



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104101716 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201410349860. 6

(22) 申请日 2014. 07. 22

(71) 申请人 重庆澳龙生物制品有限公司
地址 402460 重庆市荣昌县荣昌工业园区
(板桥工业园区四支路)

(72) 发明人 曹政 李阳春 田东升 李春燕

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 朱振德

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

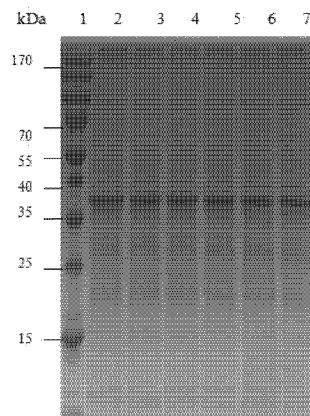
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,所述检测试剂盒包括羊棘球蚴重组抗原 Eg95 预包被酶标板、样品稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶结合物、洗涤液、底物显色液和终止液;所述羊棘球蚴重组抗原 Eg95 是通过以下方法制备的:首先 PCR 扩增 EG95 基因片段,然后采用 EcoRI 和 XhoI 同时酶切 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a,胶回收目的片段和载体后进行连接,构建重组质粒 pET-EG95,将重组质粒转化到大肠杆菌,经 IPTG 诱导表达,经 Ni-NTA 纯化。本发明以重组蛋白 Eg95 为抗原来检测羊棘球蚴病抗体,该抗体检测试剂盒特异性强、灵敏度高、试剂盒稳定性好。



1. 一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述检测试剂盒包括羊棘球蚴重组抗原 Eg95 预包被酶标板、样品稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶结合物、洗涤液、底物显色液和终止液。

2. 根据权利要求 1 所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述羊棘球蚴重组抗原 Eg95 是通过以下方法制备的:首先 PCR 扩增 EG95 基因片段,然后采用 EcoR I 和 Xho I 同时酶切 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a,胶回收目的片段和载体后进行连接,构建重组质粒 pET-EG95,将重组质粒转化到大肠杆菌,经 IPTG 诱导表达,经 Ni-NTA 纯化。

3. 根据权利要求 2 所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述抗原包被的方法为:将纯化的重组蛋白 Eg95 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 10 μ g/ml,包被酶标板,每孔 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜,用洗涤液洗 5 次,每次 3min;加入含 5% wt. 脱脂奶粉的 PBS 封闭液,每孔 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,随后用洗涤液洗 5 次,每次 3min,真空包装后置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

4. 根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液为含 5%wt. BSA 和 0.5% wt. Tween-20 的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述阴性对照液为健康未免疫棘球蚴疫苗的羊血清,所述阳性对照液为含有 Eg95 抗体的羊血清。

6. 根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述酶结合物为辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 酶标抗体。

7. 根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述洗涤液为含 0.5% wt. Tween-20 的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述底物显色液包括溶液 A 和溶液 B,溶液 A 的配方为:每 500ml 加醋酸钠 13.6g、柠檬酸 1.6g 和 30% 双氧水 0.3ml,溶液 B 的配方为:每 500ml 加乙二胺四乙酸二钠 0.2g、柠檬酸 0.95g、甘油 50ml 和 TMB 粉末 0.15g。

9. 根据权利要求 1 至 3 任意一项所述的羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术和诊断试剂领域,具体涉及一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 棘球蚴病又称包虫病,是由寄生于犬、狼、狐狸等动物小肠的细粒棘球绦虫中绦期—棘球蚴感染中间宿主而引起的一种严重的人兽共患病。棘球蚴寄生于、羊、猪、马、骆驼等家畜及多种野生动物和人的肝、肺及其他器官内。由于蚴体生长力强,体积大,不仅压迫周围组织使之萎缩和功能障碍,还易造成继发感染,如蚴体破裂,还可引起过敏反应,往往给人畜造成严重的病症,甚至死亡。

[0003] 1996 年 Lightowler 等研制成功抗细粒棘球绦虫虫卵感染的基因工程重组抗原疫苗—Eg95 疫苗,为包虫病的免疫预防带来新的希望。初步的动物实验表现了不错的抗感染能力 (96% ~ 98%), Eg95 疫苗由此也被认为是最有前途的抗细粒棘球绦虫疫苗。经过多年的发展,EG95 重组蛋白疫苗作为目前控制棘球蚴病唯一的疫苗,完全能够用于动物的免疫预防,且已实现商品化生产。但目前尚无简单有效、特异性、敏感性强的免疫学检测试剂盒,以评价疫苗的免疫效果、促进 EG95 重组蛋白疫苗的应用。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,能够用于羊棘球蚴病抗体的定性检测,具有特异性好、灵敏度高、重复性好的优点。

[0005] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

本发明公开了一种羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒,所述检测试剂盒包括羊棘球蚴重组抗原 Eg95 预包被酶标板、样品稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶结合物、洗涤液、底物显色液和终止液。

[0006] 进一步,所述羊棘球蚴重组抗原 Eg95 是通过以下方法制备的:首先 PCR 扩增 EG95 基因片段,然后采用 EcoR I 和 Xho I 同时酶切 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a,胶回收目的片段和载体后进行连接,构建重组质粒 pET-EG95,将重组质粒转化到大肠杆菌,经 IPTG 诱导表达,经 Ni-NTA 纯化。

[0007] 进一步,所述抗原包被的方法为:将纯化的重组蛋白 Eg95 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 10 μ g/ml,包被酶标板,每孔 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜,用洗涤液洗 5 次,每次 3min;加入含 5% wt. 脱脂奶粉的 PBS 封闭液,每孔 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,随后用洗涤液洗 5 次,每次 3min,真空包装后置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0008] 进一步,所述样品稀释液为含 5%wt. BSA 和 0.5% wt. Tween-20 的磷酸盐缓冲液。

[0009] 进一步,所述阴性对照液为健康未免疫棘球蚴疫苗的羊血清,所述阳性对照液为含有 Eg95 抗体的羊血清。

[0010] 进一步,所述酶结合物为辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 酶标抗体。

[0011] 进一步,所述洗涤液为含 0.5% wt. Tween-20 的磷酸盐缓冲液。

[0012] 进一步,所述底物显色液包括溶液 A 和溶液 B,溶液 A 的配方为:每 500ml 加醋酸钠 13.6g、柠檬酸 1.6g 和 30% 双氧水 0.3ml,溶液 B 的配方为:每 500ml 加乙二胺四乙酸二钠 0.2g、柠檬酸 0.95g、甘油 50ml 和 TMB 粉末 0.15g。

[0013] 进一步,所述终止液为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0014] 本发明的有益效果在于:本发明以重组蛋白 Eg95 为抗原来检测羊棘球蚴病抗体,经试验证明,该抗体检测试剂盒特异性强、灵敏度高、试剂盒稳定性好,可用于羊棘球蚴病抗体的定性检测。

附图说明

[0015] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图进行说明:

图 1:棘球蚴重组蛋白 Eg95 表达的 SDS-PAGE 分析结果。1. 蛋白 Marker ;2-7. 重组蛋白 Eg95 ;

图 2:棘球蚴重组蛋白 Eg95 表达的 Western blotting 分析结果。1. 蛋白 Marker ;2. 阴性对照 ;3. 重组蛋白 Eg95 ;

图 3:棘球蚴重组蛋白 Eg95 纯化结果。1. 蛋白 Marker ;2-11 重组蛋白 Eg95 ;

图 4:羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒的灵敏性试验结果。

具体实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,下面将对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0017] 实施例 1:羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒的制备

羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒包括羊棘球蚴重组抗原 Eg95 预包被酶标板、样品稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶结合物、洗涤液、底物显色液和终止液。

[0018] 羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒的制备方法为:

1. 羊棘球蚴重组抗原 Eg95 的表达与纯化:首先 PCR 扩增 EG95 基因片段,然后采用 EcoR I 和 Xho I 同时酶切 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a,胶回收目的片段和载体后进行连接,构建重组质粒 pET-EG95。将酶切鉴定和测序鉴定成功的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21,筛选阳性菌落并接入含 Amp 的 LB 液体培养基, IPTG 诱导后,表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析,在约 35kDa 处出现特异性条带,与预期一致。重组菌裂解后,10000rpm 离心 5min,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示目的蛋白主要以不溶性形式表达(图 1)。经 Western blotting 分析,表达产物能与羊棘球蚴(包虫)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)。

[0019] 2. 抗原包被:将纯化的重组蛋白 Eg95 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 10 μ g/ml,包被 96 孔酶标板,每孔 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜,用洗涤液洗 5 次,每次 3min;加入含 5% wt. 脱脂奶粉的 PBS 封闭液,每孔 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,随后用洗涤液洗 5 次,每次 3min,真空包装后置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0020] 3. 试剂配制:①磷酸盐缓冲液:每 1000ml 加磷酸氢二钠 19.1g,磷酸二氢钾

1. 815g, 氯化钠 8g ;②样品稀释液 :含 5%wt. BSA 和 0.5% wt. Tween-20 的磷酸盐缓冲液 ;③洗涤液 :含 0.5% wt. Tween-20 的磷酸盐缓冲液 ;④阴性对照液 :健康未免疫棘球蚴疫苗的羊血清, 阳性对照液 :含有 Eg95 抗体的羊血清 ;⑤酶结合物 :辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 酶标抗体 ;⑥底物显色液 :溶液 A :每 500ml 加醋酸钠 13.6g、柠檬酸 1.6g 和 30% 双氧水 0.3ml, 溶液 B :每 500ml 加乙二胺四乙酸二钠 0.2g、柠檬酸 0.95g、甘油 50ml 和 TMB 粉末 0.15g ;⑦终止液 :2mol/L 的硫酸溶液。

[0021] 实施例 2 :羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒的使用操作步骤

1. 取抗原包被板, 分别将稀释好的待检血清和对照各取 100 μ l 加入到抗原包被板孔中, 待检样品做 1 孔, 阴性对照和阳性对照各设 2 孔, 每孔 100 μ l ;轻轻振匀孔中样品(勿溢出), 置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟 ;

2. 甩掉板孔中的溶液, 每孔加入稀释好的洗涤液 200 μ l, 静置 3 分钟倒掉, 再在吸水纸上拍干, 共计洗涤 5 次 ;

3. 每孔加兔抗山羊酶标二抗 100 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟 ;

4. 洗涤 5 次, 方法同 2, 切记每次在干净吸水纸上拍干 ;

5. 每孔先加底物显色液 A 50 μ l、再加底物显色液 B 50 μ l, 室温避光显色 10 分钟 ;

6. 每孔加终止液 50 μ l, 10 分钟内测定结果 ;

7. 利用酶标仪在 OD450nm 测定光吸收(OD)值 ;

8. 结果判定 :试验成立的条件是阳性对照孔平均 OD450nm 值 \geq 0.6, 阴性对照孔平均 OD450nm 值必须 $<$ 0.3 ;样品 OD450nm 值 $>$ 0.6, 判为阳性 ;样品 OD450nm 值 $<$ 0.3, 判为阴性 ;0.3~0.6 之间为可疑。

[0022] 实施例 3 :羊棘球蚴 ELISA 抗体检测试剂盒检测结果评价

1. 灵敏性试验 :取一份阳性血清从 1:200 倍开始倍比稀释, 然后用此试剂盒进行 ELISA 试验, 当血清稀释度为 1:25600 时, OD₄₅₀=0.672, 结果仍为阳性(见图 4), 证明本发明试剂盒具有较好的灵敏性。

2. 阻断试验 :用包被抗原蛋白和已知阳性血清进行阻断反应, 将阳性血清

分为两份, 第一份用样品稀释液按 1:100 稀释, 第二份用含 0.1 μ g/100 μ l 的 Eg95 抗原的稀释液按 1:100 稀释, 然后按已确立的操作程序进行 ELISA 试验, 结果见表 1, 结果显示, 经包被抗原处理过的阳性血清, OD₄₅₀ 值下降明显, 表明了包被抗原具有良好的特异性。

表 1 包被抗原与阳性血清的阻断试验结果

	1	2
第一份	0.762	0.883
第二份	0.073	0.066
OD ₄₅₀ 值下降百分率	90.4%	92.5%

[0024] 3. 批内重复试验 :取 3 份抗体水平不同的阳性山羊血清和一份阴性山羊血

清, 在同一时间、同一条件下用同一批次包被的酶标板按 ELISA 程序, 每份血清做 8 个平行, 测定 OD₄₅₀ 值, 然后计算每份血清的 OD₄₅₀ 平均值、标准差和变异系数。试验结果见表 2, 统计分析结果现实变异系数在 3.3~5.6% 之间, 低于 10%, 表明同一批酶标板有良好的稳

定性, ELISA 试验批内重复性良好。

表 2 批内重复试验结果

样品	重复孔								均值 X	标准差 s	变异系数 C/V %
	1	2	3	4	5	6	7	8			
1	0.16	0.164	0.152	0.15	0.154	0.145	0.173	0.157	0.157	0.009	5.6
2	0.803	0.723	0.713	0.765	0.719	0.803	0.71	0.756	0.749	0.036	4.8
3	0.974	0.952	0.924	0.921	0.913	0.93	0.935	0.975	0.941	0.031	3.3
4	1.315	1.251	1.227	1.189	1.202	1.228	1.231	1.328	1.246	0.047	3.8

[0025] 4. 批间重复试验:取 6 个不同时间包被的酶标板,在相同条件下检测 3 份阳性血清和 1 份阴性血清,每份做 2 个重复,测定 OD₄₅₀ 值,然后计算每份血清的 OD₄₅₀ 平均值、标准差和变异系数。试验结果见表 3,统计分析结果现实变异系数在 4.1 ~ 7.6% 之间,小于 10%,表明批间重复性良好。

表 3 批间重复试验结果

样品	批次均值						均值 X	标准差 s	变异系数 C/V %
	1	2	3	4	5	6			
1	0.157	0.165	0.176	0.178	0.192	0.179	0.175	0.011	6.35
2	0.876	0.768	0.818	0.716	0.711	0.824	0.786	0.06	7.6
3	0.716	0.656	0.631	0.676	0.662	0.697	0.673	0.028	4.1
4	1.066	1.004	1.123	0.979	0.977	1.107	1.042	0.059	5.7

[0026] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

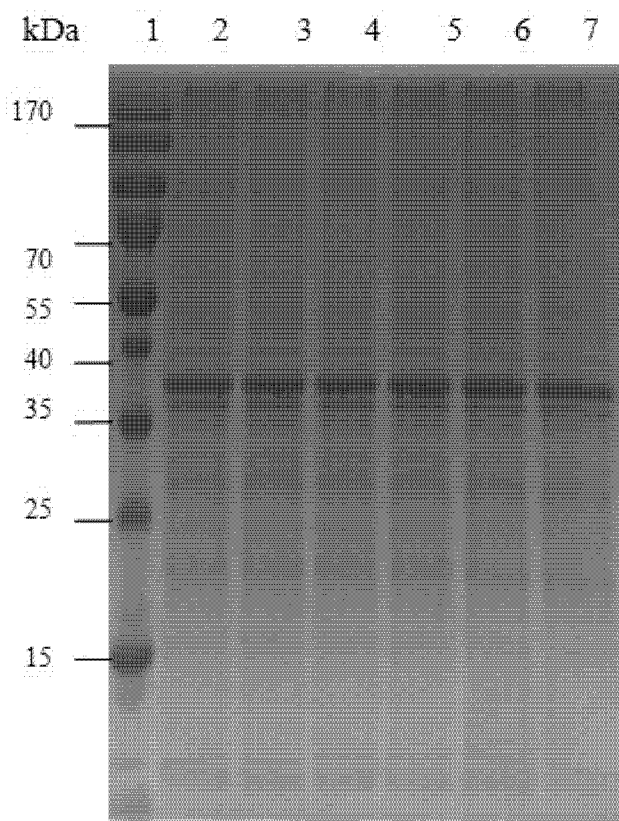


图 1

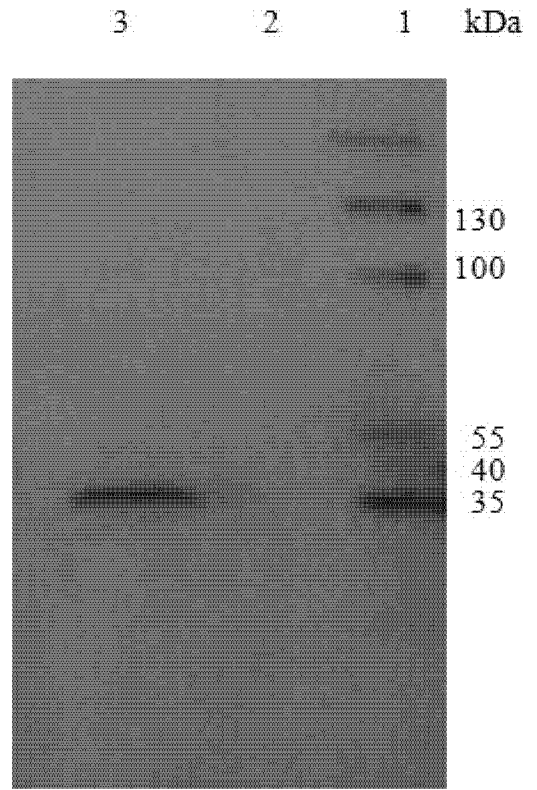


图 2

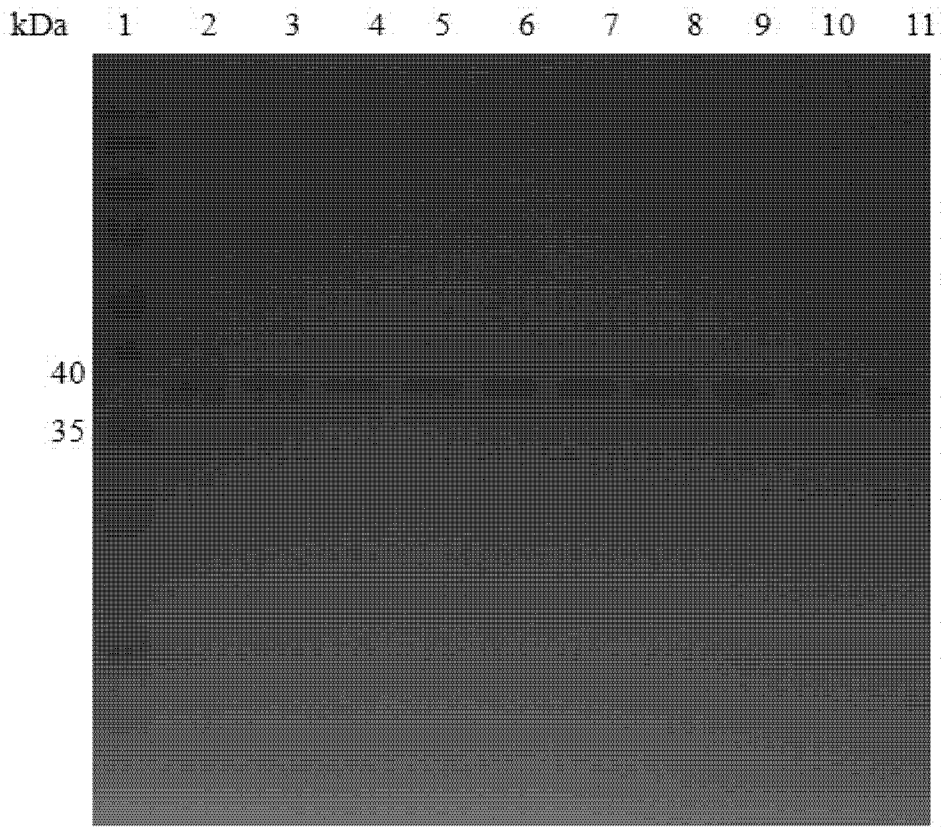


图 3

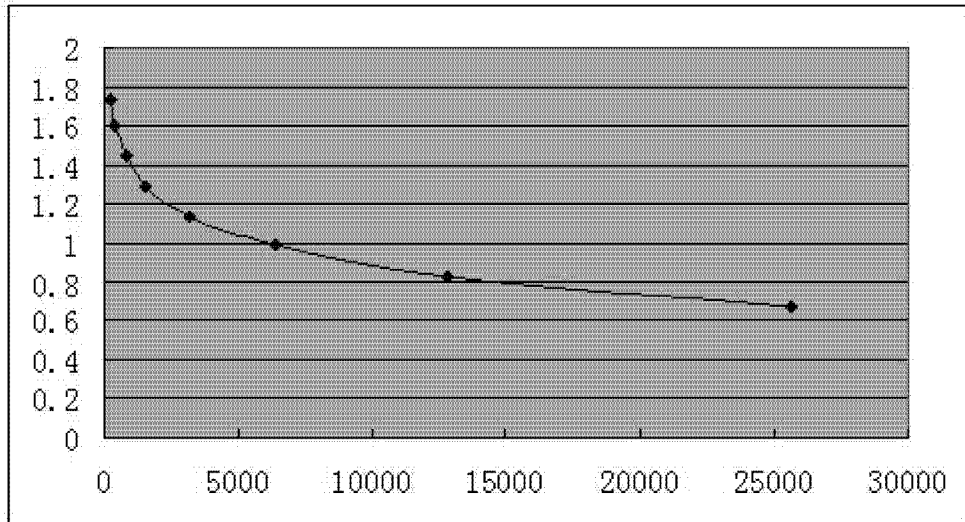


图 4

专利名称(译)	一种羊棘球蚴ELISA抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104101716A	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	CN201410349860.6	申请日	2014-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	重庆澳龙生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆澳龙生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆澳龙生物制品有限公司		
[标]发明人	曹政 李阳春 田东升 李春燕		
发明人	曹政 李阳春 田东升 李春燕		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N2333/43543		
代理人(译)	朱振德		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种羊棘球蚴ELISA抗体检测试剂盒，所述检测试剂盒包括羊棘球蚴重组抗原Eg95预包被酶标板、样品稀释液、阳性对照液、阴性对照液、酶结合物、洗涤液、底物显色液和终止液；所述羊棘球蚴重组抗原Eg95是通过以下方法制备的：首先PCR扩增EG95基因片段，然后采用EcoRI和XhoI同时酶切PCR产物和原核表达载体pET-32a，胶回收目的片段和载体后进行连接，构建重组质粒pET-EG95，将重组质粒转化到大肠杆菌，经IPTG诱导表达，经Ni-NTA纯化。本发明以重组蛋白Eg95为抗原来检测羊棘球蚴病抗体，该抗体检测试剂盒特异性强、灵敏度高、试剂盒稳定性好。

