



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106596932 B

(45)授权公告日 2019.01.25

(21)申请号 201611051539.5

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.11.25

G01N 21/76(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 李倩

申请公布号 CN 106596932 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(73)专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730000 甘肃省兰州市城关区盐场堡

徐家坪1号

(72)发明人 常惠芸 刘泽众 邵军军 赵付荣

李秀梅 张永光

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所

(普通合伙) 41120

代理人 程茗

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

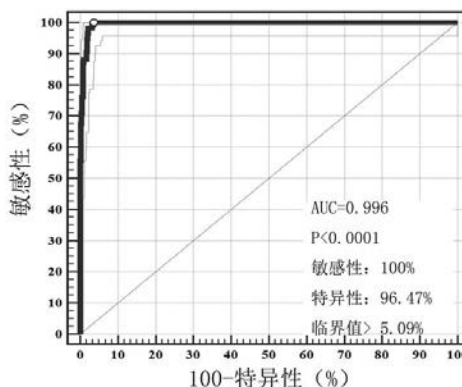
序列表6页 附图3页

(54)发明名称

一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒

(57)摘要

一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒,属免疫学检测领域,所述试剂盒包含化学发光免疫反应板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液,其特征在于:所述化学发光免疫反应板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔板,每孔内底部联合包被3ABC和2C融合蛋白;所述酶标抗体为HRP-兔抗猪IgG抗体;所述血清稀释液包含Tween-20、牛血清白蛋白和大肠杆菌裂解液;所述化学发光底物为鲁米诺和牛血清白蛋白;所述化学发光增强剂含有IPP、H₂O₂和Tween-20。本发明所述试剂盒,相对于只包被3ABC抗体的CLIA和市售常用的ELISA试剂盒相比,具有较高的敏感性、特异性和诊断能力,重复性与稳定性也较好。



1. 一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒,所述检测试剂盒包含化学发光免疫反应板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液,其特征在于:

所述化学发光免疫反应板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔板,每孔内底部联合包被3ABC和2C融合蛋白;

所述3ABC和2C融合蛋白的联合包被过程为:将3ABC和2C融合蛋白加入到pH=9.6的碳酸盐缓冲液中,使3ABC和2C融合蛋白的浓度均为250ng/mL,30-37℃水浴15min;再加入柠檬酸铵,溶解,形成包被液,其中,包被液中柠檬酸铵的质量体积分数为20%;以100μL/孔的加样量将包被液加入到化学发光免疫反应板中,37℃孵育1h,再于4℃处理20-24h,甩掉化学发光免疫反应板中的包被液;再向每孔中加入200μL血清稀释液进行封闭,4℃静置20-24h;用PBST洗涤液洗涤2-3次,于37-50℃干燥1-2h,装袋封口,2-8℃保存;

所述3ABC融合蛋白为重组蛋白,其中的3C蛋白上第46位组氨酸突变为酪氨酸和第163位半胱氨酸突变为甘氨酸;

所述3ABC和2C融合蛋白制备中,3ABC融合蛋白所用的表达载体为pPROEX-HTb载体,2C融合蛋白所用的表达载体为SUM0载体;

所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG抗体;

所述血清稀释液为pH=7.2~7.4且浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液,其中包含体积分数为0.01%的Tween-20、质量体积百分数为1%的牛血清白蛋白和体积分数为1%的大肠杆菌裂解液;

所述化学发光底物包含0.1mmol/L的鲁米诺和质量体积分数为0.1%的牛血清白蛋白,溶剂为0.05mol/L、pH=8.8的Tris缓冲液;

所述化学发光增强剂含有0.07mmol/L的IPP、3mmol/L的H₂O₂和体积分数为0.002%的Tween-20,余量为水。

2. 如权利要求1所述的一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述酶标抗体的制备是在交联剂过碘酸钠作用下,将辣根过氧化物酶连接在抗体上,再加入硼氢化钠进行还原稳定。

3. 如权利要求1所述的一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述大肠杆菌裂解液是将未经转化的大肠杆菌*Rosetta (DE3)*培养至对数期,离心,得菌体沉淀;向菌体沉淀中加入与其等体积的50mmol/L的PBS缓冲液,混匀,得混合物I;将混合物I置于-80℃冰冻,再室温融解,反复冻融三次;将经反复冻融的混合物I置于400W条件下超声破碎5s,重复5次,每次间隔5s,得混合物II;将混合物II进行离心,取上清,即为大肠杆菌裂解液。

一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体地涉及一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的一种急性、烈性传染病。口蹄疫病毒属于核糖核酸科,口蹄疫病毒属。它包括一个单链正义RNA,该RNA首先转录翻译成一个大的多聚蛋白,然后在蛋白酶的作用下被切割成四个结构蛋白(SP)(VP1、VP2、VP3、VP4)和10个非结构蛋白(NSP)(L、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D、3AB、3ABC)。其中四个结构蛋白组成病毒的衣壳,而非结构蛋白对于口蹄疫病毒的复制是必不可少的。

[0003] 防控口蹄疫主要实施疫苗普遍免疫、扑杀、血清监测的形式。有效的血清监测对于防控口蹄疫的爆发至关重要。而区分疫苗免疫动物与口蹄疫感染动物(DIVA)对于监测口蹄疫是非常重要的。目前已经建立了许多关于口蹄疫的DIVA方法,例如病毒分离实验、病毒中和实验、实时定量PCR、分泌液 IgA ELISA 和基于NSP的ELISA。其中NSP ELISA由于具有高的敏感性和特异性而被普遍应用。市场上已经有许多检测3ABC、2C、3AB、2B等的商品化ELISA试剂盒,但这些ELISA方法敏感性与重复性差,常常不能满足临床检测的需求,尤其是对于那些已经免疫后的又感染口蹄疫病毒的动物。这些动物体内由于具有中和抗体使得口蹄疫病毒的复制很慢,导致体内具有很低浓度的非结构蛋白,因此用当前这种ELISA方法很难检测到。在各种非结构蛋白中,由于3ABC蛋白抗体具有很高的丰度以及它在体内较其它结构蛋白抗体持续时间长,而被目前普遍认为是最重要的感染口蹄疫的指标,但是3ABC抗体的产生时间和应答水平存在个体差异,已有研究表明,猪对口蹄疫病毒不如其他动物敏感,有时在接种口蹄疫病毒的猪机体内并不能检测到3ABC抗体或3ABC抗体产生的时间延迟,所以,以单独包被3ABC融合蛋白的试剂盒检测猪口蹄疫病毒,其结果会出现假阴性,准确性不高。2C蛋白是一个膜蛋白,它在纯化额灭活疫苗中是不存在的。此外,2C蛋白的抗体出现较早,被广泛用于检测口蹄疫的早期感染。由于动物感染口蹄疫后再不同时期会出现不同的非结构蛋白抗体,因此检测单一的非结构蛋白抗体是不准确的。所以对于诊断猪口蹄疫来说,至少应该检测一种以上的非结构蛋白。

[0004] 化学发光免疫分析技术(CLIA)是在放射性免疫和酶联免疫分析的基础上逐渐发展建立的。化学发光不需要背景荧光,所有的能量都来自于化学反应,因此消除了背景荧光,可以在很宽的线性范围内检测极低浓度的分析物。当前CLIA在人医诊断中已经较为普遍应用,例如检测艾滋病病毒、乙型肝炎病毒、检测肿瘤标记物等等。当前关于猪口蹄疫诊断的化学发光免疫分析方法还未见报道。

发明内容

[0005] 针对口蹄疫病毒检测所面临的问题,本发明拟提供一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒,该试剂盒相对于市场上常用的试剂盒产品,敏感性更高,特异性更强,

诊断能力亦优于其他市售产品。

[0006] 一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒,所述检测试剂盒包含化学发光免疫反应板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液;所述化学发光免疫反应板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔板,每孔内底部联合包被3ABC和2C融合蛋白;

[0007] 所述3ABC和2C融合蛋白的联合包被过程为:将3ABC和2C融合蛋白加入到pH=9.6的碳酸盐缓冲液中,使3ABC和2C融合蛋白的浓度均为250ng/mL,30-37℃水浴15min;再加入柠檬酸铵,溶解,形成包被液,其中,包被液中柠檬酸铵的质量体积分数为20%;以100μL/孔的加样量将包被液加入到化学发光免疫反应板中,37℃孵育1h,再于4℃处理20-24h,甩掉化学发光免疫反应板中的包被液;再向每孔中加入200μL血清稀释液进行封闭,4℃静置20-24h;用PBST洗涤液洗涤2-3次,于37-50℃干燥1-2h,装袋封口,2-8℃保存;

[0008] 所述3ABC融合蛋白为重组蛋白,其中的3C蛋白上第46位组氨酸突变为酪氨酸和第163位半胱氨酸突变为甘氨酸;

[0009] 所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG抗体;

[0010] 所述血清稀释液为pH=7.2~7.4且浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液,其中包含体积分数为0.01%的Tween-20、质量体积百分数为1%的牛血清白蛋白和体积分数为1%的大肠杆菌裂解液;

[0011] 所述化学发光底物包含0.1mmol/L的鲁米诺和质量体积分数为0.1%的牛血清白蛋白,溶剂为0.05mol/L、pH=8.8的Tris缓冲液;

[0012] 所述化学发光增强剂含有0.07 mmol/L的IPP、3mmol/L的H₂O₂和体积分数为0.002%的Tween-20,余量为水。

[0013] 进一步的,所述酶标抗体的制备是在交联剂过碘酸钠作用下,将辣根过氧化物酶连接在抗体上,再加入硼氢化钠进行还原稳定。

[0014] 进一步的,所述大肠杆菌裂解液是将未经转化的大肠杆菌*Rosetta (DE3)*培养至对数期,离心,得菌体沉淀;向菌体沉淀中加入与其等体积的50mmol/L的PBS缓冲液,混匀,得混合物I;将混合物I置于-80℃冰冻,再室温融解,反复冻融三次;将经反复冻融的混合物I置于400W条件下超声破碎5s,重复5次,每次间隔5s,得混合物II;将混合物II进行离心,取上清,即为大肠杆菌裂解液。

[0015] 本发明所述的试剂盒检测猪口蹄疫3ABC和2C抗体的方法,包括以下步骤:将待检血清用血清稀释液稀释40倍后加入到化学发光免疫反应板中,同时设置标准阳性血清和标准阴性血清作为对照,将化学发光免疫反应板于37℃反应30min;用PBST洗涤液洗涤5次,加入用血清稀释液稀释40000倍的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG抗体,37℃孵育30min;再经PBST洗涤液洗涤5次,加入化学发光底物和化学发光增强剂,5min后用化学发光免疫分析检测仪器检测发光值。

[0016] 进一步的,所述标准阳性血清是经口蹄疫病毒感染后60天的高感染滴度的猪血清;所述标准阴性血清是未免疫过任何疫苗的健康猪血清。

[0017] 有益效果

[0018] 1、本发明人利用原核表达系统,成功表达了全长3ABC蛋白和全长2C蛋白,并获得了两种高纯度的目的蛋白,其中的3ABC蛋白是利用基因定点突变技术,将其3C上特异的蛋

白酶活性位点-第46位组氨酸(CAC)和第163位半胱氨酸(TGT)分别突变成了酪氨酸(TAC)和甘氨酸(GGT);然后将该两种蛋白联合包被到反应板上,制备化学发光免疫检测试剂盒,该试剂盒能成功区分疫苗免疫的猪与口蹄疫感染的猪,实现了对口蹄疫高敏感、准确的检测,为猪口蹄疫的检疫与预防提供了条件。

[0019] 2、本发明所述融合蛋白的联合包被过程中,将两种蛋白同时加入到缓冲溶液中,在温和条件下达到分子间的平衡,防止因为分子竞争出现包被不均匀;同时考虑到两种蛋白同时存在于包被液中,单一蛋白纯度降低,物理吸附力减弱,所以在包被液中加入柠檬酸铵,柠檬酸离子上含有3个羧基,由于电子的离域效应,产生的极性位点与蛋白分子结合形成配位结构,减少蛋白分子的游离,使吸附在固相载体上的分子量增加;铵离子在碱溶液生成少量氨气,催化吸附的进行,从而提高吸附效率与双蛋白的平均化,提高化学发光免疫反应板的质量。

[0020] 3、本发明所述试剂盒利用本发明所述抗体的检测方法检测血清样品,当样品的阳性百分率(PP) $>5.09\%$ 时,诊断的敏感性可达100%(95%置信区间:96.9-100.0),同时诊断特异性可达96.47%(95%置信区间:94.7-97.8);通过对已知背景的血清样品进行检测,与单独包被3ABC蛋白的CLIA试剂盒(3ABC CLIA试剂盒)相比,本发明所述试剂盒具有较高的符合率;与市售常用的ELISA试剂盒相比,具有较高的诊断能力;检测血清样品批间与批内的重复性好;包被3ABC和2C的CLIA板可以在4 $^{\circ}\text{C}$ 放置1年之久,具有很好的稳定性。

附图说明

[0021] 图1是3ABC蛋白纯化SDS-PAGE图,其中M:maker; 1:上样前;2:上样后;3和4:洗脱的目的蛋白。

[0022] 图2是2C蛋白纯化SDS-PAGE图,其中M:maker;1和2:洗脱的目的蛋白。

[0023] 图3是western blot图,其中 M: maker;1:纯化的3ABC; 2:纯化的2C。

[0024] 图4是用单独包被3ABC的CLIA试剂盒检测的血清样品ROC 曲线图。

[0025] 图5是用联合包被3ABC和2C的CLIA试剂盒检测的血清样品ROC 曲线图。

[0026] 图6是95%置信区间内单独包被3ABC的CLIA试剂盒诊断敏感性和诊断特异性在不同临界值时的变化比较图。

[0027] 图7是95%置信区间内联合包被3ABC和2C的CLIA试剂盒诊断敏感性和诊断特异性在不同临界值时的变化比较图。

[0028] 图8是单独包被3ABC的CLIA试剂盒检测血清背景交互点图,其中0:代表口蹄疫阴性血清; 1:代表口蹄疫阳性血清。

[0029] 图9是联合包被3ABC和2C的CLIA试剂盒检测血清背景交互点图,其中0:代表口蹄疫阴性血清; 1:代表口蹄疫阳性血清。

具体实施方式

[0030] 实施例1 3ABC和2C融合蛋白的制备

[0031] 从感染口蹄疫病毒的猪的水泡液中按照RNeasy[®] Mini Kit试剂盒操作说明书提取总RNA;以提取的RNA为模板,利用SMART[®] MMLV 逆转录酶和oligo dT 引物(购自Takara)合成cDNA;设计引物,以合成的cDNA为模板,先利用引物3ABC-F 和3C-46-R 扩增

第一段基因,然后再利用3C-46-F和3C-163-R扩增第二段基因,再用3C-163-F与3ABC-R扩增第三段基因。最后通过融合PCR将扩增的三段基因融合成突变后的全长3ABC基因,其中,3ABC基因序列如SEQ ID NO:1所示。以2C-F和2C-R为引物,按照标准PCR操作,扩增2C全长基因,其中,2C基因序列如SEQ ID NO:3所示。引物序列如下表1所示(或SEQ ID NO:5~12)。

引物名称	引物序列
3ABC-F	5' -CGGGATCC ATCTCAATTCCTTCCCAAAGTCC-3'
3ABC-R	5' -CCGCTCGAGT CTCATGGTGTGGTTCGGGGT-3'
3C-46-F	5' -CGTACCTCGTTACCTTTTCGC-3'
[0032] 3C-46-R	5' -GCGAAAAGGTAACGAGGTACG-3'
3C-163-F	5' -AGGCTACGGTGGGGGAGC-3'
3C-163-R	5' -GCTCCCCACCGTAGCCT-3'
2C-R	5' -CCGCTCGAGCTGCTTGAAAATCGGGTG-3'
2C-F	5' -CGGGATCCCTCAAAGCACGTGACATCAA-3'

[0033] 将获得的全长2C基因和3ABC基因以及对应的表达载体SUMO和PproExHTB用限制性内切酶BamH I 和Xho I酶切;然后将2C插入到SUMO载体上,3ABC插入到PproExHTB 载体上;经过转化、菌落PCR、酶切、测序鉴定为阳性后置于-20℃保存备用。

[0034] 将阳性质粒3ABC-PproExHTB、2C-SUMO 转化大肠杆菌*Rosetta (DE3)* (Novagen);从培养平板上挑取单克隆分别接种于LB液体培养基中220rpm、37℃培养16h,然后取各自菌液以1:100的比例接种到新的LB培养基中,待OD₆₀₀=0.4-0.6时,加入1 mmol/L的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)在16℃、220rpm处理20h进行诱导表达;然后分别8000rpm 收集菌体沉淀,置冰浴上超声后,11000rpm离心30min 后弃掉上清;用IB 洗涤缓冲液(20mmol/L Tris, 10mmol/L EDTA, 1% Trion-100)漂洗沉淀5次后,用20mL含6M尿素banding buffer (20mmol/L NaH₂PO₃, 500mmol/L NaCl)在4℃ 过夜溶解包涵体。然后11000rpm离心收集上清,按照Ni-NTA组氨酸纯化柱说明书纯化蛋白。如图1和2所示,3ABC与2C具有较高的纯度;将纯化好的蛋白进行western-blot 鉴定其免疫反应性,如图3,3ABC与2C蛋白与猪阳性血清反应良好。

[0035] 其中,3ABC编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;2C编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0036] 实施例2 检测猪口蹄疫3ABC和2C抗体的CLIA方法的优化与建立

[0037] 将FMDV感染后60天的高感染滴度的猪血清作为标准阳性对照血清,该血清用FMDV PrioCHECK® NSP ELISA 试剂盒检测阻断率为98%;将未免疫过任何疫苗的健康猪血清作为标准阴性对照。通过棋盘滴定的方式确定最佳3ABC抗原包被浓度以及血清稀释度,其中,3ABC蛋白分别作了2ug、1ug、500ng和250ng 的梯度,标准阴阳性血清分别作了10、20、40和

80倍的稀释。通过综合考虑信噪比及经济因素将蛋白包被条件为混合包被250ng/mL的2C蛋白和250ng/mL的3ABC蛋白抗原,将血清稀释度定在1:40。

[0038] 实施例3 敏感性与特异性评价

[0039] 1、血清盘的建立

[0040] a、共有63份血清样品来自临床上健康的猪,这些猪没有注射过疫苗,应用兰州兽医研究所开发的口蹄疫液相阻断ELISA试剂盒检测,这些血清没有相应的O、A、Asia1型抗体。这些血清用于评价联合包被3ABC和2C的CLIA试剂盒(3ABC/2C CLIA试剂盒)的诊断特异性。

[0041] b、共有532份血清样品来自临床上健康的并且免疫过口蹄疫灭活疫苗的猪,这些血清时在免疫后7-30d采集的。这些血清用于评价该3ABC/2C CLIA试剂盒的诊断特异性。

[0042] c、共有117份血清样品来自实验性地攻过毒的猪。这些血清样品是在攻过毒后收集10d的血清样品。这些血清用于评价该3ABC/2C CLIA试剂盒的诊断敏感性。

[0043] d、共有111份血清样品来自免疫后又人为实验性攻毒的猪,这些样品是在攻毒免疫后的猪的第10d采集的血清样品。这些血清用于评价该3ABC/2C CLIA试剂盒的诊断表现。

[0044] e、共有962份血清样品来自于田间可疑区采集的猪。这些样品用于比对该3ABC CLIA和3ABC/2C CLIA试剂盒和兰州兽医研究所以及PrioCHECK® NSP ELISA的符合率。

[0045] 2、检测方法的实施

[0046] 将待检血清用血清稀释液稀释40倍后加入到包被有3ABC和2C融合蛋白的化学发光免疫反应板,同时设置标准阴阳性血清作为对照;将化学发光免疫反应板于37℃反应30min,用PBST洗涤5次后加入用血清稀释液稀释40000倍的辣根过氧化物酶(HRP)-兔抗猪的抗体,37℃孵育30min,再经PBST洗涤5次,加入化学发光底物和化学发光增强剂,5min后用化学发光免疫分析检测仪器检测发光值。检测结果用阳性百分率(PP)来评价,公式如下:
$$PP = \frac{\text{检测样品发光值} - \text{标准阴性样品发光值}}{\text{标准阳性样品发光值} - \text{标准阴性样品发光值}} * 100\%$$

[0047] 3、临界值的确定以及诊断敏感性和诊断特异性的评价

[0048] 应用本发明所述试剂盒,对已知背景的血清进行检测。用3ABC CLIA和3ABC/2C CLIA两种试剂盒检测共712份背景清楚的血清样品以对两种试剂盒的诊断敏感性与诊断特异性进行评价。每份样品用阳性百分率(PP)来评价,临界值用ROC分析曲线(图4和图5)、TG-ROC(图6和图7)和血清背景交互点图(图8和图9)分析。结果表明,对于3ABC CLIA试剂盒(图4、图6和图8),在PP=5.03%时,诊断的敏感性为95.73%(95%置信区间:90.3-98.6),诊断的特异性为95.97%(95%置信区间:94.1-97.4)。对于3ABC/2C CLIA试剂盒(图5、图7和图9),在PP>5.09%时,诊断的敏感性为100%(95%置信区间:96.9-100.0),诊断特异性为96.47%(95%置信区间:94.7-97.8)。因此3ABC/2C CLIA比3ABC CLIA试剂盒同已知背景清楚的血清具有较高的符合率。

[0049] 4、评价关于3ABC/2C CLIA、3ABC CLIA、兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA和FMDV PrioCHECK® NSP ELISA试剂盒检测免疫后攻毒的猪血清的检出率,以及评价田间共962份血清样品的诊断表现

[0050] 共有111份免疫过口蹄疫灭活疫苗而后进行攻毒的猪血清。对于这部分血清,用3ABC/2C CLIA、3ABC CLIA、兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA和FMDV PrioCHECK® NSP

ELISA试剂盒进行检测。结果如下表2所示。3ABC/2C CLIA 具有较高的检出率36.03%(40/111),而3ABC CLIA的检出率为14.41%(16/111),兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA的检出率为19.81%(22/111),FMDV PrioCHECK® NSP ELISA的检出率为11.71%(13/111)。因此对于这部分动物,3ABC/2C具有较高的符合率。此外,对于田间共962份血清,3ABC/2C CLIA与兰州兽医研究所3ABC单抗阻断ELISA试剂盒的符合率为95.16%,同FMDV PrioCHECK® NSP ELISA的符合率为97.81%。

[0051]

样品信息	样品大小	3ABC/2C CLIA		3ABC CLIA		3ABC-EUSA		PrioCHECK® NSP	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
未免疫 阴性样品	63	05/63	58/63	05/63	58/63	07/63	56/63	03/63	60/63
符合率	-	92.06%		92.06%		88.88%		95.25%	
免疫后 阴性样品	532	16/532	516/532	19/532	513/532	22/532	510/532	12/532	520/532
符合率	-	96.99%		96.42%		95.86%		97.74%	
未免疫 感染阳性样品	117	117/117	0/117	112/117	5/117	106/117	11/117	109/117	8/117
符合率	-	100.00%		95.72%		90.60%		93.16%	
免疫后 感染阳性样品	111	40/111	71/111	16/111	95/111	22/111	89/111	13/111	98/111
符合率	-	36.03%		14.41%		19.81%		11.71%	
田间随机样品	962	53/962	909/962	-	-	78(47)/962	884(878)/962	50(41)/962	912(900)/962
符合率	-	-	-	-	-	96.15% (925/962)		97.81% (941/962)	

[0052] 实施例5 检测3ABC/2C CLIA的重复性

[0053] 将7个背景清楚的血清在同一CLIA板上各做3个重复,计算其批间变异系数(CV)。同时将这7个背景清楚的血清在不同的3个CLIA板上做重复,计算其批内变异系数(CV)。结果如下表3所示,批间与批内CV<20%,具有很好的重复性。

[0054]

血清	批内			批间		
	平均值	标准差	变异系数	平均值	标准差	变异系数
1	129.01	3.21	2.49	137.85	9.01	6.53
2	85.66	5.70	6.65	86.95	3.23	3.71
3	26.41	0.27	1.04	27.21	1.47	5.43
4	12.02	0.15	1.32	13.05	0.94	7.21
5	9.85	0.37	3.83	10.55	1.06	10.04
6	5.05	0.50	10.08	5.61	0.54	9.77
7	0.68	0.01	2.58	0.63	0.09	14.58

[0055] 实施例6 检测3ABC/2C CLIA板的稳定性。

[0056] 将包被有3ABC和2C蛋白抗原的CLIA板置于37℃,10天后,用口蹄疫标准阴阳性猪血清检测其反应性。结果表明,该CLIA板检测标准阳性猪血清仍具有较好的反应性。该包被有3ABC和2C的CLIA板可以在4℃ 放置1年之久。具有很好的稳定性。

[0057] 本发明所述实施例应理解为说明性的,而非限制本发明的保护范围,对本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对本发明作出的一些非本质的改进和

调整仍属于本发明的保护范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 中国农业科学院兰州兽医研究所
- [0003] <120> 一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1310
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 口蹄疫病毒
- [0011] <400> 1
- [0012] atctcaattc ctteccaaaa gtccgtgctg tacttttctca ttgagaaggg ccaacacgag 60
- [0013] gcagcaattg aattctttga ggggatggta cacgactcca ttaaggagga actccgaccc 120
- [0014] ctctgtccaac agacttcatt cgtgaaacgc gcttttaaac gcctgaagga aaactttgag 180
- [0015] atcgttgccc tatgtttgac tcttctggcg aacatagtga tcatgatccg cgagactcga 240
- [0016] agagacaaca aatggtgat gatgcattga atgagtacat cgagaaggca aacatcacca 300
- [0017] cagatgacaa gactcttgac gaggcggaaa agaaccctct ggagactacc ggtgccagca 360
- [0018] ccgtcggett cagagagaga actctcccgg gacacaggac gagcgatgac gtgaactctg 420
- [0019] agcccgccaa acctgtggaa gagcgaccac aagctgaagg accctacgcc ggaccgcttg 480
- [0020] aacaccagaa acctctgaaa gtgagagcta agctaccaca gcaggagggg ccttacgctg 540
- [0021] gtccgttga gaggcagaaa cactgaaag taaagtga tgccccggtc gtgaaggaag 600
- [0022] gaccttacga gggaccggtg aagaagcctg tcgctttgaa agtgaaaact aagaacctga 660
- [0023] ttgtactga gagtgggtgcc cccccgaccg acttgcaaaa gatggtcatg ggcaacacca 720
- [0024] agcctgttga gctcatcctc gacgggaaga cagtagccat ctgctgtgct actggagtgt 780
- [0025] ttggtactgc ctacctcgta cctcgtcacc ttttcgctga gaagtatgac aagatcatgt 840
- [0026] tggacggcag ggctatgaca gacagtgact acagagtgtt tgagtttgag attaaagtaa 900
- [0027] aaggacagga catgctctca gacgctgcgc tcatggtgct gcaccgtggg aaccgcgtga 960
- [0028] gagacatcac gaaacacttc cgtgatacag cacgaatgaa gaaaggcacc cccgtcgttg 1020
- [0029] gcgtgatcaa caacgctgac gttgggagac tgattttctc tggtagggcc cttacctaca 1080
- [0030] aggacattgt agtgagcatg gacggagaca ccatgccggg cctgtttgcc tacaagccg 1140
- [0031] ccaccaagge aggctacggc gggggagccg ttctcgccaa ggacggagcc gacacgttca 1200
- [0032] tcgttggcac tcaactccga ggtggcaatg gagttgggta ctgctcatgc gtatccagat 1260
- [0033] ccatgettct caagatgaaa gcacacatcg accccgaacc acaccatgag 1310
- [0034] <210> 2
- [0035] <211> 437
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 大肠杆菌
- [0038] <400> 2

[0078]	305	310	315	320
[0079]	Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly			
[0080]		325	330	335
[0081]	Thr Pro Val Val Gly Val Ile Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu Ile			
[0082]		340	345	350
[0083]	Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Ser Met Asp			
[0084]		355	360	365
[0085]	Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr Lys Ala			
[0086]		370	375	380
[0087]	Gly Tyr Gly Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp Thr Phe			
[0088]		385	390	400
[0089]	Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys Ser			
[0090]		405	410	415
[0091]	Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Leu Lys Met Lys Ala His Ile Asp Pro			
[0092]		420	425	430
[0093]	Glu Pro His His Glu			
[0094]		435		
[0095]	<210> 3			
[0096]	<211> 954			
[0097]	<212> DNA			
[0098]	<213> 口蹄疫病毒			
[0099]	<400> 3			
[0100]	ctcaaagcac gtgacatcaa tgacatatc gccattctca agaacggcga gtggctggtc 60			
[0101]	aagctgatcc tagctatccg cgactggatt aaagcatgga tcgcctcaga agaaaagttc 120			
[0102]	gtcaccatga cggatttggt gcctggcatc cttgaaaagc agcgggacct caacgacctg 180			
[0103]	agcaagtaca aggaagccaa ggagtggctc gacaacgcgc gacaagcgtg tctgaagagc 240			
[0104]	gggaacgtcc acattgctaa cctctgcaaa gtggctgccc cagcaccgag caggctcgaga 300			
[0105]	cccagacctg tagtcgtttg cctccgaggt aatccggcc agggcaagag tttccttgcg 360			
[0106]	aacgtgcttg cgcaagcaat ttccaccac tacactggca gaaccgattc agtttggtac 420			
[0107]	tgtccaccag accctgacca cttegcaggt tacaaccagc aaactgtcgt agtgatggat 480			
[0108]	gatttgggcc agaaccgccg cggcaaggac ttcaagtact ttgcccaaat ggtgtcaaca 540			
[0109]	acggggttca tcccgcccat ggctcgctc gaagacaaag ggaagccctt caacagtaag 600			
[0110]	gttatcattg ccaccaccaa cttgtactcg ggtttcacc cgaggactat ggtgtgcccc 660			
[0111]	gacgcgctga accgaaggtt tcactttgac attgatgtga gtgccaagga tgggtataaa 720			
[0112]	attaacaaca aattggacat aaccaagct cttgaggaca cccacaccaa cccagtggcg 780			
[0113]	atgttccaat acgactgcgc ctttctcaac ggcatggcag tcgaaatgaa gagaatgcaa 840			
[0114]	caggacatgt tcaagcccca accgcctctg cagaacgtgt accaactcgt tcaggagggtg 900			
[0115]	attgatcggg tggagctcca cgagaaggtg tcgagccacc cgattttcaa gcag 954			
[0116]	<210> 4			

[0117] <211> 318
 [0118] <212> PRT
 [0119] <213> 大肠杆菌
 [0120] <400> 4
 [0121] Leu Lys Ala Arg Asp Ile Asn Asp Ile Phe Ala Ile Leu Lys Asn Gly
 [0122] 1 5 10 15
 [0123] Glu Trp Leu Val Lys Leu Ile Leu Ala Ile Arg Asp Trp Ile Lys Ala
 [0124] 20 25 30
 [0125] Trp Ile Ala Ser Glu Glu Lys Phe Val Thr Met Thr Asp Leu Val Pro
 [0126] 35 40 45
 [0127] Gly Ile Leu Glu Lys Gln Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Lys Tyr Lys
 [0128] 50 55 60
 [0129] Glu Ala Lys Glu Trp Leu Asp Asn Ala Arg Gln Ala Cys Leu Lys Ser
 [0130] 65 70 75 80
 [0131] Gly Asn Val His Ile Ala Asn Leu Cys Lys Val Val Ala Pro Ala Pro
 [0132] 85 90 95
 [0133] Ser Arg Ser Arg Pro Glu Pro Val Val Val Cys Leu Arg Gly Lys Ser
 [0134] 100 105 110
 [0135] Gly Gln Gly Lys Ser Phe Leu Ala Asn Val Leu Ala Gln Ala Ile Ser
 [0136] 115 120 125
 [0137] Thr His Tyr Thr Gly Arg Thr Asp Ser Val Trp Tyr Cys Pro Pro Asp
 [0138] 130 135 140
 [0139] Pro Asp His Phe Asp Gly Tyr Asn Gln Gln Thr Val Val Val Met Asp
 [0140] 145 150 155 160
 [0141] Asp Leu Gly Gln Asn Pro Asp Gly Lys Asp Phe Lys Tyr Phe Ala Gln
 [0142] 165 170 175
 [0143] Met Val Ser Thr Thr Gly Phe Ile Pro Pro Met Ala Ser Leu Glu Asp
 [0144] 180 185 190
 [0145] Lys Gly Lys Pro Phe Asn Ser Lys Val Ile Ile Ala Thr Thr Asn Leu
 [0146] 195 200 205
 [0147] Tyr Ser Gly Phe Thr Pro Arg Thr Met Val Cys Pro Asp Ala Leu Asn
 [0148] 210 215 220
 [0149] Arg Arg Phe His Phe Asp Ile Asp Val Ser Ala Lys Asp Gly Tyr Lys
 [0150] 225 230 235 240
 [0151] Ile Asn Asn Lys Leu Asp Ile Thr Lys Ala Leu Glu Asp Thr His Thr
 [0152] 245 250 255
 [0153] Asn Pro Val Ala Met Phe Gln Tyr Asp Cys Ala Leu Leu Asn Gly Met
 [0154] 260 265 270
 [0155] Ala Val Glu Met Lys Arg Met Gln Gln Asp Met Phe Lys Pro Gln Pro

[0156]	275	280	285
[0157]	Pro Leu Gln Asn Val Tyr Gln Leu Val Gln Glu Val Ile Asp Arg Val		
[0158]	290	295	300
[0159]	Glu Leu His Glu Lys Val Ser Ser His Pro Ile Phe Lys Gln		
[0160]	305	310	315
[0161]	<210> 5		
[0162]	<211> 32		
[0163]	<212> DNA		
[0164]	<213> 人工序列		
[0165]	<400> 5		
[0166]	cgggatccat ctcaattcct tccc aaaagt cc 32		
[0167]	<210> 6		
[0168]	<211> 30		
[0169]	<212> DNA		
[0170]	<213> 人工序列		
[0171]	<400> 6		
[0172]	ccgctcgagt ctcatggtgt ggttcggggt 30		
[0173]	<210> 7		
[0174]	<211> 21		
[0175]	<212> DNA		
[0176]	<213> 人工序列		
[0177]	<400> 7		
[0178]	cgtacctcgt taccttttcg c 21		
[0179]	<210> 8		
[0180]	<211> 21		
[0181]	<212> DNA		
[0182]	<213> 人工序列		
[0183]	<400> 8		
[0184]	gcgaaaaggt aacgaggtac g 21		
[0185]	<210> 9		
[0186]	<211> 18		
[0187]	<212> DNA		
[0188]	<213> 人工序列		
[0189]	<400> 9		
[0190]	aggctacggt gggggagc 18		
[0191]	<210> 10		
[0192]	<211> 18		
[0193]	<212> DNA		
[0194]	<213> 人工序列		

-
- [0195] <400> 10
[0196] gctccccac cgtagcct 18
[0197] <210> 11
[0198] <211> 27
[0199] <212> DNA
[0200] <213> 人工序列
[0201] <400> 11
[0202] ccgctcgagc tgcttgaaaa tcgggtg 27
[0203] <210> 12
[0204] <211> 28
[0205] <212> DNA
[0206] <213> 人工序列
[0207] <400> 12
[0208] cgggatccct caaagcacgt gacatcaa 28

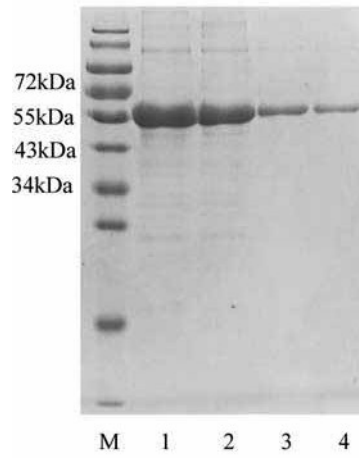


图1

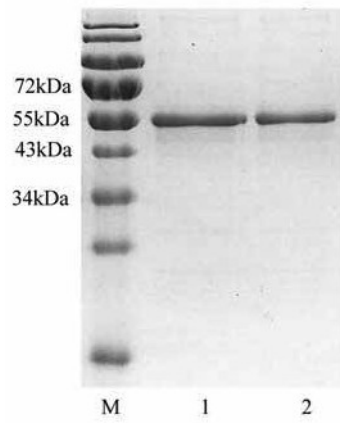


图2

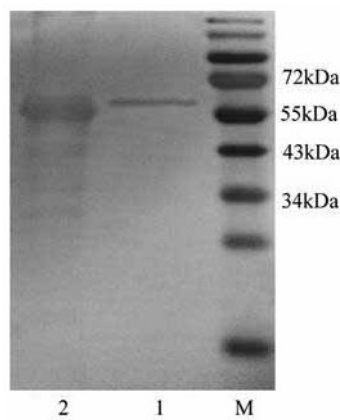


图3

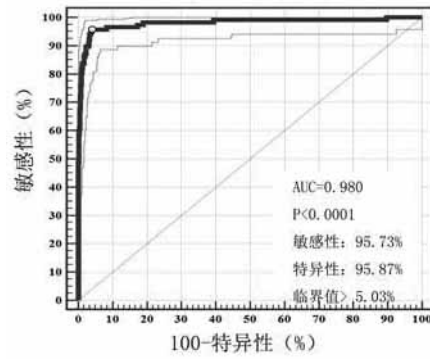


图4

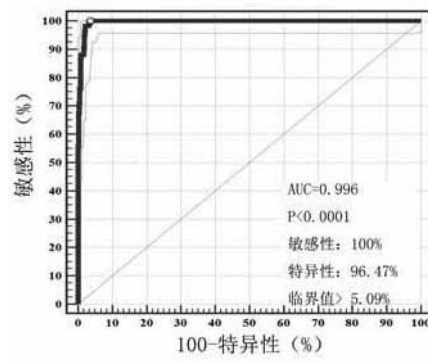


图5

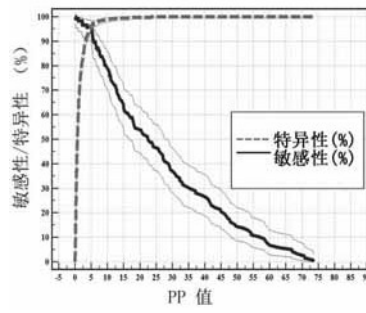


图6

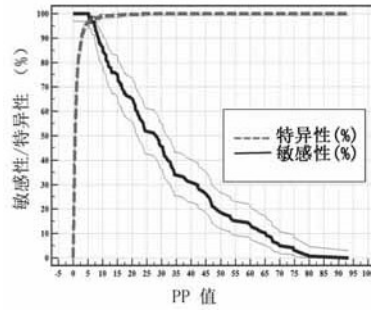


图7

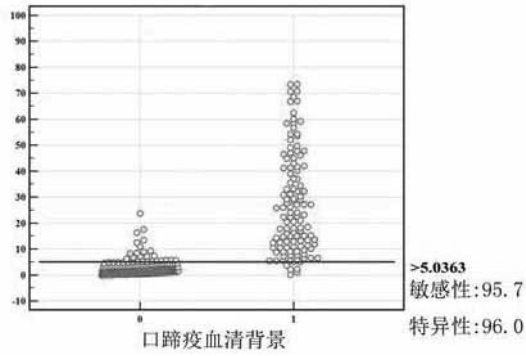


图8

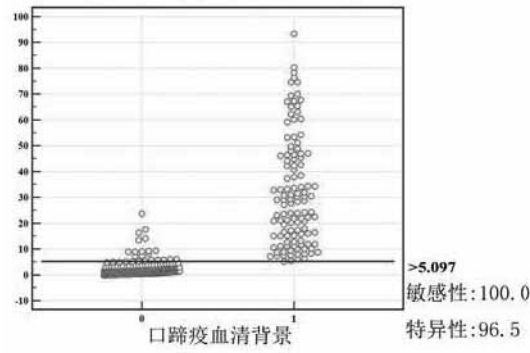


图9

专利名称(译)	一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106596932B	公开(公告)日	2019-01-25
申请号	CN201611051539.5	申请日	2016-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	常惠芸 刘泽众 邵军军 赵付荣 李秀梅 张永光		
发明人	常惠芸 刘泽众 邵军军 赵付荣 李秀梅 张永光		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/56983		
代理人(译)	程茗		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN106596932A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种猪口蹄疫3ABC和2C抗体化学发光检测试剂盒，属免疫学检测领域，所述试剂盒包含化学发光免疫反应板、酶标抗体、血清稀释液、化学发光底物、化学发光增强剂和PBST洗涤液，其特征在于：所述化学发光免疫反应板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔板，每孔内底部联合包被3ABC和2C融合蛋白；所述酶标抗体为HRP-兔抗猪IgG抗体；所述血清稀释液包含Tween-20、牛血清白蛋白和大肠杆菌裂解液；所述化学发光底物为鲁米诺和牛血清白蛋白；所述化学发光增强剂含有IPP、H₂O₂和Tween-20。本发明所述试剂盒，相对于只包被3ABC抗体的CLIA和市售常用的ELISA试剂盒相比，具有较高的敏感性、特异性和诊断能力，重复性与稳定性也较好。

