



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109001450 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201810374632.2

(22)申请日 2018.04.24

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730000 甘肃省兰州市城关区盐场路

(72)发明人 宫晓炜 陈启伟 郑福英 刘永生

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 谈杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

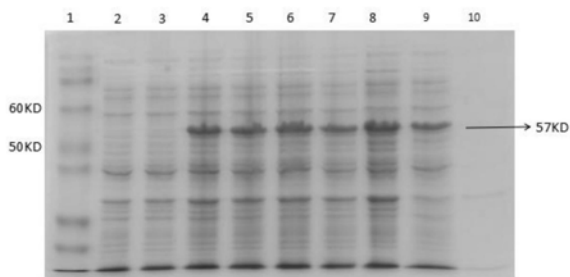
权利要求书2页 说明书13页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明提供一种检测鸡滑液囊支原体抗体的ELISA试剂盒。该试剂盒是基于鸡滑液囊支原体丙酮酸激酶(PYK)重组蛋白为包被抗原建立的检测鸡滑液囊支原体抗体的ELISA试剂盒。本发明还提供了用于制备上述试剂盒包被抗原即PYK蛋白的制备方法,通过本发明提供的方法制备的PYK蛋白具有良好的反应原性,且本发明所建立的ELISA检测试剂盒为鸡滑液囊支原体的诊断及免疫后抗体水平的检测提供了有效的方法,为该疾病的预防研究起到了显著促进作用。



1. 一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,其特征在于,包括鸡滑液囊支原体PYK蛋白的ELISA板、酶标二抗、样本稀释液、洗涤液、封闭液、TMB、终止液、阳性对照及阴性对照血清。

2. 根据权利要求1所述的一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,其特征在于,所述的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡单克隆抗体;所述阳性对照为自然感染鸡滑液囊支原体的鸡血清;所述的阴性对照为正常鸡血清;所述洗涤液每升中含8.0g NaCl,0.22g KH_2PO_4 ,0.2g KCl,2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.5mL Tween-20;所述封闭液为含5%马血清的洗涤液,样本稀释液为含5%的BSA的洗涤液;所述的终止液为2M的硫酸溶液。

3. 根据权利要求1所述的一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,其特征在于,上述试剂盒中所用的重组PYK蛋白的制备方法,其特征是人工合成鸡滑液囊支原体PYK蛋白的基因序列为模板扩增得到SEQ ID No.1所示的序列,将上述基因导入到原核表达载体PET-30a(+)中,获得重组表达载体;用重组表达载体转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,提取重组质粒,经PCR和酶切鉴定,筛选出阳性克隆PET-30a-pyk;将上述重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞诱导表达后,SDS-PAGE电泳分析表达蛋白,再采取Ni柱亲和层析方法,对目的蛋白进行纯化,然后分别用SDS-PAGE和Western blot检测蛋白纯化结果,并分析PYK蛋白的抗原性。

4. 根据权利要求3所述的一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,其特征在于,鸡滑液囊支原体PYK蛋白的制备,可以包括以下步骤:

1) 扩增目的基因:以人工合成的鸡滑液囊支原体PYK蛋白基因序列为模板,通过PCR法对其pyk基因进行扩增、克隆得到目的基因,上游引物加BamH I酶切位点,下游引物加XhoI I酶切位点,引物如下:

pyk基因上游引物:5' -GGCTTGGATCCATGTATAAAGAAACCG-3'

pyk基因下游引物:5' -GCCCTCGAGTTGAAGTGTATATTC-3'

2) Pyk基因回收以及PET-30a(+)质粒提取后用BamH I、XhoI I进行双酶切,回收目的片段,在T4DNA连接酶作用下降目的基因和载体按摩尔比5:1的比例在16°C下链接12-16小时,转化感受态细胞DH5 α ,提取质粒,经BamH I、XhoI酶切鉴定正确后获得阳性重组表达质粒PET-30a-pyk

3) 然后将提取质粒PET-30a-pyk转化BL21(DE3)感受态细胞,获得的阳性质粒菌于37°C培养,待A600值达到0.6-0.8时,加入IPTG至终浓度为1mmol/L进行诱导表达,收集诱导表达后4小时的菌体,超声波破碎,离心后取沉淀进行SDS-PAGE电泳分析。

4) 使用Ni-NTA进行亲和层析纯化,纯化后的目的蛋白进行SDS-PAGE分析,结果表明1mmol/L的IPTG诱导4h,基因工程菌获得高效的表达,产生约57KD的特异性蛋白条带,与预测的分子质量相符;

ELISA分析纯化蛋白的抗原性。

5. 根据权利要求1或3所述的一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,其特征在于,采用如下步骤制备所述的鸡滑液囊支原体PYK蛋白的ELISA板:用碳酸盐缓冲液作包被液,用上述包被液将稀释2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入ELISA反应板中,37°C封闭1小时,4°C包被过夜,拍干,在用5%马血清37°C封闭1小时,以含0.05%吐温的PBST洗涤,拍干用铝膜真空封闭保存、备用。

6. 根据权利要求1所述的一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,其特征在于,采用

ELISA方法,检测鸡滑液囊支原体血清抗体,具体步骤为:

- (1) 封闭:向酶标版微孔中加入封闭液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭1h;
- (2) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液300 μ L,洗涤3次并拍干;
- (3) 加样:向酶标版微孔中加入用样品稀释液1:200倍稀释后的待检测血清样品100 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭1h。
- (4) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液300 μ L,洗涤3次并拍干;
- (5) 加酶标二抗:每孔加入稀释好酶标抗体工作液100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育45min;
- (6) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液300 μ L,洗涤3次并拍干;
- (7) 每孔加入TMB显色液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育10min;
- (8) 每孔加入终止液每孔100 μ L,立即在酶标仪上读取OD₄₅₀。

一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细菌试剂盒及其制备方法,确切的讲是一种检测鸡滑液囊支原体抗体的ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 支原体(Mycoplasma)是一类无细胞壁及前体,细胞器极少,呈高度多形性,能在无生命培养基中生长繁殖的最小原核细胞型的微生物。禽类支原体主要涉及家禽,广泛寄生于家禽的呼吸道、泄殖腔、消化道、输卵管粘膜及关节囊中。目前鉴定命名的禽类支原体共有29中,其中属于支原体属的有25中、无胆甾原体3种、脲原体1种。在这些支原体中,同时能感染鸡、火鸡且致病的支原体主要有鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*,MG)和滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*,MS)。但同致病力强的MG相比,养殖户对MS的认识、检测及防控远远不足,导致MS感染正在从非典型的上呼吸道亚临床症状转向严重的呼吸系统疾病,如气囊炎;当合并其他致病因子,如鸡新城疫病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、低致病性禽流感病毒或大肠杆菌感染时,会使病情恶化;此外,MS引起的传染性滑膜囊炎、蛋壳形状畸形及自身免疫性疾病同样威胁着全球家禽养殖业的健康发展。在18届世界禽病大会上,就有专家提出“现在以及不远的将来MS的危害会超过MG”的观点。最新的流行病学调查显示,在东欧、荷兰、墨西哥、阿根廷,MS感染可引起严重的呼吸系统疾病和关节滑膜炎;在我国,MS的发病率亦呈明显上升趋势,加上环境及鸡群状态不良等不利因素,导致MS感染在鸡群中爆发的现象日趋严重。

[0003] 目前检测MS的方法包括:支原体的分离培养、血清学抗体检测及分子基因诊断,其中分离培养是诊断支原体感染性疾病的金标准,但支原体对培养基的营养要求高,生长缓慢,分离难度大,只适用于实验室检测;血清学检测如平板凝集试验(SPA)特异性低,而血凝抑制试验(HI)敏感性较低,需多次采样,更适合群体水平的检测,并且结果的差异与抗原菌株的来源密切相关;聚合酶链反应(PCR)和实时荧光定量PCR(real-time PCR)是目前应用最多的诊断方法,但是也存在操作步骤多,成本高,耗时长的问题(至少4.5小时),不易现场进行操作和向基层推广;目前国外商业化鸡滑液囊支原体间接ELISA试剂盒,主要来自美国和欧洲,虽然特异性高,对不同菌株感染的抗体检测敏感度不够,特别是价格昂贵,一份血样的检测费用高达11.5元,限制了养殖户的使用,仅限实验室研究用。目前国内仍没有使用高效表达的重组蛋白做包被抗原进行ELISA检测的、廉价的、特异性好、敏感性高的试剂盒的研制。随着MS蛋白质组学研究的深入,更多滑液囊支原体致病和免疫相关的蛋白质被鉴定,Bercic等人(2008)对滑液囊支原体分离株的主要免疫原性蛋白质进行了鉴定,鉴定出包括MSPA、EF-Tu等的免疫原性蛋白质,其中丙酮酸激酶PYK也是MS重要的免疫原性膜蛋白,序列分析显示在MS中具有高保守性。体外表达PYK重组蛋白作为包被抗原建立ELISA方法开发抗体检测试剂和用于该病的检测具有现实意义。目前MS感染在我国家禽养殖场发生与联系,因此,研制特异、灵敏、廉价、简便的试剂盒是我国当前防控该病的迫切要求。

发明内容

[0004] 本发明克服现有技术的不足,提供一种准确检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒,以及这种检测试剂盒的制备方法。

[0005] 包括一种鸡滑液囊支原体PYK蛋白的制备与纯化方法,其氨基酸序列如SEQ ID No.2所示;研究发现,该蛋白具有良好的免疫原性反应,为鸡滑液囊支原体抗体检测试剂盒提供的包被抗原。

[0006] 上述检测鸡滑液囊支原体的ELISA试剂盒,其包括PYK蛋白包被的ELISA板,酶标二抗,阳性对照,阴性对照,洗涤液,样品稀释液,商品化的TMB和终止液的组分及配比如下:

[0007] 包被液:无水Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.93g,加蒸馏水至1L;

[0008] 洗涤液:NaCl 8.0g,KH₂PO₄ 0.2g,Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g,KCl 0.2g,Tween-20 0.5mL,加双蒸水至1L;

[0009] 封闭液:含5%血清的洗涤液;

[0010] 样本稀释液:含5%BSA的洗涤液;

[0011] 终止液:为2M的硫酸溶液。

[0012] 上述试剂盒中所用的重组PYK蛋白的制备方法,其特征是人工合成鸡滑液囊支原体PYK蛋白的基因序列为模板扩增得到SEQ ID No.1所示的序列,将上述基因导入到原核表达载体PET-30a(+)中,获得重组表达载体;用重组表达载体转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,提取重组质粒,经PCR和酶切鉴定,筛选出阳性克隆PET-30a-pyk;将上述重组质粒转化至BL21(DE3)感受态细胞诱导表达后,SDS-PAGE电泳分析表达蛋白,再采取Ni柱亲和层析方法,对目的蛋白进行纯化,然后分别用SDS-PAGE和Western blot检测蛋白纯化结果,并分析PYK蛋白的抗原性。

[0013] 具体的,鸡滑液囊支原体PYK蛋白的制备,可以包括以下步骤:

[0014] 1) 扩增目的基因:以人工合成的鸡滑液囊支原体PYK蛋白基因序列为模板,通过PCR法对其pyk基因进行扩增、克隆得到目的基因,上游引物加BamH I酶切位点,下游引物加XhoI I酶切位点,引物如下:

[0015] pyk基因上游引物:5'-GGCTTGGATCCATGTATAAAGAAACCG-3'

[0016] pyk基因下游引物:5'-GCCCTCGAGTTGAACTGTATATTC-3'

[0017] 2) Pyk基因回收以及PET-30a(+)质粒提取后用BamH I、XhoI I进行双酶切,回收目的片段,在T4DNA连接酶作用下降目的基因和载体按摩尔比5:1的比例在16℃下链接12-16小时,转化感受态细胞DH5 α ,提取质粒,经BamH I、XhoI酶切鉴定正确后获得阳性重组表达质粒PET-30a-pyk

[0018] 3) 然后将提取质粒PET-30a-pyk转化BL21(DE3)感受态细胞,获得的阳性质粒菌于37℃培养,待A600值达到0.6-0.8时,加入IPTG至终浓度为1mmol/L进行诱导表达,收集诱导表达后4小时的菌体,超声波破碎,离心后取沉淀进行SDS-PAGE电泳分析。

[0019] 4) 使用Ni-NTA进行亲和层析纯化,纯化后的目的蛋白进行SDS-PAGE分析,结果表明1mmol/L的IPTG诱导4h,基因工程菌获得高效的表达,产生约57KD的特异性蛋白条带,与预测的分子质量相符,见附图1。

[0020] 5) ELISA分析切胶回收蛋白的抗原性。

[0021] 本发明还提供了上述试剂盒的制备方法,包括鸡滑液囊支原体PYK蛋白ELISA的制备,其方法为:用上述包被液将PYK蛋白稀释为2.6 μ g/mL,按100 μ L/孔加入ELISA反应板中,37 $^{\circ}$ C封闭1小时,4 $^{\circ}$ C包被过夜,拍干,在用5%马血清37 $^{\circ}$ C封闭1小时,以含0.05%吐温的PBST洗涤,拍干用铝膜真空封闭保存、备用。

[0022] 基于本发明试剂盒,可采用以下ELISA方法,检测鸡滑液囊支原体血清抗体:

[0023] (1) 封闭:向酶标版微孔中加入封闭液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭1h;

[0024] (2) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液300 μ L,洗涤3次并拍干;

[0025] (3) 加样:向酶标版微孔中加入用样品稀释液1:200倍稀释后的待检测血清样品100 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭1h。

[0026] (4) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液300 μ L,洗涤3次并拍干;

[0027] (5) 加酶标二抗:每孔加入稀释好酶标抗体工作液100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育45min;

[0028] (6) 洗涤:倒出孔中的液体,每孔中加入洗涤液300 μ L,洗涤3次并拍干;

[0029] (7) 每孔加入TMB显色液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育10min;

[0030] (8) 每孔加入终止液每孔100 μ L,立即在酶标仪上读取OD₄₅₀。

[0031] 本发明提供了使用可溶性PET-30a (+) 质粒,表达了鸡滑液囊支原体PYK蛋白,并利用其携带的6 \times His标签,对表达的融合蛋白进行纯化,Western-blot检测证明纯化的蛋白具有良好反应原性,见附图2;另外该蛋白序列经NCBI Blast软件分析表明,蛋白序列在鸡滑液囊支原体中高度保守,因此所发明的检测试剂盒具有很高的特异性和敏感性。

[0032] 本发明构建的用于鸡滑液囊支原体抗体检测的试剂盒,操作简便易行,检测快速敏感,特别适用于临床上对鸡滑液囊支原体抗体的快速检测,为该病的预防研究起到了显著促进作用。

[0033] 图1.重组质粒PET-30a/PYK在E.coliBL21 (DE3) 中的表达电泳图(1为蛋白质分子量标准;2为未诱导工程菌;3-8为基因工程菌在0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mmol/L不同IPTG浓度诱导下的表达产物;9为超声后上清;10为超声后沉淀)

[0034] 图2.重组蛋白PYK的纯化电泳图(1为蛋白分子量Marker;2为上样样品;3为80mM B洗脱液;4为250mM B洗脱液)

[0035] 图3.PYK纯化蛋白的Western-blot检测图(1为鸡滑液囊支原体阴性血清;2为鸡滑液囊支原体阳性血清)

[0036] 具体的实施方案

[0037] 一、实验材料

[0038] 1、主要仪器、血清和试剂:超声裂解仪(美国),Bio-Rad680型酶标检测仪购置自上海基因公司,96孔高亲和力酶标板为Costar公司产品,重组蛋白PYK为本实验室制备;鸡滑液囊支原体标准阳性、阴性血清购自中国兽医监察所;鸡毒支原体阳性血清、牛支原体阳性血清、绵羊肺炎支原体阳性血清、鸡沙门氏菌阳性血清、鸡白痢阳性血清为实验室保存;45份鸡滑液囊支原体阴性鸡采自甘肃;检测的93份、91份鸡血清分别采自江苏和广西,置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。辣根过氧化物酶标记的SPA,四甲基联苯胺(TMB)和BSA为Sigma公司的产品;辣根过氧化物酶标记兔抗鸡IgG购自北京索莱宝生物科技有限公司;美国IDEXX公司生产的鸡滑液囊支原体抗体检测试剂盒购自北京爱德士元亨生物科技有限公司;其他常规试剂均为进口或国产分析纯。

[0039] 2、试验所用的溶液及其配置

[0040] 1) 包被液 (pH=9.6): 2.93g NaHCO₃, 1.59g Na₂CO₃, PH值调至9.6, 加蒸馏水定容至1L, 混匀后置4℃保存。

[0041] 2) 洗涤液 (0.01mol/L pH值为7.4的PBST): 8.0g NaCl, 0.22g KH₂PO₄, 0.2g KCl, 2.9g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.5mL Tween-20, 加蒸馏水定容至1L。

[0042] 3) 封闭液 (5% 马血清洗涤液): 5mL马血清, 95mL洗涤液, 均匀混合后置4℃保存。

[0043] 4) TMB底物缓冲液: 4℃避光保存或棕色瓶保存。

[0044] 5) 终止液 (2M H₂SO₄): 22.2mL 98%浓硫酸缓慢滴加到150mL双蒸水中并不断搅拌, 最后加双蒸水至200mL。

[0045] 二、制备方法

[0046] 1、抗原制备中使用的主要材料包括:

[0047] 表达菌: E. coli BL21 (DE3) 购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

[0048] PET-30a (+) 表达载体: 购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

[0049] 鸡滑液囊支原体标准阳性及阴性血清: 购自中国兽药监察所。

[0050] 引物: 扩增引物由本实验室设计, 由北京英俊生物公司合成。

[0051] 酶和试剂: 各种限制性核酸内切酶、Taq DNA聚合酶、Pyrobest DNA聚合酶、T4DNA连接酶为大连宝生物公司产品; SDS、EB为Sigma公司产品; Tris为Gibco公司产品; 琼脂糖、TEMED为Promega公司产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵为Biomol公司产品; 胰蛋白酶和酵母粉为OXOID公司产品; IPTG为大连宝生物公司产品; 甘氨酸、DTT为华美公司产品; 低分子量标准蛋白为中科院上海生化研究所产品; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

[0052] 以下为抗原制备的具体实验步骤:

[0053] 本实验以人工合成的鸡滑液囊支原体PYK蛋白基因序列为模板, 通过PCR法对其pyk基因进行扩增、克隆得到目的基因, 上游引物加BamH I酶切位点, 下游引物加XhoI I酶切位点, 引物如下:

[0054] pyk基因上游引物: 5' -GGCTTGGATCCATGTATAAAGAAACCG-3'

[0055] pyk基因下游引物: 5' -GCCCTCGAGTTGAACTGTATATTC-3'

[0056] 2、目的基因克隆:

[0057] 首先将PCR产物与PET-30a (+) 表达载体连接, 再将连接产物转入DH5α感受态细胞, 从而获得带有目的基因的重组质粒PET-30a-pyk, 经过PCR和酶切鉴定挑选阳性克隆, 并将插入正确目的片段的重组质粒送北京英俊生物技术有限公司测序。测序表明测序结果表明, 所扩的pyk基因与Gene-Bank中公布的其他鸡滑液囊支原体菌株序列的同源性均为100%, 说明该基因在种间比较保守。

[0058] 3、提取质粒:

[0059] 从培养12-16h的含卡那霉素的LB固体培养基上挑取湿润、光滑、边缘整齐的白色菌落, 转接到5mL含卡那霉素的LB液体培养基中, 37℃摇床培养过夜。按照北京博大泰克公司生产的A型质粒小型快速提取试剂盒提取质粒, 操作步骤:

[0060] 1) 收集1.5-3mL菌液, 8000r/m离心1min, 弃去上清, 加入100μL溶液1, 振荡至彻底悬浮。

[0061] 2) 加入150μL溶液2, 立即轻轻颠倒离心管数次, 使菌体充分裂解, 裂解后的菌体变

得清亮,随后将离心管放到冰上1-2min。

[0062] 3) 加入150 μ L溶液3,立即温和颠倒离心管数次,室温放置5min,12000r/m离心12min。

[0063] 4) 将420 μ L结合缓冲液加入到离心吸附柱中,然后将3)中的上清倒入A型离心吸附柱中,混匀,12000r/m离心30s,倒掉废液收集管中的废液。

[0064] 5) 加入750 μ L浓缩漂洗液于离心吸附柱中,静置1min后,12000r/m离心15s,倒掉废液收集管中的废液,重复一次。倒掉废液后,再次于12000r/m离心2min,尽量除去漂洗缓冲液。

[0065] 6) 小心取出离心吸附柱,将其套入一个干净的1.5mL Eppendorf离心管中,加入30 μ L洗脱缓冲液,室温放置2-5min后,12000r/m离心1min。

[0066] 7) 再取20 μ L洗脱缓冲液,室温放置1-3min,12000r/m离心1min,最后合为一管。

[0067] 4、重组质粒PET-30a-pyk的鉴定

[0068] 1) 电泳鉴定

[0069] 取重组质粒5 μ L进行琼脂糖凝胶电泳分析结果。

[0070] 2) 酶切鉴定

[0071] 用BamH I和XhoI I进行双酶切,反应体系为40 μ L:

质粒 DNA 20 μ L

H₂O 12 μ L

[0072] BamH I 2 μ L

XhoI I 2 μ L

10 \times H buffer 4 μ L

[0073] 充分混匀后,37 $^{\circ}$ C水浴4h。以DNA 2000Marker为标准,进行琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。

[0074] 3) 测序鉴定

[0075] 经酶切鉴定的阳性重组质粒,取20 μ L,送北京英俊生物技术有限公司测序。5、鸡滑液囊支原体pyk基因在大肠杆菌中的表达

[0076] 将菌液按1:100接种于含有相应抗生素(卡那霉素)的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀为0.6~0.8时,加入IPTG至终浓度分别为1mmol/L,37 $^{\circ}$ C诱导表达4h,收获细菌,12000r/m离心2min,弃去上清,将离心得到的沉淀溶于100 μ L 0.01mol/LPBS中悬浮混匀,加入30 μ L 4 \times Protein SDS PAGE Loading Buffer,煮沸10min,然后进行SDS-PAGE分析,检测表达情况。

[0077] 6、表达产物的检测

[0078] (1) SDS-PAGE

[0079] 1) 制胶

[0080] 将电泳玻璃板清洗、干烤好后,按照操作说明固定在配胶架上,确定在两玻璃板间不漏液体的情况下开始配胶。先配下层的12%分离胶,配好混匀后迅速加入两玻璃板之间,然后马上在其上层小心加入少量去离子水封顶(此时可用手指轻轻弹击玻璃板以排除产生的气泡,并且要尽量保证水和胶之间的界限平行于水平桌面)。静置30min,待分离胶凝固后

弃去上层封顶水,并且倒置控干残留的液体,随即配置5%的浓缩胶,配好混匀后立即加在分离胶上层,并快速插入梳子(小心插入,以防产生气泡),待其凝固。

[0081] 2) 安装

[0082] 小心移去梳子,用去离子水冲洗加样槽几次后,放入电泳槽,然后往电泳槽中加入 $1\times$ Tris-甘氨酸电泳缓冲液。

[0083] 3) 样品的制备及上样

[0084] 取适量上述全菌菌体蛋白液12000r/m离心2min,弃去上清,之后用PBS悬浮洗涤离心沉淀物,同样按照上述离心条件获得菌体蛋白。然后,用100 μ L PBS悬浮沉淀物,并且加入30 μ L $4\times$ SDS上样缓冲液,使二者混匀,水浴煮沸10min,待冷却之后,用微量加样器上样10 μ L/孔。加样完毕后,当溴酚蓝进入分离胶之后,即可将电压调升至90V,继续恒压电泳直至溴酚蓝到达凝胶底层。

[0085] 4) 染色

[0086] 电泳结束后,关闭电源,从电泳槽中小心取出凝胶板,用蒸馏水冲洗。然后用起胶板小心取出分离胶置于平皿内,然后倒入染色液,将其置于水平摇动的摇床上染色1-2h。

[0087] 5) 脱色

[0088] 染色结束后,将染色液倒入回收瓶中以备下次使用。然后倒入脱色液,将其置于水平摇动的摇床上脱色1h,待蓝色背景完全脱净后,将凝胶浸入去离子水中终止反应。

[0089] 6) 结果的观察及判定

[0090] 以标准蛋白分子量Marker的条带作对照,观察并判定结果。

[0091] 7、表达蛋白的纯化

[0092] (1) 细菌培养

[0093] 取冻存于 -40°C 的菌种5 μ L接种于5mL的LB液体培养基,Kan浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37°C 摇床200r/min,过夜。将此菌液按1:100接种在200mL的LB培养基中,Kan浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37°C 摇床培养,至OD值为0.6~0.8时加入终浓度为1mmol/L的IPTG,诱导4h。

[0094] (2) 样品处理

[0095] 将菌液 4°C ,6000r/min离心20min,收集沉淀溶于20mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中, 4°C ,6000r/min离心20min,收集沉淀。将菌体重悬于20mL的20mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中,充分混匀后冰浴超声破碎,超5s,停5s,超声45min。之后于 4°C ,12000r/min离心30min,收集上清液过0.45 μm 滤膜去除粗悬浮物,此液体即可作为亲和层析上样样品。

[0096] (3) 使用Ni-NTA进行亲和层析纯化

[0097] A液:含0.5M NaCl的20mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)

[0098] B液:含0.5M咪唑、0.5M NaCl的20mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)

[0099] 1) 装柱:用3ml GE公司的His Trap HP预装柱

[0100] 2) 平衡:用5倍柱床体积的A液平衡柱子,流速为1mL/min。

[0101] 3) 上样:将样品上样,流速为1mL/min,收集流出液。

[0102] 4) 洗柱:用10倍柱床体积的A液洗柱子,洗去未吸附的蛋白,流速为1mL/min,收集流出液。

[0103] 5) 洗脱:先用5倍柱床体积的80mmol B液洗脱,流速为1mL/min,收集流出液,再用4倍柱床体积的250mmol B液洗脱,流速为1mL/min,收集流出液。

- [0104] 6) 用5倍柱床体积的250mmol B液冲洗柱子,流出液体弃之。
- [0105] 7) 用5倍柱床体积的A液冲洗柱子,流出液体弃之。
- [0106] 8) 拧住柱子出口,加入3倍柱床体积的20%乙醇,置于4℃冰箱保存。
- [0107] 9) 分别取少量各步流出液进行SDS-PAGE分析。
- [0108] 8、表达产物的检测结果
- [0109] (1) 表达产物的SDS-PAGE分析
- [0110] SDS-PAGE分析结果表明,经1mmol/L的IPTG诱导4h,基因工程菌获得高效的表达,产生57kD的特异性蛋白条带,与预测的分子质量相符,结果见图1。
- [0111] (2) 表达蛋白纯化图的SDS-PAGE分析
- [0112] SDS-PAGE分析结果表明,流穿峰中可去除一部分杂蛋白,80mmol B液能洗去大量杂蛋白,250mmol B洗脱液中PYK蛋白含量可达95%,结果见图2。
- [0113] (3) 蛋白浓度的测定
- [0114] 用Pierce BCA蛋白定量分析试剂盒法测定纯化后的PYK蛋白浓度为416μg/mL。
- [0115] (二) 试剂盒的包被
- [0116] (1) 酶标二抗最佳工作浓度的确定
- [0117] 将正常鸡血清与等量的包被液混匀,按1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048的比例稀释,包被酶标板,100μL/孔,每个浓度包被1列;二抗以1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800的比例稀释,100μL/孔,每个浓度包被1行,确定酶标二抗的最佳工作浓度。
- [0118] (2) 抗原PYK最佳包被度和最佳血清稀释度的确定
- [0119] 1) 将纯化后的蛋白溶液用包被液按1:10、1:20、1:40、1:80、1:160的比例稀释,包被酶标板,100μL/孔,每个浓度包被2列。
- [0120] 2) 加盖,在微型振荡器上振荡1-2min,置于37℃温箱内温育1h,转入4℃过夜。
- [0121] 3) 用洗涤液洗涤3次,每次5min。洗涤时孔内要加满洗液,洗涤完毕将板子在吸水纸上拍干。
- [0122] 4) 用封闭液封闭,加100μL/孔,37℃温育1h,洗涤3次。
- [0123] 5) 将阳、阴性血清分别以1:10、1:20、1:40、1:80和1:50、1:100、1:200、1:400比例稀释,做方阵滴定确定表达产物最佳包被浓度,100μL/孔,每个浓度包被1行。37℃温育1h,洗涤3次,甩干。
- [0124] 6) 再加入1:1000的酶标二抗,100μL/孔,37℃反应45min。洗涤,甩干。
- [0125] 7) 加入TMB底物缓冲液100μL/孔,37℃反应10min。
- [0126] 8) 加入100μL/孔终止液终止反应,用酶标仪测定OD_{450nm}值。
- [0127] (3) 最佳血清稀释度的确定
- [0128] 将纯化后的蛋白溶液用包被液按1:160的比例稀释,包被酶标板,100μL/孔。
- [0129] 将阳性血清分为原倍稀释和2倍稀释两种,再分别以1:50、1:100、1:200、1:400的比例稀释,100μL/孔,每个浓度包被6孔。
- [0130] 将阴性血清分别以1:50、1:100、1:200、1:400的比例稀释,100μL/孔,每个浓度包被1行。
- [0131] 根据不同的条件下包被的重组蛋白,进行ELISA测定,以确定血清的最佳稀释度。

[0132] (4) ELISA的操作步骤

[0133] 上述条件确定后ELISA试验的操作步骤如下:

[0134] 将重组蛋白抗原用包被液稀释至最佳浓度后包被96孔酶标板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h加4 $^{\circ}$ C过夜。甩去包被液,用洗涤液洗板3次,每次5min。然后加入100 μ L/孔的封闭液于37 $^{\circ}$ C封闭1h,取出洗板同上。用血清稀释液将血清样品稀释至最佳稀释度后,100 μ L/孔,每份血清样品设两个重复。37 $^{\circ}$ C反应1h后,取出洗板(同上)。再加酶标二抗,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应45min后,取出洗板(同上)。然后加入底物溶液,避光反应10min后加入终止液终止反应,立即于酶标仪上读出450nm处每孔吸光度值,同时设定空白对照孔。

[0135] (5) ELISA阴阳性临界值的确定

[0136] 取实验室保存的鸡血清45份进行间接ELISA检测。每份样品重复两孔,结果取其平均值,计算样本OD450nm值的平均值(X)和标准方差(SD),根据统计学原则,样本的OD450nm值>阴性样本OD450nm值的平均值(X)+3SD时,可以在99.9%的水平上判为阳性。

[0137] (6) 特异性试验

[0138] 用建立的ELISA方法分别检测鸡毒支原体阳性血清、鸡沙门阳性血清、鸡白痢阳性血清、牛支原体及绵羊肺炎支原体的阳性血清,并验证是否有交叉反应。

[0139] (7) 敏感性试验

[0140] 将鸡滑液囊支原体标准阳性血清做1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120八个稀释度,其余的条件按最佳反应条件进行试验。

[0141] (8) 重复性试验

[0142] 选取18份鸡血清,用两次包被的酶标板,各进行3次重复试验,计算其变异系数。

[0143] (9) 对比试验以及对其他动物的检测

[0144] 以上述的ELISA操作程序和确定的阴阳性临界值共检测了93份鸡的阳性与阴性血清,并同美国IDEXX鸡滑液囊支原体抗体检测的结果进行了比较。

[0145] (三) 结果

[0146] (1) 酶标二抗最佳工作浓度的确定

[0147] 从表1中可以看出,酶标二抗1:800稀释时,血清的OD₄₅₀值接近1,因此确定重组蛋白的酶标二抗的最佳工作浓度为1:1000。

[0148] 表1. 酶标二抗最佳工作浓度的确定

[0149]

OD ₄₅₀ 值	血清稀释度	不同酶标二抗工作浓度					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
鸡血清	1:8	3.488	2.640	1.592	0.939	0.460	0.284
	1:16	3.484	2.756	1.608	1.046	0.434	0.277
	1:32	3.501	3.028	1.683	1.063	0.507	0.284
	1:64	3.501	3.031	1.811	1.151	0.560	0.317
	1:128	3.501	3.063	1.811	1.136	0.520	0.303
	1::256	3.501	3.009	1.767	1.073	0.506	0.301
	1:512	3.501	2.925	1.680	1.113	0.498	0.289

[0150] (2) 抗原最佳包被条件确定

[0151] 从表2中可以看出,重组蛋白在37℃1h然后4℃过夜的包被条件下,阳性血清与阴性血清的OD₄₅₀值相差最大,说明包被效果较好,因此确定重组蛋白的最佳条件为1:160。

[0152] 表2. 重组蛋白最佳包被条件的确定

[0153]

组别	血清稀释度	不同抗原稀释度的 OD ₄₅₀ 值					
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
阳性血清	1:50	3.376	3.277	3.245	3.308	2.897	2.981
	1:100	3.421	3.389	3.347	3.420	2.952	3.000
	1:200	3.426	3.413	3.335	3.369	2.854	2.849
	1:400	3.091	3.412	3.114	3.075	2.729	2.462
阴性血清	1:50	0.815	0.813	0.602	0.612	0.668	0.477
	1:100	0.522	0.439	0.434	0.324	0.363	0.318
	1:200	0.383	0.253	0.210	0.214	0.262	0.200
	1:400	0.295	0.238	0.148	0.197	0.138	0.121

[0154] (3) 最佳血清稀释度和酶标二抗的确定结果(方阵滴定)

[0155] 方阵滴定显示当血清的稀释倍数为1:400,抗原的稀释度为1:160时,阳性血清的OD₄₅₀值可达到2.729,而阴性血清的OD₄₅₀值为0.138,阴阳性血清OD₄₅₀值相差最大,因此选择1:400为最佳血清稀释倍数,酶标二抗的最佳稀释倍数为1:1000(结果见表3)。

[0156] 表3. 方阵滴定的OD₄₅₀值结果

[0157]

组别	血清稀释度	不同酶标二抗稀释度的 OD ₄₅₀ 值			
		1:1000	1:2000	1:3000	1:4000
阳性血清	1:50	2.897	2.100	1.662	1.206
	1:100	2.952	2.005	1.610	1.118
	1:200	2.854	1.894	1.448	1.080
	1:400	2.729	1.719	1.348	0.956
阴性血清	1:50	0.668	0.340	0.274	0.204
	1:100	0.363	0.196	0.155	0.119
	1:200	0.262	0.135	0.139	0.087
	1:400	0.138	0.092	0.080	0.068

[0158] (4) ELISA阴阳性临界值的确定结果

[0159] 通过45份鸡阴性血清进行间接ELISA检测。求平均值X为0.144,标准方差SD为0.050,确定阴阳性临界点位 $X+3SD=0.144+3\times 0.050=0.294$ 。即待测样品的OD₄₅₀值大于0.294时为阳性,小于或等于0.294则为阴性(结果见表4)。

[0160] 表4.45份鸡阴性血清的ELISAOD₄₅₀值

[0161]

45 份鸡阴性血清 OD ₄₅₀ 值								
0.189	0.167	0.189	0.164	0.118	0.104	0.100	0.104	1.406
0.209	0.248	0.185	0.228	0.116	0.135	0.100	0.096	1.129
0.278	0.145	0.189	0.113	0.101	0.141	0.097	0.123	1.539
0.177	0.163	0.215	0.099	0.108	0.114	0.095	0.129	0.09
0.169	0.234	0.15	0.131	0.100	0.104	0.095	0.089	0.144

[0162] (5) 特异性实验结果

[0163] 采用确立的ELISA条件,以重组蛋白包被ELISA反应板,用鸡毒支原体阳性血清、鸡沙门阳性血清、鸡白痢阳性血清、牛支原体及绵羊肺炎支原体的阳性血清进行ELISA交叉试验,结果表明建立的以重组蛋白为抗原检鸡滑液囊支原体血清抗体的ELISA方法特异性较好(结果见表5)。

[0164] 表5.特异性试验结果

[0165]

血清	鸡毒支原体 阳性血清	鸡沙门 阳性血清	鸡白痢疾 阳性血清	牛支原体 阳性血清	绵羊肺炎支 原体 阳性血清
OD ₄₅₀ 值	0.216	0.258	0.273	0.331	0.230

[0166] (6) 敏感性试验结果

[0167] PYK重组蛋白按最佳包被浓度进行包被,将鸡滑液囊支原体阳性血清做1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120八个稀释度,其余条件按最适反应条件进行ELISA试验。结果当阳性血清稀释到1:2560时,通过ELISA显色后靠肉眼观察颜色变化难以判断阴性、阳性结果,但酶标仪仍然可以检出。(结果见表6)。

[0168] 表6. 敏感性试验结果

[0169]

血清	血清稀释度							
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
阳性血清 OD ₄₅₀ 值	2.962	2.851	2.734	2.100	1.542	1.002	0.615	0.201
阴性血清 OD ₄₅₀ 值	0.668	0.371	0.280	0.244	0.232	0.220	0.213	0.172

[0170] (7) 重复性试验结果

[0171] 取18份鸡血清,用两批包被的酶标板各重复检测3次,计算标准偏差。结果重复试验中变异系数最大为7.82%,最小为2.46%,18份血清变异系数都较小,具有较好的重复性。

[0172] (8) 对比试验结果检测结果

[0173] 1) 应用IDEXX盒子试验和所建立的ELISA方法对93份鸡血清样品进行检测,检测结果如表8所示,阴性检出符合率为97.8%,以IDEXX试验检测结果为参照,将PYK-ELISA试验检出结果与其相一致(同一样品经两种方法检测均为阴性)的样品数除以检测样品总数,即得检测符合率。PYK-ELISA试验与IDEXX的检测符合率为97.8%。

[0174] 表7. IDEXX与ELISA检测鸡血清的检测结果

[0175]

检测方法	样品数	阳性样品	阳性检出率	阴性样品	阴性检出率	阴性符合率
IDEXX	93	2	2.2%	91	97.8%	97.8%
ELISA	93	4	4.3%	89	95.7%	

[0176] 2) 应用IDEXX试验和所建立的ELISA方法对91份鸡血清样品进行检测,应用IDEXX盒子试验和所建立的ELISA方法对91份鸡血清样品进行检测,检测结果如表9所示,阳性检出符合率为98.9%,以IDEXX试验检测结果为参照,将PYK-ELISA试验检出结果与其相一致(同一样品经两种方法检测均为阳性)的样品数除以检测样品总数,即得检测符合率。PYK-

ELISA试验与IDEXX的检测符合率为98.9%。

[0177] 表8. IDEXX与ELISA检测鸡血清的检测结果

[0178]

检测方法	样品数	阳性样品	阳性检出率	阴性样品	阴性检出率	阳性符合率
IDEXX	91	90	98.9%	1	1.1%	98.9%
ELISA	91	91	100%	0	0%	

[0179] 本发明相对于现有技术的主要优点如下：

[0180] (1) 特异性强和敏感性高。

[0181] (2) 检测结果用ELISA酶标仪读数,结果客观、公正,从而避免了人肉眼观察可能出现的误差,发生漏判或错判的情况。

[0182] (3) 可重复性高,同一样品多次检测,结果一致;或用不同批次的抗原检测同一样品,结果一致,这是研制试剂盒的基本要求。

[0183] (4) 广谱性强,本发明选择的pyk基因与GeneBank中提交的鸡滑液囊支原体其他种的基因序列同源性均达到100%,用表达的PYK蛋白,通过间接ELISA检测多份鸡血清,检测结果与同步的IDEXX试剂盒检测结果符合率高,说明本发明可以用于鸡滑液囊支原体的诊断。

[0184] (5) 本发明所有的表达目的蛋白PYK的重组大肠杆菌,对人无危害性,可以用发酵罐规模化生产,实现质量控制,保证所生产的ELISA试剂盒的质量一致。

[0185] (6) 本发明操作简单,既适用于田间大面积流行病学调查,也适用于实验室个例诊断。序列:

[0186] SEQ ID No.1

[0187] >pyk gene (1431bp)

[0188]

```
atgtataaagaaccgataaaaagaacaaaattagtagctaccatcggaccttcaagtgataattatgaaatgtttaa
aaaattagttcaagcaggtgtaacttgcgtgagagctaatttagtcacggatcatacgaagaacaaaaataaat
ttaacttagcaaaacaagtttcaaaagaattaaaccttctctttcattaatgctagataccaaaggacctgaaatt
cgtgttggtaaaatgaaagatggtgttcaacttattaagcaaggaacaatgcttgatattttaaccactgaagaagc
atataaaaacctagaaggaaattcagaacaaatttcagtgatcatatgatatgtcacttgacttgcaagttaatgatt
cagtacttttagatgatggaaaactatcaacaaaagttgtaaaagtttcaaaaggtctgtacaagtttatgtgcaa
aacaatcacaaccttaaaacaaataaaagaattaaccttccaggagttgactttagccttccatttttaagtcctaa
agatgttgaagacgttaaatttggagttcaaaatggaattagctatgtagcagcttcttttgtaactctgctgaaa
acgtaaaacaacttagaaaagttttagtagaaaatggcggagagcacattgaaattatttctaaaattgaatcaact
ttaggaattaaaaatattgaccaaatacatcgaagcttcagatggaataatggtggctagaggtgaccttaggacttga
agttccttactacgaagttccatactaccaaaaaatgattattagaaaatgtcgtgaagcaggtaaaccagttatcg
ttgcaactcaaatgcttgattcaatggaaaactcaccatccaacaagagcagaagtaactgatgtttatgttgcag
gtagaacttgagcagattcaaccatgctttcaggagaatcagcaaatggtggatttctctagaagctgttcaaac
catgacaaaaatttctaagcgtgcagaaagagaattctattcaaaaatctactaccagtacatttagaaaaatta
aagaaaaactaggttcagatcttcgttcattaattgcatacgaatttgctaaaaaactcaaggcaacgaatacaaa
```

tttgcaattgTTTTatctagaactggaaaacttcttaaaaaggtagctaactatcgtccaaatactacaatcgtagg
tatttttagatgatgaaaaactaacaattcatttggattttattcaagtgttttcacctcatttagattcaaaagaat
tattttcagaaattaaaaagaccattcaaaagctatttttagctctaaaaccttttgaatattctaaaggtgataaa
ttccttgtagttgaaaatgattctatttaagaatatacagttcaa

[0189] SEQ ID No.2

[0190] >PYK protein (477AA)

[0191] MYKETDKR TKLVATIGPSSDNYEMLKKLVQAGVTCVRANFSHGSYEEQKNKFNLAKQVSKELNLPLSLM
LDTKGPEIRV GKMKG VQLIKQGTMLDILTTEEAYKNLEGNSEQISVSYDMSLDLQVNDVLLDDGKLSTKVVKVSK
GLVQVYVQNNHKLKTNKRINLPGVDFSLPFLSPKDVEDVKFGVQNGISYVAASFVNSAENVKQLRKVLVENGGEHIE
IISKIESTLGIKNIDQII EASDGIMVARGDLGLEVPYYPYQKMI IRKCREAGKPVIVATQMLDSMENSHPHTRA
EVTDVYFAVELGADSTMLSGESANGGFLEAVQTMTKISKRAEREFYSKIYYPVHLEKIKEKLGSDLRSLIAYEIAK
KTQGNEYKFAIVLSRTGKLLKKVANYRPNTTIVGILDDEKLTNSFGIYSSVFTSLDSKELFSEIKKDHKAILALKP
FEYSKGDKFLVVENDSIKEYTVQ

[0192] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，
尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可
以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。
凡在本发明的内容和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的
保护范围之内。

序列表

- <110> 中国农业科学院兰州兽医研究所
 <120> 一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒及制备方法
 <160> 1
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 1948
 <212> DNA
 <213> 2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*
 <400> 1

```

ncstngrtca ncatgtataa agaaaccgat aaaagaacaa aattagtagc taccatcgga 60
ccttcaagtg ataattatga aatgttaaaa aaattagttc aagcaggtgt aacttgcgtg 120
agagctaat ttagtcacgg atcatacgaa gaacaaaaaa ataaatttaa ctagcaaaa 180
caagtttcaa aagaattaaa ccttcctctt tcattaatgc tagataccaa aggacctgaa 240
attcgtgttg gtaaaatgaa agatggtgtt caacttatta agcaaggaa aatgcttgat 300
attttaacca ctgaagaagc atataaaaac ctagaaggaa attcagaaca aatttcagtg 360
tcatatgata tgtcacttga cttgcaagtt aatgattcag tactttttaga tgatggaaaa 420
ctatcaacaa aagttgtaaa agtttcaaaa ggtcttgtag aagtttatgt gcaaaacaat 480
cacaaactta aaacaaataa aagaattaac cttccaggag ttgacttttag cttccattt 540
ttaagtccta aagatgttga agacgttaaa tttggagttc aaaatggaat tagctatgta 600
gcagcttctt ttgttaactc tgctgaaaac gtaaaacaac ttagaaaagt ttagtagaa 660
aatggcggag agcacattga aattatttct aaaattgaat caactttagg aattaaaaat 720
attgacaaa tcatcgaagc ttcagatgga ataatggtgg ctagaggtga ctaggactt 780
gaagttcctt actacgaagt tccatactac caaaaatga ttattagaaa atgtcgtgaa 840
gcaggtaaac cagttatcgt tgcaactcaa atgcttgatt caatggaaa ctcacctcat 900
ccaacaagag cagaagtaac tgatgtttat tttgcagtag aacttgagc agattcaacc 960
atgctttcag gagaatcagc aaatggtgga tttcctctag aagctgttca aaccatgaca 1020
aaaatttcta agcgtgcaga aagagaattc tattcaaaaa tctactacc agtacattta 1080
gaaaaaatta aagaaaaact aggttcagat cttcgttcat taattgcata cgaaattgct 1140
aaaaaaactc aaggcaacga atacaaattt gcaattgttt tatctagaac tggaaaactt 1200
cttaaaaagg tagctaacta tcgtccaaat actacaatcg taggtatfff agatgatgaa 1260
aaactaacia attcatttgg tattttatca agtgttttca cctcattaga ttcaaaagaa 1320
ttattttcag aaattaaaaa agaccattca aaagctattt tagctctaaa accttttgaa 1380
tattctaaag gtgataaatt cettgtagtt gaaatgatt ctattaaaga atatacagtt 1440
caartcanct yryshrsysr ghrysaahry rrrssnyrty sysanayahr ysargasnhr 1500
syryrnyssn yshsnaysna ryssnrtrsh rysyrrgay styssyanys nyhrtshrrh 1560
ayryssnysn rnraryrstr snasnsrass ysrhrysa ysarysyana yransnsnsy 1620
syshrsnysr gsnryashrr hrryssasay shyansnyry raaarhasnr asnaysnrgy 1680

```

saasnysry srhryssns narsytaarg ysyaryryra ryryrnyst r gsysrgayy 1740
sraahrnts rtsnrshr rgaahrsayr haayasrht ryrasnyhr aanhrthrys 1800
rysgarghy rryryrra sysysyrs rgrayraysy shrnysnyry shaarrghry 1860
ysysysaasn yrrgrsnhrh rayssyhrs nrhyrrrah hrrsryshry sysssrysa 1920
ysrhyrrsy syshaasnr ysrhran 1948

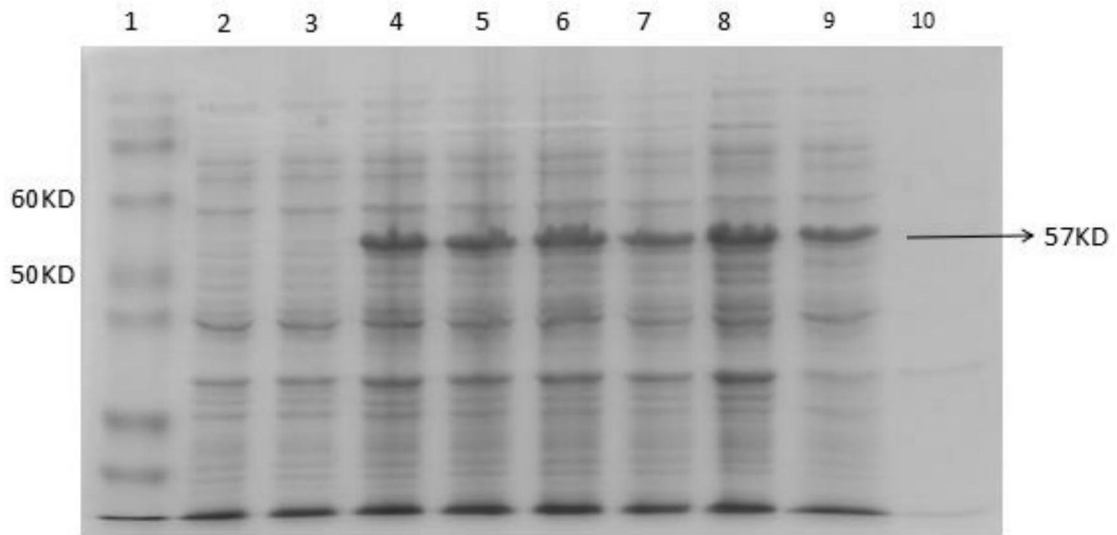


图1

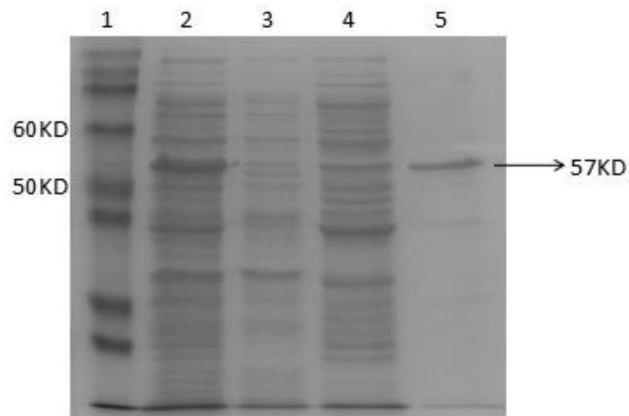


图2

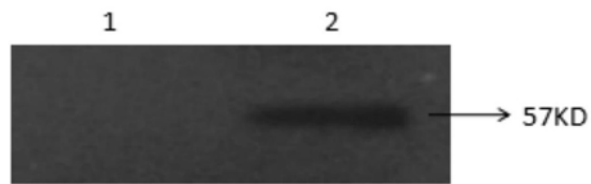


图3

专利名称(译)	一种检测鸡滑液囊支原体抗体的试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN109001450A	公开(公告)日	2018-12-14
申请号	CN201810374632.2	申请日	2018-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	宫晓炜 陈启伟 郑福英 刘永生		
发明人	宫晓炜 陈启伟 郑福英 刘永生		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/569 C12N15/70 C12N15/31		
CPC分类号	G01N33/535 C07K14/30 C12N15/70 G01N33/56927		
代理人(译)	谈杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测鸡滑液囊支原体抗体的ELISA试剂盒。该试剂盒是基于鸡滑液囊支原体丙酮酸激酶(PYK)重组蛋白为包被抗原建立的检测鸡滑液囊支原体抗体的ELISA试剂盒。本发明还提供了用于制备上述试剂盒包被抗原即PYK蛋白的制备方法，通过本发明提供的方法制备的PYK蛋白具有良好的反应原性，且本发明所建立的ELISA检测试剂盒为鸡滑液囊支原体的诊断及免疫后抗体水平的检测提供了有效的方法，为该疾病的预防研究起到了显著促进作用。

