



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109425735 A

(43)申请公布日 2019.03.05

---

(21)申请号 201710792634.9

(22)申请日 2017.09.05

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 王九峰 焦连国 才冬杰 朱要宏  
邵艳艳

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表4页 附图3页

---

(54)发明名称

一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒，该试剂盒包括抗原蛋白，所述抗原蛋白为f1jB蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示，本发明的f1jB蛋白抗原性良好，特异性强、纯度和产量高；试剂盒中抗原蛋白的包被浓度为20 μg/mL，阴性血清的稀释倍数为1:200。本发明的试剂盒能够用于临床样本中猪沙门菌f1jB抗体的快速检测。本发明试剂盒弥补了目前缺乏单一抗原对沙门菌感染进行诊断的不足，降低了漏检率，精密度也更高，为我国猪群中沙门菌的流行病学调查提供了敏感的检测手段，可用于猪沙门菌感染的早期诊断。

1. 一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒，其特征在于，包括抗原蛋白或抗原蛋白溶液，所述抗原蛋白的氨基酸序列为如下a或b或c：

- a. SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；
- b. 在其N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质；
- c. SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能由SEQ ID NO.3衍生的蛋白质。

2. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述抗原蛋白的包被浓度为 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血清的稀释度为1:200。

3. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，还含有包被液、酶标二抗、封闭液和可读性载体；所述可读性载体上记载了利用所述抗原蛋白溶液和所述酶标二抗检测的ELISA方法。

4. 如权利要求3所述的试剂盒，其特征在于，酶标二抗的稀释度为1:10000，作用时间1h。

5. 如权利要求3所述的试剂盒，其特征在于，封闭液为5%的BSA。

6. 如权利要求1-5任一所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒的底物显色条件为加入TMB底物显色，37°C，显色时间10min。

7. 如权利要求1-5任一所述的试剂盒，其特征在于，试剂盒检测结束后，记录样本的OD450值并计算平均值x和标准差S，当样本OD450值 $\geqslant x+3S$ 时，判定此血清为阳性血清；相反，判定为阴性血清。

8. 用于扩增猪沙门菌f1JB基因的特异性引物对，其特征在于，其核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示。

9. 猪沙门菌f1JB重组蛋白的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示的特异性引物对猪沙门菌基因组DNA进行PCR扩增，扩增产物纯化后，连接质粒、转入表达宿主菌中，获得含有阳性表达质粒的重组菌；

(2) f1JB蛋白诱导表达、纯化定量。

10. 权利要求1-7任一所述的试剂盒在检测或辅助检测猪群中猪沙门菌疫苗是否免疫合格的应用。

## 一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种ELISA检测试剂盒,具体地说是一种检测猪沙门菌抗体试剂盒。

### 背景技术

[0002] 沙门菌 (*Salmonella*) 是一种广泛存在于自然界中依靠鞭毛运动的革兰氏阴性细菌,不产生芽孢,有的含有荚膜,属于肠杆菌科沙门菌属,在常见的家禽、鸟类、哺乳类的动物肠道中都能发现。沙门菌是引起食源性疾病的最主要的原因之一,可通过家畜的粪便,污染的水,施肥技术等传播,并且它可以生长在许多不同的食物中,这些都使沙门菌成为人类和动物的重要防治对象。现今已发现的沙门菌O抗原超过67种,血清型超过2000个,几乎每年都有新的血清型被发现,这为沙门菌感染的血清学诊断和检测带来很大困难。及时有效的发现并控制沙门菌是最有效的防止其扩散的方法。目前,沙门菌血清学检测方法主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫荧光抗体试验(IFAT)和血清凝集试验(SAT)等,ELISA是当前生产中应用最广泛的血清学检测方法,具有特异、快速、简便、敏感性高等特点,但IFAT和SAT检测方法都存在着特异性差、操作繁琐等不足。目前尚缺乏通过单一抗原对沙门菌感染进行血清学诊断和检测的敏感、特异、快速、简便方法。

[0003] 目前,玻板凝集试验是检测猪沙门菌感染常用的方法,而这一方法敏感性欠佳,难以检测出抗体滴度低的带菌猪,需要反复使用玻板凝集方法淘汰阳性猪才能达到沙门菌净化的目的,浪费人力资源且总有一定比例的感染猪不能被检出。而带毒猪排毒具有间歇性,使得分离细菌的方法也具有一定的漏检,且检测周期较长。PCR方法则需要昂贵的仪器,不适宜猪场应用。

[0004] f1jB是沙门菌的II相鞭毛蛋白,可构成鞭毛抗原(H抗原),该鞭毛蛋白对该菌在机体内的侵袭及扩散起到了关键作用,侵袭宿主后会导致机体产生强烈的免疫应答。且70%的沙门菌亚种编码控制II相鞭毛蛋白的f1jB基因,且II相鞭毛素f1jB仅存在于沙门菌中。鞭毛蛋白可以激活机体的天然免疫系统,第一时间识别病原体并对入侵机体的病原微生物做出免疫应答反应,上调抗原递呈细胞的表面共刺激分子后,可以激活T细胞,从而诱导获得性免疫反应。目前没有利用f1jB抗原对沙门菌进行检测的报道。

### 发明内容

[0005] 针对上述不足,本发明提供一种用于检测猪沙门菌抗体的试剂盒,其操作简单,灵敏度高,特异性强,稳定性和重复性好,避免漏检,具有良好的应用前景。

[0006] 本发明提供的一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒,包括抗原蛋白或抗原蛋白溶液,所述抗原蛋白的氨基酸序列为如下a或b或c:

[0007] a. SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列;

[0008] b. 在其N端和/或C端连接标签得到的融合蛋白质;

[0009] c. SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能由SEQ ID NO.3衍生的蛋白质。

- [0010] 编码SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。
- [0011] 本发明的f1 jB重组蛋白(SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列)是通过以下方法制备而成：
- [0012] 猪沙门菌f1 jB重组蛋白的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
- [0013] (1) 核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示的特异性引物对猪沙门菌基因组DNA进行PCR扩增，扩增产物纯化后，连接T载体，连接产物转入感受态中，获得含有阳性表达质粒的重组菌；
- [0014] (2) f1 jB蛋白诱导表达、纯化定量。
- [0015] f1 jB-F: 5'-CGCGGATCCATGGCACAGTAATCAACACTAACAGT-3' (SEQ ID NO.1)
- [0016] f1 jB-R: 5'-CCGCTCGAGTTAACGTAACAGAGACAGC-3' (SEQ ID NO.2)
- [0017] 本发明的实施例中，以提取的鼠伤寒沙门菌DNA作为PCR反应模板扩增出f1 jB基因，BamH I、Xho I双酶切阳性克隆的质粒以及pET-32a，构建pET-32a-f1 jB表达载体，转入感受态细胞，培养后挑取阳性克隆，双酶切鉴定；将阳性克隆的培养液用IPTG诱导表达f1 jB重组蛋白。将表达蛋白经纯化、定量后包被酶标板，建立检测沙门菌f1 jB抗体的间接ELISA方法。
- [0018] 步骤(1)中PCR扩增条件为：94℃预变性5min, 94℃变性1min, 62℃退火30s, 72℃延伸100s，进行30个循环，最后72℃延伸10min。
- [0019] 本发明提供的检测猪沙门菌抗体ELISA试剂盒中，抗原蛋白的包被浓度为20μg/mL，血清的稀释度为1:200。
- [0020] 本发明提供的检测猪沙门菌抗体ELISA试剂盒还含有包被液、酶标二抗、封闭液和可读性载体；所述可读性载体上记载了利用所述抗原蛋白溶液和所述酶标二抗检测的ELISA方法。
- [0021] 酶标二抗的稀释度为1:10000，作用时间1h。
- [0022] 封闭液为5%的BSA。
- [0023] 所述试剂盒的底物显色条件为加入TMB底物显色，37℃，显色时间10min。
- [0024] 试剂盒检测结束后，记录样本的OD450值并计算平均值 $\bar{x}$ 和标准差S，当样本OD450值 $\geq \bar{x}+3S$ 时，判定此血清为阳性血清；相反，判定为阴性血清。
- [0025] 具体地，本发明提供一种猪沙门菌f1 j B抗体间接ELISA检测方法，该方法包括以下步骤：
- [0026] (1) 待检血清按照1:200稀释后，与酶标板上的f1 jB重组蛋白37℃孵育1h，洗板三次；
- [0027] (2) 加入辣根过氧化物酶标记(HRP)的羊抗猪IgG与待检血清37℃孵育1h洗板三次；
- [0028] (3) 加入TMB底物进行显色10min；
- [0029] (4) 终止反应后检测OD450，血清样品OD450值 $\geq 0.34$ 判断为阳性， $<0.34$ 为阴性。
- [0030] 本发明提供了用于扩增猪沙门菌f1 jB基因的特异性引物，其核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示。
- [0031] 本发明提供了上述试剂盒在检测或辅助检测猪群中猪沙门菌疫苗是否免疫合格中的应用。

[0032] 本发明还提供了上述试剂盒在猪沙门菌疫苗免疫猪群抗体水平监测中的应用。

[0033] 本发明提供了猪沙门菌f1 jB重组蛋白 (SEQ ID NO.3) 在制备检测猪只感染野毒或灭活疫苗毒试剂盒中的应用。

[0034] 本发明诱导表达f1 jB重组蛋白的纯度达到1378 $\mu$ g/mL。本发明试剂盒便于操作、使用成本低、重复性好,运用该检测试剂盒可检测出血清稀释度达1:6400的猪沙门菌抗体,弥补了目前缺乏单一抗原对沙门菌感染进行诊断的不足,具有较高的敏感度,降低了漏检率,且精密度也更高,可用于猪沙门菌疫苗免疫猪群抗体水平监测。本方法结合了抗原抗体的高特异性反应,能够更加准确的检测出血清中的f1 jB蛋白抗体,为我国猪群中沙门菌的流行病学调查提供了敏感的检测手段,可用于猪沙门菌感染的早期诊断。

## 附图说明

[0035] 图1是实施例1中3对引物扩增电泳图,1为F0引物的PCR结果,2为F1引物PCR的结果,3为F2引物PCR的结果,M为DNA Marker。

[0036] 图2是3对引物扩增产物的测序部分片段对比图,1为F0引物PCR测序结果,2为F1引物PCR测序结果,3为f1 jB蛋白基因的理论序列,从比对的图中可以看出1与3比有多处变异,2与3完全匹配。

[0037] 图3是重组表达质粒PCR的鉴定结果。M:DNA Marker,1-3:PCR产物。

[0038] 图4是重组表达质粒双酶切的鉴定结果,M:DNA Marker,1-3:酶切条带。

[0039] 图5是f1 jB重组蛋白表达SDS-PAGE图。M:蛋白Marker,1-2:表达菌诱导前上清和沉淀;3-4:重组菌30℃诱导10h上清和沉淀;5-6:重组菌37℃诱导3h上清和沉淀;7-8:重组菌37℃诱导6h上清和沉淀。

[0040] 图6是f1 jB重组蛋白纯化后SDS-PAGE图。M:蛋白Marker,1-5:纯化后的蛋白。

[0041] 图7是f1 jB重组蛋白Western-blot图。M:蛋白Marker,1-2:f1 jB重组蛋白。

## 具体实施方式

[0042] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0043] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。实施例所用的生化试剂均为市售。本发明用鼠伤寒沙门菌菌株,购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心(China Veterinary Culture Collection Center,CVCC),CVCC编号为3386。辣根过氧化物酶标的羊抗猪IgG购自earthox公司。作为感受态细胞的DH5a和E.coli rosetta(DE3)购自博迈德生物技术有限公司。

[0044] 实施例1 pET-32a-f1 jB原核表达质粒的构建

[0045] 引物设计与合成,设计引物扩增f1 jB基因,针对同一目的基因的相同保守区域,发明人设计了多对引物:

[0046] F0 F:CGCGGATCCATGGCACAGTAATCAACACTAACAG (SEQ ID NO.5)

[0047] F0 R:CCGCTCGAGTTAACGTAACAGAGACAGCACGTT (SEQ ID NO.6)

[0048] F1 F:CGCGGATCCATGGCACAGTAATCAACACTAACAGT (SEQ ID NO.1)

[0049] F1 R:CCGCTCGAGTTAACGTAACAGAGACAGC (SEQ ID NO.2)

[0050] F2 F:CGCGGATCCATGGCACAAAGTAATCAACAC (SEQ ID NO.7)

[0051] F2 R:CCGCTCGAGTTAACGTAACAGAGACAGC (SEQ ID NO.8)

[0052] 从扩增产物的电泳图来看,见图1,F2引物没有扩增出来,F0和F1虽然都扩增出来了可是经测序发现F0有多处变异,如图2,最后发明人选择测序全部正确的F1引物作为扩增引物。

[0053] 2、目的基因的扩增

[0054] 以鼠伤寒沙门菌为模板,进行PCR扩增。PCR反应条件:94℃预变性5min;94℃变性1min,62℃退火30s,72℃延伸100s,进行30个循环;最后72℃延伸10min。扩增出的f1 jB基因片段采用PCR产物纯化试剂盒回收目的片段。

[0055] 扩增的PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳后,紫外灯下切割目的条带,用DNA凝胶回收试剂盒回收和纯化DNA,具体步骤参照说明书进行。

[0056] 3、将所得片段与T载体连接,将连接产物10μL加入到新制备的感受态细胞中,轻旋混匀。冰浴30min;42℃热休克90s,立即冰浴2min。然后加入到1mL 37℃预热的液体LB培养基中,37℃100r/min振摇45min;5,000r/min离心2min,弃去800μL上清,余下的200μL培养液涂布于固体LB平板(含100μg/mL Amp+),37℃培养12h。

[0057] 4、挑取转化板上的单一菌落,无菌接至3mL LB/Amp+ (Amp+终浓度为100μg/mL) 液体培养基中,震荡培养12h后,采用试剂盒提取小量质粒。

[0058] 5、取克隆重组质粒进行PCR和BamH I、XhoI双酶切鉴定。PCR反应体系及条件同上。混匀后37℃水浴2-3h,取出后全部上样,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

[0059] 6、将pET-32a载体提取质粒,用BamH I和XhoI进行双酶切后,用DNA纯化/回收试剂盒回收。同时将质粒pMD18-T-f1 jB用BamHI和XhoI进行双酶切,使用DNA纯化/回收试剂盒回收f1 jB基因片段。将目的片段与载体pET-32a连接,16℃连接过夜后,热转化至E. coli rosetta感受态细胞中,通过Amp抗性、PCR和限制性内切酶双酶切进行筛选和鉴定(如图3、4),目的条带为1521bp,将阳性克隆进行测序。测序正确的质粒命名为pET-32a-f1 jB。

[0060] 实施例2 重组蛋白的原核表达与纯化

[0061] 1、对于实施例1序列正确的菌落pET-32a-f1 jB,挑取单个菌落接种于含Amp+的液体LB培养基中,37℃振荡过夜。取过夜培养物按2%的量接种于含Amp+的液体LB培养基中,37℃振荡培养至A600值0.5-1.0,加IPTG至终浓度为1mM,分别在30℃和37℃振荡培养,并在培养的不同时刻(0、3、6、10h)各从培养物中取出1mL菌液转移到离心管中,10,000r/min离心5min,收集菌体沉淀,沉淀重悬后超声波破碎,4000r/min再离心10min,分别取10μL上清和沉淀加入90μL 2×上样缓冲液和10μL 1mol/L DTT悬浮混匀,煮沸5min,进行SDS-PAGE电泳(8%分离胶,5%浓缩胶),以确定重组蛋白的最佳诱导温度和时间和是否为可溶性表达,按最佳诱导时间3小时(较常规诱导时间短)培养重组菌用NI-NTA柱纯化蛋白。

[0062] 2、SDS-PAGE凝胶电泳:组装好电泳设备,拔出样品梳,每孔加入10μL的样品,样品在浓缩胶中采用80V的电压进行电泳,在分离胶中采用120V的电压进行电泳。待溴酚蓝至分离胶底部约1cm时,停止电泳。取出凝胶用考马斯亮蓝R-250染色液在摇床上染色30min左右,然后脱色至背景清晰,用清水冲洗、照相。SDS-PAGE表明,在IPTG的诱导下,转化有重组质粒的大肠杆菌rosetta (DE3) 可高效表达融合蛋白;时间梯度结果表明,3h的诱导量最高

且为可溶性表达(如图5),蛋白纯化的效果理想(如图6)。

[0063] Bradford法测定纯化蛋白的浓度为 $1378\mu\text{g}/\text{mL}$ ,该浓度是纯化后、浓缩前的浓度,远远高于现有技术诱导表达纯化后的蛋白浓度。

[0064] 按“湿转法”进行:将SDS-PAGE后的凝胶中的蛋白质转到PVDF膜上,用阳性血清作为一抗,HRP标记的羊抗猪IgG作为二抗进行Western-blot检测表达的蛋白。结果:阳性血清作为一抗的Western-blot出现清晰可见的条带(如图7),表明表达的f1jB蛋白具有良好的抗原性和保守性,纯度高。

[0065] 实施例3 ELISA的建立及条件优化

[0066] 1、ELISA检测的试剂

[0067] (1)包被液:0.05mol/L碳酸盐缓冲液,4℃保存。

[0068] (2)样本稀释液:含1%牛血清白蛋白(BSA)磷酸盐-吐温缓冲液。

[0069] (3)封闭液:含5%牛血清白蛋白(BSA)磷酸盐-吐温缓冲液。

[0070] (4)酶标二抗:羊抗猪IgG/HRP。

[0071] (5)底物缓冲液(磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液(PBS,pH5.0):0.2mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 25.7mL,0.1mol柠檬酸24.3mL,去离子水50mL。

[0072] (6)TMB底物显色液:0.01g TMB干粉溶于1mL DMSO中,取底物缓冲液9.9mL加30μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,再加入DMSO溶解的TMB 100μL。

[0073] (7)终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):蒸馏水178.3mL,逐点加入浓2M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 21.7mL。

[0074] (8)0.05%PBST:在1L PBS中加入0.5mL的Tween-20。

[0075] 2、f1jB蛋白抗原最佳包被浓度及血清最佳稀释倍数的确定

[0076] 采用双方阵试验:用0.05mol/L碳酸盐缓冲液碳酸盐缓冲液(pH9.6)把纯化的重组蛋白(浓度为1mg/mL)作稀释后分别为0.02、0.01、0.008、0.006、0.004、0.002、0.001、0.0005、0.0002mg/mL,包被反应板100μL/孔,后4℃过夜。将包被好的酶标板倒去孔内液体,PBST洗涤3次后,用5%的BSA封闭液37℃封闭1h,阳性血清及SPF猪阴性血清分别用1%的BSA稀释50、100、200、400、800、1600倍,与重组蛋白不同稀释度组成方阵,100μL/孔。37℃孵育1h,PBST洗涤3次后加入稀释好的酶标抗体HRP—羊抗猪IgG(10000倍稀释)100μL/孔,37℃孵育1h,洗涤后加入新鲜配制的显色液100μL/孔,显色10min,加50μL终止液。在酶标仪上读出OD450数值,比较阴、阳性血清的OD值,以阳性OD450值接近1.0,阴、阳血清光吸收值(P/N)差最大的血清最高稀释倍数为最适血清稀释度,所对应的抗原稀释度为抗原的最佳稀释度。结果当包被抗原浓度降低、阴性血清浓度减小时,OD450值不断变小。当抗原的包被浓度为20μg/ml,阴性血清的稀释倍数为1:200,此时P/N值最高。所以,确定最佳的抗原包被浓度为20μg/ml,血清的稀释倍数为1:200。结果如表1所示。

[0077] 表1 双方阵试验结果

抗原含量 μg/mL	血清稀释度											
	1:50			1:100			1:200					
	+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N
[0078]	20	2.851	0.084	33.9	1.816	0.076	23.9	1.048	0.077	13.6		
	10	2.792	0.082	34.0	1.773	0.082	21.6	0.995	0.076	13.1		
	8	2.839	0.095	29.9	1.778	0.088	20.2	1.042	0.086	12.1		
	6	2.823	0.082	34.4	1.726	0.073	23.6	0.995	0.101	9.9		
	4	2.727	0.107	25.5	1.725	0.101	17.1	0.994	0.096	10.4		
	2	2.707	0.1	27.1	1.681	0.1	16.8	0.98	0.092	10.7		
	1	2.478	0.092	26.9	1.516	0.091	16.7	0.906	0.089	10.2		
	0.5	2.216	0.081	27.4	1.365	0.085	16.1	0.809	0.082	9.9		
抗原含量 μg/mL		1:400			1:800			1:1600				
μg/mL		+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N		
20		0.629	0.07	9.0	0.417	0.067	6.2	0.239	0.056	4.3		
10		0.619	0.071	8.7	0.409	0.068	6.0	0.247	0.056	4.4		
8		0.624	0.076	8.2	0.416	0.069	6.0	0.245	0.059	4.42		
6		0.607	0.068	8.9	0.399	0.068	5.9	0.242	0.058	4.2		
4		0.628	0.091	6.9	0.406	0.084	4.8	0.257	0.076	3.4		
2		0.609	0.088	6.9	0.4	0.085	4.7	0.254	0.071	3.6		
1		0.591	0.087	6.8	0.386	0.08	4.8	0.245	0.069	3.6		
0.5		0.521	0.073	7.1	0.35	0.069	5.1	0.224	0.066	3.4		

[0079] 3、酶标二抗工作浓度的确定

[0080] 将f1jB蛋白和阴性血清分别作最佳稀释后进行ELISA操作,酶标二抗根据说明书分别作1:5000、1:10000、1:20000、1:40000梯度稀释进行ELISA试验,测其OD450时的值并计算P/N值。结果当抗原和血清最佳工作浓度确定后,酶标二抗以1:10000稀释时的P/N值最大,确定酶标二抗最佳稀释浓度为1:10000。

[0081] 4、封闭液的选择

[0082] 将f1jB蛋白抗原、一抗血清和酶标二抗分别按照已确定的最佳浓度进行稀释。分别用2.5%脱脂奶粉、5%脱脂奶粉、1%牛血清白蛋白和5%牛血清白蛋白做封闭液,进行间接ELISA试验。测OD450时数值并计算P/N值。结果f1jB-ELISA用5%BSA封闭液效果最佳。

[0083] 5、抗原和血清反应时间的确定

[0084] 抗原抗体反应会随着时间的增加,反应量也增加,但达到一定的时间后,反应即达到平衡,f1jB蛋白抗原按上述确定的最佳反应条件,阴性与阳性血清各做3个重复,37℃分别作用0.5h、1h、1.5h、2h四个反应时间的验证。测其OD450时数值,确定P/N值最大的反应时间。结果f1jB蛋白抗原在37℃下与血清反应1h时P/N值最大,阴性平均值也较小。

[0085] 6、酶标二抗的作用时间的确定

[0086] f1jB蛋白抗原按最佳包被浓度包被酶标板,4℃过夜,将阳性、阴性血清以最佳稀释倍数稀释,酶标二抗作1:10000稀释,酶标二抗的作用时间设0.5h、1h、1.5h、2h四个反应组,每组阴性和阳性对照各做3个重复,按照ELISA操作程序进行,测其在OD450数值,比较P/N值确定反应时间。结果f1jB酶标二抗作用1h时,P/N值最大,因此f1jB-ELISA酶标二抗的作

用时间确定为1h。

[0087] 7、底物显示时间的确定

[0088] 按照已确定的ELISA反应程序依次包被、封闭、加入阴性血清，各做3个重复，再和酶标二抗反应1h之后加入TMB底物显色，37℃孵育反应设5min、10min、15min三个显色时间，测定在OD450时数值。选取阳性平均值接近1.0，阴性OD平均值比较小，且P/N值最大的一组作为最佳的底物显色时间。结果在37℃条件，与底物作用10min的阳性OD450值可以达到1.0以上，而阴性OD450值在0.2以下，P/N值最大，底物显色时间确定为10min。

[0089] 8、间接ELISA方法阴、阳性临界OD值的确定

[0090] 用f1jB蛋白抗原包被酶标板，按照前面已建立的间接ELISA检测方法，检测10份血清凝集试验判定为阴性的猪血清。每份血清做三次重复，记录样本的OD450值并计算平均值(x)和标准差(S)。当样本OD450值 $\geq x+3S$ 时，判定此血清为阳性血清；相反，判定为阴性血清。结果间接ELISA方法阴阳血清的判定值为0.34。即血清样品OD450值 $\geq 0.34$ 就可以判断为阳性， $<0.34$ 为阴性。结果如表2所示。

[0091] 表2 间接ELISA检测10份猪沙门菌阴性血清结果 (OD450nm)

[0092]

0.164	0.095	0.188	0.076	0.225	0.106	0.171	0.189	0.247	0.143
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0093] 9、特异性和敏感性试验

[0094] 用所建立的检测方法对三株PRRSV、三株PCV、一株CSFV、一株PRV-gB、一株MH、一株大肠杆菌K88、一株鼠伤寒沙门菌、一株婴儿沙门菌的阳性血清进行检测，根据阴阳临界OD值确定的0.34，来判定检测结果除两株沙门菌OD450大于0.34外，其余OD450均小于临界值。证明以f1jB为抗原建立的ELISA方法具有良好的特异性。结果如表3所示。

[0095] 表3 间接ELISA特异性检测结果

[0096]

菌株	PRR	PRR	PRR	PC	PC	PC	CSF	PRV-	M	K8	鼠	婴
	SV	SV	SV	V	V	V	V	gB	H	8	伤	儿
											寒	沙
											沙	门
											门	菌
												菌

[0097]

OD450	0.042	0.064	0.055	0.0	0.1	0.0	0.04	0.082	0.0	0.0	0.9	0.8
nm				72	11	85	6		5	47	97	83

[0098] 10、检测灵敏度试验

[0099] 将阳性和阴性血清平行倍比稀释，按建立的间接ELISA方法检测血清中抗体的含

量,将P/N $\geqslant$ 2.1的最大血清稀释度作为ELISA检测方法的灵敏度。结果通过对血清的倍比稀释后检测发现,当血清稀释度达到1:6400时,P/N值仍大于2.1,说明所建立的间接ELISA方法有很高的灵敏度。

[0100] 11、重复性试验

[0101] (1) 批内重复性试验

[0102] 用同一次纯化的f1jB重组蛋白包被酶标板,取4份不同的血清样本不同时间按已确立的间接ELISA检测程序测定,每份样品做3个平行孔,结果进行统计学分析。结果检测样品的变异系数(CV)在1.24%~4.25%之间,都小于10%。此方法有很好的重复性。

[0103] (2) 批间重复性试验

[0104] 用4次不同批次纯化的f1jB重组蛋白抗原包被酶标板,取4份不同的血清样本同一时间按照已确立的间接ELISA检测程序测定样本,每份血清样本设3个平行孔,结果进行统计学分析。结果检测样品的变异系数(CV)在1.68%~7.95%之间,都小于10%。此方法有很好的重复性。

[0105] 实施例4 沙门菌f1jB抗体间接ELISA检测板的制备及检测流程

[0106] (1) 将实施例2制得的已纯化的重组f1jB蛋白用0.05M碳酸盐(pH 9.6)缓冲液稀释20 $\mu$ g/mL后,用微量加样器吸取稀释好的样品加入孔内,100 $\mu$ L/孔,4℃冰箱12~14h;洗涤:冰箱过夜后取出ELISA板,甩干内容物,加入洗液PBST,200 $\mu$ L/孔,震荡5min,甩干,洗涤3次,最后一次甩干拍打干净;

[0107] (2) 加入5%BSA,200 $\mu$ L/孔,37℃1h,洗板3次后密封。

[0108] (3) 待检血清稀释:加入1:200稀释的待检血清到包被好的酶标反应板,100 $\mu$ L/孔,37℃孵育,1h,洗板3次;

[0109] (4) 加酶标物:被检测物种的特异IgG抗体,100 $\mu$ L/孔,37℃1h,洗板3次;

[0110] (5) 显色:将配置好的TMB底物溶液100 $\mu$ L/孔加入,37℃避光10min;

[0111] (6) 终止反应:加入终止液2mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 $\mu$ L/孔;

[0112] (7) 确定血清阴阳性临界值,按照前面已建立的间接ELISA检测方法,检测阴性的血清。每份血清做三次重复,记录样本的OD450值并计算平均值(x)和标准差(S)。当样本OD450值 $\geqslant$ x+3S时,判定此血清为阳性血清;相反,判定为阴性血清。

[0113] (8) 结果判断:利用酶标仪,空白孔调零,读取450nm波长处吸光度,即OD450值。大于等于临界值0.34的为阳性,小于临界值0.34的为阴性。

[0114] 本发明诱导表达f1jB重组蛋白的纯度高达1378 $\mu$ g/mL,以本发明的f1jB重组蛋白为包被抗原建立的间接ELISA特异性高,重复性好,灵敏度高,血清稀释度达到1:6400时,P/N值仍大于2.1,具有较高的敏感度,降低了漏检率,而且精密度也更高,为我国猪群中沙门菌的流行病学调查提供了敏感的检测手段,可用于猪沙门菌疫苗免疫猪群抗体水平监测,还可用于猪沙门菌感染的早期诊断。

[0115] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

## 序列表

<110> 中国农业大学

<120> 一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cgcggatcca tggcacaagt aatcaacact aacagt 36

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ccgctcgagt taacgtaaca gagacagc 28

<210> 3

<211> 506

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn

1 5 10 15

Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu

20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln

35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala

50 55 60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly

65 70 75 80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala

85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile

100 105 110

Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly

115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu  
 130 135 140  
 Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val Gln  
 165 170 175  
 Lys Ala Tyr Asp Val Lys Asp Thr Ala Val Thr Thr Lys Ala Tyr Ala  
 180 185 190  
 Asn Asn Gly Thr Thr Leu Asp Val Ser Gly Leu Asp Asp Ala Ala Ile  
 195 200 205  
 Lys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ala Ser Val Thr Gly Gly  
 210 215 220  
 Ala Val Lys Phe Asp Ala Asp Asn Asn Lys Tyr Phe Val Thr Ile Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Phe Thr Gly Ala Asp Ala Ala Lys Asn Gly Asp Tyr Glu Val Asn  
 245 250 255  
 Val Ala Thr Asp Gly Thr Val Thr Leu Ala Ala Gly Ala Thr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Met Pro Ala Gly Ala Thr Thr Lys Thr Glu Val Gln Glu Leu Lys  
 275 280 285  
 Asp Thr Pro Ala Val Val Ser Ala Asp Ala Lys Asn Ala Leu Ile Ala  
 290 295 300  
 Gly Gly Val Asp Ala Thr Asp Ala Asn Gly Ala Glu Leu Val Lys Met  
 305 310 315 320  
 Ser Tyr Thr Asp Lys Asn Gly Lys Thr Ile Glu Gly Gly Tyr Ala Leu  
 325 330 335  
 Lys Ala Gly Asp Lys Tyr Tyr Ala Ala Asp Tyr Asp Glu Ala Thr Gly  
 340 345 350  
 Ala Ile Lys Ala Lys Thr Thr Ser Tyr Thr Ala Ala Asp Gly Thr Thr  
 355 360 365  
 Lys Thr Ala Ala Asn Gln Leu Gly Gly Val Asp Gly Lys Thr Glu Val  
 370 375 380  
 Val Thr Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Asn Ala Ser Lys Ala Ala Gly His  
 385 390 395 400  
 Asp Phe Lys Ala Gln Pro Glu Leu Ala Glu Ala Ala Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala  
 420 425 430  
 Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile

435	440	445
Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg		
450	455	460
Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala		
465	470	475
Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln		
485	490	495
Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg		
500	505	

<210> 4  
<211> 1521  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 4

```

atggcacaag taatcaacac taacagtctg tcgctgctga cccagaataa cctgaacaaa 60
tcccagtcgg cactgggcac cgctatcgag cgtctgtttt ctggtctgcg tatcaacagc 120
gcgaaagacg atgcggcagg tcagggcatt gctaaccgtt tcaccgcgaa catcaaagg 180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc 240
gcgcgtgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggt tcagtcgt 300
aacagcacca actcccgatc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagccctg 360
aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgac 420
gacaacaccc tgaccatcca gttggcgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480
aagcagatca actctcagac cctgggtctg gactcactga acgtgcagaa agcgtatgt 540
gtgaaagata cagcagtaac aacgaaagct tatgccaata atggtaactac actggatgt 600
tcgggtctt atgatgcagc tattaaagcg gctacgggtg gtacgaatgg tacggcttct 660
gtaaccggtg gtgcggtaa atttgacgc gataataaca agtactttgt tactatttgt 720
ggcttactg gtgcgtatgc cgccaaaaat ggcgattatg aagttacgt tgctactgac 780
ggtagactaa cccttgcggc tggcgcaact aaaaccacaa tgcctgctgg tgcgacaact 840
aaaacagaag tacaggagtt aaaagataca ccggcagttt tttcagcaga tgctaaaaat 900
gccttaattt ctggcggcgt tgacgctacc gatgctaattt ggcgtgatgg ggtcaaaatg 960
tcttataccg ataaaaatgg taagacaatt gaaggcggtt atgcgtttaa agctggcgat 1020
aagtattacg ccgcagatta ccatggacgc acaggagcaa ttaaagctaa aaccacaagt 1080
tatactgctg ctgatggcac taccaaaaaca gcggctaacc aactgggtgg cgttagacgg 1140
aaaaccgaag tcgttactat cgacggtaaa acctacaatg ccagcaaagc cgctggcat 1200
gatttcaaag cacaaccaga gctggcgaa gcagccgta aaaccaccga aaaccggctg 1260
cagaaaaattt atgccgcgtt ggcgcagggtt gatgcgttc gctctgtatc gggtgcggta 1320
caaaaccgtt tcaactctgc tatcacaac ctggcataa ccgtaaacaa tctgtctgaa 1380
gcgcgttagcc gtatcgaaga ttccgactac gcgaccgaag tttccaaat gtctcgccg 1440
cagattctgc agcaggccgg tacttccgtt ctggcgcagg ctaaccaggt cccgcagaac 1500

```

gtgctgtctc tgttacgtta a 1521  
<210> 5  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 5  
cgccggatcca tggcacaagt aatcaacact aacag 35  
<210> 6  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 6  
ccgctcgagt taacgtaaca gagacagcac gtt 33  
<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 7  
cgccggatcca tggcacaagt aatcaacac 29  
<210> 8  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<400> 8  
ccgctcgagt taacgtaaca gagacagc 28

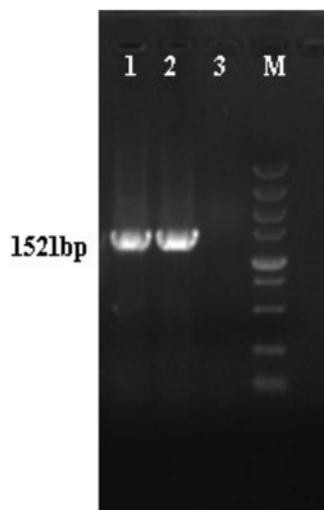


图1

GGTAGTTGTTTCAGCAGATGCTAAATGCCCTTAATGGCTGGCGGCGTTGACCTGCCGATGCTAATGCCCGCGACAT 1  
GGCAGTTGTTTCAGCAGATGCTAAATGCCCTTAATGGCTGGCGGCGTTGACCTACCGATGCTAATGCCCGCGTGA 2  
GGCAGTTGTTTCAGCAGATGCTAAATGCCCTTAATGGCTGGCGGCGTTGACCTACCGATGCTAATGCCCGCGTGA 3

图2

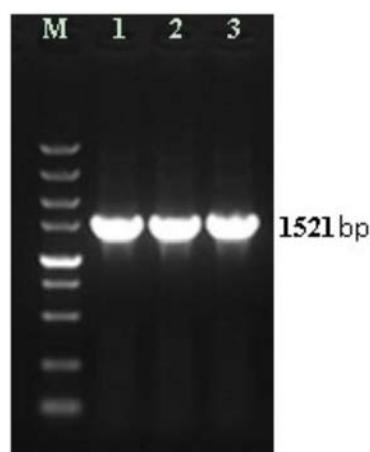


图3

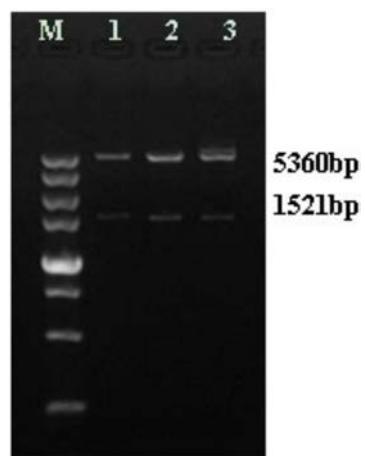


图4

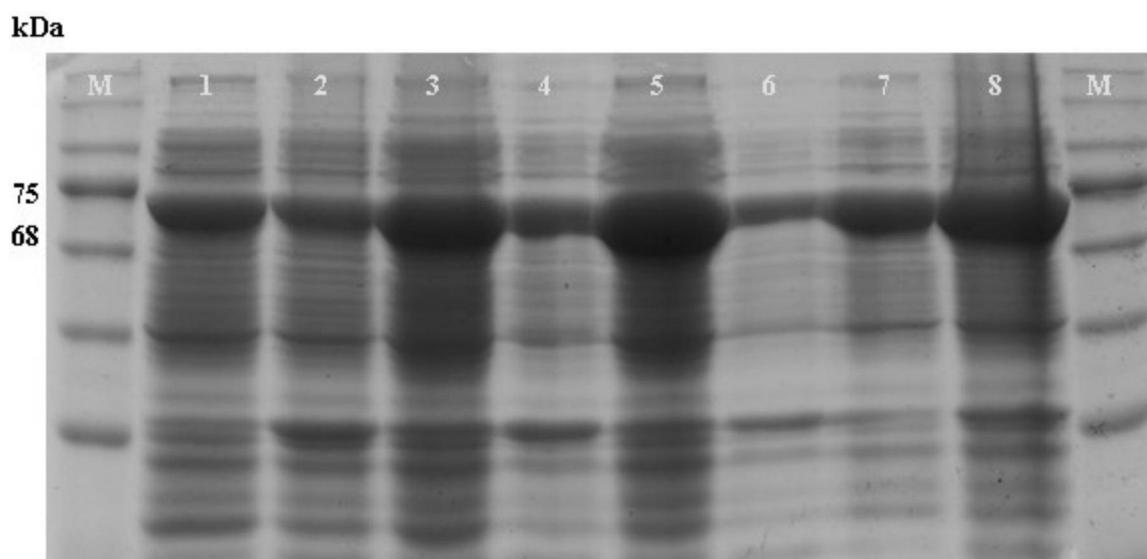


图5

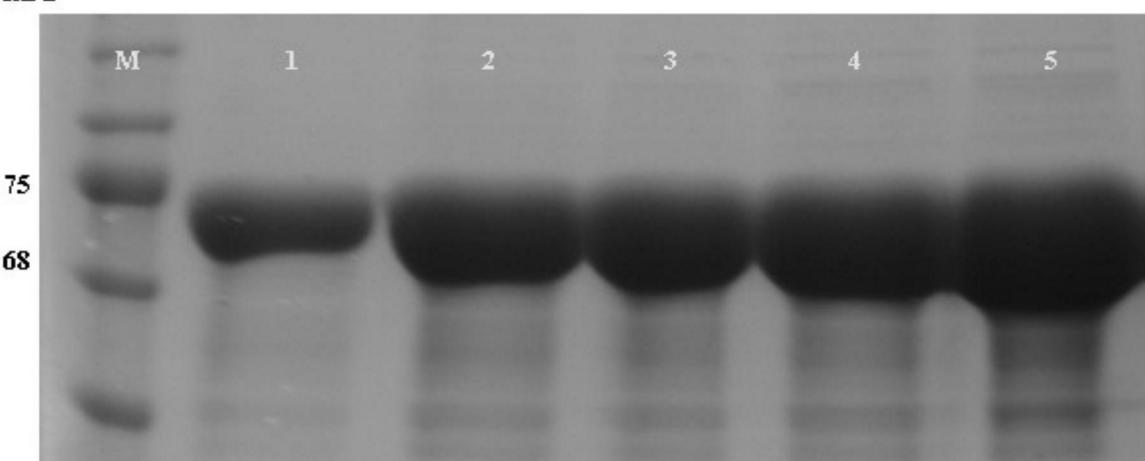
**kDa**

图6

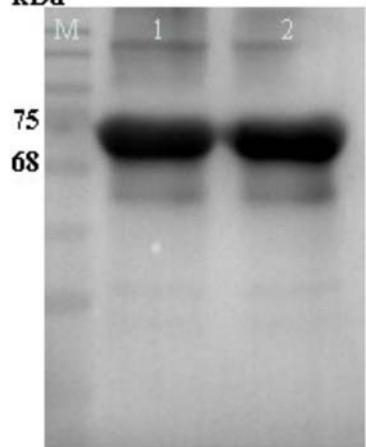
**kDa**

图7

专利名称(译)	一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒				
公开(公告)号	<a href="#">CN109425735A</a>			公开(公告)日	2019-03-05
申请号	CN201710792634.9			申请日	2017-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学				
申请(专利权)人(译)	中国农业大学				
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学				
[标]发明人	王九峰 焦连国 才冬杰 朱要宏 邵艳艳				
发明人	王九峰 焦连国 才冬杰 朱要宏 邵艳艳				
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/569 G01N33/535				
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558 G01N33/56916				
代理人(译)	王文君 陈征				
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>				

**摘要(译)**

本发明提供了一种检测猪沙门菌抗体的试剂盒，该试剂盒包括抗原蛋白，所述抗原蛋白为flijB蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示，本发明的flijB蛋白抗原性良好，特异性强、纯度和产量高；试剂盒中抗原蛋白的包被浓度为20μg/mL，阴性血清的稀释倍数为1:200。本发明的试剂盒能够用于临床样本中猪沙门菌flijB抗体的快速检测。本发明试剂盒弥补了目前缺乏单一抗原对沙门菌感染进行诊断的不足，降低了漏检率，精密度也更高，为我国猪群中沙门菌的流行病学调查提供了敏感的检测手段，可用于猪沙门菌感染的早期诊断。

抗原含量 μg/mL	血清稀释度								
	1:50			1:100			1:200		
	+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N
20	2.851	0.084	33.9	1.816	0.076	23.9	1.048	0.077	13.6
10	2.792	0.082	34.0	1.773	0.082	21.6	0.995	0.076	13.1
8	2.839	0.095	29.9	1.778	0.088	20.2	1.042	0.086	12.1
6	2.823	0.082	34.4	1.726	0.073	23.6	0.995	0.101	9.9
4	2.727	0.107	25.5	1.725	0.101	17.1	0.994	0.096	10.4
2	2.707	0.1	27.1	1.681	0.1	16.8	0.98	0.092	10.7
1	2.478	0.092	26.9	1.516	0.091	16.7	0.906	0.089	10.2
0.5	2.216	0.081	27.4	1.365	0.085	16.1	0.809	0.082	9.9

抗原含量 μg/mL	血清稀释度								
	1:400			1:800			1:1600		
	+	-	P/N	+	-	P/N	+	-	P/N
20	0.629	0.07	9.0	0.417	0.067	6.2	0.239	0.056	4.3
10	0.619	0.071	8.7	0.409	0.068	6.0	0.247	0.056	4.4
8	0.624	0.076	8.2	0.416	0.069	6.0	0.245	0.059	4.42
6	0.607	0.068	8.9	0.399	0.068	5.9	0.242	0.058	4.2
4	0.628	0.091	6.9	0.406	0.084	4.8	0.257	0.076	3.4
2	0.609	0.088	6.9	0.4	0.085	4.7	0.254	0.071	3.6
1	0.591	0.087	6.8	0.386	0.08	4.8	0.245	0.069	3.6
0.5	0.521	0.073	7.1	0.35	0.069	5.1	0.224	0.066	3.4