



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093384 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201610642066.X

(22)申请日 2016.08.08

(71)申请人 河南省农业科学院畜牧兽医研究所
地址 450002 河南省郑州市金水区花园路
116号

(72)发明人 李海利 徐引弟 朱文豪 王治方
焦文强 王克领 郎利敏 张立宪
张青娴 游一

(74)专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任
公司 32102

代理人 何朝旭 朱磊

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

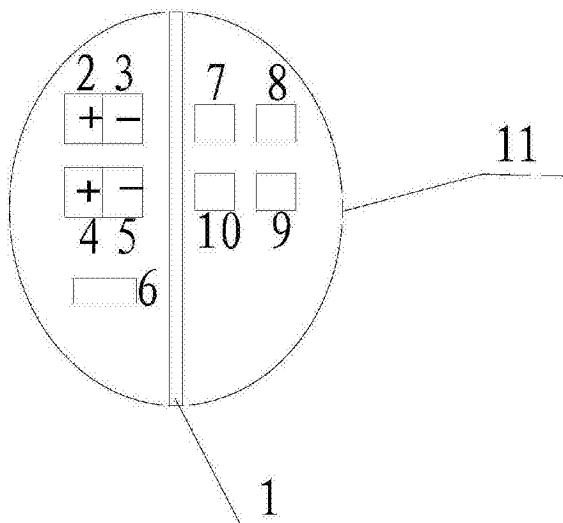
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体
和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒及其制
备方法

(57)摘要

本发明涉及一种含有猪传染性胸膜肺炎放
线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试
剂盒及其制备方法，属于化学技术领域。本发明
的试剂盒包括盒体，所述盒体内设支架，所述支
架中设有抗体反应板区，放线杆菌阳性对照血清
区、阴性对照血清区，支原体阳性对照血清区、阴
性对照血清区，样品稀释液区，洗涤液区，底物缓
冲液区，终止液区和酶标抗体区，各区内放置相
应的试剂。



1. 一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,包括盒体,所述盒体内设支架,其特征在于:所述支架中设有抗体反应板区,放线杆菌阳性对照血清区、阴性对照血清区,支原体阳性对照血清区、阴性对照血清区,样品稀释液区,洗涤液区,底物缓冲液区,终止液区和酶标抗体区,各区内放置相应的试剂。

2. 根据权利要求1所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述抗体反应板区位于支架中部,抗体反应板区的一侧为放线杆菌阳性对照血清区、阴性对照血清区,支原体阳性对照血清区、阴性对照血清区和酶标抗体区,另一侧为样品稀释液区,洗涤液区,底物缓冲液区和终止液区。

3. 根据权利要求2所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述酶标抗体区中的酶标抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪IgG。

4. 根据权利要求1所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述抗体反应板区内竖直安置抗体反应板,所述抗体反应板从左至右分为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白和猪肺炎支原体蛋白检测区域。

5. 根据权利要求4所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述抗体反应板含有96孔,按12行×8列排布。

6. 根据权利要求5所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述抗体反应板上的单数列为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌检测区,双数列为猪肺炎支原体检测区。

7. 根据权利要求1所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒的制备方法,包括用酶联免疫间接法制备,制备工艺如下:

(1) 制备抗体反应板,将96孔酶标板从左至右分为8个检测区,用抗原稀释液分别稀释猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原和猪肺炎支原体蛋白抗原,使其终浓度分别为0.35 μg/ml和0.65 μg/ml,分别按100 μl/孔和120 μl/孔包被单数检测区域和双数检测区域,4 °C放置12小时,用洗涤液洗板4次,用封闭液于37 °C湿盒内封闭1个小时,用洗涤液洗板4次,干燥后即为抗体反应板,置4 °C冰箱备用;

所述抗原稀释液、洗涤液、封闭液的具体配方如下,

抗原稀释液pH 9.6,由碳酸钠 0.318 g,碳酸氢钠 0.56 g,加去离子水至1000 ml,使其溶解并混匀;

洗涤液pH 7.4,由磷酸氢二钠2.90 g,磷酸二氢钾0.20 g,氯化钠8.0 g,氯化钾0.20 g,吐温-20 0.5 ml,加去离子水至1000 ml,使其溶解并混匀;

封闭液pH 7.4,由牛血清白蛋白0.5 g,磷酸氢二钠2.90 g,磷酸二氢钾0.20 g,氯化钠8.0 g,氯化钾0.20 g,吐温-20 0.5 ml,加去离子水至1000 ml,使其溶解并混匀;

(2) 制备猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清,将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清1 ml加入到样品稀释液中,最终定容至100 ml,然后按照1 ml/瓶的规格进行分装,所述样品稀释液由牛血清白蛋白0.1 g,磷酸氢二钠2.90 g,磷酸二氢钾0.20 g,氯化钠8.0 g,氯化钾0.20 g,吐温-20 0.5 ml,加去离子水至1000 ml,使其溶解并混匀;

(3) 制备猪支原体抗体阳性对照血清,将猪支原体抗体阳性对照血清1 ml加入到血清稀释液中,最终定容至100 ml,然后按照1 ml/瓶的规格进行分装;

(4)制备猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清,将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装;

(5)制备猪支原体抗体阴性对照血清,将猪支原体抗体阴性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装;

(6)制备酶标抗体,将5 mg HRP溶于1 mL 0.5 mol/L pH 8.0的重碳酸钠中,加0.2 mL 1%氟二硝基苯(FDNB)无水乙醇溶液,在室温中混合后,加入1 mL 0.05 mol/L 过碘酸钠(NaIO₄),室温混匀,然后加入1 mL 0.2 mol/L 乙二醇溶液。

8.然后加入5 mg氢化硼钠(NaBH₄),放4 ℃冰箱过夜,离心弃去沉淀物,上清即为酶标抗体;

(7)制备底物缓冲液,柠檬酸钠0.467 g,磷酸氢二钠1.84 g,加去离子水100 mL,溶化后加邻苯二胺0.04 g,溶化后加过氧化氢0.15 mL,混匀;

(8)制备终止液10,取4 mL浓硫酸加入32 mL去离子水中混匀;

(9)组盒:每个试剂盒配备1块抗体反应板,1瓶放线杆菌阳性对照血清,1瓶放线杆菌阴性对照血清,1瓶支原体阳性对照血清,1瓶支原体阴性对照血清,1瓶样品稀释液,1瓶洗涤液,1瓶底物缓冲液,1瓶终止液和1瓶酶标抗体,组成试剂盒。

9.根据权利要求8所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒的制备方法,其特征在于:组盒时,

放线杆菌阳性对照血清,放线杆菌阴性对照血清,支原体阳性对照血清和支原体阴性对照血清均为2 mL,样品稀释液,底物缓冲液和终止液为100 mL,酶标抗体为120 mL,洗涤液为500 mL。

一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法，属于化学技术领域。

背景技术

[0002] 猪接触性传染性胸膜肺炎又称坏死性胸膜肺炎，是由胸膜肺炎放线杆菌引起的一种急性呼吸道传染病，以急性出血性纤维素性肺炎和慢性纤维素性坏死性胸膜炎为主要特征。急性者病死率高，慢性者常能耐过。猪接触性传染性胸膜肺炎各种年龄的猪均可感染，通常以2-5月龄、体重为30-60 kg的猪多发。胸膜肺炎放线杆菌是对猪有高度宿主特异性的呼吸道寄生物，急性感染不仅可在肺部病理变化和血液中见到，而且在鼻液中也有大量细菌存在。猪群规模越大，发病危险亦越大。本病有明显的季节性，多在4-5月和9-11月发生。病猪和带菌猪是本病的主要传染源，无临诊症状有病理变化猪，或无临诊症状无病理变化阴性带菌猪较常见。如继发或并发其他疾病，常引起临诊症状加剧和死亡率升高。该病近年来在我国发生呈逐年上升的趋势，已成为危害养猪业最严重的疾病之一，给我国养猪业造成严重的经济损失。近年来，由放线杆菌所引起的猪接触性传染性胸膜肺炎已成为影响养猪业发展的一种重要细菌性疾病。发病后及时采用抗生素进行治疗可显著降低动物死亡率，同时在生产过程中适当添加抗生素也可在一定程度上降低该病的发生率。但随着大量抗菌药特别是广谱抗菌药在养猪业中的广泛使用，细菌对抗菌药物的耐药性问题日趋突出，与此同时也有研究资料表明亚抑制浓度的抗生素可以影响细菌的代谢过程而改变细菌的毒力或细菌对环境的适应能力等。目前已报道的猪接触性传染性胸膜肺炎有15个血清型，各血清型具有特异性，其血清型特异性取决于荚膜多糖和菌体脂多糖。根据烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的依赖性可把15个血清型分为两个生物型。生物Ⅰ型为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖菌株，包括血清型1-12型和15型；生物Ⅱ型的生长不依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，但需要其他特定嘌呤或嘌呤前产物以辅助生长，包括血清型13、14。其中血清型1和5型又可分为A和B两个亚型，即血清型1A、1B和5A、5B。此外，还有一些分离到的放线杆菌依据现在的分类系统还不能划分其血清型。不同血清型间致病力有明显的差异，血清型间不存在交叉保护力。放线杆菌分布广泛，世界各国均有流行。随着各国之间引进种猪的不断增多，血清型也趋于复杂。一些国家或地区存在多个血清型同时流行，甚至同一猪场内还可能存在不同血清型。我国目前已发现并分离到血清型有1、2、3、4、5、7、8 和 15 等多种血清型，主要流行血清型有 1、3、5 和 7型。

[0003] 猪支原体肺炎(mycoplasma pneumonia of swine, MPS)，又称猪地方流行性肺炎(swine enzootic pneumonia)，俗称猪气喘病，是由猪肺炎支原体引起的猪的一种慢性呼吸道传染病。主要临诊症状为咳嗽和气喘，病理变化特征是肺的尖叶、心叶、中间叶和隔叶前缘呈肉样或虾肉羊实变。本病广泛分布于世界各地，主要特点是高接触性、高传染性、高发病率和低死亡率的主要特点。临床主要表现为咳嗽，气喘，呼吸困难，日增重减少，长期

生长不良,饲料报酬率大幅下降。该病常与其他呼吸道病原如多杀性巴氏杆菌、副猪嗜血杆菌或胸膜肺炎放线杆菌等病原协同引起猪地方性肺炎,常与猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪流感病毒和猪圆环病毒2型的协同感染引起猪呼吸道综合征。MPS发病率一般在50%~80%,个别新建猪场发病率可达100%,死亡率高达14%~37%。流行后期或老疫区则以哺乳仔猪和断奶小猪多发,死亡率较高,母猪和成年猪多呈慢性和隐性感染。病猪与健康猪群混合饲养,常引起猪支原体肺炎的爆发。本病目前尚无特效药物疗法,主要采取综合防制措施及对症疗法。最根本的办法是消除患病动物和彻底消毒,切断传播途径。因此应加强检疫和本病监测,以防本病扩散。支原体可在猪群中持续存在,各种年龄的猪都易感。本病主要在冬季多发,夏季也可发生。病猪和带毒猪是主要传染源,无临诊症状有病理变化猪,或无临诊症状无病理变化阴性带菌猪较常见。MPS的诊断方法主要有病毒的分离和鉴定,ELISA方法检测抗体和PCR。PCR方法敏感性和特异性较好,是临床病原学诊断中较为普遍的一种方法。现有技术是单一的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体或猪肺炎支原体检测试剂盒,不能同时对放线杆菌和支原体同时检测。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有技术存在的缺陷,提出一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明首先提供一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,包括盒体,所述盒体内设支架,所述支架中设有抗体反应板区,放线杆菌阳性对照血清区、阴性对照血清区,支原体阳性对照血清区、阴性对照血清区,样品稀释液区,洗涤液区,底物缓冲液区,终止液区和酶标抗体区,各区内放置相应的试剂。

[0006] 所述抗体反应板区位于支架中部,抗体反应板区的一侧为放线杆菌阳性对照血清区、阴性对照血清区,支原体阳性对照血清区、阴性对照血清区和酶标抗体区,另一侧为样品稀释液区,洗涤液区,底物缓冲液区和终止液区。

[0007] 所述酶标抗体区中的酶标抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪IgG。

[0008] 所述抗体反应板区内竖直安置抗体反应板,所述抗体反应板从左至右分为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白和猪肺炎支原体蛋白检测区域。所述抗体反应板含有96孔,按12行×8列排布。所述抗体反应板上的单数列为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌检测区,双数列为猪肺炎支原体检测区。

[0009] 本发明再进一步提供一种猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒的制备方法,包括用酶联免疫间接法制备,制备工艺如下:

(1)制备抗体反应板,将96孔酶标板从左至右分为8个检测区,用抗原稀释液分别稀释猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原和猪肺炎支原体蛋白抗原,使其终浓度分别为0.35 μg/ml和0.65 μg/ml,分别按100 μl/孔和120 μl/孔包被单数检测区域和双数检测区域,4 °C放置12小时,用洗涤液洗板4次,用封闭液于37 °C湿盒内封闭1个小时,用洗涤液洗板4次,干燥后即为抗体反应板,置4 °C冰箱备用;

所述抗原稀释液、洗涤液、封闭液的具体配方如下,

抗原稀释液pH 9.6,由碳酸钠 0.318 g,碳酸氢钠 0.56 g,加去离子水至1000 ml,使其溶解并混匀;

洗涤液pH 7.4,由磷酸氢二钠2.90 g,磷酸二氢钾0.20 g,氯化钠8.0 g,氯化钾0.20 g,吐温-20 0.5 mL,加去离子水至1000 mL,使其溶解并混匀;

封闭液pH 7.4,由牛血清白蛋白0.5 g,磷酸氢二钠2.90 g,磷酸二氢钾0.20 g,氯化钠8.0 g,氯化钾0.20 g,吐温-20 0.5 mL,加去离子水至1000 mL,使其溶解并混匀;

(2)制备猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清,将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清1 mL加入到样品稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装,所述样品稀释液由牛血清白蛋白0.1 g,磷酸氢二钠2.90 g,磷酸二氢钾0.20 g,氯化钠8.0 g,氯化钾0.20 g,吐温-20 0.5 mL,加去离子水至1000 mL,使其溶解并混匀;

(3)制备猪支原体抗体阳性对照血清,将猪支原体抗体阳性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装;

(4)制备猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清,将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装;

(5)制备猪支原体抗体阴性对照血清,将猪支原体抗体阴性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装;

(6)制备酶标抗体,将5 mg HRP溶于1 mL 0.5 mol/L pH 8.0的重碳酸钠中,加0.2 mL 1%氟二硝基苯(FDNB)无水乙醇溶液,在室温中混合后,加入1 mL 0.05 mol/L 过碘酸钠(NaIO₄),室温混匀,然后加入1 mL 0.2 mol/L 乙二醇溶液。然后加入5 mg氢化硼钠(NaBH₄),放4 °C冰箱过夜,离心弃去沉淀物,上清即为酶标抗体;

(7)制备底物缓冲液,柠檬酸钠0.467 g,磷酸氢二钠1.84 g,加去离子水100 mL,溶化后加邻苯二胺0.04 g,溶化后加过氧化氢0.15 mL,混匀;

(8)制备终止液10,取4 mL浓硫酸加入32 mL去离子水中混匀;

(9)组盒:每个试剂盒配备1块抗体反应板,1瓶放线杆菌阳性对照血清,1瓶放线杆菌阴性对照血清,1瓶支原体阳性对照血清,1瓶支原体阴性对照血清,1瓶样品稀释液,1瓶洗涤液,1瓶底物缓冲液,1瓶终止液和1瓶酶标抗体,组成试剂盒。

[0010] 组盒时,

放线杆菌阳性对照血清,放线杆菌阴性对照血清,支原体阳性对照血清和支原体阴性对照血清均为2 mL,样品稀释液,底物缓冲液和终止液为100 mL,酶标抗体为120 mL,洗涤液为500 mL。

[0011] 本发明的试剂盒盒体内主要分为两个部分:试剂检测体系和抗原反应包被板。试剂检测体系的试剂瓶均为耐酸耐碱的聚乙烯塑料瓶,抗原包被反应板为96孔可拆分的酶标板。

[0012] 本发明采用酶联免疫间接法,将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原和猪肺炎支原体蛋白抗原分别包被到抗原包被反应板1'、3'、5'、7'和2'、4'、6'、8'对应的检测区域内,所包被的抗原可分别与待检测样品中的特异性抗体反应,形成抗原-抗体复合物被吸附到包被反应板上,再加入酶标抗体(辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪IgG)。当待检测样品中含有相应抗体,加入底物缓冲液后即出现显色反应,出现显色反应的为阳性,不显色的为阴性。

[0013] 本发明试剂盒的原理是通过对抗原包被反应板的蛋白抗原包被浓度和酶标结合

物的浓度的优化与调整,使其能够产生特异性显色反应,从而进行猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的检测。本试剂盒的酶标版为可拆分酶标版,可对单个猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋抗体、猪肺炎支原体抗体或同时对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体、猪肺炎支原体抗体进行批量检测,具有灵敏度高、特异性好、批量快速检测样品的优点,可用于猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、猪肺炎支原体疫病流行的检测、监测与调查等。

附图说明

[0014] 图1为本发明试剂盒的结构示意图。

[0015] 图2为图1中抗体反应板的结构示意图。

具体实施方式

实施例

[0016] 本实施例的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原和猪肺炎支原体蛋白抗原均为高纯度的真核表达蛋白,可按照真核蛋白表达常规技术或购买市售产品均可,以下不再赘述。

[0017] 本实施例的结构如图1和图2所示,图1为试剂盒的横切面图,即盒体内部试剂组成及位置示意图。图中的各标号为试剂盒中对应各区的实验用品,1为抗原包被反应板,2为3 mL猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清,3为3 mL猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清,4为3 mL猪肺炎支原体抗体阳性对照血清,5为3 mL猪肺炎支原体抗体阴性对照血清,6为33mL酶标抗体,7为33mL样品稀释液,8为150mL洗涤液,9为36mL底物缓冲液,10为18mL终止液,11为盒体。

[0018] 图2中,1'、3'、5'、7'为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌检测区,2'、4'、6'、8'为猪肺炎支原体检测区。

[0019] 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒,该试剂盒由盒体支架组成11,其中,所述盒体支架11中设有抗原包被反应板、放线杆菌阳性对照血清和阴性对照血清、支原体阳性对照血清和阴性对照血清,样品稀释液、洗涤液、底物缓冲液、终止液和酶标抗体反应板9'的规格为96孔,从左至右分为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白(1、3、5、7)猪肺炎支原体蛋白(2、4、6、8)检测区域,每个区域有12孔,所述检测区1、3、5、7包被猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原,2、4、6、8包被猪肺炎支原体蛋白抗原。抗原包被反应板为96孔可拆分的酶标板。

[0020] 试剂盒采用酶联免疫间接法制备,具体制备工艺如下:

(1)抗体反应板的制备:将96孔酶标版从左至右分为8个检测区,1、3、5、7和2、4、6、8(图2)。其中用抗原稀释液分别稀释猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原和猪肺炎支原体蛋白抗原,使其终浓度分别为0.35 μg/mL和0.65 μg/mL,分别按100 μL/孔和120 μL/孔包被1、3、5、7和2、4、6、8检测区域,4 °C放置12小时,用洗涤液洗板4次。用封闭液于37 °C湿盒内封闭1个小时,用洗涤液洗板4次,干燥后即为抗体反应板,置4 °C冰箱备用。

[0021] 上述抗原稀释液、洗涤液、封闭液的具体配方如下:

抗原稀释液(pH 9.6):碳酸钠(Na₂CO₃)0.318 g,碳酸氢钠(NaHCO₃)0.56 g,加去离子至

1000 mL,使其溶解并混匀。

[0022] 洗涤液(pH 7.4):磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)2.90 g,磷酸二氢钾(KH₂PO₄)0.20 g,氯化钠(NaCl)8.0 g,氯化钾(KCl)0.20 g,吐温-20(Tween-20)0.5 mL,加去离子水至1000 mL,使其溶解并混匀。

[0023] 封闭液(pH 7.4):牛血清白蛋白0.5 g,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)2.90 g,磷酸二氢钾(KH₂PO₄)0.20 g,氯化钠(NaCl)8.0 g,氯化钾(KCl)0.20 g,吐温-20(Tween-20)0.5 mL,加去离子水至1000 mL,使其溶解并混匀。

[0024] (2)猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清的制备:将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清1 mL加入到样品稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装。

[0025] 上述样品稀释液的具体配方如下:

样品稀释液:牛血清白蛋白0.1 g,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)2.90 g,磷酸二氢钾(KH₂PO₄)0.20 g,氯化钠(NaCl)8.0 g,氯化钾(KCl)0.20 g,吐温-20(Tween-20)0.5 mL,加去离子水至1000 mL,使其溶解并混匀。

[0026] (3)猪支原体抗体阳性对照血清的制备:将猪支原体抗体阳性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装。

[0027] (4)猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清的制备:将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装。

[0028] (5)猪支原体抗体阴性对照血清的制备:将猪支原体抗体阴性对照血清1 mL加入到血清稀释液中,最终定容至100 mL,然后按照1 mL/瓶的规格进行分装。

[0029] (6)酶标抗体的制备:将5 mg HRP溶于1 mL 0.5 mol/L pH 8.0的重碳酸钠中,加0.2 mL 1%氟二硝基苯(FDNB)无水乙醇溶液,在室温中混合后,加入1 mL 0.05 mol/L 过碘酸钠(NaIO₄),室温混匀,然后加入1 mL 0.2 mol/L 乙二醇溶液。然后加入5 mg氢化硼钠(NaBH₄),放4 ℃冰箱过夜,离心弃去沉淀物,上清即为酶标抗体。

[0030] (7)底物缓冲液的制备:柠檬酸钠0.467 g,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)1.84 g,加去离子水100 mL,溶化后加邻苯二胺0.04 g,溶化后加过氧化氢(H₂O₂)0.15 mL,混匀。

[0031] (8)终止液的制备:取4 mL浓硫酸加入32 mL去离子水中混匀。

[0032] (9)组盒:每个试剂盒配备1块抗体反应板,1瓶放线杆菌阳性对照血清、1瓶放线杆菌阴性对照血清、1瓶支原体阳性对照血清、1瓶支原体阴性对照血清,1瓶样品稀释液、1瓶洗涤液、1瓶底物缓冲液、1瓶终止液和1瓶酶标抗体,组成一个试剂盒。

[0033] 本实施例采用高纯度的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白和猪支原体蛋白作为包被抗原进行特异性的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪支原体抗体的检测。其原理是:将猪传染性胸膜肺炎放线杆菌蛋白抗原和猪支原体蛋白抗原分别包被到抗体反应板的检测区1、3、5、7和2、4、6、8中,所包抗原可分别与待检测样品中的特异性抗体反应,形成抗原-抗体复合物被吸附到抗体反应板上,再加入酶标抗体羊抗猪Ig G,形成固相抗原-抗体-抗猪抗体-HRP免疫复合物。如何待检测样品中含有相应的抗体,加入底物缓冲液后即出现显色反应,即判定为阳性,反之为阴性。

[0034] 该试剂盒的使用说明,其具体操作步骤如下:

(1)样品准备:将被检血清用稀释液做1:500稀释。

[0035] (2)编号和加样:在抗体反应板的检测区1、3、5、7和2、4、6、8中分别设空白对照、阴性对照和阳性对照各1孔,其余为待检样品孔。分别于各待检样品孔加1:500稀释的被检血清100 μl 。检测区1、3、5、7上的阴性对照孔加入猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阴性对照血清100 μl ,阳性对照孔加入猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体阳性对照血清100 μl ;检测区2、4、6、8上的阴性对照孔加入猪支原体抗体抗体阴性对照血清100 μl ,阳性对照孔加入猪支原体抗体阳性对照血清100 μl ;空白对照孔不加样。

[0036] (3)将抗体反应板用封板膜封好,37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用30分钟。用洗涤液洗涤4次,然后,每孔加入酶标抗体100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用30分钟,用洗涤液洗涤4次。

[0037] (4)加底物缓冲液:每孔加80 μl ,室温避光显色5分钟。然后,每孔加入终止液80 μl ,混匀。

[0038] (5) 测定:在酶标仪490 nm波长处,测定抗体反应板的每孔吸光值(X),除以阴性孔的吸光值(Y),求出每份被检血清的X/Y值。若X/Y值 ≥ 1 即为阳性,X/Y值 ≤ 0.8 为阴性。

[0039] 检测已知的阳性样品,结果见表1

表1

血清编号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
本试剂盒	放线杆菌	1.68	1.36	1.56	1.71	1.52	1.77	1.49	1.50	1.63	1.42	1.39	1.44
	支原体	1.73	1.58	1.65	1.57	1.48	1.39	1.61	1.53	1.49	1.70	1.63	1.57
现有检测方式	放线杆菌	1.41	1.20	1.34	1.50	1.23	1.56	1.33	1.21	1.45	1.29	1.23	1.21
	支原体	1.55	141	1.33	1.27	1.31	1.26	1.39	1.28	1.35	1.46	1.39	1.41

检测已知的强阳性样品,结果见表2

表2

血清编号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
本试剂盒	放线杆菌	0.41	0.45	0.38	0.43	0.39	0.51	0.32	0.37	0.30	0.42	0.29	0.33
	支原体	0.33	0.42	0.39	0.34	0.30	0.45	0.31	0.37	0.35	0.39	0.45	0.43
现有检测方式	放线杆菌	0.52	0.59	0.47	0.58	0.51	0.57	0.44	0.50	0.42	0.55	0.43	0.50
	支原体	0.45	0.51	0.44	0.46	0.37	0.52	0.41	0.47	0.49	0.51	0.37	0.53

除上述实施外,本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案,均落在本发明要求的保护范围。

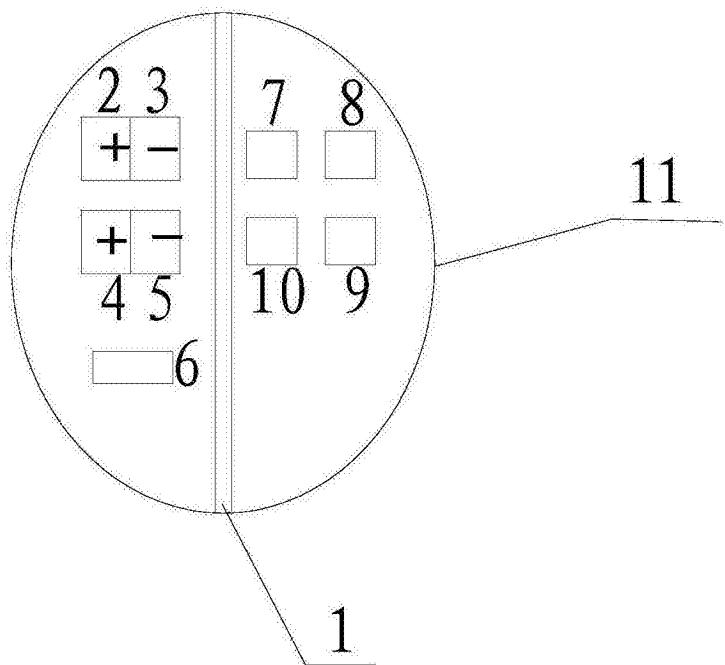


图1

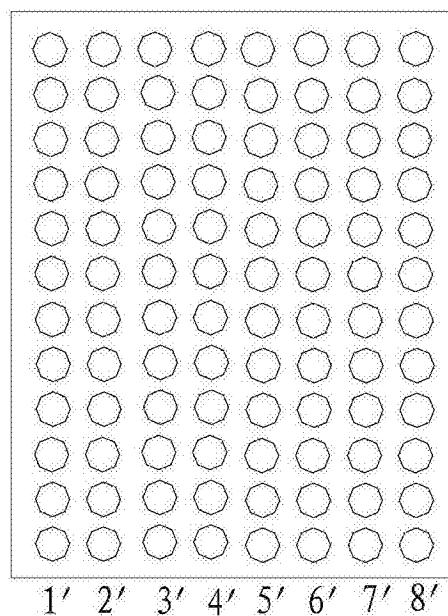


图2

专利名称(译)	一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106093384A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610642066.X	申请日	2016-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	河南省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	李海利 徐引弟 朱文豪 王治方 焦文强 王克领 郎利敏 张立宪 张青娴 游一		
发明人	李海利 徐引弟 朱文豪 王治方 焦文强 王克领 郎利敏 张立宪 张青娴 游一		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/531 G01N33/56933		
代理人(译)	何朝旭 朱磊		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种含有猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗体和猪肺炎支原体抗体的ELISA检测试剂盒及其制备方法，属于化学技术领域。本发明的试剂盒包括盒体，所述盒体内设支架，所述支架中设有抗体反应板区，放线杆菌阳性对照血清区、阴性对照血清区，支原体阳性对照血清区、阴性对照血清区，样品稀释液区，洗涤液区，底物缓冲液区，终止液区和酶标抗体区，各区内放置相应的试剂。

