



(12) 发明专利申请

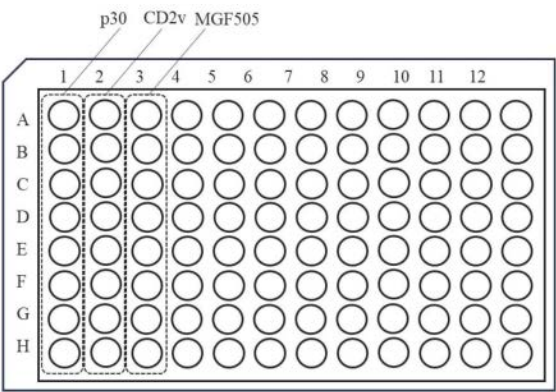
(10) 申请公布号 CN 117347631 A
(43) 申请公布日 2024. 01. 05

(21) 申请号 202311301978.7
(22) 申请日 2023.10.10
(71) 申请人 河北农业大学
地址 071000 河北省保定市灵雨寺街289号
(72) 发明人 左玉柱 范京惠 张帅 刘立辉
吴志勇 张增贤
(74) 专利代理机构 河北光迅专利代理有限公司
13190
专利代理师 宋春荣
(51) Int.Cl.
G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称
一种鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法及应用
(57) 摘要

本发明属于病毒检测技术领域,尤其涉及一种鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法及其应用。本发明所建立的鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其是通过原核表达制备的非洲猪瘟强、弱毒株共有的p30蛋白和强毒株特有而弱毒株不表达的CD2v和MGF505蛋白,并以p30、CD2v、MGF505蛋白作为包被抗原,建立了鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法。研究显示,本发明建立的方法操作简单,在一块酶标板上即可实现强、弱毒株鉴别,且具有灵敏度高,特异性强,重复性好,与市售商品化试剂盒符合率高等优点。本发明可用于鉴别非洲猪瘟野生型强毒株、CD2v或MGF505基因缺失弱毒株感染,且可为ASFV亚单位疫苗上市后的区分野毒与疫苗毒感染及免疫效果评价提供帮助,适合于ASFV抗体的大规模筛查。



1. 一种鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其是以ASFVp30、CD2v、MGF505抗原为目的基因,以pET-32a为载体,成功构建重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505,通过原核表达系统获得包涵体表达的重组蛋白p30、CD2v、MGF505,并进行纯化,分别以纯化的p30、CD2v、MGF505重组蛋白作为包被抗原,建立了鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法。

2. 根据权利要求1所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其特征在于,所述重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505构建过程如下:

(1) 通过NCBI查找ASFV Georgia 2007/1毒株p30、CD2v、MGF505基因,经Protean分析、截短后送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成得到重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505,根据p30、CD2v、MGF505基因设计特异性扩增引物,p30-F如SEQ.No.1,p30-R如SEQ.No.2,CD2v-F如SEQ.No.3,CD2v-R如SEQ.No.4,MGF505-F如SEQ.No.5,MGF505-R如SEQ.No.6。

3. 根据权利要求1所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其特征在于,重组蛋白p30、CD2v、MGF505的表达过程如下:

(1) 将上述构建的重组质粒分别转化到大肠杆菌BL21 (D3) 感受态细胞,并涂至Amp-LB固体培养平板,挑取单个阳性菌落接种于Amp-LB液体培养基培养后经菌液PCR鉴定为阳性菌液,在IPTG诱导下大量表达与His融合的ASFV重组蛋白p30、CD2v、MGF505;

PCR体系如下:

2×PCR Mix	10 uL
Primer-F	1 uL
Primer-R	1 uL
模板	2 uL
H ₂ O	6 uL

PCR反应程序如下:

95 °C	5 min	
95 °C	30 s	} ×35
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

4. 根据权利要求1所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其特征在于,重组蛋白p30、CD2v、MGF505的纯化过程如下:

(1) 将上述诱导表达后的菌液10000r/min离心10min,PBS重悬,超声裂解25min,收集沉淀,用Binding Buffer重悬过夜,10000r/min离心15min取上清,利用His标签蛋白纯化试剂盒纯化,获得纯化的ASFV重组蛋白p30、CD2v、MGF505。

(2) 将Ni-Agarose Resin填料混匀后加入层析柱,室温静置10分钟,待凝胶与溶液分层后,把底部的出液口打开,让乙醇通过重力作用缓慢流出。

(3) 向装填好的柱中加入5倍柱体积的去离子水将乙醇冲洗干净后,再用8倍柱体积的Binding Buffer平衡柱子。

(4) 将上清负载上柱,流速为10倍柱体积/小时,收集流穿液。

(5) 使用15倍柱体积的Binding Buffer冲洗柱子,洗去杂蛋白。

(6) 使用适量Elution Buffer洗脱,收集洗脱峰。通过蛋白监测仪监测,洗脱峰可以分管收集,每1ml收集1管。

(7) 洗脱后,依次使用5倍柱体积的Binding Buffer,5倍柱体积的去离子水洗涤柱子,再用3倍柱体积的20%乙醇平衡(乙醇要将填料浸没),封柱后2-8℃保存。

(8) 通过Western-blotting验证重组蛋白p30、CD2v、MGF505免疫原性。

5. 根据权利要求1所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其特征在于,鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法建立过程如下:

(1) 将上述纯化的重组蛋白p30、CD2v、MGF505用包被缓冲液倍比稀释,在96孔板上采用方阵法,每孔加入包被液稀释好的蛋白100 μ L,37℃孵育1h后4℃过夜,包被完成后用PBST洗三次,每次加入200 μ L,静置5min后洗涤,洗板完成后拍干;每孔加入含5%脱脂牛奶的PBST封闭液100 μ L,37℃孵育3h,弃掉封闭液进行洗板;将标准阴、阳性血清用封闭液从1:100开始进行倍比稀释后分别与重组蛋白p30、CD2v、MGF505组成方阵,每孔100 μ L,37℃孵育1h,再次进行洗板;向每孔中加入100 μ L,用封闭液按1:5000稀释好的HRP-兔抗猪IgG(H+L),37℃孵育1h,洗板三次后拍干;向每孔中加入100 μ L TMB单组分显色液,37℃避光10min后每孔加入50 μ L 2M H₂SO₄终止显色反应,用酶标仪测OD_{450nm}值。蛋白最佳浓度和血清的最佳稀释倍数判定标准为:阳性OD_{450nm}值/阴性OD_{450nm}值(P/N)最大,且阳性OD_{450nm}值接近1.0。

(2) 通过优化实验条件,确定最适封闭液,最佳包被时间,最佳酶标二抗稀释浓度,临界值。

6. 根据权利要求1所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其特征在于,所述应用中,重组蛋白p30、CD2v、MGF505最佳包被浓度分别为0.600 μ g/mL、1.375 μ g/mL、4.200 μ g/mL,血清最佳稀释倍数分别为1:3200、1:3200、1:1600;最佳封闭液为含5%脱脂牛奶的PBST;最佳包被时间为37℃1h,4℃过夜;最佳酶标二抗稀释度为1:5000;p30蛋白临界值为0.329,被检血清OD_{450nm}>0.329为阳性,反之,则为阴性;CD2v蛋白临界值为0.293,被检血清OD_{450nm}>0.293为阳性,反之,则为阴性;MGF505蛋白临界值为0.373,被检血清OD_{450nm}>0.373为阳性,反之,则为阴性。

一种鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于病毒检测技术领域,尤其涉及一种鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟(Africanswinefever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(Africanswinefevervirus, ASFV)感染猪引起的一种高度接触性、烈性传染病,临床上猪感染急性ASF致死率高达100%。世界动物卫生组织(WOAH)将其列为必须报告的疫病,给全球养猪业带来了巨大的经济损失。

[0003] ASFV是一种具有复杂分子结构的线性双链DNA病毒,基因组全长介于170~190kb之间,可编码超过200种蛋白质,因ASFV结构和功能尚无完全探明,严重阻碍了疫苗和特效药物的研发进程。其中,p30蛋白由CP204L基因编码,是ASFV较为保守的免疫原性衣壳结构蛋白,可在病毒感染早期刺激机体产生具有一定中和能力的抗体,并且持续时间较长,是ASFV理想的抗体诊断抗原;CD2v蛋白由EP402R基因编码,为ASFV感染晚期表达蛋白,可使红细胞吸附于病毒感染细胞表面,从而促进病毒在宿主体内进行扩散传播,此外,EP402R基因的缺失可延长病毒血症产生时间,减轻临床症状;MGF505蛋白参与免疫逃逸,可靶向TANK结合激酶1(TANKbinding kinase 1, TBK1),抑制cGAS-STING介导的IFN- β 产生,为ASFV入侵重要结构蛋白,且CD2v和MGF505为当前基因缺失减毒活疫苗的主要缺失基因。近年来,我国北方发生了CD2v和MGFs多基因家族基因缺失的ASFV弱毒株疫情,猪只感染弱毒株后无明显强毒株感染的临床症状,排毒延迟,口腔、血液、粪便等病毒载量低,很难通过病原核酸检测出ASFV,但在应激和抵抗力下降时猪只体内病毒活跃度提高而通过不同途径排毒,导致弱毒株在猪场的蔓延传播。因此需通过鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测试剂盒鉴别是否为CD2v和MGFs多基因家族基因缺失的ASFV弱毒株抗体阳性,以便及时精准剔除阳性猪只,避免猪场ASFV的爆发。

[0004] 当前国内外ASFVELISA抗体检测试剂盒均为单孔包被单一或融合蛋白,董志珍等通过原核表达的重组p30蛋白作为包被抗原,依据竞争ELISA原理制备了ELISA抗体检测试剂盒,可用于检测猪血清中ASFV抗体;张蕾等采用MGF360、MGF505和CD2v蛋白三条多肽作为包被抗原,开发了一种非洲猪瘟病毒MGFs和CD2v ELISA抗体检测试剂盒;鲁龙等利用原核表达系统表达的p54和CD2v蛋白分别作为包被抗原制备了非洲猪瘟病毒的间接ELISA抗体鉴别检测试剂盒,该方法可用于检测针对ASFVp54和CD2v蛋白抗体。以上抗体检测方法虽可用于ASFV抗体检测,但在鉴别当前我国流行的MGFs基因缺失的弱毒株方面有一定局限性,无法满足我国ASFV流行现状。因此急需开发一种可用于鉴别ASFV野生型强毒株、CD2v或MGFs基因缺失弱毒株的抗体ELISA检测方法,用于猪场大规模血清抗体筛查,精准剔除ASFV抗体阳性猪只,对于ASFV的防控具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种用于鉴别鉴别ASFV野生型强毒株、CD2v或MGFs基因缺失弱毒株的抗体ELISA检测方法,用于猪场大规模血清抗体筛查,以及在疫苗上市后鉴别野毒感染和疫苗毒感染及免疫效果评价。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0007] 鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,以ASFVp30、CD2v、MGF505抗原为目的基因,以pET-32a为载体,成功构建重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505,通过原核表达系统获得包涵体表达的重组蛋白p30、CD2v、MGF505,并进行纯化,分别以纯化的p30、CD2v、MGF505重组蛋白作为包被抗原,建立了鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法。

[0008] 所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505构建方法:

[0009] (1)通过NCBI查找ASFV Georgia 2007/1毒株p30、CD2v、MGF505基因,经Protean分析、截短后送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成得到重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505,根据p30、CD2v、MGF505基因设计特异性扩增引物,p30-F如SEQ.No.1,p30-R如SEQ.No.2,CD2v-F如SEQ.No.3,CD2v-R如SEQ.No.4,MGF505-F如SEQ.No.5,MGF505-R如SEQ.No.6。

[0010] 所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,重组蛋白p30、CD2v、pET-32a-MGF505表达纯化方法:

[0011] (1)将上述构建的重组质粒分别转化到大肠杆菌BL21(D3)感受态细胞,并涂至Amp-LB固体培养平板,挑取单个阳性菌落接种于Amp-LB液体培养基培养后经菌液PCR鉴定为阳性菌液,在IPTG诱导下大量表达与His融合的ASFV重组蛋白p30、CD2v、MGF505;

[0012] PCR体系如下:

2×PCR Mix	10 uL
Primer-F	1 uL
Primer-R	1 uL
模板	2 uL
H ₂ O	6 uL

[0013] PCR反应程序如下:

95 °C	5 min	
95 °C	30 s	] ×35
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

[0014] (2)将上述诱导表达后的菌液10000r/min离心10min,PBS重悬,超声裂解25min,收集沉淀,用Binding Buffer重悬过夜,10000r/min离心15min取上清,利用His标签蛋白纯化

试剂盒纯化,获得纯化的ASFV重组蛋白p30、CD2v、MGF505,通过Western-blotting验证重组蛋白p30、CD2v、MGF505免疫原性。

[0015] 所述鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法的建立方法:

[0016] (1) 使用包被液分别将纯化的重组蛋白p30、CD2v、MGF505倍比稀释,37℃孵育1h,4℃过夜包被抗原;使用PBST洗涤后加入含5%脱脂牛奶的PBST封闭液,37℃封闭3h;PBST洗涤后加入使用封闭液倍比稀释的阳性血清和阴性血清,37℃孵育1h;PBST洗涤后加入使用封闭液1:5000稀释的HRP-兔抗猪IgG(H+L),37℃孵育1h;PBST洗涤后加入TMB单组分显色液,37℃孵育10min,加入2M H₂SO₄终止液后使用酶标仪读取OD_{450nm}值,并比较和分析P/N值。

[0017] (2) 通过优化试验条件,确定最适抗原包被浓度和血清稀释倍数、最佳封闭液、包被时间、最佳酶标二抗稀释度及阴阳性临界值并验证该方法的特异性、敏感性、重复性和符合率。

[0018] 优选地,鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,p30、CD2v、MGF505最佳包被浓度分别为0.500ug/mL、1.000ug/mL、4.000ug/mL,血清最佳稀释倍数分别为1:3200、1:3200、1:1600;最佳封闭液为含5%脱脂牛奶的PBST;最佳包被时间为37℃1h,4℃过夜;最佳酶标二抗稀释度为1:5000。

[0019] 优选地,鉴别非洲猪瘟强、弱毒株抗体ELISA检测方法,p30蛋白临界值为0.329,被检血清OD_{450nm}>0.329为阳性,反之,则为阴性;CD2v蛋白临界值为0.293,被检血清OD_{450nm}>0.293为阳性,反之,则为阴性;MGF505蛋白临界值为0.373,被检血清OD_{450nm}>0.373为阳性,反之,则为阴性。

[0020] 本发明与现有技术相比具有如下技术优势:

[0021] 本发明建立了一种鉴别ASFV强、弱毒株抗体ELISA检测方法,用ASFV较为保守的强免疫原性且在感染4h可产生抗体的p30蛋白,弱毒株缺失、在免疫逃逸中发挥重要作用的CD2v和MGF505蛋白分别作为包被抗原,以间接法ELISA检测猪血清中p30、CD2v和MGF505抗体,该方法与商品化检测试剂盒具有较高的一致性,同时可以用于鉴别ASFV野生型强毒株、CD2v或MGFs基因缺失弱毒株感染,且可为ASFV亚单位疫苗上市后的区分野毒与疫苗毒感染及免疫效果评价提供帮助。

[0022] 本发明所建立的鉴别ASFV强、弱毒株抗体ELISA检测方法,其灵敏度高达1:25600;与PRRSV、CSFV、PRV、PCV2阳性血清无交叉反应;重复性试验显示,所检测的样品在同一批次不同时间段内的变异系数在0.473%-4.822%之间,均小于5%;而在不同批次内的变异系数在0.250%-4.648%之间,均小于5%,说明该方法批内以及批间内重复性良好;临床样品检测出18份ASFV抗体阳性样品,其中1份为MGF505基因缺失弱毒株,其余17份为强毒株感染;与商品化ASFV ELISA抗体试剂盒的符合率为96.296%,具有良好的可行性。综上所述,本发明制备的重组ASFVp30、CD2v和MGF505蛋白均能具有良好抗原性,建立的鉴别ASFV强、弱毒株抗体ELISA检测方法具有灵敏、特异、高效的特点,且可鉴别出ASFV野生型强毒株、CD2v或MGFs基因缺失弱毒株感染,适合于ASFV抗体的大规模筛查。

附图说明

[0023] 图1菌液PCR鉴定结果,其中,M:DNA 2000Marker;1-6:p30基因,p30基因扩增阴性

对照,CD2v基因,CD2v基因扩增阴性对照,MGF505基因,MGF505基因扩增阴性对照。

[0024] 图2SDS-PAGE检测p30、CD2v、MGF505蛋白表达情况,其中,M:蛋白质分子质量标准;1:pET-32a空载体;2:p30/CD2v/MGF505蛋白未诱导全菌,3:p30/CD2v/MGF505蛋白37℃诱导6h全菌。

[0025] 图3SDS-PAGE检测p30、CD2v、MGF505蛋白可溶性情况,其中,M:蛋白质分子质量标准;1:pET-32a空载体;2:p30/CD2v/MGF505蛋白上清,3:p30/CD2v/MGF505蛋白沉淀。

[0026] 图4SDS-PAGE检测p30、CD2v、MGF505蛋白纯化情况,其中,M:蛋白质分子质量标准;1:pET-32a空载体;2:p30/CD2v/MGF505蛋白未纯化,3:p30/CD2v/MGF505蛋白已纯化。

[0027] 图5p30、CD2v、MGF505蛋白Western-blotting验证结果,其中,M:蛋白质分子质量标准;1:p30/CD2v/MGF505蛋白。

[0028] 图6最佳封闭液的确定。

[0029] 图7最佳包被时间的确定。

[0030] 图8最佳酶标二抗稀释度的确定。

[0031] 图9特异性试验结果。

[0032] 图10敏感性试验结果。

[0033] 图11鉴别ASFV强、弱毒株抗体ELISA检测方法示意图。

具体实施方式

[0034] 以下通过具体实施例进一步描述本发明,但所述实施例并不以任何方式限定本发明专利保护的范围。

[0035] 本发明下述实施例中所使用的材料如下:

[0036] 本试验使用大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)感受态细胞由本实验室制备;猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒2型(PCV2)抗体阳性血清、标准非洲猪瘟病毒(ASFV)抗体阳性血清、阴性血清均有本实验室保存。

[0037] 试验中所使用的主要试剂如下:

[0038] 普泰ASFV ELISA抗体检测试剂盒购自洛阳普泰生物技术有限公司;His标签蛋白纯化试剂盒购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司;蛋白Marker、5XSDS上样缓冲液购自北京聚合美生物科技有限公司;脱脂奶粉、PBST、TMB单组分显色液购自北京索莱宝科技有限公司;DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HRP-兔抗猪IgG(H+L)购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

[0039] 实施例1重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505的原核表达载体的构建:

[0040] 1.1重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505密码子优化与合成

[0041] 根据NCBI查找p30、CD2v、MGF505基因序列(ASFV Georgia 2007/1,GenBank:FR682468),经Protean软件分析、截短、密码子优化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505。

[0042] 1.2根据p30、CD2v、MGF505基因设计特异性扩增引物,p30-F如SEQ.No.1,p30-R如SEQ.No.2,CD2v-F如SEQ.No.3,CD2v-R如SEQ.No.4,MGF505-F如SEQ.No.5,MGF505-R如SEQ.No.6。

[0043] 实施例2重组蛋白p30、CD2v、MGF505的诱导与表达

[0044] 2.1重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505的转化与鉴定

[0045] 将重组质粒pET-32a-p30、pET-32a-CD2v、pET-32a-MGF505分别转化到大肠杆菌BL21 (D3) 感受态细胞并涂至Amp-LB固体培养平板,挑取单个阳性菌落接种于Amp-LB液体培养基培养后,将菌液PCR鉴定为阳性的样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

[0046] PCR体系如下:

2×PCR Mix	10 uL
Primer-F	1 uL
Primer-R	1 uL
模板	2 uL
H ₂ O	6 uL

[0047] PCR反应程序如下:

95 °C	5 min	
95 °C	30 s	} ×35
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

[0048] 试验结果显示,菌液PCR鉴定后经1.5%琼脂糖凝胶电泳得到目的条带分别为540bp、363bp、594bp,与预期大小相符(图1)。

[0049] 2.2重组蛋白p30、CD2v、MGF505的诱导与表达

[0050] 2.2.1重组蛋白诱导表达

[0051] 将菌液PCR鉴定及测序正确的阳性菌液分别接种于Amp-LB液体培养基中,置培养箱中37°C,200r/min震荡培养至OD_{450nm}为0.7,加入1%的IPTG诱导剂继续诱导表达6h,同步进行阴性对照菌株的培养,收集菌液。

[0052] 2.2.2重组蛋白SDS-PAGE鉴定

[0053] 将上述菌液,4°C,10000r/min离心10min,弃上清,用1×PBS按2mL/100mg重悬。将重悬液超声裂解25min(功率400W,工作5S,间歇10S),4°C,10000r/min离心15min,收集上清,沉淀用Binding Buffer按2mL/0.1g重悬后4°C过夜裂解后4°C,10000r/min离心20min,收集上清。

[0054] 取上述上清40uL,加入10uL 5×SDS上样缓冲液,105°C变性8min,进行SDS-PAGE(150V,2h),SDS-PAGE后考马斯亮蓝染色鉴定重组蛋白p30、CD2v、MGF505的表达情况和可溶性。

[0055] SDS-PAGE用分离胶和浓缩胶配置如下:

[0056] (1)12%分离胶

	H ₂ O	2.3 mL
	30%丙烯酰胺	2.8 mL
	Tris-HCl (pH=8.8)	1.75 mL
	10%SDS	70 uL
	10%AP	70 uL
	TEMED	3.5 uL
	(2) 5%浓缩胶	
	H ₂ O	2.28 mL
	30%丙烯酰胺	0.68 mL
[0057]	Tris-HCl (pH=6.8)	1.0 mL
	10%SDS	40 uL
	10%AP	40 uL
	TEMED	5.5 uL
[0058]	试验结果显示,p30、CD2v、MGF505蛋白分别在46.8kDa、39.6kDa、42.3kDa表达(图2),均以包涵体形式表达(图3)。	
[0059]	2.3重组蛋白纯化与Western-blotting鉴定	
[0060]	将上述经SDS-PAGE分析鉴定后的上清0.45μm滤器过滤后使用His标签蛋白纯化试剂盒纯化,使用NanoDrop 2000检测浓度后,-80℃备用。取纯化后的重组蛋白40uL,加入10uL 5×SDS上样缓冲液,105℃变性8min,进行SDS-PAGE,鉴定重组蛋白p30、CD2v、MGF505的纯化情况。	
[0061]	His标签蛋白纯化试剂盒纯化步骤如下:	
[0062]	(1) 将Ni-Agarose Resin填料混匀后加入层析柱,室温静置10分钟,待凝胶与溶液分层后,把底部的出液口打开,让乙醇通过重力作用缓慢流出。	
[0063]	(2) 向装填好的柱中加入5倍柱体积的去离子水将乙醇冲洗干净后,再用8倍柱体积的Binding Buffer平衡柱子。	
[0064]	(3) 将上清负载上柱,流速为10倍柱体积/小时,收集流穿液。	
[0065]	(4) 使用15倍柱体积的Binding Buffer冲洗柱子,洗去杂蛋白。	
[0066]	(5) 使用适量Elution Buffer洗脱,收集洗脱峰。通过蛋白监测仪监测,洗脱峰可以分管收集,每1ml收集1管。	
[0067]	(6) 洗脱后,依次使用5倍柱体积的Binding Buffer,5倍柱体积的去离子水洗涤柱子,再用3倍柱体积的20%乙醇平衡(乙醇要将填料浸没),封柱后2-8℃保存。	
[0068]	将纯化后的蛋白制样SDS-PAGE后,23V,25min转印到NC膜上,用含5%脱脂牛奶的PBST 4℃过夜封闭,加入标准ASFV抗体阳性血清37℃孵育3h,PBST洗膜3次后,再加入1:5000稀释的HRP-兔抗猪IgG(H+L)孵育2h,使用DAB显色液显色以验证重组蛋白p30、CD2v、MGF505的免疫原性。	
[0069]	试验结果显示,纯化后的重组蛋白p30、CD2v、MGF505分别仅在39.8kDa、39.6kDa、	

42.3kDa处存在单一条带,表明纯化效果良好(图4);经DAB显色液显色显示,分别在39.8kDa、39.6kDa、42.3kDa处可见明显的条带,表明重组蛋白均有较好的免疫原性(图5)。

[0070] 实施例3基于ASFV p30、CD2v、MGF505蛋白的鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法的建立

[0071] 3.1重组蛋白最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数确定

[0072] 将上述纯化的重组蛋白p30、CD2v、MGF505用包被缓冲液倍比稀释,在96孔板上采用方阵法,每孔加入包被液稀释好的蛋白100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h后4 $^{\circ}$ C过夜,包被完成后用PBST洗三次,每次加入200 μ L,静置5min后洗涤,洗板完成后拍干;每孔加入含5%脱脂牛奶的PBST封闭液100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育3h,弃掉封闭液进行洗板;

[0073] 将标准阴、阳性血清用封闭液从1:100开始进行倍比稀释后分别与重组蛋白p30、CD2v、MGF505组成方阵,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,再次进行洗板;向每孔中加入100 μ L,用封闭液按1:5000稀释好的HRP-兔抗猪IgG(H+L),37 $^{\circ}$ C孵育1h,洗板三次后拍干;向每孔中加入100 μ L TMB单组分显色液,37 $^{\circ}$ C避光10min后每孔加入50 μ L 2M H_2SO_4 终止显色反应,用酶标仪测OD_{450nm}值。蛋白最佳浓度和血清的最佳稀释倍数判定标准为:阳性OD_{450nm}值/阴性OD_{450nm}值(P/N)最大,且阳性OD_{450nm}值接近1.0。

[0074] 3.2最适封闭液的确定

[0075] 在仅用封闭液作为变量的条件下,将重组蛋白p30、CD2v、MGF505用上述确定好的蛋白浓度分别进行包被,设置5%脱脂牛奶、5%胎牛血清、5%新牛血清和1%BSA四组封闭液,用上述确定血清浓度进行孵育一抗,其他步骤同3.1。最适封闭液的判定标准为:P/N最大,且阳性OD_{450nm}值接近1.0。

[0076] 3.3包被时间的确定

[0077] 用上述确定好浓度的重组蛋白p30、CD2v、MGF505分别进行包被,在仅包被时间作为变量的情况下,设置4 $^{\circ}$ C过夜,37 $^{\circ}$ C 1h,37 $^{\circ}$ C 2h,37 $^{\circ}$ C 1h后4 $^{\circ}$ C过夜四组对照,血清浓度按照上述确定好的浓度进行孵育,封闭液按照3.2中确定好的进行,其他步骤同3.1。包被时间通过酶标仪测定不同包被时间下阳性OD_{450nm}值及P/N最大来确定。

[0078] 3.4酶标二抗稀释浓度的确定

[0079] 将HRP-兔抗猪IgG(H+L)按1:1250,1:2500,1:5000,1:10000稀释作为唯一变量的情况下,其他按上述确定好的条件和步骤进行操作,通过不同酶标二抗稀释浓度下的阴、阳性血清OD_{450nm}值及P/N值大小来确定最适稀释倍数。

[0080] 3.5临界值的确定

[0081] 用上述优化好的间接ELISA方法对30份ASFV抗体阴性猪血清进行检测,测定OD_{450nm}值并统计学分析,当检测样品的OD_{450nm}值 $\geq$ 阴性对照平均值 $\bar{x}$ +3 $\times$ 阴性对照标准差(SD)时,就可以判定样品为阳性;当检测样品的OD_{450nm}值 $<$ 阴性对照平均值 $\bar{x}$ +3 $\times$ 阴性对照标准差(SD)时,就可以判定样品为阴性。

[0082] 基于ASFV p30、CD2v、MGF505蛋白的鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法初步条件:

[0083] 重组蛋白p30、CD2v、MGF505最佳包被浓度分别为0.600 μ g/mL、1.375 μ g/mL、4.200 μ g/mL,血清最佳稀释倍数分别为1:3200、1:3200、1:1600(表1);最佳封闭液为含5%脱脂牛奶的PBST(图6);最佳包被时间为37 $^{\circ}$ C 1h,4 $^{\circ}$ C过夜(图7);最佳酶标二抗稀释度为1:

5000 (图8); p30蛋白临界值为0.329, 被检血清OD_{450nm} > 0.329为阳性, 反之, 则为阴性; CD2v蛋白临界值为0.293, 被检血清OD_{450nm} > 0.293为阳性, 反之, 则为阴性; MGF505蛋白临界值为0.373, 被检血清OD_{450nm} > 0.373为阳性, 反之, 则为阴性 (表2)。

[0084] 表1-1 p30蛋白最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数确定

血清稀释倍数		p30 蛋白包被浓度(ug/mL)					
		1.000	0.500	0.250	0.125	0.063	0.031
1:1 600	P	1.461	1.376	1.093	0.862	0.629	0.541
	N	0.326	0.303	0.271	0.223	0.173	0.167
	P/N	4.482	4.541	4.033	3.865	3.636	3.240
1:3 200	P	1.322	1.130	0.892	0.634	0.448	0.338
	N	0.319	0.233	0.207	0.183	0.169	0.121
	P/N	4.144	4.850	4.309	3.464	2.651	2.793
1:6 400	P	0.891	0.735	0.690	0.549	0.355	0.198
	N	0.248	0.212	0.178	0.172	0.151	0.085
	P/N	3.593	3.467	3.876	3.192	2.351	2.329
1:12 800	P	0.654	0.552	0.429	0.354	0.108	0.078
	N	0.193	0.185	0.174	0.115	0.040	0.029
	P/N	3.389	2.984	2.466	3.078	2.700	2.690

[0085] 表1-2 CD2v蛋白最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数确定

血清稀释倍数		CD2v 蛋白包被浓度(ug/mL)					
		2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.063
1:1 600	P	1.572	1.360	1.204	1.128	0.973	0.705
	N	0.223	0.203	0.166	0.141	0.128	0.083
	P/N	7.049	6.700	7.253	8.000	7.602	8.494
1:3 200	P	1.262	1.034	0.900	0.799	0.682	0.537
	N	0.166	0.107	0.097	0.087	0.075	0.073
	P/N	7.602	9.664	9.278	9.184	9.093	7.356
1:6 400	P	1.098	0.792	0.652	0.545	0.540	0.369
	N	0.133	0.089	0.086	0.078	0.069	0.063
	P/N	8.256	8.899	7.581	6.987	7.826	5.857
1:12 800	P	0.774	0.588	0.453	0.419	0.359	0.264
	N	0.102	0.071	0.067	0.064	0.052	0.041
	P/N	7.588	8.282	6.761	6.547	6.904	6.439

[0086] 表1-3 MGF505蛋白最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数确定

血清稀释倍数		MGF505 蛋白包被浓度(ug/mL)					
		8.000	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250
1:400	P	2.789	2.682	2.367	2.140	1.912	1.303
	N	0.313	0.284	0.275	0.238	0.203	0.163
	P/N	8.911	9.444	8.607	8.992	9.419	7.994
1:800	P	2.022	1.761	1.634	1.418	1.160	1.022
	N	0.193	0.176	0.169	0.159	0.123	0.107
	P/N	10.477	10.006	9.669	8.918	9.431	9.551
1:1 600	P	1.078	1.056	0.864	0.843	0.716	0.564
	N	0.116	0.098	0.085	0.078	0.069	0.065
	P/N	9.293	10.776	10.165	10.808	10.377	8.677
1:3 200	P	0.805	0.796	0.683	0.536	0.465	0.409
	N	0.091	0.089	0.069	0.065	0.057	0.055
	P/N	8.846	8.944	9.899	8.246	8.158	7.436

[0087] 表2-1 p30蛋白临界值确定

阴性样品 OD _{450nm} 值					平均值	标准差	临界值
0.225	0.204	0.252	0.301	0.203	0.236	0.031	0.329
0.216	0.213	0.238	0.237	0.244			
0.230	0.203	0.223	0.241	0.198			
0.240	0.213	0.230	0.281	0.223			
0.234	0.291	0.280	0.194	0.235			
0.320	0.225	0.222	0.225	0.248			

[0088] 表2-2 CD2v蛋白临界值确定

阴性样品 OD _{450nm} 值					平均值	标准差	临界值
0.161	0.211	0.143	0.142	0.274	0.172	0.040	0.293
0.134	0.153	0.161	0.168	0.230			
0.190	0.180	0.164	0.182	0.145			
0.172	0.215	0.151	0.157	0.166			
0.160	0.145	0.112	0.137	0.154			
0.252	0.152	0.150	0.138	0.264			

[0089] 表2-3 MGF505蛋白临界值确定

阴性样品 OD _{450nm} 值					平均值	标准差	临界值
0.226	0.204	0.306	0.149	0.174	0.173	0.066	0.373
0.154	0.101	0.141	0.164	0.157			
0.280	0.110	0.121	0.122	0.250			
0.239	0.184	0.173	0.065	0.239			
0.099	0.073	0.153	0.113	0.164			
0.167	0.199	0.179	0.148	0.350			

[0090] 实施例4基于ASFV p30、CD2v、MGF505蛋白的鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法的性能测定

[0091] 4.1特异性试验

[0092] 按照上述已经确定好的条件,对PRRSV、CSFV、PRV、PCV2抗体阳性血清进行检测,同时设置阴、阳对照,对本试验建立的ELISA检测方法进行特异性检验。

[0093] 结果显示,本试验建立的ELISA检测方法检测ASFV标准阳性血清为阳性外,其他阳性血清均可判定为阴性,表明本试验建立的鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法与其他血清没有交叉反应,具有良好的特异性(图9)。

[0094] 4.2敏感性试验

[0095] 利用已建立的间接ELISA检测方法,对标准阳性血清倍比稀释后进行检测,验证本方法的灵敏度。

[0096] 结果显示,本试验建立的ELISA检测方法p30、CD2v、MGF505蛋白对标准阳性血清的检测灵敏度分别为1:51200、1:51200、1:25600,则本试验鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法灵敏度为1:25600,表明该方法具有较高的灵敏度(图10)。

[0097] 4.3重复性试验

[0098] 利用已建立的间接ELISA检测方法,对5份ASFV阳性血清进行平行试验,每份样品重复3次,在同一酶标板中进行;再对5份ASFV阳性血清进行平行试验,每份样品重复3次,在3块酶标板中同时进行,分别统计样品OD_{450nm}值并计算组内及组间变异系数。

[0099] 试验结果显示,鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法批内变异系数在0.473%-4.822%之间,而在不同批次内的批间变异系数在0.250%-4.648%之间,均小于5%,表明该方法具有较好的重复性(表3)。

[0100] 表3-1 p30蛋白组内及组间重复性试验

血清样		OD _{450nm} 值					
品		1	2	3	标准差	平均值	变异系数
1	组内 试验	1.068	1.095	1.026	0.035	1.063	3.271%
2		1.150	1.172	1.249	0.052	1.190	4.367%
3		0.992	1.004	1.013	0.011	1.003	1.050%
4		1.200	1.209	1.185	0.012	1.198	1.012%
5		0.099	0.098	0.092	0.004	0.096	3.930%
1	组间 试验	1.195	1.168	1.162	0.018	1.175	1.496%
2		1.147	1.167	1.249	0.054	1.188	4.551%
3		1.092	1.114	1.068	0.023	1.091	2.108%
4		1.189	1.279	1.175	0.056	1.214	4.648%
5		0.085	0.088	0.091	0.003	0.088	3.409%

[0101] 表3-2 CD2v蛋白组内及组间重复性试验

血清样		OD _{450nm} 值					
品		1	2	3	标准差	平均值	变异系数
6	组内 试验	1.188	1.119	1.196	0.042	1.168	3.625%
7		1.215	1.172	1.142	0.037	1.176	3.119%
8		0.897	0.899	0.913	0.009	0.903	0.965%
9		0.158	0.168	0.155	0.007	0.160	4.245%
10		0.923	0.943	0.918	0.013	0.928	1.425%
6	组间 试验	1.206	1.189	1.190	0.010	1.195	0.798%
7		1.209	1.222	1.192	0.015	1.208	1.246%
8		0.978	0.990	0.963	0.014	0.977	1.385%
9		0.164	0.153	0.155	0.006	0.157	3.724%
10		0.896	0.923	0.925	0.016	0.915	1.771%

[0102] 表3-3 MGF505蛋白组内及组间重复性试验

血清样		OD _{450nm} 值					
品		1	2	3	标准差	平均值	变异系数
11	组内 试验	0.143	0.130	0.135	0.007	0.136	4.822%
12		1.159	1.164	1.170	0.006	1.164	0.473%
13		1.389	1.364	1.374	0.013	1.376	0.915%
14		0.323	0.304	0.322	0.011	0.316	3.380%
15		0.164	0.170	0.160	0.005	0.165	3.057%
11	组间 试验	0.111	0.118	0.112	0.004	0.114	3.331%
12		1.175	1.167	1.159	0.008	1.167	0.686%
13		1.399	1.406	1.403	0.004	1.403	0.250%
14		0.311	0.321	0.327	0.008	0.320	2.529%
15		0.155	0.152	0.157	0.003	0.155	1.627%

[0103] 4.4符合率试验

[0104] 利用已建立的鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法(图11)对来自于猪场的54份临床样品进行检测,将检测结果与商品化ASFV ELISA抗体试剂盒的检测结果进行比对分析,以验证该方法的临床应用可行性。

[0105] 用本发明建立的鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法与商品化ASFV ELISA抗体试剂盒对54份临床猪血清进行检测,结果显示:两种方法检测结果的符合率为96.296%,可应用于临床(表4),其中1份为MGF505基因缺失弱毒株。

[0106] 表4鉴别强、弱毒株间接ELISA抗体检测方法

检测方法		商品化 ASFV ELISA 抗体试剂盒		
		阳性	阴性	总计
鉴别强、弱毒株	阳性	18	1	19
间接 ELISA 抗	阴性	1	34	35
体检测方法	总计	19	35	54
符合率		94.737%	97.143%	96.296%

SEQUENCE LISTING

- [0107] Primer 1:ATGAAAATGGAGGTCATCTTCAA
 [0108] Primer 2:TAAAAGTTTAATGACCATGAGTC
 [0109] Primer 3:AGTATTGATTATTGGGTTAGTT
 [0110] Primer 4:GTTACTATTATTCCAGTTATATTCAAG
 [0111] Primer 5:ATGTTCTCTCTCCAGAACTTA
 [0112] Primer 6:AGCACATTCAAAGGTATCTAT

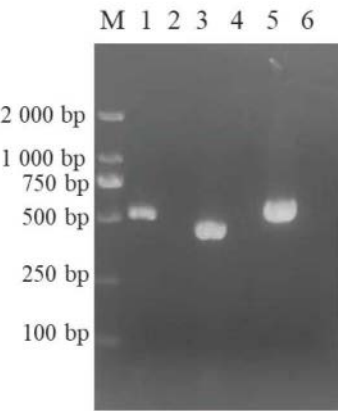


图1

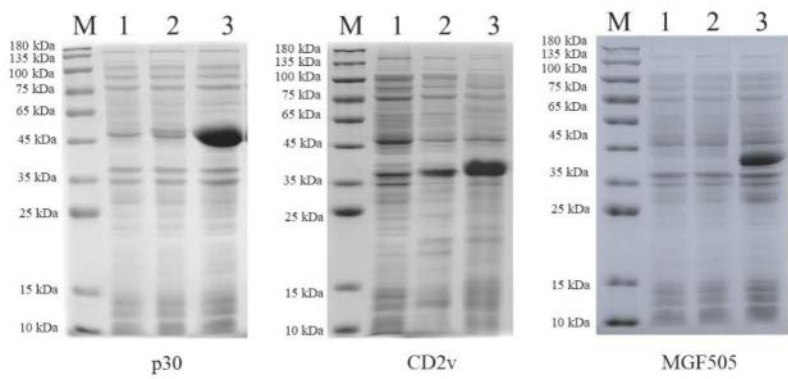


图2

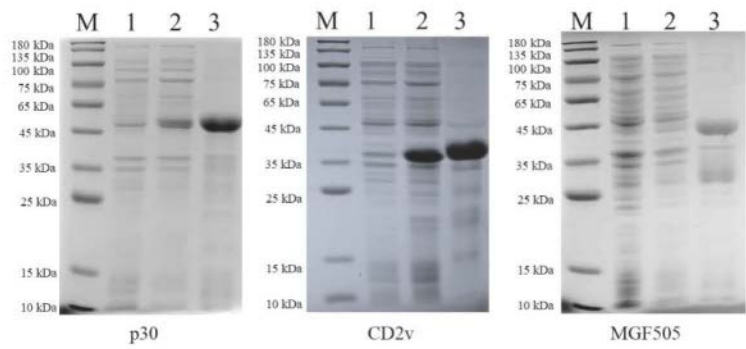


图3

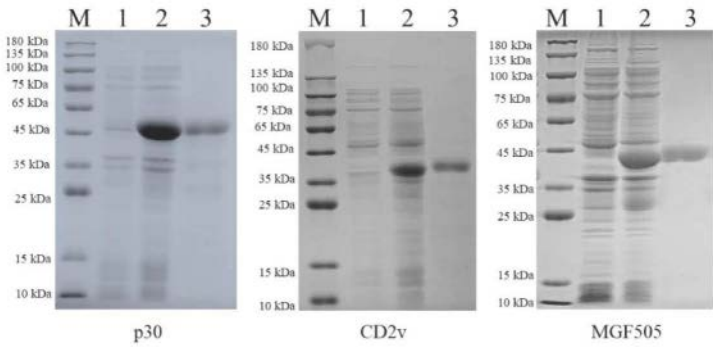


图4

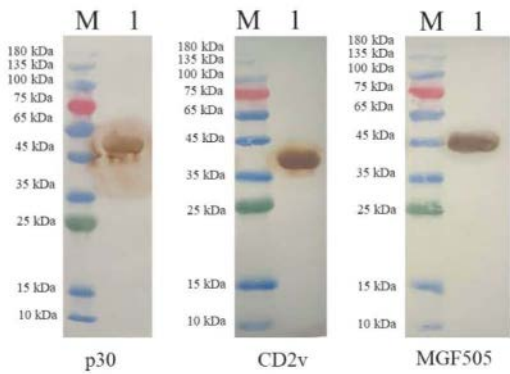


图5

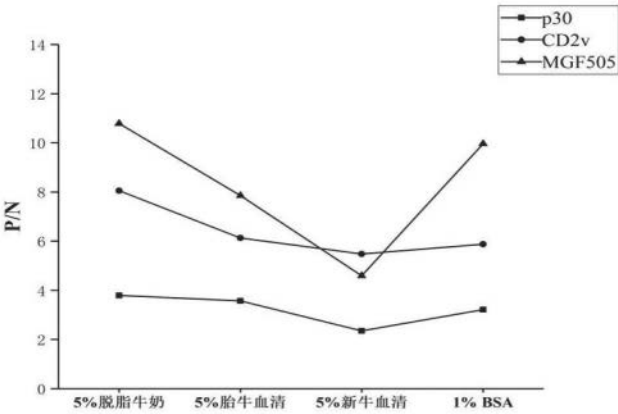


图6

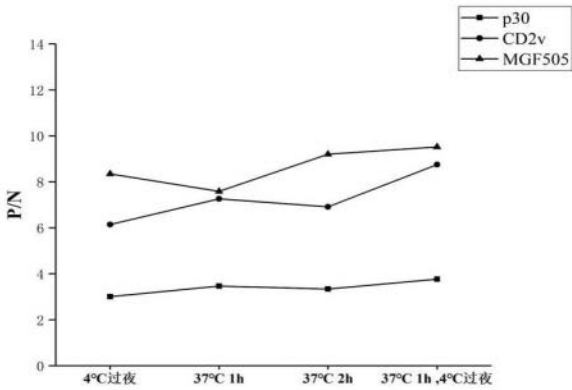


图7

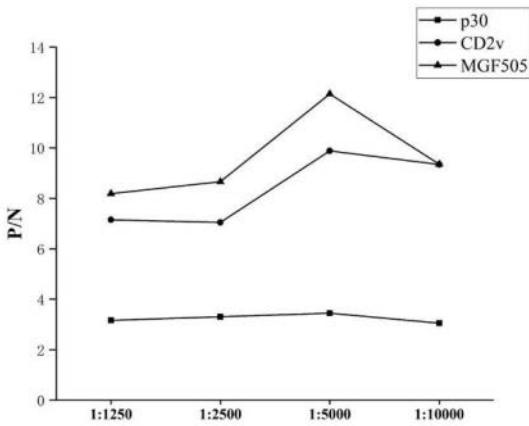


图8

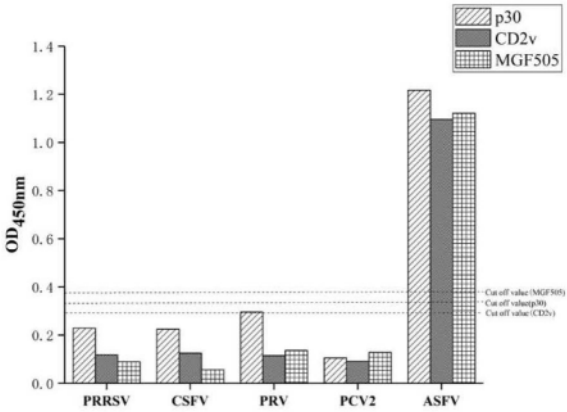


图9

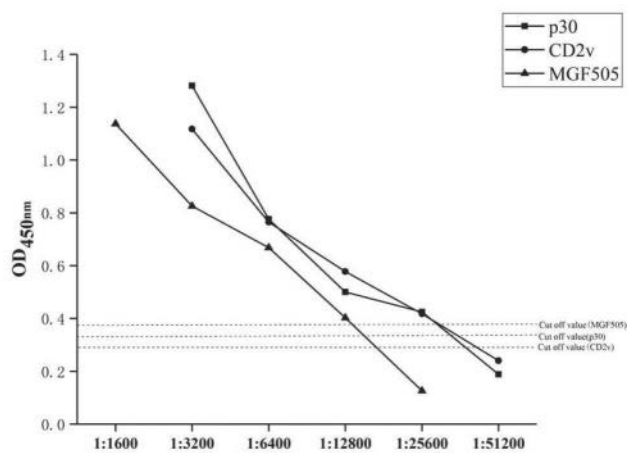


图10

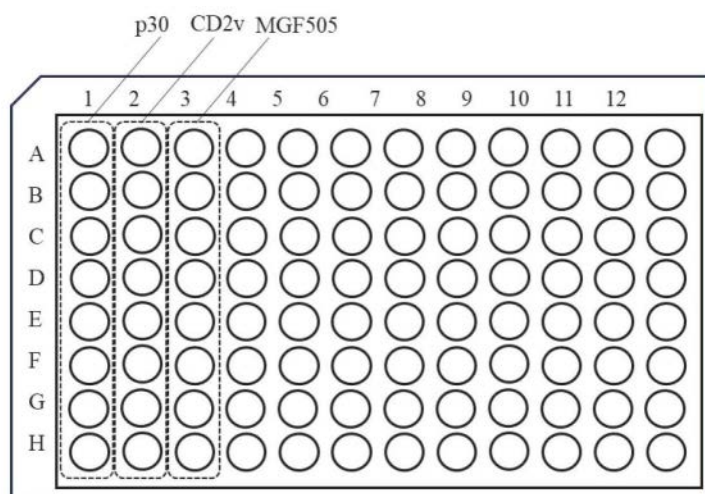


图11