



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106596966 B

(45)授权公告日 2019.03.19

(21)申请号 201611052512.8

CN 103513036 A,2014.01.15,

(22)申请日 2016.11.25

CN 103033627 A,2013.04.10,

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106596966 A

CN 102980999 A,2013.03.20,

(43)申请公布日 2017.04.26

Zengjun Lu et al..Development and validation of a 3ABC indirect ELISA for differentiation of foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals.《Veterinary Microbiology》.2007,第125卷
Gaurav K. Sharma et

(73)专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730000 甘肃省兰州市城关区盐场堡徐家坪1号

al..Immunodiagnosis of foot-and-mouth disease using mutated recombinant 3ABC polyprotein in a competitive ELISA.《Journal of Virological Methods》.2012,第185卷

(72)发明人 常惠芸 刘泽众 邵军军 赵付荣
李秀梅 张永光

Vasinee Srisombundit et al..Development of an inactivated 3Cpro-3ABC (mu3ABC) ELISA to differentiate cattle infected with foot and mouth disease virus from vaccinated cattle.《Journal of Virological Methods》.2013,第188卷

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 程茗

审查员 贾静

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01) (续)

(56)对比文件

CN 1603831 A,2005.04.06,

CN 102662062 A,2012.09.12,

CN 104788547 A,2015.07.22,

权利要求书2页 说明书6页

序列表4页 附图3页

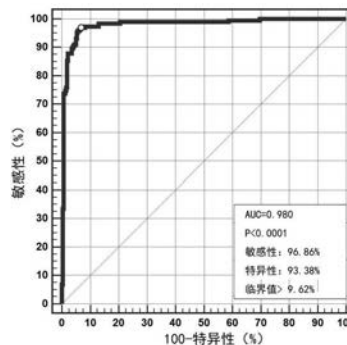
(54)发明名称

一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒

试剂盒产品,敏感性更高,特异性更强,诊断能力亦优于其他产品。

(57)摘要

一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,属免疫学检测领域,所述检测试剂盒包含96孔化学发光免疫分析板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液,其中所述96孔化学发光免疫分析板包被3ABC融合蛋白;酶标抗体为辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG抗体;血清稀释液包含0.01% Tween-20、1%酪蛋白、10%马血清和1%大肠杆菌;所述化学发光底物为鲁米诺溶液;所述化学发光增强剂含有IPP、H₂O₂和Tween-20。本发明所述试剂盒相对于市售



CN 106596966 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

C12N 15/70(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

1. 一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,所述检测试剂盒包含96孔化学发光免疫分析板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液,其特征在于:所述96孔化学发光免疫分析板包被3ABC融合蛋白,所述3ABC融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体;所述血清稀释液为pH=7.2~7.4且摩尔浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液,其中包含体积分数为0.01%的Tween-20、质量体积百分数为1%的酪蛋白、体积分数为10%的马血清和体积分数为1%的大肠杆菌裂解液;所述化学发光底物为0.1mmol/L的鲁米诺溶液;所述化学发光增强剂包含0.07 mmol/L的IPP、3mmol/L的H₂O₂和体积分数为0.002%的Tween-20;

所述3ABC融合蛋白的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、利用基因定点突变技术,获取突变后的3ABC基因,使其编码的3ABC蛋白中3C蛋白上的第46位组氨酸突变成酪氨酸和第163位半胱氨酸突变成甘氨酸;所述3ABC基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

步骤二、将步骤一获取的3ABC基因和载体 PproExHtB 均用限制性内切酶 BamHI与XhoI双酶切后进行连接,将突变后的全长3ABC基因插入线性化的重组表达质粒构建重组表达质粒PproExhTB-mu3ABC,鉴定阳性后保存备用;

步骤三、将步骤二所得阳性重组表达质粒PproExhTB-mu3ABC转化大肠杆菌*Rosetta (DE3)*,获取重组大肠杆菌,将重组大肠杆菌接种到培养基上,待OD₆₀₀=0.4-0.6时,向培养基中加入IPTG,在16℃、220rpm条件下处理20h进行诱导表达,经离心、裂解,溶解包涵体,纯化蛋白,得3ABC融合蛋白。

2. 如权利要求1所述的一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述3ABC融合蛋白的包被浓度为250ng/mL。

3. 如权利要求1所述的一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述大肠杆菌裂解液是将未经转化的大肠杆菌*Rosetta (DE3)*培养至对数期,离心,得菌体沉淀;加入与菌体沉淀等体积的裂解缓冲液,混匀,得混合物;向混合物中加入其1/3体积的直径为0.22μm的玻璃珠,震荡,离心,取上清,得大肠杆菌裂解液。

4. 如权利要求3所述的一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述裂解缓冲液由以下成分组成:体积分数为2%的Triton X-100;体积分数为1%的SDS;100mmol/L的NaCl;10mmol/L,pH=8.0的Tris-HCl;1 mmol/L,pH=8.0的EDTA;余量为水。

5. 如权利要求1所述的一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述3ABC基因的获取过程为:从感染口蹄疫病毒的牛的水疱液中提取总RNA,逆转录合成cDNA;设计六组引物,以合成的cDNA为模板,首先利用引物3ABC-F和3C-46-R扩增第一段基因;然后利用3C-46-F和3C-163-R扩增第二段基因;再用3C-163-F与3ABC-R扩增第三段基因;最后通过融合PCR将扩增的三段基因融合成突变后的3ABC基因;

所述引物序列如下:

3ABC-F:5'-CGGGATCC ATCTCAATTCCTCCCAAAAGTCC-3'

3ABC-R:5'-CCGCTCGAGT CTCATGGTGTGGTTCGGGGT-3'

3C-46-F:5'-CGTACCTCGTTACCTTTTCGC-3'

3C-46-R:5'-GCGAAAAGGTAACGAGGTACG-3'

3C-163-F:5'-AGGCTACGGTGGGGGAGC-3'

3C-163-R:5'-GCTCCCCACCGTAGCCT-3'。

一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体地涉及一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫是一种古老的政治经济病,它严重威胁畜牧业的健康发展与进出口贸易。口蹄疫早期、准确的诊断对于防控口蹄疫的大流行来说无疑是至关重要的。因此开发快速、敏感、准确的诊断口蹄疫的方法是当前研究的热点。目前为止,世界卫生组织(OIE)所提到的关于诊断口蹄疫的方法主要有:病毒分离实验、病毒中和实验、补体结合实验、各种酶联免疫分析(ELISA)以及实时定量PCR等。然而,这些方法都有很多缺点难以克服。例如:病毒分离实验需要接触活毒,容易造成病毒泄露的危险。病毒中和实验完全不能区分疫苗免疫动物与野毒感染动物。补体结合实验敏感性低,已经不再使用。实时定量PCR耗时长需要专业人员与仪器进行检测。目前,用于诊断口蹄疫最普遍,最常用的方法是ELISA方法。由于口蹄疫实行普遍疫苗免疫政策,而现有灭活疫苗中不含有或含有少量口蹄疫非结构蛋白,所以检测口蹄疫非结构蛋白的抗原或抗体成为了区分疫苗免疫与野毒感染的重要手段。市场上有许多商品化的检测3ABC、2B、3AB等非结构蛋白的ELISA试剂盒。其中检测3ABC蛋白被普遍认为是确定口蹄疫感染的金标准。

[0003] 现代免疫诊断技术发展迅速,自放射性免疫问世以来便开创了检测微量物质的先河,但放射性免疫产生放射性污染,因此在此基础上出现了酶联免疫,ELISA敏感性较低,在ELISA的基础上出现了化学发光免疫分析技术(CLIA)。相比于ELISA,CLIA是通过化学反应能量的转移产生发光。因此CLIA消除了背景荧光信号,具有极高的敏感性,可以在很宽的线性范围内检测极低浓度的分析物。但是截至目前,关于区分口蹄疫疫苗免疫动物和野毒感染动物的化学发光免疫分析方法还未见报道。

发明内容

[0004] 针对口蹄疫病毒检测所面临的问题,本发明拟提供一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,该试剂盒诊断的敏感性最高可达97.38%,诊断的特异性最高可达94.32%;通过对已知背景的血清样品进行检测,本发明所述试剂盒相对市售ELISA试剂盒都具有较高的符合率,说明诊断能力相对较高。

[0005] 一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒,所述检测试剂盒包含96孔化学发光免疫分析板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液;所述96孔化学发光免疫分析板包被3ABC融合蛋白,所述3ABC融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示;所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体;所述血清稀释液为pH=7.2~7.4且摩尔浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液,其中包含体积分数为0.01%的Tween-20、质量体积百分数为1%的酪蛋白、体积分数为10%的马血清和体积分数为1%的大肠杆菌裂解液;所述化学发光底物为0.1mmol/L的鲁米诺溶液;所述化学发光增强剂包含0.07 mmol/L的

IPP、3mmol/L的H₂O₂和体积百分比浓度为0.002%的Tween-20;

[0006] 所述3ABC融合蛋白的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤一、利用基因定点突变技术,获取突变后的3ABC基因,使其编码的3ABC蛋白中3C蛋白上的第46位组氨酸突变成酪氨酸和第163位半胱氨酸突变成甘氨酸;所述3ABC基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;

[0008] 步骤二、将步骤一获取的3ABC基因和载体 PproExHtB 均用限制性内切酶 BamHI与XhoI双酶切后进行连接,将突变后的全长3ABC基因插入线性化的重组表达质粒构建重组表达质粒PproExhTB-mu3ABC,鉴定阳性后保存备用;

[0009] 步骤三、将步骤二所得阳性重组表达质粒PproExhTB-mu3ABC转化大肠杆菌 *Rosetta (DE3)*,获取重组大肠杆菌,将重组大肠杆菌接种到培养基上,待OD₆₀₀=0.4-0.6时,向培养基中加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),在16℃、220rpm条件下处理20h进行诱导表达,经离心、裂解,溶解包涵体,纯化蛋白,得3ABC融合蛋白。

[0010] 进一步的,所述3ABC融合蛋白的包被浓度为250ng/mL。

[0011] 进一步的,所述大肠杆菌裂解液是将未经转化的大肠杆菌 *Rosetta (DE3)* 培养至对数期,离心,得菌体沉淀;加入与菌体沉淀等体积的裂解缓冲液,混匀,得混合物;向混合物中加入其1/3体积的直径为0.22μm的玻璃珠,震荡,离心,取上清,得大肠杆菌裂解液。

[0012] 进一步的,所述裂解缓冲液由以下成分组成:体积分数为2%的Triton X-100;体积分数为1%的SDS;100mmol/L的NaCl;10mmol/L,pH=8.0的Tris-HCl;1mmol/L,pH=8.0的EDTA;余量为水。

[0013] 进一步的,所述3ABC基因的获取过程为:从感染口蹄疫病毒的牛的水疱液中提取总RNA,逆转录合成cDNA;设计六组引物,以合成的cDNA为模板,首先利用引物3ABC-F和3C-46-R扩增第一段基因;然后利用3C-46-F和3C-163-R扩增第二段基因;再用3C-163-F与3ABC-R扩增第三段基因;最后通过融合PCR将扩增的三段基因融合成突变后的3ABC基因;

[0014] 所述引物序列如下:

[0015] 3ABC-F:5'-CGGGATCC ATCTCAATTCCTTCCCAAAAGTCC-3'

[0016] 3ABC-R:5'-CCGCTCGAGT CTCATGGTGTGGTTCGGGGT-3'

[0017] 3C-46-F:5'-CGTACCTCGTTACCTTTTCGC-3'

[0018] 3C-46-R:5'-GCGAAAAGGTAACGAGGTACG-3'

[0019] 3C-163-F:5'-AGGCTACGGTGGGGGAGC-3'

[0020] 3C-163-R:5'-GCTCCCCACCGTAGCCT-3'。

[0021] 本发明所述化学发光检测试剂盒检测牛血清中3ABC抗体的方法,包括以下步骤:将待检牛血清用血清稀释液稀释20倍后加入到包被有3ABC融合蛋白的化学发光免疫分析板中,同时设置标准阴阳性血清作为对照;将化学发光免疫分析板置于37℃反应30min,用PBST洗涤液洗涤5次后加入用血清稀释液稀释20000倍的辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG抗体,37℃孵育30min,再经PBST洗涤液洗涤5次,加入化学发光底物和化学发光增强剂,5min后用化学发光免疫分析检测仪器检测发光值。

[0022] 有益效果

[0023] 1、本发明所用包被蛋白为口蹄疫重组3ABC融合蛋白,3ABC蛋白是多聚蛋白,其中的3C蛋白是一种蛋白酶,它可以在特异的识别位点对3ABC蛋白进行自切,因此表达全长

3ABC蛋白是比较困难的,本发明利用基因定点突变技术,将3C上特异的蛋白酶活性位点-第46位组氨酸(CAC)和第163位半胱氨酸(TGT)分别突变成了酪氨酸(TAC)和甘氨酸(GGT),获取了全长突变3ABC基因,然后利用原核表达系统,获得了全长3ABC蛋白,以此包被化学发光免疫分析板,制备检测3ABC抗体的化学发光免疫试剂盒,实现了快速、高敏感检测牛口蹄疫病毒感染的目的,为监控与预防疾病奠定了良好的基础。

[0024] 2、本发明中所述血清稀释液包含Tween-20、酪蛋白、马血清和大肠杆菌裂解液,其中Tween-20是一种非离子去污剂,能稳定血清中的目的蛋白,也能减少非特异性吸附;酪蛋白不易溶解,中性和碱性条件下均带负电,而膜一般都是带正电荷,会与酪蛋白有一定的吸附作用;马血清能够提供促接触和伸展因子,形成血清粘度,使细胞贴壁免受机械损伤,另一方面对细胞起到保护作用;大肠杆菌裂解液是为了去除血清中能与细菌裂解蛋白进行免疫反应的抗体;大肠杆菌裂解液与Tween-20、酪蛋白、马血清协同作用,在促进免疫结合的同时,降低杂蛋白的影响,减少假阳性率,增加抗体检测的特异性。血清稀释液在3ABC融合蛋白包被反应板的过程中起到封闭液的作用,一物两用,简化操作,节约成本。

[0025] 3、本发明所述试剂盒利用本发明所述抗体的检测方法检测血清样品,诊断的敏感性最高可达97.38%,诊断的特异性最高可达94.32%;对标准阳性血清稀释的最高倍数160倍,与市售常用的ELISA试剂盒相比,具有较高的分析敏感性;通过对已知背景的血清样品进行检测,发现无论是未免疫的健康动物、感染动物还是免疫后感染的动物,本发明所述试剂盒相对市售ELISA试剂盒都具有较高的符合率,说明诊断能力相对较高。

附图说明

[0026] 图1是 3ABC 蛋白表达SDS-PAGE图,其中1:诱导后沉淀; 2:诱导后上清;3:诱导前;M:maker。

[0027] 图2是3ABC蛋白纯化SDS-PAGE图,其中M:maker; 1:上样前;2:上样后;3和4:洗脱的目的蛋白。

[0028] 图3是本发明所述试剂盒检测的血清样品ROC曲线图。

[0029] 图4是本发明所述试剂盒在95%置信区间内诊断敏感性和诊断特异性在不同临界值时的变化图。

[0030] 图5是血清背景交互点图,其中0代表口蹄疫阴性血清;1代表口蹄疫阳性血清。

[0031] 图6是本发明所述试剂盒与3ABC单抗阻断ELISA 和PrioCHECK@NSP ELISA的分析敏感性对比图。

具体实施方式

[0032] 下面通过具体的实施例对本发明作进一步的解释和说明。

[0033] 实施例1 3ABC融合蛋白的制备

[0034] 从感染口蹄疫病毒的牛的水泡液中按照RNeasy® Mini Kit试剂盒操作说明书提取总RNA;以提取的RNA为模板,利用SMART® MMLV 逆转录酶和oligo dT 引物(购自Takara)合成cDNA;设计六组引物,以合成的cDNA为模板,首先利用引物3ABC-F 和3C-46-R扩增第一段基因,然后再利用3C-46-F和3C-163-R扩增第二段基因,再用3C-163-F与3ABC-R扩增第三段基因。最后通过融合PCR将扩增的三段基因融合成突变后的全长3ABC基因,基因

序列如SEQ ID NO:1所示。引物序列如下(或SEQ ID NO:3~8):

[0035] 3ABC-F:5'-CGGGATCC ATCTCAATTCCTTCCCAAAAGTCC-3'

[0036] 3ABC-R:5'-CCGCTCGAGT CTCATGGTGTGGTTCGGGGT-3'

[0037] 3C-46-F:5'-CGTACCTCGTTACCTTTTCGC-3'

[0038] 3C-46-R:5'-GCGAAAAGGTAACGAGGTACG-3'

[0039] 3C-163-F:5'-AGGCTACGGTGGGGGAGC-3'

[0040] 3C-163-R:5'-GCTCCCCACCGTAGCCT-3'

[0041] 将获得的突变后的全长3ABC基因与载体 PproExHtB 利用限制性内切酶 BamH I 与Xho 进行双酶切后连接,将突变后的全长3ABC基因插入线性化的重组表达质粒构建表达质粒PproExhTB-mu3ABC. 该质粒经酶切、PCR及序列测定为阳性后-20℃保存备用。

[0042] 将阳性重组表达质粒转化大肠杆菌*Rosetta (DE3)*,挑取培养基上单克隆接种到含有氨苄的LB培养液中,置摇床上37℃、220rpm培养16h后,取菌液以1:100的比例接种到1L的LB新培养液中,待OD₆₀₀=0.4-0.6时,加入1mmol/L的IPTG在16℃、220rpm处理20h进行诱导表达。然后用8000rpm离心机收集沉淀,加入40mL的超声裂解液,置冰浴上超声40min后,11000rpm离心收集沉淀,弃掉上清。用IB 洗涤缓冲液(20mmol/L Tris, 10mmol/L EDTA, 1% Trion-100)漂洗沉淀5次后,用20mL含6M尿素binding buffer(20mmol/L NaH₂PO₃, 500mmol/L NaCl)在4℃ 过夜溶解包涵体。然后11000rpm 离心收集上清,按照Ni-NTA组氨酸纯化柱说明书纯化蛋白。如图1和2所示,重组蛋白条带大小与预期相符(55KD)。经纯化后的目的蛋白纯度可高达95%以上。纯化好的目的蛋白能与FMDV感染性血清发生良好的反应,说明此蛋白具有很好的生物学活性。

[0043] 其中,3ABC基因编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0044] 实施例2 检测牛口蹄疫3ABC抗体的CLIA方法的优化与建立

[0045] 将攻毒后30天的高感染滴度的犊牛血清作为标准阳性对照血清,此血清用FMDV PrioCHECK® NSP ELISA 试剂盒检测阻断率为98%;将新生胎牛血清(FBS)作为标准阴性血清。应用棋盘滴定实验,确定最佳的3ABC抗原包被浓度和血清稀释浓度,其中3ABC抗原浓度分别包被了2ug、1ug、500ng和250ng,标准阴阳性血清分别作了5倍、10倍、20倍、40倍和80倍的稀释。根据经济因素以及信噪比综合考虑,选择抗原包被条件为250ng,血清稀释度为20倍为最佳条件。此条件下,标准阳性血清与标准阴性血清的比值为93。

[0046] 实施例3 敏感性与特异性评价

[0047] 1、血清盘的建立

[0048] a、共有149份血清样品来自临床上健康的牛,这些牛没有注射过疫苗,应用兰州兽医研究所开发的口蹄疫液相阻断ELISA试剂盒检测,这些血清没有相应的O、A、Asia1型抗体。这些血清用于评价该CLIA试剂盒的诊断敏感性。

[0049] b、共有168份血清样品来自临床上健康的并且免疫过口蹄疫灭活疫苗的牛,这些血清时在免疫后30-180d采集的。这些血清用于评价该CLIA试剂盒的诊断敏感性。

[0050] c、共有143份血清样品来自实验性地攻过毒的牛。这些血清样品是在攻过毒后收集10-200d后的血清样品。这些血清用于评价该试剂盒的诊断特异性。

[0051] d、共有43份血清样品来自免疫后又人为实验性攻读的牛,这些样品是在攻毒免疫后的牛的第30-60d采集的血清样品。这些血清用于评价该CLIA试剂盒的诊断特异性。

[0052] e、共有810份血清样品来自于田间可疑区采集的牛。这些样品用于比对该CLIA 试剂盒和兰州兽医研究所以及PrioCHECK® NSP ELISA的符合率。

[0053] 2、检测方法的实施

[0054] 将250ng/mL的3ABC融合蛋白(碳酸盐缓冲液稀释,pH9.6)包被到96孔化学发光免疫分析板,置于4℃过夜孵育。检测血清用血清稀释液稀释20倍后加入到96孔板,而标准阴性血清各做两个重复。37℃反应30min后用PBST洗涤5次后加入用血清稀释液稀释20000倍的辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG抗体,37℃孵育30min,经过PBST洗涤5次后,加入化学发光底物和化学发光增强剂,5min后用化学发光免疫分析检测仪器检测发光值。检测结果用阳性百分率(PP)来评价,公式如下: $PP = (\text{检测样品发光值} - \text{标准阴性样品发光值}) / (\text{标准阳性样品发光值} - \text{标准阴性样品发光值}) * 100\%$ 。

[0055] 3、临界值的确定以及诊断敏感性和诊断特异性的评价

[0056] 应用筛选好的CLIA试剂盒的检测方法,对已知背景的血清进行检测。该CLIA方法的诊断敏感性与诊断特异性用共503份背景清楚的血清样品进行评价。每份样品用阳性百分率(PP)来评价,该方法的临界值用ROC分析曲线(图3)和TG-ROC(图4)以及血清背景交互点图(图5)分析。结果表明,在PP=9.62%时,诊断的敏感性为96.86%(95%置信区间:93.3-98.8),诊断的特异性为93.38%(95%置信区间:90.1-95.9)。

[0057] 4、评价该CLIA检测与兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA 和PrioCHECK@NSP ELISA的分析敏感性

[0058] 将标准阳性血清采取连续倍比稀释的方式(1:20-1:2560)。结果如图6所示,PrioCHECK@NSP ELISA 检测标准阳性血清稀释的最高稀释度为1:80;兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA检测标准阳性血清稀释的最高稀释度为1:160;该CLIA检测标准阳性血清的最好稀释度为1:160。因此,该CLIA方法具有较高的分析敏感性。

[0059] 5、比较该CLIA检测与兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA 和PrioCHECK@NSP ELISA的诊断能力

[0060] 用这两种商品化试剂盒与该CLIA检测方法检测已知背景的508份血清以及田间的810份血清。评价三种方法与已知背景血清的符合度,以及该CLIA方法与两种商品化试剂盒的符合度。结果如下表1所示:对于未免疫的健康动物,该CLIA方法的符合率(98.65%)较两种商品化试剂盒(95.30%,97.31%)高。对于感染口蹄疫的动物(97.97%),该CLIA较两种商品化试剂盒(94.59%,95.94%)拥有较高的符合率。而对于免疫后感染的动物,一直以来都是在免疫动物中区分感染口蹄疫动物的难点。该CLIA方法对于免疫后感染的动物拥有较高的符合率93.02%。而两种商品化试剂盒的符合率则较低(83.72%,88.37%)。可能由于该CLIA方法具有较高的敏感性,动物经过不纯的疫苗免疫后,会产生低浓度的非结构蛋白抗体,因此该CLIA方法的在疫苗免疫动物中检出阳性的概率较两种商品化试剂盒高。最后通过检测810田间样品,对比了该CLIA方法与两种商品化试剂盒的复合物,分别

[0061] 为91.85%和92.83%。

样本 信息	样品 大小	CLIA		3ABC-ELISA		PrioCHECK® NSP	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
未免疫 阴性血清	149	02/149	147/149	07/149	142/149	04/149	145/149
符合率	-	98.65%		95.30%		97.31%	
免疫后 阴性血清	168	19/168	149/168	15/168	153/168	12/168	156/168
符合率	-	88.69%		91.07%		92.85%	
未免疫 感染阳性血清	148	145/148	3/148	140/148	8/148	142/148	6/148
符合率	-	97.97%		94.59%		95.94%	
免疫后 感染阳性血清	43	40/43	3/43	36/43	7/43	38/43	5/43
符合率	-	93.02%		83.72%		88.37%	
田间随机样品	810	96/810	714/810	68(82)/810	722(662)/810	83(78)/810	727(674)/810
符合率	-			91.85% (744/810)		92.83%(752/810)	

[0063] 所述大肠杆菌Rosetta (DE3)购自Novagen公司。

[0064] 所述Ni-NTA组氨酸纯化柱购自Novagen公司。

[0065] 所述辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG抗体购自Sigma。

[0066] 本发明所述实施例应理解为说明性的,而非限制本发明的保护范围,对本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对本发明作出的一些非本质的改进和调整仍属于本发明的保护范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 中国农业科学院兰州兽医研究所
- [0003] <120> 一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 8
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1310
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 口蹄疫病毒
- [0011] <400> 1
- [0012] atctcaattc ctcccaaaa gtccgtgctg tacttttctca ttgagaaggg ccaacacgag 60
- [0013] gcagcaattg aattctttga ggggatggta cacgactcca ttaaggagga actccgaccc 120
- [0014] ctctgtccaac agacttcatt cgtgaaacgc gcttttaaac gcctgaagga aaactttgag 180
- [0015] atcgttgccc tatgtttgac tcttctggcg aacatagtga tcatgatccg cgagactcga 240
- [0016] agagacaaca aatggtgat gatgcattga atgagtacat cgagaaggca aacatcacca 300
- [0017] cagatgacaa gactcttgac gaggcggaaa agaaccctct ggagactacc ggtgccagca 360
- [0018] ccgtcggctt cagagagaga actctcccgg gacacaggac gagcgatgac gtgaactctg 420
- [0019] agcccgccaa acctgtggaa gagcgaccac aagctgaagg accctacgcc ggaccgcttg 480
- [0020] aacaccagaa acctctgaaa gtgagagcta agctaccaca gcaggagggg ccttacgctg 540
- [0021] gtccgttga gaggcagaaa cactgaaag taaagtga tgccccggtc gtgaaggaag 600
- [0022] gaccttacga gggaccggtg aagaagcctg tcgctttgaa agtgaaaact aagaacctga 660
- [0023] ttgtactga gagtgggtgcc cccccgaccg acttgcaaaa gatggtcatg ggcaacacca 720
- [0024] agcctgttga gctcatcctc gacgggaaga cagtagccat ctgctgtgct actggagtgt 780
- [0025] ttggtactgc ctacctcgta cctcgtcacc ttttcgctga gaagtatgac aagatcatgt 840
- [0026] tggacggcag ggctatgaca gacagtgact acagagtgtt tgagtttgag attaaagtaa 900
- [0027] aaggacagga catgctctca gacgctgcgc tcatggtgct gcaccgtggg aaccgcgtga 960
- [0028] gagacatcac gaaacacttc cgtgatacag cacgaatgaa gaaaggcacc cccgtcgttg 1020
- [0029] gcgtgatcaa caacgctgac gttgggagac tgattttctc tggtgaggcc cttacctaca 1080
- [0030] aggacattgt agtgagcatg gacggagaca ccatgccggg cctgtttgcc tacaagccg 1140
- [0031] ccaccaagge aggctacggc gggggagccg ttctcgccaa ggacggagcc gacacgttca 1200
- [0032] tcgttgccac tcaactccga ggtggcaatg gagttgggta ctgctcatgc gtatccagat 1260
- [0033] ccatgcttct caagatgaaa gcacacatcg accccgaacc acaccatgag 1310
- [0034] <210> 2
- [0035] <211> 437
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 大肠杆菌
- [0038] <400> 2

[0078]	305	310	315	320
[0079]	Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly			
[0080]		325	330	335
[0081]	Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile			
[0082]		340	345	350
[0083]	Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Ser Met Asp			
[0084]		355	360	365
[0085]	Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr Lys Ala			
[0086]		370	375	380
[0087]	Gly Tyr Gly Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp Thr Phe			
[0088]		385	390	400
[0089]	Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser			
[0090]		405	410	415
[0091]	Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met Lys Ala His Ile Asp Pro			
[0092]		420	425	430
[0093]	Glu Pro His His Glu			
[0094]		435		
[0095]	<210> 3			
[0096]	<211> 32			
[0097]	<212> DNA			
[0098]	<213> 人工序列			
[0099]	<400> 3			
[0100]	cgggatccat ctcaattcct tccc aaaagt cc 32			
[0101]	<210> 4			
[0102]	<211> 30			
[0103]	<212> DNA			
[0104]	<213> 人工序列			
[0105]	<400> 4			
[0106]	ccgctcgagt ctcatggtgt ggttcggggt 30			
[0107]	<210> 5			
[0108]	<211> 21			
[0109]	<212> DNA			
[0110]	<213> 人工序列			
[0111]	<400> 5			
[0112]	cgtacctcgt taccttttcg c 21			
[0113]	<210> 6			
[0114]	<211> 21			
[0115]	<212> DNA			
[0116]	<213> 人工序列			

-
- [0117] <400> 6
[0118] gcgaaaaggt aacgaggtac g 21
[0119] <210> 7
[0120] <211> 18
[0121] <212> DNA
[0122] <213> 人工序列
[0123] <400> 7
[0124] aggctacggt gggggagc 18
[0125] <210> 8
[0126] <211> 18
[0127] <212> DNA
[0128] <213> 人工序列
[0129] <400> 8
[0130] gctccccac cgtagcct 18

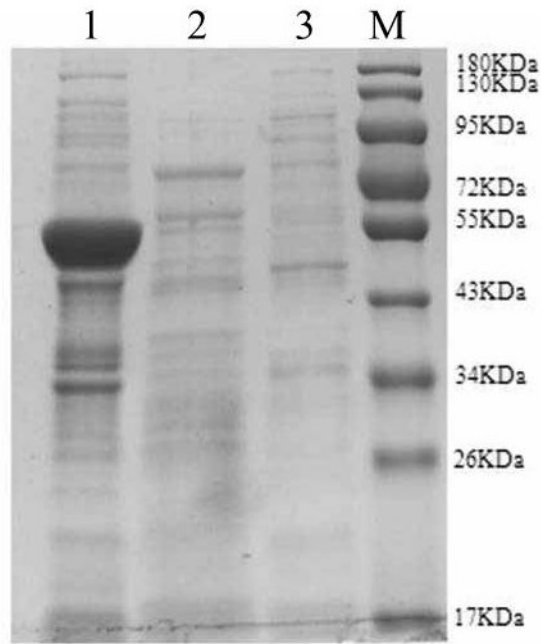


图1

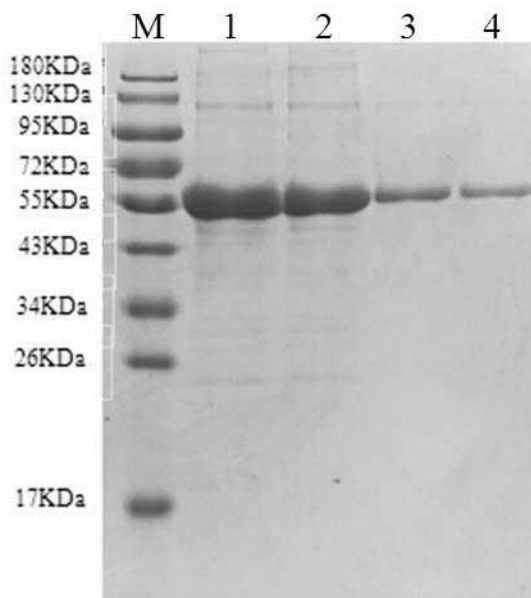


图2

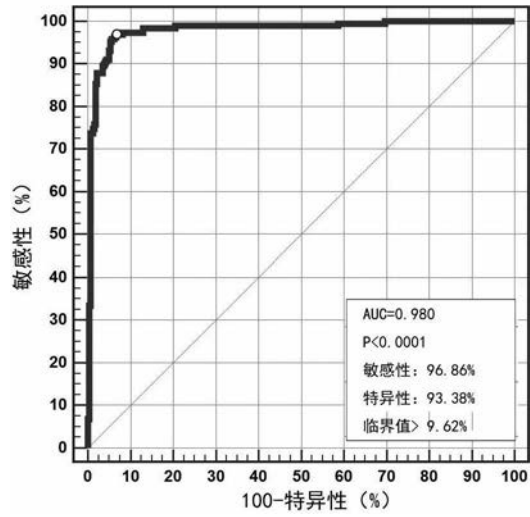


图3

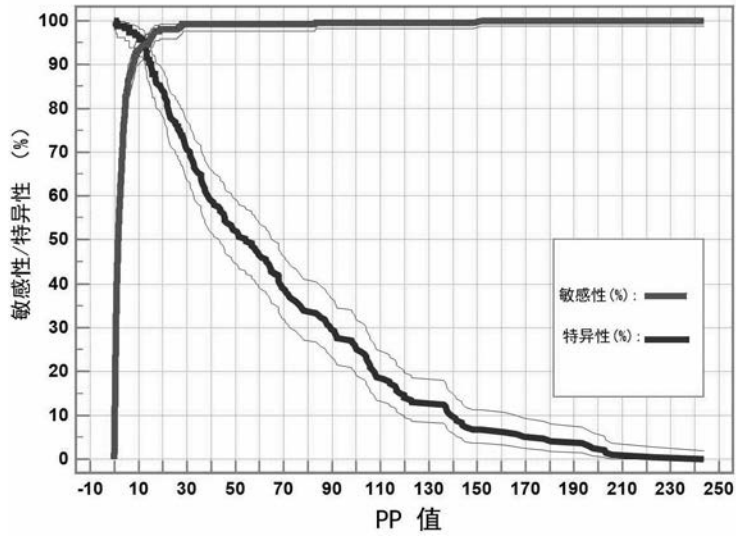


图4

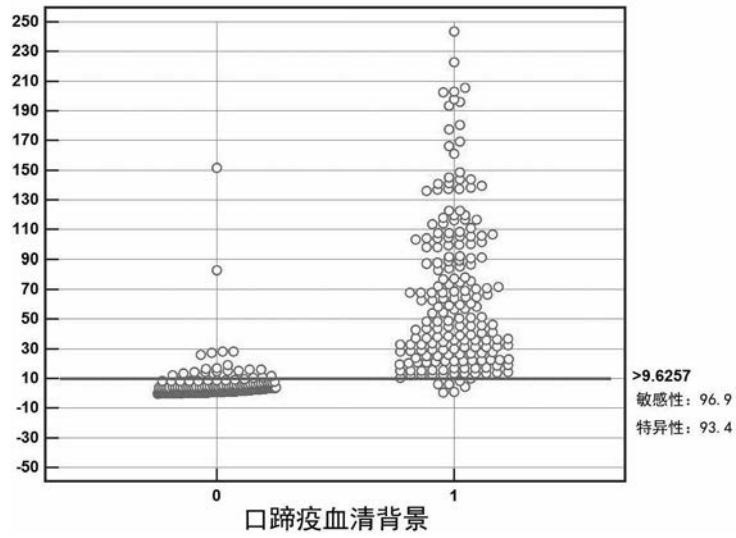


图5

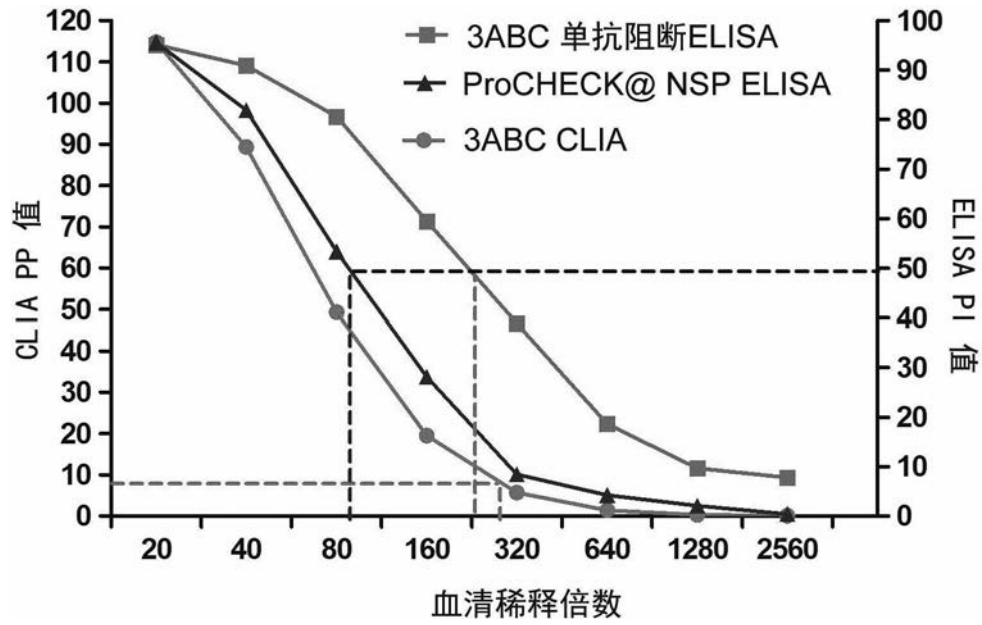


图6

专利名称(译)	一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106596966B	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201611052512.8	申请日	2016-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	常惠芸 刘泽众 邵军军 赵付荣 李秀梅 张永光		
发明人	常惠芸 刘泽众 邵军军 赵付荣 李秀梅 张永光		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/531 G01N21/76 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/70 C12N15/66		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/00 C12N15/62 C12N15/66 C12N15/70 C12N2770/32122 G01N21/763 G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/68 G01N2333/09		
代理人(译)	程茗		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN106596966A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种牛口蹄疫3ABC抗体化学发光检测试剂盒，属免疫学检测领域，所述检测试剂盒包含96孔化学发光免疫分析板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液，其中所述96孔化学发光免疫分析板包被3ABC融合蛋白；酶标抗体为辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG抗体；血清稀释液包含0.01% Tween-20、1%酪蛋白、10%马血清和1%大肠杆菌；所述化学发光底物为鲁米诺溶液；所述化学发光增强剂含有IPP、H₂O₂和Tween-20。本发明所述试剂盒相对于市售试剂盒产品，敏感性更高，特异性更强，诊断能力亦优于其他产品。

