



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541199 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811417272.6

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.11.26

(71)申请人 重庆理工大学

地址 400054 重庆市巴南区李家沱红光大道69号

申请人 重庆市动物疫病预防控制中心

(72)发明人 吴胜昔 梁望旺 曾政 李令臣
李俊萱 侯力嘉 鲁友铭 蔺露
陈忠琼

(74)专利代理机构 重庆博凯知识产权代理有限公司 50212

代理人 张先芸

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法,所述试纸的底层为支撑板,该支撑板上依次黏附有紧密相连的样品垫、结合垫、NC膜和吸收垫,所述结合垫上吸附有胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体,NC膜上喷涂兔抗牛支原体P33多克隆抗体作为检测线和喷涂羊抗BALB/c小鼠IgG抗体作为质控线,检测线和质控线的线宽为1mm,检测线和质控线相距5mm,位于NC膜的中心,所述牛支原体P33蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。该试纸可用于牛支原体抗原快速检测,5~10min出结果,敏感性达5ng/mL,具有样品用量少,无交叉反应,灵敏度高,能满足低成本、现场快速诊断的要求,大大提高了检测效率。将在牛支原体病的防控中发挥重要作用,具有潜在推广应用价值。

1. 一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸,其特征在于,所述试纸的底层为支撑板,该支撑板上依次黏附有紧密相连的样品垫、结合垫、NC膜和吸收垫,所述结合垫上吸附有胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体,所述NC膜上喷涂兔抗牛支原体P33多克隆抗体作为检测线和喷涂羊抗BALB/c小鼠IgG抗体作为质控线,所述牛支原体P33蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸,其特征在于,编码所述牛支原体P33蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求1~2任一项所述快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

(1) 兔抗牛支原体P33多克隆抗体的制备

将SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列连入表达载体并转入感受态细胞中得到重组菌,再将所述重组菌诱导表达即得到牛支原体P33蛋白,将牛支原体P33蛋白免疫新西兰大白兔,采血并分离血清,并用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行初步提纯,后用Protein A柱进一步纯化,即得到兔抗牛支原体P33多克隆抗体,于-20℃保存备用;

(2) 牛支原体P33单克隆抗体的制备

将牛支原体P33蛋白为抗原,免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0细胞进行细胞融合,制备杂交瘤细胞,将阳性单克隆杂交瘤细胞注射到BALB/c小鼠腹腔,制备单抗腹水,先使用辛酸硫酸法初步纯化小鼠腹水,再采用Protein A柱纯化,即制备得到牛支原体P33单克隆抗体,-20℃保存备用;

(3) 胶体金标记的抗体的制备

用氯金酸法制备胶体金,胶体金颗粒直径为25~30nm;然后用pH8.2,0.01M PBS缓冲液将牛支原体P33单克隆抗体稀释并加入胶体金溶液中,使抗体的终浓度为12μg/mL,经离心纯化去除游离抗体和蛋白及其它小分子物质,再用1%牛血清白蛋白BSA作为稳定剂,即得到胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体,置于4℃保存备用;

(4) NC膜的制备

将兔抗牛支原体P33多克隆抗体和羊抗BALB/c小鼠IgG分别均匀喷涂到NC膜上作为检测线和质控线,检测线和质控线的线宽为1mm,检测线和质控线相距5mm,位于NC膜的中心,然后置于37℃干燥,封装后保存备用;

(5) 试剂条或测试卡的制备

将胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体吸附于结合垫上得到金标抗体结合垫,再将样品垫、金标抗体结合垫、NC膜和吸收垫按次序保持2mm的重叠宽度后粘贴至支撑板上,得到试剂板,然后将试剂板切成50mm×10mm,即得到试剂条,立即放入有干燥剂的铝箔袋内,封口;或将试剂板切成30mm×10mm,再将其放入测试卡盒内,即得到测试卡,立即放入铝箔袋内封口。

4. 一种如权利要求1~2任一项所述快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸的使用方法,其特征在于:将适量样品溶液滴加到样品垫上,静止5~10min,根据检测线和质控线的显色情况,判断样品中是否含有牛支原体,若检测线和质控线均显现,则为阳性结果,样品中含有牛支原体;若检测线不显现,质控线显现,则为阴性结果,样品中不含牛支原体;若质控线不显现,则试纸条失效。

一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测技术领域,特别的涉及一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 牛支原体 (*Mycoplasma bovis*, Mb) 是一类没有细胞壁、介于细菌和病毒之间、能进行自我复制、独立生活的简单和极微小的原核微生物,可导致牛肺炎、乳腺炎、关节炎等多种疾病,造成巨大经济损失,严重威胁着我国养牛业健康发展。

[0003] 目前现有技术对牛支原体的检测主要包括:病原分离鉴定、聚合酶链反应 (PCR)、荧光定量PCR技术、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等方法,但这些方法在临床应用上均受到了较大的限制。通过传统的病原分离鉴定,由于支原体属于兼性厌氧生物、对营养要求极其严格、而且培养周期较长(传代培养需72小时以上才能继代),分离特别耗时;国外已根据牛支原体基因序列建立了PCR、荧光PCR和全菌蛋白ELISA方法。但PCR和荧光PCR方法存在操作复杂、检测时间长、所需设备昂贵等缺点,故难以在基层推广;而以全菌蛋白建立的ELISA特异性不好,与其它支原体有交叉反应。基于重组蛋白或单克隆抗体建立的ELISA灵敏性和特异性都较高,国外已开发成商品化试剂盒,但价格昂贵,检测成本较高,国内发明专利“牛肺炎支原体的诊断试剂及应用”(专利号ZL 201310071532.X)制备牛肺炎支原体重组蛋白,并作为包被抗原,建立间接ELISA法检测牛肺炎支原体抗体,该方法检测灵敏度较高,但操作步骤较繁琐、需多次洗涤,容易产生非特异性反应。因此发明一种快速检测牛支原体抗原的诊断试剂,应对疫情进行现场及时诊断是目前养牛中急需解决的问题。

[0004] 免疫胶体金层析法是近年来兴起的一种快速诊断技术,其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该硝酸纤维素膜一端浸入样品后,由于层析作用,样品中的抗原到达固定有抗体的区带与抗体发生特异性结合,用免疫胶体金标记的抗体可显示特定颜色,从而直接判定结果。与其他检测技术相比,免疫胶体金试纸条的待检样品无需特殊处理,且用量极小(可低至50~100 μ L),5~10分钟即可判定结果;同时该方法不需要实验室平台和特殊仪器,没有诸如放射性同位素等有害物质污染环境,试验结果还可长期保存。近年来该技术已在兽医临床疫病检测中得到了广泛的应用。但针对牛支原体抗原的免疫胶体金诊断国内外鲜见报道。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法,解决现有牛支原体检测方法存在操作繁琐、检测时间长、不能实现现场快速检测和成本高的问题。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用了如下的技术方案:一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸,所述试纸的底层为支撑板,该支撑板上依次黏附有紧密相连的样品垫、结合垫、NC膜和吸收垫,所述结合垫上吸附有胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体,所述

NC膜上喷涂兔抗牛支原体P33多克隆抗体作为检测线和喷涂羊抗BALB/c小鼠IgG抗体作为质控线,所述牛支原体P33蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 进一步,编码所述牛支原体P33蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 上述快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸的制备方法,具体包括以下步骤:

[0009] (1) 兔抗牛支原体P33多克隆抗体的制备

[0010] 将SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列连入表达载体并转入感受态细胞中得到重组菌,再将所述重组菌诱导表达即得到牛支原体P33蛋白,将牛支原体P33蛋白免疫新西兰大白兔,采血并分离血清,并用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行初步提纯,后用Protein A柱进一步纯化,即得到兔抗牛支原体P33多克隆抗体,于-20℃保存备用;

[0011] (2) 牛支原体P33单克隆抗体的制备

[0012] 将牛支原体P33蛋白为抗原,免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0细胞进行细胞融合,制备杂交瘤细胞,将阳性单克隆杂交瘤细胞注射到BALB/c小鼠腹腔,制备单抗腹水,先使用辛酸硫酸法初步纯化小鼠腹水,再采用Protein A柱纯化,即制备得到牛支原体P33单克隆抗体,-20℃保存备用;

[0013] (3) 胶体金标记的抗体的制备

[0014] 用氯金酸法制备胶体金,胶体金颗粒直径为25~30nm;然后用pH8.2,0.01M PBS缓冲液将牛支原体P33单克隆抗体稀释并加入胶体金溶液中,使抗体的终浓度为12μg/mL,经离心纯化去除游离抗体和蛋白及其它小分子物质,再用1%牛血清白蛋白BSA作为稳定剂,即得到胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体,置于4℃保存备用;

[0015] (4) NC膜的制备

[0016] 将兔抗牛支原体P33多克隆抗体和羊抗BALB/c小鼠IgG分别均匀喷涂到NC膜上作为检测线和质控线,检测线和质控线的线宽为1mm,检测线和质控线相距5mm,位于NC膜的中心,然后置于37℃干燥,封装后保存备用;

[0017] (5) 试剂条或测试卡的制备

[0018] 将胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体吸附于结合垫上得到金标抗体结合垫,再将样品垫、金标抗体结合垫、NC膜和吸收垫按次序保持2mm的重叠宽度后粘贴至支撑板上,得到试剂板,然后将试剂板切成50mm×10mm,即得到试剂条,立即放入有干燥剂的铝箔袋内,封口;或将试剂板切成30mm×10mm,再将其放入测试卡盒内,即得到测试卡,立即放入铝箔袋内封口。

[0019] 上述快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸的使用方法,将适量样品溶液滴加到样品垫上,静置5~10min,根据检测线和质控线的显色情况,判断样品中是否含有牛支原体,若检测线和质控线均显现,则为阳性结果,样品中含有牛支原体;若检测线不显现,质控线显现,则为阴性结果,样品中不含牛支原体;若质控线不显现,则试纸条失效。

[0020] 本发明的检测原理:

[0021] 滴加待测样品后,样品溶液在毛细作用下,沿着样品垫向右移动,移动到金标垫时,样品溶液溶解胶体金标记的抗体。当样品中含有待测物(牛支原体)时,将与胶体金标记的抗体结合并一起向右移动,到达固定有兔抗牛支原体P33多克隆抗体的检测线时,兔抗牛支原体P33多克隆抗体将和待测物结合,使胶体金滞留于检测线上,检测线显示红色,样品中待测物含量越高,检测线上的结合的胶体金标记抗体越多,红色颜色越深。当样品中不含

有待测物时,检测线将不显红色。无论样品中含不含有待测物,过量的胶体金标记抗体都会与质控线的羊抗BALB/c小鼠IgG抗体结合滞留于质控线,形成一条红色线。因此若质控线未形成一条红色线,则说明试纸条失效,需要重新更换试纸条进行检测,即若检测线和质控线均显红色线,则为阳性样品;若检测线不显红色线,质控线显红色线,则为阴性样品(图8)。

[0022] 相比现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0023] 1、本发明采用原核表达系统制备了牛支原体特异性膜蛋白P33,以此重组P33蛋白分别免疫兔及BALB/c小鼠,制备了兔抗牛支原体P33蛋白多克隆抗体和鼠抗牛支原体P33蛋白单克隆抗体;以鼠源单抗标记胶体金并固定于硝酸纤维素膜上作为显色源;将纯化的兔抗P33多克隆抗体结合于硝酸纤维素膜上作为捕捉抗体,将羊抗BALB/c小鼠球蛋白抗体结合于硝酸纤维素膜上作为质控抗体,制备了快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸。该方法操作简单,检测速度快,不需要专用仪器设备,检测成本低,从而解决现有牛支原体检测方法存在操作繁琐和检测时间长的的问题。

[0024] 2、本发明制备的检测牛支原体的免疫胶体金试纸,可用于牛支原体抗原快速检测,5~10min出结果,敏感性达5ng/mL,使用时具有样品用量少,无交叉反应,特异性好,稳定性好,灵敏度高,能满足低成本,现场快速检测的要求,大大提高了检测效率。将在牛支原体病的防控中发挥重要作用,具有潜在推广应用价值。

[0025] 3、本发明所用的P33蛋白是牛支原体细胞膜上新近发现的特异性粘附蛋白,该蛋白具有较强的免疫原性,能够引起宿主的粘膜免疫作用,可作为临床诊断和疫苗研究的重要抗原。

[0026] 4、本发明首次采用P33蛋白作为牛支原体的免疫抗原,其与牛布氏杆菌、大肠杆菌0157、牛巴氏杆菌、牛衣原体不发生交叉反应,对牛支原体抗体有特异性反应。

附图说明

[0027] 图1为重组质粒pET28a(+)-P33的酶切鉴定图;

[0028] 1~2为pET28a(+)-P33双酶切产物;M为DL-2000Marker;

[0029] 图2为不同诱导条件下的P33蛋白表达;

[0030] M为预染蛋白质分子量标准(10~200kD);1~3为IPTG浓度为0.5mmol/L时,诱导温度分别为20℃、25℃和30℃;4~5为30℃时,IPTG诱导浓度分别为0.1mmol·L⁻¹和0.5mmol·L⁻¹;6~9为30℃,0.5mmol·L⁻¹IPTG时,诱导时间分别为12h、10h、8h和6h;

[0031] 图3为P33蛋白SDS-PAGE检测结果;

[0032] M为预染蛋白质分子量标准(10~180kD);1~2为诱导表达产物超声破碎后上清;3~4为诱导表达产物超声破碎后沉淀;

[0033] 图4为纯化后的P33重组蛋白的SDS-PAGE电泳图;

[0034] M为预染蛋白质分子量标准(10~180kD);1为45mmol·L⁻¹咪唑洗脱液纯化后的P33蛋白;2为50mmol·L⁻¹咪唑洗脱液纯化后的P33蛋白;

[0035] 图5为P33重组蛋白的Western blot结果图;

[0036] M为蛋白分子质量标准;1为50mmol·L⁻¹咪唑洗脱纯化后的P33蛋白;2为45mmol·L⁻¹咪唑洗脱纯化后的P33蛋白;3为空载体转化的BL21(DE3)基因工程菌液;

[0037] 图6为抗体纯化SDS-PAGE电泳图;

- [0038] M为预染蛋白质分子量标准(10-180kD);1~2为纯化后的抗体;
- [0039] 图7为P33蛋白单抗的Western blot检测结果;
- [0040] 1为3D2抗体;2为4B9抗体;
- [0041] 图8为牛支原体免疫胶体金测试卡阴性、阳性图;
- [0042] 从左到右依次是阳性样品和阴性样品;
- [0043] 图9为敏感性试验结果;
- [0044] 从左到右牛支原体抗原的浓度依次是60ng/mL、50ng/mL、40ng/mL、30ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL和1ng/mL。

具体实施方式

[0045] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细说明。实施例中所所述的实验方法无特别说明,即按常规分子生物学实验方法操作。

[0046] 实施例

[0047] 1、抗原的筛选

[0048] 牛支原体细胞膜表面蛋白在致病与感染过程中起到重要作用,通过对牛支原体细胞膜表面蛋白进行预测信号肽和抗原表位分析等筛选出P33基因,进一步对P33基因及其编码蛋白进行生物信息学和免疫学分析,证明P33蛋白是牛支原体细胞膜上特异性粘附蛋白,该蛋白具有较强的免疫原性,能够引起宿主的粘膜免疫作用,因此可作为临床诊断和疫苗研究的重要抗原。

[0049] 2、牛支原体P33蛋白的原核表达与检测

[0050] 2.1pET28a(+)-P33重组载体的构建

[0051] 根据GenBank中已公布的P33(登录号为AIA33909.1)的基因序列,在不改变P33蛋白氨基酸序列的情况下,根据大肠杆菌密码子偏好性优化基因序列,利用Primer Premier 5.0软件设计1对特异性引物,基因P33的上、下游引物引入限制性酶切位点。以上引物自行设计,交由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列:P1:5'

[0052] -CGGAATTCATCACCGAAGCAAAATCAG-3' (下画线处为EcoRI酶切位点);P2:5'

[0053] -TCGCTCGAGCTAGTTGTTCTTTGTTCCCTC-3' (下画线处为XhoI酶切位点)。

[0054] 利用PPL0肉汤培养基扩增CQ-W70菌株,培养约72h,取出放入4℃中待用。用0.45μm的过滤器收集扩大培养的牛支原体,4℃、4000r/min离心20min弃去上清液。加入250μL的0.01M, pH7.4PBS缓冲液溶解沉淀并转移至1.5mL的离心管中。按照基因组DNA小量提取试剂盒说明提取DNA,超低温冰箱-80℃保存,备用。

[0055] 以提取牛支原体全基因组为模板,以P1和P2为引物扩增牛支原体P33基因片段。

[0056] PCR反应体系为:0.25μL Ex Taq DNA聚合酶,2μL cDNA,5μL 10×Ex Taq Buffer,4μL dNTP,上、下游引物分别取1μL,灭菌蒸馏水21μL。

[0057] PCR反应程序:95℃5min,95℃1min,52℃1min,72℃1min,共42个循环;72℃10min。

[0058] PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析,并通过胶回收试剂盒回收目的片段。将回收的PCR产物进行EcoRI和XhoI双酶切,酶切产物回收后,插入到同样经过EcoRI和XhoI双酶切回收的pET28a(+)载体中,将连接后的产物转化入DH5α大肠杆菌感受态细胞中,筛选阳性克隆,并对阳性克隆进行双酶切鉴定。结果如图1所示,重组质粒pET28a(+)-P33通过EcoRI

和XhoI双酶切鉴定,得到的目的片段与预期结果一致,将酶切鉴定正确的重组质粒送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。即得到序列正确的pET28a(+)-P33重组载体。

[0059] 2.2P33重组蛋白的诱导表达条件筛选

[0060] 将鉴定正确的重组质粒pET28a(+)-P33转化入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单菌落接种于LB液体培养基中,37℃振荡培养至OD600值在0.6~0.8之间,在不同温度、时间和IPTG浓度诱导后超声破菌处理,分别取适量的沉淀(0.01M,pH7.4PBS清洗后重悬)进行在33ku有一条明显的蛋白条带(图2),与预期大小相一致,说明重组蛋白P33成功表达;并且重组菌株在诱导条件为30℃,IPTG浓度为0.5mmol/L诱导12h时,重组P30蛋白表达最高。将重组菌在上述最优条件下诱导后超声破菌处理,将其上清和沉淀(0.01M,pH7.4PBS清洗后重悬)进行SDS-PAGE电泳检测,结果如图3所示。可见上清中蛋白P33的含量明显高于沉淀中。

[0061] 2.3P33蛋白的大量表达及纯化

[0062] 按优化得到的最佳条件大规模进行诱导表达重组P30目的蛋白,采用His-tag镍柱对P33目的蛋白进行纯化。样品上柱前,先用亲和平衡液平衡层析柱,然后将所得样品过柱,收集少量穿透液。用亲和平衡液过柱,除去样品中的杂蛋白。再分别用45mmol·L⁻¹和50mmol·L⁻¹咪唑洗脱液洗脱镍柱,收集得到纯化的P33重组蛋白(牛支原体P33蛋白)。经12%SDS-PAGE分析纯化结果,如图4所示。

[0063] 2.4重组蛋白的免疫印迹(Western blot)分析

[0064] 将表达的重组P33蛋白进行SDS-PAGE电泳,蛋白条带采用电转移法转移至PVDF膜,用50g/L脱脂奶粉封闭2h,弃封闭液,TBST洗3次,每次5min;以His-tag组氨酸单抗为一抗(1:10000),4℃孵育过夜,弃一抗孵育液,TBST洗3次;以山羊抗小鼠IgG-HRP为二抗(1:4000)37℃孵育2h,弃二抗孵育液,用TBST洗3次,每次5min,加适量的化学发光液孵育5min,最后用红外光扫描仪成像。纯化后的P33蛋白经Western blot鉴定,结果如图5,在33ku处出现特异性条带,与预期的目的蛋白的大小相符合。

[0065] 3牛支原体P33蛋白的单克隆抗体的制备及检测

[0066] 3.1牛支原体P33蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

[0067] 将上述纯化的P33蛋白免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞用PEG-1500进行细胞融合,细胞融合率为92.7%。建立间接ELISA,用于检测杂交瘤细胞上清中的单克隆抗体,初检阳性率分别为19.3%。选择阳性值较高的20个孔亚克隆,经过2次亚克隆,不断反复筛选得到了2株较稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,命名为3D2、4B9。细胞融合的筛选结果如表1所示。将获得的2株配对的杂交瘤细胞3D2、4B9分别腹腔注射BALB/c小鼠,收集小鼠腹水,先采用辛酸-硫酸铵法进行初步纯化,再采用Protein A柱进一步分离纯化,纯化后的抗体进SDS-PAGE电泳鉴定,如图6所示。

[0068] 表1

	融合次数	分装孔数	克隆生长数	融合率	阳性孔数	阳性率
[0069]	—	480	445	92.7%	86	19.3%

[0070] 3.2阳性杂交瘤细胞稳定性试验

[0071] 3D2、4B9细胞株继代培养6个月以上,其培养上清ELISA效价仍保持在1:640-1280,分别冻存2,4,6,8个月后复苏,其诱生小鼠腹水的Mabs效价仍保持在1:64000-128000之间,说明本发明的阳性杂交瘤细胞具有良好的稳定性。

[0072] 3.3单克隆抗体的特异性分析

[0073] 将重组P33蛋白作为抗原样品进行SDS-PAGE电泳,转膜,加入纯化后的抗体,进行Western blot鉴定。如图7所示,结果显示:单克隆抗体组在33ku处有一特异性条带,而空载体质粒转化的样品在对应位置无任何条带,这表明所得抗体的特异性较好。

[0074] 4快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸的制备方法

[0075] (1) 兔抗牛支原体P33多克隆抗体的制备

[0076] 将重组蛋白P33免疫新西兰大白兔,采血并分离血清,采用琼脂扩散试验、间接ELISA实验测得琼扩效价为1:128,ELISA效价为 12×10^4 ;并用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行初步提纯,后用Protein A柱进一步纯化,即得到兔抗牛支原体P33多克隆抗体,于-70℃保存备用;

[0077] (2) 羊抗BALB/c小鼠IgG抗体

[0078] 用BALB/c小鼠的免疫球蛋白作为抗原,免疫羊,提取免疫羊血清中的抗体球蛋白即为羊抗BALB/c小鼠IgG抗体,测得琼脂扩散试验、间接ELISA实验测得效价为1:256,ELISA效价为 12×10^5 ;采用辛酸-饱和硫酸铵法对其进行初步提纯,后用Protein A柱进一步纯化。

[0079] (3) 牛支原体P33单克隆抗体的制备

[0080] 将牛支原体P33蛋白为抗原,免疫BALB/c小鼠,取4次免疫后的小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0细胞进行细胞融合,制备杂交瘤细胞,将阳性单克隆杂交瘤细胞注射到BALB/c小鼠腹腔,制备单抗腹水,先使用辛酸硫酸法初步纯化小鼠腹水,再采用Protein A柱纯化,即制备得到牛支原体P33单克隆抗体,-20℃保存备用;

[0081] (4) 胶体金标记的抗体的制备

[0082] 用氯金酸法制备胶体金,胶体金颗粒直径为25~30nm;然后用pH8.2,0.01M PBS缓冲液将牛支原体P33单克隆抗体稀释并加入胶体金溶液中,抗体的终浓度为12μg/mL,经离心纯化去除游离抗体和蛋白及其它小分子物质,再用1%牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂,即得到胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体,置于4℃保存备用;以BSA作为稳定剂,能防止金标抗体聚沉,放在4℃达3个月以上仍然保持良好性能。

[0083] (5) 样品垫和结合垫的特殊处理

[0084] 将样品垫和结合垫分别经过样品垫处理液(表3)和结合垫处理液(表2)浸泡5~10min后,在37℃的温度下干燥2h后,样品垫切成40mm宽度、结合垫切成50mm的宽度。

[0085] 表2结合垫处理液

[0086]

试剂	I	II	III	IV	V	VI
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (mM)	70	70	80	80	90	90
PVA (%)	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
Tween-20 (%)	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
BSA (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2

[0087] 表3样品垫处理液

[0088]

试剂	I	II	III	IV	V	VI
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (g)	1.42	1.42	1.42	2.0	2.0	2.0
PVP-10 (g)	1.0	2.0	2.0	2.0	0.2	1.0
Triton-100 (mL)	3	3	2	3	2	2
BSA (g)	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5

[0089] (6) NC膜的制备

[0090] 将兔抗牛支原体P33多克隆抗体和羊抗BALB/c小鼠IgG分别均匀喷涂到NC膜上作为检测线和质控线,检测线和质控线的线宽为1mm,检测线和质控线相距5mm位于NC膜的中心,然后置于37℃干燥,封装后保存备用;

[0091] (7) 试剂条或测试卡的制备

[0092] 将胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体吸附于结合垫上得到金标抗体结合垫,再将样品垫、金标抗体结合垫、NC膜和吸收垫按次序保持2mm的重叠宽度后粘贴至底板构成的支撑层上,得到试剂板,然后将试剂板切成50mm×10mm,即得到试剂条,立即放入有干燥剂的铝箔袋内,封口;或将试剂板切成30mm×10mm,再将其放入测试卡盒内,即得到测试卡,立即放入铝箔袋内封口。

[0093] 5、牛支原体的免疫胶体金试纸性能检测

[0094] 5.1灵敏度试验

[0095] 将牛支原体抗原用PBS缓冲液(0.01M, pH7.4)进行稀释,终浓度分别为:60ng/mL、50ng/mL、40ng/mL、30ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL和1ng/mL,分别取上述样品溶液50μL滴加到样品垫上,静止10min,根据检测线和质控线的显色情况,判断样品中是否含有牛支原体,结果如图9所示,从图9可得出,当抗原浓度为5ng/mL时,检测线处形成一条明显红色线,仍然可以检测到抗原,该试纸具有良好的灵敏度。

[0096] 5.2特异性试验

[0097] 分别以牛支原体培养物为阳性对照,以牛布氏杆菌、大肠杆菌0157、牛巴氏杆菌、牛衣原体的培养物作为待检测样品,分别取上述样品溶液50μL滴加到样品垫上,静止10min,根据检测线和质控线的显色情况,结果牛支原体培养物反应为阳性,牛衣原体、牛布氏杆菌及牛巴氏杆菌培养物为阴性,重复三次,结果一致。表明该方法与牛布氏杆菌、大肠杆菌0157、牛巴氏杆菌、牛衣原体不发生交叉反应,仅对牛支原体抗体有特异性反应,说明该方法有较好的特异性。

[0098] 5.3稳定性试验

[0099] 取3个批次的牛支原体的免疫胶体金试纸(每批次60条),于37℃条件下保存,在第4月、6月、8月、10月和12月分别从每个批次取出10条试纸,每个批次试纸条分别检测5份阳性样品和5份阴性样品,用于检测试纸条的稳定性。在第4月、6月和8月的试验中,所有检测结果均与预期结果一致;在第10月的试验中,有两个批次的试纸条各出现1份阳性样品的检测结果为阴性,出现检测结果与预期不相符。试验结果表明该试纸条在常温条件下的有效保存期至少为8个月。

[0100] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不以本发明为限制,凡在本发明的精

神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 重庆理工大学 重庆市动物疫病预防控制中心;

<120> 一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 302

<212> PRT

<213> 牛支原体 (*Mycoplasma bovis*)

<400> 1

```

MKKSKYILLT TLSPIISLPF LSASCITEAK SDNKMEKDIK INENTDEKNS SETMNNKQKQ 60
DKSSIDSKME EKADNKTEKD IKINENTDEK NSSETMNNKQ KQDKSSIDSK MEEKADNKTE 120
KDIKINENTD EKNSETMNN KQKQDKSSIE SKMKEKTEKQ DSKTNSEKQD SETDDSSNEL 180
TIPSESTPKD MPTENSEIND YLDKVKEYGK EASEFYELLS KLFKTKYKDK IIQKIGKFEK 240
IIKEFSKLYE GTKNNLDQII EGFKEPDFKK ALLELLNSYK ESREEIKNAI KELKEIENES 300
RF 302

```

<210> 2

<211> 916

<212> DNA

<213> 牛支原体 (*Mycoplasma bovis*)

<400> 2

```

catatgaaaa aatctaaata catcctgctg accaccctga gcccgatcat cagcctgccg 60
ttcctgtccg ctagctgcat cactgaagcg aaatctgata acaaaatgga aaaagacatc 120
aaaattaacg aaaataccga tgaaaagaac agctctgaaa ctatgaacaa caaacagaaa 180
caggataaat cttccatcga ttctaaaatg gaagaaaaag ctgataacaa aaccgaaaaa 240
gacatcaaaa tcaacgaaaa caccgatgag aaaaactctt ctgaaaccat gaacaacaaa 300
cagaaacagg ataaaagcag catcgatagc aaatgggaag aaaaagcgga taacaaaact 360
gaaaaagata tcaaaatcaa cgaaaacacc gatgaaaaga acagctctga aaccatgaac 420
aacaagcaga aacaggacaa atcttccatc gaaagcaaaa tgaaagaaaa aaccgaaaaa 480
caggattcta aaaccaattc tgaaaaacag gacagcgaaa ccgatgattc ttctaacgaa 540
ctgaccatcc cgagcgaaaag caccgcgaaa gacatgccga ccgaaaactc tgaaatcaac 600
gattacctgg ataaagttaa agaatatggt aaagaagcga gcgaattcta cgaactgctg 660
agcaaactgt tcaaaaccaa atacaaagat aaaatcatcc agaaaatcgg caaattcgaa 720
aaaatcatca aagaattcag caaactgtac gaaggcacca aaaacaacct ggaccagatc 780
atcgaagggt tcaaagaacc ggatttcaaa aaagcgctgc tggaactgct gaactcctac 840
aaagaaagcc gcgaagaaat taaaaacgcg atcaaagaac tgaaagaaat cgaaaacgaa 900
agccgtttct aagctt 916

```

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cggaattcat caccgaagca aaatcag 27

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tcgctcgagc tagttgttct ttgttcctc 30

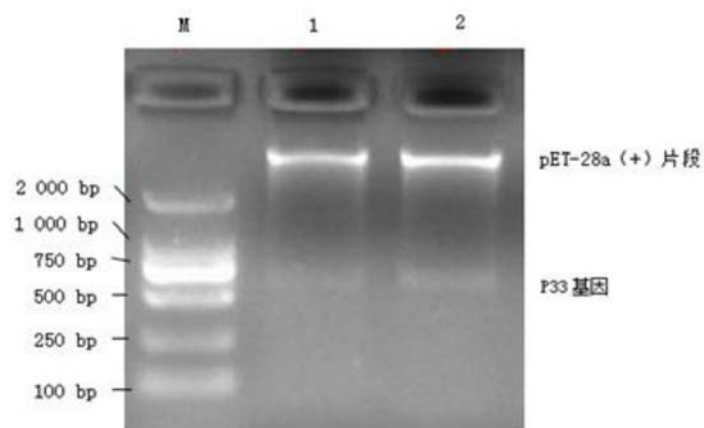


图1

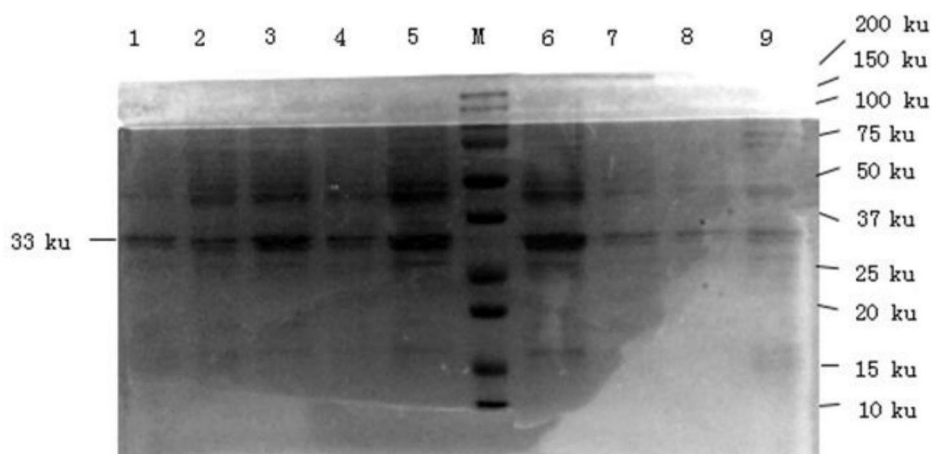


图2

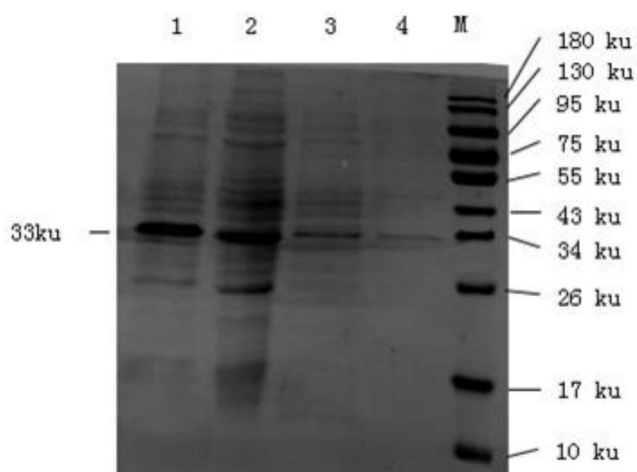


图3

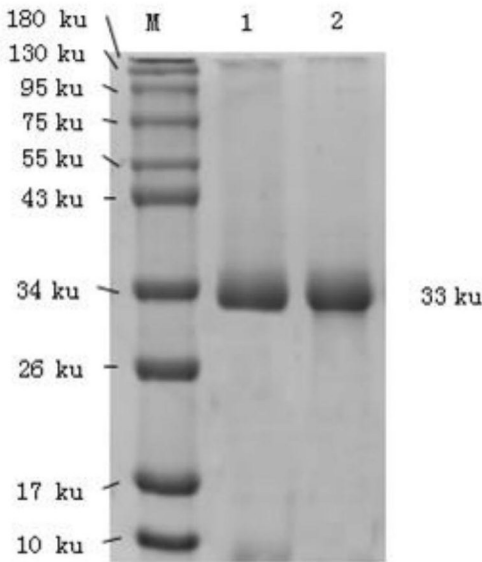


图4



图5

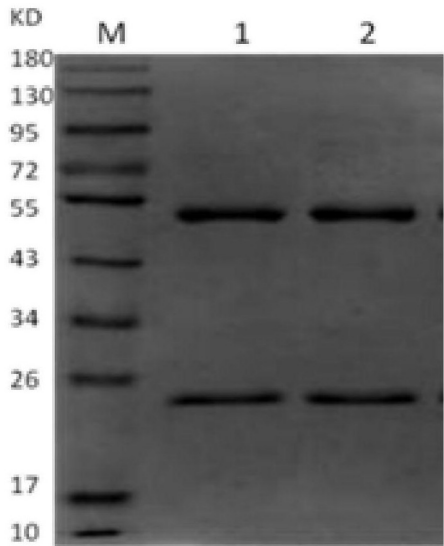


图6

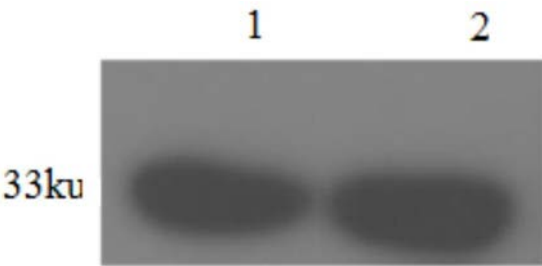


图7



图8

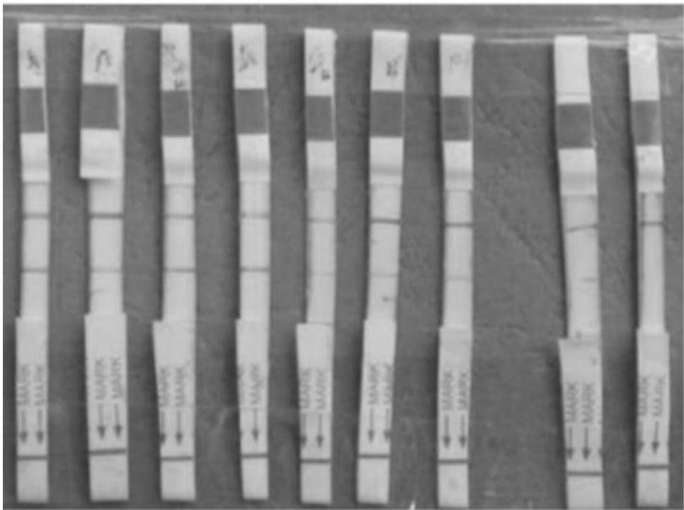


图9

专利名称(译)	一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN109541199A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811417272.6	申请日	2018-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	重庆理工大学 重庆市动物疫病预防控制中心		
申请(专利权)人(译)	重庆理工大学 重庆市动物疫病预防控制中心		
当前申请(专利权)人(译)	重庆理工大学 重庆市动物疫病预防控制中心		
[标]发明人	吴胜昔 梁望旺 曾政 李令臣 李俊萱 侯力嘉 鲁友铭 蔺露 陈忠琼		
发明人	吴胜昔 梁望旺 曾政 李令臣 李俊萱 侯力嘉 鲁友铭 蔺露 陈忠琼		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测牛支原体的免疫胶体金试纸及其制备方法，所述试纸的底层为支撑板，该支撑板上依次黏附有紧密相连的样品垫、结合垫、NC膜和吸收垫，所述结合垫上吸附有胶体金标记的牛支原体P33单克隆抗体，NC膜上喷涂兔抗牛支原体P33多克隆抗体作为检测线和喷涂羊抗BALB/c小鼠IgG抗体作为质控线，检测线和质控线的线宽为1mm，检测线和质控线相距5mm，位于NC膜的中间，所述牛支原体P33蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。该试纸可用于牛支原体抗原快速检测，5~10min出结果，敏感性达5ng/mL，具有样品用量少，无交叉反应，灵敏度高，能满足低成本、现场快速诊断的要求，大大提高了检测效率。将在牛支原体病的防控中发挥重要作用，具有潜在推广应用价值。

融合次数	分装孔数	克隆生长数	融合率	阳性孔数	阳性率
—	480	445	92.7%	86	19.3%