



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104865380 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201510273815.1

(22)申请日 2015.05.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104865380 A

(43)申请公布日 2015.08.26

(73)专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 孙凌霜 远立国 李守军

(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 林丽明

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

US 2015/0023983 A1, 2015.01.22, 说明书
第0024段.

CN 104109656 A, 2014.10.22,

GenBank.Rhodococcus equi Eq21C

plasmid virulence associated protein A

(vapA) gene, complete cds.《NCBI》.2014,

Melissa T.Hines et al..Immunity to
Rhodococcus equi: antigen-specific recall
responses in the lungs of adult horses.

《Veterinary Immunology and
Immunopathology》.2001,第79卷(第1-2期),

J.F.PRESCOTT et al..Use of a
virulence-associated protein based
enzyme-linked immunosorbent assay for
Rhodococcus equi serology in horses.
《EQUINE VETERINARY JOURNAL》.1996,第28卷
(第5期),第344-349页.

Chu di Guan et al..Vectors that
facilitate the expression and
purification of foreign peptides in
Escherichia coli by fusion to maltose-
binding protein.《Gene》.1988,第67卷(第1
期),第21-30页.

陈士恩 等.马红球菌感染的致病机理与预
防.《西北民族学院学报(自然科学版)》.2001,第
22卷(第3期),

审查员 赵晓明

权利要求书1页 说明书12页

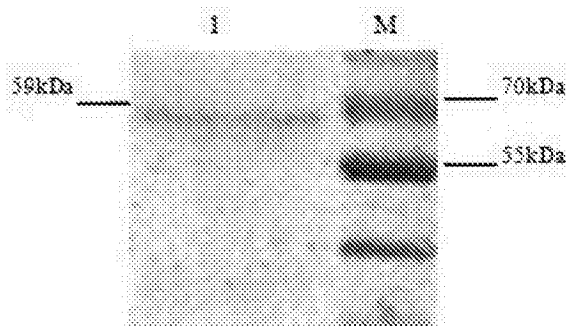
序列表5页 附图5页

(54)发明名称

一种检测马红球菌病的试剂盒

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体公开了一种
检测马红球菌病的试剂盒,所述试剂盒包括作为
免疫原的马红球菌致病基因VapA重组蛋白MBP-
VapA,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所使用
MBP-VapA蛋白更接近马红球菌致病基因VapA的
性质.用该试剂盒进行检测,灵敏度高、特异性
强、重复性和稳定性都很好,具有实际的临床应
用意义。



1. 一种检测马红球菌病的ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 免疫原的制备如下:扩增VapA基因,并克隆到PMAL-C5x载体上,构建表达载体PMAL-VapA,将PMAL-VapA转化至原核表达菌,通过IPTG在20℃下诱导、纯化后获得重组蛋白MBP-VapA;

S2. 分别配制酶标抗体羊抗马IgG Fab'2-HRP、阴性对照胎马血清、阳性对照马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清和封闭液PVA获得ELISA试剂盒;

由SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的引物扩增序列号为JN990991.1的马红球菌致病基因VapA;所述原核表达菌为BL21。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述重组蛋白MBP-VapA的包被浓度为0.125μg/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为1:400,羊抗马 IgG Fab'2-HRP稀释度为1:20000,封闭液为0.5%PVA。

3. 权利要求1或2任一项所述制备方法获得的检测马红球菌病的ELISA试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因VapA重组蛋白MBP-VapA,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括适于MBP-VapA与抗马红球菌致病基因VapA蛋白抗体发生抗原抗体反应的检测试剂。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括包被有MBP-VapA的固相载体、酶标抗体。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括封闭液、洗涤液、显色液、终止液、阳性和阴性对照。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述阴性对照为胎马血清,阳性对照为马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述酶标抗体为羊抗马IgG Fab'2-HRP。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述MBP-VapA的包被浓度为0.125μg/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为1:400,羊抗马 IgG Fab'2-HRP稀释度为1:20000,封闭液为0.5%PVA。

一种检测马红球菌病的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及一种检测马红球菌病的试剂盒。

背景技术

[0002] 马红球菌属于红球菌属,是一种人畜共患的条件性致病菌。该病原菌普遍存在于自然环境土壤中,调查表明,50~95%的农场土壤中存在该菌。马红球菌可感染人,导致呼吸道感染症状。该病也是幼龄马驹最常见的疾病之一,发病率可达80%。染病马驹一般呈慢性或亚急性支气管肺炎症状,有时伴发盲结肠和肠系膜淋巴结溃疡。

[0003] 一直以来关于马红球菌的致病机制并不清楚,直至最近研究发现,导致该细菌毒性的关键是其是否含有一个致病性相关质粒。该质粒含有85~90kb的遗传编码DNA,可编码多个高免疫原性的毒性脂蛋白。其中,毒性相关蛋白A(VapA)为其主要表达蛋白。大量研究表明,马红球菌的毒性与Vap A密切相关。目前,虽有部分重组VapA蛋白表达的报道,但其表达的蛋白多以包涵体的形式存在,较难应用于实际的医疗诊断和治疗产品的开发和应用。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术存在的缺陷,提供马红球菌致病基因VapA蛋白的试剂盒和应用。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的:

[0006] 一种检测马红球菌病的ELISA试剂盒,所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因VapA重组蛋白MBP-VapA,其氨基酸序列如SEQIDNO:1所示。

[0007] 优选地,所述试剂盒还包括适于MBP-VapA与抗马红球菌致病基因VapA抗体发生抗原抗体反应的检测试剂。

[0008] 具体地,所述试剂盒还可以包括包被有MBP-VapA的固相载体、酶标抗体。

[0009] 另外,本发明所述试剂盒还包括封闭液、洗涤液、显色液、终止液、阳性和阴性对照。

[0010] 其中,所述阴性对照为胎马血清,阳性对照为马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清,酶标抗体为羊抗马IgGFab'2-HRP。

[0011] 本发明通过优化实验,获得最佳的ELISA试剂盒的参数:MBP-VapA的包被浓度为0.125ug/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为1:400,羊抗马IgGFab'2-HRP稀释度为1:20000,封闭液为0.5%PVA。

[0012] 本发明还提供一种检测马红球菌病的ELISA试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0013] S1.免疫原的制备如下:扩增VapA基因,并克隆到PMAL-C5x载体上,构建表达载体PMAL-VapA,将PMAL-VapA转化至原核表达菌,通过IPTG在20℃下诱导、纯化后获得重组蛋白MBP-VapA;

[0014] S2.分别配制酶标抗体羊抗马IgG Fab'2-HRP、阴性对照胎马血清、阳性对照马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清和封闭液PVA获得ELISA试剂盒。

[0015] 马红球菌致病基因VapA蛋白是重要的毒性蛋白,现有技术中关于该蛋白研究较少。一般纯化出的马红球菌致病基因VapA蛋白多以包涵体的形式存在,从而限制了其实际应用。申请人通过大量探索发现:将VapA基因与PMAL-C5x载体相连,并配合20℃的诱导温度可以表达出大量可溶性表达的VapA蛋白。

[0016] 本发明使用PMAL-C5x载体,它可以促进重组表达蛋白的可溶性表达,实验研究表明,包涵体形式表达重组蛋白影响其氨基酸折叠形成正常的蛋白质三级、四级拓扑结构的形成,进而影响重组表达蛋白的抗原性和生物活性。本研究首次采用PMAL-C5x为载体,对马红球菌的致病基因VapA进行了重组,获得重组质粒—PMAL-VapA。

[0017] 另外,发明人通过实验发现,单单使用PMAL-C5x载体,对VapA蛋白的可溶性表达虽然有促进作用,但作用并不明显,还必须要配合低温诱导,才能够使VapA蛋白大量可溶性表达。发明人研究了多个诱导温度对VapA蛋白的表达影响,结果显示,只有在20℃时才能够获得大量的可溶性的VapA蛋白。

[0018] 本发明通过上述方法获得了大量可溶性表达且活性好的VapA蛋白,该蛋白具有良好的免疫原性,本发明所得到的MBP-VapA更接近马红球菌致病基因VapA的性质。

[0019] 优选地,MBP-VapA的制备方法中,所述原核表达菌在培养至OD₆₀₀值为0.5~0.7后,加入IPTG进行诱导;更优选的,原核表达菌在培养至OD₆₀₀值为0.6后加入IPTG进行诱导。

[0020] 优选的,本发明所述IPTG诱导的浓度为0.3~0.7mM,诱导时间为8~12h。

[0021] 更优选地,申请人发现所述原核表达菌在20℃培养下,IPTG诱导浓度为0.7mM,且诱导时间为8h时,VapA蛋白的表达量最高,且多为可溶性表达。

[0022] 优选地,本发明所述试剂盒的制备方法中,重组蛋白MBP-VapA的包被浓度为0.125ug/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为1:400,羊抗马IgG Fab'2-HRP稀释度为1:20000,封闭液为0.5%PVA。

[0023] 具体地,重组蛋白MBP-VapA的制备方法包括以下步骤:

[0024] S1.重组质粒PMAL-VapA的构建:设计SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所述引物扩增VapA基因,将VapA基因与pZeroBack/bTunt载体相连构建质粒pZeroBack-VapA;最后将PMAL-c5x和测序正确的pZeroBack-VapA进行双酶切后构建表达载体PMAL-VapA;

[0025] S2.将PMAL-VapA转化入BL21菌中,测序鉴定为阳性之后,将菌液接种于培养基中,培养至OD₆₀₀值为0.5~0.7,加入IPTG诱导后,离心重悬菌体,破碎菌体,收集上清,获得可溶性VapA蛋白。

[0026] S3.上清通过直链淀粉树脂进行亲和层析,获得纯化后的蛋白。

[0027] 优选地,S2中原核表达菌在培养至OD₆₀₀值为0.6后加入IPTG进行诱导。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:

[0029] 本发明提供了一种检测马红球菌病的试剂盒,所述试剂盒包括包括作为免疫原的马红球菌致病基因VapA重组蛋白MBP-VapA,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。用该试剂盒进行检测,灵敏度高,特异性强,重复性和稳定性都很好,检测临床样本,检出率为大大高于常规检测,具有实际的临床应用意义。

附图说明

[0030] 图1为VapA基因的PCR扩增图;其中,1:VapA;2:ddH₂O对照;M:2000bp的DNA分子量

标准。

[0031] 图2为重组克隆质粒pZeroBack-VapA的酶切鉴定;其中,1:pZeroBack-VapA重组质粒的EcoR I和Not I双酶切产物;M:5000bp的DNA分子量标准。

[0032] 图3为重组表达质粒PMAL-VapA的测序鉴定结果;下划线部位分别为Not I与EcoR I的酶切位点序列。

[0033] 图4为不同诱导温度对蛋白表达量的影响;其中,M:蛋白分子量标准;1:IPTG诱导前的蛋白表达;2-6:分别在10℃、15℃、20℃、28℃和37℃温度下诱导的蛋白表达。

[0034] 图5为不同IPTG诱导时间对蛋白表达量的影响;其中,M:蛋白分子量标准;1-8分别为IPTG诱导0、2、4、8、12、16、20和24小时的蛋白表达。

[0035] 图6为不同IPTG浓度对诱导蛋白表达量的影响;其中,M:蛋白分子量标准;1-7:IPTG浓度分别为:0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0和1.4mM。

[0036] 图7为20℃下0.7mM IPTG诱导8h后表达的蛋白;其中,M:蛋白分子量标准;1:诱导前BL21细菌的蛋白表达;2:诱导后BL21细菌的蛋白表达;3转化空表达载体PMAL-C5x的BL21诱导前蛋白表达;4:转化空表达载体PMAL-C5x的BL21诱导后蛋白表达;5:转化空表达质粒PMAL-VapA的BL21诱导前蛋白表达;6:转化表达质粒PMAL-VapA的BL21诱导后的蛋白表达;7:经亲和层析纯化后的VapA蛋白;8:诱导表达VapA蛋白的BL21菌液超声破碎上清(含可溶性表达蛋白);9:诱导表达VapA蛋白的BL21菌液超声破碎沉淀(含包涵体表达蛋白)。

[0037] 图8为不同温度诱导表达的VapA蛋白的状态分析;M:蛋白分子量标准;1:IPTG诱导前转化BL21(含PMAL-VapA)的蛋白表达;2和3分别为:20℃诱导表达产物的超声破碎上清(含可溶性表达蛋白)和沉淀(含包涵体表达蛋白);4和5分别为:28℃诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀;6和7分别为:37℃诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀。

[0038] 图9为纯化后VapA蛋白的Western-blot分析结果;其中,1:纯化的VapA蛋白;M:蛋白分子量标准。

[0039] 图10为MBP-VapA重组蛋白的Dot ELISA分析,其中,1至3孔为BSA,蛋白浓度分别为:0.1mg/mL、0.025mg/mL、0.00625mg/mL;4孔为PBS对照,5孔为马红球菌(ATCC33701)裂解液阳性对照;6至8孔为VapA蛋白浓度分别为0.1mg/mL、0.025mg/mL、0.00625mg/mL。

[0040] 图11为抗原抗体稀释度图。

[0041] 图12为HRP酶标二抗稀释度优化结果图。

具体实施方式

[0042] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换,均属于本发明的范围;若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0043] 实施例1 原核表达重组质粒PMAL-VapA的构建与鉴定

[0044] 1、马红球菌的复苏与培养:购买保藏于美国菌种保藏中心,保藏号为ATCC 33701的马红球菌,按照规定操作流程复苏马红球菌。

[0045] 2、引物设计:根据NCBI基因库中马红球菌致病基因VapA序列(JN990991.1)以及pZeroBack/bIunt和PMAL-C5x载体酶切位点,运用OLigo6.0软件,设计一对带酶切位点的引

物(由上海英维捷基生物技术有限公司合成),引物序列如下:

[0046] F:AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGAAGACCCTGCACAAGACGGTCTC(下划线为NotI酶切位点)

[0047] R:CCGGAATTCCTAAGCGTTGTGCCAACTACCCGAG(下划线为EcoR I酶切位点)

[0048] 3、VapA基因的PCR扩增与克隆

[0049] 3.1.参照Fast HiFidelity PCRKit说明扩增VapA基因,反应体系如表1。

[0050] 表1 PCR反应体系

[0051]

试剂	体积
Fast HiFidelity Polymerase	1uL
5×Fast HiFidelity PCR Buffer	10uL
20×Fast PCR Enhancer	2.5uL
DEPC水	33.5uL
引物F	1uL
引物R	1uL
ATCC 33701 菌液	1uL
总体积	50uL

[0052] 反应程序:94℃预变性2min;(94℃变性30s;55℃退火30s;68℃延伸30s)共运行30个循环,68℃终延伸5min,最后4℃保存,结果如图1。

[0053] 参照天根生化科技有限公司普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TIANgel Midi Purification Kit)的使用说明书进行PCR产物的回收、纯化,方法如下:

[0054] (1)准备好1.5mL的EP管,将PCR扩增后的产物用1%琼脂糖凝胶(含0.5μg/mL EB)进行电泳,在紫外线照射下,切下含有目的基因(563bp)的凝胶,并放入准备好的EP管中,称取重量。

[0055] (2)柱平衡步骤:向吸附柱CA2(吸附柱当天经过了前处理)中(吸附柱放入收集管中)加入500μL的平衡液BL。12,000rpm离心1min。倒掉收集管中的废液,并将吸附柱CA2重新放回收集管中。

[0056] (3)向胶块中加入等倍体积溶液PN(如果凝胶重为0.1g,其体积可视为100μL,则加入100μL PN溶液),置于50℃水浴温育。其间不断温和地上下翻转离心管,以确保胶块充分溶解,如果还有未溶的胶块,可继续放置几分钟或再补加一些PN溶液,直至胶块完全溶解(若胶块的体积过大,可事先将胶块切成碎块),胶块完全溶解后将溶液温度降至室温再上柱。

[0057] (4)将步骤(3)所得溶液加入步骤(2)平衡后的吸附柱CA2中(吸附柱放入收集管中)。于室温放置2min后,12,000rpm离心60s。倒掉收集管中的废液,并将吸附柱CA2放入收集管中。吸附柱容积为800μL,若样品体积大于800μL可分批加入。

[0058] (5)向吸附柱CA2中加入600μL漂洗液PW(使用前需先检查是否已加入无水乙醇),静置2~5min。12,000rpm离心30~60s,倒掉收集管中的废液,并将吸附柱CA2放入收集管中。

[0059] (6)重复操作步骤(5)。

[0060] (7)将吸附柱CA2放回收集管中,12000rpm离心2min,将收集管中的漂洗液PW去除。

将吸附柱CA2置于室温放置数分钟,彻底地晾干,以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

[0061] (8)将吸附柱CA2放到一个干净离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加40uL ddH₂O,室温放置2min。12,000rpm离心2min收集DNA溶液,将离心得到的溶液重新加回吸附柱中,室温放置2min,12,000rpm离心2min,将DNA溶液收集到离心管中。DNA产物保存在-20℃,以防DNA降解。

[0062] 3.2.PCR产物与pZeroBack/bIunt载体的连接

[0063] 参照零背景快速连接试剂盒(ZeroBack Fast Ligation Kit)说明书,连接反应体系如下:取pZeroBack/bIunt载体0.3uL、T4DNA Ligase 0.5uL、2×Reaction Buffer 5uL、ddH₂O2.2uL、目的PCR纯化产物2uL放入EP管中混匀,并于22℃条件下反应5min,结束后置于冰上,进行后序转化实验。

[0064] 3.3.大肠杆菌感受态的制备:采用氯化钙/甘油法制备,具体步骤如下:

[0065] (1)LB平板挑取新活化的大肠杆菌单菌落,接种于3~5mL LB液体培养基中,37℃下振荡培养过夜,再以1:100接种于100mL LB液体培养基,37℃振荡培养至OD₆₀₀为0.4~0.6。

[0066] (2)将培养液分装至50mL无菌离心管,冰上放置10min,4℃、3,000g离心10min。

[0067] (3)弃上清,加入预冷的0.05M CaCl₂10mL,轻轻悬浮细胞,冰上放置15~30min,4℃、3,000g离心5min。

[0068] (4)弃上清,加预冷含15%甘油的0.05M CaCl₂2mL,轻轻悬浮细胞,分装成100或者200uL的小份,贮存于-80℃冰箱中。

[0069] 3.4.连接产物转化DH5α感受态细胞:本研究采用热休克法将3.2获得的连接产物转入大肠杆菌细胞中,包括以下步骤:

[0070] (1)从-80℃冰箱取一小份感受态细胞悬液,立即放于冰上解冻。

[0071] (2)加入适量目的质粒或连接产物,轻轻混匀,冰上放置30min。

[0072] (3)42℃水浴热击60s,迅速置于冰上冷却3~5min。

[0073] (4)加入1mL LB液体培养基,混匀后37℃振荡培养60min;

[0074] (5)3000rpm离心5min后,去掉上清液至只剩余100uL后,重悬菌体,将其涂布于含相应抗生素的筛选平板上,正面向上放置于37℃恒温培养箱中待菌液完全被培养基吸收后倒置平板,培养12~16h。

[0075] 用灭菌的10uL枪头挑取可疑菌落于含氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37℃振荡培养12~16h,取适量菌液作PCR鉴定,PCR扩增体系如表2。

[0076] 表2 PCR扩增体系

[0077]

试剂	体积
2×Taq PCR star Mix	10uL
引物F	1uL
引物R	1uL
DEPC水	7uL
菌液	1uL

[0078] PCR反应程序:94℃预变性5min;(94℃变性1min;55℃退火1min;72℃延伸1min)共

运行30个循环,70℃终延伸10min,最后4℃保存。

[0079] 3.5.阳性菌液保存和质粒的提取

[0080] 将PCR鉴定为阳性的菌液送广州华大基因生物技术有限公司进行序列测定,通过互联网NCBI基因库下载致病性马红球菌VapA基因片段,使用Iasergene MegAlign软件对测序结果进行序列比对。

[0081] 将测序正确的阳性菌液部分加入终浓度为30%的灭菌甘油,放入-80℃保存;部分进行扩大培养,参照天根生化科技有限公司快速质粒小提试剂盒(TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit)的使用说明书进行质粒抽提,具体步骤如下:

[0082] (1)取1~4mL过夜培养的菌液,加入离心管中,于12,000rpm下离心1min,尽量吸除上清(菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

[0083] (2)向留有菌体沉淀的离心管中加入150uL溶液P1(请先检查是否已加入RNase A和TIANRed),使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

[0084] (3)向离心管中加入150uL溶液P2,温和地上下翻转6~8次使菌体充分裂解。此时菌液变得清亮粘稠,如果未变得清亮,可能由于菌体过多,裂解不彻底,应减少菌体量。

[0085] (4)向离心管中加入350uL溶液P5,立即快速地上下颠倒混匀12~20次,充分混匀,此时将出现絮状沉淀;12,000rpm离心2min。

[0086] (5)将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中(吸附柱放入收集管中),注意尽量不要吸出沉淀。吸附柱CP3在12,000rpm下离心30s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CP3放入收集管中。

[0087] (6)向吸附柱CP3中加入300uL漂洗液PWT(检查是否已加入无水乙醇),12,000rpm离心30s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CP3放入收集管中。

[0088] (7)将吸附柱CP3放入收集管中,12,000rpm离心1min,目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

[0089] (8)将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位滴加50~100uL洗脱缓冲液TB,12000rpm离心30s将质粒溶液收集到离心管中。

[0090] (9)利用限制性内切酶EcoR I和NotI I对抽提到的质粒进行双酶切鉴定(如图2),获得一条3.2kb左右的条带和一条560bp左右的条带,表明VapA基因已成功连接到pZeroBack/bIunt载体中。将该质粒命名为pZeroBack-VapA。

[0091] 4、原核表达重组质粒PMAL-VapA的构建与鉴定

[0092] 将原核表达载体PMAL-c5x和已经测序正确的阳性重组质粒pZeroBack-VapA分别用限制性内切酶EcoRI、Not I进行双酶切处理,酶切体系如表3。

[0093] 表3 酶切反应体系

[0094]

载体 PMAL-C5x (或重组质粒 pZeroBack-VapA)	1 μ g
10 $\times$ CutsMart Buffer	5 μ L
<i>Eco</i> RI HF	1 μ L
<i>Nco</i> I HF	1 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

[0095] 混匀表3中的酶切体系后,置于37℃水浴2~4h。将载体PMAL-C5x和重组质粒pZeroBack-VapA的酶切产物经1%的琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带,具体回收步骤参照3.1。

[0096] 将回收的PMAL-c5x以及VapA基因利用T4DNA连接酶于16℃连接仪中过夜连接,并将PMAL-VapA转入原核表达菌BL21,经菌液PCR以及测序鉴定,结果如图3。测序结果与参考VapA基因序列完全一致,且含有正确的EcoRI和NotI酶切位点。将该原核表达重组质粒命名为PMAL-VapA。

[0097] 实施例2 可溶性MBP-VapA重组蛋白的表达及最佳诱导条件的确定

[0098] 将转化PMAL-VapA质粒阳性的BL21菌液按1:100比例接种于(含氨苄青霉素50 μ g/ml)LB液体培养基中,于37℃摇床中200r/min振荡培养。至菌液OD₆₀₀值为0.6左右时,按下列方法进行MBP-VapA重组蛋白的优化表达。

[0099] 1. 诱导表达温度的确定

[0100] 加入浓度为1mM的IPTG,并分别于10℃、15℃、20℃、28℃和37℃的条件下震荡培养至恰当的诱导时间取样。样本于4000r/min离心10min,弃上清,取沉淀,并将沉淀用原体积1/10的去离子水重悬,按常规方法进行SDS-PAGE,检测融合蛋白的表达。用BandScan(5.0版)软件分析泳道内蛋白含量,以确定最佳诱导表达温度。结果表明(如图4),随着温度的由10℃的增加,VapA(59kDa)的表达量逐渐增加,并在15℃和20℃诱导时达到最大,随后降低。BandScan分析显示,在10℃、15℃、20℃、28℃和37℃的条件下诱导VapA蛋白的表达分别占总泳道蛋白量的9.1%、15.3%、16.6%、7.2%、2.7%,表明20℃诱导表达VapA的量最大。

[0101] 2. IPTG诱导时间的确定

[0102] 重复诱导实验,当转化菌液OD₆₀₀值达0.6左右时,加入浓度为1mM的IPTG,20℃诱导表达,分别在0h、2h、4h、8h、12h、16h、20h和24h后取样。样本经4000r/min离心10min,弃上清,并将沉淀用原体积1/10的去离子水重悬,进行SDS-PAGE检测,并经BandScan分析,确定IPTG最佳诱导时间。结果(如图5)显示,随诱导时间的延长VapA表达量逐渐增加,并于诱导8h时达到最大表达量。其BandScan分析显示,IPTG诱导0h、2h、4h、8h、12h、16h、20h和24h的VapA蛋白表达量分别占总泳道蛋白量的0%、14.3%、21.3%、31.4%、31.5%、26.5%、21.2%和12.3%。结果表明,IPTG的最佳诱导时间是8h。

[0103] 3. IPTG诱导浓度的确定

[0104] 按上述最佳诱导方法,当转化菌液OD₆₀₀值达0.6左右时,分别用终浓度为0mM、0.1mM、0.3mM、0.5mM、0.7mM、1.0mM和1.4mM的IPTG于20℃诱导表达8h后取样。样品以4000r/

min离心10min,弃上清。收集菌体沉淀并用原体积1/10的去离子水重悬,进行SDS-PAGE检测并经BandScan分析,确定IPTG最佳诱导浓度。结果(如图6)显示,肉眼观察VapA蛋白的表达不随IPTG诱导浓度的变化而变化。但是,BandScan分析显示VapA蛋白表达量在IPTG浓度分别为0mM、0.1mM、0.3mM、0.5mM、0.7mM、1.0mM和1.4mM时,分别占总泳道蛋白量的0%、26.9%、31.3%、30.3%、32.4%、27.9%和24.8%。显示为随着IPTG诱导浓度的增加而增加,至0.7mM达到最高而后下降。标明该IPTG诱导VapA表达的最佳浓度为0.7mM。

[0105] 4. 重组表达的VapA蛋白状态的鉴定

[0106] 申请人通过实验发现,IPTG诱导VapA重组蛋白的表达时,不同的温度对其表达的VapA蛋白的状态具有一定的影响。采用最佳IPTG浓度和诱导时间分别在20℃、28℃和37℃温度条件下对表达的VapA蛋白进行检测。取样菌液样本于4000r/min离心10min,弃上清,取沉淀。用原体积的1/10的上样缓冲液将沉淀重悬,并用超声在冰浴的条件下破碎细胞10min。经4℃离心,12000r/min 20min。按常规方法进行SDS-PAGE,检测上清(含可溶性表达的蛋白)和沉淀(含包涵体表达的蛋白)中蛋白的表达。

[0107] 试验结果(如图8)显示,诱导前、20℃诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀、28℃诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀、以及37℃诱导表达产物超声破碎上清和沉淀内VapA蛋白表达量分别占总泳道蛋白量的0%、8.9%、10.1%、2.4%、5.3%、0%和5.6%。以上诱导表达产物经紫外分光光度计检测,浓度分别为:3.0、8.3、1.5、5.3、3.2、6.5、2.7mg/mL。表明,20℃诱导表达条件下目的蛋白的表达量最大且绝大部分为可溶性表达。同时,在最佳诱导条件下,多次进行诱导表达,将产物超声波裂解细菌的上清及沉淀进行SDS-PAGE电泳鉴定表明重组蛋白绝大部分以可溶性的形式存在(图7)。

[0108] 5. 可溶性重组VapA蛋白的非变性纯化

[0109] 将含有阳性质粒(PMAL-VapA)的BL21菌液按1:100的比例接种于200mL LB液体培养基(含氨苄青霉素50μg/mL)中,于37℃振荡培养至OD₆₀₀大约0.6左右时,加入浓度为0.7mM的IPTG,20℃诱导8h,使用NEB公司Amylose Resin产品(E8021)对表达蛋白进行纯化。参照说明书进行,具体操作如下:

[0110] (1) 蛋白粗提

[0111] 将诱导蛋白表达后菌液,4000g离心10min,收集菌体。用柱子缓冲液20mL重悬(柱子缓冲液用量为原菌液体积的1/10),储存于-20℃。纯化蛋白时,将其置于冷水中化冻,并于冰水浴中,以4s的破碎,5s的间隔,进行超声破碎细胞。持续超声破碎直到所释放的蛋白质达到最大量,菌悬液变澄清为止。

[0112] 将破碎后菌液在4℃,12000rpm条件下离心20min,获取的上清即为蛋白粗提物。

[0113] (2) 亲和层析

[0114] a. 柱子的准备:将1mL amylose介质填充于规格为1.0x 10cm的柱子中。用5倍柱子体积的柱子缓冲液冲洗柱子。

[0115] b. 上柱:介质的量决定融合蛋白质的量,每毫升柱床体积可结合6~8mg融合蛋白质,根据目的蛋白的表达量估算上样体积。控制最大线性流速为24cm/h,即0.3mL/min。流速计算方式为:线性流速(cm/h)× πr =体积流速(mL/h)。

[0116] c. 洗脱:用10倍介质体积的柱子缓冲液洗柱子,然后用10倍介质体积的柱子洗脱液洗脱目的蛋白,以每组分1mL收集10个组分,使用微量分光光度计测量每组分目的蛋白的

量,1-6号收集液分别为:2.3、1.7、1.5、1.2、0.7和0.3mg/mL,7-10号收集液蛋白浓度为0。

[0117] 纯化后蛋白液用SDS-PAGE检测,使用Bandscan软件对SDS-PAGE图片进行分析重组VapA蛋白的纯度,为83.7%。

[0118] 6. 重组VapA蛋白的抗原性分析

[0119] 用Western blot对纯化的重组VapA蛋白的抗原性进行检测,具体步骤如下:

[0120] (1)将VapA蛋白的SDS-PAGE的置于转印平皿中,剪一张与SDS-PAGE凝胶一样大小的6张3mm滤纸及1张硝酸纤维素膜,浸泡于转移缓冲液中大约15min左右,以驱除留于滤膜上的气泡。

[0121] (2)阳极朝上,阴极在底部,上下各是3张滤纸,PAGE凝胶一定要在NC膜上面被滤纸包裹,并保证无气泡。

[0122] (3)安装电转移,以恒定电流150mA转移30min。

[0123] (4)加10mL封闭液(含8%~10%脱脂奶粉的TBS),4℃封闭过夜。

[0124] (5)然后吸掉封闭液,用TBST洗三次,每次5min。

[0125] (6)以1:100稀释的抗马红球菌VapA蛋白的马阳性血清(Gluck Equine Research Center馈赠)作为一抗,37℃作用2h

[0126] (7)弃反应液体,用TBST共洗15min,每次5min。

[0127] (8)最后再用羊抗马IgG Fab'2-HRP酶标二抗(LSBio公司)37℃条件下作用1h,同样洗3次,最后再拍照保存。Western-blot检测结果(如图9)显示,纯化的重组蛋白(59kDa)可被抗马红球菌VapA蛋白的马阳性血清特异性识别,表明,该重组蛋白具有良好的免疫源性。

[0128] 因VapA蛋白在马红球菌中的表达量并不高,与直接从马红球菌中提纯VapA蛋白(JuIien Cauchard,2004)相比,本发明采用非致病菌作为表达菌具生产更加安全、高效的特点;其次,与人工氨基酸合成VapA蛋白(JuIien Cauchard,2006)相比,本发明所述方法表达的VapA氨基酸序列可通过天然细菌蛋白加工工厂完成正常的折叠、加工和修饰过程,形成更接近于马红球菌VapA蛋白的自然结构形态。最后,与已报导的VapA蛋白的表达方法相比,本方法表达出的蛋白为可溶性蛋白,而非包涵体蛋白。本发明方法表达的可溶性VapA蛋白具有更好的蛋白活性和免疫源性,而且,WB验证所表达的VapA具有较高的活性。另外,虽然以包涵体蛋白形式表达的重组蛋白量通常较大,但因其加工处理过程繁琐且需经变性方式纯化,并不适用于工业生产的应用。相比之下,本发明采用非变形方法纯化对VapA重组蛋白活性影响较小且过程简单、易操作,更适用于商业化大批量生产。

[0129] 实施例3 MBP-VapA重组蛋白的Dot ELISA

[0130] Dot ELISA采用本领域的常规方法,一抗为马源抗马红球菌血清(20uL),二抗为HRP标记兔抗马IgG(1:1000稀释),结果如图10。

[0131] 用于检测马抗致病性红球菌病的抗体。图10中1至3孔为BSA,蛋白浓度分别为:0.1mg/mL、0.025mg/mL、0.00625mg/mL;4孔为PBS对照,5孔为马红球菌(ATCC33701)裂解液阳性对照;6至8孔为VapA蛋白,浓度分别为0.1mg/mL、0.025mg/mL、0.00625mg/mL。

[0132] 实验结果表明:与R.equi标准细菌相同,本发明纯化的MBP-VapA蛋白可特异性识别马血清中的R.equi细菌抗体并经酶标二抗反应显色;其次,与BSA对照相比,纯化的MBP-VapA蛋白与特异性抗体结合的能力随着蛋白浓度的下降而降低;最后,因对洗脱液对照孔

无显色,该纯化蛋白特异性识别R.equi细菌抗体的特性与其溶液无关。因此,本实验室纯化的MBP-VapA可用于R.equi特异性抗体的检测。

[0133] 实施例5 MBP-VapA重组蛋白的间接ELISA

[0134] 1、马红球菌间接ELISA方法的建立

[0135] 纯化的MBP-VapA蛋白作为抗原包被96孔板,抗原以包被液(0.1M NaHCO₃PH9.6)稀释,100uL/孔包被于96孔板,4度过夜(>8h)。使用PBST(PH7.2),每孔200uL,在洗板机上洗涤4次,每次3min;加入200uL封闭液(0.5%PVA),于室温封闭1h;洗涤4次,方法如上所述;将待检血清用PBS(PH7.2)稀释,100uL/孔加入ELISA板,37℃温浴1h;洗涤4次,方法如上所述;加入羊抗马IgG Fab'2-HRP酶标二抗,100uL/孔,37℃温浴1h;洗涤4次,方法如上所述;加入显色液100uL(TMB),室温10min;加入终止液(2M H₂SO₄),100uL;ELISA读板机于OD_{450nm}读数。

[0136] 2、抗原包被浓度及血清最佳稀释度的确定

[0137] 采用矩阵滴定法确定抗原抗体的最佳浓度,纯化的MBP-VapA蛋白抗原分别以0.1ug、0.05ug、0.025ug、0.0125ug、0.00625ug每孔包被96孔板,标准R.equi阴、阳性血清分别作100倍、200倍、400倍、800倍稀释。以标准R.equi阳性血清OD_{450nm}值在1.0左右,且P/N值最大,为标准确定抗原的最佳包被浓度和血清的最佳稀释度。

[0138] $P/N = (\text{阳性血清OD}_{450nm} \text{值} - \text{阳性血清空白对照OD}_{450nm} \text{值}) / (\text{阴性血清OD}_{450nm} \text{值} - \text{阴性血清空白对照OD}_{450nm} \text{值})$ 。

[0139] 考虑到较低的血清稀释倍数可降低血清背景值,因而确定抗原的最佳包被浓度为0.125ug/mL,血清的最佳稀释倍数为400倍(见图11,表4)。

[0140] 表4 不同抗原抗体稀释度对应P/N值结果

[0141]

抗体 抗原	0.00625ug	0.0125ug	0.025ug	0.05ug	0.1ug
100 倍	2.515	2.261	1.971	1.405	1.332
200 倍	9.119	6.058	4.200	3.122	2.180
400 倍	11.004	8.968	6.274	4.581	2.691
800 倍	8.774	7.863	6.778	4.926	3.188

[0142] 3、酶标二抗最佳工作浓度的确定

[0143] 酶标二抗分别以1:1250、1:5000、1:20000、1:80000、1:320000稀释,使用优化好的抗原浓度包被ELISA板,并使用最佳的标准R.equi阴、阳性血清稀释倍数,进行ELISA操作,以标准R.equi阳性血清OD_{450nm}值在1.0左右,且P/N值最大为标准确定羊抗马IgG Fab'2-HRP最佳稀释度。

[0144] 结果表明:羊抗马IgG Fab'2-HRP最佳稀释度为20000倍稀释(见图12,表5)。

[0145] 表5 不同羊抗马IgG Fab'2-HRP稀释倍数稀释度对应P/N值结果

[0146]

二抗稀释倍数	1250	5000	20000	80000	320000
P/N值	1.933	3.786	6.617	7.068	8.510

[0147] 4、封闭液的选择

[0148] 分别使用2%BSA、1%BSA、5%脱脂奶粉、1%PVA、0.5%PVA做ELISA封闭,选用优化好的抗原浓度包被ELISA板,并使用最佳的标准R.equi阴、阳性血清稀释倍数,以及酶标二抗稀释倍数,进行ELISA操作,以标准R.equi阳性血清OD_{450nm}值在1.0左右,且P/N比值最大为标准确定最佳封闭液,由表6可知最佳封闭液为0.5%PVA。

[0149] 表6 封闭液优化结果

[0150]

OD _{450nm} 值	2%BSA	1%BSA	5%脱脂奶粉	1%PVA	0.5%PVA
阳性血清	2.79055	2.59105	1.66075	1.6187	1.44365
阳性血清空白对照	2.00515	2.0098	0.58565	0.2177	0.283
阴性血清	0.2651	0.3196	0.33705	0.3358	0.27935
阴性血清空白对照	0.09295	0.1014	0.13165	0.08675	0.09495
P/N值	4.562	2.664	5.234	5.625	6.294

[0151] 5、ELISA阴阳性临界值的确定

[0152] 用上述已建立的ELISA检测方法,检测对标准阴性样品1份、无疫区马匹血清样品19份,做1:400稀释,每份血清重复3孔,进行ELISA测定(结果见表8)。

[0153] 经计算各样本的OD₄₅₀平均值 $\bar{X}=0.210$,标准偏差 $SD=0.054$,临界值 $\bar{X}+3SD=0.370$ 。在规定实验条件下,血清样本做1:400稀释,其OD₄₅₀值大于临界值,即待检血清样本OD₄₅₀值 ≥ 0.370 时判定为阳性,否则判定为阴性,结果如表7。

[0154] 表7 ELISA阴阳性临界值的确定

[0155]

编号	OD _{450nm}	编号	OD _{450nm}	编号	OD _{450nm}	编号	OD _{450nm}
阴性对照	0.219	B236	0.173	A142	0.186	2200	0.163
L304	0.231	B75	0.196	V108	0.201	E074	0.174
M74	0.179	B116	0.147	P109	0.295	N197	0.239
B368	0.350	J330	0.180	M256	0.276	H051	0.127
J184	0.165	L304	0.231	C105	0.216	V134	0.243

[0156] 6、特异性试验

[0157] 选取非R.equi疫区马场H7N7或H3N8流感病毒血清阳性的马匹,采集血清作为H7N7或H3N8流感病毒抗体阳性血清,进行马红球菌抗体间接ELISA检测。按最佳反应体系进行检测,与标准R.equi阴、阳性血清对照,每份血清重复3孔。如表8所示,与R.equi阳性血清对照相比,该ELISA检测H7N9或H3N8阳性血清以及R.equi阴性血清均为的阴性(OD_{450nm}<0.370)。结果表明,本实验建立的ELISA方法具有特异性检测血清中R.equi抗体的能力。

[0158] 表8 特异性实验结果

[0159]

	H3N8 阳性血清	马传贫阳性血清	马痘肺炎 阳性血清	阳性对照	阴性对照
OD _{450nm}	0.153	0.195	0.178	1.112	0.217
	0.142	0.213	0.199	1.119	0.222
	0.147	0.195	0.213	1.118	0.218
OD _{450nm} 平均值	0.147	0.201	0.189	1.117	0.219

SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学

<120> 一种检测马红球菌病的试剂盒

<130>

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> MBP-VapA

<400> 1

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
1 5 10 15

Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
20 25 30

Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
35 40 45

Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
50 55 60

His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
65 70 75 80

Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
85 90 95

Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu
100 105 110

Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys
115 120 125

Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro
145 150 155 160

Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly
180 185 190

Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp
195 200 205

Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala
210 215 220

Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys
225 230 235 240

Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser
245 250 255

Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro
260 265 270

Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp
275 280 285

Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala
290 295 300

Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Val Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala
305 310 315 320

Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln
325 330 335

Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala
340 345 350

Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
355 360 365

Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile
370 375 380

Glu Gly Arg Ile Ser His Met Ser Met Gly Gly Arg Met Lys Thr Leu

385	390	395	400
His Lys Thr Val Ser Lys Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Ala Ala Ala			
405	410	415	
Ala Ala Met Ile Pro Ala Gly Val Ala Asn Ala Thr Val Leu Asp Ser			
420	425	430	
Gly Ser Ser Ser Ala Ile Leu Asn Ser Gly Ala Gly Ser Gly Ile Val			
435	440	445	
Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Thr Ser Leu Asn Leu Gln Lys			
450	455	460	
Asp Glu Pro Asn Gly Arg Ala Ser Asp Thr Ala Gly Gln Glu Gln Gln			
465	470	475	480
Tyr Asp Val His Gly Asp Val Ile Ser Ala Val Val Tyr Gln Arg Phe			
485	490	495	
His Val Phe Gly Pro Glu Gly Lys Val Phe Asp Gly Asp Ala Gly Gly			
500	505	510	
Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Ala Phe Trp Gly Thr Leu Phe Thr Asn			
515	520	525	
Asp Leu Gln Arg Leu Tyr Lys Asp Thr Val Ser Phe Gln Tyr Asn Ala			
530	535	540	

Val Gly Pro Tyr Leu Asn Ile Asn Phe Phe Asp Ser Ser Gly Ser Phe
545 550 555 560

Leu Gly His Ile Gln Ser Gly Gly Val Ser Thr Val Val Gly Val Gly
565 570 575

Gly Gly Ser Gly Ser Trp His Asn Ala
580 585

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> 引物F

<400> 2

aaggaaaaaa gcggccgcat gaagaccctg cacaagacgg tctc

44

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> 引物R

<400> 3

ccggaattcc taagcgttgt gccaaactacc cgag

34

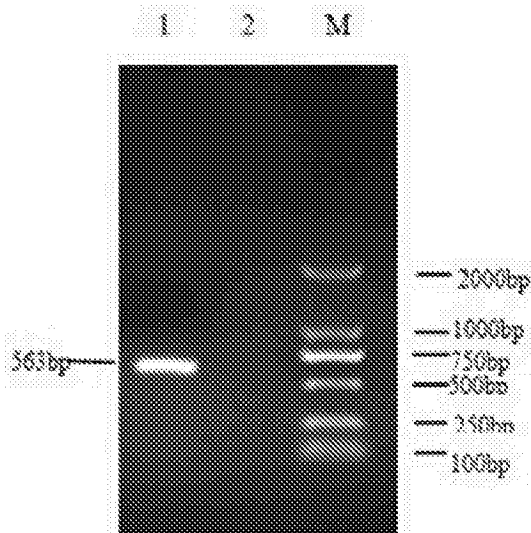


图1

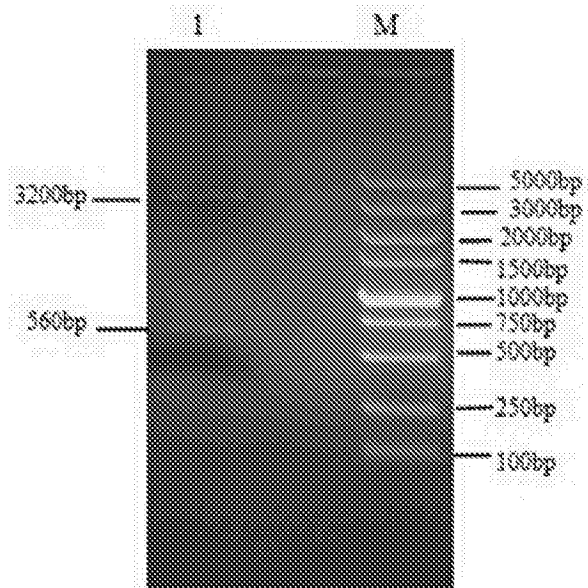


图2

ACATATGTCCATGGG**GCGGCCG**CATGAAGACCCTGCACAAGACGGTTTCTA
Not I酶切位点
 AGGCGATCGCAGCCACAGCCGTAGCTGCGGCTGCGGCTATGATTCCCGC
 CGGCGTCGCTAATGCGACCGTTCTTGATTCCGGTAGCAGCAGTGCGATT
 TCAATAGTGGGGCAGGCAGTGGCATTGTCGGTTCTGGGAGCTATGACAG
 CTCGACGACTTCGTAAACCTTCAGAAAGACGAACCGAACGGTCGAGCA
 AGCGATAACCGCCGGGCAAGAGCAGCAGTACGACGTTACAGGAGACGTC
 ATCAGCGCGGTCGTCTACCAGAGGTTTCACGTATTCGGGGCCAGAAGGAA
 AGGTCTTCGATGGCGATGCAGGGGGACTCACGCTTCCTGGGGCCGGCG
 CGTTCTGGGGGACTCTCTTCACAAATGACCTTCAGCGTCTCTACAAAGAC
 ACCGTCTCGTTCCAGTACAACGCCGTGGGGCCATACCTGAACATCAACTT
 CTTCGATAGCTCAGGTAGCTTCCTCGGCCATATCCAGTCCGGTGAGTTA
 GTACTGTGGTGGGCGTCGGCGGCGGCTCGGGTAGTTGGCACAACGCTTA
 GGAATTCCTGCA GGT
EcoR I酶切位点

图3

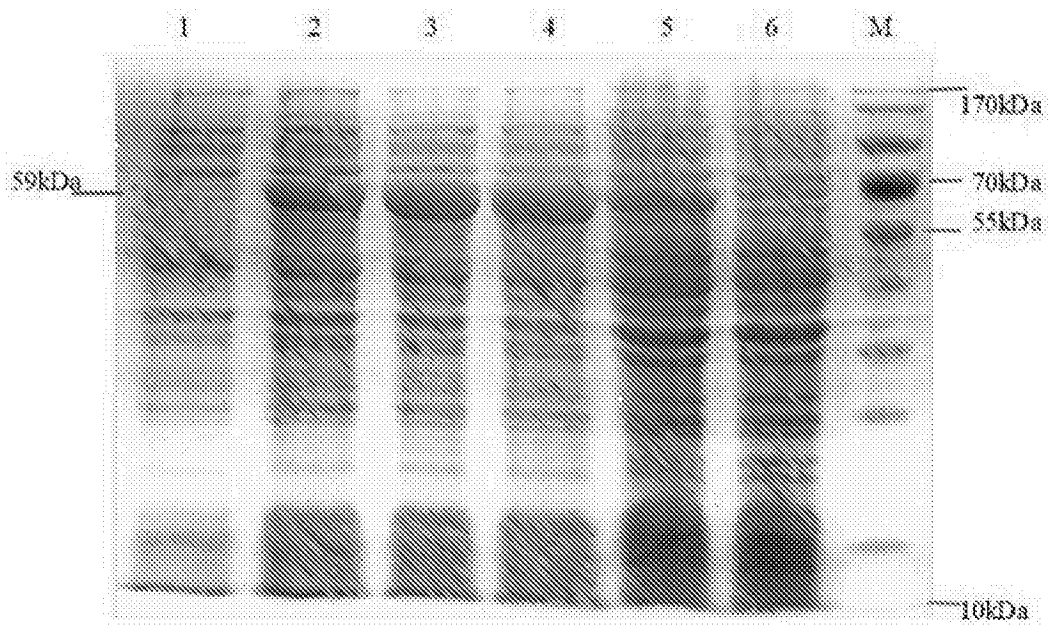


图4

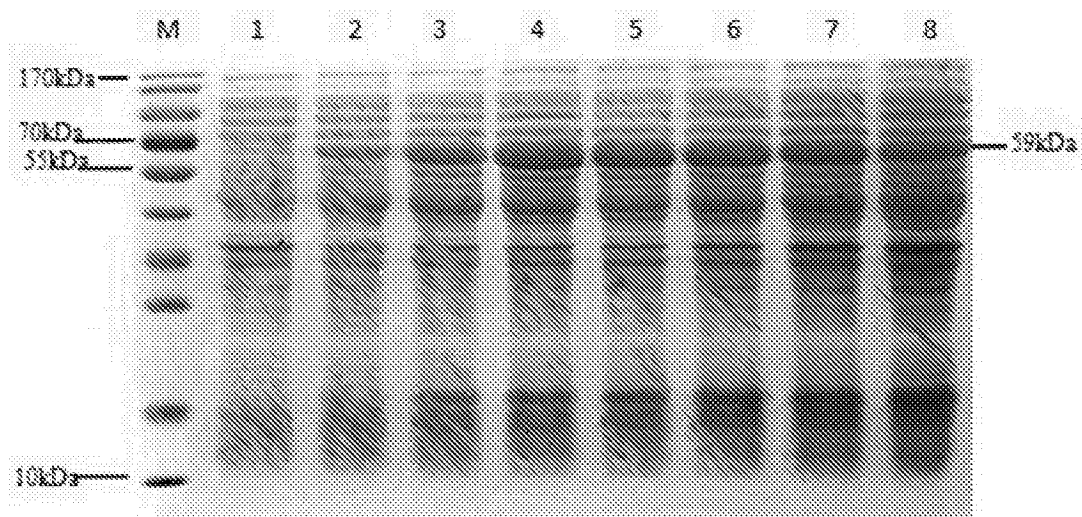


图5

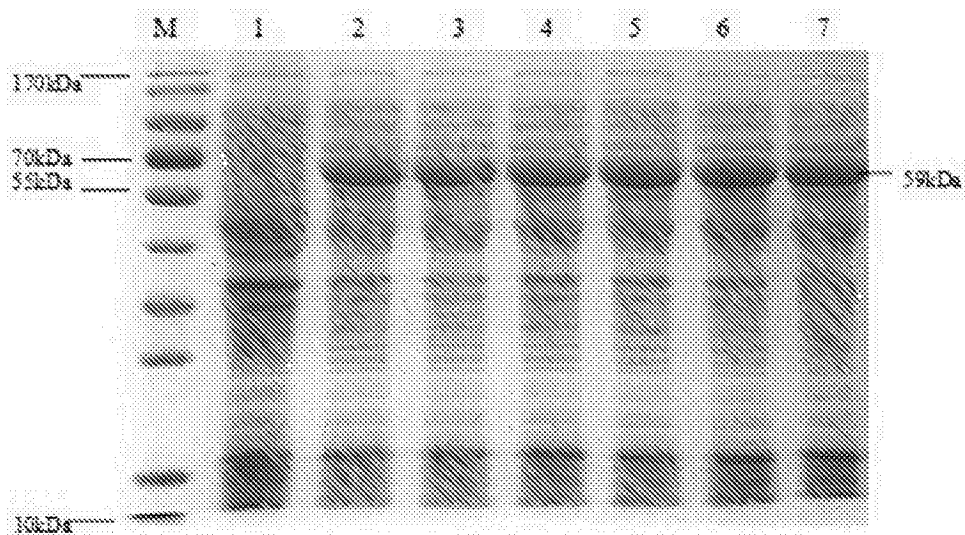


图6

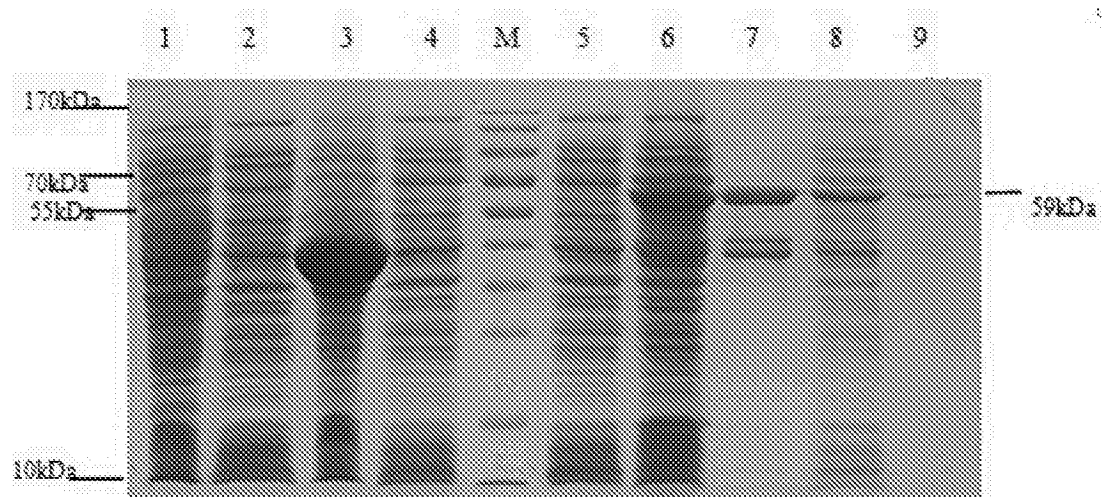


图7

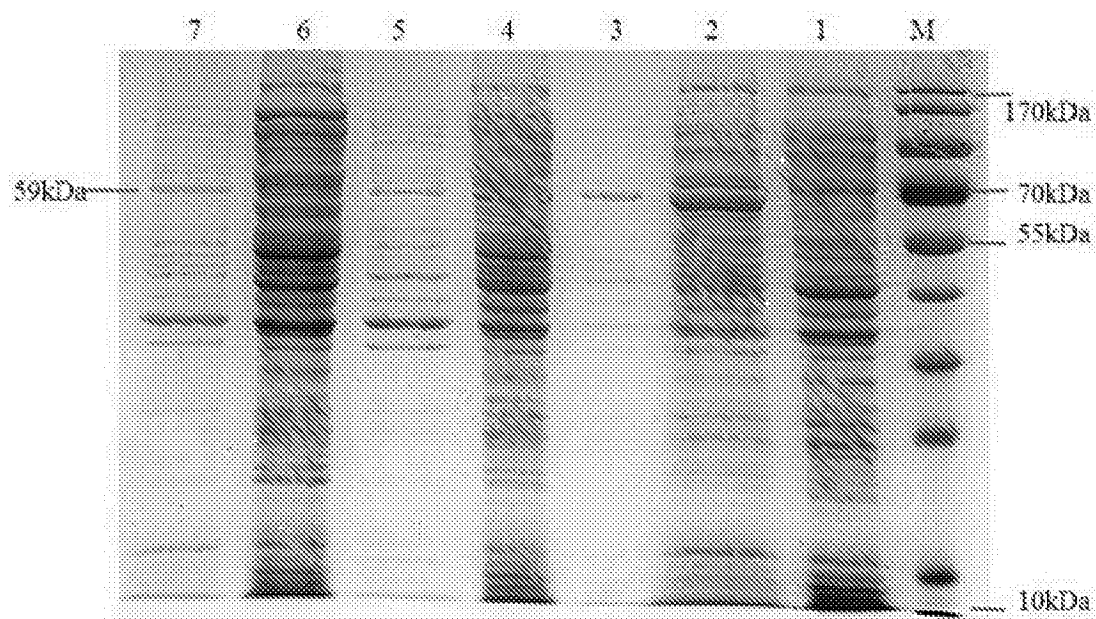


图8

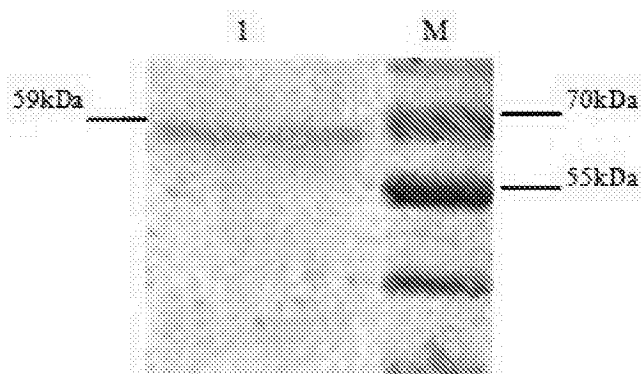


图9

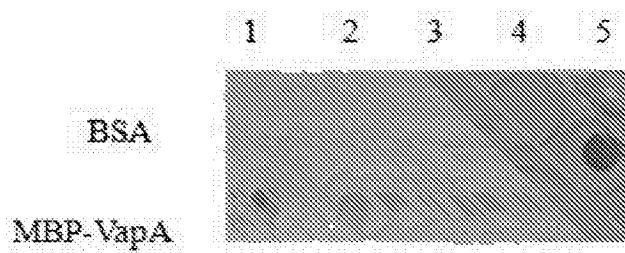


图10

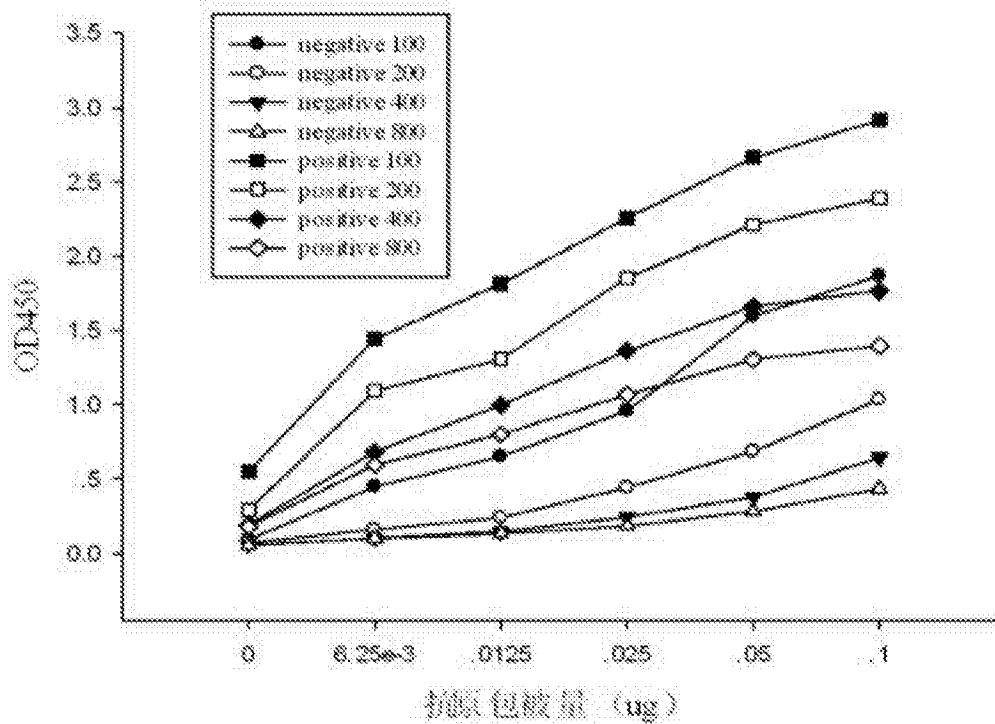


图11

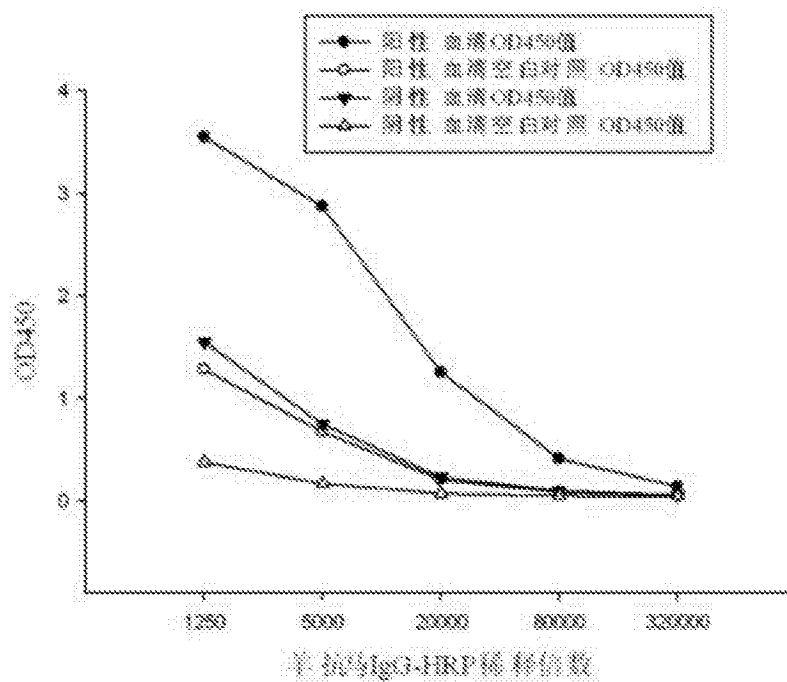


图12

专利名称(译)	一种检测马红球菌病的试剂盒		
公开(公告)号	CN104865380B	公开(公告)日	2016-09-28
申请号	CN201510273815.1	申请日	2015-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙凌霜 远立国 李守军		
发明人	孙凌霜 远立国 李守军		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911		
代理人(译)	林丽明		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN104865380A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体公开了一种检测马红球菌病的试剂盒，所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因VapA重组蛋白MBP-VapA，其氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示，所使用MBP-VapA蛋白更接近马红球菌致病基因VapA的性质。用该试剂盒进行检测，灵敏度高、特异性强、重复性和稳定性都很好，具有实际的临床应用意义。

