



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109856405 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201811573199.1

(22)申请日 2018.12.21

(71)申请人 新兴县国研科技有限公司

地址 527400 广东省云浮市新兴县新城镇
东堤北路5号

申请人 温氏食品集团股份有限公司

(72)发明人 李段 杨金易 曾道平 王磊

蔡新斌 苏晓娜 周庆丰 潘永飞

(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 33/531(2006.01)

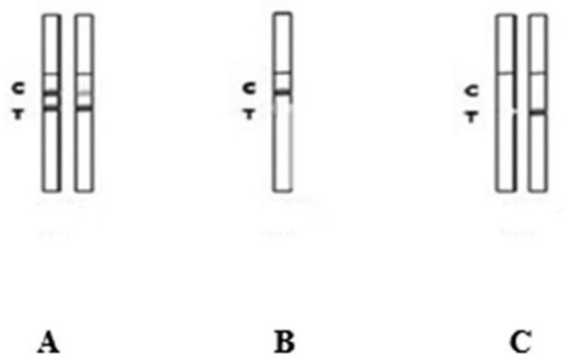
权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条

(57)摘要

本发明公开了一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条,所述试剂盒含有氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重组PEDV S蛋白和抗SPA抗体。本发明通过优选PEDV S重组蛋白的片段,大幅度提高了构建的猪流行性腹泻病毒抗体的胶体金检测试剂盒检测的检测灵敏度,使得其检测的灵敏度达到ELISA检测试剂盒的水平。同时,本检测试剂盒特异性高,并具有良好的重复性,检测时间短,能同时检测大量的样品。本发明对解决大批量样品猪血清的猪流行性腹泻抗体检测具有重要的现实意义,通过对猪群抗体水平的检测,可以实时监控猪群的整体免疫效果,为该病的诊断、检测和监测等提供了有力的工具。



1. 一种重组PEDV S基因,其特征在于,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种重组PEDV S蛋白,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。
3. 权利要求1所述重组PEDV S基因和/或权利要求2所述重组PEDV S蛋白在制备猪流行性腹泻病毒抗体的免疫学检测试剂盒中的应用。
4. 根据权利要求3所述应用,其特征在于,所述免疫学检测试剂盒为胶体金检测试剂盒。
5. 一种猪流行性腹泻病毒抗体的免疫学检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求1所述重组PEDV S基因的表达产物或权利要求2所述重组PEDV S蛋白。
6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,还包括抗SPA抗体和胶体金标记的葡萄球菌蛋白A。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述胶体金标记的葡萄球菌蛋白A的制备方法包括以下步骤:
 - S11. 将胶体金溶液的pH值调至5.5~6.5;
 - S12. 搅拌下,将葡萄球菌蛋白A溶液缓慢加入胶体金溶液中,使得混合溶液中葡萄球菌蛋白A的浓度为3~8mg/mL,胶体金的规格为3~15nm;
 - S13. 混合后,搅拌下,加入稳定剂后保存。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,步骤S13中稳定剂为牛血清白蛋白或聚乙二醇。
9. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,包括猪流行性腹泻病毒抗体胶体金检测试纸条,所述试纸条由样品垫、金标垫,硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上制成;其中,金标垫包被有胶体金标记的葡萄球菌蛋白A;硝酸纤维素膜上设置有包被有权利要求2所述的重组PEDV S蛋白的检测线,以及包被有抗SPA抗体的质控线。

一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测技术领域,更具体地,涉及一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻,英文缩写为PED(Porcine Epidemic Diarrhea),由猪流行性腹泻病毒引起的一种接触性肠道传染病。病毒主要破坏小肠茸毛,减小营养吸收面积,还导致体液损失,造成脱水,严重影响猪的生长发育。该病对哺乳仔猪致死率高,即便治愈对仔猪后期生长速度也有很大影响,并可发于各个年龄段的猪只,是猪场一种常见疾病。当前在我国绝大多数地区广为流行,尤其是高密度规模化养猪场,给养猪企业带来很大的经济损失,严重危害养猪生产的健康发展。

[0003] 由于腹泻类疾病引起症状具有相似性,所以PED不能靠临床症状和组织病理学变化来诊断。目前用来诊断PEDV的都是基于对PED病毒的检测,包括免疫荧光、免疫组化、电镜法、酶联免疫吸附试验和RT-PCR等技术。(1)免疫荧光技术检测病科室中的PEDV是应用较为广泛的可靠的特异性诊断方法。但是,免疫电镜法由于设备的限制,不适合用于大规模的临床检测。(2)RT-PCR技术法需要特殊的仪器设备,尽管具有较好的特异性和敏感性,但目前仍只能用于实验室检测,而不能用于临床诊断。(3)基于酶联免疫吸附试验的ELISA法中需要掌握专门操作技能的人员,无法大面积在养殖户中推广。

[0004] 虽然,目前市场上虽然有PED抗体检测试纸条,但都是以纯化的猪流行性腹泻病毒为基础,但病毒的纯化工艺比较复杂,并且容易散毒,存在一定的安全隐患,然而国内外尚无成熟的PED抗体检测试纸条。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,以杆状病毒系统表达的PEDV S蛋白抗原为基础,研制灵敏度高、特异性和稳定性好的抗体检测试纸条,用于猪流行性腹泻抗体的快速检测。

[0006] 本发明提供了一种猪流行性腹泻抗体检测试纸条,该试纸条由猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条,样品稀释液、样品滴管和防潮剂组成。试纸条由PVC板、样品垫、金标垫,硝酸纤维素膜和吸水垫组成。

[0007] 其中,金标垫为胶体金标记的葡萄球菌蛋白A(SPA),检测线为通过杆状病毒系统表达的PEDV S蛋白抗原,质控线为自制的抗SPA多抗血清包被硝酸纤维素膜。

[0008] 本发明的第一个目的是提供一种重组PEDV S基因。

[0009] 本发明的第二个目的是提供一种重组PEDV S蛋白。

[0010] 本发明的第三个目的是提供所述重组PEDV S基因和/或所述重组PEDV S蛋白在制备猪流行性腹泻病毒抗体的免疫学检测试剂盒中的应用。

[0011] 本发明的第四个目的是提供一种胶体金标记的葡萄球菌蛋白A的制备方法。

- [0012] 本发明的第五个目的是提供一种猪流行性腹泻的胶体金检测试剂盒的制备方法。
- [0013] 本发明的第五个目的是提供一种猪流行性腹泻病毒抗体的免疫学检测试剂盒。
- [0014] 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:
- [0015] 研究表明PEDV的S蛋白可以辨别靶细胞及促使病毒和细胞膜的融合,故被认为在免疫介导中起着重要作用,而且研究表明感染PEDV的猪血清中的抗S蛋白抗体比抗N蛋白抗体更为持久,即可在更长的时间中检测到抗S蛋白的抗体,因此S蛋白是建立PEDV血清学检测方法的首选抗原。
- [0016] 因此,本发明要求保护一种重组PEDV S基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;一种重组PEDV S蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。
- [0017] 所述重组PEDV S基因和/或所述重组PEDV S蛋白在制备猪流行性腹泻病毒抗体的免疫学检测试剂盒中的应用,都属于本发明的保护范围。
- [0018] 优选地,所述免疫学检测试剂盒为胶体金检测试剂盒。
- [0019] 一种猪流行性腹泻病毒抗体的免疫学检测试剂盒,所述试剂盒含有所述重组PEDV S基因的表达产物或所述重组PEDV S蛋白和抗SPA抗体。
- [0020] 优选地,还包括抗SPA抗体和胶体金标记的葡萄球菌蛋白A。
- [0021] 优选的,所述抗SPA抗体为多克隆抗体。
- [0022] 优选地,所述胶体金标记的葡萄球菌蛋白A的制备方法包括以下步骤:
- [0023] S11.将胶体金溶液的pH值调至5.5~6.5;
- [0024] S12.搅拌下,将葡萄球菌蛋白A溶液缓慢加入胶体金溶液中,使得混合溶液中葡萄球菌蛋白A的浓度为3~8mg/mL,胶体金的规格为3~15nm;
- [0025] S13.混合后,搅拌下,加入稳定剂后保存。
- [0026] 优选地,步骤S11中,将胶体金溶液的pH值调至6.0。
- [0027] 优选地,步骤S12中,混合溶液中葡萄球菌蛋白A的浓度为6mg/mL。
- [0028] 优选地,步骤S12中,胶体金的规格为3nm。
- [0029] 优选地,步骤S12中,葡萄球菌蛋白A时逐滴加入。
- [0030] 优选地,步骤S13中,稳定剂为牛血清白蛋白或聚乙二醇(PEG MW20000),其中。
- [0031] 优选地,步骤S13中,牛血清白蛋白的终浓度为1%。
- [0032] 优选地,步骤S13中,聚乙二醇(PEG MW20000)的终浓度为0.05%。
- [0033] 最优选地,步骤S13中稳定剂为牛血清白蛋白(BSA)。
- [0034] 所述的试剂盒,其特征在于,包括猪流行性腹泻病毒抗体胶体金检测试纸条,所述试纸条由样品垫、金标垫,硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上制成;其中,金标垫包被有胶体金标记的葡萄球菌蛋白A;硝酸纤维素膜上设置有包被有所述的重组PEDV S蛋白的检测线,以及包被有抗SPA抗体的质控线。
- [0035] 优选地,不吸水的支撑薄片为PVC版。
- [0036] 优选地,所述试剂盒还含有样品稀释液,样品滴管,防潮剂;
- [0037] 其中样品稀释液的组分为:含0.26g/LKH₂PO₄、2.89g/LNa₂HPO₄·12H₂O、8.71g/LNaCl、0.25mL/LTriton X-100的水溶液,PH值为7.4。
- [0038] 所述试剂盒的使用方法为:
- [0039] (1)用吸管吸取血清,用样品稀释液将血清作5倍稀释,取3~4滴加于试纸条卡加

样孔中,2分钟后开始观察结果,15分钟后终止观察,根据示意图判定结果。

[0040] (2)在试纸条卡质控线和检测线处均显红色(含紫色或暗红色),判为阳性,即有猪流行性腹泻病毒抗体;只在试纸条质控线处显红色,判为阴性,即无猪流行性腹泻病毒抗体(在试纸条质控线处不显红色,该试验不成立,判为失效。)

[0041] 本发明是在参考已知的胶体金免疫层析法(GICA)工作原理基础之上,将葡萄球菌蛋白A(SPA)胶体金标记作为指示介质,将通过杆状病毒表达系统获得的PEDV S蛋白抗原和自制的抗SPA多抗血清包被硝酸纤维素膜分别作为检测线和质控线,由此制成一种检测PEDV血清抗体的快速检测试纸条。

[0042] 一种猪流行性腹泻的胶体金检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0043] S21.所述PEDV S重组蛋白的表达和纯化;

[0044] S22.制备抗葡萄球菌蛋白A抗体;

[0045] S23.按照所述制备方法制备胶体金标记的葡萄球菌蛋白A;

[0046] S24.用步骤S23得到的胶体金标记的葡萄球菌蛋白A包被金标垫;

[0047] S25.用步骤S21得到的重组PEDV S蛋白包被硝酸纤维素膜上的检测线T线,用步骤S22得到抗SPA抗体包被硝酸纤维素膜上质控线C线;

[0048] S26.将样品垫、金标垫,硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上。

[0049] 优选的,所述抗SPA抗体为多克隆抗体。

[0050] 优选的,所述抗SPA多克隆抗体为使用形式为抗SPA多抗血清。

[0051] 血清中的抗猪流行性腹泻病毒抗体与SPA标记的胶体金形成复合物,由于层析作用复合物沿膜带移动,与包被在检测线上的猪流行性腹泻病毒抗原免疫胶体金复合物,富集检测线上,显示红色;剩余的免疫胶体金复合物与质控线上的猪IgG发生反应,富集在质控线上,显红色。若血清中无特异性抗体,检测线无色,质控线显红色。

[0052] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0053] 本发明通过优选PEDV S重组蛋白的片段,大幅度提高了构建的猪流行性腹泻病毒抗体检的胶体金检测试剂盒检测的检测灵敏度,使得其检测的灵敏度达到ELISA检测试剂盒的水平。同时,本检测试剂盒特异性高,并具有良好的重复性,检测时间短,能同时检测大量的样品。本发明对解决大批量样品猪血清的猪流行性腹泻抗体检测具有重要的现实意义,通过对猪群抗体水平的检测,可以实时监控猪群的整体免疫效果,为该病的诊断、检测和监测等提供了有力的工具。

附图说明

[0054] 图1为猪流行性腹泻病毒抗体检的胶体金检测试剂盒的结果判定。

具体实施方式

[0055] 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。

[0056] 实施例1PEDV S重组蛋白的表达和纯化

[0057] 本发明是将PEDV S蛋白克隆入杆状病毒表达载体系统中,转染昆虫细胞,获得体外表达的外源蛋白,并将该蛋白作为诊断抗原建立抗体检测方法,与原核表达的蛋白作为包被抗原相比,杆状病毒表达系统所表达的外源蛋白更加接近真实的天然蛋白的空间构象和功能,利用该系统表达的蛋白与猪血清中抗体的结合更加具有特异性和敏感性,可作为理想的抗原蛋白。

[0058] PEDV S重组蛋白的制备,在S基因N端的插入信号肽序列,氨基酸序列:MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFA,采用昆虫杆状病毒表达系统进行分泌表达。

[0059] 一、重组PEDV S的扩增

[0060] (一)实验方法

[0061] (1)猪流行性腹泻病毒S基因的扩增

[0062] 用猪流行性腹泻病毒SC1402株S基因引物S-Fo和S-Re进行PCR扩增。引物序列为:S-Fo:5'-ggtttttggaccatagcat-3',S-Re:5'-atttgtaagggtaatgataccctc-3'。

[0063] (2)添加信号肽序列

[0064] 依次利用以下引物(F1+R、F2+R、和F3+R)对上一步扩增产物进行扩增,经过3轮PCR扩增,将信号肽序列融合到S基因N端。具体引物序列为:

[0065] F1:ATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCGggtttttggaccatagcat;

[0066] F2:ATAAGGAACACACAAGCAAGATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCG,

[0067] F3:ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAA;

[0068] R:atttgtaagggtaatgataccctc。

[0069] (3)对上一步的扩增产物,用S-F和S-R进行扩增,添加限制性内切酶,用于克隆至杆状病毒表达载体系统,引物序列为:

[0070] S-F:5'-GGCGGATCCATGATGCTACTAGTAAATCAGT-3';

[0071] S-R:5'-GGCAAGCTT atttgtaagggtaatgataccctc-3'

[0072] (二)实验结果

[0073] S-Fo和S-Re进行PCR扩增,扩增出约693bp的特异性条带,并且各代次毒种均扩增出目的片段,其核苷酸序列如SEQ ID NO:3。添加信号肽序列后扩增产物其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0074] 二、PEDV-rS蛋白的Western-blot分析

[0075] (一)实验方法

[0076] 将扩增得到片段克隆入杆状病毒表达载体系统中,转染sf-9昆虫细胞。取接种猪流行性腹泻病毒SC1402株S基因重组杆状病毒的sf-9细胞悬液40μL与10μL 5×上样缓冲液混合,进行SDS-PAGE及Western-blot分析,以猪流行性腹泻病毒阳性血清作为一抗,用辣根过氧化物酶标记的兔抗猪的抗体为二抗。

[0077] (二)实验结果

[0078] 在60KDa出现条带,则表示PEDV-rS蛋白表达正确,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。各代次毒种的Western-blot分析均应出现30KDa目的条带。

[0079] 实施例2一种猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒的制备

[0080] 一、SPA胶体金标记物的制备

[0081] (1)根据需要被标记的胶体金的总量计算出所需要的实施例1制备得到的待标记

葡萄球菌蛋白A的总量,取高纯度的6mg SPA (葡萄球菌蛋白A) 溶于0.2ml的蒸馏水中使其终浓度为30mg/mL;

[0082] (2) 将胶体金溶液的pH值调至6.0,在电磁搅拌下,将SPA溶液加入胶体金溶液中,SPA溶液应逐滴加入,1mg的SPA溶液大约5min加完;

[0083] (3) SPA溶液与胶体金最佳混合比例为:60mg SPA加入10ml 3nm胶体金溶液;

[0084] (4) 混合3min后,在磁性搅拌下加入稳定剂:5%的牛血清白蛋白(BSA)使其终浓度为1%;

[0085] (5) 将标记好的胶体金装入透析袋中,两头扎紧,放入蔗糖或硅胶中浓缩,浓缩到原体积的1/10量,浓缩完毕后纯化。离心法纯化时,不要浓缩。

[0086] 二、兔抗SPA多抗血清的制备

[0087] (1) 选择健康的成年雄性家兔,体重2~3kg,用剪刀剪去家兔两后脚掌的部分兔毛,用75%的酒精消毒皮肤;

[0088] (2) 第一次免疫:取Sigma公司SPA冻干粉1mg加入0.5mL灭菌生理盐水,再加入等体积的弗氏完全佐剂(即FCA 0.5mL),用2mL注射器充分混匀后注射于两脚掌皮下;

[0089] (3) 第二次免疫:与第一次间隔10-14天,取Sigma公司SPA冻干粉1mg加入0.5mL灭菌生理盐水,再加入等体积的弗氏不完全佐剂(即FIA 0.5mL),用2mL注射器充分混匀后多点注射于背部皮下,每点注射0.1mL;

[0090] (4) 第三次免疫:与第二次间隔10-14天,注射部位、剂量均与第二次免疫相同;

[0091] (5) 与第三次免疫间隔5-7天后,从耳静脉采血0.5-1mL,分离血清,以双向琼脂扩散试验测定免疫血清的抗体效价,效价至少应达到1:16以上时才能放血(抗体的效价检测可以直接用琼脂双向扩散试验代替,在免疫三次后检测效价是否达到要求即可);

[0092] (6) 放血至三角烧瓶置37℃温箱1小时,再置4℃冰箱3-4小时,待血液凝固血块收缩后,用毛细血管吸取血清,于3000rpm离心15分钟,取上清加入防腐剂(终浓度为0.01%的硫柳汞或0.02%的叠氮钠),将以上获得的兔抗SPA多抗血清分装后置于4℃冰箱保存备用。

[0093] 三、金标垫包被胶体金标记的SPA

[0094] 金标垫为胶体金标记的SPA:

[0095] 取玻璃纤维素膜,置SPA胶体金标记物中浸泡1小时,取出后37℃烘干,裁成长约2.4cm,宽约4mm的小条。

[0096] 四、检测线的包被

[0097] 检测线包被有氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重组PEDV S蛋白抗原:

[0098] 以氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的重组PEDV-S蛋白(0.5ng/mL) 12μL作为点制于T线的抗原。

[0099] 五、质控线的包被

[0100] 质控线包被有抗SPA多抗血清:

[0101] 以上面制备得到的兔抗SPA多抗血清(0.6ng/mL) 10μL作为点制于C线的抗体。

[0102] 六、猪流行性腹泻病毒抗体胶体金检测试纸条

[0103] 试纸条为样品垫、金标垫,硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘附在不吸水的支撑薄片上,硝酸纤维素膜上设置有检测线和质控线。

[0104] 检测线PEDV-S蛋白的浓度为0.5ng/mL,体积12μL,质控线抗SPA多抗血清的浓度为

0.6ng/mL, 体积10 μ L。

[0105] 五、样品稀释液

[0106] 将0.26g KH_2PO_4 、2.89g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.71g NaCl 、0.25mLTriton X-100, 溶于800mL双蒸水中, 完全溶解后调PH值至7.4, 定容至1L。

[0107] 实施例3一种猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒

[0108] (1) 组成

[0109] 实施例2制备得到的猪流行性腹泻病毒抗体胶体金检测试纸条、样品稀释液以及样品滴管、防潮剂。

[0110] (2) 使用方法

[0111] 用吸管吸取血清, 用样品稀释液对血清作5倍稀释, 取3~4滴加于试纸条卡加样孔中, 2分钟后开始观察结果, 15分钟后终止观察, 根据示意图判定结果。

[0112] (3) 结果判定

[0113] 在试纸条卡“C”(对照线)和“T”(检测线)处均显红色(含紫色或暗红色), 判为阳性, 即有猪流行性腹泻病毒抗体(见图1A); 只在试纸条“C”处显红色, 判为阴性, 即无猪流行性腹泻病毒抗体(见图1B); 在试纸条“C”处不显红色, 该试验不成立(见图1C), 判为失效。

[0114] 实施例4一种猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒灵敏性检测

[0115] 一、实验操作

[0116] 将PEDV阳性高免血清倍比稀释, 同时使用自主研发的猪流行性腹泻抗体间接ELISA法, 此方法所用抗原与胶体金所用抗原相同同为PEDV—S蛋白和按照实施例3的胶体金检测试剂盒进行检测。

[0117] 间接ELISA法的具体操作如下: 使用前将试剂盒所有组件恢复到室温($25 \pm 3^\circ\text{C}$), 取出所需数量的抗原包被板。

[0118] (1) 加样: 将所需数量的板条固定于板架, 标记好样品、阴性对照和阳性对照(对照各做两孔, 不稀释), 每孔加入稀释后的血清样品100 μ L, 再加入阳性对照、阴性对照各100 μ L, 用盖板膜盖好;

[0119] (2) 温育: 置 37°C 反应40min;

[0120] (3) 洗涤: 弃去孔内液体, 取稀释后的洗液300 μ L注满各孔, 静置30—60秒, 弃去孔内洗液。重复洗4次后拍干;

[0121] (4) 加酶: 加入100 μ L酶标记物到微孔板中, 用盖板膜盖好;

[0122] (5) 温育: 置 37°C 反应30min;

[0123] (6) 洗涤: 重复步骤(3);

[0124] (7) 显色: 每孔加入底物缓冲液50 μ L, 再加入底物液50 μ L, 振荡混匀(或将底物缓冲液和底物液以1:1比例混合后, 再加入100 μ L显色液), 置 37°C 显色15min;

[0125] (8) 终止: 每孔加入终止液50 μ L, 轻拍混匀;

[0126] (9) 读值: 用酶标仪读值, 在单波长450nm下读取各孔A值。

[0127] 间接ELISA法的结果判定:

[0128] 样品中抗体的相对含量可以参考阴性对照来计算, 其关系可以通过S/N值(样品和阴性对照的比值)来计算。

[0129] (i) 实验有效性判定

[0130] 阴性对照OD值 ≤ 0.3 ;阳性对照OD值 ≥ 0.4 。

[0131] (ii) 判定标准

[0132] $S/N < 0.2$ 判为阴性; $S/N \geq 2.1$ 判为阳性。

[0133] 二、实验结果:

[0134] 二者最低检出量均在1: (640~1280) 范围内,证明敏感性相近(见表1)。

[0135] 表1:

	倍比稀释	ELISA		实施例 1 的胶体金检测试剂盒
		平均 OD 值	结果	结果
[0136]	1:10	1.785	++++	+++
	1:20	1.455	++++	+++
	1:40	1.233	+++	+++
	1:80	1.088	+++	+++
	1:160	0.722	++	+++
	1:320	0.561	++	++
	1:640	0.371	++	++
	1:1280	0.226	+	+
	1:2560	0.106	-	-
	1:50N	0.103	-	-
	1:50P	1.289	+++	+++

[0137] (注:“++++、+++、++、+”分别代表强阳性、阳性、弱阳性、疑似,“-”代表阴性;ELISA 结果判定域值为 $S/N \geq 2.1$ 为阳性,其它为阴性;N为阴性对照,P为阳性对照。)

[0138] 实施例5一种猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒的特异性检测

[0139] 一、实验操作

[0140] 用实施例3的胶体金检测试剂盒对TGEV、PRoV、PRV和PPV阳性血清进行检测

[0141] 二、实验结果

[0142] 均为阴性,而PEDV阳性血清和PEDV S蛋白血清的检测结果均为阳性,证明该检测试纸条特异性良好与其它腹泻病毒阳性血清无交叉反应,

[0143] 实施例6一种猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒的重复性检测

[0144] 一、实验操作

[0145] 实施例3的胶体金检测试剂盒对PEDV阳性血清和正常血清进行检测:

[0146] 取PEDV阳性血清和正常血清各3份,分别进行1:5稀释加样,每份样品重复检测三次。

[0147] 二、实验结果

[0148] 阳性血清点样结果均为阳性,而正常血清均为阴性,证明重复性良好。

[0149] 实施例7一种猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒的稳定性检测

[0150] 一、实验操作

[0151] 恒温箱中放置1d、2d、3d、4d、5d、6d后,依次取出继续保存于4℃。当检测试纸条于37℃恒温箱中放置至第7d后,取出所有之前保存于4℃的检测试纸条,对背景已知的30份阳性血清和30份正常血清进行检测。

[0152] 二、实验结果

[0153] 检测结果显示30份阳性血清均检测为阳性,30份阴性血清均检测为阴性,证明该试纸条的稳定性良好,可以在4℃保存一年。

[0154] 实施例8稳定剂的选择

[0155] 一、实验操作

[0156] 按照实施例2法制备猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒,其中SPA胶体金标记物的制备中,其中的稳定剂换为3%聚乙二醇(PEG MW20000),使其终浓度为0.05%。将制备得到的猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒与按照实施例2法制备猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒,放在4℃长期保存。

[0157] 二、实验结果

[0158] 对比了BSA和PEG稳定胶体金的效果,BSA稳定的标记胶体金,放在4℃达2年仍然保持良好性能,而用PEG稳定的标记胶体金放在4℃1年左右就有分层现象,而且染色效果显著下降。因此,认为使用BSA作稳定剂稳定性更好。

[0159] 实施例8SPA溶液与胶体金最佳混合比例的选择

[0160] 一、实验操作

[0161] 按照实施例2法制备猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒,其中SPA胶体金标记物的制备中,其中SPA溶液与胶体金的比例为:(1) 30mg SPA加入10ml 15nm胶体金溶液和(2) 80mg SPA加入10ml 8~13nm胶体金溶液。将制备得到的猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒与按照实施例2法制备猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒,按照实施例3的方法进行检测阳性样本。

[0162] 二、实验结果

[0163] 按照按以下比例:(1) 30mg SPA加入10ml 15nm胶体金溶液和(2) 80mg SPA加入10ml 8~13nm胶体金溶液将制备得到的猪流行性腹泻病毒抗体检测的胶体金检测试剂盒无法进行猪流行性腹泻病毒抗体的阳性样本进行检测。质控线和检测线都不会有显色反应。

序列表

<110> 新兴县国研科技有限公司

温氏食品集团股份有限公司

<120> 一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 807

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

atgctactag taaatcagtc acaccaaggc ttcaataagg aacacacaag caagatggta 60
agcgcatttg ttttatatgt gcttttggcg gcggcggcgc attctgcctt tgcgggtttt 120
tggaccatag catcgactaa ttttgttgat gcacttatcg aagttcaagg aactgccatt 180
cagcgatttc tttattgtga tgatcctgtt agccaactca agtgttctca ggtttcattt 240
gaccttgacg atggttttta ccccatattcc tctacaaacc ttctgagtca tgaacagcca 300
acttcttttg ttactttgcc atcatttaat gatcattctt ttgttaatat tactgtctct 360
gctgcttttg gtggtcatag tggtgccaac cttattgcat ctgacactac tatcaatggg 420
tttagttctt tctgtgttga cactagacaa tttaccattt cactgtttta taatgttaca 480
aacagttatg gttatgtgtc taaatcacag gacagtaatt gccctttcac cttgcaatct 540
gttaatgatt acctgtcttt tagcaaattt tgtgtttcta ccagcctttt ggctagtgcc 600
tgtaccatag atctcttttg ttaccctgag tttggtagtg gtgttaagtt cacgtccctt 660
tactttcaat tcacaaaggg tgagttgatt actggcacgc ctaaaccact tgaaggtgtt 720
acggacgttt cttttatgac tctggatgtg tgtaccaagt atactatcta tggctttaaa 780
ggtgagggtg tcattaccct taaaaat                                     807

```

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr
1           5           10           15
Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala
          20           25           30
Ala His Ser Ala Phe Ala Gly Phe Trp Thr Ile Ala Ser Thr Asn Phe
          35           40           45
Val Asp Ala Leu Ile Glu Val Gln Gly Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu
          50           55           60

```

Tyr	Cys	Asp	Asp	Pro	Val	Ser	Gln	Leu	Lys	Cys	Ser	Gln	Val	Ser	Phe
65					70				75					80	
Asp	Leu	Asp	Asp	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn	Leu	Leu	Ser
				85				90						95	
His	Glu	Gln	Pro	Thr	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Pro	Ser	Phe	Asn	Asp	His
			100					105					110		
Ser	Phe	Val	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	His	Ser	Gly
		115						120					125		
Ala	Asn	Leu	Ile	Ala	Ser	Asp	Thr	Thr	Ile	Asn	Gly	Phe	Ser	Ser	Phe
		130						135				140			
Cys	Val	Asp	Thr	Arg	Gln	Phe	Thr	Ile	Ser	Leu	Phe	Tyr	Asn	Val	Thr
145					150					155					160
Asn	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Val	Ser	Lys	Ser	Gln	Asp	Ser	Asn	Cys	Pro	Phe
					165					170					175
Thr	Leu	Gln	Ser	Val	Asn	Asp	Tyr	Leu	Ser	Phe	Ser	Lys	Phe	Cys	Val
			180					185						190	
Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Cys	Thr	Ile	Asp	Leu	Phe	Gly	Tyr
			195					200						205	
Pro	Glu	Phe	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Phe	Thr	Ser	Leu	Tyr	Phe	Gln	Phe
			210					215						220	
Thr	Lys	Gly	Glu	Leu	Ile	Thr	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Val
225					230					235					240
Thr	Asp	Val	Ser	Phe	Met	Thr	Leu	Asp	Val	Cys	Thr	Lys	Tyr	Thr	Ile
					245					250					255
Tyr	Gly	Phe	Lys	Gly	Glu	Gly	Ile	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn			
			260							265					

<210> 3

<211> 693

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

```

ggtttttggga ccatagcatc gactaatttt gttgatgcac ttatcgaagt tcaaggaact 60
gccattcagc gtattcttta ttgtgatgat cctgttagcc aactcaagtg ttctcagggt 120
tcatttgacc ttgacgatgg tttttacccc atttcttcta caaaccttct gagtcatgaa 180
cagccaactt cttttgttac ttgccatca tttaatgata attcttttgt taatattact 240
gtctctgctg cttttggtgg tcatagtggg gccaacctta ttgcatctga cactactatc 300
aatgggttta gttctttctg tgttgacact agacaattta ccatttcact gttttataat 360
gttacaaaca gttatgggta tgtgtctaaa tcacaggaca gtaattgccc tttcaccttg 420
caatctgtta atgattacct gtcttttagc aaattttgtg tttctaccag ctttttggt 480

```

```
agtcctgta ccatagatct ctttggttac cctgagtttg gtagtggtgt taagttcacg 540
tccctttact ttcaattcac aaagggtgag ttgattactg gcacgcctaa accacttgaa 600
ggtgttacgg acgtttcttt tatgactctg gatgtgtgta ccaagtatac tatctatggc 660
tttaaagggtg aggggtatcat tacccttaca aat 693
```

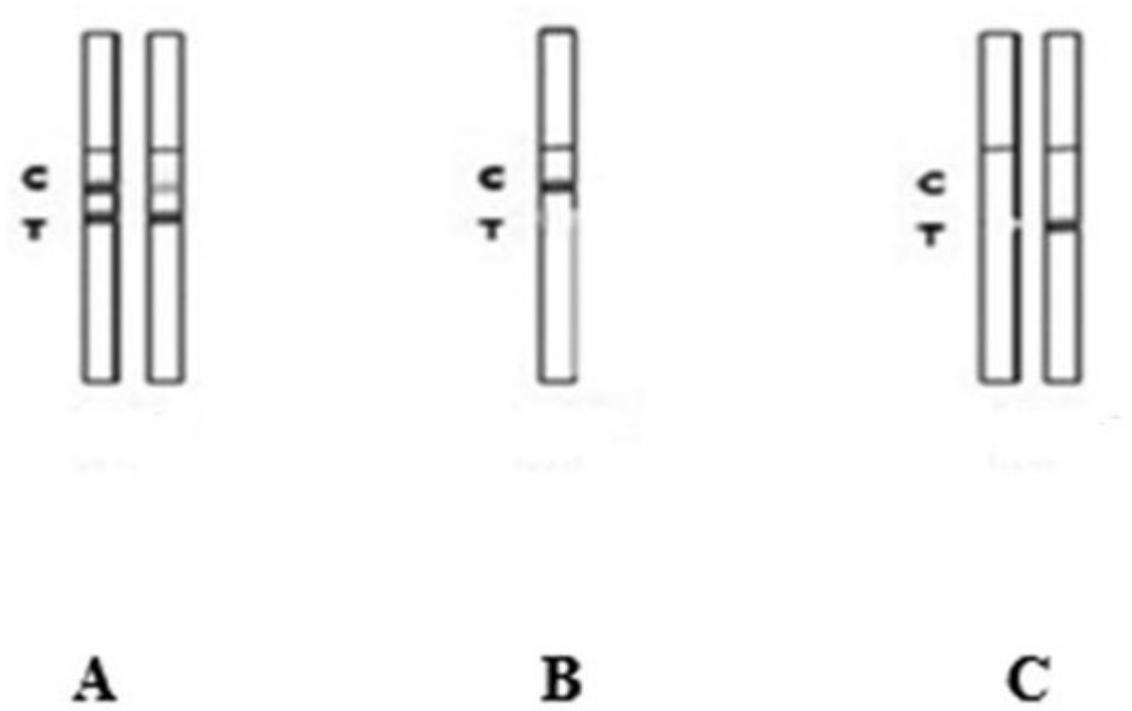


图1

专利名称(译)	一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条		
公开(公告)号	CN109856405A	公开(公告)日	2019-06-07
申请号	CN201811573199.1	申请日	2018-12-21
[标]发明人	李段 杨金易 曾道平 王磊 蔡新斌 苏晓娜 周庆丰 潘永飞		
发明人	李段 杨金易 曾道平 王磊 蔡新斌 苏晓娜 周庆丰 潘永飞		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	任重		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试纸条，所述试剂盒含有氨基酸序列如SEQ ID NO：2所示的重组PEDV S蛋白和抗SPA抗体。本发明通过优选PEDV S重组蛋白的片段，大幅度提高了构建的猪流行性腹泻病毒抗体的胶体金检测试剂盒检测的检测灵敏度，使得其检测的灵敏度达到ELISA检测试剂盒的水平。同时，本检测试剂盒特异性高，并具有良好的重复性，检测时间短，能同时检测大量的样品。本发明对解决大批量样品猪血清的猪流行性腹泻抗体检测具有重要的现实意义，通过对猪群抗体水平的检测，可以实时监控猪群的整体免疫效果，为该病的诊断、检测和监测等提供了有力的工具。

