



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103323591 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 25

(21) 申请号 201310296845. 5

(22) 申请日 2013. 07. 16

(71) 申请人 广西壮族自治区兽医研究所

地址 530001 广西壮族自治区南宁市友爱北路 51 号

(72) 发明人 谢芝勋 谢志勤 刘加波 庞耀珊

邓显文 谢丽基 范晴 罗思思

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

C12N 15/70 (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

检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法。本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒,包括包被酶标板、阴性标准血清、阳性标准血清、抗牛 IgG 酶标二抗、洗涤液、稀释液、封闭液、底物液和终止液,其中,所述包被酶标板是用氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原包被固相载体得到的。本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒具有抗原制备工艺简单、生物安全度高、成本低廉、易于生产和应用等特点。利用本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒检测牛血清特异性强、灵敏度高、重复性好、适于大批量检测,可用于牛分枝杆菌抗体的临床检测。

1. 检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒,包括包被酶标板、阴性标准血清、阳性标准血清、抗牛 IgG 酶标二抗、洗涤液、稀释液、封闭液、底物液和终止液,其特征在于:所述包被酶标板是用氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原包被固相载体得到的。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述包被酶标板按照包括如下步骤的方法制备:将氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原用包被缓冲液配制成  $8\mu\text{g/mL}$  的溶液作为包被液加入固相载体中,  $37^{\circ}\text{C}$  温育 1h 后,在  $4^{\circ}\text{C}$  放置 8-10 小时;然后对所述固相载体进行封闭得到包被酶标板。

3. 根据权利要求 2 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:每升所述包被缓冲液按照如下方法配制: $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93g,加水定容至 1000mL,调 pH 值到 9.6。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述牛分枝杆菌抗原是将编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 32-334 位核苷酸所示的 DNA 分子在大肠杆菌中表达得到的蛋白质。

5. 根据权利要求 4 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述 DNA 分子通过重组表达载体 pET32a-MBA 导入所述大肠杆菌,所述重组表达载体 pET32a-MBA 是将 pET32a (+) 中的 EcoR I 和 Hind III 识别位点间的小片段替换为所述 DNA 分子得到的重组表达载体。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述抗牛 IgG 酶标二抗是以辣根过氧化物酶标记的羊抗牛 IgG;

所述阴性标准血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清;

所述阳性标准血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清;

所述洗涤液是含有 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液;每升所述含有 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液由  $\text{NaCl}$  18.0g,  $\text{KCl}$  0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, 吐温-20 500 $\mu\text{L}$ , 加蒸水定容至 1000mL,调 pH 值到 7.4 制成;

所述稀释液是 1%BSA 溶液;

所述封闭液是 5% 脱脂奶粉溶液;

所述底物液是 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液;每升所述 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液由 TMB 缓冲液 10ml、TMB 溶液 0.5ml、 $\text{H}_2\text{O}_2$  32 $\mu\text{l}$  组成;所述 TMB 缓冲液由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  18.27g, 柠檬酸 4.665g, 用 900mL 溶解,调 pH 至 5.5,加水至 1000mL 制成;所述 TMB 溶液由 5mL 无水乙醇溶解 TMB 10mg 制成;

所述终止液是 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

7. 制备检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的方法,包括如下制备包被酶标板的步骤:将氨基酸序列是 SEQ ID No. 1 的牛分枝杆菌抗原用包被缓冲液配制成  $8\mu\text{g/mL}$  的溶液作为包被液加入固相载体中,  $37^{\circ}\text{C}$  温育 1h 后,在  $4^{\circ}\text{C}$  放置 8-10 小时;然后对所述固相载体进行封闭得到包被酶标板。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于:每升所述包被缓冲液按照如下方法配制: $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93g,加水定容至 1000mL,调 pH 值到 9.6。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法,其特征在于:所述牛分枝杆菌抗原是将编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 32-334 位核苷酸所示的 DNA 分子在大肠杆菌中表达得到的蛋白质。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述 DNA 分子通过重组表达载体

pET32a-MBA 导入所述大肠杆菌,所述重组表达载体 pET32a-MBA 是将 pET32a (+)中的 EcoR I 和 Hind III 识别位点间的小片段替换为所述 DNA 分子得到的重组表达载体。

## 检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 牛结核病(Bovine tuberculosis) 主要是由牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis) 引起的一种慢性传染病,它可以传染给人,人饮用消毒不彻底的受结核病菌污染的牛奶或直接接触患结核病的病牛,使人感染患结核病。近十几年来,世界各国都采取了各种措施来控制 and 消灭牛结核病,目前只在少数发达国家已消灭了牛结核病,在大多数发展中国家仍然有牛结核病的发生,我国也不例外, 虽然我国一直采用“检疫和捕杀阳性牛”的防治办法,但至今仍未能消灭牛结核病。因此,控制和消灭牛结核病是我国当今的一件大事,具有重要的经济和公共卫生意义。一直以来,检测牛结核病的方法用得最多的方法是牛结核菌素皮内变态反应(purified protein derivative, PPD) 检测法,其缺点是费时、费力,结果易受人为和其它因素如怀孕等的影响,虽然其结果不是很准确,但是在我国还是作为检测牛结核病的标准。目前急需快速、准确、简便的检测牛结核病的方法。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是提供一种快速、准确、简便、适于临床大批量检测的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒,以便于牛分枝杆菌抗体的临床检测。

[0004] 本发明所提供的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒,包括包被酶标板、阴性标准血清、阳性标准血清、抗牛 IgG 酶标二抗、洗涤液、稀释液、封闭液、底物液和终止液,其中,所述包被酶标板是用氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原包被固相载体得到的。

[0005] 其中,SEQ ID No. 2 由 100 个氨基酸残基组成。

[0006] 上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中,所述固相载体可为聚苯乙烯、纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯、聚丙烯、交联葡聚糖、玻璃、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。在本发明的一个实施例中,所述固相载体具体为聚苯乙烯。

[0007] 上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中,所述包被酶标板可按照包括如下步骤的方法制备:将氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原用包被缓冲液配制成  $8 \mu\text{g/mL}$  的溶液作为包被液加入固相载体中,  $37^\circ\text{C}$  温育 1h 后,在  $4^\circ\text{C}$  放置 8-10 小时;然后对所述固相载体进行封闭得到包被酶标板。

[0008] 上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中,每升所述包被缓冲液可按照如下方法配制:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93g,加水定容至 1000mL,调 pH 值到 9.6。

[0009] 上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中,所述牛分枝杆菌抗原是将编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 32-334 位核苷酸所示的 DNA 分子在大肠杆菌中表达得到的蛋白质。

[0010] 其中,SEQ ID No. 1 由 100 个核苷酸组成。

[0011] 上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中,所述 DNA 分子通过重组表达载体

pET32a-MBA 导入所述大肠杆菌,所述重组表达载体 pET32a-MBA 是将 pET32a (+)中的 EcoR I 和 Hind III 识别位点间的小片段替换为所述 DNA 分子得到的重组表达载体。

[0012] 上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中,所述抗牛 IgG 酶标二抗是以辣根过氧化物酶标记的羊抗牛 IgG ;

[0013] 所述阴性标准血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清 ;

[0014] 所述阳性标准血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清 ;

[0015] 所述洗涤液是含有 0.05% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液 ;每升所述含有 0.05% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液由 NaCl 8.0g, KCl 0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, 吐温 -20 500 $\mu$ L, 加蒸水定容至 1000mL, 调 pH 值到 7.4 制成 ;

[0016] 所述稀释液是 1% 小牛血清白蛋白 (BSA) 溶液 ;

[0017] 所述封闭液是 5% 脱脂奶粉溶液 ;

[0018] 所述底物液是 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 ;每升所述 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液由 TMB 缓冲液 10ml、TMB 溶液 0.5ml、 $\text{H}_2\text{O}_2$  32 $\mu$ l 组成 ;所述 TMB 缓冲液由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  18.27g, 柠檬酸 4.665g, 用 900mL 溶解, 调 pH 至 5.5, 加水至 1000mL 制成 ;所述 TMB 溶液由 5mL 无水乙醇溶解 TMB 10mg 制成 ;

[0019] 所述终止液是 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

[0020] 本发明还提供了制备上述检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的方法。

[0021] 本发明所提供的制备检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的方法,包括如下制备包被酶标板的步骤 :将氨基酸序列是 SEQ ID No. 1 的牛分枝杆菌抗原用包被缓冲液配制成 8  $\mu$ g/mL 的溶液作为包被液加入固相载体中,37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1h 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$  放置 8-10 小时 ;然后对所述固相载体进行封闭得到包被酶标板 ;

[0022] 上述方法中,每升所述包被缓冲液按照如下方法配制 : $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93g, 加水定容至 1000mL, 调 pH 值到 9.6。

[0023] 上述方法中,所述牛分枝杆菌抗原是将编码序列是 SEQ ID No. 1 的第 32-334 位核苷酸所示的 DNA 分子在大肠杆菌中表达得到的蛋白质。

[0024] 上述方法中,所述 DNA 分子通过重组表达载体 pET32a-MBA 导入所述大肠杆菌,所述重组表达载体 pET32a-MBA 是将 pET32a (+)中的 EcoR I 和 Hind III 识别位点间的小片段替换为所述 DNA 分子得到的重组表达载体。

[0025] 本发明的实验证明,本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒具有抗原制备工艺简单、生物安全度高、成本低廉、易于生产和应用等特点。利用本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒检测牛血清特异性强、灵敏度高、重复性好、适于大批量检测,可用于牛分枝杆菌抗体的临床检测。

## 附图说明

[0026] 图 1 是牛分枝杆菌抗原 MBA 的 SDS-PAGE 图。

[0027] 图中 :M. 蛋白质分子量标准 ;1. DH5  $\alpha$  /pET32a 未诱导,2. DH5  $\alpha$  /pET32a 诱导表达 ;3. DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA 未诱导 ;4. IPTG 诱导 DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA 1hr ;5. IPTG 诱导 DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA 2hrs ;6. IPTG 诱导 DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA 3hrs ;7. IPTG 诱导 DH5  $\alpha$  /

pET32a-MBA4hrs.

### 具体实施方式

[0028] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但本发明并不仅限于这些实施例。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0029] 下述实施例中牛结核菌素皮内变态反应检测的方法如下:将牛只编号后在颈侧中部上三分之一处剪毛,三个月以内的犊牛,也可在肩肿部进行,直径约 10cm。用卡尺测量术部中央皮皱厚度,作好记录。不论大小牛只,一律皮内注射 0.1mL(含 2000IU)牛型提纯结核菌素(牛 PPD,哈药集团生物疫苗有限公司,批号为 08007,规格为 5mL/瓶,冻干型),皮内注射后经 72h 判定,仔细观察局部有无热痛、肿胀等炎性反应,并以卡尺测量皮皱厚度,作好详细记录。判断标准:牛分枝杆菌阳性:局部有明显的炎性反应,皮厚差大于或等于 4.0mm;疑似反应:局部炎性反应不明显,皮厚差大于或等于 2.0mm 且小于 4.0mm;牛分枝杆菌阴性:无炎性反应,皮厚差在 2.0mm 以下。

[0030] 下述实施例中的  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测的方法如下:采用牛分枝杆菌 IFN- $\gamma$  试剂盒(购自北京测迪科技有限公司,为进口产品,批号为 63319)进行检测,检测方法:牛血浆的制备:采集牛的血液(至少 5mL)放入肝素抗凝管中,每头牛抗凝血加入 24 孔组织培养板三孔,各 1.5mL,分别无菌加入 100  $\mu$ L PBS(阴性抗原对照)(试剂盒自带)、禽 PPD(试剂盒自带)、牛 PPD(试剂盒自带)至相应的孔,37 $^{\circ}$ C 湿温培养箱中孵育 16-24 小时,用可调移液器小心吸取约 400  $\mu$ L 的上层血浆,转入独立的 1.5mL 离心管中。牛  $\gamma$ -干扰素酶免疫试验:加入 50  $\mu$ L 稀释液(试剂盒自带)至所需孔;加入 50  $\mu$ L 待测样品和对照样品至含有稀释液的相应孔中,室温(22 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)孵育 60 $\pm$ 5min,洗涤 6 次;每孔加入 100  $\mu$ L 新鲜配制的酶标结合物(试剂盒自带),室温孵育 60 $\pm$ 5min,洗涤 6 次,每孔加入 100  $\mu$ L 新鲜配制的底物溶液(试剂盒自带),室温避光孵育 30min。每孔加入 50  $\mu$ L 终止液,终止后 5min 内读出 OD450nm。判断标准:牛 PPD 的 OD450nm - 阴性抗原的 OD450nm  $\geq$  0.1 且牛 PPD 的 OD450nm - 禽 PPD 的 OD450nm  $\geq$  0.1 为牛分枝杆菌阳性;牛 PPD 的 OD450nm - 阴性抗原的 OD450nm < 0.1 或牛 PPD 的 OD450nm - 禽 PPD 的 OD450nm < 0.1 为牛分枝杆菌阴性。

[0031] 下述实施例中经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清是对先按照上述牛结核菌素皮内变态反应方法检测结果为牛分枝杆菌阴性的牛过一个月后再采血按照上述  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测方法仍为牛分枝杆菌阴性的牛的血清。

[0032] 下述实施例中经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清是对先按照上述牛结核菌素皮内变态反应方法检测结果为牛分枝杆菌阳性的牛过一个月后再采血按照上述  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测方法仍为牛分枝杆菌阳性的牛的血清。

[0033] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0034] 实施例 1、制备检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其使用方法

[0035] 本实施例制备的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒,包括包被酶标板、阴性标准血清、阳性标准血清、抗牛 IgG 酶标二抗、洗涤液、稀释液、封闭液、底物液和终止液。其中包被酶标板是用氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原包被固相载体得到的。各

部分的具体制备方法如下：

[0036] 一、检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的制备

[0037] (一) 包被酶标板的制备

[0038] 用氨基酸序列是 SEQ ID No. 2 的牛分枝杆菌抗原 MBA 包被 96 孔酶标板(由聚苯乙烯制成)得到包被酶标板,具体方法如下：

[0039] 1、牛分枝杆菌抗原 MBA 的制备

[0040] 制备 SEQ ID No. 1 的牛分枝杆菌抗原 MBA 基因。SEQ ID No. 1 的第 32-334 位为编码序列,编码 SEQ ID No. 2 所示的牛分枝杆菌抗原 MBA。SEQ ID No. 2 由 100 个氨基酸残基组成。

[0041] 用限制内切酶 EcoR I 和 Hind III 酶切牛分枝杆菌抗原 MBA 基因,同时用 EcoR I 和 Hind III 双酶切 pET32a (+) (购自美国 Novagen 公司,货号:69015-3),回收 pET32a (+) 的酶切大片段,并利用 T4 连接酶将回收的牛分枝杆菌抗原 MBA 基因片段与 pET32a (+) 的酶切大片段连接,转化到 E. coli 菌株 DH5  $\alpha$  感受态细胞中,通过菌落 PCR 筛选阳性克隆并测序,得到将 pET32a (+) 的 EcoR I 和 Hind III 识别位点之间的小片段取代为 SEQ ID No. 1 的第 32-334 位核苷酸所示的牛分枝杆菌抗原 MBA 基因的重组表达载体 pET32a-MBA。将导入 pET32a-MBA 的 E. coli 菌株 DH5  $\alpha$  命名为 DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA。培养 DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA,经 IPTG 诱导表达牛分枝杆菌抗原 MBA 蛋白,12,000r/min 离心 5min 收集诱导表达的菌体,以原培养液 1/50 体积的 PBS 悬浮菌体,加入溶菌酶溶液至终浓度为 100  $\mu$ g/mL,冰浴中超声裂解,每次裂解 2s,间隔 2s,共 3min;重复以上裂解步骤三次,最后 4 $^{\circ}$ C 12,000r/min 离心 10min,收集分离上清液,舍弃沉淀。上清即为表达的牛分枝杆菌抗原 MBA 蛋白。同时按照上述方法将 pET32a (+) 导入 E. coli 菌株 DH5  $\alpha$  得到含有 pET32a (+) 的空载体对照菌 DH5  $\alpha$  /pET32a,按照上述方法进行诱导表达。图 1 为牛分枝杆菌抗原 MBA 蛋白的表达检测结果,表明 DH5  $\alpha$  /pET32a-MBA 表达的牛分枝杆菌抗原 MBA 蛋白的大小为 30kDa,而空载体对照菌 DH5  $\alpha$  /pET32a 不表达牛分枝杆菌抗原 MBA 蛋白。用镍柱(购自美国通用公司的高-affinity Ni-NTA Rasin 产品)进行纯化,将镍柱预处理,加入表达的牛分枝杆菌抗原 MBA 蛋白,然后加入含咪唑洗脱液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH8.0) 4 $^{\circ}$ C 作用 10min,3000rpm 离心 1min 收集洗脱液,重复洗脱一次,收集的洗脱液即为纯化的牛分枝杆菌抗原 MBA 作为试剂盒中包被酶标板的包被抗原。

[0042] 纯化的牛分枝杆菌抗原 MBA 的序列测定结果表明其 N 末端的 15 个氨基酸为 SEQ ID No. 2 的第 1-15 位氨基酸残基。

[0043] 2、用牛分枝杆菌抗原 MBA 包被 96 孔酶标板

[0044] 经测定步骤 1 纯化的牛分枝杆菌抗原 MBA 的浓度为 144  $\mu$ g/mL,用包被缓冲液将步骤 1 纯化的牛分枝杆菌抗原 MBA 稀释至 8  $\mu$ g/mL,作为包被液加入 96 孔酶标板(由聚苯乙烯制成,购自加拿大 JET 公司),100  $\mu$ L/孔,置于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,在 4 $^{\circ}$ C 放置 8-10 小时;然后对得到的酶标板按照如下方法进行封闭得到包被酶标板:用 PBST 洗板 3 次,拍干,每孔加入 5% 的脱脂奶粉溶液 200  $\mu$ L,置于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时,用 PBST 洗板 3 次,拍干,得到包被酶标板。保存于 4 $^{\circ}$ C 待用。

[0045] 其中,每升所述包被缓冲液按照如下方法配制:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>1.59g, NaHCO<sub>3</sub>2.93g,加蒸馏水定容至 1000mL,调 pH 值到 9.6。

[0046] 每升 PBST (含有 0.05% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液) 由 NaCl 8.0g, KCl 0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, 吐温 -20 500 $\mu\text{L}$ , 加蒸水定容至 1000mL, 调 pH 值到 7.4 制成。

[0047] 每 100mL 5% 的脱脂奶粉溶液按照如下方法配制: 将 5g 脱脂奶粉用 PBST 定容至 100mL。

[0048] (二) 检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中其它试剂的配制

[0049] 1、阴性标准血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清;

[0050] 2、阳性标准血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清;

[0051] 3、抗牛 IgG 酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗牛 IgG, 购自 KPL 公司;

[0052] 4、洗涤液: 为上述 PBST (含有 0.05% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液)。

[0053] 5、稀释液: 为 1% BSA 溶液。每 100mL 1% BSA 溶液按照如下方法配制: 1g 牛血清白蛋白 BSA 用 PBST 定容至 100mL。

[0054] 6、封闭液: 为上述 5% 的脱脂奶粉溶液。

[0055] 7、底物液: 是 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液; 所述 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液由 TMB 缓冲液 10ml、TMB 溶液 0.5ml、 $\text{H}_2\text{O}_2$  32 $\mu\text{l}$  组成; 其中, 每升 TMB 缓冲液由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  18.27g, 柠檬酸 4.665g, 用 900mL 溶解, 调 pH 至 5.5, 加水至 1000mL 制成; TMB 溶液由 5mL 无水乙醇溶解 TMB 10mg 制成。

[0056] 8、终止液: 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液: 21.7mL 浓硫酸缓慢加入 178.3mL 蒸馏水中。

[0057] 二、检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的使用方法

[0058] 用步骤一的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒检测待检血清样品的方法如下:

[0059] 1、与血清结合: 在步骤一的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的包被酶标板中各设 1 个阴性标准孔和阳性标准孔, 阴性标准孔每孔加入 100  $\mu\text{L}$  阴性标准血清, 阳性标准孔每孔加入 100  $\mu\text{L}$  阳性标准血清, 其余孔加入待检血清样品 100  $\mu\text{L}$ /孔, 每份待检血清样品各设 3 个孔, 于 37 $^\circ\text{C}$  温育 1h 后, 用 PBST 洗板 3 次, 拍干。

[0060] 2、与酶标二抗结合: 抗牛 IgG 酶标二抗用稀释液以 1:500 倍稀释, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 置于 37 $^\circ\text{C}$  温育 1h 后, 用 PBST 洗板 3 次, 拍干;

[0061] 3、显色: 每孔加入 100 $\mu\text{L}$  底物液, 于 37 $^\circ\text{C}$  避光作用 10min;

[0062] 4、终止: 每孔加入 50 $\mu\text{L}$  终止液, 酶标仪读出 OD450nm 值;

[0063] 5、结果判定:

[0064] 用步骤一的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒按照上述方法检测 50 份牛分枝杆菌阴性血清, 计算 50 份牛分枝杆菌阴性血清 OD<sub>450nm</sub> 的平均值 (X) 为 0.152, 标准差 (SD) 为 0.043, 按照公式:  $X+3SD$  确定此 ELISA 方法的阴阳临界值为 0.281, 即确定步骤一的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒按照上述方法检测时, 若待检血清样品 OD450nm 值  $\geq 0.281$  为阳性, 若待检血清样品 OD450nm 值  $< 0.281$  则为阴性。

[0065] 其中, 50 份牛分枝杆菌阴性血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清。

[0066] 实施例 2、实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的特异性

[0067] 用实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒按照实施例 1 的使用方法

检测 4 份牛布鲁氏杆菌病阳性血清(Bru 阳性血清)的 10 倍稀释液、4 份牛口蹄疫阳性血清(FMD 阳性血清)的 10 倍稀释液、4 份牛分枝杆菌阳性血清(M. bovis 阳性血清)的 10 倍稀释液和 4 份牛分枝杆菌阴性血清(M. bovis 阴性血清)的 10 倍稀释液这些待检血清样品,结果表明牛布鲁氏杆菌病阳性血清、牛口蹄疫阳性血清和牛分枝杆菌阴性血清的 OD<sub>450nm</sub> 的值均小于 0.281,均为阴性,即实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒与牛常见的病原体没有发生交叉反应,结果见表 1。

[0068] 其中,牛分枝杆菌阳性血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清;

[0069] 牛分枝杆菌阴性血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清。

[0070] 表 1 间接 ELISA 检测方法的特异性试验

[0071]

	Bru 阳性血清	FMD 阳性血清	<i>M. bovis</i> 阳性血清	<i>M. bovis</i> 阴性血清
OD <sub>450nm</sub> 值	0.201	0.139	1.141	0.116
	0.152	0.128	1.096	0.125
	0.193	0.116	1.132	0.181
	0.182	0.194	1.123	0.174
平均 OD <sub>450nm</sub> 值	0.182	0.144	1.123	0.149
结果判定	-	-	+	-

[0072] 注:“+”为阳性;“-”为阴性。

[0073] 实施例 3、实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的敏感性

[0074] 用实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒按照实施例 1 的使用方法检测牛分枝杆菌阳性血清的 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 倍稀释液这六种待检测血清样品,检测结果显示,血清稀释至 1:320 的 OD<sub>450nm</sub> 为 0.301,大于阳性判定值 0.281,判为阳性,检测到 1:640 倍稀释的血清时,其 OD<sub>450nm</sub> 值为 0.242,小于阳性判定值 0.281,判为阴性,其检测敏感性为 1:320 的血清稀释。

[0075] 其中,牛分枝杆菌阳性血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清。

[0076] 实施例 4、实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的重复性

[0077] 用实施例 1 的同批次和不同批次纯化的牛分枝杆菌抗原 MBA 作包被抗原,制备实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒并按照实施例 1 的使用方法检测牛分枝杆菌阳性血清的 10 倍稀释液分别进行批内和批间重复检测,结果如表 2 所示,批内 3 次检测的变异系数在 0.3%-3.0% 之间,小于 5%;批间的变异系数在 0.7%-2.4% 之间,也小于 5%。

[0078] 表 2. 重复性试验结果

[0079]

	批内重复			批间重复		
	1	2	3	4	5	6
	1.130	0.782	0.964	0.870	1.128	1.087
	1.159	0.723	0.974	0.864	1.105	0.979
	1.169	0.769	0.971	0.880	1.097	0.991
平均 X	1.153	0.758	0.970	0.871	1.11	1.019
S	0.015	0.023	0.004	0.006	0.012	0.045
CV%	1.3%	3.0%	0.3%	0.7%	1.1%	2.4%

[0080] 实施例 5、实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的实际应用

[0081] 随机采集 30 份临床样品,从牛颈静脉或牛尾巴动脉采集牛血液 10mL,凝固析出的血清为待检血清样品。用实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒按照实施例 1 的使用方法检测。结果如表 3 所示,结果有 1 份血清为牛分枝杆菌阳性,29 份血清为牛分枝杆菌阴性。这一结果与用上述牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测结果一致。

[0082] 表 3ELISA 检测 30 份牛血清结果(OD450nm 值)

[0083]

OD450nm 值						阳性判断值 $\geq 0.281$
0.146	0.168	0.177	0.154	0.154	0.159	
0.187	0.411	0.134	0.175	0.108	0.098	
0.100	0.193	0.141	0.153	0.114	0.186	
0.192	0.153	0.131	0.184	0.195	0.127	
0.163	0.102	0.111	0.133	0.172	0.145	

[0084] 其中,上述实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒中的包被酶标板中的牛分枝杆菌抗原 MBA 的包被浓度( $8 \mu\text{g/mL}$ )是按照如下方法优化得到的:

[0085] 经测定实施例 1 纯化的牛分枝杆菌抗原 MBA 的浓度为  $144 \mu\text{g/mL}$ ,分别用实施例 1 的包被缓冲液进行倍比稀释,稀释后的浓度分别为 32、16、8 和  $4 \mu\text{g/mL}$ ,分别作为包被液,按照实施例 1 的方法制备得到包被酶标板。按照实施例 1 的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒的使用方法测定牛分枝杆菌阳性血清和牛分枝杆菌阴性血清的 OD450nm。实验结果如表 4 所示,OD450nm 的值接近 1 时,对应的牛分枝杆菌抗原 MBA 浓度为  $8 \mu\text{g/mL}$ ,血清稀释度为 1:200,即为最佳的包被抗原浓度和血清稀释度。

[0086] 通过对间接 ELISA 其他反应条件的优化,间接 ELISA 优化程序如下:包被抗原的包被条件为  $37^\circ\text{C}$  作用 1h;封闭液为 5%脱脂奶粉溶液,时间为 1h;与血清结合时间为 60min,最佳酶标二抗浓度 1:500 倍稀释,作用时间为 1h。

[0087] 表 4 抗原最佳包被浓度、血清最佳稀释度的确定

[0088]

[0089]

包被液中的包被 抗原浓度	血清稀释度											
	1: 100			1: 200			1: 400			1: 800		
	+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N
32 $\mu$ g/mL	1.647	0.335	4.9	1.151	0.178	6.4	0.988	0.179	5.5	0.746	0.180	4.1
16 $\mu$ g/mL	1.411	0.201	7.0	1.251	0.188	6.6	0.768	0.163	4.7	0.551	0.170	3.3
8 $\mu$ g/mL	1.220	0.196	6.4	1.052	0.156	6.7	0.593	0.170	3.4	0.435	0.150	2.6
4 $\mu$ g/mL	0.998	0.185	5.3	0.651	0.159	4.1	0.440	0.157	2.8	0.365	0.156	2.3

[0090] 注：“+”为阳性；“-”为阴性。

[0091] 其中，牛分枝杆菌阳性血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阳性牛的血清；牛分枝杆菌阴性血清是经牛结核菌素皮内变态反应检测和  $\gamma$ -干扰素 ELISA 检测均为牛分枝杆菌阴性牛的血清。

[0001]

## 序 列 表

- 
- <110> 广西壮族自治区兽医研究所
- <120> 检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法
- <130> CGGNAR132729
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 540
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> CDS
- <222> (32).. (334)
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| acaggccatg gctgatatcg gateccgaatt catggcagag atgaagaccg atgccgctac | 60  |
| cctcgcgcag gaggcaggta atttcgagcg gatctccggc gacctgaaaa cccagatcga  | 120 |
| ccaggtggag tcgacggcag gttegttgea gggccagtgg cgcggcgcgg cggggacgge  | 180 |
| cgcccaggcc gcggtggtgc gttccaaga agcagccaat aagcagaagc aggaactcga   | 240 |
| cgagatctcg acgaatattc gtcaggccgg cgtccaatac tcgaggaccg acgaggagca  | 300 |

[0002]

gcagcaggcg ctgtcctcgc aaatgggctt ctgagtaagc ttgcggccgc actcgagcac	360
caccaccacc accactgaga tccggetget aacaaagccc gaaaggaagc tgagttgget	420
getgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtettgagg	480
ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc ggattggoga atgggacgcg cctgtagecg	540

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly

1                    5                    10                    15

Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val

20                    25                    30

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly

35                    40                    45

[0003]

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys

50

55

60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly

65

70

75

80

Val Gln Tyr Ser Arg Thr Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser

85

90

95

Gln Met Gly Phe

100

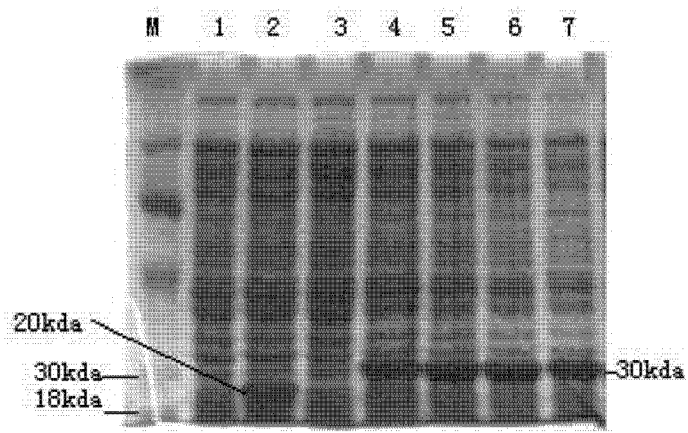


图 1

专利名称(译)	检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103323591A</a>	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201310296845.5	申请日	2013-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区兽医研究所		
[标]发明人	谢芝勋 谢志勤 刘加波 庞耀珊 邓显文 谢丽基 范晴 罗思思		
发明人	谢芝勋 谢志勤 刘加波 庞耀珊 邓显文 谢丽基 范晴 罗思思		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 C12N15/70		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN103323591B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒及其制备方法。本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒，包括包被酶标板、阴性标准血清、阳性标准血清、抗牛IgG酶标二抗、洗涤液、稀释液、封闭液、底物液和终止液，其中，所述包被酶标板是用氨基酸序列是SEQ ID No.2的牛分枝杆菌抗原包被固相载体得到的。本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒具有抗原制备工艺简单、生物安全度高、成本低廉、易于生产和应用等特点。利用本发明的检测牛分枝杆菌抗体的酶联免疫试剂盒检测牛血清特异性强、灵敏度高、重复性好、适于大批量检测，可用于牛分枝杆菌抗体的临床检测。

	Bru 阳性血清	FMD 阳性血清	M. bovis 阳性血清	M. bovis 阴性血清
OD <sub>450nm</sub> 值	0.201	0.139	1.141	0.116
	0.152	0.128	1.096	0.125
	0.193	0.116	1.132	0.181
	0.182	0.194	1.123	0.174
平均OD <sub>450nm</sub> 值	0.182	0.144	1.123	0.149
结果判定	-	-	+	-