



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110261607 A

(43)申请公布日 2019. 09. 20

(21)申请号 201910452217.9

(22)申请日 2019.05.28

(71)申请人 北京市动物疫病预防控制中心

地址 102600 北京市大兴区生物医药基地
祥瑞大街19号

申请人 北京纳百生物科技有限公司

(72)发明人 冯小宇 杨春江 梅力 赵荣茂

韦海涛 宋彦军 莫勋 魏单平

高晓龙 陈会玲 吴佳兴 罗伏兵

(74)专利代理机构 北京智为时代知识产权代理

事务所(普通合伙) 11498

代理人 王加岭 杨静

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图1页

(54)发明名称

用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析
试剂盒及方法

(57)摘要

本发明提供了一种禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒,其包括禽白血病阳性对照、禽白血病阴性对照、荧光素标记的禽白血病重组P27蛋白溶液、样本稀释液、反应微孔板组成。利用该试剂盒,该试剂盒可在15分钟内检测出鸡是否感染禽白血病病毒。本发明提供的检测试剂盒与传统技术相比较,优势明显,技术改进明显,特别是针对禽白血病净化形式复杂、需求旺盛,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

1. 一种用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒, 其特征在于, 其包括荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液、样本处理液、阳性对照、阴性对照和反应微孔板, 其中, 所述阳性对照为灭活的禽白血病毒JS09株, 所述阴性对照为未接病毒的细胞培养上清, 所述样本处理液是含禽白血病毒特异性单克隆抗体的PBST溶液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述荧光素为异硫氰酸荧光素、戊二胺罗丹明或4'-氨基甲基荧光素。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述禽白血病毒特异性单克隆抗体的浓度为0.5~5 μ g/mL, PBST溶液为含体积比为0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述荧光素标记优选为异硫氰酸荧光素, 浓度为0.5~1.0mg/mL。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述阳性对照为多个, 是具有梯度滴度的禽白血病毒。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述阳性对照为 10^4 TCID₅₀含禽白血病毒JS09株的溶液。

7. 一种用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析方法, 其特征在于, 其采用如权利要求1-6中任一项所述的试剂盒进行检测, 其包括如下步骤:

S1、采集泄殖腔拭子或胎粪或蛋清样本;

S2、泄殖腔拭子或胎粪样品或蛋清样本加入到样本稀释液即0.01mol/L pH7.4的PBS溶液中, 振荡作为样本溶液;

S3、用移液器吸取处理好的样本溶液加入反应微孔中, 然后继续加入荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液、样本处理液, 室温孵育10min; 同时做阳性对照和阴性对照; 所述阴性对照为采用样本稀释液进行检测;

S4、利用荧光偏振免疫分析仪读取荧光偏振信号, 根据阴性对照与样本检测的荧光偏振值之差, 即 Δ FP值确定样本检测结果, 样本中病毒含量与荧光偏振值呈负相关关系。

8. 根据权利要求7所述的分析方法, 其特征在于, 在步骤S3中, 所述样本溶液加入量为100 μ L, 所述荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液为50 μ L, 所述样本处理液50 μ L。

9. 根据权利要求7所述的分析方法, 其特征在于, 在步骤S4中, Δ FP值大于或等于20mP时判为阳性, Δ FP值小于20mP时判定为阴性。

10. 根据权利要求7所述的分析方法, 其特征在于, 在步骤S2中, 泄殖腔拭子或胎粪样品检测时无需稀释, 所述蛋清样品在96孔血清稀释板中按1:1的比例用样本稀释液进行稀释。

用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术制备领域,具体涉及一种用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 禽白血病(Avian Leukosis Disease)是由禽白血病毒(Avian Leukosis Virus,ALV)引起的病毒性传染病,是由禽C型反转录病毒群的病毒引起的禽类多种肿瘤性疾病的统称,主要是淋巴细胞性白血病,其次是成红细胞性白血病、髓细胞性白血病。此外,还可引起骨髓细胞瘤、结缔组织瘤、上皮肿瘤、内皮肿瘤等。大多数肿瘤侵害造血系统,少数侵害其他组织。

[0003] 禽白血病毒ALV属于反转录病毒科 α 反转录病毒属。根据其囊膜蛋白的抗原性,迄今为止已将ALV分为A-J十个亚群。ALV主要引起鸡群感染、发病,既可引起免疫抑制、生产性能下降等亚临床致病作用,还能诱发各种急性或慢性的不同细胞类型的肿瘤。随流行毒株变异及鸡群遗传背景的不同而表现出诸如纤维肉瘤、淋巴肉瘤、成红细胞瘤、髓细胞样肿瘤、组织细胞瘤、骨硬化症等不同肿瘤。

[0004] 禽白血病呈世界性分布,并且可垂直传播,严重制约着养禽业的发展。目前该病尚无切实可行的治疗方法,也无有效的疫苗,唯一有效的控制方法是净化。ALV传播方式有垂直传播和水平传播,传染源是病鸡和带毒鸡。有病毒血症的母鸡,其整个生殖系统都有病毒繁殖,以输卵管的病毒浓度最高,特别是蛋白分泌部,因此其产出的鸡蛋常带毒,孵出的雏鸡也带毒。这种先天性感染的雏鸡常有免疫耐受现象,它不产生抗肿瘤病毒抗体,长期带毒排毒,成为重要传染源。

[0005] 为了从根源上控制禽白血病,不同的种鸡场和原种鸡场都根据自身特点制定了切实可行的净化方案。这些净化方案的核心关键就是要多次检测、剔除阳性鸡,确保种群的干净和纯粹。而目前检测携带有禽白血病毒的主要方法有酶联免疫法(ELISA)和聚合酶链式反应(PCR)等,其中ELISA方法主要以ALV保守基因p27表达的P27蛋白为检测目标,通过检测P27蛋白判断鸡是否感染ALV。因使用方便,可批量检测,ALV的ELISA方法在实际检测中有大量应用,国内外也有商品化产品,如美国IDEXX、荷兰BioChek以及美国Affinitech等。

[0006] 此外,国内也有一些禽白血病抗原ELISA检测相关专利,如申请号为201310161174.1的发明专利“一种用于检测禽白血病毒P27的酶联免疫反应载体及试剂盒”公布的禽白血病ELISA检测方法,采用多克隆抗体包板,酶标单抗检测,孵育时间为1小时45分钟,最后通过酶标仪检测;申请号为201210113675.8的发明专利“检测禽白血病毒群检测禽白血病毒特异性抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒”公开的是间接双抗体夹心ELISA,其采用单抗包板,多抗夹心,二抗检测,整体耗时为2小时20分钟;陈晨等2005年在《禽白血病毒双抗体夹心ELISA检测方法的建立和标化》(中国预防兽医学报,2005,27(6):535-539)公开的ELISA方法则与美国IDEXX公司的产品类似,整体反应时间也超过1小时。

[0007] 通过以上对比可知,现有ELISA技术的主要缺陷在于检测时间长,操作较为复杂,

且需要酶标仪,只能在化验室或者中心实验室具有酶标仪才能开展检测,无法在基层养殖场大规模推广应用。PCR方法与ELISA方法相比较,其缺陷更为明显,操作繁琐复杂,精密度还要求高,PCR仪器动辄数万元,RT-PCR更是达数十万元,且操作人员需要专业水平,否则易出现假阳性或假阴性结果,基层企业难以承担。因此,亟需开发出便捷、操作简单、灵敏度高的检测方法和产品

发明内容

[0008] 为了解决上述技术操作复杂繁琐、耗时长的缺陷问题,本发明提供一种用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒及方法,采用试剂盒可在15分钟内检测出鸡是否感染禽白血病毒。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用以下的技术方案为:

[0010] 一种用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒,其包括荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液、样本处理液、阳性对照、阴性对照和反应微孔板,其中,所述阳性对照为灭活的禽白血病毒JS09株,所述阴性对照为未接病毒的细胞培养上清,所述样本处理液是含禽白血病毒特异性单克隆抗体的PBST溶液。

[0011] 如上所述的试剂盒,优选地,所述荧光素为异硫氰酸荧光素、戊二胺罗丹明、4'-氨基荧光素等。

[0012] 进一步地,荧光素的浓度为0.01~1mg/mL,标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液为0.1~5mg/mL所用的稀释液是pH值为7.4、浓度为0.01mol/L的PBS。

[0013] 所述反应微孔板为不透明的塑料96孔板。

[0014] 如上所述的试剂盒,优选地,所述禽白血病毒特异性单克隆抗体的浓度为0.5~5 μ g/mL, PBST溶液为含体积比为0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液。进一步地,所述禽白血病毒特异性单克隆抗体的浓度为1~2.5 μ g/mL。

[0015] 如上所述的试剂盒,优选地,所述荧光素标记优选为异硫氰酸荧光素(FITC),浓度为0.5~1.0mg/mL。

[0016] 如上所述的试剂盒,优选地,所述阳性对照为多个,是具有梯度滴度的禽白血病毒。此时,可以根据检测结果绘制校准曲线,对样本中的禽白血病毒定量检测。

[0017] 如上所述的试剂盒,优选地,所述阳性对照为 10^6 TCID₅₀、 10^5 TCID₅₀、 10^4 TCID₅₀、 10^3 TCID₅₀或 10^2 TCID₅₀的禽白血病毒JS09株。

[0018] 一种用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析方法,其采用如上所述的试剂盒进行检测,其包括如下步骤:

[0019] S1、采集泄殖腔拭子或胎粪或蛋清样本;

[0020] S2、泄殖腔拭子或胎粪样品或蛋清样本加入到样本稀释液中,振荡作为样本溶液;

[0021] S3、用移液器吸取处理好的样本溶液加入反应微孔中,然后继续加入荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液、样本处理液,室温孵育10min;同时做阳性对照和阴性对照,也就是阳性对照和阴性对照直接加入反应微孔中进行检测;所述阴性对照为采用未接种病毒的DF1细胞上清进行检测;所述阳性对照为含禽白血病毒JS09株的溶液进行检测;

[0022] S4、利用荧光偏振免疫分析仪读取荧光偏振信号,根据阴性对照与样本检测的荧光偏振值之差即 ΔFP 值确定样本检测结果,样本中病毒含量与荧光偏振值呈负相关关系。

[0023] 如上所述的分析方法,优选地,在步骤S3中,所述样本溶液加入量为100 μ L,所述荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液为50 μ L,所述样本处理液50 μ L。

[0024] 如上所述的分析方法,优选地,在步骤S4中, Δ FP值大于或等于20mP时判为阳性, Δ FP值小于20mP时判定为阴性。

[0025] 如上所述的方法,优选地,在步骤S2中,泄殖腔拭子或胎粪样品检测时无需稀释,蛋清样品在96孔血清稀释板中按1:1的比例用样本稀释液进行稀释。

[0026] 需要注意的是,样品若不立即使用或进行检测,可在短时间内(1~4小时)应置于4 $^{\circ}$ C保存,长时间($\geq$ 4小时)需置于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0027] 本发明的有益效果在于:

[0028] 本发明提供的用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析检测试剂盒操作简便、无需特殊培训即可进行检测操作,检测灵敏度高,非常适合禽白血病毒大规模、快速检测。

[0029] 与传统的病原学分析方法和常规ELISA方法相比,本发明具有以下优点:

[0030] 1) 检测耗时短,效率高。该试剂盒可在15分钟内检测出鸡是否感染禽白血病毒,利用96孔微孔板可同时检测至少46份样本(以双孔重复对照计算),检测效率高。

[0031] 2) 检测灵敏度高,成本低。本方法利用荧光偏振免疫检测技术优势,具有极高的检测灵敏度,且单次检测成本不超过10元。

[0032] 3) 检测结果可定性、定量。利用梯度稀释的阳性对照做校准曲线,可以进一步测定检测样本中的禽白血病毒滴度,作定量及半定量测定。

[0033] 本发明提供的用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒与传统技术相比较,优势明显,技术改进明显,操作简单方便,特别是针对禽白血病毒净化形式复杂、需求旺盛,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

附图说明

[0034] 图1为禽白血病毒的荧光偏振免疫分析检测试剂盒校准曲线,其中阳性对照品TCID₅₀值为10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²。

具体实施方式

[0035] 以下实施例用于进一步说明本发明,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前提下,对本发明所作的修饰或者替换,均属于本发明的范畴。

[0036] 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,所用试剂、实验材料,如没有特殊说明,均来源于商品化产品。

[0037] 实施例1重组P27蛋白的制备

[0038] (1) 根据GenBank序列号JF911742.1的序列设计引物并扩增,将扩增片段(扩增的基因序列和氨基酸序列分别SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2)插入载体pET-28a(+),转入大肠杆菌BL21(DE3)构建重组工程菌pET-28a(+)-P27-BL21(DE3),构建成功的重组工程菌保存于北京纳百生物科技有限公司。将表达禽白血病毒P27蛋白的工程菌接种于LB液体培养基(含氨苄青霉素100 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C过夜活化。

[0039] (2) 以1~5% (v/v) 接种活化培养物于5mL的LB液体培养基(含氨苄青霉素100 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C培养至吸光度600nm(OD₆₀₀)达0.6~0.8时,加入IPTG,终浓度为0.2mmol/L诱导

表达。

[0040] (3) 在37℃,以200~250r/min诱导4h后,取经诱导的菌液收集后移入离心管配平,15000rpm,30min,4℃离心。收集上清液过0.22μm滤器进行过滤除杂,经镍柱纯化,收集产物经SDS-PAGE鉴定,为25KD大小的目的条带,测定蛋白浓度后作为重组P27抗原分装备用。

[0041] 实施例2禽白血病病毒特异性单克隆抗体的制备、纯化及鉴定

[0042] 1. 抗体制备、纯化

[0043] 将实施例1制备好的重组P27抗原按照50μg的量,与等量弗氏佐剂乳化后,皮下多点注射免疫若干只Balb/C小鼠。首次免疫时佐剂为弗氏完全佐剂,后续免疫佐剂为弗氏不完全佐剂佐剂。免疫间隔为2周,3次免疫后以直接ELISA测定血清效价。筛选血清效价高、交叉反应较小的小鼠按常规方法细胞融合,筛选分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0044] 筛选抗原为灭活的减蛋综合症病毒EDS、禽流感病毒、新城疫病毒、禽白血病病毒及实施例1制备的重组P27蛋白抗原,并用阴性血清作为参考对照,通过筛选排除对所用的交叉反应物质有反应的单抗细胞株,保留只与禽白血病病毒及重组P27蛋白抗原反应的细胞株。扩大培养后以体内法诱生腹水,收集后经过饱和硫酸铵沉淀后,以Protein G柱纯化,获得单克隆抗体,测定蛋白浓度后冻存。

[0045] 2. 抗体亚型鉴定

[0046] 利用商品化IgG亚型鉴定试剂盒对所制备的单克隆抗体进行鉴定,结果为IgG2b亚型,具体操作如下:

[0047] (1) 将制备的纯化单抗用1×PBS溶液作1:10000、1:15000、1:20000、1:25000、1:30000、1:35000和1:40000稀释。

[0048] (2) 取实例1制备的P27蛋白包被板(0.1μg/mL),以1×洗涤液300μL/孔洗板1次,弃去洗涤液。加入相应步骤(1)稀释好的单克隆抗体,每孔50μL,每个单抗作5个重复孔,振荡混匀1分钟。37℃孵育30分钟后,取出反应板,弃去反应液,每孔加入300μL 1×洗涤液,洗涤3次后,甩干。

[0049] (3) 将商品化试剂盒中的IgG1、IgG2b和IgG3用PBS溶液作1:1000稀释,将商品化试剂盒中的IgG2a和IgM用PBS溶液作1:5000稀释。步骤(2)后的每个单抗依次加入已稀释的IgG1、IgG2b、IgG3、IgG2a和IgM抗体,每孔加入100μL,4℃孵育过夜,或37℃孵育2小时。

[0050] (4) 将HRP标记的山羊抗兔IgG抗体用PBS作1:5000稀释后,每孔加入100μL,37℃孵育30分钟后,按上一步中的方法洗涤3次,甩干。

[0051] (5) 将底物溶液立即加入到ELISA反应板中,100μL/孔,室温避光显色10分钟后,每孔加50μL终止液终止反应。

[0052] (6) 反应终止后,10分钟内用酶标仪测定OD450nm值。

[0053] (7) 比较每个单抗加入IgG1、IgG2b、IgG3、IgG2a和IgM抗体孔的OD450nm值,OD450nm最高者对应的亚类为该单抗的亚类。

[0054] 单克隆抗体鉴定结果为IgG2b亚型3. 抗体效价测定

[0055] 以间接ELISA鉴定ALV单克隆抗体的效价,具体操作如下:

[0056] (1) 将本实施例步骤1中制备的纯化单抗用1×PBS溶液作1:10000、1:15000、1:20000、1:25000、1:30000、1:35000和1:40000稀释。

[0057] (2) 取实施例1制备的P27蛋白包被板(0.1μg/mL),以1×洗涤液300μL/孔洗板1次,

弃去洗涤液。将稀释好的免疫小鼠阳性血清(阳性对照)和空白小鼠血清(阴性对照)分别加入到ELISA板中,50 μ L/孔,其中阳性及阴性对照各做2个重复。加入已稀释好的单克隆抗体,每孔100 μ L,振荡混匀1分钟。37 $^{\circ}$ C孵育30分钟后,取出反应板,弃去反应液,每孔加入300 μ L 1 $\times$ 洗涤液,洗涤3次后,甩干。

[0058] (3) 将HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体用相应的稀释液作1:100稀释后,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟后,按上一步中的方法洗涤3次,甩干。

[0059] (4) 将底物溶液立即加入到ELISA反应板中,100 μ L/孔,室温避光显色10分钟后,每孔加50 μ L终止液终止反应。

[0060] (5) 反应终止后,10分钟内用酶标仪测定OD450nm值。

[0061] (6) 阳性对照血清的平均值 $\geq$ 2倍阴性对照血清的平均值的最高稀释度确定为抗体的效价。

[0062] 实施例3:荧光素标记禽白血病毒重组P27蛋白的制备

[0063] 将荧光素FITC(异硫氰酸荧光素)与禽白血病毒重组P27蛋白标记,操作如下:

[0064] (1) 取按实施例1制备的禽白血病毒重组P27蛋白用0.01mol/L PBS,pH7.2稀释至2mg/mL备用;

[0065] (2) 取FITC用二甲基亚砷溶解成1mg/mL的FITC溶液备用;

[0066] (3) 取100 μ L准备的FITC溶液加入到1mL准备好的禽白血病毒重组P27蛋白溶液中(FITC与P27蛋白质量比例为1:20);

[0067] (4) 继续用PBS补液至2mL,然后室温避光搅拌反应2h;

[0068] (5) 将上述反应液用SephadexG-25柱过柱除去游离的FITC,用PBS洗脱。流速控制在1mL/min,收集第一个荧光蛋白结合峰流出液,测定F/P值,

[0069] $F/P = (2.87 \times A_{495}) / (A_{280} - 0.35 \times A_{495})$,确保F/P值在2.5左右。A495表示在495nm的吸光度值,A280表示在280nm的吸光度值。

[0070] (6) 纯化好的FITC标记的重组P27蛋白经进一步用PBS溶液透析后备用。

[0071] 实施例4禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒的组装

[0072] (1) 阳性对照:灭活禽白血病毒JS09株(由中国动物疫病预防控制中心制备并提供),病毒滴度为 10^4 TCID₅₀,2mL

[0073] (2) 阴性对照:DF1未接毒的细胞培养上清,2mL

[0074] (3) 异硫氰酸荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白(实施例3中制备)6mL

[0075] (4) 样本处理液:50mL含禽白血病毒特异性单克隆抗体和0.1%BSA的PBST溶液;其中抗体浓度为1 μ g/mL,PBST溶液为含0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

[0076] (5) 反应微孔板:商品化不透明的塑料96孔板

[0077] (6) 试剂盒组装:将上述各组分贴好标签,放置于刻有孔位的泡沫托上,与试剂盒说明书一起放入试剂盒外包装箱,贴上标签,塑封后保存于2~8 $^{\circ}$ C备用。

[0078] 其中,采用试剂盒的检测方法包括如下步骤:

[0079] 第一步,采集泄殖腔拭子或胎粪或蛋清样本。

[0080] 第二步,泄殖腔拭子或胎粪样品加入到配套的样本稀释液中,并且在检测之前充分振荡。泄殖腔拭子或胎粪样品检测时无需稀释。蛋清样品按1:1的比例用样本稀释液进行稀释,振荡器充分混匀备用,并确保回复室温。若不立即使用,短时间内(1~4小时)应置于4

℃保存,长时间(≥ 4 小时)需置于 -20°C 保存。

[0081] 第三步,用移液器吸取100 μL 处理好的样本溶液加入反应微孔板中,然后继续加入实施例3中制备的荧光素标记的禽白血病重组P27蛋白溶液50 μL 、样本稀释液50 μL ,室温孵育10min;

[0082] 第四步,利用荧光偏振免疫分析仪读取荧光偏振信号,根据阴性对照与样本检测的荧光偏振值之差(ΔFP 值)确定样本检测结果,样本中病毒含量与荧光偏振值呈负相关关系。当阴性对照的FP值大于180mP,阳性对照的 ΔFP 值大于或等于40mP,试验成立。 ΔFP 值大于或等于20mP时判为阳性, ΔFP 值小于20mP时判定为阴性。

[0083] 实施例5禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒检测系列滴度的禽白血病病毒

[0084] 将灭活的禽白血病病毒(TCID_{50} 为 10^6)用PBS稀释分别稀释10倍、100倍、1000倍、10000倍,用本发明实施例4中建立的荧光偏振免疫分析法做检测,利用不同含量禽白血病病毒的FP值建立标准曲线(图1),曲线回归判断本试剂盒对禽白血病病毒的最低检测限。下表1描述的是禽白血病病毒与荧光素标记的重组P27蛋白结合前后检测的FP值变化。

[0085]

表1反应物	FP (mP)
荧光素标记的重组P27蛋白	210
荧光素标记的重组P27蛋白加入阳性对照	123
荧光素标记的重组P27蛋白加入阴性对照	207

[0086] 以灭活的禽白血病病毒滴度 TCID_{50} 为横坐标,对应检测获得的FP值为纵坐标,建立禽白血病病毒检测的标准曲线,如图1所示,其中各个标准点的禽白血病病毒滴度分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 和 10^2TCID_{50} ,通过计算机软件分析可知曲线的 IC_{20} 为658.46 TCID_{50} ,即本试剂盒对禽白血病病毒的最低检测灵敏度可达到658.46 TCID_{50} 。

[0087] 实施例6禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒重复性实验

[0088] 按实施例4方法制备3个批次的禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒,检测同样的血清样本,每个样本重复检测2次,并且用不同批次试剂盒重复测定,根据检测结果判定试剂盒的批内、批间检测稳定性。

[0089] 表2

[0090]

试剂盒批次	样本 FP 值	批内变异系数
-------	---------	--------

[0091]

	首次检测	第二次检测	第三次检测	(%)
P171201	201	208	198	2.53
P171202	211	206	218	2.84
P170203	190	189	201	3.44
批间变异系数 (%)	4.53			

[0092] 由表2可知,本发明研制试剂盒批内批间变异系数均小于10%,稳定性良好。

[0093] 实施例7禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒敏感性实验

[0094] 利用本发明实施例4的禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒检测ALV病毒:禽白血病A亚型病毒VR-335(为ATCC产品)、禽白血病B亚型病毒VR-658(为ATCC产品)、禽白血病J亚型病毒CADC2010(顾小雪等,血管瘤型J亚型禽白血病病毒的分离与鉴定,中国畜牧兽医学学会禽病学分会第十五次学术研讨会论文集)。病毒效价为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL,结果均为阳性。说明本试剂盒可对不同亚型的禽白血病病毒进行检测。

[0095] 实施例8禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒特异性实验

[0096] 将常见的禽病病毒AIV为禽流感病毒A/turkey/Wisconsin/66(H9N2)();REV为禽网状内皮组织增生症病毒CVCC AV107,为中国兽医药品监察所产品;MDV为马立克氏病病毒VR-987,为ATCC产品;EDS为产蛋下降综合征病毒CVCC AV71为中国兽医药品监察所产品;IBDV为传染性法氏囊病毒VR-478,为ATCC产品,按照禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒操作说明分别检测AIV、REV、MDV、EDS和IBDV,结果AIV、REV、MDV、EDS和IBDV均呈阴性,说明本发明提供的禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒特异性强,不会发生交叉反应。

[0097] 实施例9本发明的禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒与现有的禽白血病的酶联免疫试剂盒的比较

[0098] 将本发明的禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒与美国IDEXX的禽白血病P27抗原酶联免疫试剂盒做比较结果如下表3,结果说明本发明试剂盒大缩短了高通量检测的时间,无需繁琐的洗板拍板过程,孵育时间短,方便快捷。对372份样本进行检测,本发明的禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒与美国IDEXX的禽白血病P27抗原酶联免疫试剂盒比较,总符合率在95.7%。

[0099] 表3

[0100]

技术指标	本发明试剂盒	美国试剂盒
检测时间	20min	150min以上
孵育温度	室温	室温
孵育次数	1	3
孵育时间	10min	135min

有效期	12个月	12个月
-----	------	------

序列表

<110> 北京市动物疫病预防控制中心、北京纳百生物科技有限公司

<120> 用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒及方法

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 744

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

atgcctgtag tgattaagac agagggaccc gcctggaccc ctctggagcc aaaattgata 60
acaagactgg ctgatacggg caggaccaag ggcttacgat ccccgatcac tatggcagaa 120
gtggaagcgc ttatgtcctc cccgctgctg ccgcatgacg tcacgaatct aatgagagtt 180
atcttaggac ctgccccata tgccttatgg atggacgctt ggggagtcca actacagacg 240
gttatagcgg cagccactcg cgacccccga caccacgcga acggtcaagg gcggggggaa 300
cggactaact tggatcggtt aaagggtttg gcggatggaa tggccggcaa tccagagggt 360
caggctgcat tattaagacc gggggaactg gttgctatta cggcgtcggc tctccaggcg 420
tttagagagg tcgctcggtt ggcggaaccc acagaccgtt gggcggaat tacgcaggga 480
ccatctgagt cctttgtgga ttttgccaat cgtcttataa aggcggttga agggtcagat 540
ctccacatt ccgcgcgggc tccggtgatc attgactgct ttaggcagaa gtcacagcca 600
gatatccagc agcttatacg ggcagacccc tccacgtga ccacccagg agagataatc 660
aaatatgtgc tagacaggca gaagactgcc cctcttacgg atcgaggcat agccgcggcc 720
atgtcgtctg ctatccagcc ctaa 744

```

<210> 2

<211> 247

<212> PRT

<213> P27氨基酸序列(P27)

<400> 2

```

Met Pro Val Val Ile Lys Thr Glu Gly Pro Ala Trp Thr Pro Leu Glu
1           5           10           15
Pro Lys Leu Ile Thr Arg Leu Ala Asp Thr Val Arg Thr Lys Gly Leu
          20           25           30
Arg Ser Pro Ile Thr Met Ala Glu Val Glu Ala Leu Met Ser Ser Pro
          35           40           45
Leu Leu Pro His Asp Val Thr Asn Leu Met Arg Val Ile Leu Gly Pro
          50           55           60
Ala Pro Tyr Ala Leu Trp Met Asp Ala Trp Gly Val Gln Leu Gln Thr
65           70           75           80

```

Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Asp	Pro	Arg	His	Pro	Ala	Asn	Gly	Gln
85				90				95							
Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Thr	Asn	Leu	Asp	Arg	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Asp
100				105				110							
Gly	Met	Ala	Gly	Asn	Pro	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Leu	Leu	Arg	Pro	Gly
115				120				125							
Glu	Leu	Val	Ala	Ile	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Phe	Arg	Glu	Val
130				135				140							
Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Pro	Thr	Asp	Pro	Trp	Ala	Glu	Ile	Thr	Gln	Gly
145				150				155				160			
Pro	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	Asp	Phe	Ala	Asn	Arg	Leu	Ile	Lys	Ala	Val
165				170				175							
Glu	Gly	Ser	Asp	Leu	Pro	Pro	Ser	Ala	Arg	Ala	Pro	Val	Ile	Ile	Asp
180				185				190							
Cys	Phe	Arg	Gln	Lys	Ser	Gln	Pro	Asp	Ile	Gln	Gln	Leu	Ile	Arg	Ala
195				200				205							
Ala	Pro	Ser	Thr	Leu	Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	Ile	Ile	Lys	Tyr	Val	Leu
210				215				220							
Asp	Arg	Gln	Lys	Thr	Ala	Pro	Leu	Thr	Asp	Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Ala
225				230				235				240			
Met	Ser	Ser	Ala	Ile	Gln	Pro									
245															

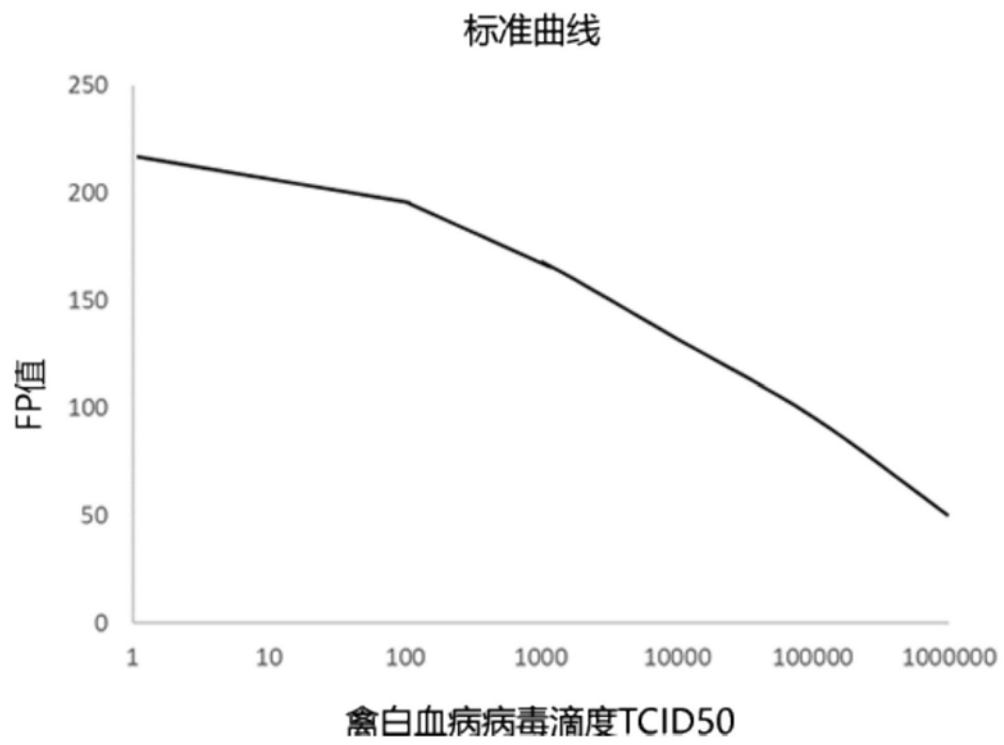


图1

专利名称(译)	用于检测禽白血病毒的荧光偏振免疫分析试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN110261607A	公开(公告)日	2019-09-20
申请号	CN201910452217.9	申请日	2019-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京市动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	北京市动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京市动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	冯小宇 杨春江 梅力 赵荣茂 韦海涛 宋彦军 莫勋 魏单平 高晓龙 陈会玲 吴佳兴 罗伏兵		
发明人	冯小宇 杨春江 梅力 赵荣茂 韦海涛 宋彦军 莫勋 魏单平 高晓龙 陈会玲 吴佳兴 罗伏兵		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56983		
代理人(译)	杨静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种禽白血病的荧光偏振免疫分析检测试剂盒，其包括禽白血病毒阳性对照、禽白血病毒阴性对照、荧光素标记的禽白血病毒重组P27蛋白溶液、样本稀释液、反应微孔板组成。利用该试剂盒，该试剂盒可在15分钟内检测出鸡是否感染禽白血病毒。本发明提供的检测试剂盒与传统技术相比较，优势明显，技术改进明显，特别是针对禽白血病毒净化形式复杂、需求旺盛，具有非常广阔的市场前景，可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

试验盒批次	样本P值	批内变异系数
-------	------	--------