



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107991499 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201711297706.9

(22)申请日 2017.12.08

(71)申请人 中牧实业股份有限公司

地址 100070 北京市丰台区南四环西路188
号八区16-19号楼

(72)发明人 向王震 肖进 董春娜 王飞
李玲 张蕾 张国栋 李静 张欣
张晓战 齐鹏

(74)专利代理机构 北京惟诚致远知识产权代理
事务所(普通合伙) 11536
代理人 王慧凤 李巍

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表2页

(54)发明名称

猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒包括酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清和酶标二抗,其中所述酶标板包被有猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物。该抗原表位多肽组合物为序列表中序列1所示的多肽、序列表中序列2、序列表中序列3所示的多肽或序列表中序列4所示的多肽中的一种或两种以上的任意组合。本试剂盒使用化学合成抗原肽包被酶标板,抗原用量少、灵敏性和特异性高,可以高效地检测是否存在猪细小病毒的结构蛋白抗体。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷,具有良好的市场前景。

1. 猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物, 为序列表中序列1所示的多肽、序列表中序列2、序列表中序列3所示的多肽和序列表中序列4所示的多肽中的一种或两种以上的任意组合。

2. 根据权利要求1所述猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物, 其特征在于: 当所述多肽组合物为序列1所示的多肽、序列2所示的多肽、序列3所示的多肽和序列4所示的多肽中的两种时, 两种多肽的质量比为 $(0.5 \sim 1.5) : (0.5 \sim 1.5)$; 优选的, 它们的质量比为1:1; 当所述多肽组合物为序列1所示的多肽、序列2所示的多肽、序列3所示的多肽和序列4所示的多肽中的三种时, 任意三种多肽的质量比为 $(0.5 \sim 1.5) : (0.5 \sim 1.5) : (0.5 \sim 1.5)$; 优选的, 它们的质量比为1:1:1; 当所述多肽组合物由序列1所示的多肽、序列2所示的多肽、序列3所示的多肽和序列4所示的多肽组成时, 它们的质量比为 $(0.5 \sim 1.5) : (0.5 \sim 1.5) : (0.5 \sim 1.5) : (0.5 \sim 1.5)$; 优选的, 它们的质量比为1:1:1:1。

3. 一种猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒, 包括酶联反应板、阳性对照血清、阴性对照血清和酶标二抗, 其中所述酶联反应板包被有权利要求1或2所述的猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物。

4. 根据权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板; 所述猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物中各个多肽为化学人工合成得到。

5. 根据权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述酶联反应板的获得方法是将权利要求1或2所述猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物溶于100 μ l的pH 9.6的碳酸盐溶液, 然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板, 每孔200ng猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物, 2~8 $^{\circ}$ C下放置8~12小时, 使猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物与酶联反应板充分结合, 然后按照300 μ l/孔加入含有0.01g/ml牛血清白蛋白pH7.4的PBS缓冲液, 37 $^{\circ}$ C封闭处理2~3小时, 甩干后, 待酶联反应板干燥后4 $^{\circ}$ C密封保存。

6. 根据权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于:

所述阳性对照血清为所述猪细小病毒人工感染后采集的猪血清; 所述阴性对照血清为无猪细小病毒病原体的猪血清。

7. 根据权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG抗体。

8. 根据权利要求3所述的酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒还包括底物液A、底物液B和终止液, 所述底物液A为含0.0006g/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液, 所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液, 使用时两者以1:1的比例混合; 所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

9. 根据权利要求3所述的试剂盒, 其特征在于: 所述试剂盒还包括样品稀释液和20倍浓缩洗涤液; 样品稀释液为含有0.00005g/ml酪蛋白的0.01mol/L、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液; 20倍浓缩洗涤液为含有体积百分浓度为0.8%~1.2%的Tween-20的0.01mol/L, pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。

10. 猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽, 为序列表中序列1所示的多肽、序列表中序列2、序列表中序列3所示的多肽或序列表中序列4所示的多肽。

猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,更具体地,本发明涉及一种猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 猪细小病毒(Porcine parvovirus Virus, PPV)是造成母猪繁殖障碍的重要病原之一。PPV感染猪群后,对成年猪引起症状较轻,但对不同孕期的母猪感染后会造成死胎、木乃伊胎和流产等不同临床症状。病原体感染机体后会导致慢性持续性感染,并不断向周围环境排毒,养殖场的PPV感染阳性率很高。在不同国家和地区,其报道的血清阳性率为40.7%~99.6%,我国不同地区血清阳性率为50.1%~98%之间。若预防控制不当,该病能在同一养殖区域连续发生几年甚至十几年的流行,造成繁殖失败,给养猪业带来较大的经济损失。

[0003] PPV是细小病毒科(Parvoviridae)细小病毒属(Parvovirus)的成员,病毒粒子呈圆形或六边形,无囊膜,为直径约20nm的单链DNA病毒。病毒基因组大约长5kb,包含多于两个开放阅读框,靠近5'端的开放阅读框主要编码非结构蛋白NS1、NS2和NS3,这些非结构蛋白主要参与病毒的复制。靠近3'端的开放阅读框编码结构蛋白VP1、VP2和VP3,分子量大小分别为84kd、64kd和60kd。衣壳蛋白由VP1、VP2和VP3组成,其中主要的衣壳蛋白为VP2,其对PPV的嗜性和毒力强弱影响很大。

[0004] 猪细小病毒在我国各养殖场检测的血清阳性率较高,对该病的血清学诊断方法中,血清中和试验、血凝抑制试验、酶联免疫吸附试验、琼脂扩散试验等是常用的检验方法,其中血凝抑制试验和酶联免疫吸附试验最为常用。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种用于检测猪细小病毒结构蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒,该试剂盒利用猪细小病毒结构蛋白VP1、VP2和VP3抗原表位多肽作为包被抗原,建立了一种特异性、敏感性和重复性好的间接ELISA方法,用于检测猪血清中是否含有猪细小病毒结构蛋白抗体。

[0006] 为了达到上述目的,本发明首先筛选得到了性能优异的猪细小病毒抗原表位多肽组合物,本发明提供的猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物,为序列表中序列1所示的多肽、序列表中序列2、序列表中序列3所示的多肽或序列表中序列4所示的多肽中的一种或两种以上的任意组合。当所述多肽组合物为序列1所示的多肽、序列2所示的多肽、序列3所示的多肽和序列4所示的多肽中的两种时,两种多肽的质量比为(0.5~1.5):(0.5~1.5);优选的,它们的质量比为1:1;当所述多肽组合物为序列1所示的多肽、序列2所示的多肽、序列3所示的多肽和序列4所示的多肽中的三种时,任意三种多肽的质量比为(0.5~1.5):(0.5~1.5):(0.5~1.5);优选的,它们的质量比为1:1:1;

[0007] 当所述多肽组合物由序列1所示的多肽、序列2所示的多肽、序列3所示的多肽和序列4所示的多肽组成时,它们的质量比为(0.5~1.5):(0.5~1.5):(0.5~1.5):(0.5~

1.5);优选的,它们的质量比为1:1:1:1。

[0008] 本发明的猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒,包括酶联反应板、阳性对照血清、阴性对照血清和酶标二抗,其中所述酶联反应板包被有猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物。

[0009] 所述酶联反应板为可拆卸96孔酶标板;所述猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物中的多肽均为化学人工合成得到。

[0010] 所述酶联反应板的最佳制备方法及条件是将所述猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物溶于pH 9.6的碳酸盐溶液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔200ng多肽,2~8℃下放置8~12小时,使多肽抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300μl/孔加入含有1% (g/ml)牛血清白蛋白(BSA) pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后4℃密封保存。

[0011] 所述阳性对照血清为所述猪细小病毒人工感染后采集的猪血清;所述阴性对照血清为无特定病原体(SPF)(无猪细小病毒病原体)的猪血清。

[0012] 所述酶标二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG抗体。

[0013] 所述试剂盒还包括底物液A、底物液B和终止液,所述底物液A为含0.06% (g/ml)过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液,所述底物液B为0.2mg/ml的四甲基联苯胺溶液,使用时两者以1:1的比例混合。所述终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0014] 所述试剂盒还包括样品稀释液和20倍浓缩洗涤液;样品稀释液为含有0.5% (g/100ml)酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液;20倍浓缩洗涤液为含有浓度为0.8%~1.2% (ml/ml)的Tween-20的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。

[0015] 本发明试剂盒的检测程序为:

[0016] 1、平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0017] 2、配液:将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0018] 3、设定:2个阴性对照孔和2个阳性对照孔,其余为待测样本孔。

[0019] 4、待测标本预稀释:使用样品稀释液将待检样品血清、阴性对照血清、阳性对照血清按照1:20的比例稀释。

[0020] 5、加样:各孔分别按预先设定加100μl稀释的待测样本。加样过程时间跨度应尽量短。

[0021] 6、温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应30min。

[0022] 7、洗板:弃去反应液,每孔加300μl稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续洗板4次后拍干。

[0023] 8、加酶:各孔加100μl辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG抗体。

[0024] 9、温育:置37℃温箱,反应30min。

[0025] 10、洗板:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗涤缓冲液300μl,浸泡15s,甩弃洗涤液,连续洗板4次后拍干。

[0026] 11、显色每孔加入100μl底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液,现用现配),震荡混匀,置37℃温箱中,避光反应15min。

[0027] 12、每孔加入显色终止液50μl,振荡混匀终止反应。

[0028] 13、测定每孔的OD_{450nm}值(加终止液的反应板应在15min内读取OD_{450nm}值)。

[0029] 检测结果的判定:

[0030] 1、阴性对照OD_{450nm}平均值应该 ≤ 0.15 ,否则无效。

[0031] 2、阳性对照每个检测值应该在1.0~2.5之间,否则无效。

[0032] 3、临界值的计算:临界值=0.17 $\times$ 阳性对照OD_{450nm}值平均值。

[0033] 待检血清测定OD_{450nm}值 $\geq$ 临界值者判为阳性;待检血清测定OD_{450nm}值 $<$ 临界值者判为阴性。

[0034] 本发明的上述试剂盒,可用于检测猪细小病毒结构蛋白抗体,以判断被检动物是否存在感染后产生的猪细小病毒结构蛋白抗体。

[0035] 在制备检测是否感染猪细小病毒病的试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围;

[0036] 本发明的积极效果在于:本发明采用生物信息学方法对猪细小病毒结构蛋白的抗原表位进行精确分析,从VP1、VP2、VP3蛋白上的主要抗原表位上筛选出适合ELISA检测用的肽段。该肽段集中了抗原表位,具有灵敏性高、特异性强的优点。

[0037] 同时,采用先进的固相合成肽技术合成多肽抗原用于包被酶标反应板的制备。

[0038] 另外,由于试剂盒中使用的包被抗原是化学合成多肽,不含杂蛋白,纯度高,进一步提高了检测猪细小病毒结构蛋白抗体的效率。

[0039] 总之,本试剂盒采用化学合成结构蛋白VP1、VP2、VP3主要抗原位点的抗原肽包被酶联反应板,抗原用量少、灵敏度高、特异性强,可以有效地检测猪细小病毒产生的结构蛋白抗体。实验结果表明,本发明的试剂盒重复性好,特异性强,灵敏度高。能满足不同层次人员的需要,具有广阔的市场前景和良好的经济、社会效益。

具体实施方式

[0040] 下述实施例中的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0041] 实施例1、猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒包被抗原的制备

[0042] 本试验采用生物信息学方法对猪细小病毒结构蛋白VP1、VP2、VP3的主要抗原表位进行精确分析,筛选出合适的肽段,用全自动多肽合成仪分别合成出四条肽,序列分别为序列表序列1、序列2、序列3和序列4所示,制成纯度约85%的更新更全的包被抗原,提高抗体阳性的检出率。多肽合成方法可为常规方法,本发明使用如下方法合成本发明的四条多肽,作为本发明试剂盒的包被原。

[0043] 本发明的包被抗原可使用Applied Biosystem全自动多肽合成仪(型号433A)制备。运用Merrifield固相合成法,采用的是Fmoc(9-fluorenylmethyloxycarbonyl,9-芴甲氧羰基)修饰的氨基酸,使用Rink AmideMBHA树脂做为固相载体。生产过程包括多肽抗原固相合成、多肽裂解和鉴定、抗原纯化、冷冻干燥以及保存五部分。以下分别进行说明:

[0044] 一、包被抗原固相合成

[0045] 1、合成试剂的准备

[0046] 合成包被抗原氨基酸序列1) TCLRLNPPVYAGQTQG1TDS1QTGVHAD1MFYT (SEQ ID NO: 1); 2): VATRNFFKARRAFAPRVAETDSPTSSQQPGGKSL (SEQ ID NO: 2); 3) TNLNSMSDNLEQHNPLNSGTALAATGNASGGGGAG (SEQ ID NO: 3); 和4) LFVR1VR1APNVTEDFNGESPQQPK11TYSNAPVNL (SEQ ID NO: 4)。

[0047] 依据包被抗原序列以及合成规模准备合适的Fmoc修饰的氨基酸(购自NOVA公司),

加入至相应的Cartridge中。同样按要求合成规模称树脂5g,放入反应腔,将上下盖子拧紧,贴标签,记录所合成肽的名称,批号,反应腔的TARE及所称树脂的重量。将反应腔装入合成仪。配制适量的合成试剂包括100%的NMP、3%的AlM(己酰咪唑)、35%的P1P(哌啶)、100%的MeOH(甲醇)等放置到相对应的试剂瓶中。

[0048] 2、合成仪状态的检测

[0049] 检查433A多肽合成仪器是否正常运行,开机后,运行Run Self Test程序,仪器自检各项指标是否正常。另外检查氮气是否充足,系统表压是否正常(433A正常表压10.2psi)。合成前应对仪器的性能有所了解,所以要对每种合成试剂的流速进行测定。433A合成仪:发送Flow Rate1-18到合成仪,选择Main Menu—Module Test—按Prer或next找Module A、ModuleD、Module1、Module1、Module A) —按Start—按more进行测量或观察,若流量不合适,则调节下阀门压力,直至达到要求(具体检测要求见下表1)。

[0050] 表1. 多肽合成仪流速检测标准表

[0051]

试剂	瓶号	Module	标准范围
35%Piperidine	1	A	1.0~1.2ml
3%AlM	4	D	1.0~1.2ml
100%MeOH	9	1	3.5~4.0ml
D1C	8	1	0.45~0.55g
100%NMP	10	A	2.6~2.8ml

[0052] 3、包被抗原合成开始

[0053] 在433A合成仪的程序中将要合成的氨基酸序列发送Std Fmoc 1.0SolD1C90到合成仪上。File-New-Sequence-编辑合成肽的序列,保存。File-New-Run,检查Chemistry是否为Std Fmoc 1.0Sol D1C 90;Sequence是否为所存名字;设定Cycles;保存。最后发送到合成仪上。

[0054] Main Menu—Cycle Monitor—begin,开始运行。

[0055] 4、包被抗原合成进行

[0056] Fmoc基团的脱除,Fmoc基团的苈环系的吸电子作用使9-H具有酸性,易被较弱碱除去,反应时用哌啶(P1P)进攻9-H, β 消除形成二苈苈烯,很容易被二级环胺进攻形成稳定的加成物。Fmoc基团的脱除后暴露出“—NH₂”基团以进行合成反应。然后加入活化的下一个Fmoc基团保护的氨基酸和1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole,HOBt)至反应器内。

[0057] 如上述的多肽序列,合成的时候是从C端开始至N端,依照特定的顺序,依次不断地重复合成步骤(合成仪按程序自动完成,具体循环步骤如下表2)。期间观察记录试剂用量及运行情况。

[0058] 表2. 包被抗原合成循环步骤

[0059]

一个完整的缩合循环步骤	具体情况描述
脱保护	用 PIP 对树脂脱保护 15min
洗涤树脂	用 NMP 浸泡树脂 20min
缩合	缩合时间应为 250~350min
戴帽	用 3.0% AIM 对树脂进行 25~30min 的戴帽反应（若进行了两次缩合反应此步可省略）
洗涤树脂	用 NMP 浸泡树脂 10min

[0060] 5、包被抗原合成结束

[0061] 包被抗原合成结束后合成仪将自动停止,并且肽树脂(肽现在还连接在树脂上)基本洗涤干净。然后从多肽合成仪上取下反应器,再用100%甲醇洗涤肽树脂3次后,在通风橱内吹干,然后将多肽树脂全部转移至棕色的聚乙烯瓶内,放入-20℃冰箱内,封口膜密封备用。

[0062] 二、包被抗原的裂解及鉴定

[0063] 1、多肽抗原的裂解

[0064] 经上述反应所得到的多肽是与固相载体通过化学键结合在一起的,必须通过特定的有机强酸的酸解把多肽与固相载体分离。酸解的同时也除去了各个氨基酸官能团上的保护基。步骤如下:

[0065] 从冰箱内取出合成的多肽树脂(指肽还连接在树脂上),放入一只2L的圆底烧瓶内,在通风橱内向烧瓶中加入90ml三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)、10ml的三丙基硅烷(TIS)和磁搅拌子,然后稳定地将烧瓶放置在磁力搅拌器上,室温下持续搅拌1h至反应完全。反应结束后,使用带冷阱的旋转蒸发仪持续蒸发30~120min除去粗产品中的TFA。然后用二甲基甲酰胺(DMF)多次清洗多肽抗原的粗品,最后将混合在一起的树脂用砂心漏斗过滤出来,既得到包被抗原。

[0066] 2、包被抗原的鉴定

[0067] 多肽抗原合成完毕后用基质辅助激光解吸飞试时间质谱法(MODAL-TOF)和反相高压液相色谱法(RP-HPLC)进行定性定量分析,用常见的氨基酸分析来鉴定所合成的肽。

[0068] 3、包被抗原纯化

[0069] 将环化后的多肽抗原使用循环式切向过滤膜包进行超滤(用PALL公司生产的Tangential Flow Device循环式切向过滤膜包以及与其配套的蠕动泵),多肽抗原作为大分子不能通过一定孔径的滤膜,而前期合成过程以及后期环化反应形成或引进的小分子杂质则可以通过滤膜。然后再通过孔径为0.2μm过滤器除菌,将最后所得溶液分装到无菌塑料瓶内,贴上标签。标签上注明多肽的名称、编号、生产批号、浓度、生产日期、保存期限及保存条件,分装后,储存于-20℃或-40℃备用。

[0070] 4、包被抗原冷冻干燥

[0071] 为了便于长期保存和运输,需要将包被抗原进行冷冻干燥以得到固体状态的多

肽。将预先冷冻好的包被抗原放置于Labconco的冷冻干燥机上进行干燥,得到固体状态的包被抗原。包装后贴上标签。标签上注明多肽的名称、编号、生产批号、浓度、生产日期、保存期限及保存条件。

[0072] 实施例2、猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的制备

[0073] 猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒包括:

[0074] (1) 包被有猪细小病毒抗原的96孔可拆聚苯乙烯酶联反应板;2×96孔。

[0075] (2) 阳性对照血清:是以猪细小病毒人工感染后采集猪血清,作为试剂盒的阳性对照血清(1管,1.5ml/管)。

[0076] (3) 阴性对照血清:是无特定病原体(SPF)(无猪细小病毒病原体)猪血清,作为试剂盒的阴性对照血清(1管,1.5ml/管)。

[0077] (4) 酶标二抗:是以辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG(购自sigma公司,货号A5670)作为原液进行1:30000稀释后制得,2瓶(12ml/瓶)。

[0078] (5) 样品稀释液:为含有0.5%(g/100ml)酪蛋白的0.01M、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液,1瓶(24ml/瓶)。

[0079] (6) 底物液A:为含0.6mg/ml过氧化氢尿素的柠檬酸磷酸盐缓冲液(1瓶,12ml/瓶)

[0080] (7) 底物液B:为0.2mg/ml的四甲基联苯胺(TMB)溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0081] (8) 终止液:2mol/L的硫酸溶液(1瓶,12ml/瓶)。

[0082] (9) 20倍浓缩洗涤液:为含有浓度为0.8%~1.2%(ml/ml)的Tween-20的0.01M,pH值为7.4的磷酸盐缓冲液(50ml/瓶,2瓶)。

[0083] 根据需要,试剂盒中还可以有血清稀释板(2块,96孔/块),用于血清样品的稀释。

[0084] 其中,包被有猪细小病毒病毒抗原的96孔可拆聚苯乙烯酶联反应板的制备方法为:将实施例1制备的多肽抗原溶于pH 9.6的碳酸盐溶液,然后加到96孔聚苯乙烯酶联反应板,每孔200ng多肽(包括五种处理:1)序列表中序列1所示的多肽,200ng;2)序列表中序列2所示的多肽,200ng;3)序列表中序列3所示的多肽,200ng;4)序列表中序列4所示的多肽,200ng;5)序列表中序列1、序列2、序列3及序列4所示的多肽各50ng),2~8℃下放置8~12小时,使多肽抗原与酶联反应板充分结合,然后按照300μl/孔加入含有1%(g/ml)牛血清白蛋白(BSA)pH7.4的PBS缓冲液,37℃封闭处理2~3小时,甩干后,待酶联反应板干燥后4℃密封保存。

[0085] 实施例3、猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的敏感性试验

[0086] 一、猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的使用方法

[0087] 1、平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡30min备用;液体试剂用前混匀。

[0088] 2、配液:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释得到洗涤缓冲液;

[0089] 3、设定:2个阴性对照孔和2个阳性对照孔,其余为待测样本孔。

[0090] 4、待测标本预稀释:使用样品稀释液将待检样品血清、阴性对照血清、阳性对照血清按照1:20的比例稀释。

[0091] 5、加样:各孔分别按预先设定加100μl稀释的待测样本。加样过程时间跨度应尽量短。

[0092] 6、温育:震荡混匀,置37℃温箱中,反应30min。

[0093] 7、洗板:弃去反应液,每孔加300μl稀释后的洗涤缓冲液,浸泡15s,甩弃洗液,连续

洗板4次后拍干。

[0094] 8、加酶：各孔加100 μ l辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG抗体。

[0095] 9、温育：置37 $^{\circ}$ C温箱，反应30min。

[0096] 10、洗板：弃去反应液，每孔加入稀释后的洗涤缓冲液300 μ l，浸泡15s，甩弃洗涤液，连续洗板4次后拍干。

[0097] 11、显色每孔加入100 μ l底物工作液(将底物液A和底物液B等量混合即为底物工作液，现用现配)，震荡混匀，置37 $^{\circ}$ C温箱中，避光反应15min。

[0098] 12、每孔加入显色终止液50 μ l，振荡混匀终止反应。

[0099] 13、测定每孔的OD_{450nm}值(加终止液的反应板应在15min内读取OD_{450nm}值)。

[0100] 检测结果的判定：

[0101] 1、阴性对照OD_{450nm}平均值应该 ≤ 0.15 ，否则无效。

[0102] 2、阳性对照每个检测值应该在1.0~2.5之间，否则无效。

[0103] 3、临界值的计算：临界值=0.17 $\times$ 阳性对照OD_{450nm}值平均值。

[0104] 待检血清测定OD_{450nm}值 $\geq$ 临界值者判为阳性；待检血清测定OD_{450nm}值 $<$ 临界值者判为阴性。

[0105] 二、对已知阳性血清的敏感性试验

[0106] 使用按照实施例2的方法制备了三批猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒，其中包括抗原包被序列1多肽(批次ZMPPVS1-001、ZMPPVS1-002、ZMPPVS1-003)，抗原包被序列2多肽(批次ZMPPVS2-001、ZMPPVS2-002、ZMPPVS2-003)，抗原包被序列3多肽(批次ZMPPVS3-001、ZMPPVS3-002、ZMPPVS3-003)，抗原包被序列4多肽(批次ZMPPVS4-001、ZMPPVS4-002、ZMPPVS4-003)以及抗原包被序列1、序列2、序列3、序列4混合多肽(批次ZMPPVM-001、ZMPPVM-002、ZMPPVM-003)。分别依照上述猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒使用方法对猪细小病毒感染猪血清30份进行敏感性试验，实验结果见表3，本发明的猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒ZMPPVS1、ZMPPVS2、ZMPPVS3、ZMPPVS4以及ZMPPVM分别检测出28份、27份、28份、27份、29份，结果表明本试剂盒对30份已知阳性血清的敏感性依次为93.3%，90.0%，93.3%，90.0%，96.7%，其中表3为其中一个批次的结果。

[0107] 表3.猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的敏感性检测结果

[0108]

试剂盒批号	检出率	敏感性
ZMPPVS1-001	28/30	93.3%
ZMPPVS2-001	27/30	90.0%
ZMPPVS3-001	28/30	93.3%
ZMPPVS4-001	27/30	90.0%
ZMPPVM-001	29/30	96.7%

[0109] 三、最低检测限量试验

[0110] 选取猪细小病毒结构蛋白抗体阳性的猪血清3份，进行倍比稀释1:20、1:40~1:320，使用实施例2制备的三批猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒ZMPPVS1，ZMPPVS2，ZMPPVS3，ZMPPVS4和ZMPPVM(三个批次编号分别为001、002和003)，依照上述猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒使用方法对倍比稀释猪血清进行检测，结果表

明,本发明试剂盒的可以检测到1:160倍稀释的阳性血清,其中,表4为一个批次的实验结果。表4中,阳性对照:是以猪细小病毒人工感染后采集猪血清,作为试剂盒的阳性对照血清(1管,1.5ml/管)。阴性对照:是无特定病原体 (SPF) 猪血清,作为试剂盒的阴性对照血清(1管,1.5ml/管)。临界值 (Cut-off值) = $0.17 \times$ 阳性对照OD_{450nm}值平均值。

[0111] 表4猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的最低检测限量试验检测结果
[0112]

试剂盒 编号 稀释倍 数	ZMPPVS1	ZMPPVS2	ZMPPVS3	ZMPPVS4	ZMPPVM
1:20	1.992	2.011	2.211	2.102	2.242
1:40	1.545	1.638	1.756	1.691	1.721
1:80	1.007	1.113	1.204	1.121	1.207
1:160	0.511	0.634	0.754	0.669	0.735
1:320	0.293	0.309	0.353	0.321	0.343
Cut-off 值	0.340	0.341	0.375	0.358	0.380
阳性对 照均值	2.001	2.007	2.209	2.108	2.237
阴性对 照均值	0.102	0.105	0.110	0.105	0.117

[0113] 实施例4、猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的特异性试验

[0114] 使用实施例2中的三批试剂盒依照实施例3中所述的猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的使用方法对50份健康猪血清(中牧实业股份有限公司兰州生物药厂提供)、2份猪蓝耳病病毒阳性血清(中牧实业股份有限公司提供)、2份猪圆环病毒2型阳性血清(中牧实业股份有限公司成都药械厂提供)、2份猪伪狂犬病阳性血清(中牧实业股份有限公司提供)、2份猪瘟阳性血清(中牧实业股份有限公司提供)分别进行检测。

[0115] 试剂盒的特异性检测结果如下表(表5)显示,其中表5为一个批次的结果。对50份健康猪血清的检测结果显示,ZMPPVS1-001试剂盒的特异性为100.0%,ZMPPVS2-001试剂盒的特异性为100.0%,ZMPPVS3-001试剂盒的特异性为100.0%,ZMPPVS4-001试剂盒的特异性为100%,ZMPPVM-001试剂盒的特异性为100%。对2份猪蓝耳病病毒(PRRSV)阳性血清、2份猪圆环病毒2型(PCV2)阳性血清、2份猪伪狂犬病病毒(PRV)阳性血清、2份猪瘟病毒(CSFV)阳性血清的检测结果显示均为阴性,因此四种试剂盒对这8份相关病原阳性血清检测的特异性均为100%。

[0116] 表5猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒特异性检测结果

[0117]

血清种类	总份数	试剂盒批号	阳性份数	阴性份数	特异性
健康猪血清	50	ZMPPVS1-001	0	50	100%
		ZMPPVS2-001	0	50	100%
		ZMPPVS3-001	0	50	100%
		ZMPPVS4-001	0	50	100%
		ZMPPVM-001	0	50	100%
PRRSV	2	ZMPPVS1-001	0	2	100%
		ZMPPVS2-001	0	2	100%
		ZMPPVS3-001	0	2	100%
		ZMPPVS4-001	0	2	100%
		ZMPPVM-001	0	2	100%
PCV2	2	ZMPPVS1-001	0	2	100%
		ZMPPVS2-001	0	2	100%
		ZMPPVS3-001	0	2	100%
		ZMPPVS4-001	0	2	100%
		ZMPPVM-001	0	2	100%
PRV	2	ZMPPVS1-001	0	2	100%
		ZMPPVS2-001	0	2	100%
		ZMPPVS3-001	0	2	100%
		ZMPPVS4-001	0	2	100%
		ZMPPVM-001	0	2	100%
CSFV	2	ZMPPVS1-001	0	2	100%
		ZMPPVS2-001	0	2	100%
		ZMPPVS3-001	0	2	100%
		ZMPPVS4-001	0	2	100%
		ZMPPVM-001	0	2	100%

[0118] 实施例5、猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒的符合率试验

[0119] 一、血凝抑制试验 (Haemagglutination Inhibition, HI) 方法

[0120] 目前猪细小病毒血清学诊断中最为常用的检测方法是血凝抑制试验 (HI), 因此用本试剂盒同血凝抑制试验进行符合率试验。

[0121] 1. 材料

[0122] 1.1 感染猪血清, 27 份 (血清编号 I1~I27), 为猪细小病毒感染后采集的猪血清, 经 56℃ 30min 灭活, 由中牧实业股份有限公司提供。

[0123] 1.2 健康猪血清, 27 份 (血清编号 N1~N27), 经 56℃ 30min 灭活, 由中牧实业股份有限公司提供。

[0124] 1.3 试验用病毒 (PPV 病毒) 为猪细小病毒的 PK15 细胞毒, 检测其血凝效价为 2^8 , 置于 -20℃ 保存待用。

[0125] 2.方法血凝抑制试验方法如下:将已检测血凝效价为 2^8 的病毒液稀释至4单位凝集抗原备用。血清灭活后,使用25%酸化高岭土悬液和豚鼠血红细胞泥处理,除去血凝抑制因子和非特异性凝集素,然后在96孔板中每孔滴加生理盐水25 μ l,设置红细胞对照孔,加入生理盐水50 μ l,随后于第1孔滴加处理过的血清25 μ l,从第1孔作倍比稀释,至第10孔,弃去25 μ l,除红细胞对照孔外,每孔加入4单位凝集抗原25 μ l,振荡充分,37℃作用1小时,每孔加入25 μ l体积的1%豚鼠红细胞悬液,振荡充分,37℃作用40分钟,对照孔中红细胞呈显著钮扣状时判定。倾斜反应板,观察判定结果。阴性对照血清H1效价不高于 $2\log_2$,阳性对照血清与已知结果相比,误差不高于 $2\log_2$ 时,试验成立。红细胞100%凝集抑制的最大血清稀释倍数为被检血清抗体H1效价。H1效价不高于 $2\log_2$ 判定为阴性;H1效价等于 $3\log_2$ 时为可疑,需重复试验;H1效价大于或等于 $4\log_2$ 为阳性。

[0126] 二、符合率试验结果:

[0127] 利用实施例2制备的猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒与血凝抑制试验(H1)分别检测27份猪细小病毒感染猪血清和27份健康血清。

[0128] 猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒对27份感染猪血清的检测结果显示见表6,本发明试剂盒ZMPPVS1、ZMPPVS2、ZMPPVS3、ZMPPVS4及ZMPPVM的敏感性分别为88.8%、88.8%、92.6%、88.8%、96.2%,而血凝抑制试验的敏感性为88.8%,在27份感染猪血清中,两种方法检测结果一致的依次为23份、23份、24份、23份和25份。因此,本发明试剂盒ZMPPVS1、ZMPPVS2、ZMPPVS3、ZMPPVS4及ZMPPVM和血凝抑制试验的符合率为85.1%、85.1%、88.8%、85.1%、92.5%,本发明试剂盒具有较高的敏感性。对健康猪血清的测试两者的符合率为100%,检测结果均为阴性(见表6)。

[0129] 猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒与血凝抑制试验一共检测54份猪血清,其中试剂盒ZMPPVS1、ZMPPVS2、ZMPPVS3、ZMPPVS4及ZMPPVM和血凝抑制检测的结果符合率分别为92.5%、92.5%、94.4%、92.5%和96.2%。

[0130] 表6猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒及血凝抑制试验法对感染猪血清和健康猪血清的检测结果显示

[0131]

免疫血清 编号	本发明试剂盒					HI
	ZMPPV S1	ZMPPV S2	ZMPPVS 3	ZMPP VS4	ZMPPV M	
I1	R	R	R	R	R	R
I2	R	R	R	R	R	R
I3	—	—	—	—	—	—
I4	R	R	R	R	R	R
I5	R	R	R	R	R	—
I6	—	R	R	—	R	R
I7	R	—	—	—	R	R
I8	R	R	R	R	R	—
I9	R	R	R	R	R	R
I10	—	—	R	R	R	R
I11	R	R	R	R	R	R
I12	R	R	R	R	R	R
I13	R	R	R	R	R	R
I14	R	R	R	R	R	R

[0132]

I15	R	R	R	R	R	R
I16	R	R	R	R	R	R
I17	R	R	R	R	R	R
I18	R	R	R	R	R	R
I19	R	R	R	R	R	R
I20	R	R	R	R	R	R
I21	R	R	R	R	R	R
I22	R	R	R	R	R	R
I23	R	R	R	R	R	R
I24	R	R	R	R	R	R
I25	R	R	R	R	R	R
I26	R	R	R	R	R	R
I27	R	R	R	R	R	R
健康血清 编号	本发明试剂盒					HI
	ZMPPV S1	ZMPPV S2	ZMPPV S3	ZMPP VS4	ZMPPV M	
N1	—	—	—	—	—	—
N2	—	—	—	—	—	—
N3	—	—	—	—	—	—
N4	—	—	—	—	—	—
N5	—	—	—	—	—	—
N6	—	—	—	—	—	—
N7	—	—	—	—	—	—
N8	—	—	—	—	—	—
N9	—	—	—	—	—	—
N10	—	—	—	—	—	—
N11	—	—	—	—	—	—
N12	—	—	—	—	—	—

[0133]

N13	—	—	—	—	—	—
N14	—	—	—	—	—	—
N15	—	—	—	—	—	—
N16	—	—	—	—	—	—
N17	—	—	—	—	—	—
N18	—	—	—	—	—	—
N19	—	—	—	—	—	—
N20	—	—	—	—	—	—
N21	—	—	—	—	—	—
N22	—	—	—	—	—	—
N23	—	—	—	—	—	—
N24	—	—	—	—	—	—
N25	—	—	—	—	—	—
N26	—	—	—	—	—	—
N27	—	—	—	—	—	—

[0134] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

序列表

<110> 中牧实业股份有限公司

<120> 猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒

<130> WH01170093

<170> Patent-In 3.5

<160> 4

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 1

Thr Cys Leu Arg Asn Leu Asn Pro Pro Val Tyr Ala Gly Gln Thr Gln

1 5 10 15

Gly Ile Thr Asp Ser Ile Gln Thr Gly Val His Ala Asp Ile Met Phe

20 25 30

Tyr Thr

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 2

Val Ala Thr Arg Asn Phe Phe Lys Ala Arg Arg Ala Phe Ala Pro Arg

1 5 10 15

Val Ala Glu Thr Asp Ser Pro Thr Ser Ser Gln Gln Pro Gly Gly Lys

20 25 30

Ser Leu

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 3

Thr Asn Leu Asn Ser Met Ser Asp Asn Leu Glu Gln His Asn Pro Leu

1 5 10 15

Asn Ser Gly Thr Ala Leu Ala Ala Thr Gly Asn Ala Ser Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Ala Gly

35

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 4

Leu Phe Val Arg Ile Val Arg Ile Ala Pro Asn Val Thr Glu Asp Phe

1 5 10 15

Asn Gly Glu Ser Pro Gln Gln Pro Lys Ile Ile Thr Tyr Ser Asn Ala

20 25 30

Pro Val Asn Leu

35

专利名称(译)	猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN107991499A	公开(公告)日	2018-05-04
申请号	CN201711297706.9	申请日	2017-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中牧实业股份有限公司		
[标]发明人	向王震 肖进 董春娜 王飞 李玲 张蕾 张国栋 李静 张欣 张晓战 齐鹏		
发明人	向王震 肖进 董春娜 王飞 李玲 张蕾 张国栋 李静 张欣 张晓战 齐鹏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/6854		
代理人(译)	李巍		
其他公开文献	CN107991499B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪细小病毒结构蛋白抗体酶联免疫检测试剂盒。该试剂盒包括酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清和酶标二抗，其中所述酶标板包被有猪细小病毒结构蛋白抗原表位多肽组合物。该抗原表位多肽组合物为序列表中序列1所示的多肽、序列表中序列2、序列表中序列3所示的多肽或序列表中序列4所示的多肽中的一种或两种以上的任意组合。本试剂盒使用化学合成抗原肽包被酶标板，抗原用量少、灵敏性和特异性高，可以高效地检测是否存在猪细小病毒的结构蛋白抗体。本发明试剂盒敏感性高、特异性好、且操作便捷，具有良好的市场前景。

一个完整的缩合循环步骤	具体情况描述
脱保护	用 PIP 对树脂脱保护 15min
洗涤树脂	用 NMP 浸泡树脂 20min
缩合	缩合时间应为 250~350min
戴帽	用 3.0% AIM 对树脂进行 25~30min 的戴帽反应（若进行了两次缩合反应此步可省略）
洗涤树脂	用 NMP 浸泡树脂 10min