



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109799344 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201811492103.9

(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 孙世琪 张韵 郭慧琛 白满元
董虎 茹嘉喜 杨志元 侯凤萍

(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

一种基于Asia I型口蹄疫病毒样颗粒的竞争ELISA抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种采用Asia I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Asia I型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有:包被Asia I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。本发明具有更高的敏感性、特异性和可重复性,而且由于VLPs不含有遗传物质,不能自我复制,因此该方法具有更好的安全性。

1. 一种Asia I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Asia I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Asia I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Asia I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Asia I型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征内在于酶标板包被的Asia I型口蹄疫病毒样颗粒是由Asia I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。

4. 根据权利要求2或3所述的Asia I型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征内在于其中的酶标板用0.05% (pH=9.6) 的碳酸盐包被缓冲液将Asia I型FMDV VLPs稀释为0.5 $\mu\text{g/mL}$,以每孔100 μL 的量加入酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱封闭1 h,洗板3次,干燥,真空包装。

一种基于Asia I型口蹄疫病毒样颗粒的竞争ELISA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用Asia I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)引起的人兽共患的一种急性、热性、高度接触性传染病。口蹄疫病毒现有A、O、C型(欧洲型)、SAT1、SAT2、SAT3(非洲型)和Asia I型(亚洲型等)7个互无交叉免疫的血清型。在长期进化过程中,产生了许多突变株,目前已有80多种亚型,同一血清型内的不同亚型或分离株的抗原性皆有不同程度的差别,血清学交叉反应的程度也各不相同,这种特性给口蹄疫的诊断和防治带来极大的困难。从根本上控制口蹄疫的发生和流行,首先要加强对口蹄疫诊断学的研究,为控制口蹄疫疫病提供技术支持。

[0003] 固相竞争ELISA法是世界动物卫生组织推荐的标准方法。通过筛选和制备关键标识物-----型特异性抗原和抗体,解决型间交叉、稳定性差的问题。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,但是以完整病毒粒子作为抗原存在安全风险,单个蛋白或多肽的免疫原性相对较差。

[0004] 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。

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Asia I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Asia I型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有:包被Asia I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] 优选地,本发明的Asia I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Asia I型口蹄疫病毒样颗粒是由Asia I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。

[0008] 优选地,本发明的Asia I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将VLPs按包被量为每孔0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 均匀的包被在酶标板孔上,37 $^{\circ}\text{C}$ 1h+4 $^{\circ}\text{C}$ 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10% milk 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 。

[0009] 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Asia I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。

[0010] 本发明使用的抗原由Asia I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,所以相对于以单个蛋白或多肽作为抗原,因此本发明具有更好的检测敏感性和特异性,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分别为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。

[0011] 本发明具有如下优点:

本发明首次用Asia I型口蹄疫的病毒样颗粒作为包被抗原,建立了可检测猪Asia I型口蹄疫的试剂盒,可对血清中的猪Asia I型口蹄疫的抗体水平进行快速检测;

VLPs在组装过程中会形成单个蛋白不具有的立体结构,并且可以重复且高密度的展示抗原位点,因此相对于单个蛋白,以VLPs为包被抗原的ELISA方法具有更高的敏感性、特异性和可重复性,结果稳定。可应用于猪Asia I型口蹄疫的抗体水平监测,了解整个猪群Asia I型口蹄疫抗体的状况;

本发明采用的病毒样颗粒相对于灭活病毒而言,不含有遗传物质,不能自主复制,因此对操作者和环境安全无害、无传染性;

本发明方法使用HRP标记兔抗Asia I型口蹄疫病毒VLPs的IgG,利用该试剂盒检测过程中,使用已包被好的酶标板,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。

[0012] 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

[0013] 以下结合实施例解说本发明。

[0014] 1.Asia I型口蹄疫病毒VLPs的制备

1) 重组VLPs蛋白的表达

a.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10μg/mL卡那霉素、50μg/mL氨苄青霉素和25μg/mL氯霉素的经高压灭菌的新鲜LB液体培养基中,在37℃、220r/min摇床上过夜培养。

[0015] b.次日再将过夜培养的表达菌接种含有10μg/mL卡那霉素、50μg/mL氨苄青霉素和25 μg/mL氯霉素的经高压灭菌的新鲜LB液体培养基中,在37℃、220r/min摇床上摇至菌液D600值为0.6~0.8。

[0016] c.加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG,并于16℃条件下诱导16h,收集菌体,超声破碎、离心收集上清。

[0017] 2) 重组VLPs蛋白的亲和层析纯化

收集的上清与Ni²⁺亲和层析树脂的层析柱结合1h。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,然后用漂洗液洗脱与 Ni^{2+} 柱非特异性结合的杂蛋白。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,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°C 保存备用。

[0018] 3) VLPs的体外制备

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,混匀后加入到截留分子量为8 kD的透析袋中,将酶切体系置于磁力搅拌器上轻微旋转, 4°C 过夜透析,切除标签蛋白。将切除标签蛋白的样品装入截留分子量为8 kD的透析袋中,透析袋置于500 ml组装Buffer (250 mmol / L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl 20 mmol / L Imidazole, 1 mmol/L CaCl_2 , 2 mmol/L DTT, 0.1% Triton X-100, pH 8.4) 中,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。

[0019] 4) 使用透射电镜(TEM)分析鉴定VLPs

取蔗糖密度梯度离心后的25 μg VLPs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。

[0020] 2. IgG的制备、纯化及HRP标记

1) 高免血清的制备

将4只实验兔分为两组,A组(3只)为实验组,B组(1只)为对照组。第1次免疫,将纯化后的Asia I型口蹄疫VLPs用PBS稀释成0.2mg/ml,与等体积的弗氏完全佐剂混合并完全乳化后免疫健康家兔,于脊部皮下肌肉多点注射,每只免疫1ml;隔14d进行第2次免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,方法剂量同上。隔14d后进行第3次免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,方法剂量同第2次免疫相同。隔14d后进行第4次免疫,佐剂为弗氏完全佐剂,方法剂量同上。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。最后一次抗原免疫后第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。

[0021] 2) IgG的纯化和HRP标记

饱和硫酸铵沉淀法和Protein A亲和层析法分离纯化IgG:

a. 在10mL抗血清中加入等体积的PBS,边搅拌边滴加5mL的饱和硫酸铵,搅拌20min后 4°C 静置30min。3500rpm离心30min,弃去沉淀,留下上清。在上清中边搅拌边滴加等体积的饱和硫酸铵,搅拌20min后 4°C 静置30min。3500rpm离心30min,弃去上清,收集沉淀,将沉淀用PBS溶解至10mL,边搅拌边滴加5.4 mL饱和硫酸铵,同上操作,重复3次。

[0022] b. 将沉淀用PBS溶解,装入透析袋中,置于20倍体积的PBS溶液(pH值8.0)中, 4°C 透析24h,每隔3-6h换液。收集脱盐后的抗体溶液,用0.22 μm 的滤膜过滤。

[0023] c. 将Protein A亲和层析柱固定于蛋白纯化仪,用10倍体积的超纯水清洗,再用10倍体积0.02mol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液平衡柱床,洗出液的盐浓度、PH值与起始缓冲液相同时,用注射器将1mL经饱和硫酸铵法分离的IgG样品注入。用10倍柱体积的0.02mol/L, pH=7.4的磷酸盐缓冲液洗脱杂蛋白。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50 μl 的1mol/L、pH=9.0的Tris-HCL缓冲液。

[0024] d. 取血清和纯化后的IgG进行SDS-PAGE电泳,凝胶染色,脱色。

[0025] 3) 简易过碘酸钠法制备兔抗Asia I型口蹄疫VLPs IgG-HRP:

a. 将5mg HRP溶于0.5 mL蒸馏水中,加入新配制的0.5mL的过碘酸钠(0.1M),混匀,4℃静置30min。

[0026] b. 加入0.16M乙二醇溶液,混匀,室温静置30min。

[0027] c. 加入含5mg IgG的水溶液1mL,混匀,装入透析袋,在PH 9.5的碳酸盐缓冲液中4℃透析过夜。

[0028] d. 吸出液体,加入0.2mL新配的5mg/mL的硼氢化钠溶液,混匀,4℃静置2h。

[0029] e. 在液体中逐滴加入等体积的饱和硫酸铵,4℃静置1h。

[0030] f. 3000r/min离心半小时,弃上清,将沉淀溶于少量PBS(0.015M,pH7.4)中,装入透析袋中,透析过夜,以去除铵离子。

[0031] g. 于10000r/min离心30min,去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装,-20℃保存。

[0032] 3. Asia I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:

a. 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、350μg/mL的BSA,在酶标板上每孔加入20μL稀释成不同浓度的BSA标准品,做1孔重复孔,再每孔加入200μL Bradford 染色液后混匀,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。

[0033] b. ELISA最佳反应条件的优化

最佳抗原包被量及抗体稀释度的优化:用0.05% pH 9.6的碳酸盐包被缓冲液将定量的Asia I型口蹄疫 VLPs稀释为0.1、0.5、1.0、1.5、2μg/ml,酶标抗体稀释为1:10000、1:20000、1:30000、1:40000,经方阵法在其他条件相同的情况下,根据P/N值确定抗原最佳包被量为0.5μg/ml,抗体最佳稀释度为1:20000。

[0034] 抗原最佳包被时间的优化:将抗原用最佳包被量分别于37℃2h+4℃过夜、37℃1h+4℃过夜、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37℃1h+4℃过夜。

[0035] 最佳封闭剂的优化:用5% milk+5%小牛血清、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对包被的酶标板分别进行封闭,在其他条件相同的情况下,根据P/N值确定最佳封闭剂为10% milk。

[0036] 最佳封闭时间的优化:用最佳封闭剂对包被好的酶标板分别封闭37℃2h、37℃1h、37℃2h+4℃过夜、37℃1h+4℃过夜,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。

[0037] 最佳酶标抗体作用时间的优化:将阴、阳性对照血清分别按最佳浓度稀释后,37℃分别作用30、45、60、90min,在其他条件相同的情况下,根据P/N值确定最佳抗体作用时间为30min。

[0038] 最佳显色时间的确定:将TMB溶液在其他条件相同的情况下,加入反应体系,分别在37℃条件下避光显色5、10、15、30、60min,根据P/N值确定最佳显色时间为15min。

[0039] c. ELISA方法阴阳性判定标准的建立

用建立的ELISA方法对300份阴性和阳性猪血清分别检测3次,并统计每个样本不同稀释度的抑制率(PI)。PI=(阴性对照OD-样本OD)/(阴性对照OD-阳性对照OD)*100%。将血清

PI值 $\geq 35\%$ 设定为临界值,IR值 $\geq 35\%$ 判定为阳性,IR $< 35\%$ 判定为阴性。

[0040] d.交叉反应试验(特异性):用包被好的酶标板同时检测Asia I型口蹄疫病毒、O型口蹄疫病毒、A型口蹄疫病毒、SAT1型口蹄疫病毒、SAT2型口蹄疫病毒、SAT3型口蹄疫病毒、猪圆环病毒2型阳性血清,分析本方法与其他的猪病毒没有交叉反应。

[0041] e.敏感性和符合率分析:用建立的ELISA方法检测50份不同抗体效价的血清样本,与荷兰赛迪公司生产的Asia I型口蹄疫抗体ELISA检测试剂盒的检测结果相比,其敏感性为91.67%、特异性为96.67%、符合率为97.56%。

[0042] f.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,根据计算的标准差和变异系数,结果显示其变异系数分别小于5%、10%,表明本试剂盒具有很好的可重复性。

[0043] 2)酶标板的制备:

将VLPs按包被量为每孔0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 均匀的包被在酶标板孔上,37 $^{\circ}\text{C}$ 1h+4 $^{\circ}\text{C}$ 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10% milk 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 ;

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pH7.2-7.4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酶底物:1,2-二氨基苯溶液(TMB),100ml去离子水中先溶解一颗磷酸盐缓冲液胶囊,充分溶解后加入一片TMB片剂,使之完全溶解后即得;④终止液:取54.34ml浓度为98%的浓硫酸加蒸馏水至1000ml即可得2N H_2SO_4 。

[0044] 4. Asia I型口蹄疫VLPs 竞争ELISA抗体检测试剂盒的操作步骤:

1)加样:酶标板每孔加50 μl 待测样本随后再加入50 μl HRP酶标抗体,同时设置阳性和阴性对照液,每孔建议设置2孔。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。

[0045] 洗涤:取出酶标板,将其甩干;每孔加入300 μl 洗涤液洗板3次,甩干。

[0046] 显色:加入酶底物溶液,每孔50 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色15分钟。

[0047] 终止:加入终止液50 μl 。

[0048] 读值:利用酶标仪在450nm测定酶标板每孔的光吸收值OD₄₅₀。

[0049] 2)结果判定:

根据每孔光吸收值求出每份被检血清和同板对照的平均光吸收值,根据公式计算个样品抑制率(PI)值,PI=(阴性对照OD-样本OD)/(阴性对照OD-阳性对照OD)*100%。将血清PI值 $\geq 35\%$ 设定为临界值,IR值 $\geq 35\%$ 判定为阳性,IR $< 35\%$ 判定为阴性。

序列表

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种基于病毒样颗粒的Asia I型口蹄疫病毒检测试剂盒

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 909

<212> DNA

<213> 亚洲I型口蹄疫病毒的结构蛋白基因 (VP0)

<400> 1

```

ggagccgggc aatccagtc gccgaccggg tcgcagaacc agtcaggcaa tactggaagc 60
atcattaaca actactacat gcagcagtac cagaactcca tggacacgca acttgagat 120
aacgctatca gcggaggctc caacgagggt tccacggaca ccacgtccac acacacaaac 180
aacacccaaa acaatgattg gttctcacgc ttggccagct cggcctttag cggactgttt 240
ggtgctcttt tggctgacaa gaaaacggag gagacaactc tgcttgaaga ccgcattctc 300
accaccagaa atggccacac gacgtcgacg acacagtcga gtgttggcgt aacatatggt 360
tacgtgtgg ctgaggacgc ggtatctggg cctaacacct caggcctgga gaccgcgtg 420
acacaggctg aacggttctt caagaaacac ctgtttgact ggacgccgga tttgtcattt 480
ggacactgtc actacttga actcccctct gaacacaagg gcgtgtttgg cagcctcatg 540
agctcttatg cttacatgag gaacgggtgg gacattgagg tgaccgctgt tggaaatcag 600
ttcaatggtg gttgtctcct cgtcgactc gtgccggagc tgaaagagct cgacacgcgg 660
cagaagtatc agttaaccct cttccacac cagttcatta acccgcgcac taacatgacg 720
gctcacatta acgtgccgta cgtgggtgtc aacaggtacg accagtacga gtcacacaaa 780
ccgtggacgc ttgtggtgat ggtggtggcc ccgcttaccg tcaaaactgg tggttctgaa 840
cagatcaagg tctacatgaa tgcagcgccg acctacgtgc acgtggcagg agaactgccc 900
tcgaaagag 909

```

<210> 2

<211> 633

<212> DNA

<213> 亚洲I型口蹄疫病毒的结构蛋白基因 (VP1)

<400> 2

```

actaccacca ctggcgagtc cgcggacca gtcaccacca cggttgagaa ctacggagga 60
gagaccacaga cggcccgacg gttcacact gatgtcgct tcgttctcga caggttcgtg 120
aaactcacc agcccaagag caccacaaacc cttgatctca tgcagatccc ctacacaca 180
ctggctgggg cgcttctccg gtctgcgacg tactacttct cagacctgga ggttgcgctc 240
gtccacacag gaccggtcac gtgggtgccc aatggtgcgc ccaagaccgc cttgaacaac 300
cacaccaacc cgactgctta ccagaagcag cctatcacc gcttggcact cccctacacc 360
gctccccacc gtgtgctgtc aacagtgtac aacgggaaga caacgtacgg agaagaatcc 420

```


tcgcggcgtg gtgatctcgc cgcccttgca cgcagagtga acaaccggct gcccacttcc 480
ttcaactacg gcgctgtgaa ggccgacacc atcacggagc tggtgatccg catgaagcgt 540
gcggaaacat actgccccag gcccttgctg gctcttgaca ccacacaaga ccgccgtaaa 600
cagaagatca ttgcacctga gaaacagact ttg 633

<210> 3

<211> 657

<212> DNA

<213> 亚洲I型口蹄疫病毒的结构蛋白基因 (VP3)

<400> 3

gggatatgtc ctgtggcgtg tgtggacggc tacggcaaca tggtaaccac ggacccgaag 60
acggctgacc ccgtctacgg gaaagtgtct aaccccccca gaacaagctt ccctgggcgc 120
ttcacaaact tccttgatgt agcggaggcg tgtccaacct tcttcgctt cggagaagta 180
ccatttgtga agacggtgaa ctctggtgac cgcttgcttg ccaagtttga cgtgtccctc 240
gctgcggggc acatgtccaa cacctacttg gcaggtttgg cgcagtacta cacacagtac 300
agcggcacta tgaatatcca cttcatgttc accggaccca cggatgcca agcccgtac 360
atggtggctt acatacctcc tggatgacg ccgccaacgg acccgagcg ggctgcacac 420
tgcattcatt ctgagtggga cactggactc aattctaaat ttacctttt tatcccttac 480
ctttctgctg cagactatgc ttacactgct tctgacgtgg ctgagaccac gagtgtgcag 540
ggatgggtgt gtatttacca gatcaccac ggaaaagctg aaggtgacgc gctggtcgtg 600
tccgtcagcg ctggcaagga ctttgagttt cgactgccgg tggatgcccc ccaacag 657

专利名称(译)	一种基于Asia I型口蹄疫病毒样颗粒的竞争ELISA抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109799344A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201811492103.9	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	孙世琪 张韵 郭慧琛 白满元 董虎 茹嘉喜 杨志元		
发明人	孙世琪 张韵 郭慧琛 白满元 董虎 茹嘉喜 杨志元 侯凤萍		
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Asia I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Asia I型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有：包被Asia I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。本发明具有更高的敏感性、特异性和可重复性，而且由于VLPs不含有遗传物质，不能自我复制，因此该方法具有更好的安全性。