



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109187967 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 01

(21) 申请号 201811091582.3

(22) 申请日 2018.09.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109187967 A

(43) 申请公布日 2019.01.11

(73) 专利权人 郑州大学
地址 450000 河南省郑州市高新技术开发
区科学大道100号
专利权人 河南中泽生物工程有限公司

(72) 发明人 张改平 刘运超 王爱萍 刘东民
赵建国 陈玉梅 石海宁 周景明
王方雨 王彦伟

(74) 专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所
(普通合伙) 41122
代理人 张爱军

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 205229160 U, 2016.05.11

CN 1877331 A, 2006.12.13

CN 105348386 A, 2016.02.24

CN 104404074 A, 2015.03.11

CN 203465272 U, 2014.03.05

US 2008280296 A1, 2008.11.13

KR 20160075963 A, 2016.06.30

审查员 胡晓佳

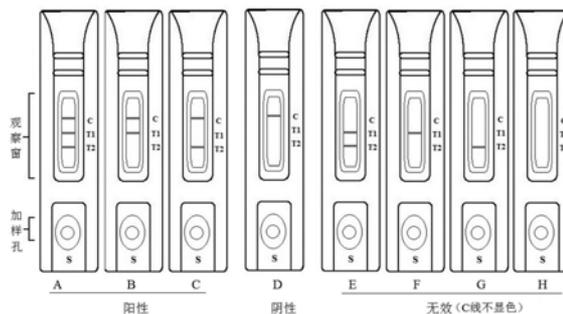
权利要求书4页 说明书14页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡及其制备方法。该检测卡利用双抗夹心ELISA检测抗原的原理,分别将可以特异性识别O型口蹄疫病毒的单克隆抗体mAbI和能特异性识别A型口蹄疫病毒的单克隆抗体mAbII喷到检测膜(硝酸纤维膜)的T1、T2检测线位置制备检测印记;将羊抗或兔抗小鼠IgG或SPA喷到检测膜的质控区C线位置制备质控印记。金标抗体纤维层分为上下两层,分别吸附的是胶体金标记的能特异性识别O型口蹄疫病毒的单克隆抗体mAbIII和能特异性识别A型口蹄疫病毒的单克隆抗体mAbIV。该试纸条可用于快速检测O型、A型口蹄疫病毒(FMDV)感染。应用本发明,操作简单快速,结果清晰易辨,适合基层推广。



1. 一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡,包括卡壳和试纸条,试纸条包括支撑板和固定在支撑板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫,其特征在于,金标垫包括依次上下叠放设置在支撑板上的上层金标垫和下层金标垫,在上层金标垫上吸附有胶体金标记的抗O-FMDV单克隆抗体mAbIII,在下层金标垫上吸附有胶体金标记的抗A-FMDV单克隆抗体mAbIV,检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C,抗O-FMDV单克隆抗体mAbI印制的检测线T1,以及抗A-FMDV单克隆抗体mAbII印制的检测线T2;

抗O-FMDV单克隆抗体mAbI、mAbIII以及抗A-FMDV单克隆抗体mAbII、mAbIV的制备方法包括:(1)O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备:制备O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原;(2)动物免疫:以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs免疫BALB/c小鼠,间接ELISA,测定免疫小鼠小鼠效价;VLPs免疫组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合;(3)细胞融合及杂交瘤细胞的筛选:利用酶联免疫吸附试验对融合细胞进行阳性筛选,然后通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3-5轮亚克隆,直到最终获得稳定分泌的单克隆抗体杂交瘤细胞株,进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选,最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株,即识别O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAbIII,以及识别A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV;(4)单抗腹水的制备及纯化:小鼠体内诱生腹水及进一步纯化获得相应单抗IgG;(5)单克隆抗体的鉴定:测定单克隆抗体的效价,并用ELISA测定单克隆抗体的效价、亲和力、特异性;

所述O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备:制备O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原,其步骤为

1) 基因优化:以GenBank公布的O-FMDV、A-FMDV毒株序列为参考,依据大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行密码子优化后,分别合成优化后的如SEQ ID NO.1所示的O型FMDV的P1结构蛋白基因以及如SEQ ID NO.2所示的A型FMDV的P1结构蛋白基因;

2) 原核表达载体构建:将上述优化的基因合成后装入pUC57质粒中,以上述合成基因为模板,分别根据O型或A型FMDV P1模板基因序列设计VP0、VP1、VP3相应的特异性引物对:

O型VP0:

上游引物:OVP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGAACACTGGTAGCATCATT-3'

下游引物:OVP0-R:5' -GGATCCTTATTCCTTGGACGGGAAGTCA-3'

O型VP1:

上游引物:OVP1-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGACCACCTCTACCGGTGAAT-3'

下游引物:OVP1-R:5' -GGATCCTTACAGAGACTGTTTAACCGGA-3'

O型VP3:

上游引物:OVP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCTCCCGGTTGCTT-3'

下游引物:OVP3-R:5' -GGATCCTTATTGACGCTCGTCAGCAG-3'

A型VP0:

上游引物:AVP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGCGCCGGTCAATCCAG-3'

下游引物:AVP0-R:5' -GGATCCTTACTCTTTAGATGGCAGCTC-3'

A型VP1:

上游引物:AVP1-F:5'-TTGGTCTCTAGGTATGCCACTGCTACCGGTGAAAGCGCAGAT-3'

下游引物:AVP1-R:5'-GGATCCTTACAGCAGCTGTTTCGCCGGCGCAAT-3'

A型VP3:

上游引物:AVP3-F:5'-TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCGTGCCGGTTGC-3'

下游引物:AVP3-R:5'-GGATCCTTAGGTTTGTGCGCGCGGGTCAATT-3'

经PCR扩增,分别获得O型和A型FMDV的VP0、VP1、VP3基因并将其克隆至pE-SUMO载体,构建原核表达载体;

3) 共表达载体的构建:随后用PCR定向克隆同源重组试剂盒将含有上游启动子的SUMO-VP0、SUMO-VP3克隆至pE-SUMO-VP1载体,分别构建O型和A型FMDV的SUMO-VP0、SUMO-VP1、SUMO-VP3共表达载体;

4) 利用大肠杆菌表达系统共表达猪O型或A型FMDV结构蛋白VP0、VP1和VP3,制备并纯化获得VLPs,具体制备方法如下:将重组菌在LB培养基中培养至OD₆₀₀达到0.6时,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导剂,使其浓度为0.3mmol/L,在30℃诱导表达12h,将表达菌液离心,收获细菌沉淀;将得到的菌体重悬于0.01mol/L PBS缓冲液中,超声破碎后离心收集上清,经Ni柱纯化蛋白;将纯化后的蛋白透析,随后用SUMO蛋白酶切除SUMO-tag,并将酶切后蛋白装入透析袋放入0.01mol/L PBS缓冲液透析促进VLPs的形成;收集透析袋内的液体,经10000r/min、4℃离心10min,弃去沉淀,将上清过分子筛分离纯化收集VLPs,获得O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原,-4℃保存备用。

2. 根据权利要求1所述的双联快速检测卡,其特征在于,动物免疫:共分为4组,分别以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs为免疫抗原;商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗按照商品说明书进行免疫,免疫剂量按照比例进行增减;免疫抗原O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs分别与弗氏免疫佐剂或弗氏不完全佐剂等量混合,充分乳化;通过背部皮下多点注射的方法,用弗氏完全佐剂免疫抗原分别免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠各3只,30μg/只;在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫2次,第2次加强免疫后两周,尾部采血,间接ELISA测小鼠血清效价;VLPs免疫组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合,在细胞融合前3-4天通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的免疫抗原进行超免,免疫剂量为50μg/只。

3. 根据权利要求1所述的双联快速检测卡,其特征在于,细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与鉴定:对小鼠进行超免后第3天,采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用选择含HAT培养液轻轻混悬,分散融合细胞到96孔细胞培养板中,250μL/孔,置37℃、5%CO₂培养箱内培养,培养3-4天可以显微镜观察到小细胞团,6-8天补加50μL/孔HAT培养液;10天后,分别以相应的O型或A型FMDV灭活病毒或VLPs作为包被抗原,利用酶联免疫吸附试验对融合细胞进行阳性筛选,然后通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3-5轮亚克隆,直到最终获得稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选,最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株,用于产生识别O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAbIII,以及识别A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV。

4. 根据权利要求1所述的双联快速检测卡,其特征在于,单抗腹水的制备及纯化:选择

经产的雌性BALB/c小鼠,腹腔内注射500 μ L灭菌石蜡,一周后,再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞,注射量为 2×10^5 个细胞/只,再过一周后,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化。

5. 一种如权利要求1-4任一项所述的双联快速检测卡的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 0-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备

1) 基因优化:以GenBank公布的0-FMDV、A-FMDV毒株序列为参考,依据大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行密码子优化后,分别合成优化后的如SEQ ID NO.1所示的0型FMDV的P1结构蛋白基因以及如SEQ ID NO.2所示的A型FMDV的P1结构蛋白基因;

2) 原核表达载体构建:将上述优化的基因合成后装入pUC57质粒中,以上述合成基因为模板,分别根据0型或A型FMDV P1模板基因序列设计VP0、VP1、VP3相应的特异性引物对:

0型VP0:

上游引物:0VP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGAACACTGGTAGCATCATT-3'

下游引物:0VP0-R:5' -GGATCCTTATTCCTTGGACGGGAAGTCA-3'

0型VP1:

上游引物:0VP1-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGACCACCTCTACCGGTGAAT-3'

下游引物:0VP1-R:5' -GGATCCTTACAGAGACTGTTTAACCGGA-3'

0型VP3:

上游引物:0VP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCTCCCGGTTGCTT-3'

下游引物:0VP3-R:5' -GGATCCTTATTGACGCTCGTCAGCAG-3'

A型VP0:

上游引物:AVP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGCGCCGGTCAATCCAG-3'

下游引物:AVP0-R:5' -GGATCCTTACTCTTTAGATGGCAGCTC-3'

A型VP1:

上游引物:AVP1-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGCCACTGCTACCGGTGAAAGCGCAGAT-3'

下游引物:AVP1-R:5' -GGATCCTTACAGCAGCTGTTTCGCCGGCGCAAT-3'

A型VP3:

上游引物:AVP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCGTGCCGGTTGC-3'

下游引物:AVP3-R:5' -GGATCCTTAGGTTTGTGCGCGGGTCAATT-3'

经PCR扩增,分别获得0型和A型FMDV的VP0、VP1、VP3基因并将其克隆至pE-SUMO载体,构建原核表达载体;

3) 共表达载体的构建:随后用PCR定向克隆同源重组试剂盒将含有上游启动子的SUMO-VP0、SUMO-VP3克隆至pE-SUMO-VP1载体,分别构建0型和A型FMDV的SUMO-VP0、SUMO-VP1、SUMO-VP3共表达载体;

4) 利用大肠杆菌表达系统共表达猪0型或A型FMDV结构蛋白VP0、VP1和VP3,制备并纯化获得VLPs,具体制备方法如下:将重组菌在LB培养基中培养至OD₆₀₀达到0.6时,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导剂,使其浓度为0.3mmol/L,在30 $^{\circ}$ C诱导表达12h,将表达菌液离心,收获细菌沉淀;将得到的菌体重悬于0.01mol/L PBS缓冲液中,超声破碎后离心收集上清,经Ni柱纯化蛋白;将纯化后的蛋白透析,随后用SUMO蛋白酶切除SUMO-tag,并将酶切后蛋白

装入透析袋放入0.01mol/LPBS缓冲液透析促进VLPs的形成；收集透析袋内的液体，经10000r/min、4℃离心10min，弃去沉淀，将上清过分子筛分离纯化收集VLPs，获得O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原，-4℃保存备用；

(2) 动物免疫

共分为4组，分别以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs为免疫抗原；将商品化O-FMDV、A-FMDV病毒灭活疫苗按照商品说明书进行免疫，免疫剂量按照比例进行增减；免疫抗原O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs分别与弗氏免疫佐剂或弗氏不完全佐剂等量混合，充分乳化；通过背部皮下多点注射的方法，用弗氏完全佐剂免疫抗原分别免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠各3只，30μg/只；在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫2次，第2次加强免疫后两周，尾部采血，间接ELISA测小鼠血清效价；VLPs免疫组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合，在细胞融合前3-4天通过尾静脉注射的方法，用不含佐剂的免疫抗原进行超免，免疫剂量为50μg/只；

(3) 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选

对小鼠进行超免后第3天，采用聚乙二醇的方法，将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合，融合后的细胞用选择含HAT培养液轻轻混悬，分散融合细胞到96孔细胞培养板中，250μL/孔，置37℃、5%CO₂培养箱内培养，培养3-4天可以显微镜观察到小细胞团，6-8天补加50μL/孔HAT培养液；10天后，分别以相应的O型或A型FMDV灭活病毒或VLPs作为包被抗原，利用酶联免疫吸附试验对融合细胞进行阳性筛选，然后通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3-5轮亚克隆，直到最终获得稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株，进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选，最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株，用于产生识别O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAbIII，以及识别A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV；

(4) 单抗腹水的制备及纯化

选择经产的雌性BALB/c小鼠，腹腔内注射500μL灭菌石蜡，一周后，再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞，注射量为 2×10^5 个细胞/只，再过一周后，待小鼠腹部膨大后抽取腹水，离心后取上清，用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化；

(5) 单克隆抗体的鉴定

测定单克隆抗体的效价，并用ELISA测定单克隆抗体的效价、亲和力、特异性；

(6) 检测卡的制备

(a) 金标垫的制备：将金标抗体吸附于玻璃纤维棉中，制得金标垫；

(b) 检测膜的制备：在NC膜中央，分别喷点抗O-FMDV单克隆抗体mAbI形成检测线T1印迹，喷点抗A-FMDV单克隆抗体mAbII形成检测线T2印迹，以及喷点羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA形成质控线C印迹，制得检测膜；

(c) 将样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫按顺序粘贴在支撑板上后，裁切制成试纸条；试纸条制备完成后，将试纸条装入塑料卡壳中，盖紧卡壳，制成快速检测卡。

一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及同时对两种家畜疫病鉴定的检测器具,特别是涉及一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡及其制备方法。

背景技术

[0002] 口蹄疫病(foot-and-mouth disease,FMD)是由口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus,FMDV)引起偶蹄动物(猪、牛、羊)的一种急性、热性、高度接触性传染病,易感动物多达70余种,该病具有感染动物种类多、传播速度快、传染性极强、引起的经济损失巨大等特点。口蹄疫是《OIE疫病、感染及侵染名录》中须申报的25种多种动物共患传染病和寄生虫病之一,被世界动物卫生组织定为A类传染病,是我国农业部要求强制免疫防控的动物疫病。

[0003] FMDV属于小RNA病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthavims),呈球形,无囊膜病毒,直径为20-30nm,分子量 6.9×10^6 道尔顿。FMDV基因组为单股正链RNA,约由8500个核苷酸(nucleotide,nt)组成。FMDV基因组的中部长约6500bp,由L基因、P1结构蛋白基因、P2和P3非结构蛋白基因以及起始密码子和终止密码子组成。该区域包含一个较大的开放阅读框(open reading frame,ORF),编码一多聚蛋白,多聚蛋白经3级裂解后,形成12种病毒蛋白,4种病毒结构蛋白(VP4,VP2,VP3,VP1)和8种非结构蛋白(L,2A,2B,2C,3A,3B,3C和3D)。电镜观察显示,FMDV是一个表面光滑、直径约25nm的球形颗粒,完整的FMDV病毒粒子由大约30%的RNA和70%的蛋白质组成。FMDV病毒的衣壳蛋白包含1A(VP4,85AA)、1B(VP2,218AA)、1C(VP3,220AA)和1D(VP1,213AA)四种蛋白各60分子,四种结构蛋白各1个分子组成1个原粒,每5个原粒经一种脲酶敏感区聚集在一起形成1个5S五聚体,12个五聚体借助组氨酸聚合成75S病毒衣壳。在病毒粒子的最后形成阶段VP0经成熟裂解为VP2、VP4,病毒RNA组装进入75S的VLPs形成完整的病毒粒子。X-射线衍射分析证实,VP1、VP2、VP3蛋白位于衣壳表面,VP1-VP2-VP3形成的 β -桶是通过形成于病毒粒子外表面的loop相连接;同时,这三种结构蛋白也是病毒的主要变异区,与病毒的稳定性、对毒力、宿主范围和免疫抗原性密切相关。

[0004] FMDV分为O型(O)、A型(A)、C型(C)、南非1型(SAT1)、南非2型(SAT2)、南非3型(SAT3)和亚洲I型(Asia 1)等7个血清型,血清型间无交叉免疫现象。控制和消灭口蹄疫的工作仍将面临不少困难和挑战,任重道远。猪口蹄疫的发病率高,传播迅速,可造成母猪流产、仔猪大批死亡,带来严重的经济损失。我国对口蹄疫采取强制免疫策略,每年都会使用大量的灭活疫苗,并监测疫苗免疫效果,提高动物临床抗体水平。如何快速检测FMDV感染动物已成为影响口蹄疫防控的关键。目前实验室检测FMDV感染的常用方法有:病毒分离、RT-PCR检测、酶联免疫吸附试验(ELISA)等;上述方法测定时操作复杂、费时、费力,需要特定的仪器设备和专业技术人员,很难在基层普及推广。1971年Faulk和Taylor将胶体金引入免疫化学,此后胶体金免疫层析技术(Immune colloidal gold technique,GICT)作为一种新的

免疫学方法,在生物医学各领域得到了日益广泛的应用。过去几年中,该方法在快速现场测定中的应用不断扩大,而其在FMDV相关检测方面的应用主要是FMDV抗体检测。由于在口蹄疫疫苗生产过程中,3ABC非结构蛋白会被除去,动物接种口蹄疫疫苗不产生3ABC抗体。因此,检测3ABC蛋白抗体,可作为诊断野毒感染的重要指标,目前出现的FMDV胶体金快速检测卡大多数是基于检测3ABC蛋白抗体的试纸条,如专利CN105954514A、CN202814986U、CN101236204、CN1798976B等均属于检测FMDV抗体的胶体金快速检测卡;而目前出现的FMDV抗原快速检测卡大多数是检测O型FMDV的,尚未见到可以同时检测O型和A型FMDV的抗原快速检测卡。因此,鉴于以上问题,研制一种直接检测O型和A型FMDV抗原的免疫层析快速检测试纸,以诊断目标动物被O型或A型口蹄疫病毒感染具有重大意义。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡及其制备方法,该检测卡条具有特异、灵敏、快速、简便的特点。

[0006] 为了实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡,包括卡壳和试纸条,试纸条包括支撑板和固定在支撑板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫,金标垫包括依次上下叠放设置在支撑板上的上层金标垫和下层金标垫,在上层金标垫上吸附有胶体金标记的抗O型口蹄疫病毒单克隆抗体mAbIII,在下层金标垫上吸附有胶体金标记的抗A型口蹄疫病毒单克隆抗体mAbIV,检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C,抗O-FMDV单克隆抗体mAbI印制的检测线T1,以及抗A-FMDV单克隆抗体mAbII印制的检测线T2。

[0008] 抗O-FMDV单克隆抗体mAbI、mAbIII以及抗A-FMDV单克隆抗体mAbII、mAbIV的制备方法包括:(1)O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备,(2)动物免疫,(3)细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与鉴定,(4)单抗腹水的制备及纯化,(5)单克隆抗体的鉴定。

[0009] 具体的,抗O-FMDV单克隆抗体mAbI、mAbIII以及抗A-FMDV单克隆抗体mAbII、mAbIV的制备方法包括:(1)O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备:制备O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原;(2)动物免疫:以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs免疫BALB/c小鼠,间接ELISA,测定免疫小鼠小鼠效价;VLPs免疫组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合;(3)细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与鉴定:利用酶联免疫吸附试验对融合细胞进行阳性筛选,然后通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3-5轮亚克隆,直到最终获得稳定分泌的单克隆抗体杂交瘤细胞株,进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选,最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株,即识别O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAb III,以及识别A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV;(4)单抗腹水的制备及纯化:小鼠体内诱生腹水及进一步纯化获得相应单抗IgG;(5)单克隆抗体的鉴定:测定单克隆抗体的效价,并用ELISA测定单克隆抗体的效价、亲和力、特异性。

[0010] O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备:以GenBank公布的O-FMDV、A-FMDV毒株序列为参考,依据大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行密码子优化后,分别合成优化后的O-FMDV以及A-FMDV的VP0、VP1、VP3基因序列,并分别构建原核重组共表达载体pESUMO-O-

VP0/VP1/VP3及pESUM0-A-VP0/VP1/VP3,利用原核系统表达并获得O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原。

[0011] 具体的, O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备:

[0012] (1) 基因优化:以GenBank公布的O-FMDV、A-FMDV毒株序列为参考,依据大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行密码子优化后,分别合成优化后的如SEQ ID NO.1所示的O型FMDV的P1结构蛋白基因以及如SEQ ID NO.2所示的A型FMDV的P1结构蛋白基因;

[0013] (2) 原核表达载体构建:将上述优化的基因合成后装入pUC57质粒中,以上述合成基因为模板,分别根据O型或A型FMDV P1模板基因序列设计VP0、VP1、VP3相应的特异性引物对:

[0014] O型VP0:

[0015] 上游引物:OVP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGAACACTGGTAGCATCATT-3'

[0016] 下游引物:OVP0-R:5' -GGATCCTTATTCCTTGGACGGGAACTCA-3'

[0017] O型VP1:

[0018] 上游引物:OVP1-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGACCACCTCTACCGGTGAAT-3'

[0019] 下游引物:OVP1-R:5' -GGATCCTTACAGAGACTGTTTAACCGGA-3'

[0020] O型VP3:

[0021] 上游引物:OVP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCTTCCCGGTTGCTT-3'

[0022] 下游引物:OVP3-R:5' -GGATCCTTATTGACGCTCGTCAGCAG-3'

[0023] A型VP0:

[0024] 上游引物:AVP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGCGCCGGTCAATCCAG-3'

[0025] 下游引物:AVP0-R:5' -GGATCCTTA CTCTTTAGATGGCAGCTC-3'

[0026] A型VP1:

[0027] 上游引物:AVP1-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGCCACTGCTACCGGTGAAAGCGCAGAT-3'

[0028] 下游引物:AVP1-R:5' -GGATCCTTACAGCAGCTGTTTCGCCGGCGCAAT-3'

[0029] A型VP3:

[0030] 上游引物:AVP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCGTGCCGGTTGC-3'

[0031] 下游引物:AVP3-R:5' -GGATCCTTAGGTTTGTGCGCGGGTCAATT-3'

[0032] 经PCR扩增,分别获得O型和A型FMDV的VP0、VP1、VP3基因并将其克隆至pE-SUMO载体,构建原核表达载体;

[0033] (3) 共表达载体的构建:随后用PCR定向克隆同源重组试剂盒将含有上游启动子的SUM0-VP0、SUM0-VP3克隆至pE-SUMO-VP1载体,分别构建O型和A型FMDV的SUM0-VP0、SUM0-VP1、SUM0-VP3共表达载体;

[0034] (4) 利用大肠杆菌表达系统共表达猪O型或A型FMDV结构蛋白VP0、VP1和VP3,制备并纯化获得VLPs,具体制备方法如下:将重组菌在LB培养基中培养至OD₆₀₀达到0.6时,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导剂,使其浓度为0.3mmol/L,在30℃诱导表达12h,将表达菌液离心,收获细菌沉淀;将得到的菌体重悬于0.01mol/L PBS缓冲液中,超声破碎后离心收集上清,经Ni柱纯化蛋白;将纯化后的蛋白透析,随后用SUM0蛋白酶切除SUM0-tag,并将酶切后蛋白装入透析袋放入0.01mol/L PBS缓冲液透析促进VLPs的形成;收集透析袋内的液体,经10000r/min、4℃离心10min,弃去沉淀,将上清过分子筛分离纯化收集VLPs,获得O-

FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原，-4℃保存备用。

[0035] 动物免疫：共分为4组，分别以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs为免疫抗原；商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗按照说明书进行免疫，免疫剂量按照比例进行增减；免疫抗原O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs分别与弗氏免疫佐剂或弗氏不完全佐剂等量混合，充分乳化；通过背部皮下多点注射的方法，用弗氏完全佐剂免疫抗原分别免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠各3只，30μg/只；在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫2次，第2次加强免疫后两周，尾部采血，间接ELISA测小鼠血清效价；VLPs免疫组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合，在细胞融合前3-4天通过尾静脉注射的方法，用不含佐剂的免疫抗原进行超免，免疫剂量为50μg/只。

[0036] 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与鉴定：对小鼠进行超免后第3天，采用聚乙二醇的方法，将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合，融合后的细胞用选择含HAT培养液轻轻混悬，分散融合细胞到96孔细胞培养板中，250μL/孔，置37℃、5%CO₂培养箱内培养，培养3-4天可以显微镜观察到小细胞团，6-8天补加50μL/孔HAT培养液；10天后，分别以相应的O型或A型FMDV灭活病毒或VLPs作为包被抗原，利用酶联免疫吸附试验对融合细胞进行阳性筛选，然后通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3-5轮亚克隆，直到最终获得稳定分泌的单克隆抗体杂交瘤细胞株，进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选，最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株，即识别O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAbIII，以及识别A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV。

[0037] 单抗腹水的制备：选择经产的雌性BALB/c小鼠，腹腔内注射500μL灭菌石蜡，一周后，再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞，注射量为2×10⁵个细胞/只，再过一周后，待小鼠腹部膨大后抽取腹水，离心后取上清，用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化。

[0038] 一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡的制备方法，包括以下步骤：

[0039] (1) O-FMDV和A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备

[0040] 以GenBank公布的O-FMDV、A-FMDV毒株序列为参考，依据大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行密码子优化后，分别合成O-FMDV以及A-FMDV的VP0、VP1、VP3基因序列，并分别构建原核重组共表达载体pESUMO-O-VP0/VP1/VP3及pESUMO-A-VP0/VP1/VP3，利用原核系统表达并获得O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原；

[0041] (2) 动物免疫

[0042] 共分为4组，分别以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs为免疫抗原；将商品化O-FMDV、A-FMDV病毒灭活疫苗按照说明书进行免疫，免疫剂量按照比例进行增减；免疫抗原O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs分别与弗氏免疫佐剂或弗氏不完全佐剂等量混合，充分乳化；通过背部皮下多点注射的方法，用弗氏完全佐剂免疫抗原分别免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠各3只，30μg/只；在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫2次，第2次加强免疫后两周，尾部采血，间接ELISA测小鼠血清效价；VLPs免疫组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合，在细胞融合前3-4天通过尾静脉注射的方法，

用不含佐剂的免疫抗原进行超免,免疫剂量为50 μ g/只;

[0043] (3) 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选

[0044] 对小鼠进行超免后第3天,采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用选择含HAT培养液轻轻混悬,分散融合细胞到96孔细胞培养板中,250 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱内培养,培养3-4天可以显微镜观察到小细胞团,6-8天补加50 μ L/孔HAT培养液;10天后,分别以相应的O型或A型FMDV灭活病毒或VLPs作为包被抗原,利用酶联免疫吸附试验对融合细胞进行阳性筛选,然后通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行3-5轮亚克隆,直到最终获得稳定分泌的单克隆抗体杂交瘤细胞株,进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选,最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株,即识别O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAbIII,以及识别A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV;

[0045] (4) 单抗腹水的制备及纯化

[0046] 选择经产的雌性BALB/c小鼠,腹腔内注射500 μ L灭菌石蜡,一周后,再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞,注射量为2 \times 10⁵个细胞/只,再过一周后,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化;

[0047] (5) 单克隆抗体的鉴定

[0048] 测定单克隆抗体的效价,并用ELISA测定单克隆抗体的效价、亲和力、特异性;

[0049] (6) 检测卡的制备

[0050] (a) 金标垫的制备:将金标抗体吸附于玻璃纤维棉中,制得金标垫;

[0051] (b) 检测膜的制备:将抗O-FMDV单克隆抗体mAbI、抗A-FMDV单克隆抗体mAbII和兔抗小鼠IgG分别喷点于NC膜中央,形成检测线T1、T2和质控线C印迹,制得检测膜;

[0052] (c) 将样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫按顺序粘贴在支撑板上后,裁切制成试纸条;试纸条制备完成后,将试纸条装入塑料卡壳中,盖紧卡壳,制成快速检测卡。

[0053] 本发明有益的积极效果

[0054] 1、本发明采用双抗体夹心法,检测特异性强、敏感性高,高效实用:本发明的检测卡以抗O-FMDV (Mya-98毒株) 特异性单克隆抗体mAbI和抗A-FMDV (Sea-97毒株) 特异性单克隆抗体mAbII作为检测线,以胶体金标记的抗O-FMDV (Mya-98毒株) 和抗A-FMDV (Sea-97毒株) 特异性单克隆抗体mAbIII和mAbIV为基础制备而成,其中mAbI和mAbIII与mAbII和mAbIV这两组单抗识别的抗原表位不同,每组单抗中的一种单抗与FMDV特异性结合后并不影响另一种单抗的特异性结合,且两组单抗都有较强特异性,因此,本发明的检测卡具有较高的特异性和敏感性,检测效率高,具有重要的实际应用价值。

[0055] 2、不受宿主样品的来源限制,试样优选是从动物分泌出来的体液,包括血液、血清、血浆、尿、眼泪、唾液、乳等。

[0056] 3、结果显示直观、准确:检测卡以显示红色或棕红色的检测印迹和对照印迹作为检测的阳性和阴性标记,即在纤维素膜层上只显示一条棕红色对照印迹C,表示在被检样品中无FMDV感染;若在纤维素膜层上显示两条棕红色,一条对照印迹C和一条棕红色检测印迹T1或T2,则表示被检动物有O型或A型FMDV感染;如果在纤维素膜层上显示三条棕红色,一条对照印迹C和两条棕红色检测印迹T1和T2,则表示被检动物有O型和A型FMDV共感染;结果判定直观、准确、简单明了,不易出现假阴性和假阳性的误判。

[0057] 4、成本低：使用本发明检测卡不需要另配其它仪器、设备和试剂，节省大量仪器、设备和附加试剂费用；专业和非专业人士均可随时随地进行实时在线检测，无需支付专家诊断费及相关费用，可节省检测成本，降低检测费用。

[0058] 5、本发明操作简便、快速且方便携带和保存：本发明的检测卡检测过程中无需附加其它仪器设备和试剂，只要将其待检样品稀释后滴加入测试端，5分钟左右即可判定检测结果，能够满足基层组织、农户对于重大疫病诊断的需求，具有广阔的市场前景。

附图说明

[0059] 图1为本发明检测卡完整结构示意图。

[0060] 图2为本发明内部试纸条的结构示意图。图中，1为支撑板，2为检测膜，3为样品垫，4为上层金标垫，5为下层金标垫，6为质控线C，7为检测线T1，8为检测线T2，9为吸水垫。

[0061] 图3为本发明免疫抗原及包被抗原O-VLPs及A-VLPs的纯化及鉴定；A图为未切除SUMO标签的SUMO-O-VP0/VP1/VP3及SUMO-A-VP0/VP1/VP3纯化结果，图中，M为Marker；1为纯化的SUMO-O-VP0/VP1/VP3；2为纯化的SUMO-A-VP0/VP1/VP3；B图为纯化的O-VLPs及A-VLPs；图中，M为Marker；3为纯化的O-VLPs；4为纯化的A-VLPs。

[0062] 图4为本发明检测卡检测结果判断示意图。图中，A表示O-FMDV和A-FMDV共感染；B表示O-FMDV感染；C表示A-FMDV感染；D表示阴性，即样本中未感染O-FMDV和A-FMDV；E-H中C线不显色，表示测试结果无效。

具体实施方式

[0063] 以下结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0064] 实施例1

[0065] 如图1-2所示，一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡，包括卡壳和试纸条，试纸条包括支撑板1和固定在支撑板上的吸附层，吸附层从测试端开始依次为样品垫3、金标垫、检测膜2和吸水垫9，金标垫包括依次上下叠放设置在支撑板上的上层金标垫4和下层金标垫5，在上层金标垫上吸附有胶体金标记的抗O型口蹄疫病毒单克隆抗体mAbIII，在下层金标垫上吸附有胶体金标记的抗A型口蹄疫病毒单克隆抗体mAbIV，检测膜上设有羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA印制的质控线C 6，抗O-FMDV单克隆抗体mAbI印制的检测线T1 7，以及抗A-FMDV单克隆抗体mAbII印制的检测线T2 8。

[0066] 支撑板材料为不吸水的韧性PVC材料。

[0067] 样品垫材料为玻璃纤维棉、尼龙膜、聚偏二氟乙烯膜或聚酯膜。金标垫材料为玻璃纤维棉。检测膜材料为硝酸纤维素膜、纯纤维素膜或羧化纤维素膜。吸水垫材料为吸水滤纸。

[0068] 检测线和质控线除“||”直线式印迹外，还可以为“十十”字型排列印迹、“┌┌”字型排列印迹、“└└”字型排列印迹、“┌└”字型排列印迹或“└┌”字型排列印迹。

[0069] 实施例2

[0070] 本发明O-FMDV和A-FMDV的双联快速检测卡的制备：首先制备O-FMDV免疫抗原和A-FMDV免疫抗原，进而制备抗O-FMDV单克隆抗体和A-FMDV单克隆抗体，并筛选识别O-FMDV和A-FMDV的单克隆抗体。其中O-FMDV单克隆抗体mAbIII和A-FMDV单克隆抗体mAbIV用于制备

金标抗体,特异性识别O-FMDV且与mAbIII识别抗原表位不同的单克隆抗体mAbI用于印制O-FMDV检测线印迹T1“|”,特异性识别A-FMDV且与mAbIV识别抗原表位不同的单克隆抗体mAbII用于印制A-FMDV检测线印迹T2“|”;其次制备羊抗或兔抗小鼠IgG抗体或金黄色葡萄球菌SPA,用于印制质控线印迹C“|”;再组装制备好的样品垫、金标垫、检测膜和吸水垫以及支撑板,并装入卡壳。其中,各产品的制备方法如下:

[0071] 1、O-FMDV以及A-FMDV免疫抗原和包被抗原的制备:

[0072] (1) 基因优化:以GenBank公布的O-FMDV(My-a-98毒株)、A-FMDV毒株(Sea-97毒株)序列为参考,依据大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行密码子优化后,分别合成优化后的如SEQ ID NO.1所示的O型FMDV的P1结构蛋白基因(包含VP0/VP1/VP3蛋白编码区基因)以及如SEQ ID NO.2所示的A型FMDV的P1结构蛋白基因(包含VP0/VP1/VP3蛋白编码区基因);

[0073] AACACTGGTAGCATCATTAACAACACTACTACATGCAACAATATCAGAACTCCATGGACACCCAACACTGGG
TGACAACGCTATTAGCGGTGGCTCCAACGAGGGTTCCACCGACACCACCTCCACCCACACCACCAACACTCAGAAC
AACGACTGGTTTTCTAAGCTGGCCTCTTCCGCCTTCAGCGGTCTGTTCCGGCGCTCTGCTGGCCGACCGTAAACCG
AGGAGACCACTCTGCTGGAGGACCGCATCTGACTACCCGCAACGGTCATACCCTTCTACCACCCAGTCTAGCGT
TGTTGTTACTTACGGTTATGCGACTGCTGAGGACTTCGTGAGCGGTCCAAACACCCGGGTCTGGAGACCCGTGTT
ACCCAGGCAGAGCGTTTCTTCAAACCCACCTGTTTCGATTGGGTTACCTCTGACCCGTTCCGGTCGTTGCTACCTGC
TGGAAGTGGCGACTGACCACAAAGGTGTGTACGGCAGCCTGACTGATTCTATGCTTACATGCGTAACGGTTGGGA
TGTTGAGGTTACTGCAGTTGGCAACCAGTTCAACGGGGTTGTCTGCTGGTGGCCATGGTGCCGAACTGTGCTCC
ATTGACAAGCGTGAGCTGTACCAACTGACCCTGTTCCCGCACCAGTTCATCAACCCGCTACCAACATGACCGCTC
ACATTACTGTGCCGTTTCGTGGGCGTTAACCGCTACGACCAGTACAAGGTTACAAACCGTGGACCCTGGTGGTTAT
GGTTGTGGCTCCGCTGACTGTAAACACCGAGGGTGGCCCGCAGATCAAGGTTTATGCCAACATTGCCCGGACCAAC
GTGCACGTTGCGGGTGAGTTCCCGTCCAAGGAAGGTATCTTCCCGGTTGCTTGCTCTGACGTTACGGTGGTCTGG
TTACCACCGACCCGAAAACCGCTGACCCGTTTACGGTAAAGTTTTCAACCCGCGCGTAACATGCTCCAGGTAG
GTTACCAACCTGCTCGACGTTGCTGAAGCGTGCCCGACCTTCTGCACTTCGACGGTGACGTTCCGTACGTTACC
ACCAAAACCGACTCTGACCGTGTCTGGCTCAGTTCGACCTGTCTCTGGCTGCTAAACACATGTCTAACACCTTCC
TGGCTGGTCTGGCTCAGTACTACCCAGTACTCTGGTACCGTTAACCTGCACTTCATGTTACCCGGTCCGACCGA
CGCTAAAGCTCGTTACATGATCGCTTACGCTCCGCCGGGTATGGAACCGCGAAAACCCGGAAGCTGCTGCTCAC
TGCATCCACGCTGAATGGGACACCGGTCTGAACTCTAAATTCACCTTCTCTATCCCGTACCTGTCTGCTGCTGACT
ACGCTTACACCGCTTCTGACGCTGCTGAAACCACCAATGTTACGGGTTGGGTATGCCTGTTCCAGATCACCCACGG
TAAAGCTGAAGGTGACGCTCTGGTTGTTCTGGCTTCTGCTGGTAAAGACTTCGAACTGCGTCTGCCGTTGACGCT
CGTCAGCAGACCACCTCTACCGGTGAATCTGCTGACCCGTTACCGTACCGTTGAAAACCTACGGTGGTGAACCC
AGGTTTCAGCGTCGTCACCACCCGACGTTTCTTTTCATCCTGGACCGTTTCGTTAAAGTTACCCGAAAGACTCTAT
CAACGTTCTGGACCTGATGCAGACCCGTTCTCACACCCTGGTTGGTCTCTGCTGCGTACCGTACCTACTACTTC
GCTGACCTGGAAGTTGCTGTTAAACACGAAGGTGACCTGACCTGGGTTCCGAACGGTCTCCGGAAGCTGCTCTGG
ACAACACCACCAACCCGACCGTTACCACAAAGCTCCGCTGACCCGTTCTGGCTCTGCCGTACACCGCTCCGCACCG
TGTTCTGGCTACCGTTTACAACGGTAACTGCAAAATACGCTGGTGGTTCTCTGCCGAACGTTCTGGTGGTACCTGCAG
GTTCTGGCTCAGAAAGCTGCTCGTCCGCTGCCGACCTCTTTCAACTACGGTGCTATCAAAGCTACCCGTGTTACCG
AACTGCTGTACCGTATGAAACGTGCTGAAACCTACTGCCCGCTCCGCTGCTGGCTGTTACCCGTTCTGCTGCTCG
TCACAAACAGAAAATCGTTGCTCCGGTTAAACAGTCTCTG (SEQ ID NO.1)

[0074] GGCGCCGGTCAATCCAGCCCGGCAACCGGTTCTCAAAACCAATCTGGCAACACTGGTTCTATCATTAACA
CAACTACTACATGCAGCAGTACCAGAACTCCATGGACACCCAACCTGGGCGACAACGCCATTAGCGGTGGTTCCAAC
GAGGGCTCCACCGACACCACCTCCACCCACACCACCAACACCCAGAACAACGATTGGTTTTCTAAACTGGCCTCTT
CCGCTTCTCGGGCTGTTTCGGCGCCCTACTGGCTGACAAAAAGACCGAGGAGACTACCCTGCTGGAAGACCGCAT
CCTGACCACCCGCAACGGTCACACCACCTCTACCACCCAGTCTTCTGTGGGTGTTACCTACGGTACTCCACTGGT
GAAGACCATGTTTCTGGTCCGAACACCTCTGGCCTGGAGACCCGTGTTATCCAGGCGGAGAGGTTCTCAAAAAGC
ATCTGTTTCGACTGGACACTGAAAAAGCTTTCGGTCACCTGGAAAAACTGGAACGCGACTGAACACAAAGGTGT
TTACGGTCACCTGGTGGACTCTTTTGCATACATGCGTAACGGCTGGGATGTGGAGGTGACCGCCGTTGGCAACCAG
TTCAACGGTGGTTGCCTGCTGGTGGCTATGGTACCGGAGTGGAAGAGTTTACCCTGCGTGAGAAATACCAGCTGA
CCCTGTTTCCACACCAATTTATTAACCCGCGTACCAACATGACCGCCACATCACCGTCCGTACCTGGGTGTTAA
CCGTTATGACCAGTACAAAACAGCACAACCCGTGGACCCTGGTTGTGATGGTGGTTTCTCCACTGACCACCAGCAGC
ATTGGTGCCTCTCAGATCAAAGTTTACGCCAACATCGCCCCGACCTTCGTTACGTGGCCGGCGAGCTGCCATCTA
AAGAGGGTATCGTGCCGGTTGCCTGTTCTGACGGTTACGGTGGCCTGGTGACCACCGACCAAAAACCGCTGACCC
GGTTTATGGTATGGTGTACAACCCGCGCGTACCAACTACCCGGGTCGCTTACCAACCTGCTGGACGTGGCCGAG
GCTTGCCCGACCTTCTGTGTTTTGACGACGGTAAACCGTACGTTGTGACCCGTACCGACGAACAACGCCTGCTGG
CCAAGTTTGACGTTTCTCTGGCTGCAAAGCACATGTCTAACACTTACCTGTCTGGTATCGCACAGTACTACACCCA
GTACTCTGGCACCATCAACCTGCATTTTCATGTTCACTGGCTCTACTGAATCTAAGGCCGTTACATGGTGGCGTAC
ATTCCACCGGGCATGGACACCCACCGGATACCCCGGAGAAAGCTGCACACTGCATCCACGCCGAGTGGGACACCG
GTCTGAACTCCAAATTTACTTTTTCTATCCCGTACGTGTCCGCTGCAGATTACGCATACACTGCGTCTGACGTGGC
GGAGACCACCAATGTACAGGGTGGGTGTGCATCTACCAGATTACTCACGGTAAGGCTGAACAGGACACTCTGGTT
GTGTCTGTAAGCGCCGGCAAGGACTTTGAACTGCGCCTGCCAATTGACCCGCGCGCACAACCACCCTGCTACCG
GTGAAAGCGCAGATCCAGTCACGACTACGGTTCGAGAACTACGGCGGTGAAACCCAGGCACAGCGTCGTCATCACAC
TGACGTGGGCTTCTGATGGATCGTTTTCGTGCAGATCAAACCGGTGGGTCCAACCCACGTGATCGACCTGATGCAG
ACCCACCAGCACGGTCTGGTAGGTGCAATGCTGCGTGCAGCAACTTACTACTTCAGCGACCTGGAGATCGTTGTAA
ACCACACCGGCAACCTGACCTGGGTTCCGAACGGTGCCCGGAAGCGGCACTGCAGAACACTAGCAACCCGACTGC
TTACCACAAAGCGCCTTTCACCCGCTGGCTCTGCCTTACACGGCTCCGCATCGTGTACTGGCTACCGTTTTATTCC
GGCACCTCTAAATATTCCGCGCCGAGGACCGTCGTGGTGATTCCGGCCCGCTGGCTGCTCGTCTGGCCGCCAAC
TGCCGGCGTCTTTAATTTTGGCGGATTTCGTGCCACCGAAATCCATGAACTGCTGGTTCGCATGAAACGCGCGGA
ACTGTATTGCCCGCGCCCGCTGCTGGCGGTTGAAGTTTCTTCTCAAGATCGCCACAAACAGAAGATCATTGCGCCG
GCGAAACAGCTGCTG (SEQ ID NO.2)

[0075] (2) 原核表达载体构建：将上述优化的基因送上海生工生物工程有限公司合成并装入pUC57质粒中，以上述合成基因为模板，分别根据O型或A型FMDV P1模板基因序列设计VP0、VP1、VP3相应的特异性引物对：

[0076] VP0 (O型)：

[0077] 上游引物：OVP0-F：5' -TTGGTCTCTAGGTATGAACACTGGTAGCATCATT-3' (SEQ ID NO.3)；

[0078] 下游引物：OVP0-R：5' -GGATCCTTATTCCTTGGACGGGAACTCA-3' (SEQ ID NO.4)；

[0079] VP1 (O型)：

[0080] 上游引物：OVP1-F：5' -TTGGTCTCTAGGTATGACCACCTCTACCGGTGAAT-3' (SEQ ID

NO.5) ;

[0081] 下游引物:OVP1-R:5' -GGATCCTTACAGAGACTGTTTAACCGGA-3' (SEQ ID NO.6)

[0082] VP3 (O型) :

[0083] 上游引物:OVP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCTTCCCGTTGCTT-3' (SEQ ID NO.7) ;

[0084] 下游引物:OVP3-R:5' -GGATCCTTATTGACGCTCGTCAGCAG-3' (SEQ ID NO.8) ;

[0085] VP0 (A型) :

[0086] 上游引物:AVP0-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGCGCCGGTCAATCCAG-3' (SEQ ID NO.9) ;

[0087] 下游引物:AVP0-R:5' -GGATCCTTA CTCTTTAGATGGCAGCTC-3' (SEQ ID NO.10) ;

[0088] VP1 (A型) :

[0089] 上游引物:AVP1-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGCCACTGCTACCGGTGAAAGCGCAGAT-3' (SEQ ID NO.11) ;

[0090] 下游引物:AVP1-R:5' -GGATCCTTACAGCAGCTGTTTCGCCGGCGCAAT-3' (SEQ ID NO.12) ;

[0091] VP3 (A型) :

[0092] 上游引物:AVP3-F:5' -TTGGTCTCTAGGTATGGGTATCGTGCCGGTTGC-3' (SEQ ID NO.13) ;

[0093] 下游引物:AVP3-R:5' -GGATCCTTAGGTTTGTGCGCGGGTCAATT-3' (SEQ ID NO.14) 。

[0094] 经PCR扩增,分别获得O型和A型FMDV的VP0、VP1、VP3基因并将其克隆至pE-SUMO载体,构建原核表达载体;

[0095] (3) 共表达载体的构建:随后用PCR定向克隆同源重组试剂盒将含有上游启动子的SUMO-VP0、SUMO-VP3克隆至pE-SUMO-VP1载体,分别构建O型和A型FMDV的SUMO-VP0、SUMO-VP1、SUMO-VP3共表达载体(重组菌);

[0096] (4) 利用大肠杆菌表达系统共表达猪O型或A型FMDV结构蛋白VP0、VP1和VP3,制备并纯化获得VLPs,具体制备方法如下:将重组菌在LB培养基中培养至OD₆₀₀达到0.6时,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导剂,使其浓度为0.3mmol/L,在30℃诱导表达12h,将表达菌液离心,收获细菌沉淀;将得到的菌体重悬于0.01mol/L PBS缓冲液中,超声破碎后离心收集上清,经Ni柱纯化蛋白;将纯化后的蛋白透析除去咪唑,随后用SUMO蛋白酶切除SUMO-tag,并将酶切后蛋白装入透析袋放入0.01mol/L PBS缓冲液透析促进VLPs的形成;收集透析袋内的液体,经10000r/min、4℃离心10min,弃去沉淀,将上清过分子筛分离纯化收集VLPs,获得O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs作为免疫抗原和包被抗原(图3),-4℃保存备用。

[0097] 2、动物免疫

[0098] 本发明中共分为4组,分别以商品化O-FMDV病毒灭活疫苗、A-FMDV病毒灭活疫苗、O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs为免疫抗原;将商品化O-FMDV、A-FMDV病毒灭活疫苗按照说明书进行免疫,免疫剂量按照比例进行增减;免疫抗原O-FMDV VLPs以及A-FMDV VLPs分别与弗氏免疫佐剂或弗氏不完全佐剂等量混合,充分乳化。通过背部皮下多点注射的方法,用弗氏完全佐剂免疫抗原分别免疫8周龄的雌性BALB/c小鼠各3只,30μg/只;在首次免疫21天后分别用弗氏不完全佐剂免疫抗原以相同的方法和剂量对BALB/c小鼠进行加强免疫2次,第2次加强免疫后两周,尾部采血,间接ELISA测小鼠血清效价;O-FMDV和A-FMDV的VLPs免疫

组及灭活疫苗免疫组各选1只效价高同时阻断效果好的小鼠进行细胞融合,在细胞融合前3-4天通过尾静脉注射的方法,用不含佐剂的免疫抗原进行超免,免疫剂量为50 μ g/只。

[0099] 3、细胞融合及杂交瘤细胞的筛选与鉴定

[0100] 对小鼠进行超免后第3天,采用聚乙二醇的方法,将免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按细胞数量10:1的比例进行细胞融合,融合后的细胞用选择培养液(含HAT)轻轻混悬,分散融合细胞到96孔细胞培养板中,250 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱内培养,培养3-4天可以显微镜观察到小细胞团,6-8天补加50 μ L/孔HAT培养液。10天后,分别以相应的O型或A型FMDV灭活病毒或VLPs作为包被抗原,利用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)对融合细胞进行阳性筛选;经过二轮间接ELISA筛选,将阳性杂交瘤细胞通过有限稀释法进行3-5轮亚克隆,直到最终获得稳定分泌的单克隆抗体杂交瘤细胞株,进一步经双抗叠加ELISA和液相阻断ELISA筛选,最终获得高特异性、高敏感性的单克隆杂交瘤细胞株。

[0101] ①间接ELISA

[0102] 首先在灭活病毒或VLPs包被的酶标板中逐行加入待检杂交瘤细胞株培养上清,灭活病毒免疫组用VLPs包板进行初筛,VLPs免疫组用灭活病毒包板进行初筛,并分别设阳性多抗血清和PBS作阳、阴性对照,37 $^{\circ}$ C作用30min;然后逐列加入HRP标记的羊抗鼠二抗,37 $^{\circ}$ C作用30min;以底物TMB进行显色,读取各检测孔的OD₄₅₀值,对阳性孔进行标记并进行第二轮筛选,第二轮ELISA同时选用灭活病毒和VLPs包板进行检测;根据第二轮筛选结果,选择OD₄₅₀值大于0.8的阳性孔通过有限稀释法进行3-5轮亚克隆,直到最终获得稳定分泌的单克隆抗体杂交瘤细胞株。

[0103] ②双抗叠加ELISA

[0104] 1) 首先利用包被抗原的酶标板以间接ELISA测定各单抗的工作浓度,绘制抗原饱和曲线。在双抗叠加ELISA试验中,根据抗原饱和曲线适当稀释单抗,进行下一步叠加ELISA实验,具体步骤如下:

[0105] 2) 包被:用VLPs包被96孔酶标反应板,37 $^{\circ}$ C,孵育2h;

[0106] 3) 封闭:每孔加入50 μ L的5%脱脂奶,37 $^{\circ}$ C封闭1h;

[0107] 4) 洗涤:PBST洗板3次,甩干;

[0108] 5) 加一抗(待检单抗):每孔加入50 μ L单个或两个不同组合的mAb,其稀释度均为饱和定量抗原的稀释度,两个mAb量相等,同时用PBS作阴性对照(NC),商品化抗HPV16单抗作阳性对照(PC);37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0109] 6) 洗涤:PBST洗6次,甩干;

[0110] 7) 加酶标二抗:将HRP标记的羊抗鼠IgG用PBS稀释至工作浓度后(1:1000),每孔各加50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0111] 8) 洗涤:PBST洗板6次,甩干;

[0112] 9) 显色:TMB显色液显色6min;

[0113] 10) 终止:每孔各加50 μ L的终止液(2mol/L H₂SO₄);

[0114] 11) 读数:反应终止后在酶标仪上测定各孔的OD₄₅₀值。

[0115] 12) 分析结果:叠加指数(additivity indexes,AI)计算公式如下:

[0116]
$$AI = (A(1+2) - (A1+A2)/2) / ((A1+A2) - (A1+A2)/2) \times 100\%$$

[0117] 其中:A1为mAb1的OD₄₅₀值;A2为mAb2的OD₄₅₀值;A(1+2)为mAb1叠加mAb2的OD₄₅₀值;

当AI<30%判定为针对同一抗原位点,AI≥30%为针对不同抗原位点,AI值越大,抗原位点重叠的可能性越小。

[0118] 表1叠加指数(A.I.)

	mAbs (O-FMDV)	A.I.	mAbs (O-FMDV)	A.I.	mAbs (A-FMDV)	A.I.	mAbs (A-FMDV)	A.I.
[0119]	1C3, 3F6	-0.05	3F6, 4G5	0.32	2D7, 3E11	0.02	3E11,5G11	0.24
	4G5, 5B6	0.76	5B6, 8C11	0.04	5G11, 6E2	0.51	6E2, 8F10	0.41
	8C11, 10D7	0.26	10D7, 15F5	0.22	8F10, 10E2	0.31	10E2, 12G5	0.07
	15F5, 18C6	0.50	18C6, 1C3	0.56	12G5, 15E2	0.58	2D7, 15E2	0.23

[0120] 经过双抗叠加ELISA最终筛选出识别不同表位的单克隆细胞株分别为:O-FMDV 5株(4G5,5B6,15F5,18C6,1C3);A-FMDV 5株(5G11,6E2,8F10,12G5,15E2)。

[0121] ③液相阻断ELISA

[0122] 选择商品化口蹄疫A型或O型抗体液相阻断ELISA检测试剂盒,按说明书步骤测定已筛选到的识别不同抗原表位的阳性单克隆细胞株的阻断效果,分别选出阻断效果最好的O-FMDV单克隆抗体4G5(mAbI)、5B6(mAbIII)以及A-FMDV单克隆抗体8F10(mAbII)、15E2(mAbIV)进行腹水的制备。

[0123] 4、单抗腹水的制备及纯化

[0124] 选择经产的雌性BALB/c小鼠,腹腔内注射500μL灭菌石蜡,一周后,再次腹腔内注射获得的单克隆杂交瘤细胞,注射量为 2×10^5 个细胞/只,再过一周后,待小鼠腹部膨大后抽取腹水,离心后取上清,用辛酸硫酸铵法对腹水进行纯化。

[0125] 5、单克隆抗体的鉴定

[0126] ①单克隆抗体亚型鉴定

[0127] 单抗亚类和型的鉴定按Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit使用说明书操作,测定结果如表2所示。

[0128] 表2单克隆抗体亚型鉴定

	单抗类型	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	κ型	λ型
[0129]	mAbI(O型)	+	-	-	-	-	+	-
	mAbIII(O型)	+	-	-	-	-	-	+
[0130]	mAbII(A型)	-	+	-	-	-	+	-
	mAbIV(A型)	+	-	-	-	-	+	-

[0131] 注:+表示阳性,-表示阴性。

[0132] 单抗亚类和亚型的鉴定结果显示单克隆抗体mAbI、mAbIV的亚型为IgG1,轻链型为Kappa型;mAbII亚型为IgG2a,Kappa型;mAb III亚型为IgG1,轻链型为Lambda型。

[0133] ②单克隆抗体的效价、亲和力、特异性鉴定:

[0134] 分别用ELISA测定O-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbI和mAbIII以及A-FMDV不同抗原表位的单克隆抗体mAbII和mAbIV的亲合常数和效价,测定结果如表3所示,结果显示,其效价均不低于 $1:5.12 \times 10^5$,亲和常数均不低于 2.6×10^{10} 。

[0135] 表3单抗效价及亲和常数

单抗	O-FMDV		A-FMDV	
	mAbI	mAb III	mAbII	mAbIV
[0136] 亲和常数(L/mol)	3.6×10^{10}	1.2×10^{11}	2.5×10^{11}	2.6×10^{10}
效价	$1:1.024 \times 10^6$	$1:1.024 \times 10^6$	$1:5.12 \times 10^5$	$1:1.024 \times 10^6$

[0137] 6、金标抗体的制备

[0138] (1) 胶体金的制备:

[0139] 取100mL超纯水置于500mL洁净的锥形瓶,加入1mL 1% (w/v) 氯金酸溶液煮沸;在搅拌状态下迅速加入新鲜配制的1mL 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液,煮沸约3min至溶液颜色由黄色变为紫红色,继续煮沸2min;待溶液冷却至室温,补超纯水至100mL,以0.2mol/L K_2CO_3 调pH至9.0,4℃避光保存备用。

[0140] (2) 最适标记蛋白浓度测定

[0141] 分别取待标记病毒单抗mAb III和mAbIV,用20mmol/L硼酸钠溶液 (pH 9.0) 4℃过夜透析。在微孔板中以25μL超纯水1:2、1:4、1:8……分别倍比稀释待标记病毒单抗;各孔加入125μL胶体金溶液,室温静置5min;加入125μL 1mol/L NaCl溶液;各孔颜色随蛋白浓度的降低而由红色变为蓝色。以颜色未变蓝的单抗最高稀释度的蛋白浓度为胶体金最适标记浓度,胶体金标记时,蛋白浓度增加20%;经测定结果分析mAbIII和mAbIV的最佳标记浓度分别为:1.6μg/mL、2.0μg/mL。

[0142] (3) 单克隆抗体的胶体金标记

[0143] 取2mL最适蛋白浓度的待标记单抗mAb III和mAbIV,加入10mL胶体金溶液 (pH 9.0),迅速混匀,室温作用30min;加入混合液体积10%的含10% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的20mmol/L硼酸钠溶液,迅速混匀,室温作用10min-15min;4℃、12000r/min离心30min,小心移去上清;以含1% (w/v) BSA的20mmol/L硼酸钠溶液重悬沉淀,同上离心,弃上清;重复洗涤1次,沉淀用1mL TB缓冲液 (20mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 1% (w/v) BSA, 0.1% (w/v) NaN_3) 调整金标抗体至0.2mg/mL,充分吹打后,4℃保存备用。

[0144] 7、检测膜的制备

[0145] 用生理盐水分别将特异性识别O-FMDV的单克隆抗体mAbI,以及特异性识别A-FMDV的单克隆抗体mAbII和羊抗小鼠IgG抗体 (或SPA) 稀释至0.68mg/mL、0.74mg/mL和1.0mg/mL,用0.22μm微孔滤膜过滤备用。将NC膜置于XYZ 3000喷点仪平台上,并以压条固定,然后以50dots/μL/cm分别将单克隆抗体mAbI、mAbII和羊抗小鼠IgG抗体 (或SPA) 溶液喷点于NC膜中央,形成检测线 (T1线、T2线) 和质控线 (C线) 印迹;检测线与检测线、检测线与质控线相距3mm。将检测膜室温自然干燥72h后,加入干燥剂密封,室温保存备用。

[0146] 8、金标垫的制备

[0147] 用含1% (w/v) BSA和0.1% (w/v) NaN_3 的20mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲液均匀喷洒于玻璃纤维棉上,制成金标抗体结合垫;然后按照每毫升溶液铺10cm²的量将获得的金标抗体混合液喷涂于金标抗体结合垫上。真空干燥3h,置装有干燥剂的密封袋中保存备用。

[0148] 9、样品垫的制备

[0149] 样品垫选用玻璃纤维棉,用含0.1mol/L NaCl、0.2%Tween 20(v/v)和0.1%(w/v)叠氮钠的PBS(pH 7.2)溶液浸泡玻璃棉条;置50℃干燥箱30min干燥,加干燥剂室温密闭保存备用。

[0150] 10、吸水垫的制备

[0151] 吸水垫选用吸水性较好的吸水滤纸,室温密闭保存备用。

[0152] 11、支撑板的制备

[0153] 支撑板为单面不干胶的PVC塑料板。

[0154] 12、检测卡的组装

[0155] 先将检测膜粘贴于支撑板中央,然后将金标垫和样品垫依次粘贴于检测膜的样品端,各层间重叠1mm-2mm,再将吸水垫粘贴于检测膜的另一端,与检测膜重叠1mm-2mm。试纸条制备完成后,将试纸条装入塑料卡壳中,盖紧卡壳,制成快速检测卡,并将其装入避光的铝箔袋中,加干燥剂封口后室温干燥保存备用。

[0156] 本发明检测卡的检测反应原理:

[0157] 当将待检溶液加入口蹄疫病毒(FMDV)抗原快速检测卡加样区,待检溶液通过虹吸带动待检抗原及金标抗体mAbIII和mAbIV混合物一起向硝酸纤维素膜扩散,并最终渗透到滤纸层中,在扩散过程中金标抗体mAbIII与待检抗原O-FMDV相结合,金标抗体mAbIV与待检抗原A-FMDV相结合,形成金标抗体-抗原复合物。mAbIII-O-FMDV金标复合物可与检测膜上的O-FMDV检测印迹mAbI结合生成红棕色“|”标记,mAbIV-A-FMDV金标复合物可与检测膜上的A-FMDV检测印迹mAbII结合生成另一条红棕色“|”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在检测膜上与质控印迹中的羊或兔抗鼠IgG或SPA,生成红棕色标记“|”。三种标记组合叠加,形成三条红棕色阳性标记“|||”,表示样品中同时含有O-FMDV和A-FMDV(图4A);而样品中只有O-FMDV时,金标复合物不能与检测膜上的A-FMDV检测印迹T2(mAbII)结合,只能与O-FMDV检测印迹T1(mAbI)结合,生成红棕色“|”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在检测膜上与质控印迹中的抗鼠IgG或SPA,生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红棕色阳性标记“||”,表示样品中只含O-FMDV(图4B);同理,样品中只有A-FMDV时,金标复合物不能与检测膜上的O-FMDV检测印迹T1(mAbI)结合,只能与A-FMDV检测印迹mAbII结合,生成红棕色“|”标记,部分未与抗原结合的金标抗体不能与检测印迹结合而继续扩散,在检测膜上与质控印迹中的抗鼠IgG或SPA,生成红棕色标记“|”,两种标记组合叠加,形成两条红棕色阳性标记“||”,表示样品中只含A-FMDV(图4C)。当样品中不含O-FMDV和A-FMDV时,没有金标抗体-抗原复合物形成,不能与T1检测印迹和T2检测印迹结合,则生成阴性标记“|”(图4D)。如果检测膜上没有红棕色标记显示(图4E)或者质控线处没有红棕色标记显示(图4F、G、H),则表明检测卡已失效。

[0158] 实施例2、O-FMDV和A-FMDV的双联快速检测卡操作方法

[0159] 1、检测样品溶液的制备:采集待检猪血清、病(死)猪组织、粪便和疫苗等不同检测样本,加适量PBS或水进行简单混悬或研磨。

[0160] 2、检测卡检测:将待检溶液滴入O-FMDV和A-FMDV的双联快速检测卡加样端;水平放置5-10min观察结果。

[0161] 3、检测结果判定:检测卡显现三条红棕色条带(O-FMDV检测线、A-FMDV检测线和质

控线)“|||”为O-FMDV和A-FMDV共感染阳性,表示待检样品中同时含有O-FMDV和A-FMDV抗原;两条红棕色条带(O-FMDV检测线和质控线)“||”为O-FMDV阳性,表示待检样品中含有O-FMDV抗原;两条红棕色条带(A-FMDV检测线和质控线)“|”为A-FMDV阳性,表示待检样品中含有A-FMDV抗原;仅显现一条红棕色条带(质控线)“|”为阴性,表示待检样品未检出O-FMDV和A-FMDV抗原;检测卡未显现任何条带表明检测操作不当或检测卡失效,需以另取检测检测卡重新检测。

[0162] 以上所述仅为本发明最佳的实施例,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 郑州大学 河南中泽生物工程有限公司	
[0003]	<120> 一种检测并区分O型、A型口蹄疫病毒的双联快速检测卡及其制备方法	
[0004]	<160> 14	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 2160	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 口蹄疫病毒 (FootandMouthDiseaseVirus)	
[0010]	<400> 1	
[0011]	aacactggta gcatcattaa caactactac atgcaacaat atcagaactc catggacacc	60
[0012]	caactgggtg acaacgctat tagcgggtgc tccaacgagg gttccaccga caccacctcc	120
[0013]	accacacca ccaaacactca gaacaacgac tggttttcta agctggcctc ttccgccttc	180
[0014]	agcggctctg tccggcgtct gctggccgac cgtaaaaccg aggagaccac tctgctggag	240
[0015]	gaccgcatcc tgactacccg caacggtcat accacttcta ccaccagtc tagcgttggg	300
[0016]	gttacttacg gttatgagc tgctgaggac ttcgtgagcg gtccaaacac cccgggtctg	360
[0017]	gagaccctg ttaccaggc agagcgttc ttcaaaacc accctgttcga ttgggttacc	420
[0018]	tctgaccctg tccgtcgtg ctacctgtg gaactgccga ctgaccacaa aggtgtgtac	480
[0019]	ggcagcctga ctgattccta tgcttacatg cgtaacggtt gggatgttga ggttactgca	540
[0020]	gttggaacc agttcaacgg gggttgtctg ctgggtggcca tgggtgccga actgtgtctc	600
[0021]	attgacaagc gtgagctgta ccaactgacc ctgttcccgc accagttcat caaccgcgt	660
[0022]	accaacatga ccgctcacat tactgtgccg ttcgtggcg ttaaccgcta cgaccagtac	720
[0023]	aaggttcaca aaccgtggac cctgggtggt atggttggc ctccgctgac tgtaaacacc	780
[0024]	gagggtgcc cgcagatcaa ggtttatgcc aacattgcc cgaccaacgt gcacgttgcg	840
[0025]	ggtgagttcc cgtccaagga aggtatctc ccggttctt gctctgacgg ttacgggtgt	900
[0026]	ctggttacc cgcaccgaa aaccgtgac ccggtttac gtaaagttt caaccgcgg	960
[0027]	cgtaacatgc tcccaggtag gttaccaac ctgctcgacg ttgctgaagc gtgcccagc	1020
[0028]	ttctgcact tcgacggtga cgttccgtac gttaccacca aaaccgactc tgaccgtgt	1080
[0029]	ctggtcagc tcgacctgct tctggctgct aaacacatgt ctaaacctt cctggctggt	1140
[0030]	ctggtcagc actacacca gtactctggt accgttaacc tgcacttcat gttcaccggt	1200
[0031]	ccgaccgacg ctaaagctg ttacatgatc gttacgctc cgccgggtat ggaaccgcg	1260
[0032]	aaaaccccg aagctgctgc tcaactgac cagctgaat gggacaccg tctgaactct	1320
[0033]	aaattcacct tctctatccc gtacctgtc gctgctgact acgcttacac cgcttctgac	1380
[0034]	gctgctgaaa ccaccaatgt tcagggttgg gtatgctgt tccagatcac ccacggtaaa	1440
[0035]	gctgaaggct acgctctggt tttctggct tctgctggtg aagacttcca actgcgtctg	1500
[0036]	ccggttgacg ctctcagca gaccacctc accggtgaat ctgctgacc ggttaccgct	1560
[0037]	accgttgaac actacggtg tgaaccag gttcagctc gtcaccacac cgacgtttct	1620
[0038]	ttatcctgg accgttctg taaagttacc ccgaaagact ctatcaacgt tctggacctg	1680
[0039]	atgcagacc cgtctcacac cctgggtggt gctctgctc gtaccgctac ctactactc	1740
[0040]	gctgacctgg aagttgctgt taaacacgaa ggtgacctga cctgggttcc gaacgggtgct	1800
[0041]	ccggaagctg ctctggacaa caccaccaac ccgaccgctt accacaaagc tccgctgacc	1860

[0042]	cgtctggctc tgccgtacac cgctccgcac cgtgttctgg ctaccgttta caacggtaac	1920
[0043]	tgcaataacg ctggtggttc tctgccgaac gttcgtggtg acctgcaggt tctggctcag	1980
[0044]	aaagctgctc gtccgtgcc gacctcttc aactacggtg ctatcaaage taccctgttt	2040
[0045]	accgaactgc tgtaccgtat gaaacgtgt gaaacctact gcccgctcc gctgctggct	2100
[0046]	gttcaccctg ctgctgctcg tcacaaacag aaaatcgttg ctccggttaa acagtctctg	2160
[0047]	<210> 2	
[0048]	<211> 2211	
[0049]	<212> DNA	
[0050]	<213> 口蹄疫病毒 (FootandMouthDiseaseVirus)	
[0051]	<400> 2	
[0052]	ggcgccgctc aatccagccc ggcaaccggt tctcaaaacc aatctggcaa cactggttct	60
[0053]	atcattaaca actactacat gcagcagtac cagaactcca tggacacca actgggcgac	120
[0054]	aacgccatta gcggtggttc caacgaggc tccaccgaca ccacctccac ccacaccacc	180
[0055]	aacaccaga acaacgattg gttttctaaa ctggcctctt ccgccttctc gggcctgttc	240
[0056]	ggcgccctac tggctgacaa aaagaccgag gagactacc tgctggaaga ccgcatcctg	300
[0057]	accaccgca acggtcacac cacctetacc acccagtctt ctgtgggtgt tacctacggt	360
[0058]	tactccactg gtgaagacca tgtttctggt ccgaacacct ctggcctgga gaccctgttt	420
[0059]	atccaggcgg agaggttctt caaaaagcat ctgttcgact ggaccactga aaaagctttc	480
[0060]	ggtcacctgg aaaaactgga actgccgact gaacacaaag gtgtttacgg tcacctggtg	540
[0061]	gactcttttg catacatgcg taacggctgg gatgtggagg tgaccgccgt tggcaaccag	600
[0062]	ttcaacggtg gttgcctgct ggtggctatg gtaccggagt ggaaagagtt taccctgcgt	660
[0063]	gagaaatacc agctgacct gtttcacac caatttatta acccgctac caacatgacc	720
[0064]	gccacatca ccgttccgta cctgggtgtt aaccgttatg accagtacaa acagcacaaa	780
[0065]	ccgtggacce tggttgtgat ggtggtttct ccaactgacca ccagcagcat tgggtcctct	840
[0066]	cagatcaaag tttacgcaa catgccccg accttcgttc acgtggccgg cgagctgcca	900
[0067]	tctaaagagg gtatcgtgcc gtttgctgt tctgacggtt acggtggcct ggtgaccacc	960
[0068]	gacccaaaa ccgctgacce gttttatggt atggtgtaca acccgccgcg taccaactac	1020
[0069]	ccgggtcgtc tcaccaacct gctggacgtg gccgaggctt gcccgacctt cctgtgtttt	1080
[0070]	gacgacgta aaccgtacgt tgtgacctg accgacgaac aacgctgct ggccaagttt	1140
[0071]	gacgtttctc tggctgcaa gcacatgtct aaccttacc tgtctggtat cgcacagtac	1200
[0072]	tacaccagt actctggcac catcaacctg catttcatgt tcaactgctc tactgaatct	1260
[0073]	aaggccggtt acatggtggc gtacattcca ccgggcatgg acaccccacc ggataccccg	1320
[0074]	gagaaagctg cactctgat ccacgccgag tgggacaccg gtctgaaact caaatttact	1380
[0075]	ttttctatcc cgtacgtgct cgctgcagat tacgcataca ctgcgtctga cgtggcggag	1440
[0076]	accaccaatg tacagggttg ggtgtgcatc taccagatta ctcacggtaa ggctgaacag	1500
[0077]	gacactctgg ttgtgtctgt aagcgcggc aaggactttg aactgctcct gccaatgac	1560
[0078]	ccgcgcgcac aaaccaccac tgctaccggt gaaagcgcag atccagtcac gactacggct	1620
[0079]	gagaactacg gcggtgaaac ccaggcacag cgtcgtcatc aactgacgt gggcttctctg	1680
[0080]	atggatcgtt tcgtgcagat caaacgggt ggtccaacc acgtgatcga cctgatgcag	1740
[0081]	accaccagc acggtctggt aggtgcaatg ctgcgtgcag caacttacta cttcagcgac	1800
[0082]	ctggagatcg ttgtaacca caccggcaac ctgacctggg ttccgaacgg tgccccgaa	1860
[0083]	gcggcactgc agaacactag caaccgact gcttaccaca aagcgccttt caccgctg	1920

[0084] gctctgcctt acacggctcc gcatcgtgta ctggctaccg tttattccgg cacctctaaa 1980
[0085] tattccgcgc cgcaggaccg tcgtggatgat tccggcccgc tggctgctcg tctggccgcc 2040
[0086] caactgccgg cgtcttttaa ttttggcgcg attcgtgccca ccgaaatcca tgaactgctg 2100
[0087] gttcgcataa aacgcgcgga actgtattgc ccgcgcccgc tgctggcggt tgaagtttct 2160
[0088] tctcaagatc gccacaaaca gaagatcatt gcgcccgcga aacagctgct g 2211
[0089] <210> 3
[0090] <211> 34
[0091] <212> DNA
[0092] <213> 人工序列()
[0093] <400> 3
[0094] ttggtcteta ggtatgaaca ctggtagcat catt 34
[0095] <210> 4
[0096] <211> 28
[0097] <212> DNA
[0098] <213> 人工序列()
[0099] <400> 4
[0100] ggatccttat tccttgacg ggaactca 28
[0101] <210> 5
[0102] <211> 35
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工序列()
[0105] <400> 5
[0106] ttggtcteta ggtatgacca cctctaccgg tgaat 35
[0107] <210> 6
[0108] <211> 28
[0109] <212> DNA
[0110] <213> 人工序列()
[0111] <400> 6
[0112] ggatccttac agagaactgtt taaccgga 28
[0113] <210> 7
[0114] <211> 35
[0115] <212> DNA
[0116] <213> 人工序列()
[0117] <400> 7
[0118] ttggtcteta ggtatgggta tcttcccggg tgctt 35
[0119] <210> 8
[0120] <211> 26
[0121] <212> DNA
[0122] <213> 人工序列()
[0123] <400> 8
[0124] ggatccttat tgacgctcgt cagcag 26
[0125] <210> 9

- [0126] <211> 33
[0127] <212> DNA
[0128] <213> 人工序列()
[0129] <400> 9
[0130] ttggtctcta ggtatggcg ccggtcaatc cag 33
[0131] <210> 10
[0132] <211> 27
[0133] <212> DNA
[0134] <213> 人工序列()
[0135] <400> 10
[0136] ggatccttac tcttagatg gcagctc 27
[0137] <210> 11
[0138] <211> 42
[0139] <212> DNA
[0140] <213> 人工序列()
[0141] <400> 11
[0142] ttggtctcta ggtatgccac tgctaccggt gaaagcgcag at 42
[0143] <210> 12
[0144] <211> 33
[0145] <212> DNA
[0146] <213> 人工序列()
[0147] <400> 12
[0148] ggatccttac agcagctggt tcgccggcgc aat 33
[0149] <210> 13
[0150] <211> 33
[0151] <212> DNA
[0152] <213> 人工序列()
[0153] <400> 13
[0154] ttggtctcta ggtatgggta tcgtgccggt tgc 33
[0155] <210> 14
[0156] <211> 31
[0157] <212> DNA
[0158] <213> 人工序列()
[0159] <400> 14
[0160] ggatccttag gtttgtgcgc gcgggtcaat t 31

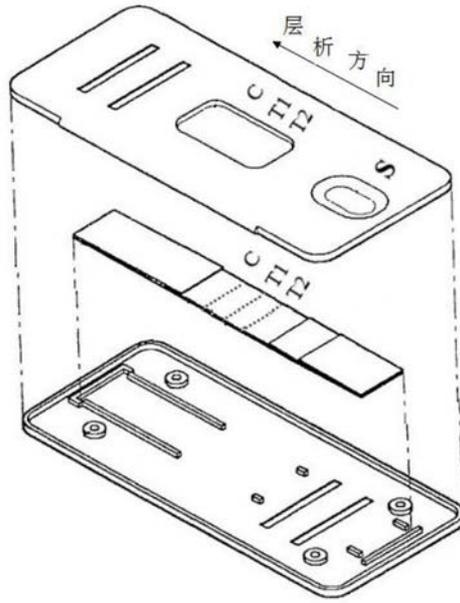


图1

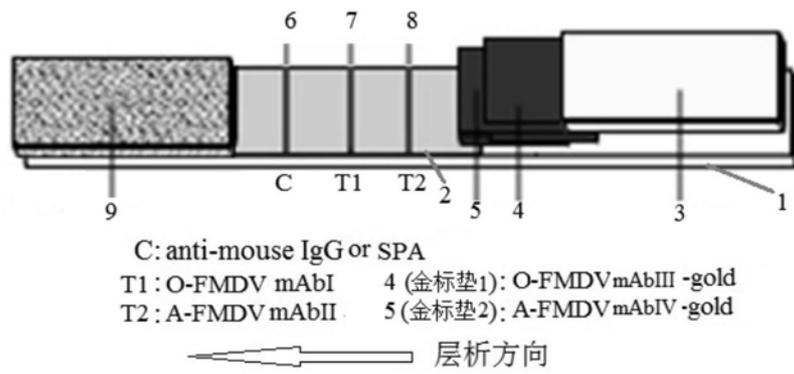


图2

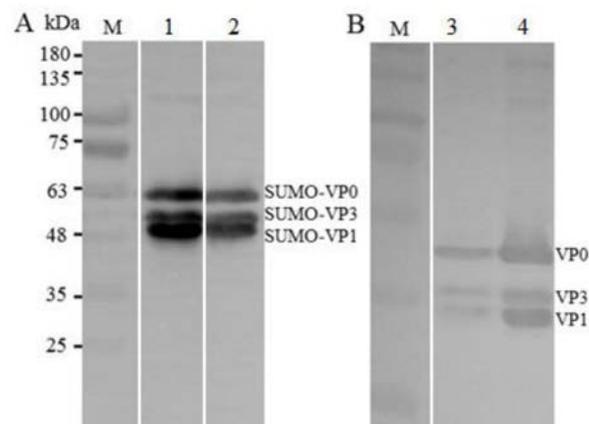


图3

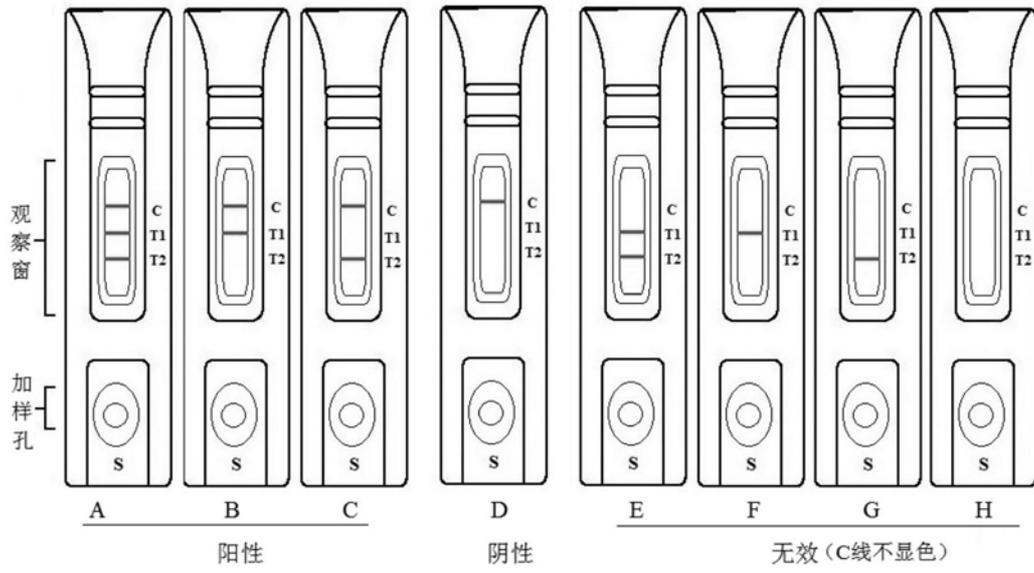


图4