

一种牛纽布病毒重组 VP1 基因、重组蛋白及其应用

技术领域

本发明属于基因工程技术领域，具体涉及一种牛纽布病毒重组 VP1 基因、重组蛋白及其应用。

背景技术

Nebovirus (NeV) 是杯状病毒科 (*Caliciviridae*) 纽布病毒属 (*Nebovirus*) 的唯一成员，为无囊膜的单股正链 RNA 病毒，目前尚无 NeV 分离培养体系，但通过排除了其他病毒的含 NeV 腹泻粪便无菌处理后感染新生无菌小牛，引起肠道损伤（尤其在十二指肠和空肠最严重）和严重腹泻，证明其是致腹泻病毒。目前该病毒已在巴西，意大利，美国等 12 个国家的犊牛腹泻粪便样本中检出，检出率为 3.0%~25.2%。本实验室证实，在国内奶牛和牦牛中存在的 NeV 是国内致牛腹泻的新发病毒；本实验室进一步对新疆维吾尔自治区、四川、辽宁、河南、山东和陕西等省的奶牛、牦牛流行病学调查结果显示，奶牛腹泻样本中 NeV 核酸平均检出率为 48.1%，显著高于健康粪便样本 5.7% 的检出率；西藏、四川和云南等省区牦牛腹泻粪便样本中 NeV 核酸平均检出率为 22.0%，场阳性检出率为 69.1%。上述结果表明该病毒已经在我国部分地区奶牛和牦牛中广泛流行且与腹泻密切相关。

VP1 是 NeV 的主要结构蛋白，由 ORF1 编码，大小为 549aa 或 548aa，由围绕 RNA 基因组形成衣壳内部的 S 结构域和从衣壳出发并包含二聚体接触的拱状突起的 P 结构域组成。P 结构域进一步分为相对保守的 P1 结构和高度突变的 P2 结构域，P2 结构域含有受体结合位点，参与受体识别并在启动宿主免疫反应中发挥重要作用。目前关于 NeV VP1 蛋白功能研究的报道仅有一篇，但对人诺如

病毒、兔出血症病毒等其它杯状病毒的研究表明，VP1 不仅参与受体结合，且诱导中和抗体产生，表明 VP1 在病毒的感染和免疫过程中起重要作用。

目前关于 NeV VP1 表达和应用的报道很少。2013 年 ThomasC 等人利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统构建 NeV VP1 的病毒样颗粒（Virus-like particles, VLPs），将其作抗原建立了检测抗体的间接 ELISA 方法；2018 年 Cho EH 等人利用 VLPs 证实 NeV 衣壳蛋白能与组织血型抗原（histo-blood group antigens, HBGAs）结合，参与受体识别。尚无操作简单、成本低廉的原核表达的 NeV VP1 蛋白制备与应用的报道。

目前对于 NeV 的筛查、检测多应用病原学检测方法如 RT-PCR，方法涉及核酸提取耗时长、操作繁复且不适合大量操作；缺乏一种用于大量筛选含有纽布病毒抗体的血清学检测方法，限制了对 NeV 及相关抗体研究的开展。

发明内容

有鉴于此，本发明旨在提供一种牛纽布病毒 VP1 基因、重组蛋白及其应用以解决上述问题。该重组蛋白特异性高，易纯化制备、成本低，可作为抗原能够简便、快速、准确的检测出待测血液样品中的纽布病毒抗体。本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明公开了一种牛纽布病毒 VP1 基因，具有 SEQ ID NO：1 所示的核酸序列。

第二个方面，本发明公开了一种牛纽布病毒重组 VP1 基因，是在 SEQ ID NO：1 所示的核酸序列基础上，在 5' 增加酶切位点 Nde I，3' 增加酶切位点 Xho I，N 端添加 His 标签；具有 SEQ ID NO：3 所示的核酸序列。

进一步地，所述 Nde I 位点序列为 CATATG，所述 Xho I 位点序列为 CTCGAG。

第三个方面，本发明还公开了一种牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白，具有如

SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

第三个方面，本发明还公开了一种可表达上述牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白的原核表达载体。

进一步地，所述的原核表达载体为 pET-28H-VP1。

第四个方面，本发明还公开了一种制备牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白的方法，包括：

(1) 提取牛纽布病毒核酸后进行 RT-PCR，拼接扩增序列，然后进行优化，在 5' 增加酶切位点 Nde I，3' 增加酶切位点 Xho I，N 端添加 His 标签，合成整个序列，得到 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列；

(2) 将步骤 (1) 得到的核酸序列与 pET-28H 载体分别酶切后连接转化 TOP10 感受态，获得重组原核表达载体；

(3) 将所得到的重组原核表达载体转化大肠杆菌表达感受态细胞，用 IPTG 于 20℃ 过夜诱导重组 VP1 基因蛋白表达，将所表达的蛋白回收并纯化即得。

第五个方面，本发明还公开了上述牛纽布病毒重组 VP1 基因或牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白在制备牛纽布病毒抗体检测试剂盒中的应用。

第六个方面，本发明公开了一种牛纽布病毒抗体检测试剂盒，包括上述牛纽布病毒重组 VP1 基因或牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白。

第七个方面，本发明还公开了一种非诊断目的的牛纽布病毒抗体的间接 ELISA 检测方法，包括以下步骤：

(1) 包被抗原：将上述的重组 VP1 蛋白作为抗原，包被于酶标板中，4℃ 过夜；

(2) 洗涤酶标板：次日弃去包被液，用 PBST 洗涤多次；

(3) 封闭：加入封闭液于 37℃ 封闭 30min~2h；

(4) 洗涤酶标板：弃去封闭液，用 PBST 洗涤多次；

说明书

(5) 孵育一抗：将阴性和阳性血清分别稀释后加入酶标板中，37℃孵育 30min~2h；

(6) 洗涤酶标板：弃去板中的液体，用 PBST 洗涤多次；

(7) 酶标二抗：将 HRP 标记的兔抗牛 IgG 稀释后于 37℃酶标 30min~2h；

(8) 洗涤酶标板：弃去板中的液体，用 PBST 洗涤多次；

(9) 显色：加入 TMB 显色液，37℃避光显色 10~30 min；

(10) 终止：加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应；

(11) 读数：在酶标仪上读取 D_{450nm} 值；试验设标准阳性、标准阴性血清对照。

进一步的，所述步骤（1）中包被的控制参数为：采用的包被液为磷酸盐、碳酸盐或 Tris-HCl 缓冲液中的一种，抗原的包被浓度为 0.5-2 μg/ml。

优选地，所述步骤（1）中包被的控制参数为：采用的包被液为 pH7.6 的磷酸盐缓冲液，抗原的包被浓度为 0.5μg/ml。

优选地，所述步骤（2）中封闭液为 4%PEG6000，封闭时间为 30min。

优选地，所述步骤（5）中稀释阴性和阳性血清采用 1% BSA，稀释度均为 1:750，孵育时间为 1h。

优选地，所述步骤（7）中稀释兔抗牛 IgG 采用 1% BSA，稀释度为 1:4500，酶标时间为 1h。

优选地，所述步骤（9）中显色时间为 25min。

进一步地，所述步骤（11）中采用的标准阳性血清为牛纽布病毒阳性血清，标准阴性血清为胎牛标准阴性血清。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1) 成本低：原核表达系统比真核系统更廉价。

2) 易于推广：原核表达使用的试剂材料容易获得，且无需特殊仪器，在所有实验室均可操作，同时生产周期短，易于形成产业化的规模，适合推广使用。

3) 更省时：本发明的表达菌株培养方式简单，培养周期短，可在几天时间内合成大量重组蛋白。

4) 更高效：原核表达系统可以短期内获得大量优良的重组蛋白。抗原蛋白通过原核表达系统表达成包涵体，包涵体在变性条件下纯化，然后复性再折叠，再经过自我组装等过程而有效制备，弥补了原核表达系统缺少像真核系统重组蛋白表达后的修饰能力、不能产生正确的二硫键的缺点，同时缩短了重组蛋白的表达时间、提高了重组蛋白的生产效率。

5) 更方便：在构建表达载体时，目的基因通常由临床样本或实验室培养物中直接扩增后克隆转化，扩增受样本处理方式和核酸浓度影响大同时需要一对可完全扩增目的基因的引物。本发明在已知基因序列的情况下，利用生物软件对基因序列进行了大肠杆菌偏爱密码子优化，将改造后的序列全序列合成，无需单独设计完全扩增目的基因的引物，避免了直接从临床样本或实验室培养物中扩增的对实验进程的影响，同时也便于对序列进行表达系统相应偏爱密码子优化和改造，有利于提高重组蛋白在表达系统中的产量和表达效率。

6) 更安全：本发明是非复制型的，在机体内不增殖，不存在散毒危险。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限

定。在附图中：

图 1 是本发明牛纽布病毒重组 VP1 基因的重组表达质粒 pET-28H-VP1 鉴定结果，其中 M 表示 DNA 标准 DL2000，1 表示基因扩增产物。

图 2 是本发明牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白表达形式分析结果，其中 M 表示蛋白分子质量标准，1 表示诱导前总蛋白，2 表示 20℃ 上清，3 表示 20℃ 沉淀，4 表示 37℃ 上清，5 表示 37℃ 沉淀。

图 3 是本发明纯化的牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白 SDS-PAGE 电泳结果，其中 M 表示蛋白分子质量标准，1 表示上样液，2 表示流出液，3 表示 20mmol/L Imidazole 洗脱组分，4 表示 50mmol/L Imidazole 洗脱组分，5 表示 500mmol/L Imidazole 洗脱组分。

图 4 是本发明牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白的 Western blot 检测结果，其中 M 表示蛋白分子质量标准，1 表示 VP1 蛋白。

图 5 是本发明间接 ELISA 检测方法灵敏度试验结果图。

具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

本实施例提供一种制备牛纽布病毒重组 VP1 基因蛋白的方法，包括以下步骤：

说 明 书

1、VP1 基因的扩增：取适量由西南民族大学动物医学实验室保存的牛纽布 BO/LN-13/18/CH 株病毒（GenBank 登录号 MH718898）核酸阳性的粪便样本，按常规方法提取总 RNA 并反转录合成 cDNA，进行 RT-PCR 扩增，利用生物软件将基因片段拼接，获得一个完整的 VP1 基因的 ORF 序列，大小为 1647bp，其核酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，编码 549 个的氨基酸，其氨基酸序列由 SEQ ID NO: 2 所示。

2 将获得的 VP1 基因序列进行优化，在不改变任何氨基酸情况下，使其密码子偏爱性接近大肠杆菌，优化后的 VP1 编码基因如 SEQ ID No: 3 所示，在其 5' 增加酶切位点 Nde I，3' 增加酶切位点 Xho I，N 端添加 His 标签，然后将序列送至引物合成公司合成，Nde I 和 Xho I 位点序列为 CATATG 和 CTCGAG。将合成的序列作为模板 Nde I 和 Xho I 双酶切后，与同样经过 Nde I 和 Xho I 双酶切的 pET-28H 载体连接转化 TOP10 感受态。挑单克隆菌落，菌落 PCR 鉴定阳性克隆送测序。其核酸序列如 SEQ ID NO.3 所示，符合预期。证明成功获得了 pET-28H-VP1 表达质粒（如图 1 所示）。

3、pET-28H-VP1 表达质粒转化 BL21 (DE3)，涂布 LB 固体培养基（含卡那霉素 30ug/ml），于恒温培养箱中 37℃ 过夜培养。次日，挑单克隆菌落接入 10mL LB 液体培养基（含卡那霉素 30ug/ml）中，37℃ 振摇培养 10h。

4、次日，菌种以 1:100 接入 200mL LB 液体培养基（含卡那霉素 30ug/ml），37℃ 振摇培养至 OD 约为 0.6~0.8 时，加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG，一组 20℃ 诱导过夜，另一组 37℃ 诱导 6h，同时以不添加 IPTG 组作为阴性对照。离心收集菌体，以 PBS 1:100 (W/V) 重悬，超声破碎、离心后分别收集上清和沉淀，沉淀用包涵体溶解液（8mol/L Urea，50mmol/L Tris-HCl，300mmol/L NaCl，pH8.0）1:20 (W/V) 溶解，以 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析，结果显示 VP6 融合蛋白以包涵体形式表达（如图 2 所示）。

5、大量诱导表达 NeV VP1 重组蛋白，制备包涵体溶解液，按照镍琼脂糖亲和层析蛋白纯化说明书使用方法以 5mL HisCap 6FF 镍离子纯化柱进行纯化，以

12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳（如图 3 所示）。收集到的组分进行 SDS-PAGE 检测后，纯度最好的几组分经 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、0mol/L 尿素梯度透析复性，最终透析至 50mmol/L Tris，300mmol/L NaCl，pH8.0 溶液中，经过 PEG20000 浓缩，0.45 μ m 滤膜过滤后分装 1mL/管，-80℃冻存，按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书使用方法进行复性后重组蛋白的浓度测定。

6、取纯化后的重组蛋白样品，以 12%的分离胶进行 SDS-PAGE，然后将重组蛋白转移至硝酸纤维素膜，用 5%脱脂牛奶进行封闭过夜处理；分别加入 1:500 倍稀释的牛 NeV 阳性血清和胎牛血清，37℃摇床孵育 2h，TBST 洗涤 3 次，10 min/次；加入 1:5000 倍稀释的 HRP 标记的兔抗牛二抗，37℃摇床孵育 1h，TBST 洗涤 3 次后进行 ECL 显色（如图 4 所示），结果显示目的蛋白约 60kD，能被 NeV 阳性血清所识别，证明重组 VP1 蛋白具有生物活性和良好的免疫原性。

实施例 2

本实施例提供一种非诊断目的的牛纽布病毒抗体的间接 ELISA 检测方法，包括以下步骤：

1 ELISA 操作流程

将本发明重组 VP1 蛋白用 50mmol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液稀释后包被于酶标板中，100 μ L/孔，4℃过夜。次日弃去包被液，用 PBST 洗涤 3 次，200 μ L/孔。加入 2%牛血清白蛋白（BSA）作为封闭液，100 μ L/孔，7℃ 1h。弃去包被液，洗涤 3 次后将阴性和阳性血清用 1% 牛血清白蛋白（BSA）分别按比例稀释后加入酶标板中，100 μ L/孔，37℃ 1h。弃去板中的液体，洗涤 3 次后加入用 1% 牛血清白蛋白（BSA）按一定比例稀释的 HRP 标记的兔抗牛 IgG，100 μ L/孔，37℃ 1h。弃去板中的液体，洗涤 3 次后加入 TMB 显色液，100 μ L/孔，37℃避光显色 20 min，然后加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应，100 μ L/孔，在酶标仪上读取 OD_{450nm} 值，阳性对照的 OD_{450nm} 读值记为 P，阴性对照的 OD_{450nm} 读值记为 N。

2 重组蛋白包被浓度的确定

纯化的重组蛋白稀释浓度为 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/mL}$, 阴性和阳性血清 1:1000 倍稀释, 兔抗牛 IgG HRP 酶标抗体 1:4000 稀释, 其余按 **ELISA 操作流程**操作, 在酶标仪上读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。结果见表 1, 以 P/N 最大作为优选依据, 确定最适重组蛋白包被浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 抗原包被浓度筛选结果

包被浓度	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
0.5 $\mu\text{g/mL}$	2.930	2.981	2.956	0.069	0.068	0.069	42.841
1 $\mu\text{g/mL}$	3.156	3.183	3.170	0.100	0.098	0.099	32.015
2 $\mu\text{g/mL}$	3.450	3.400	3.425	0.128	0.140	0.134	25.560

注: 阳性对照的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 读值记为 P, 阴性对照的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 读值记为 N, P1、P2 和 N1、N2 为同一样本平行试验结果, 下表同。

3 方阵法确定待检血清最适工作浓度和酶标抗体最佳稀释度

以最佳抗原包被量包被酶标板, 将血清按 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1250 稀释, 酶标二抗按 1:3000, 1:3500, 1:4000, 1:4500, 1:500, 1:5500 稀释, 其他按照优化后条件进行操作, 在酶标仪上读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。结果见图, 以 P/N 最大作为优选依据, 确定血清稀释浓度为 1:750, HRP 标记的酶标二抗稀释浓度为 1:4500 (见表 2)。

表 2 一抗和酶标二抗最适工作浓度筛选结果

一抗稀释 比例	$\text{OD}_{450\text{nm}}$	酶标二抗稀释比例				
		1:3000	1:3500	1:4000	1:4500	1:5000
1:500	P	3.942	3.871	3.806	3.477	3.264
	N	0.179	0.151	0.145	0.130	0.121
	P/N	22.022	25.636	26.248	26.746	26.950

说 明 书

	P	3.782	3.516	3.457	2.985	2.684
1:750	N	0.167	0.14	0.129	0.107	0.100
	P/N	22.647	26.239	26.798	27.897	26.840
	P	3.696	3.479	3.229	2.922	2.579
1:1000	N	0.158	0.132	0.133	0.110	0.106
	P/N	23.392	26.492	24.278	26.564	24.330
	P	3.467	3.358	3.206	2.654	2.452
1:1250	N	0.152	0.138	0.127	0.128	0.108
	P/N	22.809	24.333	25.244	20.734	22.7044

4 包被液、封闭液、血清稀释液的优化

50mmol/L pH 7.6 的磷酸盐缓冲液、用 50mmol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液、50mmol/L pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液和作为包被液；4% PEG6000、1%牛血清白蛋白(BSA)、2%牛血清白蛋白(BSA)、PBS 和 5%脱脂乳作为封闭液；1%BSA, PBS, PBST, 4% PEG6000 作为血清稀释液，其他按照优化后条件分别进行操作，在酶标仪上读取 OD_{450nm} 值。结果见表 3、表 4、表 5，以 P/N 最大作为优选依据，50mmol/L pH 7.6 磷酸盐缓冲液作为包被液，4% PEG6000 作为封闭液，1% BSA 为血清稀释液。

表 3 包被液筛选结果

包被液	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
磷酸盐	3.183	3.124	3.154	0.078	0.077	0.078	40.436
碳酸盐	2.885	2.828	2.857	0.083	0.080	0.082	34.841
Tris-HCl	2.691	2.686	2.689	0.071	0.064	0.068	39.544

表 4 封闭液筛选结果

--	--

说 明 书

封闭液	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
4%PEG6000	3.329	3.383	3.356	0.099	0.085	0.092	36.478
1%BSA	3.237	3.207	3.222	0.094	0.090	0.092	35.022
2%BSA	3.254	3.057	3.156	0.089	0.094	0.092	34.304
PBS	3.251	3.338	3.295	0.092	0.089	0.091	36.209
5%脱脂乳	3.120	3.090	3.105	0.650	0.545	0.598	5.192

表 5 血清稀释液筛选结果

稀释液	P1	P2	P	N1	N2	N	P/N
1%BSA	3.294	3.247	3.271	0.064	0.065	0.065	50.315
PBS	2.338	2.301	2.320	0.059	0.059	0.059	39.314
PBST	1.916	1.945	1.931	0.070	0.068	0.069	27.978
4%PEG6000	2.245	2.455	2.350	0.060	0.060	0.060	39.167

5 包被条件的选择

包被条件分别按 37℃ 2h 后 4℃过夜, 37℃ 1h 后 4℃过夜, 4℃过夜, 37℃ 2h, 37℃ 1h, 其他按照优化后条件进行操作, 在酶标仪上读取 OD_{450nm} 值。结果见表 6, 以 P/N 最大作为优选依据, 包被条件为 4℃过夜。

表 6 包被时间筛选结果

	37℃ 2h 后 4℃过夜		37℃ 1h 后 4℃过夜		4℃过夜		37℃ 2h		37℃ 1h	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	2.964	0.068	2.858	0.063	2.852	0.057	2.686	0.064	2.579	0.067
复孔 2	2.855	0.063	2.702	0.068	2.856	0.063	2.691	0.071	2.403	0.072

说 明 书

平均值	2.910	0.066	2.780	0.066	2.854	0.060	2.689	0.068	2.491	0.070
P/N	44.420		42.443		47.567		39.830		35.842	

6 封闭时间、血清温育时间、酶标抗体结合时间的选择

封闭时间设为 30min, 60min, 90min 和 120 min; 血清温育时间分别设为 30min, 60min, 90min 和 120 min; 酶标抗体作用时间分别设为 30min, 60min, 90min 和 120 min, 其他按照优化后条件分别进行操作, 在酶标仪上读取 OD_{450nm} 值。结果见表 7-9, 以 P/N 最大作为优选依据, 封闭时间为 30min, 血清温育时间为 1h, 酶标抗体结合时间为 1h。

表 7 封闭时间筛选结果

	30min		60min		90min		120min	
	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	3.534	0.091	3.237	0.090	2.298	0.072	3.003	0.078
复孔 2	3.419	0.089	3.207	0.089	2.227	0.072	3.010	0.077
平均值	3.477	0.090	3.222	0.090	2.263	0.072	3.007	0.078
P/N	38.628		35.800		31.431		38.551	

表 8 血清温育时间筛选结果

	30min		60min		90min		120min	
	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	2.985	0.057	3.294	0.064	3.488	0.071	3.644	0.073
复孔 2	2.835	0.059	3.247	0.065	3.320	0.070	3.635	0.074
平均值	2.910	0.058	3.271	0.065	3.404	0.071	3.640	0.074
P/N	50.172		50.705		48.284		49.517	

说明书

表 9 酶标抗体结合时间筛选结果

	30min		60min		90min		120min	
	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	1.964	0.081	3.268	0.118	3.563	0.149	3.617	0.210
复孔 2	2.105	0.079	3.069	0.109	3.424	0.147	3.540	0.234
平均值	2.035	0.080	3.169	0.114	3.494	0.148	3.579	0.222
P/N	25.431		27.798		23.605		16.122	

7 显色作用时间的选择

显色作用时间分别设为 15min, 20min, 25min, 30 min, 其他按照优化后条件进行操作, 在酶标仪上读取 OD_{450nm} 值。结果见表 10, 以 P/N 最大作为优选依据, 底物作用时间为 25min。

表 10 显色作用时间筛选结果

	10min		15min		20min		25min		30min	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
复孔 1	2.135	0.086	2.620	0.096	3.268	0.118	3.283	0.098	3.239	0.104
复孔 2	1.985	0.086	2.621	0.096	3.067	0.109	3.108	0.101	3.039	0.102
平均值	2.060	0.086	2.621	0.096	3.168	0.114	3.196	0.100	3.139	0.103
P/N	23.593		27.297		27.907		32.116		30.476	

优化后的 ELISA 检测程序如下: 纯化的重组蛋白用 50mmol/L pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液稀释为 0.5μg/mL 后包被于酶标板中, 100 μL/孔, 4℃包被过夜。弃去包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 200 μL/孔。加入 4%PEG6000, 37℃封闭 30min,

说明书

100 μ L/孔，弃去包被液，洗涤 3 次后将阴性和阳性血清用 1%BSA 分别按 1:750 比例稀释后加入酶标板中，100 μ L/孔，37℃ 1h。弃去板中的液体，洗涤 3 次后加入用 1%BSA 按 1:4500 稀释的 HRP 标记的兔抗牛 IgG，100 μ L/孔，37℃ 1h。弃去板中的液体，洗涤 3 次后加入 TMB 显色液，100 μ L/孔，37℃ 25 min，然后加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应，100 μ L/孔。

8 间接 ELISA 阴、阳性临界值的确定

42 份 BCoV 阴性血清样品中，用已建立的间接 ELISA 方法检测，求得这些样品的 D_{450nm} 的平均值(X)和标准差(s)，如果样品 D_{450nm}>X+3S，即判定为阳性；计算出 OD_{450nm} 值的平均值(X)为 0.124，标准差(S)为 0.029，则 X+3S=0.211。因此，在酶标仪上测定的 OD_{450nm}>0.211 者判为阳性，OD_{450nm}<0.211 者判为阴性。

9 特异性试验

将包被好的酶标板分别加入牛冠状病毒（BCoV）、牛轮状病毒（BRV）、牛病毒性腹泻粘膜病毒（BVDV）、牛肠道病毒（BEV）、牛衣原体（CVM）的阳性血清为待检样品，同时分别设牛冠状病毒阳性和阴性血清对照，每种样品做 2 个重复，依据 OD_{450nm}<0.211 者为无交叉反应。本次试验中待检样品的 OD 值均小于为 0.211（表 11），说明重组 VP1 蛋白用作包被抗原建立的间接 ELISA 抗体检测方法具有良好的特异性，与牛冠状病毒、牛病毒性腹泻粘膜病毒、牛肠道病毒、牛衣原体、牛结核分枝杆菌无交叉反应。

表 11 特异性实验结果

待检血清	BCoV	BRV	BVDV	BEV	CVM
复孔 1	0.055	0.095	0.050	0.067	0.086
复孔 2	0.056	0.096	0.054	0.073	0.094

10 重复性试验

10.1 批内重复性试验 用同一批的 ELISA 板，按优化后的条件对包括阴阳性血清在内的 6 份样品进行检测，重复 4 孔，根据变异系数（CV）判定批内重复性。由表 12 可以看出同一血清各孔间的变异系数值在 **0.246%~8.128%** 之间，小于 10%，表明该方法的批内重复性良好。

10.2 批间重复性试验 在其他条件相同的情况下，用 4 次不同时间包被的反应板，对包括阴阳性血清在内的 6 份样品进行检测，根据变异系数（CV）判定批间重复性。由表 13 可以看出，批间重复试验的变异系数在 **2.729%~9.735%** 之间，小于 10%，表明不同批次包被的酶标板对同一份血清的检测结果具有较好的重复性，所建的 ELISA 检测方法的稳定性良好。

表 12 批内重复试验

	不同血清样本					
	1	2	3	4	5	6
重复 1	0.564	1.466	0.233	1.528	3.103	0.123
重复 2	0.541	1.497	0.199	1.542	3.099	0.104
重复 3	0.504	1.489	0.210	1.466	3.094	0.107
重复 4	0.524	1.592	0.212	1.464	3.112	0.105
平均值	0.533	1.511	0.214	1.500	3.102	0.110
标准差 S	0.025	0.056	0.014	0.041	0.008	0.009
变异系数 CV	4.777%	3.678%	6.651%	2.722%	0.246%	8.128%

表 13 批间重复试验

	不同血清样本					
	1	2	3	4	5	6

说明书

重复 1	1.364	0.400	1.207	0.189	2.141	0.097
重复 2	1.259	0.415	1.168	0.176	2.207	0.090
重复 3	1.206	0.402	1.191	0.176	2.343	0.113
重复 4	1.261	0.441	1.246	0.192	2.045	0.104
平均值	1.273	0.415	1.203	0.183	2.184	0.101
标准差 S	0.066	0.019	0.033	0.008	0.125	0.010
变异系数 CV	5.195%	4.554%	2.729%	4.617%	5.730%	9.735%

11 灵敏性试验

对包括阴阳性血清在内的 4 份样品从最优稀释比例开始做倍比稀释后进行检测，检测结果为阴性的阳性血清的稀释倍数越大，本方法的灵敏度越好。检测结果如图 5 所示，当阳性血清 1:12000 稀释时，3 份阳性血清检测结果仍为阳性，表明所建立的方法灵敏度高，具有较好的敏感性。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。