



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102621303 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 01

(21) 申请号 201110031802. 5

(22) 申请日 2011. 01. 30

(71) 申请人 吉林农业大学

地址 130118 吉林省长春市南关区新城大街
2888 号

(72) 发明人 杜锐 于淼 时坤 李建明 刁燕
刘晓 张梦 刘东旭

(74) 专利代理机构 吉林省长春市新时代专利商
标代理有限公司 22204

代理人 孙国振

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法

(57) 摘要

鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法属于兽医领域。克服以往鹿结核病检测特异性差,敏感性低等不足。所选用的生物材料有:牛型提纯蛋白衍生物 (PPD)、兔抗鹿 IgG、兔抗鹿 IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清。检测方法的步骤有包被抗原、加血清、加酶结合物-兔抗鹿 IgG-HRP、加底物-兔抗鹿 IgG、终止反应后用酶联免疫检测仪测量,在 490nm 处空白调零,测各孔的 OD 值;以 PPD 的 OD 值 \geq 0.56 为阳性。本发明的积极效果是:在首创完成兔抗鹿二抗的基础上,对鹿结核间接 ELISA 的诊断抗原进行筛选,以牛型提纯蛋白衍生物 (PPD) 作为最佳抗原并确立了最佳试验步骤和条件,建立一种特异性强,敏感性高,简便快捷,耗资少的鹿结核病诊断方法。

1. 鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:

(1) 使用的生物材料有:牛型提纯蛋白衍生物、兔抗鹿 IgG、兔抗鹿 IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清;

(2) 检测步骤是:

①包被抗原

在酶标板上选定试验孔、阴性对照孔、阳性对照孔、抗原对照孔、抗体对照孔、酶结合物对照孔、空白对照孔;将牛型提纯蛋白衍生物用抗原稀释液稀释成 $10-50 \mu\text{g/ml}$ 后,等量加入上述各孔中。在 $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内 2-4 小时,包被后 $3 \times 3'$ 洗涤;

②加血清

用血清稀释液将待检血清按血清比稀释液 1 : 50-1 : 150 的比例稀释,在待检血清孔中加待检血清、标准阳性对照孔和抗体对照孔加阳性血清,标准阴性血清对照孔加阴性血清,抗原对照孔加入血清稀释液,加入量均相同于步骤①所加抗原的体积量,在 $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 0.5-1.5 小时, $3 \times 3'$ 洗涤。

③加酶结合物-兔抗鹿 IgG-HRP

将兔抗鹿 IgG-HRP 用抗原稀释液按兔抗鹿 IgG-HRP 比稀释液 1 : 2000-1 : 8000 的比例稀释,将兔抗鹿 IgG-HRP 液加入全部待检血清孔和对照孔中,每孔加入量相同于步骤①加入的抗原液体积量,在 $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 0.5-1.5 小时, $3 \times 3'$ 洗涤;

④加底物-兔抗鹿 IgG

在完成步骤③的酶标板上全部试验孔和对照孔中加兔抗鹿 IgG,作为底物反应,每孔加入量相同于步骤①加入的抗原液体积量,在 $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 10-20 分钟;

⑤终止反应

在完成步骤④的酶标板上全部待检血清孔和对照孔中加 2 摩尔质量硫酸终止反应;每孔加入量为步骤①加入的抗原液体积的 $1/2$;

⑥用酶联免疫检测仪测量

将完成步骤⑤的培养板置于酶联免疫检测仪上,在 490nm 处空白调零,测各孔的 OD 值;以 PPD 的 OD 值 ≥ 0.56 为阳性。

2. 根据权利要求 1 所述的鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的抗原稀释液为按碳酸钠 (Na_2CO_3) 0.318g,碳酸氢钠 (NaHCO_3) 0.560g,加去离子水后得 1000ml 溶液的用料比例,先用少量固体物溶解,待完全溶化后补全部去离子水,混匀所得到的溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的血清稀释液为按牛血清白蛋白 0.1g,洗液 100ml 的比例,溶化混匀所得溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:其中的兔抗鹿 IgG 通过以下过程制备:

取来自健康鹿的血清,用 50% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析一次后,再用 37.5% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析三次,提取鹿血清 IgG:充分透析至无 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} ;以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液透析平衡;过 DEAE-32 柱,以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液洗脱,收集蛋白部分,测定蛋白含量;以聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定其纯度,以鹿血清对照,若在加有过柱鹿血清 IgG 的凝胶管内仅有一条带,且此带的位置恰与加鹿血清的凝胶柱上的 γ -球蛋白带组中最后一条带相一致,将所提鹿血清 IgG 浓缩, -20°C 冰箱中保存备用。

5. 根据权利要求 1 所述的鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法,其特征是:本发明中使用的兔抗鹿 IgG-HRP 按以下用量或用量等倍数变化所取的原料及过程制备:

将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 0.5ml 蒸馏水中,加入新配制的 0.06 摩尔质量 NaIO_4 水溶液 0.5ml,混匀置冰箱中 4°C 30min,取出后加入 0.16 摩尔质量乙二醇水溶液 0.5ml,于室温放置 30min 后,加入含有 5mg 纯化兔抗鹿 IgG 的水溶液 1ml,混匀并装入透析袋,用 0.05 摩尔质量 pH9.5 碳酸盐缓冲液搅拌 6h,使之结合,然后,从透析袋中吸收出来,加入 NaBH_4 浓度为 5mg/ml 溶液 0.2ml,置 4°C 冰箱中 2h,将上述结合物混合液加入等体积 pH7.0 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,置 4°C 冰箱中 30min,3000r/min 离心 30min,将得到的沉淀物溶于少许 0.02 摩尔质量 pH7.4 磷酸盐缓冲液中,并在 PBS 中透析 12h,中间换液三次,次日再离心,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶-兔抗鹿 IgG 结合物,最后,用 PBS 加至 4.5ml 分装, -20°C 冷冻保存备用。

鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法

技术领域

[0001] 本发明属于兽医领域。具体涉及鹿结核病血清检测诊断方法。

背景技术

[0002] 鹿结核病 (Deer tuberculosis) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 引起的鹿的一种慢性、消耗性传染病,广泛流行于世界各地,几乎每个国家的鹿场都曾发生过结核病或曾经检出过结核病菌。近年来,鹿结核病在国内外养鹿场广有流行,造成巨大的经济损失,严重影响了养鹿业的发展。目前,没有专门用于鹿结核病特定的检测方法。以往多沿用其他家畜结核病的传统方法,检测结果特异性较差,敏感性较低,过程较复杂。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法。用于鹿结核病的诊断,克服以往鹿结核病检测特异性差,敏感性低等不足。

[0004] 本发明检测方法选用的生物材料有:牛型提纯蛋白衍生物 (PPD)、兔抗鹿 IgG、兔抗鹿 IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清。

[0005] 本发明检测方法的步骤是:

[0006] 1、包被抗原

[0007] 在酶标板上选定待检血清孔、阴性对照孔、阳性对照孔、抗原对照孔、抗体对照孔、酶结合物对照孔、空白对照孔;将牛型提纯蛋白衍生物 (PPD) 用抗原稀释液稀释成 $10-50 \mu\text{g/ml}$ 后,等量加入上述各孔中。在 $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内 2-4 小时包被后 $3\times 3'$ 洗涤。

[0008] 2、加血清

[0009] 用血清稀释液将待检血清按血清比稀释液为 1 : 50-1 : 150 的比例稀释,在待检血清孔中加待检血清、标准阳性对照孔和抗体对照孔加阳性血清,标准阴性血清对照孔加阴性血清,抗原对照孔加入血清稀释液,加入量均相同于步骤 1 所加抗原的体积量, $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 0.5-1.5 小时, $3\times 3'$ 洗涤。

[0010] 3、加酶结合物 - 兔抗鹿 IgG-HRP

[0011] 将兔抗鹿 IgG-HRP 用抗原稀释液按兔抗鹿 IgG-HRP 比稀释液为 1 : 2000-1 : 8000 的比例稀释,将兔抗鹿 IgG-HRP 液加入全部待检血清孔和对照孔中,每孔加入量相同于步骤 1 加入的抗原液体积量, $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 0.5-1.5 小时, $3\times 3'$ 洗涤。

[0012] 4、加底物 - 兔抗鹿 IgG

[0013] 在完成步骤 3 的酶标板上全部待检血清孔和对照孔中加兔抗鹿 IgG,作为底物反应,每孔加入量相同于步骤 1 加入的抗原液体积量, $35-42^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育 10-20 分钟;

[0014] 5、终止反应

[0015] 在完成步骤 4 的酶标板上全部待检血清孔和对照孔中加 2 摩尔质量硫酸终止反应;每孔加入量为步骤 1 加入的抗原液体积的 1/2。

[0016] 6、用酶联免疫检测仪测量

[0017] 将完成步骤5的培养板置于酶联免疫检测仪上,在490nm处空白调零,测各孔的OD值;以PPD的OD值 ≥ 0.56 为阳性。

[0018] 上述的抗原稀释液为:按碳酸钠(Na_2CO_3)0.318g,碳酸氢钠(NaHCO_3)0.560g,加去离子水后得1000ml溶液的用料比例,先用少量固体物溶解,待完全溶化后补全部去离子水,混匀所得到的溶液。

[0019] 上述的血清稀释液为:按牛血清白蛋白0.1g,洗液100ml的比例,溶化混匀所得溶液

[0020] 本发明中使用的兔抗鹿IgG通过以下过程制备:

[0021] 取来自健康鹿的血清,用50%饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析一次后,再用37.5%饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析三次,提取鹿血清IgG;充分透析至无 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 。以0.01M pH8.0磷酸缓冲液透析平衡,过DEAE-32柱。以0.01M pH8.0磷酸缓冲液洗脱,收集蛋白部分,测定蛋白含量;以聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定其纯度。以鹿血清对照,若在加有过柱鹿血清IgG的凝胶管内仅有一条带,且此带的位置恰与加鹿血清的凝胶柱上的 γ -球蛋白带组中最后一条带相一致,则说明所提蛋白为鹿IgG,且纯度高。将所提鹿血清IgG浓缩,-20℃冰箱中保存备用。

[0022] 本发明中使用的兔抗鹿IgG-HRP按以下用量或用量相等倍数变化所取的原料及过程制备:

[0023] 将5mg辣根过氧化物酶(HRP)溶于0.5ml蒸馏水中,加入新配制的0.06摩尔质量 NaIO_4 水溶液0.5ml,混匀置冰箱中4℃30min,取出后加入0.16摩尔质量乙二醇水溶液0.5ml,于室温放置30min后,加入含有5mg纯化兔抗鹿IgG的水溶液1ml,混匀并装入透析袋,用0.05摩尔质量pH9.5碳酸盐缓冲液搅拌6h,使之结合。然后,从透析袋中吸收出来,加入 NaBH_4 溶液(5mg/ml)0.2ml,置4℃冰箱中2h,将上述结合物混合液加入等体积pH7.0饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,置4℃冰箱中30min,3000r/min离心30min,将得到的沉淀物溶于少许0.02摩尔质量pH7.4磷酸盐缓冲液中,并在PBS中透析12h,中间换液三次,次日再离心,除去不溶物,即得辣根过氧化物酶(HRP)-兔抗鹿IgG结合物。最后,用PBS加至4.5ml分装,-20℃冷冻保存备用。

[0024] 本发明的积极效果是:在首创完成兔抗鹿二抗的基础上,进一步对鹿结核间接ELISA的诊断抗原进行筛选,以牛型提纯蛋白衍生物(PPD)作为最佳抗原并确立了最佳试验步骤和条件,建立一种特异性强(94.4%),敏感性高(91.1%),简便快捷,耗资少的鹿结核诊断方法。

[0025] 以PPD为抗原技术效果说明

[0026] 表1使用PPD与其他常用抗原ELISA检测结果与剖检、细菌检查符合率

[0027]

抗原	PPD	三硝基甲苯浸出物	OT聚合物	氯化钾浸出物	OT
阳性符合率 (%)	91.1 (31/34)	82.2 (30/34)	82.3 (28/34)	70.6 (24/36)	76.5 (26/36)
阴性符合率 (%)	94.4 (34/36)	94.4 (34/36)	94.4 (34/36)	88.9 (32/36)	88.9 (32/36)

[0028] 表2使用PPD与其他常用抗原敏感性测定表

[0029]

血清稀释度 判定 抗原 结果					
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
PPD	+	+	+	+	—
三硝基甲苯浸出物	+	+	+	+	—
OT 聚合物	+	+	+	—	—
氯化钾浸出物	+	+	—	—	—
OT	+	+	+	—	—

[0030] 从表中可以看出, PPD 敏感性高, 所能检出的结核病鹿血清抗体滴度为 1 : 6400。

具体实施方式

[0031] 1、选北京生物制品检定所生产的牛型提纯蛋白衍生物 (PPD) 作为抗原, 选上海生物制品所生产的葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) - 辣根过氧化物酶 (HRP) 用于制备酶标抗体, 剖检、细菌学检查均为阳性的结核病鹿血清, 经变态反应、剖检和细菌学检查均为阴性鹿血清。

[0032] 2. 兔抗鹿 IgG 的制备

[0033] 取健康鹿血清, 用 50% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析一次后, 再用 37.5% 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析三次, 提取鹿血清 IgG : 充分透析至无 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 。以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液透析平衡, 过 DEAE-32 柱。以 0.01M pH8.0 磷酸缓冲液洗脱, 收集蛋白部分, 测定蛋白含量; 以聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定其纯度。设以鹿血清对照, 若在加有过柱鹿血清 IgG 的凝胶管内仅有一条带, 且此带的位置恰与加鹿血清的凝胶柱上的 γ -球蛋白带组中最后一条带相一致, 则说明所提蛋白为鹿 IgG, 且纯度高。将所提鹿血清 IgG 浓缩, -20°C 冰箱中保存备用。

[0034] 3. 制备兔抗鹿 IgG-HRP

[0035] 将 5mg 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 0.5ml 蒸馏水中, 加入新配制的 0.06 摩尔质量 NaIO_4 水溶液 0.5ml, 混匀置冰箱中 4°C 30min, 取出后加入 0.16 摩尔质量乙二醇水溶液 0.5ml, 于室温放置 30min 后, 加入含有 5mg 纯化兔抗鹿 IgG 的水溶液 1ml, 混匀并装入透析袋, 用 0.05 摩尔质量 pH9.5 碳酸盐缓冲液搅拌 6h, 使之结合。然后, 从透析袋中吸收出来, 加入 NaBH_4 溶液 (5mg/ml) 0.2ml, 置 4°C 冰箱中 2h, 将上述结合物混合液加入等体积 pH7.0 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 置 4°C 冰箱中 30min, 3000r/min 离心 30min, 将得到的沉淀物溶于少许 0.02 摩尔质量 pH7.4 磷酸盐缓冲液中, 并在 PBS 中透析 12h, 中间换液三次, 次日再离心, 除去不溶物, 即得辣根过氧化物酶 (HRP) - 兔抗鹿 IgG 结合物。最后, 用 PBS 加至 4.5ml 分装。 -20°C 冷冻保存备用。

[0036] 4、配制抗原稀释液和血清稀释液

[0037] (1) 取碳酸钠 (Na_2CO_3) 0.318g, 碳酸氢钠 (NaHCO_3) 0.560g, 加去离子水少量使其溶解, 待完全溶化后补充去离子水至 1000ML, 混匀, 的抗原稀释液。

[0038] (2) 取牛血清白蛋白 0.1g, 洗液 100ML, 溶化混匀, 得血清稀释液。

[0039] 5、检测步骤

[0040] (1) 包被抗原

[0041] 在酶标板上选定的待检血清孔（每份血清选 2 孔）、阴性对照、阳性对照、抗原对照、抗体对照、酶结合物对照、空白对照孔；将牛型提纯蛋白衍生物（PPD）用抗原稀释液作 $20 \mu\text{g/ml}$ 稀释，在上述各孔中分别加入 0.1ml 稀释后的抗原。在 37°C 湿盒内 3 小时包被后， $3 \times 3'$ 洗涤。

[0042] (2) 加血清

[0043] 待检血清用血清稀释液按血清比稀释液 1 : 100 的比例稀释，按每孔加 0.1ml 加到选定的两个待检血清孔中，在标准阳性对照孔和抗体对照孔中各加 0.1ml 阳性血清、阴性对照孔中加 0.1ml 阴性血清、在抗原对照孔加 0.1ml 血清稀释液，在 37°C 湿盒内孵育 1 小时， $3 \times 3'$ 洗涤。

[0044] (3) 加酶结合物

[0045] 将兔抗鹿 IgG 酶标抗体用抗原稀释液按抗体比稀释液 1 : 4000 的比例稀释后，按每孔 0.1ml 加入各孔中，在 37°C 湿盒内孵育 1 小时， $3 \times 3'$ 洗涤。

[0046] (4) 加底物

[0047] 按每孔 0.1ml 将兔抗鹿 IgG 作为底物加入各孔中，在 37°C 湿盒内孵育 15 分钟；

[0048] (5) 终止反应

[0049] 在每孔中加 2 摩尔质量 H_2SO_4 0.05ml 终止反应；

[0050] (6) 酶联免疫检测仪 DG3022 型 490nm 处，以空白调零，检测各孔 OD 值；或眼观判定结果，以 PPD 的 OD 值 ≥ 0.56 为阳性。

专利名称(译)	鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法		
公开(公告)号	CN102621303A	公开(公告)日	2012-08-01
申请号	CN201110031802.5	申请日	2011-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林农业大学		
[标]发明人	杜锐 于淼 时坤 李建明 刁燕 刘晓 张梦 刘东旭		
发明人	杜锐 于淼 时坤 李建明 刁燕 刘晓 张梦 刘东旭		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	孙国振		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

鹿结核病间接酶联免疫吸附检测法属于兽医领域。克服以往鹿结核病检测特异性差，敏感性低等不足。所选用的生物材料有：牛型提纯蛋白衍生物(PPD)、兔抗鹿IgG、兔抗鹿IgG-HRP、标准阳性血清、标准阴性血清、待检血清。检测方法的步骤有包被抗原、加血清、加酶结合物-兔抗鹿IgG-HRP、加底物-兔抗鹿IgG、终止反应后用酶联免疫检测仪测量，在490nm处空白调零，测各孔的OD值；以PPD的OD值 ≥ 0.56 为阳性。本发明的积极效果是：在首创完成兔抗鹿二抗的基础上，对鹿结核间接ELISA的诊断抗原进行筛选，以牛型提纯蛋白衍生物(PPD)作为最佳抗原并确立了最佳试验步骤和条件，建立一种特异性强，敏感性高，简便快捷，耗资少的鹿结核病诊断方法。

抗原	PPD	三硝基甲苯浸出物	OT聚合物	氯化钾浸出物	OT
阳性符合率	91.1	82.2	82.3	70.6	76.5
(%)	(31/34)	(30/34)	(28/34)	(24/36)	(26/36)
阴性符合率	94.4	94.4	94.4	88.9	88.9
(%)	(34/36)	(34/36)	(34/36)	(32/36)	(32/36)