

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102012432 B

(45) 授权公告日 2013.09.25

(21) 申请号 201010299530.2

(22) 申请日 2010.09.30

(73) 专利权人 四川农业大学实验动物工程技术中心

地址 625014 四川省雅安市雨城区新康路46号

(72) 发明人 程安春 汪铭书 沈婵娟 陈孝跃

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275

代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/03 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1687406 A, 2005.10.26,

Shen Chanjuan et.al.. Expression and distribution of the duck enteritis virus UL51 protein in experimentally infected ducks. 《AVIAN DISEASES》. 2010, 第54卷(第2期),

Chan-juan Shen et.al.. Identification and characterization of the duck enteritis virus UL51 gene. 《Arch Virol》. 2009, 第154卷(第7期),

贾仁勇. 鸭瘟病毒蛋白质组二维电泳特性和UL24 基因的发现、原核表达及应用研究. 《中国博士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2009, (第01期),

审查员 刘文瀚

权利要求书1页 说明书13页

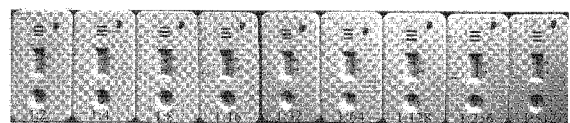
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明特别涉及基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法,所述胶体金免疫层析试纸中硝基纤维膜上的测试线由浓度 ≥ 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白包被而成,对照线由浓度 ≥ 1mg/mL 的兔免疫球蛋白包被而成,金标垫由胶体金标记的 ≥ 2mg/mL 重组 UL51 蛋白和 ≥ 2mg/mL 的羊抗兔免疫球蛋白的混合液包被而成;试纸的制作方法包括硝基纤维膜上测试线和对照线的喷制、金标垫的制备及胶体金免疫层析试纸条的组装;本发明还涉及试纸在检测鸭瘟病毒抗体中的运用;本试纸用于检测鸭瘟病毒抗体的检测灵敏度和特异性高,本制备方法操作简单实用,本运用首次将抗重组 UL51 蛋白制备成胶体金试纸用于检测鸭瘟病毒抗体。



1. 基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸,由底板、硝基纤维膜、样品垫、金标垫和吸收垫组成,硝基纤维膜上有测试线和对照线,其特征在于:所述硝基纤维膜上的测试线由浓度等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白包被而成,对照线由浓度等于 1mg/mL 的兔免疫球蛋白包被而成,所述金标垫由胶体金标记的浓度等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的浓度等于 2mg/mL 的羊抗兔免疫球蛋白组成的混合液包被而成;

所述重组 UL51 蛋白采用以下方法制得:将含 PET28a-UL51 质粒的表达菌 E. coli BL21 (DE3) 接种于 200mL LB 液体培养基中,所述 LB 液体培养基中含 50  $\mu$ g/mL Kan, 37 $^{\circ}$ C 培养 16h,作为种子菌;向发酵罐中注入 10L 的 LB 液体培养基,密封后 115 $^{\circ}$ C 灭菌 30min,之后待液体冷却至 37 $^{\circ}$ C,从加样孔处向发酵罐中加入终浓度为 50  $\mu$ g/mL Kan、1mL 消泡剂和 200mL 种子菌,在 640r/min, 37 $^{\circ}$ C, pH7.0 和 50%溶氧量的条件下培养,待培养至菌液 OD<sub>600</sub> = 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 3h,收集培养好的菌液,8,000r/min 离心 10min 后收集菌体沉淀,用 20mmol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 重悬,按 1mg/mL 加溶菌酶,4 $^{\circ}$ C 搅拌 30min,超声波冰浴间歇破碎菌体,200w, 30sec/次,5~10 次,然后 4 $^{\circ}$ C、10000r/min 离心 10min,将沉淀用 20mL 洗液悬浮,所述洗液由 10mmol/L PBS、2mol/L 尿素和 0.2% Triton X-100 组成,4 $^{\circ}$ C、10000r/min 离心 10min 后,沉淀再次用 20mL 洗液悬浮,重复洗涤三次后,用尿素溶液溶解沉淀,所述尿素溶液由 10mmol/L PBS 和 8mol/L 尿素组成,于 4 $^{\circ}$ C 在不同浓度的尿素溶液即 6、4、3、2、1、0mol/L 的尿素溶液中梯度透析,使变性蛋白逐渐复性,即得重组 UL51 蛋白。

2. 权利要求 1 所述的基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸制作方法,其特征在于:具体步骤为:

a 硝基纤维膜上测试线和对照线的喷制:将浓度等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白喷点于硝基纤维膜上形成测试线,将浓度等于 1mg/mL 的兔免疫球蛋白喷点于硝基纤维膜上形成对照线,干燥后低温密封保存备用;

b 金标垫的制备:将玻璃纤维素膜浸于由胶体金标记的浓度等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的浓度等于 2mg/mL 的羊抗兔免疫球蛋白组成的混合液中,再将该膜浸于玻璃纤维素膜处理液中封闭非特异性结合位点,干燥后得金标垫;

c 胶体金免疫层析试纸条的组装:分别将硝基纤维膜、样品垫、金标垫、吸收垫依次粘在所述底板上,硝基纤维膜上所述对照线靠近吸收垫端,所述测试线靠近样品垫端,再切割成一定宽度的试纸条,密封包装,干燥低温保存。

3. 根据权利要求 2 所述的基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸制作方法,其特征在于:所述测试线与所述对照线的距离为 0.7 厘米,所述测试线与所述对照线距硝基纤维膜的边距分别为 0.9 厘米。

4. 权利要求 1 所述的胶体金免疫层析试纸在制备鸭瘟病毒抗体检测试纸中的运用。

## 基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物医学领域中鸭瘟病毒抗体的检测,特别涉及基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 鸭瘟 (Duck plague, DP), 又称鸭病毒性肠炎 (Duck viral enteritis, DVE), 是鸭、鹅、天鹅等雁形目动物的一种急性接触性传染病, 其致病特征是血管损伤、组织出血、消化道和淋巴器官损伤。该病可导致商品水禽的产蛋量下降和死亡, 对野生水禽也有不同的致死率。DP 的病原为 DPV (Duck plague virus, DPV), DPV 是一种泛嗜性全身性感染的病毒, 目前大多数学者把其暂时列为  $\alpha$  疱疹病毒亚科, 但尚未分属。目前, 已报道的 DPV 检测方法有病毒分离鉴定、聚合酶链式反应 (PCR)、荧光实时定量 PCR、间接免疫酶组化法、间接免疫荧光法、电镜观察、原位杂交、间接原位 PCR 法、血清中和试验 (SNT)、琼脂凝胶扩散试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、反向被动血凝试验、微量固相放射免疫测定法、生物素标记寡核苷酸探针原位检测、地高辛标记核酸探针法和光敏生物素标记法等, 这些方法各有特点。但是, 传统的病毒分离鉴定方法大约需 4 ~ 5d, 且方法繁琐, 费时费力。一些免疫学方法以及 PCR 方法也往往需要特殊的仪器、设备以及熟练的技术人员。此外, 许多血清学检测方法都是基于纯化的 DPV 全病毒产生的抗体来检测 DPV, 由于病毒纯化的复杂性和纯化后的病毒中会掺杂有许多宿主细胞成分, 而导致许多假阳性结果出现。

[0003] 随着分子生物学的飞速发展, 对蛋白功能的研究日趋增强, 特别是对有免疫原性蛋白的研究日益增多, 以克隆表达的重组蛋白作为包被原检测病毒抗血清的 ELISA 方法和胶体金免疫层析法已被大量报道。但是, 基于重组 UL51 蛋白的鸭瘟病毒抗体检测方法尚未报到, 重组 UL51 蛋白是否与抗 DPV 阳性血清发生强烈的免疫反应、是否可用于鸭瘟病毒抗体的检测尚需证实。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此, 本发明的目的之一在于提供一种基于重组 UL51 蛋白为抗原的胶体金免疫层析试纸检测鸭瘟病毒抗体, 所述重组 UL51 蛋白的获得是通过构建原核表达质粒 pET28a-UL51、转化并发酵培养, 收集到了大量的含有重组 UL51 蛋白的菌体沉淀; 为保证包被蛋白成分单一, 降低非特异性结合, 接着对重组 UL51 蛋白进行了纯化; 且将纯化的蛋白再依次分步梯度透析, 以降低尿素浓度使该蛋白恢复其空间结构, 复性后的蛋白具有较好的抗原性; 同时, 用 Western blotting 分析证实该蛋白可与抗 DPV 阳性血清发生强烈的免疫反应; 进一步确定重组 UL51 蛋白标记浓度、兔免疫球蛋白的包被浓度及金标垫的包被参数后, 制备了胶体金免疫层析试纸, 该试纸检测鸭瘟病毒抗体的特异性、灵敏性较高。

[0005] 为实现上述目的, 本发明的技术方案为:

[0006] 基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸, 由底板、硝基纤维膜、样品垫、金标垫

和吸收垫组成,硝基纤维膜上有测试线和对照线,所述硝基纤维膜上的测试线由浓度大于或等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白包被而成,对照线由浓度大于或等于 1mg/mL 的兔免疫球蛋白包被而成;所述金标垫由胶体金标记的浓度大于或等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的浓度大于或等于 2mg/mL 的羊抗兔免疫球蛋白组成的混合液包被而成。

[0007] 进一步,所述的基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸,所述硝基纤维膜上的测试线由浓度等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白包被而成,对照线由浓度等于 1mg/mL 的兔免疫球蛋白包被而成,所述金标垫由胶体金标记的浓度等于 2mg/mL 的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的浓度等于 2mg/mL 的羊抗兔免疫球蛋白组成的混合液包被而成。

[0008] 本发明的目的之二在于提供所述胶体金免疫层析试纸的制备方法,该方法简单实用。

[0009] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0010] 所述胶体金免疫层析试纸的制备步骤具体步骤为:

[0011] a 硝基纤维膜上测试线和对照线的喷制:将浓度  $\geq 2\text{mg/mL}$  的重组 UL51 蛋白喷点于硝基纤维膜上形成测试线,将浓度  $\geq 1\text{mg/mL}$  的兔免疫球蛋白喷点于硝基纤维膜上形成对照线,干燥后低温密封保存备用;

[0012] b 金标垫的制备:将玻璃纤维素膜浸于由胶体金标记的浓度  $\geq 2\text{mg/mL}$  的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的浓度  $\geq 2\text{mg/mL}$  的羊抗兔免疫球蛋白组成的混合液中,再将该膜浸于玻璃纤维素膜处理液中封闭非特异性结合位点,干燥后得金标垫;

[0013] c 胶体金免疫层析试纸条的组装:分别将硝基纤维膜、样品垫、金标垫、吸收垫依次粘在所述底板上,硝基纤维膜上所述对照线靠近吸收垫端,所述测试线靠近样品垫端,再切割成一定宽度的试纸条,密封包装,干燥低温保存;

[0014] 进一步,所述测试线与所述对照线的距离为 0.7 厘米,所述测试线与所述对照线距硝基纤维膜的边距分别为 0.9 厘米。

[0015] 本发明的目的之三在于提供所述胶体金免疫层析试纸的运用,所述运用能够保证在灵敏性和特异性较高的情况下快速检测鸭瘟病毒抗体。

[0016] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0017] 所述的胶体金免疫层析试纸在制备鸭瘟病毒抗体检测试纸中的运用。

[0018] 有益效果:本胶体金试纸敏感性高,即使将 DPV 弱毒疫苗免疫鸭的阳性血清按体积稀释到 128 倍,也可以被本胶体金免疫层析试纸检测到;运用该试纸分别检测非免疫鸭阴性血清、鸭 DPV 阳性血清、鸭 DHV 阳性血清、鸭 RA 阳性血清和鸭 E. coli 阳性血清,结果显示仅鸭 DPV 阳性血清可见两条清晰的红色条带,其它血清均仅在 C 线处出现一条清晰的红色条带,表明本试纸具有很好的特异性;另外,运用本试纸检测鸭瘟病毒具有良好的批内及批间重复性;本方法制备的试纸至少可在 4°C 或 25°C 保存一年,本运用首次将重组 UL51 蛋白制备成胶体金试纸用于检测鸭瘟病毒抗体。

## 附图说明

[0019] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明作进一步的详细描述,其中:

[0020] 图 1-A 为 DPV UL51 基因的 PCR 扩增:M 指 DL2000 相对分子质量标准;1 指以正常

DEF 基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物 ;2 指以 DPV CHv 毒株基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物 (箭头所示的是其分子量大小,约为 760bp);图 1-B 为重组质粒 pMD18-UL51 的双酶切鉴定 :M 指相对分子质量标准 III,1 指重组质粒 pMD18-UL51 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切得到的两个片段 (箭头所示小片段的分子量大小约为 760bp);图 1-C 为重组表达载体 pET28a-UL51 的双酶切鉴定 :M 指相对分子质量标准 III ;1 指重组表达载体 pET28a-UL51,2 指重组表达载体 pET28a-UL51 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切得到的两个片段 (箭头所示小片段的分子量大小约为 760bp)。

[0021] 图 2-A 为重组表达蛋白的 SDS-PAGE 鉴定 :M 为蛋白质相对分子质量标准 ;1 为阴性对照 (未加 IPTG 诱导);2 为 IPTG 诱导 (箭头所示的蛋白质分子量大小约为 34KD);图 2-B 为诱导剂 IPTG 不同终浓度诱导表达结果 :1-7 的 IPTG 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2mmol/L;图 2-C 为不同温度诱导 pET28a-UL51 表达结果 :1-3 的温度分别为 20、30 和 37℃;图 2-D 为不同时间诱导 pET28a-UL51 表达结果 :1-7 的诱导时间分别为 1、2、3、4、5、6、7 和 8h。

[0022] 图 3 为重组 UL51 蛋白的检测 :(a)SDS-PAGE 分析 :M 为蛋白标准 (KD);1 为 1mL 发酵培养的菌液 ;2 为包涵体洗涤法纯化的重组 UL51 蛋白 ;0 为透析复性后的重组 UL51 蛋白 ;(b)Western blotting 分析 :1 是以兔抗 DPV 抗体为一抗检测重组 UL51 蛋白 (约为 34KD)。

[0023] 图 4 为胶体金免疫层析试纸条的组装示意图。

[0024] 图 5 为胶体金免疫层析试纸条的判定结果。

[0025] 图 6 为所述胶体金免疫层析试纸的敏感度。

[0026] 图 7 为所述胶体金免疫层析试纸的特异性。

## 具体实施方式

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面结合附图对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0028] 实施例鸭瘟病毒 UL51 胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用

[0029] 一鸭瘟病毒 UL51 基因的克隆、原核表达及产物纯化

[0030] 1、材料方法

[0031] 优选实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如分子克隆实验指南 (第三版, J. 萨姆布鲁克等著,黄培堂等译,科学出版社,2002 年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0032] 1.1 菌株、质粒和毒株

[0033] 质粒 pMD18-T,购自大连宝生物工程有限公司 ;原核表达质粒 pET28a(+), Novagen 公司产品 ;克隆宿主菌 *E. coli* DH5a、表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 和 DPV CHv 强毒株,由四川农业大学禽病研究中心提供。

[0034] 1.2 试验鸭胚

[0035] 10 日龄鸭胚,其种鸭 DPV 和抗体均为阴性。

[0036] 2 实验方法

[0037] 2.1 DPV UL51 基因的克隆

[0038] 2.1.1 引物设计

[0039] 利用Primer Premier5.0软件,参考UL51基因序列(GenBank登录号:DQ072725),由宝生物生物技术有限公司合成。引物DPV-UL51F:5'-CCGGAATTCATGTTAGCTTTTATCTCCAG-3'(划线部分为EcoRI位点);引物DPV-UL51R:5'-TCCCTCGAGTTAGACGGCTACCAACG-3'(划线部分为XhoI位点)。合成后,以适量灭菌去离子水溶解,使其终浓度为20mmol/L,-20℃保存备用。

[0040] 2.1.2DPV基因组DNA的提取

[0041] 2.1.2.1DEF的制作方法:取10d日龄健康鸭胚,分别用5%碘酒和75%酒精消毒蛋壳表面。无菌操作条件下将胚体取出并用PBS将胚体洗净,剪去头、翅、腿和内脏,PBS冲洗后将胚体剪成1mm大小的小块,加PBS适量,之后置于三角瓶内,加细胞分散剂(体积分数为2.5%的胰蛋白酶)150 $\mu$ L/胚,于37℃水浴中消化3min。立即将细胞悬液以4000r/min离心5min,倾弃上清,细胞沉淀用适量的MEM悬浮后,用5层纱布过滤,向滤液中加入10%小牛血清和100IU/mL双抗后,分装于100mL细胞培养瓶中,7mL/瓶,水平静置于37℃细胞培养箱中进行培养。

[0042] 2.1.2.2DPV增殖:取刚刚长成致密单层的DEF,弃生长营养液,用灭菌PBS清洗细胞表面2次后,加入DPV病毒液2~3mL覆盖细胞表面进行吸附,37℃吸附120min后弃病毒液,然后加含3%小牛血清和100IU/mL双抗的MEM维持营养液,之后37℃培养。同时做未接毒的DEF对照。

[0043] 2.1.2.3DNA提取方法:直接从感染细胞中提取DPV基因组DNA的具体步骤如下:(1)选取用DPV种毒感染后细胞病变(CPE)达60%~70%的DEF(100mL细胞瓶);同时选取细胞形态正常的DEF作对照;(2)倾去细胞培养液,加入500 $\mu$ L的细胞裂解液,同时加蛋白酶K(10mg/mL)至终浓度为200 $\mu$ g/mL,轻轻混匀后,37℃孵育10min;(3)将细胞悬浮液倒入EP离心管中,并用500 $\mu$ L的饱和酚洗涤残存于细胞瓶内的裂解物,倒入离心管中;(4)用饱和酚:氯仿及氯仿抽提2次,再用水饱和乙醚处理2次;(5)加1/10倍体积3mol/L NaAc,混匀后,加入2倍体积冷无水乙醇,-20℃放置30~60min;(6)13000r/min离心20min,沉淀用预冷的70%乙醇洗涤两次;(7)真空抽干后,溶于适量TE缓冲液中,加入1 $\mu$ L RNA酶,37℃作用30min,-20℃保存备用。

[0044] 2.1.3PCR扩增DPV UL51基因

[0045] PCR反应体系为:

[0046]	2 $\times$ 傻瓜 PCR Mixtrue	12.5 $\mu$ L
	DPV 基因组 DNA	1.0 $\mu$ L
	P1(20pmol/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L
	P2 (20pmol/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L
	超纯水	9.5 $\mu$ L
	Total volume	25 $\mu$ L /Sample

[0047] 轻轻混匀,2000r/min瞬时离心后进行PCR。

[0048] 反应参数:95℃预变性5min,95℃变性1min,56℃退火1min,72℃延伸1min,循环40次,最后72℃延伸10min,于4℃保存备用。取4 $\mu$ L PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳,

设 DL2000 和空白对照,观察扩增片段的长度。

[0049] 2.1.4UL51 基因 PCR 产物的回收

[0050] 按北京赛百盛基因技术有限公司 DNA 回收试剂盒说明书进行,回收后的 DNA 贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0051] 2.1.5 纯化的 UL51 基因与 pMD18-T 的连接

[0052] 连接反应体系如下:

[0053]	PCR 产物	4.5 $\mu\text{L}$
	pMD18-T	0.5 $\mu\text{L}$
	2 $\times$ DNA 连接酶 Mixtrue	5.0 $\mu\text{L}$
	超纯水补足至	10 $\mu\text{L}$

[0054] 将上述试剂加入 0.2mL 的 EP 管中,小心混匀,瞬时离心后,于  $16^{\circ}\text{C}$  连接过夜。

[0055] 2.1.6DH5a 感受态细胞的制备

[0056] 采用氯化钙法制备新鲜的 DH5a 株大肠杆菌感受态细胞,简述如下:(1) 无菌挑取平板上新鲜培养的 DH5a 单克隆菌落接种于 5mL LB 培养液中,于  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜;(2) 取 1mL 上述培养液接种于 100mL LB 培养液中, $37^{\circ}\text{C}$  200r/min 振荡培养 2.5~3h,使  $\text{OD}_{600} = 0.5$  左右;(3) 将细菌培养物倒入灭菌后用冰预冷的离心管中,冰浴 10min;(4) 于  $4^{\circ}\text{C}$  4000r/min 离心 8min,弃上清;(5) 加 10mL 冰预冷的 0.1mol/L 的  $\text{CaCl}_2$ ,温和悬起细菌沉淀,冰浴 30min;(6) 于  $4^{\circ}\text{C}$  4000r/min 离心 8min,弃上清,加 4mL 冰预冷的 0.1mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  再次重悬沉淀,加入终浓度为 15% 的灭菌甘油,混匀后分装为 200 $\mu\text{L}$ /管,直接用于转化或置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

[0057] 2.1.7 转化感受态细胞

[0058] 将 10 $\mu\text{L}$  连接体系全部取出加到 200 $\mu\text{L}$  DH5a 感受态细胞中,冰浴 30min;再置于  $42^{\circ}\text{C}$  温浴 90s,之后再冰浴 2min;然后立即加入 0.8mL LB 培养基, $37^{\circ}\text{C}$  水浴振荡培养 45min,取 200 $\mu\text{L}$  涂于含 (X-gal/IPTG/Kan) 的培养基上,置  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养过夜。次日挑取单个白色菌落接种于 5mL LB (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan) 中, $37^{\circ}\text{C}$  水浴振荡培养 18h 后进行质粒抽提。

[0059] 2.1.8 质粒的抽提

[0060] 按北京赛百盛基因技术有限公司质粒抽提试剂盒说明书进行,回收产物贮存于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0061] 2.1.9 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

[0062] 将上一步抽提的重组质粒命名为 pMD18-UL51,分别以 EcoR I/XhoI 双酶切消化与 Xho I 单酶切消化,1.0% 凝胶电泳观察结果。同时做 PCR 扩增目的基因。

	Xho I	EcoR I / Xho I
[0063] pMD18-UL51 质粒	8.0 $\mu$ L	16.0 $\mu$ L
EcoR I	-	1.0 $\mu$ L
Xho I	1.0 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
10 $\times$ H Buffer	1.0 $\mu$ L	2.0 $\mu$ L
超纯水补足至	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L

[0064] 2. 1. 10UL51 基因序列测定

[0065] 将鉴定正确的质粒寄送上海英骏生物有限公司进行测序。

[0066] 2. 2 原核表达质粒 pET28a-UL51 的构建、诱导表达与表达条件优化

[0067] 2. 2. 1 原核表达质粒 pET28a-UL51 的构建与鉴定

[0068] 2. 2. 1. 1 目的片段的酶切与连接：限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 分别双酶切 pMD18-UL51 质粒和原核表达载体 pET28a(+), 酶切体系均为：

	pMD18-UL51 质粒	原核表达载体 pET28a(+)	
[0069]	EcoR I	EcoR I	8.0 $\mu$ L
	Xho I	Xho I	1.0 $\mu$ L
	10 $\times$ H buffer	10 $\times$ H buffer	2.0 $\mu$ L
	超纯水补足至	超纯水补足至	20 $\mu$ L

[0070] 37 $^{\circ}$ C 水浴 4h, 按 DNA 回收试剂盒使用说明分别回收目的片段后, 按照下列连接体系 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

[0071]	回收目的片段 UL51	6.0 $\mu$ L
	pET28a 双酶切回收片段	1.5 $\mu$ L
	2 $\times$ DNA 连接酶 Mixtrue	7.5 $\mu$ L
	超纯水补足至	15 $\mu$ L

[0072] 2. 2. 1. 2 重组质粒的转化：采用氯化钙法制备 DH5a 感受态细胞。之后, 取连接液 15  $\mu$  L 加到含 200  $\mu$  L 感受态 DH5a 的离心管中, 混匀后冰浴 30min; 置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 90sec, 然后迅速冰浴 2min; 加入不含 Kan 的 LB 液体培养基 800  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 振摇 (150r/min) 培养 1 ~ 1.5h; 取 200  $\mu$  L 培养物涂布于含 100  $\mu$  g/mL Kan 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日挑取单个菌落接种于 5mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16h, 同时设立空载体转化组 (空载体 10  $\mu$  L+ 感受态 DH5a 200  $\mu$  L)、无载体对照组 (灭菌超纯水 10  $\mu$  L+ 感受态 DH5a 200  $\mu$  L)。

[0073] 2. 2. 1. 3 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定：将上述保存的克隆菌种接种于 5mL 的 LB 液体培养基 (含 Kan 50  $\mu$  g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C 水浴振摇培养过夜, 次日按常规方法提取重组质粒, 然后用 Xho I 单酶切、EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定该重组质粒, 其酶切体系如下：

	Xho I	EcoR I / Xho I
pET28a-UL51 质粒	8.0 $\mu$ L	16.0 $\mu$ L
EcoR I	-	1.0 $\mu$ L
[0074] Xho I	1.0 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
10 $\times$ H Buffer	1.0 $\mu$ L	2.0 $\mu$ L
超纯水补足至	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L

[0075] 然后,以上述重组质粒为模板,利用方法 2.1.1 中的引物进行 PCR 反应,其方法和扩增条件同上,取 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。经过酶切和 PCR 鉴定,获得重组原核表达质粒 pET28a-UL51。

[0076] 2.2.2 重组表达质粒 pET28a-UL51 的诱导表达

[0077] 2.2.2.1 重组质粒 pET28a-UL51 的提取:挑取 2.2.1.3 已鉴定含阳性重组质粒 pET28a-UL51 的 DH5a 菌种划线接种于含 Kan 50g/mL 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日取单个菌落接种于 5mL LB 液体培养基上,剧烈振荡培养 10 ~ 16h,离心收集菌液,按 UltraPure<sup>TM</sup> 质粒 DNA 小量提取试剂盒说明进行重组质粒的提取与纯化。

[0078] 2.2.2.2 重组质粒 pET28a-UL51 转化表达菌:采用氯化钙法制备 E. coli BL(DE3) 感受态细胞,并将上述提取的重组质粒 pET28a-UL51 转化到表达宿主菌 E. coli BL(DE3) 中,方法同 2.2.1.2。

[0079] 2.2.2.3 重组质粒 pET28a-UL51 的诱导表达:从上述 LB 固体培养基(含 Kan 50  $\mu$ g/mL)上,挑取阳性克隆菌,接种 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日取菌液按 1 : 50 的比例接入 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50  $\mu$ g/mL)中,剧烈振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.4 时,分别加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L,诱导 3h 后,收集 1mL 培养菌液,4 $^{\circ}$ C 13000r/min 离心 2min,弃上清,沉淀中加入 80  $\mu$ L 超纯水和 20  $\mu$ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴加热变性 5 ~ 10min,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,观察表达结果。

[0080] 2.2.2.4 重组质粒 pET28a-UL51 表达产物的可溶性分析:将诱导表达的 100mL 菌液和未诱导表达的 100mL 菌液,分别按下步骤处理:4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心 5min,菌体沉淀用 20mL 20mmol Tris-HCl (pH8.0) 悬浮;置 -20 $^{\circ}$ C 过夜后,加溶菌酶至终浓度为 1mg/mL,4 $^{\circ}$ C 搅拌 30min,超声波(冰浴)间歇破碎菌体(600w,30sec/次,10次),4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心 10min,取上清备用①;沉淀用 10mL 洗液(10mmol/L PBS+2mol/L 尿素+0.2% Triton X-100)悬浮,4 $^{\circ}$ C,10000r/min 离心 10min 后,沉淀再次用 10mL 洗液悬浮,重复洗涤三次后,用适量尿素溶液(10mmol/L PBS+8mol/L 尿素)溶解沉淀②,低温保存备用。分别取适量的上清①和尿素溶液溶解的沉淀②,向其中加入 80  $\mu$ L 超纯水和 20  $\mu$ L 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴加热变性 5 ~ 10min,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,将凝胶用考马斯亮蓝染色后,观察结果。并将染好色的凝胶经全自动凝胶成像分析系统扫描和 Quantity One 软件分析诱导菌液中重组蛋白在胞浆(上清①,可溶性)和沉淀中(沉淀②,包涵体形式)的相对百分含量。

[0081] 2.2.3 重组质粒 pET28a-UL51 诱导条件的优化

[0082] 2.2.3.1 诱导剂 IPTG 的浓度优化:按 2.2.2.3 方法,取含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21 (DE3),接种 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50  $\mu$ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日按 1 : 50 转接种于 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50  $\mu$ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C 培养培养至 OD<sub>600</sub>

值约 0.4 时,取其中 7 只试管,分别加入 IPTG 至终浓度为 0mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L、1.2mmol/L 37℃诱导培养 4h 后,按 2.2.2.3 方法对样品进行处理,12% SDS-PAGE 电泳,观察结果。

[0083] 2.2.3.2 温度条件优化:按 2.2.2.3 方法,取含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21 (DE3),接种 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50 μg/mL)中,37℃振荡培养过夜。次日按 1:50 转接种于 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50 μg/mL)中,37℃培养至 OD<sub>600</sub> 值约 0.4 时,取其中 3 只试管,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L,分别置于 20℃、30℃、37℃ 诱导培养 4h,按 2.2.2.3 方法对样品进行处理,12% SDS-PAGE 电泳,观察结果。

[0084] 2.2.3.3 诱导时间优化:取含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21 (DE3),接种 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50 μg/mL)上,37℃振荡培养过夜。次日按 1:50 转接种于 5mL LB 液体培养基(含 Kan 50 μg/mL)上,继续培养至 OD<sub>600</sub> 值约 0.4 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L,37℃诱导培养,分别于诱导后 0、1、2、3、4、5、6、7、8h,吸取 1mL 培养液,按 2.2.2.3 方法对样品进行处理,12% SDS-PAGE 电泳,观察结果。

[0085] 2.3 重组 UL51 蛋白的大量制备、纯化与复性

[0086] 2.3.1 菌体的发酵培养

[0087] 发酵的具体步骤为:(1)将含 pET28a-UL51 质粒的表达菌 E. coli BL21 (DE3) 接种于 200mL LB 液体培养基(含 50 μg/mL Kan)中,37℃培养 16h,作为种子菌;(2)向发酵罐中注入 10L 的 LB 液体培养基,密封后 115℃灭菌 30min,之后待液体冷却至 37℃;(3)从加样孔处向发酵罐中加入终浓度为 50 μg/mL Kan、1mL 消泡剂和 200mL 种子菌(2% v/v);(4)在 640r/min,37℃,pH 7.0,和 50%溶氧量的条件下培养,待培养至菌液 OD<sub>600</sub> = 0.6 左右时,加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L,37℃诱导培养 3h;(5)收集培养好的菌液(约 10L),取其中 1mL 进行 SDS-PAGE 分析,其余的菌液 8,000r/min 离心 10min 后收集菌体沉淀,用适量 Tris HCl (20mmol/L, pH 8.0) 重悬后,-20℃保存备用。

[0088] 2.3.2 重组 ULL51 蛋白的包涵体洗涤法大量纯化

[0089] 取出 -20℃保存的菌体沉淀,室温下融化后,按 1mg/mL 加溶菌酶,4℃搅拌 30min,超声波(冰浴)间歇破碎菌体(200w,30sec/次,5~10次),4℃,10000r/min 离心 10min。将沉淀用 20mL 洗液(10mmol/L PBS+2mol/L 尿素+0.2% Triton X-100)悬浮,4℃,10000r/min 离心 10min 后,沉淀再次用 20mL 洗液悬浮,重复洗涤三次后,用适量尿素溶液(10mmol/L PBS+8mol/L 尿素)溶解沉淀,4℃保存备用。

[0090] 2.3.3 重组 UL51 蛋白的复性和检测

[0091] 将包涵体洗涤纯化得到的重组 UL51 蛋白,于 4℃在不同浓度的尿素溶液(6、4、3、2、1、0mol/L)中梯度透析,使变性蛋白逐渐复性,收集透析好的蛋白液,取其中 20 μL 进行 SDS-PAGE 分析,并以纯化的兔抗 DPV 为一抗,以 HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blotting 检测。其余蛋白液用 Bradford 法测定浓度后,稀释成 2mg/mL,分装后,4℃保存备用。

[0092] 3 实验结果

[0093] 3.1 DPV UL51 基因的扩增、T-克隆与鉴定结果

[0094] 3.1.1 UL51 基因的 PCR 扩增结果

[0095] 以 DPV CHv 毒株基因组 DNA 为模板对 UL51 基因进行 PCR 扩增,其产物经 1.0%琼

脂糖凝胶电泳,获得了一条约 760bp 的特异性 DNA 条带,而以正常 DEF 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,无特异性条带,这与预期结果一致(图 1-A)。

### [0096] 3.1. 2UL51 基因 T 克隆鉴定结果

[0097] PCR 产物经胶回收纯化后,与 pMD18-T 载体连接并转化感受态细胞 DH5  $\alpha$ ,得到的 T 克隆命名为 pMD18-UL51。对 pMD18-UL51 进行 PCR、酶切(图 1-B)和测序鉴定,结果表明,T 克隆获得的 UL51 基因序列同已知的 DPV UL51 基因序列完全一致。

### [0098] 3.2 原核表达质粒 pET28a-UL51 的构建与鉴定、诱导表达及其优化结果

#### [0099] 3.2.1 重组表达质粒 pET28a-UL51 的构建与酶切鉴定

[0100] 以 EcoRI 和 Xho I 双酶切 T 克隆质粒后回收目的片断,与经相同酶切的 pET-28a(+) 表达载体连接,转化 DH5  $\alpha$ ,得到重组表达质粒 pET28a-UL51(理论大小约为 6130bp),经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后得到的两条片断的大小分别约为 5370bp 和 760bp(见图 1-C),与理论值相符,表明原核表达载体被成功构建。

#### [0101] 3.2.2 重组质粒 pET28a-UL51 的诱导表达

[0102] 3.2.2.1 重组质粒 pET28a-UL51 的诱导表达:将重组质粒 pET28a-UL51 转化表达菌株 BL21(DE3),在含 Kan 的 LB 琼脂平板上筛选到了白色菌落。将含重组质粒 pET28a-UL51 的表达宿主菌 BL21(DE3)用 IPTG 进行诱导表达、未用 IPTG 诱导、空载体 pET-28a(+) 转化菌株诱导表达,结果表明:空载体 pET-28a(+) 转化菌株诱导和未诱导菌株都未出现特异性蛋白条带;重组表达质粒 pET28a-UL51 表达的重组 UL51 蛋白在 34KD 处(图 2-A)。

[0103] 3.2.2.2 重组质粒 pET28a-UL51 表达产物的可溶性分析:诱导表达的 100mL 菌液经可溶性分析处理后,电泳结果显示:表达蛋白主要存在于沉淀中,说明重组表达蛋白在菌体中大量以不溶的包涵体形式存在。同时 Quantity One 软件分析显示:诱导菌液中重组蛋白在胞浆上清(可溶性)和沉淀中(包涵体形式)的相对百分含量分别为 6.72%和 93.28%。

#### [0104] 3.2.3 重组质粒 pET28a-UL51 诱导表达条件的优化

[0105] 3.2.3.1 IPTG 浓度的优化:在 37 $^{\circ}$ C 条件下,加入 IPTG 使其终浓度分别为 0mmol/L、0.2mmol/L、0.4mmol/L、0.6mmol/L、0.8mmol/L、1.0mmol/L、1.2mmol/L 诱导培养 4h,结果显示:未加诱导剂的对照管无特异性蛋白条带;随 IPTG 浓度的增高,蛋白诱导量逐渐增加,当增加到 0.8mmol/L 蛋白表达量达到最大;其后再增大 IPTG 浓度到 1.0mmol/L 和 1.2mmol/L 时,其蛋白表达量与 0.8mmol/L 时没有明显差别(图 2-B)。因此,可选择 0.8mmol/L 的 IPTG 浓度作为诱导表达浓度。

[0106] 3.2.3.2 诱导温度条件的优化:37 $^{\circ}$ C 培养培养至 OD<sub>600</sub> 值约 0.4 时,取 3 只灭菌试管,分装 5mL/管,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L,分别置于 20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4h,结果:温度在 20 $^{\circ}$ C 时,诱导蛋白量较少,37 $^{\circ}$ C 时最高(图 2-C),说明随着温度升高,蛋白诱导量逐渐增加。因此,选择温度 37 $^{\circ}$ C 为最佳诱导温度。

[0107] 3.2.3.3 诱导时间的优化:在 IPTG 浓度为 0.8mmol/L,37 $^{\circ}$ C 条件下,采用 1~8h 不同诱导时间进行诱导表达,结果 1h 时几乎无特异的蛋白条带产生;诱导 1~3h 的重组蛋白表达量均低于 4h 诱导组;诱导 5~8h,其重组蛋白表达量同 4h 相比无明显变化(图 2-D)。因此,选择 4h 作为最佳诱导时间。

#### [0108] 3.3 重组 UL51 蛋白的纯化结果

[0109] 通过发酵培养,收集到了大量含有重组 UL51 蛋白的菌体沉淀,经溶菌酶裂解、超声破碎、洗涤和溶解包涵体、变性蛋白透析复性等过程获得了大量纯化的重组 UL51 蛋白,通过 SDS-PAGE 分析显示纯化的重组 UL51 蛋白具有较高的纯度(图 3-a),Western blotting 分析显示该重组 UL51 蛋白能与抗 DPV 阳性血清发生强烈的免疫反应(图 3-b),表明该重组蛋白可作为 UL51-ICS 法检测 DPV 抗体的包被原。

[0110] 二、鸭瘟病毒重组 UL51 胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用

[0111] 1 实验材料

[0112] 1.1 菌株、毒株和血清

[0113] 含 pET28a-UL51 质粒的表达菌 *E. coli* BL21 (DE3)、DPV 强毒 CHv 株 (DPV-CHv) 由四川农业大学禽病研究中心提供;非免疫鸭阴性血清 (DPV 抗体检测阴性)、DPV 阳性血清 (为弱毒疫苗免疫后 14d 的免疫鸭血清,中和效价为 1 : 8)、鸭病毒性肝炎 (Duck virus hepatitis, DHV) 阳性血清、鸭传染性浆膜炎 (*Riemerella anatipestifer* infectious, RA) 阳性血清、鸭大肠杆菌病 (Duck *E. coli* infectious, *E. coli*) 阳性血清和 110 份待检鸭血清 (采集自四川省各养鸭场),由四川农业大学禽病研究中心提供。

[0114] 1.2 主要试剂

[0115] 牛血清白蛋白 (BSA) 购自美国 Sigma 公司产品;兔免疫球蛋白、胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白、金标蛋白稀释液、玻璃纤维素膜处理液,由上海金标生物科技有限公司提供;其它常规试剂如 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 均按常规方法配置。

[0116] 2 组 UL51 蛋白抗原 - 胶体金免疫层析试纸法 (UL51-ICS) 的制备

[0117] 2.1 鸭瘟病毒重组 UL51 胶体金免疫层析试纸的组装

[0118] 参考文献进行胶体金免疫层析试纸条的组装,具体步骤如下:(1) 将纯化的重组 UL51 蛋白抗原和兔免疫球蛋白分别用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 适当稀释后,用 XYZ-3000 三维喷点仪将稀释好的重组 UL51 蛋白和兔免疫球蛋白分别喷点于 NC 膜上,形成检测线 (test line, T 线) 和质控线 (control line, C 线),T 线与 C 线相距 0.7cm,距 NC 膜的边距分别为 0.9cm,置 37℃ 干燥 2h 后,4℃ 密封保存备用。(2) 对纯化的重组 UL51 蛋白做胶体金标记;(3) 用金标蛋白稀释液分别对胶体金标记的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白作适当稀释后混合,将玻璃纤维素膜浸于以上两种胶体金标记物的混合液中,再将该膜浸于玻璃纤维素膜处理液中以封闭非特异性结合位点,37℃ 干燥过夜,制成金标垫。(4) 分别将 NC 膜、样品垫 (吸水棉)、金标垫 (玻璃纤维素膜)、吸收垫 (吸水纤维素膜) 依次粘在白色塑料板上,组装成检测试纸板 (图 4),并用 LN-5000 切割机切割成 0.4cm 宽的试纸条,将其装入塑料盒中,密封包装,内置干燥剂,4℃ 保存。

[0119] 2.2 鸭瘟病毒重组 UL51 胶体金免疫层析试纸的原理和结果判定

[0120] 胶体金免疫层析试纸的原理:将纯化的重组 UL51 蛋白包被于 T 线,兔免疫球蛋白包被于 C 线;再将胶体金标记的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白混合后,共同固化于金标垫上;当鸭血清样品中的鸭抗 DPV 抗体流经金标垫上固化的胶体金标记的重组 UL51 蛋白时,与胶体金标记的重组 UL51 蛋白结合形成“鸭抗 DPV 抗体 - 胶体金标记的重组 UL51 蛋白”复合物,该复合物继续流动,与 T 线上的重组 UL51 蛋白抗原结合形成“重组 UL51 蛋白抗原 - 鸭抗 DPV 抗体 - 胶体金标记的重组 UL51 蛋白”复合物,胶体金颗粒在 T 线上富集而呈现红色,并且 T 线呈红色的强度与鸭抗 DPV 抗体的含量成正比;而固化于金标

垫上的不与鸭抗 DPV 抗体结合的胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白则继续向前流动,与固化在 C 线上的兔免疫球蛋白形成“兔免疫球蛋白-胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白抗体”复合物,胶体金颗粒在 C 线上富集而呈现红色。因此,当向水平放置的试纸条的样品垫上滴加约 100  $\mu$ L 的待检血清样品后,在 15min 内观察反应结果:若出现 C 线、T 线两条红线,为阳性(图 5-a);若只在 C 线上有一条红线,为阴性(图 5-b);若仅在 T 线上有一条红线或无任何红线出现,则试验无效。

[0121] 2.3 鸭瘟病毒重组 UL51 胶体金免疫层析试纸的条件优化

[0122] 以下条件逐一组合,确定鸭瘟病毒重组 UL51 胶体金免疫层析试纸检测(UL51-ICS 法)的最佳试验条件。

[0123] 纯化的重组 UL51 蛋白在 NC 膜上的包被浓度的确定:将重组 UL51 蛋白用 0.01mol/L 的 PB 缓冲液(pH 7.2)作 A:不稀释(2mg/mL)、B:2 倍稀释(1mg/mL)、C:4 倍稀释(0.5mg/mL)、D:8 倍稀释(0.25mg/mL)后,用 XYZ-3000 三维喷点仪将其喷点于 NC 膜上,形成 T 线。按制备好的胶体金免疫层析试纸,在其它条件不变的情况下,根据反应结果,确定达到试纸条敏感度要求的最适重组 UL51 蛋白的稀释度,为工作浓度。本实施例中的稀释方式均按照体积比进行。

[0124] b 兔免疫球蛋白在 NC 膜上的包被浓度的确定:将兔免疫球蛋白用 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.2)作 A:不稀释(4mg/mL)、B:2 倍稀释(2mg/mL)、C:4 倍稀释(1mg/mL)、D:8 倍稀释(0.5mg/mL)后,用 XYZ-3000 三维喷点仪将其喷点于 NC 膜上,形成 C 线。在其它条件不变的情况下,根据反应结果,确定达到试纸条敏感度要求的最适兔免疫球蛋白的稀释度,为工作浓度。

[0125] c 胶体金标记的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白的稀释度的确定:将胶体金标记的重组 UL51 蛋白作 A:不稀释(2mg/mL)、B:2 倍稀释(1mg/mL)、C:4 倍稀释(0.5mg/mL)、D:8 倍稀释(0.25mg/mL);再将胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白作 A:不稀释(4mg/mL)、B:2 倍稀释(2mg/mL)、C:4 倍稀释(1mg/mL)、D:8 倍稀释(0.5mg/mL);对以上两种标记物的不同稀释度进行逐一组合,用同样大小的玻璃纤维素膜分别浸于组合后的混合物中,在其它条件不变的情况下,根据反应结果,确定达到试纸条敏感度要求的最适胶体金标记物的稀释度,即为工作浓度。

[0126] d 胶体金免疫层析试纸的条件优化:经过优化和筛选,UL51-ICS 法的最佳条件为:(1)用 XYZ-3000 三维喷点仪将稀释好的重组 UL51 蛋白和兔免疫球蛋白分别以 2mg/mL 和 1mg/mL 喷点于 NC 膜上,形成 T 线和 C 线,置 37 $^{\circ}$ C 干燥 2h 后,4 $^{\circ}$ C 密封保存备用。(2)将玻璃纤维素膜浸于 2mg/mL 的胶体金标记的重组 UL51 蛋白和 2mg/mL 的胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白的混合液中,再将该膜浸于玻璃纤维素膜处理液中以封闭非特异性结合位点,37 $^{\circ}$ C 干燥过夜,制成金标垫。(3)分别将 NC 膜、样品垫(吸水棉)、金标垫(玻璃纤维素膜)、吸收垫(吸水纤维素膜)依次粘在白色塑料背板上,组装成检测试纸板,并用 LN-5000 切割机切割成 0.4cm 宽的试纸条,将其装入塑料盒中,密封包装,内置干燥剂,4 $^{\circ}$ C 保存。

[0127] 3 胶体金免疫层析试纸的应用

[0128] 3.1 敏感性试验

[0129] 将 DPV 阳性血清作 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 和 1:512,9 个稀释度,用上述建立的 UL51-ICS 法进行检测。

[0130] 将 DPV 阳性血清作一系列倍比稀释后,用上述建立的 UL51-ICS 法进行检测。结果当阳性血清稀释到 1 : 128 时,仍可见两条清晰的红色条带;当阳性血清稀释到 1 : 256 时,仅可见 C 线出现清晰的红色条带(图 6)。表明此方法能够检出 1 : 128 倍稀释的 DPV 阳性血清,具有较强的敏感性。

### [0131] 3.2 特异性试验

[0132] 用上述建立的 UL51-ICS 法分别检测非免疫鸭阴性血清、DPV 阳性血清、DHV 阳性血清、RA 阳性血清、E. coli 阳性血清,观察该法的特异性。

[0133] 用上述建立的 UL51-ICS 法分别检测非免疫鸭阴性血清、DPV 阳性血清、DHV 阳性血清、鸭 RA 阳性血清、鸭 E. coli 阳性血清,结果显示仅 DPV 阳性血清可见两条清晰的红色条带,其它血清均仅在 C 线处出现一条清晰的红色条带(图 7),表明本试纸具有很好的特异性。

### [0134] 4.3 重复性试验

[0135] 批内可重复性试验:用上述建立的 UL51-ICS 法分别检测非免疫鸭阴性血清(1 份)和 DPV 阳性血清(1 份),作 3 次重复,观察结果;(2) 批间可重复性试验:用 3 个不同批次制备的试纸条分别检测非免疫鸭阴性血清(1 份)和 DPV 阳性血清(1 份),观察结果。

[0136] 批内可重复性试验结果显示:非免疫鸭阴性血清和 DPV 阳性血清的 3 次重复检测结果均一致;批间可重复性试验结果显示:用 3 个不同批次制备的试纸条分别检测非免疫鸭阴性血清和 DPV 阳性血清,得到的结果也均一致。表明建立的 UL51-ICS 法具有良好的批内及批间重复性。

### [0137] 3.4 对临床待检血清样品的检测

[0138] 用本研究建立的 UL51-ICS 法、UL51-LISA 法、DPV-ELISA 法和 NT 试验分别检测 110 份待检血清样品,结果如表 1 所示:UL51-ELISA 法检出阳性率为 39.09% (43/110), UL51-ICS 法检出阳性率为 37.27% (41/110),两者符合率为 95.35% (41/43);UL51-ELISA 法与 DPV-ELISA 检测试剂盒的符合率为 91.49% (43/47),与 NT 试验的符合率为 58.14% (25/43);UL51-ICS 法与 DPV-ELISA 检测试剂盒的符合率为 87.23% (41/47),与 NT 试验的符合率为 60.98% (25/41)。以上结果表明,本研究建立的 UL51-ELISA 法与 UL51-ICS 法有最高的符合率,并且 UL51-ELISA 法与 DPV-ELISA 检测试剂盒也有较高的符合率。

### [0139] 表 14 种检测 DPV 抗体方法的比较

	方法			
	UL51-ELISA 法	UL51-ICS 法	DPV-ELISA	NT 试验
[0140] 阳性血清个数	43	41	47	25
阴性血清个数	67	69	63	85
阳性比率	39.09%	37.27%	42.73%	22.73%

### [0141] 3.5 稳定性试验

[0142] 将试纸条干燥密封后分别置于 4℃、25℃和 37℃,并分别在 3 月、6 月、9 月和 12 月检测非免疫鸭阴性血清(1 份)和 DPV 阳性血清(2 份),观察结果。

[0143] 将试纸条干燥密封后,分别在 4℃和 25℃放置 3~12 月,仍能检测到强阳性结果;在 37℃放置 3~6 月,也能检测到阳性结果,但当放置 9~12 月时,检测到的阳性结果减

弱。表明该试纸条至少可在 4℃ 或 25℃ 保存 1 年。

#### [0144] 4 讨论

[0145] 标记物工作浓度的确定是保证试纸条灵敏度和特异性的关键因素,为保证定性诊断的准确性,需严格控制金标垫上免疫胶体金与 NC 膜上的抗原或抗体的标记浓度。浓度过高,一方面会使 NC 膜背景加深,使检测带显色结果不清晰,另一方面会使非特异反应增强,影响定性结果的特异性;浓度过低虽然减少了非特异反应,但同时又降低了反应的灵敏度。在本实施例中,经优化和筛选,我们确定了 ICS 法中的重组 UL51 蛋白、兔免疫球蛋白、胶体金标记的重组 UL51 蛋白和胶体金标记的羊抗兔免疫球蛋白的最佳工作浓度分别为 2mg/mL、1mg/mL、2mg/mL 和 2mg/mL;当然,在高于上述最佳工作浓度的条件下同样可以实现鸭瘟病毒抗体的检测功能。

[0146] 公知常识中体金免疫层析试纸条及其方法的检测下限为 1 个纳克左右,与 ELISA 法相当,相对于原理相近的斑点免疫金渗滤试验更为灵敏。本实施例将 DPV 标准阳性血清作 1 : 128 倍稀释时,仍呈阳性,证明了本试纸具有较高敏感性,原因可能有如下几个方面:(1) NC 膜有很好的吸附蛋白、滤过水分和浓缩聚焦等作用,因此,尽管抗原的包被量很少,但 NC 膜检测线上的抗原浓度却较高,使该试纸具有较高的敏感性。(2) 本试纸的运用集免疫反应与层析的特点,待测样品中的鸭抗 DPV 抗体与金标垫上的胶体金标记的重组 UL51 蛋白不断结合,形成“鸭抗 DPV 抗体 - 胶体金标记的重组 UL51 蛋白”复合物;再经层析作用持续通过 NC 膜,与 NC 膜上的固相抗原结合,由于所有样品均经过条状纤维素膜发生持续性反应,金颗粒持续聚集而使检测线逐渐加深,实际上是对待测抗体起到了一个浓缩作用,从而提高了试纸的敏感性;(3) 在其它免疫学方法中,由于血清中抗体水平过高常会导致带现象的产生,即个别强阳性样品呈阴性结果的假阳性现象,而 ICS 方法的抗原抗体反应是持续性的,从而克服了这一现象,提高了敏感性。并且,在试纸的运用过程中,通过与鸭源的 DHV 阳性血清、RA 阳性血清和 E. coli 阳性血清对比,结果表明该 ICS 法与这几种血清均无交叉反应性,具有较好的特异性;批内和批间可重复性试验证实了该方法具有良好的重复性;稳定性试验表明该试纸条在 4℃ 或 25℃ 保存 1 年,仍可用于样品检测。

[0147] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过参照本发明的优选实施例已经对本发明进行了描述,但本领域的普通技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围。

[0001]

## 序 列 表

<110> 四川农业大学实验动物工程技术中心

<120> 基于重组 UL51 蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用

<160> 2

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DPV-UL51 F

<400> 1

ccggaattca tgtagcttt tatctccag 29

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 DPV-UL51 R

<400> 2

tcctcgagt tagacggcta ccaacg 26

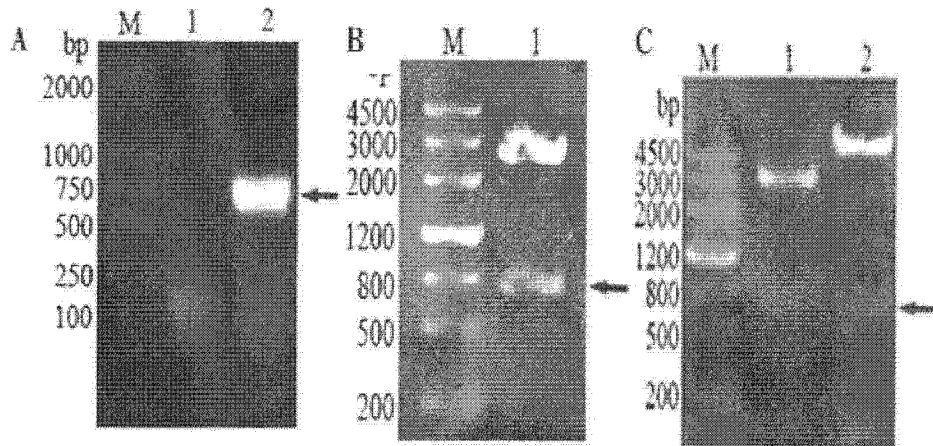


图 1

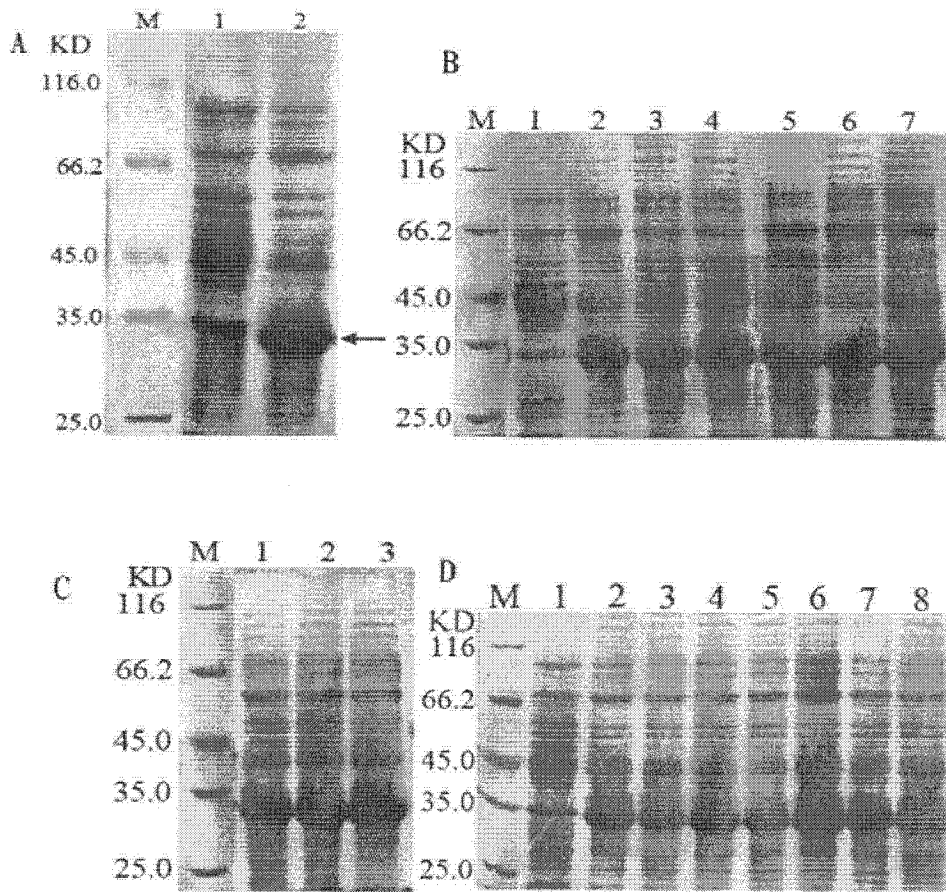


图 2

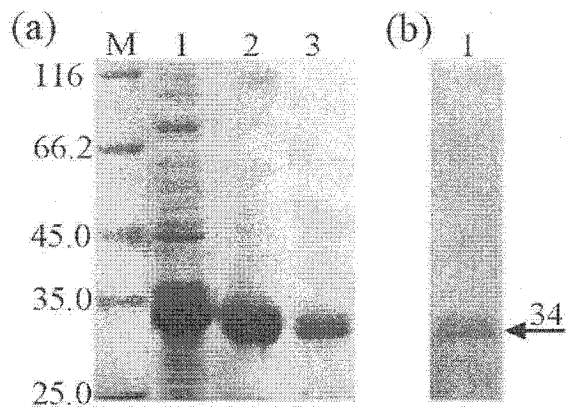


图 3

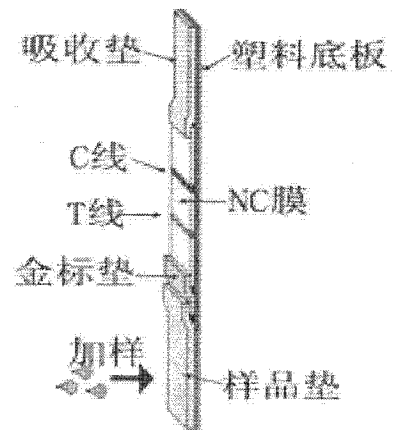


图 4

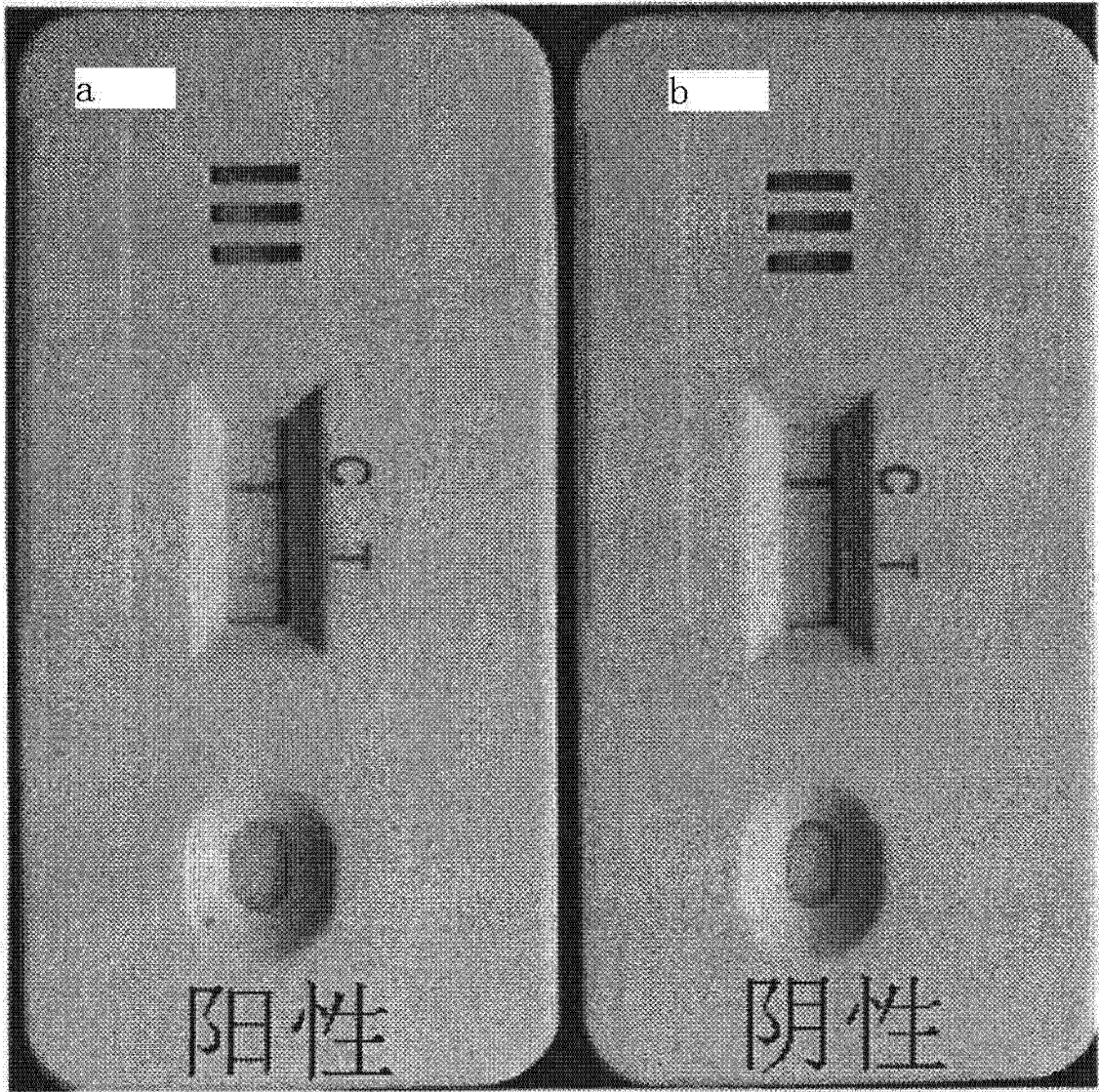


图 5

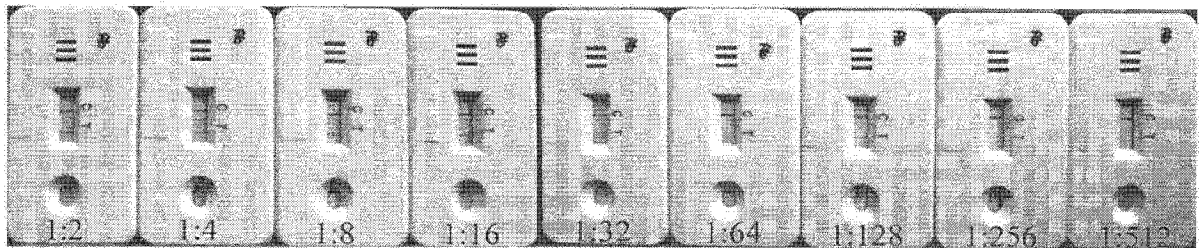


图 6

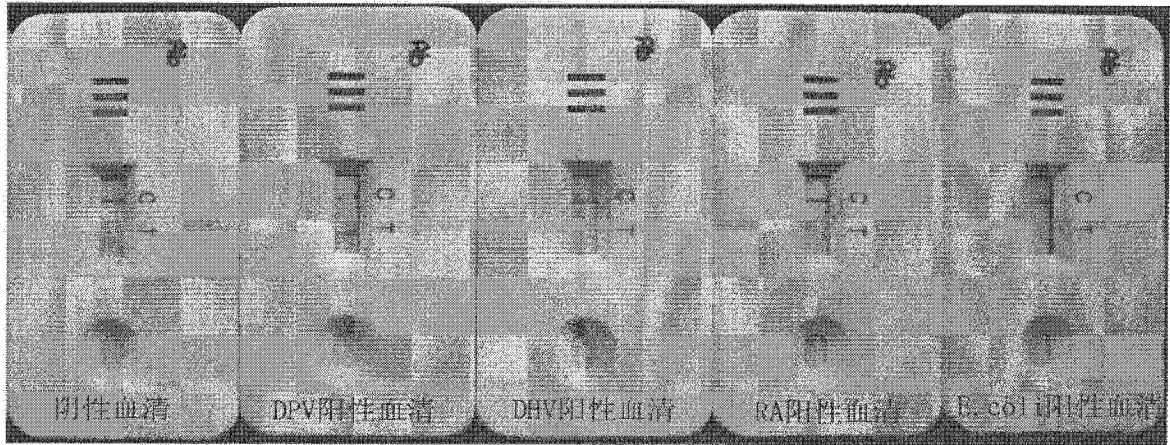


图 7

专利名称(译)	基于重组UL51蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102012432B</a>	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201010299530.2	申请日	2010-09-30
[标]发明人	程安春 汪铭书 沈婵娟 陈孝跃		
发明人	程安春 汪铭书 沈婵娟 陈孝跃		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/532 C12N15/38 C12N15/70 C07K14/03		
审查员(译)	刘文瀚		
其他公开文献	CN102012432A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明特别涉及基于重组UL51蛋白的胶体金免疫层析试纸及其制备方法，所述胶体金免疫层析试纸中硝基纤维膜上的测试线由浓度 $\geq 2\text{mg/mL}$ 的重组UL51蛋白包被而成，对照线由浓度 $\geq 1\text{mg/mL}$ 的兔免疫球蛋白包被而成，金标垫由胶体金标记的 $\geq 2\text{mg/mL}$ 重组UL51蛋白和 $\geq 2\text{mg/mL}$ 的羊抗兔免疫球蛋白的混合液包被而成；试纸的制作方法包括硝基纤维膜上测试线和对照线的喷制、金标垫的制备及胶体金免疫层析试纸条的组装；本发明还涉及试纸在检测鸭瘟病毒抗体中的运用；本试纸用于检测鸭瘟病毒抗体的检测灵敏度和特异性高，本制备方法操作简单实用，本运用首次将抗重组UL51蛋白制备成胶体金试纸用于检测鸭瘟病毒抗体。

