



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102093999 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 15

(21) 申请号 201010587212. 6

(22) 申请日 2010. 12. 14

(71) 申请人 山东省农业科学院家禽研究所
地址 250023 山东省济南市天桥区交校路 1 号

(72) 发明人 亓丽红 黄兵 宋敏训 艾武
王莉莉 刘涛 秦卓明

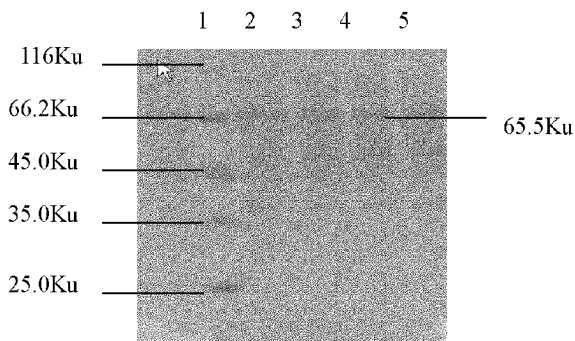
(74) 专利代理机构 济南诚智商标专利事务所有
限公司 37105
代理人 王汝银

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006. 01)
G01N 33/569 (2006. 01)
G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页
序列表 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称
一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒

(57) 摘要
本发明公开了一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒。该试剂盒含有 IBV-N 重组蛋白作为抗原包被的 ELISA 板。IBV-N 重组蛋白通过以下方法获得：根据 IBV-N 基因序列，设计一对特异引物，然后通过 RT-PCR 方法对 IBV 的 N 基因进行扩增，将 N 基因定向插入到 pET-32a(+) 表达载体，筛选获得阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N，并将该质粒转化置 BL21 感受态细胞，再经 ITPG 诱导表达，获得 IBV-N 重组蛋白。该试剂盒成本低廉、操作简便、快速，尤其适合批量样品的检测，大大提高了鸡传染性支气管炎血清学诊断的效率。



1. IBV-N 重组蛋白,其特征是,通过以下制备方法获得:

1) 根据 GenBank 中已登录的 IBV-N 基因序列,设计一对特异引物
上游引物为 5' -CCGATATCATGGCAAGCGGTAAAGCA-3',
下游引物为 5' -CCGTCGACACTCAAAGTTCATTCTCTCC-3'
扩增片段大小为 1230bp;

2) 通过 RT-PCR 方法对 IBV 的 N 基因进行扩增;以 EcoR V 和 SaI I 同时对 IBV-N 基因 RT-PCR 产物和 pET-32a(+) 载体进行酶切,回收目的片段,用 T4DNA 连接酶将二者进行连接,16°C 过夜,次日将连接产物转化感受态细胞 BL21,37°C 温箱培养 16-20h;挑取单菌落扩大培养,提取质粒,用 EcoRV、SaI I 进行双酶切鉴定;将阳性重组质粒测序,鉴定正确后获得阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N;

3) 将阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N 及空白载体 pET-32a(+) 分别转化 BL21 感受态细胞,于 37°C 培养,待 OD_{600nm} 值达到 0.5~0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L 进行诱导表达,收集诱导表达后 4h 的菌体,超声波破碎,离心后取上清进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定;电泳结束后取下凝胶,先用双蒸水洗涤,然后浸入 4°C 预冷的 250mmol/L 的 KCl 溶液中显色 5~10min,最后用双蒸水洗涤;将目的蛋白条带切下,PBS 洗涤 2 次,用研钵将其磨碎,反复冻融 3 次,8000r/min 离心 10min,吸取上清,SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定。

2. 一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,包括权利要求 1 所述的 IBV-N 重组蛋白作为抗原包被的 ELISA 板。

3. 如权利要求 2 所述的检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,所述 ELISA 板的制备为:用 pH8.5 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液作包被液,将鸡传染性支气管炎 N 重组蛋白稀释为 20 μg/mL,按 100 μL/孔加入 ELISA 反应板中,37°C 封闭 2h,4°C 包被过夜,拍干,用 1%牛血清白蛋白 37°C 封闭 2h,以含 0.05%吐温-20 pH7.4 的 PBS 洗涤,拍干,再加入 20%蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3h。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,还包括样品稀释液、10× 浓缩洗涤液、酶结合物工作液、显色液 A、显色液 B、终止液、阳性对照和阴性对照。

5. 如权利要求 4 所述的检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,所述样品稀释液为含 0.05%吐温-20 的 0.05mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述 10× 浓缩洗液为含 0.5%吐温-20 的 0.1mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述酶结合物工作液为 Sigma 公司生产的 HRP-兔抗鸡 IgG,作 1:3000 稀释的稀释液;所述显色液 A 为 0.2mg/L 的四甲基联苯胺溶液,显色液 B 为含过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;所述终止液为 2mol/L 硫酸溶液;所述阳性对照为经鸡传染性支气管炎重组蛋白免疫获得的标准阳性血清,其 OD_{450nm} ≥ 1.0,然后加入 1000U/mL 的青链霉素,经无菌过滤后获得;阴性对照为经筛选获得的 SPF 鸡标准阴性血清,其 OD_{450nm} ≤ 0.200,加入 1000U/mL 的青链霉素,经无菌过滤后获得。

6. 如权利要求 5 所述的检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,所述试剂盒包括以下组分:IBV-N 重组蛋白作为抗原包被的 ELISA 板:5 块;样品稀释液:200mL;10× 浓缩洗涤液:400mL;酶结合物工作液:50mL;显色液 A:50mL;显色液 B:

50mL ;终止液 :60mL ;阳性对照 :2mL ;阴性对照 :2mL。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒的使用方法,其特征是,将待检血清用样品稀释液作 1 : 200 稀释,按 100 μ L/ 孔加入抗体检测板中,同时设阴性对照、阳性对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min ;弃去反应孔中的液体,每孔加洗涤液 300 μ L,洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干 ;每孔加 100 μ L 的酶结合物工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min ;洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干 ;依次加入 50 μ L 显色液 A 和 50 μ L 显色液 B,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min ;加 50 μ L 终止液,用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值 ;以待检样本 OD450nm 值与标准阴性 OD450nm 值的比值大于或等于 2.1,且待检样本 OD450nm 值大于 0.297 判为阳性。

一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术,具体涉及一种检测 IBV 抗体的间接 ELISA 试剂盒,专用于鸡传染性支气管炎病毒抗体的快速检测。

背景技术

[0002] 鸡传染性支气管炎是由传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus, IBV) 引起的一种急性高度接触性传染病。IBV 主要侵害雏鸡的呼吸道、消化道、生殖系统及肾, IBV 对不同日龄的鸡产生不同程度的危害。IBV 往往引起混合感染 (如新城疫、慢性呼吸道病等),并可继发细菌性疾病如大肠杆菌病、沙门氏菌病等,从而加重对鸡群的危害。因该病引起禽产品质量下降所造成的损失,通常比死亡造成的损失还大,国内养鸡业每年因该病导致直接经济损失达数亿元人民币。目前,该病呈世界分布,是危害世界养禽业的重大传染病之一。

[0003] 目前鸡传染性支气管炎血清学诊断方法有:酶联免疫吸附试验 (ELISA)、琼脂扩散试验、血凝抑制试验、荧光抗体技术、中和试验及胶体金技术等。其中琼脂扩散试验敏感性、稳定性差;胶体金技术的敏感度也不高;IBV 未经处理前没有血凝性,而此血凝抑制抗原的制备工艺复杂;荧光抗体技术和中和试验操作复杂,费时费力,不易做快速诊断。酶联免疫吸附试验:通过包被在微量滴定板上的 IBV 抗原可被抗体捕捉,加入酶标抗抗体结合物和底物孵育后,样品中如有 IBV 抗原存在,则表现出阳性的光密度。该法快速、易操作,较容易进行大规模检测,非常适用检测较多数量的样品。

[0004] IBV 核衣壳蛋白又称核蛋白 (N 蛋白),具有很好的抗原性和免疫原性,在细胞免疫和体液免疫中起着重要作用。体外表达的 N 蛋白能引起免疫应答,能使免疫鸡增速产生抗 IBV 抗体,可诱导鸡对 IBV 气管感染的免疫保护作用。用 N 蛋白免疫鸡后,可激活 T 辅助细胞,同时可增强 B 淋巴细胞产生抗体的能力。加上 N 蛋白的具有高保守性,这使得 N 蛋白及其抗体在 IBV 诊断方面显示出优势。核蛋白占病毒总蛋白量大,而且核蛋白为非糖基化蛋白,由于它能检测群抗体应答,可以作为 IBV 群特异性诊断抗原。

发明内容

[0005] 针对上述生产中实际存在的问题,发明人经过多次实验,研制了一种检测 IBV 抗体的间接 ELISA 试剂盒,该试剂盒效价稳定,便于存放,可以作为 IBV 群特异性诊断抗原。

[0006] 本发明检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒的包被抗原 (IBV-N 重组蛋白) 的获得,包括以下步骤:

[0007] 1) 根据 GenBank 中已登录的 IBV-N 基因序列 (SEQ-1),设计一对特异引物

[0008] 上游引物为 5'-CCGATATCATGGCAAGCGGTAAGCA-3' (SEQ-3) (EcoR V 位点),下游引物为 5'-CCTCGACACTCAAAGTTCATTCTCTCC-3' (SEQ-4) (Sal I 位点)

[0009] 扩增片段大小为 1230bp。

[0010] 2) 通过 RT-PCR 方法对 IBV 的 N 基因进行扩增;以 EcoR V 和 Sal I 同时对 IBV-N

基因 RT-PCR 产物和 pET-32a(+) 载体进行酶切,回收目的片段,用 T4DNA 连接酶将二者进行连接,16℃过夜,次日将连接产物转化感受态细胞 BL21,37℃温箱培养 16-20h;挑取单菌落扩大培养,提取质粒,用 EcoRV、Sal I 进行双酶切鉴定;将阳性重组质粒测序,鉴定正确后获得阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N。

[0011] 3) 将阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N 及空白载体 pET-32a(+) 分别转化 BL21 感受态细胞,于 37℃培养,待 OD_{600nm} 值达到 0.5 ~ 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L 进行诱导表达,收集诱导表达后 4h 的菌体,超声波破碎,离心后取上清进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定;电泳结束后取下凝胶,先用双蒸水洗涤,然后浸入 4℃预冷的 250mmol/L 的 KCl 溶液中显色 5 ~ 10min,最后用双蒸水洗涤;将目的蛋白条带切下,PBS 洗涤 2 次,用研钵将其磨碎,反复冻融 3 次,8000r/min 离心 10min,吸取上清,SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定;经 SDS-PAGE 验证纯化后的蛋白分装,放 -20℃保存备用。

[0012] 本发明的技术方案是:一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,包括上述纯化的 IBV-N 重组蛋白作为抗原包被的 ELISA 板。

[0013] 本发明经过优化得到 ELISA 板的最佳制备条件为:用 pH8.5 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液作包被液,将鸡传染性支气管炎 N 重组蛋白稀释为 20 μg/mL,按 100 μL/孔加入 ELISA 反应板中,37℃封闭 2h,4℃包被过夜,拍干,用 1%牛血清白蛋白 (BSA) 37℃封闭 2h,以含 0.05%吐温-20pH7.4 的 PBS 洗涤,拍干,再加入 20%蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3h,待其干燥后装入含干燥剂的包装袋中 4℃保存。

[0014] 本发明一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,其特征是,包括上述 IBV-N 重组蛋白作为抗原包被的 ELISA 板:5 块;样品稀释液:200mL;10×浓缩洗涤液:400mL(用前 1:10 稀释);酶结合物工作液:50mL;显色液 A:50mL;显色液 B:50mL;终止液:60mL;阳性对照:2mL;阴性对照:2mL。

[0015] 上述中检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒中,样品稀释液为含 0.05%吐温-20 的 0.05mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液;10×浓缩洗液为含 0.5%吐温-20 的 0.1mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液;酶结合物工作液为 Sigma 公司生产的 HRP-兔抗鸡 IgG,作 1:3000 稀释的稀释液;显色液 A 为 0.2mg/mL 的四甲基联苯胺 (TMB) 溶液,显色液 B 为含过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;终止液为 2mol/L 硫酸溶液;阳性对照为经鸡传染性支气管炎重组蛋白免疫获得的标准阳性血清 (OD_{450nm} ≥ 1.0),加入 1000U/mL 的青链霉素,无菌过滤;阴性对照为经筛选获得的 SPF 鸡标准阴性血清 (OD_{450nm} ≤ 0.200),加入 1000U/mL 的青链霉素,无菌过滤。

[0016] 本发明经过优化得到最佳检测方法(即检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒的最佳使用方法)为:将待检血清用样品稀释液作 1:200 稀释,按 100 μL/孔加入抗体检测板中,同时设阴性对照、阳性对照,37℃孵育 30min;弃去反应孔中的液体,每孔加洗涤液 300 μL,洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干;每孔加 100 μL 的酶结合物工作液,37℃孵育 30min;洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干;依次加入 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,37℃避光孵育 15min;加 50 μL 终止液,用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值,读值计算并判定结果。判定标准为:以待检样本 OD_{450nm} 值与标准阴性 OD_{450nm} 值的比值 (P/N) 大于或等于 2.1,且待检样本 OD_{450nm} 值大于 0.297 判为阳性。

[0017] 本发明具有下列优点:

[0018] 1. 本发明选择原核表达载体 pET-32a(+) 构建重组表达质粒进行融合表达并纯化,解决了 IBV 全病毒纯化困难的问题。

[0019] 2. 本发明以基因工程表达的重组 N 蛋白为基础制备而成;重组 N 蛋白为非全病毒抗原,安全性好,不含无关杂蛋白,只与鸡传染性支气管炎病毒阳性血清特异结合,不与其他病毒阳性血清发生交叉反应。具有良好抗原性,因此具有很高的特异性和敏感性。

[0020] 3. 本发明检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒,成本低廉、操作简便、快速,尤其适合批量样品的检测,大大提高了鸡传染性支气管炎血清学诊断的效率。

附图说明

[0021] 图 1 是 IBV-N 基因的 PCR 扩增电泳图片,其中 1、3 为 IBV 的 N 基因 PCR 电泳图片,2 为 DNAMarker DL2000。

[0022] 图 2 是 IBV-N 基因插入到 pET-32a(+) 载体得到的阳性重组质粒 pET-32a(+)-IBV-N 的酶切鉴定图片,其中 1、3 为质粒 pET-32a(+)-IBV-N 的酶切鉴定图片,2 为 DNAMarkerDL2000,4 为 DNAMarker DL15000。

[0023] 图 3 是诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析图片,其中 1 为空载体诱导对照,2~6 为重组菌 PET-32a(+)-IBV-N-BL21 诱导 4h 的蛋白图片,7 为蛋白 Marker,8 为重组菌 PET-32a(+)-IBV-N-BL21 诱导 3h 的蛋白图片,9 为重组菌 PET-32a(+)-IBV-N-BL21 诱导 2h 的蛋白图片。

[0024] 图 4 是诱导表达蛋白的纯化 SDS-PAGE 图片,图片 1 为蛋白 Marker,2~5 为重组菌 PET-32a(+)-IBV-N-BL21 诱导 4h 的蛋白纯化图片。

[0025] 图 5 是 pET-32a(+)-IBV-N 表达产物的 Western-blot 分析图片,其中 1 为诱导表达蛋白,2 为预染蛋白 Marker,3 为空载体诱导对照。

具体实施方式

[0026] 1. IBV-N 基因的扩增与表达载体的构建

[0027] 根据 GenBank 中已登录的 IBV-N 基因序列 (SEQ-1),设计一对引物:上游引物:5'-CCGATATCATGGCAAGCGGTAAAGCA-3' (SEQ-3) (EcoR V 位点),;下游引物:5'-CCGTCGACACTCAAAGTTCATTCTCTCC-3' (SEQ-4) (Sal I 位点)。以 IBV RNA 为模板 RT-PCR 扩增目的基因 N(如图 1 所示),用 Trizol RNA 提取试剂提取核酸,

[0028] RNA 11.5 μ L

[0029] 5 \times RT Buffer(含 Mg²⁺) 4.0 μ L

[0030] 10mM dNTP 2.0 μ L

[0031] RNasin 0.5 μ L

[0032] 下游引物 1.0 μ L

[0033] 将上述反应混合物于台式离心机上稍作离心,然后在 PCR 仪上 70 $^{\circ}$ C 10min 后加入反转录酶 M-MLV 1.0 μ L(总体系为 20 μ L),后 42 $^{\circ}$ C 30min,94 $^{\circ}$ C 5min 后结束反应。以反转录产物为模板,继续进行 PCR 以扩增全序列目的片段:

[0034] PCR 反应体系如下:

[0035] 双蒸水 39.5 μ L

[0036]	10×PCR Buffer(含 Mg^{2+})	4.0 μ L
[0037]	RT 产物	5.0 μ L
[0038]	rTaq	0.5 μ L
[0039]	上游引物	1.0 μ L
[0040]	总体积	50 μ L

[0041] 在 PCR 仪上设置 94℃ 3min, 经 94℃ 40s, 50℃ 60s, 72℃ 2min, 共 30 个循环, 最后于 72℃ 延伸 10min, 结束反应。取 5 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 将大小为 1230bp 的目的基因回收。以 EcoR V 和 SaI I 同时对 PCR 扩增的 N 蛋白的目的基因和 pET-32a(+) 载体进行酶切, 回收目的片段, 用 T4DNA 连接酶将二者进行连接, 16℃ 过夜, 次日将连接产物转化感受态细胞 BL21, 37℃ 温箱培养 16-20h。挑取单菌落扩大培养, 提取质粒, 用 EcoR V、SaI I 进行双酶切鉴定。将阳性重组质粒测序, 鉴定正确后获得阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N。(如图 2 所示)。

[0042] 2. 重组表达质粒的诱导表达

[0043] 将阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-IBV-N 及空白载体 pET-32a(+) 分别转化 BL21 感受态细胞。阳性质粒菌于 37℃ 培养, 待 OD_{600nm} 值达到 0.5 ~ 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L, 进行诱导表达。收集不同诱导时间表达的菌体, 超声波破碎, 离心后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 并对表达产物进行 Western-blot 分析, 一抗用鸡抗 IBV 阳性血清, 二抗用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鸡 IgG, DAB 显色。结果表明重组蛋白以可溶性蛋白形式存在于菌体裂解液上清中, 分子量约为 65.5ku, 与预期结果相符, 以诱导后 4h 表达量最大(如图 3 所示)。Western-blot 分析发现, 表达的重组蛋白能够与鸡传染性支气管炎阳性血清进行反应, 具有良好的免疫学活性(如图 5 所示)。

[0044] 3. 重组蛋白的纯化

[0045] 选用 KCl 显色法: 将破碎好的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后取下凝胶, 先用双蒸水洗涤, 然后浸入 4℃ 预冷的 250mmol/L 的 KCl 溶液中显色 5 ~ 10min, 最后用双蒸水洗涤。将目的蛋白条带切下, PBS 洗涤 2 次, 用研钵将其研细, 反复冻融 3 次, 8000r/min 离心 10min, 吸取上清, SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定。结果只有一条 65.5ku 的目的蛋白条带, 表明 KCl 显色法获得了较纯的目的蛋白(如图 4 所示)。

[0046] 4. 样品稀释液、洗涤液、终止液的配制

[0047] 样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.05mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 (KH_2PO_4 0.2g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9g, NaCl 8g, 定容至 1000mL, 再加 0.5mL 吐温-20); 10× 浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 (KH_2PO_4 2g, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 29g, NaCl 80g, 定容至 1000mL, 再加 5mL 吐温-20); 终止液为 2mol/L 硫酸溶液(取 111.2mL 浓硫酸即 18mol/L, 稀释定容至 1000mL)。

[0048] 5. 阳性对照和阴性对照的制备

[0049] 将用鸡传染性支气管炎 IBV-N 重组蛋白免疫获得的标准阳性血清 ($OD_{450nm} \geq 1.0$), 加入 1000U/mL 的青链霉素, 无菌过滤, 作为鸡传染性支气管炎抗体间接 ELISA 检测试剂中的阳性对照; 将筛选获得的 SPF 鸡标准阴性血清 ($OD_{450nm} \leq 0.200$), 加入 1000U/mL 的青链霉素, 无菌过滤, 作为鸡传染性支气管炎抗体间接 ELISA 检测试剂中的阴性对照。

[0050] 6. 显色液的配制

[0051] 显色液 A :称取 200mg 四甲基联苯胺 (TMB),用 100mL 无水乙醇或 DMSO 溶解后,以双蒸水定容至 1000mL ;显色液 B :称取 21g 柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$),28.2g 无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4),6.4mL 0.75%过氧化氢尿素,双蒸水定容至 1000mL,调 pH 值 4.5 ~ 5.0。

[0052] 7. 检测鸡传染性支气管炎抗体的间接 ELISA 反应条件的确定

[0053] 抗原和血清最佳工作浓度的确定 :采用方阵试验确定。用包被缓冲液将 N 重组蛋白稀释成每孔 $8 \mu g/100 \mu L$, $4 \mu g/100 \mu L$, $2 \mu g/100 \mu L$, $1 \mu g/100 \mu L$, $0.5 \mu g/100 \mu L$, $0.25 \mu g/100 \mu L$ 包被 ELISA 反应板, IBV 阳性血清和阴性血清经大肠杆菌裂解液处理后分别作 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 系列稀释 ;进行间接 ELISA 测定。TMB 底物显色,硫酸终止反应 ;测定光波长 450nm 的 OD 值。取阳性血清 OD_{450nm} 在 1.0 左右,阴性血清 OD_{450nm} 在 0.297 左右,且阳性血清 $OD_{450nm}/$ 阴性血清 OD_{450nm} 即 P/N 值大于 2.1 的抗原浓度和血清稀释度为最佳工作浓度,结果如表 1 所示。从表 1 可以看出 :抗原最佳浓度为 $20 \mu g/mL$,血清最佳稀释浓度为 1 : 200。

[0054] 表 1 抗原和血清最佳工作浓度的确定 (OD_{450nm} 值)

[0055] Tab 1 ELISA for detecting the optimum work concentration of antigens and sera

[0056]

		IBV-N 抗原包被量 (μg/孔)											
血清稀释度		8	4	2	1	0.5	0.25						
1:25	P	1.556	1.555	1.518	1.498	1.365	1.360	1.261	1.259	1.042	1.035	0.753	0.758
	N	0.552	0.553	0.485	0.480	0.461	0.459	0.405	0.402	0.398	0.392	0.295	0.294
1:50	P	1.518	1.521	1.395	1.391	1.251	1.249	1.103	1.110	0.826	0.820	0.565	0.560
	N	0.488	0.491	0.464	0.463	0.409	0.409	0.387	0.388	0.274	0.271	0.243	0.246
1:100	P	1.383	1.379	1.251	1.247	1.234	1.229	0.769	0.763	0.522	0.515	0.397	0.400
	N	0.435	0.434	0.413	0.410	0.402	0.339	0.211	0.209	0.195	0.190	0.190	0.193
1:200	P	1.158	1.161	1.103	1.100	1.099	1.091	0.553	0.550	0.459	0.460	0.301	0.315
	N	0.307	0.306	0.301	0.299	0.297	0.294	0.198	0.196	0.193	0.191	0.183	0.185
1:400	P	0.826	0.826	0.809	0.810	0.705	0.705	0.515	0.509	0.324	0.324	0.215	0.208
	N	0.252	0.250	0.247	0.250	0.236	0.234	0.198	0.195	0.176	0.173	0.160	0.158
1:800	P	0.687	0.718	0.672	0.675	0.585	0.577	0.465	0.462	0.299	0.298	0.198	0.197
	N	0.224	0.223	0.214	0.210	0.219	0.215	0.172	0.173	0.163	0.161	0.150	0.150

		血清 P/N 值 (续)											
血清稀释度		8	4	2	1	0.5	0.25						
1:25		2.82	2.82	3.13	3.12	2.96	2.96	3.11	3.13	2.62	2.64	2.55	2.57
1:50		3.11	3.10	3.01	3.00	3.06	3.05	2.85	2.86	3.01	3.02	2.33	2.28
1:100		3.18	3.18	3.02	3.04	3.07	3.07	3.64	3.65	2.67	2.71	2.09	2.07
1:200		3.77	3.79	3.66	3.68	3.7	3.71	2.79	2.81	2.38	2.40	1.65	1.70
1:400		3.28	3.30	3.12	3.24	2.99	3.01	2.60	2.61	1.84	1.87	1.34	1.32
1:800		3.20	3.22	3.14	3.21	2.67	2.68	2.70	2.67	1.83	1.85	1.32	1.31

[0057] 注:P代表阳性血清;N代表阴性血清 (Note :P :positive serum N:negative serum)

[0058] 8. 结果判定标准

[0059] 将收集的 40 份 SPF 鸡血清,在最佳工作条件下进行间接 ELISA 测定,以确定 SPF 鸡血清在无 IBV 感染时其吸收值范围($\bar{X} \pm 3SD=0.201 \pm 3 \times 0.028=0.285$),因此确定以待检样本 OD_{450nm} 值与标准阴性 OD_{450nm} 值的比值 (P/N) 大于或等于 2.1,且待检样本 OD_{450nm} 值大于 0.297 判为阳性。

[0060] 9. 鸡传染性支气管炎抗体检测 ELISA 板的制备

[0061] 用 pH8.5 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液作包被液,将鸡传染性支气管炎 IBV-N 重组蛋白稀释为 20 μg/mL,按 100 μL/孔加入 ELISA 反应板中,37℃封闭 2h,4℃包被过夜,拍干,用 1%牛血清白蛋白 (BSA) 37℃封闭 2h,以含 0.05%吐温-20pH7.4 的 PBS 洗涤,拍干,再加入 20%蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3h,待其干燥后装入含干燥剂的包装袋中备用。

[0062] 10. ELISA 操作程序的确定

[0063] 按以上确定的优化条件进行操作,即得到本方法的最佳操作程序:

[0064] 将待检血清用样品稀释液作 1 : 200 稀释,按 100 μL/孔加入抗体检测板中,同时

设阴性对照、阳性对照,37℃孵育 30min;弃去反应孔中的液体,每孔加洗涤液 300 μL,洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干;每孔加 100 μL 的酶结合物工作液,37℃孵育 30min;洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干;依次加入 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,37℃避光孵育 10min;加 50 μL 终止液,用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值,读值计算并判定结果。

[0065] 实施例:

[0066] 一、鸡传染性支气管炎抗体 ELISA 检测试剂盒,包括以下组分:

[0067] 1)ELISA 板条(96 孔):5 块

[0068] 2)10×浓缩洗涤液:400mL(用前 1:10 稀释)

[0069] 3)样品稀释液:200mL

[0070] 4)酶结合物工作液(兔抗鸡酶标二抗):50mL

[0071] 5)显色液 A:50mL

[0072] 6)显色液 B:50mL

[0073] 7)终止液:60mL

[0074] 8)阳性对照(+):2mL

[0075] 9)阴性对照(-):2mL

[0076] 二、操作步骤:

[0077] 1、将待检血清用样品稀释液作 1:200 稀释,按 100 μL/孔加入抗体检测板中,同时设阴性对照、阳性对照,37℃孵育 30min;

[0078] 2、弃去反应孔中的液体,每孔加洗涤液 300 μL,洗涤 5 次,每次间隔 1min,拍干;

[0079] 3、每孔加 100 μL 的酶结合物工作液,37℃孵育 30min;

[0080] 4、重复步骤 2;

[0081] 5、依次加入 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,37℃避光孵育 10min;

[0082] 6、加 50 μL 终止液,用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值,读值计算并判定结果。

[0083] 三、应用

[0084] 1、特异性试验

[0085] 用 IBV-N 蛋白建立的间接 ELISA 方法分别检测新城疫、流感、减蛋综合征、传染性法氏囊、传染性喉气管炎等阳性血清及 IBV- 阴性血清,每样本 2 个重复,进行交叉反应性测定,结果均为阴性,表明该方法与上述病毒无交叉反应。

[0086] 2、重复性试验

[0087] 用两次包被的酶标板,检测 10 份 IBV 阳性血清和 10 份阴性血清,每个样品重复检测 5 次,测定其变异系数 CV% ($CV = S.D. / X \times 100\%$, S.D. 标准差, X:算术平均值)。结果表明变异系数最大为 4.80%,最小为 0.8%。20 份血清变异系数都较小,具有较好的重复性。

[0088] 3、包被抗原保存期的确定

[0089] 纯化的重组 N 蛋白以最佳工作浓度包被封闭后,待其干燥后装入含干燥剂的包装袋中 4℃保存,后每隔 12 个月取出用已知阴阳性血清按所建立的方法进行检测。共检 8 次。结果显示包被本发明的重组 N 蛋白保存 12 个月仍可用于检测。

[0090] 4、自制 ELISA 试剂盒与中和进口 IDEXX 试剂盒的对比

[0091] 临床应用检验的样品 80 份。应用自制 ELISA 试剂盒和进口 IDEXX 试剂盒同时检测送检样品,比较试剂盒的符合率。其中自制 ELISA 试剂盒检出阳性血清为 50 份,阳性检出率为 62.5%,进口 IDEXX 试剂盒检出阳性血清 47 份,阳性检出率为 58.75%,两种方法的符合率为 96.25% (结果如表 2 所示)。

[0092] 表 2 与 IDEXX 公司的 ELISA 试剂盒检测的对比

[0093]

方法	IDEXX 公司的 ELISA 试剂盒	表达 N 蛋白的自制 ELISA 试剂盒
样品数	80	80
阳检数	47	50
阳检率	58.75%	62.5%
共同阳性数		47
共同阴性数		30
符合率		96.25%

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 山东省农业科学院家禽研究所
 <120> 一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接 ELISA 试剂盒
 <130> 0
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1230
 <212> DNA
 <213> 鸡 (Gallus sp.)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1230)
 <223> 鸡 (Gallus sp.) 传染性支气管炎 N 基因
 <400> 1
 atg gca agc ggt aaa gca gct gga aag tca gac tcc ccc gcg cca atc 48
 Met Ala Ser Gly Lys Ala Ala Gly Lys Ser Asp Ser Pro Ala Pro Ile
 1 5 10 15
 atc aaa cta gga ggc cct aaa cca cca aag gta ggg tca tct gga aat 96
 Ile Lys Leu Gly Gly Pro Lys Pro Pro Lys Val Gly Ser Ser Gly Asn
 20 25 30
 gca tct tgg ttt caa gcc cta aag gcc aag aag gtg aat gca cct gca 144
 Ala Ser Trp Phe Gln Ala Leu Lys Ala Lys Lys Val Asn Ala Pro Ala
 35 40 45
 cct aag ttt gaa ggt agt ggt gtt cct gat aac gaa aat ett aaa aat 192
 Pro Lys Phe Glu Gly Ser Gly Val Pro Asp Asn Glu Asn Leu Lys Asn
 50 55 60
 agc cag cag cat gga tac tgg cga cgc caa gtt agg ttt aag cca ggt 240
 Ser Gln Gln His Gly Tyr Trp Arg Arg Gln Val Arg Phe Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 aaa ggc gga aga aaa cca gtc cca gat gca tgg tac ttt tac tat act 288
 Lys Gly Gly Arg Lys Pro Val Pro Asp Ala Trp Tyr Phe Tyr Tyr Thr

[0002]

	85	90	95
gga aca gga cca gcc gct gac ctg aat tgg ggt gat cct caa gat ggt			336
Gly Thr Gly Pro Ala Ala Asp Leu Asn Trp Gly Asp Pro Gln Asp Gly			
	100	105	110
ata gtg tgg gtt gct gct aag ggt gct gat gta aaa tct aga tct aat			384
Ile Val Trp Val Ala Ala Lys Gly Ala Asp Val Lys Ser Arg Ser Asn			
	115	120	125
cag ggt aca aga gac cct gat aag ttt gat caa tat cca cta cga ttt			432
Gln Gly Thr Arg Asp Pro Asp Lys Phe Asp Gln Tyr Pro Leu Arg Phe			
	130	135	140
tca gat gga gga cct gat ggt aat tac cgc tgg gac ttc att cct ctg			480
Ser Asp Gly Gly Pro Asp Gly Asn Tyr Arg Trp Asp Phe Ile Pro Leu			
	145	150	155
			160
agt cgt ggt agg agt gga aga tca acc gca gcc tca tca gcg gca tct			528
Ser Arg Gly Arg Ser Gly Arg Ser Thr Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ser			
	165	170	175
agt aga gca cca tct cgt gaa agt tca cgt ggt ctt agg agt gga gct			576
Ser Arg Ala Pro Ser Arg Glu Ser Ser Arg Gly Leu Arg Ser Gly Ala			
	180	185	190
gaa aat gat ttg att gcc cgt gca gcg aag att att cag gac cag caa			624
Glu Asn Asp Leu Ile Ala Arg Ala Ala Lys Ile Ile Gln Asp Gln Gln			
	195	200	205
aag agg ggt acg cgc att aca aag caa aag gca gat gag atg gtt cac			672
Lys Arg Gly Thr Arg Ile Thr Lys Gln Lys Ala Asp Glu Met Val His			
	210	215	220
cgt cga ttc tgt aag cgt acc att cca cca aag tat aga gta gat caa			720
Arg Arg Phe Cys Lys Arg Thr Ile Pro Pro Lys Tyr Arg Val Asp Gln			
	225	230	235
			240
gtt ttt ggc cct cgt act aaa ggt agg gag gga aat ttt ggt gat gac			768
Val Phe Gly Pro Arg Thr Lys Gly Arg Glu Gly Asn Phe Gly Asp Asp			
	245	250	255
aag atg aat gag gaa ggt att aag gat ggg cgt gtt aca gcc atg ctc			816
Lys Met Asn Glu Glu Gly Ile Lys Asp Gly Arg Val Thr Ala Met Leu			
	260	265	270

[0003]

aac ctt aca cct agc cca cat gct tgc ctt ttt gga agt aga gtg acg	864
Asn Leu Thr Pro Ser Pro His Ala Cys Leu Phe Gly Ser Arg Val Thr	
275 280 285	
ccc aag ctt caa cca gat ggg ctg cac att aaa ttt gaa ttt act act	912
Pro Lys Leu Gln Pro Asp Gly Leu His Ile Lys Phe Glu Phe Thr Thr	
290 295 300	
gtg gtg cca aga gac gac ccg cag ctt gat aat tat gta agg att tgt	960
Val Val Pro Arg Asp Asp Pro Gln Leu Asp Asn Tyr Val Arg Ile Cys	
305 310 315 320	
gat gag tgt gtt gat ggt gta gga aca cgt cca aaa gac gaa gtt gta	1008
Asp Glu Cys Val Asp Gly Val Gly Thr Arg Pro Lys Asp Glu Val Val	
325 330 335	
aga cca aaa tca cgc cca agt tca aga cct gca aca aga gca agt tct	1056
Arg Pro Lys Ser Arg Pro Ser Ser Arg Pro Ala Thr Arg Ala Ser Ser	
340 345 350	
cca gcg cct aaa caa cag cgc cct aag aag gag aaa aag cca aag aag	1104
Pro Ala Pro Lys Gln Gln Arg Pro Lys Lys Glu Lys Lys Pro Lys Lys	
355 360 365	
cat gat gat gaa gtg gat aaa gca ttg acc tca gat gag gag agg aac	1152
His Asp Asp Glu Val Asp Lys Ala Leu Thr Ser Asp Glu Glu Arg Asn	
370 375 380	
aat gca cag cta gaa ttt gat gat gaa ccc aaa gtg att aat tgg ggt	1200
Asn Ala Gln Leu Glu Phe Asp Asp Glu Pro Lys Val Ile Asn Trp Gly	
385 390 395 400	
gat tca gca ctt gga gag aat gaa ctt tga	1230
Asp Ser Ala Leu Gly Glu Asn Glu Leu	
405	
<210> 2	
<211> 409	
<212> PRT	
<213> 鸡 (Gallus sp.)	
<400> 2	
Met Ala Ser Gly Lys Ala Ala Gly Lys Ser Asp Ser Pro Ala Pro Ile	
1 5 10 15	

[0004]

Ile Lys Leu Gly Gly Pro Lys Pro Pro Lys Val Gly Ser Ser Gly Asn
 20 25 30

Ala Ser Trp Phe Gln Ala Leu Lys Ala Lys Lys Val Asn Ala Pro Ala
 35 40 45

Pro Lys Phe Glu Gly Ser Gly Val Pro Asp Asn Glu Asn Leu Lys Asn
 50 55 60

Ser Gln Gln His Gly Tyr Trp Arg Arg Gln Val Arg Phe Lys Pro Gly
 65 70 75 80

Lys Gly Gly Arg Lys Pro Val Pro Asp Ala Trp Tyr Phe Tyr Tyr Thr
 85 90 95

Gly Thr Gly Pro Ala Ala Asp Leu Asn Trp Gly Asp Pro Gln Asp Gly
 100 105 110

Ile Val Trp Val Ala Ala Lys Gly Ala Asp Val Lys Ser Arg Ser Asn
 115 120 125

Gln Gly Thr Arg Asp Pro Asp Lys Phe Asp Gln Tyr Pro Leu Arg Phe
 130 135 140

Ser Asp Gly Gly Pro Asp Gly Asn Tyr Arg Trp Asp Phe Ile Pro Leu
 145 150 155 160

Ser Arg Gly Arg Ser Gly Arg Ser Thr Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ser
 165 170 175

Ser Arg Ala Pro Ser Arg Glu Ser Ser Arg Gly Leu Arg Ser Gly Ala
 180 185 190

[0005]

Glu Asn Asp Leu Ile Ala Arg Ala Ala Lys Ile Ile Gln Asp Gln Gln			
195	200	205	
Lys Arg Gly Thr Arg Ile Thr Lys Gln Lys Ala Asp Glu Met Val His			
210	215	220	
Arg Arg Phe Cys Lys Arg Thr Ile Pro Pro Lys Tyr Arg Val Asp Gln			
225	230	235	240
Val Phe Gly Pro Arg Thr Lys Gly Arg Glu Gly Asn Phe Gly Asp Asp			
	245	250	255
Lys Met Asn Glu Glu Gly Ile Lys Asp Gly Arg Val Thr Ala Met Leu			
	260	265	270
Asn Leu Thr Pro Ser Pro His Ala Cys Leu Phe Gly Ser Arg Val Thr			
	275	280	285
Pro Lys Leu Gln Pro Asp Gly Leu His Ile Lys Phe Glu Phe Thr Thr			
	290	295	300
Val Val Pro Arg Asp Asp Pro Gln Leu Asp Asn Tyr Val Arg Ile Cys			
305	310	315	320
Asp Glu Cys Val Asp Gly Val Gly Thr Arg Pro Lys Asp Glu Val Val			
	325	330	335
Arg Pro Lys Ser Arg Pro Ser Ser Arg Pro Ala Thr Arg Ala Ser Ser			
	340	345	350
Pro Ala Pro Lys Gln Gln Arg Pro Lys Lys Glu Lys Lys Pro Lys Lys			
	355	360	365
His Asp Asp Glu Val Asp Lys Ala Leu Thr Ser Asp Glu Glu Arg Asn			
	370	375	380

[0006]

Asn Ala Gln Leu Glu Phe Asp Asp Glu Pro Lys Val Ile Asn Trp Gly
 385 390 395 400

Asp Ser Ala Leu Gly Glu Asn Glu Leu
 405

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 根据 PCR 反应要求设计，用于扩增鸡传染性支气管炎 N 基因的上游引物

<400> 3

ccgatatcat ggcaagcggg aaagca

26

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 根据 PCR 反应要求设计，用于扩增鸡传染性支气管炎 N 基因的下游引物

<400> 4

ccgtcgacac tcaaagttca ttctctcc

28

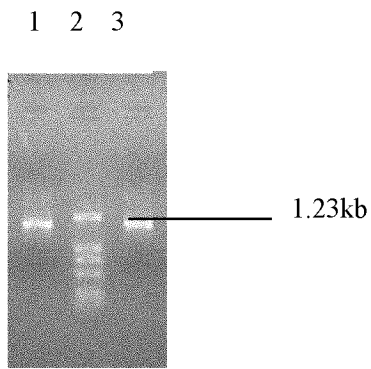


图 1

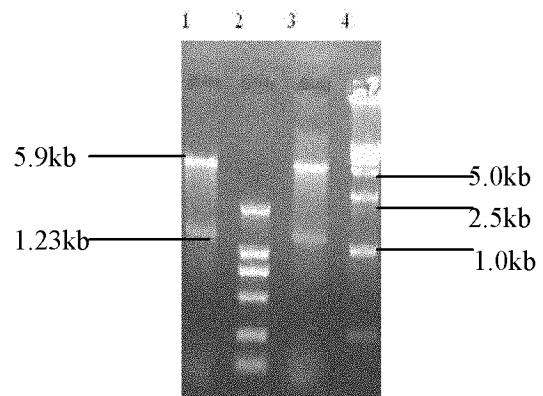


图 2

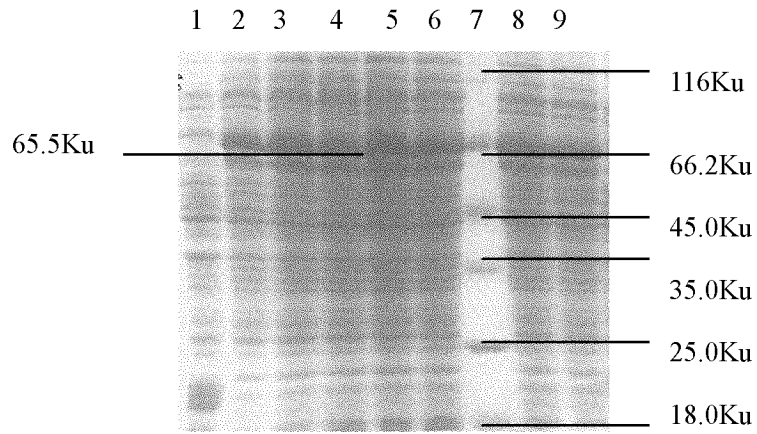


图 3

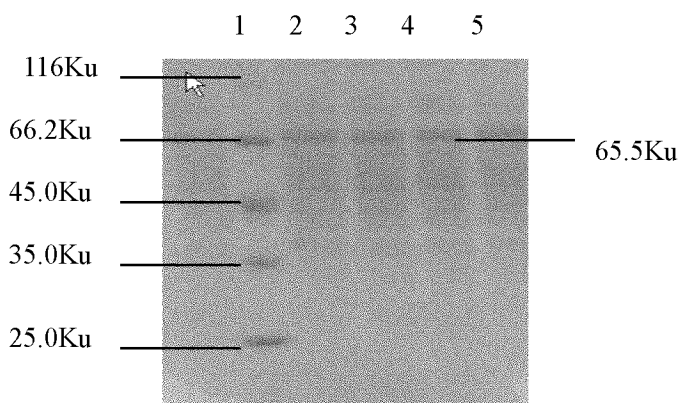


图 4

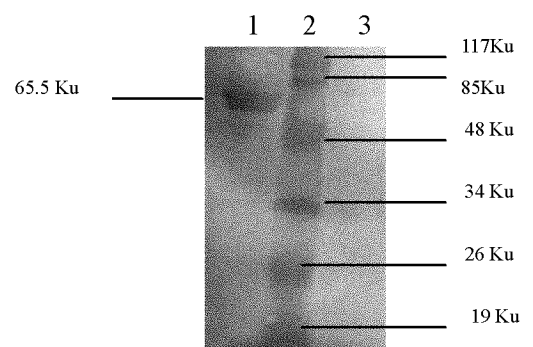


图 5

专利名称(译)	一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN102093999A	公开(公告)日	2011-06-15
申请号	CN201010587212.6	申请日	2010-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院家禽研究所		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院家禽研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院家禽研究所		
[标]发明人	亓丽红 黄兵 宋敏训 艾武 王莉莉 刘涛 秦卓明		
发明人	亓丽红 黄兵 宋敏训 艾武 王莉莉 刘涛 秦卓明		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明公开了一种检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的间接ELISA试剂盒。该试剂盒含有IBV-N重组蛋白作为抗原包被的ELISA板。IBV-N重组蛋白通过以下方法获得：根据IBV-N基因序列，设计一对特异引物，然后通过RT-PCR方法对IBV的N基因进行扩增，将N基因定向插入到pET-32a(+)表达载体，筛选获得阳性重组表达质粒pET-32a(+)-IBV-N，并将该质粒转化置BL21感受态细胞，再经ITPG诱导表达，获得IBV-N重组蛋白。该试剂盒成本低廉、操作简便、快速，尤其适合批量样品的检测，大大提高了鸡传染性支气管炎血清学诊断的效率。

