



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106324238 A

(43)申请公布日 2017.01.11

(21)申请号 201610702636.X

(22)申请日 2016.08.22

(71)申请人 吉林大学

地址 130011 吉林省长春市前进大街2699号

(72)发明人 宫鹏涛 刘伟建 杨正涛 张西臣  
寇金华 李建华 杨举 李赫  
李棕松

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有  
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51)Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒及其制备方法,利用弓形虫表面蛋白SAG3作为包被抗原,检测血清中弓形虫抗体,经过HRP标记的山羊抗猫IgG作为检测抗体,建立间接了ELISA方法,具有较强的特异性、敏感性和重复性;本发明主要试剂除洗涤液是粉末状以外,水溶解后可直接应用,用于本试剂盒主要面对实验室检测洗涤液为基本溶液,其余均以液体工作液的形式存在,使用方便;本发明为大样本检测及流行病学调查提供了一种既方便又可靠的免疫学诊断方法;为猫弓形虫病的诊断提供了依据。

1. 一种猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒,其特征主要在于主要由以下部分组成:

包被抗原、包被液、封闭液、样品稀释液及洗涤液、辣根过氧化物酶标记的二抗、底物显色液、试验终止液、阳性参照血清、阴性参照血清、96孔可拆聚苯乙烯塑料反应板构成:

包被抗原为弓形虫表面蛋白SAG3,蛋白浓度为 $3.7\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ;

包被液为 $0.05\text{M}$ 碳酸盐缓冲液 $\text{pH } 9.6$ ;

封闭液为5%的脱脂奶粉;

样品稀释液及洗涤液为 $0.5\%$  Tween-20的磷酸盐缓冲液;

辣根过氧化物酶标记的二抗为山羊抗猫IgG;

底物显色液为TMB溶液;

终止液为 $2\text{mol/L}$ 的硫酸溶液;

参照阳性血清和阴性参照血清。

2. 如权利要求1所述的猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

1) 抗原制备:利用基因工程技术将目的基因在大肠杆菌中诱导表达,鉴定出表达正确后挑取菌落,扩大培养后进行保菌;对鉴定正确的重组蛋白进行诱导后,离心收集菌体,用PBS将菌体重悬,超声仪破碎菌体后, $1200\text{rpm}$ 离心 $10\text{min}$ 中后取沉淀;用 $2\text{M}$ 尿素充分吹打沉淀后 $8000\text{rpm}$ 离心 $10\text{min}$ 后弃上清取沉淀,如此反复进行5次,用 $8\text{M}$ 尿素将沉淀充分溶解, $8000\text{rpm}$ 离心 $10\text{min}$ ,取上清,弃沉淀;上清便为纯化的SAG3蛋白;

2) SAG3蛋白的透析与复性:将透析袋放入蒸馏水中浸泡 $10\text{min}$ 进行活化;把纯化后的蛋白放入活化好的透析袋中,用密封夹子将其夹紧;取烧杯分别加入 $6\text{M}$ 、 $4\text{M}$ 、 $2\text{M}$ 、 $1\text{M}$ 、 $0\text{M}$ 尿素透析液,置于磁力搅拌器上, $4^\circ\text{C}$ 透析 $6\text{h}$ 以上;透析结束后吸取透析袋中的蛋白, $12000\text{rpm}$ 离心 $5\text{min}$ 后,吸取上清,弃掉沉淀;上清液便为SAG3蛋白, $-20^\circ\text{C}$ 保存;

3) 包被液:取 $1.59\text{g}$   $\text{NaCO}_3$ 、 $2.93\text{g}$   $\text{NaHCO}_3$ 、加入 $80\text{mL}$ 水,玻璃棒搅拌溶解,PH值调节至 $9.6$ ,取 $100\text{mL}$ 容量瓶定容至 $100\text{mL}$ , $4^\circ\text{C}$ 保存;

4) 封闭液:取脱脂奶粉 $5\text{g}$ ,加入 $100\text{mL}$  PBST溶解,封闭液需要先用现配;

5) 样品稀释液及洗涤液(PBST):取 $\text{NaCl } 8\text{g}$ 、 $\text{KCl } 0.2\text{g}$ 、 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O } 2.9\text{g}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.2\text{g}$ 、Tween-20  $0.5\text{mL}$ 加入 $800\text{mL}$ 水搅拌溶解,取 $1000\text{mL}$ 容量瓶定容;

6) 辣根过氧化物酶标记的二抗:商品化的辣根过氧化物酶标记的山羊抗猫IgG;

7) 底物显色液:底物显色液A:醋酸钠 $13.6\text{g}$ 、柠檬酸 $1.6\text{g}$ 、 $30\%$ 双氧水 $0.3\text{mL}$ 加入蒸馏水定容至 $500\text{mL}$ ;底物显色液B:二胺四乙酸二钠 $0.2\text{g}$ 、柠檬酸 $0.95\text{g}$ 、甘油 $50\text{mL}$ 、TMB溶于 $3\text{mL}$  DMSO加蒸馏水定容至 $500\text{mL}$ ;

8) 终止液:取 $\text{H}_2\text{SO}_4 22.2\text{mL}$ ,水 $178.8\text{mL}$ ,室温保存。

## 猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测猫弓形虫血清抗体检测试剂盒及其制备方法,属于兽医生物技术领域。应用于检测猫弓形虫病。

### 背景技术

[0002] 猫弓形虫病是一种重要的人畜共患寄生虫病。猫是该病的终末宿主,几乎能感染所有温血动物,可导致孕妇(畜)流产,死胎、畸形、胎儿(幼畜)生长发育受阻、死亡。人类呈隐性感染。人群中的感染率较高,全球有约六分之一的人感染弓形虫病。弓形虫的感染会对免疫力低下的人群造成严重影响,因其会对人类的健康造成严重的威胁,所以在人医上是一种重要的疾病。

[0003] 已有研究发现,兔、鼠、狗、猫等十几种动物身上发现了弓形虫。猫是弓形虫的终末宿主,猫弓形虫的感染率为14.04%~78%。患病动物和带虫动物都可成为传染源。其中患病的猫科动物的粪便中存在大量的卵囊。因为其活动范围较广泛可对环境造成严重的污染,所以对猫科动物弓形虫的检测是控制该病的重点。近年来,由于人们生活水平的提高,家庭饲养猫、狗等宠物的数量逐年增加伴随而来的便是人类的感染率逐渐上升。为了避免这种现象的继续发展,建立一种灵敏、特异的检测猫类动物弓形虫的方法显得尤其重要。

[0004] 目前诊断弓形虫的方法主要包括:病原学、分子生物学及免疫学等方法。病原学方法费时、费力、敏感性低。分子生物学技术具有较高的敏感性和特异性,但需要昂贵的仪器设备,操作过程较复杂。免疫学检测方法包括染色试验(DT)、间接荧光抗体试验(IFAT)、间接血凝试验(IHA)、直接凝集试验(DAT)、改良凝集实验(MAT)、酶联免疫吸附试验(ELISA),综合比对各种检测方法,ELISA是最合适的检测方法,因其敏感性和特异性均较高,且危险性较低,所以适用于大量样本的检测。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种猫弓形虫血清抗体间接ELISA诊断试剂盒。本试剂盒以原核表达的重组蛋白为基础,通过酶联免疫技术研发而成。具有安全,高效,操作简便,快速,可商品化大量生产,制造成本低,易于推广等特点。本发明可应用于猫弓形虫病的检测。

#### [0006] 技术方案

[0007] 本发明的目的是以原核表达的重组蛋白为基础,通过酶联免疫技术研制一种检测猫弓形虫血清抗体的试剂盒。首先是猫弓形虫表面蛋白SAG3的表达及;重组蛋白包被酶标板;间接ELISA最佳反应条件的确定;试剂盒的组装;试剂盒阻断试验、特异性、敏感性、重复性试验;初步应用;最后成功制成猫弓形虫抗体检测试剂盒。

[0008] 本发明所述的一种猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒,其特征在于主要由以下部分组成:

[0009] 包被抗原、包被液、封闭液、样品稀释液及洗涤液、辣根过氧化物酶标记的二抗、底物显色液、试验终止液、阳性参照血清、阴性参照血清、96孔可拆聚苯乙烯塑料反应板构成:

- [0010] 包被抗原为弓形虫表面蛋白SAG3,蛋白浓度为3.7 $\mu$ g/ $\mu$ L;
- [0011] 包被液为0.05M碳酸盐缓冲液pH 9.6;
- [0012] 封闭液为5%的脱脂奶粉;
- [0013] 样品稀释液及洗涤液为0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液;
- [0014] 辣根过氧化物酶标记的二抗为山羊抗猫IgG;
- [0015] 底物显色液为TMB溶液;
- [0016] 终止液为2moI/L的硫酸溶液;
- [0017] 参照阳性血清和阴性参照血清。
- [0018] 本发明所述的猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒的制备方法,包括以下步骤:
- [0019] 1、抗原制备:利用基因工程技术将目的基因在大肠杆菌中诱导表达,鉴定出表达正确后挑取菌落,扩大培养后进行保菌;对鉴定正确的重组蛋白进行诱导后,离心收集菌体,用PBS将菌体重悬,超声仪破碎菌体后,1200rpm离心10min中后取沉淀;用2M尿素充分吹打沉淀后8000rpm离心10min后弃上清取沉淀,如此反复进行5次,用8M尿素将沉淀充分溶解,8000rpm离心10min,取上清,弃沉淀;上清便为纯化的SAG3蛋白;
- [0020] 2、SAG3蛋白的透析与复性:将透析袋放入蒸馏水中浸泡10min进行活化;把纯化后的蛋白放入活化好的透析袋中,用密封夹子将其夹紧;取烧杯分别加入6M、4M、2M、1M、0M尿素透析液,置于磁力搅拌器上,4 $^{\circ}$ C透析6h以上;透析结束后吸取透析袋中的蛋白,12000rpm离心5min后,吸取上清,弃掉沉淀;上清液便为SAG3蛋白,-20 $^{\circ}$ C保存;
- [0021] 3、包被液:取1.59g NaCO<sub>3</sub>、2.93g NaHCO<sub>3</sub>、加入80mI水,玻璃棒搅拌溶解,PH值调节至9.6,取100mI容量瓶定容至100mI,4 $^{\circ}$ C保存;
- [0022] 4、封闭液:取脱脂奶粉5g,加入100mI PBST溶解,封闭液需要先用现配;
- [0023] 5、样品稀释液及洗涤液(PBST):取NaCl 8g、KCl 0.2g、NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2.9g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、Tween-20 0.5mI加入800mI水搅拌溶解,取1000mI容量瓶定容;
- [0024] 6、辣根过氧化物酶标记的二抗:商品化的辣根过氧化物酶标记的山羊抗猫IgG;
- [0025] 7、底物显色液:底物显色液A:醋酸钠13.6g、柠檬酸1.6g、30%双氧水0.3mI加入蒸馏水定容至500mI;底物显色液B:二胺四乙酸二钠0.2g、柠檬酸0.95g、甘油50mI、TMB溶于3mIDMSO加蒸馏水定容至500mI;
- [0026] 8、终止液:取H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 22.2mI,水178.8mI,室温保存。
- [0027] 本发明将纯化好的SAG3蛋白包被96孔聚乙烯板,建立间接ELISA方法,对猫血清抗体进行检测。解决了目前猫血清抗体检测弓形虫的这一空白,本方法克服了已有检测弓形虫方法的特异性弱,敏感性低等缺点,对检测猫弓形虫病的提供了方法。
- [0028] 本发明试剂盒的检测原理:将弓形虫表面抗原SAG3蛋白包被于96孔聚乙烯酶标板,使其形成固相载体,PBST进行洗板清除孔内游离的抗体,加入待检血清,血清中的抗体可与固相载体上的抗原结合,洗板清除游结合不牢固的部分,加入HRP标山羊抗猫IgG,与酶标板上的抗原-抗体复合物相结合,再次洗板。加入TMB底物显色液,放入37 $^{\circ}$ C温箱进行孵育。加入硫酸溶液终止反应。酶标仪测定450nm波长的吸光度值(OD<sub>450nm</sub>值),OD<sub>450nm</sub>值大小与相应的待检血清抗体的含量呈正相关。
- [0029] 本发明积极效果在于:利用弓形虫表面蛋白SAG3作为包被抗原,检测血清中弓形虫抗体,经过HRP标记的山羊抗猫IgG作为检测抗体,建立间接了ELISA方法,具有较强的特

异性、敏感性和重复性；本发明主要试剂除洗涤液是粉末状以外，水溶解后可直接应用，用于本试剂盒主要面对实验室检测洗涤液为基本溶液，其余均以液体工作液的形式存在，使用方便；本发明为大样本检测及流行病学调查提供了一种既方便又可靠的免疫学诊断方法；为猫弓形虫病的诊断提供了依据。

## 附图说明

[0030] 图1为DS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

## 具体实施方式：

[0031] 下面结合具体实施方式对本发明进行详细说明，但实施例不对本发明的内容做出局限。

[0032] 实施例1：

[0033] 包被抗原SAG3蛋白的制备

[0034] 利用基因工程技术将目的基因在大肠杆菌中诱导表达，鉴定出表达正确后挑取菌落，扩大培养后进行保菌。对鉴定正确的重组蛋白进行诱导后，离心收集菌体，进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)观察表达结果(见图1)；

[0035] 1)配置300mL的LB培养基，高压灭菌；

[0036] 2)将摇菌过夜的5mL菌液移入(1)中的培养基中，并加入500 $\mu$ L的卡那霉素置于37 $^{\circ}$ C摇床中培养1.5~2h随时观察；

[0037] 3)加入300 $\mu$ L IPTG，继续置于摇床中诱导4~5h随时观察；

[0038] 4)收集菌液，4 $^{\circ}$ C8000rpm $\times$ 10min离心(下同)；

[0039] 5)PBS将沉淀重悬，超声破碎。离心，弃上清；

[0040] 6)用2M尿素重悬沉淀，离心，弃上清，反复此步骤3~4次；

[0041] 7)用8M尿素将沉淀重悬，且要尽快溶解沉淀；

[0042] 8)测定蛋白浓度；

[0043] 9)配制6M；4M；2M；1M；0M尿素进行梯度透析。

[0044] 实施例2：

[0045] 间接ELISA方法的建立

[0046] 1、抗原包被浓度及血清稀释度

[0047] 抗原的包被量为0.375 $\mu$ g/孔和血清稀释倍数1:800；

[0048] 2、酶标二抗工作浓度

[0049] 标二抗最佳工作浓度为1:5000；

[0050] 3、最佳封闭剂的选择

[0051] 封闭剂为5%脱脂奶粉；

[0052] 4、酶标二抗的最佳孵育时间

[0053] 二抗孵育时间为45min；

[0054] 5、性能的测定

[0055] (1)敏感性试验

[0056] 敏感性为1:25600(见表1)；

[0057] 表1

[0058] 敏感性试验结果

	血清稀释度								
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	25600
[0059] P	1.325	1.022	0.815	0.638	0.465	0.321	0.23	0.158	0.116
N	0.218	0.138	0.097	0.075	0.069	0.062	0.059	0.058	0.058
P/N	6.078	7.406	8.402	8.507	6.739	5.177	3.898	2.724	2.000

[0060] (2)特异性试验

[0061] 应用已建立好的间接ELISA方法,对猫杯状病毒标准阳性血清和猫传染性胃肠炎病毒标准阳性血清进行检测,结果表明该方法与两种标准阳性血清无交叉反应,特异性较好(见表3);表2

[0062] 特异性试验结果

	血清的种类			
	猫弓形虫 阳性血清	猫杯状病毒阳 性血清	猫传染性胃肠炎 病毒阳性血清	猫弓形虫 阴性血清
[0063] 两个	0.976	0.056	0.049	0.061
重复	1.103	0.034	0.046	0.064

[0064] (3)重复性试验

[0065] 选用11份血清经建立的双抗夹心ELISA方法进行批间批内重复性试验后得到,批内重复性试验的变异系数最大值为4.32%,批间变异系数最大值为5.51%,表明该方法重复性较好;

[0066] 批内批间重复性试验

样品 序号	批内重复		批间重复	
	平均数±SD	变异系数(%)	平均数±SD	变异系(%)
P1	0.463±0.0058	1.27	0.518±0.0127	2.00
P2	0.531±0.0188	3.53	0.436±0.0087	2.45
P3	0.448±0.0136	3.03	1.079±0.0202	1.87
P4	0.545±0.0109	1.94	0.436±0.0175	4.02
[0067] P5	0.476±0.0187	3.92	0.542±0.072	1.33
P6	0.637±0.0115	1.81	0.619±0.034	5.51
P7	0.475±0.0205	4.32	0.485±0.016	1.46
P8	0.483±0.0109	2.27	0.538±0.015	1.86
P9	0.132±0.0056	4.22	0.117±0.0025	2.14
P10	0.067±0.0012	1.76	0.054±0.001	1.85
P11	0.15±0.00519	3.46	0.132±0.0056	4.22

[0068] 实施例3

[0069] 检测猫弓形虫血清抗体间接ELISA试剂盒成份的组装

[0070] 检测试剂盒包括以下组分:

[0071] 1、弓形虫表面抗原SAG3蛋白(-20℃保存);

[0072] 2、包被液(0.05M碳酸盐缓冲液)PH(9.6):称取NaCO<sub>3</sub>1.59g;NaHCO<sub>3</sub>2.93g;蒸馏水

80mL,待其溶解后,调PH值9.6,定容至100mL;

[0073] 3、封闭液:称取5g脱脂奶粉加入PBST溶解后定容至100mL;

[0074] 4、洗涤液及样品稀释液(PBST):称取NaCl 8g;KCl 0.2g;NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2g;吐温-200.5ml;

[0075] 5、TMB底物显色液:按底物A液(称取TMB 200mg,加入无水乙醇100mL,调PH值5.0,加双蒸水定容至1000mL),与底物B液(称取柠檬酸9.33g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>14.60g,加入6.4mLH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,调PH值5.0,加双蒸水定容至1000mL)1:1加入显色;

[0076] 6、终止液:吸取浓硫酸22.2mL后加入蒸馏水178.8mL;

[0077] 7、阳性参照血清(-20℃);

[0078] 8、阴性参照血清(-20℃);

[0079] 以上材料便是本发明的所有组分。

[0080] 保存条件:参照血清及蛋白为-20℃保存。其余组分的保存温度为4℃保存。

[0081] 实施例4

[0082] 间接ELISA检测试剂盒对猫血清中弓形虫抗体的检测

[0083] 利用本发明试剂盒对96份样品进行弓形虫血清抗体的检测,其步骤如下:

[0084] (1)取包被液对SAG3蛋白进行稀释,使蛋白浓度为0.375μg/孔包被96孔聚乙烯酶标板,4℃包被过夜,洗板3次每次5min;

[0085] (2)加入封闭液,100uL/孔,37℃温箱孵育2h;

[0086] (3)洗板同上;

[0087] (4)加待检血清样品:按1:800稀释血清待检样品,100uL/孔,37℃温箱孵育2h;

[0088] (5)洗板同上;

[0089] (6)加酶标二抗:按1:5000稀释,100uL/孔,37℃温箱孵育45min;

[0090] (8)洗板同上;

[0091] (9)显色:加入TMB底物显色液,100uL/孔,37℃温箱孵育15min;

[0092] (10)终止:加入终止液,100uL/孔;

[0093] (11)测OD值:酶标仪测定OD<sub>450</sub>值;

[0094] (12)结果判定:测定OD<sub>450nm</sub>值后,依据临界值来判断样品值;

[0095] 对兰州地区96份样品检测后,阳性率为61%。

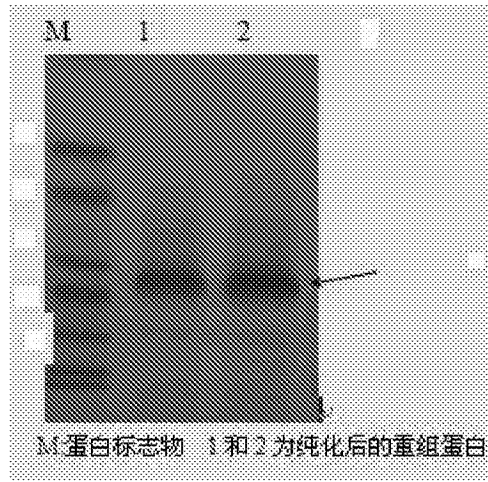


图1

专利名称(译)	猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106324238A</a>	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201610702636.X	申请日	2016-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	宫鹏涛 刘伟建 杨正涛 张西臣 寇金华 李建华 杨举 李赫 李棕松		
发明人	宫鹏涛 刘伟建 杨正涛 张西臣 寇金华 李建华 杨举 李赫 李棕松		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N2333/45		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种猫弓形虫血清抗体的间接ELISA试剂盒及其制备方法，利用弓形虫表面蛋白SAG3作为包被抗原，检测血清中弓形虫抗体，经过HRP标记的山羊抗猫IgG作为检测抗体，建立间接了ELISA方法，具有较强的特异性、敏感性和重复性；本发明主要试剂除洗涤液是粉末状以外，水溶解后可直接应用，用于本试剂盒主要面对实验室检测洗涤液为基本溶液，其余均以液体工作液的形式存在，使用方便；本发明为大批本检测及流行病学调查提供了一种既方便又可靠的免疫学诊断方法；为猫弓形虫病的诊断提供了依据。

