



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680699 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201110347288. 6

(22) 申请日 2011. 11. 07

(73) 专利权人 广西壮族自治区兽医研究所
地址 530001 广西壮族自治区南宁市友爱北路 51 号

(72) 发明人 谢芝勋 罗思思 刘加波 邓显文
庞耀珊 谢志勤 谢丽基 范晴
彭宜

(74) 专利代理机构 广西南宁汇博专利代理有限公司 45114
代理人 邓晓安

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006. 01)
G01N 33/543 (2006. 01)
G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件
CN 1462804 A, 2003. 12. 24, 全文。
李茂祥等. 减蛋综合征病毒 100K 蛋白基因的克隆与序列分析. 《中国病毒学》. 1998, 第 13 卷 (第 02 期), 160-165.

罗思思等. I 群禽腺病毒五邻体基因的克隆及原核表达. 《广东农业科学》. 2011, 第 38 卷 (第 07 期), 摘要, 第 155-156 页的第 1. 1-1. 2 节.

Michael Sheppard. Identification of a

fowl adenovirus gene with sequence homology to the 100K gene of human adenovirus. 《gene》. 1993, 第 132 卷

秦春香. 禽呼肠孤病毒非结构蛋白的克隆表达及重组蛋白 ELISA 方法的建立. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2007, (第 05 期),

赵思婷. 区分禽流感野毒感染鸡群与免疫鸡群的鉴别诊断方法研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》. 2009, (第 03 期),

韦悠等. 禽腺病毒 1 型抗体间接 ELISA 检测方法的建立. 《畜牧与兽医》. 2011, 第 43 卷 (第 10 期),

S Chiocca, et al. The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CEL0. 《Journal of Virology》. 1996, 第 70 卷 (第 5 期),

谷红等. PRRSV BJ-4 株 ORF5 基因的原核表达与重组蛋白的纯化. 《畜牧兽医学报》. 2004, 第 35 卷 (第 1 期),

审查员 许珊萍

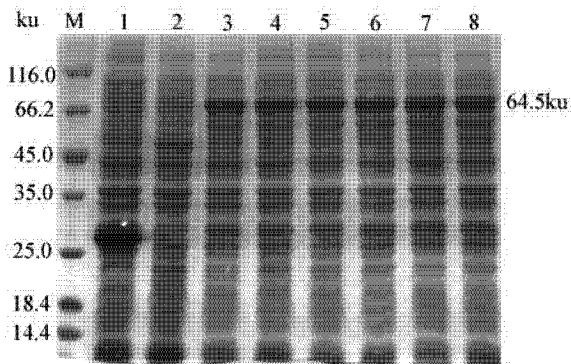
权利要求书 2 页 说明书 14 页
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法, 是以 FAVI100K 重组蛋白为包被抗原, 鸡血清为检测样品, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 为酶标二抗来检测 I 群禽腺病毒感染产生的抗体. 本发明特异性强, 操作简单, 耗时短, 成本低, 可大批量检测, 能有效的排除 I 群禽腺病毒灭活疫苗免疫的干扰, 特异性的检测 I 群禽腺病毒感染, 从而能区分 FAVI 感染动物与接种 FAVI 灭活疫苗动物, 为我国消灭 FAVI 提供一种有实际价值的诊断工具。



1. 一种鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在於:以 FAVI100K 重组蛋白为包被抗原,鸡血清为检测样品,辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 为酶标二抗来检测 I 群禽腺病毒感染产生的抗体;

所述包被抗原是经如下步骤制备:

(1)FAVI100K 重组蛋白的原核表达:以 FAVI CELO 毒株的 DNA 为模板,扩增 100K 基因前段核苷酸序列 GenBank:U46933:23671-24732nt,克隆至 pGEX-4T-1 原核表达载体中,在大肠杆菌 DH5 α 中表达,100K 基因部分序列扩增的引物如下:

上游引物:5' -CCGGAATTCTCATCGAAAATGGCAGACAAGAT-3',插入 EcoR I 酶切位点;

下游引物:5' -ATTTGCGGCCGCCCGAGACGCCATTTAGGTA-3',插入 Not I 酶切位点;

(2) 对 FAVI100K 重组蛋白反应原性的鉴定;

(3) 将鉴定后的 FAVI100K 重组蛋白经谷胱甘肽琼脂糖树脂吸附、洗涤、洗脱的亲和层析方法,获得纯化的 100K-pGEX 重组蛋白,即包被抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在於:所述鸡血清包括 FAVI 阴性血清、实验感染血清和灭活苗免疫血清。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在於包括如下步骤:

(1) 包被:用包被液将包被抗原稀释至 1 ~ 20 μ g/mL,包被 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,置于 4 $^{\circ}$ C 12 ~ 16h, PBST 洗板 3 次,拍干;

(2) 封闭:每孔加入封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育,封闭 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

(3) 与血清结合:加入检测样品,100 μ L/孔,设阴性标准品和阳性标准品为对照,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, PBST 洗板 3 次,拍干;

(4) 与酶标二抗结合:将辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 用稀释液以 1:1000 ~ 1:8000 倍稀释,每孔加入 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, PBST 洗板 3 次,拍干;

(5) 显色:每孔加入 100 μ L 底物显色液,于 37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

(6) 终止:每孔加入 50 μ L 终止液,终止反应;

(7) 结果判定:在酶标仪读取 450nm 波长处吸光值,即 OD450 值;

计算 FAVI 阴性血清的 OD450 平均值 X 和标准差 SD, FAVI 阴性血清的 X+3SD 作为阴阳性临界值,若检测样品 OD450 值 > 阴阳性临界值,判为阳性;若样品 OD450 值 < 阴阳性临界值,判为阴性。

4. 根据权利要求 3 所述的鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在於:

(1) 所述包被液为碳酸盐缓冲液:Na₂CO₃1.59g, NaHCO₃2.93g,加蒸馏水定容至 1000mL,调 pH 值到 9.6;

(2) 所述 PBST 为含有 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液:NaCl8.0g, KCl0.2g, KH₂PO₄0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O2.9g,吐温-20500 μ L,加蒸馏水定容至 1000mL,调 pH 值到 7.4;

(3) 所述封闭液为 5% 脱脂奶,即 5g 脱脂奶用 PBST 定容至 100mL;

(4) 所述稀释液为 1% BSA,即 1g 牛血清白蛋白 BSA 用 PBST 定容至 100mL;

(5) 所述底物显色液为:TMB 缓冲液 10mL, TMB 溶液 0.5mL, H₂O₂32 μ L;

(6) 所述终止液为 2M H₂SO₄,即 21.7mL 浓硫酸缓慢加入 178.3mL 蒸馏水中。

5. 根据权利要求 3 所述的鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在於:所

述阴性标准品为以 SPF 鸡胚孵育所产 2 ~ 5 日龄雏鸡的血清。

6. 根据权利要求 3 所述的鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在于:所述阳性标准品包括灭活苗阳性标准品和实验感染阳性标准品。

7. 根据权利要求 6 所述的鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,其特征在于:
所述灭活苗阳性标准品为经 I 群禽腺病毒灭活苗两次皮下免疫后的 SPF 鸡血清;
所述实验感染阳性标准品为经 I 群禽腺病毒模拟自然感染的方式滴鼻、点眼两次后的 SPF 鸡血清。

鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,特别涉及一种利用 100K 重组蛋白鉴别 I 群禽腺病毒感染的动物与经免疫接种 I 群禽腺病毒灭活疫苗的动物的间接 ELISA 方法。

背景技术

[0002] I 群禽腺病毒 (Fowl adenovirus group I, 以下简称 FAVI) 归于腺病毒科禽腺病毒属,具有共同的群抗原,基于 hexon 基因序列,分为 5 个不同的种 (A-E),基于中和试验结果,细分为 12 个血清型。FAVI 在世界范围内普遍存在,宿主较多在鸡、鸭、鹅体内,可从健康和发病的家禽中分离出。该病既可经排泄物水平传播,也可经卵垂直传播,污染鸡胚。近年来,由 FAVI 引起的包涵体肝炎、心包积液肝炎综合征和砂囊糜烂等疾病,对肉鸡的生产及种鸡的培育带来一定的威胁,因而引起养殖业对该病的预防和控制。FAVI 较多的是在体内复制而不发病,动物感染该病毒后,呈隐性感染,与其他病原共同作用于家禽。FAVI 的灭活苗免疫后,如能建立一种区分 FAVI 免疫动物和感染动物的间接 ELISA 方法,对防控、净化和消灭该病具有至关重要的作用。

[0003] 目前,检测 FAVI 的血清学方法主要有琼脂免疫扩散、中和试验、免疫荧光、对流免疫电泳、间接血凝反应和 Southern 杂交等。这些方法耗时、费力,不适合大批量的检测血清样品,而且使用的抗原较多为全病毒,存在散毒的危险。

[0004] 100K 是 FAVI 的非结构蛋白,是 FAVI 感染后期中含量最丰富的蛋白质,能与最新合成的最主要结构蛋白 hexon 结合,使后者发生卷曲并折叠成同源三聚体,同时能使 hexon 从细胞浆内质网转运到细胞核进行装配。100K 还能与腺病毒晚期 mRNA 结合,以促进病毒蛋白的合成,同时抑制宿主蛋白的合成。

[0005] 本发明所述 100K 重组蛋白的间接 ELISA 鉴别诊断方法建立的基本原理是病毒非结构蛋白只在病毒复制增殖过程中表达,刺激机体产生非结构蛋白抗体。目前在疫病防治中采用的灭活疫苗,在制备过程中破坏了绝大多数非结构蛋白,因此用灭活苗免疫动物,理论上动物体内就只有结构蛋白抗体而极少有甚至用现有方法检测不到的非结构蛋白抗体。而动物感染野毒后,病毒在体内复制、增殖的过程中就有非结构蛋白的表达,因此可以利用非结构蛋白抗体的存在与否来区分感染动物和灭活苗免疫动物。大量研究表明,利用病毒非结构蛋白建立的 ELISA 方法能区分感染与灭活苗免疫产生的抗体,如 Raue R 等利用牛病毒性腹泻 NS 基因建立商品化 ELISA 试剂盒,以区分感染和灭活苗免疫产生的抗体;我国台湾学者 Shu PY 等利用乙型脑炎非结构蛋白 NS1 建立区分感染和免疫抗体的间接 ELISA 方法;Bruderer U 等利用重组蛋白 3ABC 建立区分口蹄疫自然感染和疫苗免疫的抗体的 ELISA 方法;Makkay AM 等利用新城疫 NP 基因建立区分自然感染和 HN 基因亚单位疫苗鸡抗体的 ELISA 方法;Laviada MD 等构建非洲马病 NS3 基因重组菌,区分自然感染和灭活苗免疫的方法。但是,目前尚无利用 100K 重组蛋白鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法的研究报道。

发明内容

[0006] 本发明是针对上述领域中的不足,提供了一种利用 100K 重组蛋白鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,该方法特异性强,操作简单,耗时短,成本低,可大批量检测样品。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0008] 一种鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,是以 FAVI100K 重组蛋白为包被抗原,鸡血清为检测样品,辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 为酶标二抗来检测 I 群禽腺病毒感染产生的抗体。

[0009] 所述包被抗原是经如下步骤制备:

[0010] (1)FAVI100K 重组蛋白的原核表达:以 FAVI CELO 毒株的 DNA 为模板,用特异性引物 PCR 扩增 100K (GenBank:U46933:23671-24732nt) 目的基因,目的基因克隆于 pGEX-4T-1 原核表达载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。根据氨苄青霉素抗性提取克隆,快速提取转化子的质粒 DNA,双酶切鉴定,得到与目的片段分子量一致的片段,判为阳性结果,命名为 100K-pGEX。阳性质粒送大连宝生物公司测序,结果表明 FAVI100K 重组蛋白目的基因序列已正确连入 pGEX-4T-1,大小为 1062bp,推算蛋白质分子量为 38.9ku, pGEX-4T-1 载体本身表达的谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 的分子质量为 25.6ku,因此,FAVI100K 重组蛋白的分子量为 64.5ku,100K 基因部分序列扩增的引物如下:

[0011] 上游引物:5' -CCGGAATTCTCATCGAAAATGGCAGACAAGAT-3',插入 EcoR I 酶切位点;

[0012] 下游引物:5' -ATTTGCGGCCGCCCGAGACGCCATTTAGGTA-3',插入 Not I 酶切位点;

[0013] (2)对 FAVI100K 重组蛋白鉴定:将目的基因的重组质粒 100K-pGEX 转化大肠杆菌 DH5 α ,经 IPTG 诱导后,菌体蛋白经 SDS-PAGE 蛋白电泳及考马斯亮蓝染色显示,与空菌体相比,在约 64.5ku 处有一条浓染的新增蛋白条带。经 western-blot 鉴定,能与 FAVI 阳性血清发生反应,而空菌体不反应,表明 FAVI100K 重组蛋白具有较强的反应原性;

[0014] (3)将鉴定后的 FAVI100K 重组蛋白经谷胱甘肽琼脂糖树脂吸附、洗涤、洗脱的亲层析方法,获得纯化的 100K-pGEX 重组蛋白,即包被抗原。

[0015] 所述鸡血清包括 FAVI 阴性血清、实验感染血清和灭活苗免疫血清。

[0016] 鉴别 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法,包括如下步骤:

[0017] (1)包被:用包被液将包被抗原稀释至 1~20 μ g/mL,包被 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,置于 4 $^{\circ}$ C 12~16h, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0018] (2)封闭:每孔加入封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育,封闭 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0019] (3)与血清结合:加入检测样品,100 μ L/孔,设阴性标准品和阳性标准品为对照,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0020] (4)与酶标二抗结合:将辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 用稀释液以 1:1000~1:8000 倍稀释,每孔加入 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0021] (5)显色:每孔加入 100 μ L 底物显色液,于 37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

[0022] (6)终止:每孔加入 50 μ L 终止液,终止反应;

[0023] (7)结果判定:在酶标仪读取 450nm 波长处吸光值,即 OD450 值;

[0024] 计算 FAVI 阴性血清的 OD450 平均值 X 和标准差 SD,根据统计学原则,FAVI 阴性血清的 X+3SD 作为阴阳性临界值,FAVI 阴性血清样品至少要 30 份以上才达到统计要求,若检

测样品 OD450 值 > 阴阳性临界值, 判为阳性; 若样品 OD450 值 < 阴阳性临界值, 判为阴性。

[0025] 其中, 所述包被液为碳酸盐缓冲液: Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水定容至 1000mL, 调 pH 值到 9.6;

[0026] 所述 PBST 为含有 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液: NaCl 18.0g, KCl 10.2g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, 吐温-20 500 μL , 加蒸馏水定容至 1000mL, 调 pH 值到 7.4;

[0027] 所述封闭液为 5% 脱脂奶, 即 5g 脱脂奶用 PBST 定容至 100mL;

[0028] 所述稀释液为 1% BSA, 即 1g 牛血清白蛋白 BSA 用 PBST 定容至 100mL;

[0029] 所述底物显色液为: TMB 缓冲液 10mL, TMB 溶液 0.5mL, H_2O_2 32 μL ;

[0030] 所述终止液为 2M H_2SO_4 , 即 21.7mL 浓硫酸缓慢加入 178.3mL 蒸馏水中。

[0031] 所述阴性标准品为以 SPF 鸡胚孵育所产 2~5 日龄雏鸡的血清。

[0032] 所述阳性标准品包括灭活苗阳性标准品和实验感染阳性标准品; 灭活苗阳性标准品为经 I 群禽腺病毒灭活苗两次皮下免疫后的 SPF 鸡血清; 实验感染阳性标准品为经 I 群禽腺病毒模拟自然感染的方式滴鼻、点眼两次后的 SPF 鸡血清。

[0033] 本发明的有益效果是:

[0034] 1. 本发明选取 FAVI CELO 株的 100K 基因部分序列, 通过克隆表达, 以原核表达的 100K 重组蛋白作为鉴别诊断抗原, 采用间接 ELISA 模式, 研制出 FAVI 非结构蛋白抗体检测试剂盒, 为我国消灭 FAVI 提供一种有实际价值的诊断工具。该法操作简单, 耗时短, 成本低, 可大批量检测。

[0035] 2. 本发明选取 FAVI 抗原性较强的 100K 重组蛋白的部分序列, 通过分析, 选择其中的抗原表位和亲水性较好的区域, 采用基因重组技术, 原核表达, 亲和层析后获得一种新的 100K 重组蛋白。经过改造过得 100K 重组蛋白既保留了其抗原性, 又提高了 100K 重组蛋白的原核表达量。该重组蛋白作为抗原不仅具有高特异性, 且具有高纯度和高稳定性, 在提取纯化后, 包板作为检测方法中的重要组分。与全病毒抗原相比, 该重组抗原可规模化、标准化生产, 更安全、经济。

[0036] 3. 本发明针对我国畜牧兽医业领域实际使用的疫苗生产工艺及动物免疫情况, 确定了判定标准。FAVI 经灭活苗免疫接种后, 由于非结构蛋白在疫苗的生产过程中已破坏, 不产生非结构蛋白的抗体, 但在 FAVI 感染过程中, 产生非结构蛋白的抗体。因此, 本发明利用 FAVI 100K 非结构蛋白, 构建 100K 重组蛋白作为包被抗原, 建立间接 ELISA 抗体检测方法, 能检测到 FAVI 感染产生的抗体, 而不能检出灭活苗免疫的抗体, 从而能够有效区分 I 群禽腺病毒感染动物与 I 群禽腺病毒灭活苗免疫动物。

附图说明

[0037] 图 1: 100K 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

[0038] M. 蛋白质分子标准; 1. pGEX-4T-1 空菌体; 2. 100K-pGEX 未诱导; 3. 100K-pGEX 诱导的表达产物。

[0039] 图 2: 100K 重组蛋白的 western-blot 分析

[0040] M. 蛋白质分子量标准; 1. 空对照; 2. 100K 重组蛋白。

具体实施方式

[0041] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式并不局限于实施例表示的范围。

[0042] 实施 1:

[0043] 一、100K 基因的克隆

[0044] 1. I 群禽腺病毒 DNA 的提取

[0045] 使用天根生化科技血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒,直接从购自中国兽医药品监察所的鸡胚致死孤儿病毒 (CELOV) 的种毒传代的尿囊液中提取 DNA,操作按试剂盒说明书进行,具体步骤如下:

[0046] (1) 取尿囊液 180 μ L,加上 20 μ L GA, 20 μ L 蛋白酶 K 混匀,56 $^{\circ}$ C 4h 消化。

[0047] (2) 加入 200 μ L 缓冲液 GB,充分颠倒混匀,70 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟,溶液应变清亮,简短离心以去除管盖内壁的水珠。

[0048] (3) 加入 200 μ L 无水乙醇,充分振荡混匀 15 秒,此时可能会出现絮状沉淀,简短离心以去除管盖内壁的水珠。

[0049] (4) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中(吸附柱放入收集管中),12000rpm 离心 30 秒,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

[0050] (5) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ L 缓冲液 GD,12000rpm 离心 30 秒,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

[0051] (6) 向吸附柱 CB3 中加入 700 μ L 漂洗液 PW,12000rpm 离心 30 秒,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

[0052] (7) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ L 漂洗液 PW,12000rpm 离心 30 秒,倒掉废液。

[0053] (8) 将吸附柱 CB3 放回收集管中,12000rpm 离心 2 分钟,倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

[0054] (9) 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μ L 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2-5 分钟,12000rpm 离心 2 分钟,将溶液收集到离心管,-20 $^{\circ}$ C 保存或立即进行 PCR 扩增。

[0055] 2. PCR 扩增

[0056] 以上述步骤 1 中所得的 DNA 为模板,用上游引物

[0057] 5' -CCGGAATTCTCATCGAAAATGGCAGACAAGAT-3' 和下游引物

[0058] 5' -ATTTGCGGCCGCCCGAGACGCCATTTAGGTA-3' 进行 PCR 扩增。

[0059] 反应体系 100 μ L,如下:天根生化公司 PCR MasterMix50 μ L,上游引物 (10 μ M) 2 μ L,下游引物 (10 μ M) 2 μ L,模板 DNA 2 μ L,灭菌水 44 μ L。

[0060] 瞬间离心混匀后,PCR 扩增的反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 5min 预变性,94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 8min 延伸。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳 (100-120V),扩增产物片段与预期的目的片段大小一致,可用于下游试验。

[0061] 3. 目的 DNA 片段的纯化

[0062] 将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 50min 后,在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶块置于 1.5mL 离心管中。

[0063] 按 AXYGEN 公司 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行试验,具体步骤如下:

[0064] (1) 计算凝胶重量(提前记录 1.5ml 离心管重量),该重量作为一个凝胶体积(如

100mg = 100 μ L 体积)

[0065] (2) 加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A, 混合均匀后于 75 $^{\circ}$ C 加热, 间断混合 (每 2-3min), 直至凝胶块完全融化 (约 6-8min)

[0066] (3) 加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B, 混合均匀。

[0067] (4) 吸取步骤 3 中的混合液, 转移到 DNA 制备管 (置于 2mL (试剂盒内提供) 离心管) 中, 12000 \times g 离心 1min。弃滤液。

[0068] (5) 将制备管置回 2mL 离心管, 加 500 μ L Buffer W1, 12000 \times g 离心 30s, 弃滤液。

[0069] (6) 将制备管置回 2mL 离心管, 加 700 μ L Buffer W2, 12000 \times g 离心 30s, 弃滤液。以同样的方法再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次 12000 \times g 离心 1min。

[0070] (7) 将制备管置回 2mL 离心管中, 12000 \times g 离心 1min。

[0071] (8) 将制备管置于洁净的 1.5mL 离心管中, 在制备膜中央加 30 μ L 去离心水, 室温静置 1min。12000 \times g 离心 1min 洗脱 DNA。

[0072] 4. 目的 DNA 片段与 pGEX-4T-1 载体连接

[0073] 目的 DNA 和 pGEX-4T-1 质粒均用 EcoR I 和 Xho I 双酶切, 酶切体系均为 20 μ L, 分别如下: 目的 DNA (0.5-1 μ g/ μ L) 1 μ L, EcoR I 1 μ L, Xho I 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, dH₂O 15 μ L; pGEX-4T-1 质粒 (0.5-1 μ g/ μ L) 1 μ L, EcoR I 1 μ L, Xho I 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, dH₂O 15 μ L。37 $^{\circ}$ C 消化 3h。将两者的双酶切产物跑胶纯化后, 用大连宝生物 DNA 连接试剂盒连接, 将 pGEX-4T-1 质粒载体 DNA 与插入 DNA 片段混合制备成体积为 5-10 μ L 的 DNA 溶液 (TE 溶液或水溶液), 载体 DNA 和插入 DNA 的摩尔数比一般为 :0.03pmol :0.1-0.3pmol。向上述 DNA 溶液中加入等体积 (5-20 μ L) 的 Solution I, 充分混匀。16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。反应液可直接用于细菌转化。

[0074] 5. 感受态细胞的制备

[0075] (1) 取出保存在 -70 $^{\circ}$ C 大肠杆菌 DH5 α 菌种, 接种到 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16h 左右。

[0076] (2) 挑取菌落到 LB 培养过夜, 次日, 以 1:100 比例转接到 50mL LB 的培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2.5-3h 左右, 监视菌液 OD 值, 待 OD₆₀₀ = 0.35 时, 停止培养。

[0077] (3) 将菌液 50mL 倒入离心管中, 冰浴 10min。

[0078] (4) 0 $^{\circ}$ C 3000 \times g 离心 8min。

[0079] (5) 将培养液倒净, 倒置离心管在吸水纸上 1min, 使最后一滴倒净。

[0080] (6) 菌液与 CaCl₂ 以 5:3 比例加入 CaCl₂, 即加 30mL CaCl₂ (提前预冷) 至菌体沉淀, 将沉淀重悬。

[0081] (7) 0 $^{\circ}$ C 3000 \times g 离心 10min, 沉淀菌体。

[0082] (8) 重复步骤 (5)。

[0083] (9) 用 2mL 预冷 CaCl₂ 溶液重悬沉淀, 并加入 20% 甘油, 混匀, 以每管 200 μ L 分装于 1.5mL 离心管中, 放置 -70 $^{\circ}$ C 保存。

[0084] 6. 感受态细胞的转化

[0085] (1) 取出 -70 $^{\circ}$ C 保存的感受态细胞 200 μ L, 融化后加入 10-20 μ L 连接产物, 轻柔混匀, 冰浴 30min。

[0086] (2) 置于 42 $^{\circ}$ C 水浴热应激 90s, 取出冰浴热休克 2-3min。

[0087] (3) 加入 800 μ L LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 45min, 使细胞复苏。

[0088] (4) 用移液枪把培养好的菌液缓慢地打在平板培养基表面,然后用手摇晃下平板,使菌液充分涂布平板。

[0089] (5) 吹干后,倒置于 37℃ 恒温箱培养。

[0090] 7. 挑斑

[0091] 在超净生物安全柜用消毒的牙签从平板上挑取单个菌落,接种于 1mL LB 培养基(含 50ug/mL 氨苄青霉素)中,37℃ 振荡培养 16h 小时左右。

[0092] 8. 质粒的提取与酶切鉴定

[0093] 按照天根生化公司的质粒小提试剂盒说明书提取重组载体菌的质粒,步骤如下:

[0094] (1) 取 5mL 过夜培养的菌液,加入离心管中,使用常规台式离心机,12000rpm 离心 1 分钟,尽量吸除上清。

[0095] (2) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ L 溶液 P1,彻底悬浮细菌沉淀。

[0096] (3) 向离心管中加入 250 μ L 溶液 P2,温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。

[0097] (4) 向离心管中加入 350 μ L 溶液 P3,立即温和地上下翻转 6-8 次,充分混匀,此时出现白色絮状沉淀。12000rpm 离心 10min,此时在离心管底部形成沉淀。

[0098] (5) 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中,注意尽量不要吸到沉淀。12000rpm 离心 30-60 秒,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CP3 放入收集管中。

[0099] (6) 向吸附柱 CP3 中加入 600 μ L 漂洗液 PW,12000rpm 离心 30-60 秒,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CP3 放入收集管中。

[0100] (7) 将吸附柱 CP3 放入收集管中,12000rpm 离心 2 分钟,目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

[0101] (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 μ L 洗脱缓冲液 EB,室温放置 2 分钟,12000rpm 离心 2 分钟将质粒溶液收集到离心管中。

[0102] 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切提取的 100K-pGEX 质粒,20 μ L 体系如下: EcoR I 1 μ L, Xho I 1 μ L, 100K-pGEX 质粒 5 μ L, 加灭菌水至 20 μ L。37℃ 消化 3h。经 1% 琼脂糖电泳跑酶切鉴定图。

[0103] (9) 重组质粒的测序鉴定:将 PCR 扩增鉴定、酶切鉴定均为阳性的克隆,过夜培养扩增,送上海英骏公司测序。鉴定正确的重组质粒命名为 100K-pGEX。

[0104] 所得编码 100K 片段的核苷酸序列如下:

[0105] TCATCGAAAATGGCAGACAAGATTACCCGAGAGGAAAAAACCATAGCGACGCTGGACCTCGTGTTACGC
GTGGTCGTCGATGCTGGTAACTGGGACGTGTTCTCGAAACGTTTGGTTCGCTACACACGCGAACAGTACGGAATCGA
GCTGCCCGAAGATATCGGGGACTTACCGACACATCTGAGGTCTCGAAAGTGCTGTTGAGTCATTTGGGGGAAGACA
AGGCGGTACTGTCCGCTACCGAATCGCGGAACTGACGCAACCTTCCGAAATGGACCGCGCTAAGGTCACAGAGGGA
GGCCTGGCCGTAATTAACGCGAGTCGCGATGAAAGCGAAGCTCAGAACCCCTCGAACCCCGAACCCGAGAGCATCGA
GAGCGACGCCGTAGAGGATCTCGGCGTTGCAGCAGAGAGCGACCCTAGCGATGACGAACCCGACCCAGAACCCGAGT
ATGACCATCGAGAGGCGGATCATGACTCTGATGCGGATAGCGGATACTATTCGGCAGATGGGGGACGACCTGGAACA
CCAGTGGACGAGGAGCCCCAGGACGATTCTCCCTCTTCCGAGGAGACCGCATCCACTGTCATCGAAGAAGCGCAGAC
TAGCGCTAGCAACGATTCTCATGACGACGACACTCACCGGACGACGGCAGTGCTTCTGAAGAGGATCTCGAGCGGG
ACGCCCTCGTGGCCCCGGCCGATCCTTTTCCCAACTTGCGGAAGTGTTTCGAGCGCCAAGCCATGATGCTGACCGGG
GCGTTAAAAGACGCCGCGGACACGGCTGATCCGCCAGAAAACGCTCTCCGTCGACAGCGTGCAAAGGCAGCTCGAACG

CTTCGTCTTTAACCCCGACCGCCGCGTGCCCGCCGAACACTTGGAGGTACGCTACAATTTCTACCCTCCTTTCTCA
CCCCAAGGCCATCGCGAGCTATCACATCTTTGCCGTACCGCTTCCATCCCTCTAAGCTGCAAAGCCAACCGCAGC
GGCAGCGACCTTCTAGCCAAAGCAAAAGAGAGCACTTTCTTCAAACGCTTACCTAAATGGCGTCTCGGG

[0106] 二、重组表达质粒的诱导表达

[0107] 将经过序列分析正确的重组菌 50 μ L 接种至 5mL 含有氨苄青霉素 (50ug/mL) 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。次日, 取过夜培养物以 1:100 接种至含有氨苄青霉素 (50ug/mL) 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡至 OD600 为 0.55-0.65 时, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 5h, 进行 SDS-PAGE 和 western-blot 分析, 检测表达产物。同时设 pGEX-4T-1 空菌体和未诱导的菌液作为阴性对照。

[0108] 三、表达产物的检测

[0109] 按伯乐公司制备 SDS-PAGE 胶的说明书, 制备蛋白胶。将诱导后的菌液 12000rpm 离心 5min, 用原菌液的 1/10 的 PBS 悬浮菌体沉淀, 加入 4 \times SDS 上样 buffer, 混匀, 水浴煮沸 5min, 在蛋白胶的样品孔上样, 10 μ L/ 孔, 先用 90V 电压电泳 25min, 把电压提到 120V, 继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。用考马斯亮蓝染色液染色和脱色液脱色, 见附图 1。结果显示, 经诱导的 100K 重组蛋白得到良好的表达, 在约 64.5ku 处出现特异的表达条带, 而 pGEX-4T-1 空菌体和未诱导的 100K 重组蛋白无此表达条带。

[0110] 四、100K 重组蛋白的大量制备与纯化

[0111] 将 100K-pGEX 表达产物反复冻融 3 次, 超声波裂解, 12000 \times g 离心 10min, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 确定 100K-pGEX 重组蛋白主要表达在上清还是沉淀。利用亲和层析的方法, 先用谷胱甘肽琼脂糖树脂吸附重组蛋白, 再用 PBS 反复清洗几遍, 除去 DNA、RNA 和杂蛋白, 最后用还原型谷胱甘肽缓冲液把 100K-pGEX 重组蛋白洗脱。

[0112] 五、western-blot 分析

[0113] 纯化好的 100K 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 用上海英俊公司 Western-blot 干转仪, 将蛋白条带转到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 同时设空菌体对照。NC 膜用 5% 脱脂奶封闭 37 $^{\circ}$ C 1h, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min, 加入 1:50 稀释的 FAVI 阳性血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后, 再用 PBST 洗涤 3 次, 加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鸡 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 洗膜 3 次后, 用 DAB 显色, 观察结果。

[0114] 六、100K 间接 ELISA 建立

[0115] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法, 具体的步骤如下:

[0116] (1) 包被: 以包被液将 FAVI100K 重组蛋白稀释至工作浓度 20ug/mL, 加入 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, 置于 4 $^{\circ}$ C 16h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0117] (2) 封闭: 每孔加入 200 μ L 5% 的脱脂奶, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0118] (3) 与血清结合: 加入待检血清样品, 100 μ L/ 孔, 设阳性和阴性标准品为对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0119] (4) 与酶标二抗结合: 用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:2000 倍稀释), 每孔加入 100 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0120] (5) 显色: 每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

[0121] (6) 终止: 每孔加入 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 OD450 值。

[0122] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清, 用酶标仪在 OD450nm 波长

下读取光吸收值 (OD450nm 值), 见表 1, 计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD), 根据统计学原则, $X+3SD$ 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为: 当待检样品 OD450 < 0.345 时, 判定为阴性; 当待检样品 OD450 > 0.345 时, 判定为阳性。

[0123] 表 1100K-ELISA 检测 FAVI 阴性血清 50 份的 OD450 值

[0124]

	FAVI 阴性血清									
OD450	0.278	0.233	0.169	0.154	0.257	0.108	0.241	0.266	0.239	0.178
	0.202	0.178	0.134	0.183	0.146	0.170	0.225	0.243	0.205	0.241
	0.195	0.186	0.192	0.151	0.189	0.194	0.165	0.178	0.248	0.253
	0.241	0.149	0.144	0.205	0.218	0.275	0.189	0.297	0.228	0.271
	0.219	0.282	0.172	0.127	0.135	0.148	0.169	0.282	0.127	0.183

[0125] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0126] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清, 包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果显示如表 2、表 3 所示。

[0127] 表 2100K-ELISA 检测实验感染动物血清 50 份的 OD450 值

[0128]

	实验感染动物血清										参照值
OD450	1.356	0.879	0.963	0.278	1.244	1.027	1.133	1.287	1.045	0.847	0.345
	1.263	1.045	1.564	1.033	1.248	1.071	0.754	0.832	0.967	0.899	
	1.251	1.164	1.234	1.058	1.377	1.421	1.045	1.074	0.953	1.047	
	0.988	1.256	1.254	0.984	1.025	1.038	0.984	0.845	0.977	0.963	
	1.574	1.042	0.972	1.025	0.841	0.332	0.745	1.471	0.825	0.941	

[0129] 表 3100K-ELISA 检测灭活苗免疫血清 50 份的 OD450 值

[0130]

	灭活苗免疫血清										参照值
OD450	0.278	0.202	0.197	0.128	0.175	0.145	0.233	0.218	0.246	0.196	0.345
	0.378	0.174	0.142	0.189	0.176	0.180	0.237	0.226	0.276	0.279	

[0131]

	0.201	0.195	0.187	0.194	0.279	0.260	0.254	0.236	0.207	0.179
	0.253	0.249	0.235	0.189	0.179	0.204	0.178	0.145	0.189	0.201
	0.217	0.296	0.108	0.123	0.140	0.153	0.148	0.190	0.176	0.152

[0132] 由表 2 和表 3 可知, 96% 感染动物血清为阳性, 而 98% 灭活苗免疫动物为阴性, 表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0133] 实施例 2:

[0134] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0135] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0136] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法,具体的步骤如下:

[0137] (1) 包被:以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 1 μ g/mL,加入 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,置于 4 $^{\circ}$ C 12h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0138] (2) 封闭:每孔加入 200 μ L5%的脱脂奶,37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0139] (3) 与血清结合:加入待检血清样品,100 μ L/ 孔,设阳性和阴性标准品为对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0140] (4) 与酶标二抗结合:用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:1000 倍稀释),每孔加入 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0141] (5) 显色:每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

[0142] (6) 终止:每孔加入 50 μ L2M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 OD450 值。

[0143] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清,用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值),计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD),根据统计学原则, X+3SD 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为:当待检样品 OD450<0.345 时,判定为阴性;当待检样品 OD450>0.345 时,判定为阳性。

[0144] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0145] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清,包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果 96%感染动物血清为阳性,而 98%灭活苗免疫动物为阴性,表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0146] 实施例 3:

[0147] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0148] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0149] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法,具体的步骤如下:

[0150] (1) 包被:以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 10 μ g/mL,加入 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,置于 4 $^{\circ}$ C 15h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0151] (2) 封闭:每孔加入 200 μ L5%的脱脂奶,37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0152] (3) 与血清结合:加入待检血清样品,100 μ L/ 孔,设阳性和阴性标准品为对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0153] (4) 与酶标二抗结合:用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:8000 倍稀释),每孔加入 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0154] (5) 显色:每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

[0155] (6) 终止:每孔加入 50 μ L2M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 OD450 值。

[0156] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清,用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值),计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD),根据统计学原则, X+3SD 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为:当待检样品 OD450<0.345 时,判定为阴性;当待检样品 OD450>0.345 时,判定为阳性。

[0157] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0158] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清,包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免

疫血清 50 份。结果 96% 感染动物血清为阳性, 而 98% 灭活苗免疫动物为阴性, 表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0159] 实施例 4:

[0160] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0161] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0162] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法, 具体的步骤如下:

[0163] (1) 包被: 以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 15ug/mL, 加入 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 37°C 温育 1h, 置于 4°C 14h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0164] (2) 封闭: 每孔加入 200 μ L 5% 的脱脂奶, 37°C 封闭 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0165] (3) 与血清结合: 加入待检血清样品, 100 μ L/ 孔, 设阳性和阴性标准品为对照, 37°C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0166] (4) 与酶标二抗结合: 用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:3000 倍稀释), 每孔加入 100 μ L, 置于 37°C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0167] (5) 显色: 每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液, 37°C 避光作用 10min;

[0168] (6) 终止: 每孔加入 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 OD450 值。

[0169] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清, 用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值), 计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD), 根据统计学原则, X+3SD 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为: 当待检样品 OD450 < 0.345 时, 判定为阴性; 当待检样品 OD450 > 0.345 时, 判定为阳性。

[0170] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0171] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清, 包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果 96% 感染动物血清为阳性, 而 98% 灭活苗免疫动物为阴性, 表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0172] 实施例 5:

[0173] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0174] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0175] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法, 具体的步骤如下:

[0176] (1) 包被: 以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 5ug/mL, 加入 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 37°C 温育 1h, 置于 4°C 13h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0177] (2) 封闭: 每孔加入 200 μ L 5% 的脱脂奶, 37°C 封闭 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0178] (3) 与血清结合: 加入待检血清样品, 100 μ L/ 孔, 设阳性和阴性标准品为对照, 37°C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0179] (4) 与酶标二抗结合: 用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:4000 倍稀释), 每孔加入 100 μ L, 置于 37°C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0180] (5) 显色: 每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液, 37°C 避光作用 10min;

[0181] (6) 终止: 每孔加入 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 OD450 值。

[0182] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清, 用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值), 计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD), 根据统计学原则, X+3SD 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为: 当待检

样品 OD450<0.345 时,判定为阴性;当待检样品 OD450>0.345 时,判定为阳性。

[0183] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0184] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清,包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果 96%感染动物血清为阳性,而 98%灭活苗免疫动物为阴性,表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0185] 实施例 6:

[0186] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0187] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0188] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法,具体的步骤如下:

[0189] (1) 包被:以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 16 μ g/mL,加入 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,置于 4 $^{\circ}$ C 12h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0190] (2) 封闭:每孔加入 200 μ L 5%的脱脂奶,37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0191] (3) 与血清结合:加入待检血清样品,100 μ L/孔,设阳性和阴性标准品为对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0192] (4) 与酶标二抗结合:用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:5000 倍稀释),每孔加入 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0193] (5) 显色:每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

[0194] (6) 终止:每孔加入 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 OD450 值。

[0195] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清,用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值),计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD),根据统计学原则, X+3SD 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为:当待检样品 OD450<0.345 时,判定为阴性;当待检样品 OD450>0.345 时,判定为阳性。

[0196] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0197] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清,包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果 96%感染动物血清为阳性,而 98%灭活苗免疫动物为阴性,表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0198] 实施例 7:

[0199] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0200] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0201] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法,具体的步骤如下:

[0202] (1) 包被:以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 18 μ g/mL,加入 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,置于 4 $^{\circ}$ C 16h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0203] (2) 封闭:每孔加入 200 μ L 5%的脱脂奶,37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0204] (3) 与血清结合:加入待检血清样品,100 μ L/孔,设阳性和阴性标准品为对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0205] (4) 与酶标二抗结合:用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:6000 倍稀释),每孔加入 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗板 3 次,拍干;

[0206] (5) 显色:每孔加入 100 μ L TMB 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光作用 10min;

[0207] (6) 终止:每孔加入 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 OD450 值。

[0208] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清,用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值),计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD),根据统计学原则, $X+3SD$ 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为:当待检样品 $OD450 < 0.345$ 时,判定为阴性;当待检样品 $OD450 > 0.345$ 时,判定为阳性。

[0209] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0210] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清,包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果 96% 感染动物血清为阳性,而 98% 灭活苗免疫动物为阴性,表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0211] 实施例 8:

[0212] 按照实施例 1 中的步骤一至五制备 100K 重组蛋白

[0213] 六、100K 间接 ELISA 检测方法的建立

[0214] 以纯化后的 100K 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法,具体的步骤如下:

[0215] (1) 包被:以包被液将由原核表达的 I 群禽腺病毒 100K 蛋白稀释至工作浓度 $9\mu\text{g}/\text{mL}$,加入 96 孔酶标板,每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 温育 1h,置于 4°C 13h, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0216] (2) 封闭:每孔加入 $200\mu\text{L}$ 5% 的脱脂奶, 37°C 封闭 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0217] (3) 与血清结合:加入待检血清样品, $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 设阳性和阴性标准品为对照, 37°C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0218] (4) 与酶标二抗结合:用 1% BSA 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 至工作浓度 (1:7000 倍稀释),每孔加入 $100\mu\text{L}$,置于 37°C 孵育 1h, PBST 洗板 3 次,拍干;

[0219] (5) 显色:每孔加入 $100\mu\text{L}$ TMB 底物显色液, 37°C 避光作用 10min;

[0220] (6) 终止:每孔加入 $50\mu\text{L}$ 2M H_2SO_4 终止反应,酶标仪测定 OD450 值。

[0221] (7) 用建立的 ELISA 方法检测 50 份 FAVI 的阴性血清,用酶标仪在 OD450nm 波长下读取光吸收值 (OD450nm 值),计算阴性平均值 (X) 与标准差 (SD),根据统计学原则, $X+3SD$ 为该检测方法的 cut-off 值。通过计算的 cut-off 值定义样品检测的判定标准为:当待检样品 $OD450 < 0.345$ 时,判定为阴性;当待检样品 $OD450 > 0.345$ 时,判定为阳性。

[0222] 七、100K 间接 ELISA 方法区分 I 群禽腺病毒感染的动物与灭活疫苗接种的动物

[0223] 用 100K-ELISA 方法检测了 100 份血清,包括实验感染动物血清 50 份和灭活苗免疫血清 50 份。结果 96% 感染动物血清为阳性,而 98% 灭活苗免疫动物为阴性,表明本发明可区分 FAVI 感染的动物与灭活疫苗接种的动物。

[0224]

核苷酸序列表

<110> 广西壮族自治区兽医研究所

<120> 利用 100K 蛋白鉴别诊断 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列（上游引物）

<400>

tcatcgaaaa tggcagacaa gat 23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列（下游引物）

<400>

cccagacgc catttaggta 20

<210> 3

<211> 1062

<212> DNA

<213> I 群禽腺病毒 100K

<400>

tcatcgaaaa tggcagacaa gattaccgga gaggaaaaaa ccatagcgac gctggacctc 60

gtgttacgcg tggtcgtcga tgetggtaac tgggacgtgt tctcgaaacg ttggttcgc 120

lacacacgcg aacagtacgg aatcgagctg cccgaagata tcggggactt accggacaca 180

ictgaggtct cgaagtgtct gttgagtcct ttgggggaag acaaggcggg actgtccgcg 240

taccgaatcg cggaactgac gcaaccttc gaaatggacc gcgctaaggt cacagagga 300

ggcctggcgg tacttaacgc gactcgcgat gaaagcgaag ctcaaaccc ctcaaaccc 360

gaacccgaga gcatcgagag cgacgccgta gaggatctcg gcgttcgagc agagagcgac 420

ectagcgatg acgaaaccca cccagaaccc gagtatgacc atcgagagge ggatcatgac 480

ictgatgegg atagcggata ctattcggca gatgggggac gacctggaac accagtggac 540

gaggagcccc aggacgattc tccctcttc gaggagaccg catcactgt catcgaagaa 600

gcgcagacta gcgctagcaa cgattctcat gacgacgaca ctaccgcca cgacggcagt 660

[0225]

gcttctgaag aggatctcga gcgggacgcc ctctggccc cggcegatcc ttttccaac	720
ttgcggaagt gtttcgagcg ccaagccatg atgctgaccg gggcgtaaa agacgccgcg	780
gacacggctg atccgccaga aacgctctcc gtcgacagcg tgcaaaggca gctcgaacgc	840
ttcgtcttta accecgaccg ccgctgccc gccgaacact tggaggtacg ctacaattc	900
tacctcctt tctcacccc caaggccatc gcgagctatc acatctttgc cgtcacgct	960
tccatecctc taagetgcaa agccaaccgc agcggcageg acctctctagc caaagcaaaa	1020
gagagcactt tcttcaaacg cttacctaaa tggcgtctcg gg	1062

核苷酸序列表

<110> 广西壮族自治区兽医研究所

<120> 利用 100K 蛋白鉴别诊断 I 群禽腺病毒感染的 ELISA 检测方法

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(上游引物)

<400>

tcatcgaaaa tggcagacaa gat 23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(下游引物)

<400>

cccgagacgc catttagta 20

<210> 3

<211> 1062

<212> DNA

<213> I 群禽腺病毒 100K

<400>

tcatcgaaaa tggcagacaa gattaccgga gaggaaaaaa ccatagecgac gctggacctc 60
 gtgttacgcg tggtegtega tgctggtaac tgggacgtgt tctcgaaacg tttggttcgc 120
 tacacacgcg aacagtacgg aatcgagctg cccgaagata tcggggactt accggacaca 180
 tctgaggtct cgaaagtgct gttgagtcac ttgggggaag acaaggcggg actgtccgcg 240
 taccgaatcg cggaactgac gcaaccttcc gaaatggacc gcgctaaggt cacagaggga 300
 ggcttgcccg tacttaacgc gagtcgcgat gaaagcgaag ctcagaacce ctcgaacccc 360
 gaacccgaga gcatcgagag cgacgccgta gaggatctcg gcgttcgagc agagagcgac 420
 cctagegatg acgaaccca cccagaacce gaggatgacc atcgagagge ggatcatgac 480
 tctgatgcgg atageggata ctattcggca gatgggggac gacctggaac accagtggac 540
 gaggagcccc aggacgatte tccctcttcc gaggagaccg catccactgt categaagaa 600
 gcgcagacta gcgetagcaa cgattctcat gacgacgaca ctaccgga cgacggcagt 660
 gcttctgaag aggatctcga gcgggacgcc ctctgtggccc cggccgatcc ttttcccaac 720
 ttgcggaagt gtttcgagcg ccaagccatg atgctgaccg gggcgttaaa agacgccgcg 780

gacacggctg atccgccaga aacgctctcc gtcgacagcg tgcaaaggca gctcgaacgc	840
ttcgtcttta accccgaccg ccgctgccc gccgaacact tggaggtacg ctacaatttc	900
taccctcctt tctcaccce caaggccatc gcgagctatc acatctttgc cgtcaccgct	960
tccatccctc taagctgcaa agccaaccgc agcggcagcg accttctagc caaagcaaaa	1020
gagagcactt tcttcaaag cttacctaaa tgcgctctcg gg	1062

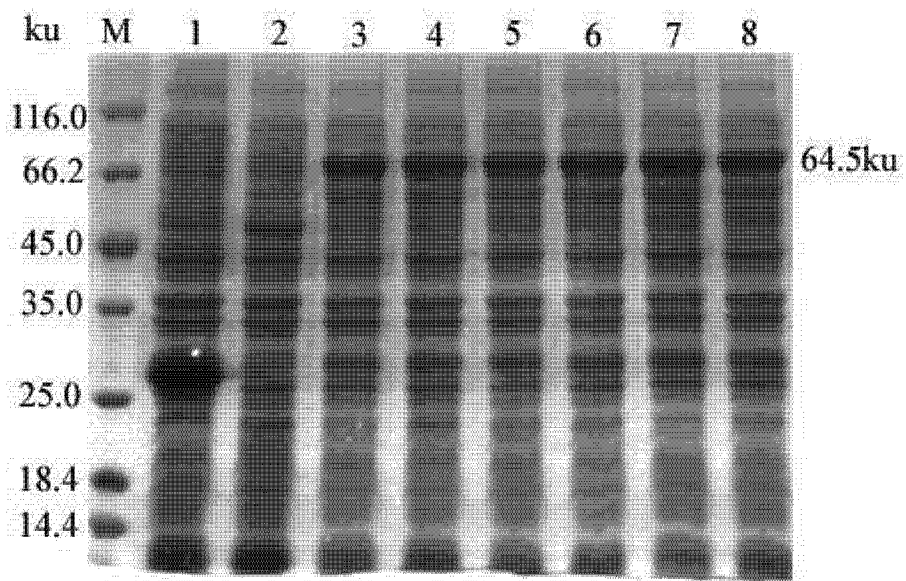


图 1

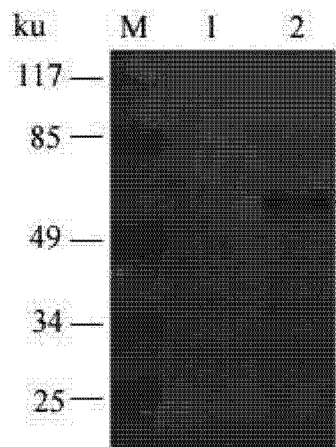


图 2

专利名称(译)	鉴别I群禽腺病毒感染的ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN102680699B	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	CN201110347288.6	申请日	2011-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
[标]发明人	谢芝勋 罗思思 刘加波 邓显文 庞耀珊 谢志勤 谢丽基 范晴 彭宜		
发明人	谢芝勋 罗思思 刘加波 邓显文 庞耀珊 谢志勤 谢丽基 范晴 彭宜		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531		
其他公开文献	CN102680699A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鉴别I群禽腺病毒感染的ELISA检测方法，是以FAVI100K重组蛋白为包被抗原，鸡血清为检测样品，辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡IgG为酶标二抗来检测I群禽腺病毒感染产生的抗体。本发明特异性强，操作简单，耗时短，成本低，可大批量检测，能有效的排除I群禽腺病毒灭活疫苗免疫的干扰，特异性的检测I群禽腺病毒感染，从而能区分FAVI感染动物与接种FAVI灭活疫苗动物，为我国消灭FAVI提供一种有实际价值的诊断工具。

