(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102419369 A

(43) 申请公布日 2012.04.18

(21) 申请号 201110236942.6

(22) 申请日 2011.08.18

(71) 申请人 云南出入境检验检疫局检验检疫技术中心

地址 650228 云南省昆明市滇池路 429 号

申请人 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心

(72) 发明人 杨建民 艾军 叶玲玲 杨俊兴 祝贺 孙洁 周晓黎 花群义 董俊 徐维加 徐自忠 尹尚莲 吕建强

(74) 专利代理机构 云南派特律师事务所 53110

代理人 张怡 岳亚苏

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域，尤其是病毒抗体检测领域。本发明所述的小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒包括分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体、稀释液、强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清、HRP 羊抗鼠二抗、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液和酶链免疫吸附板。本发明通过实验优化，确定了试剂盒中各组分的最佳配比条件。其试剂盒可用于动物小反刍兽疫病毒抗体的快速诊断、检测，尤其适合于小反刍兽疫流行病学调查时大量样本的抗体检测。本发明的小反刍兽疫 b-ELISA 检测方法，检测原理、实验操作程序等均不同于 BIRAD 实验室的 c-ELISA 检测方法，试剂盒包含的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体均为自行研制。组装试剂盒的检测敏感性、特异性等指标均与国际认可的 BIRAD 实验室的 c-ELISA 检测方法相同。

CN 102419369 A

1. 一种小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒，其特征在于主要包括分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原和小反刍兽疫单克隆抗体；所述的小反刍兽疫核蛋白抗原是由昆虫细胞表达的小反刍兽疫 Nigeria75/1 疫苗株核蛋白，核蛋白基因序列 NCBI 登录号为：X74443.2，表达蛋白分子量约 61.3 kDa，由 1578bp 核酸组成，编码 526 个氨基酸；所述的小反刍兽疫单克隆抗体是针对小反刍兽疫 Nigeria75/1 株核蛋白的特异性单克隆抗体，抗体免疫球蛋白重链和轻链分子量约 55ku 和 26ku，染色体数目约 99-104 条，相对亲和力指数为 1.0 moI/L。

2. 一种小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒，其特征在于包括分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体、稀释液、强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清、HRP 羊抗鼠二抗、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液和酶链免疫吸附板；所述的小反刍兽疫核蛋白抗原是由昆虫细胞表达的小反刍兽疫 Nigeria75/1 疫苗株核蛋白，核蛋白基因序列 NCBI 登录号为：X74443.2，表达蛋白分子量约 61.3 kDa，由 1578bp 核酸组成，编码 526 个氨基酸；所述的小反刍兽疫单克隆抗体是针对小反刍兽疫 Nigeria75/1 株核蛋白的特异性单克隆抗体，抗体免疫球蛋白重链和轻链分子量约 55ku 和 26ku，染色体数目约 99-104 条，相对亲和力指数为 1.0 moI/；所述的稀释液配方为：NaCI 8g，KH_2PO_4 0.24g，Na_2HPO_4 1.44g，KCI 0.2g，牛血清白蛋白 BSA 30 g，山羊 PPRV 阴性、Vero 细胞抗体阳性血清 10 mL，加蒸馏水至 1000mL。

3. 如权利要求 2 所述的小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒，其特征在于所述的检测试剂盒各组成部分的体积或数量如下：

试剂盒主要组成部分名称：	体积或数量：
小反刍兽疫核蛋白抗原	15mL
小反刍兽疫单克隆抗体	0.1mL
稀释液	15mL
强阳性血清	0.2mL
弱阳性血清	0.2mL
阴性血清	0.2mL
HRP 羊抗鼠二抗	0.15mL
20 倍浓缩洗涤液	25mL
底物液	15mL
终止液	15mL
酶联免疫吸附板	1 块

。

4. 权利要求 1 所述的小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒的制备方法由以下步骤制备：

一、小反刍兽疫核蛋白抗原的制备：

利用昆虫杆状病毒表达载体 pFastBacHTA 表达小反刍兽疫疫苗株 Nigeria75/1 的 N 基因，在获得表达的杆状病毒后，大量感染 sf9 细胞，反复冻融，8000rpm 离心，取上清，35000rpm 离心，按离心前后体积 300：1，用 PBS 溶解沉淀蛋白，用 0.05moI/L PH 为 9.6 碳酸盐缓冲液 $NaHCO_3$ 1.465g、Na_2CO_3 0.795g 或 $Na_2CO_3.10H_2O$ 1.2g、水 500mL 稀释成 2.9μg/mL，分装即得；

二、小反刍兽疫单克隆抗体的制备：

使用纯化的小反刍兽疫病毒免疫小鼠并取免疫小鼠的脾细胞，将所述脾细胞与 SP2/0

骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得杂交瘤细胞，收集杂交瘤细胞上清液制备抗小反刍兽疫单克隆抗体。

小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，尤其是病毒抗体检测领域。

背景技术

[0002] 小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus,PPRV)对绵羊和山羊的发病率和死亡率分别高达100%和90%，在发展中国家引起严重的社会经济问题，被世界动物卫生组织(OIE)列为重要动物疾病。该病首次报道在科特迪瓦，现发生在撒哈拉以南和赤道以北的多数非洲国家，中东到土耳其的几乎全部国家，在印度、南亚、西亚也广泛传播。2007年7月，该疫病首次传入我国西藏地区。

[0003] 小反刍兽疫病毒抗体检测方法，世界动物卫生组织推荐使用的方法为病毒中和试验(VN)和竞争ELISA(c-ELISA)，一般条件下能区分小反刍兽疫和牛瘟病毒血清抗体，且由于c-ELISA特异性和敏感性更高，且适合于检测大量的样品，时间周期相对较短，因此广泛应用于小反刍兽疫病毒抗体检测。

[0004] 小反刍兽疫c-ELISA诊断试剂盒，国内尚未见商品化的相关产品，在国际上通用的为法国BIRAD实验室研制的小反刍兽疫c-ELISA试剂盒(Libeau.et al.,1995)，该诊断试剂盒也是我国小反刍兽疫疫病的主要诊断试剂。参考文献：Libeau G, Préhaud C,Lancelot R,et al.Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein[J]. Res Vet Sci,1995,58,50-55。

[0005] 在应用法国BIRAD实验室研制的小反刍兽疫c-ELISA诊断试剂盒在国内相应疫病的调查中，我们发现此试剂盒的购买每次均需要大批量的从国外订购，无小包装，经济成本较高，其试剂盒中的底物液等均需要现配置，操作较繁琐。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种针对核蛋白的特异性单抗而研制的抗体检测试剂盒。

[0007] 本发明的另一目的在于提供这种抗体检测试剂盒的制备方法。

[0008] 本发明所述的小反刍兽疫病毒b-ELISA抗体检测试剂盒主要包括分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原和小反刍兽疫单克隆抗体；所述的小反刍兽疫核蛋白抗原是由昆虫细胞表达的小反刍兽疫Nigeria75/1疫苗株核蛋白，核蛋白基因序列NCBI登录号为：X74443.2，表达蛋白分子量约61.3 kDa，由1578bp 核酸组成，编码526个氨基酸；所述的小反刍兽疫单克隆抗体是针对小反刍兽疫Nigeria75/1株核蛋白的特异性单克隆抗体，抗体免疫球蛋白重链和轻链分子量约55ku和26ku，染色体数目约99-104条，相对亲和力指数为1.0 mol/L。

[0009] 本发明所述的小反刍兽疫病毒b-ELISA抗体检测试剂盒包括分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体、稀释液、强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清、HRP羊抗鼠二抗、20倍浓缩洗涤液、底物液、终止液和酶链免疫吸附板；所述的小反刍兽疫核蛋

白抗原是由昆虫细胞表达的小反刍兽疫 Nigeria75/1 疫苗株核蛋白，核蛋白基因序列 NCBI 登录号为 :X74443.2，表达蛋白分子量约 61.3 kDa，由 1578bp 核酸组成，编码 526 个氨基酸 ;所述的小反刍兽疫单克隆抗体是针对小反刍兽疫 Nigeria75/1 株核蛋白的特异性单克隆抗体，抗体免疫球蛋白重链和轻链分子量约 55ku 和 26ku，染色体数目约 99-104 条，相对亲和力指数为 1.0 moI/ ;所述的稀释液配方为 :NaCI 8g，KH_2PO_4 0.24g，Na_2HPO_4 1.44g，KCI 0.2g，牛血清白蛋白 BSA 30 g，山羊 PPRV 阴性、Vero 细胞抗体阳性血清 10 mL，加蒸馏水至 1000mL。

[0010] 本发明所述的小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒各组成部分的体积或数量如下 :

试剂盒主要组成部分名称 :	体积或数量 :
小反刍兽疫核蛋白抗原	15mL
小反刍兽疫单克隆抗体	0.1mL
稀释液	15mL
强阳性血清	0.2mL
弱阳性血清	0.2mL
阴性血清	0.2mL
HRP 羊抗鼠二抗	0.15mL
20 倍浓缩洗涤液	25mL
底物液	15mL
终止液	15mL
酶联免疫吸附板	1 块。

本发明所述的小反刍兽疫病毒 b-ELISA 抗体检测试剂盒中分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原和小反刍兽疫单克隆抗体分别由以下步骤制备 :

一、小反刍兽疫核蛋白抗原的制备 :

利用昆虫杆状病毒表达载体 pFastBacHTA 表达小反刍兽疫疫苗株 Nigeria75/1 的 N 基因，在获得表达的杆状病毒后，大量感染 sf9 细胞，反复冻融，8000rpm 离心，取上清，35000rpm 离心，按离心前后体积 300 :1，用 PBS 溶解沉淀蛋白，用 0.05moI/L PH 为 9.6 碳酸盐缓冲液（$NaHCO_3$ 1.465g、Na_2CO_3 0.795g 或 Na_2CO_3.$10H_2O$ 1.2g、水 500mL）稀释成 2.9μg/mL，分装即得。

[0011] 二、小反刍兽疫单克隆抗体的制备 :

使用纯化的小反刍兽疫病毒免疫小鼠并取免疫小鼠的脾细胞，将所述脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在融合剂下融合后筛选获得杂交瘤细胞，收集杂交瘤细胞上清液制备抗小反刍兽疫单克隆抗体。

[0012] 本发明是利用阻断 ELISA(b-ELISA) 原理研制而成，主要检测小反刍兽疫病毒特异性抗体。首先将小反刍兽疫核蛋白吸附于酶联免疫吸附板上，接着加入被检样品（血清样品），孵育一定时间后，再加入小反刍兽疫单克隆抗体，孵育、洗涤，加入 HRP 羊抗鼠二抗，孵育，洗涤，底物液作用，硫酸终止，最后读数。如果被检样品中含有小反刍兽疫病毒抗体，则抗体与酶联免疫吸附板上的小反刍兽疫核蛋白结合，阻止本发明提供的小反刍兽疫单抗与核蛋白结合，在洗涤过程中，单抗将被洗涤掉，进而在加入 HRP 羊抗鼠二抗时，由于酶联免疫板上没有小反刍兽疫单抗被吸附，因此 HRP 羊抗鼠二抗在孵育一定时间后的洗涤过程中，也将被洗涤掉，不会结合于酶联免疫吸附板，接着在加入底物液（TMB）后，由于 HRP 羊抗鼠二抗不存在，即 HRP 酶不存在，TMB 也将不出现颜色变化，硫酸终止反应后，OD 值读数将很

小。反之,则相反。

[0013] 本发明通过实验优化,确定了试剂盒中各组分的最佳配比条件。其试剂盒可用于动物小反刍兽疫病毒抗体的快速诊断、检测,尤其适合于小反刍兽疫流行病学调查时大量样本的抗体检测。本发明的小反刍兽疫b-ELISA检测方法,检测原理、实验操作程序等均不同于BIRAD实验室的c-ELISA检测方法,试剂盒包含的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体均为自行研制。组装试剂盒的检测敏感性、特异性等指标均与国际认可的BIRAD实验室的c-ELISA检测方法相同。

[0014] 本发明研制的试剂盒与国际通用的法国BIRAD实验室研制的试剂盒相比,还具有以下优点:(1)试剂盒中抗原、稀释液均为液体,直接按照说明书使用即可,而BIRAD研制试剂盒则需稀释和现配制,操作繁琐;(2)试剂盒底物液为单组份型,直接应用即可,而BIRAD试剂盒则需配置后才能使用;(3)从经济成本考虑,本发明研制的试剂盒经济成本明显低于法国BIRAD实验室现售试剂盒的价格,按BIRAD现售试剂盒价格计算,本发明试剂盒可节约成本1/3,在我国和全球具有巨大的经济推广价值;(4)试剂盒由于具有自行研制的全部关键技术,其试剂盒可以根据国内和国际市场客户检测样品的需求进行小量和大量包装,与法国BIRAD诊断试剂相比,更加适合于我国国内市场检测的需求。

[0015] 本发明优化了试剂盒各组成成分在整个实验反应体系中的使用量,使试剂盒达到最佳的检测敏感性和特异性,其试剂盒各组分的使用量见试剂盒操作说明书。

附图说明

[0016] 图1为本发明所述的SDS-PAGE鉴定纯化的小反刍兽疫单克隆抗体。图中M为蛋白定量标准。

[0017] 图2为本发明所述的小反刍兽疫单克隆抗体杂交瘤细胞株染色体(显微镜观察倍数1120×)。

具体实施方式

[0018] 本实施例为本发明较佳的具体实施方式,只用于对本发明做进一步的描述,并不用于限制本发明。

[0019] 本实施例采用以下步骤:

1、制备小反刍兽疫核蛋白抗原:利用市售的Invitrogen公司pFastBacHTA载体(货号10584-027),小反刍兽疫Nigeria 75/1疫苗株,通过PCR和限制性内切酶EcoRI和KpnI,构建得小反刍兽疫pFastBacHTA-PPRV-N质粒,该重组质粒转化含有杆状病毒穿梭载体的DH10BAC感受态细胞,经抗生素、PCR筛选,获得转座的杆粒Bacmid-PPRV-N。在脂质体介导下转染sf9昆虫细胞,获得重组杆状病毒,再感染细胞,反复冻融,8000rpm离心,收获上清。35000rpm超速离心,按超速离心前后体积300:1,用PBS溶解沉淀蛋白,用0.05moI/L PH=9.6碳酸盐缓冲液($NaHCO_3$ 1.465g、Na_2CO_3 0.795g或$Na_2CO_3.10H_2O$ 1.2g、水500mL)稀释成2.9μg/MI,即为小反刍兽疫病毒抗原。分装成15mL/瓶。

[0020] 2、制备小反刍兽疫单克隆抗体:Vero细胞长成单层后接种小反刍兽疫Nigeria75/1疫苗株,在细胞病变达75%以上时收获病毒,反复冻融3次后以8000rpm离心30分钟,取上清液,加入终浓度为 I / 3000 的甲醛灭活病毒,35000rpm 4℃离心3.5h,用

PBS 按离心前后体积 300 :1 溶解沉淀。溶解沉淀加入到 20%、40%、60% 的不连续蔗糖密度梯度上，35000rpm 4℃超速离心 3.5 小时，收获提纯的病毒条带作为抗原。

[0021] 用所述的提纯病毒条带作为抗原，分别加等体积弗氏完全佐剂(FCA)乳化和弗氏不完全佐剂(FIA)乳化，先后免疫 BALB/c 小鼠三次，第一次免疫为 FCA 和病毒混合物，第二、第三次免疫为 FIA 和病毒混合物 ;取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞在 50％聚乙二醇(MW1500)融合剂下融合，HAT 培养基筛选杂交瘤细胞，用间接 ELISA 方法(小反刍兽疫核蛋白包被 ELISA 板)检测分泌抗 PPRV 核蛋白的阳性孔 ;用有限稀释法进行细胞克隆，经间接 ELISA 筛选阳性克隆，获得能稳定传代并分泌抗 PPRV 核蛋白的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株，命名为 5B11(YNDJC-01)。用间接 ELISA 方法鉴定制备的单克隆抗体仅与小反刍兽疫核蛋白抗原有特异性免疫反应，而与其它相关病毒(如 RPV、BTV、CDV、AKV、BVDV 等)没有任何免疫反应。

[0022] 取 5B11(YNDJC-01) 杂交瘤细胞株，利用 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基进行培养，收集细胞上清，4℃ 8000rpm 离心，取上清，利用 ProteinG 柱进行纯化，纯化后，稀释成 0.32mg/mL 4℃进行保存。

[0023] 3、稀释液配方 :NaCI 8g，KH_2PO_4 0.24g，Na_2HPO_4 1.44g，KCI 0.2g，牛血清白蛋白 BSA 30 g，山羊 PPRV 阴性、Vero 细胞抗体阳性血清 10 mL，加蒸馏水至 1000mL。

[0024] 制备 1% 山羊 PPRV 阴性、Vero 细胞抗体阳性血清 :Vero 细胞长成单层后，反复冻融 3 次，以 8000rpm 离心 30 分钟，取上清液，装入透析袋，在 PEG20000 作用下，按体积 1 :50 透析浓缩，浓缩蛋白利用 PBS 进行溶解 ;挑选体格健壮的 16 个月以上的山羊 2 ～ 3 只，将浓缩蛋白和 FCA 佐剂混匀，经背部皮下注射，5 mL/ 只 ;首免后第 2 周和第 4 周分别用 FIC 与浓缩蛋白混匀进行二免和三免 ;待山羊血清经琼脂免疫扩散试验证实已产生 Vero 细胞抗体，同时按 OIE (2010)手册中小反刍兽疫竞争酶联免疫吸附试验方法(c-ELISA)进行测试，小反刍兽疫抗体阴性。此时无菌采血分离血清，离心除去沉淀，3mL/ 管分装，贴上标签，-80℃保存。

[0025] 将 NaCI、KH_2PO_4 、Na_2HPO_4 、KCI 用蒸馏水充分溶解，加入牛血清白蛋白，山羊 PPRV 阴性、Vero 细胞抗体阳性血清，充分溶解，过滤除菌后分装。

[0026] 4、制备强阳性血清 :挑选体格健壮的 16 个月以上的山羊 2 ～ 3 只，将 PPRV 弱毒疫苗经背部皮下注射，5 mL/ 只 ;首免后第 2 周和第 4 周分别用 PPR 弱毒疫苗进行二免和三免 ;待山羊血清产生 PPR 抗体，按 OIE (2010)手册中小反刍兽疫竞争酶联免疫吸附试验方法(c-ELISA)进行测试，其 PI% 值大于 85% 以上者判定为强阳性血清，此时无菌采血分离血清，离心除去沉淀，3mL/ 管分装，贴上标签，-80℃保存。

[0027] 或者采集动物血清，经 OIE 手册中 c-ELISA 方法进行测试，其检测结果为阳性，且结果判定中 PI% 值大于 85% 以上者定义为本专利研制试剂盒强阳性血清。大量采集，3mL/ 管分装，贴上标签，-80℃保存。

[0028] 5、制备阴性血清 :选择体格健壮的 18 个月以上的山羊，采血，用 OIE(2010)《小反刍兽疫病毒中和试验》检测方法确认血清中是否有小反刍兽疫抗体，证实无小反刍兽疫抗体的山羊，无菌采血分离血清。3mL/ 管分装，贴上标签，-80℃保存。

[0029] 6、制备弱阳性血清 :利用阴性血清，倍比稀释小反刍兽疫强阳性血清，用法国 BIRAD 实验室研制的 c-ELISA 检测试剂盒进行测试，在 PI% 值 55%-65% 时，定义为本专利研

制试剂盒的弱阳性血清，按此稀释度，稀释强阳性血清，制备试剂盒弱阳性血清。3mL/ 管分装，贴上标签，-80℃保存。

[0030] 7、底物液：TIANGEN（中国），可溶性单组份 TMB（货号：PA107-01）。

[0031] 8、20 倍浓缩洗涤液配方：NaCI 160g，KH_2PO_4 4.8g，Na_2HPO_4 29g，KCI4g，Tween-20 10mL，蒸馏水 1000mL，充分溶解，过滤除菌后分装。用时作 20 倍稀释。

[0032] 9. HRP 羊抗鼠二抗：采用商品化的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体（USA，KPL 公司，货号 074-1806，1.0mg），作 1：50 稀释。

[0033] 10. 酶联免疫吸附板：选用商品化的 Costar 92592 酶联免疫吸附板（Corning Incorporated, Lot No.14609006）。

[0034] 11. 终止液：将 10.87mL 初始浓度为 95%~98% 的硫酸缓慢加入到 89.13mL 的去离子水中混匀，即为终止液。

[0035] 12、试剂盒的组装：将按上述方法制备好的小反刍兽疫核蛋白抗原、单克隆抗体、稀释液、强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清、HRP 羊抗鼠二抗、20 倍浓缩洗涤液、底物液、终止液定量分装，酶联免疫吸附板，分别贴上标签与说明。1 份详细的试剂盒使用操作说明书。3 张贴板纸。装入专用的试剂盒外壳内，外壳贴上试剂盒标签。

[0036] 13、试剂盒中各种试液的配制与分装

试剂盒中试液的配制分装表：

试剂盒主要组成部分名称：	体积或数量：
小反刍兽疫核蛋白抗原	15mL
小反刍兽疫单克隆抗体	0.1mL
稀释液	15mL
强阳性血清	0.2mL
弱阳性血清	0.2mL
阴性血清	0.2mL
HRP 羊抗鼠二抗	0.15mL
20 倍浓缩洗涤液	25mL
底物液	15mL
终止液	15mL
酶联免疫吸附板	1 块
封板纸	3 张
说明书	1 份。

使用上述试剂盒进行检测操作的程序如下：

1. 试剂工作浓度的配置

PBST 洗液的配置：利用试剂盒提供的 20x 洗液（洗液中如出现沉淀，请 37℃加热使其溶解），用去离子水或蒸馏水进行 20 倍稀释，即为 PBST 洗液。

[0037] 单克隆抗体工作浓度：用试剂盒提供的稀释液按 1：50 倍稀释，即为单抗的工作浓度。

[0038] HRP 羊抗鼠二抗工作液：用 PBST 洗液进行 1：100 稀释，即为工作液浓度。

[0039] 2. 操作步骤：

计算测试样品数量，取所需测试 ELISA 板条数，进行试验。

[0040] （1）将试剂盒提供的抗原液，按 100μL/ 孔加入 ELISA 板，37℃作用 1 h（或 4℃包被过夜）。

[0041] （2）用 PBST 洗液，每孔 200μL，洗板 3 次，备用。（注：洗板后，请立即进行实验，长

时放置包被抗原ELISA板会影响最终实验结果）

（3）样品和阳性对照、阴性对照用试剂盒提供稀释液作1：5稀释，混匀，加入ELISA反应板，每孔50μL；M孔 加入稀释液，每孔50μL。置37℃反应1 h；

（4）不要倒掉板中液体，ELISA板每孔加入单克隆抗体工作液50μL，轻微震荡，混匀，37℃反应1 h；

（5）用PBST洗液，每孔200μL，洗板3次。加入HRP羊抗鼠二抗工作液100μL，37℃反应45min；

（6）用PBST洗液，每孔200μL，洗板3次。加入底物液100μL，37℃避光静置10~15min；

（7）加终止液100μL，需在15min之内，用ELISA仪，在450nm波长下读数。

[0042] 3. 结果判定：

（1）计算公式：

PI%=100-（样品血清平均OD值/M孔平均OD值）x100

（2）判定标准：

PI%	结果
≥ 50%	阳性
50 > PI ≥ 45	可疑
< 45%	阴性

注：1. 试剂盒置4℃保存。首次使用后，如长时间(超过3天)不使用，请将抗原液，稀释液置于-20℃保存，其余试剂4℃保存。

[0043] 2. 可疑样品，需用其它方法进行检测。

[0044] 试剂盒阳性判定值的确定：按照上述试剂盒的检测程序，采用OIE（2010）《小反刍兽疫病毒中和试验》检测方法确认的30份阴性血清和120份阳性血清，进行b-ELISA试验后，结果所有阳性血清的PI ≥ 50%，所有阴性血清PI ≤ 45%。因此，获得bELISA阴性判定值（cut-off value）为：PI ≤ 45% 被检血清PPRV抗体阴性；PI ≥ 50% 被检血清PPRV抗体阳性。

[0045] 试剂盒的临床样品检测与应用以及试剂盒敏感性、特异性的评价：按照上述试剂盒的检测程序，用OIE（2010）《小反刍兽疫病毒中和试验》检测方法确认的30份阴性血清和30份阳性血清，进行bELISA试验。统计获得试剂盒的特异性为100%（阴性结果数/阴性样品总数=30/30），敏感性为100%（阳性结果数/阳性样品总数=30/30），本试剂盒的特异性、敏感性为良好。

[0046] 应用上述试剂盒检测西藏地区采集200份血清样本，同时用国际公认的法国CIRAD实验室研制的c-ELISA试剂作为参考试剂盒进行检测，发现本专利所发明检测试剂盒与CIRAD发明检测试剂盒检测符合率为100%。

[0047] 200份临床样品检测结果

		参考 c-ELISA 试剂盒		
		阳性样品	阴性样品	总数
b-ELISA	阳性样品	60	0	60
	阴性样品	0	140	140
	总数	60	140	200

上述具体实施例的实验数据表明，本发明的小反刍兽疫病毒抗体阻断酶联免疫吸附试验（bELISA）试剂盒特异性强，敏感性高，适用于小反刍兽疫的快速诊断、检测、检疫和流行病学调查。

本发明所述的小反刍兽疫核蛋白抗原由 1578bp 核酸组成，编码 526 个氨基酸，1578bp 核酸序列如下：

atggctactctccttaaaagcttggcattgttcaagaggaacaaagacaaagcgcctactgcgtcgggttcaggaggggccatccgggggattaagaatgttatcatagtccccattcccggggactcatccatcattacccgttcaagactgctcgacaggcttgtcagattggccggagatcctgacatcaacgggtcaaagctgaccggcgtgatgatcagcatgttatctttgttcgtggagtcacccgggcaattgatacagcggatcacagatgatccagatgttagcatccgccttgttgaggtagttcaaagtactaggtcccagtccgggttgacctttgcatcacgtggtgctgatttggacaatgaggcagatatgtatttttcaactgaaggaccctcgagtggaagtaagaaaaggatcaactggtttgagaacagagaaataatagacatagaggtgcaagatgcagaagagttcaatatgttgttagcctccatcttagcacaagtttggatcctcctggccaaggcggttacggcaccggatacggcagctgactcagaactgagaaggtgggttaaatacacacaacaaaggagagtgattggggaatttcgccttgacaaagggtggctggacgcagtccgcaacaggattgcagaagatctatcacttcggcggttcatggtatctctcatacttgacatcaaaaggacccccggcaacaagccaaggattgcagaaatgatctgcgacattgacaactatattgtagaagccggactcgccagtttcattcttactatcaaatttggtattgaaaccatgtatcctgcattaggccttcacgagttcgccggggaattgtccactattgaatccttgatgaacttgtatcaacagctaggagaggttgcaccctacatggtgattctagagaactcaattcagaacaagtttagtgcaggagcctatcctctcctctggagctatgcgatgggtgtcggagtcgagttggagaactcaatgggggcctgaactttggcaggtcatattttgacccggcctatttccgtctcggacaggagatggtcagaagatctgcaggaaaggtcagctctgtaatcgcggctgagcttggtatcacagcagaggaagccaaactagtctcggaaatcgcctcacagactggggatgaacgaaccgtcagagggactgggcctcgacaggcgcaggtctccttcctccagcataaaacagatgagggagagtcgcctacaccagcgaccagagaagaagtcaaagctgcgatcccaaatgggtccgaaggaagggacacaaagcgaacacgctcaggaaagcccagaggagaaactcccggccaactgcttccggagatcatgcaagaggatgaactctcgcgagagtctagtcaaaaccctcgtgaggctcaaagatcggctgaggcactcttcaggctgcaggccatggccaagattctggaggaccaggaggagggagaagacaacagtcagatctacaacgacaaggatctcctcagctga。

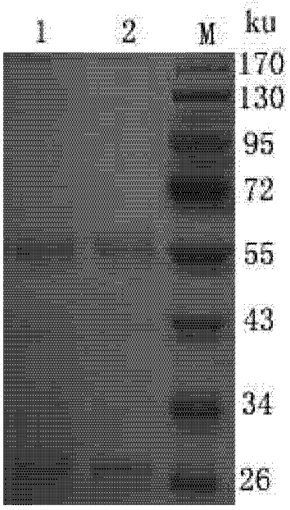

图 1

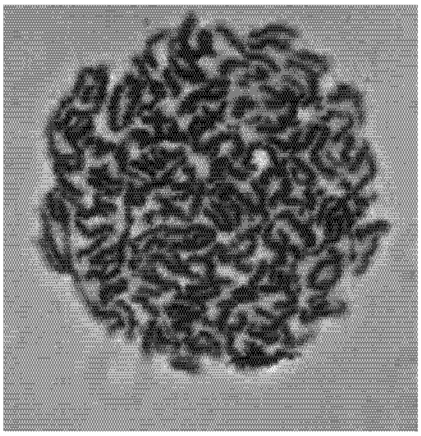

图 2

patsnap

专利名称(译)	小反刍兽疫病毒b-ELISA抗体检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN102419369A	公开(公告)日	2012-04-18
申请号	CN201110236942.6	申请日	2011-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	云南出入境检验检疫局检验检疫技术中心 深圳市华傲数据技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	云南出入境检验检疫局检验检疫技术中心 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	云南出入境检验检疫局检验检疫技术中心 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心		
[标]发明人	杨建民 艾军 叶玲玲 杨俊兴 祝贺 孙洁 周晓黎 花群义 董俊 徐维加 徐自忠 尹尚莲 吕建强		
发明人	杨建民 艾军 叶玲玲 杨俊兴 祝贺 孙洁 周晓黎 花群义 董俊 徐维加 徐自忠 尹尚莲 吕建强		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	张怡		
其他公开文献	CN102419369B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，尤其是病毒抗体检测领域。本发明所述的小反刍兽疫病毒b-ELISA抗体检测试剂盒包括分别放置的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体、稀释液、强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清、HRP羊抗鼠二抗、20倍浓缩洗涤液、底物液、终止液和酶链免疫吸附板。本发明通过实验优化，确定了试剂盒中各组分的最佳配比条件。其试剂盒可用于动物小反刍兽疫病毒抗体的快速诊断、检测，尤其适合于小反刍兽疫流行病学调查时大量样本的抗体检测。本发明的小反刍兽疫b-ELISA检测方

法，检测原理、实验操作程序等均不同于BIRAD实验室的c-ELISA检测方法，试剂盒包含的小反刍兽疫核蛋白抗原、小反刍兽疫单克隆抗体均为自行研制。组装试剂盒的检测敏感性、特异性等指标均与国际认可的BIRAD实验室的c-ELISA检测方法相同。