



(21)申请号 201710884887.9

(22)申请日 2017.09.26

(71)申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马
端街427号

(72)发明人 辛九庆 李媛 刘洋

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理

有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨 马鑫

(51)Int.Cl.

C07K 14/30(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书20页

序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种牛支原体免疫相关性蛋白、含有该蛋白
的检测试剂盒及其在牛支原体抗体检测中的用
途

(57)摘要

本发明公开了一种牛支原体免疫相关性蛋白、含有该蛋白的检测试剂盒及其在牛支原体抗体检测中的用途。所述的牛支原体免疫相关性蛋白，命名为p28蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。敏感性实验证明，本发明的一种牛支原体血清抗体ELISA检测试剂盒(MbH试剂盒)其最低可以检测出为1:2560稀释倍数的阳性血清，特异性实验证明，该试剂盒的特异性为97.8%，与牛传染性胸膜肺炎(CBPP)阳性血清、口蹄疫(FMD)阳性血清、牛结核(MB)阳性血清、牛病毒性腹泻(BVDV)阳性血清、牛传染性鼻气管炎(IBRV)阳性血清不发生特异性反应，并且具有良好的稳定性以及较高的准确性。本发明的提出为牛支原体抗体的检测提供了一种新的技术手段。

1. 一种牛支原体免疫相关性蛋白, 命名为p28蛋白, 其特征在于, 所述的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 编码权利要求1所述的牛支原体免疫相关性蛋白的核苷酸序列。

3. 如权利要求2所述的核苷酸序列, 其特征在于所述的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

4. 权利要求1所述的牛支原体免疫相关性蛋白在制备检测牛支原体抗体试剂中的用途。

5. 一种牛支原体血清抗体ELISA检测试剂盒, 其特征在于, 含有权利要求1所述的牛支原体免疫相关性蛋白。

6. 如权利要求5所述的试剂盒, 其特征在于, 还含有稀释液、封闭液、洗涤液、酶标二抗、阳性对照血清、阴性对照血清、显色液以及终止液。

7. 如权利要求6所述的试剂盒, 其特征在于, 所述的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体。

8. 如权利要求5-7任一项所述的试剂盒, 其特征在于, 用于牛支原体抗体检测时, 按照以下步骤进行:

(1) 取出牛支原体免疫相关性蛋白p28蛋白作为包被抗原, 用碳酸盐包被液稀释后加入ELISA板中;

(2) 将加入包被抗原的ELISA板用封口袋封闭, 在37℃条件下, 孵育2h, PBST洗板三次;

(3) 每孔加入封闭液封闭12~14h, 弃掉ELISA板孔中的液体, 在吸水纸上拍干, PBST洗板三次;

(4) 用PBS溶液分别稀释被检血清、阳性对照血清和阴性对照血清, 将稀释后的血清分别加入ELISA板中, 封口袋封闭, 在37℃条件下孵育;

(5) 用PBST洗板3次, 在吸水纸上拍干, 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体, 在37℃条件下孵育;

(6) 用PBST洗板3次, 在吸水纸上拍干, 加入底物溶液TMB, 37℃反应;

(7) 加入硫酸终止液;

(8) 置于紫外分光光度计在波长450nm读数, 进行结果判定。

9. 如权利要求8所述的试剂盒, 其特征在于, 牛支原体免疫相关性蛋白p28的包被浓度为10μg/ml, 使用5w/w%鱼明胶溶液作为封闭液, 4℃封闭12~14h; 被检血清最佳稀释度为1:160; 被检血清最佳作用时间为1h; 辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体的孵育时间为1h; 加入底物后室温显色9min。

10. 如权利要求8所述的试剂盒, 其特征在于, 临界值S/P为0.418, 当S/P≥0.418时判定为阳性, S/P<0.418时判定为阴性。

一种牛支原体免疫相关性蛋白、含有该蛋白的检测试剂盒及 其在牛支原体抗体检测中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种牛支原体免疫相关性蛋白、编码其的核苷酸序列及应用,还涉及含有该蛋白的检测试剂盒及其在牛支原体检测中的用途,本发明属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 牛支原体(*Mycoplasma bovis*)是感染牛的一种重要致病性病原体,主要引起牛肺炎、关节炎、乳腺炎、角膜结膜炎等疾病,给世界养牛业造成了很严重的经济损失。我国于2008年首次报道了*M. bovis*肺炎,该病原日益成为危害我国养牛业的重要因素。目前*M. bovis*无国际公认的特异性诊断方法,这给该疾病的防控带来困难。研究具有自主知识产权的*M. bovis*血清抗体ELISA试剂盒意义深远。本发明建立了*M. bovis*血清抗体检测ELISA方法并组装为试剂盒,填补了国内*M. bovis* ELISA 试剂盒的空白。

[0003] 通过对*M. bovis*Hubei-1分离株全基因组序列分析等前期工作可知,p28基因是一个假定膜蛋白基因。为了获得该基因的重组蛋白,本发明以*M. bovis*Hubei-1分离株基因组为材料,对假定膜蛋白基因p28进行PCR扩增、克隆、构建表达载体,然后通过原核表达系统获得重组蛋白,预期获得具有良好抗原反应原性的重组蛋白,为*M. bovis*抗体ELISA方法的建立及其试剂盒的研究奠定基础。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一在于提供一种新型的牛支原体免疫相关性蛋白以及编码该蛋白的核苷酸序列;

[0005] 本发明的目的之二在于提供一种含有该蛋白的检测试剂盒及其在牛支原体抗体检测中的用途。

[0006] 本发明的目的之三在于建立一种检测牛支原体抗体的ELISA检测方法。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用了以下技术手段:

[0008] 本发明的新型的牛支原体免疫相关性蛋白,命名为p28蛋白,所述的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0009] 编码所述的牛支原体免疫相关性蛋白的核苷酸序列也在本发明的保护范围之内。优选的,所述的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 进一步的,本发明还提出了所述的牛支原体免疫相关性蛋白在制备检测牛支原体抗体试剂中的用途。

[0011] 一种牛支原体血清抗体ELISA检测试剂盒,其含有本发明所述的牛支原体免疫相关性蛋白。

[0012] 优选的,所述的试剂盒中,还含有稀释液、封闭液、洗涤液、酶标二抗、阳性对照血清、阴性对照血清、显色液以及终止液。

[0013] 优选的,所述的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体。

[0014] 使用本发明所述的试剂盒检测牛支原体抗体时,按照以下步骤进行:

[0015] (1) 取出牛支原体免疫相关性蛋白p28蛋白作为包被抗原,用碳酸盐包被液稀释后加入ELISA板中;

[0016] (2) 将加入包被抗原的ELISA板用封口袋封闭,在37℃条件下,孵育2h,PBST 洗板三次;

[0017] (3) 每孔加入封闭液封闭12~14h,弃掉ELISA板孔中的液体,在吸水纸上拍干,PBST洗板三次;

[0018] (4) 用PBS溶液分别稀释被检血清、阳性对照血清和阴性对照血清,将稀释后的血清分别加入ELISA板中,封口袋封闭,在37℃条件下孵育;

[0019] (5) 用PBST洗板3次,在吸水纸上拍干,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG抗体,在37℃条件下孵育;

[0020] (6) 用PBST洗板3次,在吸水纸上拍干,加入底物溶液TMB,37℃反应;

[0021] (7) 加入硫酸终止液;

[0022] (8) 置于紫外分光光度计在波长450nm读数,进行结果判定。

[0023] 影响一种ELISA方法的条件因素有很多种,其中最主要的是抗原包被浓度、包被液、被检血清稀释浓度、被检血清和酶标抗体作用时间、底物作用时间以及临界值的确定。优化这些条件,选择最适参数是成功建立ELISA方法的重要步骤。

[0024] 本发明通过对各种影响因素进行优化筛选,最终确定了M.bovisELISA检测试剂盒的最适条件。牛源疾病的诊断试剂盒一般阴性对照值较高,选择适当的封闭液至关重要,封闭液材料不能选用牛源蛋白,如脱脂乳。因此本实验选择马血清和鱼明胶,通过筛选优化,发现5w/w%鱼明胶4℃封闭12~14h的封闭效果最好。

[0025] 包被抗原浓度也是影响ELISA方法P/N值的重要因素。酶标板孔中包被的抗原越多特异性结合增强,阳性对照值越高,敏感性越高,但同时,非特异性结合增强,阴性对照值升高,最终导致P/N值下降,ELISA方法的特异性降低。包被抗原的浓度选择15ug/ml,10ug/ml,5ug/ml,2.5ug/ml四个工作浓度进行摸索,最终确定本次纯化的重组蛋白p28以10μg/ml作为工作浓度效果最好。

[0026] 随后又对被检血清稀释浓度、被检血清抗和酶标抗体作用时间、底物作用时间进行了优化,确定被检血清最佳稀释度为1:160,被检血清最佳作用时间为1h;酶标抗体最佳工作时间为1h;底物作用时间长短也会影响最终的判定结果,通过不同时间的筛选,确定加入底物后室温显色9min为最佳。

[0027] 在临界值的选择上,应用MedCalc.v11.5.1软件对138份阳性血清和91份阴性血清的结果进行ROC分析,最终确定最佳临界值(S/P)为0.418,当S/P≥0.418时为阳性,S/P<0.418时为阴性。

附图说明

[0028] 图1为p28的PCR扩增产物;

[0029] 1:p28基因;2:空白对照M:DNA分子量标准DL2000;

[0030] 图2为重组质粒pET-28a-p28的PCR鉴定;

[0031] 1:阴性对照;2:重组质粒pET-28a-p28PCR产物;M:DNA分子量标准DL2000

- [0032] 图3为重组质粒pET-28a-p28的双酶切鉴定；
- [0033] 1:重组质粒pET-28a-p28;2:空质粒;M1:DNA分子量标准DL2000;M2: DNA分子量标准DL15000;
- [0034] 图4为表达蛋白SDS-PAGE分析;
- [0035] 1:诱导的pET-28a-p28-DE3;2:蛋白分子量Marker 0431;
- [0036] 图5为血清样品S/P值分布;
- [0037] 图6为判定值的决定;
- [0038] 图7为ROC分析曲线下面积图。

具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0040] 实施例1 编码牛支原体蛋白P28蛋白的基因的克隆及表达

[0041] 1 材料

[0042] 1.1 菌株、质粒

[0043] *M.bovis* Hubei-1分离株由本实验分离、鉴定并保存(辛九庆等,2008);pET-28a Vector购自Invitrogen公司。*M.bovis* Hubei-1分离株全基因组序列分析由本实验室完成。华舜DNA柱式胶回收试剂盒,购自上海华舜生物技术有限公司。感受态细胞DH5 α 和BL21 (DE3)由本实验室保存。

[0044] 1.2 主要试剂

[0045] TMB底物显色溶液,从天跟生化科技有限公司购得;限制性核酸内切酶BamH I、SaI I、dNTP、rTaqDNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。

[0046] 1.3 主要溶液及配制

[0047] 支原体液体培养基:PPL0肉汤21g,灭活马血清200mL,新鲜酵母浸出液 100mL, 0.5g/mL的葡萄糖2mL,0.5g/mL的丙酮酸钠8mL,0.5%酚红3.2mL,用去离子水补足到1000mL,调节PH至7.4-7.6,经0.22 μ m滤膜过滤除菌分装,4 $^{\circ}$ C保存备用。对于初代分离需加入青霉素100U/mL,醋酸铊终浓度为0.01%。

[0048] 2 方法

[0049] 2.1 *M.bovis*菌株扩增与基因组的提取

[0050] *M.bovis* HuBei-1分离株菌种按1% (v/v)接种于支原体液体培养基中,37 $^{\circ}$ C静置培养36h,至菌体含量为 10^9 CCU/mL。取1mL *M.bovis*纯培养物于1.5mL离心管中,14000r/min离心30min。取离心所得菌体沉淀用组织/细胞基因组提取试剂盒提取基因组。

[0051] 2.2 人工感染*M.bovis*阳性血清的制备

[0052] *M.bovis* HuBei-1分离株接种于含10%的马丁肉汤培养基,在37 $^{\circ}$ C静置培养至 10^9 CCU/mL。将动物随机分组,感染组包括12头犊牛,空白对照组包括2头犊牛。感染组每头犊牛气管内接种40mL *M.bovis*培养物(10^9 CCU/mL),接种1次。对照组每头犊牛气管内接种40mL *M.bovis*培养基,接种1次。接种前和接种后7天分别采集血清,之后每隔7天采集1次血

清。采集血清使用常规方法：待血液凝固后置于37℃温箱放置2小时，再置于2~6℃放置1小时，然后将析出的血清置于离心瓶中，8 000转/分钟离心15~20分钟，定量分装，将上清置于-70℃保存。

[0053] 2.3 p28基因的克隆

[0054] 针对假定膜蛋白基因p28设计上游引物0rf0521-1和下游引物0rf0521-2：

[0055] 上游引物0rf0521-1:5' cag gga tcc tct aaa tat ata tta ttg aca aca 3'

[0056] 下游引物0rf0521-2:5' cag gtc gac tta tct act ttc att ttc aa3'

[0057] 以M.bovis Hubei-1分离株基因组为模板，按照表1所列配方配置PCR反应体系。混合均匀后，按50μL/管分装。PCR反应条件：94℃5min, 94℃30s, 54℃30 s, 72℃45s, 循环30个，72℃延伸5min。PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳后，在紫外灯照射下将目的片段切下，用DNA柱式胶回收试剂盒按照说明书对PCR产物进行回收。PCR回收产物放于-20℃保存。

[0058] 表1 PCR反应体系

[0059]

PCR反应体系	体积
去离子水(dd H ₂ O)	66μL
d NTP (2.5mmol/L)	8μL
10×buffer	10μL
上游引物 (5pmol/μL)	7μL
下游引物 (5pmol/μL)	7μL
r Taq酶 (5U/μL)	1μL
模板	1μL

[0060] 2.4 pET-28a-p28重组质粒的构建与鉴定

[0061] PCR回收产物和pET-28a载体分别经SalI和BamHI双酶切后(酶切体系见表2)，用DNA柱式胶回收试剂盒按照说明书对酶切产物进行回收。将酶切后的p28 基因和pET-28a vector连接、转化至DH5α感受态细胞中，连接体系见表3。涂在 Kan⁺抗性固体LB培养基平板上，37℃过夜培养。挑菌接种于Kan⁺抗性液体LB培养基中，37℃过夜培养。用OMEGA公司的质粒(小量)提取试剂盒提质粒进行PCR、双酶切鉴定。PCR条件参照2.3中PCR反应条件。将PCR、酶切鉴定结果为阳性的重组质粒送去上海生物工程有限公司测序。

[0062] 表2 双酶切反应体系

[0063]

成分	体积
PCR产物	15μL
10×T buffer	4.5μL
BamH I	3μL
Sal I	3μL
水	4.5μL
总体积	30μL

[0064] 表3 连接体系

[0065]

成分	体积
P28酶切产物	2 μ L
SoLution I	2.5 μ L
pET28Vector	0.5 μ L
总体积	5 μ L

[0066] 2.5 重组质粒pET-28a-p28转化及诱导表达

[0067] 将经PCR鉴定、双酶切反应以及序列比对鉴定正确的重组质粒pET-28a-p28转化到BL21感受态细胞中,涂于Kan⁺LB平板上,置于37℃过夜培养,同时将pET-28a vector转化至BL21感受态细胞中作为空质粒对照,平行操作。分别挑取单个重组质粒菌落和单个空质粒菌落接种于3mL Kan⁺LB液体培养基中,置于37℃振荡培养过夜。将过夜培养的新鲜菌液按照1/50体积比例接种于Kan⁺LB液体培养基中,每个克隆接种两管,一管标记为“对照”,另一管标记为“诱导”,将接种后的菌液置于37℃振荡培养1.5h,当菌液OD值达到0.4~0.6时,向每个克隆的“诱导”管中加入终浓度为1mmol/L的IPTG,继续置于37℃振荡培养4~6h。

[0068] 将培养物以10000 $\times$ g离心2min,彻底弃上清得到诱导菌体沉淀。将沉淀物用90 μ L 1 $\times$ SDS加样缓冲液和10 μ L DTT(终浓度200mmol/L)溶液裂解,混匀后进行沸水浴10min后以10000 $\times$ g离心2min,取其裂解液上清进行12%SDS-PAGE凝胶电泳。将SDS-PAGE鉴定正确的重组质粒阳性菌克隆命名为“pET28a-BL21-p28”,诱导得到的重组蛋白命名为“P28重组蛋白”。

[0069] 2.6 蛋白可溶性判断

[0070] 按照优化后的诱导条件制备50mL诱导菌液。将菌液转入离心管,6000r/min离心10min。弃上清,用PBS重新悬起菌体沉淀,再次离心,条件同样为6000r/min离心10min。重复清洗三次。将菌体沉淀用3mL PBS重新悬起,在冰浴条件下超声破碎,超声功率为150W,间歇时间5s,有效时间为10min。将超声后的菌液转移至1.5mL离心管中,在10000r/min、4℃条件下离心15min,取40 μ L上清与50 μ L 2 $\times$ SDS凝胶电泳上样缓冲液和10 μ L 1mol/L DTT混匀备用,记为“上清”。用3mL PBS将离心所得沉淀重新悬起,充分混匀后取40 μ L悬液与50 μ L 2 $\times$ SDS凝胶电泳上样缓冲液和10 μ L 1mol/L DTT混匀备用,记为“沉淀”。将“上清”和“沉淀”置于沸水浴中加热10min。离心10000r/min,1min。取处理后的样品5 μ L进行SDS凝胶电泳,然后用考马斯亮蓝染色观察。

[0071] 2.7 重组蛋白的纯化

[0072] 吸取1mL Ni-NTA His.Bind树脂,用纯净水洗树脂三次,用pH8.0的8M尿素洗树脂两次,将离心后所得上清与洗后的树脂在4℃下结合过夜。用pH值递减的8M尿素洗脱树脂。分别取各洗脱液40 μ L与2 $\times$ SDS加样缓冲液和DTT混合如上,沸水浴加热10min后进行蛋白电泳。最后用考马斯亮蓝染色观察。

[0073] 2.8 重组蛋白的Western Blotting验证

[0074] 取纯化后的重组蛋白P2840 μ L与2 $\times$ SDS凝胶电泳上样缓冲液和10 μ L 1mol/L DTT混匀,置于沸水浴中加热10min。离心10000r/min,1min。取5 μ L处理后的样品进行SDS凝胶电泳。同时,将经诱导的带有空质粒的pET-28a-p28-DE3菌体按照2.2.5的处理方法与1 $\times$ SDS凝胶电泳上样缓冲液和10 μ L 1mol/L DTT混匀,置于沸水浴中加热10min后,10000r/min离心

1min,作为空白对照。电泳结束后,采用半干法转膜将蛋白转到硝酸纤维素膜上。用PBST洗三遍,每次10min。用5%鱼明胶封闭 2h。将硝酸纤维素膜用1:80倍稀释M.bovis阳性血清孵育1h。PBST洗三遍同上。1:8000倍兔抗牛IgG孵育1h。PBST洗三遍同上。用DAB显色液显色后观察。

[0075] 3 结果

[0076] 3.1 p28基因PCR扩增结果

[0077] 通过利用引物0rf0521-1和0rf0521-2对M.bovis Bubei-1基因组DNA的PCR 扩增,得到了大小为783bp的p28基因片段(图1)。

[0078] 3.2 pET-28a-p28重组质粒的鉴定

[0079] pET-28a-p28重组质粒的PCR鉴定结果。通过利用引物0rf0521-1和0rf0521-2 对pET-28a-p28重组质粒进行PCR扩增,得到了大小为783bp的p28基因片段。见图2。

[0080] 3.3 重组质粒pET-28a-p28的双酶切鉴定结果

[0081] 用核酸限制性内切酶BamHI和SalI对重组质粒pET-28a-p28进行双酶切鉴定,通过琼脂糖凝胶电泳观察,在重组质粒泳道可见大小为5368bp的线性质粒 pET-28a和大小为783bp的p28基因两条DNA片段,鉴定结果为阳性(图3)。

[0082] 3.4 序列测定结果

[0083] p28基因片段测序结果与M.bovis Hubei基因组参考序列进行比对分析后,相似性为100%,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,其所编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0084] 3.5 重组蛋白的诱导

[0085] 带有重组质粒的大肠杆菌pET-28a-p28-DE3经诱导后,在31kDa处有一条较宽的条带,见图4中1泳道所示。未经诱导的pET-28a-p28-DE3在此处无明显条带,表明无明显本底表达。携带空载体的大肠杆菌pET-28a-DE3和经诱导后的pET28a- DE3在此处没有条带。

[0086] 3.6 重组蛋白可溶性判定

[0087] 通过对诱导后菌体裂解液的“上清”成分和“沉淀”成分的SDS凝胶电泳分析,结果显示该重组蛋白以包涵体的形式表达。

[0088] 3.7 重组蛋白的纯化结果

[0089] 在变性条件下,用Ni-NTA His.Bind树脂纯化重组蛋白P28。在该结合和洗脱方案下,结合前体系中含有重组蛋白和大量杂蛋白,而经结合过夜后,滤液中只含有微量目的蛋白。Buffer B~D洗脱液中含有大量杂蛋白,但无重组蛋白,从Buffer E开始,重组蛋白被洗脱下来。表观分子量与理论分子量一致,且无明显杂带。

[0090] 3.8 Western Blotting检测

[0091] 应用M.bovis阳性血清对纯化后的重组蛋白作Western Blotting检测结果表明,纯化后的重组蛋白泳道在31KDa处出现一条明显的条带,即重组蛋白P28,表观分子量与理论分子量一致。同时,在诱导的pET-28a-DE3泳道中无任何条带。

[0092] 实施例2 M.bovis抗体间接ELISA方法的建立

[0093] 将实施例1制备的P28重组蛋白作为抗原,建立M.bovis血清抗体ELISA方法。通过对反应条件的优化,确定抗原包被浓度、一抗稀释度、最佳封闭条件、一抗作用时间、二抗作用时间、显色时间及临界值的判定等最佳条件。本试验为检测牛支原体抗体间接ELISA试剂

盒的研究奠定了理论基础,也为M.bovis的现地诊断方法改良提供了参考依据。

[0094] 1 材料

[0095] 1.1 主要试剂

[0096] 鱼明胶购自Sigma公司;硫酸铵 (Ammonium sulfate) 购自天津化学试剂一厂;辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体购自Sigma公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司。JET96孔酶标板,购自宏博生物技术有限公司。

[0097] 0.05mol/L碳酸盐包被液:准确称取无水1.59gNa₂CO₃和2.93gNaHCO₃,溶于 1L去离子水中,pH约为9.6。

[0098] 10×洗涤液 (PBST):0.1mol pH7.4磷酸盐缓冲液 (PBS) 中加万分之五Tween-20 (0.05v/v%)。使用前用去离子水稀释成1×工作液。

[0099] 20×样品稀释液:NaCl 80g,Na₂HPO₄ 14.4g,KCl 2g,KH₂PO₄ 2.4g于450mL 去离子水中完全溶解,调pH至7.4,加去离子水定容至500mL,高压灭菌,使用前用去离子水稀释成1×PBS工作液。

[0100] 显色终止液:2mol/L的H₂SO₄溶液。

[0101] 底物溶液:TMB

[0102] 1.2 菌株和血清

[0103] M.bovis HuBei株由本实验室分离并保存。M.bovis阳性血清由本实验室制备。

[0104] 1.3 生物信息学软件

[0105] ROC分析软件为MedCalc.v11.5.1。

[0106] 2 方法

[0107] 2.1 抗原的制备

[0108] 按照实施例1制备P28重组蛋白,并用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

[0109] 2.2 ELISA方法的建立及条件优化

[0110] 2.3 ELISA操作术式

[0111] 一、加入100μl用样品稀释液稀释好的待检血清样品于96孔酶标板中,37℃反应1h,甩净。

[0112] 二、用洗涤液洗板3次,每次5分钟,每孔加240μl。

[0113] 三、加入100μl辣根过氧化物酶标记的兔抗牛IgG抗体,37℃反应1h,甩净。

[0114] 四、用洗涤液洗板3次,每次5分钟,每孔加300μl。

[0115] 五、加入100μl底物溶液TMB,37℃反应6min。

[0116] 六、加入50μl 2mol/L硫酸终止液。

[0117] 七、置于紫外分光光度计在波长450nm读数,进行结果判定。

[0118] 2.4最佳抗原包被浓度与被检血清最佳稀释度的确定

[0119] 参考蛋白定量测出的P28重组蛋白的浓度,用碳酸盐包被液稀释P28重组蛋白,使其工作浓度为15ug/ml,10ug/ml,5ug/ml,2.5ug/ml,制备每个工作浓度的抗原包被液5ml备用。吸取每个工作浓度的重组蛋白于ELISA板中,体积为100ul/孔。每个包被浓度包被24个ELISA孔。将加入包被抗原的ELISA板用封口袋封闭,放入37℃,孵育2h。PBST洗板三次。每孔加入100ul 1w/w%鱼明胶封闭过夜。弃掉 ELISA板孔中的液体,在吸水纸上拍干。PBST洗板三次。用PBS以1:40倍、1: 80倍、1:160倍、1:320倍分别稀释阳性对照血清和阴性对照血清,

加样方法见表4,每孔加入100uI各稀释度的血清,封口袋封闭,放入37℃,孵育1h。其他条件不变,参照ELISA操作术式操作。计算各处理均值,计算S/P值。

[0120] 表4 抗原与一抗最佳工作浓度的优化

[0121]

对照血清	预包被抗原浓度测定 (ug/ml)			
	15	10	5	2.5
阳性对照 (1: 40)	A1-A3①	A4-A6	A7-A9	A10-A12
阳性对照 (1: 80)	B1-B3	B4-B6	B7-B9	B10-B12
阳性对照 (1: 160)	C1-C3	C4-C6	C7-C9	C10-C12
阳性对照 (1: 320)	D1-D3	D4-D6	D7-D9	D10-D12
阴性对照 (1: 40)	E1-E3	E4-E6	E7-E9	E10-E12
阴性对照 (1: 80)	F1-F3	F4-F6	F7-F9	F10-F12
阴性对照 (1: 160)	G1-G3	G4-G6	G7-G9	G10-G12
阴性对照 (1: 320)	H1-H3	H4-H6	H7-H9	H10-H12

[0122] ①编号为酶标板的孔号

[0123] 2.5 最佳封闭液的确定

[0124] 按照上述实验确定好的条件包被抗原,分别用含1v/v%马血清、0.1w/w%鱼明胶和5w/w%鱼明胶的含0.05v/v%Tween-20的pH 7.4的PBS溶液进行封闭,其余反应条件不变按照2.3中ELISA方法进行检测。根据ELISA检测结果,选取S/P值最大的缓冲液做本实验方法的封闭液。

[0125] 2.6 一抗作用时间的优化

[0126] 按照上述优化好的条件进行包被、封闭后,一抗作用时间为0.5h、1h、1.5h,标准阳性血清和标准阴性血清样本做3个重复,其他反应条件不变,其余反应条件不变按照2.3中ELISA方法进行实验。根据OD_{450nm}条件下测得的P/N值来确定一抗最佳作用时间。

[0127] 2.7 酶标二抗作用时间的优化

[0128] 按照上述确定好的包被条件、封闭条件、一抗作用时间,在ELISA反应过程中,将酶标抗体稀释成工作浓度1:8000倍,加入ELISA反应板中,37℃分别作用0.5h、1h、1.5h,其余反应条件不变按照2.3中ELISA方法进行实验。根据OD_{450nm}条件下测得的P/N值来确定最佳二抗作用时间。

[0129] 2.8 底物显色时间的确定

[0130] 按照上述确定好的包被条件、封闭条件、一抗作用时间、二抗作用时间,在ELISA反应过程中,调整显色液作用时间。显色过程中选取的显色时间分别是3min、6min、9min、12min。最后再根据P/N值来确定最佳底物显色时间。

[0131] 2.9 临界值的判定

[0132] 按照优化后的ELISA方法,对经病原学诊断和血清学诊断都为M.bovis阳性的牛血清样品138份、M.bovis阴性牛血清样品91份进行M.bovis抗体检测。对所得数据用

MedCalc.v11.5.1进行ROC分析。

[0133] 2.10 组装试剂盒

[0134] 将各试剂与96孔酶标板按统一规格配套组装成试剂盒。在实验室条件下,制3批ELISA试剂盒,每批次20个试剂盒,放于4℃冰箱中保存。

[0135] 3 结果

[0136] 3.1 重组蛋白抗原的制备及蛋白定量

[0137] 纯化的重组蛋白经PAGE分析无明显杂带,得率较高。经蛋白定量试剂盒定量,重组蛋白浓度为0.8mg/ml。

[0138] 3.2 最佳抗原包被浓度与被检血清最佳稀释度的确定

[0139] 取P/N值相对较大,标准阳性血清OD值较大,而标准阴性血清的OD值较小,作为本试剂盒所使用的最佳抗原包被浓度与被检血清最佳稀释度。本试验确定的最佳抗原包被浓度为10μg/ml,被检血清最佳稀释度为1:160倍。见表5。

[0140] 表5 抗原与被检血清工作浓度优化结果

[0141]

	抗原包被浓度			
血清稀释度	15μg/ml	10μg/ml	5μg/ml	2.5μg/ml
1:40	10.1①	10.63	10.21	13.1
1:80	10.3	13.7	10.31	13.89
1:160	11.34	14.6	12.9	13.11
1:320	9.87	12.1	11.12	9.97

[0142] ①P/N值

[0143] 3.3 最佳封闭液与封闭时间的确定

[0144] 取P/N值最大(P/N值=14.4)的封闭时间和封闭液作为本试剂盒所使用的最佳封闭液与封闭时间。5%鱼明胶4℃封闭过夜效果好于其37℃封闭2h效果,效果明显好于其它的封闭液封闭效果。本试验确定最佳封闭液与封闭时间为含5w/w%鱼明胶的含0.05% Tween-20的pH 7.4PBS溶液,4℃封闭过夜,见表6。

[0145] 表6 封闭液与封闭时间的优化

[0146]

	未封闭	1%马血清	1%鱼明胶	5%鱼明胶
37℃1h	7.3①	6.1	7.9	9.6
37℃2h	6.9	4.87	7.3	12.8
4℃过夜	6.3	5.46	7.5	14.4

[0147] ①P/N值

[0148] 3.4 一抗作用时间的优化

[0149] 取P/N值相对较大,标准阳性血清OD值较大,而标准阴性血清的OD值较小,作为本试剂盒所使用的血清工作时间为1小时,见表7。

[0150] 表7 一抗作用时间的确定

[0151]

反应时间 (h)	0.5	1	1.5
P/N值	8.95	15.71	15.14

[0152] 3.5 酶标抗体 (抗牛 IgG-HRP) 工作时间的确定

[0153] 取P/N值相对较大,标准阳性血清OD值较大,而标准阴性血清的OD值较小,作为本试剂盒所使用的血清工作时间为1小时。见表8。

[0154] 表8 酶标抗体 (抗牛 IgG-HRP) 工作时间的优化

[0155]

反应时间 (h)	0.5	1	1.5
P/N值	14.31	16.88	13.14

[0156] 3.6 底物显色时间的确定

[0157] 取P/N值相对较大,标准阳性血清OD₄₅₀值较大,同时标准阴性血清的OD₄₅₀值较小,作为本试剂盒所使用的底物显色时间为室温9分钟。见表9。

[0158] 表9 TMB底物显色时间的优化结果

[0159]

反应时间 (min)	3	6	9	12
P/N	12.92	15.73	16.17	11.86

[0160] 3.7 临界值的判定

[0161] 3.7.1 检测样品的OD₄₅₀值

[0162] 应用优化后的ELISA方法检测已知阳性血清138份和阴性血清91份。将各血清的OD₄₅₀值分别减去阴性对照OD₄₅₀值得到样品OD₄₅₀矫正值,见表10和表11。

[0163]

表 10 阳性样品 OD₄₅₀ 矫正值

血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值	血清 编号	矫正值
1	0.977 ^①	21	1.172	41	0.576	61	0.981	81	0.851	101	0.495	121	0.674																
2	0.926	22	1.01	42	0.861	62	1	82	0.673	102	0.872	122	0.776																
3	0.72	23	1.066	43	0.352	63	0.977	83	0.71	103	0.686	123	1.096																
4	0.542	24	1.051	44	0.748	64	1.154	84	0.789	104	0.913	124	1.067																
5	0.669	25	0.945	45	0.262	65	0.805	85	0.579	105	0.904	125	1.141																
6	0.286	26	0.923	46	0.605	66	0.844	86	0.986	106	0.453	126	0.869																
7	0.379	27	0.945	47	0.738	67	1.013	87	0.849	107	0.902	127	0.76																
8	0.918	28	0.799	48	0.405	68	0.744	88	0.568	108	0.734	128	0.528																
9	0.963	29	0.069	49	0.863	69	0.533	89	0.419	109	0.487	129	0.91																
10	0.967	30	0.907	50	0.488	70	0.849	90	0.322	110	0.804	130	0.989																
11	0.917	31	0.737	51	0.42	71	0.09	91	0.799	111	1.191	131	1.075																
12	0.787	32	0.983	52	0.289	72	0.854	92	0.504	112	1.161	132	0.913																
13	0.763	33	0.971	53	0.934	73	0.435	93	0.37	113	0.874	133	1.173																
14	0.943	34	0.822	54	0.988	74	0.841	94	0.08	114	1.227	134	0.909																
15	0.852	35	0.724	55	0.846	75	0.816	95	0.903	115	0.997	135	0.505																
16	0.503	36	0.943	56	0.591	76	0.581	96	0.927	116	0.599	136	0.902																
17	1.076	37	0.919	57	0.317	77	0.758	97	0.731	117	1.094	137	0.687																
18	0.842	38	0.934	58	0.184	78	0.951	98	0.778	118	1.211	138	1.075																
19	0.873	39	0.965	59	0.425	79	0.594	99	0.967	119	1.203	P ^②	1.103																
20	1.135	40	0.922	60	1.005	80	0.751	100	0.922	120	0.965	N ^③	0																

①P/N 值。②阳性对照矫正值。③阴性对照矫正值。

盒检测,应用MedCalc.v11.5.1对结果数据进行统计分析(ROC分析),结果表明,最优临界值根据95%的CIs下的敏感性(Sn)、特异性(Sp)、以及95%CI下的曲线下面积(AUCs)来确定。分析结果显示,Cot-off值0.418为系统分析的最优临界点(图5-图7)。

[0167] 3.8 MbH试剂盒的组装

[0168] 在实验室条件下,制备3批次ELISA试剂盒,批次为:201001、201002、201003 每批次20个试剂盒。放于4℃冰箱中保存。试剂盒组成见表12。

[0169] 表12 MbH试剂盒的组成

[0170]

	规格	数量	保存条件	备注
包被板		1	4℃保存	
阴性血清对照	1ml/管	2 管	-20℃保存	
阳性血清对照	1ml/管	2 管	-20℃保存	
20 倍 PBS 样品稀释液	12ml/瓶	1 瓶	-20℃保存	
10 倍洗涤液	10ml/瓶	1 瓶	4℃避光保存	
兔抗牛 IgG 酶标抗体	7.5ml/瓶	1 瓶	4℃保存	
底物显色液	50ml/瓶	1 瓶	4℃保存	
终止液	50ml/瓶	1 瓶	4℃保存	使用前请按说明书稀释
干燥袋		1 个		
“ <i>M.bovis</i> ELISA 抗体检测试剂盒使用说明书”		1 份		

[0171] 通过对影响ELISA方法的各种因素的筛选,确定*M.bovis* ELISA检测试剂盒最适条件为:使用5%鱼明胶作为封闭液,4℃封闭过夜(12~14h),重组蛋白P28 的包被浓度为10μg/ml;被检血清最佳稀释度为1:160;被检血清最佳作用时间为1h;酶标抗体最佳工作时间为1h;加入底物后室温显色9min;临界值(S/P)为0.418,当S/P≥0.418时为阳性,S/P<0.418时为阴性。

[0172] 实施例3 本发明的MbH试剂盒的性能评估及其与其他商品化试剂盒的比较

[0173] 为了加快MbH试剂盒的产业化,本发明对该试剂盒的敏感性、特异性、检测临床样品准确性、宿主抗体持续期以及试剂盒保存期等性能进行了评估。并且,将 MbH试剂盒与商品化试剂盒进行比较,为MbH试剂盒的应用提供数据参考。

[0174] 1 材料

[0175] 1.1 ELISA试剂盒

[0176] 本发明的“MbH *M.bovis* ELISA抗体检测试剂盒”(简称“MbH试剂盒”)按照实施例2方法制备,批次分别为:201001,201002,201003,每批试剂盒20个。

[0177] “*Mycoplasma bovis* Antibody Test Kit(ELISA)”(简称“Kit 1”)购自加拿大

Biovet 公司;“BIO-X MYCOPLASMA BOVIS ELISA KIT”(简称“Kit 2”)购自比利时Bio-X Diagnostics公司。

[0178] 1.2 血清样品

[0179] 健康牛血清样品和自然感染牛血清样品来自于不同地区,参考辛九庆(2008) 的 M.bovis病原学鉴定方法进行病原学检测,同时用Kit 1对血清样品检测抗M.bovis 抗体。见表13和表14。

[0180] 表13 自然感染血清样品背景信息

[0181]

血清编号	来源	数量(份)	病原学检测(病原分离)	血清学检测(Kit 1检测)
HuB1~13	湖北省	13	阳性	阳性
LN1~6	辽宁	6	阳性	阳性
CQ1~6	重庆	6	阳性	阳性
GX1~31	广西	31	阳性	阳性
NX1~51	宁夏	51	阳性	阳性
JL1~5	吉林	5	阳性	阳性
HLJ1~32	黑龙江	32	阳性	阳性
HeB1~14	河北	14	阳性	阳性
共计		158		

[0182] 表14 健康牛血清样品信息

[0183]

血清编号	来源	数量(份)	病原学检测(PCR)	血清学检测(Kit 1检测)
------	----	-------	------------	----------------

[0184]

NX1~66	宁夏	66	阴性	阴性
HLJ1~44	黑龙江	44	阴性	阴性
SX1~15	陕西	15	阴性	阴性
共计		125		

[0185] 牛源性其它疾病阳性血清。牛传染性胸膜肺炎(CBPP)阳性血清、口蹄疫(FMD) 阳性血清、牛结核分枝杆菌(MB)阳性血清、牛病毒性腹泻(BVDV)阳性血清、牛传染性鼻气管炎(IBRV)阳性血清各1份。其中牛传染性胸膜肺炎(CBPP)阳性血清PS2 来自牛传染性胸膜肺炎国际参考实验室—葡萄牙国家兽医实验室(LNIV),口蹄疫阳性血清来自中国农业科学院兰州兽医研究所,其它阳性血清均为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所制备和保存。

[0186] 1.3 菌株

[0187] M.bovis Hubei分离株由本实验室分离并保存。

[0188] 1.4 实验动物

[0189] 14头健康犊牛选自无M.bovis病史的牛场,经Kit 1检测均为M.bovis阴性。

[0190] 2 方法

[0191] 2.1 MbH试剂盒敏感性实验

[0192] 在表13所列血清中,随机选取16份已知M.bovis阳性血清(包括8份自然感染M.bovis阳性血清和8份人工感染M.bovis阳性血清),分别用3批MbH试剂盒进行检测,统计试剂盒的敏感性。

[0193] 用PBS将上述16份阳性血清样品分别做1:40~1:5120倍系列稀释,使用自制的 3批MbH试剂盒批次分别为:201001,201002,201003对每个稀释度分别进行检测。统计每批试剂盒的在每个血清稀释度下检测出阳性样品的数量。

[0194] 2.2 MbH试剂盒特异性实验

[0195] 2.2.1 MbH试剂盒检测阴性样品

[0196] 在表14所列血清中,随机选择已知M.bovis阴性血清样品16份,分别用三批MbH 试剂盒进行检测,统计试剂盒的特异性。

[0197] 2.2.2 MbH试剂盒交叉反应性实验

[0198] 使用自制3批试剂盒批次分别为201001,201002,201003,对牛源性其它疾病阳性血清样品检测。牛源性其它疾病阳性血清样品包括牛传染性胸膜肺炎(CBPP) 阳性血清PS2、口蹄疫(FMD) 阳性血清、牛结核分枝杆菌(MB) 阳性血清、牛病毒性腹泻(BVDV) 阳性血清、牛传染性鼻气管炎(IBRV) 阳性血清各1份。

[0199] 2.3 MbH试剂盒检测临床样品实验

[0200] 为了测试用MbH试剂盒MbH试剂盒检测临床样品的准确性,对158份已知 M.bovis 抗体阳性血清和125份已知M.bovis抗体阴性血清血清进行检测,血清背景信息见表13。然后,统计判定结果与综合诊断结果(包括病原学与血清学诊断结果) 的符合率。

[0201] 2.4 MbH试剂盒抗体持续期实验

[0202] 首先,制备人工感染M.bovis阳性血清。M.bovis Hubei-1分离株接种于含10%的马丁肉汤培养基,在37℃静置培养至 10^8 CCU/mL。动物随机分组,空白对照组包括2头犊牛,感染组包括12头犊牛。对照组犊牛每头通过气管接种40mIM.bovis培养基,接种1次。感染组犊牛每头气管通过接种40mIM.bovis培养物(10^8 CCU/mL),接种1次。接种前采集血清,之后每隔7天采集1次血清。收集血清使用常规方法:血液置于37℃温箱放置1h凝固后,再置于2~8℃放置1h,然后将析出的血清置于离心管中,2000转/分钟离心5分钟,定量分装,将血清置于-40℃保存。

[0203] 然后,分别使用自制的3批MbH试剂盒对所有试验动物的M.bovis血清抗体进行检测。

[0204] 2.5 MbH试剂盒保存期实验

[0205] 将组装好的三个批次制备的MbH试剂盒置于4℃冰箱内封闭保存。

[0206] 2.5.1 保存期试验性状检验

[0207] 分别在保存0、1、2、4、6、8、10、12、14个月后观察每批ELISA试剂盒的试剂性状。试

剂澄清、透明、无沉淀或异物为合格。

[0208] 2.5.2 保存期试验无菌检验

[0209] 分别在保存0、1、2、4、6、8、10、12、14个月后将每批ELISA试剂盒各个试剂进行无菌检验。将试剂接种于无抗LB平板培养基中,置于37℃温箱中过夜培养。无菌落生长为合格。

[0210] 2.5.3 保存期试验临床血清样品检验

[0211] 选择经病原学和血清学检测的人工感染M.bovis阳性血清3份、自然感染阳性血清3份和健康M.bovis阴性血清2份作为检验样品,分别在0、4、6、8、10、12、14个月对每批试剂盒进行检测。

[0212] 2.5.4 保存期试验敏感性检验

[0213] 将原倍的阳性对照血清用PBS进行1:40—1:2560倍稀释,在保存0、4、6、8、10、12、14个月后将分别用三个批次的试剂盒对各稀释后的血清进行检测。

[0214] 2.5.5 保存期试验交叉反应性检验

[0215] 分别在保存0、4、6、8、10、12、14个月后用牛源性其它疾病阳性血清样品对三批试剂盒进行检测。牛源性其它疾病阳性血清样品包括牛传染性胸膜肺炎(CBPP) 阳性血清、口蹄疫(FMD) 阳性血清、牛结核分枝杆菌(MB) 阳性血清、牛病毒性腹泻(BVDV) 阳性血清、牛传染性鼻气管炎(IBRV) 阳性血清各1份。

[0216] 2.6 MbH试剂盒与其他商品化试剂盒的比较

[0217] 2.6.1 MbH试剂盒与其他两种商品化试剂盒的特异性比较

[0218] 分别用MbH试剂盒、Kit 1和Kit2对牛传染性胸膜肺炎国际标准血清PS2进行检测。

[0219] 2.6.2 MbH试剂盒与其他两种商品化试剂盒检测临床样品一致性比较

[0220] 血清的选择:从自然感染发病牛血清、健康牛血清和所有人工感染牛血清样品中,选择经M.bovis病原分离培养鉴定为阳性的血清样品38份,以及经鼻拭子PCR检测为阴性的健康牛血清样品37份,作为“比较样品”。

[0221] 分别使用MbH试剂盒、Kit 1和Kit 2对比较样品进行检测。Kappa统计量一致性强度参考夏世邦等的方法:Kappa值愈高表示一致性愈好,当Kappa值<0时,证明两方法间一致性为极差;当Kappa值在0.0~0.2范围内时,证明两方法间一致性为微弱;当Kappa值在0.21~0.40范围内时,证明两种方法间一致性为弱;当Kappa值在0.41~0.6范围内时,证明两种方法间一致性为中度;当Kappa值在0.61~0.80范围内时,证明两种方法间一致性为高度;当Kappa值在0.81~1.00范围内时,证明两种方法间一致性为极强。

[0222] 2.6.3 MbH试剂盒与商品化试剂盒Kit 1敏感性比较

[0223] 随机选取已知血清样品(包括8份已知发病牛血清和8份人工感染牛血清)用PBS进行1:40—1:2560倍稀释,使用Kit 1对这16份已知阳性血清不同稀释度进行检测,确定商品化试剂盒的最低检出量。然后,比较MbH试剂盒与Kit的敏感性。

[0224] 3 结果

[0225] 3.1 MbH试剂盒敏感性实验

[0226] 用3批MbH试剂盒对16份已知阳性血清样品进行检测,结果检出阳性16份,检出阴性0份,见表15。用3批MbH试剂盒对16份已知阳性血清不同稀释度进行检测,结果表明,当待检血清为1:640稀释倍数时,3个批次的MbH试剂盒均可以全部检测出阳性样品,MbH试剂盒最低可以检测出为1:2560稀释倍数的阳性血清,在1:160倍稀释度下可以100%检出血清

样品,符合该试剂盒最低检出限量的要求,见表 16。

[0227] 表15 MbH试剂盒敏感性实验结果

[0228]

已知样品	MbH 试剂盒检出阳性		
	201001	201002	201003
阳性 (16 份)	16 份	16 份	16 份
敏感性	100%	100%	100%

[0229] 表16 MbH试剂盒敏感性测试结果

[0230]

检出数量	血清稀释度							
	1: 40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
201001	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	13/16	11/16	0/16
201002	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	13/16	11/16	0/16
201003	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16	13/16	11/16	0/16

[0231] 3.2MbH试剂盒特异性实验

[0232] 用3批MbH试剂盒对16份已知阴性血清样品进行检测,结果表明,3批试剂盒均检出阴性16份,特异性为100%,见表17。

[0233] 表17 MbH试剂盒特异性实验结果

[0234]

已知样品	MbH 试剂盒检测出阴性		
	201001	201002	201003
阴性 (16 份)	16 份	16 份	16 份
特异性	100%	100%	100%

[0235] 3批试剂盒的特异性检测结果。自制的3批M. bovisELISA抗体检测试剂盒批次分别为:201001,201002,201003。对牛源性其它疾病阳性血清包括牛传染性胸膜肺炎 (CBPP) 阳性血清、口蹄疫 (FMD) 阳性血清、牛结核 (MB) 阳性血清、牛病毒性腹泻 (BVDV) 阳性血清、牛传染性鼻气管炎 (IBRV) 阳性血清各1份检测结果全部为阴性。结果见表18。

[0236] 表18 3批MbH试剂盒交叉反应检测结果

[0237]

阳性血清	试剂盒批号			
------	-------	--	--	--

[0238]

种类	201001	201002	201003	平均值	标准差	CV%
CBPP	0.24	0.24	0.249	0.24	0.003786	1.55%
FMD	0.30	0.30	0.30	0.30	0.001528	0.50%
MB	0.264	0.256	0.249	0.26	0.007506	2.93%
BVDV	0.246	0.247	0.239	0.24	0.004359	1.79%
IBRV	0.231	0.229	0.234	0.23	0.002517	1.09%

[0239] 3.3MbH试剂盒临床样品检测

[0240] 用MbH试剂盒检测158份阳性血清(表13)和125份阴性血清(表14),结果表明MbH试剂盒与病原学和血清学诊断结果的阳性符合率为93.04%,即敏感性为93.04%;阴性符合率为97.80%,即特异性为97.80%;总体符合率为95.41%,见表19。

[0241] 表19 MbH试剂盒检测临床样品结果

[0242]

血清	MbH 试剂盒		符合率		
	检出阳性	检出阴性	阳性符合率	阴性符合率	总体符合率
阳性(158)	147	11	93.04%		
阴性(125)	2	123		97.80%	95.41%

[0243] 3.4 MbH试剂盒抗体持续期实验

[0244] 使用自制的3批试剂盒对全部12头牛进行M. bovis抗体检测。结果表明:感染前,所有试验牛血清抗体均为阴性;感染后第3周感染组的12头牛全部为阳性,在第4周抗体值达到最高,然后缓慢下降,到感染第24周后所有牛的抗体值转变为阴性。见表20。

[0245] 表20 MbH试剂盒对人工感染动物血清抗体水平的检测

[0246]

感染时间 (周)	0	1	2	4	6	6	10	14	18	22	24
201001	0①	6	12	12	12	12	12	12	12	11	0
201002	0	6	12	12	12	12	12	12	12	11	0
201003	0	6	12	12	12	12	12	12	12	11	0

[0247] ①阳转头数(头)

[0248] 3.5 MbH试剂盒与其他两种商品化试剂盒的比较

[0249] 3.5.1 对交叉反应的评估

[0250] 采用购自牛传染性胸膜肺炎国际标准血清PS2对MbH试剂盒、Kit 1和Kit2三个ELISA试剂盒进行比较,结果如下:Kit 1和MbH试剂盒检测判定为阴性,而Kit 2检测判定为

阳性。

[0251] 3.5.2 三种试剂盒临床样品检测比较

[0252] 用MbH试剂盒、Kit 1和Kit 2 3种试剂盒对病原学和血清学诊断都呈M.bovis阳性的血清样品38份与阴性样品37份进行检测。Kit 1检测结果和MbH试剂盒检测结果与病原学和血清学诊断符合率分别为96.00%、92.00%，而Kit 2检测结果与病原学和血清学诊断符合率仅为74.67%，见表21。

[0253] 表21 MbH试剂盒同商品化试剂盒检测临床样品比较

[0254]

血清学和病原学诊断	Kit 1	Kit 2	MbH试剂盒
Positive (37)	34	35	33
Negative (38)	38	21	36
符合率	96.00%	74.67%	92.00%

[0255] 3.5.3 三种试剂盒一致性检验

[0256] 用Kappa统计量检测3种试剂盒之间的一致性。结果表明MbH试剂盒与Kit 1的Kappa值=0.812>0.8,有极强的一致性;Kit 1与Kit 2和MbH试剂盒与Kit 2分别有中度的一致性。见表22、表23和表24。

[0257] 表22 Kit 1与Kit 2一致性分析

[0258]

Kit 1	Kit 2			一致性
	+	-	合计	
Positive (34)	32	2	34	
Negative (41)	20	21	41	
合计	52	23	75	Kappa =0.434

[0259] 表23 Kit 1与MbH试剂盒一致性分析

[0260]

Kit 1	MbH			一致性
	+	-	合计 (Total)	
Positive (34)	31	3	34	
Negative (41)	4	37	41	
合计 (Total)	35	40	75	Kappa =0.812

[0261] 表24 MbH试剂盒与Kit 2一致性分析

[0262]

MbH	Kit 2	一致性
-----	-------	-----

[0263]

	+	-	合计 (Total)	
Positive (35)	34	1	35	
Negative (40)	19	21	40	
合计 (Total)	53	22	75	Kappa =0.481

[0264] 3.5.4 MbH试剂盒与商品化试剂盒Kit 1的敏感性比较。

[0265] 检测商品化试剂盒对已知阳性样品的最低检出量。使用Kit 1对16份已知阳性血清不同稀释度进行检测,以确定商品化试剂盒的最低检出量。结果表明,在1:40 倍稀释阳性血清时,Kit 1能100%检测出阳性样品;Kit 1能检出的最低稀释倍数为1: 640倍。当稀释倍数提高到1:1280倍时,Kit 1检测不出阳性样品。而Kit 1的血清工作浓度设定为1:20 倍,符合最低检出限量的要求。结果见表25。MbH试剂盒最低可以检测出为1:2560稀释倍数的阳性血清,在1:160倍稀释度下可以100%检出血清样品,符合该试剂盒最低检出限量的要求。所以,这两种试剂盒在其各自规定工作条件下,敏感性性能同样好。

[0266] 表25 商品化试剂盒Kit 1敏感性检测结果

[0267]

	血清稀释度							
	1: 20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
检出数量	16/16	16/16	14/16	12/16	3/16	1/16	0/16	0/16

序列表

<110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

<120> 一种牛支原体免疫相关性蛋白、含有该蛋白的检测试剂盒及其在牛支原体抗体检测中的用途

<130> KLPI170555

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 783

<212> DNA

<213> p28

<400> 1

```

atgaaaaaat ctaaatatat attattgaca acactatcgc caattatctc attgccattt 60
ttatctgcta gttgcatcac cgaagcaaaa tcagataaca aatggaaaa agatattaag 120
ataaacgaaa atacagatga aaaaaattct tctgaaacaa tgaataacaa acaaaaacaa 180
gataaaagca gtatagattc aaagatggaa gaaaaagcag ataacaaaac ggaaaaagat 240
attaagataa acgaaaatac agatgaaaaa aattcttctg aaacaatgaa taacaaacaa 300
aaacaagata aaagcagtat agaatcgaaa atgaaagaaa aaacagaaaa gcaagattca 360
aaaactaact cagaaaaaca agattcagaa actgatgaca gtagtaatga attaacaata 420
cctagtgaaa gcacaccaaa agatatgcca acagaaaatt ctgaaataaa cgactattta 480
gacaaagtta aggaatacgg aaaagaagca tcagaatttt atgaattact ttctaaatta 540
tttaaaacaa agtataaaga taaaataatt caaaaaattg gtaagtttga gaaaataatc 600
aaagaatttt ctaaattata tgagggaaca aagaacaact tagaccaaat tattgaagga 660
tttaagaac ctgattttta gaaagcatta ttagaacttt tgaatagtta caaagaatct 720
agagaagaaa taaaaaatgc aattaaagaa ttaaaagaaa ttgaaaatga aagtagattt 780
taa 783

```

<210> 2

<211> 260

<212> PRT

<213> p28

<400> 2

```

Met Lys Lys Ser Lys Tyr Ile Leu Leu Thr Thr Leu Ser Pro Ile Ile
1           5           10           15
Ser Leu Pro Phe Leu Ser Ala Ser Cys Ile Thr Glu Ala Lys Ser Asp
          20           25           30
Asn Lys Met Glu Lys Asp Ile Lys Ile Asn Glu Asn Thr Asp Glu Lys
          35           40           45
Asn Ser Ser Glu Thr Met Asn Asn Lys Gln Lys Gln Asp Lys Ser Ser

```

50	55	60
Ile Asp Ser Lys Met Glu Glu Lys Ala Asp Asn Lys Thr Glu Lys Asp		
65	70	75
Ile Lys Ile Asn Glu Asn Thr Asp Glu Lys Asn Ser Ser Glu Thr Met		
85	90	95
Asn Asn Lys Gln Lys Gln Asp Lys Ser Ser Ile Glu Ser Lys Met Lys		
100	105	110
Glu Lys Thr Glu Lys Gln Asp Ser Lys Thr Asn Ser Glu Lys Gln Asp		
115	120	125
Ser Glu Thr Asp Asp Ser Ser Asn Glu Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser		
130	135	140
Thr Pro Lys Asp Met Pro Thr Glu Asn Ser Glu Ile Asn Asp Tyr Leu		
145	150	155
Asp Lys Val Lys Glu Tyr Gly Lys Glu Ala Ser Glu Phe Tyr Glu Leu		
165	170	175
Leu Ser Lys Leu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Asp Lys Ile Ile Gln Lys		
180	185	190
Ile Gly Lys Phe Glu Lys Ile Ile Lys Glu Phe Ser Lys Leu Tyr Glu		
195	200	205
Gly Thr Lys Asn Asn Leu Asp Gln Ile Ile Glu Gly Phe Lys Glu Pro		
210	215	220
Asp Phe Lys Lys Ala Leu Leu Glu Leu Leu Asn Ser Tyr Lys Glu Ser		
225	230	235
Arg Glu Glu Ile Lys Asn Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ile Glu Asn		
245	250	255
Glu Ser Arg Phe		
260		

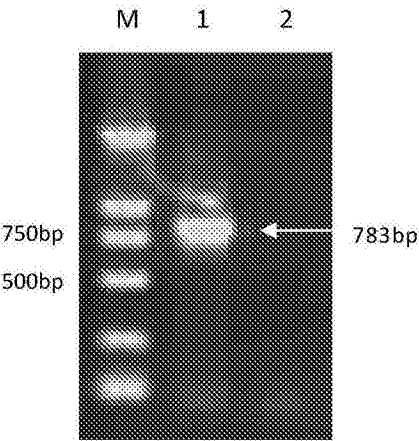


图1

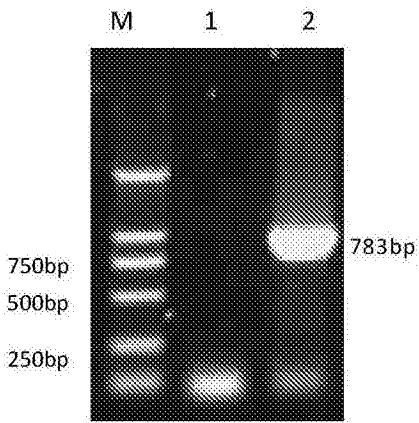


图2

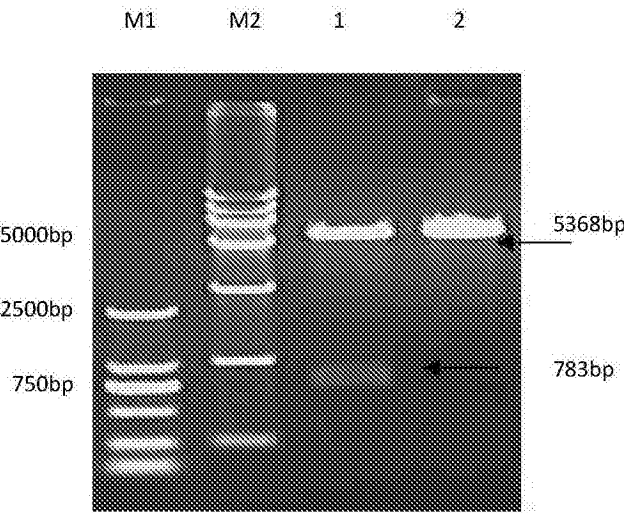


图3



图4

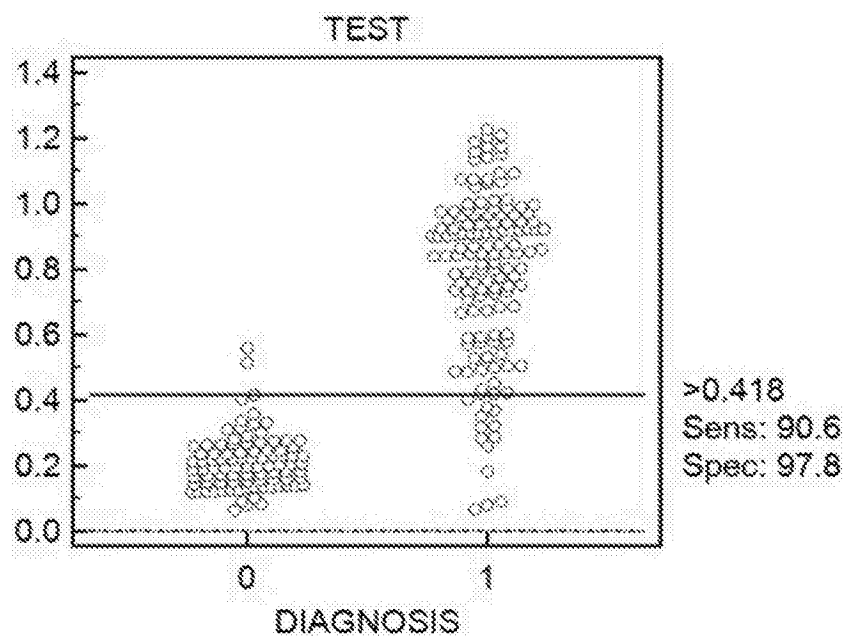


图5

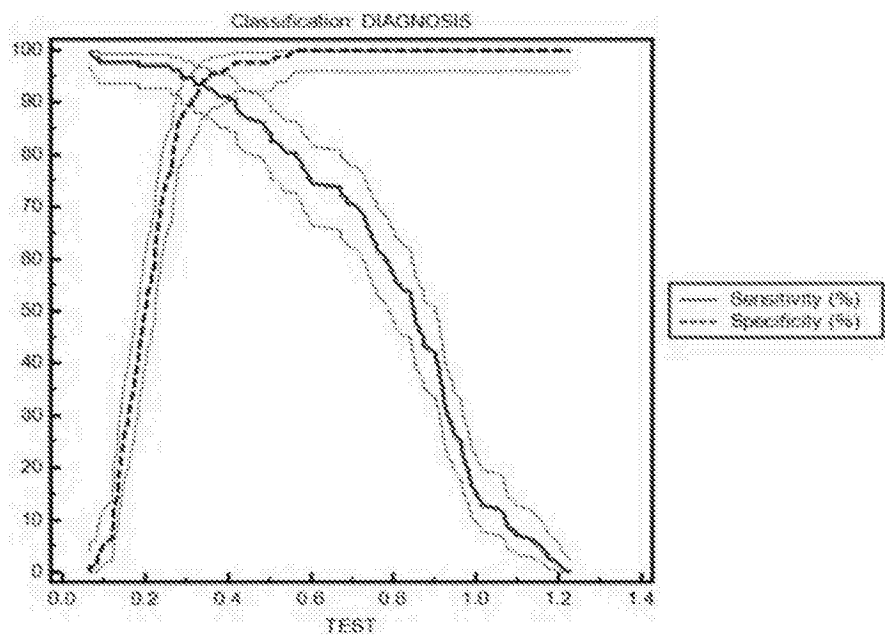


图6

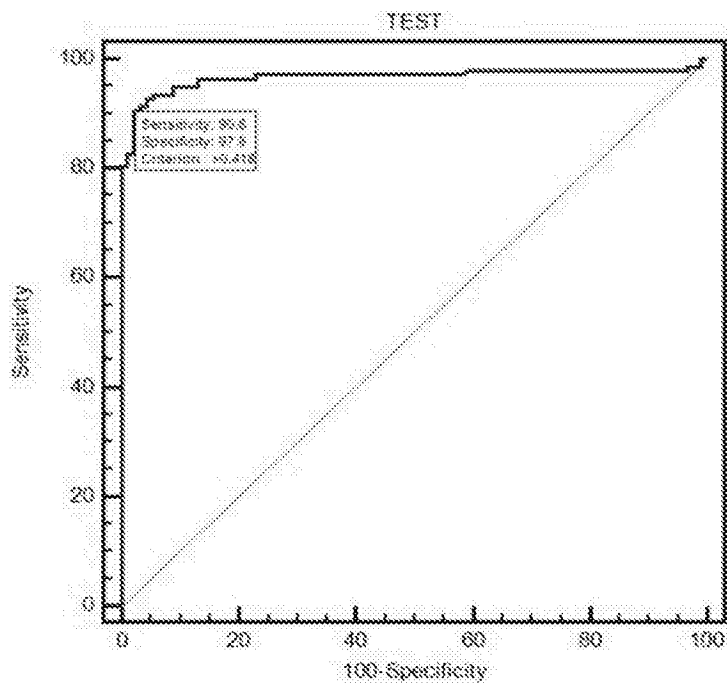


图7

专利名称(译)	一种牛支原体免疫相关性蛋白、含有该蛋白的检测试剂盒及其在牛支原体抗体检测中的用途		
公开(公告)号	CN107759674A	公开(公告)日	2018-03-06
申请号	CN2017110884887.9	申请日	2017-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	辛九庆 李媛 刘洋		
发明人	辛九庆 李媛 刘洋		
IPC分类号	C07K14/30 C12N15/31 G01N33/535 G01N33/544 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/30 G01N33/535 G01N33/544 G01N33/56933 G01N2333/30		
代理人(译)	孙皓晨 马鑫		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种牛支原体免疫相关性蛋白、含有该蛋白的检测试剂盒及其在牛支原体抗体检测中的用途。所述的牛支原体免疫相关性蛋白，命名为p28蛋白，其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。敏感性实验证明，本发明的一种牛支原体血清抗体ELISA检测试剂盒(MbH试剂盒)其最低可以检测出为1：2560稀释倍数的阳性血清，特异性实验证明，该试剂盒的特异性为97.8%，与牛传染性胸膜肺炎(CBPP)阳性血清、口蹄疫(FMD)阳性血清、牛结核(MB)阳性血清、牛病毒性腹泻(BVDV)阳性血清、牛传染性鼻气管炎(IBRV)阳性血清不发生发生特异性反应，并且具有良好的稳定性以及较高的准确性。本发明的提出为牛支原体抗体的检测提供了一种新的技术手段。

对照血清	预包被抗原浓度测定 (ug/ml)			
	15	10	5	2.5
阳性对照 (1: 40)	A1-A3①	A4-A6	A7-A9	A10-A12
阳性对照 (1: 80)	B1-B3	B4-B6	B7-B9	B10-B12
阳性对照 (1: 160)	C1-C3	C4-C6	C7-C9	C10-C12
阳性对照 (1: 320)	D1-D3	D4-D6	D7-D9	D10-D12
阴性对照 (1: 40)	E1-E3	E4-E6	E7-E9	E10-E12
阴性对照 (1: 80)	F1-F3	F4-F6	F7-F9	F10-F12
阴性对照 (1: 160)	G1-G3	G4-G6	G7-G9	G10-G12
阴性对照 (1: 320)	H1-H3	H4-H6	H7-H9	H10-H12