

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510017903.1

[43] 公开日 2007年2月28日

[11] 公开号 CN 1920571A

[22] 申请日 2005.8.23

[21] 申请号 200510017903.1

[71] 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450002 河南省郑州市金水区东风路5
号河南省生物工程技术研究中心

[72] 发明人 李晨阳 李玉林 陈小科

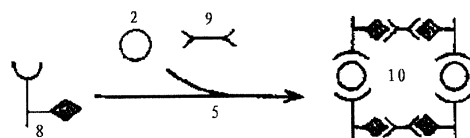
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

畜禽疫病、药物残留自身红细胞凝集快速检测
法

[57] 摘要

本发明涉及畜禽全血中病原体、残留药物的检测方法，属疾病诊断领域和食品安全检测领域中畜禽病原体、残留药物的自身红细胞凝集检测法。通过基因工程方法或化学偶联方法将畜禽病原体抗原、病原体抗体、药物抗体与畜禽红细胞单链抗体或畜禽红细胞单克隆抗体进行偶联，得到一种既能与红细胞结合又能与病原体抗体、病原体抗原、残留药物结合的双功能试剂，该双功能试剂以畜禽自身的外周血红细胞为指示物，来检测畜禽体内病原体及残留药物。



1. 一种畜禽疫病、残留药物红细胞凝集检测方法，其特征为：用基因工程或化学偶联的方法将各种畜禽动物红细胞单克隆抗体和病原体或病原体抗原或病原体抗体或残留药物抗体结合在一起，形成双功能试剂，以畜禽待测全血标本中的自身红细胞作为指示系统，直接检测全血标本中病原体、病原体的抗原、病原体的抗体、残留药物。

2. 如权利要求1所述的畜禽疫病，其中包括①病毒或细菌感染，如：伪狂犬病、细小病毒病、蓝耳病、乙型脑炎、繁殖障碍型猪瘟、仔猪大肠杆菌性下痢、仔猪红痢、传染性胃肠炎、流行性腹泻、轮状病毒雏番鸭的番鸭细小病毒病与小鹅瘟、鸡的法氏囊病与网状内皮组织增生症、传染性贫血、新城疫、新城疫与传染性支气管炎、禽流感等；②病毒性与细菌性混合感染，如：如雏番鸭的番鸭细小病毒病与鸭疫里默氏杆菌病，新城疫与大肠杆菌病、新城疫与沙门氏菌病、新城疫与慢性呼吸道病等；③细菌性混合感染，如：如猪的气喘病与传染性胸膜肺炎、猪传染性胸膜肺炎与肺疫，鸡大肠杆菌病与沙门氏杆菌、鸡大肠杆菌病与慢性呼吸道病等；④其他微生物感染致病及中毒。

3. 如权利要求1所述的畜禽病病原体及其抗体，其中，病原体包括细菌、病毒、真菌、螺旋体、寄生虫等；病原体抗体指通过免疫、自然感染和其他途径所产生的抗体。

4. 如权利要求1所述的各种动物红细胞抗体、残留药物的抗体、病原体的抗体，其中，包括利用单克隆抗体制备技术、多抗制备技术、基因工程技术所制备的抗体及其经过修饰而得到的Fab'、Fab、F(ab')₂片段。

5. 如权利要求1所述的病原体抗原，其中，包括通过天然病原体获得、通过基因工程技术获得、通过多肽合成获得的病原体抗原。

6. 如权利要求1所述残留药物，其中，包括抗生素、激素、毒素、饲料添加剂、有机磷类物质及其代谢产物。

7. 如权利要求1所述自身红细胞凝集检测方法，其中，包括病原体、病原体的抗原、病原体抗体检测的自身红细胞凝集试验和药物残留检测的自身红细胞凝集抑制试验。

8. 如权利要求7所述用于检测的自身红细胞凝集抑制试验，其特征为，动物血中如存在有相应的残留药物，则不出现凝集反应；动物血中如无残留药物，则出现红细胞凝集，测定为阴性。

9. 如权利要求6所述载体蛋白—小分子结合物，其特征为，将蛋白类物质同药物分子相偶联，形成半抗原。

畜禽疫病、药物残留自身红细胞凝集快速检测法

所属技术领域

本发明涉及畜禽全血中病原体、病原体抗原、病原体抗体、残留药物的检测方法，属疾病诊断领域和食品安全检测领域中畜禽病病原体、病原体抗原、病原体抗体、残留药物的自身红细胞凝集检测法。

技术背景

红细胞凝集试验又称血凝试验，是一种以红细胞作为反应指示物的免疫测定技术，这种由来已久的免疫学方法因其操作简便，不需仪器设备而广泛应用于基层医院，但因其灵敏度问题逐步被淘汰。1988年，澳大利亚学者将人红细胞单克隆抗体的 Fab' 片段与 HIV 合成肽抗原偶联，得到了一种双功能化学交联物，建立了一种称为自身红细胞凝集试验的检测方法，该检测方法以患者自身的外周血红细胞为指示物，检测人外周血 HIV 抗体，其灵敏度和特异性类似于 ELISA，整个检测过程仅需 2 分钟，是一种非常简单快速的快速免疫测定技术。近年，Lalley 等应用分子生物学技术制备出含重组红细胞单链抗体的双功能试剂。其方法是将红细胞单链抗体基因与 HIV-1 的 gp41 基因融合，构建重组质粒，重组质粒转化大肠杆菌，诱导表达后产生双功能试剂。该双功能试剂由红细胞膜蛋白抗体重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 组成，其间由 linker 相连，在轻链可变区末端连有 gp41。

自身红细胞凝集试验与一般间接血凝试验不同之处为反应中的红细胞是未经致敏的受检者新鲜红细胞。主要试剂材料为人红细胞的单克隆抗体，这种抗体能与所有血型的红细胞结合，但不引起凝集反应。这种抗体与另一特异性抗体连接形成的双功能抗体可用于检测标本中的抗原；如与特异性抗原连接，则可用于检测标本中的抗体。反应中的标本为受检者的全血。检测时，将一滴全血滴于一凹面玻璃板上，然后加入一滴双功能试剂，轻轻振摇 2 分钟后观察是否出现红细胞凝集。自身红细胞凝集试验不仅可以用来检测大分子蛋白（如抗原抗体），还可以用来检测药物等小分子，如动物体的残留药物，但要以凝集抑制试验的方式：动物全血在加入红细胞单抗与特定小分子抗体的双功能试剂后，如血中存在有相应的小分子，它们将会与双功能试剂反应，但并不出现红细胞凝集，因为小分子只能与一分子抗体结合而无法出现交联现象。此时，加入载体蛋白-小分子结合物，由于双功能试剂中小分子抗体的结合部位已被该动物血

中游离小分子所占据，则不出现凝集反应，如该动物血中无待测小分子，在加入的载体蛋白—小分子后则有交联现象，出现红细胞凝集；所以用于小分子测定的方法称为自身红细胞凝集抑制试验，出现红细胞凝集为阴性，反之则为阳性。

某些血液病如再生障碍性贫血、镰刀形红细胞贫血、球形红细胞血症以及血色素症等所致的红细胞异常，均不影响自身红细胞凝集检测法的应用。理论上，只要动物红细胞上特异抗原不致因患病而丧失，就不会影响自身红细胞凝集检测法测定。自身红细胞凝集检测具有简单、快速、安全的特点，与以往常用的凝集试验相比，它无需分离血清或血浆，血清(可能含有致病因子而具有传染性)分离过程中对实验操作人员可能存在的传染危险性也可排除。

目前，国内非常缺乏科学简便、易于推广普及的畜禽诊断技术，大部分基层(甚至包括一些县、市级业务部门)动物疫病防治单位缺乏必要的检测手段，导致畜禽疾病的传播难以控制，同时疾病的非典型化、多种病原的混合感染使畜禽疾病疫情复杂，诊断更加困难，靠一把剪子，一双眼睛来诊断各种畜禽传染病很容易贻误治疗时机。由于疫病不能及时检测与确诊，免疫接种也带有极大的盲目性和投机性，造成多种畜禽传染病免疫失败。随着防疫意识的加强，人们必定会在引种、畜禽商品流通及制定合理的免疫计划时加强病原的及时检测，因此快速、敏感、特异、价廉且适合基层使用的商品化疾病诊断试剂的需求量将会越来越大。

我国畜禽疾病诊断技术近几年发展较快，很多研究单位研究出不同的诊断试剂(盒)，如扬州大学的新城疫强毒快速 ELISA 诊断试剂盒、沙门氏 ELISA-PCR 联合检测试剂盒以及 H5、H9 亚型禽流感病毒多重 RT-PCR 快速检测试剂盒等；河南农科院的 IBD 胶体金诊断试剂盒；中国农业大学动物医学院的淋巴白血病 ELISA 诊断试剂、北京市农林科学院畜牧兽医研究所的传染性鼻炎 ELISA 诊断试剂等。但这些试剂(盒)因实验条件和价格的原因，难以满足基层现场快速检测的要求。

目前，我国食品安全方面也存在两大主要问题：一是微生物污染仍然是影响我国食品卫生和安全的最主要因素，致病微生物引发的食品污染严重损害了人们的健康，控制致病微生物污染仍然是目前解决食品污染问题的主要内容；二是种植、养殖等源头污染严重影响食品安全。农药、兽药(尤其是抗生素、激素)和禁止使用的饲料添加剂的滥用和残留是造成食品源头污染的主要原因。但是，目前对这些目标物的检测主要集中在有条件的实验室，需要高压液相色谱、

PCR仪、酶标仪等仪器设备，人员也需要进行培训，基层单位很难做到这些。自身红细胞凝集检测法因其操作简便，不需仪器设备，可广泛应用于基层。

根据我国现有研究基础，利用免疫学、血清学方法生产畜禽疾病和动物体药物残留的商品化自身红细胞凝集诊断盒因其快速、简便、准确、敏感、价廉的特点将有广阔的市场前景。

发明内容

本发明的目的是：用基因工程或化学偶联的方法将各种畜禽动物红细胞单克隆抗体和抗原、抗体结合在一起形成双功能试剂，从而制造出一类具有安全、快速、准确、价廉特点的检测试剂。该类试剂无需分离血清、无需仪器设备，利用待测全血标本中的自身红细胞作为指示系统，仅需一滴全血便可在2分钟内快速检测病原体及其抗体、残留药物、疫苗抗体。

本发明是这样实现的：首先利用抗体制备技术得到高效价、高特异性的畜禽动物血红细胞单克隆抗体、小分子药物抗体、病原体及疫苗的抗体，并用蛋白酶和巯基类试剂将血红细胞单克隆抗体修饰成Fab'片段；其次利用基因工程技术表达病原体抗原或生化技术纯化病原体抗原，再次，在戊二醛或其他试剂的作用下将红细胞单抗Fab'片段同病原体抗原、病原体抗体、疫苗抗体、小分子药物的抗体偶联，得到一类既能和畜禽动物红细胞相结合又能和病原体抗原、小分子药物、病原体抗体、疫苗抗体、小分子药物抗体结合的双功能试剂。检测时将一滴待测动物的全血置于一凹面玻璃板上，然后加入一滴双功能试剂，轻轻振摇，2分钟后，观察红细胞是否出现凝集，再判定结果。

残留药物的检测是这样实现的：如动物血中存在有相应的小分子，它们将会与双功能试剂反应，但并不出现红细胞凝集，因为小分子只能与一分子抗体结合而无法出现交联现象。此时，加入载体蛋白-小分子结合物，由于双功能试剂中小分子抗体的结合部位已被该动物血中游离小分子所占据，则不出现凝集反应，如该动物血中无待测小分子，因后加入的载体蛋白-小分子的交联作用则出现红细胞凝集，所以用于小分子测定的方法称为自身红细胞凝集抑制试验，出现红细胞凝集为阴性，反之则为阳性。

病原体及其抗体检测、免疫效果检测是这样实现的：如动物血中有相应病原体及其抗体，它们将会与双功能试剂反应，出现交联现象，使红细胞凝集，出现红细胞凝集判为阳性，反之则判为阴性。

本发明的积极效果:

一、简便快速: 使用本发明制备的检测试剂, 可以检测畜禽疫病、免疫效果及动物体药物残留, 其灵敏度和特异性类似于 ELISA, 整个检测过程仅需 2 分钟, 是一种极为简单方便的快速免疫测定技术。

二、特异性强: 由于采用病原体基因工程抗原或多肽抗原与抗红细胞单克隆抗体相偶联, 间接 ELISA 一些不可避免的非特异性标本绝大多数可被排除, 从而提高诊断的准确度。

三、成本低、安全性好: 该检测法无需仪器设备, 使用成本低; 试剂的制作仅需抗体、抗原及少量塑料等材料, 生产成本低; 无需分离血清或血浆, 血清(可能含有致病因子而具有传染性)分离过程中对实验操作人员可能存在的传染危险性也可排除, 安全性好。

四、社会效益显著: 本发明可制备出畜禽系列诊断试剂, 非常适合基层单位(如养殖场、农场、屠宰场、集贸市场等)现场即时检测, 防止畜禽在引种、养殖、流通、屠宰过程中疾病的传播, 有助于畜禽病死率的降低, 降低饲养成本; 防止抗生素、激素等药物在畜禽养殖过程中的滥用, 保障食品安全, 社会效益显著。

附图说明

附图是关于红细胞自身凝集微量全血快速检测研制的基本原理及检测流程图。图 1 为药物残留检测的阳性反应示意图, 图 2 为药物残留检测的阴性反应示意图, 图 3 为病原体、病原体抗原及其抗体的检测原理图。具体图示内容如下:

1. 为红细胞抗体与药物分子的抗体结合物, 即双功能试剂;
2. 为检测标本中的红细胞;
3. 为检测标本中的残留药物成分;
4. 为载体蛋白-药物分子结合物;
5. 为轻轻混匀的反应;
6. 为自身红细胞凝集抑制;
7. 为自身红细胞凝集;
8. 为红细胞抗体同病原体、病原体抗原、病原体抗体的结合物, 即双功能试剂;
9. 为待检血液中的病原体的抗体、病原体、病原体抗原;

10. 为自身红细胞凝集。

以上详述了本发明的原理、目的、实现路径和积极意义，由于抗原（或抗原决定簇）与对应抗体，配基与对应配体种类极其繁多，甚至在理论上无穷无尽，以下列实例详述本发明：

具体实施方式

一、红细胞抗体、病原体抗体、药物小分子抗体制备的方法基本类似，现以红细胞抗体制备为例说明实施的方案：

以血红细胞作为免疫抗原，免疫 BALB/c 小鼠，将免疫小鼠的脾脏淋巴细胞与骨髓瘤细胞相融合，然后用有限稀释方法获得可分泌红细胞单抗的单克隆。具体步骤如下：

1. 取健康动物全血，加入抗凝剂柠檬酸三钠，3000rpm 低速离心，提取红细胞并用生理盐水洗涤三遍，加入含抗生素的生理盐水并稀释到每毫升 2×10^7 个细胞，初次免疫采用皮下多点注射，0.1ml/点，共四点。2 周后第二次免疫，剂量同上，腹腔注射。再 2 周后第三次免疫，剂量同上，腹腔注射（5~7 天后采血测其效价）。再过 2~3 周后加强免疫，剂量 0.5ml，腹腔注射。最后一次加强免疫，剂量 0.5ml，腹腔注射，3 天后小鼠拉颈处死，无菌取脾脏，培养液洗一次，将脾脏研碎，过不锈钢筛网，离心，细胞用培养液洗 2 次，计数，取 1×10^7 脾淋巴细胞悬液备用，准备融合。

2. 将 6~10 周大的 BALB/C 小鼠拉颈处死，浸泡在 75% 酒精内，3~5min，用无菌剪刀剪开皮肤，暴露腹膜，用无菌注射器注入 5~6ml 预冷的培养液（严禁刺破肠管）反复冲洗，吸出冲洗液放入 10ml 离心管，1200rpm/分离 5~6min，用 20% 小牛血清（NCS）的培养液混悬，调整细胞数至 1×10^7 /ml，加入 96 孔板，100 μ l/孔放入 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 孵箱培养，制得饲养细胞。

3. 将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1: 10 或 1: 5 的比例混合在一起，在 50ml 离心管中用无血清不完全培养液洗 1 次，离心（1200rpm, 8min）；弃上清，用吸管吸净残留液体，以免影响聚乙二醇（PEG）浓度。轻轻弹击离心管底，使细胞沉淀略松动。90s 内加入 37 $^{\circ}$ C 预温的 1ml 45% PEG（分子量 4000）溶液，边加边轻微摇动，37 $^{\circ}$ C 水浴作用 90s，加 37 $^{\circ}$ C 预温的不完全培养液以终止 PEG 作用，每隔 2min 分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 6ml，离心（800rpm, 6min），弃上清，用含 20% 小牛血清 HAT 选择培养液重悬细胞。将上述细胞加到已有饲养细胞层的 96 孔板内，每孔加 100 μ l。一般一个免疫脾脏可接种 4 块 96 孔板。将培

养板置 37℃ 的含 5%CO₂ 的培养箱中培养，完成融合。

4.在用 HAT 选择培养 1~2 天内，将有大量瘤细胞死亡，3~4 天后瘤细胞消失，杂交细胞形成小集落，HAT 选择培养液维持 7~10 天后应换用 HT 培养液，再维持 2 周，改用一般培养液。在上述选择培养期间，杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时，即可用红细胞凝集的方法排除可直接引起红细胞凝集的克隆，再用间接红细胞凝集的方法（加入羊抗鼠 IgG）筛选出所需要的杂交瘤细胞系。在选择培养期间，一般每 2~3 天换一半培养液。最后进行有限稀释得到单克隆：克隆前 1 天制备饲养细胞层（同上）；将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹下，计数，调整细胞为 3~10 个细胞/ml；取前一天准备的有饲养细胞层的细胞培养板，每孔加入稀释细胞 100μl，孵育于 37℃、5%CO₂ 孵箱中；在第 7 天换液，以后每 2~3 天换液 1 次。8~9 天可见细胞克隆形成，及时检测抗体活性。将阳性孔的细胞移至 24 孔板中扩大培养，挑取效价高于 8×10⁷ 的特异性单克隆冻存，并复苏传代，挑取稳定的细胞株冻存备用。

5.腹水的制备：是先注射 0.5ml Pristane (降植烷)或液体石蜡于 BALB/C 鼠腹腔，1~2 周后腹腔注射 1×10⁶ 个杂交瘤细胞，接种细胞 7~10 天后可产生腹水，密切观察动物的健康状况与腹水征象，待腹水尽可能多而小鼠濒于死亡之前，处死小鼠，用滴管将腹水吸入试管中，一般一只小鼠可获 2~5ml 腹水。也可用注射器抽提腹水，可反复收集数次。腹水中单克隆抗体含量可达到 2~5mg/ml。

6.红细胞单克隆抗体的纯化：将蛋白 A-Sepharose 置于 50 倍体积的 Tris 缓冲液 (pH8.6) 中 (超过介质 50 倍 v/v)，充分溶胀，在室温下将其装入直径 2.5cm 的玻璃层析柱中，用 Tris 缓冲液洗以平衡；腹水样品经三倍体积 Tris 缓冲液稀释后，以 1-5ml/min 速度上样，用 Tris 缓冲液洗至未结合的蛋白全被洗脱 (以 A₂₈₀ 进行监测)；依次用柠檬酸缓冲液、乙酸盐缓冲液以及甘氨酸--HCl 缓冲液连续洗脱结合蛋白；将分部收集的洗脱的蛋白直接装入有中和缓冲液的试管中 (所加有的中和缓冲液应为洗脱液的 1/4 体积)；分部收集的各管洗脱液；用超滤器浓缩所得的单克隆抗体至 1-5mg/ml，将浓缩的抗体置 -20℃ 储存。

二、Fab'或单链抗体的获得

1. Fab'的获得：首先用胃蛋白酶消化红细胞单克隆抗体，得到 F(ab')₂，再使用 3-n-J 基磷化氢 (TBP) 将其还原成 Fab' 片段，经凝胶过滤纯化；将 Ellman 试剂 (DTNB) 与 Fab' 反应，得到 Fab'-巯硝基苯甲酸 (TNB) 衍生物，使 Fab' 受到保护，将 TNB 保护的 Fab' 经凝胶过滤纯化。

2. 红细胞单链抗体 (ScFv) 的获得：(1) 杂交瘤细胞 mRNA 提取：培养单

克隆抗体杂交瘤细胞株至对数生长期, 细胞计数大约为 7.8×10^6 。收集细胞, 在无 RNA 酶条件下按 QuickPrep mRNA Purification Kit 提供的方法提取细胞 mRNA。(2) cDNA 第一条链的合成: 将提取到的 mRNA, 在反转录酶的作用下合成 cDNA。(3) 鼠免疫蛋白 V_H 和 V_L 基因扩增: 以逆转录反应合成的 cDNA 第一条链为模板, 按下列体系分别进行 V_H 和 V_L 基因的扩增。模板 16.5ul, Heavy2chainprimer1 和 Heavy2chain primer2 各 1ul, dNTP(2.5mmol/L) 8ul, $10 \times$ PCR 缓冲液 5ul, 无菌双蒸水 18ul。于 95°C 变性后加入 LA Taq 酶 0.5ul (5 U/ul) 扩增。 V_L 基因扩增同上, 仅需更换引物。PCR 反应参数 94°C 、30 s, 55°C 、1 min, 72°C 1min, 30 个循环后, 72°C 延伸 7 min。将 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 MicroSpin columns 柱回收目的基因片段。(4) ScFv 基因的组装: 回收的 V_H 和 V_L 基因片段用 V_H marker 进行胶定量分析, 并与 Linker primer Mix 以近似等摩尔浓度混合, 按下列体系分别进行连接 PCR 反应: 纯化的 V_H 及 V_L 基因各 50 ng, Linker primer Mix 4 ul, dNTP(2.5 mmol/L) 20ul, $10 \times$ PCR 缓冲液 5ul, 以无菌双蒸水补充至总体积为 50ul。PCR 反应参数 94°C 、1 min, 63°C 、4 min, 循环 7 次后 72°C 延伸 5 min, 从而将 V_H 和 V_L 重叠延伸拼接成 ScFv。并以此 ScFv 为模板, 加入下列反应体系: dNTP (2.5 mmol/L) 8ul, $10 \times$ PCR 缓冲液 5ul, LA Taq 酶 0.5ul, 无菌双蒸水 32.5ul。继续进行 30 个循环。反应条件 94°C 、2min, 55°C 、2 min, 72°C 、2 min, 最后 72°C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 MicroSpin columns 柱回收目的基因片段。ScFv 基因的克隆: 将上述纯化的 PCR 产物, 与 pGEM-T Easy 载体在 T_4 DNA 连接酶(5~7U) 作用下进行连接。连接产物转化感受态 E.coliTop10 菌, 在含有 IPTG、X-gal 和氨苄青霉素琼脂平板上 37°C 培养过夜。重组质粒的鉴定: 挑取白色菌落, 于 37°C 、250rpm 振荡培养过夜, 提取并纯化重组质粒 DNA, 测序鉴定。

应用基因重组技术将红细胞单抗轻、重链可变区基因与 linker 片段拼接后, 克隆到 pET-22a (美国 Novagen 公司产品) 构建红细胞单链抗体表达载体 pET-22a-scFv, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)Plys, 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 37°C 生长, 待菌斑长出后, 挑取单个克隆于含氨苄青霉素的 LB 培养基试管中, 37°C , 200 rpm 生长过夜。第二天, 1: 100 接种于 1L 含氨苄青霉素 LB 培养基中, 37°C 生长到 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.9$ 之间。按终浓度 0.5mmol/L 加入 1mol/L 腹 IPTG, 37°C 200rpm, 诱导 4 小时, 5000rpm, 4°C 离心 10 分钟, 用 (pH8.0) 0.02mol/L PB, 0.5mol/L NaCl 缓冲液将菌体洗涤一次, 离心同上, 菌体反复冻融三次, 超

诱导 4 小时, 5000rpm、4℃ 离心 10 分钟, 用 pH8.0、0.02mol/LpB、0.5mol/L NaCl 缓冲液将菌体洗涤一次, 离心同上, 菌体反复冻融三次, 超声波破碎, 离心后上清过 Ni-金属亲和柱, 用含 50mmol/L 咪唑的 pH8.0、0.02mol/LPB、0.5mol/L NaCl 缓冲液洗涤去除杂蛋白, 用含 100mmol/L 咪唑的 pH8.0、0.02mol/LPB、0.5mol/L NaCl 缓冲液洗脱获得纯双功能蛋白, 分装后-20℃ 冻存。

2.化学偶联的方法获得: 5mg 纯 Fab'或单链抗体与 5mg 病原体抗原混合于 10ml 0.1mol/LpH6.8 的磷酸缓冲液中, 4℃对同上缓冲液透析平衡。磁力搅拌下, 缓慢加入 1% 戊二醛 0.05ml, 室温放置 2 小时。4℃对 0.05mol/LpH8.0Tris 缓冲液透析平衡, 交联物可用 50% 饱和度硫酸铵沉淀浓缩, 过 Superdex-200 分子筛凝胶层析柱, 第一峰为双功能蛋白。

五、畜禽疫病及动物体药物残留红细胞自身凝集快速检测试剂的形成:

将获得的双功能试剂用含 0.3%的柠檬酸三钠、1%的 BSA 和 0.05%的叠氮钠的 PBS 稀释到 0.1mg/L, 形成工作液。

1.检测畜禽疫病及免疫效果: 检测时, 将一滴待测动物的全血滴于一凹面玻璃板上, 然后加入一滴双功能试剂, 轻轻振摇 2 分钟后, 如出现红细胞凝集, 即为阳性, 无凝集则为阴性。

2.检测动物体药物残留: 将一滴待测动物的全血滴于一凹面玻璃板上, 然后加入一滴双功能试剂, 再加入一滴偶联该药物分子的载体蛋白, 轻轻振摇 2 分钟后, 如出现红细胞凝集为阴性, 反之则为阳性。

图 1:

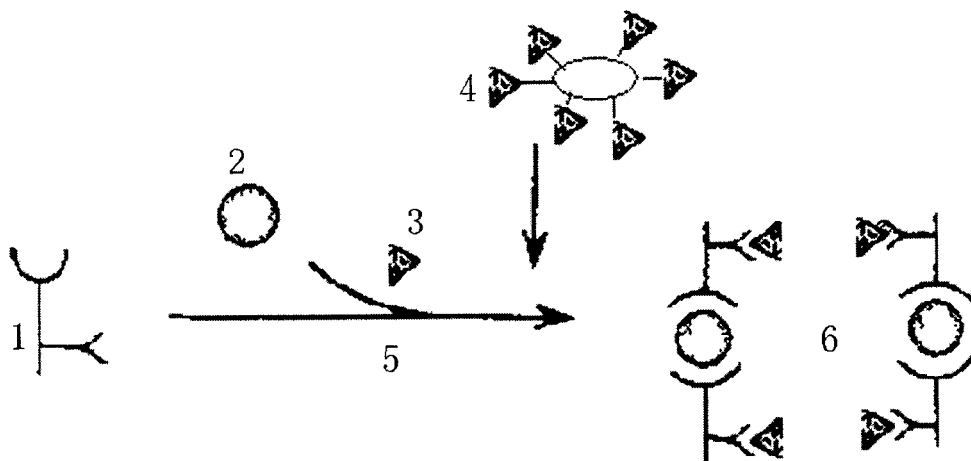


图 2:

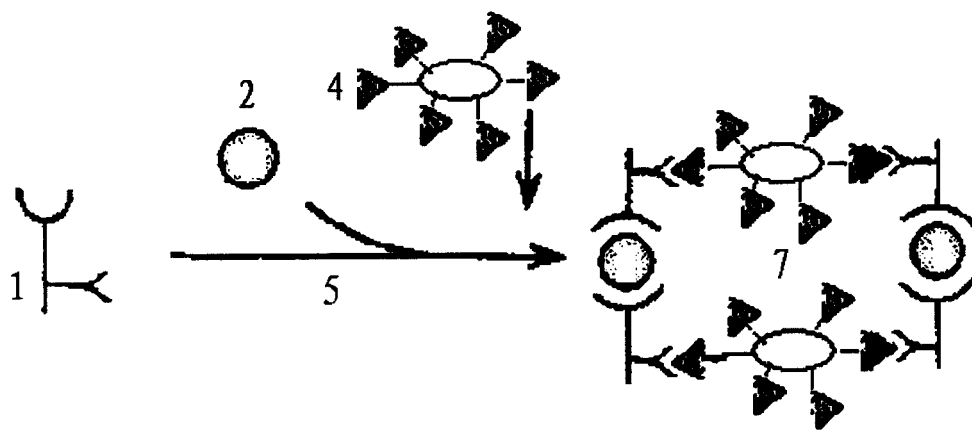
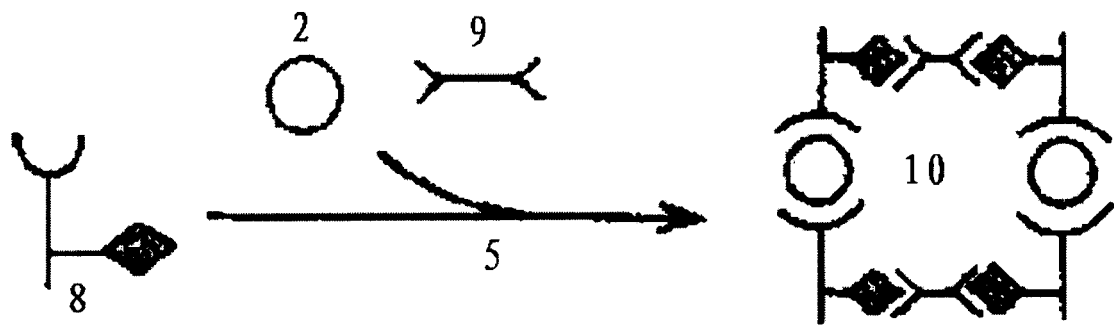


图 3:



专利名称(译)	畜禽疫病、药物残留自身红细胞凝集快速检测法		
公开(公告)号	CN1920571A	公开(公告)日	2007-02-28
申请号	CN200510017903.1	申请日	2005-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
[标]发明人	李晨阳 李玉林 陈小科		
发明人	李晨阳 李玉林 陈小科		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及畜禽全血中病原体、残留药物的检测方法，属疾病诊断领域和食品安全检测领域中畜禽病原体、残留药物的自身红细胞凝集检测法。通过基因工程方法或化学偶联方法将畜禽病原体抗原、病原体抗体、药物抗体与畜禽红细胞单链抗体或畜禽红细胞单克隆抗体进行偶联，得到一种既能与红细胞结合又能与病原体抗体、病原体抗原、残留药物结合的双功能试剂，该双功能试剂以畜禽自身的外周血红细胞为指示物，来检测畜禽体内病原体及残留药物。

