



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102183658 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(21) 申请号 201110047062.4

(22) 申请日 2011.02.28

(71) 申请人 四川农业大学实验动物工程技术中心

地址 625014 四川省雅安市新康路 46 号

(72) 发明人 程安春 吴英 汪铭书 陈孝跃

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 15 页

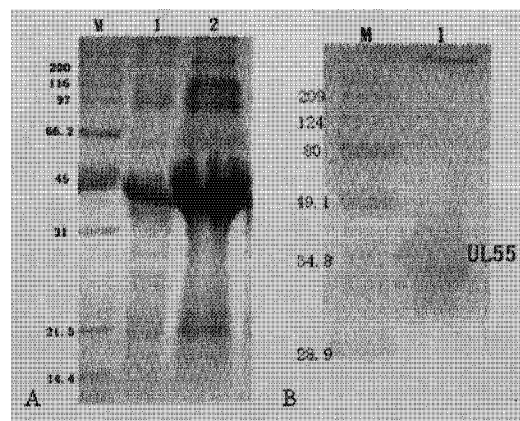
序列表 4 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种基于重组 UL55 蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法

(57) 摘要

本发明涉及动物医学领域,特别涉及用于检测鸭瘟病毒抗体的方法,具体包括固相抗原的制备、一抗结合、二抗结合、显色及检测并判定等步骤,本方法是基于纯化的重组 UL55 蛋白建立的间接 ELISA 法,其特异性好,对鸭病毒性肝炎病毒 (DHV)、鸭疫里默氏菌 (RA)、鸭大肠杆菌 (E. coli)、鸭源沙门氏菌 (Salmonella)、鸭肿头性出血症病毒和鸭源流感病毒的阳性血清进行检测,结果均为阴性;该方法的对酶标板内或板间重复试验显示变异系数均小于 10%,能检出经 1:6400 倍稀释的 DPV 弱毒疫苗免疫鸭的阳性血清。



1. 基于重组 UL55 蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于,具体步骤为:
 - a 固相抗原的制备:将包被浓度为 0.2mg/ml 的重组 UL55 蛋白液固相载体连接,用封闭液封闭,洗涤去除未结合的抗原及杂质,得固相抗原;
 - b 一抗结合:将待检血清作 160 倍的稀释,得稀释血清,即一抗,通过保温反应使所述稀释血清与所述固相抗原结合形成固相抗原抗体复合物,洗涤去除固相载体上杂质;
 - c 二抗结合:将酶标二抗作 2000 倍的稀释,得酶标二抗稀释液,将所述酶标二抗稀释液与所述固相抗原抗体复合物结合,得抗原-抗体-二抗复合物;
 - d 显色:在步骤 c 所得抗原-抗体-二抗复合物加入色原底物避光显色后,加入终止液终止反应得显色样品液;
 - e 检测并判定:将步骤 d 所述显色样品液用酶标仪测 OD_{450nm} 值,所述 OD_{450nm} 值 > 0.330 为阳性,所述 $OD_{450nm} \leq 0.330$ 则为阴性。
2. 根据权利要求 1 所述的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于:步骤 a 中所述固相载体为酶标板。
3. 根据权利要求 1 所述的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于:步骤 a 中所述的封闭液为体积浓度为 1.0% 的牛血清白蛋白。
4. 根据权利要求 1 所述的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于:步骤 d 中避光显色的时间为 30 分钟。
5. 根据权利要求 1 所述的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于:步骤 a 中所述重组 UL55 蛋白液、步骤 b 中所述稀释血清及步骤 c 中所述酶标二抗稀释液的加入量为等体积且大于或等于 $100 \mu l$ 。
6. 根据权利要求 1 所述的用于检测鸭瘟病毒抗体的方法,其特征在于:步骤 c 中所述酶标二抗为羊抗鸭 IgG-HRP。
7. 根据权利要求 1 所述的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于:步骤 d 中所述色原底物为四甲基联苯胺。
8. 根据权利要求 1 所述的鸭瘟病毒抗体检测方法,其特征在于:所述方法还包括空白对照实验和阴性对照实验。

一种基于重组 UL55 蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物医学领域,特别涉及应用重组 UL55 原核表达蛋白作为包被抗原而建立检测的鸭瘟病毒抗体方法。

背景技术

[0002] 鸭瘟 (duck plague, DP) 是由疱疹病毒科中的 DPV 引起的常见于鸭、鹅、天鹅等水禽的一种高度致死性传染病。本病死亡率高,传播迅速,自 1923 年在荷兰首次发生后,已蔓延至世界许多国家和地区,严重威胁着养鸭业的发展。因此迫切需要建立有效可靠的监测手段,以便能及时正确地了解鸭群的健康状态和免疫抗体水平。本病的经典诊断方法为中和试验,但因繁琐耗时(约 1~2 周),敏感性较差且实验要求严格,不适于大批量血清样品的检测和在基层推广。用 ELISA 方法检测病毒特异抗体已被公认为是一种敏感的方法,它比中和试验和血凝抑制试验敏感,而且对不易培养的病毒,或培养周期长、不易引起细胞病变、无法用中和试验检测的病毒,ELISA 检测更具有意义,不仅能检测某种病毒的总抗体,而且还可检测针对病毒某一抗原成分的抗体。但是由于 DPV 全病毒纯化方法的复杂性以及纯度不够理想,阻碍了包被全病毒的 ELISA 方法 (DPV-ELISA) 的大规模应用。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种基于重组 UL55 蛋白为抗原的鸭瘟病毒抗体检测方法,所述重组 UL55 蛋白的获得是通过构建原核表达质粒 pET32a-UL55、转化表达菌并发酵培养,收集到大量的含有重组 UL55 蛋白的菌体沉淀,再通过超声波破碎菌体、重组 UL55 蛋白包涵体洗涤、纯化及梯度透析而获得的;同时,用 Western blotting 分析证实该蛋白可与抗 DPV 阳性血清发生强烈的免疫反应;进一步确定了重组 UL55 蛋白的包被浓度及一抗、二抗的稀释度,制备了鸭瘟病毒抗体检测方法,该方法避免了繁琐的病毒纯化步骤,且操作简单,特异性、灵敏性较高。

[0004] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0005] 基于重组 UL55 蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法,具体步骤为:

[0006] a 固相抗原的制备:将包被浓度为 0.2mg/ml 浓度重组 UL55 蛋白液固相载体连接,用封闭液封闭,洗涤去除未结合的抗原及杂质,得固相抗原;

[0007] b 一抗结合:将待检血清作 160 倍的稀释,得稀释血清,即一抗,通过保温反应使所述稀释血清与所述固相抗原结合形成固相抗原抗体复合物,洗涤去除固相载体上杂质;

[0008] c 二抗结合:将酶标二抗作 2000 倍的稀释,得酶标二抗稀释液,将所述酶标二抗稀释液与所述固相抗原抗体复合物结合,得抗原-抗体-二抗复合物;

[0009] d 显色:在步骤 c 所得抗原-抗体-二抗复合物加入色原底物避光显色后,加入终止液终止反应得显色样品液;

[0010] e 检测并判定:将步骤 d 所述显色样品液用酶标仪测 OD_{450nm} 值,所述 OD_{450nm} 值 > 0.330 为阳性,所述 $OD_{450nm} \leq 0.330$ 则为阴性。

- [0011] 进一步,所述的鸭瘟病毒抗体检测方法的具体步骤为:
- [0012] a 固相抗原的制备:将包被浓度等于 0.2mg/ml 的重组 UL55 蛋白液与固相载体连接,用封闭液封闭,洗涤去除未结合的抗原及杂质,得固相抗原;
- [0013] b 一抗结合:将待检血清作等于 160 倍的稀释,得稀释血清,即一抗,通过保温反应使所述稀释血清与所述固相抗原结合形成固相抗原抗体复合物,洗涤去除固相载体上杂质;
- [0014] c 二抗结合:将酶标二抗作等于 2000 倍的稀释,得酶标二抗稀释液,将所述酶标二抗稀释液与所述固相抗原抗体复合物结合,得抗原-抗体-二抗复合物;
- [0015] d 显色:在步骤 c 所得抗原-抗体-二抗复合物加入色原底物避光显色后,加入终止液终止反应得显色样品液;
- [0016] e 检测并判定:将步骤 d 所述显色样品液用酶标仪测 OD_{450nm} 值,所述 OD_{450nm} 值 > 0.330 为阳性,所述 $OD_{450nm} \leq 0.330$ 则为阴性。
- [0017] 进一步,步骤 a 中所述固相载体为酶标板;
- [0018] 进一步,步骤 a 中所述的封闭液为体积浓度为 1.0% 的牛血清白蛋白;
- [0019] 进一步,步骤 e 中避光显色的时间为 30 分钟;
- [0020] 进一步,步骤 a 中所述重组 UL55 蛋白液、步骤 b 中所述稀释血清及步骤 c 中所述酶标二抗稀释液的加入量为等体积且大于或等于 $100 \mu l$;
- [0021] 进一步,步骤 c 中所述酶标二抗为羊抗鸭 IgG-HRP;
- [0022] 进一步,步骤 d 中所述色原底物为四甲基联苯胺;
- [0023] 进一步,所述方法还包括空白对照实验和阴性对照实验。
- [0024] 本发明的有益效果在于:本方法是基于纯化的重组 UL55 蛋白建立的间接 ELISA 法,其特异性好,对鸭病毒性肝炎病毒 (DHV)、鸭疫里默氏菌 (RA)、鸭大肠杆菌 (E. coli)、鸭源沙门氏菌 (Salmonella)、鸭肿头性出血症病毒和鸭源流感病毒的阳性血清进行检测,结果均为阴性;该方法的对酶标板内或板间重复试验显示变异系数均小于 10%,能检出经 1 : 6400 倍稀释的 DPV 弱毒疫苗免疫鸭的阳性血清

附图说明

[0025] 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,凡是涉及蛋白表达的均同时提供原始彩照和黑白照。图中涉及标记及含义如下:

[0026] 图 1-A 为 DPV UL55 基因的 PCR 扩增:M 指 Marker III 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 799bp);图 1-B 为重组质粒 pMD18-UL55 的双酶切鉴定:M1 指相对分子质量标准 III, M2 为 DL2000 相对分子质量标准;1 指重组质粒 pMD18-UL55 用 BamH I 和 Xho I 双酶切得到的两个片段;2 指 UL55PCR 扩增产物(箭头所示小片段的分子量大小约为 799bp);图 1-C 为重组表达载体 pET32a-UL55 的单酶切和双酶切鉴定:M1 为 DL2000 相对分子质量标准;M2 指相对分子质量标准 DL15000;1 是 UL55 基因的 PCR 产物;2 指重组表达载体 pET32a-UL55 用 BamH 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 799bp);3 指重组表达载体 pET32a-UL55 用 BamH I 单酶切

后得到的线性质粒。

[0027] 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 为以 BL21 为表达宿主的 pET32a 空载加 IPTG 诱导 ;2、3 分别为未加诱导剂的 UL55 表达产物的上清和包涵体 ;4、5 分别为 IPTG 诱导所产生的上清和包涵体 (箭头所示的蛋白质分子量大小约为 40KD) ;图 2-B 为诱导剂 IPTG 不同终浓度诱导表达结果 :1-6 的 IPTG 浓度分别为 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、和 0.1mmol/L ;图 2-C 为不同温度诱导 pET32a-UL55 表达结果 :1-3 的温度分别为 37、30 和 25℃ ;图 2-D 为不同时间诱导 pET32a-UL55 表达结果 :1-5 的诱导时间分别为 4、5、6、7 和 8h。

[0028] 图 3 为重组 UL55 蛋白纯化效果和免疫原性的检测 :A, SDS-PAGE 分析 :M 为蛋白标准 (KD) ;1 为包涵体洗涤法纯化后再经透析复性的重组 UL55 蛋白 ;2 为 5 次洗涤后的重组 UL55 包涵体蛋白 ;B, Western blotting 分析 :箭头所指是以兔抗 DPV 抗体为一抗检测复性后的重组 UL55 蛋白 (约为 20KD)。

具体实施方式

[0029] 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。

[0030] 实施例 1 鸭瘟病毒 UL55 基因的克隆、原核表达及 UL55 蛋白的纯化

[0031] 1、材料方法

[0032] 以下将参照附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如分子克隆实验指南(第三版, J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译,科学出版社,2002 年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0033] 1.1 菌株、质粒和毒株

[0034] 质粒 pMD18-T,购自大连宝生物工程有限公司 ;原核表达质粒 pET32a(+), 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。

[0035] 1.2 试验鸭胚和血清

[0036] 10 日龄鸭胚,其种鸭 DPV 和抗体均为阴性 ;兔抗 DPV 抗体,由四川农业大学禽病研究中心提供。

[0037] 1.3 主要试剂

[0038] 琼脂糖、2× 傻瓜 PCR Mixture、DNA 连接酶 Mixture、限制性内切酶 BamH I 和 XhoI、UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒和 UltraPure™ DNA 回收试剂盒等分子生物学试剂及试剂盒购自大连宝生物公司、北京赛百盛基因技术有限公司、华美生物工程公司和 Bio-Rad 公司 ;其它试剂均为分析纯,购自上海生工生物技术有限公司。

[0039] 2 实验方法

[0040] 2.1 DPV UL55 基因的克隆

[0041] 2.1.1 引物设计

[0042] 利用 Primer Premier5.0 软件,参考 UL55 基因序列 (GenBank 登录号 :EU071034),由宝生物生物技术有限公司合成。引物序列 :

[0043] F :5' -GGATCCATGGCCGACGCGAAGGCGGT-3' (划线部分为 BamH I 位点) ;

[0044] R:5' -CTCAGGCTTGGGTCTTTACTTTTTGCGCGGAAC-3' (划线部分为 Xho I 位点)。

[0045] 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。

[0046] 2.1.2DPV 基因组 DNA 的提取

[0047] 2.1.2.1DEF 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(体积分数为 2.5%的胰蛋白酶)150 μl/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。

[0048] 2.1.2.2 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。

[0049] 2.1.2.3 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 μl 的细胞裂解液,同时加蛋白酶 K(10mg/ml)至终浓度为 200 μg/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 μl 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 μl RNA 酶,37℃作用 30min, -20℃保存备用。

[0050] 2.1.3PCR 扩增 DPV UL55 基因

[0051] PCR 反应体系为:

[0052]	2×傻瓜 PCR Mixtrue	12.5μl
	DPV 基因组 DNA	2.4μl
	P1(20pmol / μl)	0.5μl
	P2 (20pmol / μl)	0.5μl
	超纯水	9.1μl
	Total volume	25μl /Sample

[0053] 轻轻混匀,2000r/min 瞬时离心后进行 PCR。

[0054] 反应参数:95℃预变性 10min;94℃变性 40s,66.2℃退火 40s,72℃延伸 1min,循环 30 次;最后 72℃延伸 10min,于 4℃保存备用。取 4 μl PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳,设 Maker III 和空白对照,观察扩增片段的长度。

[0055] 2.1.4 UL55 基因的 pMD18-T 克隆、鉴定与测序

[0056] 在优化好的 PCR 条件下用保真 PCR Mixture 扩增 UL55 基因,产物按大连宝生物公司的 T 克隆试剂盒说明书进行 T 克隆并送大连宝生物公司测序确认。

[0057] 将 T 克隆菌种接种于 5ml 的 LB 液体培养基 (含 Amp 50 μ g/ml) 中, 37°C 水浴振荡培养过夜, 次日提取重组质粒, 提取方法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, 抽提的重组质粒命名为 pMD18-UL55。然后分别以 BamH I/Xho I 双酶切消化与 BamH 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。酶切体系如下:

	BamH I	BamH I/ Xho I
pMD18-UL55 质粒	8.0 μ l	16.0 μ l
[0058] BamH I	1.0 μ l	1.0 μ l
Xho I	-	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

[0059] 将酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定, 并将克隆产物送大连宝生物公司进行测序鉴定。

[0060] 2.2 原核表达质粒 pET32a-UL55 的构建、诱导表达与表达条件优化

[0061] 2.2.1 原核表达质粒 pET32a-UL55 的构建与鉴定

[0062] 2.2.1.1 目的片段的酶切与连接: 限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 分别双酶切 pMD18-UL55 质粒和原核表达载体 pET32a(+), 酶切体系均为:

	pMD18-UL55 质粒	原核表达载体 pET32a(+)	
[0063]	BamH I	BamH I	8.0 μ l
Xho I	Xho I		1.0 μ l
10 \times H buffer	10 \times H buffer		2.0 μ l
超纯水补足至	超纯水补足至		20 μ l

[0064] 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。

[0065]	回收目的片段 UL55	4.7 μ l
	pET32a 双酶切回收片段	2.8 μ l
[0066]	2 \times DNA 连接酶 Mixtrue	7.5 μ l
	超纯水补足至	15 μ l

[0067] 2.2.1.2 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 10 μ l 加到含 200 μ l 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 Amp 的 LB 液体培养基 800 μ l, 37°C 振荡 (150r/min) 培养 1 ~ 1.5h; 取 200 μ l 培养物涂布于含 100 μ g/ml Amp 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 μ l + 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)。

[0068] 2.2.1.3 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 Amp 50 μ g/ml) 中, 37°C 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、BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定该重组质粒,其酶切体系如下:

	BamH I	BamH I/ Xho I
pET32a-UL55 质粒	8.0μl	16.0μl
BamH I	-	1.0μl
Xho I	1.0μl	1.0μl
10\timesH Buffer	1.0μl	2.0μl
超纯水补足至	10μl	20μl

[0070] 然后,以上述重组质粒为模板,利用方法 2.1.1 中的引物进行 PCR 反应,其方法和扩增条件同上,取 PCR 产物于 1.0% 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 pET32a-UL55。

[0071] 2.2.2 重组表达质粒 pET32a-UL55 的诱导表达

[0072] 2.2.2.1 重组质粒 pET32a-UL55 的提取:挑取 2.2.1.3 已鉴定含阳性重组质粒 pET32a-UL55 的 DH5a 菌种划线接种于含 Amp 50g/ml 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日取单个菌落接种于 5ml LB 液体培养基上,剧烈振荡培养 10~16h,离心收集菌液,按 UltraPureTM 质粒 DNA 小量提取试剂盒说明进行重组质粒的提取与纯化。

[0073] 2.2.2.2 重组质粒 pET32a-UL55 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 pET32a-UL55 转化到表达宿主菌 E. coli BL(DE3) 中,方法同 2.2.1.2。

[0074] 2.2.2.3 重组质粒 pET32a-UL55 的诱导表达:从上述 LB 固体培养基(含 Amp50 μ g/ml) 上,挑取阳性克隆菌,接种 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日取菌液按 1:50 的比例接入 5ml LB 液体培养基(含 Amp 50 μ g/ml) 中,剧烈振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.4 时,分别加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,诱导 4h 后,收集 1ml 培养菌液,4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 水浴加热变性 5~10min,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,观察表达结果。

[0075] 2.2.2.4 重组质粒 pET32a-UL55 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,分别按以下步骤处理:4 $^{\circ}$ C 10000r/min 离心 5min,菌体沉淀用 20ml 20mmol Tris-HCl(pH8.0) 悬浮;置 -20 $^{\circ}$ C 过夜后,加溶菌酶至终浓度为 1mg/ml,4 $^{\circ}$ C 搅拌 30min,超声波(冰浴)间歇破碎菌体(600w,30sec/次,10次),4 $^{\circ}$ C 10000r/min 离心 10min,取上清备用;沉淀用 10ml 洗液(10mmol/L PBS+2mol/L 尿素+0.2% TritonX-100) 悬浮,4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心 10min 后,沉淀再次用 10ml 洗液悬浮,重复洗涤五次后,用适量尿素溶液(10mmol/L PBS+8mol/L 尿素)溶解沉淀,低温保存备用。分别取适量的上清和尿素溶液溶解的沉淀,向其中加入 80 μ l 超纯水和 20 μ l 5 \times SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 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。

[0076] 2.2.3 重组质粒 pET32a-UL55 诱导条件的优化

[0077] 2.2.3.1 诱导剂 IPTG 的浓度优化:按 2.2.2.3 方法,取含重组质粒 pET32a-UL55 的表达宿主菌 BL21(DE3),接种 5ml LB 液体培养基(含 Amp 50 μ g/ml) 中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日按 1:50 转接种于 5ml LB 液体培养基(含 Amp 50 μ g/ml) 中,37 $^{\circ}$ C 培养培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时,取其中 6 只试管,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L、0.2mmol/L、

0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L 37℃诱导培养 4h 后,按上述方法对样品进行处理,12% SDS-PAGE 电泳,观察结果。

[0078] 2.2.3.2 温度条件优化:按上述方法,取含重组质粒 pET32a-UL55 的表达宿主菌 BL21(DE3),接种 5ml LB 液体培养基(含 Amp 50 μg/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 Amp 50 μg/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 0.2mmol/L,分别置于 25℃、30℃、37℃诱导培养 4h,按 2.2.2.3 方法对样品进行处理,12% SDS-PAGE 电泳,观察结果。

[0079] 2.2.3.3 诱导时间优化:取含重组质粒 pET32a-UL55 的表达宿主菌 BL21(DE3),接种 5ml LB 液体培养基(含 Amp 50 μg/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 Amp 50 μg/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 4、5、6、7、8h,吸取 1ml 培养液,按 2.2.2.3 方法对样品进行处理,12% SDS-PAGE 电泳,观察结果。

[0080] 2.3 重组 UL55 蛋白的大量制备、纯化与复性

[0081] 2.3.1 菌体的大量培养

[0082] 具体步骤为:(1)将含 pET32a-UL55 质粒的表达菌 E. coli BL21(DE3)接种于 200ml LB 液体培养基(含 50 μg/ml Amp)中,37℃培养 16h,作为种子菌;(2)向已灭菌的 LB 液体培养基(含 50 μg/ml Amp)中加入种子菌(按 5% v/v 的比例加);(3)在 180r/min,37℃,pH 7.0 的条件下培养,待培养至菌液 OD₆₀₀ = 0.6 左右时,加入 IPTG 至终浓度为 0.2mmol/L,37℃诱导培养 4h;(4)收集培养好的菌液(约 5L),8000r/min 离心 10min 后收集菌体沉淀,用适量 Tris-HCl(20mmol/L, pH 8.0)重悬后,加入溶菌酶使其终浓度为 1mg/ml, -20℃保存备用。

[0083] 2.3.2 重组 UL55 蛋白的包涵体洗涤法大量纯化

[0084] 取出 -20℃保存的菌体沉淀,室温下融化后,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+1% Triton X-100+20mM Tris-HCl+2mM EDTA)悬浮,4℃ 10000r/min 离心 10min 后,沉淀再次用 20ml 洗液悬浮,重复洗涤五次后,用适量尿素溶液(10mmol/L PBS+8M 尿素+50mM Tris-HCl+50mM NaCl+10%甘油)溶解沉淀,4℃保存备用。

[0085] 2.3.3 重组 UL55 蛋白的复性和检测

[0086] 将包涵体洗涤纯化得到的重组 UL55 蛋白分多次加入到复性缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0+0.15M NaCl+1mM EDTA+1mM GSSG+10mM GSSH)中,使尿素浓度按 6M、5M、4M、3M、2M 逐步降低,使变性蛋白逐渐复性,并控制蛋白终浓度在 0.1~1mg/ml 的范围内。4℃复性 24~48h,收集稀释复性的蛋白液,装入透析袋 4℃透析(透析缓冲液:50mM Tris-HCl pH 8.0+50mM NaCl+0.5mM EDTA+10%甘油+1%甘氨酸)24~48h。透析后样品经 8000g 离心 15min 后收集上清,取其中 20 μl 进行 SDS-PAGE 分析,并以纯化的兔抗 DPV 为一抗,以 HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blotting 检测。其余蛋白液用 Bradford 法测定蛋白的最终浓度,分装后冷冻干燥浓缩备用。

[0087] 再重复大量表达两次并分别纯化 UL55 重组蛋白,共得到 3 批不同表达和纯化的 UL55 重组蛋白。

[0088] 3 实验结果

[0089] 3. 1DPV UL55 基因的扩增、T- 克隆与鉴定结果

[0090] 3. 1. 1UL55 基因的 PCR 扩增结果

[0091] 以 DPV CHv 毒株基因组 DNA 为模板对 UL55 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 799bp 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)。

[0092] 3. 1. 2UL55 基因 T 克隆鉴定结果

[0093] 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-UL55。对 pMD18-UL55 进行 PCR、酶切(图 1-B)和测序鉴定,结果表明,T 克隆获得的 UL55 基因序列同已知的 DPV UL55 基因序列完全一致。

[0094] 3. 2 原核表达质粒 pET32a-UL55 的构建与鉴定、诱导表达及其优化结果

[0095] 3. 2. 1 重组表达质粒 pET32a-UL55 的构建与酶切鉴定

[0096] 以 BamH 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-32a(+) 表达载体连接,转化 DH5 α ,得到重组表达质粒 pET32a-UL55(理论大小约为 6169bp),经 BamH I 和 Xho I 双酶切后得到的两条片断的大小分别约为 5370bp 和 799bp(见图 1-C),与理论值相符,表明原核表达载体被成功构建。

[0097] 3. 2. 2 重组质粒 pET32a-UL55 的诱导表达

[0098] 3. 2. 2. 1 重组质粒 pET32a-UL55 的诱导表达:将重组质粒 pET32a-UL55 转化表达菌株 BL21(DE3) 在含 Amp 的 LB 琼脂平板上筛选到了白色菌落。将含重组质粒 pET32a-UL55 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-32a(+) 转化菌株诱导表达,结果表明:空载体 pET-32a(+) 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 pET32a-UL55 表达的重组 UL55 蛋白在 40KD 处(图 2-A)。

[0099] 3. 2. 2. 2 重组质粒 pET32a-UL55 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。

[0100] 3. 2. 3 重组质粒 pET32a-UL55 诱导表达条件的优化

[0101] 3. 2. 3. 1 IPTG 浓度的优化:在 37 $^{\circ}$ C 条件下,加入 IPTG 使其终浓度分别为 0.1mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/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,蛋白诱导量没有明显差别(图 2-B)。但是比较而言,IPTG 浓度为 0.2mmol/L 时,蛋白表达量略高。因此,可选择 0.2mmol/L 的 IPTG 浓度作为诱导表达浓度。

[0102] 3. 2. 3. 2 诱导温度条件的优化:37 $^{\circ}$ C 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 0.2mmol/L,分别置于 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4h,结果:温度在 25 $^{\circ}$ C 时,诱导蛋白量较少,37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 为最佳诱导温度。

[0103] 3. 2. 3. 3 诱导时间的优化:在 IPTG 浓度为 0.2mmol/L,37 $^{\circ}$ C 条件下,采用 4~8h 不同诱导时间进行诱导表达,结果随着时间的增加诱导产生的重组蛋白表量降低。诱导 5~8h 的重组蛋白表达量均显著低于 4h 诱导组;而诱导 6~8h,其重组蛋白表达量低于 5h 且彼此间相比无明显变化(图 2-D)。因此,选择 4h 作为最佳诱导时间。

[0104] 3. 3 重组 UL55 蛋白的纯化结果

[0105] 通过大量扩大培养,收集到了大量含有重组 UL55 蛋白的菌体沉淀,经溶菌酶裂解、超声破碎、洗涤和溶解包涵体、变性蛋白透析复性等过程获得了大量纯化的重组 UL55 蛋白,通过 SDS-PAGE 分析显示纯化的重组 UL55 蛋白具有较高的纯度(图 3-A),Western blotting 分析显示该重组 UL55 蛋白能与抗 DPV 阳性血清发生强烈的免疫反应(图 3-B),表明该重组蛋白具有较高的免疫原性,可作为临床上检测鸭瘟抗体的检测抗原。

[0106] 实施例 2、UL55-ELISA 法检测 DPV 抗体方法的建立和应用

[0107] 上述实施例获得的重组 UL55 蛋白,抗 DPV 鸭血清(为弱毒疫苗免疫后 14d 的免疫鸭血清,中和效价为 1 : 8),抗 DHV(鸭肝炎病毒)、RA(鸭里默氏杆菌)、Salmonella(沙门氏菌)、鸭肿头出血症病毒、流感病毒和 E. coli(大肠杆菌)鸭血清及非免疫鸭阴性血清,由四川农业大学禽病研究中心提供;羊抗鸭 IgG-HRP(辣根过氧化物酶标记的羊抗鸭 IgG)和四甲基联苯胺(TMB)均购自美国 KPL 公司;牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Sigma 公司产品。

[0108] 1UL55-ELISA 法检测 DPV 抗体方法的建立

[0109] 1.1 重组 UL55 蛋白包被浓度和血清稀释度的确定

[0110] 采用方阵方法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释浓度,用包被液对浓度为 4mg/ml 的复性后的重组 UL55 蛋白进行系列稀释(1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320),包被酶标反应板,每孔包被 100 μ l,每个滴度平行包被两列,将鸭血清(抗 DPV 阳性血清或非免疫鸭阴性血清)按 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320 的稀释度进行系列稀释,羊抗鸭 IgG-HRP 作 1 : 2000 稀释,用间接 ELISA 方法测定,选择阳性血清的 OD_{450nm} 值接近 1.0,阴性血清的 OD_{450nm} 值较小,P/N 值最大的 UL55 蛋白和鸭血清的稀释度为此 ELISA 的抗原抗体反应的最适工作浓度。

[0111] 重组 UL55 蛋白抗原用包被液作系列稀释后,再加 1 : 10-1 : 320 稀释的阳性血清或阴性血清;另加 1 : 2000 稀释的羊抗鸭 IgG-HRP 酶标二抗,加底物显色液,用全自动酶标仪测定 OD_{450nm} 值。纯化抗原包被浓度在 0.4mg/ml ~ 0.0125mg/ml 之间时,阳性血清的稀释度为 1 : 10-1 : 320 时,不同稀释度的抗体的 OD_{450nm} 值见表 1。当 P/N 值最大为 9.667 的时候,由方阵滴定所得的最佳抗原包被浓度为 0.2mg/ml(抗原稀释度为 1 : 20)时,阳性血清的稀释度为 1 : 160。各抗原抗体浓度对应的 P/N 值见表 2。

[0112] 表 1 方阵滴定的 OD_{450nm} 结果

不同稀释度抗体的

Item	抗原稀释度	OD _{450nm}						
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
阳性	1:10	0.66	0.727	0.752	0.684	0.608	0.574	
		0.796	0.786	0.671	0.638	0.513	0.433	
	1:20	0.607	0.754	0.857	0.787	0.725	0.6	
		0.648	0.692	0.655	0.58	0.478	0.366	
	1:40	0.761	0.735	0.659	0.506	0.371	0.269	
		0.629	0.726	0.812	0.663	0.525	0.389	
	1:80	0.566	0.733	0.837	0.761	0.64	0.467	
		0.774	0.781	0.867	0.756	0.494	0.363	
	阴性	1:10	0.475	0.331	0.27	0.214	0.194	0.161
			0.294	0.218	0.187	0.16	0.163	0.161
		1:20	0.453	0.314	0.201	0.118	0.075	0.079
			0.259	0.183	0.106	0.086	0.073	0.082
1:40		0.217	0.141	0.104	0.097	0.092	0.093	
		0.293	0.185	0.111	0.076	0.069	0.065	
1:80		0.371	0.233	0.155	0.119	0.089	0.089	
		0.308	0.204	0.16	0.111	0.092	0.097	

[0113] 表 2 DPV-UL55 表达蛋白最佳包被浓度与血清浓度 (P/N 值) 的确定

[0115]

抗原稀释度

不同稀释度抗体的

		OD _{450nm}					
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
[0115]	1:10	1.389	2.200	2.785	3.196	3.134	3.565
		2.707	3.610	3.588	3.988	3.147	2.689
[0116]	1:20	1.340	2.401	4.264	6.669	9.667	7.595
		2.502	3.781	6.179	6.744	6.548	4.463
	1:40	3.507	5.213	6.337	5.216	4.033	2.892
		2.147	3.924	7.315	8.724	7.609	5.985
	1:80	1.526	3.146	5.400	6.395	7.191	5.247
		2.513	3.829	5.419	6.811	5.370	3.742

[0117] 1.2 酶标二抗最佳稀释度的确定

[0118] 把纯化的重组 UL55 蛋白抗原按 0.2mg/ml 的浓度包被于 ELISA 反应板, 每孔 100 μ l, 再加 1 : 160 稀释的阳性血清或阴性血清。之后将酶标抗体做 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000 系列稀释后进行捕获 ELISA 测定, 同时检测正常细胞培养物替代鸭瘟病毒作阴性对照的 OD_{450nm} 值, 选择 P/N 值最大时酶标抗体浓度作为最适工作浓度。本实施例中的稀释均按照体积比进行稀释。

[0119] 酶标板用包被浓度为 0.2mg/ml 的重组 UL55 蛋白抗原包被, 血清做 1 : 160 稀释, 酶标抗体做系列稀释, 进行间接 ELISA 检测, 结果为各待检血清和酶标二抗浓度下的 P/N 值均大大地大于 2.1。当酶标二抗的稀释度在 1 : 2000, 检测血清浓度 1 : 160 时, P/N 值最大; 因此选择的最佳二抗稀释度为 1 : 2000。

[0120] 1.3 UL55-ELISA 阴阳性临界值的确定及 UL55-ELISA 方法的检测程序

[0121] 取非免疫鸭阴性血清 30 份, 每个样本平行包被 1 次。对重组 UL55 蛋白包被浓度、待检血清和酶标二抗最佳稀释度进行间接 ELISA 测定, 以确定鸭血清在无 DPV 感染时其吸收值范围。同时以 1.0% BSA/PBS 溶液作空白对照。将 30 份血清样品的 OD_{450nm} 值的平均值 (X) 和 3 倍标准方差 (SD) 之和作为阴性血清的上限, 即待检血清样品的 OD_{450nm} 值 > X+3SD 时, 判断为阳性; 否则为阴性。

[0122] 通过对 30 份 DPV 阴性血清进行检测 (表 3), 结果表明, 健康鸭血清 OD 值最高为 0.347, X 值为 0.148, SD 值为 0.061, 临界值 (X+3SD) 为 0.330。即待测样品的 OD 值大于 0.330 为阳性, 小于或等于 0.330 则为阴性。

[0123] 表 3 20 份 DPV 阴性血清检测结果

[0124]

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD _{450nm}	0.326	0.244	0.179	0.167	0.154	0.147	0.137	0.141	0.131	0.125
	0.267	0.19	0.13	0.128	0.117	0.114	0.105	0.115	0.105	0.104
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD _{450nm}	0.115	0.11	0.347	0.247	0.177	0.149	0.132	0.125	0.133	0.111
	0.107	0.123	0.298	0.217	0.147	0.131	0.12	0.118	0.132	0.121
编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD _{450nm}	0.135	0.111	0.11	0.144	0.297	0.201	0.141	0.133	0.114	0.099
	0.127	0.111	0.101	0.134	0.215	0.129	0.085	0.093	0.078	0.057

[0125] 1. 4UL55-ELISA 方法的检测程序

[0126] 根据上述优化结果,间接 ELISA 方法的检测程序如下:(1) 固相抗原的制备:将重组 UL55 蛋白以 0.2mg/ml 浓度包被于酶标板中,100 μ l/孔,置 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜,洗板机洗涤 3 次,5min/次,拍干;加入 100 μ l/孔封闭液,37 $^{\circ}$ C 湿盒封闭 1h,洗板机洗涤 1 次,5min/次,拍干;(2) 一抗结合:将待检血清按 1:160 的体积稀释度稀释后加入酶标板,100 μ l/L,37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1h,洗板机洗涤 3 次,5min/次,拍干;(3) 二抗结合:以酶标二抗稀释液将酶标二抗(羊抗鸭 IgG-HRP)以 1:2000 的体积稀释度稀释后加入,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 45min,洗板机洗涤 3 次,5min/次,拍干;(4) 显色:加入 TMB 底物(色原底物四甲基联苯胺)100 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 避光显色 30min 后,加入 50 μ l/孔 2mol/L 硫酸终止反应;(5) 检测并判断:用酶标仪测 OD_{450nm} 值,当酶标仪测 OD_{450nm} 值,OD_{450nm} 值大于 0.330 为阳性,小于或等于 0.330 则为阴性。同时以 1.0% 的 BSA/PBS 溶液作平行空白对照。

[0127] 2 有益效果评价

[0128] 2.1 敏感性实验

[0129] 将重组 UL55 蛋白按最佳包被浓度进行包被,将 DPV 弱毒疫苗免疫后 14d、中和效价为 1:8 的阳性血清做 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200 共 9 个体积稀释度,其余条件按本实施例条件进行 UL55-ELISA 试验,结果如表 4 所示。当阳性血清稀释到 1:6400 时,通过肉眼观察颜色变化难以判断阴性、阳性结果,但通过酶标仪仍然可以检出,按 1:12800 稀释的阳性血清检测结果低于临界值 0.330,表明此方法能够检出 1:6400 倍稀释的弱毒疫苗免疫后 14d 的阳性血清,具有较强的敏感性。

[0130] 表 4 敏感性试验检测结果

[0131]

	阳性血清的不同稀释度								
	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
阳性血清 OD _{450nm}	0.701	0.691	0.612	0.498	0.416	0.353	0.284	0.241	0.197
P 或 N	+	+	+	+	+	-	-	-	-

[0132] P 为阳性, N 为阴性;

[0133] 2.2 特异性试验结果

[0134] 采用确立的 ELISA 条件,以纯化的 UL55 蛋白包被 ELISA 酶标板,用 DPV 阳性血清、DHV 阳性血清、RA 阳性血清、E. coli 阳性血清、Salmonella 阳性血清、肿头性出血症阳性血清、流感阳性血清各两份进行 UL55-ELISA 特异性试验,结果如表 5 所示。根据临界值判定标准,2 份 DPV 阳性血清 OD_{450nm} 为 0.925、0.896,均远大于 0.330,判为阳性,其余各病毒病或细菌病,鸭血清 OD_{450nm} 值均小于临界值,则均为阴性,表明建立的检测 DPV 抗体的 UL55-ELISA 法具有很好的特异性。

[0135] 表 5 特异性试验结果

[0136]

Item	DPV 阳性血清	肿头性出血症阳性血清	Salmonella 阳性血清	流感病毒阳性血清	DHV 阳性血清	RA 阳性血清	E.coli 阳性血清
OD _{450nm}	0.925	0.32	0.27	0.289	0.14	0.245	0.141
	0.896	0.252	0.267	0.214	0.121	0.248	0.12
P 或 N	+	-	-	-	-	-	-

[0137] P 为阳性, N 为阴性;

[0138] 2.3 阻断性试验

[0139] 将 DPV 阳性血清按最佳稀释度稀释,加入等量最佳稀释度的表达蛋白 UL55,37℃ 作用 1h 后,作为一抗血清按确立的 ELISA 条件进行间接 ELISA,用 DPV 阳性血清同时设对照组,比较结果。计算 $(N-P)/N = (\text{阻断前 OD}_{450\text{nm}} \text{值} - \text{阻断后 OD}_{450\text{nm}} \text{值}) / \text{阻断前 OD}_{450\text{nm}} \text{值}$,若此值大于 0.5,则判为阻断阳性,否则为阴性。结果表明,鸭瘟病毒 UL55 蛋白抗原阻断的阳性血清 OD_{450nm} 值比未被阻断的对照阳性血清明显低,阻断后三份阳性 OD_{450nm} 值平均分别为 0.111、0.120、0.100,对照未阻断阳性血清的 OD_{450nm} 值平均分别为 0.708、0.675、0.637。此时表达蛋白的 (N-P)/N 值也分别为 0.84、0.82、0.84,均大于 0.5,判为阻断阳性,说明表达蛋白 UL24 抗原可以阻断阳性血清,结果见表 6。

[0140] 表 6 阻断性试验结果

	不同 DPV 血清	阻断前 OD _{450nm} 值	阻断后 OD _{450nm} 值	(N-P) / N 值
[0141]	1	0.708	0.111	0.84
	2	0.675	0.120	0.82
	3	0.637	0.100	0.84

[0142] 3、讨论

[0143] 在 ELISA 方法检测过程中, 抗原包被浓度对试验结果影响较大, 若抗原包被浓度高, 由于抗原蛋白分子之间作用力较大而造成蛋白分子的多层化 (stacking effect), 容易被洗涤, 非特异性增加, 若浓度太低, 酶标板表面可能留下未吸附抗原但完全封闭的活性表面, 非特异性也会增加, 因此必须对包被蛋白抗原浓度的进行筛选。此外, 抗体的纯度直接关系到 ELISA 试验的特异性和敏感性, 纯度不高的抗体常常会有超量的与特异性抗原结合的宿主细胞高分子化合物, 可与抗原竞争有限的载体表面位置而减少有效的吸附率, 因此高纯度的抗体蛋白可以提高反应特异性, 但间接 ELISA 方法通常检测血清中的抗体, 血清成分复杂, 生产中通常不逐一对被检血清进行纯化, 只有通过摸索适当的血清稀释倍数, 才能减少非特异结合。本实验方阵法确定血清 (一抗) 的最佳稀释倍数, 从结果来看, 虽血清稀释倍数从 1 : 10 至 1 : 320, 但血清浓度降低, OD_{450nm} 值变小, 根据 OD_{450nm} 值接近 1.0, P/N 最大来判定抗原抗体的最佳稀释度。因此确定的最佳抗原包被浓度为 0.2mg/ml, 血清的稀释倍数为 1 : 160。

[0144] 酶标二抗浓度的高低对试验结果也有较大的影响, 浓度太高, 非特异性结合的机会增多, 可能出现假阳性, 浓度太低, 没有有效结合, 则可能出现假阴性等现象。本实验在优化好的 ELISA 条件下进行间接 ELISA 来确定酶标二抗的最佳稀释倍数。根据 OD_{450nm} 值接近 1.0, P/N 最大来判定最佳稀释度, 确定出酶标二抗的最佳稀释倍数为 1 : 2000。封闭是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程, 抗原包被时所用的浓度较低, 吸收后固相载体表面尚有未被占据的空隙, 封闭就是让大量不相关的蛋白质充填这些空隙, 从而排斥在 ELISA 其后的步骤中干扰物质的再吸附。最常用的封闭剂是 0.5% -1.0% 牛血清白蛋白, 也有用脱脂奶粉或 1.0% 明胶作为封闭剂的。脱脂奶粉也是一种良好的封闭剂, 其最大的特点是价廉, 但由于奶粉的成份复杂, 而且封闭后的载体不易长期保存, 因此在试剂盒的制备中较少应用。本实施例中选用 1.0% 的 BSA 作封闭液, 其成分单一, 封闭效果较好。

[0145] 在 ELISA 判定标准中, 常用两种方法, 一种是用测定样本的原始 OD_{450nm} 值和标准方差来确定临界值。另一种是计算待测样品相对于阴性对照的比值, 通过测定大量样本效价的频次分布来确定临界值和可疑区间。本研究在确定阴阳性判定标准时, 采用了第一种判定标准。根据大量的阴性样品的 OD_{450nm} 值, 采用统计学方法确定阴阳临界值。依据的原理是样本的 OD_{450nm} 值 > 阴性样本 OD_{450nm} 值的平均值 (X) + 3SD 时, 可以在 99.9% 的水平上判为阳性, 根据统计学原则, 大量实验证实了该判断标准是可靠的。此外, Alonso 等报道利用大肠杆菌表达的蛋白作为包被抗原检测田间猪血清时, 可能存在宿主蛋白干扰的问题, 即猪血清中存在的大肠杆菌抗体有可能与表达蛋白中残存的宿主蛋白发生非特异性反应。因此, 在建立 UL55-ELISA 方法的过程中, 选择了鸭源的 E. coli 阳性血清做特异性实验, 结果

表明该 UL55-ELISA 方法与 E. coli 血清无交叉反应性,特异性好。同时又用 DPV 阳性血清、DHV 阳性血清、RA 阳性血清、E. coli 阳性血清、Salmonella 阳性血清、肿头性出血症阳性血清、流感阳性血清做特异性试验,结果都证实了建立的 UL55-ELISA 具有良好的特异性和敏感性,显示了良好的应用前景,也为进一步组装成试剂盒奠定了基础。

[0146] 实施例 3

[0147] 又一个例子,间接 ELISA 方法的检测程序如下:(1) 固相抗原的制备:将重组 UL55 蛋白以 0.2mg/ml 浓度包被于酶标板中,100 μ l/孔,置 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜,洗板机洗涤 3 次,5min/次,拍干;加入 100 μ l/孔封闭液,37 $^{\circ}$ C 湿盒封闭 1h,洗板机洗涤 1 次,5min/次,拍干;(2) 一抗结合:将待检血清按 1 : 20 的体积稀释度稀释后加入酶标板,100 μ l/L,37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1h,洗板机洗涤 3 次,5min/次,拍干;(3) 二抗结合:以酶标二抗稀释液将酶标二抗(羊抗鸭 IgG-HRP)以 1 : 1000 的体积稀释度稀释后加入,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 45min,洗板机洗涤 3 次,5min/次,拍干;(4) 显色:加入 TMB 底物(色原底物四甲基联苯胺)100 μ l/孔,25 $^{\circ}$ C 避光显色 30min 后,加入 50 μ l/孔 2mol/L 硫酸终止反应;(5) 检测并判断:用酶标仪测 OD_{450nm} 值,当酶标仪测 OD_{450nm} 值,OD_{450nm} 值大于 0.330 为阳性,小于或等于 0.330 则为阴性。同时以 1.0% 的 BSA/PBS 溶液作平行空白对照。

[0148] 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

SEQUENCE LISTING

<110> 四川农业大学实验动物工程技术中心

<120> 一种基于重组 UL55 蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 561

<212> DNA

<213> DPV UL55

<400> 1

atggccgacg cgaaggcggc aatagattct ctccggaggcg agacttgtgt aaggactatg 60

ccgcgcgtaa gtcgcategt gacgccatat gcgatagaga tgttttacat gccaagaag 120

aaggaccact gtgttacacc aagaccagag gttgttctag agagcgcgtc gttttttgaa 180

cagcgtcttt tttcaatgaa tatacaatgc aatatgaaa cagaatcaca tatattcttc 240

[0002]

tgcgggctca ttttatgcaa taaagaagag ccaagcgtcg gggacgtgaa acgtctttgc 300
 agagttttca acgatccgat ggccgctgcc ggaatacgta cggagcatcg tctatgcaac 360
 gcgccatatt tcgcatgtgt acaaacggat tcttcgatag atgaaccgga agtgctgatc 420
 ataactggcc ttggatatca ttgtcattgc aaagaacccat tttcaatgag ttgttggcag 480
 ggggtcgtat cggcatcggc tagagccgct gcattatgta ccgaaatcgc gaaacgtgga 540
 attcacaag ctaatgtatg a 561

- <210> 2
- <211> 186
- <212> PRT
- <213> DPV UL55

- <400> 2

Met Ala Asp Ala Lys Ala Val Ile Asp Ser Leu Gly Gly Glu Thr Cys

1 5 10 15

Val Arg Thr Met Pro Arg Val Ser Arg Ile Val Thr Pro Tyr Ala Ile

[0003]

Thr Asp Ser Ser Ile Asp Glu Pro Glu Val Leu Ile Ile Thr Gly Leu

130

135

140

Gly Tyr His Cys His Cys Lys Glu Pro Phe Ser Met Ser Cys Trp Gln

145

150

155

160

Gly Val Val Ser Ala Ser Ala Arg Ala Ala Ala Leu Cys Thr Glu Ile

165

170

175

Arg Lys Arg Gly Ile His Lys Ala Asn Val

180

185

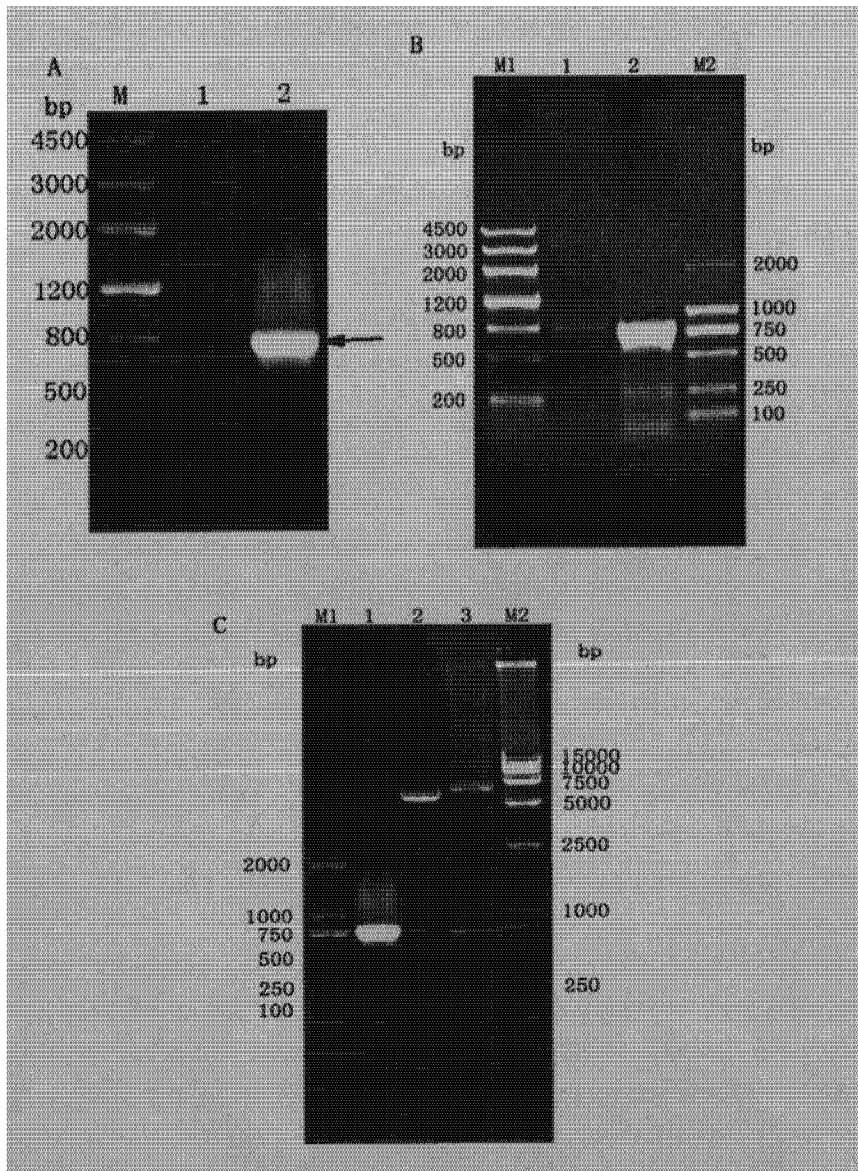


图 1

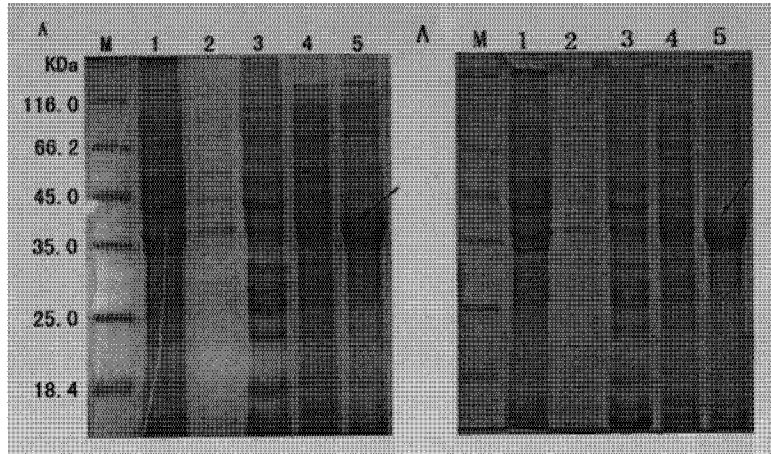


图 2

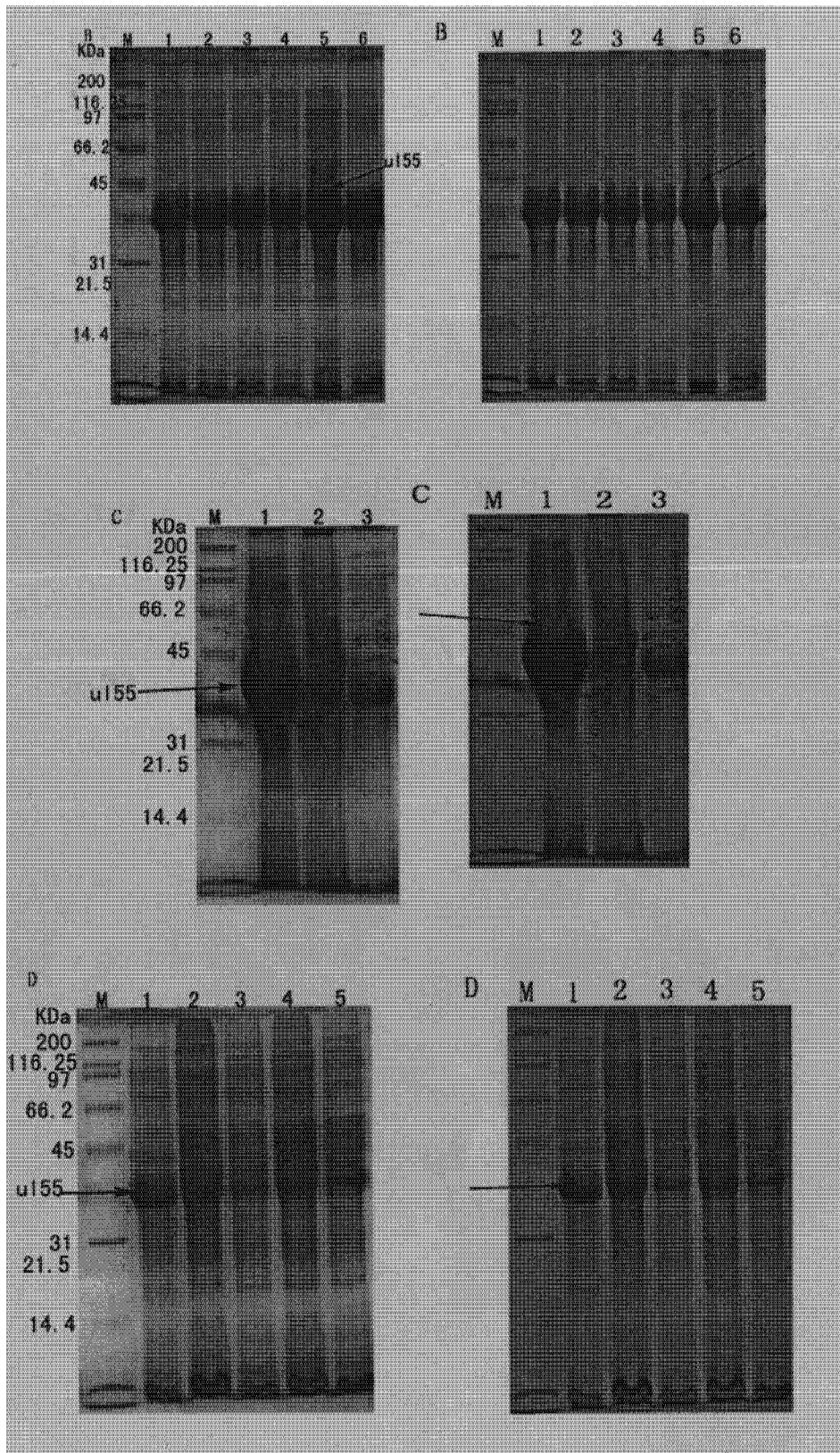


图 2

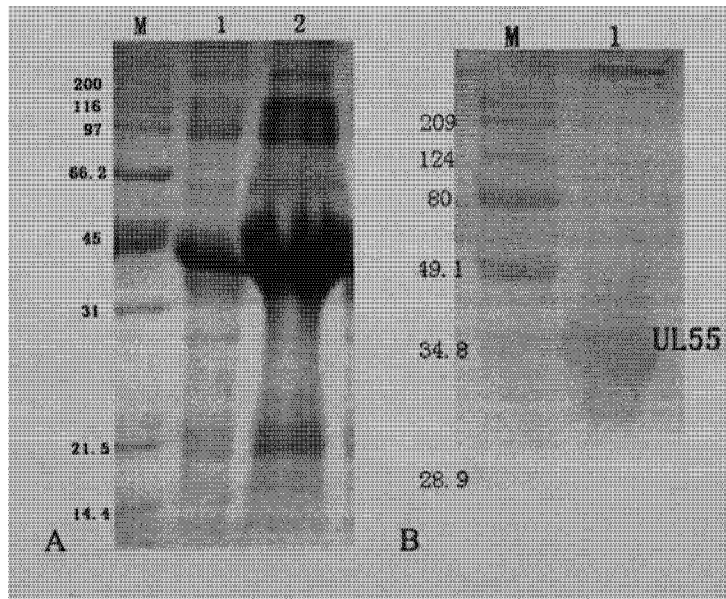


图 3

专利名称(译)	一种基于重组UL55蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法		
公开(公告)号	CN102183658A	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN201110047062.4	申请日	2011-02-28
[标]发明人	程安春 吴英 汪铭书 陈孝跃		
发明人	程安春 吴英 汪铭书 陈孝跃		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
其他公开文献	CN102183658B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及动物医学领域，特别涉及用于检测鸭瘟病毒抗体的方法，具体包括固相抗原的制备、一抗结合、二抗结合、显色及检测并判定等步骤，本方法是基于纯化的重组UL55蛋白建立的间接ELISA法，其特异性好，对鸭病毒性肝炎病毒(DHV)、鸭疫里默氏菌(RA)、鸭大肠杆菌(E. coli)、鸭源沙门氏菌(Salmonella)、鸭肿头性出血症病毒和鸭源流感病毒的阳性血清进行检测，结果均为阴性；该方法的对酶标板内或板间重复试验显示变异系数均小于10%，能检出经1:6400倍稀释的DPV弱毒疫苗免疫鸭的阳性血清。

