(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101701033 B
(45)授权公告日 2012.08.29

(21)申请号 200910309580.1

(22)申请日 2009.11.12

(73)专利权人 上海交通大学
地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72)发明人 华修国 袁聪俐 朱凝瑜 杨筱薇 杨志彪 崔立

(74)专利代理机构 上海交达专利事务所 31201
代理人 王锡麟 王桂忠

(51)Int.Cl.
C07K 14/29(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)
C07K 16/12(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

张浩等．单抗捕捉 ELISA 检测猪附红细胞体血清抗体方法的建立．《中国兽医杂志》.2008, 第 44 卷（第 9 期）, 第 16-18 页．

贾立军等．猪附红细胞体解离方法的比较．《延边大学农学学报》.2004, 第 26 卷（第 4 期）, 第 229-232 页．

黄占欣等．牛附红细胞体病双抗体夹心 ELISA 诊断方法的建立．《黑龙江畜牧兽医》.2007,（第 10 期）, 第 11-13 页．

贾立军等．猪附红细胞体解离方法的比较．《延边大学农学学报》.2004, 第 26 卷（第 4 期）, 第 229-232 页．

张浩等．单抗捕捉 ELISA 检测猪附红细胞体血清抗体方法的建立．《中国兽医杂志》.2008, 第 44 卷（第 9 期）, 第 16-18 页．

审查员 张锦广

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54)发明名称

猪附红细胞体抗原、抗体、样品的制备方法

(57)摘要

一种免疫技术领域的猪附红细胞体抗原、抗体、样品的制备方法，其中，抗原的制备方法，包括如下步骤：取感染附红细胞体的猪血，制备红细胞泥；PBS 悬浮红细胞泥，水浴，离心，取上清；滤膜过滤上清，得滤液，之后超速离心得沉淀，PBS 重悬，裂解，离心得上清，即猪附红细胞体抗原；抗体的制备方法，包括如下步骤：取猪附红细胞体抗原，制备血清；将血清与健康猪血红细胞泥混合，孵育，离心，取上清，纯化上清，得 IgG 抗体；样品的制备方法，包括如下步骤：取待检的猪血液，制备得红细胞泥；用预冷 PBS 洗涤红细胞泥，生理盐水悬浮，加 Tris-Hcl 裂解，超速离心，PBS 悬浮沉淀，得样品。在本发明的基础上，可方便地应用双抗夹心 ELISA 法检测猪附红细胞体。

CN 101701033 B

1. 一种猪附红细胞体抗原的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

步骤一，取感染附红细胞体的猪血，用淋巴分离液去除血液中的白细胞、血小板及细胞碎片，得红细胞泥；

步骤二，PBS 悬浮红细胞泥，置于解离试剂中水浴，离心，取上清；

所述水浴具体为 50℃水浴 30min；

所述解离试剂为：加入了 Tween-20 及 EDTA 的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液，其中，Tween-20 的最终体积分数为 0.15%，EDTA 的最终质量体积百分数为 3%；

所述离心具体为 1600rpm 离心 10min；

步骤三，滤膜过滤上清，得滤液，之后超速离心得沉淀，PBS 重悬，裂解，离心得上清，即猪附红细胞体抗原；

所述过滤具体为使用 1.2μm 滤器过滤；

所述超速离心具体为：12000rpm 离心 1h。

猪附红细胞体抗原、抗体、样品的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫技术领域的抗原、抗体、样品的制备方法，具体是一种猪附红细胞体双抗夹心 ELISA（酶联免疫吸附试验）方法中抗原、抗体、样品的制备方法。

背景技术

[0002] 附红细胞体病 (Eperythrozoonosis) 是由附红细胞体 (hemoplasmas) 寄生于红细胞表面、血浆及骨髓内引起的以红细胞压积降低、血红蛋白浓度下降、白细胞增多、贫血、黄疸、发热为主要临床特征的人兽共患传染病。由于该病分布范围广、多呈隐性感染、感染宿主多，给人的健康和畜牧业的发展造成巨大的危害及公共卫生问题。近年来国内外医学工作者对附红细胞体病进行了深入的研究，特别是上世纪八十年代以来，报道人及畜禽等附红细胞体病的爆发流行，越来越引起了国内外学者对该病的高度重视。

[0003] 目前附红细胞体的检测方法有显微镜检测、血清学检测、PCR 检测方法等。但目前最常用的检测方法是血液直接镜检或血涂片 Giemsa 染色；直接镜检以红细胞变形作为附红细胞体感染的诊断依据特异性较差，因为附红细胞体不是引起红细胞变形的唯一原因，人为因素、宿主感染了其他的病原都会对结果产生影响，容易出现假阳性。血涂片染色镜检操作方便，准确性较鲜血直接镜检高，但检测结果与操作者的经验密不可分。

[0004] 经对现有技术的文献检索发现，Hoelzle 等在《Haemotrophic mycoplasmas：Recentadvances in Mycoplasma suis》中指出通过显微技术检测附红细胞体特异性及敏感性较差，而 PCR 等分子生物学方法操作步骤复杂，试剂及仪器要求较高，故需开发一种快速高效的 ELISA 检测技术具有重要意义。双抗夹心 ELISA 方法主要用于检测大分子抗原，具有较高的敏感性和特异性，现有技术中，双抗夹心 ELISA 的具体操作流程已经标准化，应用该方法的关键在于制备相应的包被抗体及待检抗原，现有技术中，没有披露有关应用双抗夹心 ELISA 检测附红细胞体所需包被抗体及待检抗原的制备方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足，提供一种猪附红细胞体抗原、抗体、样品的制备方法。本发明提供了双抗夹心 ELISA 检测附红细胞体所需包被抗体及待检抗原、以及所需检测样品的制备方法；本发明可方便地应用双抗夹心 ELISA 法检测猪附红细胞体。

[0006] 本发明涉及一种猪附红细胞体抗原的制备方法，包括如下步骤：

[0007] 步骤一，取感染附红细胞体的猪血，用淋巴分离液去除血液中的白细胞、血小板及细胞碎片，得红细胞泥；

[0008] 步骤二，PBS 悬浮红细胞泥，置于解离试剂中水浴，离心，取上清；

[0009] 步骤三，滤膜过滤上清，得滤液，之后超速离心得沉淀，PBS 重悬，裂解，离心得上清，即猪附红细胞体抗原。

[0010] 步骤二中，所述解离试剂为：所述解离试剂为：加入了 Tween-20 及 EDTA 的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液，其中，Tween-20 的最终体积分数为 0.15％，EDTA 的最终质量体积百分数

为 3%。

[0011] 步骤二中，所述水浴具体为 50℃水浴 30min。

[0012] 步骤二中，所述离心具体为 1600rpm 离心 10min。

[0013] 步骤三中，所述过滤具体为使用 1.2μm 滤器过滤。

[0014] 步骤三中，所述超速离心具体为：12000rpm 离心 1h。

[0015] 本发明还涉及一种猪附红细胞体抗体的制备方法，包括如下步骤：

[0016] 步骤一，取猪附红细胞体抗原，按常规方法免疫家兔和小鼠，得血清；

[0017] 步骤二，将血清与健康猪血红细胞泥混合，孵育，离心，取上清；

[0018] 步骤三，采用硫酸铵盐析法纯化上清，得 IgG 抗体。

[0019] 本发明还涉及一种猪附红细胞体样品的制备方法，包括如下步骤：

[0020] 步骤一，取待检的猪血液，用淋巴分离液除去白细胞、血小板及细胞碎片，得红细胞泥；

[0021] 步骤二，用预冷 PBS 洗涤红细胞泥，生理盐水悬浮，加 Tris-Hcl 裂解，超速离心，PBS 悬浮沉淀，得样品。

[0022] 步骤二中，所述 PBS 的 pH 为 7.4。

[0023] 步骤二中，所述裂解为 4℃下裂解 1h。

[0024] 与现有技术相比，本发明具有如下的有益效果：本发明提供了双抗夹心 ELISA 检测附红细胞体所需包被抗体及待检抗原、以及所需检测样品的制备方法；在本发明的基础上，可方便地应用双抗夹心 ELISA 法检测猪附红细胞体；采用双抗夹心 ELISA 方法加强了抗原抗体反应的特异性，减少了假阳性结果，双抗夹心 ELISA 方法具有较高的灵敏度，测得抗原的最低检出量为 3.812μg/ml，即最低检出率下限为 1ml 感染率 0.2%的血液样品；同时，本发明中的样品制备方法可将全血样品裂解离心后直接用于检测，在大规模检测时，省去了提纯附红细胞体的繁琐操作，能更快速有效地检测附红细胞体。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等分子克隆：实验室手册 (New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0026] 实施例 1

[0027] 猪附红细胞体抗原的制备

[0028] 步骤一，从感染附红细胞体的巴马小型猪无菌前腔静脉采集 ACD 抗凝血，采用淋巴细胞分离液 (Axis-shield 公司，挪威，型号为 LymphoprepTM) 经 3000rpm 离心 20min 分离出抗凝血中的白细胞、血小板及细胞碎片等组分，然后收集红细胞泥；

[0029] 步骤二，用 PBS 悬浮，置于解离试剂中 50℃水浴中热致敏 30min，所述解离试剂为：加入了 Tween-20 及 EDTA 的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液，其中，Tween-20 的终浓度为 0.15% (V/V)，EDTA 的终浓度为 3% (W/V)。1600rpm 离心 10min，收集上清液；其中，PBS 配制过程为：8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4，溶于 800ml 蒸馏水中，用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4，最后加蒸馏水定容至 1L，即得。

[0030] 步骤三，经 1.2μm 滤器过滤后，滤液 12000rpm 离心 1h，沉淀即为附红细胞体，沉淀经 PBS 反复离心洗涤 3 次后去除残余宿主血浆蛋白，加 1ml PBS 重悬沉淀，超声波裂解 10min，得裂解液；裂解液 2000rpm 离心 10min；取上清液用紫外分光光度计测定其蛋白含量，-20℃保存

[0031] 实施例 2

[0032] 猪附红细胞体抗体的制备

[0033] 步骤一，对镜检及 PCR 检测阴性的家兔和小鼠采集抗凝血，4℃过夜，2000rpm 离心 5min，分离上清液作为阴性对照，-20℃保存。

[0034] 步骤二，按常规方法免疫家兔和小鼠（首免加入弗氏完全佐剂，二免加入弗氏不完全佐剂），最后一次免疫 2 周后心脏采血分离血清；

[0035] 步骤三，将血清与健康猪血红细胞泥 37℃孵育 1h，离心取上清（去除非特异性结合蛋白）；

[0036] 步骤四，将上清用硫酸铵盐析法纯化 IgG 抗体，-20℃保存。

[0037] 步骤五，间接 ELISA 法检测抗体效价。用 100μl 抗原（实施例 1 中的猪附红细胞体纯化抗原，10.2μg/ml）包被 96 孔酶标板，设空白对照，4℃过夜；弃掉包被液，以 PBST 洗涤液洗涤 3 次，每次 3 ～ 5min；每孔加入封闭液（1％明胶）200μl，37℃孵育 1h 后洗涤；将待测抗体（步骤二中的兔源、鼠源抗体）与阴性抗体（步骤一中的兔源、鼠源阴性血清）分别稀释 100、200、400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200 倍，每孔分别加入 100μl 不同稀释倍数的待测抗体，设相应的阴性对照和空白对照，37℃反应 1h，洗涤；每孔加入 100μl 辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG，37℃作用 1h，洗涤；每孔加底物 TMB 溶液 100μl，室温下闭光反应 10min。用酶标仪在波长 450nm 条件下测定各孔 OD 值。以测定孔 OD 值 (P)/ 阴性对照孔 OD 值 (N) ≥ 2.1 判为阳性，P/N ＜ 1.5 为阴性。结果显示鼠源抗体效价为 1 ： 1600，比值为 2.667；兔源抗体效价为 1 ： 25600，比值为 2.550。

[0038] 实施例 3

[0039] 猪附红细胞体样品的制备

[0040] 将 1ml 感染附红细胞体抗凝血样经 2000rpm 离心 15min；用 1ml 生理盐水将红细胞泥悬浮，加入等体积的淋巴细胞分离液 3000rpm 离心 20min，弃上清和白细胞，将剩余的红细胞用预冷 PH 7.4PBS 洗涤 2 次；生理盐水悬浮后，加入 3 倍体积 pH 7.4 的 Tris-Hcl，4℃作用 1h 裂解红细胞。12000rpm 离心 1h，沉淀用 100μl pH 7.4 的 PBS 悬浮，4℃保存。

[0041] 实施例 4

[0042] (1) 双抗夹心 ELISA 操作程序

[0043] 步骤一，用 100μl 捕获抗体（实施例 2 得到的鼠源抗体）包被 96 孔酶标板，设阴性对照和空白对照，4℃过夜；

[0044] 步骤二，弃掉包被液，以洗涤液洗涤 3 次，每次 3 ～ 5min；

[0045] 步骤三，每孔加入封闭液 200μl，37℃孵育 1h 后洗涤；

[0046] 步骤四，每孔加入 100μl 抗原，37℃反应 1h，洗涤；

[0047] 步骤五，每孔加入 100μl 检测抗体，37℃反应 1h，洗涤；

[0048] 步骤六，每孔加入 100μl 辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG，37℃下 1h，洗涤；

[0049] 步骤七，每孔加底物溶液 100μl，室温下闭光反应 10min；

[0050] 步骤八，每孔加入终止液 50μl 终止反应，用酶标仪在波长 450nm 条件下测定各孔 OD 值。P/N ≥ 2.1 的样品为阳性，1.5 ≤ P/N ≤ 2.1 为可疑，P/N < 1.5 为阴性。

[0051] (2) 双抗夹心 ELISA 反应参数的确定

[0052] 分别对捕获抗体的稀释倍数、包被时间、封闭条件、检测抗体稀释倍数、酶标二抗的稀释倍数、反应时间、显色时间等反应条件进行优化。(以鼠源抗体作为捕获抗体，兔源抗体作为检测抗体)

[0053] 用包被液将鼠源抗体、阴性血清分别作 50、100、200、400、800、1600、3200 倍稀释，包被 96 孔酶标板，设空白对照，分别 37℃下作用 2h 和 4℃过夜。封闭；按阳性抗原 1 ： 100 稀释；兔源抗体 1 ： 100 稀释；酶标二抗 1 ： 4000 稀释进行双抗夹心 ELISA，每个稀释倍数及作用条件各做 3 个重复，取其平均值。当捕获抗体 1 ： 200 稀释，4℃包被过夜时，P/N 值为 6.298，最佳。

[0054] 捕获抗体按最佳条件包被酶标板，分别用 1％明胶溶液，5％脱脂奶粉，2.5％ BSA 作为封闭液，设空白对照，于 37℃分别作用 1h、2h，按阳性抗原 1 ： 100 稀释；兔源抗体 1 ： 100 稀释；酶标二抗 1 ： 4000 稀释进行双抗夹心 ELISA，每种封闭液及作用条件各做 3 个重复，取其平均值。当 1％明胶溶液 37℃封闭 1h 时，P/N 值为 2.642，最佳。

[0055] 捕获抗体按最佳条件及时间包被酶标板，最佳条件封闭，阳性抗原 1 ： 100 稀释，兔源抗体、阴性血清分别作 50、100、200、400、800、1600、3200 倍稀释，设空白对照，37℃作用 1h，酶标二抗 1 ： 4000 稀释，进行双抗夹心 ELISA，每个稀释倍数做 3 个重复，取其平均值。当检测抗体 1 ： 400 稀释时，P/N 值为 7.071，最佳。

[0056] 捕获抗体按最佳条件包被酶标板，最佳条件封闭，阳性抗原 1 ： 100 稀释，检测抗体按最佳条件稀释，酶标二抗按 2000、4000、8000、16000 倍稀释，设空白对照，37℃作用 1h，进行双抗夹心 ELISA，每个稀释倍数做 3 个重复，取其平均值。当酶标二抗 1 ： 8000 稀释时，P/N 值为 4.484，最佳。

[0057] 捕获抗体按最佳条件包被酶标板，最佳条件封闭，阳性抗原 1 ： 10 稀释，检测抗体按最佳条件稀释，酶标二抗按最佳条件稀释，分别室温及 37℃避光显色 10min，各做 3 个重复，取其平均值。当 37℃显色 10min 时，P/N 值为 5.023，最佳。

[0058] (3) 双抗夹心 ELISA 检测方法的评估：

[0059] ①敏感性实验

[0060] 将阳性抗原作 50、100、200、400、800、1600、3200、6400 倍稀释，按最佳条件进行双抗夹心 ELISA，每个稀释度做 3 个重复，分别测定其光密度值，取其平均值，P/N 值大于 2.1 时阳性抗原最大稀释倍数所对应的抗原浓度即为抗原最低检出量。结果表明当阳性抗原 3200 倍稀释 (3.812μg/ml) 时符合上述要求，所以抗原的最低检出量为 3.812μg/ml。

[0061] ②特异性阻断实验

[0062] 将阳性抗原分别与按最佳条件稀释后的兔抗附红细胞体及鼠抗附红细胞体的阳性、阴性血清混合，4℃过夜，37℃孵育 1h 后进行双抗体夹心 ELISA 检测，计算阻断率。阻断率＝ $(OD_{Neg}-OD_{Test})/OD_{Neg}\times 100\%$。阻断率小于 30％为阴性，阻断率在 30％～ 40％之间为可疑，大于 40％为阳性。结果表明，阴性血清不能阻断抗原的显色反应，而抗附红细胞体的鼠源、兔源阳性抗体可阻断抗原的显色反应，且 P/N 值在 1.5 以下，阻断率分别为 62％和 69％，表明反应具有特异性。

[0063] ③交叉性实验

[0064] 附红细胞体与健康小型猪血液中纯化蛋白、大肠杆菌 DH 5a、链球菌 II 型、伤寒沙门氏菌对照进行 ELISA 试验，每种病原做 3 个重复。结果显示只有附红细胞体产生阳性反应，而宿主蛋白、大肠杆菌 DH 5a、链球菌 II 型、伤寒沙门氏菌呈阴性。表明抗体只与相应的抗原反应，具有特异性。

[0065] ④重复性实验

[0066] 将附红细胞体、步骤二、三处理后的阳性血样和阴性血样各 5 份按已建立的双抗体夹心 ELISA 法重复检测 3 次，发现光密度值波动很小 ($P > 0.05$)，差异不显著，表明本法重复性很好。

专利名称(译)	猪附红细胞体抗原、抗体、样品的制备方法		
公开(公告)号	CN101701033B	公开(公告)日	2012-08-29
申请号	CN200910309580.1	申请日	2009-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	华修国 袁聪俐 朱凝瑜 杨筱薇 杨志彪 崔立		
发明人	华修国 袁聪俐 朱凝瑜 杨筱薇 杨志彪 崔立		
IPC分类号	C07K14/29 C07K1/14 C07K16/12 G01N33/531		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
其他公开文献	CN101701033A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种免疫技术领域的猪附红细胞体抗原、抗体、样品的制备方法，其中，抗原的制备方法，包括如下步骤：取感染附红细胞体的猪血，制备红细胞泥；PBS悬浮红细胞泥，水浴，离心，取上清；滤膜过滤上清，得滤液，之后超速离心得沉淀，PBS重悬，裂解，离心得上清，即猪附红细胞体抗原；抗体的制备方法，包括如下步骤：取猪附红细胞体抗原，制备血清；将血清与健康猪血红细胞泥混合，孵育，离心，取上清，纯化上清，得IgG抗体；样品的制备方法，包括如下步骤：取待检的猪血液，制备得红细胞泥；用预冷PBS洗涤红细胞泥，生理盐水悬浮，加Tris-Hcl裂解，超速离心，PBS悬浮沉淀，得样品。在本发明的基础上，可方便地应用双抗夹心ELISA法检测猪附红细胞体。