



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108226494 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201810045190.7

(22)申请日 2018.01.17

(71)申请人 郑州中道生物技术有限公司
地址 450000 河南省郑州市高新区国家大
学科技园(东区)5号楼F座
申请人 河南中标检测服务有限公司
郑州大学

(72)发明人 赵林萍 余清卫 姜亚坤 曾小宇
王军 张杰 陈铁柱

(74)专利代理机构 北京迎硕知识产权代理事务
所(普通合伙) 11512
代理人 钱扬保 张群峰

(51)Int.Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

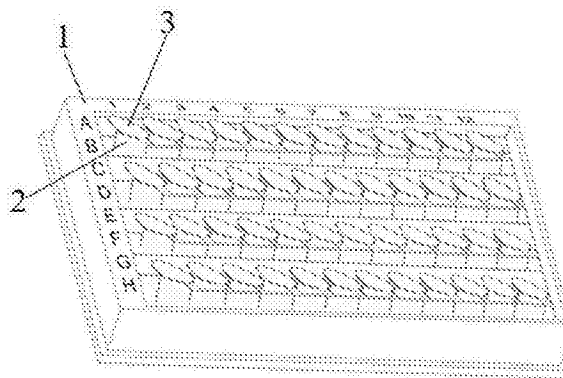
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒

(57)摘要

一种猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,该试剂盒包括:蛋白混包酶标板、血清样品批量前处理装置、样品稀释液、酶标结合物、底物显色剂、终止液、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清与猪繁殖与呼吸综合征阴性血清;其中蛋白混包酶标板包被有抗原性蛋白:囊膜蛋白GP5、膜基质蛋白M和核衣壳蛋白N。与现有主流技术包被单一抗原相比,三重包被抗原检测抗体效果更好,可以有效减少检测失效或漏检问题。并且发明了血清样品批量前处理装置,可批量混匀血清,并且可用多通道移液器单次加样,大大提高效率和减小误差。



1. 一种猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,该试剂盒包括:蛋白混包酶标板、血清样品批量前处理装置、样品稀释液、酶标结合物、底物显色剂、终止液、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清与猪繁殖与呼吸综合征阴性血清;其中蛋白混包酶标板包被有抗原性蛋白:囊膜蛋白GP5、膜基质蛋白M和核衣壳蛋白N。

2. 根据权利要求1所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,其中囊膜蛋白GP5、膜基质蛋白M和核衣壳蛋白N以质量比1:1:1进行包被酶标板。

3. 根据权利要求1所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,其中血清样品批量前处理装置包含有固定串联稀释管、串联稀释管盖和酶标支撑框架。

4. 根据权利要求1所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,其中样品稀释液由磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、溴甲酚紫、新生牛血清、Proclin以及纯化水混匀合成。

5. 根据权利要求1所述的猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,其中酶标结合物由鼠抗猪酶标二抗、Tris、氯化钠、红染料、新生牛血清,Proclin、曲拉通X-100、盐酸以及纯化水混匀而成。

6. 一种用于检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的蛋白混包酶标板的制备方法,包括以下步骤:

(1) N、M和GP5基因的扩增

根据NCBI Genbank中猪繁殖与呼吸综合征病毒CH-1R株的基因序列,设计用于扩增N、M和GP5基因的特异性引物;获取猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗并提取RNA,经反转录成cDNA后,分别用N、M和GP5基因的特异性引物进行PCR扩增,对扩增产物进行切胶回收纯化;

(2) 重组菌株的构建

将纯化的N、M和GP5基因和pET-28a载体均用限制性内切酶EcoR I和Xho I双酶切。将目的基因和载体的酶切产物分别进行切胶回收纯化,再进行DNA连接反应,连接产物分别转化于感受态细胞BL21;将转化的细胞均匀涂布到LB琼脂平皿表面,进行培养12-16小时;

(3) 重组菌株的特异性检验

分别挑取单菌落,接种于LB液体培养基;取菌液适量,离心收集菌体,用PBS悬浮后煮沸作为PCR模板,分别用N、M或GP5特异性引物进行PCR扩增;PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳分析;

(4) 重组菌株的诱导表达和鉴定

将PCR鉴定正确的菌株按1:100的比例接种于LB培养基;培养至OD_{600nm}达到0.4-0.6时,加入IPTG至终浓度为0.8mmol/L,诱导5小时,将诱导的重组细菌离心,沉淀用2×SDS加样缓冲液重悬,煮沸10分钟,进行SDS-PAGE电泳和Western-Blot抗原性分析;

(5) 重组蛋白的纯化

可溶性蛋白N和M的纯化:

将诱导的表达菌液离心,弃上清,收集沉淀;将菌体沉淀溶于Buffer A中,超声波破碎后,离心,收集上清液;将Ni-NTA纯化柱垂直固定于合适的支架上,先用5-10倍柱体积的Buffer A平衡层析柱,样品经微滤后上样,用5-10倍柱体积的Buffer A洗涤层析柱,待液体排干后,加入洗脱液Buffer B洗脱,收集纯化后的蛋白;

包涵体蛋白GP5的纯化:

将诱导的表达菌液离心,弃上清,收集沉淀。将菌体沉淀溶于PBS中,超声波破碎后,离心,用Buffer C重悬沉淀,室温轻轻混匀,溶解沉淀;将Ni-NTA纯化柱垂直固定于合适的支架上,先用5-10倍柱体积的Buffer C平衡层析柱,样品经微滤后上样,用5-10倍柱体积的Buffer C洗涤层析柱,待液体排干后,加入洗脱液Buffer D洗脱,收集纯化后的蛋白。

(6) 将上述步骤制得的N、M和GP5蛋白混合包被酶标板。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其中步骤(6)中N、M和GP5蛋白以质量比1:1:1进行包被酶标板。

猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于兽类疫病检测技术领域,本发明涉及一种酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒的制备及使用。可用于繁殖与呼吸综合征病毒抗体的检测。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Syndrome,PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Syndrome Virus,PRRSV)引起的急性、高度传染性病毒性疾病,俗称“蓝耳病”,是目前主要引起猪繁殖障碍和呼吸系统疾病的主要疫病之一。PRRS现已遍布于全世界主要养猪国家和地区,其中高致病性蓝耳病属于农业部规定的“一类动物疫病”,已经严重威胁养猪业健康发展。猪繁殖与呼吸综合征病毒根据其核苷酸序列的差异可以分为北美型和欧洲型,目前国内主要以北美型为主。PRRSV为不分节段单股正链RNA,含有至少8个不分首尾重叠的开放阅读框,分别编码8中蛋白即:多聚蛋白pp1 a、pp1 b,小囊膜蛋白GP2a、GP2b、GP3、GP4,囊膜蛋白GP5,膜基质蛋白M和核衣壳蛋白N。目前市场上,检测PRRSV抗体多以核衣壳蛋白N或者多聚蛋白等单一蛋白包被,如商品化的美国IDEXX,这就存在着样品漏检,PRRSV感染初期检测准确率不高,病毒变异导致检出率下降等缺陷。同时临床上高通量测定血清抗体时,血清稀释样品处理周期长,工作量大,血清样品孵育时间误差大,造成试验结果误差大。因此,针对以上问题,亟需一种检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体效果更好的试剂盒。

发明内容

[0003] 为解决现有技术处在不足之处,本发明提供一种猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,该试剂盒包括:蛋白混包酶标板、血清样品批量前处理装置、样品稀释液、酶标结合物、底物显色剂、终止液、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清与猪繁殖与呼吸综合征阴性血清。

[0004] 本发明中的蛋白混包酶标板通过基因工程技术及原核表达技术,生产出猪繁殖与呼吸综合征病毒的三个主要抗原性蛋白:囊膜蛋白GP5、膜基质蛋白M和核衣壳蛋白N,通过三个蛋白混合包被酶标板。GP5蛋白位于病毒粒子表面,参与PRRSV对靶细胞的粘附,对病毒中和具有重要作用;膜基质蛋白M为PRRSV的优势结构蛋白,非糖基化的基质蛋白,具有优良的免疫原性,能诱导机体产生中和抗体;N蛋白表达量较高,约占病毒粒子蛋白总量的20~40%,具有很强的免疫原性。本发明中M蛋白、N蛋白、GP5蛋白优选以质量比1:1:1比例包被。

[0005] 与现有主流技术包被单一抗原相比,三重包被抗原检测抗体效果更好。主要有以下原因,第一,猪繁殖与呼吸综合征病毒为RNA病毒且临床养殖环境复杂,疫苗使用不当等原因造成PRRSV病毒高度变异,使用多重包被可以有效减少因病毒变异带来的检测不稳定风险。第二,单一包被抗原面窄,并且目前对PRRSV分子生物学研究并不充分,通过多重抗原包被可以有效减少上述问题带来的检测失效或漏检问题。

[0006] 针对高通量稀释血清样品,工作量大周期长容易造成误差等缺陷,发明了血清样品批量前处理装置,包含有固定串联稀释管组、串联稀释管盖组和支撑框架。其中支撑框架设置有至少一排相邻的多个支撑槽;稀释管组含有至少一排固定串联连接的多个稀释管;多个稀释管能够一次性固定到支撑框架的多个支撑槽中;稀释管盖组含有至少一排固定串联连接的多个稀释管盖,每个稀释管盖与稀释管组中的各个稀释管相对应。该装置密封性好,可直接盛放固定量的稀释液。可批量混匀血清,并且可用12通道移液器单次加样12孔,而传统加样需要单通道单次加样。

附图说明

- [0007] 图1为本发明的血清样品批量前处理装置的总体组装示意图。
[0008] 图2为图1中示出的支撑框架的结构示意图;
[0009] 图3为图1中示出的稀释管组的结构示意图;
[0010] 图4为图2中示出的稀释管的结构示意图;
[0011] 图5为图1中示出的稀释管盖组的结构示意图;
[0012] 图6为图5中示出的稀释管盖的立体示意图;以及
[0013] 图7为图5中示出的稀释管盖的俯视示意图。

具体实施方式

[0014] 试剂盒的制备

[0015] 一、蛋白混包酶标板

[0016] (1) 猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的制备

[0017] 通过基因工程技术及原核表达技术实现PRRSV抗原蛋白的制备方案如下:

[0018] 1.1 N、M和GP5基因的扩增根据NCBI Genebank中猪繁殖与呼吸综合征病毒CH-1R株(登陆号EU807840)的基因序列,设计用于扩增N基因的特异性引物N-F:5'-TTTGAATTCATGCCAAATAACAACGGCA-3,N-R:5'-TTTCTCGAGTCATGCTGAGGGTGATGCTGT-3;M基因特异性引物M-F:5'-TTTGAATTCCTGCTAGGGCTTCTGCACCTT-3,M-R:5'-TTTCTCGAGTTATTTGGCATATTTGACAA-3;GP5基因特异性引物GP5-F:5'-TTTGAATTCGTGCTCGTCAACGCCAACAG-3,GP5-R:5'-TTTCTCGAGCTAGAGACGCCCATGTGTT-3。获取猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗(CH-1R株)并提取RNA,经反转录成cDNA后,分别用N、M和GP5基因的特异性引物进行PCR扩增,对扩增产物进行切胶回收纯化。

[0019] 1.2 重组菌株的构建将纯化的N、M和GP5基因和pET-28a载体均用限制性内切酶EcoR I和Xho I双酶切。将目的基因和载体的酶切产物分别进行切胶回收纯化,再进行DNA连接反应,连接产物分别转化于感受态细胞BL21(DE3)。用玻璃涂棒将转化的细胞均匀涂布到含100 μ g/ml Kan的LB琼脂平皿表面,倒置于37 $^{\circ}$ C培养12-16小时。

[0020] 1.3 重组菌株的特异性检验分别挑取单菌落,接种于含100 μ g/ml Kan的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C培养2小时。取菌液适量,离心收集菌体,用PBS悬浮后煮沸作为PCR模板,分别用N、M或GP5特异性引物进行PCR扩增。体系如下:菌液2 μ l,PCR SuperMix 10 μ l,上下游引物各1 μ l,ddH₂O 6 μ l。循环参数为:94 $^{\circ}$ C预变性5分钟;94 $^{\circ}$ C变性30秒,56 $^{\circ}$ C退火30秒,72 $^{\circ}$ C延伸45秒,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C再延伸10分钟。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

[0021] 1.4重组菌株的诱导表达和鉴定将PCR鉴定正确的菌株按1:100的比例接种于含100 μ g/ml Kan的LB培养基。37 $^{\circ}$ C培养至OD_{600nm}达到0.4-0.6时,加入IPTG至终浓度为0.8mmol/L,诱导5小时,将诱导的重组细菌离心,沉淀用2 \times SDS加样缓冲液重悬,煮沸10分钟,进行SDS-PAGE电泳和Western-Blot抗原性分析。

[0022] 1.5重组蛋白的纯化

[0023] 1.5.1可溶性蛋白N和M的纯化将诱导的表达菌液4 $^{\circ}$ C10000r/min离心5分钟,弃上清,收集沉淀。将菌体沉淀溶于20ml的Buffer A(0.5mol/LNaCl、20mmol/L咪唑、20mmol/L Tris-HCl pH8.0)中,超声波破碎后,10000r/min离心10分钟,收集上清液。将Ni-NTA纯化柱垂直固定于合适的支架上,先用5-10倍柱体积的Buffer A平衡液平衡层析柱,样品经微滤后上样,用5-10倍柱体积的Buffer A平衡液洗涤层析柱,待液体排干后,加入洗脱液Buffer B(0.5mol/L NaCl、350mmol/L咪唑、20mmol/L Tris-HCl pH8.0)洗脱,收集纯化后的蛋白。

[0024] 1.5.2包涵体蛋白GP5的纯化将诱导的表达菌液4 $^{\circ}$ C10000r/min离心5分钟,弃上清,收集沉淀。将菌体沉淀溶于20ml的PBS中,超声波破碎后,10000r/min离心10分钟,用20ml Buffer C(8mol/L尿素、0.5mol/L NaCl、20mmol/L咪唑、20mmol/L Tris-HClpH8.0)重悬沉淀,室温轻轻混匀,溶解沉淀。将Ni-NTA纯化柱垂直固定于合适的支架上,先用5-10倍柱体积的Buffer C平衡液平衡层析柱,样品经微滤后上样,用5-10倍柱体积的Buffer C平衡液洗涤层析柱,待液体排干后,加入洗脱液Buffer D(8mol/L尿素、0.5mol/L NaCl、350mmol/L咪唑、20mmol/L Tris-HCl pH8.0)洗脱,收集纯化后的蛋白。

[0025] 1.6包被酶标板

[0026] 将上述步骤制得的N、M和GP5蛋白混合包被酶标板。M/N/GP5抗原性蛋白的包被比例为1:1:1,三个蛋白的包被浓度均为5ng/孔。

[0027] 二、血清样品批量前处理装置

[0028] 参见图1,本发明中的血清样品批量前处理装置包括支撑框架1、稀释管组2以及稀释管盖组3。

[0029] 具体参见图2,支撑框架1可以采用市售的12 \times 8排列形式的96孔酶标板,酶标板上的每个孔可作为一个支撑槽11。96孔酶标板的外框长宽尺寸为124 \times 82mm,内框长宽尺寸为111 \times 72mm。

[0030] 具体参见图3-4,稀释管组2为12个稀释管21通过连接条22固定串联成一排,总长度与支撑框架1的内框长度相同。稀释管组2可以通过一体模塑形成。稀释管21分为上直部和圆形底部,上直部的直径从上到下逐渐递减,上端外径为8.8mm,上端内径为6.8mm,下端外径为6mm,壁厚为1mm,高度为16mm;圆形底部的高度为4mm。

[0031] 参见图5-7,稀释管盖组3为12个稀释管盖31通过连接带32固定串联成一排,每个稀释管盖31与稀释管组2中的各个稀释管21相对应。

[0032] 稀释管盖31包括盖板33、盖塞34以及卡舌35。盖塞34突出设置在盖板33的一侧中央,卡舌35与盖塞34间隔一定距离也突出设置在与盖塞33同侧的盖板33上,卡舌35与盖塞34之间的间距略小于稀释管21的上端壁厚。盖板33的总长度为16mm,中央最大宽度为8.8mm,与连接带32的连接柄长度为5mm。盖塞34的直径为6.8mm,高度为3mm。由于注塑过程中,稀释管21的上端留有翻边,因此图中示出的卡舌35与盖塞34之间的间距为1.8mm。在稀释管盖31盖到稀释管21上时,通过卡舌35可以进一步卡紧稀释管21,从而能够防止整个装

置在转运过程中稀释管盖31与稀释管21的松动。

[0033] 在稀释血清样品时,可以将一排稀释管21一次性嵌固到一排支撑槽11中,通过排枪可以同时一排稀释管21进行加样,加完样后,再用一排稀释管盖31将各个稀释管21进行封盖,然后批量震荡混匀。

[0034] 三、酶标结合物

[0035] Tris 2.42g,氯化钠8.5g,红染料2g,BSA 25g,Proclin 300 0.5ml,曲拉通X-100 1.5ml,加纯化水850ml,小心加入盐酸1.65ml,充分混匀,调节pH值7.0,定容至1000ml,加入HRP-抗猪抗体(鼠抗猪酶标二抗)0.2ml,搅拌均匀,用0.22 μ m的除菌滤器过滤,无菌分装,11ml/瓶,置2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0036] 四、样品稀释液

[0037] 磷酸二氢钠1.28g,磷酸氢二钠0.41g,氯化钠20.09g,溴甲酚紫0.2g,新生牛血清50ml,Proclin 300 0.5ml,加纯化水950ml,充分混匀,调节pH值6.0,定容至1000ml,分装,11ml/瓶,置2~8 $^{\circ}$ C保存。该样品稀释液直接以500 μ l分装与血清样品批量前处理装置中,可以直接稀释血清样品,稀释好的血清样品可以用于4-5次复检。极大的减少了单孔稀释、加样的工作量。并且有颜色指示剂,减少加样临床上样品无色重复加样带来的误差。

[0038] 五、标准阳性血清的制备

[0039] 以美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原免疫接种28日龄健康仔猪,采集免疫后2周的血清,检测猪瘟伪狂犬抗体阴性、繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性,无菌过滤分装。测定血清抗体中和效价。

[0040] 六、标准阴性血清的制备

[0041] 选用28日龄猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阴性的健康仔猪,无菌采血,分离血清,检测繁殖与呼吸综合征病毒抗体、猪瘟抗体、伪狂犬抗体阴性的血清抗体阴性。按现行《中华人民共和国兽药典》进行无菌检验。

[0042] 七、其他常规试剂如下:

[0043] 显色剂A 柠檬酸2.10g,结晶乙酸钠12.25g,过氧化脲0.2g,加纯化水950ml,充分混匀,调节pH值5.0,定容至1000ml,分装,6ml/瓶,置2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0044] 显色剂B 柠檬酸2.10g,EDTA 0.3g,TMB 0.2g,加纯化水950ml,充分混匀,调节pH值3.0,定容至1000ml,分装,6ml/瓶,置2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0045] 终止液 纯化水850ml,小心加入硫酸108.5ml,溶解完全,放凉后定容至1000ml,分装,6ml/瓶,置2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0046] 20 \times 洗液 磷酸二氢钾4g,十二水磷酸氢二钠58g,氯化钠160g,Proclin 300 0.5ml,吐温-20 10ml,定容至1000ml,分装,50mL/瓶,置2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0047] 参数的选择

[0048] 方阵试验确定标准血清和待检血清的最佳稀释度为1:10。方阵试验确定酶标抗体的工作浓度为1:5000。

[0049] 本发明的试剂盒的使用方法如下:

[0050] 1用法

[0051] 1.1样品准备取动物全血,待血液凝固后,以4000r/min离心10分钟,收集上清。要求血清清亮,无溶血。

[0052] 1.2洗涤液配制使用前,浓缩的洗涤液应恢复至室温,并摇动使沉淀溶解(最好在37℃水浴5~10分钟),然后用去离子水作20倍稀释,混匀。

[0053] 1.3操作步骤

[0054] 1.3.1取抗原包被板(根据样品多少,可拆开分多次使用),每孔加入稀释好的洗涤液200 μ l,静置3分钟后弃去洗涤液,并在吸水纸上拍干。在包被板上设空白对照孔1孔,阴性对照孔2孔,阳性对照孔2孔,其余为待检血清孔。在待检血清孔中加入样品稀释液,每孔100 μ l,空白对照孔、阴性对照孔及阳性对照孔不加样品稀释液。分别于各待检血清孔中加入待检血清10 μ l,阴性对照孔加入阴性对照血清100 μ l,阳性对照孔加入阳性对照血清100 μ l,空白对照孔不加样。轻轻振匀孔中样品(勿溢出),置37℃下温育30分钟。

[0055] 1.3.2弃去孔中的溶液,每孔加入稀释好的洗涤液300 μ l,静置3分钟后,弃去洗涤液,并在吸水纸上拍干,重复洗板5次。

[0056] 1.3.3每孔加入酶标结合物100 μ l,置37℃下温育30分钟。

[0057] 1.3.4洗涤5次,方法同1.3.2

[0058] 1.3.5每孔先加入50 μ l显色剂A,再加入50 μ l显色剂B,混匀,置37℃下温育10分钟。

[0059] 1.3.6每孔加入50 μ l终止液,10分钟内测定结果。对空白对照调零,用酶标仪在450nm波长处测定吸光值。或使用双波长测定吸光值,测定波长为450nm,参考波长可选630nm或655nm。

[0060] 2判定

[0061] 2.1试验成立的条件是阳性对照孔OD_{450nm}值减去阴性对照孔OD_{450nm}值不小于0.5;

[0062] 2.2试剂盒Cut Off值=0.1+阴性对照OD_{450nm}平均值(若阴性对照OD_{450nm}平均值 \geq 0.05则按实际值计算;若阴性对照OD_{450nm}平均值 $<$ 0.05则按0.05计算)。

[0063] 2.3若待检样品OD_{450nm} $<$ Cut Off值,结果判为阴性。

[0064] 2.4若待检样品OD_{450nm} \geq Cut Off值,结果判为阳性。

[0065] 试剂盒性能检测

[0066] 特异性

[0067] 猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒与用猪瘟阳性血清、猪圆环阳性血清、猪伪狂犬阳性血清、猪大肠杆菌阳性血清、猪口蹄疫血清各2份进行ELISA抗体检测,在两次重复试验中,猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒与猪瘟阳性血清、猪圆环阳性血清、猪伪狂犬阳性血清、猪大肠杆菌阳性血清、猪口蹄疫血清无特异性交叉反应(见表1)。

[0068] 表1特异性试验

[0069]

	OD 值 1	OD 值 2
猪繁殖与呼吸综合征病毒 阳性血清	0.89	0.92
猪繁殖与呼吸综合征病毒 阴性血清	0.035	0.076
猪瘟阳性血清	0.078	0.093
猪圆环阳性血清	0.085	0.087
猪伪狂犬阳性血清	0.073	0.068
猪大肠杆菌阳性血清	0.077	0.084
猪口蹄疫血清	0.034	0.054

[0070] 保存期试验

[0071] 为进一步考核猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒的性能和稳定性,选取三批试样产品(20111201批,20111202批,20111203批)进行 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 加速破坏和 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 存放条件下稳定性考核,以确定产品的效期。每天对温度进行监测,以确保保存温度在要求的范围内。对不同存放条件的试剂使用企业参考血清进行测试,及做无菌检验,每次使用后的试剂不再重复使用, $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存试剂每三月检测一次, $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 保存试剂从第二天起每天监测一次,至第七天止。检验过程严格按照使用说明书规定操作,如实验结果异常,需找出原因,对异常的样品进行复试,根据复试结果进行判定。

[0072] 试验结果表明 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 放置15个月,20111201批,20111202批,20111203批猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒检测结果试剂盒敏感性、特异性及无菌检验及性状均能符合产品质量标准要求; $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 放置6天,20111201批,20111202批,20111203批猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒检测结果试剂盒敏感性、特异性及无菌检验及性状均能符合产品质量标准要求。本发明试剂盒可稳定保存15个月以上,长于市场上其他试剂盒保存期(农业部批准的武汉科前生物股份有限公司生产的猪繁殖与呼吸道综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒有效期为6个月。)

[0073] 临床试验

[0074] 由河南省动物疫病预防控制中心提供的352猪待检血清,用本发明试剂盒和市场上应用较多的美国IDEXX公司的生产的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体检测试剂盒(PRRSX3Ab)同时检测,本发明试剂盒检测阳性率为85.2%(300/352);IDEXX试剂盒阳性检出率为82.7%(291/352)。对其中本发明试剂盒检出而IDEXX试剂盒未检出的9份血清样品,经中和试验与western blot试验验证,该血清样品为PRRSV抗体阳性血清。说明,本发明的试剂盒敏感性更佳,具有良好的市场应用前景。

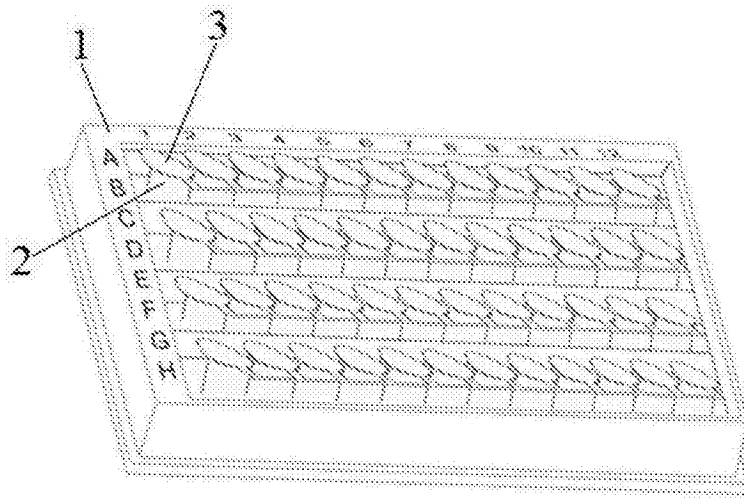


图1

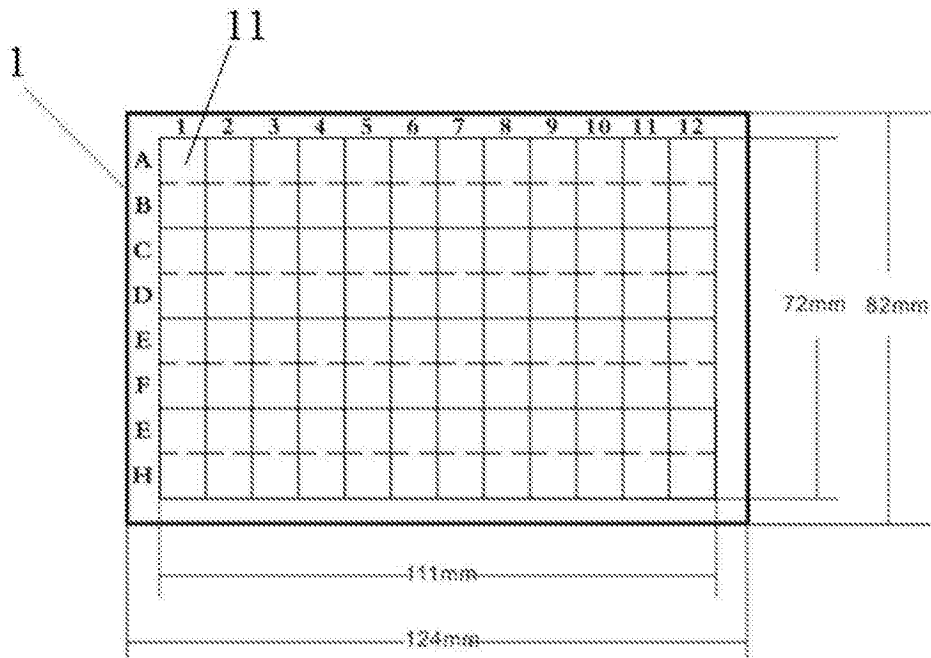


图2

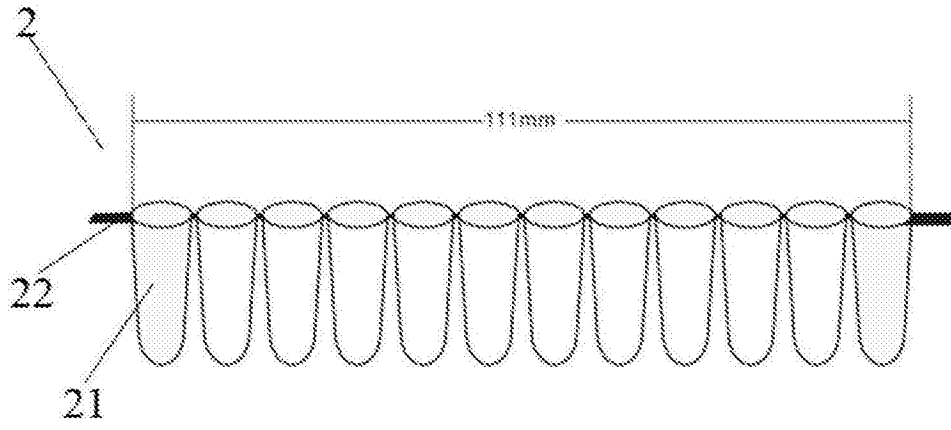


图3

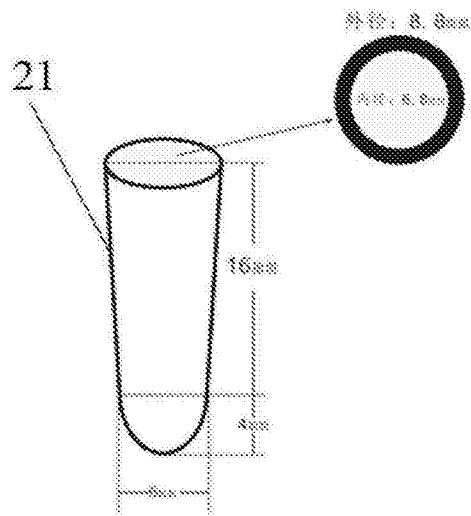


图4

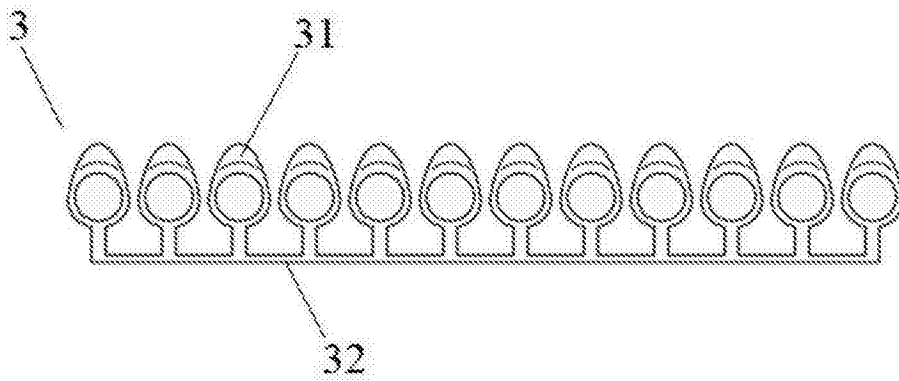


图5

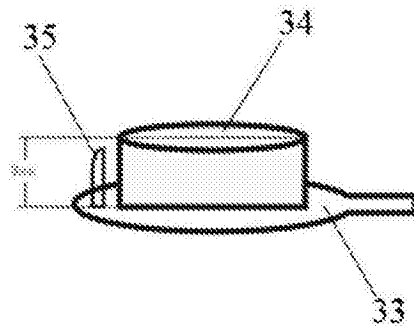


图6

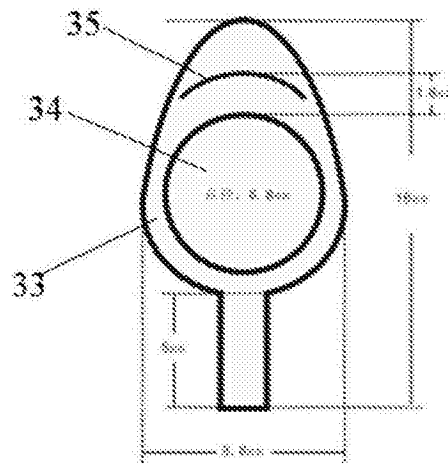


图7