



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109799342 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201811491852.X

(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 白满元 孙世琪 张韵
茹嘉喜 杨志元

(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7页
序列表2页

(54)发明名称

一种O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种采用O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O型口蹄疫病毒样颗粒是由O型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和经优化的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O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O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O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O型口蹄疫病毒样颗粒免疫4~5周龄兔,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O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其特征在于内酶标板包被的O型口蹄疫病毒样颗粒是由O型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和VP3组装而成。

4. 根据权利要求3所述的O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VP3的序列为SEQ ID No.3。

5. 根据权利要求2或3或4所述的O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O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O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种病毒检测试剂盒及其制备方法,确切讲本发明涉及一种采用O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)引起的一种常发生于偶蹄动物的高度接触性传染性疾病,且人兽共患。FMDV宿主范极广,易感动物可达70多种。该病可通过空气等多种途径传播,传播迅速,发病率100%,可造成世界范围内的大流行。其发病症状主要表现在蹄部、口部、乳房等部位发生水泡、流涎、体温升高或水泡损伤后形成溃疡或结痂等,严重时表现出跛行和卧地等症状。因此,FMD造成养殖业生产力大幅度下降。该病每年造成世界的巨大经济损失,并且影响国际贸易关系和动物进口贸易关系,素有“政治经济病”之称。国际动物卫生组织(OIE)将FMD列为法定上报传染病,同样我国农业部将其列为一类传染病之首。OIE和联合国粮农组织(FAO)将FMD列为首要防控动物疾病,并启动FMD全球防控计划,鼓励各国各地区制定官方防控策略。FMD存在多个血清型及亚型,且不同型之间几乎不存在交叉免疫反应,许多动物无临床症状但带毒严重。因此,快速、高效的诊断和监测隐性带毒动物对FMD的防控至关重要,也是该病防控的首要环节。

[0003] 口蹄疫诊断检测技术的发展历程可分为3个阶段,即早期的病毒分离实验,补体结合实验和病毒中和实验,中期发展起来以酶联免疫吸附试验为核心的病原和抗体检测方法,现今以聚合酶链式反应(PCR)为基础的多种分子学诊断技术。早期的补体结合试验和病毒中和试验等被普遍认为是实验室诊断FMD的经典方法。其检测的结果一般准确可靠,但是也存在时间长,工作量大,试验步骤复杂、实验条件要求较高和不易推广等缺点。随后发展的以酶联免疫吸附试验为核心的病原和抗体的检测技术,被普遍认为是现阶段实验室诊断FMDV的首选技术。ELISA技术具有高效、灵敏、操作简单、成本低、可大批量检测样品等优点。目前,国内O型FMD ELISA抗体检测技术主要包括液相阻断ELISA,间接ELISA,夹心ELISA,竞争ELISA等。它们大多是以灭活病毒、重组病毒、单个蛋白或多肽等作为抗原,这导致现有的ELISA抗体检测技术存在假阳性过高、特异性不强、敏感性差,准确率偏低、工作量大或实验条件要求较高等各种各样的缺点。且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。本试剂盒使用VLPs检测O型FMD抗体可以有效的克服以上问题,使得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。。

发明内容

[0004] 本发明提供一种可用于检测O型口蹄疫病毒抗体的竞争ELISA检测试剂盒及其制备方法。该检测试剂盒可克服现有技术不足,具有良好的安全性和敏感性。

[0005] 本发明用于检测O型口蹄疫病毒抗体的竞争ELISA检测试剂盒内包括有:包被O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。

[0006] 本发明用于检测O型口蹄疫病毒抗体的竞争ELISA检测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,其制备过程为:用O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。

[0007] 优选地,本发明的O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法是:其内酶标板包被的O型口蹄疫病毒样颗粒是由O型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和优化的VP3组装而成。

[0008] 进一步,本发明所使用的VP3序列为SEQ ID No.3。

[0009] 这里所述的VP0、VP1和优化的VP3的基因序列及其制备方法已经完全公开于申请号为2016109292790中国发明专利申请中,其序列分别为SEQ ID No.1、SEQ ID No. 2和SEQ ID No.3。

[0010] 优选地,本发明的O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒制备方法,其中的预包被O型口蹄疫VLPs的酶标板的制备方法是:用0.05%(pH=9.6)的碳酸盐包被缓冲液将O型FMDV VLPs稀释,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封闭液(含1% BSA),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。

[0011] 病毒样颗粒(VLPs)是由口蹄疫病毒编码的四种结构蛋白组装形成的完整的空心颗粒,具有和天然病毒粒子相同或相似的形态,不含病毒遗传物质,不能自主复制,因此不会产生任何可能导致感染的遗传成分。并且结构蛋白组装成VLPs时,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,而且可以重复并高密度的展示抗原位点。因此相对于单个病毒蛋白,使用VLPs对抗体检测具有更强的免疫原性和更高特异性。VLPs的天然生物学结构类似于亲本病毒颗粒,可以近乎完美的展示诱导中和抗体的抗原表位,因此免疫性强,不但能激发体液免疫反应,还可以激发细胞和粘膜免疫。VLPs具备安全、高效的特点,是未来具有广阔发展前景的候选疫苗或传递抗原的载体。目前在全世界实验已经有部分人以VLPs为基础制备商品化疫苗。VLPs作为疫苗具有全毒疫苗和许多重组亚单位疫苗的优点,其整合了两者抗原表位的免疫原性,安全性和保护性位点等。因此,具有很好的几何形状和明显的均匀性,并保护了天然病毒抗原的结构,在极端条件下,比水溶性抗原的稳定性要好很多。

[0012] 本发明采用的病毒样颗粒(VLPs)具有与真实病毒粒子大小相似的结构,能引起免疫应答但不具有感染性。口蹄疫病毒是无囊膜的RNA病毒,其结构蛋白可组装成VLPs,且具有良好的免疫原性。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。

[0013] 本发明以原核表达及纯化的病毒样颗粒作为抗原建立检测O型FMDV抗体的竞争ELISA方法,为我国O型FMDV的抗体检测提供了一种更为敏感、特异、快速及稳定的诊断方法。

[0014] 使用VLPs检测FMDV抗体可以有效的克服现有技术所存在的问题,相对于全病毒抗原,本发明具有更好的安全性;而相对于单个蛋白或多肽作为抗原,本发明具有良好的免疫原性和更好的敏感性与特异性。

[0015] 本发明具有如下优点：

1、本发明选用O型口蹄疫病毒样颗粒(VLPs)作为包被抗原,由于本发明采用的VLPs不含RNA遗传物质,且含有病毒的完整结构蛋白,因此它具有高的安全性和抗原性,可以代替现阶段采用多肽、单个蛋白或灭活的天然病毒在免疫学检测中发挥重要作用。本发明用VLPs建立检测O型FMDV抗体的竞争ELISA方法,可为O型FMD防控提供一种高效、准确的检测技术,实现大量临床样品的快速准确的诊断。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。

[0016] 2、本发明方法相对以往专利中的所建立的竞争ELISA方法步骤有所减少,一般可在45 min左右完成,使实验操作简单,工作量小,用时短,可实现短时间内大量样品的检测。这主要由于本发明是将HRP直接标记在跟被检抗体同时作用的竞争性抗体上(现阶段大多数竞争ELISA试剂盒都没有将HRP标记在与被检抗体同时作用的竞争性抗体上,而是将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,见专利CN105445457A、CN107064501A等)。本发明制作试剂盒过程中,酶标板为标记好的成品,实际操作步骤仅需两步。

[0017] 3、本发明提高了诊断试剂的特异性和敏感性,由于VLPs是由完整的病毒结构蛋白组成的空心颗粒,结构蛋白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,相对于单个蛋白作为检测抗原,采用VLPs作为抗原建立一种免疫学检测方法对相应抗体进行检测具有更高的敏感性(97.89%)、特异性(98.96%)(参见CN 105807052的中国发明专利,其敏感性为90.8%,特异性为93.3%),且可避免宿主种类的问题。

[0018] 4、本发明针对我国现阶段FMD感染、爆发、防控以及需求,对O型FMD VLPs竞争ELISA抗体检测方法进行了研究,并建立了判定标准,期望对FMD防控、养殖业及社会经济的发展等做出贡献。

具体实施方式

[0019] 以下结合实例对本发明进行解说。

[0020] 1.O型FMD VLPs的制备

1.1 目的蛋白的表达及纯化

(1)将由本实验室保存的阳性重组质粒pSMK-VP0VP1和pSMK-VP3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100 mL新鲜LB液体培养基中,在37℃、220 r/min摇床上过夜培养。

[0021] (2)次日将过夜培养的表达菌接种在含有相同比例的三种抗生素的1000 mL经高压灭菌的新鲜LB液体培养基中,在37℃、220 r/min摇床上摇3-4.5 h,至菌液OD600值为0.7~0.9。

[0022] (3)当菌液OD600值达到0.7~0.9范围内时,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG,并于16℃,200 r/min条件下诱导16 h。

[0023] (4)次日收菌,4℃ 4000 r/min离心30 min,弃上清收集菌体沉淀。

[0024] (5)将菌体沉淀用重悬液重悬后,在超声仪上超声破碎20~24 min、在4℃ 11000 r/min离心30 min收集上清,沉淀同时保留。

[0025] (6)将Ni²⁺亲和层析柱从4℃拿出,弃掉层析柱中液体,再用重悬液平衡柱子,平衡好后放4℃备用。

[0026] (7)收集的上清与平衡好的Ni²⁺亲和层析柱室温下结合1 h或4℃结合过夜。结合完以后先用10个柱体积Buffer A洗液(20 mM Tris-HCl,500 mM NaCl,20 mM咪唑,1% TritonX-100,pH=8.0)洗脱杂蛋白。最后用Buffer B洗液(20 mM Tris-HCl,500 mM NaCl,500 mM咪唑,1% TritonX-100,pH=8.0)洗脱目的蛋白。收集含有目的蛋白的液体,即结构蛋白VP0、VP1和VP3。用后的层析柱用蒸馏水洗涤3-4次,最后加入20%乙醇4℃保存。

[0027] (8)将收集的含有目的蛋白洗脱液用SDS-PAGE电泳实验进行鉴定。

[0028] 1.2 VLPs的体外组装

将纯化好带有His-SUMO标签的蛋白与SUMO酶按200:3的比例装入透析袋中,在500 mL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℃酶切过夜。切除His-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Western Blotting鉴定。

[0029] 1.3 透射电镜(TEM)鉴定纯化后的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2.5 min,注意铜网的正反面,用吸水纸吸出铜网上多余的液体,再用2%~3%的磷酸钨在室温下负染5 min后,吸水纸除去多余液体,最后在透射电镜下观察样品VLPs。VLPs样品成圆形,大小一般在20-40 nm之间。

[0030] 关于本发明所涉及的0型口蹄疫病毒样颗粒(FMD VLPs)的更详尽制备方法请参见申请号2016109292790的中国发明专利申请所公开的内容。

[0031] 2.高免血清的制备

2.1 动物免疫

将4只健康实验兔分为两组即A组(3只)和B组(1只),A组为实验组,B组为对照组。第1次免疫,将纯化后的0型FMD VLPs用PBS稀释成0.2 mg/mL,与弗氏完全佐剂按体积1:1混合并完全乳化后免疫健康家兔,采用脊部皮下肌肉多点注射,每只免疫1 mL完全乳化好的液体;隔14 d进行第2次免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,其余条件同第一次免疫。隔14 d后进行第三次免疫,方法和剂量同第二次免疫。隔14 d后进行第4次免疫,佐剂为弗氏完全佐剂,其余条件同第一次免疫。每次免疫前于耳缘静脉处采血,用0型口蹄疫液相阻断ELISA试剂盒测定兔子抗体效价。最后一次抗原免疫后第14 d,从兔心脏采血,37℃放置2 h或4℃放置过夜后,4℃ 4000 r/min离心30 min收集血清,经离心去掉细胞等组织碎片后,分装保存-80℃备用。

[0032] 2.2 IgG的纯化和HRP标记

2.2.1 高免血清中IgG的纯化

(1)取10 mL已制备好的高免血清再加入等体积的PBS混匀。然后边搅拌边滴加5 mL的饱和硫酸铵,搅拌20 min后4℃静置30 min。3500 r/min离心30 min,弃去沉淀,留下上清。

[0033] (2)将相同体积的饱和硫酸铵溶液边搅拌边滴加到上清中,搅拌20 min后4℃静置30 min。

[0034] (3)将静置后的液体于4℃ 3500 r/min离心30 min,弃去上清,收集沉淀,将沉淀用PBS溶解至10 mL后,边搅拌边滴加5.4 mL饱和硫酸铵溶液,同上操作,重复3次。

[0035] (4)将沉淀用适量PBS溶解,装入透析袋中,置于20倍体积的PBS溶液(pH=8.0)中,4

℃透析24 h,每隔3-6 h换液。收集脱盐后的抗体溶液,用0.22 μm的滤膜过滤。

[0036] (5)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0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液平衡柱床,

(6)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。

[0037] (7)用10倍柱体积的0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲液洗脱杂蛋白。

[0038] (8)用6倍体积的0.1 mol/L pH=3.0的柠檬酸盐缓冲液洗脱IgG,收集样品,每管0.5 mL,在每管中加入50 μL的1 mol/L pH=9.0的Tris-HCl缓冲液。

[0039] (9)取血清和纯化后的IgG进行SDS-PAGE电泳,120 U跑2 h,凝胶染色,脱色。

[0040] 2.2.2 纯化后IgG的HRP标记

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

[0041] (2)加入0.16 M乙二醇溶液混匀,室温静置30 min。

[0042] (3)加入含5 mg IgG的水溶液1 mL,混匀,装入透析袋,在pH=9.5的碳酸盐缓冲液中4℃透析过夜。

[0043] (4)吸出液体,加入0.2 mL新配的5 mg/mL的硼氢化钠溶液,混匀,4℃静置2 h。

[0044] (5)在液体中逐滴加入相同体积的饱和硫酸铵溶液中,于4℃静置1 h。

[0045] (6)将静置好的液体于4℃ 3000 r/min离心30 min,弃上清,将沉淀溶解于少量0.015 M pH=7.4的PBS中,装入透析袋中,透析过夜,以去除铵离子。

[0046] (7)将去除铵离子的液体于4℃ 10000 r/min离心30 min,去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装,-20℃保存备用。

[0047] 3. 竞争ELISA方法的建立

3.1 ELISA方法的建立及条件优化:

(1)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(1 mg/mL的BSA)稀释成浓度为0、50、100、150、200、250、300、350 μg/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染色液后混匀,室温放置5-10 min。用酶标仪测定595 nm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595 nm的吸收值,并计算样品蛋白浓度。

[0048] (2) 抗原包被浓度和血清最佳稀释度的优化

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O型FMD VLPs稀释为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 μg/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120 μL的1%BSA溶液37℃封闭60 min后,PBST洗涤3次。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30 s,置于37℃作用30 min,洗涤同前,每孔加入相同体积的TMB,置于37℃显色15 min后,每孔加入相同体积终止液(2 M H₂SO₄),酶标仪上测定450 nm吸光值。根据P/N值确定抗原最佳包被浓度为0.5 μg/mL,血清最佳稀释度为1:32。

[0049] (3) 酶标抗体 (HRP-IgG) 最佳稀释度的优化

方法同 (2), 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 1:10000、1:11000、1:12000、1:13000、1:14000、1:15000、1:16000、1:17000、1:18000、1:19000、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 1:18000。

[0050] (4) 抗原包被时间及温度的优化

方法同上, 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, 在其他条件相同的情况下, 检测各待检血清, 根据计算各已知背景的待检血清的抑制率 (PI) 确定抗原最佳作用时间及温度为 4℃ 包被过夜或 37℃ 包被 2.5 h。

$$\text{抑制率(PI)} = \frac{\text{标准阴性血清的 OD}_{450 \text{ nm}} - \text{样品血清的 OD}_{450 \text{ nm}}}{\text{标准阴性血清的 OD}_{450 \text{ nm}} - \text{标准阳性血清的 OD}_{450 \text{ nm}}} \times 100\%$$

[0051] (5) 封闭液的优化

方法同上, 用 1%BSA、2%BSA、5%脱脂乳对包被好的酶标板进行 37℃ 封闭 60 min 及未封闭的酶标板。其他条件不变的情况下, 检测各待检血清, 根据计算各已知背景待检血清的抑制率 (PI) 确定封闭液为 1%BSA 最佳。

[0052] (6) 封闭液作用时间及温度的优化

方法同上, 用最佳封闭液对包被好的酶标板分别封闭, 即 37℃ 封闭 30 min、37℃ 封闭 60 min、37℃ 封闭 90 min、37℃ 封闭 120 min。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抑制率 (PI) 确定封闭液最佳作用时间及温度为 37℃ 封闭 30 min。

[0053] (7) 血清和 HRP-IgG 作用时间及温度的优化

方法同上, 将各血清和 HRP-IgG 按最佳稀释比例进行稀释, 同时按相同体积加入酶标板中的混匀, 37℃ 作用分别 30 min、60 min、90 min、120 min、150 min。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抑制率 (PI) 确定血清和 HRP-IgG 温度最佳作用时间及温度为 37℃ 封闭 30 min。

[0054] (8) TMB 作用时间及温度的优化

方法相同, 按上述所得的最佳实验条件进行, 加入 TMB 在 37℃ 分别作用 10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 显色。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抑制率 (PI) 确定 TMB 最佳作用时间及温度为 37℃ 作用 10 min。

[0055] (9) ELISA 方法阴阳性血清判定标准的建立

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 $PI \geq 50\%$ 时, 可判定为阳性; 血清 $PI \leq 40\%$ 时, 可判定为阴性; $40\% < PI < 50\%$, 为可疑。

[0056] (10) 交叉反应试验: 用包被好的酶标板同时检测 O 型 FMD、A 型 FMD、猪圆环病毒 2 型、猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合症病毒、猪细小病毒、猪乙型脑炎病毒阳性血清, 分析结果知本方法与其他病毒没有交叉反应。

[0057] (11) 敏感性、特异性和符合率分析: 用本发明建立的竞争 ELISA 方法检测已知背景的 400 份不同抗体效价的血清样本, 其敏感性为 97.89%、特异性为 98.96%、符合率为 96.86%。

[0058] (12) 批内、批间重复性试验：分别用同一批次组建的试剂盒和3个不同批次组建本发明的试剂盒检测同样的10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均小于10%，表明本试剂盒具有很好的可重复性，稳定性好。

[0059] 3.2 酶标板的制备：将抗原VLPs按最佳包被浓度(0.5 $\mu\text{g/mL}$)稀释，每孔100 μL 均匀的包被在酶标板孔上，4℃过夜；次日倒掉孔中液体，然后每孔加入300 μL 洗涤液洗板3-4次，拍干后，每孔加入120 μL 的1%BSA，37℃封闭30 min。包被缓冲液为0.05 M pH=9.6的碳酸盐缓冲液，即1 L溶液中含1.59 g Na_2CO_3 ，2.93 g NaHCO_3 。

[0060] 3.3 获得辣根过氧化物酶(HRP)-抗兔IgG酶结合物：本发明使用的HRP-IgG均有本实验制备。

[0061] 3.4 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0.01 mol/L及pH=7.2~7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)；②洗涤液：在1000 mL的0.01 M PBS溶液中加入1 mL吐温-20(Tween-20)；③酶底物：底物TMB购置SURMODICS™公司；④终止液：取54.34 mL浓度为98%的浓硫酸加蒸馏水至1000 mL可得。

[0062] 4. 0型FMD VLPs竞争ELISA抗体检测试剂盒的操作步骤：

4.1 将待检测样本用样本稀释液1:32稀释，每孔加50 μL ，同时加入阳性和阴性对照液，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(1:18000)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30 min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 酶底物溶液，37℃避光显色15 min，再加入终止液50 μL 。最后在酶标仪测定450 nm处各样品吸收值。

[0063] 4.2 结果判定：当被检血清的PI \geq 50%时，可判定为阳性；当被检血清PI \leq 40%时，可判定为阴性；当被检血清40%<PI<50%，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> 一种O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 909

<212> DNA

<213> 口蹄疫病毒结构蛋白 (VP0)

<400> 1

```

ggtgcgggcc agtcatctcc ggcgacgggt tcccagaatc aatcaggcaa cacgggttcc 60
atcatcaaca actactacat gcaacagtat cagaacagtg tggataccca actgggcgac 120
aacgcggttt caggcggttc gaatgaaggt agtaccgaca ccacgtccac gcataccacg 180
aatacccaga acaatgattg gtttagcaaa ctggcaagct ctgctttttc tggcctgttc 240
ggtgcgctgc tggccgacaa aaagaccgaa gaaaccacgc tgctggaaga tcgtattctg 300
accacgcgca acggccatac cacgagtacc acgcagagtt ccgtcggcat cacgcacggt 360
tacgcgaccg ccgaagattt cgtgtcaggc ccgaatacgt cgggtctgga aaccctgtgtg 420
gttcaagccg aacgcttttt caaaacgcac ctgtttgatt gggtgacctc cgaccgttc 480
ggtcgttgct atctgctgga actgccgacg gatcacaagg gcgtttacgg tagcctgacc 540
gactcttatg cgtacatgcg caacggctgg gatgtggaag ttaccgccgt gggtaccag 600
tttaatggcg gttgcctgct ggttgcaatg gtcttggaac tgtgttctat tgaacgtcgc 660
gaactgttcc agctgaccct gttccgcat caattcatta acccgctac caatatgacg 720
gctcacatca aagttccggt tgtcggcggtg aaccgctatg atcagtacaa agtcacaaag 780
ccgtggaccc tggtcgtgat ggtgtcgca ccgctgaccg ttaatacgga aagcgctccg 840
caaatcaagg tgtatgcaa tatcgccccg acgaatgtcc acgttgctgg tgaatttccg 900
agtaaagaa 909

```

<210> 2

<211> 639

<212> DNA

<213> 口蹄疫病毒结构蛋白 (VP1)

<400> 2

```

accaccagca cgggcgaatc ggcatatccg gttacggcaa cggtcgaaaa ctacggcggc 60
gaaacgcagg ttcaacgtcg tcatcatacc gatgttagct ttattctgga ccgtttcgtg 120
aaagttagcg cgaaggattc tatcaacgtc ctggacctga tgcagacccc gccgcatacc 180
ctggtgggcg cactgctgcg caccgccacg tattactttg cagatctgga agtcgctgtg 240
aaacacgaag gcgacctgac ctgggtcccc aatggtgcac cggaagcagc actggataac 300
accacgaatc cgacggcata tcataaagct ccgctgaccc gtctggcact gccgtacacg 360
gccccgcacc gtgttctggc aaccgtctat aacggcaatt gcaaatacgc tggcggtagt 420

```

ctgccgaacg tgcgtggtga tctgcaggtt ctggcccaaa aggcagcttg gccgctgccg 480
accagcttca attatggtgc gattaaagcc acccgtgtga cggaactgct gtatcgtatg 540
aagcgtgcag aaacctactg tccgcgtccg ctgctggcag tccacccgtc cgcagcacgc 600
cataagcaaa aaatcgctgc cccggtcaaa caaagtctg 639

<210> 3

<211> 618

<212> DNA

<213> 口蹄疫病毒结构蛋白 (VP3)

<400> 3

ggtatcttcc cgggtggcgtg tagcgatggt tacggtggcc tggtagacgac ggacccgaaa 60
acggcagacc cgggtgtatgg caaagttttt aaccgcgcgc gtaatctgct gccgggtcgc 120
ttcaccaacc tgctggatgt tgccgaagca tgcccgacgt ttctgcattt cgatggcgac 180
gtgccgtatg ttaccacgaa aaccgattcg gaccgtgtcc tggcccagtt tgacctgtcc 240
ctggcggcca agcatatgtc aaacaccttc ctggctggcc tggcgcagta ttacacccaa 300
tacagcggta cgggtgaatct gcactttatg ttcaccggcc cgacggatgc taaagcgcgc 360
tatatgattg cctacgcacc gccgggtatg gaaccgcaa agaccccgga agcagctgcg 420
cattgcattc acgcggaatg ggacaccggc ctgaacagca aatttacgtt ctctatcccg 480
tatctgagtg ccgcagatta tgcctacacc gcaagtgcg ctgcggaaac cacgaatgtc 540
cagggttggg tgtgtctgtt tcaaatacag cacggcaagg attttgaact gcgtctgccg 600
gttcatgccc gtcagcaa 618

专利名称(译)	一种O型口蹄疫病毒抗体竞争ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109799342A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201811491852.X	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 白满元 孙世琪 张韵 茹嘉喜 杨志元		
发明人	郭慧琛 白满元 孙世琪 张韵 茹嘉喜 杨志元		
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O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O型口蹄疫病毒样颗粒是由O型口蹄疫病毒的结构蛋白VP0、VP1和经优化的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。

