



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568178 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910878461.1

(22)申请日 2019.09.18

(71)申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术
开发区荣华南路11号

(72)发明人 杨宇 聂聪 侯宝翠 王静

(74)专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限
公司 11429

代理人 杨永莉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

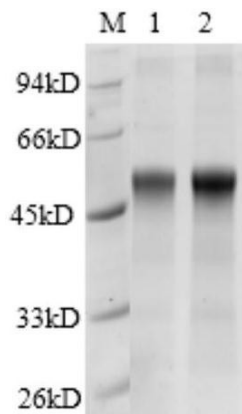
权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫
层析试剂中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种寨卡病毒NS1抗原及其在制
备荧光免疫层析试剂中的应用,寨卡病毒NS1抗
原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。制备的荧
光免疫层析试剂为检测寨卡病毒抗体的荧光免
疫层析试剂,其包括由样品垫、标记物垫、包被
垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡,所述标记物
垫为包被有荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆
抗体的玻璃纤维,所述包被垫为包被有羊抗兔鼠
IgG的抗体作为质控线和包被有寨卡病毒NS1抗
原的检测线的硝酸纤维素膜。本发明提供的寨卡
病毒NS1抗原,具有较好的表达效果,用于制备的
检测寨卡病毒IgG抗体的荧光免疫层析试剂,可
用紫外线照射后,肉眼观察检测结果。



1. 一种寨卡病毒NS1抗原,其特征在于,所述寨卡病毒NS1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 如权利要求1所述的寨卡病毒NS1抗原,其特征在于,编码所述寨卡病毒NS1抗原的基因序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求1所述的寨卡病毒NS1抗原在制备荧光免疫层析试剂中的应用。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,所述荧光免疫层析试剂为检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂,其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡,所述标记物垫为包被有荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻璃纤维,所述包被垫为包被有羊抗兔鼠IgG的抗体作为质控线和包被有寨卡病毒NS1抗原的检测线的硝酸纤维素膜。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂由如下方法制备:

S1、利用寨卡病毒NS1蛋白的基因序列如SEQ ID NO.2所示,制备寨卡病毒抗原;

S2、标记物垫的制备:将荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体,包被在玻璃纤维上,37°C干燥,;

S3、硝酸纤维素膜上设有质控线和检测线,质控线上包被有羊抗鼠IgG的抗体,检测线上包被有寨卡病毒NS1蛋白,获得包被垫;

S4、将样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡组成,按包被垫靠近质控线的一端覆盖上吸收垫,靠近检测线的另一端覆盖标记物垫进行贴条。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,在步骤S2中,所述荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的过程为:将荧光乳胶微球用0.15~0.3mol/LPBS洗涤后,重悬;加入N-羧基琥珀酰亚胺溶液和N-羧基琥珀酰亚胺溶液,震荡混匀,避光反应15~30分钟;之后加入鼠抗人IgG单克隆抗体。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液的浓度为8mg/mL,所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液为5mg/mL,所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液:所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液:荧光微球溶液的体积比为2:5:2。

8. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,避光反应后的溶液经离心、弃上清后,加入标记缓冲液复溶,再加入鼠抗人IgG单克隆抗体反应,之后离心、弃上清后,标记稀释液复溶;获得荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,所述标记缓冲液的配方为:碳酸钠4.1g、碳酸氢钠2.53g,1000mL水;所述标记稀释液的配方为:柠檬酸三钠6.48g、柠檬酸3.22g、氢氧化钠1.3g,1000mL水。

10. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,在步骤S2中,荧光微球标记抗体在玻璃纤维上的包被浓度为0.85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ~1.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;在步骤S3中,所述羊抗鼠IgG的抗体的浓度为1.3~1.7mg/mL,所述寨卡病毒NS1蛋白的浓度为2.0~2.4mg/mL。

一种寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫层析试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫层析试剂中的应用，属于医学免疫学中荧光免疫层析技术领域。

背景技术

[0002] 人感染寨卡病毒(Zika Virus)后,会有1/4-1/5的感染者会发病,其临床特征轻微多为流感样表现,主要为发热、关节痛、皮疹或结膜炎,持续数天到一周会痊愈,但也有部分患者会出现格林-巴利综合征,对孕妇威胁极大,导致胎儿流产、新生儿小头畸形甚至死亡。寨卡病毒病亟需要预防和防控。

[0003] 寨卡病毒感染后,其症状轻微,约有80%的寨卡病毒感染者不会出现任何症状,这给临床诊断及寨卡病毒的防控造成很大干扰。寨卡病毒感染的实验室诊断方法包括血清或血浆分离病毒、检测病毒核酸或病毒特异性IgM抗体及中和抗体。血清或血浆分离病毒耗时耗力,检测时间长,检测病毒核酸主要是检测病毒RNA,目前的研究表明,寨卡病毒的潜伏期为3-12天,而在感染症状出现的前两天出现后11天内均可在感染者血清中检测出病毒,但采用核酸检测易污染,检测结果不准确。而传统的血清学检测方法是寨卡病毒检测的主要方法,在感染症状出现约3天后,在血清中可检测出寨卡病毒特异性抗体,目前大多采用的是酶联免疫吸附测定方法来检测寨卡病毒抗体。但酶联免疫吸附测定方法需要专门的检测仪器,检测时间长,且检测灵敏度不高,检测所用的抗原特异性不强,用于免疫学检测时,有假阳性检测结果的弊端。目前的寨卡病毒抗原制备的方法,其表达量不高,主要是由于寨卡病毒抗原的氨基酸翻译的密码子不适用。

发明内容

[0004] (一)要解决的技术问题

[0005] 为了解决现有技术的上述问题,本发明提供一种寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫层析试剂中的应用,利用寨卡病毒NS1抗原制备的检测试剂具有较强的特异性,有效避免假阳性。

[0006] (二)技术方案

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用的主要技术方案包括:

[0008] 一种寨卡病毒NS1抗原,所述寨卡病毒NS1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0009] 如上所述的寨卡病毒NS1抗原,优选地,编码所述寨卡病毒NS1抗原的基因序列如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 如上所述的寨卡病毒NS1抗原在制备荧光免疫层析试剂中的应用。

[0011] 进一步地,所述荧光免疫层析试剂为检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂,其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡,所述标记物垫为包被有荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻璃纤维,所述包被垫为包被有羊抗兔鼠IgG的

抗体作为质控线和包被有寨卡病毒NS1抗原的检测线的硝酸纤维素膜。

[0012] 如上所述的应用,优选地,所述检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂由如下方法制备:

[0013] S1、利用寨卡病毒NS1蛋白的基因序列如SEQ ID NO.2所示,制备寨卡病毒抗原;

[0014] S2、标记物垫的制备:将荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体,包被在玻璃纤维上,37℃干燥,;

[0015] S3、硝酸纤维素膜上设有质控线和检测线,质控线上包被有羊抗鼠IgG的抗体,检测线上包被有寨卡病毒NS1蛋白,获得包被垫;

[0016] S4、将样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡组成,按包被垫靠近质控线的一端覆盖上吸收垫,靠近检测线的另一端覆盖标记物垫进行贴条。

[0017] 如上所述的应用,优选地,在步骤S2中,所述荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的过程为:将荧光乳胶微球用0.15~0.3mol/LPBS洗涤后,重悬;加入N-羧基琥珀酰亚胺溶液和N-羧基琥珀酰亚胺溶液,震荡混匀,避光反应15~30分钟;之后加入鼠抗人IgG单克隆抗体。

[0018] 如上所述的应用,优选地,所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液的浓度为8mg/mL,所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液为5mg/mL,所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液:所述N-羧基琥珀酰亚胺溶液:荧光微球溶液的体积比为2:5:2。

[0019] 如上所述的应用,优选地,避光反应后的溶液经离心、弃上清后,加入标记缓冲液复溶,再加入鼠抗人IgG单克隆抗体反应,之后离心、弃上清后,标记稀释液复溶;获得荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体。

[0020] 如上所述的应用,优选地,所述标记缓冲液的配方为:碳酸钠4.1g、碳酸氢钠2.53g,1000mL水;所述标记稀释液的配方为:柠檬酸三钠6.48g、柠檬酸3.22g、氢氧化钠1.3g,1000mL水。

[0021] 如上所述的应用,优选地,在步骤S2中,荧光微球标记抗体在玻璃纤维上的包被浓度为 $0.85\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 1.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0022] 如上所述的应用,优选地,在步骤S3中,所述羊抗鼠IgG的抗体的浓度为1.3~1.7mg/mL,所述寨卡病毒NS1蛋白的浓度为2.0~2.4mg/mL。

[0023] (三)有益效果

[0024] 本发明的有益效果是:

[0025] 本发明提供的寨卡病毒NS1抗原,具有较好的表达效果,用于制备的检测寨卡病毒Ig G抗体的荧光免疫层析试剂,可用紫外线照射后,肉眼观察检测结果。利用荧光免疫层析试剂进行检测的操作简单、耗时短,检测结果准确可靠。

[0026] 本发明提供的检测寨卡病毒Ig G抗体的荧光免疫层析试剂,其特异性强,检测灵敏度高,检测结果可用肉眼直接判定,操作简单、方便,且对血清、全血或血浆的检测结果一样,扩大了检测范围。

附图说明

[0027] 图1为诱导表达的蛋白电泳图;

[0028] 图2为纯化后的蛋白电泳图;

- [0029] 图3为检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂的结构示意图；
- [0030] 图4为阳性血清检测结果；
- [0031] 图5为阴性人血清检测结果；
- [0032] 图6为本发明制备的荧光免疫层析试剂与胶体金层析试纸的灵敏度检测对比结果。

具体实施方式

[0033] 为了更好的解释本发明，以便于理解，下面结合附图，通过具体实施方式，对本发明作详细描述。

[0034] 实施例1寨卡病毒E抗原的制备

[0035] 1、重组质粒的构建

[0036] 依据大肠杆菌*Escherichia coli* 0127:H6偏爱密码子对选择寨卡病毒NS1蛋白的基因序列进行改造，并通过生物信息学对重组蛋白二级结构筛选，经试验将编码NS1蛋白的氨基酸的核苷酸序列进行连接入表达载体PGEX-4T-2，获得连接产物即重组质粒，转化于DH5 α 感受态细胞，并看是否能获得相应蛋白。

[0037] 经过大量实验验证后，选择寨卡病毒NS1蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示，其对应的基因序列25条分别，连接入表达载体PGEX-4T-2后，挑选了对应的25个克隆表达，最后选择表达量最大的单克隆，作为优选，其确定的基因序列如SEQ ID NO.2所示，将该基因序列委托上海英俊公司合成，连接入表达载体PGEX-4T-2，获得连接产物即重组质粒，转化于DH5 α 感受态细胞；用PCR扩增引物：pGEX5' :GACGTGGGGTGCTCAGTGGACTTCT，pGEX3' :CGCTGTCACCATTCACCTCACTAAG和EcoRI、XhoI双酶切鉴定重组质粒，筛选阳性克隆送上海英俊公司测序。

[0038] 2、重组蛋白的转化及小量表达

[0039] 将上述步骤1中测序正确的重组质粒，转入到大肠杆菌BL21中，冰上放置30min，42℃热激90s；冰浴2min后，加入800 μ l无抗性的LB培养基；37℃培养45min，5000rpm离心3min，弃大部分上清，留约100-150 μ l，重悬菌体，选择有相应抗性的LB平板，涂板。晾干，于37℃培养箱中倒置培养过夜。从转化的平板挑单克隆到1.5ml LB液体培养基中，37℃，200rpm培养；培养至OD=0.6-0.8，IPTG (0.5mM) 诱导，37℃，200rpm培养2h；取1ml诱导的菌液，12000rpm，离心1min，弃上清，沉淀用50-100 μ l 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液吹散(加入缓冲液的量视菌体量而定)，加入与缓冲液等体积的2 \times loading buffer，100℃煮5min，用浓度为12%的SDS-PAGE进行电泳检测。结果如图1所示，条带1为未诱导NS1蛋白的对照，条带2和3为转化平板上挑取的单克隆。由图可见，条带2和3的单克隆有明显的50KD的目的蛋白表达条带。

[0040] 3、重组蛋白的大量表达

[0041] 取1-2 μ l诱导的菌液到10ml LB液体培养基中，37℃培养，200rpm；将培养的菌液转接到500ml LB液体培养基中，37℃，200rpm，培养至OD=0.6-0.8，IPTG (0.5mM) 37℃诱导4h；收菌：6000rpm，离心5min。弃上清；超声破菌：菌体用20-30ml 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液吹散，超声波破碎 (500W, 60次，每次10s，间隔15s)；电泳确定表达形式：取100 μ l超声后的菌悬液，12000rpm，离心10min，取50 μ l上清至另一EP管，上清去除干净后沉淀用50 μ l 10mM

Tris-HCl (pH 8.0) 溶液吹散。用浓度为12%的SDS-PAGE进行电泳检测。结果如图2所示,条带1为沉淀,条带2位上清,条带3为全菌,M:Marker;结果说明寨卡病毒的NS1抗原蛋白主要以包涵体的形式表达。

[0042] 4、重组蛋白的提取纯化

[0043] (1) 20~30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬超声离心得到的沉淀,静置10min。

[0044] (2) 12000rpm,离心10min,上清转入另一管中保存。

[0045] (3) 20~30ml 10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀,静置10min。

[0046] (4) 12000rpm,离心10min,弃上清。

[0047] (5) 重复(3)、(4)一次。

[0048] (6) 先加入少量的10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液重悬沉淀,再加5~10ml含8M尿素的10mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液溶解蛋白。

[0049] (7) 12000rpm,离心10min,收集上清,取50 μ l电泳。结果如图3所示,条带M:Marker,条带1为纯化后蛋白10倍稀释后的,条带2为纯化后蛋白5倍稀释后的,结果说明,纯化获得目的蛋白寨卡病毒NS1抗原为50KD。

[0050] 实施例2检测寨卡病毒NS1抗体的荧光免疫层析试剂制备

[0051] 1、荧光乳胶微球标记抗体蛋白

[0052] (1) 1.取200 μ L荧光乳胶微球(为带有羧基的微球),加入800 μ L的0.15mol/L PBS,通过12000rpm离心10分钟。吸弃上清,重复离心两次后加入500 μ L 0.2mol/L的PBS重悬待用,取200 μ L8mg/mL的EDC (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液,200 μ L 5mg/mL的NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液。加入上步得到的荧光乳胶微球,震荡混匀,置于反应架上避光反应30分钟获得活化的荧光乳胶微球。

[0053] (2) 上述获得活化的荧光乳胶微球12000rpm离心10min,弃上清液后用标记缓冲液复溶,并且同时加入鼠抗人IgG单克隆抗体(可购Sigma公司)搅拌反应,然后离心,弃上清液,最后用标记稀释液复溶;其中,所述标记缓冲液的配方为:碳酸钠4.1g、碳酸氢钠2.53g,溶于1000mL水中;所述标记稀释液的配方为:柠檬酸三钠6.48g、柠檬酸3.22g、氢氧化钠1.3g,溶于1000mL水中。

[0054] 2、标记物垫制备

[0055] 将1获得的荧光乳胶微球标记抗体,以含1.5%BSA的PBST缓冲液的标记稀释液稀释后,按照荧光微球标记抗体0.9 μ g/cm²喷涂于玻璃纤维之上35 $^{\circ}$ C烘干4小时,PBST缓冲液为加有体积比为0.05%TWEEN-20的PBS。

[0056] 3、包被垫制备

[0057] 硝酸纤维素膜上设有质控线和检测线,质控线上包被有羊抗兔鼠IgG的抗体1.5mg/mL,检测线上包被有寨卡病毒NS1蛋白2.2mg/mL。

[0058] 4、组装

[0059] 剪裁吸收垫,吸收垫可采用吸水纸,将玻璃纤维素膜制成的样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡上,按包被垫(即硝酸纤维素膜)靠近质控线的一端覆盖上吸收垫,靠近检测线的另一端覆盖标记物垫的要求进行贴条,按切条机标准操作规程进行操作,切成4mm \pm 0.1mm宽的检测卡。

[0060] 5、检测

[0061] 检测时在样品垫上加入标准品或待测血样,标准品或待测血样通过虹吸作用流到标记物垫上,抗原就会与标记物混合反应并沿着硝酸纤维素膜层析,分别与检测线和质控线反应。判断结果可用肉眼在紫外线下观察是否有两条条带,如检测线和质控线均显现,则样品为阳性,质控线显现,检测线不显示为阴性。

[0062] 也可采用荧光免疫检测仪YG10进行检测,通过荧光免疫检测仪YG10分别扫描读取T、C信号值;当测试结果有效时,质控线显示一定光强度。这时测试线上的光信号强度与质控线光信号强度的比值(T/C)与样本浓度成正相关。

[0063] 需要检测50份正常人血清,荧光层析试剂分析仪检测收集1000份正常人血清T/C值,计算标准差(Standard Deviation)和平均值(AVERAGE),平均值与3倍SD的和作为阳性判断值,即: $T/C \geq AVERAGE + 3SD$ 为阳性。

[0064] 下面例举检测50个人血清样本,采用荧光免疫检测仪YG1分别扫描读取T/C值,结果如表1所示,即: $T/C \geq 0.05$ 为阳性。

[0065] 表1

样本 编号	T/C	样本 编号	T/C	样本 编号	T/C	样本 编号	T/C	样本 编号	T/C
1	0.019	11	0.045	21	0.035	31	0.025	41	0.005
2	0.016	12	0.012	22	0.022	32	0.013	42	0.011
3	0.040	13	0.036	23	0.016	33	0.026	43	0.016
4	0.038	14	0.029	24	0.021	34	0.024	44	0.019
[0066] 5	0.012	15	0.027	25	0.023	35	0.017	45	0.017
6	0.006	16	0.035	26	0.015	36	0.031	46	0.025
7	0.025	17	0.028	27	0.018	37	0.011	47	0.021
8	0.028	18	0.025	28	0.005	38	0.021	48	0.015
9	0.037	19	0.032	29	0.012	39	0.022	49	0.021
10	0.049	20	0.012	30	0.022	40	0.002	50	0.022
STDEVP 0.010		AVERAG E		0.02					

[0067] 6、验证

[0068] 为了保证检测结果的准确性、有效,一般先将制备好的荧光免疫层析试剂进行验证:将寨卡IgG阳性标本取80 μ L滴加在样品垫上,质控带和检测带8分钟后判断结果,用紫外线照射时,质控带和检测带均出现荧光条带,如图4所示;将样品稀释液(PBS)80 μ L滴加在样品垫上,8分钟后判断结果,用紫外线照射时,仅质控带出现荧光;如图5所示;说明荧光免疫层析试剂合格,可进行寨卡病毒抗体的检测。

[0069] 在进行抗体的检测时,取80 μ L血清样品滴加在样品垫上,若仅质控带出现荧光,结果为阴性,说明待检血清样品中不含有寨卡病毒抗体;若质控带和检测带均出现荧光,结果为阳性,说明待血清检样品中含有寨卡抗体;若两条带都没有荧光或者只有检测带有荧光,则说明此试纸条已经失效,结果无效。

[0070] 实施例3荧光免疫层析试剂的重复性

[0071] 采用实施例2制备的荧光免疫层析试剂分别对在线性范围内检测三个浓度 2×10

×、50× (表示50倍稀释的阳性样本,阳性样本由长春海关检验检疫中心提供),检测同一个浓度时,T浮动明显,C基本保持不变,如图五;将每个浓度检测15次,分别将获得的T、C、T/C的方差与平均值的比值作为变异系数,即(CV),结果发现T、C的信号值的CV \geq 15%T/C的CV \leq 8%,具体如表2,所以T/C对T起到了矫正的作用。利用T/C的拟合曲线计算3个批次检测试纸条的批内和批间浓度的变异系数,批内、批间CV均不大于10%,重复性较好。

[0072] 表2重复性结果

[0073]	样本浓度	CV	C	T	T/C	浓度 ng/mL
	ng/mL	批次	%	%	%	%
	2×	1	13	15	5	7
	10×		12	14	4	6
	50×		13	12	6	8
	2×	2	8	10	7	9
	10×		12	15	5	6
	50×		11	12	7	9
	2×	3	12	14	6	10
	10×		12	13	5	9
	50×		14	12	7	9
	2×	三批 间	13	10	8	10
	10×		11	11	5	9
	50×		13	12	8	7

[0074] 实施例4荧光免疫层析试剂的灵敏度检测

[0075] 采用实施例2制备的荧光免疫层析试剂分别检测不同浓度的寨卡IgG阳性标本(由长春海关检验检疫中心提供),用稀释液PBS稀释为1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000的梯度,同时将阴性血清作为阴性对照,取80 μ L血清样品加在样品垫上,8min后判断结果。检测结果表明稀释度为1:100000仍有两条条带,说明检测灵敏度为1:100000稀释度的阳性标本。

[0076] 采用本实施例1制备的纯化后的NS1抗原蛋白,来制备胶体金免疫层析试纸,采用常规方法制备,采用SPA标记胶体金颗粒,硝酸纤维素膜上的检测带包被有NS1抗原蛋白,质控带包被羊抗鼠IgG。获得的胶体金免疫层析试纸,采用上述稀释液PBS稀释为1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000的寨卡IgG阳性标本进行检测,其检测灵敏度为1:10000稀释度的阳性标本,结果见图6。可见本发明制备的荧光免疫层析试剂的灵敏度高于现有技术制备的胶体金免疫层析试剂。

[0077] 实施例5荧光免疫层析试剂特异性的检测

[0078] 采用实施例2制备的寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂与对比试剂ZIKV IgG酶联免疫试剂盒(Dia.Pro.)同时检测3份寨卡阳性标本,二者均为阳性(+)的结果;同时检测10份正常人血清,二者均为阴性(-)结果;同时检测特异性样本:基孔肯雅热病毒,登革热病毒,黄热病毒,甲型流感H1N1病毒的阳性血清的检测(以上阳性血清由中国检验检疫科学研究卫生检疫研究所提供),本发明的荧光免疫层析试剂与对比试剂检测结果均为阴性(-)结果,说明本发明的寨卡病毒抗体检测试剂的特异性强,结果准确可靠。

[0079] 实施例6全血、血浆样本检测将20份正常人血清样本、血浆样本、全血样本经过按

照实施例2制备的荧光免疫层析试剂进行检测,检测均为阴性结果;将三份寨卡阳性样本,分别以血清、血浆、全血10×稀释后,检测结果均为阳性结果。血清样本、血浆样本、全血样本检测结果一致,如表3所示。本发明制备的试剂可用于检测血清样本、血浆样本、全血样本的检测,且检测结果不会有假阴性或假阳性结果,突破了现有的免疫层析试剂只适用于血清的检测。

[0080] 表3血清、血浆、全血样本检测

		样本类型		
		血清	血浆	全血
样本编号	结果			
[0081]	1	—	—	—
	2	—	—	—
	3	—	—	—
	4	—	—	—
	5	—	—	—
	6	—	—	—
	7	—	—	—
	8	—	—	—
	9	—	—	—
	10	—	—	—
	11	—	—	—
	12	—	—	—
	13	—	—	—
[0082]	14	—	—	—
	15	—	—	—
	16	—	—	—
	17	—	—	—
	18	—	—	—
	19	—	—	—
	20	—	—	—
	寨卡 1	+	+	+
	寨卡 2	+	+	+
	寨卡 3	+	+	+

[0083] 实施例7稳定性试验

[0084] 将按实施例2制备好的试剂卡密封后常温储存,在14个月内分别检测3份寨卡阳性标本为阳性结果;3份正常人血清标本为阴性结果;4份特异性样本为阴性结果如表4所示。结果表明本发明制备的试剂的有效期大于12个月。

[0085] 表4稳定性结果

		保存时间						
		第 0 月	第 3 月	第 6 月	第 9 月	第 12 月	第 13 月	第 14 月
样本名称								
[0086]	寨卡 1	0.51 (+)	0.56 (+)	0.58 (+)	0.54 (+)	0.55 (+)	0.49 (+)	0.51 (+)
	寨卡 2	0.78 (+)	0.76 (+)	0.75 (+)	0.81 (+)	0.85 (+)	0.79 (+)	0.81 (+)
	寨卡 3	0.62 (+)	0.66 (+)	0.70 (+)	0.72 (+)	0.65 (+)	0.69 (+)	0.71 (+)
	正常人血清 1	0.03 (-)	0.02 (-)	0.03 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)	0.03 (-)	0.02 (-)
	正常人血清 2	0.02 (-)	0.02 (-)	0.01 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)	0.04 (-)	0.01 (-)
	正常人血清 3	0.02 (-)	0.02 (-)	0.01 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)	0.04 (-)	0.01 (-)
[0087]	基孔肯雅热病毒	0.02 (-)	0.02 (-)	0.01 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)	0.04 (-)	0.01 (-)
	登革热病毒	0.05 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)	0.06 (-)	0.07 (-)	0.05 (-)	0.04 (-)
	黄热病毒	0.03 (-)	0.02 (-)	0.03 (-)	0.04 (-)	0.03 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)
	甲型流感 H1N1 病毒	0.02 (-)	0.03 (-)	0.01 (-)	0.04 (-)	0.05 (-)	0.04 (-)	0.01 (-)

序列表

<110> 中国检验检疫科学研究院

<120> 一种寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫层析试剂中的应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 5

<211> 352

<212> PRT

<213> 寨卡病毒NS1抗原 (Zika Virus NS1)

<400> 5

```

Asp Val Gly Cys Ser Val Asp Phe Ser Lys Lys Glu Thr Arg Cys Gly
1           5           10           15
Thr Gly Val Phe Ile Tyr Asn Asp Val Glu Ala Trp Arg Asp Arg Tyr
          20           25           30
Lys Tyr His Pro Asp Ser Pro Arg Arg Leu Ala Ala Ala Val Lys Gln
          35           40           45
Ala Trp Glu Glu Gly Ile Cys Gly Ile Ser Ser Val Ser Arg Met Glu
          50           55           60
Asn Ile Met Trp Lys Ser Val Glu Gly Glu Leu Asn Ala Ile Leu Glu
65           70           75           80
Glu Asn Gly Val Gln Leu Thr Val Val Val Gly Ser Val Lys Asn Pro
          85           90           95
Met Trp Arg Gly Pro Gln Arg Leu Pro Val Pro Val Asn Glu Leu Pro
          100          105          110
His Gly Trp Lys Ala Trp Gly Lys Ser Tyr Phe Val Arg Ala Ala Lys
          115          120          125
Thr Asn Asn Ser Phe Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Lys Glu Cys Pro
          130          135          140
Leu Glu His Arg Ala Trp Asn Ser Phe Leu Val Glu Asp His Gly Phe
145          150          155          160
Gly Val Phe His Thr Ser Val Trp Leu Lys Val Arg Glu Asp Tyr Ser
          165          170          175
Leu Glu Cys Asp Pro Ala Val Ile Gly Thr Ala Val Lys Gly Arg Glu
          180          185          190
Ala Ala His Ser Asp Leu Gly Tyr Trp Ile Glu Ser Glu Lys Asn Asp
          195          200          205
Thr Trp Arg Leu Lys Arg Ala His Leu Ile Glu Met Lys Thr Cys Glu
210          215          220

```


<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gacgtggggg gctcagtgga cttct 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

cgctgtcacc attgacctca ctaag 25

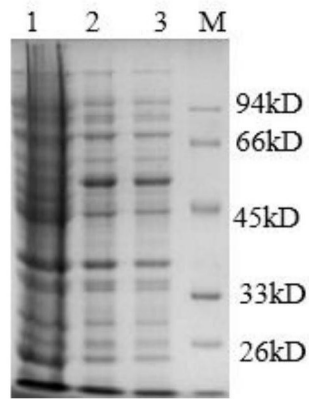


图1

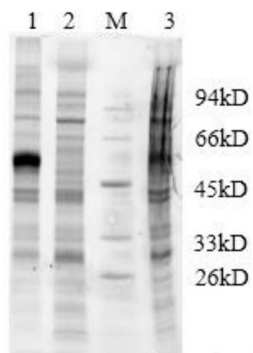


图2

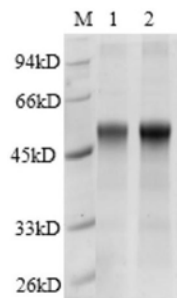


图3



图4

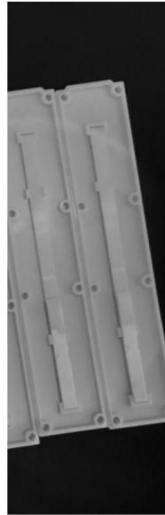


图5

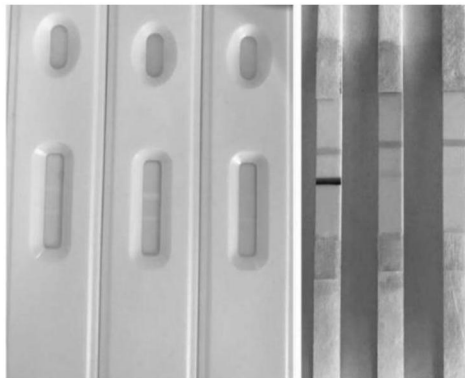


图6

专利名称(译)	一种寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫层析试剂中的应用		
公开(公告)号	CN110568178A	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910878461.1	申请日	2019-09-18
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	杨宇 聂聪 王静		
发明人	杨宇 聂聪 侯宝翠 王静		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/56983 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种寨卡病毒NS1抗原及其在制备荧光免疫层析试剂中的应用，寨卡病毒NS1抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。制备的荧光免疫层析试剂为检测寨卡病毒抗体的荧光免疫层析试剂，其包括由样品垫、标记物垫、包被垫、吸收垫依次搭接并贴在底衬卡，所述标记物垫为包被有荧光乳胶微球标记鼠抗人IgG单克隆抗体的玻璃纤维，所述包被垫为包被有羊抗兔IgG的抗体作为质控线和包被有寨卡病毒NS1抗原的检测线的硝酸纤维素膜。本发明提供的寨卡病毒NS1抗原，具有较好的表达效果，用于制备的检测寨卡病毒IgG抗体的荧光免疫层析试剂，可用紫外线照射后，肉眼观察检测结果。

