



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108802368 B

(45) 授权公告日 2021. 05. 04

(21) 申请号 201810259741.X

审查员 刘彦宁

(22) 申请日 2018.03.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108802368 A

(43) 申请公布日 2018.11.13

(73) 专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 何诚 王艺晖 郭永霞 李顺琴

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 王璐

(51) Int.Cl.

C07K 14/295 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

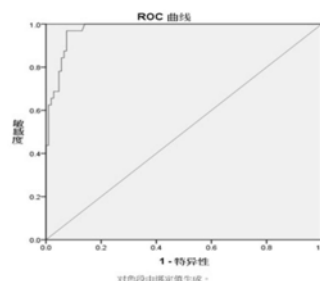
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及免疫学领域,具体公开了一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒。本发明通过人工合成如SEQ ID NO.1所示的多肽,并以此为抗原,包被固相载体,以实现牛流产衣原体的酶联免疫吸附检测。本发明以该人工合成的多肽抗原作为包被抗原,使酶联免疫吸附检测具有特异性高、灵敏性好的特点。本发明还在抗原包被固相载体后,提供了优化的抗原保护剂,对包被好的抗原进行保护,延长了抗原的保存时间。



1. 一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中的固相载体上包被有如SEQ ID NO.1所示的多肽;

所述固相载体包被所述多肽后,采用抗原保护剂进行处理;所述抗原保护剂为含有10%蔗糖、10%甘油的PBS;

所述试剂盒还包括酶标抗体,所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗牛IgG。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗原保护剂的pH值为7.2。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述固相载体为酶标板,所述酶标板的制备方法为:

1) 利用无菌去离子水将所述多肽稀释成终浓度为1mg/mL的多肽溶液;

2) 利用pH9.6、50mM 的碳酸盐缓冲液将步骤1)所得的多肽溶液稀释1000倍,加入酶标板各孔孵育,用洗涤缓冲液PBST冲洗酶标板后,使用封闭液进行封闭;

3) 向封闭好的微孔板每孔加入所述抗原保护剂孵育,倒掉抗原保护剂,洗涤,晾干,即得;

所述封闭液为含10%脱脂奶粉的PBST溶液。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述酶标板的制备方法为:

所述终浓度为1.0μg/mL的多肽溶液加入酶标板各孔后,在4℃孵育16小时;

使用所述封闭液在37℃孵育2小时封闭;

加入所述抗原保护剂后,在37℃孵育4小时。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括阴性对照血清和阳性对照血清;

所述阳性对照血清的制备方法为:

将SEQ ID NO.1所示的多肽偶联KLH载体蛋白获得偶联肽,以10mmol/L PBS 缓冲液稀释至浓度为20mg/mL作为免疫抗原;

选择流产衣原体抗体呈阴性的小牛,进行免疫;

首免:将氟氏完全佐剂与免疫抗原等量混合,充分乳化,取1mL颈部肌肉注射;

二免:首免后第14天,取氟氏不完全佐剂与免疫抗原等量混合,充分乳化,取1mL颈部皮下多点注射;

三免:二免后第7天,同二免方法加强免疫一次;

四免:三免后第7天,肌肉和颈部皮下各注射免疫抗原1mL;

1周后采血,分离血清并稀释,采用SEQ ID NO.1所示的多肽包被的酶标板,检测其免疫血清抗体效价,选取1:200稀释时OD₄₅₀大于1.0的小牛,进行颈静脉采血,无菌分离血清,水浴灭活,即获得流产衣原体阳性对照血清;

所述阴性对照血清的制备方法为:

选取多头小牛,分别采血、分离血清,水浴灭活,经过衣原体间接血凝检测和ELISA检测,收集结果为阴性的牛血清,混合,即为流产衣原体阴性对照血清。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括洗涤缓冲液、酶标抗体稀释溶液、样本稀释缓冲液、显色液和终止液。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述洗涤缓冲液为含0.5%吐温-20、pH7.2的磷酸盐缓冲液PBST;

所述酶标抗体稀释溶液为含有0.1‰硫柳汞钠、5%甘油、5%海藻糖的pH7.2的磷酸盐缓冲液；

所述样本稀释缓冲液为含有0.3% Triton-100、0.1‰硫柳汞钠的pH7.2的磷酸盐缓冲液；

所述终止液为强酸。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒，其特征在于，所述终止液为去离子水配制的 H_2SO_4 。

9. 根据权利要求7或8所述的试剂盒，其特征在于，所述显色液包括显色剂A和显色剂B：显色剂A为含1.46%磷酸氢二钠，0.93%柠檬酸，0.045%过氧化氢的水溶液；显色剂B为含0.03%四甲基联苯胺，0.096%柠檬酸，0.019%乙二胺四乙二酸钠盐，2%DMSO，4%甘油的水溶液。

一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体地说,涉及酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒。

背景技术

[0002] 牛流产衣原体病(Bovine chlamydia abortus)是由流产衣原体(*Chlamydia abortus*)引起的一类牛羊等哺乳动物和猪流产的人畜共患传染性疾病。发病奶牛感染此病主要表现为流产、生殖能力减退、产死胎、流产后胎衣不下;同时伴有产奶量下降,食欲减退,部分病牛有体温升高、精神萎靡等症状。另外有实验证实奶牛子宫内接种流产衣原体病原可引起奶牛乳腺炎。种公牛感染了流产衣原体,病原进入精液里可引起种牛繁殖能力下降。人类在接触或处理流产胎儿或小牛时不采取得当的保护措施就很容易引起感染,人感染后主要出现流感样症状,怀孕妇女感染此病原很容易引起流产。

[0003] 目前国内外对流产衣原体的主要检测手段包括两大类即抗原检测和血清学检测。抗原检测方法有:1)胎盘组织或阴道棉拭子涂片直接染色、免疫组织化学染色。直接染色病原法方法操作简单、检测快,但是灵敏性和特异性一般。免疫组织化学染色方法操作比较复杂并且上述两种方法结果判定都需要有丰富的专业技术经验,判定结果受主观影响较大,尤其辨认衣原体的EB和RB时候相当困难。2)病原分离鉴定方法细胞培养分离病原对衣原体包涵体进行免疫组织化学或免疫学染色,需要禽胚或细胞,分离过程比较复杂并对试验操作、实验环境和实验设施要求较高一般基层试验室难以进行。3)免疫荧光抗体技术其优点是方法简便、特异性强、非特异性荧光染色少。缺点是敏感性偏低、荧光显微镜价格昂贵不适合作为常规检测方法。4)聚合酶链反应虽然有较高的特异性和敏感性制备模板比较复杂所需样本量大,且需要PCR仪等贵重仪器,检测试剂昂贵。5)双抗夹心酶联免疫吸附试验方法具有简便,灵敏,高效等特点但目前国内没有能够检测流产衣原体抗原的ELISA试剂盒。

[0004] 相对于抗原检测方法,检测抗体方法为比较简便易行。比如免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验、间接血凝试验、补体结合试验以及胶体金试剂条检测试验等。1)免疫荧光试验用标记的已知衣原体抗原检测特异性抗体,此方法优点简单易行、特异性高。缺点为灵敏度偏低、所用设备昂贵。2)酶联免疫吸附试验有操作简便、特异性和灵敏度高、对操作人员的技术要求不高、实验结果受主观因素影响小等优点而被广泛应用于临床检测血清抗体技术中,但目前国内市场上没有针对流产衣原体抗体的酶联免疫吸附试剂盒。3)间接血凝试验方法操作简单、不需要特殊设备,但是结果判定受主观因素影响较大,而且耦合抗原多为全菌体,可能与部分革兰氏阴性菌存在交叉反应,结果易产生假阳性。4)补体结合试验方法被广泛应用于兽医实验室。但补体结合试验操作繁琐、敏感性低、检测时间长、需要较高的专业知识以及容易与其他革兰氏阴性菌血清产生交叉反应等缺陷在临床应用中受到较多限制。5)胶体金试纸条法操作简单易行但检测敏感性较低。

[0005] 目前国内市场流通的检测衣原体抗体试剂盒都以衣原体全菌体和纯化的衣原体脂多糖作为抗原。然而,由于这些抗原的主要成分为衣原体主要外膜蛋白(MOMP)和脂多糖,是最常见的衣原体交叉反应的抗原容易引起交叉反,只能局限于鉴定衣原体抗原而不能够

分别不同种属的衣原体,即无法特异性检测牛流产衣原体。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒,通过高特异性地检测牛流产衣原体抗体,实现对牛流产衣原体的间接酶联免疫检测。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 本发明提供一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒,所述试剂盒中的固相载体上包被有如SEQ ID NO.1所示的多肽。

[0009] 所述多肽序列来自于流产衣原体S26/3株的POMP90蛋白的一段多肽序列。

[0010] 多肽序列可委托商业公司完成合成,本发明实施例中所使用的多肽片段由北京中科亚光生物科技有限公司合成。

[0011] 进一步地,所述固相载体包被所述多肽后,采用抗原保护剂进行处理;所述抗原保护剂为含有10%蔗糖、10%甘油的PBS,优选pH值为7.2。

[0012] 更进一步地,所述固相载体为酶标板,如96孔酶标板,所述酶标板的制备方法为:

[0013] 1) 利用无菌去离子水将所述多肽稀释成多肽溶液;

[0014] 2) 利用碳酸盐缓冲液将步骤1)所得的多肽溶液稀释1000倍,加入酶标板各孔孵育,用洗涤缓冲液PBST冲洗酶标板后,使用封闭液进行封闭;

[0015] 3) 向封闭好的微孔板每孔加入所述抗原保护剂孵育,倒掉抗原保护剂,洗涤,晾干,即得;

[0016] 优选利用无菌去离子水将所述多肽稀释成终浓度为1mg/mL的多肽溶液;

[0017] 优选利用碳酸盐缓冲液将步骤1)所得的多肽溶液稀释为终浓度为1.0μg/mL的多肽溶液;

[0018] 优选所述碳酸盐缓冲液为pH9.6、50mM的碳酸盐缓冲液;

[0019] 优选所述封闭液为含10%脱脂奶粉的PBST溶液。

[0020] 作为优选,所述终浓度为1.0μg/mL的多肽溶液加入酶标板各孔后,在4℃孵育16小时;使用所述封闭液在37℃孵育2小时封闭;加入所述抗原保护剂后,在37℃孵育4小时。

[0021] 将上述优选方案组合,得到如下酶标板的制备方法:

[0022] 1) 利用无菌去离子水将所述多肽稀释成终浓度为1mg/mL的多肽溶液;

[0023] 2) 利用pH9.6、50mM的碳酸盐缓冲液将步骤1)所得的多肽溶液稀释为终浓度为1.0μg/mL的多肽溶液,加入酶标板各孔,4℃孵育16小时,用洗涤缓冲液PBST冲洗酶标板,再用封闭液(含10%脱脂奶粉的PBST溶液)封闭,以封闭液100μL/孔封闭,37℃温育2小时,倒掉封闭液,PBST洗涤3次甩干以封闭液200μL/孔封闭,37℃温育2小时,倒掉封闭液,PBST洗涤3次甩干;

[0024] 3) 封闭好的微孔板每孔加入200微升的抗原保护剂,37℃孵育2小时后,倒掉抗原保护剂,洗涤,甩干,紫外照射1小时,获得包被有所述多肽(流产衣原体S26/3株POMP90蛋白)的酶标板。

[0025] 进一步地,所述试剂盒还包括酶标抗体,所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗牛IgG。

[0026] 进一步地,所述试剂盒还包括阴性对照血清和阳性对照血清;

[0027] 所述阳性对照血清的制备方法具体如下：

[0028] 1) 取流产衣原体S26/3株POMP90蛋白KLH-偶联肽(由SEQ ID多NO.1所示多肽偶联KLH载体蛋白而成,多肽偶联委托上海强耀生物科技有限公司完成),将抗原以10mmol/L PBS缓冲液(pH 7.4)稀释至浓度为20mg/mL作为免疫抗原;

[0029] 其中,PBS缓冲液为氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠(12H₂O) 3.63g、磷酸二氢钾0.24g,溶解于900mL去离子水中,充分溶解后,以1mol/L盐酸溶液调节pH值至7.4,加去离子水定容至1L所得;

[0030] 2) 选择2头4月龄,衣原体抗体为阴性小牛,进行免疫;

[0031] 3) 首免:将氟氏完全佐剂与免疫抗原等量混合,充分乳化,取2mL颈部皮下多点注射;

[0032] 4) 二免:首免后第14天,取氟氏不完全佐剂与免疫抗原等量混合,充分乳化,取2mL颈部皮下多点注射;

[0033] 5) 三免:二免后第7天,同二免方法加强免疫一次;

[0034] 6) 四免:三免后第7天,肌肉和颈部皮下各注射免疫抗原2mL;

[0035] 7) 1周后尾静脉采血,分离血清并稀释,采用SEQ ID NO.1所示的流产衣原体S26/3株pomp90蛋白多肽包被的酶标板ELISA方法检测其免疫血清抗体效价,选取1:200稀释时OD₄₅₀值大于1.0的小牛,进行颈静脉采血,无菌分离血清,水浴灭活,即获得流产衣原体阳性对照血清(流产衣原体S26/3株阳性对照血清);

[0036] 所述阴性对照血清的制备方法为:

[0037] 选取多头小牛(例如2头),分别采血、分离血清,水浴灭活,经过衣原体间接血凝检测和ELISA检测,收集2种结果均为阴性的牛血清,混合,即为所述阴性对照血清(流产衣原体S26/3株阴性对照血清)。

[0038] 进一步地,所述试剂盒还包括洗涤缓冲液、酶标抗体稀释溶液、样本稀释缓冲液、显色液和终止液。

[0039] 其中,所述洗涤缓冲液为含1.0‰吐温-20、pH7.2的磷酸盐缓冲液(PBST);

[0040] 所述酶标抗体稀释溶液为含有0.1‰硫柳汞钠、5%甘油、5%海藻糖的pH7.2的磷酸盐缓冲液;

[0041] 所述样本稀释缓冲液为含有0.3%Triton-100、0.1‰硫柳汞钠的PBST;

[0042] 所述终止液为2N浓度的硫酸溶液,优选为去离子配制的H₂SO₄。其中,2N为当量浓度,2N等于1M,即1mol/L的硫酸溶液。

[0043] 进一步地,所述显色液包括显色剂A和显色剂B:显色剂A为含1.46%磷酸氢二钠,0.93%柠檬酸,0.045%过氧化氢的水溶液;显色剂B为含0.03%四甲基联苯胺,0.096%柠檬酸,0.019%乙二胺四乙二酸钠盐,2%DMSO,4%甘油的水溶液。

[0044] 本发明还提供了所述试剂盒的操作步骤:

[0045] 用样本稀释液将阳性对照血清,阴性对照血清和样本以1:10倍稀释,以100μL/孔加入到多肽包被板内(其中阳性和阴性对照设复孔),37℃温育30min,倒掉反应板内液体,用洗涤缓冲液洗涤4次拍干;然后以100μL/孔加入以酶标抗体1:5000倍稀释的酶标抗体置37℃温育30min;取出反应板倒掉酶标抗体有洗涤缓冲液洗涤4次;显色液A、B等体积混匀后,以100μL/孔加入,37℃温育15min;加入终止液100μL/孔,置酶标仪上450nm波段测量各

孔OD值,根据待测样本(OD_S),阳性对照(OD_{PC})和阴性对照(OD_{NC})计算阳性对照 OD_{450} 值和阴性对照 OD_{450} 值,如果 OD_{PC} 均值 ≥ 0.45 ,并且 $OD_{PC}/OD_{NC} \geq 3$ 则试验成立。在试验成立基础上计算出每个样本S/P百分比。 $S/P\%$ 值=(样品 OD_{450} /阳性对照 OD_{450}) $\times 100\%$ 。当样本S/P%值小于26%时判定为阴性、大于26%小于31%判定为可疑、大于31%判定为阳性。

[0046] 应用本发明所述试剂盒检测流产衣原体抗体的酶联免疫吸附方法。应用在牛群是否感染流产衣原体病原的分析中,待测样本为采自牛的血清。

[0047] 需要说明的是,本发明涉及到的原料或试剂均为普通市售产品,涉及到的操作如无特殊说明均为本领域常规操作。

[0048] 本领域技术人员应当理解,在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可以相互组合,得到具体实施方式。

[0049] 本发明的有益效果在于:

[0050] 本发明通过合成流产衣原体S26/3株POMP90蛋白多肽,并以此为抗原包被固相载体进行酶联免疫吸附检测。本发明试剂盒使用人工合成高纯度的多肽特异性片段为包被抗原,特异性高,灵敏性好。且在抗原包被固相载体后用抗原保护剂对包被好的抗原进行保护,延长了抗原的保存时间。此外,本发明使用的酶联抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗牛IgG,可特异性的对牛血清中流产衣原体S26/3株血清抗体的检测。

[0051] 本发明提供的试剂盒以流产衣原体POMP90蛋白特异性多肽为抗原能提高检测牛流产衣原体特异性抗体ELISA试剂盒的特异性和敏感性。目前国内外没有单独针对检测牛流产衣原体抗体检测的试剂盒,本发明能够弥补特异性检测牛流产衣原体ELISA试剂盒的空缺。本发明所述试剂盒所需时间短、降低操作人员的主观因素影响。且经济实用,对仪器要求不高,仅需要普通恒温水浴箱、酶标仪等。本发明适于作为大规模商业检测方法推广,具有良好的市场前景。所述试剂盒也可为奶牛和种牛流产衣原体病的流行病学调查与诊断奠定了新的技术基础,满足了临床检验的需求。

附图说明

[0052] 图1为本发明阳性和阴性血清ROC曲线图。

[0053] 图2为本发明ROC曲线的坐标点及相应的敏感性和特异性,图中检测结果变量为S/P%值。

具体实施方式

[0054] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0055] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0056] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0057] 实施例1 流产衣原体S26/3株POMP90蛋白多肽的合成

[0058] 根据Genbank上收录流产衣原体S26/3株POMP90蛋白序列(Genbank Accession: U65943),利用DNASTAR软件比对分析不同衣原体基因序列后选取一段由25个氨基酸组成的特异性肽序列进行人工合成。定量多肽分装,冷冻抽干后-20℃保存备用。

[0059] 实施例2 抗原保护剂的选择

[0060] 选择-蔗糖、海藻糖、葡聚糖、聚乙二醇6000、甘油、按照表1的组方配制成抗原保护剂,以最佳优化条件包被流产衣原体POMP90蛋白酶标板,封闭、洗涤后分别加入200 μ L/孔的抗原稳定剂(处方1、处方2、处方3、处方4),4 $^{\circ}$ C过夜,次日取出弃去孔内液体,加入PBST溶液300 μ L/孔,洗涤3次,每次3min,并用吸水纸拍干,紫外线照射1h,晾干后装入真空袋置于37 $^{\circ}$ C环境连续保存,第14天和21天时分别取出酶标板,按照确定的ELISA程序检测阳性对照品,重复4孔,计算其平均值,比较其OD₄₅₀的下降情况。选择现包被的无加任何保护剂的酶标板作为对照组。

[0061] 表1包被稳定剂的组方

[0062]

	蔗糖	葡聚糖	海藻糖	PEG	甘油	PBS
处方1	5%			4%	5%	至100%
处方2		2% -		4%	10%	至100%
处方3	-	2%	2%	4%	10%	至100%
处方4	10%		-	-	10%	至100%
对照组	-	-	-	-	-	-

[0063] 表2不同包被稳定剂在37 $^{\circ}$ C下的测定OD值

[0064]

	0天	7天	14天	21天
处方1	0.96	0.85	0.71	0.60
处方2	0.92	0.78	0.68	0.55
处方3	0.90	0.76	0.65	0.49
处方4	0.95	0.91	0.85	0.72
对照组	0.96	0.97	1.02	1.06

[0065] 37 $^{\circ}$ C保存7、14天和21后检测结果显示包被抗原保护液第4组与对照组结果相比OD₄₅₀值降低率分别6.18%、16.7%和32%,其余处方组OD₄₅₀值在7天下降率均超过10%,14天时OD₄₅₀值下降率均超过30%。因此选择包被处方4为抗原保护剂,筛选的抗原保护处方组成为100ml中含:10%蔗糖、10%甘油。

[0066] 实施例3 包被有流产衣原体POMP90蛋白多肽的酶标板的制备

[0067] 1、将合成好的流产衣原体POMP90蛋白多肽用无菌去离子水稀释至终浓度1mg/mL。

[0068] 2、将稀释好的1mg/mL多肽以pH9.6、50mM碳酸盐缓冲液稀释为终浓度1.0 μ g/mL,加入酶标板各孔,4 $^{\circ}$ C孵育16小时,用洗涤缓冲液PBST冲洗酶标板,再用封闭液(含10%脱脂奶粉的PBST溶液)封闭,以封闭液100 μ L/孔封闭,37 $^{\circ}$ C温育2小时,倒掉封闭液,PBST洗涤3次甩干以封闭液200 μ L/孔封闭,37 $^{\circ}$ C温育2小时,倒掉封闭液,PBST洗涤3次甩干;

[0069] 3、封闭好的微孔板每孔加入200微升的抗原保护剂,pH7.2PBS溶液37 $^{\circ}$ C孵育2小时后,倒掉抗原保护溶液,洗涤,甩干,紫外照射1小时,即获得包被有流产衣原体S26/3株POMP90蛋白多肽的酶标板。

[0070] 实施例4 流产衣原体阳性对照血清的制备

[0070] 1、取流产衣原体S26/3株pomp90蛋白KLH-偶联肽(多肽偶联委托上海强耀生物科技有限公司完成),将该偶联肽以10mmol/L PBS缓冲液(pH 7.4)稀释至浓度为20mg/mL作为免疫抗原。-20 $^{\circ}$ C保存备用,即为流产衣原体S26/3株免疫抗原。

[0071] 2、选择4月龄小牛经衣原体IHA试剂盒检测,衣原体抗体为阴性小牛2头,进行免

疫,采血、分离血清。

[0072] 3、首免:将氟氏完全佐剂与免疫抗原等量混合,充分乳化,取1mL颈部皮下多点注射。

[0073] 4、二免:首免后第14天,取氟氏不完全佐剂与免疫抗原等量混合,充分乳化,取1mL颈部皮下多点注射。

[0074] 5、三免:二免后第7天,同二免方法加强免疫一次。

[0075] 6、加强免疫:三免后第7天,肌肉和颈部皮下各注射免疫抗原1mL。

[0076] 7、血清抗体效价检测:加强免疫7天后尾静脉各采血1mL,至无菌微量离心管中,于37℃静置2小时,然后4℃过夜。次日8000g离心2分钟,分离血清并稀释,采用实施例3所制备的酶标板ELISA方法检测其免疫血清抗体效价,选取1:200稀释时OD₄₅₀值大于1.0的小牛,进行颈静脉采血,无菌分离血清,56℃水浴灭活30min,即获得流产衣原体S26/3株牛阳性对照血清,-20℃保存备用。

[0077] 实施例5 牛流产衣原体阴性对照血清的制备

[0078] 1、选取2头3-4月龄小牛,分别采血、分离血清,56℃水浴灭活30min,

[0079] 2、血清经过衣原体间接血凝(IHA)试剂盒和ELISA试剂盒检测,收集2种结果均为阴性的牛血清,混合,即为流产衣原体S26/3株阴性对照血清,-20℃保存备用。

[0080] 实施例6 牛流产衣原体病酶联免疫检测试剂盒

[0081] 1) 实施例3制备得到的酶标板;

[0082] 2) 实施例4-5制备的阳性对照血清和阴性对照血清;

[0083] 3) 洗涤缓冲液为含1.0‰吐温-20、pH7.2的磷酸盐缓冲液(PBST);

[0084] 4) 样本稀释缓冲溶液为含有0.3%Triton-100、0.1%硫柳汞钠的pH 7.2的磷酸盐缓冲液

[0085] 5) 酶标抗体稀释溶液为含有1.0%牛血清白蛋白、0.1%硫柳汞钠、5%甘油、pH7.2的磷酸盐缓冲液;

[0086] 6) 显色剂A为含1.46%磷酸氢二钠,0.93%柠檬酸,0.045%过氧化氢的水溶液。

[0087] 7) 显色剂B为含0.03%四甲基联苯胺,0.096%柠檬酸,0.019%乙二胺四乙二酸钠盐,2%DMSO,4%甘油的水溶液。

[0088] 实施例7 牛流产衣原体病酶联免疫检测试剂盒的应用

[0089] 牛流产衣原体病酶联免疫抗体检测法的具体实施步骤如下:

[0090] 1) 样品稀释:用样本稀释缓冲溶液将待测血清、阴性和阳性对照血清1:10稀释。

[0091] 2) 加样:以100μL/孔待测样品加入封闭后的酶标板孔中,同时以100μL/孔设复孔阴性对照和阳性对照,37℃温育30分钟。PBST冲洗4次,甩干。

[0092] 3) 加酶标抗体:用酶表抗体缓冲液将酶标抗体稀释成1:5000的酶工作液,每孔加入100μL,37℃温育30分钟。PBST冲洗4次,甩干。

[0093] 4) 显色:每孔先后加入显色剂A、B各50μL,37℃避光温育15分钟。

[0094] 5) 终止:每孔加入100μL终止液。

[0095] 6) 检测:于酶标仪上检测450nm吸收值。

[0096] 实施例8 牛流产衣原体病酶联免疫检测试剂盒的灵敏性和特异性

[0097] 1、灵敏性检测:用本发明所述试剂盒(实施例6)检测流产衣原体S26/3株POMP90蛋

白特异引物PCR检测感染流产衣原体奶牛阴道棉拭子, 鉴定证明均为阳性的32份感染流产衣原体的牛血清, 判断。灵敏度以真阳性率表示, 即灵敏度(%) = [阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数)] × 100%。

[0098] 2、特异性检测:

[0099] 1) 检测已知血清样本: 用本发明所述试剂盒(实施例6)检测流产衣原体S26/3株POMP90蛋白特异引物PCR检测奶牛阴道棉拭子, 鉴定证明阴性的107份奶牛血清和阳性的32份血清, 判断。特异性以真阴性率表示, 即特异性(%) = [阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数)] × 100%。

[0100] 表3检测结果

	检测方法	PCR (+)	PCR (-)	合计
[0101]	ELISA (+)	29	0	29
	ELISA (-)	3	107	110
	合计	32	107	139

[0102] 注“+”代表阳性;“-”代表阴性。

[0103] 2) 检测不同衣原体阳性血清的交叉反应: 用本发明所述试剂盒(实施例6)检测鸡抗鸚鵡热衣原体6BC珠阳性血清、肺炎衣原体阳性血清、和沙眼衣原体阳性血清同时设鸡抗流产衣原体阳性血清做阳性对照和未免SPF鸡血清做阴性对照结果如下:

[0104] 表4不同衣原体阳性血清ELISA检测OD₄₅₀值

	血清	鸡抗鸚鵡热衣原体6BC	鸡抗抗肺炎衣原体	鸡抗沙眼衣原体	鸡抗流产衣原体	鸡血清(衣原体阴性)
[0105]	OD450	0.201	0.193	0.189	0.784	0.096

[0106] 检测结果显示本专利所述试剂盒检测鸚鵡热衣原体6BC珠和肺炎衣原体、沙眼衣原体阳性血清的OD₄₅₀均小于试剂盒阴性判定临界值(即S/P% < 26%), 属于阴性, 说明本专利所述牛流产衣原体ELISA检测试剂盒不与其他衣原体血清产生交叉反应。

[0107] 3、32份由PCR检测阳性的样品, ELISA试剂盒检出29份阳性, 3份阴性; 107份由PCR检测阴性的样品, ELISA试剂盒检出0份阳性, 107份阴性。用SPSS软件对两种方法做X²检验(McNemar Test), P > 0.05, 表明两种方法没有显著差别, 同时初步得出本试剂盒的灵敏度为90.6%, 特异性为100%。

[0108] 实施例9 重复性检测

[0109] 按照ELISA操作方法, 以同一试剂盒对4份牛血清(2份阴性, 2份阳性)各重复测定3次; 同时, 用同一批不同试剂盒和不同批次的试剂盒分别对4份牛血清进行重复检测各3次, 计算其各自OD₄₅₀的平均值, 按照CV(%) = (SD / AV OD₄₅₀) × 100%计算该ELISA试剂盒的批内和批间变异系数CV值, 验证该ELISA试剂盒的重复性。检测结果如下:

[0110] 表5重复试验

样本	批内				批间			
	OD ₄₅₀			CV%	OD ₄₅₀			CV%
[0111] P1	0.518	0.553	0.528	2.7	0.521	0.579	0.671	10.5
P2	0.566	0.611	0.582	3.1	0.521	0.579	0.671	10.9
N1	0.131	0.151	0.149	6.3	0.115	0.14	0.156	12.3
N2	0.107	0.130	0.112	8.5	0.101	0.126	0.131	11.0

[0112] ELISA试剂盒批内变异系数均小于10%，批间变异系数均小于15%。

[0113] 实施例10 牛流产衣原体病酶联免疫抗体检测试剂盒标准体系的建立

[0114] 1、临界值的建立：根据优化确立的ELISA试验条件，检测32份经过流产衣原体S26/3株POMP90蛋白特异引物PCR检测，鉴定阳性的流产衣原体阳性血清和107份经过PCR检测，鉴定阴性血清进行检测，计算各血清的OD₄₅₀与阳性对照OD₄₅₀的比值S/P%并分别计算出阳性血清S/P%±2SD和阴性血清S/P%±2SD值。计算结果如下：

[0115] 表6 PCR阳性和阴性血清ELISA检测值统计值

统计值	PCR 阳性样本	PCR 阴性样本
均值	45.8	21.3
[0116] 标准差	11.96	6.86
均值+2SD	69.72	34.99
均值-2SD	21.88	14.41

[0117] 以1-特异性为横坐标，敏感度为纵坐标，运用SPSS 20.0软件绘制ROC曲线，统计尤登指数 (Youden's Index, YI)，YI=敏感性+特异性-1，分别找出阳性S/P%±2SD和阴性S/P%±2SD值对应灵敏度和特异度值。因为69.72和14.41临界值对应灵敏度和特异度均很低所以只从临界值在21.88和34.99区间选择最佳阳性和阴性临界值。不同临界值对应的ELISA灵敏性和特异如下：

[0118] 表7

临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)
21.9	100	56.1
25.8	100	79.4
26.4	100	81.3
29.8	96.9	90.7
30.8	96.9	92.5
31.2	90.6	92.5
33.6	78.1	94.4

[0120] 选择在此区间内的尤登指数最大处为最佳临界点，此点对应的敏感性和特异性最高，确定该处的S/P%值做为试剂盒阳性临界值 (CUT-OFF值)，同时选取另外一个灵敏性大于0.9，特异性大于0.8对应值做为试剂盒阴性临界值。检测值两者中间的视为可疑样本。

[0121] 如图1和图2所示，经SPSS20.0软件绘制得到ROC曲线，曲线下面积=0.976，尤登指数最大值=0.894，此点对应的灵敏性为0.969，特异性为0.925，对应坐标点为S/P%=30.81。阴性样本临界值对应灵敏性1，特异性0.813，对应坐标点为S/P%=26.33，四舍五入后本试剂盒阳性临界S/P%=31%，阴性临界值S/P%=26%，在26%和31%中间则判定可

疑样本。

[0122] 2、检测结果判定标准：待测样本(S)，阳性对照(P)和阴性对照(N)的 OD_{450} 和S/P%值。如果 OD_{PC} 均值 ≥ 0.45 并 $OD_{PC}/OD_{NC} \geq 3.0$ 则试剂盒有效。在此基础上 $S/P\% \geq 31\%$ 则判定为衣原体阳性。 $S/P\% < 26\%$ 则判定为衣原体阴性， $31\% \geq S/P\% \geq 26\%$ 则判定可疑。

[0123] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 中国农业大学
[0003]	<120> 一种酶联免疫检测牛流产衣原体的试剂盒
[0004]	<141> 2018-02-28
[0005]	<160> 1
[0006]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 25
[0009]	<212> PRT
[0010]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0011]	<400> 1
[0012]	Ser Thr Ser Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Ala Asp Lys Leu Thr Ile Val
[0013]	1 5 10 15
[0014]	Ser Gly Gly Pro Thr Leu Phe Ser Asn
[0015]	20 25

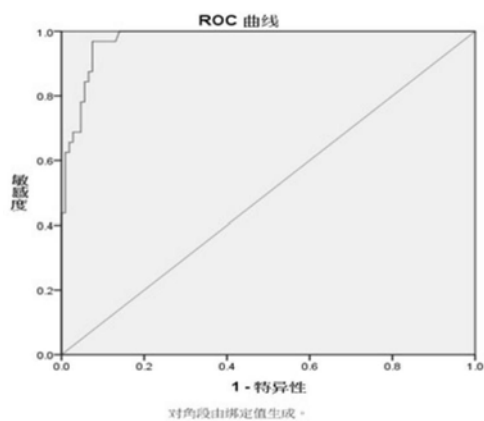


图1

曲线的坐标		
检验结果变量: ELISA		
大于或等于此值	敏感度	1 - 特异性
8.5500	1.000	1.000
9.6500	1.000	.991
.....		
25.8350	1.000	.206
26.3550	1.000	.187
.....		
28.4300	.969	.131
28.7400	.969	.121
28.9450	.969	.112
29.1550	.969	.103
29.7800	.969	.093
30.5050	.969	.084
30.8100	.969	.075
31.1750	.906	.075
32.0100	.875	.075
32.6850	.875	.065
32.8900	.844	.065
33.1600	.844	.056
.....		
71.8900	.031	.000
73.8300	.000	.000

图2