

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/569 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910088081.4

[43] 公开日 2010年1月20日

[11] 公开号 CN 101629957A

[22] 申请日 2009.7.8

[21] 申请号 200910088081.4

[71] 申请人 中国医学科学院实验动物研究所

地址 100021 北京市朝阳区潘家园南里5号

[72] 发明人 秦川 张连峰 林树柱 李万波

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

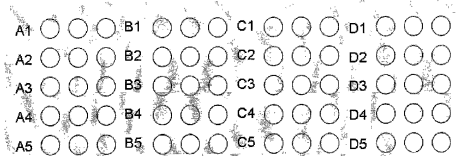
## [54] 发明名称

一种检测动物病原微生物的方法及其专用蛋白芯片

在动物病原微生物检测方面具有良好的应用前景。

## [57] 摘要

本发明属于生物医学领域，提供一种动物病原微生物的检测方法及其专用蛋白芯片，所述检测方法主要包括以下步骤：a. 制备蛋白芯片，通过实验挑选多种病原微生物的多组不同的特异性抗原固定到合适的修饰过的载体上，b. 检测，将待检动物的血清与上述蛋白芯片反应，再与标记的二级抗体杂交，通过适当的检测手段检测杂交阳性信号，并通过扫描分析获取血清与芯片的杂交结果，感染不同病原微生物的动物血清，反应后在蛋白芯片上会呈现不同的阳性信号组合模式，从而确定被检动物是否正在感染或感染过蛋白芯片上标记的病原微生物。本发明可以同时检测多种病原微生物，提高了检测效率，针对每一种病原微生物选择多组不同的具有一定特异性的抗原，使检测具有很好的特异性，



1、一种动物病原微生物的检测方法，其特征在于，主要包括以下步骤：

a. 制备蛋白芯片，通过实验挑选多种病原微生物的多组不同的特异性抗原固定到合适的修饰过的载体上，同时将不同抗原按预先设定的矩阵规则排列；

b. 检测，将待检动物的血清与上述蛋白芯片反应，再与标记的二级抗体杂交，通过适当的检测手段检测杂交阳性信号，并通过扫描分析获取血清与芯片的杂交结果，感染不同病原微生物的动物血清，反应后在蛋白芯片上会呈现不同的阳性信号组合模式，从而确定被检动物是否正在感染或感染过蛋白芯片上标记的病原微生物。

2、根据权利要求1所述的一种动物病原微生物的检测方法，其特征在于，所述步骤a中载体的修饰优选采用聚赖氨酸修饰、氨基修饰、醛基修饰、环氧基修饰、及三维立体修饰其中任意一种或几种结合的修饰方式。

3、根据权利要求1所述的一种动物病原微生物的检测方法，其特征在于，所述步骤a中，优选将多种病原微生物的多组不同的特异性抗原都固定在同一张芯片上。

4、根据权利要求1所述的一种动物病原微生物的检测方法，其特征在于，所述步骤a中，挑选病原微生物特异性抗原的实验方法优选采用蛋白印迹或酶联免疫吸附试验。

5、根据权利要求1所述的一种动物病原微生物的检测方法，其特征在于，所述步骤a中，针对每一种病原微生物选择至少3组不同的特异性抗原。

6、一种蛋白芯片，其用于上述权利要求1所述的动物病原微生物检测方法，其特征在于，通过将多种病原微生物的多组不同的特异性抗原固定到合适的修饰过的载体上，并将不同抗原按预先设定的矩阵规则排列。

7、根据权利要求6所述的蛋白芯片，其特征在于，所述载体的修饰优选采用聚赖氨酸修饰、氨基修饰、醛基修饰、环氧基修饰、及三维立体修饰其中任意一种或几种结合的修饰方式。

---

8、根据权利要求6所述的蛋白芯片，其特征在于，针对每一种病原微生物选择至少3组不同的特异性抗原。

9、根据权利要求6所述的蛋白芯片，其特征在于，将多种病原微生物的多组不同的特异性抗原都固定在同一张芯片上。

## 一种检测动物病原微生物的方法及其专用蛋白芯片

### 技术领域

本发明属于生物医学领域，特别是涉及一种动物病原微生物检测方法及其专用蛋白芯片。

### 背景技术

动物与人类的生活、生产和科学研究工作密切相关，对动物所携带的微生物进行检测，保证动物的质量，对保障人类健康，促进经济发展和确保动物实验准确性具有重要的意义。

传统的，也是目前应用最广的微生物检测方法是通过分离培养对微生物进行菌落、个体形态，生理生化鉴定。这种方法工作量大，耗时长，而且对实验操作者要求比较高。

随着现代科学发展，一些新技术应用于微生物检测。基于分子生物学的聚合酶链式反应（PCR）检测技术与DNA芯片技术实现了微生物的快速检测，但是有比较严重的交叉反应现象，且取材需要是正在被感染的组织。基于免疫学的血清凝集和酶联免疫吸附试验（ELISA）检测法，取材简单，但是由于大多数微生物之间存在某些共同的抗原决定簇，所以交叉反应非常严重，目前也只能作为微生物检测的辅助手段。蛋白质芯片技术是对固相载体进行特殊的化学处理，再将已知的大量蛋白有规律的固定其上（如抗原等），根据这些分子的特性捕获能与之特异性结合的待测蛋白（如存在于血清中的抗体等），然后用激光扫描系统或电感耦合器件（CCD）获取数据图像，最后用专门的计算机软件进行图像分析，结果定量和解释。由于蛋白纯化较困难，且操作过程中极易失活，所以蛋白芯片技术的发展明显滞后于基因芯片，目前用于微生物检测的蛋白芯片有交叉反应现象，检测效果不佳。

### 发明内容

鉴于以上问题，本发明的主要目的是提供一种动物病原微生物的检测方法及其专用蛋白芯片，该方法提高了检测效率，同时具有很好的检测特异性。

为了达到以上目的，本发明提供的该种动物病原微生物的检测方法，其主要包括以下步骤：

a. 制备蛋白芯片，通过实验挑选多种病原微生物的多组不同的特异性抗原固定到合适的修饰过的载体上，如聚赖氨酸修饰、氨基修饰、醛基修饰、环氧基修饰及三维立体修饰等，同时将不同抗原按预先设定的矩阵规则排列；

b. 检测，将待检动物的血清与上述蛋白芯片反应，再与标记的二级抗体杂交，通过适当的检测手段检测杂交阳性信号，并通过扫描分析获取动物血清与芯片的杂交结果，感染不同病原微生物的动物血清，反应后在蛋白芯片上会呈现不同的阳性信号组合模式，这样就可以确定被检动物是否正在感染或感染过蛋白芯片上标记的病原微生物。

上述步骤 a 中，对每一种病原微生物通过多项实验选择 3 组或 3 组以上不同的具有一定特异性的蛋白抗原，并同时把这些抗原都固定在同一张芯片上，这样有效的避免了细菌间因有某些共同的抗原决定簇而产生的交叉反应问题，提高了检测的特异性。

上述步骤 a 中，所述挑选病原微生物的特异性抗原的实验方法具体可以为：将培养好的病原微生物用磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）洗涤两次，洗去培养基；之后再用磷酸盐缓冲液重悬，通过机械法、超声处理法或溶菌酶法将病原微生物裂解，离心取上清液；将上清液走 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），转膜后与抗不同细菌的抗血清杂交，通过对杂交结果的分析，初步选择几种具有一定特异性的抗原；接着再通过凝胶过滤层析、离子交换层析及 SDS-PAGE 胶回收电泳等方法提取上清液中的不同蛋白；对提取的蛋白进行 SDS-PAGE 结合蛋白印迹（western blot）或酶联免疫吸附试验（ELISA）分析，最终对每一种病原微生物确定 3 组及 3 组以上的不同的具有一定特异性的抗原。

本发明还提供的一种用于上述动物病原微生物检测方法的专用蛋白芯片，该种蛋白芯片通过将多种微生物的多组不同的特异性抗原固定到合适的修饰过的载体上，不同抗原按预先设定的矩阵规则排列；

所述载体的修饰可通过聚赖氨酸修饰、氨基修饰、醛基修饰、环氧基修饰、及三维立体修饰等方式；

针对每一种病原微生物，优选通过实验选择 3 组或 3 组以上不同的具有一定特异性的蛋白抗原；

本发明提供的该种蛋白芯片具有很大的容量，本发明对每种微生物选定多种不同的特异性抗原，并把多种病原微生物的预先选定的抗原固定在同一张芯

片上，可以通过一次反应检测多种微生物，提高了检测效率，节约了检测时间和检测成本。

本发明通过将多种病原微生物抗原固定在同一张芯片上，每一种病原微生物选择多组特异性抗原，与待检动物血清杂交后，通过不同的阳性信号组合模式来判定检测结果。这样既可以同时检测多种病原微生物，提高了检测效率，又避免了由于某种共同抗原决定簇而导致的普通血清学检测中的交叉反应问题，具有很好的检测特异性，因此，本发明在动物病原微生物检测方面具有良好的应用前景。

## 附图说明

图1为本发明具体实施例一中的芯片点样示意图。

## 具体实施方式

以下结合具体实施例及说明书附图对本发明所提供的技术特征进一步说明，但不作对其的限定：

### 实施例一

#### 制备微生物蛋白抗原芯片

选择国标（GB14922.2—2001）中规定无特定病原体（SPF）级小鼠必须排除的细菌中的四种：伤寒沙门氏菌（*Salmonella Typhimurium*）、嗜肺巴氏杆菌（*Pasteurella pneumotropica*）、假结核耶尔森氏菌（*Yersinia pseudotuberculosis*）、念珠状链杆菌（*Streptobacillus moniliformis*）。通过多次蛋白印迹（western blot）实验，每种细菌选定了5种特异性抗原，通过细菌裂解、离子交换层析、SDS-PAGE胶回收电泳等方法制备了这些抗原，共计20种。抗原用磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）适当稀释后，用BioDot公司的AD3200芯片点样仪将抗原点在氨基化处理过的玻片上，每种抗原点三个重复点，然后将点好的蛋白芯片置于湿盒中，4℃过夜；第二天将芯片在湿盒中置室温平衡1h，接着用PBS洗涤蛋白芯片3次，3min/次，洗去未结合的蛋白；然后将芯片放入3%脱脂奶粉-PBS中，37℃封闭1h，再用PBS洗芯片一次，芯片制备完成。最后将制备好的蛋白质芯片室温晾干后，于-30℃冰箱中保存备用。芯片点样示意图如图1所示，每种细菌选择的五种特异性抗原，纵向排列，每种抗原横向三个重复点，按顺序点在芯片上，其中：A1-A5

为鼠伤寒沙门氏菌的五种抗原；B1-B5为嗜肺巴氏杆菌的五种抗原；C1-C5为假结核耶尔森菌的五种抗原；D1-D5为念珠状链杆菌的五种抗原。

#### 实施例二

感染鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*) 的小鼠血清学检测

感染鼠伤寒沙门氏菌的小鼠血清，用 0.5%牛血清白蛋白组分 V- PBS (BSA-PBS)1:100 体积比稀释后，与实施例一制备的微生物蛋白抗原芯片杂交，37℃ 孵育 1h，之后将芯片用 PBS 洗 3 次，3min/次，洗去未结合的抗体。接着将芯片与标记的二级抗体杂交，标记的二级抗体为用 PBS 1:200 体积比稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG，37℃孵育 1h，然后再用 PBS 洗涤芯片 3 次，3min/次。最后芯片用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色，脱水，封片。应用微阵列扫描仪对芯片的显色结果进行扫描，应用软件对扫描结果进行分析。结果显示，伤寒沙门氏菌抗原均产生了较强的阳性信号；其他菌抗原只有部分有微弱的信号。

#### 实施例三

感染嗜肺巴氏杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*) 的小鼠血清学检测

感染嗜肺巴氏杆菌的小鼠血清，用 0.5%BSA-PBS1:100 体积比稀释后，与实施例一制备的微生物蛋白抗原芯片杂交，按照实施例二的操作方法进行杂交实验。结果显示，嗜肺巴氏杆菌抗原均产生较强的阳性信号，其他菌抗原没有信号。

#### 实施例四

感染假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 的小鼠血清学检测

感染假结核耶尔森氏菌的小鼠血清，用 0.5%BSA-PBS1:200 体积比稀释后，与实施例一制备的微生物蛋白抗原芯片杂交，按照实施例二的操作方法进行杂交实验。结果显示，假结核耶尔森氏菌抗原均产生较强的阳性信号，其他菌抗原只有部分有微弱信号。

#### 实施例五

感染念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*) 的小鼠血清学检测

感染念珠状链杆菌的小鼠血清，用 0.5%BSA-PBS1:100 体积比稀释后，与实施例一制备的微生物蛋白抗原芯片杂交，按照实施例二的操作方法进行杂交实验。结果显示，念珠状链杆菌抗原均产生较强的阳性信号，其他菌抗原信号

很微弱。

#### 实施例六

##### 混合感染四种细菌的小鼠血清学检测

将分别感染鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*), 嗜肺巴氏杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*), 假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*), 念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*) 的小鼠血清混合, 用 0.5%BSA-PBS1:100 体积比稀释后, 与实施例一制备的微生物蛋白抗原芯片杂交, 按照实施例二的操作方法进行杂交实验。结果显示, 四种菌的所有抗原均产生较强的阳性信号。

上述结果显示, 实施例一制作的微生物蛋白抗原芯片, 在检测感染不同微生物的小鼠血清时, 呈现唯一的、不同的阳性信号模式, 所以芯片具有良好的检测特异性。

以上已对本发明其内容作了详尽说明。对本领域一般技术人员而言, 在不背离本发明原理的前提下对它所做的任何显而易见的改动, 都不会超出本申请所附权利要求的保护范围。

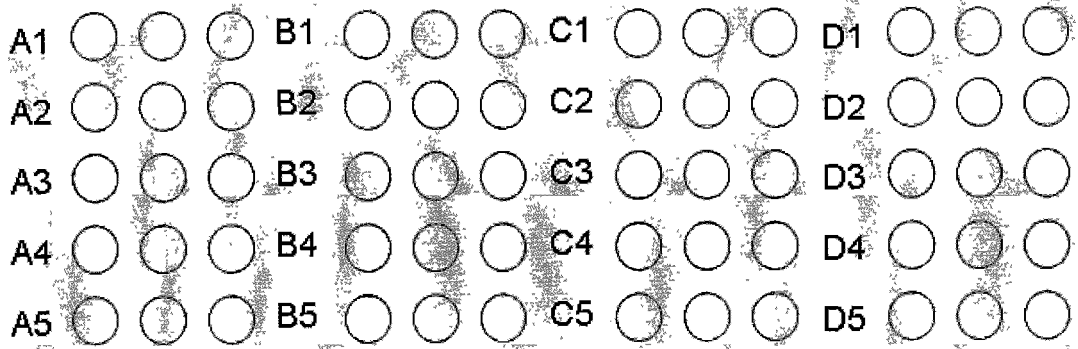


图 1

专利名称(译)	一种检测动物病原微生物的方法及其专用蛋白芯片		
公开(公告)号	<a href="#">CN101629957A</a>	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200910088081.4	申请日	2009-07-08
[标]发明人	秦川 张连峰 林树柱 李万波		
发明人	秦川 张连峰 林树柱 李万波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物医学领域，提供一种动物病原微生物的检测方法及其专用蛋白芯片，所述检测方法主要包括以下步骤：a.制备蛋白芯片，通过实验挑选多种病原微生物的多组不同的特异性抗原固定到合适的修饰过的载体上，b.检测，将待检动物的血清与上述蛋白芯片反应，再与标记的二级抗体杂交，通过适当的检测手段检测杂交阳性信号，并通过扫描分析获取血清与芯片的杂交结果，感染不同病原微生物的动物血清，反应后在蛋白芯片上会呈现不同的阳性信号组合模式，从而确定被检动物是否正在感染或感染过蛋白芯片上标记的病原微生物。本发明可以同时检测多种病原微生物，提高了检测效率，针对每一种病原微生物选择多组不同的具有一定特异性的抗原，使检测具有很好的特异性，在动物病原微生物检测方面具有良好的应用前景。

