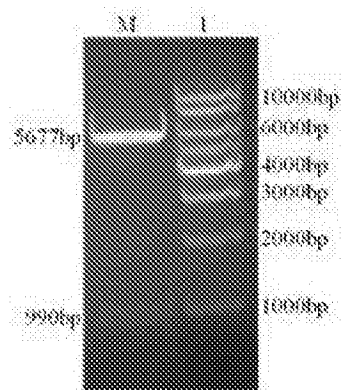


图2

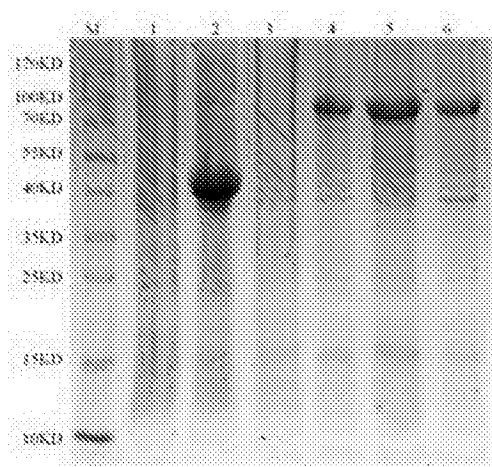


图3

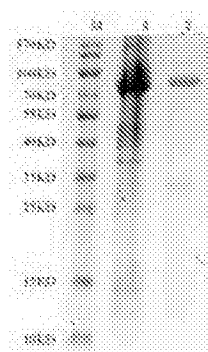


图4

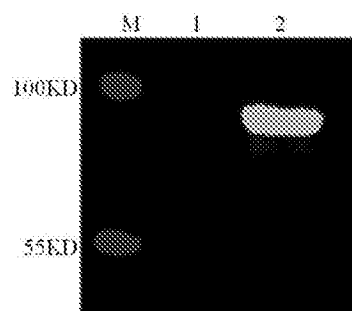


图5

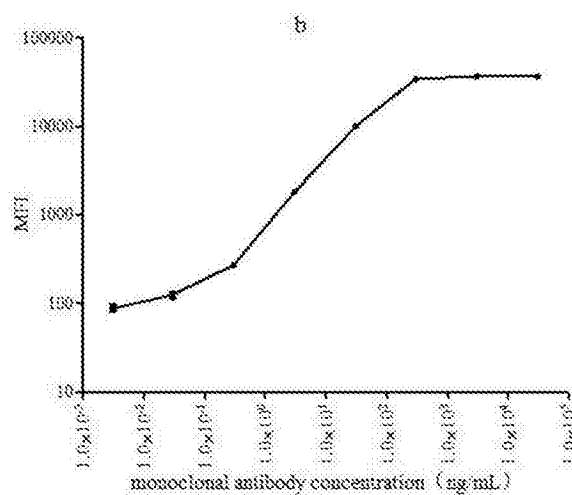
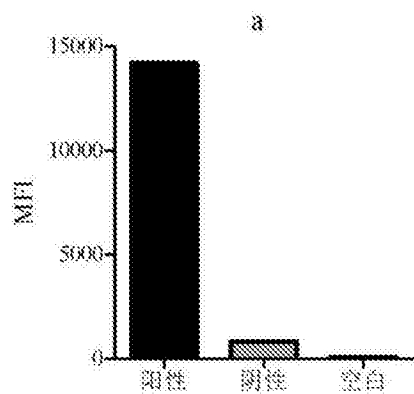


图6

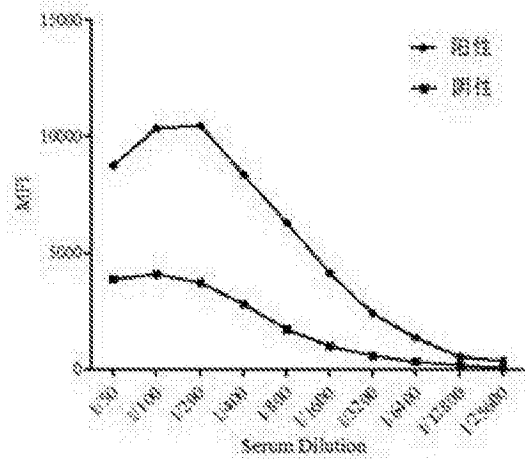


图7

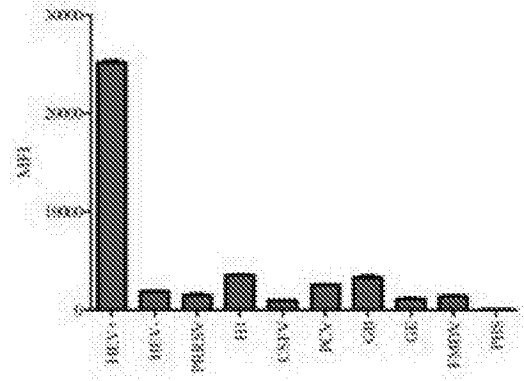


图8

专利名称(译)	一种猪戊型肝炎病毒ORF2重组蛋白的制备方法及其ORF2蛋白和检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106632618A</a>	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611015845.3	申请日	2016-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	王衡 张桂红 纪方晓 陈济钊 梁焕斌 朱婉君 古洪浪		
发明人	王衡 张桂红 纪方晓 陈济钊 梁焕斌 朱婉君 古洪浪		
IPC分类号	C07K14/08 C12N15/70 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/005 C12N2770/28131 C12N2770/28151 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/56983 G01N2469/20		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明以表达HEV ORF2 C段第337个到第645个氨基酸片段的核苷酸序列为目的片段，利用引物扩增该目的片段；连接pMAL-c5X载体，获得pMAL-c5X-ORF2重组质粒，原核表达获得重组蛋白。该蛋白能与猪戊型肝炎病毒抗体发生反应，利用该蛋白建立液相芯片检测技术，对猪常见的其他疾病阳性血清无交叉反应，其批内、批间变异系数分别为5%、6.6%。对102份临床血清样本检测结果显示，该方法与商品化ELISA试剂盒符合率为93.1%，关联性卡方检验显示两个方法具有一致性 ( $P < 0.01$ )。本研究为临床HEV血清抗体的检测提供了一种特异、灵敏的新型快速检测技术，为建立猪病多重检测方法提供了基础。

