



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110967483 A

(43)申请公布日 2020.04.07

(21)申请号 201911381775.7

(22)申请日 2019.12.27

(71)申请人 霸州市砚创科技有限公司

地址 065000 河北省廊坊市霸州市霸州镇
王伍房村

(72)发明人 沈志功

(74)专利代理机构 北京睿博行远知识产权代理
有限公司 11297

代理人 龚家骅

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54)发明名称

恶性卡他热病毒的检测试剂盒、制备方法及其用途

(57)摘要

本发明提供恶性卡他热病毒的检测试剂盒、制备方法及其用途,属于生物技术领域,包括包被有MCFV gB重组蛋白的酶标板,所述MCFV gB蛋白为SEQ ID NO.1的序列,酶标抗体,包括HRP标记的MCFV gB重组蛋白多克隆抗体。本发明提高的制备方法能够提高重组蛋白的反应原性和免疫原性,提高纯化后的重组蛋白的纯度;提供的检测试剂盒具有较好的特异性,且操作简单,具有较高的检出率。

1. 一种恶性卡他热病毒的检测试剂盒,其特征在于,包括:
 - 包被有MCFV gB重组蛋白的酶标板,所述MCFV gB蛋白为SEQ ID NO.1的序列;
 - 酶标抗体,包括HRP标记的MCFV gB重组蛋白多克隆抗体;所述检测试剂盒的结果判断标准为:样品血清抑制率 $\geq 28.3\%$ 时,为阳性;样品血清抑制率 $<28.3\%$ 时,为阴性。
2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于:所述MCFV gB重组蛋白的制备方法包括:以MCFV基因组为模板,对MCFV gB蛋白基因进行扩增,将得到的PCR产物与表达质粒pET-28a连接后导入大肠杆菌BL21中进行诱导表达,然后经分离纯化获得。
3. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于:所述MCFV gB蛋白基因扩增所用引物为SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4。
4. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于:所述MCFV gB重组蛋白的诱导表达方法为:将含有阳性质粒的菌液接种于含Amp的液体LB中培养至菌液OD₆₀₀的值为0.45-0.55,加入终浓度为1.0mmol/L的IPTG、终浓度为0.17-0.34mmol/L的1,2,4-三氮唑钠、终浓度为1.0-1.45mmol/L的4-羟基-3-甲氧基苄醇,诱导培养4-6h。
5. 根据权利要求4所述的检测试剂盒,其特征在于:所述表达蛋白以可溶性蛋白的形式存在。
6. 根据权利要求2所述的检测试剂盒,其特征在于:所述MCFV gB重组蛋白的纯化方法为:
 - a、将诱导好的菌液离心收集沉淀,用缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH值8.0)悬浮菌体,超声破碎,离心取上清,经0.45 μ m滤膜过滤后,加入终浓度为0.6-0.83mg/mL的三甲基溴化亚砷和终浓度为0.26-0.34mg/mL的2-磺胺吡啶。
 - b、用平衡缓冲液对Ni-NTA His • Bind镍离子树脂洗涤,再用平衡缓冲液重悬后装入层析柱,自然沉降,将步骤a中的上清过柱;
 - c、用洗涤缓冲液洗去杂蛋白;
 - d、用洗脱缓冲液洗下目标蛋白。
7. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于:所述MCFV gB重组蛋白多克隆抗体的制备方法:取浓度1.13-1.25mg/mL的纯化的MCFV gB重组蛋白对家兔进行免疫,免疫程序为0d、3-5d、25-28d、32-35d,首次免疫和二次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂完全乳化,三次免疫和四次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂完全乳化,乳化后的使用剂量均为250-280 μ g/只,免疫完成后进行心脏采血并分离血清,纯化。
8. 1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇在促进可溶性重组蛋白表达中的用途。
9. 权利要求1-7任一项中所述的检测试剂盒在检测绵羊MCFV抗体中的用途。
10. 权利要求1-7任一项中所述的检测试剂盒在检测牛MCFV抗体中的用途。

恶性卡他热病毒的检测试剂盒、制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及恶性卡他热病毒的检测试剂盒、制备方法及其用途。

背景技术

[0002] 恶性卡他热(Maglignant Catarrhal Fever,MCF),病原体为疱疹病毒科,疱疹病毒属的恶性卡他热病毒(Maglignant Catarrhal Fever virus,MCFV)。本病毒时疱疹病毒中最为脆弱的一个,很难保存,也很难通过牛与牛之间进行传播,除非洲以外的世界大多数地区,牛的恶性卡他热一般都是通过接触无症状的带毒绵羊而感染。因该病通常呈散发经过,预防免疫无意义,目前尚无特效疗法。因此,通过对恶性卡他热病毒检测,将感染却无症状的带毒绵羊与牛隔离,是牛恶性卡他热的一种重要防控方法。目前对恶性卡他热病毒的检测方法主要为PCR法,但是该方法存在一些弊端:容易引起污染,出现假阳性;需要特殊的仪器设备以及试剂,不适合兽医临床大规模的检验。随着免疫学和生物技术的发展,建立敏感、特异、快速的血清学检测方法对牛恶性卡他热的防控具有重要意义。

[0003] 现有技术如授权公告号为CN 105807052 B的中国发明专利,公开了一种O型FMDV抗体直接竞争ELISA检测试剂盒,该检测试剂盒中含有酶标板、洗涤液、样品稀释液、HRP标记兔抗、底物A液、底物B液、终止液、阳性对照血清、阴性对照血清以及封板膜,其中所述酶标板包被有O型FMDV基因工程抗原。该试剂盒采用一步法加样,检测时间缩短。使用HRP标记兔抗代替酶标二抗,消除动物种属差异,可检测猪、牛、羊等血清样品。该试剂盒可克服现有血清学诊断技术的不足,具备敏感、特异、快速、制备简单等特点,可广泛应用于O型FMD疫苗免疫效果监测及流行病学调查。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的在于提供一种恶性卡他热病毒的检测试剂盒及其制备方法,该制备方法能够促进可溶性重组蛋白的表达,提高重组蛋白的反应原性和免疫原性;能够促进重组蛋白中His Tag标签的暴露,增强目的蛋白与树脂的特异性结合,提高纯化后的重组蛋白的纯度;该检测试剂盒具有较好的特异性,且操作简单,具有较高的检出率。

[0005] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

[0006] 提供一种恶性卡他热病毒的检测试剂盒,该试剂盒利用直接竞争ELISA法对恶性卡他热病毒抗体检测,包括:

[0007] 包被有MCFV gB重组蛋白的酶标板,MCFV gB蛋白为SEQ ID NO.1的序列;

[0008] 酶标抗体,包括HRP标记的MCFV gB重组蛋白多克隆抗体;

[0009] 上述检测试剂盒的结果判断标准为:样品血清抑制率 $\geq 28.3\%$ 时,为阳性;样品血清抑制率 $< 28.3\%$ 时,为阴性。

[0010] 作为优选,上述MCFV gB重组蛋白的制备方法包括:以MCFV基因组为模板,对MCFV gB蛋白基因进行扩增,将得到的PCR产物与表达质粒pET-28a连接后导入大肠杆菌BL21中进

行诱导表达,然后经分离纯化获得。

[0011] 作为优选,上述MCFV gB蛋白基因扩增所用引物为SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4。

[0012] 作为优选,上述MCFV gB重组蛋白的诱导表达方法为:将含有阳性质粒的菌液接种于含Amp的液体LB中培养至菌液OD₆₀₀的值为0.45-0.55,加入终浓度为1.0mmol/L的IPTG、终浓度为0.17-0.34mmol/L的1,2,4-三氮唑钠、终浓度为1.0-1.45mmol/L的4-羟基-3-甲氧基苄醇,诱导培养4-6h。重组蛋白的表达以包涵体的形式存在时,不可溶、无生物活性的包涵体必须经过变性、复性,才能获得天然结构和生物活性,这些复杂操作极大增加了获得高活性纯品的难度和成本,且容易造成重组蛋白的生物活性降低,导致免疫原性的降低。对重组蛋白进行诱导表达时,加入1,2,4-三氮唑钠,4-羟基-3-甲氧基苄醇,能够促进可溶性重组蛋白的表达,不需要经过复杂的变性、复性,能够提高重组蛋白的反应原性和免疫原性,提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性,进而提高试剂盒的检出率。

[0013] 作为优选,上述表达蛋白以可溶性蛋白的形式存在。

[0014] 作为优选,上述MCFV gB重组蛋白的纯化方法为:

[0015] a、将诱导好的菌液离心收集沉淀,用缓冲液(50mmol/L Tris-HCl,pH值8.0)悬浮菌体,超声破碎,离心取上清,经0.45μm滤膜过滤后,加入终浓度为0.6-0.83mg/mL的三甲基溴化亚砷和终浓度为0.26-0.34mg/mL的2-磺胺吡啶。

[0016] b、用平衡缓冲液对Ni-NTA His • Bind镍离子树脂洗涤,再用平衡缓冲液重悬后装入层析柱,自然沉降,将步骤a中的上清过柱;

[0017] c、用洗涤缓冲液洗去杂蛋白;

[0018] d、用洗脱缓冲液洗下目标蛋白。重组蛋白中含有His Tag标签,重组蛋白溶液中加入三甲基溴化亚砷和2-磺胺吡啶,有利于His Tag标签的暴露,促进His Tag序列的组氨酸与Ni²⁺的结合,增强目的蛋白与树脂的特异性结合,在保证回收率的情况下,可利用高浓度咪唑对非特异结合蛋白进行洗脱,减少非特异性结合蛋白的共纯化,提高纯化后的重组蛋白的纯度,提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性,进而提高检测试剂盒的检出率。

[0019] 作为优选,上述MCFV gB重组蛋白多克隆抗体的制备方法:取浓度1.13-1.25mg/mL的纯化的MCFV gB重组蛋白对家兔进行免疫,免疫程序为0d、3-5d、25-28d、32-35d,首次免疫和二次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂完全乳化,三次免疫和四次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂完全乳化,乳化后的使用剂量均为250-280μg/只。

[0020] 本发明的一个目的在于提供一种1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇在促进可溶性重组蛋白表达中的用途。

[0021] 本发明的一个目的在于提供一种检测试剂盒在检测绵羊MCFV抗体中的用途。

[0022] 本发明还有一个目的在于提供一种检测试剂盒在检测牛MCFV抗体中的用途。

[0023] 本发明优点在于:

[0024] 1、本发明通过以MCFV gB重组蛋白作为包被抗原,HRP标记的MCFV gB蛋白多克隆抗体为酶标抗体,采用直接竞争ELISA法对恶性卡他热病毒抗体进行检测,具有敏感,操作简单,快捷、检出率高的特点;

[0025] 2、本发明通过对MCFV gB重组蛋白的表达条件进行优化,促进可溶性形式重组蛋白的表达,提高重组蛋白的反应原性和免疫原性,提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性,进而提高检测试剂盒的检出率;

[0026] 3、本发明在纯化前对重组蛋白进行处理,能够促进His Tag标签的暴露,促进His Tag序列的组氨酸与Ni²⁺的结合,增强目的蛋白与树脂的特异性结合,在保证回收率的情况下,可利用高浓度咪唑对非特异结合蛋白进行洗脱,提高纯化后的重组蛋白的纯度,提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性,进而提高检测试剂盒的检出率。

附图说明

- [0027] 图1为本发明试验例1中的上清的SDS-PAGE电泳图;
[0028] 图2为本发明试验例1中的沉淀的SDS-PAGE电泳图;纯化后重组蛋白浓度的测定结果见图3。纯化后重组蛋白的SDS-PAGE电泳图见图4。
[0029] 图3为本发明试验例1中纯化后重组蛋白浓度的测定结果;
[0030] 图4为本发明试验例1中纯化后重组蛋白的SDS-PAGE电泳图;
[0031] 图5为本发明试验例2中重组蛋白的反应原性;
[0032] 图6为本发明试验例2中重组蛋白免疫家兔的抗体水平;
[0033] 图7为本发明试验例3中重组蛋白多克隆抗体的阻断作用;
[0034] 图8为本发明试验例3中重组蛋白多克隆抗体的Western Blot检测结果;
[0035] 图9为本发明试验例4中符合率的测定结果。

具体实施方式

[0036] 以下结合实施例对本发明作进一步详细描述:

[0037] 实施例1:本发明的技术路线是,首先,提取OHV-2病毒的总RNA,反转录成cDNA,通过PCR扩增出gB蛋白的基因。然后构建pET28a-gB重组质粒。再转化质粒得到gE蛋白的原核表达系统,通过诱导表达、分离纯化得到重组gE蛋白。使用重组gE蛋白免疫家兔,免疫成功后,经心脏采血、分离血清及纯化,得到多克隆抗体,进而制备酶标多克隆抗体。最后组装成恶性卡他热病毒的检测试剂盒。

[0038] 细胞及细胞株采用:E.coli BL21,用于pET28a-gB阳性质粒的筛选和重组gB蛋白的表达。

[0039] Axyprep体液病毒DNA/RNA小量试剂盒、M-MLV反转录酶、RNA酶抑制剂购自Invitrogen公司。TaqDNA聚合酶、T4DNA连接酶及内切酶均购自NEB公司。DNA胶回收试剂盒购自天根公司。gE蛋白基因扩增的引物序列如下:

[0040] gB-XF:CTGGATCCCATCTATTGGTAATGATACAGCCAC;

[0041] gB-XR:TGAAGCTTATGGCAAGGTTACCGTATGCTACGT。

[0042] 1.1. OHV-2病毒RNA的提取

[0043] 取200μL OHV-2毒株扩增后的病毒液按Axyprep体液病毒DNA/RNA小量试剂盒的操作程序提取OHV-2总RNA。

[0044] 2. gB蛋白的原核表达系统的构建

[0045] 2.1 OHV-2-gB蛋白基因的PCR扩增:

[0046] 以提取的OHV-2RNA为模板,快速将其溶于17μL DEPC H₂O中,用于反转录反应,加入gB-XF、gB-XR各0.5μL,75℃作用5min,冰浴3min后,加入如下反应体系:

[0047] 5×RT Buffer 5μL

[0048] dNTPs (10mmol/L) 1.5μL

[0049] M-MLV 0.5μL

[0050] 42℃ 45min, 95℃ 5min, 得cDNA。

[0051] 以反转录得到的cDNA作为模板, PCR扩增gB蛋白基因。反应体系 (30μL) 如下:

cDNA 2μL

10× Taq Buffer 5μL

gB-XF(50pmol/μL) 2μL

[0052] gB-XR (50pmol/μL) 2μL

dNTPs(10mmol/L) 2μL

Taq DNA 酶(10U/μL) 1μL

ddH₂O 16μL

[0053] 混匀, 置PCR扩增仪中, 94℃预变性3min, 再按如下程序循环: 94℃变性40s, 52℃退火40s, 72℃延伸1min, 经32个循环后, 72℃延伸10min。

[0054] 经1%琼脂糖凝胶电泳后, 按照OMEGA琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒使用说明书回收纯化的目的片段。

[0055] 2.2 重组pET28a-gB质粒的构建:

[0056] 将gB蛋白基因的PCR产物分别用BamHI与HindIII对目的片段、pET-28a载体进行双酶切, 将酶切后的目的片段和pET-28a载体进行连接。酶切体系如下:

纯化后的目的片段/pET-28a 20μL

10×K Buffer 5μL

BamH I 2.5μL

[0057] Hind III 2.5μL

ddH₂O 20μL

Total 50μL

[0058] 混合均匀后放入37℃水浴锅中, 反应3h, 1%琼脂糖凝胶电泳, 切取目的条带, 用OMEGA琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化酶切产物。连接体系如下:

目的基因酶切产物 12μL

pET-28a(+) 5μL

[0059] 10×T4 DNA Ligase Buffer 2μL

T4 DNA Ligase 1μL

[0060] 放于PCR仪中, 16℃反应12h, 反应结束后, 将EP管置于冰盒中。

[0061] 将连接产物10μL加至60μL E.coli BL21感受态细胞中, 冰上放置25min; 42℃热激90s, 立即置于冰上2min; 加入500μL LB液体培养基, 37℃、200r/min震荡培养1h; 均匀地涂布于含氨苄青霉素的LB平板上, 倒置于37℃培养箱中培养过夜。小量法提取质粒并进行

酶切和PCR分析、鉴定,阳性表达质粒再次转化于BL21感受态细胞中,涂板、提质粒、经PCR、酶切鉴定,阳性克隆送上海博亚测序。得到的gB基因为523bp,测得序列如SEQ ID NO.2所示,所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,具体如下:

[0062] gB基因,SEQ ID NO.2:

[0063] ACACAGGGCTTCCCTAATGTGGAATGAGTTAAGTAAATTAATCCTACTAGTGTGATGAGCTCTATTT
ACGGACGGCCAGTCTCAGCCAAGCGAATTGGTGACGTAATATCTGTTTCCCACTGTGTAGTGGTGGACCAGCAAAG
TGTGTCTCTACACAGGAACATGCGCGTTCCTGGGCGAGACCACGCGCACGAGTGCTACTCTAGGCCGCTGTGACC
TTCAAGTTTATTAATGACAGTCACTTGTACAAAGGCCAACTGGGCGTAAACAATGAAATTCTGCTTACAACAACCG
CCCTGGAAGTGTGCCATGAGAACACCGAACATTATTTTCAAGGGGGGAACAACATGTACTTTTACAAAACTACAG
ACACGTAAAAACCATACCTGTGAGCGCCATCGCTACCCTAGATACCTTTATTGTGCTTAACGTAACCCTAGTAGAA
AACATTGGCTTTCAGGTCATAGAAGTGTACTCTAGAGAAGAAAAGCGCATGAGCACGGTTTTTGACATTGAGACC;

[0064] gB基因的氨基酸序列,SEQ ID NO.1:

[0065] HRASLMWNELSKINPT
GTGTGATGAGCTCTATTTACGGACGGCCAGTCTCAGCCAAGCGAATTGGT
SVMSSSYGRPVSAKRIG
GACGTAATATCTGTTTCCCACTGTGTAGTGGTGGACCAGCAAAGTGTGTCT
DVISVSHCVVVDQQQS
VSLHRNMRVPGRDHAHEC
CTCTAGGCCGCTGTGACCTTCAAGTTTATTAATGACAGTCACTTGTACAA
YSRPPVTFKFINDSHLY
AGGCCAACTGGGCGTAAACAATGAAATTCTGCTTACAACAACCGCCCTGG
K G Q L G V N N E I L L T T T A L
AAGTGTGCCATGAGAACACCGAACATTATTTCAAGGGGGGAACAACATG
E V C H E N T E H Y F Q G G N N M
TACTTTTACAAAACTACAGACGTAACCATACCTGTGAGCGCCAT
Y F Y K N Y R H V K T I P V S A I
CGCTACCCTAGATACCTTTATTGTGCTTAACGTAACCCTAGTAGAAAACAT
A T L D T F I V L N V T L V E N
TGGCTTTCAGGTCATAGAAGTGTACTCTAGAGAAGAAAAGCGCATGAGCA
I G F Q V I E L Y S R E E K R M S
CGGTTTTTGACATTGAGACC
T V F D I E T

[0066] SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.1对应如下:

[0067] ACACAGGGCTTCCCTAATGTGGAATGAGTTAAGTAAATTAATCCTACTA
H R A S L M W N E L S K I N P T
GTGTGATGAGCTCTATTTACGGACGGCCAGTCTCAGCCAAGCGAATTGGT
S V M S S I Y G R P V S A K R I G
GACGTAATATCTGTTTCCCACTGTGTAGTGGTGGACCAGCAAAGTGTGTCT
D V I S V S H C V V V D Q Q S V S
CTACACAGGAACATGCGCGTTCCTGGGCGAGACCACGCGCACGAGTGCTA
L H R N M R V P G R D H A H E C
CTCTAGGCCGCTGTGACCTTCAAGTTTATTAATGACAGTCACTTGTACAA
Y S R P P V T F K F I N D S H L Y
AGGCCAACTGGGCGTAAACAATGAAATTCTGCTTACAACAACCGCCCTGG
K G Q L G V N N E I L L T T T A L
AAGTGTGCCATGAGAACACCGAACATTATTTCAAGGGGGGAACAACATG
E V C H E N T E H Y F Q G G N N M
TACTTTTACAAAACTACAGACGTAACCATACCTGTGAGCGCCAT
Y F Y K N Y R H V K T I P V S A I
CGCTACCCTAGATACCTTTATTGTGCTTAACGTAACCCTAGTAGAAAACAT
A T L D T F I V L N V T L V E N
TGGCTTTCAGGTCATAGAAGTGTACTCTAGAGAAGAAAAGCGCATGAGCA
I G F Q V I E L Y S R E E K R M S
CGGTTTTTGACATTGAGACC
T V F D I E T

[0068] 3. 重组蛋白的诱导表达

[0069] 将含有pET28a-gB质粒的菌液接种于含Amp的液体LB中,37℃,180rpm摇床培养至菌液OD₆₀₀的值为0.5,加入终浓度为1.0mmol/L的IPTG、终浓度为0.18mmol/L的1,2,4-三氮唑钠,终浓度为1.2mmol/L的4-羟基-3-甲氧基苄醇,37℃,150rpm条件下,诱导培养6h。

[0070] 4. 重组蛋白的分离纯化

[0071] 将1L诱导好的菌液10000rpm离心5min,收集沉淀,用20mL缓冲液(50mmol/L Tris-HCl,pH值8.0)悬浮菌体,超声破碎5min,10000rpm离心5min取上清,经0.45μm滤膜过滤后,加入终浓度为0.6mg/mL的三甲基溴化亚砷和终浓度为0.28mg/mL的2-磺胺吡啶;用平衡缓冲液(46mM Na₃PO₄ 3.8g,500mM NaCl 14.61g,500mL H₂O,pH7.4)对Ni-NTA His•Bind镍离

子树脂洗涤,再用平衡缓冲液重悬后装入层析柱,自然沉降,将上清过柱;用洗涤缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,50mM咪唑,pH8.0)洗去杂蛋白;用洗脱缓冲液(50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,250mM咪唑,pH8.0)洗下目标蛋白,离心取上清。

[0072] 5. 重组蛋白的鉴定

[0073] 经SDS-PEG电泳检测得到25kDa左右的蛋白特征带,为预期分子量的目的蛋白。

[0074] 6. HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体的制备

[0075] 取浓度1.15mg/mL的纯化的MCFV gB重组蛋白对成年大耳白兔背部脊柱两侧、腹部、腋窝等皮下多点进行免疫,免疫程序为0d、3d、26d、33d,首次免疫和二次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂完全乳化,三次免疫和四次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂完全乳化,乳化后的使用剂量均为250μg/只,免疫完成后进行心脏采血并分离血清,使用辛酸-硫酸铵法和G蛋白柱法纯化。使用NaIO₄将HRP表面的糖分子氧化成醛基,然后与血清抗体的氨基结合,获得HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体。

[0076] 7. 组装恶性卡他热病毒的检测试剂盒

[0077] ELISA筛选出合适gB重组蛋白抗原后,组装恶性卡他热病毒的检测试剂盒。该试剂盒包括抗体包被条板、阴性对照血清、阳性对照血清、试剂稀释液、HRP标记的gB蛋白多克隆抗体、10×浓缩洗涤液、显色剂、终止液。具体组成见表1。

[0078] 表1恶性卡他热病毒的检测试剂盒组分

	名称	90 Tests	保存条件
	抗原包被条	8×12	4℃
	阳性对照血清	1 管 (1mL)	4℃
	阴性对照血清	1 管 (1mL)	4℃
[0079]	试剂稀释液 (15mL/瓶)	1 瓶	4℃
	HRP 标记的 gB 重组蛋白多克隆 抗体	1 管 (100μL)	4℃ (避光)
	20×浓缩液洗涤液	1 瓶 (125mL/瓶)	4℃
	显色剂	1 瓶 (20mL)	4℃ (避光)
	终止液	1 瓶 (20mL)	4℃
	封板膜	3 张	-
[0080]	说明书	1 份	-

[0081] 抗原包被板条的制备包括以下步骤:

[0082] 用包被液(0.05M,pH9.6的碳酸盐缓冲液)稀释gB重组蛋白至浓度为18μg/mL,按照每孔100μL的量加入96孔酶标板,37℃包被2h,4℃继续包被12h,用PBST洗涤3次,每次洗涤5min,洗涤结束后拍干;按照每孔200μL的量将含有1%BSA的PBS封闭液(50mL PBS液中加入0.25g BSA)加入酶标板,37℃封闭3h,用PBS-T洗涤3次,每次洗涤5min,洗涤结束后拍干。

[0083] 阴性对照血清为未感染恶性卡他热病毒的绵羊的阴性血清。阳性对照血清为感染

恶性卡他热病毒的绵羊的阳性血清。试剂稀释液为pH值为7.2、牛血清白蛋白含量为1% (W/V) 的磷酸盐缓冲液。浓缩洗涤液为pH值为7.2、吐温20含量为0.1% (V/V) 的磷酸盐缓冲液。显色剂是四甲基联苯胺。终止液为1N HCl (1N盐酸)。封板膜为与酶标板的板面大小一致的透明塑料膜。

[0084] 利用本发明的试剂盒进行牛水泡口炎病毒的检测,采用直接竞争ELISA检测法。gB重组蛋白抗原包被于酶标板上,分别加入待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清,再加入HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体,37℃孵育30min,HRP标记的特异性兔源抗体与待测血清样品中的MCFV抗体竞争结合酶标板微孔中包被的gB重组蛋白抗原。加入显色液,通过HRP催化显色反应,在450nm处测OD值,显色深浅与待测样品中的抗体含量呈反相关。具体包括以下步骤:

[0085] 试验所需自备试验器材:

[0086] 1) 酶标仪 (450nm检测波长滤光片,570nm或690nm校正波长滤光片);

[0087] 2) 高精度加液器及一次性吸头:0.5-10μL,2-20μL,20-200μL,200-1000μL;

[0088] 3) 微孔板振荡器,双蒸水或去离子水。

[0089] 标本收集:

[0090] 1) 收集血液的试管应为一次性的无热原,无内毒素试管;

[0091] 2) 血浆抗凝剂推荐使用EDTA,避免使用溶血,高血脂标本;

[0092] 3) 标本应清澈透明,悬浮物应离心去除;

[0093] 4) 标本收集后若不及时检测,需按一次使用量分装,冻存于-20℃或-70℃冰箱避免反复冻融;

[0094] 5) 可根据标本的实际情况,做适当倍数稀释。

[0095] 注意事项:

[0096] 1) 试剂盒使用前请保存在2-8℃;

[0097] 2) 阳性对照血清、阴性对照血清、HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体体积小,运输中颠簸和可能的倒置会使液体沾到管壁或瓶盖。因此使用前请用手甩几下或1000rpm离心1分钟,以使附着管壁或瓶盖的液体沉积到管底;

[0098] 3) 从冰箱中取出的浓缩洗涤液可能有结晶,属于正常现象,微加热至40℃使结晶完全溶解后再配制洗涤液;

[0099] 4) 不同批号的试剂盒组份不能混用(洗涤液和反应终止液除外);

[0100] 5) 充分轻微混匀对反应结果尤为重要,最好使用微量振荡器(使用最低频率),如无微量振荡器,可在反应前手工轻轻晃动酶标板,使加入孔中的反应液混匀;

[0101] 6) 酶免试验中阳性对照血清、阴性对照血清和样本检测时建议作复孔。

[0102] 检测前准备工作:

[0103] 1) 提前20分钟从冰箱中取出试剂盒,以平衡至室温;

[0104] 2) 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20),未用完的放回4℃冰箱;

[0105] 3) 阳性对照血清、阴性对照血清:根据需要进行稀释,建议按1:16进行稀释;

[0106] 4) HRP标记的gB蛋白多克隆抗体工作液:按当次试验所需用量,用试剂稀释液稀释HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体(1:500)配置成生物素化抗体工作液。使用前30分钟准备。仅供当日使用。

[0107] 洗涤方法:

[0108] 1) 自动洗板机:要求注入的洗涤液为350 μ L,注入与吸出间隔20-30秒。洗板4次;

[0109] 2) 手工洗板:每孔加洗涤液350 μ L,静置30秒后甩尽孔内液体,在厚迭吸水纸上拍干,洗板5次。

[0110] 操作步骤:

[0111] 1) 从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条,未用的板条和干燥剂请放回铝箔袋内封存于4 $^{\circ}$ C;

[0112] 2) 留空白孔(若使用双波长读板,空白孔可以不设);

[0113] 3) 提前准备好样本、阳性对照血清、阴性对照血清,HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体工作液;

[0114] 4) 先将阳性对照血清、阴性对照血清分别加入相应孔中(100 μ L/孔);在每个样本孔中加入50 μ L样本稀释液和50 μ L样本(此时样本已做了1:2倍稀释,计算结果时样本含量要乘以2),除空白孔外,加入HRP标记的gB重组蛋白多克隆抗体工作液(100 μ L/孔)。用封板胶纸封住反应孔;

[0115] 5) 37 $^{\circ}$ C孵育30min。最好使用微量振荡器(最低频率,100rpm);

[0116] 6) 洗板5次;

[0117] 7) 加入显色底物(包括空白孔)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C避光孵育15分钟;

[0118] 8) 加入终止液(包括空白孔)100 μ L/孔,混匀后即刻测量OD₄₅₀值(10分钟内)。

[0119] 结果判断:

[0120] 计算抑制率。样本血清抑制率 $\geq 28.3\%$ 时,为阳性;样品血清抑制率 $< 28.3\%$ 时,为阴性。抑制率计算公式:

[0121] 抑制率 = $[(\text{阴性对照OD}_{450} - \text{样本血清OD}_{450}) / (\text{阴性对照OD}_{450} - \text{阳性对照OD}_{450})] \times 100\%$

[0122] 对比例1:

[0123] 对重组蛋白进行诱导表达时,未加入1,2,4-三氮唑钠,其余部分和实施例1完全一致。

[0124] 对比例2:

[0125] 对重组蛋白进行诱导表达时,未加入4-羟基-3-甲氧基苄醇,其余部分和实施例1完全一致。

[0126] 对比例3:

[0127] 对重组蛋白进行诱导表达时,未加入1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇,其余部分和实施例1完全一致。

[0128] 对比例4:

[0129] 将1L诱导好的菌液10000rpm离心5min,收集沉淀,用20mL缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH值8.0)悬浮菌体,超声破碎5min,10000rpm离心5min,收集沉淀,溶解于含6M盐酸胍的Tris-HCl缓冲液中,冰上静置1h,间歇混匀溶解,离心收集上清;向收集的上清中加入Ni-NTA His•Bind树脂,再加入结合缓冲液(0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-Cl pH8.0)将其轻轻混匀,混悬30min,用25 μ L洗脱缓冲液(0.1M NaH₂PO₄, 0.01M Tris-Cl pH4.5)洗下目的蛋白,离心收集上清。其余部分和对比例3完全一致。

[0130] 对比例5:

[0131] 重组蛋白过柱纯化前,未加入三甲基溴化亚砷,所用洗涤缓冲液中咪唑的浓度为25mM,其余部分和实施例1完全一致。

[0132] 对比例6:

[0133] 重组蛋白过柱纯化前,未加入2-磺胺吡啶,所用洗涤缓冲液中咪唑的浓度为25mM,其余部分和实施例1完全一致。

[0134] 对比例7:

[0135] 重组蛋白过柱纯化前,未加入三甲基溴化亚砷和2-磺胺吡啶,所用洗涤缓冲液中咪唑的浓度为25mM,其余部分和实施例1完全一致。

[0136] 对比例8:

[0137] 重组蛋白过柱纯化前,未加入三甲基溴化亚砷,其余部分和实施例1完全一致。

[0138] 对比例9:

[0139] 重组蛋白过柱纯化前,未加入2-磺胺吡啶,其余部分和实施例1完全一致。

[0140] 对比例10:

[0141] 重组蛋白过柱纯化前,未加入三甲基溴化亚砷和2-磺胺吡啶,其余部分和实施例1完全一致。

[0142] 试验例1:

[0143] 1. 重组蛋白表达形式的鉴定:

[0144] 将1L诱导好的菌液10000rpm离心5min,收集沉淀,用20mL缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH值8.0)悬浮菌体,超声破碎5min,10000rpm离心5min,分别收集沉淀和上清进行SDS-PAGE分析。

[0145] 上清的SDS-PAGE电泳图见图1。沉淀的SDS-PAGE电泳图见图2。

[0146] 由图1、图2可以看出,实施例1、对比例1、对比例2、对比例3均成功诱导表达了分子量约为25kDa的重组蛋白。实施例1诱导表达的重组蛋白以可溶性蛋白的形式存在,对比例1、对比例2、对比例3诱导表达的重组蛋白以包涵体的形式存在,这说明,用1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇对重组蛋白进行诱导表达时,能够促进可溶性重组蛋白的表达。

[0147] 2. 重组蛋白浓度的检测:用Thermo公司的BCA蛋白浓度试剂盒对纯化后的蛋白进行浓度检测,按照说明书步骤进行。

[0148] 3. 重组蛋白纯度的检测:将纯化后的重组蛋白使用SDS-PAGE电泳进行检测。

[0149] 纯化后重组蛋白浓度的测定结果见图3。纯化后重组蛋白的SDS-PAGE电泳图见图4。

[0150] 由图3可以看出,实施例1中纯化后重组蛋白的浓度明显高于对比例8、对比例9、对比例10,由图4可以看出,实施例1中在约25kDa处存在明显、单一的目的蛋白条带,对比例5、对比例6、对比例7中25kDa处的条带较为模糊,且存在杂带,这说明,重组蛋白溶液中加入三甲基溴化亚砷和2-磺胺吡啶,有利于His Tag标签的暴露,促进His Tag序列的组氨酸与Ni²⁺的结合,增强目的蛋白与树脂的特异性结合,可在保证回收率的情况下使用较高浓度的咪唑对非特异结合蛋白进行洗脱,提高纯化后的重组蛋白的纯度。

[0151] 试验例2:

[0152] 重组蛋白的反应原性检测:包被抗原0.25μg/孔重组蛋白,用恶性卡他热病毒感染

的绵羊血清和未感染的绵羊血清进行间接ELISA实验,在450nm波长下,用酶标仪读取其吸光值。并计算阳性血清OD值/阴性血清OD值(P/N)。

[0153] 重组蛋白的免疫原性检测:

[0154] 取浓度1.15mg/mL的纯化的MCFV gB重组蛋白对成年大耳白兔背部脊柱两侧、腹部、腋窝等皮下多点进行免疫,免疫程序为0d、3d、26d、33d,首次免疫和二次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂完全乳化,三次免疫和四次免疫采用重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂完全乳化,乳化后的使用剂量均为250 μ g/只,以PBS作为阴性对照,分别于免疫18d、33d、56d、72d采血并分离血清,使用辛酸-硫酸铵法和G蛋白柱法纯化。包被抗原0.25 μ g/孔重组蛋白,间接ELISA法检测不同免疫时间多克隆抗体(1:100稀释)的水平。重组蛋白的反应原性见图5。重组蛋白免疫家兔的抗体水平见图6。

[0155] 由图5可以看出,实施例1中可溶性形式的重组蛋白和对比例4中包涵体形式的重组蛋白均与感染绵羊的阳性血清发生反应,但与对比例4相比,实施例1与阳性血清发生的反应较强,吸光度值较大,且与阴性血清的反应较弱,吸光度值较小,P/N较大;由图6可以看出,与阴性对照相比,吸光度值明显较高,用可溶性形式的重组蛋白和包涵体形式的重组蛋白免疫家兔后均能产生重组蛋白的特异性抗体,并可以持续到首免后72d,但与对比例4相比,实施例1中可溶性形式的重组蛋白诱导产生的抗体水平较高,免疫反应较强,这说明,用1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇对重组蛋白进行诱导表达时,表达的重组蛋白以可溶性蛋白形式存在,能够提高重组蛋白的反应原性、免疫原性。

[0156] 试验例3:

[0157] 重组蛋白多克隆抗体的特异性检测:

[0158] 取免疫33d后获得的多克隆抗体进行特异性检测。

[0159] 1. 重组蛋白多克隆抗体对恶性卡他热病毒的阻断作用:

[0160] 细胞培养:将NA细胞接种至细胞瓶中,待细胞长满细胞瓶时,倒去培养基,PBS洗涤3次,每次5mL;加入适量胰酶消化细胞,缓慢晃动细胞瓶,大约消化1.5min;倒去胰酶,用培养基将细胞吹打下来,1000rpm离心2min;加入新鲜培养基,并转移到新的细胞瓶。细胞传代后第二天,细胞长到单层时,倒去培养基并用PBS洗涤3次,加入稀释的OHV-2病毒混合液;培养1h后倒去混合液,PBS洗涤干净,加入细胞维持培养基;接毒48h后,倒去培养基并用PBS洗涤3次,加入适量细胞裂解液和10%蛋白酶抑制剂,置于4 $^{\circ}$ C裂解20min;将裂解液转移到EP管,4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心15min,弃去沉淀,取上清,用0.5%的Triton X 100穿透后,-70 $^{\circ}$ C冻融2次,包被ELISA板(0.25 μ g/孔),检测重组蛋白多克隆抗体(1:100稀释)的阻断作用,PBS免疫的为阴性对照。

[0161] 2. Western Blot:将上述对细胞裂解获得的蛋白的SDS-PAGE转PVDF膜,一抗为重组蛋白多克隆抗体(1:100稀释),二抗为HRP标记的兔抗氧IgG抗体,1:5000稀释。重组蛋白多克隆抗体的阻断作用见图7。重组蛋白多克隆抗体的Western Blot检测结果见图8。

[0162] 由图7可以看出,实施例1中的重组蛋白多克隆抗体与恶性卡他热病毒蛋白的反应的OD₄₅₀值明显高于对比例4、对比例5、对比例6、对比例7。由图8可以看出,实施例1中的重组蛋白多克隆抗体与恶性卡他热病毒gB蛋白发生特异性反应,在21kDa左右存在明显、单一的特异性条带,对比例4、对比例5、对比例6、对比例7在21kDa处的特异性条带较为模糊,且存在其他非特异性条带。这说明,用1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇对重组蛋白进

行诱导表达时,表达的重组蛋白以可溶性蛋白形式存在,能够提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性;重组蛋白溶液中加入三甲基溴化亚砷和2-磺胺吡啶,能够提高纯化后的重组蛋白的纯度,提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性。

[0163] 试验例4:

[0164] 临床检测:采用市场上已获得生产许可的恶性卡他热病毒PCR诊断试剂盒与本试剂盒进行比较,按试剂盒说明书以及操作方法对80份绵羊血清进行检测,计算该试剂盒的阳性符合率、阴性符合率及总符合率。符合率的测定结果见图9。

[0165] 由图9可以看出,实施例1的的阳性符合率、阴性符合率及总符合率菌明显高于对比例1、对比例4、对比例5、对比例6、对比例7。这说明,用1,2,4-三氮唑钠和4-羟基-3-甲氧基苄醇对重组蛋白进行诱导表达时,表达的重组蛋白以可溶性蛋白形式存在,能够提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性,进而提高试剂盒的检出率;重组蛋白溶液中加入三甲基溴化亚砷和2-磺胺吡啶,能够提高纯化后的重组蛋白的纯度,提高重组蛋白多克隆抗体的亲和力和特异性,进而提高试剂盒检出率。

[0166] 上述实施例中的常规技术为本领域技术人员所知晓的现有技术,故在此不再详细赘述。

[0167] 以上实施方式仅用于说明本发明,而并非对本发明的限制,本领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出各种变化和变型。因此,所有等同的技术方案也属于本发明的范畴,本发明的专利保护范围应由权利要求限定。

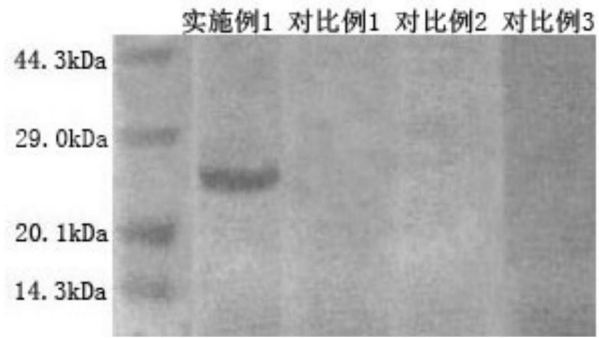


图1

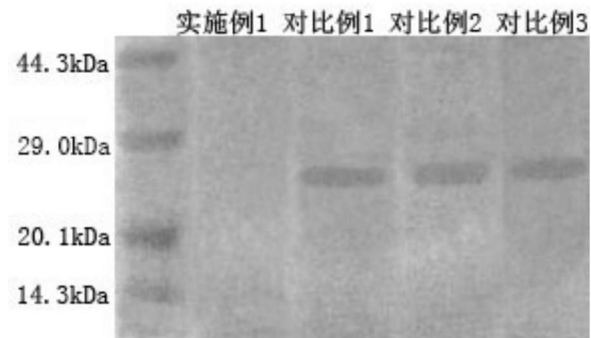


图2

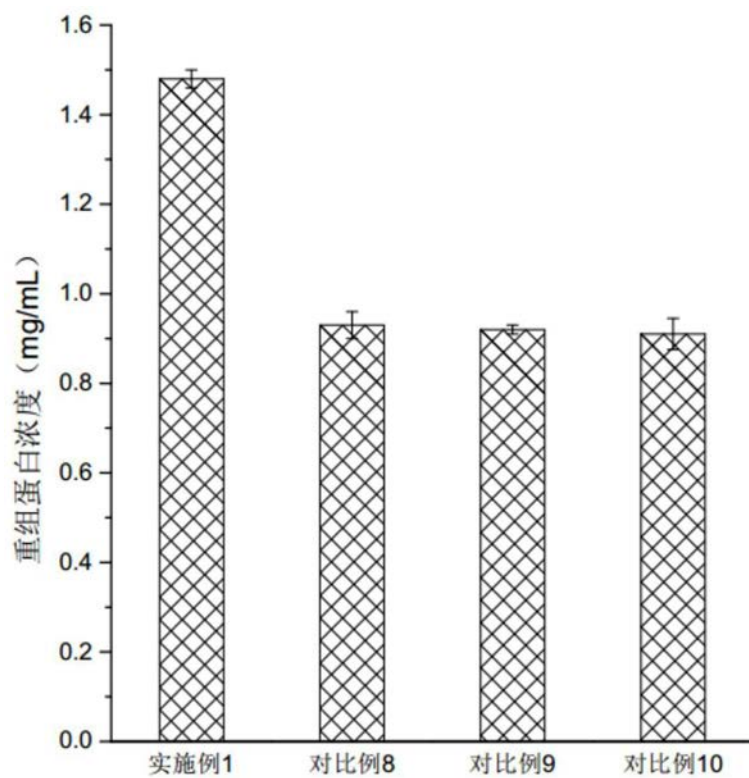


图3

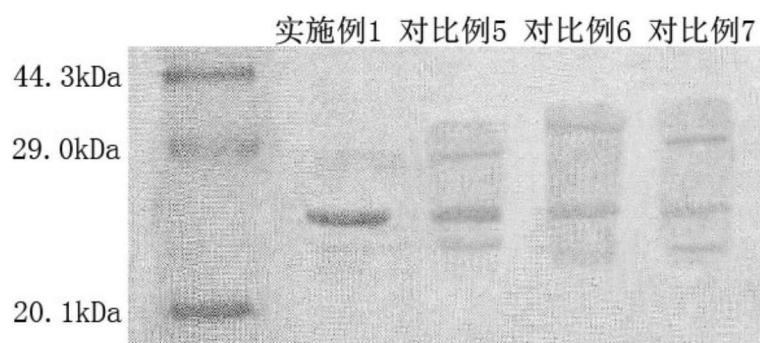


图4

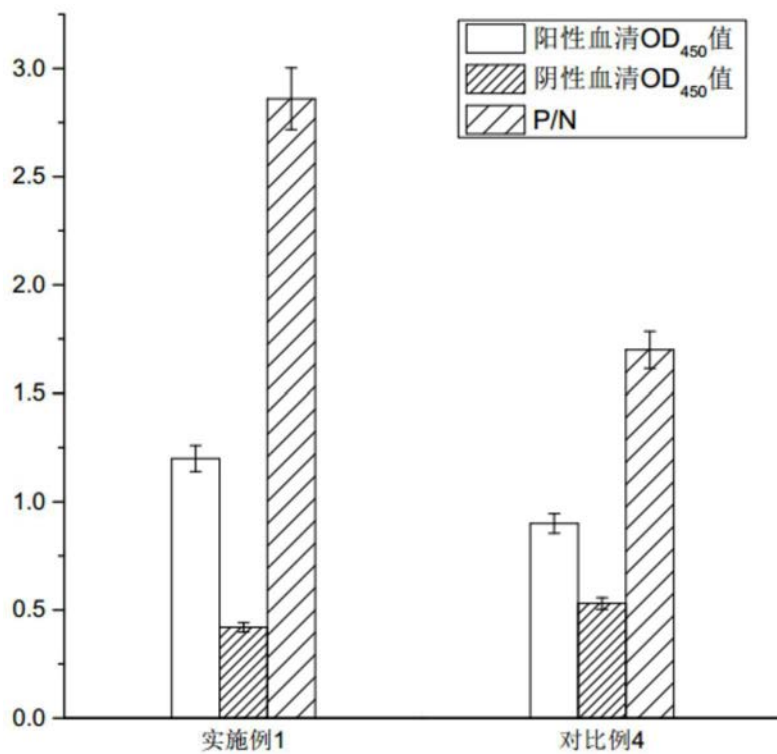


图5

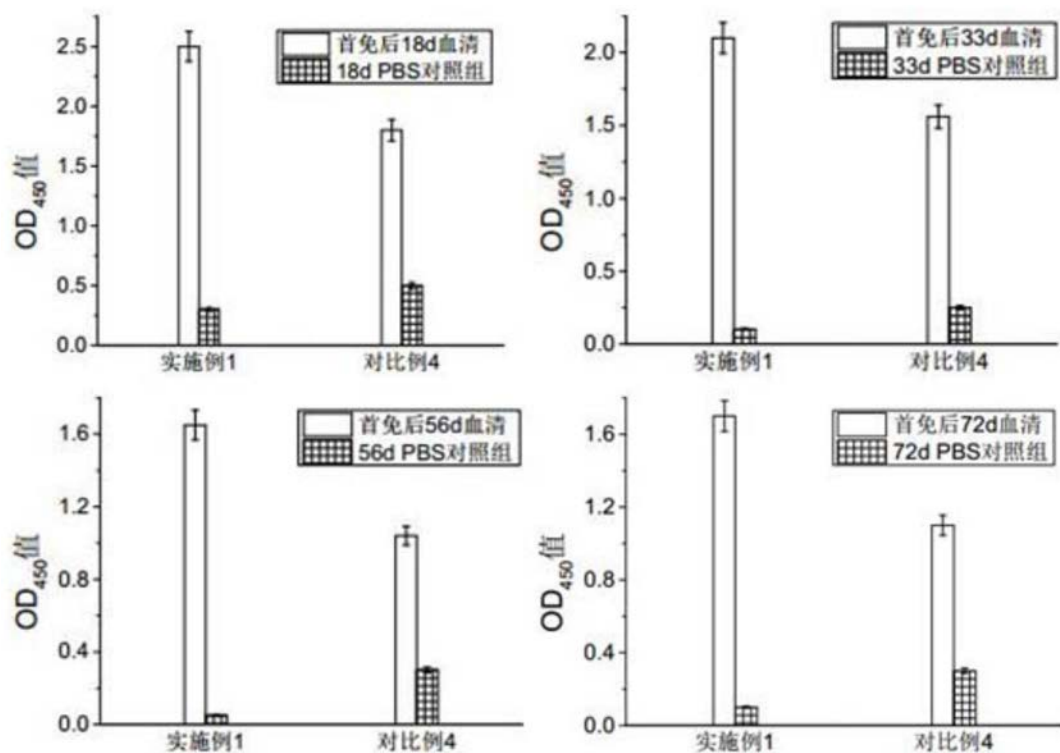


图6

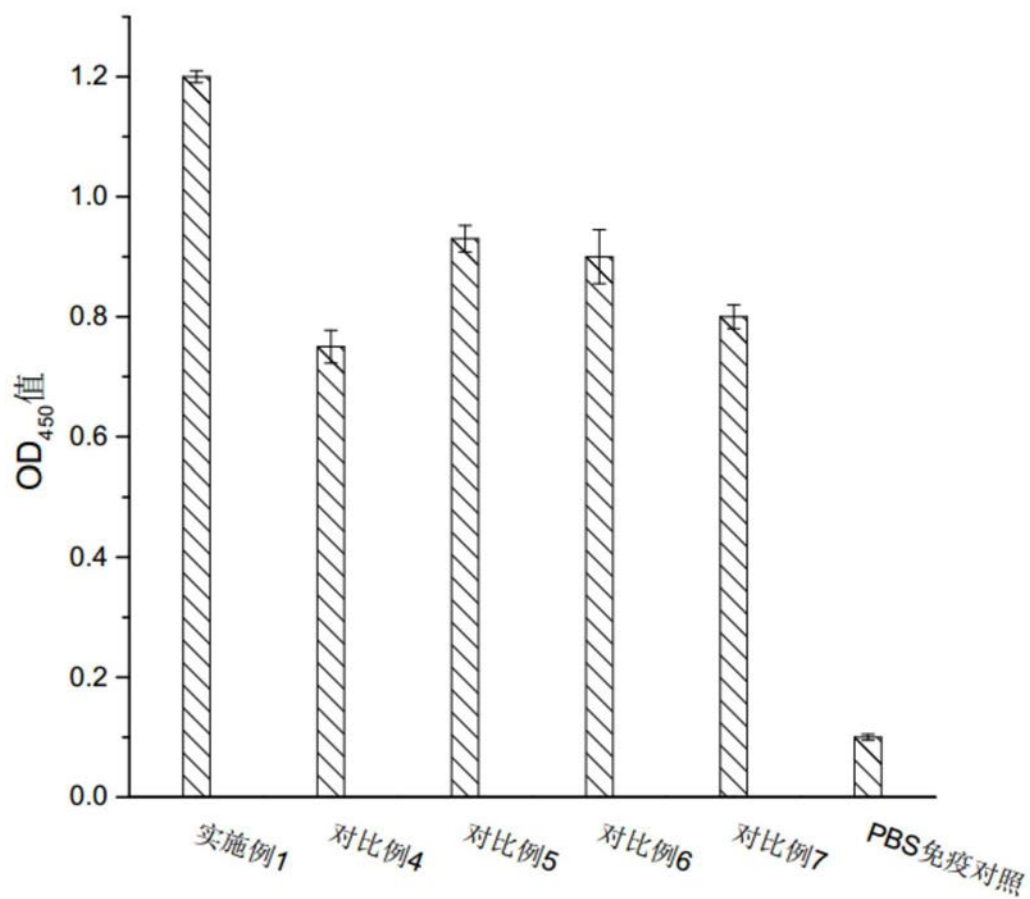


图7

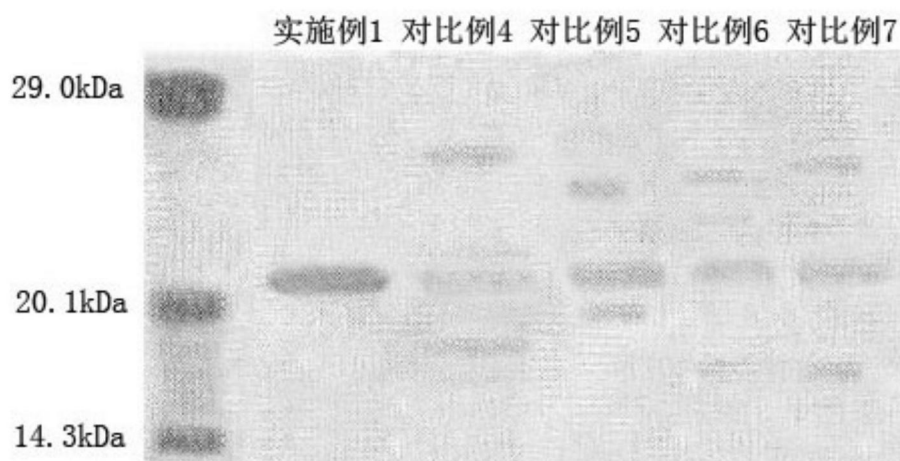


图8

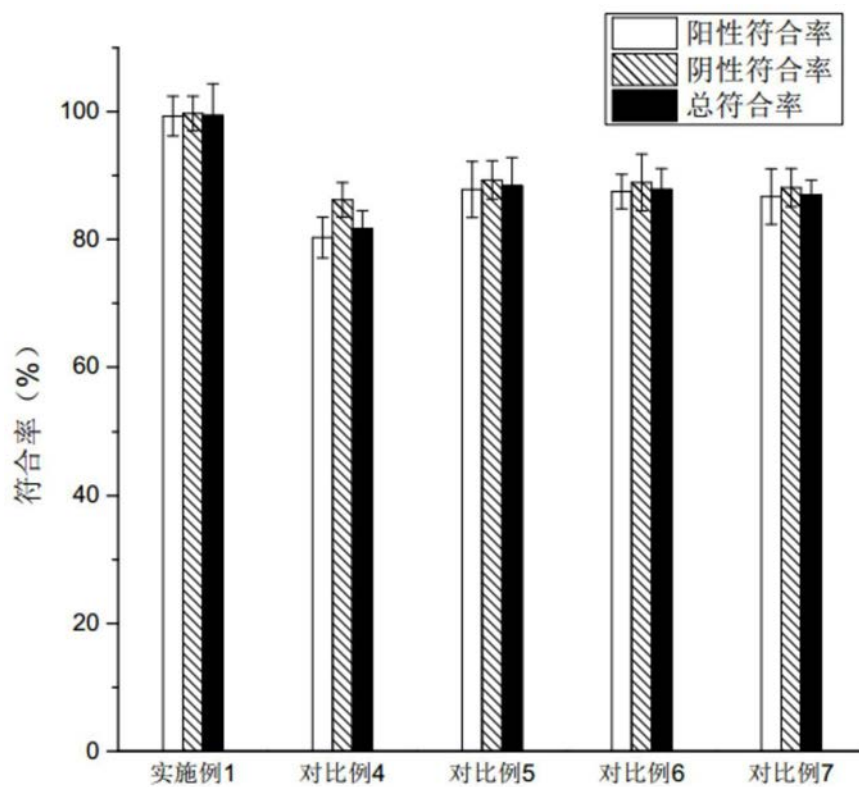


图9

专利名称(译)	恶性卡他热病毒的检测试剂盒、制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN110967483A	公开(公告)日	2020-04-07
申请号	CN201911381775.7	申请日	2019-12-27
发明人	沈志功		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/56983		
代理人(译)	龚家骅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	cDNA	2μL
本发明提供恶性卡他热病毒的检测试剂盒、制备方法及其用途，属于生物技术领域，包括包被有MCFV gB重组蛋白的酶标板，所述MCFV gB蛋白为SEQ ID NO.1的序列，酶标抗体，包括HRP标记的MCFV gB重组蛋白多克隆抗体。本发明提高的制备方法能够提高重组蛋白的反应原性和免疫原性，提高纯化后的重组蛋白的纯度；提供的检测试剂盒具有较好的特异性，且操作简单，具有较高的检出率。	10× Taq Buffer	5μL
	gB-XF(50pmol/μL)	2μL
	gB-XR (50pmol/μL)	2μL
	dNTPs(10mmol/L)	2μL
	Taq DNA 酶(10U/μL)	1μL
	ddH ₂ O	16μL