



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110045117 A

(43)申请公布日 2019. 07. 23

(21)申请号 201910370182.4

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.05.06

G01N 33/535(2006.01)

(71)申请人 江苏南农高科技股份有限公司

地址 214405 江苏省无锡市江阴市锡澄路
890号

(72)发明人 车巧林 肖澄 缪芬芳 董彦鹏
徐凤 耿晓眉 胡静雅 靳蒙蒙
余姣

(74)专利代理机构 北京卓岚智财知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11624

代理人 任漱晨

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒及其制
备方法和应用

(57)摘要

发明公开了猪肺炎支原体固相竞争ELISA试
剂盒及其制备方法和应用,包括猪肺炎支原体抗
原蛋白包被的酶标板、参照样品、兔抗猪肺炎支
原体阳性血清、兔抗猪肺炎支原体阴性血清。本
发明试剂盒可对猪肺炎支原体抗原进行相对含
量/效力测定,特异性好、重复性好,而且,所提供
的固相竞争ELISA试剂盒操作简单,耗时短,不需
要高端仪器设备,易于推广,适于疫苗生产检验
及实验室研究应用。

1. 猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,包括猪肺炎支原体抗原蛋白包被的酶标板、参照样品、兔抗猪肺炎支原体阳性血清、兔抗猪肺炎支原体阴性血清。

2. 根据权利要求1所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,还包括10×浓缩洗涤液、样品稀释液/酶标抗体稀释液、TMB显色液和终止液。

3. 根据权利要求2所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒,其特征在于,所述的样品稀释液/酶标抗体稀释液,包括:W/W为0.8%的NaCl、W/W为0.02%的KCl、W/W为0.29%的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、W/W为0.02%的 KH_2PO_4 、V/V为0.03~0.05%的Procline 300的水溶液; pH7.2;

所述的10×洗涤液为10×PBST,含有V/V为0.05%的吐温20的PBS, pH7.2;

所述的终止液是1.5mol/L的 H_2SO_4 。

4. 根据权利要求1所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述酶标板按照以下方法制备:

(1) 猪肺炎支原体抗原蛋白的制备

培养好的猪肺炎支原体菌液高速离心获得菌体, PBS洗涤2遍以上后超声波破碎或高压均质破碎或SDS抽提制备抗原蛋白, 抗原蛋白10~100倍浓缩后低温冷冻保存;

(2) 猪肺炎支原体抗原蛋白的包被

用0.1mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释猪肺炎支原体抗原蛋白至最佳包被浓度, 包被96孔酶标板, 每孔100 μl , 2~8℃过夜;

(3) 酶标板的封闭方法

取出反应板, 恢复室温, 加入1×洗涤液, 每孔300 μl , 洗涤3~5次; 甩干洗涤液, 在吸水纸上拍干孔内液体并驱除孔内气泡; 加入封闭液, 每孔200 μl , 2~8℃过夜封闭, 1×洗涤液洗涤3~5次; 甩干洗涤液, 在吸水纸上拍干孔内液体并置通风厨中吹干酶标板, 装入铝箔袋, 放入干燥剂, 抽真空后封口, 2~8℃保存备用。

5. 根据权利要求4所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述的封闭液为含有W/W为5%的脱脂奶粉、W/W为0.8%的蔗糖、W/W为2%的海藻糖、V/V为0.03~0.05%的Procline300的PBS, pH7.2。

6. 根据权利要求4所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述的参照样品若为菌液抗原时, 其制备方法同酶标板包被抗原的制备方法, 抗原浓度为200 $\mu\text{g/ml}$; 参照样品若为疫苗类产品时, 其制备方法为: 将参考样品置于-70℃以下冷冻至少24小时; 取出参照样品置37℃温浴20分钟; 冰浴上超声3分钟, 将超声处理过的样品置于超速离心管中, 30000rpm 4℃离心6小时; 离心后切勿晃动, 小心去除油层和上清液, 用Kimwipe无尘纸去除离心管内壁上残留的油渍, 将离心沉淀物溶解于1.0ml PBS中, 封口膜封口, 2~8℃过夜; 次日, 以最低输出功率在冰浴上超声5秒, 使蛋白分散。

7. 根据权利要求4所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述的兔抗猪肺炎支原体阳性血清, 按照以下方法制备:

(1) 兔抗猪肺炎支原体高免血清的制备

猪肺炎支原体菌液经甲醛、核酸灭活剂等灭活剂灭活后, 与佐剂乳化, 健康兔先微量间接血凝试验检测, 猪肺炎支原体抗体阴性的健康兔进行皮下多点免疫注射; 首免后28日, 皮下多点注射经佐剂乳化的猪肺炎支原体灭活菌液; 二次免疫后14日, 心脏少量采血, 分离血

清,用双向琼脂扩散试验测定血清效价,免疫次数不局限于两次,根据免疫后试血血清效价决定,若血清效价达到1:64以上,心脏大量采血,分离血清,制得猪肺炎支原体兔抗高免血清;

(2) 兔抗猪肺炎支原体阳性血清的纯化

MAB SELECT填料亲和层析柱用pH7.2的PBS平衡10个柱体积,然后加入离心弃沉淀的兔抗猪肺炎支原体高免血清,用10个柱体积的PBS洗涤杂蛋白,最后用5个柱体积的0.1M pH2.9的甘氨酸-HCl洗脱,收集洗脱液,即制得纯化的兔抗猪肺炎支原体阳性血清,纯化的阳性血清进行SDS-PAGE纯度鉴定和免疫印迹特异性鉴定;

(3) 兔抗猪肺炎支原体阳性血清的制备

根据间接ELISA阳性血清最佳稀释度确定结果,将纯化的高免血清进行1:25000稀释,加5%蔗糖,分装,2~8℃保存。

8. 根据权利要求7所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的兔抗猪肺炎支原体高免血清制备时,使用的佐剂包括弗氏佐剂、水佐剂、水包油佐剂、油包水佐剂。

9. 根据权利要求1所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的应用,其特征在于,用于猪肺炎支原体抗原相对含量的测定;或者用于疫苗产品抗原相对效力测定,替代动物试验进行效力检验,评价疫苗是否合格。

10. 根据权利要求1到3所述的猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒的使用方法,其特征在于,按照以下方法进行:

(1) 10×浓缩洗涤液用去离子水稀释成1×工作洗涤液;

(2) 参照样品、待检样品在稀释板上进行2倍倍比稀释,然后转移50μl液体至猪肺炎支原体抗原蛋白包被好的96孔酶标板的相应孔;

(3) 向上述96孔酶标板剩余列中分别加入兔抗猪肺炎支原体阴性血清一列,兔抗猪肺炎支原体阳性血清一列,PBS一列,每孔100μl;

(4) 待检样品和参照样品列中每孔加入50μl兔抗猪肺炎支原体阳性血清,盖好酶标板;

(5) 酶标板置37℃反应1.5小时;

(6) 倒掉孔内液体,用1×洗涤液洗涤3~5次,每孔300μl,最后一次洗涤后拍干板子;

(7) 每孔加入100μl用酶标抗体稀释液以1:2000稀释的过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,酶标板置37℃反应1小时;

(8) 倒掉孔内液体,用1×洗涤液洗涤3~5次,每孔300μl,最后一次洗涤后拍干板子;

(9) 每孔加入100μl TMB底物显色液,室温显色15分钟;

(10) 每孔加入100μl终止液,10分钟内在酶标仪上读取OD_{450nm}值;

(11) 结果计算:各孔OD_{450nm}读数均应减去空白对照OD_{450nm}读数;待检样品测定的OD_{450nm}值采用RelPot4.0软件或参照现行《中华人民共和国药典》二部附录XIV生物检定统计法(三、量反应平行线测定法)进行相对含量/效力RP值计算。

猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及兽医技术领域,具体地说,本发明涉及一种猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 猪支原体肺炎(Mycoplasma pneumoniae of swine)又称猪喘气病、猪地方性肺炎,是由猪肺炎支原体(Mycoplasma hyopneumoniae, Mhp)引起的一种慢性呼吸道传染病,该病发病率高,死亡率低,普遍存在于世界各地。临床上以咳嗽、气喘和肺部典型的“肉样”或“虾肉样”病变为特征,患病猪生长迟缓,饲料转化率低,体温基本正常。猪肺炎支原体主要通过感染破坏猪的呼吸道纤毛,导致纤毛脱落而引发肺炎,从而导致猪体的体液免疫和细胞免疫功能降低,产生免疫抑制,使其他细菌或病毒易感。目前该病仍是造成养猪经济损失最重要的疾病之一。

[0003] 测定蛋白质含量的方法有很多,如紫外分光光度法、凯氏定氮法、双缩脲法、Lowry法、BCA法、胶体金法、考马斯亮蓝染色法、银染法、荧光法等。每种方法都有其特点和局限性,比如,紫外分光光度法虽然简便、灵敏、快速,不消耗样品,测定后仍能回收使用,但是该法准确度较差,干扰物质多,需要通过计算公式校正,一般用于层析柱的检测;凯氏定氮法结果最精确,但操作复杂,用于大量样品的测定时不太合适;双缩脲法测定快速,操作简单,干扰物质较少,但是灵敏度太差,样品需要量大,测量范围窄;Lowry法因其灵敏度高,是过去应用最广泛的一种方法,但是其试剂配制较为困难,干扰物质很多,且需要精确控制操作时间,近年来逐渐被考马斯亮蓝法取代;考马斯亮蓝法(Bradford法)灵敏度比Lowry法约高4倍,测定快速、简便,干扰物质少,缺点是用于不同蛋白质测定时仍有较大偏差,制作标准曲线时通常选用g-球蛋白为标准物质以减少偏差,且标准曲线也有轻微的非线性,因而不能用Beer定律进行计算,只能用标准曲线测定未知蛋白质的浓度;BCA法所用试剂、终产物稳定,几乎没有干扰物质影响,灵敏度高,近年来备受欢迎,多家公司开发了BCA试剂盒;胶体金法具有较高的灵敏度,可达到微克水平,用于微量蛋白的测定。ELISA法因其敏感性高、特异性好、稳定性好,操作简单,目前成为检测的有效手段,在科研领域、基层得到广泛的应用。但是,目前国内还没有测定猪肺炎支原体抗原含量的ELISA试剂盒。

发明内容

[0004] 针对上述技术问题,本发明用猪肺炎支原体全菌抗原蛋白包被酶标反应板,通过设立参照样品,阴阳性对照血清,建立了猪肺炎支原体抗原相对含量/效力测定的固相竞争ELISA法,并优化ELISA反应条件形成检测试剂盒,为猪肺炎支原体有效抗原含量定量测定奠定了基础。

[0005] 本发明的第一个目的在于提供一种猪肺炎支原体抗原相对含量/效力检测的固相竞争ELISA试剂盒,第二个目的在于提供一种疫苗效力评价的方法,解决攻毒保护试验阴性猪难以寻找,攻毒试验耗时长的问题。

[0006] 本发明采用的技术方案如下：

[0007] 猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒，包括猪肺炎支原体抗原蛋白包被的酶标板、参照样品、兔抗猪肺炎支原体阳性血清、兔抗猪肺炎支原体阴性血清、10×浓缩洗涤液、样品稀释液/酶标抗体稀释液、TMB显色液和终止液。

[0008] 其中，所述的样品稀释液/酶标二抗稀释液是含有0.8% (W/W) NaCl、0.02% (W/W) KCl、0.29% (W/W) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% (W/W) KH_2PO_4 、0.03~0.05% (V/V) Procline300pH7.2的水溶液；10×浓缩洗涤液为10×PBST，是含有0.05% (V/V) 吐温20pH7.2的PBS；终止液是1.5mol/L的 H_2SO_4 。

[0009] 制备方法为：

[0010] 其中，所述酶标板按照以下方法制备：

[0011] (1) 猪肺炎支原体抗原蛋白的制备

[0012] 培养好的猪肺炎支原体菌液高速离心(8000rpm或8000g以上，离心40min以上)获得菌体，菌体经PBS洗涤2遍以上后超声波破碎或高压均质破碎或SDS抽提制备抗原蛋白，抗原蛋白10~100倍浓缩后低温冷冻保存。

[0013] (2) 猪肺炎支原体抗原蛋白的包被

[0014] 用0.1mol/LpH9.6的碳酸盐缓冲液稀释猪肺炎支原体抗原蛋白至最佳包被浓度，包被96孔酶标板，每孔100μl，2~8℃过夜。

[0015] (3) 酶标板的封闭方法

[0016] 取出反应板，恢复室温，加入1×洗涤液，每孔300μl，洗涤3~5次；甩干洗涤液，在吸水纸上拍干孔内液体并驱除孔内气泡；加入封闭液(酶标反应板稳定剂)，每孔200μl，2~8℃过夜封闭，1×洗涤液洗涤3~5次；甩干洗涤液，在吸水纸上拍干孔内液体并置通风厨中吹干酶标板，装入铝箔袋，放入干燥剂，抽真空后封口，2~8℃保存备用。

[0017] 其中，所述参照样品若为菌液抗原时，其制备方法同酶标板包被抗原的制备方法，抗原浓度为200μg/ml；参照样品若为疫苗产品(即参考疫苗)时，其制备方法为：将参考样品置于-70℃以下冷冻至少24小时；取出参照样品置37℃温浴20分钟；冰浴上超声3分钟，将超声处理过的样品置于超速离心管中，30000rpm 4℃离心6小时。离心后切勿晃动，小心去除油层和上清液，用Kimwipe无尘纸去除离心管内壁上残留的油渍，将离心沉淀物溶解于1.0ml PBS中，封口膜封口，2~8℃过夜。次日，以最低输出功率在冰浴上超声5秒，使菌体分散。

[0018] 其中，在进行猪肺炎支原体抗原相对含量/效力测定时，所述参照样品质同待检样品，也就是说待检样品为菌液抗原蛋白时，参照样选择菌液抗原蛋白，待检样品为疫苗产品时，参照样选择参考疫苗。

[0019] 其中，所述兔抗猪肺炎支原体阳性血清按照以下方法制备：

[0020] (1) 兔抗猪肺炎支原体高免血清的制备

[0021] 猪肺炎支原体菌液经甲醛、核酸灭活剂等灭活剂灭活后，与等量的弗氏完全佐剂乳化，皮下多点免疫注射健康兔(微量间接血凝试验检测，猪肺炎支原体抗体阴性)。首免后28日，皮下多点注射经等量弗氏不完全佐剂乳化的猪肺炎支原体灭活菌液。二次免疫后14日，心脏少量采血，分离血清，用双向琼脂(琼脂浓度1%)扩散试验测定血清效价。若血清效价达到1:64以上，心脏大量采血，分离血清。

[0022] (2) 兔抗猪肺炎支原体高免血清的纯化

[0023] MAB SELECT填料亲和层析柱用pH7.2的PBS平衡10个柱体积,然后加入离心弃沉淀的兔抗猪肺炎支原体高免血清,用10个柱体积的PBS洗涤杂蛋白,最后用5个柱体积的0.1M pH2.9的甘氨酸-HCl洗脱,收集洗脱液,即制得纯化的兔抗猪肺炎支原体高免血清,纯化的高免血清进行SDS-PAGE纯度鉴定和免疫印迹特异性鉴定。

[0024] (3) 兔抗猪肺炎支原体阳性血清的制备

[0025] 根据间接ELISA阳性血清最佳稀释度确定结果,将纯化的高免血清进行1:25000稀释,加5%蔗糖,分装,2~8℃保存。

[0026] 其中,所述的兔抗猪肺炎支原体高免血清制备时还可以使用水佐剂、水包油佐剂、油包水佐剂等复合佐剂,免疫次数不局限于两次,具体根据免疫后试血血清效价决定。

[0027] 其中,所述的兔抗猪肺炎支原体阴性血清制备方法为:猪肺炎支原体微量间接凝集试验检测抗体为阴性的健康兔经心脏采血,分离血清,根据间接ELISA血清最佳稀释度确定结果,将阴性血清进行1:160稀释,加5%蔗糖,分装,2~8℃保存。

[0028] 该猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒,用于猪肺炎支原体抗原相对含量的测定,或者用于疫苗产品抗原相对效力测定,替代动物试验进行效力检验,评价疫苗是否合格。

[0029] 本发明用于猪肺炎支原体抗原相对含量/效力测定时,按照以下方法进行:

[0030] (1) 10×浓缩洗涤液用去离子水稀释成1×工作洗涤液;

[0031] (2) 参照样品、待检样品在稀释板上进行2倍倍比稀释,然后转移50μl液体至猪肺炎支原体抗原蛋白包被好的96孔酶标板的相应孔;

[0032] (3) 向上述96孔酶标板剩余列中分别加入兔抗猪肺炎支原体阴性血清一列,兔抗猪肺炎支原体阳性血清一列,PBS一列,每孔100μl;

[0033] (4) 待检样品和参照样品列中每孔加入50μl兔抗猪肺炎支原体阳性血清,盖好酶标板;

[0034] (5) 酶标板置37℃反应1.5小时;

[0035] (6) 倒掉孔内液体,用1×洗涤液洗涤3~5次,每孔300μl,最后一次洗涤后拍干板子;

[0036] (7) 每孔加入100μl用酶标抗体稀释液以1:2000稀释的过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,酶标板置37℃反应1小时;

[0037] (8) 倒掉孔内液体,用1×洗涤液洗涤3~5次,每孔300μl,最后一次洗涤后拍干板子;

[0038] (9) 每孔加入100μlTMB底物显色液,室温显色15分钟;

[0039] (10) 每孔加入100μl终止液,10分钟内在酶标仪上读取OD_{450nm}值;

[0040] (11) 结果计算:各孔OD_{450nm}读数均应减去空白对照OD_{450nm}读数。待测样品检测的OD_{450nm}值采用RelPot4.0软件或参照现行《中华人民共和国药典》二部附录XIV生物检定统计法(三、量反应平行线测定法)进行相对含量/效力RP值计算。

[0041] 本发明的优点是:

[0042] (1) 本发明的试剂盒可以直接对猪肺炎支原体相关疫苗产品进行效力评价,无需通过免疫动物进行效力评价,大大缩短了检测周期,提高了动物福利。

[0043] (2) 本发明的试剂盒具有特异性强、敏感性高、检测时间短的特点,具有广阔的应

用前景。

[0044] (3) 本发明将所需的各种试剂组装成试剂盒,操作简单易行,仅需要移液器和酶标仪进行加样和读数。

[0045] (4) 本发明的试剂盒稳定性好、保存期长,在2~8℃条件下保存一年不会影响其敏感性。

附图说明

[0046] 图1为实施例猪肺炎支原体包被抗原SDS-PAGE;

[0047] 图2为实施例猪肺炎支原体包被抗原免疫印迹;

[0048] 图3为实施例兔抗猪肺炎支原体阳性血清纯化前后SDS-PAGE;

[0049] 图4为实施例兔抗猪肺炎支原体阳性血清纯化后免疫印迹;

[0050] 图5为实施例包被抗原及阳性血清间接ELISA方阵滴定试验OD值曲线图;

[0051] 图6为实施例竞争ELISA标准曲线;

[0052] 图7为实施例抗原相对RP值与抗原含量关系图。

具体实施方式

[0053] 以下结合附图说明对本发明作进一步的说明。然而,实施例中所描述的具体物料配比、数据参数、操作步骤及其结果仅用于说明本发明,而不应限制权利要求书中所描述的本发明。

[0054] 实施例1包被抗原蛋白、阴阳性血清、相关疫苗的制备

[0055] 为了更好的理解本说明,这里抗原蛋白制备仅阐述一种方法:高压均质破碎法,兔抗猪肺炎支原体阳性血清制备仅以弗氏佐剂制备方法阐述;测试样品以疫苗来说明。

[0056] 1.1包被抗原的制备

[0057] 经过3次扩大培养的3L猪肺炎支原体菌液以4℃,10000rpm离心60min,沉淀用pH7.2PBS缓冲液洗涤3次,制成原培养体积1/10的菌悬液,高压均质破碎至澄清透亮,10000rpm离心10min,取少量上清抗原蛋白进行蛋白浓度测定及特异性检验。其余分装,1.0ml/管,-40℃保存备用。

[0058] 抗原蛋白采用BCA法测定,包被抗原浓度为850μg/ml。抗原经SDS-PAGE分离后,电泳图谱上出现约9条带,见图1。抗原经免疫印迹检测,9种蛋白检测出7种蛋白具有免疫原性,相对分子质量在35kD以上,见图2。

[0059] 1.2兔抗猪肺炎支原体高免血清的制备

[0060] 猪肺炎支原体菌液经核酸灭活剂灭活后,与等量的弗氏完全佐剂乳化,皮下多点免疫注射健康兔。首免后28日,皮下多点注射经等量弗氏不完全佐剂乳化的猪肺炎支原体灭活菌液。二次免疫后14日,心脏少量采血,分离血清,用双向琼脂(1%)扩散试验测定血清效价。若血清效价达到1:64以上,心脏大量采血,分离血清。采用MAB SELECT填料亲和层析柱对高免血清进行纯化,并进行琼扩效价测定、SDS-PAGE纯度鉴定和免疫印迹检测其特异性。纯化的阳性血清过滤除菌,分装保存于-70℃冰箱。组装试剂盒时根据间接ELISA阳性血清最佳稀释度确定结果,将纯化的高免血清进行1:25000稀释,加5%蔗糖,分装,2~8℃保存。

[0061] 采用琼脂扩散试验测定兔抗猪肺炎支原体高免血清琼扩抗体效价为1:64。高免血清经MAB SELECT亲和层析柱纯化,SDS-PAGE电泳检测结果见图3,样品中大部分抗体与层析柱填料结合,上样洗脱时将大部分杂蛋白洗出,收集液中成分单一,即抗体的重链和轻链。纯化的高免血清与HN0613株抗原反应出现特异性条带,结果见图4。

[0062] 1.3兔抗猪肺炎支原体阴性血清的制备

[0063] 采集少量健康兔血,离心分离血清,用猪肺炎支原体微量间接血凝试剂盒对各兔血清进行猪肺炎支原体抗体效价测定,选择抗体效价<1:5的兔子进行大量采血,离心分离兔血清,将各兔的血清混合,过滤除菌,分装保存于-70℃冰箱。组装试剂盒时根据间接ELISA血清最佳稀释度确定结果,将阴性血清进行1:160稀释,加5%蔗糖,分装,2~8℃保存。

[0064] 1.4相关疫苗的制备

[0065] 1.4.1参考疫苗的制备

[0066] 取猪肺炎支原体抗原蛋白稀释至200μg/ml,与水溶性佐剂混匀制备1批猪肺炎支原体参考疫苗,批号为20170401,定量分装,20ml/瓶。经检验,性状、无菌检验、安全检验、效力检验均合格。

[0067] 1.4.2不同含量抗原的猪肺炎支原体疫苗

[0068] 取猪肺炎支原体抗原蛋白分别稀释为400、300、200、100、50和25μg/头份,与水溶性佐剂混匀制备6批不同含量抗原的猪肺炎支原体疫苗,批号分别为0601、0602、0603、0604、0605和0606,定量分装,20ml/瓶,2~8℃保存。不同含量抗原疫苗经检验均无细菌、霉菌污染,性状符合质量标准要求。

[0069] 1.4.3测试疫苗的制备

[0070] 取5批猪肺炎支原体抗原蛋白分别稀释为300μg/ml,与水溶性佐剂混匀制备5批猪肺炎支原体测试疫苗,批号分别为20170801、20170802、20170803、20170804和20170801,定量分装,20ml/瓶,2~8℃保存。测试疫苗经检验均无细菌、霉菌污染,性状符合质量标准要求。

[0071] 实施例2间接ELISA方法的建立

[0072] 2.1最佳抗原包被浓度和最佳阴、阳性血清使用浓度的确定

[0073] 按照正交矩阵方法进行滴定试验,包被抗原2倍系列稀释为2、4、8、16、32、64、128、256μg/ml,4℃过夜包被,100μl/孔。用1×洗涤液洗涤3次,加入含1%BSA的PBST,200μl/孔,37℃封闭2小时,洗涤后加入1:1000、1:5000、1:25000和1:50000稀释的阳性血清,1:80、1:160和1:320稀释的阴性血清,100μl/孔,37℃作用1小时,洗涤后加入1:20000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,100μl/孔,37℃作用1小时,洗涤后加入TMB显色液,100μl/孔,室温作用15分钟,加入1.5mol/LH₂SO₄100μl/孔终止反应,于酶标仪450nm波长下测定OD值,计算P/N值,以阳性血清OD值达到并接近1.0,P/N值较大的所在孔的抗原浓度和血清稀释度作为最佳抗原包被浓度和最佳阴、阳性血清使用浓度。

[0074] 抗原包被浓度和阴、阳性血清ELISA方阵滴定结果见表1,以抗原包被浓度为横坐标,阳性血清OD_{450nm}为纵坐标作图,见图5。从图5可以看出,当抗原包被浓度为16μg/ml时,各稀释度阳性血清OD_{450nm}值达到平台期,且P/N值最大;当阳性血清稀释比例为1:25000时,OD_{450nm}值接近1.0;当阴性血清稀释比例为1:160,P/N值最大,且OD_{450nm}值比空白对照OD_{450nm}

值高,因此,确定抗原最佳包被浓度为16 μ g/ml,阳性血清最佳稀释度为1:25000,阴性血清最佳稀释度为1:160。

[0075] 表1包被抗原、阴阳性血清ELISA方阵滴定试验结果 (OD_{450nm})

[0076]

血清稀释度		抗原包被浓度 (μ g/ml)							
		2	4	8	16	32	64	128	256
阳性血清	1:1000	0.938	1.398	1.798	2.045	2.101	2.103	2.139	2.148
	1:5000	0.792	1.079	1.439	1.529	1.531	1.550	1.549	1.553
	1:25000	0.569	0.809	1.053	1.125	1.117	1.126	1.119	1.134
	1:50000	0.302	0.569	0.779	0.892	0.917	0.905	0.916	0.907
阴性血清	1:80	0.328	0.351	0.423	0.449	0.483	0.501	0.519	0.537
	1:160	0.079	0.102	0.103	0.109	0.116	0.134	0.146	0.153
	1:320	0.073	0.079	0.073	0.079	0.077	0.071	0.078	0.077
PBS		0.067	0.070	0.071	0.073	0.072	0.071	0.070	0.075

[0077] 2.2酶标板抗原包被条件及稳定性确定

[0078] 2.2.1抗原包被条件的确定

[0079] 0.1mol/LpH 9.6碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释到16 μ g/ml包被酶标板,分别置4℃包被14小时、16小时、18小时、20小时和37℃包被1小时、2小时。PBST洗涤后37℃封闭2小时,洗涤后加入1:25000稀释的阳性血清和1:160稀释的阴性血清,进行ELISA测定。比较各组阴、阳性血清OD值和P/N值,确定抗原最佳包被条件为4℃16小时。

[0080] 2.2.2封闭液的确定

[0081] 0.1mol/LpH 9.6碳酸盐缓冲液将包被抗原稀释至16 μ g/ml包被酶标板,以含1.0%明胶、1.0%BSA、5.0%脱脂奶粉的PBS过夜封闭,PBST洗涤后加入1:25000稀释的阳性血清和1:160稀释的阴性血清,进行ELISA测定。比较各组阴、阳性血清OD值和P/N值,确定最佳封闭液为含5.0%脱脂奶粉的PBS。

[0082] 2.2.3酶标板稳定剂的配制

[0083] 称取50g脱脂奶粉、8g蔗糖、20g海藻糖于pH7.2的PBS中搅拌溶解,定容至1000ml,过滤除菌,加0.05%V/VProcline300,2~8℃保存备用。

[0084] 2.2.4酶标板稳定剂的37℃热稳定性试验

[0085] 每天将1块铝箔袋包装的酶标板置于37℃,15天后将所有酶标板取出,用兔抗猪肺炎支原体阳性血清、阴性血清进行间接ELISA测定,读取OD_{450nm}值,分析酶标板上包被抗原的稳定性。从检测结果看,37℃保存10天以下,阴、阳性血清OD值基本维持不变,保存11天以上时,随着保存天数增加,吸光值下降的也越多。根据Arrhenius equation理论,37℃存放1天相当于2~8℃存放1.5个月计算,该酶标板2~8℃可以保存15个月。

[0086] 2.3酶标二抗工作浓度及作用时间的确定

[0087] 向酶标板中加入1:25000稀释的阳性血清和1:160稀释的阴性血清,PBST洗涤后加入1:5000、1:10000、1:20000和1:40000稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG,37℃分别孵育0.5、1和1.5小时,洗涤后加入TMB显色液,室温作用15分钟,加入1.5mol/LH₂SO₄终止反应,于

酶标仪450nm波长下测定OD值。比较各组阴、阳性血清OD值和P/N值,确定酶标二抗稀释度为1:20000,作用时间为1小时。

[0088] 实施例3固相竞争ELISA方法的建立

[0089] 3.1样品及检测方法

[0090] 3.1.1样品及试剂盒

[0091] 参照样品:猪肺炎支原体参考疫苗,批号为20170401;

[0092] 待检样品:6批不同含量抗原的猪肺炎支原体疫苗;0601、0602、0603、0604、0605和0606;5批猪肺炎支原体测试疫苗,批号分别为20170801、20170802、20170803、20170804和20170801;

[0093] 固相竞争ELISA试剂盒:批号分别为20171101、20171102、20171103、20171104、20171105。

[0094] 3.1.2检测方法:

[0095] (1) 样品处理

[0096] 将猪肺炎支原体参考疫苗、6批不同含量抗原的猪肺炎支原体疫苗、5批猪肺炎支原体测试疫苗置于-70℃以下冷冻至少24小时;取出后置37℃温浴20分钟;冰浴上超声3分钟,将超声处理过的样品置于超速离心管中,30000rpm 4℃离心6小时。离心后切勿晃动,小心去除油层和上清液,用Kimwipe无尘纸去除离心管内壁上残留的油渍,将离心沉淀物溶解于1.0ml PBS中,封口膜封口,2~8℃过夜。次日,以最低输出功率在冰浴上超声5秒,使蛋白分散。

[0097] (2) 10×浓缩洗涤液用去离子水稀释成1×工作洗涤液;

[0098] (3) 参考疫苗、待检疫苗(各3个重复)在稀释板上进行2倍倍比稀释,然后转移50μl液体至猪肺炎支原体抗原蛋白包被好的96孔酶标板的相应孔;

[0099] (4) 向上述96孔酶标板剩余列中分别加入1:160稀释的兔抗猪肺炎支原体阴性血清一列,1:25000稀释的兔抗猪肺炎支原体阳性血清一列,PBS一列,每孔100μl;

[0100] (5) 参考疫苗和待检疫苗列中每孔加入50μl 1:25000稀释的兔抗猪肺炎支原体阳性血清,盖好酶标板;

[0101] (6) 酶标板置于37℃反应1.5小时;

[0102] (7) 倒掉孔内液体,用1×洗涤液洗涤3~5次,每孔300μl,最后一次洗涤后拍干板子;

[0103] (8) 每孔加入用酶标抗体稀释液以1:20000稀释的过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,酶标板置37℃反应1小时。

[0104] (9) 倒掉孔内液体,用1×洗涤液洗涤3~5次,每孔300μl,最后一次洗涤后拍干板子;

[0105] (10) 每孔加入100μl TMB底物显色液,室温显色15分钟。

[0106] (11) 每孔加入100μl终止液,10分钟内在酶标仪上读取OD_{450nm}值。

[0107] (12) 结果计算:各孔OD_{450nm}读数均应减去空白对照OD_{450nm}读数。待测样品检测的OD_{450nm}值采用RelPot4.0软件或参照现行《中华人民共和国药典》二部附录XIV生物检定统计法(三、量反应平行线测定法)进行相对效力RP值计算。

[0108] 3.2固相竞争ELISA标准曲线建立

[0109] 将猪肺炎支原体标准抗原用pH7.2PBS系列稀释为1280、640、320、160、80、40、20、10、5和0 $\mu\text{g/ml}$ ，分别加入到预先包被的酶标板孔中，每孔50 μl ，每个稀释度做3个重复，每孔加入50 μl 1:25000稀释的阳性血清，同时设定阴性、阳性和空白对照；酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1.5小时，PBST洗涤3次，每孔加入过氧化物酶标记羊抗兔IgG，酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1.0小时，PBST洗涤3次，甩干，每孔加入100 μl TMB显色液，室温显色15分钟，每孔加入100 μl 终止液，10分钟内在酶标仪上读取OD_{450nm}值。以竞争抗原浓度为0的OD_{450nm}值为B₀，各相应抗原浓度的OD_{450nm}值为B，用竞争抗原浓度的对数作为横坐标，以结合率(B/B₀)作为纵坐标，绘制标准曲线，见图6。从表2和图6中可以看出，应用不同浓度竞争抗原，与包被抗原建立的抗原抗体竞争反应具有良好的线性关系，线性回归为 $y = -0.3402X + 1.1274$ ($R^2 = 0.9879$)，线性范围为10~1280 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0110] 表2竞争抗原标准曲线测定结果

	竞争抗原浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	lg (竞争抗原浓度)	OD _{450nm}	B/B ₀ (%)
	1280	3.107	0.139	11.4
	640	2.806	0.207	17.0
	320	2.505	0.289	23.7
[0111]	160	2.204	0.411	33.9
	80	1.903	0.589	48.3
	40	1.602	0.731	60.0
	20	1.301	0.854	70.0
	10	1	0.961	78.8
	0		1.219	

[0112] 3.3疫苗相对效力RP值与疫苗抗原含量相关性试验

[0113] 6批不同抗原含量的猪肺炎支原体疫苗分别进行抗原蛋白提取，然后按照固相竞争ELISA操作程序进行抗原相对效力检测，考察疫苗抗原含量与疫苗抗原相对效力之间的相关性。结果见表3和图7。线性回归方程为 $y = 0.0056X - 0.1229$ ($R^2 = 0.9987$)，表明疫苗相对效力RP值与疫苗抗原含量具有良好的线性关系。

[0114] 表3 6批不同抗原含量猪肺炎支原体疫苗相对效力RP值检测结果

	疫苗批号	抗原含量 ($\mu\text{g/头份}$)	RP 值
	0601	25	0.05
	0602	50	0.11
[0115]	0603	100	0.45
	0604	200	1.03
	0605	300	1.55
	0606	400	2.14

[0116] 3.4疫苗抗原相对效力RP值与免疫攻毒保护相关性试验

[0117] 6批不同抗原含量的猪肺炎支原体疫苗和5批猪肺炎支原体测试疫苗分别进行抗原蛋白提取，然后按照固相竞争ELISA操作程序进行抗原相对效力检测，同时进行攻毒保护

试验,考察固相竞争ELISA检测抗原相对效力RP值与免疫攻毒保护之间的相关性。结果见表4。从表中可以看出,0604、0605、0606批不同含量抗原疫苗和5批测试疫苗肺炎病变减少率在76.7%~82.9%之间,均大于60% (攻毒保护标准),相对效力RP值在1.03~2.14之间,大于1.0。0603批疫苗抗原含量为100 μ g/头份,为最小保护抗原剂量,参考疫苗抗原含量为200 μ g/头份,因此在检验0603批疫苗相对效力RP值时,结果小于1.0,但肺炎病变减少率大于60%;0601和0602批疫苗抗原含量均小于最小保护抗原剂量,肺炎病变减少率分别为1.67%和36.9%,相对效力RP值分别为0.05和0.11;这证明疫苗抗原相对效力RP值与免疫攻毒保护试验有良好的平行性关系,可替代攻毒试验。

[0118] 表4疫苗相对效力RP值与免疫攻毒保护结果

产品名称	疫苗批号	RP 值	平均肺炎病变减少率
不同抗原含量 疫苗	0601	0.05	1.67%
	0602	0.11	36.9%
	0603	0.45	65.1%
	0604	1.03	76.7%
	0605	1.55	80.2%
	0606	2.14	82.9%
测试疫苗	20170801	1.33	77.3%
	20170802	1.34	78.2%
	20170803	1.36	80.5%
	20170804	1.33	79.9%
	20170805	1.37	82.7%

[0120] 3.5固相竞争ELISA的特异性试验

[0121] 按照固相竞争ELISA操作程序分别测定猪肺炎支原体灭活疫苗(P株)、猪肺炎支原体灭活疫苗(J株)、猪圆环病毒灭活疫苗(SH株)、猪伪狂犬病灭活疫苗、猪细小病毒病灭活疫苗(CP-99株)、猪口蹄疫0型灭活疫苗和猪丹毒灭活疫苗RP值,验证建立的固相竞争ELISA方法的特异性。从表5中可以看出建立的竞争ELISA方法检测同类产品RP值都在0.8以上;检测其他非猪肺炎支原体灭活疫苗均未测到RP值,说明建立的固相竞争ELISA方法特异性良好。

[0122] 表5不同疫苗RP值测定结果

	疫苗名称	厂家来源	疫苗批号	RP 值
	猪肺炎支原体灭活疫苗 (P-5722-3 株)	哈药集团生物疫苗有限公司	201724	0.89
	猪肺炎支原体灭活疫苗 (P-5722-3 株)	硕腾公司美国查理斯堡生产厂	189572D	0.97
	猪肺炎支原体灭活疫苗 (J 株)	勃林格殷格翰动物保健 (中国) 有限公司	2730501A	1.12
[0123]	猪圆环病毒灭活疫苗 (SH 株)	江苏南农高科技股份有限公司	1706017	---
	猪伪狂犬病灭活疫苗	中牧实业股份有限公司成都药械厂	1705006	---
	猪细小病毒病灭活疫苗 (CP-99 株)	武汉中博生物股份有限公司	20170301	---
	猪口蹄疫 O 型灭活疫苗 (O/Mya98/XJ/2010 株+O/GX/09-7 株)	中牧实业股份有限公司兰州生物药厂	1708003	---
	猪丹毒灭活疫苗	浙江诺信威生物技术有限公司	2017002	---

[0124] 3.5 固相竞争 ELISA 的重复性试验

[0125] 3.3.1 批内重复性试验

[0126] 随机抽取 20171101 批固相竞争 ELISA 试剂盒 5 盒, 对猪肺炎支原体测试疫苗 20170802 批进行疫苗抗原相对效力测定, 计算标准差和批内变异系数, 结果见表 6。

[0127] 表 6 批内重复性试验检测结果

	试剂盒编号	RP 值	平均值	标准差	变异系数
	1	1.37			
	2	1.41			
[0128]	3	1.31	1.41	0.08	5.67%
	4	1.43			
	5	1.53			

[0129] 3.3.2 批间重复性试验

[0130] 随机抽取 20171101、20171102、20171103、20171104、20171105 批固相竞争 ELISA 试剂盒各 1 盒, 对猪肺炎支原体测试疫苗 20170802 批进行疫苗抗原相对效力测定, 计算标准差和批间变异系数, 结果见表 7。

[0131] 表 7 批间重复性试验检测结果

	试剂盒批号	RP 值	平均值	标准差	变异系数
	20171101	1.45			
	20171102	1.53			
[0132]	20171103	1.39	1.47	0.12	8.16%
	20171104	1.65			
	20171105	1.34			

[0133] 实施例 4 试剂盒的组装与使用方法

[0134] 4.1 试剂盒的组装

[0135] (1) 酶标板: 猪肺炎支原体全菌抗原蛋白包被的酶标板, 按照实施例 1 和实施例 2 进行制备, 2~8℃ 保存;

[0136] (2) 10× 浓缩洗涤液: 含有 0.8% (W/W) NaCl、0.02% (W/W) KCl、0.29% (W/W)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% (W/W) KH_2PO_4 、0.05% (V/V) 吐温20、0.03~0.05% (V/V) Procline 300的水溶液, pH7.2, 2~8℃保存;

[0137] (3) 样品稀释液/酶标抗体稀释液: 含有0.8% (W/W) NaCl、0.02% (W/W) KCl、0.29% (W/W) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% (W/W) KH_2PO_4 、0.03~0.05% (V/V) Procline 300的水溶液, pH7.2, pH7.2, 2~8℃保存;

[0138] (4) 阳性对照血清: 兔抗猪肺炎支原体阳性血清, 2~8℃保存;

[0139] (5) 阴性对照血清: 猪肺炎支原体抗体阴性的健康兔血清, 2~8℃保存;

[0140] (6) 酶标抗体: 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, 使用时用酶标抗体稀释液以1:2000稀释;

[0141] (7) TMB显色液;

[0142] (8) 终止液: 1.5mol/L的 H_2SO_4 。

[0143] 4.2使用方法

[0144] (1) 样品处理

[0145] 若待检样品为猪肺炎支原体抗原蛋白时, 可直接进行ELISA试验; 若待检样品为猪肺炎支原体疫苗时需要进行处理, 具体操作为: 疫苗置于-70℃以下冷冻至少24小时; 取出后置37℃温浴20分钟; 冰浴上超声3分钟, 将超声处理过的样品置于超速离心管中, 30000rpm 4℃离心6小时。离心后切勿晃动, 小心去除油层和上清液, 用Kimwipe无尘纸去除离心管内壁上残留的油渍, 将离心沉淀物溶解于1.0ml PBS中, 封口膜封口, 2~8℃过夜。次日, 以最低输出功率在冰浴上超声5秒, 使蛋白分散。

[0146] (2) 10×浓缩洗涤液用去离子水稀释成1×工作洗涤液;

[0147] (3) 参考样品、待检样品(各3个重复)在稀释板上进行2倍倍比稀释, 然后转移50μl液体至猪肺炎支原体抗原蛋白包被好的96孔酶标板的相应孔;

[0148] (4) 向上述96孔酶标板剩余列中分别加入兔抗猪肺炎支原体阴性血清一列, 兔抗猪肺炎支原体阳性血清一列, PBS一列, 每孔100μl;

[0149] (5) 参考样品和待检样品列中每孔加入50μl兔抗猪肺炎支原体阳性血清, 盖好酶标板;

[0150] (6) 酶标板置于37℃反应1.5小时;

[0151] (7) 倒掉孔内液体, 用1×洗涤液洗涤3~5次, 每孔300μl, 最后一次洗涤后拍干板子;

[0152] (8) 每孔加入用酶标抗体稀释液以1:2000稀释的过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, 酶标板置37℃反应1小时。

[0153] (9) 倒掉孔内液体, 用1×洗涤液洗涤3~5次, 每孔300μl, 最后一次洗涤后拍干板子;

[0154] (10) 每孔加入100μl TMB底物显色液, 室温显色15分钟。

[0155] (11) 每孔加入100μl终止液, 10分钟内在酶标仪上读取OD_{450nm}值。

[0156] (12) 结果计算: 各孔OD_{450nm}读数均应减去空白对照OD_{450nm}读数。待测样品检测的OD_{450nm}值采用RelPot4.0软件或参照现行《中华人民共和国药典》二部附录XIV生物检定统计法(三、量反应平行线测定法)进行相对效力RP值计算。

[0157] 综上所述, 本发明建立的猪肺炎支原体抗原相对效力固相竞争ELISA检测试剂盒

具有敏感性高、特异性好、重复性好的优点,与攻毒保护试验之间有良好的平行性,可替代动物试验作为猪肺炎支原体疫苗效力检验的方法。

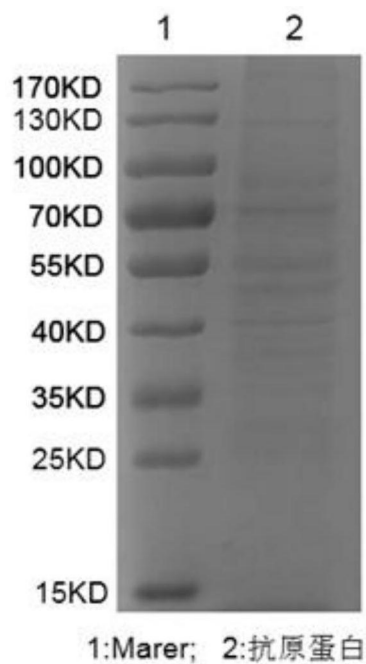


图1

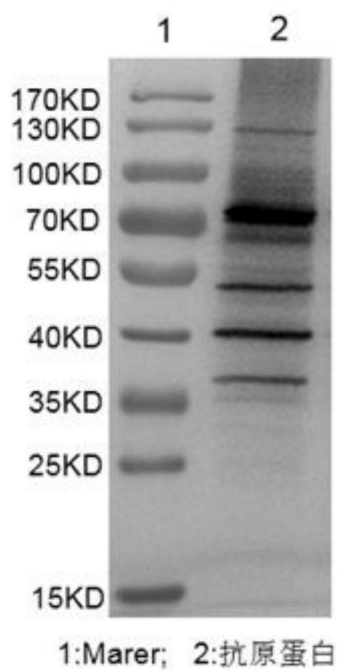


图2

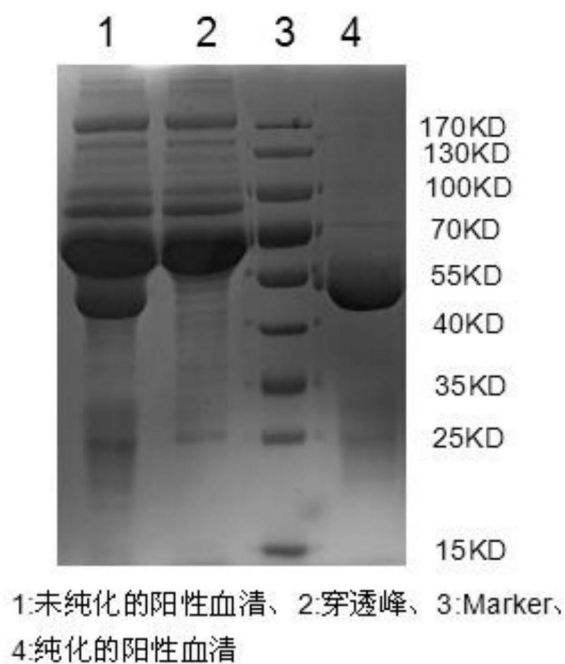


图3

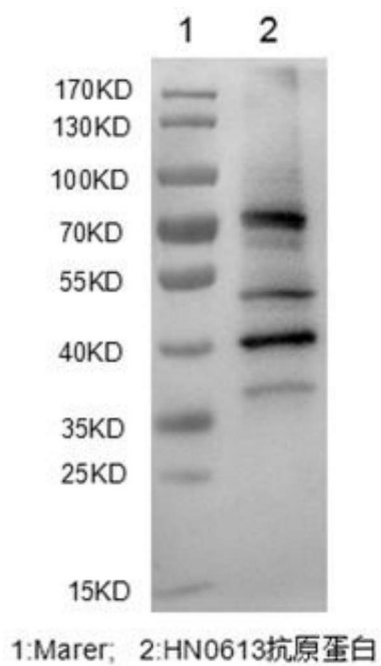


图4

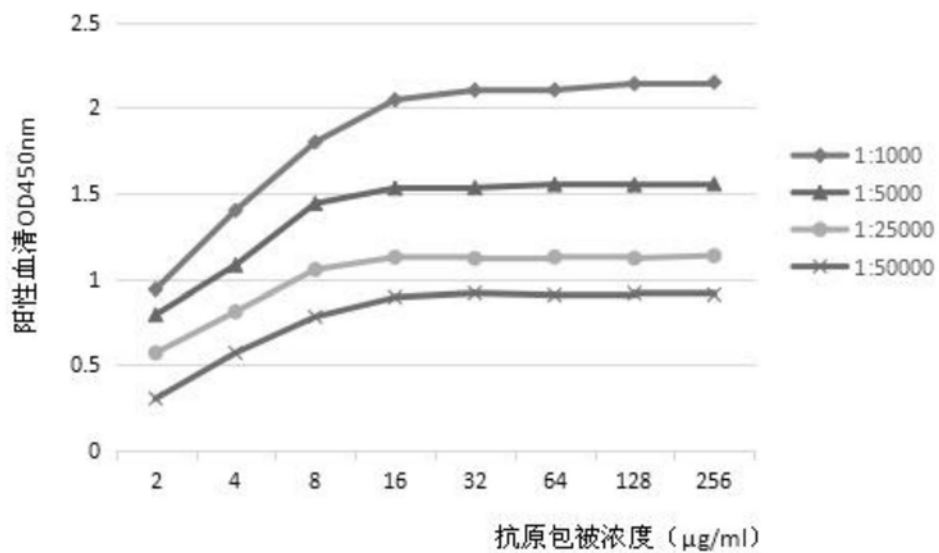


图5

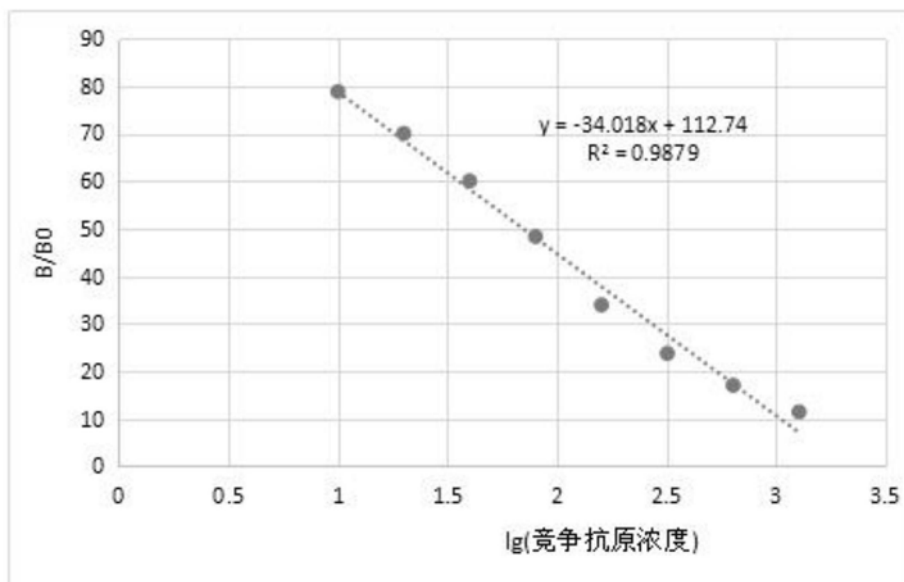


图6

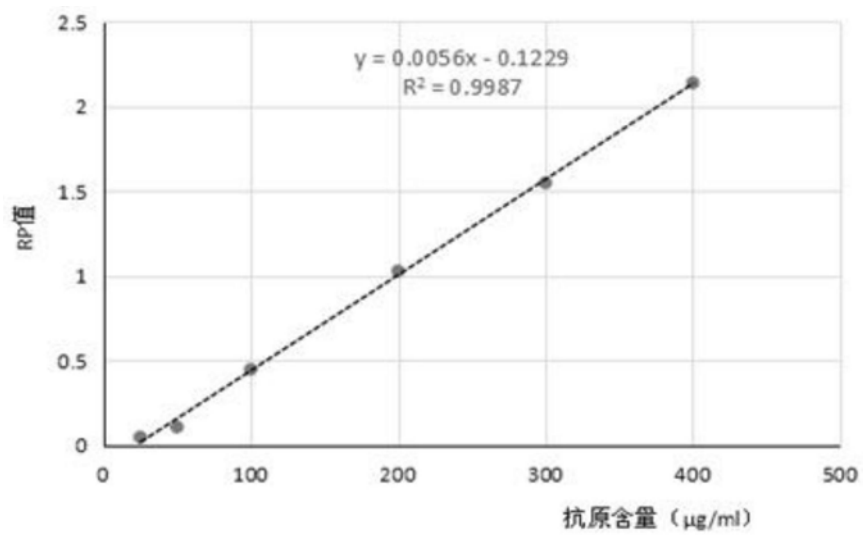


图7

专利名称(译)	猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110045117A	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201910370182.4	申请日	2019-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	江苏南农高科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏南农高科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏南农高科技股份有限公司		
[标]发明人	车巧林 肖澄 缪芬芳 董彦鹏 徐凤 耿晓眉 胡静雅 靳蒙蒙 余姣		
发明人	车巧林 肖澄 缪芬芳 董彦鹏 徐凤 耿晓眉 胡静雅 靳蒙蒙 余姣		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56933 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

发明公开了猪肺炎支原体固相竞争ELISA试剂盒及其制备方法和应用，包括猪肺炎支原体抗原蛋白包被的酶标板、参照样品、兔抗猪肺炎支原体阳性血清、兔抗猪肺炎支原体阴性血清。本发明试剂盒可对猪肺炎支原体抗原进行相对含量/效力测定，特异性好、重复性好，而且，所提供的固相竞争ELISA试剂盒操作简单，耗时短，不需要高端仪器设备，易于推广，适于疫苗生产检验及实验室研究应用。

血清稀释度	抗原包被浓度 (µg/ml)							
	2	4	8	16	32	64	128	256
阳性血清	1:1000	0.938	1.398	1.798	2.045	2.101	2.103	2.139
	1:5000	0.792	1.079	1.439	1.529	1.531	1.550	1.549
	1:25000	0.569	0.809	1.053	1.125	1.117	1.126	1.119
	1:50000	0.302	0.569	0.779	0.892	0.917	0.905	0.916
阴性血清	1:80	0.328	0.351	0.423	0.449	0.483	0.501	0.519
	1:160	0.079	0.102	0.103	0.109	0.116	0.134	0.146
	1:320	0.073	0.079	0.073	0.079	0.077	0.071	0.078
PBS		0.067	0.070	0.071	0.073	0.072	0.071	0.070