



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103808945 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410088234. 6

(22) 申请日 2014. 03. 12

(73) 专利权人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街 61 号

(72) 发明人 成子强 王言明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

审查员 胡晓佳

权利要求书1页 说明书8页

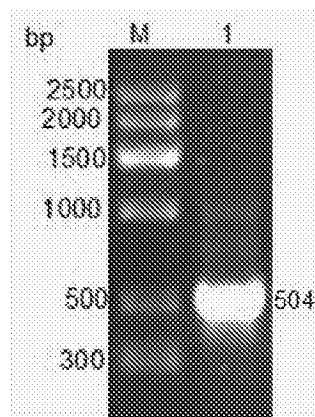
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条

(57) 摘要

本发明提供了一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条, 其中最主要的是采用了原核表达后纯化的 J 亚群禽白血病病毒表面蛋白偶联免疫胶体金, 利用该胶体金可以快速检测血清中的 J 亚群禽白血病抗体, 进而为鸡群 J 亚群禽白血病精准快速诊断提供技术保障。通过 Western Blot 检测表达的 gp85 蛋白能够与 JE9 单抗和抗 HIS 标签抗体发生特异性反应, 表明具有良好的特异性。



1. 一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条, 其特征在于: 采用了原核表达后纯化的 J 亚群禽白血病病毒表面蛋白偶联免疫胶体金, 其中所述的原核表达后纯化的 J 亚群禽白血病病毒表面蛋白为带有 HIS 标签的融合蛋白 His-gp85,

所述试纸条, 包括支撑层和吸附层, 吸附层固定在支撑层上, 吸附层从测试端依次为样品吸附纤维层、金标 SU 蛋白纤维层、纤维素膜层及吸水材料层; 在所述的纤维素膜层中部有一条包被 J 亚群禽白血病 SU 蛋白的检测线和一条包被 SU 蛋白兔多克隆抗体的质控线, 所述的纤维素膜层一端嵌入金标 SU 蛋白纤维层, 另一端嵌入吸水材料层中;

所述试纸条的制备方法如下:

根据现有的 ALV-J 设计特异性引物, 所述的正向引物为 5'-GCGGATCCATCAAGAACGGAACAACACG-3', 含 BamH I 酶切位点, 其基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示; 反向引物为 5'-GCGCGCAAGCTTGTCCCCACAAATCAAGAAAATA-3', 含 Hind III 酶切位点, 其基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示;

利用上述一对引物以 NX0101 的 DNA 为模版进行 PCR 扩增:

PCR 反应条件为: 95 °C 5min, 充分变性后进入循环体系: 95 °C 40s, 65 °C 1min, 72 °C 1min, 循环 35 次后 72 °C 延伸 10min;

扩增产物测序, 其基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示;

利用该基因片段连接 pET30a 载体, 得到了重组载体 pET30a-gp85 重组质粒, 使用 1mmol IPTG 诱导表达得到带有 HIS 标签的融合蛋白 His-gp85, 进而利用该蛋白与胶体金偶联后涂布于玻璃纤维素膜中, 制成试纸条。

2. 一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条的制备方法, 其特征在于: 具体步骤如下:

根据现有的 ALV-J 设计特异性引物, 所述的正向引物为 5'-GCGGATCCATCAAGAACGGAACAACACG-3', 含 BamH I 酶切位点, 其基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示; 反向引物为 5'-GCGCGCAAGCTTGTCCCCACAAATCAAGAAAATA-3', 含 Hind III 酶切位点, 其基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示;

利用上述一对引物以 J 亚群禽白血病病毒的 DNA 为模版进行 PCR 扩增:

PCR 反应条件为: 95 °C 5min, 充分变性后进入循环体系: 95 °C 40s, 65 °C 1min, 72 °C 1min, 循环 35 次后 72 °C 延伸 10min;

扩增产物测序, 其基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示;

利用该基因片段连接 pET30a 载体, 得到了重组载体 pET30a-gp85 重组质粒, 使用 1mmol IPTG 诱导表达得到带有 HIS 标签的融合蛋白 His-gp85, 进而利用该蛋白与胶体金偶联后涂布于玻璃纤维素膜中, 制成试纸条;

所述试纸条, 包括支撑层和吸附层, 吸附层固定在支撑层上, 吸附层从测试端依次为样品吸附纤维层、金标 SU 蛋白纤维层、纤维素膜层及吸水材料层; 在所述的纤维素膜层中部有一条包被 J 亚群禽白血病 SU 蛋白的检测线和一条包被 SU 蛋白兔多克隆抗体的质控线, 所述的纤维素膜层一端嵌入金标 SU 蛋白纤维层, 另一端嵌入吸水材料层中;

所述的扩增模板 DNA 为 NX0101 的 DNA。

一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及预防兽医学检验领域,具体涉及了一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条。

背景技术

[0002] J 亚群禽白血病是由 J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 引起的一种肿瘤性疾病,临床上主要以髓细胞性白血病多见,研究发现 J 亚群禽白血病病毒还能诱发淋巴细胞性白血病、成髓细胞性白血病、成红细胞性白血病等多种肿瘤性疾病。J 亚群禽白血病已经从最初的感染肉鸡到现在的感染蛋鸡、火鸡及地方鸡品种。近几年,禽白血病的流行呈现高感染率、高发病率,早期感染普遍、发病日龄明显提前,混合感染促使病毒重组频率增高,宿主范围扩展、肿瘤趋于多样化等新特点。目前,与 J 亚群白血病密切相关的血管瘤病在蛋种鸡群及商品蛋鸡群中的爆发,给养禽业造成了巨大的损失。基于其病毒特性,一直未有行之有效的疫苗、药物防治此病。国外通过净化控制本病的发生。由于净化周期长、成本高,在我国目前还未能有效实施,只能通过淘汰感染鸡只进行大群净化,快速精准检测 J 亚群禽白血病的感染对于净化控制 J 亚群禽白血病具有极其重要的意义。

[0003] (1)ALV-J 表面蛋白 (SU) 的生物学功能

[0004] ALV-J 属于反转录病毒。病毒囊膜蛋白可分为由 gp85 基因编码的表面蛋白 (surface protein, SU) 和 gp37 基因编码的跨膜蛋白 (transmembrane protein, TM),二者在一起形成二聚体,病毒囊膜蛋白决定亚群的特异性。SU 含有病毒 —— 受体决定簇,负责识别靶细胞膜上的特异性受体, TM 负责介导病毒与细胞的融合过程。SU 刺激机体产生的中和抗体具有亚群特异性。ALV-J 表面蛋白的核酸序列与其它 ALV 亚群同源性只有 40%。ALV-J 囊膜蛋白的 SU 可特异性识别 J 亚群禽白血病病毒刺激机体产生的中和抗体,对于 J 亚群禽白血病的诊断具有重要意义。

[0005] (2)J 亚群禽白血病诊断方法研究现状

[0006] 对于 J 亚群禽白血病的诊断方法国内外都有过许多报道,主要为病毒分离与鉴定、免疫学检测方法、核酸分子检测方法。病毒的分离与鉴定耗费时间过长且只适用于实验室诊断;免疫学检测方法如间接免疫荧光、ELISA 方法等都需要一定的专业知识和设备,不适用于养殖场的现场检测;核酸分子检测方法如 PCR 等容易受到假阳性、假阴性及抗原变异的干扰,且上述检测方法均建立在实验室基础上并需要专业操作人员操作。因此研制快速精准并易于操作携带的 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条,对于我国鸡群 J 亚型禽白血病的净化防制具有重要的现实意义。

发明内容

[0007] 针对现有存在的上述问题,本发明提供了一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条,其中最主要的是采用了原核表达后纯化的 J 亚群禽白血病病毒表面蛋白偶联免疫胶体金,利用该胶体金可以快速检测血清中的 J 亚群禽白血病抗体,进而为鸡群 J 亚群禽

白血病精准快速诊断提供技术保障。通过 Western Blot 检测表达的 gp85 蛋白能够与 JE9 单抗和抗 HIS 标签抗体发生特异性反应,表明具有良好的特异性。

[0008] 本发明所采用的具体技术方案是:

[0009] 通过比对临床病例,特别是混合肿瘤、单纯髓细胞瘤、血管瘤、纤维肉瘤、组织肉瘤、成红细胞瘤、肾瘤等病例,通过抗体及 PCR 检测确定 ALV-J 感染,DF-1 细胞培养并分离病毒,比对分析各病毒表面蛋白的关键保守基因序列,最终确定采用 ALV-J gp85 基因片段,并根据上述表面蛋白的关键保守基因序列设计引物扩增保守序列,最终原核表达的 SU 蛋白制备试纸条,所获得的试纸条可以完全实现 J 亚群禽白血病的精准诊断。

[0010] 其具体过程如下:

[0011] 根据现有的 ALV-J 设计特异性引物,所述的正向引物为 5'-GCGGATCCATCAAGAACGG AACAACACG-3',含 BamH I 酶切位点,其基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示;反向引物为 5'-GCGC GCAAGCTTGTCCCCACAAATCAAGAAAATA-3',含 Hind III 酶切位点,其基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

[0012] 利用上述一对引物以 J 亚群禽白血病病毒的 DNA 为模版进行 PCR 扩增,其中优选采用 NX0101 (ALV-J, DQ115805. 1) 的 DNA 为模板;

[0013] PCR 反应条件为:95℃ 5min,充分变性后进入循环体系:95℃ 40s,65℃ 1min,72℃ 1min,循环 35 次后 72℃ 延伸 10min。

[0014] 扩增产物测序,其基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示;

[0015] 利用该基因片段连接 pET30a 载体,得到了重组载体 pET30a—gp85 重组质粒,使用 1mmol IPTG 诱导表达得到带有 HIS 标签的融合蛋白 His-gp85,进而利用该蛋白与胶体金偶联后涂布于玻璃纤维素膜中,制成试纸条采用间接法测抗体。

[0016] 本发明的这种试纸条适用于大规模批量生产,易于操作携带,可快速诊断 J 亚群禽白血病,检测时间只需 5 分钟,一个中等养殖规模的鸡场,从制备血清到检测,只需在二十分钟内即可快速确定其鸡群 J 亚群禽白血病的感染状态,对于我国 J 亚群禽白血病及时发现和适时净化具有重要意义,且特异性强可以完全实现 J 亚群禽白血病的精准诊断。

[0017] 与现有技术相比,如“J 亚群禽白血病抗体快速检测试纸卡及其应用”,其所用鼠抗鸡 IgGFc 片段单克隆抗体较多抗具有良好的特异性,但只能针对某一特定的抗原决定簇,用途单一;

[0018] 而我们所用的多克隆抗体所使用的是 SU 蛋白,含有多个抗原位点,能够与不同的抗原决定簇进行结合,因而更加准确的检测到血清中的抗体从而确定鸡群的感染状况,较之现有的检测试纸能够更加有效准确的检测出鸡群感染状况

[0019] 本发明所获得的试纸条具体结构如下:

[0020] 一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条,包括支撑层和吸附层,吸附层固定在支撑层上,吸附层从测试端依次为样品吸附纤维层、金标 SU 蛋白纤维层、纤维素膜层及吸水材料层。在所述的纤维素膜层中部有一条包被 J 亚群禽白血病 SU 蛋白的检测线和一条包被 SU 蛋白兔多克隆抗体的质控线,所述的纤维素膜层一端嵌入金标 SU 蛋白纤维层,另一端嵌入吸水材料层中。

[0021] 其中,所述的支撑层用不吸水的硬质塑料条制成;

[0022] 所述的测试端的样品吸附纤维层用玻璃纤维制成;

- [0023] 所述的金标 SU 蛋白纤维层吸附有胶体金标记的高纯度的 SU 蛋白；
- [0024] 所述的纤维素膜层用硝酸纤维素膜制成；
- [0025] 所述的吸水材料层用吸水纸制成；
- [0026] 所述的 SU 蛋白兔多克隆抗体为采用常规技术，利用多克隆抗体制备技术将 SU 蛋白免疫新西兰大白兔获得，为现有技术，在此不再赘述。
- [0027] 上述的各种材料均为市购。
- [0028] 本发明所述胶体金试纸条的制备方法如下：具体步骤：
- [0029] 1) 在纤维素膜层的不同位置上分别包被 SU 蛋白和 SU 蛋白的多克隆抗体，分别形成检测线和质控线；具体步骤为：将包被浓度为 2mg/ml 的 SU 蛋白溶液按 2 μ l/cm 的速度喷于检测层上作为检测线，将包被浓度为 2mg/ml 的 SU 蛋白多克隆抗体按 2 μ l/cm 的速度喷于检测线下方的检测层上作为质控线，37 $^{\circ}$ C 下干燥 30min，从而制备得到检测线和质控线；
- [0030] 其中所述的 2mg/ml 的 SU 蛋白溶液用 pH 为 7.5, 0.02M 的 PBS 缓冲液稀释获得的；
- [0031] 2) 金标 SU 蛋白纤维层的制备，具体步骤为：以柠檬酸钠还原法制备金溶液，即在 100ml 沸腾的 0.02wt% 氯金酸水溶液中加入 1ml 的 1wt% 柠檬酸三钠溶液，可获得直径在 45nm 左右的胶体金；
- [0032] 通过直接混合的方式以 0.2mol/L 的 K₂CO₃ 溶液调节上述获得的胶体金 pH 至 7.0-8.5，以 1:1000 的标记比例将待标记的 SU 蛋白加入到上述调整 pH 之后的胶体金中，标记 20min 后，再向上述标记后的胶体金溶液中加入 10wt% 的 PEG10000 水溶液；至 PEG10000 的终浓度为 0.1wt%，4 $^{\circ}$ C、3000rpm 离心 30min，除去未结合的胶体金颗粒，4 $^{\circ}$ C、13000rpm 离心 30min，弃上清液，获得初步纯化的金标 SU 蛋白；
- [0033] 其中所采用的 10wt% 的 PEG10000 水溶液是利用市售的 PEG10000，用双蒸水把它稀释成 10wt% 的水溶液获得的；之后利用上述获得的 10wt% 的 PEG10000 溶液加入到标记后的胶体金溶液中，利用胶体金溶液对其进行稀释，使 PEG10000 的最终浓度变成 0.1wt% 即可；
- [0034] 按 2mg/ml 为 1:100 的比例用含 0.1-2wt% BSA 的 0.001-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液稀释胶体金标记的 SU 蛋白，将上述稀释后的金标 SU 蛋白液按 50 μ l/cm² 的速度喷于玻璃纤维素膜中，4 $^{\circ}$ C 低温真空干燥；
- [0035] 3) 采用现有工艺和设备组装支撑层、纤维素膜层、金标 SU 蛋白纤维层、吸水材料层和样品吸附纤维层既得目标试纸条。
- [0036] 综上所述，采用本发明的这种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条，其中最主要的是采用了原核表达后纯化的 J 亚群禽白血病病毒表面蛋白偶联免疫胶体金，利用该胶体金可以快速检测血清中的 J 亚群禽白血病抗体，进而为鸡群 J 亚群禽白血病精准快速诊断提供技术保障。通过 Western Blot 检测表达的 gp85 蛋白能够与 JE9 单抗和抗 HIS 标签抗体发生特异性反应，表明具有良好的特异性，具有广泛的推广和应用价值。

附图说明

- [0037] 图 1 为 PCR 扩增 ALV-J gp85 基因片段电泳图，
- [0038] 途中 M 为 DL2500marker；1 为 ALV-J gp85 基因片段；
- [0039] 图 2 为 pET30a-gp85 重组质粒酶切鉴定结果电泳图；

- [0040] 图中 M 为 DL5000marker ;1 为使用 BamH I 和 Hind III 酶切 pET30a-gp85 后获得的片段 ;
- [0041] 图 3 为 pET30a-gp85 重组质粒在 BL21 中诱导表达电泳图谱 ;
- [0042] 图中 M 为 170KD protein marker ;1 为加入 IPTG 0h 后 ;2 为加入 IPTG 1h 后 ;3 为加入 IPTG 2h 后 ;4 为加入 IPTG 3h 后 ;
- [0043] 图 4 为 SU 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析结果图,
- [0044] 图中 M 为 170KD protein marker ;1 为 SU 蛋白纯化产物 ;
- [0045] 图 5 Western blot 法检测 SU 蛋白,
- [0046] 图中 M 为 170KD protein marker ;1 为杂蛋白 ;2 为目的蛋白 ;
- [0047] 图 6 ALV-J 抗体检测试纸条检测结果示意图,
- [0048] 上方为阴性血清样品检测结果呈阴性,下方为阳性血清样品检测结果呈阳性。

具体实施方式

- [0049] 本实施例中采用的具体试剂和仪器为 :
- [0050] (1) 主要试剂
- [0051] HRP 酶标二抗为博奥森生物有限公司产品 ;
- [0052] TMB 单组份底物显色溶液, DAB 显色试剂盒为天根公司产品 ;
- [0053] Taq 聚合酶,限制性内切酶 Hind III、BamH I、T4 连接酶、dNTP、DNA Marker 为大连宝生物有限公司产品 ;
- [0054] PCR 产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒为 OMEGA 公司产品 ;
- [0055] 蛋白预染 Marker 为北京全式金生物技术有限公司产品 ;
- [0056] 胰蛋白胨 (Tryptone) 及酵母抽提物 (Yeast Extract) 为 Oxiod 公司产品 ;
- [0057] 其余试剂为国产分析纯试剂。
- [0058] (2) 主要仪器
- [0059] PCR 仪、分光光度计为 Eppendorf 公司产品 ;
- [0060] 低温高速离心机为湖北湘仪公司产品 ;
- [0061] 凝胶成像系统为北京君意公司产品 ;
- [0062] 酶标仪为 Thermo 公司产品 ;
- [0063] 恒温摇床为上海申能博彩公司产品 ;
- [0064] 恒温培养箱、超净工作台为上海博迅公司产品 ;
- [0065] 电泳仪、SDS-PAGE 电泳槽、Western-blot 膜转印装置为北京六一公司产品 ;
- [0066] 细胞超声波粉碎机为宁波新芝生物有限公司产品。
- [0067] 除上述列出内容外,本发明为提及的部分均采用现有技术。
- [0068] 实施例 1 ALV-J gp85 基因的克隆及测序
- [0069] 根据现有 ALV-J 前病毒基因组 DNA gp85 囊膜蛋白基因设计引物,正向引物为 5'-GCGGATCCATCAAGAACGGAACAACACG-3', 含 BamH I 酶切位点 (下划线部分) 其基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示 ;反向引物为 5'-GCGCGCAAGCTTGTCCCCACAAATCAAGAAAATA-3', 含 Hind III 酶切位点 (下划线部分), 其基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示。
- [0070] 利用上述一对引物以 J 亚群禽白血病病毒的 DNA 为模版进行 PCR 扩增,其中所选

择的 J 亚群禽白血病病毒为 NX0101 (ALV-J, DQ115805. 1) ;

[0071] PCR 反应条件为 :95℃ 5min, 充分变性后进入循环体系 :95℃ 40s, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 循环 35 次后 72℃ 延伸 10min。

[0072] 将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 结果见图 1, 获得了 504bp 的片段。

[0073] 扩增的片段采用常规方法连接于 PTZ57R/T 克隆载体进行基因测序, 将对应的氨基酸序列与近三年我国分离得到的 16 株不同肿瘤型 ALV-J 氨基酸保守序列进行分析比对 : 与其中 9 株的同源性高于 98%, 最低同源性也可达 87%, 确保所制备的 gp85 蛋白可与我国 ALV-J 流行毒株感染鸡只产生抗原抗体反应。

[0074] 将 pET30a 和连接了目的基因的 PTZ57R/T 克隆载体分别用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 进行双酶切 10min, 按照胶回收试剂盒说明书的要求分别回收大片段和目的基因片段 ;

[0075] 将上述获得的目标物 22℃ 过夜连接, 其中连接体系为 : pET30a 载体 0.5 μ l, gp85 基因片段 1 μ l, dH₂O 20 μ l, T4DNA 连接酶 1 μ l, 10x buffer 2.5 μ l, 总体积共 25 μ l, 获得连接产物 pET30a—gp85 重组质粒。

[0076] 将连接产物 pET30a—gp85 重组质粒按照常规方法转入 CaCl₂ 制备的感受态细菌 BL21 中, 涂布于含有卡那霉素的 LB 平板中, 37℃ 过夜生长, 次日挑取单菌落, 摇菌, 提取质粒进行双酶切鉴定后送去测序, 确认其中具有如 SEQ ID NO. 3 所示的序列, 可见获得的 gp85 保守基因 504bp 的片段已经成功克隆入 pET30a—gp85 重组质粒中。

[0077] 实施例 2 gp85 蛋白的表达和纯化

[0078] 将测序后含有重组质粒的阳性 BL21 菌接种于含 Kan (终浓度为 10 μ g/ml) 的 LB 液体培养基中 (市购常规培养基, 其中含有 1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Yeast Extract, 1% (w/v) NaCl, 0.1mg/ml Kanamycin), 37℃ 振荡 (200rpm), 培养至 OD₆₀₀ = 1.0, 加入浓度为 500mMol 的 IPTG 至整个培养基中 IPTG 的终浓度为 1mmol/L, 37℃ 继续培养 3h, 同时设未诱导的重组质粒转化 BL21 菌作为对照。

[0079] 经 SDS-PAGE 分析显示, 检测步骤如下 : 收集培养的工程菌菌液, 5000rpm, 离心 5min, 弃上清, 沉淀按照 100ml 初始培养基加入标准 PBS3ml 的比例, 向沉淀中加入标准的 PBS 获得重悬液, 沉淀重悬后分装与 5ml 离心管中每管 3ml。将离心管置于冰水混合物的烧杯内, 用超声破菌仪超声破菌, 120W, 工作 1s, 间歇 2s, 超声 2 个循环 ; 将超声破菌液转入 50ml 离心管中, 配平, 放入高速冷却离心机中, 8000rpm, 4℃, 离心 10min, 然后用 SDS-PAGE 电泳检测 ; 结果上清中无蛋白 (未显示), 蛋白存在于沉淀中, 说明目的蛋白 gp85 以包涵体形式表达, 如图 3 所示, 目的 SU 蛋白大小约为 18KD ;

[0080] SU 蛋白的纯化步骤如下 :

[0081] 将上述离心获得的沉淀用 9 倍体积的洗涤液 I 重悬沉淀, 静置 5min 后, 8000rpm, 5min 弃上清。用 9 倍体积的洗涤液 II 重悬沉淀, 静置 5min 后, 8000rpm, 5min, 弃上清, 保留沉淀。用 9 倍体积的洗涤液 III 重悬沉淀, 静置 5min 后, 8000rpm, 5min, 弃上清, 保留沉淀。按 100ml 菌液加 8ml 溶解液, 4℃ 过夜。8000rpm, 离心 5min。取上清, 即为纯化蛋白。

[0082] 包涵体纯化所述试剂配制方法 :

[0083] (1) 细菌重悬液 (250ml) : PBS (NaCl 2g, KCl 0.05g, Na₂HPO₄ 0.36g, KH₂PO₄ 0.06g), 1mm/L EDTA.

[0084] (3) 溶液 I(250ml) :500mmol/L Tris-Cl(pH = 6.0),50mmol/L NaCl,50mmol/L EDTA

[0085] (3) 溶液 II(250ml) :溶液 I,1M 尿素

[0086] (4) 溶液 III(250ml) :溶液 I,2M 尿素

[0087] (5) 包涵体溶解液(250ml) :溶液 I,4M 尿素

[0088] SDS-PAGE 法与 Western Blot 法检测纯化后的蛋白(附图 4 和 5)。得到的蛋白经过 Bradford 法测定蛋白含量,稀释到 0.5mg/mL 来分装 -80℃ 保存备用。

[0089] 上述使用的 SDS-PAGE 法为常规方法,未提及的试剂为常规方法规定使用的试剂,其具体操作步骤如下:

[0090] 1) 将玻璃板洗干净,用夹子固定,垂直放置,配置 12% 分离胶,快速注入到两玻璃板之间,胶上部加蒸馏水封口,以保持胶面平整。待分离胶凝固后,倒去分离胶表面的蒸馏水,用滤纸吸去残留水。注入浓缩胶,快速插入梳子,并注意防止气泡的产生;

[0091] 2) 取纯化后的 SU 蛋白加入 15-20 μ l 4x SDS 上样 buffer,煮沸 10min;

[0092] 3) 往电泳槽加入 1 \times Tris-甘氨酸缓冲液,待浓缩胶凝固,小心拔掉梳子,用缓冲液冲洗加样孔,用微量进样器上样,10 μ l/孔,正确连接电泳槽正负极,打开电源。120V 电压电泳,电泳至溴酚蓝到达胶的底部时停止电泳;

[0093] 4) 染色:取下凝胶,用蒸馏水冲洗,放入考马斯亮蓝染色液中,染色 4h 以上;

[0094] 5) 脱色:将凝胶放入脱色液中,置于摇床上脱色,期间更换 3 次以上脱色液,待凝胶蓝色背景全部脱去停止,将凝胶放入蒸馏水中终止脱色;拍照保存,如图 4 所示,出现了大小约为 18KD 的目的 SU 蛋白条带;

[0095] 6) 剪一张与 Western Blot 凝胶大小相同的 NC 膜,用去离子水浸透,同时将与凝胶大小相同的两张滤纸及纤维垫用转印缓冲液浸透;

[0096] 7) 按三明治法安装转印装置,即负极夹-纤维垫-滤纸-凝胶-NC 膜-滤纸-纤维垫-正极夹,使 NC 膜位于转印的正极面,凝胶位于负极面,其间无任何气泡间隙。将转印装置放入转移电泳仪中,加入转移缓冲液,140mA 电泳 2h。

[0097] 8) 转印结束后,将转移后的 NC 膜用去离子水漂洗一遍,将 NC 膜浸泡于封闭液中,4℃ 封闭过夜;

[0098] 9) 用 PBST 洗涤 NC 膜三遍,每次 10min;

[0099] 10) 使用免疫小鼠阳性血清为一抗,NC 膜与一抗 37℃ 反应 1h,用 PBST 洗膜三次,10min/次;

[0100] 11) NC 膜置于过 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 中,37℃ 反应 1h,用 PBST 洗膜三次,10min/次;

[0101] 12) 使用 DAB 显色试剂盒避光显色;此时应密切观察显色过程,并在较浅本底且达到适当显色强度时流水终止显色;拍照保存,如图 5 所示,出现了大小约为 18KD 的目的 SU 蛋白条带。

[0102] 实施例 3 gp85 蛋白的活性检测

[0103] 使用上述纯化得到的 His-gp85 蛋白包被 ELISA 板,使用酶联免疫吸附试验检测该蛋白的生物学活性。以 IDEXX 公司生产的 ALV-J 抗体检测试剂盒检测为阳性的鸡血清为阳性对照,健康 SPF 鸡血清为阴性对照,HRP 标记羊抗鼠 IgG 酶标二抗按说明书使用。结果显

示阳性对照与阴性对照的 OD 值比值大于 2.1, 说明该蛋白有良好的生物学活性和抗原性。

[0104] ELISA 具体步骤如下:

[0105] 1) 包被: 取纯化的重组 SU 蛋白, 以生理盐水稀释至最佳浓度, 包被反应板, 100 μ l/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0106] 2) 洗涤: 甩去酶标板中的包被液, 用 PBST (PBS, 0.05% Tween-20) 加满各孔, 摇床震荡 3min, 弃去 PBST, 洗涤 3 次, 3min/ 次, 拍干;

[0107] 3) 封闭: 各孔加入封闭液 (3% 脱脂乳), 350 μ l/ 孔, 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 0.5h, 洗涤 3 次, 3min/ 次, 拍干;

[0108] 4) 加样: 将待检血清按梯度稀释后加入包被板, 100 μ l/ 孔, 同时设立阴阳性血清对照; 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1h, 洗涤 3 次, 3min/ 次, 拍干;

[0109] 5) 用封闭液将 HRP 羊抗鼠 IgG 酶标二抗按 1:5000 稀释, 100 μ l/ 孔, 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1h, 洗涤 3 次, 3min/ 次, 拍干;

[0110] 6) 显色: 使用 TMB 单组份显色试剂盒 (TIANGEN 公司产品) 按 100 μ l/ 孔加入包被板, 室温下避光显色 20min 加终止液, 2M H_2SO_4 终止显色;

[0111] 7) 用酶联免疫检测仪测其在波长 450nm 检测各个孔的 OD 值, 阴性对照 OD450 值为 N, 阳性对照 OD450 值为 P。若 $P/N > 2.1$ 判为阳性。

[0112] 实施例 4 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条的制备

[0113] 1) 在纤维素膜层的不同位置上分别包被 SU 蛋白和 SU 蛋白的多克隆抗体, 分别形成检测线和质控线; 具体步骤为: 将包被浓度为 2mg/ml 的 SU 蛋白溶液按 2 μ l/cm 的速度喷于检测层上作为检测线, 将包被浓度为 2mg/ml 的 SU 蛋白多克隆抗体按 2 μ l/cm 的速度喷于检测线下方的检测层上作为质控线, 37 $^{\circ}$ C 下干燥 30min, 从而制备得到检测线和质控线;

[0114] 其中所述的 2mg/ml 的 SU 蛋白溶液用 pH 为 7.5, 0.02M 的 PBS 缓冲液稀释获得的;

[0115] 2) 金标 SU 蛋白纤维层的制备, 具体步骤为: 以柠檬酸钠还原法制备金溶液, 即在 100ml 沸腾的 0.02wt% 氯金酸水溶液中加入 1ml 的 1wt% 柠檬酸三钠溶液, 可获得直径在 45nm 左右的胶体金;

[0116] 通过直接混合的方式以 0.2mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节上述获得的胶体金 pH 至 7.0-8.5, 以 1:1000 的标记比例将待标记的 SU 蛋白加入到上述调整 pH 之后的胶体金中, 标记 20min 后, 再向上述标记后的胶体金溶液中加入 10wt% 的 PEG10000 水溶液; 至 PEG10000 的终浓度为 0.1wt%, 4 $^{\circ}$ C、3000rpm 离心 30min, 除去未结合的胶体金颗粒, 4 $^{\circ}$ C、13000rpm 离心 30min, 弃上清液, 获得初步纯化的金标 SU 蛋白;

[0117] 其中所采用的 10wt% 的 PEG10000 水溶液是利用市售的 PEG10000, 用双蒸水把它稀释成 10wt% 的水溶液获得的; 之后利用上述获得的 10wt% 的 PEG10000 溶液加入到标记后的胶体金溶液中, 利用胶体金溶液对其进行稀释, 使 PEG10000 的最终浓度变成 0.1wt% 即可;

[0118] 按 2mg/ml 为 1:100 的比例用含 0.1-2wt% BSA 的 0.001-0.2mol/L 磷酸盐缓冲液稀释胶体金标记的 SU 蛋白, 将上述稀释后的金标 SU 蛋白液按 50 μ l/cm² 的速度喷于玻璃纤维素膜中, 4 $^{\circ}$ C 低温真空干燥;

[0119] 3) 采用现有工艺和设备组装支撑层、纤维素膜层、金标 SU 蛋白纤维层、吸水材料层和样品吸附纤维层既得目标试纸条。

[0120] 试验例 1

[0121] 2013 年 10 月山东省潍坊市某养鸡场发生以病鸡主要表现为困倦、虚弱、鸡冠肉髯苍白、并有消瘦脱水等症状的传染病,经山东农业大学实验室显微镜图片和 PCR 方法检查诊断为 J 亚群禽白血病感染;

[0122] 发明人采集鸡场病鸡的血清,利用本发明实施例 4 制备的试纸条逐条进行检测,检测结果均为阳性,与经山东农业大学实验室显微镜图片和 PCR 方法检查诊断完全一致,证明本发明所提供的试纸条不需要任何的设备,就可以进行临床样本的检测,且特异性强,操作简便、快速,结果显示直观、准确,能广泛应用于基层对于 J 亚群禽白血病的检测。

[0123] 试验例 2

[0124] 2013 年 11 月新泰市某养鸡场发生以病鸡鸡冠肉髯苍白、消瘦、脱水、腹部膨大、可触摸到肿大的肝脏为主要特征的疾病,经山东农业大学实验室 PCR 检测为 J 亚群禽白血病。

[0125] 发明人采集活鸡的血清样本,利用本发明实施例 4 制备的试纸条逐条进行检测,检测结果均为阳性,与经山东农业大学实验室 PCR 方法检查诊断完全一致,证明本发明所提供的试纸条不需要任何的设备,就可以进行临床样本的检测,且特异性强,操作简便、快速,结果显示直观、准确,能广泛应用于基层对于 J 亚群禽白血病的检测。

[0001]

<110>山东农业大学

<120>一种 J 亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条

<160>3

<210>1

<211>504

<212>DNA

<213>禽白血病病毒 (ALV)

<400>1

atcaagaacg gaacaacacg tacgtgtggtt acctttgggtt cgggtgtgcta taaagagaac	60
aatcgcagta gagtctgtca caattttgat gggaatttta atgggactgg tggggcggaa	120
gcagaattgc gtgacttcat agcaaaatgg aaaagtgatg accttcttat aagaccctat	180
gtcaaccaat catggacgat ggtaagtcca ataaacgtag agagtttttc aataagtcgt	240
agatattgtg gattcaccag taacgagact cgttactata gaggggacct ttctaattgg	300
tgtggttcaa aaaggggaaa atggtcagca ggttacagca acgggacaaa atgttcacg	360
aacacgacgg gttgeggtgg taattgcacg acggaatgga attattatgc atatgggttt	420
accttcagga aacagccaga ggtgttgggg aacaatggga ctgcgaaggc actcectcca	480
ggtattttct tgatttgggg ggac	504

<210>2

<211>28

<212>DNA

<213>人工序列

<400>2

gcggatccat caagaacgga acaacacg	28
--------------------------------	----

<210>3

<211>26

<212>DNA

<213>人工序列

<400>3

gcgcgcaagc ttgtceccac aaatcaagaa aata	34
---------------------------------------	----

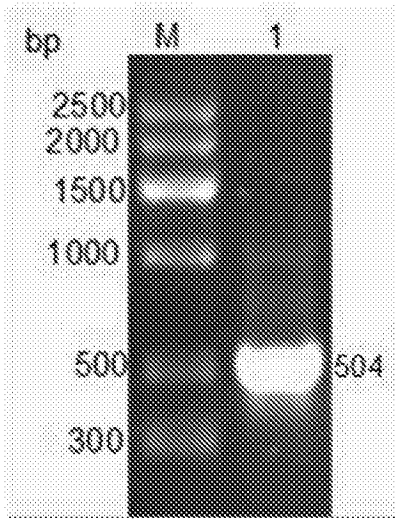


图 1

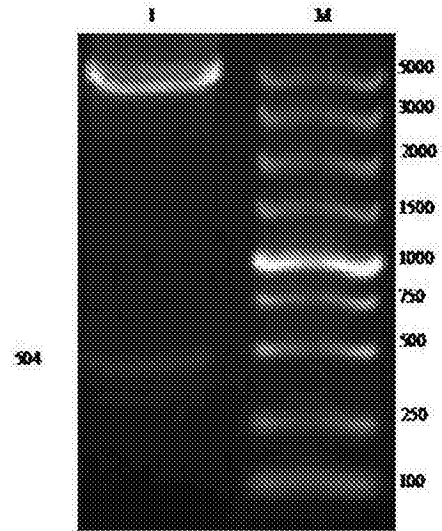


图 2

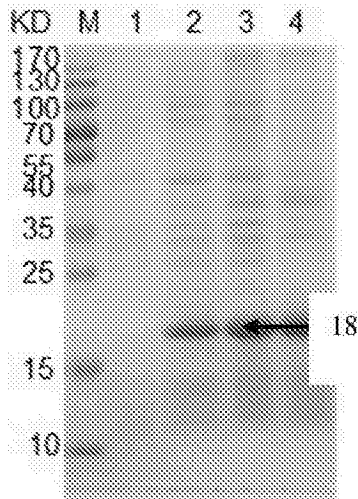


图 3

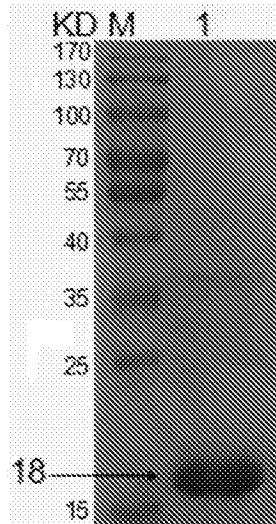


图 4

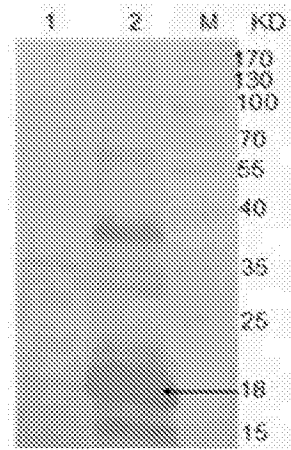


图 5

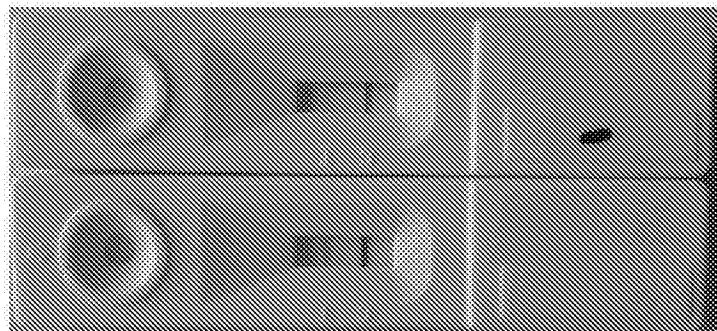


图 6

专利名称(译)	一种J亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条		
公开(公告)号	CN103808945B	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201410088234.6	申请日	2014-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	成子强 王言明		
发明人	成子强 王言明		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/21 C12N15/62 C12N2740/11022 G01N33/558 G01N33/56983		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN103808945A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种J亚群禽白血病免疫胶体金抗体检测试纸条，其中最主要的是采用了原核表达后纯化的J亚群禽白血病病毒表面蛋白偶联免疫胶体金，利用该胶体金可以快速检测血清中的J亚群禽白血病抗体，进而为鸡群J亚群禽白血病精准快速诊断提供技术保障。通过Western Blot检测表达的gp85蛋白能够与JE9单抗和抗HIS标签抗体发生特异性反应，表明具有良好的特异性。

