



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109342711 A

(43)申请公布日 2019.02.15

(21)申请号 201811336380.0

(22)申请日 2018.11.09

(71)申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街2699号

(72)发明人 任洪林 水一鸣 胡盼 卢士英
柳增善 柳溪林 李岩松 周玉
常江 王路鹿 张士军

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 魏征骥

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书4页 说明书15页
序列表3页 附图9页

(54)发明名称

多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,属于生物技术检测领域。包括抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体预包被酶标板、IL-1 β 和IL-1Ra重组蛋白标准品、稀释液、20 $\times$ PBS-T浓缩洗涤液、蓝色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体、绿色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体。本发明具有灵敏度高、特异性强、检测物种范围广等优点,可用于绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔血清、血浆及其它组织样品中IL-1 β 和IL-1Ra含量测定,并可计算其比值,两种目标物同步检测减少比值计算的误差,灵敏度达到pg级,本试剂盒测定IL-1Ra与IL-1 β 比值可用于布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫区别诊断,以及其它与该比值变化相关的疾病诊断标示研究。

1. 一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于:包括抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体预包被酶标板、IL-1 β 和IL-1Ra重组蛋白标准品、稀释液、20 $\times$ PBS-T浓缩洗涤液、蓝色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体、绿色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于:

(一) 抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体预包被酶标板的制备步骤如下:

(1) 包被抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体:将抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体用稀释液稀释至终浓度为0.078 μ g/mL,加入酶标板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

(2) 以含有0.2%吐温-20的PBS作为PBS-T洗涤液,洗板3-4次,200 μ L/孔,每次1min,然后用0.1M氯化铵溶液封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h,排干液体;

(二) 蓝色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体,其激发波长360nm,发射波长450nm;偶联步骤如下:10 μ L蓝色荧光微球加入pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液90mL,混匀,15000转/分钟离心15分钟,弃上清,收集微球沉淀,重复洗两次;在90 μ L 0.2M pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液中,加入4.8 μ L EDC (1mg/mL),活化20分钟;然后加入5.6 μ L NHS, (1mg/mL),混匀20分钟;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,收集微球沉淀;用90 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液重悬微球,再加入10 μ L豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体 (1mg/mL),室温涡旋震荡反应4小时;加入10 μ L封闭液 (10%BSA),室温反应30min;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,弃上清,加入100 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液,4 $^{\circ}$ C避光保存;

(三) 绿色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体,其激发波长480nm,发射波长520nm;10 μ L绿色荧光微球加入pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液90mL,混匀,15000转/分钟离心15分钟,弃上清,收集微球沉淀,重复洗两次;在90 μ L 0.2M pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液中,加入4.8 μ L EDC (1mg/mL),活化20分钟;然后加入5.6 μ L NHS (1mg/mL),混匀20分钟;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,收集微球沉淀;用90 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液重悬微球,再加入10 μ L豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体 (1mg/mL),室温涡旋震荡反应4小时;加入10 μ L封闭液 (10%BSA),室温反应30min;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,弃上清,加入100 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液,4 $^{\circ}$ C避光保存。

3. 根据权利要求2所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于,抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体、豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体、豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体的制备步骤如下:

(1) 在NCBI的GenBank数据库中下载全长绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 和IL-1Ra基因和蛋白序列,使用DNAMAN version 6进行序列一致性比对分析,确定绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 和IL-1Ra蛋白和核酸多物种同源保守区序列,并分析IL-1 β 和IL-1Ra同源保守区之间的差异性;

(2) 选择IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区之间具有差异较大、序列一致性低的两段序列,分别命名为IL-1 β -1和IL-1Ra-1,其原核表达重组蛋白分别用做制备抗IL-1 β 检测用抗体和抗IL-1Ra检测用抗体的免疫原,另外选择IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区之间具有部分序列一致的两段序列,分别命名为IL-1 β -2和IL-1Ra-2,并将IL-1 β -2和IL-1Ra-2通过氨基酸序列为FFMSH的DNA linker连接,构建IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区串联基因IL-1 β -1Ra-2,其原核表

达重组蛋白用做制备同时抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体的免疫原;

(3) 用于制备免疫原的多物种同源序列选择要求:IL-1 β -2与IL-1Ra-2具有部分序列一致性,将IL-1 β -2与IL-1Ra-2串联融合获得串联基因IL-1 β -1Ra-2,以其原核表达基因工程重组蛋白免疫家兔制备兔源抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体,可同时结合IL-1 β 和IL-1Ra,IL-1 β -1与IL-1 β -2、IL-1Ra-1与IL-1Ra-2、以及IL-1 β -1与IL-1Ra-1之间序列不具有序列一致性,使得分别以IL-1 β -1和IL-1Ra-1基因工程重组蛋白表达产物制备的豚鼠源抗IL-1 β 检测用抗体和豚鼠源抗IL-1Ra检测用抗体,可分别特异性结合IL-1 β 和IL-1Ra;

(4) 设计扩增IL-1 β -1的上下游引物一对IL-1 β -1-S和IL-1 β -1-A,以包含有全长IL-1 β 的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1 β -1的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1 β -1的DNA;

(5) 设计扩增IL-1Ra-1的上下游引物一对IL-1Ra-1-S和IL-1Ra-1-A,以包含有全长IL-1Ra的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1Ra-1的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1Ra-1的DNA;

(6) 设计扩增IL-1 β -2的上下游引物一对IL-1 β -2-S和IL-1 β -2-A,以包含有全长IL-1 β 的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1 β -2的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1 β -2的DNA;

(7) 设计扩增IL-1Ra-2的上下游引物一对IL-1Ra-2-S和IL-1Ra-2-A,以包含有全长IL-1Ra的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1Ra-2的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1Ra-2的DNA;

(8) 利用设计在扩增IL-1 β -2所用的下游引物IL-1 β -2-A和扩增IL-1Ra-2所用的上游引物IL-1Ra-2-S中的linker序列,使用常规重叠延伸PCR方法,以IL-1 β -2的DNA和IL-1Ra-2的DNA为模板,以IL-1 β -2-S和IL-1Ra-2-A为上游引物,将IL-1 β -2与IL-1Ra-2基因通过Linker串联,扩增IL-1 β -1Ra-2融合DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1 β -1Ra-2的DNA;

(9) 分别将获得的IL-1 β -1和IL-1Ra-1的DNA片段,以非连接酶依赖性的T4DNA聚合酶方法克隆到pMCSG9载体上,将IL-1 β -1Ra-2的DNA与pET-30a载体连接,构建重组表达质粒pMCSG9-IL-1 β -1、pMCSG9-IL-1Ra-1和pET30a-IL-1 β -1Ra-2;

(10) 将重组表达质粒转化至大肠杆菌BL21-Codonplus细胞中诱导表达重组蛋白,挑取重组质粒测序鉴定正确的单菌落,接种于含50mg/L氨苄抗性的液体LB培养基中,37℃培养2小时,然后按1:500比例接种于200mL的含50mg/L氨苄抗性的新鲜液体LB培养基中,37℃振荡培养约1小时,加300 μ L 1mol/mL的IPTG,继续振荡培养5.5小时后经4℃、10000rpm离心5min,分别收获pMCSG9-IL-1 β -1、pMCSG9-IL-1Ra-1、pET30a-IL-1 β -1Ra-2的基因工程大肠杆菌菌体沉淀,以PBS重悬后,用超声破碎仪进行裂解,功率为40W,超声10s,间歇10s,共30min,于12000转/分钟、离心30min,得到上清与包涵体沉淀;

(11) 大肠杆菌系统表达的重组蛋白融合了His标签,将基因工程表达菌的破碎菌体上清液使用镍柱按常规镍离子亲和层析自然沉降方法纯化目标抗原蛋白IL-1 β -1、IL-1 β -2和IL-1 β -1Ra-2,使用SDS-PAGE和Western-blot分析验证纯化后的重组蛋白,用截留分子量8000-14000Da的透析袋4℃透析,透析液为0.01M pH 8.0的PBS,每2h更换一次透析液,共更换5次,用PEG20000进行反透析浓缩,SDS-PAGE鉴定纯度,分装放入-80℃冰箱备用;

(12) 动物免疫

第一次免疫分别取1mg的IL-1 β -1、IL-1Ra-1和IL-1 β -1Ra-2蛋白,与等体积完全佐剂混合并乳化,分别将乳化后IL-1 β -1和IL-1Ra-1蛋白免疫豚鼠制备豚鼠源抗IL-1 β 检测用抗体和豚鼠源抗IL-1Ra检测用抗体,将乳化后的IL-1 β -1Ra-2蛋白免疫新西兰大白兔制备兔源抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体,进行背部皮下多点免疫,15天为一个免疫周期,第二次免疫开始使用不完全佐剂制备乳化免疫原用于免疫,方法同上,第三次免疫之后,每7天测定一次血清效价,效价达50000以上,进行心脏采血,收集血清待测效价和纯化抗体;

(13) 抗体效价检测与纯化

免疫前留取少量血清作为阴性血清,免疫之后的家兔和豚鼠采集血液,于37℃孵育0.5h,4℃凝血2h,3000转/分钟离心5min,吸取血清,使用常规ELISA方法检测效价,使用AKATA蛋白纯化系统和常规蛋白G亲和层析方法纯化抗体;

(14) 干扰抗体去除

通过干扰抗体去除实验,减少两种豚鼠源检测用抗体的非特异结合,其具体步骤如下:常规诱导转入pMCSG9空载体的大肠杆菌表达菌,取1mL-5mL细菌培养发酵液,1300转/分钟、离心1min,弃上清收集菌体,分别取两种豚鼠源检测用抗体100 μ L混悬菌体,37℃孵育45-90min,3000转/分钟离心5min,取上清为除去干扰抗体的检测用抗体。

4. 根据权利要求3所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于:

IL-1 β -1核苷酸序列如SEQ ID No.1所述;
IL-1 β -1氨基酸序列如SEQ ID No.2所述;
IL-1 β -2核苷酸序列如SEQ ID No.3所述;
IL-1 β -2氨基酸序列如SEQ ID No.4所述;
IL-1Ra-1核苷酸序列如SEQ ID No.5所述;
IL-1Ra-1氨基酸序列如SEQ ID No.6所述;
IL-1Ra-2核苷酸序列如SEQ ID No.7所述;
IL-1Ra-2氨基酸序列如SEQ ID No.8所述;
IL-1 β -1Ra-2核苷酸序列如SEQ ID No.9所述;
IL-1 β -1Ra-2氨基酸序列如SEQ ID No.10所述。

5. 根据权利要求3所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于:

(1) IL-1 β -1-S:5'-tactttccaatccaatgcCTATACCTGTCTTGTGTGACCCA-3';
IL-1 β -1-A:5'-ttatccactttccaatgtcAGAAGACGAATCGCTTTTCC-3';
(2) IL-1Ra-1-S:5'-tactttccaatccaatgcCAAGCCTTCAGGATCTGGG-3';
IL-1Ra-1-A:5'-ttatccactttccaatgtcAACCTTGCAAGTATCCAGC-3';
(3) IL-1 β -2-S:5'-ccgcatatgTACAAGACAGAAATCAAGAACACAGT-3';
IL-1 β -2-A:5'-atgcatgctgaagaaTATATCCTGGCCACCTCTAAAAC-3';
(4) IL-1Ra-2-S:5'-ttcttcagcatgcatGACAAGCGCTTCGCCTTCATC-3';
IL-1Ra-2-A:5'-ccgctcgagATTGGTGAGGCCACGGG-3';
(5) IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区串联基因IL-1 β -1Ra-2的linker序列ttcttcagcatgcat。

6. 根据权利要求1所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂

盒,其特征在于:所述的IL-1 β 重组蛋白标准品和IL-1Ra重组蛋白标准品,分别是以大肠杆菌表达系统基因工程表达的IL-1 β 重组蛋白和IL-1Ra重组蛋白,具体制备方法按常规的原核表达技术,分别将IL-1 β 和IL-1Ra的开放阅读框插入原核表达载体pET-30a,构建融合His标签的重组表达载体pET-30a-IL-1 β 和pET-30a-IL-1Ra,以常规诱导表达纯化技术,获得高纯度的基因工程IL-1 β 重组蛋白和IL-1Ra重组蛋白,制备标准品蛋白。

7. 根据权利要求1所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于:所述的稀释液为pH7.2-7.6的0.1M PBS溶液。

8. 如权利要求1所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒的操作方法,其特征在于步骤如下:

(1) 根据待检样本的数量,取出抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体包被的黑色平底酶标板,设置标准品孔、阳性孔、阴性孔、空白孔和样品孔,每孔每次加入液体量为100 μ L,标准品孔加入经稀释液梯度稀释的两种标准品混合溶液,两种标准品蛋白IL-1 β 和IL-1Ra的终浓度均为78.125ng/ml、39.625ng/ml、19.531ng/ml、9.766ng/ml、4.883ng/ml、2.441ng/ml、1.221ng/ml、0.610ng/ml、0.305ng/ml、0.153ng/ml、0.076ng/ml和0.038ng/ml 12个浓度梯度,样品孔加入2倍稀释的待检血清,阴性孔加入PBS稀释液,阳性孔与空白孔均不加任何液体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入0.1%PBST洗板3次,每次1min;

(2) 加入0.125 μ g/mL检测用抗体于样品孔、标准品孔和阴性孔中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入0.1%PBST洗板3次,每次1min;

(3) 空白孔不加任何液体,阳性孔加入100 μ L两种荧光微球浓度均为0.125 μ g/mL的荧光微球混合液,标准品孔、阴性孔、样品孔均加入100 μ L稀释液,

(4) 使用荧光微孔板检测仪进行双荧光检测读值,在360nm激发波长和450nm发射波长检测IL-1 β 浓度,在480nm激发波长和520nm发射波长检测IL-1Ra浓度;

(5) 以空白孔荧光值B作为仪器空白调零值,扣除仪器信噪干扰,设定标准品孔荧光值为ST,样品孔荧光值为SA,阴性孔荧光值为N,阳性孔荧光值为P,以阳性孔荧光值P作为分母校正,计算标准品孔校正荧光值ST_a和样品孔校正荧光值SA_a,即ST_a=ST/P或SA_a=SA/P,分别绘制IL-1 β 和IL-1Ra标准曲线,以标准品IL-1 β 和IL-1Ra蛋白浓度对数作为横坐标,以标准品孔校正荧光值ST_a作为纵坐标,绘制标准曲线,计算标准曲线方程和相关系数R²,以样品孔校正荧光值SA_a代入标准曲线方程,计算浓度对数X,10^X即为样品中IL-1 β 和IL-1Ra的浓度,并计算IL-1Ra/IL-1 β 浓度比值;

(6) 设立阳性孔和阴性孔,可以质控荧光检测的有效性,并使得多次检测结果具有可比性。

9. 根据权利要求1所述的一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,其特征在于:所述抗体可与羊、人、牛、马、猪、鼠、兔、犬、鸡、鸭多个物种的IL-1 β 和IL-1Ra发生特异性结合反应,用于检测羊、人、牛、马、猪、鼠、兔、犬、鸡、鸭多个物种的血清、血浆及组织器官样品中IL-1 β 和IL-1Ra含量,及IL-1Ra/IL-1 β 的比值。

多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术检测领域,通过同源比对分析绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔多物种IL-1 β 和IL-1Ra蛋白的氨基酸序列,确定多物种同源保守IL-1 β 和IL-1Ra结构域基因和蛋白片段,以原核表达系统制备IL-1 β 与IL-1Ra同源保守结构域基因工程重组蛋白,并以其做为免疫原,分别制备可同时结合多物种IL-1 β 与IL-1Ra的兔源多克隆捕获用抗体、特异性结合多物种IL-1 β 的豚鼠源多克隆检测用抗体、以及特异性结合多物种IL-1Ra豚鼠源多克隆检测用抗体。分别将两种检测用抗体与蓝色和绿色荧光微球偶联,建立可同时测定多物种IL-1 β 与IL-1Ra双抗体夹心双荧光ELISA检测方法,并组装成易于应用的检测试剂盒。可用于绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔等的血清、血浆及其它组织样品中IL-1 β 和IL-1Ra含量测定,并可计算其IL-1Ra/IL-1 β 比值,两种目标物同步检测减少比值计算的误差。

背景技术

[0002] 白细胞介素1 (Interleukin 1, IL-1) 细胞因子家族包括11个成员,主要有白介素1 α (IL-1 α)、白介素1 β (IL-1 β)、白介素1受体拮抗因子 (IL-1Ra) 等。IL-1 α 和IL-1 β 是IL-1家族中主要激活下游信号通路从而发挥生物学功能的2个成员。主要通过与其特异性受体结合,募集共受体,并激活细胞内信号,诱导炎症反应等,发挥生物学功能。研究发现IL-1 β 本身不具有信号肽序列,通过非常规途径分泌。此外,IL-1 β 前体不具生物活性,只有在其N-端区域被半胱天冬酶-1切割后才可产生活性。IL-1 β 的活性受到蛋白质翻译、加工、成熟、受体结合和受体自发信号传导抑制剂严格控制,其中IL-1Ra 是主要的IL-1家族拮抗剂。研究发现,IL-1与IL-1Ra之间的失衡会导致过度的炎症反应,IL-1 β 与IL-1Ra在一些疾病中存在不同的差异表达模式,其比值在不同疾病中也不尽相同。因此两者表达量比值衡量某些相关疾病发生、发展、转归具有一定的指示意义。目前,IL-1和IL-1Ra之间的平衡关系已经在关节炎、炎症性肠病 (IBD) 等多种疾病中开展广泛研究。IL-1局部过度产生和/或IL-1Ra产生不足都易于发生疾病,而IL-1Ra 的治疗性给药能够有效预防组织损伤。IL-1 β 和IL-1Ra含量的检测方法主要有细胞内细胞因子检测法、免疫学检测法、生物活性检测法以及分子生物学方法等。前三种方法检测物种过于单一,特异性较差,检测值可信度较低。而分子生物学方法主要集中对核酸的检测,检测操作相对繁琐、需要样品前处理核酸提取的步骤,提取效率直接影响检测结果。

[0003] 布鲁氏菌病 (Brucellosis, 简称“布病”) 是全球危害最为严重的人畜共患病之一。布病净化工作中没有有效区分接种布病疫苗动物与患病动物的检测方法,给扑杀患病动物带来阻力,严重影响布病的有效防控。

发明内容

[0004] 本发明提供一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒,通过一次实验同时检测样品中IL-1 β 和IL-1Ra的浓度及其比值,解决了单独实验测定IL-1 β 和IL-1Ra浓度比值不准确的问题,同时采用荧光检测可更灵敏的检测血清、血浆、多种组织样品

中的IL-1 β 和IL-1Ra浓度。本发明通过同源比对设计的羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 与IL-1Ra同源保守结构域及其串联融合基因,以其基因工程表达蛋白制备的抗体可与天然的羊、人、牛、马、猪、鼠、兔、犬、鸡、鸭多个物种的IL-1 β 和IL-1Ra相结合,可用于检测多个物种的血清、血浆及组织器官样品中IL-1 β 和IL-1Ra 含量,及IL-1Ra/IL-1 β 的比值。

[0005] 本发明采取的技术方案是:包括抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体预包被酶标板、IL-1 β 和IL-1Ra重组蛋白标准品、稀释液、20 $\times$ PBS-T浓缩洗涤液、蓝色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体、绿色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体。

[0006] 本发明:

[0007] (一)抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体预包被酶标板的制备步骤如下:

[0008] (1)包被抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体:将抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体用稀释液稀释至终浓度为0.078 μ g/mL,加入酶标板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0009] (2)以含有0.2%吐温-20的PBS作为PBS-T洗涤液,洗板3-4次,200 μ L/孔,每次1min,然后用0.1M氯化铵溶液封闭,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h,排干液体;

[0010] (二)蓝色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体,其激发波长360nm,发射波长450nm;偶联步骤如下:10 μ L蓝色荧光微球加入pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液90mL,混匀,15000转/分钟离心15分钟,弃上清,收集微球沉淀,重复洗两次;在90 μ L 0.2M pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液中,加入4.8 μ L EDC (1mg/mL),活化20分钟;然后加入5.6 μ L NHS, (1mg/mL),混匀20分钟;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,收集微球沉淀;用90 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液重悬微球,再加入10 μ L豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体 (1mg/mL),室温涡旋震荡反应4小时;加入10 μ L封闭液 (10%BSA),室温反应30min;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,弃上清,加入 100 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液,4 $^{\circ}$ C避光保存;

[0011] (三)绿色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体,其激发波长480nm,发射波长520nm;10 μ L绿色荧光微球加入pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液90mL,混匀, 15000转/分钟离心15分钟,弃上清,收集微球沉淀,重复洗两次;在90 μ L 0.2M pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液中,加入4.8 μ L EDC (1mg/mL),活化20分钟;然后加入5.6 μ L NHS (1mg/mL),混匀20分钟;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,收集微球沉淀;用90 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液重悬微球,再加入10 μ L豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体 (1mg/mL),室温涡旋震荡反应4小时;加入10 μ L封闭液 (10%BSA),室温反应30min;4 $^{\circ}$ C 15000转/分钟离心15分钟,弃上清,加入100 μ L pH 4.5-7.5的 MES缓冲溶液,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0012] 本发明抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体、豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体、豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体的制备步骤如下:

[0013] (1)在NCBI的GenBank数据库中下载全长绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 和IL-1Ra基因和蛋白序列,使用DNAMAN version 6进行序列一致性比对分析,确定绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 和IL-1Ra蛋白和核酸多物种同源保守区序列,并分析IL-1 β 和IL-1Ra同源保守区之间的差异性;

[0014] (2)选择IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区之间具有差异较大、序列一致性低的两段序列,分别命名为IL-1 β -1和IL-1Ra-1,其原核表达重组蛋白分别用做制备抗IL-1 β 检测用抗

体和抗IL-1Ra检测用抗体的免疫原,另外选择IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区之间具有部分序列一致的两段序列,分别命名为IL-1 β -2和IL-1Ra-2,并将IL-1 β -2和IL-1Ra-2 通过氨基酸序列为FFMSH的DNA linker连接,构建IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区串联基因IL-1 β -1Ra-2,其原核表达重组蛋白用做制备同时抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体的免疫原;

[0015] (3) 用于制备免疫原的多物种同源序列选择要求:IL-1 β -2与IL-1Ra-2具有部分序列一致性,将IL-1 β -2与IL-1Ra-2串联融合获得串联基因IL-1 β -1Ra-2,以其原核表达基因工程重组蛋白免疫家兔制备兔源抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体,可同时结合 IL-1 β 和IL-1Ra,IL-1 β -1与IL-1 β -2、IL-1Ra-1与IL-1Ra-2、以及IL-1 β -1与IL-1Ra-1 之间序列不具有序列一致性,使得分别以IL-1 β -1和IL-1Ra-1基因工程重组蛋白表达产物制备的豚鼠源抗IL-1 β 检测用抗体和豚鼠源抗IL-1Ra检测用抗体,可分别特异性结合IL-1 β 和IL-1Ra;

[0016] (4) 设计扩增IL-1 β -1的上下游引物一对IL-1 β -1-S和IL-1 β -1-A,以包含有全长IL-1 β 的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1 β -1的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1 β -1的DNA;

[0017] (5) 设计扩增IL-1Ra-1的上下游引物一对IL-1Ra-1-S和IL-1Ra-1-A,以包含有全长IL-1Ra的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1Ra-1的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1Ra-1的DNA;

[0018] (6) 设计扩增IL-1 β -2的上下游引物一对IL-1 β -2-S和IL-1 β -2-A,以包含有全长IL-1 β 的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1 β -2的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1 β -2的DNA;

[0019] (7) 设计扩增IL-1Ra-2的上下游引物一对IL-1Ra-2-S和IL-1Ra-2-A,以包含有全长IL-1Ra的cDNA重组质粒为PCR模板,利用常规PCR反应条件扩增IL-1Ra-2的DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1Ra-2的DNA;

[0020] (8) 利用设计在扩增IL-1 β -2所用的下游引物IL-1 β -2-A和扩增IL-1Ra-2所用的上游引物IL-1Ra-2-S中的linker序列,使用常规重叠延伸PCR方法,以IL-1 β -2的DNA 和IL-1Ra-2的DNA为模板,以IL-1 β -2-S和IL-1Ra-2-A为上游引物,将IL-1 β -2与 IL-1Ra-2基因通过Linker串联,扩增IL-1 β -1Ra-2融合DNA,使用DNA凝胶回收试剂盒纯化IL-1 β -1Ra-2的DNA;

[0021] (9) 分别将获得的IL-1 β -1和IL-1Ra-1的DNA片段,以非连接酶依赖性的T4DNA 聚合酶方法克隆到pMCSG9载体上,将IL-1 β -1Ra-2的DNA与pET-30a载体连接,构建重组表达质粒pMCSG9-IL-1 β -1、pMCSG9-IL-1Ra-1和pET30a-IL-1 β -1Ra-2;

[0022] (10) 将重组表达质粒转化至大肠杆菌BL21-Codonplus细胞中诱导表达重组蛋白,挑取重组质粒测序鉴定正确的单菌落,接种于含50mg/L氨苄抗性的液体LB培养基中,37℃培养2小时,然后按1:500比例接种于200mL的含50mg/L氨苄抗性的新鲜液体LB培养基中,37℃振荡培养约1小时,加300 μ L 1mol/mL的IPTG,继续振荡培养5.5小时后经4℃、10000rpm离心5min,分别收获pMCSG9-IL-1 β -1、pMCSG9-IL-1Ra-1、pET30a-IL-1 β -1Ra-2的基因工程大肠杆菌菌体沉淀,以PBS重悬后,用超声破碎仪进行裂解,功率为40W,超声10s,间歇10s,共30min,于12000转/ 分钟、离心30min,得到上清与包涵体沉淀;

[0023] (11) 大肠杆菌系统表达的重组蛋白融合了His标签,将基因工程表达菌的破碎菌体上清液使用镍柱按常规镍离子亲和层析自然沉降方法纯化目标抗原蛋白IL-1 β -1、IL-1

β -2和IL-1 β -1Ra-2,使用SDS-PAGE和Western-blot分析验证纯化后的重组蛋白,用截留分子量8000-14000Da的透析袋4℃透析,透析液为0.01M pH 8.0的PBS,每2 h更换一次透析液,共更换5次,用PEG20000进行反透析浓缩,SDS-PAGE鉴定纯度,分装放入-80℃冰箱备用;

[0024] (12) 动物免疫

[0025] 第一次免疫分别取1mg的IL-1 β -1、IL-1Ra-1和IL-1 β -1Ra-2蛋白,与等体积完全佐剂混合并乳化,分别将乳化后IL-1 β -1和IL-1Ra-1蛋白免疫豚鼠制备豚鼠源抗IL-1 β 检测用抗体和豚鼠源抗IL-1Ra检测用抗体,将乳化后的IL-1 β -1Ra-2蛋白免疫新西兰大白兔制备兔源抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体,进行背部皮下多点免疫,15天为一个免疫周期,第二次免疫开始使用不完全佐剂制备乳化免疫原用于免疫,方法同上,第三次免疫之后,每7天测定一次血清效价,效价达50000以上,进行心脏采血,收集血清待测效价和纯化抗体;

[0026] (13) 抗体效价检测与纯化

[0027] 免疫前留取少量血清作为阴性血清,免疫之后的家兔和豚鼠采集血液,于37℃孵育0.5h,4℃凝血2h,3000转/分钟离心5min,吸取血清,使用常规ELISA方法检测效价,使用AKATA蛋白纯化系统和常规蛋白G亲和层析方法纯化抗体;

[0028] (14) 干扰抗体去除

[0029] 通过干扰抗体去除实验,减少两种豚鼠源检测用抗体的非特异结合,其具体步骤如下:常规诱导转入pMCSG9空载体的大肠杆菌表达菌,取1mL-5mL细菌培养发酵液,1300转/分钟、离心1min,弃上清收集菌体,分别取两种豚鼠源检测用抗体100 μ L混悬菌体,37℃孵育45-90min,3000转/分钟离心5min,取上清为除去干扰抗体的检测用抗体。

[0030] 本发明中:

[0031] IL-1 β -1核苷酸序列如SEQ ID No.1所述;

[0032] IL-1 β -1氨基酸序列如SEQ ID No.2所述;

[0033] IL-1 β -2核苷酸序列如SEQ ID No.3所述;

[0034] IL-1 β -2氨基酸序列如SEQ ID No.4所述;

[0035] IL-1Ra-1核苷酸序列如SEQ ID No.5所述;

[0036] IL-1Ra-1氨基酸序列如SEQ ID No.6所述;

[0037] IL-1Ra-2核苷酸序列如SEQ ID No.7所述;

[0038] IL-1Ra-2氨基酸序列如SEQ ID No.8所述;

[0039] IL-1 β -1Ra-2核苷酸序列如SEQ ID No.9所述;

[0040] IL-1 β -1Ra-2氨基酸序列如SEQ ID No.10所述。

[0041] 本发明中:

[0042] (1) IL-1 β -1-S:5'-tacttccaatccaatgcCTATACCTGTCTTGTGTGACCCA-3';

[0043] IL-1 β -1-A:5'-ttatccacttccaatgtcAGAAGACGAATCGCTTTTCC-3';

[0044] (2) IL-1Ra-1-S:5'-tacttccaatccaatgcCAAGCCTTCAGGATCTGGG-3';

[0045] IL-1Ra-1-A:5'-ttatccacttccaatgtcAACCTTGCAAGTATCCAGC-3';

[0046] (3) IL-1 β -2-S:5'-ccgcatatgTACAAGACAGAAATCAAGAACACAGT-3';

[0047] IL-1 β -2-A:5'-atgcatgctgaagaaTATATCCTGGCCACCTCTAAAAC-3';

[0048] (4) IL-1Ra-2-S:5'-ttcttcagcatgcatGACAAGCGCTTCGCCTTCATC-3';

[0049] IL-1Ra-2-A:5'-ccgctcgagATTGGTGAGGCCACGGG-3';

[0050] (5) IL-1 β 与IL-1Ra同源保守区串联基因IL-1 β -1Ra-2的linker序列ttcttcagcatgcat。

[0051] 本发明所述的IL-1 β 重组蛋白标准品和IL-1Ra重组蛋白标准品,分别是以大肠杆菌表达系统基因工程表达的IL-1 β 重组蛋白和IL-1Ra重组蛋白,具体制备方法按常规的原核表达技术,分别将IL-1 β 和IL-1Ra的开放阅读框插入原核表达载体pET-30a,构建融合His标签的重组表达载体pET-30a-IL-1 β 和pET-30a-IL-1Ra,以常规诱导表达纯化技术,获得高纯度的基因工程IL-1 β 重组蛋白和IL-1Ra重组蛋白,制备标准品蛋白。

[0052] 本发明所述的稀释液为pH7.2-7.6的0.1M PBS溶液。

[0053] 一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒的操作方法,步骤如下:

[0054] (1) 根据待检样本的数量,取出抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体包被的黑色平底酶标板,设置标准品孔、阳性孔、阴性孔、空白孔和样品孔,每孔每次加入液体量为100 μ L。标准品孔加入经稀释液梯度稀释的两种标准品混合溶液,两种标准品蛋白IL-1 β 和 IL-1Ra的终浓度均为78.125ng/ml、39.625ng/ml、19.531ng/ml、9.766ng/ml、4.883 ng/ml、2.441ng/ml、1.221ng/ml、0.610ng/ml、0.305ng/ml、0.153ng/ml、0.076 ng/ml和0.038ng/ml 12个浓度梯度,样品孔加入2倍稀释的待检血清,阴性孔加入PBS 稀释液,阳性孔与空白孔均不加任何液体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入0.1%PBST洗板3次,每次1min;

[0055] (2) 加入0.125 μ g/mL检测用抗体于样品孔、标准品孔和阴性孔中,每孔100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入0.1%PBST洗板3次,每次1min;

[0056] (3) 空白孔不加任何液体,阳性孔加入100 μ L两种荧光微球浓度均为0.125 μ g/mL的荧光微球混合液,标准品孔、阴性孔、样品孔均加入100 μ L稀释液,

[0057] (4) 使用荧光微孔板检测仪进行双荧光检测读值,在360nm激发波长和450nm 发射波长检测IL-1 β 浓度,在480nm激发波长和520nm发射波长检测IL-1Ra浓度;

[0058] (5) 以空白孔荧光值B作为仪器空白调零值,扣除仪器信噪干扰,设定标准品孔荧光值为ST,样品孔荧光值为SA,阴性孔荧光值为N,阳性孔荧光值为P,以阳性孔荧光值P作为分母校正,计算标准品孔校正荧光值ST_a和样品孔校正荧光值SA_a,即 ST_a=ST/P或SA_a=SA/P,分别绘制IL-1 β 和IL-1Ra标准曲线,以标准品IL- β 和IL-1Ra 蛋白浓度对数作为横坐标,以标准品孔校正荧光值ST_a作为纵坐标,绘制标准曲线,计算标准曲线方程和相关系数R²,以样品孔校正荧光值SA_a代入标准曲线方程,计算浓度对数X,10^X即为样品中IL-1 β 和IL-1Ra的浓度,并计算IL-1Ra/IL-1 β 浓度比值;

[0059] (6) 设立阳性孔和阴性孔,可以质控荧光检测的有效性,并使得多次检测结果具有可比性。

[0060] 本发明所述抗体可与羊、人、牛、马、猪、鼠、兔、犬、鸡、鸭多个物种的IL-1 β 和IL-1Ra发生特异性结合反应,用于检测羊、人、牛、马、猪、鼠、兔、犬、鸡、鸭多个物种的血清、血浆及组织器官样品中IL-1 β 和IL-1Ra含量,及IL-1Ra/IL-1 β 的比值。

[0061] 本发明所述的双抗体夹心双荧光ELISA同步测定IL-1Ra与IL-1 β 的比值 IL-1Ra/IL-1 β ,通过临床实际羊血样品检测分析证实,布鲁氏菌病患羊血清中 IL-1Ra/IL-1 β 与布病疫苗免疫羊和健康羊血清中IL-1Ra/IL-1 β 差异极显著。而且,通过统计学ROC分析证实,羊血清中IL-1Ra/IL-1 β 在区分布鲁氏菌病感染与免疫临床检验中具有鉴别诊断意义。

本发明可用于布鲁氏菌病感染与免疫的鉴别诊断,也可用于其它与IL-1Ra/IL-1 β 相关疾病的诊断及发生、发展、转归的标示作用研究。

[0062] 本发明有益效果在于:本发明提供一种用于多物种IL-1 β 和IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心荧光ELISA检测方法及在布鲁氏菌病感染与免疫鉴别诊断中的应用方法,所建立的荧光ELISA检测方法通过一次实验可同时准确获得IL-1 β 和IL-1Ra及其IL-1Ra/IL-1 β 比值,具有操作时间短、灵敏度高、特异性强、双荧光测定干扰小、测定结果准确、检测物种范围广等优点。可用于羊、人、牛、马、猪、鼠、兔等多物种的血清、血浆及其它组织样品中IL-1 β 和IL-1Ra含量测定。两种目标物同步检测并计算比值,减少IL-1Ra/IL-1 β 比值计算的误差,灵敏度达到皮克(pg)级,解决了目前没有准确计算IL-1Ra/IL-1 β 比值方法的问题。同时,本发明的检测方法具有广泛的物种通用性,扩大了本方法的应用范围,可以更准确的比较研究不同物种IL-1 β 和IL-1Ra参与机体生理病理功能。本方法测定IL-1Ra/IL-1 β 比值可用于布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫区别诊断,以及其它与该比值变化相关的疾病诊断。解决了目前没有可靠的区别布鲁氏菌病感染与免疫鉴别诊断方法,造成大量布病免疫动物因检测血清布病抗体反应阳性,而被当作布病患病动物扑杀,带来巨大经济损失。本发明可有效的协助做好布鲁氏菌病的病健分群工作,减少不必要的畜牧养殖业经济损失,为动物布病防控提供有价值的检测诊断工具,为科学净化布病患病动物提供可应用的方法。

附图说明

[0063] 图1是多物种IL-1 β 和IL-1Ra同源保守结构域序列对比分析图,其中:

[0064] A: IL-1 β -1同源保守蛋白结构域序列比对分析图;B: IL-1Ra-1同源保守蛋白结构域序列比对分析图;C: IL-1 β -2同源保守蛋白结构域序列比对分析图;D: IL-1Ra-2同源保守蛋白结构域序列比对分析图;

[0065] 图2是IL-1 β -2与IL-1Ra-2基因串联PCR扩增产物电泳图;

[0066] 图3是IL-1 β -1、IL-1Ra-1和IL-1 β -1Ra-2重组蛋白表达与纯化SDS-PAGE电泳分析图,其中:

[0067] M:Marker;1:诱导表达IL-1 β -1;2:诱导表达IL-1Ra-1;3: IL-1 β -1未诱导对照;4: IL-1Ra-1未诱导对照;5: IL-1 β -1Ra-2未诱导对照;6:诱导表达IL-1 β -1Ra-2;7: pMCSG9空载体未诱导对照;8:pMCSG9空载体诱导对照;

[0068] 图4是抗IL-1 β 检测用抗体、抗IL-1Ra检测用抗体、同时抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体纯化SDS-PAGE分析图,其中:

[0069] M、Marker;1、抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体;2、抗IL-1 β 检测用抗体;3、抗 IL-1Ra检测用抗体;

[0070] 图5是捕获用抗体和检测用抗体与基因工程表达蛋白IL-1 β 和IL-1Ra特异性结合Western blot分析图,其中:

[0071] A: 抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体分析图;B: 抗IL-1 β 检测用抗体分析图;C: 抗 IL-1Ra检测用抗体分析图;1:基因工程表达蛋白IL-1 β ;2:基因工程表达蛋白IL-1Ra;

[0072] 图6是捕获用抗体与检测用抗体与多物种天然IL-1 β 和IL-1Ra蛋白特异性结合Western blot分析图,其中:

[0073] A:抗IL-1 β 检测用抗体与多物种天然IL-1 β 蛋白持异性结合图;B:抗IL-1Ra检测用抗体与多物种天然IL-1Ra蛋白特异性结合图;C:抗IL-1 β -1和IL-1Ra捕获用抗体与多物种天然IL-1 β 和IL-1Ra蛋白特异性结合图;

[0074] 图7是检测用抗体偶联荧光微球的紫外扫描分析图,其中:

[0075] A:抗IL-1 β 检测用抗体偶联蓝色荧光微球;B:抗IL-1Ra检测用抗体偶联绿色荧光微球;

[0076] 图8为是确定最佳抗体对工作浓度分析图;

[0077] A:捕获用抗体浓度与检测荧光值关系;B:检测用抗体浓度与荧光值关系;

[0078] 图9是IL-1 β 与IL-1Ra的标准曲线图;

[0079] 图10是检测荧光密度衰减分析图;

[0080] 图11是布鲁氏菌病疫苗免疫羊组、布鲁氏菌病疫苗未免疫羊阴性组和感染布鲁氏菌病羊阳性组临床实际血清样品检测分析图,其中:

[0081] A:羊血清样品IL-1 β 浓度检测;B:羊血清样品IL-1Ra浓度检测;C:羊血清样品中IL-1Ra/IL-1 β 比值测定;

[0082] 图12是羊血清样品中IL-1Ra/IL-1 β 比值在布鲁氏菌病感染组、疫苗免疫组、阴性对照组中区别诊断意义统计学ROC曲线分析图,其中:

[0083] A:未免疫布病疫苗阴性组与布病疫苗免疫组;B:未免疫布病疫苗阴性组和布病感染阳性组;C:布病疫苗免疫组和布病感染阳性组。

具体实施方式

[0084] 实施例1IL-1 β 与IL-1Ra同源保守序列的选择

[0085] 在NCBI的GenBank数据库中查找下载绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 和IL-1Ra基因和蛋白序列,使用DNAMAN version 6进行序列一致性比对分析,获得绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔的IL-1 β 和IL-1Ra蛋白和核酸多物种同源保守区序列,并分析IL-1 β 和IL-1Ra保守区之间的差异性;

[0086] 选择IL-1 β 与IL-1Ra之间差异较大的同源保守序列,分别命名为IL-1 β -1和 IL-1Ra-1,用于制备检测用抗体的免疫原;选择另外两段有部分相似性的IL-1 β 与 IL-1Ra,分别命名为IL-1 β -2和IL-1Ra-2,并将两者之间用序列为ttcttcagcatgcat的linker (氨基酸序列为FFSMH) 连接构建融合串联基因,命名为IL-1 β -1Ra-2,用于制备捕获用抗体的免疫原。

[0087] 用于制备免疫原的多物种同源保守序列选择要求:除IL-1 β -2与IL-1Ra-2具有部分序列一致性外,其它IL-1 β -1、IL-1 β -2、IL-1Ra-1、IL-1Ra-2两两之间序列不相似,同源比对保守序列分析选择结果见图1。

[0088] 实施例2重组蛋白的制备

[0089] (1) 设计合成用于扩增IL-1 β -1、IL-1 β -2、IL-1Ra-1、IL-1Ra-2DNA序列的引物见表1:

[0090] 表1:本发明设计合成的引物

[0091]

引物名称	引物序列
------	------

IL-1 β -1-S	5'-tactttccaatccaatgcCTATACCTGTCTTGTGTGACCCA-3'
IL-1 β -1-A	5'-ttatccactttccaatgtcAGAAGACGAATCGCTTTTCC-3'
IL-1Ra-1-S	5'-tactttccaatccaatgcCAAGCCTTCAGGATCTGGG-3'
IL-1Ra-1-A	5'-ttatccactttccaatgtcAACCTTGCAAGTATCCAGC-3'
IL-1 β -2-S	5'-ccgcatatgTACAAGACAGAAATCAAGAACACAGT-3'
IL-1 β -2-A	5'-atgcatgctgaagaaTATATCCTGGCCACCTCTAAAAC-3'
IL-1Ra-2-S	5'-ttcttcagcatgcatGACAAGCGCTTCGCCTTCATC-3'
IL-1Ra-2-A	5'-ccgctcgagATTGGTGAGGCCACGGG-3'

[0092] (2) 使用常规PCR方法扩增IL-1 β -1、IL-1Ra-1、IL-1 β -2、IL-1Ra-2的目标DNA 序列,PCR体系如下:Es Taq:25 μ l;上游引物:1 μ l;下游引物:1 μ l;IL-1 β 或IL-1Ra 全长质粒模板:2 μ l;ddH₂O:21 μ l;Total:50 μ l;IL-1 β -1和IL-1Ra-1反应条件如下:94 $^{\circ}$ C3min;94 $^{\circ}$ C30s,62 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C90s,共32个循环;72 $^{\circ}$ C10min;IL-1 β -2 和IL-1Ra-2反应条件如下:94 $^{\circ}$ C3min;94 $^{\circ}$ C30s,60 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C90s,共32个循环;72 $^{\circ}$ C10min;

[0093] (3) IL-1 β -2与IL-1Ra-2基因串联:IL-1 β -2下游引物IL-1 β -2-A和IL-1Ra-2上游引物IL-1Ra-2-S中含有一段linker序列ttcttcagcatgcat,因此,以IL-1 β -2-S作为上游引物,IL-1Ra-2-A作为下游引物,以IL-1 β -2和IL-1Ra-2胶回收产物为模板,进行PCR 扩增,扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C3min;94 $^{\circ}$ C30s,62 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C90s,共32个循环;72 $^{\circ}$ C10min;PCR体系如下:Es Taq:25 μ l;IL-1 β -2-S:1 μ l;IL-1Ra-2-A:1 μ l;IL-1 β -2 的PCR产物:1 μ l;IL-1Ra-2的PCR产物:1 μ l;ddH₂O:21 μ l;Total:50 μ l,其基因串联PCR扩增电泳结果见图2;

[0094] (4) 将pMCSG9载体以SSPI酶切处理,体系为SSPI酶4 μ l,pMCSG9质粒32 μ l,10 $\times$ Buffer 4 μ l,于37 $^{\circ}$ C过夜,不进行胶回收;

[0095] (5) 将pMCSG9的SSPI酶切产物分别与IL-1 β -1和IL-1Ra-1胶回收产物进行连接,按表2构建反应体系,混合均匀后70 $^{\circ}$ C保温5min,移入37 $^{\circ}$ C恒温槽中,加入1 μ l T4 DNA pol聚合酶,终体积10 μ l,轻轻混匀后于37 $^{\circ}$ C保温5min,将IL-1 β -1或IL-1Ra-1 反应体系2 μ l与pMCSG9反应体系2 μ l轻轻混匀后于22 $^{\circ}$ C反应15min,之后加25mM EDTA 2 μ l,于22 $^{\circ}$ C反应10min,成功构建重组表达质粒pMCSG9-IL-1 β -1和 pMCSG9-IL-1Ra-1;

[0096] 表2;反应体系

[0097]

	pMCSG9 (μ l)	IL-1 β -1 (μ l)	IL-1Ra-1 (μ l)
质粒或目标 DNA	3	3	3
10 $\times$ T4 buffer	1	1	1
0.1% BSA	1	1	1
dGTP	1	-	-
dCTP	-	1	1
dH ₂ O	3	3	3

[0098] (6) 用限制性内切酶NdeI和XhoI分别对pET-30a质粒和IL-1 β -1Ra-2胶回收产物按

常规方法进行双酶切反应,将酶切后产物进行连接,成功构建重组表达质粒 pET30a-IL-1 β -1Ra-2;

[0099] (7) 将重组表达质粒转化入E.coli BL21 (DE3) 表达菌中,按常规方法进行终浓度0.4mM的IPTG诱导表达,His标签-镍柱亲和层析纯化,分别得到原核表达基因工程重组蛋白IL-1 β -1、IL-1Ra-1和IL-1 β -1Ra-2,见图3;具体步骤如下:

[0100] 将重组表达质粒转化至大肠杆菌BL21-Codonplus细胞中诱导表达重组蛋白,挑取重组质粒测序鉴定正确的单菌落,接种于含50mg/L氨苄抗性的液体LB培养基中,37℃培养2小时,然后按1:500比例接种于200mL的含50mg/L氨苄抗性的新鲜液体LB培养基中,37℃振荡培养约1小时,加300 μ L 1mol/mL的IPTG,继续振荡培养5.5 小时后经4℃、10000rpm离心5min,分别收获pMCSG9-IL-1 β -1、pMCSG9-IL-1Ra-1、pET30a-IL-1 β -1Ra-2的基因工程大肠杆菌菌体沉淀,以PBS重悬后,用超声破碎仪进行裂解,功率为40W,超声10s,间歇10s,共30min,于12000转/分钟、离心30min,得到上清与包涵体沉淀;

[0101] 大肠杆菌系统表达的重组蛋白融合了His标签,将基因工程表达菌的破碎菌体上清液使用镍柱按常规镍离子亲和层析自然沉降方法纯化目标抗原蛋白IL-1 β -1、IL-1 β -2和IL-1 β -1Ra-2,使用SDS-PAGE和Western-blot分析验证纯化后的重组蛋白,用截留分子量8000-14000Da的透析袋4℃透析,透析液为0.01M pH 8.0的PBS,每2h更换一次透析液,共更换5次,用PEG20000进行反透析浓缩,SDS-PAGE鉴定纯度,分装放入-80℃冰箱备用。

[0102] 实施例3抗IL-1 β 检测用抗体、抗IL-1Ra检测用抗体、同时抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体的制备

[0103] (1) 第一次免疫,分别取1mg的IL-1 β -1、IL-1Ra-1和IL-1 β -1Ra-2蛋白与等体积佛氏完全佐剂混合并充分完全乳化,以背部皮下多点免疫方式,将IL-1 β -1、IL-1Ra-1 免疫豚鼠,将IL-1 β -1Ra-2免疫新西兰大白兔,15天为一个免疫周期,第二次免疫使用佛氏不完全佐剂与免疫原混合制备乳化免疫原,按上述方法免疫,第三免疫之后,每7 天测定血清效价,效价达50000之后心脏采血,收集血清;

[0104] (2) 抗体效价检测:免疫前留取少量血清作为阴性血清,采取少量免疫后家兔和豚鼠血液,于37℃孵育0.5h,4℃凝血2h,之后以3000转/分钟离心5min,吸取血清,使用常规ELISA方法检测效价,当ELISA检测抗体效价达到50000之后,使用 AKATA蛋白纯化系统和常规蛋白G亲和层析方法纯化抗体,见图4;

[0105] (3) 干扰抗体去除:诱导转入pMCSG9空载体的E.coli BL21 (DE3) 表达菌,分别取1mL-5mL细菌培养发酵液,1300转/分钟离心1min,弃上清得到菌体;分别取两种豚鼠抗体100 μ L与上述不同量的菌体混匀,于37℃分别孵育45min-90min;孵育完成后3000转/分钟离心5min,取上清为除去干扰抗体的检测用抗体。

[0106] 实施例4捕获用抗体和检测用抗体鉴定与分析

[0107] (1) 利用常规Western Blot方法杂交分析兔源捕获用抗体和豚鼠源检测用抗体与其目标基因工程重组蛋白IL-1 β 和IL-1Ra结合的特异性和交叉反应特性,见图5;

[0108] (2) 利用常规Western Blot方法杂交分析兔源捕获用抗体和豚鼠源检测用抗体与其目标多物种天然蛋白IL-1 β 和IL-1Ra结合的特异性和交叉反应特性,天然蛋白提取:利用常规RIPA裂解液提取组织蛋白,以常规RIPA裂解液对0.1M PMSF异丙醇储存液进行100倍稀释,配制成完全RIPA裂解液。具体提取步骤如下:剪取适量组织块放入2mL平底研磨管,按每

克组织加入8mL的完全RIPA裂解液比例,加入适当体积完全RIPA裂解液,充分研磨匀浆10min,4℃13000转/分钟离心20min,转移上清至1.5mL离心管中,测量总蛋白含量,利用常规Western blot方法杂交分析捕获用抗体与检测用抗体与多物种天然蛋白IL-1 β 和IL-1Ra结合特性,见图6。

[0109] 实施例5IL-1 β 标准品和IL-1Ra标准品的制备

[0110] 分别以大肠杆菌表达系统按常规的原核表达技术制备基因工程IL-1 β 重组蛋白和IL-1Ra重组蛋白作为本发明的标准品蛋白。具体制备方法,分别将IL-1 β 和IL-1Ra的开放阅读框插入原核表达载体pET-30a,构建融合His标签的重组表达载体 pET-30a-IL-1 β 和pET-30a-IL-1Ra,以常规诱导表达纯化技术,获得高纯度的基因工程 IL-1 β 重组蛋白和IL-1Ra重组蛋白制成标准品蛋白。

[0111] 实施例6检测用抗体偶联荧光微球

[0112] 将两种豚鼠源多克隆检测用抗体分别与不同颜色荧光微球进行偶联,其中抗IL-1 β 检测用抗体偶联蓝色荧光微球(激发波长360nm,发射波长450nm),抗IL-1Ra检测用抗体偶联绿色荧光微球(激发波长480nm,发射波长520nm),制备带有荧光微球的检测用抗体,可用于IL-1 β 和IL-1Ra的直接检测;其具体偶联步骤如下:10 μ L微球加入pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液90mL,混匀,15000转/分钟离心15分钟,弃上清,收集微球沉淀,重复洗两次;在90 μ L 0.2M pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液中,加入4.8 μ L EDC (1mg/mL),活化20分钟;然后加入5.6 μ L NHS (1mg/mL),混匀20分钟;4℃ 15000转/分钟离心15分钟,收集微球沉淀;用90 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液重悬微球,再加入10 μ L抗体 (1mg/mL),室温涡旋震荡反应4小时;加入10 μ L封闭液 (10%BSA),室温反应30min;4℃15000转/分钟离心15分钟,弃上清,加入100 μ L pH 4.5-7.5的MES缓冲溶液,4℃避光保存,以紫外全波长扫描分析偶联荧光微球抗体,见图7。

[0113] 实施例7棋盘法确定最佳抗体对工作浓度

[0114] 将同时抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源捕获用抗体包被于96孔黑色微孔板上,加入IL-1 β 和IL-1Ra混合蛋白标准品,再加入IL-1 β 和IL-1Ra的荧光检测用抗体,用于检测IL-1 β 和IL-1Ra在混合蛋白中IL-1 β 和IL-1Ra的含量,最后使用荧光微孔板分析仪检测其荧光值,具体操作步骤如下:

[0115] (1) 包被捕获用抗体:以pH7.2-7.6的0.1M PBS作为稀释液包被捕获用抗体,将捕获用抗体用稀释液倍比稀释到终浓度为1.248 μ g/mL,0.624 μ g/mL,0.312 μ g/mL, 0.156 μ g/mL,0.078 μ g/mL,0.039 μ g/mL,加入酶标板中,100 μ L/孔,每一纵排为同一浓度捕获用抗体,在4℃条件下包被过夜;

[0116] (2) 以含有0.2%吐温-20的PBS做为PBS-T洗涤液,洗板3-4次,200 μ L/孔,每次1min,然后用0.1M氯化铵溶液封闭,200 μ L/孔,37℃1h,排干液体;

[0117] (3) 以稀释液稀释IL-1 β 和IL-1Ra混合标准品蛋白至IL-1 β 和IL-1Ra终浓度均为1 μ g/mL,加入到酶标板中,反应1h,以PBS稀释液代替标准品做为阴性对照,每组抗体对均设立阴性对照,以未加入任何试剂的空白孔做为空白对照;

[0118] (4) 以PBS-T洗板3-4次,由IL-1 β -1检测用抗体和IL-1Ra-1检测用抗体组成混合荧光检测用抗体,以稀释液倍比稀释混合荧光检测用抗体至两种检测用抗体终浓度均为2 μ g/mL,1 μ g/mL,0.5 μ g/mL,0.25 μ g/mL,0.125 μ g/mL,0.0625 μ g/mL,37℃反应1h;

[0119] (5) 以PBS-T洗板3-4次,将没有偶联抗体的裸荧光微球也稀释相同倍数,单独设立

一组阳性对照组,使用荧光微孔板分析仪分别于激发波长360nm、发射波长450nm 和激发波长480nm、发射波长520nm测定荧光密度值。

[0120] (6) 设定标准品孔荧光值为S,空白孔荧光值为B,阴性孔荧光值为N,根据各抗体浓度对应的荧光值强弱及变化趋势,确定本方法所用最佳抗体对浓度,捕获用抗体最优包被工作浓度0.078 μ g/mL,检测用抗体最优工作浓度0.125 μ g/mL,见图8。

[0121] 实施例8确定封闭时间、抗原作用时间、检测用抗体作用时间

[0122] 0.1M氯化铵封闭液作用时间设置0.5h、1h、1.5h、2h四个时间梯度,抗原作用时间设置45min、60min、75min、90min和120min五个时间梯度,检测用抗体作用时间设置30min、45min、60min、75min和90min五个时间梯度,以最优抗体对浓度和终浓度均为1 μ g/mL IL-1 β 和IL-1R混合标准品蛋白完成ELISA检测反应,分别测定荧光值,确定最佳工作时间。结果显示:封闭液作用时间1h之前封闭效果不彻底,1h之后荧光值平稳,封闭效果基本一致,最佳封闭时间为1h;抗原作用时间对ELISA 检测荧光值影响较小,选择抗原作用时间为30min;检测用抗体作用时间在1h之前荧光值较为平稳,在1h之后荧光值开始降低,选择检测用抗体的最佳作用时间为1h。

[0123] 实施例9IL-1 β 与IL-1Ra同步测定双抗体夹心双荧光ELISA检测方法标准曲线的构建

[0124] 以pH7.2-7.6的0.1M PBS稀释液稀释IL- β 和IL-1Ra标准品混合液至两种标准品终浓度均为1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.25ng/mL、78.125ng/mL、39.625 ng/mL、19.531ng/mL、9.766ng/mL、4.883ng/mL、2.441ng/mL、1.221ng/mL、0.610 ng/mL、0.305ng/mL、0.153ng/mL、0.076ng/mL、0.038ng/mL;根据确定的最优ELISA 反应条件,按实施例7的操作过程,测定16个浓度的标准品的荧光信号值,以PBS代替标准品加样做为阴性对照,以未加入任何试剂的空白孔为空白对照,以只加入100 μ L 两种荧光微球浓度均为0.125 μ g/mL的荧光微球混合液做为阳性对照;以空白孔荧光值 B作为仪器空白调零值,扣除仪器信噪干扰。设定标准品孔荧光值为ST,阴性孔荧光值为N,阳性孔荧光值为P;以阳性孔荧光值P作为分母校正,计算标准品孔校正荧光值ST_a,即ST_a=ST/P。以标准品IL- β 和IL-1Ra蛋白浓度对数作为横坐标,以标准品孔校正荧光值ST_a作为纵坐标,分别绘制IL-1 β 和IL-1Ra标准曲线,计算标准曲线方程和相关系数R²。最终确定IL-1 β 与IL-1Ra的线性范围均为76pg/mL-625ng/mL,IL-1 β 的标准曲线方程为 $y=0.0076x-0.0058$,R²为0.9937;IL-1Ra的标准曲线方程为 $y=0.0027x+0.0251$,R²为0.9904。以8个阴性孔平均荧光值代入标准曲线方程,计算对应的浓度值为本方法的最低检测限,IL-1 β 和IL-1Ra的最低检测限均为11pg/mL,见图9。

[0125] 实施例10回收率实验

[0126] 将IL-1 β 标准品与IL-1Ra标准品分别按1:3、1:2、1:1、2:1、3:1比例混合,检测其荧光值,根据标准曲线方程计算相应的蛋白浓度,除以已知标准品蛋白浓度计算回收率,IL-1 β 回收率范围为80.89%~101.13.52%,平均回收率为87.842%;IL-1Ra回收率范围为80.07%~114.18%,平均回收率为93.93%,见表3;

[0127] 表3:回收率分析结果

[0128]

浓 度 比	IL-1 β			IL-1Ra		
	标准品浓度 (ng/mL)	检测浓度 (ng/mL)	回收率	标准品浓度 (ng/mL)	检测浓度 (ng/mL)	回收率
1: 3	100	82.98	82.98%	300	303.92	101.31%
1: 2	100	86.7	86.70%	200	228.36	114.18%
1: 1	100	80.89	80.89%	100	80.07	80.07%
2: 1	200	202.27	101.13%	100	88.77	88.77%
3: 1	300	262.54	87.51%	100	85.32	85.32%

[0129] 实施例11荧光信号衰减期分析

[0130] 用PBS稀释液稀释IL-1 β 与IL-1Ra标准品蛋白至两种蛋白终浓度均为200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、10ng/mL、5ng/mL,以建立的双抗夹心双荧光ELISA 方法进行检测,分别于荧光检测抗体加入0h、0.5h、1h、2h后进行荧光值测定。结果显示:在加入荧光抗体0.5h之内,荧光密度值无明显变化;在加入荧光抗体2h内,均可有效检出目标物;推荐在荧光抗体加入0.5h内完成荧光检测,见图10。

[0131] 实施例12一种用于多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心双荧光ELISA检测方法的操作步骤

[0132] (1) 根据待检样本的数量,取出抗IL-1 β 和IL-1Ra捕获用抗体包被的黑色平底酶标板,设置标准品孔、阳性孔、阴性孔、空白孔和样品孔,每孔每次加入液体量为100 μ L。标准品孔加入经稀释液梯度稀释的两种标准品混合溶液,两种标准品蛋白IL-1 β 和 IL-1Ra的终浓度均为78.125ng/ml、39.625ng/ml、19.531ng/ml、9.766ng/ml、4.883 ng/ml、2.441ng/ml、1.221ng/ml、0.610ng/ml、0.305ng/ml、0.153ng/ml、0.076 ng/ml和0.038ng/ml 12个浓度梯度,样品孔加入2倍稀释的待检血清,阴性孔加入PBS 稀释液,阳性孔与空白孔均不加任何液体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入0.1%PBS-T洗板3次,每次1min;

[0133] (2) 加入浓度均为0.125 μ g/mL的两种检测用抗体于样品孔、标准品孔和阴性孔中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,加入0.1%PBS-T洗板3次,每次1min;

[0134] (3) 空白孔不加任何液体,阳性孔加入100 μ L两种荧光微球浓度均为0.125 μ g/mL的荧光微球混合液,标准品孔、阴性孔、样品孔均加入100 μ L PBS稀释液;

[0135] (4) 使用荧光微孔板分析仪进行双荧光检测读值。在360nm激发波长和450nm 发射波长检测IL-1 β 浓度,在480nm激发波长和520nm发射波长检测IL-1Ra浓度;

[0136] (5) 以空白孔荧光值B作为仪器空白调零值,扣除仪器信噪干扰。设定标准品孔荧光值为ST,样品孔荧光值为SA,阴性孔荧光值为N,阳性孔荧光值为P,以阳性孔荧光值P作为分母校正,计算标准品孔校正荧光值ST_a和样品孔校正荧光值SA_a,即 ST_a=ST/P或SA_a=SA/P,分别绘制IL-1 β 和IL-1Ra标准曲线,以标准品IL- β 和IL-1Ra 蛋白浓度对数作为横坐标,以标准品孔校正荧光值ST_a作为纵坐标,绘制标准曲线,计算标准曲线方程和相关系数R²,以样品孔校正荧光值SA_a代入标准曲线方程,计算浓度对数X,10^X即为样品中IL-1 β 和IL-1Ra的

浓度,并计算IL-1Ra/IL-1 β 浓度比值;

[0137] (6) 设立阳性孔和阴性孔,可以质控荧光检测的有效性,并使得多次检测结果具有可比性。

[0138] 实施例13一种用于多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心双荧光ELISA检测方法在布鲁氏菌病感染与免疫鉴别诊断中的应用

[0139] (1) 采集904份羊血清和血浆样品,经布鲁氏菌病虎红平板凝集试验分析。未免疫布病疫苗的布病阴性健康组羊血清样品196份,虎红平板凝集试验结果阴性;免疫布鲁氏菌S2疫苗的布病免疫组羊血清样品592份,虎红平板凝集试验结果阳性;感染布鲁氏菌病的布病阳性组羊血清样品115份,虎红平板凝集试验结果阳性。目前以抗原抗体反应为基础的免疫学检测方法,如虎红平板凝集试验无法区分布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫;

[0140] (2) 使用本发明建立的IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心双荧光ELISA检测方法测定血清中IL-1 β 和IL-1Ra的浓度,并计算IL-1Ra/IL-1 β 比值。布病感染组IL-1 β 浓度明显高于布病免疫组和布病阴性健康组;布病感染组IL-1Ra浓度低于布病免疫组和布病阴性健康组,布病感染组IL-1Ra/IL-1 β 比值明显低于阴性健康组与免疫组,统计学分析差异极显著, $P<0.01$,见图11;

[0141] (3) 统计学ROC曲线分析IL-1Ra/IL-1 β 比值在布鲁氏菌病感染组、疫苗免疫组、阴性对照组中区别诊断意义。结果显示:布病阴性组和布病免疫组曲线下面积AUC为 0.155<0.5,布病阴性组和布病免疫组的IL-1Ra/IL-1 β 没有区别鉴定意义;布病阴性组与布病感染组AUC及布病免疫组与布病感染组AUC均为1.000>0.5,IL-1Ra/IL-1 β 比值可用于布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫的鉴别诊断,见图12,根据统计学正态分布法分别计算布病感染羊、布病免疫羊、布病阴性健康羊的IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值分布范围,见表4;

[0142] 表4:羊血清中IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值统计学分析

[0143]

	布病感染羊	布病免疫羊	布病阴性羊
统计学方法	正态分布法		
置信水平	99%		
IL-1 β 分布范围	21.82-26.378	9.95-16.81	9.64-15.63
IL-1 β 均值	24.09	13.38	12.63
IL-1 β 标准差	0.88	1.33	1.16
IL-1Ra 分布范围	1144.39-1221.64	1237.58-1504.45	1162.46-1639.34
IL-1Ra 均值	1183.02	1371.02	1400.90
IL-1Ra 标准差	14.97	51.72	92.42
IL-1Ra/IL-1 β 比值分布范围	44.42-53.93	74.12-132.31	83.63-139.45
IL-1Ra/IL-1 β 均值	49.17	103.22	111.54
IL-1Ra/IL-1 β 标准差	1.84	11.28	10.82

[0144] (4) 羊布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫鉴别诊断推荐操作规程如下:

[0145] ①虎红平板凝集试验

[0146] 取30 μ L羊待检测血清与30 μ L虎红凝集抗原于玻璃板上混匀。结果判定:受检血清在5min之间,没有出现凝集现象,反应体系呈均匀粉红色,则为虎红试验阴性,判定为无布病感染羊;出现肉眼可见凝集现象,则为虎红试验阳性,判定为布病感染或免疫羊,待进行下一步IL-1Ra/IL-1 β 比值测定。

[0147] ②IL-1Ra/IL-1 β 比值测定

[0148] 利用本发明的IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定双抗体夹心双荧光ELISA检测方法,按实施例12操作步骤,测定虎红试验阳性血清样品中IL-1Ra/IL-1 β 比值。结果判定:IL-1Ra/IL-1 β 在44.42-53.93范围内,则判定为布鲁氏菌患病羊;IL-1Ra/IL-1 β 在 74.12-139.45范围内,则判定为未患布鲁氏菌病羊;IL-1Ra/IL-1 β 不在以上两个范围,需结合临床症状或其它布病检测方法进一步检验分析。

[0149] 实施例14一种用于多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心双荧光ELISA检测方法在血清和血浆样品中的检测应用

[0150] 按常规方法同时采集100只羊的血清和血浆样品,利用本发明的IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定双抗体夹心双荧光ELISA检测方法,按实施例12操作步骤,测定血清和血浆中IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值,结果显示:测定的血清中IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值与血浆中的无显著性差异,本发明的方法可有效的测定血清和血浆中的IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值。

[0151] 实施例15一种用于多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心双荧光ELISA检测方法在健康小鼠和人血清样品中的检测应用

[0152] 按常规方法采集50份健康小鼠血清和57份健康人血清样品,利用本发明的IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定双抗体夹心双荧光ELISA检测方法,按实施例12操作步骤,测定小鼠血清和人血清中IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值,根据统计学正态分布法分别计算在健康小鼠和人血清中IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值分布范围,见表5;本发明IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的双抗体夹心双荧光ELISA检测方法可用于多物种的IL-1 β 与IL-1Ra及其比值测定。

[0153] 表5:小鼠和人血清中IL-1 β 、IL-1Ra、IL-1Ra/IL-1 β 比值统计学分析

[0154]

	健康小鼠	健康人
统计学方法	正态分布法	
置信水平	99%	
IL-1 β 分布范围	11.86-17.91	13.90-14.20
IL-1 β 均值	14.88	14.05
IL-1 β 标准差	1.17	0.06
IL-1Ra 分布范围	83.89-188.42	1298.59-1558.25
IL-1Ra 均值	136.15	1428.42
IL-1Ra 标准差	20.26	50.32
IL-1Ra/IL-1 β 比值分布范围	5.28-13.10	92.07-111.32
IL-1Ra/IL-1 β 均值	9.19	101.70
IL-1Ra/IL-1 β 标准差	1.51	3.73

[0155] 本发明所述的双抗体夹心双荧光ELISA同步测定IL-1Ra与IL-1 β 的比值 IL-1Ra/IL-1 β ,通过临床实际羊血样品检测分析证实,布鲁氏菌病患病羊血清中 IL-1Ra/IL-1 β 与布病疫苗免疫羊和健康羊血清中IL-1Ra/IL-1 β 差异极显著。而且,通过统计学ROC分析证实,羊血清中IL-1Ra/IL-1 β 在区分布鲁氏菌病感染与免疫临床检验中具有鉴别诊断意义。本发明可用于布鲁氏菌病感染与免疫的鉴别诊断,也可用于其它与IL-1Ra/IL-1 β 相关疾病的诊断及发生、发展、转归的标示作用研究。

序列表

<110> 吉林大学

<120> 多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒

<160> 10

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 108

<212> DNA

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 1

ctatacctgt cttgtgtgac ccaaggtgat acaccgaccc tgcagctgga ggaagtagac 60
 cccaaagtct accccaagag gaatatggaa aagcgattcg tcttctga 108

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 2

Leu Tyr Leu Ser Cys Val Thr Gln Gly Asp Thr Pro Thr Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Glu Val Asp Pro Lys Val Tyr Pro Lys Arg Asn Met Glu Lys Arg
 20 25 30
 Phe Val Phe
 35

<210> 3

<211> 126

<212> DNA

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 3

tacaagacag aaatcaagaa cacagttgaa tttgagtctg tcctgtaccc taactggtac 60
 atcagcactt ctcaaatcga agaaaagccc gtcttctctgg gacgttttag aggtggccag 120
 gatata 126

<210> 4

<211> 42

<212> PRT

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 4

Tyr Lys Thr Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu Phe Glu Ser Val Leu Tyr
 1 5 10 15

Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ile Glu Glu Lys Pro Val Phe
20 25 30

Leu Gly Arg Phe Arg Gly Gly Gln Asp Ile
35 40

<210> 5

<211> 84

<212> DNA

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 5

caagccttca ggatctggga tgtcaaccag aagatcttct acctgaggaa taaccaacta 60
gttgctggat acttgcaagg ttga 84

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 6

Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Ile Phe Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly
20 25

<210> 7

<211> 123

<212> DNA

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 7

gacaagcgct tcgccttcat ccgctctgac aacggcccca ccaccagctt cgagtcggct 60
gcctgccccg gctggttcct ctgcacatca ctggaggccg accagcccgt gggcctcacc 120
aat 123

<210> 8

<211> 41

<212> PRT

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 8

Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Asn Gly Pro Thr Thr Ser
1 5 10 15

Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ser Leu Glu
20 25 30

Ala Asp Gln Pro Val Gly Leu Thr Asn
35 40

<210> 9

<211> 264

<212> DNA

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 9

tacaagacag aaatcaagaa cacagttgaa tttgagtctg tcctgtaccc taactggtac 60
atcagcactt ctcaaatcga agaaaagccc gtcttcctgg gacgttttag aggtggccag 120
gatatatctt tcagcatgca tgacaagcgc ttcgccttca tccgctctga caacggcccc 180
accaccagct tcgagtcggc tgcctgcccc ggctggttcc tctgcacatc actggaggcc 240
gaccagcccc tgggcctcac caat 264

<210> 10

<211> 88

<212> PRT

<213> 绵羊 (绵羊)

<400> 10

Tyr Lys Thr Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu Phe Glu Ser Val Leu Tyr
1 5 10 15
Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ile Glu Glu Lys Pro Val Phe
 20 25 30
Leu Gly Arg Phe Arg Gly Gly Gln Asp Ile Phe Phe Ser Met His Asp
 35 40 45
Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Asn Gly Pro Thr Thr Ser Phe
 50 55 60
Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Asp Gln Pro Val Gly Leu Thr Asn
 85

A : IL-1 β -1牛 IL-1 β (NP_776518.1)马 IL-1 β (NP_001075995.1)人 IL-1 β (NP_000567.1)小鼠 IL-1 β (NP_032387.1)兔 IL-1 β (NP_001075670.1)绵羊 IL-1 β (AGI15465.2)猪 IL-1 β (NP_001289317.1)

保守氨基酸

```

LYLSCVKKGDTPTLQLEEVDPKVYPKRNMEKRFVF
LYLSCGMKDGKPTLQLETVDPNTPYKPKMEKRFVF
LYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVF
LYLSCVMKDGTPTLQLESVDPKQYPKKKMEKRFVF
LYLSCVMKDDKPTLQLESVDPNRYPKKKMEKRFVF
LYLSCVKKGDTPTLQLEEVDPKVYPKRNMEKRFVF
LYLSCVMKDDTPTLQLEDVDPKSYPKRDMEKRFVF
lylsc k ptlqle vdp ypk mekrfvf

```

B : IL-1Ra-1

牛 IL-1Ra (NP_776782.1)

马 IL-1Ra (NP_001075994.1)

人 IL-1Ra (NP_776214.1)

小鼠 IL-1Ra (NP_112444.1)

兔 IL-1Ra (NP_001076239.1)

绵羊 IL-1Ra (AGI15466.1)

猪 IL-1Ra (NP_999427.1)

保守氨基酸

```

QAFRIWDVNQKIFYLRNNQLVAGYLQG
QAFRIWDVNQKTFYMRNNQLVAGYLQE
QAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQG
QAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQG
QAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQG
QAFRIWDVNQKIFYLRNNQLVAGYLQE
QAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQG
qafriwd nqk fy rnnql agylq

```

C : IL-1 β -2牛 IL-1 β (NP_776518.1)马 IL-1 β (NP_001075995.1)人 IL-1 β (NP_000567.1)小鼠 IL-1 β (NP_032387.1)兔 IL-1 β (NP_001075670.1)绵羊 IL-1 β (AGI15465.2)猪 IL-1 β (NP_001289317.1)

保守氨基酸

```

YKTEIKNTVEFESVLYPNWIYSTSCIEERPVLGHRFGGQDI
NKMEIKGNVEFESAMYPNWIYSTSCAEKKPVFLGNTRGGQDI
NKIEINNKLFEFESAQFPNWIYSTSCAENMPVFLGGTKGGQDI
NKIEVKSKVEFESAEPNWIYSTSCAEHKPVFLGNNSG.QDI
NKIEIKDKLEFESAQFPNWIYSTSCTEYMPVFLGNNSGGQDL
YKTEIKNTVEFESVLYPNWIYSTSCIEERPVLGHRFGGQDI
YKTEIKNRVEFESSLYPNWIYSTSCAEQKPVFLGNSKGRQDI
k e efes pnwyistsq e pvflg g d

```

D : IL-1Ra-2

牛 IL-1Ra (NP_776782.1)

马 IL-1Ra (NP_001075994.1)

人 IL-1Ra (NP_776214.1)

小鼠 IL-1Ra (NP_112444.1)

兔 IL-1Ra (NP_001076239.1)

绵羊 IL-1Ra (AGI15466.1)

猪 IL-1Ra (NP_999427.1)

保守氨基酸

```

DKRFAFIRFDNGPTTSFESAACPGWFLCTSLEADQPVGLTN
NKRFTFIRSNSGPTTSFESAACPGWFLCTACEADRPVSLTN
DKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTN
DKRFTFIRSEKGPSTTSFESAACPGWFLCTTLEADRPVSLTN
DKRFTFIRSNSGPTTTFESASCPGWFLCTALEADQPVSLTN
DKRFAFIRSDNGPTTSFESAACPGWFLCTSLEADQPVGLTN
DKRFTFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTALEADQPVGLTN
krf fir gptt fesa cpgwflct ead pv ltn

```

图1

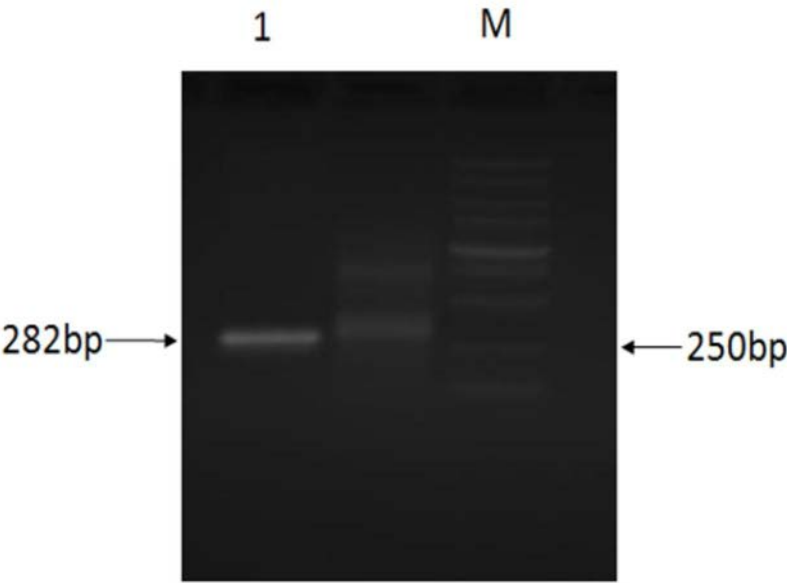


图2

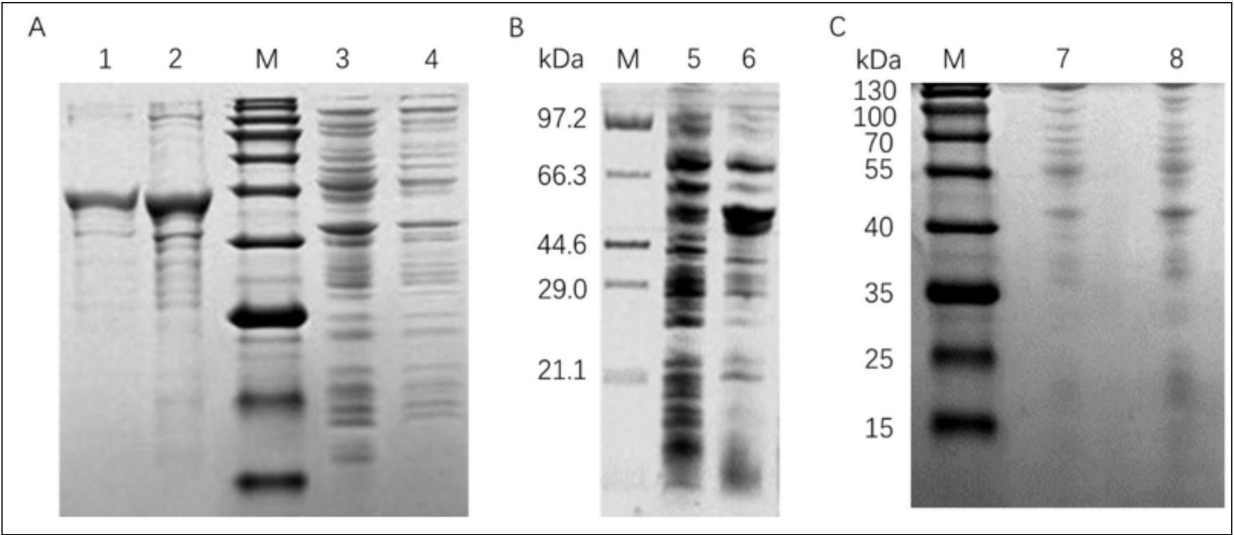


图3

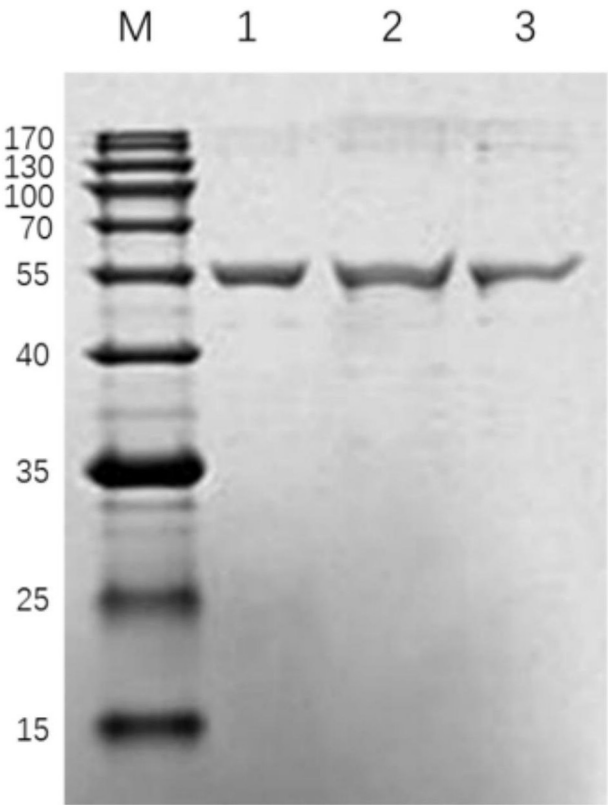


图4

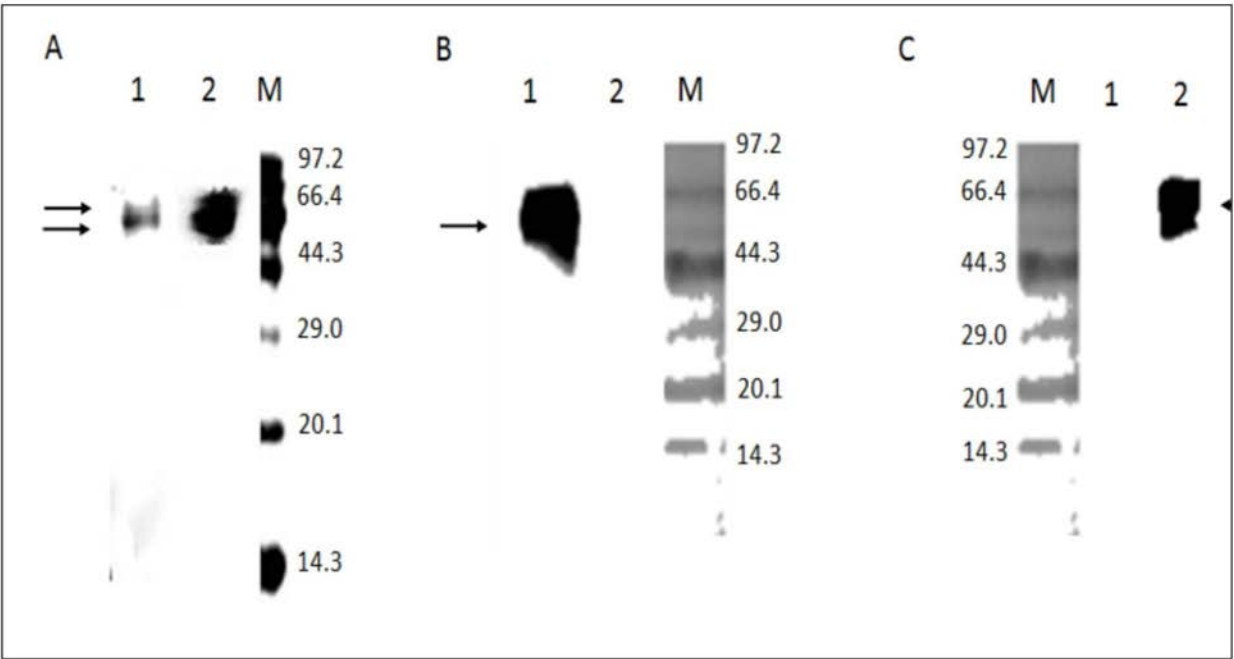


图5

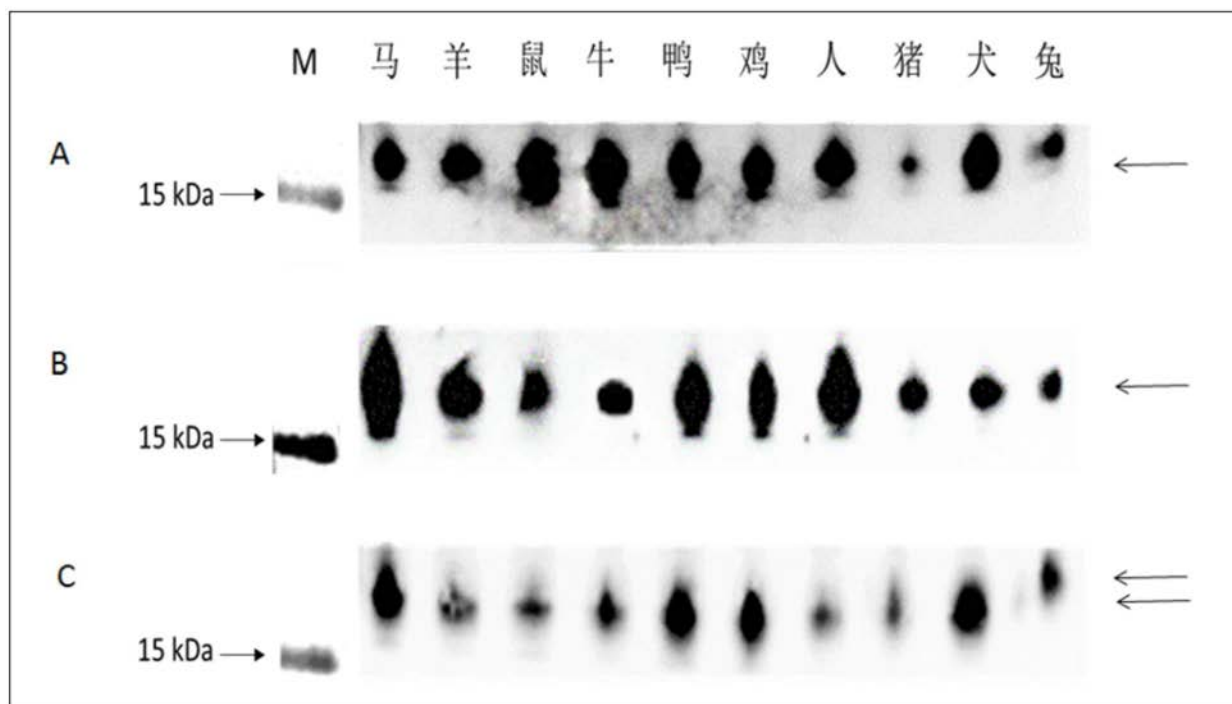


图6

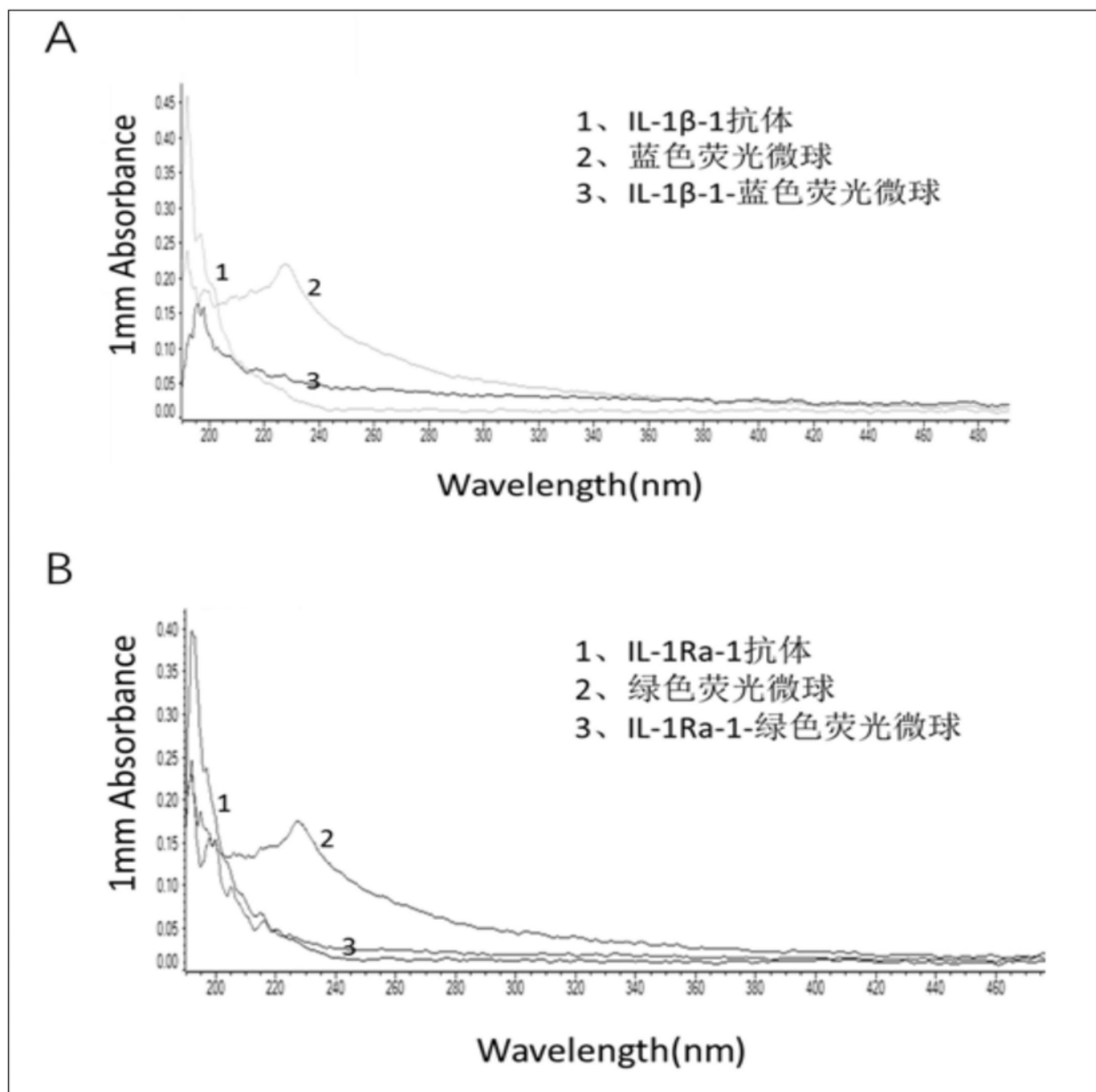


图7

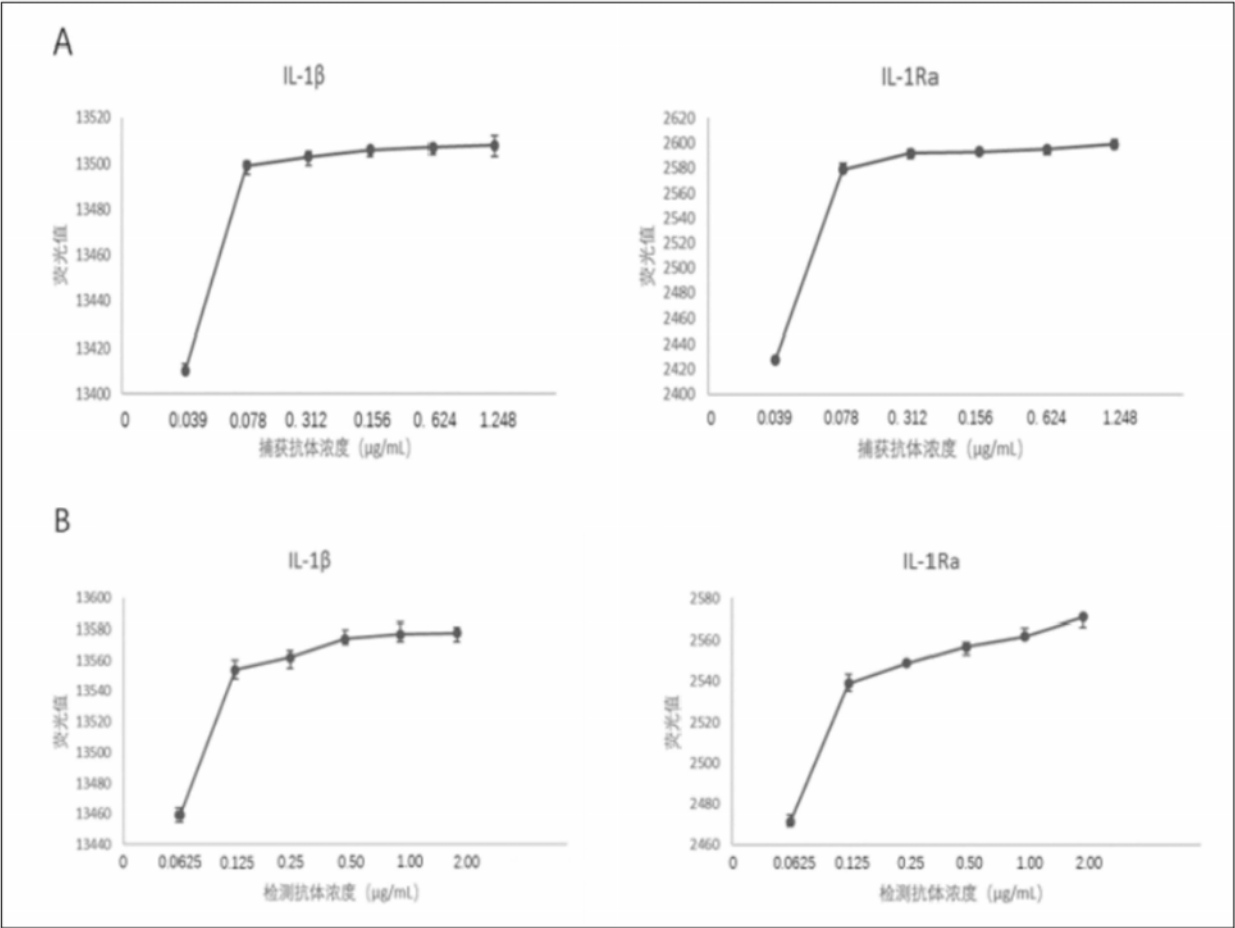


图8

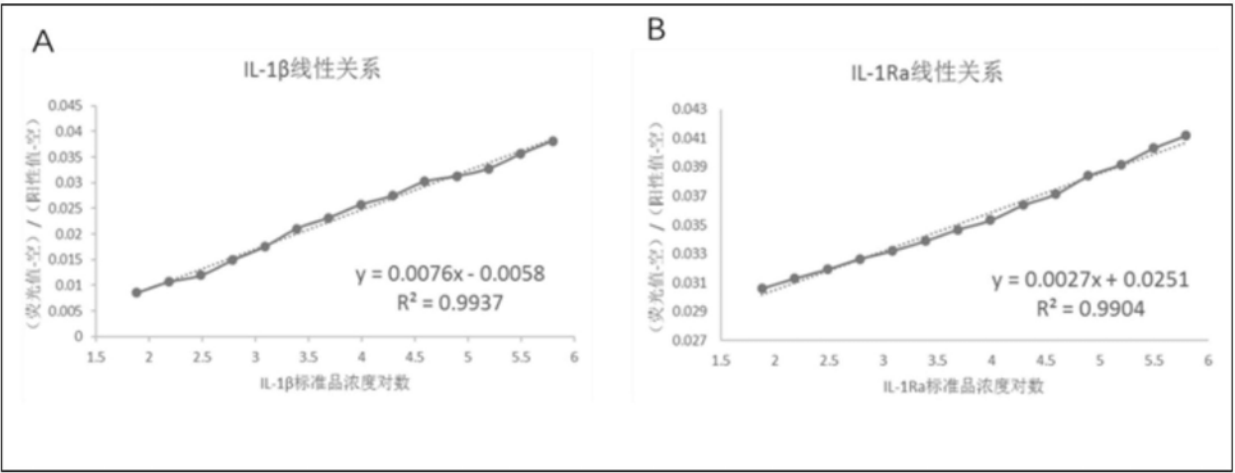


图9

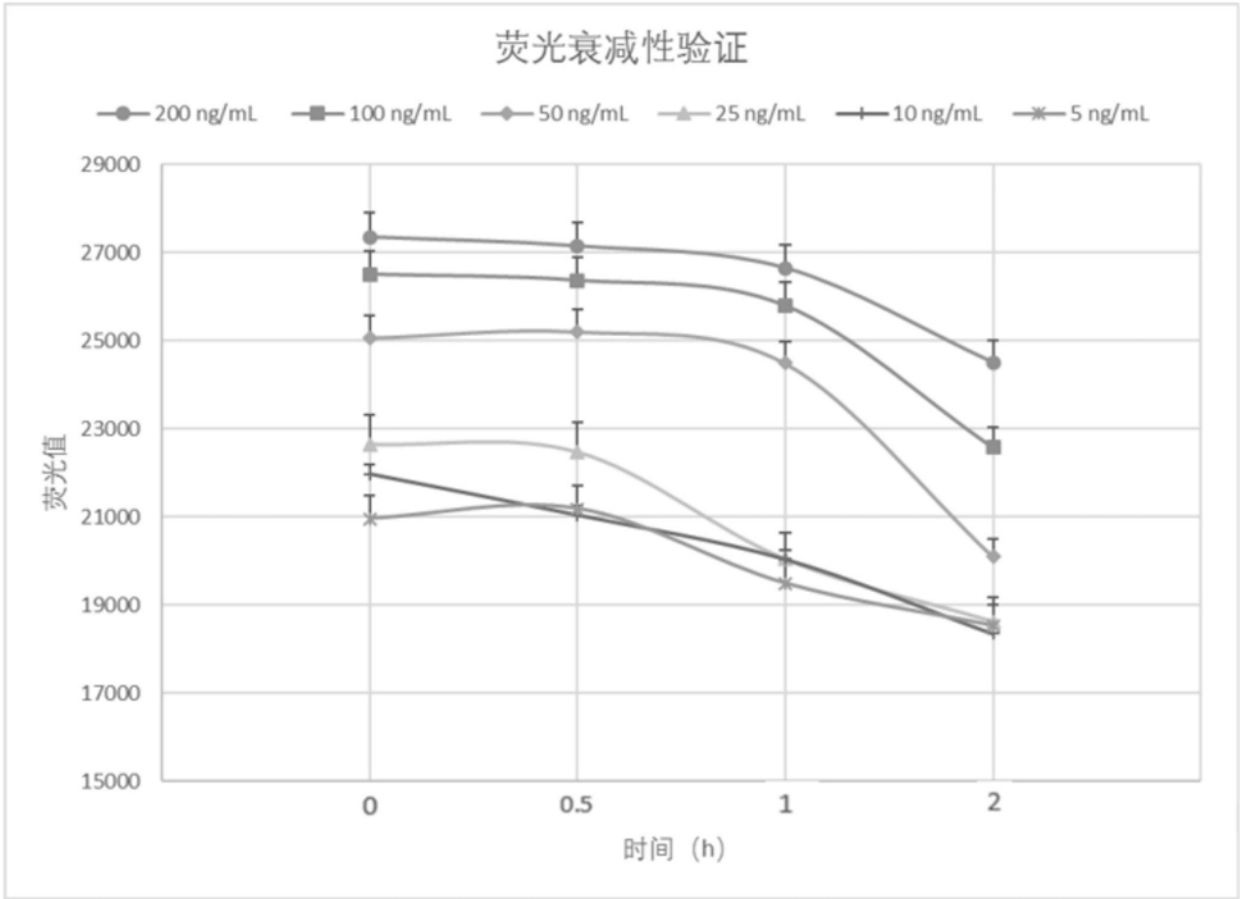


图10

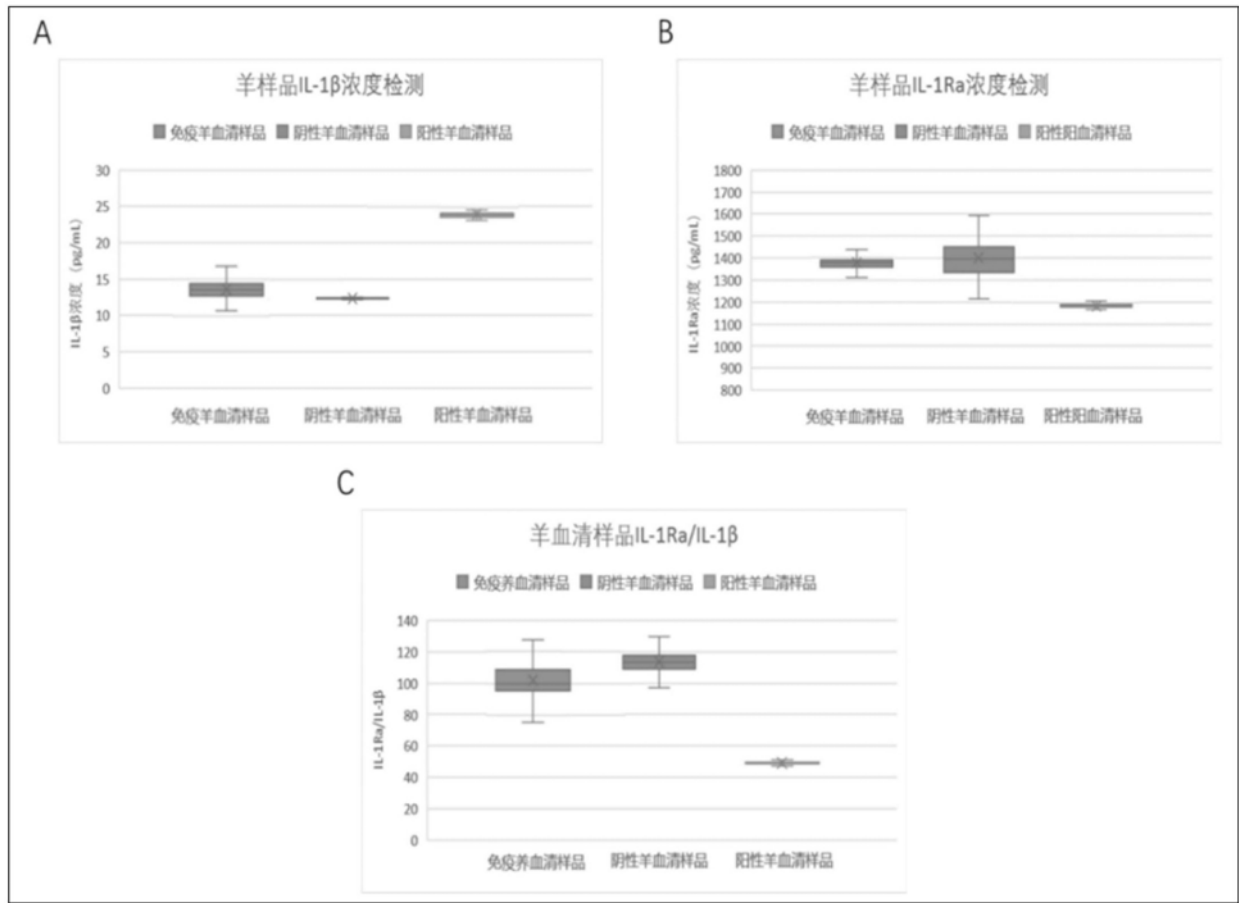


图11

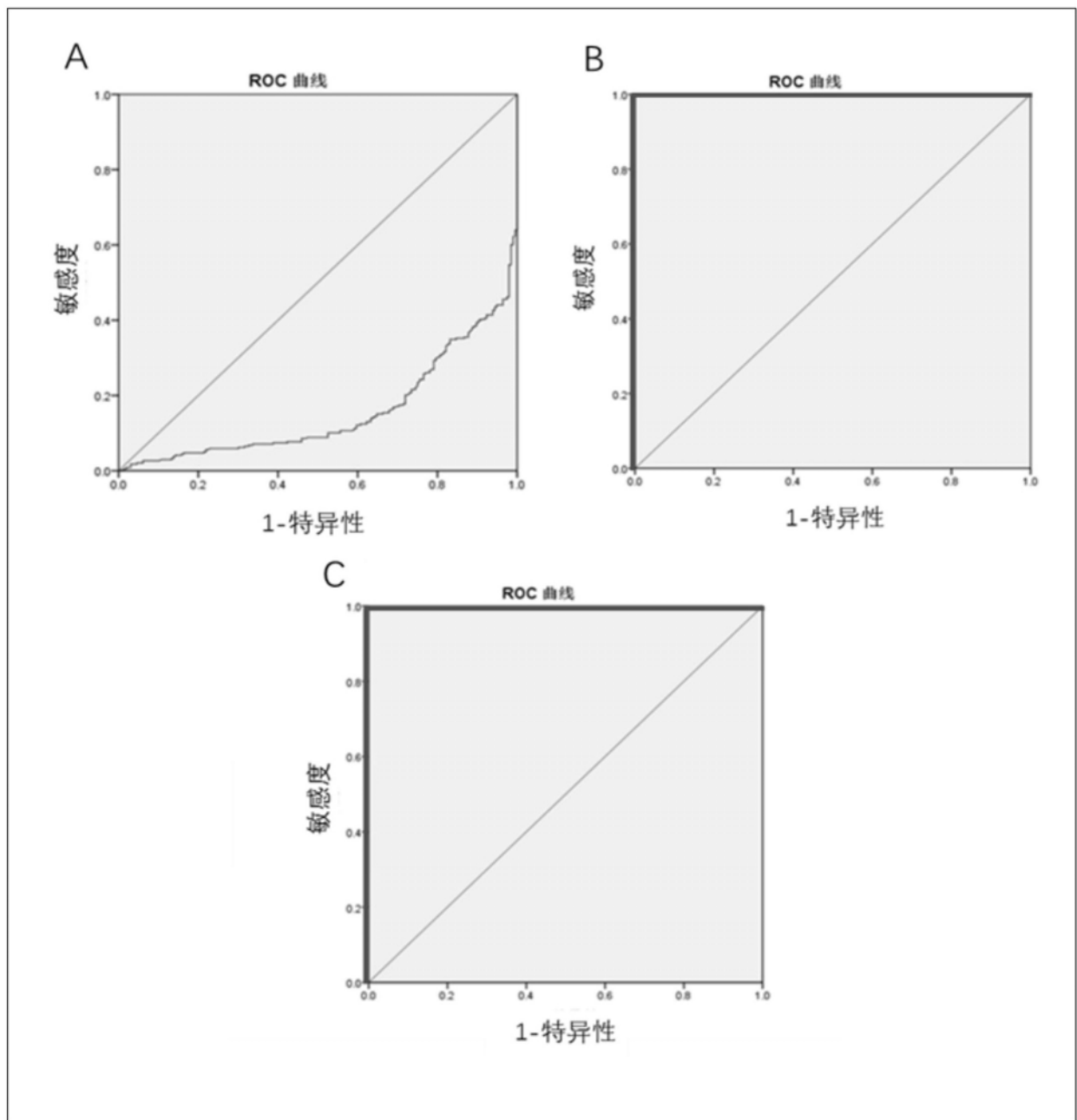


图12

专利名称(译)	多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN109342711A	公开(公告)日	2019-02-15
申请号	CN201811336380.0	申请日	2018-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	任洪林 水一鸣 胡盼 卢士英 柳增善 柳溪林 李岩松 周玉 常江 王路鹿 张士军		
发明人	任洪林 水一鸣 胡盼 卢士英 柳增善 柳溪林 李岩松 周玉 常江 王路鹿 张士军		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5304 G01N33/533		
其他公开文献	CN109342711B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种多物种IL-1 β 与IL-1Ra及其比值同步测定的ELISA试剂盒，属于生物技术检测领域。包括抗IL-1 β 和IL-1Ra兔源多克隆捕获用抗体预包被酶标板、IL-1 β 和IL-1Ra重组蛋白标准品、稀释液、20 $\times$ PBS-T浓缩洗涤液、蓝色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1 β 多克隆检测用抗体、绿色荧光微球标记的豚鼠源抗IL-1R多克隆检测用抗体。本发明具有灵敏度高、特异性强、检测物种范围广等优点，可用于绵羊、人、牛、马、猪、鼠、兔血清、血浆及其它组织样品中IL-1 β 和IL-1Ra含量测定，并可计算其比值，两种目标物同步检测减少比值计算的误差，灵敏度达到pg级，本试剂盒测定IL-1Ra与IL-1 β 比值可用于布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫区别诊断，以及其它与该比值变化相关的疾病诊断标示研究。

	pMSCG9 (μl)	<i>IL-1β</i> -1 (μl)	<i>IL-1Ra</i> -1 (μl)
质粒或目标 DNA	3	3	3
10×T4 buffer	1	1	1
0.1% BSA	1	1	1
dGTP	1	-	-
dCTP	-	1	1
dH ₂ O	3	3	3