



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108896758 A

(43)申请公布日 2018.11.27

(21)申请号 201810436738.0

(22)申请日 2018.05.09

(83)生物保藏信息

CCTCC No:M 2018116 2018.03.11

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 郑福英 陈启伟 丁耀忠

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理
有限公司 11279

代理人 席勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(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

一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒、制备方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒、制备方法及其应用,所述试剂盒中包括:(1)溶酪大球菌平板凝集试验抗原;(2)标准阳性血清;(3)标准阴性血清;本发明试剂盒操作简单方便,可用来检测溶酪大球菌血清抗体,适合在各基层兽医有关单位以及养殖场广泛推广使用;本发明中的试剂盒在检测样品时只需要使用几种简单耗材,不需要任何其它设备,即使在条件比较简陋的养殖场也可以使用;结果判定直观,眼观即可;操作人员不需要专业知识,不必接受专业培训,只参照说明书就可进行检测;成本低廉,经济实惠,使用者均可接受。

1. 一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括:(1)溶酪大球菌平板凝集试验抗原;(2)标准阳性血清;(3)标准阴性血清。

2. 一种制备权利要求1中的基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤A、溶酪大球菌平板凝集试验抗原的制备:将溶酪大球菌菌株进行增菌培养后,进行水浴加热灭活,再离心取沉淀,用5g/L石炭酸生理盐水悬浮得到;

步骤B、标准阳性血清的制备:取溶酪大球菌进行增菌培养后,离心取沉淀,进行水浴灭活,与弗氏完全佐剂混匀,免疫未感染过溶酪大球菌的健康鸭,从鸭翅静脉采血分离血清,用琼脂扩散试验检测抗体效价,效价达1:32以上即为标准阳性血清;

步骤C、标准阴性血清的制备:取健康鸭的颈动脉血,收集至大离心管中,室温过夜,离心,取上清,经琼脂扩散试验检测,溶酪大球菌血清抗体为阴性,即得到标准阴性血清;

步骤D、将上述制备的溶酪大球菌平板凝集试验抗原、标准阳性血清、标准阴性血清组装成基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒。

3. 如权利要求2所述的制备权利要求1中的基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒的制备方法,其特征在于:所述步骤A中制备溶酪大球菌平板凝集试验抗原的溶酪大球菌菌株保存于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC No:M 2018116。

4. 如权利要求1所述的一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒在检测溶酪大球菌血清抗体中的应用。

5. 一种溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测血清抗体的方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一、取出4℃保存的溶酪大球菌平板凝集试验抗原,恢复至室温,充分摇匀;

步骤二、在玻璃板上分别滴加待检血清、标准阳性血清、标准阴性血清各25 μ l;

步骤三、分别加入充分摇匀的溶酪大球菌平板凝集试验抗原25 μ l,充分混匀;

步骤四、室温静置2~5分钟,观察溶酪大球菌平板凝集试验抗原与对应血清的凝集现象;

步骤五、根据其是否凝集来判定阳性、阴性结果。

一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 溶酪大球菌(*Macrococcus caseolyticus*)属于巨球菌属,该属包括7个菌种,溶酪大球菌是其中的代表菌种。该菌可特异性的从动物皮和动物类食品中分离到,比如牛乳、生牛肉、鸡肉、火腿等,我国传统肉制品广式腊肠中也能分离到;该菌可引起鱼发病,已从牙鲆、鲭鱼、加州鲈等鱼体内分离到,给水产养殖带来了危害;另外,溶酪大球菌还可以使犬发病,表现鼻炎的症状。该菌还携带耐甲氧西林的SCCmec原件(*mecB*~*carrying* SCCmec element),表现对青霉素类药物高度耐药。

[0003] 目前国内外对溶酪大球菌的研究报道甚少,GenBank基因库中仅有一株溶酪大球菌的全序列,对于溶酪大球菌的分子生物学检测技术报道的非常少,对于溶酪大球菌的血清抗体检测技术在国内外均未见报道,更没有一种实现商品化的检测溶酪大球菌血清抗体的抗原。鉴于此,有必要开发一种可检测溶酪大球菌血清抗体的抗原及其对应的试剂盒,用来对溶酪大球菌的感染状况进行调查。

发明内容

[0004] 为了解决现有技术存在的上述问题,本发明提供了一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒及其制备方法。

[0005] 本发明的另一目的是提供一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒在检测溶酪大球菌血清抗体中的应用。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测血清抗体的方法。

[0007] 本发明所采用的技术方案为:一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒,所述试剂盒包括:(1)溶酪大球菌平板凝集试验抗原;(2)标准阳性血清;(3)标准阴性血清。

[0008] 一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 步骤A、溶酪大球菌平板凝集试验抗原的制备:将溶酪大球菌菌株进行增菌培养后,进行水浴加热灭活,再离心取沉淀,用5g/L石炭酸生理盐水悬浮得到;

[0010] 步骤B、标准阳性血清的制备:取溶酪大球菌进行增菌培养后,离心取沉淀,进行水浴灭活,与弗氏完全佐剂混匀,免疫未感染过溶酪大球菌的健康鸭,从鸭翅静脉采血分离血清,用琼脂扩散试验检测抗体效价,效价达1:32以上即为标准阳性血清;

[0011] 步骤C、标准阴性血清的制备:取健康鸭的颈动脉血,收集至大离心管中,室温过

夜,离心,取上清,经琼脂扩散试验检测,溶酪大球菌血清抗体为阴性,即得到标准阴性血清;

[0012] 步骤D、将上述制备的溶酪大球菌平板凝集试验抗原、标准阳性血清、标准阴性血清组装成基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒。

[0013] 进一步地,所述步骤A中制备溶酪大球菌平板凝集试验抗原的溶酪大球菌菌株保存于中国典型培养物保藏中心,保藏编号CCTCC No:M 2018116。

[0014] 一种溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测血清抗体的方法,包括如下步骤:

[0015] 步骤一、取出4℃保存的溶酪大球菌平板凝集试验抗原,恢复至室温,充分摇匀;

[0016] 步骤二、在玻璃板上分别滴加待检血清、标准阳性血清、标准阴性血清各25 μ l;

[0017] 步骤三、分别加入充分摇匀的溶酪大球菌平板凝集试验抗原25 μ l,充分混匀;

[0018] 步骤四、室温静置2~5分钟,观察溶酪大球菌平板凝集试验抗原与对应血清的凝集现象;

[0019] 步骤五、根据其是否凝集来判定阳性、阴性结果。

[0020] 本发明的有益效果为:

[0021] a. 试剂盒操作简单方便,适合在各基层兽医有关单位以及养殖场广泛推广使用,本发明中的试剂盒在检测样品时只需要玻璃板、移液器、移液器枪头等简单耗材,不需要任何其它设备,即使在条件比较简陋的养殖场也可以使用;

[0022] b. 结果判定直观,眼观即可;

[0023] c. 操作人员不需要专业知识,不必接受专业培训,只参照说明书就可进行检测;

[0024] d. 成本低廉,经济实惠,使用者均可接受。

附图说明

[0025] 图1为溶酪大球菌间接血凝抗原检测标准阳性血清、标准阴性血清以及腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌的阳性血清;

[0026] 图1中,“+”表示检测标准阳性血清,“-”表示检测标准阴性血清,“腐生”表示检测腐生葡萄球菌的阳性血清,“松鼠”表示检测松鼠葡萄球菌的阳性血清,“金黄”表示检测金黄色葡萄球菌的阳性血清;“粪肠”表示检测粪肠球菌的阳性血清;“尿肠”表示检测尿肠球菌的阳性血清。溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测对应的标准阳性血清、标准阴性血清均成立;检测腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌的阳性血清,结果均为阴性;

[0027] 图2为用溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测2倍系列稀释的标准阳性血清和原倍标准阴性血清;

[0028] 图2中,1:2~1:32表示血清的稀释倍数,该抗原检测到的标准阳性血清抗体效价为1:32,标准阴性血清无凝集,结果成立;

[0029] 图3为用琼脂扩散试验检测2倍系列稀释的标准阳性血清和原倍标准阴性血清;

[0030] 图3中,1:2~1:32表示血清的稀释倍数,该方法检测到标准阳性血清抗体效价为1:32,标准阴性血清无琼扩条带出现,结果成立。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例对本发明做进一步详细说明。

[0032] 一、基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成试剂盒：

[0033] 试剂盒中包括溶酪大球菌平板凝集试验抗原4瓶，2ml/瓶，4℃保存；标准阳性血清1瓶，0.5ml/瓶，-20℃冻存；标准阴性血清1瓶，0.5ml/瓶，-20℃冻存。该试剂盒可检测约300份血清，保存期为6个月。

[0034] 用来制备抗原的溶酪大球菌MCS D (Macrococcus caseolyticus MCS D) 菌株为来源于鸭的田间分离株，已于2018年3月11日保存于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC No:M 2018116，保藏地址(中国·武汉·武汉大学)，该菌株的存活性为存活。

[0035] 二、一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒的制备方法：

[0036] 步骤A、石炭酸生理盐水的制备：

[0037] 配制5g/L (w/v) 石炭酸生理盐水，即称取9克NaCl，5克苯酚(石炭酸)，加去离子水，定容至1000ml，高压灭菌。具体制备量可根据实际需要调整。

[0038] 步骤B、溶酪大球菌平板凝集试验抗原制备：

[0039] 1) 取出-80℃冻存加入20% (v/v) 甘油保存的溶酪大球菌CCTCC No:M 2018116菌株的液体菌种，划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)平板上，37℃、5%CO₂箱中培养15~20h。

[0040] 2) 挑取TSA平板上的单菌落，接于胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)内，37℃、200r/min震荡培养15~18h，然后再按1:100 (v/v) 比例接种于新鲜的TSB培养基，37℃、200r/min震荡培养6~8h，至OD₆₀₀值为1.0~1.2；

[0041] 3) 70℃水浴灭活45min；

[0042] 4) 将灭活后的菌液以4000r/min离心15min，弃上清，再用5g/L (w/v) 石炭酸生理盐水洗涤沉淀2次；

[0043] 5) 用商品化结晶紫溶液对菌体沉淀进行染色，操作方法按照说明书进行。

[0044] 6) 最后用菌液原体积20%的5g/L (w/v) 石炭酸生理盐水悬浮菌体沉淀，混匀，即为溶酪大球菌平板凝集试验抗原。

[0045] 步骤C、标准阳性血清的制备：

[0046] 取-80℃冻存加入20% (v/v) 甘油保存的溶酪大球菌CCTCC No:M 2018116 菌株的液体菌种，用接种环蘸取菌液，划线接种于TSA平板上，置于37℃、5% CO₂箱中培养15~20h，再挑取单菌落接种于5ml TSB中，37℃、200r/min培养15~18h，然后把1ml菌液转接到100ml新鲜TSB中，继续在37℃、200r/min 震荡培养6~8h，直至菌液的OD₆₀₀值达到1.0~1.2；培养完毕后，将全部菌液以4000r/min离心15min，用浓度0.01M、pH7.2的磷酸盐缓冲液将菌体沉淀洗涤3遍，再用10ml磷酸盐缓冲液悬浮菌体，进行细菌计数，然后70℃水浴灭活45min；取上述灭活菌液与弗氏完全佐剂等体积混匀，免疫未感染过溶酪大球菌的健康鸭，每只鸭接种50亿个细菌。免疫后2周再加强免疫一次；二次免疫后2周，从鸭翅静脉采血分离血清，用琼脂扩散试验检测血清抗体效价，效价达1:32及以上即为标准阳性血清；若二免后血清抗体效价达不到标准，可再次加强免疫，直至符合标准。

[0047] 步骤D、标准阴性血清的制备：

[0048] 选取体重2~2.5公斤的健康鸭，颈动脉放血直至死亡，将血液收集至大离心管中，旋紧盖子，室温过夜，然后3000r/min离心15min，取上清，经琼脂扩散试验检测，溶酪大球菌

血清抗体为阴性,即为标准阴性血清;

[0049] 步骤E、将上述制备的溶酪大球菌平板凝集试验抗原、标准阳性血清、标准阴性血清组装成基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒。

[0050] 三、基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒的应用方法示例:

[0051] 一种溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测血清抗体的方法,包括如下步骤:

[0052] 1. 按需取出4℃保存的溶酪大球菌平板凝集试验抗原,恢复至室温,充分摇匀;

[0053] 2. 在玻璃板上分别滴加待检血清、标准阳性血清、标准阴性血清各25μl;

[0054] 3. 分别加入充分摇匀的溶酪大球菌平板凝集试验抗原25μl,充分混匀;

[0055] 4. 室温静置2~5min,观察溶酪大球菌平板凝集试验抗原与对应血清的凝集现象;

[0056] 5. 根据其是否凝集及凝集程度来判定阳性、阴性结果。

[0057] 6. 凝集反应强度的判定标准:

[0058] 1) ++++: 出现大的紫色凝集块,液体清亮透明,即100%凝集;

[0059] 2) +++: 有明显的紫色凝集片,液体几乎透明,即75%凝集;

[0060] 3) ++: 有可见的紫色凝集片,液体轻度浑浊,即50%凝集;

[0061] 4) +: 有小的紫色颗粒状物,液体混浊,即25%凝集;

[0062] 5) -: 无凝集颗粒出现,液体呈均匀混浊,即无凝集。

[0063] 7. 结果判定:

[0064] 标准阳性血清对照应呈现100%凝集(++++) ;标准阴性对照血清应呈现无凝集(-)。

[0065] 在对照合格的前提下,观察待检血清反应。呈现50%凝集(++) 及以上的血清判定为阳性,呈现25%凝集(+) 及以下者判定为阴性。

[0066] 四、溶酪大球菌平板凝集试验抗原的特异性和敏感性检测:

[0067] 特异性检测:用溶酪大球菌平板凝集试验抗原检测腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、尿肠球菌的阳性血清,图1所示,结果均为阴性,表明该抗原特异性较好。

[0068] 抗原敏感性检测:用生理盐水将标准阳性血清依次作1:2、1:4、1:8、1:16、1:32倍稀释,在玻璃板上分别滴加上述稀释的血清样本、标准阳性血清、标准阴性血清各25μl,然后依次加入25μl溶酪大球菌平板凝集试验抗原,充分混匀,室温静置2~5min。结果表明,当将标准阳性血清稀释至1:32时,图2所示,虽然凝集反应明显减弱,但仍可判定为阳性;图3所示,与琼脂扩散试验的检测结果相同。因此,检测标准阳性血清时,这两种方法的敏感性相近。

[0069] 五、试剂盒检测田间样品

[0070] 对采自规模化鸭场的178份鸭血清,用本发明涉及的溶酪大球菌平板凝集试验抗原和琼脂扩散试验分别进行检测。结果表明,溶酪大球菌平板凝集试验检测到的溶酪大球菌阳性率为42.1% (75/178),琼脂扩散试验检测到的阳性率为38.2% (68/178),两种方法检测结果的符合率为96.1% (171/178),结果如表1所示。

[0071] 表1本发明的试剂盒与琼脂扩散试验的检测结果

[0072]	本发明的试剂盒				
	阳性血清	阴性血清	总样品数		
[0073]	琼脂扩散试验	阳性血清	68	0	68
		阴性血清	7	103	110
		总样品数	75	103	178

[0074] 以上结果表明,在检测田间样本时,本发明中涉及的溶酪大球菌平板凝集试验抗原及配套的试剂盒比琼脂扩散试验具有更高的敏感性,能有效检测鸭体内的溶酪大球菌血清抗体。另外,该方法操作简单方便,结果判定直观,可在实际生产中推广应用,开展溶酪大球菌流行病学调查。

[0075] 本发明不局限于上述最佳实施方式,任何人在本发明的启示下都可得出其他各种形式的产品,但不论在其形状或结构上作任何变化,凡是具有与本申请相同或相近似的技术方案,均落在本发明的保护范围之内。

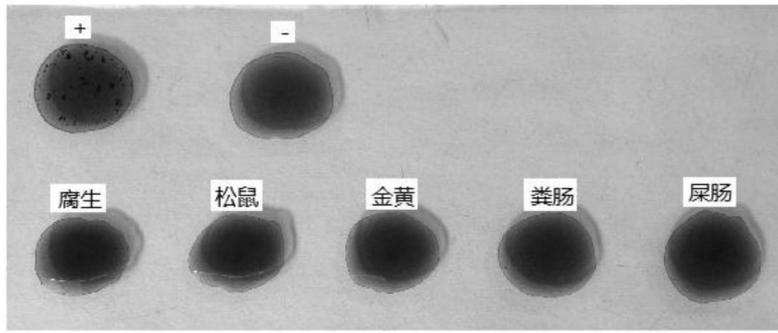


图1

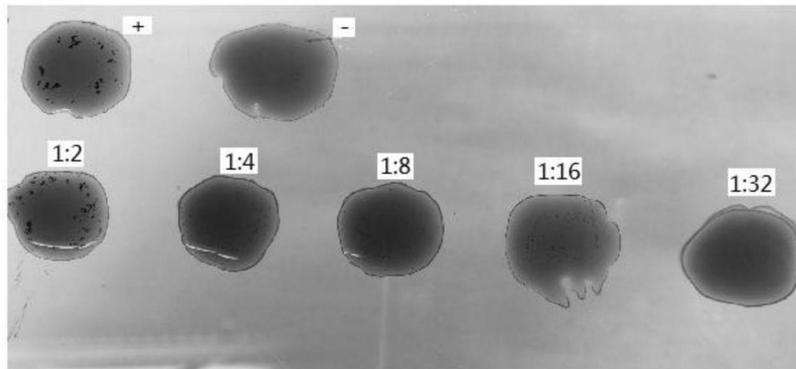


图2

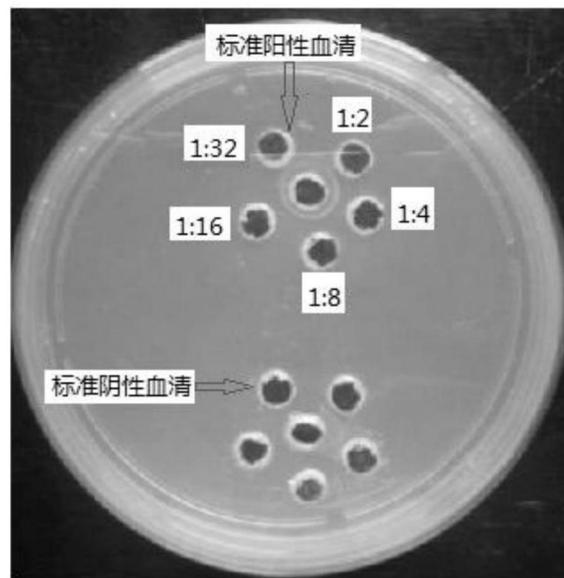


图3

专利名称(译)	一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒、制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN108896758A	公开(公告)日	2018-11-27
申请号	CN201810436738.0	申请日	2018-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院兰州兽医研究所		
[标]发明人	郑福英 陈启伟 丁耀忠		
发明人	郑福英 陈启伟 丁耀忠		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911		
代理人(译)	席勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于溶酪大球菌平板凝集试验抗原组成的试剂盒、制备方法及其应用，所述试剂盒中包括：(1)溶酪大球菌平板凝集试验抗原；(2)标准阳性血清；(3)标准阴性血清；本发明试剂盒操作简单方便，可用于检测溶酪大球菌血清抗体，适合在各基层兽医有关单位以及养殖场广泛推广使用；本发明中的试剂盒在检测样品时只需要使用几种简单耗材，不需要任何其它设备，即使在条件比较简陋的养殖场也可以使用；结果判定直观，眼观即可；操作人员不需要专业知识，不必接受专业培训，只参照说明书就可进行检测；成本低廉，经济实惠，使用者均可接受。

