



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102175849 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201010600126. 4

CN 101900731 A, 2010. 12. 01, 全文.

(22) 申请日 2010. 12. 22

CN 101144818 A, 2008. 03. 19, 全文.

(73) 专利权人 江苏出入境检验检疫局动植物与
食品检测中心

WO 03048348 A2, 2003. 06. 12, 全文.

地址 210001 江苏省南京市中华路 99 号

EP 2023953 A2, 2009. 02. 18, 全文.

专利权人 苏州艾瑞德生物科技有限公司

CN 101799471 A, 2010. 08. 11, 权利要求 1,

江苏中测检测服务有限公司

实施例.

审查员 杨冀川

(72) 发明人 薛峰 高海岗 张小荣 蒋原
吴艳涛 张睿 刘秀梵 赵红霞

(74) 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
32206

代理人 王荷英

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1540350 A, 2004. 10. 27, 实施例.

CN 101441217 A, 2009. 05. 27, 权利要求 1、
2, 实施例.

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页

(54) 发明名称

一种快速检测猪瘟抗体的试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测猪瘟抗体的试剂盒。本发明设计出一对特异性的引物, 克隆相对保守的基因序列, 通过原核表达技术, 表达出针对猪瘟 E2 蛋白的抗原, 在此基础上制备出由包被了高纯度、高活性猪瘟病毒特异性抗原的酶联板、含有辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 单克隆抗体的酶结合物以及 TMB 显色液等组成的试剂盒。本试剂盒能快速检测血清或血浆中的猪瘟抗体, 特异性强, 敏感性高。

1. 一种检测猪瘟抗体的试剂盒,其特征在于包括:
 - (1) 猪瘟病毒特异性抗原包被的酶联板;
 - (2) 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体溶液;
 - (3) 样品稀释液,含有质量浓度为 0.5% 的 NaCl、1% 的酪蛋白、0.001% 的 NaN_3 、0.001% 的溴甲酚紫的溶液;
 - (4) TMB 显色剂:浓度是 0.3g/L;
 - (5) 终止液,浓度为 2M 的 H_2SO_4 溶液;
 - (6) 20 倍浓缩洗液:含有质量浓度为 21g/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,质量浓度为 2.80g/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,质量浓度为 170g/L 的 NaCl,体积浓度为 20ml/L 吐温 -20;
 - (7) 阴性对照,经稀释的不含猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆;
 - (8) 阳性对照:经稀释的含有猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆;所述的猪瘟病毒特异性抗原包被酶联板由以下方法制得:
 - 一. 制备猪瘟病毒特异性抗原
 - (1) 反转录反应:以 P2 为引物,CSFV 石门株的总 RNA 为模板反转录反应;
 - (2) PCR 反应:以反转录产物为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 反应;其中,P1 的序列为:5' -TAAAAGGATCCGGCCTGACCACCACCTGGGAAG-3',
P2 序列为:5' -CCCCTCTCGAGTTAATAGCTATCACGCGGTTTCATAATATTTG-3';
 - (3) 回收 PCR 反应产物中片断大小为 887bp,将其克隆入 pET32a 载体的 BamHI 和 Xho I 酶切位点之间,构建成功的重组载体命名为 pET32a-E2,将重组载体 pET32a-E2 进一步转化入大肠杆菌宿主菌 BL21,进行重组蛋白表达;
 - (4) 纯化重组蛋白,得猪瘟病毒特异性抗原;
 - 二. 用猪瘟病毒特异性抗原包被固化于 96 孔酶联板上。
2. 根据权利要求 1 所述的检测猪瘟抗体的试剂盒,其特征在于所述的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体溶液由以下方法制得:
 - (1) 制备兔抗猪 IgG 抗体:用猪 IgG 免疫家兔后,分离得血清,经纯化获得兔抗猪 IgG 抗体;
 - (2) 用辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 抗体;
 - (3) 用稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体,获得辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体溶液。
3. 根据权利要求 1 所述的检测猪瘟抗体的试剂盒,其特征在于所述稀释液由以下方法制得:

在浓度为 0.01M, pH7.4 的 PBST 中添加 10% 小牛血清。

一种快速检测猪瘟抗体的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种猪瘟抗体检测试剂盒及其制备方法,用于对猪血清或血浆样本进行猪瘟抗体的检测,属于酶标免疫分析领域。

背景技术

[0002] 猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的一种高度接触性传染病,1833年首先发现于美国的俄亥俄州,曾广泛流行于世界养猪国家,对养猪业造成严重危害,是世界动物卫生组织(OIE)确定的应报告疾病(Notifiable diseases)之一。多年来CSF也危害我国养猪业的发展,是我国四大动物疫病之一,被我国农业部法定为一类传染病。CSF是一种急性烈性传染病,死亡率高达80%~90% 90%,接种疫苗是防制本病唯一有效的措施。我国于1954年成功研制的猪瘟兔化弱毒疫苗(CSFLV),在防治CSF工作中发挥了重要作用,取得了显著效果,通过疫苗接种有效的控制了CSF的发生,保障了我国养猪业的发展和养猪户的利益。但近些年来,CSF流行发生了较大变化,从频发的大流行转变为周期性、波浪式的地区散发性流行,临床症状和病理变化也由典型转为非典型,并出现了亚临床感染、母猪繁殖障碍和新生仔猪先天性感染等现象。虽通过加大免疫密度、超量、超前免疫和增加免疫次数等多种途径和办法,仍不能有效控制CSF流行,当前CSF发病无季节性,虽然流行规模较小,强度较轻,但这种散发流行见于全国各地,作为一种免疫抑制性疾病,CSF感染可引起多种疾病的继发感染,造成大批猪只发病死亡,这些现象已引起学术界的广泛关注和兽医行政管理、防疫部门的高度重视。

[0003] 建立安全有效的实验室和临床评价方法尤为重要,血清学检测通常用于了解猪的群体免疫水平和对疫苗免疫效果进行评价,为预防接种提供科学依据,常用的方法有以下几种:(1)猪瘟正向间接血凝试验,(2)中和试验,(3)间接ELISA试验,(4)胶体金免疫检测等技术,其中,间接ELISA法具有敏感性高、特异性强、重复性好的优点,可用于临床猪瘟血清/血浆抗体的定性和定量检测,为猪瘟免疫效果的监测提供参考。但是,目前的检测手段对猪瘟抗体的检测存在重复性不好,操作技术繁琐。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种特异强、灵敏度高,能快速、简便地检测猪瘟抗体的检测试剂盒,通过猪瘟抗体的检测,确定免疫效果,进行抗体监控,及时调整免疫程序,挽回不必要的经济损失。

[0005] 本发明试剂盒包含:

[0006] (1)猪瘟病毒特异性抗原包被的酶联板;

[0007] (2)辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗猪IgG(免疫球蛋白)抗体溶液;

[0008] (3)样品稀释液,含有质量浓度为0.5%的NaCl、1%的酪蛋白、0.001%的NaN₃、0.001%的溴甲酚紫的溶液;

[0009] (4)TMB显色剂:浓度是0.3g/L;

- [0010] (5) 终止液,浓度为 2M 的 H_2SO_4 溶液;
- [0011] (6) 20 倍浓缩洗液:含有质量浓度为 21g/L 的 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$,质量浓度为 2.80g/L 的 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$,质量浓度为 170g/L 的 NaCl,体积浓度为 20ml/L 吐温 -20;
- [0012] (7) 阴性对照,经稀释的不含猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆;
- [0013] (8) 阳性对照:经稀释的含有猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆;
- [0014] 还包含说明书及其他包材。
- [0015] 本试剂盒中的猪瘟病毒特异性抗原包被酶联板由以下方法制得:
- [0016] 一. 制备猪瘟病毒特异性抗原
- [0017] (1) 反转录反应:以 P2 为引物,CSFV 石门株的总 RNA 为模板反转录反应;
- [0018] (2) PCR 反应:以反转录产物为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 反应;其中,
- [0019] P1 的序列为:5' -TAAAAGGATCCGGCCTGACCACCACCTGGGAAG-3',
- [0020] P2 序列为:5' -CCCCTCTCGAGTTAATAGCTATCACGCGGTTTCATAATATTTG-3';
- [0021] (3) 回收 PCR 反应产物中片断大小为 887bp,将其克隆入 pET32a 载体的 BamH I 和 Xho I 酶切位点之间,构建成功的重组载体命名为 pET32a-E2,将重组载体 pET32a-E2 进一步转化入大肠杆菌宿主菌 BL21,进行重组蛋白表达。
- [0022] (4) 纯化重组蛋白,得猪瘟病毒特异性抗原;
- [0023] 二. 用猪瘟病毒特异性抗原包被固化于 96 孔酶联板上。
- [0024] 本试剂盒中的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 抗体溶液由以下方法制得:
- [0025] (1) 制备兔抗猪 IgG 抗体:用猪 IgG (免疫球蛋白) 免疫家兔后,分离得血清,经纯化获得兔抗猪 IgG 抗体;
- [0026] (2) 用辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 抗体;
- [0027] (3) 用稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体,获得辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 抗体溶液;
- [0028] 本试剂盒中的稀释液由以下方法制得:
- [0029] 在浓度为 0.01M, pH7.4 的 PBST 中添加 10% 小牛血清。
- [0030] 所述阴性对照是经稀释的不含猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆,若其在实验结果中为阳性,则试验以失败论,若其为阴性结果则试验成功;
- [0031] 所述阳性对照为稀释的含有猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆,若其在实验结果中为阴性,则试验以失败论,若其为阳性结果则试验成功。
- [0032] 本发明设计出一对特异性的引物,克隆相对保守的基因序列,通过原核表达技术,表达出针对猪瘟 E2 蛋白的抗原,在此基础上研制出快速、特异、灵敏的检测试剂盒。
- [0033] 综上所述,本猪瘟抗体检测试剂盒以包被了基因工程表达的高纯度、高活性猪瘟病毒特异性抗原的酶联板、含有辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 单克隆抗体的酶结合物以及 TMB 显色系统为基础制成,特异性强,敏感性高。其特异性为:100%,总符合率为:100%;1 小时内即可判定被检样品液的检测结果,检测结果显示科学、直观,简明、准确,不易出现假阳性或假阴性等人为误判。试剂盒结构简单,仅需实验室准备纯化水和酶标仪等仪器,检测成本低,操作简便、快速、时效性强,特别适用于临床猪瘟血清 / 血浆抗体的定性检测,监测猪瘟的免疫效果,具有广阔的市场前景和社会效益。

具体实施方式

[0034] 实施例 1 制备猪瘟病毒特异性抗原

[0035] 根据 CSFV E2 基因序列,设计一对引物,用于扩增 E2 基因的主要抗原表位区序列。其中,上游引物 P1 为:5' -TAAAAGGATCCGGCCTGACCACCACCTGGGAAG-3',

[0036] 下游引物 P2 序列为:5' -CCCCTCTCGAGTTAATAGCTATCACGCGGTTTCATAATATTTG-3'。

[0037] 通过 RT-PCR 方法扩增 CSFV 石门株(购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心,病毒编号 CVCC AV1411)E2 基因的主要抗原表位区序列,

[0038] 具体步骤:

[0039] 反转录反应体系为:先将 2 μ L 下游引物 P2 (25 μ mol/L) 与 CSFV 石门株的总 RNA 混合,70 $^{\circ}$ C 水浴 10min,然后迅速冰浴 5min;再加入 dNTP 混合物(浓度分别为 10mM, TaKaRa, Dalian, China) 4 μ L, RNase 抑制剂 (40U/ μ L, TaKaRa, Dalian, China), AMV (100U/ μ L, TaKaRa, Dalian, China) 1 μ L, 5 \times Buffer 10 μ L, 添加超纯水至总体积为 50 μ L, 混匀,于 42 $^{\circ}$ C 反转录 60min 后,95 $^{\circ}$ C 水浴 5min;扩增产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0040] 以反转录产物为模板,进行 PCR 反应,体系如下:2.5 μ L 10 \times buffer (Mg²⁺ plus, TaKaRa, Dalian, China), 0.5 μ L 浓度为 10mmol/L dNTP 混合物 (TaKaRa, Dalian, China), 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ L, TaKaRa, Dalian, China), 上游引物 P1、下游引物 P2 各 1 μ L (25 μ mol/L), 3 μ L cDNA (反转录产物), 加超纯水至总体积 25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min;94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 产物 1% 的琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色检测。可见于 887bp 处出现清晰的 PCR 条带,证明扩增成功。

[0041] 将 PCR 产物经 BamH I 和 Xho I 双酶切后插入 pET32a 载体的 BamH I 和 Xho I 酶切位点之间,构建成功的重组载体命名为 pET32a-E2,将重组载体 pET32a-E2 进一步转化入大肠杆菌宿主菌 BL21 (DE3),用浓度为 0.4mM 的 IPTG 诱导重组蛋白表达,应用金斯瑞生物科技有限公司的高亲和力 Ni-NTA 树脂 (High Affinity Ni-NTA Resin 货号 Cat. No. L00250) 进行表达蛋白的纯化,纯化的蛋白用浓度为 0.01M 的 PBS (pH7.4) 透析过夜,进行蛋白定量后 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。蛋白浓度经测定为 3.2mg/ml,该蛋白即为猪瘟病毒特异性抗原。

[0042] 蛋白的鉴定:(western blot 方法),表达产物经 SDS-PAGE 分析后,转移至 NC 膜上进行 Western blot,结果显示,表达产物能被 CSFV 阳性血清(购自中国兽医药品监察所)所识别,而对照没有发应条带,证明表达产物具有免疫反应,对猪瘟病毒抗体有很好的特异性。

[0043] 实施例 2 本发明试剂盒的制备

[0044] 猪瘟抗体检测试剂盒,包括(1)猪瘟病毒特异性抗原包被的酶联板,(2)辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG (免疫球蛋白),(3)样品稀释液,(4)TMB 显色剂,(5)终止液,(6)20 倍浓缩洗液,(7)阴性对照,(8)阳性对照。

[0045] CB 包被液:pH9.6,具体成分及浓度为:无水碳酸钠 (Na₂CO₃) 1.59g/l,碳酸氢钠 (NaHCO₃) 2.93g g/l。

[0046] 20 倍浓缩洗液:磷酸氢二钠 \cdot 12H₂O 21g/l,磷酸二氢钠 \cdot 2H₂O 2.80g/l,氯化钠 170g/l,吐温 20ml/l。

[0047] 10mM PBS PH7.4 配方 :磷酸氢二钠 · 12H₂O 2.2g/l,磷酸二氢钠 · 2H₂O 0.2g/l,氯化钠 8.5g/l

[0048] TMB 显色剂 :溶液中的 TMB 浓度是 0.3g/L,来源于 sigma。

[0049] 终止液 :浓硫酸 66.154ml/L。

[0050] (1) 猪瘟病毒特异性抗原包被的酶联板

[0051] 酶联板制备 :酶联板为聚苯乙烯材质,设有 96 个微孔。将猪瘟病毒特异性抗原用浓度为 0.05M 的碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释至 0.1 μg/ml,加入到微孔中,100 μl/孔,2 ~ 8℃ 过夜,次日用封闭液 150 μl/孔室温封闭 2h,弃去液体,干燥,封装。

[0052] 封闭液 :2.9g/l 的 Na₂HPO₄ · 12H₂O,8.0g/l 的 NaCl,0.2g/l 的 KCl,0.2g/l 的 KH₂PO₄ · 2H₂O,200ml/l 的小牛血清,50g/l 的蔗糖,0.5g/l 的吐温 20。

[0053] (2) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 溶液

[0054] 兔抗猪 IgG 制备 :用猪 IgG 免疫家兔 4 只,第一次用费氏完全佐剂与猪 IgG 混合均匀后多点注射免疫,半个月后以费氏不完全佐剂与抗原混合均匀后多点注射免疫,10 天后耳缘静脉采血测效价,合格 (> 1 : 10,000) 则采血,不合格则加强免疫,再过 10 天后采血,分离血清,饱和硫酸铵纯化后即得兔抗猪 IgG,紫外分光光度计测蛋白含量。

[0055] 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记兔抗猪 IgG 的方法,称取 5mg 的 HRP 溶于 1ml 蒸馏水中,加入 200 μl 新配的 NaIO₄ (浓度为 0.1M),室温下避光搅拌 20 分钟,将上述溶液装入透析袋,用 1mM 的醋酸盐缓冲液 (pH4.4) 透析,4℃ 过夜,加 20ul 浓度为 0.2M, pH9.5 碳酸盐缓冲液使 pH 值升到 9.0 ~ 9.5,然后立即加入 1ml 兔抗猪 IgG 溶液 (10mg 兔抗猪 IgG 溶解在 1ml 浓度为 0.01M 的碳酸盐缓冲液),室温避光轻轻搅拌 2 小时,加入 100 μl 新配的 4mg/ml 的 NaBH₄ 溶液,混匀,在 4℃ 放置 2 小时。将上述液体放入透析袋中用 0.15M, pH7.4 的 PBS 透析,4℃ 过夜,取出透析袋内液体,加入等量甘油后放置 -20℃ 保存。

[0056] 稀释液 :浓度为 0.01M, pH7.4 的 PBST 中添加 10% 小牛血清。

[0057] 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 溶液 :将按照上述方法制备的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记兔抗猪 IgG 用稀释液稀释至 1 : 8000,混匀,分装为 12ml/瓶。

[0058] (3) 样品稀释液 :含有 0.5% 的 NaCl,1% 的 casein (酪蛋白)、0.001% 的 NaN₃、0.001% 的溴甲酚紫的溶液,分装为 6ml/瓶 ;

[0059] (4) TMB 显色剂 :TMB 浓度是 0.3g/L,分装为 6ml/瓶 ;

[0060] (5) 终止液 :2M 的 H₂SO₄,分装为 6ml/瓶 ;

[0061] (6) 20 倍浓缩洗液 :0.2M pH7.4 的 PBST。分装为 30ml/瓶。

[0062] (7) 阴性对照 :稀释的不含猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆,分装为 0.5ml/瓶。

[0063] (8) 阳性对照 :为稀释的含有猪抗猪瘟病毒抗体的猪血清或血浆,分装为 0.5ml/瓶,

[0064] 组装 :将所有瓶装试剂插于盒托的对应孔内,与酶联板、说明书、自封袋、封板膜一起放入纸盒,储存于 2 ~ 8℃,检验合格后贴检封签。

[0065] 实施实例 3 本发明试剂盒检测猪瘟抗体的方法

[0066] 检测样品制备 :

[0067] ①采血,静置沉淀或 3000 转 / 分钟离心 5 分钟,上清即为血清。

[0068] ②采血,加入抗凝剂,3000 转 / 分钟离心 5 分钟,上清即为血浆。

[0069] 样品应为淡黄色、黄色、无乳糜、无溶血及异物的血清或血浆。各种常用抗凝剂对试验结果均无影响。如果不立即试验,可在 2~8℃冰箱保存 1~2 天。长期储存需要在 -18℃~-25℃冷冻,试验前平衡至室温并混匀。

[0070] 具体使用操作步骤如下:

[0071] 1. 平衡:将试剂盒从冷藏环境中取出,置室温平衡 30 分钟后使用。

[0072] 2. 配洗液:将 20 倍浓缩洗液用纯化水稀释 20 倍备用。

[0073] 3. 设定:留 1 孔作空白对照,另设阴性对照 3 孔、阳性对照 2 孔,A1 孔不加标本稀释液,A2A3 加 100 μl 阳性对照血清,A4-A6 加 100 μl 阴性对照血清。

[0074] 4. 加样:在其它反应孔中各加样品稀释液 50 μl。

[0075] 5. 温育:在反应板上加盖封板膜,振荡混匀,置室温避光反应 20 分钟。

[0076] 6. 洗板:弃去反应液,每孔注满洗液,浸泡 15 秒,甩弃洗液。连续洗板 5 次,最后拍干。

[0077] 7. 加酶:每孔加入 100 μl 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗猪 IgG 溶液 (空白对照孔不加)。

[0078] 8. 温育:在反应板上加盖封板膜,置室温避光反应 20 分钟。

[0079] 9. 洗板:洗板 5 次,同操作步骤 6。

[0080] 10. 显色:每孔依次加入 TMB 显色剂 100 μl (包括空白对照孔),加盖封板膜,振荡混匀,室温避光反应 10 分钟。

[0081] 11. 终止:每孔加入终止液各 50 μl (包括空白对照孔),振荡混匀终止反应。

[0082] 12. 测定:用酶标仪对空白孔调零,单波长 450nm 测定各孔 OD 值。

[0083] 结果判定:

[0084] 1. 临界值 (cut-off 值) 计算:

[0085] 临界值 = 0.10 + 阴性对照 OD 平均值 (阴性对照 OD 平均值 ≤ 0.05 按 0.05 计算)。

[0086] 2. 结果判定:

[0087] 测定标本 OD 值 ≥ (2 × 临界值) 时为抗猪瘟病毒抗体阳性。

[0088] 测定标本 OD 值介于临界值与 (2 × 临界值) 之间时为可疑。

[0089] 测定标本 OD 值 < 临界值时为抗猪瘟病毒抗体阴性。

[0090] 群体保护率计算:

[0091] 群体保护率 = (抗体阳性数 + 抗体可疑数 × 75%) / 总受检数 × 100%。

[0092] 实施实例 4 本发明试剂盒检测猪瘟抗体

[0093] 取临床样本 30 例,用本试剂盒检测,检测结果如下:

[0094]

样 本 号	结 果	样 本 号	结 果	样 本 号	结 果	样 本 号	结 果	样 本 号	结 果
1	1.347	7	0.078	13	0.984	19	1.264	25	0.845
2	1.567	8	0.045	14	0.963	20	1.653	26	0.117
3	1.473	9	0.645	15	0.947	21	0.121	27	0.087
4	0.986	10	0.845	16	0.845	22	0.089	28	0.045
5	1.253	11	1.256	17	1.256	23	0.104	29	0.037
6	0.769	12	0.127	18	1.358	24	1.547	30	1.587

[0095] 判定： $OD \geq 0.2$ 时为阳性。

[0096] 其中，阳性 20 例，阴性 10 例，吻合率 100%。

[0097] 购买口蹄疫阳性血清、蓝耳病阳性血清、猪瘟阳性进行对比试验如下表：

[0098]

样本号	结果	样本号	结果	样本号	结果
1	0.142	6	0.087	11	1.201
2	0.089	7	0.062	12	1.198
3	0.035	8	0.047	13	1.274
4	0.078	9	0.108	14	1.767
5	0.103	10	0.037	15	1.417

[0099] 其中样本号 1-5 为口蹄疫阳性血清，6-10 为蓝耳病阳性血清，11-15 为猪瘟阳性血清。

[0100] 判定： $OD \geq 0.2$ 时为阳性。其中口蹄疫、蓝耳病血清检出阴性，猪瘟结果阳性，因此本试剂盒具有良好的特异性。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心
江苏中测检测服务有限公司
苏州艾瑞德生物科技有限公司

<120> 一种快速检测猪瘟抗体的试剂盒及其制备方法

<130> 20101220

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> P1

<400> 1

taaaagatc cggcctgacc accacctggg aag

33

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> P2

<400> 2

cccctctcga gttaatagct atcacgcggt tcataatatt tg

42

专利名称(译)	一种快速检测猪瘟抗体的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102175849B	公开(公告)日	2013-07-03
申请号	CN201010600126.4	申请日	2010-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
申请(专利权)人(译)	江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
当前申请(专利权)人(译)	江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
[标]发明人	薛峰 高海岗 张小荣 蒋原 吴艳涛 张睿 刘秀梵 赵红霞		
发明人	薛峰 高海岗 张小荣 蒋原 吴艳涛 张睿 刘秀梵 赵红霞		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
其他公开文献	CN102175849A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测猪瘟抗体的试剂盒。本发明设计出一对特异性的引物，克隆相对保守的基因序列，通过原核表达技术，表达出针对猪瘟E2蛋白的抗原，在此基础上制备出由包被了高纯度、高活性猪瘟病毒特异性抗原的酶联板、含有辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗猪IgG单克隆抗体的酶结合物以及TMB显色液等组成的试剂盒。本试剂盒能快速检测血清或血浆中的猪瘟抗体，特异性强，敏感性高。

样本号	结果	样本号	结果	样本号	结果	样本号	结果	样本号	结果
1	1.347	7	0.078	13	0.984	19	1.264	25	0.845
2	1.567	8	0.045	14	0.963	20	1.653	26	0.117
3	1.473	9	0.645	15	0.947	21	0.121	27	0.087
4	0.986	10	0.845	16	0.845	22	0.089	28	0.045
5	1.253	11	1.256	17	1.256	23	0.104	29	0.037
6	0.769	12	0.127	18	1.358	24	1.547	30	1.587