



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633173 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201910008503.6

C12N 15/81(2006.01)

(22)申请日 2019.01.04

C07K 14/08(2006.01)

(71)申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号

(72)发明人 唐丽杰 周晗 王丽 徐义刚

乔薪瑗 龚如月 崔文 姜艳平

李一经

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理

有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨 马鑫

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

序列表1页 附图3页

### (54)发明名称

一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用

### (57)摘要

本发明公开了一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用。所述的试剂盒中含有偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠,其中,所述的IBDV VP3蛋白是通过毕赤酵母表达系统表达,纯化后获得。本发明利用毕赤酵母表达系统表达的重组VP3蛋白作为抗原,建立了一种新的检测IBDV血清抗体的免疫磁珠间接ELISA方法。与商品化IBDV血清抗体检测试剂盒相比较,操作过程比商品化IBDV血清抗体检测试剂盒节省了约1h,且显著节省了血清的用量。实验结果表明本发明以IBDV VP3重组蛋白作为抗原建立的检测鸡血清中IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA方法,具有良好的特异性和敏感性,重复性好,符合率高,能够缩短检测时间且操作简便。本发明的提出为抗鸡IBDV血清抗体的快速检测提供了新的技术手段。

1. 一种用于检测鸡传染性法氏囊病病毒 (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV) 抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒, 其特征在于, 所述的试剂盒中含有偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠, 其中, 所述的IBDV VP3蛋白是通过毕赤酵母表达系统表达, 纯化后获得。

2. 如权利要求1所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒, 其特征在于, 所述的IBDV VP3蛋白是通过以下方法制备得到的:

(1) 引物合成

合成用于扩增VP3基因的特异性引物, 在引物中引入XbaI、EcoRI酶切位点和保护性碱基, 引物序列如下所示:

上游引物F的序列为: 5'-CCGGAATTCATGCGTTTCCCTCACAATCCAC-3',

下游引物R的序列为: 5'-CTAGTCTAGATCACTCAAGGTCCTCATCAG-3';

(2) IBDV VP3基因的克隆

取IBDV CEF94病毒株, 按照病毒RNA提取试剂盒说明书方法提取RNA, 以提取的RNA为模板, 反转录成cDNA, 采用步骤(1)的引物应用RT-PCR扩增得到IBDV VP3基因片段, 将其连接到pMD19-T Simple Vector并转化TG1感受态细胞, 得到的重组质粒被命名pMD19T-VP3;

(3) VP3重组酵母表达载体的构建

XbaI、EcoRI双酶切重组pMD19T-VP3质粒和pGAPZaA质粒, 将VP3基因和pGAPZaA重组表达载体相连接, 热转化入大肠杆菌TG1感受态细胞, 得到的表达载体质粒被命名pGAPZaA-VP3, 将表达载体质粒pGAPZaA-VP3经AVRII酶线性化后与用山梨醇溶液处理新鲜菌体制备的GS115感受态细胞混合, 电击转化GS115感受态细胞, 涂布含有Zeocin的YPDS平板, 30℃恒温静置培养, 将筛选正确的重组菌命名为pGAPZaA-VP3/GS115;

(4) 重组VP3蛋白的纯化及鉴定

将重组菌pGAPZaA-VP3/GS115在含有Zeocin的YPD培养液中30℃下震荡培养后, 接种于相同培养基中继续培养, 菌液离心取上清, 用TCA-丙酮法提取上清蛋白, 利用镍琼脂糖凝胶柱对目的蛋白进行纯化, 并对纯化蛋白进行SDS-PAGE检测, 得到所述的IBDV VP3蛋白。

3. 如权利要求1或2所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒, 其特征在于, 所述的偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠是通过以下方法制备得到:

(1) 磁珠的活化

(2) 磁珠与抗原偶联

纯化的VP3蛋白作为检测抗原与羧基磁珠进行偶联, 按照以下步骤进行:

(1) 将25~110μg检测抗原加至含2mg活化的磁珠的MES偶联液中, 其中, 优选的, 检测抗原的量为95μg, MES偶联液的浓度为50mM, pH8.0;

(2) 剧烈振荡混匀, 室温下, 将管置于旋转混匀仪上进行偶联反应1-4h, 其中, 优选的, 偶联反应时间为3h;

(3) 将管放在磁分离架上直到上清液变清后, 用吸管小心移弃上清;

(4) 将20μL新配的MES偶联液加入磁珠中, 涡旋混匀, 室温下连续混合孵育30~60分钟;

(5) 将试管放入磁力架中, 磁分离并吸弃上清;

(6) 羧基磁珠加入500μL TBS淬灭缓冲液, 涡旋20秒, 磁分离并吸弃上清;

(7) 向羧基磁珠加入500 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液,室温孵育30~60分钟,磁分离并吸弃上清;

(8) 向羧基磁珠加入500 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液,剧烈漩涡20秒,磁分离并吸弃上清;按该步骤再洗两次磁珠;

(9) 从磁力架上取下EP管,添加100 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液,涡旋混合并在2~8 $^{\circ}$ C储存偶联好的磁珠,待用。

4. 如权利要求3所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述的TBS淬灭缓冲液中含有25mM Tris-Cl,130mM NaCl,2.7mM KCl以及0.01%Triton X-100,pH 8.0。

5. 如权利要求1所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中还含有pH 8.0的50mM MES缓冲液、pH 8.0的三乙醇胺缓冲盐水溶液、HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体、阴性对照、TMB显色液以及2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液。

6. 如权利要求4所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述的阴性对照为未免疫的SPF鸡血清。

7. 如权利要求4所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒,其特征在于,使用所述的试剂盒检测鸡传染性法氏囊病毒抗体时,按照以下步骤进行:

将偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠2 $\mu$ l和用50mM MES (pH 8.0) 缓冲液按照体积比1:1600稀释好的待检血清混匀,室温轻轻震荡30min,用pH 8.0的三乙醇胺缓冲盐水溶液涡旋振荡洗涤三次,每次30s;之后加入用50mM MES (pH 8.0) 缓冲液按照1:4000稀释的HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体,室温轻轻震荡混匀20min,用pH 8.0的三乙醇胺缓冲盐水溶液涡旋振荡洗涤三次,每次30s;加入100 $\mu$ l TMB显色液,静止3min,加入50 $\mu$ l的2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>检测OD<sub>450nm</sub>的值。

8. 如权利要求5所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒,其特征在于,当待检血清样品的OD<sub>450nm</sub>值 $\geq$ 0.134时判断为阳性,当待检血清样品的OD<sub>450nm</sub><0.134时判断为阴性。

9. 权利要求1-8任一项所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒在制备检测鸡传染性法氏囊病毒(Infectious Bursal Disease Virus,IBDV) 抗体中的应用。

## 一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗体检测试剂盒及其应用,特别涉及一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用。本发明属于病毒检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 鸡传染性法氏囊病(infectious bursal disease,IBD)是由鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus,IBDV)引起的雏鸡一种急性、高度接触性传染病。IBDV主要侵害淋巴组织,特别是法氏囊组织。3周龄以下的雏鸡感染后由于法氏囊功能丧失可引起亚急性疾病,导致其产生严重的免疫抑制,从而易感其他病原体死亡。在3周龄以上的鸡中,该病的急性感染导致高发病率和死亡率,但存活的鸡不会产生永久性免疫抑制。目前可以通过疫苗接种实现对IBDV感染的控制,血清学监测对于确定接种疫苗的最佳日期具有重要的意义。

[0003] IBDV属于双节段dsRNA病毒,其基因组是由A、B两个双链RNA片段组成。A片段具有2个开放阅读框,大阅读框ORF1编码VP2、VP4、VP3三个蛋白质,小开放阅读框ORF2编码VP5蛋白。B片段只有1个ORF,编码VP1蛋白。VP2是病毒的主要结构蛋白和保护性抗原,携带病毒中和表位,与病毒中和抗体的诱导及抗原和毒力的变异、细胞凋亡的诱导等密切相关。VP3不仅是结构蛋白,还是病毒的群特异性抗原,能够阻止病毒吸附并能中和病毒,用灭活病毒疫苗免疫的鸡早期产生的是VP3抗体。因此,VP3蛋白可用于在感染的早期阶段检测病毒诱导的抗体。

[0004] 免疫磁珠(immunomagnetic beads,IMB)由磁性微球上包被抗原或抗体等免疫活性分子构成。IMB具有抗原-抗体识别反应的高度专一性,当IMB与相应配体结合后,形成的免疫复合物可以在磁场下与其他物质快速分离开,从而达到快速特异性分离纯化靶配体的作用,具有特异性高,操作简便快速的特点。

[0005] 本发明通过在毕赤酵母中表达重组VP3蛋白,将纯化的VP3蛋白和羧基磁珠偶联,首次建立基于VP3蛋白检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA方法及其检测试剂盒,为IBDV感染鸡群血清抗体的检测提供了新的技术手段。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是建立一种快速检测鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)抗体的血清学检测方法,并提供可供配套使用的试剂盒。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用了以下技术手段:

[0008] 为建立快速检测鸡传染性法氏囊病(IBD)的血清学方法,本发明利用镍琼脂糖柱纯化的IBDV VP3蛋白作为抗原和羧基磁珠偶联,建立了室温条件下,1h内完成检测IBDV血清抗体的免疫磁珠间接ELISA方法,对各反应条件进行了优化和初步应用。利用毕赤酵母表达系统获得约为39KD的重组VP3蛋白,Western-blot检测表明重组VP3蛋白具有良好的特异

性和反应原性。免疫磁珠间接ELISA的最佳反应条件为：磁珠和抗原偶联的缓冲液是50mM MES (pH8.0)，偶联时间为3h，抗原加入量为95 $\mu$ g，抗原与羧基磁珠最大偶联量为80 $\mu$ g。待检血清和酶标二抗的稀释度分别为1:1600和1:4000，血清孵育时间为30min，酶标二抗孵育时间为20min。在该优化条件下，阴、阳性临界值判定标准为0.134。特异性实验表明，本发明所建立的检测方法对抗AIV、IBV、MDV、NDV阳性血清检测结果均为阴性，特异性良好。敏感性实验表明，本发明所建立的检测方法敏感性高于商品化IBDV血清抗体检测试剂盒。重复性实验表明，批内和批间重复实验的最大变异系数分别为3.8%和5.9%。稳定性实验结果显示变异系数小于7%。用本发明建立的检测方法和商品化IBDV血清抗体检测试剂盒同时检测50份血清，结果显示两种检测方法的相对敏感性为94.6%，相对特异性为92.3%，符合率为97.6%。

[0009] 因此，在上述研究的基础上，本发明提出了一种用于检测鸡传染性法氏囊病病毒 (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV) 抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒，所述的试剂盒中含有偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠，其中，所述的IBDVVP3蛋白是通过毕赤酵母表达系统表达，纯化后获得。

[0010] 其中，优选的，所述的IBDV VP3蛋白是通过以下方法制备得到的：

[0011] (1) 引物合成

[0012] 合成用于扩增VP3基因的特异性引物，在引物中引入XbaI、EcoRI酶切位点和保护性碱基，引物序列如下所示：

[0013] 上游引物F的序列为：5'-CCGGAATTCATGCGTTTCCCTCACAATCCAC-3'，

[0014] 下游引物R的序列为：5'-CTAGTCTAGATCACTCAAGGTCCTCATCAG-3'；

[0015] (2) IBDV VP3基因的克隆

[0016] 取IBDV CEF94病毒株，按照病毒RNA提取试剂盒说明书方法提取RNA，以提取的RNA为模板，反转录成cDNA，采用步骤(1)的引物应用RT-PCR扩增得到IBDV VP3基因片段，将其连接到pMD19-T Simple Vector并转化TG1感受态细胞，得到的重组质粒被命名pMD19T-VP3；

[0017] (3) VP3重组酵母表达载体的构建

[0018] XbaI、EcoRI双酶切重组pMD19T-VP3质粒和pGAPZaA质粒，将VP3基因和pGAPZaA重组表达载体相连接，热转化入大肠杆菌TG1感受态细胞，得到的表达体质粒被命名pGAPZaA-VP3，将表达体质粒pGAPZaA-VP3经AVR II酶线性化后与用山梨醇溶液处理新鲜菌体制备的感受态细胞混合，电击转化GS115感受态细胞，涂布含有Zeocin的YPDS平板，30℃恒温静置培养，将筛选正确的重组菌命名为pGAPZaA-VP3/GS115；

[0019] (4) 重组VP3蛋白的纯化及鉴定

[0020] 将重组菌pGAPZaA-VP3/GS115在含有Zeocin的YPD培养液中30℃下震荡培养后，接种于相同培养基中继续培养，菌液离心取上清，用TCA-丙酮法提取上清蛋白，利用镍琼脂糖凝胶柱对目的蛋白进行纯化，并对纯化蛋白进行SDS-PAGE检测，得到所述的IBDV VP3蛋白。

[0021] 其中，优选的，所述的偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠是通过以下方法制备得到：

[0022] (1) 磁珠的活化

[0023] (2) 磁珠与抗原偶联

[0024] 纯化的VP3蛋白作为检测抗原与羧基磁珠进行偶联，按照以下步骤进行：

[0025] (1) 将25~110 $\mu$ g检测抗原加至含2mg活化的磁珠的MES偶联液中,其中,优选的,检测抗原的量为95 $\mu$ g,MES偶联液的浓度为50mM,pH8.0;

[0026] (2) 剧烈振荡混匀,室温下,将管置于旋转混匀仪上进行偶联反应1-4h,其中,优选的,偶联反应时间为3h;

[0027] (3) 将管放在磁分离架上直到上清液变清后,用吸管小心移弃上清;

[0028] (4) 将20 $\mu$ L新配的MES偶联液加入磁珠中。涡旋混匀,室温下连续混合孵育30~60分钟;

[0029] (5) 将试管放入磁力架中,磁分离并吸弃上清;

[0030] (6) 羧基磁珠加入500 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液,涡旋20秒,磁分离并吸弃上清;

[0031] (7) 向羧基磁珠加入500 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液。室温孵育30~60分钟,磁分离并吸弃上清;

[0032] (8) 向羧基磁珠加入500 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液。剧烈漩涡20秒,磁分离并吸弃上清;按该步骤再洗两次磁珠;

[0033] (9) 从磁力架上取下EP管,添加100 $\mu$ L TBS淬灭缓冲液,涡旋混合并在2~8 $^{\circ}$ C储存偶联好的磁珠,待用。

[0034] 其中,优选的,所述的TBS淬灭缓冲液中含有25mM Tris-Cl,130mM NaCl,2.7mM KCl以及0.01%Triton X-100,pH 8.0。

[0035] 其中,优选的,所述的试剂盒中还含有pH 8.0的50mM MES缓冲液、pH 8.0的三乙醇胺缓冲盐水溶液、HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体、阴性对照、TMB显色液以及2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液。

[0036] 其中,优选的,所述的阴性对照为未免疫的SPF鸡血清。

[0037] 其中,优选的,使用所述的试剂盒检测鸡传染性法氏囊病病毒抗体时,按照以下步骤进行:

[0038] 将偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠2 $\mu$ l和用50mM MES (pH 8.0) 缓冲液按照体积比1:1600稀释好的待检血清混匀,室温轻轻震荡30min,用pH 8.0的三乙醇胺缓冲盐水溶液涡旋振荡洗涤三次,每次30s;之后加入用50mM MES (pH 8.0) 缓冲液按照1:4000稀释的HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体,室温轻轻震荡混匀20min,用pH 8.0的三乙醇胺缓冲盐水溶液涡旋振荡洗涤三次,每次30s;加入100 $\mu$ l TMB显色液,静止3min,加入50 $\mu$ l的2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>检测OD<sub>450nm</sub>的值。

[0039] 其中,优选的,当待检血清样品的OD<sub>450nm</sub>值 $\geq$ 0.134时判断为阳性,当待检血清样品的OD<sub>450nm</sub><0.134时判断为阴性。

[0040] 进一步的,本发明还提出了所述的免疫磁珠间接ELISA试剂盒在制备检测鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus,IBDV) 抗体中的应用。

[0041] 相较于现有技术,本发明的有益效果是:

[0042] 本发明利用毕赤酵母表达系统表达的重组VP3蛋白作为抗原建立检测血清抗体的方法,其优点在于操作简便、经济,能够进行复杂的翻译后加工,表达水平高。本发明利用毕赤酵母表达系统表达的重组VP3蛋白作为抗原,建立了一种新的检测血清抗体的免疫磁珠间接ELISA方法。与商品化IBDV血清抗体检测试剂盒相比较,血清孵育时间由37 $^{\circ}$ C孵育1h缩短至室温孵育30min。酶标二抗的孵育时间也由37 $^{\circ}$ C孵育1h缩短至20min。洗涤时间由每次5min缩短至30s。本发明所建立的检测方法,操作过程比商品化IBDV血清抗体检测试剂盒节

省了约1h;进行检测的血清抗体稀释度达到了1:1600,而普通ELISA检测血清抗体的稀释度在1:200-1:500之间,此方法显著节省了血清的用量。实验结果表明本发明以IBDV VP3重组蛋白作为抗原建立的检测鸡血清中IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA方法,具有良好的特异性和敏感性,重复性好,符合率高,能够缩短检测时间且操作简便,为抗鸡IBDV血清抗体的快速检测提供了新的技术手段。

## 附图说明

- [0043] 图1为重组菌pGAPZαA-VP3/GS115基因组PCR鉴定结果;
- [0044] M:DNA分子质量标准;1~8:pGAPZαA-VP3/GS115菌基因组,3、5、7号菌基因组PCR扩增结果与目的片段一致;9:pGAPZαA-VP3质粒;
- [0045] 图2为重组蛋白的SDS-PAGE分析;
- [0046] M:蛋白质分子质量标准;1:纯化的VP3蛋白;2:pGAPZαA-VP3/GS115上清;3:pGAPZαA/GS115上清;
- [0047] 图3为重组蛋白的Western-blot分析;
- [0048] M:预染蛋白Marker;1:pGAPZαA-VP3/GS115上清;2:pGAPZαA/GS115上清;
- [0049] 图4为不同偶联液中的抗原与羧基磁珠的偶联率;
- [0050] 图5为不同pH值的缓冲液中抗原与羧基磁珠的偶联率;
- [0051] 图6为不同的偶联时间时抗原与羧基磁珠的偶联率;
- [0052] 图7为抗原加入量对偶联效果的影响;
- [0053] 图8为敏感性实验结果。

## 具体实施方式

[0054] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0055] 实施例1检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA方法的建立

[0056] 1材料

[0057] 1.1病毒、血清和质粒

[0058] IBDV CEF94毒株、鸡抗IBDV阳性血清、25份SPF阴性鸡血清、毕赤酵母菌GS115、抗鸡新城疫病毒(NDV)血清和大肠杆菌TG1感受态细胞由本实验室保存;禽流感病毒(AIV)H5亚型血清来源于华中农业大学重大动物疫病与人畜共患病重点实验室;抗鸡马立克氏病毒(MDV)血清和抗鸡传染性支气管炎病毒(IBV)血清来源于中国农业大学微生物学与免疫学重点实验室;pMD19-T Simple Vector购于宝生物工程(大连)有限公司;pGAPZαA表达载体购自于invitrogen公司;50份待检血清样品来自于哈尔滨地区某鸡场。

[0059] 1.2主要试剂

[0060] HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体、Ex Taq DNA聚合酶Ex Taq Buffer、dNTP、Oligo(dT)18、DNA Marker、Protein Marker、EcoRI、XbaI内切酶、T4 DNA连接酶购自于宝生物工程(大连)有限公司;AVRII酶购自于NEB公司;镍琼脂糖柱蛋白纯化试剂盒购自天根生化科技有限

公司;RNA提取试剂盒RNA fast 200购自上海飞捷生物有限公司;RT-Ace反转录酶和RNA酶抑制剂购自ToYoBo公司;质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购自Axygen公司;BCA蛋白试剂盒购于北京全式生物技术有限公司;羧基磁珠购于厦门普瑞迈格生物技术有限公司;IBDV血清抗体检测试剂盒购于上海江莱生物有限公司。

#### [0061] 2方法

##### [0062] 2.1引物的设计

[0063] 根据GeneBank发表的IBDV VP3全基因序列(登陆号:AY444873)用Primer 5.0软件设计扩增VP3基因的特异性引物,在引物中引入XbaI、EcoRI酶切位点和保护性碱基。

[0064] 上游引物F的序列为:5'-CCGGAATTCATGCGTTTCCTCACAATCCAC-3'(SEQ ID NO.1),

[0065] 下游引物R的序列为:5'-CTAGTCTAGATCACTCAAGGTCCTCATCAG-3'(SEQ ID NO.2)。

[0066] 基因扩增片段长度为896bp,引物由金唯智生物有限公司合成,放于-20℃保存备用。

##### [0067] 2.2 IBDV VP3基因的克隆

[0068] 取IBDV CEF94病毒株,按照病毒RNA提取试剂盒说明书方法提取RNA。以提取的RNA为模板,反转录成cDNA。应用RT-PCR扩增IBDV VP3基因片段,PCR产物经过1%琼脂糖凝胶电泳分析,将目的条带用凝胶回收试剂盒回收。将其连接到pMD19-T Simple Vector并转化TG1感受态细胞。提取阳性质粒经XbaI、EcoRI双酶切鉴定后送往吉林省库美生物有限公司进行测序,正确的重组质粒被命名pMD19T-VP3。

##### [0069] 2.3 VP3重组酵母表达载体的构建

[0070] XbaI、EcoRI双酶切重组pMD19T-VP3质粒和pGAPZaA质粒,将VP3基因和pGAPZaA重组表达载体相连接,热转化入大肠杆菌TG1感受态细胞。参考invitrogen公司所提供的pGAPZaA Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant Proteins说明书。将表达体质粒pGAPZaA-VP3经AVRII酶线性化后取10ul与用1mol/L山梨醇溶液处理新鲜菌体制备的感受态细胞80ul混合,电击转化GS115感受态细胞。涂布含有Zeocin(100ug/ml) YPDS平板,30℃恒温静置培养3d。挑取平板上长出的菌落进行活化培养48h,提取基因组进行PCR鉴定。将筛选正确的重组菌命名为pGAPZaA-VP3/GS115。

##### [0071] 2.4重组VP3蛋白的纯化及鉴定

[0072] 将重组菌pGAPZaA-VP3/GS115在含有Zeocin的YPD培养液中30℃下震荡培养24h后,按照1:100的比例接种于100ml相同培养基中继续培养72h,取出10ml重组菌离心取上清,用TCA-丙酮法提取上清蛋白。用SDS-PAGE和Western blot(一抗为IBDV阳性血清,二抗为HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体)对菌体上清蛋白进行检测。利用镍琼脂糖凝胶柱对目的蛋白进行纯化,并对纯化蛋白进行SDS-PAGE检测。

##### [0073] 2.5免疫磁珠的制备

###### [0074] 2.5.1磁珠的活化

[0075] 磁珠的活化参考厦门普瑞迈格生物技术有限公司提供的PuriMag™G-COOH羧基磁珠说明书进行操作。

###### [0076] 2.5.2磁珠与抗原偶联条件的优化

[0077] 纯化的VP3蛋白作为检测抗原与羧基磁珠进行偶联,按照以下步骤进行:



- [0078] (1) 将95μg检测抗原加至含2mg活化的磁珠的偶联液中；
- [0079] (2) 剧烈振荡混匀，室温下，将管置于旋转混匀仪上偶联反应一定时间；
- [0080] (3) 将管放在磁分离架上直到上清液变清后，用吸管小心移弃上清；
- [0081] (4) 将20μL新配的偶联液加入磁珠中。涡旋混匀，室温下连续混合孵育30~60分钟；
- [0082] (5) 将试管放入磁力架中，磁分离并吸弃上清；
- [0083] (6) 羧基磁珠加入500μL TBS淬灭缓冲液(25mM Tris-Cl, 130mM NaCl, 2.7mM KCl以及0.01% Triton X-100, pH 8.0)，涡旋20秒，磁分离并吸弃上清；
- [0084] (7) 向羧基磁珠加入500μL TBS淬灭缓冲液。室温孵育30~60分钟，磁分离并吸弃上清；
- [0085] (8) 向羧基磁珠加入500μL TBS淬灭缓冲液。剧烈漩涡20秒，磁分离并吸弃上清；按该步骤再洗两次磁珠；
- [0086] (9) 从磁力架上取下EP管，添加100μL TBS淬灭缓冲液，涡旋混合并在2~8℃储存偶联好的磁珠，待用。
- [0087] 先分别用去离子水(ddH<sub>2</sub>O)、50mM PB(磷酸缓冲液)、50mM PBS(磷酸盐缓冲液)、50mM MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液)和50mM ME(脂肪酸甲酯磺酸钠缓冲液)进行偶联液筛选，再优化偶联液的pH值(6.8, 7.4, 8.0, 8.6, 9.2)、偶联时间(1.0h, 1.5h, 2.0h, 2.5h, 3.0h, 3.5h, 4.0h)和检测抗原的最佳偶联量(25μg、35μg、45μg、55μg、65μg、75μg、85μg、95μg、110μg)，选用2mg活化的磁珠进行优化。通过用BCA蛋白测定法测定偶联液中的蛋白含量来计算偶联率，以此来确定磁珠和抗原偶联的最佳条件。
- [0088] 2.6待检血清和酶标二抗最佳稀释度的确定
- [0089] 对IBDV阳性血清和阴性血清均进行1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200稀释。对酶标二抗以1:1000、1:2000、1:4000三个稀释度稀释。按照阳性血清OD<sub>450nm</sub>值约为1.0、阴性血清值OD<sub>450nm</sub><0.1且P/N值最大为原则，确定待检血清和酶标二抗最佳稀释倍数。
- [0090] 2.7免疫磁珠间接ELISA临界值的确定
- [0091] 根据上述确定的免疫磁珠ELISA最佳实验条件，检测了25份SPF阴性鸡血清。根据阴阳性临界值的界定公式：临界值=阴性血清样品OD<sub>450nm</sub>平均值+3×阴性血清样品标准方差，进行计算。根据统计学原理，当血清样品的OD<sub>450nm</sub>值≥临界值，可在99%水平上判断为阳性，OD<sub>450nm</sub>值<临界值，即可判断为阴性。
- [0092] 2.8免疫磁珠间接ELISA反应条件的确定
- [0093] 利用制备好的免疫磁珠及上述实验确定的待检血清和酶标二抗稀释度、反应条件和临界值，确定免疫磁珠间接ELISA方法的最佳检测条件。
- [0094] 2.9免疫磁珠间接ELISA敏感性的测定
- [0095] 将阳性血清从1:50到1:102400倍比稀释，在最佳实验条件下用商品化IBDV血清抗体试剂盒和所建立的免疫磁珠间接ELISA同时测定OD<sub>450nm</sub>值比较两种检测方法的敏感性。
- [0096] 2.10免疫磁珠间接ELISA特异性的测定
- [0097] 在优化后的ELISA实验条件下，对抗IBV、MDV、AIV、NDV四种阳性血清进行检测，并设立IBDV的标准阴性血清与标准阳性血清为对照，每份血清重复检测3孔，根据测定的OD<sub>450nm</sub>值来判定该ELISA方法的特异性。

[0098] 2.11免疫磁珠间接ELISA重复性的测定

[0099] 2.11.1批内重复实验

[0100] 利用不同时间使用同一批次抗原偶联的免疫磁珠对8份阳性血清和2份阴性血清进行6次重复检测,测定OD<sub>450nm</sub>值的差异,计算批内的变异系数CV(%) = 标准偏差/平均值 × 100%<sup>[15]</sup>。

[0101] 2.11.2批间重复实验

[0102] 选择32份血清样品,包括24份阳性血清和8份阴性血清,在三个不同时间段分别用不同批次抗原偶联的免疫磁珠进行检测,测定OD<sub>450nm</sub>值。

[0103] 2.12免疫磁珠间接ELISA稳定性的测定

[0104] 将同一批次偶联好抗原的免疫磁珠置于4℃冰箱保存,并于放置前检测24份(21份阳性,3份阴性)血清样品,以后每个月检测一次,共检测三次,观察偶联抗原的磁珠稳定性。

[0105] 2.13免疫磁珠间接ELISA符合率的检测

[0106] 同时用本实验建立的免疫磁珠间接ELISA方法和商品化的IBDV血清抗体检测试剂盒对50份待检鸡血清样品进行检测,比较两者检测结果的符合率。

[0107] 3结果与分析

[0108] 3.1 IBDV VP3蛋白的表达与纯化

[0109] 挑取YPDS平板上的8个单个菌落在30℃恒温摇床上进行活化培养,进行编号(1~8)后提取基因组进行PCR鉴定。以pGAPZαA-VP3质粒作为阳性对照,其中3、5、7号菌的基因组经PCR扩增后出现正确的目的基因片段(见图1)。采用TCA-丙酮法提取重组菌pGAPZαA-VP3/GS115和pGAPZαA/GS115上清蛋白,进行SDS-PAGE分析,结果表明pGAPZαA-VP3/GS115在39KD处出现了VP3重组蛋白的表达而pGAPZαA/GS115并未出现(见图2)。利用镍琼脂糖柱纯化后的蛋白在39KD处也出现了单一的条带(见图2)。Western-blot分析结果显示,重组蛋白VP3与IBDV阳性血清能发生反应,出现特异性目的条带(见图3)。说明利用毕赤酵母表达系统表达的VP3蛋白免疫反应性良好。

[0110] 3.2免疫磁珠的制备

[0111] 在ddH<sub>2</sub>O、50mM PB、50mM PBS、50mM MES和50mM ME五种不同偶联缓冲液中,抗原与羧基磁珠的偶联率在50mM MES中最高,达到42.34%(见图4)。不同pH(6.8,7.4,8.0,8.6,9.2)的MES缓冲液中,抗原与羧基磁珠的偶联率在pH为8.0的MES缓冲液中最高,为39.27%(见图5)。将抗原与羧基磁珠在50mM MES(pH8.0)缓冲液中偶联不同的时间(1.0h,1.5h,2.0h,2.5h,3.0h,3.5h,4.0h),当偶联时间为3h时偶联率逐渐趋于平衡(见图6),故抗原和羧基磁珠偶联最佳时间为3h。在50mM MES(pH8.0)缓冲液中加入不同的抗原量(25μg、35μg、45μg、55μg、65μg、75μg、85μg、95μg、110μg),当抗原加入量在25~95μg之间时,磁珠上偶联的抗原量逐渐增加,当加入的抗原量大于95μg时,偶联上的抗原量趋向饱和,所以最佳抗原加入量为95μg,偶联上的抗原量为80.0μg(见图7)。

[0112] 3.3待检血清和酶标二抗最佳稀释度的确定

[0113] 采用方阵滴定法,测定OD<sub>450nm</sub>值,以阳性血清OD<sub>450nm</sub>值为1.0左右,阴性血清OD<sub>450nm</sub>值为0.1以下且P/N值最大为原则,重复多次操作。阳性血清的最佳稀释度为1:1600,酶标二抗最佳稀释度为1:4000,且此时P/N的最大值为16.16(见表1)。当血清和酶标二抗按照最佳稀释度稀释时,设计了5个不同的孵育时间(20min,30min,40min,50min,60min)。由

以上确定原则,血清最佳孵育时间为30min(见表2),酶标二抗最佳孵育时间为20min(见表3)。

[0114] 表1血清和酶标二抗最佳稀释度的确定

		酶标二抗稀释度 Enzyme standard second anti - dilution degree		
血清稀释度 Serum dilution		1:1000	1:2000	1:4000
1:100	Positive	3.871	2.561	1.987
	Negative	0.192	0.113	0.102
	P/N	20.16	22.66	19.48
1:200	Positive	3.042	1.674	1.076
	Negative	0.187	0.105	0.098
	P/N	16.27	15.94	10.98
1:400	Positive	2.675	1.378	1.199
	Negative	0.194	0.127	0.102
	P/N	13.79	10.85	11.75
1:800	Positive	1.874	1.245	0.947
	Negative	0.141	0.115	0.081
	P/N	13.29	10.83	11.69
1:1600	Positive	1.248	1.139	1.001
	Negative	0.111	0.103	0.062
	P/N	11.24	10.55	16.16
1:3200	Positive	1.146	1.056	0.705
	Negative	0.099	0.078	0.065
	P/N	11.57	13.54	10.85

[0116] 表2血清最佳孵育时间的确定

		血清孵育时间 Serum incubation time				
		20min	30min	40min	50min	60min
[0117]	Positive	1.456	1.537	1.621	1.449	1.350
	Negative	0.116	0.088	0.131	0.105	0.098
	P/N	12.55	17.47	12.37	13.80	13.77

[0118] 表3酶标二抗最佳孵育时间的确定

		酶标二抗孵育时间 Enzyme labeled second antibody incubation time				
		20min	30min	40min	50min	60min
[0119]	Positive	1.278	1.319	1.428	1.323	1.349
	Negative	0.081	0.091	0.121	0.113	0.195
	P/N	15.77	14.49	14.01	11.71	6.91

[0120] 3.4免疫磁珠间接ELISA临界值的确定

[0121] 利用确定的免疫磁珠间接ELISA最佳反应条件,检测了25份SPF阴性鸡血清,根据阴阳性临界值的计算公式可知,平均值是0.086,标准差是0.016。临界值为0.134。即当血清样品的OD<sub>450nm</sub>值 $\geq$ 0.134时可判断为阳性,当血清样品的OD<sub>450nm</sub><0.134时可判断为阴性。

[0122] 3.5免疫磁珠间接ELISA反应条件的确定

[0123] 根据利用制备好的免疫磁珠及以上确定的最佳反应条件,确定的免疫磁珠间接ELISA最佳检测条件为:将偶联抗原的磁珠2u1和用50mM MES (pH 8.0) 缓冲液稀释好的待检血清(1:1600)混匀,室温轻轻震荡30min,用TBS(三乙醇胺缓冲盐水溶液,pH 8.0) 缓冲液涡旋振荡洗涤三次,每次30s。之后加入用50mM MES (pH 8.0) 缓冲液稀释的HRP标记的山羊抗鸡IgG抗体(1:4000),室温轻轻震荡混匀20min,用TBS缓冲液涡旋振荡洗涤三次,每次30s。加入100u1TMB显色液,静止3min,加入50u1的2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>检测OD<sub>450nm</sub>的值。阴性对照为未免疫的SPF鸡血清。当血清样品的OD<sub>450nm</sub>值 $\geq 0.134$ 时可判断为阳性,当血清样品的OD<sub>450nm</sub><0.134时可判断为阴性。

[0124] 3.6免疫磁珠间接ELISA特异性的测定

[0125] 在上述的最佳实验条件下,对建立的免疫磁珠间接ELISA方法进行特异性的检测。除IBDV标准阳性血清外,其他阳性血清结果均小于临界值(见表4),说明建立的免疫磁珠间接ELISA特异性良好。

[0126] 表4特异性实验结果

[0127]	AIV+	NDV+	IBV+	MDV+	IBDV+	IBDV-
	OD mean	0.096	0.084	0.079	0.091	1.45

[0128] 3.7免疫磁珠间接ELISA敏感性的测定

[0129] 在最佳实验条件下,将阳性血清从1:50到1:102400倍比稀释,在血清1:12800倍稀释的时候,建立的免疫磁珠间接ELISA的OD<sub>450nm</sub>值仍然大于临界值,且所建立检测方法的敏感性高于商品化IBDV血清抗体检测试剂盒的敏感性(见图8)。

[0130] 3.8免疫磁珠间接ELISA重复性的测定

[0131] 3.8.1批内重复结果

[0132] 对8份阳性血清和2份阴性血清,在用同一批次抗原包被的免疫磁珠进行8次重复测定,并计算变异系数CV(%) = 标准偏差/平均值 $\times 100\%$ ,结果显示利用纯化的VP3重组蛋白作为抗原建立的免疫磁珠间接ELISA检测方法的变异系数在1.9%~3.8%之间,批内重复的变异系数小于4%。说明建立的免疫磁珠间接ELISA检测方法具有良好的重复性。

[0133] 3.8.2批间重复结果

[0134] 选择32份血清(24份阳性血清,8份阴性血清),进行三个不同批次抗原包被的免疫磁珠的测定,并计算批间的变异系数CV(%)。结果显示,纯化的VP3重组蛋白作为抗原建立的免疫磁珠间接ELISA检测方法的变异系数在2.5%~5.9%之间,批间重复的变异系数小于6%,说明所建立的免疫磁珠间接ELISA具有良好重复性。

[0135] 3.9免疫磁珠间接ELISA稳定性的测定

[0136] 将抗原偶联的羧基磁珠放于4℃冰箱保存3个月,血清OD<sub>450nm</sub>值之间的变异系数均小于7%,显示抗原包被的免疫磁珠稳定性良好。

[0137] 3.10免疫磁珠间接ELISA符合率的检测

[0138] 应用VP3重组蛋白作为抗原所建立的免疫磁珠间接ELISA检测方法(IMB-VP3-ELISA)和商品化IBDV血清抗体检测试剂盒同时检测50份临床血清样品。IMB-VP3-ELISA检测出50份血清样品中有38份阳性血清和12份阴性血清。商品化IBDV血清抗体检测试剂盒检测出37份阳性血清和13份阴性血清。同时用IMB-VP3-ELISA检测商品化IBDV血清抗体检测试剂盒检测出的13份阴性血清,其中有1份检测结果为阳性,37份阳性血清中有2份为阴性。

根据相关公式计算分析得出两种检测方法相对敏感性为94.6%，相对特异性为92.3%，符合率为97.6% (见表5)。

[0139] 表5 IMB-VP3-ELISA和商品化IBDV血清抗体检测试剂盒检测结果比较

[0140]

IBDV 抗体检测试剂盒检测结果 Results of IBDV antibody detection kit				
		阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total
IMB-VP3-ELISA 检测结果	阳性 Positive	35	12	47
IMB-VP3-ELISA detection	阴性 Negative	2	1	3
results	合计 Total	37	13	50
统计分析	敏感性 Sensibility	94.6%		
Statistical analysis	特异性 Specificity		92.3%	
	符合率 Coincidence			97.6%

## 序列表

<110> 东北农业大学

<120> 一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用

<130> KLPI181056

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 1

ccggaattca tgcgtttccc tcacaatcca c 31

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 2

ctagtctaga tcactcaagg tcctcatcag 30

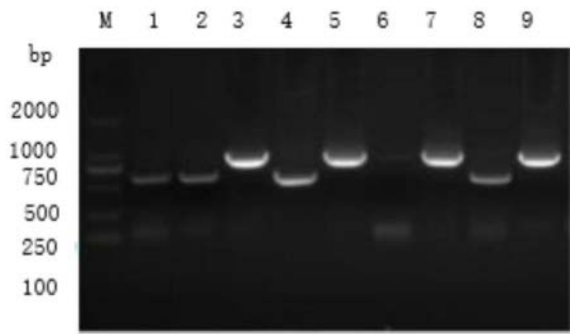


图1

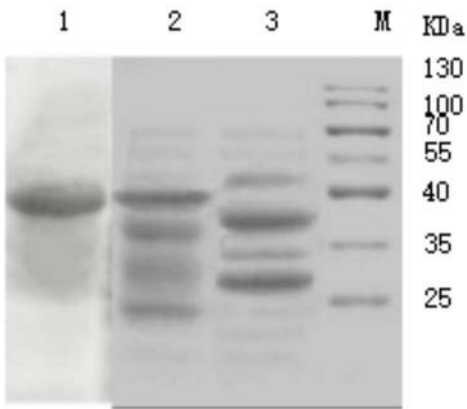


图2

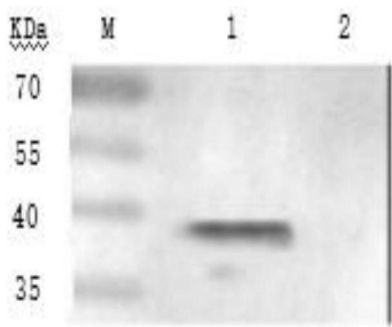


图3

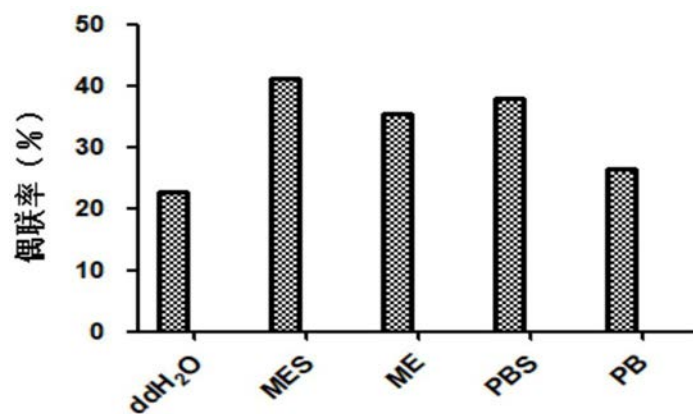


图4

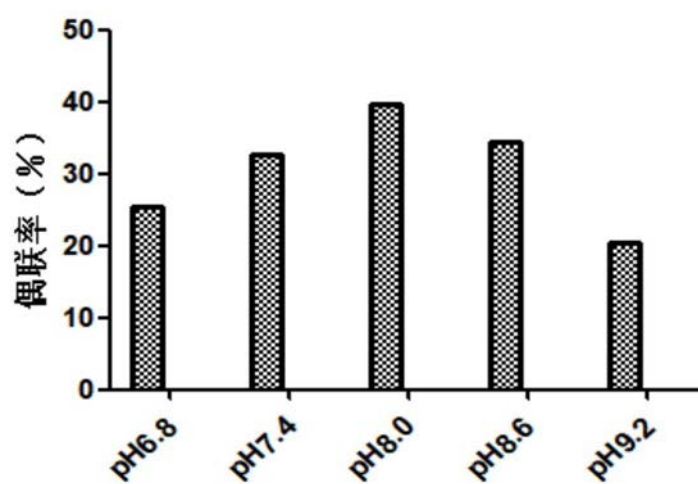


图5

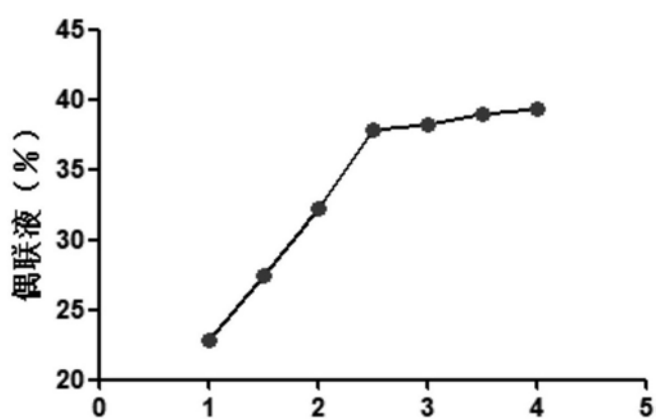


图6



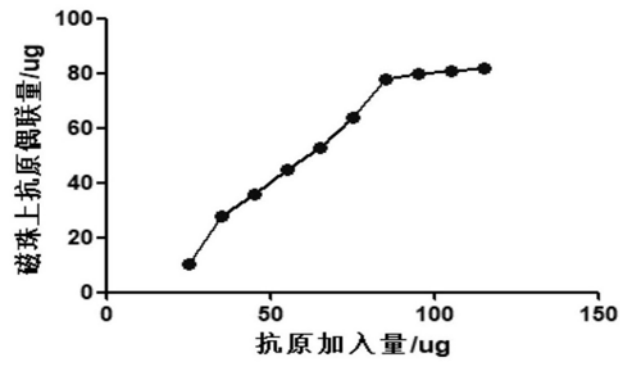


图7

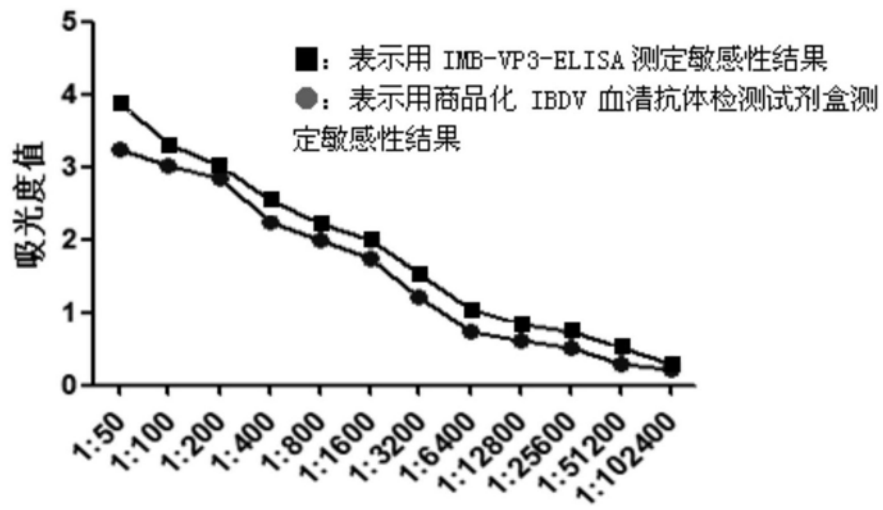


图8

专利名称(译)	一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109633173A</a>	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201910008503.6	申请日	2019-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	唐丽杰 周晗 王丽 徐义刚 乔薪媛 崔文 姜艳平 李一经		
发明人	唐丽杰 周晗 王丽 徐义刚 乔薪媛 龚如月 崔文 姜艳平 李一经		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 C12N15/66 C12N15/81 C07K14/08		
CPC分类号	G01N33/68 C07K14/005 C12N15/66 C12N15/815 C12N2720/10022 G01N33/531		
代理人(译)	孙皓晨 马鑫		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了一种用于检测IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA试剂盒及其应用。所述的试剂盒中含有偶联有IBDV VP3蛋白的免疫磁珠，其中，所述的IBDV VP3蛋白是通过毕赤酵母表达系统表达，纯化后获得。本发明利用毕赤酵母表达系统表达的重组VP3蛋白作为抗原，建立了一种新的检测IBDV血清抗体的免疫磁珠间接ELISA方法。与商品化IBDV血清抗体检测试剂盒相比较，操作过程比商品化IBDV血清抗体检测试剂盒节省了约1h，且显著节省了血清的用量。实验结果表明本发明以IBDV VP3重组蛋白作为抗原建立的检测鸡血清中IBDV抗体的免疫磁珠间接ELISA方法，具有良好的特异性和敏感性，重复性好，符合率高，能够缩短检测时间且操作简便。本发明的提出为抗鸡IBDV血清抗体的快速检测提供了新的技术手段。

		酶标二抗稀释度 Enzyme standard anti - dilution degree		
血清稀释度 Serum dilution		1:1000	1:2000	1:4000
1:100	Positive	3.871	2.561	1.987
	Negative	0.192	0.113	0.102
	P/N	20.16	22.66	19.48
1:200	Positive	3.042	1.674	1.076
	Negative	0.187	0.105	0.098
	P/N	16.27	15.94	10.98
1:400	Positive	2.675	1.378	1.199
	Negative	0.194	0.127	0.102
	P/N	13.79	10.85	11.75
1:800	Positive	1.874	1.245	0.947
	Negative	0.141	0.115	0.081
	P/N	13.29	10.83	11.69
1:1600	Positive	1.248	1.139	1.001
	Negative	0.111	0.103	0.062
	P/N	11.24	10.55	16.16
1:3200	Positive	1.146	1.056	0.705
	Negative	0.099	0.078	0.065
	P/N	11.57	13.54	10.85