



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196325 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910548328.X

(22)申请日 2019.06.24

(71)申请人 中国动物疫病预防控制中心(农业
农村部屠宰技术中心)

地址 102600 北京市大兴区天贵大街17号

(72)发明人 孙雨 蒋菲 王传彬 肖颖
宋晓晖 赵晓春 杨林 王睿男
央珍 王美君 白崇生 李硕
刘林青 李晓霞 曾邦权 邹联斌
王文 肖开提·阿不都克里木
刘健鹏 林汉亮 扎西卓玛 徐琦
苏晓慧 刘玉良 毕一鸣 马英
亢文华 秦菊 薛文 马晓燕
任娟 李舵 杨天意 孙航

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 任凤华

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页
序列表1页

(54)发明名称

塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸

(57)摘要

本发明公开了塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸。该试剂盒包括包被抗原,所述包被抗原由eVP1-1偶联物和/或eVP2-1偶联物组成;所述eVP1-1偶联物是由eVP1-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原;所述eVP2-1偶联物是由eVP2-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原;所述eVP1-1序列1所示的多肽,所述eVP1-2是序列2所示的多肽。试剂盒特异性高、敏感性高,准确性高,操作简单、快速,适用于基层各级兽医部门和出入境检验检疫局对塞内卡病毒感染血清抗体的快速大量筛选检测。

1. 塞内卡病毒病诊断试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括包被抗原,所述包被抗原由eVP1-1偶联物和/或eVP2-1偶联物组成;所述eVP1-1偶联物是由eVP1-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原;所述eVP2-1偶联物是由eVP2-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原;所述eVP1-1是P11、P12或P13的多肽:

P11、氨基酸序列为SEQ ID No.1的多肽,

P12、氨基酸序列为SEQ ID No.1的第2-16位的多肽,

P13、在P12的多肽的氨基末端或羧基末端连接氨基酸残基以与载体蛋白偶联得到的多肽;

所述eVP1-2是P21、P22或P23的多肽:

P21、氨基酸序列为SEQ ID No.2的多肽,

P22、氨基酸序列为SEQ ID No.2的第2-15位的多肽,

P23、在P22的多肽的氨基末端或羧基末端连接氨基酸残基以与载体蛋白偶联得到的多肽。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒为诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒为诊断塞内卡病毒病的酶联免疫试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的酶联免疫试剂盒。

4. 塞内卡病毒病诊断试纸或检测塞内卡病毒抗体的试纸,其特征在于:所述试纸包括包被抗原,所述包被抗原由权利要求1中所述的eVP1-1偶联物和/或权利要求1中所述的eVP2-1偶联物组成。

5. 权利要求1中所述的包被抗原、成套多肽或单独多肽在制备试剂盒中的应用,其特征在于:所述试剂盒为塞内卡病毒病诊断试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的试剂盒;所述成套多肽由权利要求1中所述的eVP1-1和权利要求1中所述的eVP2-1组成

所述单独多肽为权利要求1中所述的eVP1-1或权利要求1中所述的eVP2-1。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述试剂盒为诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,所述试剂盒包括包被抗原,所述包被抗原由权利要求1中所述的eVP1-1偶联物和/或权利要求1中所述的eVP2-1偶联物组成。

7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述试剂盒为诊断塞内卡病毒病的酶联免疫试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括包被抗原,所述包被抗原由权利要求1中所述的eVP1-1偶联物和/或权利要求1中所述的eVP2-1偶联物组成。

8. 权利要求1中所述的包被抗原、成套多肽或单独多肽在制备试纸中的应用,其特征在于:所述试纸为塞内卡病毒病诊断试纸或检测塞内卡病毒抗体的试纸,所述成套多肽由权利要求1中所述的eVP1-1和权利要求1中所述的eVP2-1组成,所述单独多肽为权利要求1中所述的eVP1-1或权利要求1中所述的eVP2-1。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述试纸包括包被抗原,所述包被抗原由权利要求1中所述的eVP1-1偶联物和/或权利要求1中所述的eVP2-1偶联物组成。

10. 权利要求1-3中任一所述的试剂盒或权利要求4所述的试纸在制备塞内卡病毒病监测试剂盒中的应用。

塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸

技术领域

[0001] 本发明涉及塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸。

背景技术

[0002] A型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 是一种无囊膜的单股正链RNA病毒, 曾经被命名为“塞内卡谷病毒” (Seneca valley virus)。SVA属于小RNA病毒科、塞内卡病毒属, SVA基因组全长约7.3kb, 由5'端非编码区 (5' UTR)、一个编码多聚蛋白的开放阅读框 (ORF) 和3'端非编码区 (3UTR) 组成, 具有小RNA病毒科病毒基因组的共同特点, 即呈现L4-3-4分布。该病毒的结构蛋白由VP0、VP2、VP3和VP1, 4种蛋白组成, 尤其是VP1与VP2蛋白其抗原性较强、相对保守, 可刺激动物机体产生特异性免疫反应, 成为塞内卡病毒病的诊断靶抗原。

[0003] SVA感染猪主要表现为口鼻、蹄冠部皮肤出现水泡、同时病猪伴有发烧和腹泻等症状。新生仔猪 (7日龄以内) 死亡率可达30%-70%, 并伴有腹泻症状。该病的暴发已给全球养猪业造成了较大的经济损失。该病与口蹄疫 (FMD)、猪水疱病 (SVD) 及猪水疱性口炎 (VS) 类似。由于猪塞内卡病毒病具有与口蹄疫、水泡性口炎和猪水疱病等严重危害养猪业的疫病相似的临床症状, 因此需借助实验室检测技术对该病进行确诊。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的一个技术问题是如何高特异性和高灵敏性检测塞内卡病毒感染抗体以更准确地诊断塞内卡病毒病。

[0005] 为解决上述技术问题, 本发明提供了塞内卡病毒病诊断试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的试剂盒。

[0006] 本发明所提供的塞内卡病毒病诊断试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的试剂盒, 均包括包被抗原, 所述包被抗原由eVP1-1偶联物和/或eVP2-1偶联物组成; 所述eVP1-1偶联物是由eVP1-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原; 所述eVP2-1偶联物是由eVP2-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原; 所述eVP1-1是P11、P12或P13的多肽:

[0007] P11、氨基酸序列为SEQ ID No.1的多肽,

[0008] P12、氨基酸序列为SEQ ID No.1的第2-16位的多肽,

[0009] P13、在P12的多肽的氨基末端或羧基末端连接氨基酸残基以与载体蛋白偶联得到的多肽;

[0010] 所述eVP1-2是P21、P22或P23的多肽:

[0011] P21、氨基酸序列为SEQ ID No.2的多肽,

[0012] P22、氨基酸序列为SEQ ID No.2的第2-15位的多肽,

[0013] P23、在P22的多肽的氨基末端或羧基末端连接氨基酸残基以与载体蛋白偶联得到的多肽。

[0014] 其中, SEQ ID No.1由16个氨基酸残基组成, 第1位的半胱氨酸残基是为了与载体蛋白连接添加的连接臂, 其它氨基酸残基来源于塞内卡病毒VP1蛋白; SEQ ID No.2由15个

氨基酸残基组成,第1位的半胱氨酸残基是为了与载体蛋白连接添加的连接臂,其它氨基酸残基来源于塞内卡病毒VP2蛋白。

[0015] 上述试剂盒中,所述包被抗原中,所述eVP1-1偶联物和所述eVP2-1偶联物的质量比本领域技术人员可根据对塞内卡病毒抗体检测效果确定,如可为4:6。

[0016] 上述试剂盒中,所述试剂盒可为诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒。

[0017] 上述试剂盒中,所述试剂盒还包括进行时间分辨荧光免疫分析所需的其它试剂,如稀土元素标记的二抗。

[0018] 上述试剂盒中,所述稀土元素可为铕(Eu³⁺)、镝(Dy³⁺)、铽(Tb³⁺)或钐(Sm³⁺)。

[0019] 上述试剂盒中,所述试剂盒还可为诊断塞内卡病毒病的酶联免疫试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的酶联免疫试剂盒。

[0020] 上述试剂盒中,所述试剂盒可还包括进行酶联免疫分析所需的其它试剂,如酶标二抗。

[0021] 为解决上述技术问题,本发明还提供了塞内卡病毒病诊断试纸或检测塞内卡病毒抗体的试纸。

[0022] 本发明所提供的塞内卡病毒病诊断试纸或检测塞内卡病毒抗体的试纸均包括包被抗原,所述包被抗原由上述eVP1-1偶联物和/或上述eVP2-1偶联物组成。

[0023] 上述试纸中,所述包被抗原中,所述eVP1-1偶联物和所述eVP2-1偶联物的质量比本领域技术人员可根据对塞内卡病毒抗体检测效果确定,如可为4:6。

[0024] 上述包被抗原、成套多肽或单独多肽在制备试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。所述试剂盒为塞内卡病毒病诊断试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的试剂盒;所述成套多肽由上述eVP1-1和上述eVP2-1组成。所述单独多肽为上述eVP1-1或上述eVP2-1。

[0025] 上文中,所述成套多肽中所述eVP1-1和所述eVP2-1的质量比本领域技术人员可根据对塞内卡病毒抗体检测效果确定,如可为4:6。

[0026] 上述应用中,所述试剂盒可为诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,所述试剂盒包括包被抗原,所述包被抗原由所述eVP1-1偶联物和/或所述eVP2-1偶联物组成。

[0027] 上述应用中,所述试剂盒可为诊断塞内卡病毒病的酶联免疫试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括上述包被抗原。

[0028] 上述包被抗原、上述成套多肽或上述单独多肽在制备试纸中的应用也属于本发明的保护范围。

[0029] 上述应用中,所述试纸可为塞内卡病毒病诊断试纸或检测塞内卡病毒抗体的试纸。

[0030] 上述应用中,所述试纸包括包被抗原,所述包被抗原由所述eVP1-1偶联物和/或所述eVP2-1偶联物组成。

[0031] 上述试剂盒或上述试纸在制备塞内卡病毒病监测试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。

[0032] 用塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白或塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白作为半抗原与载体蛋白偶联得到的偶联物作为包被原,不能有效地区分塞内卡病毒抗体与口蹄疫病毒

抗体、猪水疱病病毒抗体和猪水泡性口炎病毒抗体。为了提高塞内卡病毒抗体检测的特异性,本发明从塞内卡病毒的全长VP1和塞内卡病毒的全长VP2分别选择优势抗原表位eVP1-1和eVP2-1,分别与载体蛋白偶联得到的偶联物(BSA-eVP1-1和/或BSA-eVP2-1)作为包被原,可以有效地区分塞内卡病毒抗体与口蹄疫病毒抗体、猪水疱病病毒抗体和猪水泡性口炎病毒抗体,提高了塞内卡病毒抗体检测的特异性。分别用BSA-eVP1-1和/或BSA-eVP2-1作为包被抗原制备的检测血清中的塞内卡病毒抗体的试剂盒可以将猪塞内卡病毒抗体阳性血清与猪口蹄疫病毒抗体阳性血清、猪水疱病病毒抗体阳性血清和猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清进行准确区分。

[0033] 利用包被抗原为BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1的诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒(本发明的试剂盒1)检测猪血清的方法(本发明TRFIA方法1)与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为96.67%(阳性符合率为97.78%,阴性符合率为5.56%);利用包被抗原为BSA-eVP1-1的诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒(本发明的试剂盒2)检测猪血清的方法(本发明TRFIA方法2)与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为91.11%(阳性符合率为85.56%,阴性符合率为96.67%);利用包被抗原为BSA-eVP2-1的诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒(本发明的试剂盒3)检测猪血清的方法(本发明TRFIA方法3)与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为92.78%(阳性符合率为90%,阴性符合率为95.56%)。美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为75%(阳性符合率为97.78%,阴性符合率为52.22%)。

[0034] 本发明以BSA-eVP1-1和/或BSA-eVP2-1作为包被原制备的抗体检测试剂盒特异性强、敏感性高,准确性高,操作简单、快速,适用于基层各级兽医部门和出入境检验检疫局对塞内卡病毒感染血清抗体的快速大量筛选检测。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0036] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0037] 下述实施例中的pET32a(+)为Novagen公司产品。镧标记元素(Eu³⁺)为广州达瑞生物科技股份有限公司产品。兔抗山羊二抗为Sigma公司产品。Auto-DELFI A1235时间分辨荧光检测仪购自PerkinElmer股份有限公司。酶标板,购自美国Costar公司。下述实施例中的瑞士PRIONICS口蹄疫NS抗体检测试剂盒为PrioCHECK® FMDV NS Antibody ELISA test Kit(PrioCHECK® FMDV NS FMDV Antibody test Kit,ELISA),批号是F161101L,货号是7610770。下述实施例中的美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒为AsurDx™ Senecavirus (SVA) Antibody Test Kit Cat No:10039-05, Lot No:BA2536。

[0038] 下述实施例中的猪FMDV非结构蛋白抗体阳性血清为临床猪血清经瑞士PRIONICS

口蹄疫NS抗体检测试剂盒检测为阳性的血清,猪FMDV非结构蛋白抗体阴性血清为临床猪血清经瑞士PRIONICS口蹄疫NS抗体检测试剂盒检测为阴性的血清。

[0039] 2.下述实施例中的猪塞内卡病毒血清中和试验方法如下:

[0040] 2.1被检血清处理血清于58℃灭活30分钟,用无血清的MEM培养基进行梯度稀释备用。

[0041] 2.2对照血清使用抗塞内卡病毒标准阴性血清和抗塞内卡病毒标准阳性血清(中国动物疫病预防控制中心(农业农村部兽医诊断中心)保存。

[0042] 2.3中和将浓度为 2×10^5 个/ml的Vero细胞悬液接种到96孔细胞板上,100μl/孔。37℃5%CO₂温箱中培养1-2日,直到有70%-80%的细胞形成单层。将50μl已经稀释好的待检血清与含100TCID₅₀/50μl的塞内卡病毒悬液等体积混合,置37℃5%CO₂温箱中作用1小时。

[0043] 2.4培养血清和病毒中和1小时后,细胞培养板的中和孔,每孔加100μl病毒与血清的混合悬液,37℃5%CO₂温箱中继续培养。

[0044] 2.5结果判定

[0045] 2.2.4接种后72小时进行结果初判,弃掉有特异性病变的孔,并把其他孔的培养液换成维持液,并继续旋转培养7天,进行终判。

[0046] 2.5.2判定标准能抑制50%或者50%以上的细胞出现细胞病变效应(CPE)者判为阳性。根据此标准计算血清的最大中和稀释倍数。待测血清的最大中和稀释倍数大于等于4的为阳性血清,待测血清的最大中和稀释倍数小于4的为阴性血清。

[0047] 实施例1、时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)检测塞内卡病毒感染血清抗体

[0048] 本发明人在研发过程中利用pET32a(+)在大肠杆菌BL21(DE3)中可溶性表达了塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白和塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白。实验结果表明将塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白和塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白分别作为包被抗原建立的时间分辨荧光免疫分析方法不能有效地区分塞内卡病毒抗体和口蹄疫病毒抗体,特异性差。发明人从塞内卡病毒的全长VP1蛋白中选择了4个优势抗原表位多肽(eVP1-1、eVP1-2、eVP1-3和eVP1-4),从塞内卡病毒的全长VP2蛋白中选择了5个优势抗原表位多肽(eVP2-1、eVP2-2、eVP2-3、eVP2-4和eVP2-5),分别与BSA偶联后作为包被抗原建立的时间分辨荧光免疫分析方法,特异性得到了显著提高,可以有效区分塞内卡病毒抗体和口蹄疫病毒抗体,但是敏感性差异较大。将eVP1-1与BSA的偶联物(BSA-eVP1-1)和eVP2-1与BSA的偶联物(BSA-eVP2-1)按照4:6的质量比混合得到的混合完全抗原作为包被抗原建立的时间分辨荧光免疫分析方法,特异性得到了显著提高,可以有效区分塞内卡病毒抗体和口蹄疫病毒抗体,敏感性也显著提高。具体的实验方法如下:

[0049] 1包括抗原的制备

[0050] 本实施例制备了以下12种包被抗原:1) BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1, 2) BSA-eVP1-1(eVP1-1偶联物), 3) BSA-eVP2-1(eVP2-1偶联物), 4) BSA-eVP1-2(eVP1-2偶联物), 5) BSA-eVP1-3(eVP1-3偶联物), 6) BSA-eVP1-4(eVP1-4偶联物), 7) BSA-eVP2-2(eVP2-2偶联物), 8) BSA-eVP2-3(eVP2-3偶联物), 9) BSA-eVP2-4(eVP2-4偶联物), 10) BSA-eVP2-5(eVP2-5偶联物), 11) 塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白, 12) 塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白。

[0051] 1.1优势抗原表位多肽

[0052] 从塞内卡病毒的VP1蛋白和VP2蛋白中选择优势抗原表位多肽,由北京六合华大基因科技有限公司合成N末端连接有半胱氨酸的多肽eVP1-1、eVP1-2、eVP1-3、eVP1-4、eVP2-1、eVP2-2、eVP2-3、eVP2-4和eVP2-5(表1),纯度均大于95%,冻干保存。

[0053] 表1.多肽

[0054]

名称	序列
----	----

[0055]

eVP1-1	C*KLSSATRGLPAHADW
eVP1-2	C*FTYFRSDLEVTVVSLE
eVP1-3	C*NAETGVIEAGNTD
eVP1-4	C*VASRPATRFGLYVNPS
eVP2-1	C*MSDDYRTGKNMPFQ
eVP2-2	C*HNTEEMENSADRVIT
eVP2-3	C*GVLCAYVEDPTKSDP
eVP2-4	C*LSRQGGLNGGAFTA
eVP2-5	C*WTL LVMVLVPLDYKE

[0056] 注:序列中的C*为半胱氨酸残基,是为了与载体蛋白连接,在塞内卡病毒的VP1蛋白的抗原表位多肽或VP2蛋白的抗原表位多肽的氨基末端添加的连接臂;其它氨基酸残基来源于塞内卡病毒。

[0057] 1.2 10种包被抗原的制备

[0058] 将1.1的eVP1-1、eVP1-2、eVP1-3、eVP1-4、eVP2-1、eVP2-2、eVP2-3、eVP2-4和eVP2-5这9种多肽分别与BSA偶联得到9种包被抗原:2) BSA-eVP1-1(eVP1-1与BSA的偶联物),3) BSA-eVP2-1(eVP2-1与BSA的偶联物),4) BSA-eVP1-2(eVP1-2与BSA的偶联物),5) BSA-eVP1-3(eVP1-3与BSA的偶联物),6) BSA-eVP1-4(eVP1-4与BSA的偶联物),7) BSA-eVP2-2(eVP2-2与BSA的偶联物),8) BSA-eVP2-3(eVP2-3与BSA的偶联物),9) BSA-eVP2-4(eVP2-4与BSA的偶联物),10) BSA-eVP2-5(eVP2-5与BSA的偶联物)。具体制备方法如下:使用美国KPL公司生产的BSA标签偶联试剂盒(Readilink™ BSA Conjugation Kit)货号:5501,批号:148045,按照说明书要求对合成的多肽片段进行偶联,制备成上述9种包被抗原。

[0059] 将BSA-eVP1-1和BSA-eVP2-1按照4:6的质量比混合得到包被抗原BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1。

[0060] 1.3塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白和塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白的表达

[0061] 1.2.2全长VP1重组蛋白基因和全长VP2蛋白基因重组表达载体的构建

[0062] 用核苷酸序列是GenBank Accession No.KY747519.1(Update Date是30-JUN-2017)的第1-792位替换pET32a(+)的BamH I和XhoI识别位点间的片段(BamH I识别位点和XhoI识别位点间的小片段),保持pET32a(+)的其它序列不变,得到塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白基因重组表达载体,命名为pET32a-f1VP1.pET32a-f1VP1能表达含有塞内卡病毒的

全长VP1蛋白(氨基酸序列是GenBank Accession No.ARR73608.1(Update Date是30-JUN-2017)的第1-264位)的融合蛋白。

[0063] 用核苷酸序列是GenBank Accession No.KT321458.1(Update Date是16-MAR-2016)的第1107-1964位替换pET32a(+)的BamH I和XhoI识别位点间的片段(BamH I识别位点和XhoI识别位点间的小片段),保持pET32a(+)的其它序列不变,得到塞内卡病毒的全长VP2蛋白基因重组表达载体,命名为pET32a-f1VP2。pET32a-f1VP2能表达含有塞内卡病毒的全长VP2蛋白(氨基酸序列是GenBank Accession No.ALN69919.1(Update Date是16-MAR-2016)的第147-432位)的融合蛋白。

[0064] 1.3.2重组菌的构建

[0065] 将步骤1构建的pET32a-f1VP1和pET32a-f1VP2这2种表达载体分别单独转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞。将其均匀涂布于含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的LB平板上,37 $^{\circ}$ C培养16小时。单菌落振荡培养过夜,提取质粒进行测序,将测序结果表明含有pET32a-f1VP1的重组大肠杆菌命名为BL21(DE3)/pET32a-f1VP1,将测序结果表明含有pET32a-f1VP2的重组大肠杆菌命名为BL21(DE3)/pET32a-f1VP2。

[0066] 1.3.3塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白或塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白的可溶性表达

[0067] 将BL21(DE3)/pET32a-f1VP1和BL21(DE3)/pET32a-f1VP2这2个菌株分别单独接种于含50 μ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基(在LB液体培养基中加入氨苄青霉素至氨苄青霉素的浓度为50 μ g/mL得到的培养基)中,37 $^{\circ}$ C,采用Thermo MaxQ6000型全温振荡器200rpm振荡培养至OD₆₀₀值(以含50 μ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基为空白对照)达到0.6时,加入IPTG进行诱导表达。该诱导表达用0.75mM的IPTG在16 $^{\circ}$ C诱导13h。取IPTG诱导表达13h后的发酵液收集菌体沉淀。加入PBS重悬沉淀,8000rpm/min离心5min,弃掉上清液。向洗涤好的菌体沉淀中加入PBS,高压破碎菌体,裂解至菌液不再粘稠,于4 $^{\circ}$ C离心机中16000rpm/min离心30min,收集上清液,弃沉淀。将上清液用0.22 μ m滤膜过滤后上样至预先用溶液1(溶质及其浓度如下:20mM Tris、150mM NaCl,溶剂是水,pH8.0的溶液)平衡好的镍柱。将镍柱接入AKTA机器上,分别用10个柱体积的溶液1与10个柱体积的溶液2(溶质及其浓度如下:20mM Tris、150mM NaCl、50mM咪唑,溶剂是水,pH8.0的溶液)清洗镍柱中的杂质蛋白,并在AKTA机器上监测蛋白峰。用溶液3(溶质及其浓度如下:20mM Tris、150mM NaCl、300mM咪唑,溶剂是水,pH8.0的溶液)冲洗镍柱挂在镍柱上的目的蛋白,并使用AKTA收集出现目的蛋白峰的洗脱样品,用GE公司生产的Superdex200凝胶柱通过分子筛进一步纯化,分别得到分子筛纯化的塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白和分子筛纯化的塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白。

[0068] 2利用诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒进行时间分辨荧光免疫分析

[0069] 本实施例提供了12种诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒。这12种试剂盒均包括包被抗原、铕标记二抗、包被缓冲液、洗涤液、二抗稀释液。这12种试剂盒的区别仅在于包被抗原不同,其它组分完全相同。

[0070] 这12种试剂盒分别为包被抗原为步骤1的BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1的诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析

试剂盒,以下简称本发明的试剂盒1;包被抗原为步骤1的BSA-eVP1-1的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称本发明的试剂盒2;包被抗原为步骤1的BSA-eVP2-1的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称本发明的试剂盒3;包被抗原为步骤1的BSA-eVP1-2的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒1;包被抗原为步骤1的BSA-eVP1-3的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒2;包被抗原为步骤1的BSA-eVP1-4的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒3;包被抗原为步骤1的BSA-eVP2-2的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒4;包被抗原为步骤1的BSA-eVP2-3的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒5;包被抗原为步骤1的BSA-eVP2-4的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒6;包被抗原为步骤1的BSA-eVP2-5的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒7;包被抗原为步骤1的寨内卡病毒的全长VP1重组蛋白的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒8;包被抗原为步骤1的寨内卡病毒的全长VP2重组蛋白的诊断寨内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测寨内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,以下简称对照试剂盒9。

[0071] 按照如下文献中的方法制备铕标记的兔抗山羊二抗(简称铕标记二抗):EB病毒核抗原(NA1) IgA抗体和Zta蛋白IgA抗体时间分辨荧光免疫分析检测试剂的研制.南方医科大学2012级硕士学位论文。

[0072] 包被缓冲液:0.05mol/L的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH9.6),溶剂为水,溶质及其浓度如下: Na_2CO_3 1.59g/L和 NaHCO_3 2.93g/L。

[0073] 洗涤液为PBST洗涤液。PBST洗涤液按照如下方法配制:在浓度为0.01M,pH值为7.4的PBS缓冲液中加入吐温20至吐温20的含量为5mL/L,得到PBST洗涤液。

[0074] 封闭液为1%BSA封闭液。1%BSA封闭液按照如下方法配制:在浓度为0.01M,pH值为7.4的PBS缓冲液中加入10%的BSA溶液,至BSA的体积百分含量为1%,得到1%BSA封闭液。

[0075] 二抗稀释液:在浓度为0.01M,pH值为7.4的PBS缓冲液中加入BSA至BSA的含量为1%(体积百分含量),得到二抗稀释液。

[0076] 其中,浓度为0.01M,pH值为7.4的PBS缓冲液的配制:8.5g NaCl 、0.2g KCl 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.59g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,1L去离子水。

[0077] 2.1利用本发明的试剂盒1,经过优化实验建立了以BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称本发明TRFIA方法1),具体如下:

[0078] 2.1.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1至BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1的浓度(BSA-eVP1-1和BSA-eVP2-1的总质量浓度)为1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,得到包被抗原溶

液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0079] 2.1.2洗涤:倾去孔内包被原溶液,用PBST洗涤液洗涤5次,每次3min;拍干。

[0080] 2.1.3封闭:加入1%BSA封闭液,250 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0081] 2.1.4加样:

[0082] 2.1.4.1样品孔

[0083] 用包被缓冲液将猪塞内卡病毒抗体阳性血清稀释50倍,得到待测血清。将100 μ L待测血清加到酶标板上,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤5次。

[0084] 猪塞内卡病毒抗体阳性血清是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阳性的猪血清。

[0085] 2.1.4.2空白对照孔

[0086] 与2.1.4.1的区别仅在于将待测血清替换为等体积的高纯水,其它步骤不变。

[0087] 2.1.5加酶元素标二抗:加入用二抗稀释液进行1:50000稀释的酶标记兔抗山羊IgG,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 30min。

[0088] 2.1.6显色:加入TMB,100 μ L/孔,反应10min。

[0089] 2.1.7终止:加入0.2mol/L H_2SO_4 溶液终止反应,100 μ L/孔。

[0090] 2.1.8测定:用时间分辨荧光免疫分析仪读取各孔的荧光检测值。

[0091] 2.1.9阴阳性临界值的确定

[0092] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.1.1-2.1.8(将2.1.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值(X)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0093] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值X为3155,SD为218,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为3809。

[0094] 2.2利用本发明的试剂盒2,经过优化实验建立了以BSA-eVP1-1为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称本发明TRFIA方法2)如下:

[0095] 2.2.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP1-1至BSA-eVP1-1的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0096] 2.2.2洗涤:倾去孔内包被原溶液,用PBST洗涤液洗涤5次,每次3min;拍干。

[0097] 2.2.3封闭:加入1%BSA封闭液,250 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0098] 2.2.4加样:

[0099] 2.2.4.1样品孔

[0100] 用包被缓冲液将猪塞内卡病毒抗体阳性血清稀释50倍,得到待测血清。将100 μ L待测血清加到酶标板上,37 $^{\circ}$ C反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤5次。

[0101] 猪塞内卡病毒抗体阳性血清是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阳性的猪血清。

[0102] 2.2.4.2空白对照孔

[0103] 与2.2.4.1的区别仅在于将待测血清替换为等体积的高纯水,其它步骤不变。

[0104] 2.2.5加酶元素标二抗:加入用二抗稀释液进行1:50000稀释的酶标记兔抗山羊IgG,100μL/孔,37℃30min。

[0105] 2.2.6显色:加入TMB,100μL/孔,反应10min。

[0106] 2.2.7终止:加入0.2mol/L H₂SO₄溶液终止反应,100μL/孔。

[0107] 2.2.8测定:用时间分辨荧光免疫分析仪读取各孔的荧光检测值。

[0108] 2.2.9、阴阳性临界值的确定

[0109] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.2.1-2.2.8(将2.2.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0110] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为2682,SD为247,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为3423。

[0111] 2.3利用本发明的试剂盒3,经过优化实验建立了以BSA-eVP2-1为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称本发明TRFIA方法3)如下:

[0112] 2.3.2包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP2-1至BSA-eVP2-1的浓度为1.0μg/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100μL/孔加至酶标板,4℃孵育16h。

[0113] 2.3.2洗涤:倾去孔内包被原溶液,用PBST洗涤液洗涤5次,每次3min;拍干。

[0114] 2.3.3封闭:加入1%BSA封闭液,250μL/孔,37℃孵育2h。

[0115] 2.3.4加样:

[0116] 2.3.4.1样品孔

[0117] 用包被缓冲液将猪塞内卡病毒抗体阳性血清稀释50倍,得到待测血清。将100μL待测血清加到酶标板上,37℃反应1h,倾去孔内液体,然后用洗涤液洗涤5次。

[0118] 猪塞内卡病毒抗体阳性血清是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阳性的猪血清。

[0119] 2.3.4.2空白对照孔

[0120] 与2.3.4.1的区别仅在于将待测血清替换为等体积的高纯水,其它步骤不变。

[0121] 2.3.5加酶元素标二抗:加入用二抗稀释液进行1:50000稀释的酶标记兔抗山羊IgG,100μL/孔,37℃30min。

[0122] 2.3.6显色:加入TMB,100μL/孔,反应10min。

[0123] 2.3.7终止:加入0.2mol/L H₂SO₄溶液终止反应,100μL/孔。

[0124] 2.3.8测定:用时间分辨荧光免疫分析仪读取各孔荧光检测值。

[0125] 2.3.9阴阳性临界值的确定

[0126] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.2.2-2.3.8(将2.3.4.1中的猪塞

内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0127] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为2544,SD为207,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为3165。

[0128] 2.4利用对照试剂盒1,经过优化实验建立了以BSA-eVP1-2为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法1)如下:

[0129] 2.4.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP1-2至BSA-eVP1-2的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0130] 2.4.2洗涤:同2.2.2。

[0131] 2.4.3封闭:同2.2.3。

[0132] 2.4.4加样:同2.2.4。

[0133] 2.4.5加镧元素标二抗:同2.2.5。

[0134] 2.4.6显色:同2.2.6。

[0135] 2.4.7终止:同2.2.7。

[0136] 2.4.8测定:同2.2.8。

[0137] 2.4.9阴阳性临界值的确定

[0138] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.4.1-2.4.8(将2.4.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0139] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为2879,SD为232,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为3575。

[0140] 2.5利用对照试剂盒2,经过优化实验建立了以BSA-eVP1-3为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法2)如下:

[0141] 2.5.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP1-3至BSA-eVP1-3的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0142] 2.5.2洗涤:同2.2.2。

[0143] 2.5.3封闭:同2.2.3。

[0144] 2.5.4加样:同2.2.4。

[0145] 2.5.5加镧元素标二抗:同2.2.5。

[0146] 2.5.6显色:同2.2.6。

[0147] 2.5.7终止:同2.2.7。

[0148] 2.5.8测定:同2.2.8。

[0149] 2.5.9、阴阳性临界值的确定

[0150] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.5.1-2.5.8(将2.5.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0151] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为3290,SD为274,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为4112。

[0152] 2.6利用对照试剂盒3,经过优化实验建立了以BSA-eVP1-4为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法3)如下:

[0153] 2.6.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP1-4至BSA-eVP1-4的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0154] 2.6.2洗涤:同2.2.2。

[0155] 2.6.3封闭:同2.2.3。

[0156] 2.6.4加样:同2.2.4。

[0157] 2.6.5加镧元素标二抗:同2.2.5。

[0158] 2.6.6显色:同2.2.6。

[0159] 2.6.7终止:同2.2.7。

[0160] 2.6.8测定:同2.2.8。

[0161] 2.6.9阴阳性临界值的确定

[0162] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.6.1-2.6.8(将2.6.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0163] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为2792,SD为227,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为3473。

[0164] 2.7利用对照试剂盒4,经过优化实验建立了以BSA-eVP2-2为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法4)如下:

[0165] 2.7.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP2-2的至BSA-eVP2-2的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育

育16h。

[0166] 2.7.2洗涤:同2.2.2。

[0167] 2.7.3封闭:同2.2.3。

[0168] 2.7.4加样:同2.2.4。

[0169] 2.7.5加酶元素标二抗:同2.2.5。

[0170] 2.7.6显色:同2.2.6。

[0171] 2.7.7终止:同2.2.7。

[0172] 2.7.8测定:同2.2.8。

[0173] 2.7.9阴阳性临界值的确定

[0174] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.7.1-2.7.8(将2.7.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的荧光检测值的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0175] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为3540,SD为242,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为4266。

[0176] 2.8利用对照试剂盒5,经过优化实验建立了以BSA-eVP2-3为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法5)如下:

[0177] 2.8.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP2-3至BSA-eVP2-3的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0178] 2.8.2洗涤:同2.2.2。

[0179] 2.8.3封闭:同2.2.3。

[0180] 2.8.4加样:同2.2.4。

[0181] 2.8.5加酶元素标二抗:同2.2.5。

[0182] 2.8.6显色:同2.2.6。

[0183] 2.8.7终止:同2.2.7。

[0184] 2.8.8测定:同2.2.8。

[0185] 2.8.9、阴阳性临界值的确定

[0186] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.8.1-2.8.8(将2.8.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0187] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为2562,SD为238,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为3276。

[0188] 2.9利用对照试剂盒6,经过优化实验建立了以BSA-eVP2-4为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法6)如下:

[0189] 2.9.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP2-4至BSA-eVP2-4的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0190] 2.9.2洗涤:同2.2.2。

[0191] 2.9.3封闭:同2.2.3。

[0192] 2.9.4加样:同2.2.4。

[0193] 2.9.5加辅元素标二抗:同2.2.5。

[0194] 2.9.6显色:同2.2.6。

[0195] 2.9.7终止:同2.2.7。

[0196] 2.9.8测定:同2.2.8。

[0197] 2.9.9阴阳性临界值的确定

[0198] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.9.1-2.9.8(将2.9.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0199] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为3297,SD为316,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为4245。

[0200] 2.10利用对照试剂盒7,经过优化实验建立了以BSA-eVP2-5为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法7)如下:

[0201] 2.10.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的BSA-eVP2-5至BSA-eVP2-5的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4 $^{\circ}$ C孵育16h。

[0202] 2.10.2洗涤:同2.2.2。

[0203] 2.10.3封闭:同2.2.3。

[0204] 2.10.4加样:同2.2.4。

[0205] 2.10.5加辅元素标二抗:同2.2.5。

[0206] 2.10.6显色:同2.2.6。

[0207] 2.10.7终止:同2.2.7。

[0208] 2.10.8测定:同2.2.8。

[0209] 2.10.9阴阳性临界值的确定

[0210] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.10.1-2.10.8(将2.10.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0211] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为3499,SD为310,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为4429。

[0212] 2.11利用对照试剂盒8,经过优化实验建立了以塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法8)如下:

[0213] 2.11.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的分子筛纯化的塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白至塞内卡病毒的全长VP1重组蛋白的浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4℃孵育16h。

[0214] 2.11.2洗涤:同2.2.2。

[0215] 2.11.3封闭:同2.2.3。

[0216] 2.11.4加样:同2.2.4。

[0217] 2.11.5加镧元素标二抗:同2.2.5。

[0218] 2.11.6显色:同2.2.6。

[0219] 2.11.7终止:同2.2.7。

[0220] 2.11.8测定:同2.2.8。

[0221] 2.11.9、阴阳性临界值的确定

[0222] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.11.1-2.11.8(将2.11.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阳性血清的平均值($\bar{X}$)和标准偏差(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X}+3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0223] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阳性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为5789,SD为493,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为7268。

[0224] 2.12利用对照试剂盒9,经过优化实验建立了以塞内卡病毒的全长VP2蛋白为包被抗原的时间分辨荧光免疫分析方法(以下简称对照TRFIA方法9)如下:

[0225] 2.12.1包被:用包被缓冲液稀释步骤1中的分子筛纯化的塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白至塞内卡病毒的全长VP2重组蛋白浓度为1.0 μ g/ml,得到包被抗原溶液,用该包被抗原溶液包被实验孔,100 μ L/孔加至酶标板,4℃孵育16h。

[0226] 2.12.2洗涤:同2.2.2。

[0227] 2.12.3封闭:同2.2.3。

[0228] 2.12.4加样:同2.2.4。

[0229] 2.12.5加镧元素标二抗:同2.2.5。

[0230] 2.12.6显色:同2.2.6。

[0231] 2.12.7终止:同2.2.7。

[0232] 2.12.8测定:同2.2.8。

[0233] 2.11.9阴阳性临界值的确定

[0234] 将400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清采用步骤2.12.1-2.12.8(将2.12.4.1中的猪塞内卡病毒抗体阳性血清分别替换为该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清,其它步骤相同)的方法进行TRFIA检测,计算该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均值($\bar{X}$)和标准偏差

(SD)。荧光检测值 $\geq \bar{X}+3SD$ 判为阳性;荧光检测值 $< \bar{X} +3SD$ 判为阴性。该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清均是采用猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测为阴性的猪血清。

[0235] 结果表明,该400份猪塞内卡病毒抗体阴性血清的平均荧光检测值 $\bar{X}$ 为5562,SD为523,因此阴阳性临界荧光检测值 $\bar{X}+3SD$ 为7131。

[0236] 3、特异性试验

[0237] 利用步骤2的本发明TRFIA方法1-3(简称本发明方法1-3)、对照TRFIA方法1-9(简称对照方法1-9)和美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒对各10份的猪口蹄疫病毒抗体阳性血清、猪水疱病病毒抗体阳性血清和猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清进行检测,观察与其它疾病有无交叉反应。结果表明本发明TRFIA方法1-3对猪口蹄疫病毒抗体阳性血清、猪水疱病病毒抗体阳性血清和猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清无交叉反应,说明本发明的试剂盒1-3可以对猪塞内卡病毒抗体阳性血清与猪口蹄疫病毒抗体阳性血清、猪水疱病病毒抗体阳性血清和猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清进行准确区分。

[0238] 表2. 本发明方法1-3、对照方法1-9对10份猪口蹄疫病毒抗体阳性血清的检测结果

[0239]

方法	包被抗原	临界值	对 10 份猪口蹄疫病毒抗体阳性血清的荧光检测值										交叉反应率 (%)
本发明方法 1	BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1	3809	1275	987	1102	2149	1354	1782	2384	1198	1849	902	0
本发明方法 2	BSA-eVP1-1	3423	1103	806	2109	932	2182	1432	1568	717	689	1799	0
本发明方法 3	BSA-eVP2-1	3165	1078	871	1346	774	2243	890	1893	2105	1178	894	0
对照方法 1	BSA-eVP1-2	3575	1250	1783	2184	1084	1587	8973	2572	903	779	8087	20
对照方法 2	BSA-eVP1-3	4112	3567	2390	1279	1766	7705	1571	1123	1340	1532	1728	10
对照方法 3	BSA-eVP1-4	3473	2102	1939	1090	7545	2164	13964	18775	1537	2738	7875	40
对照方法 4	BSA-eVP2-2	4266	5380	2504	1437	1209	19742	1078	14556	2366	1450	1884	30
对照方法 5	BSA-eVP2-3	3276	1579	2771	19883	1791	1799	974	1340	2568	1675	1332	10
对照方法 6	BSA-eVP2-4	4245	12934	1982	2742	2237	1080	28243	1248	2236	1621	1856	20
对照方法 7	BSA-eVP2-5	4429	3445	1792	1305	19284	2243	3321	8766	2354	1156	3532	20
对照方法 8	塞内卡病毒的全长 VP1 重组蛋白	7268	24331	3545	55447	12231	2728	23669	17658	2654	18775	37684	70
对照方法 9	塞内卡病毒的全长 VP2 重组蛋白	7131	5787	47996	2787	2546	14556	12452	9789	3421	26554	72897	60

[0240]

法 9	长 VP2 重组蛋白												
-----	------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0241] 表3.美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒对10份猪口蹄疫病毒抗体阳性血清的检测结果

[0242]

临界值	对 10 份猪口蹄疫病毒抗体阳性血清的检测值										交叉反应率 (%)
40%	83.5%	77.2%	68.4%	27.9%	53.6%	71.2%	68.6%	12.2%	47.4%	23.3%	70%

[0243] 注:表中美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒的判定标准为:PP值<40%,样品应判定为抗体阴性;PP值≥40%,样品应判定为抗体阳性,样品PP值=(样品OD值/阳性对照OD值)*100%。

[0244] 表4.本发明方法1-3、对照方法1-9对10份猪水疱病病毒抗体阳性血清的检测结果

[0245]

方法	包被抗原	临界值	对 10 份猪水疱病病毒抗体阳性血清的荧光检测值										交叉反应率 (%)
本发明方法 1	BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1	3809	1283	1285	2146	1178	884	767	1354	2148	1645	810	0
本发明方法 2	BSA-eVP1-1	3423	1154	723	1167	836	2265	1521	889	934	877	1898	0
本发明方法 3	BSA-eVP2-1	3165	2073	1373	1588	975	1244	976	1467	2145	1367	925	0
对照方法 1	BSA-eVP1-2	3575	1030	785	1185	1244	886	972	1274	954	870	1027	0
对照方法 2	BSA-eVP1-3	4112	1533	892	756	2760	1743	11270	824	742	934	3224	10
对照方法 3	BSA-eVP1-4	3473	3003	1459	8092	2532	2411	2943	727	1555	2453	1867	10
对照方法 4	BSA-eVP2-2	4266	3325	721	1466	1875	2731	1378	3576	2261	3551	1884	0
对照方法 5	BSA-eVP2-3	3276	2174	2122	1834	9721	890	922	1434	2582	1776	2335	10
对照方法 6	BSA-eVP2-4	4245	1922	3183	743	1267	1544	690	1549	2763	1578	1488	0

[0246]

对照方 法 7	BSA-eVP2-5	4429	1433	6654	1255	889	1940	8727	834	3334	1463	2531	20
对照方 法 8	塞内卡病毒的全 长 VP1 重组蛋白	7268	1589	9550	889	2784	3750	13387	15668	4666	1767	4685	30
对照方 法 9	塞内卡病毒的全 长 VP2 重组蛋白	7131	2786	2956	3755	12646	19878	1047	3345	9425	5553	28446	30

[0247] 表5.美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒对10份猪水疱病病毒抗体阳性血清的检测结果

[0248]

临界值	对 10 份猪水疱病病毒抗体阳性血清的检测值										交叉反应率 (%)
40%	13.2%	37.8%	27.5%	53.3%	62.1%	22.6%	14.9%	72.1%	25.5%	69.7%	40%

[0249] 注:表中美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒的判定标准为:PP值<40%,样品应判定为抗体阴性;PP值≥40%,样品应判定为抗体阳性,样品PP值=(样品OD值/阳性对照OD值)*100%。

[0250] 表6.本发明方法1-3、对照方法1-9对10份猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清的检测结果

[0251]

方法	包被抗原	临界值	对 10 份水泡性口炎病毒抗体阳性血清的荧光检测值										交叉反应率 (%)
本发明 方法 1	BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1	3809	1421	1167	745	1563	787	1143	1324	2145	946	988	0
本发明 方法 2	BSA-eVP1-1	3423	1266	915	2533	815	1145	1209	890	909	1669	1698	0
本发明 方法 3	BSA-eVP2-1	3165	1341	972	1266	975	1520	854	1784	2490	1341	856	0
对照方 法 1	BSA-eVP1-2	3575	1146	1573	2348	976	889	1944	2545	1467	7767	1084	10
对照方	BSA-eVP1-3	4112	1545	2366	970	746	2312	8560	2133	1346	1565	2734	10

[0252]

法 2													
对照方 法 3	BSA-eVP1-4	3473	1123	1034	1565	2543	760	954	1778	1364	2398	1335	0
对照方 法 4	BSA-eVP2-2	4266	1342	11544	1587	2244	1489	974	2553	1365	835	866	10
对照方 法 5	BSA-eVP2-3	3276	8473	1779	2923	1466	1529	940	1233	2478	1989	7337	20
对照方 法 6	BSA-eVP2-4	4245	5934	1467	2688	2134	1675	2446	12480	2461	1451	1443	20
对照方 法 7	BSA-eVP2-5	4429	1432	1566	830	2283	2331	896	964	15542	850	1536	10
对照方 法 8	塞内卡病毒的全 长 VP1 重组蛋白	7268	14367	1544	25876	3246	1744	13655	4650	1677	1954	2755	30
对照方 法 9	塞内卡病毒的全 长 VP2 重组蛋白	7131	3484	15975	1733	2437	18773	17995	1743	3572	2588	1286	30

[0253] 表7.美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒对10份猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清的检测结果

[0254]

临界值	对 10 份猪水泡性口炎病毒抗体阳性血清的检测值										交叉反 应率 (%)
40%	20.5%	45.7%	16.6%	23.8%	35.6%	62.7%	58.9%	32.1%	27.8%	14.6%	30%

[0255] 注:表中美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒的判定标准为:PP值<40%,样品应判定为抗体阴性;PP值≥40%,样品应判定为抗体阳性,样品PP值=(样品OD值/阳性对照OD值)*100%。

[0256] 4、灵敏度试验将猪塞内卡病毒抗体阳性血清进行倍比稀释,分别采用本发明TRFIA方法1-3(简称本发明方法1-3)、对照TRFIA方法1-9(简称对照方法1-9)和美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒进行检测,得出阳性临界值时的最大稀释度。

[0257] 结果表明本发明TRFIA方法1-3检测猪塞内卡病毒抗体阳性血清的最高稀释倍数分别为1:1024倍、1:512倍、1:512倍;对照TRFIA方法1-9检测猪塞内卡病毒抗体阳性血清的最高稀释倍数分别为1:256倍、1:256倍、1:512倍、1:512倍、1:128倍、1:512倍、1:256倍、1:1024倍、1:1024倍,美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒检测猪塞内卡病毒抗体阳性血清的最高稀释倍数为1:256倍。

[0258] 5、重复性试验

[0259] 采用本发明TRFIA方法1-3分别对6份猪塞内卡病毒抗体阳性血清在同批次板和不

同批次板上分别进行检测,平行测定5次,计算批内、批间变异系数(CV)。结果显示,本发明TRFIA方法1-3批内重复变异系数在1.91%~5.48%之间,批间重复变异系数小于7%(表8-10)。结果表明,本发明的试剂盒1-3对猪塞内卡病毒抗体阳性血清具有良好的重复性。

[0260] 表8. 本发明TRFIA方法1重复性试验

[0261]

阳性血清编号	批内变异系数		批间变异系数	
	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
1	36805 $\pm$ 1283	3.49%	15725 $\pm$ 878	5.58%
2	18751 $\pm$ 672	3.58%	48680 $\pm$ 2677	5.50%
3	27881 $\pm$ 1221	2.41%	23524 $\pm$ 1369	5.82%
4	15631 $\pm$ 546	3.49%	16730 $\pm$ 980	5.86%
5	48602 $\pm$ 1766	3.63%	79561 $\pm$ 2767	3.48%
6	68553 $\pm$ 2331	3.40%	52632 $\pm$ 2870	5.26%

[0262] 表9. 本发明TRFIA方法2重复性试验

[0263]

阳性血清编号	批内变异系数		批间变异系数	
	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
1	48755 $\pm$ 1765	3.62%	46331 $\pm$ 2981	6.43%
2	46215 $\pm$ 1204	2.61%	17442 $\pm$ 909	5.21%
3	17456 $\pm$ 957	5.48%	68643 $\pm$ 2897	4.22%
4	16487 $\pm$ 590	3.58%	12765 $\pm$ 775	6.07%
5	9723 $\pm$ 317	3.26%	9614 $\pm$ 442	4.60%
6	35642 $\pm$ 1679	4.71%	15332 $\pm$ 870	5.67%

[0264] 表10. 本发明TRFIA方法3重复性试验

[0265]

阳性血清编号	批内变异系数		批间变异系数	
	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
1	15732 $\pm$ 787	5.00%	10998 $\pm$ 727	6.61%
2	16778 $\pm$ 664	3.96%	14540 $\pm$ 829	5.70%
3	46487 $\pm$ 1655	3.56%	63442 $\pm$ 2103	3.31%
4	20981 $\pm$ 772	3.68%	46509 $\pm$ 2021	4.35%
5	16098 $\pm$ 431	2.68%	24542 $\pm$ 554	2.26%
6	23550 $\pm$ 449	1.91%	37098 $\pm$ 1090	2.94%

[0266] 6、符合性试验

[0267] 采用上述猪塞内卡病毒血清中和试验方法从中国动物疫病预防控制中心(农业农村部兽医诊断中心)保存的猪血清挑选出了90份猪塞内卡病毒抗体阳性血清与90份猪塞内卡病毒抗体阴性血清。对这180份猪血清分别采用本发明TRFIA方法1-3(简称本发明方法1-3)、对照TRFIA方法1-9(简称对照方法1-9)和美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒

进行检测,计算与猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测的符合率。

[0268] 敏感性(真阳性率,阳性符合率):实际有病而按试验标准被正确判断为有病的百分率,敏感性越大越好,理想敏感性为100%。

[0269] 特异性(真阴性率,阴性符合率):实际无病而按试验标准被正确判断为无病的百分率,特异性越大越好,理想特异性为100%。

[0270] 结果表明该180份猪血清,本发明TRFIA方法1与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为96.67%(阳性符合率为97.78%,阴性符合率为5.56%),本发明TRFIA方法2与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为91.11%(阳性符合率为85.56%,阴性符合率为96.67%),本发明TRFIA方法3与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为92.78%(阳性符合率为90%,阴性符合率为95.56%)。本发明对照TRFIA方法1检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为87.22%(阳性符合率为86.67%,阴性符合率为87.78%),本发明对照TRFIA方法2检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为79.44%(阳性符合率为81.11%,阴性符合率为77.78%),本发明对照TRFIA方法3检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为78.33%(阳性符合率为82.22%,阴性符合率为74.44%),本发明对照TRFIA方法4检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为76.11%(阳性符合率为82.22%,阴性符合率为70%),本发明对照TRFIA方法5检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为81.67%(阳性符合率为82.22%,阴性符合率为81.11%),本发明对照TRFIA方法6检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为83.33%(阳性符合率为90%,阴性符合率为76.67%),本发明对照TRFIA方法7检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为77.78%(阳性符合率为81.11%,阴性符合率为74.44%),本发明对照TRFIA方法8检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为80.56%(阳性符合率为95.56%,阴性符合率为65.56%),本发明对照TRFIA方法9检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为79.44%(阳性符合率为90.67%,阴性符合率为62.22%)。美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒检测结果与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率为75%(阳性符合率为97.78%,阴性符合率为52.22%)(表11-表23)。

[0271] 说明分别将BSA-eVP1-1+BSA-eVP2-1、BSA-eVP1-1和BSA-eVP2-1作为包被抗原制备的诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒与猪塞内卡病毒血清中和试验方法的总符合率显著高于分别以BSA-eVP1-2、BSA-eVP1-3、BSA-eVP1-4、BSA-eVP2-2、BSA-eVP2-3、BSA-eVP2-4、BSA-eVP2-5、塞内卡病毒的全长VP1蛋白和塞内卡病毒的全长VP2蛋白作为包被抗原制备的诊断塞内卡病毒病的时间分辨荧光免疫分析试剂盒或检测塞内卡病毒抗体的时间分辨荧光免疫分析试剂盒,也高于美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒。

[0272] 表11. 本发明TRFIA方法1对猪血清样品检测结果

[0273]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
本发明 TRFIA 方法 1 检测结果	阳性	88	4	92
	阴性	2	86	88
	合计	90	90	180
	阳性符合率=88/90=97.78%，阴性符合率=86/90=95.56%，总符合率=（88+86）/180×100%=96.67%			

[0274] 表12. 本发明TRFIA方法2对猪血清样品检测结果

[0275]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
本发明 TRFIA 方法 2 检测结果	阳性	77	3	80
	阴性	13	87	100
	合计	90	90	180
	阳性符合率=77/90=85.56%，阴性符合率=87/90=96.67%，总符合率=（77+87）/180×100%=91.11%			

[0276] 表13. 本发明TRFIA方法3对猪血清样品检测结果

[0277]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
本发明 TRFIA 方法 3 检测结果	阳性	81	4	85
	阴性	9	86	95
	合计	90	90	180
	阳性符合率=81/90=90%，阴性符合率=86/90=95.56%，总符合率=（81+86）/180×100%=92.78%			

[0278] 表14. 对照TRFIA方法1对猪血清样品检测结果

[0279]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 1 检测结果	阳性	78	11	89
	阴性	12	79	91
	合计	90	90	180
	阳性符合率=78/90=86.67%，阴性符合率=79/90=87.78%，总符合率=（78+79）/180×100%=87.22%			

[0280] 表15. 对照TRFIA方法2对猪血清样品检测结果

[0281]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
--	--	--------------------	--	--

[0282]

		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 2 检测结果	阳性	73	20	93
	阴性	17	70	87
	合计	90	90	180
	阳性符合率=73/90=81.11%，阴性符合率=70/90=77.78%，总符合率= (73+70) /180×100%=79.44%			

[0283] 表16. 对照TRFIA方法3对猪血清样品检测结果

[0284]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 3 检测结果	阳性	74	23	97
	阴性	16	67	83
	合计	90	90	180
	阳性符合率=74/90=82.22%，阴性符合率=67/90=74.44%，总符合率= (74+67) /180×100%=78.33%			

[0285] 表17. 对照TRFIA方法4对猪血清样品检测结果

[0286]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 4 检测结果	阳性	74	27	101
	阴性	16	63	79
	合计	90	90	180
	阳性符合率=74/90=82.22%，阴性符合率=63/90=70%，总符合率= (74+63) /180×100%=76.11%			

[0287] 表18. 对照TRFIA方法5对猪血清样品检测结果

[0288]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 5 检测结果	阳性	74	17	91
	阴性	16	73	89
	合计	90	90	180
	阳性符合率=74/90=82.22%，阴性符合率=73/90=81.11%，总符合率= (74+73) /180×100%=81.67%			

[0289] 表19. 对照TRFIA方法6对猪血清样品检测结果

[0290]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 6 检测结果	阳性	81	21	102
	阴性	9	69	78
	合计	90	90	180
	阳性符合率=81/90=90%，阴性符合率=69/90=76.67%，总符合率=			

[0291]

	$(81+69) / 180 \times 100\% = 83.33\%$
--	--

[0292] 表20.对照TRFIA方法7对猪血清样品检测结果

[0293]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 7 检测结果	阳性	73	23	96
	阴性	17	67	84
	合计	90	90	180
	阳性符合率=73/90=81.11%，阴性符合率=67/90=74.44%，总符合率= $(73+67) / 180 \times 100\% = 77.78\%$			

[0294] 表21.对照TRFIA方法8对猪血清样品检测结果

[0295]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 8 检测结果	阳性	86	31	117
	阴性	4	59	63
	合计	90	90	180
	阳性符合率=86/90=95.56%，阴性符合率=59/90=65.56%，总符合率= $(86+59) / 180 \times 100\% = 80.56\%$			

[0296] 表22.对照TRFIA方法9对猪血清样品检测结果

[0297]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
对照 TRFIA 方法 9 检测结果	阳性	87	34	121
	阴性	3	56	59
	合计	90	90	180
	阳性符合率=87/90=96.67%，阴性符合率=56/90=62.22%，总符合率= $(87+56) / 180 \times 100\% = 79.44\%$			

[0298] 表23.美国Biostone猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒对猪血清样品检测结果

[0299]

		猪塞内卡病毒血清中和试验方法检测结果		
		阳性	阴性	合计
美国 Biostone 猪塞内卡病毒抗体检测试剂盒检测结果	阳性	88	43	131
	阴性	2	47	49
	合计	90	90	180
	阳性符合率=88/90=97.78%，阴性符合率=47/90=52.22%，总符合率=（88+47）/180×100%=75%			

[0300] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说，在不脱离本发明的宗旨和范围，以及无需进行不必要的实验情况下，可在等同参数、浓度和条件下，在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例，应该理解为，可以对本发明作进一步的改进。总之，按本发明的原理，本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进，包括脱离了本申请中已公开范围，而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围，可以进行一些基本特征的应用。

<110> 中国动物疫病预防控制中心(农业农村部屠宰技术中心)

<120> 塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸

<130> GNCFH190887

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Cys Lys Leu Ser Ser Ala Thr Arg Gly Leu Pro Ala His Ala Asp Trp

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Cys Met Ser Asp Asp Tyr Arg Thr Gly Lys Asn Met Pro Phe Gln

1 5 10 15

专利名称(译)	塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸		
公开(公告)号	CN110196325A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910548328.X	申请日	2019-06-24
[标]发明人	孙雨 蒋菲 王传彬 肖颖 宋晓晖 赵晓春 杨林 王睿男 央珍 王美君 白崇生 李硕 刘林青 李晓霞 邹联斌 王文 刘健鹏 扎西卓玛 徐琦 苏晓慧 刘玉良 毕一鸣 马英 亢文华 秦菊 薛文 马晓燕 任娟 李舵 杨天意 孙航		
发明人	孙雨 蒋菲 王传彬 肖颖 宋晓晖 赵晓春 杨林 王睿男 央珍 王美君 白崇生 李硕 刘林青 李晓霞 曾邦权 邹联斌 王文		

肖开提·阿不都克里木
刘健鹏
林汉亮
扎西卓玛
徐琦
苏晓慧
刘玉良
毕一鸣
马英
亢文华
秦菊
薛文
马晓燕
任娟
李舵
杨天意
孙航

IPC分类号 G01N33/569 G01N33/531

CPC分类号 G01N33/531 G01N33/56983

外部链接 [Espacenet](#) [SIPO](#)

摘要(译)

本发明公开了塞内卡病毒病诊断试剂盒及试纸。该试剂盒包括包被抗原，所述包被抗原由eVP1-1偶联物和/或eVP2-1偶联物组成；所述eVP1-1偶联物是由eVP1-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原；所述eVP2-1偶联物是由eVP2-1和载体蛋白偶联得到的完全抗原；所述eVP1-1序列1所示的多肽，所述eVP1-2是序列2所示的多肽。试剂盒特异性高、敏感性高，准确性高，操作简单、快速，适用于基层各级兽医部门和出入境检验检疫局对塞内卡病毒感染血清抗体的快速大量筛选检测。

