

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510038211.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

C07K 14/36 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年12月27日

[11] 授权公告号 CN 1292254C

[22] 申请日 2005.1.24

[21] 申请号 200510038211.5

[73] 专利权人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市钟灵街50号

[72] 发明人 何孔旺 彭小华 王芳 邱索平

张雪寒 倪艳秀 郭容利 俞正玉

陆承平

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 楼高潮

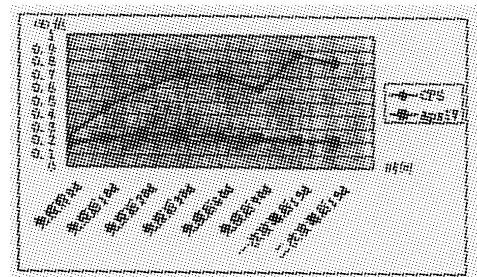
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

[54] 发明名称

检测猪胸膜肺炎放线杆菌野毒感染的试剂盒

[57] 摘要

一种检测胸膜肺炎放线杆菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae, App) 野毒感染的试剂盒, 其组成成分如下: 细菌毒素 ApxIV 纯化表达蛋白包被好的酶标板、辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 抗体、柠檬酸、碳酸氢二钠、EDTA 缓冲系统加 TMB 构成的显色系统、阳性血清、阴性血清和试剂盒说明书。其特征是利用聚合酶链反应 (PCR) 从 App 血清 1 型的 ApxIV 基因中扩增出目的基因, 构建了含目的基因的表达质粒 pET32a - ApxIV, 该质粒转化入宿主菌 BL21 (DE3), 体外表达蛋白经镍柱纯化后作为抗原, 建立酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测方法并优化反应条件形成了检测试剂盒, 该试剂盒在 App 的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要应用价值。



1. 一种检测胸膜肺炎放线杆菌 App 野毒感染的酶联免疫吸附试 ELISA 试剂盒，由细菌毒素 ApxIV 纯化表达蛋白包被好的酶标板、辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 抗体、柠檬酸、碳酸氢二钠、乙二胺四乙酸 (EDTA) 缓冲系统加 3, 3', 5, 5' -四甲基苯 (TMB) 构成的显色系统、阳性血清、阴性血清和试剂盒说明书组成，其特征在于：包被酶标板所用的抗原即 ApxIV 片段纯化表达蛋白是由基因工程菌株 BL21 体外诱导表达获得，该菌株含表达质粒 pET32a-ApxIV，重组表达质粒 pET32a-ApxIV，含有大肠杆菌复制子 ori、启动子 P_{T7}、外源目的基因 ApxIV 基因的 3' 端 1078bp 和抗性筛选基因氨苄青霉素 Amp 基因，其表达式为：—ori—P_{T7}—ApxIV gene—Amp gene—。
2. 根据权利要求 1 所述的 ELISA 试剂盒，其特征在于，其表达质粒 pET32a-ApxIV 的构建中，设计并合成的一对特异性引物为，
上游引物 P₁: 5' -gcaggatccaaattaccgatgtg-3'，
下游引物 P₂: 5' -gtaaagcttctcttcaagcgacaca-3'。

检测猪胸膜肺炎放线杆菌野毒感染的试剂盒

一、技术领域

本发明涉及一种检测猪胸膜肺炎放线杆菌野毒感染的试剂盒，属于动物抗原抗体的检测试剂盒的研制，专用于胸膜肺炎放线杆菌（App）的检测、流行病学调查和免疫监测等。

二、背景技术

猪传染性胸膜肺炎（porcine infection pleuropneumonia）是由猪胸膜肺炎放线杆菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App）引起的猪的一种高度传染性呼吸道疾病，以出血性、坏死性肺炎和慢性纤维素性胸膜肺炎为特征。该病已成为当今大型养猪场的三大呼吸道传染病之一，与其它呼吸道疾病相比，其危害性在于具有高发病率和死亡率，尤其在新引进猪群中多呈急性爆发，最急性的死亡率可达80-100%。

App的毒力因子很多，包括荚膜多糖（CPS）、脂多糖（LPS）、外膜蛋白（OMP）、细菌毒素（Apx）、转铁蛋白（Tbp）、蛋白酶、渗透因子、菌毛等，其中Apx是App最重要的毒力因子，不同血清型的菌株可产生4种Apx即Apx I~IV，都具有溶细胞作用，是一种穿孔毒素，属于含重复子毒素（repeats-in-toxin, RTX）家族^[1-4]。ApxIV是一种分子量为202 kD的蛋白，App的12个血清型均能分泌这种毒素，但具有种属特异性，放线杆菌属中的其他菌株都不分泌这种毒素，ApxIV具有特异的抗原性，与App的其他RXT无交叉性，此外App仅在感染宿主时分泌ApxIV，而在体外培养时不表达该蛋白。

App有12种血清型之多，不同血清型之间缺乏足够的交叉保护性，加之该病原菌极易产生耐药性，因此疫苗免疫是预防本病最有效途径，但是在不同的国家和地区其流行的血清型可能不同，就是同一猪场也可能有多个血清型；目前国内外使用较多的是含有12种血清型中某几种血清型的全菌灭活疫苗，这样就会出现一些养猪场所用的App多价疫苗与其实际流行的血清型不相符合的情况，从而导致疫苗免疫低下或失败，给养猪场造成巨大的经济损失。

本发明基于“App仅在感染宿主时分泌ApxIV”这一特点，利用PCR技术从App血清1型的ApxIV基因中扩增出目的基因，构建了含目的基因的重组表达质粒pET-ApxIV，该质粒转化入宿主菌BL21（DE3），体外表达蛋白经镍柱亲和层析纯化后作为抗原，建立间接ELISA检测方法，并优化ELISA的反应条件形成检测试剂盒，该试剂盒可检测App的野毒感染，指导养殖场选择合适的疫苗和药物进行防治。

三、发明内容

技术问题 本发明的目的是提供一种检测 App 野毒感染的试剂盒，通过构建一个在原核细胞中表达的高效重组表达质粒，利用重组表达质粒的表达产物为抗原，研制检测 App 野毒感染的试剂盒，专用于 App 的检测、流行病学调查和免疫监测。

技术方案 本发明的具体实施方案如下：

一种检测 App 野毒感染的酶联免疫吸附试 ELISA 试剂盒，其组成成分如下：细菌毒素 ApxIV 纯化表达蛋白包被好的酶标板、辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 抗体、柠檬酸、碳酸氢二钠、乙二胺四乙酸（EDTA）缓冲系统加 3, 3' 5, 5' - 四甲基苯（TMB）构成的显色系统、阳性血清、阴性血清和试剂盒说明书。

上述的 ELISA 试剂盒，其特征在于包被酶标板所用的抗原即细菌毒素 Apx IV 纯化表达蛋白是由基因工程菌株 BL21（DE3）体外诱导表达后经镍柱纯化获得，该菌株含重组表达质粒 pET32a-ApxIV，该重组表达质粒含有大肠杆菌复制子 ori、启动子 P_{T7}、外源目的基因 ApxIV 基因的 3' 端 1078bp 和抗性筛选基因氨苄青霉素 Amp 基因，其表达式为：—ori—P_{T7}—ApxIV gene—Amp gene—；此外在其表达质粒 pET32a-ApxIV 的构建中，设计并合成的一对特异性引物为，

上游引物 P₁：5' -gcaggatccaaatttaccgatgtg-3'，

下游引物 P₂：5' -gtaaagcttcctcttcaagcgacaca-3'。

本发明的技术方案主要包括以下两个方面：

第一方面构建了表达载体 pET32a-ApxIV。根据 GenBank 发表的 App1 型的 ApxIV 序列（序列号：AF021919），利用 DNASTar 软件分析，选取 ApxIV 基因 3' 端 5434bp-6511bp（ApxIV C 端抗原性较强的 359 个氨基酸），自行设计一对特异性引物，引物两端分别加限制性酶切位点 *Bam*HI 和 *Hind*III 及保护性碱基（Takara 公司合成），下划线部分为酶切位点。

P₁：5' -gcaggatccaaatttaccgatgtg-3' *Bam*HI

P₂：5' -gtaaagcttcctcttcaagcgacaca-3' *Hind* III

通过 PCR 获取 ApxIV 目的基因，将获取的目的基因克隆入 pMD18-T 载体并进行序列测定，将 pMD18-T 载体上的目的片段酶切后克隆入 pET32a 载体，构建重组表达质粒 pET32a-ApxIV，将重组质粒转化入 BL21（DE3）感受态细胞，并用双酶切和 PCR 进行鉴定，鉴定阳性的质粒即为重组表达质粒 pET32a-ApxIV。

第二方面通过重组表达质粒 pET32a-ApxIV 体外高效表达，表达蛋白经镍柱纯化后，测定蛋白浓度，以纯化蛋白为抗原研制 ELISA 试剂盒，为了验证 ApxIV-ELISA 的检测效果，又建立了一个以 App 荚膜多糖（CPS）粗提物为抗原的 CPS-ELISA 与之对照。

有益效果 本发明的特点和优点如下：

本发明选取的目的基因较短，只有 1078bp，表达载体 pET32a-ApxIV 构建容易；其次，pET32a-ApxIV 的表达产物具有良好的抗原性；第三，基因工程菌株 BL21（DE3）（pET32a-ApxIV）表达的蛋白表达量 25%~30%；以可溶性形式存在于菌

体内部，收集和纯化比较方便；第四，纯化的表达蛋白不需要进行蛋白复性就可用于 ELISA 试剂盒的研制。

事实证明，本发明细菌毒素 ApxIV 纯化表达蛋白具有良好的抗原性，能特异性地检测到人工发病猪血清中的抗 ApxIV 毒素抗体。ELISA 试剂盒检测临床血清样品结果显示在从未使用过 App 灭活疫苗的猪场收集的的血样，对照 CPS-ELISA 检测结果和本发明试剂盒的检测结果显示符合率达 100%（表 4），说明本试剂盒在实际应用中具有良好的特异性和敏感性。表明本发明 ELISA 试剂盒在检测 App 野毒感染，在 App 的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要的应用价值，可以指导养殖场选择合适的疫苗和药物进行防治。

四、附图说明

图 1 pET32a-ApxIV 重组质粒图谱

表达式为：—ori—P_{T7}—ApxIV gene—Amp gene—，它含有大肠杆菌复制子 ori、P_{T7} 是 T7RNA 聚合酶/启动子表达系统、外源目的基因为 ApxIV 3' 端部分基因，抗性筛选基因为氨苄青霉素 Amp 基因。

图 2 目的片段的测序结果

图 3 pMD18-T 载体克隆的酶切图谱

泳道 1 为 DL-15000Marker；泳道 2 为 DL-2000Marker；泳道 3~5 为 pMD18-T 载体 BamHI、HindIII 双酶切。

图 4 表达重组质粒 pET32a-ApxIV 的鉴定图谱

泳道 1 为 DL-15000Marker；泳道 2 为 DL-2000Marker；泳道 3 为 pET32a(+)/BamHI、HindIII 双酶切；泳道 4-5 为 pET32a-ApxIV/BamHI、HindIII 双酶切。

图 5 重组表达质粒 pET32a-ApxIV 体外表达的 SDS-PAGE 图谱

泳道 1 为低分子量标准蛋白质；泳道 2 为诱导的 pET32a 质粒；泳道 3 ~11 为重组表达质粒 pET-ApxIV 0,2,4,5,6,7,8,9,10 小时诱导；泳道 12 为重组表达质粒 pET-ApxIV 诱导后超声波裂解上清；泳道 13 为重组表达质粒 pET-ApxIV 诱导后超声波裂解沉淀。

图 6 表达蛋白的免疫转印鉴定图

图 7 测定多糖含量的标准 OD 值曲线

图 8 人工感染猪体内抗体的动态变化

图 9 灭活疫苗免疫猪体内抗体的动态变化

五、具体实施方式

下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的描述

1. 引物设计

根据 GenBank 发表的 App1 型 (shope 株购于农业部青岛动检所) 的 ApxIV 序

列(序列号: AF021919), 利用应用 DNASTar 软件分析, 选取 ApxIV 基因 3' 端 5434bp-6511bp (ApxIV C 端抗原性较强的 359 个氨基酸), 自行设计一对特异性引物, 引物两端分别加限制性酶切位点 *Bam*HI 和 *Hind*III 及保护性碱基, 下划线部分为酶切位点。

P₁: 5' -gcaggatccaaattaccgatgtg-3' *Bam*HI

P₂: 5' -gtaaagcttctcttcaagcgacaca-3' *Hind* III

2. PCR 获取 ApxIV 目的基因

PCR 反应条件: 94℃ 预热 5min, 94℃ 变性 1min, 60℃ 退火 40sec, 72℃ 延伸 80sec, 30 个循环, 最后一个循环后再延伸 10 分钟。PCR 产物长度为 1096bp, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察, 切下目的片段, 用小量胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

3. 将获取的目的基因克隆入 pMD18-T 载体并进行序列测定

将回收 PCR 产物 4.5μl, 与 pMD18-T 0.5μl 和 Solution I 5.0μl, 混匀后, 4℃ 连接过夜, 用于转化 DH5α 感受态细胞, 挑取单个菌落进行过夜培养, 提取质粒, 用 *Bam*HI、*Hind* III 双酶切, 37℃ 水浴 2 小时, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可以看到一条约 1100bp 的条带出现(图 3)。将双酶切鉴定阳性的细菌寄出, 由大连宝生物公司进行序列测定, 结果此序列与 GenBank 上公布的序列相比较, 核苷酸同源性为 100% (图 2), 获得 pMD18-T 载体质粒。

4. 重组表达质粒 pET32a-ApxIV 的构建和鉴定

将已测序鉴定的载体质粒 pMD18-T 和 pET32a(+), 用 *Bam*HI、*Hind*III 双酶切, 电泳后, 回收目的片段和 pET32a(+), 然后用 T4 DNA 连接酶进行连接反应, 转化 BL21 感受态细胞, 用氨苄青霉素板筛选, 挑取细菌培养, 提取质粒进行酶切鉴定, 可见目的条带(图 4), 将阳性重组质粒命名为 pET32a-ApxIV。

5. 重组表达质粒 pET32a-ApxIV 的表达和免疫转印

将阳性重组菌液以 2% 的比例接种与 LB (Amp⁺) 液体培养基中, 37℃、180 转/分钟振荡培养 2 小时后加入终浓度为 1mmol/ml IPTG 进行诱导表达, 分别收集 0h、2h、4h、5h、6h、7h、8h、9h、10h 的菌液。样品用 10%SDS-PAGE 鉴定, 表达产物诱导 2 小时即可产生分子量约 60kD 的目的条带, 7~8 小时达最高峰(图 5)。取 8 小时的培养物超声波处理, 12,000r/min、4℃ 离心 5min 分离上清和沉淀, 用 10%SDS-PAGE 鉴定, 表达蛋白以可溶形式存在于菌体内部(图 5)。并进行转印, 然后以兔抗 App1 血清为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗作免疫转印鉴定, 最后用 DAB 显色试剂盒显色, 在醋酸纤维素膜上可见目的条带(图 6)。

6. 细菌毒素 ApxIV 表达蛋白经镍柱纯化后, 测定蛋白浓度

参照 Novagen 公司 His • bind[®] purification kit 的说明书, 细菌毒素 ApxIV 表达蛋白经镍柱纯化后, 测定该蛋白浓度为 0.5mg/ml。

7. App 荚膜多糖的提取及浓度的测定

7.1 荚膜多糖 (CPS) 的制备 (三氯乙酸-丙酮法)

App3 (S1421 株)、App5 (K17 株)、App7 (WF83 株) (购于农业部青岛动

检所)各 200ml 的过夜培养物 10,000g 离心后收集菌体,用等体积的灭菌去离子水重悬,分别加 50ml 的三氯乙酸(100%)混匀,4℃、10,000g 离心 30min,取上清加等体积的丙酮混匀,4℃过夜后 10,000g 离心 30min,用丙酮洗涤沉淀 3 次,在用 5%的醋酸钠溶解沉淀,溶解物用 1/3 体积的氯仿:正丁醇(4:1)抽提两次,10,000g 离心 30min 每次取水相,水相中加等体积的丙酮摇匀 4℃过夜,10,000g 离心 30min,沉淀用无水乙醇洗涤 3 次,室温待乙醇晾干后用 10ml 灭菌去离子水溶解,-20℃保存备用。

7.2 苯酚-浓硫酸法进行 CPS 的定量测定

取 5mg 的葡萄糖溶解于 100ml 的灭菌双蒸水配制成 50 μ g/ml 的葡萄糖标准液,吸取该标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 及 1.8ml,分别加灭菌双蒸水补至 2.0ml。分别加入 6%苯酚(临用前用 80%苯酚溶液配制)1.0ml 及浓硫酸 5.0ml,静置 10min,摇匀,室温放置 20min 后于 490nm 测定吸光值(OD)。以糖浓度为横坐标、OD 值为纵坐标,绘制标准曲线(表 1 和图 7)。

表 1 标准液中糖的含量和与其对应的 OD 值

| 糖含量(μ g/ml) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 值 | 0 | 0.036 | 0.076 | 0.124 | 0.154 | 0.202 | 0.245 | 0.302 | 0.327 | 0.386 |

分别取待测样品原液、10 倍稀释液和 100 倍稀释液 1ml,加灭菌双蒸水补至 2.0ml,另取一管加灭菌双蒸水 2.0ml。分别加入 6%苯酚(临用前用 80%苯酚溶液配制)1.0ml 及浓硫酸 5.0ml,静置 10min,摇匀,室温放置 20min 后于 490nm 测定吸光值(OD),双蒸水对照管用于 OD 值测定时仪器的校零。待测样品管的 OD 值可在标准曲线上求得相应的 CP 含量,测得提取的 App3、5b、7 的 CPS 含量分别为 2.4、2.2、3.2mg/ml。

8 CPS-ELISA 和细菌毒素 ApxIV 表达纯化蛋白 ELISA 试剂盒的研制

8.1 ELISA 试剂盒的组成成分和最佳反应条件

- 1) 抗原最佳包被浓度:表达产物 0.625 μ g/ml 的浓度,100 μ l/孔包被,4℃包被过夜;包被液为 0.05M PH9.6 的碳酸盐缓冲液(Na_2CO_3 1.95g, NaHCO_3 2.93g,去离子水 1000ml);提取的荚膜多糖以 3 μ g/ml 的浓度,100 μ l/孔包被;
- 2) 洗涤液:PBST/Tween-20 (NaCl 8g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.6g, KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.2g, Tween-20 0.5ml,去离子水 1000ml)
- 3) 最佳封闭液:10%的小牛血清(PBST/Tween-20)
- 4) 血清稀释液:0.01M 的 PBS (NaCl 8g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.6g, KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.2g,去离子水 1000ml),PH7.2
- 5) 血清的最佳稀释浓度:100 倍稀释
- 6) 血清与抗原的结合时间:90 分钟
- 7) 酶标二抗的最佳稀释浓度和反应时间:20000 倍稀释,50 分钟
- 8) 显色系统:柠檬酸、碳酸氢二钠、乙二胺四乙酸(EDTA)为缓冲系统加 TMB 和过氧化氢尿素配制成显色底物,配方:A 液(磷酸氢二钠 36.82g,柠檬酸

10.21g, 过氧化氢尿素 0.6g, 去离子水 1000ml), B 液 (10.5g, EDTA0.146g, TMB0.25g, 去离子水 1000ml)。

9) 终止液: $2\text{MH}_2\text{SO}_4$

8.2 ELISA 的操作程序

- 1) 4°C 包被过夜, 取出后用洗涤液 PBST/Tween-20 洗涤 3 次, 每次 5 分钟。
- 2) 加入 100 倍稀释好的血清样品, $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 每次设阳性、阴性和空白对照, 37°C 孵育 90 分钟, 取出洗涤 3 次, 每次 5 分钟。
- 3) 加酶标记的二抗, $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 37°C 孵育 50 分钟, 取出洗涤 3 次, 每次 5 分钟。
- 4) 加底物 $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 37°C 孵育 10 分钟, 2M 的硫酸终止反应, $50\ \mu\text{l}$ / 孔, 酶标仪测吸光值 (波长 450nm)。

8.3 判定标准的确定

分别取猪传染性胸膜肺炎正向间接血凝诊断试剂盒检测阳性、阴性血清 100 份和 40 份进行 ELISA, 并计算它们的 OD_{450} 平均值和标准差 (Standard deviation, SD), 以阳性和阴性血清的 OD_{450} 平均值 + 3SD 的比值大于或等于 2.1 作为 ELISA 的判定标准。

8.4 保存期试验

按照上述 ELISA 确定的条件, 抗原包被、封闭后, 分别在 4°C 和 -20°C 保存, 于不同时间取出进行 ELISA 试验, 包被 ELISA 板的保存期在 4°C 可保存 6 个月, 而在 -20°C 可保存 15 个月。

9. 本发明 ELISA 试剂盒的使用说明书

- 1) 加入 100 倍稀释好的血清样品, $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 每次设阳性、阴性和空白对照, 37°C 孵育 90 分钟, 取出洗涤 3 次, 每次 5 分钟。
- 2) 加酶标记的二抗, $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 37°C 孵育 50 分钟, 取出洗涤 3 次, 每次 5 分钟。
- 3) 加底物 $100\ \mu\text{l}$ / 孔, 37°C 孵育 10 分钟, 2M 的硫酸终止反应, $50\ \mu\text{l}$ / 孔, 酶标仪测吸光值 (波长 450nm)。
- 4) 试剂盒所附的阳性血清的 OD_{450} 与阴性对照血清的 OD_{450} 的比值大于 2.1 时, 若待检样品的 OD_{450} 与阴性对照血清的 OD_{450} 的比值大于或等于 2.1 则可判为阳性。

10. ELISA 试剂盒的应用

10.1 ELISA 试剂盒检测人工感染猪血清样品

App1、3、5b 和 7 活菌分别鼻腔接种 3 头 35 日龄小猪 (总共 12 头, 实验前用兰州兽医研究所的间接血凝试剂盒检测阴性), 15d 后再次鼻腔接种; 分别采集接种前、第一次接种后 15d、第二次接种后 15d 和 25d 血清, 结果显示 App 阴性的 35 日龄猪经鼻腔接种后 15 天可两种 ELISA 均可以检测到相应的抗体, 再次接种后 15 天 OD 值下降, 再过 10 天, OD 值上升超过一次接种后 15 天的值 (表 2 和图 8), 表明 App 活菌在猪体内能分泌 ApxIV 毒素, 说明细菌毒素 ApxIV 纯化表达

蛋白具有良好的抗原性，能特异性地检测到人工发病猪血清中的抗 ApxIV 毒素抗体。

表 2 人工感染猪血清样品的平均 OD 值

| | 接种前 | 一次接种后 15 天 | 二次接种后 15 天 | 二次接种后 25 天 |
|-------|----------|------------|------------|------------|
| CPS | 0.205667 | 0.7758 | 0.6825 | 0.813889 |
| ApxIV | 0.162833 | 0.6735 | 0.6102 | 0.755889 |

10.2 ELISA 试剂盒检测 App 四价灭活苗免疫猪血清样品

App1、3、5b 和 7 四价灭活苗免疫 12 头 30 日龄猪（实验前用兰州兽医研究所的间接血凝试剂盒检测阴性），分别收集免疫前、免疫后 10d、20d、30d、60d、90d 血清；在免疫后 90d 分别以 App1、3、5b 和 7 活菌鼻腔攻毒两次，其间间隔 15d，并收集两次攻毒后 15d 的血清，检测结果表明 CPS-ELISA 可以检测到 30 日龄猪免疫后相应抗体的动态变化，而 ApxIV-ELISA 检测不到相应的抗 ApxIV 抗体即使是活菌攻毒后（见表 3 和图 9）。本试验验证了“App 仅在感染宿主时分泌 ApxIV 毒素，而在体外培养时不表达 ApxIV 毒素蛋白”这一论断，同时也表明本发明所研制的试剂盒可以检测 App 野毒感染，可以指导养殖场选择合适的疫苗和药物进行防治，本试剂盒在 App 的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要的应用价值。

表 3 灭活疫苗猪血清样品的平均 OD 值

| | 免疫前 0d | 免疫后 10d | 20d | 30d | 60d | 90d | 一次攻毒后 15d | 二次攻毒后 15d |
|-------|----------|---------|--------|--------|---------|--------|-----------|-----------|
| CPS | 0.22125 | 0.4495 | 0.6014 | 0.7018 | 0.6935 | 0.6001 | 0.859833 | 0.800417 |
| ApxIV | 0.161167 | 0.21583 | 0.2426 | 0.2478 | 0.23425 | 0.2193 | 0.207083 | 0.203 |

10.3 ELISA 试剂盒检测临床血清样品

分别收集南京六合、镇江、常州、常熟、苏州五地某猪场血清 100、90、80、49 和 128 份，其中后四地猪场猪群均存在严重呼吸道症状，病死猪解剖病变集中于肺部，未使用过 App 疫苗。结果显示在从未使用过 App 灭活疫苗的猪场收集的的血样，CPS-ELISA 检测结果和本发明试剂盒的检测结果符合率达 100%（表 4），说明本试剂盒在实际应用中具有良好的特异性和敏感性。

表 4 两种 ELISA 检测临床血清样品

| | CPS-ELISA | | ApxIV-ELISA | |
|----|-----------|---------|-------------|---------|
| | 检出数/总数 | 检出率 (%) | 检出数/总数 | 检出率 (%) |
| 六合 | 3/100 | 3 | 3/100 | 3 |
| 镇江 | 85/90 | 94.4 | 85/90 | 94.4 |
| 常州 | 70/80 | 87.5 | 70/80 | 87.5 |
| 常熟 | 46/49 | 93.9 | 46/49 | 93.9 |
| 苏州 | 119/128 | 93 | 119/128 | 93 |

序列表

<110> 江苏省农业科学院
 <120> 检测猪胸膜肺炎放线杆菌野毒感染的试剂盒
 <130> 说明书
 <140> 200510038211.5
 <141> 2005-01-24
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1600
 <212> DNA
 <213> 胸膜肺炎放线杆菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae)
 <220>
 <221> gene
 <222> (1)..(1600)
 <223>
 <400> 1
 agtggagtag caaaggaaag gaacagatgg agggacctgt catacgacac acttaaagg 60
 aatgcaacgt caatggcgat gcctaattgt tacttacagc aggttccaaa gatttgttcc 120
 accacgcgtg aaggaatcag attcgactgc tcccaactta catgcaacgt caatatcaat 180
 cctcatataa agctgattaa aagttgattt ttaatattaa gaatagcatc ccattcacct 240
 cccataacag tgatcatttt gtaacatttt aaagttaagt gactaaaaca taaatttact 300
 gttaatntag tgatcttggg tgtaatttat ccatatttat gttacatgca cgggtgaagac 360
 ttctgcatt tgggaacatt ttacttgc ttctttact tcattctgt actttaatct 420
 atctcaacca agattaagat tctgtatgtt gagaactttg gtagtttat atttgaaaaa 480
 aattattgat attattaaaa aaaataacta taaatttaaa aaatattaaa aacatgtaca 540
 accaaaacat ctattttaa tgaagcattt cgaagcgaa ttgattaaa aaaggatagc 600
 catgtgaaag tcaacttga gcatgtgaac aacttattga aatcatttat cattttcaat 660
 tagttgaaag tcctaaattt attttttaa aatcggtttg tttaaaacta aggtgttgat 720
 agaataagta tttaattaaa tgcattattt ttagtgtaag aaaaataata attcagtatg 780
 ccatgtaatt gatgtggtac gattaagttc gagcaacaaa tcgaaaggag gcggtttttg 840
 ggcatgctat agggcatttg gttccgtaca aatatgcaaa taagtttaa tgtaattttg 900
 atggggccct ctctgttgac agtgggtatt cggggtgaat ttgtgcggtg catctcgagt 960
 ttataaaga tcgcaaagtc catctttctg cgggtggaagt catgtctact catcattgct 1020
 ttattgaaag caaactactt tgaatgtatt tctatcctg tttatcatt catactgtta 1080
 atgttgataa attgttaca caggatgaaa ataagatagg acttagaaaa ggggtgtattg 1140
 ggtaagccgg ttgatttggg tttaactctg accacttatt ttcattttgt ttcttttta 1200
 tcagttttac tggtttaagt aatttgattt tatatttaaa aaaaatcaaa tataaatgtt 1260

tagttgccat cagcattagg atatcaacca catgtcaagc atgattgctt aatttgattt 1320
 aaatataat aataataat gaaaattgac ttttggttg gatgataaca tcacttatgt 1380
 aagctaaaat tgcaatttaa aatcagaaaa tgaatcctc gagttctttt tcattcatac 1440
 tttcataaat tcaactatag ttaataatag atcataaatg cagtcagtt tcttataata 1500
 aaaaaacaag gtaggtctta aattcttata aatgcaagca gtccagtttc tgaataaaca 1560
 aggcaaatta gttttctgag tgactaaaaa gttagggagc 1600
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> 上游引物 P1
 <222> (1)..(24)
 <223>
 <400> 2
 gcaggatccaaattaccga tgtg 24
 <210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> 下游引物 P2
 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 3
 gtaaagcttcctcttcaagc gacaca 26

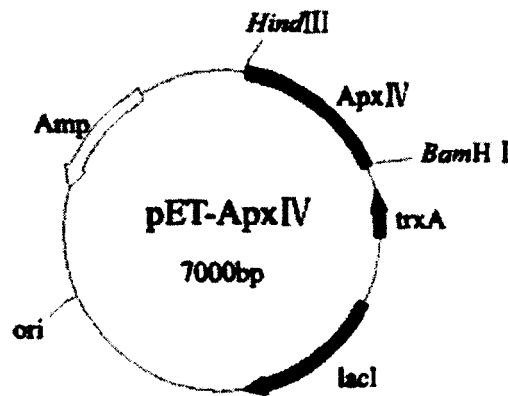


图 1

aaa ttt acc gat gtg aat tat gcg gaa gtg aaa ttc cga cga gta gat aat gac tta atg tta ttc ggt tat
 cat gat acg gat tcg gtc acg gta aaa tcc ttc tac agc cat gta gat tat caa ttt gac aaa ttg gag ttt
 gct gac cgc agt ata act cgc gat gaa ctg att aaa gca ggg ctt cat cta tac ggc acc gat ggc aat
 gat gat ata aag gat cat gcg gat tgg gac agc att ttg gaa ggc ggc aaa ggc aac gat att cta aga
 ggt ggc tac ggt gcg gac acc tat atc ttt agc aaa gga cac gga cag gat atc gtt tat gaa gat acc
 aat aat gat aac cga gca aga gat atc gac acc tta aaa ttt act gat gtg aat tat gcg gaa gtg aaa
 ttc cga cga gta gat aat gac tta atg tta ttc ggt tat cat gat acg gat tcg gtc acg ata aaa tcc ttc
 tac aac cat gta gat tat caa ttt gac aaa ttg gaa ttt gct gac cgc agt ata act cgt gat gaa cta ggt
 aaa caa ggt atg gca tta ttt ggc act gac ggt gat gat aat atc aac gac tgg gga cgt aac tcg gtg
 att gat gcc ggt gcg ggt aat gat acg gtt aat ggc ggt aat ggc gat gac acc ctc atc ggc ggc aaa
 ggt aat gat att cta aga ggt ggc tac ggt gcg gac acc tat atc ttt agc aaa gga cac gga cag gat
 atc gtt tat gaa gat acc aat aat gat aac cgc gca aga gat atc gac acc tta aaa ttt act gat att aat
 tta tcc gaa ctt tgg ttt agc cga gaa aat aac gat ttg att att aaa tca tta tta agt gag gat aaa gtc
 acg gtt caa aat tgg tat tca cac caa gat cat aaa ata gaa aat att cgt tta tcg aat gag caa acg ttg
 gtg agc act cag gtg gag aag atg gtt gag tcg atg gcc ggc ttt gct cag aag cac gga gga gag
 ata tct ctt gtg tcg ctt gaa gag g

图 2

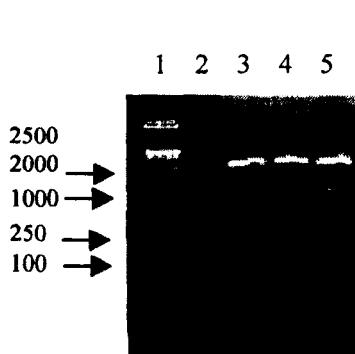


图 3

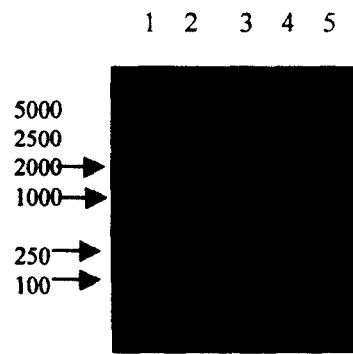


图 4

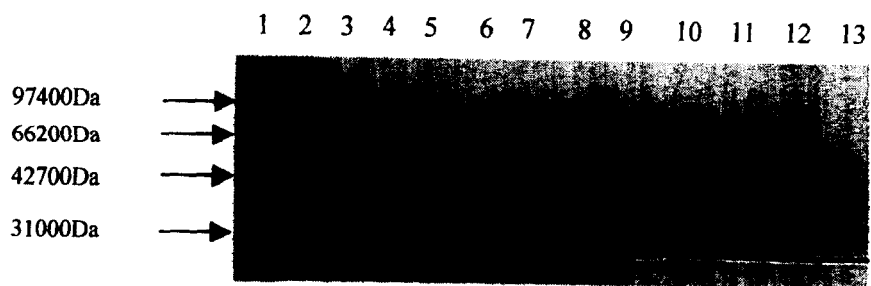


图 5

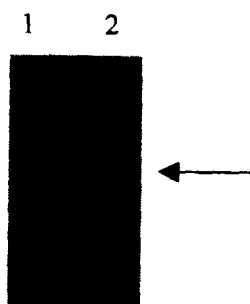


图 6

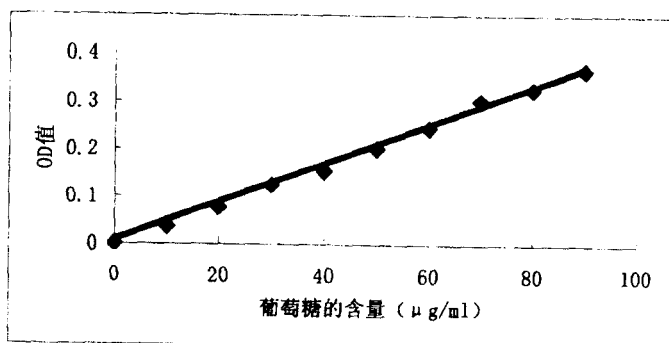


图 7

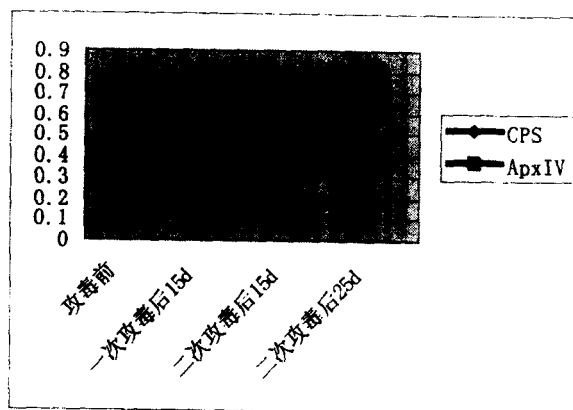


图 8

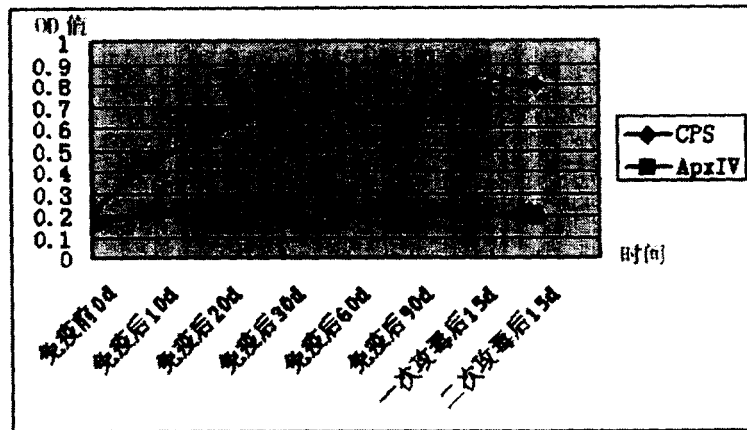


图 9

| | | | |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测猪胸膜肺炎放线杆菌野毒感染的试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN1292254C | 公开(公告)日 | 2006-12-27 |
| 申请号 | CN200510038211.5 | 申请日 | 2005-01-24 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 江苏省农业科学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 江苏省农业科学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 江苏省农业科学院 | | |
| [标]发明人 | 何孔旺 彭小华 王芳 邱索平 张雪寒 倪艳秀 郭容利 俞正玉 陆承平 | | |
| 发明人 | 何孔旺 彭小华 王芳 邱索平 张雪寒 倪艳秀 郭容利 俞正玉 陆承平 | | |
| IPC分类号 | G01N33/569 C12N15/31 C12Q1/04 G01N33/543 G01N33/535 C07K14/36 C07H19/00 C07H21/00 G01N33/52 | | |
| 其他公开文献 | CN1645148A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种检测胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App)野毒感染的试剂盒,其组成成分如下:细菌毒素ApxIV纯化表达蛋白包被好的酶标板、辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgG抗体、柠檬酸、碳酸氢二钠、EDTA缓冲系统加TMB构成的显色系统、阳性血清、阴性血清和试剂盒说明书。其特征是利用聚合酶链反应(PCR)从App血清1型的ApxIV基因中扩增出目的基因,构建了含目的基因的表达质粒pET32a-ApxIV,该质粒转化入宿主菌BL21(DE3),体外表达蛋白经镍柱纯化后作为抗原,建立酶联免疫吸附试验(ELISA)检测方法并优化反应条件形成了检测试剂盒,该试剂盒在App的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要应用价值。

