



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102043054 A

(43) 申请公布日 2011.05.04

(21) 申请号 201010518500.6

(22) 申请日 2010.10.26

(71) 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区公滨路木材街 59 号东北农业大学动物医学学院

(72) 发明人 李德军 刘运枫 王海彬

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种快速准确的奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒。它是利用 SAA、IL-6 和 IL-8 的标准抗体包被酶标板,用新型单克隆抗体作竞争抗体,用辣根过氧化物酶标记二抗,配制血清稀释液等组装组成。包括 SAA、IL-6 和 IL-8 抗体制备,辣根过氧化物酶标记二抗制备,ELISA 试剂的配制,酶标板制作。本发明主要采用酶联免疫吸附试验的方法。ELISA 方法应用范围广泛,操作速度快,两分钟便得到结果,可以消除一些疫苗反应。它既可以用于实验室检测,也可以运用于牧场和野外操作,适合于临床及养殖户现场的检测。

1. 一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒,其特征在于:它是利用 SAA、IL-6 和 IL-8 的标准抗体包被酶标板,用单克隆抗体作竞争抗体,用辣根过氧化物酶标记二抗,配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、 H_2O_2 、终止液,组装组成;

(一) SAA、IL-6 和 IL-8 抗体的制备

(1) 抗原的获得与动物接种

将 E. coli 进行原核培养,通过 Ni 柱分离纯化,然后用弗氏完全佐剂乳化的抗原在家兔的背部进行多点皮内注射,每点需要注射 0.1ml 左右,共注射 0.5ml,2 周后加强免疫;

(2) 抗血清的采集和保存:耳缘静脉或耳动脉采血,以常规方法分离血清,将血清用 0.45 μ m 的滤器进行抽滤除菌,为了防止血清发生腐败,需在无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02%,然后无菌条件下定量分装、冻干,贴上标签,存放于 -80°C 冰箱内备用;

(二) 辣根过氧化物酶标记二抗制备

(1) 羊抗兔 IgG 获得:无菌采健康兔心脏血,辛酸-硫酸铵法提取血清 IgG, SephadexG25 柱层析, SDS-PAGE 电泳检测 IgG 纯度,透析袋浓缩,与福氏完全佐剂和不完全佐剂乳化后,免疫健康奶牛,10 天后静脉采血,用同样方法纯化奶牛 IgG;

(2) 酶标记:使酶与戊二醛反应,除去未反应的戊二醛,再使已“活化”的酶分子与抗体分子的氨基结合,最后加入少量的赖氨酸封闭被戊二醛激活的酶的残基;

(3) 酶标抗体结合物的纯化:50%饱和硫酸铵沉淀法;Sephadex 凝胶过滤法;

(三) 其他 ELISA 试剂的配制

(1) 稀释液的制备

用于稀释高浓度的结合物以配成工作液,为避免结合物在反应中直接吸附在固相载体上,在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质如 1%牛血清白蛋白,通过竞争以抑制结合物的吸附,一般还加入具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂,如吐温 20, 0.05%的浓度较为适宜;

A 液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.34g/100ml, B 液 ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 5.37g/100ml;取 A 液 2ml、B 液 8ml、NaCl 3.18g、Triton \times 1000.75m,加双蒸水至 150ml;

(2) 洗涤液的配制

NaCO_3 0.3g, NaHCO_3 0.58g,加水至 200ml,即可配成 0.05mol/L pH9.6 的磷酸盐缓冲液 200ml;

NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, Tween-20.5ml, BAS 1g 加双蒸水至 1000ml,即可配成 0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液 1000ml;

(3) 显色液的配制

A 液:19.2g 柠檬酸钠加蒸馏水至 1000ml,配成 0.1mol/L 柠檬酸钠溶液;

B 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7g 加蒸馏水至 1000ml;

临用前取 A 液 24.3ml 与 B 液 25.7ml 混合,加入联苯二胺 20mg,待充分溶解后,加入 30%的 H_2O_2 250 μ L,即可配成显色液;

(4) 封闭液的配制

小牛血清 5ml, 0.01mol/L pH7.4PBS 95ml;

(5) 终止液的制备

双蒸水 200ml, 浓硫酸 34ml, 缓慢滴加并不断搅拌, 加至 300ml 蒸馏水即配成终止液;

(四) 酶标板制作的工艺流程

(1) 包被过程: 无菌条件下, 将所制备的 SAA、IL-6 和 IL-8 抗体用包被稀释液 (0.05M pH9.6) 的碳酸缓冲液稀释到适当浓度, 每孔抗原加入 100 μ l, 密封, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

(2) 洗涤: 弃去孔中液体, 以 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBST 作洗涤液, 加入足量室温作用 3 分钟后甩去, 如上重复 3 次, 或用洗板机重复洗 3 次, 拍干至无水印为止;

(3) 封闭酶标反应孔: 5% 小牛血清置 37 $^{\circ}$ C 封闭 40min, 封闭时将封闭液加满各反应孔, 并去除各孔中的气泡, 封闭结束后, 甩去封闭液, 加入足量洗涤液, 室温作用 3min, 甩去, 重复 3 遍, 每次要吸干孔内的反应液, 倾去液体后在吸水纸上拍干, 重复 3 次;

(4) 包装: 将封闭好的酶标板放于铝箔袋中, 加入 1g 包装的干燥剂, 用真空包装机将酶标板包装好, 贴上标签。

一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检验技术,具体说就是一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒。

(二) 背景技术

[0002] 自 1896 年 G. Widal 和 A. Sicad 应用凝集反应诊断伤寒起,免疫学就与医学检验结下不解之缘,至今已经历了一个世纪。随着免疫学技术的发展,免疫学检验已成为兽医临床检验中的一个重要部分。

[0003] 免疫学检验的检测对象是具有免疫活性的物质,内容包括检测方法和临床意义。免疫学检验可分为细胞免疫检验和体液免疫检验两大类,免疫活性细胞及其功能的检测属于前者,抗原、抗体、补体等的检测属于后者。

[0004] 近年来免疫学检验飞跃发展,在各种疾病的诊断和防治中起着日益重要的作用。免疫学检验在传染病的诊断中应用广泛,大部分传染病病原体及其抗体的检测已在实验室中作为常规检验。由于新技术的发展,许多与免疫无关的物质亦可作为免疫原而制备其相应抗体并用于这些物质的测定。利用抗原体反应来测定标本中微量物质的方法称为免疫测定 (immunoassay)。免疫测定具有高度的特异性和敏感性,在临床检验中已用于测定各种蛋白质、酶、激素、药物等。

[0005] 抗原与抗体能够特异性结合是基于两中分子间的结构互补性与亲和性,这两种特性是由抗原与抗体分子的一级结构决定的。抗原抗体反应可分为两个阶段。第一为抗原与抗体发生特异性结合的阶段,此阶段反应快,仅需几秒至几分钟,但不出现可见反应。第二为可见反应阶段,抗原抗体复合物在环境因素(如电解质、pH、温度、补体)的影响下,进一步交联和聚集,表现为凝集、沉淀、溶解、补体结合介导的生物现象等肉眼可见的反应。此阶段反应慢,往往需要数分钟至数小时。实际上这两个阶段以严格区分,而且两阶段的反应所需时间亦受多种因素和反应条件的影响,若反应开始时抗原抗体浓度较大且两者比较适合,则很快能形成可见反应。

[0006] 隐性子宫内膜炎由于临床诊断困难,而且潜在的危害性严重,所以近年来,国内外不少学者都在探索对该病的快速、早期、简易诊断方法,同时也获得了很大进展,如冲洗液沉淀法,是将子宫内冲洗回流液静置后发现沉淀物,或见到蛋白样或絮状物浮游时,可作出初步诊断,但本方法的主观性较强一些,因为对于沉淀物性状的判断因检验者的视觉不同而不一样。

[0007] 隐性子宫内膜炎是子宫内膜慢性的不明显的炎症过程,而且子宫内膜上有大量的嗜中性粒细胞浸润,这个炎症过程抑制了奶牛的繁殖力。认为嗜中性粒细胞的比例“相对较高”的判定标准,取决于采样的技术及分娩的时间。国外学者通过对分娩后临床表现正常的、泌乳 20-30 天奶牛的研究,证实子宫内膜的细胞学与超声波检查可作为隐性子宫内膜炎的诊断工具。包括直肠触诊、子宫内膜细胞学检查和超声波检查在内的检查要在第一次检查后的两周重新作一次,例如在泌乳的 34-47d。用于子宫内膜细胞学分析样本的采

集是通过改良的应用于细胞刷技术获得,在显微镜的载玻片上转动、固定、用经过改良的瑞士-姬姆萨染色液染色。与相对较低的妊娠率有关的因素已经被确定并可以作为诊断隐性子宫内膜炎的标准:(1)泌乳 20-33 天确定子宫内膜 PMN(中性粒细胞)的数量 > 18%;(2)泌乳 34-47 天确定子宫内膜 PMN 的数量 > 10%;(3)子宫内液体可做任何检查。Gilbert 等(2005)应用另一种技术,从泌乳 40-60 天的奶牛子宫冲洗液中获取子宫内膜细胞样本。由于样本是 2-5ml 的液体,所以在染色前必须重新悬浮样本并通过细胞涂片离心机转移到显微镜的载玻片上。采用瑞士-姬姆萨染色,PMN 的下限是 5%,作为诊断隐性子宫内膜炎的标准。Foldi 等认为子宫的直肠检查对隐性子宫内膜炎没有诊断价值。Ишпилов 等报道,可用精液作生物学诊断,在加温(38℃)的载玻片上分开滴 2 滴精液,将子宫分泌的粘液加入其中的一滴精液中,用干净盖玻片盖住两个液滴,置显微镜下观察,如果精子在粘液中逐渐不运动或被凝集,说明发生了隐性子宫内膜炎。金子一幸等报道,可通过检查发情期子宫颈口粘液中的白细胞诊断隐性子宫内膜炎,即取发情期宫颈外口粘液,涂片,晾干,姬姆萨染色后镜检,全视野无白细胞为(-),散在点状存在为(+),全视野中有白细胞密集者为(+++),介于(+)和(+++)为(++). Габриш 报道,用牛尿液与硝酸银作用可诊断隐性子宫内膜炎,方法是取被检牛尿液 2ml 放入清洁的试管里,加入 5%硝酸银溶液 1ml,加热煮沸 2min,试管底部有黑色沉淀物的为阳性反应,褐色或色泽较淡的为阴性反应。

[0008] 对于以上所述对隐性子宫内膜炎的检测方法,直肠触诊、超声波检查都需要检测者具有一定的临床经验和具备一定的技术操作知识,同时直肠检查还容易导致奶牛受到惊吓,产生应激,从而影响检测结果。而对于子宫分泌物所作的细胞学检查,同样也会对奶牛造成应激反应,同时如果操作不当还可能破坏阴道组织,或将外源性致病菌带入子宫体内。对于进行细胞学检查的操作人员要求能够识别中性粒细胞及其染色技术。Шипилов 等提出用精液所作的生物学诊断,操作虽然简便,但对精液的温度控制不容易掌握。而对于 Габриш 等所采用的尿液与硝酸银反应的方法,其缺点在于样品不易采集,奶牛的排尿随意性很大,所以不容易操作。

(三) 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种快速、准确、简洁、方便的奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒。

[0010] 本发明的目的是这样实现的:它是利用 SAA、IL-6 和 IL-8 的标准抗体包被酶标板,用新型单克隆抗体作竞争抗体,用辣根过氧化物酶标记二抗,配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H₂O₂、终止液,组装组成;

[0011] 1. SAA、IL-6 和 IL-8 抗体的制备

[0012] (1) 抗原的获得与动物接种

[0013] 将 E. coli 进行原核培养,通过 Ni 柱分离纯化,然后用弗氏完全佐剂乳化的抗原在家兔的背部进行多点皮内注射,每点需要注射 0.1ml 左右,共注射 0.5ml,2 周后加强免疫;

[0014] (2) 抗血清的采集和保存:耳缘静脉或耳动脉采血,以常规方法分离血清,将血清用 0.45 μm 的滤器进行抽滤除菌,为了防止血清发生腐败,需在无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02%,然后无菌条件下定量分装、冻干,贴上标签,存放于 -80℃ 冰箱内备用;

[0015] 2. 辣根过氧化物酶标记二抗制备

[0016] (1) 羊抗兔 IgG 获得: 无菌采健康兔心脏血, 辛酸-硫酸铵法提取血清 IgG, SephadexG25 柱层析, SDS-PAGE 电泳检测 IgG 纯度, 透析袋浓缩, 与福氏完全佐剂和不完全佐剂乳化后, 免疫健康奶牛, 10 天后静脉采血, 用同样方法纯化奶牛 IgG;

[0017] (2) 酶标记: 使酶与戊二醛反应, 除去未反应的戊二醛, 再使已“活化”的酶分子与抗体分子的氨基结合, 最后加入少量的赖氨酸封闭被戊二醛激活的酶的残基;

[0018] (3) 酶标抗体结合物的纯化: 50% 饱和硫酸铵沉淀法; Sephadex 凝胶过滤法;

[0019] 3. 其他 ELISA 试剂的配制

[0020] (1) 稀释液的制备

[0021] 用于稀释高浓度的结合物以配成工作液, 为避免结合物在反应中直接吸附在固相载体上, 在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质如 1% 牛血清白蛋白, 通过竞争以抑制结合物的吸附, 一般还加入具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂, 如吐温 20, 0.05% 的浓度较为适宜;

[0022] A 液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.34g/100ml, B 液 ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 5.37g/100ml; 取 A 液 2ml、B 液 8ml、NaCl 13.18g、Triton X1000.75ml, 加双蒸水至 150ml;

[0023] (2) 洗涤液的配制

[0024] NaCO_3 0.3g, NaHCO_3 0.58g, 加水至 200ml, 即可配成 0.05mol/L pH9.6 的磷酸盐缓冲液 200ml;

[0025] NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, Tween-20 0.5ml, BAS 1g 加双蒸水至 1000ml, 即可配成 0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液 1000ml;

[0026] (3) 显色液的配制

[0027] A 液: 19.2g 柠檬酸钠加蒸馏水至 1000ml, 配成 0.1mol/L 柠檬酸钠溶液;

[0028] B 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7g 加蒸馏水至 1000ml;

[0029] 临用前取 A 液 24.3ml 与 B 液 25.7ml 混合, 加入联苯二胺 20mg, 待充分溶解后, 加入 30% 的 H_2O_2 250 μL , 即可配成显色液;

[0030] (4) 封闭液的配制

[0031] 小牛血清 5ml, 0.01mol/L pH7.4PBS 95ml;

[0032] (5) 终止液的制备

[0033] 双蒸水 200ml, 浓硫酸 34ml, 缓慢滴加并不断搅拌, 加至 300ml 蒸馏水即配成终止液;

[0034] 4. 酶标板制作的工艺流程

[0035] (1) 包被过程: 无菌条件下, 将所制备的 SAA、IL-6 和 IL-8 抗体用包被稀释液 (0.05M pH9.6) 的碳酸缓冲液稀释到适当浓度, 每孔抗原加入 100 μL , 密封, 4°C 过夜;

[0036] (2) 洗涤: 弃去孔中液体, 以 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBST 作洗涤液, 加入足量室温作用 3 分钟后甩去, 如上重复 3 次, 或用洗板机重复洗 3 次, 拍干至无水印为止;

[0037] (3) 封闭酶标反应孔: 5% 小牛血清置 37°C 封闭 40min, 封闭时将封闭液加满各反应孔, 并去除各孔中的气泡, 封闭结束后, 甩去封闭液, 加入足量洗涤液, 室温作用 3min, 甩去, 重复 3 遍, 每次要吸干孔内的反应液, 倾去液体后在吸水纸上拍干, 重复 3 次;

[0038] (4) 包装: 将封闭好的酶标板放于铝箔袋中, 加入 1g 包装的干燥剂, 用真空包装机

将酶标板包装好,贴上标签。

[0039] 本发明一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒,主要采用酶联免疫吸附试验的方法(ELISA)。ELISA方法应用范围广泛,因为各种抗原成份,包括小分子的半抗原,均可用以制备特异性的抗血清或单克隆抗体。利用此抗体作为试剂可检测标本中相应的抗原,所以不需要除去未结合试剂,操作速度快,两分钟便得到结果,可以消除一些疫苗反应。它既可以用于实验室检测,也可以运用于牧场和野外操作,适合于临床及养殖户现场的检测。ELISA方法的敏感性高,在测定血清中SAA、IL-6、IL-8的含量时,化学比色法的敏感度为mg/ml水平,而酶反应测定法的敏感度约为5-10 μ g/ml,是优秀的筛选试验。价格相对低廉,准确度与其它的初级结合试验一样。这种类型的测定,也适合自动化。它的原理是测量分子反应率变化,这种改变是由于在试验样品中抗体与可溶性抗原反应引起。如果抗体结合抗原,抗原的旋转率将下降,则可测量这种反应。ELISA的基本原理是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

[0040] 本发明采用酶联免疫吸附试验方法中的竞争法测抗原的原理。小分子抗原(SAA、IL-6、IL-8)或半抗原因缺乏夹心法的两个以上的位点,因此不能用双抗体夹心法测定,所以本试剂盒采用此种模式。其原理是标本中的抗原和一定量的酶标抗原竞争与固相抗体结合。标本中抗原量愈多,结合在固相上的酶标抗原愈少,最后的显色愈浅。反之亦然。此检测法以高敏感度的单克隆抗体为基础,是很好的最后隐性子宫内膜炎病的确诊试验,也是用于区分显性和隐性子宫内膜炎的最有效的方法。

(四)具体实施方式

[0041] 下面对本发明作进一步说明。

[0042] 实施例1:本发明一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒,它是利用SAA、IL-6和IL-8的标准抗体包被酶标板,用新型单克隆抗体作竞争抗体,用辣根过氧化物酶标记二抗,配制血清稀释液、洗涤液、底物溶液A、底物溶液B、H₂O₂、终止液,组装组成;

[0043] 1. SAA、IL-6和IL-8抗体的制备

[0044] (1) 抗原的获得与动物接种

[0045] 将E. coli进行原核培养,通过Ni柱分离纯化,然后用弗氏完全佐剂乳化的抗原在家兔的背部进行多点皮内注射,每点需要注射0.1ml左右,共注射0.5ml,2周后加强免疫;

[0046] (2) 抗血清的采集和保存:耳缘静脉或耳动脉采血,以常规方法分离血清,将血清用0.45 μ m的滤器进行抽滤除菌,为了防止血清发生腐败,需在无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为0.02%,然后无菌条件下定量分装、冻干,贴上标签,存放于-80 $^{\circ}$ C冰箱内备用;

[0047] 2. 辣根过氧化物酶标记二抗制备

[0048] (1) 羊抗兔 IgG 获得: 无菌采健康兔心脏血, 辛酸-硫酸铵法提取血清 IgG, SephadexG25 柱层析, SDS-PAGE 电泳检测 IgG 纯度, 透析袋浓缩, 与福氏完全佐剂和不完全佐剂乳化后, 免疫健康奶牛, 10 天后静脉采血, 用同样方法纯化奶牛 IgG;

[0049] (2) 酶标记: 使酶与戊二醛反应, 除去未反应的戊二醛, 再使已“活化”的酶分子与抗体分子的氨基结合, 最后加入少量的赖氨酸封闭被戊二醛激活的酶的残基;

[0050] (3) 酶标抗体结合物的纯化: 50% 饱和硫酸铵沉淀法; Sephadex 凝胶过滤法;

[0051] 3. 其他 ELISA 试剂的配制

[0052] (1) 稀释液的制备

[0053] 用于稀释高浓度的结合物以配成工作液, 为避免结合物在反应中直接吸附在固相载体上, 在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质如 1% 牛血清白蛋白, 通过竞争以抑制结合物的吸附, 一般还加入具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂, 如吐温 20, 0.05% 的浓度较为适宜;

[0054] A 液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2.34g/100ml, B 液 ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 5.37g/100ml; 取 A 液 2ml、B 液 8ml、NaCl 13.18g、Triton X1000 0.75ml, 加双蒸水至 150ml;

[0055] (2) 洗涤液的配制

[0056] NaCO_3 0.3g, NaHCO_3 0.58g, 加水至 200ml, 即可配成 0.05mol/L pH9.6 的磷酸盐缓冲液 200ml;

[0057] NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, Tween-20 0.5ml, BAS 1g 加双蒸水至 1000ml, 即可配成 0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液 1000ml;

[0058] (3) 显色液的配制

[0059] A 液: 19.2g 柠檬酸钠加蒸馏水至 1000ml, 配成 0.1mol/L 柠檬酸钠溶液;

[0060] B 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7g 加蒸馏水至 1000ml;

[0061] 临用前取 A 液 24.3ml 与 B 液 25.7ml 混合, 加入联苯二胺 20mg, 待充分溶解后, 加入 30% 的 H_2O_2 250 μL , 即可配成显色液;

[0062] (4) 封闭液的配制

[0063] 小牛血清 5ml, 0.01mol/L pH7.4 PBS 95ml;

[0064] (5) 终止液的制备

[0065] 双蒸水 200ml, 浓硫酸 34ml, 缓慢滴加并不断搅拌, 加至 300ml 蒸馏水即配成终止液;

[0066] 4. 酶标板制作的工艺流程

[0067] (1) 包被过程: 无菌条件下, 将所制备的 SAA、IL-6 和 IL-8 抗体用包被稀释液 (0.05M pH9.6) 的碳酸缓冲液稀释到适当浓度, 每孔抗原加入 100 μL , 密封, 4°C 过夜;

[0068] (2) 洗涤: 弃去孔中液体, 以 0.01mol/L, pH 值为 7.4 的 PBST 作洗涤液, 加入足量室温作用 3 分钟后甩去, 如上重复 3 次, 或用洗板机重复洗 3 次, 拍干至无水印为止;

[0069] (3) 封闭酶标反应孔: 5% 小牛血清置 37°C 封闭 40min, 封闭时将封闭液加满各反应孔, 并去除各孔中的气泡, 封闭结束后, 甩去封闭液, 加入足量洗涤液, 室温作用 3min, 甩去, 重复 3 遍, 每次要吸干孔内的反应液, 倾去液体后在吸水纸上拍干, 重复 3 次;

[0070] (4) 包装: 将封闭好的酶标板放于铝箔袋中, 加入 1g 包装的干燥剂, 用真空包装机

将酶标板包装好,贴上标签。

[0071] 实施例 2 :就隐性子宫颈炎竞争酶联免疫吸附试验检测试剂盒的有关问题作如下说明 :

[0072] 1 关于标本的采取和保存

[0073] 大部分 ELISA 检测均以血清为标本。血浆中除尚含有纤维蛋白原和抗凝剂外,其他成份均同等于血清。除特殊情况外,在医学检验中均以血清作为检测标本。在 ELISA 中血清和血浆可同等应用。血清标本可按常规方法采集,应注意避免溶血,红细胞溶解时会释放出具有过氧化物酶活性的物质,以 HRP 为标记的 ELISA 测定中,溶血标本可能会增加非特异性显色。

[0074] 血清标本宜在新鲜时检测。如有细菌污染,菌体中可能含有内源性 HRP,也会产生假阳性反应。一般来说,在 5 天内测定的血清标本可放置于 4℃,超过一周测定的需低温冻存。冻结血清融解后,蛋白质浓缩,分布不均,应充分混匀,但动作宜轻缓,避免气泡,可上下颠倒混合,不要在混匀器上强烈震荡。混浊或有沉淀的血清标本应先离心或过滤,澄清后再检测。反复冻融会使抗体效价跌落,所以测抗体的血清标本如需保存做多次检测,宜少量分装冻存。

[0075] 2 关于试剂的准备

[0076] ELISA 中用的蒸馏水或去离子水,包括用于洗涤的,应为新鲜的和高质量的。自配的缓冲液应用 pH 计测量校正。从冰箱中取出的试验用试剂应待温度与室温平衡后使用。试剂盒中本次实验不需用的部分应及时放回冰箱保存。

[0077] 3 关于加样的要求

[0078] 在操作过程中有 3 次加样步骤,即加标本,加酶结合物,加底物。加样时应将所加物加在板孔的底部,避免加在孔壁上部,并注意不可溅出,不可产生气泡。

[0079] 4 关于保温

[0080] 在反应过程中有两次抗原抗体反应,即加标本和加酶结合物后。抗原抗体反应的完成需要有一定的温度和时间,这一保温过程称为温育或孵育。保温的方式一般采用水浴,可将 ELISA 板至于水浴箱中,ELISA 板底应贴着水面,使温度迅速平衡。为避免蒸发,板上应加盖,也可用塑料贴封纸或保鲜膜覆盖板孔,此时可让反应板漂浮在水面上。若用保温箱,ELISA 板应放在湿盒内,湿盒要选用传导性良好的材料如金属等,在盒底垫湿的纱布,最后将 ELISA 板放在湿纱布上。湿盒应先放在保温箱中预温至规定的温度,特别是在气温较低的时候更应如此。无论是水浴还是湿盒温育,反应板均不宜叠放,以保证各板的温度都能迅速平衡。室温温育时,操作时的室温应严格限制在规定的范围内,标准室温温度是指 20-25℃。

[0081] 5 关于洗涤

[0082] 洗涤在 ELISA 过程中虽不是一个反应步骤,但却也决定着实验的成败。ELISA 就是靠洗涤来达到分离游离的和结合的酶标记物的目的。通过洗涤以清除残留在板孔中没能与固相抗原或抗体结合的物质,以及在反应过程中非特异性地吸附于固相载体的干扰物质。聚苯乙烯等塑料对蛋白质的吸附是普遍性的,而在洗涤时又应把这种非特异性吸附的干扰物质洗涤下来。可以说在 ELISA 操作中,洗涤是最主要的关键技术,应引起操作者的高度重视,操作者应严格按照要求洗涤,不得马虎。洗涤的方式除某些 ELISA 仪器配有特殊的自动洗

涤仪外,手工操作有浸泡式和流水冲洗式两种,过程如下:

[0083] 5.1 浸泡式 a. 吸干或甩干孔内反应液;b. 用洗涤液过洗一遍(将洗涤液注满板孔后,即甩去);c. 浸泡,即将洗涤液注满板孔,放置 1-2 分钟,间歇摇动,浸泡时间不可随意缩短;d. 吸干孔内液体。吸干应彻底,可用水泵或真空泵抽吸,也可甩去液体后在清洁毛巾或吸水纸上拍干;e. 重复操作 c 和 d,洗涤 3-4 次(或按说明规定)。在间接法中如本底较高,可增加洗涤次数或延长浸泡时间。微量滴定板多采用浸泡式洗涤法。洗涤液多为含非离子型洗涤剂的中性缓冲液。聚苯乙烯载体与蛋白质的结合是疏水性的,非离子型洗涤剂既含疏水基团,也含亲水基团,其疏水基团与蛋白质的疏水基团借疏水键结合,从而削弱蛋白质与固相载体的结合,并借助于亲水基团和水分子的结合作用,使蛋白质回复到水溶液状态,从而脱离固相载体。洗涤液中的非离子型洗涤剂一般是吐温 20,其浓度可在 0.05% -0.2% 之间,高于 0.2% 时,可使包被在固相上的抗原或抗体解吸附而减低试验的灵敏度。

[0084] 5.2 流水冲洗式流水冲洗法最初用于小珠载体的洗涤,洗涤液仅为蒸馏水甚至可用自来水。洗涤时附接一特殊装置,使小珠在流水冲击下不断地滚动淋洗,持续冲洗 2 分钟后,吸干液体,再用蒸馏水浸泡 2 分钟,吸干即可。浸泡式犹如盆浴,流水冲洗式则好比淋浴,其洗涤效果更为彻底,且也简便、快速。已有实验表明,流水冲洗式同样也适用于微量滴定板的洗涤。洗涤时设法加大水流量或加大水压,让水流冲击板孔表面,洗涤效果更佳。

[0085] 6 关于显色和比色

[0086] 6.1 显色

[0087] 显色是 ELISA 中的最后一步温育反应,此时酶催化无色的底物生成有色的产物。反应的温度和时间仍是影响显色的因素。在一定时间内,阴性孔可保持无色,而阳性孔则随时间的延长而呈色加强。适当提高温度有助于加速显色进行。在定量测定中,加入底物后的反应温度和时间应按规定力求准确。定性测定的显色可在室温进行,时间一般不需要严格控制,有时可根据阳性对照孔和阴性对照孔的显色情况适当缩短或延长反应时间,及时判断。TMB 受光照的影响不大,可在室温中置于操作台上,边反应观察结果。但为保证实验结果的稳定性,宜在规定的适当时间阅读结果。TMB 经 HRP 作用后,约 40 分钟显色达顶峰,随即逐渐减弱,至 2 小时后即可完全消退至无色。TMB 的终止液有多种,叠氮钠和十二烷基硫酸钠(SDS)等酶抑制剂均可使反应终止。这类终止剂尚能使蓝色维持较长时间(12-24 小时)不褪,是目视判断的良好终止剂。此外,各类酸性终止液则会使蓝色转变成黄色,此时可用特定的波长(450nm)测读吸光值。

[0088] 6.2 比色

[0089] 比色前应先用洁净的吸水纸拭干板底附着的液体,然后将板正确放入酶标比色仪的比色架中。以软板为载体的试验,需先将板置于标准 96 孔的座架中,才可进行比色。最好在加底物液显色前,先将软板边缘剪净,这样,此板就可完全平妥坐入座架中。

[0090] 比色时应先以蒸馏水校零点,测读底物孔(未经任何反应仅加底物液的孔)和空白孔(以生理盐水或稀释液代替标本作全过程的孔),以记录本次试验的试剂状况。其后可用空白孔以蒸馏水校零点,以上各孔的吸光度需减去空白孔的吸光度,然后进行计算。比色结果的表达以往通用光密度(optical density, OD),现按规定用吸光度(absorbance, A),两者含义相同。通常的表示方法是,将吸收波长写于 A 字母的右下角,如 OPD 的吸收波长为

492nm,表示方法为" A492nm" 或" OD492nm" 。

[0091] 7 关于结果的判定

[0092] ELSIA 操作步骤复杂,影响反应因素较多,特别是固相载体的包被难达到各个体之间的一致,因此在定量测定中,每批测试均须用一系列不同浓度的参考标准品在相同的条件下制作标准曲线。测定大分子量物质的夹心法 ELISA,标准曲线的范围一般较宽,曲线最高点的吸光度可接近 2.0,绘制时常用半对数纸,以检测物的浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,将各浓度的值逐点连接,所得曲线一般呈 S 形,其头、尾部曲线趋于平坦,中央较呈直线的部分是最理想的检测区域。测定小分子量物质常用竞争法,其标准曲线中吸光度与受检物质的浓度呈负相关。标准曲线的形状因试剂盒所用模式的差别而略有不同。

专利名称(译)	一种奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN102043054A	公开(公告)日	2011-05-04
申请号	CN201010518500.6	申请日	2010-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
申请(专利权)人(译)	东北农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北农业大学学报		
[标]发明人	李德军 刘运枫 王海彬		
发明人	李德军 刘运枫 王海彬		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种快速准确的奶牛隐性子宫内膜炎早期诊断试剂盒。它是利用SAA、IL-6和IL-8的标准抗体包被酶标板，用新型单克隆抗体作竞争抗体，用辣根过氧化物酶标记二抗，配制血清稀释液等组装组成。包括SAA、IL-6和IL-8抗体制备，辣根过氧化物酶标记二抗制备，ELISA试剂的配制，酶标板制作。本发明主要采用酶联免疫吸附试验的方法。ELISA方法应用范围广泛，操作速度快，两分钟便得到结果，可以消除一些疫苗反应。它既可以用于实验室检测，也可以运用于牧场和野外操作，适合于临床及养殖户现场的检测。