



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109613238 B

(45) 授权公告日 2021.02.09

---

(21) 申请号 201811564230.5	G01N 33/569 (2006.01)
(22) 申请日 2018.12.20	G01N 33/531 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109613238 A	(56) 对比文件 CN 105950563 A, 2016.09.21 CN 103091490 A, 2013.05.08 CN 105445462 A, 2016.03.30
(43) 申请公布日 2019.04.12	
(73) 专利权人 中牧实业股份有限公司 地址 100070 北京市丰台区南四环西路188 号八区16-19号楼	审查员 刘彦宁
(72) 发明人 董春娜 张蕾 李静 肖进 王飞 齐鹏	
(74) 专利代理机构 北京惟诚致远知识产权代理 事务所(普通合伙) 11536 代理人 王慧凤 李巍	
(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)	权利要求书2页 说明书15页 序列表5页 附图1页

---

(54) 发明名称

检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫试剂盒及其应用。该试剂盒包括可以与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的特异性结合的单克隆抗体5G11作为捕获抗体制成的酶标板和酶标抗体。利用本发明试剂盒进行检测与目前口蹄疫其他毒株均不发生交叉反应。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷,能够稳定地检测口蹄疫A型武汉株抗原含量及特异性区分口蹄疫A型武汉株与其他毒株。

1. 一种特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫试剂盒,包括可以与口蹄疫A型武汉株146S抗原特异性结合的单克隆抗体作为捕获抗体制成的酶联反应板和酶标抗体;所述酶标抗体为用可以与口蹄疫A型武汉株146S抗原特异性结合的单克隆抗体作为检测抗体制成的酶标抗体;

所述捕获抗体含有重链可变区5G11-V<sub>H</sub>和轻链可变区5G11-V<sub>L</sub>;所述5G11-V<sub>H</sub>和5G11-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;

所述5G11-V<sub>H</sub>和所述5G11-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;

所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示;

所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第51~58位氨基酸所示;

所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第98~114位氨基酸所示;

所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;

所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;

所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第95~98位氨基酸所示;

所述检测抗体含有重链可变区1C10-V<sub>H</sub>和轻链可变区1C10-V<sub>L</sub>,所述1C10-V<sub>H</sub>和1C10-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;

所述1C10-V<sub>H</sub>和所述1C10-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;

所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第26~36位氨基酸所示;

所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第54~61位氨基酸所示;

所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第98~111位氨基酸所示;

所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第24~36位氨基酸所示;

所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第50~59位氨基酸所示;

所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第94~99位氨基酸所示。

2. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中还包括抗原标准品,所述抗原标准品为口蹄疫A型武汉株A/WH/09株146S抗原。

3. 根据权利要求1或2所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:5G11-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~128位所示;其5G11-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示;

所述1C10-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.3的第1~127位所示;其1C10-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4的第1~116位所示。

4. 根据权利要求3所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶联反应板的获得方法是将捕获抗体溶于100 $\mu$ l的 pH 9.6的碳酸盐溶液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔100ng~1000ng特异性单克隆抗体,2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时,使捕获抗体与酶联反应板充分结合,然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后4 $^{\circ}$ C密封保存。

5. 根据权利要求1所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括底物液A、底物液B和终止液;所述底物液A为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液,使用时两者以1:1的比例混合;所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括样品稀释液和20倍

浓缩洗涤液；样品稀释液为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液；20倍浓缩洗涤液为含有体积百分浓度为0.8%~1.2%的Tween-20的0.01M，pH 值为7.4的磷酸盐缓冲液。

7. 权利要求1-6中任意一项所述的酶联免疫试剂盒在制备特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原的试剂中的应用。

## 检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,更具体地,本发明涉及一种特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫检测试剂盒,适用于口蹄疫A型武汉株抗原的特异、快速、准确检测。

### 背景技术

[0002] 口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 感染引起的偶蹄动物共患的一种烈性传染病。口蹄疫的致死率很低,但是感染率很高。发病的主要症状为:口腔粘膜、舌、唇、鼻镜、蹄叉、乳头等部位发生水疱,破溃形成烂斑,病畜蹄痛卧地、严重者蹄壳边缘溃裂或脱壳。不同动物的症状稍有不同,妊娠母牛可能流产,而后导致繁殖力降低;猪则以破蹄为最主要症状;山羊和绵羊的症状通常比牛温和。口蹄疫传染性高,传播迅速,感染猪、牛、羊等牲畜常导致幼畜死亡,成年动物生产能力急剧下降,严重危害畜牧业的发展和畜产品的生产供应。由于其在世界范围内广泛分布,能感染70多种家养和野生动物,且发病率极高(约为100%),严重影响畜牧业生产和国际贸易,因而受到各国的高度重视,被世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 列为法定报告动物疫病。

[0003] 口蹄疫病毒 (FMDV) 是小RNA病毒科 (picornaviridae), 口蹄疫病毒属 (aphthovirus) 的成员,由一条长约8500个核苷酸的单股、正链RNA和衣壳蛋白组成。病毒衣壳由4种结构蛋白即VP1、VP2、VP3和VP4各60个拷贝组成,其中VP1和VP3是主要免疫性抗原。口蹄疫病毒 (FMDV) 具有多型性、易变性等特点,具有7个血清型,分别为A、O、C、SAT1、SAT2、SAT3及Asia1型,各型之间无交叉保护反应。目前国内主要流行的是O型、A型和亚洲1型。

[0004] 目前测定口蹄疫146S抗原的方法主要有蔗糖密度梯度离心,但该方法操作复杂,需要3天时间完成,耗时较长,且不能区分血清型,更无法对同一血清型不同毒株进行区分,因而,需要开发一种更为特异,灵敏、准确和可靠的检测方法来对口蹄疫不同血清型和毒株进行区分。

[0005] 目前,酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, ELISA) 是市场上主流的免疫测定技术,已广泛应用于临床检测,快速便捷且灵敏度高,且不需要特殊的仪器设备,可用于口蹄疫146S抗原检测。目前市场上,用于检测口蹄疫抗原的ELISA试剂盒大都采用多克隆抗体,比如中国农业科学院兰州兽医研究所开发的“一种A型口蹄疫146S抗原定量ELISA检测方法及其试剂盒和应用”,该试剂盒专利(申请号CN201310017209.4)显示采用了A型口蹄疫兔抗血清作为捕获抗体,辣根过氧化物酶标记的豚鼠抗血清作为检测抗体,能够将A型与O型、亚洲1型进行区分,但无法区分A型的不同毒株,因此无法对多价疫苗中的每种毒株的口蹄疫146S抗原进行单独定量检测,其主要原因就是在于多克隆抗体针对多种抗原表位,而不同血清型尤其是同一血清型的不同毒株间的同源性非常高,可超过85%,可能仅有少数几十个甚至几个氨基酸序列的差异,可能存在相同的抗原表位,因此依据多克隆抗体建立的双抗体夹心ELISA抗原检测试剂盒不能对同一血清型不同毒株的口蹄疫病毒

进行区分并定量检测。单克隆抗体是针对抗原上单一表位筛选制备的抗体,能够同源性识别不同毒株的口蹄疫病毒,是建立区分同一血清型不同毒株的口蹄疫146S抗原定量ELISA试剂盒的基础。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种用于特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫试剂盒,该试剂盒利用一株可以与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原特异性结合的单克隆抗体5G11作为捕获抗体,另外一株可以与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原特异性结合的单克隆抗体1C10制成的酶标抗体作为检测抗体,建立了一种特异性、敏感性和重复性好的口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原检测方法,用于检测疫苗生产过程中的培养液、灭活液、纯化液、浓缩液和破乳后的成品疫苗等中的口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原含量。

[0007] 基于上述目的,本发明的特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原酶联免疫试剂盒,包括以一株可以与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原特异性结合的单克隆抗体5G11作为捕获抗体制成的酶联反应板、另外一株可以与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原特异性结合的单克隆抗体1C10作为检测抗体制成的酶标抗体。所述酶标抗体优选为经辣根过氧化物酶标记抗体,所述辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体上。

[0008] 优选的,所述口蹄疫A型武汉株为口蹄疫A型武汉株A/WH/09株。

[0009] 所述捕获抗体(单克隆抗体5G11)含有重链可变区5G11-V<sub>H</sub>和轻链可变区5G11-V<sub>L</sub>;所述5G11-V<sub>H</sub>和5G11-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;所述5G11-V<sub>H</sub>和所述5G11-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第51~58位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第98~114位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第95~98位氨基酸所示;

[0010] 所述检测抗体(单克隆抗体1C10)含有重链可变区1C10-V<sub>H</sub>和轻链可变区1C10-V<sub>L</sub>,所述1C10-V<sub>H</sub>和1C10-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;所述1C10-V<sub>H</sub>和所述1C10-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第26~36位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第54~61位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第98~111位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第24~36位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第50~59位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第94~99位氨基酸所示。

[0011] 优选的,所述5G11-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~128位所示;其5G11-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示;

[0012] 优选的,所述1C10-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.3的第1~127位所示;其1C10-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4的第1~116位所示。

[0013] 所述酶联反应板的最佳包被制备方法及条件是将所述口蹄疫A型武汉株(A/WH/09

株)的一株特异性单克隆抗体5G11用pH 9.6的碳酸盐溶液稀释成1~10 $\mu$ g/ml的包被工作液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,100 $\mu$ l/孔,2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时,使特异性单克隆抗体5G11与酶联反应板充分结合,然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后2~8 $^{\circ}$ C密封保存。

[0014] 优选的,所述试剂盒中还包括抗原标准品,所述抗原标准品为口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原,纯度不低于80%,抗原含量为4 $\mu$ g/ml,使用时用样品稀释液稀释至(3.1ng/ml~200ng/ml)。抗原含量为4 $\mu$ g/ml,使用时用样品稀释液进行(1:20~1:1280)倍比稀释,所测OD<sub>450nm</sub>值用于绘制标准曲线。

[0015] 本发明试剂盒是采用口蹄疫A/WH/09株特异性单克隆抗体制成的双抗体夹心法酶联免疫定量检测试剂盒,通过检测酶催化底物产生的信号变化来定量检测样品中口蹄疫A/WH/09株的抗原含量。

[0016] 更进一步的,所述试剂盒还包括样品稀释液、20倍浓缩洗涤液、底物液A、底物液B、终止液。所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板。所述样品稀释液为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。所述20倍浓缩洗涤液为含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。所述底物液A为含0.06%(g/ml)过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液,使用时两者以1:1的比例混合。所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0017] 本发明还要求保护单克隆抗体,其可以与口蹄疫A型武汉株146S抗原特异性结合,是下述任意一项所述的单克隆抗体:

[0018] 1) 含有重链可变区5G11-V<sub>H</sub>和轻链可变区5G11-V<sub>L</sub>;所述5G11-V<sub>H</sub>和5G11-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;所述5G11-V<sub>H</sub>和所述5G11-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第51~58位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第98~114位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第95~98位氨基酸所示;

[0019] 2) 含有重链可变区1C10-V<sub>H</sub>和轻链可变区1C10-V<sub>L</sub>,所述1C10-V<sub>H</sub>和1C10-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;所述1C10-V<sub>H</sub>和所述1C10-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第26~36位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第54~61位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第98~111位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第24~36位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第50~59位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第94~99位氨基酸所示。

[0020] 3) 含有重链可变区5G11-V<sub>H</sub>和轻链可变区5G11-V<sub>L</sub>;所述5G11-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的第1~128位所示;其5G11-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示;

[0021] 4) 含有重链可变区1C10-V<sub>H</sub>和轻链可变区1C10-V<sub>L</sub>,所述1C10-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.3的第1~127位所示;其1C10-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4的第1~116位所示。

[0022] 通过上述重链可变区和轻链可变区序列,可以与动物源恒定区(如鼠抗体重链和轻链恒定区)连接,制备得到可与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原特异性结合的单克隆抗体。

[0023] 上述酶联免疫试剂盒在特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原中的应用也属于本发明的保护范围。

[0024] 上述可以与口蹄疫A型武汉株146S抗原特异性结合的单克隆抗体在制备检测口蹄疫的试剂盒中的应用也是本发明的保护范围。特别是在制备检测口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原的试剂盒中的应用。

[0025] 上述可以与口蹄疫口蹄疫A型武汉株146S抗原特异性结合的单克隆抗体的获得方法如下:按照本领域已知的常规方法制备本发明口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)特异性单克隆抗体。具体来讲,本发明口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的特异性单克隆抗体,可包括下述步骤:

[0026] 1) 利用蔗糖密度梯度法(45%、35%、25%、15%),获得146S抗原,纯度不低于80%,将抗原调整浓度至10 $\mu$ g/ml,作为免疫原使用;

[0027] 2) 用口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原作为免疫原免疫动物,连续免疫4次,每次间隔14天,前3次采用多点皮下免疫方式,第4次采取腹腔注射的免疫方式,每次10 $\mu$ g/只动物;

[0028] 3) 分离免疫动物的脾细胞,将其与骨髓瘤细胞进行融合,用HAT选择性培养基筛选杂交瘤细胞,对杂交瘤细胞上清用间接ELISA方法进行筛选特异性阳性克隆;当被免疫动物的血清抗体水平用间接ELISA进行检测效价超过1:50000时,可分离动物的脾细胞并制备成单细胞悬液,并在适当的融合剂(如聚乙二醇)的诱导下与骨髓瘤细胞(优选为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0)融合以形成杂交瘤,然后在HAT培养基中培养以筛选融合的杂交瘤细胞,并进一步可使用间接ELISA等方法鉴定所需的特异性单克隆抗体细胞株,经配对试验,优选分泌5G11的单克隆细胞株和分泌1C10的单克隆细胞株为配对用于检测口蹄疫A型武汉株抗原的两株单克隆细胞株。

[0029] 4) 特异性阳性克隆杂交瘤细胞株总RNA提取:取杂交瘤细胞悬液250 $\mu$ l,加入750 $\mu$ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 $\mu$ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5mlEP管中,加入600 $\mu$ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 $\mu$ l无RNA酶水溶解RNA。

[0030] 5) 反转录、PCR扩增及基因测序:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得杂交瘤细胞的cDNA。针对重链(V<sub>H</sub>-1:5'-GTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG-3';V<sub>H</sub>-2:5'-ATGTCGACTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC-3')和轻链(V<sub>L</sub>-1:5'-GTGAATTCATGGACATTGTGATGACCCAGTCTCC-3';V<sub>L</sub>-2:5'-CAGTCGACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3')可变区设计通用引物,利用扩增引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取单克隆抗体重链和轻链可变区序列信息。

[0031] 6) 特异性单克隆抗体的基因序列的合成、穿梭载体的构建、重组Bacmid的筛选与

提取、重组杆状病毒的拯救:①基因序列的合成:根据已测得单抗1E10和7G2的重链和轻链可变区的序列,将鼠抗体重链和轻链恒定区的序列补充在可变区部分,然后送往北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化。②穿梭载体的构建:根据重链和轻链的序列信息以及pFastBacDual载体序列信息,设计相应引物,扩增重链和轻链全长的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacDual载体中,其中pFastBacDual载体含有两个启动子,即PH启动子和P10启动子,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37℃培养箱培养48h后挑取白斑,利用1E103引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为4600bp,阴性克隆为300bp,选取完全无300bp条带的克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 $2 \times 10^6$ 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 $\mu$ g和2.5 $\mu$ g的量进行转染,转染试剂用量为8 $\mu$ l,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0032] 7) 特异性单克隆抗体的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 $2 \times 10^6$ 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 $\mu$ m滤膜过滤备用。用Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>pH值为7.0溶液平衡ProteinA预装柱,平衡3~5个柱体积,然后将细胞上清结合ProteinA预装柱,样品结合完后用Glycine-HCl pH值为3.0洗脱液进行洗脱,即获得纯化的口蹄疫A型(A/WH/09株)特异性单克隆抗体5G11及1C10。

[0033] 本发明试剂盒的检测程序为:

[0034] 1) 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0035] 2) 配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0036] 3) 样品稀释:抗原标准品用样品稀释液进行1:20~1:1280倍系列稀释,对应抗原浓度分别为200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml、6.2ng/ml、3.1ng/ml,待测样品同样用样品稀释液进行4~8个梯度稀释。

[0037] 4) 加样:取出所需板条,剩余板条装入铝箔袋中封好,置于2~8℃保存备用。将稀释好的待检样品、系列稀释的抗原标准品加入到包被板中,100 $\mu$ l/孔,设1孔作为阴性质控,仅加入样品稀释液。加样过程时间跨度应尽量短。如图1所示加样:S1~S7:1:20~1:1280倍比稀释抗原标准品,N:表示阴性质控孔,仅加入样品稀释液;T1:表示加各待检样品。

[0038] 5) 温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应30min。

[0039] 6) 洗板:弃去反应液,每孔加300 $\mu$ l稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续洗板4次后拍干。

[0040] 7) 加酶:各孔加100 $\mu$ l酶标抗体。

[0041] 8) 温育:置37℃温箱,反应30min。

[0042] 9) 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液300 $\mu$ l,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0043] 10) 显色每孔加入100 $\mu$ l底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37℃温箱中,避光反应15min。

[0044] 11) 每孔加入显色终止液50 $\mu$ l,振荡混匀终止反应。

[0045] 12) 测定每孔的OD<sub>450nm</sub>值(加终止液的反应板应在15min内读取OD<sub>450nm</sub>值)。

[0046] 13) 结果分析:抗原标准品(200ng/ml)孔OD<sub>450nm</sub>值应 $\geq 2.0$ ,否则无效;阴性质控孔OD<sub>450nm</sub>值应 $\leq 0.15$ ,否则无效;浓度计算:根据抗原标准品各孔OD<sub>450nm</sub>值绘制标准曲线,计算各待测样品中口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)含量。

[0047] 在上述检测方法中,待测样品的选择可以是多样的,如对于口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)感染动物,可为来自感染动物的活检物,也可为细胞培养后收获的病毒液等,也可为疫苗生产过程中的培养液、灭活液、纯化液、浓缩液和破乳后的成品疫苗等。

[0048] 步骤13)中的结果分析方法可为:以抗原标准品检测孔各稀释度OD<sub>450nm</sub>值和阴性质控孔OD<sub>450nm</sub>值作为X轴,以蛋白浓度为Y轴,采用EXCEL程序,→“插入”→“散点图”,选择“带平滑线和数据标记的散点图”→“趋势线”→选中“多项式”→“显示公式”和“显示R平方值”。通常R<sup>2</sup>值 $\geq 0.98$ 表明标准曲线可信(其中应舍弃OD过高或者过低的点)。每一块96孔板应设一组标准并绘制相应标准曲线。根据多项式公式,样品孔OD<sub>450nm</sub>值带入计算获得样品中抗原浓度。

[0049] 本发明的积极效果在于:本发明提供了对口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的定量检测的酶联免疫检测试剂盒,敏感性高、特异性好、且操作便捷,能够稳定地检测口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原含量及特异性区分口蹄疫A型武汉株与其他毒株。该试剂盒是采用口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的两株特异性单克隆抗体制成的双抗体夹心法酶联免疫定量检测试剂盒,可通过检测酶催化底物产生的信号变化来定量检测样品中口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原的含量,且与目前口蹄疫其他毒株如A型AF/72、0/Mya98/XJ/2010株、0S/99株、0ZK/93毒株、亚洲1型JSL/06株均不发生交叉反应。

[0050] 综上所述,本试剂盒采用口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的两株特异性单克隆抗体制成的双抗体夹心法酶联免疫定量检测试剂盒,灵敏度高、特异性强,可以有效地区分并检测样品中口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原的含量。同时该操作方法可在1.5小时内完成最多检测除抗原标准品和阴性质控孔外的88份样品的检测,大大缩短了检测周期,通常蔗糖密度梯度法3天才可以完成大约5份样品检测,且不需要昂贵的超速离心机,为口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)感染的鉴定及抗原含量测定提供了更为便捷有效的方法,具有广阔的市场前景和良好的经济、社会效益。

## 附图说明

[0051] 图1为本发明试剂盒酶联免疫板加样示意图。

## 具体实施方式

[0052] 下述实施例中的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0053] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和伦理道德可获取的生物材料都可按照实施例中的提示替换使用。

[0054] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,实施例将有助于理解本发明,但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0055] 实施例1、口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)单克隆抗体的杂交瘤细胞株的筛选

[0056] 包括以下步骤:

[0057] 1) 利用蔗糖密度梯度法获得口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)(由中牧实业股份有限公司提供)146S抗原,将抗原调整浓度至 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,作为免疫原使用;

[0058] 2) 免疫动物为BALB/c小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),连续免疫4次,每次间隔14天,前3次采用多点皮下免疫方式,第4次采取腹腔注射的免疫方式,每只小鼠注射 $10\mu\text{g}$ 146S抗原;

[0059] 3) 末次免疫后7天,取小鼠尾血分离血清后,用间接ELISA进行检测,效价 $>1:50000$ 后,分离免疫动物的脾细胞,将其与生长状态良好的骨髓瘤细胞SP2/0进行融合,用HAT选择性培养基筛选获得杂交瘤细胞;

[0060] 4) 对杂交瘤细胞上清用间接ELISA方法进行筛选特异性阳性克隆,最终获得3个特异性阳性克隆;具体操作步骤:用口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)、A型(AF/72株)、O型新疆株(O/Mya98/XJ/2010株)、O型OS/99株、O型OZK/93株、亚洲1型(JSL/06株)等146S纯化抗原(由中牧实业股份有限公司提供)溶于 $100\mu\text{l}$ 的pH 9.6的碳酸盐溶液稀释浓度至 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔 $100\mu\text{l}$ , $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下放置 $8\sim 12$ 小时,使特异性单克隆抗体与酶联反应板充分结合,然后按照 $300\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入含有 $10\text{mg}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液, $37^{\circ}\text{C}$ 封闭处理 $2\sim 3$ 小时,甩干后,待酶联反应板干燥后用铝箔纸进行封袋,置 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0061] 取细胞培养上清加入包被有病毒抗原的酶标板中, $37^{\circ}\text{C}$ 反应30分钟,用洗涤液(含有浓度为 $0.8\%\sim 1.2\%$ ( $\text{ml}/\text{ml}$ )的Tween-20的 $0.01\text{M}$ ,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,使用时用双蒸水稀释20倍。)洗板4次,拍干后,向每孔加入 $1:5000$ 稀释的兔抗鼠IgG-HRP标记物(购自美国Sigma公司), $37^{\circ}\text{C}$ 反应30分钟,用洗涤液4次,拍干后,向每孔加入底物液A(为含 $0.6\text{mg}/\text{ml}$ 过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液)和底物液B(为 $0.2\text{mg}/\text{ml}$ 的四甲基联苯胺溶液)各 $50\mu\text{l}$ 底物工作液, $37^{\circ}\text{C}$ 避光反应15分钟。向每孔加入 $50\mu\text{l}$ 终止液( $2\text{mol}/\text{L}$ 的硫酸溶液),振荡混匀终止反应。15分钟内测定每孔的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。以吸光度值 $>$ 阴性对照(即洗板培养液) $\times 2.1$ 倍为阳性判定标准,测定细胞培养上清中特异性单克隆抗体效价,同时测定单克隆抗体洗板株是否与其他病毒存在交叉反应,最后获得3株特异性细胞克隆,他们只与口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)有强烈信号反应,而不与A型(AF/72株)、新疆株(O/Mya98/XJ/2010株)、O型OS/99株、O型OZK/93株和亚洲1型(JSL/06株)等毒株反应,将这3株分别编号为1C10、3C6、5G11。用紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 值,用该 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 值除以经验系数1.48即为单克隆抗体的浓度,单位为 $\text{mg}/\text{ml}$ 。结果显示,1C10分泌的单克隆抗体浓度为 $1.1\text{mg}/\text{ml}$ ,3C6分泌的单克隆抗体浓度为 $0.9\text{mg}/\text{ml}$ ,5G11分泌的单克隆抗体浓度为 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 。

[0062] 实施例2、口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)单克隆纯化抗体的配对试验

[0063] 1) 用口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的特异性单克隆抗体制备包被板

[0064] 将纯化后的特异性单克隆抗体用pH 9.6的碳酸盐溶液稀释成 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 的包被工作液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板, $100\mu\text{l}/\text{孔}$ , $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下放置 $8\sim 12$ 小时,使特异性单克隆抗体与酶联反应板充分结合,然后按照 $300\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入含有 $10\text{mg}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液, $37^{\circ}\text{C}$ 封闭处理 $2\sim 3$ 小时,甩干后,待酶联反应板干燥后 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

[0065] 2) 制备辣根过氧化物酶标记的口蹄疫A型武汉株 (A/WH/09株) 特异性单克隆抗体

[0066] 将口蹄疫A型武汉株 (A/WH/09株) 的特异性单克隆抗体用戊二醛氧化法与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行偶联, 用pH7.4的PBS缓冲液充分透析, 加等量的优质丙三醇, -20℃以下保存。具体步骤如下:

[0067] ①将5mg HRP溶于0.2ml含有1.25%戊二醛的0.1mol/L pH值6.8的PBS缓冲液中, 置室温偶联18个小时, 充分透析出去多余戊二醛;

[0068] ②加生理盐水至1ml, 然后加入2.5mg纯化的口蹄疫A型武汉株 (A/WH/09株) 的特异性单克隆抗体及0.1ml pH值9.6的1mol/L碳酸盐缓冲液, 置于2~8℃放置24小时;

[0069] ③加入0.1ml 0.3mol/L的赖氨酸溶液, 室温放置2小时;

[0070] ④用pH7.4的PBS缓冲液充分透析, 通过离心除去沉淀, 上清即为酶结合物。用酶标记物稀释液按一定比例稀释后 (1:1000、1:2000和1:4000倍稀释) 即为酶标记物的工作液。

[0071] 3) 三个特异性抗体之间的配对试验采用棋盘滴定法来确定3株单抗 (1C10、3C6、5G11) 之间的配对模式。

[0072] ①加入146S抗原: 将146S抗原用样品稀释液进行稀释, 一份浓度为100ng/ml, 一份浓度为10ng/ml, 100μl/孔, 37℃反应30分钟;

[0073] ②加酶标单抗: 连续洗板4次后, 加入酶标单抗 (1C10、3C6、5G11), 37℃反应30分钟;

[0074] ③显色: 连续洗板4次后, 加入100μl底物工作液 (将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液, 现用现配), 震荡混匀, 置37℃温箱中, 避光反应15min;

[0075] ④读数: 每孔加入显色终止液50μl, 振荡混匀终止反应。测定每孔的OD<sub>450nm</sub>值。用100ng/ml样品的OD<sub>450nm</sub>值 (A) 除以10ng/ml样品的OD<sub>450nm</sub>值 (B), A/B值越大, 表明该配对单抗的检测灵敏度越高, 结果如表1-表3所示, 因此优选5G11作为捕获抗体, 1C10作为检测抗体使用, 其中5G11作为捕获抗体可选择1μg/ml, 1C10作为检测抗体可选择1:2000稀释。

[0076] 表1以1C10作为捕获抗体的配对试验结果 (A/B值)

捕获抗体 1C10	检测抗体 HRP-3C6			检测抗体 HRP-5G11		
	1:1000	1:2000	1:4000	1:1000	1:2000	1:4000
0.5μg/ml	3.24	3.28	1.19	5.01	5.16	4.35
1μg/ml	3.97	3.42	1.93	6.77	7.92	5.33
2μg/ml	3.99	3.08	1.87	6.67	7.91	5.42
4μg/ml	4.07	3.36	1.99	7.08	7.64	5.49

[0078] 表2以3C6作为捕获抗体的配对试验结果 (A/B值)

[0079]	捕获抗体 3C6	检测抗体 HRP-1C10			检测抗体 HRP-5G11		
		1:1000	1:2000	1:4000	1:1000	1:2000	1:4000
	0.5 $\mu$ g/ml	2.15	1.96	1.22	4.29	3.33	2.18
	1 $\mu$ g/ml	3.64	2.86	1.85	5.23	4.36	3.11
	2 $\mu$ g/ml	3.58	3.55	1.61	5.29	5.29	3.26
	4 $\mu$ g/ml	3.99	3.89	1.78	5.36	5.11	3.17

[0080] 表3以5G11作为捕获抗体的配对试验结果(A/B值)

[0081]	捕获抗体 5G11	检测抗体 HRP-1C10			检测抗体 HRP-3C6		
		1:1000	1:2000	1:4000	1:1000	1:2000	1:4000
	0.5 $\mu$ g/ml	7.01	8.16	6.35	2.25	2.08	1.66
	1 $\mu$ g/ml	8.77	<b>9.92</b>	6.33	2.96	2.66	1.93
	2 $\mu$ g/ml	8.67	9.91	6.42	3.11	2.75	2.36
	4 $\mu$ g/ml	8.08	9.64	6.49	3.18	2.64	2.33

[0082] 实施例3、口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)单克隆抗体的特异性杂交瘤细胞株的基因测序及单克隆抗体重组表达系统的建立

[0083] 包括以下步骤:

[0084] 1) 特异性阳性克隆杂交瘤细胞株总RNA提取、反转录、PCR及序列测定:

[0085] ①总RNA提取:取杂交瘤细胞悬液250 $\mu$ l,加入750 $\mu$ l的Trizol,上下颠倒混匀,加入200 $\mu$ l的氯仿,混匀,4 $^{\circ}$ C12000rpm离心15min。吸取上清至新的1.5mlEP管中,加入600 $\mu$ l的异丙醇,混匀离心10min。将异丙醇弃去,用75%的DEPC乙醇洗涤,离心。将乙醇弃去,烘干,用20 $\mu$ l无RNA酶水溶解RNA。

[0086] ②反转录:利用Invitrogen反转录试剂盒按说明书进行反转录,获得杂交瘤细胞的cDNA。

[0087] ③PCR反应及其产物的克隆测序:针对重链和轻链可变区设计通用引物,序列信息如下:

[0088] 表4重链和轻链可变区通用引物

[0089]	名称	序列(5' -3')
	V <sub>H</sub> -F	GTGAATTCATGCAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG
	V <sub>H</sub> -R	ATGTCGACTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
	V <sub>L</sub> -F	GTGAATTCATGGACATTGTGATGACCCAGTCTCC
	V <sub>L</sub> -R	CAGTCGACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC

[0090] 利用扩增引物对目的片段进行扩增,扩增完后胶回收片段,然后连接载体进行序列测定,获取单克隆抗体重链和轻链可变区序列信息。

[0091] 单克隆抗体5G11含有重链可变区5G11-V<sub>H</sub>和轻链可变区5G11-V<sub>L</sub>;所述5G11-V<sub>H</sub>和5G11-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;5G11-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.1的

第1~128位所示;其5G11-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.2的第1~115位所示;

[0092] 所述5G11-V<sub>H</sub>和所述5G11-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第25~34位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第51~58位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.1的第98~114位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第24~35位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第49~58位氨基酸所示;所述5G11-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.2的第95~98位氨基酸所示;

[0093] 单克隆抗体1C10含有重链可变区1C10-V<sub>H</sub>和轻链可变区1C10-V<sub>L</sub>,所述1C10-V<sub>H</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.3的第1~127位所示;其1C10-V<sub>L</sub>的氨基酸序列如序列表中SEQ ID No.4的第1~116位所示。

[0094] 所述1C10-V<sub>H</sub>和1C10-V<sub>L</sub>均由决定簇互补区和框架区组成;所述1C10-V<sub>H</sub>和所述1C10-V<sub>L</sub>的决定簇互补区均由CDR1、CDR2和CDR3组成;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第26~36位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第54~61位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>H</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.3的第98~111位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR1的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第24~36位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR2的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第50~59位氨基酸所示;所述1C10-V<sub>L</sub>的CDR3的氨基酸序列如SEQ ID No.4的第94~99位氨基酸所示。

[0095] 2) 特异性单克隆抗体的基因序列的合成及重组表达系统的建立

[0096] ①基因序列的合成:根据已测得单抗5G11和1C10的重链和轻链可变区的序列,将鼠抗体重链和轻链恒定区的序列补充在可变区部分,然后送往北京中美泰和公司进行基因序列的合成,并进行昆虫细胞密码子优化,5G11重链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.5(全长序列即为编码序列)所示,5G11轻链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.6(全长序列即为编码序列)所示;1C10重链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.7(全长序列即为编码序列)所示,1C10轻链的核苷酸序列如序列表中SEQ ID No.8(全长序列即为编码序列)所示。

[0097] ②穿梭载体的构建:根据重链和轻链的序列信息以及pFastBacdual载体(购自Thermo Fisher公司,货号10712024)序列信息,设计相应引物设计相应引物(序列见下表5),扩增重链和轻链全长的片段,胶回收完后通过同源重组的方法连入pFastBacdual载体中,其中pFastBacdual载体含有两个启动子,即PH启动子和P10启动子,连入载体后进行序列测定确保序列的准确性。

[0098] 表5表达载体构建引物序列信息

名称	序列 (5' -3')
[0099] M1-HF	TCATACATCTACGCGGCCGCTAGCGAGGTTTCAGTTGTTGAC TTCTGGTGGTGGTG

[0100]	<b>M1-HR</b>	TCCCCATCTCCCGGTACCTTATTTGCCTGGAGACAGGGACA GGC
	<b>M1-LF</b>	CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCAACTTCATGTTGACTCAGC AGCATTTC
	<b>M1-LR</b>	CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTAGCTACACTCAGTTGGTGC CACGGTC
	<b>M2-HF</b>	TCATACATCTACGCGGCCGCTAGCGAGGTCCAACCTCGTTCAA TGGGGTGCTTC
	<b>M2-HR</b>	TCCCCATCTCCCGGTACCTTACTTTCCTGGAGAGAGGGACA GGGAC
	<b>M2-LF</b>	CTGCCTTTGCGGCGGATGAATTCCAATCTGACCTGACCCAG CCTCCATCTGTC
	<b>M2-LR</b>	CTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTAGCTGCATTCCGGTTGGAGC CACAGTC

[0101] ③重组Bacmid的筛选与提取:将构建好的穿梭载体转化DH10Bac感受态,然后涂布三抗平板(卡那霉素、庆大霉素、四环霉素),37℃培养箱培养48h后挑取白斑,利用M13引物进行鉴定,阳性克隆目的片段大小为4600bp,阴性克隆为300bp,选取完全无300bp条带的克隆摇菌,12h后采用异丙醇沉淀法进行Bacmid的提取,然后利用Nanodrop进行浓度测定。

[0102] ④重组杆状病毒的拯救:转染前将密度为 $2 \times 10^6$ 的SF9细胞铺六孔板,重组Bacmid按5 $\mu$ g和2.5 $\mu$ g的量进行转染,转染试剂用量为8 $\mu$ l,转染后4~6h进行换液,28℃培养,72h后收获扩增P2代病毒,采用同样方法进行P3代病毒扩增。P4代病毒的扩增采取摇瓶扩增,病毒接种比例为1:100。

[0103] 6) 特异性单克隆抗体的表达与纯化:将P4代病毒按1:5的比例接种密度为 $2 \times 10^6$ 的Hi5细胞,28℃培养,48h后收获细胞,8000r/min离心1h取上清,然后用0.22 $\mu$ m滤膜过滤备用。用Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>pH值为7.0溶液平衡ProteinA预装柱,平衡3~5个柱体积,然后将细胞上清结合ProteinA预装柱,样品结合完后用Glycine-HCL pH值为3.0洗脱液进行洗脱,即获得纯化的口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)特异性单克隆抗体5G11、3C6及1C10。用紫外分光光度计测定OD<sub>280nm</sub>值,用该OD<sub>280nm</sub>值除以经验系数1.48即为单克隆抗体的浓度,单位为mg/ml。结果显示,纯化后的1C10分泌的单克隆抗体浓度为4.2mg/ml,3C6分泌的单克隆抗体浓度为3.78mg/ml,5G11分泌的单克隆抗体浓度为1.78mg/ml。

[0104] 实施例4、制备口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原定量检测酶联免疫试剂盒

[0105] 1) 用口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)特异性单克隆抗体制备抗原包被板

[0106] 将纯化后的特异性单克隆抗体用pH 9.6的碳酸盐溶液稀释成0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、4 $\mu$ g/ml的包被工作液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,100 $\mu$ l/孔,2~8℃下放置8~12小时,使特异性单克隆抗体与酶联反应板充分结合,然后按照300 $\mu$ l/孔加入含有10mg/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板

干燥后2~8℃密封保存。

[0107] 2) 制备辣根过氧化物酶标记的口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)特异性单克隆抗体

[0108] 将口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的特异性单克隆抗体用戊二醛氧化法与辣根过氧化物酶(HRP)进行偶联,用pH7.4的PBS缓冲液充分透析,加等量的优质丙三醇,-20℃以下保存。具体步骤如下:

[0109] ①将5mg HRP溶于0.2ml含有1.25%戊二醛的0.1mol/L pH值6.8的PBS缓冲液中,置室温偶联18个小时,充分透析出去多余戊二醛;

[0110] ②加生理盐水至1ml,然后加入2.5mg纯化的口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)的特异性单克隆抗体及0.1ml pH值9.6的1mol/L碳酸盐缓冲液,置于2~8℃放置24小时;

[0111] ③加入0.1ml 0.3mol/L的赖氨酸溶液,室温放置2小时;

[0112] ④用pH7.4的PBS缓冲液充分透析,通过离心除去沉淀,上清即为酶结合物。用酶标记物稀释液按一定比例稀释后即为酶标记物的工作液。

[0113] 3) 制备口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原标准品

[0114] 为了方便结果分析,所述试剂盒还包括口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原标准品,具体可为口蹄疫疫苗厂生产的口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S抗原纯化液,纯度不低于80%,抗原含量为4μg/ml,分装成1.0ml/管,使用时用样品稀释液进行(1:20~1:1280)倍比稀释,贴好标签,置于-20℃以下保存备用。

[0115] 4) 样品稀释液的制备为含有5mg/ml酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,1瓶(24ml/瓶)。

[0116] 5) 底物液A的制备为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液(1瓶,12ml/瓶)

[0117] 6) 底物液B的制备为0.2mg/ml的四甲基联苯胺(TMB)溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0118] 7) 20倍浓缩洗涤液的制备为含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液(50ml/瓶,2瓶)。

[0119] 8) 终止液的制备2mol/L的硫酸溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0120] 9) 根据需要,试剂盒中还可以有样品稀释板(2块,96孔/块),用于样品的稀释。

[0121] 实施例5、口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)抗原定量检测酶联免疫试剂盒的使用方法

[0122] 1) 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0123] 2) 配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0124] 3) 样品稀释:抗原标准品用样品稀释液进行1:20~1:1280倍系列稀释,对应抗原浓度分别为200ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml、6.2ng/ml、3.1ng/ml,待测样品同样用样品稀释液进行4~8个梯度稀释。

[0125] 4) 加样:取出所需板条,剩余板条装入铝箔袋中封好,置于2~8℃保存备用。将稀释好的待检样品、系列稀释的抗原标准品加入到包被板中,100μl/孔,设1孔作为阴性质控,仅加入样品稀释液。加样过程时间跨度应尽量短。如图1所示,加样:S1~S7:1:20~1:1280倍比稀释抗原标准品,N:表示阴性质控孔,仅加入样品稀释液;T1:表示加各待检样品。

[0126] 5) 温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应30min。

[0127] 6) 洗板:弃去反应液,每孔加300μl稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续

洗板4次后拍干。

[0128] 7) 加酶:各孔加100 $\mu$ l酶标抗体。

[0129] 8) 温育:置37 $^{\circ}$ C温箱,反应30min。

[0130] 9) 洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液300 $\mu$ l,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0131] 10) 显色每孔加入100 $\mu$ l底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37 $^{\circ}$ C温箱中,避光反应15min。

[0132] 11) 每孔加入显色终止液50 $\mu$ l,振荡混匀终止反应。

[0133] 12) 测定每孔的OD<sub>450nm</sub>值(加终止液的反应板应在15min内读取OD<sub>450nm</sub>值)。

[0134] 13) 结果分析:抗原标准品(200ng/ml)孔OD<sub>450nm</sub>值应 $\geq$ 2.0,否则无效;阴性质控孔OD<sub>450nm</sub>值应 $\leq$ 0.15,否则无效;浓度计算:根据抗原标准品各孔OD<sub>450nm</sub>值绘制标准曲线,计算各待测样品中口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)含量。

[0135] 在上述检测方法中,待测样品的选择可以是多样的,如对于口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)感染动物的活检物,也可为细胞培养后收获的病毒液等,也可为疫苗生产过程中的培养液、灭活液、纯化液、浓缩液和破乳后的成品疫苗等。

[0136] 步骤13)中的结果分析方法可为:以抗原标准品检测孔各稀释度OD<sub>450nm</sub>值和阴性质控孔OD<sub>450nm</sub>值作为X轴,以蛋白浓度为Y轴,采用EXCEL程序,→“插入”→“散点图”,选择“带平滑线和数据标记的散点图”→“趋势线”→选中“多项式”→“显示公式”和“显示R平方值”。通常R<sup>2</sup>值 $\geq$ 0.98表明标准曲线可信(其中应舍弃OD过高或者过低的点)。每一块96孔板应设一组标准并绘制相应标准曲线。根据多项式公式,样品孔OD<sub>450nm</sub>值带入计算获得样品中抗原浓度。

[0137] 以上检测过程约需1.5小时,一次实验最多可检测88份样品。

[0138] 实施例6、重复性试验

[0139] 1、批内可重复性试验

[0140] 用样品稀释液将口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S的抗原标准品进行倍比稀释(1:20~1:320),每个稀释度重复8孔,按照实施例3的试剂盒和实施例4的检测方法在同一批实验中测定OD<sub>450nm</sub>值,计算本发明试剂盒的批内重复性。

[0141] 结果如表6所示,可见本发明试剂盒的批内重复性在6.0%~13.6%之间,均 $<$ 15%,批内重复性较好,检测结果稳定可靠。

[0142] 表6批内重复性试验

[0143]

稀释倍数	理论浓度	检测平均值	SD	变异系数CV
1:20	200ng/ml	208.3	12.4	6.0
1:40	100ng/ml	104.5	8.4	8.0
1:80	50ng/ml	52.2	6.1	11.7
1:160	25ng/ml	23.6	3.2	13.6
1:320	12.5ng/ml	13.1	1.5	11.5

[0144] 2、批间可重复性试验

[0145] 用样品稀释液将口蹄疫A型武汉株(A/WH/09株)146S的抗原标准品进行倍比稀释(1:20~1:320),选取3个不同批次试剂盒各1测试条,按照实施例3的试剂盒和实施例4的检

测方法,测定OD<sub>450nm</sub>值,计算本发明试剂盒的批间重复性。

[0146] 结果显示(表7),可见本发明试剂盒的批内重复性在5.1%~14.3%之间,均<15%,批间重复性较好,检测结果稳定可靠。

[0147] 表7批间重复性试验

稀释倍数	理论浓度	检测平均值	SD	变异系数CV
1:20	200ng/ml	204.5	10.4	5.1
1:40	100ng/ml	106.4	6.9	6.5
1:80	50ng/ml	51.7	3.9	7.5
1:160	25ng/ml	25.2	3.6	14.3
1:320	12.5ng/ml	12.9	1.8	14.0

[0149] 实施例7、灵敏度试验

[0150] 选用3批试剂盒,用样品稀释液,100 $\mu$ l/孔,重复8孔,按照实施例3的试剂盒和实施例4的检测方法进行检测,计算其平均值(X)+3 $\times$ 标准差(SD)即为本试剂盒的检测灵敏度,以其中最大值作为本试剂盒的灵敏度。

[0151] 表8灵敏度试验

试剂盒批次	平均值(X)	标准差(SD)	X+3SD
1	0.95	0.091	1.22
2	1.22	0.067	1.42
3	1.15	0.119	1.50

[0153] 经3次重复试验结果(标8)显示,本试剂盒的灵敏度为1.5ng/ml,但低于该灵敏度也可用本试剂盒检测出。

[0154] 实施例8、特异性试验

[0155] 选用BHK21细胞宿主蛋白、A型(A/WH/09株)146S抗原、A型(AF/72株)146S抗原、口蹄疫O型新疆株(O/Mya98/XJ/2010株)146S抗原、O型OS/99株146S抗原、O型OZK/93株146S抗原和亚洲1型(JSL/06株)146S抗原,用试剂盒中的样品稀释液进行稀释,稀释为2 $\mu$ g/ml,按照实施例3的试剂盒和实施例4的检测方法进行检测,同时设置阴性质控孔(即仅加入样品稀释液),检测结果显示,本试剂盒所用的抗体特异性非常高,完全可用于口蹄疫不同血清型间的分型,即可将A型与O型和亚洲1型区分开,也可以区分A型不同毒株,即可将A/WH/09株与A型的其他毒株区分开。

[0156] 实施例8、本发明试剂盒及其检测方法与蔗糖密度梯度离心方法的比较

[0157] 为了验证本发明专利检测结果的准确性与便捷性,现与蔗糖密度梯度离心方法进行比较试验。用本发明专利试剂盒和蔗糖密度梯度离心同时检测3份A/WH/09株样品。检测结果见表9所示,两种检测方法符合率较高,用EXCEL进行拟合趋势线,其相关系数R<sup>2</sup>=0.98。

[0158] 表9本试剂盒与蔗糖密度梯度离心方法的比较试验结果

	样品编号	本试剂盒 ( $\mu\text{g/ml}$ )	蔗糖密度梯度离心 ( $\mu\text{g/ml}$ )
[0159]	1	31.8	35.6
	2	102.9	100.4
[0160]	3	19.6	20.1

[0161] 同时,在操作便捷性方面,本试剂盒整个操作仅需1.5小时,最多可检测88份样品,且不需要昂贵的仪器设备,而蔗糖密度梯度离心方法则需要72小时,而每台超速离心机只能检测5份样品,影响口蹄疫146S抗原定量检测的效率。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 中牧实业股份有限公司  
 [0003] <120> 特异性定量检测口蹄疫A型武汉株抗原的酶联免疫试剂盒  
 [0004] <130> WH0I180090  
 [0005] <160> 8  
 [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 [0007] <210> 1  
 [0008] <211> 128  
 [0009] <212> PRT  
 [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0011] <400> 1  
 [0012] Glu Val Gln Leu Leu Thr Ser Gly Gly Gly Val Val Ser Pro Gly Arg  
 [0013] 1 5 10 15  
 [0014] Ser Thr Arg Leu Ser Cys Ser Ala Trp Ala Gly Ser Phe Arg Ser Ala  
 [0015] 20 25 30  
 [0016] Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0017] 35 40 45  
 [0018] Ala Leu Ser Ser Asn Gln Tyr Val Gln Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0019] 50 55 60  
 [0020] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Ile  
 [0021] 65 70 75 80  
 [0022] Leu Gln Met Asn Ser Leu Val Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Trp Cys  
 [0023] 85 90 95  
 [0024] Asn Gly Ser Gly His Tyr Lys Glu Ser Gly Asp Gln Gly Ser Ala Pro  
 [0025] 100 105 110  
 [0026] Leu Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 [0027] 115 120 125  
 [0028] <210> 2  
 [0029] <211> 115  
 [0030] <212> PRT  
 [0031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0032] <400> 2  
 [0033] Asn Phe Met Leu Thr Gln Gln His Ser Val Ser Glu Ser Trp Gly Lys  
 [0034] 1 5 10 15  
 [0035] Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Gln Ser Glu Ser Val Phe Trp Thr  
 [0036] 20 25 30  
 [0037] Tyr Pro Gln Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Ser Gly Pro Thr Thr Val  
 [0038] 35 40 45  
 [0039] Ile Tyr Ala Trp Trp Gln Thr Pro Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 [0040] 50 55 60  
 [0041] Gly Ser Ile Glu Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

[0042]	65	70	75	80
[0043]	Leu Lys Thr Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Val Trp			
[0044]		85	90	95
[0045]	Gln Arg Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Tyr Leu Thr Val Leu Gly Gln			
[0046]		100	105	110
[0047]	Pro Lys Ala			
[0048]		115		
[0049]	<210> 3			
[0050]	<211> 127			
[0051]	<212> PRT			
[0052]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0053]	<400> 3			
[0054]	Glu Val Gln Leu Val Gln Trp Gly Ala Ser Leu Leu Lys Pro Asp Glu			
[0055]	1	5	10	15
[0056]	Thr Leu Ser Leu Arg Cys Ala Val Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Tyr Trp			
[0057]		20	25	30
[0058]	Tyr Thr Ala Ser Trp Ile Arg Gln Pro Asp Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
[0059]		35	40	45
[0060]	Ile Glu Glu Ile Asn His Asp Ala Phe Tyr Asn Trp Ala Pro Ser Leu			
[0061]		50	55	60
[0062]	Lys Ser Arg Val Thr Gln Ser Val Asp Thr Ser Asn Asn Gln Phe Ser			
[0063]	65	70	75	80
[0064]	Leu Lys Leu Ser Val Val Thr Ala Ala His Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0065]		85	90	95
[0066]	Ala Ala Gln Glu Tyr Glu Pro Ser Leu Pro Lys His Asn Gly Gln Trp			
[0067]		100	105	110
[0068]	Gly Gln Thr Thr Leu Val Val Val Ser Ser Thr Ser Thr Lys Gly			
[0069]		115	120	125
[0070]	<210> 4			
[0071]	<211> 116			
[0072]	<212> PRT			
[0073]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0074]	<400> 4			
[0075]	Gln Ser Asp Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Glu Gly Ala Pro Gly Val			
[0076]	1	5	10	15
[0077]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Tyr Tyr Ser Gly Asn Lys Gly Trp Leu			
[0078]		20	25	30
[0079]	Phe His Val Glu Trp Tyr Gln Asp Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu			
[0080]		35	40	45
[0081]	Leu Ile Ala Val Asn Phe Phe Val Ser Gly Asp Val Pro Asp Arg Phe			
[0082]		50	55	60
[0083]	Ser Gly Ser His Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Asp Ala Gly Leu			

[0084]	65	70	75	80
[0085]	Gln Ala Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ala Gln Lys			
[0086]		85	90	95
[0087]	Thr Phe Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Thr Val Leu Ser			
[0088]		100	105	110
[0089]	Gln Pro Lys Ala			
[0090]		115		
[0091]	<210> 5			
[0092]	<211> 1359			
[0093]	<212> DNA			
[0094]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
[0095]	<400> 5			
[0096]	gaggttcagt tgttgacttc tgggtggtgt gttgtttctc ctggaagatc cactagactc	60		
[0097]	tcttgctctg cttgggcagg ttccttccgc tctgcctgga ttcattgggt gagacaagca	120		
[0098]	cctggcaaaag gactggagtg ggtcgcactg tcaagcaacc aatacgtcca ggcctactac	180		
[0099]	gctgattcag tcaaaggcag gttcaccatc tctcgcgact cctcaaagaa cactctcact	240		
[0100]	ctccagatga atagcttggc cgcagaggac actgctgtgt attggtgtaa tggttcaggc	300		
[0101]	cattacaaag aatctggaga tcagggcagc gcacctctcg gtcagggcac attggtgaca	360		
[0102]	gtgagcagcg cctccacaaa gggctccctc gtgtttccct tggctcctc ctccaaatct	420		
[0103]	acctcaggag gaacagccgc tttgggatgc ttggttaagg actacttccc agaacctgtg	480		
[0104]	acagtttctt ggaactcagg agccctgaca tccggtgtgc ataccttccc agccgtctc	540		
[0105]	cagtcatccg gtctgtactc cctcagctct gtggtgacag ttcctcctc ctcactcggc	600		
[0106]	accagacct atatctgcaa tgtgaatcac aagccaagca atactaaggt ggacaagaag	660		
[0107]	gtcgaacca agtcttgcga taagaccac acttgtctc cttgccagc accagaactg	720		
[0108]	ctgggaggtc cttccgtgtt cttgttccca cccaacca aagatacact catgatctca	780		
[0109]	cgcactccag aggtgacttg cgtcgtcgtt gatgtttccc atgaggacce agaggttaag	840		
[0110]	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaagtc cacaatgcta agaccaagcc tcgagaggag	900		
[0111]	caatacaact ctacatatag agttgtctca gtcctcacag tctccacca ggactggctc	960		
[0112]	aatggcaagg agtacaaatg taaagtgtcc aacaaggccc tgctgtctc catcgagaag	1020		
[0113]	actattagca aggccaagg ccaacctcgc gaaccacagg tgtacacact gccaccttc	1080		
[0114]	agagatgaac tcaccaagaa ccagggtgcc ctgacttgc tggttaaagg tttctacca	1140		
[0115]	agcgacatcg ccgtggagtg ggaatctaag gccagccag agaataacta caagaccact	1200		
[0116]	cctcctgtgc tggattctga cggttcattc ttcttgtaga gcaagctgac cgtggacaaa	1260		
[0117]	tctaggtggc agcagggaaa cgtgttctcc tgttcagtca tgcattgagc cctgcataac	1320		
[0118]	cactataccc agaagagcct gtcctgtct ccaggcaaa	1359		
[0119]	<210> 6			
[0120]	<211> 648			
[0121]	<212> DNA			
[0122]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
[0123]	<400> 6			
[0124]	aactcatgt tgactcagca gcattccgtt agcgagagct ggggtaagac cgtcactatc	60		
[0125]	tcttgacacac gccagtcaga atcagtgctc tggacctatc ctcagtggtg tcaacaagge	120		

[0126]	ccaggatcag gacctactac agttatctat gcttgggtggc agactccaga cgggtgttccc	180
[0127]	gacaggttct ctggtagcat tgaatccagc tctaattccg cttcattgac catttctggc	240
[0128]	ctcaagacag aagatgaaac cgactactat tgccagtctt atgtgtggca gagaagggtg	300
[0129]	tttggagggtg gtacttatct gacagtcttg ggccagccta aagccgctcc ctctgtgaca	360
[0130]	ctgtttccac caagctctga agaactccag gcaacaagg caacactcgt gtgtctcatc	420
[0131]	tccgacttct atcccgggtgc tgtgactgtt gcatggaaag cagacagcag ccctgttaag	480
[0132]	gcaggagtgc aaactaccac acccagcaag cagtcaaaca ataagtacgc agcttctctc	540
[0133]	tatctgtcac tcacaccga gcagtggaaa tcacataggt catacagctg ccaggctact	600
[0134]	cacgaaggaa gcaccgtgga gaagaccgtg gcaccaactg agtgtagc	648
[0135]	<210> 7	
[0136]	<211> 1356	
[0137]	<212> DNA	
[0138]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0139]	<400> 7	
[0140]	gaggccaac tcgttcaatg ggggtcttca ctgctgaaac cgcagaaac tctgtctctc	60
[0141]	cgctgcgctg tgtactccgc agccctgacc tactgggtaca ctgccagctg gatcaggcaa	120
[0142]	cctgacggta agggctctgga atggattgag gagatcaatc atgatgcctt ctacaattgg	180
[0143]	gctcctagct tgaagtccag ggttactcag tccgtcgata cctccaataa ccaattcagc	240
[0144]	ttgaagctgt ccgtgggtgac agcagcacac actgctgtct attactgtgc tgcccaggag	300
[0145]	tacgagccct ctctccctaa acacaacggc cagtggggtc aaacaacct cgctgtgggtg	360
[0146]	tcctctacct caactaaagg accctccgtc tttccactcg caccatccag caagtccaca	420
[0147]	tctggaggca ctgctgcctt gggttgcctg gttaaagact actttccaga acctgttact	480
[0148]	gtttcatgga actctgggtgc cctgacctct ggcgtgcata cttttcccgc agtgcctcag	540
[0149]	tcctccgat tgtattccct ctccagcgtg gtcactgtcc cttcctctc cctcggaact	600
[0150]	cagacttaca tctgtaatgt caaccacaaa cctctaaaca caaagggtgga taagaagggtg	660
[0151]	gaaccaaagt catgcgataa gactcact tgtcctccat gccctgcacc tgaactcctg	720
[0152]	ggaggaccct ccgtgttctt cttccctccc aagccaaagg acacactcat gatttctagg	780
[0153]	acacctgagg tgacttgtgt ggtcgtggat gtttctcag aagatcctga ggtcaagttc	840
[0154]	aattggtacg tggacggcgt cgagggtcac aatgctaaga caaagcccag ggaggagcaa	900
[0155]	tacaatagca catatagagt ggtttctgtt ctgacagtgc tgcacagga ctggctcaac	960
[0156]	ggaaaggagt acaaatgtaa agtgtctaac aaggccttgc ctgctcctat cgagaagacc	1020
[0157]	atctcaaagg ccaaaggcca gccacgcgaa ccacaggtgt acaccctgcc accttctcgc	1080
[0158]	gacgagctga ctaagaacca ggtgtctttg acttgccttg tgaagggtt ctaccaagc	1140
[0159]	gacatcgccg tcgaatggga gagcaacgga cagcctgaga ataactaaa gaccactcca	1200
[0160]	cccgtgctgg actcagacgg ttattcttc ctgtactcaa agctgacagt ggacaagtca	1260
[0161]	cgctggcaac aaggcaacgt gttctctgt tctgtcatgc acgaagccct gcacaatcac	1320
[0162]	tatacccaga agtccctgtc cctctctcca ggaaag	1356
[0163]	<210> 8	
[0164]	<211> 651	
[0165]	<212> DNA	
[0166]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0167]	<400> 8	

[0168] caatctgacc tgaccagcc tccatctgtc gaaggagcac caggcgtcag ggtcactatt 60  
[0169] tcctgtacct attactcagg aaacaagga tggctgttcc atgtggagtg gtatcaggac 120  
[0170] ctgcctggaa ctgctcctaa gctgttgatc gctgtcaatt tcttcgtctc tggcgacgtg 180  
[0171] cccgaccgct tcagcggtc ccacagcggc acttcagcat ctttggtga cgctggactc 240  
[0172] caggccgagg atgagactga ctactattgt acatcatacg cacagaagac attctacgtg 300  
[0173] gtgttcggtg gtggtactaa agccacagtg ctgtctcaac ctaaggcagc tccttcagtt 360  
[0174] actttgttcc ctccaagctc cgaagagtg caggccaaca aagcaacctt ggtgtgtctg 420  
[0175] atctccgact tctaccagg cgctgtcaca gttgcttggc aagccgactc atcacctgtt 480  
[0176] aaggcaggag tcgaaactac cactcccagc aagcagtcca ataacaagta cgcagccagc 540  
[0177] tcatacctgt ccctgactcc tgagcagtgg aaatcccatc gctcttactc ctgccaagtg 600  
[0178] acccatgagg gttctaccgt cgagaagact gtggctccaa ccgaatgcag c 651

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	T1										
B	S2	...										
C	S3											
D	S4											
E	S5											
F	S6											
G	S7											
H	N											

图1