



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110927390 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201911293735.7

(22)申请日 2019.12.16

(71)申请人 广东省农业科学院动物卫生研究所
地址 510640 广东省广州市天河区五山路白石岗

(72)发明人 蒋智勇 李春玲 蔡汝健 郭怡德
宋帅 李艳 楚品品 勾红潮
徐民生 卞志标

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245
代理人 苏运贞 裘晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

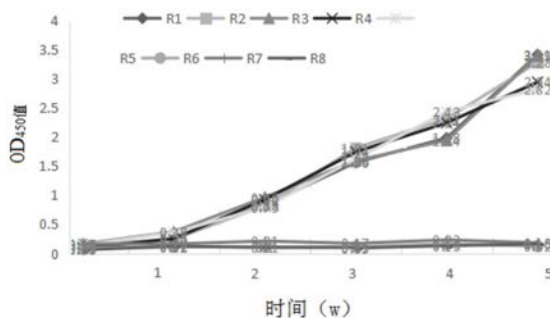
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法、试剂盒及应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法、试剂盒及应用。该ELISA方法为双抗原夹心法。通过该方法,获得了检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA试剂盒,其包括辣根过氧化物酶标记的CD2v抗原和CD2v蛋白包被的酶标板。利用本发明设计的试剂盒不仅能大量筛查非洲猪瘟病毒抗体,还能用于鉴别CD2v缺失株免疫猪群中非洲猪瘟疫苗株与野毒株,检测快速、灵敏,特异性好,非常适合非洲猪瘟疫情的大面积快速检测普查,以及猪场将来进行非洲猪瘟的净化与根除,应用前景广阔。



1. 一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法,其特征就在于包括如下步骤:

(1) 将重组的非洲猪瘟病毒CD2v蛋白包被于微孔板中,然后封闭,再于不同的微孔中加入待测样本及标准阳性对照、阴性对照进行反应,洗板;

(2) 接着加入HRP标记的CD2v抗原反应,洗板;再加入显色液进行显色反应,加入终止液终止反应;

(3) 在450nm波长下,测定各孔吸光度值;根据测定结果,对待测样本进行定性或定量的判断。

2. 根据权利要求1所述的检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法,其特征就在于:

步骤(1)中所述的非洲猪瘟病毒CD2v蛋白的包被量为0.06 μ g/孔;

步骤(2)中所述的HRP标记的CD2v抗原的加入量为0.02 μ g/孔。

3. 根据权利要求1所述的检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法,其特征就在于:所述的定性判断的标准如下:待检血清样本OD450>0.4,判为阳性,反之为阴性。

4. 一种用于检测非洲猪瘟病毒CD2v抗体的双抗原夹心ELISA试剂盒,其特征就在于:包括CD2v蛋白包被的酶标板和辣根过氧化物酶标记的CD2v抗原。

5. 根据权利要求4所述的双抗原夹心ELISA试剂盒,其特征就在于:还包括底物显色液、终止液、阳性对照、阴性对照、血清稀释液和10倍浓缩洗涤液中的至少一种。

6. 根据权利要求4或5所述的双抗原夹心ELISA试剂盒,其特征就在于:所述的CD2v蛋白包被的酶标板通过如下步骤制备得到:用pH9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液,将浓度为0.6 μ g/L的CD2v蛋白溶液按100 μ L/孔加入空白酶标板中,4 $^{\circ}$ C包被过夜;接着弃去包被液,按200 μ L/孔加入浓度为5% (w/v) 的BSA溶液,4 $^{\circ}$ C静置12小时,洗涤甩干,室温干燥后装入包装袋,加入干燥剂,真空保存。

7. 根据权利要求5所述的双抗原夹心ELISA试剂盒,其特征就在于,所述的底物显色液的组成如下:浓度为2mg/mL的四甲基联苯乙醇溶液0.5mL,底物缓冲液10mL,0.75% H_2O_2 ,32 μ L;

其中,底物缓冲液的组成如下:浓度为0.2mol/L的 Na_2HPO_4 溶液25.7mL,浓度为0.1M的柠檬酸24.3mL,蒸馏水50mL。

8. 根据权利要求5所述的双抗原夹心ELISA试剂盒,其特征就在于:

所述的阳性对照为CD2v抗体和含CD2v抗体的样品中的至少一种;

所述的阴性对照为不含CD2v抗体的样品。

9. 权利要求1~8任一所述的双抗原夹心ELISA试剂盒在检测非洲猪瘟病毒CD2v蛋白抗体中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征就在于:所述的双抗原夹心ELISA试剂盒用于鉴别CD2v缺失株免疫猪群中的猪是否存在非洲猪瘟病毒感染或用于未免疫猪群的非洲猪瘟病毒的抗体检测。

一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法、试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明属于动物医学动物疫病分子生物学诊断技术领域,具体涉及一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法、试剂盒及应用。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)感染家猪和野猪引起高致死率的高度接触性传染病。临床上以高热、内部器官广泛出血、脾肿大且颜色因出血呈现黑色为主要特征。非洲猪瘟病毒基因型众多,目前已知有24个基因型。迄今为止,该病尚无商品化的疫苗,疫情的防控主要依靠加强饲养场生物安全管理、限制生猪和猪产品跨区域流动、对发病动物采取清群扑杀等处置方式,常造成巨大经济损失。世界动物卫生组织将非洲猪瘟列为法定报告的动物疫病,我国将其列为一类动物疫病。

[0003] 1921年,Montgomery首次报道在肯尼亚发生非洲猪瘟疫情。2007年以来,非洲猪瘟在中东欧多个国家扩散并流行,特别是俄罗斯及其周边地区。2017年3月,俄罗斯远东地区伊尔库茨克州发生非洲猪瘟疫情,2018年8月,我国辽宁省沈阳市沈北区首次发现非洲猪瘟疫情,经核酸检测和序列比对分析发现,该毒株与俄罗斯和中东欧国家流行的格鲁吉亚毒株(Georgia 2007)属于同一进化支,属于基因II型毒株。随后,在我国的河南、江苏、内蒙古、黑龙江、浙江、安徽等多个省份(自治区、直辖市)呈现散发流行,对我国养猪业造成了数十亿元的经济损失,目前该病仍在蔓延之中。

[0004] 由于ASF可给养猪业造成毁灭性打击,故对于ASF疫苗的研究从未间断过。迄今,国际上采用基因工程手段获得了多个ASFV基因缺失疫苗候选株,并通过细胞传代致弱和从自然界分离弱毒株的方法获得了弱毒疫苗候选株,基因缺失株疫苗研究较多的是MGF和CD2v基因缺失株。国外2017年构建了CD2v缺失的BA71株(基因I型)已经充分致弱,免疫猪后存活率均100%(Monteagudo,P.L,et al.BA71DeltaCD2:a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities.J Virol,2017.91(21)。)。2019年国内构建了CD2v和MGF双基因缺失猪,可使免疫猪获得100%的保护(张艳艳等,非洲猪瘟病毒基因缺失疫苗株的构建和免疫保护特性,中国兽医学报,2019.39(8),1421-1427)。

[0005] 专利CN102236017A公开了一种用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接ELISA试剂盒及其用途,其以原核表达的重组蛋白为基础,通过酶联免疫技术研制一种检测非洲猪瘟病毒抗体的间接ELISA试剂盒。然而,所述试剂盒仅能用于非洲猪瘟病毒抗体的大量筛选,并不能鉴别疫苗株与野毒株。因此,将来随着疫苗的大量使用如何鉴别疫苗株与野毒株成为当务之急。

发明内容

[0006] 本申请的首要目的在于提供一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法。

[0007] 本发明的另一目的在于提供一种用于检测非洲猪瘟病毒CD2v抗体的双抗原夹心ELISA试剂盒。该试剂盒可用于非洲猪瘟病毒抗体的大量筛查以及用于鉴别CD2v缺失株免疫猪群中非洲猪瘟疫苗株与野毒株。

[0008] 本发明的再一目的在于提供上述双抗原夹心ELISA试剂盒在检测非洲猪瘟病毒CD2v抗体中的应用。

[0009] 本发明的上述目的,通过以下技术方案予以实现:

[0010] 一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法,包括如下步骤:

[0011] (1) 将重组的非洲猪瘟病毒CD2v蛋白包被于微孔板中,然后封闭,再于不同的微孔中加入待测样本及标准阳性对照、阴性对照进行反应,洗板;

[0012] (2) 接着加入HRP标记的CD2v抗原反应,洗板;再加入显色液进行显色反应,加入终止液终止反应;

[0013] (3) 在450nm波长下,测定各孔吸光度值;根据测定结果,对待测样本进行定性或定量的判断。

[0014] 步骤(1)中所述的非洲猪瘟病毒CD2v蛋白的包被量优选为0.06 μ g/孔。

[0015] 步骤(1)中所述的包被的条件优选为4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0016] 步骤(1)中所述的封闭优选为使用1~5% (w/v) 的牛血清白蛋白溶液进行封闭,200 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C静置12小时。

[0017] 步骤(1)中所述的反应的条件优选为37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0018] 步骤(1)中所述的洗板的次数优选为3~5次。

[0019] 步骤(2)中所述的HRP标记的CD2v抗原的加入量优选为0.02 μ g/孔。

[0020] 步骤(2)中所述的加入HRP标记的CD2v抗原反应的反应条件优选为37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0021] 步骤(2)中所述的洗板的次数优选为3~5次。

[0022] 步骤(2)中所述的显色反应的条件优选为室温避光反应10~15分钟。

[0023] 所述的定性判断是对待测样本是否感染非洲猪瘟病毒进行判断,具体如下:待检血清样本OD₄₅₀>0.4,判为阳性,反之为阴性。

[0024] 用于检测非洲猪瘟病毒CD2v抗体的双抗原夹心ELISA试剂盒,包括CD2v蛋白包被的酶标板和辣根过氧化物酶(HRP)标记的CD2v抗原。借助该酶标记抗体,建立双抗原夹心ELISA法检测非洲猪瘟病毒CD2v抗体。

[0025] 所述的辣根过氧化物酶(HRP)标记CD2v抗原优选通过过碘酸钠法制备;更优选通过HRP标记试剂盒制备。

[0026] 上述用于检测非洲猪瘟病毒抗体的间接ELISA试剂盒还包括底物显色液、终止液、阳性对照、阴性对照、血清稀释液和10倍浓缩洗涤液中的至少一种。

[0027] 所述的酶标板优选为可拆卸酶标板。

[0028] 所述的酶标板的数量优选为2块。

[0029] 所述的酶标板的规格优选为8孔 \times 12条。

[0030] 所述的CD2v蛋白包被的酶标板优选通过如下步骤制备得到:用pH9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液,将浓度为0.6 μ g/mL的CD2v蛋白溶液按100 μ L/孔加入空白酶标板中,4 $^{\circ}$ C包被过夜;接着弃去包被液,按200 μ L/孔加入浓度为5% (w/v) 的BSA溶液,4 $^{\circ}$ C静置

12小时,洗涤甩干,室温干燥后装入包装袋,加入干燥剂,真空保存。

[0031] 所述的底物显色液的组成优选如下:浓度为2mg/mL的四甲基联苯乙醇溶液0.5mL,底物缓冲液10mL,0.75% H_2O_2 ,32 μ L;

[0032] 底物缓冲液的组成如下:浓度为0.2mol/L的 Na_2HPO_4 溶液25.7mL,浓度为0.1M的柠檬酸24.3mL,蒸馏水50mL。

[0033] 所述的终止液的组成如下:蒸馏水178.3mL,浓度为98%的浓硫酸21.7mL。

[0034] 所述的10倍浓缩洗涤液为pH7.4、1.5M的PBS。

[0035] 所述的血清稀释液的组成如下:牛血清白蛋白1g,用pH7.4、0.15M的PBS定容至100mL。

[0036] 所述的阳性对照为CD2v抗体和含CD2v抗体的样品中的至少一种。

[0037] 所述的阴性对照为不含CD2v抗体的样品。

[0038] 所述的双抗原夹心ELISA试剂盒在检测非洲猪瘟病毒CD2v蛋白抗体中的应用,主要用于鉴别CD2v缺失株免疫猪群中的猪是否存在非洲猪瘟病毒感染或用于未免疫猪群的非洲猪瘟病毒的抗体检测。

[0039] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果及优点:

[0040] 本发明的试剂盒采用CHO-K1细胞表达的重组CD2v蛋白作为包被抗原,依据双抗原夹心ELISA原理检测猪血清中非洲猪瘟CD2v蛋白的抗体。利用本发明设计的试剂盒不仅能大量筛选非洲猪瘟病毒抗体,还能用于鉴别CD2v缺失株免疫猪群中非洲猪瘟疫苗株与野毒株,检测快速、灵敏,特异性好,非常适合非洲猪瘟疫情的大面积快速检测普查,以及猪场将来进行非洲猪瘟的净化与根除,应用前景广阔。

附图说明

[0041] 图1为稳定表达CD2v基因的CHO-CD2v细胞株的间接免疫荧光(IFA)鉴定结果图。

[0042] 图2为CD2v蛋白免疫的新西兰大白兔抗体用建立的双抗原夹心ELISA试剂盒检测的效价图;其中,R1~R5分别表示免疫的5只新西兰大白兔,R6~R8为未免疫的3只新西兰大白兔。

具体实施方式

[0043] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0044] 实施例1:CD2v抗原的制备

[0045] 1.非洲猪瘟CD2v蛋白的表达

[0046] 根据GenBank中非洲猪瘟(ASFV)中国流行株Pig/HLJ/2018(GenBank:MK333180.1)的CD2v基因序列,人工合成CD2v全基因作为模板,设计一对引物CD2v-F/CD2v-R通过PCR扩增并克隆到真核表达载体pIRESpuro2(购自美国Clontech公司),构建了重组质粒pIRES-CD2v,测序验证后转染CHO-K1细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),经加嘌呤霉素筛选以及2-3轮单细胞克隆并用间接免疫荧光(IFA)进行鉴定。具体鉴定方法为:将单细胞克隆的细胞转移到12孔细胞培养板中培养长成致密单层后经4%多聚甲醛固定,因表达的蛋白末尾带有6个组氨酸标签,可以与组氨酸标签抗体(购自美国Thermo公司)

反应,洗涤3次后加入FITC标记的羊抗鼠IgG反应,然后用荧光显微镜观察结果(如图1所示),结果显示细胞中有绿色荧光,表明获得的细胞株为稳定表达CD2v基因的细胞株,命名为CHO-CD2v细胞株。

[0047] 其中,所用的引物为:

[0048] CD2v-F:5'-GACGCTAGCATGATATACTTATTTTTTTAATA-3';

[0049] CD2v-R:5'-GTCGCGGCCGCGTGGTGGTGGTGGTGAATAATTCTATCTACGTGAATAAGC-3';

[0050] 下划线部分为引入的酶切位点,CD2v-F为ASFV CD2v基因上游扩增引物,引入的酶切位点为Nhe I;CD2v-R为ASFV CD2v基因下游扩增引物,引入的酶切位点为Not I,同时为了CD2v表达蛋白的纯化在下游引物引入了6个组氨酸(6×His)的编码碱基,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

[0051] 2. 非洲猪瘟CD2v蛋白的纯化

[0052] 将上述制备得到的CHO-CD2v细胞株用含10% (v/v) 胎牛血清的F12培养液(胎牛血清和F12培养液均购自美国Gibico公司)在37℃、5%CO₂培养箱内大规模悬浮培养3d,离心收集细胞,弃上清,用PBS洗涤重悬细胞,超声裂解(超声1s,间隔1s,共10min),12000rpm离心,收集上清,进行SDS-PAGE分析。蛋白纯化时使用镍离子亲和层析柱(购自美国Thermo公司)纯化,按镍离子亲和层析柱说明书进行操作,经SDS-PAGE和western blotting鉴定,western blotting实验中所用一抗为非洲猪瘟阳性血清(采自广东省内某猪场,由西班牙Ingenasa公司生产的非洲猪瘟抗体检测试剂盒检测为阳性),二抗为HRP标记的兔抗猪IgG,结果显示为单一条带且与理论预测值大小一致,并具备较好的抗原性。采用商品化的试剂盒Pierce™ BCA Protein Assay Kit(购自美国Thermo公司)测定纯化后的蛋白含量,标准品(由试剂盒提供)浓度及其对应的OD值见表1,其中,A~H为不同稀释倍数的标准品,标准品浓度单位:μg/mL。纯化后的CD2v蛋白的OD值为1.917,与标准品比较后,其浓度为1.5mg/mL。

[0053] 表1:纯化后的蛋白含量、标准品浓度及其对应的OD值

样品名称	A	B	C	D	E	F	G	H	样品
[0054] 浓度	2000	1500	1000	500	250	125	25	0	1.537
OD 值	2.712	2.242	1.662	1.054	0.662	0.418	0.191	0.116	1.917

[0055] 3. CD2v蛋白抗原的HRP标记

[0056] CD2v蛋白抗原的HRP标记采用商品化的HRP标记试剂盒(购自北京博奥龙免疫技术有限公司),CD2v蛋白在标记前先用PBS(0.01M、pH7.4)进行充分透析除去蛋白纯化时洗脱缓冲液中的咪唑、Tris等物质,然后将浓度调整到2mg/ml,然后按照试剂盒说明书进行,标记完成后加入等体积的标记物保存液(由试剂盒提供),充分混匀,置于-20℃保存。

[0057] 4. 标准ASFV阳性血清及标准ASFV阴性血清的制备

[0058] 在ELISA检测过程中,为了建立试剂盒的有效性验证、阴阳性判断标准,同时避免人为操作误差,本发明研制了标准ASFV抗体阳性对照血清和标准ASFV抗体阴性对照血清,用于检测条件的优化和检测结果的判定。

[0059] 4.1 标准阳性血清的制备

[0060] 取新西兰大白兔5只(购自广东省实验动物中心),体重2~3kg。第一次免疫,用注

射器吸取弗式完全佐剂(FCA)(购自美国Sigma公司)与重组CD2v蛋白等体积比例混合的乳化液1mL,大腿内侧肌肉注入0.5mL。间隔2周后,进行第二次免疫,同样剂量和部位注射弗式不完全佐剂与重组CD2v蛋白等体积比例混合的乳化液1mL,分别在第0d、7d、14d、21d和28d从耳静脉采血0.5~1.0mL,分离血清,采用ELISA方法检测血清效价,如图2;从图2的结果可以看出,新西兰大白兔在免疫后一周可以检测到抗体,二免后显著升高,而未免疫的新西兰大白兔一直维持阴性。

[0061] 第35d采用心脏采血法采血,待析出血清后进行分离,3000r/min离心15min,取上清,加入终浓度为0.01%的硫柳汞防腐,分装后,于-20℃保存。

[0062] 4.2标准阴性血清的制备

[0063] 取清洁级实验猪(购自南方医科大学实验动物中心)作为采血用猪,采血前体况较好,体温、食欲、大小便正常,未免疫任何疫苗和无其他疾病。消毒后,前腔静脉采血,分离血清,加入万分之一的硫柳汞防腐。以每管0.5ML的量分装于无菌管中,-20℃保存。

[0064] 实施例2用于检测非洲猪瘟病毒CD2v抗体的双抗原夹心ELISA试剂盒的建立

[0065] 1.本发明试剂盒的检测原理

[0066] 本发明采用双抗原夹心法,将重组的非洲猪瘟病毒CD2v蛋白包被于微孔板中,然后用1%(w/v)BSA溶液将酶标板封闭,加入待测样本及标准阳性对照、阴性对照。样本或标准品中的非洲猪瘟病毒CD2v抗体能与酶标板中包被的CD2v抗原反应,加入HRP标记的CD2v抗原后,酶标抗原与上一步反应结束的CD2v抗原-抗体复合物结合,随后,加入辣根过氧化物酶(HRP)底物TMB显色,终止液终止反应,通过酶标仪在450nm波长下,测定各孔吸光度值,OD值的大小与待测样本中非洲猪瘟病毒CD2v抗体的含量成正比。

[0067] 2.本发明试剂盒的组成

[0068] 2.1酶标板的最佳制备方法

[0069] 用pH9.6、0.05M的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液,将实施例1制备的纯化后的重组CD2v蛋白稀释后,按100μL/孔加入微孔板中,每孔中的CD2v蛋白含量为0.06μg。4℃包被过夜,次日,弃去包被液,按200μL/孔加入1%(w/v)BSA的封闭液,4℃静置12小时,洗涤甩干。室温干燥后装入包装袋,加入干燥剂,真空保存。

[0070] 2.2工作试剂的配置

[0071] 洗涤液(pH7.4、1.5M的PBS):KH₂PO₄ 0.2g,Na₂HPO₄-12H₂O 2.9g,NaCl 8.0g,KCl 0.2g,Tween-20(0.05%)0.5mL,加蒸馏水定容至100mL即为10倍洗涤液作为存储液,使用时稀释10倍即可。

[0072] 血清稀释液:牛血清白蛋白1g,加洗涤缓冲液至100mL;

[0073] 底物缓冲液(pH5.0磷酸柠檬酸):0.2M Na₂HPO₄ 25.7mL,0.1M柠檬酸24.3mL,加蒸馏水50mL;

[0074] TMB(四甲基联苯)使用液:TMB(10mg/5mL无水乙醇)0.5mL,底物缓冲液10mL,0.75%H₂O,32μL;

[0075] 终止液(2M H₂SO₄):蒸馏水178.3mL,逐滴加入浓硫酸(98%)21.7mL。

[0076] 2.3检测非洲猪瘟的双抗原夹心ELISA试剂盒的组建

[0077] 组建检测非洲猪瘟CD2v抗体的酶联免疫试剂盒,包含以下组分:

[0078] CD2v重组蛋白包被的96孔酶标板、辣根过氧化物酶(HRP)标记的CD2v抗原蛋白、标

准阳性对照、标准阴性对照、浓缩洗涤液、血清稀释液、TMB底物、终止液、产品说明书。

[0079] 实施例3样品中非洲猪瘟病毒CD2v抗体的检测

[0080] 1. 用上述制备的试剂盒进行检测

[0081] 1) 将待测血清、阳性对照及阴性对照用血清稀释液按比例稀释, 每孔100 μ L加入实施例2中的酶标板, 37 $^{\circ}$ C孵育1小时, 弃去溶液后用洗涤液清洗3~5次。

[0082] 2) 每孔加入HRP标记的CD2v抗原蛋白100 μ L (0.2 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C孵育30min, 弃去溶液后用洗涤液清洗3~5次。

[0083] 3) 每孔加入TMB底物液100 μ L, 室温避光反应10~15分钟。

[0084] 4) 每孔加入100 μ L 2M H₂SO₄, 终止反应, 酶标仪检测450nm吸光度值。

[0085] 2. 检测结果分析

[0086] 1) 阴阳性样品的判断标准

[0087] 用所建立的双抗原夹心ELISA方法检测100份阴性血清, 每份血清重复2孔, 按照以上已确立的ELISA程序进行ELISA测定, 读出OD₄₅₀值, 计算100份血清的OD₄₅₀平均值和标准差;

[0088] 根据统计学原则, OD₄₅₀值平均数+3 \times 标准方差时, 可以在99.9%的水准上判定为阳性, 因而设定阴阳性临界值等于阴性血清的OD₄₅₀值平均数+3 \times 标准方差, 求得阴阳性临界值0.4, 在规定的实验条件下, 其OD₄₅₀值大于临界值, 即待检血清样本OD₄₅₀>0.4, 判为阳性, 反之为阴性。

[0089] 2) 特异性试验

[0090] 取猪蓝耳病毒抗体阳性血清 (PRRS-Ab)、猪圆环病毒2型抗体阳性血清 (PCV2-Ab)、猪口蹄疫抗体阳性血清 (FMDV-Ab) 和猪伪狂犬病毒抗体阳性血清 (PRV-Ab) (由美国IDEXX公司生产的相关抗体试剂盒检测为阳性), 用所建立的双抗原夹心ELISA试剂盒进行检测, 结果显示猪蓝耳病毒抗体阳性血清 (PRRS-Ab)、猪圆环病毒2型抗体阳性血清 (PCV2-Ab)、猪口蹄疫抗体阳性血清 (FMDV-Ab) 和猪伪狂犬病毒抗体阳性血清 (PRV-Ab) 这些样品的OD₄₅₀值均小于0.2 (见表2), 结果表明本发明建立的双抗原夹心ELISA试剂盒具有很好的特异性。

[0091] 表2: 感染不同病毒的血清样品稀释100倍后对应的OD值

被检样品	PRRS-Ab	PCV2-Ab	FMDV-Ab	PRV-Ab	CD2v-Ab
OD 值	0.106	0.127	0.112	0.094	1.308

[0093] 3) 样品检测结果

[0094] CD2v蛋白免疫新西兰大白兔采集血液分离血清, 用所建立的双抗原夹心ELISA试剂盒进行检测, 结果表明5只新西兰大白兔在免疫后7d抗体转阳 (OD₄₅₀>0.4), 二免后第21d抗体显著上升, 采血处死时达到最高效价。CD2v免疫新西兰大白兔血清的OD值较高, 在0.4以上, 而未免疫的3只新西兰大白兔均血清的OD值在0.2以下 (结果见附图2)。

[0095] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110>	广东省农业科学院动物卫生研究所	
<120>	一种检测非洲猪瘟CD2v蛋白抗体的ELISA方法、试剂盒及应用	
<160>	2	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<223>	CD2v-F	
<400>	1	
	gacgctagca tgatataactt atttttttaa ta	32
<210>	2	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<223>	CD2v-R	
<400>	2	
	gtcgcggccg cgtggtggtg gtggtggtga ataattctat ctacgtgaat aagc	54

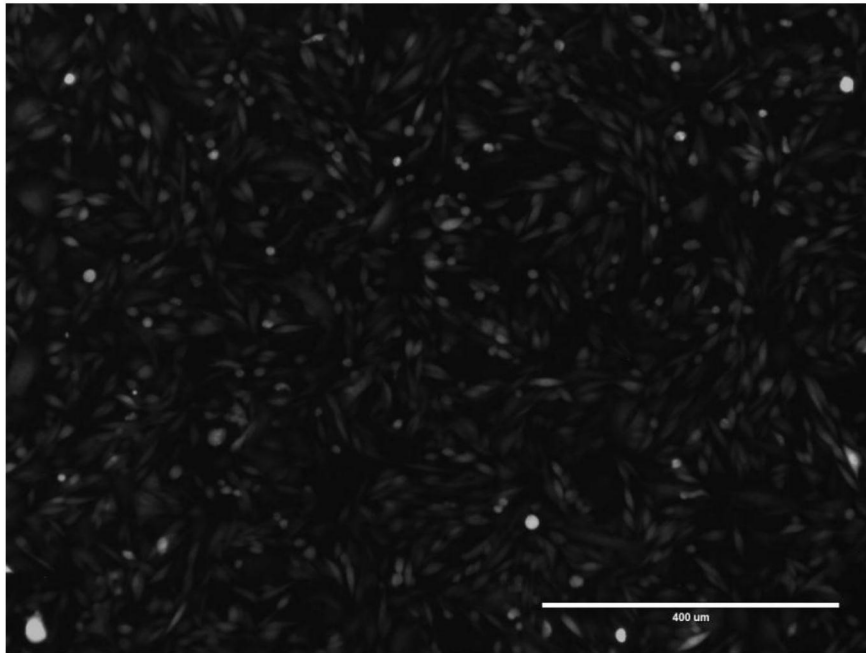


图1

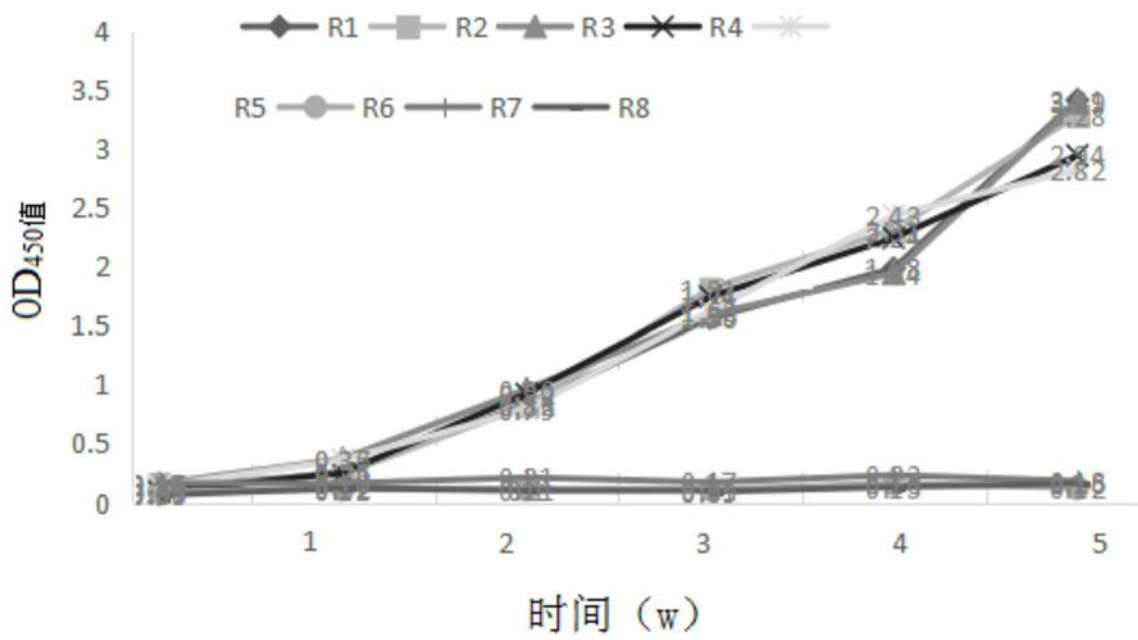


图2