

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510135606.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/33 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月4日

[11] 公开号 CN 1990870A

[22] 申请日 2005.12.31

[21] 申请号 200510135606.7

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

地址 150010 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

[72] 发明人 王笑梅 高宏雷 高玉龙 付朝阳

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司

代理人 孙皓晨

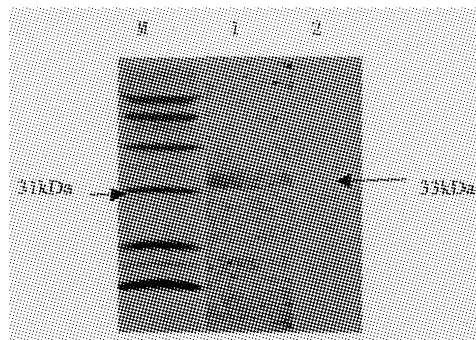
权利要求书2页 说明书26页 附图5页

[54] 发明名称

鸡传染性法氏囊病毒 VP3 基因、所表达的重组蛋白及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种鸡传染性法氏囊病毒 VP3 cDNA 全序列中的一段 cDNA、利用其表达载体制备重组蛋白的方法、应用该重组蛋白所建立的一种 IB-DV 间接 ELISA 诊断方法以及由该重组蛋白所制备的试剂盒。本发明通过对鸡传染性法氏囊病毒 VP3 cDNA 全序列进行筛选和分析,选取了其中一段抗原表位较丰富、能够在原核细胞中高效表达的 cDNA 序列,构建了原核表达载体,进行原核表达,用所表达的重组蛋白作为包被抗原,成功地建立了 IB-DV 间接 ELISA 诊断方法,并确定了该方法的最佳反应条件,为免疫鸡群抗体检测和进行流行病学调查提供了一种快速简便的血清学鉴别诊断方法。本发明还提供了用该重组 VP3 蛋白作为包被抗原的试剂盒,试验表明,该试剂盒具有良好的敏感性、特异性、稳定性和重复性。



1.一种鸡传染性法氏囊病毒 VP3 cDNA 全序列中的一段 cDNA,其特征是:具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。

2.含有权利要求 1 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列的原核表达载体。

3.按照权利要求 2 的原核表达载体,其特征是:所述的原核表达载体为 pPROVP3。

4.一种鸡传染性法氏囊病毒重组 VP3 蛋白,其特征是含有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

5.一种制备权利要求 4 的重组蛋白的方法,包括:

用权利要求 2 的原核表达载体转化大肠杆菌;培养转化体,诱导重组 VP3 蛋白表达,回收并纯化所表达的重组 VP3 蛋白。

6.一种检测或诊断鸡传染性法氏囊病毒的试剂盒,该试剂盒主要由包被有抗原的酶标板,样品稀释液、酶标抗体,底物显色液、终止液、标准阳性血清、标准阴性血清组成,其特征是:所述的用于包被酶标板的抗原为权利要求 4 的重组 VP3 蛋白。

7.按照权利要求 6 的试剂盒,其特征是:所述的标准阳性血清为鸡传染性法氏囊病标准阳性血清;所述的标准阴性血清为鸡标准阴性血清;所述的酶标抗体结合物为辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgG;所述的底物显色液为邻苯二胺。

8.权利要求 4 的重组 VP3 蛋白在体外检测或诊断鸡传染性法氏囊病毒中的应用,包括用抗原包被酶标板,用封闭剂封闭,再依次加入待检血清、酶标抗体结合物、底物显色液、终止液、测定 OD 值等步骤,其特征是:用浓度为 2~4 μ g/ml 的重组 VP3 蛋白包被酶标板;所述的封闭剂选自 1%马血清加 PBS、0.5%马血清加 PBS、5%牛血清加 PBS、5%脱脂乳加 PBS 或 3%脱脂乳加 PBS,封闭时间为 60 分钟-120 分钟;所加入待检血清的稀释度为 1:100-1:200;底物显色液与酶标抗体结合物的作用时间为 10-15 分钟。

9.按照权利要求 8 的应用,其特征是:用 2 μ g/ml 重组 IBDV VP3 蛋白包被酶标板;所述的封闭剂为 0.5%马血清加 PBS,封闭时间为 60 分钟;所加入

待检血清的稀释度为 1:100；待检血清与包被抗原的作用时间为 60 分钟，酶标抗体结合物与待检血清的作用时间为 60 分钟；底物显色液与酶标抗体结合物的作用时间为 15 分钟

10.权利要求 1 的鸡传染性法氏囊病毒 VP3 cDNA 或权利要求 4 的鸡传染性法氏囊病毒 VP3 重组蛋白在制备检测或诊断鸡传染性法氏囊病毒药物中的应用。

鸡传染性法氏囊病毒 VP3 基因、所表达的重组蛋白及应用

技术领域

本发明涉及一种基因，尤其涉及一种鸡传染性法氏囊病毒 VP3 基因，该基因表达载体的构建、转化，所表达的重组蛋白及该重组蛋白所制备的检测或诊断传染性法氏囊病毒的试剂盒，属于基因工程领域。

背景技术

鸡传染性法氏囊病（chicken infectious busal disease, IBD）是由传染性法氏囊病毒（chicken infectious busal disease virus, IBDV）引起的鸡和火鸡的一种急性高度接触性传染病，该病主要侵害 3-12 周龄的雏鸡和青年鸡，给世界各国的养禽业带来巨大的损失。IBDV 的靶细胞是未成熟的 B 淋巴细胞或 B 前淋巴细胞，感染后很快发生变性和坏死。由于法氏囊是 B 细胞成熟的重要器官，鸡在感染 IBDV 后，淋巴滤泡内的 B 细胞大量裂解死亡，网状细胞呈凋亡过程，最终导致法氏囊等器官萎缩，使病鸡更易感染其他致病因子，而且对某些疫苗(如新城疫、禽流感等)的免疫应答能力下降，导致免疫失败。研究表明传染性法氏囊病毒常与其他一些疾病呈混合感染，这可能是引发鸡群多疾病爆发,使养禽业的疫病更加复杂和严重的主要原因之一。如何准确的对 IBDV 进行快速诊断是及时掌握 IBDV 流行的分子机制、抗原变异，并据此制定正确的疾病防制措施的必要前提。

鸡传染性法氏囊病是鸡传染性法氏囊病病毒引起能够使鸡死亡的禽类的一种重要的传染病。在我国，鸡传染性法氏囊病对养禽业的危害是巨大的，虽然该病疫苗已经列入免疫程序，但是免疫效果的好坏直接影响着该病防制的成功与否，同时感染后也会使其他疫病易感，近年来变异株和高致病力毒株的出现也时不时造成该病的地域性流行及点状爆发，给该病的防制带来很

多新的挑战。

国外学者 Jorgel 等在昆虫细胞中分别表达了 IBDV 结构蛋白 VPX(VP2-VP4-VP3)和 VP3，使用表达的重组蛋白作为诊断用抗原进行间接 ELISA 试验。对超过 300 份鸡血清的监测结果证明：与两种商业试剂盒（美国 IDDEXX 和 KPL）比较，VPX 具有较好的相关性，阳性检出率为 100%，与两种商业试剂盒一致，阴性检出率为 56.6%，高于两种商业试剂盒；而 VP3 的相关性稍差，阳性检出率为 96%，阴性检出率为 26.6%，与 KPL 一致，而低于 IDDEXX 的 46.6%。Saravanan P 等（2004）使用两段合成的 IBDV VP2 多抗原肽(MAPs)，分别作为诊断用抗原，进行 ELISA 试验检测 IBDV 抗体，两段多抗原肽的特异性和敏感性均好于全病毒。

目前 IBD 的诊断主要通过琼脂扩散试验、以全病毒抗原建立的免疫荧光试验以及进口的 ELISA 试剂盒（包被抗原主要为全病毒）等方法来进行。上述这些方法中，有的存在特异性不高的问题，有的存在步骤烦琐、成本昂贵的缺陷，并且现有的这些诊断方法均不能够将 VP2 亚单位疫苗免疫和野毒感染区别开来，对鸡传染性法氏囊病的诊断和预防造成了一定的困难。

发明内容

本发明首先所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种特异性高，易纯化制备、成本低的重组 IBDV VP3 蛋白，该重组蛋白可作为诊断抗原，不仅能够简便、快速、准确的检测出待测血液样品中的传染性法氏囊病毒，还能够准确的将 VP2 亚单位疫苗免疫和野毒感染区分开来。

本发明首先所要解决的技术问题是以下技术途径来实现的：

一种重组 IBDV VP3 蛋白，含有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

本发明还要解决的一个技术问题是提供一种编码上述重组蛋白基因，含有该基因的原核表达载体以及含有该表达载体的宿主细胞。

本发明还要解决的一个技术问题是以下技术途径来实现的：

一种编码上述重组 IBDV VP3 蛋白 cDNA，其具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列；含有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列的原核表达载体，含有该

表达载体的宿主细胞。其中，所述的原核表达载体优选为 pPROVP3，所述的宿主细胞优选为大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α 。

本发明所要解决的另一个技术问题是提供一种制备本发明重组 IBDV VP3 蛋白的方法。

本发明所要解决的另一个技术问题是以下技术途径来实现的：

一种制备本发明重组 IBDV VP3 蛋白的方法，包括以下步骤：

用上述的原核表达载体转化大肠杆菌，培养转化体，诱导重组 VP3 蛋白表达，回收并纯化所表达的重组 VP3 蛋白。

作为本发明的一个最优的实施方案，优选为将 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列插入到原核表达载体 pPROEX-Hta 上的 *EcoRI* 和 *HindIII* 限制性酶切位点之间，得到重组原核表达载体 pPROVP3；将所得到的重组原核表达载体 pPROVP3 通过本领域常规方法转化大肠杆菌感受态细胞，作为本发明的一个最优的实施方案，优选为转化大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 α ；用 IPTG 诱导重组 IBDV VP3 蛋白的表达，将所表达的蛋白采用常规的方法回收并纯化即得。

本发明所要解决的又一个技术问题是提供一种诊断或检测传染性法氏囊病毒的试剂盒。

本发明所要解决的又一个技术问题是以下技术途径来实现的：

一种检测或诊断鸡传染性法氏囊病毒的试剂盒，该试剂盒主要由包被有抗原的酶标板，样品稀释液、酶标抗体，底物显色液、终止液、标准阳性血清、标准阴性血清组成，其中，所述的用于包被酶标板的抗原为本发明的鸡传染性法氏囊病毒 VP3 重组蛋白；所述的标准阳性血清为鸡传染性法氏囊病标准阳性血清；所述的标准阴性血清为鸡标准阴性血清。

上述试剂盒中，所述的样品稀释液、洗液、酶标抗体结合物，底物显色液和终止液均为本领域试剂盒中的常规用品，其制备方法为本领域技术人员所公知。作为本发明的一个优选的技术方案，所述的酶标抗体结合物优选为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鸡 IgG；所述的底物显色液优选为邻苯二胺 (OPD)。

本发明所要解决的再一个技术问题是提供一种应用本发明重组 IBDV

VP3 蛋白体外检测或诊断传染性法氏囊病毒的方法。

本发明所要解决的再一个技术问题是通过以下技术途径来实现的：

一种应用本发明重组 IBDV VP3 蛋白体外检测或诊断传染性法氏囊病毒的间接 ELISA 方法，包括用抗原包被酶标板，封闭，再依次加入待检血清、酶标抗体结合物、底物显色液、终止液、测定 OD 值等步骤，其中，用浓度为 2~4 $\mu\text{g/ml}$ 的重组 IBDV VP3 蛋白包被酶标板；所述的封闭剂选自 1%马血清加 PBS、0.5%马血清加 PBS、5%牛血清加 PBS、5%脱脂乳加 PBS 或 3%脱脂乳加 PBS；封闭时间为 60 分钟-120 分钟；所加入待检血清的稀释度为 1:100-1:200；底物显色液与酶标抗体结合物的作用时间为 10-15 分钟。

间接 ELISA 抗原的包被浓度、血清的稀释倍数以及反应时间等都是影响试验稳定性的重要因素，为了得到了理想的反应体系，本发明人分别对这些条件进行了反复的试验和测试。最终发现：抗原用 2 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度包被、血清作 1:100 稀释反应 60min，结果较为满意。抗原包被后的固相载体表面会留有部分可吸附蛋白质的活性部位，这些部位会影响试验的特异性，在实验中对不同封闭剂作用不同的时间及对封闭结果进行了比较，发现含有 0.5%马血清或 3%的脱脂乳封闭的 PBST 都有良好的封闭作用，可明显的降低反应的非特异性。试验结果良好。但快诊板要长期保存，则 3%的脱脂乳封闭的效果就不太理想，测得的 OD 值普遍升高，因为脱脂乳中的蛋白成分更为复杂，且容易变性，影响了最终的检测结果。因此，本发明确立了 0.5%马血清的 PBS 作为最适封闭液。此外，本发明还通过大量的试验确立待检血清与包被抗原的作用最佳时间为 60 分钟，酶标抗体结合物与待检血清的最佳作用时间为 60 分钟；底物显色液与酶标抗体结合物的最佳作用时间为 15 分钟。

大肠杆菌表达系统操作简便，成本低廉，可以大量生产目的蛋白。当目的蛋白与标签蛋白融合后，还可以方便蛋白的纯化，所以目前应用广泛。本发明通过对鸡传染性法氏囊病毒 VP3 cDNA 全序列进行筛选和分析，选取了其中一段抗原表位较丰富、能够在原核细胞中高效表达的 cDNA 序列 (SEQ ID NO:1)，构建了原核表达载体，采用大肠杆菌系统进行原核表达，用所表达的 IBDV 部分 VP3 重组蛋白作为包被抗原，成功地建立了 IBDV 间接 ELISA 诊

断方法，经特异性、敏感性和重复性试验证实，该方法特异性强，敏感性高，重复性好，同时本发明确定了 ELISA 的最佳反应条件，为免疫鸡群抗体检测和进行流行病学调查提供了一种快速简便的血清学鉴别诊断方法。

在兽医实际临床工作中大量的血清样品监测及现地未知疾病的爆发迫切需要一种反应快速、操作简捷、结果准确的诊断方法。ELISA 试验（ELISA）诊断方法在以上提到的这些方面很符合临床的要求。ELISA 诊断方法已经越来越普及的应用到各种疫病的诊断中。间接 ELISA 作为一种快速的诊断方法其敏感性就成为该诊断方法实用性的先决条件。

本发明以重组 IBDV VP3 蛋白为抗原所建立的间接 ELISA 方法，具有很好的特异性，除可用于 IBD 的常规血清学诊断外，还可用于鉴别诊断，即用 VP2 亚单位疫苗免疫后，不会产生抗 VP3 的抗体，如用本发明建立的 ELISA 方法检测为阳性时，即为野毒感染。所以本方法的建立更重要的意义是将有利于 VP2 亚单位疫苗的有效预防及扑杀计划，有利于鸡场的净化，为生产实践提供一种快速有效地鉴别诊断方法，为彻底扑灭法氏囊病提供技术支撑。

用本发明所表达的 IBDV 部分 VP3 重组蛋白作为包被抗原，具有全病毒无可比拟的安全性，不存在潜在的病毒逃逸和扩散的威胁，同时具有很高的特异性，并且能够作为现有技术中 VP2 亚单位疫苗的配套产品，可以鉴别亚单位疫苗免疫和野毒感染，为今后启动 IBDV 根除计划创造了技术条件。

本发明试剂盒可以鉴别基因工程亚单位疫苗免疫与野毒感染鸡产生抗体。本发明试剂盒用于鸡传染性法氏囊病间接 ELISA 试验，用于鸡传染性法氏囊病抗体的血清学诊断、现地疫情监测、流行病学调查等。

本发明的间接 ELISA 试剂盒具有很高的敏感性，在鸡体感染病毒后第 5 天即可检出抗体，与琼扩诊断方法的检出时间相同，间接 ELISA 方法检测抗体持续期相对琼扩方法时间长，间接 ELISA 方法可以很方便的进行大量样品的检测，并且整个实验操作过程所用时间短于琼扩诊断，相对更为快速。本发明试剂盒所用包被抗原是生物安全性很高的亚单位蛋白，不存在散毒危险。可以在实际临床工作中得到更为广泛的应用。

附图说明

图 1 VP3 基因 PCR 扩增结果。

1.VP3 基因的 PCR 产物；2.阴性对照；3.Marker。

图 2 重组表达质粒 pPROVP3 的 PCR 鉴定。

M. DL2000 Marker；1.阳性对照(PA 质粒)；2.阴性对照；3.4.重组表达质粒 VP3/PA PCR 产物。

图 3 VP3/PA 推导的氨基酸序列与 vvIBDV-GX 等株的比较。

图 4 重组融合蛋白的 SDS-PAGE 检测。

1.pPROEX-HTa 转化 DH5 α ；2.VP3/PA 转化 DH5 α （加 IPTG 诱导前）；3.VP3/PA 转化 DH5 α （加 IPTG 诱导 4h）；4.超声波裂解的沉淀(包涵体)；5.超声波裂解的上清；M. 蛋白 Marker。

图 5 重组融合蛋白的 Western blot 检测。

M.蛋白 Marker；1.重组融合蛋白；2.阴性对照（插入空载体诱导菌株）。

图 6 抗原最适包被浓度和血清最适稀释度的确定试验结果。

图 7 鉴别诊断试验结果。

图 8 竞争抑制性试验结果。

具体实施方式

以下通过实施例来进一步描述本发明，应该理解的是，这些实施例仅用于例证的目的，决不限制本发明的保护范围。

[实施例 1] 鸡传染性法氏囊病毒重组 VP3 蛋白的制备

1、试验材料

1.1 病毒 vvIBDV-Gx 株由哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽免疫抑制病课题组分离、鉴定及保存。

1.2 菌株与质粒 大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 由本实验室保存，表达载体 pPROEX-HTa 购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 工具酶与主要试剂 *Ex Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII*、一步法反转录 PCR (RT-PCR) 试剂盒购自大连宝生物工程公司；

邻苯二胺及胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司；异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgG 购自美国 Sigma 公司；其它试剂为从商业公司购买的分析纯产品。

1.4 试验用血清及动物 鸡传染性法氏囊病标准阳性血清、鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白标准阳性血清均由本实验室用 SPF 鸡制备，标准阴性血清来自哈尔滨兽医研究所实验动物中心 SPF 鸡血清。

2 试验方法

2.1 VP3 基因 RT-PCR 扩增

取感染 IBDV-Gx 病毒鸡法氏囊组织 100mg，冻融三次后，剪碎研磨，补加 TE(pH8.0)至 445 μ l，加 50 μ l 10% SDS，5 μ l 蛋白酶 K (100mg/ml)，56 $^{\circ}$ C 孵育 4h。加等体积的酚 (pH4.5)、氯仿抽提两次，等体积的氯仿抽提一次。移上清到另一 1.5ml 离心管，加 1/10 体积的 NaAc(3M,pH5.2)、2.5 倍体积的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 2h。4 $^{\circ}$ C、12000RPM 离心 10min，弃上清，用 75%乙醇洗沉淀一次。真空干燥。加入 50 μ l TE(pH8.0)溶解 RNA。以 Gx(AY444873)序列为参照，用 DNASTAR 软件对 IBDV VP3 限制性内切酶位点、ORF 及模拟表达 VP3 蛋白抗原性分析，选择抗原表位较丰富的 2382bp-3152bp (SEQ ID NO:1)，设计并合成了一对引物分别含有 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切位点：

PF: 5'GAC GAA TTC ATG GCC GCT TCA GAG TTC A-3'

PR: 5'CCAAAG CTT TCA CTC AAG GTC CTC ATC A-3';

用一步法 RT-PCR 试剂盒，取 1 μ g RNA 作为 RT-PCR 模板，进行 VP3 基因的扩增。扩增条件为：42 $^{\circ}$ C 反转录 60min；95 $^{\circ}$ C 预变性 5min；95 $^{\circ}$ C 变性 45sec，56 $^{\circ}$ C 退火 45sec，72 $^{\circ}$ C 延伸 45sec，30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。经 RT-PCR 扩增，得到了一条约 800bp 片段(见图 1)，与预期大小一致。

2.2 表达载体 pPROVP3 的构建

将 PCR 产物用胶回收试剂盒回收后，与原核表达载体 pPROEX-HTa，分别用限制性内切酶进行消化，将回收后的片段和载体质粒 pPROEX-HTa 以摩尔比 3:1 混匀，用 T4 DNA 连接酶，16 $^{\circ}$ C 过夜连接，连接产物转化 DH5 α 感

受态。随机挑取一些菌落，于含氨苄青霉素的 LB 中 37℃ 培养过夜后小量提取质粒，经双酶切和 PCR 鉴定（PCR 鉴定结果见图 2。PCR 扩增获得了 800bp 左右的片段，说明插入片断为目的基因 VP3 片段），并测序鉴定（上海 Invitrogen 公司），确定阳性菌株。将所构建的重组表达载体命名 pPROVP3。根据 pPROVP3 重组表达质粒测序结果，推导出的氨基酸序列，与 vvIBDV-GX 株等进行了比较，结果本试验所克隆表达的片段与 IBDV-G 株完全一致（除了目的片段两端的载体自身氨基酸外）参见图 3。

2.3 诱导表达

将测序正确的阳性重组菌 30 μ l 接种至 3ml 的 LB 培养液（含 100 μ g/ml 氨苄青霉素）中，37℃ 振摇过夜。取过夜培养物 100 μ l 接种于 10ml 的 LB 培养液（含 100 μ g/ml 氨苄青霉素）中，37℃ 剧烈振摇至 OD₅₉₀ 为 0.5~1.0 时，取 1ml 菌液作为 0h 对照，余下的菌液加入 IPTG 至终浓度为 0.6mM，37℃ 诱导表达，4h 后收菌，其中取出 1ml 菌液，以 12000RPM 离心 2min，余下菌液做超声波裂解，以 12000RPM 离心 10min 分别收集上清和沉淀，同时用未诱导的菌液作为阴性对照。收集的菌液用 1ml pH7.4 的 PBS 重悬沉淀，12000RPM 离心 2min，用 100 μ l pH7.4 的 PBS 悬浮，加入等体积的 2 \times SDS 上样 buffer，混匀，水浴煮沸 5min，用 12% 的 SDS-PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）进行电泳。电泳显示，重组表达质粒产生了约 33kDa 的蛋白带（图 4），与由核苷酸序列推导的蛋白相对分子质量大小相符进一步说明表达产物为 VP3 融合蛋白，其中 VP3 蛋白相对分子质量为 29kDa。经薄层扫描分析，目的蛋白的表达量占细菌总蛋白量的 33.9%。超声波裂解表明蛋白以包涵体形式存在。另外在目的条带下方还有一条约 32kDa 的较小条带。

2.4 Western blot 分析

将 SDS-PAGE 电泳的蛋白带转移至硝酸纤维素膜（NC 膜），用含 5% 脱脂乳的 PBST 封闭，以 vvIBDV-G 株高免血清为一抗（1:500 稀释），Sigma 公司 HRP 标记的兔抗鸡 IgG 为二抗，DAB 显色。结果显示，表达产物能被 IBDV 阳性血清所识别，证明表达产物具有良好的反应原性，而目的条带下方的较小条带不与 IBDV 阳性血清反应（见图 5）。

2.5 重组 VP3 蛋白的纯化

利用大肠杆菌 pPROE-HTa 表达载体融合表达了 IBDV 的 VP3 蛋白,其羧基端含有 6 个组氨酸标签。按 Amersham 公司 HisTrap kit 说明书提供的一般策略,进行蛋白纯化,用紫外分光光度计测定蛋白浓度。用 pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释成 100 μ g/ml 后,保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱,留作实施例 2 的 ELISA 抗原和实施例 3 制备试剂盒使用。

[实施例 2] 应用本发明重组 VP3 蛋白在建立鸡传染性法氏囊病间接 ELISA 诊断方法中的应用

一、试验材料

1、包被抗原: 实施例 1 所纯化的重组 VP3 蛋白。

2、试验用血清及动物: 鸡传染性法氏囊病标准阳性血清、鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白标准阳性血清均由本发明人按照常规方法用 SPF 鸡制备,标准阴性血清购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心 SPF 鸡血清。

二、试验方法

试验方法采用间接 ELISA 方法,检测鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 抗血清 12 份,以 IBDV 全病毒包被板进行间接 ELISA 试验对照。

按常规方法在酶标板上进行。将本发明重组 VP3 蛋白用 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释后,包被反应板 4 $^{\circ}$ C 过夜,翌日取出用封闭剂封闭 1h,然后加入待检血清,37 $^{\circ}$ C 反应 1h 取出加入适当浓度的二抗酶结合物,1h 后取出洗涤,然后加入底物显色液。37 $^{\circ}$ C 避光反应 10-20min 后,用 2M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测定 OD_{492nm} 值。试验设标准阳性、标准阴性血清对照。

本试验同时进行了摸索下述间接 ELISA 诊断方法的最佳条件的一系列试验: 抗原最佳浓度和血清最佳稀释度; 最佳封闭剂和最佳封闭时间; 酶标抗体最佳作用时间; 一抗最佳作用时间和底物最佳显色时间; 经过了一系列的试验摸索,最终确立了上述试验条件的最佳值,具体如下:

1、最佳抗原浓度和最佳血清稀释度的确定: 用不同浓度的本发明 VP3 重组蛋白包被酶标板后,用不同倍数稀释的阳性血清与之作用,以方阵滴定法确定抗原浓度。由图 6 结果可见,抗原包被浓度为 2-4 μ g/ml,血清 1:100-1:200

稀释时，阳性血清 OD 值接近 1.0，阴性血清 OD 值小于 0.2。一般的，酶标仪在检测 OD 值为 1.0 左右时误差最小，反应最灵敏。此外，还要考虑节省纯化的 VP3 蛋白，据此，确定 2 μ g/ml 为抗原的最适包被浓度，1:100 为血清最适稀释度。

2、最佳封闭剂和最佳封闭时间的选择：本试验分别用 1%马血清、0.5%马血清、5%牛血清、5%脱脂乳、3%脱脂乳加 PBST 作为封闭剂，每孔加 100 μ l，作用时间分别为 60min、90min、120min，进行 ELISA 试验，选择最适的封闭液。

试验结果表明，封闭时间为 60min，效果要好于 90min 和 120min 的封闭效果，其中用 0.5%马血清的封闭效果最好，能有效的封闭在体表面的残留活性部位，试验特异性高，结果令人满意。所以本试验确立用 0.5%马血清的 PBS（0.01M、pH7.4，PBS 的具体配制方法:NaCl 8g; KCl 0.2g; Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g; KH₂PO₄ 0.5g,加水溶解后定容至 1 升）缓冲液作为试验用封闭液，封闭时间为 60min。

3、酶标抗体最佳作用时间试验：将标准阳性、阴性血清作 1:100 稀释，酶标抗体作 1:5000 稀释，分别作用 30min、60min、90min 和 120min，按间接 ELISA 程序测定。当酶标抗体作用 60min 时，P/N 值最大。因此，本试验确定 60min 为酶标抗体最适作用时间。

4、一抗最佳作用时间和底物最佳显色时间：一抗作用时间分别为 37 $^{\circ}$ C，30min、60min、90 min、120min；底物显色时间：分别为 5min、10min、15min、20min、25min。其它按已确定的 ELISA 程序。由 ELISA 检测结果可见，一抗最佳作用时间 60min；底物显色时间为 10-15min，P/N 值最大。因此，确定一抗最佳作用时间为 60min，底物最适作用时间为 15min。

5、间接 ELISA 判定标准的确定

92 份 IBVD 阴性血清样品中，在本试验确定的上述最佳条件下进行间接 ELISA 测定。

S/P 的计算公式为： $S/P = (\text{样品 OD 值} - \text{标准阴性 OD 值}) / (\text{标准阳性 OD 值} - \text{标准阴性 OD 值})$ 。这些血清数据经统计学分析，样品 S/P 的平均值 $\bar{X} = 0.033$ ，

标准差 $S=0.205$ ，取置信区间上限 $X+3S\approx 0.24$ ，作为 IBDV 阳性血清的下限； $X+2S\approx 0.17$ ，定为可疑界限。根据统计学原理， S/P 值 $\geq X+3S$ 时，可以在 99.7% 的水平上判定为阳性。因此，得到间接 ELISA 判定标准，即 S/P 值 ≥ 0.24 者判为阳性， S/P 值 ≤ 0.17 者判为阴性，介于二者之间者判为可疑。标准阳性阴性血清之差小于 0.5 时，试验无效。

三、诊断结果

对于试验用的 12 份血清，使用全病毒包被进行间接 ELISA 试验，测得的 OD 值根据已有标准判定均为阳性。使用重组 VP3 蛋白包被进行间接 ELISA 试验，测得的 OD 值则均为阴性（本次试验中标准阳性 OD 值为 1.25，标准阴性 OD 值为 0.075，根据建立的判定标准 $S/P\leq 0.17$ 为阴性，本次试验中样品的 S/P 值均小于 0.17（图 7）。

试验结果表明，将本发明重组 VP3 蛋白用作包被抗原，采用间接 ELISA 方法可以方便、快速、准确的诊断出血清样品中鸡传染性法氏囊病病毒抗体；本试验所建立的间接 ELISA 诊断鸡传染性法氏囊病病毒方法，具有敏感性高、特异性高、重复性好等优点，适合于临床检测的应用。

实施例 3 本发明间接 ELISA 诊断试剂盒的制备

1、包被有抗原的酶标板的制备

1.1 抗原的制备：采用实施例 1 所纯化的重组 VP3 蛋白。

1.2 包被：抗原的最终浓度为 $2\mu\text{g/ml}$ ，每孔包被量为 $100\mu\text{l}$ ，盖上包被微孔板，置于 4°C 冰箱中孵育过夜；

1.3 洗涤：孵育 2h 后，弃去酶标板内的包被液，开始洗涤（洗涤液的组成及配制为： 0.01M 、 $\text{pH}7.4$ 的 PBS 加 0.5% Tween 20），每孔洗涤 3 次，时间间隔为每次 3min，洗涤完后，将包被板在吸水纸上扣干。

1.4 封闭：用封闭剂进行封闭（封闭剂为 0.5% 马血清的 PBS），封闭完成后，盖上包被微孔板，置于 37°C 水浴箱中孵育 1h。

1.5 洗涤：封闭结束后，弃去酶标板内的封闭液，将包被酶标板洗涤，每孔洗涤 3 次，时间间隔为每次 3 分钟，洗涤完后，将包被板在吸水纸上扣干，将经过上述处理后的包被酶标板，盖上盖子，置于 37°C 烘箱中干燥 30min。

1.6 保存: -20℃中保存, 有效期 6 个月。

2、阴性血清的制备

2.1 制造用动物 选取 6~8 周龄的 SPF 鸡群。

2.2 血清制造 无菌条件下, 采集 SPF 鸡血液, 分离血清, 用 0.22μm 滤膜过滤, 在无菌条件下每瓶分装 1ml, 保存于-20℃冰箱。

2.3 阴性对照血清检验

2.3.1 物理性状 液体时为淡黄色或淡红色清亮液体。

2.3.2 无菌检验 按标准进行, 应无菌生长。

2.4 保存 制品在-20℃保存, 有效期为 1 年。

3、阳性血清的制备及检验

3.1 制造动物 选用 6~8 周龄的 SPF 鸡群, 在负压隔离器中饲养。

3.2 免疫原 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研制的以国内超强毒株 (vvIBDV-G)鸡胚成纤维细胞(CEF)适应株病毒制备的鸡传染性法氏囊病灭活疫苗。

3.3 免疫接种方法及程序 通过肌肉注射途径分 3 次接种疫苗 0.5ml、0.5ml 和 1ml, 每次间隔 14 日, 最后一次接种后 14 天, 采血制备血清测定效价。

3.3 效价测定 用 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBST, pH7.4, 含 0.05% Tween-20)将标准阳性血清和阴性血清作 1:100, 进行 ELISA 测定, 标准阳性血清应 S/P 值≥0.24。

3.4 分装 对血清抗体效价合格的免疫鸡无菌采血, 分离血清。用 0.22μm 滤膜过滤, 在无菌条件下每瓶分装 1ml, 保存于-20℃冰箱。

3.5 阳性对照血清检验

3.5.1 物理性状 为淡黄色或淡红色清亮液体。

3.5.2 无菌检验 按标准进行, 应无菌生长。

3.6 保存 制品在-20℃保存, 有效期为 1 年。

4、酶标抗体结合物制备及检验

4.1 酶标抗体结合物制备

4.1.1 酶结合物 为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鸡 IgG, 购自美国

SIGMA 公司。

4.1.2 酶结合物稀释液 0.01M 的磷酸盐缓冲液(pH7.4)。

4.1.3 酶结合物使用液的制备 按 1:5000 用酶结合物稀释液稀释,用 0.22 μ m 滤膜过滤。

4.2 酶标抗体结合物的检验

4.2.1 物理性状 应为澄清、淡黄色溶液,无臭、无味,无沉淀物。

4.2.2 无菌检验 按标准 301 页进行,应无菌生长。

4.3 保存 制品在-20 $^{\circ}$ C 保存,有效期为 1 年。

5、底物显色液的制备及检验

5.1 底物显色液的制备 往容器内加入 700ml 无菌去离子水,然后依次加入 5.1g 柠檬酸、18.4g Na₂HPO₄, 0.4g 邻苯二胺(OPD),混合溶解后,用无菌去离子水定容至 1L,用 0.22 μ m 滤膜过滤。 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。

5.2 物理性状 应为澄清、淡黄色溶液,无沉淀物。

5.3 无菌检验 按标准进行,应无菌生长。

5.4 保存 -20 $^{\circ}$ C 避光保存,有效期为 1 年。

6、样品稀释液的制备及检验

6.1 样品稀释液的制备 在容器内加入总体积 90%的灭菌去离子水,依次加入 60g NaH₂PO₄、4g Na₂HPO₄·2H₂O、50g NaCl、6g 庆大霉素,在 18~25 $^{\circ}$ C 下搅拌使各组分充分溶解并混合均匀。测量溶液的酸碱度,用适量 0.1M 盐酸或 0.1M 氢氧化钠溶液调整 pH 值至 7.1~7.3。用灭菌去离子水定容至 30L,0.22 μ m 滤膜滤过。

6.2 样本稀释液的检验

6.2.1 物理性状 应为澄清的金黄色溶液,无臭、无味、无沉淀物。

6.2.2 pH 值应为 7.1~7.3。

6.2.3 无菌检验 按标准 301 页进行,应无菌生长。

6.3 保存 在室温下保存,使用期为 2 年。

7、洗液的制备及检验

7.1 洗液的制备 在容器内加入总体积 80%的灭菌去离子水,依次加入 60g

NaH₂PO₄、300g Na₂HPO₄·2H₂O、100gNaCl 及 15ml 吐温(Tween-20)，充分搅拌至完全溶解。用灭菌去离子水定容至 30L。0.22μm 滤膜滤过。无菌分装，每瓶 120ml。

7.2 洗液的检验

7.2.1 物理性状 应为澄清、无色、无臭、无味的溶液，无沉淀物。

7.2.2 pH 值应为 7.0~7.2。

7.2.3 无菌检验 按标准 301 页进行，应无菌生长。

7.3 保存 在室温下保存，使用期为 2 年。

8、终止液的制备及检验

8.1 终止液的制备 用去离子水将硫酸稀释成 2M，即为终止液。

8.2 终止液的检验

8.2.1 物理性状 应为澄清、无色溶液。

8.2.2 无菌检验 按标准进行，应无菌生长。

8.3 保存 在室温下保存，使用期为 2 年。

9 试剂盒的组装及检验

9.1 组装

将检验合格的各试剂盒组份按表 1 组装成试剂盒。

表 1

试剂盒组分	规格	数量
抗原包被板	96 孔/块	5 块
样品稀释液	120ml/瓶	1 瓶
洗液	120ml/瓶	1 瓶
标准阳性血清	1ml/瓶	1 瓶
标准阴性血清	1ml/瓶	1 瓶
酶标抗体结合物	70ml/瓶	1 瓶
显色液	70ml/瓶	1 瓶
终止液	40ml/瓶	1 瓶
使用说明书	份	1

将每支塑料瓶插入泡沫垫各个孔中，将泡沫垫装入中纸盒中，在上面放上经真空包装的酶标板，阴性血清、阳性血清和抗体稀释液，浓缩的洗液，置于包装盒的相应位置中。放入说明书。

9.2 成品检验

9.2.1 物理性状 逐盒检验，应洁净，密封好。盒中各组分应齐全，无破损，无渗漏，各个试剂标签完好、清楚。其中酶标板应为真空密封，打开后为无色透明。阳性与阴性血清为淡黄色或微红色液体。底物液装在棕色瓶中。其他溶液为无色透明的液体，无沉淀，无异物。

9.2.2 无菌检验 试剂盒内各组分按标准 301 页检验应无细菌、霉菌污染。

9.2.3 特异性检验

9.2.3.1 试剂盒内的阴性血清按试剂盒使用的说明检测后，结果应为阴性。

9.2.3.2 试剂盒内的阳性血清按试剂盒使用的说明检测后，结果应为阳性。

9.2.4 效价测定 抗原包被板的效价测定 用 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBST, pH7.4, 含 0.5% Tween-20)将标准阳性血清和阴性血清作 1:100 稀释，进行 ELISA 测定，标准阳性血清应 S/P 值 ≥ 0.24 。

9.2.5 稀释液 按 8.5.3.1 检测，结果为阴性。

10、本试剂盒使用说明与判定

10.1 使用说明

ELISA 板加入用样品稀释液稀释的待检血清及标准阳性、阴性血清，37℃ 孵育 1h 后取出洗涤，加入酶结合物，37℃ 孵育 1h 后取出洗涤，然后加入显色液，37℃ 避光反应 10~20min 后，用终止液终止反应。酶标仪测定 OD_{492nm}。

10.2 结果判定 S/P 值 ≥ 0.24 者判为阳性，S/P 值 ≤ 0.17 者判为阴性，介于二者之间者判为可疑，标准阳性阴性血清之差小于 0.5 时，试验无效。S/P 的计算公式为： $S/P = (\text{样品 OD 值} - \text{标准阴性 OD 值}) / (\text{标准阳性 OD 值} - \text{标准阴性 OD 值})$ 。

10.2 特异性检验

用本试剂盒检验鸡新城疫(ND)；鸡传支 (IBD)；禽流感(AI)；鸡马立克 (MD)；禽白血病(AL-J)；禽贫血病(CIA)；鸡白痢(PD)7 种疫病阳性血清不

发生反应。

10.3 鉴别诊断

本试剂盒配合全病毒包被抗原间接 ELISA 方法, 进行间接 ELISA 试验检测鸡传染性法氏囊病重组 VP2 蛋白基因工程亚单位疫苗免疫鸡血清为阴性, 全病毒包被抗原间接 ELISA 检测相同血清为阳性。本试剂盒可以鉴别基因工程亚单位疫苗免疫与野毒感染鸡产生抗体。

11、试剂盒贮藏 本试剂盒-20℃保存, 有效期 6 个月。

试验例 1 本发明重组 VP3 蛋白鉴别诊断试验

一、试验材料

1、包被抗原: 1) 实施例 1 所纯化的重组 VP3 蛋白; 2) 鸡传染性法氏囊病全病毒蛋白(购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心)。

2、试验用血清及动物: 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白标准阳性血清由本发明人按照常规方法用 SPF 鸡制备, 标准阴性血清购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心 SPF 鸡血清。

二、试验方法

试验方法采用间接 ELISA 方法, 检测鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 抗血清 35 份, 以 IBDV 全病毒包被板进行间接 ELISA 试验对照。

按常规方法在酶标板上进行(同实施例 2)。将本发明重组 VP3 蛋白用 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释后, 包被反应板 4℃过夜, 翌日取出用封闭剂封闭 1h(同实施例 2), 然后加入待检血清(鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白标准阳性血清), 37℃反应 1h 取出加入适当浓度的二抗酶结合物(同实施例 2), 1h 后取出洗涤, 然后加入底物显色液(同实施例 2)。37℃避光反应 10-20min 后, 用 2M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测定 OD_{492nm} 值。

试验结果见表 2。

表2 本发明重组VP3蛋白鉴别诊断试验

样品编号	全病毒包被			VP3 包被		
	OD 值	判定	备注	OD 值	判定	备注
1	0.357	+		0.134	-	
2	0.188	-/+	复检为阳性	0.055	-	
3	0.403	+		0.136	-	
4	0.666	+		0.141	-	
5	0.510	+		0.117	-	
6	0.342	+		0.133	-	
7	0.469	+		0.154	-	
8	0.393	+		0.151	-	
9	0.797	+		0.160	-	
10	0.956	+		0.230	-/+	复检为阴性
11	0.476	+		0.168	-	
12	0.585	.		0.170	-	
13	0.555	+		0.165	-	
14	0.537	+		0.158	-	
15	0.477	+		0.165	-	
16	0.501	+		0.156	-	
17	0.737	+		0.127	-	
18	0.516	+		0.133	-	
19	0.410	+		0.159	-	
20	0.575	+		0.141	-	
21	0.609	+		0.092	-	
22	0.594	+		0.129	-	
23	0.652	+		0.105	-	
24	0.606	.		0.212	-/+	复检为阴性
25	0.418	+		0.208	-/+	复检为阴性
26	0.641	+		0.167	-	
27	0.412	+		0.125	-	
28	1.083	+		0.221	-	
29	0.450	+		0.157	-	
30	0.639	+		0.147	-	
31	0.934	+		0.137	-	
32	0.608	+		0.111	-	
33	0.183	-/+	复检为阳性	0.120	-	
34	0.564	+		0.132		
35	0.465	+		0.128		

试验结果表明，将本发明重组 VP3 蛋白用作包被抗原，采用间接 ELISA 方法，可以准确的鉴别诊断出鸡传染性法氏囊病病毒野毒感染和 VP2 亚单位疫苗免疫。

试验例 1 本发明间接 ELISA 诊断试剂盒的敏感性试验

一、1 试验材料与方法

1.1 试验用病毒

鸡传染性法氏囊病病毒 Gt 株(IBDV-Gt),由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定、保管和供应，毒价为 $10^{6.25}$ EID₅₀/0.2ml。

1.2 试验用鸡

6-8 周龄 SPF 级白来航鸡由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。实验期间饲养于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心感染室的负压隔离器中。

1.3 检测用试剂盒

本发明实施例 3 所制备的诊断试剂盒。

1.4 鸡传染性法氏囊病琼扩抗原

购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所维科生物技术公司，批号 200305。

1.5 鸡传染性法氏囊病阳性血清

购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所维科生物技术公司生产，批号 200305。

二、人工感染试验

感染时每只鸡采用 10^3 EID₅₀ 的剂量 0.2ml 滴鼻、点眼接种，共接种 50 只，感染后的第 3、5、7、14 和 21 天，21 天以后每隔 10 天，直至 180 天，每次采血 20 只，分离血清，用于琼扩试验 (AGP) 和间接 ELISA 试验。

三、试验结果

感染后不同时间采血，分离血清，检测琼扩抗体和 ELISA 抗体阳性率。结果见表 3。

表3 人工接种鸡的抗体阳性检出率

时间	3	5	7	14	21	40	60	80	100	110	120	130	140	150	160	170	180
ELISA	0/20	2/20	4/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	18/20	18/20	18/20	18/20	16/20	10/20	8/20
AGP	0/20	0/20	0/20	8/20	18/20	20/20	20/20	20/20	19/20	18/20	18/20	18/20	16/20	15/20	6/20	0/20	0/20

从试验结果可以看出：感染后的第3、5、7、14、18和21天间接ELISA诊断方法检出率是0、10%、20%、100%、100%，琼扩诊断方法检出率分别是0、0、0、40%、90%，ELISA检出率高于AGP；感染100天后，AGP检出率开始下降，ELISA检出率降低幅度较为缓慢。

从上面结果可以看出，本发明间接ELISA试剂盒具有很高的敏感性，在鸡体感染病毒后第5天即可检出抗体，比琼扩诊断方法的检出时间早。间接ELISA方法检测抗体持续期相对琼扩方法时间长，间接ELISA方法可以很方便的进行大量样品的检测，并且整个实验操作过程所用时间短于琼扩诊断，相对更为快速。本发明试剂盒所用包被抗原是生物安全性很高的亚单位蛋白，不存在散毒危险，可以在实际临床工作中得到更为广泛的应用。

试验例2 本发明间接ELISA诊断试剂盒的特异性试验

1、试验材料和方法

1.1 鸡传染性法氏囊病、鸡传染性贫血、禽白血病(AL)-J亚群标准阳性血清均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室免疫抑制病课题组制备和保存。鸡马立克氏病(MD)、鸡新城疫(ND)、禽流感(AI)、鸡传染性支气管炎病(IB)、鸡白痢(PD)的阳性血清均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所维科生物技术公司提供。

1.2 鸡传染性法氏囊病重组VP3蛋白间接ELISA诊断试剂盒：本发明实施例3所制备。

1.3 间接ELISA操作步骤：按照实施例2所确定的最佳条件来进行。

1.4 阻断实验 又称竞争抑制试验，将阳性血清作1:25~1:51200共12个梯度，倍比稀释，每个稀释度加入等量的IBDV阳性血清（1:100稀释，中和试验效价为 10^7 ），于37℃作用60min，进行间接ELISA测定，同时设立对照，比较结果。

1.5 交叉试验 在同一条件下，将鸡新城疫(ND)；鸡传支 (IBD)；禽流感

(AI); 鸡马立克 (MD); 禽白血病(AL-J); 鸡传染性贫血(CIA); 鸡白痢(PD) 阳性血清以 1:100 稀释, 进行间接 ELISA 程序测定。

2 试验结果

2.1 竞争抑制试验 不做任何处理的阳性血清显示了较高的 OD 值, 当把 IBDV 阳性血清稀释到 1:6400 倍时, 仍然呈阳性反应, 而 IBDV 全病毒中和试验用抗原处理的阳性血清 OD 值呈明显下降, 1:6400 倍稀释后呈明显的阴性结果 (图 8)。

2.2 交叉试验 对 7 种其他疾病的阳性血清按间接 ELISA 程序测定, S/P 值均小于 0.07(表 4), 为阴性, 即没有交叉反应性。

表 4 交叉试验结果

血清	ND	IDB	AI	MD	AL-J	CIA	PD	IBDV	SPF
OD 值	0.14 ± 0.012	0.15 ± 0.007	0.13 ± 0.013	0.12 ± 0.006	0.10 ± 0.008	0.14 ± 0.013	0.15 ± 0.018	1.02 ± 0.005	0.1 ± 0.011
S/P 值	0.053	0.063	0.039	0.029	0.005	0.044	0.064		

试验结果说明, 本发明间接 ELISA 诊断试剂盒具有较高的特异性。

试验例 3 本发明间接 ELISA 诊断试剂盒批间和批内的重复性研究试验

为考察利用本发明重组蛋白制备的间接 ELISA 诊断试剂盒在使用过程中检测效果的稳定性和可重复性, 特进行以下试验。

1 材料和方法

1.1 鸡传染性法氏囊病重组 VP3 蛋白间接 ELISA 试剂盒 分别按照本发明实施例 3 的方法制备成 4 批。

1.2 鸡传染性法氏囊病标准阳性血清 共 5 份, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所免疫抑制病实验室研制并保存, 标准阴性血清为 SPF 鸡血清。

1.3 批内重复性试验 用同一批制备的重组抗原试剂盒, 取 5 份不同抗体水平的 IBDV 阳性血清, 在同一时间, 同一条件, 同一批试验中按间接 ELISA 程序测定, 每份血样平行做 5 孔, 结果进行统计学分析 (见表 5)。

表 5

血清	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	阴性
OD 值	1.253±002	0.461±014	0.344±005	0.729±005	0.957±012	0.076±002
	1.14±013	0.404±015	0.382±008	0.71±004	0.943±013	0.07±006
	1.09±011	0.435±013	0.37±01	0.69±006	0.92±016	0.069±012
	1.23±009	0.39±017	0.375±019	0.73±011	1.023±013	0.068±009
	1.15±01	0.4±011	0.335±004	0.713±012	0.89±009	0.073±003
X 均值	1.172	0.418	0.361	0.714	0.946	0.060
S	0.054	0.0264	0.02	0.0141	0.0436	0.005
C.V%	4.60%	6.30%	5.54%	1.97%	4.61%	7.12%

5

5

10

1.4 批间重复性试验

1.4.1 用同一批制备的试剂盒，取 5 份不同抗体水平的阳性血清和 1 份阴性血清，在 8 个不同时间按间接 ELISA 程序测定，每份血样平行做 2 孔，结果进行统计学分析。

1.4.2 取 4 批不同批次制备的本发明重组抗原试剂盒，在相同条件下检测 4 份不同抗体水平的阳性血清和 1 份阴性血清，每份血样重复 2 孔，结果进行统计学分析。

2.1 批内重复性试验 取抗体水平不同的 5 份阳性血清和一份阴性血清，在同一批次实验中，按间接 ELISA 程序测定不同孔径的 OD 值，结果进行统计学分析，其变异系数位于 1.97%~7.12%之间，小于 10%。说明同一样品在同一批试验中变异程度很小，具有较好的重复性。见表 3。

2.2 批间重复性试验

2.2.1 取抗体水平不同的 5 份阳性血清在 8 个不同的实验日按间接 ELISA 程序测定其 OD 值，结果进行统计学分析，其变异系数位于 2.00%~11.09%之间，小于 15%，说明同一样品在不同批次试验中变异程度很小，具有较好的重复性。见表 6。

表6 批间重复性结果

血清号	日期								X 均值	S	C. V%
	11.10	11.15	11.18	11.25	12.06	12.10	12.15	12.19			
1	1.121	1.219	1.021	0.984	1.251	0.997	1.175	0.892	1.081	0.120	11.09%
2	0.450	0.432	0.398	0.415	0.443	0.442	0.385	0.426	0.423	0.022	5.27%
3	0.315	0.355	0.334	0.326	0.301	0.305	0.296	0.314	0.318	0.020	6.28%
4	0.712	0.698	0.675	0.706	0.725	0.718	0.733	0.688	0.706	0.014	2.00%
5	1.003	1.12	0.985	0.976	0.857	0.953	0.834	0.912	0.955	0.084	8.82%
阴性	0.075	0.059	0.068	0.062	0.070	0.055	0.063	0.072	0.066	0.006	9.60%

2.2.2 用 4 批不同的本发明重组抗原包被的反应板，在相同条件下检测 4 份阳性血清和 1 份阴性血清，重复性试验结果经统计学分析，S/P 值的变异系数在 2.2-11.3% 之间（见表 7），小于 15%，说明同一样品在不同批次抗原试验中变异程度很小，具有较好的重复性。

表7 批间重复性试验

血清号	试剂盒批次				X	S	C. V%
	1	2	3	4			
	S/P 值						
1	0.48	0.44	0.42	0.48	0.452	0.021	4.6
2	0.84	0.83	0.82	0.83	0.832	0.03	3.6
3	1.09	1.07	1.1	1.08	1.085	0.024	2.2
4	0.99	0.98	0.92	0.96	0.962	0.043	4.5
阴性	0.15	0.16	0.17	0.19	0.167	0.019	11.3

试验例 3 本发明间接 ELISA 诊断试剂盒诊断方法符合率试验

本试验主要是考察鸡传染性法氏囊病重组 VP3 蛋白间接 ELISA 诊断试剂盒与鸡传染性法氏囊病全病毒琼脂扩散试验和鸡传染性法氏囊病的其他常用诊断方法的检测差异性。

1 试验材料和试验方法

1.1 鸡传染性法氏囊病全病毒抗原 鸡传染性法氏囊病抗原由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室免疫抑制病课题组试制生产，其琼脂扩散价为 2。

1.2 间接免疫荧光试验用病毒 鸡传染性法氏囊病病毒 Gt 株 (IBDV-Gt) 暂由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定、保管和供应。毒价为

4.0×10^8 PFU/ml。

1.3 鸡传染性法氏囊病病毒阳性血清以及阴性血清 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室免疫抑制病课题组制备并提供。

1.4 禽类其他疫病标准阳性血清如新城疫等 7 种疾病标准阳性血清均购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所维科公司, 共计 14 份(每种疫病血清两份)。

1.5 免疫血清 实验室人工免疫 SPF 鸡, 在免疫后不同时间采集分离免疫鸡的血清, 共计 200 份。

1.6 待检血清 一共 330 份, 分别采自于哈尔滨地区 110 份, 大庆 50 份, 青岛 25 份, 河北 45 份, 河南 40 份, 北京 33 份, 山东 27 份。

1.7 全病毒间接免疫荧光试验, 琼脂扩散试验均按常规方法进行。

2 试验结果

2.1 琼脂扩散试验检测结果 用琼脂扩散试验检测所有的血清样品, 其中阴性血清为阴性, 阳性血清检测为阳性, 其他 7 种疫病阳性血清检测结果为阴性, 免疫鸡血清和现地血清中检测阳性的分别是 154 份和 292 份, 具体结果见表 6。

2.2 间接免疫荧光试验检测结果 用全病毒抗原建立的间接 ELISA 方法检测所有血清样品, 其中所有阴性血清均为阴性结果; 标准阳性血清为阳性结果; 7 种其他疫病阳性血清的检测结果也全为阴性; 免疫鸡血清中检出 193 份血清阳性, 现地血清中检出 312 份为阳性, 具体结果见表 8。

2.3 重组蛋白间接 ELISA 诊断试剂盒检测结果 用间接 ELISA 方法检测所有的血清样品, 其中阴性血清均为阴性, 阳性血清检测为阳性, 其他 7 种疫病阳性血清检测结果全为阴性, 免疫鸡血清检测阳性的血清样品有 159 份; 现地血清样品中有 270 份为阳性, 具体结果见表 8。

对总共 710 份鸡血清样品进行检测, 用琼脂扩散实验检出 446 份血清样品阳性, 用间接免疫荧光试验检出 505 份血清样品为阳性; 用间接 ELISA 方法检出 429 份血清样品为阳性。其中与琼扩方法的符合率为 96.2%(421/446), 与间接免疫荧光试验方法的符合率为 83.4%(421/505), 从上面的实验结果可以看出, 间接免疫荧光试验方法敏感性较高, 琼扩试验次之, 重组抗原间接

ELISA 方法和琼扩方法检出率近似。但是对于群体的大量样品检测来说，重组抗原间接 ELISA 诊断方法更为适宜。

表 8 重组抗原间接 ELISA 方法和琼脂扩散试验及间接免疫荧光试验对血清样品的比较性检测

血清样品	羽份	间 接 ELISA	琼脂扩 散试验	间接免 疫荧光 试验
SPF 鸡血清	150	0	0	0
其他疫病标准阳性血清	14	0	0	0
免疫鸡血清	200	159	154	193
现地血清	330	270	292	312
合计	710	429	446	505

注：表中试验数据均表示的为阳性数据。

间接免疫荧光试验需要荧光显微镜设备限制了该方法的使用，琼扩试验耗时较长不太适合紧急诊断的需要。因此本发明重组抗原间接 ELISA 诊断方法将是鸡传染性法氏囊病血清学监测的主要手段之一。

SEQUENCE LISTING

- <110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
 <120> 鸡传染性法氏囊病毒VP3基因、其表达载体、所表达的重组蛋白及由该重组蛋白所制备的试剂盒
 <130> 22
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 780
 <212> DNA
 <213> 鸡传染性法氏囊病毒 (chicken infectious busal disease virus)

<400> 1
 atgccgctt cagagttcaa agaaaccccc gaactcgaga ggcgctcag agccatggaa 60
 gcagcagcca acgtggacc accgttccat tctgcgctca gtgtgttcat gtggctggaa 120
 gaaaatggga ttgtgaccga catggccaac ttcgcactca ggcacccgaa cgcccatcgg 180
 atgcgcaatt tictcgaaa cgcaccacaa gcaggcagca agtcgcaaag agccaagtac 240
 gggacagcag gctacggagt ggaggccccg ggcaccactc cagaggaagc acagagggaa 300
 aaagacacac ggatctcaaa gaagatggag actatgggca tctactttgc aacaccagaa 360
 tgggtagcac tcaatgggca ccgggggcca agccccggcc agctgaagta ctggcagaac 420
 acacgagaaa tacctgatcc aaacgaggac tacctagact acgtgcatgc agagaagagc 480
 cggttggcat cagaagaaca aatcctaagg gcagctacgt cgatctacgg ggctccagga 540
 caggcagagc caccccaagc cticcatagac gaagtcgcca aagtctatga aatcaacat 600
 gggcgtggcc ccaaccaaga acagatgaaa gatctgctct tgactgcat ggagatgaag 660
 catcgcaatc ccagcggggc tccaccaaag cccaagccaa aacccaatgt tccaacacag 720
 agaccacctg gtcgctggg ccgctggatc agggctgtct ctgatgagga ccttgagtga 780

- <210> 2
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 鸡传染性法氏囊病毒 (chicken infectious busal disease virus)

<400> 2

Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val
 1 5 10 15

Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe His Ser Ala
 20 25 30

Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met
 35 40 45

Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe
 50 55 60

Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr
 65 70 75 80

Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu
 85 90 95

Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met
 100 105 110
 Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg
 115 120 125
 Gly Pro Ser Pro Gly Gln Leu Lys Tyr Trp Gln Asn Thr Arg Glu Ile
 130 135 140
 Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr
 165 170 175
 Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val
 180 185 190
 Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu Gln
 195 200 205
 Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro
 210 215 220
 Arg Arg Ala Pro Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Val Pro Thr Gln
 225 230 235 240
 Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Ala Val Ser Asp Glu
 245 250 255
 Asp Leu Glu

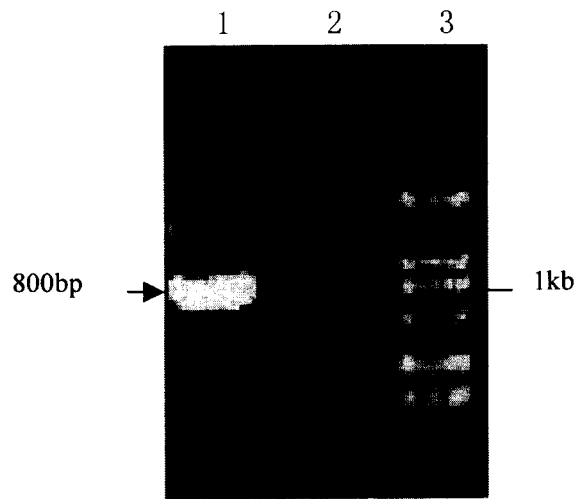


图 1

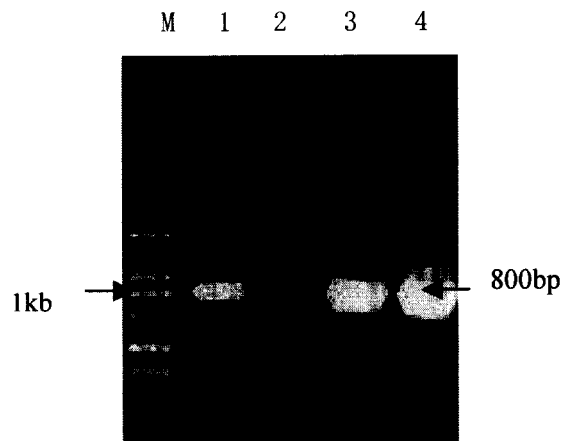


图 2

		760	770	780	790	800	
G. AMI	751	DLAMAASEFK	ETPELESAVR	AMEAAANVDP	LFHSALSVM	WLEENGIVTD	800
pPROVP3. AMI	751	PEF-----	-----	-----	-----	-----	800
		810	820	830	840	850	
G. AMI	801	MANFALSDPN	AHRMRNFLAN	APQAGSKSQR	AKYGTAGYGV	EARGPTPEEA	850
pPROVP3. AMI	801	-----	-----	-----	-----	-----	850
		860	870	880	890	900	
G. AMI	851	QREKDTRISK	KMETMGIYFA	TPEWVALNGH	RGPSPGQLKY	WQNTREIPDP	900
pPROVP3. AMI	851	-----	-----	-----	-----	-----	900
		910	920	930	940	950	
G. AMI	901	NEDYLDYVHA	EKSRLASEEQ	ILRAATSIYG	APGQAEPQQA	FIDEVAKVYE	950
pPROVP3. AMI	901	-----	-----	-----	-----	-----	950
		960	970	980	990	1000	
G. AMI	951	INHGRGPNQE	QMKDLLLLTAM	EMKHRNPRRA	PPKPKPKPNV	PTQRPPGRLG	1000
pPROVP3. AMI	951	-----	-----	-----	-----	-----	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
G. AMI	1001	RWIRAV----	-----	-----	-----	-----	1050
pPROVP3. AMI	1001	-----CLGPV	KACCFGGEKI	FSLIQIIRPQ	KRFLKQNLPG	GSSGGGSHPE	1050

图 3

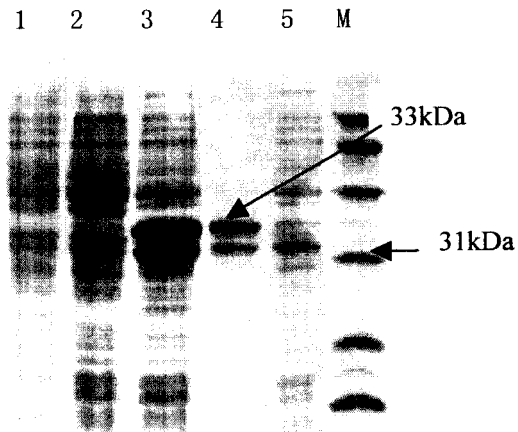


图 4

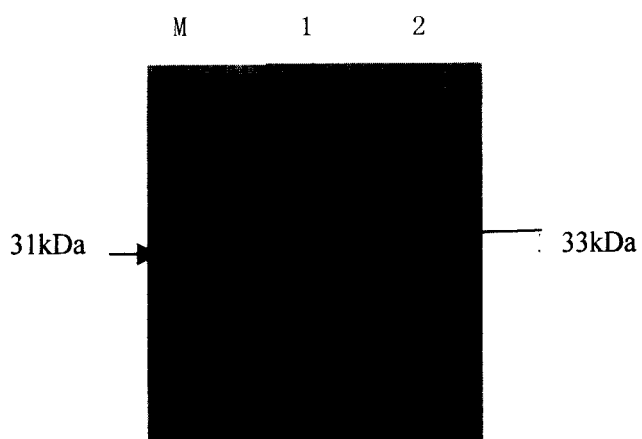


图 5

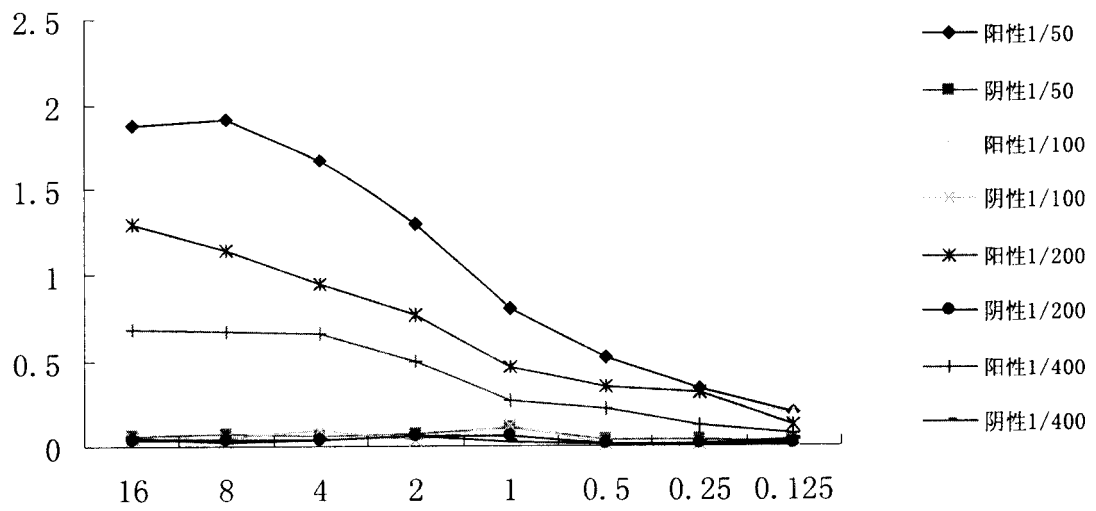


图 6

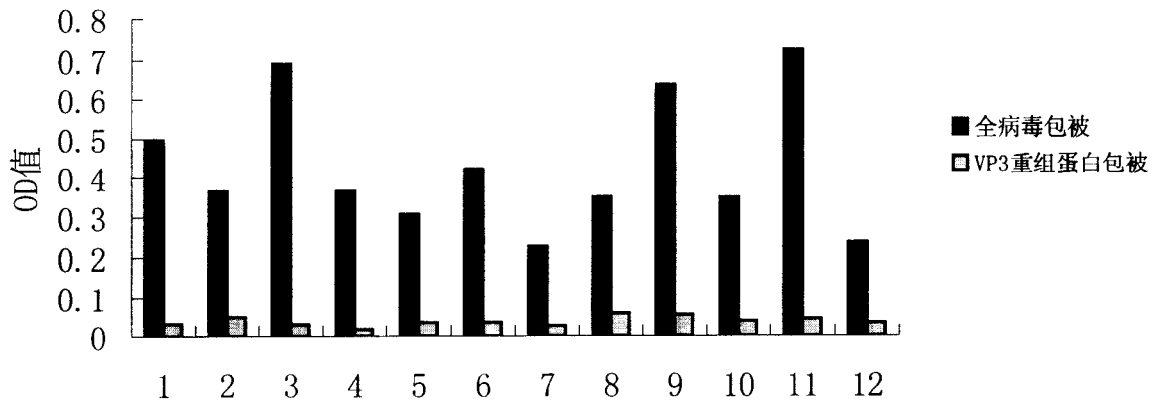


图 7

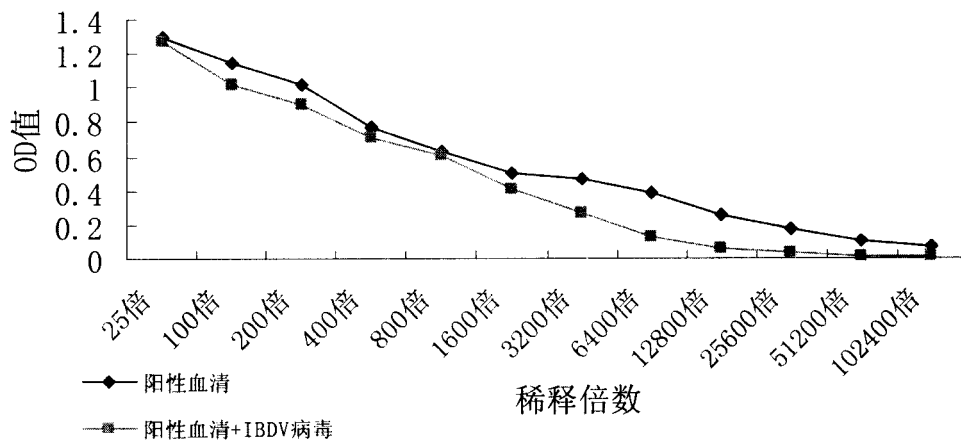


图 8

专利名称(译)	鸡传染性法氏囊病毒VP3基因、所表达的重组蛋白及应用		
公开(公告)号	CN1990870A	公开(公告)日	2007-07-04
申请号	CN200510135606.7	申请日	2005-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	王笑梅 高宏雷 高玉龙 付朝阳		
发明人	王笑梅 高宏雷 高玉龙 付朝阳		
IPC分类号	C12N15/33 C12N15/63 C07K14/005 C12P21/02 G01N33/535 A61K39/12		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN100503831C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鸡传染性法氏囊病毒VP3 cDNA全序列中的一段cDNA、利用其表达载体制备重组蛋白的方法、应用该重组蛋白所建立的一种IBDV间接ELISA诊断方法以及由该重组蛋白所制备的试剂盒。本发明通过对鸡传染性法氏囊病毒VP3 cDNA全序列进行筛选和分析，选取了其中一段抗原表位较丰富、能够在原核细胞中高效表达的cDNA序列，构建了原核表达载体，进行原核表达，用所表达的重组蛋白作为包被抗原，成功地建立了IBDV间接ELISA诊断方法，并确定了该方法的最佳反应条件，为免疫鸡群抗体检测和进行流行病学调查提供了一种快速简便的血清学鉴别诊断方法。本发明还提供了用该重组VP3蛋白作为包被抗原的试剂盒，试验表明，该试剂盒具有良好的敏感性、特异性、稳定性和重复性。

