



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102772794 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201210190050. 1

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 11

G01N 33/531 (2006. 01)

(71) 申请人 新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所

G01N 33/543 (2006. 01)

地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市克拉玛依东路 151 号

C12N 15/70 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

C12R 1/01 (2006. 01)

(72) 发明人 钟旗 易新萍 王力俭 谷文喜  
叶锋 刘丽娅 李延涛 吴冬玲  
马晓菁 吐尔洪·努尔 姚刚  
范伟兴

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐中科新兴专利事务所 65106

代理人 张莉

(51) Int. Cl.

A61K 39/10 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

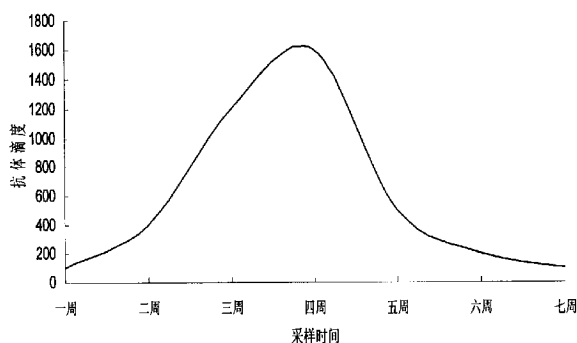
序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别

(57) 摘要

本发明涉及一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别,应用该布鲁氏菌病疫苗后可提供间接酶联免疫吸附试验 (iELISA) 方法区分该疫苗接种的动物与野毒感染动物。本发明以牛为防疫布鲁氏菌病的实验靶动物,应用布鲁氏菌病 A19-ΔVirB12 标记疫苗免疫牛,评价该分子标记苗的免疫保护力。建立了区分布鲁氏菌病 A19-ΔVirB12 免疫动物与野毒感染动物的 iELISA 方法。本发明提供的布鲁氏菌病 A19-ΔVirB12 标记疫苗不仅对牛布鲁氏菌病具有较好免疫保护力,而且发明的 iELISA 方法解决了免疫动物与临床患病动物难以鉴别的问题,对牛布鲁氏菌病的防控、根除和净化具有实际应用价值。



1. 一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的应用,其特征在于以 500 亿 CFU 的牛布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗活菌皮下注射免疫 4-6 月龄犊牛。

2. 一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的免疫学鉴别,其特征在于以布鲁氏菌病 A19 疫苗为起始原料,制备牛布鲁氏菌 VirB12 抗原蛋白具体操作按下列步骤进行:

a、根据布鲁氏菌 A19 的 VirB12 基因设计引物, VirB12 基因的一对特异性引物为:

VirB12F:5' -CATATGCGCACATTGGTTATGGTC-3' 含 Nde I 酶切位点;VirB12R:5' -GTCGACTTACTTGCGTAAAATTTC-3' 含 SaI I 酶切位点;

b、从牛种布鲁氏菌 A19 株提取细菌总 DNA,以细菌总 DNA 为模板,将步骤 a 中设计的 VirB12 基因引物进行聚合酶链反应,获得 VirB12 蛋白基因;

c、将步骤 b 中获得 VirB12 蛋白基因转入原核表达载体 pET-28a(+) 中,获得重组表达载体;

d、将步骤 c 中重组表达载体导入大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 中,摇菌至  $OD_{600} = 0.5$ ,以 IPTG 终浓度 0.2mg/mL 温度 37°C 诱导表达 4h,收集菌体,经组氨酸结合树脂柱纯化,制备 VirB12 抗原蛋白即可。

3. 如权利要求 2 所述的布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的免疫学鉴别,其特征在于步骤 d 中所述的制备 VirB12 蛋白能被非免疫布鲁氏菌阳性牛血清所识别。

4. 如权利要求 3 所述的布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗免疫学鉴别的方法,其特征在于,以 VirB12 标记蛋白作抗原包被酶标板,以健康非免疫牛血清为阴性对照,自然感染的布病阳性牛血清为阳性对照,以辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 为二抗,建立了鉴别布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗免疫动物与临床患病动物的间接酶联免疫吸附实验方法,区分 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗免疫抗体与自然感染抗体。

## 布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别

### 技术领域

[0001] 本发明涉及布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的应用及其免疫学鉴别,尤其是布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的 (A19- $\Delta$ VirB12) 免疫保护力及应用,建立免疫学方法解决了免疫动物与临床患病动物难以鉴别的问题,属于兽用生物制品领域。

### 背景技术

[0002] 布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是由布鲁氏菌 (Brucella) 引起的世界各地广泛流行的人畜共患传染病。对布鲁氏菌病的预防和根除,已经成为众多国家和地区公共卫生安全防御体系的主要任务。

[0003] 在多数布病流行的国家和地区,控制家畜布病的主要手段仍是使用疫苗接种进行免疫,因此,疫苗免疫是预防和控制畜间布鲁氏菌病的主要措施和最有效的手段。目前我国使用的弱毒菌疫苗有牛 A19、羊 M5 和猪 S2;国外使用的弱毒菌疫苗有牛 S19 和 RB51、羊 Rev1;S19 由美国研发,我国从前苏联引进,不缺失 Ery 基因,命名为 A19。加拿大、澳大利亚、美国等几个宣布布病消灭的国家,主要采用以弱毒疫苗免疫为主的综合防控措施。

[0004] 纵观布鲁氏菌免疫制剂研究历史我们发现,布鲁氏菌弱毒苗一直处于主导地位,对布鲁氏菌的防治起到很大的作用,但是同时也带来一些隐忧,首先,现用的布鲁氏菌疫苗均为弱毒活菌疫苗,容易感染人,对人类健康存在威胁。其次,疫苗缺乏鉴别诊断标记,疫苗接种动物与自然患病动物无法甄别,造成患病动物在自然群体中长期存在,严重危害人类和动物的健康,阻碍动物布鲁氏菌病的根除和净化。

[0005] 随着分子生物学技术的发展,基因敲除技术成为目前解决弱毒疫苗毒力强、无法用免疫学方法区分疫苗免疫和自然感染等难题的一项重要技术。为解决布鲁氏菌病弱毒疫苗中存在的上述问题,本发明通过分子生物学技术构建出缺失 VirB12 蛋白的牛布鲁氏菌病分子标记苗,缺失的 VirB12 蛋白能刺激机体产生有诊断意义的抗体,并且不改变 A19 疫苗的免疫原性和生物学特性,用免疫学方法可以区分疫苗免疫抗体和自然感染抗体,弥补现有 A19 苗的缺陷,对全面提升国产弱毒菌疫苗的性能,发挥国内自主知识产权的布鲁氏菌弱毒菌疫苗作用的意义重大,为动物布病防控提供新的疫苗。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别,应用该布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗后可提供间接酶联免疫吸附试验 (iELISA) 区分该疫苗接种的动物与野毒感染动物。本发明以牛为防疫布鲁氏菌病的实验靶动物,应用布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 标记疫苗免疫牛,评价该分子标记苗的免疫保护力。利用该分子标记苗中缺失的 VirB12 蛋白作抗原包被酶标板,以健康非免疫牛免疫为阴性对照,自然感染的布病阳性牛免疫为阳性对照,以辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 为二抗,建立了鉴别布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 免疫动物与野毒感染动物的 iELISA 方法。本发明提供的布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 标记疫苗不仅对牛布鲁氏菌病具有好的免疫保护力,而且发明的 iELISA 方

法解决了免疫动物与临床患病动物难以鉴别的问题,对牛布鲁氏菌病的防控、根除和净化具有实际应用价值。

[0007] 本发明所述的一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的应用,以 500 亿 CFU 的牛布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗活菌皮下注射免疫 4-6 月龄犊牛。

[0008] 一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的免疫学鉴别,以布鲁氏菌病 A19 疫苗为起始原料,制备牛布鲁氏菌 VirB12 抗原蛋白具体操作按下列步骤进行:

[0009] a、根据布鲁氏菌 A19 的 VirB12 基因设计引物,VirB12 基因的一对特异性引物为:

[0010] VirB12F:5' -CATATGCGCACATTGGTTATGGTC-3' 含 NdeI 酶切位点;VirB12R:5' -GTCGACTTACTTGCCTAAAATTTC-3' 含 Sal I 酶切位点;

[0011] b、从牛种布鲁氏菌 A19 株提取细菌总 DNA,以细菌总 DNA 为模板,将步骤 a 中设计的 VirB12 基因引物进行聚合酶链反应,获得 VirB12 蛋白基因;

[0012] c、将步骤 b 中获得 VirB12 蛋白基因转入原核表达载体 pET-28a(+) 中,获得重组表达载体;

[0013] d、将步骤 c 中重组表达载体导入大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 中,摇菌至  $OD_{600} = 0.5$ ,以 IPTG 终浓度 0.2mg/mL 温度 37°C 诱导表达 4h,收集菌体制备 VirB12 抗原蛋白即可。

[0014] 所述布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的免疫学鉴别中,步骤 d 中所述的制备 VirB12 蛋白能被非免疫布鲁氏菌阳性牛血清所识别。

[0015] 所述布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗免疫学鉴别的方法,该方法以 VirB12 标记蛋白作抗原包被酶标板,以健康非免疫牛血清为阴性对照,自然感染的布病阳性牛血清为阳性对照,以辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 为二抗,建立了鉴别布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗免疫动物与临床患病动物的间接酶联免疫吸附实验方法,区分 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗免疫抗体与自然感染抗体。

[0016] 本发明所述的一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别,提供了以牛为试验靶动物,确定了牛种布鲁氏菌 2308 强毒株感染牛的最小感染剂量。

[0017] 本发明所述的一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别,以牛为试验靶动物,牛种布鲁氏菌 2308 强毒株作为牛布鲁氏菌病感染病原,以此评价了牛布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 标记疫苗对布鲁氏菌病的免疫保护力。

[0018] 本发明所述的一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别,应用聚合酶链反应 (PCR) 扩增出 VirB12 基因,经克隆、亚克隆连接到原核表达载体 pET-28a(+) 上,转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,37°C 培养至  $OD_{600} = 0.5$ ,用 IPTG 诱导表达,结果温度 37°C 诱导 4h 时,用 SDS-PAGE 分析,高效表达出带有 His-tag 标签的融合蛋白 VirB12 蛋白,经 8M 尿素变性,组氨酸结合树脂柱纯化,复性得到纯化的 VirB12 蛋白。Western-blot 鉴定纯化的 VirB12 蛋白具有免疫活性。

[0019] 本发明所述的一种布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别,以 VirB12 标记蛋白作抗原包被酶标板,以健康非免疫牛血清为阴性对照,自然感染的布病阳性牛血清为阳性对照,以辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 为二抗,建立了鉴别布鲁氏菌病 A19- $\Delta$ VirB12 标记疫苗免疫动物与临床患病动物的间接酶联免疫吸附实验检测方法。

## 附图说明

- [0020] 图 1 为本发明 A19- $\Delta$ VirB12 免疫牛抗体消长规律曲线图  
 [0021] 图 2 为本发明 A19- $\Delta$ VirB12 免疫保护牛的病理组织切片图  
 [0022] 图 3 为本发明重组质粒经 IPTG 诱导表达的 SDS-PAGE 分析图  
 [0023] 图 4 为本发明 VirB12 重组蛋白的 Western Blot 检测图  
 [0024] 图 5 为本发明的 iELISA 法鉴别布鲁氏菌 A19- $\Delta$ VirB12 免疫抗体与野毒株感染抗体的检测图

## 具体实施方式

[0025] 下列实施例旨在进一步举例说明,而不是限制本发明,下述实施例中方法与材料,如无特殊说明,均为常规方法与常用试剂。

[0026] 实施例 1

[0027] 布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的应用及其免疫保护力:

[0028] 材料:

[0029] 菌株:A19- $\Delta$ VirB12 标记疫苗由新疆畜牧科学院兽医研究所布病室研制和保存,布鲁氏菌 2308 株购自中国兽药监察所,A19 疫苗购自新疆天康畜牧生物技术股份有限公司;

[0030] 实验动物:25 头 6-8 月龄新疆土牛,购自新疆米泉地区活牛交易市场,经布鲁氏菌病检测均为阴性;

[0031] 布鲁氏菌 2308 株攻毒剂量的确定:25 头的新疆本地牛,随机分为 5 组,每组 5 头牛,其中,1-4 组分别用布鲁氏菌 2308 标准菌攻毒,眼睑接种的攻毒剂量分别为  $1 \times 10^6$ CFU、 $1 \times 10^7$ CFU、 $1 \times 10^8$ CFU、 $1 \times 10^9$ CFU,第 5 组为空白对照组,应用 0.01MPBS 液皮下注射,45 天后于动物生物安全三级实验室屠宰攻毒牛,取脾脏分离布鲁氏菌并计数,计算每组脾脏的克脾菌数见表 1:

[0032] 表 1 布鲁氏菌 2308 株不同攻毒剂量的牛脾脏载菌量

[0033]

实验组	1 组	2 组	3 组	4 组	空白对照组
2308 菌液 攻毒剂量	$1 \times 10^6$ CFU	$1 \times 10^7$ CFU	$1 \times 10^8$ CFU	$1 \times 10^9$ CFU	PBS 液
克脾菌数 (CFU/g)	未分到菌	98	190	648	未分到菌

[0034] 实验数据表明随着接种剂量的增加,平均克脾菌数呈上升的趋势。因此,根据牛脾脏分到的克脾菌数的量确定 2308 标准菌对牛的攻毒剂量为  $5 \times 10^7$ CFU。

[0035] A19- $\Delta$ VirB12 标记疫苗免疫保护力的评价:

[0036] 动物分组:10 头 8 月龄的新疆本地牛,随机分为 2 组,每组 5 头牛,即免疫 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗组,对照组。

[0037] 牛免疫实验:采用颈部皮下注射 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗,免疫剂量为 500 亿 CFU 活菌,对照组注射 0.01MPBS 液 1.0ml,每周采血并应用试管凝集试验检测抗体效价,检测结

果表明布鲁氏菌 A19- $\Delta$ VirB12 疫苗刺激牛机体产生特异的抗体,且抗体效价自第 1 周开始增长,第三周到第四周达到最高峰,第四周至第五周后抗体滴度逐渐降低,但一直维持 1 : 200-1 : 400 左右的抗体滴度,在第六周后抗体滴度迅速下降至 1 : 50-1 : 100。以 SAT 检测的抗体滴度为纵坐标,采样时间(周)为横坐标,A19- $\Delta$ VirB12 免疫牛抗体消长规律曲线图见图 1。

[0038] 免疫牛的攻毒实验:免疫 45 天后,将实验牛全部移至新疆天康畜牧生物技术股份有限公司动物生物安全三级实验室内隔离饲养,2 天后将 10 头牛采用眼睑接种布鲁氏菌 2308 株攻毒,剂量为  $5 \times 10^7$ CFU。攻毒后 45 天剖检牛,取脾脏分离布鲁氏菌。

[0039] 牛脾脏细菌的分离:屠宰牛后无菌取脾脏,加 TSB 液体研磨脾脏,研磨脾脏液体接种于 TSA 培养基平板上培养,A19- $\Delta$ VirB12 组的 5 头牛中有 1 头牛的脾脏分离到布鲁氏菌,对照组 5 头牛的脾脏均分离到布鲁氏菌。实验数据表明,A19- $\Delta$ VirB12 疫苗对牛布鲁氏菌病具有好的免疫保护力,免疫保护率达 80%。

[0040] 牛组织病理变化切片:将屠宰的牛取心、肝、脾、肺、肾及淋巴结组织,经 10%中性福尔马林溶液固定,组织脱水、透明、浸蜡和包埋,常规方法制备石蜡切片。HE 染色,镜检,观察牛组织的病理变化。病理组织学观察,免疫组攻毒后牛的淋巴结中有轻微纤维组织增生;脾小梁稍有延伸;肝细胞间质间有淤血,而心脏、肾脏、肺组织中未见明显病理变化。对照组攻毒后牛的淋巴结中有纤维组织增生,且淋巴结结构被破坏;脾小梁明显增生,增多、并伴有延伸和增宽现象;肝细胞部分区域有炎细胞浸润。与对照组攻毒后牛的组织变化相比较,A19- $\Delta$ VirB12 疫苗免疫攻毒后牛组织无明显病理损伤,该疫苗对牛布鲁氏菌病有好的免疫保护力,结果见图 2。图 2 中,A 为免疫攻毒组牛的淋巴结;B 为对照攻毒组牛的淋巴结;C 为免疫攻毒组牛的脾脏;D 为对照攻毒组牛的脾脏;E 为免疫攻毒组牛的肝脏;F 为对照攻毒组牛的肝脏。

[0041] 实施例 2

[0042] 布鲁氏菌病 A19 分子标记疫苗的免疫学鉴别:

[0043] 制备 VirB12 抗原蛋白:

[0044] 菌株及载体:A19 分子标记疫苗由新疆畜牧科学院兽医研究所布病室研制;布鲁氏菌 2308 株购自中国兽药监察所,克隆 pGEM-T 载体为商品化试剂,购自 Promega 公司;原核表达载体 pET-28a(+) 由新疆畜牧科学院兽医研究所保存;

[0045] 试剂:限制性内切酶购自 Fermentas 公司;质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自 Promega 公司;T4DNA 连接酶、DNA Marker、DH5  $\alpha$  为北京鼎国生物公司产品。酶标二抗为兔抗牛 IgG 辣根过氧化物酶(美国, Bethyl 公司);蛋白纯化的 His-trap 柱为美国 GE 公司产品;序列测定由上海 Invitrogen 贸易有限公司完成;

[0046] VirB12 基因表达载体的构建:从牛种布鲁氏菌 A19 株提取细菌总 DNA,以该总 DNA 为模板,根据布鲁氏菌 A19 的 VirB12 基因序列设计引物, VirB12F:5' -CATATGCGCACATTGGTTATGGTC-3' 含 Nde I 酶切位点;VirB12R:5' -GTCGACTTACTTGCCTAAAATTTTC-3' 含 Sal I 酶切位点;PCR 扩增 VirB12 基因片段,见序列 1。将 VirB12 基因克隆至 pGEM-T 载体中,即 pV12,将该克隆质粒送至上海 Invitrogen 贸易有限公司测序,序列结果与目的 VirB12 基因序列一致,应用限制性内切酶 Nde I 和 Sal I 双酶切原核表达载体 pET-28a(+) 和 pV12,将 pET-28a(+) 与 VirB12 基因片段连接、转化

DH5  $\alpha$  ,得到 VirB12 基因表达载体 pET28a-VirB12 ;

[0047] 序列 1 为布鲁氏菌 VirB12 基因 DNA 序列 ATGCGCACATTGGTTATGGTCGCATGCGCTGTCTCTCTGGCCGCTTGTTCAGCCCGCCGAAGCCGCCACAGTCAGCGGACGCCACCGCATTCCGATAAACAGCCCGGCGCACAAGAGGAACTGCGCTTGCAGGTTTTCCCGCAAGAACCACCGCGCAAGCAACCATGTGGCCAGCACGACCGCCCAAACAAACAGTCAACGTGTATTTTTCCCGCAGGATGTGACGGTATTCGGCCAACATCCGCACAGATAAACCAACTCCACACACTGCTCTGGCCCGTGCCCAAGCATATCAACGTACAGGGCCCTGACGGACAACAACACTGCCCTCCTCCCGGTGATACGCAAGTCGCGCGTGTCCGTGCGCTGGCTATCTATAATTGGCTGATCAATCAAGGCGTACCCGCCAGCAGGATCACATAAGCTATGCCCGGTAAAAGATTACGCATCAAATGCCCCCTTTCACCGGGCCGCGTCCTGAACAGGCGCGTGGATATCGAAATTTTACGCAAGTAA

[0048] VirB12 重组蛋白的表达 :将鉴定为阳性的 pET28a-VirB12 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取单克隆接入含卡那霉素 (50mg/L) 的 LB 液体培养基中,温度 37 $^{\circ}$ C 培养至  $OD_{600} = 0.5$ ,加入终浓度为 0.2mg/mL 的 IPTG 诱导 4h,收集菌体,SDS-PAGE 检测结果表明 VirB12 蛋白的表达在菌液沉淀中, VirB12 蛋白序列见序列 2。

[0049] 序列 2 为布鲁氏菌 VirB12 蛋白序列

[0050] MRTLVMVACAVSLAACSSPPKPPTVSGRHRIPINSPAAQEELRLQVFPQEPTAQATMWPARPPKQTVN VYFYPQDVTVFRPTSAQINQLHTLLWPVPHINVRGLTDNNCPPPGDTQVARVRALAIYNWLINQGVASRITISYA PVKDYASNAPLSPGRVLRNRVDIEILRK

[0051] VirB12 重组蛋白的纯化及复性 :先将组氨酸结合树脂柱 (His-trap 柱) 平衡,将菌体超声破碎后的沉淀用含有 8M 尿素的结合缓冲液重悬后上柱,然后用 5 倍柱体积的结合缓冲液进行洗涤 ;用洗脱缓冲液洗脱 VirB12 蛋白,收集洗脱液装入透析袋中,依次在温度 4 $^{\circ}$ C 下经梯度 6mol/L 尿素、4mol/L 尿素、2mol/L 尿素、1mol/L 尿素、0.01mol/L PBS 中分别透析 12h,缓慢复性,收集透析的复性蛋白于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。结果见重组质粒经 IPTG 诱导表达的 SDS-PAGE 分析 (图 3),其中图 3 中, M 为低分子量蛋白 Marker ;1 为未诱导的 pET-28a-virB12 大肠杆菌液 ;2 为诱导的 pET28a-virB12 大肠杆菌液 ;3-4 为纯化的 virB12 蛋白 ;

[0052] VirB12 重组蛋白的免疫活性鉴定 :将复性后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜、封闭、洗涤,然后将膜在室温下浸泡于布鲁氏菌阳性血清中 1h,应用磷酸盐缓冲液洗膜后加入兔抗牛的二抗,室温孵育 1h,4-氯-1-萘酚显色至条带清晰,蒸馏水冲洗终止反应。以纯化的 VirB12 蛋白为抗原,分别以 A19 疫苗免疫牛血清、A19- $\Delta$  VirB12 免疫牛血清、非免疫布病阴性牛血清、自然感染布病阳性牛血清为抗体,Western-blot 实验结果表明, VirB12 蛋白具有免疫活性,鉴定结果见图 4,其中图 4 中, M 为低分子量蛋白 Marker ;1 为 A19- $\Delta$  VirB12 免疫 ;2 为阴性对照 ;3 为 A19 免疫 ;4 为阳性对照。

[0053] 实施例 3

[0054] A19- $\Delta$  VirB12 疫苗抗体与野毒株抗体的 iELISA 鉴别 :

[0055] 实验材料及设备 :丹麦 NUNC 酶标 96 孔反应板,兔抗牛 IgG 辣根过氧化物酶 (美国, Bethyl 公司),酶标仪 (Bio-Rad 680),微量移液器 (10-1000  $\mu$  L)。

[0056] 试剂及溶液配方 :

[0057] 酶标板预处理液 (PBST10) :1 $\times$  PBS (pH7.4) 1000mL, Tween205mL。

[0058] 包被稀释液 (0.05mol/L 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6) :Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>1.5g,

NaHCO<sub>3</sub> 2.9g, Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 0.2g, 加去离子水至 1000ml, 调至 pH = 9.6。

[0059] 洗涤液 (PBST, pH 7.4): NaCl 8.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, NaHPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9g, KCl 0.2g, Tween200.5ml, 加去离子水至 1000ml, 调至 pH 7.4。

[0060] 样本稀释液: 1×PBS1000mL, Tween205mL, (pH 10.8)。

[0061] 酶标二抗: 兔抗牛 IgG 辣根过氧化物酶。

[0062] 底物显色液: 1ml 柠檬酸液加入 20 μL TMB (3,3',5,5' - 四甲基联苯胺) 溶液和 1.2 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TMB 水溶液 15mg/ml; 柠檬酸为 0.1mol/L pH 4.0。终止液: 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液。

[0063] iELISA 法鉴别 A19-ΔVirB12 疫苗抗体与野毒株抗体的操作步骤:

[0064] 酶标板预处理: 酶标板各孔中加满酶标板预处理液, 温度 37℃ 孵育 0.5h。

[0065] 洗涤: 弃去板内处理液, 用去离子水洗涤 5 遍。

[0066] 包被: 用包被缓冲液稀释纯化 VirB12 蛋白抗原, 每孔加入 100 μL (含蛋白 25 μg/孔), 温度 37℃ 孵育 2h。

[0067] 洗涤: 弃去板内包被液, 用 PBST 洗涤 3 遍。

[0068] 加样: 设置阳性和阴性对照血清孔, 分别加入阳性和阴性血清 5 μL, 然后每孔加入样品稀释液 95 μL, 其余检测孔加入待检牛血清样本 5 μL, 温度 37℃ 静置 1h。

[0069] 洗涤: 弃去板内样品稀释液, 用 PBST 洗涤 3 遍。

[0070] 加酶标二抗: 将酶标二抗 1 : 5000 倍稀释, 每孔加入 100 μL, 室温静置 2min。

[0071] 洗涤: 弃去板内酶标二抗, 用 PBST 洗涤 4 遍。

[0072] 加底物显色液: 每孔加入现配制的底物显色液 100 μL, 室温反应, 观察阳性对照孔产生明显颜色变化。

[0073] 终止反应: 于各反应孔中加入 2mol/L 硫酸 50 μL。

[0074] 结果判定: 将酶标板置于酶标检测仪上, 于 450nm 处测 OD 值, 待检血清 OD<sub>450</sub> 值计为 P 值, 以非免疫的健康牛血清为阴性对照血清 OD<sub>450</sub> 值计为 N 值, 若 P/N ≥ 2 即判定为阳性 (即牛感染布鲁氏菌病)。

[0075] iELISA 检测方法应用: 以自然感染布鲁氏菌的牛血清为阳性对照, 以非免疫的健康牛血清为阴性对照, 布病阳性牛血清 20 份, 免疫 A19-ΔVirB12 疫苗牛血清 20 份, 按照上述 iELISA 方法操作步骤进行检测 (表 2), 检测结果如表 3。

[0076] 表 2 样品检测序列

[0077]

阳性血清	免疫 1	免疫 9	免疫 17	野毒 1	野毒 9	野毒 17
阳性血清	免疫 2	免疫 10	免疫 18	野毒 2	野毒 10	野毒 18
阴性血清	免疫 3	免疫 11	免疫 19	野毒 3	野毒 11	野毒 19
阴性血清	免疫 4	免疫 12	免疫 20	野毒 4	野毒 12	野毒 20
空白对照	免疫 5	免疫 13	/	野毒 5	野毒 13	/
空白对照	免疫 6	免疫 14	/	野毒 6	野毒 14	/

/	免疫 7	免疫 15	/	野毒 7	野毒 15	/
/	免疫 8	免疫 16	/	野毒 8	野毒 16	/

[0078] 表 3 iELISA 方法检测待检牛血清结果

[0079]

0.677	0.11	0.136	0.117	0.495	0.387	0.695
0.673	0.17	0.109	0.138	0.361	0.434	0.336
0.108	0.142	0.098	0.137	0.465	0.72	0.362
0.115	0.137	0.104	0.143	0.460	0.353	0.338
0.089	0.13	0.101	/	0.464	0.471	/
0.099	0.13	0.119	/	0.524	0.347	/
/	0.163	0.137	/	0.392	0.279	/
/	0.132	0.111	/	0.308	0.32	/

[0080] 表 3 数据展示了牛布病野毒株抗体与 A19- $\Delta$ VirB12 免疫抗体的值有明显差异。实验结果证明,应用 VirB12 抗原蛋白建立的 iELISA 法可以鉴别布鲁氏菌 A19- $\Delta$ VirB12 免疫动物与临床患病动物, iELISA 法鉴别布鲁氏菌 A19- $\Delta$ VirB12 免疫抗体与野毒株感染抗体的检测图见图 5。

[0001]

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

序列1为布鲁氏菌VirB12基因DNA序列

ATGCGCACATTGGTTATGGTCGCATGCGCTGTCTCTCTGGCCGCTTGTTCCAGCCCGCCGAAGC  
CGCCACAGTCAGCGGACGCCACCGCATTCCGATAAACAGCCCGGCGGCACAAGAGGAACTGCG  
CTTGCAGGTTTTCCCGCAAGAACCCACCGCGCAAGCAACCATGTGGCCAGCACGACCGCCCAA  
CAAACAGTCAACGTGTATTTTCCCCAGGATGTGACGGTATTCCGGCCAACATCCGCACAGATAA  
ACCAACTCCACACACTGCTCTGGCCCGTGCCCAAGCATATCAACGTCAGGGGCCTGACGGACAA  
CAACTGCCCTCCTCCCGGTGATACGCAAGTCGCGCGTGTCCGTGCGCTGGCTATCTATAATTGG  
CTGATCAATCAAGGCGTACCCGCCAGCAGGATCACCATAAGCTATGCCCCGGTAAAAGATTACG  
CATCAAATGCCCCCTTTCACCGGGCCGCGTCCTGAACAGGCGCGTGGATATCGAAATTTTACG  
CAAGTAA

序列2为布鲁氏菌VirB12 蛋白序列

MRTLVMVACAVSLAACSSPPKPPTVSGRHRIPINSPAAQEELRLQVFPQEPTAQATMWPAPPK  
QTVNVYFPQDVTVFRPTSAQINQLHTLLWPVPKHINVRGLTDNNCPPPGDTQVARVRALAIYNW  
LINQGVASRITISYAPVKDYASNAPLSPGRVLRNRVDIEILRK。

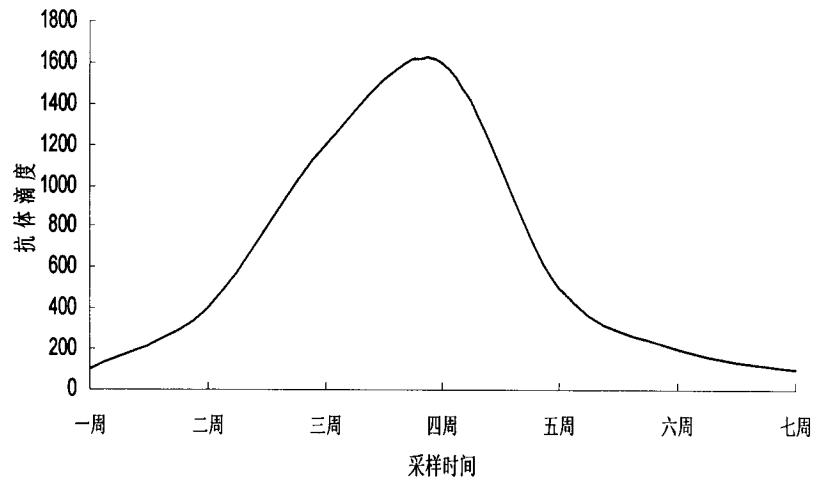


图 1

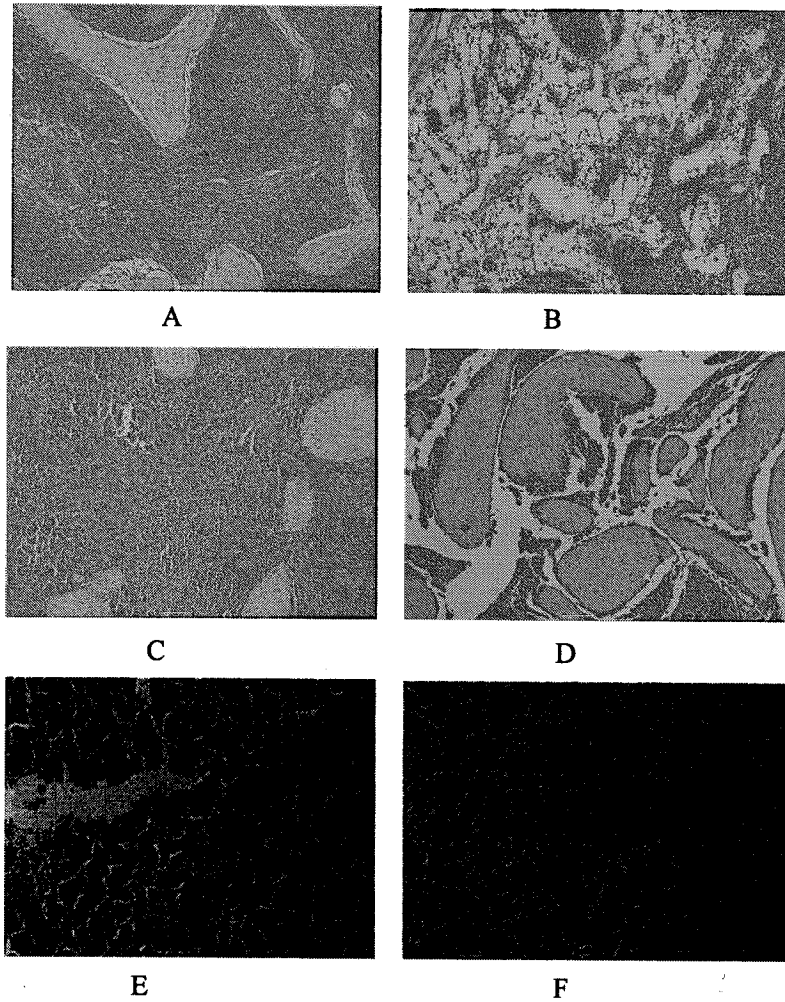


图 2

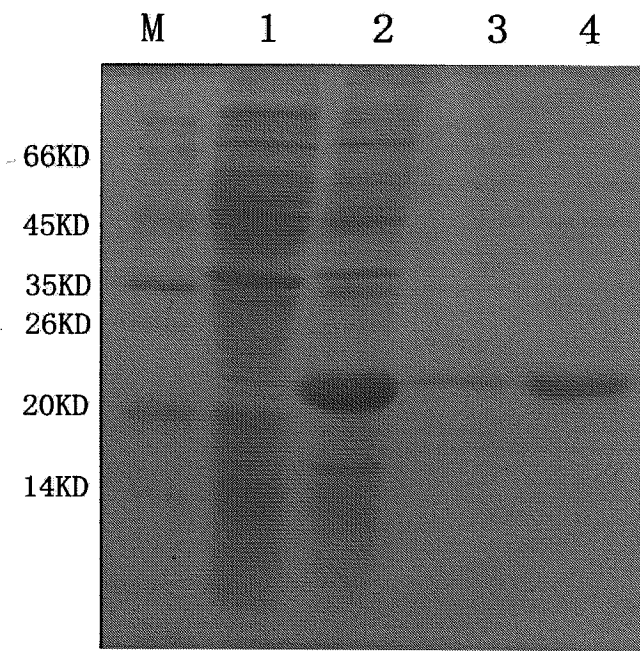


图 3

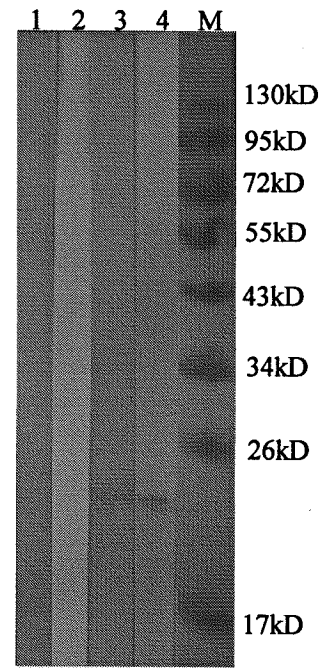


图 4

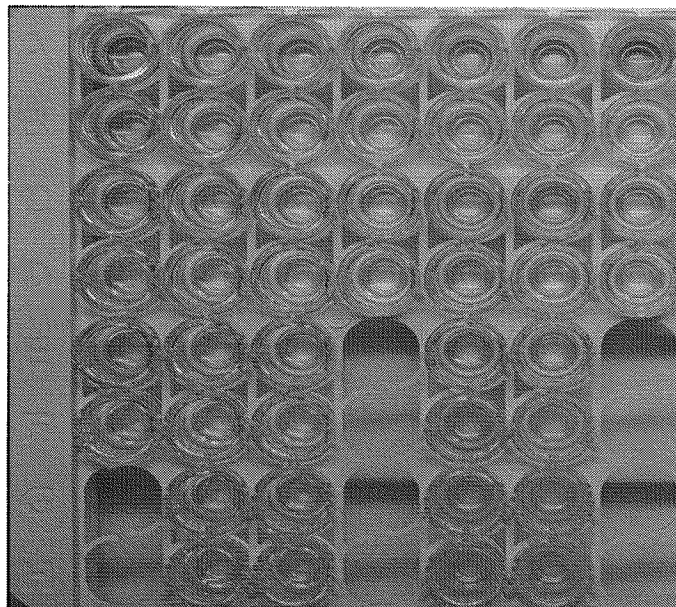


图 5

专利名称(译)	布鲁氏菌病A19分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别		
公开(公告)号	<a href="#">CN102772794A</a>	公开(公告)日	2012-11-14
申请号	CN201210190050.1	申请日	2012-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所		
[标]发明人	钟旗 易新萍 王力俭 谷文喜 叶锋 刘丽娅 李延涛 吴冬玲 马晓菁 吐尔洪努尔 姚刚 范伟兴		
发明人	钟旗 易新萍 王力俭 谷文喜 叶锋 刘丽娅 李延涛 吴冬玲 马晓菁 吐尔洪·努尔 姚刚 范伟兴		
IPC分类号	A61K39/10 A61P31/04 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 C12N15/70 C12R1/19 C12R1/01		
代理人(译)	张莉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种布鲁氏菌病A19分子标记疫苗应用及其免疫学鉴别，应用该布鲁氏菌病疫苗后可提供间接酶联免疫吸附试验(iELISA)方法区分该疫苗接种的动物与野毒感染动物。本发明以牛为防疫布鲁氏菌病的实验靶动物，应用布鲁氏菌病A19-ΔVirB12标记疫苗免疫牛，评价该分子标记苗的免疫保护力。建立了区分布鲁氏菌病A19-ΔVirB12免疫动物与野毒感染动物的iELISA方法。本发明提供的布鲁氏菌病A19-ΔVirB12标记疫苗不仅对牛布鲁氏菌病具有较好免疫保护力，而且发明的iELISA方法解决了免疫动物与临床患病动物难以鉴别的问题，对牛布鲁氏菌病的防控、根除和净化具有实际应用价值。

