



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103063838 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210385688. 0

G01N 33/531 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 11

(71) 申请人 广东出入境检验检疫局检验检疫技
术中心

地址 510623 广东省广州市珠江新城花城大
道 66 号国检大厦 B 座 716 房

(72) 发明人 林志雄 田纯见 马静云 罗琼
鱼海琼 罗长保 陈茹 刘志玲
王宏 吴晓薇 毕英佐

(74) 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理
有限公司 11100

代理人 王淳

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页
序列表9页

(54) 发明名称

一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物
及试剂盒

(57) 摘要

一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的试剂盒, 包含 3 块预包被 ELISA 微孔板: 分别预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3ABC 抗原、吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3B 抗原、吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3D 抗原; 山羊抗猪抗体-辣根过氧化物酶结合物; 洗涤液: 0. 15mol/L、pH7. 2 的 PBS; 底物: 0. 1% TMB 溶液; 显色剂: 0. 015% H₂O₂; 样本稀释液: 0. 1% 牛血清白蛋白, 0. 1% 叠氮化钠作保护剂; 终止液: 2mol/L H₂SO₄; 阳性对照品, 500 倍稀释, 0. 1% 叠氮化钠作保护剂; 阴性对照品, 500 倍稀释, 0. 1% 叠氮化钠作保护剂。

1. 一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含:
 - 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3ABC 抗原的 ELISA 微孔板,所述口蹄疫病毒 3ABC 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID:No. 1 所示;
 - 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3B 抗原的 ELISA 微孔板,所述口蹄疫病毒 3B 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID:No. 2 所示;
 - 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3D 抗原的 ELISA 微孔板,所述口蹄疫病毒 3D 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID:No. 3 所示;酶结合物:山羊抗猪抗体-辣根过氧化物酶结合物的水溶液,浓度为 $55 \mu\text{mol/L}$;
洗涤液: 0.15mol/L 、 $\text{pH}7.2$ 的 PBS ;
底物:浓度为 0.1g/mL 的 TMB 水溶液 ;
显色剂:浓度为 0.015g/mL 的 H_2O_2 水溶液 ;
样本稀释液: 0.1g/mL 牛血清白蛋白,添加 0.1g/mL 叠氮化钠作保护剂 ;
终止液: 2mol/L 的 H_2SO_4 ;
阳性对照品:含 FMDV 抗体的猪血清,用蒸馏水按照 1:500 进行稀释,添加 0.1g/mL 叠氮化钠作保护剂 ;
阴性对照品:不含 FMDV 抗体的猪血清,用蒸馏水按照 1:500 进行稀释,添加 0.1g/mL 叠氮化钠作保护剂。
 2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述 ELISA 微孔板为 96 孔 ELISA 微孔板。
 3. 权利要求 1 所述试剂盒的使用方法,其特征在于,步骤如下:
 - A. 用蒸馏水或去离子水将所述洗涤液按 1:10 的体积比稀释,作为工作洗涤液 ;
 - B. 用所述样本稀释液将待检血清按 1:100 的体积比稀释 ;
 - C. 取所述阴性对照品和阳性对照品各 $100 \mu\text{L}$ 分别加入一个反应孔内,并取 $100 \mu\text{L}$ 所述样本稀释液加入一个反应孔内作为空白对照,其余的每个样本检测孔中分别加已稀释待检血清 $100 \mu\text{L}$; 37°C 避光反应 30 分钟后甩去孔内液体,每个孔内注满所述工作洗涤液,重复洗涤 3 次,每次洗涤均停留 1 分钟后甩净拍干 ;
 - D. 除空白对照孔外其余每孔内加入 1 滴所述酶结合物, 37°C 下避光反应 30 分钟后甩去孔内液体,按照步骤 C 中所述的操作对孔进行洗涤,拍干 ;
 - E. 各孔内分别加入所述底物和显色剂各一滴,混匀, 37°C 下避光显色 10 分钟,之后分别加入所述终止液一滴,混匀,终止反应 ;
 - F. 通过仪器判断结果,以空白对照调零,以 620nm 作参比波长,用酶标仪于 450nm 读取 O.D 值,若检孔 O.D 值大于阴性对照 2.1 倍为阳性,当阴性对照 O.D 值低于 0.08 时按 0.08 计算。
 4. 一对鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物,其用来克隆口蹄疫病毒 3ABC 基因,其特征在于,
 - 上游引物 T4-3A 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 4 所示,
 - 下游引物 T4-3C 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 5 所示。
 5. 一对鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物,其用来克隆口蹄疫病毒 3B 基因,其特征在于,
 - 上游引物 T4-3B1 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 6 所示,

下游引物 T4-3B2 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 7 所示。

6. 一对鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物,其用来克隆口蹄疫病毒 3D 基因,其特征在于,

上游引物 T4-3D1 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 8 所示。

下游引物 T4-3D2 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 9 所示。

一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体地,涉及一种家畜口蹄疫感染与免疫鉴别试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot-and-mouth disease,FMD)又称口疮热(Aphthous fever),是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus,FMDV)感染引起的偶蹄动物共患的急性、热性、高度接触性传染病。除了猪、牛、羊等主要家畜之外,FMDV还可以感染三十多种野生动物,感染后发病率几乎高达100%。患病动物的口、舌、蹄和乳房等部位出现水泡,破溃并形成烂斑。人也可以感染FMD,症状较轻,大多病程呈良性经过。世界各国都高度重视FMD疫情,世界动物卫生组织(OIE)和世界粮农组织(FAO)将其列为A类动物传染病之首。

[0003] 区分FMD野毒感染动物和疫苗免疫动物能准确反映一个地区的FMD感染状态,也是OIE判断一个国家或地区有无FMD的依据。在采取FMD计划免疫的预防措施的国家或地区,也必须实行严格的FMD进口检疫和国内疫情监测。在疫情监测的过程中,通常是以动物血清抗体检测为主,然而现有的血清学检测方法主要是针对FMDV的结构蛋白(structural protein)抗体的监测,这种检测可以确定动物是否接触过FMDV,但难以区分FMD免疫动物和自然感染动物。OIE规定存在FMD的地区必须进行疫苗免疫,而且一般采用灭活苗免疫。因为在疫苗制备过程中,病毒要经过灭活,纯化和乳化等过程,FMDV16的非结构蛋白(nonstructural protein,NSP)受到严重破坏,疫苗中几乎不存在NSP,因此,免疫动物体内无NSP抗体。感染FMD的动物,野毒在成熟或装配过程中伴随NSP的产生,因此感染动物体内存在NSP抗体。所以,检测NSP抗体可以区分免疫动物和感染动物。

[0004] NSP抗体检测方法包括以2C、3A、3B、3ABC和3D为基础的琼脂凝胶免疫扩散实验(AGID)、乳胶凝集实验、酶联免疫吸附实验(ELISA)、酶联免疫电转化斑点实验(enzyme immuno-transfer blotting,EITB)方法和免疫阻断方法(immuno-block method),De Dingo等(1997)应用ELISA的结果表明,ELISA是最佳方法,客观性强,敏感性高,适宜大规模样品的检测。

[0005] 但是,现有的检测方法仍存在着缺点和不足,主要有以下几点:①未利用噬菌体表面展示的多拷贝NSP抗原;②抗原分离纯化工艺复杂。

发明内容

[0006] 本发明的主要目的是,提供一种利用噬菌体表面展示的多拷贝NSP抗原,简化抗原分离纯化制备试剂盒。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0009] 一块预包被有吸附T4噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒3ABC抗原的ELISA微孔板,所述口蹄疫病毒3ABC抗原的氨基酸序列如SEQ ID:No.1所示;

[0010] 一块预包被有吸附T4噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒3B抗原的ELISA微孔

板,所述口蹄疫病毒 3B 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID:No. 2 所示;

[0011] 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3D 抗原的 ELISA 微孔板,所述口蹄疫病毒 3D 抗原的氨基酸序列如 SEQ ID:No. 3 所示;

[0012] 酶结合物:山羊抗猪抗体-辣根过氧化物酶结合物的水溶液,浓度为 $55 \mu\text{mol/L}$;

[0013] 洗涤液: 0.15mol/L 、 $\text{pH}7.2$ 的 PBS;

[0014] 底物:浓度为 0.1g/mL 的 TMB 水溶液;

[0015] 显色剂:浓度为 0.015g/mL 的 H_2O_2 水溶液;

[0016] 样本稀释液: 0.1g/mL 牛血清白蛋白,添加 0.1g/mL 叠氮化钠作保护剂;

[0017] 终止液: 2mol/L 的 H_2SO_4 ;

[0018] 阳性对照品:含 FMDV 抗体的猪血清,用蒸馏水按照 1:500 进行稀释,添加 0.1g/mL 叠氮化钠作保护剂;

[0019] 阴性对照品:不含 FMDV 抗体的猪血清,用蒸馏水按照 1:500 进行稀释,添加 0.1g/mL 叠氮化钠作保护剂。

[0020] 如上所述的试剂盒,其中优选地,所述 ELISA 微孔板为 96 孔 ELISA 微孔板。

[0021] 如上所述试剂盒的使用方法,其步骤如下:

[0022] A. 用蒸馏水或去离子水将所述洗涤液按 1:10 的体积比稀释,作为工作洗涤液;

[0023] B. 用所述样本稀释液将待检血清按 1:100 的体积比稀释;

[0024] C. 取所述阴性对照品和阳性对照品各 $100 \mu\text{L}$ 分别加入一个反应孔内,并取 $100 \mu\text{L}$ 所述样本稀释液加入一个反应孔内作为空白对照,其余的每个样本检测孔中分别加入已稀释待检血清 $100 \mu\text{L}$; 37°C 避光反应 30 分钟后甩去孔内液体,每个孔内注满所述工作洗涤液,重复洗涤 3 次,每次洗涤均停留 1 分钟后甩净拍干;

[0025] D. 除空白对照孔外其余每孔内加入 1 滴所述酶结合物, 37°C 下避光反应 30 分钟后甩去孔内液体,按照步骤 C 中所述的操作对孔进行洗涤,拍干;

[0026] E. 各孔内分别加入所述底物和显色剂各一滴,混匀, 37°C 下避光显色 10 分钟,之后分别加入所述终止液一滴,混匀,终止反应;

[0027] F. 通过仪器判断结果,以空白对照调零,以 620nm 作参比波长,用酶标仪于 450nm 读取 O.D 值,若检孔 O.D 值大于阴性对照 2.1 倍为阳性,当阴性对照 O.D 值低于 0.08 时按 0.08 计算。

[0028] 注意事项:试剂盒在 $2-8^\circ\text{C}$ 下保存,每次取出时先平衡至室温后使用。滴瓶每次用后一定要将盖拧紧,各瓶盖之间不可混用,各试剂盒之间不可混用。

[0029] 洗涤时将蒸馏水加满孔内,每次停放三十秒钟后甩去孔内液体。禁用自来水等其它水源。

[0030] 为提高实验的可比性建议使用仪器判读结果,并对阴性对照测复孔以减少误差。

[0031] 一对鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物,其用来克隆口蹄疫病毒 3ABC 基因,其特征在于,

[0032] 上游引物 T4-3A 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 4 所示,

[0033] 下游引物 T4-3C 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 5 所示。

[0034] 一对鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物,其用来克隆口蹄疫病毒 3B 基因,其特征在于,

[0035] 上游引物 T4-3B1 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 6 所示,

[0036] 下游引物 T4-3B2 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 7 所示。

[0037] 一对鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物,其用来克隆口蹄疫病毒 3D 基因,其特征在于,

[0038] 上游引物 T4-3D1 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 8 所示。

[0039] 下游引物 T4-3D2 的核苷酸序列如 SEQ ID:No. 9 所示。

[0040] 本发明的有益效果为:

[0041] 本发明首次将口蹄疫病毒(FMDV)非结构蛋白(NSP)3ABC、3B 和 3D 展示在 T4 噬菌体表面,并使用改造的高效可溶性表达载体对 3B 蛋白进行融合表达,建立 4 种区分 FMD 野毒感染动物和疫苗免疫动物 DIVA — ELISA 方法。

[0042] 本发明还提供了利用 T4 噬菌体表面多拷贝展示口蹄疫病毒 NSP 抗原 3ABC、3B 及 3D 制备的 ELISA 试剂盒,为感染与免疫鉴别诊断提供了新的技术手段。

具体实施方式

[0043] 一、制备抗原蛋白

[0044] 1. 根据 GenBank 中注册的 O 型 FMDV 的 3ABC 和 3D 基因序列设计特异性的引物对 T4-3A/T4-3C 和 T4-3D1/T4-3D2,分别用于克隆和表达 3ABC 和 3D 基因:

[0045] 上游引物 T4-3A :SEQ ID:No. 4 ;

[0046] 下游引物 T4-3C :SEQ ID:No. 5 ;

[0047] 上游引物 T4-3D1 :SEQ ID:No. 8 ;

[0048] 下游引物 T4-3D2 :SEQ ID:No. 9。

[0049] 采用 RT-PCR 方法扩增 3ABC 和 3D 基因片段并克隆到 pGEM-T Easy 载体中进行序列测定。对两个基因的操作过程相同,详述如下。

[0050] (1) 总 RNA 的萃取:

[0051] 取含 FMDV 的乳鼠体,剪碎,加入 Eppendorf 管中称重。按照 1g 加入 10mL 的比例逐渐加入 199 培养液(美国 Gibco 公司产品),在消毒的玻璃研磨器内反复研磨得到均匀的混悬液。从中吸出 250 μ L 混悬液,加入 TRIZOL LS 总 RNA 抽提溶液(美国 Invitrogen 公司产品) 750 μ L,混合备用,可置 -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0052] 抽提 BHK21 细胞传代适应的 FMDV 时,待细胞单层出现 100% 细胞病变(CPE)时,细胞脱壁悬浮。无菌收集细胞和培养液,10,000rpm 离心 10min。取沉淀,按照每 10cm² 的 BHK21 细胞单层加入 1mL TRIZOL LS,用移液器吹打溶解为均匀的混悬液,即用或置 -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0053] 将上述制备好的样品置 Eppendorf 管中,15 ~ 30 $^{\circ}$ C 下孵育 5min。然后按照每 1mL TRIZOL LS 加入 0.2mL 氯仿的比例加入氯仿,盖紧,大力摇动 15 次(共约 15s),置室温孵育 2-3min 后,在预先致冷至 2-8 $^{\circ}$ C 的冷冻高速离心机中离心 15min。

[0054] 离心后用 1mL 一次性注射器吸取上清,置新的无菌 Eppendorf 管中,按照 1mL TRIZOL LS 原量加入异丙醇 0.5mL,室温下置 10min,再在预先致冷至 2-8 $^{\circ}$ C 的冷冻高速离心机中离心 10min。

[0055] 用移液器吸去上清,沉淀按 TRIZOL LS 原量加入等量 75% 乙醇,轻轻振摇,在预先

致冷至 2-8℃ 的冷冻高速离心机中离心 15min。

[0056] 用移液器去掉酒精, 打开 Eppendorf 管盖, 置超净工作台吹风干燥 5-10min。管底的微量白色物质即为抽提出的总 RNA。

[0057] (2) 反转录:

[0058] 取 0.2mLEppendorf 管, 作为 A 管, 加入:

[0059] 5× 反转录酶 XL 缓冲液 4 μ L

[0060] dNTP 5 μ L

[0061] RNA 酶抑制剂 0.5 μ L

[0062] 将 A 管置冰盒中, 加入 AMV 反转录酶 XL 2 μ L;

[0063] 在抽提的总 RNA 的 Eppendorf 管中, 加入:

[0064] 上游引物 2 μ L

[0065] 下游引物 2 μ L

[0066] DEPC 水 3-5 μ L

[0067] 轻轻吹打溶解, 从中吸取 8.5 μ L 加入 A 管。将 A 管以 5,000rpm 离心 10s, 置 HYBAID PCR 仪中, 42℃ 保温 1h。

[0068] (3) PCR 扩增:

[0069] 在 0.5mL Eppendorf 管中, 制备反应体系, 总量为 100 μ L, 其中加入:

[0070]

反转录产物	10μL
上游引物	1μL
下游引物	1μL
ExTM Taq DNA 聚合酶	1μL
10×ExTMTaq 缓冲液	10μL
MgCl ₂ 溶液	8μL
dNTP 混合物	5μL
DEPC-水	64μL

[0071] 5,000rpm 离心 10s; 用 0.2mL Eppendorf 管分装, 10 μ L/ 管, 向每管中加入 10 μ L PCR 矿物油, 5,000rpm 离心 10s。按照温度梯度, 置 HYBAID 梯度 PCR 仪上, 进行降落 PCR 扩增, 相应的循环条件和温度列表如下:

循环数	变性	复性	聚合
[0072] 首轮循环	94℃, 3min	55-65℃, 45s	72℃, 60s
后续循环 (30 个)	94℃, 45s	55-65℃, 45s	72℃, 60s
末轮循环	94℃, 45s	55-65℃, 45s	72℃, 10min

[0073] (4) PCR 产物的检测:

[0074] 用 1×TAE 缓冲液配制 1% 琼脂糖凝胶, 其中添加 0.5ug/mL 溴化乙锭。取 PCR 扩增产物 5 μ L, 加入 2 μ L 加样缓冲液, 混匀后加入一个加样孔, 设置蛋白 Marker 对照, 用恒压

80V (约 35mA) 电泳 20 ~ 50 分钟。用紫外透射仪观察结果,凝胶成像系统拍照。

[0075] (5) PCR 产物的回收与纯化:

[0076] 应用 DNA 快速纯化回收试剂盒(德国 QIAGEN 公司产品)回收 PCR 产物:用 1×TAE 制备 1% 琼脂糖回收凝胶,其中添加 0.5ug/mL 溴化乙锭,加宽梳形成回收槽孔。在 PCR 产物中加入适量加样缓冲液,混匀后移入琼脂回收槽孔,另设一较小的 DNA Marker 孔道:用新鲜 1×TAE 电泳缓冲液,在 EC-320 电泳仪上 80V 恒压电泳 45 分钟。将回收胶取出,置紫外透射仪上小心地切下有所需大小的 DNA 条带的琼脂,操作中保持干净不受污染。

[0077] 按照 1g 加入 3mL 的比例混合琼脂和溶液 B,在装有切下琼脂的 Eppendorf 管中加入溶液 B,盖紧,置 50 ~ 55℃ 水浴 10 ~ 20 分钟,至琼脂胶充分溶化。其间漩涡振荡三次,以保证琼脂胶充分溶化。将溶化的琼脂倒入离心柱中,置 50℃ 培养箱中静置 20 分钟,8,000 离心 60s。一次加不完可分两次离心。加入 500 μL 溶液 C,8,000rpm 离心 60s,倒掉溶液。重复一次。15,000rpm 离心 60s,去掉水份。取出离心柱,置于 Eppendorf 管中,加入 50℃ 预热的溶液 D,在 50℃ 培养箱中静置 20min。15,000rpm 离心 60s,Eppendorf 管中即为回收的 DNA。检测合格后,置 -20℃ 保存备用。

[0078] (6) PCR 产物加尾:

[0079] 取 0.2mL Eppendorf 管,加入:

[0080]

10×EXTM Taq 缓冲液	1μL
dATP	1μL
PCR 回收纯化产物	6μL
PCR 矿物油	10μL
10×EXTM Taq 酶	2μL

[0081] 5,000 离心 10s;置 HYBAID PCR 仪上,70℃ 运行 30min,为 PCR 产物加上多聚 A (腺苷酸)尾巴。

[0082] (7) PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体质粒连接:

[0083] 取 0.2mL Eppendorf 管,加入:

[0084]

2×T4 DNA 连接酶缓冲液	5μL
pGEM-T Easy 载体	1μL
T4 DNA 连接酶	1μL
已加多聚 A 尾巴的 PCR 产物	3μL

[0085] 5,000rpm 离心 10s。置 4℃ 冰箱连接过夜。

[0086] (8) E. coli DH5 α 感受态细胞的制备和连接产物的转化:

[0087] 在新鲜 LB 培养板上划线接种 E. coli DH5 α,置 37℃ 培养过夜。从培养板上挑取单个菌落,接种于 2-3mL LB 培养液中,37℃ 下以 220rpm 振摇培养过夜。将菌液置 0℃ 的冰水混合物中 3h。取 1mL 菌液接种至 100mL 新鲜 LB 培养液,置 250mL 三角烧瓶中,37℃ 下以 200rpm 振摇培养 2-3h,使菌落 OD 值(600nm)达到 0.3-0.4。将三角瓶取出,立即冰水浴 15min。

[0088] 在无菌条件下,将菌液转移至 4℃ 预冷的两个 50mL 离心管中,3,000rpm 4℃ 离心 10min。弃去上清液,两支管均加入 4℃ 预冷的灭菌双蒸水,重悬浮菌体。将离心管的菌液合并,3,000rpm 4℃ 离心 10min。弃去上清液,加入 4℃ 预冷的 0.1mol/L 灭菌 CaCl₂ 10mL,重悬浮菌体,冰水浴 15 分钟,3,000rpm 4℃ 离心 10 分钟。尽量弃去上清液,加入 4℃ 预冷的 0.1mol/L 灭菌 CaCl₂ 1mL。将菌液分装,每个 0.2mL Eppendorf 管加入 50 μL,再加入 10 μL 4℃ 预冷的灭菌甘油,混匀后,置 -80℃ 保存备用。

[0089] 取制备好的感受态细胞 *E. coli* DH5 α 50-100 μL,加入 2-3 μL 连接产物,轻轻旋转以混合均匀,冰水浴 30min。在 HYBAID PCR 仪上,42℃ 热休克 1.5min,立即取出冰水浴 3min。将转化的细胞吸出,加入 200 μL LB 培养液中,37℃ 下以 150rpm 振摇培养 1.5h。

[0090] 取 LA 培养板两个,各加入 20mg/mL 的 X-gal 40 μL 和 IPTG 4 μL,无菌涂布均匀,置 37℃ 吸附 30min。取振摇培养的转化细菌 100-150 μL,分别加在两个板上,涂布均匀,37℃ 培养过夜。

[0091] 观察菌落生长情况,检查经过 24 ~ 48h 培养的蓝白斑菌落。挑取白色菌落,分别接种 2-3mL LA 培养液,37℃ 下以 220rpm 振摇培养,用于阳性重组子的筛选。

[0092] (9) 阳性重组子筛选:

[0093] 取 0.5mL Eppendorf 管,加入:

[0094]

上游引物	1.5μL
下游引物	1.5μL
Taq DNA 聚合酶	4μL
10×PCR 缓冲液	10μL
dNTP	7μL
DEPC 水	66μL

[0095] 5,000rpm 离心 10s;取 0.2mL Eppendorf 管,每管加入 9 μL 上述 PCR 混合液,在其中分别加入 1 μL 不同白色菌落的培养液和 10 μL PCR 矿物油,5,000rpm 离心 10s;置 HYBAID PCR 仪上进行扩增,相应的循环条件和温度列表如下:

	循环数	变性	复性	聚合
[0096]	首轮循环	94℃, 3min	58℃, 40s	72℃, 1min
	后续循环 (30 个)	94℃, 40s	58℃, 40s	72℃, 1min
	末轮循环	94℃, 40s	58℃, 40s	72℃, 10min

[0097] PCR 产物按前法电泳检查,看是否有条带及条带是否正确。

[0098] (10) 阳性重组子质粒的抽提和鉴定:

[0099] 选 PCR 阳性重组子(单个菌落) 2-3 个的培养液,分别取 100 μL 接种 LA 培养液 20mL,37℃ 下以 220rpm 振摇培养过夜。从中取 1.5mL 菌液,加入 1.5mL Eppendorf 管,15,000rpm 离心 10s,倒掉上清液,再加入 1.5mL 菌液,同样离心,取沉淀。在其中加入 10 μL 溶液 A 和 200 μL 溶液 B (DNA 快速纯化回收试剂盒,德国 QIAGEN 公司产品),用力充分振荡悬浮,室温静置 10 分钟。加入 200 μL 溶液 E,轻轻颠倒混匀 4-6 次,见溶液变粘即可。加入

200 μ L 溶液 C, 用力颠倒混匀 4-6 次, 见到白色沉淀。12, 000rpm 离心 5min, 取上清到离心柱中, 室温静置 5min。8, 000rpm 离心 60s, 弃下清, 柱中加入 500 μ L 溶液 D, 8, 000rpm 离心 60s, 弃下清。重复一次。15, 000rpm 离心 60s, 去除残留水份。取离心柱置于 1.5mL Eppendorf 管中, 加入 55 $^{\circ}$ C 预热的溶液 F 30 μ L, 在 55 $^{\circ}$ C 恒温箱中保温 10min, 12, 000rpm 离心 60s, 管底溶液即为质粒 DNA 溶液。

[0100] 取 2-5 μ L 质粒 DNA 溶液, 同前法进行琼脂凝胶电泳, 看是否回收到质粒 DNA。取抽提出的质粒按照菌液的方法进行 PCR 扩增鉴定; PCR 鉴定阳性的质粒及其菌液, 送宝生物(大连)有限公司和上海基康生物技术公司测序。测序应用 T7 和 SP6 启动子通用引物, 测得的序列合并, 经校对后, 应用 NCBI-BLAST 检索其是否是 FMDV3C 的序列。

[0101] 结果获得 5 个毒株的 3ABC 和 3D 基因核苷酸序列, 其中 L1 ~ L4 分离株的 3ABC 基因全长均为 1, 311bp, 编码 437 个氨基酸; L5 分离株的 3ABC 基因全长为 1, 281bp, 编码 427 个氨基酸。5 个毒株的 3D 基因全长均为 1, 410bp, 编码 470 个氨基酸。5 个分离株的 3ABCD 基因中, L1 ~ L4 核苷酸的同源性高达 98.7% ~ 99.5%, 推导氨基酸序列同源性高达 98.8% ~ 99.3%; L5 株的基因与前 4 株基因的核苷酸同源性介于 91.6% ~ 92.3%, 氨基酸同源性约为 93%; L5 分离株与 2002 年的香港毒株和 1999 年在台湾流行泛亚的 0 型泛亚毒株同源性较高, 而且它们的 3A 蛋白都缺失 10 个氨基酸残基。SOSUI 软件分析得出 5 株 FMDV 的跨膜区主要存在于 3A 蛋白的 1 ~ 23 氨基酸处和 56 ~ 77 氨基酸处。

[0102] 2. 利用前文所述的根据 3ABC 和 3D 基因设计的特异性引物对 T4-3A/T4-3C 和 T4-3D1/T4-3D2, 以及根据 3B 基因设计的特异性引物对 T4-3B1/T4-3B2:

[0103] 上游引物 T4-3B1: SEQ ID: No. 6;

[0104] 下游引物 T4-3B2: SEQ ID: No. 7。

[0105] 用 PCR 方法从上述 3ABC 和 3D 基因克隆到 pGEM-T Easy 载体中得到的重组质粒中, 扩增编码 3ABC、3B、3D 基因片段, 大小分别为 1, 311bp、213bp 和 1, 410bp, 各编码 437、71 和 470 个氨基酸。

[0106] 由于 3ABC 和 3D 基因存在 EcoR I 酶切位点 (GAATTC), 而表达质粒 pSOC 和噬菌体穿梭质粒 pR 只能用 EcoR I 酶切位点插入外源基因, 利用引物对 T4-3A/T4-3C 和 T4-3D1/T4-3D2, 进行拼接重叠延伸聚合酶链反应, 对 3ABC (含 3B) 和 3D 基因 EcoR I 酶切位点进行定点突变。突变好的 3ABC 和 3D 基因和 3B 基因通过 EcoR I 限制位点分别插入 pSOC 表达质粒 soc 基因的 3' 端, 获得重组质粒 pSOC-3ABC、pSOC-3B 和 pSOC-3D。用上述重组表达质粒分别转化 E. coli BL21 (DE3) 菌株, 在 1mmol/L IPTG 诱导下进行表达。

[0107] 经 SDS-PAGE 和 Western-Blot 检测表明, 获得了 3 种融合蛋白 SOC-3ABC、SOC-3B 和 SOC-3D, 其最高表达量分别占菌体蛋白量的 26.3%、29.8% 和 24.5%, 分子量大小分别为 57Ku、17Ku 和 63Ku, 该蛋白条带可与 FMDV 感染血清特异性结合。

[0108] 将 3ABC、3B、3D 基因片段插入 pR 整合质粒的 EcoR I 限制位点, 获得重组整合质粒 pR-3ABC、pR-3B 和 pR-3D, 用此重组质粒分别转化 E. coli E2 感受态细胞获得重组菌 pR-3ABC-E2、pR-3B-E2 和 pR-3D-E2。

[0109] 将重组菌与溶菌酶基因缺陷的 T4 噬菌体 T4-Z1 进行同源重组并用特异性引物进行 PCR 筛选, 将含有 3ABC、3B、3D 基因的噬菌体命名为 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B 和 Φ T4-3D。

[0110] 采用 SDS-PAGE 和 Western-Blot 检测纯化的重组噬菌体 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B 和

ΦT4-3D, 在电泳凝胶和硝酸纤维素膜上检测到分子量大小分别为 57Ku、17Ku 和 63Ku 的特异性蛋白条带, 该蛋白条带可与 FMDV 感染血清特异性结合。

[0111] 采用 3B 基因引物 T4-3B1/T4-3B2 从质粒 T-3ABC-L1 质粒中扩增 3B 基因, 经 EcoR I 和 Xho I 酶切位点将 3B 基因插入线性化载体 pET32a- (+)载体和 pEM 中, 经过 PCR 筛选, 获得 2 个重组子 pET-3B 和 pEM-3B, 分别转化 E. coli BL-21 (DE3), 在 1mmol/L IPTG 诱导下进行表达。

[0112] 经 SDS-PAGE 和 Western-Blot 检测表明, 获得 2 种融合蛋白 0M-3B 和 EM-3B, 其最高表达量分别占菌体蛋白量的 26.0% 和 50.0%, 分子量大小分别为 31Ku 和 40Ku, 两种融合蛋白均能与 FMDV 感染血清发生特异性结合反应。对融合蛋白 EM-3B 进行纯化和含量测定, 经紫外分光光度计测定, 纯化后的 EM-3B 蛋白浓度为 2.188mg/mL。

[0113] 将重组噬菌体 ΦT4-3ABC、ΦT4-3B、ΦT4-3D 进行大量扩增、收集和纯化, 与纯化的可溶性表达的融合蛋白 EM-3B 作为诊断抗原, 建立了 4 种 FMDV NSP 的抗体检测 DIVA-ELISA 试剂盒。

[0114] 所述试剂盒的组成为:

[0115] 预包被板: 3 块预包被 ELISA 微孔板: 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3ABC 抗原, 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3B 抗原, 一块预包被有吸附 T4 噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒 3D 抗原;

[0116] 酶结合物: 山羊抗猪抗体-辣根过氧化物酶 (1:1) 结合物水溶液, 浓度为 55 μmol/L;

[0117] 洗涤液: 0.15mol/L、pH7.2 的 PBS;

[0118] 底物: 含 0.1%g/mL TMB 水溶液;

[0119] 显色剂: 含 0.015%g/mL H₂O₂ 水溶液;

[0120] 样本稀释液: 0.1%g/mL 牛血清白蛋白, 添加 0.1%g/mL 叠氮化钠作保护剂;

[0121] 终止液: 2mol/L 的 H₂SO₄;

[0122] 阳性对照品: 含 FMDV 抗体的猪血清, 用蒸馏水按照 1:500 进行稀释, 添加 0.1%g/mL 叠氮化钠作保护剂;

[0123] 阴性对照品: 不含 FMDV 抗体的猪血清, 用蒸馏水按照 1:500 进行稀释, 添加 0.1%g/mL 叠氮化钠作保护剂。

[0124] 所述试剂盒的使用方法如下:

[0125] ①用蒸馏水或去离子水将浓缩洗涤液按 1:10 的体积比稀释。用样本稀释液将待检血清按 1:100 的体积比稀释, 充分混匀。阴、阳对照不用稀释, 直接加样。

[0126] ②向每个样本检测孔中分别加已稀释样本血清 100 μL, 同时设阴性、阳性及空白对照各一孔, 取阴性、阳性对照各 100 μL 分别加入反应孔内, 空白对照孔仅加入 100 μL 样本稀释液。37℃避光反应 30 分钟后甩去孔内液体, 每孔注满工作洗涤液洗涤 3 次, 每次均需停留 1 分钟后再甩净拍干。

[0127] ③除空白对照孔外其余每孔加酶结合物 1 滴, 37℃避光反应 30 分钟后甩去孔内液体, 如上洗涤, 拍干。

[0128] ④加底物和显色剂各一滴, 混匀, 37℃下避光显色 10 分钟。加终止液一滴, 混匀, 终止反应(加终止液后蓝色会变为黄色)。

[0129] ⑤以空白对照调零,620nm作参比波长,用酶标仪于450nm读取O.D值,若检孔O.D值大于阴性对照2.1倍则为阳性;当阴性对照O.D值低于0.08时按0.08计算。

[0130] 注意事项:试剂盒在2-8℃下保存,每次取出时先平衡至室温后使用。滴瓶每次用后一定要将盖拧紧,各瓶盖之间不可混用,各试剂盒之间不可混用。

[0131] 洗涤时将蒸馏水加满孔内,每次停放三十秒钟后甩去孔内液体。禁用自来水等其它水源。

[0132] 为提高实验的可比性建议使用仪器判读结果,并对阴性对照测复孔以减少误差。

[0133] 4种ELISA方法均能区分注苗动物和自然感染动物,具有很高的特异性(对于未免疫猪的特异性为100%) and 敏感性(感染豚鼠的敏感性均大于97.5%),并且不受不同血清型FMDV感染的限制。

[0134] 二、抗原抗体最适ELISA工作浓度的测定

[0135] 为了消除ΦT4噬菌体和大肠杆菌的干扰,在ΦT4-3ABC、ΦT4-3B、ΦT4-3D作为包被抗原的间接ELISA中,向抗体稀释液(0.1%BSA,添加0.1%叠氮化钠作保护剂)中加入1%ΦT4噬菌体,在EM-3B间接ELISA的抗体稀释液中加入1%的大肠杆菌破碎产物。

[0136] 采用棋盘滴定方法,测得最佳的抗原抗体反应的稀释浓度分别为:

[0137] 纯化重组噬菌体ΦT4-3B以1:20稀释,阳性血清1:20倍稀释P/N值较大,为4.07;

[0138] 纯化重组噬菌体ΦT4-3ABC以1:20稀释,阳性血清1:20倍稀释P/N值较大,为5.85;

[0139] 纯化重组噬菌体ΦT4-3D以1:20稀释,阳性血清1:20倍稀释P/N值较大,为4.17;

[0140] 纯化蛋白EM-3B以1:40稀释,其含量为54.7μg/mL,阳性血清1:20倍稀释P/N值较大,为8.58。

[0141] 三、临界值的确定

[0142] 1. 为了检验本实验所用的无免疫无感染血清的背景,采用现有技术中的两种试剂盒对40份无免疫无感染猪血清进行测定。

[0143] (1)按照中国农业科学院兰州兽医研究所研制的口蹄疫非结构蛋白3ABC-I-ELISA试剂盒(批号2005101908)的说明书进行测定,将待检血清和阴性、阳性对照血清进行1:21倍稀释后检测。

[0144] 实验成立的条件是:阳性对照平均OD值应大于0.6,阴性对照平均OD值应小于0.2。本次实验测出的阳性对照平均OD值为0.608,阴性对照平均OD值0.045,符合实验成立的条件。

[0145] 根据以下标准进行判定:抗体效价=(样品的OD450值-阴性血清的OD450均值)/(阳性血清的OD450均值-阴性血清的OD450均值),若效价<0.2为阴性,效价>0.3为阳性,效价0.2~0.3为可疑。本次实验的测定结果是,40份血清全部为阴性。

[0146] (2)按照北京世纪元亨动物防疫技术有限公司研制的口蹄疫病毒非结构蛋白抗体单抗阻断ELISA试剂盒(批号CB05040701)的说明书进行测定。首先将待检血清1:1比例进行稀释,阴性、阳性对照血清不用稀释进行检测。

[0147] 实验成立的条件是:阴性对照平均OD值-阳性对照平均OD值应≥0.6,阳性对照

阻断率均 $\geq 55\%$ 。本次实验测出的阳性对照 OD 值分别为 0.426、0.370, 阳性对照平均 OD 值为 0.398; 阴性对照 OD 值分别为 1.402、1.368, 阴性对照平均 OD 值为 1.385; 阴性对照平均 OD 值 - 阳性对照平均 OD 值 = $1.385 - 0.398 = 0.987 \geq 0.6$, 阳性对照阻断率分别为 69.2% 和 73.3%, 均符合试剂盒的实验条件。

[0148] 根据以下标准进行判定: 阻断率(Inh%) = (阴性对照平均 OD 值 - 样品 OD 值) / 阴性对照平均 OD 值 $\times 100\%$, 被检血清样品(猪血清)阻断率(Inh%) $\geq 30\%$, 判为 FMDV-NS 抗体阳性; $20\% \leq \text{Inh}\% < 30\%$, 判为 FMDV-NS 抗体可疑; $\text{Inh}\% < 20\%$, 判为 FMDV-NS 抗体阴性。本次实验的测定结果是, 全部 40 份血清样品的阻断率都低于 10%, 均为阴性血清。

[0149] 2. 以最适抗原包被浓度包被 ELISA 板, 即纯化重组噬菌体 $\Phi T4-3B$ 、 $\Phi T4-3ABC$ 、 $\Phi T4-3D$ 以 1:20 稀释, 纯化蛋白 EM-3B 以 1:40 稀释, 随机取无免疫无感染的 40 天龄的保育猪血清样品 40 份、标准阳性感染血清 1 份、标准阴性血清 1 份, 全部血清稀释 1:20 倍后进行 ELISA 检测, 测定血清的 OD450 值。

[0150] 采用 $\Phi T4-3ABC$ 、 $\Phi T4-3B$ 、 $\Phi T4-3D$ 和 EM-3B 4 种不同 NSP 抗原建立的 DIVA-ELISA 方法测定的 40 份非免疫非感染的血清样品的平均 OD450 值分别为: 0.3023、0.2862、0.3122、0.2910; 均差(SD)分别为 0.0389、0.0383、0.0365、0.0420。参考中国农业科学院兰州兽医研究所刘在新等(2005)制定的临界值判定标准: 阴性血清最高效价 = 血清的 OD450 均值 + 2SD, 阳性血清最低效价 = 血清的 OD450 均值 + 3SD, 校正后阴性血清效价上限 = (阴性血清最高效价 - 阴性血清的 OD450 均值) / (阳性血清的 OD450 均值 - 阴性血清的 OD450 均值), 校正后阳性血清效价下限 = (阳性血清最低效价 - 阴性血清的 OD450 均值) / (阳性血清的 OD450 均值 - 阴性血清的 OD450 均值)。

[0151] 因此, 根据公式: 阴性血清最高效价 = 血清的 OD450 均值 + 2SD, 阳性血清最低效价 = 血清的 OD450 均值 + 3SD, 计算出 4 种不同 NSP 抗原 DIVA-ELISA 方法测定的阴性血清最高效价分别为: 0.3801、0.3628、0.3852、0.3750; 阳性血清最低效价分别为: 0.4190、0.4011、0.4217、0.4170; 标准猪 O 型阳性血清 OD450 均值分别为: 0.996、0.963、0.958、1.029; 标准猪阴性血清 OD450 均值分别为: 0.230、0.208、0.242、0.215; 因此计算出校正后阴性血清效价上限都是 0.2, 校正后阳性血清效价下限都是 0.3。由此确定 4 种不同 NSP 抗原建立的 DIVA-ELISA 方法的判断标准为: 检测样本血清的抗体效价小于 0.2 为阴性, 介于 0.2 ~ 0.3 之间为可疑, 大于 0.3 为阳性。

[0152] 又, 根据公式: 抗体效价 = (样品的 OD450 均值 - 阴性血清的 OD450 均值) / (阳性血清的 OD450 均值 - 阴性血清的 OD450 均值), 计算每一份无免疫无感染血清的效价, 结果显示, 采用四种 DIVA-ELISA 方法的测定结果, 40 份猪未免血清效价都低于 0.2, 属于阴性血清。本实验 4 种间接 ELISA 方法对于未免猪的特异性达到 100%, 与上述现有技术中的两个试剂盒对未免猪检测结果的符合率达到 100%。

[0153] 四、封闭液的选择

[0154] 将 4 种 NSP 抗原按照最佳浓度稀释后以 $100 \mu\text{L}$ / 孔包被酶标微孔板, 4°C 过夜, 加入稀释好的血清后分别用 5% 脱脂奶粉、1% BSA 和 1% 明胶作为封闭液, 封闭时间 2h。对不同样品分别三次测定 P/N 值, 进行 ELISA 实验, 结果以 5% 脱脂奶粉 / PBS 或 1% BSA / PBS 封闭效果较好。因此, 后续实验选用 5% 脱脂奶粉 / PBS 作为封闭液。

[0155] 五、孵育时间对抗原抗体反应的影响

[0156] 以最适浓度抗原包被酶标板,加入阳性和阴性对照血清反应,按 ELISA 步骤进行操作,采用不同的反应时间进行实验:抗原与一抗的反应时间分别为 30min、60min 和 90min,与二抗的反应时间分别为 30min、60min 与 90min。同一样品进行反复三次测定 OD450,计算出 P/N 值,选择合适的反应时间。结果表明,抗原与一抗和二抗的反应时间均采用 60min 的效果最好。因此,后续实验选用抗原与一抗和二抗反应时间各为 60min 作为最佳孵育时间。

[0157] 六、交叉实验和阻断实验

[0158] 用最适浓度抗原包被酶标板:100 μ L/孔,置于 4℃ 冰箱过夜,分别加入对照血清测定其特异性。对照血清分别为豚鼠 O 型 FMD 阳性血清、豚鼠 FMD 阴性血清、豚鼠 A 型 FMD 阳性血清、豚鼠 Asia1 型 FMD 阳性血清、豚鼠 C 型 FMD 阳性血清、猪标准 O 型阳性血清、猪标准阴性血清、猪水疱病阳性血清、猪瘟阳性血清。

[0159] 采用 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D 和 EM-3B4 种抗原建立的 DIVA-ELISA 方法测定的标准豚鼠 O 型阳性血清 OD450 均值分别为:1.010、1.015、1.064、1.770;标准豚鼠阴性血清 OD450 均值分别为:0.239、0.227、0.257、0.229;根据公式抗体效价=(样品的 OD450 均值-豚鼠阴性血清的 OD450 均值)/(豚鼠 O 型 FMD 阳性对照血清-豚鼠阴性血清的 OD450 均值),计算出 4 种 DIVA-ELISA 方法测定的豚鼠 A 型 FMD 阳性对照血清的效价分别为:0.59、0.66、0.44、0.76;豚鼠 Asia1 型 FMD 阳性对照血清的效价分别为:0.66、0.68、0.49、0.88;豚鼠 C 型 FMD 阳性对照血清的效价分别为:0.53、0.54、0.34、0.36,根据抗体效价大于 0.3 为阳性的判定标准可以得出,4 种 DIVA-ELISA 方法无血清型特异性,与 O 型、A 型、Asia1 型和 C 型的标准血清有交叉反应,每一种间接 ELISA 方法都可以同时测出 O 型、A 型、Asia1 型和 C 型的感染血清中的非结构蛋白抗体。

[0160] 采用 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D 和 EM-3B4 种抗原建立的 DIVA-ELISA 方法测定的标准猪 O 型阳性血清 OD450 均值分别为:1.036、1.125、0.996、1.118;标准猪阴性血清 OD450 均值分别为:0.201、0.193、0.201、0.196;根据公式抗体效价=(样品的 OD450 均值-猪阴性血清的 OD450 均值)/(猪 O 型 FMD 阳性对照血清-猪阴性血清的 OD450 均值),计算出 4 种 DIVA-ELISA 方法测定的猪水疱病标准阳性血清的效价分别为:0.14、0.12、0.15、0.12;猪瘟标准阳性血清的效价分别为:0.12、0.13、0.13、0.14。根据抗体效价低于 0.2 为阴性的标准可以判定 4 种方法与猪水疱病标准阳性血清和猪瘟标准阳性血清无交叉反应性,特异性良好。

[0161] Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D 和 EM-3B 四种诊断抗原的阻断实验的(N-P)/N=(未阻断孔 OD 值-阻断孔 OD 值)/未阻断孔 OD 值均大于 0.5,其中用猪阳性血清阻断, Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D 和 EM-3B 诊断抗原的(N-P)/N 分别为 0.605、0.578、0.580 和 0.681。表明本研究采用 4 种不同 NSP 抗原建立的 DIVA-ELISA 方法特异性良好。

[0162] 七、重复性实验

[0163] 以 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D 和 EM-3B 为包被抗原,分别取 5 份待检的豚鼠感染血清在同一条件下重复 5 次实验,求出变异系数(CV)。结果表明,4 个 DIVA-ELISA 试剂盒的变异系数都小于 8%,说明在不同时间的操作具有良好的重复性。

[0164] 八、猪免疫血清的检测

[0165] 用已建立的 4 种 ELISA 方法检测 40 份送检猪免疫血清(免疫 2 次以上的母猪血

清),同时用两种现有试剂盒进行对照,根据检测样本血清的抗体效价小于0.2为阴性,介于0.2~0.3之间为可疑,大于0.3为阳性的标准进行结果判断。

[0166] 用本发明建立的 Φ T4-3ABC-I-ELISA方法对于经过多次免疫的猪的血清进行测定,根据效价介于0.2~0.3之间为可疑的判定标准,40份免疫血清中有5份为可疑血清,该ELISA方法对于免疫猪的特异性为87.5%(35/40),远远低于对于未免疫猪的特异性(100%); Φ T4-3B-I-ELISA方法检测结果中有2份可疑血样,该方法对于免疫猪的特异性为95%;EM-3B-I-ELISA方法检测结果中有2份可疑血样,该方法对于免疫猪的特异性也是95%; Φ T4-3D-I-ELISA方法检测结果中有2份阳性,10份可疑血样,该方法对于免疫猪的特异性只有70%。说明猪体经过FMD疫苗多次免疫后FMDV非结构蛋白3D抗体大大提高,而3ABC抗体也略有升高。

[0167] 从两种现有试剂盒的实验结果可以看出,兰州兽医研究所研制的3ABC-I-ELISA试剂盒检测40份猪免疫血清中,有4份呈现抗体可疑,对于免疫猪的特异性为90.0%(36/40),而口蹄疫病毒非结构蛋白抗体单抗阻断ELISA试剂盒检测结果中只有1份可疑血清,对于免疫猪的特异性为97.5%(39/40)。九、豚鼠感染血清的检测

[0168] 用本发明建立的ELISA方法检测40份具有明显的临床症状的人工感染豚鼠血清,同时用两种现有试剂盒进行对照。

[0169] 取40份具有明显的FMD临床症状的豚鼠的FMD感染血清,用本研究建立的 Φ T4-3ABC-I-ELISA方法、 Φ T4-3B-I-ELISA方法和 Φ T4-3D-I-ELISA方法检测全部为阳性,对于感染豚鼠的敏感性高达100%;而由EM-3B-I-ELISA方法检测只有39份阳性,1份为可疑,对于感染豚鼠的敏感性为97.5%。

[0170] 使用两种现有试剂盒对同样的40份豚鼠FMD感染血清进行检测,其中兰州兽医研究所研制的3ABC-I-ELISA试剂盒检测40份感染血清全部为阳性,对于感染豚鼠的敏感性为100%;而口蹄疫病毒非结构蛋白抗体单抗阻断ELISA试剂盒检测结果中有1份可疑血清(根据口蹄疫病毒非结构蛋白抗体单抗阻断ELISA试剂盒对于其它动物血清的阻断率 $I_{hn}\% \geq 40\%$ 为阳性, $20\% \leq I_{hn}\% < 30\%$ 为可疑, $I_{hn}\% < 20\%$ 为阴性的判定标准可以得出,40份豚鼠感染血清中有一份是可疑血清)对于感染豚鼠的敏感性为97.5%(39/40)。

[0171] 除了 Φ T4-3D-I-ELISA方法检测结果与3ABC-I-ELISA试剂盒和单抗阻断ELISA试剂盒检测结果符合率低于95%,分别为91.67%和89.17%以外(说明免疫动物体内含有较高水平的3D抗体)。本发明的其它3种间接ELISA方法与现有技术的两个试剂盒进行检测结果比较,符合率皆大于95%。

[0172] 总的来讲,对于未免疫猪而言,本实验采用 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D、和EM-3B 4种不同抗原建立的4种DIVA-ELISA方法(Φ T4-3ABC-I-ELISA方法、 Φ T4-3B-I-ELISA方法、 Φ T4-3D-I-ELISA方法、EM-3B-I-ELISA方法)具有很高的特异性,全部为100%,与猪瘟和猪水疱病无交叉反应性,而且4个ELISA方法无型特异性,即不受不同血清型FMDV感染的限制。

[0173] 对于经过多次免疫猪而言,本实验建立的4种DIVA-ELISA方法的特异性有所下降,特异性高低依次为: Φ T4-3B-I-ELISA方法的特异性=EM-3B-I-ELISA方法的特异性(都为95%)> Φ T4-3ABC-I-ELISA方法的特异性(87.5%)> Φ T4-3D-I-ELISA方法的特异性(70%),说明猪经过多次免疫后,非结构蛋白3D抗体大大升高,而3ABC抗体也略有升高。使

用两种现有试剂盒也同样证实这一点。

[0174] 对于感染 FMD 的豚鼠而言,本实验使用 Φ T4-3ABC、 Φ T4-3B、 Φ T4-3D 和 EM-3B 4 种不同抗原建立的 DIVA-ELISA 方法具有很高的敏感性, Φ T4-3ABC-I-ELISA 方法、 Φ T4-3B-I-ELISA 方法、 Φ T4-3D-I-ELISA 方法和 EM-3B-I-ELISA 方法敏感性分别为 100%、100%、100%和 97.5%。这与两个现有试剂盒的结果相似(敏感性为 100%和 97.5%)。

[0175] 本实验使用 4 种不同抗原建立的 DIVA-ELISA 方法与现有技术中的两个试剂盒的符合率除了 Φ T4-3D-I-ELISA 方法略为偏低以外,其它 3 种间接 ELISA 方法与试剂盒的符合率都比较高,大于 95%。

[0001]

序列表

<110> 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心

<120> 一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物及试剂盒

<130>

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> *Aphtae epizooticae*

<400> 1

Ile Ser Ile Pro Ser Gln Lys Ala Val Leu Tyr Phe Leu Ile Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Gln His Glu Ala Ala Ile Glu Phe Phe Glu Gly Met Val His Asp
 20 25 30

Ser Ile Lys Glu Glu Leu Arg Pro Leu Ile Gln Gln Thr Ser Phe Val
 35 40 45

Lys Arg Ala Phe Lys Arg Leu Lys Glu Asn Phe Glu Ile Val Ala Leu
 50 55 60

Cys Leu Thr Leu Leu Ala Asn Ile Val Ile Met Ile Arg Glu Thr Arg

[0002]

65	70	75	80
Lys Arg Gln Gln Met Val Asp Asp Ala Val Asn Glu Tyr Ile Glu Lys			
	85	90	95
Ala Asn Ile Thr Thr Asp Asp Lys Thr Leu Asp Glu Ala Glu Lys Asn			
	100	105	110
Pro Leu Glu Thr Ser Gly Ala Ala Thr Val Gly Phe Arg Glu Lys Thr			
	115	120	125
Leu Pro Gly His Lys Ala Ser Asp Asp Val Asn Ser Glu Pro Ala Lys			
	130	135	140
Pro Val Glu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Gly Pro Tyr Thr Gly Pro Leu			
	145	150	155
Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu			
	165	170	175
Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys			
	180	185	190
Val Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys			
	195	200	205
Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu			
	210	215	220
Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr			
	225	230	235
			240

[0003]

Lys Pro Val Glu Leu Ile Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys
 245 250 255

Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe
 260 265 270

Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp
 275 280 285

Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asp
 290 295 300

Met Leu Ser Asp Ala Ala Leu Met Val Leu His Arg Gly Asn Arg Val
 305 310 315 320

Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Val Ala Arg Met Lys Lys Gly
 325 330 335

Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile
 340 345 350

Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met Asp
 355 360 365

Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr Lys Ala
 370 375 380

Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Glu Thr Phe
 385 390 395 400

Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser
 405 410 415

[0004]

Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met Lys Ala His Ile Asp Pro
 420 425 430

Glu Pro His His Glu
 435

<210> 2

<211> 71

<212> PRT

<213> Aphtae epizooticae

<400> 2

Gly Pro Tyr Thr Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Arg
 1 5 10 15

Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg
 20 25 30

Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Val Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly
 35 40 45

Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala
 50 55 60

Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu
 65 70

<210> 3

[0005]

<211> 470

<212> PRT

<213> Aphtae epizooticae

<400> 3

Gly Leu Ile Val Asp Thr Arg Asp Val Glu Glu Arg Val His Val Met
1 5 10 15

Arg Lys Thr Lys Leu Ala Pro Thr Val Ala His Gly Val Phe Asn Pro
 20 25 30

Glu Phe Gly Pro Ala Ala Leu Ser Asn Lys Asp Pro Arg Leu Asn Glu
 35 40 45

Gly Val Val Leu Asp Glu Ala Ile Phe Ser Lys His Lys Gly Asn Thr
 50 55 60

Lys Met Ser Glu Glu Asp Lys Ala Leu Phe Arg Arg Cys Ala Ala Asp
65 70 75 80

Tyr Ala Ser Arg Leu His Ser Val Leu Gly Thr Ala Asn Ala Pro Leu
 85 90 95

Ser Thr Tyr Glu Ala Ile Lys Gly Val Asp Gly Leu Asp Ala Met Glu
 100 105 110

Pro Asp Thr Ala Pro Gly Leu Pro Trp Ala Leu Gln Gly Lys Arg Arg
 115 120 125

Gly Ala Leu Ile Asp Phe Glu Asn Gly Thr Val Gly Pro Glu Val Glu
 130 135 140

[0006]

Ala Ala Leu Lys Leu Met Glu Lys Arg Glu Tyr Lys Phe Val Cys Gln
 145 150 155 160

Thr Phe Leu Lys Asp Glu Ile Arg Pro Met Glu Lys Val Arg Ala Gly
 165 170 175

Lys Thr Arg Ile Val Asp Val Leu Pro Val Glu His Ile Leu Tyr Thr
 180 185 190

Arg Met Met Ile Gly Arg Phe Cys Ala Gln Met His Ser Asn Asn Gly
 195 200 205

Pro Gln Ile Gly Ser Ala Val Gly Cys Asn Pro Asp Val Asp Trp Gln
 210 215 220

Arg Phe Gly Thr His Phe Ala Gln Tyr Arg Asn Val Trp Asp Val Asp
 225 230 235 240

Tyr Ser Ala Phe Asp Ala Asn His Cys Ser Asp Ala Met Asn Ile Met
 245 250 255

Phe Glu Glu Val Phe Asn Thr Asp Phe Gly Phe His Pro Asn Ala Glu
 260 265 270

Trp Ile Leu Lys Thr Leu Val Asn Thr Glu His Ala Tyr Glu Asn Lys
 275 280 285

Arg Ile Thr Val Glu Gly Gly Met Pro Ser Gly Cys Ser Ala Thr Ser
 290 295 300

Ile Ile Asn Thr Ile Leu Asn Asn Ile Tyr Val Leu Tyr Ala Leu Arg

[0007]

305	310	315	320
Arg His Tyr Glu Gly Val Glu Leu Asp Ser Tyr Thr Met Ile Ser Tyr			
	325	330	335
Gly Asp Asp Ile Val Val Ala Ser Asp Tyr Asp Leu Asp Phe Glu Ala			
	340	345	350
Leu Lys Pro His Phe Lys Ser Leu Gly Gln Thr Ile Thr Pro Ala Asp			
	355	360	365
Lys Ser Asp Lys Gly Phe Val Leu Gly His Ser Ile Thr Asp Val Thr			
	370	375	380
Phe Leu Lys Arg His Phe His Met Asp Tyr Gly Thr Gly Phe Tyr Lys			
	385	390	395
Pro Val Met Ala Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ile Leu Ser Phe Ala Arg			
	405	410	415
Arg Gly Thr Ile Gln Glu Lys Leu Ile Ser Val Ala Gly Leu Ala Val			
	420	425	430
His Ser Gly Pro Asp Glu Tyr Arg Arg Leu Phe Glu Pro Phe Gln Gly			
	435	440	445
Leu Phe Glu Ile Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Tyr Leu Arg Trp Val Asn			
	450	455	460
Ala Val Cys Gly Asp Ala			
	465	470	

[0008]

- <210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
- <400> 4
ctagaattct atctcaattc cticecaaaa 30
- <210> 5
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
- <400> 5
aggatgaattc ttactcgtgg tgtgggttcgg gatcgat 37
- <210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
- <400> 6
attgaattct ggaccctacg ccgggccact c 31
- <210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

[0009]

<400> 7	
gtagaattct tactcagtga caatcaagtt	30
<210> 8	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
tatagaattc tgggttgatc gtcgacacca ga	32
<210> 9	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
cgcagaattc ttatgcgtca ccgcacacgg cgtt	34

专利名称(译)	一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的引物及试剂盒		
公开(公告)号	CN103063838A	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201210385688.0	申请日	2012-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	林志雄 田纯见 马静云 罗琼 鱼海琼 罗长保 陈茹 刘志玲 王宏 吴晓薇 毕英佐		
发明人	林志雄 田纯见 马静云 罗琼 鱼海琼 罗长保 陈茹 刘志玲 王宏 吴晓薇 毕英佐		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	王淳		
其他公开文献	CN103063838B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种鉴别进境动物口蹄疫感染与免疫的试剂盒，包含3块预包被ELISA微孔板：分别预包被有吸附T4噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒3ABC抗原、吸附T4噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒3B抗原、吸附T4噬菌体表面多拷贝展示的口蹄疫病毒3D抗原；山羊抗猪抗体-辣根过氧化物酶结合物；洗涤液：0.15mol/L、pH7.2的PBS；底物：0.1%TMB溶液；显色剂：0.015%H₂O₂；样本稀释液：0.1%牛血清白蛋白，0.1%叠氮化钠作保护剂；终止液：2mol/LH₂SO₄；阳性对照品，500倍稀释，0.1%叠氮化钠作保护剂；阴性对照品，500倍稀释，0.1%叠氮化钠作保护剂。

反转录产物	10 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
ExTM Taq DNA 聚合酶	1 μ L
10 \times ExTMTaq 缓冲液	10 μ L
MgCl ₂ 溶液	8 μ L
dNTP 混合物	5 μ L
DEPC-水	64 μ L