



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103837688 A

(43) 申请公布日 2014.06.04

(21) 申请号 201410118911.4

(22) 申请日 2014.03.27

(71) 申请人 吉林农业大学

地址 130118 吉林省长春市新城大街 2888
号

(72) 发明人 刘全 王泽东 蔡玉峰 魏峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测犬猫弓形虫抗体的间接 ELISA 试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测犬猫弓形虫抗体的间接 ELISA 试剂盒,涉及一种人兽共患传染病的免疫学检测技术,适用于犬猫弓形虫抗体的定性检测。本试剂盒包括弓形虫重组抗原 GRA7 预包被酶标板、样品稀释液为含有 0.5% BSA 和 0.05% NaN_3 的 0.01mol/L (pH7.2) 的 PBS;酶结合物为辣根过氧化物酶(HRP)-兔抗犬或猫 IgG 结合物、底物显色液为 TMB 显色液、终止液为 2mol/L 硫酸溶液、阳性对照、阴性对照。本发明敏感性高、特异性强、重复性好,可作为犬猫弓形虫抗体检测方法。

1. 一种检测犬猫弓形虫抗体的间接 ELISA 试剂盒,所述检测试剂盒包含:弓形虫重组抗原 GRA7 预包被酶标板,包被量为 $0.25 \mu\text{g}$;样品稀释液为含 0.5% BSA 和 0.05% NaN_3 的 0.01mol/L (pH 7.2) 的 PBS;酶结合物为辣根过氧化物酶-兔抗犬或猫 IgG 结合物;底物显色液为 TMB 显色液;终止液为 2 mol/L 硫酸溶液,阳性对照、阴性对照。

2. 根据权利要求 1 所述的犬猫弓形虫抗体间接 ELISA 试剂盒,其特征在于包被抗原的制备是通过 PCR 技术扩增弓形虫致密颗粒蛋白 GRA7 基因,将其克隆至原核表达载体 pET-28a 中,构建 pET-GRA7,转化大肠杆菌,经 IPTG 诱导表达,经 Ni-NTA 纯化后作为弓形虫检测抗原。

一种检测犬猫弓形虫抗体的间接 ELISA 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明公开了一种犬猫弓形虫抗体检测的间接 ELISA 试剂盒,属于基因工程技术和诊断试剂领域。

背景技术

[0002] 弓形虫病是弓形虫引起的一种重要人兽共患寄生虫病,导致人及动物流产、畸胎、死胎,严重危害公共卫生安全和畜牧业生产。猫是弓形虫终末宿主,犬是弓形虫中间宿主,在弓形虫的传播与感染中起重要作用。目前弓形虫尚无有效疫苗,犬猫弓形虫感染的监测对于疾病的防控具有重要意义。

[0003] 弓形虫感染的诊断主要包括病原学、分子生物学及免疫学等方法。病原学方法费时、费力、敏感性低。分子生物学方法包括 PCR、DNA 探针及基因芯片等技术具有较高的敏感性和特异性,但需要昂贵的仪器设备,操作过程较复杂。免疫学检测方法包括染色试验(DT)、间接荧光抗体试验(IFAT)、间接血凝试验(IHA)、直接凝集试验(DAT)、改良凝集实验(MAT)、酶联免疫吸附试验(ELISA),其中DT需要用活的虫体,存在生物安全风险;IFAT具有较高的敏感性和特异性,但需要专门的仪器设备,不适合临床使用;IHA和LAT无种属特异性,但其敏感性较低;MAT检测结果被认为是金标准,但对犬弓形虫检测出率较低。ELISA敏感性、特异性较高,适合于大样本量检测。

[0004] 目前弓形虫 ELISA 检测所用的抗原多是虫体可溶性抗原,其成分不确定,抗原制备批次间差别较大,不易标准化。随着分子生物学技术不断发展,重组抗原作为弓形虫的诊断抗原具有无可比拟的优势,如抗原成分确定,易标准化,特异性强等。弓形虫速殖子有 3 种分泌细胞器,微线体、棒状体和致密颗粒。致密颗粒蛋白(dense granule protein, GRA)主要是在虫体修饰纳虫泡时及细胞内存活中起重要作用,与虫体在细胞内存活和复制有相关,能够引发宿主 T 细胞 B 细胞强烈的免疫应答,其中 GRA7 分泌过程持续速殖子感染宿主的整个阶段,是排泄分泌(ES)抗原的主要成分,能够刺激干扰素及肿瘤坏死因子的大量分泌,具有良好的免疫原性,是一种潜在的疫苗、诊断候选抗原分子。本发明公开了以重组 GRA7 作为犬猫弓形虫抗体检测的间接 ELISA 试剂盒,与其它方法相比,具有较强的敏感性和特异性。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种以重组蛋白 GRA7 为抗原来检测犬猫弓形虫抗体的间接 ELISA 试剂盒,其目的在于克服现有技术存在的特异性不强、假阳性率高等缺点和不足,用于弓形虫抗体的定性检测。

[0006] 本发明提供的犬猫弓形虫抗体的间接 ELISA 试剂盒包括重组抗原 GRA7 预包被酶标板、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、酶结合物、洗涤液、底物显色液和终止液。

[0007] 本发明所述的试剂盒制备方法包括以下步骤:

1、弓形虫重组 GRA7 蛋白的表达与纯化:运用 PCR 技术扩增弓形虫 GRA7 基因,将其克隆入原核表达载体 pET-28a(+),构建重组质粒 pET-GRA7,经酶切鉴定分析和序列测定。将

重组质粒 pET-GRA7 转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导后,表达产物进行 SDS-PAGE 分析,在约 29kDa 处出现特异性表达带,与预期一致。重组菌裂解后,9000 rpm 离心 6 min,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE,结果显示目的蛋白主要以不可溶性形式表达(图 1)。Western blotting 分析,表达产物能与弓形虫阳性血清反应(图 2)。重组蛋白经 Ni-NTA 纯化后,纯度达 90% 以上(图 3)。

[0008] 2、抗原包被:将纯化的重组蛋白 GRA7 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 5 μ g/mL,包被 96 孔酶标板,每孔 50 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜,用洗涤液洗 5 遍,每遍 5min;加入 5% 脱脂奶粉配制成的封闭液,每孔 100 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C,1h;随后用洗涤液洗涤 5 遍,每遍 5min,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0009] 3、兔抗犬或猫 IgG 的制备和辣根过氧化物(HRP)标记:按常规方法提取纯化犬或猫 IgG,免疫家兔,当兔抗血清 ELISA 效价达 1:32 以上时取血清;硫酸铵沉淀纯化;用改良的过碘酸氧化法进行标记;最后酶标记物加入 5% 牛血清白蛋白、1% 酪蛋白和 50% 的中性甘油,测定工作浓度后,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0010] 4、上述各种溶液的配制:①样品稀释液:5% BSA, 0.05% NaN₃ 的 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS);②洗涤液:在 1000 ml 的 0.01 M PBS 溶液(3.58g Na₂HPO₄, 0.27 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 0.2 g KCl) 中加 0.5 ml 吐温-20(Tween-20);④封闭液:100 ml 洗涤液中加入 5g 脱脂奶粉,即 5% 脱脂奶粉封闭液;⑤终止液:取 54.3ml 浓度为 95-98% 浓硫酸加蒸馏水至 1000ml 即可。

[0011] 本发明与现有技术相比其积极效果在于具有特异性好、灵敏度高、重复性好,可以作为犬猫弓形虫抗体常规检测方法。

[0012] 附图表说明

图 1:弓形虫重组蛋白 GRA7 表达的 SDS-PAGE 分析结果. 1. 蛋白 Marker; 2-4. 重组蛋白 GRA7;5. 空白对照.

图 2:弓形虫重组蛋白 GRA7 表达的 Western blotting 分析. 1. 蛋白 Marker;2. 重组蛋白 GRA7;3. 阴性对照.

图 3:弓形虫重组蛋白 GRA7 纯化结果. 1. 蛋白 Marker;2, 3. 纯化的重组蛋白 GRA7.

表 1. 犬弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果

表 2. 猫弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果

具体实施方式

[0013] 实施例 1:犬弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒操作步骤

(1) 将样品稀释液将犬血清按 1:50 稀释后,加入 GRA7 预包被酶标板的孔内,每孔 50 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C,1h;

(2) 洗涤液洗涤 5 遍,每遍 5min;

(3) 加入 HRP 标记兔抗犬 IgG(工作浓度),每孔 50 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C,1h;

(4) 洗涤液洗涤 5 遍,每遍 5min;

(5) 加入 TMB 底物显色液,每孔 50 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C 避光显色 20min;

(6) 加入终止液,每孔 50 μ L;

(7) 利用酶标仪在 450nm 测定光吸收(OD)值;

(8) 结果判定:以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1

倍,即为阳性。

[0014] 实施例 2:猫弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒操作步骤

(1) 将样品稀释液将猫血清按 1:64 稀释后,加入 GRA7 预包被酶标板的孔内,每孔 50 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C,1h;

(2) 洗涤液洗涤 5 遍,每遍 5min;

(3) 加入 HRP 标记兔抗猫 IgG(工作浓度),每孔 50 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C,1h;

(4) 洗涤液洗涤 5 遍,每遍 5min;

(5) 加入 TMB 底物显色液,每孔 50 μ L,温箱 37 $^{\circ}$ C 避光显色 20min;

(6) 加入终止液,每孔 50 μ L;

(7) 利用酶标仪在 450nm 测定光吸收(OD)值;

(8) 结果判定:以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍,即为阳性。

[0015] 实施例 3:犬弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果评价

将通过 MAT 法及 IFAT 法确定为犬弓形虫抗体阳性、阴性血清 259 份,用该试剂盒检测。检测结果如表 1。统计学分析表明,ELISA 检测结果与实际结果无显著差异($P > 0.05$; Kappa=0.8631,95% CI: 0.7803,0.9459),结果一致率为 96.1%。犬弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果敏感性为 88.6%,特异性为 97.7%。

[0016] 实施例 4:猫弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果评价

将通过 MAT 法及 IFAT 法确定为猫弓形虫抗体阳性、阴性血清 185 份,用该试剂盒检测。检测结果如表 2。统计学分析表明,ELISA 检测结果与实际结果无显著差异($P > 0.05$; Kappa=0.9195,95%眼 CI: 0.8500,0.9890),结果一致率为 97.3%。猫弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果敏感性为 92.5%,特异性为 98.6%。

表 1. 犬弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果

	IFAT 和 MAT		合计
	阳性样本	阴性样本	
ELISA			
阳性结果	39	5	44
阴性结果	5	210	215
合计	44	215	259

表 2. 猫弓形虫抗体间接 ELSIA 试剂盒检测结果

	IFAT 和 MAT		合计
	阳性样本	阴性样本	
ELISA			
阳性结果	37	3	40
阴性结果	2	143	145
合计	39	146	185

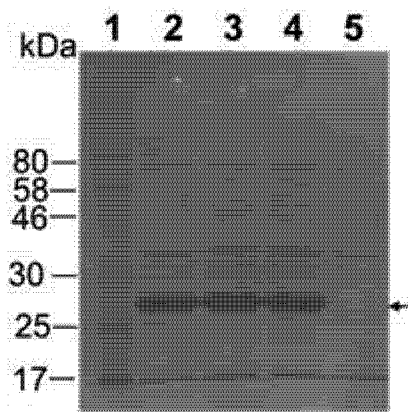


图 1

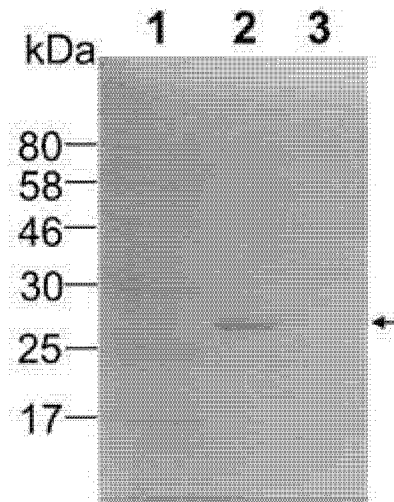


图 2

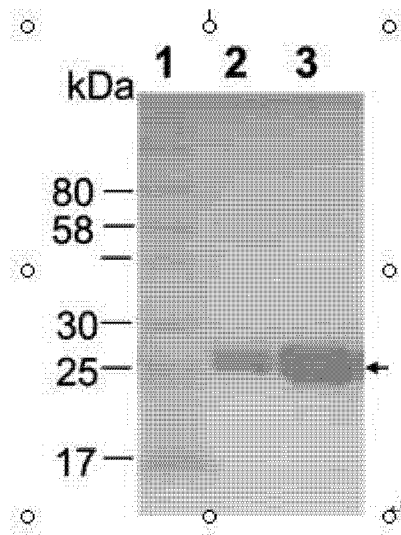


图 3

专利名称(译)	一种检测犬猫弓形虫抗体的间接ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN103837688A	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201410118911.4	申请日	2014-03-27
[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	刘全 王泽东 蔡玉峰 魏峰		
发明人	刘全 王泽东 蔡玉峰 魏峰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56905 G01N2333/45		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测犬猫弓形虫抗体的间接ELISA试剂盒，涉及一种人兽共患传染病的免疫学检测技术，适用于犬猫弓形虫抗体的定性检测。本试剂盒包括弓形虫重组抗原GRA7预包被酶标板、样品稀释液为含有0.5%BSA和0.05%NaN₃的0.01mol/L (pH7.2) 的PBS；酶结合物为辣根过氧化物酶 (HRP) -兔抗犬或猫IgG结合物、底物显色液为TMB显色液、终止液为2mol/L硫酸溶液、阳性对照、阴性对照。本发明剪感性高、剪异性强、重复性好，可作为犬猫弓形虫抗体检测方法。

	IFAT 和 MAT		
	阳性样本	阴性样本	合计
ELISA			
阳性结果	37	3	40
阴性结果	2	143	145
合计	39	146	185