



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702925 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201911097381.9

(22)申请日 2019.11.11

(71)申请人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇  
国家农业科技园南京农业大学基地

(72)发明人 周斌 吴月 吴许丹 陈婧

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任  
公司 32218

代理人 徐冬涛 竞存

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

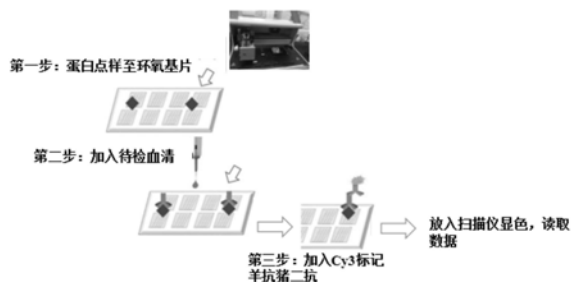
权利要求书2页 说明书11页  
序列表2页 附图5页

## (54)发明名称

同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的荧光  
标记蛋白芯片制备和检测方法

## (57)摘要

本发明涉及一种检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片、试剂盒及检测方法。所述芯片载体为环氧基修饰的光学级玻片,其成本较低,适合产业化大规模购买和生产。本发明通过原核表达获得目的抗原,将蛋白通过晶芯Personal Arrayer 16接触式点样系统点制芯片,其特征在于每个基片至少包含一个检测区,每个检测区至少包含5个检测亚区,分别为CSFV、PPV、JEV、PRRSV、检测区及2%BSA阴性对照区。检测结果通过博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪读取荧光值,在临床使用中,本发明具有特异性高、灵敏性强、能高通量检测的优点。



1. 一种同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

S1:截取CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位,分别将CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位、PPV-VP2基因序列,克隆至pET-32a原核表达载体,转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞进行扩增,构建得到重组表达质粒pET-32a-E2、pET-32a-EDIII、pET-32a-N、pET-32a-VP2;

S2:鉴定正确的重组质粒pET-32a-E2、pET-32a-VP2、pET-32a-EDIII、pET-32a-N分别转化至大肠杆菌BL21感受态, IPTG诱导,离心分离上清和包涵体,对包涵体进行洗涤、溶解、过滤后用His标签高亲和力Ni柱纯化,得到目的蛋白CSFV、PPV、JEV、PRRSV, BCA蛋白定量试剂盒测定浓度后-80 $^{\circ}$ C保存;

S3:将S2制得的重组蛋白CSFV、PPV、JEV、PRRSV稀释后,点样在芯片载体上,所述载体为环氧基片,经水合、干燥、封闭、洗涤制得检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片,储存备用;优选的,所述储存条件为4 $^{\circ}$ C。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,S1中,所述CSFV-E2基因特异性抗原表位为GenBank:FJ598612.1,193-530bp处,JEV-EDIII基因特异性抗原表位为GenBank:LC095865.1,849-1304bp处,PRRSV-N基因特异性抗原表位为GenBank:KM252867.1,1-372bp处,PPV VP2基因序列如SEQ ID No.1所示。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,S2中,所述IPTG诱导浓度为0.2mM,诱导条件为37 $^{\circ}$ C,5h。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,S3中,制备的蛋白芯片至少包含一个检测区,每个检测区至少包括CSFV蛋白检测亚区、PPV蛋白检测亚区、JEV蛋白检测亚区、PRRSV蛋白检测亚区,2%BSA阴性对照亚区。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述S3中所述稀释为,将S2制得的重组蛋白CSFV、PPV、JEV、PRRSV分别稀释至0.025mg/ml-0.4mg/ml;

优选的,所述稀释为将CSFV稀释至0.2mg/ml,将PPV稀释至0.4mg/ml,将JEV稀释至0.4mg/ml,将PRRSV稀释至0.4mg/ml;

更优选的,稀释所用蛋白稀释液为含博奥点样液的PBS;

更进一步优选的,稀释所用蛋白稀释液为含50vol%的博奥点样液的PBS;

所述点样方式为晶芯Personal Arrayer 16接触式点样系统;

所述水合条件为37 $^{\circ}$ C水合10h以上,优选的,水合条件为37 $^{\circ}$ C水合10h;

所述封闭方法为2%BSA封闭2h;

所述洗涤方法为PBST,洗涤5min;

各检测样本间通过凸起的围栏进行隔离。

6. 采用权利要求1至5任一项所述的同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片检测方法制备得到的同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片。

7. 基于权利要求6所述同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:

S1:将待测血清稀释后,点样至所述检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片,37 $^{\circ}$ C孵育30-60min,用PBST洗涤5min后干燥;

优选的,所述待测血清孵育时间为60min;

S2:在S1点样点上加入以PBST进行400-800倍稀释的Cy3标记羊抗猪二抗,点样量为100  $\mu$ L,于37℃孵育30-60min,用PBST洗涤5min后干燥;

优选的,所述Cy3标记羊抗猪二抗稀释倍数为600倍;

优选的,所述Cy3标记羊抗猪二抗孵育时间为45min;

S3:将S2得到的蛋白芯片通过博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪扫描分析,得到荧光数值,判定阴阳性,所述CSFV、PPV、JEV、PRRSV阴阳性判定的临界值分别为1.78、2.35、3.38、1.58。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,S1所述待测血清稀释倍数为0-100倍,优选的为50倍;稀释后的待测血清点样量为100 $\mu$ L。

9. 权利要求1至5任一项所述制备方法或权利要求6所述同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片在制备CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体检测试剂盒中的应用。

10. 一种检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求6所述检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片。

## 同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的荧光标记蛋白芯片制备和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、免疫分析学等技术领域,尤其涉及同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片的制备方法和检测方法。

### 背景技术

[0002] 近几十年,生命科学研究经历着一个以高通量为特点的大规模新兴技术研发与应用的阶段,开启了基于高通量的数据收集与分析的时代。随着生物研究的深入,人们认识到基因水平的研究对揭示复杂的生物现象已经是远远不够的,蛋白质才是生命活动的最终执行者,随着蛋白质组学的发展,微阵列芯片技术也引起了人们的广泛关注。

[0003] 蛋白质芯片是一种将已知蛋白分子(Capture molecular)固定在芯片基质上的检测方法,从混合样品中捕捉目标分子,再用抗体对目标分子进行检测或标记,从而检测得知哪些被测样品中含有与已知蛋白分子结合的目标分子。其原理是对固相载体进行特殊的化学处理,再将已知的蛋白分子产物固定其上(如酶、抗原、抗体、受体、配体、细胞因子等),根据这些生物分子的特性,捕获能与之特异性结合的待测蛋白(存在于血清、血浆、淋巴、间质液、尿液、渗出液、细胞溶解液、分泌液等),经洗涤、纯化,再进行确认和生化分析;它为获得重要生命信息(如未知蛋白组分、序列。体内表达水平生物学功能、与其他分子的相互调控关系、药物筛选、药物靶位的选择等)提供有力的技术支持。

[0004] 蛋白芯片作为新型的实验室检测技术,因其制备成本较高,在动物疫病诊断的研究并不广泛,也没有用于检测动物传染病相应成熟的检测产品问世。石霖等制备得到的可可视化诊断蛋白芯片,可以同时鉴别诊断禽流感(AI)、新城疫(ND)2种禽病的血清抗体,其灵敏度是琼扩(AGP)抗体检测方法的400倍以上;Wang等建立了一种可区分禽流感(AI)、新城疫(ND)、鸡传染性支气管炎(IB)、传染性法氏囊病(IBD)4种禽病的可视化蛋白芯片,其灵敏性明显高于传统检测方法;Xu等利用新型固体材料iPDMS作为固相载体,建立了一种新型蛋白质芯片用于检测蓝舌病毒,该方法有高度的灵敏度和特异性,并与商业化的IDEXX BTX ELISA试剂盒比较,其总符合率、阴性符合率和阳性符合率分别为95.12%,99.28%和86.5%;纪方晓等将纯化的猪戊型肝炎ORF2原核表达重组蛋白作为抗原,建立液相蛋白芯片检测方法,这种方法批内、批间变异系数小,该方法与商品化ELISA试剂盒比较的符合率为93.1%。

[0005] 猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus,CSFV)引起的猪瘟导致猪群高热性和高度接触性死亡,致使我国及全世界养猪业经济损失严重。我国现阶段正在加紧猪瘟净化的步伐,血清学检测是猪瘟防控免疫效果评估重要技术手段,也是猪瘟净化计划最后阶段必要实施的检测方法。目前常用的猪瘟抗体检测方法,其中NPLA、FAVN和ELISA是国际贸易中指定诊断方法。其中ELISA以其简便、已操作等优点被广泛用于临床检验,但ELISA检测抗体所需样本量较多,且不能同时检测多种疾病。结构蛋白E2是主要的保护性抗原,具有良好的免疫原性,能诱导机体产生中和抗体,因而是建立疾病诊断方法的首选蛋白。藺辉星等以

纯化的截短E2蛋白为包被抗原,优化间接ELISA反应条件,建立了检测CSFV血清抗体的间接ELISA,为CSFV血清抗体检测试剂盒的研制奠定了基础。但此方法每个临床样本至少需要100ul,且只能检测猪瘟单一抗体。目前还没有以Cy3荧光标记蛋白芯片的方法检测猪瘟抗体的报道。

[0006] 猪细小病毒(porcine parvovirus,PPV)是导致猪繁殖障碍性疾病的重要病原之一,临床病例中显示其通常与伪狂犬病病毒、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒2型或日本脑炎病等其他引起繁殖障碍的病原混合感染,使疾病严重程度加重,给养猪业带来严重的经济损失。1966年,Mary与Mahnel首次发现了PPV,随后在世界多个国家和地区相继爆发,我国于20世纪80年代检测发现PPV,何启盖等分别用乳胶凝集试验、胶体金染色法、银加强胶体金检测PPV血清抗体。侯金秀等用原核表达的VP2点样于环氧基片上,建立了可视化蛋白芯片法检测PPV抗体,但可视化蛋白芯片相比于Cy3荧光芯片,敏感性及特异性都较低。

[0007] 1871年乙脑由日本人首先发现并命名为日本乙型脑炎,但直到1924年,乙脑在日本大范围爆发后才第一次鉴定出该病为病毒性传染病。我国于1935年夏季首次爆发了乙型脑炎,随着国际交流的频繁乙型脑炎的分布已经扩大到南亚、东南亚、远东以及澳大利亚等地区。检测乙脑病毒抗体的方法主要包括血凝抑制试验、补体结合试验、乳胶凝集试验、中和试验。姚俊庸等以纯化后的重组蛋白EⅢ包被酶标板,优化ELISA反应条件,建立了诊断试剂盒。李俊才等运用免疫胶体金技术,对JEV快速检测试纸条的可行性做了初步的探索研究。

[0008] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome)又被叫做猪蓝耳病,是一种危害母猪的繁殖系统和仔猪呼吸系统的疾病。蓝耳病在1987年于美国首次发现以来,已经在世界各地相继发生,主要引起母猪发热、流产(怀孕后期),另外还侵害仔猪的呼吸系统。PRRSV主要有欧洲型和美洲型,这两种型只有60%的基因相似度。2006年在我国的某些省市又发现能引起更高感染率和死亡率的亚型,称为高致病性蓝耳病,此后这种蓝耳病相继在亚洲多个国家和地区爆发。国内外很多学者已研制出针对M蛋白、N蛋白、GP5蛋白等蛋白的多种单抗,并由此建立了免疫胶体金技术、免疫荧光抗体染色、免疫组化染色等技术用于检测病料样品中PRRSV,但都需要细胞培养,工作量大且检测时间长,这些因素限制了以上方法的推广应用。

[0009] 虽然以上四种疾病都已建立相应的诊断方法,但临床生产实践中以上四种疾病经常呈现混合感染的情况,且现有的诊断技术并不能同时且大批量的检测四种病毒抗体。而蛋白芯片作为新型的实验室检测技术,因其制备成本较高,在动物疫病诊断的研究并不广泛,也没有用于检测动物传染病相应成熟的检测产品问世。

[0010] 传统的芯片技术在硝酸纤维素膜或NC膜上进行多个样本的制备,由于生物膜质地较软且空间有限,经常发生样本间交叉污染的现象。为了发挥蛋白芯片高通量的特点,必须改进芯片的种类和材质。基于这种现状,我们改进蛋白芯片检测方法,并对传统的基片进行优化改良,创立了一种新型的蛋白芯片检测技术。本发明采用环氧基修饰玻片,环氧基活性较强可以和蛋白质表面的多种基团如羟基、巯基、羧基等发生反应且不改变蛋白质性质。相比较于其他化学修饰的基片,环氧基片成本较低,适合产业化大规模购买和生产,相对于ELISA技术,本法发明的荧光标记芯片,所需蛋白量极低。此外,目前市面流通的四种病毒抗

体检测方法试剂盒多以全病毒作为抗原,抗原制备过程费事、费力、对技术要求较高,且存在散播野毒的风险,本发明采用原核表达蛋白作为抗原,解决了上述存在的问题。

## 发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题是克服现有蛋白芯片技术的缺点和不足,提供一种能同时检测四种病毒抗体的检测方法,填补临床此方面技术的空白,为解决以上问题,本发明提供技术路线如下:

[0012] 本发明的第一个目的是提供一种检测猪瘟病毒(CSFV)、猪细小病毒(PPV)、猪乙型脑炎病毒(JEV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)抗体的Cy3标记蛋白芯片制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0013] S1:分别提取CSFV、JEV、PRRSV核酸,并进行反转录,截取CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位,分别将CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位、PPV-VP2基因序列,克隆至pET-32a原核表达载体,构建得到重组表达质粒pET-32a-E2、pET-32a-EDIII、pET-32a-N、pET-32a-VP2。直接截取CSFV-E2、PPV-VP2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位,能够避免非特异性结合。

[0014] 具体操作如下:根据GenBank登录的特异性基因序列设计三对特异性引物(SEQ ID NO.2~7)分别扩增CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位,所述CSFV-E2基因特异性抗原表位为GenBank:FJ598612.1,193-530bp处,JEV-EDIII基因特异性抗原表位为GenBank:LC095865.1,849-1304bp处,PRRSV-N基因特异性抗原表位为GenBank:KM252867.1,1-372bp处,克隆至pET-32a原核表达载体。

[0015] 截取CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位的特异性引物序列如下:

|        | 特异性引物序列(5'→3')                                                                                                                                       | 酶切位点             | 扩增位点     | 片段大小  |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------|-------|
| [0016] | CSFV<br>CSFV-E2-F:5'-TGACTCTAGATATTTGGCATCATTCGATAAGGGGG-3'<br>(SEQ ID NO.2)<br>CSFV-E2-R: 5'-TGACGGTACCGATCTTCATTTTCCACTGTGGTGG-3'<br>(SEQ ID NO.3) | XbaI<br>KpnI     | 193-530  | 338bp |
|        | JEV<br>JEV-EDIII-F:5'-TGACGATATCCACCTGAAATGCAGGCTAAAAATGG-3'<br>(SEQ ID NO.4)<br>JEV-EDIII-R: 5'-TGACAAGCTTGAATACCCCTCCAATGGAGCC-3' (SEQ ID NO.5)    | EcoRV<br>HindIII | 849-1304 | 455bp |
|        | PRRSV<br>PRRSV-N-F: 5'-TGACGGATCCATGCCAAATAACAACGGCAGAC-3'<br>(SEQ ID NO.6)<br>PRRSV-N-R: 5'-TGACCTCGAGTCATGCTGAGGGTGGTGTT-3' (SEQ ID NO.7)          | BamHI<br>XhoI    | 1-372    | 372bp |

[0017] 通过DNASTar分析PPV VP2基因序列(GenBank:JQ710896.1),优化使其利于在大肠杆菌系统表达,得到如SEQ ID No.1所示的PPV-VP2基因序列,优化后基因由金开瑞公司合成。将如SEQ ID No.1所示的PPV-VP2基因序列克隆至pET-32a原核表达载体,构建得到重组表达质粒pET-32a-VP2;

[0018] SEQ ID No.1所示的PPV-VP2基因序列如下:

[0019] AGCGCAACCACTCCGCTACCAAAATTTACAATAATGATCTGACCGCAAGCCTGATGGTGGCACTGGATACCAATAATACCCTGCCGTATACACCGGCAGCACCGCGTAGCGAAACCCTGGGTTTTTATCCGTGGCTGCCGACCAACCGACACAGTATCGTTATTATCTGAGCTGCATTCGCAATCTGAATCCTCCGACCTATACCGTCAGAGCCAGCCGA

ATAATCGTCTGAATACCAATCGTCTGCATAGCGATATCATGTTCTATACCATTGAAAATGCCGTGCCGATTTCATCTGCTGCGTACCGGTGATGAATTTAGTACCGGTATCTATCACTTTGATACCAAACCGCTGAACTGACCCATAGCTGGCAGACCAATCGTAGCCTGGGTCTGCCTCCGAAACTGCTGACCGAACCGACCACCGAAGGTGATCAGCATCCGGGTACAC TGCCTGCAGCAAATACCCGTAAAGGTTATCATCAGACCATCAACAATAGCTATACCGAAGCAACCGCAATTTCGTCCG GCACAGGTTGGTTATAATACCCGTATATGAACTTCGAGTATAGCAATGGTGGTCCGTTTCTGACCCCGATTGTTCC GACCGCAGATACCCAGTATAATGATGATGAACCGAATGGTGCAATTCGCTTCACCATGGATTATCAGCATGGTCATC TGACCACCAGTAGCCAAGAACTGGAACGTTATACCTTTAATCCGCAGAGCAAATGTGGTCGTGCACCGAAACAGCAG TTTAATCAGCAGGCACCGCTGAATCTGGAAAATACAAATAATGGCACCCCTGCTGCCGAGCGATCCGATTGGTGGTAA AAGCAATATG

[0020] 构建得到的pET-32a-E2、pET-32a-VP2、pET-32a-EDⅢ、pET-32a-N质粒转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态进行扩增,并提取重组质粒;优选的,如pET-32a质粒原始浓度比较低(低于100ng/ $\mu$ l),可将pET-32a原核表达载体也转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态进行扩增。

[0021] S2:鉴定正确的重组质粒pET-32a-E2、pET-32a-VP2、pET-32a-EDⅢ、pET-32a-N分别转化至大肠杆菌BL21感受态,IPTG诱导,离心分离上清和包涵体,对包涵体进行洗涤、溶解、过滤后用His标签高亲和力Ni柱纯化,得到目的蛋白CSFV、PPV、JEV、PRRSV,BCA蛋白定量试剂盒测定浓度后-80 $^{\circ}$ C保存。

[0022] S3:将S2制得的重组蛋白CSFV、PPV、JEV、PRRSV稀释至相应点样液浓度后,点样在芯片载体上,所述载体为环氧基片,经水合、干燥、封闭、洗涤制得检测四种病毒抗体的Cy3荧光标记蛋白芯片,储存备用;

[0023] 优选的,所述储存条件为4 $^{\circ}$ C。

[0024] 本发明采用环氧基片作为蛋白芯片,以普通光学级玻璃片为基片,在超净车间消除基片表面颗粒、蛋白及其他会影响芯片质量的污染物,表面修饰环氧基集团,环氧基集团能与蛋白样品中氨基、巯基、羧基等形成稳定地共价结合,使蛋白样品能够在基片表面形成形状规则,大小均一的样品点,且基片表面荧光背景低,所制备蛋白芯片具有较高的信噪比。

[0025] 进一步的,S2中,IPTG诱导浓度为0.2mM,诱导条件为37 $^{\circ}$ C,5h。

[0026] 进一步的,S3中,制备的蛋白芯片至少包含一个检测区,为了实现高通量检测的优点,每张芯片优选为多个检测区,例如:两个、三个、四个、五个、六个、七个……,这样就可以在一个芯片上同时检测多个样本,节约时间,降低成本;每个检测区至少包括CSFV蛋白检测亚区、PPV蛋白检测亚区、JEV蛋白检测亚区、PRRSV蛋白检测亚区,2%BSA阴性对照亚区。

[0027] 进一步的,S3中,所述稀释为将S2制得的重组蛋白CSFV、PPV、JEV、PRRSV分别稀释至0.025mg/ml-0.4mg/ml;

[0028] 优选的,将CSFV稀释至0.2mg/ml,将PPV稀释至0.4mg/ml,将JEV稀释至0.4mg/ml,将PRRSV稀释至0.4mg/ml;在此浓度下点样可有效克服芯片背景值较高的缺陷,提高了实验的准确性。

[0029] 更优选的,稀释所用蛋白稀释液为含博奥点样液的PBS;

[0030] 更进一步优选的,稀释所用蛋白稀释液为含50vol%的博奥点样液的PBS;

[0031] 所述点样方式为晶芯Personal Arrayer 16接触式点样系统点制芯片,

[0032] 水合条件为37 $^{\circ}$ C水合10h以上,优选的,水合条件为37 $^{\circ}$ C水合10h,目前的现有技术

对水合时间并没有进行研究,本发明通过一系列时间梯度测试,发现水合10h以上可以形成稳定不拖尾的蛋白点,并选定10h为最佳条件。

[0033] 封闭方法为2%BSA封闭2h,

[0034] 洗涤方法为PBST,洗涤5min;

[0035] 各检测样本间通过凸起的围栏进行隔离,显著的降低了交叉污染的概率。

[0036] 本发明的第二个目的是提供采用前述的检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片检测方法制备得到的检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片。所述蛋白芯片可同时检测四种病毒抗体,极大地提高了临床检测的效率。

[0037] 本发明的第三个目的是提供前述检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片的检测方法,所述方法通过共价键结合在基片上的蛋白抗原,与待测血清中的抗体结合后,再与Cy3标记的荧光二抗结合实现双夹心检测方法,通过扫描仪检测荧光强度,判定是否存在待检抗体,大大提高了检测的灵敏性和特异性。

[0038] 所述检测方法具体包括以下步骤:

[0039] S1:将待测血清稀释后,点样至所述检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片,37℃孵育30-60min,用PBST洗涤5min后干燥;

[0040] S2:在S1点样点上加入以PBST进行400-800倍稀释的Cy3标记羊抗猪二抗,点样量为100μL,于37℃孵育30-60min,用PBST洗涤5min后干燥;优选的,所述Cy3标记羊抗猪二抗稀释倍数为600倍;

[0041] S3:将S2得到的蛋白芯片通过博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪扫描分析,得到荧光数值,判定阴阳性,所述CSFV、PPV、JEV、PRRSV阴阳性判定的临界值分别为1.78、2.35、3.38、1.58,当SNR(信号强度中位值与背景中位值的比值)值高于相应临界值,即表示相应待测血清中的相关抗体为阳性。

[0042] 进一步的,S1所述待测血清稀释倍数为0-100倍,优选的为50倍;稀释后的待测血清点样量为100μL。

[0043] 进一步的,S1所述待测血清孵育时间为60min。

[0044] 进一步的,S2所述Cy3标记羊抗猪二抗孵育时间为45min。

[0045] 本发明的第四个目的是提供前述制备方法或前述检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片在制备CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体检测试剂盒中的应用。

[0046] 本发明的第五个目的是提供一种检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的试剂盒,所述试剂盒包括前述检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片。

[0047] 本发明技术方案所实现的有益效果为:

[0048] 1.本发明建立蛋白芯片可用于CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体共检,用已建立的方法进行临床血样检测,CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体阳性率分别可达到90.5%、87.5%、60%、96.5%,相比于ELISA方法CSFV阳性率持平,PPV高出ELISA法2%,JEV高出ELISA法2.5%,PRRSV与ELISA法持平。因此蛋白芯片法特异性和敏感性更强,且具有高通量的优点。

[0049] 2.本发明采用的环氧基修饰的基片能与蛋白更好的结合,相对于传统的PVDF膜、NC膜与醛基基片,环氧基修饰的玻片只需极低数量的蛋白即可制成蛋白芯片,且检测灵敏。相比较于其他化学修饰的基片,环氧基片成本较低,适合产业化大规模购买和生产,相对于ELISA技术,制备时每个待检样本需要点样200-1000ng蛋白,而基于环氧基修饰的基片(即

本发明所述环氧基片), 结合本发明的制备方法, 使得在制备本法发明的荧光标记芯片时, CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白只需点样2-4ng。

[0050] 3. 本发明采取原核表达纯化后的蛋白作为抗原, 操作简单, 且无散播野毒的风险。

[0051] 4. 本发明不仅可以同时检测4种疾病抗体, 且同一基片上可点制多个样本, 可以实现真正的高通量。

[0052] 5. 本发明的荧光蛋白芯片, 采用高纯度的蛋白与环氧基片上的环氧基高效结合, 能够捕捉到待测血清中的微量抗体, 因此所需样本量较少(四种病毒抗体同时检测, 只需原始血清样本2 $\mu$ L, 而ELISA方法至少需要100 $\mu$ L), 一定程度上减轻了临床采集血液的工作量。

[0053] 6. 解决了ELISA方法耗时、耗力且灵敏性低的问题。

## 附图说明

[0054] 图1实施例1重组表达质粒诱导后SDS-PAGE分析表达形式及纯度。

[0055] A. pET-32a-E2重组蛋白; B. pET-32a-VP2重组蛋白; C. pET-32a-EDIII重组蛋白; D. pET-32a-N重组蛋白;

[0056] M. 蛋白分子质量标准; 1. 未诱导上清; 2. 诱导上清; 3. 未诱导包涵体; 4. 诱导包涵体; 5. pET-32a空载体; 6. 纯化后包涵体。

[0057] 图2实施例1 western blotting鉴定蛋白是否成功表达。

[0058] A. pET-32a-E2重组蛋白; B. pET-32a-VP2重组蛋白; C. pET-32a-EDIII重组蛋白; D. pET-32a-N重组蛋白; E. pET-32a空载体蛋白。

[0059] 图3实施例2 Cy3标记荧光蛋白芯片制备图示。

[0060] 图4实施例2不同水合时间对形成稳定蛋白点样点的影响

[0061] A水合8h; B水合10h

[0062] 1. CSFV E2蛋白(0.2mg/ml) 2. PPV VP2蛋白(0.4mg/ml) 3. JEV EDIII蛋白(0.4mg/ml) 4. PRRSV N蛋白(0.4mg/ml)

[0063] 图5实施例2最佳蛋白抗原点样浓度

[0064] A. CSFV E2蛋白最佳浓度; B. PPV VP2蛋白最佳浓度; C. JEV EDIII蛋白最佳浓度; D. PRRSV N蛋白最佳浓度。

[0065] 1. 0.4mg/ml; 2. 0.2mg/ml; 3. 0.1mg/ml; 4. 0.05mg/ml; 5. 0.025mg/ml; 6. 阴性对照。

[0066] 图6实施例2不同蛋白点样浓度荧光曲线图

[0067] 图7实施例3最佳点样液浓度

[0068] 1. 50%商品化点样液; 2. 50%自制点样液; 3. 40%商品化点样液; 4. 阴性对照。

[0069] 图8实施例7特异性检验

[0070] A. CSFV&PRRSV阳性血清; B. PPV阳性血清; C. JEV阳性血清;

[0071] 1. CSFV E2蛋白; 2. PRRSV N蛋白; 3. JEV EDIII蛋白; 4. PPV VP2蛋白。

## 具体实施方式

[0072] 主要材料与试剂

[0073] pET-32a原核表达载体、猪瘟病毒(CSFV)、猪细小病毒(PPV)、猪乙型脑炎病毒(JEV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)阴阳性血清由本实验室保存(也可采用市售渠道

获得) ; 大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态、大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态 (北京擎科生物技术有限公司, 中国) ; 质粒提取试剂盒 (Omega, 美国) ; IPTG (biouniger, 中国) ; 预染蛋白质分子量标准 (Bio-Rad生命医学产品 (上海) 有限公司, 中国) ; PVDF膜 (PALL, 美国) ; His标签高亲和力Ni柱 (GE, 美国) ; BSA (上海生工生物工程技术有限公司, 中国) ; ECL化学发光检测试剂盒 (Bio-Rad生命医学产品 (上海) 有限公司, 中国) ; 预制蛋白胶 (北京庄盟生物技术有限公司, 中国) 鼠源6 $\times$ 抗His单克隆抗体; 羊抗鼠IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 美国) ; 羊抗猪IgG-HRP (Abcam, 英国) Cy3标记山羊抗猪IgG (Immune Jackson, 美国) ; 晶芯蛋白芯片点样液、晶芯光学环氧基片、晶芯微阵列芯片杂交盒、晶芯多样品芯片围栏、晶芯多样品芯片盖片 (北京博奥生物技术有限公司, 中国) ; 猪瘟病毒ELISA抗体检测试剂盒 (IDEXX, 美国) ; 猪细小病毒、猪乙型脑炎病毒抗体检测试剂盒 (武汉科前生物股份有限公司, 中国) ; 猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体检测试剂盒 (JBT, 韩国) 、Personal Arrayer<sup>TM</sup>16微阵列芯片点样系统、博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪 (北京博奥生物技术有限公司, 中国) , 其他试剂均为国产分析纯。

[0074] 实施例1: CSFV、PPV、JEV、PRRSV四种蛋白原核表达及鉴定

[0075] S1: 分别提取CSFV、JEV、PRRSV核酸, 并进行反转录, 根据GenBank登录的特异性基因序列设计三对特异性引物 (SEQ ID No. 2~7) 分别扩增CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位, 所述CSFV-E2基因特异性抗原表位为GenBank: FJ598612.1, 193-530bp处, JEV-EDIII基因特异性抗原表位为GenBank: LC095865.1, 849-1304bp处, PRRSV-N基因特异性抗原表位为GenBank: KM252867.1, 1-372bp处, 对PCR产物进行纯化, 分别用XbaI、KpnI; EcoRV、HindIII; BamHI、XhoI对纯化后得到的CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N以及pET-32a原核表达载体进行双酶切, 酶切产物纯化后经T4 Ligase酶16 $^{\circ}$ C过夜连接, 将CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N分别克隆至pET-32a原核表达载体, 构建得到pET-32a-E2、pET-32a-EDIII、pET-32a-N质粒。

[0076] 截取CSFV-E2、JEV-EDIII、PRRSV-N基因特异性抗原表位的特异性引物序列如下:

[0077]

|       | 特异性引物序列(5'→3')                                                       | 酶切位点             | 扩增位点     | 片段大小  |
|-------|----------------------------------------------------------------------|------------------|----------|-------|
| CSFV  | CSFV-E2-F: 5'-TGACTCTAGATATTTGGCATCATTCATAAGGGGG-3' (SEQ ID NO.2)    | XbaI<br>KpnI     | 193-530  | 338bp |
|       | CSFV-E2-R: 5'-TGACGGTACCGATCTTCATTTTCCACTGTGGTGG-3' (SEQ ID NO.3)    |                  |          |       |
| JEV   | JEV-EDIII-F: 5'-TGACGATATCCACCTGAAATGCAGGCTAAAAATGG-3' (SEQ ID NO.4) | EcoRV<br>HindIII | 849-1304 | 455bp |
|       | JEV-EDIII-R: 5'-TGACCAAGCTTGAATACCCCTCCAATGGAGCC-3' (SEQ ID NO.5)    |                  |          |       |
| PRRSV | PRRSV-N-F: 5'-TGACGGATCCATGCCAAATAACAACGGCAGAC-3' (SEQ ID NO.6)      | BamHI<br>XhoI    | 1-372    | 372bp |
|       | PRRSV-N-R: 5'-TGACCTCGAGTCATGCTGAGGGTGGTGT-3' (SEQ ID NO.7)          |                  |          |       |

[0078] 通过DNASTar分析PPV VP2基因序列 (GenBank: JQ710896.1) , 优化使其利于在大肠杆菌系统表达, 优化后的PPV-VP2基因序列如SEQ ID No.1所示, 并在其两端分别引入KpnI和HindIII酶切位点, 将优化后的PPV-VP2基因序列克隆至pET-32a原核表达载体, 构建得到重组表达质粒pET-32a-VP2, 优化后pET-32a-PPV原核表达质粒由金开瑞公司合成。

[0079] 将上述获得的连接产物pET-32a-E2、pET-32a-EDIII、pET-32a-N以及优化合成的

pET-32a-PPV原核表达质粒各取10 $\mu$ L,加入到50 $\mu$ L大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,轻轻混匀,冰浴30min,42 $^{\circ}$ C热应激90s,冰浴5min,加入800 $\mu$ L无抗性LB,37 $^{\circ}$ C,200rpm,振荡45min后,常温3000rpm,离心5min,余200 $\mu$ L液体重悬菌体,均匀涂布于含有卡那抗性的平板上,37 $^{\circ}$ C倒置过夜培养,次日挑取2个单菌落于5ml LB中,过夜培养后提取质粒。

[0080] S2:经测序鉴定成功的重组质粒转化至大肠杆菌BL21感受态细胞中,转化及鉴定方法同上,挑取2个单菌落,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD<sub>600</sub>为0.6-0.8,加入终浓度为0.2mM的IPTG诱导5h,同时设置未诱导的重组菌和空载体做对照。

[0081] 将诱导后的BL21重组菌液4 $^{\circ}$ C,12000rpm,离心5min,收集菌液,PBS重悬后,超声破碎仪冰浴破碎7min(工作3s,间歇4s),离心分离上清和包涵体,SDS-PAGE鉴定表达形式,对包涵体蛋白进行洗涤(20mM sodium phosphate,0.5M NaCl,20mM imidazole,pH 7.4),溶解(20mM sodium phosphate,0.5M NaCl,20mM imidazole,8M Urea,pH 7.4),过滤后,用His标签亲和Ni柱进行纯化,加入5 $\times$ SDS电泳上样缓冲液煮沸,以未诱导的菌液及空载体(BL21)作为对照,分析蛋白纯化情况。

[0082] SDS-PAGE显示,在35kDa,30kDa,30kDa以及30kDa处分别可见CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白(图1),蛋白均以包涵体形式表达,且纯度较高。因此从大肠杆菌BL21中得到4种病毒的包涵体蛋白,且经His标签纯化后纯度较高,经BCA蛋白定量试剂盒测定浓度后,分装保存于-80 $^{\circ}$ C。

[0083] 将纯化后的CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白进行western blotting,以His标签抗体为一抗,鼠源6 $\times$ 抗His单克隆抗体为二抗,鉴定蛋白是否成功表达(图2)。

[0084] 实施例2:蛋白抗原点样浓度的确定及蛋白芯片的制备

[0085] (1)制备蛋白芯片:蛋白芯片是根据抗原抗体特异性结合反映的原理建立起来的新技术。其基本操作流程为:先将稀释至相应点样液浓度后的微量抗原固定于化学处理后的玻片上,经过水合反应、干燥、封闭,一抗特异性结合,荧光标记二抗孵育后,放入扫描仪读取数据(图3)。

[0086] 本方法使用晶芯Personal Arrayer 16作为点样系统,使用喷样针进行点样。芯片为光学级环氧基片。将蛋白样本用含点样液的PBS稀释成不同浓度,加入蛋白点样缓冲液,根据实验设计,依次向384孔稀释板中分别加入80 $\mu$ L梯度稀释的蛋白以及等量的PBS作为阴性对照。标定喷样针X、Y、Z轴位置,根据实验需求对系统参数进行如下设计:

|        |                 |      |      |
|--------|-----------------|------|------|
| [0087] | 系统参数            | X    | Y    |
|        | OX (nm)         | 7nm  | —    |
| [0088] | OY (nm)         | —    | 5nm  |
|        | 针阵点距 ( $\mu$ m) | 2000 | 2700 |
|        | 针阵点数            | 6    | 3    |
|        | 阵间间隔 (mm)       | 1    | 10   |
|        | 阵数              | 1    | 4    |

[0089] 点样环境湿度设置在45%以上。起始玻片设置为1,根据实验所需玻片数量放入后

按照对应数量进行设置。样品重复数设置为3。在清洗设置中将清洗、超声、抽干时间分别设置为3s,重复4次保证点样针的清洁。点样完成后,将芯片放入分子杂交仪37℃过夜水合,次日根据点阵大小贴上合适的样品围栏,加入适量2%的BSA于37℃封闭2h,用PBST洗涤5min,蒸馏水清洗5min,经离心干燥后可立即使用也可保存于4℃备用。

[0090] 水合时间长短会对能否形成稳定不拖尾的蛋白点样点有显著影响,进而影响实验结果的准确性及灵敏性,本实验通过设置6、8、10、12h水合时间梯度,发现水合时间为6、8h时,蛋白点有时会出现拖尾现象,实验结果不稳定,将水合时间提高到10h以上,可以形成稳定不拖尾的蛋白点,出于时间成本考虑,本发明将最适水合时间设置为10h。(图4)

[0091] 封闭后的芯片加入适量的待检血清(猪瘟病毒(CSFV)、猪细小病毒(PPV)、猪乙型脑炎病毒(JEV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)阴阳性血清)于37℃孵育1h,经PBST洗涤5min离心干燥,避光加入1:600倍稀释的Cy3标记的羊抗猪IgG,37℃孵育45min,PBST洗涤5min,蒸馏水洗涤5min,离心干燥后,放入博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪扫描分析。(2)最佳蛋白点样浓度的确定

[0092] 在免疫反应中,抗原的浓度对反应的特异性、灵敏性影响较大,抗原浓度越高,荧光信号值越强,但检测的灵敏度也将下降。将CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白用含50%点样液的PBS稀释成0.4mg/ml、0.2mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml、0.025mg/ml,2%的BSA作为阴性对照,按照制备流程点样在环氧基片上,每个点重复3次,确定最佳抗原浓度后,将蛋白以此浓度点样在环氧基片上,封闭后存于4℃备用。

[0093] 结果显示:CSFV、PPV、JEV、PRRSV最佳点样浓度分别为0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.4mg/ml、0.4mg/ml(图4)。荧光值扫描数据如图5。

[0094] 实施例3:最佳点样液的确定

[0095] 点样液类别及浓度会影响是否能形成稳定的蛋白斑点,继而会影响SNR值,影响整个实验结果。将CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白分别用含50vol%、40vol%商品化点样液(博奥点样液)、50vol%自制点样液(自制点样液为PBST+20%甘油)的PBS稀释成最佳抗原浓度,按照制备流程点样在环氧基片上,每个点重复3次,以能形成稳定不拖尾的荧光斑点为最佳浓度。

[0096] 结果显示:最佳点样液浓度为50vol%商品化点样液(博奥点样液)(图6)。

[0097] 实施例4:待测血清稀释倍数的确定

[0098] 将CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体阳性血清以原液、2倍、5倍、10倍、50倍、100倍稀释后,分别加在制备好的芯片上,点样量为100μL,37℃孵育30min、45min、60min,确定最佳一抗稀释浓度与孵育时间。

[0099] 结果显示:最佳血清稀释倍数为50倍,最佳孵育时间为60min。

[0100] 实施例5:二抗稀释倍数与时间的确定

[0101] 将CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白分别以0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.4mg/ml、0.4mg/ml点样在环氧基片上,封闭后,加入1:50倍稀释的一抗血清,37℃孵育1h,洗涤后,加入100倍、200倍、500倍、600倍、800倍稀释的Cy3标记荧光二抗,37℃孵育30min、45min、1h确定最佳二抗稀释倍数与孵育时间。

[0102] 结果显示:最佳二抗稀释倍数为600倍,最佳孵育时间为45min。

[0103] 实施例6:临界值的确定

[0104] 各取20份CSFV、PPV、JEV、PRRSV阴性血清以50倍稀释后,以100 $\mu$ L点样量进行点样,滴加在制备好的基片上,每份重复3次,通过博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪扫描分析,计算SNR(信号强度中位值与背景中位值的比值)值,确定每种病毒抗体检测临界值。

[0105] 结果显示,CSFV、PPV、JEV、PRRSV阴阳性判定的临界值分别为1.78、2.35、3.38、1.58。

[0106] 实施例7:特异性检验

[0107] 将CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白以0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.4mg/ml、0.4mg/ml点样在同一阵列内,每个点重复3次,每块芯片形成4个重复阵列,分别以CSFV、PPV、共感染临床血清,JEV、PRRSV特异性临床阳性血清孵育,通过博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪扫描分析,对每种蛋白的特异性进行检验。

[0108] 结果显示:在四种样本混合的阵列内,孵育CSFV与PRRSV阳性血清的阵列只有CSFV与PRRSV蛋白处出现荧光斑点,孵育PPV阳性血清的阵列只在PPV蛋白处出现荧光斑点,孵育JEV阳性血清的阵列只在JEV蛋白处出现荧光斑点。表明本实验建立的蛋白芯片检测技术具有较高的特异性(图7)。

[0109] 实施例8:稳定性验证

[0110] 分别用同一批次内的3张蛋白芯片和不同批次间的3张蛋白芯片检测50份临床血清样本,验证制备的蛋白芯片是否具有良好的稳定性和重复性。

[0111] 结果显示:通过验证制备的芯片批间和批内重复性良好(表1)。

[0112] 表1稳定性验证

| [0113] | 批内重复 |      |      |       |          | 批间重复 |      |      |      |          |
|--------|------|------|------|-------|----------|------|------|------|------|----------|
|        | 1 组  | 2 组  | 3 组  | 标准差   | 变异系数 (%) | 1 组  | 2 组  | 3 组  | 标准差  | 变异系数 (%) |
|        |      |      |      |       |          |      |      |      |      |          |
| CSFV   | 1.83 | 1.86 | 1.9  | 0.035 | 1.88     | 1.89 | 1.93 | 1.83 | 0.05 | 2.67     |
| PPV    | 3.13 | 3.2  | 3.09 | 0.056 | 1.74     | 3.15 | 3.25 | 3.22 | 0.05 | 1.6      |
| JEV    | 3.54 | 3.69 | 3.65 | 0.077 | 2.14     | 3.66 | 3.57 | 3.69 | 0.06 | 1.71     |
| PRRSV  | 2.37 | 2.29 | 2.34 | 0.040 | 1.73     | 2.38 | 2.28 | 2.31 | 0.05 | 2.2      |

[0114] 实施例9:临床样本检测与ELISA符合率比较

[0115] 用已建立的Cy3荧光标记蛋白芯片技术检测未知的临床猪血清样本200份,得到的结果与市售商品化ELISA试剂盒进行符合率比较(表2)。

[0116] 结果显示:该方法与商品化ELISA试剂盒阳性符合率分别为100%、97.7%、95.8%、100%;阴性符合率为100%、86.2%、94.1%、100%。本发明建立的检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片,具有特异性强,灵敏性高,高通量的特点。

[0117] 制备时,目的蛋白与环氧基片能高效集合,因此只需微量蛋白。相对于ELISA检测技术制备时每个待检样本需要点样200-1000ng蛋白,而基于环氧基修饰的基片,结合本发明的制备方法,使得在制备本法发明的荧光标记芯片时,CSFV、PPV、JEV、PRRSV蛋白只需点样2-4ng。

[0118] 利用本发明的蛋白芯片技术检测时,只需2 $\mu$ L原始血清(50倍稀释,100 $\mu$ L点样量),而ELISA至少需要100 $\mu$ L,一定程度上减少了临床血样采集的工作量。解决了间接ELISA灵敏性低、检测需耗费大量抗原蛋白和临床血清以及不能大批量检测的弊端。

[0119] 表2临床样本检测与ELISA符合率比较

|        |       |       |       |       |       |      |       |       |       |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| [0120] |       | CSFV  |       | PPV   |       | JEV  |       | PRRSV |       |
|        |       | 蛋白芯片  | ELISA | 蛋白芯片  | ELISA | 蛋白芯片 | ELISA | 蛋白芯片  | ELISA |
|        | 检测样本数 | 200   |       | 200   |       | 200  |       | 200   |       |
|        | 阳性    | 183   | 183   | 175   | 171   | 120  | 115   | 193   | 193   |
| [0121] | 阴性    | 17    | 17    | 25    | 29    | 80   | 85    | 7     | 7     |
|        | 阳性率   | 91.5% | 91.5% | 87.5% | 85.5% | 60%  | 57.5% | 96.5% | 96.5% |
|        | 阴性率   | 9.5%  | 9.5%  | 12.5% | 14.5% | 40%  | 42.5% | 3.5%  | 3.5%  |

## 序列表

|       |                                                                    |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| <110> | 南京农业大学                                                             |     |
| <120> | 同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的荧光标记蛋白芯片制备和检测方法                           |     |
| <160> | 7                                                                  |     |
| <170> | SIP0SequenceListing 1.0                                            |     |
| <210> | 1                                                                  |     |
| <211> | 849                                                                |     |
| <212> | DNA                                                                |     |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                          |     |
| <400> | 1                                                                  |     |
|       | agcgcaacca gtccgcctac caaaatttac aataatgac tgaccgcaag cctgatggtg   | 60  |
|       | gcaactggata ccaataatac cctgccgtat acaccggcag caccgcgtag cgaaaccctg | 120 |
|       | ggttttttatc cgtggctgcc gaccaaaccg acacagtatc gttattatct gagctgcatt | 180 |
|       | cgcaatctga atcctccgac ctataccggt cagagccagc cgaataatcg tctgaatacc  | 240 |
|       | aatcgtctgc atagcgatat catgttctat accattgaaa atgccgtgcc gattcatctg  | 300 |
|       | ctgcgtaccg gtgatgaatt tagtaccggt atctatcact ttgataccaa accgctgaaa  | 360 |
|       | ctgacccata gctggcagac caatcgtagc ctgggtctgc ctccgaaact gctgaccgaa  | 420 |
|       | ccgaccaccg aaggtgatca gcatccgggt aactgcctg cagcaaatac ccgtaaaggt   | 480 |
|       | tatcatcaga ccatcaacaa tagctatacc gaagcaaccg caattcgtcc ggcacaggtt  | 540 |
|       | ggttataata ccccgatat gaacttcgag tatagcaatg gtggtccgtt tctgaccccg   | 600 |
|       | attgtttccga ccgcagatac ccagtataat gatgatgaac cgaatggtgc aattcgcttc | 660 |
|       | accatggatt atcagcatgg tcatctgacc accagtagcc aagaactgga acgttatacc  | 720 |
|       | tttaatccgc agagcaaatg tggctctgca ccgaaacagc agtttaatca gcaggcaccg  | 780 |
|       | ctgaatctgg aaaatacaaa taatggcacc ctgctgccga gcgatccgat tgggtgtaaa  | 840 |
|       | agcaatatg                                                          | 849 |
| <210> | 2                                                                  |     |
| <211> | 35                                                                 |     |
| <212> | DNA                                                                |     |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                          |     |
| <400> | 2                                                                  |     |
|       | tgactctaga tatttggcat cattgcataa ggggg                             | 35  |
| <210> | 3                                                                  |     |
| <211> | 34                                                                 |     |
| <212> | DNA                                                                |     |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                          |     |
| <400> | 3                                                                  |     |
|       | tgacggtacc gatcttcatt ttccactgtg gtgg                              | 34  |
| <210> | 4                                                                  |     |

|                                        |                            |    |
|----------------------------------------|----------------------------|----|
| <211>                                  | 35                         |    |
| <212>                                  | DNA                        |    |
| <213>                                  | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <400>                                  | 4                          |    |
| tgacgatatc cacctgaaat gcaggctaaa aatgg |                            | 35 |
| <210>                                  | 5                          |    |
| <211>                                  | 31                         |    |
| <212>                                  | DNA                        |    |
| <213>                                  | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <400>                                  | 5                          |    |
| tgacaagctt gaatacccct ccaatggagc c     |                            | 31 |
| <210>                                  | 6                          |    |
| <211>                                  | 32                         |    |
| <212>                                  | DNA                        |    |
| <213>                                  | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <400>                                  | 6                          |    |
| tgacggatcc atgccaaata acaacggcag ac    |                            | 32 |
| <210>                                  | 7                          |    |
| <211>                                  | 29                         |    |
| <212>                                  | DNA                        |    |
| <213>                                  | 人工序列 (Artificial Sequence) |    |
| <400>                                  | 7                          |    |
| tgacctcgag tcatgctgag ggtggtgtt        |                            | 29 |

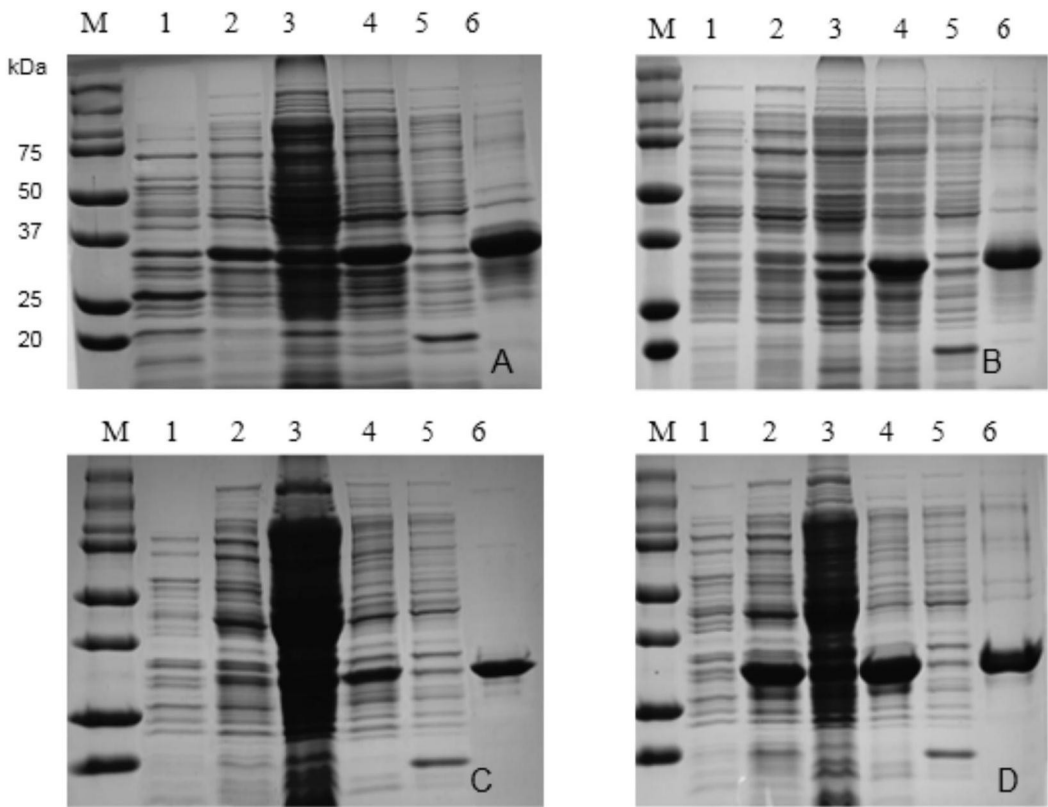


图1

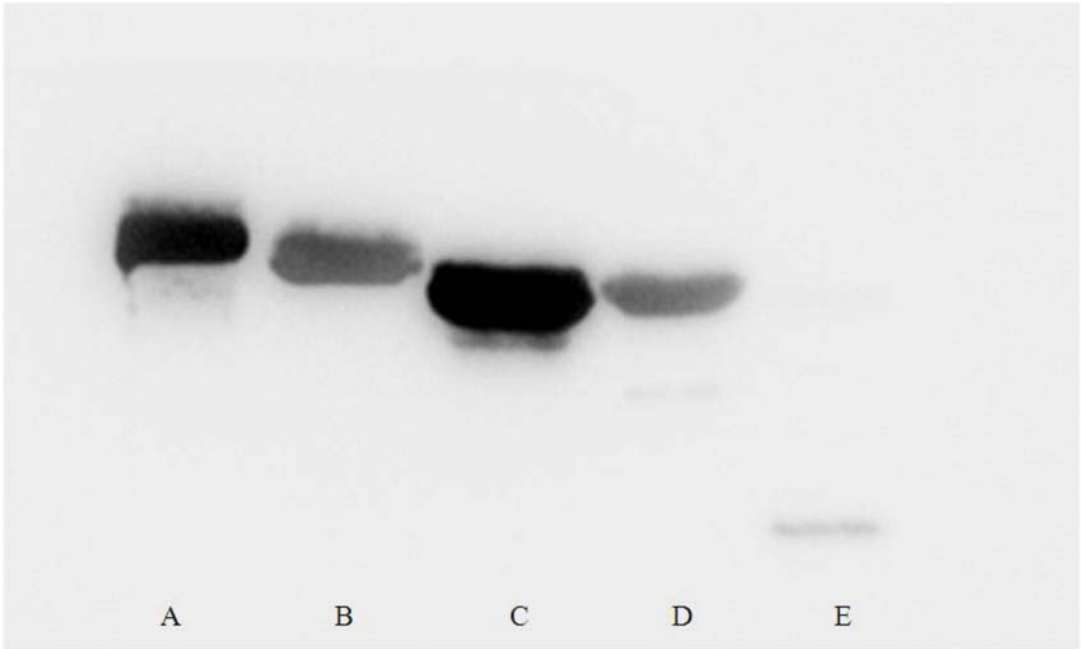


图2

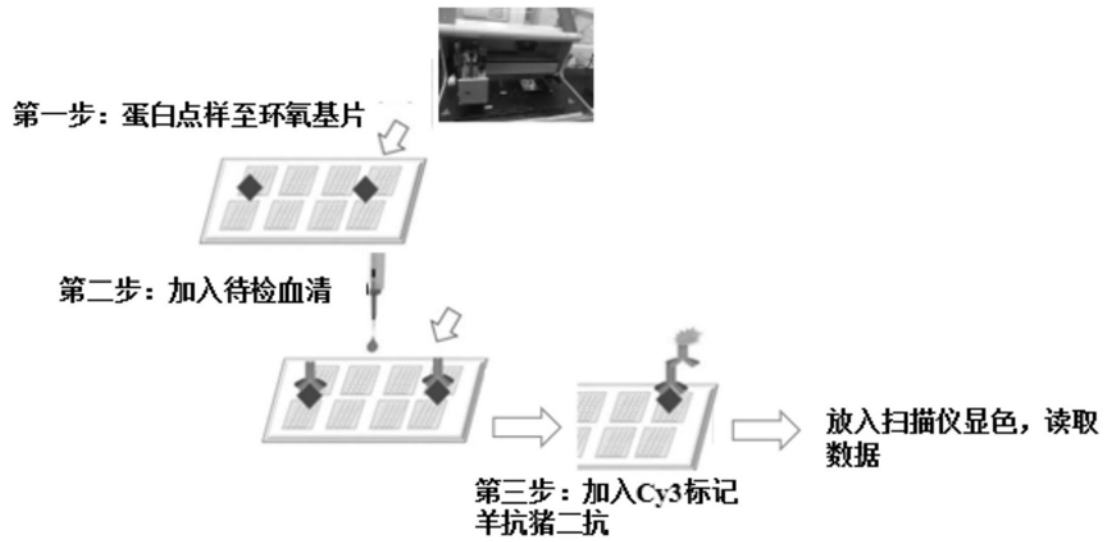


图3

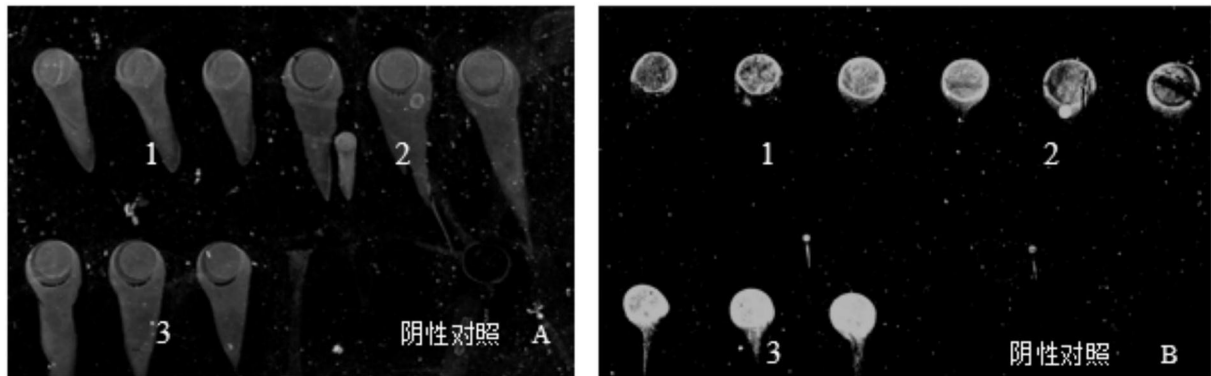


图4

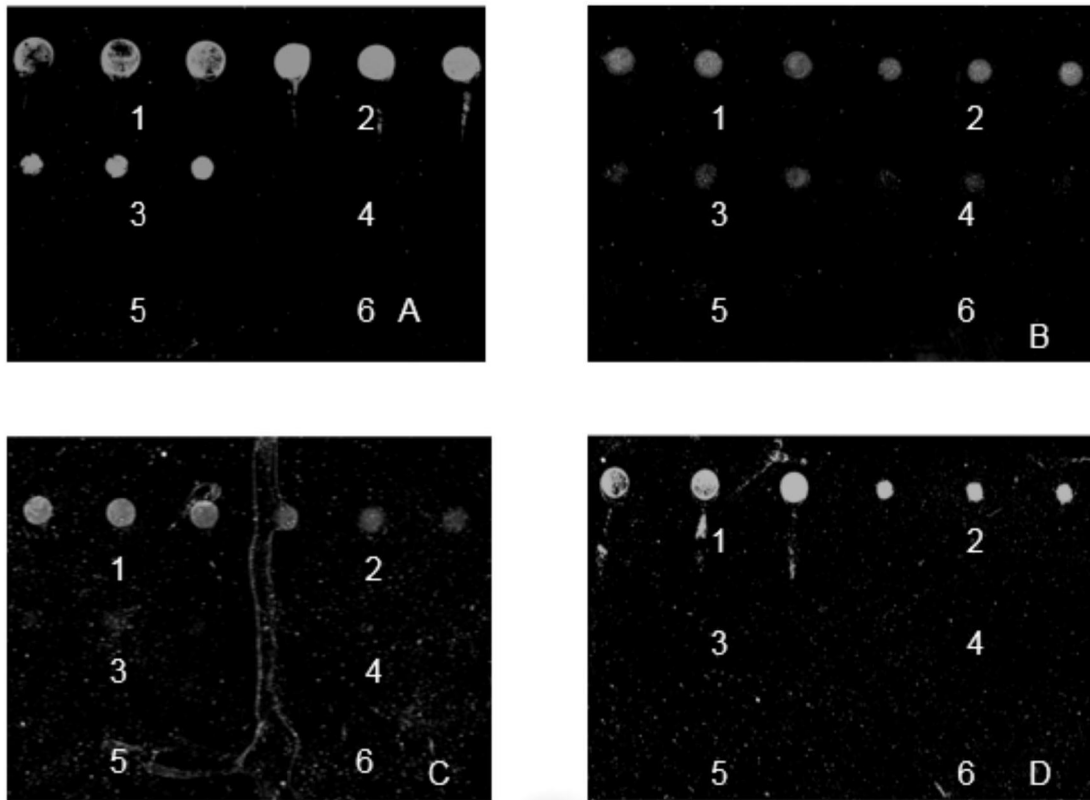


图5

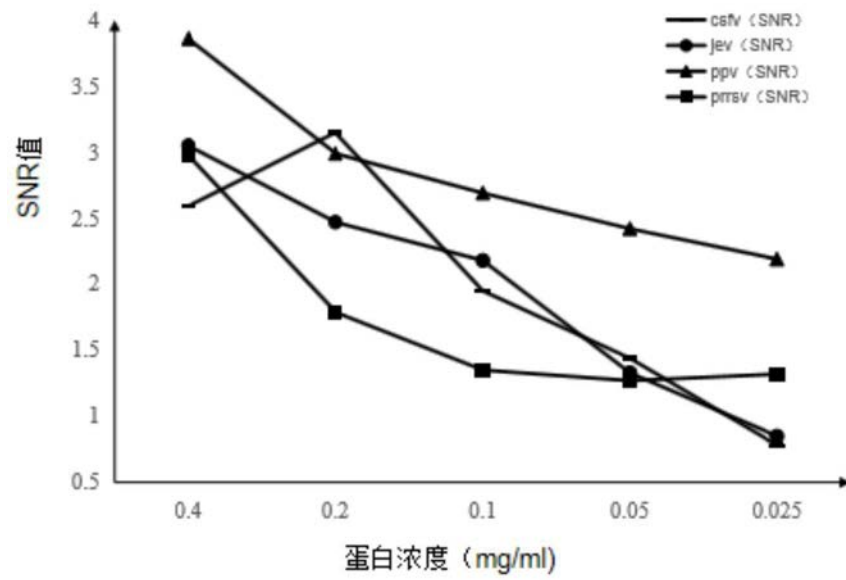


图6

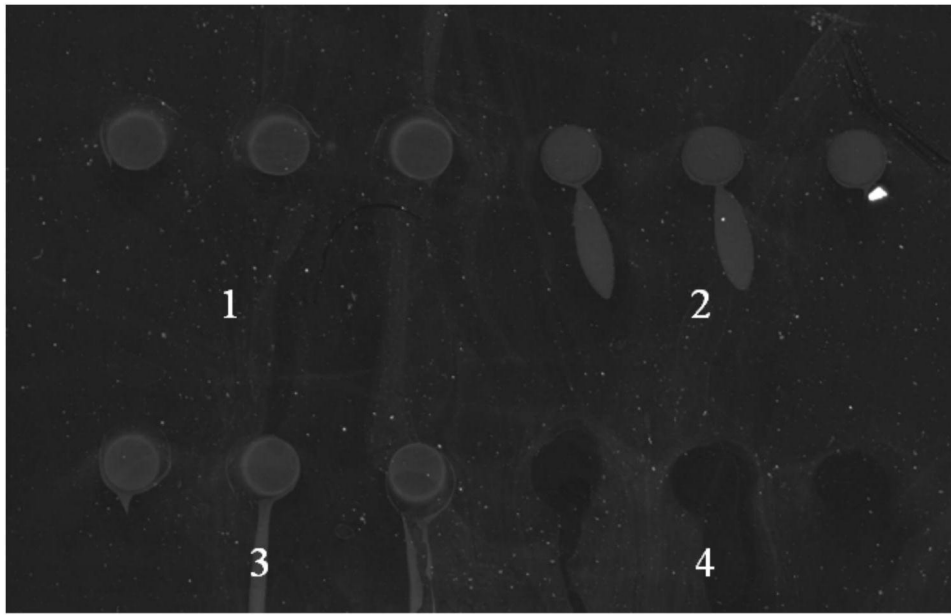


图7

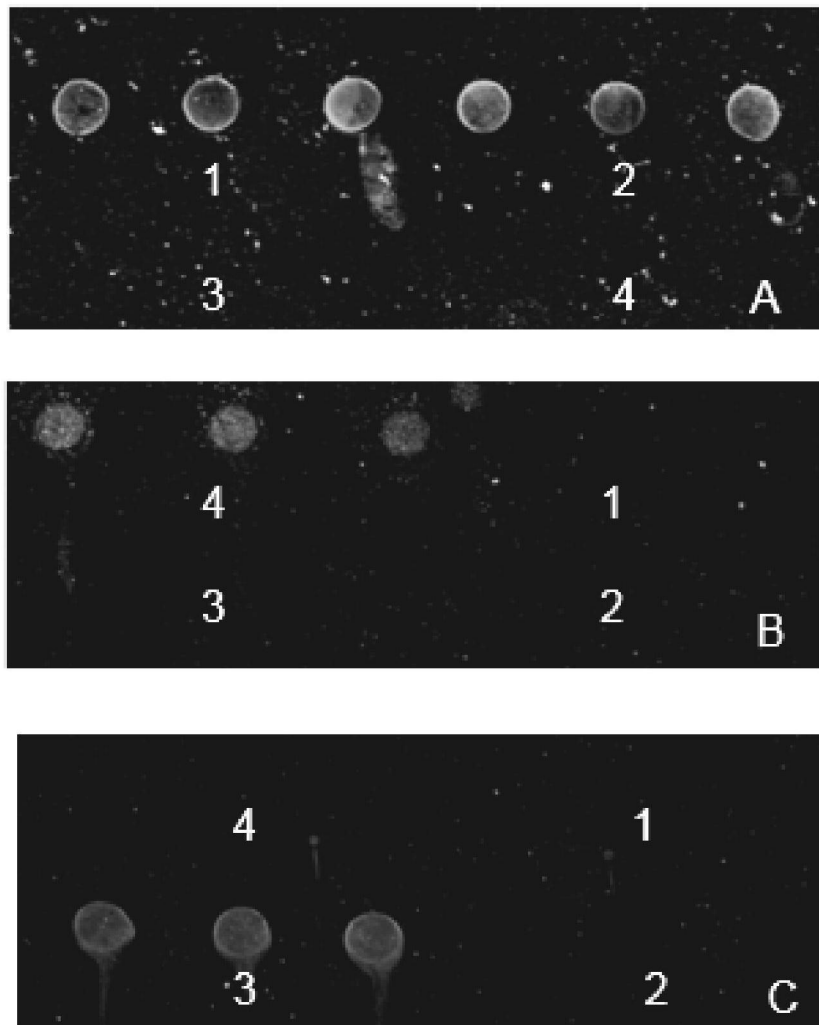


图8

|                |                                                 |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 同时检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的荧光标记蛋白芯片制备和检测方法        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN110702925A</a>                    | 公开(公告)日 | 2020-01-17 |
| 申请号            | CN2019111097381.9                               | 申请日     | 2019-11-11 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南京农业大学                                          |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 南京农业大学                                          |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 南京农业大学                                          |         |            |
| [标]发明人         | 周斌<br>吴月<br>陈婧                                  |         |            |
| 发明人            | 周斌<br>吴月<br>吴许丹<br>陈婧                           |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/569 G01N33/533 G01N21/64       |         |            |
| CPC分类号         | G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/56983 G01N33/6854 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>  |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种检测CSFV、PPV、JEV、PRRSV抗体的Cy3标记蛋白芯片、试剂盒及检测方法。所述芯片载体为环氧基修饰的光学级玻片，其成本较低，适合产业化大规模购买和生产。本发明通过原核表达获得目的抗原，将蛋白通过晶芯Personal Arrayer 16接触式点样系统点制芯片，其特征在于每个基片至少包含一个检测区，每个检测区至少包含5个检测亚区，分别为CSFV、PPV、JEV、PRRSV、检测区及2%BSA阴性对照区。检测结果通过博奥Luxscan-10K/A芯片扫描仪读取荧光值，在临床使用中，本发明具有特异性高、灵敏性强、能高通量检测的优点。

