



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110542755 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201810526601.4

(22)申请日 2018.05.28

(71)申请人 金宇保灵生物药品有限公司

地址 010000 内蒙古自治区呼和浩特市鄂
尔多斯西街58号

(72)发明人 孔彩平 张燕红 谢雪岑 史琳凯

齐志涛 路荣 范秀丽 郝鹏

魏学峰 杜宇荣 李雪峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的
试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒(SVV)的试剂盒及其检测方法。所述的试剂盒是利用荧光染料或过氧化物酶标记IgG抗体,利用免疫荧光法或免疫过氧化物酶法检测塞尼卡谷病毒的原理制得。本发明试剂盒能够快速、准确检测SVV病毒,应用于实验室快速诊断,而且可对病原进行准确定位,指示各组织器官的感染程度,对研究SVV的致病机理具有重要意义,且制备试剂盒的方法可根据实际生产灵活选择,制成的试剂盒敏感性、稳定性、特异性均能满足检测需要,适合批量生产,以应对突发的疫情。

1. 一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括检测用细胞,检测抗体和标记物标记的IgG抗体;所述检测用细胞为PK-15细胞;所述检测抗体为抗SVV单克隆抗体;所述标记物为荧光染料或过氧化物酶。

2. 根据权利要求1所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒,其特征在于,所述检测抗体优选的为小鼠抗SVV单克隆抗体,所述标记物标记的IgG抗体优选的为标记物标记的羊抗鼠IgG抗体。

3. 根据权利要求1所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒,其特征在于,所述荧光染料优选的为异硫氰酸荧光素,所述过氧化物酶优选的为辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求1~3任意一项所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒,其特征在于,还包括以下试剂:样品稀释液、洗涤液、固定液、阴性对照;

所述样品稀释液为无血清的MEM溶液;

所述洗涤液为磷酸盐缓冲液,pH为7.2~7.6;

所述固定液为80%、-20℃的冷丙酮;

所述阴性对照为不接种SVV的PK-15细胞。

5. 一种如权利要求1~4所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 待检病毒接种及固定;

S2. 抗体孵育及病毒检测。

6. 根据权利要求5所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤S1具体包括:

(1) 传代细胞培养:将长满单层的PK-15细胞,用胰酶消化,加入细胞营养液制成传代细胞悬液,以 $2-4 \times 10^5$ 个/ml的密度铺96孔细胞培养板,每孔100 μ L,置于37℃ 5%CO₂的条件下培养,24h后细胞贴壁铺满孔底;其中,所述细胞营养液为含有10%新生牛血清的MEM培养基;

(2) 病毒接种:将待检病毒经稀释后接种于步骤(1)培养的PK-15细胞单层,添加无血清的MEM溶液至每孔200 μ L,培养24h;同时设不接种SVV的PK-15细胞作为阴性对照;

(3) 洗涤:将细胞培养板从培养箱中取出,弃去96孔细胞培养板维持液,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;

(4) 固定:每孔用100 μ L、-20℃下预冷的固定液固定10-30min,弃去固定液,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;其中,所述固定液优选浓度为60%~80%的丙酮,固定是在2-8℃的低温环境下进行。

7. 根据权利要求5所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤S2具体包括:

(1) 一抗孵育:加入用PBS稀释的SVV单克隆抗体,每孔50 μ L,37℃湿盒孵育45-90min,弃去一抗,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;

(2) 二抗孵育:用PBS稀释荧光染料/过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG二抗,每孔50 μ L,37℃孵育45-90min,弃去二抗,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;

(3) 检测:将96孔板置于荧光倒置显微镜上在暗室中观察,判定结果。

8. 根据权利要求5所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,其

特征在于,所述步骤S2具体包括:

(1) 加入用PBS稀释的荧光染料/过氧化物酶标记的SVV抗体,每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育45-90min,弃去抗体,用PBS洗涤3-5次;

(2) 将96孔板置于倒置显微镜上在暗室中观察,判定结果。

9. 根据权利要求8-9所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述SVV单克隆抗体的稀释倍数为50~400倍,所述羊抗鼠IgG二抗的稀释倍数为50~800倍。

10. 根据权利要求5~9所述的利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,其特征在于,结果观察及判定:置于显微镜下观察显色情况,判定结果。

一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体讲,涉及一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 塞尼卡谷病毒(Seneca Valley virus,SVV)是由微RNA病毒科的A型塞尼卡谷病毒(Senecavirus A,SVA)引起的动物传染病,主要感染猪,不同年龄阶段的猪均易感,但不同毒株的致病力明显不同,引起的临床症状也不尽相同。早期的分离株多导致亚临床感染,近年来的分离株通常引起口蹄疫样的临床症状,病猪口鼻部、蹄部出现水疱、溃疡,新生仔猪病死率达30%~70%。目前,该病主要流行于加拿大、巴西和美国等国家;2015年以来,我国广东和湖北两省某些猪场相继发生SVV疫情。

[0003] 由于SVV可致与口蹄疫、猪水泡病、水泡性口炎、猪水疱疹等类似的水疱性病变,如果未能及时作出准确的鉴别诊断,将导致防控措施采取不当,养殖成本提高。目前国外针对SVV已经开发了相应的实验室检测方法,如电子显微镜、免疫组化、RT-PCR、病毒血清抗体中和试验、竞争ELISA和荧光定量PCR染料法等,但均操作比较复杂,不适合广泛应用于SVV的日常检测。在我国,2016年也首次分离到了SVV。本研究建立了利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒及其检测方法,适合批量生产,能够快速、准确检测SVV病毒,应用于实验室快速诊断,而且可对病原进行准确定位,指示各组织器官的感染程度,对研究SVV的致病机理具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒及其检测方法,该试剂盒能够快速、准确检测SVV病毒,应用于实验室快速诊断,而且可对病原进行鉴定及准确定位,指示各组织器官的感染程度,对研究SVV的致病机理具有重要意义。

[0005] 首先,本发明提供了一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒,所述试剂盒包括检测用细胞,检测抗体和标记物标记的IgG抗体;所述检测用细胞为PK-15细胞;所述检测抗体为抗SVV单克隆抗体;所述标记物为荧光染料或过氧化物酶。

[0006] 所述检测抗体优选的为小鼠抗SVV单克隆抗体,所述标记物标记的IgG抗体优选的为标记物标记的羊抗鼠IgG抗体。

[0007] 所述荧光染料优选的为异硫氰酸荧光素,所述过氧化物酶优选的为辣根过氧化物酶。

[0008] 本发明试剂盒还包括以下试剂:样品稀释液、洗涤液、固定液、阳性对照、阴性对照,其中:

[0009] 所述样品稀释液为无血清的MEM溶液;

[0010] 所述洗涤液为磷酸盐缓冲液,pH为7.2~7.6;

[0011] 所述固定液为80%、-20℃的冷丙酮；

[0012] 所述阴性对照为不接种SVV的PK-15细胞。

[0013] 作为检测试剂盒,细胞、检测抗体和酶标抗体是其核心成分,只要有这三种成分就能实现基本的抗原-抗体结合反应。至于辅助成分,比如样品稀释液、洗涤液、酶底物溶液、终止液、阳性对照和阴性对照,可以与上述三种成分配套组装在一个检测试剂盒中,也可以单独提供,因此本发明中检测试剂盒可以包括这些辅助成分,也可以不包括,本发明优选包括这些辅助成分,以方便使用。

[0014] 本发明中,检测抗体可以是来源于小鼠、大鼠、兔等哺乳动物的抗SVV的单克隆抗体,优选的为小鼠抗SVV单克隆抗体。

[0015] 本发明中,对二抗动物来源不作特别限定,具体根据所使用的单克隆抗体的来源确定。本发明优选标记物标记的羊抗鼠抗体。

[0016] 本发明中,所述标记物标二抗中的标记物可以是荧光染料,也可以是过氧化物酶,本发明所述荧光染料优选的为异硫氰酸荧光素,所述过氧化物酶优选的为辣根过氧化物酶。

[0017] 当标记物为辣根过氧化物酶时,可选择的在本发明试剂盒中加入过氧化物酶底物显色液。

[0018] 本发明还提供了一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0019] S1.待检病毒接种及固定;

[0020] S2.抗体孵育及病毒检测。

[0021] 利用该发明制备的试剂盒检测SVV抗原,具体步骤如下:

[0022] S1.待检病毒接种及固定

[0023] (1)传代细胞培养:将长满单层的PK-15细胞,用胰酶消化,加入细胞营养液制成传代细胞悬液,以 $2-4 \times 10^5$ 个/ml的密度铺96孔细胞培养板,每孔100 μ L,置于37℃5%CO₂的条件下培养,24h后细胞贴壁铺满孔底;其中,所述细胞营养液为含有10%新生牛血清的MEM培养基;

[0024] (2)病毒接种:将待检病毒经适当倍数稀释后接种于步骤(1)培养的PK-15细胞单层,添加无血清的MEM溶液至每孔200 μ L,培养24h;同时设不接种SVV的PK-15细胞作为阴性对照;

[0025] (3)洗涤:将细胞培养板从培养箱中取出,弃去96孔细胞培养板维持液,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;

[0026] (4)固定:每孔用100 μ L、-20℃下预冷的固定液固定10-30min,弃去丙酮溶液,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;其中,所述固定液优选浓度为60%~80%的丙酮,固定是在2-8℃的低温环境下进行。

[0027] S2.抗体孵育及病毒检测

[0028] (1)一抗孵育:加入用PBS稀释的SVV单克隆抗体,每孔50 μ L,37℃湿盒孵育45-90min,弃去一抗,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;

[0029] (2)二抗孵育:用PBS稀释FITC/过氧化物酶标记羊抗鼠IgG二抗,每孔50 μ L,37℃孵育45-90min,弃去二抗,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min;

[0030] (3) 检测:将96孔板置于倒置显微镜上在暗室中观察,判定结果。

[0031] 其中,所述SVV单克隆抗体的稀释倍数为50~400倍,所述羊抗鼠IgG二抗的稀释倍数为50~800倍。

[0032] 本发明也可以将SVV一抗进行荧光染料或过氧化物酶标记,采用直接免疫荧光法或直接免疫过氧化物酶法检测SVV病毒,S2具体步骤为:

[0033] (1) 加入用PBS稀释的标记物标记的SVV抗体,每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育45-90min,弃去抗体,用PBS洗涤3-5次;

[0034] (2) 将96孔板置于倒置显微镜上在暗室中观察,判定结果。

[0035] 本发明的结果观察及判定:置于显微镜下观察变色情况,判定结果。免疫荧光判定标准为:阴性对照、空白对照无特异性绿色荧光,阳性细胞的细胞质内有特异性亮绿色荧光。免疫过氧化物酶方法判定标准为:阴性对照、空白对照无特异性红色着染,阳性细胞的细胞质内有特异性红色着染。

[0036] 本发明的有益效果为:本发明的试剂盒能够快速、准确检测SVV病毒,应用于实验室快速诊断,而且可对病原进行鉴定及准确定位,指示各组织器官的感染程度,对研究SVV的致病机理具有重要意义;制备试剂盒的方法可根据实际生产灵活选择,制成的试剂盒均能满足检测需要,适合批量生产,以应对突发的疫情。

附图说明

[0037] 图1为实施例1检测阴性对照图;

[0038] 图2为实施例1检测阳性对照图;

[0039] 图3为实施例2检测阴性对照图;

[0040] 图4为实施例2检测阳性对照图;

[0041] 图5为实施例3检测阴性对照图;

[0042] 图6为实施例3检测阳性对照图;

[0043] 图7为实施例4检测阴性对照图;

[0044] 图8为实施例4检测阳性对照图。

具体实施方式:

[0045] 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,任何不违反法律和道德伦理能够获取的生物材料都可以按照实施例中的提示替换使用。

[0046] 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。

[0047] 实施例1:SVV检测试剂盒及其检测方法(间接免疫荧光法)

[0048] SVV检测试剂盒包括:PK-15细胞,SVV单克隆抗体,96孔细胞培养板,FITC荧光标记IgG抗体(羊抗鼠);具体检测方法为:

[0049] 1. 待检病毒接种及固定:

[0050] (1) 传代细胞培养:将长满单层的PK-15细胞,用胰酶消化,加入细胞营养液制成传

代细胞悬液,以 3×10^5 个/ml的密度铺96孔细胞培养板,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂的条件下培养,24h后细胞贴壁铺满孔底;

[0051] (2) 病毒接种:将待检病毒经适当倍数稀释后接种于步骤(1)培养的PK-15细胞单层中,添加无血清的细胞培养液至每孔200 μ L,培养24h;同时设不接种SVV的PK-15细胞作为阴性对照;

[0052] (3) 洗涤:将细胞培养板从培养箱中取出,弃去96孔细胞培养板维持液,用PBS洗涤3次,每次5min;

[0053] (4) 固定:每孔用100 μ L、-20 $^{\circ}$ C下预冷的80%丙酮固定30min,弃去丙酮溶液,用PBS洗涤3次,每次5min。

[0054] 2. 检测抗体:

[0055] SVV单克隆抗体和酶标二抗可通过技术服务外包获得或商购,也可通过本领域常规方法制备,制备已知抗原的抗体的方法是本领域公知的;本发明中使用的鼠抗SVV单克隆抗体为实验室自制。

[0056] 3. 抗体孵育及病毒检测

[0057] (1) 加入用PBS稀释的SVV单克隆抗体(一抗,实验室自制),每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C湿盒孵育60min,弃去一抗,用PBS洗涤3次,每次4-6min;

[0058] (2) 用PBS稀释FITC标记羊抗鼠IgG二抗(二抗,购自Sigma),每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育60min,弃去二抗,用PBS洗涤2-3次,每次4-6min。

[0059] 试剂盒其它溶液配制:

[0060] ①样品稀释液:无血清的MEM溶液;

[0061] ②洗涤液:磷酸盐缓冲液,pH为7.2~7.6;

[0062] ③固定液:80%、-20 $^{\circ}$ C的冷丙酮;

[0063] ④阴性对照:不接种SVV的PK-15细胞;

[0064] ⑤阳性对照:SVV病毒液。

[0065] 检测阴性对照图如图1所示,检测阳性对照图如图2所示。

[0066] 实施例2:SVV检测试剂盒及其检测方法(间接免疫过氧化物酶法)

[0067] SVV检测试剂盒包括:PK-15细胞,SVV单克隆抗体,96孔细胞培养板,HRP标记IgG抗体;具体检测方法为:

[0068] 1. 待检病毒接种及固定

[0069] (1) 传代细胞培养:将长满单层的PK-15细胞,用胰酶消化,加入细胞营养液制成传代细胞悬液,以 3×10^5 个/ml的密度铺96孔细胞培养板,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂的条件下培养,24h后细胞贴壁铺满孔底;

[0070] (2) 病毒接种:将待检病毒经适当倍数稀释后接种于步骤(1)培养的PK-15细胞单层,添加无血清的细胞培养液至每孔200 μ L,培养24h;同时设不接种SVV的PK-15细胞作为阴性对照;

[0071] (3) 洗涤:将细胞培养板从培养箱中取出,弃去96孔细胞培养板维持液,用PBS洗涤3次,每次5min;

[0072] (4) 固定:每孔用100 μ L、-20 $^{\circ}$ C下预冷的80%的丙酮固定30min,弃去丙酮溶液,用PBS洗涤3次,每次5min。

[0073] 2. 检测抗体:

[0074] SVV单克隆抗体抗体和酶标二抗可通过技术服务外包获得或商购,也可通过本领域常规方法制备,制备已知抗原的抗体的方法是本领域公知的;本发明中使用的鼠抗SVV单克隆抗体为实验室自制。

[0075] 3. 过氧化物酶标记二抗

[0076] (1) 每孔加入100 μ L 0.1%过氧化氢溶液,室温作用20min;

[0077] (2) 加入用PBS稀释100倍的SVV单抗(一抗,实验室自制),每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃去一抗,用PBS洗涤3-5次;

[0078] (3) 加入用PBS稀释300倍用HRP标记的羊抗鼠IgG(二抗,购自Abeam),每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃去二抗,用PBS洗涤3-5次;

[0079] (4) 加入显色液(购自美国Vector公司)室温显色15min,弃去显色液,PBS洗涤。

[0080] 试剂盒其它溶液配制:

[0081] ①样品稀释液:无血清的MEM溶液;

[0082] ②洗涤液:磷酸盐缓冲液,pH为7.2~7.4;

[0083] ③固定液:80%、-20 $^{\circ}$ C的冷丙酮;

[0084] ④过氧化物酶底物显色液;

[0085] ⑤阴性对照:不接种SVV的PK-15细胞;

[0086] ⑥阳性对照:SVV病毒液。

[0087] 检测阴性对照图如图3所示,检测阳性对照图如图4所示。

[0088] 实施例3:SVV检测试剂盒及其检测方法(直接免疫荧光法)

[0089] SVV检测试剂盒包括:PK-15细胞,FITC标记的SVV单克隆抗体,96孔细胞培养板;具体检测方法为:

[0090] (1) PK-15细胞的培养:PK-15细胞在细胞培养瓶中培养,生长液为含有10%牛血清的MEM培养基,在37 $^{\circ}$ C 5%CO₂的恒温培养箱中培养,2天传代1次,长满单层PK-15细胞。用胰酶消化后,加入生长液制成细胞悬液以 3×10^5 个/ml的密度接种于96孔板,每孔100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂的条件下培养,24h后细胞贴壁铺满孔底;

[0091] (2) 待检样品的接种:用步骤1培养的PK-15细胞接种SVV,添加无血清的MEM溶液至每孔200 μ L,培养24h,同时设不接种SVV的PK-15细胞作为阴性对照;

[0092] (3) 将细胞培养板从培养箱中取出,弃去培养孔内的液体,用PBS洗涤3次;

[0093] (4) 每孔加入100 μ L 80%、-20 $^{\circ}$ C冷丙酮4 $^{\circ}$ C固定30min,弃去丙酮溶液,用PBS洗涤3次;

[0094] (5) 加入用PBS稀释300倍FITC标记的SVV荧光抗体(实验室自制),每孔50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃去荧光抗体,用PBS洗涤3-5次。

[0095] 试剂盒其它溶液配制:

[0096] ①样品稀释液:无血清的MEM溶液;

[0097] ②洗涤液:磷酸盐缓冲液,pH为7.2~7.6;

[0098] ③固定液:80%、-20 $^{\circ}$ C的冷丙酮;

[0099] ④阴性对照:不接种SVV的PK-15细胞;

[0100] ⑤阳性对照:SVV病毒液。

[0101] 检测阴性对照图如图5所示,检测阳性对照图如图6所示。

[0102] 实施例4:SVV检测试剂盒及其检测方法(直接免疫过氧化物酶法)

[0103] SVV检测试剂盒包括:PK-15细胞,HRP标记的SVV单克隆抗体,96孔细胞培养板;具体检测方法为:

[0104] (1) PK-15细胞的培养:PK-15细胞在细胞培养瓶中培养,生长液为含有10%牛血清的MEM培养基,在37℃5%CO₂的恒温培养箱中培养,2天传代1次,长满单层PK-15细胞。用胰酶消化后,加入生长液制成细胞悬液以 3×10^5 个/ml的密度接种于96孔板,每孔100μL,置于37℃5%CO₂的条件下培养,24h后细胞贴壁铺满孔底;

[0105] (2) 待检样品的接种:用步骤1培养的PK-15细胞接种SVV,添加无血清的MEM溶液至每孔200μL,培养24h,同时设不接种SVV的PK-15细胞作为阴性对照;

[0106] (3) 将细胞培养板从培养箱中取出,弃去培养孔内的液体,用PBS洗涤3次;

[0107] (4) 每孔加入100μL 80%、-20℃冷丙酮4℃固定30min,弃去丙酮溶液,用PBS洗涤3次;

[0108] (5) 每孔加入100μL 0.1%过氧化氢溶液,室温作用20min;

[0109] (6) 加入用PBS稀释300倍HRP标记的SVV单克隆抗体(实验室自制),每孔50μL,37℃孵育1h,弃去抗体,用PBS洗涤3-5次。

[0110] 试剂盒其它溶液配制:

[0111] ①样品稀释液:无血清的MEM溶液;

[0112] ②洗涤液:磷酸盐缓冲液,pH为7.2~7.6;

[0113] ③固定液:80%、-20℃的冷丙酮;

[0114] ④过氧化物酶底物显色液;

[0115] ⑤阴性对照:不接种SVV的PK-15细胞;

[0116] ⑥阳性对照:SVV病毒液。

[0117] 检测阴性对照图如图7所示,检测阳性对照图如图8所示。

[0118] 实施例5:特异性试验

[0119] 用上述实施例1-4的试剂盒对猪伪狂犬病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、口蹄疫病毒(FMDV)、猪圆环病毒(PCV)及塞尼卡谷病毒(SVV)阳性样本进行检测,实验结果见表1。

[0120] 表1特异性试验结果

试剂	病原名称				
	PRV	CSFV	FMDV	PCV	SVV
[0121] 间接免疫荧光试剂盒	-	-	-	-	+
间接免疫过氧化物酶试剂盒	-	-	-	-	+
直接免疫荧光试剂盒	-	-	-	-	+
直接免疫过氧化物酶试剂盒	-	-	-	-	+

[0122] 从上表可以看出所述四种试剂盒和检测方法对猪伪狂犬病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、口蹄疫病毒(FMDV)、猪圆环病毒(PCV)阳性样本检测结果均为阴性,对塞尼卡谷病

毒 (SVV) 阳性样本检测结果为阳性,说明特异性良好,与猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV)、口蹄疫病毒 (FMDV)、猪圆环病毒 (PCV) 不存在交叉反应。

[0123] 实施例6:敏感性和稳定性试验

[0124] 1. 敏感性试验:将已知TCID₅₀的SVV细胞毒,进行10倍系列稀释,取1TCID₅₀、10TCID₅₀、100TCID₅₀、10³TCID₅₀、10⁴TCID₅₀、10⁵TCID₅₀细胞毒分别接种于长满单层的PK-15细胞,每个稀释度接种4孔,培养24h,用上述实施例1-4的试剂盒分别进行检测,结果如下:

[0125] 表2敏感性试验结果

[0126]

试剂	接毒量						敏感性
	1TCID ₅₀	10TCID ₅₀	100TCID ₅₀	10 ³ TCID ₅₀	10 ⁴ TCID ₅₀	10 ⁵ TCID ₅₀	
SVV 间接免疫荧光试剂盒	---	+++	++++	++++	++++	++++	10TCID ₅₀
SVV 间接免疫过氧化物酶试剂盒	---	++++	++++	++++	++++	++++	10TCID ₅₀
SVV 直接免疫荧光试剂盒	---	---	+++	++++	++++	++++	100TCID ₅₀

[0127]

SVV 直接免疫过氧化物酶试剂盒	---	---	++++	++++	++++	++++	100TCID ₅₀
------------------	-----	-----	------	------	------	------	-----------------------

[0128] 从上表可以看出,SVV间接免疫荧光试剂盒和间接免疫过氧化物酶试剂盒最低能够检测到10TCID₅₀的SVV抗原,SVV直接免疫荧光试剂盒和直接免疫过氧化物酶试剂盒最低能够检测到100TCID₅₀的SVV抗原,说明间接免疫标记试剂盒敏感性稍优于直接免疫标记试剂盒,但均达到检测要求。

[0129] 2. 稳定性试验:将同一样品利用上述实施例1-4的试剂盒在不同时间进行3次检测,每次检测10份样品,验证结果稳定性。试验结果如下表:

[0130] 表3稳定性试验结果

[0131]

试剂盒名称	试验 批次	样品编号										重复率
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SVV间接免疫 荧光试剂盒	1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	95%
	2	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	
	3	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
SVV 间接免疫 过氧化物酶试 剂盒	1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	95%
	2	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
	3	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
SVV直接免疫 荧光试剂盒	1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	90%
	2	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
	3	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	
SVV直接免疫 过氧化物酶试 剂盒	1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	85%
	2	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	
	3	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	

[0132] 从上表可以看出,实施例1~4的试剂盒3次检测结果重复率均在85%以上,试剂盒结果稳定性较好。

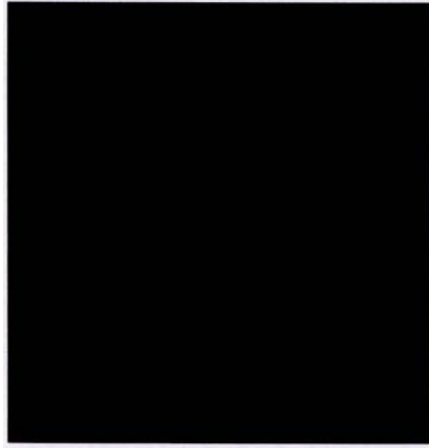


图1

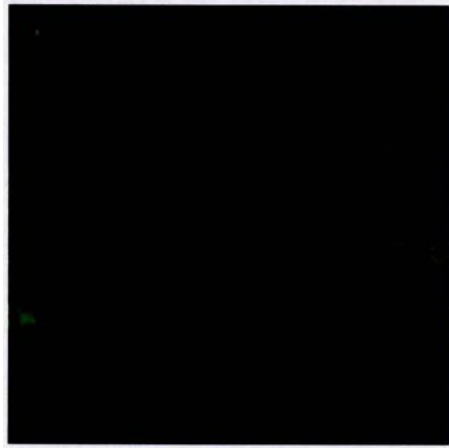


图2



图3

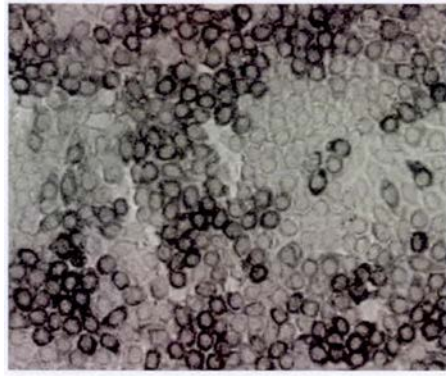


图4

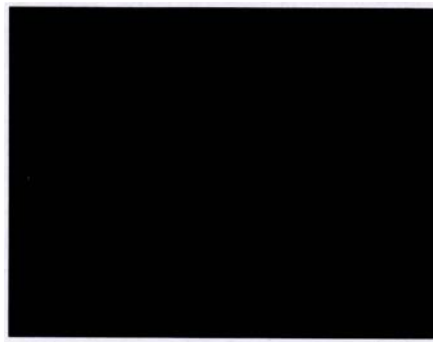


图5

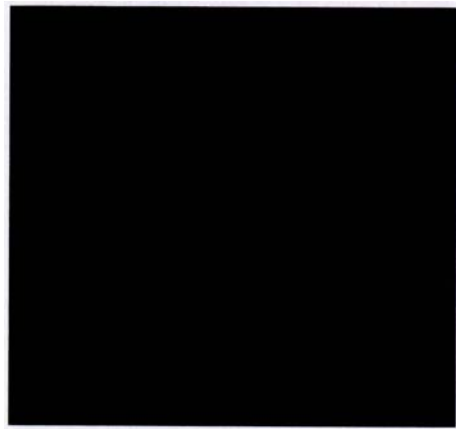


图6

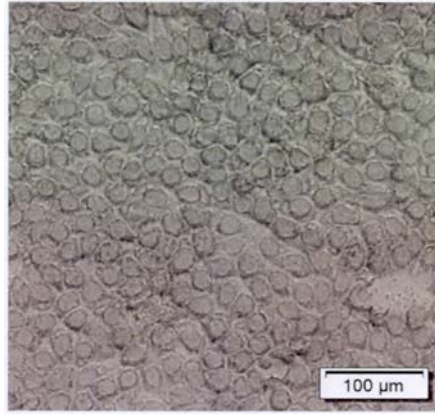


图7

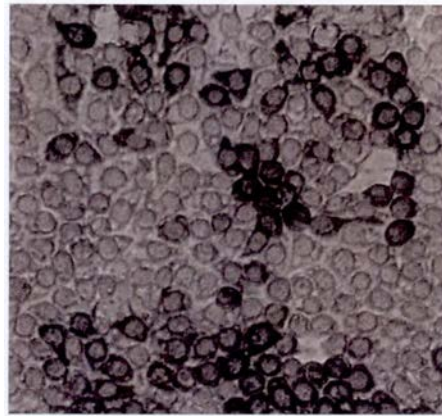


图8

专利名称(译)	一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN110542755A	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN201810526601.4	申请日	2018-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	金宇保灵生物药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	金宇保灵生物药品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	金宇保灵生物药品有限公司		
[标]发明人	孔彩平 张燕红 谢雪岑 齐志涛 路荣 范秀丽 郝鹏 魏学峰 杜宇荣 李雪峰		
发明人	孔彩平 张燕红 谢雪岑 史琳凯 齐志涛 路荣 范秀丽 郝鹏 魏学峰 杜宇荣 李雪峰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/536 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/536 G01N33/56983		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种利用免疫标记法检测塞尼卡谷病毒(SVV)的试剂盒及其检测方法。所述的试剂盒是利用荧光染料或过氧化物酶标记IgG抗体，利用免疫荧光法或免疫过氧化物酶法检测塞尼卡谷病毒的原理制得。本发明试剂盒能够快速、准确检测SVV病毒，应用于实验室快速诊断，而且可对病原进行准确定位，指示各组织器官的感染程度，对研究SVV的致病机理具有重要意义，且制备试剂盒的方法可根据实际生产灵活选择，制成的试剂盒敏感性、稳定性、特异性均能满足检测需要，适合批量生产，以应对突发的疫情。

试剂	病原名称				
	PRV	CSFV	FMDV	PCV	SVV
间接免疫荧光试剂盒	-	-	-	-	+
间接免疫过氧化物酶试剂盒	-	-	-	-	+
直接免疫荧光试剂盒	-	-	-	-	+
直接免疫过氧化物酶试剂盒	-	-	-	-	+