



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108627645 A

(43)申请公布日 2018.10.09

(21)申请号 201810399078.3

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2013.07.11

G01N 33/558(2006.01)

(62)分案原申请数据

G01N 33/531(2006.01)

201310290098.4 2013.07.11

(71)申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心哈
尔滨分中心)

地址 150069 黑龙江省哈尔滨市马端街427
号

(72)发明人 张云 刘明 陈志峰

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

鸭坦布苏病毒病E-ELISA检测试剂盒及其制
备方法

(57)摘要

本发明涉及以一种鸭坦布苏病毒E蛋白为包
被抗原的酶联免疫吸附试验(E-ELISA)检测试剂
盒、其制备方法及其应用。本发明试剂盒包含标
准阳性对照鸭血清、标准阴性对照鸭血清、坦布
苏病毒E蛋白(SEQ ID No.2)所包被的ELISA板、
羊抗鸭酶标二抗、TMB底物显色液、终止液。本发
明制备的E-ELISA检测试剂盒用于鸭坦布苏病毒
感染后的抗体检测。

1. 原核表达的鸭坦布苏病毒TA株E蛋白在制备鸭坦布苏病毒病E-ELISA检测试剂盒中的应用,其中所述试剂盒包含标准阳性对照鸭血清、标准阴性对照鸭血清、鸭坦布苏病毒TA株E蛋白所包被的ELISA板、羊抗鸭酶标二抗及其他试剂,

其中所述标准阳性对照鸭血清为提取自用鸭坦布苏病毒免疫的SPF鸭的血清,所述标准阴性对照鸭血清为提取自SPF鸭的血清,

所述鸭坦布苏病毒TA株E蛋白所包被的ELISA板通过用在原核表达系统中重组表达的鸭坦布苏病毒TA株E蛋白包被ELISA板制得,其中所述鸭坦布苏病毒TA株E蛋白通过将SEQ ID No.1所示的编码坦布苏病毒TA株E蛋白的核苷酸序列克隆在原核细胞表达载体中并在原核细胞中表达制得,并且

所述羊抗鸭酶标二抗为HRP标记的羊抗鸭二抗,

所述其他试剂包括样品稀释液、10×浓缩洗液、TMB底物显色液和终止液,其中所述10×浓缩洗液为100mmol/L PBST, pH7.4,所述样品稀释液由所述10×浓缩洗液按照1:9V/V稀释获得,所述终止液为2mol/L硫酸溶液。

2. 权利要求1所述的应用,其中所述试剂盒的检测方法包括:

(1) 反应步骤:将待测鸭血清样品、标准阳性对照鸭血清和标准阴性对照鸭血清分别加入所述鸭坦布苏病毒TA株E蛋白所包被的ELISA板的独立的孔中,在37℃反应1h;

(2) 与二抗反应步骤:将每孔洗涤后,分别加入所述HRP标记的羊抗鸭二抗,在37℃反应1h;

(3) 显色步骤:将每孔洗涤后,分别加入TMB底物显色液进行显色反应;

(4) 读数步骤:终止显色反应,在酶标仪上在波长450读数;

(5) 判断步骤:待测鸭血清样品反应孔的OD值与标准阴性对照鸭血清反应孔的OD值的比例大于等于2.1时,表示待测鸭血清样品为阳性,说明待测鸭感染了鸭坦布苏病毒;上述比值小于2.1时,表示待测鸭血清样品为阴性,说明待测鸭没有感染鸭坦布苏病毒。

3. 一种制备权利要求1所述的鸭坦布苏病毒病E-ELISA检测试剂盒的方法,所述方法包括下述步骤:

(1) 原核表达并纯化鸭坦布苏病毒TA株E蛋白,取适量的鸭坦布苏病毒TA株E蛋白包被ELISA板;

其中所述鸭坦布苏病毒TA株E蛋白通过将SEQ ID No.1所示的编码坦布苏病毒TA株E蛋白的核苷酸序列克隆在原核细胞表达载体中并在原核细胞中表达制得;

其中所述的E蛋白包被的ELISA板可以由以下过程制备得到:

用0.05mol/L pH值9.6的碳酸盐缓冲液将已纯化的坦布苏病毒TA株E蛋白稀释为5μg/ml;将含有E蛋白的碳酸盐缓冲液加入到96孔酶标板中,100μl/孔,置于4℃,15~18h;倾尽96孔板中的液体,加入10mmol/L pH值7.4的PBST,200μl/孔,洗3次,每次5min;倾尽96孔板中的液体,加入封闭液,置于37℃2.5h;倾尽96孔板中的液体,加入10mmol/L pH值7.4的PBST,200μl/孔,洗3次,每次5min;彻底倾尽96孔板中的液体,将包被有E蛋白的96孔板置于37℃,干燥2h,放入有干燥剂的塑料袋中;

其中所用的封闭液的配制如下:KH₂PO₄ 0.26g,Na₂HPO₄-12H₂O 2.89g,NaCl 8.71g,脱脂奶粉50g,去离子水800ml,调pH值至7.4,添加去离子水至1L,在此溶液中添加0.5ml Tween-20;

(2) 从SPF鸭提取血清作为标准对照阴性血清,从用鸭坦布苏病毒免疫后的SPF鸭提取血清作为标准对照阳性血清;

(3) 商购得到HRP羊抗鸭二抗;

(4) 配制样品稀释液、 $10\times$ 浓缩洗液、TMB底物显色液和终止液:

样品稀释液:每个试剂盒装量1瓶,250ml/瓶;

$10\times$ 浓缩洗液的配制过程如下: KH_2PO_4 2.6g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 28.9g, NaCl 87.1g, 去离子水800ml, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加5ml Tween-20;

使用时 $10\times$ 浓缩洗液按照1:9V/V稀释获得样品稀释液;

TMB底物显色液购自天根公司, 每个试剂盒装量1瓶/盒50ml;

终止液:每个试剂盒装量1瓶,250ml/瓶;终止液的配制:将浓度为18mol/L的浓硫酸与去离子水按1:9配制制得2mol/L的硫酸溶液作为终止液;

(5) 组装:将步骤(1)中得到的鸭坦布苏病毒TA株E蛋白包被的ELISA板与适量的步骤(2)-(4)制得的成分组装成试剂盒。

鸭坦布苏病毒病E-ELISA检测试剂盒及其制备方法

[0001] 本申请是2013年7月11日提交的发明名称为“鸭坦布苏病毒病E-ELISA检测试剂盒及其制备方法”的发明专利申请201310290098.4的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供一种以鸭坦布苏病毒E蛋白为包被抗原的酶联免疫吸附试验(E-ELISA)检测试剂盒,本发明还提供所述试剂盒的制备方法。

背景技术

[0003] 黄病毒(Flavivirus)是通过节肢动物传播的,属于黄病毒家族成员。其基因组由单股正链RNA组成,约为10.5kb,由一个开放阅读框组成,共编码3个结构蛋白和7个非结构蛋白,该病毒在3'末端没有poly-A尾巴,病毒粒子由一个外壳蛋白(C),一个膜蛋白(E),一个小的非糖基化蛋白(M),7个非结构蛋白(NS1,NS2A,NS2B,NS3,NS4A,NS4B,NS5)组成。在大多数黄病毒中,E蛋白定位于病毒粒子表面,病毒在与受体结合、侵入、细胞融合过程中起重要作用^[1-2]。

[0004] 2010年4月以来,一种引起产蛋量急剧下降的新型传染病在中国各地的水禽饲养区大面积爆发,感染鸭的种类包括:北京鸭、番鸭、麻鸭、鹅等^[3-5]。该病引起高达100%的发病率和小于5%的死亡率,产蛋率在5天内降至10%左右。剖检后发现病鸭具有严重的卵巢出血、卵巢炎、卵巢萎缩现象。由于该病导致繁殖力的急剧下降给许多养殖场带来了严重的经济损失。经过病毒分离和鉴定,该病毒鉴定为鸭坦布苏病毒(在本发明中也简称为“坦布苏病毒”)。

[0005] 该病近年来在我国一些省、市、自治区均有流行,给水禽养殖业造成经济损失惨重。国内外用于坦布苏病毒病诊断方法为病毒常规分离和鉴定。病毒分离和鉴定技术(诊断过程需7-10天时间),费时、费力,还需要专业人员和电镜等设备;很难在临床上推广和应用。为此急需建立一种敏感、准确、快速、简便的鸭坦布苏病毒病抗体检测方法。酶联免疫吸附试验(ELISA)是广泛用于动物疾病诊断的一种方法,更适合短时间内检测大批量的血清样品,具有较好的特异性和较高的灵敏度。

[0006] 随着我国人民生活水平的提高,水禽养殖业的迅猛发展,水禽发生坦布苏病毒病的比率也随之上升。因此,急需研制和开发坦布苏病毒抗体监测试剂盒,为国内的坦布苏病毒的防治提供技术支持。国外科研小组的报告中,已经证明E蛋白是坦布苏病毒的主要免疫原性蛋白,免疫原性好,可诱导机体产生免疫保护性抗体。通过对国内不同的分离株序列的比较分析,设计E蛋白PCR引物,E蛋白原核表达纯化后,以其为包被抗原建立了一种快速检测坦布苏病毒抗体的ELISA方法。

发明内容

[0007] 本发明提供一种以鸭坦布苏病毒E蛋白为包被抗原的酶联免疫吸附试验(E-ELISA)检测试剂盒,所述试剂盒包含标准对照阳性鸭血清、标准对照阴性鸭血清、鸭坦布苏

病毒E蛋白所包被的ELISA板、羊抗鸭酶标二抗及其它试剂,将标准对照阳性鸭血清、标准对照阴性鸭血清、鸭坦布苏病毒E蛋白所包被的ELISA板、羊抗鸭酶标二抗及其它试剂组装,即得到所述试剂盒,其他成分包括样品稀释液,10×浓缩洗液,TMB底物显色液,终止液,所述试剂盒特征在于酶标ELISA板的包被抗原为纯化的原核表达的坦布苏病毒E蛋白,经过定量后包被ELISA板后得到;阳性标准血清为鸭坦布苏病毒免疫无特定病原(SPF)鸭后得到,阴性标准血清为SPF鸭血清。

[0008] 本发明制备的E-ELISA检测试剂盒用于鸭坦布苏病毒感染后的抗体检测。

[0009] 如上所述,从鸭坦布苏病毒TA株(自行分离)提取RNA,反转录后经坦布苏病毒E蛋白基因特异性引物P1和P2(引物序列见表1)扩增得到坦布苏病毒E蛋白的编码核苷酸序列(SEQ ID No.1),将其克隆到适当的原核细胞表达载体中,在相应的原核宿主细胞中进行表达和纯化,得到坦布苏病毒E蛋白(SEQ ID No.2)。经过定量后可用于包被ELISA板。

[0010] 为便于纯化,经原核重组表达的坦布苏病毒E蛋白的N端带有His标签,便于纯化。

[0011] 本领域技术任意应该理解,利用坦布苏病毒E蛋白包被ELISA板可以按照本领域的常规方法进行。例如,所述的E蛋白包被的ELISA板可以由以下过程制备得到:

[0012] 用0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH值9.6)将已纯化的E重组蛋白稀释为5μg/ml;将含有重组蛋白的碳酸盐缓冲液加入到96孔酶标板中,100μl/孔,置于4℃(15~18h);倾尽96孔板中的液体,加入10mmol/L PBST(pH值7.4),200μl/孔,洗3次,每次5min;倾尽96孔板中的液体,加入封闭液,置于37℃2.5h;倾尽96孔板中的液体,加入10mmol/L PBST(pH值7.4),200μl/孔,洗3次,每次5min。彻底倾尽96孔板中的液体,将包被有His-E蛋白的96孔板置于37℃,干燥2h,放入有干燥剂塑料袋中。

[0013] 标准阴性对照血清为SPF鸭血清,由SPF鸭采血,按照常规方法提取血清。标准阳性对照血清为用鸭坦布苏病毒(例如,鸭坦布苏病毒TA株)免疫SPF鸭后采血,按照常规方法提取血清。为用于试剂盒,可以按照常规方法分别大量提取SPF鸭血清和鸭坦布苏病毒免疫鸭后的血清,并作为标准品储备,无需每次检测重新提取。

[0014] 羊抗鸭酶标二抗可以商购得到,例如,可从KPL公司购买的HRP羊抗鸭二抗(货号:04-25-06)。

[0015] 所述试剂盒中的其他试剂包括:样品稀释液,10×浓缩洗液,TMB底物显色液,终止液。其成分及配制方法如下:

[0016] 1) 样品稀释液:每个试剂盒装量1瓶,250ml/瓶;10×浓缩洗液(100mmol/L PBST, pH7.4)的配制过程如下:KH₂PO₄2.6g,Na₂HPO₄-12H₂O 28.9g,NaCl 87.1g,去离子水800ml,调pH值至7.4,添加去离子水至1L,在此溶液中添加5ml Tween-20。使用时10×浓缩洗液按照1:9(V/V)稀释获得样品稀释液。

[0017] 2) 包被液的配制:0.05mol/L碳酸盐缓冲液,pH值9.6包被液的配制

[0018] 甲液:Na₂CO₃ 10.6g加去离子水溶解至500ml

[0019] 乙液:NaHCO₃ 8.4g加去离子水溶解至500ml

[0020] 取甲液16ml,乙液34ml,加去离子水至200ml,即为0.05mol/L pH值9.6碳酸盐缓冲液。

[0021] 3) TMB底物显色液购自天根公司,每个试剂盒装量1瓶/盒50ml。

[0022] 4) 终止液:每个试剂盒装量1瓶瓶,250ml/瓶;终止液的配制:2mol/L硫酸溶液

(2mol/L H₂SO₄), 浓硫酸溶液浓度为18mol/L, 浓硫酸与去离子水按1:9配制即可成为2mol/L硫酸溶液。

[0023] 5) 封闭液的配制: KH₂PO₄ 0.26g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.89g, NaCl 8.71g, 脱脂奶粉50g, 去离子水800ml, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加0.5ml Tween-20。

[0024] 检测的样品为鸭血清。

[0025] 本发明还涉及制备以鸭坦布苏病毒E蛋白为包被抗原的酶联免疫吸附试验(E-ELISA)检测试剂盒的方法, 所述方法包括下述步骤:

[0026] (1) 原核表达并纯化鸭坦布苏病毒E蛋白, 取适量的鸭坦布苏病毒E蛋白包被ELISA板;

[0027] (2) 从SPF鸭提取血清作为标准对照阴性血清, 从用鸭坦布苏病毒(例如, 鸭坦布苏病毒TA株)免疫后的SPF鸭提取血清作为标准对照阳性血清;

[0028] (3) 商购得到羊抗鸭酶标二抗, 例如, 但不限于, KPL公司购买的HRP羊抗鸭二抗(货号: 04-25-06);

[0029] (4) 配制样品稀释液、10×浓缩洗液、TMB底物显色液和终止液:

[0030] 样品稀释液: 每个试剂盒装量1瓶, 250ml/瓶; 10×浓缩洗液(100mmol/L PBST, pH7.4)的配制过程如下: KH₂PO₄ 2.6g, Na₂HPO₄·12H₂O 28.9g, NaCl 87.1g, 去离子水800ml, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加5ml Tween-20。使用时10×浓缩洗液按照1:9(V/V)稀释获得样品稀释液;

[0031] 包被液的配制: 0.05mol/L碳酸盐缓冲液, pH值9.6包被液的配制

[0032] 甲液: Na₂CO₃ 10.6g加去离子水溶解至500ml

[0033] 乙液: NaHCO₃ 8.4g加去离子水溶解至500ml

[0034] 取甲液16ml, 乙液34ml, 加去离子水至200ml, 即为0.05mol/L pH值9.6碳酸盐缓冲液;

[0035] TMB底物显色液购自天根公司, 每个试剂盒装量1瓶/盒50ml;

[0036] 终止液: 每个试剂盒装量1瓶, 250ml/瓶; 终止液的配制: 2mol/L硫酸溶液(2mol/L H₂SO₄), 浓硫酸溶液浓度为18mol/L, 浓硫酸与去离子水按1:9配制即可成为2mol/L硫酸溶液;

[0037] 封闭液的配制: KH₂PO₄ 0.26g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.89g, NaCl 8.71g, 脱脂奶粉50g, 去离子水800ml, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加0.5ml Tween-20;

[0038] (5) 组装: 将上述鸭坦布苏病毒E蛋白包被的ELISA板与适量的(2)-(4)的成分组装成试剂盒。

[0039] 因此, 本发明提供下列各项:

[0040] 1. 一种鸭坦布苏病毒E-ELISA检测试剂盒, 所述试剂盒包含标准阳性对照鸭血清、标准阴性对照鸭血清、鸭坦布苏病毒E蛋白所包被的ELISA板、羊抗鸭酶标二抗及其他试剂。

[0041] 2. 第1项所述的试剂盒, 其中所述标准阳性对照鸭血清为提取自用鸭坦布苏病毒免疫的SPF鸭的血清, 所述标准阴性对照鸭血清为提取自SPF鸭的血清。

[0042] 3. 第1项所述的试剂盒, 其中所述鸭坦布苏病毒E蛋白所包被的ELISA板通过用在原核表达系统中重组表达的鸭坦布苏病毒E蛋白包被ELISA板制得。

[0043] 4. 第3项所述的试剂盒,其中所述鸭坦布苏病毒E蛋白通过将SEQ ID No.1所示的编码坦布苏病毒E蛋白的核苷酸序列克隆在原核细胞表达载体中并在原核细胞中表达制得。

[0044] 5. 第1项所述的试剂盒,其中所述羊抗鸭酶标二抗为HR标记的羊抗鸭二抗。

[0045] 6. 第1项所述的试剂盒,其中所述其他试剂包括样品稀释液、10×浓缩洗液、TMB底物显色液、终止液。

[0046] 7. 第1项所述的试剂盒,所述试剂盒的检测方法包括:

[0047] (1) 反应步骤:将待测鸭血清样品、标准阳性对照鸭血清和标准阴性对照鸭血清分别加入所述鸭坦布苏病毒E蛋白所包被的ELISA板的独立的孔中,在37℃反应1h;

[0048] (2) 与二抗反应步骤:将每孔洗涤后,分别加入所述羊抗鸭酶标二抗,在37℃反应1h;

[0049] (3) 显色步骤:将每孔洗涤后,分别加入TMB底物显色液进行显色反应;

[0050] (4) 读数步骤:终止显色反应,在酶标仪上读数;

[0051] (5) 判断步骤:待测鸭血清样品反应孔的OD值与标准阴性对照鸭血清反应孔的OD值的比例大于等于2.1时,表示待测鸭血清样品为阳性,说明待测鸭感染了鸭坦布苏病毒;上述比值小于2.1时,表示待测鸭血清样品为阴性,说明待测鸭没有感染鸭坦布苏病毒。

[0052] 本发明的有益效果:

[0053] 与费时费力的现有检测鸭坦布苏病毒的方法相比较,利用本发明的试剂盒检测鸭坦布苏病毒的方法具有下述优点:

[0054] (1) 省时,只须2小时,即可知道检测结果;

[0055] (2) 无需分离病毒,对待检鸭血清直接进行检测,操作简单;

[0056] (3) 可以同时检测多份样品,进行高通量检测;

[0057] (4) 本发明的试剂盒具有针对鸭坦布苏病毒的高特异性,检测不受其他病毒感染的影响,准确度高;

附图说明

[0058] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0059] 图1.纯化的E蛋白的SDS-PAGE和Western blot分析;泳带1,蛋白分子量标准;泳带2,纯化的E蛋白;泳带3,纯化的E蛋白。

具体实施方式

[0060] 下面参照具体的实施例进一步描述本发明,但是本领域技术人员应该理解,本发明并不限于这些具体的实施例。

[0061] 下述实施例中所用的试剂如无特别说明,均为市售分析纯级别的试剂。

[0062] 实施例1.原核表达坦布苏病毒E蛋白

[0063] 1) 按TRIZOL说明书提取鸭坦布苏病毒TA株(由张云和刘明在山东泰安原始采集,现保存于哈尔滨兽医研究所)RNA,反转录后经坦布苏病毒E蛋白基因特异性引物P1和P2(TaKaRa公司合成)扩增。1%琼脂糖凝胶电泳回收PCR产物,与原核表达质粒pET32a(购自Novagen公司)连接获得重组质粒pET32-E。

[0064] 表1. 扩增坦布苏病毒E蛋白基因的引物序列

[0065]

引物名称	序列 (5'-3')
P1	5'ATGA <u>ATTCTTCAGCTGTCTGGGGATGCAG</u> -3' (下划线为 EcoRI 位点)
P2	5'ATCT <u>CGAGTAAGGCATTGACATTTACTGCC</u> 3' (下划线为 Xho I 位点)

[0066] 2) 重组质粒pET-E及pET32a载体(空白对照)分别转化E.coli BL21 (DE3)感受态细胞,挑取单个菌落接种于2mL含有100mg/L氨苄青霉素的LB培养基中,37℃振荡过夜,第2天以1:100 (v/v)的比例接种于含相同浓度抗生素的LB培养基中,37℃振荡培养至A600达到0.6~0.8,加IPTG至终浓度1mmol/L诱导,收集表达菌体沉淀,超声波裂解变性后进行SDS-PAGE和Western Blot分析。结果显示分子量为60kDa的目的蛋白存在(54kDa的E蛋白加6kDa的His标签蛋白)。

[0067] 3) 高纯度重组蛋白的纯化过程如下:将大量制备的诱导菌液经超声裂解后,在4℃10000g离心10min后,收集沉淀,用含有6mol/L尿素和0.5mol/L NaCl的20mmol/L PBS (pH值7.4)溶解后,用0.45μm滤器过滤后用HisTrap™ HP (GE Healthcare)进行蛋白的纯化(操作按说明书进行)。经柱纯化后的重组蛋白(His-E)经SDS-PAGE和Western Blot分析进行纯度分析。仅在60KDa附近有单一的蛋白条带,其它位置无明显杂带(见图1,泳带2和3)。通过Eppendorf公司的Biophotometer紫外分光光度计测定纯化蛋白浓度。

[0068] 实施例2. 标准阴性血清的制备

[0069] 标准阴性血清制备:选取60日龄SPF鸭(购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心)无菌采血,待血液凝固后置于37℃温箱放置2h,再置于2~8℃放置1h,然后将析出的血清置于离心瓶中,8000r/min离心15~20min,无菌分离血清,置于-20℃保存。

[0070] 标准阳性血清制备:经PBS缓冲液(pH值7.4)1:100 (v/v)倍稀释鸭坦布苏病毒TA株($1 \times 10^{5.3}$ EID₅₀/ml)接种于12日龄鸭胚中,收获85~96小时内死亡的鸭胚尿囊液。将收获的鸭胚尿囊液与等体积Seppic乳化剂(购自)均匀混合,0.5ml/只皮下注射接种SPF试验鸭,接种3次,每次间隔14日,末次接种后7日无菌采血,按上述方法分离血清,置于-20℃保存。

[0071] 实施例3. 坦布苏病毒E蛋白包被ELISA板

[0072] 用0.05mol/L碳酸盐缓冲液(pH值9.6)将已纯化的His-E重组蛋白稀释为5μg/ml。将含有重组蛋白的碳酸盐缓冲液加入到96孔酶标板中,100μl/孔,置于4℃(15~18h)。倾尽96孔板中的液体,加入10mmol/L PBST (pH值7.4),200μl/孔,洗3次,每次5min。倾尽96孔板中的液体,加入封闭液,置于37℃2.5h。倾尽96孔板中的液体,加入10mmol/L PBST (pH值7.4),200μl/孔,洗3次,每次5min。彻底倾尽96孔板中的液体,将包被有His-E蛋白的96孔板置于37℃,干燥2h,放入有干燥剂塑料袋中。

[0073] 实施例4. 试剂盒的组装

- [0074] 1) 选择每个试剂盒可检测500个样次的抗体及药品试剂量进行组装;
- [0075] 2) 阳性对照:将检验合格的实施例2制备的标准阳性对照血清按2ml/瓶定量分装,置于-20℃保存;
- [0076] 3) 阴性对照:将检验合格的实施例2制备的标准阴性对照血清按2ml/瓶定量分装,置于-20℃保存;
- [0077] 4) 酶标抗体:KPL公司购买的HRP标记的羊抗鸭二抗,每个试剂盒50ml分装(1:500稀释),4℃保存。
- [0078] 5) 其他试剂:按溶液体积定量分装,常温下保存。
- [0079] 所述其他试剂的配制及具体用量如下:
- [0080] a) 样品稀释液:每个试剂盒装量1瓶/盒250ml;10×浓缩洗液(100mmol/L PBST, pH7.4)的配制过程如下:KH₂PO₄ 2.6g, Na₂HPO₄·12H₂O 28.9g, NaCl 87.1g, 去离子水800ml, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加5ml Tween-20, 混匀, 然后用0.22μm滤器除菌, 无菌分装, 每瓶不少于250ml。使用时10×浓缩洗液按照1:9 (V/V) 稀释获得样品稀释液。
- [0081] b) 包被液的配制:0.05mol/L碳酸盐缓冲液, pH值9.6包被液的配制
- [0082] 甲液:Na₂CO₃ 10.6g加去离子水溶解至500ml
- [0083] 乙液:NaHCO₃ 8.4g加去离子水溶解至500ml
- [0084] 取甲液16ml, 乙液34ml, 加去离子水至200ml, 即为0.05mol/L pH值9.6碳酸盐缓冲液。
- [0085] c) TMB底物显色液购自天根公司, 每个试剂盒装量1瓶/盒50ml。
- [0086] d) 终止液:每个试剂盒装量1瓶, 50ml/瓶;终止液的配制:2mol/L硫酸溶液(2mol/L H₂SO₄), 浓硫酸溶液浓度为18mol/L, 浓硫酸与去离子水按1:9配制即可成为2mol/L硫酸溶液。
- [0087] e) 封闭液的配制:KH₂PO₄ 0.26g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.89g, NaCl 8.71g, 脱脂奶粉50g, 去离子水800ml, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加0.5ml Tween-20。
- [0088] 6) 按照实施例3的包被方法用坦布苏病毒E蛋白包被的酶标板5块。
- [0089] 其中, 酶标二抗的配制:0.26gKH₂PO₄, 2.89gNa₂HPO₄·12H₂O, 8.71g NaCl, 800ml去离子水, 0.25ml辣根过氧化物酶标记的羊抗鸭抗体, 调pH值至7.4, 添加去离子水至1L, 在此溶液中添加5ml Tween-20。用0.22μm滤器除菌, 无菌分装, 不少于50ml/瓶。保存2~8℃保存, 有效期12个月。
- [0090] 阳性标准血清的配制:用含100mmol/L PBST (pH值7.4) 稀释阳性血清, 使其OD450值在1.0-1.2之间。用0.22μm滤器除菌, 无菌分装, 不少于50ml/瓶。2~8℃保存, 有效期12个月。
- [0091] 100mmol/L PBST (pH值7.4) 的配制如下:0.26gKH₂PO₄, 2.89gNa₂HPO₄·12H₂O, 8.71g NaCl, 800ml去离子水, 100μl硫柳汞, 调PH值至7.4, 添加无离子水至1L, 在此溶液中添加5ml Tween-20。
- [0092] 标准阴性对照血清的配制:用含100mmol/L PBST (pH值7.4) 稀释阳性血清, 使其OD450值在1-1.2之间。0.26gKH₂PO₄, 2.89gNa₂HPO₄·12H₂O, 8.71g NaCl, 800ml去离子水, 15mg酚红, 100μl硫柳汞, 调PH值至7.4, 添加无离子水至1L, 在此溶液中添加5ml Tween-20(此处添加酚红可以杀菌, 保存期长)。用0.22μm滤器除菌, 无菌分装, 不少于50ml/瓶。2~8℃保

存,有效期12个月。

[0093] 实施例5.坦布苏病毒E-ELISA抗体检测试剂盒的检测规程

[0094] A.样品的稀释:取自待检测的禽类的血清样品需要用样品稀释液稀释100倍:使用多道加样器和96孔板进行稀释,推荐使用以下步骤:先吸取10 μ l的血清样本,加入到90 μ l的样品稀释液中,混匀,再吸取10 μ l稀释了10倍的液体加入ELISA反应板孔中,再加入90 μ l的样品稀释液。

[0095] B.向三排反应孔中分别加入体积为100 μ l的标准阳性、阴性对照血清及100倍稀释的被检血清样品,每种血清样品三个重复孔。

[0096] C.盖上保鲜膜,37 $^{\circ}$ C作用1h。

[0097] D.去膜,用200 μ l的1 \times 洗液洗3遍,并在吸水纸上将ELISA板中的液体吸干。

[0098] E.在每个反应孔中加入100 μ l的酶标抗体(羊抗鸭酶标二抗)。

[0099] F.盖上膜,37 $^{\circ}$ C作用1h。

[0100] G.去膜,用200 μ l的1 \times 洗液洗3遍,并在吸水纸上将ELISA板中的液体吸干。

[0101] H.在每个反应孔中加入100 μ l的TMB底物显色液,轻摇板2s。

[0102] I.将反应板放在黑暗处在37 $^{\circ}$ C作用15min。

[0103] J.在每个反应孔中加入100 μ l的终止液。

[0104] K.用柔软的东西轻拭反应板底面的脏物,加完终止液5~10min内,将ELISA板放入酶标仪(Elx808,购自BioTek,USA)中,在450nm下完成读数,并记录结果。

[0105] L.结果判定记录酶标仪在450nm波长下酶标板每孔的OD值,首先进行空白孔系统调零,若经空白孔调零后,系统检测出现大量的负值时,整个系统测定无效;每一样品测定双孔的OD值应基本一致,若两孔测定值差别较大,该酶标板测定无效。若标准阳性对照值OD低于或接近标准阴性对照OD值时,测定也无效。待测样品OD值与标准阴性对照OD值检测之比大于等于2.1时,待测样品为阳性,否则为阴性。

[0106] 例如,自某鸭场采集临床血清10份,按照本发明的ELISA的操作步骤进行检测,标准阴性血清OD值(三次重复)平均值为0.172;10份待检血清OD值(三次重复)平均值为0.415-0.873,与标准阴性血清的比值为:0.415/0.172=2.41和0.873/0.172=5.08之间,该值大于2.1。因此被检测10份鸭血清判定为坦布苏病毒感染阳性。

[0107] M.特异性检验对鹅细小病毒、禽流感病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒、I型鸭肝炎病毒、番鸭细小病毒、鸭瘟病毒阳性血清检测均呈阴性反应,当其它病毒血清1:100倍稀释,OD值<0.31。这说明本发明的试剂盒能够特异性检测鸭坦布苏病毒。

[0108] 应该理解,尽管参考其示例性的实施方案,已经对本发明进行具体地显示和描述,但是本领域的普通技术人员应该理解,在不背离由权利要求书所定义的本发明的精神和范围的条件下,可以在其中进行各种形式和细节的变化,可以进行各种实施方案的任意组合。

[0109] 参考文献

[0110] [1]Lindenbach B D,et al.Flaviviridae:the viruses and their replication,In Knipe DM,Howley,PM(ed),Fields virology,5th ed.Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA,2007,1101-1152.

[0111] [2]Rice C M,Strauss J H.Production of flavivirus polypeptides by proteolytic processing.Semin.Virol,1990,1:357-367.

- [0112] [3] Su J, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus. *PLoS One*, 2011, 6 (3) :e18106.
- [0113] [4] Liu, M., Chen, S.Y., Chen, Y.H., Liu, C.G., Shilong Chen, Xiuchen Yin, Gang Li, and Yun Zhang. Adapted Tembusu-Like Virus in Chickens and Geese in China. *J Clin Microbiol*. 2012, 50 (8) :2807-2809.
- [0114] [5] Liu M, Liu, C.G., Li G., Li X.J., Yin X.C., Chen Y.H., Zhang Y., 2012. Complete genomic sequence of duck flavivirus from China. *J. Virol.* 86:3398-3399.

序列表

<110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

<120> 鸭坦布苏病毒病E-ELISA检测试剂盒及其制备方法

<130> IB130136

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1498

<212> DNA

<213> 鸭坦布苏病毒E蛋白的编码基因序列

<400> 1

[0001] tgcctgggga tgcagaaccg agactttggt gaggagtgga atgggttga gtggatcgat 60
 gtcgttctgg aaggaggctc atgtgtgact atcacggcaa aagacaggcc gaccatagac 120
 gtcaagatga tgaacatgga ggctacggaa ttagecgttg tgagatctta ctgctatgag 180
 ccgaaagtgt cggacgtgac gacagaatcc agatgcccaa ccatgggaga ggctcataat 240
 cccaaggcaa cttatgtcga atacatatgc aaaaaagatt ttgtggacag gggttgggga 300
 aatggctgtg gcttgtttgg aaaggggagc atacagacat gtgccaagt tgcactgaca 360
 aagaaagcag aaggcaggat tgtgcagaag gaaaacgtcc agtttgaagt tgcagttttc 420
 atacatgggt ccacggaagc gagcacctac cacaattatt cageccagca gtcgctgaaa 480
 catgccccta gattcgttat aacgcccata agtcccgtct acaccgctga gatggaggat 540
 tatggtaccg tcaactcga atgtgaacce cgatctgggg ttgacatggg gcaattctat 600
 gtctttacca tgaacacaaa aagetggctt gttaacagag actggtttca tgatctaac 660
 ttaccatgga cagggtcacc agcggggagc tggcaaaaca aagagtcatt gatagaattt 720
 gaggaggccc acgccaccaa acaatcagtg gtggctttgg catcacaaga aggagccctc 780
 catgcagcat tggcgggagc tattccagtg aagtactctg gaagcaaatt ggaaatgacc 840
 tcaggtcacc ttaaatgcag ggttaaaatg cagggtttga agccgaaagg aatgacctac 900
 ccgatgtgta gcaatacatt ttccctagtg aagaatccta ccgacactgg gcatggcact 960
 gtcgtggtgg aattgtctta tgcaggatcc gatgggccct gtagagttcc catatccatg 1020
 tcggcagatc tgaatgacat gacaccagtt ggacgcttga taacagtcaa cccatacgtg 1080
 tcgacctcct ccacgggtgc caagataatg gtggaagtgg aacctccatt cggggattca 1140
 ttcatcttag taggaagtgg aaaaggacag atcaggtacc agtggcatag aagtgggagc 1200
 acaattggaa aagcttttac gtcaacactc aaaggagcac aaaggatggt tgctttgggt 1260

gacactgcat gggattttgg ctcaattggg ggtgtactca ctccattgg gaaaggcatt 1320
 catcaggttt tcggctcagc atttaaaagc ttatttggag gaatgtcatg gattactcaa 1380
 ggcatgttgg gggcactgct attgtggatg gggctgaatg caaggacag atccatttct 1440
 atgacttttc tagccgtagg aggaatttta gtcttcctgg cagtaaagt caatgccg 1498

<210> 2

<211> 501

<212> PRT

<213> 鸭坦布苏病毒E蛋白氨基酸序列

<400> 2

Phe Ser Cys Leu Gly Met Gln Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Asn
 1 5 10 15

Gly Val Glu Trp Ile Asp Val Val Leu Glu Gly Gly Ser Cys Val Thr
 20 25 30

Ile Thr Ala Lys Asp Arg Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met
 35 40 45

Glu Ala Thr Glu Leu Ala Val Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Pro Lys
 50 55 60

[0002]

Val Ser Asp Val Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala
 65 70 75 80

His Asn Pro Lys Ala Thr Tyr Ala Glu Tyr Ile Cys Lys Lys Asp Phe
 85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110

Ile Gln Thr Cys Ala Lys Phe Asp Cys Thr Lys Lys Ala Glu Gly Arg
 115 120 125

Ile Val Gln Lys Glu Asn Val Gln Phe Glu Val Ala Val Phe Ile His
 130 135 140

Gly Ser Thr Glu Ala Ser Thr Tyr His Asn Tyr Ser Ala Gln Gln Ser
 145 150 155 160

Leu Lys His Ala Ala Arg Phe Val Ile Thr Pro Lys Ser Pro Val Tyr
 165 170 175

Thr Ala Glu Met Glu Asp Tyr Gly Thr Val Thr Leu Glu Cys Glu Pro
 180 185 190

Arg Ser Gly Val Asp Met Gly Gln Phe Tyr Val Phe Thr Met Asn Thr
 195 200 205

Lys Ser Trp Leu Val Asn Arg Asp Trp Phe His Asp Leu Asn Leu Pro
 210 215 220

Trp Thr Gly Ser Ser Ala Gly Thr Trp Gln Asn Lys Glu Ser Leu Ile
 225 230 235 240

Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Ala
 245 250 255

Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val
 260 265 270

Lys Tyr Ser Gly Ser Lys Leu Glu Met Thr Ser Gly His Leu Lys Cys
 275 280 285

Arg Val Lys Met Gln Gly Leu Lys Pro Lys Gly Met Thr Tyr Pro Met
 290 295 300

Cys Ser Asn Thr Phe Ser Leu Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His
 305 310 315 320

Gly Thr Val Val Val Glu Leu Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys
 325 330 335

Arg Val Pro Ile Ser Met Ser Ala Asp Leu Asn Asp Met Thr Pro Val
 340 345 350

Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Tyr Val Ser Thr Ser Ser Thr Gly
 355 360 365

[0003]

Ala Lys Ile Met Val Glu Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Phe Ile
 370 375 380

Leu Val Gly Ser Gly Lys Gly Gln Ile Arg Tyr Gln Trp His Arg Ser
 385 390 395 400

Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Thr Ser Thr Leu Lys Gly Ala Gln
 405 410 415

Arg Met Val Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly
 420 425 430

Gly Val Leu Thr Ser Ile Gly Lys Gly Ile His Gln Val Phe Gly Ser
 435 440 445

Ala Phe Lys Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Met
 450 455 460

Leu Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Leu Asn Ala Arg Asp Arg Ser
 465 470 475 480

Ile Ser Met Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Ile Leu Val Phe Leu Ala
 485 490 495

Val Asn Val Asn Ala
 500

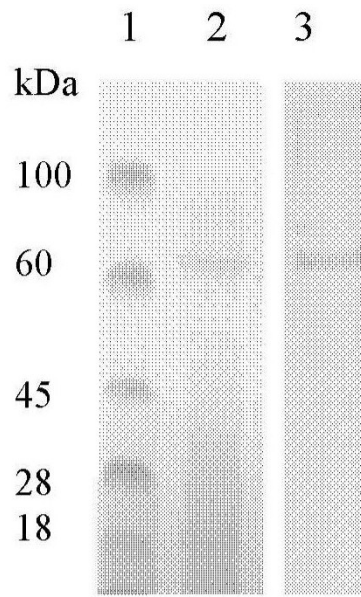


图1

专利名称(译)	鸭坦布苏病毒E-ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108627645A	公开(公告)日	2018-10-09
申请号	CN201810399078.3	申请日	2013-07-11
[标]发明人	张云 刘明 陈志峰		
发明人	张云 刘明 陈志峰		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	张国梁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及以一种鸭坦布苏病毒E蛋白为包被抗原的酶联免疫吸附试验(E-ELISA)检测试剂盒、其制备方法及其应用。本发明试剂盒包含标准阳性对照鸭血清、标准阴性对照鸭血清、坦布苏病毒E蛋白(SEQ ID No.2)所包被的ELISA板、羊抗鸭酶标二抗、TMB底物显色液、终止液。本发明制备的E-ELISA检测试剂盒用于鸭坦布苏病毒感染后的抗体检测。

引物名称	序列 (5'-3')
P1	5' ATGAATCTTCAGCTGTCTGGGGATGCAG-3' (下划线为EcoRI位点)
P2	5' ATCTCGAGTAAGGCATTGACATTTACTGCC3' (下划线为Xho I位点)