



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 206756849 U

(45)授权公告日 2017.12.15

(21)申请号 201720517045.5

(22)申请日 2017.05.05

(73)专利权人 浙江海隆生物科技有限公司

地址 312000 浙江省绍兴市滨海新城马欢路398号科创中心2号楼5楼

(72)发明人 钱泓 吴有强 查银河 贾宝琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

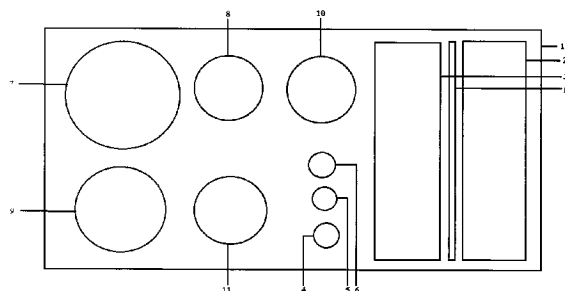
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)实用新型名称

猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒

(57)摘要

本实用新型公开了一种猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒,所述试剂盒有一个箱体,箱体设有抗原包被反应板存放槽、样品稀释板存放槽、流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液孔槽、猪流行性腹泻病毒S蛋白阳性对照液孔槽、猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白阴性对照液孔槽、样品稀释液孔槽、酶结合物孔槽、浓缩洗涤液孔槽、TMB显色液、终止液孔槽和操作说明书存放槽;抗原包被反应板分为检测区I和检测区II,检测区I和检测区II分别包被猪流行性腹泻病毒N蛋白抗原和猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原。本试剂盒可用于PEDV野毒感染及亚单位疫苗免疫的鉴别诊断和评估亚单位疫苗的免疫效果,具有灵敏度高、特异性好、快速检测大批量样品等优点。



1. 一种猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒有一个箱体(1),箱体(1)内设有抗原包被反应板存放槽(2)、样品稀释板存放槽(3)、流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液孔槽(4)、猪流行性腹泻病毒S蛋白阳性对照液孔槽(5)、猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白阴性对照液孔槽(6)、样品稀释液孔槽(7)、酶结合物孔槽(8)、浓缩洗涤液孔槽(9)、TMB显色液(10)、终止液孔槽(11)和操作说明书存放槽(12);抗原包被反应板存放槽(2)内放置抗原包被反应板,样品稀释板存放槽(3)内放置样品稀释板,各孔槽中(4-11)放置装有相应溶液的试剂瓶,操作说明书存放槽(12)内放置操作说明书;所述的抗原包被反应板分为检测区I和检测区II,检测区I和检测区II分别包被猪流行性腹泻病毒N蛋白抗原和猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的抗原包被反应板的规格为96孔,每个试剂盒共有5块包被板,每块包被板从左至右平均分为检测区I和检测区II。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的样品稀释板的规格为96孔,每个试剂盒共有5块样品稀释板。

4. 根据权利要求1-3任一权利要求所述的试剂盒,其特征在于,所述的抗原包被反应板和样品稀释板都是可以拆卸的96孔板,每块板都可以拆卸为12排,每排8孔。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的猪流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液和猪流行性腹泻病毒S蛋白抗体阳性对照液分别为用样品稀释液100倍稀释的猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的猪阳性血清,分别按2mL/瓶分装。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体阴性对照液为用样品稀释液100倍稀释的不含有猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的猪阴性血清,按4mL/瓶分装。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的样品稀释液为1%BSA溶液,按照250mL/瓶分装。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的酶结合物为用样品稀释液5,000倍稀释的商品化羊抗猪IgG酶标二抗,按60mL/瓶分装。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的浓缩洗涤液为25×PBST溶液,按照150mL/瓶分装。

10. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的TMB显色液为商品化的显示液,按60mL/瓶分装,所述的终止液为2M H₂SO₄溶液,按60mL/瓶分装。

猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型属于兽用疫病检测技术领域,具体涉及一种猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻(Porcine Epidemic Diarrhea,PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus,PEDV)引起的一种以呕吐、腹泻和脱水为主要症状的肠道传染病。该病对各种年龄阶段的猪均易感,尤其是7日龄以内的哺育仔猪,感染后死亡率高达50%-90%。近几年,该病在我国的发病率、死亡率均呈上升趋势,给养猪行业造成了重大经济损失。

[0003] PEDV N蛋白是由441个氨基酸组成,分子量约为56kDa。PEDV N蛋白与病毒基因组RNA相互缠绕形成病毒核衣壳,在病毒RNA合成过程中发挥着重要作用。另外,N蛋白在PEDV的结构蛋白中所占的比例最大,在感染的细胞中得到大量表达。猪在感染PEDV的早期,体内就能产生针对N蛋白的高水平抗体。最后,N蛋白十分保守,所以N蛋白在PEDV分子生物学诊断技术中具有很好的应用前景。

[0004] PEDV S蛋白为伸出病毒颗粒囊膜的20nm球杆形糖蛋白,分子量约为180-220kDa,约由1383个氨基酸组成。根据PEDV与其它冠状病毒S蛋白的保守序列的相似性,将PEDV S蛋白划分为S1(1-789aa)和S2(790-1383aa)两个结构域,其中S1位于病毒表面,主要作用在于识别受体并与宿主细胞受体相结合,并介导中和抗体的产生。S2主要负责病毒囊膜与宿主细胞膜的融合,并将病毒RNA导入宿主细胞内,从而引起细胞的感染。另外,PEDV S蛋白也是诱导宿主体液免疫反应的免疫原蛋白。因此,PEDV S蛋白不仅在PEDV分子生物学诊断技术中也具有很好的应用前景,而且也是PEDV亚单位疫苗研究的重要蛋白之一。

[0005] 随着科学技术的进步,使用PEDV S蛋白作为PEDV新型亚单位疫苗的研究也在逐步推进,在猪群免疫PEDV S蛋白亚单位疫苗后,为了能够区分疫苗免疫产生抗体和野毒感染产生的抗体(目的在于指导猪场对PEDV的净化以及评价疫苗的免疫效果),这2种使用不同蛋白包被的试剂盒都会使用到。但是,目前市场上还没有一个能够同时检测针对这2个蛋白的抗体检测试剂盒,且分别使用不同的试剂盒分开检测时,误差较大(分开两次操作,就会产生2次误差,而在同一个试剂盒中同时检测,就会减少分开检测带来的误差)。

实用新型内容

[0006] 本实用新型的目的是为了提供一种快速、有效、同时检测猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒,为实验动物筛选、PEDV亚单位疫苗免疫效果的评价以及猪场PEDV净化提供新的快捷高效的工具;同时进一步减少分开检测时带来的误差。

[0007] 本实用新型提供了一种猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒,所述试剂盒有一个盒体(1),盒体(1)内设有抗原包被反应板存放槽(2)、样品稀释板

存放槽(3)、流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液孔槽(4)、猪流行性腹泻病毒S蛋白阳性对照液孔槽(5)、猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白阴性对照液孔槽(6)、样品稀释液孔槽(7)、酶结合物孔槽(8)、浓缩洗涤液孔槽(9)、TMB显色液(10)、终止液孔槽(11)和操作说明书存放槽(12);抗原包被反应板存放槽(2)内放置抗原包被反应板,样品稀释板存放槽(3)内放置样品稀释板,各孔槽中(4-11)放置装有相应溶液的试剂瓶,操作说明书存放槽(12)内放置操作说明书;所述的抗原包被反应板分为检测区I和检测区II,检测区I和检测区II分别包被猪流行性腹泻病毒N蛋白抗原和猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原。

[0008] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的抗原包被反应板的规格为96孔,每个试剂盒共有5块包被板,每块包被板从左至右平均分为检测区I和检测区II。

[0009] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的样品稀释板的规格为96孔,每个试剂盒共有5块样品稀释板。

[0010] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的抗原包被反应板和样品稀释板都是可以拆卸的96孔板,每块板都可以拆卸为12排,每排8孔。

[0011] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的猪流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液和猪流行性腹泻病毒S蛋白抗体阳性对照液分别为用样品稀释液100倍稀释的猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的猪阳性血清,分别按2mL/瓶分装。

[0012] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体阴性对照液为用样品稀释液100倍稀释的不含有猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的猪阴性血清,按4mL/瓶分装。

[0013] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的样品稀释液为1%BSA溶液,按照250ml/瓶分装。

[0014] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的酶结合物为用样品稀释液5,000倍稀释的商品化羊抗猪IgG酶标二抗,按60mL/瓶分装。

[0015] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的浓缩洗涤液为25×PBST溶液,按照150ml/瓶分装。

[0016] 本实用新型的技术方案中,优选地,所述的TMB显色液为商品化的显示液,按60mL/瓶分装,所述的终止液为2M H₂SO₄溶液,按60ml/瓶分装。

[0017] 本实用新型采用酶联免疫间接法,将猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗原分别包被在抗原包被板的两个检测区内,可分别与待检样品中的特异性抗体反应,形成抗原抗体复合物,再加入羊抗猪IgG二抗的酶结合物,形成“抗原-抗体-二抗-酶”复合物,最后通过加入TMB显示液进行显色,并读取光吸收值(OD₄₅₀)。

[0018] 实验有效性判定:只有当满足以下条件时检测才能有效:阳性对照OD值-阴性对照OD值>0.5;阴性对照OD值<0.15。

[0019] 结果计算与判定: $S/P = (\text{样品OD值} - \text{阴性对照OD值}) / (\text{阳性对照OD值} - \text{阴性对照OD值})$;S/P值≥0.35,判定为PEDV抗体阳性;S/P值<0.35,判定为PEDV抗体阴性。

[0020] 本实用新型的检测试剂盒具有如下优点:(1)本实用新型使用基因表达的重组蛋白为检测抗原,安全性好、无杂蛋白污染,且具有特异性好、灵敏度高、可大批量检测等优点;(2)本实用新型的试剂盒可以在同一块板子上同时检测猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体,在检测亚单位疫苗免疫产生的抗体同时可进一步区别是否有野毒感染,因此本试

剂盒可应用于PEDV野毒感染及亚单位疫苗免疫的鉴别诊断、评估PEDV亚单位疫苗的免疫效果以及指导猪场进行PEDV的净化；(3) 本试剂盒的抗原包被板是可以拆卸的，当样品较少时，可以将暂时不用的包被板拆下，以便后续使用，可以进一步降低使用成本和方便终端用户的使用；(4) 本试剂盒提供了样品稀释板，可以在96孔板上直接稀释样品，这样在加样时可以使用多道移液器直接将稀释好的样品加到酶标板相应的孔中，这样可以节约加样时的时间，尽量保证检测时孵育的时间一致，进一步减少加样和孵育引起的误差。

附图说明

[0021] 图1为本试剂盒的横切面剖视图：其中1是盒体，2是抗原包被反应板存放槽、3是样品稀释板存放槽、4是流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液孔槽、5是猪流行性腹泻病毒S蛋白阳性对照液孔槽、6是猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白阴性对照液孔槽、7是样品稀释液孔槽、8是酶结合物孔槽、9是浓缩洗涤液孔槽、10是TMB显色液、11是终止液孔槽、12是操作说明书存放槽。

[0022] 图2为本试剂盒抗原包被反应板的结构示意图；其中，I区包被猪流行性腹泻病毒N蛋白抗原，II区包被猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原。

具体实施方式

[0023] 以下将结合附图和实施例对本实用新型做进一步说明，本实用新型的实施例仅用于说明本实用新型的技术方案，并非限定本实用新型。

[0024] 本实用新型使用的试剂和耗材均为市售产品，其中：

[0025] 酶标板和样品稀释板均购自NUNC公司；

[0026] ProClin[®]300购自sigma公司；

[0027] 酶结合物购自美国Earthox公司；

[0028] TMB显示液购自北京索莱宝科技有限公司。

[0029] 实施例1：试剂盒组成

[0030] 一种猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的间接ELISA检测试剂盒，其横切面剖视图如图1所示，该试剂盒有一个盒体(1)，盒体(1)内设有抗原包被反应板存放槽(2)、样品稀释板存放槽(3)、流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液孔槽(4)、猪流行性腹泻病毒S蛋白阳性对照液孔槽(5)、猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白阴性对照液孔槽(6)、样品稀释液孔槽(7)、酶结合物孔槽(8)、浓缩洗涤液孔槽(9)、TMB显色液(10)、终止液孔槽(11)和操作说明书存放槽(12)；抗原包被反应板存放槽(2)内放置抗原包被反应板，样品稀释板存放槽(3)内放置样品稀释板，各孔槽中(4-11)放置装有相应溶液的试剂瓶，操作说明书存放槽(12)内放置操作说明书；所述的抗原包被反应板分为检测区I和检测区II，检测区I和检测区II分别包被猪流行性腹泻病毒N蛋白抗原和猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原。

[0031] 其中，抗原包被反应板的规格为96孔，每个试剂盒共有5块包被板，每块包被板从左至右平均分为检测区I和检测区II，具体如图2所示。样品稀释板的规格为96孔，每个试剂盒共有5块样品稀释板。抗原包被反应板和样品稀释板都是可以拆卸的96孔板，每块板都可以拆卸为12排，每排8孔。

[0032] 实施例2：试剂盒制备

[0033] 1. 抗原包被反应板制备: 检测区I和检测区II在酶标板孔中均匀包被猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗原, 包被量为0.5-2 μ g/孔, 包被缓冲液为0.05mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液(即1L碳酸盐缓冲液中含1.59g Na₂CO₃和2.93g NaHCO₃), 2~8 $^{\circ}$ C过夜后, 使用PBST洗板3次; 洗板后加入封闭液, 封闭液为质量浓度为1-5%的BSA或脱脂牛奶的任一种或其组合, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C封闭2h, 干燥后密封保存。

[0034] 2. 样品稀释液: 使用1 \times PBS作为溶剂, 配制1%BSA溶液, 再加入ProClin[®]300, 使用终浓度(v:v)为0.1%, 按照250ml/瓶分装。

[0035] 3. 酶结合物: 用样品稀释液将商品化羊抗猪IgG酶标二抗按照1:5,000稀释而成, 按60ml/瓶分装。

[0036] 4. 浓缩洗涤液: 为25 \times PBST溶液, 其中Tween-20的浓度为1.25% (v/v), 再加入ProClin[®]300, 使用终浓度(v:v)为0.1%, 按照150ml/瓶分装。

[0037] 5. TMB显色液: 为商品化的TMB显示液, 按60ml/瓶分装。

[0038] 6. 终止液: 为2M H₂SO₄溶液, 配制时在178.26ml的超纯水中加入21.76ml的浓硫酸, 混匀即得, 按60ml/瓶分装。

[0039] 7. 阳性对照液: 分别为用样品稀释液100倍稀释的猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的猪阳性血清, 分别按2ml/瓶分装。

[0040] 8. 阴性对照液: 用样品稀释液100倍稀释的不含有猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体的猪阴性血清, 按4ml/瓶分装。

[0041] 9. 组装: 按每一个试剂盒配抗原包被反应板5块、样品稀释板5块、猪流行性腹泻病毒N蛋白抗体阳性对照液1瓶、猪流行性腹泻病毒S蛋白阳性对照液1瓶、猪猪流行性腹泻病毒N蛋白和S蛋白抗体阴性对照液1瓶、样品稀释液1瓶、酶结合物1瓶、浓缩洗涤液1瓶、TMB显色液1瓶、终止液1瓶和操作说明书1份进行装盒。

[0042] 实施例3: 试剂盒检测方法

[0043] 1. 将待检样品用样品稀释液在样品稀释板中稀释100倍(如取297 μ L样品稀释液再加入3 μ L待检样品), 将其分别加入抗原包被反应板中检测区I和检测区II, 每孔加100 μ L, 同时设置阳性对照组、阴性对照组, 其中, 阳性对照组加入相应的100 μ L阳性对照液, 阴性对照组加入100 μ L阴性对照液, 每个样品和对照平行加样2个孔;

[0044] 2. 加样完成后, 将抗原包被反应板置37 $^{\circ}$ C孵育1h后, 洗涤液(提前将25 \times 浓缩洗涤液稀释成1 \times , 即为洗涤液, 稀释时取10ml 25 \times 浓缩洗涤液加到240ml超纯水中, 混匀即得)洗板3-5次, 甩干;

[0045] 3. 每孔再加入100 μ L酶结合物, 37 $^{\circ}$ C孵育0.5h, 洗涤液洗板3-5次, 甩干;

[0046] 4. 每孔加入100 μ L TMB显色液, 室温避光显色10-15min, 每孔加入100 μ L终止液;

[0047] 5. 将抗原包被反应板置于酶标仪中, 在450nm测定其光吸收值OD₄₅₀;

[0048] 6. 结果分析:

[0049] 实验有效性判定: 只有当满足以下条件时检测才能有效: 阳性对照OD值-阴性对照OD值 $>$ 0.5; 阴性对照OD值 $<$ 0.15。

[0050] 结果计算与判定: $S/P = (\text{样品OD值} - \text{阴性对照OD值}) / (\text{阳性对照OD值} - \text{阴性对照OD值})$; S/P 值 \geq 0.35, 判定为PEDV抗体阳性; S/P 值 $<$ 0.35, 判定为PEDV抗体阴性。

[0051] 本实用新型通过上面的实施例进行举例说明, 但是, 应当理解, 本实用新型并不限

于这里所描述的特殊实例和实施方案。在这里包含这些特殊实例和实施方案的目的在于帮助本领域中的技术人员实践本实用新型。任何本领域中的技术人员很容易在不脱离本实用新型精神和范围的情况下进行进一步的改进和完善,因此本实用新型只受到本实用新型权利要求的内容和范围的限制,其意图涵盖所有包括在由附录权利要求所限定的本实用新型精神和范围内的备选方案和等同方案。

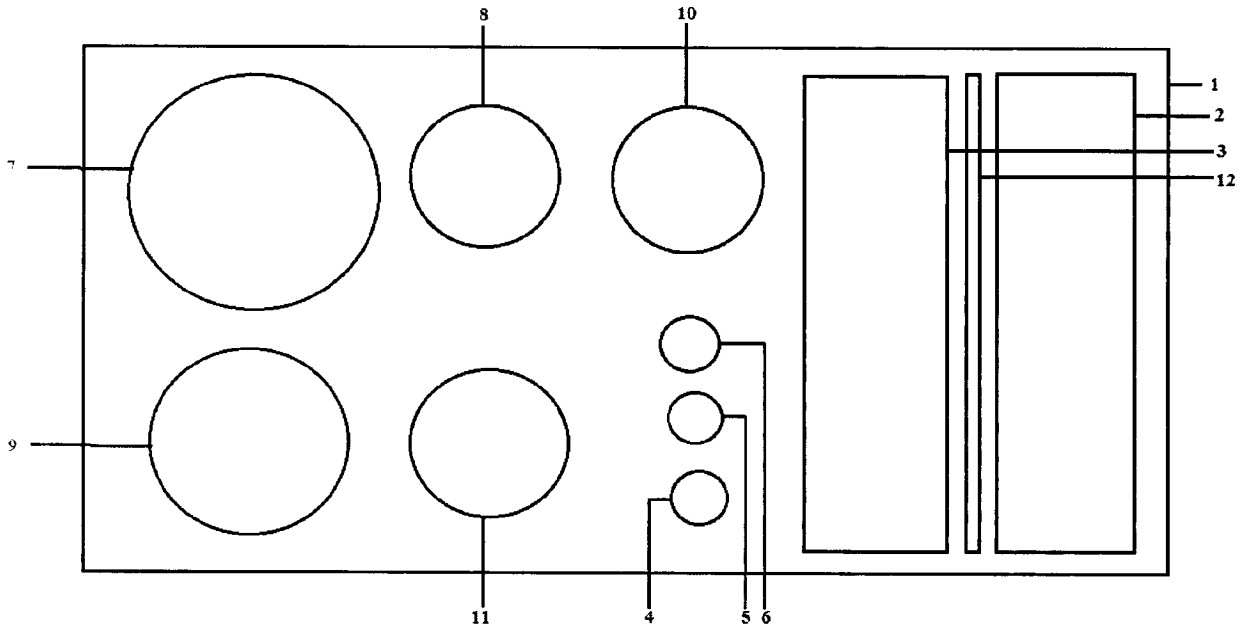


图1

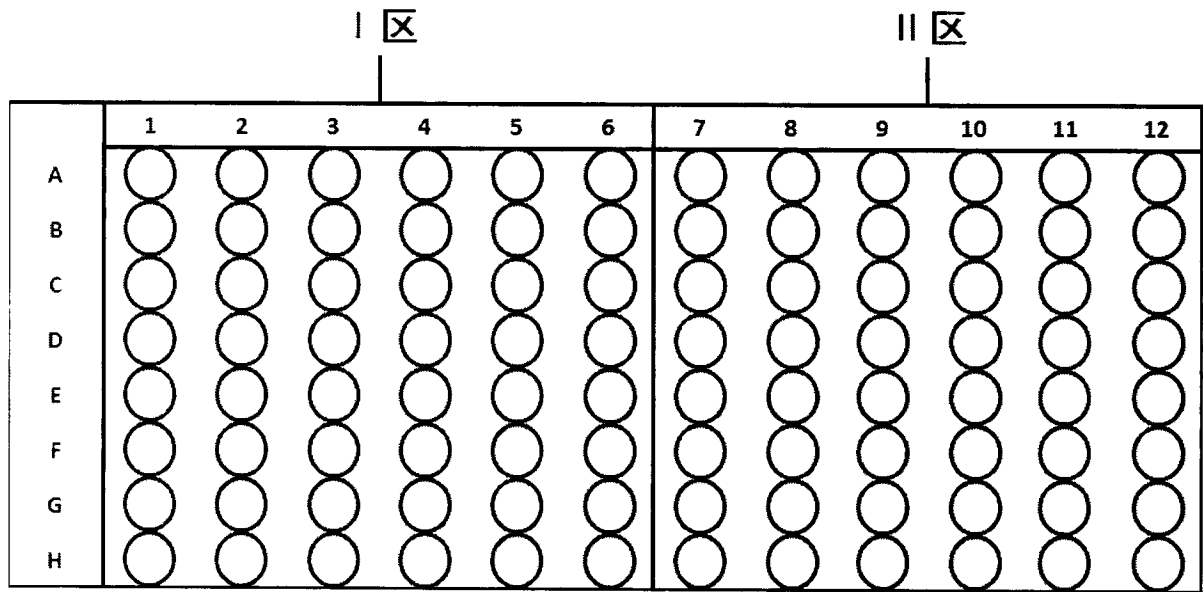


图2