



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103048444 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 17

(21) 申请号 201210525105. X

(22) 申请日 2012. 11. 29

(71) 申请人 塔里木大学

地址 843300 新疆维吾尔自治区阿拉尔市虹
桥南路 1 号塔里木大学

(72) 发明人 王帅 马春晖 胡建军 席琳乔
王连群 陈根元

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

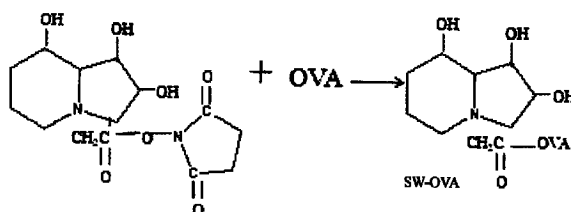
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法
及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法及试剂盒,采用间接 ELISA 法检测家兔血清抗苦马豆素抗体,包括以下步骤:(1) 包被;(2) 封闭;(3) 添加待检血清及阳性、阴性血清;(4) 添加酶标二抗;(5) 添加底物溶液;(6) 终止。通过该方法的实施,达到对家兔免疫效果的快速、敏感、准确的判断,操作方法简单易行,适用于科研院所和基层畜牧系统。



1. 一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法, 其特征在于, 间接 ELISA 法检测家兔血清抗苦马豆素抗体, 包括以下步骤:

(1) 包被: 使用抗原包被缓冲液将苦马豆素人工抗原稀释到工作浓度, 加入 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

(2) 封闭: 将孔内抗原液弃去, 加入 PBST 洗涤液, 每孔 200 μ L, 振荡 30s 后弃去孔内液体, 拍干, PBST 洗涤液的配制方法: 十二水磷酸氢二钠 2.9g, 无水磷酸氢二钾 0.2g, 氯化钠 8.0g, 氯化钾 0.2g, 吐温-200.5mL, 溶解于 1000mL 蒸馏水; 重复洗涤 3 次后, 每孔加入 20g/L 明胶溶液, 将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 1h 进行封闭;

(3) 添加待检血清及阳性、阴性血清: 弃去孔内明胶溶液, 洗涤 3 次后, 向每孔加入 100 μ L 工作浓度的待检血清、阳性血清和阴性血清, 并以 PBS 溶液为空白对照, 将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 1h;

(4) 添加酶标二抗: 弃去孔内血清, 洗涤 3 次后, 向每孔加入 100 μ L 工作浓度的 HRP-羊抗兔酶标抗体, 将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 1h;

(5) 添加底物溶液: 弃去孔内溶液, 洗涤 3 次后, 向每孔加入 100 μ L 底物溶液, 底物使用四甲基联苯胺, 即 TMB, 配置方法为: 底物显色 A 液: 无水醋酸钠 13.6g, 柠檬酸 1.6g, 30% 双氧水 0.3mL, 用蒸馏水定容于 500mL; 底物显色 B 液: 乙二胺四乙酸二钠 0.2g, 柠檬酸 0.95g, 甘油 50mL, 0.15g TMB, 3mL DMSO, 用蒸馏水定容于 500mL, 使用时 AB 液等量混合, 将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 30min;

(6) 终止: 将酶标板拿出培养箱后, 立即向每孔加入 2mol/LH₂SO₄ 溶液终止反应, 立即使用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 以待检血清 OD₄₅₀ 值 (P) 和阴性血清 OD₄₅₀ 值 (N) 的比值 (P/N) $\geq$ 2.1 判定样品为阳性。

2. 根据权利要求 1 所述的家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法, 其特征在于, 所述的步骤 (1) 中, 包被抗原选择为 SW-OVA, 工作浓度为 10 μ g/mL, 抗原包被缓冲液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液, 配置方法为 2.93g 碳酸氢钠和 1.95g 碳酸钠溶解于 1000mL 蒸馏水。

3. 根据权利要求 1 所述的家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法, 其特征在于, 所述的步骤 (3) 中, 血清稀释度为 1 : 200, 稀释液选用包被缓冲液。

4. 根据权利要求 1 所述的家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法, 其特征在于, 所述的步骤 (4) 中, 酶标二抗稀释度为 1 : 1500, 稀释液选用包被缓冲液。

5. 根据权利要求 1 所述的家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法, 其特征在于, 所述的步骤 (5) 中, 底物更换为四甲基联苯胺二盐酸, 即 TMB $\cdot$ 2HCl, 在底物显色 B 液中弃去 DMSO。

6. 一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测试剂盒, 其特征在于, 试剂盒中包括已包被完全的 96 孔酶标板 (包被抗原为 10 μ g/mL 的 SW-OVA)、阳性血清 (抗体效价 2¹² ~ 2¹⁴)、阴性血清、HRP-羊抗兔酶标抗体 PBS 溶液、PBST 洗涤液、底物显色 A 液、底物显色 B 液、终止液。

一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,涉及一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 疯草 (locoweed) 是豆科 (Leguminosae) 棘豆属 (Oxytropis) 和黄芪属 (Astragalus) 有毒植物的统称,由此而引起的中毒病称为疯草中毒 (Locosim) 或疯草病 (Locodisease)。我国疯草主要分布于内蒙古、宁夏、甘肃、陕西、青海、新疆、西藏等省区。分布面积已超过 1100 万 hm^2 , 约占全国草场总面积的 2.8%, 占西部草场面积的 3.3%, 且每年以 3.5% 的速度蔓延。疯草已成为我国西南、西北牧区危害草原畜牧业可持续发展的主要毒草。苦马豆素 (Swainsonine, SW) 是疯草的主要毒性成分之一,对疯草中毒病的发病机理和防治有重要意义。

[0003] 新疆是我国五大草原畜牧业省份之一,天然草地总面积为 $5596.16 \times 10^4 \text{hm}^2$, 其中可利用面积 $4800.68 \times 10^4 \text{hm}^2$, 是已垦农地的 10.4 倍,林地的 18 倍。然而,由于“超载过牧”等原因,现已引起疯草等有毒植物的广泛蔓延,优质牧草严重退化,造成大量放牧家畜中毒,其中阿克苏地区每年中毒家畜在 5%~10%, 严重时可达 50%, 不利于新疆畜牧业的可持续发展。

[0004] 疯草属于豆科植物,除含有疯草毒素外,还含有丰富的营养物质。其中黄花棘豆的粗蛋白含量高达 20%, 超过“饲料之王”的苜蓿,小花棘豆粗蛋白、钙、磷含量及必需氨基酸组成接近于优质苜蓿,将甘肃棘豆的添加量控制在 10% 以内饲喂家兔,家兔的体质量增加量与棘豆饲喂量成正比,说明疯草有较好的利用前景。

[0005] 目前多采用免疫学方法使动物获得抗苦马豆素抗体,以期在动物采食疯草时获得保护。其免疫效果的确定有赖于抗体的准确检测,ELISA 法因具有快速、敏感、准确等优点而得到广泛应用。本课题组以家兔为试验动物,通过制备苦马豆素人工抗原,筛选包被抗原,制备阳性血清和阴性血清,制备 HRP-羊抗兔酶标抗体,建立测定方法,从而得到检测家兔血清抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测试剂盒,为家兔安全利用疯草提供基础。而到目前为止,并未有家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测试剂盒的研究报道和专利申请。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种设备简单,操作方便的家兔血清抗苦马豆素抗体检测方法及试剂盒。通过该方法的实施,达到对家兔免疫效果的快速、敏感、准确的判断,操作方法简单易行,适用于科研院所和基层畜牧系统。

[0007] 具体技术方案为:

[0008] 一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测方法,间接 ELISA 法检测家兔血清抗苦马豆素抗体,包括以下步骤:

[0009] (1) 包被:使用抗原包被缓冲液将苦马豆素人工抗原稀释到工作浓度,加入 96 孔

酶标板,每孔 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0010] (2) 封闭:将孔内抗原液弃去,加入 PBST 洗涤液,每孔 200 μ L,振荡 30s 后弃去孔内液体,拍干。PBST 洗涤液的配制方法:十二水磷酸氢二钠 2.9g,无水磷酸氢二钾 0.2g,氯化钠 8.0g,氯化钾 0.2g,吐温-200.5mL,溶解于 1000mL 蒸馏水;重复洗涤 3 次后,每孔加入 20g/L 明胶溶液,将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 1h 进行封闭;

[0011] (3) 添加待检血清及阳性、阴性血清:弃去孔内明胶溶液,洗涤 3 次后,向每孔加入 100 μ L 工作浓度的待检血清、阳性血清和阴性血清,并以 PBS 溶液为空白对照,将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 1h;

[0012] (4) 添加酶标二抗:弃去孔内血清,洗涤 3 次后,向每孔加入 100 μ L 工作浓度的 HRP-羊抗兔酶标抗体,将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 1h;

[0013] (5) 添加底物溶液:弃去孔内溶液,洗涤 3 次后,向每孔加入 100 μ L 底物溶液,底物使用四甲基联苯胺,即 TMB,配置方法为:底物显色 A 液:无水醋酸钠 13.6g,柠檬酸 1.6g,30% 双氧水 0.3mL,用蒸馏水定容于 500mL;底物显色 B 液:乙二胺四乙酸二钠 0.2g,柠檬酸 0.95g,甘油 50mL,0.15g TMB,3mL DMSO,用蒸馏水定容于 500mL,使用时 AB 液等量混合,将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 30min;

[0014] (6) 终止:将酶标板拿出培养箱后,立即向每孔加入 2mol/L H_2SO_4 溶液终止反应,立即使用酶标仪测定 OD_{450} 值,以待检血清 OD_{450} 值 (P) 和阴性血清 OD_{450} 值 (N) 的比值 (P/N) ≥ 2.1 判定样品为阳性。

[0015] 所述的步骤 (1) 中,包被抗原选择为 SW-OVA,工作浓度为 10 μ g/mL,抗原包被缓冲液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液,配置方法为 2.93g 碳酸氢钠和 1.95g 碳酸钠溶解于 1000mL 蒸馏水。

[0016] 所述的步骤 (3) 中,血清稀释度为 1 : 200,稀释液选用包被缓冲液。

[0017] 所述的步骤 (4) 中,酶标二抗稀释度为 1 : 1500,稀释液选用包被缓冲液。

[0018] 所述的步骤 (5) 中,底物更换为四甲基联苯胺二盐酸,即 TMB $\cdot$ 2HCl,在底物显色 B 液中弃去 DMSO。

[0019] 一种家兔抗苦马豆素抗体的 ELISA 检测试剂盒,试剂盒中包括已包被完全的 96 孔酶标板 (包被抗原为 10 μ g/mL 的 SW-OVA)、阳性血清 (抗体效价 $2^{12} \sim 2^{14}$)、阴性血清、HRP-羊抗兔酶标抗体 PBS 溶液、PBST 洗涤液、底物显色 A 液、底物显色 B 液、终止液。

[0020] 本发明的有益效果:

[0021] (1) 本发明建立了家兔血清抗苦马豆素抗体检测方法,优化了检测条件,所需设备简单,操作方便。

[0022] (2) 本发明中的阳性血清抗体效价较高,可检测的范围较大。

[0023] (3) 本发明中的检测方法变异系数小于 15%,有较好的精密性。

[0024] (4) 本发明中的试剂盒可在 4 $^{\circ}$ C 保存 6 个月,有较好的稳定性。

附图说明

[0025] 图 1 为活性酯的合成反应式;

[0026] 图 2 为 N-羧甲基苦马豆素的合成反应式;

[0027] 图 3 为 SW-OVA 的合成反应式;

[0028] 图 4 为 SW-BSA 的合成反应式。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图和具体实施方式对本发明的方法作进一步详细地说明。

[0030] 检测试验中所需的包被抗原、阳性血清和酶标抗体制备方法如下：

[0031] (1) 包被抗原的制备：首先将溴乙酸与 N- 羟基琥珀酰亚胺反应成活性酯，活性酯再与 SW 合成为 N- 羧甲基苦马豆素，然后与 N- 羧甲基苦马豆素与 OVA 缩合，透析后冷冻干燥即为 SW-OVA，其化学反应式如图 1- 图 3 所示。

[0032] (2) 阳性血清的制备：使用苦马豆素人工抗原 SW-BSA 免疫家兔，对免疫兔使用弗氏完全佐剂 (FAC) 进行基础免疫，10d 后进行首免，使用 FAC 和生理盐水的混合液（体积比 1 : 1）充分乳化制备的 SW-BSA；第一次和第二次加强免疫用弗氏不完全佐剂 (FAI) 和生理盐水的混合液（体积比 1 : 1）乳化；第三次加强免疫使用生理盐水溶解 SW-BSA，第三次加强免疫 10d 后，所有试验家兔耳缘静脉采血，分离血清，即得到抗苦马豆素阳性血清；

[0033] (3) 羊抗兔抗体的制备：将家兔抗苦马豆素血清采用硫酸铵沉淀法制备抗苦马豆素抗体，通过 DEAE 纯化，流水透析后冻干，即得到家兔抗苦马豆素抗体，将家兔抗苦马豆素抗体与 FAI 1 : 1 (m/v) 混合，完全乳化后对和田羊进行接种，每 10d 免疫一次，免疫剂量分别为 5mg、10mg、15mg、20mg、30mg/ 只，共免疫 5 次。免疫结束后对和田羊颈静脉采血，分离血清，硫酸铵沉淀，DEAE 纯化，流水透析后冻干，即得到羊抗兔抗体；

[0034] (4) HRP 标记羊抗兔抗体的制备：使用改良过碘酸钠法，取 HRP 50mg 溶于 5mL 去离子水，加入新配制的 0.06mol/L 过碘酸钠水溶液 5mL，于 4℃ 静置反应 30min，取出后加入 0.16mol/L 乙二醇水溶液 5mL，室温放置，反应 30min，加入上步制备的羊抗兔抗体 50mg，混匀后透析过夜，透析液为 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液，然后加入 5mg 硼氢化钠，于 4℃ 静置反应 2h，然后饱和硫酸铵沉淀，沉淀物以 0.02mol/L pH7.4 PBS 液溶解后透析过夜，透析液为 0.02mol/L pH7.4 PBS 液，次日取出离心，除去不溶物，即得到 HRP 标记羊抗兔抗体。

[0035] 实施例 1 使用苦马豆素人工抗原对家兔进行免疫，通过由以下步骤组成的方法制成：

[0036] 1. 苦马豆素人工抗原的制备：首先将溴乙酸与 N- 羟基琥珀酰亚胺反应成活性酯，活性酯再与 SW 合成为 N- 羧甲基苦马豆素，然后与 N- 羧甲基苦马豆素与 BSA 缩合，透析后冷冻干燥即为 SW-BSA，其化学反应式如图 1、图 2、图 4 所示。

[0037] 2. 苦马豆素人工抗原免疫家兔：将家兔随机分为阴性对照组（1 只）和 SW-BSA 免疫组（6 只），对免疫组使用弗氏完全佐剂 (FAC) 进行基础免疫，首免时使用 FAC 和生理盐水的混合液（体积比 1 : 1）充分乳化制备的 SW-BSA；第一次和第二次加强免疫用弗氏不完全佐剂 (FAI) 和生理盐水的混合液（体积比 1 : 1）乳化；第三次加强免疫使用生理盐水乳化 SW-BSA。免疫组免疫剂量和次数见表 1。对照组注射等体积的抗原乳化液。第三次加强免疫 10d 后，所有试验家兔耳缘静脉采血，分离血清，-20℃ 保存。

[0038] 表 1 家兔免疫组的免疫时间和免疫剂量

[0039]

免疫次数	基础免疫后时间/d	免疫剂量/mg
首免	10	3.0
第一次加强免疫	30	6.0
第二次加强免疫	45	12.0
第三次加强免疫	50	18.0

[0040] 3. 血清抗体检测：以阴性对照兔血清为阴性血清，利用制备得到的 SW-OVA 为包被抗原，HRP- 羊抗兔抗体为酶标二抗，采用优化的方法，在不同时间对免疫兔血清进行 ELISA 检测，对测定结果进行统计学分析并计算批间变异系数。结果在选定的最适条件下，家兔血清抗体 ELISA 检测的 OD₄₅₀ 值批间变异系数 (CV) 为 0.54%~0.91%，表明测定结果稳定性和重复性较好。

[0041] 表 2 免疫兔血清抗 SW 抗体间接 ELISA 检测的重复性试验

[0042]

血清样品	测定次数			平均值	标准差	P/N 值	变异系数 /%
	1	2	3				
A1	0.833	0.824	0.828	0.828	0.0045	3.554	0.54
A2	0.814	0.827	0.829	0.823	0.0081	3.532	0.98
A3	0.821	0.830	0.823	0.825	0.0047	3.548	0.60
A4	0.801	0.812	0.811	0.808	0.0061	3.468	0.75
A5	0.813	0.822	0.817	0.817	0.0045	3.511	0.55
A6	0.827	0.819	0.834	0.827	0.0075	3.551	0.91

[0043] 4. 试剂盒稳定性检测：在 4℃ 下保存 0d、30d、60d、90d、120d、150d 和 180d 做 ELISA 检测。试验发现随着试剂盒保存期的延长，检测 OD₄₅₀ 值变动范围不大，其批间变异系数 (CV) 为 0.99%~1.80%，表明试剂盒在 4℃ 下 6 个月保存期内可以保证稳定。

[0044] 表 3 试剂盒稳定性试验

[0045]

检测时间	测定次数			平均值	标准差	P/N 值	变异系数 /%
	1	2	3				
0 d	0.800	0.825	0.817	0.814	0.0127	3.493	1.56
30 d	0.787	0.812	0.812	0.799	0.0144	3.430	1.80
60 d	0.817	0.803	0.794	0.805	0.0116	3.454	1.44
90 d	0.791	0.810	0.799	0.800	0.0095	3.432	1.19
120 d	0.802	0.811	0.818	0.810	0.0080	3.477	0.99
150 d	0.809	0.793	0.814	0.805	0.0110	3.454	1.37
180 d	0.804	0.791	0.787	0.794	0.0089	3.407	1.12

[0046] 以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，本发明的保护范围不限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内，可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

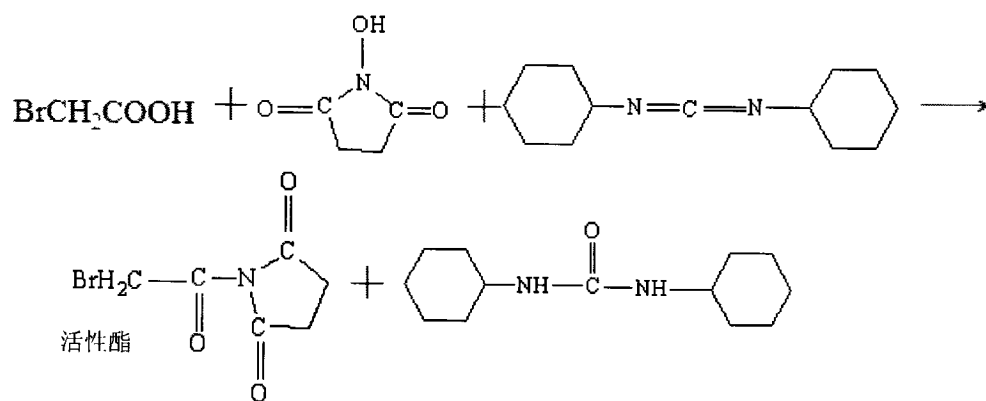


图 1

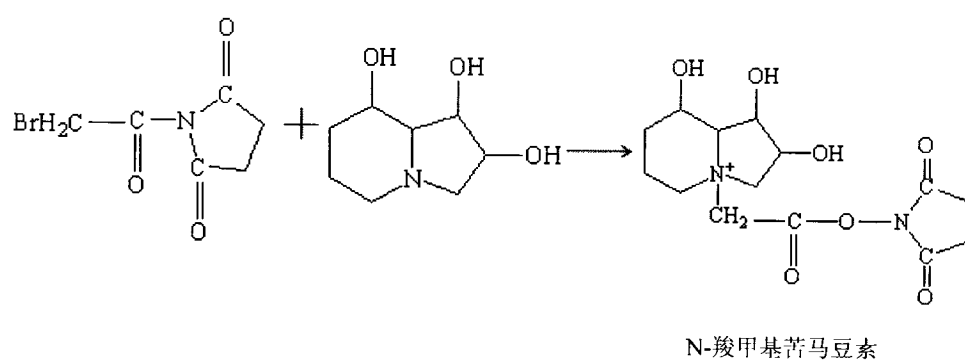


图 2

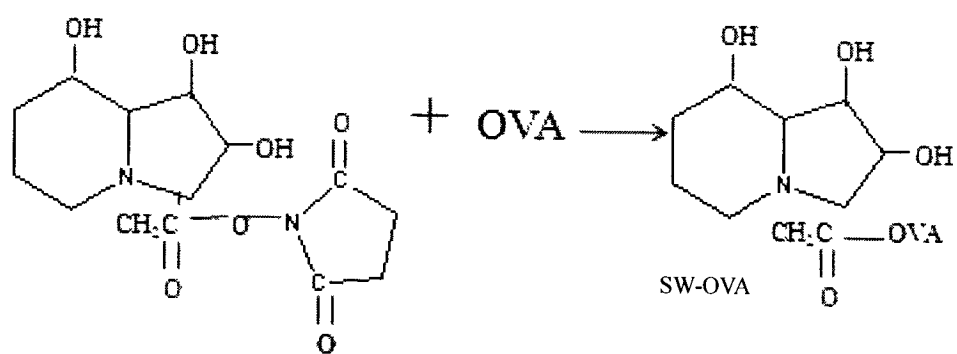


图 3

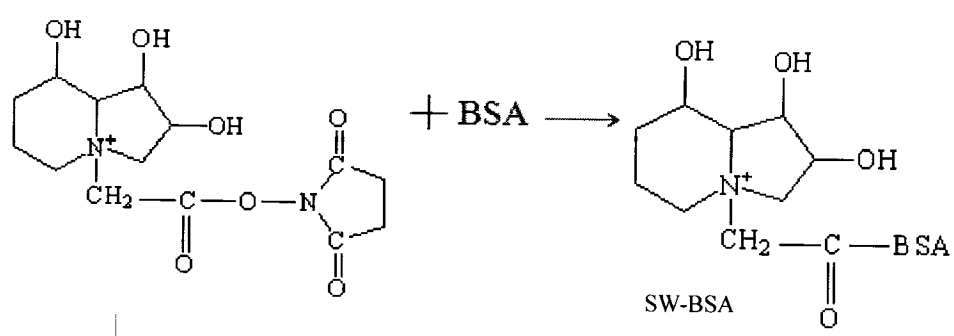


图 4

专利名称(译)	一种家兔抗苦马豆素抗体的ELISA检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN103048444A	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210525105.X	申请日	2012-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	塔里木大学		
申请(专利权)人(译)	塔里木大学		
[标]发明人	王帅 马春晖 胡建军 席琳乔 王连群 陈根元		
发明人	王帅 马春晖 胡建军 席琳乔 王连群 陈根元		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种家兔抗苦马豆素抗体的ELISA检测方法及其试剂盒，采用间接ELISA法检测家兔血清抗苦马豆素抗体，包括以下步骤：(1)包被；(2)封闭；(3)添加待检血清及阳性、阴性血清；(4)添加酶标二抗；(5)添加底物溶液；(6)终止。通过该方法的实施，达到对家兔免疫效果的快速、敏感、准确的判断，操作方法简单易行，适用于科研院所和基层畜牧系统。

