



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101839917 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 201010175527.X

C12N 15/70(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.18

G07K 14/085(2006.01)

(71) 申请人 河南科技大学

地址 471003 河南省洛阳市涧西区西苑路  
48号

(72) 发明人 王臣 赵战勤 廖成水 牛明福  
张春杰 程相朝 吴庭才 李银聚

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限公司 41119

代理人 牛爱周

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C12N 15/51(2006.01)

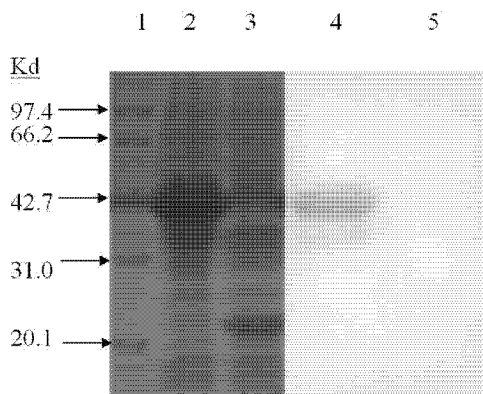
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

## (54) 发明名称

I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒及其检测方法和应用

## (57) 摘要

本发明涉及一种 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,同时还涉及一种该试剂盒的检测方法和应用,其中试剂盒包括:经重组 VP1 蛋白包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭 IgG 抗体、TMB 底物显色液、阳性血清、阴性血清和试剂盒说明书。本发明利用聚合酶链反应从 DHV-1 基因组中扩增出 VP1 基因,构建了含 VP1 基因的重组表达质粒 pET32a-VP1,该质粒转化入宿主菌 BL21 (DE3),体外表达 VP1 蛋白经镍柱纯化后作为抗原,建立酶联免疫吸附试验检测试剂盒,阳性血清为 I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清,阴性对照为鸭标准阴性血清。检测试剂盒特异性强、敏感性高、操作简单,易于大范围推广应用,在 I 型鸭病毒性肝炎的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要应用价值。



1. 一种 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征在于,包括:经重组 VP1 蛋白包被的酶标板,辣根过氧化物酶 HRP 标记的兔抗鸭 IgG 抗体,TMB 底物显色液,阳性血清,阴性血清。

2. 根据权利要求 1 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:所述的包被酶标板所用的抗原即重组 VP1 蛋白是由基因工程菌株 BL21 体外诱导表达获得,该菌株含表达质粒 pET32a-VP1,重组表达质粒 pET32a-VP1 含有大肠杆菌复制子 ori、启动子 PT7、外源 VP1 基因和抗性筛选基因氨苄青霉素 Amp 基因,其表达式为:-ori-PT7-VP1gene-Ampgene-。

3. 根据权利要求 2 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:其重组表达质粒 pET32a-VP1 的构建中,设计并合成的一对特异性引物为:

上游引物 P1 :5' -CCAGAATTCGGTGATTCTAACCAG-3'

下游引物 P2 :5' -GTTTCTAGATTCAATTTCCAG-3' 。

4. 根据权利要求 1 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:所述的阳性血清为经 I 型鸭肝炎病毒 VP1 蛋白免疫获得的 I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清,OD450nm  $\geq$  1.00。

5. 根据权利要求 1 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:所述的阴性对照为经筛选获得的鸭标准阴性血清,OD450nm  $\leq$  0.100。

6. 根据权利要求 1 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:辣根过氧化物酶 HRP 标记的兔抗鸭 IgG 抗体的制备方法为:

(1) 用超纯水配制辣根过氧化物酶 HRP 溶液,加入 0.06M 过碘酸钠溶液 4℃ 避光 1-2 小时,加入 160mM 乙二醇,室温反应 30-60 分钟,加入 pH4.4 的醋酸缓冲液 2-8℃ 透析过夜,换液两次;

(2) 将纯化的兔抗鸭 IgG 加入步骤(1)经活化的酶中,转移至透析袋,于 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液中透析,4℃ 搅拌过夜,换液两次;

(3) 透析液吸至离心管中,加 0.05M 硼氢化钠溶液,4℃ 反应 1-2 小时,加入等量的饱和硫酸铵溶液 4℃ 放置 30-60 分钟,4℃ 4000rpm 离心 10-20 分钟,弃上清,将沉淀溶于少量 PBS,装入透析袋中,对 0.02MPBS (pH7.4) 透析,4℃ 过夜;

(4) 收集透析袋中液体,4000rpm 离心 10-20 分钟,上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭 IgG 多克隆抗体,将其与等量甘油混合,-20℃ 保存。

7. 根据权利要求 1 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:所述的 TMB 底物显色液包括显色液 A 和显色液 B。

8. 根据权利要求 7 所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征为:所述的显色液 A 的配制方法如下:200mg 四甲基联苯胺(TMB),用 100mL 无水乙醇或 DMSO 溶解后,以双蒸水定容至 1000mL,配制成显色液 A;所述的显色液 B 的配制如下:称取 21g 无水柠檬酸,28.2g 无水磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),6.4mL 0.75% 过氧化氢尿素,双蒸水定容至 1000mL,调 PH 值到 4.5-5.0,配制成显色液 B。

9. 如权利要求 1-8 中任一条所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒的检测方法,其特征为:包括以下步骤:

(1) 将 10× 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;

(2)将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释,按 100  $\mu$  L 孔加入抗体检测板即经重组 VP1 蛋白包被的酶标板中,同时设只加 100  $\mu$  L 样品稀释液的空白、鸭标准阴性作为阴性对照、I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清作为阳性对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟,甩干;

(3) 每孔加洗涤液 200  $\mu$  L 洗涤 5 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

(4)每孔加 100  $\mu$  L 的辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭 IgG 多克隆抗体,空白不加,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,甩干;

(5) 每孔加洗涤液 200  $\mu$  L,洗涤 5 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

(6) 依次加入 50  $\mu$  L 底物 TMB 显色液 A 和 50  $\mu$  L 显色液 B,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟;

(7) 加 50  $\mu$  L 终止液 (2M $H_2SO_4$ ),用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔;

(8)以待测样本 OD450nm 值与标准阴性 OD450nm 值的比值(P/N),大于或等于 3 判为阳性,小于或等于 1.5 为阴性,介于 1.5-3 之间为可疑,须重检;重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性,小于 2.0 为阴性。

10. 如权利要求 1—8 中任一条所述的 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒在 I 型鸭病毒性肝炎的诊断、流行病学调查和免疫监测方面的应用。

## I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒及其检测方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种 I 型鸭肝炎病毒(Duckhepatitisvirustype-1, DHV-1) 血清抗体酶联免疫法 ELISA 检测试剂盒,同时还涉及一种该试剂盒的检测方法和应用,属于禽类免疫学技术领域。

### 背景技术

[0002] 鸭病毒性肝炎是幼龄雏鸭的一种高度致死性的急性传染病,此病的特征是发病急,传播快,死亡率高,临床表现为角弓反张,病理变化为肝炎和出血,此病常给养鸭场造成严重的经济损失。此病最先在美国发现,并用鸡胚分离到病毒,其后在英国、加拿大、德国等许多养鸭国家陆续发现此病。我国大部分省市和地区亦有此病的发生且呈上升趋势。鸭肝炎病毒(*Duckhepatitisvirus*, DHV),在分类上属微 RNA 病毒科,病毒大小约 20 ~ 40nm,在电镜下观察感染细胞,病毒在胞浆中呈晶格状排列,病毒对氯仿、乙醚、胰蛋白酶和 pH3.0 均有抵抗力,56℃加热 60min 仍可存活,但 62℃的条件下 30min 即被灭活。病毒在 1% 福尔马林或 2% 氢氧化钠中 2h (15 ~ 20℃)或在 2% 漂白粉溶液中 3h 或者是在 0.2% 福尔马林或 0.25%β-丙内酯中 37℃ 30min 均可被灭活。病毒可在污染的孵化器内至少存活 10 周,在阴凉处的湿粪中可存活 37d 以上,在 4℃条件下可存活 2 年以上,在 -20℃则可长达 9 年。此病主要感染鸭,在自然条件下不感染鸡、火鸡和鹅。此病的主要通过接触传播,经呼吸道亦可感染,据推测不发生与蛋的传递。在野外和舍饲条件下,此病可迅速传播给鸭群中的全部易感小鸭,表明它具有极强的传染性,感染多由从发病场或有发病史的鸭场购入带病毒的雏鸭引起。由参观人员、饲养人员的串舍以及污染的用具、垫料和车辆等引起的传播经常发生,鸭舍内的鼠类在传播病毒方面亦起重要作用。野生水禽可能成为带毒者,成年鸭感染不发病,但可成为传染来源。雏鸭的发病率与病死率均很高,1 周龄内的雏鸭病死率可达 95%,1 ~ 3 周龄的雏鸭病死率为 50% 或稍低,4 ~ 5 周龄的小鸭发病率与病死率较低。

[0003] 鸭病毒性肝炎有三种类型, I 型呈世界性分布, II 型和 III 型鸭病毒性肝炎分别局限于英国和美国。鸭病毒性肝炎 I 型(DVH- I) 引起雏鸭的严重死亡,主要侵害 4 周龄以内的雏鸭,死亡率高达 90%。目前国内流行的主要是 DHV- I,是严重危害鸭子的主要传染病之一。成年鸭在自然条件下被 DHV-I 感染后,可长期带毒和排毒而不出现临床症状,但进入环境中的 DHV-I 对 4 周龄内的雏鸭却有高致病性,从而导致该病毒在鸭群中广泛传播。因此,建立快速、敏感、特异的诊断方法是有效预防和控制该病的关键措施之一。目前,对 DHV-I 的诊断主要依靠流行病学资料、临床症状、病理变化及病毒的分离和鉴定。但这些方法用于检测感染 DHV-I 的死亡鸭组织中的病原时存在不足,如检测所需时间长、敏感性较低等,临床应用受到一定的限制。因此,研制开发适用于鸭病毒性肝炎抗体检测的特异的、敏感的、生物安全度高的、适合于基层使用的诊断检测的工具,对鸭免疫水平进行实时监控和建立科学、灵活的鸭病毒性肝炎的免疫程序,以及对疫病的预防和控制有重要意义。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒。

[0005] 本发明的目的还在于提供一种试剂盒的检测方法以及在 I 型鸭病毒性肝炎的检测、流行病学调查和免疫监测方面的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明的技术方案采用了一种 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒,包括:经重组 VP1 蛋白包被的酶标板,辣根过氧化酶 HRP 标记的兔抗鸭 IgG 抗体,TMB 底物显色液,阳性血清,阴性血清。

[0007] 所述的包被酶标板所用的抗原即重组 VP1 蛋白是由基因工程菌株 BL21 体外诱导表达获得,该菌株含表达质粒 pET32a-VP1,重组表达质粒 pET32a-VP1 含有大肠杆菌复制子 ori、启动子 PT7、外源 VP1 基因和抗性筛选基因氨苄青霉素 Amp 基因,其表达式为:-ori-PT7-VP1gene-Ampgene-。

[0008] 其重组表达质粒 pET32a-VP1 的构建中,设计并合成的一对特异性引物为:

上游引物 P1 :5' -CCAGAATTCGGTGATTCTAACCAG-3'

下游引物 P2 :5' -GTTTCTAGATTCAATTTCCAG-3' 。

所述的阳性血清为经 I 型鸭肝炎病毒 VP1 蛋白免疫获得的 I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清,OD450nm  $\geq$  1.00。

[0009] 所述的阴性对照为经筛选获得的鸭标准阴性血清,OD450nm  $\leq$  0.100。

[0010] 所述的 TMB 底物显色液包括显色液 A 和显色液 B,其中显色液 A 的配制方法如下:200mg 四甲基联苯胺(TMB),用 100mL 无水乙醇或 DMSO 溶解后,以双蒸水定容至 1000mL,配制成显色液 A;显色液 B 的配制如下:称取 21g 无水柠檬酸,28.2g 无水磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>),6.4mL 0.75% 过氧化氢尿素,双蒸水定容至 1000mL,调 PH 值到 4.5-5.0,配制成显色液 B。

[0011] 本发明的技术方案还采用了一种 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

(1) 将 10 $\times$  浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;

(2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释,按 100  $\mu$  L 孔加入抗体检测板即经重组 VP1 蛋白包被的酶标板中,同时设只加 100  $\mu$  L 样品稀释液的空白、鸭标准阴性作为阴性对照、I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清作为阳性对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟,甩干;

(3) 每孔加洗涤液 200  $\mu$  L 洗涤 5 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

(4) 每孔加 100  $\mu$  L 的辣根过氧化酶标记的兔抗鸭 IgG 多克隆抗体,空白不加,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,甩干;

(5) 每孔加洗涤液 200  $\mu$  L,洗涤 5 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

(6) 依次加入 50  $\mu$  L 底物 TMB 显色液 A 和 50  $\mu$  L 显色液 B,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟;

(7) 加 50  $\mu$  L 终止液 (2MH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔;

(8) 以待测样本 OD450nm 值与标准阴性 OD450nm 值的比值(P/N),大于或等于 3 判为阳性,小于或等于 1.5 为阴性,介于 1.5-3 之间为可疑,须重检;重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性,小于 2.0 为阴性。

[0012] 另外,本发明的技术方案还采用了 I 型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒在 I 型鸭病毒性肝炎的诊断、流行病学调查方面以及免疫监测方面的应用。

[0013] 本发明中：

**VP1 蛋白的制备(即制备包被酶标板所用的抗原)**

第一方面构建了表达载体 pET32a-VP1。根据 GenBank 发表的 DHV-1 的 VP1 基因序列(序列号 :EF653378),利用 DNASTar 软件分析,设计一对特异性引物,引物两端分别加限制性酶切位点 *EcoRI* 和 *XbaI* 及保护性碱基(Takara 公司合成),下划线部分为酶切位点。

[0014] 上游引物 P1 :5' -CCAGAATTCGGTGATTCTAACCAG-3' *EcoRI*

下游引物 P2 :5' -GTTTCTAGATTCAATTTCCAG-3' *XbaI*

通过 PCR 获取 VP1 基因,将获取的 VP1 基因克隆入 pMD18-T 载体并进行序列测定,将 pMD18-T 载体上的目的片段酶切后克隆入 pET32a 载体,构建重组表达质粒 pET32a-VP1,将重组质粒转化入 BL21 (DE3) 感受态细胞,并用双酶切和 PCR 进行鉴定,鉴定阳性的质粒即为重组表达质粒 pET32a-VP1。

[0015] 第二方面通过重组表达质粒 pET32a-VP1 体外高效表达,表达蛋白经镍柱纯化后,测定蛋白浓度,以纯化蛋白为抗原研制 ELISA 试剂盒。

**VP1 蛋白的最佳包被条件(即抗体检测板的最佳制备条件)**

用 PH8.5 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液作包被液,将上述基因工程表达的 VP1 蛋白稀释为 10 μg/mL,按 100 μL/孔加入聚苯乙烯微孔板中,4℃包被过夜,甩干,按 100 μL/孔加入含 1% 牛血清白蛋白(双(三甲基硅基)乙酰胺 BSA),37℃封闭 4 小时,洗涤甩干,置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装袋中保存。

**辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鸭 IgG 抗体的制备过程如下：**

(1) 用超纯水配制辣根过氧化物酶(HRP)溶液;加入 0.06M 过碘酸钠溶液 4℃避光 1 小时,加入 160mM 乙二醇,室温反应 30-60 分钟,加入 PH4.4 的醋酸缓冲液 2-8℃透析过夜,换液两次;

(2) 将纯化的兔抗鸭 IgG 加入上述活化的酶中,转移至透析袋,于 0.05MPH9.6 的碳酸缓冲液中透析,4℃搅拌过夜,换液两次;

(3) 透析液吸至离心管中,加现配的 0.05M 硼氢化钠溶液,4℃反应 2 小时,加入等量的饱和硫酸铵溶液 4℃放置 30-60 分钟,4℃4000rpm 离心 10-20 分钟,弃上清,将沉淀溶于少量 PBS,装入透析袋中,对 0.02MPBS (PH7.4)透析,4℃过夜;

(4) 收集透析袋中液体,4000rpm 离心 10-20 分钟,上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭 IgG 多克隆抗体,将其与等量甘油混合,-20℃冻存,以含 0.1% 双(三甲基硅基)乙酰胺 BSA,0.05% 吐温 -20,0.01% 硫柳汞钠,PH7.4 的磷酸缓冲液按 1:200-5000 稀释冻存。

**I 型鸭肝炎病毒血清抗体 ELISA 检测试剂盒,其检测程序为：**

(1) 将 10× 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;

(2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释,按 100 μL 孔加入抗体检测板中,同时设只加 100 μL 样品稀释液的空白、鸭标准阴性作为阴性对照、I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清作为阳性对照,37℃孵育 60 分钟,甩干;

(3) 每孔加洗涤液 200 μL 洗涤 5 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

(4) 每孔加 100 μL 的辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭 IgG 多克隆抗体,空白不加,37℃孵育 30 分钟,甩干;

(5) 每孔加洗涤液 200 μL,洗涤 5 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

(6) 依次加入 50  $\mu$  L 底物 TMB 显色液 A 和 50  $\mu$  L 显色液 B, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟;

(7) 加 50  $\mu$  L 终止液 (2M $H_2SO_4$ ), 用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD450nm)。

[0019] I 型鸭肝炎病毒血清抗体 ELISA 检测试剂盒, 其检测样本的判定标准为:

以待测样本 OD450nm 值与标准阴性 OD450nm 值的比值 (P/N), 大于或等于 3 判为阳性, 小于或等于 1.5 为阴性, 介于 1.5-3 之间为可疑, 须重检; 重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性, 小于 2.0 为阴性。

[0020] 本发明是通过构建一个在原核细胞中表达的高效重组表达质粒, 利用重组表达质粒的表达产物为抗原, 研制检测 I 型鸭肝炎病毒血清抗体的 ELISA 试剂盒, 专用于 I 型鸭病毒性肝炎的检测、流行病学调查和免疫监测。本发明试剂盒操作简单, 人人都可操作, 能较好满足不同层次人员的需要, 如疫病监测、海关检疫、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等, 易于大范围推广应用。本发明 ELISA 试剂盒在 I 型鸭病毒性肝炎的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有很重要的应用价值, 可以指导养殖场选择合适的疫苗和药物进行防治, 因此具有广阔的市场情景和较大的经济、社会效益。

[0021] 本发明的特点和优点如下:

(1) 特异性强, 敏感性高, 安全性好

本发明重组 VP1 蛋白为非全病毒抗原、安全性好, 不含无关杂蛋白, 只与相应亚型 I 型鸭肝炎病毒阳性血清特异结合, 不与鸭其它疫病阳性血清发生交叉反应, 具有良好抗原性, 因此具有很高的特异性和敏感性, 重组表达载体 pET32a-VP1 的表达产物具有良好的抗原性;

(2) 操作简便快速、结果判定准确

使用 I 型鸭肝炎病毒血清抗体检测试剂盒检测 I 型鸭肝炎病毒血清抗体时, 无需另配其它试剂, 样品无需无菌处理, 按试剂盒说明书在 1-2 小时内即可判定检测结果, ELISA 检测试剂盒以显色的深浅显示检测结果, 即检测孔出现蓝色显色为阳性, 中止后成黄色, 无色为阴性, 采用酶标仪机读数, 减少主观性, 准确可靠;

(3) 成本低, 制备简单

I 型鸭肝炎病毒血清抗体 ELISA 检测试剂盒可批量检测, 基因工程菌株 BL21 (DE3) (pET32a-VP1) 表达的 VP1 蛋白表达量很高, 可占菌体蛋白 60% 以上; 重组 VP1 蛋白以可溶性形式存在于菌体内部, 收集和纯化比较方便; 同时纯化的重组 VP1 蛋白不需要进行蛋白复性可用于 ELISA 试剂盒的研制。

[0022] I 型鸭肝炎病毒结构蛋白 VP1 位于 DHV-1 基因组的 2103-2816 位, VP1 全基因由 714 个核苷酸组成, 编码 238 个氨基酸。3D 位于 DHV1 基因组的 6012-7373 位, VP1 全基因由 1362 个核苷酸组成, 编码 454 个氨基酸。VP1 蛋白大部分暴露在病毒的里面, 是决定病毒抗原性的主要成分, VP1 蛋白是主要结构蛋白, 含有可诱导 T、B 淋巴细胞反应的多个抗原表位, 能诱导机体产生保护性的中和抗体。

[0023] 本发明利用 PCR 技术从 I 型鸭肝炎病毒基因组中扩增出 VP1 基因, 构建了含 VP1 基因的重组表达质粒 pET32a-VP1, 该质粒转化入宿主菌 BL21 (DE3), 体外表达 VP1 蛋白经镍柱亲和层析纯化后作为抗原, 建立间接 ELISA 检测方法, 并优化 ELISA 的反应条件形成检测试剂盒, 该试剂盒可在 DVH-I 的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要应用价值。

## 附图说明

[0024] 图 1 VP1 基因的 PCR 扩增及重组表达质粒 pET32a-VP1 的鉴定图谱；

泳道 1 为 DL2000Marker；泳道 2 为 VP1 基因的 PCR 扩增产物；泳道 3 为 pET32a-VP1/*EcoRI*、*XbaI* 双酶切；泳道 4 为 DL15000Marker；

图 2 为重组 VP1 蛋白 SDS-PAGE 电泳及 western-blot 分析；

泳道 1 为低分子蛋白 Marker；泳道 2 为大肠杆菌 BL21（重组质粒 pET32a-VP1）诱导表达产物；泳道 3 为大肠杆菌 BL21（空质粒 pET32a）诱导表达产物；泳道 4 为重组 VP1 蛋白 western-blot 结果；泳道 5 为重组 VP1 蛋白 western-blot 结果；大肠杆菌 BL21（空质粒 pET32a）诱导表达产物 western-blot 结果；

图 3 为灭活疫苗免疫鸭体内抗体的动态变化。

## 具体实施方式

### [0025] 1、引物设计

根据 GenBank 发表的 DHV-1 的 VP1 基因序列(序列号 :EF653378)，利用 DNASTar 软件分析，设计一对特异性引物，引物两端分别加限制性酶切位点 *EcoRI* 和 *XbaI* 及保护性碱基 (Takara 公司合成)，下划线部分为酶切位点。

[0026] 上游引物 P1 :5' -CCAGAAATTCGGTGATTCTAACCCAG-3' *EcoRI*

下游引物 P2 :5' -GTTTCTAGATTCAATTTCCAG-3' *XbaI*

### 2、VP1 基因的 PCR 扩增

PCR 反应条件 :94℃ 预热 5min,94℃ 变性 1min,55℃ 退火 30sec,72℃ 延伸 50sec,30 个循环,最后一个循环后再延伸 10 分钟。将 PCR 产物经含有溴化乙锭 (Ethidium Bromide, EB) 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,切下目的条带,随后按胶回收试剂盒 (大连 TaKaRa 公司) 使用说明进行回收,并对回收产物进行电泳鉴定约 714bp 大小片段即为 VP1 基因 (图 1)。

### [0027] 3、表达 VP1 基因的基因工程菌株构建

用 *EcoRI* 和 *XbaI* 对 VP1 基因和质粒载体 pET-32a 进行双酶切,并置于 37℃ 水浴作用 2h,酶切产物同样经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,胶回收试剂盒进行回收鉴定。经过酶切的 VP1 基因和 pET-32a 载体按 1 :3 的摩尔比 4℃ 过夜连接。取连接产物加入含有 100 μL 感受态 DH5 α 的聚丙烯离心管中,轻轻混匀后冰浴 30min。将聚丙烯离心管从冰中取出后 42℃ 热休克 90sec,然后立即冰浴 2min。加入 800 μL 37℃ 预热的 LB 培养基,于 37℃ 振摇 (100 ~ 150rpm) 45min。取 100 μL 菌液均匀涂布含氨苄青霉素 (Amp) 50 μg/ml 的琼脂 LB 平板,在 37℃ 正置 20min 后,倒置培养 16~20h。按《分子克隆实验指南》上的碱裂解法提取质粒。对提取质粒进行 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切鉴定。以酶切出现 714bp 左右大小 DNA 片段的质粒为阳性质粒 (图 1)。并将阳性质粒命名为 pET32a-VP1。送上海 Invitrogen 公司测序。采用  $CaCl_2$  转化法,将重组质粒 pET32a-VP1 转化进入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,筛选阳性克隆,即为基因工程菌株。

### [0028] 4、VP1 蛋白的诱导表达与免疫转印

挑取基因工程菌株单菌落接种到盛有 3mL LB 液体培养基 (50 μg/ml 氨苄青霉素) 试管中,于 37℃ 振摇培养过夜,第二天从中取出一定量的菌体加到另一盛有 3mL LB 液体培养基中,使菌体浓度达到  $OD_{600} \approx 0.1$ ,37℃ 振摇培养 2~4 小时,当菌体浓度  $OD_{600} \approx 0.4-0.6$  时,

加入终浓度为 1mM 的 IPTG 进行诱导表达 4~6h, 每隔 1 小时收集 100  $\mu$  L 菌液。4000rpm, 离心 10min, 收集菌体, 将收集的菌体用 100  $\mu$  L PBS 重悬后, 加等体积的 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液(100mmol/L Tris-HCl (pH6.8); 200mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT); 4% SDS (电泳级); 0.2% 溴酚蓝; 20% 甘油), 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min 以使蛋白质变形, 取 10  $\mu$  L 加样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, SDS-PAGE 电泳凝胶的配制及电泳条件参照分子克隆手册。表达产物诱导 3 小时即可产生分子量约为 43KD 的目的条带(图 2)。取 3 小时的培养物超声波处理, 12,000r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5min 分离上清和沉淀, 用 10% SDS-PAGE 鉴定, 表达蛋白以可溶性形式存在于菌体内部。并进行转印, 然后以鸭抗 DHV-1 血清为一抗, HRP 标记的兔抗鸭 IgG 为二抗作免疫转印鉴定, 最后用 DAB 显色试剂盒显色, 在醋酸纤维素膜上可见目的条带(图 2)。

#### [0029] 5、VP1 表达蛋白纯化及蛋白浓度测定

将诱导表达的菌液于 12000rpm 离心 10min 收获沉淀, 以洗涤液(5mM 咪唑, 0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.9)重悬菌体, 后经超声波裂解 10min, 随后 12000rpm 离心 10min 收获包涵体沉淀和上清, 经 SDS-PAGE 电泳鉴定表达产物主要以可溶性表达。将此上清用蛋白质 Ni 柱亲和层析进行纯化, 具体操作过程可参照 Novagen 公司 His-bind purification kit 的说明书, VP1 表达蛋白经镍柱纯化后, 测定该蛋白浓度。

#### [0030] 6、VP1 表达纯化蛋白 ELISA 试剂盒的研制

##### 6.1、ELISA 试剂盒的组成成分和最佳反应条件

1) 抗原最佳包被浓度: 用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液作包被液, 将上述基因工程表达的 VP1 蛋白稀释为 10  $\mu$ g/mL, 按 100  $\mu$  L/孔加入聚苯乙烯微孔板中,

2) 洗涤液: PBST/Tween-20 (NaCl 8g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 3.6g, KCl 0.2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, Tween-20 0.5mL, 去离子水 1000mL)

3) 最佳封闭液: 1% 牛血清白蛋白 (BSA)。

[0031] 4) 血清稀释液: 0.01M 的 PBS (NaCl 8g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 3.6g, KCl 0.2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, Tween-20 0.5mL, 去离子水 1000mL), pH7.2

5) 血清的最佳稀释浓度: 100 倍稀释

6) 血清与抗原的结合时间: 60 分钟

7) 酶标二抗的最佳稀释浓度和反应时间: 2000 倍稀释, 30 分钟

8) 显色系统: 称取 200mg 四甲基联苯胺 (TMB), 用 100mL 无水乙醇或 DMSO 溶解后, 以双蒸水定容至 1000mL, 配制显色液 A; 称取 21g 无水柠檬酸, 28.2g 无水磷酸氢二钠 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 6.4mL 0.75% 过氧化氢尿素, 双蒸水定容至 1000mL, 调 pH 值到 4.5-5.0, 配制显色液 B;

9) 终止液: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

##### [0032] 6.2、ELISA 的操作程序

(1) 将 10 $\times$  浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;

(2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释, 按 100  $\mu$  L 孔加入抗体检测板中, 同时设只加 100  $\mu$  L 样品稀释液的空白、鸭标准阴性作为阴性对照、I 型鸭肝炎病毒标准阳性血清作为阳性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟, 甩干;

(3) 每孔加洗涤液 200  $\mu$  L 洗涤 5 次, 每次间隔 1 分钟, 拍干;

(4) 每孔加 100  $\mu$  L 的辣根过氧化物酶标记的兔抗鸭 IgG 多克隆抗体, 空白不加, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 甩干;

(5) 每孔加洗涤液 200  $\mu$  L, 洗涤 5 次, 每次间隔 1 分钟, 拍干;

(6) 依次加入 50  $\mu$  L 底物 TMB 显色液 A 和 50  $\mu$  L 显色液 B, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟;

(7) 加 50  $\mu$  L 终止液 (2M $H_2SO_4$ ), 用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD<sub>450nm</sub>)。

#### [0033] 6.3、判定标准的确定

以待测样本 OD<sub>450nm</sub> 值与标准阴性 OD<sub>450nm</sub> 值的比值 (P/N), 大于或等于 3 判为阳性, 小于或等于 1.5 为阴性, 介于 1.5-3 之间为可疑, 须重检; 重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性, 小于 2.0 为阴性。

#### [0034] 6.4、保存期试验

按照上述 ELISA 确定的条件, 抗原包被、封闭后, 分别在 4 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C 保存, 于不同时间取出进行 ELISA 试验, 包被 ELISA 板的保存期在 4 $^{\circ}$ C 可保存 6 个月, 而在 -20 $^{\circ}$ C 可保存 12 个月。

#### [0035] 7、本发明 ELISA 试剂盒的使用说明书

1) 加入 100 倍稀释液好的血清样品, 100  $\mu$  L/ 孔, 每次设阳性、阴性和空白对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟, 取出洗涤 5 次, 每次 1 分钟;

2) 加酶标记的二抗, 100  $\mu$  L/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 取出洗涤 5 次, 每次 1 分钟;

3) 依次加入 50  $\mu$  L 底物 TMB 显色液 A 和 50  $\mu$  L 显色液 B, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟, 2M 的浓硫酸终止反应, 50  $\mu$  L/ 孔, 酶标仪测吸光值 (波长 450nm);

4) 以待测样本 OD<sub>450nm</sub> 值与标准阴性 OD<sub>450nm</sub> 值的比值 (P/N), 大于或等于 3 判为阳性, 小于或等于 1.5 为阴性, 介于 1.5-3 之间为可疑, 须重检; 重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性, 小于 2.0 为阴性。

#### [0036] 8、ELISA 试剂盒的应用

##### 8.1、ELISA 试剂盒检测 I 型鸭肝炎病毒灭活疫苗鸭血清样品

I 型鸭肝炎病毒灭活苗免疫 20 只 7 日龄健康雏鸭 (试验前检测 I-DHV 抗体阴性), 收集免疫后 0d、5d、10d、15d、20d、25d、30d、35d 血清; 在结果显示 I-DHV 抗体阴性的 10 日龄鸭经免疫接种后 5 天 ELISA 就可以检测到相应的抗体, 25 天后 OD 值下降, 表明本发明的 ELISA 试剂盒中 VP1 纯化的表达蛋白具有良好的抗原性, 能特异性地检测到免疫鸭血清中的抗 VP1 抗体 (图 3)。

##### [0037] 8.2、ELISA 试剂盒检测临床血清样品

应用本发明所研制的试剂盒对来自河南、山东、江苏等地发病鸭群的 2100 份鸭血清进行了 I 型鸭肝炎病毒血清抗体的检测, 结果检出抗体阳性鸭血清 1839 份, 为了进一步检测该方法的特异性和敏感性, 我们先后从抗体阳性鸭中随机抽取了 200 份发病肝脏, 通过 9-11 日龄鸭胚进行了病毒的分离鉴定。结果, 200 份从发病的肝脏分离物通过 RT-PCR 试验检测证明均为病毒阳性, 二者的符合率达 100%。说明本发明的试剂盒在实际应用中具有良好的特异性和敏感性。同时也表明本发明所研制的试剂盒可以检测 I 型鸭肝炎病毒感染, 可以指导养殖场选择合适的疫苗和药物进行防治, 本试剂盒在 I 型鸭病毒性肝炎的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要的应用价值。

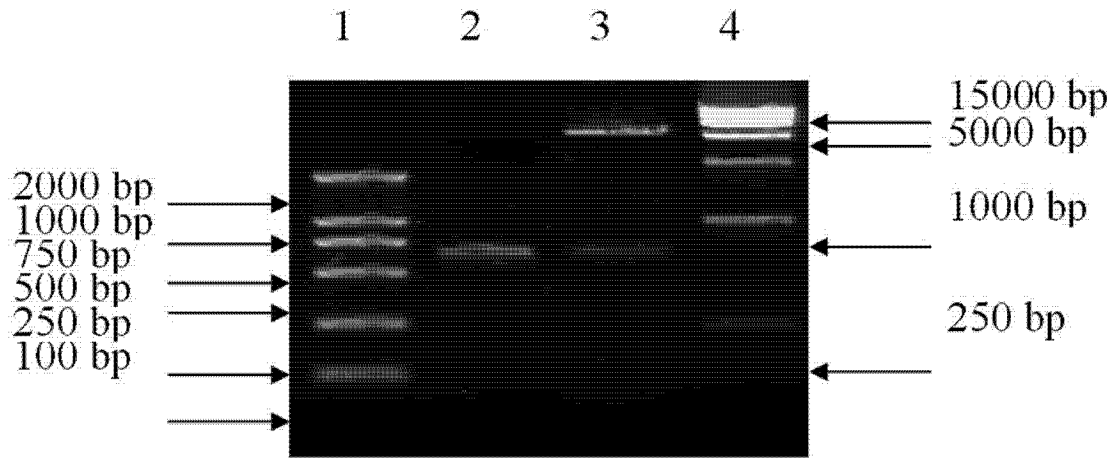


图1

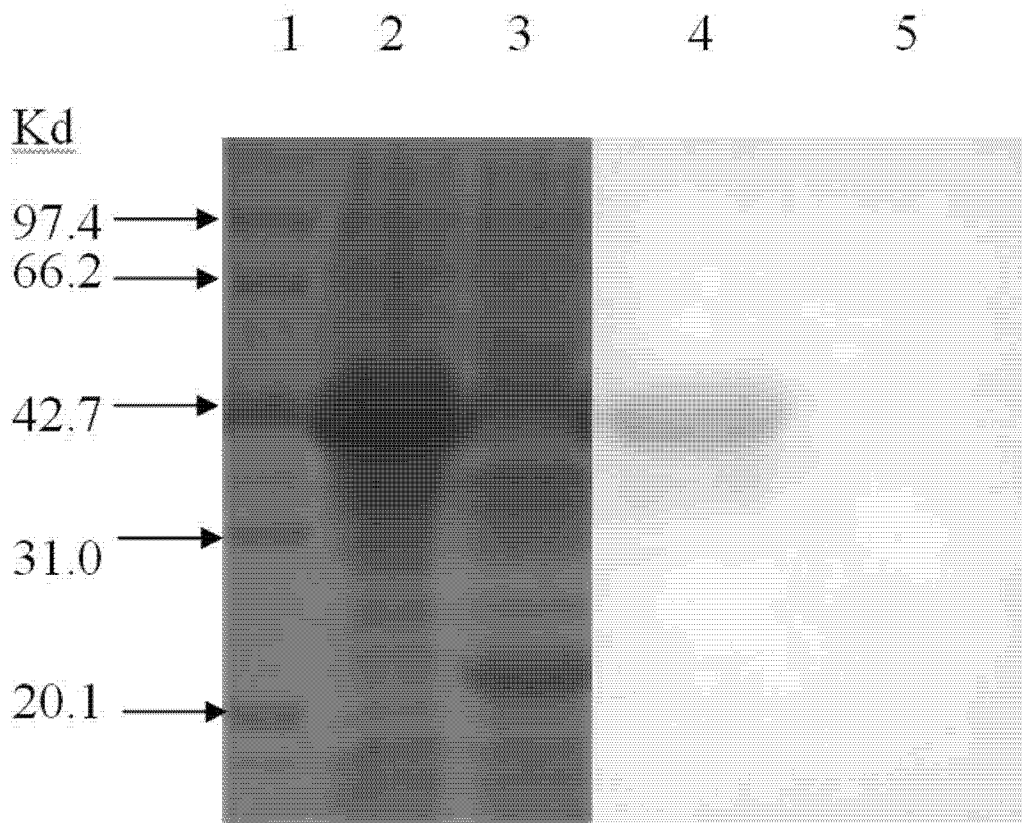


图 2

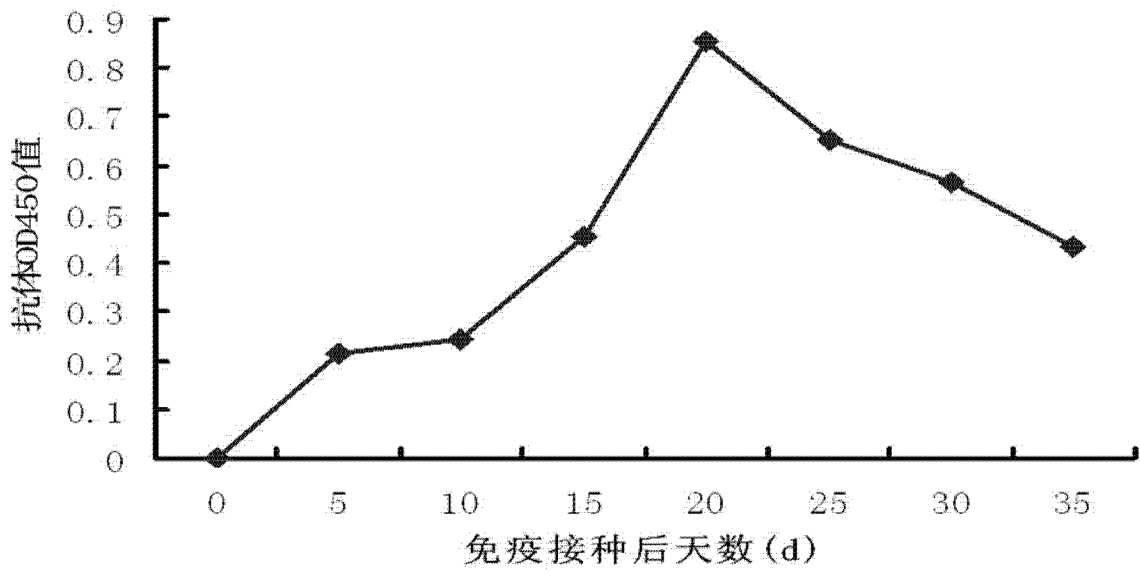


图 3

专利名称(译)	I型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒及其检测方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101839917A</a>	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	CN201010175527.X	申请日	2010-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南科技大学		
[标]发明人	王臣 赵战勤 廖成水 牛明福 张春杰 程相朝 吴庭才 李银聚		
发明人	王臣 赵战勤 廖成水 牛明福 张春杰 程相朝 吴庭才 李银聚		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/535 C12N15/51 C12N15/70 C07K14/085		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种I型鸭肝炎病毒血清抗体酶联免疫法检测试剂盒，同时还涉及一种该试剂盒的检测方法和应用，其中试剂盒包括：经重组VP1蛋白包被的酶标板、辣根过氧化酶标记的兔抗鸭IgG抗体、TMB底物显色液、阳性血清、阴性血清和试剂盒说明书。本发明利用聚合酶链反应从DHV-1基因组中扩增出VP1基因，构建了含VP1基因的重组表达质粒pET32a-VP1，该质粒转化入宿主菌BL21(DE3)，体外表达VP1蛋白经镍柱纯化后作为抗原，建立酶联免疫吸附试验检测试剂盒，阳性血清为I型鸭肝炎病毒标准阳性血清，阴性对照为鸭标准阴性血清。检测试剂盒特异性强、敏感性高、操作简单，易于大范围推广应用，在I型鸭病毒性肝炎的诊断、流行病学调查和免疫监测等方面具有重要应用价值。

