



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102127531 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 20

(21) 申请号 201010599000. X

G01N 33/569 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 22

G01N 33/535 (2006. 01)

(71) 申请人 山东省农业科学院家禽研究所
地址 250023 山东省济南市天桥区交校路 1 号

(72) 发明人 马秀丽 黄兵 李玉峰 吴静
于可响 宋敏训 秦卓明

(74) 专利代理机构 济南诚智商标专利事务所有
限公司 37105

代理人 王汝银

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

C12N 15/51 (2006. 01)

C12P 21/02 (2006. 01)

G01N 33/576 (2006. 01)

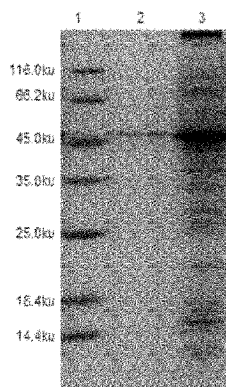
权利要求书 2 页 说明书 7 页
序列表 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒。该试剂盒含有以韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白包被的 ELISA 板、样品稀释液、浓缩洗涤液、酶结合物工作液、显色液 A、显色液 B、终止液、阳性对照和阴性对照。VP1 重组蛋白是以下述方法获得：以韩国新型鸭肝炎病毒作为材料，通过 RT-PCR 方法对其 VP1 基因进行扩增、克隆得到重组质粒 pMD-VP1。然后定向插入到 pET-32a(+) 表达载体，筛选获得重组表达质粒 pET-32a(+)-VP1。经 ITPG 诱导表达、纯化，获得 VP1 重组蛋白。该检测试剂盒用于韩国新型鸭肝炎的检测，其特异性强、敏感性高、操作简单，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景。



1. 韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白的制备,包括以下步骤:

1) 以韩国新型鸭肝炎病毒作为材料,通过 RT-PCR 方法对其 VP1 基因进行扩增、克隆得到重组质粒 pMD-VP1;扩增 VP1 基因的上下游引物分别是:

上游引物:5' -GAATTCGGTGATTCCAATCAGCT-3'

下游引物:5' -CTCGAGTTCAATCTCCAGATGGA-3'

扩增片段大小为 720bp;

2) 以 EcoR I 和 XhoI I 同时对重组质粒 pMD-VP1 和 pET-32a(+) 载体进行酶切,回收目的片段,16℃连接过夜,转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,提取质粒,经 EcoR I 和 XhoI I 双酶切鉴定正确后获得阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-VP1;

3) 将阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-VP1 及空白载体 pET-32a(+) 分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,获得的阳性质粒菌于 37℃培养,待 A600 值达到 0.4 ~ 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L 进行诱导表达,收集诱导表达后 4h 的菌体,超声波破碎,离心后取沉淀进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定,经鉴定的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后取下凝胶,先用双蒸水洗涤,然后浸入 4℃预冷的 250mmol/L 的 KCL 溶液中显色 5 ~ 10min,最后用双蒸水洗涤;将目的蛋白条带切下,PBS 洗涤 3 次,用玻璃棒将其捣细,反复冻融 3 次,8000r/min 离心 10min,吸取上清,SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定。

2. 一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,其特征是,包括权利要求 1 所述的韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白包被的 ELISA 板。

3. 如权利要求 2 所述的韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,其特征是,所述 ELISA 板的制备方法为:用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCL 缓冲液作包被液,将韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白稀释为 25 μg/mL,按 100 μL/孔加入 ELISA 反应板中,37℃封闭 2 小时,4℃包被过夜,拍干,用 1%牛血清白蛋白 37℃封闭 2 小时,以含 0.05%吐温 -20pH7.4 的 PBS 洗涤,拍干,再加入 20%蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,其特征是,还包括样品稀释液、10× 浓缩洗涤液、酶结合物工作液、显色液 A、显色液 B、终止液、阳性对照和阴性对照。

5. 如权利要求 4 所述的韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,其特征是,所述样品稀释液为含 0.05%吐温 -20 的 0.05M pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述 10× 浓缩洗涤液为含 0.5%吐温 -20 的 0.1M pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述酶结合物工作液为美国 KPL 公司生产的 HRP-羊抗鸭 IgG;所述显色液 A 为 0.2mg/mL 的四甲基联苯胺溶液,所述显色液 B 为含 0.5%过氧化氢尿素的柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液;所述终止液为 2M 硫酸溶液;所述阳性对照为经韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白免疫获得的阳性血清,其 $OD_{450nm} \geq 1.0$,加入 1000U/mL 的青链霉素,无菌过滤后获得;所述阴性对照为经筛选获得的阴性血清,其 $OD_{450nm} \leq 0.25$,加入 1000U/mL 的青链霉素,无菌过滤后获得。

6. 如权利要求 5 所述的韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,其特征是,所述试剂盒各组分的量为:以韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白包被的 ELISA 板:5 块;样品稀释液:200mL;10× 浓缩洗涤液:400mL;酶结合物工作液:50mL;显色液 A:50mL;显色液 B:50mL;终止液:60mL;阳性对照:2mL;阴性对照:2mL。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒的使用方法,

其特征是,将待检血清用样品稀释液作 1 : 100 稀释,按 100 μ L/ 孔加入抗体检测板中,同时设阴性对照、阳性对照,37 $^{\circ}$ C 孵育 45min ;弃去反应孔中的液体,每孔加洗涤液 350 μ L,洗涤 3 ~ 5 次,每次间隔 1min,拍干 ;每孔加 100 μ L 的酶结合物工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 45min ;洗涤 3 ~ 5 次,每次间隔 1min,拍干 ;依次加入 50 μ L 显色液 A 和 50 μ L 显色液 B,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min ;加 50 μ L 终止液,用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值 ;以待检样本 OD_{450nm} 值与阴性对照 OD_{450nm} 值的比值大于或等于 2.1,且待检样本 OD_{450nm} 值大于 0.228 判为阳性。

一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型鸭肝炎病毒抗体检测试剂盒,专用于韩国新型(基因 C 型)鸭肝炎病毒抗体的快速检测,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 鸭病毒性肝炎是危害雏鸭的一种急性、高度致死性和接触性的传染病。通常将鸭肝炎病毒分为 3 个血清型,即 1 型(DHV-1)、2 型(DHV-2)和 3 型(DHV-3)。其中 1 型 DHV 呈世界性分布。近年来,国内许多地区出现新型鸭肝炎的报道,其与 DHV-1 在序列上存在显著差异,且新型 DHV 均不与 DHV-1 产生交叉反应,严重制约了养鸭业的发展。为了区分上述毒株,国内学者将其分别称为“台湾新型”、“韩国新型”和“血清 1 型”DHV。目前的研究发现,血清 1 型、“台湾新型”和“韩国新型”等 DHV 在进化分析中属于三个不同的基因型,即基因 A 型(血清 1 型)、基因 B 型(台湾新型)和基因 C 型(韩国新型)。迄今为止,国内报道的新型 DHV 毒株与“韩国新型”DHV 的序列相似性非常高,均为基因 C 型。除台湾外,内陆尚未见基因 B 型 DHV 的报道。

[0003] 长期以来鸭肝炎的检测一直依赖于传统的病毒分离和中和试验,该方法费时费力,不适于批量样品的检测。基于全病毒建立的 ELISA 方法因 DHV 纯化比较困难而限制了该方法的推广应用。目前尚未见针对韩国新型鸭肝炎抗体 ELISA 检测方法的报道。VP1 作为鸭肝炎主要的保护蛋白,编码主要的抗原位点,已成为研究的首选基因。因此,利用基因工程技术研制开发适用于韩国新型鸭肝炎抗体检测的特异的、敏感的、适合基层应用的 ELISA 检测试剂盒,对于韩国新型鸭肝炎的预防和控制具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是克服传统的鸭肝炎检测方面的不足,提供一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,该试剂盒成本低廉、操作简便、快速,尤其适合批量样品的检测,大大提高了鸭肝炎血清学诊断的速度。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现:韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白的制备,包括以下步骤:

[0006] 1) 以韩国新型鸭肝炎病毒作为材料,通过 RT-PCR 方法对其 VP1 基因(SEQ-1)进行扩增、克隆得到重组质粒 pMD-VP1;扩增 VP1 基因的上下游引物分别是:

[0007] 正链引物(上游引物):5'-GAATTCGGTGATTCCAATCAGCT-3'(SEQ-3)(EcoR I 位点),

[0008] 负链引物(下游引物):5'-CTCGAGTTCAATCTCCAGATGGA-3'(SEQ-4)(XhoI I 位点),

[0009] 扩增片段大小为 720bp。

[0010] 2) 以 EcoR I 和 XhoI I 同时对重组质粒 pMD-VP1 和 pET-32a(+) 载体进行酶切,回收目的片段,16℃连接过夜,转化 BL21(DE3) 感受态细胞,提取质粒,经 EcoR I 和 XhoI I 双酶切鉴定正确后获得阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-VP1。

[0011] 3) 将阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-VP1 及空白载体 pET-32a(+) 分别转化

BL21 (DE3) 感受态细胞, 获得的阳性质粒菌于 37°C 培养, 待 A600 值达到 0.4 ~ 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L 进行诱导表达, 收集诱导表达后 4h 的菌体, 超声波破碎, 离心后取沉淀进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 鉴定, 经鉴定的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后取下凝胶, 先用双蒸水洗涤, 然后浸入 4°C 预冷的 250 mmol/L 的 KCl 溶液中显色 5 ~ 10 min, 最后用双蒸水洗涤。将目的蛋白条带切下, PBS 洗涤 3 次, 用玻璃棒将其捣细, 反复冻融 3 次, 8000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定。

[0012] 本发明的技术方案是: 一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒, 其特征是, 包括以韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白包被的 ELISA 板。

[0013] ELISA 板的最佳制备条件为: 用 pH 8.5 的 0.05 M Tris-HCl 缓冲液作包被液, 将韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白稀释为 25 μ g/mL, 按 100 μ L/孔加入 ELISA 反应板中, 37°C 作用 2 小时, 4°C 包被过夜, 拍干, 用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 37°C 封闭 2 小时, 以含 0.05% 吐温-20 pH 7.4 的 PBS 洗涤, 拍干, 再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时, 待其干燥后装入含干燥剂的包装袋中保存。

[0014] 本发明的进一步技术方案是: 一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒, 包括以下组分: 以韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白包被的 ELISA 板: 5 块; 样品稀释液: 200 mL; 10 \times 浓缩洗涤液: 400 mL (用前 1:10 稀释); 酶结合物工作液: 50 mL; 显色液 A: 50 mL; 显色液 B: 50 mL; 终止液: 60 mL; 阳性对照: 2 mL; 阴性对照: 2 mL。

[0015] 上述韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒中, 样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.05 M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液; 10 \times 浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1 M pH 7.4 的磷酸盐缓冲液; 酶结合物工作液为美国 KPL 公司生产的 HRP-羊抗鸭 IgG; 显色液 A 为 0.2 mg/mL 的四甲基联苯胺 (TMB) 溶液, 显色液 B 为含 0.5% 过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液; 终止液为 2 M 硫酸溶液; 阳性对照为经韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白免疫获得的阳性血清 ($OD_{450nm} \geq 1.0$), 加入 1000 U/mL 的青链霉素, 无菌过滤; 阴性对照为经筛选获得的阴性血清 ($OD_{450nm} \leq 0.25$), 加入 1000 U/mL 的青链霉素, 无菌过滤。

[0016] 上述韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒使用方法: 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释, 按 100 μ L/孔加入抗体检测板中, 同时设阴性对照、阳性对照, 37°C 孵育 45 min; 弃去反应孔中的液体, 每孔加洗涤液 350 μ L, 洗涤 3 ~ 5 次, 每次间隔 1 min, 拍干; 每孔加 100 μ L 的酶结合物工作液, 37°C 孵育 45 min; 洗涤 3 ~ 5 次, 每次间隔 1 min, 拍干; 依次加入 50 μ L 显色液 A 和 50 μ L 显色液 B, 37°C 避光孵育 15 min; 加 50 μ L 终止液, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度 A 值, 读值计算并判定结果。其检测样本的判定标准为: 以待检样本 OD_{450nm} 值与阴性对照 OD_{450nm} 值的比值 (P/N) 大于或等于 2.1, 且待检样本 OD_{450nm} 值大于 0.228 判为阳性。

[0017] 本发明具有下列优点:

[0018] 1. 本发明选择原核表达载体 pET-32a(+) 构建重组表达质粒进行融合表达, 利用其组氨酸标签进行重组蛋白的纯化, 解决了 DHV 全病毒纯化困难的问题。

[0019] 2. 本发明以基因工程表达的重组 VP1 蛋白为基础制备而成, 重组 VP1 蛋白为非全病毒抗原, 安全性好, 不含无关杂蛋白, 只与韩国新型鸭肝炎病毒阳性血清特异结合, 不与其他病毒阳性血清发生交叉反应, 具有良好抗原性, 因此所发明的检测试剂盒具有很高的特异性和敏感性。

[0020] 3. 本发明建立的韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,成本低廉、操作简便、快速,尤其适合批量样品的检测,大大提高了鸭肝炎血清学诊断的速度。

附图说明

[0021] 图 1 是 VP1 基因扩增的电泳图片,其中 1:韩国新型 DHV VP1 基因,2:DNA MarkerDL2000。

[0022] 图 2 是 VP1 基因克隆到 pMD18-T 载体得到的重组质粒 pMD-VP1 的酶切鉴定图片,其中 1:DNAMarker DL2000,2:重组质粒 pMD18-VP1 的酶切片段。

[0023] 图 3 是 VP1 基因插入到 pET-32a(+) 载体得到的重组质粒 pET-32a(+)-VP1 的酶切鉴定图片,其中 1:DNA Marker DL2000,2:重组质粒 pET-32a(+)-VP1 的酶切片段,3:DNA MarkerDL15000。

[0024] 图 4 是诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析图片,其中 1:蛋白 Marker,2~5 重组质粒 pET-32a(+)-vp1 分别诱导表达 1h,2h,3h,4h 的沉淀,6:空载体诱导 4h 对照,7~10:重组质粒 pET-32a(+)-vp1 分别诱导表达 1h,2h,3h,4h 的上清。

[0025] 图 5 是韩国新型 DHVVP1 表达产物的 Western-blot 分析图片,其中 M:预染蛋白 Marker,1:诱导表达蛋白,2:空载体诱导对照。

[0026] 图 6 是重组蛋白的纯化图片,其中 1:蛋白 Marker,2:纯化的重组蛋白,3:未纯化重组蛋白。

具体实施方式

[0027] 1. VP1 基因的扩增与表达载体的构建

[0028] 根据 GenBank 中已登录的韩国新型 DHV VP1 基因序列 (SEQ-1),设计一对引物:上游引物:5' GAATTCGGTGATTCCAATCAGCT 3' (SEQ-3);下游引物:5' CTCGAGTTCAATCTCCAGATGGA 3' (SEQ-4)。利用 Trizol 试剂提取韩国新型 DHV RNA 模板。RT 反应体系 (20 μ L):25mmol/L Mg^{2+} 1.2 μ L、10mmol/L dNTP 2.0 μ L、5 \times RT 缓冲液 4.0 μ L、下游引物 1.0 μ L、RNA 酶抑制剂 0.5 μ L、RNA 模板 10.3 μ L。置于 PCR 扩增仪进行反应,反转录酶 1 μ L 于 42 $^{\circ}$ C 时加入;反应程序:70 $^{\circ}$ C 5min,42 $^{\circ}$ C 30min,95 $^{\circ}$ C 2min。PCR 反应体系 (50 μ L):ddH₂O 38.1 μ L、10 \times 缓冲液 4.0 μ L、25mmol/L Mg^{2+} 1.4 μ L、5U/ μ L rTaqDNA 聚合酶 0.5 μ L、上游引物 1.0 μ L、RT 产物 5.0 μ L。置于 PCR 扩增仪进行反应,反应程序:95 $^{\circ}$ C 5min 预变性;94 $^{\circ}$ C 变性 30sec、50 $^{\circ}$ C 退火 30sec、72 $^{\circ}$ C 延伸 30sec,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10min;4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,以确定产物大小(如图 1 所示)。将扩增出的 VP1 基因克隆至 pMD18-T 载体中,经 EcoR I 和 XhoI I 双酶切鉴定、测序正确的阳性克隆命名为 pMD-VP1(如图 2 所示)。以 EcoRI 和 XhoI I 同时对重组质粒 pMD-VP1 和 pET-32a(+) 载体进行酶切,回收目的片段,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,提取质粒,经 EcoR I 和 XhoI I 双酶切鉴定、测序正确的阳性克隆命名为 pET-32a(+)-VP1(如图 3 所示)。

[0029] 2. 重组表达质粒的诱导表达

[0030] 将阳性重组表达质粒 pET-32a(+)-VP1 及空白载体 pET-32a(+) 分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞。阳性质粒菌于 37 $^{\circ}$ C 培养,待 A600 值达到 0.4~0.6 时,加入 IPTG

至终浓度为 0.8mmol/L,进行诱导表达。收集不同诱导时间表达的菌体,超声波破碎,离心后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,并对表达产物进行 Western blot 分析,一抗用鸡抗韩国新型 DHV 阳性血清,二抗用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鸡 IgG, DAB 显色。结果表明重组蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中,分子量约为 47ku,与预期结果相符,以诱导后 4h 表达量最大(如图 4 所示)。Western-blot 分析发现,表达的重组蛋白能够与韩国新型鸭肝炎阳性血清进行反应,具有良好的免疫学活性(如图 5 所示)。

[0031] 3. 重组蛋白的纯化

[0032] 选用 KCL 显色法:将破碎好的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后取下凝胶,先用双蒸水洗涤,然后浸入 4℃ 预冷的 250mmol/L 的 KCL 溶液中显色 5-10min,最后用双蒸水洗涤。将目的蛋白条带切下, PBS 洗涤 3 次,用玻璃棒将其捣细,反复冻融 3 次,8000r/min 离心 10min,吸取上清, SDS-PAGE 电泳进行纯度鉴定。结果只有一条 47ku 的目的蛋白条带,表明 KCL 显色法获得了较纯的目的蛋白(如图 6 所示)。

[0033] 4. 样品稀释液、洗涤液、终止液的配制

[0034] 样品稀释液为含 0.05% 吐温 -20 的 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (KH_2PO_4 0.2g, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, NaCl 8g, 定容至 1000mL, 再加 0.5mL 吐温 -20); $10\times$ 浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温 -20 的 0.1M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (KH_2PO_4 2g, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29g, NaCl 80g, 定容至 1000mL, 再加 5mL 吐温 -20); 终止液为 2M 硫酸溶液(取 111.2mL 浓硫酸即 18M, 稀释定容至 1000mL)。

[0035] 5. 阳性对照和阴性对照的制备

[0036] 将用韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白免疫获得的阳性血清用样品稀释液作 1 : 100 稀释 ($\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$), 加入 1000U/mL 的青链霉素, 无菌过滤, 作为韩国新型鸭肝炎抗体间接 ELISA 检测试剂盒中的阳性对照; 将筛选获得的阴性血清 ($\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.25$), 加入 1000U/mL 的青链霉素, 无菌过滤, 作为韩国新型鸭肝炎抗体间接 ELISA 检测试剂盒中的阴性对照。

[0037] 6. 显色液的配制

[0038] 显色液 A: 称取 200mg 四甲基联苯胺 (TMB), 用 100mL 无水乙醇或 DMSO 溶解后, 以双蒸水定容至 1000mL; 显色液 B: 称取 21g 柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 28.2g 无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4), 6.4mL 0.75% 过氧化氢尿素, 双蒸水定容至 1000mL, 调 pH 值 4.5 ~ 5.0。

[0039] 7. 检测新型鸭肝炎抗体的间接 ELISA 反应条件的确定

[0040] 抗原和血清最佳工作浓度的确定: 采用方阵试验确定。用包被缓冲液将 VP1 重组蛋白作 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 等系列稀释, 包被 ELISA 反应板, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$; 韩国新型 DHV 阳性血清和阴性血清用样品稀释液分别作 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 等系列稀释; 进行间接 ELISA 测定。显色液显色, 终止液终止反应; 测定光波长 450nm 的 OD 值。取阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 1.0 左右, 阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 0.2 左右, 且阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}/\text{阴性血清 } \text{OD}_{450\text{nm}}$ 即 P/N 值大于 2.1 的抗原浓度和血清稀释度为最佳工作浓度, 结果如表 1 所示, 结果表明血清最佳稀释度为 1 : 100, 抗原最佳浓度 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0041] 表 1 抗原和血清最佳工作浓度的确定 ($\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值)

[0042]

		VP1 抗原包被量 ($\mu\text{g}/\text{孔}$)											
血清稀释度		10 μg		5 μg		2.5 μg		1.25 μg		0.625 μg		0.3125 μg	
1:25	P	1.559	1.565	1.468	1.476	1.352	1.366	1.317	1.309	1.275	1.278	1.156	1.179
	N	0.324	0.332	0.311	0.318	0.303	0.298	0.279	0.264	0.26	0.256	0.259	0.244
1:50	P	1.464	1.475	1.405	1.396	1.299	1.294	1.232	1.228	1.112	1.125	0.885	0.864
	N	0.282	0.278	0.272	0.275	0.283	0.276	0.281	0.267	0.252	0.254	0.242	0.249
1:100	P	1.228	1.235	1.132	1.136	<u>1.048</u>	<u>1.055</u>	0.956	0.964	0.892	0.889	0.672	0.669
	N	0.249	0.245	0.236	0.238	0.219	0.224	0.214	0.225	0.212	0.218	0.209	0.214
1:200	P	1.118	1.114	0.924	0.916	0.867	0.875	0.659	0.668	0.599	0.584	0.457	0.448
	N	0.215	0.212	0.205	0.216	0.201	0.211	0.209	0.204	0.208	0.203	0.207	0.202
1:400	P	0.824	0.836	0.765	0.772	0.652	0.649	0.438	0.442	0.392	0.389	0.318	0.315

[0043]

1:800	N	0.201	0.203	0.206	0.202	0.198	0.203	0.198	0.199	0.201	0.197	0.196	0.194
	P	0.692	0.694	0.578	0.584	0.488	0.495	0.354	0.349	0.324	0.328	0.294	0.305
	N	0.206	0.198	0.202	0.197	0.208	0.204	0.196	0.199	0.199	0.198	0.194	0.191

血清 P/N 值

血清稀释度		10 μg		5 μg		2.5 μg		1.25 μg		0.625 μg		0.3125 μg	
1:25		4.81	4.71	4.72	4.64	4.46	4.58	4.72	4.96	4.90	4.99	4.46	4.83
1:50		5.19	5.31	5.17	5.08	4.59	4.69	4.38	4.60	4.41	4.43	3.66	3.47
1:100		4.93	5.04	4.80	4.77	<u>4.79</u>	<u>4.71</u>	4.47	4.28	4.21	4.08	3.22	3.13
1:200		5.20	5.25	4.51	4.24	4.31	4.15	3.15	3.27	2.88	2.88	2.21	2.22
1:400		4.10	4.12	3.71	3.82	3.29	3.20	2.21	2.22	1.95	1.97	1.62	1.62
1:800		3.36	3.51	2.86	2.96	2.35	2.43	1.81	1.75	1.63	1.66	1.52	1.60

[0044] 8. 结果判定标准

[0045] 将收集的 40 份无韩国新型 DHV 抗体的鸭血清,在最佳工作条件下进行间接 ELISA 测定,以确定鸭血清在无韩国新型 DHV 感染时其吸收值范围 ($X \pm 3SD = 0.201 \pm 3 \times 0.009 = 0.228$),因此确定以待检样本 $OD_{450\text{nm}}$ 值与阴性 $OD_{450\text{nm}}$ 值的比值 (P/N) 大于或等于 2.1,且待检样本 $OD_{450\text{nm}}$ 值大于 0.228 判为阳性。

[0046] 9. 韩国新型鸭肝炎抗体检测 ELISA 板的制备

[0047] 用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCL 缓冲液作包被液,将韩国新型鸭肝炎 VP1 重组蛋白稀释为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 ELISA 反应板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 小时,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,拍干,用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 小时,以含 0.05% 吐温 -20 pH7.4 的 PBS 洗涤,拍干,再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时,待其干燥后装入含干燥剂的包装袋中备用。

[0048] 10. ELISA 操作程序的确定

[0049] 按以上确定的优化条件进行操作,即得到本方法的最佳操作程序:

[0050] 将待检血清用样品稀释液作 1 : 100 稀释,按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入抗体检测板中,同时设阴性对照、阳性对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45min;弃去反应孔中的液体,每孔加洗涤液 350 μL ,洗涤 3 ~ 5 次,每次间隔 1min,拍干;每孔加 100 μL 的酶结合物工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45min;洗涤 3 ~ 5 次,每次间隔 1min,拍干;依次加入 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15min;加 50 μL 终止液,用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值,读值计算并判定结果。

[0051] 实施例：

[0052] 一、韩国新型鸭肝炎抗体 ELISA 检测试剂盒，包括以下组分：

[0053] 1) ELISA 板条 (96 孔) : 5 块

[0054] 2) 10× 浓缩洗涤液 : 400mL (用前 1 : 10 稀释)

[0055] 3) 样品稀释液 : 200mL

[0056] 4) 羊抗鸭酶标二抗 (酶结合物工作液) : 50mL

[0057] 5) 显色液 A : 50mL

[0058] 6) 显色液 B : 50mL

[0059] 7) 终止液 : 60mL

[0060] 8) 阳性血清对照 (+) : 2mL

[0061] 9) 阴性血清对照 (-) : 2mL

[0062] 二、操作步骤：

[0063] 1、将待检血清用样品稀释液作 1 : 100 稀释，按 100 μ L/ 孔加入抗体检测板中，同时设阴性血清对照、阳性血清对照，37℃ 孵育 45min；

[0064] 2、弃去反应孔中的液体，每孔加洗涤液 350 μ L，洗涤 3 ~ 5 次，每次间隔 1min，拍干；

[0065] 3、每孔加 100 μ L 的酶结合物工作液，37℃ 孵育 45min；

[0066] 4、重复步骤 2；

[0067] 5、依次加入 50 μ L 显色液 A 和 50 μ L 显色液 B，37℃ 避光孵育 15min；

[0068] 6、加 50 μ L 终止液，用酶标仪在 450nm 波长下测定各孔吸光度 A 值，读值计算并判定结果。

[0069] 三、应用

[0070] 1、特异性试验

[0071] 11 交叉试验：用 VP1 重组蛋白建立的间接 ELISA 检测试剂盒分别检测鸭瘟、番鸭细小病毒病、鸭新城疫、鸭流感、传统 1 型鸭肝炎 (基因 A 型)、韩国新型鸭肝炎 (基因 C 型) 等阳性血清及韩国新型鸭肝炎阴性血清，每样本 4 个重复，进行交叉反应性测定，检测结果显示韩国新型鸭肝炎阳性血清为阳性结果，其余均为阴性，表明该检测试剂盒与上述病毒无交叉反应；

[0072] 1.2 阻抑试验：将韩国新型鸭肝炎阳性血清分别与等体积的韩国新型鸭肝炎病毒 (200TCID₅₀/0.2ml) 和鸭瘟病毒 (200TCID₅₀/0.2ml) 混合，室温作用 30min，将处理后的血清与未作任何处理的血清分别按最佳反应条件进行阻抑试验测定，结果表明韩国新型鸭肝炎阳性血清只能被韩国新型鸭肝炎病毒特异性阻抑，而不能被鸭瘟病毒阻抑。

[0073] 2、敏感性试验

[0074] 10 份韩国新型鸭肝炎阳性血清分别从 1 : 2 开始倍比稀释，其余条件按最佳反应条件进行 ELISA 检测，同时用病毒中和试验 (VN) 对其终点滴度进行测定。结果表明，ELISA 检测试剂盒的敏感性要明显高于中和试验 (如表 2 所示)，二者的相关系数为 0.985。

[0075] 表 2 敏感性试验

[0076]

方法	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VN	59.71	111.43	100.43	222.86	181.02	97.01	27.86	51.98	194.01	107.63
ELISA	256	512	512	1024	1024	512	128	256	1024	512

[0077] 3、重复性试验

[0078] 用两次包被的酶标板,检测 5 份韩国新型鸭肝炎阳性血清和 5 份阴性血清,每个样品重复检测 5 次,测定其变异系数 CV% ($CV = S. D. / X \times 100\%$, S. D. :标准差, X :算术平均值)。结果表明变异系数最大为 5.12%,最小为 1.0%。10 份血清变异系数都较小,具有较好的重复性。

[0079] 4、临床应用

[0080] 临床应用检验的样品为试验样品 10 份和部分送检的样品 60 份。应用 ELISA 检测试剂盒和血清中和试验 (VN) 同时检测送检样品,比较两种方法的符合率。其中 ELISA 检测试剂盒检出阳性血清为 30 份,阳性检出率为 42.9%,中和试验检出阳性血清 29 份,阳性检出率为 41.4%,两种方法的符合率为 98.6% (如表 3 所示)。

[0081] 表 3 ELISA 检测试剂盒与中和试验比较

	方法	ELISA 检测试剂盒	VN
	样品数	70	70
	阳检数	30	29
[0082]	阳检率	42.9%	41.4%
	共同阳性数		29
	共同阴性数		40
	符合率		98.6%

[0083] 注:检出符合率 = (共同阳性数 + 共同阴性数) / 总样品数 $\times 100\%$

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 山东省农业科学院家禽研究所

<120> 一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒

<130> 0

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> 鸭 (Anas sp.)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(720)

<223> 韩国新型鸭肝炎病毒 VP1 基因

<400> 1

ggt gat tcc aat cag ctt ggt gat gat gaa cca gtg tgt ttt ctc aat 48
 Gly Asp Ser Asn Gln Leu Gly Asp Asp Glu Pro Val Cys Phe Leu Asn
 1 5 10 15

ttt gag act gca aat gtg cca ata caa ggg gag tcg cac act ttg gtg 96
 Phe Glu Thr Ala Asn Val Pro Ile Gln Gly Glu Ser His Thr Leu Val
 20 25 30

aaa cat ctt ttt ggc cgt caa tgg ctg gtt cgt act gtt caa cat act 144
 Lys His Leu Phe Gly Arg Gln Trp Leu Val Arg Thr Val Gln His Thr
 35 40 45

ggt gag gta caa gag ttg gat ttg cca gtg cct gac cag ggt cat gca 192
 Gly Glu Val Gln Glu Leu Asp Leu Pro Val Pro Asp Gln Gly His Ala
 50 55 60

tct ctg ttg cga ttc ttt gcc tat ttc tct gga gaa gtg att ttg acc 240
 Ser Leu Leu Arg Phe Phe Ala Tyr Phe Ser Gly Glu Val Ile Leu Thr
 65 70 75 80

att gtc aat aat gga aca aca ccc tgc atg gtt gca cac tcc tat aca 288
 Ile Val Asn Asn Gly Thr Thr Pro Cys Met Val Ala His Ser Tyr Thr

[0002]

85	90	95	
atg gac aat ctc act tct gaa tat gct gtc act gcc atg ggg ggt att			336
Met Asp Asn Leu Thr Ser Glu Tyr Ala Val Thr Ala Met Gly Gly Ile			
100	105	110	
ctt atc cca gca aac tct gcc aag aat att aat att cca ttt tat tct			384
Leu Ile Pro Ala Asn Ser Ala Lys Asn Ile Asn Ile Pro Phe Tyr Ser			
115	120	125	
gtc aca cct tta cgc ccc aca cga ccc atg cca gca tct cag ggg ggt			432
Val Thr Pro Leu Arg Pro Thr Arg Pro Met Pro Ala Ser Gln Gly Gly			
130	135	140	
ggc ttg act ttt ggc agg ttg tat atc tgg aca caa tca gga agc gtt			480
Gly Leu Thr Phe Gly Arg Leu Tyr Ile Trp Thr Gln Ser Gly Ser Val			
145	150	155	160
tct gtt ttt atg ggc ctc cac aag cca gct tta ttt ttc cca ctg cct			528
Ser Val Phe Met Gly Leu His Lys Pro Ala Leu Phe Phe Pro Leu Pro			
165	170	175	
gca cca act tat aca aca cat act ctg ttg aat aag att gaa acc atg			576
Ala Pro Thr Tyr Thr Thr His Thr Leu Leu Asn Lys Ile Glu Thr Met			
180	185	190	
aat ctg cat gat caa tca gat cag cca gac tgc cat ctg tgt gag att			624
Asn Leu His Asp Gln Ser Asp Gln Pro Asp Cys His Leu Cys Glu Ile			
195	200	205	
tgt agg aaa atg aag aaa tgg tct cgc aac cat cgc cca ttt cgc ttc			672
Cys Arg Lys Met Lys Lys Trp Ser Arg Asn His Arg Pro Phe Arg Phe			
210	215	220	
tgt ttg aga ctt aaa aca ctt gcc ttt gag ctc cat ctg gag att gaa			720
Cys Leu Arg Leu Lys Thr Leu Ala Phe Glu Leu His Leu Glu Ile Glu			
225	230	235	240
<210>	2		
<211>	240		
<212>	PRT		
<213>	鸭 (Anas sp.)		
<400>	2		

[0003]

Asn Leu His Asp Gln Ser Asp Gln Pro Asp Cys His Leu Cys Glu Ile
 195 200 205

Cys Arg Lys Met Lys Lys Trp Ser Arg Asn His Arg Pro Phe Arg Phe
 210 215 220

Cys Leu Arg Leu Lys Thr Leu Ala Phe Glu Leu His Leu Glu Ile Glu
 225 230 235 240

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 根据 PCR 反应要求设计, 用于扩增韩国新型鸭肝炎病毒 VP1 基因的上游引物

<400> 3

gaattcgggtg attccaatca gct

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 根据 PCR 反应要求设计, 用于扩增韩国新型鸭肝炎病毒 VP1 基因的下游引物

<400> 4

ctcgagttca atctccagat gga

23



图 1

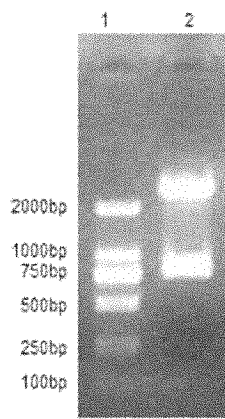


图 2

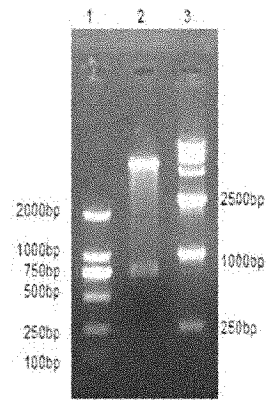


图 3

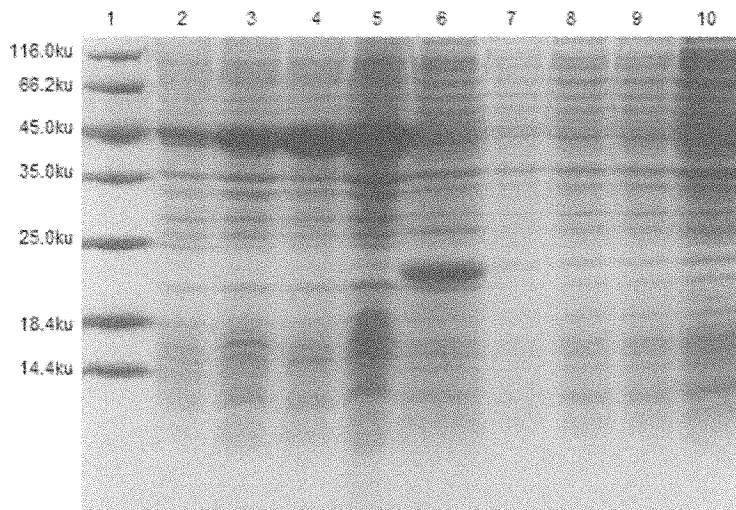


图 4

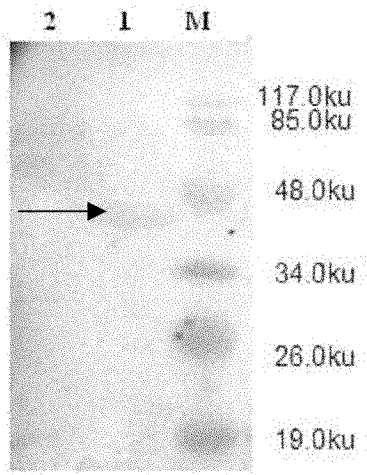


图 5

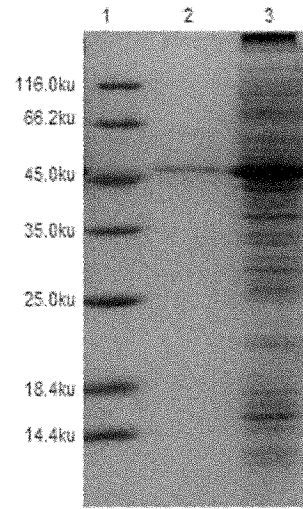


图 6

专利名称(译)	一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102127531A	公开(公告)日	2011-07-20
申请号	CN201010599000.X	申请日	2010-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院家禽研究所		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院家禽研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院家禽研究所		
[标]发明人	马秀丽 黄兵 李玉峰 吴静 于可响 宋敏训 秦卓明		
发明人	马秀丽 黄兵 李玉峰 吴静 于可响 宋敏训 秦卓明		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/51 C12P21/02 G01N33/576 G01N33/569 G01N33/535		
其他公开文献	CN102127531B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种韩国新型鸭肝炎病毒抗体ELISA检测试剂盒。该试剂盒含有以韩国新型鸭肝炎VP1重组蛋白包被的ELISA板、样品稀释液、浓缩洗涤液、酶结合物工作液、显色液A、显色液B、终止液、阳性对照和阴性对照。VP1重组蛋白是以下述方法获得：以韩国新型鸭肝炎病毒作为材料，通过RT-PCR方法对其VP1基因进行扩增、克隆得到重组质粒pMD-VP1。然后定向插入到pET-32a(+)表达载体，筛选获得重组表达质粒pET-32a(+)-VP1。经IPTG诱导表达、纯化，获得VP1重组蛋白。该检测试剂盒用于韩国新型鸭肝炎的检测，其特异性强、敏感性高、操作简单，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景。

