



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109799343 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201811492102.4

(22)申请日 2018.12.07

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市盐场堡徐家坪1号

(72)发明人 郭慧琛 孙世琪 白满元 张韵
张禹 茹嘉喜 杨志元 王蕊
何继军 罗建勋

(74)专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任公司
62102

代理人 张晋

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表2页

(54)发明名称

基于病毒样颗粒的A型口蹄疫病毒抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种采用A型口蹄疫病毒样颗粒(VLPs)制备的检测试剂盒及制备方法。本发明的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有:包被A型口蹄疫病毒样颗粒的酶标板,HRP标记的兔抗、含有吐温和磷酸盐缓冲液的样品稀释液和洗涤液、TMB底物、阳性对照血清、阴性对照血清、以及浓硫酸与水混合的终止液。本发明相对现有技术具有更好的安全性、良好的免疫原性,以及更高的灵敏度及特异性。

1. 一种A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒,其特征在于检测试剂盒内包括有:包被A型口蹄疫病毒样颗粒的酶标板,HRP标记的兔抗、含有吐温和磷酸盐缓冲液的样品稀释液和洗涤液、TMB底物、阳性对照血清、阴性对照血清、以及浓硫酸与水混合的终止液。

2. 权利要求1所述的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征在于HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上,其制备过程包括:用A型口蹄疫病毒样颗粒免疫兔,免疫结束后,从兔心脏采血,分离血清并用Protein A亲和层析法分离纯化得到IgG,采用过碘酸钠方法将HRP标记到IgG上。

3. 根据权利要求2所述的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征在于酶标板包被的A型口蹄疫病毒样颗粒是由A型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成,VP0、VP1和VP3的序列分别为SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和 SEQ ID No.3。

4. 根据权利要求2或3所述的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征在于其中的酶标板制备是用0.05% (pH=9.6) 的碳酸盐包被缓冲液将A型FMDV VLPs稀释为1.0 μ g/mL,以每孔100 μ L的量加入酶标板,4 $^{\circ}$ C包被过夜,洗涤液洗板3次;加入以酶标板稳定剂配制的含1%BSA封闭液,每孔120 μ L,37 $^{\circ}$ C恒温箱封闭1 h,洗板3次,干燥,真空包装。

基于病毒样颗粒的A型口蹄疫病毒抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗体检测试剂盒及其制备方法,确切讲本发明涉及一种采用A型口蹄疫病毒样颗粒(VLPs)制备的检测试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的急性、热性、高度接触性传染病,其主要感染猪、牛、羊等偶蹄动物。FMDV有O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3、Asia I 7个血清型,而这7个血清型间几乎没有交叉免疫保护反应。由于FMD传播速度极快,血清型和基因型不断的变化,且血清型之间不存在交叉保护性,给口蹄疫防控带来了极大的挑战。近年来,A、O型在中国部分地区以交替流行的态势出现,且其疫情复杂、涉及面广、破坏性强。我国新疆的阿克苏地区及韩国等地在2009-2013年间相继出现A型口蹄疫疫情;2013年3月广东茂名某猪场出现了A型口蹄疫临床发病病例,之后便在中国的某些省份及周边国家俄罗斯、哈萨克斯坦相继发生疫情,造成了重大的经济损失。目前预防口蹄疫最有效的方法是接种疫苗,主要根据地区性流行毒株的亚型,进行大规模地调查了解有关流行毒株的抗原漂移、转移等特性,选择匹配的疫苗株来免疫接种动物,为防控动物口蹄疫疾病,需要有效的方法来精确快速地检测动物感染的病原和疫苗免疫水平,因此,一种稳定可靠的检测方法显得尤为重要。

[0003] 目前用于检测FMDV抗体的ELISA方法大多是以灭活病毒、重组病毒、单个蛋白或多肽等作为抗原,以完整病毒粒子作为抗原虽具有许多优点,但却存在安全风险,而单个蛋白或多肽的免疫原性相对较差,影响其使用的效果。

[0004] 现阶段大多数竞争ELISA试剂盒都是将HRP标记在抗竞争性抗体的抗体上,这就导致它们的实验步骤多,用时长,多在1 h以上,参见中国专利申请CN105445457A、CN107064501A等公开的内容。

发明内容

[0005] 本发明提供一种可克服现有技术不足,用于检测A型口蹄疫病毒抗体的竞争ELISA检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 本发明的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有:包被A型口蹄疫病毒样颗粒的酶标板,HRP标记的兔抗、含有吐温和磷酸盐缓冲液的样品稀释液和洗涤液、TMB底物、阳性对照血清、阴性对照血清、以及浓硫酸与水混合的终止液。

[0007] 本发明的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法是:将HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上,其制备过程包括:用A型口蹄疫病毒样颗粒免疫兔,免疫结束后,从兔心脏采血,分离血清并用Protein A亲和层析法分离纯化得到IgG,采用过碘酸钠方法将HRP标记到IgG上。

[0008] 优选地,本发明的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法中,其内酶标板包被的A型口蹄疫病毒样颗粒是由A型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成,

其中VP0、VP1和VP3的序列分别为SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和 SEQ ID No.3。

[0009] 优选地,本发明的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法中,所用的酶标板制备是:用0.05% (pH=9.6) 的碳酸盐包被缓冲液将A型FMDV VLPs稀释为1.0 μ g/mL,以每孔100 μ L的量加入酶标板,4 $^{\circ}$ C包被过夜,洗涤液洗板3次;加入以酶标板稳定剂配制的含1%BSA封闭液,每孔120 μ L,37 $^{\circ}$ C恒温箱封闭1 h,洗板3次,干燥,真空包装。

[0010] 病毒样颗粒是由病毒的结构蛋白组成的中空纳米颗粒,不含遗传物质,不能自我复制,具有与天然病毒相同或类似的结构特征,因此相对于灭活病毒抗原具有良好的安全性。本发明使用口蹄疫病毒样颗粒作为检测A型FMDV抗体。可以有效的克服现有技术存在的问题,因此本发明具有更好的安全性、良好的免疫原性,以及更高的灵敏度及特异性。

[0011] 虽然目前有很多不同的生物学和血清学方法对口蹄疫病进行研究和检测,但ELISA方法由于其操作简单、易于推广、特异性和敏感性高而处于优势地位。

[0012] 本发明具有如下优点:

1. 本发明首次用A型口蹄疫的病毒样颗粒作为包被抗原,建立了可检测猪A型口蹄疫的试剂盒,可对血清中的猪A型口蹄疫的抗体水平进行快速检测;充分利用了VLPs免疫原性强,安全性高可以替代天然病毒在免疫学检测中发挥重要作用的特点。A型FMDV的VLPs是由A型FMDV病毒的结构蛋白组成的中空纳米颗粒,不含遗传物质,不能自我复制,具有与天然病毒相同或类似的结构特征,因此相对于灭活病毒抗原具有良好的安全性。

[0013] 2. 本发明使用的抗原由A型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组成,其表面可形成了重复且有序的抗原表位,且通过各亚单位之间的相互作用可以形成单个蛋白不具有的立体构象,所以相对于以单个蛋白或多肽作为抗原,本发明具有更好的检测敏感性和特异性,且避免了宿主种类的问题。相应的试验表明,以FMDV-VLPs作为抗原,其敏感性为96%,特异性为100%,与荷兰赛迪试剂盒的符合率为97%。本发明的这一结果优于现阶段已经公开的针对口蹄疫病毒的竞争ELISA方法的结果。

[0014] 3. 本发明方法使用HRP标记兔抗A型口蹄疫VLPs的IgG,利用该试剂盒检测过程中,使用已标记好的酶标竞争抗体,实际操作步骤仅需两步,实验简便,易操作,用时较短,本发明的方法用时大约在45min。而大多数竞争ELISA试剂盒的作用时间为1h左右,参见专利CN105445457A、CN107064501A等。

[0015] 4. 本发明应用大肠杆菌表达系统具有经济、廉价的优点。

具体实施方式

[0016] 以下结合实施例解说本发明。

[0017] 1. A型口蹄疫病毒VLPs的制备

(1) 将由本实验室保存的阳性重组质粒pSMK-VP0VP3和pSMK-VP1共转化至感受态细胞BL21 (DE3)-RIL,表达菌按1:100的比例接种到含有10 μ g/mL卡那霉素、50 μ g/mL氨苄青霉素和25 μ g/mL氯霉素的经高压灭菌的100mL新鲜LB液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C、220r/min摇床上过夜培养。

[0018] (2) 再将过夜培养的表达菌接种含有1 μ g/mL卡那霉素、50 μ g/mL氨苄青霉素和25 μ g/mL氯霉素的经高压灭菌的1000mL新鲜LB液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C、220r/min摇床上摇至菌液OD600值为0.6~0.8。

[0019] (3)加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG,并于16℃条件下诱导16h。

[0020] (4)收集菌体

(5)超声破碎、离心收集上清

(6)收集的上清与Ni²⁺亲和层析柱结合2h。先用10个柱体积Buffer A洗液(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 20mM咪唑, 3% TritonX-100, pH=8.0)洗脱杂蛋白,然后用Buffer B洗液(20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 500mM咪唑, 3% TritonX-100, pH=8.0)将目的蛋白洗脱。

[0021] (7)收集洗脱液,然后用SDS-PAGE电泳实验鉴定得到的蛋白。测定蛋白浓度后于-80℃保存备用。

[0022] (8)VLPs的体外组装

将纯化好带有His-SUMO标签的蛋白与SUMO酶按100:1的比例装入透析袋中,在500mL的酶切缓冲液中,将酶切体系置于磁力搅拌器上轻微旋转,4℃过夜。切除SUMO标签的结构蛋白自行组装为VLPs。收集组装后的VLPs,进行SDS-PAGE和WB鉴定。

[0023] (9)使用透射电镜(TEM)分析鉴定VLPs

取蔗糖密度梯度离心后的25μgVLPs室温吸附到碳膜包被的铜网上2.5min,用滤纸吸去铜网上多余的液体,用2%~3%的磷酸钨负染5min后,滤纸除去多余液体,最后在透射电镜下观察样品VLPs。VLPs样品成圆形,大小一般在20-40nm之间。

[0024] 2. 高免血清的制备

(1)动物选择:1.8-2.0kg左右健康雄性家兔4只,分为两组,实验组3只,对照组1只。

[0025] (2)抗原:将纯化后的A口蹄疫VLPs用PBS稀释成0.2mg/mL,与弗氏佐剂按1:1的体积比乳化,脊部皮下肌肉多点注射,免疫剂量1mL/次/只,共进行4次免疫,每次间隔14d。初次免疫用弗氏完全佐剂,第2、3次免疫用弗氏不完全佐剂,最后1次用弗氏完全佐剂。

[0026] (3)抗体检测:每次免疫前于耳缘静脉处采血,用液相阻断ELISA试剂盒测定效价。最后一次免疫结束第14d,从兔心脏采血,分离血清,经离心去掉细胞等组织碎片后,分装待用。

[0027] 3. Protein A亲和层析法分离纯化IgG

(1)样品准备:将兔血清与结合缓冲液1:1混合,过滤。

[0028] (2)平衡柱子:用5-10倍体积的磷酸缓冲液过Protein A柱。

[0029] (3)上样:用注射器将1mL准备好的血清样品注入。

[0030] (4)洗脱杂蛋白:用磷酸缓冲液冲洗柱子,直至结合液中不含蛋白。

[0031] (5)收集抗体:用6倍体积的0.1mol/L、pH=3.0的柠檬酸盐缓冲液洗脱IgG,收集样品,每管0.5mL,在每管中加入50μL的1mol/L、pH=9.0的Tris-HCL缓冲液。测定各收集管中的蛋白含量,合并蛋白管。

[0032] (6)PBS透析收集的抗体。

[0033] 4. 过碘酸钠方法制备A型口蹄疫VLPs的IgG-HRP

(1)称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中。

[0034] (2)于上液中加入0.2mL新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌静置30分钟。加入0.16M乙二醇溶液,混匀,室温静置30min。

[0035] (3)将上述溶液装入透析袋中,对1mM pH=4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜。

[0036] (4)加20μL 0.2M pH=9.5碳酸盐缓冲液,使溶液的pH升高到9.0~9.5,然后立即加

入10mg IgG (抗体,或SPA5Mg) 在1mL 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2h。

[0037] (5)加0.1mL新配的4mg/mL NaBH_4 液,混匀,4℃静置2h。将上述液体装入透析袋中,于0.15M pH=7.4的PBS透析液中4℃过夜。

[0038] (6)将透析过的液体于4℃3000r/min离心30min,弃上清,将沉淀溶解于少量0.015M pH=7.4的PBS中,装入透析袋中,透析过夜,以去除铵离子。

[0039] (7)将去除铵离子的液体于4℃10000r/min离心30min,去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装,-20℃保存备用。

[0040] 2. A型口蹄疫病毒VLPs ELISA抗体检测试剂盒的制备

1)ELISA方法的建立及条件优化:

应用Bradford蛋白定量试剂盒检测浓缩蛋白的浓度:首先将标准品(1mg/mL的BSA)稀释成浓度为0、50、100、150、200、250、300、350 $\mu\text{g/mL}$ 的BSA,在酶标板上每孔加入20 μL 稀释成不同浓度的BSA标准品,做1孔重复孔,再每孔加入200 μL Bradford染色液混匀后室温放置5-10min。用酶标仪测定595nm的吸光值,绘制标准曲线。然后将待测蛋白样品用去离子水稀释至适当浓度,按上述方法测定样品595nm的吸收值,并计算样品蛋白浓度。

[0041] 抗原包被量及血清稀释度的优化:采用交叉棋盘滴定法。用0.05%pH=9.6的碳酸盐包被缓冲液将已知浓度的A型FMD VLPs稀释为0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g/mL}$,加入酶标板中,每孔100 μL 4℃包被过夜后,做1孔重复孔。次日倒掉孔中液体用洗涤液洗涤3-4次后拍干,再每孔加入110 μL 的1%BSA溶液37℃封闭60min后,洗涤同前。将阴、阳性参考血清进行倍比稀释,从1:2稀释至1:512,自上而下分别加入各孔中,每孔50 μL ,同时每孔加入相同体积工作浓度的酶标抗体(HRP-IgG),室温下震荡混匀30s,置于37℃作用30min,洗涤同前,每孔加入相同体积的TMB,置于37℃显色15min后,每孔加入相同体积终止液(2M H_2SO_4),酶标仪上测定450nm吸光值。根据P/N值确定抗原最佳包被浓度为1 $\mu\text{g/mL}$,血清最佳稀释度为1:16。

[0042] 酶标抗体的最佳稀释度的确定及优化:将抗原按最佳浓度进行包被,参考血清按最佳稀释度进行稀释。将HRP-IgG进行稀释,即1:8000、1:10000、1:12000、1:14000、1:16000、1:18000、1:20000。在其他条件相同的情况下经方阵滴定法,根据P/N值确定HRP-IgG最佳稀释度为1:10000。

[0043] 抗原最佳包被时间及温度的确定及优化:将抗原用最佳包被量分别于37℃2h+4℃过夜、37℃2h、4℃过夜包被酶标板,在其他条件相同的情况下,根据P/N值确定抗原最佳包被时间4℃过夜。

[0044] 封闭液的优化:用5% milk +0.5%BSA、5% milk 、10% milk 、5%小牛血清、10%小牛血清、0.5%BSA和1%BSA对包被的酶标板分解进行封闭,在其他条件相同的情况下,根据P/N值确定最佳封闭剂为1%BSA。

[0045] 封闭时间的作用时间及温度的确定及优化:用最佳封闭剂对包被好的酶标板分别封闭37℃1h、37℃2h、37℃3h,在其他条件相同的情况下,根据P/N值确定最佳封闭时间为37℃1h。

[0046] 待测血清及酶标抗体作用时间及温度的确定及优化:将待测血清和HRP-IgG按最佳稀释比例进行稀释,按相同的体积加入酶标板中的混匀,37℃作用分别30min、60min、90min、120min。其他条件不变的情况下,检测各种待检血清,根据计算各已知背景待检血清的P/N值确定血清和HRP-IgG最佳作用时间及温度为37℃封闭30min。

[0047] 底物TMB作用时间及温度的确定及优化:将底物溶液在其他条件相同的情况下,加入反应体系,分别在37℃和室温下条件下避光显色5min、10min、15min、30min,根据P/N值确定最佳作用时间为37℃显色15min。

[0048] ELISA方法阴阳性判定标准的建立

用本发明建立的ELISA方法对200份已知背景的阴阳性血清分别检测3次,计算出各血清的抑制率(PI)。血清 $PI \geq 40\%$ 时,可判定为阳性;血清 $PI \leq 35\%$ 时,可判定为阴性; $35\% < PI < 40\%$,为可疑。

[0049] 交叉反应试验:用包被好的酶标板同时检测口蹄疫病毒A型、Asia I型、O型、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合症病毒、犬细小病毒阳性血清,本方法与其他的易感动物病毒没有交叉反应。

[0050] 敏感性、特异性分析:用建立的ELISA方法检测100份不同抗体效价的血清样本,与兰州兽医研究所A型FMD液相阻断ELISA抗体检测试剂盒的检测结果相比,其敏感性为97%、特异性为98%。

[0051] 批内、批间重复性试验:分别用同一批次组建的试剂盒和3个不同批次组建的试剂盒检测同样的4份血清,每个样本设立三个重复。其各个样本的变异系数均小于8%,说明竞争ELISA方法制备的酶标板具有良好的重复性。

[0052] 2) 酶标板的制备:将VLPs按包被量为每孔 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 均匀的包被在酶标板孔上,4℃过夜;然后每孔加入300 μL 洗涤液洗板3次,甩干,每孔加入100 μL 的1%BSA 37℃封闭1h(包被缓冲液为0.05M, pH9.6的碳酸盐缓冲液,即1L溶液中含1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3)。

[0053] 3) 试剂盒其他溶液配制:① 样品稀释液:含有体积浓度0.1%吐温-20的0.01mol/L及pH=7.2-7.4的磷酸盐缓冲液(PBS);② 洗涤液:在1000mL的0.01M PBS溶液中加入1mL吐温-20(Tween-20);③ 终止液:取54.34mL浓度为98%的浓硫酸加蒸馏水至1000mL即可。

[0054] 3. A型口蹄疫病毒VLPs ELISA抗体检测试剂盒的操作步骤:

1) 将待检测样本用样本稀释液1:16稀释,每孔加50 μL ,同时加入阳性和阴性对照血清,每孔建议做1孔重复,再同时往每孔加入50 μL 按最佳稀释比例(1:10000)稀释的酶标抗体(IgG-HRP),室温下手动震荡或用微量震荡器上混匀。置于37℃作用30min后,倒掉孔中液体,每孔加入300 μL 洗涤液洗板3-4次拍干,再每孔加入50 μL TMB溶液,37℃避光显色15min,再加入终止液50 μL 。最后在酶标仪测定450nm处各样品吸收值。

[0055] 2) 结果判定:当被检血清的 $PI \geq 40\%$ 时,可判定为阳性;当被检血清 $PI \leq 35\%$ 时,可判定为阴性;当被检血清 $35\% < PI < 40\%$,可判定为可疑。

序列表

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 基于病毒样颗粒的A型口蹄疫病毒检测试剂盒

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 909

<212> DNA

<213> A型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP0)

<400> 1

```

ggtgcgggtc agagcagccc ggcgaccggt agccagaacc aaagcggtaa caccggcagc 60
atcattaaca actactatat gcagcaatac cagaacagca tggacacca actgggcat 120
aacgcgatca gcggtggcag caacgagggt agcaccgaca ccaccagcac ccacaccacc 180
aacacccaaa acaacgattg gttcagcaag ctggcgagca gcgcgttcac cggctctgtt 240
ggcgcgctgc tggcggacaa gaaaaccgag gaaaccaccc tgctggagga tcgtattctg 300
accacccgta acggccacac caccagcacc acccagagca gcgtgggtgt tacctgcggc 360
tatagcaccg gtgaagacca cgtgagcgggt ccgaacacca gcggtctgga gaccctgtgt 420
gttcaagcgg aacgtttctt taagaaacac ctgttcgact ggaccaccga taagccgttt 480
ggtcacatcg agaaactgga actgccgacc gagcacaagg gtgtgtacgg ccagctggtt 540
gagagcttcg cgtatatgcg taacggctgg gacgttgagg tgtctgcggt tggtaaccaa 600
tttaacgggtg gctgcctgct ggttgcatg gttccggagt tcaaggaatt taccagcgt 660
gaaaaatacc aactgaccct gttccgcac cagtttatca gcccgcgtac caacatgacc 720
gcgcacatta ccgtgccgta tctgggtgtt aaccgttacg atcaatataa gaaacacaaa 780
ccgtggaccc tgggtggttat ggtggttagc ccgctgacca ccagcagcat cggctgcgacc 840
cagattaagg tgtacgcgaa cattgcgccc acccacgtgc acgttgcggg cgagctgccg 900
agcaaagaa 909

```

<210> 2

<211> 630

<212> DNA

<213> A型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP1)

<400> 2

```

accaccgcga ccggcgagag cgcggaaccg gtgaccacca ccgttgagaa ctacggtggc 60
gaaacccagg ttcaacgtcg ttatcacacc gacgtgggtt tctgatgga tcgttttgtg 120
cagatcaagc cggttggccc gaccacgtg attgacctga tgcagacca ccaacacggt 180
ctggttggcg cgatgctgcg tgcggcgacc tactatttca gcgatctgga gatcgtggtt 240
aaccacaccg gtaacctgac ctgggtgccg aacggtgcgc cggaagcggc gctgcaaac 300
accagcaacc cgaccgcgta ccacaaggcg ccgtttaccg gtctggcgct gccgtatacc 360
gcgccgcacc gtgtgctggc gaccgtttac agcgttacca gcaaataatag cgcgccgcag 420

```


aaccgtcgtg gtagacctggg tccgctggcg gcgcgtctgg cggcgcaact gccggcgagc 480
ttcaactttg gcgcgatccg tgcgaccgag attcgtgaac tgctggttcg tatgaagcgt 540
gcggagctgt actgcccgcg tccgctgctg gcggtggaag ttagcagcca ggatcgtcac 600
aagcaaaaaa tcattgcgcc ggcgaaacag 630

<210> 3

<211> 663

<212> DNA

<213> A型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP3)

<400> 3

ggtatcgtgc cggttgctg cagcgacggt tacggtggcc tggtgaccac cgacccgaag 60
accgcggatc cggcgtagcg catggtttat aaccgcgcg gtaccaacta tccgggtcgt 120
ttcaccaacc tgctggatgt ggcgaggcg tgcccgacct tcctgtgctt tgacgatggc 180
aaaccgtaca ttgttaccg taccgacgaa cagcgtctgc tggcgaagtt tgatctgagc 240
ctggcgggcg aacacatgag caacacctac ctgagcggta tcgcgcagta ctatgcgcaa 300
tatagcggca ccattaacct gcacttcattg tttaccggta gcaccgacag caaggcgctg 360
tacatggtgg cgtatgttcc gccgggcgtg gagacccgc cggacacccc ggaaaaggcg 420
gcgcactgca tccacgcgga gtgggatacc ggtctgaaca gcaaattcac ctttagcatt 480
ccgtatgtta gcgcggcgga ctacgcgtat accgcgagcg atgaggcgga aaccaccaac 540
gtgcagggct gggtttgcat ctaccaaatt acccacggca aggcggagca ggataccctg 600
gtggttagcg tgagcgcggg taaagacttc gaactgcgtc tgccgatcga tccgcgtgcg 660
caa 663

专利名称(译)	基于病毒样颗粒的A型口蹄疫病毒抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109799343A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201811492102.4	申请日	2018-12-07
[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	郭慧琛 孙世琪 白满元 张韵 张禹 茹嘉喜 杨志元 王蕊 何继军 罗建勋		
发明人	郭慧琛 孙世琪 白满元 张韵 张禹 茹嘉喜 杨志元 王蕊 何继军 罗建勋		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	张晋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种采用A型口蹄疫病毒样颗粒 (VLPs) 制备的检测试剂盒及制备方法。本发明的A型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有：包被A型口蹄疫病毒样颗粒的酶标板，HRP标记的兔抗、含有吐温和磷酸盐缓冲液的样品稀释液和洗涤液、TMB底物、阳性对照血清、阴性对照血清、以及浓硫酸与水混合的终止液。本发明相对现有技术具有更好的安全性、良好的免疫原性，以及更高的灵敏度及特异性。