



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102323428 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110235293. 8

(22) 申请日 2011. 08. 17

(71) 申请人 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所
地址 430064 湖北省武汉市洪山区南湖瑶苑
1 号

(72) 发明人 张蓉蓉 罗青平 温国元 邵华斌
艾地云 王红琳 杨峻 罗玲
杨依靠

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 崔友明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页

序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 方法检测试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及鸭的一种鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 方法检测试剂盒及其应用, 包括有 :a) 抗体检测板, b) 酶结合物工作液, c) 阳性对照, d) 阴性对照, e) 样品稀释液, f) 10× 浓缩洗涤液, g) 底物显色液 A, h) 底物显色液 B 和 i) 终止液, 本发明有益的积极效果是 : 试剂盒操作简单, 所需仪器要求不高, 人人都可操作, 能较好满足不同层次的需要, 如疫病监测、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等, 易于大范围推广应用, 具有广阔的市场前景。

1. 一种鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于该试剂盒包括有:a) 抗体检测板, b) 酶结合物工作液, c) 阳性对照, d) 阴性对照, e) 样品稀释液, f) 10× 浓缩洗涤液, g) 底物显色液 A, h) 底物显色液 B 和 i) 终止液,其中:所述的抗体检测板为包被鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的可拆 96 孔聚苯乙烯酶标板,酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY 多克隆抗体,阳性对照为鸭疫里默氏杆菌标准菌株免疫雏鸭制备高免血清,阴性对照为经筛选获得的未免疫鸭疫里默氏杆菌的雏鸭的阴性血清。

2. 根据权利要求 1 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于:所述的鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的制备方法为:利用 PCR 技术扩增鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的基因序列,利用基因工程重组技术构建鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的原核表达质粒,命名为 pET-28a-OmpA;将质粒 pET-28a-OmpA 转入宿主菌大肠杆菌中成为基因工程菌,命名为 BLpET-28a-OmpA,将 BLpET-28a-OmpA 在 LB 培养基中培养,诱导表达并经 SDS-PAGE 电泳分析显示重组外膜蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中,将重组外膜蛋白通过亲和层析进行纯化后复性。

3. 根据权利要求 1 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于:所述的抗体检测板的制备方法为:将纯化复性后的重组外膜蛋白用抗原包被液稀释为 1.5 μg/mL 的终浓度,向可拆 96 孔酶标板的每个聚苯乙烯微孔中加入 100 μL,37°C 条件下包被 2h,用洗涤液洗涤 5min×4 次,甩干,每孔加封闭液 100 μL,37°C 反应 3h,用 PBST 缓冲液洗涤 5min×4 次,甩干,再加入 20% (w/v) 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时,置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装袋中保存备用。

4. 按权利要求 3 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于:所述的抗原包被液为 PBS 缓冲液,所述的洗涤液为 PBST 缓冲液,所述的封闭液为 1% (w/v) 牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液。

5. 根据权利要求 1 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于:所述的辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY 多克隆抗体用磷酸盐缓冲液稀释。

6. 根据权利要求 1 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于:所述的样品稀释液为按 0.1% (w/v) 加入牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液;10× 浓缩洗涤液为含 0.5% (v/v) 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液;底物显色液 A 为 0.2mg/ml 的四甲基联苯胺溶液,底物显色液 B 为含 0.05% (v/v) 过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;终止液为 2M 硫酸溶液。

7. 权利要求 1 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒的应用方法,其特征在于包括有以下步骤:

- 1) 将 10× 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;
- 2) 将待检血清用样品稀释液按体积 1 : 100 稀释,按 100 μL/ 孔加入到抗体检测板中,设阴性对照、阳性对照,并设只加 100 μL 样品稀释液作为空白对照,37°C 孵育 20-45 分钟,甩干;
- 3) 每孔加步骤 1) 的洗涤液 200 μL,洗涤 4 次,每次间隔 1 分钟,拍干;
- 4) 每孔加 100 μL 的酶结合物工作液,空白对照不加,37°C 孵育 20-45 分钟,甩干;
- 5) 每孔加步骤 1) 的洗涤液 200 μL,洗涤 4 次,每次间隔 1 分钟,拍干;
- 6) 依次每孔加入 50 μL 底物显色液 A 和 50 μL 底物显色液 B,37°C 避光孵育 5-15 分

钟；

7) 每孔加 50 μ l 终止液,用酶标仪在 630nm 波长下读取每孔光吸收值。

鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 方法检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及鸭的一种细菌抗体的快速诊断方法和器具,更具体的讲是一种鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 方法检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 鸭疫里默氏杆菌病(Riemerella anatipestifer infection, RAI)是家鸭、火鸡和多种其它鸟类的一种接触传染性疾病。目前该病呈世界范围分布,已在所有的集约化养鸭生产的国家发现。该病主要侵害 1~8 周龄(尤其 2~8 周龄)雏鸭、雏鹅及雏火鸡。该病常呈急性或慢性败血症过程,主要以神经症状和纤维素性心包炎、肝周炎和气囊炎为特征。该病的发病率可达 9%以上,致死率可高达 75%以上,耐过病鸭常常长成残次鸭或僵鸭,饲料转化率降低,生长发育迟缓。此外,由该病所引起的输卵管炎也是影响鸭成年后产蛋率低下的最重要原因之一。

[0003] 鸭疫里默氏杆菌的血清型复杂,目前公认有 21 种血清型,在我国血清型发展越来越复杂,药物预防是我国控制该病的主要措施之一,但目前很多研究报告表明鸭疫里默氏杆菌已对生产上的大多常用药物产生耐药性,同时,大量使用药物也给食品安全造成极大威胁,免疫接种已将逐渐取代药物预防成为控制该病的安全有效措施之一。

[0004] 若要开展鸭疫里默氏杆菌病的流行情况和感染范围的调查,有必要建立一种快速、敏感、特异、便于大规模应用且不需要扑杀动物的血清学检测诊断方法。

[0005] 因此研制开发用于鸭疫里默氏杆菌抗体检测的特异的、敏感的、生物安全度高的、适合于基层使用的诊断检测的器具,对鸭免疫水平进行实时监控和建立科学、灵活的鸭疫里默氏杆菌的免疫程序、以及对疫病的预防和控制有重要意义。

[0006] 经有关报道表明鸭疫里默氏杆菌的外膜蛋白 ompA 基因存在于所有的参考菌株中。在不同的血清型中,ompA 基因显示出较小的异源性。OmpA 是一个保守的且强的抗原决定簇,因此,不仅可作为亚单位疫苗的候选成分之一,而且还具有很好的血清学检测价值。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种用于检测鸭疫里默氏杆菌抗体的间接 ELISA 检测试剂盒,通过 pET-28a 表达载体构建了能表达鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白基因 ompA 的载体,并将表达的重组蛋白建立检测相应抗体,可用于鸭疫里默氏杆菌抗体的检测。

[0008] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案:一种鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其特征在于该试剂盒包括有:a) 抗体检测板,b) 酶结合物工作液,c) 阳性对照,d) 阴性对照,e) 样品稀释液,f) 10× 浓缩洗涤液,g) 底物显色液 A,h) 底物显色液 B 和 i) 终止液,其中:所述的抗体检测板为包被鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的可拆 96 孔聚苯乙烯酶标板,酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY 多克隆抗体,阳性对照为鸭疫里默氏杆菌标准菌株免疫雏鸭制备高免血清,阴性对照为经筛选获得的未免疫鸭疫里默氏杆菌的雏鸭的阴性血清。

[0009] 按上述方案,所述的鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的制备方法为:利用 PCR 技术扩增鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的基因序列,利用基因工程重组技术构建鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的原核表达质粒,命名为 pET-28a-OmpA;将质粒 pET-28a-OmpA 转入宿主菌大肠杆菌中成为基因工程菌,命名为 BLpET-28a-OmpA,将 BLpET-28a-OmpA 在 LB 培养基中培养,诱导表达并经 SDS-PAGE 电泳分析显示重组外膜蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中,将重组外膜蛋白通过亲和层析进行纯化后复性。

[0010] 按上述方案,所述的抗体检测板的制备方法为:将纯化复性后的重组外膜蛋白用抗原包被液稀释为 $1.5 \mu\text{g/mL}$ 的终浓度,向可拆 96 孔酶标板的每个聚苯乙烯微孔中加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 条件下包被 2h,用洗涤液洗涤 $5\text{min} \times 4$ 次,甩干,每孔加封闭液 $100 \mu\text{L}$, 37°C 反应 3h,用 PBST 缓冲液洗涤 $5\text{min} \times 4$ 次,甩干,再加入 20% (w/v) 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时,置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装袋中保存备用。

[0011] 按上述方案,所述的抗原包被液为 PBS 缓冲液,所述的洗涤液为 PBST 缓冲液,所述的封闭液为 1% (w/v) 牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液。

[0012] 按上述方案,所述的辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY 多克隆抗体用磷酸盐缓冲液稀释。

[0013] 按上述方案,所述的样品稀释液为按 0.1% (w/v) 加入牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液; $10 \times$ 浓缩洗涤液为含 0.5% (v/v) 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液;底物显色液 A 为 0.2mg/ml 的四甲基联苯胺溶液,底物显色液 B 为含 0.05% (v/v) 过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;终止液为 2M 硫酸溶液。

[0014] 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒的应用方法,其特征在于包括有以下步骤:

- 1) 将 $10 \times$ 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;
- 2) 将待检血清用样品稀释液按体积 1 : 100 稀释,按 $100 \mu\text{L}$ / 孔加入到抗体检测板中,设阴性对照、阳性对照,并设只加 $100 \mu\text{L}$ 样品稀释液作为空白对照, 37°C 孵育 20-45 分钟,甩干;
- 3) 每孔加步骤 1) 的洗涤液 $200 \mu\text{L}$,洗涤 4 次,每次间隔 1 分钟,拍干;
- 4) 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 的酶结合物工作液,空白对照不加, 37°C 孵育 20-45 分钟,甩干;
- 5) 每孔加步骤 1) 的洗涤液 $200 \mu\text{L}$,洗涤 4 次,每次间隔 1 分钟,拍干;
- 6) 依次每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 底物显色液 A 和 $50 \mu\text{L}$ 底物显色液 B, 37°C 避光孵育 5-15 分钟;
- 7) 每孔加 $50 \mu\text{L}$ 终止液,用酶标仪在 630nm 波长下读取每孔光吸收值。

[0015] 鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒,其检测样本的判定标准为:在最佳工作条件下,对收集的 30 份无鸭疫里默氏杆菌抗体的鸭血清进行间接 ELISA 测定,求得 OD 平均值 (Average) X 为 0.099,标准差 (Standard Difference) SD 为 0.022,并设定阴阳性临界值为 $X+3SD$ 为 0.166,大于该值定为阳性,小于为阴性。

[0016] 本发明有益的积极效果是:试剂盒操作简单,所需仪器要求不高,人人都可操作,能较好满足不同层次的需要,如疫病监测、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等,易于大范围推广应用,具有广阔的市场前景,具有下列优点:

- 1) 特异性强,敏感性高,安全性好。鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒以基因

工程表达的重组外膜蛋白为基础制备而成；有关报道表明鸭疫里默氏杆菌的外膜蛋白基因存在于所有的鸭疫里默氏杆菌的参考菌株中。重组外膜蛋白安全性好，不含无关杂蛋白，能与鸭疫里默氏杆菌阳性血清特异结合，不与鸭其它疫病阳性血清发生交叉反应。具有良好抗原性，因此具有很高的特异性和敏感性；

2)操作简便快速。使用鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒检测鸭疫里默氏杆菌抗体时，无需另配其它试剂，样品无需无菌处理，按试剂盒说明在 1-2 小时内即可判定检测结果；

3)结果判定形象、准确、可靠。鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒可根据显色的深浅初步判定检测结果，检测孔出现蓝色即为阳性，无色即为阴性，结果判定形象。再采用酶标仪机读数，可更精确检测结果，减少主观性，准确可靠；

4)成本低、投资少。该试剂盒可大批量检测，一步到位，成本低廉，投资少，见效快。

附图说明

[0017] 图 1 为鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 ompA 基因的 PCR 扩增产物；

其中：泳道 M 为 DL2000 DNA Marker；泳道 1 为鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 ompA 的 PCR 产物；

图 2 重组质粒 pET28a(+)-ompA 双酶切鉴定；

其中：泳道 M1 为 DL2000 DNA Marker；泳道 M2 为 DL15000 DNA Marker；泳道 1 为重组质粒 pET28a(+)-ompA 双酶切鉴定；

图 3 重组蛋白 ompA 表达和纯化后的 SDS-PAGE 分析；

其中：泳道 M 为高分子量蛋白质 Marker；泳道 1 为超声破碎的菌液沉淀蛋白；泳道 2 为经亲和层析纯化后的目的蛋白 ompA；

图 4 重组 ompA 蛋白用免疫印迹试验(SDS-PAGE)分析；

其中：泳道 M 为高分子量蛋白质 Marker；泳道 1 为鸭疫里默氏杆菌标准阳性血清检测到的重组外膜蛋白 ompA。

具体实施方式

[0018] 下面结合实施例对本发明进一步详细的说明，但是此说明不会构成对本发明的限制。

[0019] 一种鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒，该试剂盒包括有：a) 抗体检测板，b) 酶结合物工作液，c) 阳性对照，d) 阴性对照，e) 样品稀释液，f) 10× 浓缩洗涤液，g) 底物显色液 A，h) 底物显色液 B 和 i) 终止液，其中：所述的抗体检测板为包被鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白(ompA)的可拆 96 孔聚苯乙烯酶标板，酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY 多克隆抗体，阳性对照为鸭疫里默氏杆菌标准菌株免疫雏鸭制备高免血清，阴性对照为经筛选获得的未免疫鸭疫里默氏杆菌的雏鸭的阴性血清。

[0020] 所述的鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的制备方法为：利用 PCR 技术扩增鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的基因序列，利用基因工程重组技术构建鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的原核表达质粒，命名为 pET-28a-OmpA；将质粒 pET-28a-OmpA 转入宿主菌大肠杆菌中成为基因工程菌，命名为 BLpET-28a-OmpA，将 BLpET-28a-OmpA 在 LB 培养基中培养，诱导表达并经

SDS-PAGE 电泳分析显示重组外膜蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中,将重组外膜蛋白通过亲和层析进行纯化后复性。

[0021] 所述的抗体检测板的制备方法为:将纯化复性后的重组外膜蛋白用抗原包被液稀释为 $1.5 \mu\text{g/mL}$ 的终浓度,向可拆 96 孔酶标板的每个聚苯乙烯微孔中加入 $100 \mu\text{L}$, 37°C 条件下包被 2h,用洗涤液洗涤 $5\text{min} \times 4$ 次,甩干,每孔加封闭液 $100 \mu\text{L}$, 37°C 反应 3h,用 PBST 缓冲液洗涤 $5\text{min} \times 4$ 次,甩干,再加入 20% (w/v) 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时,置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装袋中保存备用。

[0022] 所述的抗原包被液为 PBS 缓冲液,所述的洗涤液为 PBST 缓冲液,所述的封闭液为 1% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA) 的 PBST 缓冲液。

[0023] 所述的辣根过氧化物酶标记兔抗鸭 IgY 多克隆抗体用磷酸盐缓冲液按 1:5000 比例稀释。

[0024] 所述的样品稀释液为按 0.1% (w/v) 加入牛血清白蛋白的 PBST 缓冲液; $10 \times$ 浓缩洗涤液为含 0.5% (v/v) 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液;底物显色液 A 为 0.2mg/ml 的四甲基联苯胺溶液,底物显色液 B 为含 0.05% (v/v) 过氧化氢尿素的柠檬酸-磷酸盐缓冲液;终止液为 2M 硫酸溶液。

[0025] 所述的鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 检测试剂盒的应用方法,其特征在于包括有以下步骤:

1) 将 $10 \times$ 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;

2) 将待检血清用样品稀释液按体积 1 : 100 稀释,按 $100 \mu\text{L}$ / 孔加入到抗体检测板中,设阴性对照、阳性对照,并设只加 $100 \mu\text{L}$ 样品稀释液作为空白对照, 37°C 孵育 20-45 分钟,甩干;

3) 每孔加步骤 1) 的洗涤液 $200 \mu\text{L}$,洗涤 4 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

4) 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 的酶结合物工作液,空白对照不加, 37°C 孵育 20-45 分钟,甩干;

5) 每孔加步骤 1) 的洗涤液 $200 \mu\text{L}$,洗涤 4 次,每次间隔 1 分钟,拍干;

6) 依次每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 底物显色液 A 和 $50 \mu\text{L}$ 底物显色液 B, 37°C 避光孵育 5-15 分钟;

7) 每孔加 $50 \mu\text{L}$ 终止液,用酶标仪在 630nm 波长下读取每孔光吸收值。

[0026] 本发明的发明要点是:利用 pET-28a Prokaryotic Expression Systems 构建 ompA 基因的原核表达载体,并将表达后的重组蛋白进行纯化,在此基础上建立 ELISA 方法组装诊断试剂盒,并初步运用于临床。

[0027] 本发明的具体制备方法如下:

一、鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 ompA 基因的克隆、表达和纯化

(1) 鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 ompA 基因扩增及表达载体的构建

根据 NCBI Genbank 中发表的 ompA 基因序列,自行设计一对表达引物(OmpAF 上游引物 $5' -\text{CCATGGATCCATGGACAAGGAGTTTATG}-3'$; OmpAR 下游引物 $5' -\text{CGCCTCGAGTTATTTTCTTTCTTTTAC}-3'$)。以鸭疫里默氏杆菌标准菌株为模板,采用 PCR 技术扩增出 ompA 的目的基因,大小约为 1200bp,如图 1 所示。用 BamHI/XhoI 双酶切目的片段,获得 ompA 基因,克隆入 pET-28a 载体,用 BamHI/XhoI 酶切鉴定,阳性克隆命名为 pET-28a-OmpA,如图 2 所示,并送上海生物工程有限公司测序,见 SEQ1。

[0028] (2) 鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 ompA 基因的诱导表达和分析

将质粒 pET-28a-OmpA 转入宿主菌大肠杆菌中成为基因工程菌,命名为 BLPET-28a-OmpA,挑取单个菌落于 LB 液体培养基中 37℃ 培养,待 A600 值达到 0.4~0.6 时,加入 Isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) 至终浓度为 1.0mmol/L,进行诱导表达。收集诱导后 1h、2h、3h、4h 表达的菌体,于冰浴上进行超声破碎,4℃ 15000×g 离心 10min,取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果在沉淀中可见有明显的重组外膜蛋白表达,且重组外膜蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中。

[0029] (3) 重组外膜蛋白的纯化、复性和分析

按照镍亲和层析柱纯化试剂盒的说明书通过亲和层析进行蛋白的纯化,再用透析的方法使其复性,结果可见一条 42KDa 的目的蛋白条带,表明亲和层析能获得较纯的目的蛋白。Western blot 分析表明复性后的重组外膜蛋白具有良好的免疫学活性。该蛋白可用于鸭疫里默氏杆菌阳性血清的检测。

[0030] 二、以鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白为包被抗原制备 ELISA 的抗体检测板,检测鸭血清中鸭疫里默氏杆菌的抗体水平,并对影响试验的各种条件进行选择。

[0031] 1. 抗原包被浓度与血清最佳稀释度的选择

采用方阵滴定,横排作抗原倍比稀释(12μg/mL、6μg/mL、3μg/mL、1.5μg/mL、0.75μg/mL、0.375μg/mL、0.188μg/mL、0.099μg/mL),纵排将阳性血清和阴性血清经大肠杆菌裂解液处理后也分别进行倍比稀释(1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、做了 12 个倍比稀释),每个稀释度重复 1 次,取其平均值。结果,当抗原浓度为 1.5μg/mL,待检血清以 1:100 稀释时,P/N 值(阳性 OD 值与阴性 OD 值得比值)最大,非特异性较低。因此每孔 150ng 的抗原包被量和 1:100 稀释的血清浓度为最佳反应浓度。

[0032] 2. 抗原包被条件的确定

用最适浓度抗原包被酶标板,包被条件分别为:37℃ 条件下 3h,4℃ 过夜,37℃ 条件下 2h 再 4℃ 过夜,37℃ 3h 再 4℃ 过夜。用 0.5% BSA 溶液封闭,加入 1:100 稀释的阳性血清进行 ELISA 测定,综合结果 4℃ 过夜包被最好。

[0033] 3. 最佳封闭条件的确定

分别加入 0.5%BSA、1%BSA、0.5% 脱脂奶粉和 1% 脱脂奶粉,在 37℃ 温箱中作用 30Min、60Min、90Min、120Min。加入 1:100 稀释的阳性血清进行 ELISA 测定,结果 1%BSA 封闭 60Min 为最佳。

[0034] 4. 血清最佳反应时间的确定

加入血清后,分别在 37℃ 温箱中作用 30Min、60Min、90Min、120Min。用 0.5% BSA 溶液封闭,加入 1:100 稀释的阳性血清进行 ELISA 测定,结果待检血清作用 30Min 为最佳。

[0035] 5. 二抗最佳反应时间的确定

加入 1:5000 稀释的二抗后,分别在在 37℃ 温箱中作用 30Min、60Min、90Min、120Min。用加入 1:100 稀释的阳性血清进行 ELISA 测定,结果二抗作用 60Min 为最佳。

[0036] 6. 底物最佳反应时间的确定

加入底物液后,避光条件下作用 5Min、10Min、12Min、15Min,结果显示避光条件下 5Min 最佳。

[0037] 7. 间接 ELISA 临界值的确定

在最佳工作条件下,对收集的 30 份无鸭疫里默氏杆菌抗体的鸭血清 100 倍稀释后进行间接 ELISA 测定,求得 OD 平均值(Average) X 为 0.099,标准差(Standard Difference) SD 为 0.022,并设定阴阳性临界值为 $X+3SD$ 为 0.166,大于该值定为阳性,小于为阴性。

[0038] 三、鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 试剂盒的制备

1. 抗体检测板的制备

将纯化复性后的外膜蛋白用抗原包被液(PBS, 0.05mol/L, pH9.6 的碳酸盐缓冲液)稀释为 1.5 μ g/mL 的终浓度,向可拆 96 孔酶标板的每个聚苯乙烯微孔中加入 100 μ L, 37°C 条件下包被 2h,用洗涤液(PBST, 含 0.05%Tween-20 的 PBS 缓冲液)洗涤 5min \times 4 次,甩干,每孔加封闭液 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBST 缓冲液 100 μ L, 37°C 作用 3h, PBST 缓冲液洗涤 5min \times 4 次,甩干,再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时,置干燥室干燥后,装入含干燥剂的包装袋中保存。

[0039] 2. 酶结合工作液的制备

pH7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)按 1:5000 比例稀释 HRP 标记的兔抗鸭 IgY。

[0040] 3. 样品洗涤液、稀释液、终止液的配制

10 \times 浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温 -20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(KH_2PO_4 2g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 29g, NaCl 80g, 定容至 1000ml, pH7.4, 再加 5ml 吐温 -20); 样品稀释液为含 0.1%BSA 的 1 \times 样品洗涤液即量取 0.1g 的 BSA 加入到 100ml 的 1 \times 样品洗涤液(PBST)中即可; 终止液为 2M 硫酸溶液, 即量取 111.2ml 浓硫酸(18M) 稀释定容至 1000ml。

[0041] 4. 阳性对照和阴性对照的制备

按常规方法制备阳性血清和阴性血清。选 7 日龄健康麻鸭 10 羽,用 1 型鸭疫里默氏杆菌灭活油乳剂疫苗三次免疫,每次免疫间隔 14d。收集血清备用。

[0042] 阴性血清则直接采未免疫的 15 日龄雏鸭血清经筛选后备用。

[0043] 将阴性血清、阳性血清用样品稀释液 1 : 800 倍稀释(阳性血清 OD_{630nm} \geq 1.00, 阴性血清 \leq 0.10) 按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素, 无菌过滤, 作为鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白抗体间接 ELISA 检测试剂盒的阴性对照和阳性对照。

[0044] 5. 底物显色液的配制

称取 200mg 四甲基联苯胺(TMB), 用 100ml 无水乙醇或 DMSO 溶解后, 以双蒸水定容至 1000ml, 配底物显色液 A; 称取 21g 一水柠檬酸, 28.2g 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4), 6.4ml 10.75% 过氧化氢尿素, 双蒸水定容至 1000ml, 调 pH 值到 4.5-5.0, 配制底物显色液 B。

[0045] 6. 试剂盒检测操作程序

其检测程序为:

- 1) 将 10 \times 浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液;
- 2) 将待检血清用样品稀释液作 1 : 100 稀释, 将 100 μ l / 孔加入抗体检测板中, 同时设空白(只加 100 μ l 样品稀释液)、阴性对照(鸭标准阴性血清)、阳性对照(鸭疫里默氏杆菌标准阳性血清), 37°C 孵育 20-45 分钟, 甩干;
- 3) 每孔加洗涤液 200 μ l, 洗涤 4 次, 每次间隔 1 分钟, 拍干;
- 4) 每孔加 100 μ l 酶结合物工作液(空白不加), 37°C 孵育 20-45 分钟, 甩干;
- 5) 每孔加洗涤液 200 μ l, 洗涤 4 次, 每次间隔 1 分钟, 拍干;
- 6) 依次加 50 μ l 底物显色液 A 和 50 μ l 底物显色液 B, 混匀, 37°C 避光孵育 5-15 分钟;

7) 每孔加 50 μ l 终止液,用酶标仪在 630nm 波长下读取每孔光吸收值(OD_{630nm} 值)。

[0046] 7. 结果判定标准 阴阳性临界值为 0.166,大于该值定为阳性,小于为阴性。

[0047] 四) 鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 方法检测试剂盒的鉴定

1. 间接 ELISA 方法检测试剂盒的特异性和重复性试验

利用鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 ompA 建立的间接 ELISA 方法检测试剂盒检测鸭源大肠杆菌、鸭多杀性巴氏杆菌、鸭链球菌、鸭源呼肠孤病毒、鸭肝炎病毒和鸭瘟病毒感染鸭血清等阳性血清,结果 OD 值均小于 0.166,为阴性,表明该方法与上述病毒及细菌无交叉反应;对效价高、中、低的三份血清进行了测定,计算本试验的板间、板内的变异系数(CV,是个体参数的标准差与平均数的比率),结果分别在 5% 和 9% 以内,表明该方法具有较好的重复性,该检测试剂盒具有很好的临床应用价值。

[0048] 2. 间接 ELISA 方法检测试剂盒的阻断试验

将各 4 份阳性血清与阴性血清分别与浓度为 1.5mg/ml 的鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白溶液按 1:10(V/V)的比例混匀,37℃作用 1h,10000rpm 离心 20min 取上清。用此处理过的阴、阳性血清 1:100 稀释后,与未加抗原处理的阴、阳性血清按已建立的间接 ELISA 方法检测试剂盒进行测定,比较阻断前后血清的 OD_{630nm} 值变化。结果表明用重组外膜蛋白处理的阳性血清的 OD 值明显小于未加抗原处理的阳性血清 OD 值,且差异显著($P < 0.05$),而用重组外膜蛋白处理的阴性血清 OD 值也明显小于未加抗原的阴性血清的 OD 值,说明该蛋白能很好的阻断血清中的抗体。

[0049] 3. 间接 ELISA 方法检测试剂盒的重复性试验

(1) 批内重复

用同一批制备的抗原包被酶标板,取待检血清 4 份,已知的阳性血清 1 份、阴性血清 1 份,每份血清重复 3 孔。结果见表 2,经过 SPSS 统计分析软件分析表明,批内重复性试验结果无显著差异,说明该 ELISA 检测方法的重复性良好。操作步骤同上。

[0050] 表 1 批内重复结果

血清	待检样品 1	待检样品 2	待检样品 3	待检样品 4	阳性血清	阴性血清
OD _{630nm}	0.811	0.880	1.036	1.447	1.154	0.096
值(重复 3 孔)	0.737	0.620	0.869	1.422	1.133	0.087
	0.792	0.732	0.948	1.383	1.024	0.091

(2) 批间重复

用不同批次的抗原包被酶标板,取待检血清 4 份,已知的阳性血清 1 份、阴性血清 1 份进行检测,每份血清检测 3 孔,重复检测 3 次。比较 OD_{630nm} 值和 S/N,计算各样品标准差和变异系数。结果见表 3,经过 SPSS 统计分析软件分析表明,批间重复试验变异系数小于 8.8%,表明建立的间接 ELISA 方法具有很好的重复性,能快速、准确的检测鸭疫里默氏杆菌的抗体水平。

[0051] 表 2 批间重复结果

待检血清	待检样品 1	待检样品 2	待检样品 3	待检样品 4	阳性血清	阴性血清
OD630nm 值	0.557	0.604	0.802	1.103	1.084	0.097
(重复三孔)	0.547	0.524	0.678	0.975	0.992	0.086
	0.541	0.506	0.661	0.987	1.057	0.084
三次平均 OD 值	0.548	0.545	0.714	1.022	1.044	0.089
标准差 SD	0.0066	0.0423	0.0628	0.0577	0.039	0.0057
变异系数 CV	1.2%	7.8%	8.8%	5.6%	3.7%	6.4%

序列表

<110> 湖北省农科院畜牧兽医研究所

<120> 鸭疫里默氏杆菌抗体间接 ELISA 方法检测试剂盒及其应用

<160> 1

<210> 1

<211> 1266

<212> DNA

<213> 鸭疫里默氏杆菌

<400> 1

```

atgggcagca gccatcatca tcatcatcac agcagcggcc tggtgccgcg cggcagccat 60
atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccatggacaa ggagtttatg 120
ttgatgactg gtcttggctc tcagcttaaa tttgctggtc ttctttttgg aaacgaagat 180
gcgtggtttg acccttatgt aagagttgga gccaactatt tgagacacga ctatacaggt 240
cttacgttcc ctgtgactga tagctacaat gatgtaactt acgcggggta tagcgaaaat 300
aaaccataca ctcaaggaag agcggatcat tttgctttat caacaggttt aggtacaaac 360
atlttggttaa ctaagaactt tggctttggt atccaagggg attatgttcc tactccagta 420
gataagtctg gattggctaa cttttggcaa gcgtcagctt cattgaaactt tagatttggg 480
aacagagata aggataagga tggagtgtta gataaagacg atttatgtcc agaaatacca 540
ggtttacctg aattccaagg ttgtccagat acagatggcg atggagtcc agataaagat 600
gataactgtc cagaagttgc aggaccagtt gaaaacaacg gttgtccttg gccagataca 660
gacaaagatg gtgtattgga taaagacgat gcttgtgttg atgtagctgg acctgctgaa 720
aacaatgggt gtccttggcc agatacagat aatgatggag tattagataa agatgataag 780
tgtcctaatag ttccaggtct tccagaatac aaaggttgtc ctaagcctca ggaagcgtat 840
gcagttgaag caacaggagc attaaagggt atattcttca actttaataa agcatctatc 900
agacctgaat ctaatactaa gttagatcaa gctgctgaag tgattaagtc ttctaacgga 960
ggtactttct tagtggtagg tcatacggat gtttaagggt atgctaacta caacttgaaa 1020
ctttctagag aaagagctgc atctgtagta gctgctttag aagctagagg agttaatcca 1080
tctcagttaa aatctaaagg ggttggttct gctgaagcta cagtaccage gtctgcttct 1140
aacgaagaga gaatgaaaga cagaaaagtg gttgtagaag caatcagcgg atctgcttgg 1200
gaagctcttc aaaagtctga tcttccagta gtgaagaaaa aagtagtaaa aaagaaaaga 1260
aaataa 1266

```

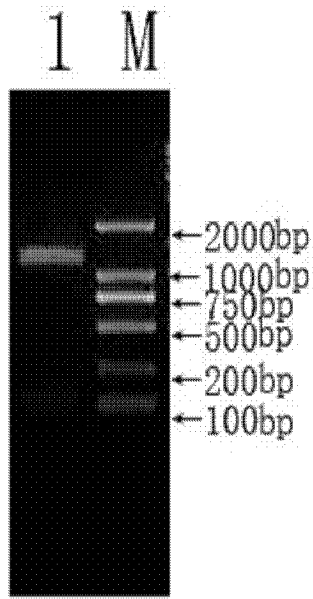


图 1

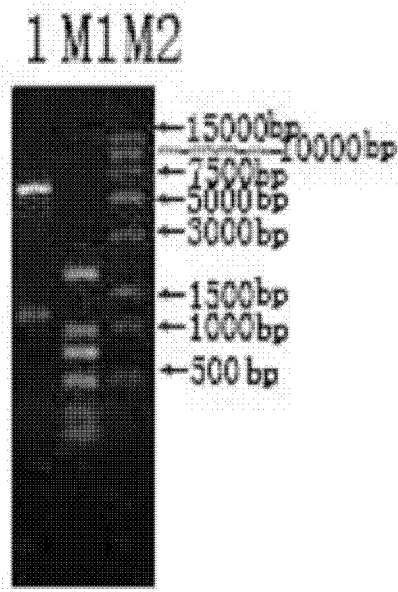


图 2

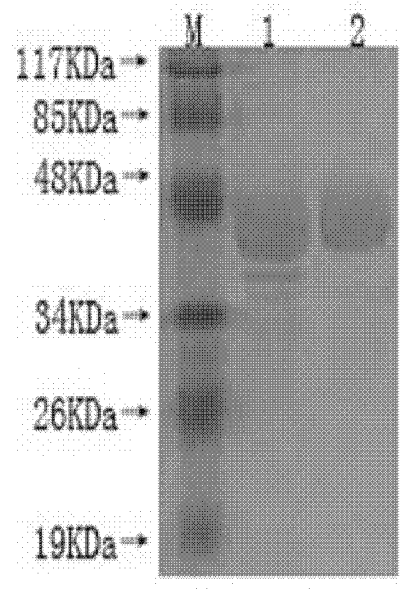


图 3

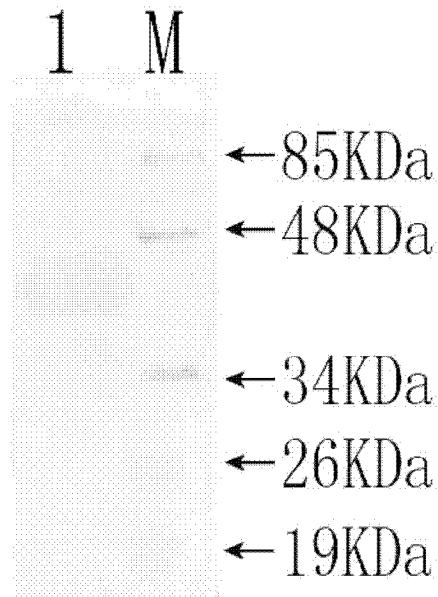


图 4

专利名称(译)	鸭疫里默氏杆菌抗体间接ELISA方法检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN102323428A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN201110235293.8	申请日	2011-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	湖北省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	湖北省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	湖北省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	张蓉蓉 罗青平 温国元 邵华斌 艾地云 王红琳 杨峻 罗玲 杨依靠		
发明人	张蓉蓉 罗青平 温国元 邵华斌 艾地云 王红琳 杨峻 罗玲 杨依靠		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	崔友明		
其他公开文献	CN102323428B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及鸭的一种鸭疫里默氏杆菌抗体间接ELISA方法检测试剂盒及其应用，包括有：a)抗体检测板，b)酶结合物工作液，c)阳性对照，d)阴性对照，e)样品稀释液，f)10×浓缩洗涤液，g)底物显色液A，h)底物显色液B和i)终止液，本发明有益的积极效果是：试剂盒操作简单，所需仪器要求不高，人人都可操作，能较好满足不同层次的需要，如疫病监测、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景。

待检血清	待检样品1	待检样品2	待检样品3	待检样品4	阳性血清	阴性血清
OD630nm 值	0.557	0.604	0.802	1.103	1.084	0.097
(重复三孔)	0.547	0.524	0.678	0.975	0.992	0.086
	0.541	0.506	0.661	0.987	1.057	0.084
三次平均 OD 值	0.548	0.545	0.714	1.022	1.044	0.089
标准差 SD	0.0066	0.0423	0.0628	0.0577	0.039	0.0057
变异系数 CV	1.2%	7.8%	8.8%	5.6%	3.7%	6.4%