



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107607717 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201710669646.2

C12N 15/70(2006.01)

(22)申请日 2017.08.08

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市邗江区大学南路88号

(72)发明人 叶建强 王伟康 邵红霞 秦爱建
田晓彦 梁广成 万志敏

(74)专利代理机构 南京钟山专利代理有限公司
32252

代理人 戴朝荣 郑慧娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G07K 14/075(2006.01)

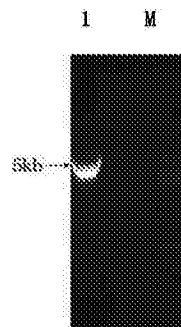
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒,包括包被有纤突蛋白基因F2表达产物的ELISA酶标板,阳性阴性对照,HRP标记的兔抗鸡二抗,样品稀释液、显色液以及洗涤液。本发明建立的FAdV-4抗体的间接ELISA试剂盒能特异性的检测出FAdV-4抗体,而与抗流感病毒血清(AIV)、抗马立克病毒血清(MDV)、抗新城疫病毒血清(NDV)、抗禽网状内皮组织增生症病毒血清(REV)以及SPF鸡血清不反应(图6)。因此,该试剂盒具有良好FAdV-4的特异性,能用于FAdV-4感染及免疫状况流行病学调查。



1. 一种基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于,包括包被有纤突蛋白基因F2表达产物的ELISA酶标板,阳性阴性对照,HRP标记的兔抗鸡二抗,样品稀释液、显色液以及洗涤液。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述阳性对照为抗血清4型禽腺病毒的鸡血清,阴性对照为SPF鸡血清。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述包被有纤突蛋白基因F2表达产物的ELISA酶标板,是通过将纯化的F2基因片段原核表达产物包被于96孔ELISA酶标板而制备。

4. 如权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述纤突蛋白基因F2的表达蛋白通过以下步骤得到:

(1) 禽腺病毒分离:取疑似禽腺病毒感染的病死鸡的肝脏,研碎后按1:5的比例加入PBS制成悬液;经微孔滤器过滤后,经尿囊腔接种8日龄SPF鸡胚,接种后收取尿囊液;尿囊液经鉴定为血清4型禽腺病毒后,-20℃保存;

(2) 禽腺病毒基因组的制备:首先将血清4型禽腺病毒分离毒株病毒经细胞裂解液裂解,随后用酚、氯仿、异戊醇进行病毒基因组抽提,最后用无水乙醇沉淀,溶于30uL灭菌超纯水,即得禽腺病毒基因组,置-20℃备用;

(3) PCR扩增pGEX-6p-1线性化载体以及FAdV-4病毒F2蛋白基因片段:设计出扩增血清4型禽腺病毒F2基因的引物以及pGEX-6p-1线性化载体的引物;以pGEX-6p-1原核表达载体以及禽腺病毒基因组为模板,利用相应引物分别PCR扩增出线性化的pGEX-6p-1载体以及禽腺病毒F2基因序列;

(4) p-FAdV-F2重组表达载体构建:利用重组酶Exnase™ II将线性化的pGEX-6p-1载体以及禽腺病毒F2基因的PCR产物进行快速体外重组克隆,重组克隆经序列验证后,命名为p-FAdV-F2,挑取细菌克隆进行质粒制备,并进行PCR鉴定,鉴定的阳性克隆转化到BL21细胞中进行诱导表达;

(5) F2原核表达质粒的表达及其产物的免疫反应性鉴定:扩增阳性克隆的BL21细胞,并以1:100接种于加AMP的LB培养基中,250rpm摇3h以后加入IPTG进行诱导表达,5h后收集细菌,用PBS重悬后40Hz,间隔8s进行破碎,破碎完成后离心分上清和沉淀;

(6) 制备检测禽腺病毒抗体的抗原:将BL21表达的融合表达产物GST-F2上清经GST标签亲和层析柱纯化后得到纤突蛋白基因F2的表达蛋白。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液是指含0.05%Tween-20的PBST。

6. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述显色液是指TMB显色液。

7. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述洗涤液是指含0.05% Tween-20的PBST。

8. 按照权利要求1~7任一所述的试剂盒在血清4型禽腺病毒检测中的应用。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,所述试剂盒检测血清4型禽腺病毒抗体的步骤及阳性判定标准如下:将阳性血清1:100稀释后,加入A1、A2孔,将阴性血清1:100稀释后加入A3、A4孔,剩下的孔用于检测待检样品,1:400稀释,37度反应1小时;PBST洗涤3遍后,加入工作浓度的HRP标记的兔抗鸡抗体,37度反应1小时;PBST洗涤3遍后,进行显色10分钟,之后加入终止液终止显色。读取OD450吸光值,OD450大于0.2的孔判为阳性。

基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术检测领域,具体涉及一种基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 禽腺病毒(Fowl Adenovirus, FAdV)属于腺病毒科禽腺病毒属,分为5个种(A-E),12个血清型。虽然在世界各地均有报道,FAdV感染一般引起亚临床症状,而急性感染主要引起包涵体肝炎、心包积液以及肌胃糜烂等。自2013年,国内鸡群由FAdV引起的包涵体肝炎、心包积液病例逐渐增多。到2015年,FAdV感染在国内多个省份鸡群爆发。目前国内FAdV爆发不仅发生在3-4周龄肉鸡,还发生于10-20周龄的蛋鸡,给养鸡业造成了严重经济损失。病毒分离鉴定发现,目前高致病性血清4型FAdV(FAdV-4)在国内鸡群流行较广泛。然目前尚无针对FAdV-4血清学抗体检测的快速方法及其试剂盒。

发明内容

[0003] 本发明的目的是在于提供一种基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒。

[0004] 本发明的原理和最核心的关键技术是科学合理的构建了禽腺病毒F2基因的原核表达质粒,之后将该质粒转化入BL21细胞进行原核表达并纯化并进一步将纯化的蛋白作为包被抗原建立试剂盒,检测血清4型禽腺病毒特异性抗体。

[0005] 实现本发明目的的技术方案是:

[0006] 本发明所述的一种基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒,包括包被有纤突蛋白基因F2表达产物的ELISA酶标板,阳性阴性对照,HRP标记的兔抗鸡二抗,样品稀释液、显色液以及洗涤液。

[0007] 进一步地,所述包被有表达F2蛋白的ELISA酶标板,是通过将纯化的F2基因原核表达产物包被于96孔ELISA酶标板而制备。

[0008] 本发明所述基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒,可以通过下述步骤得到:

[0009] (1) 禽腺病毒分离:取疑似禽腺病毒感染的病死鸡的肝脏,研碎后按1:5的比例加入PBS制成悬液;经0.45um微孔过滤器过滤后,经尿囊腔接种8日龄SPF鸡胚,接种后收取尿囊液;尿囊液经鉴定为血清4型禽腺病毒后,-20℃保存;

[0010] (2) 禽腺病毒基因组的制备:首先将血清4型禽腺病毒分离毒株病毒经细胞裂解液裂解,随后用酚、氯仿、异戊醇进行病毒基因组抽提,最后用无水乙醇沉淀,溶于30uL灭菌超纯水,即得禽腺病毒基因组,置-20℃备用;

[0011] (3) PCR扩增pGEX-6p-1线性化载体以及FAdV-4病毒F2蛋白基因片段:设计出扩增血清4型禽腺病毒F2基因的引物以及pGEX-6p-1线性化载体的引物;以pGEX-6p-1原核表达载体以及禽腺病毒基因组为模板,利用相应引物分别PCR扩增出线性化的pGEX-6p-1载体以

及禽腺病毒F2基因序列；

[0012] (4) p-FAdV-F2重组表达载体构建：利用重组酶Exnase™ II将线性化的pGEX-6p-1载体以及禽腺病毒F2基因的PCR产物进行快速体外重组克隆，重组克隆经序列验证后，命名为p-FAdV-F2，挑取细菌克隆进行质粒制备，并进行PCR鉴定，鉴定的阳性克隆转化到BL21细胞中进行诱导表达。

[0013] (5) F2原核表达质粒的表达及其产物的免疫反应性鉴定：扩增阳性克隆的BL21细胞，并以1:100接种于加AMP的LB培养基中，250rpm摇3h以后加入IPTG进行诱导表达，5h后收集细菌，用PBS重悬后40Hz，间隔8s进行破碎，破碎完成后离心分上清和沉淀。图3为本发明SDS-PAGE分析GST-F2的表达示意图，SDS-PAGE分析破碎后的上清和沉淀，可见表达产物部分在上清中，部分在沉淀中以包涵体的形式存在。之后利用Western-blot分析表达产物与阳性血清的反应性(如图4所示)。

[0014] (6) 制备检测禽腺病毒抗体的抗原：将BL21表达的融合表达产物GST-F2上清经GST标签亲和层析柱纯化后得到纤突蛋白基因F2的表达蛋白。图5为SDS-PAGE分析纯化的F2蛋白表达产物。

[0015] (7) 检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒：该试剂盒成分包括包被有纤突蛋白基因F2表达产物的ELISA酶标板，阳性阴性对照(阳性对照为抗血清4型禽腺病毒的鸡血清，阴性对照为SPF鸡血清)，HRP标记的兔抗鸡二抗(购买所得)，样品稀释液(含0.05% Tween-20的PBST)，显色液(TMB显色液)及洗涤液(含0.05% Tween-20的PBST)。

[0016] 该试剂盒检测血清4型禽腺病毒抗体的步骤及阳性判定标准如下：将阳性血清1:100稀释后，加入A1、A2孔，将阴性血清1:100稀释后加入A3、A4孔，剩下的孔用于检测待检样品(1:400稀释)，37度反应1小时；PBST洗涤3遍后，加入工作浓度的HRP标记的兔抗鸡抗体，37度反应1小时；PBST洗涤3遍后，进行显色10分钟，之后加入终止液终止显色。读取OD450吸光值，OD450大于0.2的孔判为阳性。

[0017] 本发明的有益效果体现在：本发明建立的FAdV-4抗体的间接ELISA试剂盒能特异性的检测出FAdV-4抗体，而与抗流感病毒血清(AIV)、抗马立克病毒血清(MDV)、抗新城疫病毒血清(NDV)、抗禽网状内皮组织增生症病毒血清(REV)以及SPF鸡血清不反应(图6)。因此，该试剂盒具有良好FAdV-4的特异性，能用于FAdV-4感染及免疫状况流行病学调查。

附图说明

[0018] 图1是本发明PCR扩增线性化pGEX-6p-1载体示意图(泳道1:线性化的pGEX-6p-1载体；泳道M:1Kb DNA Ladder)。

[0019] 图2是本发明PCR扩增F2目的片段示意图(泳道1:禽腺病毒F2基因；泳道M:100bpDNA Ladder)。

[0020] 图3是本发明SDS-PAGE分析GST-F2的表达示意图(泳道1:蛋白Marker；泳道2:GST上清；泳道3:GST沉淀；泳道4:GST-F2表达产物破碎上清；泳道5:GST-F2表达产物破碎沉淀)。图4是本发明Western-blot分析表达产物的反应性示意图(泳道1:GST-F2表达产物破碎上清；泳道2:GST-F2表达产物破碎沉淀；泳道3:阴性对照GST上清；泳道4:阴性对照GST沉淀；泳道5:蛋白Marker)。

[0021] 图5是本发明SDS-PAGE分析纯化的GST-F2的表达产物示意图(泳道1:纯化的GST-

F2表达产物;泳道2:蛋白Marker;泳道3:阴性对照GST上清;泳道4:阴性对照GST沉淀;泳道5:未纯化GST-F2的表达产物破碎上清;泳道6:未纯化GST-F2的表达产物破碎沉淀)。图6是本发明检测FAdV-4抗体的间接ELISA试剂盒特异性检测示意图。

具体实施方式

[0022] 下面将通过附图和具体实施方例对本发明做进一步的具体描述,但不能理解为是对本发明保护范围的限定。

[0023] 实施例1

[0024] 本发明所述基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒,可以通过下述步骤得到:

[0025] (1) FAdV-4禽腺病毒分离:

[0026] 取疑似禽腺病毒感染的病死鸡的肝脏,研碎后用按1:5的比例加入PBST制成悬液;5000r/min离心15min,取上清;加入青霉素和链霉素各1000IU/ml,37℃反应30min;经0.45um微孔滤器过滤后,以0.2ml/胚的剂量,经尿囊腔接种8日龄SPF鸡胚,接种后96-120小时后收取尿囊液;尿囊液经鉴定为FAdV-4禽腺病毒后,-20℃保存。

[0027] (2) 禽腺病毒基因组的制备:

[0028] 取FAdV-4分离毒株病毒(血清4型禽腺病毒)上清400uL于1.5mL指形管内,加入400uL细胞裂解液(50mmol/L Tris-HCl pH 8.0,20mmol/L EDTA pH 8.0,2%SDS和蛋白酶K),充分混匀后放置56℃水浴锅作用4小时;加入400uLTris平衡酚,充分混匀后10000r/min离心10分钟,取上清于另一1.5mL指形管;加入400uL酚:氯仿:异戊醇,充分混匀后10000r/min离心5分钟,取上清于另一1.5mL指形管;加入800uL无水乙醇,颠倒混匀后放入-20℃孵育30分钟,12000r/min离心15分钟,弃尽上清;室温自然干燥后向沉淀加入30uL灭菌超纯水和2uLRNA酶,充分溶解后,即得FAdV-4病毒基因组(禽腺病毒基因组),置-20℃备用。

[0029] (3) PCR扩增pGEX-6p-1线性化载体以及FAdV-4病毒F2蛋白基因片段:

[0030] 设计扩增出含pGEX-6p-1线性化载体与FAdV-4禽腺病毒F2蛋白基因片段的引物:具体引物序列见表1,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0031] 表1.PCR扩增线性化pGEX-6p-1及禽腺病毒F2基因引物

[0032]

PCR 产物	引物序列 5' -3'
pGEX-6p-1 线性化载体	上游引物: GAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTG (SEQ ID NO. 1)
	下游引物: GCTCCGTACCAAGCTTAAGTTTAAACG (SEQ ID NO. 2)
FAdV-4 病毒 F2 蛋白基因片段	上游引物: GTTCCAGGGGCCCATGCTCCGGGCCCTAA (SEQ ID NO. 3)
	下游引物: GTTTTCACCGTCATTACGGGAGGGAGGCCG (SEQ ID NO. 4)

[0033] 分别以pGEX-6p-1载体质粒(Invitrogen公司)以及步骤(2)制备的禽腺病毒基因组为模板,表1所述相应引物为引物分别进行PCR扩增出线性化的pGEX-6p-1载体以及禽腺病毒F2基因序列.PCR扩增反应体系为:模板1uL,5×Buffer10uL,10mM dNTP Mix 1uL,上游引物为10μmol 2uL,下游引物为10μmol 2uL,高保真酶1uL,加入灭菌超纯水至50uL.PCR扩

增反应循环参数为:95℃预变性4分钟,随后进行30个循环(95℃变性30秒,55℃退火30秒,72℃延伸3分钟),72℃延伸10分钟。PCR结束后,PCR产物在1%的琼脂糖凝胶中进行电泳分析(如图1,图2所示)。

[0034] (4) p-FAdV-F2重组表达载体构建:

[0035] 将以上纯化的线性化载体pGEX-6p-1以及禽腺病毒F2基因片段PCR产物在商品化重组酶ExnaseTM II的作用下进行重组克隆。重组克隆经序列验证后,命名为p-FAdV-F2。具体重组反应体系如下:纯化的禽腺病毒F2基因片段PCR产物50-100ng,纯化的pGEX-6p-1线性化载体50ng,2μL商品化的ExnaseTM II酶,4μL 5倍的缓冲液,其它补加水至20μL。反应物于37℃作用30分钟后,置冰上5分钟。随后将20μL反应物转化到常规感受态细菌,涂LB平板。次日挑取细菌克隆进行质粒制备,并进行PCR鉴定。鉴定的阳性克隆转化到BL21细胞中进行诱导表达。

[0036] (5) F2原核表达质粒的表达及其产物的免疫反应性鉴定:

[0037] 扩增阳性克隆的BL21细胞,并以1:100接种于加AMP的LB培养基中,250rpm摇3h以后加入IPTG进行诱导表达,5h后收集细菌,用PBST重悬后40Hz,间隔8s进行破碎,破碎完成后离心分上清和沉淀,图3为本发明SDS-PAGE分析GST-F2的表达示意图,SDS-PAGE分析破碎后的上清和沉淀,可见表达产物主要表达在沉淀中以包涵体的形式存在,之后利用Western-blot分析表达产物与阳性血清的反应性(图4)。用抗禽腺病毒阳性血清进行的Western-blot分析证明,只有本发明表达的F2蛋白片段能与禽腺病毒阳性血清进行良好的免疫反应。

[0038] (6) 制备检测FAdV-4抗体的抗原:

[0039] 利用BL21表达的产物上清进行蛋白纯化,经谷胱甘肽琼脂糖树脂亲和层析纯化。图5为SDS-PAGE分析纯化的F2蛋白表达产物。

[0040] (7) 检测FAdV-4抗体的间接ELISA试剂盒组装及特性:

[0041] 该试剂盒成分包括包被有F2蛋白表达产物的ELISA酶标板,阳性阴性对照(阳性对照为抗血清4型禽腺病毒的鸡血清,阴性对照为SPF鸡血清),HRP标记的兔抗鸡二抗(购买所得),样品稀释液(含0.05%Tween-20的PBST),显色液TMB以及洗涤液(含0.05%Tween-20的PBST)。该试剂盒检测血清4型禽腺病毒抗体的步骤及阳性判定标准如下:将阳性血清1:400稀释后,加入A1、A2孔,将阴性血清1:400稀释后加入A3、A4孔,剩下的孔用于检测待检样品,37度反应1小时;PBST洗涤3遍后,加入1:50000稀释的HRP标记的兔抗鸡抗体,37度反应1小时;PBST洗涤3遍后,进行显色10分钟,之后加入终止液终止显色。读取OD450吸光值。以大于阴性OD值为0.2的孔判为阳性。试剂盒特异性试验发现,该试剂盒仅与抗FAdV-4的阳性血清反应(FAdV1,FAdV2),而抗流感病毒血清(AIV)、抗马立克病毒血清(MDV)、抗新城疫病毒血清(NDV)、抗禽网状内皮组织增生症病毒血清(REV)、SPF鸡血清均不反应(图6)。

[0042] 实施例2

[0043] 临床样品检测效果

[0044] 对临床上来自FAdV-4免疫鸡群的16份血清进行了检测。如表2所示,免疫7天后的4份血清ELISA检测均为阴性,而免疫后14天以及21天的的相应4份血清样品均为ELISA阳性。而且发现ELISA读值随着鸡免疫后天数增加而增大。这与鸡群免疫后抗体产生规律相一致,同时提示本发明构建的ELISA具有良好的特异性。另外,为进一步验证ELISA检测的可靠性,

以感染FAdV-4的禽腺病毒的鸡肝细胞为抗原,进行了间接免疫荧光分析。比对结果发现,在所检测的样品中,间接免疫荧光检测FAdV-4抗体的结果与ELISA检测结果完全符合。以上检测结果证明,本发明基于纤突蛋白F2的检测血清4型禽腺病毒抗体的ELISA试剂盒具有良好的特异性及应用前景。

[0045] 表2.ELISA试剂盒对免疫鸡群血清检测效果

[0046]

血清来源	OD450值 (+/-)			
灭活疫苗接种7天	0.1486 (-)	0.1386 (-)	0.147 (-)	0.1444 (-)
灭活疫苗接种14天	0.3162 (+)	0.5068 (+)	0.3403 (+)	0.3966 (+)
灭活疫苗接种21天	0.5181 (+)	1.0691 (+)	0.5655 (+)	0.7656 (+)

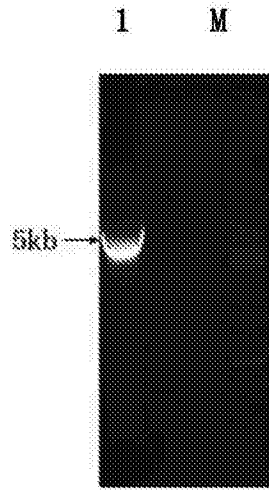


图1

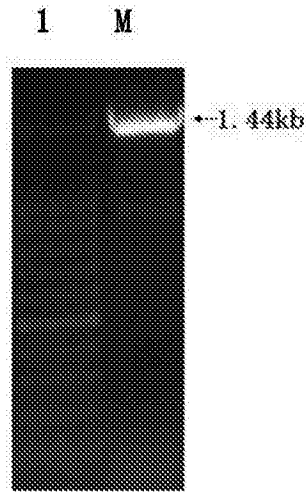


图2

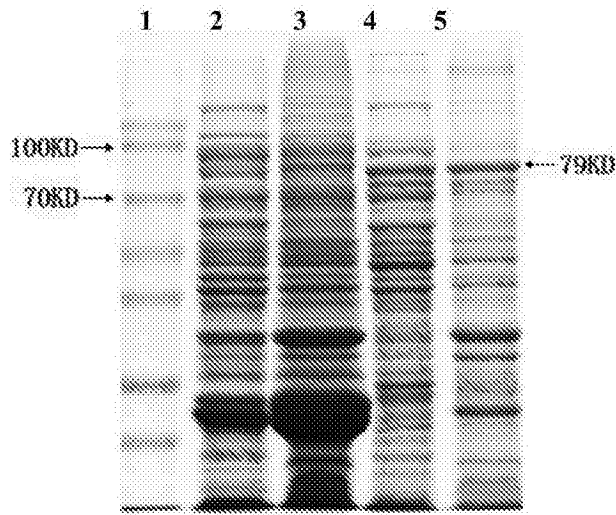


图3

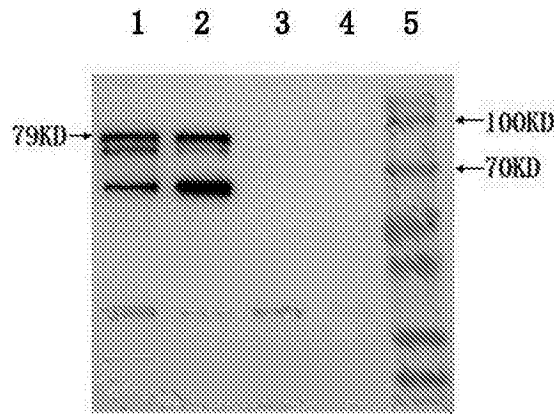


图4

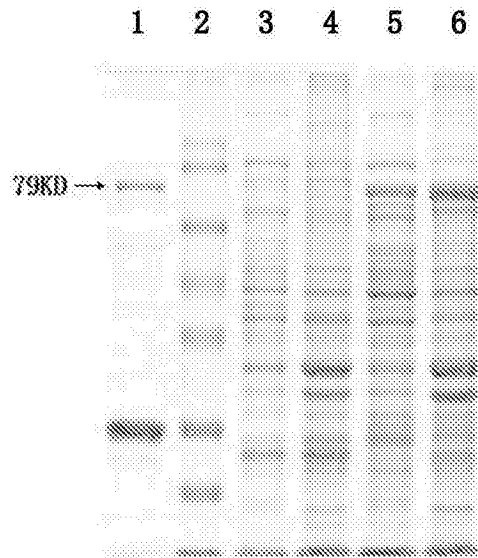


图5

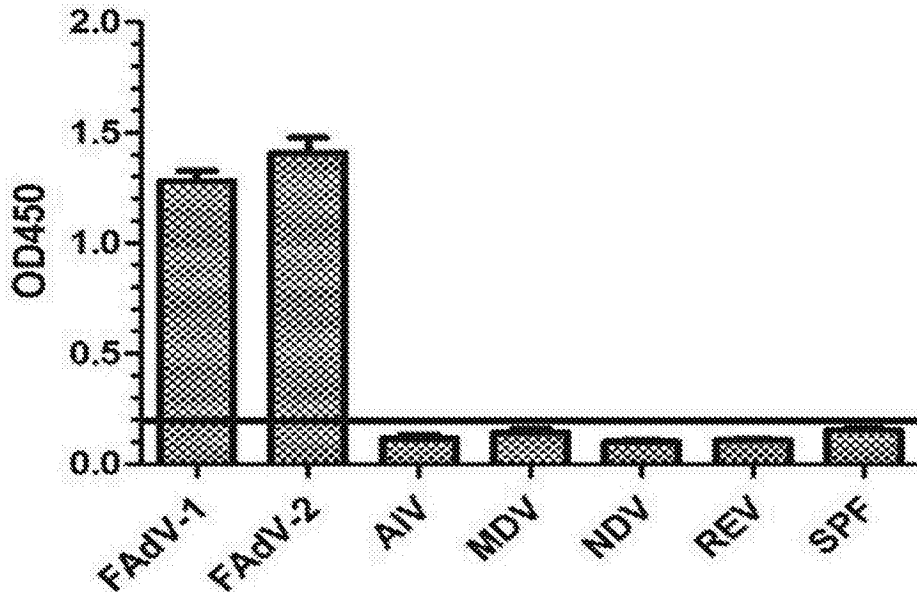


图6

专利名称(译)	基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN107607717A	公开(公告)日	2018-01-19
申请号	CN2017110669646.2	申请日	2017-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	叶建强 王伟康 邵红霞 秦爱建 田晓彦 梁广成 万志敏		
发明人	叶建强 王伟康 邵红霞 秦爱建 田晓彦 梁广成 万志敏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535 C07K14/075 C12N15/70		
代理人(译)	戴朝荣 郑慧娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于F2蛋白的检测血清4型禽腺病毒抗体的间接ELISA试剂盒，包括包被有纤突蛋白基因F2表达产物的ELISA酶标板，阳性阴性对照，HRP标记的兔抗鸡二抗，样品稀释液、显色液以及洗涤液。本发明建立的FAdV-4抗体的间接ELISA试剂盒能特异性的检测出FAdV-4抗体，而与抗流感病毒血清(AIV)、抗马立克病毒血清(MDV)、抗新城疫病毒血清(NDV)、抗禽网状内皮组织增生症病毒血清(REV)以及SPF鸡血清不反应(图6)。因此，该试剂盒具有良好FAdV-4的特异性，能用于FAdV-4感染及免疫状况流行病学调查。

