



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 106771190 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611220771.7

(22)申请日 2016.12.26

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 刘志杰 殷宏 王振国 杨吉飞
牛庆丽 罗建勋 关贵全

(74)专利代理机构 兰州振华专利代理有限责任
公司 62102

代理人 张晋

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种羊无浆体病间接ELISA诊断试剂盒及其
制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测羊无浆体(*Anaplasma ovis*)血清抗体的以重组表达的P35为抗原的间接ELISA诊断试剂盒、P35重组抗原及其制备方法。该试剂盒仅与*A. ovis*阳性血清发生特异性反应,具有良好的特异性;该试剂盒具有良好的敏感性,可检测到羊无浆体早期感染产生的抗体,并能从1:800稀释的阳性血清中检测到抗体。试剂盒重复性良好,操作相对简便,可应用于羊无浆体病流行病学调查和免疫抗体水平检测。

1. 一种羊无浆体病间接ELISA诊断试剂盒,包括被抗原包被的酶标板、标准阳性血清、标准阴性血清、HRP标记的兔抗羊抗体、血清稀释液、酶标抗体稀释液、TMB显色液、终止液和浓缩洗涤液,其特征在于所述抗原为重组蛋白P35,核苷酸序列为SEQ No. 1。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述重组蛋白P35含有能被羊无浆体阳性血清特异性识别的P35特异抗原表位。

3. 一种重组蛋白P35的制备方法,其特征在于:正向引物SEQ No. 2,反向引物SEQ No. 3,以A. ovis全基因组为模板扩增出P35基因,长度为897bp的片段,将前述扩增片段与pGEM-T Easy Vector 连接,转化感受态DH5a大肠杆菌,筛选阳性克隆菌株送测序,将测序正确的克隆菌株提取重组质粒,再将质粒pET30a和pGEM-P35分别用内切酶EcoR I和Hind III双酶切,分别回收目的DNA片段和pET30a载体片段,再连接、转化感受态BL21 (DE3) 大肠杆菌,筛选阳性克隆菌株,用终浓度1 mM的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后得到重组蛋白。

一种羊无浆体病间接ELISA诊断试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测领域,具体为一种羊无浆体病间接ELISA诊断试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 无浆体是一类由蜱传播的专性胞内寄生菌,主要寄生于牛羊等反刍动物红细胞内,导致无浆体病,旧称边虫病。无浆体与人埃立克体均归类为变形菌纲、立克次氏体目(Rickettsiales),无浆体科(Anaplasmataceae),无浆体属(*Anaplasma*),其中羊无浆体(*A. ovis*)是重要的组成成员,可以引发小反刍动物的无浆体病。该病临床症状为发热、贫血、黄疸、衰弱和渐进性消瘦。血象检测表现为红细胞数量、红细胞压积和血红蛋白含量显著下降,严重感染时可以导致死亡。该病在世界各地广泛流行,在我国许多地区也时有发生,严重阻碍了畜牧业的发展,给畜牧业造成了巨大的经济损失。因此,建立快速、灵敏、准确又操作方便的检测方法十分必要。

[0003] 国内外学者对羊无浆体的检测方法进行了一系列的研究工作,血涂片镜检法、补体结合试验(CF)、卡片凝集试验(CAT)、间接荧光抗体试验(IFAT)、PCR方法等,血涂片镜检法是实际中应用最多的方法。然而该方法需要较强的专业知识来与泰勒虫、巴贝斯虫等血液寄生虫感染进行区别,而且该方法不利于感染早期和感染持续期染虫率极低的情况。虽然补体结合试验(CF)、卡片凝集试验(CAT)、间接荧光抗体试验(IFAT)等也有应用的报道,但补体结合试验操作复杂,不易推广;卡片凝集试验操作简单,但敏感性较差,这些血清学方法鲜有在实践中大量使用的报道,这些方法尚需进一步评价其检测性能。PCR方法虽是一种比较快速灵敏的分子诊断方法,但其需要琼脂糖凝胶电泳分析结果,所需试剂如溴化乙锭,操作稍不慎就对使用者和周围环境产生毒害,而且PCR仪器和凝胶成像系统昂贵,难以在基层单位中推广。至今,世界尚没有用于羊无浆体感染检测的商品化的血清学试剂盒。

发明内容

[0004] 本发明提供一种可克服现有技术不足,仅与*A. ovis*抗体发生反应,而不与其他蜱传病原或相关细菌的抗体发生交叉反应,用于检测*A. ovis*血清抗体的间接ELISA试剂盒,同时提供制备这一检测试剂盒的方法和试剂盒中所用的*A. ovis*P35重组抗原,以及这种重组抗原的制备方法。

[0005] 本发明的羊无浆体间接ELISA抗体检测试剂盒中包括:已包被抗原、真空包装的酶标板(2块);标准阳性血清1支(100 μ l);标准阴性血清1支(100 μ l);50倍HRP标记的兔抗羊抗体1支(100 μ l);血清稀释液1瓶(20ml)酶标抗体稀释液1瓶(20ml);TMB显色液1瓶(20ml);终止液1瓶(20ml);50倍浓缩洗涤液1瓶(20ml)。试剂盒4 $^{\circ}$ C保存,保存期为6个月。试剂盒可检测180份血清。

[0006] 本发明的羊无浆体间接ELISA抗体检测试剂盒中宝贝酶标板的抗原为重组蛋白,为大肠杆菌表达蛋白,表达的基因位于P35基因的73bp-969 bp,经测序,其序列为SEQ ID

No.1,长度为897 bp,包含P35特异性的抗原表位。

[0007] 该重组抗原的制备方法是:用正向引物SEQ ID No.2,反向引物SEQ ID No.3,以*A. ovis*全基因组为模板扩增出P35的基因,长度为897 bp的片段,将前述扩增片段与pGEM-T Easy Vector 连接,转化感受态DH5a大肠杆菌,筛选阳性克隆菌株送测序,鉴定正确的重组质粒命名为pGEM-P35。将测序正确的克隆菌株提取重组质粒,再将质粒pET30a和pGEM-P35分别用内切酶EcoR I和HindIII双酶切,分别回收目的DNA片段和pET30a载体片段,在连接、转化感受态BL21 (DE3) 大肠杆菌,筛选阳性克隆菌株,用终浓度1 mM的IPTG进行诱导表达,表达产物经纯化后得到重组蛋白,表达后的P35重组蛋白为40 KDa。

[0008] 本发明的试剂盒中包括:已包被抗原、真空包装的酶标板(2块);标准阳性血清1支(100μl);标准阴性血清1支(100μl);50倍HRP标记的兔抗羊抗体1支(100μl);血清稀释液1瓶(20ml)酶标抗体稀释液1瓶(20ml);TMB显色液1瓶(20ml);终止液1瓶(20ml);50倍浓缩洗涤液1瓶(20ml)。试剂盒4℃保存,保存期为6个月。试剂盒可检测180份血清。

[0009] 本发明经过试验发现,羊无浆体P35基因的部分特异性片段,即P35基因的73-969 bp,长度为897 bp的片段,只与羊无浆体阳性血清发生反应,而与其它相关病原的阳性血清无交叉反应。经过进一步试验表明,用于这一片段进行检测血清,其结果具有较好的特异性。

[0010] 本发明的优越性为:

a.选择*A. ovis*基因的特异性片段进行克隆表达,所选择的基因片段与同属的其它细菌该基因对应片段的同源性低,并且含有P35基因中的特异性抗原表位。因此,这种纯化的重组蛋白作为包被抗原,只与*A. ovis*阳性血清发生反应,保证了特异性;并且该抗原表位是线性表位,重组蛋白具有良好的反应性,保证了反应的敏感性。

[0011] b.表达目的基因片段所用的载体是pET-30a,得到的重组蛋白带有组氨酸标签。虽然重组蛋白以包涵体形式存在,但是溶解后可用NI HisTrap FF 采用AKTA系统纯化,纯度上保证了与抗体反应的特异性。

[0012] c.本发明涉及的试剂盒应用间接ELISA技术,开放性操作,与目前用于检测羊无浆体的PCR技术跟其它检测血清相比,技术要求比较宽松,具有极大的可操作性。

附图说明

[0013] 图1:*A. ovis*P35基因的PCR扩增。

[0014] 图2:P35重组蛋白的SDS-PAGE分析,其中M:蛋白分子量标准;1:全菌;2:沉淀;3:上清;4纯化产物。

[0015] 图3:P35重组蛋白的Western-blotting分析,其中M:蛋白分子标准;1:抗His标签抗体;2:羊无浆体阳性血清;3阴性血清;4-11:绵羊肺炎支原体、山羊支原体山羊肺炎亚种、羊巴贝斯虫、尤氏泰勒虫、吕氏泰勒虫、牛无浆体、牛巴贝斯、环形泰勒虫。

具体实施方式

[0016] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0017] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0018] 实施例一、重组抗原制备。

[0019] 根据选定的基因片段设计一对引物,正向引物(SEQ ID No.2)序列为5'-CCGGAATTCAGGGTACTGGTAATGGGC-3',反向引物(SEQ ID No.3)序列为5'-CCCAAGCTTCTAAATAGCAAGACTT TGC GTATTAG-3'。引物中的下划线为内切酶位点,酶切位点前面3个碱基为保护性碱基,上游引物中酶切位点为EcoRI,下游中酶切位点为Hind III。用全血基因组提取试剂盒,从羊无浆体感染血液中提取全血基因组作为模板,用上述引物通过PCR方法对目的片段进行扩增。扩增得到的目的片段长度为897 bp,包含有P35抗原表位。将扩增到的目的片段进行琼脂糖凝胶电泳,纯化、回收目的DNA,将目的DNA片段与pGEM-T Easy Vector 连接,转化感受态DH5a大肠杆菌,筛选阳性克隆菌株送测序,将测序正确的克隆菌株提取重组质粒,再将质粒pET30a和pGEM-P35分别用内切酶EcoR I和Hind III双酶切,分别回收目的DNA片段和pET30a载体片段,在连接、转化感受态BL21 (DE3) 大肠杆菌,筛选阳性克隆菌株,用终浓度1 mM IPTG进行诱导表达。

[0020] 诱导后的菌液离心沉淀,用PH7.4的PBS洗涤沉淀、重悬,然后超声破碎菌体,再离心,表达的目的蛋白为包涵体位于沉淀中。沉淀用8 M尿素溶解,然后过NI HisTrap FF 采用AKTA系统纯化,经纯化后得到重组蛋白。操作按照说明书进行。

[0021] 实施例二、抗原包被酶标板。

[0022] 纯化好的重组蛋白作为抗原包被酶标板。经棋盘格法滴定测试,确保抗原的最佳浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,100 $\mu\text{I}/\text{孔}$;血清稀释倍数为1:100;HRP标记兔抗羊抗体稀释倍数为1:20000,将其先稀释50倍保存,工作浓度再做400倍稀释。

[0023] 抗原的包被程序为:将-20℃冻存的抗原融化,用PH9.6的碳酸盐缓冲液稀释到浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加入酶标板,100 $\mu\text{I}/\text{孔}$,转入4℃过夜。次日甩掉抗原液,洗涤以后用1%的明胶封闭,100 $\mu\text{I}/\text{孔}$,37℃孵育1h,再洗涤。然后加入蛋白稳定剂,100 $\mu\text{I}/\text{孔}$,室温孵育30min,甩干,在超净台内吹1h。最后放入包装袋内,抽成真空。

[0024] 本发明涉及的试剂盒中的标准阳性血清,用*A. ovis*菌血静脉注射1岁羊10mL,经血涂片染色镜检、PCR方法检测后结果均为阳性时制备。阴性血清为经血涂片染色镜检、PCR方法检测后结果均为阴性的健康绵羊血清。本发明盒中的50倍浓缩液HRP标记兔抗羊抗体购买于Sigma公司;血清稀释液、酶标抗体稀释液、TMB显色液、终止液、50倍浓缩洗涤液均购自中国农业科学院兰州兽医研究所生物制品诊断中心。

[0025] 实施例三、组装试剂盒。

[0026] 各种试剂制备后组装成本发明的检测*A. ovis*血清抗体的间接ELISA试剂盒(以下简称试剂盒)。试剂盒中包括:已包被抗原、真空包装的酶标板(2块);标准阳性血清1支(100 μI);标准阴性血清1支(100 μI);50倍HRP标记的兔抗羊抗体1支(100 μI);血清稀释液1瓶(20mL)酶标抗体稀释液1瓶(20mL);TMB显色液1瓶(20mL);终止液1瓶(20mL);50倍浓缩洗涤液1瓶(20mL)。试剂盒4℃保存,保存期为6个月。试剂盒可检测180份血清。

[0027] 实施例四、试剂盒的使用方法示例。

[0028] 1.将试剂盒从4℃冰箱中取出,平衡至室温。用双蒸馏水将50倍洗涤液稀释至1倍工作浓度。

[0029] 2.取出酶标板,按待检血清的数量确定需要的酶标板条,剩余的板条放入包装袋中,4℃保存。拆封的酶标板应在一周内使用完。

[0030] 3.加血清稀释液:在酶标板孔内加入血清稀释液,第一排的5-6孔(空白对照孔)为

100 μ I/孔,其余为99 μ I/孔。

[0031] 4.加血清:第一排的1-2孔加入标准阳性血清,第3-4孔加入标准阴性血清,第5-6孔为空白对照。其余各孔加入待检血清,每份血清加入1孔,不做重复。各血清加入量均为1 μ I/孔(血清最终稀释度为1:100),空白对照孔不加血清。轻轻摇动混匀。

[0032] 5.温育:用封板膜封住酶标板,放入37 $^{\circ}$ C温箱中孵育1h。

[0033] 6.洗涤:小心去除封板膜,用洗板机洗涤3次,拍干。

[0034] 7.与二抗结合:用酶标抗体稀释液将兔抗羊酶标二抗HRP抗体做400倍稀释,加入酶标孔内,加入100 μ I/孔。

[0035] 8.温育:操作同5。

[0036] 9.洗涤:操作同6。

[0037] 10.显色:加入TMB显色液,加入100 μ I/孔,37 $^{\circ}$ C避光显色8min。

[0038] 11.终止:加入终止液100 μ I/孔。

[0039] 12.测定:立即用酶标仪在450nm波长下测量各孔的吸光度(OD₄₅₀值)。

[0040] 13.结果判定:(OD样品-OD阴性) $\div$ (OD阳性-OD阴性)*100,

判断样品的阴阳性阈值:若小于6.0,为阴性;效价大于6.0为阳性。

[0041] 实施例五、试剂盒的敏感性、特异性、重复性测定。

[0042] 将实验室感染*A. ovis*的3只绵羊的阳性血清,分别按照1:20、1:40、1:80、1:160、1:320共5个稀释度分别检测,将抗体稀释度均为1:20跟1:320的每份稀释度血清检测均为阳性,说明试剂盒具有较高的敏感性。

[0043] 用试剂盒检测羊尤氏泰勒虫、吕氏泰勒虫、巴贝斯虫、绵羊肺炎支原体、支原体山羊亚种的阳性血清均为阴性。说明阳性血清和其它血清之间不存在交叉反应。试剂盒具有良好的特异性。

[0044] 取20份*A. ovis*的阳性血清用同批次试剂盒在不同时间相同条件下检测3次,判定结果完全相同,说明试剂盒重复性较好。

[0045] 实施例六、试剂盒检测样品。

[0046] 用此方法检测了3735份采集的血清,包括人工感染动物血清、野外动物血清和健康动物血清。结果100%感染动物血清为阳性,而35.25%野外样品为阳性,健康动物血清为阴性。说明本发明的ELISA试剂盒性能良好,可用于田间样品的调查。

[0047] 以上实施例表明,本发明中首次合成的P35重组蛋白,对于检测羊无浆体病意义重大。采用P35重组蛋白为包被抗原的羊无浆体病间接ELISA抗体检测试剂盒,灵敏度高,特异性好,使用方便,填补了国内外羊无浆体感染检测的商品化的血清学试剂盒的空白。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种羊无浆体病间接ELISA诊断试剂盒及其制备方法

<160> 3

<210> 1

<211> 897

<212> DNA

<213> 重组蛋白P35

<400> 1

```

ttgttgatgt cgggggggttc ccctacaggc cttggttctg ttgttgccgc tcttaaagcc 60
gctgttggtgc ttgggggaagc ggctaaagct ctacttgcta ctgtggatcg tgcagaactc 120
gagcaggagc tgagggccat agatgccaag tggcggttctc aagtttcgga ggaagctaaa 180
ctggcactag gtaaggaact taaagccata gatgccaagt ggcgttctca agtttcggag 240
gaagctaaac tggcactagg taaggaactt aaagccatag atgccaagtg gcgttctcaa 300
gtttcggagg aagctaaact ggcactaggt aaggaactta aagccataga tgccaagtgg 360
cgtcctgaag ttctcaataa ggaactgagg gccatagatg ccaagtggcg ttctcaagtt 420
tcggaggaag ctaaactggc actaggttaag gaacttaaag ccatagatgc caagtggcgt 480
cctgaagttc tcaataagga actgagggcc atagatgcca agtggcgtcc tcaagttctc 540
aatgaggagc tgaggaccat agatgccaag tggcgctcctc aagtttcgga ggaagctaaa 600
ctggcactag gtaaggaact gagggccata gatgccaagt ggcgtcctca agtttcgggg 660
gaagctaaac tggcactagg tgaggaactg agggccatag atgccaagtg gaagtctaga 720
attgcggagg aagctcaaca ggaacttgcc cgcgttgctg agaggtttct cgctgcagca 780
cagaagtgcg gacagcttgg cgttataggc aaacaggctg taccagcac tgatatgata 840
agtgttggtg cacaatctgt ttctgctact aatactaata cgcaaagtct tgctatt 897

```

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工上游引物

<400> 2

ccggaattca ggggtactggt aatgggc 27

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工下游引物

<400> 3

cccaagcttc taaatagcaa gactttgcgt attag 35

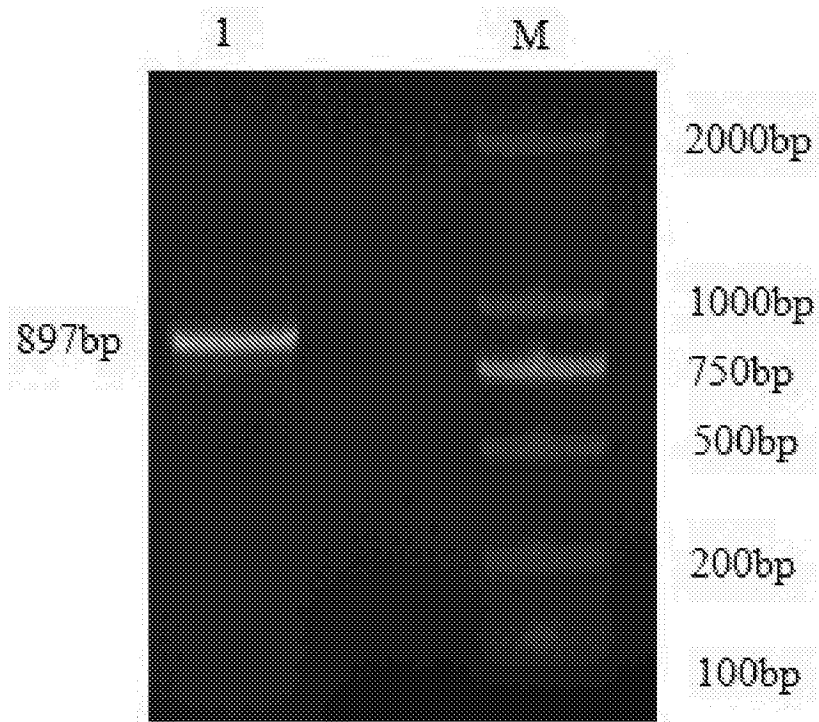


图1

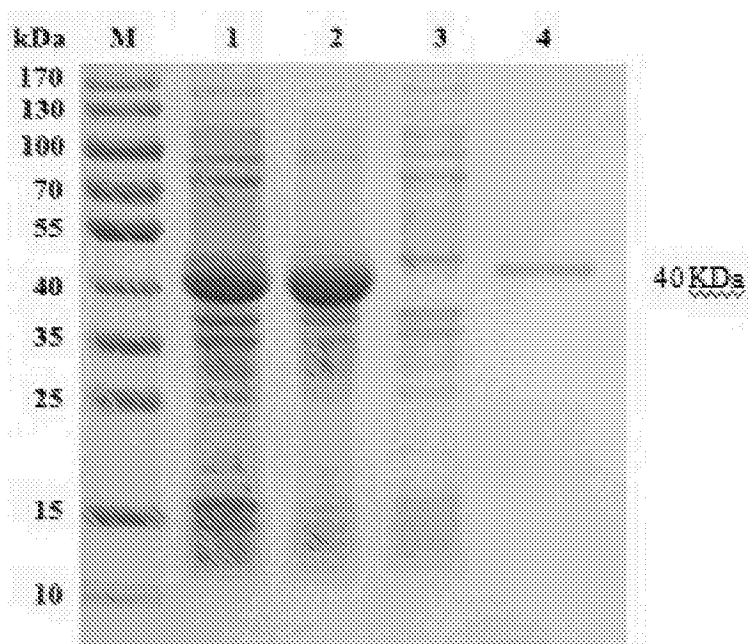


图2

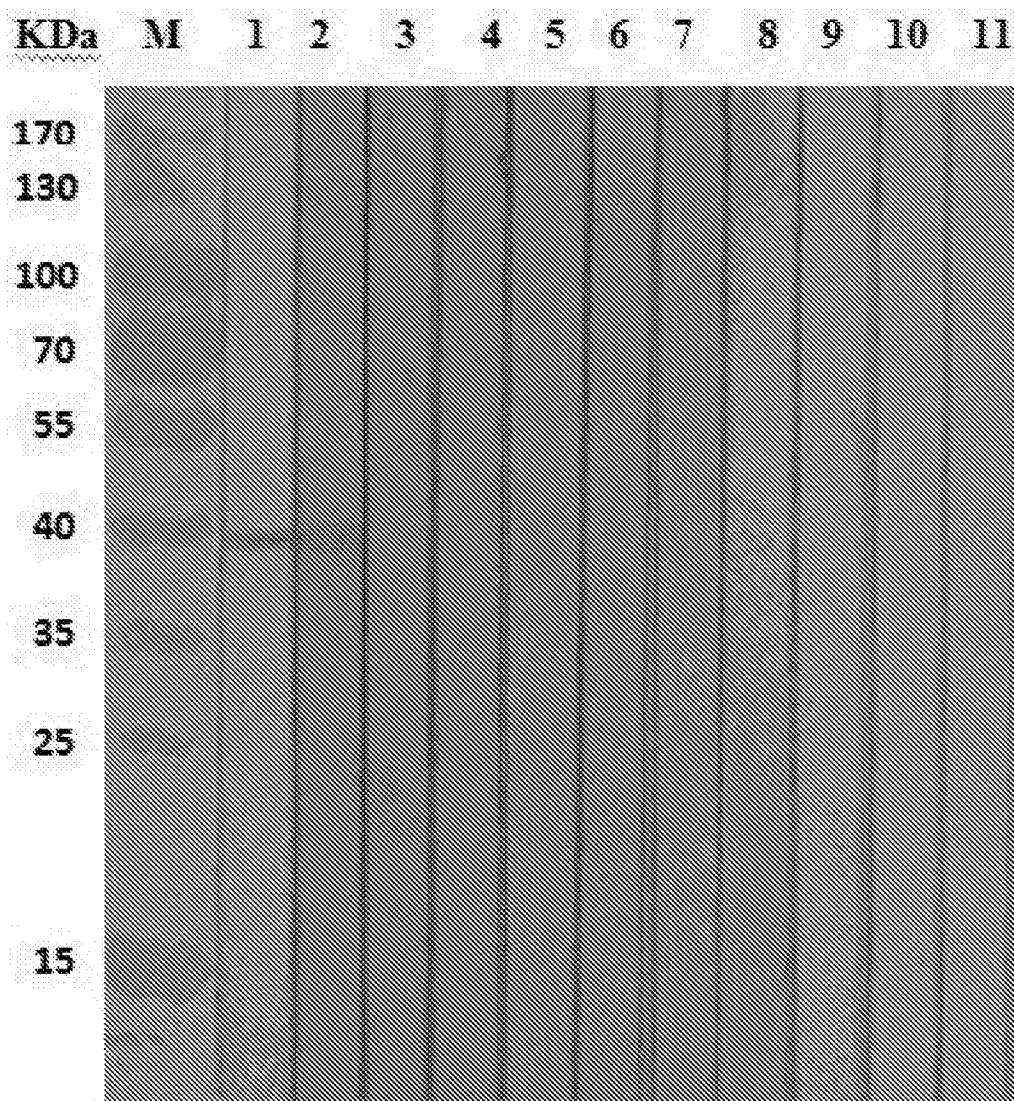


图3

专利名称(译)	一种羊无浆体病间接ELISA诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106771190A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611220771.7	申请日	2016-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	刘志杰 殷宏 王振国 杨吉飞 牛庆丽 罗建勋 关贵全		
发明人	刘志杰 殷宏 王振国 杨吉飞 牛庆丽 罗建勋 关贵全		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	C07K14/29 C12N15/70 G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/56911 G01N2333/29 G01N2469/20		
代理人(译)	张晋		
其他公开文献	CN106771190B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测羊无浆体 (*Anaplasma ovis*) 血清抗体的以重组表达的P35为抗原的间接ELISA诊断试剂盒、P35重组抗原及其制备方法。该试剂盒仅与A. ovis阳性血清发生特异性反应，具有良好的特异性；该试剂盒具有良好的敏感性，可检测到羊无浆体早期感染产生的抗体，并能从1：800稀释的阳性血清中检测到抗体。试剂盒重复性良好，操作相对简便，可应用于羊无浆体病流行病学调查和免疫抗体水平检测。

