



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106432440 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610578054.5

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2016.07.21

C12R 1/01(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

(71)申请人 山东绿都生物科技有限公司

地址 256600 山东省滨州市滨城区黄河二路169号

(72)发明人 董炳梅 沈志强 王金良 孙培娇
董艳凯 吕素芳 张春玲

(74)专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公司 37205

代理人 徐槐

(51)Int.Cl.

G07K 14/23(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

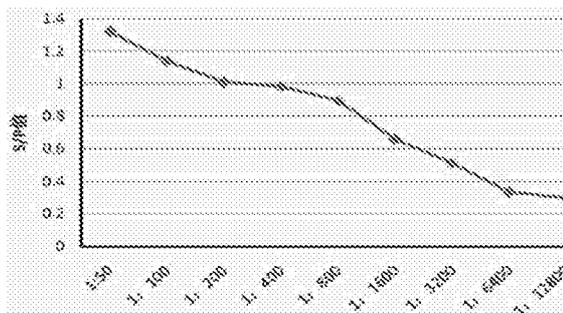
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

羊布鲁氏菌抗体PPA-ELISA检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒,其由Pet-28a为载体、以BL21工程菌为表达菌、经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG,ELISA板、封闭液、洗涤缓冲液、酶标二抗稀释液、样品稀释液、阳性对照血清、阴性对照血清、TMB显色液与终止液组装而成,本发明的有益效果是:本发明试剂盒以Pet-28a为载体,经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原,经过合理的工艺步骤使得本申请试剂盒对羊种布鲁氏菌抗原具有良好的特异性、较强的敏感性以及良好的重复性,可实现大批量样品的同时检测。



1. 一种羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒,其特征在于:其由Pet-28a为载体、以BL21工程菌为表达菌、经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG,ELISA板、封闭液、洗涤缓冲液、酶标二抗稀释液、样品稀释液、阳性对照血清、阴性对照血清、TMB显色液与终止液组装而成,所述洗涤缓冲液为PBST磷酸盐吐温缓冲液,所述样品稀释液为含1%牛血清白蛋白的PBST溶液,所述终止液为2moI/L的硫酸溶液。

2. 根据权利要求1所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述包被抗原的制备方法包括如下步骤:

(1) OMP25与OMP31目的基因的扩增

根据布鲁氏菌S2株OMP25与OMP31基因组序列,设计引物,并引入NdeI与EcoI I酶切位点,分别扩增573bp与783bp的目的基因片段;

(2) OMP25与OMP31目的蛋白的表达

将扩增的基因片段分别克隆到pMD18-T载体上,并转入DH5 α 感受态细胞中,并提取质粒,经PCR鉴定、NdeI与EcoII酶切鉴定及测序后,将鉴定正确的OMP25与OMP31目的片段分别进行酶切,并连接至Pet-28a原核表达载体上,构建Pet-OMP25质粒与Pet-OMP31质粒,并转化BL21表达菌,加入IPTG 37 $^{\circ}$ C进行诱导表达16h后,进行超声裂解后,经SDS-PAGE鉴定,获得了以包涵体形式表达的重组蛋白;

(3) OMP25与OMP31目的蛋白的纯化与鉴定

采用亲和层析法,将表达的OMP25与OMP31蛋白进行分离纯化,应用BCA法分别测定两种蛋白的浓度,并应用Westernblotting技术,确定纯化蛋白的抗原性和特异性,将纯化并鉴定正确的OMP25与OMP31蛋白分别进行冻干保存。

3. 根据权利要求1所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

(1) 抗原包被

应用高压灭菌的去离子水,将冻干的OMP25与OMP31蛋白溶解至冻干前的体积,按OMP25与OMP31体积比4:1的比例混合,用包被缓冲液稀释至100 μ g/mL,加入96孔ELISA板中,100 μ I/孔,4 $^{\circ}$ C孵育16h;

(2) 洗涤

弃掉包被缓冲液,将ELISA板在滤纸上拍干至无水印,加入洗涤缓冲液,300 μ I/孔,静置3~5min,弃掉洗涤液,重复洗涤3次;

(3) 封闭

将封闭液加入上述ELISA板中,100 μ I/孔,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃掉,用洗涤缓冲液按照步骤(2)的方法洗涤3次,在滤纸上拍干,自然干燥后,封膜,并置于铝箔袋中,加入干燥剂,用真空包装机进行包装;

(4) 血清的制备

A、阳性对照血清的制备

取8~10月龄,经实验室检测,应为布鲁氏菌、大肠杆菌0157、小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌抗体阴性的健康、成年羊;将冻干的OMP25与OMP31蛋白应用PBS缓冲液溶解并混合均匀,应用弗氏佐剂进行乳化后,肌肉注射,两种蛋白均为2mg/只;接种14d,进行第二次

免疫；二免后14d，采血并制备血清，经ELISA检测，P/N值>1时，方可用于该试剂盒的制备；采集的血清还需用 $60\text{Co}-\gamma$ 射线辐照处理，并经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤除菌，最后用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤，并加入血清量的0.01%的硫柳汞，定量分装， -70°C 保存备用；

B、阴性血清的制备

该血清的制备用动物同强阳性对照血清的制备用动物，无菌条件下采血、制备血清；将血清用 $60\text{Co}-\gamma$ 射线辐照处理，再将血清先用 $0.45\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤，最后用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤，按血清量的0.01%加硫柳汞，定量分装， 4°C 低温保存。

4. 根据权利要求1所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒的检测步骤如下：

(1) 将阴性对照血清加入ELISA板A1和A2孔中， $50\mu\text{I}$ /孔；将阳性对照血清加入ELISA板A3和A4孔中 $100\mu\text{I}$ /孔；

(2) 用样品稀释液将待测样品进行1:50倍稀释，并加入ELISA板相应的孔中， $100\mu\text{I}$ /孔， 37°C 孵育1h，弃掉孔中液体，在滤纸上拍干；

(3) 将10倍洗涤缓冲液进行稀释，并加入上述ELISA板中， $300\mu\text{I}$ /孔，静置3~5min，弃掉洗涤缓冲液，在滤纸上拍干，重复洗涤3次；

(4) 应用酶标二抗稀释液，将酶标二抗做1:2000倍稀释，并加入上述ELISA板中， $100\mu\text{I}$ /孔， 37°C 孵育1h，弃掉孔中液体，在滤纸上拍干；

(5) 洗涤，同步骤(3)；

(6) 将TMB显色液加入上述ELISA板中， $100\mu\text{I}$ /孔， 37°C 作用15min；

(7) 将终止液加入上述ELISA板中， $100\mu\text{I}$ /孔，并立即于450nm波长处测定各孔的吸光度值，即 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

5. 根据权利要求1所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒，其特征在于：所述封闭液的制备方法如下：准确称取NaCl 28g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g、蔗糖50g、明胶1g、小牛血清100mL、硫柳汞0.1g，加入纯化水使试剂充分溶解后，定容至1000mL；先用 $0.45\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤，最后用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤， 4°C 低温保存。

6. 根据权利要求1所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒，其特征在于：所述酶标二抗稀释液的制备方法如下：准确称取NaCl 28g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2g、Triton X-100 10mL、蔗糖2g、山梨醇2g、甘油40mL、小牛血清200mL、硫柳汞0.1g，加入适量纯化水，使试剂充分溶解后，定容至1000mL；先用 $0.45\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤，最后用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤， 4°C 低温保存。

7. 根据权利要求2所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒，其特征在于：所述OMP25和OMP31的引物序列如下：

OMP25基因上游引物：5' F-NdeI: TATCATATGATGCGCACTCTTAAGTCTCT 3'；

OMP25基因下游引物：5' R-EcoRI: GTGAATTCTTAGAACTTG TAGCCGATGC 3'；

OMP31基因上游引物：5' TATCATATGGCCGACATCATCGTTGT 3'；

OMP31基因下游引物：5' GGTGAATTCTTAGAGCTTG TAGTTCAG 3'。

8. 根据权利要求3所述的羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒的制备方法，其特征在于：所述包被缓冲液的制备方法如下：准确称取 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g，加入适量纯化水，使试剂充分溶解后，定容至1000mL；使用pH计调pH值到9.6，使用 115°C ，20min灭菌程序进行灭菌，冷却后 4°C 低温保存。

羊布鲁氏菌抗体PPA-ELISA检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及PPA-ELISA检测试剂盒,更具体的讲是羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒及其制备方法。

技术背景

[0002] 布鲁氏菌病是由布鲁氏菌(*BruceIIa* sp)引起的人畜共患性传染病,严重威胁着人和多种动物的生命健康。我国将布鲁氏菌病列为二类传染病,世界动物卫生组织将其列为B类法定传染病。布鲁氏菌病呈世界性流行,可引发多种家畜的流产、不育以及人的波浪热,造成严重的经济损失和食品安全问题,在我国29个省、市、自治区都有不同程度的发生和流行,在全世界170多个国家和地区存在和流行,而在拉丁美洲它每年造成约6亿美元的损失,在美国每年造成的损失平均达1.5亿美元,随着畜牧业的快速发展,布鲁氏菌病在多数疫区有明显回升的趋势。

[0003] 布鲁氏菌细胞膜是一个3层膜的结构,最内层的膜称为细胞质膜,外层膜称为外周胞质膜,最外层膜称为外膜。外膜与肽聚糖(peptidoglycan,PG)层紧密结合组成细胞壁,含有脂多糖、蛋白质和磷脂层。布鲁氏菌细胞膜中含有的脂多糖和外膜蛋白,与细菌的毒力及免疫原性密切相关,但脂多糖免疫原性较弱。

[0004] 目前布鲁氏菌病的实验室检测方法主要包括免疫学检测方法(包括凝集试验、补体结合试验、变态反应检查、ELISA检测方法等)、病原学检查与分子生物学技术(包括PCR检测方法、脉冲场凝胶电泳技术、荧光偏振试验等)等方法。在国际贸易中,布鲁氏菌病ELISA检测方法被指定为牛种布鲁氏菌病的标准检测方法;而我国布鲁氏菌病法定检测方法仍以病原学检测与血清学诊断方法为主,该方法存在非特异性反应、假阳性、前带现象或动物自身免疫抑制等缺陷,因此远不能满足对布鲁氏菌病的防控的需求。ELISA诊断方法具有敏感性和特异性强、操作简单、检测快速、重复性好、高通量、无辐射、价格低廉等特点,可同时完成大量样品的检测,是当前动物传染病检疫、流行病学调查和免疫监测广泛采用的血清学诊断技术。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种制备布鲁氏菌S2株抗原重组蛋白OMP25与OMP31的方法,同时提供利用这两种布鲁氏菌外膜蛋白作为包被抗原研制布鲁氏菌病抗体间接ELISA(PPA-ELISA)检测试剂盒的方法。

[0006] 本发明的技术路线如下:

[0007] 一种羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒,其由Pet-28a为载体、以BL21工程菌为表达菌、经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG,ELISA板、封闭液、洗涤缓冲液、酶标二抗稀释液、样品稀释液、阳性对照血清、阴性对照血清、TMB显色液与终止液组装而成,所述洗涤缓冲液为PBST磷酸盐吐温缓冲液,所述样品稀释液为含1%牛血清白蛋白的PBST溶液,所述终止液为

2moI/L的硫酸溶液。

[0008] 上述封闭液的制备方法如下:准确称取NaCl 28g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g、蔗糖50g、明胶1g、小牛血清100mL、硫柳汞0.1g,加入纯化水使试剂充分溶解后,定容至1000mL;先用0.45μm无菌滤膜加压过滤,最后用0.22μm无菌滤膜加压过滤,4℃低温保存。

[0009] 上述酶标二抗稀释液的制备放下如下:准确称取NaCl 28g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g、Triton X-100 10mL、蔗糖2g、山梨醇2g、甘油40mL、小牛血清200mL、硫柳汞0.1g,加入适量纯化水,使试剂充分溶解后,定容至1000mL。先用0.45μm无菌滤膜加压过滤,最后用0.22μm无菌滤膜加压过滤,4℃低温保存。

[0010] 上述羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒中所述包被抗原的制备方法包括如下步骤:

[0011] (1) OMP25与OMP31目的基因的扩增

[0012] 根据布鲁氏菌S2株(BruceIIa suis) OMP25与OMP31基因组序列,设计引物,并引入NdeI与EcoI I酶切位点,分别扩增573bp与783bp的目的基因片段;

[0013] (2) OMP25与OMP31目的蛋白的表达

[0014] 将扩增的基因片段分别克隆到pMD18-T载体上,并转入DH5α感受态细胞中,并提取质粒,经PCR鉴定、NdeI与EcoI I酶切鉴定及测序后,将鉴定正确的OMP25与OMP31目的片段分别进行酶切,并连接至Pet-28a原核表达载体上,构建Pet-OMP25质粒与Pet-OMP31质粒,并转化BL21表达菌,加入IPTG 37℃进行诱导表达16h后,进行超声裂解后,经SDS-PAGE鉴定,获得了以包涵体形式表达的重组蛋白;

[0015] (3) OMP25与OMP31目的蛋白的纯化与鉴定

[0016] 采用亲和层析法,将表达的OMP25与OMP31蛋白进行分离纯化,应用BCA法分别测定两种蛋白的浓度,并应用WesternBlotting技术,确定纯化蛋白的抗原性和特异性,将纯化并鉴定正确的OMP25与OMP31蛋白分别进行冻干保存。

[0017] 所述OMP25和OMP31的引物序列如下:

[0018] OMP25基因上游引物:5' F-NdeI:TATCATATGATGCGCACTCTTAAGTCTCT 3' ;

[0019] OMP25基因下游引物:5' R-EcoRI:GTGAATTCTTAGAACTTGTAGCCGATGC 3' ;

[0020] OMP31基因上游引物:5' TATCATATGGCCGACATCATCGTTGT 3' ;

[0021] OMP31基因下游引物:5' GGTGAATTCTTAGAGCTTGTAGTTCAG 3' ;

[0022] 本发明所述羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0023] (1) 抗原包被

[0024] 应用高压灭菌的去离子水,将冻干的OMP25与OMP31蛋白溶解至冻干前的体积,按OMP25与OMP31体积比为4:1的比例混合,用包被缓冲液稀释至100μg/mL,加入96孔ELISA板中,100μI/孔,4℃孵育16h;

[0025] (2) 洗涤

[0026] 弃掉包被缓冲液,将ELISA板在滤纸上拍干至无水印,加入洗涤缓冲液,300μI/孔,静置3~5min,弃掉洗涤液,重复洗涤3次;

[0027] (3) 封闭

[0028] 将封闭液加入上述ELISA板中,100μI/孔,37℃孵育1h,弃掉,用洗涤缓冲液按照上

述步骤(2)的方法洗涤3次,在滤纸上拍干,自然干燥后,封膜,并置于铝箔袋中,加入干燥剂,用真空包装机进行包装。

[0029] (4) 血清的制备

[0030] A、阳性对照血清的制备

[0031] 取8~10月龄,经实验室检测,应为布鲁氏菌、大肠杆菌0157、小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌抗体阴性的健康、成年羊。将冻干的OMP25与OMP31蛋白应用PBS缓冲液溶解并混合均匀,应用弗氏佐剂进行乳化后,肌肉注射,两种蛋白均为2mg/只;接种14d,进行第二次免疫;二免后14d,采血并制备血清,经ELISA检测,P/N值>1时,方可用于该试剂盒的制备。采集的血清还需用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照处理,并经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤除菌,最后用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤,并加入血清量的0.01%的硫柳汞,定量分装, -70°C 保存备用。

[0032] B、阴性血清的制备

[0033] 该血清的制备用动物同强阳性对照血清的制备用动物,无菌条件下采血、制备血清。将血清用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照处理,再将血清先用 $0.45\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤,最后用 $0.22\mu\text{m}$ 无菌滤膜加压过滤,按血清量的0.01%加硫柳汞,定量分装, 4°C 低温保存。

[0034] 所述包被缓冲液的制备方法如下:准确称取 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.93g,加入适量纯化水,使试剂充分溶解后,定容至1000mL;使用pH计调pH值到9.6,使用 115°C ,20min 灭菌程序进行灭菌,冷却后 4°C 低温保存。

[0035] 本发明所述羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒的检测步骤如下:

[0036] (1) 将阴性对照血清加入ELISA板A1和A2孔中, $50\mu\text{I}$ /孔;将阳性对照血清加入ELISA板A3和A4孔中 $100\mu\text{I}$ /孔;

[0037] (2) 用样品稀释液将待测样品进行1:50倍稀释,并加入ELISA板相应的孔中, $100\mu\text{I}$ /孔, 37°C 孵育1h,弃掉孔中液体,在滤纸上拍干;

[0038] (3) 将10倍洗涤缓冲液进行稀释(如有结晶,需先溶解后,方可进行稀释),并加入上述ELISA板中, $300\mu\text{I}$ /孔,静置3~5min,弃掉洗涤缓冲液,在滤纸上拍干,重复洗涤3次(或用洗板机反复洗涤3次均可));

[0039] (4) 应用酶标二抗稀释液,将酶标二抗做1:2000倍稀释,并加入上述ELISA板中, $100\mu\text{I}$ /孔, 37°C 孵育1h,弃掉孔中液体,在滤纸上拍干;

[0040] (5) 洗涤,同步骤(3);

[0041] (6) 将TMB显色液加入上述ELISA板中, $100\mu\text{I}$ /孔, 37°C 作用15min;

[0042] (7) 将终止液加入上述ELISA板中, $100\mu\text{I}$ /孔,并立即于450nm波长处测定各孔的吸光度值,即 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

[0043] 本发明的有益效果是:本发明试剂盒以Pet-28a为载体,经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原,经过合理的工艺步骤使得本申请试剂盒对布鲁氏菌S2株抗原具有良好的特异性、较强的敏感性以及良好的重复性,可实现大批量样品的同时检测。

附图说明

[0044] 图1为Pet-OMP25质粒与Pet-OMP31质粒双酶切鉴定结果。

[0045] 其中A:Pet-OMP25质粒经NdeI与EcoI I限制性内切酶双酶切鉴定结果;B:Pet-

OMP31质粒经NdeI与EcoI I限制性内切酶双酶切鉴定结果。

[0046] 图2为OMP25与OMP31目的蛋白的诱导表达。

[0047] 其中A:1为OMP25经IPTG诱导前,2为OMP25经IPTG诱导后;M为蛋白Marker;B:1为OMP31经IPTG诱导前;2为OMP31经IPTG诱导后,M为蛋白Marker。

[0048] 图3为OMP25与OMP31目的蛋白在上清与沉淀中的表达结果。

[0049] 其中A:M为蛋白Marker,1为OMP25目的蛋白表达上清液,2为OMP25目的蛋白表达沉淀;B:1为OMP31目的蛋白表达上清液,2为OMP31目的蛋白表达沉淀,M为蛋白Marker。

[0050] 图4为OMP25与OMP31目的蛋白纯化效果图。

[0051] 其中A:M为蛋白Marker,1为OMP25经500mM咪唑洗脱结果,2为OMP25经200mM咪唑洗脱结果;B:1为OMP31经500mM咪唑洗脱结果,2为OMP31经200mM咪唑洗脱结果,M为蛋白Marker。

[0052] 图5为OMP25与OMP31目的蛋白经Westernblotting鉴定结果图。

[0053] 其中A:M为蛋白Marker,1为OMP25经Westernblotting鉴定结果;B:M为蛋白Marker,1为OMP31经Westernblotting鉴定结果

[0054] 图6 PPA-ELISA试剂盒敏感性实验。

具体实施方式

[0055] 1.材料与方法

[0056] (1)菌种与质粒

[0057] 猪种布鲁氏菌S2株 (*BruceIIa suis*)由中国兽医药品监察所提供;DH5 α 感受态细胞、BL21表达菌 (DE3) 与Pet-28a原核表达载体由山东绿都生物科技有限公司重点实验室保存。

[0058] (2)主要试剂

[0059] NdeI与EcoI I限制性内切酶、pMD18-T载体、rTaq Mix、DL2000Marker与IPTG购自大连宝生物制品有限公司;布鲁氏菌多克隆抗体购自中国兽医药品监察所;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG(二抗)购自中杉金桥生物技术有限公司;预染蛋白Marker购自Fermentas公司。

[0060] 2.实验方法

[0061] (1)布鲁氏菌S2株OMP25与OMP31的表达、纯化及鉴定

[0062] ①OMP25与OMP31目的基因的扩增

[0063] 参照已发表的猪种布鲁氏菌S2株 (*BruceIIa suis*)全基因组序列,利用Primer 5和DNASTar等生物学软件对OMP25与OMP31基因进行分析,设计引物,并引入NdeI与EcoI I酶切位点,分别扩增573bp与783bp的目的基因片段。引物系列如下:

[0064] OMP25基因上游引物:5' F-NdeI:TATCATATGATGCGCACTCTTAAGTCTCT 3' ;

[0065] OMP25基因下游引物:5' R-EcoRI:GTGAATTCTTAGAACTTGTAGCCGATGC 3' ;

[0066] OMP31基因上游引物:5' TATCATATGGCCGACATCATCGTTGT 3' ;

[0067] OMP31基因下游引物:5' GGTGAATTCTTAGAGCTTGTAGTTCAG 3' ;

[0068] ②OMP25与OMP31目的蛋白的表达

[0069] 将扩增的基因片段分别克隆到pMD18-T载体上,并转入DH5 α 感受态细胞中,并提取

质粒,经PCR鉴定、NdeI与EcoI I酶切鉴定及测序后,将鉴定正确的OMP25与OMP31目的片段分别进行酶切,并连接至Pet-28a原核表达载体上,构建Pet-OMP25质粒与Pet-OMP31质粒,转化BL21表达菌,加入IPTG 37℃进行诱导表达16h后,进行超声裂解后,经SDS-PAGE鉴定,获得了以包涵体形式表达的重组蛋白。

[0070] ③OMP25与OMP31目的蛋白的纯化与鉴定

[0071] 采用亲和层析法,将表达的OMP25与OMP31蛋白进行分离纯化,应用BCA法分别测定两种蛋白的浓度,并应用Western Blotting技术,确定纯化蛋白的抗原性和特异性,将纯化并鉴定正确的OMP25与OMP31蛋白分别进行冻干保存。

[0072] (2) 羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒的制备方法

[0073] ①抗原包被

[0074] 将冻干保存的OMP25与OMP31蛋白溶解至冻干前的体积,按4:1的比例混合,用包被缓冲液稀释至100μg/mL,加入96孔ELISA板中,100μI/孔,4℃孵育16h;

[0075] ②洗涤

[0076] 弃掉上述包被缓冲液,将ELISA板在滤纸上拍干至无水印,加入洗涤缓冲液,300μI/孔,静置3~5min,弃掉洗涤缓冲液,重复洗涤3次(或用洗板机反复洗涤3次均可);

[0077] ③封闭

[0078] 将封闭液加入上述ELISA板中,100μI/孔,37℃孵育1h,弃掉,用洗涤缓冲液洗涤3次(方法同上),在滤纸上拍干,自然干燥后,封膜,并置于铝箔袋中,加入干燥剂,用真空包装机进行包装。

[0079] 血清的制备

[0080] A、阳性对照血清的制备

[0081] 取8~10月龄,经实验室检测,应为布鲁氏菌、大肠杆菌0157、小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌抗体阴性的健康、成年羊。将冻干的OMP25与OMP31蛋白应用PBS缓冲液溶解并混合均匀,应用弗氏佐剂进行乳化后,肌肉注射,两种蛋白均为2mg/只;接种14d,进行第二次免疫;二免后14d,采血并制备血清,经ELISA检测,P/N值>1时,方可用于该试剂盒的制备。采集的血清还需用60Co-γ射线辐照处理,并经0.45μm的滤膜进行过滤除菌,最后用0.22μm无菌滤膜加压过滤,并加入终浓度为0.01%的硫柳汞,定量分装,-70℃保存备用。

[0082] B、阴性血清的制备

[0083] 该血清的制备用动物同强阳性对照血清的制备用动物,无菌条件下采血、制备血清。将血清用60Co-γ射线辐照处理,再将血清先用0.45μm无菌滤膜加压过滤,最后用0.22μm无菌滤膜加压过滤,按血清量的0.01%加硫柳汞,定量分装,4℃低温保存。

[0084] (3) 包被缓冲液、洗涤缓冲液、封闭液、样品稀释液、酶标二抗稀释液与终止液的制备

[0085] ①包被缓冲液

[0086] 准确称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.93g,加入适量纯化水,使试剂充分溶解后,定容至1000mL。使用pH计调pH值到9.6,使用115℃,20min灭菌程序进行灭菌,冷却后4℃低温保存。

[0087] ②10倍洗涤缓冲液(PBST缓冲液)

[0088] 将NaCl 8g,KH₂PO₄ 0.2g,Na₂HPO₄·12H₂O 6.29g,加蒸馏水至100mL,加入0.5mL吐

温-20,调节pH值为7.2,先用0.45 μ m无菌滤膜加压过滤,最后用0.22 μ m无菌滤膜加压过滤,4 $^{\circ}$ C低温保存。

[0089] ③封闭液

[0090] 准确称取NaCl 28g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g、蔗糖50g、明胶1g、小牛血清100mL、硫柳汞0.1g,加入适量纯化水,使试剂充分溶解后,定容至1000mL。先用0.45 μ m无菌滤膜加压过滤,最后用0.22 μ m无菌滤膜加压过滤,4 $^{\circ}$ C低温保存。

[0091] ④样品稀释液

[0092] 本发明中的样品稀释液为含有1%牛血清白蛋白(BSA)的PBST溶液,其具体配制方法为:量取上述10倍的洗涤缓冲液10mL,稀释至100mL,再加入1%BSA,摇匀,备用。

[0093] ⑤酶标二抗稀释液

[0094] 准确称取NaCl 28g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g、KH₂PO₄ 0.2g、Triton X-100 10mL、蔗糖2g、山梨醇2g、甘油40mL、小牛血清200mL、硫柳汞0.1g,加入适量纯化水,使试剂充分溶解后,定容至1000mL。先用0.45 μ m无菌滤膜加压过滤,最后用0.22 μ m无菌滤膜加压过滤,4 $^{\circ}$ C低温保存。

[0095] ⑥终止液

[0096] 上述试剂盒中所用的终止液为2mol/L的硫酸溶液。

[0097] (4) 羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒反应条件的确定

[0098] ①OMP25与OMP31蛋白最佳配比的确定

[0099] 依据前期试验结果,将OMP25与OMP31蛋白分别按1:1、2:1、3:1与4:1的配比包被ELISA板,应用羊布鲁氏菌病标准阳性血清进行ELISA检测,根据试验结果,最终选择4:1作为OMP25与OMP31蛋白的最佳配比浓度。

[0100] ②OMP25与OMP31蛋白最佳包被时间和温度的确定

[0101] 将OMP25与OMP31混合蛋白加入微孔板中,分别在4 $^{\circ}$ C 12h、4 $^{\circ}$ C 16h、4 $^{\circ}$ C 20h、4 $^{\circ}$ C 24h、37 $^{\circ}$ C 2h、37 $^{\circ}$ C 3h、37 $^{\circ}$ C 4h进行包被,经ELISA检测,选取P/N值最大的组合,确定二者最佳包被时间。经测定,OMP25与OMP31蛋白混合液最佳包被时间与温度分别为37 $^{\circ}$ C 1h。

[0102] ③血清最佳稀释倍数的确定

[0103] 将标准阳性血清进行1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800 6个稀释度进行方阵滴定试验,将标准阳性血清OD₄₅₀≈1.0,标准阴性血清OD₄₅₀<0.2,选取P/N值最大的组合,确定为待检血清的稀释倍数。最终选择1:50倍稀释作为血清的最佳稀释倍数。

[0104] ④血清最佳孵育时间的确定

[0105] 将标准阴阳性血清定量稀释后分别在37 $^{\circ}$ C下作用30min、45min、60min、90min、120min,并进行ELISA检测,选取P/N值最大的组合,确定血清最佳孵育时间。经测定,血清的最佳孵育时间为37 $^{\circ}$ C 1h。

[0106] ⑤酶标二抗最适工作浓度和孵育时间的确定

[0107] 应用样品稀释液,将酶标二抗分别作1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000倍稀释,并分别在37 $^{\circ}$ C下反应30min、45min、60min、75min、90min,并进行ELISA试验,选取P/N值最大的组合,确定酶标二抗最佳工作浓度和孵育时间。经测定,酶标二抗最佳工作浓度为1:2000倍稀释,最佳孵育时间为37 $^{\circ}$ C 1h。

[0108] ⑥底物最佳显色时间的确定

[0109] 将标准阴阳性血清定量稀释后分别在37℃下反应30min、45min、60min、75min、90min 5个梯度,加入TMB显色液100μI/孔,分别在37℃下反应10min、15min、20min、30min 4个梯度,进行ELISA试验,选取P/N值最大的组合,确定底物最佳显色时间。经测定,底物最佳显色时间为37℃15min。

[0110] ③阴阳性临界值的确定

[0111] 应用已优化的最佳ELISA反应条件,对40份羊布鲁氏菌病阴性血清进行ELISA测定。经测定,其平均值 \bar{X} 为0.208,标准差SD为0.053,即当样本OD_{450nm}值 $\geq \bar{X} + 3SD = 0.208 + 0.159 = 0.367$ 时判为阳性,当样本OD_{450nm}值 $\leq \bar{X} + 2SD = 0.208 + 2 \times 0.053 = 0.314$ 时判为阴性,OD_{450nm}值处于两者之间判为可疑。

[0112] (5) PPA-ELISA检测试剂盒特异性试验

[0113] 应用以上组装的羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒,分别对大肠杆菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、羊布鲁氏菌阳性血清进行检测。结果显示,应用该试剂盒,大肠杆菌、巴氏杆菌与沙门氏菌病阳性血清均为布鲁氏菌阴性,而羊布鲁氏菌阳性血清其OD_{450nm}值为1.051,为强阳性。该结果说明,本试剂盒具有较好的特异性。

[0114] 表1羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒特异性试验结果

[0115]

	常见病阳性血清			布鲁氏菌阳性阴性血清	
	大肠杆菌	巴氏杆菌	沙门氏菌	Positive control	Negative control
OD ₄₅₀	0.219	0.128	0.077	1.012	0.055
SP				1.0	0

[0116] (6) 羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒敏感性试验

[0117] 将羊布鲁氏菌病阳性血清分别进行1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800倍稀释,应用已有的羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒,按以上最佳条件进行检测,结果显示,羊布鲁氏菌病阳性血清稀释度为1:6400时,其OD_{450nm}值处于临界状态(P/N值为0.335),表明该试剂盒具有较强的敏感性。

[0118] (7) 羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒重复性试验

[0119] ①批内重复性试验

[0120] 4个人,应用1批次羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒,分别对10份羊布鲁氏菌病阳性血清分别进行检测,计算各值之间的变异系数。

[0121] ②批间重复性试验

[0122] 取4批次羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒,分别对10份羊布鲁氏菌病阳性血清分别进行检测,计算各值之间的变异系数。

[0123] 经检测,结果显示,该羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒的批内变异系数为0.42%~1.85%,均小于5%(见表2);批间变异系数为0.48%~7.65%,均小于10%(见表3);说明该试剂盒具有良好的重复性。

[0124] 表2羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒批内重复性试验结果

[0125]

检测样品	重复次数 (S/P)								平均值 \bar{x}	标准差 SD	变异系数 (%) C.V value
	1	2	3	4	5	6	7	8			
1	0.786	0.795	0.774	0.769	0.752	0.771	0.782	0.794	0.778	0.0144	1.850899743
2	0.857	0.866	0.841	0.861	0.854	0.85	0.864	0.869	0.858	0.0093	1.083916084
3	0.659	0.673	0.642	0.651	0.663	0.66	0.649	0.668	0.658	0.0102	1.550151976
4	0.715	0.706	0.713	0.715	0.721	0.714	0.709	0.711	0.713	0.0045	0.631136045
5	0.739	0.729	0.731	0.73	0.735	0.734	0.73	0.735	0.733	0.0034	0.463847203
6	0.599	0.587	0.589	0.595	0.594	0.598	0.591	0.59	0.593	0.0043	0.725126476
7	0.679	0.678	0.688	0.675	0.681	0.69	0.686	0.679	0.682	0.0053	0.7771261
8	0.577	0.572	0.569	0.581	0.567	0.571	0.573	0.569	0.572	0.0046	0.804195804
9	0.599	0.597	0.591	0.593	0.589	0.597	0.594	0.592	0.594	0.0034	0.572390572
10	0.729	0.732	0.735	0.728	0.729	0.731	0.736	0.728	0.731	0.0031	0.424076607

[0126] 表3羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒批间重复性试验结果

[0127]

检测样品	不同批次 (S/P)				平均值 \bar{x}	标准差 SD	变异系数 (%) C.V value
	1	2	3	4			
1	0.808	0.792	0.837	0.836	0.81825	0.022066188	2.696753842
2	0.714	0.739	0.698	0.742	0.72325	0.020998016	2.90328597
3	0.455	0.438	0.425	0.452	0.4425	0.013820275	3.12322598
4	0.512	0.501	0.532	0.512	0.51425	0.012919623	2.512323445
5	0.608	0.625	0.605	0.618	0.614	0.009201449	1.498607355
6	0.152	0.176	0.163	0.149	0.16	0.012247449	7.654655446
7	0.085	0.081	0.08	0.081	0.08175	0.002217356	2.712361814
8	0.854	0.849	0.855	0.859	0.85425	0.004112988	0.481473522
9	0.789	0.768	0.774	0.763	0.7735	0.011269428	1.456939582
10	0.515	0.536	0.528	0.534	0.52825	0.009464847	1.791736345

[0128] (8) 羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒与布鲁氏菌虎红平板凝集试验对比性试验结果

[0129] 对来自于山东省部分地区的、布鲁氏菌虎红平板凝集试验检测为阳性的63份血清

与检测为阴性的80份血清,分别应用本发明的羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒进行检测。结果显示,63份阳性血清中,ELISA检测阳性为60份,阴性为3份;80份阴性血清中,ELISA检测阳性为10份,阴性为70份。因此,羊布鲁氏菌病抗体检测ELISA试剂盒相对于布鲁氏菌虎红平板凝集试验的符合率为95.2%,敏感性为,特异性为。

[0130] 表4羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒与虎红平板凝集试验对比性试验结果

[0131]

RPST		ELISA		Coincidence	Sensitivity	Specificity
Positive	Negative	Positive	Negative			
63	80	60	3	91.4%	95.2%	87.5%
10	70	10	70			

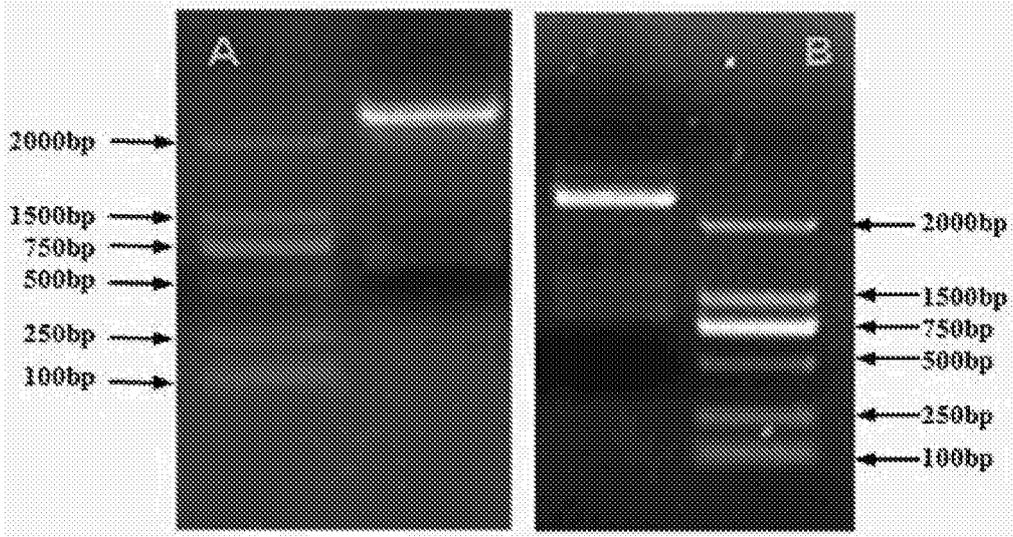


图1

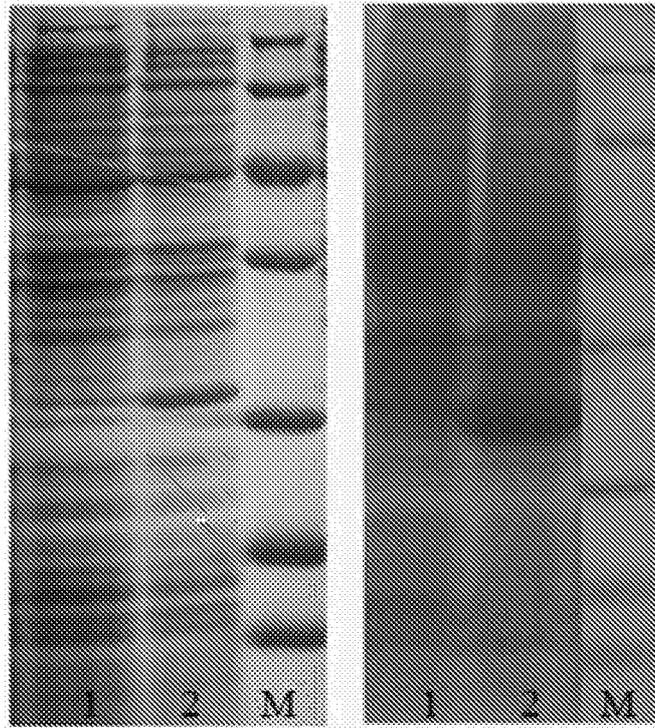


图2

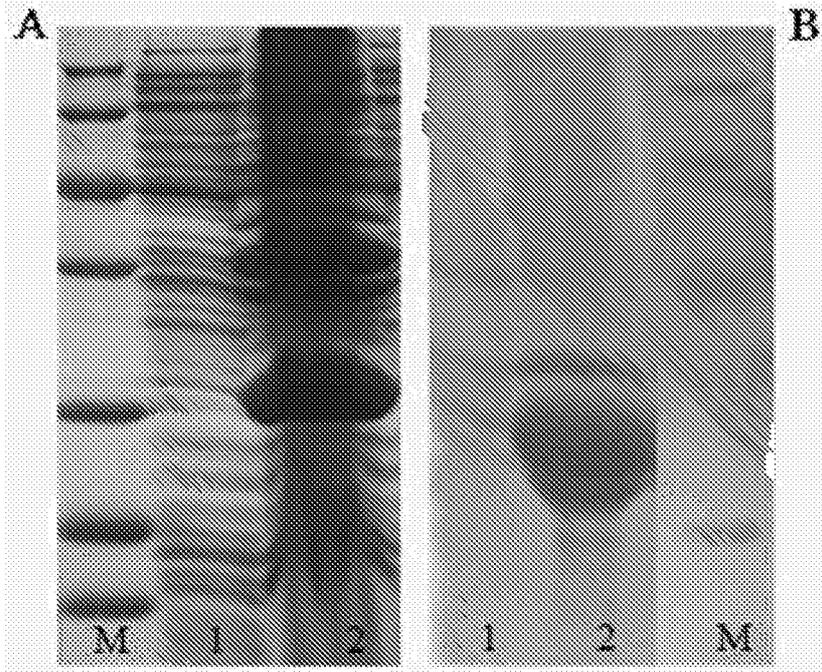


图3

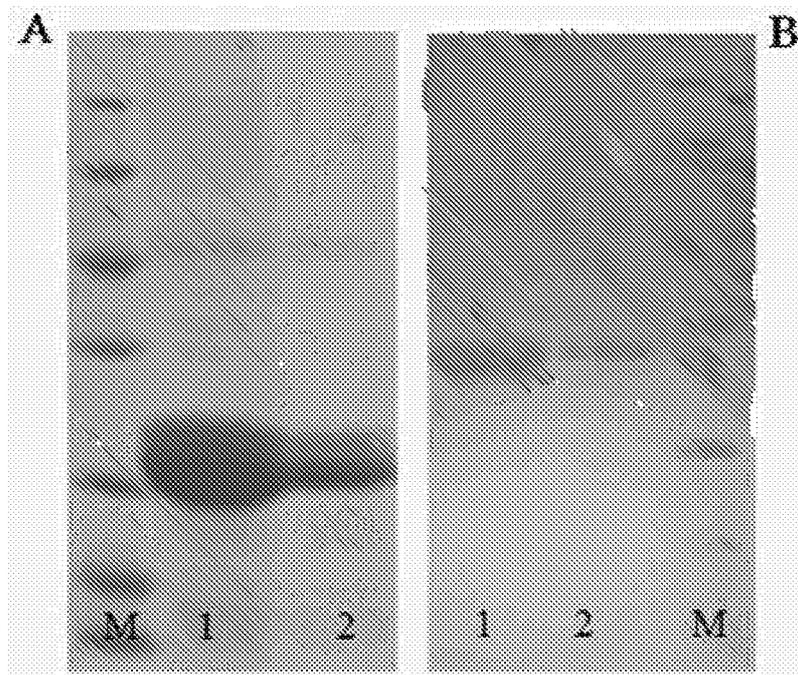


图4

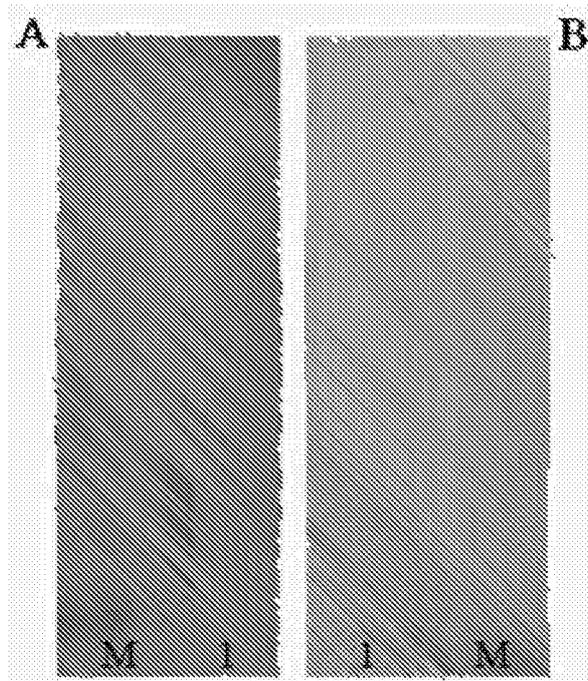


图5

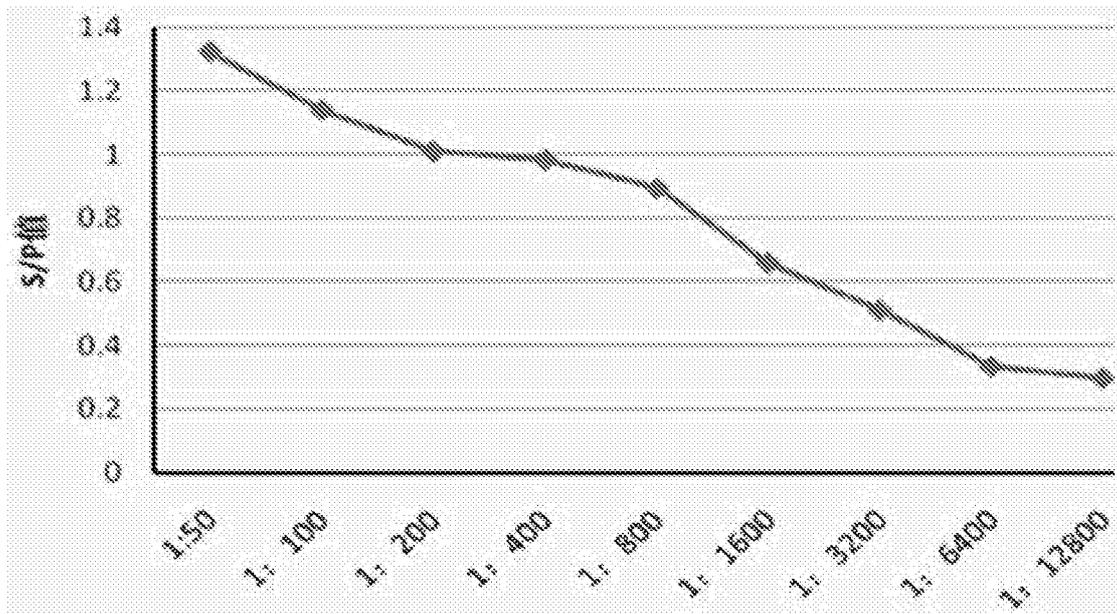


图6

专利名称(译)	羊布鲁氏菌抗体PPA-ELISA检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106432440A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201610578054.5	申请日	2016-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	山东绿都生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东绿都生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东绿都生物科技有限公司		
[标]发明人	董炳梅 沈志强 王金良 孙培娇 董艳凯 吕素芳 张春玲		
发明人	董炳梅 沈志强 王金良 孙培娇 董艳凯 吕素芳 张春玲		
IPC分类号	C07K14/23 C12N15/70 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/531 C12R1/01 C12R1/19		
CPC分类号	C07K14/23 C12N15/70 C12N2800/101 G01N33/531 G01N33/56911 G01N33/68 G01N2333/23		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及羊布鲁氏菌病抗体PPA-ELISA检测试剂盒，其由Pet-28a为载体、以BL21工程菌为表达菌、经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原，二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG，ELISA板、封闭液、洗涤缓冲液、酶标二抗稀释液、样品稀释液、阳性对照血清、阴性对照血清、TMB显色液与终止液组装而成，本发明的有益效果是：本发明试剂盒以Pet-28a为载体，经IPTG诱导表达的猪种布鲁氏菌S2株外膜蛋白OMP25与OMP31为包被抗原，经过合理的工艺步骤使得本申请试剂盒对羊种布鲁氏菌抗原具有良好的特异性、较强的敏感性以及良好的重复性，可实现大批量样品的同时检测。

