

说明书

一种绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测试剂盒

技术领域

本发明涉及兽用生物制品检测技术领域，尤其涉及一种绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测试剂盒。

背景技术

绵羊肺炎支原体是引起绵羊和山羊非典型性肺炎的主要病原，同时，羊感染绵羊肺炎支原体后，对多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌及副流感病毒等的易感性也明显增加。目前，该病原在全球范围内分布，给绵羊、山羊养殖业造成了重大的经济损失，同时也严重威胁野生小反刍动物的健康。在我国，绵羊肺炎支原体的感染也十分普遍，危害严重。

对绵羊肺炎支原体感染的准确诊断及流行病学调查是采取综合防控措施的关键环节。目前，绵羊肺炎支原体感染的诊断方法主要是采用分子生物学技术，应用最广泛的为 L.Mcauliffe 等基于绵羊肺炎支原体 16S rRNA 基因建立的 PCR 检测方法。血清抗体的检测是进行流行病学调查、疾病诊断和疫苗免疫效果评价的重要手段，但目前绵羊肺炎支原体尚无公认的特异灵敏的血清学检测方法。在血清学检测方法中，ELISA 方法因其灵敏特异、简单快速、稳定及易于自动化操作和批量检测等优点，已广泛用于各种病原微生物所引起的传染病、寄生虫病及非传染病等的免疫诊断。目前，绵羊肺炎支原体中并没有商业化的 ELISA 抗体检测试剂盒，国内虽有采用全菌抗原建立的 ELISA 方法，但由于在羊中存在结膜支原体等与绵羊肺炎支原体亲缘关系相近的其他支原体，全菌抗原包被会出现明显的交叉反应，因此不适合用于血清学诊断技术的建立。因此，建立一种特异灵敏的绵羊肺炎支原体抗体检测 ELISA 方法及试剂盒十分必要。

发明内容

本发明要解决的技术问题是由于在羊中存在结膜支原体等与绵羊肺炎支原体亲缘关系相近的其他支原体，全菌抗原包被会出现明显的交叉反应，因此不适合用于血清学诊断技术。

为解决上述问题，本发明提供一种以纯化 P113 重组蛋白 rP113(C)作为包被抗原，建立绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测试剂盒，为流行病学调查、疾病诊断和疫苗免疫效果评价提供了有力工具。

为达到上述目的，本发明通过以下技术方案实现，一种绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其中的包被抗原为绵羊肺炎支原体黏附素基因 P113 重组蛋白 rP113(C)，其引物序列如下：

P113(c) F: 5-CGCGGATCC GAAGGTGCTCAAGACCAAGGTA -3

说明书

P113(c) R: 5-CCGCTCGAG GGTGTTGTTGAGGTGGTATCAGG-3。

粘附素不仅是支原体重要的毒力因子，同时也是最为重要的免疫原，并且 P113 重组蛋白已证明是良好的免疫原，而且避免了用全菌作为抗原导致的交叉反应。因此，建立绵羊肺炎支原体抗体间接 ELSIA 检测方法，通过最适的反应条件优化，建立特异性强，敏感性好，符合率高的绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测试剂盒。

经由特异性分析表明，P113(C)作为包被抗原，可以用于建立检测绵羊肺炎支原体的间接 ELISA 检测试剂盒。

绵羊肺炎支原体重组蛋白的特异性分析具体为：将纯化的重组蛋白 rP113(C)按浓度稀释到 4μg/ml 包被过夜，5%脱脂奶粉 37℃封闭 2h，用于特异性评价的兔血清均 1:400 倍稀释，37℃孵育 1h，各血清均做 3 个重复，HRP 标记的山羊抗兔 IgG 以 1:6000 倍稀释，37℃孵育 1h，加 TMB 室温显色 10min 后，2M H₂SO₄ 终止，酶标仪读取 OD₄₅₀ 吸光值。包被重组蛋白 rP113(C)，以兔抗 MO 阳性血清为标准阳性、兔抗 MO 阴性血清为标准阴性，其余兔抗阳性或高免血清对两个重组蛋白进行特异性评价，结果显示，重组蛋白与绵羊肺炎支原体阳性血清出现强阳性反应，与阴性血清几乎无反应；与绵羊肺炎支原体 Y98 株和 SC01 株亦出现强。

进一步的，根据阳性平均值接近 1 且 P/N 最大的判定条件，rP113(C)最佳抗原包被浓度为 1μg/ml，最适血清稀释度为 1:200 倍稀释。

进一步的，最佳封闭液为 5%脱脂奶粉。

进一步的，最佳孵育时间为 60min。

进一步的，当酶标二抗以 1:40000 稀释时，阳性血清 OD₄₅₀ 读数接近于 1 且 P/N 最大，因此 1:40000 为最佳的酶标二抗稀释度。

进一步的，酶标二抗最佳反应时间为 45min。

进一步的，结果判定为当 $S'/N \geq 2.9$ 时，判定为阳性； $S'/N \leq 2.5$ 时，判定为阴性， $2.5 < S'/N < 2.9$ 时，结果为可疑。

临界值的确定：按特异性分析的方法检测 30 份绵羊肺炎支原体阴性兔血清，以 OD₄₅₀ 最小的一份作为标准阴性血清，其余所有血清的 OD₄₅₀ (P) 分别除以标准阴性血清的 OD₄₅₀ (N)，得到所有的 P/N。计算 30 份血清的 P/N 平均值 X 和标准差 S，以血清 $P/N \geq X+3S$ 为阳性， $P/N \leq X+2S$ 为阴性作为特异性血清的判断标准，介于二者之前的为可疑。结果矫正值的平均值 $X=1.631$ ，标准差 $S=0.430$ ，因此计算得： $X+3S=2.921$ ， $X+2S=2.491$ ，为了判定结果方便，确定当 $S'/N \geq 2.9$ 时，判定为阳性； $S'/N \leq 2.5$ 时，判定为阴性， $2.5 < S'/N < 2.9$ 时，结果为可疑。

说明书

批内重复试验的变异系数均值为 1.5%，批间重复试验的变异系数均值为 6%，表明该方法重复性良好。

进一步的，绵羊肺炎支原体黏附素基因 P113 重组蛋白 rP113(C)的制备方法如下：诱导表达纯化绵羊肺炎支原体黏附素基因 p113 重组蛋白作为抗原，rP113(C) 浓度为 816 μ g/ml。

本发明的有益效果在于：

首次以纯化 P113 重组蛋白 rP113(C)作为包被抗原，建立绵羊肺炎支原体抗体间接 ELSIA 检测试剂盒，为流行病学调查、疾病诊断和疫苗免疫效果评价提供了有力工具。

附图说明

图 1 pET-32a(+)-P113(C)重组质粒的酶切鉴定 M: DL1,0000 Marker; 1: pET-32a(+)-P113(C)重组质粒 Xho I 酶切产物; 2: pET-32a(+)-P113(C)重组质粒的双酶切产物;

图 2 pET32a(+)-P113(C)在 Rosetta(DE3)中的表达 M: 蛋白质分子量标准; 0a~9a: 0.4mM IPTG 诱导前、诱导 2、4、6、8 及诱导过夜重组表达工程菌表达产物; 0b~9b: 1mM IPTG 诱导前、诱导 2、4、6、8 及诱导过夜重组表达工程菌表达产物; 0c~9c: 诱导前、诱导 2、4、6、8 及诱导过夜 pET32a (+) 空载表达产物;

图 3 rP113(C)的可溶性分析及纯化 M: 蛋白分子量标准; 1: 表达 rP113(C)的 Eoli Rosetta(DE3)裂解物; 2: 裂解物沉淀; 3:裂解物 上清; 4: 纯化产物;

图 4 rP113(C)重组蛋白的 Western blot 分析 M: 蛋白分子量标准品; 1: 纯化的 rP113(C)/阳性血清; 2. 纯化的重组蛋白 rP113(C)/阴性血清;

图 5 绵羊肺炎支原体抗体消长规律 折线为 rP113(C)-ELISA 结果，柱状图为 IHA 结果。

具体实施方式

为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明的实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

实施例 1 绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 抗原的制备以及免疫源性检测

1.材料

(1) 菌株及质粒：绵羊肺炎支原体的阳性血清和绵羊肺炎支原体阴性血清、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、溶血曼氏杆菌阳性血清以及丝状支原体山羊亚种血清、猪肺炎支原体阳性血清、丝状支原体丝状亚种血清均为现有材料，由西南民族大学动物医学实验室-20℃保存；大肠杆菌、沙门氏菌因子血清购自四川省生物制品研究所；绵羊肺炎支原体临床分离株 SC01 由本实验室分离保存；原核表达载体 pET-32a(+)为 Novagen 公司产品；感受态细胞 DH5 α 、

说明书

Rosetta(DE3)为 TaKaRa 公司产品;

(2) 主要试剂

IPTG、氨苄青霉素、氯霉素为 Sigma 公司产品; dNTPs、Mg²⁺离子、TaqDNA 聚合酶、T4 连接酶为 TaKaRa 公司产品; 限制性内切酶 BamH I、Xho I 为 NEB 公司产品; 核酸蛋白分子量标准 DL2000、DL10000 为 Blotopped 公司产品; DNA Gel Extraction Kit、Plasmid Miniprep Kit 为 AXYGEn 公司产品; DNA 纯化试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒为上海生工公司产品; 30%丙烯酰胺、PVDF 膜、Immun-Star WesternC Chemiluminescence Kit、Precision Plus ProteinTM 标准品、Precision Plus ProteinTM WesternCTM 标准品为 Bio-Rad 公司产品; DAB Substrate Kit 为 Thermo 公司产品; HistrapTM HP 纯化柱为 GE 公司产品。

(3) 主要仪器

离心机: 5417R、5804R, Eppendorf, 德国; CO₂ 恒温培养箱: Forma Series II, Thermo, 美国; 隔水式恒温培养箱: 上海齐欣科学仪器有限公司; 核酸蛋白检测仪: DU800, Beckman, 美国; RCR 仪: My CyclorTM, Bio-Rad, 美国; 核酸电泳仪: Powerpac UniversalTM, Bio-Rad, 美国; 凝胶成像系统: VerSa Doc2000, Bio-Rad, 美国; 超声细胞破碎仪: VC-750, SONIC, 美国; 酶标仪: 680, Bio-Rad, 美国; 凝胶半干转印装置: Trars-Blot SD, Bio-Rad, 美国。

2. 方法

(1) 抗原的制备

① SC01 株的培养与基因组 DNA 的提取

将绵羊肺炎支原体 SC01 株冻干菌种加入 2ml 改良 Hayflick's 培养基中, 37℃、160rpm 恒温水平震荡培养 48h 后, 按 3%(v/v) 将其接入新鲜的改良 Hayflick's 培养基中, 37℃、160rpm 恒温水平震荡培养 24h 后, 13000rpm 室温离心 30min, 收集菌体, 采用常规酚/氯仿法提取 DNA, 分光光度计检测提取质量并测定浓度后, 分装-20℃保存。

② 引物的设计与合成

根据生物信息学分析结果, 对 P113 蛋白 C 端进行原核表达, 针对 C 端, 利用 Primer Premier 5 软件设计一对表达引物, 序列如下:

P113(c) F: 5-CGCGGATCC GAAGGTGCTCAAGACCAAGGTA -3

P113(c) R: 5-CCGCTCGAG GGTGTTGTTGAGGTGGTATCAGG-3

上游引物 P113(c)F 于 5'端引入 BamH I 酶切位点, 下游引物 P113(c)R 于 5'端引入 Xho I 酶切位点。该对引物扩增的目的区域为第 2344bp 至 3012bp 大小共 669bp 的碱基片段, 其间不含有在支原体中编码色氨酸的 TGA 密码子, 且目的片段包含 P113 蛋白 C 端重复区域的整个编码区域。

说明书

③原核表达质粒的构建及鉴定结果

目的片段经酶切后与质粒连接，转化入 DH5 α 感受态细胞，挑取疑似阳性菌落进行培养，提取质粒，分别进行阳性质粒的鉴定。

采用引物 P113(c)F/P113(c)R 对质粒进行 PCR 扩增，所得条带与目的条带大小相符；BamH I 和 Xho I 双酶切结果显示，双酶切后在 5800bp 左右及 700bp 左右出现两条明显的条带，单酶切后在 6500bp 左右出现一条亮带，与预期一致，见图 1；同时，该质粒的测序结果显示，目的片段的序列和大小与引物设计所参考的绵羊肺炎支原体 SC01 株 p113 基因相应区域完全相同且在载体中插入的位置正确。因此成功的构建了扩增 P113 蛋白 C 端重复区的原核表达重组质粒 pET-32a(+)-P113(C)。

④重组蛋白的诱导表达

将重组表达质粒 pET-32a(+)-P113(C)转化入表达工程菌 E.coli Rosetta(DE3)后，分别经 0.4mM 和 1mM 的 IPTG 浓度诱导，在诱导后 0h、2h、4h、6h、8h 及过夜五个时间点分别采集菌液进行 SDS-PAGE 检测，结果显示：

pET-32a(+)-P113(C)/ Rosetta(DE3)重组表达工程菌经 IPTG 诱导后，能够表达出大小约为 44ku 的蛋白条带，其大小与预期相符。诱导条件的优化结果显示（图 2），在诱导开始后 2h，目的蛋白即开始表达（图中 2a，2b）；到诱导后 6h，目的蛋白的表达量达到最高（图中 6a，6b）。同时，0.4mM 和 1mM 的 IPTG 浓度下，目的蛋白表达量趋势相同，但是 0.4mM IPTG 诱导的目的蛋白表达量（图中 6a）明显高于 1mM 下的表达量（图中 6b）。含空载的表达工程菌无相应蛋白的表达（图中 c）。因此，rP113(C)重组蛋白的最佳表达条件为：37℃下 0.4mM IPTG 浓度诱导表达 6h。

⑤ 重组蛋白的可溶性分析及纯化

rP113(C)重组蛋白的可溶性分析显示，该蛋白以可溶性表达的形式表达。利用 HistrapTM HP 纯化柱对全菌裂解液上清进行纯化，对收集到的目的蛋白进行 SDS-PAGE 检测，结果仅在 44ku 左右出现单一条带，纯化回收结果良好。可溶性分析和纯化结果如图 3。

(2) 抗原免疫源性检测

以rP113(C)纯化蛋白制样，进行SDS-PAGE，转膜后，以兔抗绵羊肺炎支原体高免血清为一抗，同时以绵羊肺炎支原体阴性兔血清作为阴性对照，HRP标记的山羊抗兔IgG为二抗，进行Western blot分析，结果显示，经纯化后的重组蛋白可与兔抗绵羊肺炎支原体全菌抗体结合，而与阴性对照血清无结合反应，如图4。表明P113重组蛋白具有良好的免疫原性，说明P113蛋白是绵羊肺炎支原体的免疫原，能在感染中诱导产生特异性抗体。

(3) 抗原特异性检测

说明书

将纯化的重组蛋白 rP113(C)按浓度稀释到 4μg/ml 包被过夜，5%脱脂奶粉 37℃封闭 2h，用于特异性评价的兔血清均 1:400 倍稀释，37℃孵育 1h，各血清均做 3 个重复，HRP 标记的山羊抗兔 IgG 以 1:6000 倍稀释，37℃孵育 1h，加 TMB 室温显色 10min 后，2M H2SO4 终止，酶标仪读取 OD450 吸光值。以兔抗 MO 阳性血清为标准阳性、兔抗 MO 阴性血清为标准阴性，其余兔抗阳性或高免血清对两个重组蛋白进行特异性评价，结果见表 1。结果显示，两个重组蛋白与绵羊肺炎支原体阳性血清均出现强阳性反应，与阴性血清几乎无反应；与绵羊肺炎支原体 Y98 株和 SC01 株亦出现强阳性反应。rP113(C)与无关血清无反应，OD450 读数均接近阴性血清且都小于临界值；

表 1 特异性评价结果

Table 1 Results of specificity

血清	MO 阳性	MO 阴性	Y98	SC01	MmmLC	Mmc	Mcc	Mccp	金葡	E.coli	空白 对照
rP113(C)	3.244	0.171	3.238	3.203	0.158	0.121	0.114	0.213	0.122	0.201	0.096
判定结果	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N

注：表格中数值为 OD₄₅₀ 读数，P 为阳性，N 为阴性。

实施例 2 绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 方法的建立及条件优化

① 抗原抗体最佳工作浓度的确定

采用方正滴定法确定抗原抗体的最佳工作浓度。根据所制备的重组蛋白浓度，使用包被缓冲液将抗原依次稀释成 4μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml，每个稀释度做 3 个重复。使用血清稀释液将绵羊肺炎支原体阴阳性血清依次做 1:100 倍、1:200 倍、1:400 倍和 1: 800 倍稀释，以 2%BSA 封闭，其余步骤按 2.3.1 方法操作，读取结果，计算 P/N 值，选择阳性 OD450 平均值在 1 左右且 P/N 最大时的抗原浓度为抗原最佳作用浓度。该点对应的血清稀释度为最佳的血清稀释度。方正滴定结果见表 2，根据阳性平均值接近 1 且 P/N 最大的判定条件，本试验所确定的 rP113(C)最佳抗原包被浓度为 1μg/ml，最适血清稀释度为 1:200 倍稀释。

表 2 抗原与血清最适工作浓度的确定

说明书

Table 2 Determination of the optimal antigen concentration and serum dilution

血清稀释度		抗原包被浓度				
		4μg/ml	2μg/ml	1μg/ml	0.5μg/ml	0.25μg/ml
1: 100	P	2.244	1.993	1.750	1.383	0.877
	N	0.357	0.353	0.332	0.329	0.281
	P/N	6.286	5.645	5.271	4.204	3.121
1: 200	P	1.602	1.397	1.164	0.881	0.553
	N	0.275	0.259	0.215	0.246	0.212
	P/N	5.825	5.393	5.414	3.581	2.608
1: 400	P	1.168	0.861	0.698	0.556	0.356
	N	0.219	0.168	0.153	0.148	0.143
	P/N	5.333	5.125	4.562	3.757	2.490
1: 800	P	0.711	0.525	0.434	0.320	0.220
	N	0.160	0.119	0.107	0.109	0.106
	P/N	4.444	4.412	4.056	2.936	2.075

注：P：阳性血清；N：阴性血清。

② 最佳封闭液的确定

按照确定的最佳条件，包被抗原，分别使用 PBST 稀释的 5%脱脂奶粉、10%脱脂奶粉、1%BSA、2%BSA、5%马血清和 1%明胶，每种封闭液做 3 个重复，加入最佳稀释度的阴阳性血清，选择阴性 OD450 平均最小且 P/N 值最大的封闭液为最佳。不同封闭液的封闭效果见表 3，根据阴性 OD450 平均值最小且 P/N 值最大的判定条件，本试验确定的最佳封闭液为 5%脱脂奶粉。

表 3 封闭液的优化

Fig. 3 Optimization of blocking reagents

封闭液	5%脱脂奶粉	10%脱脂奶粉	1%BSA	2%BSA	1%明胶	5%马血清
阳性血清	0.971	0.939	1.411	1.206	1.833	1.618
阴性血清	0.155	0.178	0.245	0.227	0.579	0.536
P/N	6.265	5.275	5.759	5.313	3.166	3.019

③血清作用时间的确定

说明书

按以上最优条件包被、封闭后，阴阳性血清作用时间分别为 30min、60min 和 90min，每个时间点做 3 个重复，比较各时间点阴阳性血清的 OD450 平均值和 P/N 值，以阳性血清 OD450 接近 1，P/N 最大的时间作为最佳。血清反应不同时间的结果见表 4，以阳性血清 OD450 接近 1，P/N 最大的时间作为最佳，因此，本试验确定的一抗最佳孵育时间为 60min。

表 4 血清反应时间的优化

Fig.4 Optimization of incubating time of sera

反应时间	60min	90min	120min
阳性血清	1.045	1.209	1.288
阴性血清	0.147	0.165	0.219
P/N	7.109	7.327	5.88

④酶标二抗稀释度的优化

按以上最优条件操作后，将酶标二抗依次稀释为 1:10000、1:20000、1:40000 和 1:80000，每个稀释度做 3 个重复，以阳性血清 OD450 接近 1，P/N 最大的二抗浓度作为最佳。HRP 标记的兔抗山羊 IgG 不同稀释度的反应结果如表 5，当酶标二抗以 1:40000 稀释时，阳性血清 OD450 读数接近于 1 且 P/N 最大，因此 1:40000 为最佳的酶标二抗稀释度。

表 5 酶标二抗浓度的优化

Fig.5 Optimization of concentration of HRP-labeled antibody

稀释度	1:10000	1:20000	1:40000	1: 80000
阳性血清	2.203	1.567	1.101	0.560
阴性血清	0.383	0.259	0.151	0.093
P/N	5.752	6.050	7.291	6.022

⑤酶标二抗作用时间的优化

按以上最优条件，加入酶标二抗后，分别于 37℃作用 30min、45min、60min 和 90min，以阳性血清 OD450 接近 1，P/N 最大的时间作为最佳。将 HRP 标记的兔抗山羊 IgG 以最佳稀释度稀释，分别作用 30min、45min、60min 和 90min，结果如表 6。以阳性血清 OD450 接近 1，P/N 最大的反应时间作为最佳，因此本试验确定的酶标二抗最佳反应时间为 45min。

表 6 酶标二抗作用时间的优化

说明书

Fig.6 Optimization of incubating time of HRP-labeled antibody

作用时间	30min	45min	60min	90min
阳性血清	0.871	1.084	1.211	1.410
阴性血清	0.132	0.143	0.178	0.211
P/N	6.598	7.580	6.803	6.682

⑥临界值的判定

用优化好的间接 ELISA 方法测定 30 份绵羊肺炎支原体阴性山羊血清，以 OD₄₅₀ 最小的一份作为标准阴性血清，其余所有血清的 OD₄₅₀ (P) 分别除以标准阴性血清的 OD₄₅₀ (N)，得到所有的 P/N。计算这些 P/N 的平均值(X)和标准差(S)， $P/N \geq X+3S$ 判定为阳性， $P/N \leq X+2S$ 则判定为阴性，介于二者之前的为可疑。根据表 7 的结果，校正值的平均值 $X=1.631$ ，标准差 $S=0.430$ ，因此计算得： $X+3S=2.921$ ， $X+2S=2.491$ ，为了判定结果方便，确定当 $S'/N \geq 2.9$ 时，判定为阳性； $S'/N \leq 2.5$ 时，判定为阴性， $2.5 < S'/N < 2.9$ 时，结果为可疑。

表 7 阴阳性血清临界值的确定

Fig.7 Determination of the threshold between negative and positive serum

血清 编号	OD ₄₅₀	校正 值 (N'/N)	血清 编号	OD ₄₅₀	校正 值 (N'/N)	血清 编号	OD ₄₅₀	校正 值 (N'/N)
1	0.155	1.396	9	0.172	1.550	17	0.192	1.730
2	0.182	1.640	10	0.111	—	18	0.202	1.820
3	0.138	1.243	11	0.134	1.207	19	0.329	2.964
4	0.127	1.144	12	0.141	1.270	20	0.214	1.928
5	0.143	1.288	13	0.139	1.252	21	0.177	1.595
6	0.183	1.649	14	0.119	1.072	22	0.252	2.270
7	0.225	2.027	15	0.179	1.613	23	0.208	1.874
8	0.202	1.820	16	0.206	1.856	24	0.144	1.297

⑥重复性试验

用同一次包被的酶标板，取 5 份血清，在同一条件下进行检测，每个血清样本做 5 个重复，根据读数结果判定批内重复性。取 3 个不同批次包被的酶标板，在同一条件下对 15 份血清进行检测，每个血清样本做 2 个重复，根据读数结果盘点批间重复性。用同一批包被的 ELISA 板，对 5 份临床血清进行检测，各重复 5 孔，批内重复试验的变异系数均值为 1.5%，

说明书

表明该方法重复性良好。15 份血清样本分别用 3 个不同批次包被的酶标板进行检测，结果显示平均变异系数小于 6%。

⑦临床应用

(1) 抗体消长规律测定结果

使用建立的 rP113(C)-ELISA 方法和 IHA 方法，分别测定 4 只 (A、B、C、D) 山羊在免疫绵羊肺炎支原体疫苗前，免疫后 1 周、2 周、3 周、4 周及 8 周的血清抗体水平，所得抗体消长规律见图 5。ELISA 结果显示，免疫前，有一只山羊 (D) 为绵羊肺炎支原体阳性，免疫后 1 周抗体水平急剧提高，2 周时达到最高，之后一直维持较高抗体水平；其余山羊 (A、B、C) 为绵羊肺炎支原体阴性，免疫后 3 周抗体达到最高，4 周时略有下降，至 8 周下降幅度不大。该结果与 IHA 结果趋势相符，表明 rP113(C)-ELISA 方法能正确反应出疫苗免疫后山羊血清抗体的变化趋势，表明该方法可用于绵羊肺炎支原体抗体水平的监测。

(2) 临床血清的检测

对来至四川省南江县、双流县和攀枝花市的共 80 份山羊血清使用建立的 rP113(C)-ELISA 进行检测，结果见表 8。对所检测样本，南江县、双流县和攀枝花市的血清阳性率分别为 33.3%、45%和 40%，与之对应的 IHA 检测阳性率为 23.3%、35%和 33.3%，可见 rP113(C)-ELISA 方法具有相对更高的检出率，敏感性更好。然而，经 rP113(C)-ELISA 检测为阴性的 49 份血清中，有 3 份被 IHA 检测判定为阳性，这可能是由于 rP113(C)-ELISA 或 IHA 判定标准差异造成，也可能与 IHA 方法的检测特异性有关，值得进一步探讨。

表 8 rP113(C)-ELISA 与 IHA 对临床血清的检测比较

Table.8 Seras used for comparison of rP113(C)-ELISA with IHA

		IHA 结果					
		南江 (30 份)		双流 (20 份)		攀枝花 (30 份)	
		P	N	P	N	P	N
ELISA 结果	P	6	4	7	2	8	4
	N	1	19	0	11	2	16

最后需要说明，以上实施例虽然描述了本发明的具体实施方式，但是并非限制本发明；本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，本发明的保护范围是由所附权利要求书所

说 明 书

限定的。而一切进行修改或等同替换，其均应包含在本发明的保护范围内。

序 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> 西南民族大学

<120> 一种绵羊肺炎支原体抗体间接 ELISA 检测试剂盒

<130> 西南民族大学

<140> 20200113

<141> 2020-01-13

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cgcggatccg aaggtgctca agaccaaggt a

31

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ccgctcgagg gttgtgttg aggtggtatc agg

33