



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107632150 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(21)申请号 201710801582.7

(22)申请日 2017.09.07

(71)申请人 武汉科前生物股份有限公司

地址 430070 湖北省武汉市东湖高新技术  
开发区高新二路419号

(72)发明人 董俊 李冉 徐高原 金梅林  
陈焕春

(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 董建林 徐瑛

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页  
序列表2页 附图1页

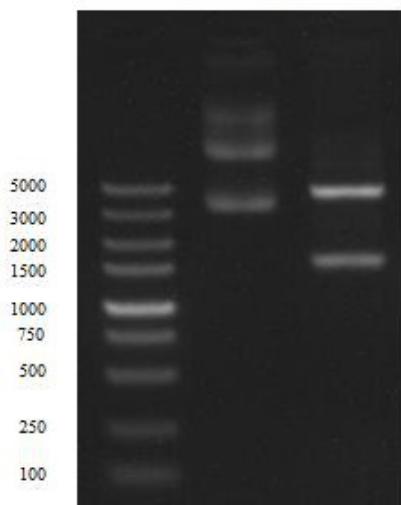
(54)发明名称

一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的试剂盒  
及其应用

(57)摘要

本发明公开了鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白在制备检测鸡马立克氏病病毒抗体间接ELISA试剂盒中的应用，并提供了一种利用MDV囊膜糖蛋白gB蛋白建立的检测鸡马立克氏病抗体的间接ELISA试剂盒。本发明弥补目前针对鸡MDV抗体的检测缺陷，具有简便、稳定、高效的优点，所述试剂盒可用于快速、早期检测临床鸡血清样品中MDV病毒抗体，也可对免疫鸡的抗体进行监测，是一种面向基层并适用于大批量检测的有效方法，且其较高的特异性、敏感性和重现性使本发明的检测效果优于现有的传统方法。

lane 1 lane 2 lane 3



1. 鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白在制备检测鸡马立克氏病病毒抗体间接ELISA试剂盒中的应用。

2. 一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,包含权利要求1所述的鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白,编码所述gB蛋白的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 根据权利要求2所述的检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述gB蛋白为将重组gB蛋白经诱导、纯化获得,所述诱导的条件为在0.4-0.6mM的IPTG中,温度15-18℃、转速80-120rpm条件下过夜。

4. 根据权利要求3所述的检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,包含所述马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白包被的酶标板、辣根过氧化酶标记的羊抗鸡酶标抗体、标准阳性对照血清、标准阴性对照血清、样本稀释液、洗涤液、显色底物液A、显色底物液B和显色终止液。

5. 根据权利要求4所述的检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述的样本稀释液、洗涤液、显色底物液A、显色底物液B和显色终止液的组成和/或制备方法如下:

所述样本稀释液包含:5%卵清蛋白溶液和5%马血清;取卵清蛋白2g,马血清5mL溶于100mL 1×PBS缓冲液中得所述样本稀释液;

所述洗涤液为20倍浓缩,由NaCl 160.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.4g, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 28.4g, KCl 4.0g, Tween20 10mL, 加双蒸水至1000mL制得所述洗涤液;

所述显色底物液A:将3,3',5,5' -四甲基联苯胺溶解于DMSO中,使3,3',5,5' -四甲基联苯胺终浓度为10mg/mL,加入10%体积的甘油,再加入终浓度为0.6mg/mL的L-半胱氨酸盐酸盐制得所述显色底物液A;

所述显色底物液B:将重量百分比0.1%柠檬酸、0.2%磷酸氢二钠、0.02%亚硫酸钠、0.003% EDTA、0.02%尿素过氧化氢,溶于ddH<sub>2</sub>O中,调pH至5.3制得所述显色底物液B;

所述显色终止液:0.5mol/L硫酸溶液。

6. 根据权利要求4所述的一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白包被的浓度为1.1ug/ml。

7. 根据权利要求4所述的一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述辣根过氧化物酶标记的抗体的稀释倍数为1:5000。

8. 根据权利要求4所述的一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述囊膜糖蛋白gB蛋白包被的酶标板所用包被液的组分及配比为1.59g NaCO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub>, 加双蒸水至1L, pH 9.0。

9. 一种鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA检测方法,利用权利要求4~8任一项所述的试剂盒,包括如下步骤:

1) 将待测血清样品用样本稀释液1:500倍稀释;

2) 加样:向鸡MDV gB蛋白包被的酶标板微孔中加入步骤1)已稀释的待测血清样品100uL,37℃恒温孵育30min;

3) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液200 uL,洗涤5次并拍干;

4) 加酶标二抗:每孔中加入辣根过氧化酶标记的羊抗鸡酶标抗体100 uL,37℃恒温孵育30min;

- 5) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液200  $\mu$ L,洗涤5次并拍干;
- 6) 加底物液:将显色底物液A用显色底物液B稀释50倍混匀后每孔加100  $\mu$ L,室温避光显色10min;
- 7) 加终止液:每孔中加入显色终止液50 $\mu$ L;
- 8) 测定:用酶标仪在450nm处测定每孔的吸光光度值。

## 一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物免疫学、分子生物学及动物疫病检测领域,更具体地,涉及鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白在制备检测鸡马立克氏病病毒抗体间接ELISA试剂盒中的应用,本发明还涉及一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒。

### 背景技术

[0002] 马立克氏病是由马立克氏病病毒 (Marek' disease virus, MDV, 下文称之为MDV) 引起的一种高度传染性、淋巴组织增生性疾病。虽然从60年代即开始对MD使用疫苗,且为MD的预防起了极重要的作用,但随着MDV毒力的增强,MD仍是当今对养鸡业危害较大的疫病之一。

[0003] MDV基因组为双股线性DNA,长度约为175Kb,属于疱疹病毒亚科类马立克氏病毒属。MDV编码的蛋白有gC、gB、gD、gH、gL以及gI蛋白,其中gB蛋白是一组分子量为gp100、gp60、gp49构成的糖蛋白复合物,抗原位于感染细胞的膜表面和胞浆中,因此它能引起体液免疫和细胞免疫。MDV gB胞外区 (22aa-682aa) 含有抗原表位、穿膜、入胞及中和作用的区域,其中N端信号肽、10个半胱氨酸位点和9个糖基化位点中8个是高度保守的,且由前体蛋白裂解为gp60和gp49的蛋白裂解位点 (Arg-Leu-Arg-Arg) 是完全一致的,证明B抗原在结构和功能上是相当保守的。因此,MDV gB蛋白靶标抗体的检测可成为临幊上评价马立克氏病病毒野毒感染和疫苗免疫效果评估的重要标识。

[0004] 虽然经过二三十年的研究和发展,通过对一系列弱毒或无毒的马立克氏病疫苗的研究和应用,马立克氏病在养禽业中得到了很大的控制。疫苗可以保护鸡群不产生肿瘤和死亡,但不能完全抑制病毒的增殖。因此,家禽养殖场中MDV的存在不可避免,且存在着变异、毒力增强的风险。当前,在我国马立克氏病病毒抗体检测中仍然采用传统的琼脂扩散实验方法,该方法存在特异性强的优点,然而却存在着灵敏度低、耗时长等缺点,无法在当前规模化家禽养殖中大量应用。因此,建立一套快速、简便、特异、灵敏、高通量并面向基层的MDV的抗体检测方法,并能够同时应用于临幊患病家禽的诊断和免疫家禽的抗体监测意义重大。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有马立克氏病抗体检测的技术缺陷,提供一种利用MDV囊膜糖蛋白gB蛋白建立的检测鸡马立克氏病抗体的间接ELISA试剂盒,该试剂盒可用于快速检测临幊鸡血清样品中MDV病毒抗体和免疫鸡的抗体监测。

[0006] 本发明的上述目的是通过以下技术方案予以实现的。

[0007] 鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白在制备检测鸡马立克氏病病毒抗体间接ELISA试剂盒中的应用。

[0008] 一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的间接ELISA试剂盒,包含所述的鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白,编码所述gB蛋白的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 优选地,所述gB蛋白为将重组gB蛋白经诱导、纯化获得,所述诱导的条件为在0.4-0.6mM的IPTG中,温度15-18℃、转速80-120rpm条件下过夜。

[0010] 优选地,所述间接ELISA试剂盒,具体包含所述马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白包被的酶标板、辣根过氧化酶标记的羊抗鸡酶标抗体、标准阳性对照血清、标准阴性对照血清、样本稀释液、洗涤液、显色底物液A、显色底物液B和显色终止液。

[0011] 优选地,所述的样本稀释液、洗涤液、显色底物液A、显色底物液B和显色终止液的组成和/或制备方法如下:

[0012] 所述样本稀释液包含:5%卵清蛋白溶液和5%马血清;取卵清蛋白2g,马血清5ml溶于100mL 1×PBS缓冲液中得所述样本稀释液;

[0013] 所述洗涤液为20倍浓缩,由NaCl 160.0g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.4g,Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 28.4g,KC1 4.0g,Tween20 10mL,加双蒸水至1000mL制得所述洗涤液;

[0014] 所述显色底物液A:将3,3',5,5' -四甲基联苯胺溶解于DMSO中,使3,3',5,5' -四甲基联苯胺终浓度为10mg/mL,加入10%体积的甘油,再加入终浓度为0.6mg/mL的L-半胱氨酸盐酸盐制得所述显色底物液A;

[0015] 所述显色底物液B:将重量百分比0.1%柠檬酸、0.2%磷酸氢二钠、0.02%亚硫酸钠、0.003%EDTA、0.02%尿素过氧化氢,溶于ddH<sub>2</sub>O中,调pH至5.3制得所述显色底物液B;

[0016] 所述显色终止液:0.5mol/L硫酸溶液。

[0017] 优选地,所述马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白包被的浓度为1.1ug/ml。

[0018] 优选地,所述辣根过氧化物酶标记的抗体的稀释倍数为1:5000。

[0019] 优选地,所述囊膜糖蛋白gB蛋白包被的酶标板所用包被液的组分及配比为1.59g NaC0<sub>3</sub>,2.93g NaHCO<sub>3</sub>,加双蒸水至1L,pH 9.0。

[0020] 本发明所述间接ELISA试剂盒的制备方法:

[0021] S1.鸡MDV囊膜糖蛋白gB基因的原核表达

[0022] ①根据NCBI上(NCBI Reference Sequence:D13713.1)已发表的gB蛋白的基因序列,结合pGEX-6p-1载体序列,人工合成pGEX-6p-1-gB基因,gB基因的核酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。将构建得到的原核表达载体pGEX-6p-1-gB转化大肠杆菌BL21感受态细胞,氨苄青霉素抗性筛选单个重组菌,该菌株经诱导可以特异性地表达鸡MDV囊膜糖蛋白gB蛋白;

[0023] ②将步骤①表达的gB蛋白进行亲和层析纯化。

[0024] S2.ELISA试剂盒的组装

[0025] 所述试剂盒包含有:步骤S1获得的原核表达的鸡MDV囊膜糖蛋白gB蛋白包被的酶标板、辣根过氧化酶标记的羊抗鸡酶标抗体、标准阳性对照血清、标准阴性对照血清、样本稀释液、洗涤液、显色底物液A、显色底物液B和显色终止液,其中所述的样本稀释液、洗涤液、显色底物液A、显色底物液B和显色终止液的组成和/或制备方法如下:

[0026] 所述样本稀释液包含:5%卵清蛋白溶液和5%马血清;取卵清蛋白2g,马血清5ml溶于100mL 1×PBS缓冲液中得所述样本稀释液;

[0027] 所述洗涤液为20倍浓缩,由NaCl 160.0g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.4g,Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 28.4g,KC1 4.0g,Tween20 10mL,加双蒸水至1000mL制得所述洗涤液;

[0028] 所述显色底物液A:将3,3',5,5' -四甲基联苯胺溶解于DMSO中,使3,3',5,5' -四甲基联苯胺终浓度为10mg/mL,加入10%体积的甘油,再加入终浓度为0.6mg/mL的L-半胱氨酸

盐酸盐制得所述显色底物液A；

[0029] 所述显色底物液B:将重量百分比0.1%柠檬酸、0.2%磷酸氢二钠、0.02%亚硫酸钠、0.003%EDTA、0.02%尿素过氧化氢,溶于ddH<sub>2</sub>O中,调pH至5.3制得所述显色底物液B；

[0030] 所述显色终止液:0.5mol/L硫酸溶液。

[0031] 更优选地,步骤S1中①所述诱导的条件为在0.4mM的IPTG中,温度15℃、转速100rpm条件下过夜。

[0032] 一种利用上述的试剂盒进行鸡MDV抗体的间接ELISA检测方法,包括以下步骤:

[0033] 1)将待测血清样品用样本稀释液1:500倍稀释;

[0034] 2)加样:向鸡MDV gB蛋白包被的酶标板微孔中加入步骤1)已稀释的待测血清样品100uL,37℃恒温孵育30min;

[0035] 3)洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液200uL,洗涤5次并拍干;

[0036] 4)加酶标二抗:每孔中加入辣根过氧化酶标记的羊抗鸡酶标抗体100uL,37℃恒温孵育30min;

[0037] 5)洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液200uL,洗涤5次并拍干;

[0038] 6)加底物液:将显色底物液A用显色底物液B稀释50倍混匀后每孔加100uL,室温避光显色10min;

[0039] 7)加终止液:每孔中加入显色终止液50uL;

[0040] 8)测定:用酶标仪在450nm处测定每孔的吸光光度值。

[0041] 与现有技术相比,本发明有益效果在于:

[0042] 1.将鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白应用于检测鸡马立克氏病病毒抗体,构建了检测鸡MDV抗体的间接ELISA试剂盒,为鸡MDV抗体的快速检测奠定了基础。目前针对鸡MDV抗体的检测缺乏成熟的适合临床应用的快速、简便、稳定、高效的方法,且不能对免疫鸡进行抗体监测,本发明首次通过探索影响因素,摸索实验条件,建立了有效检测鸡MDV抗体的试剂盒和方法。

[0043] 2.为临幊上鸡MDV感染情况的快速检测提供了有效的工具。ELISA方法实验操作简便易行,检测快速敏感,同时不需要精密的仪器设备,是一种面向基层并适用于大批量检测的有效方法。本发明根据实际应用需要所构建的鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒解决了临幊上鸡MDV抗体无可靠实用方法的问题。

[0044] 3.建立的间接ELISA试剂盒不仅可以用于病鸡的快速、早期诊断,也可以对免疫鸡进行免疫监测,从而提供了更加广阔的应用空间。

[0045] 4.建立的间接ELISA试剂盒和方法具有较高的特异性、敏感性和重现性,检测效果优于现有传统方法。

## 附图说明

[0046] 图1为实施例1的酶切鉴定结果;其中lane 1:DNA Marker, lane 2:pGEX-6P-1-gB, lane 3:pGEX-6P-1-gB经EcoRI/SaII酶切。

[0047] 图2为实施例1的重组gB蛋白的Western blot结果;其中lane 1:pGEX-6P-1-gB蛋白, lane 2:Protein Marker。

## 具体实施方式

[0048] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0049] 以下以具体实施条件为例对本发明方法进行进一步说明。

[0050] 实施例1鸡MDV gB蛋白的表达与纯化

[0051] 1. MDV pGEX-6p-1-gB表达载体的构建与鉴定

[0052] 根据NCBI上 (NCBI Reference Sequence:D13713.1) 已发表的gB蛋白的基因序列,结合pGEX-6p-1载体序列,人工合成pGEX-6p-1-gB基因 (武汉擎科创新生物技术有限公司合成),gB基因的核酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

[0053] 将合成的质粒取2uL加入至50uL DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,冰浴30min;42℃热激90s后迅速冰浴5min。加入1mL的无抗生素LB液体培养基轻轻吹打混匀后,37℃摇培60min。摇培的菌液1000rpm离心10min后,将上清液弃至100uL左右,与沉淀轻轻吹打混匀后全量转移到含有氨苄抗生素(100ug/mL)的LB平板上 (LB平板从4℃冰箱取出后先放置37℃恒温培养箱烘烤10min以除去水分后再用),涂布均匀并正面放置5-10min,使菌液完全被培养基吸收。37℃培养16-24h至单菌落出现。

[0054] 随机挑取5个单菌落接种到含有氨苄的LB液体培养基中摇培12h后提取质粒 (质粒提取具体操作参照试剂盒说明书;Plasmid Mini Kit I,OMEGA BIO-TEC)。对提取的质粒进行双酶切鉴定 (EcoRI、Sall),酶切鉴定结果见图1.2. 重组gB蛋白的诱导表达与纯化

[0055] 将重组pGEX-6p-1-gB质粒转化BL21大肠杆菌株感受态,挑取单菌落接种到含有100ug/mL氨苄的LB液体培养基中摇培12h,按1:100将菌种接种到氨苄培养基中37℃摇培至A60为0.6-0.8(约3h)。在浓度为0.4-0.6mM的IPTG条件下,环境温度15-18℃,转速80-120rpm的低温低转速条件下过夜诱导表达。离心破碎菌体,经SDS-PAGE检测,pGEX-6p-1-gB成功表达在上清中。

[0056] 将诱导表达结束的菌液8000rpm 4℃离心10min,收集菌体沉淀,PBS洗涤后用1/10菌液体积的PBS重悬。压力破碎(压力为1000bar)2个循环后,8000rpm,4℃离心20min收集上清液,将上清液进行GST-Tag亲和层析。纯化的gB融合蛋白用BCA法测定蛋白浓度后分装保存于-80℃备用。

[0057] 最终得到浓度含量为2.2mg/mL的gB-GST融合蛋白,更加优选的诱导条件为在浓度0.4mM的IPTG中,环境温度15℃,转速100rpm条件下过夜。SDS-PAGE鉴定显示纯化的pGEX-6p-1-gB融合蛋白纯度较高,Western blot与琼脂扩散实验检验重组蛋白的免疫原性,结果在87Kda处出现明显的目的带(如图2所示),且琼脂扩散实验显示具有明显的沉淀线。表明重组pGEX-6p-1-gB上清可溶性蛋白具有较好的抗原特异性。

[0058] 实施例2鸡MDV抗体间接ELISA检测方法的建立

[0059] 1. 鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒最佳反应条件的确定

[0060] 以本发明制备的可溶性pGEX-6p-1-gB蛋白包被酶标板作为抗原,HRP标记羊抗鸡二抗体与鸡血清一抗结合,并催化TMB底物显色。通过方阵滴定确定蛋白的最佳包被浓度为

1.1ug/mL, 辣根过氧化物酶标抗体的最佳稀释倍数为1:5000。

[0061] 2. 鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒阴阳临界值的确定

[0062] 检测经琼脂扩散实验检测为鸡MDV抗体阴性的25份鸡血清样品, 同时设标准阳性对照及阴性对照, 经多次重复检测OD450值, 最终确定本方法的阴阳性临界值判定标准如下:

[0063] 实验成立条件: 阳性对照平均OD值 (PC) : 大于0.6; 阴性对照平均OD值 (NC) : 小于0.2; SP计算方法:  $SP = \text{平均值}(\bar{x}) + 3\text{标准差}(SD)$

[0064] 阴阳性界线判定标准: 阳性SP $\geq 0.523$ ; 阴性SP $< 0.523$ , 结果见表1。

[0065] 表1 25份鸡MDV阴性样品间接ELISA检测结果

[0066]

样品	OD450							
	1-8	0.211	0.162	0.342	0.218	0.348	0.442	0.220
9-16	0.302	0.317	0.346	0.335	0.287	0.296	0.110	0.279
17-24	0.221	0.267	0.288	0.311	0.342	0.253	0.287	0.401

[0067]

25	0.421							
平均值	0.289							
标准差	0.078							
临界值	0.523							

[0068] 3. 鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒特异性试验

[0069] 用建立的间接ELISA方法对已知鸡新城疫病毒 (NDV) 阳性血清, 流感病毒 (AIV) 阳性血清, 鸡白血病病毒 (ALV) 阳性血清, 鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV) 阳性血清, 进行特异性交叉试验, 同时设标准阴性对照。结果显示所建方法与常见鸡病毒抗血清无交叉反应性, 说明本发明方法的特异性良好。本发明试剂盒的特异性试验结果见表2。

[0070] 表2鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒特异性试验结果

[0071]	抗血清	NDV	AIV	ALV	IBDV	阳性血清	阴性血清
	OD450	0.220	0.243	0.304	0.202	0.923	0.114

[0072] 4. 鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒敏感性试验

[0073] 将MDV阳性血清分别进行1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000倍稀释, 用所建立的方法进行检测, 测定OD450。结果显示MDV阳性血清500倍到8000倍稀释时仍检测为阳性, 16000到64000倍稀释时检测为阴性, 表明所建方法具有较好的敏感性。结果见表3。

[0074] 表3鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒的敏感性试验结果

[0075]

倍比稀释	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	阳性对照	阴性对照
OD450	2.1	1.773	1.321	0.986	0.620	0.325	0.286	0.265	0.924	0.115

[0076] 5. 鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒重复性试验

[0077] 用同期包被的酶标板对6份血清进行检测,统计分析得其变异系数(CV%)为0.82-9.96%,小于10% (如表4所示)。用不同时期包被的酶标板对6份血清进行检测,统计分析得其变异系数(CV%)为1.91-9.47%,小于10% (如表5所示)。批内变异系数和批间变异系数均小于10%,说明本发明的试剂盒具有良好的重复性。

[0078] 表4利用同批包被ELISA酶标板对8份样品的检测结果

[0079]

		OD450			CV%
阳性血清样本	1.87	1.85	1.88	0.82%	
	1.76	1.79	1.77	0.86%	
	1.22	1.23	1.19	1.72%	
	0.97	0.99	1.01	2.02%	
阴性血清样本	0.23	0.25	0.25	4.75%	
	0.34	0.33	0.31	4.68%	
	0.14	0.15	0.17	9.96%	
	0.37	0.34	0.31	8.82%	

[0080] 表5利用3批包被ELISA酶标板对8份样品的检测结果

[0081]

		OD450			CV%
阳性血清样本	1.84	1.8	1.87	1.91%	
	1.78	1.8	1.7	3.00%	
	1.3	1.21	1.19	4.75%	
	0.91	1	1.1	9.47%	
阴性血清样本	0.21	0.23	0.22	4.54%	
	0.32	0.35	0.29	9.37%	
	0.14	0.15	0.13	7.14%	
	0.35	0.34	0.35	1.66%	

- [0082] 实施例3鸡MDV抗体间接ELISA抗体检测试剂盒的组装
- [0083] 1. ELISA试剂盒组装
- [0084] a. 96孔酶标板,包被有鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白;
- [0085] b. 标准阳性对照:鸡马立克氏病病毒阳性血清;
- [0086] c. 标准阴性对照:鸡马立克氏病病毒阴性血清;
- [0087] d. 辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡酶标抗体;
- [0088] e. 样本稀释液:5%卵清蛋白溶液+5%马血清,取卵清蛋白2g,马血清5mL溶于100mL 1×PBS缓冲液中;
- [0089] d. 洗涤液(20×浓缩):由NaCl 160.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.4g, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 28.4g, KC1 4.0g, Tween20 10mL, 加双蒸水至1000mL制得所述洗涤液;
- [0090] e. 显色底物液A:将3,3',5,5' -四甲基联苯胺溶解于DMSO中,使3,3',5,5' -四甲基联苯胺终浓度为10mg/mL,加入10%体积的甘油,再加入终浓度为0.6mg/mL的L-半胱氨酸盐酸盐制得所述显色底物液A;
- [0091] f. 显色底物液B:将重量百分比0.1%柠檬酸、0.2%磷酸氢二钠、0.02%亚硫酸钠、0.003%EDTA、0.02%尿素过氧化氢,溶于ddH<sub>2</sub>O中,调pH至5.3制得所述显色底物液B;
- [0092] g. 显色终止液:0.5mol/L硫酸溶液。
- [0093] 2. 酶标板的制备
- [0094] 用包被液将鸡MDV gB蛋白稀释至1.1ug/mL,每孔加100uL,4℃过夜,倾去孔内液体,用洗涤液洗5次,拍干,然后用封闭液封闭,37℃孵育1h,倾去孔内封闭液,洗涤液洗涤5次,拍干,用铝膜真一封存、备用。
- [0095] 包被液:1.59g NaCO<sub>3</sub>,2.93g NaHCO<sub>3</sub>,加双蒸水至1000mL,pH 9.0。
- [0096] 实施例4鸡MDV抗体间接ELISA抗体检测试剂盒的测定程序
- [0097] 1.准备工作
- [0098] (1) 使用前将置于冷藏保存的试剂盒取出,至于室温回温;如洗涤液存在结晶,先在水浴中溶解。
- [0099] (2) 洗涤液配制:将实施例3的试剂盒中提供的洗涤液用蒸馏水稀释20倍后使用;
- [0100] 2.测定步骤
- [0101] 1) 将待测血清样品用样本稀释液按照1:500倍稀释;
- [0102] 2) 加样:向鸡MDV gB囊膜糖蛋白包被的酶标板微孔中加入步骤1)已稀释好的待测血清样品100uL,37℃恒温孵育30min;
- [0103] 3) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液200uL,洗涤5次并拍干;
- [0104] 4) 加酶标二抗:每孔中加入辣根过氧化酶标记的羊抗鸡酶标抗体100uL,37℃恒温孵育30min;
- [0105] 5) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液200uL,洗涤5次并拍干;
- [0106] 6) 加底物液:将显色底物液A用显色底物液B稀释50倍混匀后每孔加100uL,室温避光显色10min;
- [0107] 7) 加终止液:每孔中加入显色终止液50uL;
- [0108] 8) 测定:用酶标仪在450nm处测定每孔的吸光光度值(OD450值)。
- [0109] 3.结果判断

[0110] 以标准阳性对照孔平均OD值( PC )大于0.6,标准阴性对照孔平均OD值( NC )小于0.2判定为本次测定成立的条件。按照公式SP计算方法:SP=平均值(  $\bar{x}$  )+3标准差( SD )。待测样品的SP $\geq$ 0.523判定为阳性;SP<0.523判定为阴性。

[0111] 实施例5鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒的临床应用

[0112] 分别使用本发明的鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒和琼脂扩散实验方法对临床收集的66份鸡血清进行检测,并对检测结果进行统计分析。结果显示间接ELISA方法和琼脂扩散实验的总符合率为90.9%,说明本发明的间接ELISA方法与对照琼脂扩散实验具有较高的符合率。检测结果见表6。

[0113] 表6鸡MDV抗体间接ELISA检测试剂盒与琼脂扩散实验的符合率比较

[0114]

ELISA				
琼脂扩散实验	阳性	阴性	总数	符合率
阳性	36	0	36	100.0%
阴性	6	24	30	80.0%
总数	42	24	66	90.9%

[0115] 对比例重组gB蛋白的诱导表达与纯化

[0116] 将鉴定正确的pGEX-6p-1-gB质粒转化BL21大肠杆菌株感受态,挑取单菌落接种到含有100ug/mL氨苄的LB液体培养基中摇培12h,按1:100将菌种接种到氨苄培养基中37℃摇培至A60为0.6-0.8(约3h)。分别在0.2mM、0.4mM、0.6mM、0.8mM及1.0mM浓度的IPTG,在37℃,转速200rpm的条件下分别诱导3h、4h、5h、6h、7h,摸索重组gB蛋白的诱导表达的最佳条件。结果表明,IPTG浓度0.8mM,37℃,200rpm条件下,诱导6h,目的蛋白表达在包涵体中。

[0117] 将诱导表达结束的菌液8000rpm 4℃离心10min,收集菌体沉淀,PBS洗涤后用1/10菌液体积的PBS重悬。压力破碎(压力为1000bar)2个循环后,8000rpm,4℃离心20min收集包涵体沉淀,将包涵体用含2mol/L,4mol/L,6mol/L尿素的Tris缓冲液依次进行洗涤后,再用含8mol/L尿素的Tris缓冲液溶解,然后进行GST-Tag亲和层析。纯化的gB融合蛋白用BCA法测定蛋白浓度后分装保存于-80℃。最终得到浓度含量为3.2mg/mL的pGEX-6p-1-gB重组蛋白。然而经Western blot与琼脂扩散实验证明,该包涵体蛋白Western blot无目的带,琼脂扩散实验与标准阳性血清不形成沉淀线。因此该蛋白不能作为试剂盒的包被蛋白。

[0118] 本发明建立一套快速、简便、特异、灵敏、高通量并面向基层的MDV的抗体检测方法,能够同时应用于临床患病家禽的诊断和免疫家禽的抗体监测;当改变MDV囊膜糖蛋白gB蛋白在制备检测鸡马立克氏病病毒抗体间接ELISA试剂盒中的应用(例如gB蛋白的诱导条件),或改变其应用于间接ELISA试剂盒的组成、浓度等,或者改变应用该试剂盒的检测方法,都将会影响抗体检测的特异性、敏感性和重复性。

[0119] 以上详细描述了本发明的实施,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

## SEQUENCE LISTING

<110> 武汉科前生物股份有限公司

<120> 一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的试剂盒及其应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1626

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gaattccagc tgagcgaaga agaaagcacc ttttatctgt gtccgcccggcc ggttggttagc 60  
accgttattc gtctggAACcc gccgcgtaaa tgtccggAACc cgcgtaaAGc aaccgaatgg 120  
ggtaaggtt ttgcaattct gtttaaAGAA aatattAGCC cgtataaATT taaagtTACC 180  
ctgtattata aaaatattat tcagaccacc acctggaccg gtaccaccta tcgtcagatt 240  
accaatcgTT ataccgatcg taccccggtt agcattgaag aaattaccga tctgattgat 300  
ggtaaaggTC gttgtacgAG caaAGCACGT tatctgcgtA ataatgttA tggtaagca 360  
tttgatcgTG atgcaggTGA aaaacaggTT ctgctgAAAC cgagcaaATT taataccCG 420  
gaaagccgtG catggcatac caccaatgaa acctataccg tttggggtag cccgtggatt 480  
tatcgtaCCG gtaccacgGT taattgtatt gttgaagAAA tggatgcacG tagcgTTTT 540  
ccgtatAGCT attttGCAAT ggcaAAgtGT gatattGCAAt atattAGCCG gttttatGGT 600  
ctgagcccgc cggaaggcAGC agcagaACCG atgggttATC cgcaggataa ttttaaACAG 660  
ctggatAGCT atttAGCAT ggatctggat aaacgtcgta aagcaAGCCT gccggtaAA 720  
cgtaatttTC tgattaccAG ccattttacc gttgggtggg attgggcacc gaaaaccacc 780  
cgtgtttGTA gcatgaccaa atggaaAGAA gttaccgAAA tgctgcgtGC aaccgttaat 840  
ggtcgttATC gttttatGGC acgtgaACTG agcgcaACCT ttattAGCAA taccaccgAA 900  
tttgatccGA atcgtaTTAT tctgggtcAG tggtaAAAC gtgaAGcAGA agcagcaATT 960  
gaacagATTt ttcgtaccaa atataatgat agccatgttA aagttggta tggtagtAt 1020  
tttctggcac tgggtggTTT tattttGCA tattttccGG ttctgagcaA aagcctggca 1080  
catatgtATC tgcgtGAact gatgcgtGAT aatcgtaCCG atggaaatGCT ggatctggTT 1140  
aataataAAAC atgcaatttA taaaaAGAA gcaaccAGCC tgagccgtCT gcgtcgTGT 1200  
attcgtaATG caccGAATCG taaaattacc ctggatgata ccaccgcaat taaaAGcacc 1260  
agcagcgtTC agtttGCAAT gctgcAGTTT ctgtatGATC atattcAGAC ccatattaAT 1320  
gatatgttA gccgttATGc aaccGcatGG tggtaACTGC agaAtcgtGA actggTTctG 1380  
tggcatGAAG gtattAAAT taatccGAGC gcaaccGCAA ggcgaaccCT gggtcgtcgt 1440  
gttgcagCAA aaatGCTGGG tgatGTTGCA gcagttAGCA gctgtaccGC aattGATGCA 1500  
gaaagcgttA ccctGcagAA tagcatGcGT gttattACCA gcaccaatac ctgttatAGC 1560  
cgtccgctGG ttctgtttAG ctatggtaA aatcaggGta atattcaggG tcagctggGT 1620

gtcgac 1626

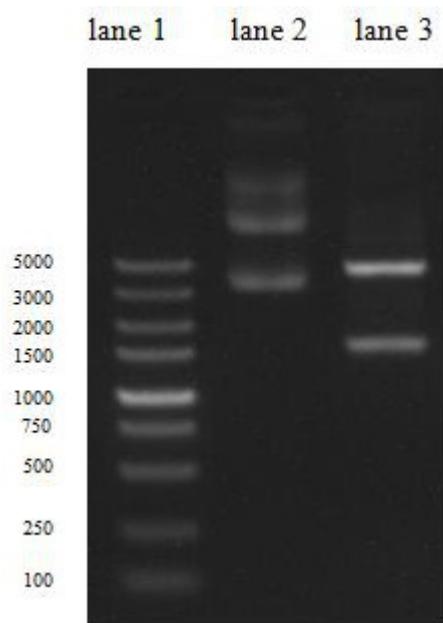


图1

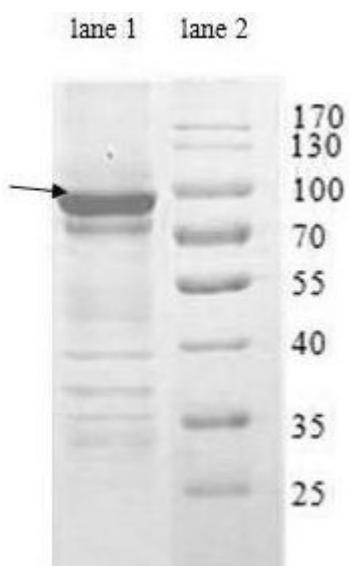


图2

专利名称(译)	一种检测鸡马立克氏病病毒抗体的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107632150A</a>	公开(公告)日	2018-01-26
申请号	CN201710801582.7	申请日	2017-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	武汉科前生物股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉科前生物股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉科前生物股份有限公司		
[标]发明人	董俊 李冉 徐高原 金梅林 陈焕春		
发明人	董俊 李冉 徐高原 金梅林 陈焕春		
IPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	董建林 徐瑛		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明公开了鸡马立克氏病病毒囊膜糖蛋白gB蛋白在制备检测鸡马立克氏病病毒抗体间接ELISA试剂盒中的应用，并提供了一种利用MDV囊膜糖蛋白gB蛋白建立的检测鸡马立克氏病抗体的间接ELISA试剂盒。本发明弥补目前针对鸡MDV抗体的检测缺陷，具有简便、稳定、高效的优点，所述试剂盒可用于快速、早期检测临床鸡血清样品中MDV病毒抗体，也可对免疫鸡的抗体进行监测，是一种面向基层并适用于大批量检测的有效方法，且其较高的特异性、敏感性和重现性使本发明的检测效果优于现有的传统方法。

