



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107356751 A

(43)申请公布日 2017. 11. 17

(21)申请号 201710408511.0

C07K 14/315(2006.01)

(22)申请日 2017.06.02

(71)申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730010 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72)发明人 刘永生 李学瑞 刘永安 周建华
马丽娜

(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 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页
序列表1页

(54)发明名称

一种羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法

(57)摘要

一种羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法,属于微生物检测技术领域,以上羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法专用试剂制备过程与监测方法包括如下步骤:血清制备、免疫激活、Acm抗原制备、ELISA方法的最优工作条件。

1. 一种羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法,其特征在于:所述检测方法中用到试剂的Acm蛋白序列为:

DAGRDISSNVTSLTVDPTNITDGGNIKVKFSFDEKKQNIQPGDYLWINWPSEGNIRGEGFQKEIPLMIENKNV
GTLTVRKDSAQVVFENENIKNLDSVEGWGQFEIQARNVTDTEENTGPFTVTSGDKTATVNVTKPASGSSSVFYKYT
GDMLPEDTKHIRWFLNINNGTYVEQPVKISDEIQSGQRLDPSTFEINQIHLGEQKVYRGEEGIQQFLQDFPGATFN
FSVTDNYIEITIPKNFVNLRKIMVSYKTIENPEQINFENHSEAWFKEFNKPAVDGESFNHTVKNISASGGVNGTVR
GELKIFKYINDTEIGIPNVTFELRRADEQPIQGQSSILLTSNEQGEASIKGLQVGDYVVKKEAPNWDIDPLSSNE
LKFSINENDTEGVSLPIYNKKKVTNITATKIWNGGTPRPSIYFKLFRASTNNWEPVPAETKRLDNGITSVTWEDI
QQYDDSGNEYTFKVQEVDQNGNDYVPSGYQKIENGLVVTNENK。

2. 根据权利要求1所述的一种羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法,具体操作包括如下步骤:

血清制备:

第一步,病原菌的扩大培养:将配制的THB液体培养基121摄氏度高压灭菌15分钟,冷却后于超净工作台内分装至200毫升的培养瓶中,每瓶中装入180mI THB培养液;然后向200毫升培养瓶中接入1毫升预先制备的病原菌菌液,将接入菌液的培养瓶放入摇床,37摄氏度、180转/分钟震荡培养12~24小时后收集菌体;

第二步,灭活:以福尔马林作为化学灭活剂,灭活前先确定福尔马林对病原菌的安全灭活浓度,具体操作时先取多支试管,分别向所有支试管内加入5毫升预先制备的病原菌菌液,取用部分试管作为对照组,其余为实验组,向实验组试管内加入一定量的福尔马林,福尔马林加入终浓度从0.1%至1.0%;将所有试管置于4摄氏度环境中放置24小时,放置结束后分别从每支试管中取出0.2毫升菌液,涂抹于THB琼脂平板上,在37摄氏度环境中培养48小时,检测各试管内细菌的存活情况,只有没有细菌生长的对应福尔马林浓度才是该病原菌的灭活安全浓度;检测结果显示,各菌的福尔马林安全灭活终浓度均为0.6%;依照以上安全浓度,对稀释的菌液进行灭活处理;

第三步,安全性检测:取0.2毫升灭活菌液涂抹于THB琼脂平板上,在37摄氏度环境中培养48小时,只有在琼脂平板上没有出现菌落出现才说明灭活彻底,灭活菌液中确实没有活菌存在;将所制备的灭活菌液稀释成疫苗接种所用的浓度(10⁷-10⁸菌落形成单位),用注射法将稀释后的灭活菌液接种到无患病史的同种寄主动物体内,经20d观察无发病或死亡才说明该灭活细菌是安全的;

第四步,乳化:将灭活菌液、佐剂加入烧杯,灭活菌液与佐剂重量比为1:1,用水浴锅将装有灭活菌液、佐剂的烧杯加热至30~31摄氏度,期间伴随搅拌,搅拌器距烧杯底部10毫米;乳化器转速5000转/分,进行4分钟;停止搅拌后,将烧杯内的液体置于20摄氏度环境中1小时;最后将制备的乳液分装,并余留一部分,将余留乳液置于20摄氏度环境中24小时后质检;

第五步,质量检验:剂型检验,用吸管吸取疫苗,滴几滴于水中,观察是否分散;粒度检验,用显微镜直接观察颗粒是否均匀;稳定性检验,在一个半径为10厘米的离心机中装入乳液,用离心机3000转/分钟,离心15分钟不分层,相当于保存1年以上不破乳;粘度检验,取内口直径为1.2毫米的吸管,在室温下吸满1毫升乳液,垂直放出0.4毫升所需时间作为粘度单位,以2~6秒为合格,不得多余10~15秒;无菌检验,取灭活苗1毫升,接种于T.G培养基上,

于37摄氏度环境中培养72小时,之后吸取培养物,分别接种于T.G和G.A斜面,每支0.2毫升,一支置于37摄氏度环境中,一支置于25摄氏度环境中,另取0.2毫升接种于G.P培养基,于2525摄氏度环境中120小时,观察是否有细菌生长;安全性检验,取10只18~20克的小白鼠,每只腹腔注射疫苗1毫升,观察21日,小白鼠未死亡算合格;

免疫激活:

在采集受测健康绵羊的血样,即对照阴性血样,之后对受测绵羊进行两次颈部皮下血清注射,两次注射间隔3周,第二次注射后15天进行静脉攻毒,每只羊攻毒剂量为 3×10^9 菌落形成单位,然后每隔1周采集一次受测绵羊的阳性血清;

Acm抗原制备:

所用材料试剂来源:AxyPrep DNA GeI Extraction Kit购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;磁珠法基因DNA抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;pUC57-Kan载体、Pfu聚合酶、Premix Taq酶(Ex Taq 2.0plus)、DL2000DNA Marker、质粒抽提试剂盒、BamH I、Xho I限制性内切酶均购自TaKaRa公司;氨苄青霉素、卡那青霉素均购自美国Sigma公司;Trans5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;其他基因扩增相关试剂均由苏州金唯智生物科技有限公司提供;

第一步,取上述过夜培养的菌株2毫升,放入离心管离心,按照磁珠法基因DNA抽提试剂盒说明书提取细菌DNA,负20摄氏度保存备用;

第二步,PCR扩增Acm基因:其中PCR反应体系(100微升)为:Pfu聚合酶1微升,Pfu buffer 93微升,首尾引物(10 μ mol/L)各1微升,基因组模板4微升;

PCR反应程序为:98摄氏度预变性5分钟;98摄氏度变性20秒,55摄氏度退火20秒,72摄氏度延伸1分钟,30个循环;72摄氏度再延伸3分钟;PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测;

第三步,重组质粒pUC57-Kan-Acm的构建与鉴定:

(1)按照AxyPrep DNA GeI Extraction Kit胶回收试剂盒说明书回收Acm目的基因片段;将目的基因片段与pUC57-Kan载体连接,得到重组质粒pUC57-Kan-Acm,连接体系如下:pUC57-Kan:2.0微升;纯化PCR产物:4.0微升;T4buffer:5.0微升;T4连接酶:1.0微升;去离子H₂O:2.0微升;对加入的样品轻轻震荡混匀;4摄氏度放置12小时;

(2)将重组质粒pUC57-Kan-Acm转化到Trans5 α 感受态细胞,均匀涂于卡那抗生素抗性的LB固体培养皿,37摄氏度培养15小时左右;然后挑取10小时以上时间长出的单克隆接种至8毫升含卡那抗生素的LB液体培养基中,37摄氏度,220转/分钟摇菌过夜(12小时左右)培养;按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒;

(3)Acm基因PCR扩增检测及序列分析:用上述引物和反应条件进行PCR扩增;PCR反应体系(50微升)如下:Pfu聚合酶0.5微升,Pfu buffer 47.5微升,首尾引物(10微摩每毫升)各0.5微升,质粒模板1微升;然后将提取的质粒送苏州金唯智生物科技有限公司测序;将测序结果与GenBank中已发布的序列进行BLAST在线(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对和同源性分析,证明为尿肠球菌Acm基因;

第四步,pET32a-Acm表达载体的构建:用BamH I和Xho I酶切重组质粒pUC57-Kan-Acm,获得Acm目的基因,克隆至同样用BamH I和Xho I酶切的pET-32a(+)质粒中;

第五步,pET32a-Acm表达载体体外表达与鉴定:重组质粒转入大肠杆菌BL21(DE3)中,在含氨苄青霉素的LB培养基中37摄氏度200转每分钟孵育,当OD₆₀₀值达到0.6-0.8时,加入

IPTG诱导表达;收集菌体,超声破碎后进行SDS-PAGE电泳和Western blot分析,表明Acm蛋白为大小约74ku的可溶性蛋白,最佳表达浓度为40毫克每毫升,且具有免疫原性;

第六步,重组蛋白的纯化及分析:将细胞裂解液上清按说明书经过镍琼脂糖凝胶亲和层析柱(Superdex 200)进行两步法纯化,然后经过SDS-PAGE电泳和Western blot分析,纯度为85%,纯化蛋白浓度为1.20毫克每毫升;

ELISA方法的最优工作条件(步骤):

Acm蛋白抗原的包被浓度为12微克每毫升,放置37摄氏度作用2小时后4摄氏度包被过夜,用10%马血清37摄氏度封闭1.5小时,待检血清稀释倍数为1:100,37摄氏度孵育1小时,酶标二抗最佳稀释比为1:500,37摄氏度作用15分钟,底物37摄氏度显色5分钟,临界值为0.427。

3. 根据权利要求2所述的一种羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法,其特征在于:所述ELISA方法的最优工作条件(步骤):

①包被抗原:用包被缓冲液将Acm蛋白抗原稀释至12微克每毫升,包被酶标板,每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C 2h后4 $^{\circ}$ C过夜;

②封闭酶标板:取出酶标板,弃液,拍干,然后向每孔加入洗涤液PBST 300 μ L,放置4min,弃液,拍干,重复洗涤3次。拍干后加入10%马血清封闭液,每孔200 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭1.5小时;

③加入阴阳性血清:PBST洗涤3次后加入1:100稀释的待检血清及阴、阳性对照血清,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

④加入酶标二抗:如上PBST洗涤3次后,加入1:500稀释的HRP标记的兔抗绵羊IgG,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育15分钟;

⑤显色:洗涤拍干后加入底物显色液TMB,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C显色5分钟;

⑥终止:加入2moI/L的H₂SO₄终止液,50 μ L/孔,终止反应;

⑦结果判定:在酶标仪上测定OD₄₅₀值。当OD₄₅₀值 \geq 0.427时,可判定为阳性,OD₄₅₀值 $<$ 0.427时判定为阴性。

一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测技术领域,具体是一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法。

背景技术

[0002] 近几年的研究表明,肠球菌已是医院流行的主要病原体。美国医院感染监视系统(NISS)已将其列为医院感染的第二大病原菌,检出率仅次于大肠杆菌。有资料统计,在引起尿路感染的致病菌中,肠球菌感染居第2位;腹腔、盆腔感染,肠球菌居第3位;败血症,肠球菌居第3位,病死率12.6%~57%。在肠球菌所致感染中屎肠球菌的比例占到近一半。在动物方面,近年来,屎肠球菌感染动物,导致动物发病死亡的病例日益增多,并造成人畜共患,其严重性在日益增强。屎肠球菌作为重要的条件性致病菌已给人类和养殖业造成严重损失,尽管在一些肠球菌的病原学、致病机理、耐药机制、诊断等方面有大量研究,但是对屎肠球菌致病机理和耐药机制,尤其是诊断和治疗方法的研究还非常欠缺。屎肠球菌感染主要依靠实验室细菌分离、PCR分子生物学鉴定,在基层则缺乏快速有效的屎肠球菌血清学诊断方法。血清学诊断方法的缺乏,可能使得基层对屎肠球菌感染造成误诊及漏诊,从而对畜牧业生产造成不必要的损失。现有的间接血凝(IHA)检测方法(申请号或专利号:201610382656.3)特异性不高,敏感性较差。国内曾以粪肠球菌胶原蛋白黏附素(Ace)蛋白为抗原建立了猪源粪肠球菌ELISA检测方法。屎肠球菌胶原蛋白粘附素(adhesin of collagen from *E. faecium*, Acm)蛋白在屎肠球菌中也具有特异性,故本研究通过构建pET-32a-Acm表达载体,原核表达屎肠球菌Acm蛋白,以此作为抗原建立羊源(绵羊)屎肠球菌间接ELISA血清学检测方法,为屎肠球菌的临床诊断和防治提供重要技术支持。

发明内容

[0003] 本发明旨在提供一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法专用试剂,以达到快速简便、特异高、敏感性好的检测效果。

[0004] 一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法专用试剂,Acm蛋白序列为(501个氨基酸残基): DAGRDISSNVTSLTVDPTNITDGGNIKVKFSFDEKKQNIQPGDYLWINWPSEGNIRGEGFQKEIPLMIENKNVGTLTVRKDSAQVVFENIKNLDSVEGWGQFEIQARNVTDGTGEENTGPFTVTS GDKTATVNVTKPASGSSSSVFYYKTGDMLPEDTKHIRWFLNINNNGTYVEQPVKISDEIQSGQRLDPSTFEINQIHLGEQKVYRGEEGIQQFLQDFPGATFNFSVTDNYIEITIPKNFVNL RKIMVSYKTIIENPEQINFENHSEAWFKEFNKPAVDGESFNHTVKNISASGGVNGTVRGELKIFKYINDTEIGIPNVTFELRRADEQPIQGQSSILLTSNEQGEASIKGLQVGDYVVKEKEAPNWIDFDPLSSNELKFSINENDTEGVSLPIYNKKKVTNITATKIWNGGTTTPRPSIYFKLFRASTNNWEPVPAETKRLDNGITSVTWEDIQQYDDSGNEYTFKVVQEVDQNGNDYVPSGYQKIENGLVVTNENK。

[0005] 以上羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法专用试剂制备过程包括如下步骤:

[0006] 血清制备:

[0007] 第一步,病原菌的扩大培养:将配制的THB液体培养基121摄氏度高压灭菌15分钟,

冷却后于超净工作台内分装至200毫升的培养瓶中,每瓶中装入180mI THB培养液;然后向200毫升培养瓶中接入1毫升预先制备的病原菌菌液,将接入菌液的培养瓶放入摇床,37摄氏度、180转/分钟震荡培养12~24小时后收集菌体;

[0008] 第二步,灭活:以福尔马林作为化学灭活剂,灭活前先确定福尔马林对病原菌的安全灭活浓度,具体操作时先取多支试管,分别向所有支试管内加入5毫升预先制备的病原菌菌液,取用部分试管作为对照组,其余为实验组,向实验组试管内加入一定量的福尔马林,福尔马林加入终浓度从0.1%至1.0%;将所有试管置于4摄氏度环境中放置24小时,放置结束后分别从每支试管中取出0.2毫升菌液,涂抹于THB琼脂平板上,在37摄氏度环境中培养48小时,检测各试管内细菌的存活情况,只有没有细菌生长的对应福尔马林浓度才是该病原菌的灭活安全浓度;检测结果显示,各菌的福尔马林安全灭活终浓度均为 0.6%;依照以上安全浓度,对稀释的菌液进行灭活处理;

[0009] 第三步,安全性检测:取0.2毫升灭活菌液涂抹于THB琼脂平板上,在37摄氏度环境中培养48小时,只有在琼脂平板上没有出现菌落出现才说明灭活彻底,灭活菌液中确实没有活菌存在;将所制备的灭活菌液稀释成疫苗接种所用的浓度(10⁷-10⁸菌落形成单位),用注射法将稀释后的灭活菌液接种到无患病史的同种寄主动物体内,经20d观察无发病或死亡才说明该灭活细菌是安全的;

[0010] 第四步,乳化:将灭活菌液、佐剂加入烧杯,灭活菌液与佐剂重量比为1:1,用水浴锅将装有灭活菌液、佐剂的烧杯加热至30~31摄氏度,期间伴随搅拌,搅拌器距烧杯底部10毫米;乳化器转速5000转/分,进行4分钟;停止搅拌后,将烧杯内的液体置于20摄氏度环境中1小时;最后将制备的乳液分装,并余留一部分,将余留乳液置于20摄氏度环境中24小时后质检;

[0011] 第五步,质量检验:剂型检验,用吸管吸取疫苗,滴几滴于水中,观察是否分散;粒度检验,用显微镜直接观察颗粒是否均匀;稳定性检验,在一个半径为10厘米的离心机中装入乳液,用离心机3000转/分钟,离心15分钟不分层,相当于保存1年以上不破乳;粘度检验,取内口直径为1.2毫米的吸管,在室温下吸满1毫升乳液,垂直放出0.4毫升所需时间作为粘度单位,以2~6秒为合格,不得多余10~15秒;无菌检验,取灭活苗 1毫升,接种于T.G培养基上,于37摄氏度环境中培养72小时,之后吸取培养物,分别接种于T.G和G.A斜面,每支0.2毫升,一支置于37摄氏度环境中,一支置于25摄氏度环境中,另取0.2毫升接种于G.P培养基,于25摄氏度环境中120小时,观察是否有细菌生长;安全性检验,取10只18~20克的小白鼠,每只腹腔注射疫苗1毫升,观察21日,小白鼠未死亡算合格;

[0012] 免疫激活:

[0013] 在采集受测健康绵羊的血样,即对照阴性血样,之后对受测绵羊进行两次颈部皮下血清注射,两次注射间隔3周,第二次注射后15天进行静脉攻毒,每只羊攻毒剂量为3×10⁹菌落形成单位,然后每隔1周采集一次受测绵羊的阳性血清;

[0014] Acm抗原制备:

[0015] 所用材料试剂来源:AxyPrep DNA GeI Extraction Kit购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;磁珠法基因DNA抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;pUC57-Kan载体、Pfu聚合酶、Premix Taq酶(Ex Taq 2.0pIus)、DL2000 DNA Marker、质粒抽提试剂盒、BamH I、Xho I限制性内切酶均购自TaKaRa公司;氨苄青霉素、卡那青霉素均购自美国

Sigma公司;Trans5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;其他基因扩增相关试剂均由苏州金唯智生物科技有限公司提供;

[0016] 第一步,取上述过夜培养的菌株2毫升,放入离心管离心,按照磁珠法基因DNA抽提试剂盒说明书提取细菌DNA,负20摄氏度保存备用;

[0017] 第二步,PCR扩增Acm基因:其中PCR反应体系(100微升)为:Pfu聚合酶1微升,Pfu buffer 93微升,首尾引物(10 μ mol/L)各1微升,基因组模板4微升;PCR反应程序为:98摄氏度预变性5分钟;98摄氏度变性20秒,55摄氏度退火20秒,72摄氏度延伸1分钟,30个循环;72摄氏度再延伸3分钟;PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测;

[0018] 第三步,重组质粒pUC57-Kan-Acm的构建与鉴定:

[0019] (1)按照AxyPrep DNA Gel Extraction Kit胶回收试剂盒说明书回收Acm目的基因片段;将目的基因片段与pUC57-Kan载体连接,得到重组质粒pUC57-Kan-Acm,连接体系如下:pUC57-Kan:2.0微升;纯化PCR产物:4.0微升;T4buffer:5.0微升;T4连接酶:1.0微升;去离子H₂O:2.0微升;对加入的样品轻轻震荡混匀;4摄氏度放置12小时;

[0020] (2)将重组质粒pUC57-Kan-Acm转化到Trans5 α 感受态细胞,均匀涂于卡那抗生素抗性的LB固体培养皿,37摄氏度培养15小时左右;然后挑取10小时以上时间长出的单克隆接种至8毫升含卡那抗生素的LB液体培养基中,37摄氏度,220转/分钟摇菌过夜(12小时左右)培养;按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒;

[0021] (3)Acm基因PCR扩增检测及序列分析:用上述引物和反应条件进行PCR扩增;PCR反应体系(50微升)如下:Pfu聚合酶0.5微升,Pfu buffer 47.5微升,首尾引物(10微摩每毫升)各0.5微升,质粒模板1微升;然后将提取的质粒送苏州金唯智生物科技有限公司测序;将测序结果与GenBank中已发布的序列进行BLAST在线(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对和同源性分析,证明为屎肠球菌Acm基因;

[0022] 第四步,pET32a-Acm表达载体的构建:用BamH I和Xho I酶切重组质粒pUC57-Kan-Acm,获得Acm目的基因,克隆至同样用BamH I和Xho I酶切的pET-32a(+)质粒中;第五步,pET32a-Acm表达载体体外表达与鉴定:重组质粒转入大肠杆菌BL21(DE3)中,在含氨苄青霉素的LB培养基中37摄氏度200转每分钟孵育,当OD₆₀₀值达到0.6-0.8时,加入IPTG诱导表达;收集菌体,超声破碎后进行SDS-PAGE电泳和Western blot分析,表明Acm蛋白为大小约74ku的可溶性蛋白,最佳表达浓度为40毫克每毫升,且具有免疫原性;

[0023] 第六步,重组蛋白的纯化及分析:将细胞裂解液上清按说明书经过镍琼脂糖凝胶亲和层析柱(Superdex 200)进行两步法纯化,然后经过SDS-PAGE电泳和Western blot分析,纯度为85%,纯化蛋白浓度为1.20毫克每毫升;

[0024] ELISA方法的最优工作条件(步骤):

[0025] Acm蛋白抗原的包被浓度为12微克每毫升,放置37摄氏度作用2小时后4摄氏度包被过夜,用10%马血清37摄氏度封闭1.5小时,待检血清稀释倍数为1:100,37摄氏度孵育1小时,酶标二抗最佳稀释比为1:500,37摄氏度作用15分钟,底物37摄氏度显色5分钟,临界值为0.427。

[0026] 临界值:用建立的方法测定24份屎肠球菌阴性血清的平均值(X)为0.268,标准方差(SD)值为0.053,临界值 $X+3SD=0.427$,因此,当待检血清OD₄₅₀ ≥ 0.427 时判定为阳性,OD₄₅₀ ≤ 0.427 时判定为阴性。

[0027] 特异性:用建立的方法同时检测绵羊链球菌2型、绵羊巴氏杆菌、绵羊葡萄球菌以及绵羊破伤风梭菌阳性血清,结果均为阴性,表明本次建立的ELISA方法具有较好的特异性。

[0028] 敏感性:检测绵羊源尿肠球菌5份阳性血清和一份阴性血清,当血清稀释比为1:200时所测值仍为阳性。拥有较好的敏感性。

[0029] 重复性:用同一批次和不同批次纯化的Acm蛋白包被酶标板,用建立的间接ELISA检测方法对5份尿肠球菌阳性血清和1份阴性血清进行重复性试验,各进行3次重复,测定OD450值后计算出批内重复试验和批间重复试验的变异系数均值分别为6.05%和5.52%,拥有较好的重复性。

[0030] 临床检测:用所建立的间接ELISA方法检测73份绵羊血清样品,阳性有15份,阳性率为20.55%;用PCR测序方法检测的阳性有11份,阳性率为15.07%,符合率达73.33%。本发明具有如下有益效果:成本低,操作简单、方便快捷。

具体实施方式

[0031] 一种羊源尿肠球菌间接ELISA检测方法专用试剂制备过程包括如下步骤:

[0032] 血清制备:

[0033] 第一步,病原菌的扩大培养:将配制的THB液体培养基121摄氏度高压灭菌15分钟,冷却后于超净工作台内分装至200毫升的培养瓶中,每瓶中装入180mL THB培养液;然后向200毫升培养瓶中接入1毫升预先制备的病原菌菌液,将接入菌液的培养瓶放入摇床,37摄氏度、180转/分钟震荡培养12~24小时后收集菌体;

[0034] 第二步,灭活:以福尔马林作为化学灭活剂,灭活前先确定福尔马林对病原菌的安全灭活浓度,具体操作时先取多支试管,分别向所有支试管内加入5毫升预先制备的病原菌菌液,取用部分试管作为对照组,其余为实验组,向实验组试管内加入一定量的福尔马林,福尔马林加入终浓度从0.1%至1.0%;将所有试管置于4摄氏度环境中放置24小时,放置结束后分别从每支试管中取出0.2毫升菌液,涂抹于THB琼脂平板上,在37摄氏度环境中培养48小时,检测各试管内细菌的存活情况,只有没有细菌生长的对应福尔马林浓度才是该病原菌的灭活安全浓度;检测结果显示,各菌的福尔马林安全灭活终浓度均为0.6%;依照以上安全浓度,对稀释的菌液进行灭活处理;

[0035] 第三步,安全性检测:取0.2毫升灭活菌液涂抹于THB琼脂平板上,在37摄氏度环境中培养48小时,只有在琼脂平板上没有出现菌落出现才说明灭活彻底,灭活菌液中确实没有活菌存在;将所制备的灭活菌液稀释成疫苗接种所用的浓度(10⁷-10⁸菌落形成单位),用注射法将稀释后的灭活菌液接种到无患病史的同种寄主动物体内,经20d观察无发病或死亡才说明该灭活细菌是安全的;

[0036] 第四步,乳化:将灭活菌液、佐剂加入烧杯,灭活菌液与佐剂重量比为1:1,用水浴锅将装有灭活菌液、佐剂的烧杯加热至30~31摄氏度,期间伴随搅拌,搅拌器距烧杯底部10毫米;乳化器转速5000转/分,进行4分钟;停止搅拌后,将烧杯内的液体置于20摄氏度环境中1小时;最后将制备的乳液分装,并余留一部分,将余留乳液置于20摄氏度环境中24小时后质检;

[0037] 第五步,质量检验:剂型检验,用吸管吸取疫苗,滴几滴于水中,观察是否分散;粒

度检验,用显微镜直接观察颗粒是否均匀;稳定性检验,在一个半径为10厘米的离心机中装入乳液,用离心机3000转/分钟,离心15分钟不分层,相当于保存1年以上不破乳;粘度检验,取内口直径为1.2毫米的吸管,在室温下吸满1毫升乳液,垂直放出0.4毫升所需时间作为粘度单位,以2~6秒为合格,不得多余10~15秒;无菌检验,取灭活苗1毫升,接种于T.G培养基上,于37摄氏度环境中培养72小时,之后吸取培养物,分别接种于T.G和G.A斜面,每支0.2毫升,一支置于37摄氏度环境中,一支置于25摄氏度环境中,另取0.2毫升接种于G.P培养基,于25~26摄氏度环境中120小时,观察是否有细菌生长;安全性检验,取10只18~20克的小白鼠,每只腹腔注射疫苗1毫升,观察21日,小白鼠未死亡算合格;

[0038] 免疫激活:

[0039] 在采集受测健康绵羊的血样,即对照阴性血样,之后对受测绵羊进行两次颈部皮下血清注射,两次注射间隔3周,第二次注射后15天进行静脉攻毒,每只羊攻毒剂量为 3×10^9 菌落形成单位,然后每隔1周采集一次受测绵羊的阳性血清;

[0040] Acm抗原制备:

[0041] 所用材料试剂来源:AxyPrep DNA Gel Extraction Kit购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;磁珠法基因DNA抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;pUC57-Kan载体、Pfu聚合酶、Premix Taq酶(Ex Taq 2.0plus)、DL2000DNA Marker、质粒抽提试剂盒、BamH I、Xho I限制性内切酶均购自TaKaRa公司;氨苄青霉素、卡那青霉素均购自美国Sigma公司;Trans5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;其他基因扩增相关试剂均由苏州金唯智生物科技有限公司提供;

[0042] 第一步,取上述过夜培养的菌株2毫升,放入离心管离心,按照磁珠法基因DNA抽提试剂盒说明书提取细菌DNA,负20摄氏度保存备用;

[0043] 第二步,PCR扩增Acm基因:其中PCR反应体系(100微升)为:Pfu聚合酶1微升,Pfu buffer 93微升,首尾引物(10 μ mol/L)各1微升,基因组模板4微升;PCR反应程序为:98摄氏度预变性5分钟;98摄氏度变性20秒,55摄氏度退火20秒,72摄氏度延伸1分钟,30个循环;72摄氏度再延伸3分钟;PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测;

[0044] 第三步,重组质粒pUC57-Kan-Acm的构建与鉴定:

[0045] (1)按照AxyPrep DNA Gel Extraction Kit胶回收试剂盒说明书回收Acm目的基因片段;将目的基因片段与pUC57-Kan载体连接,得到重组质粒pUC57-Kan-Acm,连接体系如下:pUC57-Kan:2.0微升;纯化PCR产物:4.0微升;T4buffer:5.0微升;T4连接酶:1.0微升;去离子H₂O:2.0微升;对加入的样品轻轻震荡混匀;4摄氏度放置12小时;

[0046] (2)将重组质粒pUC57-Kan-Acm转化到Trans5 α 感受态细胞,均匀涂于卡那抗生素抗性的LB固体培养皿,37摄氏度培养15小时左右;然后挑取10小时以上时间长出的单克隆接种至8毫升含卡那抗生素的LB液体培养基中,37摄氏度,220转/分钟摇菌过夜(12小时左右)培养;按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒;

[0047] (3)Acm基因PCR扩增检测及序列分析:用上述引物和反应条件进行PCR扩增;PCR反应体系(50微升)如下:Pfu聚合酶0.5微升,Pfu buffer 47.5微升,首尾引物(10微摩每毫升)各0.5微升,质粒模板1微升;然后将提取的质粒送苏州金唯智生物科技有限公司测序;将测序结果与GenBank中已发布的序列进行BLAST在线(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对和同源性分析,证明为屎肠球菌Acm基因;

[0048] 第四步, pET32a-Acm表达载体的构建: 用BamH I和Xho I酶切重组质粒pUC57-Kan-Acm, 获得Acm目的基因, 克隆至同样用BamH I和Xho I酶切的pET-32a (+) 质粒中;

[0049] 第五步, pET32a-Acm表达载体体外表达与鉴定: 重组质粒转入大肠杆菌BL21 (DE3) 中, 在含氨苄青霉素的LB培养基中37摄氏度200转每分钟孵育, 当OD600值达到0.6- 0.8时, 加入IPTG诱导表达; 收集菌体, 超声破碎后进行SDS-PAGE电泳和Western blot分析, 表明Acm蛋白为大小约74ku的可溶性蛋白, 最佳表达浓度为40毫克每毫升, 且具有免疫原性;

[0050] 第六步, 重组蛋白的纯化及分析: 将细胞裂解液上清按说明书经过镍琼脂糖凝胶亲和层析柱 (Superdex 200) 进行两步法纯化, 然后经过SDS-PAGE电泳和Western blot分析, 纯度为85%, 纯化蛋白浓度为1.20毫克每毫升;

[0051] ELISA方法的最优工作条件 (步骤):

[0052] ①包被抗原: 用包被缓冲液将Acm蛋白抗原稀释至12微克每毫升, 包被酶标板, 每孔加入100μL, 37℃ 2h后4℃过夜;

[0053] ②封闭酶标板: 取出酶标板, 弃液, 拍干, 然后向每孔加入洗涤液PBST 300μL, 放置4 min, 弃液, 拍干, 重复洗涤3次。拍干后加入10% 马血清封闭液, 每孔200μL, 37℃封闭1.5小时;

[0054] ③加入阴阳性血清: PBST洗涤3次后加入1:100稀释的待检血清及阴、阳性对照血清, 100μL/孔, 37℃孵育1h;

[0055] ④加入酶标二抗: 如上PBST洗涤3次后, 加入1:500稀释的HRP标记的兔抗绵羊IgG, 100μL/孔, 37℃孵育15分钟;

[0056] ⑤显色: 洗涤拍干后加入底物显色液TMB, 每孔100μL, 37℃显色5分钟;

[0057] ⑥终止: 加入2moI/L的H2SO4终止液, 50μL/孔, 终止反应;

[0058] ⑦结果判定: 在酶标仪上测定OD450值。当OD450值 ≥ 0.427 时, 可判定为阳性, OD450值 < 0.427 时判定为阴性。

计算机可读序列文本

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

[0059]

<120> 一种羊源屎肠球菌间接 ELISA 检测方法

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1514

<212> DNA

[0060] <213> Acm 蛋白的编码序列

<400> 1

gatgcaggca gagatatacag cagtaatgtc acttcgttga ccgtggaccc aacgaatatt 60

acagatggag gaaacataaa agtaaaattc tcgtttgacg aaaaaaaaca aaatatccaa 120

ccaggtgatt atctttggat caattggcca agtgaaggaa atattcgagg tgaaggattc 180

caaaaagaaa tccattaat gattgaaaat aaaaatgttg gaactttaac ggtcagaaaa 240

	gattctgcgc aggttggtt taatgaaaat attaaaaacc tagactcagt agaaggttg	300
	gggcaattg agatacaggc cagaaacgta accgataccg gtgaagaaaa tacgggacca	360
	ttcacgtga cgagcgggtga taaaacagct actgtaatg tgacaaagcc agcttctggt	420
	tcttctcta gcgttttta ttataaaca ggagacatgc tacctgaaga tactaagcac	480
	attcgatggt tttgaatat taacaataac ggcacttatg ttgaacaacc agttaaatc	540
[0061]	agtgatgaaa tccaaagtgg acaaagatta gatccaagta cgtttgaaat taatcaaata	600
	cacttaggtg aacagaaggt ttatagagga gaagagggaa tccaacaatt ttacaagat	660
	ttccccggcg ctacatttaa ttttcagta actgataatt acattgaaat aactatacca	720
	aaaaactttg tcaatcttag gaaaataatg gtgagttata agacgatcat agaaaacca	780
	gaacaaataa attttgagaa tcattcggaa gcttggtta aagaattta taaacctgct	840
	gttgatggag aaagtttcaa tcatacagtt aaaaatattt cagcttctgg tggagtcaac	900

	ggtacagtta gaggcgaatt gaagatttc aaatatatca atgacacaga gattggatc	960
	ccaaatgtga ctttcgaatt aagacgagca gatgaacagc ctattcaagg acagtctagt	1020
	atcctgttga cttcgaatga acagggagaa gctagtatca aaggcctgca agtaggagac	1080
	tatgttgtaa aagaaaaaga agcacccaat tggattgatt ttgatccact aagtcaaat	1140
	gaactcaaat tctcataaa cgaaaatgat acagagggag tcagtttacc tattataac	1200
[0062]		
	aagaaaaagg ttacgaacat cacagcaact aaaatttggga acggtggaac cactccaaga	1260
	ccgagtattt attttaaatt attcagagca agtacaaca attggaacc agttcctgat	1320
	gcagaaacaa aacgattaga caatggaata acttcagtga cttgggaaga tatccaacag	1380
	tatgatgata gtggaaacga atatacgttt aaagtgcaag aagtagatca aaacggaaat	1440
	gattatgtcc cttcaggta tcaaaaaatt gaaaacgggc tagtcgttac aaatgagaat	1500
[0063]	aaataaggta ccaa	1514

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1514

<212> DNA

<213> Acm蛋白的编码序列

<400> 1

```

gatgcaggca gagatatcag cagtaatgtc acttcgttga ccgtggaccc aacgaatatt 60
acagatggag gaaacataaa agtaaaatc tcgtttgacg aaaaaaaca aaatatccaa 120
ccaggtgatt atctttggat caattggcca agtgaaggaa atattcgagg tgaaggattc 180
caaaaagaaa tcccattaat gattgaaaat aaaaatgttg gaactttaac ggtcagaaaa 240
gattctgcgc aggttgtgtt taatgaaaat attaaaaacc tagactcagt agaaggttgg 300
gggcaatttg agatacaggc cagaaacgta accgataccg gtgaagaaaa tacgggacca 360
ttcacctgta cgagcgggtg taaaacagct actgtaaatg tgacaaagcc agcttctggt 420
tcttcttcta gcgtttttta ttataaaaca ggagacatgc tacctgaaga tactaagcac 480
attcgatggg ttttgaatat taacaataac ggcacttatg ttgaacaacc agttaaaatc 540
agtgatgaaa tccaagtgg acaaagatta gatccaagta cgtttgaaat taatcaaata 600
cacttaggtg aacagaaggt ttatagagga gaagagggaa tccaacaatt ttacaagat 660
ttccccggcg ctacatttaa tttttcagta actgataatt acattgaaat aactatacca 720
aaaaactttg tcaatcttag gaaaataatg gtgagttata agacgatcat agaaaaccca 780
gaacaaataa attttgagaa tcattcggaa gcttggttta aagaatttaa taaacctgct 840
gttgatggag aaagtttcaa tcatacagtt aaaaatattt cagcttctgg tggagtcaac 900
ggtacagtta gaggcgaatt gaagattttc aaatatatca atgacacaga gattggtatc 960
ccaaatgtga ctttcgaatt aagacgagca gatgaacagc ctattcaagg acagtctagt 1020
atcctgttga cttcgaatga acagggagaa gctagtatca aaggcctgca agtaggagac 1080
tatgttgtaa aagaaaaaga agcacccaat tggattgatt ttgatccact aagttcaaat 1140
gaactcaaat tctccataaa cgaaaatgat acagagggag tcagtttacc tatttataac 1200
aagaaaaagg ttacgaacat cacagcaact aaaatttggg acggtggaac cactccaaga 1260
ccgagtattt attttaaatt attcagagca agtacaaaca attgggaacc agttcctgat 1320
gcagaaacaa aacgattaga caatggaata acttcagtga cttgggaaga tatccaacag 1380
tatgatgata gtggaaacga atatacgttt aaagtgaag aagtagatca aaacggaaat 1440
gattatgtcc cttcaggtta tcaaaaaatt gaaaacgggc tagtcgttac aaatgagaat 1500
aaataaggta ccaa
1514

```

专利名称(译)	一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN107356751A	公开(公告)日	2017-11-17
申请号	CN2017110408511.0	申请日	2017-06-02
[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	刘永生 李学瑞 刘永安 周建华 马丽娜		
发明人	刘永生 李学瑞 刘永安 周建华 马丽娜		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535 C12N15/70 C07K14/315		
CPC分类号	G01N33/56916 C07K14/315 C12N15/70 G01N33/535 G01N33/543 G01N2333/315		
代理人(译)	席勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法，属于微生物检测技术领域，以上羊源屎肠球菌间接ELISA检测方法专用试剂制备过程与监测方法包括如下步骤：血清制备、免疫激活、Acm抗原制备、ELISA方法的最优工作条件。

计算机可读序列文本

<110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

<120> 一种羊源屎肠球菌间接 ELISA 检测方法