



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510027316.0

[43] 公开日 2005 年 12 月 28 日

[11] 公开号 CN 1712965A

[22] 申请日 2005. 6. 30

[21] 申请号 200510027316.0

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

[72] 发明人 孙建和 王 琰 陆承平 严亚贤
陆 莘

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

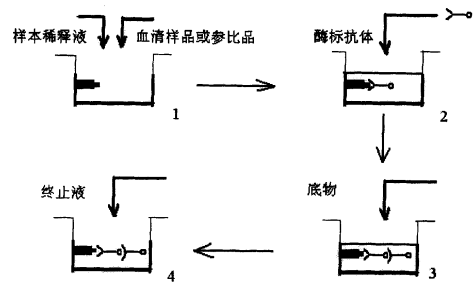
代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法

[57] 摘要

一种鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，通过原核表达 H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白，以此作为抗原包被酶标反应板。即将 H9N2 型禽流感病毒进行 RT-PCR 扩增，获得目的片断，再将目的片断与 pET-32a(+) 载体连接，得到重组表达质粒，导入大肠杆菌 BL21 表达，获得一个分子量为 44.2KD 的融合蛋白。该融合蛋白，经过纯化，得到纯度较高的 H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白。将获得的蛋白作为抗原包被酶标反应板，通过间接酶联免疫吸附试验的方法测定待检血清中与抗原反应的抗体 IgG 水平鉴别诊断禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群。本发明操作简单，价格低廉，又克服了现有技术的缺点，是一种有效可靠的禽流感诊断方法。



1、一种鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征在于，对 H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白进行原核表达，以此作为抗原包被酶标反应板，将 H9N2 型禽流感病毒进行 RT-PCR 扩增，获得目的片断，再将目的片断与 pET-32a (+) 载体连接，得到重组表达质粒，导入大肠杆菌 BL21 表达，获得一个分子量为 44.2KD 的融合蛋白，该融合蛋白，经过纯化，得到纯度较高的 H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白，将获得的蛋白作为抗原包被酶标反应板，通过间接酶联免疫吸附试验的方法测定待检血清中与抗原反应的抗体 IgG 水平，鉴别诊断禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群。

2、根据权利要求 1 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，包括步骤如下：

- ①、H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白的原核表达；
- ②、先扩增了 H9N2 型禽流感病毒 NS1 基因序列，再将扩增序列；
- ③、通过酶切插入到 pET-32a (+) 中，构建出原核表达质粒，将构建好的质粒转入大肠杆菌 BL21 中，IPTG 诱导表达，表达产物经 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定为分子量 44.2KD 的融合蛋白；
- ④、间接酶联免疫吸附试验的方法的建立；
- ⑤、按照常规间接酶联免疫吸附试验的方法，对样品进行检测。

3、根据权利要求 1 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的间接酶联免疫吸附试验的方法，具体包括确定抗原反应浓度，抗体稀释倍数，抗原抗体反应时间，酶标抗 IgG 抗体稀释倍数。

4、根据权利要求 1 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的抗原反应浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 。

5、根据权利要求 4 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的抗体稀释倍数是 1:200 倍。

6、根据权利要求 4 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的抗原抗体反应时间为 1h。

7、根据权利要求 4 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试

验的方法，其特征是，所述的酶标抗 IgG 抗体稀释倍数是 1：10000。

8、根据权利要求 1、3、4、6 中的任一项所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的抗原，是经大肠杆菌原核表达的抗原，包被在固相载体上进行抗体的测定，对待测血清样品进行定性分析。

9、根据权利要求 1 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的酶联免疫吸附试验，利用酶标记的抗原或抗体，在固相载体上进行的抗原或抗体的测定，酶联免疫吸附试验的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记，结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性，在测定时，受检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应，用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开，再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上，此时固相上的酶量与标本中受检物质的量，加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。

10、根据权利要求 1 所述的鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，其特征是，所述的抗原包被酶标反应板，是以禽流感病毒 NS1 蛋白作为抗原包被酶标反应板，将待测血清样品经稀释与抗原反应，加入酶标二抗，最后加底物显色，根据测定显色样品的 OD 值来判定结果。

鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法

技术领域

本发明涉及的是一种生物技术领域的方法，具体地说，是一种鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法。

背景技术

高致病性禽流感的流行造成了大批的家禽死亡和禽产品损失。目前有效控制禽流感的方法之一是疫苗接种，有效评价免疫效果的一个指标就是检测免疫后的抗体水平。但是野毒感染后期也会诱导抗体产生，而此时鸡群已经带毒，生产上对此则必须采取断然扑杀措施。因此有效区分自然感染产生的抗体与免疫接种产生的抗体非常重要。禽流感病毒感染细胞的早期可以在细胞核内发现大量的 NS1 蛋白存在，在感染的晚期，NS1 蛋白可以在胞浆中出现，它可以刺激机体产生 NS1 非结构蛋白抗体。但在成熟的病毒颗粒中没有发现该蛋白。应用疫苗免疫后，在鸡体中不会出现 NS1 蛋白抗体或出现极低含量的 NS1 蛋白抗体，而野毒感染的鸡体内由于存在病毒的繁殖、复制，通常会出现大量 NS1 蛋白，从而诱导抗体产生。非结构蛋白及其抗体可以作为病毒感染机体的一个重要标记 (Inoue Y, Suzuk R, Matsuura Y 等, 肝病病人丙肝病毒 NS1 氮端蛋白的表达和抗体的检出, [病毒学杂志]) (Inoue Y, Suzuk R, Matsuura Y, et al. Expression of the aminoterminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection of antibody to the expressed protein in patients with liver disease [J]. J Gen Virol. 1992, 73:2151-2154)。传统的血清学实验方法，如血凝和血抑实验 (HA-HI)、琼脂扩散实验 (AGP) 以及现有的间接酶联免疫吸附试验方法，只能检测免疫后的抗体水平。但是野毒感染后期也会诱导抗体产生，这样不能鉴别自然感染鸡群与免疫接种鸡群。本发明采用间接酶联免疫吸附试验的方法，可以有效地鉴别诊断禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群。

对现有技术文献的分析中，利用禽流感 NS1 蛋白作为包被抗原，通过间接

酶联免疫吸附试验的方法检测鸡血清中与抗原反应的抗体 IgG 水平，来鉴别诊断自然感染鸡群与免疫接种鸡群，未见相关报道。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中的不足，提供一种鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法。使其利用禽流感 NS1 蛋白抗体在自然感染鸡群与免疫接种鸡群含量的不同，通过间接酶联免疫吸附试验的方法检测鸡血清中与抗原反应的抗体 IgG 水平来鉴别诊断。

本发明是通过以下技术方案实现的，在本发明对 H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白进行原核表达，以此作为抗原包被酶标反应板。将 H9N2 型禽流感病毒进行 RT-PCR 扩增，获得目的片断，再将目的片断与 pET-32a (+) 载体连接，得到重组表达质粒，导入大肠杆菌 BL21 表达，获得一个分子量为 44.2KD 的融合蛋白，该融合蛋白，经过纯化，得到纯度较高的 H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白。将获得的蛋白作为抗原包被酶标反应板，通过间接酶联免疫吸附试验的方法测定待检血清中与抗原反应的抗体 IgG 水平，鉴别诊断禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群。

本发明的步骤包括：

- ①、H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白的原核表达；
- ②、先扩增了 H9N2 型禽流感病毒 NS1 基因，再将扩增基因；
- ③、通过酶切插入到 pET-32a (+) 中，构建出原核表达质粒，将构建好的质粒转入大肠杆菌 BL21 中，IPTG 诱导表达，表达产物经 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定为分子量 44.2KD 的融合蛋白；
- ④、间接酶联免疫吸附试验的方法的建立；
- ⑤、按照常规间接酶联免疫吸附试验的方法，对样品进行检测。

所述的间接酶联免疫吸附试验的方法，具体包括确定抗原反应浓度，抗体稀释倍数，抗原抗体反应时间，酶标抗 IgG 抗体稀释倍数。

抗原反应浓度为 10 μg/mL，抗体稀释倍数是 1：200 倍，抗原抗体反应时间为 1h，酶标抗 IgG 抗体稀释倍数是 1：10000。

所述的抗原，是经大肠杆菌原核表达的抗原，包被在固相载体上进行抗体的测定，对待测血清样品进行定性分析。

酶联免疫吸附试验利用酶标记的抗原或抗体，在固相载体上进行的抗原或抗体的测定。酶联免疫吸附试验的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，受检标本（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。本发明是以禽流感病毒 NS1 蛋白作为抗原包被酶标反应板，将待测血清样品按照一定比例稀释与抗原反应，加入酶标二抗，最后加底物显色，根据测定显色样品的 OD 值来判定结果。

在本发明中，术语“H9N2 型禽流感病毒”，是指甲型流感病毒血凝素（H）及神经氨酸酶（N）分为 15 个 H 型和 9 个 N 型。本发明所用的是 H9N2 型禽流感病毒。

在本发明中，术语“原核表达”，是指重组表达质粒导入原核细胞，如大肠杆菌、枯草杆菌等，使插入质粒中的待表达核苷酸序列表达成所需的蛋白。

在本发明中，术语“融合蛋白”，是指包括 pET-32a (+) 载体上的 Trx Tag、His Tag、S Tag 及一系列酶切位点在内的 168 个氨基酸加上 H9N2 型禽流感 NS1 蛋白 230 个氨基酸序列，分子量 44.2KD。融合蛋白的最大优点是方便蛋白的纯化及防止蛋白降解。

本发明是鉴于 NS1 蛋白在自然感染鸡体内和疫苗感染鸡体内的不同通过酶联免疫吸附试验来鉴别诊断的。用原核表达的 NS1 蛋白作为抗原包被酶标反应板，将待检血清通过一定稀释与包被的抗原反应。再加入抗 IgG 的酶标二抗显色。通过测定 OD 值的大小来判定鸡群是否感染了禽流感。

现在检测禽流感的方法主要有：传统用于禽流感的监测和诊断方式包括血凝试验（HI）、琼脂免疫扩散（AGP）、微量中和、及神经氨酸酶抑制等方法，检验相当耗时费事。还有一些基于分子生物学与免疫学结合的 RT-PCR、荧光定量 PCR（RRT-PCR）、NASBA 等，虽然敏感性较高，但是操作繁琐，费用较高。现

有的间接酶联免疫吸附试验的诊断方法也不能有效区分禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群。而本发明所提供的间接酶联免疫吸附试验的方法，结合了血清学方法的优点，即操作简单，价格低廉，又克服了现有间接酶联免疫吸附试验的方法不能鉴别诊断禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群的缺点，是一种有效可靠的禽流感诊断方法。

附图说明

图 1 本发明原理示意图

具体实施方案

下面结合具体实施例，下列事实例中未注明具体条件的实验方法，根据图 1 的工作原理，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1

H9N2 型禽流感病毒 NS1 蛋白的原核表达

H9N2 型禽流感 NS1 基因的克隆

Trizol (Invitrogen) 抽提总 RNA。根据禽流感 NS1 基因保守序列设计引物进行 RT-PCR 扩增。连接到 pMD-18 T 载体 (Takara 公司) 上测序。根据测序结果设计上游包含 *EcoR* I 限制性酶切位点和下游包含 *Xho* I 限制性酶切位点的引物，进行 PCR 扩增。

表达载体的构建

EcoR I 和 *Xho* I 分别酶切 PCR 产物和 pET-32a (+)，T4 DNA 连接酶 (Takara 公司) 10-16°C 过夜连接。连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 中，37°C 过夜培养，提取质粒。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切鉴定。鉴定的阳性重组质粒测序。

融合蛋白的表达

阳性克隆提质粒，转入大肠杆菌 BL21 中。挑取 1 个菌落接种 2ml Amp LB 培养基过夜培养。取 200 μ l 过夜培养菌液接种 20ml Amp LB 培养基，37°C 150 转/分摇菌 2h，至 OD₆₀₀ 为 0.4-1。加 IPTG 至终浓度为 1mM，25°C 摇菌 4h 后，收取菌液。

融合蛋白的检测

(1) SDS-PAGE 电泳

配制 14% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。样品用上样缓冲液沸水煮 4min。浓缩胶电压 80V，分离胶电压 136V。电泳 4-5h。

考马斯亮兰染色 2h。

脱色液脱色。

观察，在 44KD 处有明显的条带出现。

(2) Western Blot 鉴定

SDS-PAGE 电泳结束时，用蒸馏水淋洗石墨板，然后用纸揩干。

切 6 张 Whatman 3MM 滤纸和一张硝酸纤维素膜。将硝酸纤维素膜浸没于去离子水的水面上，滤纸浸没于转移缓冲液中，平衡 5min。

按纸、膜、胶、纸的顺序从阳极到阴极摆放正确，按照 $0.65\text{mA}/\text{cm}^2$ 通电转印 5h。

硝酸纤维素膜放在密封的塑料袋中，内加封闭液和禽流感阳性血清。（禽流感阳性血清为 1:100 稀释）。4°C 过夜孵育，再转入 37°C 孵育 2h。

取出硝酸纤维素膜用 PBS 漂洗三次，每次 10min。

滤膜再用 TBST 漂洗 10min。

硝酸纤维素膜放在密封的塑料袋中，内加封闭液和 1:1000 稀释的兔抗鸡 IgG 二抗（Bethyl laboratories. Inc）。37°C 孵育 2h。

硝酸纤维素膜放 TBST 中漂洗 3 次，每次 1h。

加入底物显色 2-3min。观察结果，在 44KD 处有黑色条带出现。

实施例 2

间接酶联免疫吸附试验的方法的建立

最佳酶标抗 IgG 抗体浓度的确定

酶标抗 IgG 抗体做从 1:5000 开始作倍比稀释至 1:160000，测得酶标二抗最佳反应浓度为 1:10000。

最佳抗原反应浓度

抗原按 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $6\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度稀释，抗体按 1:50、1:100、1:500、1:1000 稀释，作方阵滴定。确定最佳抗原反应浓度

为 $10 \mu\text{g/ml}$ 。

最佳抗体稀释倍数

将 20 份阴性血清、11 份疫苗感染血清、12 份自然感染血清做 1: 50、1: 100、1: 200、1: 500 倍稀释，测定 OD_{450} ，将检测结果作 t 检验，当阴性血清与疫苗感染血清差异不显著，而与自然感染血清差异显著时的血清稀释倍数作为最佳血清稀释倍数，本发明测定的最佳稀释倍数为 1: 200。

抗原抗体最佳反应时间

抗原抗体分别反应 0.5h、1h、1.5h、2h，测定抗原抗体最佳反应时间为 1h。

实施例 3

间接酶联免疫吸附试验的方法鉴别诊断禽流感病毒自然感染鸡群。

将所用抗原用包被稀释液稀释到 $10 \mu\text{g/ml}$ 后，每孔加入 $100 \mu\text{l}$ ， 4°C 过夜， 37°C 2h。弃去孔内液体。

选择 5%脱脂乳 37°C 封闭 2h，弃去孔内液体，PBST 洗液清洗 7 遍。

待测血清样本 1: 200 倍稀释，每孔加入 $100 \mu\text{l}$ ， 37°C 1h，弃去孔内液体，用 PBST 清洗清洗 10 遍。

加入酶标抗 IgG 抗体 $100 \mu\text{l}$ ， 37°C 1h，弃去孔内液体，用 PBST 洗液清洗 10 遍。

加入 TMD $100 \mu\text{l}$ 室温显色 8min。

加入 $50 \mu\text{l}$ 终止液终止反应。

测定 OD_{450} 。判定结果。

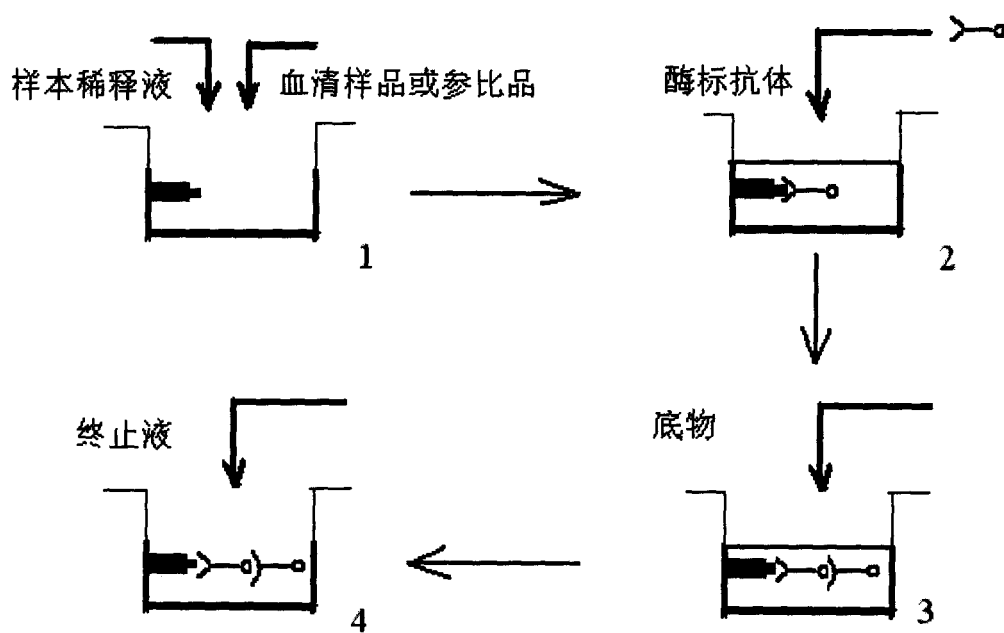


图 1

专利名称(译)	鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法		
公开(公告)号	CN1712965A	公开(公告)日	2005-12-28
申请号	CN200510027316.0	申请日	2005-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海通信联合.		
[标]发明人	孙建和 王琰 陆承平 严亚贤 陆萃		
发明人	孙建和 王琰 陆承平 严亚贤 陆萃		
IPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法，通过原核表达H9N2型禽流感病毒NS1蛋白，以此作为抗原包被酶标反应板。即将H9N2型禽流感病毒进行RT-PCR扩增，获得目的片断，再将目的片断与pET-32a(+)载体连接，得到重组表达质粒，导入大肠杆菌BL21表达，获得一个分子量为44.2KD的融合蛋白。该融合蛋白，经过纯化，得到纯度较高的H9N2型禽流感病毒NS1蛋白。将获得的蛋白作为抗原包被酶标反应板，通过间接酶联免疫吸附试验的方法测定待检血清中与抗原反应的抗体IgG水平鉴别诊断禽流感自然感染鸡群与免疫接种鸡群。本发明操作简单，价格低廉，又克服了现有技术的缺点，是一种有效可靠的禽流感诊断方法。

