



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799341 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201811491851.5

(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 张韵 孙世琪 董虎
白满元 侯凤萍 茹嘉喜

(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

一种检测南非2型口蹄疫病毒抗体的试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明公开一种采用南非2型口蹄疫病毒样颗粒(VLPs)制备的检测试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒的制备方法是将HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上,其内酶标板包被的南非2型口蹄疫病毒样颗粒是由南非2型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成。本发明采用的VLPs能高效组装,且不影响其诊断效率,有利于降低诊断制剂的成本。本发明方法相对现有技术的检测步骤有所减少,实验操作简单,工作量小,用时短,并可提高诊断试剂的特异性和敏感性。

1. 一种南非2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:包被南非2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所述的南非2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:用南非2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所述的南非2型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征在于试剂盒内的酶标板包被的南非2型口蹄疫病毒样颗粒是由南非2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所述的南非2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南非2型FMDV VLPs稀释为0.4 $\mu\text{g/mL}$,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30 min,洗板3次,干燥,真空包装。

一种检测南非2型口蹄疫病毒抗体的试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种南非2型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒。

背景技术

[0002] 口蹄疫在亚洲、非洲和中东以及南美洲均有发生,造成了巨大的经济损失,世界卫生组织将口蹄疫列为法定上报传染病。南非2型口蹄疫病毒 (SAT2) 是口蹄疫病毒属,小RNA病毒科的成员之一,该病毒主要在非洲南部和西部地区爆发,严重威胁周边地区畜牧业的发展。最近几十年在非洲大陆以外的周边地区相继出现南非2型口蹄疫病毒报道,这就说明该病毒已经出现了跨境传播的危险,2000年科威特和沙特出现了SAT2口蹄疫的疫情,2012年巴基斯坦和巴林岛也有SAT2口蹄疫病例出现。由此可见,SAT2-FMDV正威胁着世界各国,所以对于SAT2口蹄疫的预防、诊断就显得尤为重要。

[0003] 病毒样颗粒 (Virus like particles,VLPs) 作为最接近自然病毒粒子但不含病毒基因的类病毒颗粒在多个研究领域尽显其优势。病毒的衣壳蛋白或膜蛋白组装成VLPs后,可以作为抗原对抗体进行检测。组装后的VLPs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,因此相对于单个病毒蛋白,使用VLPs对抗体进行检测具有更高的灵敏度和特异性。并且VLPs具有类似天然病毒的结构,具有很强的免疫原性,以VLPs免疫动物可以获得高滴度的抗体,这种抗体可以用于相应病毒的免疫学检测。

[0004] 口蹄疫的血清学诊断技术是在流行病学调查技术体系中应用最为广泛的技术手段,它不仅能够在口蹄疫暴发和流行时结合其他血清学方法对疫情进行预测和判断,而且能够在口蹄疫疫苗免疫效力评估中发挥主要作用。目前,我国口蹄疫结构蛋白抗体检测主要用途是口蹄疫疫苗免疫效力评估。2004年OIE公布的口蹄疫血清学检测方法有三种:病毒中和试验(VNT)、液相阻断ELISA方法(LBE)和固相竞争ELISA(SCE)。病毒中和试验是三种方法中最为经典的方法,是评价其他方法的黄金标准;1986年,由口蹄疫世界参考实验室建立起来的液相阻断ELISA方法的敏感性、特异性和稳定性一直在国际上得到公认,是目前全球使用最广的口蹄疫血清学检测方法。2001年后发展起来的固相竞争ELISA方法其特异性好,操作时间短,操作更为简便,更适合大批量血清检测,2004年被OIE确定为口蹄疫血清学检测方法。

[0005] 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

[0006] 本发明提供一种可克服现有技术不足,用于检测南非2型口蹄疫病毒抗体的竞争ELISA检测试剂盒及其制备方法。

[0007] 本发明的南非2型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒内包括有:包被南非2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。

[0008] 本发明的南非2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：用南非2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。

[0009] 优选地，本发明的南非2型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法，其内酶标板包被的南非2型口蹄疫病毒样颗粒是由南非2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。

[0010] 优选地，本发明的南非2型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法，其酶标板制备是用0.05% (pH=9.6)的碳酸盐包被缓冲液将南非2型FMDV VLPs稀释为0.4 μg/mL，以每孔100 μL的量加入酶标板，4℃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℃恒温箱封闭30 min，洗板3次，干燥，真空包装。

[0011] 本发明具有如下优点：

1. 本发明首次用南非2型(SAT2)口蹄疫病毒样颗粒(VLPs)作为包被抗原，充分利用VLPs安全性高、免疫原性强，可以替代天然病毒在免疫学检测中发挥重要作用的特点，建立了可检测SAT2-FMDV抗体的竞争ELISA方法，对血清中的SAT2口蹄疫的抗体水平进行快速检测。由于VLPs的高效组装，既没有影响诊断效率，而且降低了诊断制剂的成本。

[0012] 2. 本发明方法使用HRP标记兔抗SAT2-FMDV VLPs的IgG，制作试剂盒过程中，酶标板为包被好的成品，所以实际操作步骤仅需两步，实验简便，易操作，用时较短，本方法用时大约在45min。(大多数竞争ELISA试剂盒的作用时间为1h左右，见专利CN105445457A、CN107064501A等)。

[0013] 3. 在提高了试验的特异性和敏感性方面，由于衣壳蛋白组装成VLPs后，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，因此使用VLPs对抗体进行检测具有更高的灵敏度和特异性，且避免宿主种类的问题。

[0014] 4. 本发明结合我国口岸对SAT2口蹄疫抗体检测、监测的需求，对SAT2-FMDV VLPs竞争ELISA抗体检测方法进行了研究，并建立了判定标准。

具体实施方式

[0015] 以下结合实例解说本发明。

[0016] 1. 南非2型口蹄疫病毒VLPs的制备

(1) 将由本实验室保存的南非2型口蹄疫病毒(参考GenBank中AJ251473毒株)阳性重组质粒pSMK-VP0VP3和pSMK-VP1共转化至感受态细胞 BL21 (DE3) -RIL，挑取单克隆菌落按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。VP0、VP1和VP3和基因序列分别为SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3。

[0017] (2) 将过夜培养的表达式菌接种到含上述3种抗生素的LB培养基中，于37℃下220 r/min的条件下培养至OD600值为0.6-0.7左右，留样1 ml 作为诱导前对照。

[0018] (3) 加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG，并于16℃条件下诱导16h。

[0019] (4) 诱导后的菌液4750 r/min，离心20 min后收取菌体，随后按1:50浓缩比例将

菌体悬浮于Buffer A(500mmol /L NaCl,20 mmol /L Tris-HCl,20 mmol /L Imidazole,2mmol /L DTT,0.05%TritonX-100,pH8.4),充分混匀后在冰上超声波处理6 min,然后10000 r/min 4℃下离心15 min 后收集上清。

[0020] (5)收集的上清按照His标签蛋白纯化试剂盒说明书纯化融合蛋白。

[0021] (6)收集洗脱液进行10% SDS-PAGE电泳,随后采用湿转法将重组蛋白转移至聚偏氟乙烯杂交膜(PVDF膜)上,用封闭液(PBS,5%脱脂奶粉,pH 7.0) 37℃条封闭1h,然后分别用抗His一抗(1:3000)和抗FLAG一抗(1:1000) 37℃孵育1h,PBST充分洗涤后分别用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG(1:6000)和山羊抗兔IgG(1:4000) 37℃孵育1h,PBST充分洗涤后于暗室内加入发光底物反应3min,置于Kozak胶片下曝光,显影及定影固定后,观察目的蛋白的表达情况。测定蛋白浓度后于-80℃保存备用。

[0022] (7)His-SUMO标签蛋白酶切反应在8000 MWC0的透析袋中进行。将纯化的SUMO融合蛋白和SUMO酶按照100:1的比例置于透析袋内,透析袋置于组装缓冲液(40 mmol /L Tris-HCl,500 mmol /L NaCl,1 mmol /L CaCl₂,pH 7.4) 中4℃透析14 h,整个缓冲体系应置于搅拌仪上,对缓冲液轻微搅动。

[0023] (8)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。

[0024] (9)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2.5 min后,滤纸除去多余液体,100 kV观察样品。

[0025] 2.高免血清的制备

(1)动物选择:1.8-2Kg左右健康雄性家兔4只,分为两组,实验组3只,对照组1只。

[0026] (2)抗原:将纯化后的SAT2口蹄疫VLPs用PBS稀释成0.2mg/mL,与等体积的佐剂混合并完全乳化成1mL,背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。

[0027] (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。

[0028] 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。

[0029] (2)平衡柱子:用5-10倍体积的磷酸缓冲液过Protein A柱。

[0030] (3)上样:用注射器将1mL准备好的血清样品注入。

[0031] (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。

[0032] (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。

[0033] (6)PBS透析收集的抗体。

[0034] 4. 过碘酸钠方法制备SAT2口蹄疫VLPs IgG-HRP

(1)称取5mgHRP溶解于1mL蒸馏水中。

[0035] (2) 于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20分钟。

[0036] (3) 将上述溶液装入透析袋中,对1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜。

[0037] (4) 加20μl 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg IgG在1ml 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光轻轻搅拌2小时。

[0038] (5) 加0.1ml新配的4mg/mL NaBH₄溶液,混匀,4℃静置2小时。然后将上述液装入透析袋中,对0.15M pH7.4 PBS透析,4℃过夜。

[0039] (6) 将上述透析液于10000r/min离心30min,去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装,-20℃保存。

[0040] 5. 竞争ELISA方法的建立

(1) 本方法建立的检测原理

采用竞争法,将SAT2-FMDV的VLPs包被于微孔板中,然后用1%BSA将酶标板封闭,同时加入待测样本和酶标抗体。样本中的SAT2-FMDV抗体和酶标抗体与96孔板中包被的VLPs竞争反应,SAT2-FMDV抗体和酶标抗体共同参与结合表位的竞争。随后,加入辣根过氧化物酶底物TMB显色,终止液终止反应,通过酶标仪在450nm波长下,测定各孔吸光度值,OD值的大小(终止显色反应后颜色的深浅)与待测样本中SAT2-FMDV抗体的含量成反比。

[0041] (2) 抗原包被浓度和血清稀释度的确定

采用棋盘滴定法将pH=9.6 0.05M的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液,将纯化的SAT2-FMDV VLPs稀释为0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7μg/mL,每个梯度各加两列,按100μL/孔加入微孔板中。4℃包被过夜,次日,弃去包被液,洗涤液洗涤3-4次后拍干,按120μL/孔加入1%BSA的封闭液,37℃静置30min后,洗涤甩干。将阴、阳性标准血清进行倍比稀释,浓度为1:2~1:521,每行一个梯度阴阳性在不同抗原浓度下各加1孔,每孔50 μL,同时每孔加入相同体积工作浓度的酶标抗体,室温下震荡混匀30s,置于37℃作用30 min,洗涤后每孔加入50 μL的TMB,置于37℃显色15 min后,每孔加入100μL终止液,酶标仪检测450nm吸光度值。根据P/N值确定抗原最佳包被浓度为0.4 μg/mL,血清最佳稀释度为1:64。

[0042] (3) 酶标抗体最佳稀释度确定

确定包被浓度后,将酶标抗体进行稀释,范围为1:10000、1:12000、1:14000、1:16000、1:18000、1:20000、1:22000、1:24000。在其他条件固定的情况下利用方阵滴定法,根据P/N值确定酶标抗体最佳稀释度为1:20000。

[0043] (4) 抗原包被时间及温度的优化

将抗原用最佳包浓度分别于4℃过夜包被、37℃包被1 h、37℃包被1.5 h、37℃包被2 h、37℃包被2.5 h、37℃包被3 h,计算P/N值,确定抗原最佳作用时间及温度为4℃包被过夜。

[0044] (5) 封闭液及封闭时间的确定

分别选用1%BSA、1%明胶、5%胎牛血清和5%脱脂奶粉进行竞争ELISA,选择最佳封闭液;37℃分别封闭30、45、60 min进行竞争ELISA,确定封闭时间。结果显示,1% BSA 37℃ 30 min 封闭效果最佳。

[0045] (6) 待检血清与酶标抗体最适作用时间的确定

在其他条件最有的情况下,将待检血清与酶标抗体均分别于37℃作用30、45、60 min进行竞争ELISA,来确定两者的最适作用时间。根据P/N值确定,待检血清与酶标抗体最适的作

用时间确定为37℃ 30 min。

[0046] (7) TMB作用时间及温度的优化

按固定的步骤加入TMB后在37℃分别作用10 min、15 min、20 min、25 min、30 min显色。根据P/N值确定TMB最佳作用时间及温度为37℃作用10 min。

[0047] (8) 竞争ELISA 阴阳临界值的确定

选择200份SAT2阴性血清,运用已优化的条件进行竞争ELISA。取各个样本的平均OD₄₅₀值,计算样本的抑制率(PI) = $(1 - OD_{450} \text{样本} / OD_{450} \text{阴性对照}) \times 100\%$ 。确定,血清PI $\geq 45\%$ 时,可判定为阳性;血清PI $\leq 40\%$ 时,可判定为阴性; $40\% < PI < 45\%$,为可疑。

[0048] (9) 特异性及重复性试验鉴定

用O型、Asia1型和A型FMDV阴阳性血清,PCV2阴阳性血清,PRRS阴阳性血清及ASFV阴阳性血清为待检血清进行竞争ELISA,计算PI%值判断特异性。结果显示,只有SAT2口蹄疫阳性血清能阻断酶标抗体与抗原的反应,其余血清均为阴性,表明建立的竞争ELISA特异性强。选4份不同效价的血清和阴阳性对照血清进行竞争ELISA,每份血清进行3个重复,选择同一块ELISA板进行板内重复、不同的ELISA板间进行板间重复。根据变异系数值,评价试验的重复性效果。结果显示其变异系数分别均小于10%,表明建立的单抗竞争ELISA 重复性较好。

[0049] (10) 敏感性试验鉴定

将VLPs按最佳包被质量浓度进行包被。对免疫猪血清样品100份,未免疫猪血清100份进行竞争ELISA。经计算阳性检出率为97%,阴性检出率为98%。

[0050] (11) 工作试剂的配置

血清稀释液:含有体积浓度0.1%吐温-20的0.01 mol/L及pH=7.2~7.4的磷酸盐缓冲液(PBS);洗涤液:在1000 mL的0.01 M PBS溶液中加入1 mL吐温-20(Tween-20);底物缓冲液(pH5.0磷酸柠檬酸):0.2M Na₂HPO₄ 25.7mL,0.1M柠檬酸24.3mL,加蒸馏水50mL;TMB(四甲基联苯胺)使用液:TMB(10mg/5mL无水乙醇)0.5mL,底物缓冲液10mL,0.75% H₂O₂ 32μL;终止液(2M H₂SO₄):取54.34mL浓度为98%的浓硫酸加蒸馏水至1000 mL。

序列表

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种检测南非2型口蹄疫病毒抗体的试剂盒及制备方法

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 912

<212> DNA

<213> 南非2型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP0)

<400> 1

```

ggcgcaggtc aatccagtcc ggcaacgggc tcgcagaacc aaagcggcaa cacgggctct 60
atcatcaata actactacat gcagcaatat cagaacagta tggataccca actgggtgac 120
aacgcgatta gtggcggttc caatgaaggc tcaacggaca ccacgtcgac gcataccaac 180
aatacccaga acaatgattg gttctccaaa ctggcgcaat cagccatctc gggcctgttt 240
ggtgcactgc tggctgacaa aaagaccgaa gaaaccacgc tgctggaaga tcgtattctg 300
accacgcgcc acggtaccac gaccagtacg acccagagct ctgtgggcat cacctatggt 360
tacgcggata gcgactcttt tcgtagcggc ccgaatacgt ctggtctgga aaccctgttt 420
gaacaagccg aacgcttttt caaagaaaag ctgttcgatt ggacgagtga caaacgttt 480
ggtaccctgt atgtgctgga actgccgcgt gatcataaag gcatttacgg caagctgacg 540
gactcctata cctacatgcg caacggctgg gatgtccaag tgagcgccac gtctacccaa 600
ttcaatggcg gttgcctgct ggttgcatg gttccggaac tgtgtagcct gaaagcccgt 660
gaagaatata agctgaccct gtaccgcgat caatttatca acccgcgac caatacgacc 720
gcacacctgc aggtcccgt tctgggcgtg aaccgtcatg atcagggtaa acgccaccaa 780
agttgggtccc tgggtggttat ggtgctgacc ccgccgacga ccgaagcaca gatgaatagc 840
ggtaccgttg aagtctatgc gaacattgcc ccgaccaatg tgtacgttgc ggtgaaactg 900
ccgggcaaac ag 912

```

<210> 2

<211> 651

<212> DNA

<213> 南非2型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP1)

<400> 2

```

atgacgacca gcgcaggtga aggtgccgaa gttgtcacga ccgatccgac gacccatggc 60
ggtaaagtta cgaccccgcg tcgcgtgcac accgatgttg ctttctgct ggaccgtagc 120
acgcatgtgc acaccaataa gaccacattt gaggttgatc tgatggacac caaagaaaag 180
gcactggttg gtgctatcct gcgctctgcg acctattact tctgcgatct ggaagttgcc 240
tgtgtcggca aacataagca cgtgttttgg cagccgaacg gtgcgccgcg tacgacccaa 300
ctgggtgata atccgatggt ttacagccgt aacaatgtca cgcgcttcgc gattccgttt 360
accgccccgc atcgctgct gtctaccgtt tataacggtg aatgcgaata caccaaacg 420

```


gtgaccgcca tccgtggcga tcgcgaagtt ctggcacaga aatattcatc ggctaagcac 480
agtctgccgt ccacgtttaa tttcggcttt gtgaccgcag ataaaccggt tgacgtctat 540
taccgtatga agcgcgctga actgtattgt ccgcgcgcgc tgctgccggc ctatacgcac 600
gcaggtcggg accgctttga tgctccgatt ggtgtggaga aacaactgct g 651

<210> 3

<211> 666

<212> DNA

<213> 南非2型口蹄疫病毒结构蛋白 (VP3)

<400> 3

ggtatcgccc cggtggcatg cgctgatggc tatggcggtt ttcaaaacac cgatccgaag 60
tctgcggacc cgatttatgg tcatgtttac aaccgcgcac gtaatgactg ccacggccgc 120
ttctcgaatc tgctggatgt cgcggaagcc tgtccgaccc tgctggattt tgacggcaaa 180
ccgtatgtcg tgacaaaaaa caatggtgat aaggttatgg cggccttcga cgtcgccttt 240
acgcataaag tgcacaagaa cacctatctg gcaggcctgg ctgattatta caccagctac 300
tcaggttcgc tgaattatca tttcatgtac acgggcccga cccatcacia agcaaagttt 360
atggctcgtt atgtgccgcc gggcatcgaa gttgaagaac tgccgaaaac cccggaagac 420
gcagctcatt gttaccacag tgaatgggat acgggtctga actccaattt taccttcgcg 480
gtgccgtatc tgagttccgg cgatttttca tacacgcata ccgacacgcc ggcaatggct 540
acgaccaacg gttgggttgt cgtgctgcag gtcaccgata cgcactcggc agaagcggcc 600
gttgctcgtga gcgtgtctgc tggcccggat ctggaatttc gtttcccgat tgaccgggtg 660
cgtcag 666

专利名称(译)	一种检测南非2型口蹄疫病毒抗体的试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN109799341A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201811491851.5	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 张韵 孙世琪 董虎 白满元 茹嘉喜		
发明人	郭慧琛 张韵 孙世琪 董虎 白满元 侯凤萍 茹嘉喜		
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南非2型口蹄疫病毒样颗粒 (VLPs) 制备的检测试剂盒及制备方法。本发明的试剂盒的制备方法是将HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上，其内酶标板包被的南非2型口蹄疫病毒样颗粒是由南非2型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成。本发明采用的VLPs能高效组装，且不影响其诊断效率，有利于降低诊断制剂的成本。本发明方法相对现有技术的检测步骤有所减少，实验操作简单，工作量大，用时短，并可提高诊断试剂的特异性和敏感性。