



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103323585 A

(43) 申请公布日 2013.09.25

(21) 申请号 201310224728.8

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2013.06.06

(71) 申请人 广东海大畜牧兽医研究院有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业开发区新桂二路 56 号中试楼 101 室

申请人 中国水产科学研究院珠江水产研究所

(72) 发明人 陈善真 李其昌 卢迈新 石和荣

贾爱卿 可小丽 罗均 李庆勇

刘志刚 李中圣 陈克宏 田珂

刘小琴

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标

事务所(普通合伙) 44288

代理人 何新华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒及其制备方法。所述 ELISA 试剂盒包括包被抗原、兔抗鱼 IgM 二抗、HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液;所述包被抗原为鱼类无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白,其中 ScpB 蛋白片段序列为与 SEQIDNO:1 至少 80% 同源的序列;通过鱼特异性 IgM 的制备、兔抗鱼 IgM 抗体的制备、抗原的制备、试剂盒组装等步骤制备而成。本发明所述的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,用于检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体,具有高特异性。

1. 一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,包括包被抗原、HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液;其特征在于:还包括兔抗鱼 IgM 二抗,所述包被抗原为鱼类无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白,其中 ScpB 蛋白片段序列为与 SEQ ID NO:1 至少 80% 同源性的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,其特征在于:所述兔抗鱼 IgM 二抗是通过分离培养的无乳链球菌对健康鱼类攻毒,收集鱼血清,纯化 IgM 抗体,然后免疫兔子,免疫两次后采血收集血清,然后利用 Protein G 亲和层析柱纯化而得。

3. 一种如权利要求 1 所述的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于其包括以下步骤:

1) 鱼特异性 IgM 的制备:对健康鱼注射无乳链球菌菌液,攻毒后,采集攻毒鱼血清,用 IgM 纯化试剂盒纯化鱼血清中的特异性 IgM;

2) 兔抗鱼 IgM 二抗的制备:纯化后的鱼特异性 IgM 作为抗原注射免疫兔子,免疫两次后采集兔血清,兔血清用 Protein G 亲和层析柱纯化,备用;

3) 抗原的制备:获取鱼类无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原;

4) 试剂盒组装:将步骤 2) 中的兔抗鱼 IgM 抗体、步骤 3) 中的抗原、以及 HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液组装成 ELISA 试剂盒。

4. 根据权利要求 3 所述的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于步骤 3) 中鱼类无乳链球菌全菌蛋白包被抗原是通过以下方法获得:无菌培养无乳链球菌菌液,离心后收集菌液沉淀,无菌 PBS 重悬洗涤,并重复离心洗涤 2-5 次;沉淀重悬振荡混匀后,进行超声破碎;超声后离心处理,取上清作为包被抗原。

5. 根据权利要求 4 所述的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于:所述超声破碎的方式采用超声 4 s,停 6 s 相互间隔的方式,超声振幅 35%,超声时间为 25min,直到菌液透明为止,整个超声过程在冰浴中进行。

6. 根据权利要求 3 所述的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于步骤 3) 中无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原是通过以下方法获得:从鱼无乳链球菌 ScpB 全长蛋白获取与 SEQ ID NO:1 序列 SEQ ID NO:1 至少 80% 同源的序列;在 ScpB-1 两端分别加上酶切位点 EcoR I 和 Xho I,将克隆质粒导入表达载体 pET32a(+) 中,获得重组质粒,然后将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,0.7mM IPTG 诱导重组蛋白表达,经纯化后获得无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原。

一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于动物疫病血清学诊断技术领域,具体涉及一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 从 30 年代开始,人们就应用血清学方法诊断细菌性和病毒性鱼病,对鱼病早期诊断起到了很大的作用。近十多年来,由于人、兽医诊断新技术的渗透,细菌学、病毒学和组织病理学的诊断方法正逐步被快速、准确的血清学诊断技术所取代。目前常采用的主要方法有:血清中和试验、酶联免疫吸附试验、凝集反应、沉淀反应(琼脂扩散、免疫对流电泳等)、补体参与的反应、免疫标记检测方法(免疫荧光技术、免疫酶技术、放射免疫测定法)以及免疫电泳等。此外花环试验、移动抑制试验、巨噬细胞吞噬功能试验等体外细胞免疫测定法也曾用来进行鱼类免疫学诊断。

[0003] 随着现代免疫学、分子生物学的发展,酶联免疫吸附技术(ELISA)在水产方面也得到应用。ELISA 是一种应用非常广泛的血清学检测方法,其需要的血清量少,非常适用于鱼类血清抗体水平检测。大量的试验结果表明该方法操作简便、快速、特异性和灵敏性强,并且可以通过目测判定试验结果,该方法在我国各级兽医检测部门已应用多年,适宜于大规模检测,可在基层推广使用。Shelby 等 2001 年首次将这一方法应用于检测海豚链球菌疫苗对条纹杂交鲈免疫的效果。Wenbin 等 2009 年也利用 ELISA 检测接种海豚链球菌灭活疫苗后的大菱虾的血清抗体水平,发现抗体水平的 OD 值有明显升高。在诊断方面,通过测定病鱼的血清抗体,也可以确定自然发病鱼类的病原。

[0004] 许多证据表明,鱼类与哺乳类一样也有细胞免疫和体液免疫两种类型的特异性免疫反应。人所共识哺乳动物具有五类免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD,而鱼类中主要的免疫球蛋白之一 IgM 在鱼类的特异性免疫应答中发挥重要作用。目前人们已从许多鱼类中分离得到免疫球蛋白,无颌鱼类免疫球蛋白表达量很少,有颌鱼类血清中的免疫球蛋白在血液中的相对水平较哺乳动物的高。鱼类的 IgM 不仅存在于血清中,还存在于皮肤、肠粘液、胆汁和卵中。

[0005] 鱼和哺乳动物一样,抗原进入机体后有一段潜伏期,这时血清中的抗体很少或没有,鱼类对病原体的免疫保护力也很低。在适宜条件下,抗原刺激一段时间后在鱼类的肾脏和脾中产生相应的抗体,然后释放到血液中。此类抗体是针对抗原产生的特异性抗体,即是针对 IgM 的免疫球蛋白,如果能对该类抗体进行检测,那对鱼类疾病的快速诊断及鱼类口服疫苗的抗体评估有着十分重要的应用价值。

[0006] 无乳链球菌的 C5a 肽酶简称 ScpB(Streptococcal C5a Peptidase from Group B Streptococcus),ScpB 可以裂解人 C5a 补体的 His-67,阻止其与中性粒细胞的结合,抑制炎症反应,是介导细菌粘附和入侵靶细胞及引起机体免疫反应的重要蛋白。也是目前发现的细菌较大的表面蛋白,其存在于各类血清型的无乳链球菌菌株中。研究表明,人源无乳链球

菌的 ScpB 蛋白由 1150 个氨基酸组成,前 31 个为信号肽,紧邻的 68 个为蛋白前肽。此外,该蛋白还含有 N 端裂解 C5a 的蛋白酶活性区、蛋白酶相关区、纤维结合素结合区以及 C 端细胞壁锚定、穿膜结构等五个功能区。细菌主要通过纤维结合素结合区(Fn)与宿主细胞的纤维结合素受体结合,实现粘附和定植宿主细胞的第一步。同时,酶活性区可以裂解补体 C5a,阻断 C5a 趋化中性粒细胞的作用,达到抑制炎症目的。

[0007] 目前,动物实验证实 ScpB 蛋白对小鼠具有较好的免疫保护作用,并且由于该蛋白存在于所有血清型的无乳链球菌菌株中,高度保守,具有较好的免疫原性,且其分解补体 C5a 的作用明确,因而成为无乳链球菌疫苗的主要候选成分之一,同时也成为构建 ELISA 试剂盒的一个优选抗原。

发明内容

[0008] 为克服现有技术的缺陷,本发明的目的在于提供一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,用于检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体,具有高特异性。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒及其制备方法。

[0010] 为实现上述目的本发明所采用的技术方案如下:

[0011] 一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,包括包被抗原、兔抗鱼 IgM 二抗、HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液;所述包被抗原为鱼类无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白,其中 ScpB 蛋白片段序列为与 SEQ ID NO:1 序列至少 80% 同源的序列。

[0012] 上述方案中,所述兔抗鱼 IgM 二抗是通过分离培养的无乳链球菌对健康鱼类攻毒,收集鱼血清,纯化 IgM 抗体,然后免疫兔子,免疫两次后采血收集血清,然后利用 Protein G 亲和层析柱纯化而得。

[0013] 为实现本发明的另一个目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0014] 一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0015] 1) 鱼特异性 IgM 的制备:对健康鱼注射无乳链球菌菌液,攻毒后,采集攻毒鱼血清,用 IgM 纯化试剂盒纯化鱼血清中的特异性 IgM;

[0016] 2) 兔抗鱼 IgM 二抗的制备:纯化后的鱼特异性 IgM 作为抗原注射免疫兔子,免疫两次后采集兔血清,兔血清用 Protein G 亲和层析柱纯化,备用;

[0017] 3) 抗原的制备:获取鱼类无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原;

[0018] 4) 试剂盒组装:将步骤 2) 中的兔抗鱼 IgM 抗体、步骤 3) 中的抗原、以及 HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液组装成 ELISA 试剂盒。

[0019] 上述方法中,所述步骤 3) 中鱼类无乳链球菌全菌蛋白包被抗原是通过以下方法获得:无菌培养无乳链球菌菌液,离心后收集菌液沉淀,无菌 PBS 重悬洗涤,并重复离心洗涤 2-5 次;沉淀重悬振荡混匀后,进行超声破碎;超声后离心处理,取上清作为包被抗原。

[0020] 在上述方案的基础上,作为本发明的一种优选实施方式,所述超声破碎的方式采用超声 4s,停 6s 相互间隔的方式,超声振幅 35%,超声时间为 25min,直到菌液透明为止,整

个超声过程在冰浴中进行。

[0021] 上述方法中,所述步骤 3) 中无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原是通过以下方法获得:从鱼无乳链球菌 ScpB 全长蛋白获取与 SEQ ID NO:1 序列至少 80% 同源性的序列;在 scpB-1 两端分别加上酶切位点 EcoR I 和 Xho I,将克隆质粒导入表达载体 pET32a(+) 中,获得重组质粒,然后将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3)中,0.7mM IPTG 诱导重组蛋白表达,经纯化后获得无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原。

[0022] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:由于鱼类的 IgM 抗体不同于其他动物的 IgM 抗体,不能通过通用的试剂盒来检测,因此本发明建立一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒。本发明采用特异性的兔抗鱼 IgM 抗体作为二抗,并采用超声破碎的无乳链球菌全菌上清或重组表达 ScpB 蛋白作为包被抗原,全菌抗原包含无乳链球菌菌体的大部分蛋白,在检测过程中可以充分地鱼血清中的特异性 IgM 抗体结合,具有较强的特异性,而 ScpB 蛋白为选自无乳链球菌的保守序列,该区段序列保守且抗原表位丰富,特异性更强。因此本发明的检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒具有更好特异性。

[0023] 下面结合附图和具体的实施方式对本发明作进一步详细说明。

附图说明

[0024] 图 1 为实施例 1 的临床样本检测结果图;

[0025] 图 2 为实施例 2 的临床样本检测结果图。

具体实施方式

[0026] 实施例 1

[0027] 一种检测罗非鱼无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,包括包被抗原、HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液;所述包被抗原为罗非鱼无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白,其中 ScpB 蛋白片段序列为 SEQ ID NO:1;其还包括兔抗罗非鱼 IgM 二抗;该试剂盒是通过以下方法制备而成的:

[0028] 1) 罗非鱼特异性 IgM 的制备:对健康罗非鱼注射无乳链球菌菌液(1×10^8 CFU/mL),攻毒一周后,采集攻毒鱼血清,用 IgM 纯化试剂盒纯化罗非鱼血清中的特异性 IgM;

[0029] 2) 兔抗鱼 IgM 抗体的制备:用纯化后的罗非鱼 IgM 作为抗原注射免疫兔子,共免疫两次,第一次免疫,将 0.42mg 的纯化后的罗非鱼 IgM 稀释至 1mL 与弗氏完全佐剂 1:1(v/v) 混合乳化,在兔子背部皮下多点注射免疫;一免两周后二免,免疫的抗原剂量为 0.4mg IgM,与弗氏不完全佐剂 1:1 (v/v) 混合乳化,二免后一周采集兔血清,测血清中的抗体效价;将制备好的兔血清用 Protein G 亲和层析柱纯化,备用;

[0030] 3) 罗非鱼无乳链球菌全菌抗原的制备:无菌培养无乳链球菌菌液,8000rpm/min,离心 10min,收集菌液沉淀,无菌 PBS 重悬洗涤,重复离心洗涤 3 次。沉淀重悬振荡混匀后,进行超声破碎,超声方式:超声 4s,停 6s,振幅 35%,超声 25min,直到菌液透明为止,整个过程在冰浴中进行;超声后用 10000rpm/min 离心 15min,取上清,然后测定蛋白浓度(3.2mg/ml),作为 ELISA 检测的包被抗原;

[0031] 4) 组装试剂盒:将步骤 2) 中的兔抗鱼 IgM 抗体、步骤 3) 中的抗原、以及 HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液组装成 ELISA 试剂盒。

[0032] 实施例 2

[0033] 一种检测罗非鱼无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒,包括包被抗原、HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液;所述包被抗原为罗非鱼无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白,其中 ScpB 蛋白片段序列为 SEQ ID NO:1;其还包括兔抗罗非鱼 IgM 二抗;该试剂盒是通过以下方法制备而成的:

[0034] 1) 罗非鱼特异性 IgM 的制备:对健康罗非鱼注射无乳链球菌菌液(1×10^8 CFU/mL),攻毒一周后,采集攻毒鱼血清,用 IgM 纯化试剂盒纯化罗非鱼血清中的特异性 IgM;

[0035] 2) 兔抗鱼 IgM 抗体的制备:用纯化后的罗非鱼 IgM 作为抗原注射免疫兔子,共免疫两次,第一次免疫,将 0.42mg 的纯化后的罗非鱼 IgM 稀释至 1mL 与弗氏完全佐剂 1:1(v/v)混合乳化,在兔子背部皮下多点注射免疫;一免两周后二免,免疫的抗原剂量为 0.4mg IgM,与弗氏不完全佐剂 1:1(v/v)混合乳化,二免后一周采集兔血清,测血清中的抗体效价;将制备好的兔血清用 Protein G 亲和层析柱纯化,备用;

[0036] 3) 无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原的制备:从罗非鱼无乳链球菌 ScpB 全长蛋白获取 SEQ ID NO:1 序列片段;在 scpB-1 两端分别加上酶切位点 EcoR I 和 Xho I,将克隆质粒导入表达载体 pET32a(+) 中,获得重组质粒,然后将重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,0.7mM IPTG 诱导重组蛋白表达,经纯化后获得无乳链球菌 ScpB 蛋白片段的重组蛋白包被抗原;

[0037] 4) 组装试剂盒:将步骤 2) 中的兔抗鱼 IgM 抗体、步骤 3) 中的抗原、以及 HRP 标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液组装成 ELISA 试剂盒。

[0038] 应用实施例 1:实施例 2 所述的罗非鱼无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的应用

[0039] 1. 确定抗原的最佳包被浓度及羊抗兔 HRP 的最佳稀释倍数

[0040] 1) 首先固定血清及兔抗鱼 IgM 纯化抗体的稀释度来确定抗原的最佳包被浓度及羊抗兔 HRP 的最佳稀释度;

[0041] 2) 以抗原最佳包被浓度和羊抗兔 HRP 最佳稀释度进行 ELISA 反应,确定血清及兔抗鱼 IgM 纯化抗体的最佳稀释倍数。

[0042] 具体操作步骤如下:

[0043] (1) 包被:抗原用包被液稀释后,100 μ L/孔,加入 96 孔聚苯乙烯酶联反应板,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,每孔加 250 μ L 洗涤液,洗涤 3 次后甩干;

[0044] (2) 封闭:每孔加封闭液 150 μ L,37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,甩干,每孔加 250 μ L 洗涤液进行洗涤,洗 3 次;

[0045] (3) 加样:血清用抗体稀释液稀释,每孔加入 100 μ L,25 $^{\circ}$ C 孵育 30min,甩干,每孔加 250 μ L 洗涤液进行洗涤,洗 6 次;

[0046] (4) 加兔抗鱼 IgM 抗体:兔抗鱼 IgM 抗体用抗体稀释液稀释,100 μ L/孔加样,作用 30min,洗涤同上;

[0047] (5) 加 HRP 标记的羊抗兔抗体:HRP 标记的羊抗兔抗体用抗体稀释液稀释,100 μ L/孔,25 $^{\circ}$ C 作用 30min,洗涤同上;

[0048] (6) 加显色液:每孔加入新配制的显色液 100 μ L,室温避光显色 10min;

[0049] (7) 加入终止液:每孔加入 50 μ L 终止液终止反应;

[0050] (8) 测 OD 值 : 自动酶联检测仪测定各孔 OD_{450nm} 值, 检测的具体内容及结果见表 1 和表 2。

[0051] 表 1

[0052]

血清 1:50 稀释, 兔抗鱼 IgM 纯化抗体 1:250 稀释, 显色 10min。												
Measurement count: 1 Filter: 450												
	抗原 1: 50			抗原 1:100			抗原 1:200			抗原 1: 400		
A+	0.994	0.682	0.466	0.983	0.641	0.403	0.807	0.512	0.330	0.558	0.407	0.268
B+	0.994	0.646	0.441	0.917	0.587	0.397	0.778	0.498	0.342	0.553	0.398	0.278
C-	0.280	0.184	0.119	0.270	0.184	0.112	0.223	0.145	0.106	0.182	0.125	0.080
D-	0.291	0.203	0.145	0.332	0.197	0.131	0.225	0.169	0.117	0.177	0.137	0.094
HRP	1:2000	1:4000	1:8000	1:2000	1:4000	1:8000	1:2000	1:4000	1:8000	1:2000	1:4000	1:8000

[0053] 表 1 的结果显示 : 通过上述方法确定抗原的最佳包被浓度为 1:200, HRP 的稀释度为 1:2000。

[0054] 表 2

血清稀释度	1:40		1:80		1:160	
阳性血清	0.827	0.446	0.594	0.320	0.421	0.246
阳性血清	0.781	0.459	0.592	0.395	0.466	0.232
阴性血清	0.181	0.101	0.114	0.074	0.091	0.056
阴性血清	0.203	0.108	0.125	0.077	0.102	0.063
IgM 稀释度	1:250	1:500	1:250	1:500	1:250	1:500

[0055]

[0056] 表 2 的结果显示 : 通过上述方法确定血清及兔抗鱼 IgM 纯化抗体的最佳稀释倍数分别为 1:80 和 1:250。

[0057] 2. 临床样品的检测

[0058] 采用上述 ELISA 试剂盒检测攻毒后 4 个月的免疫鱼血清, 共检测注射免疫组、高浓度浸泡免疫组、中浓度浸泡免疫组、低浓度浸泡免疫组和未经免疫处理的对照组 5 个组罗非鱼血清 4 个月内血清抗体水平的变化趋势, 结果见图 1。由图 1 检测结果可见, 各免疫组和对照组之间的血清抗体水平表现出差异, 相对免疫保护率越高的免疫组, 血清中抗体水平也越高, 并且都高于对照组。免疫组在攻毒前、免疫结束后一周和免疫结束后两周, 血清抗体水平呈上升趋势。这说明建立的 ELISA 方法可以对罗非鱼血清抗体具有较高的特异性。

[0059] 应用实施例 2 : 实施例 2 所述的罗非鱼无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒的应用

[0060] 1. 抗原、兔抗鱼 IgM 抗体的最佳稀释浓度的确定 :

[0061] 用棋盘 (checkerboard) 滴定法确定抗原和兔抗鱼 IgM 抗体的最佳工作浓度, 然后再以最佳稀释度的抗原包被酶标板, 确定羊抗兔 HRP 的最佳稀释度。

[0062] 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液将蛋白分别稀释为 1:800、1:1600 和 1:3200 三个浓度, 从左到右依次包被于 96 孔酶标板, 100 μ L/ 孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜 ; 次日, 洗涤和封闭后, 将阴、阳性血清分别 1:50 稀释加于反应孔中, 100 μ L/ 孔, 兔抗 IgM 抗体做 1:500、1:1000、1:2000 三个稀释度, 自上而下分别加入以上的反应孔中, 100 μ L/ 孔, 组成方阵, 室温孵育 30min, 按操作程序进行操作。羊抗兔 HRP1 :2000 倍稀释, 进行 ELISA 试验。在酶标仪上于 450nm 处测各孔的 OD 值, 阴性血清 OD_{450nm} 记为 N, 各阳性检测孔的 OD_{450nm} 记为 S。比较阴阳性血清的

OD_{450nm} 值,当二者比率(即 S/N)最大,且阴性血清 OD₄₅₀ 值为小于 0.2,阳性血清的 OD₄₅₀ 值大于 0.5 时的抗原和兔抗鱼 IgM 抗体的稀释浓度为最佳工作稀释浓度。

[0063] 具体操作步骤如下:

[0064] (1) 包被:抗原用包被液稀释后,100 μL/孔,加入 96 孔聚苯乙烯酶联反应板,4℃ 包被过夜,每孔加 250 μL 洗涤液,洗涤 3 次后甩干;

[0065] (2) 封闭:每孔加封闭液 150 μL,37℃ 封闭 1h,甩干,每孔加 250 μL 洗涤液进行洗涤,洗 3 次;

[0066] (3) 加样:血清用抗体稀释液稀释,每孔加入 100 μL,25℃ 孵育 30min,甩干,每孔加 250 μL 洗涤液进行洗涤,洗 6 次;

[0067] (4) 加兔抗鱼 IgM 抗体:兔抗鱼 IgM 抗体用抗体稀释液稀释,100 μL/孔加样,作用 30min,洗涤同上;

[0068] (5) 加 HRP 标记的羊抗兔抗体:HRP 标记的羊抗兔抗体用抗体稀释液稀释,100 μL/孔,25℃ 作用 30min,洗涤同上;

[0069] (6) 加显色液:每孔加入新配制的显色液 100 μL,室温避光显色 10min;

[0070] (7) 加入终止液:每孔加入 50 μL 终止液终止反应;

[0071] (8) 测 OD 值:自动酶联检测仪测定各孔 OD_{450nm} 值,OD₄₅₀ 检测结果见表 3 和表 4。

[0072] 表 3

[0073]

抗原稀释倍数	1:800	1:1600	1:3200	1:800	1:1600	1:3200
	阴性血清			阳性血清		
兔抗鱼 1:500	0.293	0.203	0.156	1.085	0.787	0.715
IgM 稀释 1:1000	0.192	0.097	0.088	0.846	0.666	0.546
倍数 1:2000	0.092	0.066	0.056	0.566	0.429	0.332

[0074] 由表 3 可见,抗原作 1:1600 倍稀释,兔抗鱼 IgM 抗体 1:1000 倍稀释时,S/N 值最大。因此,抗原最佳稀释度是 1:1600,兔抗鱼 IgM 抗体的最佳稀释度为 1:1000。

[0075] 表 4

[0076]

抗体稀释度	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
阴性血清	0.280	0.234	0.182	0.154
阳性血清	1.569	1.306	1.145	0.956

[0077] 当 HRP-羊抗兔作 1:4000 稀释时,S/N 值最大。因此,HRP-羊抗兔的最佳稀释度是 1:4000。

[0078] 2. 阴阳性临界值的确定

[0079] 随机收集临床采集的无链球菌感染的罗非鱼血清,用现有的间接 ELISA 方法检测,计算出 40 份阴性血清的平均 OD 值(\bar{X}) 和标准方差(SD),阴、阳性临界值的确定公式为

$\bar{X}+2SD$, 凡超过临界值的判为阳性, 否则判为阴性; 检测结果见表 5。

[0080] 表 5

编号	1	2	3	4	5
1	0.253	0.100	0.199	0.226	0.366
2	0.194	0.257	0.293	0.259	0.168
3	0.319	0.239	0.236	0.229	0.138
[0081] 4	0.340	0.389	0.231	0.182	0.211
5	0.162	0.285	0.264	0.261	0.251
6	0.234	0.232	0.215	0.179	0.140
7	0.137	0.251	0.357	0.186	0.093
8	0.203	0.366	0.380	0.342	0.198

[0082] 检测中阴性对照的 OD_{450nm} 值为 0.095, 阳性对照的 OD_{450nm} 值为 1.006。由表 5 计算结果可知, 40 份阴性血清的平均 OD 值为 0.239, 标准方差 (SD) 为 0.0747, 因此, 阴阳性临界值 $\bar{X}+2SD=0.388$ 。

[0083] 3. 临床样品检测

[0084] 采用上述 ELISA 试剂盒检测攻毒后 4 个月的免疫鱼血清, 共检测注射免疫组、高浓度浸泡免疫组、中浓度浸泡免疫组、低浓度浸泡免疫组和未经免疫处理的对照组 5 个组罗非鱼血清 4 个月内血清抗体水平的变化趋势, 结果见图 2。由图 2 可见, 免疫组罗非鱼在受到免疫原刺激后机体产生大量抗体, 抗体水平随着时间降低到一定水平后开始缓慢升高, 并在攻毒后第 58d, 血清内抗体水平达到峰值, 58d 后又逐渐下降, 而对照组一直保持较低的抗体水平。同样说明该 ELISA 方法, 用于罗非鱼抗体水平的检测, 具有很高的特异性。

[0085] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式, 不能以此来限定本发明保护的范围, 本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范畴。

- <110> 广东海大畜牧兽医研究院有限公司 ; 中国水产科学研究院珠江水产研究所
 <120> 一种检测鱼类无乳链球菌 IgM 抗体的 ELISA 试剂盒及其制备方法
 <130>
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 31701
 <212> DNA
 <213> ScpB 蛋白
 <400> 1

atgtatgtaa	cagataagga	caatacctca	agcaaggttc	acctgaacaa	tgtttctgat	60
aaatttgaag	taacagtaac	agttcacaac	aaatctgata	agcctcaaga	gttgtattac	120
caagtaactg	ttcaaacaga	taaagtagat	ggaaaacact	ttgccttgge	tcctaaagca	180
ttgtatgaga	catcatggca	aaaaateaca	attccagcca	atagcagcaa	acaagtcacc	240
gttccaatcg	atgctagtcg	atntagcaag	gacttgcttg	cccaaatgaa	aaatggctat	300
ttcttagaag	gttttgttcg	tttcaacaaa	gactctacaa	aagaagaget	tatgagcatt	360
ccatatattg	gtttccgagg	tgattttgge	aatctgtcag	ctttagaaaa	accaatctat	420
gatagtaaag	acggtagcag	ctactatcat	gaagcaaata	gtgatgcaa	gaccaattaa	480
gatggtgatg	gattacagtt	ttacgctctg	aaaaataact	ttacagcact	taccacagag	540
tctaaccat	ggacgattat	taaagctgtc	aaagaagggg	ttgaaaacat	agaggatate	600
gaatcttcag	agatcacaga	aaccatTTTT	gcaggtactt	ttgcaaaaca	agacgatgat	660
agccactact	atatccaccg	tcacgcta	ggcaaacat	atgctgcgat	ctctccaaat	720
ggggacggta	acagagatta	tgcccaattc	caaggtactt	tcttgcgtaa	tgctaaaaac	780
cttgtggctg	aagtcttggg	caaagaagga	aatgttgttt	ggacaagtga	ggtaaccgag	840
caagttgta	aaaactacaa	caatgacttg	gcaagcacac	ttggttcaac	ccgttttgaa	900
aaaacgcgtt	gggacggtaa	agataaagac	ggcaaagttg	ttgctaacgg	aacctacacc	960
tatcgtgttc	gctacacgcc	gattagctca	ggtgcaaaaag	aacaacacac	tgatTTTgat	1020
gtgattgtag	acaatacgac	acctgaagtc	gcaacatcgg	caacattctc	aacagaagat	1080
agtcgTTTgg	cacttgcatc	taaaccaaaa	accagccaac	cggTTTaccg	tgagcgtatt	1140
gcttacactt	atatggatga	ggatctgcca	acaacagagt	atatttctcc	aatgaagat	1200
ggtacettta	ctcttctga	agaggctgaa	acaatggaag	gcgctactgt	tccattgaaa	1260
atgtcagact	ttacttatgt	tgttgaagat	atgactggta	acatcactta	tacaccagtg	1320
actaagctat	tggagggcc	ctctaataag	ccagaacaag	acggttcaga	tcaagcacca	1380
gacaaaaaac	cagaagctaa	accagaacaa	gacggttcag	gtcaaacacc	agataaaaaa	1440
aaagaaacta	aaccagaaaa	agatagttca	ggtcaaacac	caggtaaaac	tcctcaaaaa	1500
ggtcaatctt	ctcgtactct	agagaaacga	tcttctaage	gtgctttage	tacaaaagca	1560
tcaacaagag	atcagttacc	aacgactaat	gacaaggata	caaatcgTTT	acatctcctt	1620
aagttagta	tgaccacttt	cttcttggga	ttagcagctc	atatatttaa	aacaaaacgc	1680
caaaaagaaa	ctaaaaaata	g				1701

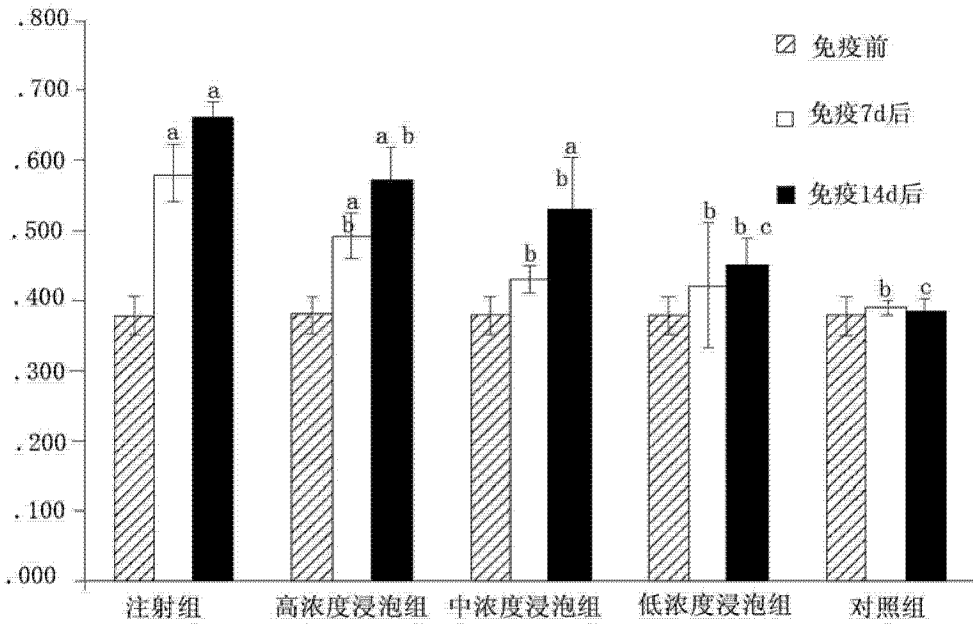


图 1

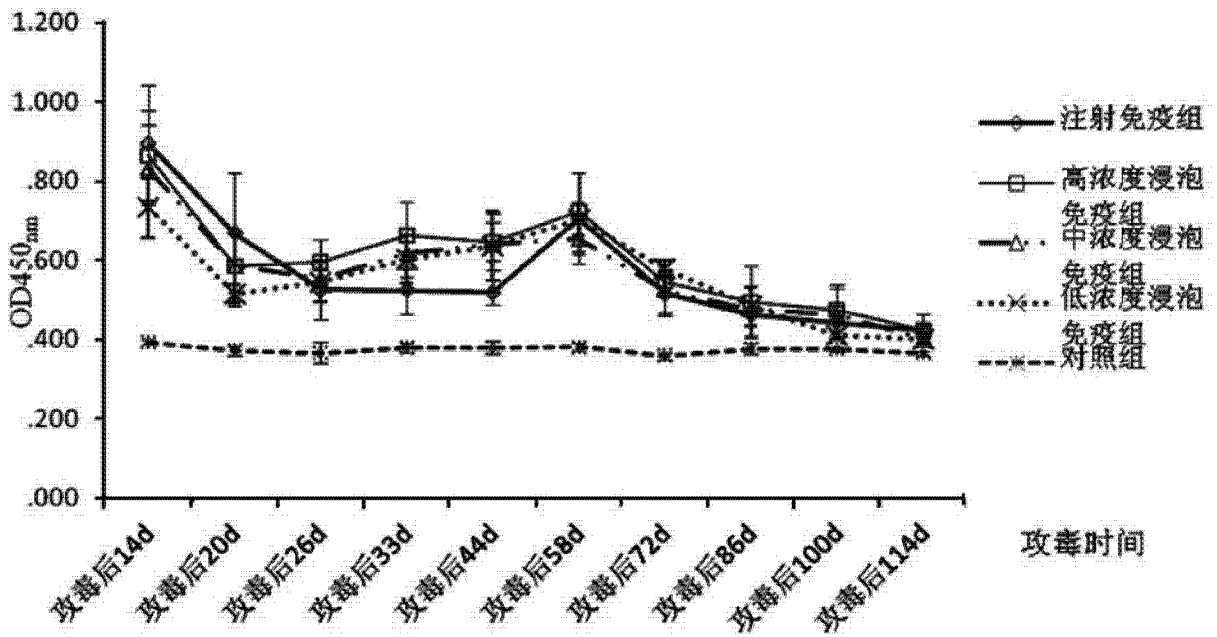


图 2

专利名称(译)	一种检测鱼类无乳链球菌IgM抗体的ELISA试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN103323585A	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201310224728.8	申请日	2013-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司 中国水产科学研究院珠江水产研究所		
申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司 中国水产科学研究院珠江水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东海大畜牧兽医研究院有限公司 中国水产科学研究院珠江水产研究所		
[标]发明人	陈善真 李其昌 卢迈新 石和荣 贾爱卿 可小丽 罗均 李庆勇 刘志刚 李中圣 陈克宏 田珂 刘小琴		
发明人	陈善真 李其昌 卢迈新 石和荣 贾爱卿 可小丽 罗均 李庆勇 刘志刚 李中圣 陈克宏 田珂 刘小琴		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	何新华		
其他公开文献	CN103323585B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测鱼类无乳链球菌IgM抗体的ELISA试剂盒及其制备方法。所述ELISA试剂盒包括包被抗原、兔抗鱼IgM二抗、HRP标记的羊抗兔二抗、抗体稀释液、洗涤液、显色液、终止液；所述包被抗原为鱼类无乳链球菌全菌蛋白或无乳链球菌

ScpB蛋白片段的重组蛋白，其中ScpB蛋白片段序列为与SEQIDNO:1至少80%同源的序列；通过鱼特异性IgM的制备、兔抗鱼IgM抗体的制备、抗原的制备、试剂盒组装等步骤制备而成。本发明所述的检测鱼类无乳链球菌IgM抗体的ELISA试剂盒，用于检测鱼类无乳链球菌IgM抗体，具有高特异性。

血清 1:50 稀释, 兔抗鱼 IgM 纯化抗体 1:250 稀释, 显色 10min.												
Measurement count: 1 Filter: 450												
	抗原 1: 50			抗原 1:100			抗原 1:200			抗原 1: 400		
A+	0.994	0.682	0.466	0.983	0.641	0.403	0.807	0.512	0.330	0.558	0.407	0.268
B+	0.994	0.646	0.441	0.917	0.587	0.397	0.778	0.498	0.342	0.553	0.398	0.278
C-	0.280	0.184	0.119	0.270	0.184	0.112	0.223	0.145	0.106	0.182	0.125	0.080
D-	0.291	0.203	0.145	0.332	0.197	0.131	0.225	0.169	0.117	0.177	0.137	0.094
HRP	1:2000	1:4000	1:8000	1:2000	1:4000	1:8000	1:2000	1:4000	1:8000	1:2000	1:4000	1:8000