



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109781973 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201910092874.7

(22)申请日 2019.01.30

(71)申请人 贵州省畜牧兽医研究所

地址 550005 贵州省贵阳市南明区小碧乡
老里坡

(72)发明人 文正常 王璇 潘淑惠 吴珣彤

(74)专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100

代理人 李余江 程新敏

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

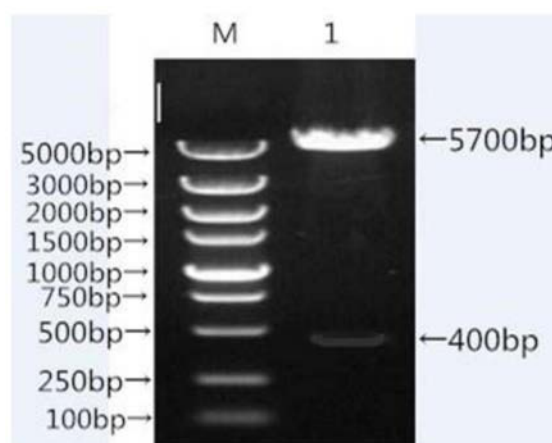
权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂
制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法,以羊传染性胸膜肺炎支原体菌株BNCC126187株(*Mycoplasma ovipneumoniad*)基因组DNA为模板,通过PCR扩增目的基因RPS11,将其克隆到pET28a(+)载体,成功构建了重组质粒pET28a-RPS11,并转化至大肠杆菌Rosetta感受态细胞中,通过包涵体诱导表达重组RPS11蛋白并鉴定及纯化。本发明完成了RPS11蛋白的重组表达,制备出特异性较好的选择性免疫抗原,建立的间接ELISA检测方法为羊传染性胸膜肺炎的血清学检测诊断及流行病学调查提供了有效的技术手段。



1. 一种羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法,其特征在于:通过羊传染性胸膜肺炎支原体菌株全基因序列设计引物扩增目的基因RPS11进行克隆,构建重组质粒pET28a-RPS11,转化至大肠杆菌Rosetta感受态细胞中,并通过包涵体诱导表达重组RPS11蛋白并鉴定及纯化。

2. 根据权利要求1所述的羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法,其特征在于引物设计与合成方法是:利用primer 5.0软件,根据Genebank中的基因序列,对ribosomal protein S11[Mycoplasma ovipneumoniae NM2010]基因序列设计引物:

RPS11-F:5'-GGATCCATGGCAACTAATACTCGT-3' ;

RPS11-R:5'-CTCGAGCCTTTTTCCTGACG-3' 。

3. 根据权利要求2所述的羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法,其特征在于PCR产物扩增方法是:按照细菌DNA基因组提取试剂盒说明书提取GM01株的基因组DNA;以提取的DNA为模版,PCR采用50μL反应体系:ddH₂O 25μL,2×PCR mix 20μL,基因组DNA模板4μL,上、下游引物各1μL;反应条件:95℃预变性5min,95℃变性15s,55℃退火30s,72℃延伸1min,25个循环,最后72℃延伸10min。

4. 根据权利要求2所述的羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法,其特征在于载体与目的基因酶切和连接方法是:将测序正确的目的基因PCR产物及pET28a(+)质粒于37℃水浴锅分别用BamHI、XhoI同时进行双酶切,孵育1~2h,使用胶回收试剂盒分别回收目的片段和载体片段。

5. 根据权利要求2所述的羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法,其特征在于所述重组质粒载体的构建与鉴定包括:

重组质粒构建:将要转化的DNA片段加入到装有TOP10感受态细胞的管中,混匀内容物,冰浴30min;离心管混合物放入加温至42℃的循环水中,热激90s,快速将管转移到冰浴中,使细胞冷却1~2min;每管加入200μL SOC液体培养基,用水浴将培养基加温至37℃,然后将管转移到设置为37℃的摇床上,220rpm培养45min,使细胞复苏并表达质粒编码的抗性标记基因;将已转化的感受态细胞转移到含有kana抗生素的LB培养基上增殖培养;倒置平板,于37℃培养,直至12~16h后出现菌斑;

DNA酶切与扩增检测:用BamHI和XhoI两种酶酶切重组质粒,回收目的基因;用酶切回收质粒pET28a(+),使用T4 DNA Ligase回收链接双酶切后的质粒目的DNA,于16℃水浴锅孵育0.5~1h;将链接后的产物转化至大肠杆菌TOP10感受态细胞,并涂布于LB固体平板,37℃过夜培养;待平板长出菌落,随机挑取若干个单个菌落,进行菌落PCR验证,检测转化子。

羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及畜牧兽医技术领域,特别是一种羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法。

背景技术

[0002] 年来,随着我国肉羊养殖数量及养殖规模的不断增大,频繁的跨区域引种及大量的活羊、肉品的市场交易和流通,因受长途运输应激、不同季节和地域气候特性、饲养管理方式的差异等不利因素的影响,导致羊传染性胸膜肺炎(Infectious pleuropneumonia in sheep and goats)的发生变得更加频繁,其流行区域及范围更加广泛,已成为一种危害国内肉羊养殖生产的主要常发条件性传染病,严重影响肉羊产业的健康可持续性发展^[1-3]。该病潜伏期较长,当临床症状显著时往往处于发病晚期,给治疗带来困难。由于肉羊养殖产业的特殊性,目前,国内肉羊专业规模化养殖相对滞后,大部分地区仍以农户小规模分散养殖为主,其分布主要在交通相对欠发达的边远山区,无论从养殖设施条件、规范化养殖生产技术的应用,到早期特异性检测诊断技术手段等,都难以满足该病有效防控的技术条件及要求。^[4-6]

[0003] 绵羊肺炎支原体(Mycoplasma ovipneumoniae,MO)是羊传染性胸膜肺炎的主要致病源,国内对绵羊肺炎支原体分离株的分子特性、免疫原性蛋白的研究分析结果表明,核糖体蛋白质(ribosomal protein,RP)在进化过程中高度保守,在哺乳动物中其氨基酸序列均相同,在原核细菌、真菌和酵母中也极其相似。RP是一种RNA结合蛋白,与核糖体RNA共同参与蛋白质的合成。其功能是组装、稳定rRNA,协助rRNA完成译码功能。根据来源的大小亚基RP分别被命名为RPL和RPS。30SRPS11是参与核糖体构成的重要亚单位,国内研究学者田露露等对其抗原表位集中区进行克隆、表达,对表达的重组蛋白进行了反应原性和免疫原性分析,证实发现30SRPS11是绵羊肺炎支原体(Mycoplasma ovipneumoniae,MO)的重要抗原,能刺激机体产生相对较强的免疫反应。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为克服现有技术缺陷,提供一种羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 本发明通过羊传染性胸膜肺炎支原体菌株全基因序列设计引物扩增目的基因RPS11进行克隆,构建重组质粒pET28a-RPS11,转化至大肠杆菌Rosetta感受态细胞中,并通过包涵体诱导表达重组RPS11蛋白并鉴定及纯化。

[0007] 其中,引物设计与合成方法是:利用primer 5.0软件,根据Genebank中的基因序列,对ribosomal protein S11[Mycoplasma ovipneumoniae NM2010]基因序列设计引物:

[0008] RPS11-F:5'-GGATCCATGGCACTAATACTCGT-3';

[0009] RPS11-R:5'-CTCGAGCCTTTTTTCCTGACG-3'。

[0010] 本发明以羊传染性胸膜肺炎支原体BNCC126187株 (*Mycoplasma ovipneumoniad*) 全基因序列设计RPS11基因片段PCR引物,经全基因合成、扩增产物pET28a-RPS11重组质粒构建、大肠杆菌转化、包涵体质粒表达、重组蛋白纯化及其反应原性鉴定等试验,并以pET28a-RPS11蛋白为包被抗原建立间接ELISA检测方法,为羊传染性胸膜肺炎的早期诊断、监测、免疫抗体效价检测及综合防控提供技术支撑。

附图说明

[0011] 图1是pET28a-RPS11质粒双酶切鉴定电泳结果;图中,M:DNA分子量标准 (DL 5000);1:pET28a-RPS11质粒双酶切产物;

[0012] 图2是pET28a-RPS11表达产物分析图;图中,M:蛋白分子量标准;1:重组质粒pET28a-RPS11诱导菌裂解上清;2:重组质粒pET28a-RPS11诱导菌裂解沉淀。

具体实施方式

[0013] 下面通过实例对本发明进一步具体描述。本发明设计的思想或同类物质的简单替代属于本发明的保护范围。下述方法中所涉及配料或材料,如无特殊说明,均为商业途径可获得。相关实验方法中如无特殊说明的均为本技术领域现有常规方法。其中的数值或数值比例,如无标注,均指质量数值或质量比例。

[0014] 实施例1:

[0015] 1试验材料及方法

[0016] 1.1主要试剂耗材

[0017] YEAST EXTRACT (LP0021)、TRYPTONE (LP0042) 为OXOID生产;IPTG (0487)、硫酸卡拉素 (0408) 为Amresco生产;Tris (T8060) 为Solarbio生产;还原型谷胱甘肽 (CB3541)、氧化型谷胱甘肽 (CB3542) 为Merck生产;考马斯亮蓝G250购于上海沃凯化学试剂有限公司;精氨酸购于北京中科科奥;NaCl、EDTA • 2Na、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NiSO₄、磷酸等试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

[0018] 1.2主要生物试验制剂及试验溶液

[0019] 山羊传染性胸膜肺炎支原体菌株BNCC126187株 (*Mycoplasma ovipneumoniad*) 由中国菌种保藏中心保藏,购至北京北纳创联生物技术研究院商成分院;高免血清由贵州省畜牧兽医研究所畜禽疫病研究实验室制备保存;羊口蹄疫、布鲁氏杆菌阳性血清购于青岛立见生物公司;阴性山羊血清购于广州蕊特生物科技有限公司;山羊传染性胸膜肺炎间接血凝检测试剂购于兰州兽医研究所;BamHI、XhoI为NEB;Pfu DNA polymerase为Life technology;T4 DNA连接酶为Fermentas;基因组DNA提取试剂盒、DNA回收试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司;质粒提取试剂盒为Axygen;载体pET28a(+),大肠杆菌TOP10感受态细胞为大连宝生物;辣根过氧化物酶标兔抗羊IgG (Rbanti-Goat IgG/HRP) 购于北京博奥森生物技术有限公司;邻苯二胺 (OPD) 购于BBI公司。

[0020] 1.3引物设计与合成

[0021] 利用primer 5.0软件,根据Genebank中的基因序列 (GeneID:29941767),对ribosomal protein S11 [*Mycoplasma ovipneumoniae* NM2010] 基因序列设计引物:RPS11-F:5' -GGATCCATGGCAACTAATACTCGT-3';RPS11-R:5' -CTCGAGCCTTTTTCCTGACG-3' (下划线处

分别为BamHI、XhoI酶切位点),由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

[0022] 1.4 PCR产物扩增

[0023] 按照细菌DNA基因组提取试剂盒说明书提取GM01株的基因组DNA。以提取的DNA为模版,PCR采用50μL反应体系:ddH₂O 25μL,2×PCR mix 20μL,基因组DNA模板4μL,上、下游引物各1μL;反应条件:95℃预变性5min,95℃变性15s,55℃退火30s,72℃延伸1min,25个循环,最后72℃延伸10min。使用天根胶回收试剂盒回收目的条带,送武汉金开瑞生物工程有限公司测序。

[0024] 1.5载体与目的基因酶切和连接

[0025] 将测序正确的质粒PCR产物及pET28a(+)质粒于37℃水浴锅分别用BamHI、XhoI同时进行双酶切,孵育1~2h,使用胶回收试剂盒分别回收目的片段和载体片段。

[0026] 1.6重组质粒载体的构建与鉴定

[0027] 1.6.1重组质粒构建将要转化的DNA片段加入到装有TOP10感受态细胞的管中(50μL感受态细胞需要25ng DNA),轻轻旋转几次混匀内容物,冰浴30min;离心管混合物放入加热至42℃的循环水中,热激90s,快速将管转移到冰浴中,使细胞冷却1~2min;每管加入200μL SOC液体培养基,用水浴将培养基加热至37℃,然后将管转移到设置为37℃的摇床上,220rpm培养45min,使细胞复苏并表达质粒编码的抗性标记基因(均为kana抗性);将适当体积(每个90mm平板达200μL)已转化的感受态细胞转移到含有kana抗生素的LB培养基上增殖培养;倒置平板,于37℃培养,12~16h后可出现菌斑。

[0028] 1.6.2 DNA酶切与扩增检测用BamHI和XhoI两种酶酶切重组质粒,回收目的基因;用酶切回收质粒pET28a(+),使用T4 DNA Ligase回收链接双酶切后的质粒目的DNA,于16℃水浴锅孵育0.5~1h;将链接后的产物转化至大肠杆菌TOP10感受态细胞,并涂布于LB固体平板,37℃过夜培养。待平板长出菌落,随机挑取若干个单个菌落,进行菌落PCR验证,检测转化子。菌液测序及验证由武汉金开瑞生物工程有限公司完成。

[0029] 1.7重组RPS11蛋白的原核表达、鉴定与纯化

[0030] 1.7.1感受态转化及阳性克隆筛选从超低温冰箱中取出Rosetta感受态细胞置于冰上融化;加入pET28a-RPS11质粒5μg,轻轻吹吸充分混匀,冰上放置30min;水浴锅42℃热激90s,冰上放置1~2min;加入800μL预热LB液体培养基,37℃158rpm培养50min;6000rpm离心4min,去部分上清,取150μL体积菌液混匀后涂至kana抗性平板上;倒置平板,37℃培养12~16h可见出现单菌落。

[0031] 1.7.2 RPS11阳性克隆小量表达与鉴定挑选含pET28a-RPS11重组质粒的单菌落至3mL LB液体培养基中,37℃培养过夜后-20℃保种;分别挑选含pET28a-RPS11重组质粒的单菌落至3mL LB液体培养基中,37℃震荡培养至OD₆₀₀约0.6;取部分菌液作为对照组,余下菌液加入IPTG诱导剂(终浓度1mmol/L),37℃震荡培养3h;分别取两组菌液0.15mL、12000×g离心2min,菌体沉淀以40μL、1×loadingbuffer重悬裂解,SDS-PAGE检测。

[0032] 1.7.3 RPS11蛋白大量表达及破菌检测取保存于-20℃的菌种100μL接种于100mL LB液体(卡那抗性)培养基中震荡培养过夜;取100mL菌液接种于2000mL LB液体培养基37℃扩大培养至OD₆₀₀约0.6,降低培养温度到30℃;加入IPTG诱导剂至终浓度0.1mmol/L、30℃继续震荡培养8h;8000rpm离心3min收集菌体,重悬于50mL预冷NTA-0缓冲液中,冰浴30min;超声破碎菌体,参数设置为功率200W、工作3s、暂停4s、时间25~30min,16000rpm 4℃离心

50min,收集上清以及沉淀;取少量上清及沉淀进行SDS-PAGE检测,剩余上清及沉淀至于4℃备用。

[0033] 1.7.4 RPS11包涵体蛋白纯化沉淀以50mL NTA-0缓冲液重悬,加入DTT至终浓度1mmol/L;超声促进杂蛋白溶解(参数设置:功率200W、工作3s、暂停3s、时间10min),10000rpm 4℃离心10min,弃上清;重复以上三步至上清透明。沉淀以PBS重悬、超声(参数设置:功率200W、工作3s、暂停3s、时间5min),16000rpm 4℃离心10min,去上清;3mL 6mol/L盐酸胍重悬包涵体,加DTT至终浓度5mmol/L、220rpm 37℃震荡3h至包涵体全部溶解,1000rpm 4℃离心10min,取上清。

[0034] 1.7.5RPS11包涵体蛋白复性以2倍体积的3mol/L盐酸胍稀释蛋白溶液,在4℃环境下以注射器逐滴加入到200mL复性液(pH8.0)中,转速调节至最大,搅拌24h,降低转速搅拌24h;取蛋白溶液于透析袋中,以PEG20000浓缩体积至50~100mL,4℃以PBS缓冲液透析过夜;取蛋白溶液,以PEG20000浓缩体积至2~4mL 4℃以PBS缓冲液透析过夜,取蛋白溶液进行SDS-PAGE检测。

[0035] 1.7.6复性蛋白纯化上清蛋白溶液用0.22μm过滤器过滤备用;按Ni-NTA柱料准备流程准备Ni-NTA柱;以1mL/min的流速上样上清蛋白溶液;以0.1mol/L EDTA溶液洗柱至流出液不含蛋白;分别以20mmol/L、60mmol/L、200mmol/L和50mmol/L咪唑洗脱,分段收集洗脱液至G250检测液不变色;以3倍柱体积去离子水洗涤柱料,以20%乙醇封柱;对收集的洗脱液进行SDS-PAGE电泳检测。

[0036] 1.8间接ELISA检测方法的建立

[0037] 1.8.1抗原包被浓度及阳性血清稀释度的筛选采用棋盘法,将纯化后的RPS11蛋白用0.05mol/LpH9.6的碳酸盐缓冲液(包被液)分别稀释至4.0、2.0、1.0、0.51μg/mL,取酶联反应板,4℃过夜,用200μLPBST溶液洗涤3次,加入200μL/孔0.05%脱脂奶的PBST溶液37℃封闭1h,洗涤3次。每孔分别按1:100,1:200,1:400,1:800,1:1600,1:3200,加入100μL稀释的制阴、阳性血清,37℃孵育45min;洗涤3次,按100μL/孔加入辣根过氧化物酶标兔抗羊IgG(Rbanti-Goat IgG/HRP),37℃作用30min,洗涤5次;50μL/孔加入显色液10min;按50μL/孔加入2mol/L H₂SO₄终止液终止显色,于酶标仪OD₄₅₀检测,根据OD₄₅₀值计算相应的P/N值,选择阳性血清OD₄₅₀接近于1.0,阴性血清对应孔OD₄₅₀值接近于0.2,且其P/N值对应的最大值作为最佳反应条件,以确定抗原最佳包被浓度及阳性血清稀释度。

[0038] 1.8.2酶标二抗最佳工作浓度的确定以选定的抗原包被浓度和阳性血清稀释度,将酶标兔抗羊IgG分别按将1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:10000稀释,比较各组OD₄₅₀测定值,以P/N最大值为酶标二抗最佳工作浓度。

[0039] 1.8.3待检血清作用时间的选择加入待检阳性血清,分别在37℃条件下孵育30、45、60、75、90、120min后进行检测,比较各组OD₄₅₀测定值以P/N最大值为最佳作用时间。

[0040] 1.8.4酶标二抗反应时间的优化加入酶标二抗,分别在37℃条件下孵育30、45、60、75、90、120min后进行检测,选定P/N最大值为二抗最佳反应时间。

[0041] 1.8.5 TMB底物反应时间的选择在选定条件下,加入TMB显色溶液分别在时间分别37℃条件下孵育5、10、15、20、25min,加入50μL2mol/LH₂SO₄终止反应,以P/N最大值为最佳反应时间。

[0042] 1.8.6临界值的确定及判定方法用选定的最佳反应条件下建立的间接ELISA检测

方法测定36份羊阴性血清OD₄₅₀值,计算其平均值($\bar{x}$)和标准差(s);当OD₄₅₀值 $\geq \bar{x}+3s$ 即判定为阳性,OD₄₅₀值 $\leq \bar{x}+2s$ 即判定为阴性, $\bar{x}+2s < OD_{450} < \bar{x}+3s$ 即判定为可疑。

[0043] 1.8.7特异性交叉检测试验分别选择羊口蹄疫、布鲁氏菌阳性血清,应用建立的间接LISA检测方法进行交叉检测,每份血清重复检测6孔,比较其特异性。

[0044] 1.8.8临床样本检测应用建立的间接LISA检测方法对从4个生产羊场采集的共180份临床非免疫血清样本进行检测,并与羊传染性胸膜间接血凝检测试验进行比较,计算符合率。

[0045] 2实验结果

[0046] 2.1重组质粒构建与验证

[0047] pET28a-RPS11质粒经过BamHI和XhoI双酶切后,电泳可见在5000bp和500bp附近出现2条条带,说明目的基因已经正确构建到pET28a上(图1)。

[0048] 2.2重组RPS11蛋白的原核表达、鉴定与纯化

[0049] pET28a-RPS11表达蛋白经过超声波破碎、离心后,分别取上清和沉淀进行SDS-PAGE电泳,结果显示,pET28a-RPS11主要以包涵体的形式存在;包涵体蛋白经复性及Ni-NTA纯化处理后,获得了大小为19kDa的重组RPS11蛋白3mg,重组蛋白纯度 $>85\%$ (图2)。

[0050] 2.3间接ELISA反应条件的选择

[0051] 从方阵试验结果可以看出,pET28a-RPS11抗原浓度为1.0 $\mu\text{g/mL}$,血清的稀释度为1:400时,阳性血清的OD₄₅₀值在1.0左右,且阴性血清的OD₄₅₀较低,P/N值最高(表1)。因此确定pET28a-RPS11抗原最佳包被浓度为1.0 $\mu\text{g/mL}$,血清最佳稀释度为1:400。按上述条件继续进行后续条件筛选,根据P/N值的大小明确了血清最佳作用时间为45min,酶标二抗最佳工作浓度为1:4000,酶标二抗反应时间为30min,底物显色为10min。

[0052] 表1重组蛋白抗原最适包被浓度与血清稀释度的确定

[0053]

重组蛋白浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		血清稀释度					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
4.0	P	1.813	1.436	1.215	1.143	0.834	0.739
	N	0.386	0.382	0.337	0.278	0.294	0.270
	P/N	4.697	3.759	3.605	4.112	2.837	2.737
2.0	P	1.762	1.413	1.113	1.063	0.821	0.672
	N	0.373	0.296	0.270	0.239	0.232	0.211
	P/N	4.724	4.774	4.122	4.448	3.539	3.185
1.0	P	1.732	1.402	1.072	1.106	0.716	0.653
	N	0.354	0.284	0.203	0.220	0.191	0.183
	P/N	4.893	4.937	5.280	5.027	3.749	3.568
0.5	P	1.561	1.454	1.126	0.922	0.702	0.612
	N	0.207	0.278	0.225	0.195	0.193	0.172
	P/N	7.541	5.230	5.004	4.728	3.637	3.558

[0054] 2.4临界值的确定

[0055] 在抗原包被浓度为1.0 $\mu\text{g/mL}$,血清稀释度为1:400实验条件下,对36份阴性血清进

行检测(表2)。计算其平均值 $\bar{x}=0.245$,标准差 $s=0.047$ 。故当 OD_{450} 值 ≥ 0.386 判定为为阳性, OD_{450} 值 ≤ 0.339 即判定为阴性, $0.339 < OD_{450}$ 值 < 0.386 即判定为可疑。

[0056] 表2 36份阴性血清检测结果

[0057]

血清编号		OD ₄₅₀				
1-6	0.303	0.286	0.311	0.225	0.290	0.273
7-12	0.284	0.198	0.194	0.257	0.273	0.230
13-18	0.224	0.274	0.305	0.252	0.312	0.139
19-24	0.193	0.229	0.138	0.228	0.260	0.185
25-30	0.251	0.295	0.249	0.278	0.267	0.264
31-36	0.220	0.277	0.275	0.171	0.179	0.246

[0058] 2.5特异性交叉检测

[0059] 应用建立的间接LISA检测方法对羊口蹄疫、布鲁氏菌阳性血清检测结果均为阴性,表明无交叉特异性反应。

[0060] 2.6临床样本检测

[0061] 应用建立的间接ELISA检测方法和间接血凝检测方法分别对180份生产场临床血清样本进行检测(表3)。结果表明,间接ELISA检测阳性率为35.00%,阴性率为65.00%;间接血凝检测阳性率为29.44%,阴性率为70.56%;两者间阳性符合率为94.34%,阴性符合率为89.76%,总符合率达91.11%。

[0062] 表3 180份临床血清间接ELISA与HI试验检测结果

[0063]

检测方法		HI 试验 HI test		合计 Total
		+	-	
间接 ELISA	+	50	13	63
Indirect ELISA	-	3	114	117
合计 Total		53	127	180

[0064] 3结论与分析

[0065] 3.1本试验通过羊传染性胸膜肺炎支原体菌株全基因序列设计引物扩增目的基因RPS11进行克隆,构建重组质粒pET28a-RPS11,成功转化至大肠杆菌Rosetta感受态细胞中,并通过包涵体诱导表达重组RPS11蛋白并鉴定及纯化。SDS-PAGE检测鉴定试验结果表明,经大肠杆菌表达系统表达的pET28a-RPS11重组蛋白分子量正确,纯化后的重组蛋白总量有3mg,分子量大小约19kDa,蛋白纯度为85%,具有良好的抗原性及特异性。

[0066] 3.2本研究基于原核表达的RPS11重组蛋白作为包被抗原建立的羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测方法,具有较好的检测敏感性和特异性,与羊传染性胸膜间接血凝检测方法相比,两者符合率达91.11%,与其他学者建立的间接ELISA检测符合率^[10-13]的结果相符。该方法适用于基层兽医实验室开展血清学检测诊断及流行病学调查,为诊断试剂盒的研发奠定了良好的技术基础。

[0067] 当然,以上只是本发明的具体应用范例,本发明还有其他的实施方式,凡采用等同

替换或等效变换形成的技术方案,均落在本发明所要求的保护范围之内。

序列表

<110>	贵州省畜牧兽医研究所	
<120>	羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法	
<160>	2	
<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	羊肺炎支原体 (<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>)	
<400>	1	
	ggatccatgg caactaatac tcgt	24
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	羊肺炎支原体 (<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>)	
<400>	2	
	ctcgagcctt ttttcctgac g	21

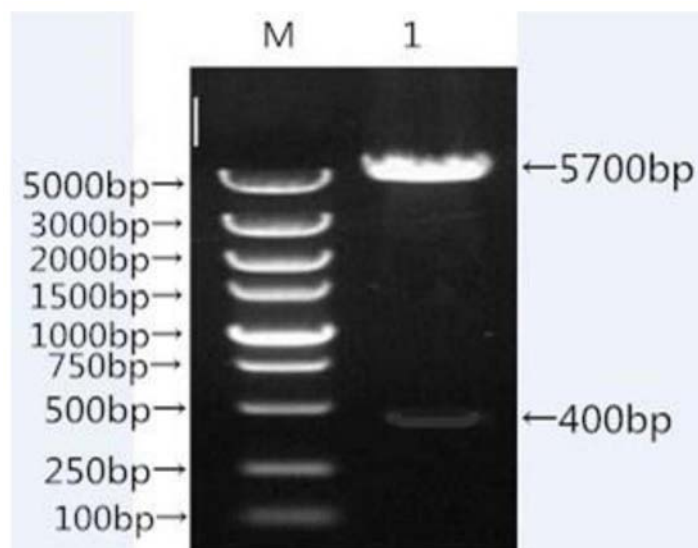


图1

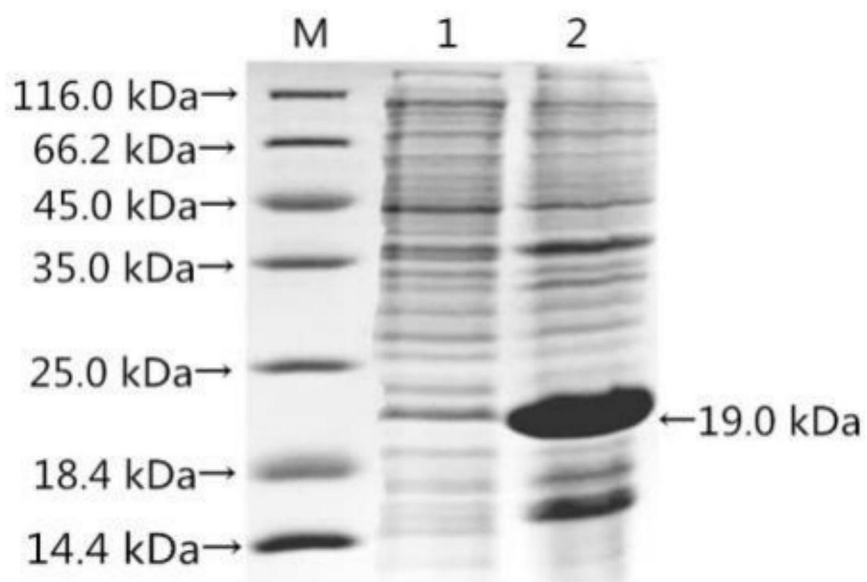


图2

专利名称(译)	羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法		
公开(公告)号	CN109781973A	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201910092874.7	申请日	2019-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	贵州省畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	贵州省畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	贵州省畜牧兽医研究所		
[标]发明人	文正常 王璇 潘淑惠 吴珣彤		
发明人	文正常 王璇 潘淑惠 吴珣彤		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 C12N15/70 C12N15/31		
代理人(译)	李余江		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种羊传染性胸膜肺炎间接ELISA检测诊断试剂制备方法，以羊传染性胸膜肺炎支原体菌株BNCC126187株(*Mycoplasma ovipneumoniad*)基因组DNA为模板，通过PCR扩增目的基因RPS11，将其克隆到pET28a(+)载体，成功构建了重组质粒pET28a-RPS11，并转化至大肠杆菌Rosetta感受态细胞中，通过包涵体诱导表达重组RPS11蛋白并鉴定及纯化。本发明完成了RPS11蛋白的重组表达，制备出特异性较好的选择性免疫抗原，建立的间接ELISA检测方法为羊传染性胸膜肺炎的血清学检测诊断及流行病学调查提供了有效的技术手段。

