



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109283348 A

(43)申请公布日 2019.01.29

(21)申请号 201811375417.0

(22)申请日 2018.11.19

(71)申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 刘晶 李祎 刘群

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理

有限公司 11279

代理人 王芊雨 周际

(51)Int.Cl.

G01N 33/96(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表2页 附图2页

(54)发明名称

检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒及制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒及制备方法和应用,所述双抗体夹心ELISA试剂盒包括:捕获抗体,所述捕获抗体为弓形虫GRA1单克隆抗体,该捕获抗体的效价为 5×10^6 ,抗体亚型为IgG1;以及HRP标记的检测抗体,所述检测抗体为鼠源弓形虫GRA1多克隆抗体,该检测抗体的效价为 1.28×10^5 ;该双抗体夹心ELISA试剂盒操作简便、受环境因素影响小,无种属特异性,相比多克隆抗体建立的诊断方法具有更高的敏感性和特异性。

1. 一种检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒,其特征在于,所述双抗体夹心ELISA试剂盒包括:

捕获抗体,所述捕获抗体为弓形虫GRA1单克隆抗体,该捕获抗体的效价为 5×10^6 ,抗体亚型为IgG1;以及

HRP标记的检测抗体,所述检测抗体为鼠源弓形虫GRA1多克隆抗体,该检测抗体的效价为 1.28×10^5 。

2. 如权利要求1所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒,其特征在于,所述双抗体夹心ELISA试剂盒还包括:

96孔酶标反应板;

包被液,所述包被液是pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液;

封闭液及样品稀释液,所述封闭液及样品稀释液是5%的脱脂奶;

洗涤液,所述洗涤液是含有0.5% Tween-20的磷酸盐缓冲液;

TMB底物显色液;

终止液,所述终止液是2mol/L的 H_2SO_4 溶液;

标准阳性血清;以及

标准阴性血清。

3. 如权利要求1或2所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

(1) 所述捕获抗体的制备方法为:使用弓形虫GRA1-His重组蛋白免疫小鼠,筛选出阳性杂交瘤细胞,将该阳性杂交瘤细胞给小鼠腹腔注射,连续收集腹水,纯化腹水中的弓形虫GRA1单克隆抗体,即得;

(2) 所述HRP标记的检测抗体的制备方法为:将弓形虫GRA1-His重组蛋白加弗氏佐剂乳化后,免疫小鼠,采集血液、分离血清,纯化血清中的弓形虫GRA1多克隆抗体,将纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体使用HRP标记,即得;

(3) 所述包被液的制备方法为:称取 Na_2CO_3 1.43g和 $NaHCO_3$ 3.066g,溶于1000mL蒸馏水中,4℃保存备用;

(4) 所述封闭液及样品稀释液的制备方法为:称取5g脱脂奶粉溶于100mLPBS中,现配现用;

(5) 所述洗涤液的制备方法为:在1LPBS中加入0.5mL Tween-20;

(6) 所述TMB底物显色液的制备方法为:称取TMB 200mg,加入无水乙醇100mL,调pH值5.0,加双蒸水定容至1000mL,制成底物A液;另外称取柠檬酸9.33g, Na_2HPO_4 14.60g,加入6.4mL H_2O_2 ,调pH值5.0,加双蒸水定容至1000mL,制成底物B液,将所述底物A液与底物B液以1:1的体积比加入显色;

(7) 所述终止液的制备方法为:将浓硫酸22.2mL倒入蒸馏水178.8mL制得;

(8) 所述标准阳性血清是加入了100ng/mL弓形虫GRA1-His重组蛋白的FBS;以及

(9) 所述标准阴性血清为未加弓形虫GRA1-His重组蛋白的FBS。

4. 如权利要求3所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述捕获抗体的制备方法如下:

用弓形虫GRA1-His重组蛋白免疫小鼠,三免后取小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,用弓

形虫GRA1-GST重组蛋白为包被物建立间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞,将该阳性杂交瘤细胞给小鼠腹腔注射,连续收集腹水,进而纯化腹水中的单克隆抗体,经过SDS-PAGE鉴定纯化效果,得到所述捕获抗体。

5.如权利要求3所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述HRP标记的检测抗体的制备方法如下:

用弓形虫GRA1-His重组蛋白加同体积弗氏完全佐剂乳化后,按照100 μ g/只首次免疫BALB/c小鼠,然后用弗式不完全佐剂乳化,按照50 μ g/只免疫BALB/c小鼠,免疫两次,每次免疫间隔2周,二免和三免后十天眼眶采集血液、分离血清并检测抗体滴度,滴度达到 1×10^6 以上后将小鼠摘眼球采血分离血清,进而纯化血清中的多克隆抗体,经过SDS-PAGE鉴定纯化效果,进一步将纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体使用HRP标记,即得。

6.如权利要求5所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体是采用改良过碘酸钠法对其进行HRP标记的。

7.如权利要求4所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述弓形虫GRA1-His重组蛋白和弓形虫GRA1-GST重组蛋白是通过如下方式获得的:

(1)根据弓形虫GRA1的编码基因序列提取虫体RNA,反转录为cDNA,扩增目的片段,命名为TgGRA1;

(2)将所述目的片段分别与载体pET-28a和pGEX-6P-1进行重组,组装为pET-28a-TgGRA1和pGEX-6P-1-TgGRA1重组质粒,进一步将所述pET-28a-TgGRA1和pGEX-6P-1-TgGRA1重组质粒转入Transetta (DE3)感受态细胞中;以及

(3)将经鉴定已转入重组质粒pET-28a-TgGRA1和pGEX-6P-1-TgGRA1的感受态细胞经诱导表达、纯化,获得弓形虫GRA1-His重组蛋白和弓形虫GRA1-GST重组蛋白。

8.如权利要求4-7任一项所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述弓形虫GRA1-His重组蛋白的大小为30kDa,所述弓形虫GRA1-GST重组蛋白的大小为50kDa。

9.如权利要求1或2所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)用包被液将捕获抗体进行稀释,加入96孔酶标反应板中的每孔中,于4 $^{\circ}$ C包被后再于37 $^{\circ}$ C包被,甩板,并用洗涤液洗涤;

(2)每孔加入封闭液,封闭,用洗涤液洗涤;

(3)加入待检样品,于37 $^{\circ}$ C作用,用洗涤液洗涤;

(4)加入稀释后的HRP标记的检测抗体,于37 $^{\circ}$ C作用,用洗涤液洗涤;

(5)每孔加入TMB底物显色液,显色;

(6)用终止液终止反应;以及

(7)在波长450nm下读取OD值:当OD值 >0.157 时,判定样品为阳性, $0.131 < OD < 0.157$ 时,样品为可疑样品, $OD < 0.131$ 时,判定样品为阴性。

10.权利要求1或2所述的检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒在血清学检测领域中的应用。

检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明是关于血清学检测领域,特别是关于一种检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 龚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种专性细胞内寄生原虫,在全球范围内广泛传播,据估计全球约有三分之一的人群表现弓形虫血清抗体阳性。在家畜中同样流行广泛,其中以猪的感染率较高。弓形虫感染可依据宿主发病的轻重缓急分为急性弓形虫病和慢性弓形虫病,急性弓形虫病相对而言对家畜的危害更大。猪急性弓形虫病常引起母猪流产、死胎等繁殖障碍,仔猪发热、呼吸困难甚至死亡等,给养殖业造成巨大的经济损失;而且猪作为人类重要的肉制品来源,在人弓形虫病的传播上发挥了重要作用。因此,研发一种高效、便捷的急性弓形虫病诊断方法非常必要。

[0003] 急性弓形虫病常见的诊断方法包括病原学、血清学、分子生物学和免疫病理学等。病原学和分子生物学诊断方法(如PCR)结果虽然直观可靠,但病原学诊断操作复杂、检出率低、周期长,易出现假阴性,分子生物学诊断方法需要使用专用设备,检测时间和费用较高。血清学诊断常用的方法有抗体亲和力试验、间接免疫荧光试验(IFA)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)等,但是也都有不同程度的缺陷。抗体亲和力的变化与弓形虫感染进程并不是完全相符,例如妊娠期间IgG亲和力可能在虫体感染后很长时间内不会上升,有可能造成假阳性检测结果。IFA检测弓形虫早期感染是通过体内IgM水平来诊断,但其检测的敏感性远不如ELISA方法,而且实验需要特殊的仪器设备,对结果的判断具有主观性,假阳性率高,目前主要用于实验室检测。ELISA方法具有敏感特异、操作方便快捷、重复性好等优势,并且可以用于基层大批量临床样品的检测。

[0004] 弓形虫病的诊断常以检测血清中IgG抗体为目标,但是高亲和力IgG抗体的存在仅能表示弓形虫感染至少发生在检测前3-4个月。目前在临床上常用的指示急性弓形虫病的是IgM抗体,但仅是IgM抗体阳性不能确定是否有近期弓形虫感染,因为IgM可在机体内存在数月甚至几年,造成假阳性诊断结果。而弓形虫循环抗原(CAg)是指弓形虫在宿主体内入侵、运动和增殖过程中产生的代谢和裂解产物,通常在弓形虫感染早期或活动期的血清中出现,而且出现时间一般早于IgM,可以说是确诊急性弓形虫病的直接证据,相比抗体检测,CAg能更准确的诊断急性弓形虫病。

[0005] 弓形虫致密颗粒蛋白1(GRA1)是CAg的重要组成部分,具有良好的免疫原性,是一种良好的疫苗候选分子,也是弓形虫病诊断常见的候选抗原。弓形虫在入侵宿主细胞时及入侵后均能分泌GRA1到纳虫空泡(PV)内,调节PV内钙离子浓度,起到调节、修饰纳虫空泡膜(Parasitophorous vacuole membrane,PVM)的作用,抵抗宿主溶酶体的攻击,是弓形虫生长发育必不可少的重要功能蛋白;而且不同发育时期和不同基因型的弓形虫均能稳定分泌,表达量较高,这十分利于弓形虫的检测。

[0006] 目前,国内外学者已建立了多种关于血清CAg检测方法,例如基于SAG3单抗的双抗体夹心ELISA(寇金华),但检测下线为稀释640倍的标准阳性样品,并未对阳性样品中的循环抗原进行定量检测;Rui Chen等建立了一步法夹心ELISA方法,检测下线为血清中31.2ng/mL循环抗原,但该方法使用的是检测抗体和捕获抗体均为弓形虫全虫多抗。

[0007] 综上所述,发明一种特异性强、敏感性高,操作简便的夹心ELISA方法对多种动物急性弓形虫病的诊断具有重要的意义。

[0008] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒及制备方法和应用,该双抗体夹心ELISA试剂盒操作简便、受环境因素影响小,无种属特异性,相比多克隆抗体建立的诊断方法具有更高的敏感性和特异性。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供了一种检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒,所述双抗体夹心ELISA试剂盒包括:捕获抗体,所述捕获抗体为弓形虫GRA1(即,致密颗粒蛋白1)单克隆抗体,该捕获抗体的效价为 5×10^6 ,抗体亚型为IgG1;以及HRP标记的检测抗体,所述检测抗体为鼠源弓形虫GRA1多克隆抗体,该检测抗体的效价为 1.28×10^5 。

[0011] 本发明以CAg中GRA1抗原组分为检测目标,其中,GRA1是一种具有良好免疫原性的可溶性抗原,在弓形虫发育的各个时期均能大量表达,它参与纳虫空泡膜的形成及相关功能的发挥。

[0012] 在一优选的实施方式中,所述双抗体夹心ELISA试剂盒还包括:96孔酶标反应板;包被液,所述包被液是pH值为9.6的50mM碳酸盐缓冲液;封闭液及样品稀释液,所述封闭液及样品稀释液是5%的脱脂奶;洗涤液,所述洗涤液是含有0.5%Tween-20的磷酸盐缓冲液;TMB底物显色液;终止液,所述终止液是2mol/L的H₂SO₄溶液;标准阳性血清;以及标准阴性血清。

[0013] 本发明还提供了上述检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的制备方法,包括:(1)所述捕获抗体的制备方法为:使用弓形虫GRA1-His重组蛋白免疫小鼠,筛选出阳性杂交瘤细胞,将该阳性杂交瘤细胞给小鼠腹腔注射,连续收集腹水,纯化腹水中的弓形虫GRA1单克隆抗体,即得;(2)所述HRP标记的检测抗体的制备方法为:将弓形虫GRA1-His重组蛋白加弗氏佐剂乳化后,免疫小鼠,采集血液、分离血清,纯化血清中的弓形虫GRA1多克隆抗体,将纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体使用HRP标记,即得;(3)所述包被液的制备方法为:称取Na₂CO₃1.43g和NaHCO₃3.066g,溶于1000mL蒸馏水中,4℃保存备用;(4)所述封闭液及样品稀释液的制备方法为:称取5g脱脂奶粉溶于100mL PBS(磷酸盐缓冲液)中,现配现用;(5)所述洗涤液的制备方法为:在1LPBS中加入0.5mL Tween-20;(6)所述TMB底物显色液的制备方法为:称取TMB 200mg,加入无水乙醇100mL,调pH值5.0,加双蒸水定容至1000mL,制成底物A液;另外称取柠檬酸9.33g,Na₂HPO₄14.60g,加入6.4mL H₂O₂,调pH值5.0,加双蒸水定容至1000mL,制成底物B液,将所述底物A液与底物B液以1:1的体积比加入显色;(7)所述终止液的制备方法为:将浓硫酸22.2mL倒入蒸馏水178.8mL制得;(8)所

述标准阳性血清是加入了100ng/mL弓形虫GRA1-His重组蛋白的FBS(胎牛血清);以及(9)所述标准阴性血清为未加弓形虫GRA1-His重组蛋白的FBS。

[0014] 在一优选的实施方式中,所述捕获抗体的制备方法如下:用弓形虫GRA1-His重组蛋白免疫小鼠,三免后取小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,用弓形虫GRA1-GST重组蛋白为包被物建立间接ELISA方法筛选阳性杂交瘤细胞,将该阳性杂交瘤细胞给小鼠腹腔注射,连续收集腹水,进而利用Protein G重力预装柱纯化腹水中的单克隆抗体,经过SDS-PAGE鉴定纯化效果,得到所述捕获抗体。

[0015] 在一优选的实施方式中,所述HRP标记的检测抗体的制备方法如下:用弓形虫GRA1-His重组蛋白加同体积弗氏完全佐剂乳化后,按照100 μ g/只首次免疫BALB/c小鼠,然后用弗式不完全佐剂乳化,按照50 μ g/只免疫BALB/c小鼠,免疫两次,每次免疫间隔2周,二免和三免后十天眼眶采集血液、分离血清并检测抗体滴度,滴度达到 1×10^6 以上后将小鼠摘眼球采血分离血清,进而利用Protein G重力预装柱纯化血清中的多克隆抗体,经过SDS-PAGE鉴定纯化效果,进一步将纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体使用HRP标记,即得。

[0016] 在一优选的实施方式中,纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体是采用改良过碘酸钠法对其进行HRP标记的;优选的,使用HRP标记所述纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体的步骤如下:采用改良过碘酸钠法对纯化之后的多克隆抗体进行辣根过氧化物酶的标记:将5mg HRP溶于0.5mL蒸馏水中,室温搅拌2min;加入0.5mL新鲜配制的0.06mol/LNaIO₄水溶液,混匀后置于4 $^{\circ}$ C冰箱避光30min,溶液慢慢转变为绿色;再加入0.5mL 0.16mol/L乙二醇水溶液,室温静置30min,终止反应;将含有5mg纯化之后的弓形虫GRA1多克隆抗体的1mL水溶液加入到上述液体中,混匀后装入预先活化的透析袋中,放入0.05mol/LpH9.5的碳酸盐缓冲液缓慢搅拌,4 $^{\circ}$ C过夜透析;将透析袋内的液体转移出来,加入5mg/mL的NaBH₄溶液0.5mL,置于4 $^{\circ}$ C冰箱还原6h,使酶标抗体还原为稳定的结合物;然后加入等体积的饱和硫酸铵,于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜,4 $^{\circ}$ C3000r/min离心10min,沉淀溶于0.02mol/LpH7.4PBS中,并用PBS透析;透析后的液体4 $^{\circ}$ C3000r/min离心10min,根据沉淀量加入适量的PBS溶解;根据最终液体体积加入等量甘油混匀,于-20 $^{\circ}$ C长期保存。

[0017] 在一优选的实施方式中,所述弓形虫GRA1-His重组蛋白和弓形虫GRA1-GST重组蛋白是通过如下方式获得的:(1)根据弓形虫GRA1的编码基因序列(GRA1于ToxoDB数据库中的登录号为TGGT1_270250)提取虫体RNA,反转录为cDNA,扩增目的片段,命名为TgGRA1;(2)将所述目的片段分别与载体pET-28a和pGEX-6P-1进行重组,组装为pET-28a-TgGRA1和pGEX-6P-1-TgGRA1重组质粒,进一步将所述pET-28a-TgGRA1和pGEX-6P-1-TgGRA1重组质粒转入Transtetta(DE3)感受态细胞中;以及(3)将经鉴定已转入重组质粒pET-28a-TgGRA1和pGEX-6P-1-TgGRA1的感受态细胞经诱导表达、纯化,获得弓形虫GRA1-His重组蛋白(即,TgGRA1-His重组蛋白)和弓形虫GRA1-GST重组蛋白(即,TgGRA1-GST重组蛋白)。

[0018] 在一优选的实施方式中,所述弓形虫GRA1-His重组蛋白的大小为30kDa,所述弓形虫GRA1-GST重组蛋白的大小为50kDa。

[0019] 本发明还提供了上述测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒的使用方法,包括以下步骤:(1)用包被液将捕获抗体进行200倍稀释,于96孔酶标反应板中的每孔中加入100 μ L,于4 $^{\circ}$ C包被14h再于37 $^{\circ}$ C包被1h,甩板,并用洗涤液洗涤4次,每次间隔3min;(2)加入封闭液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C下封闭1h,用洗涤液洗涤;(3)加入待检样品,于37

℃作用1h,用洗涤液洗涤;(4)加入400倍稀释的HRP标记的检测抗体,每孔100 μ L,于37℃作用1h,用洗涤液洗涤;(5)每孔加入100 μ L TMB底物显色液,显色10min;(6)用终止液终止反应,每孔50 μ L;以及(7)在波长450nm下读取OD值:当OD值>0.157时,判定样品为阳性,0.131<OD<0.157时,样品为可疑样品,OD<0.131时,判定样品为阴性。

[0020] 本发明还提供了上述检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒在血清学检测领域中的应用。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0022] (1) 本发明以CAg中GRA1抗原组分为检测目标,建立双抗体夹心ELISA方法,对急性弓形虫病做出诊断,其具有针对单一抗原表位的特点,相比多克隆抗体建立的诊断方法具有更高的敏感性和特异性;

[0023] (2) 本发明将检测抗体直接标记酶,消除了对检测样品种属的限制,可用于多种动物血清样品的检测;

[0024] (3) 弓形虫GRA1具有良好的免疫原性,已有大量的研究证实了弓形虫GRA1在ESA(excreted/secreted antigen,排泄分泌抗原)中的存在,而且相比常用诊断抗原SAG1等期特异性蛋白,GRA1在弓形虫发育的各个时期均能大量表达,对弓形虫病的诊断更具有普适性。

附图说明

[0025] 图1是根据本发明一实施方式的抗体纯化后的SDS-PAGE鉴定图;

[0026] 图2是根据本发明一实施方式的TgGRA1-His重组蛋白经SDS-PAGE考马斯亮蓝R250染色并脱色后效果图;

[0027] 图3是根据本发明一实施方式的TgGRA1-GST重组蛋白经SDS-PAGE考马斯亮蓝R250染色并脱色后效果图。

[0028] 主要附图标记说明:

[0029] 1-单克隆抗体IgG的纯化;2-鼠源GRA1多克隆抗体的纯化;1'、1"-未诱导菌液;2'、2"-诱导后菌液;3、3'-菌液超声裂解并离心后上清;4、4'-菌液超声裂解并离心后包涵体;5、5'-纯化并浓缩后的蛋白;M-蛋白Marker。

具体实施方式

[0030] 下面结合附图,对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。

[0031] 除非另有其它明确表示,否则在整个说明书和权利要求书中,术语“包括”或其变换如“包含”或“包括有”等等将被理解为包括所陈述的元件或组成部分,而并未排除其它元件或其它组成部分。

[0032] 本发明所涉及到的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0033] 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。

[0034] E.coli Transetta (DE3) 菌株:购自北京全式金生物技术有限公司;

[0035] 镍亲和层析填料和谷胱甘肽Sepharose 4B填料:购自美国GE公司;

[0036] 蛋白G重力预装柱套装:购自北京博奥龙免疫技术有限公司;

- [0037] 小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒:购自美国SigmaAldrich公司;
- [0038] 96孔可拆卸酶标反应板:购自广州洁特生物过滤股份有限公司;
- [0039] 弓形虫RH速殖子由实验室保存;
- [0040] 6~8周龄雌性BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限责任公司;
- [0041] 实验猪购自北京顺鑫农业股份有限公司。
- [0042] 实施例1:TgGRA1的制备
- [0043] 本发明中弓形虫抗原为TgGRA1(其在ToxoDB数据库中的登录号为TGGT1_270250)(http://toxodb.org/toxo/app/record/gene/TGGT1_270250),编码该蛋白的基因片段为495bp。
- [0044] 1.TgGRA1基因的克隆和重组质粒的构建
- [0045] 设计引物扩增TgGRA1基因,引物如下表所示。引物两端含酶切位点,引物5'端增加保护碱基,3'端为GRA1基因序列。
- [0046] 表1 TgGRA1PCR扩增引物
- [0047]

| 基因 | 引物 | 酶切位点 |
|------------------|---|----------|
| pET-28a-TgGRA1 | Up:5' -CGGGATCCGAAGGCGGCGACAACCAGTCGAGC-3' (SEQ ID NO.:1) | BamH I |
| | Down:5' -CCGCTCGAGCTCTCTCTCTCTGTTAGGAACCC-3' (SEQ ID NO.:2) | XhoI |
| pGEX-6P-1-TgGRA1 | Up: 5' -TCCAGGGGCCCTGGGATCCGAAGGCGGCGACAACCAGT-3' (SEQ ID NO.:3) | BamH I |
| | Down: 5' - TCACGATGCGGCCGCTCGAGTTACTCTCTCTCTCTGTT-3' (SEQ ID NO.:4) | Hind III |

- [0048] 以弓形虫GT1株的cDNA为模板,对TgGRA1进行扩增,反应体系如下:
- [0049] 表2 TgGRA1 PCR扩增体系

| | 体系组成 | 体积/ μ L |
|--------|--------------------|-------------|
| [0050] | cDNA | 2 |
| | 上游引物 | 1 |
| | 下游引物 | 1 |
| | 2×HiFi SuperMix II | 25 |
| | 高压超纯水 | 21 |
| | 总体积 | 50 |

- [0051] PCR反应条件:94℃预变性10min,进行31轮循环,循环包括94℃变性30sec,56℃退火30sec,72℃延伸1min。最后72℃延伸10min。
- [0052] PCR产物取样进行琼脂糖凝胶电泳检测,鉴定其是否扩增成功。将与目的片段大小相符的PCR产物利用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收。
- [0053] 用BamHI和HindIII双酶切pGEX-6P-1骨架,以及BamHI和XhoI双酶切pET-28a骨架,并进行核酸电泳及纯化回收。具体酶切体系如下:
- [0054] 表3酶切反应体系

| | 组分 | 体积 |
|--------|-------------------------------|------------|
| | 质粒 | 43 μ L |
| [0055] | 10 \times Buffer (cutsmart) | 5 μ L |
| | BamH I | 2 μ L |
| | Xho I | 2 μ L |

[0056] 将纯化后的TgGRA1序列与双酶切骨架进行单片段连接,具体反应体系如下:

[0057] 表4单片段连接体系

| | 组分 | 体积 |
|--------|----------------------|----------------|
| | 载体骨架 | 2~6 μ L |
| [0058] | 目的片段 | 2~4 μ L |
| | 5 \times CE Buffer | 4 μ L |
| | Exnase | 2 μ L |
| | ddH ₂ O | 补足至 20 μ L |

[0059] 备注:连接前通过核酸电泳比较各片段亮度的方法估算DNA浓度,最适片段使用量 = $[0.4 \times \text{片段碱基对数}] \text{ng}$ (0.06pmol),最适载体使用量 = $[0.2 \times \text{片段碱基对数}] \text{ng}$ (0.03pmol)。

[0060] 2. TgGRA1重组蛋白的表达

[0061] 将两种重组质粒转入表达感受态Transetta (DE3) 中,冰浴30min,42 $^{\circ}$ C热激1min,冰浴3~5min,加入500 μ l无抗性的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C摇菌1h,取100~200 μ l菌液涂布于含有卡那霉素抗性的LB固体培养基上,37 $^{\circ}$ C过夜培养。次日挑取单个菌落,加入含有卡那霉素的LB液体培养基37 $^{\circ}$ C培养至对数生长期 ($OD_{600\text{nm}}$ 值约为0.6~0.8),加入IPTG,使其终浓度为0.8mM。继续培养4~6h后,将菌液8000rpm 4 $^{\circ}$ C离心20min,收集菌体沉淀。加入40ml PBS重悬菌体沉淀进行超声裂解,工作2s,间歇4s,裂解10min。然后12000rpm 4 $^{\circ}$ C离心20min,分别收集上清和沉淀,取样进行SDS-PAGE电泳。经鉴定,TgGRA1-His和TgGRA1-GST均主要存在于上清中,分别根据镍亲和层析填料和谷胱甘肽Sephrose 4B填料的说明对上清中的蛋白进行纯化。结果见图2。纯化的蛋白分装后-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0062] 实施例2:弓形虫GRA1抗体的制备

[0063] 1. 多克隆抗体的制备

[0064] 用弓形虫GRA1-His重组蛋白加同体积弗氏完全佐剂乳化后,按照100 μ g/只首次免疫BALB/c小鼠,然后用弗氏不完全佐剂乳化,按照50 μ g/只免疫BALB/c小鼠,免疫两次,每次免疫间隔2周,二免和三免后十天眼眶采集血液、分离血清并检测抗体滴度,用ELISA检测抗体滴度,滴度达到 1×10^6 以上后,将小鼠摘眼球采血分离血清,利用Protein G重力预装柱纯化血清中的多抗,并用SDS-PAGE鉴定纯化效果,该多抗的效价为 1.28×10^5 ,结果见图1。

[0065] 2. 单克隆抗体的制备

[0066] 用重组GRA1-His蛋白免疫小鼠,三免后取小鼠的脾细胞与SP2/0细胞融合,用GRA1-GST建立间接ELISA方法筛选阳性单克隆杂交瘤细胞;将筛选出的阳性杂交瘤细胞给小鼠腹腔注射,连续收集腹水,利用Protein G重力预装柱纯化腹水中单克隆抗体,并用SDS-PAGE鉴定纯化效果。结果见图1。将纯化后的单抗用GRA1-GST包被的ELISA方法测定其

效价,用商品化小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒进行抗体亚型的鉴定。结果显示,抗体效价为 5×10^6 ,抗体亚型为IgG1,具体见表5和表6。

[0067] 表5腹水效价的测定

[0068]

| 细胞株名称 | 单抗稀释倍数 | | | | | | | | 效价 |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| | 10^2 | 10^3 | 10^4 | 10^5 | 10^6 | 10^7 | 10^8 | 10^9 | |
| 4H10 | 1.431 | 1.392 | 1.361 | 1.281 | 0.582 | 0.076 | 0.014 | 0.012 | 5×10^6 |

[0069] 表6抗体亚型的鉴定

[0070]

| 细胞名称 | 抗体亚型 | | | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | IgG1 | | IgG2a | | IgG2b | | IgG3 | | IgA | | IgM | |
| 4H10 | 1.205 | 1.225 | 0.298 | 0.356 | 0.216 | 0.217 | 0.2 | 0.214 | 0.265 | 0.181 | 0.174 | 0.157 |
| 阴性对照 | 0.244 | | 0.252 | | 0.268 | | 0.275 | | 0.205 | | 0.2 | |

[0071] 实施例3:弓形虫急性感染动物样品的制备

[0072] 1. 弓形虫急性感染鼠血清样品的制备

[0073] 收集新鲜释放的纯化的弓形虫RH株速殖子,实验组共20只清洁级6-8周龄雌性BALB/c小鼠,每只腹腔注射100个,另设立对照组2只小鼠,腹腔注射无菌PBS。接种后每天观察临床症状,随机取2只小鼠摘眼球采血。

[0074] 2. 弓形虫急性感染猪血清样品的制备

[0075] 实验猪腹腔注射纯化后的弓形虫RH株速殖子 2×10^7 个,每天前腔静脉采血10mL,3mL分离血清,剩下的加入枸橼酸钠抗凝剂,利用商品化全血、组织细胞基因组提取试剂盒提取全血DNA。

[0076] 实施例4:弓形虫循环抗原夹心ELISA检测方法的建立

[0077] 1. 辣根过氧化物酶标记多克隆抗体的制备及评价

[0078] 采用改良过碘酸钠法对多克隆抗体进行辣根过氧化物酶的标记。将5mg HRP溶于0.5mL蒸馏水中,室温搅拌2min;加入0.5mL新鲜配制的0.06mol/L NaIO₄水溶液,混匀后置于4℃冰箱避光30min,溶液慢慢转变为绿色;再加入0.5mL 0.16mol/L乙二醇水溶液,室温静置30min,终止反应;将含有5mg纯化抗体的1mL水溶液加入到上述液体中,混匀后装入预先活化的透析袋中,放入0.05mol/LpH9.5的碳酸盐缓冲液缓慢搅拌,4℃过夜透析;将透析袋内的液体转移出来,加入5mg/mL的NaBH₄溶液0.5mL,置于4℃冰箱还原6h,使酶标抗体还原为稳定的结合物;然后加入等体积的饱和硫酸铵,于4℃冰箱中过夜,4℃3000r/min离心10min,沉淀溶于0.02mol/LpH7.4PBS中,并用PBS透析;透析后的液体4℃3000r/min离心10min,根据沉淀量加入适量的PBS溶解;根据最终液体体积加入等量甘油混匀,于-20℃长期保存。

[0079] 2. 单抗包被浓度与酶标抗体稀释度的优化

[0080] 采用棋盘法确定单抗包被浓度与酶标抗体最佳稀释度。将单抗和酶标抗体进行梯度稀释,包被条件为4℃过夜;次日甩板,并用0.5%PBST洗涤4次,每次间隔3min;加入封闭

液(PBS稀释的5%脱脂乳),每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C下封闭1h;再次洗涤,方法同上;加入标准阴性样品与37 $^{\circ}$ C中作用1h,标准阳性样品为加入了100ng/mL TgGRA1-His重组蛋白的FBS血清,标准阴性血清为未加蛋白的FBS。洗涤同上。最终选择P值在1.0左右,且P/N值最大的条件为最佳抗体使用浓度。结果显示,单抗200倍稀释,酶标抗体400倍稀释时,P值在1.0左右,且P/N值最大,见表7。

[0081] 表7单抗包被浓度与酶标抗体最佳稀释度的确定

[0082]

| 酶标抗体稀释倍数 | | 单抗稀释度 | | | | | |
|----------|-----|--------|---------------|--------|--------|--------|-------|
| | | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 |
| 100 | P | 3.399 | 2.745 | 1.987 | 1.376 | 1.155 | 0.681 |
| | N | 0.137 | 0.121 | 0.143 | 0.105 | 0.133 | 0.135 |
| | P/N | 24.810 | 22.686 | 13.895 | 13.105 | 8.684 | 5.044 |
| 200 | P | 2.124 | 1.557 | 1.278 | 0.949 | 0.819 | 0.370 |
| | N | 0.084 | 0.086 | 0.087 | 0.082 | 0.083 | 0.083 |
| | P/N | 25.286 | 18.105 | 14.690 | 11.573 | 9.867 | 4.458 |
| 400 | P | 2.059 | 1.183 | 0.901 | 0.695 | 0.577 | 0.303 |
| | N | 0.068 | 0.077 | 0.072 | 0.064 | 0.056 | 0.063 |
| | P/N | 30.279 | 15.364 | 12.514 | 10.859 | 10.304 | 4.810 |
| 800 | P | 1.420 | 0.852 | 0.632 | 0.397 | 0.356 | 0.189 |
| | N | 0.055 | 0.048 | 0.055 | 0.063 | 0.063 | 0.048 |
| | P/N | 25.818 | 17.750 | 11.491 | 6.302 | 5.651 | 3.938 |

[0083] 3.包被液种类的优化

[0084] 分别用pH9.6的碳酸盐缓冲液、Tris-HCl pH7.2和PBS pH7.4三种缓冲液包被单抗,浓度为最佳包被浓度,设立阴阳性对照,各4次重复,同时使用最佳酶标抗体稀释度进行夹心ELISA实验,其他操作步骤同2。最终选择P值在1.0左右,且P/N值最大的条件为最佳包被液。结果显示,使用碳酸盐缓冲液进行包被时,P值在1.0左右,且P/N值最大,见表8。

[0085] 表8包被液种类的优化

[0086]

| 包被液种类 | P | | | N | | | P/N | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| PBS | 1.419 | 1.438 | 1.660 | 1.469 | 0.119 | 0.092 | 0.129 | 0.120 | 13.013 |
| Tris-HCl | 1.598 | 1.495 | 1.481 | 1.366 | 0.156 | 0.109 | 0.158 | 0.103 | 13.194 |
| 碳酸盐缓冲液 | 1.444 | 1.293 | 1.508 | 1.349 | 0.092 | 0.038 | 0.119 | 0.096 | 16.214 |

[0087] 4.包被条件的优化

[0088] 使用优化的包被液、包被浓度和酶标抗体稀释液进行夹心ELISA实验,设立3种不同的包被条件,分别为4 $^{\circ}$ C14h,37 $^{\circ}$ C2h,4 $^{\circ}$ C14h+37 $^{\circ}$ C1h,每组阴阳性对照各做4次重复,其他操作步骤同2。最终选择P值在1.0左右,且P/N值最大的条件为最佳包被条件。结果显示,包被条件为4 $^{\circ}$ C14h+37 $^{\circ}$ C1h时,P值在1.0左右,且P/N值最大,见表9。

[0089] 表9包被条件的优化

[0090]

| 包被条件 | P | | | | | N | | | P/N |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 4℃ 14h | 0.529 | 0.524 | 0.583 | 0.562 | 0.105 | 0.119 | 0.129 | 0.130 | 4.551 |
| 37℃ 2h | 0.671 | 0.830 | 0.739 | 0.755 | 0.125 | 0.131 | 0.107 | 0.263 | 6.188 |
| 4℃ 14h + 37℃ 1h | 1.119 | 1.181 | 1.078 | 1.120 | 0.202 | 0.152 | 0.213 | 0.261 | 5.432 |

[0091] 5. 封闭液的确定

[0092] 使用已优化的实验条件进行夹心ELISA, 设立6种不同的封闭液, 分别是1%明胶、DMEM、5%脱脂奶、1%BSA、2%马血清、1%BSA+2%马血清, 每组阴阳性对照各做4次重复, 其他操作步骤同2。最终选择P值在1.0左右, 且P/N值最大的条件为最佳封闭液。结果显示, 封闭液为5%脱脂奶时, P值在1.0左右, 且P/N值最大, 见表10。

[0093] 表10封闭液的优化

[0094]

| 封闭液的种类 | P | | | | | N | | | P/N |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| DMEM | 0.957 | 1.147 | 1.338 | 0.933 | 0.253 | 0.250 | 0.198 | 0.237 | 4.664 |
| 5%脱脂奶 | 0.794 | 0.932 | 1.061 | 0.917 | 0.089 | 0.077 | 0.098 | 0.076 | 10.894 |
| 1%明胶 PBS | 1.505 | 1.721 | 1.816 | 1.612 | 0.295 | 0.224 | 0.288 | 0.257 | 6.254 |
| 1%BSA | 1.635 | 1.496 | 1.506 | 1.393 | 0.149 | 0.183 | 0.223 | 0.177 | 8.238 |
| 5%马血清 | 1.490 | 1.528 | 1.519 | 1.291 | 0.126 | 0.112 | 0.156 | 0.173 | 10.279 |
| 5%马血清+1%BSA | 1.658 | 1.676 | 1.758 | 1.708 | 0.167 | 0.105 | 0.155 | 0.106 | 12.758 |

[0095] 6. 显色时间的确定

[0096] 使用已优化的实验条件进行夹心ELISA, 在洗涤结束后加入显色底物, 分别在显色5min、10min、15min、20min终止反应, 每组阴阳性对照各做4次重复, 其他操作步骤同2。最终选择P值在1.0左右, 且P/N值最大的条件为最佳显色时间。结果显示, 显色10min时, P值在1.0左右, 且P/N值最大, 见表11。

[0097] 表11显色时间的优化

[0098]

| 显色时间 | P | | | | | N | | | P/N |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 5min | 0.812 | 0.857 | 0.882 | 0.850 | 0.059 | 0.065 | 0.06 | 0.061 | 13.864 |
| 10min | 1.327 | 1.300 | 1.250 | 1.292 | 0.055 | 0.047 | 0.045 | 0.049 | 26.374 |
| 15min | 1.601 | 1.466 | 1.580 | 1.591 | 0.072 | 0.076 | 0.088 | 0.079 | 20.218 |
| 20min | 2.074 | 1.922 | 2.088 | 2.028 | 0.096 | 0.086 | 0.082 | 0.088 | 23.045 |

[0099] 7. 阴阳性临界值的确定

[0100] 使用以上优化完成的所有条件进行夹心ELISA实验, 使用6种不同来源的阴性血清进行孵育, 10倍稀释使用, 根据公式计算阴阳性临界值。计算公式: cut off值 = 阴性对照OD_{450nm}平均值 + 3 × 标准差(SD)。经计算, cut off值为0.157。见表12; 同时, 我们以大于0.131小于0.157为可疑样品范围。

[0101] 表12阴阳性临界值的确定

[0102]

| 阴性血清种类 | 1号 | 2号 | 3号 | 4号 | 5号 | 6号 | 7号 | 8号 | 平均值 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| OD _{450nm} | 0.073 | 0.078 | 0.046 | 0.061 | 0.11 | 0.061 | 0.078 | 0.13 | 0.080 |

[0103] 实施例5:弓形虫循环抗原夹心ELISA检测方法效果评价

[0104] 1. 敏感性实验

[0105] 将标准阳性样品10倍倍比稀释,使用前期优化好的夹心ELISA进行实验,以cut off值判定抗原最低检出浓度。结果显示,优化后的夹心ELISA方法可以检测到FBS中1.563ng/mL以下的GRA1抗原。见表13。

[0106] 表13敏感性检测

[0107]

| OD _{450nm} | GRA1-His 浓度 (ng/mL) | | | | | | | | |
|---------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.250 | 3.125 | 1.563 | 0.781 | 0.391 |
| P | 1.115 | 0.854 | 0.874 | 0.856 | 0.663 | 0.433 | 0.300 | 0.167 | 0.109 |
| N | 0.061 | 0.069 | 0.038 | 0.043 | 0.059 | 0.046 | 0.057 | 0.070 | 0.071 |

[0108] 2. 特异性实验

[0109] 使用分别加入了新孢子虫和弓形虫速殖子的FBS进行特异性检测,同时设立阴性对照,根据前期建立好的夹心ELISA方法进行实验。结果显示,加入了新孢子虫的FBS检测结果为阴性,证明该方法特异性良好。

[0110] 3. 重复性实验

[0111] 选用10份血清进行双抗体夹心ELISA方法批间和批内重复性试验。结果显示,批内重复性试验变异系数最大值为9.231%,批间重复变异系数最大值为9.295%,说明该方法重复性较好。见表14。

[0112] 表14重复性试验

| 样品 | | 批内重复 | | 批间重复 | |
|----|-----|-------|----------|-------|----------|
| | | 均值 | 变异系数 (%) | 均值 | 变异系数 (%) |
| P | 第一次 | 1.084 | 2.030 | 1.328 | 2.861 |
| | 第二次 | 1.280 | 2.273 | 1.231 | 2.356 |
| | 第三次 | 1.400 | 1.743 | 1.43 | 1.259 |
| | 第四次 | 1.425 | 1.811 | 1.139 | 1.493 |
| N | 第一次 | 0.052 | 4.003 | 0.068 | 5.882 |
| | 第二次 | 0.054 | 9.231 | 0.047 | 4.255 |
| | 第三次 | 0.055 | 3.636 | 0.065 | 9.259 |
| | 第四次 | 0.057 | 7.018 | 0.061 | 4.918 |

[0113] 4. 检测弓形虫循环抗原的夹心ELISA试剂盒与nPCR检测方法的一致性比较

[0115] 使用王权等报道的巢式PCR方法,对实验动物全血中弓形虫的基因进行鉴定。nPCR的具体操作方法如下:按文献报道设计合成nPCR的内外引物,具体序列如下:

[0116] ITS外引物F1:5' ACCTTTGAATCCCAAGCA 3' (SEQ ID NO.:5)

[0117] ITS内引物R1:5' TAAATCGGACAAACGCC 3' (SEQ ID NO.:6)

[0118] ITS外引物F2:5' TTTGCATTCAAGAAGCGTG 3' (SEQ ID NO.:7)

[0119] ITS内引物R2:5' AAGGTGCCATTTGCGTTC 3' (SEQ ID NO.:8)

[0120] 对弓形虫ITS基因进行PCR扩增。反应体系如下:

[0121] 表15 nPCR扩增体系

| 组分 | 体积 |
|--------------------------|----------------|
| 引物 F | 0.5 μ L |
| [0122] 引物 R | 0.5 μ L |
| 2 \times ExTaq Mix PCR | 12.5 μ L |
| 模板 | 2 μ L |
| ddH ₂ O | 补足至 25 μ L |

[0123] 第一轮PCR扩增条件:25 μ L体系的Taq DNA聚合酶扩增反应,94 $^{\circ}$ C预变性5min,94 $^{\circ}$ C变性50s,60 $^{\circ}$ C退火40s,72 $^{\circ}$ C延伸45s,共30次循环,72 $^{\circ}$ C终延伸10min。第二轮PCR:将第一轮PCR产物进行500倍稀释后取2 μ L为模板,其他条件不变。将两轮PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像仪下观察结果。同时,以上述夹心ELISA操作步骤对血清中的弓形虫循环抗原进行检测。实验结果表明,小鼠从第4d可以在全血中检测到弓形虫基因,而猪在感染后第1d即可检测到,如表16和表17。由于循环系统中弓形虫速殖子的存在是CAg存在的前提,只有当弓形虫达到某种数量时循环抗原才可以被成功检测到,而且nPCR检测目标为弓形虫基因组并非CAg,因此,检测结果nPCR阳性早于ELISA循环抗原的检测是正常也是必然的一种现象。

[0124] 表16鼠弓形虫急性感染检测结果

[0125]

| 感染后天数 | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d |
|----------|----|----|----|----|----|----|
| 夹心 ELISA | - | - | - | - | + | + |
| nPCR | - | - | - | + | + | + |

[0126] 表17猪弓形虫急性感染检测结果

[0127]

| 感染后天数 | 1d | 2d | 3d | 4d | 5d | 6d | 7d | 8d | 9d | 10d | 11d | 12d | 13d | 14d |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 夹心 ELISA | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| nPCR | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |

[0128] 5. 与国产商品化试剂盒检测小鼠血清循环抗原效果的比较

[0129] 为比较以GRA1为检验目标的双抗体夹心ELISA方法与市售商品化试剂盒的效果,将上述采集的鼠血清样品用两种国产试剂盒进行检测。结果显示,与国产商品化试剂盒相比,本发明的检测结果显示出明显的规律性和更高的敏感性,可信程度更高,见表18。

[0130] 表18与国产商品化试剂盒检测小鼠血清循环抗原效果的比较

[0131]

| 检测方法 | 感染后天数 (天) | | | | | |
|----------|-----------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 夹心 ELISA | - | - | - | - | + | + |
| 国产试剂盒 1 | + | + | - | + | - | - |
| 国产试剂盒 2 | + | - | - | - | - | - |
| nPCR | - | - | - | + | + | + |

[0132] 实施例6:检测弓形虫循环抗原的夹心ELISA试剂盒的组装和检测方法

[0133] ELISA检测试剂盒包括以下组分:

[0134] 1. 捕获抗体为GRA1单克隆抗体(4H10),检测抗体为鼠源GRA1多抗;

[0135] 2. 包被液(pH值9.650mM碳酸盐缓冲液): Na_2CO_3 1.43g, NaHCO_3 3.066g,溶于1000mL蒸馏水中,4℃保存备用;

[0136] 3. 封闭液及样品稀释液(PBS稀释的5%脱脂乳):称取5g脱脂奶粉溶于100mLPBS中,现配现用。

[0137] 4. 洗涤液(0.5%PBST):在1LPBS中加入0.5mLTween-20;

[0138] 5. TMB底物显色液:按底物A液(称取TMB 200mg,加入无水乙醇100mL,调pH值5.0,加双蒸水定容至1000mL),与底物B液(称取柠檬酸9.33g, Na_2HPO_4 14.60g,加入6.4mL H_2O_2 ,调pH值5.0,加双蒸水定容至1000mL)1:1加入显色;

[0139] 6. 终止液(2M浓硫酸):浓硫酸22.2mL,加入蒸馏水178.8mL;

[0140] 7. 标准阳性血清;

[0141] 8. 标准阴性血清。

[0142] 将上述材料组装即得本发明。

[0143] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

序列表

<110> 中国农业大学

<120> 检测多种动物血清中弓形虫循环抗原的双抗体夹心ELISA试剂盒及制备方法和应用

<130> P181732DD1F

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

cgggatccga aggcggcgac aaccagtcga gc 32

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

ccgctcgagc tctctctctc ctgtaggaa ccc 33

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

tccaggggcc cctgggatcc gaaggcggcg acaaccagt 39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

tcacgatgcg gccgctcgag ttactctctc tctctgtt 39

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

acctttgaat cccaagca 18

<210> 6

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
taaatcggac aaacgccc 18
<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
tttgattca agaagcgtg 19
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
aaggtgcat ttgcgttc 18

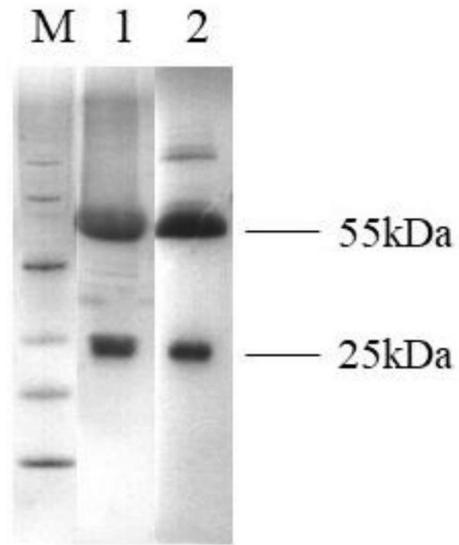


图1

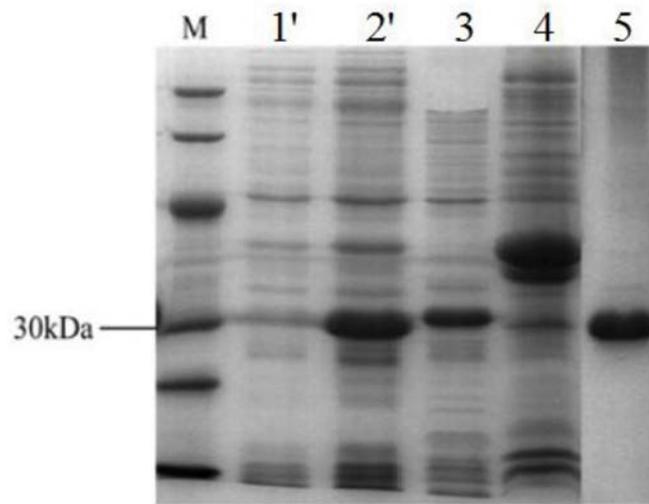


图2

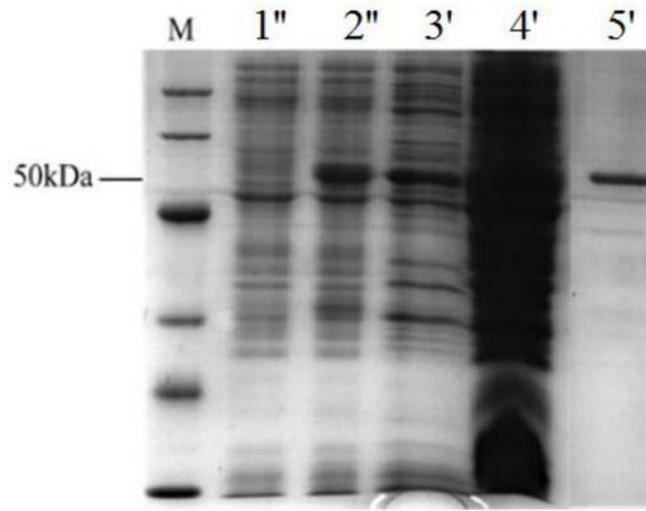


图3