



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111929433 B

(45) 授权公告日 2021.03.12

(21) 申请号 201910816946.8	CN 104311660 A,2015.01.28
(22) 申请日 2019.08.30	CN 109781980 A,2019.05.21
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111929433 A	CN 108148138 A,2018.06.12
(43) 申请公布日 2020.11.13	J.M. Oviedo等.High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents.《Journal of Virological Methods》.1997,第64卷
(73) 专利权人 洛阳普泰生物技术有限公司 地址 471003 河南省洛阳市中国(河南)自 由贸易试验区洛阳片区高新区华夏路 6号	J.M. Oviedo等.High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents.《Journal of Virological Methods》.1997,第64卷
(72) 发明人 田克恭 孙杰 王彦伟 邓均华	
(74) 专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理 事务所(普通合伙) 11017 代理人 韩登营	
(51) Int.Cl. C07K 14/01 (2006.01) G01N 33/535 (2006.01)	审查员 李倩
(56) 对比文件 CN 105527442 A,2016.04.27	权利要求书1页 说明书8页 序列表1页

(54) 发明名称

一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,该试剂盒的支持介质上包被有非洲猪瘟病毒抗原,该非洲猪瘟病毒抗原为非洲猪瘟病毒p30和/或蛋白 Δ p54蛋白;该非洲猪瘟病毒p30蛋白如SEQ ID No.1所示,该非洲猪瘟病毒 Δ p54蛋白如SEQ ID No.2所示。本发明非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒特异性、灵敏度、重复性良好,包被了两种抗原的试剂盒其灵敏度与间接免疫荧光检测相当,能在早期较低抗体水平下较早的检测到抗体阳性,为临床猪群感染情况提供依据,对于预防和控制非洲猪瘟病毒感染具有重要作用。

CN 111929433 B

1. 一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,其中,所述试剂盒的支持介质上包被有非洲猪瘟病毒抗原,所述非洲猪瘟病毒抗原为非洲猪瘟病毒p30和蛋白 Δ p54蛋白;所述非洲猪瘟病毒p30蛋白为SEQ ID No.1所编码,所述非洲猪瘟病毒 Δ p54蛋白为SEQ ID No.2所编码。

2. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,其中,所述支持介质为96孔酶标板,所述非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒还包括样品稀释液、洗涤液、封闭液、羊抗猪酶标二抗、显色液、终止液、抗体阳性猪血清对照以及抗体阴性猪血清对照。

3. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,其中,所述样品稀释液为含有氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.24g、氯化钾0.2g、纯化水600ml、Proclin300 1ml、新生牛血清200ml、PUR染料0.028g混匀,用纯化水定容至1000ml;所述洗涤液为含有氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.12g、氯化钾0.2g、吐温20 0.5ml、纯化水800ml混匀,补加纯化水定容至1000ml;所述封闭液为含1%W/VBSA的磷酸盐缓冲液、含5%W/V脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液、含1.5%V/V明胶的磷酸盐缓冲液或含20%V/V新生牛血清磷酸盐缓冲液;所述显色液包括显色剂A液和显色剂B液,所述显色剂A液含磷酸氢二钠14.7g、柠檬酸9.3g、过氧化脲0.3g,溶于800ml纯化水混匀,补加纯化水定容至1000ml;所述显色液B含四甲基联苯二胺(TMB)0.2g,无水乙醇10ml,溶于800ml纯化水混匀,补加纯化水定容至1000ml;所述终止液为2M的 H_2SO_4 。

4. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,其中,所述p30蛋白包被量为4-10ng/孔,所述 Δ p54蛋白包被量为4-10ng/孔。

5. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,其中,所述p30蛋白包被量为6ng/孔,所述 Δ p54蛋白包被量为8ng/孔。

一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫测定法领域,具体涉及一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(ASFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触的烈性传染性疾病。其特征为病程短、病死率高,可高达100%,临床症状和病理变化均类似于急性猪瘟,在诊断时极易误诊,表现高热、皮肤充血发绀、流产、水肿及脏器出血。

[0003] 该病在我国被列为一类动物疫病,属于世界动物卫生组织(OIE)的法定报告动物疫病。我国于2018年报告了首例非洲猪瘟病例,并迅速传播到各个省(区)。中国的生猪数量占全球的50%,ASFV在中国的传播,严重威胁着世界养殖业。迄今为止,非洲猪瘟主要的诊断是在病毒基因检测的基础上,通过RT-PCR和部分基因组序列分析进行的,耗时长,不能及时给出是否感染的准确判断,因此,临床上急需开发出快速准确有效的ELISA检测试剂盒。

发明内容

[0004] 为解决现有技术的不足,本发明提供了一种非洲猪瘟病毒抗体检测ELISA试剂盒,以及该试剂盒的制备及应用。

[0005] 本发明的第一方面是一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒,其中,所述试剂盒的支持介质上包被有非洲猪瘟病毒抗原,所述非洲猪瘟病毒抗原为非洲猪瘟病毒p30和/或蛋白 Δ p54蛋白;所述非洲猪瘟病毒p30蛋白如SEQ ID No.1所示,所述非洲猪瘟病毒 Δ p54蛋白如SEQ ID No.2所示。本发明试剂盒意外的选取了极低的抗原含量进行包被,不仅检测灵敏度较高,且极大降低了背景值,检测结果更准确。发明包被两种抗原的试剂盒其灵敏度与间接免疫荧光检测相当,能在早期较低抗体水平下较早的检测到抗体阳性,为临床猪群感染情况提供依据,对于预防和控制非洲猪瘟病毒感染具有重要作用。

[0006] 作为本发明的一种实施方式,本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述支持介质为96孔酶标板,所述非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒还包括样品稀释液、洗涤液、封闭液、羊抗猪酶标二抗、显色液、终止液、抗体阳性猪血清对照以及抗体阴性猪血清对照。

[0007] 作为本发明的一种优选实施方式,本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述样品稀释液为含有氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.24g、氯化钾0.2g、纯化水600ml、Proclin300 1ml、新生牛血清200ml、PUR染料0.028g混匀,用纯化水定容至1000ml;所述洗涤液为含有氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.12g、氯化钾0.2g、吐温20 0.5ml、纯化水800ml混匀,补加纯化水定容至1000ml;所述封闭液为含1%W/V BSA的磷酸盐缓冲液、含5%W/V脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液、含1.5%V/V明胶的磷酸盐缓冲液或含

20%V/V新生牛血清磷酸盐缓冲液;所述显色液包括显色剂A液和显色剂B液,所述显色剂A液含磷酸氢二钠14.7g、柠檬酸9.3g、过氧化脲0.3g,溶于800ml纯化水混匀,补加纯化水定容至1000ml;所述显色液B含四甲基联苯二胺(TMB)0.2g,无水乙醇10ml,溶于800ml纯化水混匀,补加纯化水定容至1000ml;所述终止液为2M的 H_2SO_4 。

[0008] 所述磷酸盐缓冲液,pH值为7.4,其1L体积配方为:NaCl 8.0g、KCl 0.2g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.24g。

[0009] 术语“磷酸盐缓冲液”是指含有磷酸或其盐并被调至理想pH值的溶液,是生物化学研究中使用最为广泛的一种缓冲液。一般地,磷酸盐缓冲液是从磷酸或磷酸盐(包括但不限于钠和钾盐)制备的。本领域已经知道一些磷酸盐,例如磷酸二氢钠和磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和磷酸氢二钾、磷酸钠和磷酸钾。已经知道磷酸盐是以盐的水合物形式存在的。由于缓冲液的二级解离作用,缓冲的pH值范围很宽,例如约4-10的范围,优选约5-9的范围,更有选约6-8的范围,最优选约7.4。进一步优选地,所述磷酸盐缓冲液为含氯化钠和氯化钾的磷酸盐缓冲液。作为本发明的一种优选实施方式,本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述p30蛋白包被量为4-10ng/孔,所述 Δ p54蛋白包被量为4-10ng/孔。

[0010] 作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述非洲猪瘟病毒p30蛋白和 Δ p54蛋白为原核表达体系表达的重组蛋白。

[0011] 作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述非洲猪瘟病毒p30蛋白和 Δ p54蛋白为重组大肠杆菌表达体系表达的重组蛋白。作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述p30蛋白包被量为6ng/孔,所述 Δ p54蛋白包被量为8ng/孔。

[0012] 作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒中,所述非洲猪瘟病毒抗原为非洲猪瘟病毒p30,所述p30包被量为10ng/孔;或所述非洲猪瘟病毒抗原为非洲猪瘟病毒 Δ p54蛋白,所述 Δ p54蛋白包被量为10ng/孔。

[0013] 本发明的另一方面是一种所述非洲猪瘟病毒抗体检测试剂盒的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:(1)克隆表达所述非洲猪瘟病毒抗原性蛋白p30蛋白、 Δ p54蛋白,使用所述p30蛋白和 Δ p54蛋白包被酶标板;(2)制备或配制样品稀释液、洗涤液、封闭液、HRP标记的兔抗猪IgG、显色剂A液、显色剂B液、终止液、阳性猪血清对照以及阴性猪血清对照;以及(3)将步骤(1)与(2)所制备的各成分组装成试剂盒。

[0014] 作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟抗体检测试剂盒的制备方法中,所述步骤(1)中克隆表达p30蛋白如SEQ ID No.1所示,所述 Δ p54蛋白如SEQ ID No.2所示;所述p30蛋白含量为4-10ng/孔, Δ p54蛋白含量为4-10ng/孔;优选地,所述非洲猪瘟病毒p30蛋白含量为6ng/孔, Δ p54蛋白含量为8ng/孔。

[0015] 作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟抗体检测试剂盒的制备方法中,所述步骤(1)使用原核表达体系表达非洲猪瘟病毒p30蛋白和 Δ p54蛋白;优选地,所述原核表达体系为重组大肠杆菌表达体系。

[0016] 作为本发明的一种优选实施方式,在本发明的非洲猪瘟病毒抗体检测试剂盒的制备方法中,所述样品稀释液为含有氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.24g、氯化钾0.2g、纯化水600ml、Proclin300 1ml、新生牛血清200ml、PUR染料0.028g混匀,用纯化水定容至1000ml;

[0017] 所述洗涤液为含有氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.12g、氯化钾0.2g、吐温20 0.5ml、纯化水800ml混匀，补加纯化水定容至1000ml；

[0018] 所述封闭液为1%W/V BSA的磷酸盐缓冲液、5%W/V脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液、1.5%V/V明胶的磷酸盐缓冲液或20%V/V新生牛血清磷酸盐缓冲液；

[0019] 所述显色液包括显色剂A液和显色剂B液，所述显色剂A液含磷酸氢二钠14.7g、柠檬酸9.3g、过氧化脲0.3g，溶于800ml纯化水混匀，补加纯化水定容至1000ml；所述显色液B含四甲基联苯二胺(TMB) 0.2g，无水乙醇10ml，溶于800ml纯化水混匀，补加纯化水定容至1000ml；

[0020] 所述终止液为2M的 H_2SO_4 。

[0021] 本发明的另一方面是提供一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒在非洲猪瘟预防控制中的应用。

[0022] 本发明的突出优点在于：

[0023] 1. 提供一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA试剂盒，该试剂盒的包被原含非洲猪瘟病毒p30蛋白和 $\Delta p54$ 蛋白，对阳性样品的检出率、灵敏度高于单独包被原的试剂盒的检测效果；

[0024] 2. 所述包被原中非洲猪瘟病毒p30蛋白和 $\Delta p54$ 蛋白的混合比例经过优化，使抗原对血清中抗体的捕捉效率最高，提高了检测的灵敏度；

[0025] 3. 尤其是 $\Delta p54$ 蛋白，把优势抗原表位呈现出来，是优质的抗原，能有效降低检测的背景值，提高检测的准确性；

[0026] 4. 本发明试剂盒意外的选取了极低的抗原含量进行包被，不仅检测灵敏度较高，且极大降低了背景值，检测结果更准确。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述更为清楚。但这些实施例仅是范例性的，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替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0028] 本发明实施例中所用的碳酸盐缓冲液的pH值为9.6，其1L体积配方为： Na_2CO_3 1.59g、 $NaHCO_3$ 2.93g，但该实施方式无论在任何情况下均不构成对本发明的限定。本发明实施例中所用的磷酸盐缓冲液，pH值为7.4，其1L体积配方为： $NaCl$ 8.0g、 KCl 0.2g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.24g。

[0029] 本发明中所用的化学试剂均为分析纯，购自国药集团。本发明所述的实验方法，若无特殊说明，均为常规方法；所述的生物材料，若无特殊说明，均可从商业途径获得。

[0030] 本实例中所用的非洲猪瘟抗体检测试剂盒检测方法的判定标准为：

[0031] $S/P值 = OD_{样品} / OD_{阳性血清均值}$

[0032] (其中，OD表示 $OD_{450-630}$ ，即 $OD_{450} - OD_{630}$ 的值)当OD参考阳性血清 ≥ 0.3 ，OD阴性血清 ≤ 0.1 时结果成立；当血清样品的S/P值 ≥ 0.5 时为阳性，当S/P值 < 0.5 时为阴性。

[0033] 实施例1非洲猪瘟病毒 $\Delta p54$ 蛋白的制备

[0034] 1. 重组大肠杆菌工程菌E.coli BL21/pET- $\Delta p54$ 的构建

[0035] 将SEQ ID NO.2所示的 $\Delta p54$ 蛋白基因序列送由苏州金唯智生物科技有限公司进

行全序列合成,并连接到pET28a质粒上。连接后的质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3),挑取单克隆在含有100 μ g/ml卡那霉素的LB培养基中培养过夜,提取质粒后测序分析,阳性克隆既为工程菌E.coli BL21/pET- Δ p54。

[0036] 2. Δ p54蛋白的表达

[0037] 将E.coli BL21/pET- Δ p54菌种1ml,接种至100ml含卡那霉素的LB液体培养基内,37 $^{\circ}$ C 220转/分钟振荡培养2小时后,将温度降至28 $^{\circ}$ C,加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG溶液诱导培养12小时。菌液培养完成后离心收集菌体,按每克菌体湿重加10毫升裂解液(20mmol/L Tris缓冲液(pH值7.2),0.5mol/L NaCl)的比例重悬菌体,在冰水浴中超声破碎30分钟,破碎液于4 $^{\circ}$ C、10000r/min离心10分钟后收集上清。向上清液中加入0.02mol/L咪唑,过滤后采用蛋白层析纯化系统进行蛋白亲和层析纯化。

[0038] 纯度检验:用SDS-PAGE电泳检测,染色后应可见清晰的目的蛋白条带,经凝胶成像仪扫描后,用软件分析目的蛋白的纯度,纯度为92%。

[0039] 蛋白含量:用BCA法测定蛋白含量,浓度为1.73mg/ml。

[0040] 实施例2非洲猪瘟病毒p30蛋白的制备

[0041] 1.重组大肠杆菌工程菌E.coli BL21/pET-p30的构建

[0042] 将SEQ ID NO.1所示的p30蛋白基因序列送由苏州金唯智生物科技有限公司进行全序列合成,并连接到pET28a质粒上。连接后的质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3),挑取单克隆在含有100 μ g/ml卡那霉素的LB培养基中培养过夜,提取质粒后测序分析,阳性克隆既为工程菌E.coli BL21/pET-p30。

[0043] 2.p30蛋白的表达

[0044] 将E.coli BL21/pET-p30菌种1ml,接种至100ml含卡那霉素的LB液体培养基内,37 $^{\circ}$ C 220转/分钟振荡培养2小时后,将温度降至28 $^{\circ}$ C,加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG溶液诱导培养12小时。菌液培养完成后离心收集菌体,按每克菌体湿重加10毫升裂解液(20mmol/L Tris缓冲液(pH值7.2),0.5mol/L NaCl)的比例重悬菌体,在冰水浴中超声破碎30分钟,破碎液于4 $^{\circ}$ C、10000r/min离心10分钟后收集上清。向上清液中加入0.02mol/L咪唑,过滤后采用蛋白层析纯化系统进行蛋白亲和层析纯化。

[0045] 纯度检验:用SDS-PAGE电泳检测,染色后应可见清晰的目的蛋白条带,经凝胶成像仪扫描后,用软件分析目的蛋白的纯度,纯度为90%。

[0046] 蛋白含量:用BCA法测定蛋白含量,浓度为1.64mg/ml。

[0047] 实施例3非洲猪瘟病毒ELISA抗体检测试剂盒的制备

[0048] 1.酶标板制备

[0049] 酶标板包被抗原:用pH9.6的碳酸盐缓冲液将实施例1和实施例2所制备的非洲猪瘟病毒 Δ p54蛋白和p30蛋白按照表1所示包被原编号所对应的成分和包被量进行配制,包被酶标板,用封板膜封板后于2~8 $^{\circ}$ C包被16~24小时。弃去孔中液体,用洗涤液洗涤1次,300 μ l/孔,在吸水纸上拍干。

[0050] 表1各试剂盒所对应的包被原组分及其含量

	试剂盒	包被原	蛋白组份及含量 (ng/孔)	
			$\Delta p54$ 蛋白	p30 蛋白
[0051]	试剂盒 1	包被原 1	10	0
	试剂盒 2	包被原 2	8	6
	试剂盒 3	包被原 3	0	10

[0052] 封闭:每孔加入150 μ l含20%新生牛血清的磷酸盐缓冲液(pH值7.4)2~8 $^{\circ}$ C封闭16~24小时。置18~26 $^{\circ}$ C、相对湿度30%以下环境中干燥3~6小时;

[0053] 样品稀释液:取氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.24g、氯化钾0.2g、纯化水600ml、Proclin300 1ml、新生牛血清200ml、PUR染料0.028g混匀,用纯化水定容至1000ml,混匀;

[0054] 洗涤液:取氯化钠8g、磷酸氢二钠2.9g、磷酸二氢钾0.12g、氯化钾0.2g、吐温20 0.5ml、纯化水800ml混匀,补加纯化水定容至1000ml,混匀;显色剂A液:取磷酸氢二钠14.7g、柠檬酸9.3g、过氧化脲0.3g,溶于800ml纯化水混匀,补加纯化水定容至1000ml,混匀;

[0055] 显色剂B液:取四甲基联苯二胺(TMB)0.2g,无水乙醇10ml,溶于800ml纯化水混匀,补加纯化水定容至1000ml,混匀;

[0056] 终止液:2M H₂SO₄。

[0057] 将上述制备的试剂及材料组装成非洲猪瘟抗体试剂盒,按包被原的不同组装成不同的试剂盒,编号依次为试剂盒1-3。

[0058] 实施例4建立间接ELISA方法

[0059] 非洲猪瘟抗体检测试剂盒的使用方法包括:

[0060] 1. 样品稀释:将猪血清或全血用稀释液100倍(V/V)稀释,用移液器混匀,100 μ l/孔加样;

[0061] 2. 样品孵育:用封板膜封板后,置37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;

[0062] 3. 洗版:小心揭掉封板膜,洗板;

[0063] 机洗:用洗板机洗涤5遍,最后一次尽量扣干;

[0064] 手洗:弃去反应液,每孔加入稀释后的洗液300 μ l,浸泡30秒,甩弃洗液。如此反复连续洗板5次,最后一次尽量扣干;

[0065] 4. 酶标孵育:每孔加入酶标羊抗猪二抗100 μ l,空白对照孔除外。用封板膜封板后,置37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;

[0066] 5. 洗板:同3;

[0067] 6. 显色:显色剂A液和显色剂B液按体积比1:1混合,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C避光孵育15min;

[0068] 7. 每孔加入50 μ l的2M H₂SO₄终止反应;

[0069] 8. 读数:用酶标仪读取OD₄₅₀₋₆₃₀,根据判定标准进行判定。

[0070] 实施例5非洲猪瘟抗体检测试剂盒的鉴定

[0071] 1. 特异性试验

[0072] 将实施例3制备的非洲猪瘟抗体检测试剂盒1-3分别对猪瘟病毒抗体阳性血清、猪圆环病毒2型抗体阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性血清、猪伪狂犬病毒抗体阳性血清、猪细小病毒抗体阳性血清、非洲猪瘟病毒抗体阴性血清和抗体阴性全血样品进行ELISA检测,每个样品做3个重复,并同时设置阴阳性对照。

[0073] 检测结果表明,除非洲猪瘟病毒阳性对照血清OD值为0.823到0.876外,试剂盒检测的OD均小于0.1,说明试剂盒与其它主要猪病无交叉反应,特异性好。

[0074] 2. 灵敏度试验

[0075] 将非洲猪瘟病毒高免血清做1:10、1:40、1:160、1:640倍(V/V)稀释。用试剂盒1-3进行ELISA检测。结果见表2。

[0076] 表2非洲猪瘟病毒抗体检测试剂盒灵敏度试验结果

试剂盒	血清稀释度 (V/V) 所对应的 OD 值			
	1:10	1:40	1:160	1:640
[0077] 试剂盒 1	1.736	1.246	0.572	0.107
试剂盒 2	1.937	1.479	0.673	0.168
试剂盒 3	1.718	1.214	0.528	0.094

[0078] OD值表示 $OD_{450} - OD_{630}$

[0079] 当阳性猪血清稀释到1:160(V/V)时,各试剂盒通过ELISA检测显色后虽然靠肉眼观察难以判断结果,但在酶标仪上读数时仍然可以读出且检出结果均为阳性,而在1:640的血清稀释度检出结果为阴性。表明试剂盒的灵敏度较高。

[0080] 3. 批内重复性试验

[0081] 选取10份抗体阳性样品,用实施例3中的试剂盒1按照实施例4建立的方法进行检测,每个样品做10次重复。用统计学分析OD值发现批内重复变异系数在5.3%至7.4%之间,均小于10%,说明该方法重复性好。

[0082] 同样试剂盒2-3检测抗体阳性样本,变异系数小于10%,重复性好。

[0083] 4. 批间重复性试验

[0084] 用3个批次的试剂盒1对10个抗体阳性样品进行测定,经统计学进行分析后发现:3次批次的试验结果差异不显著,变异系数均在5.5%-8.7%之间,均小于10%,说明该检测方法重复性好。

[0085] 同样,分别用3个批次的试剂盒2-3对10个抗体阳性样品做测定,测定结果表明:变异系数小于10%,该检测方法重复性好。

[0086] 5. 保存期试验

[0087] 将分别用包被原1-3包被好的酶标板一式四份用封闭液封闭后洗涤吸干水分,再用包封袋封好后置于2~8℃分别保存3个月、6个月、9个月、12个月,即试剂盒的实时稳定性试验。对不同时间保存的酶标板用5份背景已知样品进行检测。

[0088] 经统计学分析,结果表明:各酶标板对每一样品进行检测时,3个月、6个月、9个月、12个月的结果均无显著差异,说明试剂盒在2~8℃条件下可保存12个月。

[0089] 实施例6试剂盒临床检测应用试验

[0090] 将经间接免疫荧光试验鉴定为阳性的380份临床感染非洲猪瘟病毒的猪血清样品,分别用实施例3制备的试剂盒1-3进行比对检测,检测结果为:试剂盒1的阳性检出率为90% (342/380),试剂盒2的阳性检出率为100% (380/380),试剂盒3的阳性检出率为91.6% (348/380)。

[0091] 上述结果说明本发明试剂盒检测时阳性检测率均较高,尤其是本发明同时包被两种蛋白的试剂盒2,阳性检出率与间接免疫荧光试验鉴定结果完全一致,具有较好的应用前景。

[0092] 实施例7试剂盒临床检测比较试验

[0093] 将感染非洲猪瘟病毒的猪场中发病及未发病的猪随机采集500份血清,其中发病猪血清286份,未发病猪血清214份,通过间接免疫荧光试验进行鉴定,结果显示,发病猪血清286份全部显示阳性,未发病猪血清214份中有162份显示阳性。结果见表3。

[0094] 表3临床比较试验间接免疫荧光鉴定结果

[0095]	分组	数量	阳性率
	发病猪血清	286	286/286 (100%)
[0096]	未发病猪血清	214	162/214 (75.7%)

[0097] 将上述鉴定过的血清样品再通过本发明试剂盒1-3进行检测,结果显示,发病猪血清286份三个试剂盒检测结果一致,全部显示阳性;未发病猪血清通过间接免疫荧光试验鉴定为阴性的52份三个试剂盒检测结果一致,全部显示阴性;未发病猪血清通过间接免疫荧光试验鉴定为阳性的162份,其中试剂盒1检测阳性率为87.7% (142/162),试剂盒2检测阳性率为100% (162/162),试剂盒3检测阳性率为91.4% (148/162)。结果见表4。

[0098] 表4试剂盒临床检测比较试验结果

[0099]	分组	数量	阳性率		
			试剂盒 1	试剂盒 2	试剂盒 3
	发病猪血清	286	100% (286/286)	100% (286/286)	100% (286/286)
	未发病猪血清	52	0% (0/52)	0% (0/52)	0% (0/52)
		162	87.7% (142/162)	100% (162/162)	90.1% (146/162)

[0100] 上述结果表明,对于临床发病猪,猪体内病毒感染抗体水平较高,本发明试剂盒1-3均能准确检测阳性;对于感染场临床未发病猪,存在感染事件时间短,病毒含量低,相应抗体水平低,试剂盒1、试剂盒2和试剂盒3的检测结果有差异,试剂盒1和试剂盒3存在漏检的情况;对于阴性猪,三个试剂盒均检测为阴性。

[0101] 说明本发明的试剂盒2能在早期较低抗体水平下较早的检测到抗体阳性,为临床猪群感染情况提供依据,对于预防和控制非洲猪瘟病毒感染具有重要作用。

[0102] 以上所述仅是本发明的优选实施例而已,并非对本发明做任何形式上的限制,虽然本发明已以优选实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案的范围,当可利用上述揭示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实

质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围
内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 洛阳普泰生物技术有限公司
- [0003] <120> 一种非洲猪瘟病毒抗体ELISA检测试剂盒及其制备方法
- [0004] <160> 2
- [0005] <170> PatentIn version 3.3
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 606
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 非洲猪瘟病毒(African swine fever virus)
- [0010] <400> 1
- [0011] atggacttca tctgaacat ctctatgaaa atggaagtta tcttcaaaac cgacctgcgt 60
- [0012] tcttcttctc aggttgtttt ccacgctggg tctctgtaca actggttctc tgttgaaatc 120
- [0013] atcaactctg gtcgtatcgt taccaccgct atcaaaaccc tgctgtctac cgttaaatac 180
- [0014] gacatcgtta aatctgctcg tatctacgct ggtcagggtt acaccgaaca ccaggctcag 240
- [0015] gaagaatgga acatgatcct gcacgttctg ttcgaagaag aaaccgaatc ttctgcttct 300
- [0016] tctgaaaaca tccacgaaaa aaacgacaac gaaaccaacg aatgcacctc ttctttcgaa 360
- [0017] accctgttcg aacaggaacc gtcttctgaa gttccgaaag actctaaact gtacatgctg 420
- [0018] gctcagaaaa ccgttcagca catcgaacag tacggtaaag ctccggactt caacaaagtt 480
- [0019] atccgtgctc acaacttcat ccagaccatc tacggtagcc cgctgaaaga agaagaaaaa 540
- [0020] gaagttgttc gtctgatggt tatcaactg ctgaaaaaaaa tctctttctt cctgacctac 600
- [0021] atctaa 606
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 399
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 非洲猪瘟病毒(African swine fever virus)
- [0026] <400> 2
- [0027] tcttctcgta aaaaaaaaagc tgctgctatc gaagaagaag acatccagtt catcaaccgcg 60
- [0028] taccaggacc agcagtgggt tgaagttacc ccgcagccgg gtacctctaa accggctggg 120
- [0029] gctaccaccg cttctgttgg taaaccgggt accggctcgc cggctaccaa ccgtccggct 180
- [0030] accaacaac cggttaccga caaccgggt accgaccgctc tggttatggc taccgggtgg 240
- [0031] ccggctgctg ctccggctgc tgcttctgct ccggctcacc cggctgaacc gtacaccacc 300
- [0032] gttaccacce agaacaccgc ttctcagacc atgtctgcta tcgaaaacct gcgtcagcgt 360
- [0033] aacacctaca cccacaaaga cctgaaaaac tctctgtaa 399