



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 106442997 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201510921656.1

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.12.14

G01N 33/577(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/569(2006.01)

CCTCC NO:C2014244 2015.01.07

G01N 33/535(2006.01)

CCTCC NO:C2014248 2015.01.07

(71)申请人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡

塘区大学东路100号

申请人 广西壮族自治区水产科学研究院

(72)发明人 陈汉忠 梁万文 李旻 王凯

陈明 吴文德 王瑞

(74)专利代理机构 广西南宁汇博专利代理有限

公司 45114

代理人 兰如康

权利要求书2页 说明书12页

(54)发明名称

检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸
附测定试剂盒

(57)摘要

检测无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的双抗体夹心酶联免疫吸附测定(double antibody sandwich ELISA)试剂盒,由包被有3A9单克隆抗体的多孔板、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12和显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺(TMB)组成。上述试剂盒的制备方法有以下工艺步骤:(1)制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板;(2)制备辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12;(3)配备显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺。

1. 一种检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在于:所述试剂盒由包被有3A9单克隆抗体的多孔板、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12。

2. 根据权利要求1所述的检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在于:所述多孔板每孔包被3A9单克隆抗体浓度为2.0-200.0 μ g/mL。

3. 根据权利要求1所述的检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺。

4. 根据权利要求2所述的检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在于:所述多孔板每孔包被3A9单克隆抗体的用量为100 μ L,浓度为10.0 μ g/mL。

5. 根据权利要求1所述的检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,其特征在于:所述辣根过氧化物酶标记单克隆抗体4C12的制备方法的步骤为,

1) 按常规方法制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯小鼠腹水单克隆抗体4C12,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为 4.34mg/mL,单克隆抗体4C12放置于-20℃环境下 保存备用;

2) 称取5mg辣根过氧化物酶溶解于1ml蒸馏水中;

3) 将步骤2)获得的溶液加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,冰浴下避光搅拌15分钟;

4) 将步骤3)获得的溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

5) 在步骤4)获得的溶液中加入20 μ L 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg 1gG,冰浴避光搅拌2小时;

6) 将步骤5)获得的溶液加入0.1ml 浓度为4mg/ml NaBH₄液,混匀,再在4℃环境下放置2小时;

7) 将步骤6)获得的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

8) 将步骤7)获得的溶液在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置于4℃环境下 2小时;

9) 将步骤8)获得的溶液放入离心管内,用离心机3000rpm离心30min,弃去上清,沉淀用半饱和硫酸铵洗1-2次,最后沉淀物溶于0.15M pH7.4的PBS中;

10) 将步骤9)得到的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,祛除铵离子后,12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,酶标4C12分装后冰冻保存。

6. 一种检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在于,其制备步骤如下:

(1) 制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板

用碳酸盐缓冲液制成的包被液将3A9单克隆抗体稀释为浓度10.0 μ g/mL的稀释液,所述包被液由Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g,加双蒸水定容至1000 mL制成,其在4℃条件下保存,然后将所述3A9单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,置于4℃环境下包被12小时-24小时,包被时间届满后,将质量浓度5%的脱脂奶粉溶液加入多孔板的各孔内,并在37℃进行封闭反应,封闭反应时间至少1小时-1.5小时,封闭反应结束后,用洗涤缓冲液洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有3A9单克隆抗体的多孔板,其保存温度为4

℃;

(2) 制备辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12

按常规方法:用杂交瘤细胞制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为 4.34mg/mL,单克隆抗体至-20℃ 保存备用;

(3) 按常规方法配备显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺;

(4) 配备洗涤缓冲液,洗涤缓冲液由以下成分组成:NaCl 8.0 g,KH₂PO₄ 0.2 g, KCl 0.2 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.58 g,Tween-20 0.5 mL,加双蒸水定容至1000 mL即制成洗涤缓冲液;

(5) 按常规方法将洗涤缓冲液分装到20ML消毒过的玻璃瓶,辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12和显色底物分别分装到环氧树脂小试管管内,然后与制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板一起组合成试剂盒;

所述辣根过氧化物酶标记4C12步骤如下:

步骤1) 称取5mg辣根过氧化物酶溶解于1ml蒸馏水中;

步骤2) 于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,冰浴下避光搅拌15分钟;

步骤3) 将上述溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

步骤4) 加20μl 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化辣根过氧化物酶的pH值升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg 1gG,冰浴避光搅拌2小时;

步骤5) 加0.1ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再置4℃2小时;

步骤6) 将上述液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

步骤7) 在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置于4℃ 环境下2小时;

步骤8) 将步骤7) 获得的溶液置于4℃ 环境下2小时的溶液置于离心管内用离心机在3000rpm条件下离心30min,弃去上清,沉淀用半饱和硫酸铵洗1-2次,将沉淀物溶于0.15M pH7.4的PBS中;

步骤9) 将步骤8) 得到的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,去除铵离子后,12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,使用时,用磷酸盐缓冲液作1:1600倍稀释。

7. 根据权利要求6所述的一种检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒的制备方法,其特征在于:所述制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板时,所述3A9单克隆抗体稀释液的加入量为100μL/孔,所述辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12稀释液的加入量为100μL/孔,所述质量浓度5%的脱脂奶粉溶液的加入量为100μL/孔。

检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于链球菌病免疫诊断、检测技术领域,涉及一种链球菌即无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定及其试剂盒的制备方法。

技术背景

[0002] 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是一种具有高毒力的革兰氏阳性菌,能感染多种淡水和海水鱼类,每年给世界水产养殖业带来数以亿计的损失,近几年在我国南方罗非鱼养殖区肆虐流行,由于生产上缺乏有效的诊断检测方法,致使罗非鱼无乳链球菌病没有得到有效监控和防治,给罗非鱼养殖造成了造成重大损失,严重阻碍了我国罗非鱼养殖业的发展。目前对无乳链球菌病诊断检测方法主要有:(1)常规的形态培养鉴定、生理生化鉴定等传统方法,这些传统的诊断检测方法通常精确度较低,耗时耗力(2)分子生物学检测方法,主要有PCR、LAMP等一些分子生物学方法,这些分子生物学方法虽然灵敏度高,但操作技术难度高,基层使用有一定的困难。(3)免疫学检测方法,免疫学的检测方面很多,有检抗体的,也有检抗原的,检抗体的如间接酶联免疫吸附试验,这种方法只能检测到循环抗体,但不能区分现症感染和既往感染,因此不能对疫病做出准确的诊断。本发明利用我们制备和筛选鉴定的抗鱼源无乳链球菌的特异的3A9和4C12单克隆抗体建立一种新的罗非鱼链球菌病免疫诊断检测方法,即:双抗体夹心ELISA法的检测方法,本发明由于利用了针对罗非鱼无乳链球菌的特异的单克隆抗体,不仅可以直接检测病原进行现症诊断,而且由于单克隆抗体可大量的制备、质量容易控制,因此可进一步提高检测方法的稳定性、灵敏度和特异性。

[0003] 本发明为临床上诊断和检测罗非鱼源无乳链球菌病提供了一种新的方法,可用于罗非鱼无乳链球菌的检测、诊断和药物治疗评价等。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,为临床提供一种检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒及其制备方法,可为临床实际提供一种用于罗非鱼无乳链球菌的检测、诊断和药物治疗评价的新方法。

[0005] 本发明所述的检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,包被有3A9单克隆抗体的多孔板,辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12和显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。

[0006] 本发明为达到上述目标,选择了专利申请人制备、筛选的3A9单克隆抗体作为包被抗体,所述单克隆抗体由保藏号为:CCTCC NO:C2014244的杂交瘤细胞生产,C2014244杂交瘤细胞保存在中国典型培养物保存中心。

[0007] 所述试剂盒中,包被有3A9单克隆抗体的多孔板、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12和显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺分别各自单独存放。

[0008] 进一步的:所述多孔板每孔包被3A9单克隆抗体浓度为2.0-200.0 μ g/mL。

[0009] 进一步的:所述试剂盒还包括显色底物3',3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0010] 进一步的:所述多孔板每孔包被3A9单克隆抗体的用量为100 μ L,浓度为10.0 μ g/mL。

[0011] 进一步的:所述辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体为4C12,

所述辣根过氧化物酶标记单克隆抗体4C12的制备方法为:

1)按常规方法制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯小鼠腹水单克隆抗体4C12,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为4.34mg/mL,单克隆抗体4C12放置于-20℃环境下保存备用;

2)称取5mg辣根过氧化物酶溶解于1ml蒸馏水中;

3)将步骤2)获得的溶液加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,冰浴下避光搅拌15分钟;

4)将步骤3)获得的溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

5)在步骤4)获得的溶液中加入20 μ l 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg IgG,冰浴避光搅拌2小时;

6)将步骤5)获得的溶液加入0.1ml 浓度为4mg/ml NaBH₄液,混匀,再在4℃环境下放置2小时;

7)将步骤6)获得的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

8)将步骤7)获得的溶液在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置于4℃环境下2小时;

9)将步骤8)获得的溶液放入离心管内,用离心机3000rpm离心30min,弃去上清,沉淀用半饱和硫酸铵洗1-2次,最后沉淀物溶于0.15M pH7.4的PBS中;

10)将步骤9)得到的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,祛除铵离子后(用茚氏试剂检测),12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,酶标4C12分装后冰冻保存,用间接ELISA方法检测,酶标4C12的效价达1:6400,最适稀释工作浓度为1:1600。

[0012] 进一步的:本发明还提供了检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒制备方法,所述步骤如下:

A. 制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板

用碳酸盐缓冲液制成的包被液将3A9单克隆抗体稀释为浓度10.0 μ g/mL的稀释液,所述包被液由Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g,加双蒸水定容至1000 mL制成,其在4℃条件下保存,然后将所述3A9单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,置于4℃环境下包被12-24小时,包被时间届满后,将质量浓度5%的脱脂奶粉溶液加入多孔板的各孔内,并在37℃进行封闭反应,封闭反应时间至少1-1.5小时,封闭反应结束后,用洗涤缓冲液洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有3A9单克隆抗体的多孔板,其保存温度为4℃;

B. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的单克隆抗体4C12

按常规方法:用杂交瘤细胞制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为4.34mg/mL,单克隆抗体至-20℃保存备用;

C. 配备显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺;

D. 制备检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,

所述辣根过氧化物酶HRP标记4C12步骤如下:

步骤1) 称取5mg辣根过氧化物酶溶解于1ml蒸馏水中;

步骤2) 在步骤1) 获得的溶液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO_4 溶液,冰浴下避光搅拌15分钟;

步骤3) 在步骤2) 获得的溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

步骤4) 在步骤3) 获得的溶液中加入20 μl 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化辣根过氧化物酶的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg IgG (经正辛酸一饱和硫酸铵粗提的4C12和经Protein G亲和层析纯化的4C12),冰浴避光搅拌2小时;

步骤5) 将步骤4) 获得的溶液加0.1ml新配的4mg/ml NaBH_4 液,混匀,再置4℃ 2小时;

步骤6) 将步骤5) 获得的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

步骤7) 将步骤6) 获得的溶液在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置4℃ 2小时;

步骤8) 将步骤7) 获得的溶液置于离心管内,用离心机在3000rpm条件下离心30min,弃去上清,沉淀用半饱和硫酸铵洗1-2次,最后沉淀物溶于少量0.15M pH7.4的PBS中;步骤9) 将步骤8获得的溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测),12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,使用时,用磷酸盐缓冲液作1:1600倍稀释。

[0013] 进一步的:所述制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板时,所述3A9单克隆抗体稀释液的加入量为100 μL /孔,所述辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体4C12稀释液的加入量为100 μL /孔,所述质量浓度5%的脱脂奶粉溶液的加入量为100 μL /孔。

[0014] 进一步的:所述洗涤缓冲液由以下成分组成: NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58 g,Tween-20 0.5 mL,加双蒸水定容至1000 mL即制成洗涤缓冲液。

[0015] 所述辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12,制备方法如下:按常规方法,用杂交瘤细胞制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,该单克隆抗体由保藏号为:CCTCC NO:C2014248的杂交瘤细胞生产,C2014248杂交瘤细胞保存在中国典型培养物保存中心。

所述4C12的保藏的培养物名称:一种产生抗罗非鱼无乳链球菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株4C12,保藏单位:中国典型培养物保藏中心;保藏地址:中国武汉市,武汉大学;保藏日期:2015年1月7日;保藏编号:CCTCC NO:C2014248。

[0016] 用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为4.34mg/mL,单克隆抗体至-20℃ 保存备用。

[0017] HRP标记4C12步骤如下:

①称取5mg辣根过氧化物酶(HRP)溶解于1ml蒸馏水中。

[0018] ②于上述溶液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO_4 溶液,冰浴下避光搅拌15分钟。

[0019] ③将上述溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液3-5次;

④将上述溶液加20 μ l 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg 1gG(经正辛酸一饱和硫酸铵粗提的4C12和经Protein G亲和层析纯化的4C12),冰浴避光搅拌2小时。

[0020] ⑤将上述溶液加0.1ml新配的4mg/ml NaBH₄液,混匀,再置4℃2小时。

[0021] ⑥将上述溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液3-5次。

[0022] ⑦将上述溶液在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置4℃ 2小时。

[0023] ⑧将上述溶液放入离心管中,用离心机3000rpm离心30min,弃去上清,沉淀用半饱和硫酸铵洗1-2次,最后沉淀物溶于少量0.15M pH7.4的PBS中。

[0024] ⑨将上述溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测),12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,使用时,用磷酸盐缓冲液作1:1600倍稀释。

[0025]

上述辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12 相关试剂的配制:

①0.1M NaIO₄:称取241mg高碘酸钠溶于蒸馏水10ml中。

[0026] ②1mM pH4.4醋酸钠缓冲液:

{ 0.2M NaAc称取无水醋酸钠16.4g,加双蒸水200ml溶解,定容到1000ml。

[0027] 0.2M HAc量取11.55ml冰醋酸定容到1000ml。

[0028] 1mM pH4.4醋酸钠缓冲液:0.2M NaAc 195ml加0.2M HAc 305ml充分混匀。

[0029] ③0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液:

{ Na₂CO₃ 0.32g
NaHCO₃ 0.586g
加蒸馏水至50ml

使用工作液再用蒸馏水作20倍稀释,即成0.01M pH9.5的碳酸盐缓冲液。

[0030] ④稀释缓冲液:0.15M pH7.4 PBS:

A .0.2mol/L的NaH₂PO₄:称取NaH₂PO₄ · 2H₂O 31.2g加蒸馏水至1000ml溶液;

B .0.2mol/L的Na₂HPO₄:称取Na₂HPO₄ · 12H₂O 71.632g加蒸馏水至1000ml溶液;

0.15M pH7.4 PBS由292.5ml的A液加457.5ml B液充分混合,调节pH到7.4,并定容到1000ml。

[0031] ⑤NaBH₄溶液(4mg/ml):

临用时称取NaBH₄4mg溶于1ml蒸馏水中。

[0032]

本发明所述试剂盒及制备方法中,3A9单克隆抗体本质上为蛋白质,能特异识别无乳链球菌。

所述3A9的保藏的培养物名称为：一种产生抗罗非鱼无乳链球菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株3A9，保藏单位：中国典型培养物保藏中心；保藏地址：中国武汉市，武汉大学；保藏日期：2015年1月7日；保藏编号：CCTCC NO：C2014244。

[0033] 本发明所述检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒，检测标本为感染动物（如罗非鱼）的血清及脑、肝、脾、肾组织浸出液，所需仪器为酶标仪，使用方法如下：

在包被有3A9单克隆抗体的多孔板的孔中加入待检样品，37℃反应1小时后，洗涤液洗涤3次除去未反应物，加入HRP标记的单克隆抗体4C12，37℃作用1小时后洗涤除去未反应物，加入新鲜配制的3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺显色，室温显色时间为20分钟后加入终止液2 mol/L H₂SO₄ 50μL/孔终止反应，用酶标仪测所述多孔板各孔的OD₄₅₀值。

所述3A9的保藏的培养物名称为：一种产生抗罗非鱼无乳链球菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株3A9，保藏单位：中国典型培养物保藏中心；保藏地址：中国武汉市，武汉大学；保藏日期：2015年1月7日；保藏编号：CCTCC NO：C2014244。

所述4C12的保藏的培养物名称：一种产生抗罗非鱼无乳链球菌的单克隆抗体的杂交瘤细胞株4C12，保藏单位：中国典型培养物保藏中心；保藏地址：中国武汉市，武汉大学；保藏日期：2015年1月7日；保藏编号：CCTCC NO：C2014248。

[0034] 本发明具有以下有益效果：

1. 本发明使用的识别无乳链球菌的单克隆抗体3A9是我们从制备的多个单克隆抗体中筛选鉴定出来的，因此使本发明所述试剂盒检测无乳链球菌特异性效果更好。

[0035] 2. 使用本发明所述试剂盒进行无乳链球菌检测，操作简单，一个样品的检测只需5个小时左右。与传统的形态培养鉴定、生理生化鉴定等传统方法相比，使用本发明所述试剂盒可以进行早期诊断，而且具有更高的检测灵敏度。

[0036] 3. 与常用的间接ELISA相比，使用本发明所述试剂盒，能区分现症感染和既往感染，能做出是否感染无乳链球菌的直接判断，还可用于临床无乳链球菌病治疗效果的评价。

具体实施方式

[0037] 下面通过实施例对本发明所述检测无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (double antibody sandwich ELISA) 试剂盒及制备方法和使用方法做进一步说明。

[0038] 下述实施例中涉及的材料来源和制备方法如下：

3A9单克隆抗体和4C12单克隆抗体分别用3A9杂交瘤细胞株（保藏编号：CCTCC NO：C2014244）和4C12杂交瘤细胞株（保藏编号：CCTCC NO：C2014248）按常规方法制备；

辣根过氧化物酶 (HRP)、显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺、牛血清白蛋白均为Sigma公司产品；

1gG为经正辛酸一饱和硫酸铵粗提的4C12

其余常规试剂为国产分析纯级产品；

各种试液配制：

包被缓冲液配制：Na₂CO₃ 1.59 g, NaHCO₃ 2.93 g, 加双蒸水定容至1 000 mL, 4℃保存；

封闭液配制:脱脂奶粉5.0 g,加包被液定容至100 mL。

[0039] 稀释缓冲液配制:称取 KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58 g, NaCl 8.0 g,加三蒸水定容至1000 mL,灭菌后4℃保存备用。

[0040] 洗涤缓冲液配制: NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.58 g, Tween-20 0.5 mL,加双蒸水定容至1000 mL。

[0041] 底物缓冲液配制: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.68 g,柠檬酸0.93 g,加三蒸水定容至100 mL。

[0042] 3',3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)母液配制:称取TMB(四甲基联苯胺)200mg,加入100 mL无水乙醇溶解。

[0043] 显色液配制:取TMB母液500 μL ,底物缓冲液10mL,0.75% H_2O_2 32 μL 混匀。

[0044] 终止液配制:量取2M浓 H_2SO_4 22.2 mL,蒸馏水177.8 mL混合(操作小心)。

[0045] 多孔板为市售96孔的酶标检测用多孔板。

[0046]

实施例1

本实施例中,采用以下工艺步骤制备检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0047] (1)制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板

用碳酸盐缓冲液即包被液将3A9单克隆抗体稀释为浓度10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的稀释液,然后将所述3A9单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,置于4℃包被至少12小时,包被时间届满后,将质量浓度5%的脱脂奶粉溶液加入多孔板的各孔内,并在37℃进行封闭反应,封闭反应时间至少1小时以上,封闭反应结束后,用洗涤缓冲液洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有3A9单克隆抗体的多孔板,其保存温度为4℃。

[0048] (2)制备辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体4C12

按常规方法:用杂交瘤细胞制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为4.34mg/mL,单克隆抗体至-20℃保存备用。

[0049] HRP标记4C12步骤如下:

①称取5mg辣根过氧化物酶溶解于1ml蒸馏水中。

[0050] ②于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO_4 溶液,冰浴下避光搅拌15分钟。

[0051] ③将上述溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液3次。

[0052] ④加20 μl 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后立即加入10mg 1gG(经正辛酸一饱和硫酸铵粗提的4C12和经Protein G亲和层析纯化的4C12),冰浴避光搅拌2小时。

[0053] ⑤加0.1ml新配的4mg/ml NaBH_4 液,混匀,再置4℃2小时。

[0054] ⑥将上述液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液3次。

[0055] ⑦在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置4℃2小时。

[0056] ⑧3000rpm离心30min,弃去上清。沉淀用半饱和硫酸铵洗1-2次,最后沉淀物溶于

少量0.15M pH7.4的PBS中。

[0057] ⑨将上述溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测),12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,使用时,用稀释缓冲液(同上)作1:1600倍稀释。

[0058] (3)用底物缓冲液配制3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺底物显色液20000μL。

[0059] 所述显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺为市售商品,可直接从市场购买。

上述方法中,制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板时,所述3A9单克隆抗体稀释液的加入量为每孔100 μL,所述辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体4C12稀释液的加入量为100μL/孔,所述质量浓度5%的脱脂奶粉溶液的加入量为100μL/孔。

[0060] 本发明所述试剂盒及制备方法中,3A9单克隆抗体本质上为蛋白质,能特异识别无乳链球菌。

[0061] 本发明所述检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,检测标本为感染动物(如罗非鱼)的血清及脑、肝、脾、肾组织浸出液,所需仪器为酶标仪,使用方法如下:

在包被有3A9单克隆抗体的多孔板的孔中加入待检样品,37 °C反应1 小时后,洗涤液洗涤3次除去未反应物,加入HRP标记的单克隆抗体4C12,37 °C作用1小时后洗涤除去未反应物,加入新鲜配制的3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺显色,室温显色时间为20分钟后加入终止液2 mol/L H₂SO₄ 50μL/孔终止反应,用酶标仪测所述多孔板各孔的OD₄₅₀值。

[0062] 用本实施例制备的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒对无乳链球菌和阴性血清进行检测,操作如下:

将无乳链球菌和阴性血清用稀释缓冲液(同上)稀释成表1中的稀释倍数;用碳酸缓冲液(同上)将3A9单克隆抗体稀释为浓度10.0μg/mL的稀释液;将酶标4C12用稀释缓冲液(同上)作1:1600倍稀释;空白对照为稀释缓冲液(同上)。

[0063] 向包被有3A9单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入不同稀释倍数的无乳链球菌、阴性血清和对照稀释盐缓冲液(PBS)。加入量为每孔100 μL。在37 °C反应1 小时后,用洗涤液洗涤3次除去未反应物,加入HRP标记的单克隆抗体4C12,37 °C作用1小时后洗涤除去未反应物,加入新鲜配制的3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺显色,室温显色时间为20分钟后加入终止液2 mol/L H₂SO₄ 50μL/孔终止反应,用酶标仪测所述多孔板各孔的OD₄₅₀值。检测结果见表1:

表1 检测结果

无乳链球菌浓度	无乳链球菌 OD ₄₅₀ 值	阴性值 OD ₄₅₀ 值	PBS 空白对照
10 ⁸	0.94±0.037	0.153±0.007	0.088±0.001
2×10 ⁷	0.74±0.019	0.134±0.005	
4×10 ⁶	0.664±0.027	0.118±0.011	
8×10 ⁵	0.41±0.110	0.132±0.006	
1.6×10 ⁵	0.392±0.016	0.157±0.12	
3.2×10 ⁴	0.261±0.033	0.117±0.007	
6.4×10 ³	0.185±0.010	0.123±0.010	
1.28×10 ³	0.127±0.007	0.127±0.004	

从表1的检测结果可以看出随着检测标本中无乳链球菌浓度的降低,OD₄₅₀值也随之降低,空白对照的OD₄₅₀值则远低于检测无乳链球菌的OD₄₅₀值。

[0064] 实施例2

与实施例1的不同在于用阴阳临界值(OD₄₅₀平均值)作为判断检测样本中有无无乳链球菌的标准。

[0065] 本实施例中,采用以下步骤制备检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0066] (1) 制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板

用碳酸盐缓冲液即包被液(同上)将3A9单克隆抗体稀释为浓度10.0μg/mL的稀释液,然后将所述3A9单克隆抗体稀释液加入多孔板的各孔内,置于4℃包被至少12小时,包被时间届满后,将质量浓度5%的脱脂奶粉溶液加入多孔板的各孔内,并在37℃进行封闭反应,封闭反应时间至少1小时以上,封闭反应结束后,用洗涤缓冲液(同上)洗涤多孔板,当多孔板上的未反应物被去除后即获得包被有3A9单克隆抗体的多孔板,其保存温度为4℃(一般在4℃冰箱保存备用)。

[0067] (2) 制备辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体4C12

按常规方法:用杂交瘤细胞制备小鼠腹水单克隆抗体4C12,用正辛酸一饱和硫酸铵法提纯,以BCA蛋白浓度测定试剂盒检测得单克隆抗体4C12的浓度为4.34mg/mL,单克隆抗体至-20℃保存备用。

[0068] HRP标记4C12步骤如下:

①称取5mgHRP溶解于1ml蒸馏水中。

[0069] ②于上液中加入0.2ml新配的0.1M NaIO₄溶液,冰浴下避光搅拌15分钟。

[0070] ③将上述溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4小时换液一次,期间换液5次。

[0071] ④加20μl 0.2M pH9.5碳酸盐缓冲液,使以上醛化HRP的pH升高到9.0~9.5,然后

立即加入10mg 1gG (经正辛酸一饱和硫酸铵粗提的4C12和经Protein G亲和层析纯化的4C12),冰浴避光搅拌2小时。

[0072] ⑤加0.1ml新配的4mg/ml NaBH_4 液,混匀,再置4℃2小时。

[0073] ⑥将上述液装入透析袋中,用0.15M pH7.4 PBS透析,4小时换液一次,期间换液5次。

[0074] ⑦在冰浴搅拌下逐滴缓慢加入等体积饱和硫酸铵,置4℃ 2小时。

[0075] ⑧3000rpm离心30min,弃去上清。沉淀用半饱和硫酸铵洗2次,最后沉淀物溶于少量0.15M pH7.4的PBS中。

[0076] ⑨将上述溶液装入透析袋中,用0.15M pH7.4的PBS缓冲盐水透析,去除铵离子后(用茚氏试剂检测),12000rpm离心30分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,即酶标4C12,使用时,用稀释缓冲液(同上)作1:1600倍稀释。

[0077] (3)用底物缓冲液配制3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺底物显色液20000 μL 。

[0078] 所述显色底物3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺为市售商品,可直接从市场购买。

上述方法中,制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板时,所述3A9单克隆抗体稀释液的加入量为每孔100 μL ,所述辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体4C12稀释液的加入量为100 μL /孔,所述质量浓度5%的脱脂奶粉溶液的加入量为100 μL /孔。

[0079] 本发明所述试剂盒及制备方法中,3A9单克隆抗体本质上为蛋白质,能特异识别无乳链球菌。

[0080] 本发明所述检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒,检测标本为感染动物(如罗非鱼)的血清及脑、肝、脾、肾组织浸出液,所需仪器为酶标仪,使用方法如下:

在包被有3A9单克隆抗体的多孔板的孔中加入待检样品,37℃反应1小时后,洗涤液洗涤3次除去未反应物,加入HRP标记的单克隆抗体4C12,37℃作用1小时后洗涤除去未反应物,加入新鲜配制的3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺显色,室温显色时间为20分钟后加入终止液2 mol/L H_2SO_4 50 μL /孔终止反应,用酶标仪测所述多孔板各孔的 OD_{450} 值。

[0081] 用本实施例制备的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒对无乳链球菌和阴性血清进行检测,操作如下:

将无乳链球菌和阴性血清用稀释缓冲液(同上)稀释成表1中的稀释倍数;用碳酸缓冲液(同上)将3A9单克隆抗体稀释为浓度10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的稀释液;将酶标4C12用稀释缓冲液(同上)作1:1600倍稀释;空白对照为稀释缓冲液(同上)。

[0082] 向包被有3A9单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入不同稀释倍数的无乳链球菌、阴性血清和对照稀释盐缓冲液(PBS)。加入量为每孔100 μL 。在37℃反应1小时后,用洗涤液洗涤3次除去未反应物,加入HRP标记的单克隆抗体4C12,37℃作用1小时后洗涤除去未反应物,加入新鲜配制的3'.3'.5,5'-四甲基联苯胺显色,室温显色时间为20分钟后加入终止液2 mol/L H_2SO_4 50 μL /孔终止反应,用酶标仪测所述多孔板各孔的 OD_{450} 值。

[0083] 按照实施例2所述的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测操作方法,向包被有3A9单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入阴性血清、阳性对照血清和空白对照(PBS,同上)检测样品,检测10份阴性血清样本,以及阳性对照血清和空白对照,每份重复3孔,结果见表2,计算出其 OD_{450} 的平均值及标准方差分别为:平均值(X)为 0.1484,

标准差(S)为 0.0201,空白对照的数值为 0.088 ± 0.001 ,根据公式 $X + 3S$ 计算得:阳性和阴性的结果判断的临界值为 0.21,即在阴阳性对照成立的情况下,OD₄₅₀大于0.21就可以判定为无乳链球菌阳性,否则,判为阴性。

[0084] 表2 阴性样本的测定结果

Table 5-5 Results of Detection the negative sera

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD值	0.131	0.125	0.123	0.156	0.159	0.164	0.146	0.151	0.14	0.189

判断检测样本中无乳链球菌阴阳临界值(OD₄₅₀平均值)的确定。按照实施例1所述的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测操作方法,向包被有3A9单克隆抗体的多孔板的各列孔中分别加入阴性血清、阳性对照血清和空白对照(PBS,同上)检测样品,检测10份阴性血清样本,以及阳性对照血清和空白对照,每份重复3孔,结果见表2,计算其OD₄₅₀的平均值及标准方差。阴阳性临界值=阴性样本OD₄₅₀平均值+3×标准方差。经计算阴性血清OD₄₅₀平均值(X)=0.08427,标准方差(S)=0.015252。所以,阴阳性临界值=0.08427+3×0.015252=0.130 因此把判断检测样本中大片吸虫抗原阴阳临界值定为0.130。用所述的检测大片形吸虫双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测样本时,在阴阳对照成立的情况下,OD₄₅₀大于0.130就可以判定为大片吸虫抗原阳性,否则,判为阴性。

[0085]

表2 阴性血清、阳性对照血清OD₄₅₀值测定结果

血清样品	平均值	血清样品	平均值
1	0.085 ± 0.004	6	0.092 ± 0.016
2	0.092 ± 0.004	7	0.110 ± 0.001
3	0.085 ± 0.011	8	0.049 ± 0.004
4	0.074 ± 0.001	9	0.084 ± 0.002
5	0.085 ± 0.006	10	0.086 ± 0.001
空白对照 Blank	0.049 ± 0.004	阳性对照 Positive	1.501 ± 0.089

实施例3

与实施例1和实施例2的不同在于用阴阳临界值(OD₄₅₀平均值)来判断对无乳链球菌的特异性检测效果。

[0086] 按照实施例1所述的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测方法,检测无乳链球菌、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、荧光假单胞菌(*P. Fluorescens*)、豚鼠单胞菌(*Aeromonas caviae*)、铜绿假单胞菌(*P. Aeruginosa*)和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzer*)并用SP2/0细胞(骨髓瘤细胞)作阴性对照,进行特异性验证测定,结果见表3。

[0087] 表3 检测结果

T

菌液浓度(CFU/ml)	1.5×10^8
无乳链球菌	1.021 ± 0.072
鳃弧菌	0.088 ± 0.007
嗜水气单胞菌	0.130 ± 0.003

荧光假单胞菌	0.120 ± 0.053
豚鼠气单胞菌	0.132 ± 0.013
铜绿假单胞菌	0.123 ± 0.009
施氏假单胞菌	0.115 ± 0.017
阴性对照	0.121 ± 0.043

从表3的结果可以看出,无乳链球菌的 OD_{450} 值为 1.021 ± 0.072 ,高于阴阳临界值(阴阳临界值为0.21),为阳性判断,而鳃弧菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、豚鼠单胞菌、铜绿假单胞菌、施氏假单胞菌检测到的 OD_{450} 值都远低于阴阳临界值,证明用所述的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测鳃弧菌、嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、豚鼠单胞菌、铜绿假单胞菌、施氏假单胞菌时,不与这些抗原发生交叉反应,说明所述的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒具有良好的检测特异性。

[0088]

实施例4

与实施例1-3的不同在于用阴阳临界值(OD_{450} 平均值)来判断被检测不同临床样品中有无无乳链球菌。

[0089] 采用无乳链球菌回归感染的方法,用罗非鱼人工感染无乳链球菌,感染剂量为 1.5×10^5 CFU(每毫升样品中含有的细菌群落总数)/尾,感染12小时后采集感染罗非鱼的肝脏、脾脏,按照实施例1所述的检测无乳链球菌双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒检测方法检测30份肝脾的组织浸出液样本,结果见表4。

[0090] 从表4检测结果可知,按照实验确定的阴阳临界 OD_{450} 值(见实施例2)为0.21,实验的阴阳对照和空白对照成立,在所检测的30份肝脾的组织浸出液样本,都能再肝脏或(和)脾脏检测到无乳链球菌,检测数据结果见表4。

[0091]

表4 检测结果

鱼 编 号	肝组织浸出液 OD_{450} 值	脾组织浸出液 OD_{450} 值
1	0.859	0.122
2	0.226	0.115
3	1.117	0.168
4	0.363	0.148
5	0.398	0.128
6	0.155	0.643
7	0.152	0.359
8	0.143	0.652
9	0.262	0.281
10	0.129	0.336
11	0.429	0.194
12	0.092	0.192
13	0.118	0.270
14	0.215	0.189

15	0.117	0.244
16	0.094	0.219
17	0.309	0.267
18	0.882	0.151
19	0.079	0.412
20	0.066	0.250
21	0.080	0.318
22	0.113	1.154
23	0.084	0.406
24	0.068	0.210
25	0.846	0.404
26	0.210	0.580
27	0.135	0.253
28	0.103	0.570
29	0.186	0.377
30	0.155	0.643
阴性	0.105	0.145
阴性	0.155	0.130

本发明不局限于以上所述的具体实施方式,以上所述仅为本发明较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明保护范围之内。

专利名称(译)	检测无乳链球菌的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒		
公开(公告)号	CN106442997A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201510921656.1	申请日	2015-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学 广西壮族自治区水产科学研究院		
申请(专利权)人(译)	广西大学 广西壮族自治区水产科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学 广西壮族自治区水产科学研究院		
[标]发明人	陈汉忠 梁万文 李旻 王凯 陈明 吴文德 王瑞		
发明人	陈汉忠 梁万文 李旻 王凯 陈明 吴文德 王瑞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56944 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的双抗体夹心酶联免疫吸附测定 (double antibody sandwich ELISA) 试剂盒，由包被有3A9单克隆抗体的多孔板、辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12和显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 组成。上述试剂盒的制备方法有以下工艺步骤：(1) 制备包被有3A9单克隆抗体的多孔板；(2) 制备辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体4C12；(3) 配备显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

无乳链球菌浓度	无乳链球菌 OD ₄₉₀ 值	阴性值 OD ₄₉₀ 值	BBS 空白对照
10 ⁸	0.94±0.037	0.153±0.007	0.088±0.001
2×10 ⁷	0.74±0.019	0.134±0.005	
4×10 ⁶	0.664±0.027	0.118±0.011	
8×10 ⁵	0.41±0.110	0.132±0.006	
1.6×10 ⁵	0.392±0.016	0.157±0.12	
3.2×10 ⁴	0.261±0.033	0.117±0.007	
6.4×10 ³	0.185±0.010	0.123±0.010	
1.28×10 ³	0.127±0.007	0.127±0.004	