



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109307772 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201811192108.X

(22)申请日 2018.10.12

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 王衡 张桂红 曾梦 冀池海

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 任重

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

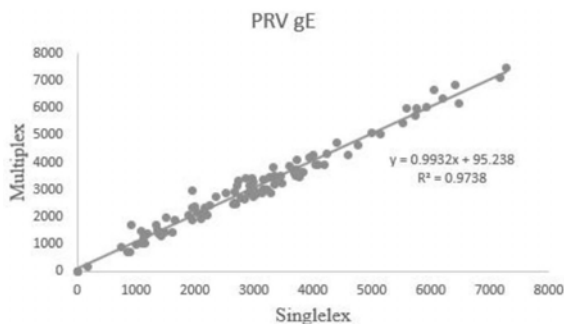
权利要求书1页 说明书13页
序列表3页 附图8页

(54)发明名称

一种伪狂犬病毒gE和gB IgG抗体双重荧光
微球免疫学检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种伪狂犬病毒gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学的检测方法,本检测方法基于一组基于液相蛋白芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的羧基化荧光微球组合,其包括分别偶联有gE截短蛋白和gB截短蛋白的羧基化荧光微球,gE、gB截短蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:2和4所示。本发明构建的同时检测PRV gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测方法,重复性好、灵敏度高,特异性好,与其他常见猪病毒病阳性血清无交叉反应。该方法的建立可同时用于伪狂犬病毒野毒感染猪和疫苗免疫猪的快速鉴别诊断及保护性抗体的检测,为猪病毒病监测提供了一个重要的方法,有很大的应用价值,值得大面积推广。



1. 一组基于液相芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的羧基化荧光微球组合,其特征在于,包括分别偶联有gE截短蛋白和gB截短蛋白的羧基化荧光微球,gE截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,gB截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

2. 根据权利要求1所述的羧基化荧光微球组合,其特征不在于,偶联有gE截短蛋白的羧基化荧光微球的编号为12号。

3. 根据权利要求1所述的羧基化荧光微球组合,其特征不在于,偶联有gB截短蛋白的羧基化荧光微球的编号为28号。

4. 权利要求1所述的羧基化荧光微球组合的制备方法,其特征不在于,包括以下步骤

S1. 得到核苷酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3所示的PRV gE截短基因和PRV gB截短基因;

S2. 分别将PRV gE截短基因和PRV gB截短基因连接入pMAL-c5X表达载体,得到重组质粒pMAL-c5x PRV gE和pMAL-c5x PRV gB;

S3. 将重组质粒pMAL-c5x PRV gE和pMAL-c5x PRV gB分别转化入大肠杆菌中得到重组菌;

S4. 对得到的重组菌分别诱导PRV gE截短蛋白和PRV gB截短蛋白表达;

S5. 分别取菌液,超声波破碎,用Ni²⁺柱进行纯化;

S6. 采用两步酰胺反应法进行gE截短蛋白/gB截短蛋白与羧基化荧光微球的偶联。

5. 权利要求4所述制备方法,其特征不在于,PRV gE截短蛋白和PRV gB截短蛋白表达的条件为:终浓度为0.3~1 mM的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷,16~37℃摇床中诱导表达4~8 h。

6. 权利要求4所述制备方法,其特征不在于,PRV gE截短蛋白用Ni²⁺柱进行纯化用100~500 mM咪唑溶液进行洗脱,洗脱1~3次。

7. 权利要求4所述制备方法,其特征不在于,PRV gB截短蛋白用Ni²⁺柱进行纯化用100~500mM咪唑溶液进行洗脱,洗脱1~3次。

8. 一种基于液相芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒,其特征不在于,包括权利要求1所述羧基化荧光微球组合。

9. 根据权利要求4所述试剂盒,其特征不在于,还包括磷酸盐吐温缓冲液、生物素标记IgG抗体、链霉素-藻红蛋白、鞘液。

10. 根据权利要求6所述试剂盒,其特征不在于,链霉素-藻红蛋白的稀释浓度为1:500~1:1000。

一种伪狂犬病毒gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测技术领域,更具体地,涉及一种伪狂犬病毒gE和gB IgG 抗体双重荧光微球免疫学检测方法。

背景技术

[0002] 伪狂犬病毒(Pseudorabies virus,PRV)是疱疹病毒科(Herpesviridae)、 α -疱疹病毒亚科(Alphaherpesvirinae)的成员之一。猪是PRV的天然宿主和传染源,可引起新生猪致命脑炎、育肥猪呼吸紊乱、种猪繁殖衰竭,以及妊娠母猪流产、死胎、产木乃伊胎。成年猪感染后无明显症状,呈隐性感染,耐过后造成长期带毒排毒,成为最危险的传染源,给养猪业带来巨大的经济损失。

[0003] 由于PRV gE基因表达于所有野毒株;同时,gE缺失疫苗较其它基因缺失疫苗的安全性更高,市场上常见PRV疫苗均为gE缺失疫苗。因此,PRV gE蛋白作为标记区分PRV野毒感染抗体和疫苗免疫抗体。

[0004] PRV gB蛋白诱导产生的小鼠血清和猪血清均能在体外中和病毒感染;同时,gB蛋白免疫后均能保护小鼠和猪免受PRV病毒感染。因此,gB蛋白是良好的亚单位疫苗靶标及保护性抗体检测诊断抗原。

[0005] 因此对于gE和gB的检测,有助于了解猪的免疫情况,以便稳定生产和预防伪狂犬病的暴发。但是,目前临床上主要使用gE和gB蛋白IgG抗体的单项 ELISA方法对该病毒的感染及保护性抗体水平进行检测分析,具有成本高,方法单一的不足。

发明内容

[0006] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,提供建立一种能同时有效区分PRV野毒感染猪与疫苗免疫猪,且监测疫苗免疫猪gB蛋白IgG抗体的双重高效鉴别诊断技术,将为伪狂犬病的系统防控提供重要帮助。

[0007] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

[0008] 一组基于液相芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的羧基化荧光微球组合,包括分别偶联有gE截短蛋白和gB截短蛋白的羧基化荧光微球,gE截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,gB截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4 所示。

[0009] 优选地,偶联有gE截短蛋白的羧基化荧光微球的编号为12号。

[0010] 优选地,偶联有gB截短蛋白的羧基化荧光微球的编号为28号。

[0011] 所述的羧基化荧光微球组合的制备方法,包括以下步骤

[0012] S1.得到核苷酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3所示的PRV gE截短基因和PRV gB截短基因;

[0013] S2.分别将PRV gE截短基因和PRV gB截短基因连接入pMAL-c5X表达载体,得到重组质粒pMAL-c5x PRV gE和pMAL-c5x PRV gB;

- [0014] S3.将重组质粒pMAL-c5x PRV gE和pMAL-c5x PRV gB分别转化入大肠杆菌中得到重组菌；
- [0015] S4.对得到的重组菌分别诱导PRV gE截短蛋白和PRV gB截短蛋白表达；
- [0016] S5.分别取菌液，超声波破碎，用Ni²⁺柱进行纯化，得到氨基酸序列如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4所示的PRV gE截短蛋白和PRV gB截短蛋白；
- [0017] S6.采用两步酰胺反应法进行gE截短蛋白/gB截短蛋白与羧基化荧光微球的偶联。
- [0018] 优选地，所述大肠杆菌为BL21 (DE3)。
- [0019] 优选地，其特征在于，PRV gE截短蛋白和PRV gB截短蛋白表达的条件为：终浓度为0.3~1mM的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷，16~37℃摇床中诱导表达 3~8h。
- [0020] 更优选地，PRVgE截短蛋白和PRV gB截短蛋白表达的条件为：终浓度为 0.3mM的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷，16℃摇床中诱导表达8h。
- [0021] 优选地，PRVgE截短蛋白用Ni²⁺柱进行纯化用100~500mM咪唑溶液进行洗脱，洗脱1~3次。
- [0022] 更优选地，PRVgE截短蛋白用Ni²⁺柱进行纯化用300mM咪唑溶液进行洗脱，洗脱2次。
- [0023] 优选地，PRVgB截短蛋白用Ni²⁺柱进行纯化用100~500mM咪唑溶液进行洗脱，洗脱1~3次。
- [0024] 更优选地，PRVgB截短蛋白用Ni²⁺柱进行纯化用200mM咪唑溶液进行洗脱，洗脱2次。
- [0025] 优选地，所述两步酰胺反应法为：(1) NaH₂PO₄缓冲液、Sulfo-NHS和EDC 溶液活化磷酸化微球，使PRV gE截短蛋白和PRV gB截短蛋白分别与羧基化荧光微球形成共价酰胺键；(2) PBS-TBN溶液重悬偶联复合体，4℃避光保存。
- [0026] 一种基于液相芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒，包括以上所述羧基化荧光微球组合。
- [0027] 优选地，还包括磷酸盐吐温缓冲液 (PBST)、生物素标记IgG抗体、链霉素-藻红蛋白、鞘液。
- [0028] 优选地，磷酸盐吐温缓冲液pH=7.4。
- [0029] 优选地，链霉素-藻红蛋白的稀释浓度为1:500~1:1000。
- [0030] 更优选地，链霉素-藻红蛋白的稀释浓度为1:1000。
- [0031] 优选地，所述IgG抗体为兔抗猪IgG抗体。
- [0032] 一种基于液相芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的试剂盒，包括：偶联有g E截短蛋白12号羧基化荧光微球gE-12和偶联有gB截短蛋白的28号羧基化荧光微球gB-18，gE截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，gB截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示；
- [0033] 磷酸盐吐温缓冲液 (PBST)、生物素标记IgG抗体、链霉素-藻红蛋白、鞘液。
- [0034] 试剂盒的使用方法包括以下步骤：
- [0035] (1) 偶联好的微球 (gE-12微球复合体和gB-18微球复合体) 恢复室温后，于96孔板上每孔加入50μL (2500个) 微球，室温孵育30min后，加入50μL 待检测样品，室温避光震荡 (500r/min) 孵育45min；
- [0036] (2) 用200μL PBST洗涤2次；
- [0037] (3) 每孔加入100μL 1:1000稀释的生物素标记的兔抗猪IgG (H+L链) 抗体，室温避光震荡 (500r/min) 孵育60min；；

- [0038] (4) 用200 μ L PBST洗涤2次;
- [0039] (5) 每孔加入100 μ L 1:1000稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE),在避光条件下,室温震荡(500r/min)孵育0.5h;
- [0040] (6) 200 μ L PBST洗涤2次;
- [0041] (7) 每孔加入125 μ L鞘液重悬,于Flex 3D液相芯片检测系统进行读取中位数荧光强度。
- [0042] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:
- [0043] 本发明构建的同时检测PRV gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测方法,重复性好、灵敏度高,特异性好,与其他常见猪病毒病阳性血清无交叉反应。该方法的建立可同时用于伪狂犬病毒野毒感染猪和疫苗免疫猪的快速鉴别诊断及保护性抗体的检测,为猪疾病监测提供了一个重要的方法,有很大的应用价值,值得大面积推广。

附图说明

- [0044] 图1为PRV gE基因第二轮扩增的电泳图;M:DL2000Marker;1:样本PCR 扩增产物。
- [0045] 图2为PRV gB基因第二轮扩增的电泳图;M:DL2000Marker;1、2:样本PCR扩增产物。
- [0046] 图3为重组质粒pMAL-c5x PRV gE酶切鉴定;M:DL5000Marker;1、2:酶切产物。
- [0047] 图4为重组质粒pMAL-c5x PRV gB酶切鉴定;M:DL5000Marker;1:酶切产物。
- [0048] 图5为PRV gE截短蛋白表达和可溶性分析结果;M:170kDa预染的蛋白 Marker;1:pMAL-c5x空载诱导前;2:pMAL-c5x空载诱导后;3:pMAL-c5x PRV gE诱导前;4:pMAL-c5x PRV gE诱导产物破碎沉淀;5:pMAL-c5x PRV gE诱导产物破碎上清。
- [0049] 图6为PRV gB截短蛋白表达和可溶性分析结果;M:170kDa预染的蛋白 Marker;1:pMAL-c5x空载诱导前;2:pMAL-c5x空载诱导后;3:pMAL-c5x PRV gB诱导前;4:pMAL-c5x PRV gB诱导后;5:pMAL-c5x PRV gB诱导产物破碎上清;6:pMAL-c5x PRV gB诱导产物破碎沉淀。
- [0050] 图7为pMAL-c5x PRV gE截短蛋白Western-blot验证;A:His标签 Western-blot验证;B:MBP标签Western-blot验证;M:170kDa预染的蛋白 Marker;1:pMAL-c5x PRV gE截短蛋白破碎上清。
- [0051] 图8为pMAL-c5x PRV gB截短蛋白Western-blot验证;A:His标签 Western-blot验证;B:MBP标签Western-blot验证;M:170kDa预染的蛋白 Marker;1:pMAL-c5x PRV gB截短蛋白破碎上清。
- [0052] 图9为PRV gE截短蛋白的纯化;M:170kDa预染蛋白Marker;1:80mM 咪唑洗杂;2:100mM咪唑洗脱;3:200mM咪唑洗脱;4:300mM咪唑洗脱;5:400mM咪唑洗脱;6:500mM咪唑洗脱。
- [0053] 图10为PRV gB截短蛋白的纯化;M:170kDa预染的蛋白Marker;1:pMAL-c5x PRV gB截短蛋白破碎上清;2:流出液;3:20mM咪唑洗杂;4:20 mM咪唑洗杂;5:40mM咪唑洗杂;6:40mM咪唑洗杂;7:60mM咪唑洗杂;8:60mM咪唑洗杂;9:200mM咪唑洗脱。
- [0054] 图11为重组PRV gE蛋白抗原性验证;A中,M:170kDa预染的蛋白Marker;1:PRV gE阳性血清;B中,M:170kDa预染的蛋白Marker;1:PRV gE阴性血清
- [0055] 图12为重组PRV gB蛋白抗原性验证;A中,M:170kDa预染的蛋白Marker;1:PRV gB

阳性血清;B中,M:170kDa预染的蛋白Marker;1:PRV gB阴性血清。

[0056] 图13为单项荧光微球免疫学检测方法的可行性分析。

[0057] 图14为gE、gB血清稀释条件的优化。

[0058] 图15为gE IgG抗体检测方法特异性分析。

[0059] 图16为gB IgG抗体检测方法特异性分析。

[0060] 图17为gE IgG抗体检测方法ROC曲线。

[0061] 图18为gE IgG抗体检测方法ROC曲线分析。

[0062] 图19为gB IgG抗体检测方法ROC曲线。

[0063] 图20为gB IgG抗体检测方法ROC曲线分析。

[0064] 图21为双重FMIA检测方法检测gE IgG抗体效果的评价。

[0065] 图22为双重FMIA检测gB IgG抗体效果方法的评价。

具体实施方式

[0066] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0067] 血清及主要试剂

[0068] PRV gE、PRV gB、猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CFSV)、猪圆环病毒(Porcine circovirus,PCV)及猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV) 阴阳性血清由华南农业大学兽医学院临床实验室保存。临床猪PRV gE血清样本284份、PRV gB血清样本121份收集于广东省猪场。羊抗猪(HRP标记)抗体由华南农业大学兽医学院临床实验室保存;IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H+L) 购自LI-COR公司产品;Rabbit F(ab) Anti-Pig IgG H&L (Biotin)、Goat Anti-Mouse IgG H&L (Biotin) 购自 Abcam公司。

[0069] PRVgE、gB蛋白IgG检测ELISA试剂盒购自美国IDEXX公司;羧基化荧光编码微球、校正、校准试剂、鞘液、1.5mL磁力架购自美国Luminex公司;乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐(EDC)、琥珀酰亚氨基磺酸基生物素 (Sulfo-NHS-Biotin)、2-[N-吗啉代] 乙磺酸(MES)、叠氮钠购自美国Sigma公司;链霉素-藻红蛋白(SA-PE) 购自Invitrogen公司;Microplates 96孔板购自Greiner 公司。

[0070] 主要仪器

[0071] Flex 3D液相芯片检测系统为美国Luminex公司产品;Odyssey双色激光分析系统为美国LI-COR公司产品。

[0072] 实施例1 PRV gE和gB基因的扩增

[0073] 一、实验操作

[0074] 根据NCBI GenBank提供的ID为KU056477.1疱疹病毒全基因组序列和 ID为KT948041.1疱疹I型广东分离株全基因序列分别设计上下游引物(见表1)。由于直接以DNA为模板克隆全长基因无法设计合适的引物,故分别设计两组引物进行两轮克隆,获得PRV gE和gB截短基因。

[0075] 表1引物:

[0076]

引物名称	引物序列
gEF1	5'-GACCATGCGGCCCTTTCTGCT-3'
gER1	5'-CCATTCGTCACCTCCGGTTTCTCC-3'
gEF2	5'-GCGGAATTCATGGAGGCCGACGACGATGAC-3' (<i>EcoR</i> I)
gER2	5'-GGGAAGCTTTCAATGATGATGATGATGATGGGGCGAGAAGAGCTGCGA - (<i>Hind</i> III)
gBF1	5'-GACAAGCCCGAGGTGTAC-3'
gBR1	5'-TGGAAGAAGTTGGCGATG-3'
[0077]	
gBF2	5'- GCGGAATTCATGGACCACATCCAGGCGCAC -3' (<i>EcoR</i> I)
gBR2	5'-GGGAAGCTTTCAATGATGATGATGATGATGGTAGAACTTGAGCGCGTG- 3' (<i>Hind</i> III)

[0078] 第一轮扩增分别使用gEF1、gER1和gBF1、gBR1对PRV gE和gB基因进行扩增。

[0079] 第一轮扩增分别使用gEF2、gER2和gBF2、gBR2对PRV gE和gB基因进行扩增。第二轮引物内含EcoR I和HindIII酶切位点,表中加粗内容为对应的酶切位点;且第二轮下游引物中插入6×His标签基因。

[0080] 二、实验结果

[0081] PRV gE基因第一轮扩增片段长度为930bp,第二轮扩增片段长度为564bp; PRVgB基因第一轮扩增片段长度为933bp(图1),为第二轮扩增片段长度为609 bp(图2),均与预期的结果一致。

[0082] 得到PRV gE截短基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1,编码的PRV gE截短蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2;得到PRV gB截短基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:3,编码的PRV gB截短蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4。

[0083] 实施例2重组质粒pMAL-c5x PRV gE、pMAL-c5x PRV gB的构建和鉴定

[0084] 一、实验操作

[0085] 将获得PRV gE、PRV gB基因片段分别与pMAL-c5X表达载体用EcoR I和 HindIII限制性内切酶分别进行双酶切后连接,分别命名为pMAL-c5x PRV gE、pMAL-c5x PRV gB。连接产物转化后,挑取的单个菌落经进行扩菌后重组质粒的鉴定:(1)进行PCR;(2)使用限制性内切酶EcoR I和HindIII对两个重组质粒进行双酶切;(3)将所提质粒送至生工生物有限公司测序。

[0086] 二、实验结果

[0087] PCR之后凝胶电泳分别获得约546bp、609bp的特异性条带,与预期大小一致。

[0088] 双酶切之后凝胶电泳,pMAL-c5x PRV gE酶切得到两条约为5677bp和547 bp的条带,与预期结果一致(图3);pMAL-c5x PRV gB酶切得到两条约为5677 bp和609bp的条带,与

预期结果一致(图4)。

[0089] 测序结果分别与GenBank中ID为KU056477.1疱疹病毒全基因组序列和ID 为KT948041.1疱疹I型广东分离株全基因序列比对,显示与其对应序列完全一致,且两个酶切位点均正确,重组质粒构建成功。

[0090] 实施例3检测抗原的诱导表达和可溶性分析、Western-blot验证

[0091] 一、实验操作

[0092] (1) 抗原的诱导表达

[0093] 将测序成功的阳性重组质粒转化至E.coli BL21 (DE3) 大肠杆菌中,加入终浓度为0.3mM的诱导剂异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG),16℃摇床中诱导表达8h。

[0094] (2) 抗原的可溶性分析

[0095] 将诱导好的菌液8000rpm/min离心10min,弃上清,菌体用PBS重悬。将重悬的菌体在冰浴条件下超声破碎,200W,工作3sec,间歇5sec,破碎至菌液变澄清。菌液经12000rpm,4℃离心20min,分别收集上清液和沉淀,沉淀用PBS重悬,进行截短蛋白的可溶性分析。

[0096] 取诱导前后全菌液、破碎上清及破碎沉淀,同时取pMAL-c5X空载体诱导产物作为对照。进行SDS-PAGE电泳以及考马斯亮蓝染色。

[0097] (3) 抗原的Western-blot验证

[0098] pMAL-c5x PRV gE、pMAL-c5x PRV gB诱导产物破碎上清经SDS-PAGE 电泳分析后转膜至PVDF膜上,以Anti-MBP单抗、Anti-His单抗为一抗、IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG (H+L) 羊抗鼠抗体为二抗,进行蛋白免疫印迹法验证。

[0099] 二、实验结果

[0100] 结果显示pMAL-c5X空载体诱导后在43.3KDa出现一条较突出的蛋白条带,与预期的MBP标签蛋白和His标签蛋白的重组标签蛋白大小一致;重组PRV gE、PRV gB蛋白分别在约63.3KDa、66.3KDa有一条明显蛋白条带,与预期目的蛋白大小相一致,且均在破碎产物上清中大量存在,说明该蛋白具有可溶性 (图5、6)。

[0101] 蛋白免疫印迹法验证结果显示均出现与目的蛋白大小一致的单一特异性条带(图7、8),说明MBP标签蛋白和His标签蛋白在重组质粒中成功表达。

[0102] 前期研究中,在gE基因扩增过程中,针对几个主要的抗原表位(1~125、31~339、52~238位的氨基酸残基,)进行其基因的PCR扩增,并构建表达质粒,发现并非所有的基因片段都能表达出可溶性的蛋白,经过筛选后,在大肠杆菌表达系统中表达了本发明中的gE 52~238位的氨基酸残基,经纯化后作为抗原进行后续的研究。

[0103] 迄今为止,国内外许多学者都成功地在大肠杆菌中表达了PRV的gE、gB 基因,但大多以包涵体的形式存在,然而包涵体的纯化步骤复杂、对蛋白样品要求也更高。本发明获得了可溶性的gE和gB蛋白。

[0104] 实施例4截短蛋白的纯化及Western-blot分析

[0105] 一、截短蛋白的纯化

[0106] 1、实验操作

[0107] 将pMAL-c5x PRV gE、pMAL-c5x PRV gB诱导产物破碎上清用GE公司Ni²⁺柱进行纯化,取其流出液、洗杂液、洗脱液进行SDS-PAGE与考马斯亮蓝分析。

[0108] 2、实验结果

[0109] 重组gE蛋白检测结果显示经20mM、40mM、60mM、80mM浓度的咪唑溶液各2两次洗杂后,300mM咪唑溶液洗脱下来的目的蛋白纯度较高(图9);重组gB蛋白检测结果显示经20mM、40mM、60mM浓度的咪唑溶液各2两次洗杂后,200mM咪唑溶液洗脱下来的目的蛋白纯度较高,杂蛋白基本去除(图 10)。

[0110] 二、纯化后蛋白进行Western-blot分析

[0111] 1、实验操作

[0112] 纯化产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转印至偏二氟乙烯(PVDF)膜上;5%脱脂奶粉37℃封闭2h;1:10稀释的PRV gE阴、阳性血清,PRVgB阴、阳性血清作为一抗,4℃孵育过夜;加入1:5000稀释HRP的标记羊抗猪抗体,室温孵育1h;应用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)进行显色分析。

[0113] 2、实验结果

[0114] 重组gE、gB蛋白分别与对应的阳性血清发生特异性结合(图11、12),均出现与目的条带大小相符合的条带;重组gE、gB蛋白与对应的阴性血清不发生反应,无条带出现。说明所表达的截短蛋白具有抗原性,可用于荧光微球免疫学检测方法的建立。

[0115] 实施例5伪狂犬病毒gE、gB IgG抗体的单项荧光微球免疫学检测方法的建立

[0116] 一、实验操作

[0117] 1、抗原与磁性羧基化荧光编码微球的偶联

[0118] 根据Luminex的xMAP技术手册,采用两步酰胺反应法进行偶联:通过加入 NaH_2PO_4 缓冲液、Sulfo-NHS和EDC溶液活化磷酸化微球,使PRV gE、PRV gB抗原分别与12、28号微球形成共价酰胺键,然后用PBS-TBN溶液重悬制备得到12-PRV gE、28-PRV gB偶联复合体命名为gE-12微球和gB-28微球复合体,4℃避光保存。取gE-12、gB-28微球复合体以及对相应的阴、阳性血清、PBS进行上机检测。

[0119] 2、荧光微球免疫学检测方法的建立

[0120] 偶联好的微球恢复室温后,于96孔板上每孔加入50μL(2500个)微球和50μL待检测样品(单抗或血清),室温避光震荡(500r/min)孵育1h;用200μL PBST(pH=7.4)洗涤2次;每孔加入100μL生物素标记的兔抗猪IgG(H+L链)抗体(1:5000);200μL PBST洗涤2次;每孔加入100μL 1:1000稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE),在避光条件下,室温震荡(500r/min)孵育0.5h;200μL PBST 洗涤2次;每孔加入125μL鞘液重悬,于Flex 3D液相芯片检测系统进行读取中位数荧光强度(Median Fluorescent Intensity,MFI)。

[0121] 应用PRV gE/gB阳性血清(Positive serun)、PRV gE/gB阴性血清(Negative serun)、PBS(Control)分别作为阳性对照、阴性对照、空白对照样品,进行上机检测读数分析偶联是否成功。

[0122] 二、实验结果

[0123] 结果显示:阳性血清的MFI大于10000,且大于5倍阴性对照的MFI,空白对照的MFI小于100(图13),说明该偶联方法和检测方法是可行的。

[0124] 实施例6伪狂犬病毒gE、gB IgG抗体的单项荧光微球免疫学检测方法的优化

[0125] 一、正交试验

[0126] 1、实验操作

[0127] 将生物素标记抗体的稀释度(二抗稀释度),SA-PE浓度,微球与血清反应的时间,

微球、血清与检测抗体反应的时间四个因素各自设置三个位级,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验表确定试验条件,见表2。

[0128] 表2因素位级表:

[0129]	位级	二抗稀释度	SA-PE 浓 度	微球与血	微球、血清与二抗
			(μg/ml)	清 反 应 的	反应的时间 (min)
		时间(min)			
[0130]	位级 1	1: 1000	1	30	30
	位级 2	1: 5000	5	45	45
	位级 3	1: 10000	10	60	60

[0131] 2、实验结果

[0132] 根据正交试验分别得出gE、gB IgG抗体检测方法的 $L_9(3^4)$ 正交表数据(表 3、4),由两次重复试验数据结果显示:gE IgG抗体检测方法最优条件为A1B2C2D3,即二抗稀释度为1:1000、SA-PE浓度为 $5\mu\text{g}$ 、与血清孵育时间为45 min、与二抗孵育时间为60min为最优反应条件;gB IgG抗体检测方法最优条件为A1B3C2D3,即二抗稀释度为1:1000、SA-PE浓度为 $10\mu\text{g}$ 、与血清孵育时间为45min、与二抗孵育时间为60min为最优反应条件。且二抗稀释度对于gE、gB IgG抗体检测方法都是最主要的影响因素。

[0133] 表3gE IgG抗体检测方法的 $L_9(3^4)$ 正交表:

[0134]

二抗 稀释度 A		SA-PE 浓 度 ($\mu\text{g/ml}$) B	与血清 孵育时间 (min) C	与二抗 孵育时间 (min) D	MFI①	MFI②
1	1	1	1	1	1079.00	1233.00
2	1	2	2	2	2275.00	2737.00
3	1	3	3	3	2628.00	2677.50
4	2	1	2	3	1207.50	1364.00
5	2	2	3	1	722.00	630.00
6	2	3	1	2	659.50	794.50
7	3	1	3	2	392.00	542.00
8	3	2	1	3	785.00	639.00
9	3	3	2	1	417.50	484.00
K	5982.00	2678.50	2523.50	2218.50	10165.5	11101
1	6647.50	3139.00	2666.50	2347.00		
K	2589.00	3782.00	3900.00	3326.50		
2	2788.50	4006.00	4585.00	4073.50	10165.5	11101
K	1594.50	3705.00	3742.00	4620.50		
3	1665.00	3956.00	3849.50	4680.50		
K	35784324	7174362.2	6368052.25	4921742.25	10165.5	11101
1 ²	44189256	9853321	7110222.25	5508409.00		
K	6702921	14303524	15210000	11065602.25		
2 ²	7775732	16048036	21022225.00	16593402.25	10165.5	11101
K	2542430	13727025	14002564	21349020.25		
3 ²	2772225	15649936	14818650.25	21907080.25		
R	1462.50	367.83	458.83	800.67	10165.5	11101

[0135]

[0136] 表4 gB IgG抗体检测方法的L9 (3⁴) 正交表:

[0137]

	二抗 稀释度		SA-PE 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	与血清 孵育时间 (min)	与二抗 孵育时间 (min)	MFI①	MFI②
	A		B	C	D		
1	1		1	1	1	1172.33	1205.00
2	1		2	2	2	2469.17	2395.50
3	1		3	3	3	2744.17	2927.00
4	2		1	2	3	1332.33	1425.50
5	2		2	3	1	709.67	777.00
6	2		3	1	2	760.50	827.50
7	3		1	3	2	492.17	542.50
8	3		2	1	3	687.67	639.00
9	3		3	2	1	461.83	484.00
K1	6385.667		2996.833	2620.5	2343.833	10829.83	11223
	6527.5		3173	2671.5	2466		
K2	2802.5		3866.5	4263.333	3721.833		
	3030		3811.5	4305	3765.5		
K3	1641.667		3966.5	3946	4764.167		
[0138]	1665.5		4238.5	4246.5	4991.5		
	40776739		8981010	6867020	5493555		
K1 ²	42608256		10067929	7136912	6081156		
	7854006		14949822	18176011	13852043		
K2 ²	42608256		10067929	7136912	6081156		
	2695069		15733122	15570916	22697284		
K3 ²	2773890		17964882	18032762	24915072		
R	1620.67		355.17	544.50	841.83		

[0139] 二、最佳血清稀释度选择

[0140] 1、实验操作

[0141] 将PRV gE/gB阳性、PRV gE/gB阴性血清分别进行1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320梯度稀释。每组3个重复,根据各组的MFI值确定血清最佳稀释倍数。

[0142] 2、实验结果

[0143] 将PRV gE、gB阴、阳性血清分别进行1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 梯度稀释。结果显示:最佳稀释倍数为1:10,此时阳性血清MFI值大于10000,且大于阴性血清MFI值的5倍(图14)。

[0144] 三、最佳检测方法

[0145] 1、gE IgG抗体的单项荧光微球免疫学检测方法步骤

[0146] 用涡旋振荡器振荡1min偶联好的微球,用PBS-TBN将微球稀释为工作浓度50个/ μ L后,50 μ L/孔(即2500个微球)加至Microplates 96孔板上,室温孵育30min后,加入待检测样品50 μ L/孔,室温下振荡避光孵育45min,用PBST 洗涤2次,200 μ L/孔;

[0147] 加入生物素标记的兔抗猪IgG (H+L链) 抗体(1:1000稀释) 100 μ L/孔,室温震荡(500r/min) 避光孵育60min,用PBST洗涤2次,200 μ L/孔;

[0148] 加入1:500稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE) 100 μ L/孔,室温震荡(500r/min) 避光孵育0.5h,用PBST洗涤2次,200 μ L/孔;

[0149] 加入鞘液125 μ L/孔,重悬微球,采用Flex 3D液相芯片检测系统进行读数分析,得到每个孔对应的MFI。

[0150] 2、gE IgG抗体的单项荧光微球免疫学检测方法步骤

[0151] 用涡旋振荡器振荡1min偶联好的微球,用PBS-TBN将微球稀释为工作浓度50个/ μ L后,50 μ L/孔(即2500个微球)加至Microplates 96孔板上,室温孵育30min后,加入待检测样品50 μ L/孔,室温下振荡避光孵育45min,用PBST 洗涤2次,200 μ L/孔;

[0152] 加入生物素标记的兔抗猪IgG抗体(1:1000稀释) 100 μ L/孔,室温震荡(500 r/min) 避光孵育60min,用PBST洗涤2次,200 μ L/孔;

[0153] 加入1:1000稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE) 100 μ L/孔,室温震荡(500 r/min) 避光孵育0.5h,用PBST洗涤2次,200 μ L/孔;

[0154] 加入鞘液125 μ L/孔,重悬微球,采用Flex 3D液相芯片检测系统进行读数分析,得到每个孔对应的MFI。

[0155] 实施例7伪狂犬病毒gE、gB IgG抗体的单项荧光微球免疫学检测方法的评价

[0156] 一、特异性验证

[0157] 1、实验操作

[0158] 为验证优化后FMIA方法的特异性,应用该方法对猪常见疾病PRRSV、PCV、CFSV阳性血清进行检测。

[0159] 偶联好的磁珠与PRRSV阳性血清、PCV阳性血清、CSFV阳性血清进行反应,每组3个重复,根据不同血清的MFI值差异判断其特异性。

[0160] 2、实验结果

[0161] 建立的PRV gE IgG抗体检测方法,只与PRV gE阳性血清反应结果为阳性,其他猪常见疾病检测结果为阴性;建立的PRV gB IgG抗体检测方法,只与PRV gB阳性血清反应结果为阳性,其他猪常见疾病检测结果均为阴性;且两种单项方法进行阳性血清互检时,没有交叉反应。表明所建立两种FMIA方法特异性良好,偶联抗原与其他常见猪病毒阳性血清没

有交叉反应(图15、16)。

[0162] 二、重复性验证

[0163] 1、实验操作

[0164] 各取PRV gE、PRV gB的4份阳性血清、1份阴性血清进行检测,其中每份血清做16个重复,计算其变异系数(CV)评价该方法的批内精密度;各取PRV gE、PRV gB的11份阳性血清、1份阴性血清进行检测,其中每份血清3个重复,在不同时间做3次,计算CV评价该方法的批间精密度。

[0165] 2、实验结果

[0166] PRV gE、gB IgG抗体FMIA检测方法的批内变异系数(CV)分别为 2.7%~10.9%、3.9%~9.7%,批间CV分别为:2.1%~9.5%、3.6%~14.6%。其平均批内CV分别为:7.6%、5.8%,平均批间CV分别为:8.9%、12.1%。符合Luminex 公司的xMAP技术大全中的批内CV小于10%、批间CV小于20%的要求,则表明本研究建立的FMIA检测方法重复性较好。

[0167] 对比1荧光微球免疫学检测方法与ELISA的比较

[0168] 一、实验操作

[0169] 应用IDEXX公司ELISA试剂盒检测得到284份PRV gE和121份PRV gB 临床阳性血清,采用实施例6建立的最佳单项荧光微球免疫学检测方法这些样本进行检测,并与IDEXX公司的ELISA试剂盒检测结果进行比对,检测结果MFI 值采用MedCalc软件进行ROC曲线分析,确定最优临界值、特异性及敏感度。并且对检测结果进行卡方检验评价其符合率。

[0170] 二、实验结果

[0171] 应用PRV gE IgG抗体FMIA方法检测IDEXX公司ELISA试剂盒检测的284 份gE临床阳性血清,并与ELISA结果进行比对,结果通过MedCalc软件进行 ROC分析,得到ROC曲线(图17)。结果显示,PRV gE FMIA检测方法的灵敏度为92.3%,特异性为99.26%,临界值为5991.5(图18)。

[0172] 应用PRV gB IgG抗体FMIA方法检测IDEXX公司ELISA试剂盒检测的121 份gB临床猪阳性血清样品,并与ELISA结果进行比对,通过MedCalc软件进行ROC分析,得到ROC曲线(图19)。结果显示,PRV gB IgG抗体FMIA检测方法的灵敏度为96.3%,特异性为95.74%,临界值为2862(图20)。

[0173] 卡方检验表明:gE、gB IgG抗体FMIA检测方法与IDEXX公司ELISA的关联性显著($P < 0.01$),两种方法均可反应同一指标。

[0174] 实施例8一种PRV gE、gB IgG抗体荧光微球免疫学双重检测方法

[0175] 将gE-12、gB-28微球复合体同时加入同一个检测反应中,建立gE、gB IgG 抗体双重检测方法。应用单项荧光微球免疫学检测技术和双重荧光微球免疫学检测技术同时对猪血清进行检测。

[0176] 根据Luminex的xMAP技术大全,用PBS-TBN将两种微球稀释为工作浓度 50个/ μL 后,两种微球各50 μL /孔 (PRV-gE PRV-gB抗原偶联微球各2500个) 加至Microplates 96孔板上,室温孵育30min后,加入待检测样品50 μL /孔,室温下振荡避光孵育45min,用PBST洗涤2次,200 μL /孔;

[0177] 加入生物素标记的兔抗猪IgG抗体(1:1000稀释) 100 μL /孔,室温震荡(500 r/min)避光孵育60min,用PBST洗涤2次,200 μL /孔;

[0178] 加入1:1000稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE) 100 μ L/孔,室温震荡(500 r/min)避光孵育0.5h,用PBST洗涤2次,200 μ L/孔;

[0179] 加入鞘液125 μ L/孔,重悬微球,采用Flex 3D液相芯片检测系统进行读数分析,得到每个孔对应的MFI。

[0180] 实施例9 PRV gE、gB IgG抗体荧光微球免疫学双重检测方法的评价

[0181] 一、实验操作

[0182] 实施例6建立的单项FMIA检测方法和实施例8建立的双重FMIA检测方法同时检测96份临床猪血清样本,其检测结果进行线性回归分析,得到对应的相关系数(R^2),检验建立的双重FMIA检测方法是否存在交叉反应,同时验证多重FMIA检测方法的可行性。

[0183] 二、实验结果

[0184] gE、gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测技术与单项荧光微球免疫学检测技术时MFI值的相关系数(R^2)分别为0.9738、0.9859(图21、22),说明多重检测时gE-12号微球、gB-28号微球复合体不会相互影响,无交叉反应。

[0185] 实施例10一种PRV gE、gB IgG抗体荧光微球免疫学双重检测试剂盒

[0186] 一、试剂盒的组成

[0187] 偶联有gE截短蛋白12号羧基化荧光微球(gE-12微球复合体)和偶联有gB截短蛋白的28号羧基化荧光微球(gB-18微球复合体),gE截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,gB截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,微球的工作浓度为50个/ μ L。

[0188] 磷酸盐吐温缓冲液(PBST)、生物素标记IgG抗体、链霉素-藻红蛋白、鞘液。

[0189] 二、试剂盒的使用方法

[0190] (1)偶联好的微球(gE-12微球复合体和gB-18微球复合体)恢复室温后,于96孔板上每孔加入50 μ L(2500个)微球,室温孵育30min后,加入50 μ L待检测样品,室温避光震荡(500r/min)孵育45min;

[0191] (2)用200 μ L PBST洗涤2次;

[0192] (3)每孔加入100 μ L 1:1000稀释的生物素标记的兔抗猪IgG(H+L链)抗体,室温避光震荡(500r/min)孵育60min;;

[0193] (4)用200 μ L PBST洗涤2次;

[0194] (5)每孔加入100 μ L 1:1000稀释的链霉素-藻红蛋白(SA-PE),在避光条件下,室温震荡(500r/min)孵育0.5h;

[0195] (6)200 μ L PBST洗涤2次;

[0196] (7)每孔加入125 μ L鞘液重悬,于Flex 3D液相芯片检测系统进行读取中位数荧光强度。

序列表

<110> 华南农业大学

<120> 一种伪狂犬病毒gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测方法

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 564

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

gaggccgacg acgatgacct caacggcgac ctcgacggcg acgaccgccg cgcgggcttc 60
ggctcggccc tcgcatccct gagggaggcg cccccggccc atctggtgaa cgtgtccgag 120
ggcgccaact tcaccctcga cgcgcgcggc gacggcgccg tgctggccgg gatctggacg 180
ttcctgcccc tccgcggctg cgacgccgtg tcggtgacca cgggtgtgctt cgagaccgcg 240
tgccaccggg acctggtgct gggccgcgcc tgcgtccccg aggccccgga gatgggcatc 300
ggcgactacc tgccgcccga ggtgccgcgg ctccggcgcg agccgcccac cgtcaccgcc 360
gagcggttgt cgccgcacct gagcgtcctg cgggccacgc ccaacgacac gggcctctac 420
acgctgcacg acgcctcggg gccgcgggcc gtgttctttg tggcggtggg cgaccggccg 480
cccgcgccgg cggaccgggt gggccccgcg cgccacgagc cccgcttcca cgcgctcggc 540
ttccactcgc agctcttctc gccc 564

```

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Glu Ala Asp Asp Asp Asp Leu Asn Gly Asp Leu Asp Gly Asp Asp Arg
1           5           10           15
Arg Ala Gly Phe Gly Ser Ala Leu Ala Ser Leu Arg Glu Ala Pro Pro
          20           25           30
Ala His Leu Val Asn Val Ser Glu Gly Ala Asn Phe Thr Leu Asp Ala
          35           40           45
Arg Gly Asp Gly Ala Val Leu Ala Gly Ile Trp Thr Phe Leu Pro Val
          50           55           60
Arg Gly Cys Asp Ala Val Ser Val Thr Thr Val Cys Phe Glu Thr Ala
65           70           75           80
Cys His Pro Asp Leu Val Leu Gly Arg Ala Cys Val Pro Glu Ala Pro
          85           90           95
Glu Met Gly Ile Gly Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Val Pro Arg Leu Arg

```

100	105	110
Arg Glu Pro Pro Ile Val Thr Pro Glu Arg Trp Ser Pro His Leu Ser		
115	120	125
Val Leu Arg Ala Thr Pro Asn Asp Thr Gly Leu Tyr Thr Leu His Asp		
130	135	140
Ala Ser Gly Pro Arg Ala Val Phe Phe Val Ala Val Gly Asp Arg Pro		
145	150	155
Pro Ala Pro Ala Asp Pro Val Gly Pro Ala Arg His Glu Pro Arg Phe		
165	170	175
His Ala Leu Gly Phe His Ser Gln Leu Phe Ser Pro		
180	185	

<210> 3

<211> 609

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gaccacatcc aggcgacgt gaacgacatg ctgagccgca tcgcgaccgc ctggtgcgag 60
 ctgcagaaca aggaccgcac cctgtggagc gagatgtcgc gcctgaaccc cagcgccgtg 120
 gccacggccg cgctgggcca gcgcgtctcg gcgcgcatgc tcggcgacgt gatggccatc 180
 tcgcggtgcg tggaggtgcg cggcggcgtg tacgtgcaga actccatgcg cgtgcccggc 240
 gagcgcgga cgtgctacag ccgcccgtg gtgaccttc agcacaacgg cacgggctg 300
 atcgagggcc agctcggcga cgacaacgag ctctcatct cgcgcgacct catcgagccc 360
 tgcaccggca accaccggcg ctactttaag ctgggcggcg ggtacgtgta ctacaggac 420
 tacagctacg tgcgcatggt ggaggtgccc gagacgatca gcacgcgggt gaccctgaac 480
 ctgacgctgc tcgaggaccg cgagttcctg cccctcgagg tgtacacgcg cgaggagctc 540
 gccgacacgg gcctcctgga ctacagcgag atccagcgcc gcaaccagct gcacgcgctc 600
 aagttctac 609

<210> 4

<211> 203

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Asp His Ile Gln Ala His Val Asn Asp Met Leu Ser Arg Ile Ala Thr
1 5 10 15
Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn Lys Asp Arg Thr Leu Trp Ser Glu Met
20 25 30
Ser Arg Leu Asn Pro Ser Ala Val Ala Thr Ala Ala Leu Gly Gln Arg
35 40 45
Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Ile Ser Arg Cys Val

50	55	60
Glu Val Arg Gly Gly Val Tyr Val Gln Asn Ser Met Arg Val Pro Gly		
65	70	75
Glu Arg Gly Thr Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Thr Phe Glu His Asn		80
85	90	95
Gly Thr Gly Val Ile Glu Gly Gln Leu Gly Asp Asp Asn Glu Leu Leu		
100	105	110
Ile Ser Arg Asp Leu Ile Glu Pro Cys Thr Gly Asn His Arg Arg Tyr		
115	120	125
Phe Lys Leu Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Tyr Glu Asp Tyr Ser Tyr Val		
130	135	140
Arg Met Val Glu Val Pro Glu Thr Ile Ser Thr Arg Val Thr Leu Asn		
145	150	155
Leu Thr Leu Leu Glu Asp Arg Glu Phe Leu Pro Leu Glu Val Tyr Thr		
165	170	175
Arg Glu Glu Leu Ala Asp Thr Gly Leu Leu Asp Tyr Ser Glu Ile Gln		
180	185	190
Arg Arg Asn Gln Leu His Ala Leu Lys Phe Tyr		
195	200	

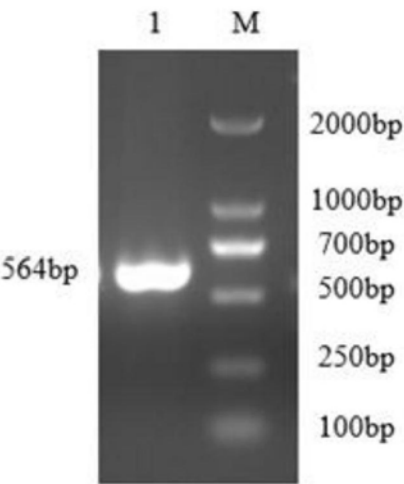


图1

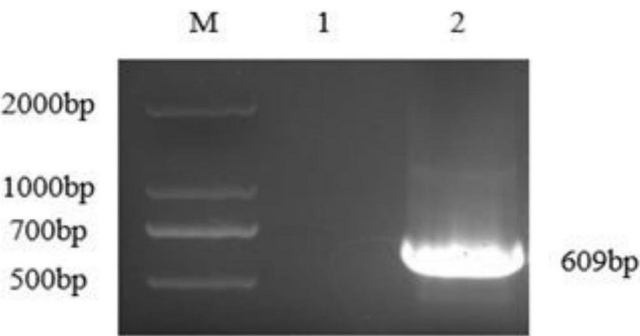


图2

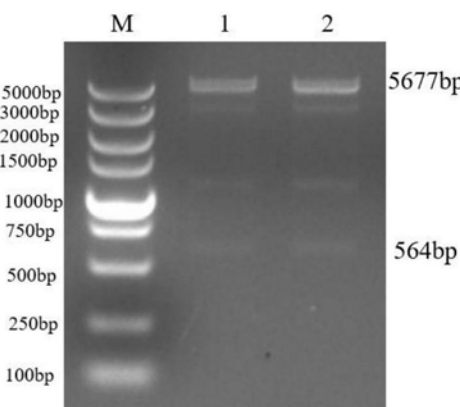


图3

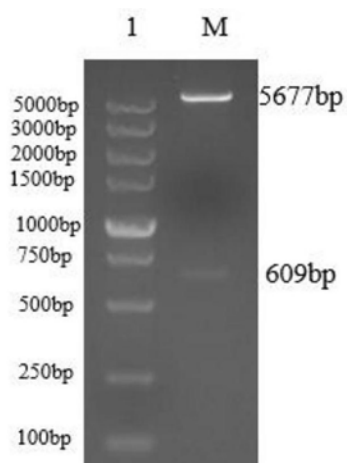


图4

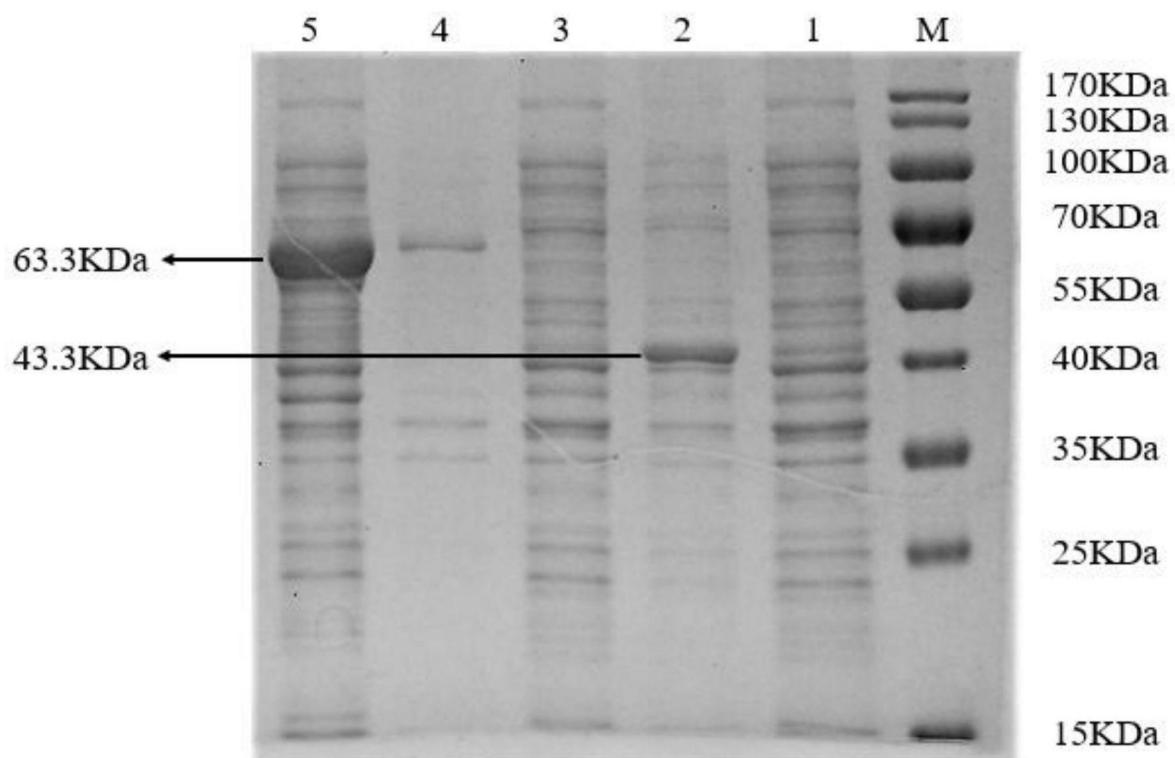


图5

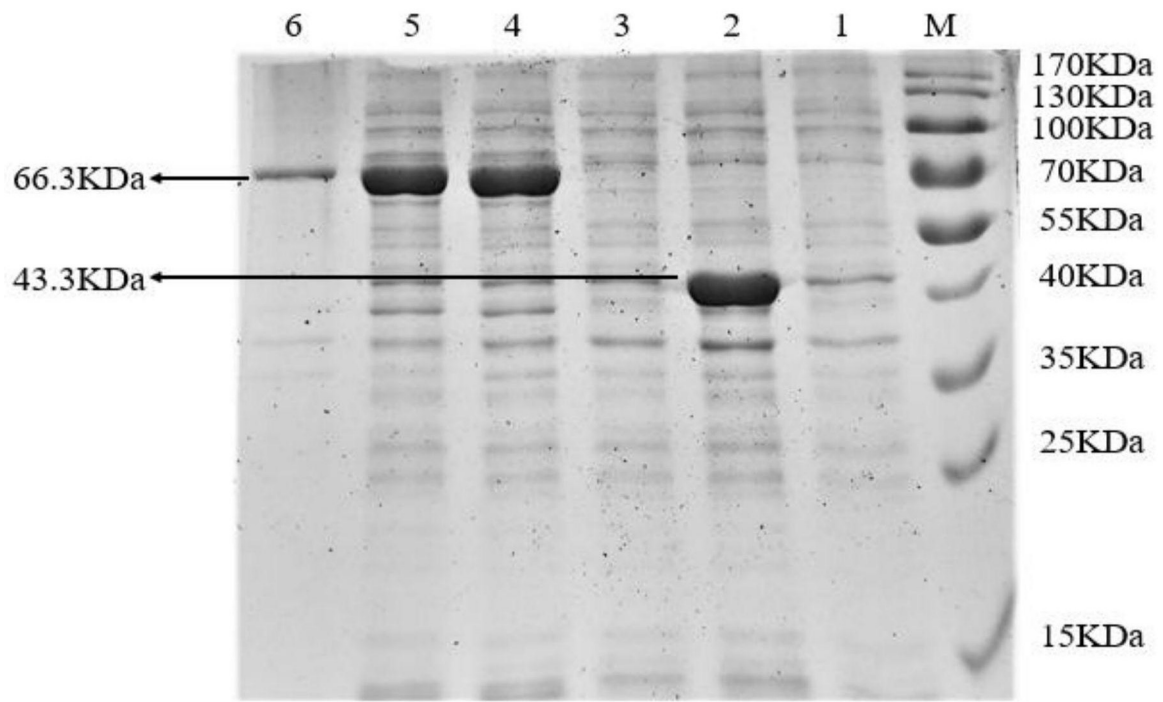


图6

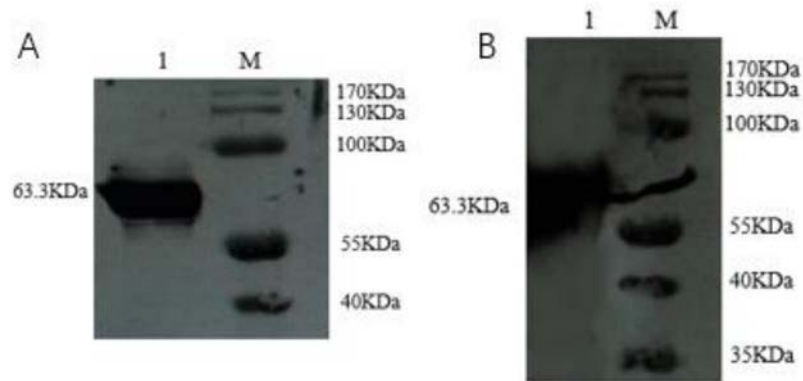


图7

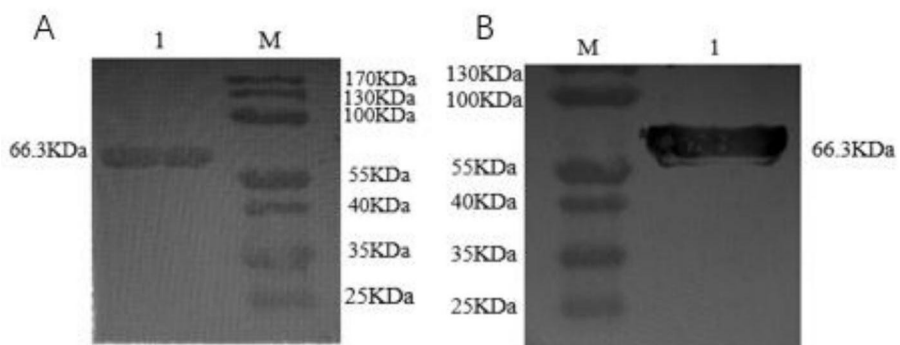


图8

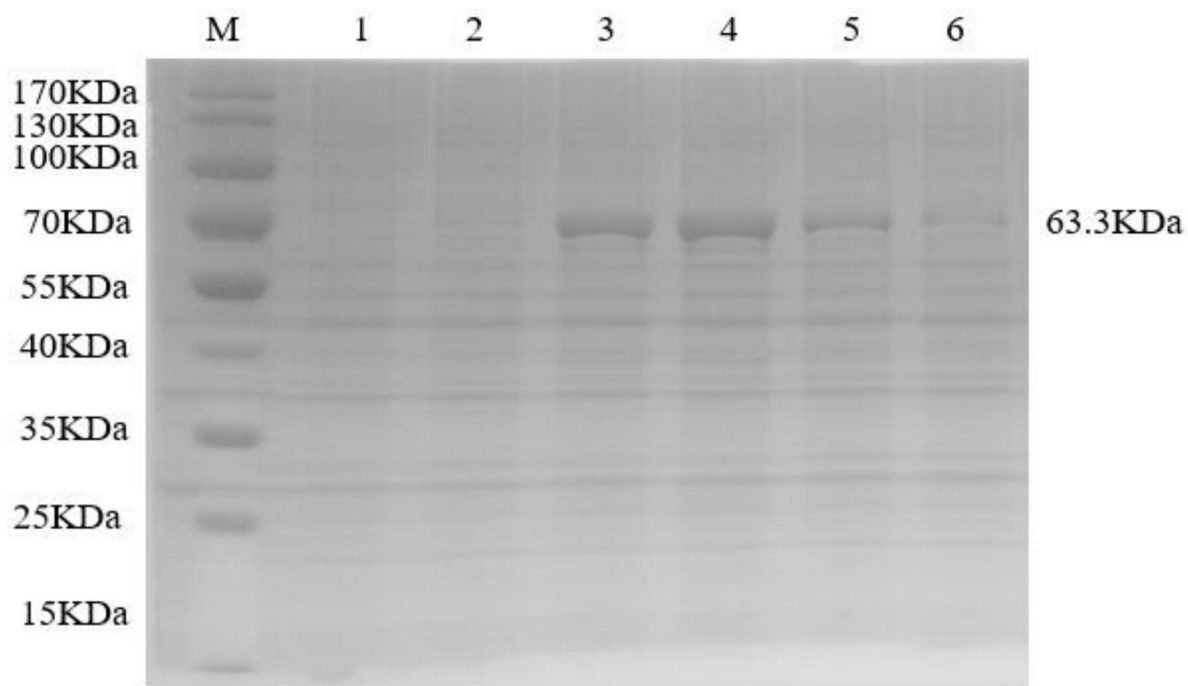


图9

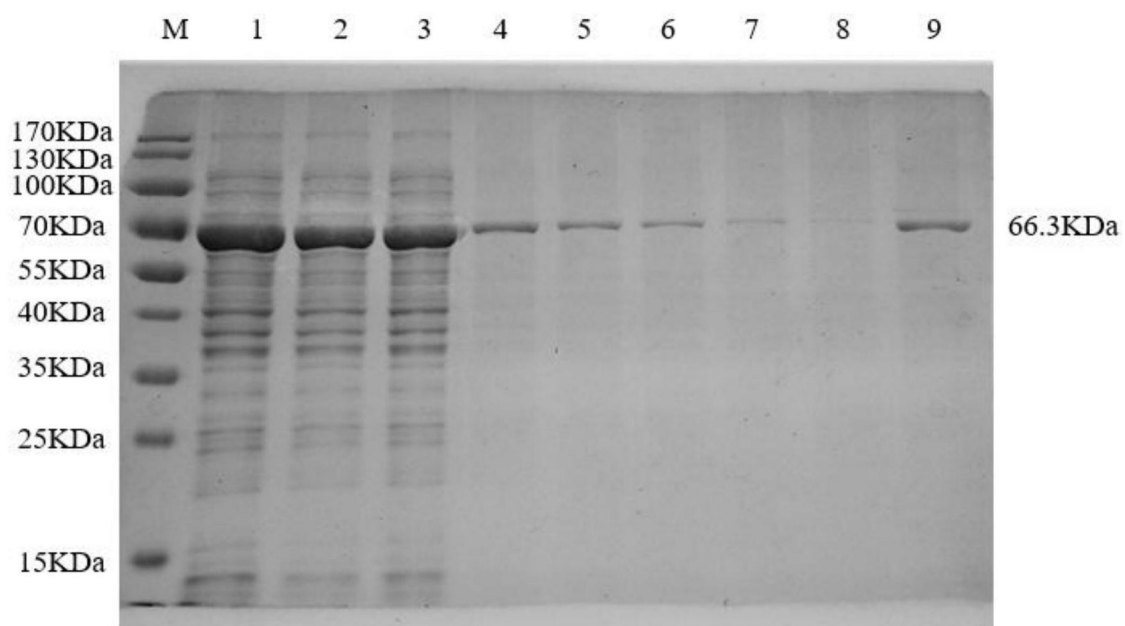


图10

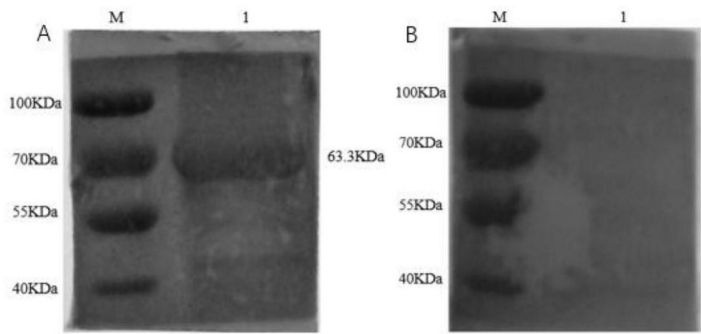


图11

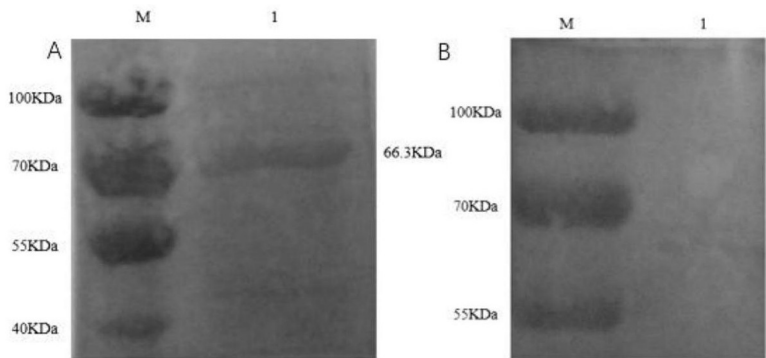


图12

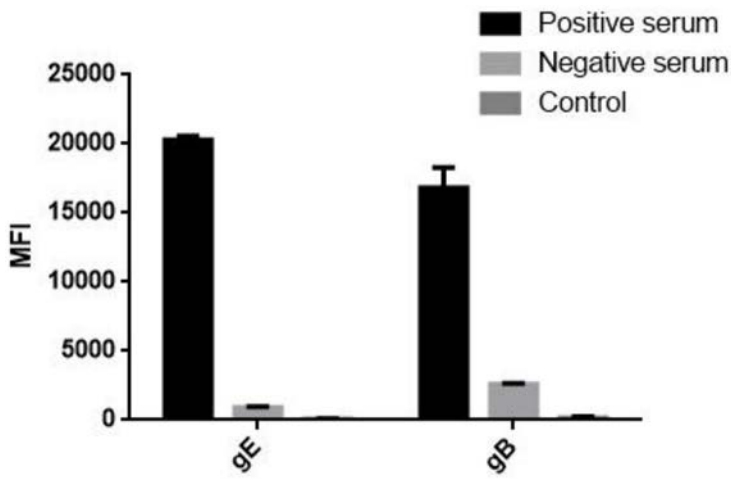


图13

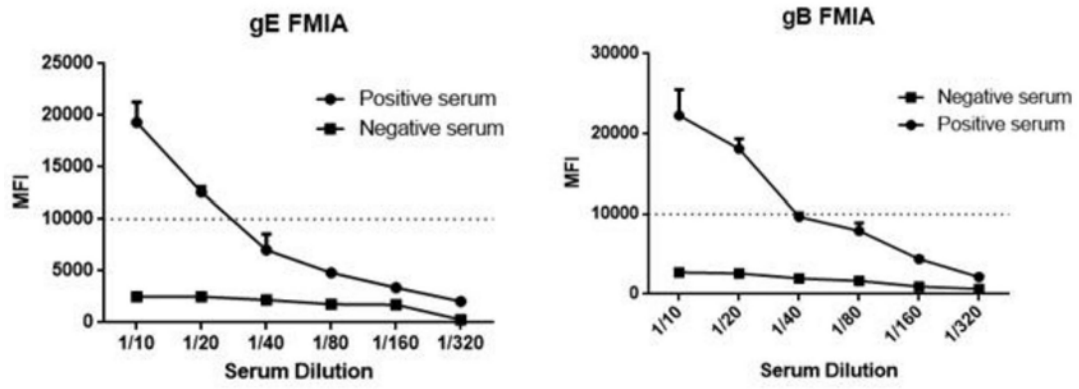


图14

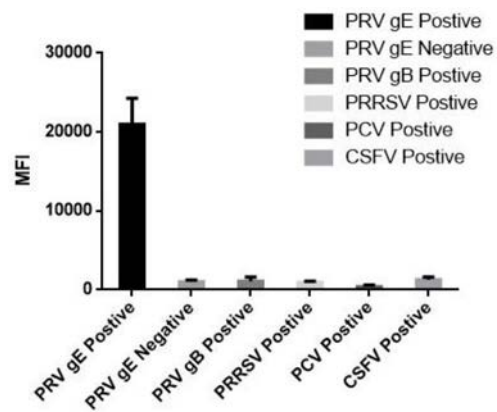


图15

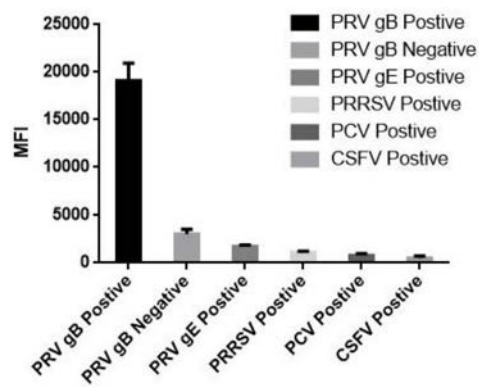


图16

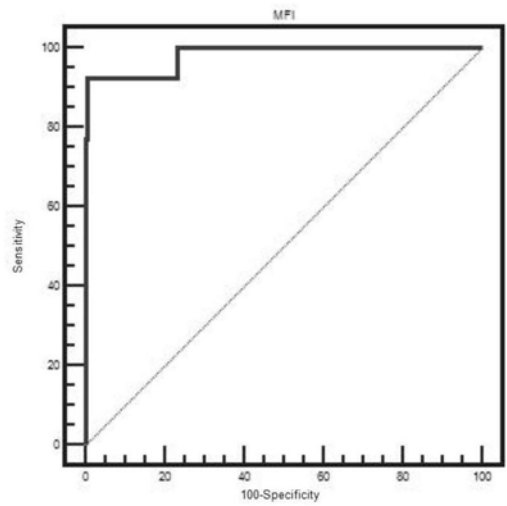


图17

Area under the ROC curve	0.981					
Standard error	0.027					
95% Confidence interval	0.957 to 0.993					
Significance level P (Area=0.5)	0.0001					
Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=163.5	100.00	75.1 - 100.0	0.00	0.0 - 1.4	1.00	
>3168	100.00	75.1 - 100.0	76.75	71.3 - 81.6	4.30	0.00
>3253.5	92.31	63.9 - 98.7	76.75	71.3 - 81.6	3.97	0.10
>5991.5 *	92.31	63.9 - 98.7	99.26	97.4 - 99.9	125.08	0.08
>6401.5	76.92	46.2 - 94.7	99.26	97.4 - 99.9	104.23	0.23
>6483	76.92	46.2 - 94.7	99.63	98.0 - 99.9	208.46	0.23
>7166	69.23	38.6 - 90.7	99.63	98.0 - 99.9	187.62	0.31
>7269	69.23	38.6 - 90.7	100.00	98.6 - 100.0		0.31
>20564.5	0.00	0.0 - 24.9	100.00	98.6 - 100.0		1.00

图18

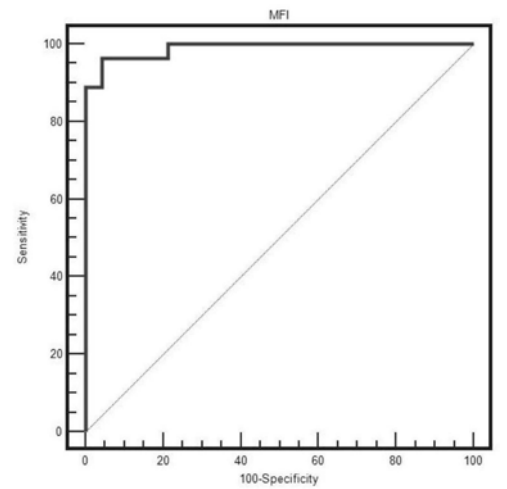


图19

Area under the ROC curve	0.989
Standard error	0.014
95% Confidence interval	0.950 to 0.999
Significance level P (Area=0.5)	0.0001

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>=193	100.00	87.1 - 100.0	0.00	0.0 - 3.9	1.00	
>2170.5	100.00	87.1 - 100.0	78.72	69.1 - 86.5	4.70	0.00
>2195.5	96.30	81.0 - 99.4	78.72	69.1 - 86.5	4.53	0.05
>2862 *	96.30	81.0 - 99.4	95.74	89.5 - 98.8	22.63	0.04
>3092	88.89	70.8 - 97.5	95.74	89.5 - 98.8	20.89	0.12
>4570	88.89	70.8 - 97.5	100.00	96.1 - 100.0		0.11
>29086	0.00	0.0 - 12.9	100.00	96.1 - 100.0		1.00

+LR : Positive likelihood ratio
-LR : Negative likelihood ratio



图20

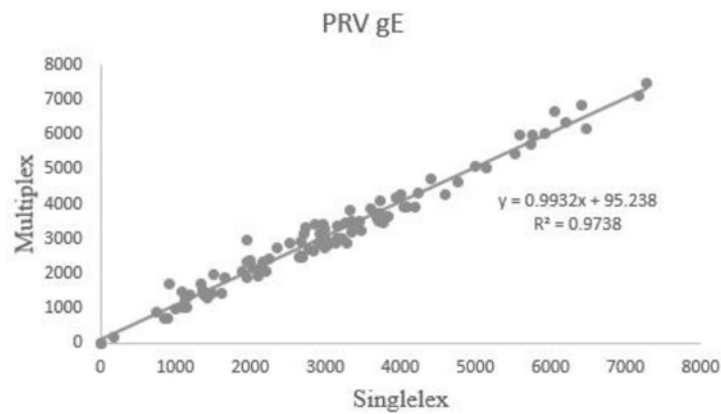


图21

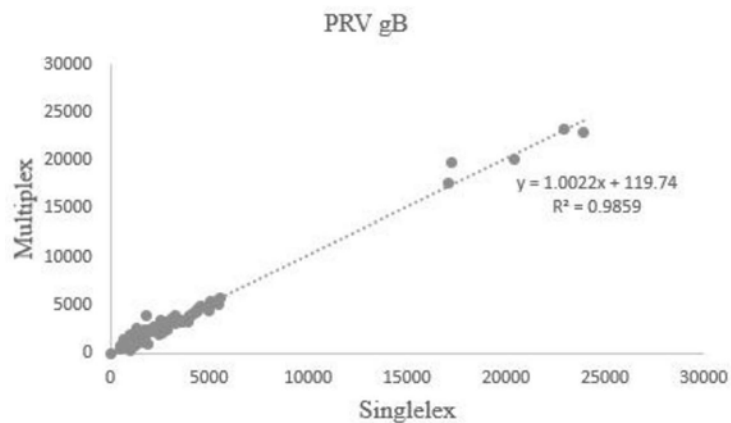


图22

专利名称(译)	一种伪狂犬病毒gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测方法		
公开(公告)号	CN109307772A	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201811192108.X	申请日	2018-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	王衡 张桂红 曾梦 冀池海		
发明人	王衡 张桂红 曾梦 冀池海		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6857 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/56994 G01N2333/032		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种伪狂犬病毒gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学的检测方法，本检测方法基于一组基于液相蛋白芯片技术的检测猪伪狂犬病毒抗体的羧基化荧光微球组合，其包括分别偶联有gE截短蛋白和gB截短蛋白的羧基化荧光微球，gE、gB截短蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO：2和4所示。本发明构建的同时检测PRV gE和gB IgG抗体双重荧光微球免疫学检测方法，重复性好、灵敏度高，特异性好，与其他常见猪病毒病阳性血清无交叉反应。该方法的建立可同时用于伪狂犬病毒野毒感染猪和疫苗免疫猪的快速鉴别诊断及保护性抗体的检测，为猪病毒病监测提供了一个重要的方法，有很大的应用价值，值得大面积推广。

