



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102012428 B

(45) 授权公告日 2013.09.25

(21) 申请号 201010299524.7

(22) 申请日 2010.09.30

(73) 专利权人 四川农业大学实验动物工程技术中心

地址 625014 四川省雅安市雨城区新康路46号

(72) 发明人 程安春 汪铭书 沈婵娟 陈孝跃

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101271110 A, 2008.09.24,

Shen Chanjuan et.al.. Expression and

distribution of the duck enteritis virus UL51 protein in experimentally infected ducks. 《AVIAN DISEASES》.2010, 第54卷(第2期),

Chan-juan Shen et.al.. Identification and characterization of the duck enteritis virus UL51 gene. 《Arch Virol》.2009, 第154卷(第7期),

贾仁勇. 鸭瘟病毒蛋白质组二维电泳特性和UL24 基因的发现、原核表达及应用研究. 《中国博士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2009, (第01期),

审查员 刘文瀚

权利要求书1页 说明书16页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸,其由吸收垫、底板、硝基纤维膜、金标垫和样品垫组成,所述硝基纤维膜上的测试线由浓度 $\geq 1\text{mg/mL}$ 动物抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成,所述金标垫由浓度 $\geq 2\text{mg/mL}$ 胶体金标记 B 动物抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成,所述硝基纤维膜上的对照线由浓度 $\geq 1\text{mg/mL}$ C 动物抗 B 动物 IgG 包被而成;所述胶体金试纸的制备方法包括硝基纤维膜上测试线 and 对照线喷制、金标垫制备及胶体金免疫层析试纸条的组装;本试纸用于检测鸭瘟病毒抗原的检测灵敏度和特异性高,本制备方法操作简单实用,本运用首次将抗重组 UL51 蛋白抗体制备成胶体金试纸用于检测鸭瘟病毒抗原。



1. 基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸,由底板、硝基纤维膜、样品垫、金标垫和吸收垫组成,硝基纤维膜上有测试线 and 对照线,其特征在于:所述硝基纤维膜上的测试线由浓度等于 1mg/mL 的 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成,对照线由浓度等于 1mg/mL C 抗 B IgG 包被而成;所述金标垫由胶体金标记浓度等于 2mg/mL 的 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成;所述 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 为鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,所述 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 为兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,所述 C 抗 B IgG 为羊抗兔 IgG。

2. 权利要求 1 所述的基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸的制作方法,其特征在于:具体步骤为:

a 硝基纤维膜上测试线 and 对照线的喷制:将浓度等于 1mg/mL 的 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 喷点于硝基纤维膜上形成测试线,将浓度等于 1mg/mL C 抗 B IgG 喷点于硝基纤维膜上形成对照线,干燥后低温密封保存备用;

b 金标垫的制备:将玻璃纤维素膜浸于胶体金标记浓度等于 2mg/mL 的 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 中,再将该膜浸于玻璃纤维素膜处理液中封闭非特异性结合位点,干燥后得金标垫;

c 胶体金免疫层析试纸条的组装:分别将硝基纤维膜、样品垫、金标垫和吸收垫依次粘在所述底板上,硝基纤维膜上所述对照线靠近吸收垫端,所述测试线靠近样品垫端,再切割成一定宽度的试纸条,密封包装,干燥低温保存。

3. 根据权利要求 2 所述的基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸的制作方法,其特征在于:所述测试线与所述对照线的距离为 0.7 厘米,所述测试线与所述对照线距硝基纤维膜的边距分别为 0.9 厘米。

4. 权利要求 1 所述的基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸在制备鸭瘟病毒抗原检测试纸中的应用。

基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及动物医学领域中鸭瘟病毒抗原的检测检测,特别涉及基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 鸭瘟 (Duck plague, DP), 又称鸭病毒性肠炎 (Duck viral enteritis, DVE), 是鸭、鹅、天鹅等雁形目动物的一种急性接触性传染病, 其致病特征是血管损伤、组织出血、消化道和淋巴器官损伤。该病可导致商品水禽的产蛋量下降和死亡, 对野生水禽也有不同的致死率。DP 的病原为 DPV (Duck plague virus, DPV), DPV 是一种泛嗜性全身性感染的病毒, 目前大多数学者把其暂时列为 α 疱疹病毒亚科, 但尚未分属。目前, 已报道的 DPV 检测方法有病毒分离鉴定、聚合酶链式反应 (PCR)、荧光实时定量 PCR、间接免疫酶组化法、间接免疫荧光法、电镜观察、原位杂交、间接原位 PCR 法、血清中和试验 (SNT)、琼脂凝胶扩散试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、反向被动血凝试验、微量固相放射免疫测定法、生物素标记寡核苷酸探针原位检测、地高辛标记核酸探针法和光敏生物素标记法等, 这些方法各有特点。但是, 传统的病毒分离鉴定方法大约需 4 ~ 5d, 且方法繁琐, 费时费力。一些免疫学方法以及 PCR 方法也往往需要特殊的仪器、设备以及熟练的技术人员。此外, 许多血清学检测方法都是基于纯化的 DPV 全病毒产生的抗体来检测 DPV, 由于病毒纯化的复杂性和纯化后的病毒中会掺杂有许多宿主细胞成分, 而导致许多假阳性结果出现。

[0003] 胶体金 (ICS) 法是 20 世纪 80 年代发展起来的一种将胶体金免疫技术和色谱层析技术相结合的固相膜免疫分析方法, 它是在免疫胶体金渗滤法基础上发展而来的。近年来已在生物医学各领域得到了日益广泛的应用, 如寄生虫病、病毒病、细菌病和药物残留等的检测。该方法操作简单、特异性强, 并可在 15min 内很直观地判断出待测物的有无, 大大提高了检测的速度。ICS 法现已成为当今最快速、敏感的免疫学检测技术之一, 特别适合于广大基层兽医人员以及大批量检测和大面积普查等, 因此该技术具有巨大的发展潜力和应用前景。随着分子生物学的飞速发展, 对蛋白功能的研究日趋增强, 特别是对有免疫原性蛋白的研究日益增多, 以克隆表达的重组蛋白作为包被原检测病毒抗血清的 ELISA 方法和胶体金免疫层析法已被大量报道, 同时也有以表达的重组蛋白制备的抗体检测病毒抗原的报道。但是, 基于重组 UL51 蛋白的抗体检测鸭瘟病毒抗原的 ICS 法尚未见报道, 重组 UL51 蛋白的抗体是否与 DPV 发生强烈的免疫反应尚需证实。

发明内容

[0004] 有鉴于此, 本发明的目的之一在于提供一种胶体金试纸, 该试纸是基于抗重组 UL51 蛋白抗体标记并严格控制金标垫上免疫胶体金与硝基纤维膜上抗体的标记浓度的基础上制备而成, 其特异性和灵敏性高。

[0005] 为实现上述目的, 本发明的技术方案为:

[0006] 基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸,由底板、硝基纤维膜、样品垫、金标垫和吸收垫组成,硝基纤维膜上有测试线和对照线,所述硝基纤维膜上的测试线由浓度大于或等于 1mg/mL 的 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成,对照线由浓度大于或等于 1mg/mL C 抗 B IgG 包被而成;所述金标垫由胶体金标记浓度大于或等于 2mg/mL 的 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成;所述 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 为免疫学研究中常规实验动物中除鸭外的任一种动物抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,所述 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 为免疫学研究中常规实验动物中除 A 外的任一种动物抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,所述 C 抗 B IgG 为免疫学研究中常规实验动物中除 A 和 B 外的任一种动物抗 B IgG。

[0007] 进一步,所述 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 中的 A 为鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,所述 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 为兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,所述 C 抗 B IgG 为羊抗兔 IgG;

[0008] 进一步,所述硝基纤维膜上的测试线由浓度等于 1mg/mL 的 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成,对照线由浓度等于 1mg/mL C 抗 B IgG 包被而成;所述金标垫包由胶体金标记浓度等于 2mg/mL 的 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 包被而成;

[0009] 本发明的目的之二在于提供所述胶体金试纸的制备方法,该方法简单实用。

[0010] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0011] 上述的基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸的制作方法,具体步骤为:

[0012] a 硝基纤维膜上测试线和对照线的喷制:将浓度大于或等于 1mg/mL 的 A 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 喷点于硝基纤维膜上形成测试线,将浓度大于或等于 1mg/mL C 抗 B IgG 喷点于硝基纤维膜上形成对照线,干燥后低温密封保存备用;

[0013] b 金标垫的制备:将玻璃纤维素膜浸于胶体金标记浓度大于或等于 2mg/mL 的 B 抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 中,再将该膜浸于玻璃纤维素膜处理液中封闭非特异性结合位点,干燥后得金标垫;

[0014] c 胶体金免疫层析试纸条的组装:分别将硝基纤维膜、样品垫、金标垫和吸收垫依次粘在所述底板上,硝基纤维膜上所述对照线靠近吸收垫端,所述测试线靠近样品垫端,再切割成一定宽度的试纸条,密封包装,干燥低温保存。

[0015] 进一步,所述测试线与所述对照线的距离为 0.7 厘米,所述测试线与所述对照线距硝基纤维膜的边距分别为 0.9 厘米。

[0016] 本发明的目的之三在于提供所述胶体金试纸的运用,所述运用能够保证在灵敏性和特异性较高的情况下快速检测鸭瘟病毒抗原。

[0017] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0018] 胶体金试纸在制备鸭瘟病毒抗原检测试纸中的应用。

[0019] 本发明的有益效果在于:本胶体金试纸敏感性高,可检测到最低含量为 0.125 μ g 的 DPV 病毒蛋白;运用该试纸对含 DPV 的 DEF 培养液、含 DHV 的鸭胚尿囊液、含 RA 的菌体培养液和含 E. coli 菌体培养液,结果显示仅含 DPV 的 DEF 培养液可见两条清晰的红色条带,其它样品液均仅在 C 线处出现一条清晰的红色条带,表明此方法具有良好的特异性;另外,运用本试纸检测鸭瘟病毒具有良好的批内及批间重复性;本方法制备的试纸至少可在 4℃ 或 25℃ 保存半年,本运用首次将抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 制备成胶体金试纸用于检测鸭瘟病毒。

附图说明

[0020] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明作进一步的详细描述,其中:

[0021] 图 1-A 为 DPV UL51 基因的 PCR 扩增:M 指 DL2000 相对分子质量标准,1 指以正常 DEF 基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物,2 指以 DPV CHv 毒株基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物(箭头所示的是其分子量大小,约为 760bp);图 1-B 为重组质粒 pMD18-UL51 的双酶切鉴定:M 指相对分子质量标准 III,1 指重组质粒 pMD18-UL51 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切得到的两个片段(箭头所示小片段的分子量大小约为 760bp);图 1-C 为重组表达载体 pET28a-UL51 的双酶切鉴定:M 指相对分子质量标准 III,1 指重组表达载体 pET28a-UL51,2 指重组表达载体 pET28a-UL51 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切得到的两个片段(箭头所示小片段的分子量大小约为 760bp)。

[0022] 图 2-A 为重组表达蛋白的 SDS-PAGE 鉴定:M 为蛋白质相对分子质量标准,1 为阴性对照(未加 IPTG 诱导),2 为 IPTG 诱导(箭头所示的蛋白质分子量大小约为 34KD);图 2-B 为诱导剂 IPTG 不同终浓度诱导表达结果:1-7 的 IPTG 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2mmol/L;图 2-C 为不同温度诱导 pET28a-UL51 表达结果:1-3 的温度分别为 20、30 和 37℃;图 2-D 为不同时间诱导 pET28a-UL51 表达结果:1-7 的诱导时间分别为 1、2、3、4、5、6、7 和 8h。

[0023] 图 3-A 为重组 UL51 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析:M 为蛋白质分子量,1 为 IPTG 诱导的 1ml 菌液,2 为粗提的 UL51 蛋白包涵体,3 为 50mM 咪唑洗脱峰(不含纯化的重组 UL51 蛋白);4 为 300mM 咪唑洗脱峰(含有纯化的重组 UL51 蛋白);图 3-B 为纯化的抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的 SDS-PAGE 分析:M 指标准蛋白质分子量,1 指过柱纯化的兔抗 UL51 蛋白抗体 IgG,2 为过柱纯化鼠抗 UL51 蛋白抗体 IgG。

[0024] 图 4 为琼脂糖凝胶扩散试验检测兔抗重组 UL51 蛋白高免血清效价测定。

[0025] 图 5 为胶体金免疫层析试纸条的组装示意图;

[0026] 图 6 为基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法的敏感性检测结果。

具体实施方式

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面结合附图对本发明的优选实施例进行详细的描述。本实施例中,试纸是基于抗重组 UL51 蛋白抗体标记并严格控制金标垫上免疫胶体金与硝基纤维膜上抗体的标记浓度的基础上制备而成,所述重组 UL51 蛋白的获得是通过构建原核表达质粒 pET28a-UL51、转化表达菌并发酵培养,收集到了大量的含有重组 UL51 蛋白的菌体沉淀,再通过超声波破碎菌体、重组 UL51 蛋白包涵体洗涤、纯化及梯度透析而获得的;用所述重组 UL51 蛋白对兔和鼠进行常规免疫程序和纯化,获得兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 和鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG;进一步确定了兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 和鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的最佳浓度范围及酶标抗体最适浓度,最终得到特异性和灵敏性高的检测试纸。

[0028] 实施例基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用

[0029] 一鸭瘟病毒 UL51 基因的克隆、原核表达及 UL51 蛋白的纯化

[0030] 1 材料准备

[0031] 1.1 菌株、质粒和毒株

[0032] 质粒 pMD18-T, 购自大连宝生物工程有限公司; 原核表达质粒 pET28a(+), Novagen 公司产品; 克隆宿主菌 *E. coli* DH5a、表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 和 DPV CHv 强毒株, 由四川农业大学禽病研究中心提供。

[0033] 1.2 试验动物

[0034] 10 日龄鸭胚, 其种鸭 DPV 和抗体均为阴性; 健康雄性白兔 4 只, 体重 2-3kg/ 只, 购自雅安某兔场; 健康 Vista 大鼠 20 只, 购自四川大学。

[0035] 2 实验方法

[0036] 2.1 DPV UL51 基因的克隆

[0037] 2.1.1 引物设计

[0038] 利用 Primer Premier5.0 软件, 参考 UL51 基因序列 (GenBank 登录号: DQ072725), 由宝生物生物技术有限公司合成。

[0039] 引物 DPV-UL51F: 5'-CCGGAATTCATGTTAGCTTTTATCTCCAG-3' (划线部分为 EcoRI 位点); 引物 DPV-UL51R: 5'-TCCCTCGAGTTAGACGGCTACCAACG-3' (划线部分为 XhoI 位点)。合成后, 以适量灭菌去离子水溶解, 使其终浓度为 20mmol/L, -20℃ 保存备用。

[0040] 2.1.2 DPV 基因组 DNA 的提取

[0041] a 正常鸭胚成纤维细胞 (DEF) 的制作方法: 取 10d 日龄健康鸭胚, 分别用 5% 碘酒和 75% 酒精消毒蛋壳表面。无菌操作条件下将胚体取出并用 PBS 将胚体洗净, 剪去头、翅、腿和内脏, PBS 冲洗后将胚体剪成 1mm 大小的小块, 加 PBS 适量, 之后置于三角瓶内, 加细胞分散剂 (2.5% 胰蛋白酶) 150 μ l/ 胚, 于 37℃ 水浴中消化 3min。立即将细胞悬液以 4000r/min 离心 5min, 倾弃上清, 细胞沉淀用适量的 MEM 悬浮后, 用 5 层纱布过滤, 向滤液中加入 10% 小牛血清和 100IU/mL 双抗后, 分装于 100mL 细胞培养瓶中, 7mL/ 瓶, 水平静置于 37℃ 细胞培养箱中进行培养。

[0042] b DPV 增殖: 取刚刚长成致密单层的 DEF, 弃生长营养液, 用灭菌 PBS 清洗细胞表面 2 次后, 加入 DPV 病毒液 2 ~ 3mL 覆盖细胞表面进行吸附, 37℃ 吸附 120min 后弃病毒液, 然后加含 3% 小牛血清和 100IU/mL 双抗的 MEM 维持营养液, 之后 37℃ 培养。同时做未接毒的 DEF 对照。

[0043] c DNA 提取方法: 直接从感染细胞中提取 DPV 基因组 DNA 的具体步骤如下: (1) 选取用 DPV 种毒感染后细胞病变 (CPE) 达 60% ~ 70% 的 DEF (100mL 细胞瓶); 同时选取细胞形态正常的 DEF 作对照; (2) 倾去细胞培养液, 加入 500 μ l 的细胞裂解液, 同时加蛋白酶 K (10mg/mL) 至终浓度为 200 μ g/mL, 轻轻混匀后, 37℃ 孵育 10min; (3) 将细胞悬浮液倒入 EP 离心管中, 并用 500 μ l 的饱和酚洗涤残存于细胞瓶内的裂解物, 倒入离心管中; (4) 用饱和酚: 氯仿及氯仿抽提 2 次, 再用水饱和乙醚处理 2 次; (5) 加 1/10 倍体积 3mol/L NaAC, 混匀后, 加入 2 倍体积冷无水乙醇, -20℃ 放置 30 ~ 60min; (6) 13000r/min 离心 20min, 沉淀用预冷的 70% 乙醇洗涤两次; (7) 真空抽干后, 溶于适量 TE 缓冲液中, 加入 1 μ l RNA 酶, 37℃ 作用 30min, -20℃ 保存备用。

[0044] 2.1.3 PCR 扩增 DPV UL51 基因

[0045] PCR 反应体系为:

[0046]	2 × 傻瓜 PCR Mixtrue	12.5μL
	DPV 基因组 DNA	1.0μL
	P1(20pmol / μL)	1.0μL
	P2 (20pmol / μL)	1.0μL
	超纯水	9.5μL
	Total volume	25μL /Sample

[0047] 轻轻混匀,2000r/min 瞬时离心后进行 PCR。

[0048] 反应参数 :95℃预变性 5min,95℃变性 1min,56℃退火 1min,72℃延伸 1min,循环 40 次,最后 72℃延伸 10min,于 4℃保存备用。取 4 μ L PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳,设 DL2000 和空白对照,观察扩增片段的长度。

[0049] 2. 1. 4UL51 基因 PCR 产物的回收

[0050] 按北京赛百盛基因技术有限公司 DNA 回收试剂盒说明书进行,回收后的 DNA 贮存于 -20℃保存备用。

[0051] 2. 1. 5 纯化的 UL51 基因与 pMD18-T 的连接

[0052] 连接反应体系如下 :

[0053]	PCR 产物	4.5μL
	pMD18-T	0.5μL
	2×DNA 连接酶 Mixtrue	5.0μL
	超纯水补足至	10μL

[0054] 将上述试剂加入 0. 2mL 的 EP 管中,小心混匀,瞬时离心后,于 16℃连接过夜。

[0055] 2. 1. 6DH5a 感受态细胞的制备

[0056] 采用氯化钙法制备新鲜的 DH5a 株大肠杆菌感受态细胞,简述如下:(1) 无菌挑取平板上新鲜培养的 DH5a 单克隆菌落接种于 5mL LB 培养液中,于 37℃振荡培养过夜;(2) 取 1mL 上述培养液接种于 100mL LB 培养液中,37℃ 200r/min 振荡培养 2. 5 ~ 3h,使 OD₆₀₀ = 0. 5 左右;(3) 将细菌培养物倒入灭菌后用冰预冷的离心管中,冰浴 10min;(4) 于 4℃ 4000r/min 离心 8min,弃上清;(5) 加 10mL 冰预冷的 0. 1mol/L 的 CaCl₂,温和悬起细菌沉淀,冰浴 30min;(6) 于 4℃ 4000r/min 离心 8min,弃上清,加 4mL 冰预冷的 0. 1mol/L 的 CaCl₂ 再次重悬沉淀,加入终浓度为 15%的灭菌甘油,混匀后分装为 200 μ L/ 管,直接用于转化或置于 -70℃冰箱中保存备用。

[0057] 2. 1. 7 转化感受态细胞

[0058] 将 10 μ L 连接体系全部取出加到 200 μ L DH5a 感受态细胞中,冰浴 30min;再置于 42℃温浴 90s,之后再冰浴 2min;然后立即加入 0. 8mL LB 培养基,37℃水浴振荡培养 45min,取 200 μ L 涂于含 (X-gal/IPTG/Kan) 的培养基上,置 37℃培养箱中培养过夜。次日挑取单个白色菌落接种于 5mL LB (含 50 μ g/mL Kan) 中,37℃水浴振荡培养 18h 后进行质粒抽提。

[0059] 2. 1. 8 质粒的抽提

[0060] 按北京赛百盛基因技术有限公司质粒抽提试剂盒说明书进行,回收产物贮存于 -20°C 保存备用。

[0061] 2.1.9 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

[0062] 将上一步抽提的重组质粒命名为 pMD18-UL51, 分别以 EcoR I/XhoI 双酶切消化与 Xho I 单酶切消化, 1.0% 凝胶电泳观察结果。同时做 PCR 扩增目的基因。

	Xho I	EcoR I / Xho I
pMD18-UL51 质粒	8.0 μL	16.0 μL
EcoR I	-	1.0 μL
[0063] Xho I	1.0 μL	1.0 μL
10 $\times$ H Buffer	1.0 μL	2.0 μL
超纯水补足至	10 μL	20 μL

[0064] 2.1.10 UL51 基因序列测定

[0065] 将鉴定正确的质粒寄送上海英骏生物有限公司进行测序。

[0066] 2.2 原核表达质粒 pET28a-UL51 的构建、诱导表达与表达条件优化

[0067] 2.2.1 原核表达质粒 pET28a-UL51 的构建与鉴定

[0068] a 目的片段的酶切与连接: 限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 分别双酶切 pMD18-UL51 质粒和原核表达载体 pET28a(+), 酶切体系均为:

	pMD18-UL51 质粒	原核表达载体 pET28a(+)	8.0 μL
EcoR I	EcoR I		1.0 μL
[0069] Xho I	Xho I		1.0 μL
10 $\times$ H buffer	10 $\times$ H buffer		2.0 μL
超纯水补足至	超纯水补足至		20 μL

[0070] 37°C 水浴 4h, 按 DNA 回收试剂盒使用说明分别回收目的片段后, 按照下列连接体系 16°C 连接过夜。

	回收目的片段 UL51	6.0 μL
pET28a 双酶切回收片段		1.5 μL
[0071] 2 $\times$ DNA 连接酶 Mixtrue		7.5 μL
超纯水补足至		15 μL

[0072] b 重组质粒的转化: 采用氯化钙法制备 DH5a 感受态细胞。之后, 取连接液 15 μL 加到含 200 μL 感受态 DH5a 的离心管中, 混匀后冰浴 30min; 置于 42°C 水浴 90sec, 然后迅速冰浴 2min; 加入不含 Kan 的 LB 液体培养基 800 μL , 37°C 振摇 (150r/min) 培养 1 ~ 1.5h; 取 200 μL 培养物涂布于含 100 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 LB 平板, 37°C 培养过夜, 次日挑取单个菌落接种于 5mL 的 LB 液体培养基中, 37°C 培养 12 ~ 16h, 同时设立空载体转化组 (空载体 10 μL +

感受态 DH5a 200 μ L)、无载体对照组 (灭菌超纯水 10 μ L+ 感受态 DH5a 200 μ L)。

[0073] c 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定:将上述保存的克隆菌种接种于 5mL 的 LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 中,37℃ 水浴振荡培养过夜,次日按常规方法提取重组质粒,然后用 Xho I 单酶切、EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定该重组质粒,其酶切体系如下:

		Xho I	EcoR I / Xho I
[0074]	pET28a-UL51 质粒	8.0 μ L	16.0 μ L
	EcoR I	-	1.0 μ L
	Xho I	1.0 μ L	1.0 μ L
	10 $\times$ H Buffer	1.0 μ L	2.0 μ L
	超纯水补足至	10 μ L	20 μ L

[0075] 然后,以上述重组质粒为模板,利用所述引物进行 PCR 反应,其方法和扩增条件同上,取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。经过酶切和 PCR 鉴定,获得重组原核表达质粒 pET28a-UL51。

[0076] 2.2.2 重组表达质粒 pET28a-UL51 的诱导表达

[0077] a 重组质粒 pET28a-UL51 的提取:挑取已鉴定含阳性重组质粒 pET28a-UL51 的 DH5a 菌种划线接种于含 Kan 50g/mL 的 LB 琼脂平板上,37℃ 培养过夜,次日取单个菌落接种于 5mLLB 液体培养基上,剧烈振荡培养 10 ~ 16h,离心收集菌液,按 UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒说明进行重组质粒的提取与纯化。

[0078] b 重组质粒 pET28a-UL51 转化表达菌:采用氯化钙法制备 E. coli BL(DE3) 感受态细胞,并将上述提取的重组质粒 pET28a-UL51 转化到表达宿主菌 E. coli BL(DE3) 中。

[0079] c 重组质粒 pET28a-UL51 的诱导表达:从上述 LB 固体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 上,挑取阳性克隆菌,接种 LB 液体培养基,37℃ 培养过夜,次日取菌液按 1 : 50 的比例接入 5mLLB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 中,剧烈振荡培养至 $OD_{600} = 0.4$ 时,分别加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,诱导 3h 后,收集 1mL 培养菌液,4℃ 13000r/min 离心 2min,弃上清,沉淀中加入 80 μ L 超纯水和 20 μ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,100℃ 水浴加热变性 5 ~ 10min,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,观察表达结果。

[0080] d 重组质粒 pET28a-UL51 表达产物的可溶性分析:将诱导表达的 100mL 菌液和未诱导表达的 100mL 菌液,分别按下步骤处理:4℃,10000r/min 离心 5min,菌体沉淀用 20mL 20mmolTris-HCl (pH8.0) 悬浮;置 -20℃ 过夜后,加溶菌酶至终浓度为 1mg/mL,4℃ 搅拌 30min,超声波 (冰浴) 间歇破碎菌体 (600w,30sec/ 次,10 次),4℃,10000r/min 离心 10min,取上清备用①;沉淀用 10mL 洗液 (10mmol/L PBS+2mol/L 尿素+0.2% Triton X-100) 悬浮,4℃,10000r/min 离心 10min 后,沉淀再次用 10mL 洗液悬浮,重复洗涤三次后,用适量尿素溶液 (10mmol/L PBS+8mol/L 尿素) 溶解沉淀②,低温保存备用。分别取适量的上清①和尿素溶液溶解的沉淀②,向其中加入 80 μ L 超纯水和 20 μ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,100℃ 水浴加热变性 5 ~ 10min,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,将凝胶用考马斯亮蓝染色后,观察结果。并将染好色的凝胶经全自动凝胶成像分析系统扫描和 Quantity One 软件分析诱导菌液中重组蛋白在胞浆 (上清①,可溶性) 和沉淀中 (沉淀②,包涵体形式) 的相对百分含量。

[0081] 2.2.3 重组质粒 pET28a-UL51 表达条件的优化

[0082] a 诱导剂 IPTG 的浓度优化 : 取含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21 (DE3), 接种 5mL LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 中, 37℃ 振荡培养过夜。次日按 1 : 50 转接种于 5mL LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 中, 37℃ 培养培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时, 取其中 7 只试管, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L、1.2mmol/L 37℃ 诱导培养 4h 后, 按所述方法对样品进行处理, 12% SDS-PAGE 电泳, 观察结果。

[0083] b 温度条件优化 : 取含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21 (DE3), 接种 5mL LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 中, 37℃ 振荡培养过夜。次日按 1 : 50 转接种于 5mL LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 中, 37℃ 培养培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时, 取其中 3 只试管, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L, 分别置于 20℃、30℃、37℃ 诱导培养 4h, 按上述常规方法对样品进行处理, 12% SDS-PAGE 电泳, 观察结果。

[0084] c 诱导时间优化 : 取含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21 (DE3), 接种 5mL LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 上, 37℃ 振荡培养过夜。次日按 1 : 50 转接种于 5mL LB 液体培养基 (含 Kan 50 μ g/mL) 上, 继续培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L, 37℃ 诱导培养, 分别于诱导后 0、1、2、3、4、5、6、7、8h, 吸取 1mL 培养液, 按上述方法对样品进行处理, 12% SDS-PAGE 电泳, 观察结果。

[0085] 2.3 重组 UL51 蛋白的大量制备、纯化与复性

[0086] 2.3.1 重组 UL51 蛋白的大量制备 (包涵体处理)

[0087] 将诱导表达 1000mL 菌液于 4℃、10000r/min 离心 10min, 将菌体沉淀用 40mL 20mmol Tris-HCl (pH8.0) 悬浮; 置 -20℃ 过夜后按 1mg/mL 加溶菌酶, 4℃ 搅拌 30min, 超声波 (冰浴) 间歇破碎菌体 (200w, 30sec/次, 5~10 次), 4℃、10000r/min 离心 10min。将沉淀用 20mL 洗液 (10mmol/L PBS+2mol/L 尿素+0.2% Triton X-100) 悬浮, 4℃、10000r/min 离心 10min 后, 用适量尿素溶液 (10mmol/L PBS+8mol/L 尿素) 溶解沉淀, 4℃ 保存备用。

[0088] 2.3.2 重组 UL51 蛋白的纯化

[0089] 镍琼脂糖凝胶 (Ni²⁺-NAT) 亲和层析纯化重组 UL51 蛋白 : 根据融合蛋白的 6-His 标签对镍离子特殊的亲和作用, 使带有标签的融合蛋白能够结合于镍琼脂糖凝胶上, 改变洗脱液的条件将其洗脱, 而达到纯化的目的。具体操作步骤为 : (1) 装柱 : 镍琼脂糖凝胶装柱, 柱床体积约为 40mL ; (2) 平衡 : 用平衡缓冲液 I 约 5 个床体积平衡层析柱, 流速为 1mL/min ; (3) 上样 : 将 0.45 μ m 滤膜过滤的可溶性包涵体样品约 5mL, 加入层析柱中, 流速为 0.5mL/min ; (4) 洗涤 : 用平衡缓冲液 II 再洗 2-5 个床体积, 流速为 1mL/min ; (5) 洗脱 : 分别用含 50、300、500mmol 咪唑的洗脱缓冲液 III 进行梯度洗脱, 流速为 1mL/min, 收集各梯度的洗脱峰, 用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子量大小和纯度 ; (4) 清洗 : 用超纯水洗 5 个柱床体积, 再用 25% 的乙醇洗 3 个柱床体积, 流速为 1mL/min, 回收镍琼脂糖凝胶柱, 于 4℃ 中保存。

[0090] 2.3.3 重组 UL51 蛋白的复性

[0091] 将过柱纯化的重组 UL51 蛋白, 于 4℃ 在不同浓度的尿素溶液 (6、4、3、2、1、0mol/L) 中梯度透析, 使变性蛋白逐渐复性, 并用 Bradford 法测定蛋白的最终浓度, 分装后备用。

[0092] 3 实验结果

[0093] 3.1DPV UL51 基因的扩增、T-克隆与鉴定结果

[0094] 3.1.1UL51 基因的 PCR 扩增结果

[0095] 以 DPV CHv 毒株基因组 DNA 为模板对 UL51 基因进行 PCR 扩增,其产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,获得了一条约 760bp 的特异性 DNA 条带,而以正常 DEF 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,无特异性条带,这与预期结果一致(图 1-A)。

[0096] 3.1.2UL51 基因 T 克隆鉴定结果

[0097] PCR 产物经胶回收纯化后,与 pMD18-T 载体连接并转化感受态细胞 DH5 α ,得到的 T 克隆命名为 pMD18-UL51。对 pMD18-UL51 进行 PCR、酶切(图 1-B:重组质粒 pMD18-UL51 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切得到的两个片段,箭头所示小片段的分子量大小约为 760bp)和测序鉴定,结果表明,T 克隆获得的 UL51 基因序列同已知的 DPV UL51 基因序列完全一致。。

[0098] 3.2 原核表达质粒 pET28a-UL51 的构建与鉴定、诱导表达及其优化结果

[0099] 3.2.1 重组表达质粒 pET28a-UL51 的构建与酶切鉴定

[0100] 以 EcoR I 和 Xho I 双酶切 T 克隆质粒后回收目的片断,与经相同酶切的 pET-28a(+) 表达载体连接,转化 DH5 α ,得到重组表达质粒 pET28a-UL51,该理论大小约为 6130bp,经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后得到的两条片断的大小分别约为 5370bp 和 760bp(见图 1-C),与理论值相符,表明原核表达载体被成功构建。

[0101] 3.2.2 重组质粒 pET28a-UL51 的诱导表达

[0102] a 重组质粒 pET28a-UL51 的诱导表达将重组质粒 pET28a-UL51 转化表达:菌株 BL21(DE3),在含 Kan 的 LB 琼脂平板上筛选到了白色菌落。将含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21(DE3)用 IPTG 进行诱导表达、未用 IPTG 诱导、空载体 pET-28a(+) 转化菌株诱导表达,结果表明:空载体 pET-28a(+) 转化菌株诱导和未诱导菌株都未出现特异性蛋白条带;重组表达质粒 pET28a-UL51 表达的重组 UL51 蛋白在 34KD 处(图 2-A)。

[0103] b 重组质粒 pET28a-UL51 表达产物的可溶性分析:诱导表达的 100mL 菌液经可溶性分析处理后,电泳结果显示:表达蛋白主要存在于沉淀中,说明重组表达蛋白在菌体中大量以不溶的包涵体形式存在。同时 Quantity One 软件分析显示:诱导菌液中重组蛋白在胞浆上清(可溶性)和沉淀中(包涵体形式)的相对百分含量分别为 6.72%和 93.28%。

[0104] 3.2.3 重组质粒 pET28a-UL51 表达条件的优化

[0105] a、IPTG 浓度的优化:在 37℃ 条件下,加入 IPTG 使其终浓度分别为 0mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L、1.2mmol/L 诱导培养 4h,结果显示:未加诱导剂的对照管无特异性蛋白条带;随 IPTG 浓度的增高,蛋白诱导量逐渐增加,当增加到 0.8mmol/L 蛋白表达量达到最大;其后再增大 IPTG 浓度到 1.0mmol/L 和 1.2mmol/L 时,其蛋白表达量与 0.8mmol/L 时没有明显差别(图 2-B)。因此,可选择 0.8mmol/L 的 IPTG 浓度作为诱导表达浓度。

[0106] b、诱导温度条件的优化:37℃ 培养培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时,取 3 只灭菌试管,分装 5mL/管,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L,分别置于 20℃、30℃、37℃ 诱导培养 4h,结果:温度在 20℃ 时,诱导蛋白量较少,37℃ 时最高(图 2-C),说明随着温度升高,蛋白诱导量逐渐增加。因此,选择温度 37℃ 为最佳诱导温度。

[0107] c、诱导时间的优化:在 IPTG 浓度为 0.8mmol/L,37℃ 条件下,采用 1~8h 不同诱导时间进行诱导表达,结果 1h 时几乎无特异的蛋白条带产生;诱导 1~3h 的重组蛋白表达量均低于 4h 诱导组;诱导 5~8h,其重组蛋白表达量同 4h 相比无明显变化(图 2-D)。因

此,选择 4h 作为最佳诱导时间。

[0108] 3.3 重组 UL51 蛋白的纯化结果

[0109] 表达产物经过溶菌酶裂解、超声波破碎、尿素洗涤等一系列前处理后,镍琼脂糖凝胶亲和层析纯化重组 UL51 蛋白。UL51 蛋白样品过柱纯化后的 UV 曲线图显示出 3 个峰,峰 1 为穿透峰,峰 2 为 50mmol 咪唑洗脱峰,峰 3 为 300mmol 咪唑洗脱峰。同时收集不同浓度咪唑洗脱峰,进行 SDS-PAGE 电泳,检验纯度及浓度,结果显示:只有 300mmol 咪唑洗脱峰中含有大量高纯度的重组 UL51 蛋白(图 3-A)。将纯化的重组 UL51 蛋白透析复性后,用 Bradford 法测定蛋白的终浓度,并将其稀释为 1mg/mL,分装后备用。

[0110] 二基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用

[0111] 1 抗重组 UL51 蛋白多克隆抗体的制备和纯化

[0112] 1.1 弗氏佐剂

[0113] a 弗氏不完全佐剂:液体石蜡油 3 份,羊毛脂 1 份,混合均匀,115℃,15min 高压灭菌后得弗氏不完全佐剂。使用前加热融化,冷却至 50℃左右,加抗原进行乳化处理;b 弗氏完全佐剂:在上述基础上添加卡介苗至终浓度 1mg/mL 即可,使用时将抗原溶液与其等量混合,充分乳化。

[0114] 1.2 兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的制备和纯化

[0115] 1.2.1 兔抗重组 UL51 蛋白抗体的制备(重复进行三次此试验,每次间隔 1 周,以制备三个不同批次的抗体)

[0116] a 免疫原的制备:将纯化并复性后的重组 UL51 蛋白,首免与等量完全弗氏佐剂混合并充分乳化,第二、三免与不完全弗氏佐剂混合并充分乳化,第四免不加佐剂。

[0117] b 免疫程序:选择健康雄兔 4 只,首免前一天分别采血,分离血清作为阴性对照。制备兔抗 UL51 高免血清免疫程序如下表:

[0118]

免疫接种时间	抗原及佐剂	抗原注射剂量	注射部位
一免(第 1d)	UL51 蛋白+弗氏完全佐剂	500μg/mL/kg	双后足掌、腋下
二免(第 14d)	UL51 蛋白+弗氏不完全佐剂	300μg/mL/kg	腋下、脊背皮下
三免(第 21d)	UL51 蛋白+弗氏不完全佐剂	300μg/mL/kg	双后足掌、脊背皮下
四免(第 28d)	纯化的重组 UL51 蛋白	0.6mL 只	耳缘静脉

[0119] 四免后 14d 颈动脉放血,收集血液。37℃放置 1h,4℃冰箱过夜。第二天析出血清,血凝块以 4000r/min 离心 15min 再次收集血清,-20℃保存备用。

[0120] 按双向琼扩法,用 100mL 0.8% NaCl 溶液溶解 1g 琼脂糖,115℃高压灭菌 10min 后,倒入培养皿中,制成 4mm 厚的凝胶板。用打孔器在凝胶板上打孔,将倍比稀释的血清(1:2、1:4、1:8、1:16、1:32)和阴性兔血清分别滴于梅花形外周孔内,中间孔滴加纯化的重组 UL51 蛋白或 DPV,37℃湿盒孵育 24~48h,观察琼扩结果。结果显示,1:2、1:4、1:8、1:16 和 1:32 均出现清晰可见的琼扩沉淀线,而阴性兔血清无沉淀线(图 4),这表明重组 UL51 蛋白,具有较好的抗原性并能与 DPV 反应。

[0121] 1.2.2 兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的纯化

[0122] a、正辛酸-硫酸铵法粗提兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG:粗提兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG,步骤如下:(1) 取分离的 10mL 血清加入等量的 0.06mol/L pH4.8 醋酸盐缓冲液,混匀;(2) 室温搅拌下逐滴加入正辛酸 75 μ g/mL 血清,室温搅拌 30min,4℃静置>3h,使其充分沉淀后,13000r/min 离心 30min;(3) 取上清用滤纸过滤,向滤液中加入 1/10 体积的 10mmol/LpH7.4 的 PBS,用 2mol/L NaOH 调节 pH = 7.4;(4) 冰浴下向液体中缓缓加入饱和硫酸铵 0.277g/mL 使其终浓度达到 45%,搅拌 30min,置 4℃静置>3h 或过夜,13000r/min 离心 30min 弃上清液;(4) 按 1 : 4 的比例向沉淀中加入 PBS,充分吹打使其充分溶解;(5) 将溶解液装入透析袋中,在 4℃下用 10mmol/L pH7.4PBS 透析,每 6h 换液一次,直至奈氏试剂检测透析液中无沉淀产生为止。

[0123] b、High Q 柱阴离子交换色谱法纯化兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG:纯化抗体 IgG,步骤如下:(1) 样品前处理:将粗提 IgG 用 0.45 μ m 滤膜过滤去除杂质,以缓冲液 A(pH8.0, 20mmol/LTris-HCl 缓冲液)在 4℃条件下进行透析平衡过夜;(2) 色谱柱前处理:经过 0.5mol/LNaOH、水洗、1.0mol/LNaCl、水洗等前处理,且以缓冲液 A 平衡 HighQ 色谱柱;(3) 上样:取 5mL 的粗提 IgG 样品;(4) 清洗:用 50mL 缓冲液 A 平衡并洗下未结合的蛋白质和杂质;(5) 洗脱:以缓冲液 B(1.0mol/L NaCl)进行线性梯度离子强度洗脱,流速 0.5mL/min,洗脱时间为 200min,分部收集洗脱组分。

[0124] c、抗体 IgG 纯度和浓度测定:将收集到的洗脱峰样品处理后,进行 SDS-PAGE 电泳,来测定抗体 IgG 的纯度,并用 Bradford 法测定抗体 IgG 的最终浓度,并将其稀释为 2mg/mL,分装后于 -20℃保存备用。

[0125] 1.3 鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的制备和纯化(重复进行三次此试验,每次间隔 1 周,以制备三个不同批次的抗体)

[0126] 具体包括(1) 免疫原的制备:将纯化的重组 UL51 蛋白,首免与等量完全弗氏佐剂混合乳化充分,第二、三免与不完全弗氏佐剂混合乳化充分,第四免不加佐剂。(2) 免疫程序:选择健康 Vista 大鼠 20 只,首免前一天分别采血,分离血清作阴性对照。制备鼠抗重组 UL51 蛋白高免血清免疫程序如表 1。四免后 14d 摘眼球放血,收集血液。37℃放置 1h,4℃冰箱过夜。第二天析出血清,血凝块以 4000r/min 离心 15min 再次收集血清,-20℃保存备用。(3) 双向琼扩法测定鼠抗重组 UL51 蛋白高免血清的效价为 1 : 64。其它可参照兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的制备和纯化。

[0127] 表 1 鼠抗重组 UL51 蛋白多克隆抗体的免疫程序

[0128]

免疫接种时间	抗原及佐剂	抗原注射剂量	注射部位
一免(第 1d)	UL51 蛋白+弗氏完全佐剂	100 μ g/mL/只	腹部皮下、腋下
二免(第 14d)	UL51 蛋白+弗氏不完全佐剂	50 μ g/mL/只	腋下、脊背皮下
三免(第 21d)	UL51 蛋白+弗氏不完全佐剂	50 μ g/mL/只	腹部皮下、脊背皮下
四免(第 28d)	纯化的重组 UL51 蛋白	0.12mL 只	尾静脉

[0129] 鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 的纯化:多克隆抗体的纯化参照兔抗纯化步骤,将得到的鼠抗重组 UL51 蛋白抗血清进行纯化,用 Bradford 法测定抗体 IgG 的最终浓度,并将

其稀释为 2mg/mL,分装后于 -20℃ 保存备用。分别对纯化后的鼠抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 和兔抗重组 UL51 蛋白抗体 IgG 进行 SDS-PAGE 鉴定,结果表明该抗体 IgG 具有很高的纯度。用 Bradford 法测定两种抗体 IgG 的最终浓度,并将其稀释为 2mg/mL,分装后于 -20℃ 保存备用。

[0130] 本实施例中,将所制备的两种重组 UL51 蛋白抗体的动物选为大鼠和兔,也可选用其他不同种属动物。

[0131] 2 实验材料及样品处理

[0132] 2.1 检测菌株、毒株和样品

[0133] 正常鸭胚成纤维细胞 (DEF) 培养液、含 DPV 强毒的 DEF 培养液、含鸭病毒性肝炎病毒 (Duck virus hepatitis, DHV) 的鸭胚尿囊液、含鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 的菌体培养液、含鸭大肠杆菌 (*E. coli*) 的菌体培养液、DPV 阴性鸭的泄殖腔棉拭子和人工感染 DPV 强毒后的病鸭泄殖腔棉拭子样品均由本实验室提供。

[0134] 2.2 其它主要试剂

[0135] 羊抗兔 IgG 抗体购自上海博升生物科技有限公司;金标抗体稀释液、金标抗体保存液、玻璃纤维素膜处理液,由上海金标生物科技有限公司提供;其它常规试剂如 0.01mol/L 的 PB 缓冲液 (pH7.2) 均按常规方法配置。

[0136] 2.3 主要仪器及用品

[0137] YZ-3000 三维喷点仪、IN-5000 切割机、CM-4000 压膜机、吸水纤维素膜、玻璃纤维素膜、白色塑料背板、塑料盒、干燥剂、吸水棉、硝酸纤维素膜 (NC 膜) 等均由上海金标生物科技有限公司提供。

[0138] 2.4 待测样品的处理

[0139] a 细胞培养液、鸭胚尿囊液或菌体培养液的处理

[0140] 将待检的液体样品进行以下裂解处理:向待检样品液中加入等体积的裂解液 [2% TritonX-100/PBS (0.01mol/L, PH = 7.2) 溶液] 作用 5min (剧烈振荡), 12000r/min、4℃ 离心 5min, 收集上清液作用于检测。

[0141] b 泄殖腔棉拭子样品的处理

[0142] 泄殖腔棉拭子的处理方法如下:用无菌棉拭子擦试病鸭泄殖腔后,放入盛有约 500 μ L 生理盐水的灭菌 EP 管中,将 EP 管在旋涡振荡器上剧烈振荡 1 ~ 3min 后,用无菌镊子将棉拭子在 EP 管壁上反复挤压后取出,余下的液体按 a 的方法处理。

[0143] 3、胶体金试纸的制备

[0144] 3.1 胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白抗体的制备 (由上海金标生物科技有限公司制备)

[0145] 胶体金颗粒的制备:运用柠檬酸三钠还原法,取 1% 氯金酸溶液 1mL,加 99mL 超纯水成终浓度 0.01% 的氯金酸溶液,加热沸腾后,取 1% 柠檬酸三钠 1.6mL 一次性迅速加入煮沸的氯金酸溶液中,继续加热至溶液由淡黄色转为蓝黑色最终变为亮红色,颜色稳定后继续加热 5min,室温冷却,补充失水至原体积。

[0146] 胶体金标记抗体的制备:确定需要标记的兔抗重组 UL51 蛋白抗体最适稳定量 and 最适标记 PH,进行标记。得到的免疫胶体金复合物经超速离心纯化,弃上清,用保存液悬较疏松的红色沉积物即为初步纯化的免疫胶体金复合物。以保存液作对照测 OD_{530nm} 值,4℃ 避

光保存。

[0147] 3.2 胶体金试纸的组装

[0148] 按照常规方法进行 ICS 的组装,具体步骤如下:(1) 将鼠抗 UL51 重组蛋白 IgG 抗体和羊抗兔 IgG 抗体分别用 0.01mol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.2) 适当稀释后,用 XYZ-3000 三维喷点仪将稀释好的鼠抗 UL51 重组蛋白 IgG 抗体和羊抗兔 IgG 抗体分别喷点于 NC 膜上,形成检测线 (test line,T 线) 和质控线 (control line,C 线),T 线与 C 线相距 0.7cm,距 NC 膜的边距分别为 0.9cm,置 37℃干燥 2h 后,4℃密封保存备用。(2) 将玻璃纤维素膜浸于用金标抗体稀释液作适当稀释的胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白抗体中,再将其浸于玻璃纤维素膜处理液中以封闭非特异性结合位点,37℃干燥过夜,制成金标垫。(3) 分别将 NC 膜、样品垫 (吸水棉)、金标垫 (玻璃纤维素膜)、吸收垫 (吸水纤维素膜) 依次粘在白色塑料板上,组装成检测试纸板,并用 LN-5000 切割机切割成 0.4cm 宽的试纸条,将其装入塑料盒中,密封包装,内置干燥剂,4℃保存。

[0149] 3.3 ICS 法的原理和结果判定

[0150] 检测 DPV 抗原的 ICS 法的原理:将鼠抗重组 UL51 蛋白的 IgG 抗体包被于 T 线,羊抗兔 IgG 抗体包被于 C 线,胶体金标记兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体固化于金标垫上;当样品中的 DPV 液流经金标垫上固化的金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体时,与其结合形成“DPVUL51 蛋白-胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体”复合物,该复合物继续流动,与 T 线上的鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体结合,形成“鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体-DPV UL51 蛋白-胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体”复合物,胶体金颗粒在 T 线上富集而呈现红色,并且 T 线呈红色的强度与 DPV UL51 蛋白的含量成正比;未结合的胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体继续向前流动,与固定在 C 线上的羊抗兔 IgG 抗体形成“羊抗兔 IgG 抗体-胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体”复合物,胶体金颗粒在 C 线上富集而呈现红色。因此,当向水平放置的试纸条的样品垫上滴加约 100 μ L 的待检样品液后,在 15min 内观察反应结果:若出现 C 线、T 线两条红线,为阳性;若只在 C 线上有一条红线,为阴性;若仅在 T 线上有一条红线或无任何红线出现,则试验无效。

[0151] 3.4 试纸条最佳试验条件的优化

[0152] 以下条件逐一组合,确定 ICS 法的最佳试验条件:

[0153] 纯化的鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体的包被浓度的确定:将鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 作 A:不稀释 (2mg/mL)、B:2 倍稀释 (1mg/mL)、C:4 倍稀释 (0.5mg/mL)、D:8 倍稀释 (0.25mg/mL) 后,用 XYZ-3000 三维喷点仪将其喷点于 NC 膜上,形成 T 线。将制备的试纸在其它条件不变的情况下,根据反应结果,确定达到试纸条敏感度要求的最适鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体的稀释度,即为工作浓度。本实施例中的倍数稀释均按体积倍数进行稀释。

[0154] 羊抗兔 IgG 抗体的包被浓度的确定:将羊抗兔 IgG 抗体用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH7.2) 作 A:不稀释 (4mg/mL)、B:2 倍稀释 (2mg/mL)、C:4 倍稀释 (1mg/mL)、D:8 倍稀释 (0.5mg/mL) 后,用 XYZ-3000 三维喷点仪将其喷点于 NC 膜上,形成 C 线。将制备的试纸在其它条件不变的情况下,根据反应结果,确定达到试纸条敏感度要求的最适羊抗兔 IgG 抗体的稀释度,即为工作浓度。

[0155] 胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体的稀释度的确定:将胶体金标记的兔抗

重组 UL51 蛋白 IgG 抗体作 A :不稀释 (2mg/mL)、B :2 倍稀释 (1mg/mL)、C :4 倍稀释 (0.5mg/mL)、D :8 倍稀释 (0.25mg/mL) 后,用同样大小的玻璃纤维素膜分别浸于不同浓度的稀释液中,将制备的试纸在其它条件不变的情况下,根据反应结果,确定达到试纸条敏感度要求的最适胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体的稀释度,即为工作浓度。

[0156] 经过优化和筛选,基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 的最佳条件为:(1) 用 XYZ-3000 三维喷点仪将稀释好的纯化的鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 和羊抗兔 IgG 抗体分别以 1mg/mL 和 1mg/mL 喷点于 NC 膜上,形成 T 线和 C 线,置 37℃干燥 2h 后,4℃密封保存备用。(2) 将玻璃纤维素膜浸于用 2mg/mL 的胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体中,再将其浸于玻璃纤维素膜处理液中以封闭非特异性结合位点,37℃干燥过夜,制成金标垫。(3) 分别将 NC 膜、样品垫(吸水棉)、金标垫(玻璃纤维素膜)、吸收垫(吸水纤维素膜)依次粘在白色塑料背板上,组装成检测试纸板,并用 LN-5000 切割机切割成 0.4cm 宽的试纸条,将其装入塑料盒中,密封包装,内置干燥剂,4℃保存,详见图 5。

[0157] 4 胶体金试纸的运用

[0158] 4.1 敏感性试验

[0159] 将含 DPV 的细胞培养液作 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160 和 1 : 320 倍比稀释后,用上述建立的 ICS 法进行检测,确定其可检测的最低稀释倍数。

[0160] 结果当含 DPV 的细胞培养液稀释到 1 : 80 时,仍可见两条清晰的红色条带;当含 DPV 的细胞培养液稀释到 1 : 160 时,仅可见 C 线出现清晰的红色条带(图 6)。当该病毒液稀释至 1 : 80 倍时,浓度约为 1.25 μ g/mL 时,试纸条呈现弱阳性反应,由于每一加样孔中加入了 100 μ L 待检样品,所以用 ICS 法能检测到的 DPV 病毒蛋白最低含量为 0.125 μ g。

[0161] 4.2 特异性试验

[0162] 用上述建立的 ICS 法分别检测正常 DEF 培养液、含 DPV 的 DEF 培养液、含病 DHV 的鸭胚尿囊液、含 RA 的菌体培养液和含 E. coli 菌体培养液,观察结果。

[0163] 结果显示仅含 DPV 的 DEF 培养液可见两条清晰的红色条带,其它样品液均仅在 C 线处出现一条清晰的红色条带。表明此方法具有良好的特异性。

[0164] 4.3 重复性试验

[0165] (1) 批内可重复性试验:用上述建立的胶体金免疫层析试纸条法分别检测正常 DEF 培养液(1 份)和含 DPV 的 DEF 培养液(1 份),作 3 次重复,观察结果;(2) 批间可重复性试验:用 3 个不同批次制备的试纸条分别检测正常 DEF 培养液(1 份)和含 DPV 强毒的 DEF 培养液(1 份),观察结果。

[0166] (1) 批内可重复性试验结果显示:按经处理过的所述正常 DEF 培养液和含 DPV 的 DEF 培养液的 3 次重复检测结果均一致;(2) 批间可重复性试验结果显示:用 3 个不同批次制备的试纸条分别检测处理过的正常 DEF 培养液和含 DPV 强毒的 DEF 培养液,得到的结果也均一致。表明建立的 ICS 法具有良好的批内及批间重复性。

[0167] 4.4 稳定性试验

[0168] 将试纸条干燥密封后分别置于 4℃、25℃和 37℃,并分别在 3 月和 6 月检测正常 DEF 培养液(1 份)和含 DPV 的 DEF 培养液(1 份),观察结果。

[0169] 将试纸条干燥密封后,分别在 4℃和 25℃放置 3 ~ 6 月,能检测到较强的阳性结果;在 37℃放置 3 ~ 6 月,仍能检测到较强的阳性结果。表明该试纸条至少可在 4℃或 25℃

保存半年。

[0170] 4.5 对鸭泄殖腔棉拭子样品的检测

[0171] 对 10 份未感染 DPV 强毒鸭和 10 份 DPV 强毒人工感染病鸭的泄殖腔棉拭子样品，按 2.4b 方法处理后，分别用本实施例基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法、基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 AC-ELISA 法和常规 PCR 方法检测，并对检测结果比较。

[0172] 检测结果如表 2 所示：(1) 10 份未感染 DPV 强毒鸭的泄殖腔棉拭子样品的检测结果：三种方法的阴性率一致，都为 100%；(2) 10 份 DPV 强毒人工感染病鸭的泄殖腔棉拭子样品的检测结果：基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 AC-ELISA 法的检出阳性率为 100% (10/10)，基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法的检出阳性率为 90% (9/10)，两者符合率为 90% (9/10)；基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 AC-ELISA 法检出与规 PCR 方法的符合率为 100% (10/10)；基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法与常规 PCR 方法的符合率为 90% (9/10)。以上结果表明，本研究建立的基于抗重组 UL51 蛋白抗体的抗原捕获 ELISA 法与常规 PCR 方法有 100% 的符合率，而基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法与以上 2 种方法的符合率均为 90%。

[0173] 表 2 3 种检测 DPV 方法的比较

[0174]

样品分类		方法		
		基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 AC-ELISA 法	基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法	常规 PCR 方法
10 份未感染 DPV 强毒的鸭的泄殖腔棉拭子样品	阳性个数	0	0	0
	阴性个数	10	10	10
	阴性比率	100%	100%	100%
10 份 DPV 强毒人工感染病鸭的泄殖腔棉拭子样品	阳性个数	10	9	10
	阴性个数	0	1	0
	阳性比率	100%	90%	100%

[0175] 5 讨论

[0176] 本实施例中建立的基于抗重组 UL51 蛋白抗体的 ICS 法应用了双抗体夹心法的工作原理，双抗体夹心法是检测抗原的常规方法，具有较强的特异性，非常适合于检验各种大分子抗原。传统方法中的 2 种抗体是用病毒免疫不同种属动物制备得到的，而本试验中的 2 种抗体则是用重组 UL51 蛋白免疫不同种属动物制备得到的。

[0177] 样品的处理方法对于 DPV UL51 蛋白从细胞中释放出来起着关键作用。通常处理样品的方法有反复冻融法、氯仿作用法、超声波裂解法、加裂解液作用法等。在预实验中运用了多种方法来处理样品，检测结果表明了加裂解液作用法的效果最好，因此选用了向待检样品液中加入等体积的裂解液来处理各种待检样品。

[0178] 基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸采用了双抗夹心原理，即两种抗重组 UL51 蛋白抗体分别被用于包被 NC 膜和标记胶体金，如果待测样品中含有 DPV UL51 蛋白，样品通过层析作用向前移动，到达金标位置和金标记兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体发生免疫反应，形成“DPV UL51 蛋白 - 胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体”复合物；该复合物继

续流动,与检测线上的鼠抗重组 UL51 蛋白的 IgG 抗体发生免疫反应,形成“鼠抗重组 UL51 蛋白的 IgG 抗体-DPV UL51 蛋白-胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白的 IgG 抗体”复合物,胶体金颗粒在 T 线上富集而呈现红色,并且 T 线呈红色的强度与 DPV UL51 蛋白的含量成正比;多余的金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体继续泳动到 C 线,与羊抗兔多克隆抗体发生免疫反应,使胶体金在 C 线上显色。

[0179] 此外,标记物工作浓度的确定是保证试纸条灵敏度和特异性的关键因素,为保证定性诊断的准确性,需严格控制金标垫上免疫胶体金与 NC 膜上抗体的标记浓度。浓度过高,一方面会使 NC 膜背景加深,使检测带显色结果不清晰,另一方面会使非特异反应增强,影响定性结果的特异性;浓度过低虽然减少了非特异反应,但同时又降低了反应的灵敏度。在本试验中,经优化和筛选,我们确定了 ICS 法中的鼠抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体、羊抗兔 IgG 抗体和胶体金标记兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体的最佳工作浓度分别为 1mg/mL、1mg/mL 和 2mg/mL。

[0180] 本试验将 DPV 病毒液作 1 : 80 倍稀释时,仍呈阳性,证明了本试纸具有较高的敏感性,原因可能有如下几个方面:(1) 本试验选用的 NC 膜、玻璃纤维滤纸具有蛋白吸附容量大、亲水性能好、无需预处理等优点,因此,尽管抗原的包被量很少,但 NC 膜检测线上的抗原浓度却较高,使 ICS 方法具有较高的敏感性。(2) ICS 方法集免疫反应与层析的特点,待测样品中的 DPV UL51 抗原与金标垫上的金标兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体结合,形成“DPV UL51 蛋白-胶体金标记的兔抗重组 UL51 蛋白 IgG 抗体”复合物;再经层析作用持续通过 NC 膜,与 NC 膜上固相抗原结合,由于所有样品均经过条状纤维素膜发生持续性反应,金颗粒持续聚集而使 T 线逐渐加深,实际上是对待测抗体起到了一个浓缩作用,从而提高了免疫层析法的敏感性。此外,在建立 ICS 方法的过程中,我们选择了含 DHV 的鸭胚尿囊液、含 RA 的菌体培养液和含 E. coli 的菌体培养液做特异性实验,结果都表明该 ICS 法与这几种病原均无交叉反应性,具有较好的特异性;批内和批间可重复性试验证实了该方法具有良好的重复性;稳定性试验表明该试纸条在 4℃ 或 25℃ 保存半年,仍可用于样品检测。

[0181] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过参照本发明的优选实施例已经对本发明进行了描述,但本领域的普通技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围。

[0001]

序 列 表

<110> 四川农业大学实验动物工程技术中心

<120> 基于抗重组 UL51 蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用

<160> 2

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DPV-UL51 F

<400> 1

ccggaattca tgtagcttt tatctccag 29

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DPV-UL51 R

<400> 2

tcctcgagt tagacggcta ccaacg 26

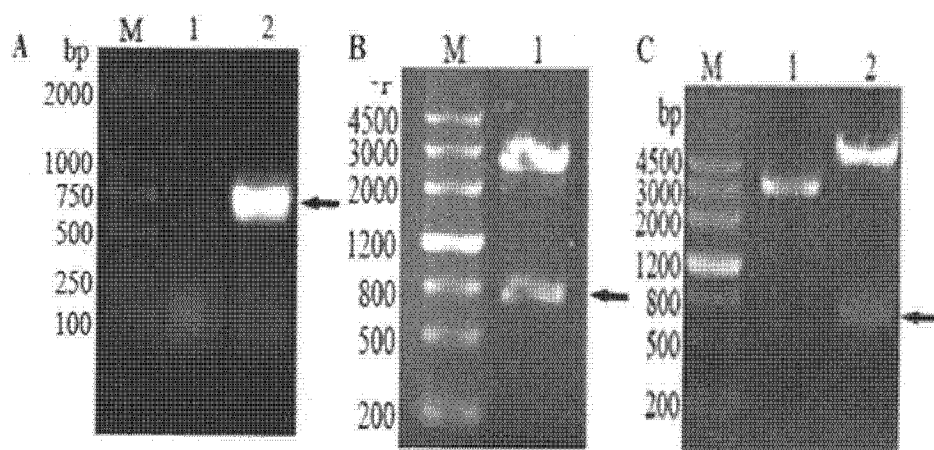


图 1

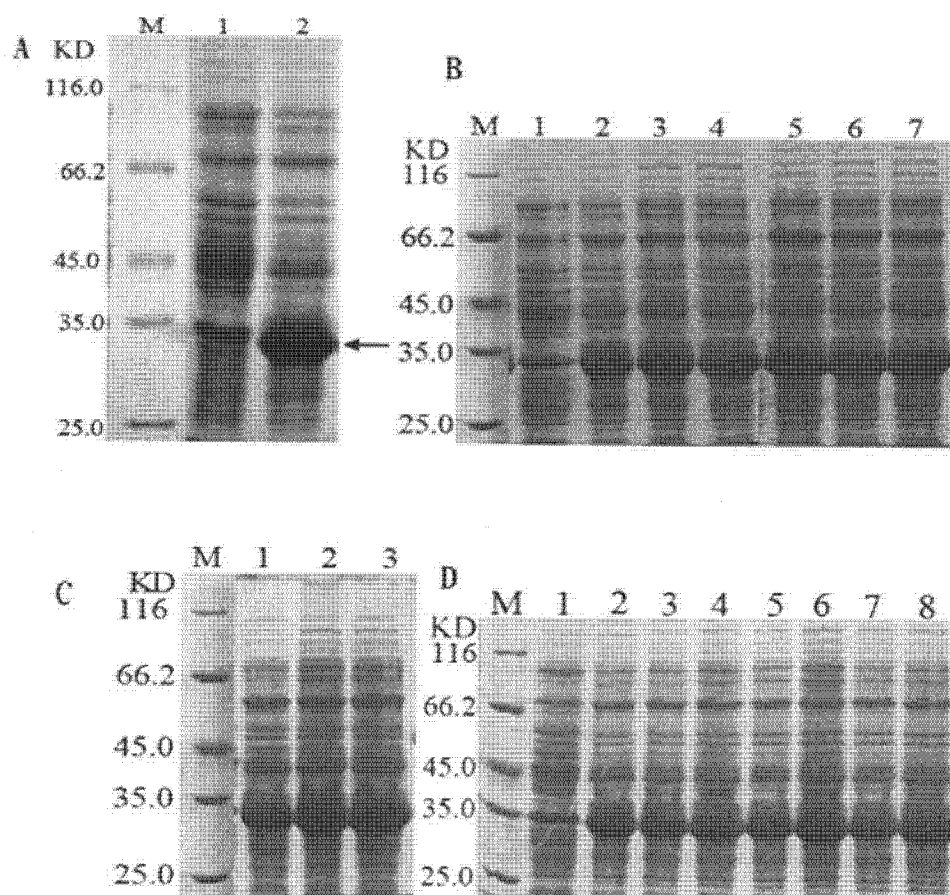


图 2

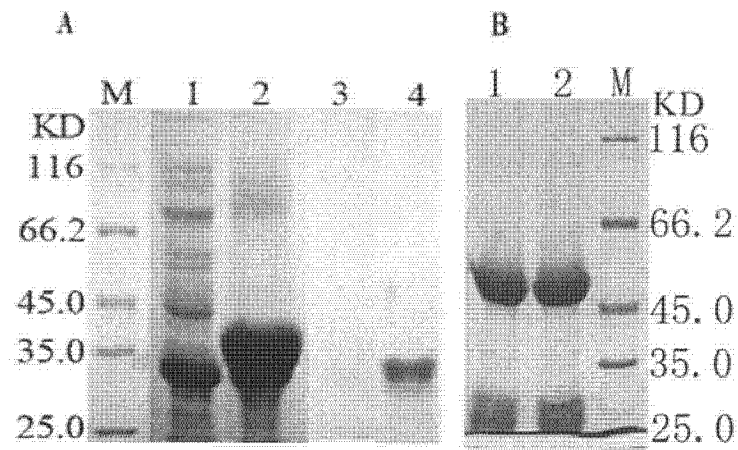


图 3

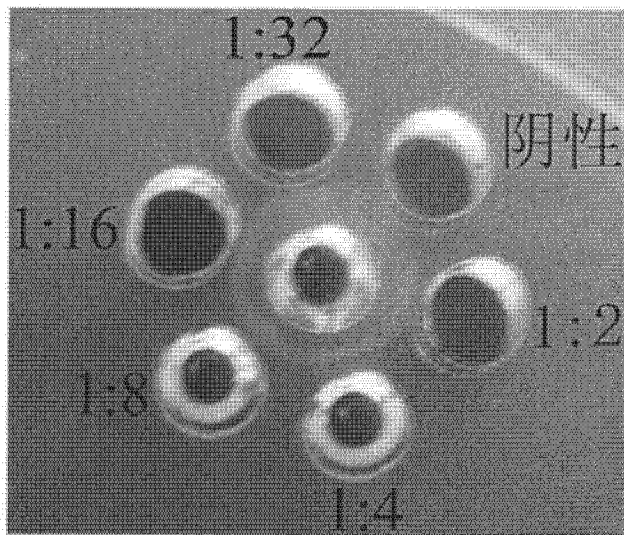


图 4

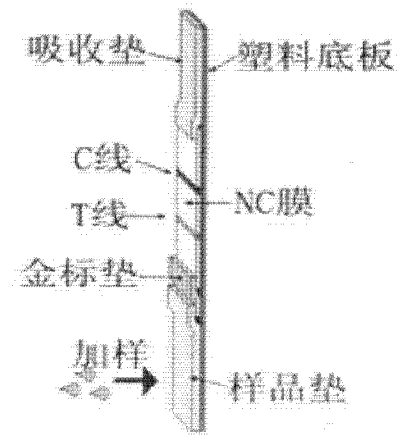


图 5

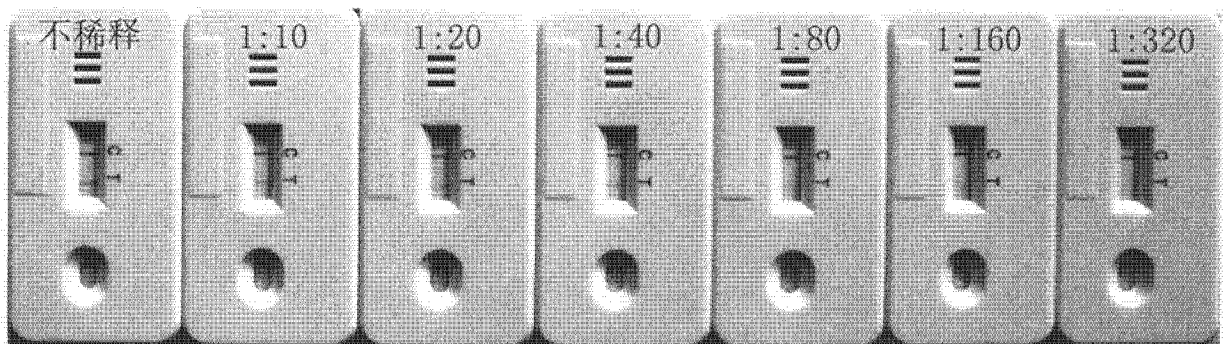


图 6

专利名称(译)	基于抗重组UL51蛋白抗体的胶体金试纸及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102012428B	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201010299524.7	申请日	2010-09-30
[标]发明人	程安春 汪铭书 沈婵娟 陈孝跃		
发明人	程安春 汪铭书 沈婵娟 陈孝跃		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
审查员(译)	刘文瀚		
其他公开文献	CN102012428A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基于抗重组UL51蛋白抗体的胶体金试纸，其由吸收垫、底板、硝基纤维膜、金标垫和样品垫组成，所述硝基纤维膜上的测试线由浓度≥1mg/mL动物抗重组UL51蛋白抗体IgG包被而成，所述金标垫由浓度≥2mg/mL胶体金标记B动物抗重组UL51蛋白抗体IgG包被而成，所述硝基纤维膜上的对照线由浓度≥1mg/mL C动物抗B动物IgG包被而成；所述胶体金试纸的制备方法包括硝基纤维膜上测试线 and 对照线喷制、金标垫制备及胶体金免疫层析试纸条的组装；本试纸用于检测鸭瘟病毒抗原的检测灵敏度和特异性高，本制备方法操作简单实用，本运用首次将抗重组UL51蛋白抗体制备成胶体金试纸用于检测鸭瘟病毒抗原。

