



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105717299 A

(43)申请公布日 2016.06.29

(21)申请号 201610065704.6

(22)申请日 2016.02.01

(71)申请人 贵州大学

地址 550025 贵州省贵阳市贵州大学花溪
北校区科技处

(72)发明人 程振涛 吴燕 岳筠 文明
周碧君 王开功

(74)专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100

代理人 吴无惧

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

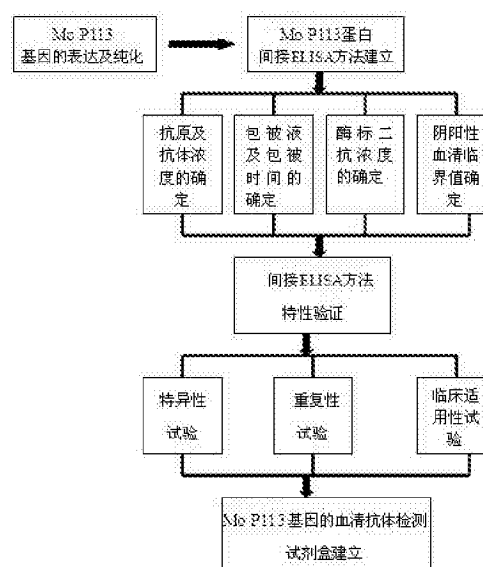
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒
及使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒及使用方法。基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒原料及配方为：包被Mo P113蛋白的酶标板、Mo标准阳性和标准阴性血清、酶标二抗、50×PBST缓冲液、底物液A、底物液B和终止液。本发明能检测羊血清Mo感染抗体和疫苗免疫抗体，将为Mo引起的山羊和绵羊支原体性肺炎的早期监测、疫苗免疫效果评价及相关研究工作提供关键技术，对本病原所致疫病的早发现早防控具有重要意义。



1. 一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:间接ELISA试剂盒的原料配方为:包被酶标板1~5个,Mo标准阳性血清0.5~1.5mL、Mo标准阴性血清0.5~1.5mL、酶标二抗300~500 μ L、50 \times PBST缓冲液20~25mL、底物液A 10mL~15mL、底物液B 10mL~15mL和终止液10mL~15mL。

2. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:包被酶标板为重组蛋白包被,重组蛋白为Mo P113基因通过大肠杆菌Rosseta(DE3)表达系统获得P113重组蛋白,并通过镍柱法蛋白纯化试剂盒进行重组蛋白纯化,使用包被缓冲液稀释为1.5 μ g ~3.5 μ g /100 μ L,室温包被酶标板12h;3g/100mL的BSA溶液,37 $^{\circ}$ C封闭ELISA反应板1.5h后即为包被酶标板。

3. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:Mo标准阳性血清应用绵羊肺炎支原体GZ-QX1株免疫山羊获得的高免血清,按1:100稀释。

4. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:Mo标准阴性血清为采集自Mo血清抗体阴性的山羊血清,按1:100稀释。

5. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:所述酶标二抗为兔抗羊IgG-HRP,按1:2000稀释使用。

6. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:所述50 \times PBST缓冲液为:NaCl 400.0 g、KCl 10.0 g、KH₂PO₄ 10.0 g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 145 g、Tween-20 25 mL溶于400~500mL蒸馏水,调整pH为7.2~7.6,定容至1000 mL。

7. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:所述底物液A为Na₂HPO₄ 14.60 g、柠檬酸 9.33 g、过氧化氢脲 0.52 g,溶于三蒸水,并定容至1000 mL,调至pH 5.0~5.4,所述底物液B为TMB 20mg、无水乙醇8~10 mL,加双蒸水至1 000 mL,过滤除菌,无菌分装。

8. 根据权利要求1所述一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,其特征在于:所述终止液为0.2 %~0.3% HF溶液。

9. 如权利要求1所述的一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒的使用方法,其特征在于:包含以下步骤:

第一,取包被酶标板,应用PBST洗涤ELISA反应板5次;

第二,将阴、阳性对照血清及待检血清做1:100倍稀释,按100 μ L加入酶标板反应孔中,37 $^{\circ}$ C孵育1h后,应用PBS洗涤ELISA酶标板各反应孔5次;

第三,将兔抗羊IgG-HRP用PBST做1:2000倍稀释,按100 μ L加入酶标板反应孔,37 $^{\circ}$ C作用1h后,应用PBST洗涤酶标板反应孔5次;

第四,将底物液A和B各50 μ L加入ELISA反应板,避光室温显色10~15min,加入50 μ L终止液,立即在酶标仪630nm波长下读取OD值;

第五,试验成立条件为阳性血清OD₆₃₀平均值 \geq 2.846,阴性血清OD₆₃₀平均值 $<$ 1.627;试验结果判定标准为待检样本OD₆₃₀值 \geq 2.325为阳性,待检样本OD₆₃₀值 $<$ 2.325为阴性。

一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒及使用方法。

背景技术

[0002] 绵羊肺炎支原体是致山羊和绵羊发生慢性呼吸道传染疾病及影响养羊业发展的重要疫病的主要病原菌之一,常危害1~3月龄羔羊,羊群感染后表现呼吸障碍、流鼻涕、渐进性消瘦、生长发育迟缓及间质性肺炎等慢性非典型性肺炎症状(Engin BaIikci,2008)。1963年Mackay等首次在绵羊体内分离得到绵羊肺炎支原体,随后Cottew从患肺炎的澳大利亚绵羊体内分离到相同的病原菌,Carmicheal分离到具有致病性的这种新型支原体,且命名为绵羊肺炎支原体(Mackay J M K, 1963;G S. Cottew, 1971;Carmichael L E, 1972)。1978年我国首次从由新西兰等地引进的种羊体内分离到此病原,此后在我国贵州、云南、甘肃、湖南等多个省市都有此病报道(胡景韶,1982;李媛,2007)。绵羊肺炎支原体引发的早期支原体肺炎病例患病率高、死亡率低,长时间以来未曾引起人们的重视,但近年调查发现,该病死亡率呈不断上升趋势,给养羊业带来严重的经济损失(张双翔,2013)。

[0003] 对绵羊肺炎支原体的防控,目前主要依靠药物预防,尚缺乏可靠的疫苗,究其原因与Mo分离培养费时费力及基因组研究缓慢有关(侯相山等,2006;赵萍等,2008)。临床疫苗(羊传染性胸膜肺炎灭活疫苗)应用也显示对Mo感染流行病例疫苗免疫防控效果不佳,给养羊业带来严重的经济损失(张双翔,2012)。且目前缺乏疫病检测与防控所需的快速血清学检测手段,尤其可高通量检测、敏感性高的ELISA方法。Mo P113蛋白是一种重要的黏附分子和膜表面免疫原,黏附分子与病原致病力具有相关性,可作为亚单位疫苗及血清学诊断技术研究的靶蛋白(张亚宁,2013;Simionatto S,2012;张悦,2013;韦艳娜,2013)。而P113蛋白较大,全基因表达易形成包涵体,影响表达效率,选用其相对稳定C末端基因可有效检测该蛋白的抗原性等特征。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题在于,选取核苷酸同源性较高的Mo贵州分离株,通过Mo P113基因原核表达载体的构建与表达,建立基于表达产物Mo P113蛋白的间接ELISA方法,并进行条件优化,制备成商品化间接ELISA试剂盒。该间接ELISA试剂盒的发明,将为Mo引起的山羊和绵羊间质性肺炎疫病的早期监测、免疫效果评价提供关键技术,对本病原所致疫病的早发现早防控具有重要意义。

[0005] 本发明的技术方案为:一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒,间接ELISA试剂盒的原料配方为:包被酶标板1~5个,Mo标准阳性血清0.5~1.5mL、Mo标准阴性血清0.5~1.5mL、酶标二抗300~500 μ L、50 \times PBST缓冲液20~25mL、底物液A 10mL~15mL、底物液B 10mL~15mL和终止液10mL~15mL。

[0006] 包被酶标板为重组蛋白包被,重组蛋白为Mo P113基因通过大肠杆菌Rosetta(DE3)表达系统获得P113重组蛋白,并通过镍柱法蛋白纯化试剂盒进行重组蛋白纯化,使用

包被缓冲液稀释为 $1.5\mu\text{g} \sim 3.5\mu\text{g} / 100\mu\text{L}$,室温包被酶标板12h。 $3\text{g} / 100\text{mL}$ 的BSA溶液, 37°C 封闭ELISA反应板1.5h后即包被酶标板。

[0007] Mo标准阳性血清应用绵羊肺炎支原体GZ-QX1株免疫山羊获得的高免血清,按1:100稀释。

[0008] Mo标准阴性血清为采集自Mo血清抗体阴性的山羊血清,按1:100稀释。

[0009] 所述酶标二抗为兔抗羊IgG-HRP,按1:2000稀释使用。

[0010] 所述 $50\times\text{PBST}$ 缓冲液为:NaCl 400.0 g 、KCl 10.0 g 、 KH_2PO_4 10.0 g 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 145 g 、Tween-20 25 mL 溶于 $400\sim 500\text{mL}$ 蒸馏水,调整pH为 $7.2\sim 7.6$,定容至 1000 mL 。

[0011] 所述底物液A为 Na_2HPO_4 14.60 g 、柠檬酸 9.33 g 、过氧化氢脲 0.52 g ,溶于三蒸水,并定容至 1000 mL ,调至pH $5.0\sim 5.4$ 。所述底物液B为TMB 20mg 、无水乙醇 $8\sim 10\text{ mL}$,加双蒸水至 1000 mL ,过滤除菌,无菌分装。

[0012] 所述终止液为 $0.2\%\sim 0.3\%$ HF溶液。

[0013] 一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒的使用方法,包含以下步骤:

第一,取包被酶标板,应用PBST洗涤ELISA反应板5次;

第二,将阴、阳性对照血清及待检血清做1:100倍稀释,按 $100\mu\text{L}$ 加入酶标板反应孔中, 37°C 孵育1h后,应用PBS洗涤ELISA酶标板各反应孔5次;

第三,将兔抗羊IgG-HRP用PBST做1:2000倍稀释,按 $100\mu\text{L}$ 加入酶标板反应孔, 37°C 作用1h后,应用PBST洗涤酶标板反应孔5次;

第四,将底物液A和B各 $50\mu\text{L}$ 加入ELISA反应板,避光室温显色 $10\sim 15\text{min}$,加入 $50\mu\text{L}$ 终止液,立即在酶标仪 630nm 波长下读取OD值。

[0014] 第五,试验成立条件为阳性血清OD₆₃₀平均值 ≥ 2.846 ,阴性血清OD₆₃₀平均值 < 1.627 ;试验结果判定标准为待检样本OD₆₃₀值 ≥ 2.325 为阳性,待检样本OD₆₃₀值 < 2.325 为阴性。

[0015] 本发明有益效果:本发明方法适用于检测羊Mo感染抗体和免疫抗体,能够体现动物体内Mo感染水平或疫苗免疫效果,将为Mo引起的山羊和绵羊间质性肺炎疫病的早期检测、免疫效果评价及后续研究工作提供关键技术,对本病原所致疫病的早发现早防控具有重要意义,改变本病免疫防控监测缺乏商品化ELISA试剂盒的局面。本发明与现有技术相比,具有以下的技术优势和积极效果:

(1)效果好:试剂盒能够较好的体现机体Mo感染水平或疫苗免疫水平;本试剂盒相对于全菌蛋白包被,其敏感性、特异性更高,为Mo引起的山羊和绵羊间质性肺炎的早期监测、疫苗免疫效果评价具有重要意义。

[0016] (2)制备简单、生产成本低:本试剂盒相对于全菌蛋白包被,解决了Mo培养困难、培养周期长等问题,且保证了试剂盒批次间可重复性、一致性,重组蛋白的大批量生产、纯化成本低,周期短,提高了市场推广可能。

[0017] (3)经济、社会效益高:试剂盒的开发有效填补商品化试剂盒的缺失,且市场前景广阔,在内蒙古、新疆、贵州等山羊养殖区域具有广泛应用前景,可简化Mo所致疫病程序,提高疫苗免疫效果,试剂盒的生产应用将产生良好的经济和社会效益。

附图说明

[0018] 图1为本发明的Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒制备生产流程图。

具体实施方式

[0019] 本发明的实施例：

基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒原料及配方为：

酶标板；Mo标准阳性和标准阴性血清；重组蛋白为Mo P113基因通过大肠杆菌Rosseta (DE3)表达系统获得P113蛋白，并通过镍柱法蛋白纯化试剂盒进行重组蛋白纯化，纯化蛋白经包被缓冲液稀释为 $1.5\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ；包被缓冲液： Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g溶于去离子水中，定容至1000mL，调至 pH 9.5~9.8；酶标二抗：兔抗羊IgG-HRP；1×PBST缓冲液： NaCl 8.0g、 KCl 0.2g、 KH_2PO_4 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、Tween-20 0.5mL溶于800mL蒸馏水，调整pH为7.2~7.6，定容至1000mL；封闭缓冲液：1g~5g明胶溶于10mL PBST缓冲液；底物液A： Na_2HPO_4 14.60g、柠檬酸 9.33 g、过氧化氢脲 0.52 g，溶于三蒸水，并定容至1 000 mL，调至 pH 5.0~5.4；底物液B：TMB 20mg、无水乙醇10 mL，加双蒸水至1 000 mL，过滤除菌，无菌分装；终止液：0.2 %~0.3 % HF溶液；

如图1所示意，本发明的间接ELISA试剂盒的制备方法为：

第一，原核表达系统表达Mo P113蛋白，并经镍柱亲和层析纯化得到蛋白浓度为0.158 mg/mL。应用SDS-PAGE分析其纯化效果。

[0020] 第二，步骤一的纯化融合蛋白P113作为包被抗原，并优化间接ELISA反应条件，间接ELISA方法最佳反应条件为：抗原包被液浓度 $1.5\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ；抗原包被条件室温12h；封闭液1%明胶，封闭时间1h；阳性、阴性和待检血清稀释度1:100；酶标二抗稀释浓度1:2000；显色反应时间15min。

[0021] 第三，取92份已知Mo抗体阴性的羊血清，按步骤二确定的最佳反应条件，进行间接ELISA反应确定其判定标准。样本 OD_{630} 值 \geq 阴性样本 OD_{630} 值的平均值(X)+3(SD)=2.325，可在99%的水平上判为阳性。因此当样本 OD_{630} 值 \geq 2.325时，判为阳性；当样本 OD_{630} 值 $<$ 2.325时，判为阴性；

第四，基于重组Mo P113蛋白间接ELISA试剂盒的最佳使用步骤与方法为：

① 取包被酶标板，应用PBST洗涤ELISA反应板5次；② 将阳性血清、阴性血清和待检血清用PBST做1:100倍稀释，按100 μL 加入ELISA反应板，37℃作用1h后，用PBS洗涤ELISA反应板5次；③ 将兔抗羊IgG-HRP用PBST做1:2000倍稀释，以100 μL 加入ELISA反应板，37℃作用1h后，应用PBST洗涤ELISA反应板5次；④ 将底物液A和B各50 μL 加入ELISA反应板，避光室温显色15min，加入50 μL 终止液，立即在酶标仪630nm波长下读取OD值。⑤ 试验结果判定标准为样本 OD_{630} 值 \geq 2.325为阳性， OD_{630} 值 $<$ 2.325为阴性。

[0022] 第五，应用步骤二~四建立的间接ELISA方法，检测Mo标准阳性血清的 OD_{630} 值为2.846；而检测丝状支原体山羊亚种、弓形虫、口蹄疫、山羊痘、蓝舌病等标准阳性血清的 OD_{630} 值均显示阴性值，说明建立的间接 ELISA特异性良好；

第六，应用步骤二~四建立的间接ELISA方法，批内及批间重复性试验变异系数为均 \leq 15.0%，确定该间接ELISA批内重复性及批间重复性良好；

第七，应用步骤二~四建立的间接ELISA方法，检测184份临床羊血清样本，阳性率为

39.67%(73/184),确定其临床适用性良好。

[0023] 第八,步骤五、步骤六和步骤七合格即制得基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒。

[0024] 以上第一至第七步骤中按照原料配比进行。

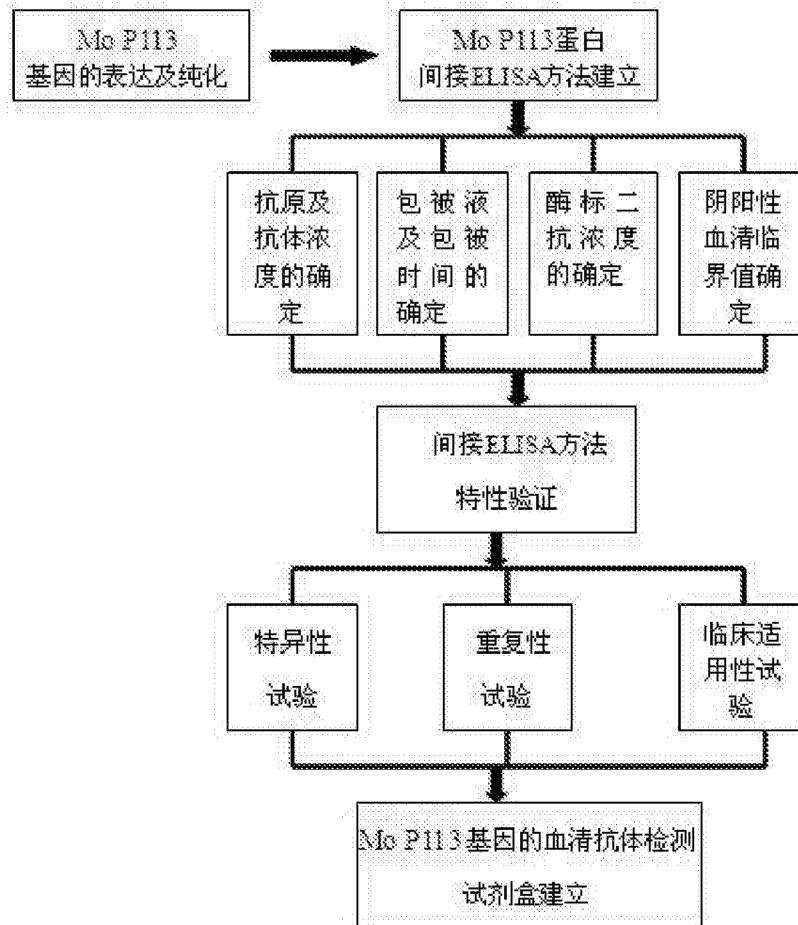


图1

专利名称(译)	一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN105717299A	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201610065704.6	申请日	2016-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	贵州大学		
申请(专利权)人(译)	贵州大学		
当前申请(专利权)人(译)	贵州大学		
[标]发明人	程振涛 吴燕 岳筠 文明 周碧君 王开功		
发明人	程振涛 吴燕 岳筠 文明 周碧君 王开功		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/68 G01N21/78 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒及使用方法。基于Mo P113蛋白的间接ELISA试剂盒原料及配方为：包被Mo P113蛋白的酶标板、Mo标准阳性和标准阴性血清、酶标二抗、50×PBST缓冲液、底物液A、底物液B和终止液。本发明能检测羊血清Mo感染抗体和疫苗免疫抗体，将为Mo引起的山羊和绵羊支原体性肺炎的早期监测、疫苗免疫效果评价及相关研究工作提供关键技术，对本病原所致疫病的早发现早防控具有重要意义。

