



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102998453 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201210485102. 8

(22) 申请日 2012. 11. 23

(73) 专利权人 广东海大畜牧兽医研究院有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业开发区新桂二路 56 号中试楼 101 室

(72) 发明人 李中圣 罗钧 陈善真 赵焱

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标事务所(普通合伙) 44288

代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102621305 A, 2012. 08. 01, 全文.

CN 102590503 A, 2012. 07. 18, 全文.

CN 102712930 A, 2012. 10. 03, 全文.

WO 2008127279 A2, 2008. 10. 23, 全文.

WO 2008138619 A2, 2008. 11. 20, 全文.

CA 2775277 A1, 2011. 04. 21, 全文.

刘建波等. 猪输血传播病毒 (TTV) 与猪圆环病毒混合感染的检测及 TTV 遗传变异分析. 《中国预防兽医学报》. 2011, 第 33 卷 (第 01 期), 6-10.

娄高明等. PCR 检测猪输血传播病毒 I 型方法的建立及其初步应用. 《中国兽医学报》. 2011, 第 31 卷 (第 08 期), 1107-1110.

冯顺胜等. 猪输血传播病毒的研究进展. 《中国兽医杂志》. 2009, 第 31 卷 (第 10 期), 751-755.

Yao-Wei Huang et al.. Serological profile of torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and -2), and between porcine and human anelloviruses. 《Journal of Virology》. 2012, 第 86 卷 (第 19 期),

审查员 刘彦宁

权利要求书3页 说明书7页
序列表3页

(54) 发明名称

一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒及其制备方法, 通过酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白包被抗原制备、标准阳性血清和标准阴性血清筛选、确定抗原包被浓度和血清稀释度、试剂盒的组装等步骤建立 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒, 用于检测猪血清中 TTSuV1 抗体水平。TTSuV1ORF1a 重组蛋白可以竞争性抑制血清中抗体与固相包被抗原的结合, 本发明的试剂盒对 TTSuV1 抗体的特异性较好, 试剂盒批内和批间的最大变异系数 (CV) 分别为 6. 87% 和 11. 4%, 均低于行业标准的 15%, 使试剂盒具有很好的重复性和稳定性。

1. 一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其特征在于:其包括用酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板,以及用 TTSuV1ORF1 作为免疫诊断抗原筛选出的标准阳性血清和标准阴性血清,其中用酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白的序列为 SEQ ID NO:1。

2. 根据权利要求 1 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其特征在于还包括

1) HRP 标记的兔抗猪二抗液:兔抗猪二抗与 HRP 保护液按照体积比为 1 : 2000-3000 的比例稀释,用量为 100 μ l ;

2) 抗体稀释液:0.1% BSA1.0g 加入 PBS 至 1000ml,用量为 100 μ l ;

3) 显色液:50mg TMB,10mL DMSO,9.8g 柠檬酸和 1.2ml30 % H_2O_2 加蒸馏水定容至 1000ml,用量为 100 μ l ;

4) 终止液:双蒸水 178.3mL 和 98%的浓硫酸 21.7mL 混合,用量为 100 μ l 。

3. 根据权利要求 2 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其特征在于:其还包括 pH 值为 7.4,0.2g KH_2PO_4 ,2.9g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,8.0g NaCl,0.2g KCl,0.5mL0.05% (V/V) Tween-20,加双蒸水定容至 100ml 的洗脱液。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其特征在于:用酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板中,包被浓度为 0.25 ~ 1 μ g/ml。

5. 一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其特征在于其包括以下步骤:

1) 酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白包被抗原的制备

a. TTSuV1ORF1a 序列获取:结合 Genbank 数据库中 TTSuV1 序列信息,在病毒基因组序列保守区设计诊断引物 SEQ ID NO:2 和引物 SEQ ID NO:3;应用 rTaq DNA 聚合酶 PCR 扩增目的片段,PCR 扩增产物进行电泳,纯化、测序获得已测序列;然后在已测序列基础上设计反向扩增引物 SEQ ID NO:4 和引物 SEQ ID NO:5,扩增包括 TTSuV1ORF1 全序列的病毒基因序列;应用 LA Taq DNA 聚合酶 PCR 反向扩增目的片段,对 PCR 扩增产物进行电泳,纯化、获得 TTSuV1ORF1a 蛋白基因;

b. TTSuV1ORF1a 的酵母表达:应用 Primer Premier5.0 设计表达引物 SEQ ID NO:6 和引物 SEQ ID NO:7,以上述 TTSuV1ORF1a 蛋白基因为模板,应用 Kod plus 高保真酶的 PCR 反应,电泳、纯化目的条带后,双酶切 PCR 产物及载体,连接,转化 E. coli :DH5a,提取重组质粒 pPICZa-TTSuV1ORF1a, Sac I 单酶切线性化;将酵母菌 X-33 制备成感受态细胞,取 80mL 感受态细胞与 5 ~ 10mg 线性化的重组表达质粒混合,转入 0.2cm 电转杯,电转化,电转化后的菌液用 1ml 冰浴山梨醇 10 倍稀释后,涂布于基本葡萄糖培养基选择平板上,置于 30℃ 培养 2 ~ 3d,在 200-1000mg/ml 浓度 Zeocin 的 YPD 平板上筛选具有高 Zeocin 抗性且生长良好的菌株作为表达株,接种单菌落于 25ml BMMY 培养基,于 30℃ 培养至 $OD_{600nm} \approx 4.0$;离心、收集菌体,用 100ml BMMY 培养基重悬培养,每日取样 1ml,并补加纯甲醇于培养基至终浓度为 0.5%,诱导表达 6d,取样品离心收集上清作 SDS-PAGE 分析,以 Anti-HIS-antibody 为第一抗体,Western Blotting 筛选出步骤 1) TTSuV1ORF1a 蛋白的高拷贝子;

c. TTSuV1ORF1a 纯化:取步骤 b 中的筛选出的高拷贝子,用 50%硫酸铵沉淀上清中蛋

白,溶解,应用亲和层析的方法纯化酵母表达系统表达的重组 TTSuV10RF1a 在 PBS 中透析后,应用 BCA 法进行定量,获得酵母表达的 TTSuV10RF1a 重组蛋白,序列为 SEQ ID NO:1;

2) 标准阳性血清和标准阴性血清的筛选

a. 构建插入 pET-21 空载体的 TTSuV10RF1 原核表达载体:应用 Primer Premier5.0 设计引物 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9,以 TTSuV1 阳性核酸为模板,PCR 扩增,回收纯化 PCR 目的片段,双酶切 PCR 产物及 pET-21 空载体、连接、转化 E. coli :DH5a 后挑取单克隆菌落,提取质粒,将正确构建的质粒转化 E. coli :Rosetta(DE3)pLysS 感受态细胞,鉴定出阳性克隆,阳性克隆接种 2ml LA 液体培养基,37℃,180rpm 至菌液 OD 值达到 0.6 时加入 1mM IPTG,诱导 6 小时,离心收集菌泥,加入 Loading buffer 煮沸样品,SDS-PAGE 分析蛋白表达,应用 Western blotting 验证,获得 TTSuV10RF1 重组蛋白;

b. TTSuV1 标准阳性血清和标准阴性血清的筛选:制备 TTSuV10RF1 重组蛋白,切胶纯化、乳化后以 5mg/头的剂量免疫 2 月龄无 TTSuV1 病原的仔猪,1 个月后以相同剂量重复免疫,15 天后,采血进行 Western Blotting 和 ELISA 实验,将实验证明为阳性的血清为 TTSuV1 抗体参考阳性血清;利用酵母表达的 TTSuV10RF1a 重组蛋白为固相包被物,对 50 份血清进行 ELISA 检测,筛选出与参考阳性血清 Western blotting 和 ELISA 实验反应信号一致的血清为标准阳性血清;免疫学实验无信号,且 PCR 检测 TTSuV1 病原阴性的血清为标准阴性血清;

3) 确定抗原包被浓度和二抗稀释度

采用棋盘滴定法,先取阳性 OD_{450nm} 值在 1 左右的,然后再从中找出阳性血清 OD_{450nm} 值和阴性血清 OD_{450nm} 值之比最高的反应孔的抗原浓度和二抗稀释度为最佳抗原包被浓度和二抗稀释度;

4) 试剂盒的组装

按照确定好的包被浓度,用酵母表达的 TTSuV10RF1a 重组蛋白包被酶标板,将酶标板 1 块、标准阴阳性血清各 1 管、抗体稀释液 1 瓶、酶标二抗 1 瓶、底物显色液 1 瓶、终止液 1 瓶、操作说明书一份组装成 ELISA 试剂盒。

6. 根据权利要求 5 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤 1) 中应用 rTaq DNA 聚合酶 PCR 扩增目的片段具体程序为:94℃预变性 5min,94℃变性 30s,52℃退火 30s,72℃延伸 30s,设置 35 个循环,72℃延伸 8min;扩增完成后用 1.0%的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳。

7. 根据权利要求 5 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤 1) 中应用 LA Taq DNA 聚合酶 PCR 反向扩增目的片段具体程序为 94℃预变性 5min,94℃变性 30s,52℃退火 30s,72℃延伸 120s,设置 30 个循环,72℃延伸 8min;扩增完成后用 0.8%的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳。

8. 根据权利要求 5 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤 1) 中 Kod plus 高保真酶的 PCR 反应的具体程序为 94℃预变性 5min,94℃变性 30s,52℃退火 30s,68℃延伸 45s,设置 30 个循环,68℃延伸 8min。

9. 根据权利要求 5 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤 2) 中 PCR 扩增的条件为 94℃ 5min;94℃ 30S,52℃ 30S,68℃ 120S,30 个循环;68℃延伸 10min。

10. 根据权利要求 5 所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤 3) 中棋盘滴定法的具体步骤为:将酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白在酶标板上从左到右以起始浓度为 $4\mu\text{g/ml}$ 按照在后的孔浓度为在先孔浓度的 $1/2$ 的梯度浓度稀释包被酶标板,最后一列作为空白对照,每孔包被 $100\mu\text{l}$, 37°C 放置 1 小时,用 PBST 洗板 1 次,每孔加入 10% 羔羊血清, 37°C 封闭 1 小时,阳性对照血清和阴性对照血清分别进行梯度稀释,自上而下加入到酶标板中,每孔加入 $100\mu\text{l}$,最后一行为无血清对照, 37°C 反应 1 小时, PBST 洗涤 3 次,每孔加入 $100\mu\text{l}$ 的 HRP 标记兔抗猪二抗, 37°C 反应 1 小时, PBST 洗涤 3 次,每孔加入底物显色液 $100\mu\text{l}$,避光显色 10 分钟,每孔加入 $100\mu\text{l}$ 终止液,于 450nm 处读数仪读取 OD 值, 620nm 作为参考波长。

一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及兽医技术领域,具体涉及一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒及其制备方法,建立 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒用于检测猪血清中 TTSuV1 的抗体水平。

背景技术

[0002] 输血传播病毒(Transufsion Transmitted Viurs, TTV)是一类无囊膜,二十面体,单股负链环状 DNA 病毒,电镜观察病毒颗粒直径约为 30 -32nm。TTV 首次由日本学者从一例未知病原的非甲—非戊型输血后肝炎病人的血清中发现,随后人们在非灵长类以及猪、牛、羊、犬、猫、家禽等多种家养及野生动物体内也发现了 TTV 的感染。2009 年,国际病毒分类协会(ICTV)将猪的 TTV 划分到指环病毒科(Anelloviridae)细环病毒属(Iotatorquevirus),细环病毒属进一步划分为两个种;猪 I 型细环病毒(Torque teno sus virus I, TTSuV1)和猪 II 型细环病毒(Torque teno sus virus II, TTSuV2)。作为一种较为新型的病毒, TTSuV2 的致病机理知之甚少。2004 年, McKeown 对中国,爱荷华州,泰国,安大略,韩国,西班牙,魁北克和萨斯喀彻温省这六个不同国家地区的 154 份猪血清进行检测, TTSuV2 阳性率可高达 66.2%(102/154)。Aramouni 等证实了 TTSuV1 与断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)和猪皮炎肾病综合征(PDNS)之间有一定的联系并发现 TTSuV2 与其他已知的猪病原体协同感染可以导致疾病加重。近年来,关于 TTSuV1 和 TTSuV2 的报道逐渐增多, TTSuV2 的感染具有广泛性和普遍性,这一特点引起了诸多科研工作者的关注。因此,加强对 TTSuV2 的流行病学调查,确定其抗原性点,对 TTSuV2 的防治有十分重要的意义。

[0003] 目前,国内外对 TTSuV1 和 TTSuV2 的流行病学报道中,较为注重 TTSuV2 的感染情况, TTSuV2 的感染似乎在增强 PMWS 和 PDNS 病症方面起着更为重要的作用,目前已经有报道建立了 TTSuV2 抗体诊断的“阻断 ELISA 法”。然而,在几乎所有报道中, TTSuV1 在猪血清中超过 30% 的检出率(PCR 方法)足以引起人们对 TTSuV1 危害的重视。国内外逐渐建立了 TTSuV1 病毒核酸诊断(PCR)的方法,尚无关于 TTSuV1 抗体诊断(ELISA)试剂盒的报道。

发明内容

[0004] 为克服现有技术的缺陷,本发明的目的在于提供一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,建立的 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒具有良好的重复性和稳定性,可以检测猪血清中 TTSuV1 的抗体水平。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法。

[0006] 为实现上述目的本发明所采用的技术方案如下:

[0007] 一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其包括用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板,以及用 TTSuV1 唯一结构蛋白 ORF1 作为免

疫诊断抗原筛选出的标准阳性血清和标准阴性血清,其中用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白的序列为 SEQ ID NO:1。

[0008] 本发明中,所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其还包括

[0009] 1) HRP 标记的兔抗猪二抗液:兔抗猪二抗与 HRP 保护液按照体积比为 1 : 2000-3000 的比例稀释,用量为 100 μ l ;

[0010] 2) 抗体稀释液:0.1%BSA1.0g 加入 PBS 至 1000ml,用量为 100 μ l ;

[0011] 3) 显色液:50mg TMB,10mL DMSO,9.8g 柠檬酸和 1.2ml 30% H_2O_2 加蒸馏水定容至 1000ml,用量为 100 μ l ;

[0012] 4) 终止液:双蒸水 178.3mL 和 98% 的浓硫酸 21.7mL 混合,用量为 100 μ l。

[0013] 优选的方案中,上述猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒还包括 pH 值 为 7.4,0.2g KH_2PO_4 ,2.9g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,8.0g NaCl,0.2g KCl,0.5mL 0.05% (V/V) Tween-20,加双蒸水定容至 100ml 的洗脱液。

[0014] 作为一个优选的方案中,所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒中,用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板的包被浓度为 0.25 ~ 1 μ g/ml。

[0015] 一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0016] 1) 酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被抗原的制备

[0017] a. TTSuV1 ORF1a 序列获取:结合 Genbank 数据库中 TTSuV1 序列信息,在病毒基因组序列保守区设计诊断引物 SEQ ID NO:2 和引物 SEQ ID NO:3;应用 rTaq DNA 聚合酶 PCR 扩增目的片段,PCR 扩增产物进行电泳,纯化、测序获得已测序列;然后在已测序列基础上设计反向扩增引物 SEQ ID NO:4 和引物 SEQ ID NO:5,扩增包括 TTSuV1 ORF1 全序列的病毒基因序列;应用 LA TaqDNA 聚合酶 PCR 反向扩增目的片段,对 PCR 扩增产物进行电泳,纯化、获得 TTSuV1 ORF1a 蛋白;

[0018] b. TTSuV1 ORF1a 的酵母表达:应用 Primer Premier5.0 设计表达引物 SEQ ID NO:6 和引物 SEQ ID NO:7,以 TTSuV1 阳性核酸为模板,应用 Kod plus 高保真酶的 PCR 反应,电泳、纯化目的条带后,双酶切 PCR 产物及载体,连接,转化 E. coli :DH5 α , 提取重组质粒 pPICZ α -TTSuV1 ORF1a, Sac I 单酶切线性化;将酵母菌 X-33 制备成感受态细胞,取 80 μ L 感受态细胞与 5 ~ 10 μ g 线性化的重组表达质粒混合,转入 0.2cm 电转杯,电转化,电转化后的菌液用 1ml 冰浴山梨醇 10 倍稀释后,涂布于基本葡萄糖培养基选择平板上,置于 30 $^{\circ}$ C 培养 2 ~ 3d,在 200-1000 μ g/ml 浓度 Zeocin 的 YPD 平板上筛选具有高 Zeocin 抗性且生长良好的菌株作为表达株,接种单菌落于 25ml BMGY 培养基,于 30 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600nm} \approx 4.0$;离心、收集菌体,用 100ml BMMY 培养基重悬培养,每日取样 1ml,并补加纯甲醇于培养基至终浓度为 0.5%,诱导表达 6d,取样品离心收集上清作 SDS-PAGE 分析,以 Anti-HIS-antibody 为第一抗体,Western Blotting 筛选出步骤 1) TTSuV1 ORF1a 蛋白的高拷贝子;

[0019] c. TTSuV1 ORF1a 纯化:取步骤 2) 中的筛选出的高拷贝子,用 50% 硫酸铵沉淀上清中蛋白,溶解,应用亲和层析的方法纯化酵母表达系统表达的重组 TTSuV1 ORF1a 在 PBS 中透析后,应用 BCA 法进行定量,获得酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白,序列为 SEQ ID NO:1;

[0020] 2) 标准阳性血清和标准阴性血清的筛选

[0021] a. 构建插入 pET-21 空载体的 TTSuV1 ORF1 原核表达载体：应用 PrimerPremier5.0 设计引物 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9, 以 TTSuV1 阳性核酸为模板, PCR 扩增, 回收纯化 PCR 目的片段, 双酶切 PCR 产物及 pET-21 空载体、连接、转化 E. coli :DH5 α 后挑取单克隆菌落, 提取质粒, 将正确构建的质粒转化 E. coli :Rosetta(DE3)pLysS 感受态细胞, 鉴定出阳性克隆, 阳性克隆接种 2ml LA 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 180rpm 至菌液 OD 值达到 0.6 时加入 1mM IPTG, 诱导 6 小时, 离心收集菌泥, 加入 Loading buffer 煮沸样品, SDS-PAGE 分析蛋白表达, 应用 Western blotting 验证, 获得 TTSuV1 ORF1 重组蛋白;

[0022] b. TTSuV1 标准阳性血清和标准阴性血清的筛选：制备 TTSuV1 ORF1 重组蛋白, 切胶纯化、乳化后以 5mg/ 头的剂量免疫 2 月龄无 TTSuV1 病原(PCR 检测)的仔猪, 1 个月后以相同剂量重复免疫, 15 天后, 采血进行 Western Blotting 和 ELISA 实验, 将实验证明为阳性的血清为 TTSuV1 抗体参考阳性血清; 利用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白为固相包被物, 对 50 份血清进行 ELISA 检测, 筛选出与参考阳性血清 Western blotting 和 ELISA 实验反应信号一致的血清为标准阳性血清; 免疫学实验无信号, 且 PCR 检测 TTSuV1 病原阴性的血清为标准阴性血清;

[0023] 3) 确定抗原包被浓度和二抗稀释度

[0024] 采用棋盘滴定法, 先取阳性 OD_{450nm} 值在 1 左右的, 然后再从中找出阳性血清 OD_{450nm} 值和阴性血清 OD_{450nm} 值之比最高的反应孔的抗原浓度和二抗稀释度为最佳抗原包被浓度和二抗稀释度;

[0025] 4) 试剂盒的组装

[0026] 按照确定好的包被浓度, 用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被酶标板, 将酶标板 1 块、标准阴阳性血清各 1 管、抗体稀释液 1 瓶、酶标二抗 1 瓶、底物显色液 1 瓶、终止液 1 瓶、操作说明书一份组装成 ELISA 试剂盒。

[0027] 上述制备方法中, 步骤 1) 应用 rTaq DNA 聚合酶 PCR 扩增目的片段具体程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 设置 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min; 扩增完成后用 1.0% 的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳。

[0028] 上述制备方法中, 步骤 1) 应用 LA Taq DNA 聚合酶 PCR 反向扩增目的片段具体程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120s, 设置 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min; 扩增完成后用 0.8% 的琼脂糖凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳。

[0029] 上述制备方法中, 步骤 1) Kod plus 高保真酶的 PCR 反应的具体程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 设置 30 个循环, 68 $^{\circ}$ C 延伸 8min。

[0030] 上述制备方法中, 步骤 2) PCR 扩增的条件为 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30S, 52 $^{\circ}$ C 30S, 68 $^{\circ}$ C 120S, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0031] 上述制备方法中, 步骤 3) 棋盘滴定法的具体步骤为: 将酵母表达的 TTSuV1ORF1a 重组蛋白在酶标板上从左到右以起始浓度为 4 μ g/ml 按照在后的孔浓度为在先孔浓度的 1/2 的梯度浓度稀释包被酶标板, 最后一列作为空白对照, 每孔包被 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 放置 1 小时, 用 PBST 洗板 1 次, 每孔加入 10% 羔羊血清, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时, 阳性对照血清和阴性对照血清分别进行梯度稀释, 自上而下加入到酶标板中, 每孔加入 100 μ l, 最后一行为无血清对照, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μ l 的 HRP 标记兔抗猪二抗, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入底物显色液 100 μ l, 避光显色 10 分钟, 每孔加入 100 μ l 终

止液,于 450nm 处读数仪读取 OD 值,620nm 作为参考波长。

[0032] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:通过本发明的制备方法制备的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,TTSuV1 抗体阳性血清中存在的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白可以竞争性抑制血清中抗体与固相包被抗原的结合,本发明的试剂盒对 TTSuV1 抗体的特异性较好,本发明的试剂盒批内和批间的最大变异系数(CV)分别为 6.87%和 11.4%,均低于行业标准的 15%,因此,本发明的试剂盒具有很好的重复性和稳定性。

[0033] 下面结合具体的实施方式对本发明作进一步详细说明。

具体实施方式

[0034] 以下是本发明具体优选的实施例。

[0035] 实施例 1

[0036] 猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其包括用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板,以及用 TTSuV1 ORF1 作为免疫诊断抗原筛选出的标准阳性血清和标准阴性血清,其中用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白的序列为 SEQ ID NO:1,酶标板的包被浓度为包被浓度为 $0.25 \mu\text{g/ml}$;HRP 标记的兔抗猪二抗液 12ml:即兔抗猪二抗 1gM 与 HRP 保护液按照体积比为 1 : 2000 的比例稀释;抗体稀释液 12ml;显色液 12ml;终止液 12ml;以及洗脱液 12ml。

[0037] 实施例 2

[0038] 猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其包括用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板,以及用 TTSuV1 ORF1 作为免疫诊断抗原筛选出的标准阳性血清和标准阴性血清,其中用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白的序列为 SEQ ID NO:1,酶标板的包被浓度为包被浓度为 $0.5 \mu\text{g/ml}$;HRP 标记的兔抗猪二抗液 12ml:即兔抗猪二抗 1gM 与 HRP 保护液按照体积比为 1 : 2500 的比例稀释;抗体稀释液 12ml;显色液 12ml;终止液 12ml;以及洗脱液 12ml。

[0039] 实施例 3

[0040] 猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,其包括用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白包被抗原包被的酶标板,以及用 TTSuV1 ORF1 作为免疫诊断抗原筛选出的标准阳性血清和标准阴性血清,其中用酵母表达的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白的序列为 SEQ ID NO:1,酶标板的包被浓度为包被浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$;HRP 标记的兔抗猪二抗液 12ml:即兔抗猪二抗与 HRP 保护液按照体积比为 1 : 3000 的比例稀释;抗体稀释液 12ml;显色液 12ml;终止液 12ml;以及洗脱液 12ml。

[0041] 应用实施例 1

[0042] 应用本发明所述的猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒检测 40 份病猪血清(采自广东增城某猪场);操作步骤如下:

[0043] (1)将纯化的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白用包被液稀释到 $0.5 \mu\text{g/ml}$,加到酶标板上,每孔 $100 \mu\text{l}$, 37°C 放置 1 小时。用 PBST 洗板 1 次,每孔加入含 10%羔羊血清的 PBST, 37°C 封闭 1 小时;

[0044] (2)将待检血清样品用 PBST 稀释 40 倍,加到酶标板上,每孔 $100 \mu\text{l}$,设置阴性和阳性对照, 37°C 反应 1 小时;

[0045] (3)PBST洗涤3次,每孔加入100 μ l的HRP标记兔抗猪二抗(3000倍稀释),37℃反应1小时,PBST洗涤3次,每孔加入底物显色液100 μ l,避光显色10分钟,每孔加入100 μ l终止液,于450nm处读数仪读取OD值;结果如下表1:

[0046] 表1:40份猪血清的OD值

[0047]

样品编号	OD 值	样品编号	OD 值	样品编号	OD 值	样品编号	OD 值
1	0.280	11	0.546	21	1.027	31	0.340
2	0.701	12	0.764	22	0.635	32	0.348
3	0.315	13	0.696	23	0.318	33	0.506
4	0.269	14	0.250	24	0.255	34	0.443
5	0.863	15	0.583	25	0.163	35	0.336
6	0.128	16	0.214	26	0.522	36	0.517
7	0.931	17	0.474	27	0.552	37	0.510
8	0.661	18	0.247	28	0.624	38	0.135
9	0.193	19	0.307	29	0.676	39	0.222
10	0.637	20	0.284	30	0.550	40	0.567

[0048] 上述表格的数据根据试剂盒判定标准,有22份血清样品的OD_{450nm}>0.35。抗体阳性率为55%。

[0049] 性能检测

[0050] 1. 特异性试验

[0051] 交叉试验:搜集PRV、PCV2、PRRSV、HCV抗体阳性猪血清,经WestBlotting和ELISA检验TTSuV1抗体为阴性后,用建立的间接ELISA方法对上述血清进行检测,判断是否具有交叉反应。

[0052] 竞争性抑制试验:将标准阳性和阴性血清用稀释液进行2倍梯度稀释,阳性血清稀释2组,阴性血清稀释1组。取1组稀释后的阳性血清和稀释的阴性血清与等体积的TTSuV1 ORF1a重组蛋白(1 μ g/ml)混合,分别记为第1和第2组;取1组稀释后的阳性血清与等体积血清稀释液混合,作为无抑制对照组,记为第3组。将3组血清置于37℃作用2小时后,采用建立好的间接ELISA方法进行检测,比较各组血清的OD值。

[0053] 表2:交叉实验及竞争性抑制实验结果

[0054]

交叉试验		竞争性抑制试验			
样品名称	ELISA 检测平均 OD 值	血清稀释比例	组1*. ELISA 检测平均 OD 值	组2**. ELISA 检测平均 OD 值	组3***. ELISA 检测平均 OD 值
TTSuV1阳性	0.980	1	0.573	0.210	1.0122
TTSuV1阴性	0.117	1/2	0.345	0.245	0.9741
PRV 阳性	0.215	1/4	0.312	0.236	0.8925
PCV2阳性	0.169	1/8	0.311	0.212	0.7821
PRRSV 阳性	0.263	1/16	0.256	0.232	0.6942
HCV 阳性	0.128	1/32	0.241	0.243	0.6328

[0055] * 组 1:TTSuV1 阳性血清与 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白混和组。

[0056] ** 组 2:TTSuV1 阴性血清与 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白混和组。

[0057] *** 组 3:TTSuV1 阳性血清与蛋白稀释液混和组。

[0058] 2. 重复性实验

[0059] 取 3 块不同批次包被的酶标板,检测已知血清 10 份,每个样品每块板设置 3 个重复,计算批间变异系数 $CV = (SD/OD_{450nm} \text{ 平均值}) \times 100\%$;在同一块酶标板上进行批内重复,检测已知阳性血清 10 份,每个样品设置 3 个重复,记录平均值,计算批内变异系数 $CV = (SD/OD_{450nm} \text{ 平均值}) \times 100\%$ 。

[0060] 表 3 :批内重复实验

[0061]

血清	1	2	3	4	5	6	7	8	阳性对照	阴性对照
OD 均值	0.6182	0.7509	0.7778	0.7724	0.2014	0.2707	0.1165	0.3194	0.8215	0.107
SD	0.015	0.038	0.036	0.009	0.013	0.018	0.008	0.015	0.044	0.0068
CV	2.43%	5.06%	4.63%	1.17%	6.45%	6.65%	6.87%	4.70%	5.36%	6.36%

[0062] 表 4 :批间重复实验

[0063]

血清	第一批			第二批			第三批		
	OD 均值	SD	CV	OD 均值	SD	CV	OD 均值	SD	CV
1	0.6191	0.0361	5.83%	0.6009	0.065	10.82%	0.6337	0.0327	5.16%
2	0.7435	0.0361	4.86%	0.7191	0.0481	6.69%	0.7197	0.0254	3.53%
3	0.7721	0.0459	5.94%	0.7599	0.0524	6.90%	0.7795	0.0245	3.14%
4	0.5987	0.0341	5.70%	0.6018	0.0467	7.76%	0.5955	0.0259	4.35%
5	0.2115	0.015	7.09%	0.2014	0.0172	8.54%	0.2194	0.0171	7.79%
6	0.2705	0.0159	5.88%	0.2753	0.0159	5.78%	0.2957	0.0198	6.70%
7	0.1291	0.0147	11.39%	0.1321	0.0144	10.90%	0.1205	0.0124	10.29%
8	0.3178	0.0222	6.99%	0.32	0.0342	10.69%	0.3191	0.0254	7.96%
阳性对照	0.8045	0.0561	6.97%	0.7728	0.0478	6.19%	0.8215	0.0393	4.78%
阴性对照	0.1131	0.0109	9.64%	0.1123	0.0106	9.44%	0.1209	0.0129	9.84%

[0064] 根据统计学原则,当样本的 OD_{450nm} 值大于阴性样本 OD_{450nm} 值平均值 +3 标准差 (SD) 时,可以在 99.9% 水平上判定为阳性;经统计,试剂盒阳性 / 阴性抗体的临界值为 $OD_{450nm}=0.35$, OD_{450nm} 高于 0.35 判定为阳性, OD_{450nm} 低于 0.35 判定为阴性。

[0065] TTSuV1 抗体阳性血清中存在的 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白可以竞争性抑制血清中抗体与固相包被抗原的结合,说明该 TTSuV1 ORF1a 重组蛋白对 TTSuV1 抗体的特异性较好。表 2 和表 3 的数据中可以看出,重复性实验的结果显示,试剂盒批内和批间的最大变异系数 (CV) 分别为 6.87% 和 11.4%,均低于行业标准的 15%,说明该 ELISA 方法的重复性和稳定性很好。

[0066] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。

〈110〉 广东现代农业集团研究院有限公司
 〈120〉 一种猪 I 型细环病毒 TTSuV1 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒及其制备方
 〈130〉
 〈160〉 9
 〈170〉 PatentIn version 3.5
 〈210〉 1
 〈211〉 193
 〈212〉 PRT
 〈213〉 TTSuV1 ORF1a

〈400〉 1

```

met asp trp asp ala glu arg gln trp val trp lys glu gly glu
1      5      10      15
pro pro asp gln tyr gly tyr leu val gln tyr gly gly gly trp
      20      25      30
gly ser gly glu ile ser leu ala gly leu tyr arg glu his leu
      35      40      45
leu trp arg asn ser trp ser lys gly asn asp gly met asp leu
      50      55      60
val arg tyr phe gly cys ser ile lys leu tyr pro thr gln asn
      65      70      75
met asp tyr tyr phe trp trp asp thr asp phe lys pro gly tyr
      80      85      90

glu asp lys val lys glu tyr ser gln pro ser val met met met
      95      100     105
ala lys asn ser arg ile val ile ala arg asp arg ala pro asn
      110     115     120
arg arg arg ile arg lys leu phe ile pro pro pro ser arg asp
      125     130     135
thr thr gln trp gln phe gln thr asp phe cys asn arg pro leu
      140     145     150
phe thr trp ala ala gly leu ile asp leu gln lys pro phe asp
      155     160     165
ser lys gly ser phe arg asn ala trp trp met glu asp arg thr
      170     175     180
glu asp gly asn met glu tyr ile glu lys trp gly arg
      185     190
  
```

〈210〉 2

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1-F

〈400〉 2

TACACTTCCG GGTTCAGG 18

〈210〉 3

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1-R

〈400〉 3

AACGCCGCCA TCTCCTTA 18

〈210〉 4

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1cycle-F

〈400〉 4

TAAGGAGATG GCGGCGTT 18

〈210〉 5

〈211〉 18

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1cycle-R

〈400〉 5

CCTGAACCCG GAAGTGTA 18

〈210〉 6

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1-ORF1a-EcorF

〈400〉 6

CGGAATTCAT GGACTGGGAC GCAGAAAGA 29

〈210〉 7

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1-ORF1a-XbaR

〈400〉 7

GCTCTAGATC TTCCCCACTT TTCTATGTA 29

〈210〉 8

〈211〉 28

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1 ORF1 Hind III F

〈400〉 8

CCCAAGCTTC GCTTTAGACG ACGCAGAT 28

〈210〉 9

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 TTSuV1 ORF1 Xho I R

〈400〉 9

CCGCTCGAGC TCTGAAAATC TTCGTCGCT 29

专利名称(译)	一种猪I型细环病毒TTSuV1抗体间接ELISA诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102998453B	公开(公告)日	2014-10-08
申请号	CN201210485102.8	申请日	2012-11-23
[标]申请(专利权)人(译)	广东现代农业集团研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东现代农业集团研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司		
[标]发明人	李中圣 罗钧 陈善真 赵焱		
发明人	李中圣 罗钧 陈善真 赵焱		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN102998453A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	样品编号	OD 值	样品编号	OD 值	样品编号	OD 值	样品编号	OD 值
本发明公开一种猪I型细环病毒TTSuV1抗体间接ELISA诊断试剂盒及其制备方法，通过酵母表达的TTSuV1ORF1a重组蛋白包被抗原制备、标准阳性血清和标准阴性血清筛选、确定抗原包被浓度和血清稀释度、试剂盒的组装等步骤建立TTSuV1抗体间接ELISA诊断试剂盒，用于检测猪血清中TTSuV1抗体水平。TTSuV1ORF1a重组蛋白可以竞争性抑制血清中抗体与固相包被抗原的结合，本发明的试剂盒对TTSuV1抗体的特异性较好，试剂盒批内和批间的最大变异系数（CV）分别为6.87%和11.4%，均低于行业标准的15%，使试剂盒具有很好的重复性和稳定性。	1	0.280	11	0.546	21	1.027	31	0.340
	2	0.701	12	0.764	22	0.635	32	0.348
	3	0.315	13	0.696	23	0.318	33	0.506
	4	0.269	14	0.250	24	0.255	34	0.443
	5	0.863	15	0.583	25	0.163	35	0.336
	6	0.128	16	0.214	26	0.522	36	0.517
	7	0.931	17	0.474	27	0.552	37	0.510
	8	0.661	18	0.247	28	0.624	38	0.135
	9	0.193	19	0.307	29	0.676	39	0.222
	10	0.637	20	0.284	30	0.550	40	0.567