



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106556701 A

(43)申请公布日 2017.04.05

(21)申请号 201611023727.7

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.11.14

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13282 2016.11.14

(71)申请人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街8号

(72)发明人 丁家波 冯宇 王芳 朱良全

蒋卉 彭小薇

(74)专利代理机构 北京君智知识产权代理事务

所(普通合伙) 11305

代理人 郑明

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

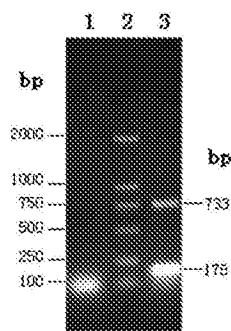
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒。本发明将提纯的布鲁氏菌脂多糖(LPS)经定量后包被96孔酶标板,以人工免疫健康绵羊制备阳性血清,以健康非免疫绵羊血清作阴性血清,以HRP标记兔抗羊Fc端抗体、底物溶液、终止液、样品稀释液、HRP标记兔抗羊IgG稀释液及20×洗涤液等组分组装而成,用于检测羊血清中的光滑型布鲁氏菌抗体。本发明在常规提取LPS中,增加了蛋白酶K消化和苯酚抽提步骤,有效提高了LPS纯度;筛选了对山羊和绵羊均具有良好亲和力的单克隆抗体作为酶标二抗。本发明通过对主要试剂配方的改进和优化,有效控制试剂盒的反应背景,缩短了高通量检测所需的时间。



1. 一种羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于该试剂盒主要含有:以制备的布鲁氏菌脂多糖作为包被抗原,以人工免疫健康绵羊制备阳性血清,以采集健康非免疫绵羊血清作阴性血清,以HRP标记鼠抗羊IgG Fc抗体、底物溶液、终止液、样品稀释液、HRP标记鼠抗羊IgG稀释液及20×洗涤液等组分组装而成,用于检测绵羊和山羊血清中的光滑型布鲁氏菌抗体。

2. 权利要求1所述羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于阳性血清的制备和标定方法是:

用布鲁氏菌虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验对临床表现健康的15月龄成年羊进行检测,筛选布病抗体阴性羊;对筛选的阴性羊用布鲁氏菌参考强毒株M28灭活抗原以 5×10^{10} CFU/羊颈部皮下免疫,3个月后双倍剂量加强免疫1次。加强免疫后2周采血,用试管凝集试验测定凝集效价为800IU/mL。静脉放血,分离血清,用羊布病阴性血清与效价为800IU的阳性血清等体积稀释,将其效价调整为400IU/mL,用0.45 μ m滤器过滤除菌,作为试剂盒中布病阳性血清。

3. 权利要求1所述羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,其特征在于HRP标记鼠抗羊IgG Fc抗体是由被命名为抗羊IgG Fc段单克隆抗体细胞6F9株制备的,该细胞株已于2016年11月14日送交北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所内中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CGMCCNo.13282。

4. 权利要求1所述羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒的应用,其特征在于使用该试剂盒能对山羊和绵羊布鲁氏菌病进行高通量检测。

羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种动物布鲁氏菌病的诊断方法——羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,属生物制品检测技术领域。

技术背景

[0002] 布鲁氏菌病(布病)是一种严重威胁人类健康的世界性重要人畜共患病,可感染人、多种家畜和野生动物,主要表现为发热、流产与不育、慢性关节炎及神经损伤等。目前全世界范围内消除该病的主要方法是扑杀与免疫相结合,所以建立快速准确的诊断方法对防治和清除布病非常必要。

[0003] 布鲁氏菌抗体检测中的国际贸易指定试验主要有虎红平板凝集试验(RBT)、补体结合试验(CFT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)。荧光偏振试验(FPA)是国际贸易中选择试验。目前我国《布鲁氏菌病防治技术规范》中规定的牛布鲁氏菌抗体检测方法为:先经虎红凝集试验(RBPT)初步检测,再经试管凝集试验(SAT)或补体结合试验确诊。试管凝集试验不仅操作复杂,耗时长,而且也存在特异性不高的问题;补体结合试验是公认的确诊方法,但是试验操作复杂,需有良好的试验设施和训练有素的人员作准确的组分滴定、试剂保存和结果判断。荧光偏振试验(FPA)对实验条件和操作技术要求都较高。

[0004] ELISA是一种与CFT效果相当的诊断方法,该方法操作方便,灵敏度高,特异性较好,一次可以完成大量样品的检测,既可以作为筛选试验应用于动物群体检疫,还可以作为确诊试验。ELISA不仅可以应用于血清抗体的检测,还可应用于乳样中抗体的检测。牛布鲁氏菌病ELISA检测方法已是国际贸易中指定的检测方法之一,该方法解决了常规方法耗时费力的不足,提高了检测的特异性、敏感性和便捷性。

[0005] 可能由于羊布病在国际上发病率较低等原因,到目前为止,国际上尚无商品化的专门针对羊布病的间接ELISA诊断试剂盒。而我国羊的养殖规模非常大,布病发病率又非常高,因此开发专门针对羊的布病间接ELISA诊断试剂盒有其现实意义。在成功开发了牛布病间接ELISA的基础上,我们又开发成功了羊布病间接ELISA抗体检测试剂盒。通过对单抗制备和筛选、包被抗原、反应条件、结果判断标准等多方面条件的优化,特别是以提取的绵羊IgG Fc段作为免疫原,采用绵羊IgG和山羊IgG同时进行单抗筛选,选取对同一浓度山羊IgG和绵羊IgG具有相似反应强度的单抗作为辣根过氧化物酶的标记抗体,使试剂盒在检测山羊血清和绵羊血清时具有同等的敏感性;另外,本发明中对阳性血清的效价进行了精确标定,比较理想地解决了羊布鲁氏菌间接ELISA抗体诊断方法中特异性和敏感性问题。

[0006] 本发明的内容

[0007] 本发明的目的是建立一种羊布鲁氏菌抗体高通量检测技术,其核心是将提纯的布鲁氏菌脂多糖(LPS)经定量后包被96孔酶标板,以人工免疫健康绵羊制备阳性血清,以健康非免疫绵羊血清作阴性血清,以HRP标记鼠抗羊Fc段单抗、底物溶液、终止液、样品稀释液、HRP标记鼠抗羊IgG稀释液及20×洗涤液等组分组装而成,用于检测绵羊和山羊血清中的光滑型布鲁氏菌抗体。

[0008] 本发明的技术方案

[0009] 1. 一种羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,其特征在於该试剂盒主要含有:以制备的布鲁氏菌脂多糖作为包被抗原,以人工免疫健康绵羊制备阳性血清,以采集健康非免疫绵羊血清作阴性血清,以HRP标记鼠抗羊IgG Fc抗体、底物溶液、终止液、样品稀释液、HRP标记鼠抗羊IgG稀释液及20×洗涤液等组分组装而成,用于检测绵羊和山羊血清中的光滑型布鲁氏菌抗体。

[0010] 2. 本发明所述羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,其特征在於阳性血清的制备和标定方法是:

[0011] 用布鲁氏菌虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验对临床表现健康的15月龄成年羊进行检测,筛选布病抗体阴性羊;对筛选的阴性羊用布鲁氏菌参考强毒株M28灭活抗原以 5×10^{10} CFU/羊颈部皮下免疫,3个月后双倍剂量加强免疫1次。加强免疫后2周采血,用试管凝集试验测定凝集效价为800IU/ml。静脉放血,分离血清,用羊布病阴性血清与效价为800IU的阳性血清等体积稀释,将其效价调整为400IU/ml,用0.45 μ m滤器过滤除菌,作为试剂盒中布病阳性血清。

[0012] 3. 本发明所述羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒,其特征在於HRP标记鼠抗羊IgG Fc抗体是由被命名为抗羊IgG Fc段单克隆抗体细胞6F9株制备的,该细胞株已于2016年11月14日送交北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所内中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CGMCCNo.13282。

[0013] 4. 本发明所述羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒的应用,其特征在於使用该试剂盒能对山羊和绵羊布鲁氏菌病进行高通量检测。

[0014] 本发明具体实施方式

[0015] 1. 抗原制备用菌种(羊种布鲁氏菌M28株,*B. Melitensis* M28)的鉴定。

[0016] (1) 菌落形态菌落边缘整齐、圆润,露滴状,斜光照射,逆光观察微带蓝色乳光。

[0017] (2) 染色形态为球杆菌,单个散在,不形成芽孢和荚膜。大小在0.3~0.6 μ m之间。革兰氏染色为阴性,柯氏染色为红色。

[0018] (3) 纯粹检验按现行《中国兽药典》(中国兽药典委员会,中华人民共和国兽药典,二〇一〇年版三部,中国农业出版社,2011,以下称《中国兽药典》)附录进行,应纯粹。

[0019] (4) 特异性检验

[0020] 1) 血清学特异性以培养物制成抗原,与光滑型布鲁氏菌阳性血清应出现凝集,与粗糙型血清不出现凝集。

[0021] 2) 以M28基因组DNA为模板,使用如下4条引物,能扩增出大小分别为178bp和733bp的特异性PCR条带。

[0022] Feri:5'-GCGCCGCGAAGAACTTATCAA-3' (序列1)

[0023] Reri:5'-CGCCATGTTAGCGGCGGTGA-3' (序列2)

[0024] F_{melitensis}:5'-AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-3' (序列3)

[0025] R_{IS711}:5'-TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3' (序列4)

[0026] PCR反应体系:50 μ L的反应体系中,含5 μ L 10×Buffer,8 μ L2.5mM dNTPs,混合引物储存液2 μ L,Taq酶2U,模板DNA 1 μ L(或挑取菌落少许)。

[0027] PCR反应程序:95℃5min后,按94℃1min、60℃1.5min、72℃1.5min进行28个循环,

最后72℃10min。

[0028] 结果:扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,应出现2条特异性PCR条带,大小分别为178bp和733bp(见附图1)。

[0029] 2. 包被抗原LPS的提纯和定量

[0030] (1) 菌悬液制备将鉴定合格的*B. MeIitensis* M28株二级种子接种于胰豚琼脂扁瓶中,37℃培养48小时后,每瓶加入含有0.5%苯酚的生理盐水20ml浸泡菌体表面10min以上,洗下培养物,收集于无菌玻璃瓶中。

[0031] (2) 菌液灭活及灭活检验将收集好的菌悬液加热到80℃,维持120min,待其自然冷却后,存于4℃。对灭活菌液应进行灭活检验。取灭活菌液0.1ml涂布胰豚琼脂或胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)平板,37℃培养7天,不应无菌生长。

[0032] (3) LPS的粗提将灭活检验合格的菌悬液以10000g离心20min,收集沉淀。称量并计算菌体湿重,将菌体湿重按1:3(W/W)比例加入灭菌蒸馏水中,充分混匀后,加热到66℃,然后加入66℃预热的90%(V/V)苯酚溶液。在此温度下(66℃)持续搅拌15min,置室温自然冷却后,于4℃10000g离心15min。用一长管吸弃下层棕红色的酚相,将水相用Whatman 1号滤纸过滤去除大菌体碎片。用量筒量取酚相体积,然后加入3倍体积-15℃以下预冷的甲醇(含1%甲醇饱和的醋酸钠),4℃孵育2小时,4℃10000g离心10min,弃上清。

[0033] (4) 蛋白酶消化和苯酚抽提将沉淀用原水相1/2体积蒸馏水重悬,加入一定量的蛋白酶K,使其终浓度达50μg/ml,并用1N NaOH调节pH值至8.0,置56℃水浴消化2小时。加入等体积苯酚溶液抽提2次后,4℃10000g离心10min。收集上清液于4℃保存,在上清液中加入终浓度为5%的三氯乙酸,室温搅拌15min后,10000g离心15min,弃去沉淀,上清液用蒸馏水透析过夜,换液2次(每一次至少4000ml),收集透析袋内容物,此即提纯的LPS。

[0034] (5) LPS纯度测定将制备的LPS冻干后称重,记录LPS净重M。将商品化LPS标准品稀释成1mg/ml、100μg/ml、10μg/ml、1μg/ml、100ng/ml、10ng/ml等不同稀释度;同时根据称重结果将LPS配制成1mg/ml的初始浓度,并稀释成100μg/ml的浓度。将上述各稀释度的LPS溶液取100μl/样品加入96孔酶标板上,在529nm波长下读取吸光度。建立LPS标准品各稀释度的OD₅₂₉值,并建立浓度与吸光度之间的标准曲线。根据标准曲线以及布鲁氏菌LPS吸光度,计算LPS的浓度。LPS纯度为LPS浓度×单位体积/单位质量。

[0035] 3. 试剂盒中阴性对照血清和阳性对照血清的制备与检验

[0036] (1) 阴性对照血清的制备

[0037] 1) 动物用虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验均检测为布鲁氏菌抗体阴性的15月龄左右、性成熟的健康绵羊。

[0038] 2) 血清制备颈静脉采血,分离血清,用0.45μm滤器过滤除菌,收集的血清加入0.05%procIn300防腐,无菌分装,检验合格后,-20℃保存备用。

[0039] (2) 阴性对照血清的检验

[0040] 1) 性状橙黄或淡黄色澄清液体。

[0041] 2) 无菌检验按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0042] 3) 特异性检验经虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验检验应均为阴性。将制备的阴性对照血清作为待检血清,进行间接ELISA检测,其OD_{450nm}<0.1,且P%<10%。

[0043] (3) 阳性对照血清的制备与检验

[0044] (1) 阳性对照血清的制备

[0045] 1) 动物筛选用布鲁氏菌虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验对临床表现健康的15月龄左右成年绵羊进行检测,筛选布病抗体阴性羊。

[0046] 2) 血清制备将布鲁氏菌参考强毒株M28灭活抗原制成菌悬液,以 5×10^{10} CFU/羊颈部皮下免疫,3个月后双倍剂量加强免疫1次。加强免疫后2周采血。用试管凝集试验测定凝集效价,此时效价一般为1:800(800IU/mI)。当效价超过800IU/mI时,静脉放血,分离血清。根据实际测定的效价,用羊布病阴性血清将其效价稀释至400IU/mL,用0.45 μ m滤器过滤除菌,加入ProcIn 300至终浓度为0.05%, -20°C 保存备用,作为试剂盒中布病阳性血清。

[0047] (2) 阳性对照血清的检验

[0048] ①性状橙黄或淡黄色澄清液体。

[0049] ②无菌检验按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0050] ③效价测定采用试管凝集试验测定阳性对照血清的效价,应为1:400。将制备的阳性对照血清作为待检血清,进行间接ELISA检测,其OD_{450nm} ≥ 0.8 。将阳性对照血清用阴性对照血清进行1:32稀释作为待检血清,进行间接ELISA检测,计算P%,应不低于15%。

[0051] 4. HRP标记的抗羊IgG Fc段单克隆抗体的制备

[0052] (1) 山羊IgG Fc段的制备

[0053] 使用浓度为10mg/mL的胃蛋白酶(sigma公司,货号77161-100G)水解绵羊IgG抗体。 37°C 搅拌过夜后,加入Tris缓冲液终止反应。通过SPA亲和层析柱,洗脱已消化的IgG Fc段。分别使用BCA试剂盒和分光光度计测定其蛋白含量。

[0054] (2) 单克隆抗体的制备

[0055] 1) 将纯化后的羊IgG Fc段加入弗氏佐剂免疫小鼠,免疫剂量为10ng/只,免疫3~4次后取脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0056] 2) 细胞融合后,分别将山羊血清和绵羊血清用碳酸盐缓冲液稀释成10%的包被液,100 μ I/孔包被96孔酶标板,上述抗体先作1:10稀释,然后作2倍梯度稀释后,100 μ I/孔加入各孔作为待检血清,按常规方法进行ELISA检测。

[0057] 3) 经过3~4次亚克隆后挑选与山羊和绵羊血清均有良好反应的细胞株,该细胞株被命名为抗羊IgG Fc段单克隆抗体细胞6F9株(该株细胞已于2016年11月14日送交北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC No.13282),扩大培养后鉴定其亚型和染色体数目,合格后将细胞冻存并制备腹水(10^5 个细胞/只,腹腔注射)。

[0058] 5) 制备的小鼠腹水使用Protein A亲和层析柱进行纯化,得到的纯化抗体使用辣根过氧化物酶(HRP)进行标记。简要步骤为将辣根过氧化物酶溶液与纯化的抗体混匀后 4°C 过夜透析,加入硫酸铵溶液后沉淀,将沉淀后的抗体溶于PBS溶液中透析后去除铵离子,离心取上清即为辣根过氧化物酶标记的酶标抗体。

[0059] 6) 将制备的酶标抗体通过ELISA方法鉴定其反应性,加入50%的甘油 -20°C 冻存。

[0060] 5. 试剂盒各组分的制备和检验

[0061] (1) 抗原包被板的制备及检验

[0062] 1) 原包被板的制备以包被缓冲液(0.05M碳酸盐缓冲液,pH9.6)将抗原稀释至10 μ

g/mI,加入到酶标板中,每孔100 μ I,2~8 $^{\circ}$ C包被16小时。以1 \times 洗涤液洗涤1次,每孔加入封闭液(含3%明胶的0.01M pH7.4的PBS)200 μ I,2~8 $^{\circ}$ C封闭24小时。以1 \times 洗涤液洗涤1次,在吸水纸上拍干,自然风干,于铝箔袋真空包装。

[0063] 2) 原包被板的检验包装袋封闭良好,孔底清洁透明,无异物。

[0064] (2) 20 \times 涂液的配制及检验

[0065] 1) 配制称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.0g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 70.0g, NaCl 170.0g,Tween-20 10.0mI,加去离子水至800mI,调pH值至7.2~7.6,定容至1000mI。分装备用。

[0066] 2) 检验

[0067] ①性状无色透明液体,低温储藏时可能会出现白色结晶,37 $^{\circ}$ C水浴可使其溶解。

[0068] ②pH值应为7.2~7.6。

[0069] (3) 样品稀释液的配制及检验

[0070] 1) 配制称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5g, NaCl 8.5g,Tween-20 0.5mI,蔗糖5g,加去离子水至800mI,调pH值7.2~7.6,定容至1000mI。加入procIin 300溶液使其终浓度为0.05%,过滤除菌后,无菌分装。

[0071] 2) 检验

[0072] ①性状为无色透明液体。

[0073] ②无菌检验按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0074] ③pH值应为7.2~7.6。

[0075] (4) HRP-鼠抗羊Fc单克隆抗体的配制及检验

[0076] 1) 配制将本实验室制备的的HRP-兔抗羊Fc段单克隆抗体(6F9),用酶标二抗保护液作1:100稀释,加入procIin 300溶液使其终浓度为0.05%,无菌分装。

[0077] 2) 检验

[0078] ①性状橙黄色澄明液体。

[0079] ②无菌检验按《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0080] ③效价测定将配制的HRP-兔抗-绵羊Fc抗体溶液用稀释液作1:200稀释,作为试剂盒的酶标二抗,用试剂盒的对阳性对照血清、阴性对照血清、质控阳性血清、质控阴性血清进行检测。检测结果应满足:阳性对照血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.8$;阴性对照血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} < 0.1$ 且 $\text{P}\% < 15\%$;质控阳性血清 $\text{P1}:\text{P}\% \geq 60\%$; $\text{P2}:\text{P}\% \geq 40\%$; $\text{P3}:\text{P}\% \geq 15\%$;质控阴性血清(N1、N2、N3、N4、N5) $\text{P}\%$ 值均 $< 15\%$ 。

[0081] (5) HRP-HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体稀释液的配制及检验

[0082] 1) 配制称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5g, NaCl 8.5g,Tween-20 0.5mI,加去离子水至800mI,加入马血清5mI,调pH值7.2~7.6,定容至1000mI。加入ProCIin 300溶液使其终浓度为0.05%,无菌分装。

[0083] 2) 检验

[0084] ①性状淡黄色澄明液体。

[0085] ②无菌检验按《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0086] (6) 底物显色液的来源及检验

[0087] 1) 来源用于本试剂盒的底物溶液购自美国KPL公司,分为底物溶液A(TMB Peroxidase Substrate)和底物溶液B(Peroxidase Substrate B)。

- [0088] 2) 检验性状底物溶液A和B均为棕色瓶包装,无色透明液体。
- [0089] (7) 终止液的配制及检验
- [0090] 1) 配制1M HCL,定量分装。
- [0091] 2) 检验性状无色透明液体。
- [0092] 6. 使用足够样本的参考血清评价试剂盒的特异性和敏感性
- [0093] 基本步骤如下:(1) 将2009~2013年间发明人本收集的273份田间羊的血清样本,分别用虎红平板凝集试验和试管凝集试验检测,将两种方法均检测为阳性的血清样本和均检测为阴性的样本再用补体结合试验确认,选择三种方法全为阳性的血清作为阳性参考血清,三种方法全为阴性的血清作为阴性参考血清;(2) 用筛选出的110份确定为布病阳性的血清(其中山羊43份,绵羊67份)和121份布病阴性血清作为待检血清,评价试剂盒的可靠性。

附图说明

- [0094] 图1羊布鲁氏菌M28的PCR鉴定鉴定图图中1:大肠杆菌阴性对照;2:DNA Marker;3:M28菌株的PCR扩增。
- [0095] 图2不同包被液包被效果的比较。
- [0096] 图3不同封闭液的效果比较。
- [0097] 图4不同HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体稀释液的稀释效果比较。
- [0098] 本发明生物材料资源信息
- [0099] 本发明所涉及的微生物为:羊种布鲁氏菌(*BruceIIa melitensis*)M28株(CVCC70003),来自国家兽医微生物菌种保藏中心(请见中国兽医药品监察所、中国兽医微生物菌种保藏管理中心编著,中国兽医菌种目录(第二版),中国农业科学技术出版社,2002年,p32),系羊种布鲁氏菌生物1型,是布鲁氏菌病活疫苗效力评价检验用强毒参考株,由北京市海淀区中关村南大街8号中国兽医药品监察所中国兽医微生物菌种保藏管理中心鉴定、保管和供应。本发明所涉及的抗羊IgG Fc段单克隆抗体细胞6F9株,该细胞株已于2016年11月14日送交北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所内中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CGMCCNo.13282。
- [0100] 本发明的优点
- [0101] 本发明涉及开发一种羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒。本发明所涉及的该试剂盒弥补了国内外无专门针对绵羊和山羊的布病间接ELISA检测方法
- [0102] 本发明成功筛选到了一株针对绵羊Fc段的单克隆抗体,该单抗与绵羊和山羊血清均具有良好的反应性。本发明将其作为酶标抗体使用。使本试剂盒可以同时用于山羊和绵羊布鲁氏菌病的诊断;本发明通过对主要试剂配方的改进和优化,有效控制试剂盒的反应背景,缩短了高通量检测所需的时间;本发明为我国及国际上羊的布鲁氏菌病诊断提供了新型高效的检测方法。

实施例

- [0103] 以下实施例是为进一步说明本发明,不对本发明构成限制。
- [0104] 实施例1

[0105] ——试剂盒组分优化研究

[0106] 1. 包被液的选择

[0107] 分别选用碳酸盐缓冲液 (pH 9.6)、Tris-HCL缓冲液 (pH 8.5)、磷酸缓冲液 (pH 7.2) 和柠檬酸缓冲液 (pH 5.0) 作为包被液, 包被的抗原浓度为均 $10\mu\text{g}/\text{mL}$, 经封闭液封闭后, 与阳性血清反应OD值最高者作为抗原吸附效果最好的包被液。结果通过对4种包被液比较, 表明pH9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液的包被效果最好 (结果见附图2)。

[0108] 2. 封闭液的选择

[0109] 分别采用含3%明胶的PBS、含10%脱脂奶粉的PBS、含10%马血清的PBS和含3%BSA的PBS作为封闭剂进行封闭, 封闭条件为 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 24小时。比较阳性对照血清和阴性对照血清的OD值的比值, 确定最佳的封闭液成分。结果以含3%明胶的PBS作为封闭剂时, 阳性血清的OD值和P/N值均最高, 因此, 选择含3%明胶的PBS作为本方法的封闭液, 结果见附图3。

[0110] 3. HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体稀释液的选择

[0111] 分别比较PBST、含10%脱脂奶粉的PBST、含5%马血清的PBST作为HRP标记鼠抗羊Fc段单克隆抗体稀释液的效果。用上述稀释液分别对HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体进行稀释, 比较OD值和P/N值, 从中选取阳性血清OD值高, 并且P/N值也最高的稀释液作为HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体稀释液。结果以含5%马血清的PBST作为样品稀释液时, 阳性血清的OD值较高, 且P/N值最高, 因此, 以含5%马血清的PBST作为HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体稀释液, 结果见附图4。

[0112] 实施例2

[0113] ——羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒阳性对照血清的制备

[0114] 用布鲁氏菌虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验对临床表现健康的15月龄左右成年羊进行检测, 筛选布病抗体阴性羊。对筛选的阴性羊用布鲁氏菌参考强毒株M28灭活抗原制成菌悬液, 以 $5\times 10^{10}\text{CFU}/\text{羊}$ 颈部皮下免疫, 3个月后双倍剂量加强免疫1次。加强免疫后2周采血。用试管凝集试验测定凝集效价, 此时效价一般为1:800 (800IU/mI)。当效价超过800IU/mI时, 静脉放血, 分离血清。根据实际测定的效价, 用羊布病阴性血清将其效价稀释至400IU/mL, 用 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌, 加入procIn 300至终浓度为0.05%, -20°C 保存备用, 作为试剂盒中布病阳性血清。

[0115] 1. 布病阴性羊筛选

[0116] 采用虎红平板凝集试验、试管凝集试验及补体结合试验对临床试验绵羊进行检测, 选择三种方法均检测为阴性的绵羊作为制备阳性血清的候选羊。结果试验中选择了编号为039、073、104的三份血清检测, 结果见表1。3份待检血清样品与虎红抗原均无凝集颗粒出现, 呈均匀浑浊, 判为布病抗体阴性。对照阳性血清与虎红抗原呈明显凝集颗粒, 液体几乎完全透明。试管凝集试验中3份待检血清样品4个不同稀释度 (1:25、1:50、1:100、1:200) 结果均为阴性。补体试验中3份待检血清样品均100%溶血, 判为布病抗体阴性。

[0117] 表1三种不同方法对待检血清的检测结果

[0118]

血清编号	虎红平板凝集试验	试管凝集试验				补体结合试验
		1:25	1:50	1:100	1:200	
039	—	—	—	—	—	N

[0119]	073	---	---	---	---	---	N
	104	---	---	---	---	---	N
	阴性对照血清 (200901 批)	---	---	---	---	---	N
	阳性对照血清 (200901 批)	++++	4+	4+	4+	3+	P

[0120] 注：(1) 虎红平板凝集试验结果说明：

[0121] +++++：出现大的凝集片或颗粒，液体完全透明；+++：有明显的凝集颗粒，液体几乎完全透明；++：有较明显的凝集颗粒，液体稍透明；+：稍能见到凝集，液体混浊；-：无凝集，液体均匀混浊。

[0122] (2) 试管凝集试验结果说明：4+：菌体完全凝集和沉淀，液体100%清亮；3+：菌体几乎完全凝集和沉淀，液体75%清亮；2+：有显著的凝集和沉淀，液体50%清亮；1+：有清楚可见的凝集和沉淀，液体25%清亮；-：无凝集和沉淀，液体菌液混浊。

[0123] (3) 补体结合试验结果说明：P：阳性；N：阴性。

[0124] 2. 免疫

[0125] 免疫一般只需进行两次。初免：用2ml布鲁氏菌M28灭活抗原 (5×10^{10} CFU/ml) 颈部皮下免疫布病阴性的绵羊。加强免疫：初免3个月后，双倍剂量颈部皮下加强免疫1次。加强免疫后2周采血，用试管凝集试验测定凝集效价应不低于1:800。若效价达不到标准，继续加强免疫1~2次，15日后再试血，直至效价合格。本发明039、073号和104号牛进行二次免疫后采用试管凝集试验测定的效价分别为1:900、1:800、1:1100。

[0126] 3. 血清制备

[0127] 二免14日后采血，测定试管凝集效价，进一步用阴性对照血清将分离的阳性血清按比例(约3:1)稀释到预期效价为1:400，加入ProCIn 300 (SUPELCO公司)至终浓度为0.05%，无菌分装，作为待检阳性对照血清。

[0128] 4. 检验

[0129] 对制备完成的阳性对照血清按如下项目进行检验：

[0130] (1) 性状观察血清制品色泽为淡黄或微红色澄明液体。

[0131] (2) 无菌检验按现行《中国兽药典》附录进行检验，为无菌生长。

[0132] (3) 效价测定将血清作1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180稀释进行试管凝集试验，测定其效价。将制备的血清1:32稀释作为待检血清，用羊布鲁氏菌间接ELISA检测试剂盒进行检测，计算P%，均不低于15%。

[0133] 实施例3

[0134] ——试剂盒敏感性试验

[0135] 1. 对梯度稀释的羊布鲁氏菌抗体阳性对照血清的灵敏度试验

[0136] 将羊布鲁氏菌抗体阳性对照血清进行2倍梯度稀释后，用3批实验室自制试剂盒进行检测，确定该试剂盒对梯度稀释的阳性对照血清的灵敏度，结果见表2。由表2可见，3批间接ELISA试剂盒检测梯度稀释阳性对照血清的结果一致，血清效价均检测至1:32倍(P%值 $\geq 15\%$)。

[0137] 表2对梯度稀释的阳性对照血清的灵敏度检测

[0138]

稀释倍数	批号					
	201405		201406		201407	
	P%值	结果判定	P%值	结果判定	P%值	结果判定
1:2	82.51%	+	78.56%	+	80.74%	+
1:4	66.39%	+	65.87%	+	63.43%	+
1:8	43.65%	+	44.11%	+	43.89%	+
1:16	36.91%	+	35.29%	+	34.48%	+
1:32	23.03%	+	24.53%	+	22.35%	+
1:64	14.19%	—	14.14%	—	13.36%	—
1:128	9.78%	—	9.33%	—	9.03%	—
1:256	5.27%	—	5.24%	—	5.16%	—
1:512	3.12%	—	3.33%	—	3.16%	—
阳性对照 OD _{450nm} 值	1.934	/	1.919	/	1.844	/
阴性对照 OD _{450nm} 值	0.063	/	0.061	/	0.059	/
阴性对照 P%值	3.26%	/	3.18%	/	3.20%	/

[0139] 注：羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒的判定标准为：样本p%值 $\geq 15\%$ 时，羊布鲁氏菌抗体阳性（标为“+”）；样本p%值 $< 15\%$ 时，为羊布鲁氏菌抗体阴性（标为“—”）。

[0140] 2. 对已知阳性样本的敏感性试验

[0141] 采用3批羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒对110份布病阳性血清（其中山羊43份，绵羊67份），121份布病阴性血清进行检测，结果与已确认的110份羊布病阳性血清样本的符合率为97.3%（107/110），与已确认的121份阴性样本的符合率为96.7%（117/121），由此确定试剂盒对田间样本的敏感性为97.3%，特异性为96.7%，显示了试剂盒诊断结果的可靠性。

[0142] 附注

[0143] iELISA方法使用说明

[0144] 1用法

[0145] 1.1样品处理取动物全血，待血液凝固后，以4000r/min离心10min，收集上清，血清应清亮，无溶血。

[0146] 1.2 1 \times 洗涤液的配制使用前，将20 \times 洗涤液恢复至室温（20~25 $^{\circ}$ C），并摇动，使结晶溶解（可在37 $^{\circ}$ C水浴中加热5~10min），然后用去离子水作1:20稀释，充分混匀。

[0147] 1.3待检血清和对照血清的稀释在血清稀释板中将待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清用样品稀释液作1:50稀释。

[0148] 1.4操作步骤

[0149] 1.4.1加样取抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），以1 \times 洗涤液300 μ I/孔洗板1次，弃去洗涤液。将稀释好的待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清分别加入到ELISA板中，100 μ I/孔，其中阳性对照血清和阴性对照血清各加2孔（孔1、孔2）。加样结束后，37 $^{\circ}$ C作用30min。取出反应板，弃去反应液，每孔加入300 μ I 1 \times 洗涤液，洗涤3次，最后1次甩干或拍干。

[0150] 1.4.2加酶标抗体将HRP-鼠抗羊Fc段单克隆抗体用稀释液作1:200稀释后，每孔加

入100 μ I,37 $^{\circ}$ C作用30min。按1.4.1中的方法洗涤3次,甩干。

[0151] 1.4.3显色与终止将底物溶液A和B按1:1 (V/V) 混合后,立即加入到ELISA反应板中,100 μ I/孔,室温避光显色15min后,每孔加50 μ I终止液终止反应。

[0152] 2结果判定反应终止后,15min内用酶标仪测定OD_{450nm}值。

[0153] 2.1计算方法

$$[0154] \quad \text{阳性对照平均 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} = \frac{(\text{孔 1} + \text{孔 2}) \text{ OD}_{450\text{nm}}}{2}$$

$$[0155] \quad \text{阴性对照平均 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} = \frac{(\text{孔 1} + \text{孔 2}) \text{ OD}_{450\text{nm}}}{2}$$

$$[0156] \quad \text{阳性百分比 P\%} = \frac{\text{样本 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值}}{\text{阳性对照平均 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值}} \times 100\%$$

[0157] 2.2实验成立条件

[0158] 当阳性对照平均OD_{450nm}≥0.8,阴性对照平均OD_{450nm}<0.1且P%<15%时,实验成立。

[0159] 2.3结果判定

[0160] 当血清样本的P%值≥15%时,为羊布鲁氏菌病抗体阳性;

[0161] 当血清样本的P%值<15%时,为羊布鲁氏菌病抗体阴性。

序列表

- <110> 中国兽医药品监察所
<120> 羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒
<130>
<160> 4
<170> Patent in version 3.5
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 对人工序列的描述: 引物Feri
<400> 1
GCGCCGCGAA GAACTTATCA A 21(序列1)
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 对人工序列的描述: 引物Reri
<400> 2
CGCCATGTTA GCGGCGGTGA 20(序列2)
<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 对人工序列的描述: 引物FmeIitensis
<400> 3
AAATCGCGTC CTTGCTGGTC TGA 23(序列3)
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 对人工序列的描述: 引物RIS711
<400> 4
TGCCGATCAC TTAAGGCCT TCAT 24(序列4)

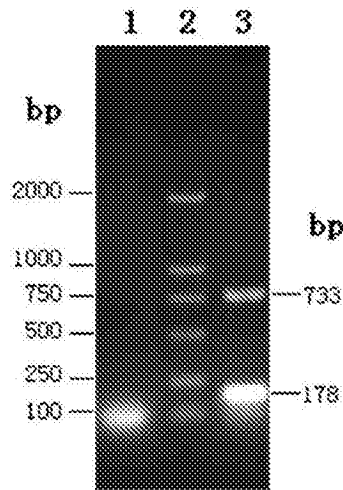


图1

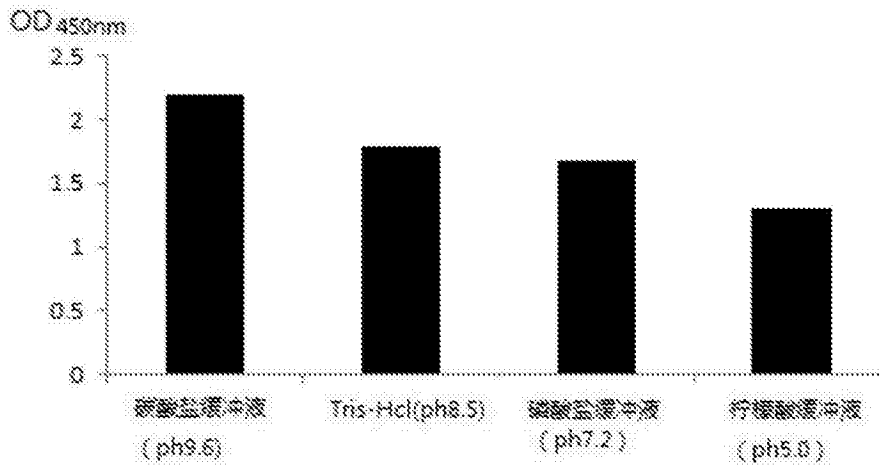


图2

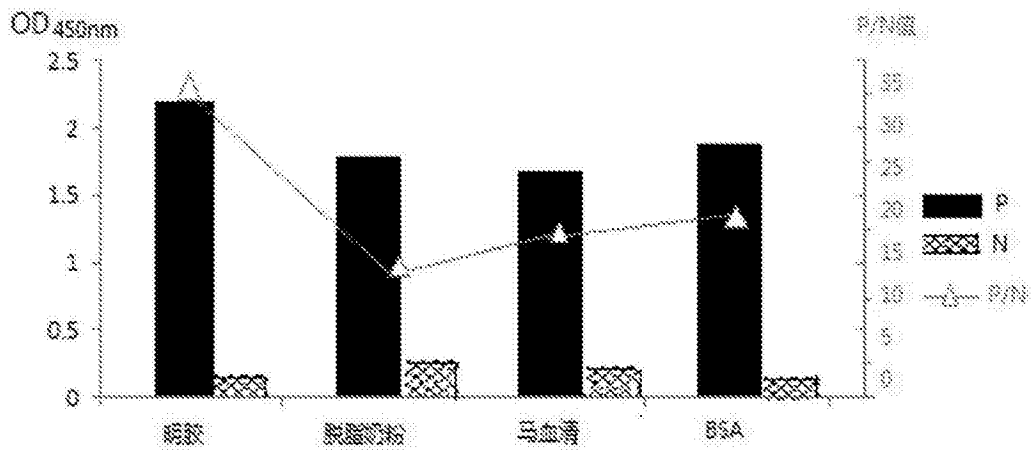


图3

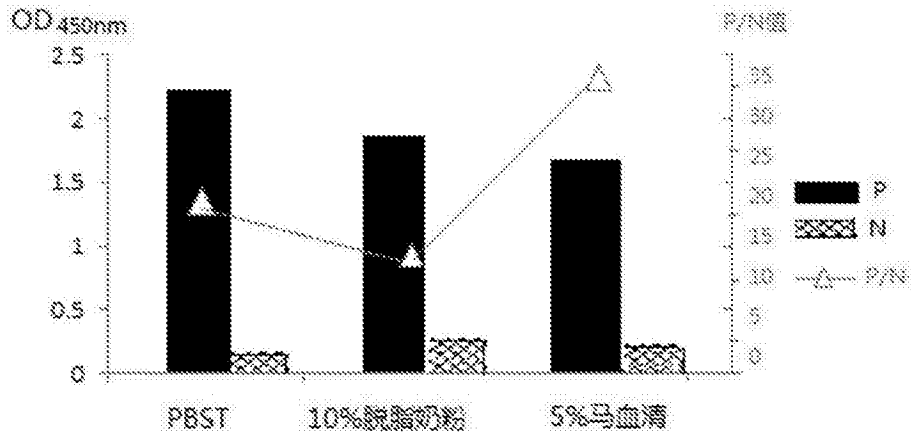


图4

专利名称(译)	羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106556701A	公开(公告)日	2017-04-05
申请号	CN201611023727.7	申请日	2016-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	丁家波 冯宇 王芳 朱良全 蒋卉 彭小微		
发明人	丁家波 冯宇 王芳 朱良全 蒋卉 彭小微		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56911 G01N33/577		
代理人(译)	郑明		
其他公开文献	CN106556701B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒。本发明将提纯的布鲁氏菌脂多糖(LPS)经定量后包被96孔酶标板，以人工免疫健康绵羊制备阳性血清，以健康非免疫绵羊血清作阴性血清，以HRP标记兔抗羊Fc端抗体、底物溶液、终止液、样品稀释液、HRP标记兔抗羊IgG稀释液及20×洗涤液等组分组装而成，用于检测羊血清中的光滑型布鲁氏菌抗体。本发明在常规提取LPS中，增加了蛋白酶K消化和苯酚抽提步骤，有效提高了LPS纯度；筛选了对山羊和绵羊均具有良好亲和力的单克隆抗体作为酶标二抗。本发明通过对主要试剂配方的改进和优化，有效控制试剂盒的反应背景，缩短了高通量检测所需的时间。

