



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106018780 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610327488.8

(22)申请日 2016.05.17

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 叶建强 梁广成 邵红霞 王伟康

秦爱建 万志敏

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

序列表2页 附图2页

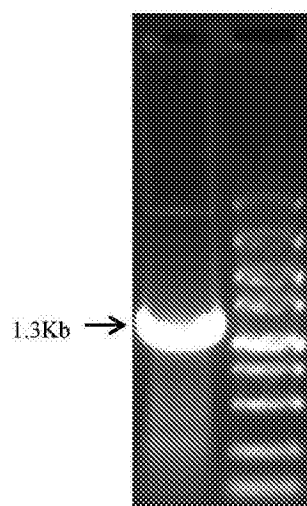
(54)发明名称

一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒

(57)摘要

本发明属于生物技术检测领域,具体涉及一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒。该试剂盒包括表达F1蛋白的293T细胞,FITC标记的羊抗鸡抗体,样品稀释液,洗涤液。本发明试剂盒具有良好的特异性;该试剂盒不仅能用于血清4型禽腺病毒感染状况流行病学调查,而且能有效用于监测免疫鸡群血清4型禽腺病毒抗体水平,用于评价免疫保护性抗体水平等。

1 M



1. 一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒,其特征在于,包括表达F1蛋白的293T细胞,FITC标记的羊抗鸡抗体,样品稀释液,洗涤液。
2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述表达F1蛋白的293T细胞,是转染F1蛋白真核表达质粒的表达4型禽腺病毒F1蛋白的293T细胞。
3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于稀释液及洗涤液是10mM pH7.2的磷酸缓冲液。

一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术检测领域,具体涉及一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒。

背景技术

[0002] 禽腺病毒(Fowl Adenovirus, FAdV)属于腺病毒科禽腺病毒属,分为5个种(A-E), 12个血清型。虽然在世界各地均有报道,FAdV感染一般引起亚临床状况,而急性感染主要引起包涵体肝炎、心包积液以及肌胃糜烂等。自2013年,国内鸡群由FAdV引起的包涵体肝炎、心包积液病例逐渐增多。到2015年,FAdV感染在国内多个省份鸡群爆发。目前FAdV爆发不仅发生在3-4周龄肉鸡,还发生于10-20周龄的蛋鸡,给国内养鸡业造成了严重经济损失。病毒分离鉴定发现,目前高致病性4型FAdV在国内鸡群流行较广泛。然目前尚无针对4型FAdV血清学抗体检测的快速方法及其试剂盒。在FAdV的编码蛋白中,F1纤突蛋白为FAdV的表面蛋白,在介导FAdV病毒感染宿主细胞中起重要作用,能有效刺激机体产生体液免疫,甚至中和抗体。

发明内容

[0003] 本发明的目的是在于提供一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒。本发明的原理和最核心的关键技术是构建了血清4型禽腺病毒F1蛋白基因真核表达质粒,并将转染该质粒的表达F1蛋白的293T细胞作为抗原建立试剂盒,检测血清4型禽腺病毒特异性抗体。

[0004] 本发明所述的一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒,包括表达F1蛋白的293T细胞,FITC标记的羊抗鸡抗体,样品稀释液,洗涤液。

[0005] 其中,所述表达F1蛋白的293T细胞,是转染F1蛋白真核表达质粒的表达4型禽腺病毒F1蛋白的293T细胞;

[0006] 其中,所述稀释液及洗涤液是10mM pH7.2的磷酸缓冲液。

[0007] 所述表达F1蛋白的293T细胞,通过下述步骤得到:

[0008] (1)禽腺病毒F1蛋白真核表达质粒构建:以pcDNA3.1真核表达载体以及血清4型禽腺病毒基因组为模板,分别以SEQ ID NO.1-2和SEQ ID NO.3-4的序列为引物,分别PCR扩增出线性化的pcDNA3.1载体以及血清4型禽腺病毒F1蛋白基因(SEQ ID No.5);随后利用重组酶Exnase™ II将线性化的pcDNA 3.1载体以及血清4型禽腺病毒F1蛋白基因的PCR产物进行快速体外重组克隆(参见图1,图2),重组克隆经序列验证后,命名为pcDNA3.1-FAdV_F1(参见图3)。并血清4型禽腺病毒阳性鸡血清通过western blot验证F1蛋白在293T细胞中的表达(参见图4)。

[0009] (2)制备检测血清4型禽腺病毒抗体的抗原:将pcDNA3.1-FAdV_F1重组质粒,用MIRUS转染液转染293T细胞。细胞转染48小时后,用丙酮乙醇固定液固定细胞5分钟;固定的

表达细胞血清4型禽腺病毒F1蛋白的293T细胞自然干燥后置-20度待用,即为检测血清4型禽腺病毒抗体的抗原。

[0010] 检测血清4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒:该试剂盒成分包括固定在96孔中的表达F1蛋白的293T细胞,商品化的FITC标记的羊抗鸡抗体,样品稀释液以及洗涤液。该试剂盒检测血清4型禽腺病毒抗体的步骤及阳性判定标准如下:固定在96孔中的表达F1蛋白的293T细胞用PBS洗涤一遍后,加入稀释的血清样品,37度反应1小时;PBS洗涤3遍后,加入稀释的FITC标记的羊抗鸡抗体,37度反应1小时;PBS洗涤3遍后,进行倒置荧光显微镜下观察。若出现细胞核内亮绿色特异荧光,则该样品判为阳性(图5A);否则为阴性(图5C)。

[0011] 本发明的有益效果体现在:本发明建立的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒能特异性的检查出抗血清4型禽腺病毒抗体,而不能检测出抗其它病原的抗体(图5A-H)。因此,该试剂盒具有良好的特异性。该试剂盒不仅能用于血清4型禽腺病毒感染状况流行病学调查,而且能有效用于监测免疫鸡群血清4型禽腺病毒抗体水平,用于评价免疫保护性抗体水平等。

附图说明

[0012] 图1,PCR扩增线性化pcDNA3.1载体

[0013] 1:线性化的pcDNA3.1载体;M:1Kb DNA Ladder。

[0014] 图2,PCR扩增F1基因

[0015] 1:血清4型禽腺病毒F1蛋白基因;M:1Kb DNA Ladder。

[0016] 图3,pcDNA3.1-FAdV_F1重组表达载体鉴定

[0017] 1:pcDNA3.1-FAdV_F1重组质粒F1基因PCR;M:DL5000DNA Marker。

[0018] 图4,pcDNA3.1-FAdV_F1在293T细胞表达效果

[0019] 1:正常293T细胞裂解产物;2:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞裂解产物;M:1Kb Protein Marker。

[0020] 图5,检测4型FAdV抗体的间接免疫荧光试剂盒检测效果

[0021] A:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与FAdV血清反应;B:未转染质粒的293T细胞与FAdV血清反应;C:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与SPF鸡血清反应;D:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与抗马立克氏病病毒血清反应;E:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与抗禽白血病病毒血清反应;F:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与抗禽流感病毒血清反应;G:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与抗鸡新城疫病毒血清反应;H:转染pcDNA3.1-FAdV_F1的293T细胞与抗传染性法氏囊病病毒血清反应。

具体实施方式

[0022] 实施例:

[0023] 1,血清4型禽腺病毒分离:取疑似4型禽腺病毒感染的病死鸡的肝脏,研碎后用按1:5的比例加入PBS制成悬液;5000r/min离心15min,取上清;加入青霉素和链霉素各1000IU/ml,37℃反应30min;经0.45um微孔滤器过滤后,以0.2ml/胚的剂量,经尿囊腔接种8日龄SPF鸡胚,接种后96-120小时后收取尿囊液;尿囊液经鉴定为4型禽腺病毒后,-20℃保存。

[0024] 2,设计扩增出含pcDNA3.1线性化载体与血清4型禽腺病毒F1蛋白基因片段的引物:具体引物序列见表1,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0025] 表1.PCR扩增线性化pcDNA3.1及血清4型禽腺病毒F1蛋白基因引物

[0026]

PCR产物	引物序列 5' -3'
pcDNA3.1 线性化载体	上游引物: GAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTG(SEQ ID No.1)
	下游引物: GCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACG(SEQ ID No.2)
血清4型禽腺病毒F1蛋白基因	上游引物: AGCTTGGTACCGAATGTCGGCCCTAATCGC(SEQ ID No.3)
	下游引物: ATATCTGCAGAATTTAGGGGCCCGGAGCAT(SEQ ID No.4)

[0027] 3,血清4型禽腺病毒基因组的制备:取血清4型禽腺病毒分离毒株病毒上清400uL于1.5mL指形管内,加入400uL细胞裂解液(50mmol/L Tris-HCl pH 8.0,20mmol/L EDTA pH 8.0,2%SDS和蛋白酶K),充分混匀后放置56℃水浴锅作用4小时;加入400uLTris平衡酚,充分混匀后10000r/min离心10分钟,取上清于另一1.5mL指形管;加入400uL酚:氯仿:异戊醇,充分混匀后10000r/min离心5分钟,取上清于另一1.5mL指形管;加入800uL无水乙醇,颠倒混匀后放入-20℃孵育30分钟,12000r/min离心15分钟,弃尽上清;室温自然干燥后向沉淀加入30uL灭菌超纯水和2uLRNA酶,充分溶解后,即得血清4型禽腺病毒基因组,置-20℃备用。

[0028] 4,PCR扩增pcDNA3.1线性化载体以及血清4型禽腺病毒F1蛋白基因片段:分别以pcDNA3.1载体质粒(Invitrogen公司)以及以上制备的4型禽腺病毒基因组为模板,表1所述相应引物为引物分别进行PCR扩增出线性化的pcDNA3.1载体以及血清4型禽腺病毒F1蛋白基因(SEQ ID No.4)。PCR扩增反应体系为:模板1uL,5×Buffer10uL,10mM dNTP Mix 1uL,上游引物为10μmol 2uL,下游引物为10μmol 2uL,高保真酶1uL,加入灭菌超纯水至50uL。PCR扩增反应循环参数为:95℃预变性4分钟,随后进行30个循环(95℃变性30秒,55℃退火30秒,72℃延伸3分钟),72℃延伸10分钟。PCR结束后,PCR产物在1%的琼脂糖凝胶中进行电泳分析(如图1,图2所示)。

[0029] 5,pcDNA3.1-FAdV_F1重组表达载体构建:将以上纯化的线性化载体pcDNA3.1以及血清4型禽腺病毒F1蛋白基因片段PCR产物在商品化重组酶Exnase™ II的作用下进行重组克隆。具体重组反应体系如下:纯化的血清4型禽腺病毒F1蛋白基因片段PCR产物50-100ng,纯化的pcDNA3.1线性化载体50ng,2μL商品化的Exnase™ II酶,4μL5倍的缓冲液,其它补加水至20μL。反应物于37℃作用30分钟后,置冰上5分钟。随后将20μL反应物转化到常规感受态细菌,涂LB板。次日挑取细菌克隆进行质粒制备,并进行PCR鉴定(如图3所示)。利用血清4型禽腺病毒阳性鸡血清通过western blot验证F1蛋白在293T细胞中的表达(如图4)。

[0030] 6,制备检测血清4型禽腺病毒抗体的抗原:在96孔细胞板中培养293T细胞至形成80%-90%单层;随即参照转染试剂TransIT-LT1说明书的步骤进行pcDNA3.1-FAdV_F1重组表达质粒转染。具体步骤:先将48ug质粒溶于1.6mL的OPTI-MEM培养基,然后加入72uL的TransIT-LT1转染试剂,混匀后室温放置;45分钟后加入6.4mL的OPTI-MEM培养基;混匀后滴加到96孔细胞板,每孔80uL。细胞转染48小时后,弃去96孔细胞板中培养基,并用丙酮乙醇固定液固定细胞5分钟;固定的表达细胞血清4型禽腺病毒F1蛋白的293T细胞自然干燥后置-20度待用,即为检测血清4型禽腺病毒抗体的抗原。

[0031] 7,检测血清4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒组装及应用:该试剂盒成分包括1块固定的表达F1蛋白的293T细胞96孔板,1mI商品化的FITC标记的羊抗鸡抗体,200mI样品稀释液以及洗涤液(PBS),1mI阳性血清及1mI阴性血清。该试剂盒检测血清4型禽腺病毒抗体的步骤及阳性判定标准如下:先用PBS洗涤一遍固定有表达F1蛋白的293T细胞96孔板,然后加入1:100稀释的血清样品(同时设立1:100的阳性血清及阴性血清对照),50uI/孔,37度反应45min;PBS洗涤3遍后,加入1:100稀释的FITC标记的羊抗鸡抗体,50uI/孔,37度反应30min;PBS洗涤3遍后,进行倒置荧光显微镜下观察。若出现细胞核内亮绿色特异荧光,则该样品判为阳性(图5A);否则为阴性(图5C)。试剂盒特异性试验发现,4型腺病毒血清可与表达F1的293T细胞呈现特异性亮绿色荧光(图5A),与不表达F1的正常293T细胞不反应(图5B);而SPF鸡血清、抗马立克氏病病毒血清、抗鸡新城疫病毒抗体、抗禽白血病病毒抗体、抗禽流感病毒抗体以及抗传染性法氏囊病病毒抗体均与表达F1的293T细胞不反应(分别为图5中C、D、E、F、G、H)。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 扬州大学

<120> 一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒

<130>

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gaattctgca gatatccagc acagtg

26

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gctcgggtacc aagcttaagt ttaaacg

27

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

agcttggtac cgaatgctcg ccctaategc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

atatctgcag aatttagggg ccggagcat

30

<210> 5

<211> 1296

<212> DNA

<213> 4型禽腺病毒

<400> 5

atgtcgcccc taategcctc cgcagccgat accgtctecg ccagcggaaa aaaacgaccc

60

[0002]

cgcagggccc	tatecgaacc	tagccggtac	ctttcggagg	gcgacgagcg	tcgaaaaccc	120
aaacgcgcgc	gaccggecac	ccgegcgaat	ggtcccctec	tcgatetggt	gtatccattt	180
gacttcaatg	cggggggagg	aggtggcagc	ggtggcggcg	gtgggggagg	tggaggtcag	240
cagatcgcgg	tcgaccccca	tgggecgctc	gaactcaactg	gtgacetact	gaecctcaac	300
acaaaaacgc	ccatttacgt	cagcgatcga	gcggtcagtc	tgetcatcga	tgacaatact	360
ttggcacta	agcaagecaa	cggggcgctc	atgggtcaaaa	ccgcggcccc	tctgaactcg	420
ggcactggtg	gaggcgctac	gctaggcttc	gaccctcgca	ccatggcgct	agattccgtc	480
aecgggggtg	tcaaagtgct	cgtegactca	cagggaccte	tacaagecca	caegggagge	540
ateactctcc	agttcgacac	tcaagacttc	gttgtcaaca	atggcgctct	agcgctagcc	600
tectcggteg	gtccgaecta	tctgagcccc	tttgcgacct	acgaagtcac	gcccgtcttg	660
ggaatatcgc	agaggaacgg	caacgtaaaa	agcaagggct	tgcaaaactg	gtccatagge	720
tattacatct	acatgggtgag	ctcagccggg	ctagtcaacg	gactcatcac	tctggagcta	780
gccccatgac	tcacaggcgc	gagcggagaa	aacagcctga	ctagcggctc	caactttacc	840
tttgtctca	gccccatgta	cccgatagaa	acagaggtga	atttgteect	catcgtgccg	900
cccacggtct	cgecgaccaa	tcaaaaccac	gtgtttgtgc	ccaatagcaa	ccagagegac	960
gtgggetate	tegggetgcc	gcctcaface	agggacaatt	ggtacgtgcc	catcgactcg	1020
cccggcctgc	ggetcgtctc	tttcatgecc	accgccaccg	gaaacgagaa	attcggacag	1080
ggeacgttgg	gatactgcgc	cgccaccate	cagaacacgt	ccagcggaac	caegccgctc	1140
gatcgcgatg	ccttcaactgt	ctcgtctgecg	cagacctccg	getccaactg	gtttgaccag	1200
aaegcgeccg	acactgtggt	gacgaccggt	ectatccett	tttctatca	gggttacgtc	1260
tactcecca	acgggaacaa	tgetcegggc	ccctaa			1296

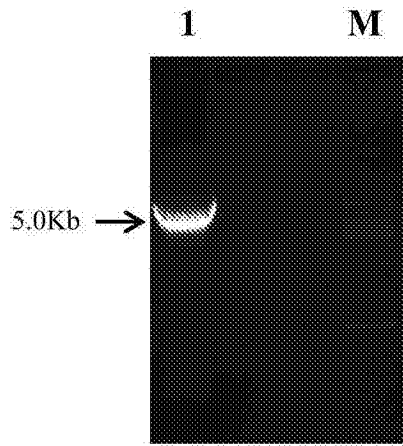


图1

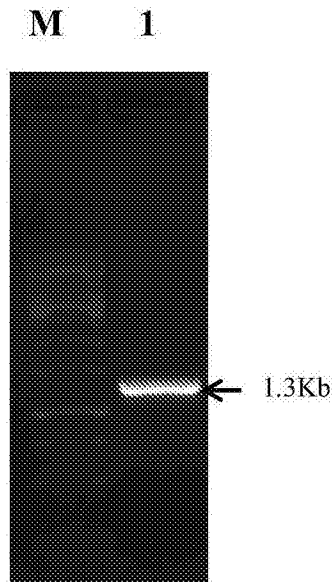


图2

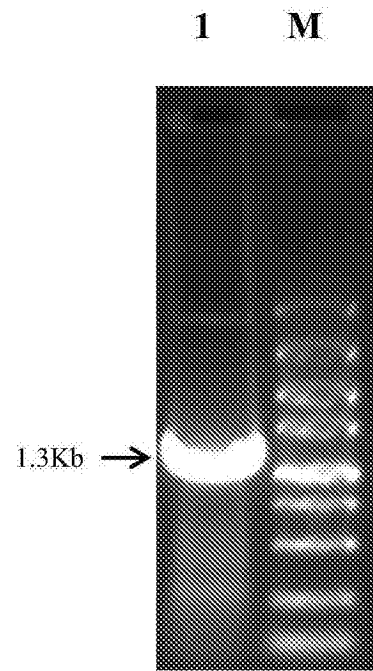


图3

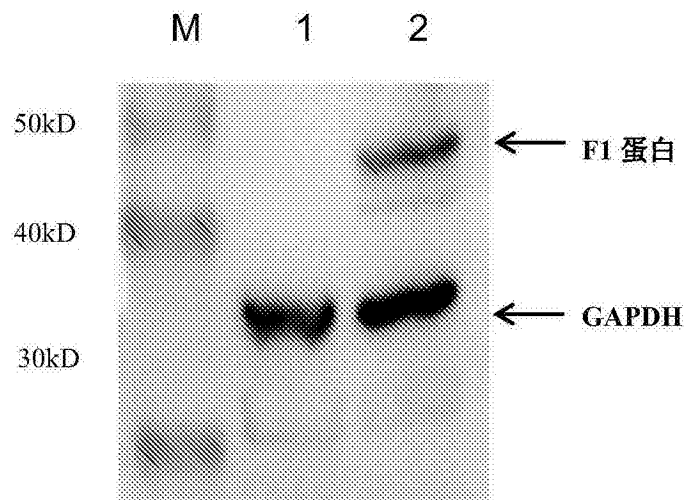


图4

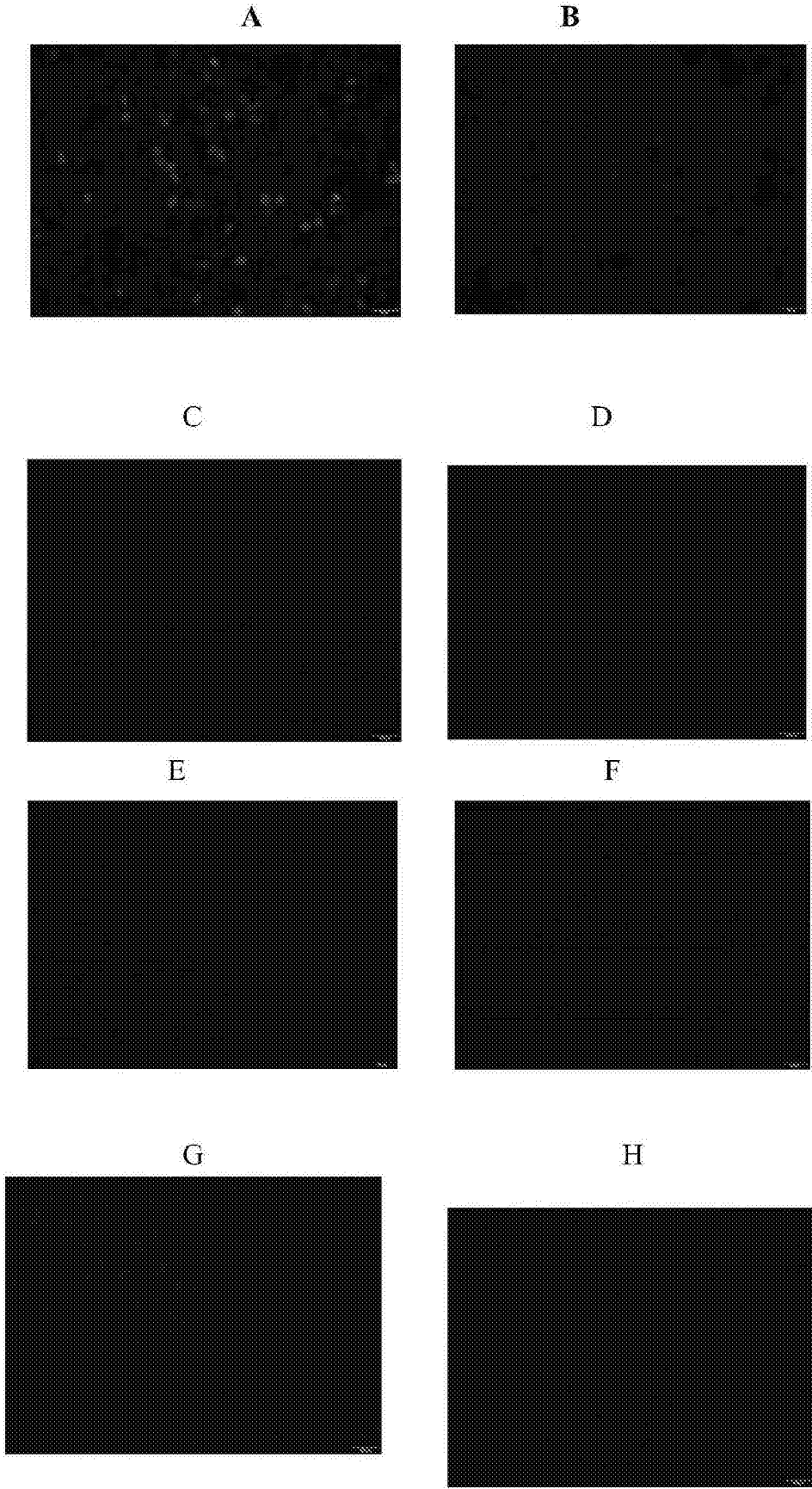


图5

专利名称(译)	一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒		
公开(公告)号	CN106018780A	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610327488.8	申请日	2016-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	叶建强 梁广成 邵红霞 王伟康 秦爱建 万志敏		
发明人	叶建强 梁广成 邵红霞 王伟康 秦爱建 万志敏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/5302		
代理人(译)	卢亚丽		
其他公开文献	CN106018780B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术检测领域，具体涉及一种基于F1蛋白的检测4型禽腺病毒抗体的间接免疫荧光试剂盒。该试剂盒包括表达F1蛋白的293T细胞，FITC标记的羊抗鸡抗体，样品稀释液，洗涤液。本发明试剂盒具有良好的特异性；该试剂盒不仅能用于血清4型禽腺病毒感染状况流行病学调查，而且能有效用于监测免疫鸡群血清4型禽腺病毒抗体水平，用于评价免疫保护性抗体水平等。

