



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105242043 A

(43) 申请公布日 2016.01.13

(21) 申请号 201510680061.1

(22) 申请日 2015.10.19

(71) 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材
街 59 号

(72) 发明人 王君伟 高明春 彭统全 李迪
马波

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书26页
序列表7页 附图6页

(54) 发明名称

一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用
ELISA 试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种可鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用 AGL-ELISA 试剂盒,包括包被 8BF 蛋白的酶标板和酶标记的重组蛋白 [AGL]_n,重组蛋白 [AGL]_n为将金黄色葡萄球菌 A 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 B 结构域、链球菌蛋白 G 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 C2 结构域、大消化链球菌蛋白 L 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 B3 结构域这三种蛋白结构域进行基因优化和串联,形成的多拷贝重组蛋白,n 为 1、2 或 3。本发明重组蛋白 [AGL]₂进行酶标记,酶标记产物经 Western-blot、ELISA 检测,可与多物种哺乳动物免疫球蛋白结合,可作为各种哺乳动物血清学检测中通用抗体,可替代物种特异性抗体,进行多物种共患传染病检测。AGL-ELISA 可检测多种动物口蹄疫感染,并能鉴别疫苗免疫和自然感染动物以及持续感染动物。

1. 一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用 AGL-ELISA 试剂盒,其特征在于,包括包被 8BF 蛋白的酶标板和酶标记的重组蛋白 [AGL]_n;

其中,所述重组蛋白 [AGL]_n为将金黄色葡萄球菌 A 蛋白免疫球蛋白结构域中 B 结构域、链球菌蛋白 G 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 C2 结构域、大消化链球菌蛋白 L 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 B3 结构域这三种蛋白结构域进行基因优化和串联,形成的多拷贝重组蛋白,n 为 1、2 或 3。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的多物种为牛、羊、猪以及鹿;所述的鉴别诊断口蹄疫病毒感染是指通过检测口蹄疫病毒非结构蛋白(NSP)产生的抗体来达到区分疫苗免疫动物与口蹄疫病毒感染动物的目的。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述重组蛋白 [AGL]_n按照以下方法制备得到:

(1) 重组蛋白 [AGL]_n基因的设计与串联

①选取金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 B 结构域、链球菌蛋白 G 的 C2 结构域和大消化链球菌蛋白 L 的 B3 结构域,设计可在大肠杆菌表达系统中高效表达的 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL 基因序列,并采用重叠延伸 PCR 方法合成出 B-SPA 和 B-SPG 基因,人工合成 B-PPL 基因,所述 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL 基因的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示;

②将合成的 B-SPA 和 B-SPG 基因分别与 pMD18-T 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切、PCR 鉴定和测序,得到重组质粒 pMD18-T-B-SPA 和重组质粒 pMD18-T-B-SPG;将合成的 B-PPL 基因与同样用 XhoI、BglIII 酶切的 pJWF 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切、PCR 鉴定和测序,得到重组质粒 pJWF-B-PPL;

③重组质粒 pMD18-T-B-SPA 用 BglIII 和 Xho I 进行双酶切,酶切产物 B-SPA 与同样双酶切的 pET-30a(+) 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPA;重组质粒 pMD18-T-B-SPG 用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,酶切产物 B-SPG 与同样双酶切的 pET-30a(+) 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPG;

④重组质粒 pET-30a(+)-B-SPA 用 BglIII 和 XhoI 进行双酶切,重组质粒 pET-30a(+)-B-SPG 用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,酶切产物 B-SPA、B-SPG 同时与酶切回收产物 pET-30a(+) 载体进行连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG;

⑤重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG 用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切,重组质粒 pJWF-B-PPL 用 BglIII 和 XhoI 进行双酶切,酶切产物 B-PPL 基因与酶切回收产物 pET-30a(+)AG 载体进行连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPPAGL;

⑥重组质粒 pET-30a(+)-B-SPPAGL 经 BglIII 和 XhoI 双酶切后回收的带有黏性末端的 B-SPPAGL 片段,连接在经 BamHI 和 XhoI 双酶切 pET-30a(+)-B-SPPAGL 后回收的黏性末端的载体大片段上,串联为 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n载体;

(2) 重组蛋白 [AGL]_n的诱导表达

串联表达载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n,转化 Rosetta (DS3) pLysS 感受态细胞,感受态

细胞于含浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中 37°C 培养 12h 后,按照体积比 1:100 的比例转接到含浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,培养至菌液 OD_{600} 达到 0.4 ~ 0.6 时,按浓度 0.8 ~ 1.2mmol/L 加入 IPTG 诱导 4 ~ 5h,诱导后的菌液 4°C 5000r/min 离心 20min,收集菌体沉淀;

(3) 重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$ 的提取与纯化

①每克菌体沉淀用 1mL lysis bufferr 溶解,反复冻融 3 次,在冰浴条件下超声波裂解菌体,功率 400W,按超声 3s,间歇 3s 的方式进行,超声至菌液不再粘稠为宜。超声后产物 4°C 条件下 5000r/min 离心 20min,小心吸取上清,上清液用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后用于重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$ 的纯化;

所述 lysis bufferr 包含 50mmol/L NaH_2PO_4 , 300mmol/L NaCl , 10mmol/L 咪唑, pH8.0;

②重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$ 采用亲和层析进行纯化,具体采用 Novagen His Purification System 纯化系统进行纯化,得到重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$ 。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 (1) 重叠延伸 PCR 方法合成 B-SPA 的引物为 A1、A2、A3 和 A4,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:6-9 所示;重叠延伸 PCR 方法合成 B-SPG 的引物为 G1、G2、G3 和 G4,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:10-13 所示。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,当 n 为 2 时,重组蛋白 $[\text{AGL}]_2$ 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示;编码重组蛋白 $[\text{AGL}]_2$ 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括阳性对照、阴性对照、封闭液、稀释液、显色液、洗涤液和终止液;所述酶为辣根过氧化物酶。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于,所述阳性对照为成年牛免疫 3ABC 蛋白后 1 月采集的血清,3ABC 抗体效价为大于 1:1024;所述阴性对照为健康未免疫犊牛血清,经 LPBE 和 NSP 蛋白试剂盒检测为阴性;所述封闭液和稀释液均为 5% 脱脂乳;所述显色液为 TMB 底物溶液;所述洗涤液为 PBST 缓冲液;所述终止液为 1M H_2SO_4 溶液。

8. 使用权利要求 1-7 任一项所述试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 包被 8BF 蛋白的酶标板 4°C 过夜后用洗涤液洗涤, 37°C 下用封闭液封闭 2h,洗板;
- (2) 加入对照和待测样品, 37°C 孵育,洗板;
- (3) 加入酶标记的重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$, 37°C 孵育,洗板;
- (4) 加入显色液, 37°C 显色,最后加终止液终止反应,测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述 8BF 蛋白的包被稀释液为 0.01M NaOH 溶液,包被稀释倍数为 1:320;所述酶标记的重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$ 的使用浓度为 1:8000;所述对照包括阳性对照和阴性对照,所述阳性对照为成年牛免疫 3ABC 蛋白后 1 月采集的血清,3ABC 抗体效价为大于 1:1024; ;阴性对照为健康未免疫犊牛血清,经 LPBE 和 NS 蛋白试剂盒检测为阴性;所述封闭液为 5% 脱脂乳;所述显色液为 TMB 底物溶液;所述洗涤液为 PBST 缓冲液;所述终止液为 1M H_2SO_4 溶液;所述酶为辣根过氧化物酶;所述对照和待测样品、酶标记的重组蛋白 $[\text{AGL}]_n$ 及显色液的作用时间分别为 30min、30min 和 5min。

10. 权利要求 1-7 任一项所述的试剂盒在制备检测多种动物共患传染病、非共患传染病以及哺乳动物免疫球蛋白试剂中的应用;优选的,所述的多种动物共患传染病为口蹄疫病或布鲁氏菌病,所述的非共患传染病为牛病毒性腹泻。

一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用 ELISA 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,特别涉及一种一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用 ELISA 试剂盒,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] SPA、SPG、PPL 都是典型的免疫球蛋白结合蛋白,可以与人和多种动物免疫球蛋白结合,结合能力和结合谱不同。SpA, SpG 和 PPL 的单结构域已被证实有结合 Ig 的作用 (Jansson Birger,Uhlén Mathias,Nygren Per Åke .All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding[J].FEMS Immunology&Medical Microbiology, 2006, 20(1)。先前报道认为 SPA 只能结合鼠 IgG 的 Fc 区域, SPG 既能结合 Fc 区域又能结合 Fab 区域,并且认为 SPA、SPG 与 Fc 的结合位点是重叠的。但是 Aybay, C 等用木瓜蛋白酶消化鼠 IgG 后发现两种蛋白结合 Fc 区域的结合位点是独立的,并不重叠 (Aybay C.Differential binding characteristics of protein G and protein A for Fc fragments of papain-digested mouse IgG[J].IMMUNOLOGY LETTERS, 2003, 85(PII S0165-2478(02)00262-63):231-235。)。SPA、SPG 与免疫球蛋白的重链结合,相反 PPL 只与多种哺乳动物 Ig κ 轻链结合,而且只与片段区域的可变区的 V κ I、V κ III、和 V κ IV 亚基结合而不与重链、Ig λ 轻链和 κ 链的 C_L区域结合。PPL 与人 IgA1、A2、D、E、M 亚型和大鼠 IgG1 的结合能力是 SPA、SPG 所无法比拟的。PPL 有 5 个同源性 Ig 结合区域 (B1-B5) 每个区域有 72-76 个残基。尽管 B1 结构域初始残基有些无序,它的 C 末端 62 个残基形成一个非常牢固的区域 (T_m $\approx$ 70°C),由一个 α 螺旋贯穿四个 β 折叠构成。

[0003] 根据 SPA、SPA、PPL 的免疫球蛋白结合区域的特性与互补性,早在 1994 就有学者选择 L 蛋白 4 个重复结构域 B1-B4 和蛋白 G 两个 IgG_{FC} 结合结构域,构建融合蛋白 LG,并用来纯化鼠科动物的 IgG 和 IgG 片段的单克隆抗体 (G Svensson H.,R Hoogenboom H.,U Sjöbring .Protein LA,a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody-and Fab-binding properties. [J].European Journal of Biochemistry, 1999, 258(2)),这些融合蛋白高效而且通用,可以作为强有力的结合介质,用来鉴定、纯化抗体和抗体片段。但并未证实融合后的结构域是如何发挥作用,是协同作用还是抑制作用。2008 年 Yang hua 构建了两种单结构域融合的新型免疫球蛋白结合分子 PA(A)-PG 和 PA(A)-PL,对 hIgG/hIgG1-Fc 和 hIgM/hIgA 展现出很强的结合能力,经竞争性抑制试验证实 PA(A)-PG 和 PA(A)-PL 分子发挥协同结合的优势和结合性能 (Hua Yang,Jie Cao,Lian-Qing Liet al.Evolutional selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various single domains of immunoglobulin(Ig)-binding proteins(IBPs)with four kinds of Ig molecules[J]. BMC Microbiology, 2008, 8(1))。

[0004] 本发明选金黄色葡萄球菌 A 蛋白免疫球蛋白结构域中 B 结构域、链球菌蛋白 G 蛋白免疫球蛋白结合结构域 C2 结构域、大消化链球菌蛋白 L 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 B3

结构域进行基因优化设计,把三种蛋白结构域串联,形成多种拷贝,在大肠杆菌中实现可溶性高效表达,选择表达量高与免疫球蛋白结合能力强的 2 拷贝体进行酶标记。标记产物经 Western-blot、ELISA 检测,可与多物哺乳动物免疫球蛋白结合,可作为血清学检测中通用抗体,可替代单一抗体,进行多物种布鲁氏菌检测。改善的 AGL-ELISA 可检测口蹄疫感染,并能鉴别疫苗免疫和自然感染动物以及持续感染动物。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的在于提供一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用 ELISA 试剂盒,该试剂盒可检测多种动物口蹄疫感染,并能鉴别诊断出疫苗免疫和自然感染动物以及持续感染动物;

[0006] 本发明第二个目的在于一系列所述重组蛋白 $[AGL]_n$, HRP 酶标记的重组蛋白 $[AGL]_2$ 可以特异地与多种哺乳动物免疫球蛋白反应,并且可以作为第二抗体用于多种动物传染病的血清学检测方法中;

[0007] 本发明的第三个目的在于提供一种制备所述重组蛋白 $[AGL]_n$ 的方法;

[0008] 本发明的第四个目的在于提供所述 AGL-ELISA 试剂盒在制备检测多种动物共患传染病、非共患传染病以及哺乳动物免疫球蛋白试剂中的应用。

[0009] 为了实现本发明的目的,本发明提供了如下技术方案:

[0010] 一种检测口蹄疫病毒非结构蛋白抗体的 AGL-ELISA 试剂盒,其特征在于,包括包被 8BF 蛋白的酶标板和酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$;

[0011] 其中,所述重组蛋白 $[AGL]_n$ 为将金黄色葡萄球菌 A 蛋白免疫球蛋白结构域中 B 结构域、链球菌蛋白 G 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 C2 结构域、大消化链球菌蛋白 L 蛋白免疫球蛋白结合结构域中 B3 结构域这三种蛋白结构域进行基因优化和串联,形成的多拷贝重组蛋白, n 为 1、2 或 3。

[0012] 在本发明中,优选的,所述的多物种为牛、羊、猪以及鹿;所述的鉴别诊断口蹄疫病毒感染是指通过检测口蹄疫病毒非结构蛋白(NSP)产生的抗体来达到区分疫苗免疫动物与口蹄疫病毒感染动物的目的。

[0013] 进一步的,本发明提供了所述重组蛋白 $[AGL]_n$ 的制备方法:

[0014] (1) 重组蛋白 $[AGL]_n$ 基因的设计与串联

[0015] ①选取金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 B 结构域、链球菌蛋白 G 的 C2 结构域和大消化链球菌蛋白 L 的 B3 结构域,设计可在大肠杆菌表达系统中高效表达的 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL 基因序列,并采用重叠延伸 PCR 方法合成出 B-SPA 和 B-SPG 基因,人工合成 B-PPL 基因,所述 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL 基因的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所示;

[0016] ②将合成的 B-SPA 和 B-SPG 基因分别与 pMD18-T 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切、PCR 鉴定和测序,得到重组质粒 pMD18-T-B-SPA 和重组质粒 pMD18-T-B-SPG;将合成的 B-PPL 基因与同样用 XhoI、BglIII 酶切的 pJWF 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切、PCR 鉴定和测序,得到重组质粒 pJWF-B-PPL;

[0017] ③重组质粒 pMD18-T-B-SPA 用 BglIII 和 Xho I 进行双酶切,酶切产物 B-SPA 与同样双酶切的 pET-30a(+) 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,

得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPA ;重组质粒 pMD18-T-B-SPG 用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,酶切产物 B-SPG 与同样双酶切的 pET-30a(+) 载体连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPG ;

[0018] ④ 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPA 用 BglIII 和 XhoI 进行双酶切,重组质粒 pET-30a(+)-B-SPG 用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,酶切产物 B-SPA、B-SPG 同时与酶切回收产物 pET-30a(+) 载体进行连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG ;

[0019] ⑤ 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG 用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切,重组质粒 pJWF-B-PPL 用 BglIII 和 XhoI 进行双酶切,酶切产物 B-PPL 基因与酶切回收产物 pET-30a(+) AG 载体进行连接,连接产物转化 TG1 感受态细胞,挑选阳性克隆,酶切鉴定,得到重组质粒 pET-30a(+)-B-SPPAGL ;

[0020] ⑥ 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPPAGL 经 BglIII 和 XhoI 双酶切后回收的带有黏性末端的 B-SPPAGL 片段,连接在经 BamHI 和 XhoI 双酶切 pET-30a(+)-B-SPPAGL 后回收的黏性末端的载体大片段上,串联为 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n 载体 ;

[0021] (2) 重组蛋白 [AGL]_n 的诱导表达

[0022] 串联表达载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n, 转化 Rosetta (DS3) pLysS 感受态细胞,感受态细胞于含浓度为 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中 37℃ 培养 12h 后,按照 1:100 (V/V) 的比例转接到含浓度为 30 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,培养至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.4 ~ 0.6 时,按浓度 0.8 ~ 1.2mmol/L 加入 IPTG 诱导 4 ~ 5h,诱导后的菌液 4℃ 5000r/min 离 20min,收集菌体沉淀 ;

[0023] (3) 重组蛋白 [AGL]_n 的提取与纯化

[0024] ① 每克菌体沉淀用 1mL lysis bufferr 溶解,反复冻融 3 次,在冰浴条件下超声波裂解菌体,功率 400W,按超声 3s,间歇 3s 的方式进行,超声至菌液不再粘稠为宜。超声后产物 4℃ 条件下 5000r/min 离心 20min,小心吸取上清,上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后用于重组蛋白 [AGL]_n 的纯化 ;

[0025] 所述 lysis bufferr 包含 50mmol/L NaH₂PO₄, 300mmol/L NaCl, 10mmol/L 咪唑, pH8.0 ;

[0026] ② 重组蛋白 [AGL]_n 采用亲和层析进行纯化,具体采用 Novagen His Purification System 纯化系统进行纯化,得到重组蛋白 [AGL]_n。

[0027] 在本发明中,优选的,步骤 (1) 重叠延伸 PCR 方法合成 B-SPA 的引物为 A1、A2、A3 和 A4,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:6-9 所示 ;重叠延伸 PCR 方法合成 B-SPG 的引物为 G1、G2、G3 和 G4,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:10-13 所示。

[0028] 进一步的,本发明提供了当 n 为 2 时,重组蛋白 [AGL]₂ 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示 ;编码所述重组蛋白 [AGL]₂ 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0029] 在本发明中,优选的,所述试剂盒还包括阳性对照、阴性对照、封闭液、稀释液、显色液、洗涤液和终止液 ;所述酶为辣根过氧化物酶 ;所述口蹄疫病毒非结构蛋白抗体来源于受感染的牛、猪、羊和鹿血清。

[0030] 在本发明中,优选的,所述阳性对照为成年牛免疫 3ABC 蛋白后 1 月采集的血清,3ABC 抗体效价为大于 1:1024 ; ;所述阴性对照为健康未免疫犊牛血清,经 LPBE 和 NSP 蛋白

试剂盒检测为阴性 ;所述封闭液和稀释液均为 5%脱脂乳 ;所述显色液为 TMB 底物溶液 ;所述洗涤液为 PBST 缓冲液 ;所述终止液为 1M H_2SO_4 溶液。

[0031] 使用所述试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0032] (1) 包被 8BF 蛋白的酶标板 4℃过夜后用洗涤液洗涤,37℃下用封闭液封闭 2h,洗板;

[0033] (2) 加入对照和待测样品,37℃孵育,洗板;

[0034] (3) 加入酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$,37℃孵育,洗板;

[0035] (4) 加入显色液,37℃显色,最后加终止液终止反应,测定 OD_{450nm} 值。

[0036] 在本发明的一个具体实施例中,优选的,所述的试剂盒包括:

[0037] 酶标板:由 8BF 蛋白包被;

[0038] 酶标记的重组蛋白 $[AGL]_2$:辣根过氧化酶标记的重组蛋白 $[AGL]_2$;

[0039] 稀释液:5%脱脂乳;

[0040] 封闭液:5%脱脂乳;

[0041] 洗涤液:PBST 缓冲液;

[0042] 阳性对照:成年牛免疫 3ABC 蛋白后 1 月采集的血清,3ABC 抗体效价为大于 1:1024;;

[0043] 阴性对照:健康未免疫犊牛血清,经 LPBE 和 NSP(非结构蛋白)试剂盒检测为阴性;

[0044] 显色液:TMB 底物溶液;

[0045] 终止液:1M H_2SO_4 溶液。

[0046] 为了确定出最佳反应条件,本发明在不同反应条件下,对包被缓冲液、封闭液、血清稀释液及酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ 稀释液进行优化,以 P/N 值高低为评价指标,确定它们的种类;对 8BF 抗原和酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ 分别系列稀释后做方阵滴定,以 P/N 值高低为评价指标,确定它们的最佳使用浓度;然后固定 8BF 抗原及酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ 的使用浓度分别检测待测样品和对照(5min、10min、15min、30min、45min 和 60min)、酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ (5min、10min、20min、30min、45min 和 60min)、封闭液(3min、5min、10min、15min、20min 和 30min)不同孵育时间对检测效果的影响,选取 P/N 值较高者作为最佳的孵育时间。经试验确定包被缓冲液为 0.01M NaOH 溶液,封闭液、血清稀释液和酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ 稀释液均为 5%脱脂乳,8BF 抗原包被稀释倍数为 1:320,酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ 的使用浓度为 1:8000,对照和待测样品、酶标记的重组蛋白 $[AGL]_n$ 及显色液的作用时间分别为 30min、30min 和 5min。

[0047] 在本发明中,优选的,所述对照包括阳性对照和阴性对照,阳性对照为成年牛免疫 3ABC 蛋白后 1 月采集的血清,3ABC 抗体效价为大于 1:1024;;阴性对照为健康未免疫犊牛血清,经 LPBE 和 NSP(非结构蛋白)试剂盒检测为阴性;所述封闭液为 5%脱脂乳;所述显色液为 TMB 底物溶液;所述洗涤液为 PBST 缓冲液;所述终止液为 1M H_2SO_4 溶液;所述酶为辣根过氧化酶。

[0048] 本发明 $[AGL]_2$ -HRP 可应用于多种与哺乳动物免疫球蛋白检测相关的研究,例如用于多抗效价的测定(牛干扰素 α 多克隆抗体的检测)、非共患传染病的检测(牛病毒性腹泻)、多种动物共患传染病的检测(口蹄疫病、布鲁氏菌病)。 $[AGL]_2$ -HRP 应用于布鲁氏菌

病间接 ELISA, 通过检测 118 份犬血清, 86 份鹿血清, 90 份猪血清, 87 份羊血清, 证实与国际标准检测方法结果一致。[AGL]₂-HRP 用于检测牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 抗体, 与国际标准方法的符合率达到 97.83%。口蹄疫检测结果证实, [AGL]₂-HRP 可准确、特异的检测牛、猪、羊、鹿口蹄疫感染抗体。

[0049] 因此, 更进一步的, 本发明提供了所述试剂盒在检测多种动物共患传染病、非共患传染病以及哺乳动物免疫球蛋白试剂中的应用。

[0050] 在本发明中, 优选的, 所述的多种动物共患传染病为口蹄疫病或布鲁氏菌病, 所述的非共患传染病为牛病毒性腹泻。

[0051] 与现有技术相比, 本发明的有益效果体现在:

[0052] 1. 蛋白构造上, [AGL]_n蛋白为多拷贝化的重组蛋白, 其是包括 3 种免疫球蛋白结合结构域的串联重复体, 以往技术发明只包括 SPA、SPG、PPL 中的 1 种或 2 种结构域, 或者活性片段为单拷贝。

[0053] 2. [AGL]_n蛋白可特异结合牛、羊、猪、鹿、犬、鼠、人等物种的免疫球蛋白, 结合免疫球蛋白速度与结合谱优于以往蛋白, 可作为检测多种动物免疫球蛋白的通用结合物, 用以替代物种特异性抗体 (例如抗牛抗体、抗羊抗体等), 尤其在该物种 (例如鹿、虎、狐、貂) 缺乏商品化抗体检测试剂的情况下更为优越。

[0054] 3. [AGL]_n蛋白, 特别是 [AGL]₂蛋白, 标记后可用于多种动物共患传染病的检测 (口蹄疫病、布鲁氏菌病等), 构建多物种通用检测试剂盒。例如, 可感染多种动物 (牛、羊、猪、鹿、骆驼等) 的口蹄疫的检测, 通常要分别制备适用于各个动物的检测试剂盒, 非常繁琐。但使用 [AGL]₂, 组装一种试剂盒即可用于多个物种, 大大减化了研究与制备成本。

附图说明

[0055] 图 1 为 B-PPL 优化前后密码子使用频率图;

[0056] 图 2 为改造前后的蛋白 L B3 结构域 RNA structure 分析图;

[0057] 图 3 为 B-SPA, B-SPG 基因的合成结果图, 其中 1: B-SPA 基因 SOE-PCR 结果, 2: B-SPG 基因 SOE-PCR 结果, M: DNA Marker DL2000;

[0058] 图 4 为重组克隆载体 pET-30a(+)-B-SPA, pET-30a(+)-B-SPG 的酶切鉴定图, 其中 M: Trans 2K plus II DNA Marker, 1: pET-30a(+)-B-SPA Xho I 单酶切, 2: pET-30a(+)-B-SPA Xho I 和 Bgl II 双酶切, 3: pET-30a(+)-B-SPG Xho I 单酶切, 4: pET-30a(+)-B-SPG Xho I 和 Bgl II 双酶切;

[0059] 图 5 为重组质粒 pJWF-PPL 的酶切鉴定图, 其中 M: DNA Marker; 1: pJWF-PPL Xho I 单酶切, 2: pJWF-PPL Xho I 和 Bgl II 双酶切;

[0060] 图 6 为图 3-3pET-30a(+)-B-SPAG 的酶切鉴定图, 其中 M: Trans 2K plus II DNA Marker, 1: pET-30a(+)-B-SPAG Xho I 单酶切, 2: pET-30a(+)-B-SPAG Xho I 和 Bgl II 双酶切;

[0061] 图 7 为 pET-30a(+)-B-SPPAGL 的酶切鉴定图, 其中 M: DNA Marker; 1: pET-30a(+)-B-SPPAGL Xho I 单酶切, 2: pET-30a(+)-B-SPPAGL Xho I 和 Bgl II 双酶切;

[0062] 图 8 为 AGL 基因的信息学特征图;

[0063] 图 9 为串联 AGL 基因表达载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n 的鉴定

图, 其中 M:Trans 2K plus II DNA Marker ;2、3、5、7 :pET-30a(+)-BB-pPL、pET-30a(+)-B-SPPAGL、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂、pET-30a(+)-BB-SP[AGL]₃XhoI 单酶切 ;1、4、6、8 :pET-30a(+)-B-PPL、pET-30a(+)-B-SPPAGL、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₃XhoI 和 Bgl II 双酶切 ;

[0064] 图 10 为串联 AGL 基因表达载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n的超声处理后的 SDS-PAGE 分析图,其中 M:蛋白质分子质量标准 ;1, 6, 10, 14 分别对应 L. AGL, (AGL)₂, (AGL)₃蛋白诱导表达前全菌体 ;2, 7, 11, 15 分别对应 L. AGL, (AGL)₂, (AGL)₃蛋白诱导表达后全菌体 ;3, 8, 12, 16 分别对应 L. AGL, (AGL)₂, (AGL)₃蛋白超声后沉淀 ;4, 9, 13, 17 分别对应 L. AGL, (AGL)₂, (AGL)₃蛋白超声后上清 ;5, 18 分别对应 pET32a-Rosstta 空载体诱导表达 ;

[0065] 图 11 为重组蛋白 L、[AGL]_n的纯化图,其中 M:蛋白质分子质量标准 ;1-5. L、AGL、[AGL]₂、[AGL]₃蛋白纯化结果 ;

[0066] 图 12 为纯化的 [AGL]_n蛋白 Western Blot 检测结果图,其中 2, 3, 4 分别对应纯化后 AGL、[AGL]₂、[AGL]₃蛋白 Western Blot 检测结果,1 对应 pET30a 阴性对照蛋白 ;

[0067] 图 13 为 [AGL]₂蛋白与多种 IgG 的 Western Blot 检测结果图,其中 A-M. Western Marker, B-M EasySee Western Blot Marker,1- 人 IgG,2- 猪 IgG,3- 山羊 IgG,4- 兔 IgG,5- 豚鼠 IgG,6- 空白对照,7- 小鼠 IgG,8- 鸡 IgY,9- 鹅 IgY,10-pET30a 空载体对照 ;

[0068] 图 14 为 [AGL]₂和 [AGL]₃两种蛋白的结合免疫球蛋白能力的比较图 ;

[0069] 图 15 为 HRP 标记 [AGL]₂蛋白 SDS - PAGE 电泳图,其中 M, Blue blus II Marker ;1. 纯化后的 [AGL]₂蛋白 ;2, HRP 标记后 [AGL]₂蛋白 ;3, 辣根过氧化物酶 ;

[0070] 图 16 为酶标蛋白活性测定图 ;

[0071] 图 17 为酶标蛋白与动物免疫球蛋白 Dot-ELISA 结果图,其中 A1-A5 :人 IgM, 人 IgG, 人 IgA, 兔 IgG, 猪 IgG ;B1-B5 :小鼠 IgG, 豚鼠 IgG, 山羊 IgG, 鸡 IgY, 鹿 IgG ;

[0072] 图 18 为酶标蛋白与多物种免疫球蛋白结合活性的比较分析结果图 ;

[0073] 图 19 为两种酶标蛋白活性的比较分析结果图 ;

[0074] 图 20 为两种酶标物检测 BoIFN- α 蛋白的 Western Blot 结果图 ;其中 1-BoIFN- α 蛋白,2-pPZ α A 空载体蛋白,M-WesternBlot EasySEE Marker ;

[0075] 图 21 为牛、猪、羊、鹿血清 S/P 平均值 (X) 分布图 ;其中 A: 牛血清, B: 猪血清, C: 羊血清, D: 鹿血清。

具体实施方式

[0076] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0077] 实施例 1 重组蛋白 [AGL]_n基因的设计和串联

[0078] 1、材料和方法

[0079] 1.1 材料

[0080] 重组质粒 pET-30a-8BF、表达载体 pET-30a(+)、大肠杆菌感受态细胞 TG1 及 Rosetta(DE3)PlysS 均由本实验室保存 ;克隆载体 pJWF 购于北京六合华大基因科技股

份有限公司,克隆载体 pMD18-T 购于宝生物工程(大连)有限公司;目的蛋白表达菌株 BL21-pET-30a-8BF 以及空载体对照菌株 BL21-pET-30a 均由本实验室制备并保存。限制性内切酶 BamH I、Xho I、BglIII 和 T4 DNA 多聚核酸激酶(T4 PNK)均购自宝生物工程(大连)有限公司;T4DNA 连接酶购自 New England BioLabs(NEB)。

[0081] 1.2 实验方法

[0082] 1.2.1 用于合成 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL 基因的寡聚核苷酸链设计

[0083] 分析文献中鉴别出的金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 5 个免疫球蛋白结合结构域,从中选取 B 结构域基因进行设计优化,而对于链球菌蛋白 G 的 3 个免疫球蛋白结合结构域,从中选取 C2 结构域为设计优化对象,对于大消化链球菌蛋白 L 的 5 个免疫球蛋白结合结构域,选取大消化链球菌蛋白 L 的 B3 结构域为设计优化对象。

[0084] 参考大肠杆菌密码子利用表,利用 Dnastar Lasergene 7.1 和 Synthetic Gene Designer 进行反向翻译,在不改变参考氨基酸序列的前提下尽量综合考虑密码子偏好性、密码子对及 mRNA 二级结构等与大肠杆菌基因表达相关的因素,将参考表位的核苷酸序列密码子改为大肠杆菌利用率最高或较高的密码子。利用 RNA 二级结构预测软件 RNA structure 4.5 进行调整,使此设计的基因 mRNA 自由能尽量降低、二级结构尽可能减少,最终获得密码子优化基因序列 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL。

[0085] 利用 Primer Premier 5 软件分别设计 4 条相互重叠的寡聚核苷酸片段 A1、A2、A3、A4(表 1),G1、G2、G3、G4(表 2),采用重叠延伸 PCR(gene splicing by overlap extension; SOE-PCR)技术(Horton, 1989;Xiong, 2004)进行合成优化基因 B-SPA、B-SPG,并委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成 B-PPL 基因(表 3)。

[0086] 表 1 4 条寡聚核苷酸片段及优化后 B-SPA

[0087]

A1	GTAAAGATCTTTTAACAAAGAACAACAAAATGCGTTTTACGAAATCC	SEQ ID NO:6
A2	TGTTTACGCAAAATGCTTTAGGACTTGTACGGTTTGGACTTGCTTCTTGTCGCATT GC	SEQ ID NO:7
A3	GAACGAAGAACAGCGTAACGGCTTCATCCAATCTCTGAAAGACGACCCATCACAA TCTG	SEQ ID NO:8
A4	TTCTGCTGGGTAGTGTAGACGATTGGACGACAGACTCCGATTTTTTGACTTGCTT AGA	SEQ ID NO:9
B-SPA	GTAAAGATCTTTTAACAAAGAACAACAAAATGCGTTTTACGAAATCCTGAACATGC CAAACCTGAACGAAGAACAGCGTAACGGCTTCATCCAATCTCTGAAAGACGACCC ATCACAATCTGCTAACCTGCTGTCTGAGGCTAAAAAACTGAACGAATCT	SEQ ID NO:3

[0088] 表 2 4 条寡聚核苷酸片段及优化后 B-SPG

[0089]

G1	CGCGGATCCACCTACAACTGGTTATCAATGGCAAAACCCTGAAAGGTGAAA CCAC	SEQ ID NO:10
G2	TTGGGACTTTCCACTTTGGTGGTGGCTTCGGCACCTGCGACGATGGCGGCTCT TTCAAA	SEQ ID NO:11
G3	GCTACCGCCGAGAAAGTTTTCAAACAGTACGCTAACGACAACGGTGTGATG GCGAATG	SEQ ID NO:12
G4	TGCCACAACCTACCGCTTACCTGGATGCTGCTGCGATGGTTTTGGAAGTGGCAA TGGCTTGAGCTCGCC	SEQ ID NO:13
B-SPG	CGCGGATCCACCTACAACTGGTTATCAATGGCAAAACCCTGAAAGGTGAAA CCACCGAAGCCGTGGACGCTGCTACCGCCGAGAAAGTTTTCAAACAGTACGC TAACGACAACGGTGTGATGGCGAATGGACCTACGACGACGCTACCAAAACC TTCACCGTTACCGAAGCTCGAGCGG	SEQ ID NO:4

[0090] 表 3 优化后 B-PPL

[0091]

B-PPL	AGATCTAAAGAAAAAACCCTCGGAAGAACCGAAAGAAGAAGTTACCATCAAAGCTAAC CTGATCTACGCTGACGCTAAAACCCAGACCGCTGAGTTCAAAGGTACCTTCGAAGAAG CTACCGCTGAAGCGTATCGTTACGCTGACGCTCTGAAAAAAGACAACGGTGAATACAC GGTIGACGTTGCTGACAAAGGTTACACCCTGAACATCAAATTCGCTGGTCAGGCTCCGA AAGCTGACAACAAAGGATCCAAATTCCTCGAG	SEQ ID NO:5
-------	---	-------------

[0092] 1. 2. 2 SOE-PCR 法合成密码子优化基因 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL

[0093] 1. 人工合成 B-SPA

[0094] 将 4 条寡聚核苷酸片段用去离子水稀释后作为模板和引物,采用 SOE-PCR 经两步合成 B-SPA。

[0095] B-SPA 基因合成第一步体系:

[0096]

A1	1μl	A3	1μl
A2	1μl	A4	1μl
Buffer	2μl	Buffer	2μl
dNTPS	2μl	dNTPS	2μl
pfu	1μl	pfu	1μl
ddH ₂ O	13μl	ddH ₂ O	13μl

[0097] 反应条件为: 94℃2min
94℃20sec
66℃20sec
72℃30sec
72℃2min
8cycles

[0098] 将反应后的两份产物各取 10 μl 混合,按上述反应条件进行 PCR。

[0099] B-SPA 基因合成第二步:

[0100] 将最终反应液取出 1 μl 作为目的基因模板,以 A1,A4 为引物进行 PCR 扩增。体系

及反应条件如下：

[0101]

Template	<1μg
Primer 1 (10μM)	1μl
Primer 2 (10μM)	1μl
10 x pfu Buffer	5μl
dNTP Mixture(2.5mM)	4μl
Pfu(2.5U/μl)	0.5-1μl
ddH ₂ O	补至 50μl

94℃3min

94℃30sec

[0102] 反应条件：56℃30sec 25 cycles

72℃45sec

72℃2min

[0103] 2. 人工合成 B-SPG

[0104] SPG 的合成方法同 SPA 的合成,但第一步的退火温度为 60℃,第二步的退火温度为 60℃。

[0105] 首次扩增目的基因 SPA 产物较特异,直接用于回收;SPG 特异性较差,需进行优化。

[0106] SPG 优化:对起始浓度分别进行 1:10 和 1:50 倍稀释产物较特异,可用于直接回收。

[0107] 3. 人工合成 B-PPL

[0108] 委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成 B-PPL 基因。

[0109] 1. 2. 3 克隆载体 pET-30a(+)-B-SPAG 构建及序列测定

[0110] 1. 2. 3. 1 B-SPA、B-SPG 基因片段的纯化

[0111] 1.5% 琼脂糖凝胶分别回收第二次 PCR 产物中 159bp 的 B-SPA 条带和 174bp 的 B-SPG 条带,应用上海华舜生物工程有限公司的销量胶回收试剂盒进行纯化,操作按说明书进行。B-SPA 基因与同样用 BglIII 和 XhoI 酶切的 pMD18-T 载体 16℃连接过夜,重组质粒命名为 pMD18-T-B-SPA,B-SPG 基因与同样用 BamH I 和 Xho I 酶切的 pMD18-T 载体 16℃连接过夜,重组质粒命名为 pMD18-T-B-SPG。上述重组质粒转化到感受态 TG1 中。待菌落长出后,挑取菌落于含有氨苄青霉素的新鲜的 LB 液体培养基,37℃振荡培养箱中培养过夜,碱裂解法小剂量制备重组质粒。对于重组质粒 pMD18-T-B-SPA 进行 Xho I 单酶切,BglIII 和 XhoI 双酶切鉴定,并以重组质粒 pMD18-T-B-SPA 为模板,利用寡聚核苷酸 A1、A4 为引物进行 PCR 鉴定。酶切产物和 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察酶切产物和 PCR 产物片段大小。

[0112] 对于重组质粒 pMD18-T-B-SPG 进行 Xho I 单酶切,BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定,并以重组质粒 pMD18-T-B-SPG 为模板,利用寡聚核苷酸 G1、G4 为引物进行 PCR 鉴定。酶切产物和 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察酶切产物和 PCR 产物片段大小。

[0113] 重组质粒 pMD18-T-B-SPA 和 pMD18-T-B-SPG 分别经单、双酶切和 PCR 鉴定后,将阳性重组子进行测序(由上海生工生物工程技术服务有限公司完成)。

[0114] 1.2.3.2 串联 SPAG 基因载体 pET-30a(+)-B-SP[AG]_n 的构建

[0115] a 克隆载体 pET-30a(+)-B-SPA 构建

[0116] 相同黏性末端 B-SPA 基因和载体 pET-30a(+) 的制备：

[0117] 重组质粒 pMD18-T-B-SPA 和载体 pET-30a(+) 用 BglIII 和 Xho I 进行双酶切，放于 16℃ 金属浴连接过夜。转化到感受态 TG1 中。待菌落长出后，挑取菌落于含有氨苄青霉素的新鲜的 LB 液体培养基，37℃ 振荡培养箱中培养过夜，碱裂解法小剂量制备重组质粒。对于重组质粒进行 Xho I 单酶切，BglIII 和 Xho I 双酶切鉴定。进行琼脂糖凝胶电泳，观察酶切产物片段大小。

[0118] b 克隆载体 pET-30a(+)-B-SPG 构建

[0119] 克隆载体 pET-30a(+)-B-SPG 构建方法与 pET-30a(+)-B-SPA 相似。

[0120] 重组质粒分别经单、双酶切鉴定后，阳性重组子分别命名为 pET-30a(+)-B-SPA、pET-30a(+)-B-SPG，存于 -20℃ 保存。

[0121] c 克隆载体 pET-30a(+)-B-SPAG 构建

[0122] (1) 黏性末端 B-SPG 基因和载体 pET-30a(+)-B-SPA 的制备

[0123] 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPG 用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切，取酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳，观察结果。对目的片段进行回收，回收产物存于 -20℃。

[0124] 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPA 用 BglIII 和 Xho I 进行双酶切，取酶切产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳，观察结果。对目的片段进行回收，回收产物存于 -20℃。

[0125] (2) B-SPA 基因和载体 pET-30a(+) 的连接

[0126] 由于 BglIII 与 BamH I 两种限制性内切酶属于同尾酶，进行酶切反应时可以产生相同的黏性末端，所以产物可以进行连接。两种回收产物放于 16℃ 金属浴连接过夜。

[0127] (3) 连接产物转化 TG1 感受态和质粒提取

[0128] 连接产物转化 TG1 感受态和质粒提取参照《分子克隆实验指南》进行。

[0129] (4) 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG 的鉴定

[0130] 对于重组质粒进行 Xho I 单酶切，BglIII 和 Xho I 双酶切鉴定。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，观察酶切产物片段大小。

[0131] 1.2.4 串联 SPPAGL 基因载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n 的构建

[0132] 1.2.4.1 B-PPL 基因片段的纯化

[0133] 委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成 B-PPL 基因片段，所用载体为 pJWF。pJWF 载体是按照本发明发明人的要求由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。pJWF 载体的核苷酸序列如 SEQ ID NO:14 所示。将合成的 B-PPL 基因与同样用 XhoI、BglIII 酶切的 pJWF 载体连接，连接产物转化 TG1 感受态细胞，挑选阳性克隆，酶切、PCR 鉴定和测序，得到重组质粒 pJWF-B-PPL。对于重组质粒 pJWF-B-PPL 进行 XhoI 单酶切，BglIII 和 XhoI 双酶切鉴定。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳，观察酶切产物片段大小。

[0134] 1.2.4.2 克隆载体 pET-30a(+)-B-SPPAGL 构建

[0135] (1) 蛋白 L B3 结构域和载体 pET-30a(+)-B-SPAG 粘性末端的制备

[0136] 重组质粒 pJWF-B-PPL 用 BglIII 和 XhoI 进行双酶切，取酶切产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳，观察结果。对目的片段进行回收，回收产物存于 -20℃。

[0137] 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG 用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切，取酶切产物在 0.8%

琼脂糖凝胶上进行电泳,观察结果。对目的片段进行回收,回收产物存于 -20°C 。

[0138] (2)B-PPL 基因和载体 pET-30a(+)AG 的连接

[0139] BglIII 与 BamHI 酶切后产生相同的黏性末端,所以产物可以进行连接。两种回收产物于 16°C 金属浴连接 $12\sim 14$ 小时。

[0140] (3) 连接产物转化 TG1 感受态和质粒提取

[0141] 连接产物转化 TG1 感受态和质粒提取参照《分子克隆实验指南》进行。

[0142] (4) 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPPAGL 的鉴定

[0143] 对于重组质粒进行 XhoI 单酶切, BamHI 和 XhoI 双酶切鉴定。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察酶切产物片段大小。

[0144] 2、实验结果

[0145] 2.1 重组克隆载体 pET-30a(+)-B-SPPAGL 的构建

[0146] 2.1.1 B-SPA、B-SPG、B-PPL 多肽的基因优化

[0147] 设计利用氨基酸密码子的简并性进行同义改造, B-SPA、B-SPG 两种序列自由能增大,密码子适应性指数升高,稳定的二级结构被打开使转录更易进行,并且消除了序列中的 AT 富含区,使 GC 含量较为均衡(45.36%和50.30%),优化后的 B-PPL 序列自由能减小,CAI 升高,二级结构打开后转录更容易进行,并且消除了序列中的 AT 富含区,使 GC 含量较为均衡(47.64%)(见表4),mRNA 的二级结构得到优化,增大基因 B-SPA 密码子使用频率,从而提高表达效率。mRNA 的二级结构得到优化,增大基因 B-PPL 密码子使用频率,从而提高表达效率。B-PPL 优化前后密码子使用频率的比较见图1,改造前后的蛋白 L B3 结构域 RNA structure 分析见图2。

[0148] 表4 基因优化前后表达量影响因素的比对

[0149]

组别 Group	密码子适应性指数 CAI	GC 含量 Content of GC	自由能 Energy
B-SPA 优化前 Before optimization	0.73	38.69%	-20.8
B-SPG 优化后 After optimization	0.81	45.36%	-13.0
B-SPG 优化前 Before optimization	0.52	39.39%	-30.7
B-SPG 优化后 After optimization	0.81	50.30%	-24.3

[0150] 2.1.2 SOE-PCR 人工合成 B-SPA, B-SPG 和 B-PPL 基因

[0151] 分别将4寡聚核苷酸片段进行 SOE-PCR 人工合成 B-SPA、B-SPG 和 B-PPL 基因,经1.5%琼脂糖电泳分析显示:在100-250bp 之间出现了特异的基因条带,大小与预期 B-SPA(159bp)、B-SPG(174bp) 一致,如图3所示。B-PPL 基因条带大小为264bp。

[0152] 2.1.3 重组克隆载体 pET-30a(+)-B-SPA, pET-30a(+)-B-SPG 构建及序列测定

[0153] 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPA, pET-30a(+)-B-SPG 经 XhoI 单酶切,出现了约5400bp 的基因片段;经 Bgl II 和 XhoI 双酶切,都分别出现了约210bp 左右的目的基因和约5400bp 的 pET-30a(+) 载体大片段,出现与预期大小一致的基因带,见图4。

[0154] 将鉴定为阳性的重组质粒送交上海生工生物工程技术有限公司进行测序,序列测定显示 B-SPA 基因 (159bp) 和 B-SPG (174bp) 碱基无突变,人工合成结果与设计相符,并且两基因成功克隆到载体 pET-30a(+) 的 Bgl II 和 Xho I 位点。

[0155] 2.1.4 重组质粒 pJWF-PPL 的鉴定

[0156] pJWF-PPL 重组质粒经 Xho I 单酶切,出现了约 3007bp 的基因片段;Bgl III 和 Xho I 双酶切后,出现了两条带,一条约为 260bp,另一条约 2800bp,与预期大小一致,见图 5。

[0157] 2.1.5 重组克隆载体 pET-30a(+)-B-SPAG 构建

[0158] 重组质粒 pET-30a(+)-B-SPAG 经 XhoI 单酶切,出现了约 5400bp 的基因片段;经 Bgl III/XhoI 双酶切,分别出现了 373bp 的目的基因片段和约 5400bp 的 pET-30a(+) 载体大片段,见图 6。证实 B-SPA、B-SPG 基因成功利用同尾酶 Bgl III 和 BamH I 在载体 pET-30a(+) 上相连。

[0159] 2.1.6 重组克隆载体 pET-30a(+)-B-SPPAGL 构建

[0160] pET-30a(+)-B-SPPAGL 重组质粒经 XhoI 单酶切,出现了约 6139bp 的基因片段;Bgl III 和 XhoI 双酶切,出现了两条带,一条为 717bp,另一条约 5400bp,与预期大小一致,见图 7。证实 B-PPL 基因成功利用同尾酶 Bgl III 和 BamHI 相连在载体 pET-30a(+)AG 上。

[0161] 本发明选择三种免疫球蛋白结合分子单个结构域进行化设计,串联表达技术把三种蛋白单独结构域融合在一起。为让各结构域独立发挥免疫结合能力,发挥协同作用,也防止目的片段被酶切和拼接后可能引起的蛋白质生物学特性变化,所以在 L 结构域两端分别加入蛋白 L 结构域天然间隔肽序列 SKEKTPEEPKEE 和蛋白 A 结构域天然间隔肽序列 QAPKADNKGSKF。因为两种间隔肽有良好的柔韧性和折叠性,同时具有高度亲水性,又是结合蛋白本身所含有的氨基酸序列(如图 8A、B 所示),既保证了单联蛋白的生化特性,又确保各结构域形成各自的天然高级构象。

[0162] 通过对构建好的 AGL 蛋白单独结构域串联基因的生物信息学分析(DNASTar 软件)发现,90%以上的串联蛋白氨基酸显示出良好的亲水性,表明选择的区域为免疫球蛋白结合区域,容易形成亲水性好、暴露于蛋白高级结构外层的免疫球蛋白结合部位,而且串联蛋白的柔性和折叠性也较好,与免疫球蛋白结合部位有突出分子表面部位的可能性(如图 8C 所示)。由于利用同尾酶原理,AGL 蛋白前段即蛋白 A 结构域与载体连接部位包含 50 个 pET-30a(+) 载体氨基酸序列,经 DNASTar 软件分析,这部分氨基酸有良好的亲水性和折叠性,在多拷贝串联时可作为间隔肽,确保串联的结构域能够独立发挥作用。综合上述分析,表明构建各个表位片段选择合理,串联基因构建成功。

[0163] 实施例 2 重组蛋白 [AGL]_n 的原核表达与鉴定

[0164] 1、材料和方法

[0165] 1.1 材料

[0166] 氨苄青霉素(Amp)和卡那霉素(Kan)购自 Sigma 公司;小量胶回收试剂盒(Gel Extraction Mini Kit)、硝酸纤维素膜(NC 膜)购于上海华舜生物工程有限公司;蛋白纯化试剂盒 Ni-NTA His Hind Purification System 试剂盒购自 Qiagen 公司;EasySee Western Blot Kit 和 Western Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

[0167] 1.2 方法

[0168] 1.2.1 B-SPPAGL 基因串联载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n 的构建

[0169] pET-30a(+)-B-SPPAGL 上的 B-SPPAGL 基因,设计时在首尾两端添加便于串联基因的 XhoI、BglIII 和 BamHI 酶切位点的核苷酸序列,其中 BglIII 和 BamHI 互为同尾酶,pET-30a(+)-B-SPPAGL 序列经 BglIII 和 XhoI 双酶切后回收的带有黏性末端的 B-SPPAGL 片段,可以连接在经 BamHI 和 XhoI 双酶切 pET-30a(+)-B-SPPAGL 后回收的黏性末端的载体大片段上,串联为 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂载体,pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂载体中的 B-SPP[AGL]₂基因片段与 B-SPPAGL 基因具有相同的酶切位点,因此参照相同的串联方式,可以串联成 n 为任意整数的 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n载体。本发明共构建了 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₃三种串联载体。各重组质粒转化至大肠杆菌 TG1 感受态细胞并进行质粒提取,参照《分子克隆实验指南》进行,并进行 XhoI 单酶切,BglIII 和 XhoI 双酶切鉴定。鉴定为阳性的重组质粒和菌液存于 -20℃。

[0170] 1.2.2[AGL]_n蛋白的原核表达

[0171] 1.2.2.1 串联表达载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n的构建

[0172] 本实施例 1.2.1 中构建的 3 种 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n串联载体的 AGL 基因都插在 pET-30a(+) 的 BglIII 与 XhoI 位点之间,为防止出现基因移码,再次利用同尾酶原理构建 pET-30a(+)-B-PPL、pET-30a(+)-B-SPPAGL、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₃四种表达载体。

[0173] 1.2.2.2 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n质粒转化 Rosetta(DS3)pLysS 感受态细胞

[0174] 将质粒转化入 Rosetta 感受态细胞中,转化步骤参照《分子克隆实验指南》进行。

[0175] 1.2.2.3 重组蛋白 [AGL]_n的诱导表达

[0176] 将含有 pET-30a(+)-B-PPL、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n质粒的菌液和 pET-30a(+)空载体质粒的菌液分别接种于 5ml LB 培养基中(含有卡那霉素 30 μg/mL),37℃ 恒温振荡培养 12h。取 2ml 接种于 200ml LB 培养基中(含有卡那霉素 30 μg/mL),培养至菌液 OD_{600nm} 约为 0.5 时,加入终浓度为 1.0mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,测定诱导 5h 后诱导后的菌液 4℃ 5000r/min 离 20min,收集菌体沉淀留做 SDS-PAGE 分析。

[0177] 1.2.2.4 诱导菌的 SDS-PAGE 分析

[0178] 用适量 PBS 重悬菌体,变性处理:菌液:2XSDS:DTT = 5:4:1,100℃ 水浴裂解处理 10min,《参照分子克隆指南》第三版中 SDS-PAGE 制胶方法,采用 12% 分离胶进行电泳分析。

[0179] 1.2.2.5 目的蛋白表达的可溶性检测

[0180] 每克菌体沉淀用 1mL lysis bufferr(50mmol/L NaH₂PO₄,300mmol/L NaCl,10mmol/L imidazole(咪唑),pH8.0) 溶解,反复冻融 3 次,在冰浴条件下超声波裂解菌体,功率 400W,按超声 3s,间歇 3s 的方式进行,超声至菌液不再粘稠为宜。超声后产物 4℃ 条件下 5000r/min 离心 20min,小心吸取上清,上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后用于重组蛋白 [AGL]₂的纯化;

[0181] 样品处理后各取 10 μL 跑蛋白电泳,考马斯亮蓝染色,检测目的蛋白的表达形式,是可溶性表达还是包涵体表达。

[0182] 1.2.2.6 重组蛋白 [AGL]_n的亲亲和层析纯化

[0183] 对重组蛋白 [AGL]_n蛋白采用 Novagen His Purification System 纯化系统进行纯化,方法参照说明书进行。

[0184] 收集本实施例 1.2.2.4 的大量诱导 200mL 重组菌 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n上清, 用 0.45 μm 滤膜过滤后用于蛋白的纯化。具体方法如下:

[0185] 再生 Ni-NTA 柱, 用 lysis buffer 洗涤柱子, 2mL/次, 洗涤两次。将过滤后的菌液裂解上清加入到 Ni-NTA 柱中, 旋转结合, 旋转 1min, 至冰浴中 3min, 反复操作 45min, 收集流出液 1ml; 分别用 2mL Wash buffer 洗柱 10 次, 收集少量流出液; 用 1.5mL Elutionbuffer 洗脱目的蛋白四次, 收集全部的洗脱液。收集的液体均进行 SDS-PAGE 分析。

[0186] 1.2.3 重组蛋白 [AGL]_n免疫球蛋白结合活性的鉴定

[0187] 1.2.3.1 重组蛋白 [AGL]_n结合力鉴定

[0188] 以选取的 3 种重组蛋白为被检抗原, pET-30a 空载体蛋白为阴性参照; 用 5% 脱脂乳 1:200 稀释牛血清; 兔抗牛 IgG-HRP 为第二抗体, 参照《免疫学常用实验方法》进行 WesternBlot 操作。

[0189] 1.2.3.2 重组 [AGL]_n和 [AG]_n蛋白与免疫球蛋白结合能力的比较

[0190] 用 0.01M NaOH 作为包被缓冲液, 包被人 IgG、人 IgA、人 IgM、山羊 IgG、兔 IgG、豚鼠 IgG、小鼠 IgG、猪 IgG、鹿 IgG、鸡 IgY 至 ELISA 反应板上, 1μg/孔, pET-30a(+) 空载体为阴性对照, 4℃过夜, 洗板, 拍干残余液体, 用 5% 脱脂乳 37℃封闭 2h, 洗板, 加相同物质的量的 [AGL]₂和 [AG]₃蛋白 (确保两种蛋白分子个数、结构域个数大致相等), 37℃作用 1h, 洗板, 拍干残余液体, 加入二抗 HRP 标记鹅免疫球蛋白 λ 轻链单克隆抗体, 37℃作用 1h, 洗板, 拍干残余液体, 加入 TMB 底物溶液, 室温 10 分钟, 用 1M H₂SO₄终止反应, 酶标仪读 OD_{450nm}值。

[0191] 1.2.3.3 HRP 标记 [AGL]₂蛋白及其活性测定

[0192] 本研究采用的是过碘酸钠法, 取 4mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 1mL 去离子水中, 加入 400 μL 新制备的 NaOI₄ (0.1mol/L) 室温震荡 20min。将反应物于 pH = 4.4 的醋酸钠缓冲液 (0.001mol/L) 中透析过夜。加入 6mg [AGL]₂重组蛋白, 用 0.2mol/L 的碳酸钠缓冲液 (PH9.5) 调节溶液 pH 值至 9.0-9.5 之间。立即加入 200 μL 新制备的 NaBH₄ (5mg/ml) 4℃ 2h。标记物的纯化采用饱和硫酸铵盐析法: 将制备好的酶结合物中缓慢滴加等体积的饱和硫酸铵, 边加边搅拌, 4℃沉淀 30min, 5000rpm 离心 15min, 沉淀用适量的 PBS 溶解并加入等体积的甘油, -20℃保存。

[0193] 酶标蛋白活性的测定选用 ELISA 法: 牛 IgG 及阴性对照牛 IFN-α 蛋白, 1 μg/孔包被于 ELISA 板, HRP 标记的 [AGL]₂蛋白用 PBST 以 1:200 开始倍比稀释至 1:256000 倍, 具体步骤参照本实施例 1.2.3.2。

[0194] 2 实验结果

[0195] 2.1 [AGL]_n蛋白的表达

[0196] 2.1.1 串联 AGL 基因表达载体 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n的构建

[0197] 为了防止本实施例 1.2.1 构建的 3 种 pET-30a(+)-B-SPP[AGL]_n串联载体由于移码而导致表达错误, 因此利用同尾酶原理把 [AGL]_n基因连接到用 BamHI 与 XhoI 双酶切后的 pET-30a(+) 载体上, 以此方式共构 pET-30a(+)-B-PPL、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₁、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₂、pET-30a(+)-B-SPP[AGL]₃ 4 种基因读码正确的表达载体, 经 XhoI 单酶切, Bgl II 和 XhoI 双酶切, 出现了目的基因和约 5400bp 的 pET-30a(+) 载体大片段, 见图 9。证实 [AGL]_n基因成功地克隆到了载体 pET-30a(+) 的 Bgl II 和 XhoI 位点。

[0198] 2.1.2 重组蛋白 [AGL]_n的诱导表达与纯化

[0199] 结果如图 10 所示,与空载体菌 pET-30a(+)/Rosetta 相比,4 种重组菌 L/Rosetta、AGL/Rosetta、[AGL]₂/Rosetta、[AGL]₃/Rosetta 在约 19.1ku、34.2ku、59.1ku、83.9ku 的位置出现了目的蛋白表达带。经过凝胶成像系统软件扫描分析,目的蛋白占总菌体的百分比最高的为 [AGL]₂/Rosetta(36.2%)。对 4 种菌液进行表达形式分析,结果均完全为可溶性表达。选取表达量相对较大的重组菌株 (AGL/Rosetta、[AGL]₂/Rosetta、[AGL]₃/Rosetta) 在正常条件下经过 Ni-NTA 纯化,出现单一目的条带,如图 11 所示。

[0200] 2.1.3 重组蛋白 [AGL]_n 的 WesternBolt 鉴定结果

[0201] 纯化后的 AGL、[AGL]₂、[AGL]₃ 重组蛋白进行 Western Blot 检测,结果如图 12 所示。结果证实 [AGL]_n 蛋白 (AGL、[AGL]₂、[AGL]₃) 与牛血清间具有良好的反应性,其中 AGL 反应性最弱,[AGL]₂、[AGL]₃ 相当。WesternBlot 分析 [AGL]₂ 重组蛋白与多种动物免疫球蛋白的反应性,结果显示 [AGL]₂ 蛋白与人 IgG,猪 IgG,山羊 IgG,兔 IgG,豚鼠 IgG,小鼠 IgG 有很好地结合能力,不与鸡 IgY 反应 (见图 13)。

[0202] [AGL]₂ 蛋白和 [AG]₃ 蛋白在摩尔数相同的情况下,分子结构域数量也相同,两种蛋白与包被量相同的各物种免疫球蛋白 (1 μg/孔) 反应,间接 ELISA 结果如图 14 所示,初步判定 [AGL]₂ 蛋白结合免疫球蛋白能力强于 [AG]₃ 蛋白。

[0203] 实施例 3 酶标记蛋白与多种动物 Ig 结合活性分析与应用

[0204] 1、材料和方法

[0205] 1.1 材料

[0206] 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、兔抗牛 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体和山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体购自 Sigma 公司;布鲁氏杆菌抗体快速检测试剂盒和布鲁氏菌快速检测试纸条购自韩国安捷公司;Western Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;3ABC 抗体检测 ELISA 试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所;Human IgM、Human IgA 购自北京博胜经纬科技有限公司;山羊 IgG、猪 IgG、豚鼠 IgG 人 IgG、兔 IgG、小鼠 IgG 均购自万华士 (北京) 生物科技有限公司。

[0207] 1.2 方法

[0208] 1.2.1 HRP 标记 [AGL]₂ 蛋白与多种动物 Ig Dot-ELISA 试验分析

[0209] IgG、人 IgA、人 IgM、山羊 IgG、兔 IgG、豚鼠 IgG、小鼠 IgG、猪 IgG、鹿 IgG、鸡 IgY 为被检抗原,具体操作:(1) 取适当大小 NC 膜,用铅笔画或使用点膜器制备直径 5mm 的加样孔,并作好相应标记。(2) 将 NC 膜浸入到 0.01mol/L pH 7.4 的 PBS 中 15-30min,取出用滤纸吸干。(3) 将 1 μL 牛 IgG、兔 IgG、山羊 IgG、猪 IgG、人 IgG、豚鼠 IgG、人 IgM、人 IgA 分别点加于加样孔内,室温干燥。(4) 将 NC 膜浸入封闭液中振摇封闭 30min。(5) 将 NC 膜浸入洗涤液中振荡洗涤 3 次,每次 5min,取出用滤纸吸干。(6) 将 NC 膜浸入稀释好的酶标抗体溶液中,振摇反应 30min。(7) 重复步骤 5。(8) 将 NC 膜浸入底物溶液中,振摇显色 10-20min。(9) 用流水冲洗数分钟,放入蒸馏水中终止反应。判定标准根据显色反应有无或颜色深浅,进行定性或半定量:斑点呈褐色为 +,无色为 -。

[0210] 1.2.2 HRP 标记 [AGL]₂ 蛋白与多种 Ig 结合力的比较

[0211] 采用直接 ELISA 方法比较酶标蛋白的结合活性,分别包被 0.1 μg、1 μg 的不同动物的 IgG,酶标蛋白 1:8000 稀释,具体方法参见实施例 2 中的 1.2.3.2。

[0212] 1.2.3 [AGL]₂ 与 [AG]₄ 两种酶标蛋白活性的比较

[0213] (1) 以人 IgG 为被检抗原,包被、封闭同实施例 2 中的 1.2.3.2,分别加入倍比稀释的两种酶标蛋白(1:1000 起),稀释至 1:128000,每个梯度做 4 个重复,37℃作用 1h,显色,酶标仪读数 OD_{450nm}。

[0214] (2) 选择两种酶标蛋白 OD_{450nm}相等的稀释梯度,并以此稀释度作用梯度稀释包被的人 IgM,人 IgA(1 μg/孔~2⁷×1 μg/孔),ELISA 步骤同上。

[0215] (3) 选择两种酶标蛋白 OD_{450nm}相等的稀释梯度,并以此稀释度作用包被好的人 IgG,作用时间设为 5min,10min,20min,25min,30min,ELISA 步骤同上。

[0216] 1.2.4 酶标蛋白应用于检测 BoIFN-α 多克隆抗体

[0217] 以兔抗 BoIFN-α A 多克隆抗体为被检抗原,pET-30a 空载体蛋白为阴性参照;参照 2.2.4.1 方法进行 Western Blot 操作,兔血清为一抗;1:8000 稀释 [AGL]₂-HRP、1:5000 稀释山羊抗兔 IgG-HRP,最后用 ECL 显色系统进行显色,比较两种酶标抗体的活性及特异性。

[0218] 1.2.5 酶标蛋白应用于布鲁氏菌和 BVDV 临床样品检测

[0219] 先用布鲁氏菌快速间接 ELISA 试剂盒对实验室现存 88 份牛血清进行布鲁氏菌血清抗体检测,HRP 标兔抗牛 IgG1:1295 稀释,[AGL]₂-HRP 以 1:8000 稀释,应用快速间接 ELISA 试剂盒对检测过的 88 份血清进行再次检测,对检测结果进行分析,来比较两种酶标抗体的性能的差异。对实验室保存的 122 份犬血清、88 份猪血清、92 份羊血清、86 份鹿血清用布鲁氏菌快速间接 ELISA 检测,步骤按实际和说明书。

[0220] 用 NS3-ELISA 试剂盒对本实验室保存的 92 份牛血清进行 BVDV 血清抗体检测,Thermo 商品化 AG 二抗滴度为 1:8000。再用标记好的 [AGL]₂蛋白以 1:8000 的滴度替代 Thermo 商品化二抗,应用 NS3-ELISA 检测,分析检测结果,比较两种酶标物性能的差异。

[0221] 2 实验结果

[0222] 2.1 酶标蛋白的制备与鉴定

[0223] 2.1.1 重组蛋白 [AGL]₂标记

[0224] 标记产物和 HRP 以及 [AGL]₂重组蛋白经 SDS 和 DDT 高温变性处理后进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色 10min,煮胶 10min 脱色后观察,结果显示大部分 HRP 偶联在蛋白上,分子量增大,条带上移(图 15)。测定标记后蛋白浓度为 0.643mg/mL。[AGL]₂重组蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0225] 2.1.2 酶标蛋白活性检测

[0226] 对 HRP 标记蛋白的活性及特异性进行检测,HRP-[AGL]₂活性滴度达 1:6400 以上,与对照组相比显示明显的特异性(图 16)。

[0227] 2.2 酶标蛋白活性分析

[0228] Dot-ELISA 结果显示,酶标蛋白与 9 种免疫球蛋白反应,但反应程度各不相同,ELISA 结果显示与人 IgG 反应性最强,与山羊 IgG、小鼠 IgG、猪 IgG、豚鼠 IgG、人 IgM、人 IgA、兔 IgG、鹿 IgG 显示了良好的反应性,鸡免疫球蛋白几乎不反应(图 17 和图 18)。酶标蛋白可以在哺乳动物疾病血清学检测中作为一种通用抗体,具有很好的使用价值。

[0229] 两种酶标蛋白在倍比稀释,用直接 ELISA 方法测定活性,结果显示 [AGL]₂-HRP1:8000 稀释后与人 IgG 作用 OD_{45nm}与 [AGL]₄酶标蛋白 1:4000 稀释后相等(如表 5 所示),故选作两种酶标蛋白分别以 1:8000,1:4000 稀释与倍比稀释包被的人 IgA,人 IgM 作用,TMB 显色终止后,测得 OD_{450nm}值如图 19-A 和图 19-B 所示。随着人 IgA,人 IgM 包

被量的减少,OD_{450nm}呈减小趋势,但 [AGL]₂-HRP 对人 IgA,人 IgM 的亲合性明显高于 [AG]₄酶标蛋白。两种蛋白在相同时间内与人 IgG 作用后,在不同时间段内测得 OD_{450nm}, [AGL]₂-HRP 始终高于 [AG]₄酶标蛋白,如图 19-C 所示。有文献报道蛋白 G 对人 IgA,人 IgM 没有结合能力,蛋白 A 只能结合少量的人 IgA,人 IgM,蛋白 L 对所有人 Ig 亚型都有较强的结合能力,这也验证了本发明研究的结果。

[0230] 表 5 两种酶标蛋白稀释度的选择

[0231]

	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000
[AGL] ₂ -HRP	2.309	2.034	1.921	1.107	0.711	0.407	0.181	0.111
[AG] ₄ 酶标蛋白	2.595	1.71	1.098	0.826	0.539	0.321	0.097	0.059

[0232] 2.3 酶标 [AGL]₂蛋白应用于检测 BoIFN-α A 多克隆抗体

[0233] WesternBlot 化学发光试验结果显示,两种酶标物结果均为阳性,并且特异比较好。说明 [AGL]₂-HRP 可替代山羊抗兔酶标物用于检测 BoIFN-α A 多抗,结果见图 20。

[0234] 2.4 酶标蛋白用于布鲁氏菌病和 BVDV 临床样品检测

[0235] 布鲁氏菌病快速间接 ELISA 试剂盒应用标记好的 [AGL]₂蛋白与 HRP 标记兔抗牛 IgG 检测结果(如表 6 所示),应用兔抗牛 IgG 酶标物检测 Brucellosis 阳性血清 56 份,阴性血清 32 份,利用酶标 [AGL]₂蛋白检测结果 56 份阳性血清,其中 52 份血清符合,阴性血清 33 份,29 份血清符合,共 81 份完全符合,符合率为 92.05%。对两种二抗检测结果不同的样品,用韩国安捷布鲁氏杆菌抗体快速检测测试盒重新检测,4 份 HRP 标记兔抗牛 IgG 检测阳性而 [AGL]₂-HRP 检测阴性的样品结果为阴性,3 份 HRP 标记兔抗牛 IgG 检测阴性而 [AGL]₂-HRP 检测阳性的样品结果为弱阳性,应用酶标蛋白为二抗的快速间接 ELISA 特异性和特异性明显增强,完全适用于对布鲁氏菌病的检测。对本实验室保存的 122 份犬血清、92 份猪血清、86 份鹿血清、88 份羊血清进行布鲁氏菌快速间接 ELISA 检测,结果见表 7。

[0236] 用酶标蛋白代替 Thermo 商品化二抗检测 BVDV 结果见表 8 所示,两种方法符合率为 97.83%,酶标蛋白可代替 Thermo 商品化二抗应用于 NSP-ELISA 检测 BVDV。

[0237] 表 6 酶标蛋白和兔抗牛 IgG-HRP 比较

[0238]

	阳性数(Positive)	阴性数(Negative)	总数(Total)	总符合率(Coincident)
HRP 标记兔抗牛 IgG	56	32	88	
[AGL] ₂ -HRP	55(52)	33(29)	88(81)	92.05%

[0239] 注:括号内为两种方法检测一致的血清数

[0240] 表 7 酶标蛋白应用于布病快速间接 ELISA 检测

[0241]

	阳性数 (Positive)	阴性数 (Negative)	总数(Total)	阳性率 (positive rate)
犬	4	118	122	3.28%
鹿	0	86	86	0
猪	2	90	92	2.17%
羊	1	87	88	1.14%

[0242] 表 8 酶标蛋白和 Thermo 商品化二抗比较

[0243]

	阳性数(Positive)	阴性数(Negative)	总数(Total)	总符合率(Coincident)
Thermo 商品化二抗	33	59	92	
[AGL] ₂ -HRP	35(33)	57(57)	92(90)	97.83%

[0244] 注:括号内为两种方法检测一致的血清数

[0245] 实施例 4 酶标蛋白用于 AGL-ELISA 检测多物种 FMD

[0246] 1、材料和方法

[0247] 1.1 材料

[0248] 3、3、5、5- 四甲基联苯胺 (TMB) 购自 Sigma 公司,HRP 标记鹅免疫球蛋白 λ 轻链单克隆抗体、BoIFN- α A 多抗以及所用到的血清均由本实验室按照常规方法制备并保存。

[0249] 1.2 方法

[0250] 1.2.1 AGL-ELISA 相关条件确定方法

[0251] 1.2.1.1 ELISA 操作步骤

[0252] (1) 将纯化后的 8BF 蛋白 (非结构蛋白 3B 上的一段抗原短肽进行反复串联,并在大肠杆菌中表达出重组蛋白,具体制备方案参见文献 An ELISA based on the repeated foot-and-mouth disease virus 3B epitope peptide can distinguish infected and vaccinated cattle(2012,Appl Microbiol Biotechnol Gao,M 等)), 用 0.01M NaOH(pH12.0) 稀释后包被到酶标板上,100 μ L/ 孔,置于 4℃ 14h ~ 18h。

[0253] (2)PBST 洗板,排干残余液体。

[0254] (3) 每孔加入 300 μ L 5%脱脂乳封闭,37℃,2h。

[0255] (4) 重复步骤 2

[0256] (5) 阴阳性对照血清 1:10 稀释后每孔加入 100 μ L,37℃作用 30min。

[0257] (6) 重复步骤 2

[0258] (7) [AGL]₂-HRP1:8000 稀释后,100 μ L/ 孔,37℃作用 20min。

[0259] (8) 重复步骤 2

[0260] (9) 显色,具体步骤参照 2.2.4.2,酶标仪 OD_{450nm} 读值。求出 P/N 值。

[0261] 阳性对照:成年牛免疫 3ABC 蛋白后 1 月采集的血清,3ABC 抗体效价为大于 1:1024; ;阴性对照:健康未免疫犊牛血清,经 LPBE 和 NS 蛋白试剂盒检测为阴性。

[0262] 1.2.1.2 抗原最佳包被量和最佳血清稀释度的确定

[0263] 棋盘法确定抗原最佳包被量和最佳血清稀释度,按本实施例 1.2.1.1 方法进行

ELISA, 观察记录结果, 计算并且 P/N 值。

[0264] 1. 2. 1. 3 最佳酶标蛋白工作浓度的选择

[0265] 抗原包被和封闭见本实施例 1. 2. 1. 1, 血清作 1:10 稀释, 将酶标蛋白做 1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 和 1:64000 倍稀释, 100 μ L/ 孔, 按间接 ELISA 操作, 确定最佳酶标蛋白工作浓度。

[0266] 1. 2. 1. 4 最适包被缓冲液、封闭液、牛血清稀释液、酶标蛋白稀释液的确定

[0267] 将 8BF 蛋白分别溶于 4 种包被缓冲液中, 1 μ g/ 孔包被 ELISA 板, 血清作 1:10 稀释。按 2. 2. 8. 1 方法进行 ELISA 操作, 观察记录结果。7 种组合封闭液, 血清作 1:10 稀释, 按间接 ELISA 操作, 比较封闭效果。用 4 种稀释液稀释血清, 其他条件按已经摸索好的最佳反应条件进行 ELISA, 比较本 ELISA 方法选用的血清稀释液的效果。用 4 种稀释液稀释酶标蛋白, 其他条件按已经摸索好的最佳反应条件进行 ELISA, 比较本 ELISA 方法选用的酶标蛋白稀释液的效果。各种稀释封闭液体见表 9。

[0268] 表 9 各种稀释、封闭液体的确定

[0269]

最适包被缓冲液的确定	0.1mol/L PBS 缓冲液	0.05mol/L 碳酸盐缓冲液	0.01M NaOH	灭菌去离子水			
最佳封闭液的选择	1%鱼明胶	0.5%聚乙烯醇 (PVA)	1% 鱼 明 胶 +0.5%PVA	1%酪蛋白	1%牛血清白蛋白 (BSA)	5% 脱脂乳	1% 鱼 明 胶 +0.5%酪蛋白 +0.25%PVA
最佳牛血清稀释液的选择		1% 鱼 明 胶 +0.5%酪蛋白 +0.25%PVA	PBST+0.2%酪蛋白 +10% 马血清	1% 鱼 明 胶 +0.5%酪蛋白 +0.25%PVA	5%Ecoli 裂解液		
酶标蛋白稀释液的选择	PBST	5%脱脂乳	1%鱼明胶	0.5%PVA			

[0270] 1. 2. 1. 5 各步作用时间的确定

[0271] 各部分作用时间设定见表 10, 后一步反应均在前一步确定好的条件下进行。

[0272] 表 10 各步作用时间的确定

[0273]

	时间设定				
蛋白包被时间 的确定	4℃过夜	4℃过夜+37℃ 0.5h	4℃过夜+37℃ 1.5h	4℃过夜-37℃ 2.5h	
封闭时间的确 定(37℃)	1h	1.5	2h	2.5h	
被检血清作用 时间的确定 (37℃)	15min	30min	45min	60min	
最佳酶标蛋白 作用时间的选 择(37℃)	10min	20min	45min	60min	90min
最佳显色时间 的测定	3min	5min	10min	20min	

[0274] 1.2.2 重复性试验

[0275] 批内重复性试验:用同一批次制备的重组抗原包被酶标板,6份效价不同的血清和标准阴阳性血清进行检测,每份血清做5个重复。批间重复性试验:在5个不同时间各包被的ELISA板,对批内检测过的6份血清进行检测,结果进行统计学分析。

[0276] 统计学分析方法为:变异系数 $CV = S/X \times 100\%$, S:标准差, X:算术平均值,以检验板内和板间检测样品的重复性。

[0277] 1.2.3 特异性试验

[0278] 用建立的AGL-ELISA方法分别检测牛结核阳性血清、牛布鲁氏菌阳性血清、牛病毒性腹泻阳性血清、牛传染性鼻气管炎阳性血清、牛肠道病毒血清,同时设置阳、阴性血清对照,计算S/P值,并对结果进行分析。

[0279] 1.2.4 AGL-ELISA试剂盒保存期试验

[0280] AGL-ELISA试剂盒放置4℃保存,每隔1个月取5条包被好的酶标板条对30份不同状态的奶牛血清进行检验,测定试剂盒的保存期。

[0281] 1.2.5 与3ABC-ELISA商品化试剂盒的比较

[0282] 用建立的AGL-ELISA试剂盒检测3ABC ELISA试剂盒检测过的血清,比较本发明AGL-ELISA试剂盒与商品化试剂盒的差异。

[0283] 1.2.6 AGL-ELISA检测猪、羊血清、鹿血清相关条件的确定

[0284] 以检测牛血清的相关条件为基础,改变AGL-ELISA各个反应条件,改善各步反应时间,主要改良血清稀释液配方和作用时间,对其他物种FMD的检测。血清以1:10、1:20、1:40比例确定血清稀释倍数,其它各步反应条件的选择与牛血清检测条件类似。

[0285] 1.2.7 FMDV AGL-ELISA方法的初步应用

[0286] 使用多物种AGL-ELISA方法对黑龙江省及上海等地养殖场进行FMDV抗体的血清学检测,共检测9个奶牛养殖场,904份血清,猪血清174份,羊血清292份,鹿血清80份,评估本方法的临床应用价值。

[0287] 2 实验结果

[0288] 2.1 AGL-ELISA相关条件确定

[0289] 2.1.1 AGL-ELISA抗原抗体最佳稀释度的确定

[0290] 8BF抗原与FMDV标准血清方阵滴定结果(见表11)表明,当8BF以1:320($1.0 \mu g/$

m1) 稀释包被,对照血清作 1:10 稀释时,阴性血清 $OD_{450nm} < 0.2$ 且 P/N 值最大,所以选此稀释度作为抗原抗体的最佳稀释浓度。

[0291] 表 11 AGL-ELISA 抗原抗体最佳稀释度

[0292]

抗原	阳性对照血清					阴性对照血清				
Ag dilution	Positive serum dilution					Negative serum dilution				
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
1:20	1.054	0.356	0.32	0.116	0.108	0.063	0.066	0.065	0.055	0.057
1:40	0.975	0.329	0.279	0.102	0.109	0.061	0.066	0.072	0.065	0.114
1:80	0.943	0.503	0.341	0.134	0.112	0.057	0.054	0.067	0.06	0.055
1:160	1.037	0.536	0.328	0.148	0.106	0.054	0.055	0.06	0.057	0.049
1:320	1.290	0.356	0.313	0.182	0.107	0.063	0.062	0.070	0.070	0.060
1:640	0.706	0.287	0.228	0.185	0.091	0.068	0.104	0.049	0.056	0.063
1:1280	0.462	0.297	0.154	0.165	0.079	0.061	0.05	0.051	0.045	0.047
抗原稀释度	P/N 值					P/N Ratio				
Ag dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
1:20	16.73	5.39	4.92	2.11	1.89					
1:40	15.98	4.98	3.88	1.57	0.96					
1:80	16.54	9.31	5.09	2.23	2.04					
1:160	19.20	9.75	5.47	2.60	2.16					
1:320	20.48	2.76	4.47	2.60	1.78					
1:640	10.38	5.94	4.65	3.30	1.44					
1:1280	7.57	2.83	3.02	3.67	1.68					

[0293] 2.1.2 酶标蛋白工作浓度的确定

[0294] $[AGL]_2$ -HRP 最佳稀释度摸索,如表 12 所示,当酶标蛋白 1:8000 稀释时, $PosOD_{450nm}$ 值大于 1.0, $NegOD_{450nm}$ 小于 0.2, 且 P/N 比值最大,最终确定其工作浓度为 1:8000。

[0295] 表 12 $[AGL]_2$ -HRP 最佳稀释度的确定

[0296]

	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000
$PosOD_{450nm}$	1.320	1.092	1.002	0.431	0.218
$NegOD_{450nm}$	0.067	0.054	0.053	0.042	0.039
P/N	19.591	20.213	18.906	10.262	5.590

[0297] 2.1.3 包被缓冲液的确定

[0298] 结果显示:0.01M NaOH (pH12.0) P/N 明显较大,如表 13 所示。所以选择 0.01M NaOH 溶液为 AGL-ELISA 多物种试剂盒的包被缓冲液。

[0299] 表 13 包被缓冲液的确定

[0300]

	碳酸盐	PBS 缓冲液	0.01MNaOH	ddH ₂ O
PosOD _{450nm}	1.244	1.263	1.318	0.607
NegOD _{450nm}	0.125	0.151	0.099	0.218
P/N	9.988	8.364	13.376	2.783

[0301] 2.1.4 最佳封闭液的确定

[0302] 5%脱脂乳作为封闭液时,P/N值较高为 10.736,而 1%酪蛋白 P/N 值为 10.700,二者几乎相同,但酪蛋白配制时不易溶解,所以选 5%脱脂乳作为最佳封闭液,结果如表 14 所示。

[0303] 表 14 最佳封闭液的确定

[0304]

	1% 明 胶 +0.5%PVA	5% 脱 脂 乳	1%BSA	1%酪蛋白	1% 明 胶 +0.25%PVA +0.5%酪蛋白	PBST
PosOD _{450nm}	0.667	0.795	0.632	0.819	0.781	0.683
NegOD _{450nm}	0.103	0.074	0.191	0.077	0.082	0.095
P/N	6.471	10.736	3.314	10.700	9.518	7.208

[0305] 2.1.5 最佳牛血清稀释液的确定

[0306] PBST 明显高于其他稀释液(结果如表 15 所示),5%脱脂乳 P/N 比值也较高但无论是从配制上还是经济角度,都不如 PBST 溶液配制简单而且经济实惠。

[0307] 表 15 牛血清稀释液的确定

[0308]

	血清稀释液	1% 明 胶 +0.25%PVA+2% 马血清	1%酪蛋白	PBST	5%脱脂乳	5%BSA
PosOD _{450nm}	0.935	1.320	0.093	2.045	1.797	1.844
NegOD _{450nm}	0.068	0.062	0.090	0.061	0.061	0.083
P/N	13.797	21.368	1.033	33.529	29.331	22.355

[0309] 2.1.6 [AGL]₂-HRP 稀释液的选择

[0310] 用 5%脱脂乳稀释时阳性血清 OD_{450nm} 值达到 1.460,并且阴性值小于 0.2(结果如表 16 所示)。5%脱脂乳控制本底方面较为突出,所以确定 5%脱脂酶标蛋白稀释液。

[0311] 表 16 [AGL]₂-HRP 稀释液的选择

[0312]

	PBST	5%脱脂乳	1%明胶, 0.5%PVA
PosOD _{450nm}	1.283	1.460	1.396
NegOD _{450nm}	0.283	0.127	0.222
P/N	4.534	11.532	6.290

[0313] 2.1.7 AGL-ELISA 多物种试剂盒各步反应时间确定

[0314] (1) 包被时间和封闭时间的确定

[0315] 综合比较 AGL-ELISA 试剂盒原有条件 4℃包被过夜为最佳,不作改动。

[0316] (2) 被检血清最佳作用时间的确定

[0317] 从表 17 中看出 37℃ 30min 条件下,标准阳性血清和阴性血清 P/N 比值明显高于其他组,所以选定 37℃ 30min 为一抗孵育时间。

[0318] 表 17 被检血清最佳作用时间确定 (37℃)

[0319]

	5min	10min	15min	30min	45min	60min
PosOD _{450nm}	0.2445	0.556	0.7205	1.254	1.389	1.379
NegOD _{450nm}	0.062	0.066	0.077	0.070	0.115	0.183
P/N	3.976	8.485	9.357	17.978	12.129	7.556

[0320] (3) 酶标蛋白最佳作用时间的确定

[0321] 从表 18 中看出,最终选择 37℃ 30min P/N 较高,为最佳孵育时间。

[0322] 表 18 辣根过氧化物酶标记蛋白最佳作用时间确定 (37℃)

[0323]

	5	10	20	30	45	60
PosOD _{450nm}	0.558	0.836	1.161	1.191	1.320	1.372
NegOD _{450nm}	0.077	0.105	0.090	0.104	0.110	0.176
P/N	7.288	7.960	13.011	11.505	12.000	7.786

[0324] (4) 底物最佳显色时间确定

[0325] 在其余条件相同的情况下,结果见表 19,最终选择 37℃ 5min 为最佳底物显色时间。

[0326] 表 19 底物最佳作用时间确定

[0327]

	3min	5min	10min	15min	20min	30min
PosOD _{450nm}	0.837	1.565	1.959	2.686	2.816	2.414
NegOD _{450nm}	0.081	0.099	0.164	0.188	0.200	0.212
P/N	10.336	15.495	11.944	14.265	14.080	11.387

[0328] 2.2 AGL-ELISA 重复性试验

[0329] 结果显示,批内重复性试验 CV 在 2.22%~6.39%;批间 CV 在 6.32%~9.75%,均小于 10%,说明操作具有良好的重复性 (表 20)。

[0330] 表 20 板内、板间重复性试验结果 (n = 5)

[0331]

血清 Serum	1	2	3	4	5	Pos	Neg
批内变异系数 CV%	2.59	4.97	2.23	3.56	6.39	2.62	6.15
Intro-batch CV%							
批间变异系数 CV%	7.84	9.01	6.96	9.75	6.32	5.92	4.84
Inter-batch CV%							

[0332] 2.3 AGL-ELISA 特异性试验

[0333] 用建立好的 AGL-ELISA 多物种试剂盒检测牛结核、牛布病、牛病毒性腹泻、牛肠道病毒、牛传染性鼻气管炎五种牛常见传染病阳性血清,结果均为阴性,相同条件下牛 FMD 血清为阳性,表明建立的 AGL-ELISA 多物种试剂盒具有较好的特异性(表 21)。S/P = (被检血清 OD_{450nm} 值 - 阴性对照 OD_{450nm} 均值) / (阳性对照 OD_{450nm} 值 - 阴性对照 OD_{450nm} 均值)

[0334] 表 21 特异性试验

[0335]

	牛结核	牛布病	牛病毒性 腹泻	牛肠道 病毒	牛传染性 鼻气管炎	阳性对照	阴性对照
	TB	BR	BVD	BEV	IBR	Pos control	Neg control
OD _{450nm}	0.213	0.126	0.169	0.208	0.234	1.361	0.146
S/P	0.035	-0.02	0.019	0.051	0.072	1	0
判定结果	阴	阴	阴	阴	阴	阳	阴

[0336] 2.4 AGL-ELISA 保存期试验

[0337] 保存期试验表明,检测试剂盒在 4℃ 保存 4 个月,试剂盒物理性状,检测特异性、灵敏性和重复性均不受影响;至第 4 个月,底物溶液与新配置的相比,检测被检血清光密度值略微下降,灵敏性稍低。因此我们将保存期暂定为:4℃ 保存,有效期 4 个月。

[0338] 2.5 AGL-ELISA 与 3ABC-I-ELISA 试剂盒比较

[0339] 优化后的 AGL-ELISA 与 3ABC-I-ELISA 试剂盒检测结果(表 22),两种试剂盒的符合率为 93.75%,优化后的 AGL-ELISA 检出的阳性阴性血清完全符合于 3ABC-I-ELISA 试剂盒。

[0340] 表 22 试剂盒初步比较结果

[0341]

	阳性数 Positive	可疑数 Ambiguous	阴性数 Negative	总数 Total	总符合率 Coincident
AGL-ELISA	17	2	61	80	
3ABC-I-ELISA	20(17)	1	60(60)	80(77)	96.25%

[0342] 注:括号其它两种试剂盒检测一致的血清数

[0343] 2.6 AGL-ELISA 检测猪血清、羊、鹿血清反应条件的确立

[0344] 2.6.1 猪血清稀释液的选择

[0345] 5%的脱脂乳 P/N 值较其他稀释液较大(如表 23 所示),且控制本底方面较为突

出,所以为 5%的脱脂乳为猪血清稀释液。

[0346] 表 23 猪血清稀释液的选择

[0347]

	血清稀释液	1% 鱼 明 胶 +0.25%PVA+2% 马血清	兰兽研	5%脱脂乳	5%BSA
PosOD _{450nm}	0.938	1.104	1.144	1.276	1.181
NegOD _{450nm}	0.068	0.062	0.061	0.061	0.083
P/N	13.838	17.870	18.750	20.829	14.318

[0348] 2.6.2 猪血清最佳稀释度的确定

[0349] 猪 FMD 阳性对照血清作 1:10 稀释时,阴性血清 OD_{450nm}<0.2 且 P/N 值较大(如表 24 所示),所以选 1:10 稀释度作为猪血清最佳稀释浓度。

[0350] 表 24 猪血清最佳稀释度的确定

[0351]

	1:10	1:20	1:40
已知阳性血清			
11B-15	1.394	0.901	0.501
已知阴性血清			
12A-10	0.083	0.063	0.059
P/N	16.795	14.302	8.492

[0352] 2.6.3 AGL-ELISA 检测猪、羊、鹿血清相关条件的确立

[0353] AGL-ELISA 以检测牛血清条件为基础,优化反应步骤,实现检测猪、羊、鹿血清各步反应条件确定为:各物种血清 0.01M NaOH(pH12.0) 稀释 8BF 抗原以 1:320 (1.0 μg/ml), 4℃ 包被过夜,5%脱脂乳封闭 37℃ 封闭 2h,血清作用时间 30min,酶标蛋白作用时间 20min,显色 5min。猪血清以 5%脱脂乳 1:10 稀释;羊血清用兰兽研血清液 1:10 稀释;鹿血清用 5%脱脂乳 1:10 稀释。

[0354] 2.7 AGL-ELISA 检测多种动物 FMD 临界值的确定

[0355] 2.7.1 牛、猪、羊、鹿血清临界值判定

[0356] 用优化后的 AGL-ELISA 检测本实验室保存的 FMD 阴性牛、猪、羊、鹿血清进行检测,计算 S/P 平均值 (X) (S/P 平均值 (X) 分布见图 21A-D),标准差 (SD) 计算结果结果见表 25。经统计学计算,牛、羊、鹿阴阳性临界值=平均值 +3X 标准差,即当待检血清样品 S/P ≥ X+3SD =判定为阳性, S/P<X+2SD 判定为阴性, X+3SD ≥ S/P ≥ X+2SD 为可疑。猪血清临界值判定 S/P<X+2SD 判定为阴性, S/P>X+2SD 判定为阳性。

[0357] 表 25 牛、羊、猪、鹿血清阴阳性临界值判定

[0358]

	血清份数	S/P 平均值 (X)	标准差 (SD)	S/P<X+2SD	X+3SD
牛血清	208	0.0291	0.0823	0.2	0.3
猪血清	96	0.1881	0.1441	0.476	0.62
羊血清	88	0.0696	0.0791	0.23	0.31
鹿血清	88	0.0501	0.0902	0.23	0.32

[0359] 2.8 AGL-ELISA 在临床检测中的应用

[0360] 应用本发明方法检测黑龙江省部分奶牛场和上海某地奶牛场临床血清样本 904 份进行检测,并且对本实验保存的猪血清 174 份、羊血清 292 份、鹿血清 80 份进行检测,结果如下表 26 所示。

[0361] 表 26 AGL-ELISA 在临床检测中的应用

[0362]

		血清样品数	阳性数	可疑数	阴性数	阳性率(%)
牛血清 Herd	A	44	5	3	36	11.36
	B	96	9	2	85	9.38
	C	88	1	7	80	1.14
	D	88	6	0	82	6.82
	E	84	64	9	11	76.19
	F	44	1	0	43	2.27
	G	92	0	2	90	0
	H	276	33	0	243	11.96
	I	92	5	0	87	5.43
猪血清		174	38	0	136	21.4
羊血清		292	14	8	270	4.79
鹿血清		80	4	0	76	5.00

[0363] 实施例 5 试剂盒的组装

[0364] 本发明中所述的试剂盒包括：

[0365] 酶标板：由 8BF 蛋白包被；

[0366] 酶标记的重组蛋白 [AGL]₂；辣根过氧化物酶标记的重组蛋白 [AGL]₂；

[0367] 稀释液：5%脱脂乳；

[0368] 封闭液：5%脱脂乳；

[0369] 洗涤液：PBST 缓冲液；

[0370] 阳性对照：成年牛免疫 3ABC 蛋白后的 1 月采集的血清，3ABC 抗体效价为大于 1:1024，NSP（非结构蛋白）抗体阳性；

[0371] 阴性对照：健康未免疫犊牛血清，经 LPBE 和 NSP（非结构蛋白）试剂盒检测为阴性；

[0372] 显色液：TMB 底物溶液；

[0373] 终止液：1M H₂SO₄溶液。

[0001]

序列表

<110>东北农业大学

<120>一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用 ELISA 试剂盒

<130> KLPT150619

<160>14

<170> PatentIn3.5

<210> 1

<211>490

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 1

Met His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly
1 5 10 15
Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His
16 20 25 30
Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met
31 35 40 45
Ala Asp Ile Gly Ser Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
46 50 55 60
Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
61 65 70 75
Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
76 80 85 90
Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Ile Gly Ser Thr Tyr
91 95 100 105
Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr
106 110 115 120
Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr
121 125 130 135
Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala
136 140 145 150
Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Ile Gly Ser Lys Glu Lys Thr
151 155 160 165
Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile
166 170 175 180
Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe
181 185 190 195
Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu Lys

[0002]

196	200	205	210
Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr			
211	215	220	225
Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn			
226	230	235	240
Lys Gly Ser Lys Phe Met His His His His His Ser Ser Gly			
241	245	250	255
Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys			
256	260	265	270
Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp			
271	275	280	285
Asp Asp Lys Ala Met Ala Asp Ile Gly Ser Phe Asn Lys Glu Gln			
286	290	295	300
Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu			
301	305	310	315
Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser			
316	320	325	330
Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser			
331	335	340	345
Ile Gly Ser Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys			
346	350	355	360
Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys			
361	365	370	375
Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp			
376	380	385	390
Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Ile Gly			
391	395	400	405
Ser Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile			
406	410	415	420
Lys Ala Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu			
421	425	430	435
Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr			
436	440	445	450
Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val			
451	455	460	465
Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Gln Ala			
466	470	475	480
Pro Lys Ala Asp Asn Lys Gly Ser Lys Phe			
481	485	490	

<210>2

<211>1470

<212>DNA

[0003]

<213> Artificial sequence

<400>2

```

atgcaccatc atcatcatca ttcttctggt ctggtgccac gcggttctgg tatgaaagaa      60
accgctgctg ctaaattcga acgccagcac atggacagcc cagatctggg taccgacgac      120
gacgacaagg ccatggctga tatcggatct ttaacaaag aacaacaaaa tgcgttttac      180
gaaatcctga acatgccaaa cctgaacgaa gaacagcgta acggcttcac ccaatctctg      240
aaagacgacc catcacaatc tgctaacctg ctgtctgagg ctaaaaaact gaacgaatct      300
atcggatcta cctacaaact ggttatcaat ggcaaaaccc tgaaagggtg aaccaccacc      360
gaagccgtgg acgtgcttac cgccgagaaa gttttcaaac agtacgctaa cgacaatggc      420
gttgatggcg aatggacctt cgacgacgct accaaaacct tcaccgttac ggaaatcgga      480
tctaaagaaa aaaccccggg agaaccgaaa gaagaagtta ccatcaaagc taacctgac      540
tacgtgacg gttaaaaccca gaccgctgag ttcaaaggta cttcgaaga agctaccgct      600
gaagcgtatc gttacgtga cgctctgaaa aaagacaacg gtgaatacac ggttgacgtt      660
gctgacaaag gttacaccct gaacatcaaa ttcgctgggc aggtccgaa agctgacaac      720
aaaggatcca aattcatgca ccatcatcat catattctt ctggtctggt gccacgcggt      780
tctggtatga aagaaaccgc tgctgctaaa ttcgaaacgc agcacatgga cagcccagat      840
ctgggtaccg acgacgacga caaggccatg gctgatatcg gatcttttaa caaagaacaa      900
caaaatgcgt ttacgaaat cctgaacatg ccaaacctga acgaagaaca gcgtaacggc      960
ttcatccaat ctctgaaaga cgacccatca caatctgcta acctgctgtc tgaggctaaa     1020
aaactgaacg aatctatcgg atctacctac aaactggtta tcaatggcaa aacctgaaa     1080
ggtgaaacca ccaccgaagc cgtggacgct gctaccgccg agaaagtttt caaacagtac     1140
gctaacgaca atggcgttga tggcgaatgg acctacgacg acgctaccaa aaccttcacc     1200
gttacggaaa tcggatctaa agaaaaaacc ccggaagaac cgaaagaaga agttaccatc     1260
aaagctaacc tgatctacgc tgacggtaaa acccagaccg ctgagttcaa aggtaccttc     1320
gaagaagcta ccgctgaagc gtatcgttac gctgacgctc tgaaaaaaga caacggtgaa     1380
tacacggttg acgttgctga caaaggttac acctgaaca tcaaatcgc tggtcaggct     1440
ccgaaagctg acaacaaagg atccaaattc

```

<210>3

<211>160

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>3

```

gtaaagatct ttaacaaag aacaacaaaa tgcgttttac gaaatcctga acatgccaaa      60
cctgaacgaa gaacagcgta acggcttcac ccaatctctg aaagacgacc catcacaatc      120
tgctaacctg ctgtctgagg ctaaaaaact gaacgaatct

```

<210>4

<211>180

<212>DNA

[0004]

<213> Artificial sequence

<400>4

cgcggatcca cctacaaact ggttatcaat ggcaaaaccc tgaaagggtga aaccaccgaa	60
gccgtggacg ctgctaccgc cgagaaagtt ttcaaacagt acgctaacga caacggtgtt	120
gatggcgaat ggacctacga cgacgtacc aaaaccttca ccgttaccga actcgagcgg	180

<210>5

<211>264

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>5

agatctaaag aaaaaacccc ggaagaaccg aaagaagaag ttaccatcaa agctaacctg	60
atctacgctg acggtaaaac ccagaccgct gagttcaaag gtaccttcga agaagctacc	120
gctgaagcgt atcgttacgc tgacgctctg aaaaaagaca acggtgaata cacggttgac	180
gttgctgaca aaggttacac cctgaacatc aaattcgctg gtcaggctcc gaaagctgac	240
aacaaggat ccaaattcct cgag	264

<210>6

<211>47

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>6

gtaaagatct tttacaaag aacaacaaaa tgcgttttac gaaatcc	47
--	----

<210>7

<211>58

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>7

tgtttacgca aaatgcttta ggacttgtac ggtttgact tgcttcttgt cgcattgc	58
--	----

<210>8

<211>59

<212>DNA

<213> Artificial sequence

[0005]

<400>8
gaacgaagaa cagcgtaacg gcttcatcca atctctgaaa gacgacccat cacaatctg 59

<210>9

<211>59

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>9
ttctgctggg tagtgtaga cgattggacg acagactccg atttttgac ttgcttaga 59

<210>10

<211>56

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>10
cgcggatcca cctacaaact ggttatcaat ggcaaaaccc tgaaaggatg aaccac 56

<210>11

<211>59

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>11
ttgggacttt ccactttggt ggtggcttcg gcacctgcga cgatggcggc tctttcaaa 59

<210>12

<211>59

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>12
gctaccgccg agaaagtttt caaacagtac gctaacgaca acggtgttga tggcgaatg 59

<210>13

[0006]

<211>68

<212>DNA

<213> Artificial sequence

<400>13

tgccacaact accgcttacc tggatgctgc tgcgatgggt ttggaagtgg caatggcttg	60
agctcgcc	68

<210>14

<211>2743

<212>pJWF 载体

<213> Artificial sequence

<400>14

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatattgc gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgtat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaaatt cgttcgcaga attgggaatc	420
ggtctcgatc ctctagagtc gacctgcaca ggaccgtgca ggtaccccgc gttgtgagac	480
cgacctattg ggcttgcctat cccaagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg	540
tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa	600
gcctgggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgcta actgccgct	660
ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga	720
ggcggtttgc gtattggcg ctcttcgct tcctcgctca ctgactcgt gcgctcggtc	780
gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt acccacagaa	840
tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaaccgt	900
aaaaaggccg cgttgcctggc gtttttccat aggtctcgcc cccctgacga gcatcacaaa	960
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt	1020
ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cgataacctg	1080
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc	1140
agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc	1200
gaccgctgcg ctttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta	1260
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatgt aggcgggtgct	1320
acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatatc	1380
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa	1440
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgaagc agcagattac gcgcagaaaa	1500
aaaggatctc aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa	1560
aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggaatcttcac ctagatcctt	1620
ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac	1680
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc	1740
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc	1800

[0007]

cccagtgctg	caataatacc	gcgggaccca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	1860
aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggtcctg	caactttatc	cgcctccatc	1920
cagtctatta	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	1980
aacgttgttg	ccatcgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	cgtcgtttgg	tatggcttca	2040
ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	2100
gcggtttagct	ccttcgggtcc	tccgatcgtt	gtcagaagta	agttggccgc	cgtgttatca	2160
ctcatggtta	tggcagcact	acataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	2220
tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	2280
tgctcttgcc	cggcgtcaat	acgggataat	accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	2340
ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	2400
tccagttcga	tgtaacccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	2460
agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaatgccg	caaaaaagg	aataagggcg	2520
acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	2580
ggttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	agaaaaataa	acaaataggg	2640
gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgcc	cctgacgtct	aagaaaccat	tattatcatg	2700
acattaacct	ataaaaaatag	gcgtatcacg	aggccctttc	gtc		2743

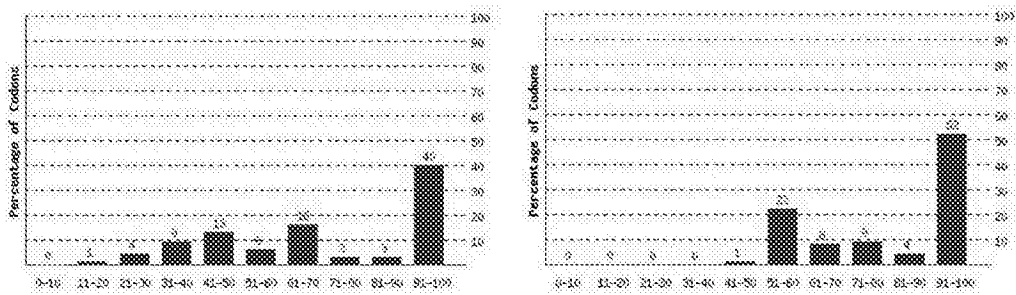


图 1

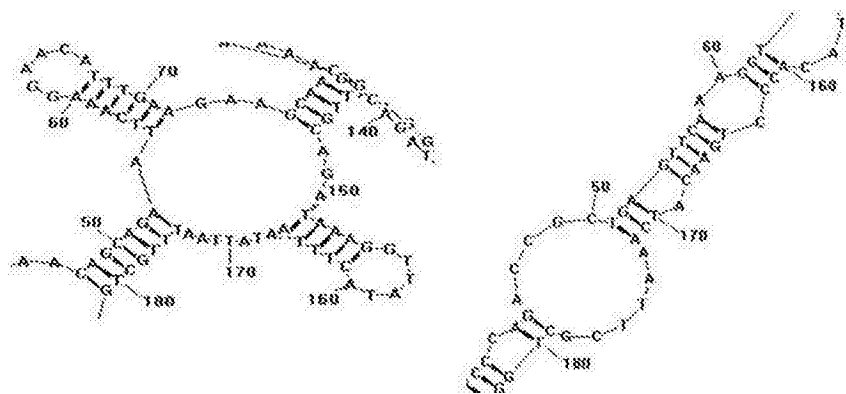


图 2

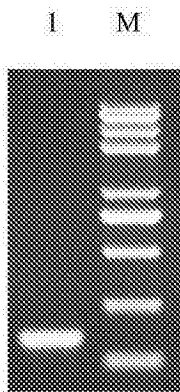


图 3

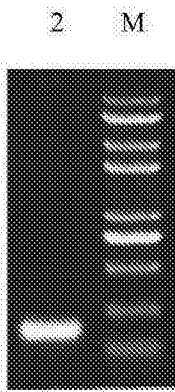


图 4

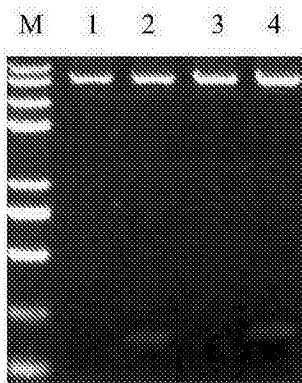


图 5

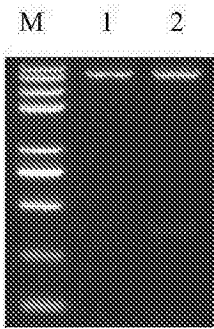


图 6

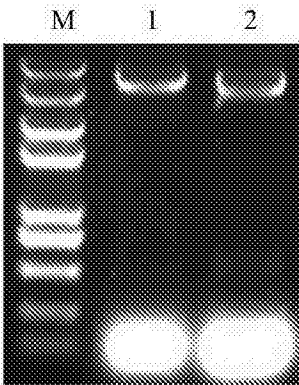


图 7

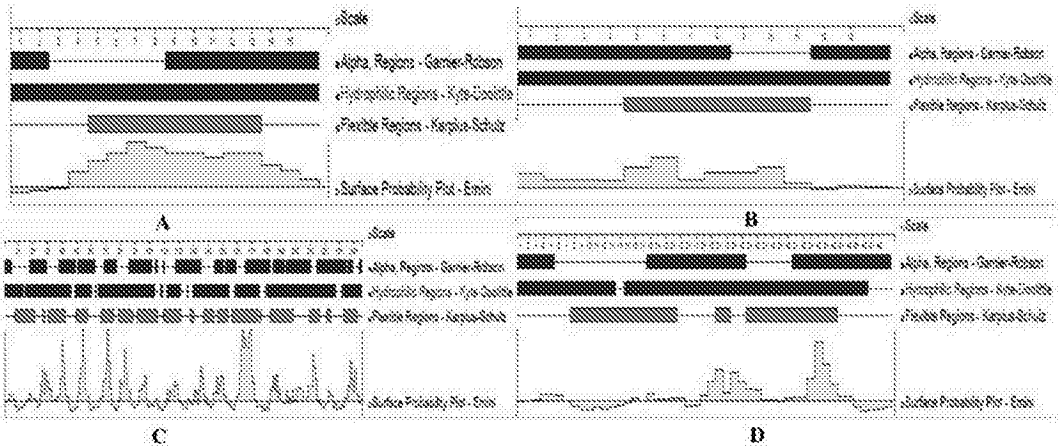


图 8

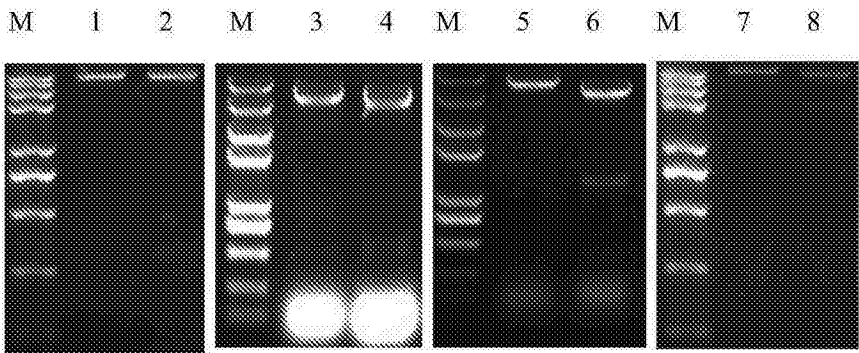


图 9

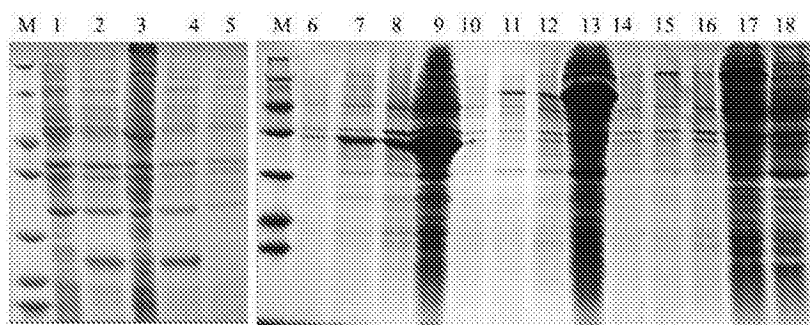


图 10

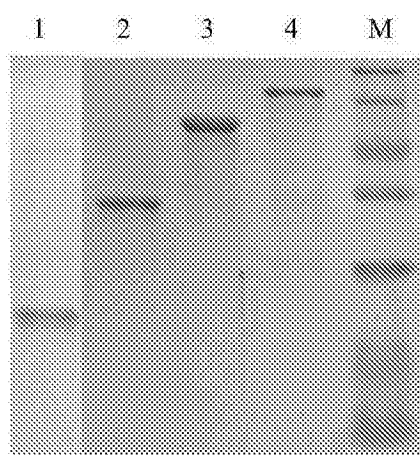


图 11



图 12

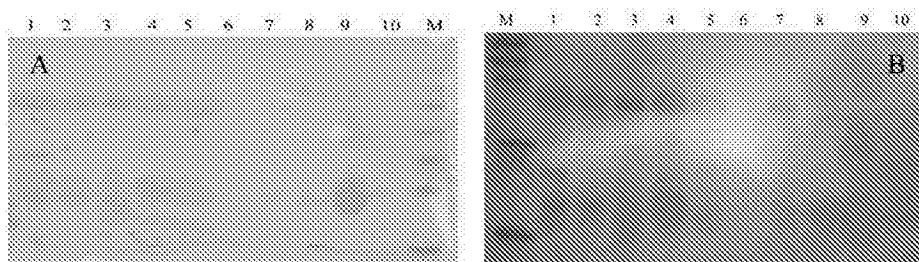


图 13

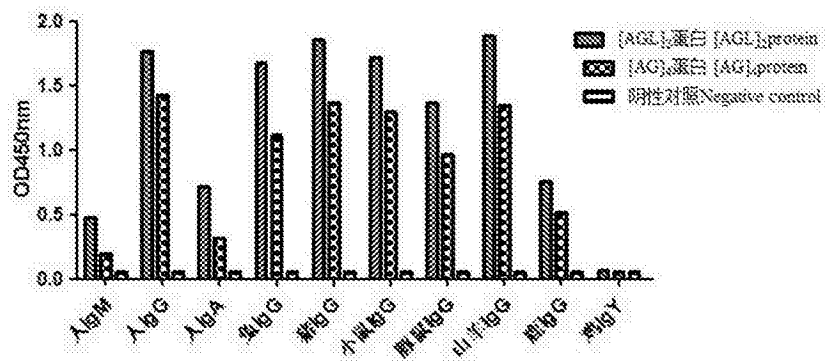


图 14



图 15

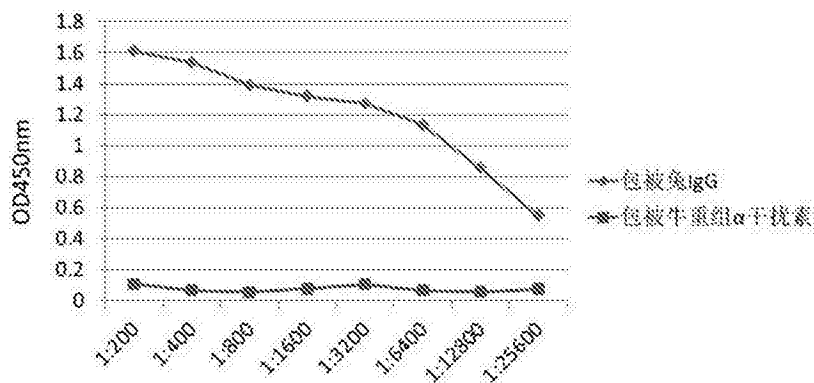


图 16

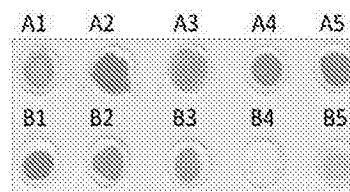


图 17

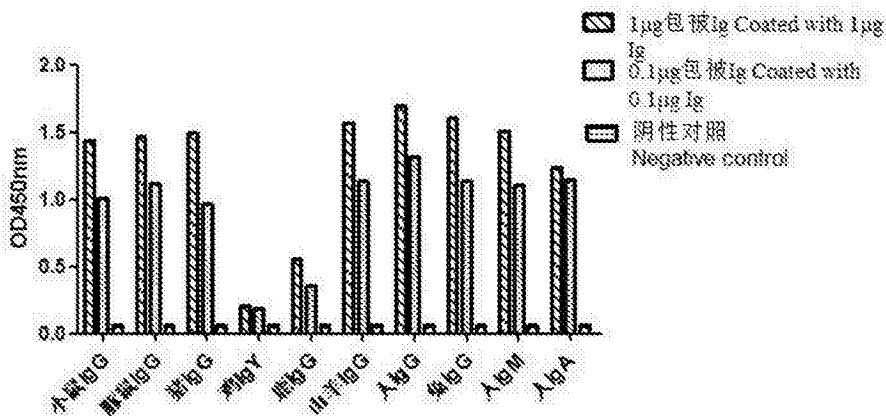


图 18

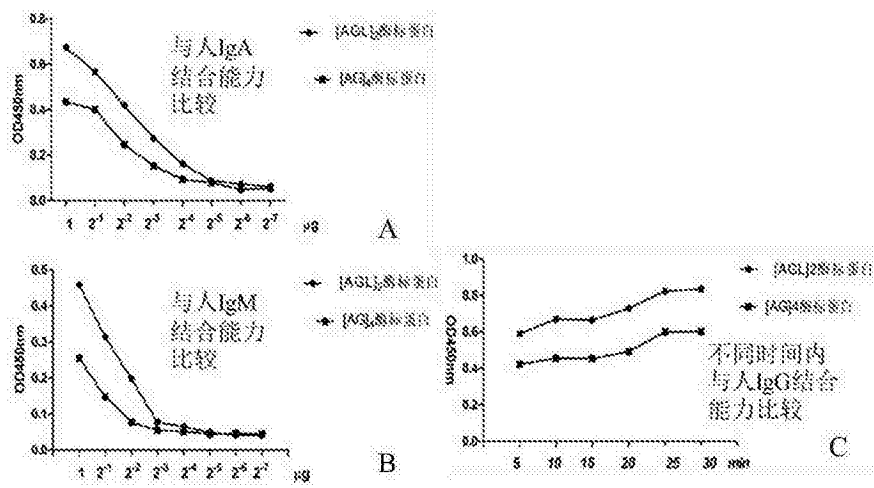


图 19

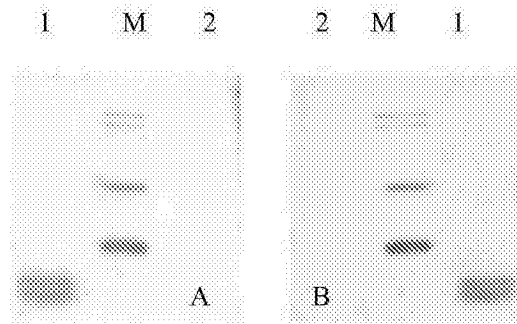


图 20

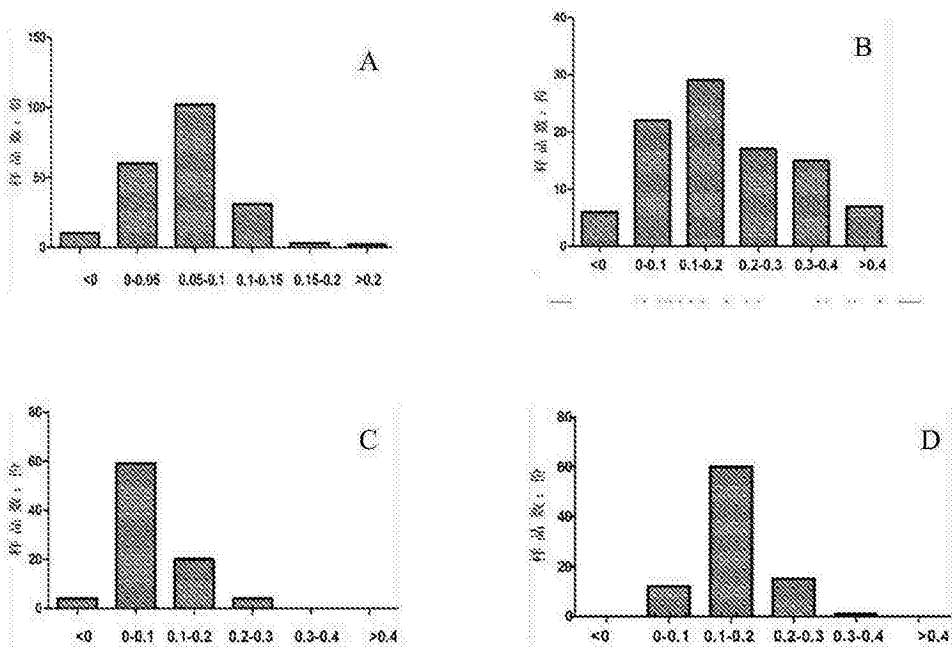


图 21

专利名称(译)	一种鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN105242043A	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	CN201510680061.1	申请日	2015-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
[标]发明人	王君伟 高明春 彭统全 李迪 马波		
发明人	王君伟 高明春 彭统全 李迪 马波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN105242043B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种可鉴别诊断口蹄疫病毒感染的多物种通用AGL-ELISA试剂盒，包括包被8BF蛋白的酶标板和酶标记的重组蛋白[AGL]_n，重组蛋白[AGL]_n为将金黄色葡萄球菌A蛋白免疫球蛋白结合结构域中B结构域、链球菌蛋白G蛋白免疫球蛋白结合结构域中C2结构域、大消化链球菌蛋白L蛋白免疫球蛋白结合结构域中B3结构域这三种蛋白结构域进行基因优化和串联，形成的多拷贝重组蛋白，n为1、2或3。本发明重组蛋白[AGL]₂进行酶标记，酶标记产物经Western-blot、ELISA检测，可与多物种哺乳动物免疫球蛋白结合，可作为各种哺乳动物血清学检测中通用抗体，可替代物种特异性抗体，进行多物种共患传染病检测。AGL-ELISA可检测多种动物口蹄疫感染，并能鉴别疫苗免疫和自然感染动物以及持续感染动物。

A1	GTAAAGATCTTTTAAACAAAGAACAACAAAATGCGTTTTACGAAATCC	SEQ ID NO:6
A2	TGTTTACGCAAAATGCTTTAGGACTTGTACGTTTGGACTTGCTTCTGTGCAATT GC	SEQ ID NO:7
A3	GAACGAAGAACAGCGTAACGGCTTCATCCAATCTCTGAAAGACGACCCATCACA TCTG	SEQ ID NO:8
A4	TTCTGCTGGGTAGTGTTAGACGATTGGACGACAGACTCCGATTTTTTGACTTGCTT AGA	SEQ ID NO:9
B-SPA	GTAAAGATCTTTTAAACAAAGAACAACAAAATGCGTTTTACGAAATCCTGAACATGC CAAACTGAACGAAGAACAGCGTAACGGCTTCATCCAATCTCTGAAAGACGACCC ATCACAATCTGCTAACCTGCTGTCTGAGGCTAAAAAAGTGAACGAATCT	SEQ ID NO:3