



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104865380 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510273815. 1

(22) 申请日 2015. 05. 26

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483 号

(72) 发明人 孙凌霜 远立国 李守军

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 林丽明

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

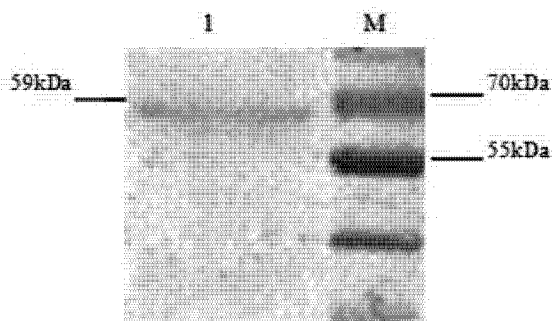
权利要求书1页 说明书10页  
序列表5页 附图5页

(54) 发明名称

一种检测马红球菌病的试剂盒

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体公开了一种检测马红球菌病的试剂盒,所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因 VapA 重组蛋白 MBP-VapA,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,所使用 MBP-VapA 蛋白更接近马红球菌致病基因 VapA 的性质。用该试剂盒进行检测,灵敏度高、特异性强、重复性和稳定性都很好,具有实际的临床应用意义。



1. 一种检测马红球菌病的 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因 VapA 重组蛋白 MBP-VapA,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。
2. 一种检测马红球菌病的 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - S1. 免疫原的制备如下:扩增 VapA 基因,并克隆到 PMAL-C5x 载体上,构建表达载体 PMAL-VapA,将 PMAL-VapA 转化至原核表达菌,通过 IPTG 在 20℃ 下诱导、纯化后获得重组蛋白 MBP-VapA ;
  - S2. 分别配制酶标抗体羊抗马 IgG Fab' 2-HRP、阴性对照胎马血清、阳性对照马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清和封闭液 PVA 获得 ELISA 试剂盒。
3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于,所述重组蛋白 MBP-VapA 的包被浓度为 0.125ug/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为 1 :400,羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 稀释度为 1 :20000,封闭液为 0.5%PVA。
4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括适于 MBP-VapA 与抗马红球菌致病基因 VapA 抗体发生抗原抗体反应的检测试剂。
5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括包被有 MBP-VapA 的固相载体、酶标抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括封闭液、洗涤液、显色液、终止液、阳性和阴性对照。
7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于,所述阴性对照为胎马血清,阳性对照为马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清。
8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,其特征在于,所述酶标抗体为羊抗马 IgG Fab' 2-HRP。
9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述 MBP-VapA 的包被浓度为 0.125ug/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为 1 :400,羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 稀释度为 1 :20000,封闭液为 0.5%PVA。

## 一种检测马红球菌病的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及一种检测马红球菌病的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 马红球菌属于红球菌属,是一种人畜共患的条件性致病菌。该病原菌普遍存在于自然环境土壤中,调查表明,50 ~ 95% 的农场土壤中存在该菌。马红球菌可感染人,导致呼吸道感染症状。该病也是幼龄马驹最常见的疾病之一,发病率可达 80%。染病马驹一般呈慢性或亚急性支气管肺炎症状,有时伴发盲结肠和肠系膜淋巴结溃疡。

[0003] 一直以来关于马红球菌的致病机制并不清楚,直至最近研究发现,导致该细菌毒性的关键是其是否含有一个致病性相关质粒。该质粒含有 85 ~ 90kb 的遗传编码 DNA,可编码多个高免疫原性的毒性脂蛋白。其中,毒性相关蛋白 A(Vap A)为其主要表达蛋白。大量研究表明,马红球菌的毒性与 Vap A 密切相关。目前,虽有部分重组 VapA 蛋白表达的报道,但其表达的蛋白多以包涵体的形式存在,较难应用于实际的医疗诊断和治疗产品的开发和应用。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术存在的缺陷,提供马红球菌致病基因 VapA 蛋白的试剂盒和应用。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的:

一种检测马红球菌病的 ELISA 试剂盒,所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因 VapA 重组蛋白 MBP-VapA,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。

[0006] 优选地,所述试剂盒还包括适于 MBP-VapA 与抗马红球菌致病基因 VapA 抗体发生抗原抗体反应的检测试剂。

[0007] 具体地,所述试剂盒还可以包括包被有 MBP-VapA 的固相载体、酶标抗体。

[0008] 另外,本发明所述试剂盒还包括封闭液、洗涤液、显色液、终止液、阳性和阴性对照。

[0009] 其中,所述阴性对照为胎马血清,阳性对照为马红球菌灭活疫苗免疫的成年马血清,酶标抗体为羊抗马 IgG Fab' 2-HRP。

[0010] 本发明通过优化实验,获得最佳的 ELISA 试剂盒的参数:MBP-VapA 的包被浓度为 0.125ug/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为 1:400,羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 稀释度为 1:20000,封闭液为 0.5%PVA。

[0011] 本发明还提供一种检测马红球菌病的 ELISA 试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

S1. 免疫原的制备如下:扩增 VapA 基因,并克隆到 PMAL-C5x 载体上,构建表达载体 PMAL-VapA,将 PMAL-VapA 转化至原核表达菌,通过 IPTG 在 20°C 下诱导、纯化后获得重组蛋白 MBP-VapA;

S2. 分别配制酶标抗体羊抗马 IgG Fab' 2-HRP、阴性对照胎马血清、阳性对照马红球菌

灭活疫苗免疫的成年马血清和封闭液 PVA 获得 ELISA 试剂盒。

[0012] 马红球菌致病基因 VapA 蛋白是重要的毒性蛋白,现有技术中关于该蛋白研究较少。一般纯化出的马红球菌致病基因 VapA 蛋白多以包涵体的形式存在,从而限制了其实际应用。申请人通过大量探索发现:将 VapA 基因与 PMAL-C5x 载体相连,并配合 20℃ 的诱导温度可以表达出大量可溶性表达的 VapA 蛋白。

[0013] 本发明使用 PMAL-C5x 载体,它可以促进重组表达蛋白的可溶性表达,实验研究表明,包涵体形式表达重组蛋白影响其氨基酸折叠形成正常的蛋白质三级、四级拓扑结构的形成,进而影响重组表达蛋白的抗原性和生物活性。本研究首次采用 PMAL-C5x 为载体,对马红球菌的致病基因 VapA 进行了重组,获得重组质粒—PMAL-VapA。

[0014] 另外,发明人通过实验发现,单单使用 PMAL-C5x 载体,对 VapA 蛋白的可溶性表达虽然有促进作用,但作用并不明显,还必须要配合低温诱导,才能够使 VapA 蛋白大量可溶性表达。发明人研究了多个诱导温度对 VapA 蛋白的表达影响,结果显示,只有在 20℃ 时才能够获得大量的可溶性的 VapA 蛋白。

[0015] 本发明通过上述方法获得了大量可溶性表达且活性好的 VapA 蛋白,该蛋白具有良好的免疫原性,本发明所得到的 MBP-VapA 更接近马红球菌致病基因 VapA 的性质。

[0016] 优选地,MBP-VapA 的制备方法中,所述原核表达菌在培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.5 ~ 0.7 后,加入 IPTG 进行诱导;更优选的,原核表达菌在培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 后加入 IPTG 进行诱导。

[0017] 优选的,本发明所述 IPTG 诱导的浓度为 0.3 ~ 0.7mM,诱导时间为 8 ~ 12h。

[0018] 更优选地,申请人发现所述原核表达菌在 20℃ 培养下,IPTG 诱导浓度为 0.7mM,且诱导时间为 8h 时,VapA 蛋白的表达量最高,且多为可溶性表达。

[0019] 优选地,本发明所述试剂盒的制备方法中,重组蛋白 MBP-VapA 的包被浓度为 0.125ug/mL,阴性对照和阳性对照血清稀释度为 1:400,羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 稀释度为 1:20000,封闭液为 0.5%PVA。

[0020] 具体地,重组蛋白 MBP-VapA 的制备方法包括以下步骤:

S1. 重组质粒 PMAL-VapA 的构建:设计 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所述引物扩增 VapA 基因,将 VapA 基因与 pZeroBack/blunt 载体相连构建质粒 pZeroBack-VapA;最后将 PMAL-c5x 和测序正确的 pZeroBack-VapA 进行双酶切后构建表达载体 PMAL-VapA;

S2. 将 PMAL-VapA 转化入 BL21 菌中,测序鉴定为阳性之后,将菌液接种于培养基中,培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.5 ~ 0.7,加入 IPTG 诱导后,离心重悬菌体,破碎菌体,收集上清,获得可溶性 VapA 蛋白。

[0021] S3. 上清通过直链淀粉树脂进行亲和层析,获得纯化后的蛋白。

[0022] 优选地,S2 中原核表达菌在培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 后加入 IPTG 进行诱导。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:

本发明提供了一种检测马红球菌病的试剂盒,所述试剂盒包括包括作为免疫原的马红球菌致病基因 VapA 重组蛋白 MBP-VapA,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。用该试剂盒进行检测,灵敏度高,特异性强,重复性和稳定性都很好,检测临床样本,检出率为大大高于常规检测,具有实际的临床应用意义。

## 附图说明

[0024] 图 1 为 VapA 基因的 PCR 扩增图 ;其中, 1 :VapA ;2 :ddH<sub>2</sub>O 对照 ;M :2000bp 的 DNA 分子量标准。

[0025] 图 2 为重组克隆质粒 pZeroBack-VapA 的酶切鉴定 ;其中, 1 :pZeroBack-VapA 重组质粒的 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切产物 ;M :5000bp 的 DNA 分子量标准。

[0026] 图 3 为重组表达质粒 PMAL-VapA 的测序鉴定结果 ;下划线部位分别为 *Not* I 与 *EcoR* I 的酶切位点序列。

[0027] 图 4 为不同诱导温度对蛋白表达量的影响 ;其中, M :蛋白分子量标准 ;1 :IPTG 诱导前的蛋白表达 ;2-6 :分别在 10℃、15℃、20℃、28℃和 37℃温度下诱导的蛋白表达。

[0028] 图 5 为不同 IPTG 诱导时间对蛋白表达量的影响 ;其中, M :蛋白分子量标准 ;1-8 分别为 IPTG 诱导 0、2、4、8、12、16、20 和 24 小时的蛋白表达。

[0029] 图 6 为不同 IPTG 浓度对诱导蛋白表达量的影响 ;其中, M :蛋白分子量标准 ; 1-7 : IPTG 浓度分别为 :0、0. 1、0. 3、0. 5、0. 7、1. 0 和 1. 4 mM。

[0030] 图 7 为 20℃下 0. 7mM IPTG 诱导 8h 后表达的蛋白 ;其中, M :蛋白分子量标准 ;1 :诱导前 BL21 细菌的蛋白表达 ;2 :诱导后 BL21 细菌的蛋白表达 ;3 转化空表达载体 PMAL-C5x 的 BL21 诱导前蛋白表达 ;4 :转化空表达载体 PMAL-C5x 的 BL21 诱导后蛋白表达 ;5 :转化空表达质粒 PMAL-VapA 的 BL21 诱导前蛋白表达 ;6 :转化表达质粒 PMAL-VapA 的 BL21 诱导后的蛋白表达 ;7 :经亲和层析纯化后的 VapA 蛋白 ;8 :诱导表达 VapA 蛋白的 BL21 菌液超声破碎上清(含可溶性表达蛋白);9 :诱导表达 VapA 蛋白的 BL21 菌液超声破碎沉淀(含包涵体表达蛋白)。

[0031] 图 8 为不同温度诱导表达的 VapA 蛋白的状态分析 ;M :蛋白分子量标准 ;1 :IPTG 诱导前转化 BL21 (含 PMAL-VapA) 的蛋白表达 ;2 和 3 分别为 :20℃诱导表达产物的超声破碎上清(含可溶性表达蛋白)和沉淀(含包涵体表达蛋白);4 和 5 分别为 :28℃诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀 ;6 和 7 分别为 :37℃诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀。

[0032] 图 9 为纯化后 VapA 蛋白的 Western-blot 分析结果 ;其中, 1 :纯化的 VapA 蛋白 ;M :蛋白分子量标准。

[0033] 图 10 为 MBP-VapA 重组蛋白的 Dot ELISA 分析, 其中, 1 至 3 孔为 BSA, 蛋白浓度分别为 :0. 1mg/mL、0. 025mg/mL、0. 00625mg/mL ;4 孔为 PBS 对照, 5 孔为马红球菌(ATCC33701)裂解液阳性对照 ;6 至 8 孔为 VapA 蛋白浓度分别为 0. 1mg/mL、0. 025mg/mL、0. 00625mg/mL。

[0034] 图 11 为抗原抗体稀释度图。

[0035] 图 12 为 HRP 酶标二抗稀释度优化结果图。

## 具体实施方式

[0036] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明的内容, 但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下, 对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换, 均属于本发明的范围 ;若未特别指明, 实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0037] 实施例 1 原核表达重组质粒 PMAL-VapA 的构建与鉴定

1、马红球菌的复苏与培养 :购买保藏于美国菌种保藏中心, 保藏号为 ATCC 33701 的马

红球菌,按照规定操作流程复苏马红球菌。

[0038] 2、引物设计:根据 NCBI 基因库中马红球菌致病基因 VapA 序列(JN990991.1)以及 pZeroBack/blunt 和 PMAL-C5x 载体酶切位点,运用 Oligo6.0 软件,设计一对带酶切位点的引物(由上海英维捷基生物技术有限公司合成),引物序列如下:

F:AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGAAGACCCTGCACAAGACGGTCTC (下划线为 *NotI* 酶切位点)

R:CCGGAATTCCTAAGCGTTGTGCCAACTACCCGAG (下划线为 *EcoR I* 酶切位点)

3、VapA 基因的 PCR 扩增与克隆

3.1. 参照 Fast HiFidelity PCR Kit 说明扩增 VapA 基因,反应体系如表 1。

[0039] 反应程序:94℃ 预变性 2min;(94℃ 变性 30s;55℃ 退火 30s;68℃ 延伸 30s)共运行 30 个循环,68℃ 终延伸 5min,最后 4℃ 保存,结果如图 1。

[0040] 参照天根生化科技有限公司普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANgel Midi Purification Kit)的使用说明书进行 PCR 产物的回收、纯化,方法如下:

(1)准备好 1.5 mL 的 EP 管,将 PCR 扩增后的产物用 1% 琼脂糖凝胶(含 0.5μg/mL EB)进行电泳,在紫外线照射下,切下含有目的基因(563bp)的凝胶,并放入准备好的 EP 管中,称取重量。

[0041] (2)柱平衡步骤:向吸附柱 CA2 (吸附柱当天经过了前处理)中(吸附柱放入收集管中)加入 500 μL 的平衡液 BL。12,000 rpm 离心 1 min。倒掉收集管中的废液,并将吸附柱 CA2 重新放回收集管中。

[0042] (3)向胶块中加入等倍体积溶液 PN (如果凝胶重为 0.1 g,其体积可视为 100 μL,则加入 100 μL PN 溶液),置于 50℃ 水浴温育。其间不断温和地上下翻转离心管,以确保胶块充分溶解,如果还有未溶的胶块,可继续放置几分钟或再补加一些 PN 溶液,直至胶块完全溶解(若胶块的体积过大,可事先将胶块切成碎块),胶块完全溶解后将溶液温度降至室温再上柱。

[0043] (4)将步骤(3)所得溶液加入步骤(2)平衡后的吸附柱 CA2 中(吸附柱放入收集管中)。于室温放置 2 min 后,12,000 rpm 离心 60s。倒掉收集管中的废液,并将吸附柱 CA2 放入收集管中。吸附柱容积为 800 μL,若样品体积大于 800 μL 可分批加入。

[0044] (5)向吸附柱 CA2 中加入 600 μL 漂洗液 PW (使用前需先检查是否已加入无水乙醇),静置 2~5 min。12,000 rpm 离心 30~60s,倒掉收集管中的废液,并将吸附柱 CA2 放入收集管中。

[0045] (6)重复操作步骤(5)。

[0046] (7)将吸附柱 CA2 放回收集管中,12 000 rpm 离心 2 min,将收集管中的漂洗液 PW 去除。将吸附柱 CA2 置于室温放置数分钟,彻底地晾干,以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

[0047] (8)将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加 40μL ddH<sub>2</sub>O,室温放置 2 min。12,000 rpm 离心 2 min 收集 DNA 溶液,将离心得到的溶液重新加回吸附柱中,室温放置 2 min,12,000 rpm 离心 2 min,将 DNA 溶液收集到离心管中。DNA 产物保存在 -20℃,以防 DNA 降解。

[0048] 3.2. PCR 产物与 pZeroBack/blunt 载体的连接

参照零背景快速连接试剂盒(ZeroBack Fast Ligation Kit)说明书,连接反应体系如

下:取 pZeroBack/blunt 载体 0.3uL、T4 DNA Ligase 0.5uL、2× Reaction Buffer 5uL、ddH<sub>2</sub>O 2.2uL、目的 PCR 纯化产物 2uL 放入 EP 管中混匀,并于 22℃ 条件下反应 5min,结束后置于冰上,进行后序转化实验。

[0049] 3.3. 大肠杆菌感受态的制备:采用氯化钙/甘油法制备,具体步骤如下:

(1) LB 平板挑取新活化的大肠杆菌单菌落,接种于 3~5mL LB 液体培养基中,37℃ 下振荡培养过夜,再以 1:100 接种于 100mL LB 液体培养基,37℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6。

[0050] (2) 将培养液分装至 50mL 无菌离心管,冰上放置 10min,4℃、3,000 g 离心 10 min。

[0051] (3) 弃上清,加入预冷的 0.05M CaCl<sub>2</sub> 10mL,轻轻悬浮细胞,冰上放置 15~30min,4℃、3,000 g 离心 5 min。

[0052] (4) 弃上清,加预冷含 15% 甘油的 0.05M CaCl<sub>2</sub> 2mL,轻轻悬浮细胞,分装成 100 或者 200uL 的小份,贮存于 -80℃ 冰箱中。

[0053] 3.4. 连接产物转化 DH5α 感受态细胞:本研究采用热休克法将 3.2 获得的连接产物转入大肠杆菌细胞中,包括以下步骤:

(1) 从 -80℃ 冰箱取一小份感受态细胞悬液,立即放于冰上解冻。

[0054] (2) 加入适量目的质粒或连接产物,轻轻混匀,冰上放置 30min。

[0055] (3) 42℃ 水浴热击 60 s,迅速置于冰上冷却 3~5 min。

[0056] (4) 加入 1mL LB 液体培养基,混匀后 37℃ 振荡培养 60min;

(5) 3000rpm 离心 5min 后,去掉上清液至只剩余 100uL 后,重悬菌体,将其涂布于含相应抗生素的筛选平板上,正面向上放置于 37℃ 恒温培养箱中待菌液完全被培养基吸收后倒置平板,培养 12~16h。

[0057] 用灭菌的 10uL 枪头挑取可疑菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃ 振荡培养 12~16 h,取适量菌液作 PCR 鉴定,PCR 扩增体系如表 2。

[0058] PCR 反应程序:94℃ 预变性 5min;(94℃ 变性 1 min;55℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 1 min) 共运行 30 个循环,70℃ 终延伸 10min,最后 4℃ 保存。

[0059] 3.5. 阳性菌液保存和质粒的提取

将 PCR 鉴定为阳性的菌液送广州华大基因生物技术有限公司进行序列测定,通过互联网 NCBI 基因库下载致病性马红球菌 VapA 基因片段,使用 lasergene MegAlign 软件对测序结果进行序列比对。

[0060] 将测序正确的阳性菌液部分加入终浓度为 30% 的灭菌甘油,放入 -80℃ 保存;部分进行扩大培养,参照天根生化科技有限公司快速质粒小提试剂盒(TIANprep Rapid Mini Plasmid Kit) 的使用说明书进行质粒抽提,具体步骤如下:

(1) 取 1~4 mL 过夜培养的菌液,加入离心管中,于 12,000rpm 下离心 1 min,尽量吸除上清(菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

[0061] (2) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 150uL 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNase A 和 TIANRed),使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

[0062] (3) 向离心管中加入 150 μL 溶液 P2,温和地上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解。此时菌液变得清亮粘稠,如果未变得清亮,可能由于菌体过多,裂解不彻底,应减少菌体量。

[0063] (4) 向离心管中加入 350 μL 溶液 P5,立即快速地上下颠倒混匀 12~20 次,充分混匀,此时将出现絮状沉淀;12,000 rpm 离心 2min。

[0064] (5)将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中(吸附柱放入收集管中),注意尽量不要吸出沉淀。吸附柱 CP3 在 12,000 rpm 下离心 30s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CP3 放入收集管中。

[0065] (6)向吸附柱 CP3 中加入 300  $\mu$ L 漂洗液 PWT (检查是否已加入无水乙醇),12,000 rpm 离心 30 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CP3 放入收集管中。

[0066] (7)将吸附柱 CP3 放入收集管中,12,000 rpm 离心 1 min,目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

[0067] (8)将吸附柱 CP3 置于一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位滴加 50 ~ 100 $\mu$ L 洗脱缓冲液 TB,12 000 rpm 离心 30s 将质粒溶液收集到离心管中。

[0068] (9)利用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not*I I 对抽提到的质粒进行双酶切鉴定(如图 2),获得一条 3.2kb 左右的条带和一条 560bp 左右的条带,表明 VapA 基因已成功连接到 pZeroBack/blunt 载体中。将该质粒命名为 pZeroBack-VapA。

[0069] 4、原核表达重组质粒 PMAL-VapA 的构建与鉴定

将原核表达载体 PMAL-c5x 和已经测序正确的阳性重组质粒 pZeroBack-VapA 分别用限制性内切酶 *EcoR*I、*Not*I 进行双酶切处理,酶切体系如表 3。

[0070] 混匀表 3 中的酶切体系后,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 ~ 4 h。将载体 PMAL-C5x 和重组质粒 pZeroBack-VapA 的酶切产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带,具体回收步骤参照 3.1。

[0071] 将回收的 PMAL-c5x 以及 VapA 基因利用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接仪中过夜连接,并将 PMAL-VapA 转入原核表达菌 BL21,经菌液 PCR 以及测序鉴定,结果如图 3。测序结果与参考 VapA 基因序列完全一致,且含有正确的 *EcoR*I 和 *Not*I 酶切位点。将该原核表达重组质粒命名为 PMAL-VapA。

[0072] 实施例 2 可溶性 MBP-VapA 重组蛋白的表达及最佳诱导条件的确定

将转化 PMAL-VapA 质粒阳性的 BL21 菌液按 1:100 比例接种于(含氨苄青霉素 50  $\mu$ g/ml) LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 摇床中 200r/min 振荡培养。至菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 左右时,按下列方法进行 MBP-VapA 重组蛋白的优化表达。

[0073] 1. 诱导表达温度的确定

加入浓度为 1mM 的 IPTG,并分别于 10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 的条件下震荡培养至恰当的诱导时间取样。样本于 4000r/min 离心 10 min,弃上清,取沉淀,并将沉淀用原体积 1/10 的去离子水重悬,按常规方法进行 SDS-PAGE,检测融合蛋白的表达。用 BandScan(5.0 版)软件分析泳道内蛋白含量,以确定最佳诱导表达温度。结果表明(如图 4),随着温度的由 10 $^{\circ}$ C 的增加,VapA (59kDa) 的表达量逐渐增加,并在 15 $^{\circ}$ C 和 20 $^{\circ}$ C 诱导时达到最大,随后降低。BandScan 分析显示,在 10 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 的条件下诱导 VapA 蛋白的表达分别占总泳道蛋白量的 9.1%、15.3%、16.6%、7.2%、2.7%,表明 20 $^{\circ}$ C 诱导表达 VapA 的量最大。

[0074] 2. IPTG 诱导时间的确定

重复诱导实验,当转化菌液 OD<sub>600</sub> 值达 0.6 左右时,加入浓度为 1mM 的 IPTG,20 $^{\circ}$ C 诱导表达,分别在 0h、2h、4h、8h、12h、16h、20 h 和 24h 后取样。样本经 4000r/min 离心 10min,弃上清,并将沉淀用原体积 1/10 的去离子水重悬,进行 SDS-PAGE 检测,并经 BandScan 分析,确定 IPTG 最佳诱导时间。结果(如图 5)显示,随诱导时间的延长 VapA 表达量逐渐增加,并

于诱导 8h 时达到最大表达量。其 BandScan 分析显示, IPTG 诱导 0h、2h、4h、8h、12h、16h、20h 和 24h 的 VapA 蛋白表达量分别占总泳道蛋白量的 0%、14.3%、21.3%、31.4%、31.5%、26.5%、21.2% 和 12.3%。结果表明, IPTG 的最佳诱导时间是 8h。

### [0075] 3. IPTG 诱导浓度的确定

按上述最佳诱导方法,当转化菌液  $OD_{600}$  值达 0.6 左右时,分别用终浓度为 0mM、0.1mM、0.3mM、0.5mM、0.7mM、1.0mM 和 1.4mM 的 IPTG 于 20℃ 诱导表达 8h 后取样。样品以 4000r/min 离心 10min,弃上清。收集菌体沉淀并用原体积 1/10 的去离子水重悬,进行 SDS-PAGE 检测并经 BandScan 分析,确定 IPTG 最佳诱导浓度。结果(如图 6)显示,肉眼观察 VapA 蛋白的表达不随 IPTG 诱导浓度的变化而变化。但是,BandScan 分析显示 VapA 蛋白表达量在 IPTG 浓度分别为 0mM、0.1mM、0.3mM、0.5mM、0.7mM、1.0mM 和 1.4mM 时,分别占总泳道蛋白量的 0%、26.9%、31.3%、30.3%、32.4%、27.9% 和 24.8%。显示为随着 IPTG 诱导浓度的增加而增加,至 0.7mM 达到最高而后下降。标明该 IPTG 诱导 VapA 表达的最佳浓度为 0.7mM。

### [0076] 4. 重组表达的 VapA 蛋白状态的鉴定

申请人通过实验发现, IPTG 诱导 VapA 重组蛋白的表达时,不同的温度对其表达的 VapA 蛋白的状态具有一定的影响。采用最佳 IPTG 浓度和诱导时间分别在 20℃、28℃ 和 37℃ 温度条件下对表达的 VapA 蛋白进行检测。取样菌液样本于 4000r/min 离心 10 min,弃上清,取沉淀。用原体积的 1/10 的上样缓冲液将沉淀重悬,并用超声在冰浴的条件下破碎细胞 10min。经 4℃ 离心,12000r/min 20min。按常规方法进行 SDS-PAGE,检测上清(含可溶性表达的蛋白)和沉淀(含包涵体表达的蛋白)中蛋白的表达。

[0077] 试验结果(如图 8)显示,诱导前、20℃ 诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀、28℃ 诱导表达产物的超声破碎上清和沉淀、以及 37℃ 诱导表达产物超声破碎上清和沉淀内 VapA 蛋白表达量分别占总泳道蛋白量的 0%、8.9%、10.1%、2.4%、5.3%、0% 和 5.6%。以上诱导表达产物经紫外分光光度计检测,浓度分别为:3.0、8.3、1.5、5.3、3.2、6.5、2.7mg/mL。表明,20℃ 诱导表达条件下目的蛋白的表达量最大且绝大部分为可溶性表达。同时,在最佳诱导条件下,多次进行诱导表达,将产物超声波裂解细菌的上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳鉴定表明重组蛋白绝大部分以可溶性的形式存在(图 7)。

### [0078] 5. 可溶性重组 VapA 蛋白的非变性纯化

将含有阳性质粒(PMAL-VapA)的 BL21 菌液按 1:100 的比例接种于 200ml LB 液体培养基(含氨苄青霉素 50  $\mu$ g/ml)中,于 37℃ 振荡培养至  $OD_{600}$  大约 0.6 左右时,加入浓度为 0.7mM 的 IPTG,20℃ 诱导 8h,使用 NEB 公司 Amylose Resin 产品(E8021)对表达蛋白进行纯化。参照说明书进行,具体操作如下:

#### (1) 蛋白粗提

将诱导蛋白表达后菌液,4000g 离心 10min,收集菌体。用柱子缓冲液 20mL 重悬(柱子缓冲液用量为原菌液体积的 1/10),储存于 -20℃。纯化蛋白时,将其置于冷水中化冻,并于冰水浴中,以 4s 的破碎,5s 的间隔,进行超声破碎细胞。持续超声破碎直到所释放的蛋白质达到最大量,菌悬液变澄清为止。

[0079] 将破碎后菌液在 4℃,12000rpm 条件下离心 20min,获取的上清即为蛋白粗提物。

#### [0080] (2) 亲和层析

a. 柱子的准备:将 1mL amylose 介质填充于规格为 1.0 x 10cm 的柱子中。用 5 倍柱

子体积的柱子缓冲液冲洗柱子。

[0081] b. 上柱:介质的量决定融合蛋白质的量,每毫升柱床体积可结合 6 ~ 8mg 融合蛋白质,根据目的蛋白的表达量估算上样体积。控制最大线性流速为 24cm/h,即 0.3mL/min。流速计算方式为:线性流速(cm/h) ×  $\pi r^2$  = 体积流速(mL/h)。

[0082] c. 洗脱:用 10 倍介质体积的柱子缓冲液洗柱子,然后用 10 倍介质体积的柱子洗脱液洗脱目的蛋白,以每组分 1mL 收集 10 个组分,使用微量分光光度计测量每组分目的蛋白的量,1-6 号收集液分别为:2.3、1.7、1.5、1.2、0.7 和 0.3mg/ml,7-10 号收集液蛋白浓度为 0。

[0083] 纯化后蛋白液用 SDS-PAGE 检测,使用 BandsScan 软件对 SDS-PAGE 图片进行分析重组 VapA 蛋白的纯度,为 83.7%。

[0084] 6. 重组 VapA 蛋白的抗原性分析

用 Western blot 对纯化的重组 VapA 蛋白的抗原性进行检测,具体步骤如下:

(1) 将 VapA 蛋白的 SDS-PAGE 的置于转印平皿中,剪一张与 SDS-PAGE 凝胶一样大小的 6 张 3mm 滤纸及 1 张硝酸纤维素膜,浸泡于转移缓冲液中大约 15min 左右,以驱除留于滤膜上的气泡。

[0085] (2) 阳极朝上,阴极在底部,上下各是 3 张滤纸, PAGE 凝胶一定要在 NC 膜上面被滤纸包裹,并保证无气泡。

[0086] (3) 安装电转移,以恒定电流 150mA 转移 30min。

[0087] (4) 加 10ml 封闭液(含 8% ~ 10% 脱脂奶粉的 TBS),4℃ 封闭过夜。

[0088] (5) 然后吸掉封闭液,用 TBST 洗三次,每次 5min。

[0089] (6) 以 1:100 稀释的抗马红球菌 VapA 蛋白的马阳性血清(Gluck Equine Research Center 馈赠)作为一抗,37℃ 作用 2h

(7) 弃反应液体,用 TBST 共洗 15min,每次 5min。

[0090] (8) 最后再用羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 酶标二抗(LSBio 公司)37℃ 条件下作用 1h,同样洗 3 次,最后再拍照保存。Western-blot 检测结果(如图 9)显示,纯化的重组蛋白(59kDa)可被抗马红球菌 VapA 蛋白的马阳性血清特异性识别,表明,该重组蛋白具有良好的免疫源性。

[0091] 因 VapA 蛋白在马红球菌中的表达量并不高,与直接从马红球菌中提纯 VapA 蛋白(Julien Cauchard, 2004) 相比,本发明采用非致病菌作为表达菌具生产更加安全、高效的特点;其次,与人工氨基酸合成 VapA 蛋白(Julien Cauchard, 2006) 相比,本发明所述方法表达的 VapA 氨基酸序列可通过天然细菌蛋白加工工厂完成正常的折叠、加工和修饰过程,形成更接近于马红球菌 VapA 蛋白的自然结构形态。最后,与已报导的 VapA 蛋白的表达方法相比,本方法表达出的蛋白为可溶性蛋白,而非包涵体蛋白。本发明方法表达的可溶性 VapA 蛋白具有更好的蛋白活性和免疫源性,而且, WB 验证所表达的 VapA 具有较高的活性。另外,虽然以包涵体蛋白形式表达的重组蛋白量通常较大,但因其加工处理过程繁琐且需经变性方式纯化,并不适用于工业生产的应用。相比之下,本发明采用非变形方法纯化对 VapA 重组蛋白活性影响较小且过程简单、易操作,更适用于商业化大批量生产。

[0092] 实施例 3 MBP-VapA 重组蛋白的 Dot ELISA

Dot ELISA 采用本领域的常规方法,一抗为马源抗马红球菌血清(20uL),二抗为 HRP 标

记兔抗马 IgG (1:1000 稀释),结果如图 10。

[0093] 用于检测马抗致病性红球菌病的抗体。图 10 中 1 至 3 孔为 BSA,蛋白浓度分别为: 0.1mg/mL、0.025mg/mL、0.00625mg/mL;4 孔为 PBS 对照,5 孔为马红球菌(ATCC33701)裂解液阳性对照;6 至 8 孔为 VapA 蛋白,浓度分别为 0.1mg/mL、0.025mg/mL、0.00625mg/mL。

[0094] 实验结果表明:与 *R. equi*标准细菌相同,本发明纯化的 MBP-VapA 蛋白可特异性识别马血清中的 *R. equi*细菌抗体并经酶标二抗反应显色;其次,与 BSA 对照相比,纯化的 MBP-VapA 蛋白与特异性抗体结合的能力随着蛋白浓度的下降而降低;最后,因对洗脱液对照孔无显色,该纯化蛋白特异性识别 *R. equi*细菌抗体的特性与其溶液无关。因此,本实验室纯化的 MBP-VapA 可用于 *R. equi*特异性抗体的检测。

[0095] 实施例 5MBP-VapA重组蛋白的间接 ELISA

#### 1、马红球菌间接 ELISA 方法的建立

纯化的 MBP-VapA 蛋白作为抗原包被 96 孔板,抗原以包被液(0.1M NaHCO<sub>3</sub> PH9.6)稀释,100uL/孔包被于 96 孔板,4 度过夜(>8h)。使用 PBST(PH7.2),每孔 200uL,在洗板机上洗涤 4 次,每次 3min;加入 200uL 封闭液(0.5%PVA),于室温封闭 1h;洗涤 4 次,方法如上所述;将待检血清用 PBS(PH7.2)稀释,100uL/孔加入 ELISA 板,37°C 温浴 1h;洗涤 4 次,方法如上所述;加入羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 酶标二抗,100uL/孔,37°C 温浴 1h;洗涤 4 次,方法如上所述;加入显色液 100uL (TMB),室温 10min;加入终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),100uL;ELISA 读板机于 OD<sub>450nm</sub> 读数。

[0096] 2、抗原包被浓度及血清最佳稀释度的确定

采用矩阵滴定法确定抗原抗体的最佳浓度,纯化的 MBP-VapA 蛋白抗原分别以 0.1ug、0.05ug、0.025ug、0.0125ug、0.00625ug 每孔包被 96 孔板,标准 *R. equi*阴、阳性血清分别作 100 倍、200 倍、400 倍、800 倍稀释。以标准 *R. equi*阳性血清 OD<sub>450nm</sub> 值在 1.0 左右,且 P/N 值最大,为标准确定抗原的最佳包被浓度和血清的最佳稀释度。

[0097]  $P/N = (\text{阳性血清 OD}_{450\text{nm}} \text{值} - \text{阳性血清空白对照 OD}_{450\text{nm}} \text{值}) / (\text{阴性血清 OD}_{450\text{nm}} \text{值} - \text{阴性血清空白对照 OD}_{450\text{nm}} \text{值})$ 。

[0098] 考虑到较低的血清稀释倍数可降低血清背景值,因而确定抗原的最佳包被浓度为 0.125ug/mL,血清的最佳稀释倍数为 400 倍(见图 11,表 4)。

[0099] 3、酶标二抗最佳工作浓度的确定

酶标二抗分别以 1:1250、1:5000、1:20000、1:80000、1:320000 稀释,使用优化好的抗原浓度包被 ELISA 板,并使用最佳的标准 *R. equi*阴、阳性血清稀释倍数,进行 ELISA 操作,以标准 *R. equi*阳性血清 OD<sub>450nm</sub> 值在 1.0 左右,且 P/N 值最大为标准确定羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 最佳稀释度。

[0100] 结果表明:羊抗马 IgG Fab' 2-HRP 最佳稀释度为 20000 倍稀释(见图 12,表 5)。

[0101] 4、封闭液的选择

分别使用 2%BSA、1%BSA、5%脱脂奶粉、1%PVA、0.5%PVA 做 ELISA 封闭,选用优化好的抗原浓度包被 ELISA 板,并使用最佳的标准 *R. equi*阴、阳性血清稀释倍数,以及酶标二抗稀释倍数,进行 ELISA 操作,以标准 *R. equi*阳性血清 OD<sub>450nm</sub> 值在 1.0 左右,且 P/N 比值最大为标准确定最佳封闭液,由表 6 可知最佳封闭液为 0.5%PVA。

表 6 封闭液优化结果

OD <sub>450nm</sub> 值	2%BSA	1%BSA	5%脱脂奶粉	1%PVA	0.5%PVA
阳性血清	2.79055	2.59105	1.66075	1.6187	1.44365
阳性血清空白对照	2.00515	2.0098	0.58565	0.2177	0.283
阴性血清	0.2651	0.3196	0.33705	0.3358	0.27935
阴性血清空白对照	0.09295	0.1014	0.13165	0.08675	0.09495
P/N 值	4.562	2.664	5.234	5.625	6.294

[0102]

## 5、ELISA 阴阳性临界值的确定

用上述已建立的 ELISA 检测方法,检测对标准阴性样品 1 份、无疫区马匹血清样品 19 份,做 1:400 稀释,每份血清重复 3 孔,进行 ELISA 测定(结果见表 8)。

经计算各样本的 OD<sub>450</sub> 平均值  $\bar{X}=0.210$ , 标准偏差  $SD=0.054$ , 临界值  $\bar{X}+3SD=0.370$ 。在规定的实验条件下,血清样本做 1:400 稀释,其 OD<sub>450</sub> 值大于临界值,即待检血清样本 OD<sub>450</sub> 值  $\geq 0.370$  时判定为阳性,否则判定为阴性,结果如表 7。

## [0103] 6、特异性试验

选取非 *R. equi* 疫区马场 H7N7 或 H3N8 流感病毒血清阳性的马匹,采集血清作为 H7N7 或 H3N8 流感病毒抗体阳性血清,进行马红球菌抗体间接 ELISA 检测。按最佳反应体系进行检测,与标准 *R. equi* 阴、阳性血清对照,每份血清重复 3 孔。如表 8 所示,与 *R. equi* 阳性血清对照相比,该 ELISA 检测 H7N9 或 H3N8 阳性血清以及 *R. equi* 阴性血清均为的阴性 (OD<sub>450nm</sub> < 0.370)。结果表明,本实验建立的 ELISA 方法具有特异性检测血清中 *R. equi* 抗体的能力。

表 8 特异性实验结果

	H3N8 阳性血清	马传贫阳性血清	马痲肺炎 阳性血清	阳性对照	阴性对照
OD <sub>450nm</sub>	0.153	0.195	0.178	1.112	0.217
	0.142	0.213	0.199	1.119	0.222
	0.147	0.195	0.213	1.118	0.218
OD <sub>450nm</sub> 平均值	0.147	0.201	0.189	1.117	0.219

## SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学

<120> 一种检测马红球菌病的试剂盒

<130>

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> MBP-VapA

<400> 1

Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys  
1                    5                    10                    15

Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr  
                  20                    25                    30

Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe  
                  35                    40                    45

Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala  
                  50                    55                    60

His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile  
65                    70                    75                    80

Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp  
85 90 95

Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu  
100 105 110

Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys  
115 120 125

Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly  
130 135 140

Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro  
145 150 155 160

Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys  
165 170 175

Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly  
180 185 190

Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp  
195 200 205

Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala  
210 215 220

Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys  
225 230 235 240

Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser  
 245 250 255

Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro  
 260 265 270

Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp  
 275 280 285

Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala  
 290 295 300

Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Val Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala  
 305 310 315 320

Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln  
 325 330 335

Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala  
 340 345 350

Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn  
 355 360 365

Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Leu Gly Ile  
 370 375 380

Glu Gly Arg Ile Ser His Met Ser Met Gly Gly Arg Met Lys Thr Leu

385	390	395	400
His Lys Thr Val Ser Lys Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Ala Ala Ala	405	410	415
Ala Ala Met Ile Pro Ala Gly Val Ala Asn Ala Thr Val Leu Asp Ser	420	425	430
Gly Ser Ser Ser Ala Ile Leu Asn Ser Gly Ala Gly Ser Gly Ile Val	435	440	445
Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Thr Ser Leu Asn Leu Gln Lys	450	455	460
Asp Glu Pro Asn Gly Arg Ala Ser Asp Thr Ala Gly Gln Glu Gln Gln	465	470	475
Tyr Asp Val His Gly Asp Val Ile Ser Ala Val Val Tyr Gln Arg Phe	485	490	495
His Val Phe Gly Pro Glu Gly Lys Val Phe Asp Gly Asp Ala Gly Gly	500	505	510
Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Ala Phe Trp Gly Thr Leu Phe Thr Asn	515	520	525
Asp Leu Gln Arg Leu Tyr Lys Asp Thr Val Ser Phe Gln Tyr Asn Ala	530	535	540



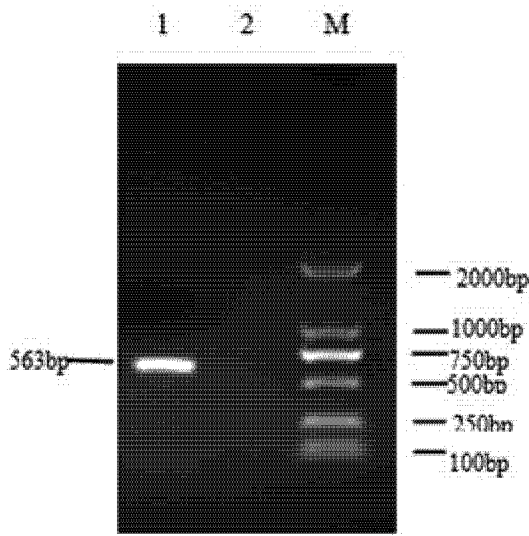


图 1

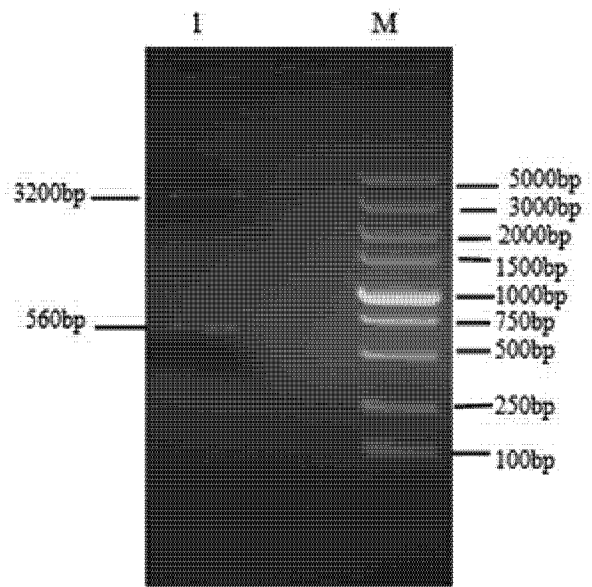


图 2

ACATATGTCCATGGG**GCGGCCG**CATGAAGACCCTGCACAAGACGGTTTCTA

*Not I* 酶切位点

AGGCGATCGCAGCCACAGCCGTAGCTGCGGCTGCGGCTATGATTCCC  
 CGGCGTCGCTAATGCGACCGTTCTTGATTCCGGTAGCAGCAGTGCGATTC  
 TCAATAGTGGGGCAGGCAGTGGCATTGTTCGGTTCTGGGAGCTATGACAG  
 CTCGACGACTTCGTAAACCTTCAGAAAGACGAACCGAACGGTTCGAGCA  
 AGCGATAACCGCCGGGCAAGAGCAGCAGTACGACGTTACGGAGACGTC  
 ATCAGCGCGGTTCGTCTACCAGAGGTTTCACGTATTCGGGCCAGAAGGAA  
 AGGTCTTCGATGGCGATGCAGGGGGACTCACGCTTCCTGGGGCCGGCG  
 CGTTCTGGGGGACTCTTTCACAAATGACCTTCAGCGTCTCTACAAAGAC  
 ACCGTCTCGTTCCAGTACAACGCCGTGGGGCCATACCTGAACATCAACTT  
 CTTCGATAGCTCAGGTAGCTTCTCGGCCATATCCAGTCCGGTGGAGTTA  
 GTACTGTGGTGGGCGTCGGCGGGCTCGGGTAGTTGGCACAACGCTTA  
**GGAATTC**CCTGCA GGT

*EcoR I* 酶切位点

图 3

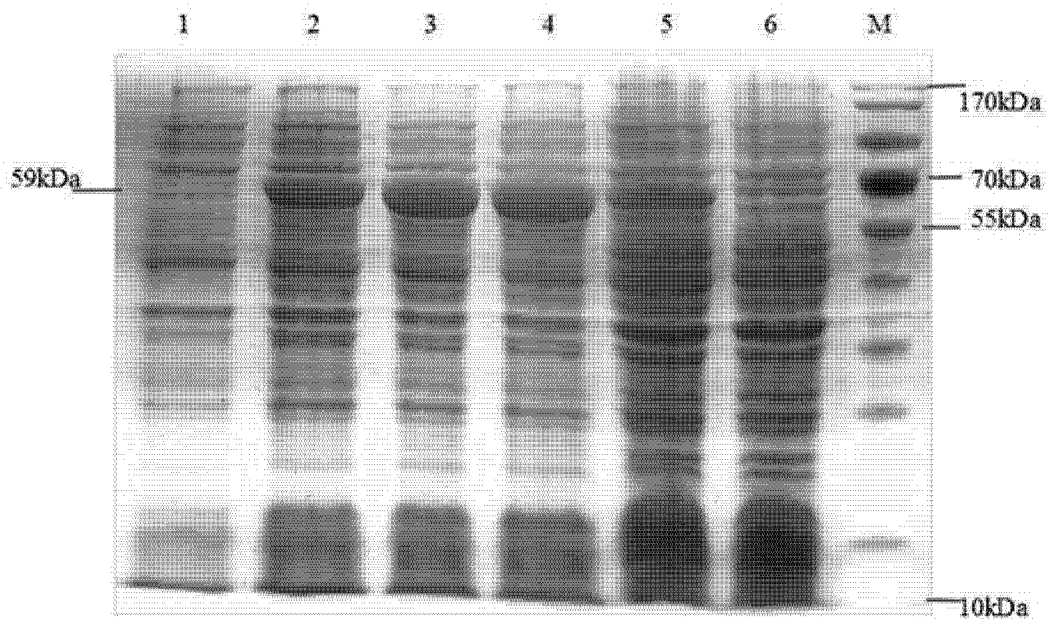


图 4

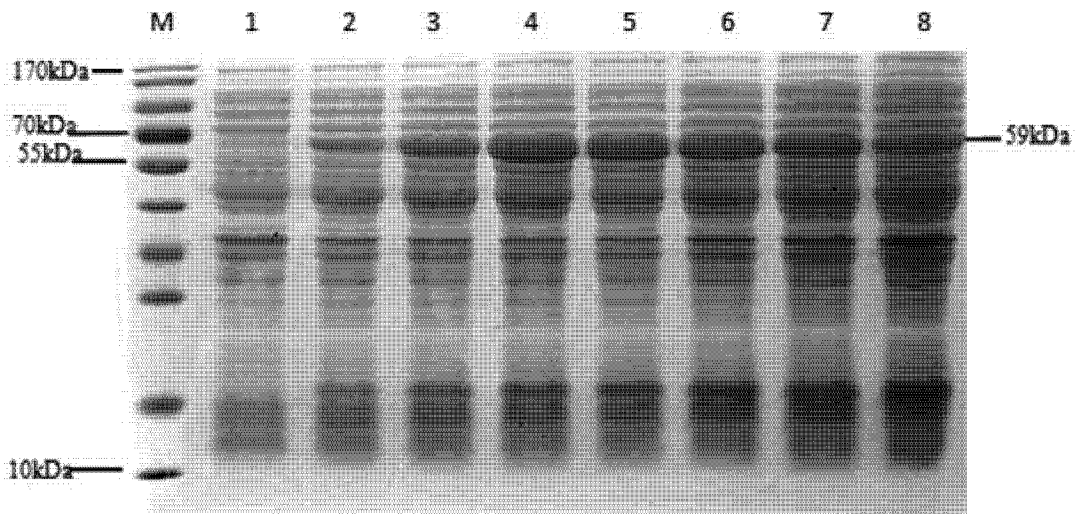


图 5

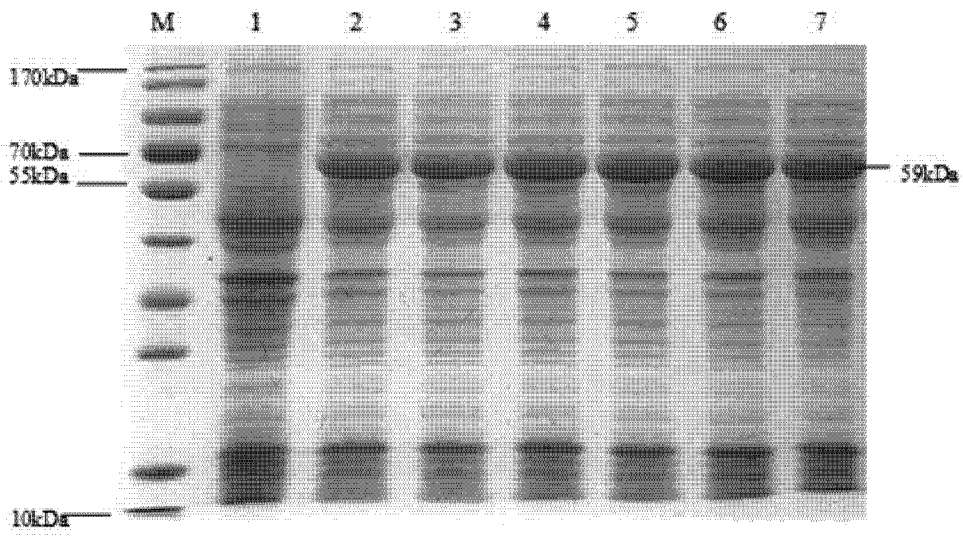


图 6

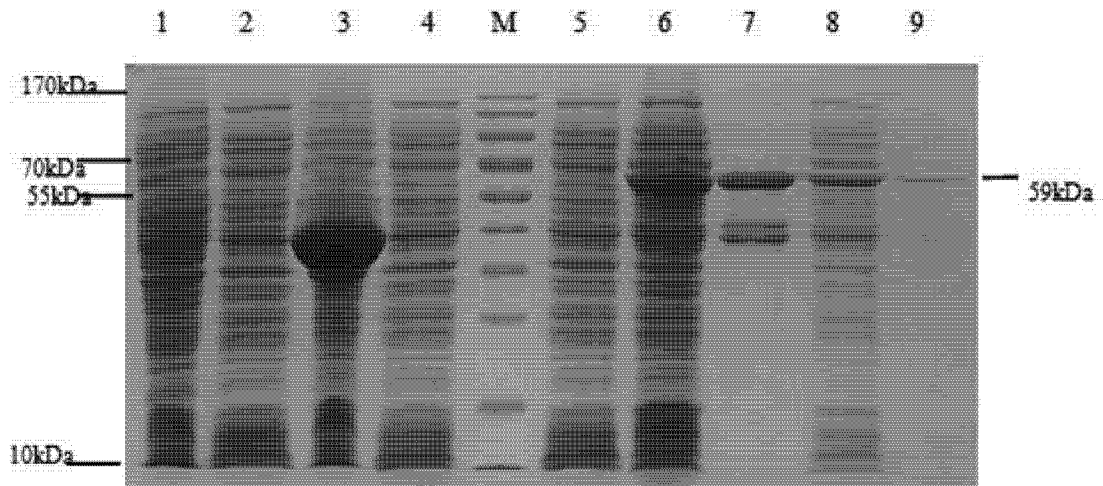


图 7

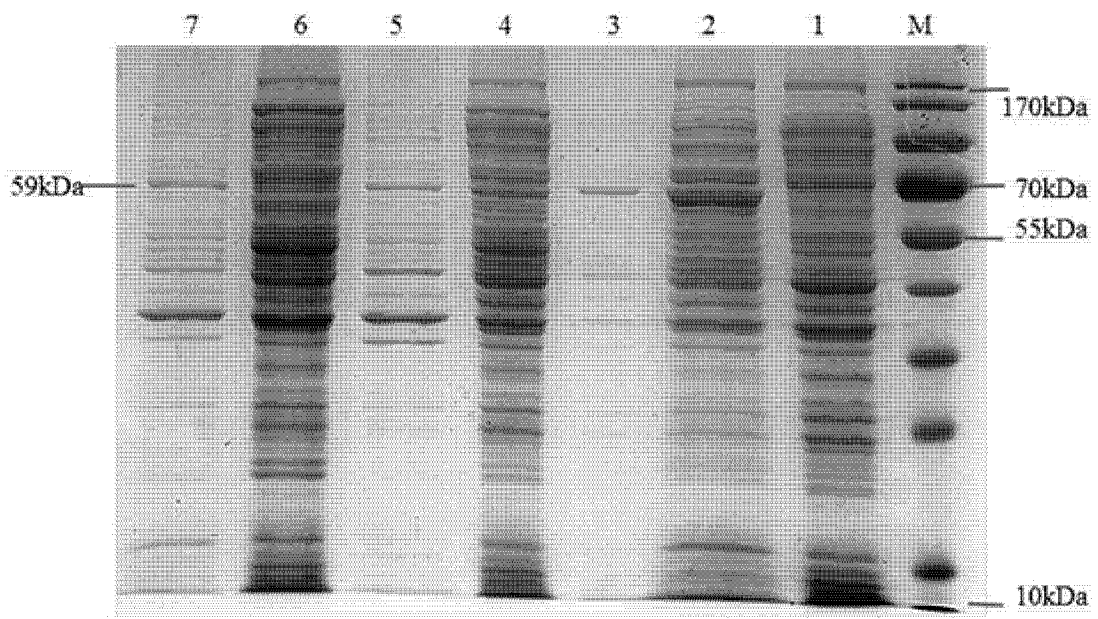


图 8

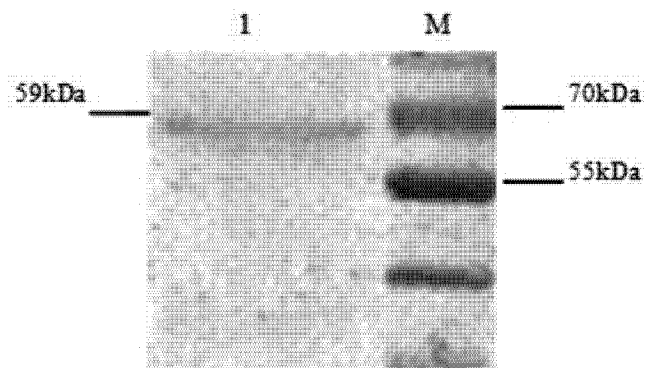


图 9

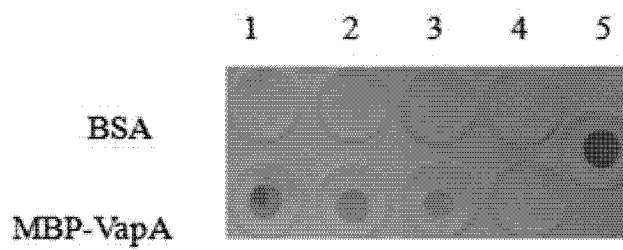


图 10

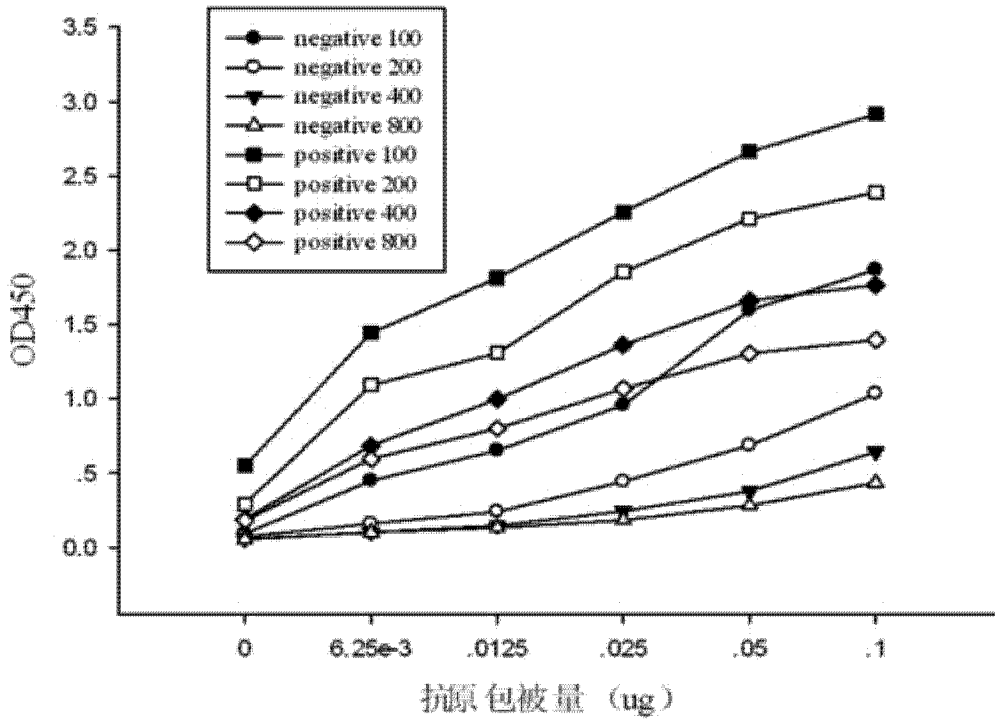


图 11

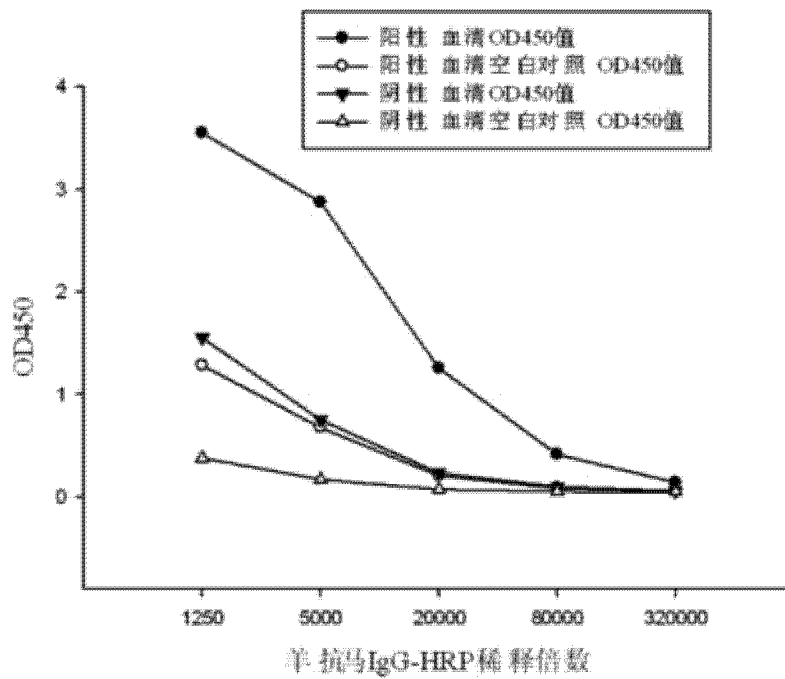


图 12

专利名称(译)	一种检测马红球菌病的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104865380A</a>	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201510273815.1	申请日	2015-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	孙凌霜 远立国 李守军		
发明人	孙凌霜 远立国 李守军		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911		
代理人(译)	林丽明		
其他公开文献	CN104865380B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体公开了一种检测马红球菌病的试剂盒，所述试剂盒包括作为免疫原的马红球菌致病基因VapA重组蛋白MBP-VapA，其氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示，所使用MBP-VapA蛋白更接近马红球菌致病基因VapA的性质。用该试剂盒进行检测，灵敏度高、特异性强、重复性和稳定性都很好，具有实际的临床应用意义。

