



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104166000 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201410314620. 2

(22) 申请日 2014. 07. 03

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路 155 号

(72) 发明人 崔步云 姜海 杨星雅 田国忠
赵鸿雁 朴东日

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书14页
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜
的方法

(57) 摘要

本发明提供一种用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法,其是将 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白作为布鲁氏菌种间差异标识蛋白,且以 Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白作为阳性对照蛋白,对于布鲁氏菌感染血清 SAT 呈阳性的家畜, Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白与不同种的布鲁氏菌感染血清均发生反应,而 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白仅与除牛种布鲁氏菌以外的其它种的布鲁氏菌感染血清发生反应,进而判定 SAT 呈阳性的家畜为布鲁氏菌自然感染或免疫接种。通过 Western Blot 检测,证明了两种蛋白具有区分牛种和非牛种布鲁氏菌免疫血清的能力,也可以区分牛的自然感染与疫苗免疫;Omp31 和 Bp26 蛋白还可用于鉴别其他微生物与布鲁氏菌 SAT 抗原的非特异凝集反应。

1. 一种用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法,其特征在于,其是将 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白作为布鲁氏菌种间差异标识蛋白,且以 Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白作为阳性对照蛋白,对于布鲁氏菌感染血清 SAT 呈阳性的家畜,Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白与不同种的布鲁氏菌感染血清均发生反应,而 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白仅与除牛种布鲁氏菌以外的其它种的布鲁氏菌感染血清发生反应,进而判定 SAT 呈阳性的家畜为布鲁氏菌自然感染或免疫接种。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,利用蛋白免疫印迹法检测蛋白与布鲁氏菌感染血清中抗相应蛋白的特异性抗体之间的反应。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述含 His 标签的重组 Omp31 蛋白以及含 His 标签的重组 Bp26 蛋白的制备方法为:

1) 从 NCBI 上获取 bp26 和 omp31 的基因序列,分别设计引物,PCR 扩增 bp26 基因和 omp31 基因;

2) 分别对步骤 1) 的扩增产物进行酶切,然后将 bp26 基因片段与经过相同酶切的 pET30a 质粒连接,将 omp31 基因片段与经过相同酶切的 pET32a 质粒连接,分别将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆;

3) 将步骤 2) 中筛选到的阳性克隆分别接种到含相应抗生素的 LB 液体培养基中,加入诱导剂 IPTG 进行诱导,将诱导后的菌液离心,收集菌体,加入 PBS 液重悬菌体,超声破碎后离心,所得沉淀用尿素溶解,离心后收集上清,用孔径 0.45 μ m 的滤膜过滤,滤液过 His 标签蛋白纯化柱,即得含 His 标签的重组蛋白。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,用于 PCR 扩增 bp26 基因的引物包括:

上游引物:5' -CCGGAATTCATGAACACTCGTGCTAGCAA-3' 和

下游引物:5' -CCGCTCGAGTTACTTGATTTCAAAAACGACAT-3'。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,用于 PCR 扩增 omp31 基因的引物包括:

上游引物:5' -CCGGAATTCATGAAATCCGTAATTTTGGC-3' 和

下游引物:5' -CCGGAATTCATGAAATCCGTAATTTTGGC-3'。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的方法,其特征在于,所述家畜包括但不限于牛。

7. 用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的试剂盒,其特征在于,以 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白,以及 Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白作为包被抗原。

用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质组学,具体地说,涉及一种用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌 (*Bruceella*, 简称布氏菌) 是一种革兰染色阴性的兼性细胞内寄生菌, 是布鲁氏菌病 (*Bruceellosis*, 简称布病) 的病原菌。布病是一种人兽共患病, 在我国传染病防治法中属于乙类传染病。国际上, 布病被归为 B 类传染病, 在世界范围内都有流行, 特别是 2000 年以后, 布病疫情大幅度上升, 给人民群众带来严重的健康损害和经济损失。

[0003] 目前, 布鲁氏菌诊断的金标准是细菌分离培养, 但是, 布鲁氏菌培养难度大, 周期长, 且分离率低。最常用的血清学检测方法为虎红平板凝集试验 (RBPT)、试管凝集试验 (SAT)、补体结合试验 (CFT) 等, 另外, 由布鲁氏菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 包被的 ELISA 检测方法也逐步用于布病的诊断。但以上方法均无法区别试管凝集阳性血清是由于疫苗免疫还是自然感染。随着基因组学和蛋白质组学的发展, 许多科研人员着眼于寻找布鲁氏菌疫苗株与野毒株的差异蛋白, 并且进行了大量研究, 但是目前为止, 并没有找到一个能够从本质上区别疫苗株与野毒株的理想方法。

[0004] 人间布病的防控与动物布病的防控密不可分, 而且研究数据显示人间布病的流行趋势与动物布病的流行趋势相符。在我国, 牛和羊是布病主要的传染源, 因此, 控制牛和羊的布病疫情, 有利于控制人间布病的流行, 对减少国家和人民的经济损失具有重大意义。家畜布病预防的主要措施之一是疫苗的免疫接种。但是, 由于传统的检测方法无法区别家畜的自然感染和免疫接种, 如果将布病病畜误以为是免疫家畜, 会保存传染源, 对人和健康家畜带来极大威胁, 反之, 若将免疫家畜误以为是布病疫苗而淘汰宰杀, 会对国家及个人经济带来巨大损失。特别是牛作为一种布病常见传染源, 且其经济价值较高, 所以, 在目前疫情极其严重时期, 更加需要一种方法能够区别出牛是自然感染还是免疫接种, 并据此采取科学的处理措施, 最大程度的避免不必要的经济损失, 同时鉴别染疫动物保护人及其他家畜的健康。

[0005] 目前, 我国最普遍应用于牛的疫苗是 M5 和 S2, 分别是羊种和猪种布鲁氏菌的弱毒活疫苗株, 而自然感染的病牛, 主要是牛种布鲁氏菌。随着布鲁氏菌全基因组测序技术的发展, 已经有报道 bp26 基因存在于所有布鲁氏菌种中, 而且种间相当保守, 而 omp31 基因存在于除牛种之外的所有布鲁氏菌中, 所以, 将 Bp26 蛋白作为阳性对照蛋白, 而 Omp31 蛋白作为种间差异标识蛋白, 可有效地将牛种布鲁氏菌与羊种和猪种等其他布鲁氏菌种从血清学方法上区分开来, 进而判断 SAT 阳性的牛是自然感染还是免疫接种。

发明内容

[0006] 本发明主要根据家畜免疫接种疫苗株与自然感染的布鲁氏菌种的不同, 通过区分布鲁氏菌的种间差异, 间接的将疫苗接种与自然感染的家畜区分开来。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明提供一种用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法,其是将 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白作为布鲁氏菌种间差异标识蛋白,且以 Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白作为阳性对照蛋白,对于布鲁氏菌感染血清 SAT 呈阳性的家畜, Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白与不同种的布鲁氏菌感染血清均发生反应,而 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白仅与除牛种布鲁氏菌以外的其它种的布鲁氏菌感染血清发生反应,进而判定 SAT 呈阳性的家畜为布鲁氏菌自然感染或免疫接种。

[0008] 其中,所述含 His 标签的重组 Omp31 蛋白以及含 His 标签的重组 Bp26 蛋白的制备方法为:

[0009] 1) 从 NCBI 上获取 bp26 和 omp31 的基因序列 (bp26 基因的 GenBank 编号为 AY166768. 1, omp31 基因的 GenBank 编号为 AF366063. 1), 分别设计引物, PCR 扩增 bp26 基因和 omp31 基因;

[0010] 2) 分别对步骤 1) 的扩增产物进行酶切,然后将 bp26 基因片段与经过相同酶切的 pET30a 质粒连接,将 omp31 基因片段与经过相同酶切的 pET32a 质粒连接,分别将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆;

[0011] 3) 将步骤 2) 中筛选到的阳性克隆分别接种到含相应抗生素的 LB 液体培养基中,加入诱导剂 IPTG 进行诱导,将诱导后的菌液离心,收集菌体,加入 PBS 液重悬菌体,超声破碎后离心,所得沉淀用尿素溶解,离心后收集上清,用孔径 0.45 μm 的滤膜过滤,滤液过 His 标签蛋白纯化柱,即得含 His 标签的重组蛋白。

[0012] 用于 PCR 扩增 bp26 基因的引物包括:

[0013] 上游引物:5' -CCGGAATTCATGAACACTCGTGCTAGCAA-3' 和

[0014] 下游引物:5' -CCGCTCGAGTTACTTGATTTCAAAAACGACAT-3'。

[0015] 用于 PCR 扩增 omp31 基因的引物包括:

[0016] 上游引物:5' -CCGGAATTCATGAAATCCGTAATTTTGGC-3' 和

[0017] 下游引物:5' -CCGGAATTCATGAAATCCGTAATTTTGGC-3'。

[0018] 前述的方法,利用蛋白免疫印迹法 (Western Blot, 缩写 WB) 检测蛋白与布鲁氏菌感染血清中抗相应蛋白的特异性抗体之间的反应。

[0019] 本发明中涉及的家畜包括但不限于牛。

[0020] 本发明还提供一种用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的试剂盒,其是以 Omp31 蛋白或含 His 标签的重组 Omp31 蛋白,以及 Bp26 蛋白或含 His 标签的重组 Bp26 蛋白作为包被抗原。

[0021] 本发明成功构建了两种目的标识蛋白 Omp31 和 Bp26 的重组原核表达质粒,并成功的表达并纯化出两种目的标识蛋白。WB 试验结果显示, M5 疫苗免疫的血清中 6/7 表现为 Bp26 和 Omp31 均反应阳性, S2 疫苗免疫血清中 5/6 表现为两种蛋白反应阳性,自然感染的血清中 9/10 表现为 Bp26 反应阳性,而 Omp31 反应阴性。通过 WB 检测,证明了两种蛋白具有区分牛种和非牛种布鲁氏菌免疫血清的能力,也可以区分牛的自然感染与疫苗免疫; Omp31 和 Bp26 蛋白还可用于鉴别其他微生物与布鲁氏菌 SAT 抗原的非特异凝集反应。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明实施例中两种布鲁氏菌基因 PCR 扩增图 ;其中, A 为 bp26 基因扩增图 ;1. DNA marker, 2. bp26 ;B 为 omp31 基因扩增图 ;1. DNA marker, 2. omp31。

[0023] 图 2 为本发明实施例中两种重组质粒酶切鉴定图 ;其中, 1. DNA Marker ; 2. pET30a/bp26 重组质粒酶切结果 ;3. pET32a/omp31 重组质粒酶切结果。

[0024] 图 3 为本发明实施例中重组质粒 PET30a/bp26 在 BL21 (DE3) 中的表达情况 ;A 中 : 1 蛋白 Marker ;2 未转化质粒的 BL21 (DE3) 感受态细胞诱导后 ;3 未插入目的序列 PET30a 载体转化进 BL21 (DE3) 感受态细胞诱导后 ;4 重组质粒 PET30a/bp26 在 BL21 (DE3) 中未诱导 ;5 重组质粒转化产物诱导后 ;6 诱导的重组质粒超声破碎后沉淀 ;7 诱导的重组质粒超声破碎后上清 ;B 中 : 1 蛋白 Marker ;2 未转化质粒的 BL21 (DE3) 感受态细胞诱导后 ;3 未插入目的序列 PET32a 载体转化进 BL21 (DE3) 感受态细胞诱导后 ;4 重组质粒 PET32a/omp31 在 BL21 (DE3) 中未诱导 ;5 重组质粒转化产物诱导后 ;6 诱导的重组质粒超声破碎后沉淀 ;7 诱导的重组质粒超声破碎后上清。

[0025] 图 4 为本发明实施例中不同尿素浓度溶解 Bp26 重组蛋白包涵体效果图 ;A 中 : 1 蛋白 Marker ;2 未诱导对照 ;3 裂解后上清 ;4 2M 尿素溶解后上清 ;5 4M 尿素溶解后上清 ; 6 6M 尿素溶解后上清 ;7 8M 尿素溶解后上清 ;8 溶解后沉淀 ;B 中 : 1 蛋白 Marker ;2 未诱导对照 ;3 裂解后上清 ;4 诱导后对照 ;5 2M 尿素溶解后上清 ;6 4M 尿素溶解后上清 ;7 6M 尿素溶解后上清 ;8 8M 尿素溶解后上清。

[0026] 图 5 为本发明实施例中两种重组蛋白经 His 标签柱纯化后的 SDS-PAGE 电泳结果 ; A 中 : 1 Marker ;2 诱导的重组蛋白 ;3 诱导后菌液超声破碎后沉淀 ;4 诱导后菌液超声破碎后上清 ;5-8 洗脱液① - ④ ;B 中 : 1 Marker ;2-9 Omp31 蛋白洗脱液① - ⑧。

[0027] 图 6 为本发明实施例中 Western Blot 验证两种蛋白抗原性结果 ;其中, A、B、C 依次为空白对照、阴性对照、羊种 16M 免疫血清 ;其中, 空白对照是以 PBS 代替一抗进行孵育, 阴性对照是来自非疫区的健康牛血清作为一抗进行孵育 ;A-C 中, 1-3 依次代表蛋白 Marker、Bp26 和 Omp31。

[0028] 图 7 为本发明实施例中 Western Blot 检测已知血清中抗体结果 ;其中, A、B、C 依次为疫苗株 M5 免疫血清、疫苗株 S2 免疫血清、牛种菌感染的病牛血清 ;A-C 中, 1-3 依次代表蛋白 Marker、Bp26 和 Omp31。

具体实施方式

[0029] 以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。若未特别指明, 实施例均按照常规实验条件, 如 Sambrook 等分子克隆实验手册 (Sambrook J&Russell DW, Molecular cloning:a laboratory manual, 2001), 或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0030] 实施例 用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法

[0031] 根据目前我国的畜用疫苗的应用状态, 牛群布病预防途径主要是接种羊 5 号布鲁氏菌疫苗 (M5) 和猪 2 号布鲁氏菌疫苗 (S2), 而牛感染的主要是牛种布鲁氏菌。所以, 通过 Omp31 与 Bp26 在不同种间标识的存在状态不同, 可以研究在血清学的水平上将布鲁氏菌牛种菌和非牛种菌区别开, 从而间接的区分出牛是由于自然感染还是疫苗接种, 为进一步对其进行鉴别诊断处理提供必要的依据。

[0032] 1. 布鲁氏菌蛋白 bp26 和 omp31 基因的克隆表达

[0033] 1.1 目的基因的扩增

[0034] 1.1.1 引物设计从 NCBI 上获取 bp26 和 omp31 的基因序列 (bp26 基因的 GenBank 编号为 AY166768.1, omp31 基因的 GenBank 编号为 AF366063.1), 同时从网站上检测 2 个基因是否存在信号肽, 2 个基因存在信号肽的可能性为 0。然后设计限制性内切酶位点, 本实施例选用 EcoR I 和 Xho I, 运用 primer5 软件设计引物, 2 个表达基因的信息和引物见表 1 和表 2。

[0035] 表 1 两种基因序列的基本情况

[0036]

基因名称	蛋白名称	基因来源	片段长度(bp)
<i>bp26</i>	Bp26	羊种布鲁氏菌 16M	753
<i>omp31</i>	Omp31	羊种布鲁氏菌 16M	723

[0037] 表 2 两种布鲁氏菌基因克隆表达设计引物

[0038]

基因	上游引物	下游引物
<i>bp26</i>	5'-CCGGAATTCATGAACACTCGT GCTAGCAA-3'	5'-CCGCTCGAGTTACTTGATTCA AAAACGACAT-3'
<i>omp31</i>	5'-CCGGAATTCATGAAATCCGTA ATTTTGGC-3'	5'-CCGGAATTCATGAAATCCGTA ATTTTGGC-3'

[0039] 1.1.2 PCR 扩增以及产物回收

[0040] (1) PCR 20 μ L 扩增体系: HiFi Mix 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 模板 (16M) 0.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

[0041] PCR 循环条件: 95°C 5min; 95°C 1min, 62°C 1min, 72°C 2min, 30 个循环; 72°C 5min; PCR 产物于 4°C 保存。

[0042] (2) 扩增所得的 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪下观察结果。对已鉴定的 PCR 产物进行切胶纯化, 使用凝胶回收试剂盒进行回收。PCR 扩增结果见图 1。

[0043] 1.2 目的基因连接 T 载体

[0044] 1.2.1 连接

[0045] 10 μ L 连接体系: PMD18-T 载体 1 μ L, PCR 产物 3 μ L, 连接溶液 I 5 μ L, ddH₂O 1 μ L, 于 16°C 连接过夜。

[0046] 1.2.2 转化

[0047] 取 10 μ L 连接产物转化到 50 μ L 的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。转化方法: DH5 α 感受态细胞放于冰上 10min, 待其融化, 将 10 μ L 连接产物与 50 μ L 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞混匀后放置于冰上 30min。42°C 热激 90s, 立刻放于冰上 90s。加入 500 μ L 的 LB 培养基, 混匀, 37°C, 220rpm 摇菌 45 ~ 60min, 取出 200 μ L 菌液均匀涂在含有抗性的平板上, 37°C 培养过夜。

[0048] 1.2.3 阳性克隆子鉴定

[0049] 取出过夜培养平板,随机挑取几个单克隆,种在新的抗性平板上保存,接种环上残留的菌加到 PCR 体系中做菌落 PCR 鉴定。PCR 扩增体系:HiFi Mix $10\mu\text{L}$;上、下游引物各 $0.5\mu\text{L}$;ddH₂O $9\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件:95℃ 10min;95℃ 1min,62℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 5min;4℃ 保存扩增产物。将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外下观察结果,是否扩增出了预期的目的条带。

[0050] 阳性克隆子接种到新鲜的含 0.1mg/ml Amp(kana) 的新鲜 LB 液体培养基中,过夜摇菌,提取质粒,以质粒为模板对其进行质粒 PCR 鉴定,质粒 PCR 体系与普通 PCR 相同。鉴定为阳性的克隆子标记为 T/bp26 和 T/omp31。

[0051] 测序:将 T/bp26 和 T/omp31 阳性克隆子质粒,送至北京天一辉远生物科技有限公司,利用 T 载体通用引物测序。测序后的序列与原始序列用 blast 比对,看有无突变,选用无任何突变的克隆子继续进行后续的试验。

[0052] 1.3 重组质粒的构建**[0053]** 1.3.1 酶切回收目的片段和表达质粒

[0054] 将 T/bp26 和 T/omp31,与表达载体 kana 抗性和 Amp 抗性同时用两种限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切反应,酶切体系为 $30\mu\text{L}$ 体系:重组 T 载体质粒或表达载体各 $20\mu\text{L}$, $10\times$ 缓冲液 H3 μL , ddH₂O $5\mu\text{L}$,限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 各 $1\mu\text{L}$ 。酶切条件:37℃ 4h。酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切效果,并在紫外灯下切割目的条带,按照天根公司的普通凝胶回收试剂盒进行核酸回收。回收后的片段进行 1% 琼脂糖凝胶电泳查看回收效果。存放于 -20℃ 备用。

[0055] 1.3.2 连接目的片段和表达载体

[0056] 根据酶切后的目的基因和表达载体条带亮度粗略估计其浓度比,按照待插入的目的基因片段与酶切载体的摩尔比为 3-6:1,计算其体积比,将二者连接。若二者条带亮度相当,连接体系为($10\mu\text{L}$):目的基因 $6\mu\text{L}$,表达载体 $2\mu\text{L}$,T4DNA 连接酶 $1\mu\text{L}$,T4DNA 连接酶缓冲液 $1\mu\text{L}$ 。连接条件:16℃,过夜连接。

[0057] 1.3.3 转化

[0058] 将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞:从 -80℃ 超低温冰箱中取出 DH5 α 感受态细胞放于新冰上 10min,待其融化,向感受态细胞中加入连接产物 $10\mu\text{L}$,轻轻旋转离心管以混匀内容物,在冰浴中静置 30min,将离心管置于 42℃ 水浴中放置热激 90s,然后快速将管转移到冰浴中 90s,此过程不要摇动离心管。然后向离心管中加入 $500\mu\text{L}$ 的 LB 培养基中,混匀后置于 37℃ 摇床振荡培养 45min,目的是使质粒上相关的抗性基因表达,使菌体复苏;然后将离心管内容物混匀,吸取 $100\mu\text{L}$ 已转化的感受态细胞加到含相应抗生素的 LB 培养基上,用无菌接种环将细胞均匀涂开。将平板置于室温直至液体被吸收,倒置平板,37℃ 培养过夜。

[0059] 1.4 阳性克隆子的筛选和鉴定

[0060] 随机挑取若干单菌落种在新的抗性平板上以便保存,接种环上残留的菌加到 PCR 体系中做菌落 PCR 鉴定,并将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,紫外下观察结果,是否扩增出了预期的目的条带。

[0061] 经菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆子接种到含相应抗性的新鲜 LB 液体培养基中,

220rpm, 37°C 过夜摇菌, 用天根公司的质粒小提试剂盒提取重组质粒, 进行质粒 PCR 鉴定。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 紫外下观察结果, 是否扩增出预期的目的条带。

[0062] 对菌落 PCR 鉴定阳性的克隆子进行质粒 PCR 和双酶切鉴定。

[0063] 质粒 PCR 体系: HiFi Mix 10 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 质粒 1 μ L, ddH₂O 0.5 μ L。PCR 循环条件: 95°C 5min; 95°C 1min, 62°C 1min, 72°C 2min, 30 个循环; 72°C 5min;

[0064] 酶切体系 (10 μ L): 重组质粒 5 μ L, 10 \times 缓冲液 H1 1 μ L, 双蒸水 3 μ L, 限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 各 0.5 μ L。酶切条件: 37°C 4h。

[0065] 质粒 PCR 产物及酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外光下观察是否在预期位置酶切得到了相应的条带。鉴定结果如图 2 所示。

[0066] 将重组质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 取感受态细胞置于冰浴中, 向感受态细胞中加入重组质粒 1 μ L, 冰上放置 30min 后, 然后向离心管中加入 800 μ L 的 LB 培养基中, 混匀后置于 37°C 摇床振荡培养 45min; 吸取 100 μ L 已转化的感受态细胞加到含相应抗生素的 LB 培养平板上, 用无菌接种环将细胞均匀涂开, 37°C 培养过夜。挑选单菌落接种于 5mL 含相应抗性的 LB 液体培养基中, 37°C, 200rpm 摇床过夜, 用质粒小提试剂盒抽提质粒, 质粒 PCR 鉴定。成功构建的重组质粒标记为 PET30a/bp26 和 PET32a/omp31。

[0067] 1.5 重组质粒的诱导及表达

[0068] 挑取阳性克隆接种到含相应抗性的 LB 液体培养基中, 过夜摇菌。将过夜的菌液按 1:100 的比例加入 5ml 含相应抗性的新鲜 LB 液体培养基中, 37°C, 220rpm 摇至菌液 OD 值约为 0.6 ~ 1.0 时加入诱导剂 IPTG, 使其终浓度为 1.0mM。37°C, 220rpm 诱导 4h。将诱导后的菌液 12000rpm 离心 5min, 弃上清, 用 PBS 洗涤 2 次, 沉淀用 30 μ L PBS 悬浮, 加入 10 μ L 4 \times 蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 8min, SDS-PAGE 电泳进行鉴定, 观察表达结果。选取诱导蛋白量最大的 IPTG 浓度, 重新对菌液进行诱导后, 用 0.01M 的 PBS 洗菌 2 次, 200 μ L PBS 混悬菌体, 冰浴超声破碎处理, 超声 2s, 间歇 3s, 共超 2min; 4°C, 12000rpm 离心 5 分钟, 分离上清和沉淀, 沉淀加入 PBS 悬浮, 取 30 μ L 沉淀或上清与 10 μ L 4 \times 蛋白上样缓冲液混合, 煮沸后跑 SDS-PAGE 电泳, 观察结果。SDS-PAGE 结果见图 3。

[0069] SDS-PAGE 电泳方法:

[0070] 首先, 配制 SDS-PAGE 凝胶, 分离胶浓度 15%, 浓缩胶浓度 5%, 准备 SDS-PAGE 电泳; 将处理好的蛋白样品与蛋白标准品——预染的蛋白 marker 按一定顺序加入加样孔中, 按其中蛋白含量确定加样量; 电压 80V, 30min, 待溴酚蓝进入分离胶后, 换 120V 继续电泳 2h 左右; 待溴酚蓝到达距凝胶底部 1cm 左右时终止。取出凝胶, 置于 5 倍体积的考马斯亮蓝染液中染色 2h, 然后用脱色液脱色 4h, 肉眼观察或用凝胶成像仪成像。

[0071] 重组质粒诱导表达结果: 两种基因 bp26 和 omp31 表达蛋白的大小应该分别为 27.6kDa 和 26.5kDa。pET30a 的标签大小为 5kDa, 而 pET32 的标签是一个 18kDa 的融合蛋白, 故理论上 Bp26 蛋白条带应该位于 32kDa 左右, 而 Omp31 蛋白条带应该位于 44kDa 左右。结果显示, pET30a/bp26 重组克隆和 pET32a/omp31 重组克隆均在目的位置有蛋白被诱导出来, 超声裂解之后, 发现两种重组蛋白均主要以包涵体的形式存在于沉淀中。

[0072] 1.6 蛋白的纯化

[0073] 1.6.1 包涵体溶解最佳尿素浓度的优化

[0074] 将含有阳性克隆子的细菌接种进 10ml 含相应抗性的新鲜 LB 液体培养基中, 按照

以上的方法进行诱导表达,诱导完成以后,按上述方法收集菌体,洗涤并超声破碎,离心,分别收集上清和沉淀,将沉淀混悬于 2M 尿素溶液中溶解,放置 30 分钟,10000rpm 离心,收集上清和沉淀,所得的沉淀继续用 4M 尿素溶解,而后依次将前次所得的沉淀用 6M、8M 尿素溶液溶解,收集各次离心所得的上清以及最后一次离心的沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳,确定对包涵体的溶解作用最强的尿素浓度,SDS-PAGE 结果见图 4。

[0075] 将诱导后的菌液超声破碎后,沉淀依次用 2M、4M、6M 和 8M 的尿素溶解所得结果如图 4 所示,在最大浓度 8M 的尿素的溶解下,依然有部分蛋白溶出,说明 8M 的尿素溶解蛋白最彻底,因此选用 8M 作为溶解包涵体的最适尿素浓度。

[0076] 1.6.2 蛋白纯化

[0077] 含有阳性克隆子的细菌接种进 600ml 含相应抗性的 LB 液体培养基中进行大量诱导,8000rpm 离心 30min 收集菌体,PBS 洗三遍。将菌体混悬于 50ml PBS 中,冰浴超声破碎,超声 5s,间隔 10 秒,60W,超声 20min。10000rpm 离心 20min。所得沉淀用 8M 尿素溶解 30min 后,10000rpm 离心 20min,收集上清,并用 0.45 μ m 的滤膜过滤备用。

[0078] 注射器手推纯化:His 标签蛋白纯化柱(5ml)依次用 5-10 柱体积的纯水和结合缓冲液过柱,清洗以及平衡柱子;将过滤后的蛋白注射器手推过柱,流速控制在 0.5-5ml/min 范围之内;上样完成后,用至少 5-10 柱体积的结合缓冲液过柱,洗去不能跟柱子结合的杂蛋白;然后用 5-10 柱体积的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白,收集洗脱液时分管收集,以保证蛋白的浓度;洗脱完成以后,在另外用 10 体积洗脱缓冲液过柱,彻底洗去残留的蛋白,再用 10-15 柱体积的纯水过柱,最后用 5 体积 20%乙醇过柱,保存柱子备用。

[0079] BP26 蛋白过柱纯化以后,洗脱液分四管收集,其中①、②管蛋白含量较多,浓度相当,③、④管蛋白很少,几乎可以忽略,所以弃去这两管收集液,合并①、②管的收集液,留作后续试验备用。Omp31 蛋白纯化后洗脱液分 8 管收集,标为①-⑧管,其中②、③管蛋白含量较多,合并备用,弃去其他几管收集液。

[0080] 将分管收集的各管蛋白跑 SDS-PAGE 电泳,对比纯化效果,并用 Bradford 法蛋白定量试剂盒检测各管蛋白浓度,选取浓度最适宜的蛋白进行后续试验,SDS-PAGE 结果见图 5。

[0081] 2Western Blot 分析

[0082] 2.1 两种目的蛋白的抗原性验证

[0083] 克隆表达以及纯化后得到的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完成后,将准备好的 NC 膜在转膜液里浸泡 5min,用“夹心法”安装转膜装置,即从上到下按照海绵、滤纸、SDS-PAGE 胶、NC 膜、滤纸、海绵的顺序固定装置,注意各层之间不能有气泡。NC 膜朝向正极,恒流 200mA 湿转 2h。

[0084] 转膜后的 NC 膜,用 PBS 稍加洗涤,然后转入封闭液(含 0.5% Tween 的 PBS 配成 5%的脱脂奶粉),4℃过夜封闭。

[0085] 将封闭后的 NC 膜置于 1:100 稀释的一抗羊种菌 16M 免疫绵羊血清稀释液,37℃,50rpm 缓慢摇动孵育 2h,孵育完成后,倒掉一抗稀释液,PBS 洗膜三遍,每次 10min。加 1:30000 稀释的二抗稀释液(HRP 标记的鼠抗绵羊/山羊/牛 IgG),37℃,50rpm 缓慢摇动孵育 2h,孵育完成后,倒掉二抗稀释液,PBS 洗膜三遍,每次 10min。洗膜后加入显色液 DAB,缓慢摇动显色 1-2min,加蒸馏水终止显色反应。各种免疫血清的 WB 结果见图 6 和图 7。

[0086] 2.2 Western Blot 法检测血清样本

[0087] 血清样本来源见表 3- 表 5。

[0088] 表 3 M5 免疫血清

[0089]

血清编号	原始编号	动物种类	免疫途径	血清来源
1	M5	羊	皮下注射	中国 CDC 传染病所 布鲁氏菌病研究室
2	15	羊	皮下注射	中国农业大学
3	18	羊	皮下注射	中国农业大学
[0090]				
4	48	羊	皮下注射	中国农业大学
5	52	羊	皮下注射	中国农业大学
6	82	羊	皮下注射	中国农业大学
7	84	羊	皮下注射	中国农业大学
8	91	羊	皮下注射	中国农业大学
9	98	羊	皮下注射	中国农业大学

[0091] 表 4 S2 免疫血清

[0092]

血清编号	原始编号	动物种类	免疫途径	血清来源
1	S2	牛	皮下注射	中国 CDC 传染病所 布鲁氏菌病研究室
2	57(第 4 周)	牛	口服免疫	中国农业大学
3	48 (第 2 周)	牛	口服免疫	中国农业大学
4	46 (第 4 周)	牛	口服免疫	中国农业大学
5	45 (第 12 周)	牛	口服免疫	中国农业大学
6	10 (第 8 周)	牛	口服免疫	中国农业大学
7	51 (第 2 周)	牛	口服免疫	中国农业大学
8	N15	牛	口服免疫	中国农业大学
9	N38	牛	口服免疫	中国农业大学
10	N28	牛	口服免疫	中国农业大学

[0093] 表 5 自然感染牛血清

[0094]

血清编号	原始编号	动物种类	血清来源
1	8129	牛	河南
2	8175	牛	河南
3	8148	牛	河南
4	9103	牛	河南
5	9136	牛	河南
6	9075	牛	河南
7	9090	牛	河南
8	5057	牛	河南
9	9077	牛	河南
10	7161	牛	河南

[0095] 血清样品的检测结果：从各血清样品的检测结果来看，共检测 9 份 M5 疫苗免疫血清、10 份 S2 疫苗免疫血清，10 份自然感染的牛血清，在 M5 免疫的血清中，有 7 份 SAT 试验阳性，其中 6 份 Bp26 和 Omp31 均呈阳性，1 份表现为二者均阴性，SAT 阴性血清的 western blot 试验，两种蛋白均表现为阴性；在 S2 免疫血清中，有 6 份 SAT 试验阳性，其中的 5 份 Bp26 和 Omp31 均阳性，4 份 SAT 阴性血清中，Bp26 和 Omp31 均为阴性。自然感染的 10 份牛血清中，有 9 份出现预期结果，即 Bp26 为阳性且 Omp31 为阴性，1 份 Bp26 和 Omp31 均显示阴性。

[0096] 表 6 各种布鲁氏菌阳性血清 Western Blot 结果

[0097]

	血清编号	试管效价	Bp26	Omp31
M5 免疫 血清	1	1:1600	+	+
	2	1:800	+	+
	3	-	-	-
	4	1:400	+	+
	5	1:800	+	+
	6	1:100	-	-
	7	1:400	+	+
	8	1:800	+	+
	9	-	-	-
S2 免疫 血清	1	1:1600	+	+
	2	1:400	+	+
	3	1:400	+	+
	4	1:200	+	+
	5	-	-	-
	6	1:400	+	+
	7	1:200	-	-
	8	-	-	-
	9	-	-	-
	10	-	-	-
自然 感染 牛种 菌血 清	1	1:400	+	-
	2	1:1600	+	-
	3	1:3200	+	-
	4	1:1600	+	-
	5	1:400	-	-
	6	1:400	+	-
	7	1:200	+	-
	8	1:800	+	-
	9	1:800	+	-
	10	1:800	+	-

[0098] 针对自然感染病畜与疫苗免疫动物难以区分的问题,之前的研究从羊种布鲁氏菌野毒菌株 16M 和疫苗菌株 M5 进行差异蛋白的分析入手,研究发现部分功能蛋白从野毒株到疫苗株的变异过程中发生了表达量上调或下调的现象,但未能找到可以表现出从无到有或者从有到无变化的蛋白,因此,也就未能成功找到具有鉴别野毒株和疫苗株能力的差异蛋白。

[0099] 在本发明中,基于已有的研究成果,通过查阅相关文献,在对布鲁氏菌蛋白质 2-D 电泳和质谱分析的基础上,掌握了各种蛋白的特性,结合牛感染布鲁氏菌的规律和菌株特

征,以及国内疫苗使用状况,从应用的角度区分布鲁氏菌阳性的血清是牛种菌还是非牛种菌感染形成的种间差异,以此间接地将牛是自然感染还是疫苗免疫区分开。

[0100] 本发明所用的两种表达载体 pET30a 和 pET32a 均属于 pET 系列,目的片段插入该系列表达载体后,受噬菌体 T7 强转录及翻译(可选择)信号控制;表达由宿主细胞提供的 T7RNA 聚合酶诱导。T7RNA 聚合酶机制十分有效并具选择性:充分诱导时,几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白;诱导表达后仅几个小时,目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的 50% 以上。而在非诱导条件下,可以使目的基因完全处于沉默状态而不转录。pET30a 由 T7 启动子、T7 终止子,卡纳抗性基因、lac 调控基因、His 标签基因和 S 标签基因以及各酶切位点组成。

[0101] 本发明选取的酶切位点为 EcoR I 和 Xho I 两种,因此表达产物应为带有 His 标签的融合蛋白;pET32a 由 T7 启动子、T7 终止子、氨苄抗性基因、lac 调控基因、His 标签(组氨酸标签)基因、Trx 标签(硫氧还蛋白标签)基因以及 S 标签基因以及各酶切位点组成,在两酶切位点之间插入目的片段,所以表达产物应为带有以上三种标签的融合蛋白。His 标签是蛋白纯化标签,特别是以包涵体形式存在的蛋白,可以将蛋白在完全变性的条件下溶解后,进行亲和纯化;Trx 标签可以增加表达蛋白的溶解性,硫氧还蛋白可以驱动二硫键的形成,促进蛋白的正确折叠,增加其可溶性。

[0102] 本发明中,最初通过扩增 omp31 和 bp26 目的基因,构建了原核表达重组质粒 pET30a/bp26、pET30a/omp31,经过双酶切和测序证明插入片段与目的片段完全一致,经过 IPTG 诱导大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞后,成功表达出了 Bp26 融合蛋白,但 pET30a/omp31 却未能诱导出蛋白。进一步对诱导剂浓度、诱导温度、诱导时间等条件参数进行探索,成功表达出 Omp31 融合蛋白。

[0103] 本发明的两种目的蛋白中,Bp26 作为阳性对照标识蛋白,其抗体应存在于所有布鲁氏菌阳性的血清中。从试验结果中可以看出,在 23 份试管凝集试验阳性血清中,有 21 份血清都与 Bp26 蛋白产生抗原抗体反应,符合率为 91%,与文献报道的 bp26 作为抗原检测布病抗原的准确率 90% 这一结果相符,达到了预期的目的。

[0104] Omp31 作为种间差异的鉴别标识蛋白,牛种菌感染不会产生该蛋白的抗体,而非牛种菌感染血清中均存在其抗体,在本发明中也验证了这一理论。在 13 份非牛种菌的免疫血清中,有 11 份均与 Omp31 蛋白产生了免疫条带,而在 10 份自然感染的牛血清中,都没有与 Omp31 发生特异性抗原抗体反应,证明它具有鉴别牛种菌和非牛种菌感染血清的能力。

[0105] 有部分免疫的动物血清未能产生出布病的抗体,而 SAT 试验也呈阴性,分析原因,可能由于各动物的免疫方式,个体差异以及采血时间不同,接种疫苗后,并不是所有的动物都能够出现抗体,有研究结果显示,S2 口服免疫奶牛 15d 后,可检出布鲁氏菌抗体,30d 达到高峰,45 ~ 90d 后抗体滴度和性率呈现缓慢下降趋势,而且在不同的研究中,由于免疫方法不同,试管凝集试验检测到的抗体效价差别较大,从 5% ~ 60% 不等。因此,口服接种 S2 株布鲁氏菌疫苗诱导形成的抗体水平较低,消失比较缓慢。另外,这些未产生抗体的家畜更可能是因为,虽然按照正常剂量对其进行了接种,但是布鲁氏菌疫苗接种不成功,未产生相应布鲁氏菌抗体。本发明中,免疫方法已无从考证,但是 SAT 阴性的这部分血清两种蛋白都是阴性,所以并不影响结论。

[0106] 除去 SAT 阴性血清不予考虑外,6/7 的 M5 疫苗免疫阳性血清,5/6 的 S2 免疫阳性

血清均出现预期结果,即 Bp26 和 Omp31 均出现阳性反应条带;而自然感染牛阳性血清中,9/10 的血清为 Bp26 阳性而 Omp31 阴性反应。所以,通过血清的 western blot 试验验证得到,Bp26 和 Omp31 可以比较有效的区分牛种菌与非牛种布鲁氏菌的感染。

[0107] 另外,自然感染血清中 5 号标本的 SAT 试验结果为阳性,而 Western Blot 结果为 Bp26 和 Omp31 均出现阴性反应,分析其原因,该血清可能并非布鲁氏菌感染的血清,而是其它微生物感染后出现的抗体与 SAT 的抗原出现的交叉凝集反应,从而表现为 SAT 阳性。由于本发明所用的自然感染的血清是直接采自感染动物,以目前的阳性判定标准 SAT 试验判断的其为阳性,并没有分离到病原菌。而 SAT 所用的抗原为菌体抗原,其成分比较复杂,有可能与很多微生物感染的血清出现交叉凝集。本发明所用的抗原是布鲁氏菌所特有的两种蛋白,因此,如果是其他微生物感染产生的抗体,则不会与这两种蛋白发生特异的抗原抗体反应。由此可见,通过 Bp26 和 Omp31 的进一步检测试验,可以排除其它微生物与布鲁氏菌 SAT 抗原的交叉凝集现象,这一点还需进一步试验证明。

[0108] 本发明中采用 WB 方法检测蛋白与血清中抗体的反应,主要考虑到其灵敏度高,适用于定性结果的检测。

[0109] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0110] 参考文献

[0111] [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 北京:中国农业出版社,2001.

[0112] [2] 肖东楼. 布鲁氏菌病防治手册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2008.

[0113] [3] 尚德秋. 布鲁氏菌病流行病学研究现状 [J]. 中华流行病学杂志,1984(02).

[0114] [4] 崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制 [J]. 疾病监测,2007,22(10):649-651.

[0115] [5] Deqiu S, Donglou X, Jiming Y. Epidemiology and control of brucellosis in China [J]. Vet Microbiol, 2002, 90(1-4):165-182.

[0116] [6] Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24(12):845-845.

[0117] [7] Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, et al. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and parafn-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, 59:23-32.

[0118] [8] Bounaadja L, Albert d, Chenais B, et al. Real-time PCR for identification of *brucella* spp: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes [J]. Vet microbiol, 2009, 137:156-164.

[0119] [9] Sangari fJ, Aguero J. Identification of *brucella abortus* b19vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus [J]. Vaccine, 1994, 12:435-438.

[0120] [10] 姜海, 崔步云, 赵鸿雁, 等. AMOS-PCR 对布鲁氏菌种型鉴定的应用 [J]. 中

国人兽共患病学报, 2009, 25(2):107-109.

[0121] [11] Rees RK, Graves M, Caton N, et al. Single tube identification and strain typing of brucella melitensis by multiplex PCR[J]. J microbiol methods, 2009, 78:66-70.

[0122] [12] 刘国栋, 崔步云, 刘荣臻, 等. 布鲁氏菌多重聚合酶链反应鉴定研究 [J]. 疾病监测, 2008, 23(5):271-273.

[0123] [13] 刘志国, 张利, 崔步云, 等. 应用 PCR 方法快速检测布鲁氏菌核酸的研究进展 [J]. 疾病监测, 2010, 25(9):746-751.

[0124] [14] Tibor A, Wansard V, Bielartz V, et al. Effect of omp10 or omp19 Deletion on Brucella abortus Outer Membrane Properties and Virulence in Mice [J]. Infect Immun, 2002, 70(10):5540-5546.

[0125] [15] 张洪丽. 羊种布鲁氏菌强毒株 16M 和疫苗株 M5 蛋白质组学分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

[0126] [16] 顾超慧. 布鲁氏菌强毒株 16M 和疫苗株 M5 蛋白质组学分析 [D]. 内蒙: 内蒙农业大学, 2009.

[0127] [17] Patricia SM, Verger JM, Grayon M, et al. Epitope mapping of the Brucella melitensis BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(4):647-651.

[0128] [18] Arese AI, Cravero SL, Rossetti OL, et al. Use of a recombinant protein from Brucella abortus for the diagnosis of brucellosis in different animal species [J]. Rev Agent Microbiol, 1999, 07(31):36-39.

[0129] [19] 唐利燕, 陈创夫等. 布鲁氏菌 bp26 基因的原核表达及 BP26 间接 ELISA 方法的初步建立 [J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2009, 27(4).

[0130] [20] Letesson JJ, Tibor A, Eynde GV, et al. Humoral Immune Responses of Brucella-Infected Cattle, Sheep, and Goats to Eight Purified Recombinant Brucella Proteins in an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1997, 4(5):556-564.

[0131] [21] Liu WX, Hu S, Qiao ZJ, et al. Expression, purification and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of Brucella melitensis M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats [J]. Biotechnol Appl Biochem. 2011, 58(1):32-38.

[0132] [22] 黄泓, 张伟. 包涵体体外复性研究进展 [J]. 生命的化学, 2003(05):398-400.

[0133] [23] 宁云山, 李妍, 王小宁. 包涵体蛋白质复性研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2001, 12(3):237-240.

[0134] [24] 纪剑飞, 张成刚. 包涵体重组蛋白的纯化及复性 [J]. 沈阳药科大学学报, 1998(04):303-307.

[0135] [25] 吉清, 何凤田. 包涵体复性的研究进展 [J]. 国外医学 (临床生物化学与检验学分册), 2004, 6:516-518.

- [0136] [26] 杨晓梅. 包涵体蛋白的复性技术 [J]. 国外医学 (临床生物化学与检验学分册), 2000, 21 (02):98-99.
- [0137] [27] 王天齐, 史开志, 肖硕, 等. S2 株布氏杆菌减毒活疫苗免疫效果观察 [J]. 中国奶牛, 2011, 6:44-46.
- [0138] [28] 风英, 刘晓松, 牧仁. S2 疫苗对奶牛布氏杆菌病防制效果及安全性试验 [J]. 中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十三次学术研讨会, 2009.
- [0139] [29] 韩磊, 傅彩霞, 靳兴军. 奶牛接种布氏杆菌 S2 疫苗后抗体消长规律 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45 (3).

[0001]

序列表

- <110> 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所
 <120> 用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法
 <130> KHP141113025.8
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 1
 ccggaattca tgaacactcg tgctagcaa 29
- <210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 2
 ccgctegagt tacttgattt caaaaacgac at 32
- <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 3
 ccggaattca tgaaatccgt aattttggc 29
- <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <400> 4
 ccggaattca tgaaatccgt aattttggc 29

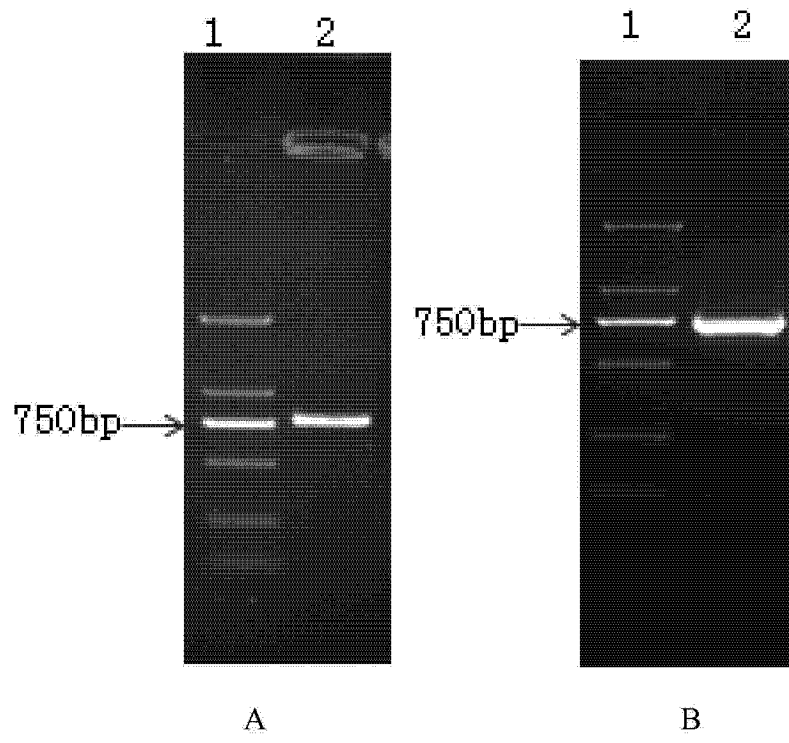


图 1

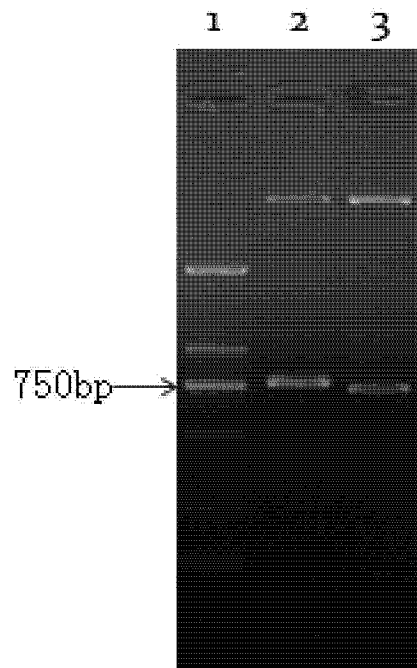


图 2

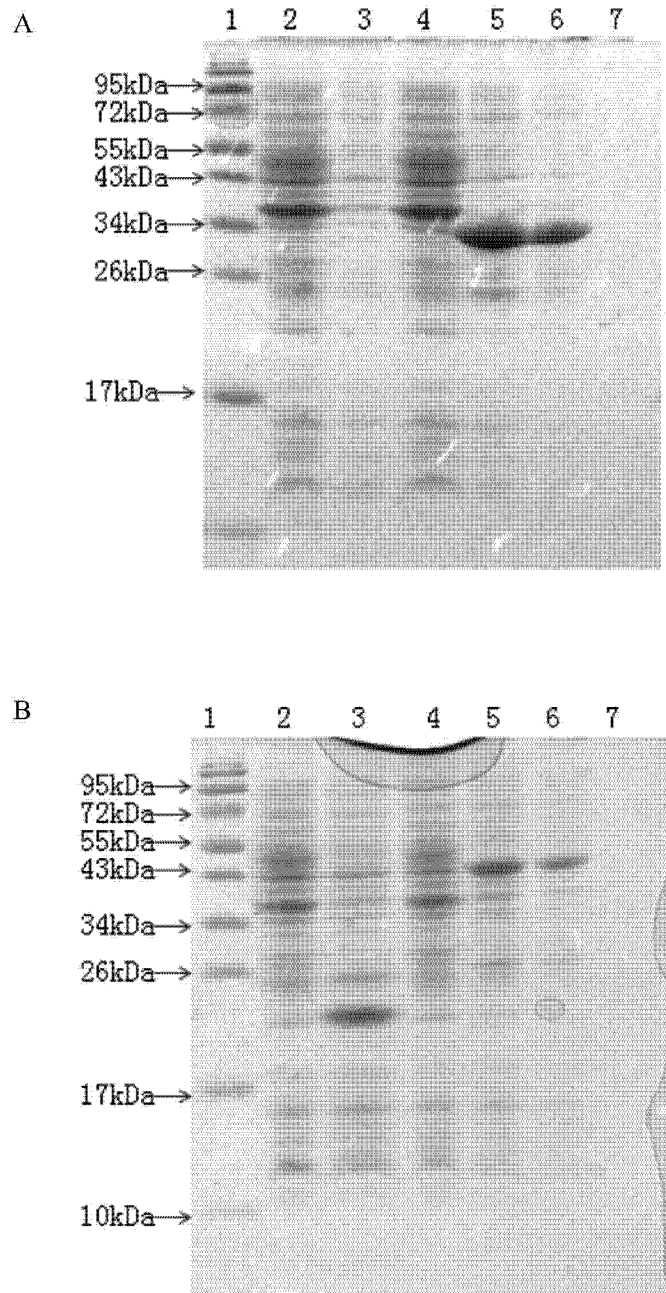


图 3

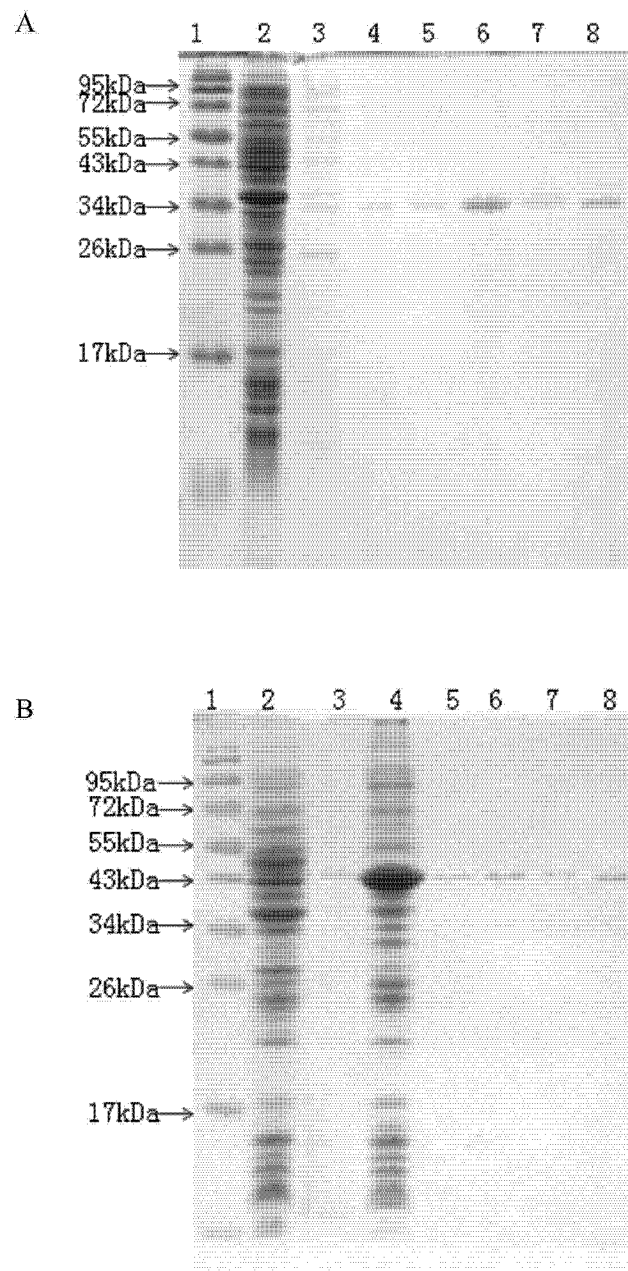


图 4

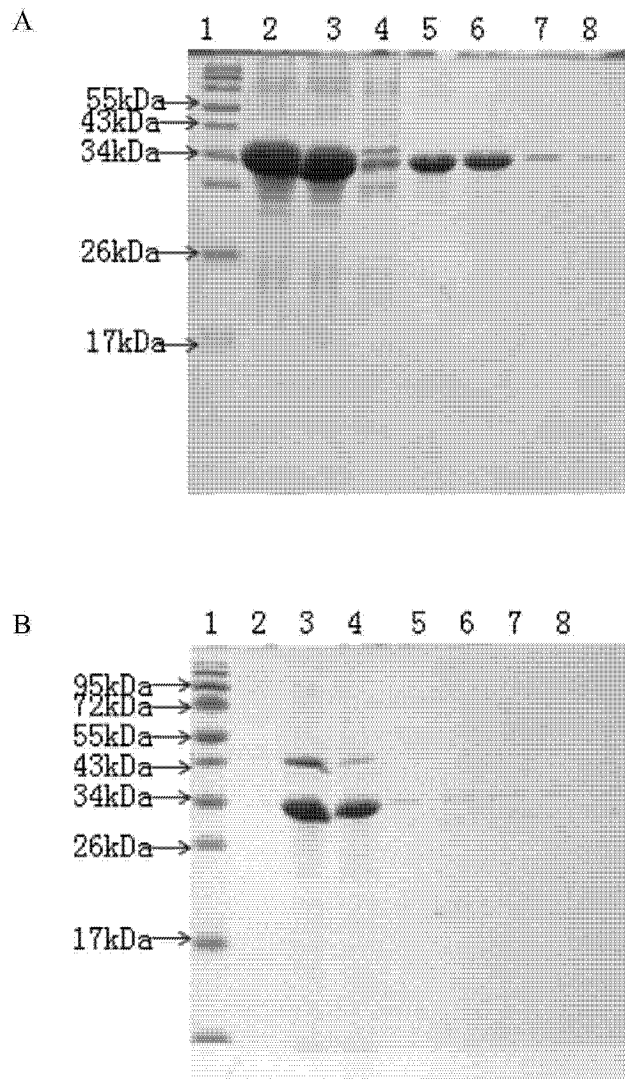


图 5

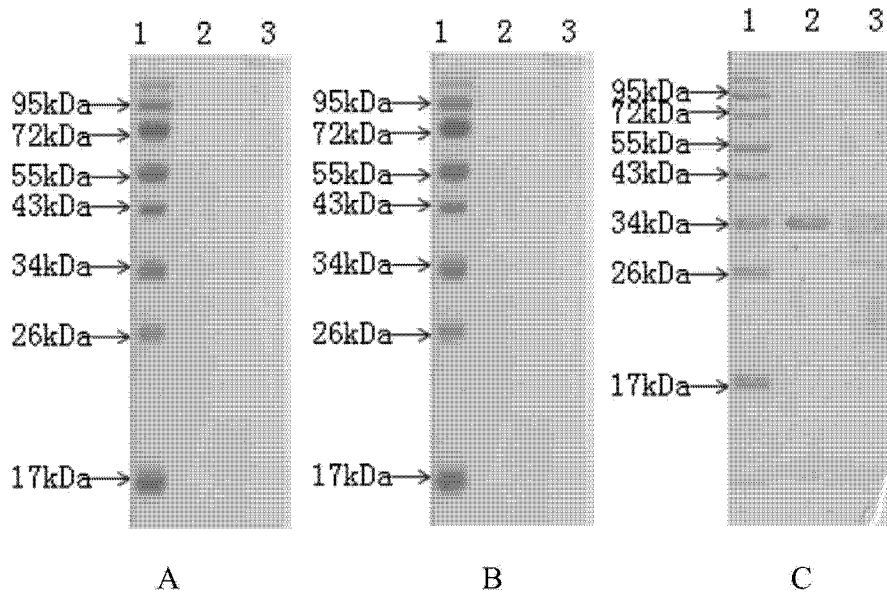


图 6

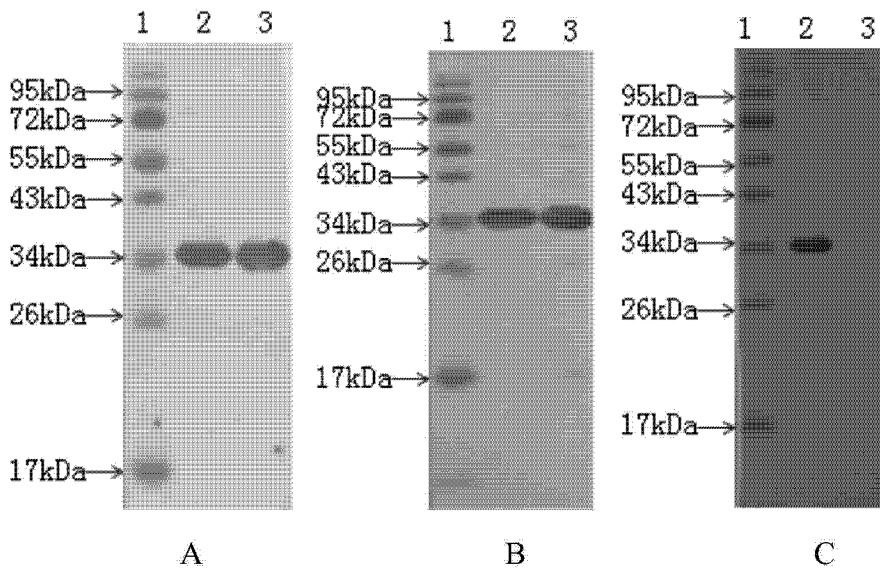


图 7

专利名称(译)	用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法		
公开(公告)号	CN104166000A	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	CN201410314620.2	申请日	2014-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	崔步云 姜海 杨星雅 田国忠 赵鸿雁 朴东日		
发明人	崔步云 姜海 杨星雅 田国忠 赵鸿雁 朴东日		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/68 G01N2333/23		
代理人(译)	王文君		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用于鉴定布鲁氏菌自然感染或免疫接种家畜的方法，其是将Omp31蛋白或含His标签的重组Omp31蛋白作为布鲁氏菌种间差异标识蛋白，且以Bp26蛋白或含His标签的重组Bp26蛋白作为阳性对照蛋白，对于布鲁氏菌感染血清SAT呈阳性的家畜，Bp26蛋白或含His标签的重组Bp26蛋白与不同种的布鲁氏菌感染血清均发生反应，而Omp31蛋白或含His标签的重组Omp31蛋白仅与除牛种布鲁氏菌以外的其它种的布鲁氏菌感染血清发生反应，进而判定SAT呈阳性的家畜为布鲁氏菌自然感染或免疫接种。通过Western Blot检测，证明了两种蛋白具有区分牛种和非牛种布鲁氏菌免疫血清的能力，也可以区分牛的自然感染与疫苗免疫；Omp31和Bp26蛋白还可用于鉴别其他微生物与布鲁氏菌SAT抗原的非特异凝集反应。

基因名称	蛋白名称	基因来源	片段长度(bp)
<i>bp26</i>	Bp26	羊种布鲁氏菌 16M	753
<i>omp31</i>	Omp31	羊种布鲁氏菌 16M	723