



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108872575 A

(43)申请公布日 2018.11.23

(21)申请号 201810765361.3

(22)申请日 2018.07.12

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 潘丽 吕建亮 张中旺 张永光
卢田鑫 罗虹 李姚尧

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139
代理人 孙皓晨 马鑫

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体
ELISA检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体的ELISA检测试剂盒。该试剂盒包括塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标抗体、样品稀释液、显色液、终止液以及浓缩洗涤液。所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明所述的试剂盒使用原核表达系统表达的非结构蛋白3ABC抗原包被反应板,抗原用量少,可以高效地检测猪血清中是否存在塞尼卡谷病毒,且与猪水疱病毒、猪瘟病毒和猪圆环病毒-2型不反应。本发明试剂盒特异性好、敏感、高效,具有良好的市场前景。

1. 一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板,阳性对照血清,阴性对照血清,酶标抗体,样品稀释液,显色液、终止液以及浓缩洗涤液。

2. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原经原核表达系统获得,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板按照以下方法制备得到:

(1) 包被抗原的制备和包被

原核表达系统表达获得的重组蛋白包涵体经复性及Ni-NTA纯化得到塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,包被时用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至3.5 μ g/ml,按照100 μ l/孔包被酶标板,4 $^{\circ}$ C冰箱静置过夜;

(2) 酶标板的封闭与保存

酶标板以PBST洗涤3次,按照100 μ l/孔加入含有5w/v%脱脂奶粉和0.01w/v%硫柳汞的封闭液,37 $^{\circ}$ C封闭1h,弃掉封闭液,PBST洗涤3次,采用铝箔袋真空封口,4 $^{\circ}$ C保存。

4. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述阳性对照血清是经塞尼卡病毒感染后14天的高感染滴度的猪血清;所述阴性对照血清是未免疫过任何疫苗的健康猪血清。

5. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗。

6. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的样品稀释液为含1w/v%海藻糖,0.01w/v%硫柳汞,0.01v/v%Tween20和0.5w/v%酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

7. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的显色液为TMB显色液,所述的终止液为2M H₂SO₄溶液。

8. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的浓缩洗涤液为10 $\times$ PBST溶液,即含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/L PBS溶液,pH 7.4,使用时稀释10倍。

9. 如权利要求1所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其特征在于,利用所述的试剂盒进行塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体检测时,按照以下步骤进行:

(1) 样本稀释

将待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清用样品稀释液按照体积比1:32进行稀释;

(2) 洗板

从4 $^{\circ}$ C冰箱中取出塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板,打开铝箔袋,取出酶标板,以稀释好的洗涤液洗板3次,吸水纸拍干,每次3min;

(3) 加样

将稀释后的待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清分别加入酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育45min;

(4) 洗涤

取出酶标板,甩掉血清样品,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干;

(5) 加入酶标抗体

加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗,100 μ L/孔,37℃工作45min;

(6) 加底物

甩掉酶标抗体,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干,加入显色液37℃显色15min,取出后立即加入终止液;

(7) 结果判定

在酶标仪上读取OD450nm数值,待测样本的OD450nm值大于等于阴性对照血清平均值的2.5倍判为阳性,小于阴性对照血清平均值的2.5倍判为阴性。

一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒及其检测方法。本发明属于病毒检测技术领域。

背景技术

[0002] 猪塞尼卡谷病是由塞尼卡谷病毒 (Seneca Valley virus, SVV) 引起的一种猪原发性疱疹病。该病主要引起猪口鼻黏膜及蹄部出现水泡和溃疡。2008年和2012年,美国、加拿大等部分地区在发病猪群中诊断出SVV,2015年9月,美国某种猪场猪群出现跛足、水泡且伴随初生仔猪死亡,PCR检测排除口蹄疫病毒 (FMDV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪轮状病毒、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪呼吸与繁殖综合症病毒 (PRRSV) 的感染,发病猪的血清、皮肤、粪便、蹄部冠状带的PCR检测结果显示为SVV阳性,最终被确诊为SVV感染。同年,我国广东省某猪场相继发生水疱性疾病,母猪发烧厌食、口鼻及蹄部出现水泡,传播速度快,并伴有产房仔猪急性死亡,经检测FMD、SVD、VS检测结果为阴性,SVV显示为阳性,随后分离出了一株SVV毒株 (CH-01-2015),这是中国首次报道有猪感染SVV。虽然猪塞尼卡谷病不会造成与口蹄疫病毒相同的重大经济损失,但是该病对于新生仔猪也有较高的致死率,其临床症状与口蹄疫、猪水泡病、水泡性口炎等高度相似,给鉴别和区分该病带来了一定的困难,目前,尚无有效的疫苗和诊断试剂用于防控SVV。因此,研制出相应的疫苗和鉴别诊断试剂来预防和诊断猪塞尼卡谷病具有重要意义。

[0003] SVV基因组全长约7.2kb,包括5'-UTR、3'-UTR、1个开放阅读框 (ORF) 以及3'末端 poly (A) 尾,研究表明,SVV的RNA编码1个长为2181个氨基酸的多聚蛋白,该多聚蛋白可进一步水解为前导蛋白L、结构蛋白P1,非结构蛋白P2和P3,P1进一步被P3前体蛋白中具有蛋白酶活性的3C和一些可能的细胞内切酶切割分解为VP0、VP1和VP3三种结构蛋白。对于猪塞尼卡谷病的诊断来说,检测非结构蛋白或其抗体可以有效区分疫苗免疫动物与野毒感染动物。

[0004] 本发明以非结构蛋白3ABC作为候选基因,克隆获得SVV的3ABC基因,以大肠杆菌中表达并纯化3ABC蛋白作为包被抗原,建立SVV的非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,为今后应对SVV的可能疫情,提前做好技术储备具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种特异性好、灵敏度高的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,旨在解决上述背景技术中,目前尚无有效的、快速的鉴别诊断试剂用于SVV的防控的问题,为今后提前应对SVV的可能疫情做好技术储备。

[0006] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术手段为:

[0007] 本发明的一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒,其包括塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板,阳性对照血清,阴性对照血清,酶标抗体,样品稀释液,显色液、终止液以及浓缩洗涤液。

[0008] 其中,优选的,试剂盒保存在4℃冰箱中。

[0009] 其中,优选的,所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原经原核表达系统获得,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 其中,优选的,所述的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板按照以下方法制备得到:

[0011] (1) 包被抗原的制备和包被

[0012] 原核表达系统表达获得的重组蛋白包涵体经复性及Ni-NTA纯化得到塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,包被时用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至3.5μg/ml,按照100μl/孔包被酶标板,4℃过夜;

[0013] (2) 酶标板的封闭与保存

[0014] 酶标板以PBST洗涤3次,每孔加入100μl含有5w/v%脱脂奶粉和0.01w/v%硫柳汞的封闭液,37℃封闭1h,弃掉封闭液,PBST洗涤3次,采用铝箔袋真空封口,4℃保存。

[0015] 其中,优选的,所述阳性对照血清是经塞尼卡病毒感染后14天的高感染滴度的猪血清;所述阴性对照血清是未免疫过任何疫苗的健康猪血清。

[0016] 其中,优选的,所述的酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗。

[0017] 其中,优选的,所述的样品稀释液为含1w/v%海藻糖、0.01w/v%硫柳汞、0.01v/v%Tween20和0.5w/v%酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

[0018] 其中,优选的,所述的显色液为TMB显色液,所述的终止液为2M H₂SO₄溶液。

[0019] 其中,优选的,所述的浓缩洗涤液为10×PBST溶液,即含有0.5v/v%Tween20的0.1mol/L PBS溶液,pH 7.4,使用时稀释10倍。

[0020] 进一步的,本发明还提出了利用所述的试剂盒进行塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体检测的方法,按照以下步骤进行:

[0021] (1) 样本稀释

[0022] 将待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清用样品稀释液按照体积比1:32进行稀释;

[0023] (2) 洗板

[0024] 从4℃冰箱中取出塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板,打开铝箔袋,取出酶标板,以稀释好的洗涤液洗板3次,吸水纸拍干,每次3min;

[0025] (3) 加样

[0026] 将稀释后的待测样本、阳性对照血清以及阴性对照血清分别加入酶标板中,每孔100μL,37℃孵育45min;

[0027] (4) 洗涤

[0028] 取出酶标板,甩掉血清样品,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干;

[0029] (5) 加入酶标抗体

[0030] 加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗,100μL/孔,37℃工作45min;

[0031] (6) 加底物

[0032] 甩掉酶标抗体,用洗涤液漂洗4次,吸水纸拍干,加入显色液37℃显色15min,取出后立即加入终止液;

[0033] (7) 结果判定

[0034] 在酶标仪上读取OD450nm数值,待测样本的OD450nm值大于等于阴性对照血清平均值的2.5倍判为阳性,小于阴性对照血清平均值的2.5倍判为阴性。

[0035] 相较于现有技术,本发明的有益效果在于:

[0036] (1) 本发明检测试剂盒是将塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC在E.Coli高效表达,蛋白产量高,抗原纯度达90%以上;

[0037] (2) 本发明检测试剂盒具有操作简单,敏感性高,特异性强等优点,可以用于大量样品检测和流行病学调查。

附图说明

[0038] 图1是本发明实施例提供的3ABC蛋白表达结果;

[0039] 图中:泳道M:蛋白分子量标准(116.0/66.2/45.0/35.0/25.0/18.4/14.4kDa);泳道1:宿主菌全菌蛋白;泳道2:IPTG诱导全菌蛋白;

[0040] 图2是本发明实施例提供的表达的菌体破碎上清及沉淀SDS-PAGE电泳图;

[0041] 图中:泳道M:蛋白分子量标准(116.0/66.2/45.0/35.0/25.0/18.4/14.4kDa);泳道1:诱导表达破碎后的上清蛋白;泳道2:诱导表达破碎后的不溶蛋白;

[0042] 图3是本发明实施例提供的纯化重组蛋白结果。

[0043] 图中:泳道M:蛋白分子量标准(116.0/66.2/45.0/35.0/25.0/18.4/14.4kDa);泳道1:洗脱蛋白。

具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施例对本发明做进一步说明,但下述实施例不会在任何方面限制本发明的保护范围。

[0045] 实施例1塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒的制备及组装

[0046] (一) 试剂盒的制备:

[0047] 1、塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原的表达:

[0048] 将塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC的编码基因969bp (SEQ ID NO.1所示) 克隆到pET-30a(+) 原核表达载体,经酶切、测序正确后,阳性质粒转化至BL21DE3plysS菌株,卡那霉素抗性LB平板筛选单克隆,37℃,LB培养基摇菌过夜;将过夜菌液按体积比(v/v) 1:100转接至新鲜LB培养基,37℃,200rpm摇3h至OD600值达到0.6左右,加入终浓度1mmol/L的IPTG继续摇菌3h,6000rpm离心收集菌液。降低培养温度到30℃;加入IPTG诱导剂至终浓度0.5mM,30℃继续震荡培养3-4h;8000rpm离心3min收集菌体,重悬于50mL预冷NTA-0缓冲液中,冰浴30min;超声破碎菌体,16000rpm 4℃离心50min,收集上清以及沉淀;取少量上清及沉淀进行SDS-PAGE检测,蛋白表达结果如图1所示,表达的菌体破碎上清及沉淀SDS-PAGE电泳图如图2所示。剩余上清及沉淀置于4℃备用。

[0049] 2、包涵体蛋白纯化、复性:沉淀以50mL NTA-0缓冲液重悬,加入DTT至终浓度1mM,超声促进杂蛋白溶解,离心收集沉淀,重复三次至上清透明,沉淀以PBS重悬,超声,离心去上清,以6M盐酸胍重悬包涵体,加DTT至终浓度5mM;37℃震荡3h至包涵体全部溶解,离心去上清。再用蛋白复性液将蛋白低温透析复性,以2倍体积的3M盐酸胍稀释蛋白溶液,在4℃下逐滴加入到200mL复性液(pH8.0)中,转速调节至最大,搅拌24h,取蛋白溶液于透析袋中,以

PEG60000浓缩后以PBS缓冲液透析过夜。复性后的蛋白用阴离子交换柱Ni-NTA再次纯化,收集蛋白。蛋白纯化结果如图3所示,塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0050] 3、包被抗原的制备与最佳包被浓度的选择:

[0051] 纯化蛋白用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 系列稀释成7 μ g/mL, 3.5 μ g/mL, 1.75 μ g/mL, 0.88 μ g/mL, 0.44 μ g/mL, 0.22 μ g/mL, 每个浓度包被两列, 按照100 μ L/孔加到96孔酶标板上, 4 $^{\circ}$ C包被过夜。结果表明, 包被抗原浓度为3.5 μ g/mL时阳性值OD450值大于1.0, 且P/N的值最大, 因此确定该浓度为最佳包被浓度 (表1)。

[0052] 表1 棋盘滴定抗原工作浓度 (OD450nm)

[0053]

包被浓度 (μ g/mL)	7	3.5	1.75	0.88	0.44	0.22
阳性样品 (P)	2.286	1.452	0.964	0.723	0.756	0.708
阴性样品 (N)	0.199	0.109	0.09	0.086	0.088	0.083
P/N	11.487	12.404	10.71	8.407	8.59	8.53

[0054] 4、酶标板的封闭:

[0055] 上述酶标板用PBST (含0.5v/v% Tween20的0.01mol/L PBS溶液, pH 7.4) 洗4次, 每孔加入100 μ L封闭液 (含有5w/v% 脱脂奶粉和0.01w/v% 的硫柳汞), 37 $^{\circ}$ C放置2h。弃掉封闭液, PBST洗涤3遍, 得到预包被抗原的酶标板, 采用铝箔袋真空封口, 4 $^{\circ}$ C保存。

[0056] 5、标准血清的制备:

[0057] 用塞尼卡谷病毒按照免疫程序接种70日龄的健康易感仔猪 (猪塞尼卡谷病毒血清中和抗体效价不高于1:4, 猪塞尼卡谷病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪口蹄疫病毒抗原阴性), 采集接种前的猪血清, 将该批次样品无菌分装作为阴性对照血清, 另外收集接种后14天的血清, 将该批次样品无菌分装作为阳性对照血清。

[0058] 6、酶标抗体 (10 $\times$)

[0059] 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG二抗, 使用时稀释10倍使用。

[0060] 7、样品稀释液

[0061] 样品稀释液为含1w/v% 海藻糖, 0.01w/v% 硫柳汞, 0.01v/v% Tween20和0.5w/v% 的酪蛋白的0.01M磷酸盐溶液。

[0062] 8、PBST (10 $\times$)

[0063] 含有0.5v/v% Tween20的0.1mol/L PBS溶液, pH 7.4。使用时稀释10倍使用。

[0064] 9、显色液以及终止液

[0065] 显色液为TMB显色液, 终止液为2M H₂SO₄溶液。

[0066] (二) 试剂盒的组装及保存

[0067] 按照表2所列的试剂盒内容, 装配试剂盒, 组成后装于4 $^{\circ}$ C保存。

[0068] 表2 ELISA检测试剂盒内容

[0069]

编号	内容	数量
1	说明书	1 份
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)
3	阳性对照血清	500 μ l
4	阴性对照血清	500 μ l
5	酶标抗体 (10 $\times$)	500 μ l
6	样品稀释液	20 ml
7	PBST (10 $\times$)	25ml
8	显色液	5ml
9	终止液	5ml

[0070] (三) 试剂盒的使用方法 (检测方法)

[0071] (1) 稀释: 用灭菌水将 PBST (10 $\times$) 洗液稀释至 250ml, 以样品稀释液将酶标抗体 (10 $\times$) 稀释至 5ml。

[0072] (2) 洗板: 打开包装袋, 取出预包被抗原的酶标板, 以稀释好的 PBST 洗板 3 次, 吸水纸拍干, 每次 3min。

[0073] (3) 加样: 将血清样品以 1:32 倍稀释, 每孔 100 μ l 加入到反应板中, 加入阳性对照血清与阴性对照血清, 100 μ L/孔, 该对照血清做两个重复。37 $^{\circ}$ C 孵育 45min。[0074] (4) 加酶标抗体: 甩掉血清样品, 用 PBST 漂洗 4 次, 吸水纸拍干, 加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 二抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45min。[0075] (5) 加底物: 甩掉酶标抗体, 用 PBST 漂洗 4 次, 吸水纸拍干。加入 TMB 底物溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 取出加入 100 μ l/孔的反应终止液。

[0076] (6) 在酶标仪上读取 OD450 数值。

[0077] 在酶标仪上读取 OD450 数值, 待测样本的 OD450nm 值大于等于阴性对照血清平均值的 2.5 倍判为阳性, 小于阴性对照血清平均值的 2.5 倍判为阴性。

[0078] 实施例 2 塞尼卡谷病毒非结构蛋白 3ABC 抗体 ELISA 检测试剂盒的敏感性、特异性实验

[0079] 1、敏感性实验:

[0080] 利用实施例 1 制备得到试剂盒检测 80 份血清样品, 这些样品是在实验攻毒后收集的的血清样品, 这些猪在进行攻毒之前未进行任何免疫, 检测方法同实施例 1 通过计算阳性检出率分析该方法的敏感性。ELISA 检测结果表明以上样品阳性 76 份, 阴性 4 份, 阳性检出率为 95%。说明本发明的试剂盒具有较好的敏感性, 结果如表 3 所示。

[0081] 表 3 ELISA 试剂盒敏感性试验

[0082]

检测方法	样品数 (份)	阳性数(份)	阴性数 (份)	阳性率 (%)
间接 ELISA	80	76	4	95%

[0083] 2、特异性实验:

[0084] 利用实施例1制备得到试剂盒检测了猪水疱病阳性血清、猪瘟病毒阳性血清和猪圆环病毒-2型阳性血清以及猪塞尼卡谷病毒阴性血清各30份,检测方法同实施例1。这些血清用于评价塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测方法的特异性。检测猪水疱病阳性血清、猪瘟病毒阳性血清、猪圆环病毒-2型和猪塞尼卡谷病毒阴性血清的反应均为阴性结果,结果如下表4,表明本发明的试剂盒有很好的特异性,从根本上保证了检测结果的准确和可靠性。以上血清初步检测结果表明:选取的塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC蛋白作为诊断抗原具有良好的敏感性和特异性。

[0085] 表4 ELISA试剂盒特异性试验

[0086]

阳性血清类型	样品数 (份)	反应结果
猪瘟病毒	30	-
猪圆环病毒-2 型	30	-
猪水疱病毒	30	-
猪塞尼卡病毒阴性血清	30	-

[0087] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒

<160>2

<170>Patent-In 3.5

<210>1

<211>969

<212>DNA

<213>Seneca Valley virus

<400>1

```

agccccaacg agaatgatga caccgccgtc gacgaggcgt tgggtagagt tctctccccc 60
gctgcggtcg atgaggcget tctcgacctc actccagagg ccgaccgggt tggccgtttg 120
gctattcttg ccaagctagg tcttgcccta gctgcggtca cccctgggtc gataatcttg 180
gcagtgggac tctacaggta cttctctggc tctgatgcag accaagaaga aacagaaagt 240
gagggatctg tcaaggcacc caggagcgaa aatgcttatg acggcccgaa gaaaaactct 300
aagccccctg gagcactctc tctcatggaa atgcaacagc ccaacgtgga catgggcttt 360
gaggctgcgg tcgctaagaa agtggtcgct cccattacct tcatggttcc caacagacct 420
tctgggctta cacagtccgc tcttctggtg accggccgga ccttcctaata caatgaacat 480
acatgggtcca atccctcctg gaccagcttc acaatccgcg gtgaggtaca cactcgtgat 540
gagcccttcc aaacggttca tttcactcac cacggtattc ccacagatct gatgatggta 600
cgtctcggac cgggcaattc tttccctaac aatctagaca agtttggact tgaccagatg 660
ccggcacgca actcccgtgt ggttggcggt tcgtccagtt acggaaactt cttcttctct 720
ggaaatttcc tcggatttgt tgattccatc acctctgaac aaggaactta cgcaagactc 780
tttaggtaca gggtgacgac ctacaaagga tgggtgcggct cggccctgggt ctgtgaggcc 840
gggtggcgctc gacgcatcat tggcctgcat tctgctggcg ccgccgggtat cggcgccggg 900
acctatatct caaaattagg actaatcaaa gccctgaaac acctcggtga acctttggcc 960
acaatgcaa 969

```

<210>2

<211>323

<212>PRT

<213>Seneca Valley virus

<400>2

```

Ser Pro Asn Glu Asn Asp Asp Thr Pro Val Asp Glu Ala Leu Gly 15
Arg Val Leu Ser Pro Ala Ala Val Asp Glu Ala Leu Val Asp Leu 30
Thr Pro Glu Ala Asp Pro Val Gly Arg Leu Ala Ile Leu Ala Lys 45
Leu Gly Leu Ala Leu Ala Ala Val Thr Pro Gly Leu Ile Ile Leu 60
Ala Val Gly Leu Tyr Arg Tyr Phe Ser Gly Ser Asp Ala Asp Gln 75
Glu Glu Thr Glu Ser Glu Gly Ser Val Lys Ala Pro Arg Ser Glu 90

```

Asn Ala Tyr Asp Gly Pro Lys Lys Asn Ser Lys Pro Pro Gly Ala 105
Leu Ser Leu Met Glu Met Gln Gln Pro Asn Val Asp Met Gly Phe 120
Glu Ala Ala Val Ala Lys Lys Val Val Val Pro Ile Thr Phe Met 135
Val Pro Asn Arg Pro Ser Gly Leu Thr Gln Ser Ala Leu Leu Val 150
Thr Gly Arg Thr Phe Leu Ile Asn Glu His Thr Trp Ser Asn Pro 165
Ser Trp Thr Ser Phe Thr Ile Arg Gly Glu Val His Thr Arg Asp 180
Glu Pro Phe Gln Thr Val His Phe Thr His His Gly Ile Pro Thr 195
Asp Leu Met Met Val Arg Leu Gly Pro Gly Asn Ser Phe Pro Asn 210
Asn Leu Asp Lys Phe Gly Leu Asp Gln Met Pro Ala Arg Asn Ser 225
Arg Val Val Gly Val Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Phe Phe Phe Ser 240
Gly Asn Phe Leu Gly Phe Val Asp Ser Ile Thr Ser Glu Gln Gly 255
Thr Tyr Ala Arg Leu Phe Arg Tyr Arg Val Thr Thr Tyr Lys Gly 270
Trp Cys Gly Ser Ala Leu Val Cys Glu Ala Gly Gly Val Arg Arg 285
Ile Ile Gly Leu His Ser Ala Gly Ala Ala Gly Ile Gly Ala Gly 300
Thr Tyr Ile Ser Lys Leu Gly Leu Ile Lys Ala Leu Lys His Leu 315
Gly Glu Pro Leu Ala Thr Met Gln 323

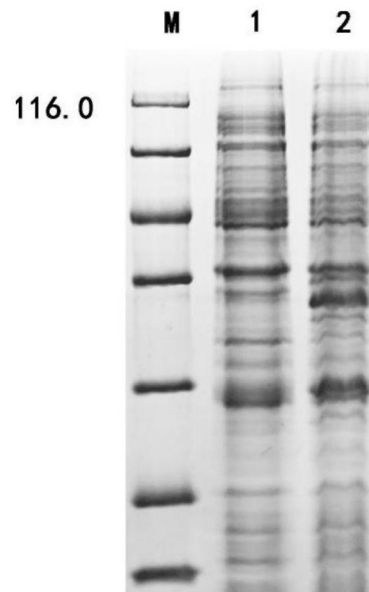


图1

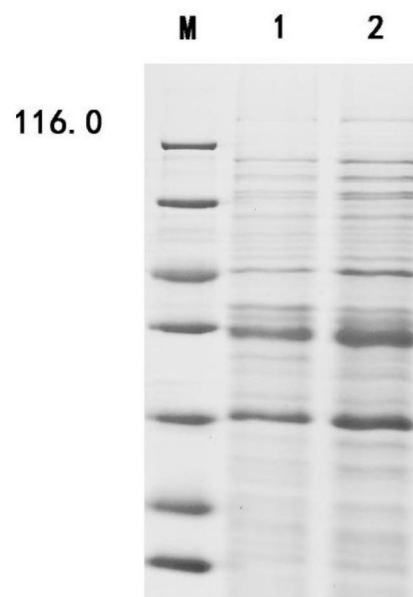


图2

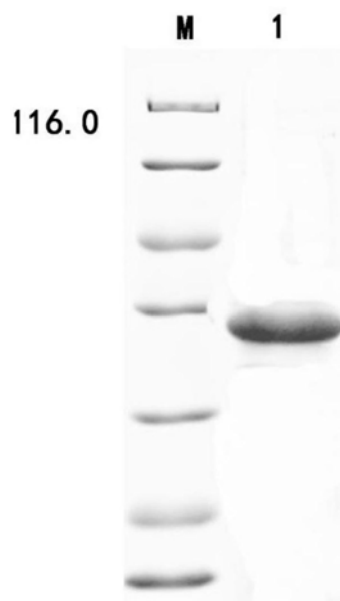


图3

专利名称(译)	一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN108872575A	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201810765361.3	申请日	2018-07-12
[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	潘丽 吕建亮 张中旺 张永光 罗虹		
发明人	潘丽 吕建亮 张中旺 张永光 卢田鑫 罗虹 李姚尧		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56994 G01N33/6854 G01N2333/03 G01N2333/47		
代理人(译)	孙皓晨 马鑫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗体的ELISA检测试剂盒。该试剂盒包括塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC抗原包被的酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标抗体，样品稀释液，显色液、终止液以及浓缩洗涤液。所述塞尼卡谷病毒非结构蛋白3ABC的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明所述的试剂盒使用原核表达系统表达的非结构蛋白3ABC抗原包被反应板，抗原用量少，可以高效地检测猪血清中是否存在塞尼卡谷病毒，且与猪水疱病毒、猪瘟病毒和猪圆环病毒-2型不反应。本发明试剂盒特异性好、敏感、高效，具有良好的市场前景。

编号	内容	数量
1	说明书	1 份
2	预包被抗原的酶标板	1 块 (96 孔)
3	阳性对照血清	500 μ l
4	阴性对照血清	500 μ l
5	酶标抗体 (10 $\times$)	500 μ l
6	样品稀释液	20 ml
7	PBST (10 $\times$)	25ml
8	显色液	5ml
9	终止液	5ml