



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109374886 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201811188313.9

(22) 申请日 2018.10.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109374886 A

(43) 申请公布日 2019.02.22

(73) 专利权人 北京纳百生物科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术

开发区科创十四街11号院3号楼

(72) 发明人 杨春江 于在江 刘佳 赵荣茂

曹倩倩 李月 莫勋 孙海霞

王军 陈曼利

(51) Int.Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106405093 A,2017.02.15

CN 105753947 A,2016.07.13

CN 104120109 A,2014.10.29

DE 1035133 A1,2005.02.10

WO 9963063 A1,1999.12.09

Schwyzer,M. and Ackermann,M..“Bovine
herpesvirus 1, complete genome”.《GenBank,
NCBI Reference Sequence:NC_001847.1》
.2018,

审查员 陈亚文

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒及
其应用

(57) 摘要

提供了一种牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,所述检测试剂盒由重组gD抗原包被酶标板、阴性对照、阳性对照、辣根过氧化物酶标记的IBR特异性单克隆抗体、样本稀释液、洗涤液、底物液和终止液组成。利用该试剂盒,可在较短时间内检测出牛群是否感染牛传染性鼻气管炎,并制定相应的管理策略。针对当前动物疫病防控的复杂形势,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

1. 一种牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒中重组gD蛋白是利用如氨基酸序列为SEQ ID No.1所列的截短型gD序列在大肠杆菌系统中表达获得的,其基因序列如SEQ ID No.2所列序列。

2. 根据权利要求1所述的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述重组gD蛋白克隆表达的引物序列:上游引物序列为SEQ ID No.3序列,下游序列为SEQ ID No.4序列。

3. 根据权利要求1所述的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒由重组gD抗原包被酶标板、阴性对照、阳性对照、辣根过氧化物酶标记的IBR特异性单克隆抗体、样本稀释液、洗涤液、底物液和终止液组成,其中:

所述重组gD抗原包被酶标板上包被的是重组牛传染性鼻气管炎gD蛋白;

所述阴性对照为进口胎牛血清,并经《NY/T 575-2002 牛传染性鼻气管炎诊断技术》中所列方法确认为阴性;

所述阳性对照为标准牛传染性鼻气管炎抗体阳性牛血清;

所述辣根过氧化物酶标记的IBR特异性单克隆抗体是利用辣根过氧化物酶标记IBR特异性鼠单抗制备的,其中IBR特异性鼠单抗是利用重组gD蛋白免疫小鼠后筛选获得的,其针对牛传染性鼻气管炎病毒具有特异性反应;

所述的样本稀释液是pH7.2的0.02mol/L PBS;

所述的洗涤液是含有0.05%吐温-20的 0.01mol/L pH7.2的PBS;所述的底物液是从市场上采购的商品化单组份TMB显色底物液;

所述的终止液是2mol/L硫酸溶液。

4. 根据权利要求1所述的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒用于检测牛血清中的牛传染性鼻气管炎抗体。

5. 根据权利要求1所述的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,试剂盒检测过程包括如下步骤:

(1) 采集并分离血清样本;

(2) 使用样本稀释液按照1:40的比例稀释样本后备用,若不立即使用,1~4小时应置于4℃保存,大于等于4小时需置于-20℃保存;

(3) 利用所述的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒检测处理好的样本,并判定结果。

牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于动物疫病快速检测技术领域,涉及一种牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis,简称IBR)是由牛疱疹病毒1型(BHV—1)感染家养牛和野生牛引起的一种病毒性传染病,被世界动物卫生组织列为B类疾病,我国农业部列为二类动物疫病。该病广泛分布于世界各地,死亡率较低。许多感染牛呈亚临床症状经过,往往由于细菌继发感染导致更为严重的呼吸道疾病及混合感染,因此对于IBR的早期感染诊断检测非常重要。

[0003] 农业部行业标准《NY/T 575-2002 牛传染性鼻气管炎诊断技术》列出了3种IBR的检测方法:病毒分离鉴定、微量血清中和试验、酶联免疫检测方法,前两种方法操作繁琐复杂,耗时长,所需试剂及设备较多,在基层牧场很难展开;而酶联免疫法整体耗时接近4h,并且需要配制各种溶液及准备组分,对于基层兽医实验室而言,亦难以开展。

[0004] 更进一步而言,标准中所描述的酶联免疫法为兔多克隆抗体间接酶联免疫法,采用病毒抗原包被酶标板,存在一定的散毒风险,实验废物如处理不当亦可能导致交叉污染。如果开发出方便快捷、无散毒风险、省时省力的牛传染性鼻气管炎检测试剂盒则能极大地改善当前IBR的检测现状。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,利用该检测试剂盒可在1小时内检测出牛群是否感牛传染性鼻气管炎病毒。

[0006] 本发明提供的检测试剂盒无需昂贵设备,操作简便,无需特殊培训,检测灵敏度高,非常适合基层兽医实验室、养殖场检测应用。

[0007] 本发明所提供的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒基于酶联免疫阻断法检测原理,由重组gD抗原包被酶标板、阴性对照、阳性对照、辣根过氧化物酶标记的IBR特异性单克隆抗体、样本稀释液、洗涤液、底物液和终止液组成。

[0008] 其中,所述重组gD抗原包被酶标板上包被的是重组牛传染性鼻气管炎gD蛋白,所述重组gD蛋白是利用如SEQ ID No.1所列的截短型gD序列在大肠杆菌系统中表达获得的,表达该蛋白的基因序列如SEQ ID No.2所列。

[0009] 所述阴性对照为进口胎牛血清,并经《NY/T 575-2002 牛传染性鼻气管炎诊断技术》中所列方法确认为阴性。

[0010] 所述阳性对照为标准牛传染性鼻气管炎抗体阳性牛血清。

[0011] 所述辣根过氧化物酶标记的IBR特异性单克隆抗体是利用辣根过氧化物酶标记IBR特异性鼠单抗制备的,其中IBR特异性鼠单抗是利用重组gD蛋白免疫小鼠后筛选获得的,其针对牛传染性鼻气管炎病毒具有特异性反应。

- [0012] 所述的样本稀释液是pH7.2的0.02mol/L PBS。
- [0013] 所述的洗涤液是含有0.05%吐温-20的0.01mol/L PBS (pH7.2)。
- [0014] 所述的底物液是从市场上采购的商品化单组份TMB显色底物液。
- [0015] 所述的终止液是2mol/L硫酸溶液。
- [0016] 本发明的另外一个目的是提供上述检测试剂盒的制备方法,具体包括如下步骤:
- [0017] (1)重组gD蛋白的制备;
- [0018] (2)gD蛋白特异性单克隆抗体的制备;
- [0019] (3)检测试剂盒各组分的制备;
- [0020] (4)检测试剂盒的组装。
- [0021] 此外,本发明还涉及一种使用本发明的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒检测牛血清中牛传染性鼻气管炎病毒抗体的检测方法,包括如下步骤:
- [0022] 第一步,采集并分离血清样本。
- [0023] 第二步,使用样本稀释液按照1:40的比例稀释样本后备用。若不立即使用,短时间内(1~4小时)应置于4℃保存,长时间(≥4小时)需置于-20℃保存。
- [0024] 第三步,利用本发明的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒检测处理好的样本,并最终判定结果。
- [0025] 与传统的病原学分析方法和常规ELISA方法相比,本发明具有以下有益效果:
- [0026] 1)操作简单,无需特殊仪器设备。从试剂、仪器设备来看,本方法无需有机试剂,检测样本经稀释后可以直接检测,降低了操作难度,非常适合于基层检测实验室推广应用。
- [0027] 2)耗时短,检测效率高。整体检测时间较短,比农业部标准推荐方法省时省力。
- [0028] 3)检测无需涉及外来病毒,无散毒风险,有利于牛场和基层兽医实验室的疫病防控及交叉污染控制。
- [0029] 4)检测灵敏,准确率高。利用阻断法原理可以有效监测病毒抗体变化,区别于一般的间接ELISA。
- [0030] 本发明提供的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒与传统技术及标准方法相比较,优势明显,技术改进明显,特别是针对当前牛传染性鼻气管炎防控形式复杂的现状,具有非常广阔的市场前景,可在基层检测和政府监管中发挥重大作用。

附图说明

- [0031] 图1为gD基因的PCR扩增图。
- [0032] 图2为gD重组蛋白的纯化鉴定图。

具体实施方式

[0033] 下面结合具体实施方式来进一步描述本发明。本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚,但这些实施例仅是范例性质,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下,可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或者替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围。下述试剂、实验材料,如没有特殊说明,均来源于商品化产品。

- [0034] 实施例1:重组gD蛋白的制备

[0035] (1) 重组gD抗原的制备与纯化

[0036] 根据Genbank NC 001847中的牛传染性鼻气管炎病毒基因信息,利用DNASTar对gD蛋白的氨基酸序列的信号肽、抗原性、亲水性等进行分析,去除信号肽序列,筛选抗原性区域,最终截取2段蛋白序列,进行串联组合,合成gD基因序列,为SEQ ID No.2序列,并设计一对引物,上游引物序列为SEQ ID No.3序列,下游序列为SEQ ID No.4序列。

[0037] 以合成基因为模板,进行PCR反应。PCR反应体系为50 μ L。在灭菌0.2mL EP管中分别加入以下试剂:模板DNA 0.5 μ L,10XEx TaqTN Buffer(Mg²⁺ free) 5 μ L,dNTP Mixture (各2.5mM) 2 μ L,MgCl₂ (25mM) 4 μ L,上游引物(20pM/ μ L) 0.5 μ L,下游引物(20pM/ μ L) 0.5 μ L,TaKaRa Ex TaqTM (5u/ μ L) 0.25 μ L,灭菌超纯水 37.25 μ L。PCR反应完成后,将PCR产物与10x溴酚蓝上样缓冲液混匀,经1.5%琼脂糖凝胶电泳(含EB 0.5 μ g/mL)。结束电泳,在紫外灯下观察,用凝胶成像系统拍照并分析。如图1所示。

[0038] 使用商品化回收试剂盒(天根生化)回收纯化产物,经双酶切后的gD基因片段与质粒载体pET-32a (+)以3:1的比例混合,同T4 DNA连接酶在16 $^{\circ}$ C条件下进行粘性末端定向连接,然后转化入BL21 (DE3)感受态细胞,然后筛选阳性菌落送上海杰瑞进行测序鉴定,并将测序结果与Genbank数据库中做Blast对比分析,确保序列正确。

[0039] gD重组蛋白表达基因工程菌接种于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C,180r/min下摇床振荡培养至对数生长期中期(OD_{600nm}为0.6~0.8),加入IPTG至终浓度为1.0mM,继续诱导培养1~5小时,用pH7.2的PBS洗涤1次,将菌体悬液用溶菌酶和超声裂解,4 $^{\circ}$ C下12000r/min离心20min,将可溶蛋白和包涵体分开。分别取裂解上清和沉淀进行SDS-PAGE电泳,分析重组蛋白的可溶性。用His-Tag亲和层析柱(Merck产品)分离纯化重组gD蛋白,-20 $^{\circ}$ C以下保存备用。gD纯化蛋白如图2所示。

[0040] (2) 重组gD蛋白的特异性检测

[0041] 将纯化的重组gD蛋白经SDS-PAGE电泳转印至NC膜,进行Western Blotting检测。将1:100稀释的IBRV阳性牛血清作为一抗,37 $^{\circ}$ C孵育2h,TBST洗涤3次,10min/次。用TBST稀释的1:5000倍的HRP兔抗牛二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1h,继续TBST洗涤3次,10min/次。DAB显色,去离子水终止反应。

[0042] 实施例2: gD蛋白特异性单克隆抗体的制备及纯化

[0043] 将制备好的重组gD抗原按照50 μ g的量,与等量弗氏佐剂乳化后,皮下多点注射免疫若干只Balb/C小鼠。首次免疫时佐剂为弗氏完全佐剂,后续免疫佐剂为弗氏不完全佐剂。免疫间隔为2周,3次免疫后以直接ELISA测定血清效价。筛选血清效价高、交叉反应较小的小鼠按常规方法细胞融合,筛选分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0044] 筛选抗原为灭活的牛传染性鼻气管炎病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛口蹄疫病毒等及重组gD蛋白抗原,并用阴性血清作为参考对照,通过筛选排除对所用的交叉反应物质有反应的单抗细胞株,保留只与牛传染性鼻气管炎病毒及重组gD蛋白同时反应的细胞株,最终获得13株阳性细胞株,结果如下表:

[0045]

克隆号	OD 值 gD 蛋白 2 μ g/ml 包被	OD 值 IBRV 病毒 1:1000 稀释包被
6H6-1G2	0.572	0.615
6H6-1B5	0.443	0.208
5A1-1D5	0.909	0.742
5A1-1A11	0.941	0.749
4F12-1F11	0.872	0.555
4F12-1B6	0.635	0.511
7C10-1B1	0.918	0.776
1G6-1F2	0.945	0.584
1G6-1A1	0.897	0.555
7H10-1B6	0.717	0.617
7H10-1F2	0.775	0.605
7F8-1E3	0.652	0.667
7F8-1D3	0.793	0.549

[0046] 取其中效价最高的5A1-1A11和7C10-1B1扩大培养后以体内法诱生腹水,收集后经饱和硫酸铵沉淀后,以Protein G柱纯化,测定蛋白浓度后冻存。

[0047] 实施例3: IBR特异性单克隆抗体的鉴定

[0048] 利用商品化IgG亚型鉴定试纸盒对所制备的单克隆抗体进行鉴定,结果显示5A1-1A11和7C10-1B1分别为IgG2a和IgG2b亚型,具体操作如下:

[0049] 1) 将制备的纯化单抗用PBS溶液作1:10000、1:15000、1:20000、1:25000、1:30000、1:35000和1:40000稀释。

[0050] 2) 取gD蛋白包被板(0.1 μ g/ml),以1 $\times$ 洗涤液300 μ l/孔洗板1次,弃去洗涤液。加入相应已稀释好的单克隆抗体,每孔50 μ l,每个单抗作5个重复孔,振荡混匀1分钟。37 $^{\circ}$ C孵育30分钟后,取出反应板,弃去反应液,每孔加入300 μ l 1 $\times$ 洗涤液,洗涤3次后,甩干。

[0051] 3) 将IgG1、IgG2b和IgG3用PBS溶液作1:1000稀释,将IgG2a和IgM用PBS溶液作1:5000稀释。每个单抗依次加入已稀释的IgG1、IgG2b、IgG3、IgG2a和IgM抗体,每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。

[0052] 4) 将HRP标记的羊抗兔IgG抗体用PBS作1:5000稀释后,每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟后,按上一步中的方法洗涤3次,甩干。

[0053] 5) 将底物溶液立即加入到ELISA反应板中,100 μ l/孔,室温避光显色10分钟后,每孔加50 μ l终止液终止反应。

[0054] 6) 反应终止后,10分钟内用酶标仪测定OD450nm值。

[0055] 7) 比较每个单抗加入IgG1、IgG2b、IgG3、IgG2a和IgM抗体孔的OD450nm值,OD450nm最高者对应的亚类为该单抗的亚类。

[0056] 实施例4: 辣根过氧化物酶标记IBR特异性单克隆抗体

[0057] 利用戊二醛法将辣根过氧化物酶与IBR特异性单克隆抗体标记,具体如下:

[0058] (1) 称取辣根过氧化物酶25mg溶于1.25%戊二醛溶液中,室温静置过夜。

[0059] (2) 反应后的酶溶液经Sephadex G-25层析柱,用生理盐水洗脱。流速控制在1ml/min,收集棕色流出液。如体积大于5ml,则以PEG浓缩至5ml。放置25ml小烧杯中,缓慢搅拌。

[0060] (3) 将待标记的鼠单克隆抗体5A1-1A11和7C10-1B1分别取12.5mg用生理盐水稀释至5ml,搅拌下逐滴加入酶溶液中。

[0061] (4) 用1M pH9.5碳酸缓冲液0.25ml,继续搅拌3小时。

[0062] (5) 加0.2M赖氨酸0.25ml,混匀后,置室温2小时。

[0063] (6) 在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1小时。

[0064] (7) 3000rpm离心半小时,弃上清。沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于少量0.15M pH7.2的PBS中。

[0065] (8) 将上述溶液装入透析袋中,对0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测),10000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶标单克隆抗体,分装后,冰冻保存。

[0066] 最终获得了2个标记抗体,记为HRP-1A11和HRP-1B1。

[0067] 实施例5:阻断抗体的筛选

[0068] 将重组gD蛋白按照1μg/ml浓度包被酶标板,然后加入稀释好的已知样本(经北京市动物疫病预防控制中心检测确认结果),然后分别加入2株HRP标记抗体进行ELISA检测,根据检测结果筛选确定用于试剂盒的优选HRP标记抗体。具体操作如下:

[0069] (1) 酶标板的包被:将重组gD蛋白用0.05M碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释至1μg/mL,按照每孔100μL包被酶标板,4℃过夜包被,然后以PBST洗板3次,每次60s,然后以200μL 1%明胶(1g明胶溶于100mL PBS,pH 7.2~7.4,过滤除菌)封闭酶标板,37℃封闭2小时。然后洗板1次后甩干备用。

[0070] (2) ELISA检测:加入待检样本100μL至孔中,37℃孵育30min,弃去孔中液体,洗板3次。加入HRP标记单抗 100μL每孔,继续37℃孵育30min,弃去孔中液体,洗板3次,加入TMB底物,100μL每孔,37℃孵育10min,再以2mol/L硫酸50μL/孔终止反应。酶标仪读取450nm吸光度值。

[0071] 2个不同抗体的检测结果如下表:

[0072]

样本编号	已知结果	HRP-1A11	HRP-1B1
1	-	1.03	0.41
2	-	0.769	0.423
3	-	0.829	0.395
4	-	0.831	0.459
5	+	0.33	0.244
6	+	0.376	0.251
7	+	0.334	0.344
8	+	0.455	0.287
9	-	0.847	0.697
10	-	0.735	0.613
11	-	0.918	0.529
12	-	0.52	0.492
13	-	1.008	0.556
14	-	0.918	0.647
15	+	0.295	0.268
进口阴性	阴性	1.004	0.706

[0073] 由结果可知,HRP-1A11在检测进口阴性血清时,OD值为1.0左右,较高,符合实际样本;HRP-1B1检测进口阴性血清时,OD值为0.706,较低,同时样本1的OD值也为如此,整体样本检测的N/P值较大,综合考虑选择HRP-1A11作为后续优选酶标抗体用于试剂盒组分配制。

[0074] 实施例6:牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒各组分的配制

[0075] (1) 酶标板的包被:同实施例5操作步骤中包被过程,待其干燥后用铝箔袋真空密封备用。

[0076] (2) 阴性对照的制备:进口胎牛血清,经《NY/T 575-2002 牛传染性鼻气管炎诊断技术》中所列方法确认为阴性,添加0.03%的叠氮化钠后,分装至塑料瓶中,每瓶1mL。

[0077] (3) 阳性对照:采购自中国兽医药品监察所标准血清,稀释200倍,添加0.03%的叠氮化钠后,并分装至塑料瓶中,每瓶1mL。

[0078] (4) 辣根过氧化物酶标记的IBR特异性单克隆抗体:将HRP-1A11用PBS稀释至1:3000倍,添加0.04%的叠氮化钠后,分装至棕色瓶中,每瓶10mL;

[0079] (5) 样本稀释液:0.02mol/L的PBS,分装至50mL每瓶;

[0080] (6) 洗涤液:0.2mol/L PBS,pH7.4,含有1%吐温-20,60mL每瓶,使用时需要用去离子水稀释20倍;

[0081] (7) 底物液:单组份TMB底物液,商品化产品,分装至棕色瓶中,7mL每瓶;

[0082] (8) 终止液:2mol/L硫酸溶液,自行配制,分装至塑料瓶中,7mL每瓶。

[0083] 实施例7:牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒的组装及检测步骤

[0084] 按照实施例6准备好各个试剂盒组分,贴好标签,并将其分别安插在刻有孔位的泡沫托上后,放入试剂盒外包装箱中,并放入操作说明书、质控报告,然后密封保存于2~8℃。

[0085] 牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒的检测步骤如下:

[0086] (1) 将试剂盒和待测样本恢复至室温(19~25℃),例如将其放置室温环境45min;

[0087] (2) 稀释待测样本:用微量移液器取样本10 μ L,加入390 μ L样本稀释液,混匀备用,稀释好的样本若不能立即检测,短时间内(1~4小时)应置于4 $^{\circ}$ C保存,长时间($\geq$ 4小时)需置于-20 $^{\circ}$ C保存不超过1个月;

[0088] (3) 加样本/阴阳性对照:根据需要取适当的酶标板条,加入样本/阴阳性对照,每孔100 μ L,做双孔平行,然后37 $^{\circ}$ C避光孵育30min;

[0089] (4) 洗板3次,拍干。加入酶标单抗100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育15min;

[0090] (5) 洗板3次,拍干。加入底物液100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育15min;

[0091] (6) 取出后加入终止液50 μ L中止反应,酶标仪读取450nm吸光度值,并根据阴阳性对照OD值判定样本检测结果。

[0092] (7) 结果判定方式:利用以下公式计算阻断率

[0093] 阻断率=(阴性对照平均值-样本平均OD值)/阴性对照平均值*100%

[0094] 若阻断率 $\geq$ 45%为阳性;40%~45%为可疑, $\leq$ 40%为阴性。

[0095] 实施例8:牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒的稳定性实验

[0096] 制备3个批次的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒,检测标准阴性对照和标准阳性对照,每个样本重复检测2次,根据检测结果判定检测试剂盒的稳定性。

[0097]

试剂盒批次	阴性对照 OD 值		阳性对照 OD 值		批内变异系数(%)
171203	2.068	2.032	0.098	0.107	3.2%~5.8%
	2.141	1.986	0.105	0.113	
171204	1.945	1.989	0.102	0.103	3.5%~6.1%
	2.032	2.109	0.098	0.113	
171206	1.98	2.268	0.091	0.105	5.6%~6.3%
	2.174	2.132	0.103	0.098	
批间变异系数(%)	4.3%	5.2%	5.0%	5.5%	

[0098] 统计可知,本发明牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒阴阳性对照批内变异系数为3.2%~6.3%,批间变异系数为4.3%~5.5%,稳定性良好。

[0099] 实施例9:牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒敏感性实验

[0100] 将购买的标准阳性血清(中国兽医药品监察所)用样本稀释液稀释至1:10、1:50、1:100、1:200、1:400和1:800,然后利用牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒检测。结果如下表。

[0101]

样本稀释倍数	试剂盒检测 OD 值	阻断率
1:10	0.352	86.0%
1:50	0.409	82.7%
1:100	0.632	69.8%
1:200	0.83	58.3%
1:400	1.234	34.8%
1:800	1.767	3.8%
阴性对照	1.832	—
阳性对照	0.112	—

[0102] 由表可知当稀释至1:400时,阻断率为34.8%,小于40%为阴性。即试剂盒对阳性标准血清最低检测稀释倍数为1:200~1:400之间,有较高的敏感性。

[0103] 实施例10:牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒特异性实验

[0104] 将常见的牛病病毒抗体阳性标准血清,如A型牛口蹄疫病毒阳性标准血清、牛病毒性腹泻病毒阳性标准血清、犊牛腹泻病毒阳性标准血清,分别用样本稀释液稀释100倍后用自制试剂盒检测,结果显示阻断率均小于10%,均呈阴性,表明自制牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒与常见牛病阳性血清无交叉反应,特异性良好。

[0105] 实施例11:自制试剂盒与进口同类产品的对比

[0106] 将临床采集自全国不同区域牛场的358份血清用自制牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒与美国IDEXX的gB抗体阻断试剂盒检测,结果统计如下表。

[0107]

样本结果	自制试剂盒	美国 IDEXX 试剂盒
阴性	314	312
阳性	44	44
可疑样本	0	2
总数	358	358

[0108] 由结果可知,检测358份样本中,美国IDEXX试剂盒检测312份阴性结果中,自制试剂盒全部检出,符合率为100%;美国IDEXX试剂盒检测的44份阳性结果中,自制试剂盒检出44份,全部检出,符合率为100%;而美国进口试剂盒检出的2份可疑样本,自制试剂盒检测为阳性,其结果表明自制试剂盒敏感性高于美国试剂盒。综合来看,自制与进口试剂盒阳性、阴性符合率为均较高,整体符合率为99.44%,具有较好的应用前景。

[0109] 实施例12:自制试剂盒对人工感染动物的检测

[0110] 使用IBR病毒人工感染3头经血清筛选和病原筛选为阴性的牛,用自制试剂盒和美国IDEXX试剂盒分别在感染后的1、3、5、7、9、12、15天同步检测牛血清中的IBR病毒抗体,结果如下表所示:

[0111]

检测时间	自制试剂盒	美国 IDEXX 试剂盒
1	— — —	— — —
3	— — —	— — —
5	— — +	— — —
7	+++	— — +
9	+++	— ++
12	+++	+++
15	+++	+++

[0112] 由结果可知,人工感染后第五天,自制试剂盒检测出1份阳性,美国试剂盒全为阴性;人工感染后7~15天,自制试剂盒检测结果全部为阳性,而美国试剂盒在人工感染后12天检测才全部为阳性,可初步判定自制试剂盒比美国IDEXX试剂盒检测更为敏感,更适合于临床IBR病毒抗体普查筛选。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 北京纳百生物科技有限公司
 [0003] <120> 牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测试剂盒及其应用
 [0004] <130> F001
 [0005] <160> 4
 [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 162
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列(未知)
 [0011] <400> 1
 [0012] Leu Pro Thr Pro Ala Pro Arg Val Thr Val Tyr Val Asp Pro Pro Ala
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Tyr Pro Met Pro Arg Tyr Asn Tyr Thr Glu Arg Trp His Thr Thr Gly
 [0015] 20 25 30
 [0016] Pro Ile Pro Ser Pro Phe Ala Asp Gly Arg Glu Gln Pro Val Glu Val
 [0017] 35 40 45
 [0018] Arg Tyr Ala Val Val Pro Pro Tyr Phe Glu Glu Ser Lys Gly Tyr Glu
 [0019] 50 55 60
 [0020] Pro Pro Pro Ala Ala Asp Gly Gly Ser Pro Ala Pro Pro Gly Asp Asp
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Glu Ala Arg Glu Asp Glu Gly Glu Thr Glu Asp Gly Ala Ala Gly Arg
 [0023] 85 90 95
 [0024] Glu Gly Asn Gly Gly Pro Pro Gly Pro Glu Gly Asp Gly Glu Ser Gln
 [0025] 100 105 110
 [0026] Thr Pro Glu Ala Asn Gly Gly Ala Glu Gly Glu Pro Lys Pro Gly Pro
 [0027] 115 120 125
 [0028] Ser Pro Asp Ala Asp Arg Pro Glu Gly Trp Pro Ser Leu Glu Ala Ile
 [0029] 130 135 140
 [0030] Thr His Pro Pro Pro Ala Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Asp Ala Val
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Pro Val
 [0033] <210> 2
 [0034] <211> 486
 [0035] <212> DNA
 [0036] <213> 人工序列(未知)
 [0037] <400> 2
 [0038] ttgcctacac ccgcgccgcg ggtgacggta tacgtcgacc cgccggcgta cccgatgccg 60

[0039] cgatacaact acactgaacg ctggcacact accgggccc a taccgtcgcc cttcgcagac 120
[0040] ggccgcgagc agcccgctga ggtgcgctac gcggtcgttc cgccgtatatt tgaggagtcg 180
[0041] aagggtctacg agccgcccgc tgccgcccgat gggggttccc ccgcccacc cggcgacgac 240
[0042] gaggcccgcg aggatgaagg ggagaccgag gacggggcag ccgggcggga gggcaacggc 300
[0043] ggccccccag gaccgaagg cgacggcgag agtcagaccc ccgaagccaa cggaggcgcc 360
[0044] gaggcgagc cgaaaccgg cccagcccc gacggcgacc gcccgaagg ctggccgagc 420
[0045] ctcgaagcca tcacgaccc cccgcccgc cccgctacgc ccgcgcccc cgacgccgtg 480
[0046] ccggtc 486
[0047] <210> 3
[0048] <211> 29
[0049] <212> DNA
[0050] <213> 人工序列(未知)
[0051] <400> 3
[0052] caaggtcct tgcctacacc cgcgccgcg 29
[0053] <210> 4
[0054] <211> 29
[0055] <212> DNA
[0056] <213> 人工序列(未知)
[0057] <400> 4
[0058] aaactcgagg accggcacgg cgtcggggg 29

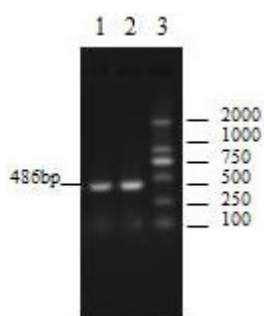


图1

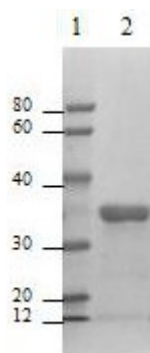


图2