



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956987 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810623712.7

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2018.06.15

G01N 33/558(2006.01)

(71)申请人 新兴县国研科技有限公司

地址 527400 广东省云浮市新兴县新城镇
东堤北路5号温氏集团研究院(员工活
动中心)二楼(办公住所)

申请人 温氏食品集团股份有限公司

(72)发明人 苏晓娜 杨金易 周庆丰 蔡新斌
曾道平 李群辉 罗洋洋 李段
陈丽

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 任重

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

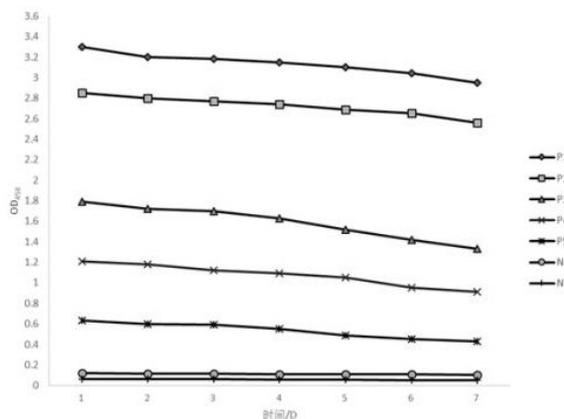
权利要求书1页 说明书12页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

fiber2蛋白及其重组蛋白在检测鸭血清中
鸭2型腺病毒抗体方面的应用

(57)摘要

本发明公开了fiber2蛋白及其重组蛋白在
检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体方面的应用。首
先基于fiber2蛋白获得了能与鸭2型腺病毒特异
性抗体特异结合的重组DAdV-2 fiber2蛋白,并
进一步利用所述重组蛋白作为包被蛋白,建立了
鸭血清样品中鸭2型腺病毒抗体特异性酶联免疫
检测方法和检测试剂盒。该检测试剂盒灵敏度
高、特异性强、稳定性好、能反映中和抗体水平,
用于鸭血清中鸭2型腺病毒抗体的快速检测,具
有操作简单、高特异性、高灵敏度、低成本的特
点,能同时检测大量的样品,通过对鸭群血清样
品的检测,可以实时监控鸭群的整体免疫效果及
中和抗体水平,为该病的诊断和疫苗防控等提供
了有力的基础和支持,具有很好的应用前景。



1. 一种fiber2蛋白,其特征在于,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种重组蛋白DAdV-2 fiber2,其特征在于,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
3. 权利要求2所述重组蛋白DAdV-2 fiber2在检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体方面的应用。
4. 权利要求2所述重组蛋白DAdV-2 fiber2在制备鸭血清中鸭2型腺病毒抗体的检测试剂盒方面的应用。
5. 根据权利要求3或4所述应用,其特征在于,所述检测的方法为酶联免疫检测方法。
6. 根据权利要求5所述应用,其特征在于,所述检测的方法为间接ELISA法。
7. 一种检测鸭血清中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫检测方法,其特征在于,以权利要求2所述重组蛋白DAdV-2 fiber2为包被抗原,利用ELISA法进行检测。
8. 一种检测鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫试剂盒,其特征在于,包括由权利要求2所述重组蛋白DAdV-2 fiber2包被的酶标板。
9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,还包括辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭IgG抗体。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,还包括抗鸭2型腺病毒的阳性血清对照及阴性血清对照、血清样品稀释液、浓缩洗涤液、底物缓冲液、底物液和反应终止液。

fiber2蛋白及其重组蛋白在检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体方面的应用

技术领域

[0001] 本发明属于养殖业疾病防控技术领域。更具体地,涉及fiber2蛋白和其重组蛋白在间接ELISA法检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体方面的应用及检测方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 近年来,我国养鸭业发展迅速,已成为农村经济发展的支柱产业之一。但由于目前我国养鸭业散养户较多,养鸭条件简陋、粗放,环境卫生管理不到位及消毒意识的淡薄等,使鸭病的流行日趋复杂。禽腺病毒(Fowl adenovirus, FAdV)归为腺病毒科(Adenoviridae)禽腺病毒属(Aviadenovirus),根据抗原性差异,分为3个群,其中,I群禽腺病毒(FAdVI)具有共同的群抗原,共12个血清型,广泛存在于多种家禽的眼睛、上呼吸道及消化道内,大多数呈隐性感染或与其他疾病共同作用引起家禽发病或死亡。2015年国内学者陈峰等应用宏基因组学分离、鉴定出国内首株鸭2型腺病毒(Duck adenovirus 3, DAdV-2)。该病近年来在我国南方番鸭群发病率呈上升趋势,引起以严重肝脏肿大、斑驳状出血、白色点状坏死为特征的疾病,俗称肝坏死病,给当前家禽养殖业带来巨大危害。而鸭2型腺病毒导致的鸭病,该病临床上尚无有效的治疗措施,以饲养管理、卫生消毒、疫苗预防和控制种源等防治措施为主。

[0003] 通过对鸭群血清样品中病毒抗体水平的检测,可以实时监控鸭群的整体免疫效果及中和抗体水平,为该病的诊断和疫苗防控等提供有力的工具。可靠的抗体诊断技术在疫苗防控和种源选择等方面起着关键的作用。在疫苗开发及应用过程中,更需要一种能反映中和抗体水平的抗体检测方法。

[0004] 酶联免疫吸附测定(ELISA)是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术。目前,针对I群禽腺病毒的特异性抗体ELISA检测方法进行了广泛的研究,市场上已有荷兰BioChek公司生产的针对I群禽腺病毒特异性抗体开发的ELISA检测试剂盒,用于检测鸡血清中FADVI抗体的含量。该试剂盒的基本技术手段是通过微量板包被FADVI的灭活抗原。将稀释的鸡血清样品加入到微量孔中,样品中FADVI抗体将与包被的抗原形成抗原抗体复合物。非特异性抗体和其它血清蛋白被洗去。将碱性磷酸酶标记的抗鸡抗体加入孔中,与抗原抗体复合物结合,然后再洗去未反应的结合物。PNPP显色剂作为底物被加入,如果FADVI抗体存在,则显黄色。颜色强度直接与样品中的该抗体的量有关。但是该试剂盒只适用于鸡血清中FADVI抗体的含量的检测,不能用于鸭血清的检测。

[0005] 目前,针对鸭2型腺病毒特异性抗体的检测试剂、检测产品和检测方法均研究较少,并无针对DAdV-2抗体检测的商品化试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是克服现有鸭2型腺病毒特异性抗体检测技术的缺陷

和不足,提供一种血清2型鸭腺病毒(DAdV-2)抗体的分子检测方法。即提供了一种fiber2蛋白,基于所述fiber2蛋白,可成功获得能与鸭2型腺病毒特异性抗体特异结合的重组DAdV-2 fiber2蛋白;并进一步基于所述重组蛋白DAdV-2 fiber2作为包被蛋白,建立了鸭血清样品中鸭2型腺病毒抗体特异性酶联免疫检测方法。

[0007] 本发明的目的是提供一种fiber2蛋白。

[0008] 本发明另一目的是提供一种重组蛋白DAdV-2 fiber2。

[0009] 本发明的再一目的是提供一种检测鸭血清中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫检测方法。

[0010] 本发明的再一目的是提供一种检测鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫试剂盒。

[0011] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

一种fiber2蛋白,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] 一种重组蛋白DAdV-2 fiber2,其编码核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0013] 优选地,所述重组蛋白DAdV-2 fiber2的制备方法包括以下步骤:

S1. 原核表达或真核表达:

以SEQ ID NO.1所示fiber2序列,设计特异性引物,上下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示,以DAdV-2病毒株核酸为模板,扩增DAdV-2 fiber2基因完整的开放阅读框,将其克隆至pET-28a原核表达载体,并转化至大肠杆菌BL21(DE3)中进行诱导表达,或将其克隆入昆虫杆状病毒表达系统进行表达;

S2. 蛋白纯化和复性:原核表达获得的重组菌株进行超声处理,离心后提取菌体沉淀进行亲和层析纯化,然后通过梯度透析法复性,获得DAdV-2 fiber2蛋白;或将真核表达获得的细胞及细胞上清进行亲和层析纯化,获得DAdV-2 fiber2蛋白。

[0014] 另外,所述重组蛋白DAdV-2 fiber2在检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体方面的应用,以及在制备鸭血清中鸭2型腺病毒抗体的检测试剂盒方面的应用,均应在本发明的保护范围之内。

[0015] 具体地,所述检测的方法为酶联免疫检测方法,更优选为间接ELISA法。

[0016] 一种检测鸭血清中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫检测方法,是以所述重组蛋白DAdV-2 fiber2为包被抗原,利用ELISA法进行检测。

[0017] 优选地,所述鸭血清中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫检测方法,包括以下步骤:

S1. 以重组DAdV-2 fiber2蛋白为包被抗原,并封闭液封闭微孔表面未吸附位点(以重组DAdV-2 fiber2蛋白为包被抗原包被酶标板,并以含3%明胶的PBST为封闭液封闭微孔表面未吸附位点);

S2. 将待测鸭血清加入(酶标板)包被抗原,待测鸭血清中的抗体与包被抗原反应,形成固相免疫复合物;

S3. 洗涤除去经反应后未结合物质,再加入酶标抗体,固相免疫复合物上的抗体与酶标抗体结合;

S4. 洗涤未结合的酶标抗体,加入预先等体积混合的底物液和底物缓冲液,显色,用终止液终止反应,检测OD值,进行结果判定;

所述结果判定方法:空白对照OD₄₅₀值应<0.05,每个阴性对照孔的OD₄₅₀值应≤ 0.15,阳性对照孔OD₄₅₀值应≥0.8;根据阴性对照孔OD₄₅₀值计算临界值。

[0018] 所述临界值计算方法如下:利用统计学方法计算出阴性对照样品的平均值OD₄₅₀值和标准差(SD),其中所述的阴性对照平均OD₄₅₀值=(阴性对照孔1 OD₄₅₀值+阴性对照2 OD₄₅₀值+阴性对照3 OD₄₅₀值)/3,所述的临界值(C.O.)= 3×SD+阴性对照平均OD₄₅₀值,根据样品OD₄₅₀值对其进行阴阳性判定,所述阴阳性判定标准为:样品OD₄₅₀值≥临界值(C.O.)为DAdV-2抗体阳性,样品OD₄₅₀值<临界值(C.O.)为DAdV-2抗体阴性。

[0019] 一种检测鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫试剂盒,包括由所述重组蛋白DAdV-2 fiber2包被的酶标板。

[0020] 优选地,还包括盒体、酶标板(酶标板孔内包被有能与鸭2型腺病毒特异性抗体特异结合的重组蛋白DAdV-2 fiber2)、辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭IgG抗体、抗鸭2型腺病毒的阳性血清对照及阴性血清对照、血清样品稀释液、浓缩洗涤液、底物缓冲液、底物液和反应终止液。

[0021] 更具体地,所述试剂盒包括以下各组分:

- (1) 酶标板:酶标板孔内包被有所述重组蛋白DAdV-2 fiber2;
- (2) 酶标记物:1:1000稀释的HRP标记的兔抗鸭IgG;
- (3) 阳性血清对照;
- (4) 阴性血清对照;
- (5) 血清样品稀释液:0.2M PB缓冲液;
- (6) 20X浓缩洗涤液:氯化钠8g、磷酸二氢钾0.2g、磷酸氢二钠3g、氯化钾5g、吐温-20 2mL、蒸馏水20 mL;
- (7) 底物缓冲液A:过氧化脲1g,10.3g柠檬酸,35.8g Na₂ HPO₄ · 12 H₂O,吐温-20 100μL,蒸馏水 1000 mL,pH5;
- (8) 底物液B:四甲基联苯胺(TMB)700mg(40mL DMSO溶解),10.3g柠檬酸,蒸馏水 1000 mL,pH2.4;
- (9) 终止液配方:2M 浓硫酸。

[0022] 其中,优选地,所述酶标板是96孔酶标板,本发明实施例中所用酶标板为聚苯乙烯微孔板,包被有能与鸭2型腺病毒特异性抗体特异结合的包被抗原,并封闭微孔表面未吸附位点。

[0023] 优选地,所述酶标抗体(辣根过氧化物标记抗体)为兔抗鸭IgG多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体。

[0024] 优选地,所述阳性血清对照为:经噬斑纯化后DAdV-2型毒株,灭活后通过皮下注射途径免疫10日龄无特定病原番鸭,21天后再经滴口途径感染无特定病原番鸭,二次免疫后14天采集免疫番鸭的血分离的血清,并以血清样品稀释液按1:1000稀释。

[0025] 优选地,所述阴性血清对照为:采集自无特定病原的番鸭血清,并以血清样品稀释液按1:1000稀释。

[0026] 优选地,所述血清样品稀释液为0.2M 磷酸缓冲液,其配方为:Na₂HPO₄ · 12H₂O 57.996g/L及NaH₂PO₄ · 2H₂O 5.928g/L,溶剂超纯水。

[0027] 所述底物缓冲液为含有3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的pH5.0磷酸-柠檬酸

缓冲溶液。

[0028] 所述底物液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液。

[0029] 所述终止液为1mol/L硫酸溶液。

[0030] 另外,所述试剂盒的使用方法,即利用所述试剂盒检测鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的方法,包括如下步骤:

(1)加样:将所需数量的板条固定于板架,每次实验设空白对照1孔(不加任何液体),阳性对照2孔、阴性对照3孔,分别加入阳、阴性对照各100 μ L,其余孔加入用样品稀释液1:1000倍稀释的待测样品100 μ L;

(2)温育:置37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

(3)洗涤:弃去孔内液体,将稀释后的洗液注满各孔,静置30~60秒,弃去孔内洗液,重复洗涤(4次)拍干;

(4)加酶:空白对照孔不加酶标记物,其余孔加入酶标记物100 μ L;

(5)温育:置37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

(6)洗涤:弃去孔内液体,将稀释后的洗液注满各孔,静置30~60秒,弃去孔内洗液。重复洗4次后拍干;

(7)显色:取适量底物缓冲液和底物液1:1震荡混匀,每孔加入100 μ L,置37 $^{\circ}$ C温育10分钟;

(8)终止:每孔加入终止液50 μ L,轻拍混匀;

(9)读值:用酶标仪读值,在单波长450nm(须以空白对照孔调零)或双波长 450nm/620nm下读取各孔OD₄₅₀值;进行结果判定;

结果判定:空白对照OD₄₅₀值应<0.05,每个阴性对照孔的OD₄₅₀值应 \leq 0.15,阳性对照孔OD₄₅₀值应 \geq 0.8。根据阴性对照孔OD₄₅₀值计算临界值。

[0031] 所述临界值计算方法如下:利用统计学方法计算出阴性对照样品的平均值OD₄₅₀值和标准差(SD),其中所述的阴性对照平均OD₄₅₀值=(阴性对照孔1 OD₄₅₀值+阴性对照2 OD₄₅₀值+阴性对照3 OD₄₅₀值)/3,所述的临界值(C.O.)= 3 \times SD+阴性对照平均OD₄₅₀值,根据样品OD₄₅₀值对其进行阴阳性判定,所述阴阳性判定标准为:样品OD₄₅₀值 \geq 临界值(C.O.)为DAdV-2抗体阳性,样品OD₄₅₀值<临界值(C.O.)为DAdV-2抗体阴性。

[0032] 本发明具有以下有益效果:

本发明以原核表达系统或真核表达系统表达的鸭2型腺病毒 fiber2 重组蛋白为基础,研制灵敏度高、特异性强、稳定性好、能反映中和抗体水平的ELISA抗体检测试剂盒,用于鸭血清中鸭2型腺病毒抗体的快速检测。

[0033] 首先,本发明对DAdV-2 fiber2 蛋白的选择和制备进行了科学的研究和设计,以原核表达系统或真核表达系统获得纯化的重组鸭2型腺病毒 fiber2蛋白,并通过番鸭的攻毒保护试验,结果证明该重组蛋白DAdV-2 fiber2与DAdV-2诱发机体产生中和抗体有关。将纯化的重组蛋白DAdV-2 fiber2作为包被抗原,利用HRP标记的兔抗鸭IgG作为酶标抗体成功建立了灵敏度性、特异性、稳定性很好的间接ELISA法检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体的检测方法,填补了针对鸭 2型腺病毒特异性抗体的检测试剂、检测产品和检测方法的空白。

[0034] 本发明进一步开发的DAdV-2 ELISA抗体检测试剂盒,能够特异性检测鸭血清中的抗DAdV-2 IgG,且与血清中的中和抗体水平相关性好,具有很好特异性和灵敏性,检测时间

短,能同时检测大量的样品,而且本发明试剂盒保存时间长,稳定性好。本发明对解决大批量样品鸭血清中的鸭2型腺病毒抗体检测具有重要的现实意义,通过对鸭群血清样品的检测,可以实时监控鸭群的整体免疫效果及中和抗体水平,为该病的诊断和疫苗防控等提供了有力的基础和支持。

附图说明

[0035] 图1为本发明检测鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫试剂盒的保存稳定性试验结果。

具体实施方式

[0036] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。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。

[0037] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0038] 实施例1 DAdV-2 fiber2 蛋白的选择和制备

1、经过分析,hexon、penton和fiber是主要结构蛋白,构成了鸭2型腺病毒的核衣壳。DAdV-2具有两条纤维,分别为一条长的纤维(fiber1)和一条短的纤维(fiber2)。其中fiber2对病毒的增殖、组装或扩散某个阶段是必要的,缺少fiber2不能产生病毒粒子。纤维上有主要的种特异性抗原决定簇和次要的亚属特异性抗原决定簇。纤维蛋白可识别细胞膜上的特异性受体,即病毒颗粒通过纤维蛋白与细胞受体结合,从而引起感染。另外,纤维蛋白还具有抗原性。

[0039] 本发明基于fiber2蛋白,利用原核表达和真核表达两种获得方法制备重组蛋白DAdV-2 fiber2:(1)原核表达:将fiber2序列克隆入pET-28a原核表达载体中,转化BL21(DE3)大肠杆菌中,通过蛋白的诱导表达和纯化,获得重组表达的DAdV-2 fiber2蛋白,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2;(2)真核表达:采用昆虫杆状病毒表达系统对DAdV-2 fiber2 蛋白进行表达,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2。将这两种蛋白分别作为诊断抗原建立DAdV-2间接ELISA抗体检测方法。

[0040] 2、蛋白制备

(1)本发明2013-2017年对血清2型DAdV进行流行病学监控,通过病毒分离、fiber2序列测定、序列同源性及进化分析等对该病毒的fiber2变异情况进行分析,筛选出目标病毒株,以该病毒株fiber2蛋白碱基序列为目标fiber2蛋白碱基序列,如SEQ ID NO.1所示。

[0041] (2)原核表达或真核表达:

以上述fiber2序列作为参考,设计特异性引物,核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4,上下游引物中分别含有BamHI和HindIII酶切位点。以筛选出的DAdV-2病毒株核酸为模板,扩增DAdV-2 fiber2基因完整的开放阅读框,反应体系为:Taq酶10 μ L,上游引物0.5 μ L,下游引物0.5 μ L,模板1 μ L,超纯水8 μ L,将以上反应体系混匀离心,置于PCR扩增仪中按照以下程序进行扩增:94 $^{\circ}$ C预变性4 min;94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸40 s,共进行30个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸7 min。随后进行原核表达或杆状病毒真核表达:其一,将PCR产物进行胶回收纯化后与pET-28a载体共同使用BamHI和HindIII进行双酶切,将酶切后的线性

pET-28a及fiber-2基因片段再次进行胶回收纯化,随后将带有BamHI和HindIII fiber-2片段及pET-28a载体进行连接,获得pET-28a-fiber2重组质粒,并转化至大肠杆菌BL21 (DE3)中,具体步骤按照感受态细胞转化使用说明书进行,将序列测定正确的重组菌种接种于LA液体培养基中,置于37℃恒温摇床200r/min振荡培养过夜,将培养过夜的菌液按1:100比例接种于100mL LA液体培养基中,置于37℃恒温摇床200r/min振荡培养2h。当菌液OD600值达到0.4-0.6时,在菌液中加入IPTG至其终浓度至0.6mM,并将其置于30℃恒温摇床200r/min振荡培养3h;其二,或将其克隆入pFastBac杆状病毒载体,随后转化DH10Bac感受态细胞获得重组质粒rBacmid-fiber2,将重组质粒转染Sf9细胞获得重组杆状病毒rB-fiber2,并进行诱导表达,具体操作步骤按照Bac-to-Bac® 杆状病毒表达系统使用说明书进行。

[0042] (3) 蛋白纯化和复性:

原核表达获得的重组菌株进行超声处理(功率400 W,工作4 sec,间歇8 sec,共20 min),离心后(4℃,12000r/min 30min)提取菌体沉淀进行亲和层析纯化,具体操作步骤按照His-tag包涵体蛋白纯化试剂盒说明书进行操作,然后通过梯度透析法复性,将纯化后的重组fiber-2蛋白放入即用型透析袋中,用夹子将两端夹紧。浸于含有6M尿素的PBS溶液中,4℃透析12h。再更换溶液为含4M尿素的PBS溶液、2M尿素的PBS溶液及PBS中,透析时间不变。透析后吸出可溶性fiber-2蛋白,获得DAdV-2 fiber2蛋白;或将真核表达获得的细胞及细胞上清进行亲和层析纯化,具体操作步骤按照His-tag可溶性蛋白纯化试剂盒说明书进行操作,获得重组DAdV-2 fiber2蛋白,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0043] 实施例2 动物攻毒保护试验

1、实验材料

实验动物:1日龄无攻毒任何疫苗的番鸭75只。

[0044] 免疫疫苗:DAdV-2全病毒灭活苗,重组DAdV-2 fiber2蛋白亚单位油苗,hexon蛋白亚单位油苗,PBS作为对照。

[0045] 攻毒毒株:DAdV-2病毒液,PBS作为对照。

[0046] 2、实验方法

免疫日龄:10日龄。

[0047] 攻毒日龄:8日龄。

[0048] 试验动物共分为灭活苗、重组DAdV-2 fiber2、hexon、免疫空白对照组及空白对照组,每组15只,于10天龄进行免疫,于免疫后1周进行攻毒。其中攻毒对照组以PBS作为免疫对照,空白组以PBS作为攻毒和免疫对照。攻毒后逐日观察并记录鸭只的精神状态、饮食、饮水情况,发病和病死情况。

[0049] 3、实验结果

攻毒后第8天,各组存活率如表1所示。

[0050] 表1

组别	存活率
灭活苗	90%
重组 DAdV-2 fiber2	100%
hexon	40%
攻毒对照组	0%
空白对照组	100%

根据动物攻毒保护试验结果,重组DAdV-2 fiber2亚单位疫苗能使机体产生对DAdV-2的有效保护力,且效果优于全病毒灭活苗及hexon亚单位疫苗,这说明重组DAdV-2 fiber2蛋白与诱导机体产生中和抗体有关,与临床保护力密切相关。

[0051] 实施例3 DAdV-2 抗体酶联免疫检测方法的构建

基于实施例1获得的重组蛋白DAdV-2 fiber2,构建了鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫检测方法,包括如下步骤:

(1)以重组DAdV-2 fiber2蛋白为包被抗原,并封闭液封闭微孔表面未吸附位点(以重组DAdV-2 fiber2蛋白为包被抗原包被酶标板,并以含3%明胶的PBST为封闭液封闭微孔表面未吸附位点);

(2)将待测鸭血清加入(酶标板)包被抗原,待测鸭血清中的抗体与包被抗原反应,形成固相免疫复合物;

(3)洗涤除去经反应后未结合物质,再加入酶标抗体,固相免疫复合物上的抗体与酶标抗体结合;

(4)洗涤未结合的酶标抗体,加入预先等体积混合的底物液和底物缓冲液,显色,用终止液终止反应,检测OD值,进行结果判定。

[0052] 所述结果判定方法:空白对照OD₄₅₀值应<0.05,每个阴性对照孔的OD₄₅₀值应≤0.15,阳性对照孔OD₄₅₀值应≥0.8;根据阴性对照孔OD₄₅₀值计算临界值。

[0053] 所述临界值计算方法如下:利用统计学方法计算出阴性对照样品的平均值OD₄₅₀值和标准差(SD),其中所述的阴性对照平均OD₄₅₀值=(阴性对照孔1 OD₄₅₀值+阴性对照2 OD₄₅₀值+阴性对照3 OD₄₅₀值)/3,所述的临界值(C.O.)=3×SD+阴性对照平均OD₄₅₀值,根据样品OD₄₅₀值对其进行阴阳性判定,所述阴阳性判定标准为:样品OD₄₅₀值≥临界值(C.O.)为DAdV-2抗体阳性,样品OD₄₅₀值<临界值(C.O.)为DAdV-2抗体阴性。

[0054] 实施例4 DAdV-2 抗体检测试剂盒的组建

基于实施例3的酶联免疫检测方法,构建了试剂盒鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的酶联免疫检测试剂盒,包含如下组分(以真核表达DAdV-2 fiber2 蛋白作为包被抗原为例):

- (1)酶标板:酶标板孔内包被有重组蛋白DAdV-2 fiber2;
- (2)酶标记物:1:1000稀释的HRP标记的兔抗鸭IgG;
- (3)阳性血清对照;
- (4)阴性血清对照;

(5) 血清样品稀释液:0.2M PB缓冲液;

(6) 20X浓缩洗涤液:氯化钠8g、磷酸二氢钾0.2g、磷酸氢二钠3g、氯化钾5g、吐温-20 2mL、蒸馏水20 mL;

(7) 底物缓冲液A:过氧化脲1g,10.3g柠檬酸,35.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,吐温-20 100 μL ,蒸馏水 1000 mL,pH5;

(8) 底物液B:四甲基联苯胺(TMB)700mg(40mL DMSO溶解),10.3g柠檬酸,蒸馏水 1000 mL,pH2.4;

(9) 终止液配方:2M 浓硫酸。

[0055] 其中,所用酶标板为96孔酶标板,为聚苯乙烯微孔板,包被有能与鸭2型腺病毒特异性抗体特异结合的包被抗原,并封闭微孔表面未吸附位点。

[0056] 所述酶标抗体(辣根过氧化物标记抗体)为兔抗鸭IgG多克隆抗体、单克隆抗体或基因工程抗体,购自KPL公司。

[0057] 所述阳性血清对照为:经噬斑纯化后DAdV-2型毒株,灭活后通过皮下注射途径免疫10日龄无特定病原番鸭,21天后再经滴口途径感染无特定病原番鸭,二次免疫后14天采集免疫番鸭的血分离的血清,并以血清稀释液按1:1000稀释。

[0058] 所述阴性血清对照为:采集自无特定病原的番鸭血清,并以血清稀释液按1:1000稀释。

[0059] 所述血清样品稀释液为0.2M 磷酸缓冲液,其通过称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 57.996g及 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.928g,加入900mL超纯水溶解后,定容至1000mL获得

所述底物缓冲液为含有3,3,5,5-四甲基联苯胺或邻苯二胺的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液。

[0060] 所述底物液为含有过氧化氢或过氧化脲的pH5.0磷酸-柠檬酸缓冲溶液。

[0061] 所述终止液为1mol/L硫酸溶液。

[0062] 实施例5 试剂盒使用方法及结果计算

以真核表达DAdV-2 fiber2蛋白作为包被抗原为例,实施例4所构建试剂盒的使用方法,即利用所述试剂盒检测鸭血清样品中鸭2型腺病毒特异性抗体的方法,首先待测血清前处理后,用血清稀释液1:1000倍稀释备用;取出试剂盒,在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下平衡30分钟备用;20X的浓缩洗液按所需量稀释成1X备用,阴性对照血清做三个重复,阳性血清做两个重复,加入100mL已稀释好的待检血清。

[0063] 具体地包括如下步骤:

(1) 加样:将所需数量的板条固定于板架,每次实验设空白对照1孔(不加任何液体),阳性对照2孔、阴性对照3孔,分别加入阳、阴性对照各100 μL ,其余孔加入用样品稀释液1:1000倍稀释的待测样品100 μL ;

(2) 温育:37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min;

(3) 洗涤:倒出孔中的液体,用稀释好的PBST洗4次(注满各孔静置30~60秒,弃去孔内洗液;重复洗4次);

(4) 加酶:将酶标板倒置在吸水纸上拍干;加入酶标记物100 μL ;空白对照孔不加酶标记物;

(5) 温育:37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min;

(6) 洗涤: 倒出孔中的液体, 用PBST洗板4次(注满各孔静置30~60秒, 弃去孔内洗液; 重复洗4次), 拍干;

(7) 显色: 取底物缓冲液和底物液等体积混匀, 每孔加100 μ L, 在暗处37 $^{\circ}$ C显色10分钟;

(8) 终止: 每孔加入50 μ L的终止液终止反应;

(9) 读值: 用酶标仪读值, 酶标仪上测定各孔在波长为450nm(须以空白对照孔调零)处的OD值。

[0064] (10) 结果计算: 用所建立的间接ELISA方法检测30份阴性血清, 血清用血清稀释液作1:1000稀释, 100 μ L/孔, 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30份血清OD₄₅₀平均值和标准差。

[0065] 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0.2, 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 \geq 0.2, 判为阳性, 反之为阴性。

[0066] 具体地, 结果判定方法如下: 空白对照OD₄₅₀值应 $<$ 0.05, 每个阴性对照孔的OD₄₅₀值应 \leq 0.15, 阳性对照孔OD₄₅₀值应 \geq 0.8。根据样品OD₄₅₀值对其进行阴阳性判定, 所述阴阳性判定标准为: 样品OD₄₅₀值 \geq 0.2为DAdV-2抗体阳性, 样品OD₄₅₀值 $<$ 0.2为DAdV-2抗体阴性。

[0067] 实施例5 试剂盒保存期稳定性实验

1、以真核表达DAdV-2 fiber2蛋白作为包被抗原为例。将DAdV-2抗体检测试剂盒中的抗原包被ELISA板和酶标记物, 置37 $^{\circ}$ C恒温箱中加速老化, 将其余成分仍放于4 $^{\circ}$ C。抗原包被ELISA板和酶标记物于37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d后, 依次取出继续保存于4 $^{\circ}$ C。当抗原包被ELISA板和酶标记物于37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置至第9d后, 取出所有之前保存于4 $^{\circ}$ C的抗原包被ELISA板和酶标记物, 对背景已知的6份被检血清(4份阳性血清P1、P2、P3、P4、P5, 2份阴性血清N1、N2)进行检测, 以判断抗原包被ELISA板和酶标记物的保存情况。保存期测定结果如图1所示。

[0068] 从结果可知抗原包被ELISA板和酶标记物在37 $^{\circ}$ C恒温箱中放置7d, 其检测结果数值仍较稳定, 说明试剂盒中的酶标抗原在37 $^{\circ}$ C恒温箱中可保存一周, 即相对于4 $^{\circ}$ C能保存一年。

[0069] 实施例6 试剂盒特异性实验

以真核表达DAdV-2 fiber2蛋白作为包被抗原为例。用纯化的重组DAdV-2 fiber2蛋白以10倍的反应浓度与DAdV-2阳性血清混合, 进行阻断试验。重组DAdV-2 fiber2蛋白吸附阳性血清后, 所测抗体的OD₄₅₀值显著降低, (N-P)/N的值均大于0.5, 阻断阳性。阻断试验的结果表明, 以重组DAdV-2 fiber2蛋白为抗原建立的间接ELISA具有较好的特异性。

[0070] $(N-P)/N = (\text{未阻断孔OD值} - \text{阻断孔OD值}) / \text{未阻断孔OD值}$ (此比值大于0.5即判为阻断阳性)。

[0071] 用纯化的fiber2蛋白包被酶标板, 在同一条件下, 分别对鹅细小病毒(GPV)、番鸭细小病毒(MDPV)、鸭呼肠孤病毒(DRV)、禽肺病毒(APV)的标准鸭阳性血清等, 进行交叉试验。鸭2型腺病毒阳性血清ELISA试验P/N值较高, 在10.0以上, 而与鹅细小病毒、番鸭细小病毒、鸭呼肠孤病毒、禽肺病毒的标准鸭阳性血清反应的P/N值则比较低, 均在2.0以下。

[0072] 表2

被检样品	DAdV-2	GPV	MDPV	DRV	APV
P/N	12.1	1.12	1.41	1.72	1.12

结果说明,本发明建立的双抗原夹心ELISA对鸭2型腺病毒具有较好的特异性(表2所示)。根据阻断试验和交叉试验结果可知该试剂盒其特异性较好,可用于鸭2型腺病毒的血清学诊断。

[0073] 实施例7 试剂盒敏感性实验

以真核表达DAdV-2 fiber2蛋白作为包被抗原为例。选择保存的1份强阳性血清(S1)、1份中等阳性血清(S2)、2份弱阳性血清(S3、S4),一份阴性血清S5,分别进行倍比稀释(25~6400),设置重复孔,按优化的ELISA方法进行检测,读取其OD₄₅₀值。

[0074] 表3

样品	血清稀释倍数								
	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400
S1	2.633	2.553	2.425	2.246	2.125	2.930	1.435	0.942	0.542
S2	1.543	1.203	1.054	0.830	0.533	0.274	0.203	0.112	0.065
S3	1.087	0.746	1.053	0.738	0.472	0.170	0.142	0.065	0.037
S4	0.840	0.503	0.440	0.321	0.229	0.163	0.130	0.040	0.033
S5	0.132	0.118	0.072	0.035	0.019	0.002	0.003	0.001	0.001

由表3可见,强阳性血清经6400倍稀释,中等阳性血清经1600倍稀释,弱阳性血清经800倍稀释,OD₄₅₀值均大于0.15,而阴性样品经25~6400倍稀释,OD₄₅₀值均小于0.15,表明该方法具有良好的敏感性。

[0075] 实施例8 与中和试验符合率比较

以真核表达DAdV-2 fiber2蛋白作为包被抗原为例。将建立的fiber2蛋白ELISA方法与病毒中和试验对150份临床血清进行检测。结果如表4所示。

[0076] 表4

方法	病毒中和试验	fiber2-ELISA
检测样品数	150	150
阳性数	78	75
阴性数	72	75
共同阳性数	74	
共同阴性数	70	
阳性符合率	74/78=94.8%	
阴性符合率	70/72=97.2%	
总符合率	144/153=94.1%	

由结果可以看出,本发明所建立的间接ELISA方法与病毒中和试验的阳性符合率为94.8%,阴性符合率为97.2%,两者总符合率为94.1%。

[0077] 实施例9 与荷兰BioChekI群禽腺病毒抗体ELISA 试剂盒符合率比较

以真核表达DadV-2 fiber2蛋白作为包被抗原为例。将建立的fiber2蛋白ELISA方法对150份临床血清进行检测,结果与荷兰BioChekI群禽腺病毒抗体ELISA 试剂盒比较。结果如表5所示。

[0078] 表5

方法	Biochek	fiber2-ELISA
检测样品数	150	150
阳性数	98	75
阴性数	52	75
共同阳性数	75	
共同阴性数	52	
阳性符合率	75/98=76.5%	
阴性符合率	52/75=69.3%	
总符合率	127/172=73.8%	

由结果可以看出,本发明所建立的间接ELISA方法与BioChekI群禽腺病毒抗体ELISA试剂盒的阳性符合率为76.5%,阴性符合率为69.3%,两者总符合率为73.8%。

[0079] 实施例10 鸭2型腺病毒新型抗体检测试剂盒的包装规格设计

对本发明所建立的酶联免疫试剂盒进行包装规格设计,利于实现该试剂盒的产业化和实际检测的方便应用。本发明所建立的酶联免疫试剂盒方法按照以下规格进行产品组装:产品规格:96孔/板,5板/盒,产品组分如表6所示:

表6

1	抗原包被板 8孔×12	96孔×5
2	阴性对照血清	2ml×1瓶
3	阳性对照血清	2ml×1瓶
4	样品稀释液	400ml×1瓶
5	酶标记物	80ml×1瓶
6	20倍浓缩洗液	100ml×1瓶
7	底物液	40ml×1瓶
8	底物缓冲液	40ml×1瓶
9	终止液	40ml×1瓶
10	封口袋	5个
11	封板膜	10片
12	使用说明书	1份

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> 新兴县国研科技有限公司、广东温氏食品集团股份有限公司

<120> fiber2蛋白及其重组蛋白在检测鸭血清中鸭2型腺病毒抗体方面的应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1443

<212> DNA

<213> fiber2蛋白编码核苷酸序列(fiber2 nucleotide sequence)

<400> 1

```

atgaaacgga ccaacagatc agacaatggt gaaggattca caaagcgtgc gaagattcag 60
gcatctgctt ctgcgacaat cgacctaaca tatccagtct gggagcaagc ttcgagtcgc 120
aaccgcgataa atcctccgat tgtcaccgaa ccaactgtatg atgacaacgg gtatcttaac 180
gtaagaacat ccgaccgat aagaaccgtt ggtaacagcc tcagcctact gtacgatgat 240
tcgctagctg tgacaagtgg caaactaggc gttaaaatcg acccaaacgg gcctctagat 300
gagtcgcccg ctggactcag tttagctcta ggagacggtc ttgaagaaga cgagttcaca 360
ggtttatctg taaaaccaga tccacgtggc cctatcgaag tgtcagatga aggagtgggt 420
atagcctatg atacagaaac catgtcaata acatcaatgc aaccaaattc acagatgact 480
ctcgggtgtac gactaaacc cgatggtgca ctacacagta acaacggatt agatgtaaaa 540
attgatgatg atgcgttgat agtcagcgac gaaggcctaa cagtactcgt tagtgaaagc 600
gggccactta caatcgacc tggcaaagga ctggatattg atatcgatca atcactctcc 660
gttagaacta atcctcaagg agagaaagag ttaggcatca acatcatccc cacatcgtgc 720
ataacactag acaacggagg cctcgacctc aaggtggacc caggaagcct ggccgtcact 780
gacaataccc tacacctcac aagctcatac tcaacctatg tctttacgag tggatctgac 840
acacttcaga agacacaagc ccaagtgtgc tgcggagcag ggtctgttac gtttccgtgc 900
gcatacaatg ccaagatcgt atgctcaaac aagttgtctt caggatatat aacactgaag 960
gtgagcgctg aggatgcatc acatgctgta gatcaacgct tcgcgactat tcaaccagta 1020
ttcacattct ggttatgtcg agacatattg aatgaaaaca cegtcaattt ttcccactgt 1080
accaacaaca gttataagcc agaggaaacc gcagtcgta aggcatgcat cacaccagca 1140
tacaanaaatt ttgatgtcag caatgtttca gaacatgact ttattctgta taactatagt 1200
ggggtaaaca catcaggagt tccaatagcc acagggaaacc taaagaatgt gtatgattac 1260
gtatcaagat tctccatagc ccaagtatca ggaagcccca catcaccaca attaactttt 1320
acaatagaac ttaataagat agatcaatct tcgtactatc tgtacaaaca aggcacaact 1380
ggatgatatta tttttgggtcc aattccattt tcgtacgtta gcaaccatc aatgttaat 1440
tag 1443

```

<210> 2

<211> 1464

<212> DNA

<213> 重组蛋白DAdV-2 fiber2编码核苷酸序列 (Recombinant protein DAdV-2 fiber2 nucleotide sequence)

<400> 2

```

atgaaacgga ccaacagatc agacaatggt gaaggattca caaagcgtgc gaagattcag 60
gcatctgctt ctgcgacaat cgacctaca tatccagtct gggagcaagc ttcgagtcgc 120
aaccggataa atcctccgat tgtcaccgaa cactgtatg atgacaacgg gtatcttaac 180
gtaagaacat ccgacccgat aagaaccgtt ggtaacagcc tcagcctact gtacgatgat 240
tcgctagctg tgacaagtgg caaactaggc gttaaaatcg acccaaacgg gcctctagat 300
gagtcgcccc ctggactcag tttagctcta ggagacggtc ttgaagaaga cgagttcaca 360
ggtttatctg taaaaccaga tccacgtggc cctatcgaag tgtcagatga aggagtgggt 420
atagcctatg atacagaaac catgtcaata acatcaatgc aaccaaattc acagatgact 480
ctcgggttac gactaaacct cgatggtgca ctacacagta acaacggatt agatgtaaaa 540
attgatgatg atgcgttgat agtcagcgac gaaggcctaa cagtactcgt tagtgaaagc 600
gggccactta caatcgacct tggcaaagga ctggatattg atatcgatca atcactctcc 660
gttagaacta atcctcaagg agagaaagag ttaggcatca acatcatccc cacatcgtgc 720
ataacactag acaacggagg cctcgacctc aaggtggacc caggaagcct ggccgtcact 780
gacaataccc tacacctcac aagctcatac tcaacctatg tctttacgag tggatctgac 840
acacttcaga agacacaagc ccaagtgtgc tgcggagcag ggtctgttac gtttccgtgc 900
gcatacaatg ccaagatcgt atgctcaaac aagttgtctt caggatatat aacctgaag 960
gtgagcgctg aggatgcatc acatgctgta gatcaacgct tcgcgactat tcaaccagta 1020
ttcacattct gggtatgtcg agacatattg aatgaaaaca ccgtcaattt ttcccactgt 1080
accaacaaca gttataagcc agaggaaacc gcagtcgtta aggcatgcat cacaccagca 1140
tacaanaaatt ttgatgtcag caatgtttca gaacatgact ttattctgta taactatagt 1200
ggggtaaaca catcaggagt tccaataggc acagggaaacc taaagaatgt gtatgattac 1260
gtatcaagat tctccatagc ccaagtatca ggaagcccca catcaccaca attaactttt 1320
acaatagaac ttaataagat agatcaatct tcgtactatc tgtacaaaca aggcaaac 1380
ggtgatatta tttttgtcc aattccattt tcgtacgta gcaaccatc aatgttaat 1440
tagcatcatc atcatcatca ttaa 1464

```

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 上游引物 (forward primer)

<400> 3

```
ctaggatcca tgaacggac caacag 26
```

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> 下游引物 (reverse primer)

<400> 4

caggaagctt aatgatgatg atgatgatgc t 31

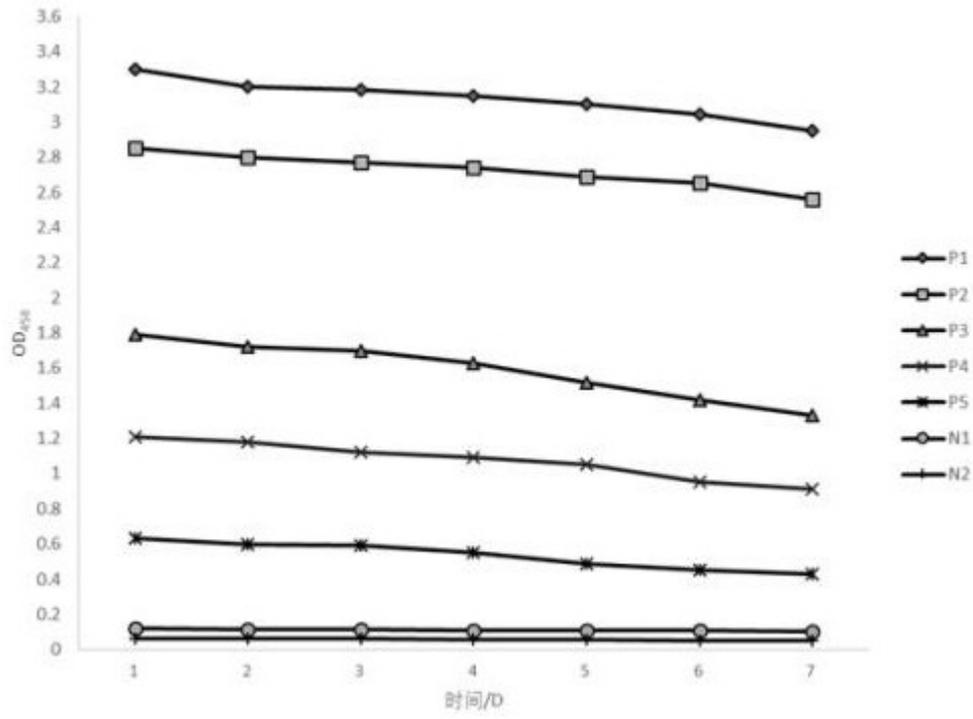


图1

