



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102621304 A

(43) 申请公布日 2012.08.01

(21) 申请号 201110031816.7

(22) 申请日 2011.01.30

(71) 申请人 吉林农业大学

地址 130118 吉林省长春市南关区新城大街
2888 号

(72) 发明人 杜锐 刘东旭 时坤 李建明

刁燕 刘晓 张梦 于淼

(74) 专利代理机构 吉林省长春市新时代专利商

标代理有限公司 22204

代理人 孙国振

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法

(57) 摘要

鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,属于兽医领域。用于鹿布氏杆菌病诊断,提高相对现有技术的诊断水平。本发明的检测方法所用生物材料包括:作为抗原的布氏杆菌猪型2号苗(S₂)、酶标抗体兔抗鹿 IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清;检测步骤包括:抗原包被、洗涤、加血清、加兔抗鹿 IgG-HRP、加底物液、终止反应、用酶联检测仪在 490nm 处空白调零,并测每孔的 OD 值,OD 值 \geq 0.32 判定为阳性。本发明的积极效果是,以布氏杆菌猪型2号苗(S₂)为抗原,兔抗鹿 IgG-HRP 为酶标抗体,用间接酶联免疫吸附检测诊断鹿布氏杆菌病,和以往的诊断方法相比,具有特异性、敏感性和重复性较好,诊断精确的优点。

1. 鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:

(1) 所用生物材料包括:作为抗原的布氏杆菌猪型 2 号苗、酶标抗体兔抗鹿 IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清;

(2) 检测步骤包括:

①抗原包被

在酶标板上选定待检血清、阳性血清对照、阴性血清对照、抗原对照、酶标抗体对照、抗体对照孔及底物对照七种培养孔;将经超声波粉碎的布氏杆菌猪型 2 号苗用抗原稀释液以疫苗比稀释液 1 : 12.5-1 : 50 的比例稀释,等量加入待检血清孔、阳性血清对照孔、阴性血清对照孔及抗原对照孔中,在兔抗鹿 IgG-HRP 对照孔、抗体对照孔及底物对照孔中加入与前述抗原液等体积的浓度为 50mg/ml 的牛血清白蛋白,之后将酶标板置 35℃ -42℃温箱孵育 2-4h;

②洗涤

取出酶标板,甩去微孔中的溶液,向全部待检血清孔和对照孔加入洗液,加入量为将孔加满为止,室温下放置 3min 以上,然后倒掉,如此反复三次,空干;

③加血清

将被检血清加稀释液按血清比稀释液 1 : 50-1 : 200 的比例稀释,等量加到待检血清孔中、在阳性血清对照孔和抗体对照孔中加入用 8-10 倍标准阳性血清体积的稀释液稀释的阳性血清液,在阴性血清对照孔中加用 8-10 倍标准阴性血清体积的稀释液稀释的阴性血清液,在抗原对照孔中加入血清稀释液,前述材料的加入量均与步骤①中每孔所加抗原液的体积相同,之后置 37℃温箱中 0.25-1h 后,3×3' 洗涤;

④加兔抗鹿 IgG-HRP

将兔抗鹿 IgG-HRP 用抗原稀释液按兔抗鹿 IgG-HRP 比稀释液 1 : 1600-6400 的比例稀释,等量加入全部待检血清孔和对照孔中,每孔加入量与步骤①中每孔所加抗原液的体积相同,之后置 35℃ -42℃温箱中 0.25-1h 后,3×3' 洗涤;

⑤加底物液

在全部待检血清孔和对照孔中加底物液,每孔加入量与步骤①中每孔所加抗原液的体积相同,置 35℃ -42℃温箱中 0.25-1h。

⑥终止反应

取出反应板,在全部待检血清孔和对照孔中加的 2M H₂SO₄,以终止反应,每孔加入量为步骤①中每孔所加抗原液的体积的 1/2;

⑦使用仪器测量

完成步骤⑥的酶标板静止 5min 后,将其放在酶联免疫检测仪上,在 490nm 处空白调零,并测每孔的 OD 值,OD 值 ≥ 0.32 判定为阳性。

2. 根据权利要求 1 所述的鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的兔抗鹿 IgG-HRP 通过以下过程制备:

(1) 制备兔抗鹿 IgG

取来自健康鹿的血清,用 50% 饱和 (NH₄)₂SO₄ 盐析一次后,再用 37.5% 饱和 (NH₄)₂SO₄ 盐析三次,提取鹿血清 IgG,充分透析至无 NH₄⁺、SO₄²⁺。以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液透析平衡,过 DEAE-32 柱,以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液洗脱,收集蛋白部分,测定蛋白含量;以聚丙烯酰

胺圆盘电泳鉴定其纯度,以鹿血清对照,若在加有过柱鹿血清 IgG 的凝胶管内仅有一条带,且此带的位置恰与加鹿血清的凝胶柱上的 γ -球蛋白带组中最后一条带相一致,则说明所提蛋白为鹿 IgG,且纯度高,将所提鹿血清 IgG 浓缩, -20°C 冰箱中保存备用;

(2) 制备兔抗鹿 IgG-HRP

按下述用量或用量相等倍数变化所取的原料及过程制备:

将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 0.5ml 蒸馏水中,加入新配制的 0.06M 的 NaIO_4 水溶液 0.5ml,混匀置冰箱中 4°C 30min,取出后加入 0.16M 的乙二醇水溶液 0.5ml,于室温放置 30min 后,加入含有 5mg 纯化兔抗鹿 IgG 的水溶液 1ml,混匀并装入透析袋,放于 800ml, 0.05M pH9.5 碳酸盐缓冲液搅拌 6h,使之结合,然后,从透析袋中吸收出来,加入浓度为 5mg/ml 的 NaBH_4 溶液 0.2ml,置 4°C 冰箱中 2h,将上述结合物混合液加入等体积 pH7.0 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,置 4°C 冰箱中 30min, 3000r/min 离心 30min,将得到的沉淀物溶于 2~3ml, 0.02M pH7.4 磷酸盐缓冲液中,并在 800ml PBS 中透析 12h,中间换液三次,然后 4000r/min 离心 5min,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶-兔抗鹿 IgG 结合物,最后,用 PBS 加至 4.5ml 分装, -20°C 冷冻保存备用。

3. 根据权利要求 1 所述的鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的抗原通过以下过程预处理,用灭菌蒸馏水稀释布氏杆菌猪型 2 号苗,并制成 100 亿 /ml 菌液,菌液至于 -20°C 冷冻 1h 后,放于室温融解 1h,反复冻融 3 次,置超声波破碎器中作用 15min 后, 12000r/min 离心 1min 去沉淀,其上清液装入透析袋中,以 1ml 菌液用 800ml 的比例,用生理盐水透析,浓缩和测定蛋白含量,当蛋白含量为 $3.0\mu\text{g/ml}$ 时,分装保存于冰箱中备用。

4. 根据权利要求 1 所述的鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的抗原稀释液为:按碳酸钠 0.318g、碳酸氢钠 0.560g、加入去离子水得 1000ml 体积的用量比例取材,先用少量去离子水使固体物溶解,待完全溶化后补充加入全部去离子水所得到的溶液。

5. 根据权利要求 1 所述的鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的洗液为:按磷酸氢二钠 2.90g、磷酸二氢钾 0.20g、氯化钠 8.0g、氯化钾 0.20g、吐温 -200.5ml 、加入去离子水得 1000ml 体积的用量比例取材,先用少量去离子水使固体物溶解,待完全溶化后补充加入全部去离子水所得到的溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的血清及酶标抗体稀释液为:以每 0.1g 牛血清白蛋白加本发明中制备的洗液 100ml 的比例混合,溶化混匀所得到的溶液。

7. 根据权利要求 1 所述的鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的底物溶液为以下按过程及材料用量比例所得到的溶液;柠檬酸 0.467g、磷酸氢二钠 1.841g、加去离子水 100ml,溶化后加邻苯二胺 0.04g、溶化混匀后加过氧化氢 0.15ml,再混合均匀。

鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法

技术领域

[0001] 本发明属于兽医学,具体涉及鹿布氏杆菌病的血清检测诊断方法

技术背景

[0002] 布氏杆菌病是由布氏杆菌感染引起的世界范围内的重要人畜共患传染病。它的危害程度极大,不仅影响人们的身体健康,阻碍畜牧业的发展,还可造成严重的经济损失。

[0003] 鹿布氏杆菌病是由布氏杆菌引起的一种鹿的慢性传染病,本病主要侵害生殖系统,致使母鹿发生流产和乳腺炎,公鹿发生睾丸炎和附睾炎。自 1940 年鹿布氏杆菌病被首次确立以来,鹿的布病广泛发生于世界各地,给养鹿业带来了严重的经济损失。据国外报道,鹿布氏杆菌病在一些鹿群的感染率高达 50%~60%,个别鹿群甚至更高。目前,有关鹿的布病的特异性诊断方法尚未缺乏研究。

[0004] 近二十几年来,免疫学分析方法发展很快,特别是在使用标记了的抗原和抗体的分析技术以后,使原来许多经典的分析方法在敏感性和特异性方面都不能相比。继 50 年代的免疫荧光 (IFA) 和 60 年代的放射免疫 (RIA) 分析技术之后,在 70 年代初期又建立了用酶来标记抗原或抗体的分析技术。由于酶的高效生物催化作用,一个酶分子在数分钟内可以催化几十几百个底物分子发生反应,产生了放大作用,使得原来极其微乎其微的抗原或抗体在数分钟后就可被识别出来,这种技术被称为酶联免疫吸附试验法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA),本试验方法自 70 年代初期由 VAN WEEMEN、SCHUARS. ENGVALL 及 PERLMARN 等相继分别报道后,现已引起广泛重视。现已成功地应用于多种病原微生物所引起的传染病、寄生虫病及非传染病等方面的免疫诊断。也已应用于大分子抗原和小分子抗原的定量测定,根据已经使用的结果,认为 ELISA 法具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点。不仅适用于临床标本的检查,而且由于一天之内可以检查几百甚至上千份标本,因此,也适合于血清流行病学调查。本法不仅可以用来测定抗体,而且也可用于测定体液中的循环抗原,所以也是一种早期诊断的良好方法。因此 ELISA 法在生物学各领域的应用范围日益扩大。

[0005] 酶联免疫吸附试验法以其灵敏度高 (可达 ng 甚至 pg 水平),特异性好等优点,在生命科学各领域得到广泛应用,它已迈出医药、临床领域,步入农业、渔业、畜牧业和食品加工业。

[0006] 1976 年, Cavleson 等首次应用 ELISA 方法检测牛布氏杆菌抗体并发现其敏感性比试管凝集试验 (SAT) 高 10~20 倍后,许多学者相继应用 ELISA 对人、牛等动物的布氏杆菌病抗体检测进行了研究,结果均表明:ELISA 比传统的 SAT、补体结合试验 (CFT) 敏感,且特异性高。

[0007] 目前,对鹿的布病检测,还停留在平板和试管凝集试验等常规的血清学方法上,并以家畜判定标准作为鹿的判定标准。其特异性,敏感性,重复性和用 ELISA 方法检测牛等动物布氏杆菌病抗体所得的结果相比较,差距很大。说明以往的鹿的布病检测,仍停留在较低的水平。

发明内容：

[0008] 本发明的目的是提供一种鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法,用于鹿布氏杆菌病诊断,提高相对现有技术的诊断水平。

[0009] 本发明的检测方法所用生物材料包括:作为抗原的布氏杆菌猪型 2 号苗 (S_2)、酶标抗体兔抗鹿 IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清:

[0010] 本发明的检测方法检测步骤包括:

[0011] 1、抗原包被

[0012] 在酶标板上选待检血清、阳性血清对照、阴性血清对照、抗原对照、酶标抗体对照、抗体对照孔及底物对照七种用途的培养孔;将经超声波粉碎的布氏杆菌猪型 2 号苗用抗原稀释液按疫苗比稀释液 1 : 12.5-1 : 50 的比例稀释。等量加入试验孔、阳性血清对照孔、阴性血清对照孔及抗原对照孔中,在兔抗鹿 IgG-HRP 对照孔、抗体对照孔及底物对照孔中加入与前述抗原液等体积的浓度为 50mg/ml 的牛血清白蛋白,之后将酶标板置 35℃ -42℃ 温箱孵育 2-4h;

[0013] 2、洗涤

[0014] 取出酶标板,甩去微孔中的溶液,向全部待检血清孔和对照孔等量加入洗液,加入量为将孔加满为止,之后室温 (15-25℃) 下放置 3min,后倒掉,如此反复三次,空干 (简称 3×3');

[0015] 3、加血清

[0016] 将被检血清加稀释液按血清比稀释液 1 : 50-1 : 200 比例稀释,等量加到待检血清孔中,在阳性血清对照孔和抗体对照孔中加入用 8-10 倍标准阳性血清体积的稀释液稀释的阳性血清液,在阴性血清对照孔中加入用 8-10 倍标准阴性血清体积的稀释液稀释的阴性血清液,在抗原对照孔中加入血清稀释液,前述材料的加入量均与步骤 1 中每孔所加抗原液体积相同,之后置 35℃ -42℃,温箱中 0.25-1h 后,3×3' 洗涤;

[0017] 4、加兔抗鹿 IgG-HRP

[0018] 将兔抗鹿 IgG-HRP 用抗原稀释液按兔抗鹿 IgG-HRP 比稀释液 1 : 1600-1 : 6400 的比例稀释,等量加入待检血清孔和对照孔中,每孔加入量与步骤 1 中每孔所加抗原液体积相同,之后置 35℃ -42℃ 温箱中 0.25-1h 后,3×3' 洗涤;

[0019] 5、加底物液

[0020] 在全部待检血清孔和对照孔中加底物液,每孔加入量与步骤 1 中每孔所加抗原液体积相同,置 35℃ -42℃ 温箱中 0.25-1h。

[0021] 6、终止反应

[0022] 取出反应板,在全部待检血清孔和对照孔中加的 2M H_2SO_4 ,以终止反应,每孔加入量为步骤 1 中每孔所加抗原液体积的 1/2。

[0023] 7、使用仪器测量

[0024] 完成步骤 6 的酶标板静止 5min 后,将其放在酶联免疫检测仪上,在 490nm 处空白调零,并测每孔的 OD 值,OD 值 ≥ 0.32 判定为阳性。

[0025] 以上为本发明基本方案

[0026] 本发明的兔抗鹿 IgG-HRP 的获得是先制得兔抗鹿 IgG,再用兔抗鹿 IgG 和辣根过氧

化物酶 (HRP) 制备兔抗鹿 IgG-HRP。

[0027] 制备兔抗鹿 IgG

[0028] 取来自健康鹿的血清,用 50% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析一次后,再用 37.5% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析三次,提取鹿血清 IgG,充分透析至无 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 。以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液透析平衡,过 DEAE-32 柱。以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液洗脱,收集蛋白部分,测定蛋白含量;以聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定其纯度。以鹿血清对照,若在加有过柱鹿血清 IgG 的凝胶管内仅有一条带,且此带的位置恰与加鹿血清的凝胶柱上的 γ -球蛋白带组中最后一条带相一致,则说明所提蛋白为鹿 IgG,且纯度高。将所提鹿血清 IgG 浓缩, -20°C 冰箱中保存 备用。

[0029] 制备兔抗鹿 IgG-HRP

[0030] 按下述用量或用量相等倍数变化所取的原料及过程制备:

[0031] 将 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 0.5ml 蒸馏水中,加入新配制的 0.06M 的 NaIO_4 水溶液 0.5ml,混匀置冰箱中 4°C 30min,取出后加入 0.16M 的乙二醇水溶液 0.5ml,于室温放置 30min 后,加入含有 5mg 纯化兔抗鹿 IgG 的水溶液 1ml,混匀并装入透析袋,放于 800ml, 0.05M pH9.5 碳酸盐缓冲液搅拌 6h,使之结合。然后,从透析袋中吸收出来,加入 NaBH_4 溶液 (5mg/ml) 0.2ml,置 4°C 冰箱中 2h,将上述结合物混合液加入等体积 pH7.0 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,置 4°C 冰箱中 30min,3000r/min 离心 30min,将得到的沉淀物溶于 2~3ml, 0.02M pH7.4 磷酸盐缓冲液中,并在 800ml PBS 中透析 12h,中间换液三次,然后 4000r/min 离心 5min,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶 (HRP)-兔抗鹿 IgG 结合物。最后,用 PBS 加至 4.5ml 分装。 -20°C 冷冻保存备用。

[0032] 本发明所用抗原通过以下过程预处理,用灭菌蒸馏水稀释布氏杆菌猪型 2 号苗,并制成 100 亿 /ml 菌液,菌液至于 -20°C 冷冻 1h 后,放于室温融解 1h,反复冻融 3 次,置超声波破碎器中作用 15min 后,12000r/min 离心 1min 去沉淀,其上清液装入透析袋中,以 1ml 菌液用 800ml 的比例,用生理盐水透析,浓缩和测定蛋白含量,当蛋白含量为 $3.0\mu\text{g/ml}$ 时,分装保存于冰箱中备用。

[0033] 本发明中使用的抗原稀释液为:

[0034] 按碳酸钠 (Na_2CO_3) 0.318g、碳酸氢钠 (NaHCO_3) 0.560g、加入去离子水 1000ml 体积的用量比例取材,先用少量去离子水使固体物溶解,待完全溶化 后补充加入全部去离子水后,所得到的溶液。

[0035] 本发明中使用的洗液为:

[0036] 按磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.90g、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.20g,氯化钠 (NaCl) 8.0g、氯化钾 (KCl) 0.20g、吐温-20 (Tween-20) 0.5ml、加入去离子水 1000ml 体积的用量比例取材,先用少量去离子水使固体物溶解,待完全溶化后补充加入全部去离子水所得到的溶液。

[0037] 本发明中使用的血清及酶标抗体稀释液为

[0038] 以每 0.1g 牛血清白蛋白加本发明中制备的洗液 100ml 的比例混合,溶化混匀所得到的溶液。

[0039] 本发明中的底物溶液为:

[0040] 按柠檬酸 0.467g、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 1.841g、加去离子水 100ml,溶化后

加邻苯二胺 0.04g、溶化混匀后加过氧化氢 (H₂O₂) 0.15ml,再混合均匀,过程及材料用量比例所得到的溶液。

[0041] 本发明的积极效果是,以布氏杆菌猪型 2 号苗 (S₂) 为抗原,兔抗鹿 IgG-HRP 为酶标抗体,用间接酶联免疫吸附检测诊断鹿布氏杆菌病,和以往的诊断方法相比,具有特异性、敏感性和重复性较好,诊断精确的优点。

[0042] 效果验证

[0043] 1、布氏杆菌脂多糖抗原 (LPS,脂抗),超声波破碎抗原 (SA,超抗)、布氏杆菌离心抗原 (SAT,离抗) 三种抗原各要素条件的比较

[0044] 表 1 三种抗原 ELISA 各要素条件的比较

[0045]

项目	抗原		
	脂抗	超抗	离抗
抗原包被浓度	1:40	1:25	1:10
抗原包被时间	3h (37℃)	3h (37℃)	3h (37℃)
抗体稀释度	1:100	1:100	1:100
抗体工作时间	1h (37℃)	0.5h (37℃)	1h (37℃)
酶结合物工作浓度	1:3200	1:3200	1:3200
底物作用时间	1.5h (37℃)	0.5h (37℃)	1h (37℃)
参考阳性/阴性血清符合率	100%	100%	100%
检测抗体滴度	1:1600	1:6400	1:3200
重复率试验变异系数差	2.97%	0.87%	1.15%

[0046]

[0047] 从表 1 可以看出脂抗、超抗和离抗三种抗原的 ELISA 其特异性,敏感性和重复性都很好,三种抗原均可做 ELISA 抗原用来检测鹿布氏杆菌病。比较之下其中超抗优于其他二种抗原,除了其特异性、敏感性和重复性较好外,而且抗体和底物作用时间较短,因此选择超抗为最佳抗原用作试验。

[0048] 2、平板、试管和 ELISA 的敏感性比较试验

[0049] 将 6 份参考阳性血清分别按 1 : 25、1 : 50……1 : 6400 稀释,分别做平板、试管和超抗 ELISA,并比较三种方法的敏感性。结果见表 2。

[0050] 表 2 三种血清学方法的敏感性试验

[0051]

项目	血清稀释度									
	25 [×]	50 [×]	100 [×]	200 [×]	400 [×]	800 [×]	1600 [×]	3200 [×]	6400 [×]	
平板	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
试管	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ELISA	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-

[0052]

[0053] 从表 2 检测结果证明,ELISA 法的敏感性远远高出平板法和试管法。ELISA 法检出血清最高滴度为 1 : 6400,而平板法和试管法仅为 1 : 400,也就是说 ELISA 法的敏感性比平板法和试管法高 3-4 个稀释度。

[0054] 3、现场检测试验结果

[0055] 表 3 现场检测试验结果

[0056]

项目	试验数	阳性数	阴性数	可疑数	阳性检出率
平板	300	26	262	12	8.66%
ELISA	300	42	258	0	14.0%

[0057] 从表 3 可以看出,在对 300 份血清的检测中,ELISA 阳性检出数为 42 头,检出率为 14%;平板的检出数为 26 头,阳性检出率为 8.66%,ELISA 法比平板试验的阳性检出率高

5.34%。ELISA 检测的 42 份阳性血清中包括平板法阳性的 26 份血清,同时,平板法可疑的 12 份血清和平板法阴性中的 4 份也为 ELISA 阳性。因而,ELISA 检出率高于平板法的检出率。

具体实施方式

[0058] 1、材料准备

[0059] (1) 材料:

[0060] 布氏杆菌猪型 2 号苗 (S_2)、标准阳性血清、标准阴性血清;

[0061] (2) 制备酶标抗体——兔抗鹿 IgG-HRP:

[0062] 将 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 0.5ml 蒸馏水中,加入新配制的 0.06M 的 NaIO_4 水溶液 0.5ml,混匀置冰箱中 4°C 30min,取出后加入 0.16M 的乙二醇水溶液 0.5ml,于室温放置 30min 后,加入含有 5mg 纯化兔抗鹿 IgG 的水溶液 1ml,混匀并装入透析袋,放于 800ml, 0.05M pH9.5 碳酸盐缓冲液搅拌 6h,使之结合。然后,从透析袋中吸收出来,加入 NaBH_4 溶液 (5mg/ml) 0.2ml,置 4°C 冰箱中 2h,将上述结合物混合液加入等体积 pH7.0 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,置 4°C 冰箱中 30min,3000r/min 离心 30min,将得到的沉淀物溶于 2~3ml, 0.02M pH7.4 磷酸盐缓冲液中,并在 800ml PBS 中透析 12h,中间换液三次,然后 4000r/min 离心 5min,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶 (HRP)-兔抗鹿 IgG 结合物。最后,用 PBS 加至 4.5ml 分装。 -20°C 冷冻保存备用。

[0063] (3) 抗原预处理:

[0064] 用灭菌蒸馏水稀释布氏杆菌猪型 2 号苗,并制成 100 亿/ml 菌液,以 1ml 菌液为例,菌液至于 -20°C 冷冻 1h 后,放于室温融解 1h,反复冻融 3 次,置超声波破碎器中作用 15min 后,12000r/min 离心 1min 去沉淀,其上清液装入透析袋中,用 800ml 生理盐水透析,浓缩和测定蛋白含量,当蛋白含量为 $3.0\mu\text{g/ml}$ 时,分装保存于冰箱中备用。

[0065] (4) 制备抗原稀释液

[0066] 碳酸钠 (Na_2CO_3) 0.318g,碳酸氢钠 (NaHCO_3) 0.560g,加去离子水少量使其溶解,待完全溶化后补充去离子水至 1000ml,混匀,并调 pH 9.6。

[0067] (5) 制备洗液

[0068] 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.90g,磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.20g,氯化钠 (NaCl) 8.0g,氯化钾 (KCl) 0.20g,吐温-20 (Tween-20) 0.5ml,去离子水少量使其溶解,待完全溶化后补充去离子水至 1000ml,混匀,并调 pH 7.4。

[0069] (6) 制备血清及酶标抗体稀释液:

[0070] 以每 0.1g 牛血清白蛋白加前述第 (5) 项制备的洗液 100ml 的比例混合,溶化混匀。

[0071] (7) 制备底物溶液:

[0072] 用柠檬酸 0.467g,磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 1.841g,加去离子水 100ml,溶化后加邻苯二胺 0.04g,溶化混匀后加过氧化氢 (H_2O_2) 0.15ml,混匀。

[0073] 2、检测操作步骤:

[0074] (1) 抗原包被

[0075] 取 96 孔酶标板,划分出阳性对照、阴性对照、抗原对照、酶标抗体对照、抗体对照、

底物对照 6 个孔为对照组, 剩余 90 个孔为待检血清孔。将预处理的抗原用本发明中制备的抗原稀释液稀释, 抗原与稀释液的用量体积比例为 1 : 25。在试验组及阳性对照、阴性对照和抗原对照的孔中, 各加入 0. 1ml 稀释后的抗原; 在兔抗鹿 IgG-HRP 对照、抗体对照和底物对照的孔中, 各加入 0. 1ml, 浓度为 50mg/ml 的牛血清白蛋白。置 37℃温箱孵育 3h。

[0076] (2) 洗涤

[0077] 取出酶标板, 甩去微孔中的溶液, 用 1-(5) 制备的洗液加满各孔清洗, 室温 (15-25℃) 下放置 3min 后倒掉, 如此反复三次, 空干 (简称 3×3')。

[0078] (3) 加血清

[0079] 将被检血清用血清稀释液按血清比稀释液 1 : 100 的比例稀释, 加入待检血清孔中, 每孔加 0. 1ml, 每份血清加两孔。在对照组中, 阳性对照孔和抗体对照孔分别加入 0. 1ml 标准阳性血清稀释液 (标准阳性血清与血清稀释液的比例为 1 : 9), 阴性对照孔中入 0. 1ml 标准阴性血清稀释液 (标准阴性血清与血清稀释液的比例为 1 : 9), 抗原对照孔中加入 0. 1ml 血清稀释液。置 37℃温箱中 0. 5h 后, 3×3' 洗涤。

[0080] (4) 加酶标抗体 - 兔抗鹿 IgG-HRP

[0081] 将兔抗鹿 IgG-HRP 用 1-(6) 稀释液按兔抗鹿 IgG-HRP 比稀释液 1 : 3200 的比例稀释, 等量加入全部待检血清孔和对照孔中, 每孔加 0. 1ml, 置 37℃温箱中 0. 5h 后, 3×3' 洗涤。

[0082] (5) 加底物液

[0083] 全部待检血清孔和对照孔中加底物溶液, 每孔加 0. 1ml, 置 37℃温箱中 0. 5h。

[0084] (6) 终止反应

[0085] 取出酶标板, 全部待检血清孔和对照孔中 2M H₂SO₄, 每孔加 0. 05ml, 以终止反应。

[0086] (7) 仪器上检测

[0087] 将完成步骤 (6) 的酶标板静止 5min, 之后放在酶联免疫检测仪上, 在 490nm 处空白调零, 并测每孔的 OD 值。OD 值 ≥ 0. 32 定为阳性判定标准。

专利名称(译)	鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法		
公开(公告)号	CN102621304A	公开(公告)日	2012-08-01
申请号	CN201110031816.7	申请日	2011-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
[标]发明人	杜锐 刘东旭 时坤 李建明 刁燕 刘晓 张梦 于淼		
发明人	杜锐 刘东旭 时坤 李建明 刁燕 刘晓 张梦 于淼		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	孙国振		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

鹿布氏杆菌病间接酶联免疫吸附检测法，属于兽医领域。用于鹿布氏杆菌病诊断，提高相对现有技术的诊断水平。本发明的检测方法所用生物材料包括：作为抗原的布氏杆菌猪型2号苗(S2)、酶标抗体兔抗鹿IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清；检测步骤包括：抗原包被、洗涤、加血清、加兔抗鹿IgG-HRP、加底物液、终止反应、用酶联检测仪在490nm处空白调零，并测每孔的OD值，OD值 ≥ 0.32 判定为阳性。本发明的积极效果是，以布氏杆菌猪型2号苗(S2)为抗原，兔抗鹿IgG-HRP为酶标抗体，用间接酶联免疫吸附检测诊断鹿布氏杆菌病，和以往的诊断方法相比，具有特异性、敏感性和重复性较好，诊断精确的优点。

项目	抗原		
	脂抗	超抗	离抗
抗原包被浓度	1:40	1:25	1:10
抗原包被时间	3h (37°C)	3h (37°C)	3h (37°C)
抗体稀释度	1:100	1:100	1:100