



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802382 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810641006.5

(22)申请日 2018.06.21

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 张鑫宇 刘潇羽 周花艳 孙怀昌
叶建强

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 薛海霞 董建林

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

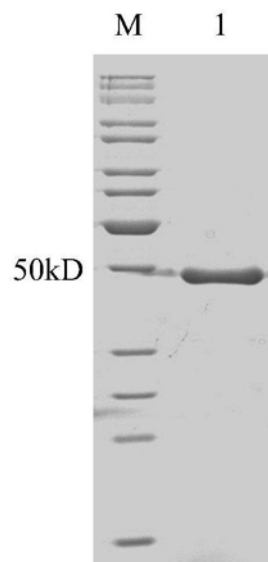
权利要求书2页 说明书6页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒及制备方法,包括酶标板、酶标二抗、鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清、稀释液、10×洗涤液、TMB底物溶液、终止液;该试剂盒中包被酶标板的抗原为鹅星状病毒Cap蛋白;鹅星状病毒为禽星状病毒3型。本发明以表达纯化新发生的鹅星状病毒(禽星状病毒3型)Cap蛋白为包被抗原,利用间接ELISA方法检测待检鹅血清样品,并组装成用于测定血清中星状病毒抗体的试剂盒。该试剂盒可用于近来发生鹅星状病毒感染血清学诊断以及抗体的水平的监测、流行病学调查等,为鹅星状病毒防制提供一种简便、快捷的方法。



1. 一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,包括酶标板、酶标二抗、鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清、稀释液、 $10\times$ 洗涤液、TMB底物溶液、终止液;该试剂盒中包被酶标板的抗原为鹅星状病毒Cap蛋白;鹅星状病毒为禽星状病毒3型。

2. 如权利要求1所述的一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,所述的酶标板包被抗原为鹅星状病毒Cap P2重组蛋白,Cap P2重组蛋白对应于Cap蛋白高变区。

3. 如权利要求2所述的一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,所述的Cap P2重组蛋白利用装载有编码Cap P2重组蛋白的基因序列的质粒pET-30a在BL21 (DE3) 大肠杆菌中表达、纯化获得,其中表达的基因序列经过密码子优化,所述的基因序列如SEQ ID No.1所示。

4. 如权利要求1所述的一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,所述酶标板为包被鹅星状病毒Cap P2重组蛋白的96孔酶标板;所述的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY抗体;所述的阳性对照血清为Cap p2重组蛋白免疫健康鹅获得的血清;所述的阴性对照血清为未感染鹅星状病毒的健康鹅血清。

5. 如权利要求1所述的一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,

稀释液:含0.01%Proclin300的1%牛血清白蛋白(BSA);

$10\times$ 洗涤液:NaCl 80g,KCl 2g, Na_2HPO_4 14.4g, KH_2PO_4 2.4g,Tween-20 0.5mL,Proclin300 0.1 mL,溶于800mL蒸馏水,调pH7.4,定容至1L, $0.22\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌, 4°C 保存;

终止液: $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 。

6. 权利要求1-5任意一项所述的检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 鹅星状病毒Cap P2重组蛋白制备:Cap P2基因的人工合成,重组菌构建,Cap P2重组蛋白表达、纯化;

(2) 鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清的制备;

(3) 检测鹅星状病毒抗体ELISA试剂盒的制备。

7. 如权利要求6所述的检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤(1)具体为:

a. Cap P2基因的人工合成:优化Cap P2基因密码子,使之适合在大肠杆菌中表达,并在Cap P2基因两端分别引入限制性酶切位点EcoRV和XhoI,合成该基因,序列如SEQ ID NO.1所示,合成后的基因装于载体pUC57中;

b. 重组菌构建:将pET30a(+)质粒和pUC57中的Cap P2基因分别用限制性内切酶EcoRV和XhoI酶切,回收酶切后的pET30a(+)质粒和约843bp的Cap P2基因,用T4 DNA连接酶连接回收的片段,并将连接产物转化BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞,采用EcoRV和XhoI双酶切筛选出携带质粒pET30a-P2的重组菌;

c. Cap P2重组蛋白表达、纯化:按1:100体积比,将携带质粒pET30a-P2的重组菌接种含 $50\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 $2\times\text{YT}$ 培养基, 37°C 培养至 $\text{OD}_{600}=0.8$,加入 1mmol/L IPTG , 37°C 诱导4h; 8000rpm 离心2 min,离心得到的菌体用 0.01M PBS 溶液洗涤2次,再次离心;再次离心得到的菌体用超声波仪裂解,超声波仪功率50W,10 s/次,共10 min; 4°C 、 12000rpm 离心20 min,收集沉淀;采用Ni-NTA琼脂糖柱纯化Cap P2重组蛋白;取纯化后的Cap P2重组蛋白 2μ

g/孔,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用蛋白转印仪转印硝酸纤维素膜,用鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清进行Western-blotting验证。

8.如权利要求6所述的检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤(2)具体为:用pH7.4、0.01M PBS将纯化得到的Cap P2重组蛋白浓度调整为1mg/mL,分别与等体积弗氏完全佐剂混合,采用超声波仪充分乳化,其中超声波仪功率30W,超声时间为5 min;将乳化的Cap P2重组蛋白通过肌肉注射60日龄健康雏鹅10只,0.5mL/只;第一次免疫后10天,用弗氏不完全佐剂混合的同样剂量抗原加强免疫1次;10天后再用同样剂量的Cap P2重组蛋白加强免疫1次;在第三次免疫后第7天,无菌采集鹅血分离血清;按照常规间接ELISA方法,分别以2.5 μ g/mL Cap P2重组蛋白包被酶标板,封闭酶标板后与连续10倍稀释的鹅分离血清反应,二抗为稀释至工作浓度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY抗体,底物为TMB底物溶液,终止液为2M H₂SO₄,450nm波长下检测每孔的吸光值,确定重组蛋白免疫鹅血清的ELISA抗体效价为1:10⁵;鹅血清分装后-20℃保存,作为检测用阳性对照血清;采集10只87日龄健康鹅血液,分离血清,测定抗体为阴性,鹅血清分装后-20℃保存,作为检测用阴性对照血清。

9.如权利要求6所述的检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤(3)具体为:

1)酶标板:酶标板处理过程如下:用pH9.6、0.05M碳酸盐缓冲液稀释Cap P2重组蛋白至终浓度2.5 μ g/mL,96孔板奇数竖排每孔加入稀释后的P2重组蛋白溶液100 μ L,96孔板偶数竖排每孔不加稀释的抗原溶液,4℃静置24h,用pH7.4的洗涤液PBST洗涤2遍后,每孔加入封闭液、37℃封闭2h,再用洗涤液PBST洗涤2遍,吸水纸上拍去残留水分,超净工作台内风干,装入铝箔袋,抽真空密封,4℃保存;其中洗涤液PBST组分为0.01M PBS,0.5% Tween-20,0.01% Proclin300;封闭液为pH7.6、含有5%脱脂奶粉的洗涤液PBST;

2)稀释液:含0.01%Proclin300的1%牛血清白蛋白(BSA)100mL,具体制备方法为:将1gBSA、10 μ L Proclin300完全溶解于PBST中,最终体积定容至100mL,0.22 μ m滤器过滤除菌,装入100mL灭菌瓶,4℃保存;

3)酶标二抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY60 μ L,-20℃保存;

4)阳性对照血清、阴性对照血清:各500 μ L,-20℃保存;

5)10 $\times$ 洗涤液:10倍浓缩的PBST 200mL,具体将制备方法为:NaCl 80g,KCl 2g,Na₂HPO₄ 14.4g,KH₂PO₄ 2.4g,Tween-20 0.5mL,Proclin300 0.1 mL,溶于800mL蒸馏水,调pH7.4,定容至1L,0.22 μ m滤器过滤除菌,取200mL装入200mL灭菌瓶,4℃保存;

6)TMB底物溶液:TMB底物溶液60mL,4℃保存;

7)终止液:2M H₂SO₄30mL,室温保存。

一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和动物传染病诊断研究领域,具体涉及一种检测鹅星状病毒(即禽星状病毒3型)抗体的ELISA试剂盒和试剂盒的制备方法,用于鹅星状病毒(禽星状病毒3型)感染血清学诊断以及抗体的水平的监测、流行病学调查等。

背景技术

[0002] 2015年以来,国内一些省份发生雏鹅痛风为主要症状的鹅传染病,2016年开始蔓延,2017年全国各养鹅省份基本都发生该病,发病鹅约1周龄大小,病程持续7-10天,发病率高达80-90%,死亡率20-70%。解剖病变主要表现为肝脏、心脏、肌胃、气管粘膜表面、腿关节以及胆囊内有大量的尿酸盐沉积,肾脏肿大,输尿管内充满白色物质。病毒全基因组测序比对发现,这是一种新的鹅星状病毒,根据国际病毒分类委员会的分类标准,该星状病毒属于禽星状病毒3型,并且ORF2编码的Cap蛋白氨基酸序列与其他禽星状病毒的同源性小于60.8%。通过在禽细胞上传代,获得该鹅星状病毒,该病毒能被康复鹅血清有效中和。健康雏鹅接种分离的病毒后,能有效导致肾脏病理性损伤,并与临床发病鹅显微病变一致,表明该鹅星状病毒是一种能造成肾脏损伤的病原微生物,而肾脏的损伤可以导致禽类体内的尿酸盐排泄障碍,最终可造成尿酸盐在脏器表面大量沉积,发生痛风。

[0003] 该疾病诊断主要是通过检测禽星状病毒的简并引物进行RT-PCR,扩增出的核酸片段须测序才能确定是否是引起雏鹅痛风的鹅星状病毒;本实验室最近用分离的鹅星状病毒(禽星状病毒3型)感染易感细胞,病毒复制后,固定细胞,间接免疫荧光试验检测待检血清中是否含有该病毒抗体,受条件限制,这两种方法难以在基层广泛应用。由于该病毒是一种新发现的鹅星状病毒,其它血清学诊断方法目前未见任何报道,因此建立特异性强、敏感性高、操作简单、成本低廉的鹅星状病毒抗体检测方法有重要意义。

发明内容

[0004] 为了克服上述缺陷,本发明提供一种特异性强、敏感性高、操作简单、成本低廉的鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体检测ELISA试剂盒和制备方法,用于鹅星状病毒的血清学诊断、流行病学调查和抗体的监测。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,包括酶标板、酶标二抗、鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清、稀释液、10×洗涤液、TMB底物溶液、终止液;该试剂盒中包被酶标板的抗原为鹅星状病毒Cap蛋白;鹅星状病毒为禽星状病毒3型。

[0006] 所述的酶标板包被抗原为鹅星状病毒Cap P2重组蛋白,Cap P2重组蛋白对应于Cap蛋白高变区。所述的Cap P2重组蛋白利用装载有编码Cap P2重组蛋白的基因序列的质粒pET-30a在BL21(DE3)大肠杆菌中表达、纯化获得,其中表达的基因序列经过密码子优化,所述的基因序列如SEQ ID No.1所示。

[0007] 所述酶标板为包被鹅星状病毒Cap P2重组蛋白的96孔酶标板;所述的酶标二抗为

辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY抗体;所述的阳性对照血清为Cap p2重组蛋白免疫健康鹅获得的血清;所述的阴性对照血清为未感染鹅星状病毒的健康鹅血清。

[0008] 检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0009] (1) 鹅星状病毒Cap P2重组蛋白制备:Cap P2基因的人工合成,重组菌构建,Cap P2重组蛋白表达、纯化;

[0010] (2) 鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清的制备;

[0011] (3) 检测鹅星状病毒抗体ELISA试剂盒的制备。

[0012] 步骤(1)具体为:

[0013] a. Cap P2基因的人工合成:优化Cap P2基因密码子,使之适合在大肠杆菌中表达,并在Cap P2基因两端分别引入限制性酶切位点EcoRV和XhoI,合成该基因,序列如SEQ ID NO.1所示,合成后的基因装于载体pUC57中;

[0014] b. 重组菌构建:将pET30a(+)质粒和pUC57中的Cap P2基因分别用限制性内切酶EcoRV和XhoI酶切,回收酶切后的pET30a(+)质粒和约843bp的Cap P2基因,用T4DNA连接酶连接回收的片段,并将连接产物转化BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞,采用EcoRV和XhoI双酶切筛选出携带质粒pET30a-P2的重组菌;

[0015] c. Cap P2重组蛋白表达、纯化:按1:100体积比,将携带质粒pET30a-P2的重组菌接种含50 μ g/mL卡那霉素的2 $\times$ YT培养基,37 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀=0.8,加入1mmol/L IPTG,37 $^{\circ}$ C诱导4h;8000rpm离心2min,离心得到的菌体用0.01M PBS溶液洗涤2次,再次离心;再次离心得到的菌体用超声波仪裂解,超声波仪功率50W,10s/次,共10min;4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心20min,收集沉淀;采用Ni-NTA琼脂糖柱纯化Cap P2重组蛋白;取纯化后的Cap P2重组蛋白2 μ g/孔,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用蛋白转印仪转印硝酸纤维素膜,用鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清进行Western-blotting验证。

[0016] 步骤(2)具体为:用pH7.4、0.01M PBS将纯化得到的Cap P2重组蛋白浓度调整为1mg/mL,分别与等体积弗氏完全佐剂混合,采用超声波仪充分乳化,其中超声波仪功率30W,超声时间为5min;将乳化的Cap P2重组蛋白通过肌肉注射60日龄健康雏鹅10只,0.5mL/只;第一次免疫后10天,用弗氏不完全佐剂混合的同样剂量抗原加强免疫1次;10天后再用同样剂量的Cap P2重组蛋白加强免疫1次;在第三次免疫后第7天,无菌采集鹅血分离血清;按照常规间接ELISA方法,分别以2.5 μ g/mL Cap P2重组蛋白包被酶标板,封闭酶标板后与连续10倍稀释的重组蛋白免疫鹅血清(即通过无菌采集得到的鹅血分离血清)反应,二抗为稀释至工作浓度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY抗体,底物为TMB底物溶液,终止液为2M H₂SO₄,450nm波长下检测每孔的吸光值,确定重组蛋白免疫鹅血清的ELISA抗体效价为1:10⁵;鹅血清分装后-20 $^{\circ}$ C保存,作为检测用阳性对照血清;采集10只87日龄健康鹅血液,分离血清,测定抗体为阴性,鹅血清分装后-20 $^{\circ}$ C保存,作为检测用阴性对照血清。

[0017] 步骤(3)具体为:

[0018] 1) 酶标板:酶标板处理过程如下:用pH9.6、0.05M碳酸盐缓冲液稀释Cap P2重组蛋白至终浓度2.5 μ g/mL,96孔板奇数竖排每孔加入稀释后的P2重组蛋白溶液100 μ L,96孔板偶数竖排每孔不加稀释的抗原溶液,4 $^{\circ}$ C静置24h,用pH7.4的洗涤液PBST洗涤2遍后,每孔加入封闭液、37 $^{\circ}$ C封闭2h,再用洗涤液PBST洗涤2遍,吸水纸上拍去残留水分,超净工作台内风干,装入铝箔袋,抽真空密封,4 $^{\circ}$ C保存;其中洗涤液PBST组分为0.01M PBS,0.5% Tween-20,

0.01%Proclin300;封闭液组分为含有5%脱脂奶粉、pH7.6的洗涤液PBST;

[0019] 2) 稀释液:含0.01%Proclin300的1%牛血清白蛋白(BSA) 100mL,具体制备方法为:将1gBSA、10μLProclin300完全溶解于PBST中,最终体积定容至100mL,0.22μm滤器过滤除菌,装入100mL灭菌瓶,4℃保存;

[0020] 3) 酶标二抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY60μL,-20℃保存;

[0021] 4) 阳性对照血清、阴性对照血清:各500μL,-20℃保存;

[0022] 5) 10×洗涤液:10倍浓缩的PBST 200mL,具体将制备方法为:NaCl 80g,KCl 2g,Na₂HPO₄ 14.4g,KH₂PO₄ 2.4g,Tween-20 0.5mL,Proclin300 0.1mL,溶于800mL蒸馏水,调pH7.4,定容至1L,0.22μm滤器过滤除菌,取200mL装入200mL灭菌瓶,4℃保存;

[0023] 6) TMB底物溶液:TMB底物溶液60mL,4℃保存;

[0024] 7) 终止液:2M H₂SO₄30mL,室温保存。

[0025] 相对于现有技术,本发明的一种检测鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体的ELISA试剂盒具有灵敏度高、检测通量大、操作简便的特点,可用于鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体检测,弥补了目前在引起雏鹅痛风的鹅星状病毒抗体检测方法上的空白。本发明利用分子生物学技术,克隆、表达优化的核酸序列,通过His标签纯化获得重组的CapP2蛋白,以该重组蛋白为包被抗原,建立检测鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体的间接ELISA试剂盒。该试剂盒可用于鹅星状病毒感染(禽星状病毒3型)血清学诊断以及抗体的水平的监测、流行病学调查等,为鹅星状病毒的防制提供一种简便、快捷的方法。

附图说明

[0026] 图1为纯化的Cap P2重组蛋白电泳图;其中,M为PageRuler Unstained Protein LadderMarker;1为纯化的Cap P2重组蛋白;

[0027] 图2为纯化的Cap P2重组蛋白免疫印迹图;其中,M为PageRuler Prestained Protein LadderMarker;1为鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阴性血清,2为鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阳性血清。

具体实施方式

[0028] 为了阐述本发明的技术方案及技术目的,下面结合附图说明及具体实施方式对本发明做进一步的介绍。

[0029] 生物材料来源:

[0030] pET30a(+):大肠杆菌表达载体,从美国Novogen公司引进(Cat No.69909.3);

[0031] BL21(DE3)大肠杆菌(E.coli)感受态细胞:从海基生物(HaiGene)科技有限公司引进(Cat No,K10127);

[0032] 鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阳性血清:山东临朐发生雏鹅痛风病幸存下来的55日龄鹅血清50份,间接免疫荧光试验确定抗体阳性;

[0033] 鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阴性血清:江苏农牧科技职业学院国家水禽基因库隔离饲养健康鹅群的鹅血清45份,间接免疫荧光试验确定抗体阴性;

[0034] 酶标二抗Goat Anti-Chicken IgY H&L(HRP):购于Abcam公司(Cat No,ab6877);

[0035] 8周龄的ICR小鼠:购于扬州大学比较医学院。

[0036] 实施例1鹅星状病毒(禽星状病毒3型)重组蛋白制备

[0037] 1. Cap P2基因的人工合成:根据本实验室对GAstV GD株全基因组测序结果,优化Cap P2基因密码子,使之适合在大肠杆菌中表达,并在两端分别引入限制性酶切位点EcoRV和XhoI,由上海生工生物工程有限公司合成该基因,序列如下:

[0038] 5'-GATATCCAGGTTACACCCTCGCTTGTGTACAACCTCCAGGGTGAAAGGCAGAGCACTACAGAATCGTGCTCATTCTGGTGTGTTGGAATACCACAGGCAGAATCCAGGTCAAGATACAATGCAGCTATAACCTTCAATGTTGGCTACCGTGAAGGACTTCAACATCATTTACACTTGAACACACAATTGGTGGGCTGTTATGACACTTTTACAAACAGGAGTAATTTTTGCACCACCGGCTGTGGGCACAGGGGTCTGTAATACATTGGCTACAGCCATACAACATTTAAATCCTGAGCTTGAAACAGCAGTCTGCGTGTGAATACCAGTACAACATCTACTGGTGGGCTAATAACGGAACCTCAGGAATCGGCTCAACATCGCTGATGGGGACTATGTGATTTCAATGGGTGATCCGCAAGGAAATAGGTCAGCACTGTACTTTAGGAATTCAGACCAGAAATGGGTGTGGCTCTGGGCTGGCGACTCTAACCTGGCGAACTTTCCAAAATTTTAAGATGCCAGTCCTAATTAATTGGTCAGTGTGAGATTCCCAGGAACAATACAATGCTAGAGTTAGGATGGTACAGTATGCTAATGCAACAACAGCAGATTTTGCAGACCCTGAGGAAGATGATGATCCCCTCTCTGATGTCACCTTCGCTTTTTGATCCAACAGCGGAAGATGAGACTGACTTCCACCTAGCAGTCTCGCTCAAGACCTCTGACTACTTAAAAGAAGAGGCTGAGTACTGGAAGCGAAGGCACAGGCCTTGCTTATGGAGAAGGCACTAAGTGCACCACAAGCAGGGGCAGTCCGCTTTGAGAAGGGCGGACATGAGTGACTCGAG-3' (SEQ ID NO.1),合成后的基因装于载体pUC57中。

[0039] 2. 重组菌构建:将pET30a(+)质粒和pUC57中的P2基因分别用限制性内切酶EcoRV和XhoI酶切,回收酶切后的pET30a(+)质粒和约843bp大小的CapP2基因,T4DNA连接酶连接回收的片段,并将连接产物转化BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞,EcoRV和XhoI双酶切筛选出携带质粒pET30a-P2的重组菌。

[0040] 3. Cap P2重组蛋白表达、纯化:按1:100体积比,将携带质粒pET30a-P2的重组菌接种含50 μ g/mL卡那霉素的2 $\times$ YT培养基,37 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀=0.8,加入1mmol/L IPTG,37 $^{\circ}$ C诱导4h;8000rpm离心2min,收集菌体用0.01M PBS(NaCl 8g,KCl 0.2g,Na₂HPO₄1.44g,KH₂PO₄0.24g,溶于800mL蒸馏水,调pH7.4,定容至1L,高压灭菌)洗涤2次,离心;离心沉淀菌体用超声波仪裂解(功率50W,10s/次,共10min),4 $^{\circ}$ C、12000rpm离心20min,收集沉淀;按照Ni-NTA琼脂糖柱(Qiagen,Cat No:30210)说明书变性条件下纯化Cap P2重组蛋白(图1);取重组蛋白2 μ g/孔,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用蛋白转印仪(BioRad公司)转印Protran BA83硝酸纤维素膜(Whatman公司),用鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阳性和抗体阴性血清进行Western-blotting验证(图2)。

[0041] 实施例2阳性对照血清、阴性对照的制备

[0042] 用0.01M PBS(pH7.4)将纯化的Cap P2重组蛋白浓度调整为1mg/mL,分别与等体积弗氏完全佐剂(Sigma公司)混合,超声波仪(Bandelin公司)充分乳化(功率30W,5min);乳化的重组抗原肌肉注射60日龄健康雏鹅(江苏农牧科技职业学院国家水禽基因库提供)10只,0.5mL/只;第一次免疫后10天,用弗氏不完全佐剂混合的同样剂量抗原加强免疫1次;10天后再用同样剂量的重组抗原加强免疫1次;在第三次免疫后第7天,无菌采集鹅血分离血清;按照常规间接ELISA方法,分别以2.5 μ g/mL Cap P2蛋白重组包被酶标板,封闭后与连续10倍稀释重组蛋白免疫鹅血清反应,二抗为稀释至工作浓度Abcam公司的Goat Anti-Chicken IgY H&L(HRP),底物为TMB底物溶液,终止液为2M H₂SO₄,450nm波长下检测每孔的吸光值,确定重组蛋白免疫鹅血清的ELISA抗体效价为1:10⁵。鹅血清分装后-20 $^{\circ}$ C保存,作为检测用阳

性对照血清。采集10只87日龄健康鹅(江苏农牧科技职业学院国家水禽基因库提供)血液,分离血清,用上述ELISA测定抗体为阴性,鹅血清分装后-20℃保存,作为检测用阴性对照血清。

[0043] 实施例3检测鹅星状病毒抗体ELISA试剂盒的制备

[0044] 1. 抗体检测酶标板: 试剂盒内包含4块处理过的96孔酶标板(铝箔袋包装), 酶标板处理过程如下: 用0.05M碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释Cap P2重组蛋白至终浓度2.5μg/mL, 96孔板奇数竖排每孔(样品检测孔)加入100μL, 96孔板偶数竖排每孔(本底对照孔)不加稀释的抗原, 4℃静置24h, 用洗涤液PBST(0.01M PBS, 0.5% Tween-20, 0.01% Proclin300, pH7.4)洗涤2遍后, 每孔加入封闭液(PBST, 5% 脱脂奶粉, pH7.6) 37℃封闭2h, 再用洗涤液PBST洗涤2遍, 吸水纸上拍去残留水分, 超净工作台内风干, 装入铝箔袋(1块酶标板/袋), 抽真空密封, 4℃保存。

[0045] 2. 稀释液: 含0.01% Proclin300的1%牛血清白蛋白(BSA) 100mL。将1gBSA、10μL Proclin300完全溶解于PBST中, 最终体积定容至100mL, 0.22μm滤器过滤除菌, 装入100mL灭菌瓶, 4℃保存。

[0046] 3. 酶标二抗: 辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgY60μL, -20℃保存。

[0047] 4. 阳性对照血清、阴性对照血清: 各500μL, 按照实施例2中的方法制备, -20℃保存。

[0048] 5. 10×洗涤液: 10倍浓缩的PBST 200mL。将NaCl 80g, KCl 2g, Na₂HPO₄ 14.4g, KH₂PO₄ 2.4g, Tween-20 0.5mL, Proclin300 0.1mL, 溶于800mL蒸馏水, 调pH7.4, 定容至1L, 0.22μm滤器过滤除菌, 取200mL装入200mL灭菌瓶, 4℃保存。

[0049] 6. TMB底物溶液: TMB底物溶液60mL, 4℃保存。

[0050] 7. 终止液: 2M H₂SO₄30mL, 室温保存。

[0051] 实施例4检测鹅星状病毒抗体ELISA试剂盒的使用

[0052] 1. 从试剂盒中取出酶标板, 平衡至室温(16-26℃), 避免阳光直射。

[0053] 2. 用稀释液稀释待检血清、阳性和阴性对照血清, 稀释倍数为50倍, 再分别加样至对应的检测孔和本底对照孔(表1), 100μL/孔, 37℃作用1h;

[0054] 表1检测加样孔示意表

[0055]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C+	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
B	C-	C-	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
C	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
D	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
E	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
F	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
G	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45
H	S6	S7	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38	S46	S46

[0056] 注: C+, 表示阳性对照血清; C-, 表示阴性对照血清; S, 表示待检血清样品。

[0057] 3. 1×洗涤液洗涤酶标板, 200μL/孔×4次, 3min/次, 吸水纸上拍干孔中液体;

- [0058] 4.加入1:1000稀释的酶标二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C作用1h;
- [0059] 5.1 $\times$ 洗涤液洗涤酶标板,200 μ L/孔 $\times$ 4次,3min/次,吸水纸上拍干孔中液体;
- [0060] 6.加入TMB底物溶液,100 μ L/孔,室温下避光静置15min;
- [0061] 7.加入终止液终止反应,50 μ L/孔;
- [0062] 8.酶标仪读取每孔450nm波长吸光值(OD450),每份血清样品OD450净值=样品检测孔OD450值一本底对照孔OD450值;
- [0063] 9.在符合阳性对照血清OD450净值 >1.829 ,阴性对照血清OD450净值 ≤ 0.1 的前提下,待检血清样品OD450净值 $>$ 阴性血清临界值,判定为鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阳性;待检血清样品OD450净值 $\leq$ 阴性血清临界值,判定为鹅星状病毒(禽星状病毒3型)抗体阴性;阴性血清临界值为0.216。
- [0064] 实施例5检测鹅星状病毒抗体ELISA试剂盒的临床应用
- [0065] 用本发明的鹅星状病毒抗体ELISA试剂盒检测95份临床血清样品,其中50份血清来自山东临朐发生雏鹅痛风病幸存下来的55日龄鹅血清(鹅星状病毒抗体阳性血清),45份血清来自江苏农牧科技职业学院国家水禽基因库隔离饲养健康鹅群的鹅血清(鹅星状病毒抗体阴性血清)。
- [0066] 实验结果显示,ELISA试剂盒检测山东临朐发生雏鹅痛风病幸存下来的55日龄鹅血清结果均为阳性,抗体阳性率为100%;ELISA试剂盒检测来自江苏农牧科技职业学院国家水禽基因库隔离饲养健康鹅群的45份鹅血清结果44份为阴性,1份为弱阳性,阳性率为2.22%。这表明该试剂盒能用于GAstV抗体的批量检测,田间样品的阳性检出准确率为100%,阴性检出准确率为97.78%。
- [0067] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

序列表

<110> 扬州大学

<120> 一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒及制备方法

<130> xhx2018062001

<141> 2018-06-20

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 855

<212> DNA

<213> Anser cygnoides domesticus

<400> 1

```
gatatccagg ttacaccctc gcttgtgtac aacttccagg gtgaaaggca gagcactaca 60
gaatcgtgct cattcctggt gtttgggaata ccacaggcag aatccaggtc aagatacaat 120
gcagctataa ccttcaatgt tggctaccgt ggaaggactt caacatcatt tacacttgga 180
acacacaatt ggtgggctgt tatgacactt tcacaaacag gagtaatttt tgcaccaccg 240
gctgtgggca caggggtctg taatacattg gctacagcca tacaacattt aaatcctgag 300
cttgaaacag cagtcctgcg tgtgaatacc agtacaacat ctactggtgg gctaataacg 360
gaactcagga atcggctcaa catcgctgat ggggactatg tgatttcaat gggatgatccg 420
caaggaaata ggtcagcact gtactttagg aattcagacc agaaatgggt gtggctctgg 480
gctggcgact ctaaccctgg cgaaactttc caaaatttta agatgccagt cctaattaat 540
tggtcagtgt cagattccca ggaacaatac aatgctagag ttaggatggg acagtatgct 600
aatgcacaac agcagatttt gacagaccct gaggaagatg atgatcccct ctctgatgtc 660
acttcgcttt ttgatccaac agcggaagat gagactgact tccacctagc agtctcgctc 720
aagacctctg actacttaaa agaagaggct gagtactgga aagcgaaggc acaggccttg 780
cttatggaga aggcactaag tgcaccacaa gcaggggcag tccgctttga gaaggcgga 840
catgagtgac tcgag 855
```

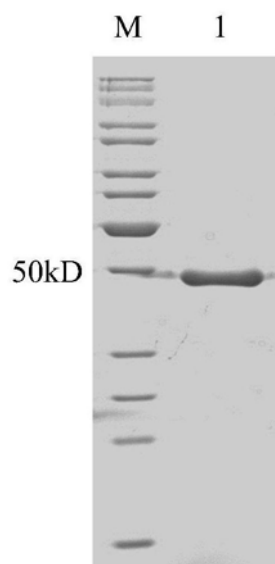


图1

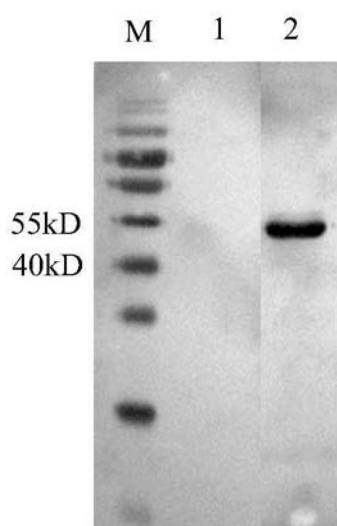


图2

专利名称(译)	一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN108802382A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810641006.5	申请日	2018-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	张鑫宇 周花艳 孙怀昌 叶建强		
发明人	张鑫宇 刘潇羽 周花艳 孙怀昌 叶建强		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	薛海霞 董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测鹅星状病毒抗体的ELISA试剂盒及制备方法，包括酶标板、酶标二抗、鹅星状病毒阳性对照血清、鹅星状病毒阴性对照血清、稀释液、10×洗涤液、TMB底物溶液、终止液；该试剂盒中包被酶标板的抗原为鹅星状病毒Cap蛋白；鹅星状病毒为禽星状病毒3型。本发明以表达纯化新发生的鹅星状病毒（禽星状病毒3型）Cap蛋白为包被抗原，利用间接ELISA方法检测待检鹅血清样品，并组装成用于测定血清中星状病毒抗体的试剂盒。该试剂盒可用于近来发生鹅星状病毒感染血清学诊断以及抗体的水平的监测、流行病学调查等，为鹅星状病毒防控提供一种简便、快捷的方法。

