



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110514830 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201910804785.0

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

申请人 尼沃诺斯(苏州)生物工程有限公司

(72)发明人 朱传刚 周志平 冒丽 刘冀
江嘉欣 纪荣毅 沈元曦

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

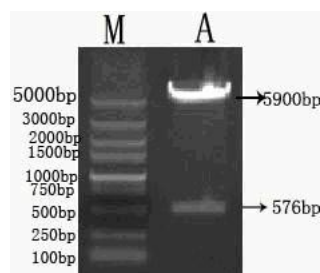
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及ELISA检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及ELISA检测试剂盒,所述蛋白为GE蛋白的核心表位,构建的gE表位原核表达的重组质粒转入B121后获得了高效表达,同时由于重组蛋白连接有6个His的标签,可以通过镍柱进行亲和层析,重组蛋白大小适中,又是疫苗缺失部分,因此通过间接ELISA或胶体金免疫层析试纸条法即可直接检测猪体内是否存在相关抗体,即获得猪场伪狂犬病的筛查。检测时所需的标本量极小,不需要特殊仪器,肉眼直接判读结果,且检测简便快速,特异性强,灵敏度高,准确可靠,成本低,应用广泛。



1. 一种包括伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白的ELISA试剂盒,所述试剂盒中包括:伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白、封闭液(5%脱脂奶粉),酶标二抗(HRP标记的兔抗羊Ig G),PBST,显色液(TMB底物液)、终止液(2 mol/L硫酸)。

2. 一种以伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白作为检测抗原的间接ELISA方法,所述方法为:采用包被液将重组抗原稀释至4.0 μ g/ml、2.0 μ g/ml、1.0 μ g/ml、0.5 μ g/ml和0.25 μ g/ml,100 μ l/孔包被于96孔板上,2~8 $^{\circ}$ C包被过夜;PBST洗涤三次,加入用PBS(PH7.3)稀释的5%的脱脂奶粉溶液封闭,300 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2小时;PBST洗涤三次,加入1:10—1:1000稀释的猪伪狂犬病阳性血清和阴性血清,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1小时;PBST洗涤三次,分别加入1:2000倍PBST稀释的HRP标记的重组链球菌蛋白G,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟;PBST洗涤三次,加入TMB进行显色,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C反应5分钟左右;加入2mol/L H₂SO₄终止反应,50 μ l/孔,读取OD₄₅₀,计算P/N值,以P/N值 $\geq$ 2.1的血清判为阳性,以P/N值<2.1的血清判为阴性。

3. 如权利要求2所述的间接ELISA方法,其中,重组抗原最佳包被浓度为1.0 μ g/ml,最佳封闭液为PBS稀释的5%的脱脂奶粉溶液,阳性血清和阴性血清最适合稀释比为1:100。

4. 如权利要求1所述的一种包括伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白的ELISA试剂盒,其中所述的所述重组蛋白GE的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

一种伪狂犬病病毒gE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及动物病毒学与免疫学检测技术领域,更具体涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病抗体的病毒gE蛋白的构建,同时还涉及一种利用上述蛋白制备免疫胶体金试纸的方法,还涉及一种用于检测猪血清中伪狂犬病的病毒gE蛋白的免疫胶体金试纸的用途。

背景技术

[0002] 伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus, PRV)是引起牛、羊、猪、犬和猫等多种家畜和野生动物发热、奇痒(除猪外)和急性脑脊髓炎等为主要症状的疱疹病毒,由该病毒引起的疾病症状似狂犬病,故称伪狂犬病。猪是PRV的贮存宿主和传染源,健康猪与患猪、带毒猪直接接触可感染该病。主要引起母猪繁殖障碍、流产、产木乃伊胎、死胎和产弱仔,初生仔猪表现为腹泻及神经症状,感染率和死亡率高达100%,给养猪业造成了严重的经济损失[1]。病毒可以通过体液、精液、乳汁、粪便等排泄物传播,也可以通过空气传播,通常可引起猪场的季节性爆发(Lisa E. Pomeranz et al., 2005)。

该病没有明显的季节性,一年四季均可发生,但以冬春两季多发,病毒首先在猪呼吸道和鼻腔粘膜进行复制(Mask, M. et al., 1965),而后进入神经系统,从而引发呼吸系统与神经系统症状。研究表明,PRV基因组为大小约为150kb的双股线状DNA,可以编码70~100种病毒蛋白,gE为伪狂犬病病毒(PRV)非必需基因,gE主要抗原结构域位于gE基因第52~238氨基酸残基之间,gE基因的缺失可以使PRV的毒力大大降低,同时gE糖蛋白还能影响PRV在猪体内的组织趋向性,从而有助于PRV向神经系统扩散。2011年以来,许多使用基因缺失活疫苗的规模化猪场出现了PR流行,主要表现为猪群gE抗体阳性率显著升高。因此,gE糖蛋白可作为PRV主要诊断抗原。由于一般疫苗均是gE基因缺失株,疫苗免疫的猪不会产生针对gE蛋白的抗体故通过检测gE抗体可以区分猪场是否感染了或感染过PRV病毒。另外,gE蛋白能促进病毒跨神经元传播并进入中枢神经系统并扩散,相比而言gE基因缺失苗更加安全。目前,联合使用gE基因缺失疫苗株,并通过gE抗体检测对感染和免疫的猪进行区别诊断是PRV清除计划的有效措施。

[0003] 在中国,猪伪狂犬病病毒gE基因缺失疫苗也正在广泛应用,gE基因缺失疫苗免疫接种后,在被免疫的猪血清中不能检测到针对gE蛋白的抗体,为利用血清进行PRV野生毒株感染猪和gE基因缺失疫苗免疫接种猪进行鉴别诊断提供了条件,这也是猪伪狂犬病净化 and 根除计划的基础。因此,在净化 and 根除计划中,监测和检测猪血清中的伪狂犬病病毒gE蛋白抗体是非常重要的一个环节。对已经免疫接种过的猪进行血清抗体检测,如果检测到gE蛋白抗体,说明猪已经感染了猪伪狂犬病病毒的野生毒株,可将感染的猪只淘汰,彻底净化 and 根除猪伪狂犬病。

[0004] 目前国内检测猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体一般采用酶联免疫吸附试验(ELISA),但是由于这种检测方法的特殊性,必须在实验室中完成,所用时间长,费用高。因此建立一种快速、方便、特异性高、灵敏度强、现场可用的检测方法很有优势。

发明内容

[0005] 本发明主要解决的技术问题是提供一种快速、高灵敏的免疫检测产品及方法,实现高效、高密度的免疫检测。

[0006] 我们发现gE蛋白N端的第33-100位氨基酸区段具有高度的抗原性和免疫原性,这一段至少存在6个抗原表位,其中5个都位于N端胞外区,这个区段位于52-123位氨基酸残基;另一段抗原表位集中区位于78-238位氨基酸残基之间。从理论上分析,这段胞外区和抗原表位集中区更有可能刺激机体产生免疫反应,因而也是机体产生特异性抗体的针对区段,更进一步,我们认为非连续性抗原表位,即构象依赖型表位对于诊断的价值有限,而连续性抗原表位更适合作为诊断抗原检测特异性抗体。为此,我们选择gE蛋白N端的连续性抗原表位,即52-238位的氨基酸序列,根据原核表达系统的细菌密码子的偏向性重构这段蛋白的基因序列,构建一个新型的碱基序列,通过原核细菌表达具有相同氨基酸序列的gE蛋白的N端抗原表位。为增加表达重组蛋白的可溶性,我们选择pET-32a (+) 质粒构建重组表达质粒,获得了高效表达,且表达的重组蛋白存在于上清,方便纯化,经过亲和层析纯化的重组蛋白作为诊断抗原建立的检测方法成本较低,检测方法简便。特别是集中了gE抗原主要的抗原表位作为诊断抗原,检测的灵敏性和特异性都较完全的gE蛋白更好。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种具有抗原性的伪狂犬病毒GE基因,应用 DNASTAR软件分析重组序列所表达的氨基酸序列、理论分子量及等电点,添加5' BamHI和3' HindIII,后将优化的基因克隆至表达载体pET-32a (+),得到重组质粒,命名为pET-32a (+)-rGE,GE的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 进一步的,本发明提供上述GE蛋白表位在制备诊断、预防或治疗伪狂犬病毒诊断试剂或药物中的应用。

[0009] 上述方法中,融合蛋白基因的表达、纯化可采用本领域常规用于蛋白表达纯化的方法,例如将融合蛋白基因克隆入表达载体,将表达载体和/或共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白,经破碎、纯化后得到融合蛋白。其中,本发明对表达载体、共表达载体、表达宿主的种类和类别不作限定,可选用本领域常规用于遗传修饰的载体和宿主,具体的,表达载体可为pET-28、pET-32、pET-15或pET-11的等,共表达载体可为pCDFDuet-1等;表达宿主可选自大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、棒状杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母或哺乳动物细胞。

[0010] 本发明同时提供一种用于免疫分析的产品,所述产品包括本发明所述的融合蛋白。

[0011] 进一步的,所述产品为一种包括伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白的ELISA试剂盒,所述试剂盒中包括:伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白、封闭液(5%脱脂奶粉),酶标二抗(HRP标记的兔抗羊Ig G),PBST,显色液(TMB底物液)、终止液(2 mol/L硫酸)。

附图说明

[0012] 图1重组质粒的PCR鉴定电泳图,1 M:DNA分子质量标准(DL2000);A:重组pET-32a (+)-rGE基因PCR产物

图2重组质粒的双酶切鉴定电泳图,M:DNA分子质量标准(DL5000);A:双酶切产物;

图3 GE蛋白的诱导表达时相,M:蛋白分子质量标准;1:未诱导细菌裂解产物;2-7诱导1h,2h,3h,4h,6h,8h后 的细菌裂解产物;

图4 GE蛋白可溶性鉴定结果,M:蛋白分子质量标准;A:重组pET-28a(+)-rGE/BL21(DE3)转染菌后的上清B:重组pET-28a(+)-rGE/BL21(DE3)转染菌后的裂解于8M尿素的沉淀;

图5 GE蛋白免疫原性Western Blotting结果,M:蛋白分子质量标准;A:重组蛋白。

具体实施方式

[0013] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0014] 实施例1伪狂犬病毒GE重组基因的构建表达及活性鉴定

根据GeneBank中给出的已公布的猪瘟病毒的GE糖蛋白主要抗原结构域基因序列,找出主要抗原结构域A区、B区、C区、D区,得到GE基因序列,最后3'端加入TAA的终止序列。应用DNASTAR软件分析重组序列所表达的氨基酸序列、理论分子量及等电点,基因序列由苏州金唯智生物科技有限公司进行优化并合成,添加5' BamHI和3' HindIII,后将优化的基因克隆至表达载体pET-32a(+),得到重组质粒,命名为pET-32a(+)-rGE,GE的基因序列如SEQ ID NO.1所示。

[0015] 将重组质粒干粉按4ug中加入200ul无菌水,之后转入BL21(DE3),42℃水浴45s转化,加入不含抗生素的LB培养基上,37℃,250rpm孵育45min,然后将其涂布在含Amp^r抗性LB平板上37℃培养12h后,挑取若干阳性克隆菌落置于含Amp^r抗性的LB培养基中,37℃震荡培养12h。

[0016] 将转化后的重组质粒菌液进行PCR反应,表达载体pET-32a(+)的上游引物为S.tag/TRxfor,下游引物为T7-Terminatoy,使用T7通用引物,反应体系如下:

组分	所需用量 (ul)
pET-32a(+)-rGE/BL21(DE3)菌液	1
上游引物 (10 uM)	1
下游引物 (10uM)	1
	7
ddH ₂ O	50
Total	

将各组混匀后,稍离心,置于PCR仪中进行以下反应:

温度	反应时间
94℃	5min
92℃	30cycles } 30s
55℃	
72℃	
72℃	
4℃	30s
	90s
	10min

1%琼脂糖凝胶鉴定(图1),并送去测序。

[0017] 将测序正确的PCR菌液按Axygen质粒小量提取试剂盒抽提重组质粒后,进行双酶

切,酶切体系如下:

组分	所需用量 (ul)
pET-32a(+)-GE	41
10×Q C•G• Buffer	5
BamH I	2
HindIII	2
Total	50

将双酶切体系混匀后于37℃水浴锅中反应30min.,1%琼脂糖进行鉴定(图2)。

[0018] PCR目的片段大小约为1300bp(如图1); BamHI和HindIII双酶切鉴定得到5900bp(载体片段)和576bp(目的基因片段)(如图2),与预期相符。

[0019] 实施例2 蛋白的制备和纯化

(一) 重组质粒的表达

(1) 将测序正确的含有重组质粒pET-32a(+)-GE的宿主菌BL21(DE3)接种于250 mL含50 μg/mL Amp⁺的LB液体培养基中,置于37℃培养箱中,250 r/min振荡培养至细菌生长对数期(OD₆₀₀约为0.6)。

[0020] (2) 加入终浓度为1mmol/L的IPTG溶液,诱导8 h,分别于诱导前、诱导后第1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8h时,各取菌液1 mL,进行SDS-PAGE电泳鉴定,观察最佳诱导表达时间。

[0021] (3) 于诱导4 h后,将菌液4℃,12 000 r/min离心15min,收集菌体沉淀。

[0022] (4) 菌体沉淀用12 mL 1×PBS重悬,反复冻融3次后,冰浴超声破碎20 min(超声2 s,间隔9.9 s)。

[0023] (5) 将超声后的菌液4℃,12 000 r/min离心15 min,收集上清与沉淀,沉淀溶于10 mL 8 M尿素中,然后同样条件离心收集上清。

[0024] (6) 分别取超声后上清和沉淀溶解上清,用SDS-PAGE鉴定重组蛋白表达形式。(图3)。

[0025] (二) 重组蛋白的纯化

根据SDS-PAGE鉴定结果分析重组蛋白表达形式,采用His•resin Bind树脂柱层析的方法纯化目的蛋白:

(1) 装脂:取一个空柱,加入3 mL树脂进行预装柱,待保存液降至树脂表明时,依次用3倍树脂体积双蒸水清洗,5倍树脂体积1×charge Buffer进行树脂离子化,3倍树脂体积1×binding buffer平衡色谱柱。

[0026] (2) 柱层析纯化:

①待1×binding buffer降至树脂表面时,加入含重组蛋白的溶液,并保留过柱后的溶液;

②加入10倍树脂体积1×binding buffer,并保留过柱后的溶液;

③加入6倍树脂体积1×washing buffer,洗脱未能结合到树脂上的杂蛋白,并保留洗脱液;

④加入6倍树脂体积1×Elute buffer,将结合到树脂上的目的蛋白洗脱下来,洗脱液依次保留在1.5 mL的EP管中;

⑤加入6倍树脂体积的1×Strip buffer,洗涤树脂;

⑥将树脂保存于适量的20%乙醇中;

(3) 用SDS-PAGE鉴定重组蛋白纯化效果。

[0027] 经SDS-PAGE分析显示,pET-32a (+)-rGE在大肠杆菌BL21 (DE3) 中经IPTG诱导,得到大量表达。在约37kDa处有清晰的目的条带,与预期的重组蛋白的分子质量大小相符(见图3)。经IPTG诱导1h,2h,3h,4h,6h,8h后,在3h后表达量达到最高,但表达8h后,表达量有所下降,而未经诱导的菌液(0h)未出现目的蛋白条带(图3),故取诱导表达3h的菌液进行可溶性表达鉴定。SDS-PAGE分析显示目的蛋白为包涵体表达,且在8M尿素中包涵体裂解(图4)。

[0028] (三) 重组蛋白的复性

将纯化后的重组蛋白用梯度尿素溶液进行透析复性(依次为含5 mol/L、4 mol/L、3 mol/L、2 mol/L、1 mol/L尿素的 PBS溶液及1×PBS),各个浓度溶液低温透析2 h。重组蛋白rGE的包涵体经过纯化后,得到一条清晰的目的条带,大小约为37kDa,与目的蛋白大小一致,经尿素梯度逐步透析,完成重组蛋白的复性。

[0029] (四) 蛋白浓度的测定

复性后的蛋白用TaKaRa BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度,按操作说明进行:

工作液的配制:按照BCA Reagent A: BCA Reagent B =100:1的比例混合后配制成工作液

BSA标准品曲线制备:BSA标准品溶液的稀释,2 mg/mL BSA Standard按24ul、18ul、12ul、9ul、6ul、3ul、2ul、0ul加入孔板中,用1×PBS将各孔板补足至终体积为25ul后,加入200ul工作液,立即混匀;

检测蛋白的测定:透析后的蛋白在孔板中加入25ul,加入200ul工作液,立即混匀;

37℃水浴槽中反应30分钟后,冷却至室温。使用酶标仪测定562nm处的吸光值。

[0030] 绘制标准曲线,分析待测蛋白的浓度。

[0031] 实施例3重组蛋白的免疫原性鉴定

按以下步骤检测重组蛋白的免疫原性:

(1) 将纯化透析后重组蛋白进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后,在冰浴条件下,用260 mA电流转移1h,将重组蛋白电转移至硝酸纤维素膜上;

(2) 硝酸纤维素膜的封闭:称取5 g脱脂奶粉溶于100 mL的1×PBST中,将硝酸纤维素膜浸泡在溶液中,37℃封闭2 h;

(3) 一抗孵育:封闭结束后,用PBST洗掉未结合的脱脂奶粉(每次10 min,4次),然后以PRV Ab (+) (1:100稀释)为一抗,37℃孵育2 h;

(4) 二抗孵育:用PBST洗掉未结合的一抗(每次10 min,4次),以羊抗猪IgG(1:3000稀释)为二抗,37℃孵育1 h;

(5) 显色:用PBST洗掉未结合的二抗(每次10 min,4次),使用沉淀型HRP-DAB显色试剂盒显色,当有清晰的蛋白条带出现时,立即使用清水终止显色,证实获得的重组蛋白具有较好的免疫原性(图5)。

[0032] 实施例4 血清检测ELISA的建立

采用包被液将重组抗原稀释至4.0μg/ml、2.0μg/ml、1.0μg/ml、0.5μg/ml和0.25μg/ml,100μl/孔包被于96孔板上,2~8℃包被过夜;PBST洗涤三次,加入用PBS(PH7.3)稀释的5%的脱脂奶粉溶液封闭,300μl/孔,37℃封闭2小时;PBST洗涤三次,加入1:10—1:1000稀释的猪伪狂犬病阳性血清和阴性血清,100μl/孔,37℃孵育1小时;PBST洗涤三次,分别加入1:2000

倍PBST稀释的HRP标记的重组链球菌蛋白G,100 μ l/孔,37℃孵育30分钟;PBST洗涤三次,加入TMB进行显色,100 μ l/孔,37℃反应5分钟左右;加入2mol/L H₂SO₄终止反应,50 μ l/孔,读取OD450,计算P/N值,以P/N值 $\geq$ 2.1的血清判为阳性,以P/N值<2.1的血清判为阴性。

[0033] 通过上述实验获得最佳检测条件:重组抗原最佳包被浓度为1.0 μ g/ml,最佳封闭液为PBS稀释的5%的脱脂奶粉溶液,阳性血清和阴性血清最适合稀释比为1:100。

<110>中国农业科学院上海兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心),
尼沃诺斯(苏州)生物工程有限公司

<120>一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及ELISA检测试剂盒

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 498

<212> DNA

<213> GE蛋白全长序列

<400>GGATCCGGTCTGACCACCACCTGGAAAGAATATAGCCACGACCTGCAGCTGAACGATGGTGGTGGTG
GTACCAATCCGAGCACCGAAGAAATGGGCGACGATTTTGGCTTTGGCCTGTGCCCCGTTTGATACCAGCCCGGTGGTG
AAAGGCAAAGGCAGCGTGAGTCCGACCACCCTGGGTGGTCGAGAAAAACCGTTTCCGGGTAGCACCACCGTGGAAGG
TGGTACCTGCGTGAAAGGCGAACCGGTGGTGTATACCGGTGGTCAGGTGGGTAGCTTTAATGAACCGGATGGCCTGC
CGCATTATGGCGGTTACCGCATCGTGGATAGCACCGATTGCAATCGCGGCAGCGAAGGCAGCGGTGGTAAAGTGCAT
GCAAGCGATGAACGCCTGGGTCCGATGCCGTGTCGTCCGAAAGAAATCGTGAGCAGCGCAGGTCCGGTGCGCAAAGG
CAGCAAGAACAAGTACTACGAGCCGCGCGATAGCTATTAAGCTT

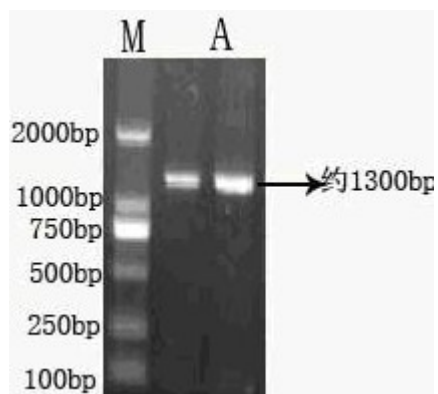


图1

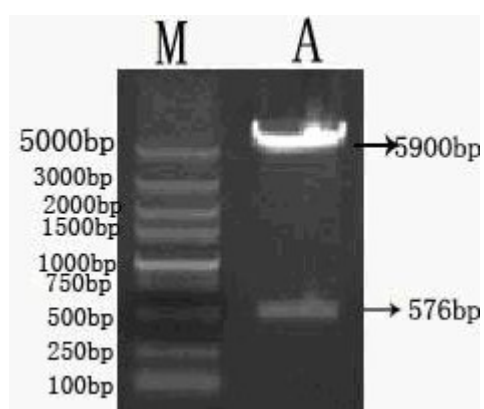


图2

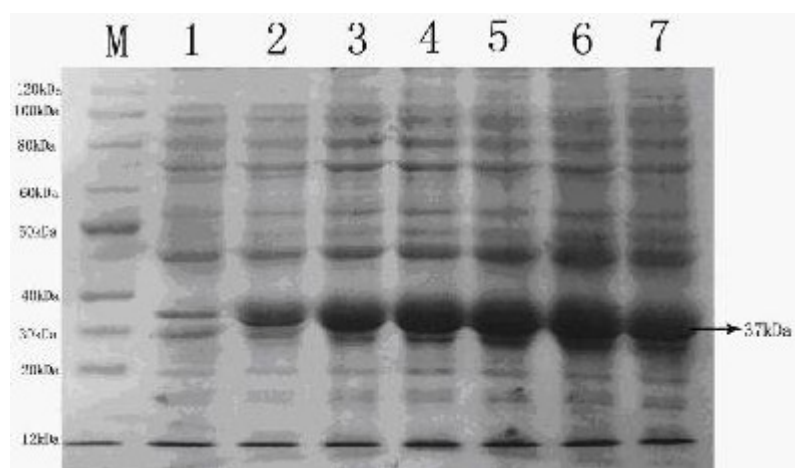


图3

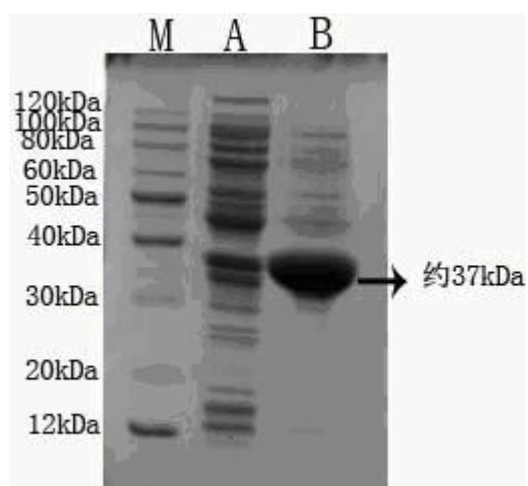


图4

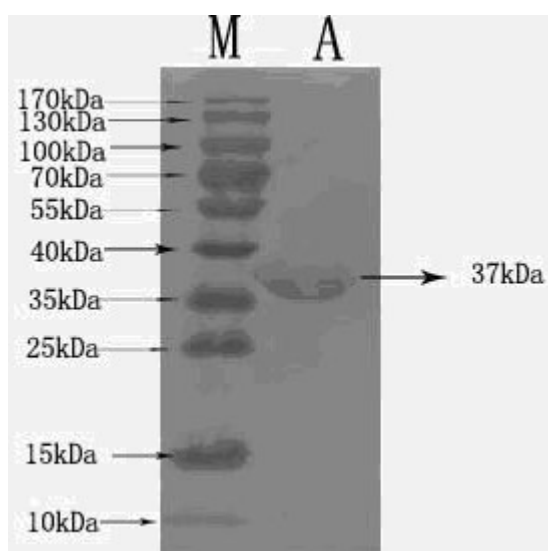


图5

专利名称(译)	一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110514830A	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201910804785.0	申请日	2019-08-28
[标]发明人	朱传刚 周志平 刘冀 江嘉欣 沈元曦		
发明人	朱传刚 周志平 冒丽 刘冀 江嘉欣 纪荣毅 沈元曦		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/541		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/541 G01N33/56983 G01N33/581 G01N33/686		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种伪狂犬病病毒GE基因主要抗原表位区域重组蛋白制备及ELISA检测试剂盒，所述蛋白为GE蛋白的核心表位，构建的gE表位原核表达的重组质粒转入BI21后获得了高效表达，同时由于重组蛋白连接有6个His的标签，可以通过镍柱进行亲和层析，重组蛋白大小适中，又是疫苗缺失部分，因此通过间接ELISA或胶体金免疫层析试纸条法即可直接检测猪体内是否存在相关抗体，即获得猪场伪狂犬病的筛查。检测时所需的标本量极小，不需要特殊仪器，肉眼直接判读结果，且检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低，应用广泛。

