



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102967703 A

(43) 申请公布日 2013.03.13

(21) 申请号 201210328006.2

(22) 申请日 2012.09.06

(71) 申请人 中国动物卫生与流行病学中心  
地址 266000 山东省青岛市市南区南京路  
369 号

(72) 发明人 龚振华 王志亮 路平 王丽萍  
包静月 王淑娟 李金明 单虎

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C07K 16/08(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 4 页  
序列表 2 页

(54) 发明名称

一种用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟  
抗原多因子血清

(57) 摘要

一种用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟  
抗原多因子血清,采用基因表达的结构蛋白 P72、  
K205R、P54、A104R 四种蛋白,经过化学纯化,用福  
氏不完全佐剂包被,分三批次肌肉免疫实验动物  
猪,一个月后采集猪血,分离血清,经过血清学检  
测,分装保存,将血清分装到 ELISA 试剂盒中,按  
照常规 ELISA 试验方法进行试验。

1. 一种用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于，采用基因表达的结构蛋白 P72、K205R、P54、A104R 四种蛋白，经过化学纯化，用福氏不完全佐剂包被，分三批次肌肉免疫实验动物猪，一个月后采集猪血，分离血清，经过血清学检测，分装保存。

2. 如权利要求 1 所述的用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于结构蛋白 P72 蛋白氨基酸序列如下：

```
1   vsvegtsgpl lcnihdlhkp hqskpiltde ndtqrtsht npkflsqhfp enshniqtg
61  kqditpitda tyldirrvnh yscngpqtprk yyqpplalwi klrfwfnenv nlaipsvsip
121 fgerfitikl asqkdlvnef pg。
```

3. 如权利要求 1 所述的用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于：结构蛋白 K205R 蛋白氨基酸序列如下：

```
1   mvepreqffq dllsavidqpm dtvknidkdi mkektsfmvs fenfierydtmekniqdlqn
61  kyeemaanlm tvmtdtkiql gaiiaqleil mingtplpak kttikeamplpsntnneqt
121 sppasgktse tpkknptnam fftrsewass ntfrekfltp eiqaildeqfanktgierlh
181 aeglymwrtq fsdeqkkmvk emmkk。
```

4. 如权利要求 1 所述的用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于结构蛋白 P54 蛋白氨基酸序列如下：

```
1   mdseffqpyv prhygeclss tptpsffsth mytiliaivv lliiiiivliy lfssrkkkaa
61  aaieeediqf inpyqdqwa gvppqpgiak pagattgsvs kpvmrptitnnpvmrptvt
121 hpvtdrlvtd klgmtatgepa aasapahsae pyttvtqtnt asqtmsaienlrqrstythk
181 dlensl。
```

5. 如权利要求 1 所述的用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于：结构蛋白 A104R 蛋白氨基酸序列如下：

```
1   mstkkkptit kqelyslvaa dtqlnkalie riftsqkkii qnalkhnqeviippgikftv
61  vtvkakparq ghnpatgepi qikakpehka vkiralkpvh dmln。
```

6. 如权利要求 1 所述的用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于：阳性血清的使用方法：

- 1) 通过棋盘法试验确定该阳性血清的最佳攻毒浓度；
- 2) 将血清分装到 ELISA 试剂盒中，按照常规 ELISA 试验方法进行试验。

7. 如权利要求 1 所述的用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清，其特征在于 ELISA 试验方法如下：

1) 包被：抗原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液作 1:80 稀释，加入酶标板，100  $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过夜；

2) 封闭：酶标板用 PBST 洗三次后，加入含 1% BSA 的 PBST 封闭液进行封闭，每孔 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1h；

3) 加血清：每次 ELISA 试验均设立阳性对照和阴性对照，阳性对照孔加阳性血清，阴性对照孔加阴性血清。其它孔加检测血清样品，用血清稀释液对血清作 1:20 稀释后加入酶标板，每孔 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1h；

4) 加酶标抗体：将酶标抗体 (RHP 一羊抗猪 IgG) 用 PBsT 作 1:800 稀释后加入酶标板，

每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h ;

5) 加底物液 :每孔加底物反应液 100 $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min ;6) 终止反应 :加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 每孔 50 $\mu$  l, 摇匀后测 OD 值。

## 一种用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种血清,尤其是用于 ELISA 诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清。

### 背景技术

[0002] 非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒引起的猪的一种烈性传染病,可以引起猪群 100% 发病率和死亡率,目前国内外无有效的疫苗用于防疫这一疾病,该病被国际兽疫局列为 A 类动物疫病。该病主要在非洲和欧洲国家流行,并造成巨大的经济损失。一旦发病,只能采取封锁、扑杀和销毁的措施。上世纪八十年代,马而他发生非洲猪瘟,最终导致其国内当年所有生猪全部被屠宰焚烧。我国从未有过非洲猪瘟,应当对于非洲猪瘟保持高度警惕,因为非洲猪瘟病毒的传播速度快、传播媒介多种多样。尤其值得关注的是,2007 年 5 月,格鲁吉亚发生了非洲猪瘟,此后,在不到一年的时间里,非洲猪瘟传播到了亚美尼亚、阿塞拜疆、俄罗斯等前苏联地区,在这一地区形成了一个新的非洲猪瘟流行区域。在当前情况下,我国应当加强可能造成非洲猪瘟感染的所有进出境检疫和消毒,监控与俄罗斯接壤地区野生动物流动,进行适当的非洲猪瘟监控和流行病学调查。

[0003] 诊断技术对于非洲猪瘟的防疫至关重要,先进诊断技术有助于对于感染地区及其周边地区进行监控,严格控制非洲猪瘟从境外传入,快速划定感染区和受威胁区,进行详细的流行病学调查。国外最常用的诊断技术是 ELISA,此方法既可以检测血清,也可检测组织液,可用于诊断、监测和流行病学调查。

[0004] 国内现无成型的非洲猪瘟血清学 ELISA 诊断技术产品,主要原因为缺少阳性对照血清,因为非洲猪瘟的血清型诊断试剂盒首先需要有阳性血清作为实验对照。一方面,我国没有发生过非洲猪瘟,没有实验室保存的非洲猪瘟病毒;另一方面,非洲猪瘟是 A 类动物病,目前也没有从国外引进研究用病毒。所以国内无法通过实验技术生产非洲猪瘟的人工感染血清。到目前为止,国内所采用的非洲猪瘟 ELISA 诊断试剂盒都是高价从国外购买,每份猪血清样品的检测花费超过 200 元人民币,远远超过养殖户甚至是研究所的使用该诊断试剂所能承受的经济压力。

[0005] 生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清彻底解决我国无法生产非洲猪瘟诊断试剂盒的瓶颈,目前可行的方法有两种,一种方法是从国外高价购买阳性血清,另外一种方法是通过生物技术制备抗原,通过动物接种,技术研制具有高度生物安全性、低成本的、适合于诊断试剂开放的阳性对照血清。而第一种方法,除了要花费高成本,还要解决从国外引进非洲猪瘟阳性血清所带来的生物安全威胁以及贸易技术壁垒的种种不利,不适于开发诊断试剂,而后者为自己创新方法,构思独特,技术严谨,在理论上可行,表达蛋白融合了本实验室现有的基础条件和优势,生产低成本诊断用阳性对照血清,则具备开发诊断试剂盒的先天条件。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的之一是通过以下技术方案来实现的：

[0007] 采用基因表达的结构蛋白 P72、K205R、P54、A104R 四种蛋白，经过化学纯化，用福氏不完全佐剂包被，分三批次肌肉免疫实验动物猪，一个月后采集猪血，分离血清，经过血清学检测，分装保存。

[0008] 四种表达的结构蛋白 P72、K205R、P54、A104R 蛋白氨基酸序列如下：

[0009] 1、P72

[0010] 1 vsvegtsgpl lcnihdlhkp hqskpiltde ndtqrtsht npkflsqhfpenshniqtg

[0011] 61 kqditpitda tyldirrvnh yscngpqtprk yyqplalwi klrfwfnenvnlaiipsvsip

[0012] 121 fgerfitikl asqkdlvnef pg

[0013] 2、K205R

[0014] 1 mvepreqffq dllsavidqpm dtvknidkdi mkektsfmvs fenfierydtmekniqdlqn

[0015] 61 kyeemaanlm tvmtdtkiql gaiiaqleil mingtplpak ktikeamplp ssntneqt

[0016] 121 sppasgktse tpkknptnam fftrsewass ntfrekfltp eiqaildeqfanktgierlh

[0017] 181 aeglymwrtq fsdeqkkmvk emmkk

[0018] 3、P54

[0019] 1 mdseffqpvy prhygeclss tptpsffsth mytiliaivv liiiiiivliy lfssrkkkaa

[0020] 61 aaieeediqf inpyqdqwa gvppqpgiak pagattgsvs kpvmrpitnnpvmrprvt

[0021] 121 hpvtdrlvtd klgmtgepa aasapahsae pyttvtqtnt asqtmsaienlrqrstythk

[0022] 181 dlensl

[0023] 4、A104R

[0024] 1 mstkkkptit kqelyslvaa dtqlnkaliie riftsqkkii qnalkhnqev iippgikftv

[0025] 61 vtvkakparq ghnpatgepi qikakpehka vkiralkpvh dmln

[0026] 生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清制备方法所制备的血清主要用于 ELISA 诊断试剂盒的阳性血清。

[0027] 1、通过棋盘法试验确定该阳性血清的最佳攻毒浓度。

[0028] 2、将血清分装到 ELISA 试剂盒中，按照常规 ELISA 试验方法进行试验。

[0029] 非洲猪瘟抗原多因子血清 ELISA 试验方法如下：

[0030] 1、包被：抗原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液作 1:80 稀释，加入酶标板，100  $\mu$  l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。

[0031] 2、封闭：酶标板用 PBST 洗三次后，加入含 1% BSA 的 PBST 封闭液进行封闭，每孔 100  $\mu$  l，37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1h。

[0032] 3、加血清：每次 ELISA 试验均设立阳性对照和阴性对照，阳性对照孔加阳性血清，阴性对照孔加阴性血清。其它孔加检测血清样品，用血清稀释液对血清作 1:20 稀释后加入酶标板，每孔 100  $\mu$  l，37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1h。

[0033] 4、加酶标抗体：将酶标抗体（RHP 一羊抗猪 IgG）用 PBsT 作 1:800 稀释后加入酶标板，每孔 100  $\mu$  l，37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0034] 5、加底物液：每孔加底物反应液 100  $\mu$  l，37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min。

[0035] 6、终止反应：加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，每孔 50  $\mu$  l，摇匀后测 OD 值。

## 具体实施方式

[0036] 以下对本发明的优选实施例进行详细的描述；应当理解，优选实施例仅为了说明本发明，而不是为了限制本发明的保护范围。

[0037] 采用基因表达的结构蛋白 P72、K205R、P54、A104R 四种蛋白，经过化学纯化，用福氏不完全佐剂包被，分三批次肌肉免疫实验动物猪，一个月后采集猪血，分离血清，经过血清学检测，分装保存。

[0038] 四种表达的结构蛋白 P72、K205R、P54、A104R 蛋白氨基酸序列如下：

[0039] 1、P72

[0040] 1 vsvegtsgpl lcnihdlhkp hqskpiltde ndtqrtsht npkflsqhfp enshniqtag

[0041] 61 kqditpitda tyldirrvnh yscngpqtqk yyqplalwi klrfwfnenvnlaipsvsip

[0042] 121 fgerfitikl asqkdlvnef pg

[0043] 2、K205R

[0044] 1 mvepreqffq dllsavidqmq dtvknidkdi mkektsfmvs fenfierydtmekniqdlqn

[0045] 61 kyeemaanlm tvmtdtkiql gaiiaqleil mingtplpak kttikeamplpsntnneqt

[0046] 121 sppasgktse tpkknptnam fftrsewass ntfrekfltp eiqaildeqfanktgierlh

[0047] 181 aeglymwrtq fsdeqkkmvk emmkk

[0048] 3、P54

[0049] 1 mdseffqpvy prhygeclss tptpsffsth mytiliaivv liiiiivliy lfssrkkkaa

[0050] 61 aaieeediqf inpyqdqqa gvppqpgiak pagattgsvs kpvmrptitnnpvmrptvn

[0051] 121 hpvtdrlvtd klgmtgepa aasapahsae pyttvtqtnt asqtmsaienlrqrstythk

[0052] 181 dlensl

[0053] 4、A104R

[0054] 1 mstkkkptit kqelyslvaa dtqlnkalie riftsqkkii qnalkhnqev iippgikftv

[0055] 61 vtvkakparq ghnpatgepi qikakpehka vkiralkpvh dmln

[0056] 生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清制备方法所制备的血清主要用于 ELISA 诊断试剂盒的阳性血清。

[0057] 1、通过棋盘法试验确定该阳性血清的最佳攻毒浓度。

[0058] 2、将血清分装到 ELISA 试剂盒中，按照常规 ELISA 试验方法进行试验。

[0059] 非洲猪瘟抗原多因子血清 ELISA 试验方法如下：

[0060] 1、包被：抗原用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液作 1:80 稀释，加入酶标板，100  $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。

[0061] 2、封闭：酶标板用 PBST 洗三次后，加入含 1% BSA 的 PBST 封闭液进行封闭，每孔 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1h。

[0062] 3、加血清：每次 ELISA 试验均设立阳性对照和阴性对照，阳性对照孔加阳性血清，阴性对照孔加阴性血清。其它孔加检测血清样品，用血清稀释液对血清作 1:20 稀释后加入酶标板，每孔 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 湿盒内反应 1h。

[0063] 4、加酶标抗体：将酶标抗体（RHP 一羊抗猪 IgG）用 PBST 作 1:800 稀释后加入酶标板，每孔 100  $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

- [0064] 5、加底物液：每孔加底物反应液 100  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15min。
- [0065] 6、终止反应：加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 每孔 50  $\mu$  l, 摇匀后测 OD 值。

<400> 1

1 vsvegtsgpl lenihdlhkp hqskpiltde ndtqrtesht npkflsqhfp enshniqtag  
61 kqditpitda tyldirrvnh yscngpqtphk yyqplalwi klrfwfnenv nlaipsvsip  
121 fgerfitikl asqkdlvnef pg

<400> 2

1 mvepreqffq dllsavgqm dtvkndikdi mkektsfmvs fenfierydt mekniqudlqn  
61 kyeemaanlm tvmtdtkiql gaiiaqleil mingtplpak ktikeampl pssntnneqt  
121 sppasgktse tpkknptnam fftrsewass ntfrekfltp eiqaildeqf anktgierlh  
181 aeglymwrtq fsdeqkkmvk emmkk。

<400> 3

1 mdseffqpyv prhygeclss tptpsffsth mytiliaivv liiiiivliy lfssrkkkaa  
61 aaieeediqf inpyqdqqa gvppqgiak pagattgsvs kpvmrdrpitn npvmrdrptn  
121 hpvtdrlvtd klmatgepa aasapahsae pyttvtqtnt asqtmsaien lrqrstythk  
181 dlensl

<400>4

1 mstkkkptit kqelyslvaa dtqlnkalie riftsqkkii qnalkhnqev iipgikftv  
61 vtvkakparq ghnpatgepi qikakpehka vkiralkpvh dmln  
SEQUENCE LISTING

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 142

<212> PRT

<213> P72 蛋白

<400> 1

1 vsvegtsgpl lenihdlhkp hqskpiltde ndtqrtesht npkflsqhfp enshniqtag  
61 kqditpitda tyldirrvnh yscngpqtphk yyqplalwi klrfwfnenv nlaipsvsip  
121 fgerfitikl asqkdlvnef pg

<210> 2

<211> 205

<212> PRT

<213> K205R 蛋白

<400> 2

1 mvepreqffq dllsavidqpm dtvknidiki mkektsfmvs fenfierydt meknidqln  
61 kyeemaanlm tvmtdtkiql gaiiaqleil mingtplpak kttikeampl pssntnneqt  
121 sppasgktse tpkknptnam fftrsewass ntfrekfltp eiqaildeqf anktgierlh  
181 aeglymwrtq fsdeqkkmvk emmkk

<210> 3

<211> 186

<212> PRT

<213> P54 蛋白

<400> 3

1 mdseffqpvv prhygeclss tptpsffsth mytiliaivv liiiiivliy lfssrkkkaa  
61 aaieeediqf inpyqdqwa gvppqpgiak pagattgsvs kpvmrpitn npvmrptvn  
121 hpvtdrlvtd klgmtgepa aasapahsae pyttvtqtnt asqtmsaien lrqrstythk  
181 dlensl

<210> 4

<211> 104

<212> PRT

<213> A104R 蛋白

<400> 4

1 mstkkkptit kqelyslvaa dtqlnkalie riftsqkkii qnalkhnqev iippgikftv  
61 vtvkakparq ghnpatgepi qikakpehka vkiralkpvh dmln

专利名称(译)	一种用于ELISA诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清		
公开(公告)号	<a href="#">CN102967703A</a>	公开(公告)日	2013-03-13
申请号	CN201210328006.2	申请日	2012-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国动物卫生与流行病学中心		
申请(专利权)人(译)	中国动物卫生与流行病学中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国动物卫生与流行病学中心		
[标]发明人	龚振华 王志亮 路平 王丽萍 包静月 王淑娟 李金明 单虎		
发明人	龚振华 王志亮 路平 王丽萍 包静月 王淑娟 李金明 单虎		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 C07K16/08 C07K16/06		
其他公开文献	CN102967703B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种用于ELISA诊断的生物安全性非洲猪瘟抗原多因子血清,采用基因表达的结构蛋白P72、K205R、P54、A104R四种蛋白,经过化学纯化,用福氏不完全佐剂包被,分三批次肌肉免疫实验动物猪,一个月后采集猪血,分离血清,经过血清学检测,分装保存,将血清分装到ELISA试剂盒中,按照常规ELISA试验方法进行试验。