



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1851463 B

(45) 授权公告日 2011.04.20

(21) 申请号 200610044437.0

(22) 申请日 2006.03.10

(73) 专利权人 山东出入境检验检疫局检验检疫
技术中心

地址 266002 山东省青岛市瞿塘峡路 70 号

(72) 发明人 梁成珠 岳志芹 朱来华 高宏伟
吴华

(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有
限公司 37101

代理人 袁和善

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 9519438 A, 1995.07.20, 全文.

杜建等. 马动脉炎病毒大囊膜蛋白和膜蛋白基因的克隆与序列分析. 中国兽医科技 35
2. 2005, 35(2), 112-116.

审查员 王晓媛

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法

(57) 摘要

一种间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法,其操作程序是:分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性,设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因,构建大囊膜糖蛋白表达载体 pET-GL1,将 pET-GL1 质粒转化 BL-21 宿主菌,高效表达大囊膜糖蛋白,纯化重组大囊膜糖蛋白作为检测抗原,建立了检测马动脉炎病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验。间接酶联免疫吸附试验与病毒中和试验、西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒(品牌:INGEZIM-ARTERITIS)的检测结果符合率分别达到 94.1%、95.6%。间接酶联免疫吸附试验方法检测马动脉炎病毒,特异性好、灵敏度高,可提高检测效率,降低检测成本,具有很强的推广性和实用性。

1. 一种间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法，其特征在于它的程序是：分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性，设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因，构建大囊膜糖蛋白原核表达载体 pET-GL1，将 pET-GL1 质粒转化 BL-21 宿主菌，高效表达马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白，Western-blot 鉴定表达产物，His-Bind 柱纯化蛋白，优化马动脉炎病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验方法的反应条件，其中所述的引物序列为：

P1：5' -CGTGGATCCTACAACTGTTCCGCCAGTAA-3'，划线部分是 Bam HI 酶切位点；

P2：5' -ATACTCGAGCGGACCATGCGCCTGTTC-3'，划线部分是 Xho I 酶切位点。

2. 根据权利要求 1 所述的一种间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法，其特征在于所述的高效表达马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白，其程序是将阳性转化菌接种于 LB 培养基 37℃ 震荡培养过夜，次日以 2% 的量接种于含有 50 μ /mL 氨苄青霉素的 2×YT 培养基，震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4-0.5 时，加入 0.8mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷，在 30℃ 和 37℃ 的培养条件下进行诱导培养 4 小时，SDS-PAGE 电泳鉴定表达产物的大小约为 26kD。

间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法

技术领域：

[0001] 本发明是属于马动脉炎病毒感染的检测技术，是一种采用间接酶联免疫吸附试验的检测方法。

背景技术：

[0002] 马动脉炎病毒 (Equine Arteritis Virus, EAV) 是马病毒性动脉炎的病原，马病毒性动脉炎是引起马的散发性呼吸系统和繁殖系统的接触性传染病，可导致病变器官的小动脉中膜变性和坏死。国际兽疫局 (OIE) 将马病毒性动脉炎列为 B 类传染病，我国农业部宣布其为禁止进境的二类动物传染病。马动脉炎病毒为套式病毒目 (Nidovirales)、动脉炎病毒科 (Arteriviridae) 成员。1953 年美国专家 Doll 等首次从马流产胎儿中分离出该病毒，并命名为 Bucyrus 株。马动脉炎病毒是线性单股正链 RNA 病毒，含有七个 ORF (开放阅读框架)，编码四种结构蛋白：核衣壳蛋白 N、膜蛋白 M、大囊膜糖蛋白 GL 和小囊膜糖蛋白 Gs。大囊膜糖蛋白 GL 含有马动脉炎病毒最主要的中和抗原决定簇，是马动脉炎病毒的主要保护性抗原，大囊膜糖蛋白和膜蛋白通过二硫键形成二聚体复合物，是病毒颗粒的主要组成单位。

[0003] 在马动脉炎病毒流行地区，马匹一般呈隐性感染或出现比较轻的感染症状，如果在牧场发生流行可造成妊娠母马的高流产率。持续感染的种公马虽然没有明显的临床症状，但是精液中的病毒可传播给雌马，引起马动脉炎病毒的传播。该病呈世界性分布，血清学试验证实，中国也存在此病。由于目前还无法区别自然感染产生的抗体和免疫接种产生的抗体，许多国家为了出口的需要，禁止使用疫苗接种来控制本病。

[0004] 本发明在做出之前，对马动脉炎病毒的检验检疫方法，世界动物卫生组织 (OIE) 规定其方法包括：血清中和试验、补体结合试验、血凝和血凝抑制试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。

[0005] 血清中和试验 (SNT)：动物受到病毒感染后，体内产生特异性的中和抗体，并与相应的病毒粒子呈现特异性结合，因而阻止病毒对敏感细胞的吸附，或抑制其侵入，使病毒失去感染能力。中和试验是以测定病毒的感染力为基础，比较病毒受免疫血清中和后的感染力为依据，来判定免疫血清中和病毒的能力。中和试验常用的有两种方法：一种是固定病毒量与等量系列稀释的血清混合，另一种是固定血清用量与等量系列对数稀释的病毒混合；然后把血清-病毒混合物置适当条件下作用一定时间后，接种于敏感细胞、鸡胚或动物，测定血清阻止病毒感染宿主的能力及其效价。如果接种血清-病毒混合物的宿主与对照一样都出现病变或死亡，则说明血清中没有相应的中和抗体。中和试验不仅能定性而且能定量。

[0006] 补体结合试验 (CFT)：补体是一组正常血清蛋白成分，可被免疫复合物激活产生具有裂解细胞壁的因子。如果该过程发生在红细胞表面则导致红细胞裂解而出现溶血。利用这种反应来检测血清中的抗体或抗原，称作补体结合试验 (complement fixation test, CFT)。CFT 包括两种系统，第一个为反应系统，已知抗原 (抗体)，被检血清 (或

抗原)和补体。第二个系统为指示系统(又称溶血系统),即溶血素+绵羊红细胞,溶血素即为抗绵羊红细胞抗体,补体常用豚鼠血清,它对红细胞有较强的裂解能力。但补体只有和抗原抗体复合物结合后被激活才能够产生溶血作用。因此,如果试验中的抗原和抗体是对应的,形成免疫复合物,定量的补体就被结合,这时加入指示系统,由于没有游离的补体,就不产生溶血现象,即为阳性反应。反之试验中缺乏抗原或特异性抗体,就不能形成免疫复合物,补体就游离于反应液中,就被指示系统,即绵羊红细胞和溶血素免疫复合物激活,而出现溶血,即阴性反应。

[0007] 血凝和血凝抑制试验:其基本原理是某些病毒或者病毒的血凝素,能选择性的使几种动物的红细胞发生凝集,这种凝集红细胞的现象称为血凝。当病毒的悬液中加入特异性抗体,且这种抗体的量足以抑制病毒颗粒或其血凝素时,则红细胞表面的受体就不能与病毒颗粒或其血凝素直接接触。这时红细胞的凝集现象就被抑制,成为血凝抑制反应。该方法的优点是简单快速,但是由于它检测的是病毒抗体,而抗体必须在感染后相当一段时间内才能产生,因此,该方法的应用范围受到限制。

[0008] 酶联免疫吸附试验(ELISA):ELISA方法的基本原理是酶分子与抗体或抗抗体分子共价结合,此种结合不会改变抗体的免疫学特性,也不影响酶的生物学活性。该酶标记抗体可与吸附在固相载体上的抗原或抗体发生特异性结合。滴加底物溶液后,底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型,出现颜色反应。因此,可通过底物的颜色反应来判断有无相应的免疫反应,颜色的深浅与标本中相应抗体或抗原的量成正比。此种显色反应可通过ELISA检测仪(酶标仪)来测定。

[0009] 上述方法因敏感性、特异性、确诊时间过长或环境污染等问题,很难满足进出口贸易中快速、敏感、特异、经济的需求。

发明内容:

[0010] 本发明的目的是采用间接酶联免疫吸附试验的检测技术,建立一种敏感、特异、快速、准确的检测方法,并应用于马动脉炎病毒的检验检疫,以提高检测方法的敏感性、特异性,缩短检测时间,降低检测成本,保护和促进我国畜牧业和对外贸易的发展。

[0011] 本发明是按以下技术方案完成的,其检测方法是:

[0012] 分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性,设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因,构建大囊膜糖蛋白原核表达载体pET-GL1,将pET-GL1质粒转化BL-21宿主菌,高效表达马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白,Western-blot鉴定表达产物,表达产物的大小约为26kD,His-Bind柱纯化蛋白,优化马动脉炎病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验方法的反应条件,并建立结果判断的标准,分析该检测方法的特异性,对待检血清分别用间接酶联免疫吸附试验、病毒中和试验、以及西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒(品牌:INGEZIM-ARTERITIS)这3种方法进行检测,比较检测结果的符合率。

[0013] 分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性:根据GenBank上登陆的马动脉炎病毒Bucyrus的基因序列(NC-002532),应用DNASTAR软件分析大囊膜糖蛋白的抗原性,结果表明大囊膜糖蛋白54Aa-98Aa抗原指数较高。

[0014] 设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因:用Primer 5.0软件设计引物,

目标扩增基因为马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的 54Aa-98Aa 区域。在引物 P1 中加入 Bam HI 酶切位点，引物 P2 中加入 Xho I 酶切位点。引物序列为：

[0015] P1：5' -CGTGGATCCTACAACCTGTTCCGCCAGTAA-3'，划线部分是 Bam HI 酶切位点；

[0016] P2：5' -ATACTCGAGCGGACCATGCGCCTGTTC-3'，划线部分是 Xho I 酶切位点。

[0017] 取病毒悬液，提取总 RNA，进行逆转录反应。取 5 μL 反转录产物为 PCR 模板，进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物，用胶回收试剂盒回收。

[0018] 构建大囊膜糖蛋白原核表达载体 pET-GL1：将回收的目的片段和 pET-32a 质粒分别用 BamHI、Xho I 酶切，用胶回收试剂盒回收纯化的目的产物。将目的片段和载体按用 T₄DNA 连接酶连接。氯化钙法制备 BL21 (DE3) 感受态细胞，转化连接产物。自氨苄 (Amp) 平板上挑取单菌落，接种于 LB 培养基，37℃ 震荡培养 14-16h，碱裂解法提取质粒用 Bam HI 和 Xho I 双酶切鉴定。将阳性质粒命名为 pET-GL1，测序。

[0019] 将 pET-GL1 质粒转化 BL-21 宿主菌，高效表达马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白：将阳性转化菌接种于含 50 μg/mL Amp 的 LB 培养基 37℃ 震荡培养过夜。次日以 2% 的量接种于 2×YT 培养基 (50 μg/mL Amp) 震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4-0.5 时分别加入 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2mmol/L 的 IPTG 进行诱导培养 4h。取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。分别在 30℃ 和 37℃ 的培养条件下用最佳浓度的 IPTG 进行诱导培养 4h。取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。表达产物的大小约为 26kD。

[0020] Western-blot 鉴定表达产物：将经诱导表达的菌液处理进行 SDS-PAGE 电泳后，按《分子克隆实验指南》介绍的方法进行转印及反应，一抗为抗马动脉炎病毒阳性血清，二抗为羊抗马 IgG-HRP。显色用 DAB 试剂。

[0021] His-Bind 柱纯化蛋白：根据 Novagen 公司的 His • Bind® PurificationKit 说明书进行，取不同时间的洗脱液进行电泳鉴定分析。

[0022] 优化马动脉炎病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验方法的反应条件，建立结果判断的标准：进行间接酶联免疫吸附试验方阵滴定，选取某一 P/N (阳性血清 OD 值 / 阴性血清 OD 值) 最大且 P 在 1.0 左右的抗原和血清稀释度，确定抗原最佳包被浓度和抗体适宜稀释倍数。结果表明最佳的抗原最佳稀释倍数为 1 : 40，抗体最佳稀释倍数为 1 : 80，最佳抗原包被浓度为 9.65 μg/mL。结果判断的标准是：当待检血清 OD₄₉₀ > 0.4，且待检血清 OD₄₉₀ / 阴性血清 OD₄₉₀ > 2 时，样品判定为阳性。

[0023] 分析检测方法的特异性：将马动脉炎阳性血清、马动脉炎阴性血清、马鼻肺炎阳性血清、马鼻肺炎阴性血清、马传贫阳性血清、马传贫阴性血清从 1 : 20 开始做倍比稀释，每个样品设 3 个重复，利用间接酶联免疫吸附试验进行检测。

[0024] 与病毒中和试验进行比较：取病毒中和试验检测过的 900 份马血清样品，应用本研究建立的间接酶联免疫吸附试验进行检测，对检测结果作比较分析。

[0025] 与西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒 (品牌：INGEZIM-ARTERITIS) 试剂盒进行比较：将 180 份待检马血清样品分别用西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒 (品牌：INGEZIM-ARTERITIS) 和本研究建立的间接酶联免疫吸附试验进行检测，对检测结果作比较分析。

[0026] 本发明与已有技术对比其特点是：

[0027] 1、通过基因克隆技术获取抗原性较高的目的基因，构建原核表达载体，转化大肠杆菌，可以方便的得到大量质优价廉的重组抗原，与通过细胞增殖病毒提取抗原相比，间接酶联免疫吸附试验与病毒中和试验的符合率达到 94.1%，可以节省大量人力、物力，效率更高，表达产物经过纯化后可以作为检测抗原包被微量板。

[0028] 2、间接酶联免疫吸附试验法可以检测抗体，而酶联免疫吸附试验法检测抗原。

[0029] 3、简便快速。利用该方法，从提取核酸到最后结果判定，仅需要 8 小时。

[0030] 4、结果判定准确，可靠性高。当待检血清 $OD_{490} > 0.4$ ，且待检血清 OD_{490} / 阴性血清 $OD_{490} > 2$ 时，样品判定为阳性。

附图说明：

[0031] 图 1. 马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白分析及目标扩增基因的编码蛋白的抗原性分析：

[0032] A：马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白；B：目标扩增基因的编码蛋白。

[0033] 图 2. 目标基因的扩增及表达载体构建鉴定：

[0034] 1.DL15000；2.BamHI、Xho I 酶切的 pET-GL1；3. 扩增产物；4.DL2000.

[0035] 图 3.IPTG 最佳诱导浓度的确定：

[0036] 1-5.IPTG 浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mmol/L，

[0037] M. 蛋白质分子量标准。

[0038] 图 4 培养温度对表达的影响：

[0039] 1.30℃下 E.coli 孵育 pET-GL1；2.37℃下 E.coli 孵育 pET-GL1；3.37℃下 E.coli 孵育 pET-32a；M. 蛋白质分子量标准。

[0040] 图 5. 表达产物的免疫印迹分析：

[0041] M. 蛋白质分子量标准；1.PET-32a-BL₂₁；2.PET-GL1-BL₂₁

[0042] 图 6. 表达产物的分离与纯化。

[0043] M. 蛋白质分子量标准；1.BL₂₁(PET-32a)；2. 纯化蛋白样品 1；3. 纯化蛋白样品 2；4. 离心后的裂解上清液。

具体实施方式：

[0044] 下面通过实施例结合附图详细叙述本发明的马动脉炎病毒 GL 蛋白间接 ELISA 的检测方法：

[0045] 分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性，设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因，构建大囊膜糖蛋白原核表达载体 pET-GL1，之后将 pET-GL1 质粒转化 BL-21 宿主菌，高效表达马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白，Western-blot 鉴定表达产物，His-Bind 柱纯化蛋白，最后优化马动脉炎病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验方法的反应条件，并建立结果判断的标准，分析该检测方法的特异性，对待检血清分别用间接酶联免疫吸附试验、病毒中和试验、以及西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒（品牌：INGEZIM-ARTERITIS）这 3 种方法进行检测，比较检测结果的符合率。

[0046] 1、分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性：

[0047] 参照 GenBank 上登陆的马动脉炎病毒 Bucyrus 的基因序列 (NC002532), 应用 DNASTar 软件分析大囊膜蛋白的抗原性。具体步骤为:

[0048] (1) 打开 DNASTar 软件包, 选择 “Protean” 程序。

[0049] (2) 在 “Protean” 程序中, 选择 “File” 下拉菜单中的 “New”, 新建一个文件, 并输入大囊膜糖蛋白的序列 (见核苷酸序列表)。

[0050] (3) 在界面显示的信息中, 选取 Antigenic index-Jameson-wolf 指数信息 (见附图 1), 作为分析抗原性的依据。

[0051] 经过分析, 大囊膜糖蛋白 54Aa-98Aa 抗原指数较高, 设计引物扩增该区域的编码基因, 作为目标表达蛋白。选取大囊膜糖蛋白是因为马动脉炎病毒的中和抗体表位主要位于大囊膜糖蛋白上, 分析抗原性的目的是找到抗原指数较高的区域, 以得到较好的抗原。

[0052] 2、设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因:

[0053] 用 Primer 5.0 软件设计一对引物, 目标扩增基因为马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的主要抗原域编码基因, 对应于马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白 GP5163-294bp。在引物 P1 中加入 Bam HI 酶切位点, 引物 P2 中加入 Xho I 酶切位点。引物序列为:

[0054] P1: 5' -CGTGGATCCTACAACCTGTTCCGCCAGTAA-3' (Bam HI),

[0055] P2: 5' -ATACTCGAGCGGACCATGCGCCTGTTC-3' (Xho I)。

[0056] 取 500 μ L 病毒悬液, 按 TripureTM 试剂盒的操作说明提取总 RNA。提取的病毒总 RNA 立即用于 RT-PCR。反转录的体系为病毒总 RNA 9.2 μ L、5 \times Buffer 4 μ L、10mmol/L dNTP 2 μ L、25mmol/L MgCl₂ 0.8 μ L、Rnasin 1.0 μ L 及下游引物 P2 2 μ L。65 $^{\circ}$ C 反应 15min 后取出, 冰浴条件下加入反转录酶 M-MLV 1.0 μ L, 37 $^{\circ}$ C、1h, 94 $^{\circ}$ C、5min 后结束反应, 总体系为 20 μ L。取 5 μ L 反转录产物为 PCR 模板, 按常规体系进行 PCR 扩增, 退火温度为 56 $^{\circ}$ C, 时间为 1min, 共 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用胶回收试剂盒回收。应用设计的引物 RT-PCR 扩增出大小约为 150bp 的片段 (图 2)。

[0057] 3、构建大囊膜糖蛋白原核表达载体 pET-GL1:

[0058] 将回收的目的片段和 pET-32a 质粒分别用 Bam HI、Xho I 酶切, 用胶回收试剂盒回收纯化的目的产物。将目的片段和载体按 3:1 的摩尔比用进行 T4DNA 连接酶进行 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。按《分子克隆实验指南》介绍的氯化钙法制备 BL21 (DE3) 感受态细胞, 并按常规方法转化连接产物。自氨苄 (Amp) 平板上挑取单菌落, 接种于含 50 μ /mL Amp 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 14-16h, 碱裂解法提取质粒用 Bam HI 和 Xho I 双酶切鉴定。将阳性质粒命名为 pET-GL1, 送大连 TaKaRa 公司测序。测序结果表明扩增片段为目的基因, 编码马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白 55 位 Asn 和 97 位 Gly 的密码子 AAT 和 GGA 分别突变为大肠杆菌嗜性密码子 AAC 和 GGT。双酶切鉴定的电泳结果 (图 2) 表明目的片段已成功插入表达载体。在本步骤中应用的表达载体为 pET-32a, 是 Novagen 公司研制的一种新型融合表达载体, 该载体含有转录功能强大的 T7 启动子, 在多克隆位点的上游含有大肠杆菌硫氧还原蛋白的编码基因, 该蛋白可促进目标蛋白的融合表达。

[0059] 4、将 pET-GL1 质粒转化 BL-21 宿主菌, 高效表达马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白:

[0060] 将阳性转化菌接种于含 50 μ /mL Amp 的 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。次日以 2% 的量接种于 2 \times YT 培养基 (50 μ /mL Amp) 震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4-0.5 时分别加入 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2mmol/L 的 IPTG 进行诱导培养 4h。取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。分别在 30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 的培养条件下用最佳浓度的 IPTG 进行诱导培养 4h。取样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。不同浓度的 IPTG 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳的结果 (图 3) 表明, 0.2-1.0mmol/L 的 IPTG 均可有效诱导目标蛋白的表达, 0.8mmol/L 的 IPTG 的诱导效果最佳。表达产物的大小约为 26kD。不同温度条件下的诱导表达结果 (图 4) 表明, 在 30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 条件下目标产物的表达量没有明显的差别, 均可高效表达目标产物。

[0061] 5、Western-blot 鉴定表达产物：

[0062] 将经诱导表达的菌液处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 按《分子克隆实验指南》介绍的方法进行转印及反应, 一抗为抗马动脉炎病毒阳性血清, 二抗为羊抗马 IgG-HRP。显色用 DAB 试剂。经 Western-blot 检测, 在目标条带所处的位置 (26kD 左右) 出现一棕红色印迹 (图 5), 表明表达产物具有良好的抗原性。

[0063] 6、His-Bind 柱纯化蛋白：

[0064] 将发酵的菌体进行超声波裂解, 收集包涵体, 变性液溶解后, 根据 Novagen 公司的 His • Bind® Purification Kit 层析柱纯化说明书进行, 取不同时间的洗脱液进行电泳鉴定分析。见图 6, 目标蛋白有较高的浓度, 尽管存在极少量的杂蛋白, 但目标蛋白占有绝对多的含量, 表明纯化效果达到预期的目的。pET-32a 表达载体的载体阅读框编码了 6 个连续的 His 作为亲和标签, 使得表达的重组蛋白能通过金属离子 (Ni²⁺) 配体亲和层析, 为快速纯化目的蛋白提供了便利的条件。

[0065] 7、优化马动脉炎病毒间接酶联免疫吸附试验的反应条件、建立结果判定标准：

[0066] 根据抗原抗体的某一稀释孔其 OD₄₉₀ 值为 1.0 左右, 且 P/N 最大的原则确定抗原抗体的最佳稀释度。本实验设计如表 1, 结果表明最佳的抗原最佳稀释倍数为 1 : 40, 抗体最佳稀释倍数为 1 : 80, 最佳抗原包被浓度为 9.65 μ g/mL。分析数据、进行结果判断, 是依据如下标准: 当待检血清 OD₄₉₀ > 0.4, 且待检血清 OD₄₉₀/ 阴性血清 OD₄₉₀ > 2 时, 样品判定为阳性。

[0067] 表 1 马动脉炎病毒间接 ELISA 方阵滴定结果

[0068]

抗原 稀释 倍数	阳性血清稀释梯度								阴性血清稀释梯度			
	20	40	80	160	320	640	1280	2460	20	40	80	160
10	2.690	1.791	1.076	0.673	0.382	0.224	0.158	0.064	0.870	0.413	0.291	0.240
20	2.518	1.639	0.979	0.641	0.387	0.233	0.181	0.07	0.539	0.351	0.227	0.197
40	2.896	1.489	1.193	0.754	0.42	0.231	0.171	0.062	0.430	0.288	0.194	0.165
80	2.438	1.083	0.677	0.541	0.305	0.241	0.169	0.068	0.452	0.274	0.182	0.179
160	1.941	0.850	0.553	0.514	0.266	0.235	0.178	0.072	0.083	0.061	0.074	0.066
320	1.700	0.694	0.433	0.391	0.235	0.191	0.162	0.071	0.076	0.065	0.057	0.072
640	1.348	0.517	0.380	0.384	0.207	0.187	0.159	0.088	0.081	0.063	0.052	0.069
1280	1.090	0.500	0.326	0.374	0.202	0.185	0.159	0.082	0.071	0.057	0.067	0.072

[0069] 第 1-8 列 A-H 排为阳性血清；第 9-12 列 A-D 排为阴性血清；第 9-12 列 E-H 排为空白对照。

[0070] 8、分析检测方法的特异性：

[0071] 利用间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎阳性血清、马动脉炎阴性血清、马鼻肺炎阳性血清、马鼻肺炎阴性血清、马传贫阳性血清、马传贫阴性血清。只有马动脉炎阳性血清样品 OD_{490} 值与马动脉炎阴性血清样品 OD_{490} 值的比值远大于 2，其余样品的 OD_{490} 值与马动脉炎阴性血清样品 OD_{490} 值的比值均小于 2。建立的间接酶联免疫吸附试验 A 具有较好的特异性。

[0072] 9、间接酶联免疫吸附试验与病毒中和试验检测结果的比较：

[0073] 应用间接酶联免疫吸附试验对病毒中和试验检测过的 900 份马血清样品进行了检测。结果病毒中和试验检测为阳性的 138 份血清，间接酶联免疫吸附试验结果也全为阳性（待检血清 OD_{490} / 阴性血清 $OD_{490} > 2$ ）；病毒中和试验检测为阴性的 762 份血清中间接酶联免疫吸附试验结果为阴性的为 729 份（待检血清 OD_{490} / 阴性血清 $OD_{490} < 2$ ），但有 53 份为阳性（待检血清 OD_{490} / 阴性血清 $OD_{490} > 2$ ）。在 900 份马血清样品中，病毒中和试验检测阳性率为 15.3%，间接酶联免疫吸附试验检测为阳性的样品有 171 份，阳性率 19%。

[0074] 间接酶联免疫吸附试验与病毒中和试验进行对比发现，在 900 份马血清样品中 iGL1-ELISA 与中和试验的结果相符合的样品为 867 份，两种方法的检测符合率为 94.1%。

[0075] 间接酶联免疫吸附试验结果为阴性的 729 份马血清的 OD_{490} 的平均值为 0.243 ± 0.067 。因此，初步确定间接酶联免疫吸附试验检测结果的阳性标准为：待检血清 $OD_{490} > 0.4$ ，且待检血清 OD_{490} / 阴性血清 $OD_{490} > 2$ 。

[0076] 10、间接酶联免疫吸附试验与西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒（品牌：INGEZIM-ARTERITIS）的比较试验结果

[0077] 对该检测方法与西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒（品牌：INGEZIM-ARTERITIS）试剂盒进行了比较，按照实施例 7 的方法，及西班牙生产的马动

脉炎病毒检测试剂盒（品牌：INGEZIM-ARTERITIS）试剂盒说明书，对 180 份待检血清进行了检测，结果显示，间接酶联免疫吸附试验检测结果的阳性率为 18.3%，西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒（品牌：INGEZIM-ARTERITIS）试剂盒检测结果的阳性率 17.2%。本研究制备的间接酶联免疫吸附试验试剂盒与西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒（品牌：INGEZIM-ARTERITIS）试剂盒的检测符合率为 95.6%（表 2）。

[0078] 表 2 本检测方法与西班牙检测试剂盒比较试验结果

[0079]

检测方法	检测结果	样品数量	血清样品总数
本方法	阳性 (+)	28	180
西班牙马动脉炎病毒检测试剂盒	阳性 (+)		
本方法	阴性 (-)	144	
西班牙马动脉炎病毒检测试剂盒	阴性 (-)		
本方法	阴性 (-)	3	
西班牙马动脉炎病毒检测试剂盒	阳性 (+)		
本方法	阳性 (+)	5	
西班牙马动脉炎病毒检测试剂盒	阴性 (-)		

[0080] 核苷酸序列表

[0081] <110> 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心

[0082] <120> 间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法

[0083] <160>3

[0084] <170>Patent In Version 2.1

[0085] <210>1

[0086] <211>768

[0087] <212>RNA

[0088] <213> 马动脉炎病毒 (Arterivirus SP.)

[0089] <221>CDS

[0090] <222> (11146) ... (11913)

[0091] <400>1

[0092] atgttatcta tgattgtatt gctattcttg ctttggggtg cgccatcaca tgcttacttc 60

[0093] tcatactaca ccgctcagcg cttcacagac ttcacctgt gtatgtgac ggatcgcggc 120

[0094] gttattgcc aattgctgcg atatgatgag cacactgctt tgtacaattg ttcgccagt 180

[0095] aaaacctgtt ggtattgcac attcctggac gaacagatta tcacgtttgg aaccgattgt 240

- [0096] gatgacacct acgcggtecc agttgctgag gtcctggaac aggcgcatgg accgtacagt 300
- [0097] gcgctgtttg atgacatgcc cccttttatt tactatggcc gtgaatcgg catagttgtg 360
- [0098] ttggatgtgt ttatgttcta tcccgttta gttctgtttt tcttatcagt actaccctat 420
- [0099] gtaacgetta ttctgaaat gtgtgtatct attctgttta taatctatgg catttacagc 480
- [0100] ggggcctact tggccatggg catatttgcg gccacgcttg ctatacatc aattgtggtc 540
- [0101] ctccgecaat tactgtgggt atgcctggct tggcgatacc gctgtacgct teacgcgtcc 600
- [0102] ttatatcag ctgaggggaa agtgtacccc gtagacccc gactcccggg tgccgccgtg 660
- [0103] ggcaatcggg tttagtccc aggtaggccc actatcgatt atgcagtggc ctacggcagc 720
- [0104] aaagcaacc ttgtgaggtt gggggcagct gaggtatggg agccatag 768
- [0105] <210>2
- [0106] <211>29
- [0107] <212>DNA
- [0108] <213> 人工序列
- [0109] <220>
- [0110] <223> 根据 PCR 反应要求设计, 用于扩增马动脉炎病毒的正链引物。
- [0111] <400>2
- [0112] CGTGGATCCT ACAACTGTTC CGCCAGTAA 29
- [0113] <210>3
- [0114] <211>27
- [0115] <212>DNA
- [0116] <213> 人工序列
- [0117] <220>
- [0118] <223> 根据 PCR 反应要求设计, 用于扩增马动脉炎病毒的负链引物。
- [0119] <400>3
- [0120] AACTCGAGC GGACCATGCG CCTGTTC 27

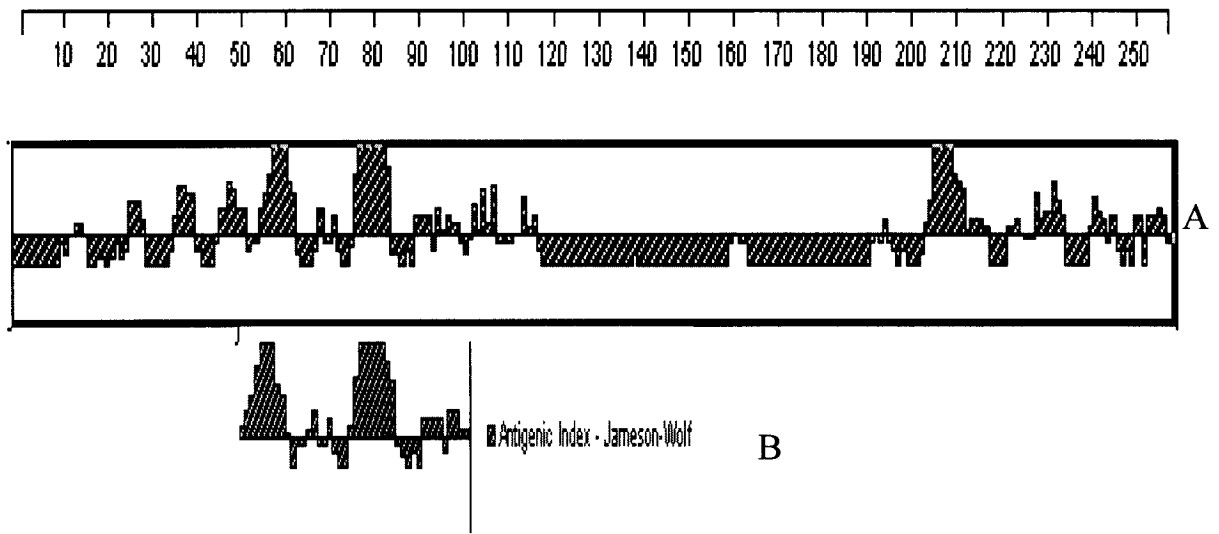


图 1

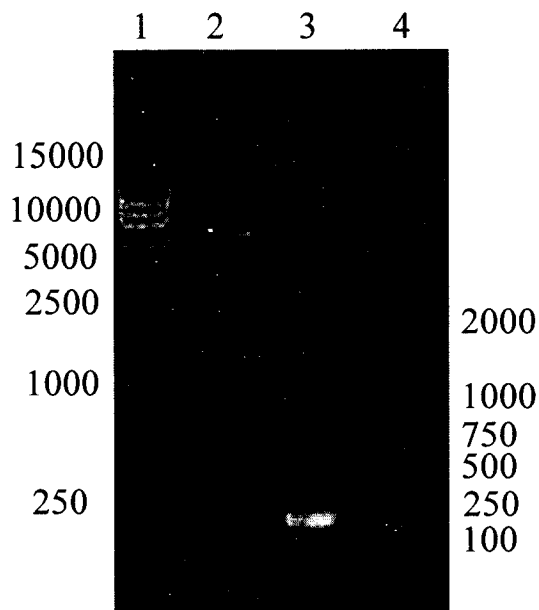


图 2

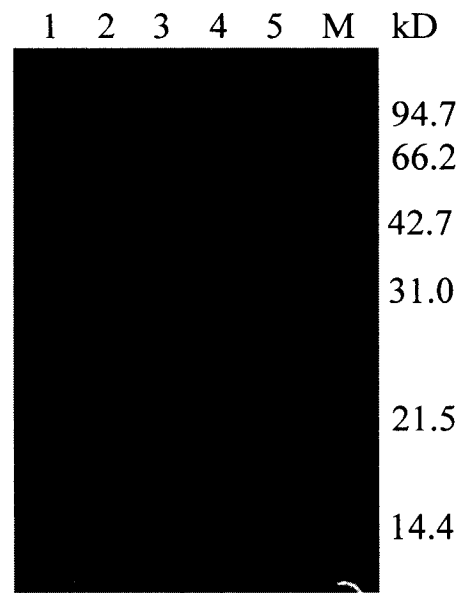


图 3

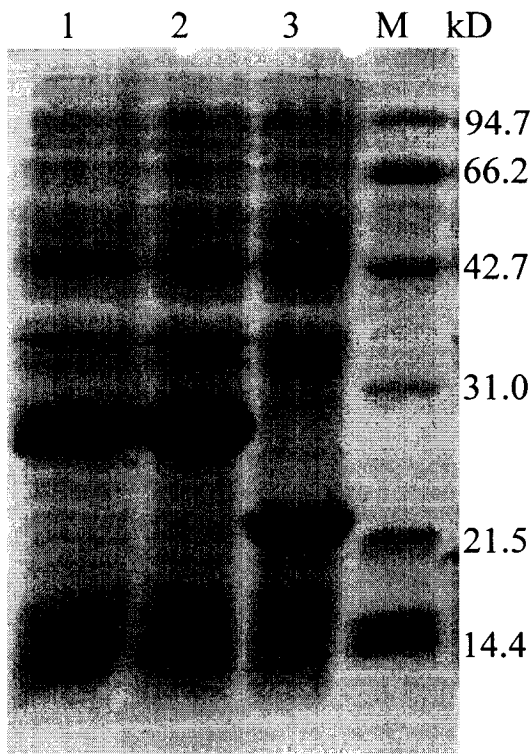


图 4

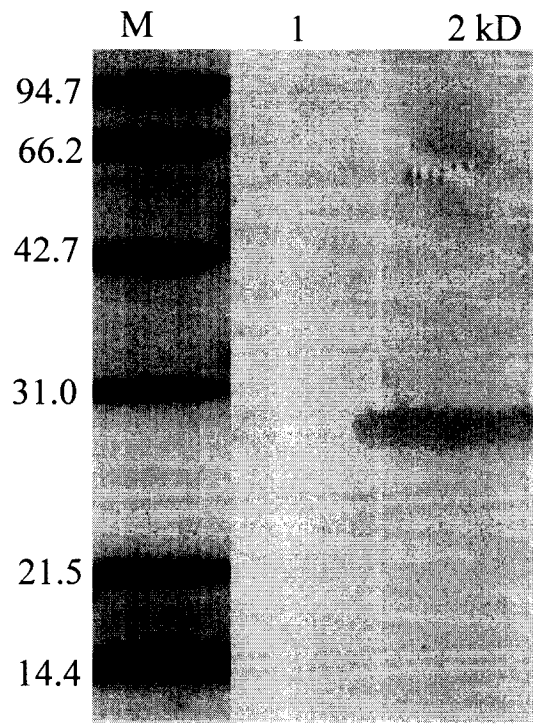


图 5

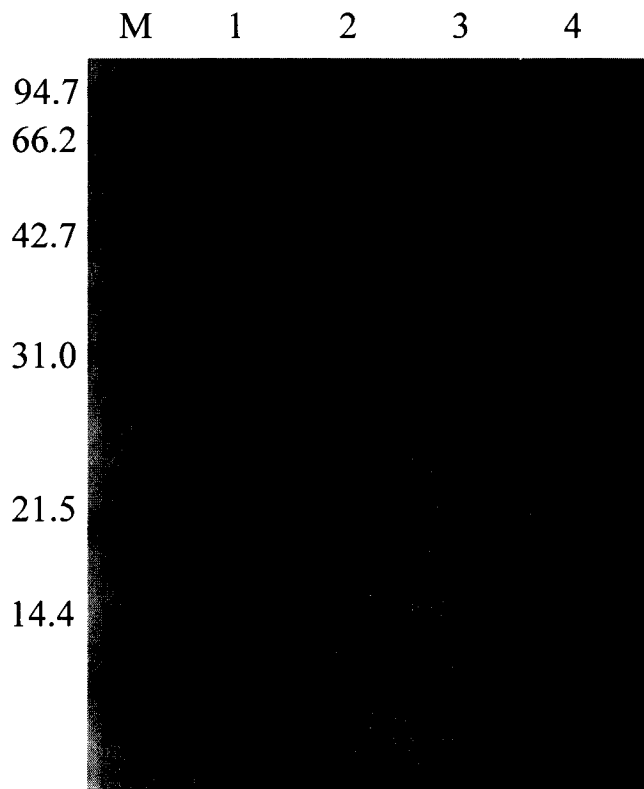


图 6

专利名称(译)	间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法		
公开(公告)号	CN1851463B	公开(公告)日	2011-04-20
申请号	CN200610044437.0	申请日	2006-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	梁成珠 岳志芹 朱来华 高宏伟 吴华		
发明人	梁成珠 岳志芹 朱来华 高宏伟 吴华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
审查员(译)	王晓媛		
其他公开文献	CN1851463A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种间接酶联免疫吸附试验检测马动脉炎病毒的方法，其操作程序是：分析马动脉炎病毒大囊膜糖蛋白的抗原性，设计引物并克隆大囊膜糖蛋白的抗原域编码基因，构建大囊膜糖蛋白表达载体pET-GL1，将pET-GL1质粒转化BL-21宿主菌，高效表达大囊膜糖蛋白，纯化重组大囊膜糖蛋白作为检测抗原，建立了检测马动脉炎病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验。间接酶联免疫吸附试验与病毒中和试验、西班牙生产的马动脉炎病毒检测试剂盒(品牌：INGEZIM-ARTERITIS)的检测结果符合率分别达到94.1%、95.6%。间接酶联免疫吸附试验方法检测马动脉炎病毒，特异性好、灵敏度高，可提高检测效率，降低检测成本，具有很强的推广性和实用性。

抗原 稀释 倍数	阳性血清稀释梯度								阴性血清稀释梯度			
	20	40	80	160	320	640	1280	2460	20	40	80	160
10	2.690	1.791	1.076	0.673	0.382	0.224	0.158	0.064	0.870	0.413	0.291	0.240
20	2.518	1.639	0.979	0.641	0.387	0.233	0.181	0.07	0.539	0.351	0.227	0.197
40	2.896	1.489	1.193	0.754	0.42	0.231	0.171	0.062	0.430	0.288	0.194	0.165
80	2.438	1.083	0.677	0.541	0.305	0.241	0.169	0.068	0.452	0.274	0.182	0.179
160	1.941	0.850	0.553	0.514	0.266	0.235	0.178	0.072	0.083	0.061	0.074	0.066
320	1.700	0.694	0.433	0.391	0.235	0.191	0.162	0.071	0.076	0.065	0.057	0.072
640	1.348	0.517	0.380	0.384	0.207	0.187	0.159	0.088	0.081	0.063	0.052	0.069
1280	1.090	0.500	0.326	0.374	0.202	0.185	0.159	0.082	0.071	0.057	0.067	0.072