



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106841636 A

(43)申请公布日 2017.06.13

(21)申请号 201710054451.7

(22)申请日 2017.01.24

(71)申请人 北京美正生物科技有限公司

地址 102101 北京市延庆县风谷四路8号院
2号楼一层(中关村延庆园)

(72)发明人 张彦明

(51)Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

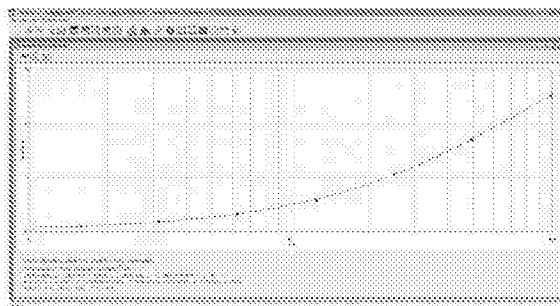
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫吸附
试剂盒及其制备方法和用途

(57)摘要

本发明描述了一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫试剂盒及其制备方法,属于分析测试领域。该试剂盒包括:由结合珠蛋白单克隆抗体包被的酶标板、结合珠蛋白抗原标准品、结合珠蛋白单克隆抗体、酶标记的羊抗鼠抗体、稀释液、洗涤液、显色液及终止液。通过双抗体夹心间接酶联免疫吸附分析方法测定牛奶中的结合珠蛋白含量。以此检测奶牛隐性乳房炎。本发明操作简便,具有特异性高、灵敏度好、重现性好的特点,为奶牛隐性乳房炎检测提供了新的测试工具。



1. 一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:
用牛结合珠蛋白HP抗体包被的酶标板
牛结合珠蛋白HP标准品
标准品稀释液
牛结合珠蛋白HP抗体
酶标记的羊抗鼠IgG抗体
洗涤液
底物
显色剂
终止液。
2. 根据权利要求1所述的酶标板,其特点在于酶标板的材质为聚苯乙烯微孔板。
3. 根据权利要求1所描述的酶标板,其特征在于酶标板制备方法包括以下步骤
包被:将牛结合珠蛋白抗体用PH6-8的0.01-0.05M PBS缓冲液稀释,终浓度为1-50ug/
mI,按照每孔100-300uI的量加入到酶标板的微孔中,在37℃孵育1-4小时或者4℃孵育过夜
洗涤:用0.01-0.05M的PBS缓冲液,加入0.1%的Tween20洗涤酶标板3-5次
封闭:在上述酶标板中每孔加入300uI封闭液(10%小牛血清或者3%脱脂奶粉)室温封闭
1-3小时
洗涤:用0.01-0.05M,PH6-8的PBS缓冲液加入0.1%Tween20缓冲液洗涤酶标板3-5次
干燥:在20-37℃干燥5-10小时,使酶标板干燥。
4. 根据权利要求3所描述的酶标板制备方法,其特征在于,包被酶标板的牛结合珠蛋白
抗体可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,其中优选单克隆抗体。
5. 根据权利要求1所描述的牛结合珠蛋白标准品,其特征在于所用的牛结合珠蛋白可
以是天然的牛结合珠蛋白也可以是重组表达的牛结合珠蛋白。
6. 根据权利要求5所描述的天然或者重组表达的牛结合珠蛋白,其特征在于,牛结合珠
蛋白的基因对应GeneBank ID NM_001040470.2对应的基因序列。
7. 根据权利要求1所描述的标准品稀释液,其特征在于标准品稀释液为浓度为0.01-
0.05M,PH6-8的磷酸缓冲液PBS,其中优选0.01MPH7.4的磷酸缓冲液。
8. 根据权利要求1所描述的牛结合珠蛋白HP抗体,其特征在于抗体可以是单克隆抗体
也可以是多克隆抗体,其中优选单克隆抗体。
9. 根据权利要求1所描述的酶标记的羊抗鼠IgG抗体,其特征在于酶可以是辣根过氧化
物酶HRP或者碱性磷酸酶AP,其中优选辣根过氧化物酶HRP。
10. 根据权利要求1所描述的洗涤液,其特征在于洗涤液为含有表面活性剂的磷酸盐缓
冲液,更具体的,洗涤液为含有0.1%Tween20的磷酸缓冲液。
11. 根据权利要求1中所描述的底物,其特征在于底物为过氧化物,更具体的,底物为
H2O2或者其氧化物,优选1mg/mI的过氧化氢脲。
12. 根据权利要求1中所描述的显色剂,其特征在于显色剂为0.1—0.3mg/mI的四氨基
联苯胺溶液。
13. 根据权利要求1中所描述的终止液,其特征在于终止液为2M的H2SO4。
14. 一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫试剂盒的用途,其特征在于检测牛奶中的牛

结合珠蛋白浓度,并以此检测奶牛的隐性乳房炎。

一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫吸附试剂盒及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明描述了一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫吸附检测试剂盒,用于检测奶牛的隐性乳房炎。属分析测试领域。

背景技术

[0002] 乳房炎(Mastitis)是奶牛最常见、最多发、导致经济损失最严重的疾病之一,并危害着人类健康,这是因为乳房炎奶牛的乳汁中往往含有大量病原微生物、毒素或治疗后残留的抗生素,食用后可引起发热、呕吐、腹泻及过敏等不良反应。随着我国奶牛业和乳品工业的发展及人类对公共健康的重视,奶牛乳房炎的危害已引起人们的广泛关注和高度重视。

[0003] 乳房炎不仅使奶牛产奶量显著下降而造成严重经济损失,还可导致乳汁成分发生改变,使牛奶的营养价值和食用价值显著下降。

[0004] 奶牛乳房炎分为临床型乳房炎和隐性乳房炎。临床型乳房炎会导致牛奶分泌大幅度下降,严重时奶牛甚至完全不能泌乳。隐性乳房炎发病率高,作用时间更长,而且长期潜伏在牛群中不易诊断。奶牛日产奶量与隐性乳房炎发病程度呈显著负相关,因此隐性乳房炎实际上比病例数较少的临床型乳房炎造成的经济损失更大。

[0005] 美国国家乳房炎委员会(National Mastitis Council,NMC)1996年的调查数据显示每年全世界约三分之一的奶牛感染乳房炎,其直接经济损失达20亿美元,而仅加拿大一个国家,奶牛乳房炎造成的直接经济损失就达到了7亿英镑。同时,乳房炎被列为淘汰奶牛的主要原因,美国淘汰奶牛的26.5%是因为患乳房炎,在芬兰、挪威、瑞典因奶牛乳房健康问题分别淘汰了奶牛的35%、19%和22%。我国目前奶牛存栏数为600万~700万头,主要集中在黑龙江、内蒙古及河北等地区,调查表明,奶牛乳房炎在我国的发病率达70%~80%,每年造成的直接经济损失约为30亿元人民币。

[0006] 目前检测奶牛隐性乳房炎主要是依靠检测牛奶中的体细胞数来进行,即牛奶SCC。牛奶体细胞数是目前衡量奶牛乳房炎的常用标准。其原理是当奶牛的泌乳系统受到各种细菌的侵袭而发生感染和损伤时,由于机体的免疫机制,血液中承担排除感染和修复任务的白细胞就会穿越毛细血管壁和乳腺泡壁层,进入腺泡腔而进入乳汁中,引起乳汁中体细胞总数的升高。因此,可通过乳汁SCC的变化来判断是否是隐性乳房炎。

[0007] 但是牛奶体细胞数的变化受到很多因素的影响,如年龄、泌乳期、昼夜、挤奶过程、病原菌感染等。导致目前的体细胞检测不能完全诊断奶牛乳房炎。

[0008] 近年来的研究发现,感染、创伤、炎症等应激原作用于动物机体,造成机体稳态失衡,会引起一系列反应,如发热、负氮平衡、白细胞增多、促肾上腺皮质激素和糖皮质激素分泌增多、补体系统和凝集系统激活、血清微量元素浓度改变及一些血浆蛋白浓度的改变等。在应激刺激下所产生变化的蛋白即为急性期蛋白(Acute Phase Protein,APP),又叫急性期反应物或应激敏感蛋白质。

[0009] 在奶牛发生隐性乳房炎时,急性期蛋白APP浓度会发生急剧变化。因此急性期蛋白APP作为奶牛乳房炎的生物标记物,成为继乳汁体细胞数之后,另一种奶牛乳房炎的诊断标准。

[0010] 奶牛发生乳房炎后,在各种致炎因子作用下,肝脏迅速合成 APP,其浓度在血清和乳汁中都会上升,其中最显著的是牛血清珠蛋白HP。通过分析牛奶中血清珠蛋白HP的含量直接反应奶牛乳房的炎症状态。

[0011] 血清珠蛋白HP 是血清 α -球蛋白组分中的一种酸性糖蛋白,广泛存在于哺乳动物的血清及其他体液中,其分子量约为 125kDa,由 16 到 23kDa 的 α 链和 35 到 40kDa 的 β 链组成。在奶牛血清中,HP 常和白蛋白结合成聚合体,分子量达到 1000~2000kDa。人类 HP 在遗传多态现象中表现为 3 个亚型,犬类 HP 与人类 HP1-1亚型相似,牛 HP 则与人类 HP2-2亚型相似。HP 最重要的诊断意义在于反刍动物 HP 在健康状态的血清中几乎是不存在的,只有在发生 APR 时才会产生,所以 HP 是反刍动物的主要 APP。健康奶牛的血清HP 浓度低于 20mg/L,而感染乳房炎 2 天内,即可升高到 2g/L。

[0012] 目前对于牛奶中血清珠蛋白HP的检测还没有有效的方法。本发明描述了一种酶联免疫吸附试剂盒,用于测定牛奶中血清珠蛋白的浓度,进而为奶牛隐性乳房炎诊断提供依据。

发明内容

[0013] 本发明提供了一种酶联免疫吸附试剂盒及其制备方法,用于测定牛奶中血清珠蛋白的浓度,进而为奶牛隐性乳房炎诊断提供依据

为解决上述技术问题,本发明提供了一种酶联免疫吸附试剂盒,该试剂盒包括:

- 1) 用牛结合珠蛋白HP抗体包被的酶标板
- 2) 牛结合珠蛋白HP标准品
- 3) 标准品稀释液
- 4) 牛结合珠蛋白HP抗体
- 5) 酶标记的羊抗鼠IgG抗体
- 6) 洗涤液
- 7) 底物
- 8) 显色剂
- 9) 终止液。

[0014] 该试剂盒通过下述方法获得

1. 牛结合珠蛋白基因(GeneBank ID NM_001040470.2)通过PCR扩增后,克隆到表达载体PET28中,将其转化大肠杆菌BL21后,通过IPTG诱导表达,得到重组的牛结合珠蛋白HP

2. 将重组的牛结合珠蛋白纯化后HP,免疫小鼠,通过细胞融合和筛选后,制备得到HP的单克隆抗体

3. 利用纯化的牛结合珠蛋白单克隆抗体和重组牛结合珠蛋白抗原通过下述方法制备酶联免疫试剂盒

- 1) 包被有牛结合珠蛋白抗体的酶标板制备
- w 包被

将牛结合珠蛋白抗体用PH6-8的0.01-0.05M PBS缓冲液稀释,终浓度为1-50ug/ml,按照每孔100-300uI的量加入到酶标板的微孔中。在37℃孵育1-4小时或者4℃孵育过夜;

w 洗涤

用0.01-0.05M的PBS缓冲液,加入0.1%的Tween20洗涤酶标板3-5次;

w 封闭

在上述酶标板中每孔加入300uI封闭液(10%小牛血清或者3%脱脂奶粉)室温封闭1-3小时;

w 洗涤

用0.01-0.05M,PH6-8的PBS缓冲液加入0.1%Tween20缓冲液洗涤酶标板3-5次;

w 干燥

在20-37℃干燥5-10小时,使酶标板干燥。干燥后就得到包被有牛结合珠蛋白抗体的酶标板

2) 标准品稀释液配制

配制0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS,调节PH至PH7.4

3) 牛结合珠蛋白HP标准品配制

将重组表达纯化的牛结合珠蛋白用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,配制终浓度为10ug/ml的牛结合珠蛋白标准品

4) 牛结合珠蛋白抗体配制

牛结合珠蛋白单克隆抗体用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,配制终浓度为10ng/ml的牛结合珠蛋白标准品

5) 酶标记的羊抗鼠IgG抗体配制

将HRP标记的羊抗鼠IgG用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4做1:10000稀释

6) 洗涤液配制

在0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4中加入0.1%的Tween20

7) 底物液配制

过氧化氢脲用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,终浓度为1mg/ml

8) 显色液配制

四氨基联苯胺TMB用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,终浓度为0.1mg/ml,使用前底物液和显色液1:1混合,配制显色底物

9) 终止液配制

2moI/L H2SO4。

[0015] 该试剂盒使用方法如下:

1. 结合珠蛋白标准品配制

w 取6支离心管,编号A、B、C、D、E和F;

w 管F中取900μL标准品稀释液,加入100μL 试剂盒中的结合珠蛋白标准品(10ug/ml)混匀,配制1ug/ml标准品;

w 管E中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品F,混匀,作1:2稀释,配制成校准品E;

w 管D中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品E,混匀,作1:2稀释,配制成校准品D;

w 管C中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品D,混匀,作1:2稀释,配制成校准品C;

- w 管B中取500 μ L标准品稀释液,加入500 μ L校准品C,混匀,作1:2稀释,配制成校准品B;
w 管A中取500 μ L标准品稀释液,加入500 μ L校准品B,混匀,作1:2稀释,配制成校准品A;
w 以标准品稀释液作为标准品0,即空白标准品。共配制成6个浓度标准品系列

2. 从铝箔袋中取出所需数量的结合珠蛋白HP抗体包被的酶标板板条,装至微孔板架上。标准品0、A、B、C、D、E和F各2孔,其余各孔为待测样品,轻轻振荡微孔板,使内容物充分混匀

3. 用封板膜将微孔板密封,置37 $^{\circ}$ C温育60分钟

4. 弃去微孔板反应孔内液体,每孔加入350 μ L工作浓度洗涤液,然后将洗涤液弃去。重复洗板共5次,最后拍干

5. 每孔加牛结合珠蛋白抗体100 μ L,用封板膜将微孔板密封,置37 $^{\circ}$ C温育30分钟

6. 弃去微孔板反应孔内液体,每孔加入350 μ L工作浓度洗涤液,然后将洗涤液弃去。重复洗板共5次,最后拍干

7. 每孔加入酶标记的羊抗鼠IgG抗体100 μ I,置37 $^{\circ}$ C温育30分钟

8. 弃去微孔板反应孔内液体,每孔加入350 μ L工作浓度洗涤液,然后将洗涤液弃去。重复洗板共5次,最后拍干

9. 每孔加底物缓冲液和显色剂各50 μ L,用封板膜将微孔板密封,置室温(18~30 $^{\circ}$ C)避光温育30分钟

10. 每孔加终止液50 μ L,轻轻振荡微孔板,使内容物充分混匀

11. 终止反应后1小时内,用酶标仪在450nm波长处,测定各孔吸光度值,参考波长选择620-700nm。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

1. 利用牛结合珠蛋白HP含量变化检测奶牛隐性乳房炎,不受奶牛胎次、年龄、泌乳周期、挤奶过程等影响,结果相对稳定

2. 本发明利用了抗原抗体特异性结合的原理,检测特异性好,不受牛奶中基质的影响

3. 本发明采用了酶联免疫检测方法,结果判定准确,有量化的结果。

[0017] 附图

M:蛋白质分子量标记

1:结合珠蛋白HP重组菌液

2:结合珠蛋白HP纯化穿透液

3:结合珠蛋白HP10nmol/L咪唑洗脱液

4:结合珠蛋白HP20nmol/L咪唑洗脱液

5:小鼠腹水

6:结合珠蛋白HP单克隆抗体

图1:重组牛结合珠蛋白HP表达纯化图谱

图2:牛结合珠蛋白HP单克隆抗体纯化图谱

图3:奶牛隐性乳房炎酶联免疫吸附试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0018] 实施例1:重组牛结合珠蛋白的重组表达和纯化

1. 牛结合珠蛋白 (HP) 基因克隆

利用软件对牛结合珠蛋白 (HP) 基因进行序列分析 (GeneBank ID NM_001040470.2), 设计PCR扩增引物, 扩增出HP基因, 并在两端加入酶切位点NdeI和BamHI

2. HP基因克隆至表达载体

将扩增的HP基因双酶切后, 插入表达载体pET28a中, 构建重组质粒pET28a/HP。酶切和序列测定鉴定重组质粒

3. HP基因诱导表达

将重组质粒pET28a/HP转化大肠杆菌BL21 (DE3), 筛选阳性克隆。挑取阳性单克隆接种LB kan+培养基, 37℃ 200rpm培养过夜。第二天 按照1%的接种量接种到ZYM-5052培养基中进行自诱导表达。取诱导后的菌液与不含重组质粒的菌液做对比, 检测表达情况

ZYM-5052培养基含有 1% N-Z-amine AS, 0.5% 酵母提取物, 25 mM Na₂HPO₄, 25mMKH₂po₄, 50mM NH₄Cl, 5mM NaSO₄, 2mM MgSO₄, 0.2×微量元素, 0.05%葡萄糖, 0.5%甘油以及0.2% α-乳糖

4. 重组HP蛋白的纯化

重组表达的HP蛋白采用Ni-琼脂糖凝胶亲和层析纯化, 用20mM PBS上样, 采用含有20mM和50mM咪唑的PBS洗脱结合的HP蛋白

重组表达的HP蛋白电泳图谱见图1。

[0019] 实施例2: 重组牛结合珠蛋白HP单克隆抗体的制备的制备

1. 牛结合珠蛋白HP杂交瘤细胞株建立:

用纯化的重组HP蛋白免疫BALB/C小鼠, 首次免疫用弗氏完全佐剂颈背部和腋下皮下多点注射, 加强免疫用弗氏不完全佐剂颈背部皮下、腋下及足垫注射。每隔两周采血检测抗体滴度。8周后取小鼠脾脏与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0做细胞融合。用重组的HP和灭活的LM进行间接ELISA筛选。选择强阳性细胞继续培养, 并采用有限稀释法获得能分泌抗体的单克隆。筛选得到的单克隆细胞扩增后液氮冻存保种

2. HP腹水制备和单克隆抗体纯化

杂交瘤细胞腹腔注射经液体石蜡处理过的BALB/C小鼠, 每只约 2×10^6 个细胞, 2周后收集腹水。腹水5000rpm离心10min去除细胞碎片及脂类。上清过Protein G Hitrap亲和柱。收集的抗体用BCA法检测蛋白浓度, 用SDS-PAGE电泳检测抗体纯度

电泳结果显示, 结合珠蛋白HP单克隆抗体纯度超过95%

牛结合珠蛋白单克隆抗体电泳图谱见图2。

[0020] 实施例3: 牛结合珠蛋白HP酶联免疫吸附试剂盒的制备

1. 包被有牛结合珠蛋白抗体的酶标板制备

w 包被

将牛结合珠蛋白抗体用PH6-8的0.01-0.05M PBS缓冲液稀释, 终浓度为1-50ug/ml, 按照每孔100-300uI的量加入到酶标板的微孔中。在37℃孵育1-4小时或者4℃孵育过夜

w 洗涤

用0.01-0.05M的PBS缓冲液, 加入0.1%的Tween20洗涤酶标板3-5次

w 封闭

在上述酶标板中每孔加入300uI封闭液 (10%小牛血清或者3%脱脂奶粉) 室温封闭1-3小

时

w 洗涤

用0.01-0.05M,PH6-8的PBS缓冲液加入0.1%Tween20缓冲液洗涤酶标板3-5次

w 干燥

在20-37℃干燥5-10小时,使酶标板干燥

干燥后就得到包被有牛结合珠蛋白抗体的酶标板

2. 标准品稀释液配制

配制0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS,调节PH至PH7.4

3. 牛结合珠蛋白HP标准品配制

将重组表达纯化的牛结合珠蛋白用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,配制终浓度为10ug/mI的牛结合珠蛋白标准品

4. 牛结合珠蛋白抗体配制

牛结合珠蛋白单克隆抗体用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,配制终浓度为10ng/mI的牛结合珠蛋白标准品

5. 酶标记的羊抗鼠IgG抗体配制

将HRP标记的羊抗鼠IgG用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4做1:10000稀释

6. 洗涤液配制

在0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4中加入0.1%的Tween20

7. 底物液配制

过氧化氢脲用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,终浓度为1mg/mI

8. 显色液配制

四氨基联苯胺TMB用0.01moI/L的磷酸缓冲液PBS PH7.4溶解,终浓度为0.1mg/mI,使用前底物液和显色液1:1混合,配制显色底物

9. 终止液配制

2moI/L H₂SO₄。

[0021] 实施例四:利用奶牛乳房炎酶联免疫吸附试剂盒检测牛奶中的结合珠蛋白含量

1. 牛奶样本处理

取原奶10mI,3000×g 离心20min。去除上层的乳脂。下层牛奶待检

2. 结合珠蛋白标准品配制

w 取7支离心管,编号A、B、C、D、E、F和0;

w 管F中取900μL标准品稀释液,加入100μL 试剂盒中的结合珠蛋白标准品(10ug/mL)混匀,配制1ug/mI标准品;

w 管E中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品F,混匀,作1:2稀释,配制成校准品E;

w 管D中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品E,混匀,作1:2稀释,配制成校准品D;

w 管C中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品D,混匀,作1:2稀释,配制成校准品C;

w 管B中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品C,混匀,作1:2稀释,配制成校准品B;

w 管A中取500μL标准品稀释液,加入500μL校准品B,混匀,作1:2稀释,配制成校准品A;

w 以标准品稀释液作为标准品0,即空白标准品。共配制成6个浓度标准品系列

3. 从铝箔袋中取出所需数量的结合珠蛋白HP抗体包被的酶标板板条,装至微孔板架

上。标准品0、A、B、C、D、E和F各2孔,其余各孔为待测样品,将上述处理后的牛奶样本加入待检孔。标准品与待检奶样均加入100uI,轻轻振荡微孔板,使内容物充分混匀

4. 用封板膜将微孔板密封,置37℃温育60分钟

5. 弃去微孔板反应孔内液体,每孔加入350μL工作浓度洗涤液,然后将洗涤液弃去。重复洗板共5次,最后拍干

6. 每孔加牛结合珠蛋白抗体100μL,用封板膜将微孔板密封,置37℃温育30分钟

7. 弃去微孔板反应孔内液体,每孔加入350μL工作浓度洗涤液,然后将洗涤液弃去。重复洗板共5次,最后拍干

8. 每孔加入酶标记的羊抗鼠IgG抗体100uI,置37℃温育30分钟

9. 弃去微孔板反应孔内液体,每孔加入350μL工作浓度洗涤液,然后将洗涤液弃去。重复洗板共5次,最后拍干

10. 每孔加底物缓冲液和显色剂各50μL,用封板膜将微孔板密封,置室温(18~30℃)避光温育30分钟

11. 每孔加终止液50μL,轻轻振荡微孔板,使内容物充分混匀

12. 终止反应后1小时内,用酶标仪在450nm波长处,测定各孔吸光度值,参考波长选择620-700nm

检测结果显示,两个牛奶样本中结合珠蛋白HP的含量分别为A:1200ng/mI和B:300ng/mI,按照1000ng/mI为cutoff值计算,样本A为隐性乳房炎阳性

试剂盒检测的标准曲线见图3。

actgctcttccagagccagacacaccaacgatgagcgccctgcaagctgtcgtcactctctctgctctgcgggc
agcttct
cgcggtggaaaccggcagtgaggccacagccgacagctgcccaggcccccgagattgctaatagccaatgtg
gagtact
cggttcgctatcagtgtagcaaatattacaaactgcatgctggaaatggggtgtataacttttaacaataagca
atggata
aacaaggacattggacagcaacttctgaatgtgaagaagatgacagctgcccagagcccccaagattgaaa
atggcta
cgtggagtacttggttcgctatcagtgcaaacctattacacactgcgcacctgtggagatggagtgtacacc
tttaaca
gtaagaagcagtggtataaataagaacattggacagaaactcctgaatgtgaggcagtgtaggggaagccca
gcacccc
gtggaccaggtgcagaggatcatcggtggetcattggatgccagggcagcttccctggcaggccaagatgg
tctccca
gcataacctcatctcgggagccacgctcatcaatgaacgatggctcctcaccacagctaaaaatctctacctg
ggtcaca
gtagtgacaaaaagcaaaggacatcactcctactttaagactctatgtggggaagaaccagctttagaggt
ggagaag
gtggttctccacctgaccactccaaggtagacattgggctcatcaactcagacagaaggtacctgtcaatg
acaagt
aatgcccactctgcctaccttcaaaagattatgtgaaggtgggtcgtgtgggttatgtgtctggctgggggcca
aatgaaa
acttcaactttacggagcatctgaagtatgtcatgctacctgtggctgaccaagacaagtggtgtaaacacta
tgagggc
gtcgacgcacctaaaaataagacagctaagagccccgtaggggtgcaaccatactgaatgagaacaccttct
gcgtcgg
cctgtccaagtaccaggacgacacctgctatggcgacgccggcagcgccttcgtcgttcacgacaaggaagac
gacacct
ggtatgcgcccgggatcctgagctttgacaagagctgtgctgtggctgagtatgggtgtgtacgtgaaggtgac
ctccatt
ctggactgggttcggaaaaccatcgctaacaactaaggcggggctggctaggagcagctgacctggaaggacga
ggggaaa
gctgcacaggagtggaggggacacgagtgcagtggtggcctgggtgggttccagccaataaagagcttgccttg
ccccaaa
aaaaaaaaaaaaa

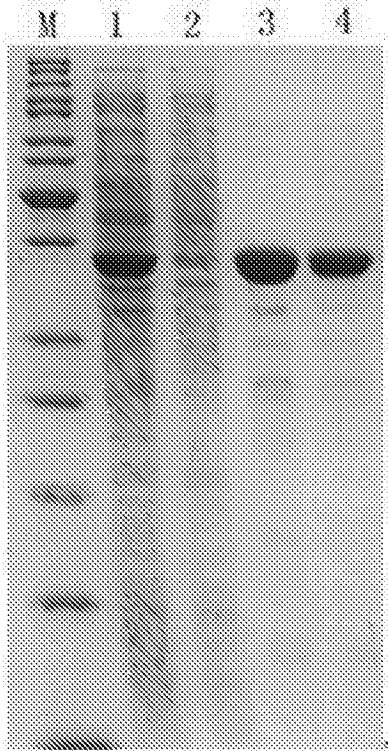


图1

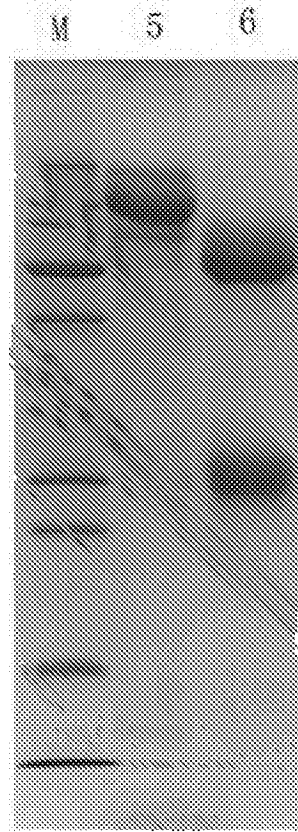


图2

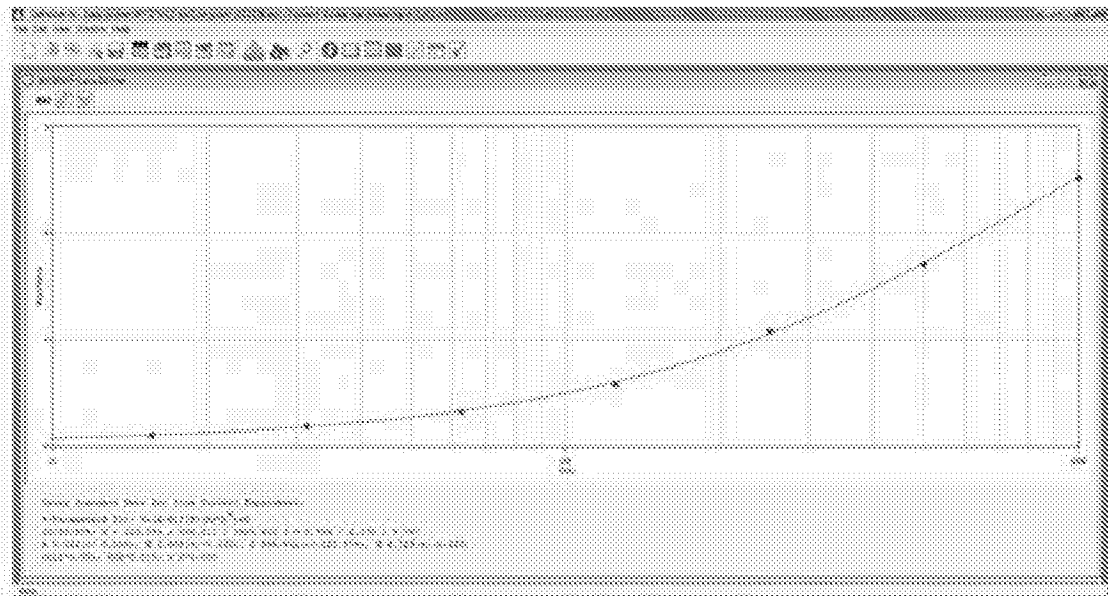


图3

专利名称(译)	一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫吸附试剂盒及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN106841636A	公开(公告)日	2017-06-13
申请号	CN201710054451.7	申请日	2017-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	北京美正生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京美正生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京美正生物科技有限公司		
[标]发明人	张彦明		
发明人	张彦明		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N2333/435		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了一种检测奶牛隐性乳房炎的酶联免疫试剂盒及其制备方法，属于分析测试领域。该试剂盒包括：由结合珠蛋白单克隆抗体包被的酶标板、结合珠蛋白抗原标准品、结合珠蛋白单克隆抗体、酶标记的羊抗鼠抗体、稀释液、洗涤液、显色液及终止液。通过双抗体夹心间接酶联免疫吸附分析方法测定牛奶中的结合珠蛋白含量。以此检测奶牛隐性乳房炎。本发明操作简便，具有特异性高、灵敏度好、重现性好的特点，为奶牛隐性乳房炎检测提供了新的测试工具。

