



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101968489 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 06

(21) 申请号 201010261673. 4

C12N 15/70(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 25

G07K 14/435(2006. 01)

(73) 专利权人 四川农业大学

(56) 对比文件

地址 625014 四川省雅安市雨城区新康路
46 号

CN 101070539 A, 2007. 11. 14,

CN 101303349 A, 2008. 11. 12,

(72) 发明人 杨光友 安晓雪 古小彬 彭雪蓉
王淑贤

审查员 刘迎鸣

(74) 专利代理机构 成都信博专利代理有限责任
公司 51200

代理人 卓仲阳 舒启龙

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 27/447(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

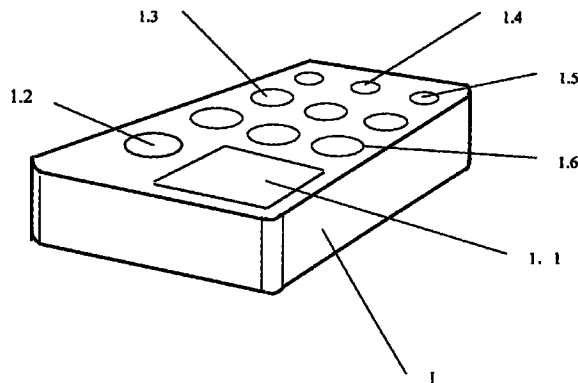
序列表 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

利用基因重组抗原检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明公开一种利用基因重组抗原检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,涉及寄生虫病免疫抗体检测技术领域。其包被原是羊多头蚴基因重组抗原蛋白,酶标记物是酶标抗抗体;酶标抗抗体是羊脑多头蚴病阳性羊血清为一抗,辣根过氧化物酶偶联兔抗羊 IgG 为二抗;羊多头蚴基因重组抗原蛋白,其氨基酸序列为表 SEQ ID NO:1 所示序列,其核苷酸序列为表 SEQID NO:2 所示序列;表达重组体是 pET-32a-Tm7 重组表达质粒;诊断膜片是包被有包被原的硝酸纤维素膜,阴性对照血清是未患羊脑多头蚴病的阴性对照血清,阳性对照血清是羊脑多头蚴病阳性对照血清,底物溶液是 DAB 缓冲液,洗涤液是 pH7.4PBST 缓冲液;上属液体的均分装在小瓶内,置试剂盒中;人工合成重组抗原,构建了简单、快速的脑多头蚴病诊断方法所需的酶联免疫试剂盒。



1. 利用基因重组抗原检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,包括试剂盒(1)内包被着包被原的诊断膜片(1.1),酶标记物(1.2),阴性对照血清(1.3),阳性对照血清(1.4),底物溶液(1.5),洗涤液(1.6),其特征是,所述包被原是羊多头蚴基因重组抗原蛋白 Tm7 蛋白,所述酶标记物(1.2)是酶标抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,其特征是所述的羊多头蚴基因重组抗原蛋白 Tm7 蛋白,其氨基酸序列为序列 SEQID NO: 1 所示序列。

3. 根据权利要求1或2所述的检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,其特征是所述的羊多头蚴基因重组抗原蛋白 Tm7 蛋白的核苷酸序列为表 SEQID NO: 2 所示序列。

4. 根据权利要求1或2所述的检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,其特征是所述基因重组抗原蛋白 Tm7 蛋白的表达载体是 pET-32a-Tm7 重组表达质粒。

5. 根据权利要求1所述的检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,其特征是所述酶标抗体是羊脑多头蚴病阳性羊血清为一抗,辣根过氧化物酶偶联兔抗羊 IgG 为二抗。

6. 根据权利要求1所述的检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒,其特征是所述诊断膜片(1.1)是包被有包被原的硝酸纤维素膜 NC,阴性对照血清(1.3)是未患羊脑多头蚴病的阴性对照血清,阳性对照血清(1.4)是羊脑多头蚴病阳性对照血清,底物溶液(1.5)是 DAB 缓冲液,洗涤液(1.6)是洗涤缓冲液 pH7.4PBST,以上属液体成分的均分装在小瓶中,并置于试剂盒(1)中。

7. 根据权利要求1所述的羊多头蚴基因重组抗原蛋白 Tm7 蛋白的制备方法,其步骤如下:

(1)从羊脑内采到的多头蚴原头节为原料,提取总 RNA,RT-PCR 技术扩增出目的基因的全序列,命名为 Tm7 基因。

(2)PCR 产物测序正确后,克隆出目的基因的开放阅读框 ORF,将其连接到 pMD 18-T 载体,转化到大肠杆菌 DH5 α 后测序,发现克隆到的目的基因的开放阅读框为 207 bp,编码 69 个氨基酸。

(3)将此片段亚克隆入 pET-32a(+) 载体,构建重组表达质粒 pET-32a-Tm7,经转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后 IPTG 诱导表达,用 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测表达产物。

(4)将目的蛋白样品过 Ni-Charged Resin 柱纯化,收集洗脱峰蛋白液,进行电泳检测,获得纯度很高的目的蛋白即为基因重组抗原蛋白 Tm7 蛋白。

利用基因重组抗原检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及有蹄动物的脑和脊髓内寄生虫病免疫抗体检测技术领域,尤其涉及针对羊感染多头蚴的诊断及其检测需要的一种酶联免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 脑多头蚴病(Coenuriasis)又叫脑包虫病,是由带科的多头带绦虫(*Taenia multiceps*)的中绦期幼虫——脑多头蚴(*Coenurus cerebralis*)寄生于绵羊、山羊、黄牛、牦牛和骆驼等有蹄动物的脑和脊髓等处引起的一种寄生虫病,也偶见有人感染此病的报道;其成虫寄生于犬、豺、狼和狐狸等的小肠内。本病多发于6~18个月龄的绵羊,病程缓慢,患病动物多以死亡为转归,给畜牧业造成巨大的经济损失。

[0003] 近年来,血清学诊断技术被应用于脑多头蚴病的诊断,但由于所用的诊断抗原主要是多头蚴原头节抗原和囊液抗原等虫体天然抗原,它们来源十分有限,不能满足实际的需要。

[0004] 随着分子生物学技术的发展及其在寄生虫学的应用,带科绦虫基因重组抗原已经成为研究的焦点而且取得了突破性进展,各国学者对于绦虫蚴病诊断的候选基因作了大量研究工作。在诊断中,大分子蛋白在不同绦虫间易产生交叉反应,特异性低,因而目前侧重于低分子量诊断抗原的研究。在猪囊虫病的诊断方面,成功克隆表达了糖蛋白抗原(LLGP)中的GP50、Ts14和T24蛋白,8kDa的Ts8B1和Ts8B2以及10kDa蛋白;细粒棘球蚴病上也成功克隆表达出了AgB2、EpC1、硫氧还蛋白过氧化物酶(EgTPx)p29等小分子量蛋白。以上抗原用于诊断,均有较好的敏感性和特异性。

[0005] 本研究借鉴猪囊尾蚴病和细粒棘球蚴病诊断抗原成功克隆表达的经验,通过分子生物学的方法,人工合成一种可以用于脑多头蚴病诊断的重组抗原,并构建一种简单、快速的脑多头蚴病诊断方法及其所需的酶联免疫试剂盒。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒,可快速有效的检测羊多头蚴感染的抗体水平,从分子生物学的角度,为预防、诊断脑包虫病奠定基础。

[0007] 实现本发明之目的技术解决方案如下:

[0008] 一种检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒,包括试剂盒1内包被着包被原的诊断膜片1.1,酶标记物1.2,阴性对照血清1.3,阳性对照血清1.4,底物溶液1.5,洗涤液1.6,其特征是,所述包被原是羊多头蚴基因重组抗原蛋白,所述酶标记物是酶标抗体。

[0009] 所述的检测羊多头蚴的基因重组抗原蛋白,其氨基酸序列为序列表SEQID NO: 1所示序列。

[0010] 所述的检测羊多头蚴的基因重组抗原蛋白的核苷酸序列为序列表SEQID NO: 2所示序列。

[0011] 所述的检测羊多头蚴的基因重组抗原蛋白的重组体是pET-32a-Tm7重组表达质

粒。

[0012] 所述检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒的酶标抗体是羊脑多头蚴病阳性羊血清为一抗,辣根过氧化物酶偶联兔抗羊 IgG 为二抗。

[0013] 所述检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒的诊断膜片 1.1 是包被有包被原的硝酸纤维素膜 NC,阴性对照血清 1.3 是未患羊脑多头蚴病的阴性对照血清,阳性对照血清 1.4 是羊脑多头蚴病阳性对照血清,底物溶液 1.5 是 DAB 缓冲液。

[0014] 洗涤液 1.6 是洗涤缓冲液(pH7.4 PBST,含 0.05%Tween-20)由 NaCl 8.0g、KCl 0.2g、 KH_2PO_4 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、Tween-20 0.5mL 加蒸馏水至 1000mL 即成。以上属液体成分的均分装在小瓶内,并置于试剂盒中。

[0015] 依据以上所述的羊多头蚴基因重组抗原蛋白的一种制备方法,其步骤如下:

[0016] (1)从羊脑内采到的多头蚴原头节为原料,提取总 RNA,RT-PCR 技术扩增出目的基因的全序列,命名为 Tm7 基因。

[0017] (2)PCR 产物测序正确后,克隆出目的基因的开放阅读框 ORF,将其连接到 pMD 18-T 载体,转化到大肠杆菌 DH5 α 后测序,发现克隆到的目的基因的开放阅读框为 207 bp,编码 69 个氨基酸。

[0018] (3)将此片段亚克隆入 pET-32a(+) 载体,构建重组表达质粒 pET-32a-Tm7,经转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后 IPTG 诱导表达,用 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测表达产物。

[0019] (4)将目的蛋白样品过 Ni-Charged Resin 柱纯化,收集洗脱峰蛋白液,进行电泳检测,获得纯度很高的目的蛋白即为基因重组抗原蛋白。

[0020] 测序结果表明 Tm7 基因的全序列为 378 bp,其中开放阅读框(ORF)为 207 bp,编码 69 个氨基酸,该蛋白分子量约 7.6kDa。本次的测序结果已登录到 GenBank,登录号为 :FJ603044。将该序列进行 BlastN 比对,它与猪囊尾蚴诊断抗原 NC-3 基因(AJ012669)和 Ts76 基因(AF216696)的相似性均为 97%;与细粒棘球绦虫 EpC1 基因(AF481884)和 EF-hand 基因(AY942148)的相似性均为 83%。其 ORF 与猪带绦虫的 NC-3 基因的 ORF 和 Ts76 基因序列的部分 ORF 同源性均高达 99.52%,在 35 位和 152 位处发生了 C-T、A-G 的转换,在 92 位处发生了 C-G 的颠换;与细粒棘球绦虫的 EpC1 基因和 EF-hand 基因序列的部分 ORF 同源性均为 85.99%。

[0021] 与已有技术相比,本发明具有显著的优点与积极效果:

[0022] 1、本研究利用基因重组方法在大肠杆菌中成功表达 Tm7 蛋白,表达产物为约 27 kDa 的融合表达蛋白,并能被羊脑多头蚴病阳性血清识别。表达出的目的蛋白,纯化后能作为抗原建立检测羊脑多头蚴病抗体的重组蛋白间接 ELISA 方法,其间接 ELISA 方法检测敏感性可达 93.3%,特异性达 94.1%,初步证明 Tm7 重组蛋白具有作为诊断抗原的特点,而且本诊断抗原可以进行产业化生产。

[0023] 2、在上述研究基础上建立的一种检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒,简单、有效、快速,将有效检测绵羊、山羊、黄牛、牦牛和骆驼等有蹄动物的脑和脊髓等处的多头蚴寄生虫病;在畜牧兽医领域为防止该病的蔓延与发展具有重要意义。

附图说明

[0024] 图 1 本发明所述的酶联免疫试剂盒构成图示意图。

- [0025] 图 2 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定示意图。
- [0026] 图 3 所述目的基因 ORF 的 PCR 扩增鉴定图(重组 pET32a-Tm7 质粒 PCR 鉴定)。
- [0027] 图 4 重组质粒 pET32a-Tm7 双酶切鉴定检测凝胶电泳图。
- [0028] 图 5 所述 Tm7 蛋白表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测图。
- [0029] 图 6 重组载体菌表达产物与脑多头蚴病阳性羊血清发生反应的免疫印迹图。
- [0030] 图 7 所述的重组蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析图。
- [0031] 图中的数字与字母的含义：
- [0032] 图 1 1:试剂盒、1.1:包被着包被原的诊断膜片、1.2:酶标记物、1.3 阴性对照血清、1.4 阳性对照血清、1.5 底物溶液、1.6 洗涤液。图 2 M:DNA 分子量标准 DL2000 ;1, 2 :重组 pET32a-Tm7 质粒 PCR 鉴定。图 3 M1, M2 :DNA 分子质量标准 ;1:重组 pET32a-Tm7 质粒 PCR 产物 ;2, 3 :EcoR 和 Xho I 双酶切 pET32a-Tm7 质粒。图 4 M:蛋白质分子量标准 ;1, 2 :经 IPTG 诱导的重组菌 ;3 :未经诱导的重组菌 ;4 :经 IPTG 诱导的含质粒 pET-32a(+) 的菌体 ;5 :未经 IPTG 诱导的含质粒 pET-32a(+) 的菌体。图 5 M:蛋白质分子量标准 ;1 :未经诱导的重组菌 ;2 :经 IPTG 诱导的重组菌 ;3 :未经诱导的重组菌的免疫印迹条带 ;4 :经 IPTG 诱导的重组菌表达蛋白的免疫印迹条带。图 6 M:蛋白质分子量标准 ;1, 2 :未纯化重组蛋白 ;3, 4 :过柱纯化重组蛋白。

具体实施方式

[0033] 结合附图给出实施例,对本发明做进一步说明。从图 1 看出,所说的一种检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒,包括试剂盒内包被着包被原的诊断膜片,酶标记物,阴性对照血清,阳性对照血清,底物溶液,洗涤液,所述包被原是羊多头蚴基因重组抗原蛋白,所述酶标记物是酶标抗体。所述的包被原羊多头蚴基因重组抗原蛋白的获得必须做一系列实验。

[0034] 实验所需虫体脑多头蚴,采自四川省攀枝花市某羊场。剥离后的脑多头蚴去除囊液,用无菌生理盐水冲洗 3~4 次, -70℃ 保存备用。

[0035] 实验所需菌种和质粒, E. coli DH5 α 和 BL21 (DE3)感受态细胞购自天根生化科技有限公司 ;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司 ;pET32a(+) 载体由本发明人所在实验室保存。

[0036] 实验所需试剂,总 RNA 抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司 ;逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司 ;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司 ;EcoR I, Xho I 购自 TaKaRa 公司 ;DNA Marker, 质粒小提试剂盒, 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司 ;蛋白质 Marker SM0431 购自 Fermentas 公司 ;Ni-Charged Resin 购自 Bio-Rad 公司 ;HRP-兔抗羊 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司 ;阴、阳性血清由发明人实验室自行保存。

[0037] 脑多头蚴总 RNA 的提取和鉴定

[0038] 按照上海华舜生物工程有限公司总 RNA 提取试剂盒说明提取脑多头蚴的总 RNA, -70℃ 保存备用。利用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

[0039] 图 2 看出所述的包被原羊多头蚴基因重组抗原蛋白的获得,还需要首先以多头带绦虫脑多头蚴的原头节 RNA 为模板,用本实验设计的一对特异性引物,采用 RT-PCR 扩增出大小约 400 bp 的片段,与预期片段大小相符,见图 2 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定。将该片段克隆到 pMD 18-T 质粒,经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测,同样得到与预期相

符的,约 400 bp 的片段。测序结果表明 Tm7 基因的全序列为 378 bp,其中开放阅读框(ORF)为 207 bp,编码 69 个氨基酸,该蛋白分子量约 7.6kDa。本次的测序结果已登录到 GenBank,登录号为:FJ603044,命名为 Tm7 基因。

[0040] 图 3 图 4 看出是 pMD-Tm7 重组质粒的构建。以测序正确的 pMD-Tm7 质粒为模板,用加酶切位点的特异性引物进行扩增。扩增出的片段大小约为 200 bp,与预期片段大小相符,如图 3。将 Tm7 的阅读框基因片段与原核表达载体 pET-32a(+) 连接,构建 pET32a-Tm7 重组表达质粒,转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,挑取单菌落,进行 PCR 扩增鉴定,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果,可见约 200 bp 处有目的条带,将 PCR 鉴定为阳性的 pET32a-Tm7 转化菌提取质粒,用 EcoR 和 Xho I 双酶切重组 pET32a-Tm7 质粒,也得到了与预期大小相符的约 200bp 片段如图 4,证明了所克隆的目的片段成功插入了 pET-32a(+) 载体。经测序证明,基因的完整开放阅读框成功亚克隆入 pET-32a(+) 载体。基因重组抗原蛋白的核苷酸序列为表 SEQID NO: 2 所示序列。

[0041] 图 5 看出是 pET-32a-Tm7 重组质粒的表达。重组质粒 pET32a-Tm7 和空质粒 pET-32a(+) 在 *E. coli* BL21(DE3) 中,以 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L 诱导 3 h,SDS-PAGE 鉴定菌体蛋白,可见重组菌诱导后较诱导前出现一个大小约为 27 kDa 的明显条带,此条带与预期蛋白分子量大小相一致,表明此重组质粒在 *E. coli* 中表达了含有目的蛋白的融合蛋白如图 5。因此所述的检测羊多头蚴的基因重组抗原蛋白的重组体是 pET-32a-Tm7 重组表达质粒。根据重组菌在不同 IPTG 浓度和不同诱导时间下表达量的差异,得出其最佳诱导条件为:IPTG 终浓度为 0.25 mmol/L 诱导 4h。

[0042] 图 6 是重组蛋白的 Western-blot 分析。为进一步鉴定表达产物,将纯化的表达蛋白经 SDS-PAGE 后,转移至纤维素 NC 膜上,以脑多头蚴病阳性羊血清为一抗,以辣根过氧化物酶偶联兔抗羊 IgG 为二抗,DAB 缓冲液为底物,进行蛋白质印迹分析。重组载体菌表达产物可与脑多头蚴病阳性羊血清发生反应,出现显色带如图 6,说明 表达的蛋白质具有反应原性。因此所述检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒的酶标抗抗体是羊脑多头蚴病阳性羊血清为一抗,辣根过氧化物酶偶联兔抗羊 IgG 为二抗。

[0043] 图 7 是重组蛋白的纯化。将蛋白样品过 Ni-Charged Resin 柱纯化,收集洗脱峰蛋白液,进行电泳检测,杂带基本除去,得到纯度很高的样品,如图 7。紫外分光光度计测定,目的蛋白的浓度为 1.86 mg/ml。所述的检测羊多头蚴的基因重组抗原蛋白,其氨基酸序列为序列表 SEQID NO: 1 所示序列。

[0044] 综上所述,羊多头蚴基因重组抗原蛋白的一种制备方法,其步骤如下:

[0045] (1) 从羊脑内采到的多头蚴原头节为原料,提取总 RNA,RT-PCR 技术扩增出目的基因的全序列,命名为 Tm7 基因。

[0046] (2) PCR 产物测序正确后,克隆出目的基因的开放阅读框 ORF,将其连接到 pMD 18-T 载体,转化到大肠杆菌 DH5 α 后测序,发现克隆到的目的基因的开放阅读框为 207 bp,编码 68 个氨基酸。

[0047] (3) 将此片段亚克隆入 pET-32a(+) 载体,构建重组表达质粒 pET-32a-Tm7,经转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后 IPTG 诱导表达,用 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测表达产物。

[0048] (4) 将目的蛋白样品过 Ni-Charged Resin 柱纯化,收集洗脱峰蛋白液,进行电泳检测,获得纯度很高的目的蛋白即为基因重组抗原蛋白。

[0049] 下面是为建立检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒所需的间接 ELISA 最佳工作条件的确定：

[0050] 表 1 是方阵试验的 P/N 值结果

[0051] Table1 The P/N ratios of checkerboard titration

[0052]

血清稀释倍数 Dilution of serum	抗原包被浓度 ($\mu\text{g/ml}$) Concentration of antigen			
	1	2.5	5	10
1: 20	2.19	2.40	2.03	1.84
1: 40	2.55	2.52	2.09	1.95
1: 80	2.43	2.64	2.21	2.06
1: 160	2.59	2.88	2.36	2.34
1: 320	2.60	2.88	2.44	2.27

[0053] 根据方阵试验的结果可知(见表 1), P/N 值随着抗原浓度的减小,先增大,后减小;而随血清稀释倍数的增大而逐渐增大。当抗原浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$,血清稀释倍数为 1:40 时, P/N 值较大,且阳性血清的 OD 值接近 1,故蛋白的最佳包被浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$,血清最佳稀释比为 1:40。一抗最佳反应时间为 1 h,酶标二抗工作浓度为 1:5000,反应时间为 37°C 45 min,底物 37°C 显色 15 min。

[0054] 实施例 1 间接 ELISA 检测方法的建立：

[0055] (1) 抗原包被浓度及抗体稀释度的确定

[0056] 将重组蛋白用包被液稀释为 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 和 $1 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{L}$ /孔包被 96 孔板, 4°C 过夜;常规方法洗涤、封闭后,将阴性和阳性血清分别按 1:20、1:40……1:320 倍比稀释,每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 反应 2 h。后面步骤按常规间接 ELISA 方法进行。以 P/N 值最大时的条件为最适抗原浓度和最适血清稀释度。

[0057] (2) 酶标二抗稀释度的确定

[0058] 抗原和血清最适浓度确定以后,将辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊 IgG 按 1:5000、1:7500、1:10000 和 1:15000 倍稀释,反应 1 h,再加入底物显色,当出现 P/N 值最大的二抗浓度为最佳稀释度。

[0059] (3) 血清最佳作用时间的确定

[0060] 将抗原和血清稀释到最佳浓度后,分别反应 0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h,加入酶标二抗,显色测定 OD_{490} ,以 P/N 值确定最佳反应时间。

[0061] (4) 酶标二抗最佳作用时间的确定

[0062] 加二抗后分别作用 30 min、45 min、60 min 和 90 min,常规方法进行 ELISA 实验,比较各组阴阳性血清的 OD_{490} 值和 P/N 值,以确定二抗最佳的反应时间。

[0063] (5) 底物显色时间的确定

[0064] 用抗原包被好的诊断膜片,按照前面设定的 ELISA 程序依次包被、封闭、加入标准阴阳血清,再和酶标二抗反应,然后加底物显色,在 37°C 下不同时间内测定它们的 OD_{490} 值,选取 P/N 值最大的一组为最佳显色时间。需要说明的是底物溶液 1.5 是底物缓冲液 DAB。分 A 液: 0.1 mol/L 柠檬酸溶液

[0065]

柠檬酸	19.2 g
加蒸馏水至	1000 mL

[0066] B液:0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液

[0067]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71.7 g
加蒸馏水至	1000 mL

[0068] 临用前取A液4.86 mL与B液5.14 mL,加入OPD 4 mg,待充分溶解后加入30%的过氧化氢 50 μL ,即成底物应用液。

[0069] 实施例2 间接ELISA方法临界值的确定:

[0070] 按照已建立的间接ELISA方法检测12份经剖检没有多头蚴包囊的阴性羊血清,每孔重复两次,计算 OD_{490} 的平均值(\bar{x})及标准方差(S),**阴阳性临界值** $=\bar{x}+2S$ 。经计算阴性血清的平均OD值为0.476,标准方差为0.112,所以临界值 $=0.476+2\times 0.112=0.7$ 。在阴阳对照成立的情况下, OD_{490} 大于0.7就可以判定为脑多头蚴抗体阳性,否则判为阴性。

[0071] 实施例3 试剂盒敏感性和特异性检测试验:

[0072] A、采集12头份未出现羊脑多头蚴感染临床症状、剖检后未发现有虫体的待检羊血清,根据上述确定的最佳反应条件进行羊多头蚴酶联免疫检测。12份阴性血清的OD值均低于临界值。

[0073] B、临床采集15头份出现羊脑多头蚴感染临床症状、剖检后发现有虫体的待检羊血清进行酶联免疫检测。结果其中1份血清出现OD值低于临界值,其余14份血清均有明显的斑点出现,判定为阳性;敏感性为93.3%。

[0074] C、采集5头份出现羊细颈囊尾蚴感染临床症状、剖检后发现有虫体的待检羊血清,根据上述确定的最佳反应条件进行羊多头蚴酶联免疫检测,5份细颈囊尾蚴血清仅有1份高于临界值,说明细颈囊尾蚴患畜的血清能与该重组蛋白非特异性结合。

[0075] 下面是本发明所述的羊多头蚴基因重组抗原蛋白的氨基酸序列表SEQID NO: 1及核苷酸序列表SEQID NO: 2所示序列:

[0001]

羊多头蚴基因重组抗原蛋白的氨基酸序列表 SEQID NO: 1

SEQID NO: 1 TM7 基因氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 四川农业大学
 <120> 发明
 <130> 一种检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 脑多头蚴
 <400> 1

Ala Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Cys Thr Thr Thr Thr
 20 25 30
 Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly
 35 40 45
 Gly Ala Cys Ala Ala Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Met Gly Leu Lys
 50 55 60
 Glu Thr Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Leu Asp Lys Asp Lys Ser Gly
 65 70 75 80
 Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly
 85 90 95
 Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Gly Cys Ala Thr Thr
 100 105 110
 Ala Gly Ala Gly Thr Cys Gly Thr Ala Cys Thr Cys Gly Gly Cys Gly

[0002]

115	120	125	
Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys Thr Cys Gly Ala Cys Lys Ile Ser Cys			
130	135	140	
Ala Glu Leu Lys Ser Ala Leu Glu Ser Tyr Ser Ala Glu Pro Leu Asp			
145	150	155	160
Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly			
	165	170	175
Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Gly Ala Thr Ala Ala Gly Cys Thr			
	180	185	190
Gly Gly Ala Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly Gly Ala Thr			
	195	200	205
Gly Gly Cys Gly Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Cys Glu Ser His Val			
	210	215	220
Lys Ala Phe Phe Asp Lys Leu Asp Ser Asn Lys Asp Gly Glu Leu Ser			
225	230	235	240
Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly			
	245	250	255
Cys Thr Cys Thr Ala Thr Thr Cys Thr Gly Ala Leu Asp Glu Leu Met			
	260	265	270
Ala Leu Phe			
	275		

羊多头蚴基因重组抗原蛋白核苷酸序列表 SEQID NO: 2

SEQID NO: 2 Tm7 基因核苷酸序列表

SEQUENCE LISTING

- <110> 四川农业大学
 <120> 一种检测羊多头蚴的酶联免疫试剂盒
 <130> 发明
 <160> 1

[0003]

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 378

<212> DNA

<213> 脑多头蚴

<400> 1

ggtcgacgat ttgtcctcc tttcctgtc aagtcattggg tctcaaagaa acagttgaga 60

agcttttcgc tgagttggac aaggacaagt cgggcaagat cagctgtgct gagctcaaat 120

ccgcattaga gtcgtactcg gcggaacccc tcgacgaaag ccacgtgaag gctttcttcc 180

ataagctgga ctccaacaag gatggcgagt tgagcctaga tgagttaatg gctctattct 240

gagccgagga ctagctgac gggctcagtc tcattcttct taccctctct ctctcctaat 300

tcgccggtct atgtgcttcg ctaaatttca ttgtcatgtc gagaaaagtc gtgctactat 360

caataaatac tgagttat 378

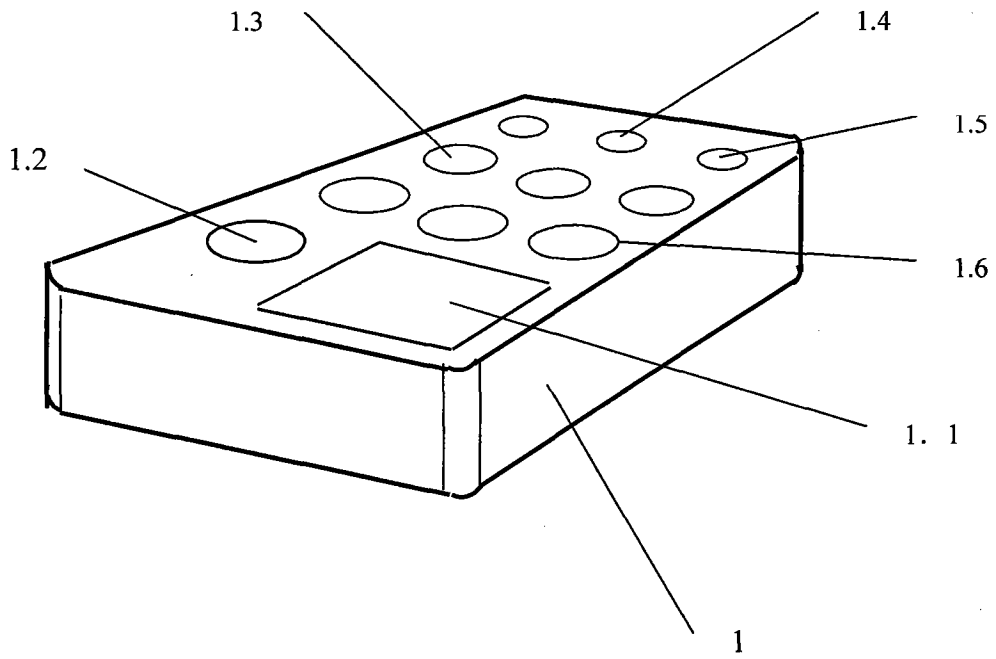


图 1

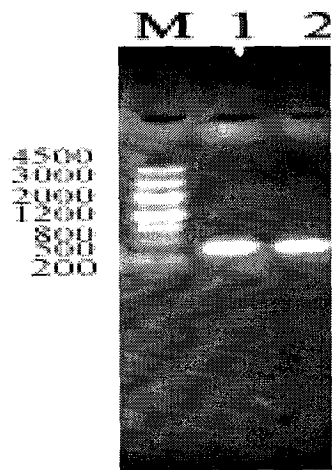


图 2

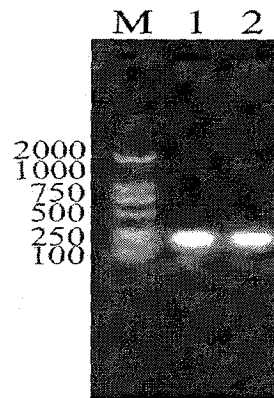


图 3

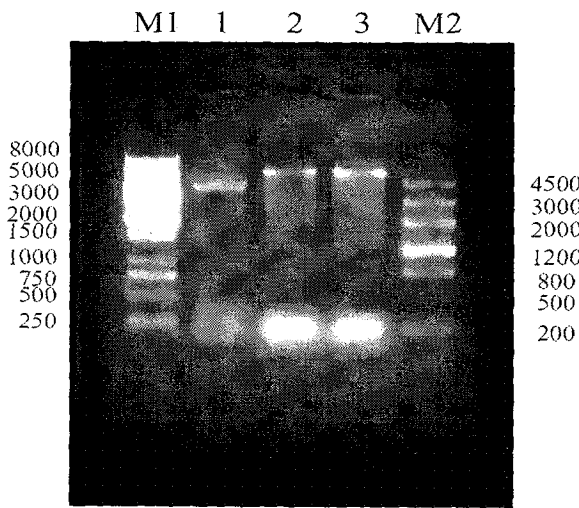


图 4

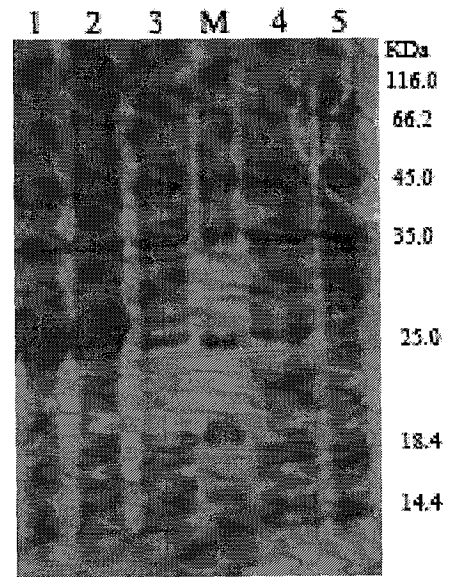


图 5

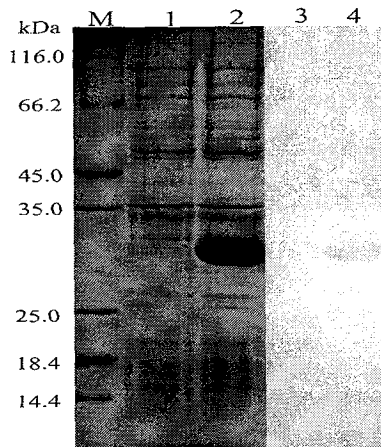


图 6

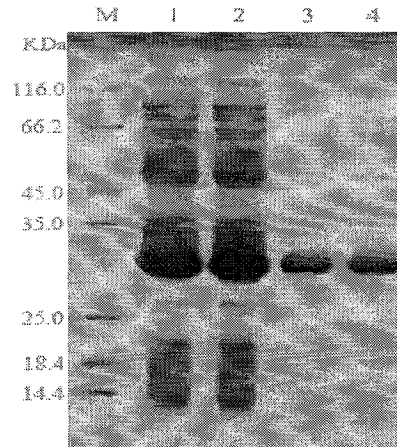


图 7

专利名称(译)	利用基因重组抗原检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN101968489B	公开(公告)日	2013-02-06
申请号	CN201010261673.4	申请日	2010-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	杨光友 安晓雪 古小彬 彭雪蓉 王淑贤		
发明人	杨光友 安晓雪 古小彬 彭雪蓉 王淑贤		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N27/447 C12N15/12 C12N15/70 C07K14/435		
其他公开文献	CN101968489A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种利用基因重组抗原检测羊多头蚴病的酶联免疫试剂盒，涉及寄生虫病免疫抗体检测技术领域。其包被原是羊多头蚴基因重组抗原蛋白，酶标记物是酶标抗体；酶标抗体是羊脑多头蚴病阳性羊血清为一抗，辣根过氧化物酶偶联兔抗羊IgG为二抗；羊多头蚴基因重组抗原蛋白，其氨基酸序列为表SEQ ID NO：1所示序列，其核苷酸序列为表SEQ ID NO：2所示序列；表达重组体是pET-32a-Tm7重组表达质粒；诊断膜片是包被有包被原的硝酸纤维素膜，阴性对照血清是未患羊脑多头蚴病的阴性对照血清，阳性对照血清是羊脑多头蚴病阳性对照血清，底物溶液是DAB缓冲液，洗涤液是pH7.4PBST缓冲液；上属液体的均分装在小瓶内，置试剂盒中；人工合成重组抗原，构建了简单、快速的脑多头蚴病诊断方法所需的酶联免疫试剂盒。

