



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109283342 A

(43)申请公布日 2019.01.29

(21)申请号 201811371911.X

(22)申请日 2018.11.16

(71)申请人 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

地址 300461 天津市滨海新区天津港保税区京门大道158号

(72)发明人 肖妍 赵祥平 霍蕾 董志珍
赵丹 张俊哲 刘河冰 马立才
杨若松 刘薇

(74)专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司 12108

代理人 王晓红

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表1页

(54)发明名称

一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,利用Omp31基因构建重组工程菌,表达Omp31重组蛋白作为包被原制备蛋白包被板,建立ELISA抗体检测试剂盒,本试剂盒特异性好、敏感性高,检测成本低廉,适于推广。在本病的抗体水平检测、流行病学调查、类症鉴别及采取有效防控措施方面提供重要方法。本试剂盒主要组份:Omp31蛋白包被板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标记兔抗多克隆抗体、底物液、终止液、稀释液、洗涤液、血清稀释板。

1. 一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,包括Omp31重组蛋白包被板,所述Omp31重组蛋白是使用部分Omp31基因序列并经密码子优化后得到如序列表中的SEQ ID NO.1所示核苷酸序列全基因合成,经酶切后将Omp 31基因连接到pET-28a(+)质粒中,经鉴定后转化大肠杆菌BL21感受态细胞,诱导表达,亲和层析法分离纯化获得的。

2. 根据权利要求1所述检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,所述蛋白包被板的包被方法为:Omp31重组蛋白用0.5M碳酸盐缓冲液稀释,向96孔酶标板各孔中加入0.1mL,2~8℃包被15h;每孔加250μL封闭液,室温封闭2h,弃去封闭液后室温干燥2h;将包被板与干燥剂放入铝箔袋内,真空密封。

3. 根据权利要求1所述检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,还包括酶标记兔抗牛多克隆抗体,酶标记兔抗牛多克隆抗体制备方法如下:采用牛多克隆抗体免疫家兔,使用琼脂扩散实验检测抗体效价,经Protein A柱纯化多抗,辣根过氧化物酶HRP标记。

一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及ELISA试剂盒,尤其是一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌是一种革兰氏阴性、细胞内寄生菌,为小杆状菌,可以在很多种家畜体内存活,牛、羊、猪、狗以及骆驼、鹿等动物都可能被感染,通过接触感染动物或者被感染的食物以及实验室接触可传播给人类。对人造成感染的主要是马耳他布鲁氏杆菌(“马耳他热”),流产布鲁氏杆菌,牛、羊布鲁氏杆菌、猪布鲁氏杆菌和狗布鲁氏杆菌,其中以羊布鲁氏杆菌病最为多见。

[0003] 1886年英国军医Bruce在马尔他岛从死于“马尔他热”的士兵脾脏中分离出“布鲁氏菌”,首次明确了该病的病原体。人患病后,首先出现的症状是发烧,体温可达38-40℃,持续时间长,处于长期低热状态;有的人体温呈波浪状,即高热几天,体温降下来几天,又开始高,反复多次,所以布鲁氏杆菌病又称浪状热。

[0004] 布鲁氏杆菌病自出现至今,关于本病诊断方法与研究成果不断涌现。传统布鲁氏杆菌检测方法,由于其检测周期长、程序复杂、所需试剂繁多等缺点已远远不能满足现代检测要求。以聚合酶链式反应技术为代表的病原核酸检测技术在实际应用中存在一些问题,如普通聚合酶链式反应技术需要专门的仪器,而且存在容易交叉污染和操作过程繁琐的特点。免疫学检测方法是应用免疫学理论设计的一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及其分泌的细胞因子的实验方法。抗原与相应抗体相遇可发生特异性结合,并在外界条件的影响下呈现某种反应现象,如凝集或沉淀,藉此可用已知抗原(或抗体)检测未知抗体(或抗原)。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种快速、简便、灵敏、准确的检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,包括Omp31重组蛋白包被板,所述Omp31重组蛋白是使用部分Omp31基因序列并经密码子优化后得到如序列表中的SEQ ID NO.1所示核苷酸序列全基因合成,经酶切后将Omp 31基因连接到pET-28a(+)质粒中,经鉴定后转化大肠杆菌BL21感受态细胞,诱导表达,亲和层析法分离纯化获得的。

[0007] 所述蛋白包被板的包被方法为:Omp31重组蛋白用0.5M碳酸盐缓冲液稀释,向96孔酶标板各孔中加入0.1mL,2~8℃包被15h;每孔加250μL封闭液,室温封闭2h,弃去封闭液后室温干燥2h;将包被板与干燥剂放入铝箔袋内,真空密封。

[0008] 还包括酶标记兔抗牛多克隆抗体,酶标记兔抗牛多克隆抗体制备方法如下:采用牛多克隆抗体免疫家兔,使用琼脂扩散实验检测抗体效价,经Protein A柱纯化多抗,辣根过氧化物酶HRP标记。

[0009] 本发明的有益效果是:用于布鲁氏杆菌抗体的检测,试剂盒特异性好、敏感性高,

检测成本低廉,适于推广。在本病的抗体水平检测、流行病学调查、类症鉴别及采取有效防控措施方面提供重要方法。

具体实施方式

[0010] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明:

[0011] 本发明的检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,包括Omp31重组蛋白包被板,所述Omp31重组蛋白是使用部分Omp31基因序列并经密码子优化后得到如序列表中的SEQ ID NO.1所示核苷酸序列全基因合成,经酶切后将Omp 31基因连接到pET-28a(+)质粒中,经鉴定后转化大肠杆菌BL21感受态细胞,诱导表达,亲和层析法分离纯化获得的。

[0012] 所述蛋白包被板的包被方法为:Omp31重组蛋白用0.5M碳酸盐缓冲液稀释,向96孔酶标板各孔中加入0.1mL,2~8℃包被15h;每孔加250μL封闭液,室温封闭2h,弃去封闭液后室温干燥2h;将包被板与干燥剂放入铝箔袋内,真空密封。

[0013] 还包括酶标记兔抗牛多克隆抗体,酶标记兔抗牛多克隆抗体制备方法如下:采用牛多克隆抗体免疫家兔,使用琼脂扩散实验检测抗体效价,经Protein A柱纯化多抗,辣根过氧化物酶HRP标记。

[0014] 1组分的制备

[0015] 1.1抗原的制备

[0016] 以Brucella melitensis strain 1520mp31基因序列目标物,全基因合成此序列,经EcoRI和XhoI酶切后将Omp 31基因连接到pET-28a(+)质粒中,经鉴定后转化大肠杆菌BL21感受态细胞,IPTG诱导表达,亲和层析法分离纯化获得的。

[0017] 1.1.1菌株、质粒

[0018] E.coli DH5α、E.coli BL21(DE3)购自TaKaRa公司;表达载体pET-28a购自Promega公司。

[0019] 1.1.2试剂

[0020] 限制性内切酶、核酸及蛋白质标准分子量Marker均购自Fennentas公司;质粒抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;兔抗牛IgG-HRP、兔抗羊IgG-HRP购自KPL公司;蛋白纯化His.BindKits购自Merk公司。

[0021] 根据已登录的Brucella melitensis strain 1520mp31全基因序列,选取其中能够表达244个氨基酸的基因并经密码子优化,上游引入EcoRI酶切位点,下游引入XhoI酶切位点,进行全基因合成并随后导入质粒中(南京金斯瑞生物科技有限公司)。全基因合成序列如序列表中的SEQ ID NO.1所示。

[0022] 1.1.3表达载体的构建

[0023] 含有全基因序列的质粒转化到DH5α菌株中,用质粒提取试剂盒提取质粒,经EcoRI和XhoI酶切,克隆于表达载体pet28a中构建重组质粒pet28a-Omp 31。

[0024] 1.1.4重组蛋白Omp 31的诱导表达和纯化

[0025] 将重组质粒pet28a-Omp 31转化大肠杆菌BL21(DE3)中,挑取阳性克隆菌,接种于LB培养基。于37℃摇床200r/min振荡培养过夜,按1:100的比例接种至5ml LB培养基中。培养至OD600为0.6-0.8时,加入IPTG至终浓度1mmol/L,诱导表达6h后收菌。将1.5ml菌液离心,取沉淀,加入80μL1%SDS和20μL蛋白上样缓冲液,振荡混匀后,沸水煮5min,稍离心,取

上清10μL进行12%SDS-PAGE分析。按照Ni-NTA蛋白纯化试剂盒操作说明提纯蛋白。使用电转印仪在60mA条件下,4℃转移过夜,将SDS胶面蛋白转移至PVDF硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉PBST封闭液4℃封闭过夜,然后将膜装入内有His免血清一抗(1:1000稀释)的无菌小塑料袋中,孵育结合2h,用TBST室温摇床上脱色,洗3次,每次5min。再加入二抗(1:10000稀释,羊抗兔IgG-HRP购自Novagen公司),室温孵育结合2h,然后用TBST在摇床上洗3次,每次5min。DAB显色。实验结果表明,含有阳性重组载体的大肠杆菌在IPTG诱导下表达,不同诱导时间的产物经SDS-PAGE检测,在大约29KD处可见表达条带,与预期蛋白大小相一致,而未诱导菌和空载体菌诱导后,均没有出现此蛋白条带纯化的蛋白为所要表达的目的蛋白。

[0026] 1.2酶标多克隆抗体(酶标记物)制备

[0027] 采用牛多克隆抗体免疫家兔,多次免疫后进行采血,用琼脂扩散实验测定抗体效价,使用抗原柱对兔抗牛多抗进行纯化。采用辣根过氧化物酶(HRP)对所制多克隆抗体进行标记,制成酶标多克隆抗体。

[0028] 1.3蛋白包被板制备

[0029] 在无菌条件下,将纯化的蛋白用碳酸盐缓冲液稀释,向96孔酶标板各孔中加入0.1mL,2~8℃15h。加封闭液于已包被好的酶标板各孔内,每孔250μL,室温封闭2h,弃去封闭液。将包被板放入铝箔袋内,真空密封。

[0030] 1.4阳性对照和阴性对照

[0031] 采购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

[0032] 2试剂盒组装

[0033] 蛋白包被板 96孔

[0034] 阴性对照 0.1mL

[0035] 阳性对照 0.1mL

[0036] 酶标抗体 0.7mL

[0037] 使用说明书份

[0038] 底物A液 30mL(主要成分:过氧化氢脲、PEG-2000、十二水合磷酸氢二钠、一水合柠檬酸)

[0039] 底物B液 30mL(主要成分:一水合柠檬酸、硫代硫酸钠、光稳定剂292、DMF)

[0040] 25倍洗涤浓缩液 60mL

[0041] 终止液 60mL

[0042] 稀释液 200mL

[0043] 血清稀释板 96孔

[0044] 3用法与判定

[0045] 3.1样品准备

[0046] 取动物全血,待血液凝固后,以4000r/min离心10min,收集上清。也可采集血液,待凝固后自然析出血清。血清应清亮,无溶血。

[0047] 3.2洗涤液的配制

[0048] 使用前,将浓缩的洗涤液恢复至室温(20~25℃),并摇动,使结晶溶解,然后用去离子水作1:25稀释,混匀即可。

[0049] 3.3待检血清和对照血清的稀释

[0050] 在血清稀释板中将待检血清、标准阴性对照血清和标准阳性对照血清作1:50稀释,其中标准阴、阳性对照血清各加2孔。加入血清后充分混匀。

[0051] 3.4操作步骤

[0052] 3.4.1阴性对照血清、阳性对照血清、样品稀释液和待检样品各取50μL加至相应微孔中,盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下(25±2℃),避光反应30min。

[0053] 3.4.2甩掉孔中的溶液,每孔加入稀释好的洗涤液300μL,震荡洗涤4次,每次30s左右,在干净吸水纸上拍打去除残存洗涤液;每孔加入100μL酶标二抗工作液,盖好盖板膜,轻轻振荡酶标板10s,充分混匀,室温下(25±2℃)避光反应30min。

[0054] 3.3甩掉孔中的溶液,每孔加入稀释好的洗涤液300μL,震荡洗涤4次,每次30s左右,在干净吸水纸上拍打去除残存洗涤液;然后尽快将底物液A和底物液B等量混合,混匀后每孔加入100μL,盖上盖板膜,室温(25±2℃)下,避光反应15min。

[0055] 3.4每孔加入终止液50μL,在酶标仪上读各孔OD_{450nm}值。

[0056] 3.5结果判定

[0057] 计算出样本稀释液的平均OD值。样本稀释液被认为抑制百分比(I%)为0,即不抑制。其它对照和样品的抑制百分比按照下列公式计算:

[0058] $I\% = 100 - \text{被测样品OD值} \times 100 / \text{样本稀释液的平均OD值}$ 。

[0059] 如果 $I\% \geq 70$,判为布鲁氏菌抗体阳性;如果 $I\% < 70$,判为布鲁氏菌抗体阴性。

[0060] 4试剂盒验证

[0061] 4.1敏感性

[0062] 根据临界值可将试验结果分成阳性或阴性,每批次设6孔细菌抗原对照,细菌抗原对照不加任何血清,直接用PBST稀释至工作浓度,与血清/细菌抗原复合物同步加入酶标板孔,50μL/孔。测细菌抗原对照OD_{450nm}值。以细菌抗原对照OD_{450nm}值50%为临界值,表示阻断50%反应的对照OD_{450nm}值。以细菌抗原对照平均OD_{450nm}值的50%为临界值,被检血清OD_{450nm}值大于临界值的阴性孔,小于或等于临界值的孔为阳性孔。

[0063] 以标准血清阳性检出率来表示,以78份标准阳性血清样品和65份标准阴性血清检测结果的比较确定其敏感性,同时要确定试剂盒的最低检出量。

[0064] 敏感性 = 阳性样品 / 总样品 × 100%

[0065] 特异性 = 阴性样品 / 总样品 × 100%

[0066] 4.2交叉反应

[0067] 以其他猪病病毒阳性血清作为检测抗体,以布鲁氏菌阳性样品作为对照,以PBS作为空白对照,用三批次试剂盒,每种病毒4份阳性血清做交叉反应。

[0068] 4.3精密度

[0069] 精密度通常用变异系数表示,三批次试剂盒对一直阴性、弱阳性、强阳性对照样品进行4次重复检测,计算变异系数。变异系数,即一系列检测数据的标准差与其相应的均值的比值。

[0070] 4.4结果

[0071] 4.4.1敏感性

[0072] 表1试剂盒阴性、阳性临界值测定结果

[0073]

批号	细菌抗原对照 OD _{450nm} 值						平均值	阴、阳性临界值
1	2.226	2.237	2.261	2.019	2.042	2.062	2.144	1.072
2	2.262	2.141	2.040	2.104	2.081	2.157		
3	2.083	2.251	2.254	2.117	2.199	2.053		

[0074] 该试剂盒阴性、阳性临界值为OD_{450nm}值≤1.072为阳性,OD_{450nm}值>1.072为阴性。

[0075] 表2敏感度检测结果

[0076]

血清种类	样品数	阳性检出样品数	敏感性(%)	特异性(%)
标准阳性血清	78	74	94.9	—
标准阴性血清	65	3	—	95.4

[0077] 布鲁氏菌抗体检测试剂盒对标准阳性血清敏感性为94.9%,特异性为95.4%。

[0078] 4.4.2交叉反应

[0079] 表3试剂盒交叉反应检测结果

[0080]

批次	口蹄疫 O 型阳性血清		口蹄疫 A 型阳性血清		口蹄疫亚洲 I 型阳性血清		牛副伤寒病阳性血清		PBS 缓冲液		布鲁氏菌阳性血清	
1	1.939	1.976	1.707	1.627	1.975	1.746	1.902	1.856	2.293	2.193	0.397	0.503
	1.935	2.128	1.517	1.593	1.746	1.875	2.080	1.911	2.219	2.099	0.388	0.702
2	1.906	2.044	1.772	1.486	1.797	1.742	1.765	1.833	2.121	2.255	0.678	0.685
	1.926	1.922	1.780	1.599	1.995	1.811	1.971	1.885	2.009	2.120	0.495	0.725
3	2.003	2.140	1.776	1.680	1.991	1.794	1.992	1.568	2.113	2.133	0.443	0.421
	2.122	2.038	1.543	1.575	1.972	1.703	1.905	1.781	2.151	2.281	0.431	0.225

[0081] 布鲁氏菌抗体检测试剂盒与口蹄疫O型阳性血清、口蹄疫A型阳性血清、口蹄疫亚洲I型阳性血清、牛副伤寒病阳性血清没有交叉反应。

[0082] 4.4.3精密度

[0083] 表4三批试剂盒精密度检测结果

[0084]

检测项目	1		2		3		CV%
阴性	1.811	1.898	1.727	2.107	2.153	1.901	6.7
	2.057	1.89	2.001	1.848	1.987	1.821	
弱阳性	0.798	0.815	0.833	0.956	0.812	0.896	8.5
	0.902	0.948	0.706	0.907	0.925	0.853	
强阳性	0.323	0.371	0.382	0.358	0.356	0.338	7.0
	0.357	0.349	0.385	0.312	0.397	0.353	

[0085] 对三批次试剂盒的精密度检测结果,阴性血清变异系数小于6.7%,弱阳性血清变异系数小于8.5%,强阳性变异系数小于7.0%,该试剂盒变异系数均小于10%。

[0086] 4.5结论

[0087] 本发明的布鲁氏菌抗体检测试剂盒对标准阳性血清敏感性为94.9%,特异性为95.4%。试剂盒与口蹄疫O型阳性血清、口蹄疫A型阳性血清、口蹄疫亚洲I型阳性血清、牛副伤寒病阳性血清没有交叉反应。对三批次试剂盒的精密度检测结果,阴性血清变异系数小于6.7%,弱阳性血清变异系数小于8.5%,强阳性变异系数小于7.0%,该试剂盒变异系数均小于10%。

[0088] 综上所述,本发明的内容并不局限在上述的实施例中,相同领域内的有识之士可以在本发明的技术指导思想之内可以轻易提出其他的实施例,但这种实施例都包括在本发明的范围之内。

序列表

<110> 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

<120> 一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 690

<212> DNA

<213> 合成序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
ccggaattca tcgccgctat gttcgccacg tccgctatgg ctgccgacgt ggttgtttct 60
gaaccttccg cccccaactgc tgetcctgtt gacacettct cgtggaccgg cggctatatac 120
ggtatcaacg ccggttacgc aggcggaag ttcaagcatc cattttctag ctttgacaag 180
gaagacaacg aacaggtttc cggttcgctc gacgtaacag ctggcggctt cgtcgggtgt 240
gttcaggccg gttacaactg gcagctcgac aacggcgctc tgctcggcgc ggaaaccgac 300
ttccagggat cgagcggtac gggttcgatt tcagccggtg ccagcggctt cgaaggcaaa 360
gctgaaacca aggtcgagtg gttcggcaca gttcgtgccc gtcttggtta cacggctacc 420
gaacgcctca tggtttatgg taccggcggg ctggcctatg gtaaggtcaa gtctgcgttc 480
aacctgggtg atgatgcaag tgccctgcac acgtgggtccg acaagacgaa agctggctgg 540
accctcggcg ctggtgctga atatgccatc aacaacaact ggacgctcaa gtcggaatac 600
ctctacaccg acctcggcaa gcgcaacctc gtcgacgttg acaatagctt ccttgagagc 660
aagggtcaatt tccacactgt tctcgagcgg 690
```

专利名称(译)	一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN109283342A	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201811371911.X	申请日	2018-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
当前申请(专利权)人(译)	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心		
[标]发明人	肖妍 赵祥平 霍蕾 董志珍 赵丹 张俊哲 刘河冰 马立才 杨若松 刘薇		
发明人	肖妍 赵祥平 霍蕾 董志珍 赵丹 张俊哲 刘河冰 马立才 杨若松 刘薇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/535 G01N33/6893		
代理人(译)	王晓红		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测布鲁氏杆菌抗体的ELISA试剂盒,利用Omp31基因构建重组工程菌,表达Omp31重组蛋白作为包被原制备蛋白包被板,建立ELISA抗体检测试剂盒,本试剂盒特异性好、敏感性高,检测成本低廉,适于推广。在本病的抗体水平检测、流行病学调查、类症鉴别及采取有效防控措施方面提供重要方法。本试剂盒主要组份:Omp31蛋白包被板、阳性对照血清、阴性对照血清、酶标记兔抗多克隆抗体、底物液、终止液、稀释液、洗涤液、血清稀释板。

批号	细菌抗原对照 OD _{490nm} 值						平均值	阴、阳性临界值
1	2.226	2.237	2.261	2.019	2.042	2.062	2.144	1.072
2	2.262	2.141	2.040	2.104	2.081	2.157		
3	2.083	2.251	2.254	2.117	2.199	2.053		

