



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108931642 A

(43)申请公布日 2018.12.04

(21)申请号 201710391560.8

(22)申请日 2017.05.27

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 杨汉春 陈红 盖新娜 周磊

郭鑫 韩军 陈艳红

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

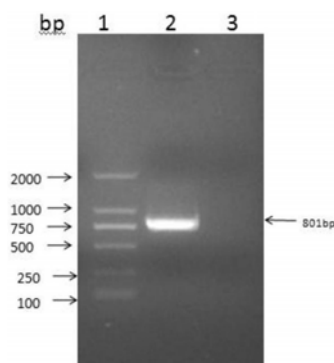
权利要求书2页 说明书15页
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法。所述试剂盒包括以猪伪狂犬病毒HB1201毒株为模板,利用上下游引物进行PCR扩增得到的重组蛋白;所述上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;所述下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明提供的含有gE重组蛋白的猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒,与商品化ELISA试剂盒相比,具有更高的检测敏感性。本发明建立的PRV gE抗体检测间接化学发光酶免疫方法为我国猪群中猪伪狂犬病野毒感染情况调查提供了敏感的检测手段,可用于病毒感染的早期、快速诊断,具有较好的开发前景。



1. 一种检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒,其特征在于,包括以猪伪狂犬病病毒 HB1201毒株为模板,利用上下游引物进行PCR扩增得到的重组蛋白;

所述上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

所述下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述PCR扩增的反应体系还包括:PCR Buffer、dNTPs、KOD酶和ddH₂O;

和/或,所述PCR扩增的反应条件为:94℃预变性2min;98℃变性10s,65℃退火30s,68℃延伸30s,35个循环;68℃延伸7min。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述重组蛋白的制备还包括:

将扩增后的产物纯化回收后,经EcoR I和Hind III双酶切,连接到相同双酶切的pET-32a表达载体中,转化得到重组质粒pET-32a-gE;

将重组质粒pET-32a-gE转化到感受态细胞BL21 (DE3) 中,用IPTG诱导重组蛋白表达,纯化,即得所述重组蛋白。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括包被液、封闭液、HRP标记山羊抗猪IgG抗体和化学发光底物。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,

所述包被液为pH为9-11、浓度为0.01-0.1mol/L的NaCO₃-NaHCO₃的缓冲液;

和/或,所述封闭液为0.5%-10%明胶、PBS、0.5%-10%马血清、0.5%-10%小牛血清、蔗糖混合液或0.5%-10%脱脂乳;

和/或,所述化学发光底物为Luminol和PIP。

6. 使用权利要求1-5中任一项所述的试剂盒检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的方法,其特征在于,包括:

(1) 使用包被液和封闭液对所述重组蛋白进行处理;

(2) 向步骤(1)处理后的液体中加入经稀释后的待检血清反应,再加入HRP标记山羊抗猪IgG抗体和化学发光底物,反应完成后,测定化学发光值RLU。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中:

使用包被液对重组蛋白进行处理包括:

用包被液将所述重组蛋白稀释至1-8μg/mL,优选为4μg/mL;

使用封闭液对所述重组蛋白进行处理包括:

向被包被液稀释后的重组蛋白中加入封闭剂,37℃下反应30min-2h;所述封闭剂为0.5%-10%明胶、PBS、0.5%-10%马血清、0.5%-10%小牛血清、蔗糖混合液或0.5%-10%脱脂乳。

8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中:

使用裂解剂对待检血清进行稀释,所述裂解剂为血清用PBS、PBST、10%-50%大肠杆菌裂解液上清中的一种或多种,优选为PBS+25%大肠杆菌裂解液上清;

血清的稀释比例为1:100-1:3200,优选为1:200-1:800,进一步优选为1:400;

加入经稀释后的待检血清的反应条件为:37℃下反应20min-1h。

9. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中:

加入HRP标记山羊抗猪IgG抗体的反应条件为:37℃下反应20min-1h,优选20min-

40min。

10. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中:

所述化学发光底物为0.1-0.8mmol/L Luminol和0.1-2mmol/L PIP的过氧化氢体系,优选为0.2-0.4mmol/L Luminol和0.5-1mmol/L PIP的过氧化氢体系,所述过氧化氢的浓度为0.1-4.0mmol/L,优选为0.5-1mmol/L;所述体系中pH值为7.5-9.0,优选为8.2-8.7;

加入化学发光底物的反应条件为:室温下反应3-15min,优选为5-10min。

检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,更具体地,涉及一种检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 伪狂犬病(Pseudorabies PR)是由伪狂犬病病毒(PRV)引起的家畜和多种野生动物共患的一种急性传染病。伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)又称猪疱疹病毒I型、传染性延髓麻痹病毒、奇痒症病毒、奥叶兹基氏病病毒,是引起牛、羊、猪、犬和猫等多种家畜和野生动物发热、奇痒(猪除外)及脑脊髓炎为主要症状的疱疹病毒。除猪外,其它易感染动物感染本病为高度致死性感染,但呈散发形式。该病对猪危害严重,主要引起种猪不育、妊娠母猪流产、死产和产木乃伊胎,亲生仔猪和断奶仔猪大量死亡,育肥猪增重减慢等症状。防治本病的疫苗包括灭活疫苗和弱毒疫苗。长期以来,对伪狂犬病的防治主要措施就是接种疫苗。上世纪八十年代末,基因缺失标志疫苗及相应的弱毒疫苗免疫和野毒感染鉴别诊断相继问世与得到应用,使猪伪狂犬病的根除成为可能。九十年代初期,部分伪狂犬病流行国家正式启动猪伪狂犬病的根除计划,即在使用疫苗防治本病的同时,配合以适当的鉴别诊断方法诊断出野毒感染猪,对已感染野毒的猪进行扑杀淘汰。

[0003] 目前广泛使用的疫苗是gE/gI双基因缺失疫苗。gE糖蛋白是PRV的一种十分重要的糖蛋白,在决定病毒的毒力及神经嗜性等方面起着重要作用,但gE不是PRV增殖所必需的蛋白,常作为缺失的候选基因。结构蛋白gE非常保守,具有良好的免疫原性且抗原表位分析清晰,可作为理想的血清学检测用抗原。

[0004] 目前,国内外已建立了许多PRV相关的诊断技术,主要分为抗体检测和抗原检测两大类。抗体检测方法包括间接免疫荧光法和ELISA法等。目前一般采用间接gE-ELISA的依法来检测猪伪狂犬病毒gE蛋白抗体,这些方法的特异性不强,敏感度不高,容易出现假阳性和假阴性,不可避免地会造成误判,并产生不必要的损失。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题或者至少部分地解决上述问题,本发明提供了一种检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒,包括以猪伪狂犬病病毒HB1201毒株为模板,利用上下游引物进行PCR扩增得到的重组蛋白;

[0006] 上游引物P1的核苷酸序列为:

[0007] CCGAATTCATGCGGCCCTTTCTGCTGCGC,如SEQ ID NO.1所示;

[0008] 下游引物P2的核苷酸序列为:

[0009] CCCAAGCTTTTAGTACCAGTCCAGCGTGGCGGT,如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 本发明以上述重组蛋白作为检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的包被抗原,具有更高的检测敏感性。

[0011] 在本发明一个优选实施方式中,该PCR扩增的反应体系还包括:PCR Buffer、

dNTPs、KOD酶和ddH₂O。

[0012] 在该反应体系中,还可以包括模板,在本发明实施方式中,以PRV HB1201毒株为模板。该HB1201毒株的基因序列的GenBank登录号为KU057086。

[0013] 在该反应体系中,各物质的量可以为:2×PCR Buffer for KOD FX Buffer 25uL、2Mm dNTPs 10uL、引物P1 1.5uL、引物P2 1.5uL、模板0.5uL、KOD酶1.0uL、ddH₂O 10.5uL。

[0014] 其中,PCR扩增的反应条件优选为:94℃预变性2min;98℃变性10s,65℃退火30s,68℃延伸30s,35个循环;68℃延伸7min。

[0015] 在本发明一个优选实施方式中,该重组蛋白的制备还包括:

[0016] 将扩增后的产物纯化回收后,经EcoRI和Hind III双酶切,连接到相同双酶切的pET-32a表达载体中,转化得到重组质粒pET-32a-gE;

[0017] 将重组质粒pET-32a-gE转化到感受态细胞BL21 (DE3) 中,用IPTG诱导重组蛋白表达,纯化,即得所述重组蛋白。

[0018] 其中,经EcoR I和Hind III双酶切时,可建立如下的50uL酶切反应体系:

[0019] EcoR I 1.5uL、Hind III 1.5uL、NEB Buffer4 5.0uL、胶回收PCR扩增产物/pET-32a表达载体各2.0ug、ddH₂O补至50uL。

[0020] 将酶切后的pET-32a表达载体和PCR扩增产物分离,利用胶回收试剂盒回收酶切的PCR产物以及载体。

[0021] 使用本领域中常用的方法将重组质粒pET-32a-gE转化到感受态细胞BL21 (DE3) 中,用IPTG诱导重组蛋白表达。

[0022] 在上述过程中,可以使用20uL菌液PCR鉴定体系来进行PCR鉴定,该体系如下:

[0023] TaqDNA聚合酶10uL、引物P1 1.0uL、引物P2 1.0uL、菌液5.0uL、ddH₂O至20uL。

[0024] 在本发明中,为了提高检测敏感性,以上述gE重组蛋白为包被抗原建立间接化学发光酶免疫方法(ICLEIA)。

[0025] 即,在本发明一个优选实施方式中,试剂盒中还包括包被液、封闭液、HRP标记山羊抗猪IgG抗体和化学发光底物。

[0026] 得到的试剂盒与商品化ELISA试剂盒相比,本发明的试剂盒具有更高的检测敏感性,与间接免疫荧光方法相比,ICLEIA检测特异性达93.4%,敏感性达检测95.9%,两者之间的符合率达94.86%。

[0027] 其中,包被液优选为pH为9-11、浓度为0.01-0.1mol/L的NaCO₃-NaHCO₃的缓冲液。

[0028] 封闭液优选为0.5%-10%的明胶、PBS、0.5%-10%马血清、0.5%-10%小牛血清、蔗糖混合液或0.5%-10%脱脂乳;其中,蔗糖为1%BSA和4-5%蔗糖。其中,百分比为质量体积比值。

[0029] 化学发光底物优选为Luminol和PIP。

[0030] 本发明另一个方面,还提供了使用上述试剂盒检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的方法,包括:

[0031] (1) 使用包被液和封闭液对上述重组蛋白进行处理;

[0032] (2) 向步骤(1)处理后的液体中加入经稀释后的待检血清反应,再加入HRP标记山羊抗猪IgG抗体和化学发光底物,反应完成后,测定化学发光值RLU。

[0033] 在一个优选实施方式中,步骤(1)中:使用包被液对重组蛋白进行处理可以为:

- [0034] 用包被液将上述重组蛋白稀释至1-8 μ g/mL,优选为4 μ g/mL。
- [0035] 其中,包被液为pH为9-11、浓度为0.01-0.1mol/L的NaCO₃-NaHCO₃的缓冲液,优选为pH为9.6、浓度为0.05mol/L的NaCO₃-NaHCO₃的缓冲液。
- [0036] 包被条件为以上述缓冲液作为包被液,置于37℃下反应30min-2h,优选为2h。
- [0037] 步骤(1)中:使用封闭液对上述重组蛋白进行处理可以为:
- [0038] 向被包被液稀释后的重组蛋白中加入封闭剂,37℃下反应30min-2h,优选为2h。
- [0039] 封闭剂可选自0.5%-10%明胶、PBS、0.5%-10%马血清、0.5%-10%小牛血清、蔗糖混合液或0.5%-10%脱脂乳,其中,蔗糖为1%BSA和4%蔗糖。其中,封闭剂优选为0.5%-10%明胶,进一步优选为0.5%明胶。
- [0040] 在步骤(2)中:使用裂解剂对待检血清进行稀释得到经稀释后的待检血清。其中,裂解剂可以为血清用PBS、PBST、10%-50%大肠杆菌裂解液上清中的一种或多种,优选为PBS+25%大肠杆菌裂液上清。
- [0041] 在该稀释反应中,血清的稀释比例可以为1:100-1:3200,优选为1:200-1:800,进一步优选为1:400。
- [0042] 向步骤(1)中经包被液和封闭剂处理后的液体中加入经稀释后的待检血清反应,反应条件为:37℃下反应20min-1h,优选为20min。综合考虑发光值和P/N值,优选为40min。
- [0043] 在步骤(2)中,加入HRP标记山羊抗猪IgG抗体的反应条件为:37℃下反应20min-1h,优选20min-40min。
- [0044] 在步骤(2)中,化学发光底物为0.1-0.8mmol/L Luminol和0.1-2mmol/L PIP的过氧化氢体系,优选为0.2-0.4mmol/L Luminol和0.5-1mmol/L PIP的过氧化氢体系,过氧化氢的浓度为0.1-4.0mmol/L,优选为0.5-1mmol/L,进一步优选为0.5mmol/L。在该体系中,Luminol的浓度进一步优选为0.2mmol/L,PIP的浓度进一步优选为0.5mmol/L。
- [0045] 在该体系中pH值为7.5-9.0,优选为8.2-8.7,进一步优选为8.5,在该体系中使用Tris-HCl缓冲液来调控pH值。
- [0046] 在化学发光底物体系中包括Luminol、PIP、过氧化氢以及Tris-HCl缓冲液。
- [0047] 在步骤(2)中,加入化学发光底物的反应条件为:室温下反应3-15min,优选为5-10min,进一步优选为5min。
- [0048] 选择多份市售的PRV gE抗体检测试剂盒和间接免疫荧光法检测为阴性的血清样本,用建立的间接CLEIA进行检测,计算阴性血清样本发光值的平均值($\bar{x}$)和标准差(SD)。根据统计学原理,确定间接CLEIA检测的阴阳性临界值。
- [0049] 在本发明中,根据统计学原理,确定当RLU值大于等于292832时,样本判为PRV gE抗体阳性,小于21979时判为阴性,两者之间判为可疑。
- [0050] 本发明提供的含有gE重组蛋白的猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒,与商品化ELISA试剂盒相比,具有更高的检测敏感性,使用上述试剂盒建立的间接化学发光酶免疫方法(ICLEIA)与间接免疫荧光方法相比,ICLEIA检测特异性达93.4%,敏感性达检测95.9%,两者之间的符合率达94.86%。本发明建立的PRV gE抗体检测间接化学发光酶免疫方法为我国猪群中猪伪狂犬病野毒感染情况调查提供了敏感的检测手段,可用于病毒感染的早期、快速诊断,具有较好的开发前景。

附图说明

[0051] 图1为本发明实施例1中PRV gE基因片段PCR扩增的琼脂糖凝胶电泳结果图;其中, 1.Trans 2K DNA Maker, 2.PRV gE基因, 3.空白对照;

[0052] 图2为本发明实施例2中PRV gE重组蛋白表达的SDS-PAGE分析图;其中, 1. 蛋白Marker, 2.pET32a空载体, 3.未诱导重组菌, 4.37℃诱导3h上清, 5.37℃诱导3h沉淀, 6.37℃诱导4h上清, 7.37℃诱导4h沉淀, 8.37℃诱导6h上清, 9.37℃诱导6h沉淀;

[0053] 图3为本发明实施例2中His-gE蛋白纯化的SDS-PAGE分析结果图;其中, 1. 蛋白Marker; 2. 诱导上清; 3. 诱导沉淀; 4. 纯化的gE重组蛋白;

[0054] 图4为本发明实施例2中重组gE蛋白的Western blotting鉴定结果图;其中, 1. 重组菌裂解沉淀; 2-4. 纯化的gE重组蛋白;

[0055] 图5为本发明实施例3中血清稀释度和抗原包被浓度与P/N值的曲线图;

[0056] 图6为本发明实施例3中抗原包被时间与发光值和P/N值的曲线图;

[0057] 图7为本发明实施例3中不同封闭液与发光值和P/N值的曲线图;

[0058] 图8为本发明实施例3中His-gE不同封闭时间与发光值和P/N值的曲线图;

[0059] 图9为本发明实施例3中不同血清稀释液与发光值和P/N值的曲线图;

[0060] 图10为本发明实施例3中血清不同作用时间与发光值和P/N值的曲线图;

[0061] 图11为本发明实施例3中二抗的作用时间与发光值和P/N值的曲线图;

[0062] 图12为本发明实施例3中发光液中不同浓度Luminol与发光值的曲线图;

[0063] 图13为本发明实施例3中发光液中不同浓度PIP与发光值的曲线图;

[0064] 图14为本发明实施例3中不同H₂O₂工作浓度与发光值的曲线图;

[0065] 图15为本发明实施例3中不同pH值的Tris-HCl缓冲液与发光值的曲线图;

[0066] 图16为本发明实施例3中发光底物的不同反应时间与发光值的曲线图。

具体实施方式

[0067] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0068] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规技术手段。若未特别指明,实施例中所用的试剂为市售。

[0069] 实施例1pET-32a-gE重组质粒的构建

[0070] 1) 引物的设计与合成

[0071] 根据实验室2012年分离获得的PRV流行毒株HB1201的基因序列 (GenBank登录号KU057086),设计1对包含gE主要抗原表位区的引物,具体信息见下表1。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

[0072] 表1gE抗原表位区基因扩增引物的设计

[0073]

引物	序列 (5'-3')	限制性酶切位点
上游引物 P1	CCGGAATTCATGCGGCCCTTT CTGCTGCGC	<i>EcoR</i> I
下游引物 P2	CCCAAGCTTTTAGTACCAGTC CAGCGTGGCGGT	<i>Hind</i> III

[0074] 注:横线处为限制性内切酶识别序列

[0075] 2) 目的基因的PCR扩增

[0076] 以实验室保存的PRV HB1201毒株为模板,利用设计的上下游引物,建立如下的PCR扩增反应体系:

2×PCR Buffer for KOD FX Buffer	25uL
2Mm dNTPs	10uL
引物 P1	1.5uL
[0077] 引物 P2	1.5uL
模板	0.5uL
KOD 酶	1.0uL
ddH2O	10.5uL

[0078] 加完上述成分后,瞬时离心混匀,进行PCR扩增。PCR反应条件:94℃预变性2min;98℃变性10s,65℃退火30s,68℃延伸30s,35个循环;68℃延伸7min。

[0079] 3) PCR扩增产物的回收

[0080] 用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增情况,并按照Omega公司胶回收试剂盒说明书进行胶回收,具体步骤如下:

[0081] 溶胶切取琼脂糖凝胶中的目的DNA片段,放入干净的EP管中称重,按照100mg的凝胶对应加入100μL的膜结合液 (Binding Buffer) 的比例,加入相应的膜结合液,于60℃金属浴溶胶,1min左右摇晃一次,确保胶块全部溶解。

[0082] 目的条带与吸附柱结合待溶液温度降至室温,加入吸附柱中静置2min,12000r/min离心1min,弃掉离心下来的液体。将吸附柱重新置于收集管中,再次加入300uL的膜结合液,12000r/min离心1min,弃掉离心下来的液体。

[0083] 洗涤将吸附柱重新置于收集管中,加入700uL已经加入乙醇的膜漂洗液 (SPW wash buffer),12000r/min离心2min,弃掉离下来的液体,12000r/min空离2min,尽量除尽残留的洗液。

[0084] 洗脱将吸附柱置于一干净的EP管中,打开吸附柱的盖子,将其放于50℃干燥箱内干燥10min,防止残留的漂洗液影响后续实验。最后在吸附膜中间位置悬空滴加30uL-50uL

洗脱缓冲液(elution buffer),静置2min,12000r/min离心2min收集DNA溶液于离心管中,-20℃保存备用。

[0085] 以实验室构建的PRV HB1201株gE质粒为模板,PCR扩增PRV gE基因片段。1.2%琼脂糖凝胶电泳结果显示,获得的目的基因片段大小约801bp,如图1所示,与预期大小一致。

[0086] 4) 目的片段与载体的双酶切

[0087] 将回收的目的片段与pET-32a表达载体分别进行双酶切,建立如下的50uL酶切反应体系:

	<i>EcoR</i> I	1.5uL
	<i>Hind</i> III	1.5uL
[0088]	NEB Buffer4	5.0uL
	胶回收 PCR 扩增产物/pET-32a 表达载体	各 2.0ug
	ddH ₂ O	补至 50uL

[0089] 混合液置37℃水浴酶切过夜。

[0090] 5) 双酶切产物的连接

[0091] 将酶切后的pET-32a表达载体和PCR扩增产物瞬离,利用胶回收试剂盒回收酶切的PCR产物以及载体。胶回收后的酶切产物建立10uL的连接体系,具体如下:

	10×T ₄ Ligase buffer	1μL
	载体 pET-32a	2μL
[0092]	酶切 PCR 产物	6μL
	T ₄ DNA 连接酶	1μL

[0093] 混匀后,置16℃金属浴连接至少6h。

[0094] 6) 转化

[0095] 提前半小时紫外照射超净台。取Trans10感受态细胞(100μL/支)1支,冰中解冻约3min至融化。在超净台中点燃酒精灯,吸取融化的Trans10感受态细胞100uL加到10uL的连接产物中,用移液枪轻轻吹打混匀,冰浴30min;42℃热激60s,再次冰浴5min;向离心管中加入500uL无抗性的SOC培养基,轻轻吹打混匀后,置于37℃摇床,200r/min培养40min-1h,3000-5000r/min离心5min,弃去大部分上清液,留下大约100uL液体,将沉淀重悬吹打混匀后,均匀的涂布于含氨苄青霉素的LB固体培养基中,37℃温箱过夜培养,观察菌落的生长状况。

[0096] 7) 重组质粒的鉴定

[0097] 取1mL Amp+LB培养液于1.5mL EP管中,用枪头挑取单个生长状况良好的白色菌落置于EP管中;37℃,180r/min振荡培养8h,用枪头吸取5μL菌液进行PCR鉴定。

[0098] 20uL菌液PCR鉴定体系如下:

	TaqDNA 聚合酶	10uL
	引物 P1	1.0uL
[0099]	引物 P2	1.0uL
	菌液	5.0μL
	ddH ₂ O	至 20uL

[0100] 菌液PCR反应程序:94℃预变性3min;94℃变性30s,56℃淬火30s,72℃延伸30s,35个循环;72℃终末延伸10min;4℃保存。选取PCR阳性克隆,将对应的菌液送测序公司测序。

[0101] 8) 中提质粒

[0102] 将测序正确的pET-32a-gE对应的菌液于200mL LB液体培养基中扩大培养,37℃、180r/min振荡培养约20h。将菌液分装于灭菌的100mL离心管中,配平结束后,8000r/min离心3min,弃去上清,倒置,用吸水纸尽量吸取剩余的上清;加入6mL细胞悬浮液(CRA)将沉淀重悬,并振荡混匀,再加入6mL细胞裂解液(CLA),轻轻旋转离心管,静置3min;待液体由浑浊变得澄清后加入10mL中和溶液(NSB),轻柔旋转离心管,使油状物在分层处消失,配平后12000r/min离心15min;按蓝色在上白色在下的顺序将吸附柱组装于真空泵上,将离心后的上清轻轻倒入蓝管中,防止沉淀重悬,打开真空泵,抽吸干净后弃去蓝管。在白管中加入5mL内毒素清除液(ETR)去除内毒素,打开真空泵,抽吸干净。加入20mL含有异丙醇的柱清洗液(column wash),抽吸30min左右,尽量抽干;最后加入500μL无核糖核酸酶的水,静置2min,将膜上的质粒DNA溶解抽提到1.5mLEP管中,12000r/min离心5min除去杂质,测量浓度后,放于-20℃保存。

[0103] 实施例2重组蛋白的原核表达、纯化与复性

[0104] 1) 重组表达菌的转化

[0105] 将测序鉴定正确的阳性质粒pET-32a-gE转化到感受态细胞BL21(DE3)中,转化步骤参照上述转化步骤。将其中10uL连接产物以2uL中提质粒替代,感染态细胞由Trans10换成BL21(DE3)。

[0106] 2) 重组蛋白的诱导表达

[0107] 挑取生长状态良好的单菌落,转接于1mL的Amp⁺/LB培养基中,37℃180r/min摇床中过夜活化,约10h,按1:50的比例接种到5mL的Amp⁺/LB液体培养基中,37℃180r/min振荡培养至生长对数期,即OD₆₀₀介于0.4与0.6之间。取出1mL作为未诱导的菌液放于4℃冰箱,剩余菌液中加入不同浓度的IPTG,分别为0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L,置180r/min摇床中,于37℃及28℃条件下分别诱导表达6h。诱导结束后菌液以8000r/min离心10min,弃掉菌液,沉淀用适量PBS重悬,吹打混匀后在4℃冰浴条件下间断超声裂解,超声条件为超声1.5s,间隔8.5s,振幅30%,直至菌体相对清亮;裂解液4℃12000r/min离心10min,吸取上清100uL,其余弃掉,沉淀用100uL PBS重悬,上清和沉淀按比例加入5×SDS上样缓冲液,煮沸8min,用10%的聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE,进行表达蛋白的可溶性分析。

[0108] 收集不同浓度IPTG条件下,诱导不同时间的菌液,进行SDS-PAGE,结果如图2。从图中可以看出,重组蛋白表达量随诱导时间的延长而升高,并在诱导6h时达到高峰,且主要存在于超声裂解的沉淀中。表明,重组蛋白主要以包涵体形式表达。

[0109] 3) SDS-PAGE分析

[0110] 聚丙烯凝胶的配制:用清水洗净玻璃板,用风机吹干,然后按照说明将两块板夹紧,加入1mL左右的1.0%的琼脂糖凝胶封底(防止漏胶)。按照说明书配制10%的分离胶,立即加到玻璃板中(约7mL),并用70%的乙醇压实。待分离胶凝固,弃去酒精,并用纸吸干净。按照说明配制5%的聚丙烯酰胺凝胶作为浓缩胶,加到玻璃板中,每个板约3mL,根据实验要求插上合适的梳子,室温静置15min,待浓缩胶充分凝固后,取下胶于4℃保存。

[0111] 点样及电泳:将制备好的聚丙烯酰胺凝胶夹入电泳槽,轻轻拔出梳子,将预先处理好的样品及Marker加入胶孔内,每孔上样量为20μL。电泳程序为:60v 30min;110v 1h30min。

[0112] 考马斯亮蓝染色:电泳结束后,取下凝胶,用蒸馏水轻轻冲洗后,置于5倍体积的考马斯亮蓝中,摇床中浸泡染色40-60min,之后置于蒸馏水中脱色,不断更换蒸馏水直至有清晰明显的条带出现。

[0113] Western blotting:电泳结束后,根据凝胶大小裁剪NC膜,将NC膜置于甲醇中浸泡30s左右,放于之前配置好的转膜液中。将凝胶取下,转膜时从负极到正极按照以下顺序放置:海绵垫、滤纸、聚丙烯凝胶、NC膜、滤纸、海绵垫,用滚轮轻轻赶走气泡,安装完毕后电泳槽冰浴100v 2h进行转膜。

[0114] 封闭:转膜结束后取出NC膜,用PBST洗涤转膜液后用5%脱脂乳37℃封闭2h。

[0115] 孵育一抗:根据目的蛋白大小切割NC膜,一抗稀释液与His标签抗体按照1:5000倍稀释,1:500稀释阳性的小鼠腹水,37℃孵育2h或4℃孵育过夜,NC膜用PBST洗涤,3min/次,洗涤3次,10min/次,洗涤2次。

[0116] 孵育二抗:NC膜洗涤完毕后,将NC膜置于1:10000倍稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG中,37℃摇床孵育1h,洗涤方法同上。

[0117] 曝光显色:用吸水纸吸干膜上的PBST,根据实验需求将化学发光试剂A、B等体积混合,均匀滴加在NC膜上,避光反应4min,用吸水纸稍微吸一下多余的曝光液,置于曝光仪中显色。

[0118] 4) 重组蛋白的纯化、浓度测定及复性

[0119] 重组蛋白的纯化

[0120] 按康为世纪公司6×His-Tagged Protein Purification Kit Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)说明书操作。具体步骤如下:

[0121] 菌体处理:将收集好的菌体蛋白按每100g菌体加入2mL细菌裂解液计算,每1mL细菌裂解液加入10μL PMSF,吹打混匀。

[0122] 收集包涵体蛋白:将菌体冰浴超声,超声程序如下:超声2s,停顿8s,温度4℃,超声功率30%,至液体澄清;4℃,10000g离心15min,收集沉淀;将沉淀重悬于10mL Binding Buffer溶液中,充分混匀,使包涵体蛋白充分溶解;10000g离心20min,收集上清。

[0123] 层析柱组装:将填料混匀后加入层析柱,室温静置10min,待凝胶与溶液分层后,把底部出液口打开,让乙醇通过重力作用缓缓流出。向组装好的柱子中依次加入5倍柱体积的去离子水、8倍柱体积的Binding Buffer溶液平衡柱子,结束后可上样。

[0124] 上样:将10mL上清负载上柱,每5min颠倒一次,颠倒6次左右,使上清与填料充分结合,打开底盖,收集1mL左右流穿液;用15倍柱体积的Binding Buffer冲洗柱子,洗去杂蛋

白;洗脱液按照100mM、200mM、300mM、400mM的咪唑浓度依次洗脱,再用10倍柱体积咪唑浓度为500mM的洗脱液洗脱,每种浓度的洗脱液收集1mL左右。之后依次用5倍柱体积的Binging Buffer、5倍柱体积的去离子水清洗柱子,再用3倍柱体积的20%的乙醇平衡,4℃保存。

[0125] 将不同浓度的洗脱液按比例加入5×SDS上样缓冲液,煮沸6min,用10%聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE,确定咪唑最佳洗脱浓度。

[0126] 重组蛋白经镍柱亲和层析纯化后,收集经不同浓度咪唑洗脱的蛋白液,进行SDS-PAGE。结果如图3。经纯化后,重组蛋白在48ku处形成单一的蛋白条带,几乎无杂带。

[0127] 纯化蛋白的浓度测定

[0128] 将纯化蛋白根据BCA法测定蛋白浓度。具体方法如下:在96孔板中加入9种不同浓度的蛋白标准体,每种浓度重复一次,然后加入待测样品,以上每孔加入10uL。将BCA A液和B液以50:1的比例混匀,避光加到96孔板中,每孔200uL,混匀后避光于37℃温箱中孵育30min,然后测量562nm处的吸光度,绘制吸光度-标准蛋白含量直线,计算样品蛋白浓度。

[0129] 重组蛋白的复性

[0130] 收集纯化蛋白,通过透析使蛋白复性,具体操作方法如下:

[0131] 透析膜处理:置2%NaHCO₃、1mM的Na₂-EDTA (pH8.0) 溶液中煮沸,10min。或者,1mM Na₂-EDTA (pH8.0) 溶液煮沸10min,蒸馏水冲洗干净。

[0132] 透析:将纯化蛋白加入透析膜,两端扎紧,放到PBS溶液中,4℃透析,并用磁力搅拌器不断搅拌,每12h更换一次PBS溶液,透析48h。收集复性后的目标蛋白。

[0133] 收集诱导后重组表达菌的超声裂解沉淀,进行SDS-PAGE,以His标签单抗和gE单抗为一抗,进行Western blotting。经化学发光显色后,在48ku处可观察到一条特异性蛋白条带(见图4)。表明,表达的gE重组蛋白能够被gE特异性抗体识别,具有较好的免疫反应性。

[0134] 实施例3间接化学发光酶免疫方法(ICLEIA)的建立及条件优化

[0135] 1) ICLEIA基本操作步骤

[0136] 用0.05mol/L pH9.6的NaCO₃-NaHCO₃缓冲液(CBS) 稀释重组gE蛋白抗原至工作浓度,100μL/孔包被聚乙烯板,37℃孵育1h,用洗板机以含0.05%吐温-20的PBS (PBST) 为洗液洗板4次;加入0.5%明胶封闭,300μL/孔,37℃封闭2h,PBST洗4次;加入稀释后的待检血清,100μL/孔,37℃作用1h,洗板4次;加入1:20000稀释的HRP标记山羊抗猪IgG的二抗,100μL/孔,37℃作用1h,洗板4次;加入发光液,A液与B液等体积混合(现配现用),100μL/孔,摇匀后室温避光反应3min;用化学发光测量仪测定425nm处的发光强度(relative light units, RLU)。

[0137] 2) 血清最佳稀释度和抗原最佳包被浓度的确定

[0138] 将阴、阳性血清分别按1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200进行稀释,抗原用包被液稀释为1μg/mL,2μg/mL和4μg/mL、8μg/mL。用方阵滴定法确定血清最佳稀释度。按3.1所述操作步骤,在化学发光检测仪上读取化学发光值,确定血清最佳稀释度和抗原最佳包被浓度。

[0139] 方阵法确定抗原最佳包被浓度及血清最佳稀释度,结果见图5。由图可见,在抗原包被浓度为4μg/mL,血清稀释度为1:400时,P/N值最大。

[0140] 3) 包被条件的选择

[0141] 用0.05mol/L pH9.6的NaCO₃-NaHCO₃缓冲液作为包被液,分别置37℃30min、1h、2h,

其他条件相同,比较发光值RLU和P/N,确定最佳包被条件。

[0142] 将抗原包被不同时间,结果如图6。由图可见,37℃包被2h时,P/N值最大。

[0143] 4) 封闭液的选择

[0144] 以0.05mol/L pH9.6的NaCO₃-NaHCO₃缓冲液为包被液,分别用0.5%明胶、PBS、10%马血清、5%小牛血清、1%BSA+4%蔗糖、5%脱脂乳为封闭液,对包被的化学发光板进行封闭。在其他条件相同的情况下,比较发光值RLU和P/N,确定最佳封闭液。

[0145] 用不同的封闭液封闭发光板,结果如图7。当以0.5%明胶作为封闭液时,P/N值最大。

[0146] 5) 封闭时间的选择

[0147] 用0.05mol/L pH9.6的NaCO₃-NaHCO₃缓冲液为包被液,0.5%明胶为封闭液,置37℃30min、1h、2h,其他条件相同,比较发光值RLU和P/N,确定最佳封闭时间。

[0148] 以0.5%明胶为封闭液,置37℃封闭30min、1h和2h,结果如图8。由图可见,37℃封闭2h时,P/N值最高。

[0149] 6) 血清最佳稀释液的确定

[0150] 用0.05mol/L pH9.6的NaCO₃-NaHCO₃缓冲液为包被液,0.5%明胶为封闭液,血清用PBS、PBST、PBST+10%大肠杆菌裂解液上清(E.coli浓度为635ug/mL)、PBST+25%大肠杆菌裂解液上清和PBST+50%大肠杆菌裂解液上清,在其他条件相同的情况下,比较发光值RLU和P/N,确定血清最佳稀释液。

[0151] 血清用PBST+大肠杆菌裂解液上清进行稀释,比较不同组分稀释液对应的发光值RLU和P/N,确定PBST+25%大肠杆菌裂解液上清为血清最适稀释液(图9)。

[0152] 7) 血清最佳作用时间的确定

[0153] 将阳性血清按最佳稀释度进行稀释后,置37℃20min、40min、1h,在其他条件相同的情况下,比较发光值RLU和P/N,确定血清最佳作用时间。

[0154] 加入血清后,置37℃分别作用20min、40min和1h,结果如图10。由图可见,37℃反应20min时,P/N值最高。

[0155] 8) 二抗最佳作用时间的确定

[0156] 将阳性血清按最佳稀释度进行稀释后,置37℃20min、30min、40min、1h,在其他条件相同的情况下,比较发光值RLU和P/N,确定二抗最佳作用时间。

[0157] 加入二抗后,置37℃分别作用20min、30min、40min和1h,结果如图11。由图可见,37℃反应30min时,P/N值最高。

[0158] 9) Luminol和PIP最佳工作浓度的确定

[0159] 将发光液中Luminol浓度分别稀释为0.1mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.8mmol/L,其他条件相同的情况下,检测各浓度下的发光强度RLU,确定Luminol的最佳工作浓度。

[0160] 将发光液中PIP浓度分别稀释为0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L、2mmol/L,其他条件相同的情况下,检测各浓度下的发光强度RLU,确定PIP的最佳工作浓度。

[0161] 发光液中不同浓度Luminol对应的发光值如图12。由图可见,发光值在Luminol浓度为0.2mmol/L时达到高峰;0.4mmol/L时,保持稳定。因此,选取发光值最高时的0.2mmol/L作为Luminol的最佳工作浓度。

[0162] 发光液中PIP浓度为0.1mmol/L、0.5mmol/L、1mmol/L和2mmol/L时对应的发光值如

图13。由图可见,当PIP浓度为0.5mmol/L时,发光值最高。因此,选取发光值最高时的0.5mmol/L为PIP的最佳工作浓度。

[0163] 10) H₂O₂最佳工作浓度的确定

[0164] 根据发光液中Luminol和对碘苯酚(PIP)的最佳工作浓度,将H₂O₂分别稀释为0.1mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L、2.0mmol/L、4.0mmol/L,其他条件相同的情况下,检测各浓度下的发光强度RLU,确定H₂O₂的最佳工作浓度。

[0165] 不同H₂O₂工作浓度下的发光值如图14。可以看出,H₂O₂浓度在0.5mmol/L时,发光值最高。

[0166] 11) Tris-HCl缓冲液pH值的确定

[0167] 发光液中Luminol、对碘苯酚(PIP)和H₂O₂均采用最佳工作浓度,检测Tris-HCl缓冲液pH值分别为7.5、8.0、8.5、9.0时对发光强度的影响。根据RLU结果确定Tris-HCl缓冲液的最适工作pH值。

[0168] 发光液中Tris-HCl缓冲液pH值分别为7.5、8.0、8.5、9.0时对应的发光值如图15。由图可见,当Tris-HCl缓冲液pH为8.5时,所对应的发光值最大。

[0169] 12) 发光底物最佳反应时间的确定

[0170] 在已确定的最佳条件下,加入发光底物,分别在3min、5min、10min、15min时开始读数,测量RLU,以发光值最高时发光液的反应时间为最佳反应时间。

[0171] 加入发光底物后,分别在3min、5min、10min和15min开始读数,测量发光值RLU,结果如图16。由图可见,加入发光底物反应5min时,发光值最高。

[0172] 13) 阴阳性临界值的确定

[0173] 选择20份经IDEXX公司生产的PRV gE抗体检测试剂盒和间接免疫荧光法检测为阴性的血清样本,用建立的间接CLEIA进行检测,计算阴性血清样本发光值的平均值($\bar{x}$)和标准差(SD)。根据统计学原理,确定间接CLEIA检测的阴阳性临界值。

[0174] 收集20份经IDEXX公司生产的gE抗体检测试剂盒和免疫荧光法检测均为阴性的血清样本,用建立的ICLEIA进行检测,结果如表2。

[0175] 表2PRV gE抗体阴性血清样本的ICLEIA检测结果

	样本数	发光值				
		RLU				
[0176]	1-5	1567	5169	12111	3971	1634
	6-10	18321	229	10996.5	18592.5	17823
	11-15	2219.5	1071	19980.5	3311.5	17628
	16-20	298	5869	543	5148.5	1201.5

[0177] 20份血清样本测得的发光值的平均值($\bar{x}$)为7372,标准偏差(SD)为7303。根据统计学原理,确定当RLU值大于等于292832($\bar{x}+3SD=7372+3\times7303$)时,样本判为PRV gE抗体阳性,小于21979($\bar{x}+2SD=7372+2\times7303$)时判为阴性,两者之间判为可疑。

[0178] 14) 重复性试验

[0179] 板内重复性试验

[0180] 用同一批次纯化的重组gE蛋白包被化学发光板,在同一块板上检测已知背景的5份血清样本,每份血清做5个重复,计算标准差和变异系数,分析其板内重复性。

[0181] 板内重复性实验的检测结果见表3。5份血清在板内各孔的变异系数在2.12%–8.54%之间,均小于10%。表明,该ICLEIA的板内重复性较好。

[0182] 表3板内重复性检测结果

	血清 1	血清 2	血清 3	血清 4	血清 5
重复 1	95342	72007	68420	43979	36975
重复 2	99472	67907	70205	39743	40120
重复 3	89532	69896	65063	44563	39789
重复 4	87903	70452	65890	37678	32670
重复 5	90789	71079	69532	42053	35341
平均值	92607	72468	68422	43603	36579
标准差 (SD)	4730	1535	2253	2892	3123
变异系数 (CV%)	5.10%	2.12%	3.29%	6.63%	8.54%

[0184] 板间重复性试验

[0185] 相同条件下,不同时间,分别用重组gE蛋白包被5块化学发光板,每块板上均检测已知背景的5份血清,每份血清做5个重复,计算标准差和变异系数,分析其板间重复性。

[0186] 板间重复性实验的检测结果见表4。5份血清在板间各批次的变异系数在3.56%–7.49%之间,均小于10%。表明,该ICLEIA的板间重复性也较好。

[0187] 表4板间重复性检测结果

	血清 1	血清 2	血清 3	血清 4	血清 5
重复 1	129871	85720	106384	72930	53420
重复 2	117819	90124	112312	70134	50123
重复 3	120389	99231	128942	69323	59321
重复 4	127893	93271	108231	74579	52313
重复 5	126738	89242	122452	68630	49242
平均值	124542	91517	115664	71119	52883
标准差 (SD)	5169	5081	9682	2531	3966
变异系数 (CV%)	4.15%	5.55%	8.37	3.56%	7.49%

[0189] 15) ICLEIA交叉反应性及检测灵敏性检测

[0190] 用包被好的化学发光板同时检测PRV gE、PRV gB、PRRSV、CSFV和FMDV阳性血清,确定ICLEIA检测结果的特异性。

[0191] 将6份已知PRV感染血清进行1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200和1:6400稀释,用所建立的间接CLEIA和IDEXX公司生产的PRV gE抗体ELISA检测试剂盒同时对以上样本进行检测,比较两种方法检测阳性样本中PRV gE抗体的最高稀释度,以确定其

检测灵敏性。

[0192] 用包被好的化学发光板同时检测PRV gE、PRV gB、PRRSV、CSFV和FMDV阳性血清,检测结果如表5。除PRV gE阳性血清检测结果为阳性外,其余4份血清的检测结果显示为阴性。结果表明,所建立的ICLEIA与PRRSV、CSFV和FMDV抗体无交叉反应。

[0193] 表5交叉反应试验结果

	PRV (gE+)	PRV (gE-/gB+)	PRRSV	CSFV	FMDV
[0194] 发光值	69239	2344	3077	2503.67	4323
结果判定	+	-	-	-	-

[0195] 将6份已知的PRV感染血清进行倍比稀释,用间接CLEIA和IDEXX公司生产的PRV gE抗体检测ELISA试剂盒同时进行检测,结果如表6。ICLEIA方法测得阳性血清的最大稀释度为1:1600,而ELISA试剂盒测得的抗体最大稀释度仅为1:200。表明,间接CLEIA方法能够检测出更低水平的PRV gE抗体,具有更高的检测灵敏性。

[0196] 表6间接CLEIA方法与间接ELISA方法的检测灵敏性比较

		1:2	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	3200	6400
[0197]	血清1 CLEIA检测结果	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	IDEXX检测结果	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	血清2 CLEIA检测结果	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	IDEXX检测结果	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	血清3 CLEIA检测结果	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	IDEXX检测结果	+	±	-	-	-	-	-	-	-
	血清4 CLEIA检测结果	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	IDEXX检测结果	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	血清5 CLEIA检测结果	+	+	+	+	+	+	±	-	-
	IDEXX检测结果	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	血清6 CLEIA检测结果	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IDEXX检测结果	+	+	-	-	-	-	-	-	-

[0198] 实施例4间接CLEIA与间接免疫荧光方法检测gE抗体的特异性与敏感性比较

[0199] 1) 间接免疫荧光法 (IFA)

[0200] 真核细胞转染

[0201] 将Vero细胞传至48孔板上,待细胞密度达到70-80%时,采用Invitrogen公司的Lipofectamine LTX and PLUS Reagents转染试剂,进行HA-gE质粒转染。在无菌1.5mL EP管中加入500μL的Opti-MEM和2μg/孔的质粒DNA,轻轻混匀后,将PLUS Reagent (2μL/孔)添加到上述Opti-MEM中,混匀,室温静置5min;再加入Lipofectamine LTX (4μL/孔),混匀,室温静置30min,以利于形成DNA-脂质体混合物,在此期间更换新鲜的培养液;最后将上述的转染混合液逐滴加入细胞培养孔中,轻轻摇动培养板,于37℃ 5% CO₂培养箱中培养,逐日观察病变。

[0202] IFA检测及结果统计

[0203] 待细胞孔内70-80%细胞表现CPE时,使用实验室保存的HA标签抗体、PRV标准阳性、阴性血清及待检血清进行IFA,具体操作程序为:弃掉细胞上清,加入100uL预冷的无水

乙醇,室温固定15min;弃液,PBS洗3次,每次3min;弃液,加入PBS稀释的1:1000gE蛋白单抗,血清样本进行1:10稀释,100uL/孔,37℃孵育1h;弃液,PBS洗3次,3min/次;弃液,加入PBS稀释的1:200的FITC标记山羊抗小鼠二抗,37℃孵育1h;弃液,PBS洗3次,3min/次;置荧光显微镜下观察并记录阳性细胞孔数。

[0204] 2) 间接CLEIA的特异性、敏感性分析

[0205] 用已建立的间接CLEIA和间接免疫荧光方法 (IFA) 同时检测临床血清样本。以间接免疫荧光方法为检测“金标准”,分析间接CLEIA的特异性、敏感性和符合率。

[0206] 敏感性 (%) = [阳性样本数 / (阳性样本数 + 假阴性样本数)] × 100%

[0207] 特异性 (%) = [阴性样本数 / (阴性样本数 + 假阳性样本数)] × 100%

[0208] 符合率 (%) = [(阳性样本数 + 阴性样本数) / 样本总数] × 100%

[0209] 用建立的间接CLEIA和IFA同时检测506份血清样本。阴性血清的阴性检出率即为相对特异性,阳性血清的阳性检出率即为相对敏感性,检出为阳性和阴性的血清样本总数占总样本数的比例即为两者的符合率,结果见表7。表明,我们建立的间接CLEIA特异性达93.4%,敏感性为95.9%,与IFA的符合率为94.86%。

[0210] 表7建立的CLEIA检测方法与传统方法IFA的检测结果比较

		样本数	ICLEIA	IFA	IFA/ ICLEIA	符合率
[0211]	敏感性	281	+(281)	+(281)		
		12	+(12)	-(12)		
		293	+(293)	+(281)	95.9% (281/293)	94.86% 480/506
		199	-(199)	-(199)		
		14	-(14)	+(14)		
	特异性	213	-(213)	-(199)	93.4% (199/213)	

[0212] 综上所述,本发明以原核表达并纯化的猪伪狂犬病毒gE蛋白为抗原,建立了用于PRV gE抗体检测的间接CLEIA。

[0213] 通过一系列工作条件优化,间接CLEIA的具体操作程序如下:用0.05mol/L pH9.6NaCO₃-NaHCO₃缓冲液为包被液,稀释gE蛋白至4μg/mL,每孔100μL加入聚乙烯板,置37℃包被2h;以含0.05%吐温-20的PBS (PBST) 为洗涤液洗板4次;每孔加300μL 0.5%明胶,37℃封闭2h,PBST洗4次;以PBST+25%大肠杆菌裂解液上清为血清稀释液,每孔加入100μL 1:400稀释的待检血清,置37℃反应20min,洗板4次;加入100μL 1:20000稀释的HRP标记山羊抗猪IgG抗体,37℃30min,洗板4次;每孔加入发光液100μL,其中:Luminol工作浓度为0.2mmol/L、PIP工作浓度为0.5mmol/L;Tris-HCl pH为8.5,过氧化氢工作浓度为0.5mmol/L;室温避光反应5min;用化学发光检测仪测定425nm处的发光值。当检测样本的RLU大于等于292832时,判为阳性;小于21979时,判为阴性;处于两者之间时,判为可疑。

[0214] 本发明建立的间接CLEIA特异性高,重复性好。与商品化试剂盒相比,该间接CLEIA的检测灵敏性较高,且与间接免疫荧光方法有较高的符合率,具有非常好的开发前景。

[0215] 最后,本发明的方法仅为较佳的实施方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在

本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110>	中国农业大学	
<120>	检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法	
<130>	KHP171112693.1	
<160>	2	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	ccggaattca tgcggccctt tctgctgcgc	30
<210>	2	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	cccaagcttt tagtaccagt ccagcgtggc ggt	33

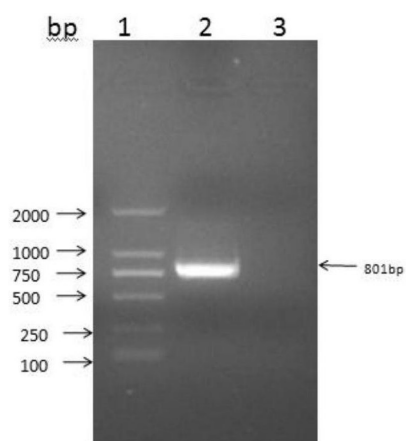


图1

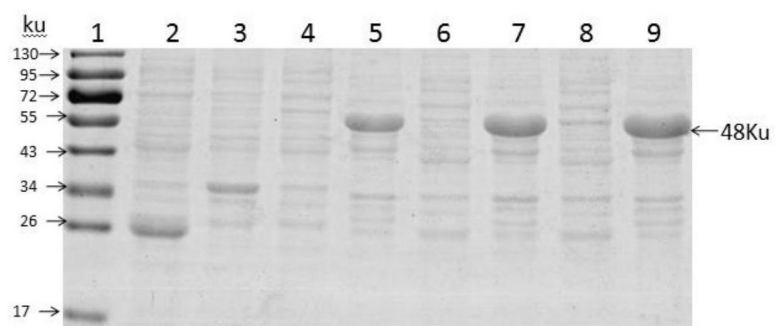


图2

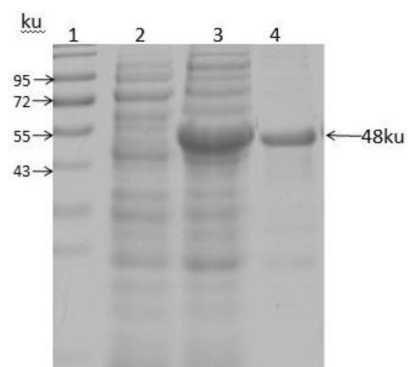


图3

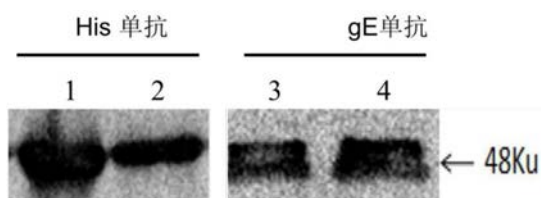


图4

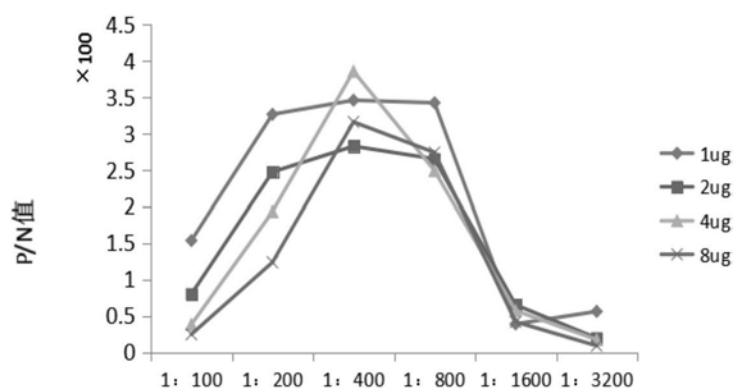


图5

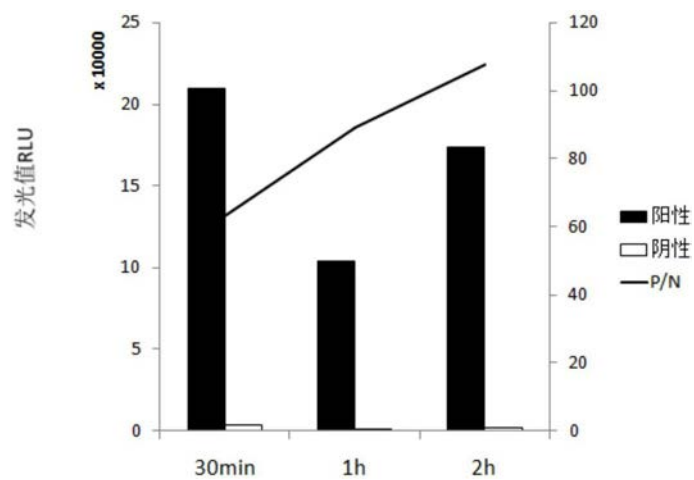


图6

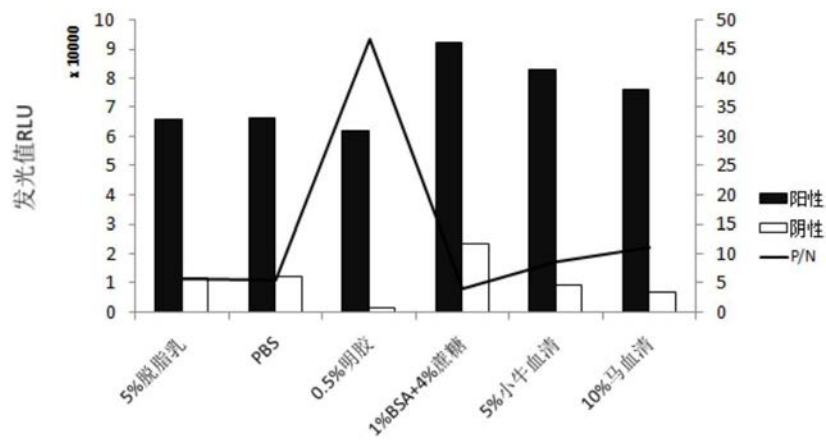


图7

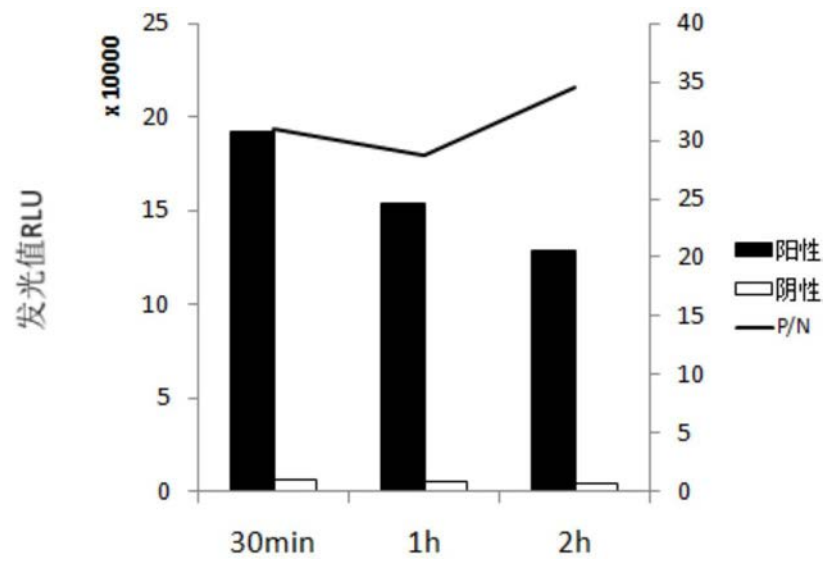


图8

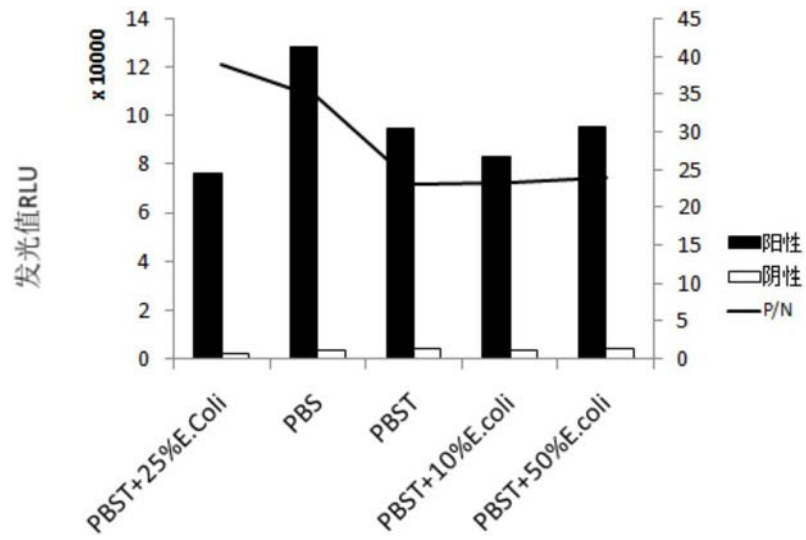


图9

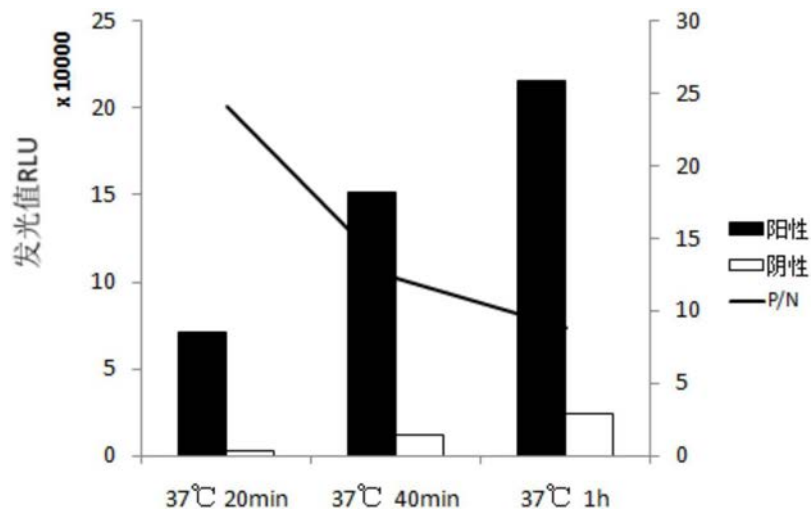


图10

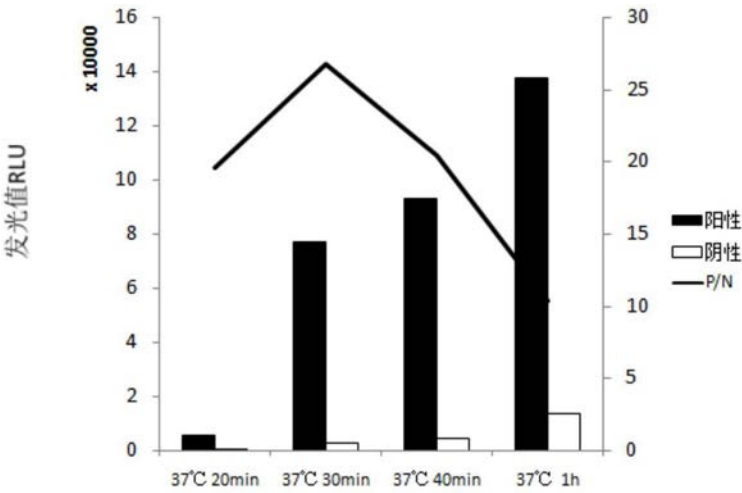


图11

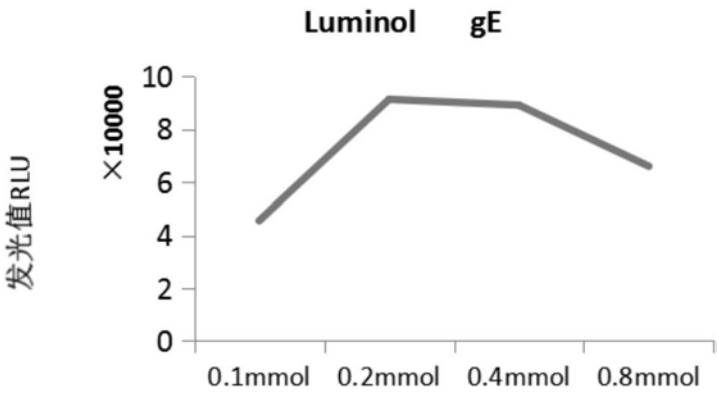


图12

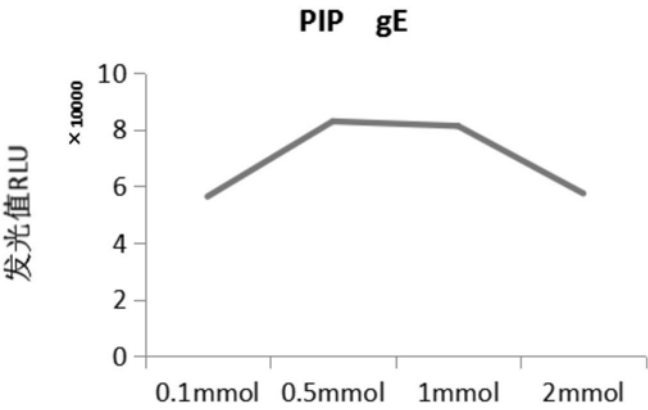


图13

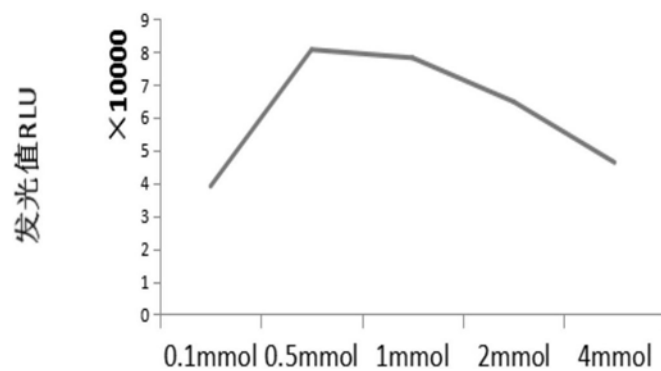


图14

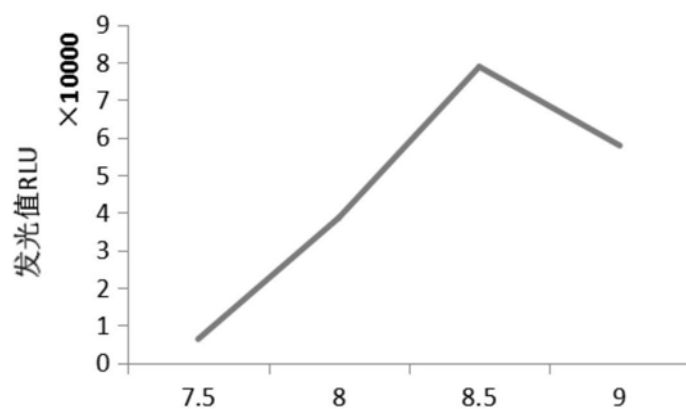


图15

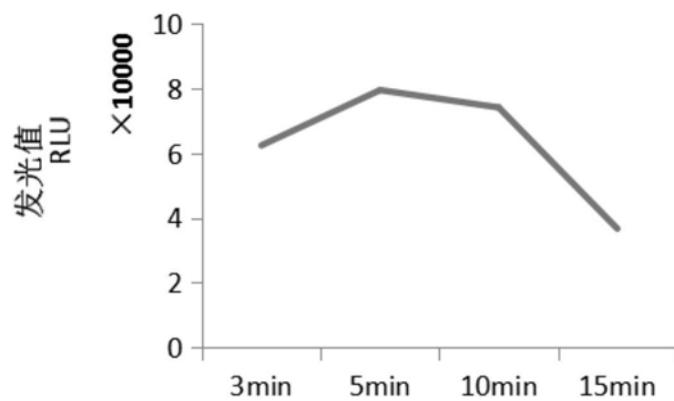


图16

专利名称(译)	检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN108931642A	公开(公告)日	2018-12-04
申请号	CN2017110391560.8	申请日	2017-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	杨汉春 陈红 盖新娜 周磊 郭鑫 韩军 陈艳红		
发明人	杨汉春 陈红 盖新娜 周磊 郭鑫 韩军 陈艳红		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	王莹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒及检测方法。所述试剂盒包括以猪伪狂犬病病毒HB1201毒株为模板，利用上下游引物进行PCR扩增得到的重组蛋白；所述上游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO. 1所示；所述下游引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明提供的含有gE重组蛋白的猪伪狂犬病毒野毒抗体的试剂盒，与商品化ELISA试剂盒相比，具有更高的检测敏感性。本发明建立的PRV gE抗体检测间接化学发光酶免疫方法为我国猪群中猪伪狂犬病野毒感染情况调查提供了敏感的检测手段，可用于病毒感染的早期、快速诊断，具有较好的开发前景。

