



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110095607 B

(45) 授权公告日 2021.08.10

(21) 申请号 201910304998.7

(22) 申请日 2019.04.16

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110095607 A

(43) 申请公布日 2019.08.06

(73) 专利权人 东北农业大学  
地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木  
材街59号

(72) 发明人 马波 戚海惠 刘悦 张琪  
陈浩田 常蕊 张雪莲 张文龙  
高明春 王君伟

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理  
有限责任公司 11139  
代理人 孙皓晨 马鑫

(51) Int.Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104087609 A, 2014.10.08

CN 105198970 A, 2015.12.30

KR 20070121468 A, 2007.12.27

Youlin Shen 等. Development of duck  
and DHAV-3 antibodies.《Journal of  
Virological Methods》.2015,30-34.

齐晓燕 等. 基于VP0蛋白的用以检测1型鸭  
甲肝病毒抗体的间接ELISA的建立和应用.《中国  
兽医科学》.2015,第45卷(第12期),1218-1224.

审查员 周洋

权利要求书2页 说明书12页  
序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗  
体的通用型间接ELISA试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测1型和3型鸭甲  
型肝炎病毒血清抗体的通用型间接ELISA试剂盒  
及其应用。本发明建立了一种基于VP0重组蛋白  
检测1型和3型DHAV血清抗体的通用型间接ELISA  
检测方法,该方法是以前核表达的1型DHAV VP0  
重组蛋白为检测抗原,经Western blotting和间  
接ELISA方法证实该VP0重组蛋白即可以与1型  
DHAV血清抗体发生特异性反应,也能与3型DHAV  
血清抗体发生特异性反应,因此以1型DHAV VP0  
重组蛋白为检测抗原进行间接ELISA检测可判断  
被检鸭血清是否含有1型和3型鸭甲型肝炎病毒  
的抗体及其抗体水平,本发明的提出为有效防治  
鸭甲型肝炎提供了新的快速检测手段。

1.1型鸭甲型肝炎病毒(Duck Hepatitis A Virus 1, DHAV-1)VP0重组蛋白在制备检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体通用型检测试剂中的用途,所述的1型鸭甲型肝炎病毒VP0重组蛋白由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列编码。

2.用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒(Duck Hepatitis A Virus, DHAV)血清抗体的通用型间接ELISA试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中包括1型DHAV VP0重组蛋白包被的ELISA板,所述的1型DHAV VP0重组蛋白由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列编码。

3.如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述的1型DHAV VP0重组蛋白按照以下方法制备得到:

1)以携带1型DHAV VP0基因的阳性质粒作为模板,通过RT-PCR方法对其VP0基因进行扩增、克隆至pMD18-T得到重组质粒pMD18T-DHAV-1-VP0,扩增1型DHAV VP0基因的上下游引物分别是:

DHAV-1-VP0上游引物:5'-CCGGAATTCATGGATACTCTCACCAAAAA-3'

DHAV-1-VP0下游引物:5'-CCGCTCGAGTAACTGATTGTCAAATGGTCG-3

扩增得到的1型DHAV VP0基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

2)以*EcoRI*和*XhoI*限制性内切酶同时对重组质粒pMD18T-DHAV-1-VP0和pET-30a(+)载体进行酶切,回收目的片段,16°C金属浴连接过夜,将连接产物转化到TG1感受态细胞,提取质粒,质粒经*EcoRI*和*XhoI*双酶切鉴定正确后获得阳性重组表达质粒pET30a-DHAV-1-VP0;

3)将阳性重组表达质粒pET30a-DHAV-1-VP0转化到RosettaTM(DE3)PlysS感受态细胞,获得的阳性质粒菌于37°C培养,待A600值达到0.4-0.6时,加入IPTG至终浓度为0.6mmol/L进行诱导表达,收集诱导表达后5h的菌体,超声波破碎,离心后取沉淀进行SDS-PAGE分析和Western blotting鉴定,而后沉淀用Ni<sup>2+</sup>-NTA琼脂糖凝胶柱纯化,透析,得到1型DHAV VP0重组蛋白。

4.如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述的1型DHAV VP0重组蛋白包被的ELISA板是按照以下方法制备得到:

用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液作为抗原包被缓冲液,将DHAV-1-VP0重组蛋白稀释为0.25ug/mL,按100uL/孔加入ELISA反应板中,37°C作用2h,4°C包被过夜,洗涤液洗板,拍干,用5%w/v脱脂乳37°C封闭2小时,以含0.05%v/v吐温-20 pH7.4的PBS洗涤,拍干。

5.如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中还包括样品稀释液、10×浓缩洗涤液、酶结合物工作液、显色液A、显色液B、终止液、阳性血清和阴性血清。

6.如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液为含0.05%v/v吐温-20的0.05M pH7.4的磷酸盐缓冲液;所述10×浓缩洗涤液为含0.05%v/v吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液;所述酶结合物工作液为HRP-山羊抗鸭IgG;所述显色液A为0.2mg/mL的四甲基联苯胺溶液,所述显色液B为含0.5%ow/v过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;所述终止液为0.01M硫酸溶液;所述阳性血清为经鸭甲型肝炎病毒1型疫苗和3型病毒尿囊液免疫成年鸭获得的阳性血清;所述阴性血清为未免疫鸭的血清。

7.如权利要求2-6任一项所述的试剂盒,其特征在于,用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体时,按照以下步骤进行:

1)用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液作为抗原包被缓冲液,将DHAV-1-VP0重组蛋白稀释为

- 0.25ug/mL,100uL/孔,37℃作用2h,4℃包被过夜,洗涤液洗板,拍干;
- 2) 5%w/v脱脂乳封闭,300uL/孔,37℃作用90min,洗涤液洗板,拍干;
- 3) 将待检血清用样品稀释液作1:100稀释,按100uL/孔加入抗原包被板孔中,37℃作用60min,同时设阴性对照,洗涤液洗板,拍干;
- 4) 加入HRP标记的山羊抗鸭IgG与抗原抗体复合物结合,用洗涤液洗板,拍干;
- 5) 加入TMB底物显色液A、B按体积比1:1比例混合后显色,再加入终止液;
- 6) 在波长450nm处读取其吸收值。
8. 权利要求2-6任一项所述的试剂盒在制备检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体试剂中的用途。

## 用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体的通用型间接ELISA试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明特别涉及一种基于1型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白的,可用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体的通用型间接ELISA试剂盒及其应用。本发明属于生物检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 鸭病毒性肝炎(Duck Viral Hepatitis, DVH)是由鸭甲型肝炎病毒(Duck Hepatitis A Virus, DHAV)和鸭星状病毒(Duck astrovirus, DAsTV)引起的雏鸭的一种传播迅速、高度致死的病毒性疾病。鸭甲型肝炎病毒属于小RNA病毒科禽肝病毒属成员,其成员按照基因型分为A、B、C型分别对应传统的DHV-1、台湾新型和韩国新型,此三型也称为鸭甲型肝炎病毒1型(DHV-1),2型(DHV-2)和3型(DHV-3),各型间无交叉保护或弱交叉保护。鸭星状病毒属于星状病毒科禽星状病毒属成员,与鸭甲型肝炎病毒无血清型交叉反应。我国以鸭甲型肝炎病毒的发生最为严重,主要流行的为1型和3型DHAV,且生产实践中常发生1型和3型DHAV的混合感染,除台湾地区外,内陆尚未见DHAV-2的报道。随着养鸭业不断向产业化、集约化和规模化方向发展,许多地区所进行的传统鸭肝炎的主动免疫和被动免疫失败现象频繁发生,对鸭肝炎的防控提出了新的挑战。目前1型DHAV疫苗已获得批准文号,3型DHAV-3疫苗尚在研制中。鉴于当前DHAV-1和DHAV-3的危害日趋严重,多价苗的开发迫在眉睫。

[0003] 为了能有效防控鸭甲型肝炎在我国的流行,对疫情进行实时监测和及时接种疫苗显得尤为重要。目前,对于鸭甲型肝炎的血清学检测方法主要采用的是血清中和试验,但是该方法存在检测周期长、重复性较差的缺点,不适合进行快速检测,因此急需一种更为简洁、可靠的鸭肝炎抗体检测技术。基于全病毒建立的ELISA方法因DHV纯化比较困难限制了该方法的推广使用,已报道的利用大肠杆菌表达的主要抗原蛋白建立的ELISA方法都是针对其中一个型的DHAV,在用于多价苗评价及临床混合感染血清抗体检测时,需要分别进行DHAV-1和DHAV-3血清抗体的检测,操作繁琐且成本翻倍。目前鲜有针对鸭甲型肝炎病毒我国主要流行株1型和3型DHAV血清抗体通用型ELISA检测方法的报道。在小RNA病毒中,VP0蛋白作为主要的宿主保护蛋白,编码主要的抗原位点并具有主要的型特异性位点,是决定病毒抗原性的主要成分。因此,利用基因工程技术研制开发适用于1型和3型DHAV血清抗体检测的特异的、敏感的、适合基层应用的通用型ELISA检测方法,对于我国当前鸭甲型肝炎病毒的快速诊断和有效防控具有重要意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是克服传统鸭甲型肝炎病毒血清抗体检测手段的不足,即不能一次性全面检测鸭血清中I型和3型鸭甲型肝炎病毒的抗体水平,提供了一种可检测I型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体水平的通用型间接ELISA检测方法及其试剂盒。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案实现：

[0006] 本发明以原核表达的1型和3型DHAV VP0重组蛋白为检测抗原，经Western blotting和间接ELISA方法证实1型DHAV VP0重组蛋白即可以与1型DHAV血清抗体发生特异性反应，也能与3型DHAV血清抗体发生特异性反应，且 DHAV-1-VP0重组蛋白作为包被抗原与3型血清抗体反应的强度强于 DHAV-3-VP0重组蛋白作为包被抗原与1型血清抗体反应的强度。因此以1型 DHAV VP0重组蛋白为检测抗原进行间接ELISA检测可判断被检鸭血清是否含有1型和3型鸭甲型肝炎病毒的抗体及其抗体水平。

[0007] 在上述研究的基础上，本发明提出了1型鸭甲型肝炎病毒(Duck Hepatitis A Virus 1, DHAV-1) VP0重组蛋白在制备检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体通用型检测试剂中的用途。其中，优选的，所述的1型鸭甲型肝炎病毒VP0重组蛋白由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列编码。

[0008] 进一步的，本发明还提出了一种用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒(Duck Hepatitis A Virus, DHAV)血清抗体的通用型间接ELISA试剂盒，所述的试剂盒中包括1型DHAV VP0重组蛋白包被的ELISA板。

[0009] 其中，优选的，所述的1型DHAV VP0重组蛋白按照以下方法制备得到：

[0010] 1) 以携带1型DHAV VP0基因的阳性质粒作为模板，通过RT-PCR方法对其VP0基因进行扩增、克隆至pMD18-T得到重组质粒pMD18T-DHAV-1-VP0，扩增1型DHAV VP0基因的上下游引物分别是：

[0011] DHAV-1-VP0上游引物：5'-CCGGAATTCATGGATACTCTCACCAAAAA-3'

[0012] DHAV-1-VP0下游引物：5'-CCGCTCGAGTAACTGATTGTCAAATGGTCG-3'

[0013] 2) 以EcoR I和Xho I限制性内切酶同时对重组质粒pMD18T-DHAV-1-VP0 和pET-30a(+)载体进行酶切，回收目的片段，16℃金属浴连接过夜，将连接产物转化到TG1感受态细胞，提取质粒，质粒经EcoR I和Xho I双酶切鉴定正确后获得阳性重组表达质粒pET30a-DHAV-1-VP0；

[0014] 3) 将阳性重组表达质粒pET30a-DHAV-1-VP0转化到RosettaTM(DE3) PlysS 感受态细胞，获得的阳性质粒菌于37℃培养，待A600值达到0.4-0.6时，加入IPTG 至终浓度为0.6mmol/L进行诱导表达，收集诱导表达后5h的菌体，超声波破碎，离心后取沉淀进行SDS-PAGE分析和Western blotting鉴定，而后沉淀用Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖凝胶柱纯化，透析，得到1型DHAV VP0重组蛋白。

[0015] 其中，优选的，步骤1)中扩增得到的1型DHAV VP0基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1所示。

[0016] 其中，优选的，所述的1型DHAV VP0重组蛋白包被的ELISA板是按照以下方法制备得到：

[0017] 用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液作为抗原包被缓冲液，将DHAV-1-VP0重组蛋白稀释为0.25ug/mL，按100uL/孔加入ELISA反应板中，37℃作用2h，4℃包被过夜，洗涤液洗板，拍干，用5%w/v脱脂乳37℃封闭2小时，以含0.05%v/v 吐温-20pH7.4的PBS洗涤，拍干。

[0018] 其中，优选的，所述的试剂盒中还包括样品稀释液、10×浓缩洗涤液、酶结合物工作液、显色液A、显色液B、终止液、阳性血清和阴性血清。

[0019] 其中，优选的，所述样品稀释液为含0.05%v/v吐温-20的0.05M pH7.4的磷酸盐缓

冲液;所述10×浓缩洗涤液为含0.05%v/v吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液;所述酶结合物工作液为HRP-山羊抗鸭IgG;所述显色液A为0.2mg/mL的四甲基联苯胺溶液,所述显色液B为含0.5%w/v过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;所述终止液为0.01M硫酸溶液;所述阳性血清为经鸭甲型肝炎病毒1型疫苗和3型病毒尿囊液免疫成年鸭获得的阳性血清;所述阴性血清为未免疫鸭的血清。

[0020] 其中,优选的,所述的试剂盒用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体时,按照以下步骤进行:

[0021] 1) 用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液作为抗原包被缓冲液,将DHAV-1-VP0重组蛋白稀释为0.25ug/mL,100uL/孔,37℃作用2h,4℃包被过夜,洗涤液洗板,拍干;

[0022] 2) 5%w/v脱脂乳封闭,300uL/孔,37℃作用90min,洗涤液洗板,拍干;

[0023] 3) 将待检血清用样品稀释液作1:100稀释,按100uL/孔加入抗原包被板孔中,37℃作用60min,同时设阴性对照,洗涤液洗板,拍干;

[0024] 4) 加入HRP标记的山羊抗鸭IgG与抗原抗体复合物结合,用洗涤液洗板,拍干;

[0025] 5) 加入TMB底物显色液A、B按体积比1:1比例混合后显色,再加入终止液;

[0026] 6) 在波长450nm处读取其吸收值。

[0027] 进一步的,本发明还提出了所述的试剂盒在制备检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体试剂中的用途。

[0028] 相较于现有技术,本发明具有以下优点:

[0029] 1. 本发明建立的检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体通用型间接ELISA,一次性全面检测鸭血清中1型和3型鸭甲型肝炎病毒的抗体水平,较分别检测型和3型DHAV血清抗体,检测次数由两次变为一次,可显著降低检测成本。

[0030] 2. 该方法操作简单、快速,适合大批量样本的检测,尤其适用于1型DHAV疫苗,3型DHAV疫苗单独免疫或联合免疫,及1型和3型DHAV混合感染后批量血清样品的抗体检测,对于DHAV的血清抗体的监测和检测,评价疫苗的免疫效力及掌握DHAV的发生和流行情况,有效防控DHAV的发生和流行,提供有力的检测手段和基础数据。

[0031] 3. 本发明以基因工程表达并纯化的1型DHAV VP0重组蛋白作为检测抗原,重组蛋白为非全病毒抗原,安全性好,不含无关杂蛋白,只与1型和3型DHAV血清发生特异性结合,不与其他病毒的阳性血清发生交叉反应,具有良好的特异性。

## 附图说明

[0032] 图1是DHAV-1-VP0基因扩增的电泳图片;

[0033] 其中M:DNA分子质量标准;1:DHAV-1-VP0基因扩增产物;2:阴性对照。

[0034] 图2是DHAV-3-VP0基因扩增的电泳图片;

[0035] 其中M:DNA分子质量标准;1:DHAV-3-VP0基因扩增产物;2:DHAV-3-VP0基因扩增产物;3:阴性对照。

[0036] 图3是DHAV-1-VP0基因克隆到pMD18-T载体得到的重组质粒 pMD18T-DHAV-1-VP0的酶切鉴定图片;

[0037] 其中M:DNA分子质量标准;1:XhoI单酶切pMD18T-DHAV-1-VP0产物;2:EcoRI、XhoI双酶切pMD18T-DHAV-1-VP0产物。

[0038] 图4是DHAV-3-VP0基因克隆到pMD18-T载体得到的重组质粒 pMD18T-DHAV-3-VP0的酶切鉴定图片；

[0039] 其中M:DNA分子质量标准;1:EcoRI单酶切pMD18T-DHAV-3-VP0产物;2:XhoI单酶切pMD18T-DHAV-3-VP0产物;3:EcoRI、XhoI双酶切 pMD18T-DHAV-3-VP0产物。

[0040] 图5是DHAV-1-VP0基因插入到pET-30a(+)载体得到的重组质粒 pET30a-DHAV-1-VP0的酶切鉴定图片；

[0041] 其中M:DNA分子质量标准;1:EcoRI单酶切pET30a-DHAV-1-VP0产物;2:XhoI单酶切pET30a-DHAV-1-VP0产物;3:EcoRI、XhoI双酶切 pET30a-DHAV-1-VP0产物。

[0042] 图6是DHAV-3-VP0基因插入到pET-30a(+)载体得到的重组质粒 pET30a-DHAV-3-VP0的酶切鉴定图片；

[0043] 其中M:DNA分子质量标准;1:EcoRI单酶切pET30a-DHAV-3-VP0产物;2:XhoI单酶切pET30a-DHAV-3-VP0产物;3:EcoRI、XhoI双酶切 pET30a-DHAV-3-VP0产物。

[0044] 图7是Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0诱导表达结果图片；

[0045] 其中M:Protein marker;1:Rosetta-pET-30a诱导前菌体;2:Rosetta-pET-30a 诱导后菌体;3:Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0诱导前菌体;4: Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0诱导后全菌体;5:Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0 诱导后超声上清;6:Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0诱导后超声沉淀。

[0046] 图8是Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0蛋白纯化结果图片；

[0047] 其中M:Protein marker;1:Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0纯化后蛋白。

[0048] 图9是Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0诱导表达结果图片；

[0049] 其中M:Protein marker;1:Rosetta-pET-30a诱导前菌体;2:Rosetta-pET-30a 诱导后菌体;3:Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0诱导前菌体;4: Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0诱导后全菌体;5:Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0 诱导后超声上清;6:Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0诱导后超声沉淀。

[0050] 图10是Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0蛋白纯化结果图片；

[0051] 其中M:Protein marker;1:Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0纯化后蛋白。

[0052] 图11是DHAV-1-VP0和DHAV-3-VP0表达产物与DHAV-1阳性血清反应的 Western blotting分析图片；

[0053] 其中M:Protein marker;1:Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0纯化后蛋白;2: Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0纯化后蛋白;3:阴性对照Rosetta-pET30a-MX-C 纯化后蛋白。

[0054] 图12是DHAV-1-VP0和DHAV-3-VP0表达产物与DHAV-3阳性血清反应的 Western blotting分析图片；

[0055] 其中M:Protein marker;1:Rosetta-pET30a-DHAV-1-VP0纯化后蛋白;2: Rosetta-pET30a-DHAV-3-VP0纯化后蛋白;3:阴性对照Rosetta-pET30a-MX-C 纯化后蛋白；

[0056] 图13为检测DHAV-1血清抗体最低检出量；

[0057] 图14为检测DHAV-3血清抗体最低检出量。

## 具体实施方式

[0058] 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。

[0059] 实施例1 1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体的间接ELISA检测方法的建立

[0060] 1. DHAV1-VP0和DHAV3-VP0基因的扩增及表达载体的构建

[0061] 1) 参照GenBank发表的1型鸭甲型肝炎病毒E53株全基因序列 (EF151313.1) 和本实验室克隆的3型鸭甲型肝炎病毒全基因序列,设计 DHAV-1-VP0和DHAV-3-VP0两对引物, DHAV-1-VP0上游引物:5' - CCGGAATTCATGGATACTCTCACCAAAAA-3'; DHAV-1-VP0下游引物: 5' - CCGCTCGAGTAACTGATTGTCAAATGGTCG-3'。DHAV-3-VP0上游引物: 5' - GGCGAATTCATGGACACTCTAACTA-3'; DHAV-3-VP0下游引物: 5' - CGGCTCGAGTTACTGGTCATTGAAAGGCCG-3'。以本实验室保存的携带 DHAV-1VP0基因或DHAV-3VP0基因的阳性质粒为模板,对目的基因进行PCR 扩增。分别用表1中的引物和Prime STAR DNA聚合酶进行PCR扩增,扩增体系包括上下游引物各0.5uL,无菌水16.8uL,Prime STAR DNA聚合酶0.2uL,dNTP 1uL,5×Prime STAR Buffer 5uL,携带DHAV-1VP0基因或DHAV-3VP0基因的阳性质粒为模板1uL,扩增体系为25uL。反应条件:98℃5min;94℃30s;58℃30s; 72℃1min;72℃10min;30个循环;PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行分析,以确定产物的大小(如图1和图2所示)。

[0062] 表1 DHAV-1-VP0和DHAV-3-VP0基因的克隆及表达引物序列

引物名称	序列 (5'-3')
[0063] DHAV-1-VP0引物	DHAV-1-VP0-S:5'-CCGGAATTCATGGATACTCTCACCAAAAA-3' ( <i>EcoR</i> I)
	DHAV-1-VP0-A:5'-CCGCTCGAGTAACTGATTGTCAAATGGTCG-3' ( <i>Xho</i> I)
DHAV-3-VP0引物	DHAV-3-VP0-S:5'-GGCGAATTCATGGACACTCTAACTA-3'( <i>EcoR</i> I)
	DHAV-3-VP0-A:5'-CGGCTCGAGTTACTGGTCATTGAAAGGCCG-3' ( <i>Xho</i> I)

[0064] 2) PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,切胶,回收目的片段,将扩增出的DHAV-1-VP0 (SEQ ID NO.1所示) 和DHAV-3-VP0基因 (SEQ ID NO.2所示) 克隆至pMD18-T载体中,经*EcoR* I和*Xho* I双酶切鉴定、测序正确的阳性克隆分别命名为pMD18T-DHAV-1-VP0和pMD18T-DHAV-3-VP0 (如图3和图4所示)。以*EcoR* I和*Xho* I同时对重组质粒pMD18T-DHAV-1/DHAV-3-VP0和pET-30a(+) 载体进行酶切,回收目的片段,16℃连接过夜,转化TG1感受态细胞,提取质粒,经*EcoR* I和*Xho* I双酶切鉴定正确后获得阳性重组质粒pET30a-DHAV-1-VP0和 pET30a-DHAV-3-VP0 (如图5和图6所示)。

[0065] 2. 重组表达质粒的诱导表达

[0066] 将阳性重组表达质粒pET30a-DHAV-1/DHAV-3VP0及空白载体pET-30a(+) 分别转化到RosettaTM (DE3) PlysS感受态细胞,将获得的阳性重组表达质粒菌于37℃培养,待A600达到0.4-0.6时,加入IPTG至终浓度为0.8mmol/L,37℃培养进行诱导表达。收集诱导5h后表

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。结果表明重组蛋白以不溶性包涵体的形式存在于菌体中,分子量均约为34kDa,与预期结果相符(SDS-PAGE结果如图7和9所示)。

### [0067] 3. 重组蛋白的纯化

[0068] 将表达菌体的沉淀用8mol/L尿素溶解,根据重组蛋白的表达形式采取变性条件下纯化目的蛋白,用Ni<sup>2+</sup>-NTA琼脂糖凝胶柱纯化,而后透析。采用TGE透析液4℃透析,每隔4-6小时换液一次,完全除去尿素后,12%SDS-PAGE分析纯化效果(如图8和图10)。

### [0069] 4. 鸭抗血清的Western blotting分析

[0070] 将纯化后的重组蛋白经SDS-PAGE电泳后转印至硝酸纤维素膜(NC膜)上,分别以制备的1型和3型鸭抗血清为一抗(1:500倍稀释),HRP标记的山羊抗鸭 IgG为二抗(1:500倍稀释),加入ECL显色液作用1min后曝光,结果表明一种型的纯化后重组VP0蛋白与两种型的血清抗体均可发生反应(如图11和12)。

### [0071] 5. 样品稀释液、洗涤液和终止液的配制

[0072] 样品稀释液为含0.05%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液(K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 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0.1M pH7.4的磷酸盐缓冲液(K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 29g, NaCl 80g,定容至1000mL,再加5mL吐温-20);终止液为 2M硫酸溶液(取111.2mL浓硫酸即18M,稀释定容至1000mL)。

### [0073] 6. 阳性血清和阴性血清的处理

[0074] 采用胸肌免疫的方式,将DHAV-1A66株疫苗和DHAV-3病毒尿囊液分别免疫七只成年鸭(均未免疫过鸭肝炎疫苗),6只未免疫鸭(均未免疫过鸭肝炎疫苗)作为阴性对照;首免2周后进行第二次免疫,免疫方式同前,免疫剂量为首免的二倍,每隔7天采血一次;二免12周后进行第三次免疫,免疫方式同前,免疫剂量为首免的二倍,每隔7天采血一次;采血的方式采取翅下静脉采血。将DHAV-1疫苗和DHAV-3病毒免疫成年鸭获得的1型和3型鸭抗血清用样品稀释液作1:100倍稀释,作为待检血清。

### [0075] 7. 显色液的配制

[0076] 显色液:A液:称取200mg四甲基联苯胺(TMB),用100mL无水乙醇或DMSO溶解后,用双蒸水定容至1000mL;B液:称取21g柠檬酸(C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O),28.2g无水硫酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),6.4mL0.75%过氧化氢尿素,双蒸水定容至1000mL,调pH值4.5-5.0;二者的体积比为1:1。

### [0077] 8. 检测1型和3型DHAV血清抗体的间接ELISA条件的确定

[0078] 抗原和血清最佳工作浓度的确定:采用棋盘滴定法试验。用包被缓冲液将DHAV-1-VP0和DHAV-3-VP0重组蛋白进行包被,包被的蛋白浓度按照0.25ug/mL、0.5ug/mL、1ug/mL、2ug/mL,100uL/孔;抗DHAV-1和DHAV-3的阳性血清和阴性血清用样品稀释液分别作1:20、1:50、1:100、1:500、1:1000倍稀释;进行间接ELISA测定;TMB显色液显色,硫酸终止液终止反应;测定光波长OD<sub>450</sub>值。DHAV-1-VP0与1型血清抗体和3型血清抗体反应的结果分别见表2和表3所示,DHAV-3-VP0与1型血清抗体和3型血清抗体反应的结果分别见表4和表5所示,结果表明,VP0重组蛋白与1型和3型的血清抗体均可发生反应,且DHAV-1-VP0重组蛋白作为包被抗原与3型血清抗体反应的强度强于DHAV-3-VP0重组蛋白作为包被抗原与1型血

清抗体反应的强度。综上所述,选择DHAV-1-VP0作为最佳抗原,取阳性血清OD<sub>450</sub> 1.0左右,且阳性血清OD<sub>450</sub>/阴性血清OD<sub>450</sub>即P/N值 $\geq 2$ 的抗原浓度和血清稀释度为最佳工作浓度,结果表明,血清最佳稀释度为1:100,抗原最佳浓度为0.25 $\mu$ g/mL。

[0079] 表2 DHAV-1-VP0抗原与1型血清抗体反应的ELISA棋盘滴定结果

抗原浓度 ( $\mu$ g/mL)	OD <sub>450nm</sub> 值									
	阳性血清稀释倍数					阴性血清稀释倍数				
[0080]	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	1.088	1.031	0.792	0.525	0.322	0.346	0.325	0.232	0.221	0.178
1	1.052	1.041	0.802	0.518	0.315	0.332	0.319	0.241	0.214	0.167
0.5	1.047	0.985	0.785	0.504	0.309	0.328	0.312	0.218	0.211	0.171
0.25	0.986	0.982	<b>0.784</b>	0.512	0.312	0.305	0.304	<b>0.204</b>	0.207	0.159
抗原浓度 ( $\mu$ g/mL)	P/N 值									
	血清稀释度									
[0081]	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000					
2	3.145	3.172	3.414	2.376	1.809					
1	3.169	3.263	3.328	2.421	1.886					
0.5	3.192	3.157	3.601	2.389	1.807					
0.25	3.233	3.230	<b>3.843</b>	2.473	1.962					

[0082] 表3 DHAV-1-VP0抗原与3型血清抗体反应的ELISA棋盘滴定结果

抗原浓度 (μg/mL)	OD <sub>450nm</sub> 值									
	阳性血清稀释倍数					阴性血清稀释倍数				
	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	0.812	0.803	0.711	0.412	0.302	0.313	0.302	0.252	0.218	0.169
1	0.795	0.791	0.705	0.395	0.298	0.311	0.295	0.231	0.214	0.171
0.5	0.793	0.783	0.692	0.388	0.275	0.308	0.297	0.222	0.209	0.165
0.25	0.782	0.744	<b>0.688</b>	0.389	0.278	0.304	0.275	<b>0.207</b>	0.201	0.157

[0083]

抗原浓度 (μg/mL)	P/N 值				
	血清稀释度				
	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	2.594	2.659	2.821	1.890	1.787
1	2.556	2.681	3.052	1.846	1.743
0.5	2.575	2.636	3.117	1.856	1.667
0.25	2.572	2.705	<b>3.324</b>	1.935	1.771

[0084] 表4 DHAV-3-VP0抗原与1型血清抗体反应的ELISA棋盘滴定结果

抗原浓度 (μg/mL)	OD <sub>450nm</sub> 值									
	阳性血清稀释倍数					阴性血清稀释倍数				
	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	0.781	0.712	0.582	0.372	0.307	0.325	0.311	0.259	0.221	0.158
1	0.779	0.685	0.571	0.368	0.295	0.321	0.307	0.243	0.215	0.162
0.5	0.764	0.681	0.586	0.354	0.288	0.317	0.287	0.218	0.207	0.154
0.25	0.769	0.674	<b>0.564</b>	0.357	0.274	0.319	0.285	<b>0.216</b>	0.196	0.151

[0086]

抗原浓度 (μg/mL)	P/N 值				
	血清稀释度				
	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	2.403	2.289	2.247	1.683	1.905
1	2.427	2.231	2.350	1.716	1.821
0.5	2.410	2.373	<b>2.817</b>	1.710	1.870
0.25	2.411	2.365	2.611	1.821	1.815

[0087] 表5 DHAV-3-VP0抗原与3型血清抗体反应的ELISA棋盘滴定结果

抗原浓度 (μg/mL)	OD <sub>450nm</sub> 值									
	阳性血清稀释倍数					阴性血清稀释倍数				
	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	0.945	0.903	0.785	0.503	0.315	0.341	0.325	0.241	0.215	0.171
1	0.931	0.897	0.773	0.495	0.307	0.337	0.324	0.243	0.223	0.165
0.5	0.925	0.852	0.762	0.481	0.298	0.322	0.315	0.237	0.207	0.178
0.25	0.914	0.855	<b>0.783</b>	0.475	0.303	0.331	0.319	<b>0.211</b>	0.211	0.163

[0088]

抗原浓度 (μg/mL)	P/N 值				
	血清稀释度				
	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000
2	2.771	2.778	3.257	2.340	1.842
1	2.763	2.769	3.181	2.220	1.861
0.5	2.873	2.705	3.215	2.324	1.674
0.25	2.761	2.680	<b>3.711</b>	2.251	1.859

## [0089] 9. 间接ELISA检测方法的优化

[0090] 按照上述确定的优化后的抗原浓度和血清抗体稀释倍数包被ELISA检测板,摸索包被液的选择及包被时间、封闭液的选择及封闭时间、血清最佳孵育时间、酶标二抗工作浓度及工作时间、底物显色时间,以确定最终优化后的间接ELISA 检测方法,优化结果如表6。

[0091] 表6间接VP0-ELISA的最佳反应条件

优化条件	优化结果
抗原最佳包被浓度	0.25ug/mL
血清最佳稀释度	1:100
最佳抗原包被条件	37℃ 2h 转 4℃ 过夜
HRP 山羊抗鸭 IgG 的最佳稀释度	1:400
最佳封闭液	5%脱脂乳
最佳封闭时间	90min
最佳显色时间	15min

[0092]

## [0093] 10. 结果判定标准

[0094] 将收集的118份阴性鸭血清,在最佳的工作条件下进行间接ELISA测定,以确定鸭血清在无DHAV-1和DHAV-3感染时其吸收值范围,平均值( $\bar{X}$ )为0.180,标准差(SD)为

0.042, 本检测方法以  $\bar{X}+3SD$  为临界值, 即临界值为 0.307, 检测的血清样本为  $OD_{450} \geq \bar{X}+3SD$  (0.307) 判定为阳性, 检测的血清样本  $OD_{450} < \bar{X}+2SD$  (0.264) 判定为阴性,  $\bar{X}+3SD$  (0.307)  $\geq$  检测的血清样本  $OD_{450} \geq \bar{X}+2SD$  (0.264) 为可疑。

[0095] 11. ELISA操作程序的确定

[0096] 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:

[0097] 用pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液作包被液, 将DHAV-1-VP0重组蛋白稀释为 0.25ug/mL, 按100uL/孔加入ELISA反应板中, 37°C作用2h, 4°C包被过夜, 以含0.05%吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干; 加入5%脱脂乳, 300uL/孔, 37°C封闭2h, 以含0.05%吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干; 将待检血清用样品稀释液1:100倍稀释, 按100uL/孔加入抗体检测板中, 37°C孵育60min, 弃去反应孔中的液体, 以含0.05%吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干; 将酶标二抗用样品稀释液按1:400倍稀释, 按100uL/孔加入抗体检测板中, 37°C孵育60min, 弃去反应孔中的液体, 以含0.05%吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干; 加入100uL TMB显色液, 37°C避光显色 15min; 加入50uL硫酸终止液, 用酶标仪在450<sub>nm</sub>波长测定各孔的吸光度A值, 读值计算并判定结果。

[0098] 实施例2试剂盒的组装及应用

[0099] 一、试剂盒的组装

[0100] 所述试剂盒包括: 1型DHAV VP0重组蛋白包被的ELISA板、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、阳性血清和阴性血清。其中, 所述样品稀释液为含0.05%v/v吐温-20的0.05M pH7.4的磷酸盐缓冲液; 所述10×浓缩洗涤液为含0.05%v/v吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液; 所述酶结合物工作液为HRP-山羊抗鸭IgG; 所述显色液A为0.2mg/mL的四甲基联苯胺溶液, 所述显色液B为含0.5%ow/v过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液; 所述终止液为0.01M硫酸溶液; 所述阳性血清为经鸭甲型肝炎病毒1型疫苗和3型病毒尿囊液免疫成年鸭获得的阳性血清; 所述阴性血清为未免疫鸭的血清。

[0101] 二、操作步骤

[0102] 1、将DHAV-1-VP0重组蛋白用样品稀释液稀释成0.25ug/mL, 按100uL/孔加入ELISA检测板中, 37°C作用2h, 4°C包被过夜;

[0103] 2、弃去反应孔中的液体, 以含0.05%v/v吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干; 加入5%w/v脱脂乳, 300uL/孔, 37°C封闭2h, 以含0.05%v/v吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干;

[0104] 3、将待检血清用样品稀释液作1:100稀释, 按100uL/孔加入抗原包被板孔中, 37°C作用60min, 同时设阴性对照;

[0105] 4、弃去反应孔中的液体, 以含0.05%v/v吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干。将酶标二抗用样品稀释液按1:400倍稀释, 按100uL/孔加入检测板中, 37°C孵育60min;

[0106] 5、弃去反应孔中的液体, 以含0.05%v/v吐温-20pH 7.4的PBS洗涤, 每孔加洗涤液300uL, 洗涤3次, 拍干; 加入100uL TMB显色液, 37°C避光显色15min;

[0107] 6、加入50uL硫酸终止液,用酶标仪在450<sub>nm</sub>波长下测定各孔吸光度A值,读值计算并判定结果。

[0108] 三、应用

[0109] 1、特异性试验

[0110] 用DHAV-1-VP0重组蛋白建立的间接ELISA检测试剂盒分别检测鸭源小鹅瘟、鸭肠炎、禽流感H9N2亚型的阳性血清,并设立鸭甲型肝炎病毒1型和3型阳性对照及阴性对照,每个样本2个重复,进行反应性测定。检测结果显示鸭甲型肝炎病毒1型和鸭甲型肝炎病毒3型阳性血清为阳性结果,其余均为阴性,表明该检测方法与小鹅瘟、鸭肠炎、禽流感H9N2亚型等无交叉反应。

[0111] 2、敏感性试验

[0112] DHAV-1和DHAV-3血清各3份,分别选择抗体水平较强的、较弱的及阴性血清三种进行检测,将血清从1:20起进行倍比稀释,其余条件按最佳反应条件进行ELISA检测,结果表明,检测DHAV-1血清,最低检出量为1:640,结果如图 13;检测DHAV-3血清,最低检出量为1:320,结果如图14,综上所述,本发明建立的方法的最低检出量为1:320。

[0113] 3.重复性试验

[0114] 板内重复试验:用DHAV-1-VP0重组蛋白作抗原包被酶标板,分别对根据血清抗体消长规律筛选出的6份抗体水平不同的DHAV-1和DHAV-3阳性血清样本进行检测,每份做6个重复。

[0115] 板间重复试验:分别在6个不同时间包被ELISA板,对根据血清抗体消长规律筛选出的(同板内重复性试验的血清)6份抗体水平不同的DHAV-1和DHAV-3 阳性血清进行检测。

[0116] 同时设立阴性对照,对结果进行统计学分析,计算同一份检测样本阳性百分率的变异系数( $CV=S/\bar{X} \times 100\%$ , S:标准差,  $\bar{X}$ :算术平均值)。结果表明对DHAV-1 血清样本进行检测,板内变异系数在0.57%~2.67%之间,板间变异系数在 1.94%~6.05%之间。对DHAV-3血清样本进行检测,板内变异系数在0.65%~3.48%之间,板间变异系数在2.48%~4.20%之间。变异系数均小于10%,重复性较好。

[0117] 4.符合率试验

[0118] 检测的样本为试验样本和部分送检样本。应用本发明建立的ELISA检测方法和公司生产的试剂盒同时检测46份血清样本,比较两种方法的符合率。其中本发明建立的ELISA检测方法检出阳性血清为30份,阳性检出率为65.2%,公司生产的试剂盒检出阳性血清为28份,阳性检出率为60.9%,两种方法的符合率为 95.7% (如表7所示)。

[0119] 表7本发明建立的ELISA检测方法与公司生产的试剂盒比较

	方法	公司生产的 ELISA 试剂盒	本发明建立的 ELISA 检测方法
	样品数	46	46
	阳检数	28	30
[0120]	阳检率	60.9%	65.2%
	共同阳性数	28	
	共同阴性数	16	
	符合率	95.7%	

[0121] 注: 检出符合率 = (共同阳性数 + 共同阴性数) / 总样品数 × 100%。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 东北农业大学
- [0003] <120> 用于检测1型和3型鸭甲型肝炎病毒血清抗体的通用型间接ELISA试剂盒及其应用
- [0004] <130> KLPI190125
- [0005] <160> 2
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 768
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> DHAV-1
- [0011] <400> 1
- [0012] atggatactc tcaccaaaaa cattgaagat gcaacagtca acatcattgg atcttgtgca 60
- [0013] gaaaaggtgg aggaagcaat ttcaggccta ggggcagtgg aaagtgtggc atccaccaac 120
- [0014] tcagccatta ccaactgcca tgcaacaact acacagacaa taccagacc aacggagggt 180
- [0015] tccactgatg acttctactc ttgttcttat gaagtaggag ctcaagggga taacatttct 240
- [0016] agattggtac atctggttac aggacagtgg gttccaaatg atgattatta tgctgcctg 300
- [0017] cgctggttag caacacctgc ttgttttttt caaaataaca cacaaccagc atatggccag 360
- [0018] acacgatatt ttaggtttat tagatgtggc ttccatttca ggttgcttgt aaatgcccc 420
- [0019] tctggatctg ctggagcgt tatgctagtt tggatgcctt acccctattg tcgggtctta 480
- [0020] tctggtacta atcagatcca tgcaaatggt gagagaagga gtctaataaa cctgccctat 540
- [0021] gccatcttgg atctccgcac caacacagaa attgacctg tagttccata tgtcaactac 600
- [0022] cggaactatg tagagattac aaccagtgc acaactggtg gtgccatctg tgtgattgtg 660
- [0023] ttaggcaagt accgacatgg caatggaacc tccaacactg tggatttcac attatttggga 720
- [0024] gaactccttg aaactgattt gcagtgcacc cgaccatttg acaatcag 768
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 768
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> DHAV-3
- [0029] <400> 2
- [0030] atggacactc taactaaaaa cattgaagat gaaaccgtca agattattgg atcctgtgcc 60
- [0031] gagaaggtac aagaagcgt ctctggtctt ggagctgttg agagtgttgc ttccactaac 120
- [0032] tctgtggttg ccaactgcaaa tgctacaaca acacaaacga ttctgatcc aacagatggt 180
- [0033] tccacagatg acttctatct atgttctctat gaggttgggg cccagggtga caacatctca 240
- [0034] cgtttggtec atctacatac cggacagtgg tctacacagc atggtgtcac tacatgcctt 300
- [0035] agatggttgg ccaactcctg atgtttttat acagetaata cccaaccagc atatggacaa 360
- [0036] actaggtatt ttaggttcat cagatgcggc taccacttcc gccttcttgt gaatgcacca 420
- [0037] tctggtgctg ctggtggact aatgatggtg tggatgcctt atccatattg cggggttctc 480

---

[0038] actgatcctt acaatgtgga tgcacagta gatcgcaggt cattgttgaa tcttcctat 540  
[0039] gccatcttgg atctgcgcac caacactgaa attgacctgg ttattccata tgtaaatttt 600  
[0040] aggaattatg ttgaaattaa tgccacagat agtgttgggtg gggccatatg tgtctttgtg 660  
[0041] ttgggagctt ttacacatgg gtcaggaacc tccaacactg ttgattacac tctctttggc 720  
[0042] gagatgcttg aaactgattt acaatgtcct cggcctttca atgaccag 768

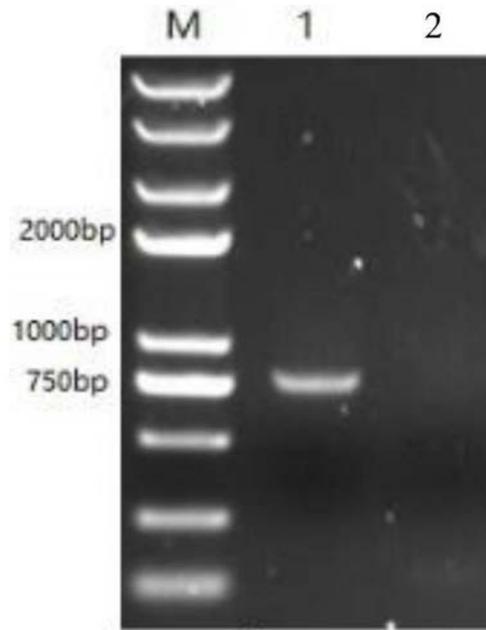


图1

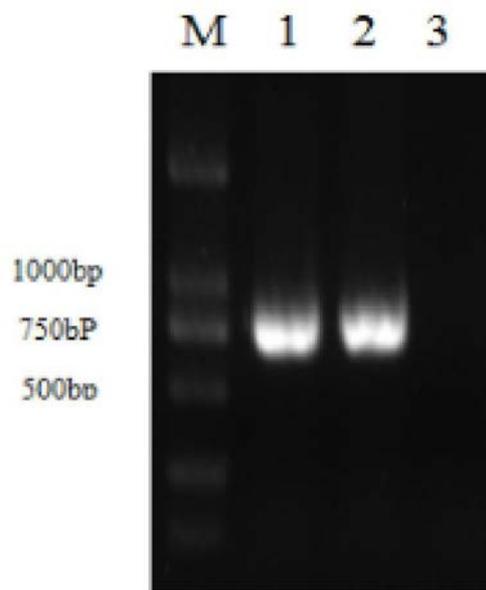


图2

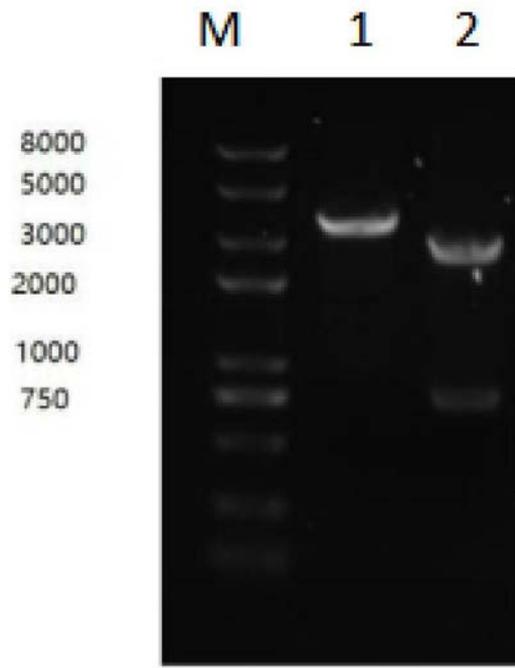


图3

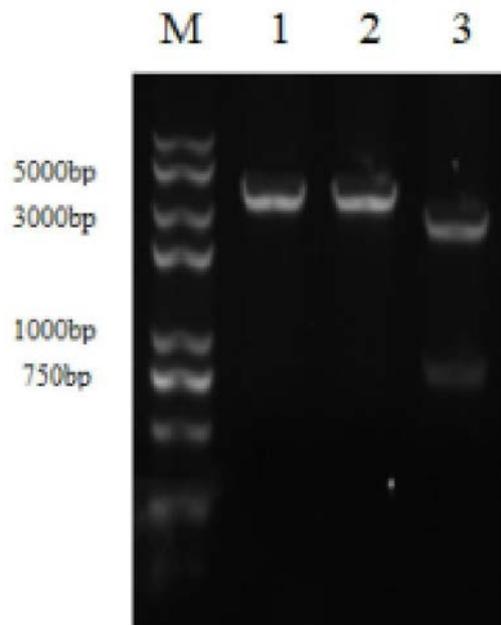


图4

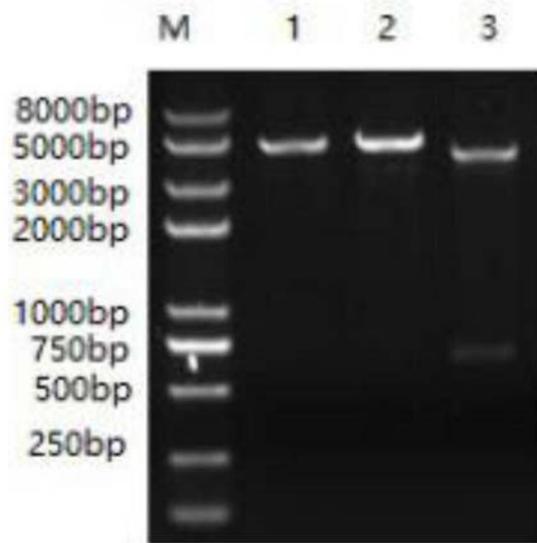


图5

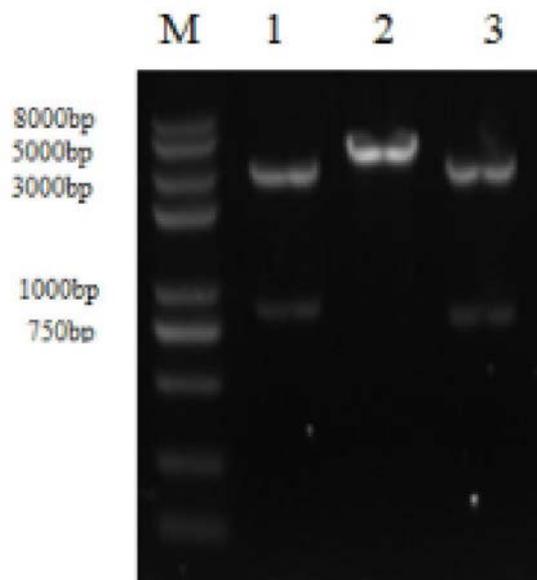


图6

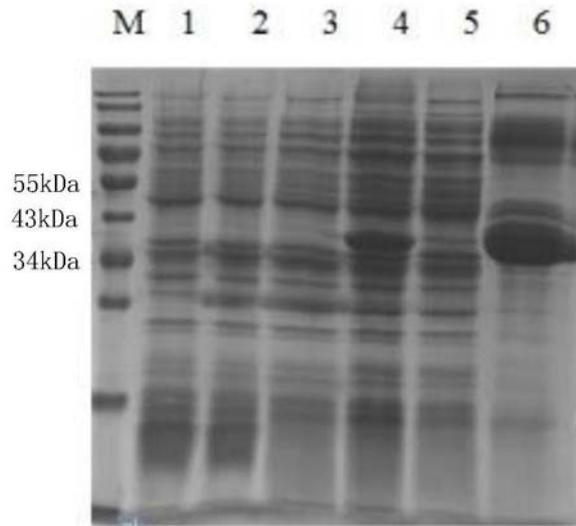


图7

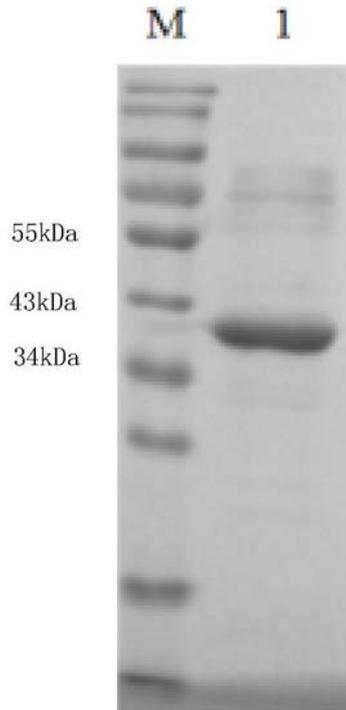


图8

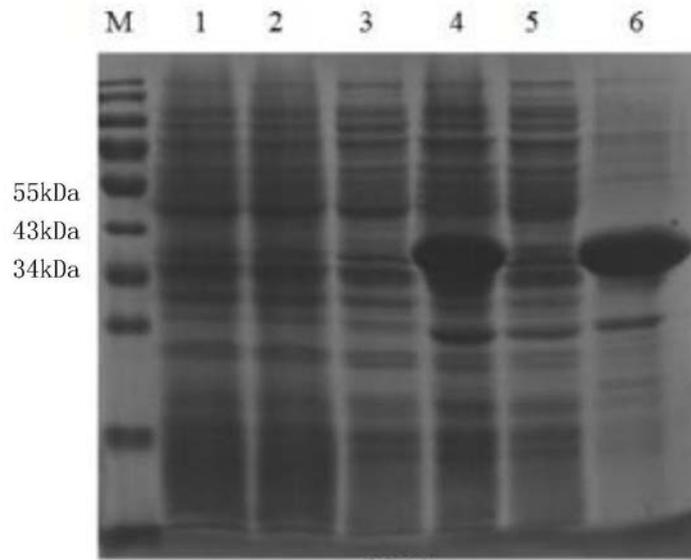


图9

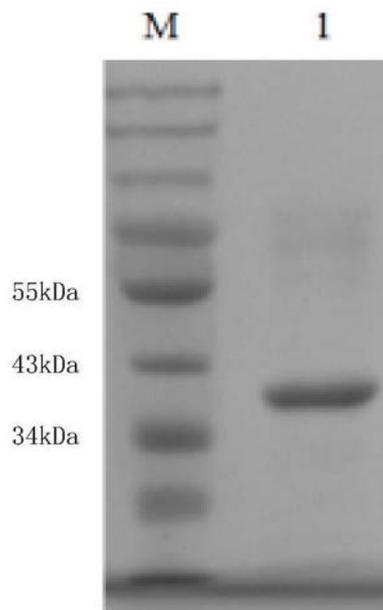


图10

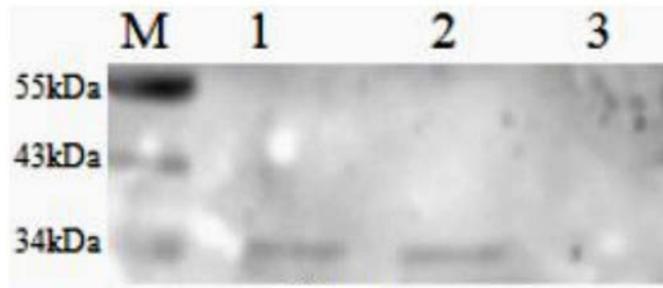


图11

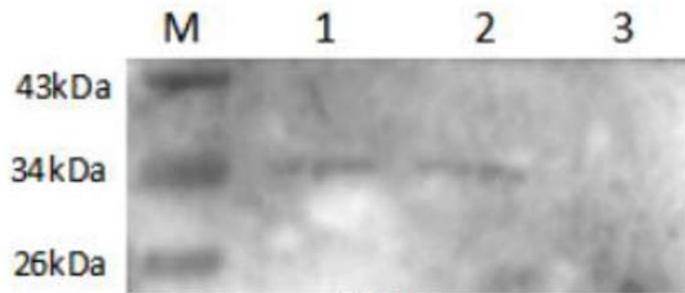


图12

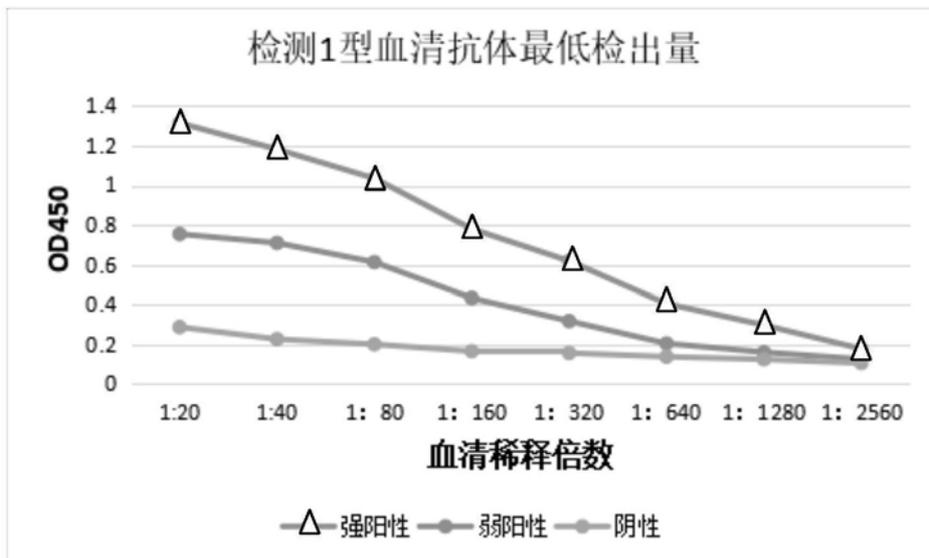


图13

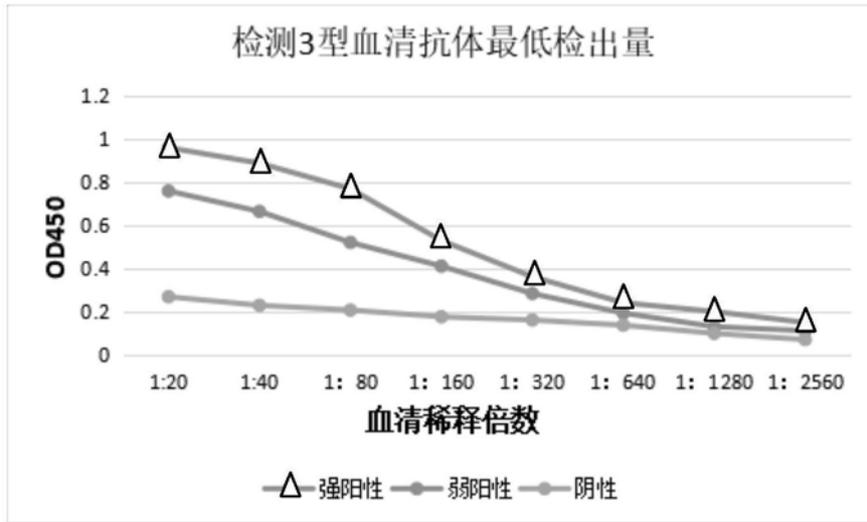


图14