



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101692089 A

(43) 申请公布日 2010.04.07

(21) 申请号 200910177452.6

(22) 申请日 2009.09.29

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号

(72) 发明人 端青 赵海 朱虹 何君 檀华  
李岩伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页

### (54) 发明名称

一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法。该试纸包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针的金标垫、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线含有牛型结核分枝杆菌抗原，所述质控线含有能与所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体。本发明的免疫层析试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

1. 一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸，包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针的金标垫、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫；所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线含有结核分枝杆菌抗原，所述质控线含有能与所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸，其特征在于：所述检测包被抗原来自本发明的发明人对牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白进行的分别克隆表达，优选为 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白的混合配比抗原；所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异性抗体为以金黄色葡萄球菌蛋白 A 为抗原免疫动物得到的抗体，所述免疫动物的选择是多种多样的，如羊、兔、猴、鸡或鼠等常用的免疫动物；所述检测线含有 MPB70 的浓度为 1-3mg/mL、MPB83 的浓度为 1-3mg/mL、ESXA 和 ESXB 的浓度为 1-3mg/mL，其中 ESXA 和 ESXB 的抗原比例为 1 : 1-1 : 1.8，所述质控线含有的能与金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体的浓度可为 3-5mg/mL。

3. 根据权利要求 2 所述的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸，其特征在于：所述结核分枝杆菌抗原为 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白的混合配比抗原

4. 根据权利要求 1 所述的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸，其特征在于：所述检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的背面紧密连接一背板。

5. 一种制备权利要求 1 所述的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

A. 制备牛型结核分枝杆菌抗原，将结核分枝杆菌抗原溶液喷到纤维素膜上形成检测线，将能与金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体溶液喷到所述纤维膜的另一区域形成质控线，然后将吸水垫粘贴在所述纤维素膜的远离所述测试带的一端；

B. 制备金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的免疫胶体金探针溶液，将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维素膜的靠近所述检测线的一端；

C. 将在步骤 2) 中得到的金标垫上远离所述检测线的一端粘贴样品垫，得到检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 所述检测包被抗原来自本发明的发明人对牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白进行的分别克隆表达，优选为 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白的混合配比抗原；所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异性抗体为以金黄色葡萄球菌蛋白 A 为抗原免疫动物得到的抗体，所述免疫动物的选择是多种多样的，如羊、兔、猴、鸡或鼠等常用的免疫动物；所述检测线含有 MPB70 的浓度为 1-3mg/mL、MPB83 的浓度为 1-3mg/mL、ESXA 和 ESXB 的浓度为 1-3mg/mL，其中 ESXA 和 ESXB 的抗原比例为 1 : 1-1 : 1.8，所述质控线含有的能与金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体的浓度可为 3-5mg/mL。

7. 根据权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 中的干燥温度为 30-45℃，干燥时间为 2.5-3.5 小时；步骤 2) 中牛型结核分枝杆菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法包括以下步骤：

A. 将  $\text{HAuCl}_4$  配制成 0.01% 水溶液, 取 100mL 加热至沸, 搅动下准确加入 1.6mL 的 1% 柠檬酸三钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 水溶液, 继续加热煮沸 (优选为 10-12 分钟), 直到液体颜色稳定成葡萄酒红色, 得到胶体金溶液, 冷却后用水恢复至原体积;

B. 将步骤 1) 获得的胶体金溶液的 pH 值调至 8.5-9.5, 每 100mL 胶体金溶液加入终浓度为  $12 \mu\text{g/mL}$  的金黄色葡萄球菌蛋白 A, 搅拌 25-35 分钟, 加入 5mL 10% BSA, 搅拌 20-30 分钟, 再加入 1mL 10% PEG20000, 搅拌 20-30 分钟, 先在 20,000-23,500rpm 下离心 25-35 分钟, 弃上清, 用 0.05-0.1M 的四硼酸钠溶液洗涤沉淀, 并将其保存于 8-10mL 0.05-0.1M 的四硼酸钠溶液中, 得到金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的胶体金探针溶液。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法, 其特征在于: 在所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法中, 用  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液或 HCl 溶液调 pH 值为 8.5-9.5, 所述调节 pH 值的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液的浓度为 0.15-0.25M; 所述调节 pH 值 HCl 溶液的浓度为 0.08-0.12mol/L。

9. 根据权利要求 5-8 任一项所述的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的制备方法, 其特征在于: 向所述步骤 2) 中的牛型结核分枝杆菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液中添加 0.05-0.1g/mL 蔗糖; 将金标垫在  $-20^\circ\text{C}$  至  $-50^\circ\text{C}$  冷冻 10-12 小时, 并将其冷冻抽干后, 再与纤维素膜粘贴; 在所述步骤 3) 获得的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的背面紧密粘贴一背板; 所述纤维素膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜; 所述吸水垫为吸水纸; 所述样品垫为玻璃纤维膜。

## 一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种牛型结核分枝杆菌抗体的检测试纸及其制备方法，特别是涉及一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 自从 1882 年 Kock 发现结核分枝杆菌以来，已报道的分枝杆菌有 100 多种。有关分枝杆菌的分类有很多，国际上通常将分枝杆菌分为典型结核分枝杆菌 (*tuberculosis mycobacterium*, TM)，和非结核分枝杆菌 (*non-tuberculosis mycobacterium*, NTM)。TM 包括人型结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、非洲结核分枝杆菌和田鼠分枝杆菌，又称为结核分枝杆菌复合群 (*mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC)，该群中 DNA 相关性约为 85%~100%，分类地位相近；NTM 指 MTBC 和麻风分枝杆菌以外的所有其它分枝杆菌。

[0003] 结核是由 MTBC 中细菌引起的人畜共患传染病，近年来全球发病率逐年上升，特别是近年来发现由牛结核分枝杆菌引起的人类结核已成为值得关注的公共卫生问题。研究表明，结核病牛可通过痰液、乳汁、粪便等向外排出结核杆菌污染环境，因此，动物检疫是控制结核病的重要环节。

[0004] 牛结核病抗体检测的方法很多，例如：ELISA 和免疫传感器技术等。但在实践中，这些方法的使用暴露出一些共同的劣势，例如：实验必须在专门的实验室中进行；需要电源和特殊的仪器；操作人员必须经过专门培训；实验系统不容易标准化，不容易在基层推广，为使结果可信，需要进行多次预试验和设立多项对照；试验操作步骤繁琐，至少需要 2 小时以上。

[0005] 表面脂蛋白 83(*cell surface lipoprotein MPB83*, MPB83) 和主要分泌性免疫蛋白 70(*major secreted immunogenic protein mpb70*, MPB70) 是牛分枝杆菌主要的特异性分泌抗原，并可在其中高水平表达(如 MPB70 可占牛结核分枝杆菌培养滤液蛋白的 10%)，而在人型结核分枝杆菌 H37Rv 株中仅有少量产生，至今尚未证明 MPB83 在结核分枝杆菌复合群以外的分枝杆菌中存在。因此，MPB83 和 MPB70 具有显著的种特异性。

[0006] MPB70 编码基因大小约 583bp，蛋白分子量约为 22KDa，是感染动物体内 T 细胞识别的一种血清优势抗原，BCG 接种牛的 T 细胞不识别 MPB70。MPB83 编码基因大小约 603bp，蛋白分子量约为 30KDa，是牛分枝杆菌的免疫主导蛋白，也是牛结核菌素的有效成分，能诱导很强的迟发型变态反应，刺激 T 淋巴细胞增殖和抗体产生。MPB70 和 MPB83 的氨基酸序列具有 61% 的同源性，单克隆抗体验证了二者具有某些共同的抗原决定簇。但与 MPB70 不同的是，MPB83 是牛分枝杆菌表面相关性脂蛋白，其基因片段中含有一段典型的脂蛋白序列，并且在 N 端插有 5 个独特的氨基酸 (Behr MR. et al. Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Rv0444c, the gene encoding anti-SigK, explain high level expression of MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis*[J]. *Mol microbial*2006, 62(5) :

1251-1263.)。

[0007] 6Kda 早期分泌性蛋白 (6kDa early secretory antigenic target, ESXA) 和 10Kda 培养滤液蛋白 (10kDa culture filtrate antigen, ESXB) 是近几年研究较多的两种结核分枝杆菌蛋白抗原, 是存在于致病性结核分枝杆菌培养滤液中的早期分泌蛋白, 均由 BCG 缺失的基因片段 (RD1) 所编码 (Van pinxteren, Laurens A.H, et al. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and ESXB[J]. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 2000, 7(2): 155-160), 序列有 25% 的同源性, 诱导强烈的 T 淋巴细胞增殖活化和细胞因子分泌。

[0008] 免疫胶体金技术是近年来迅速发展的快速检测技术, 该技术与其它方法比较, 优势在于: 检测过程中标本处理简单, 不需要专门仪器和人员培训, 非专业技术人员按照说明书即可操作, 并可迅速观察结果, 很适合突发事件现场和基层使用。

[0009] 目前, 将胶体金免疫层析技术用于体外检测牛结核分枝杆菌在国内尚属空白。美国 CHEMBIO DIAGNOSTICS 公司应用 ESXA、ESXB 和 MBP83 混合抗原研制了一种体外免疫胶体金诊断试剂产品——PrimaTB STAT-PAK, 本发明将 MPB83、MPB70、ESXA 和 ESXB 配比混合作为检测抗原尚属首次, 具有高特异性和高敏感性。

## 发明内容

[0010] 本发明目的是提供一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸 (Immuno-Chromatographic Assay, ICA)。

[0011] 为解决上述技术问题, 本发明采取以下技术方案: 一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸 (ICA 试纸), 包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针的金标垫、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜 (NC 膜) 和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫; 所述硝酸纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线, 所述检测线含有牛型结核分枝杆菌重组 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB, 所述质控线含有能与所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体。

[0012] 所述检测包被抗原来自本发明的发明人对牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白进行的分别克隆表达, 优选为 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白的混合配比抗原; 所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异性抗体为以金黄色葡萄球菌蛋白 A 为抗原免疫动物得到的抗体, 所述免疫动物的选择是多种多样的, 如羊、兔、猴、鸡或鼠等常用的免疫动物; 所述检测线含有 MPB70 的浓度为 1-3mg/mL、MPB83 的浓度为 1-3mg/mL、ESXA 和 ESXB 的浓度为 1-3mg/mL, 其中 ESXA 和 ESXB 的抗原比例为 1:1-1:1.8, 所述质控线含有的能与金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体的浓度可为 3-5mg/mL。

[0013] 所述吸水垫和样品垫均由吸水材料制备。

[0014] 检测样品时可将上述检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的样品垫直接浸于样品中; 为使使用更加方便, 所述检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的背面还紧密连接一背板, 背板材料的选择是多种多样的, 如塑料、树脂或聚氯乙烯板 (PVC 板) 等, 再将该带有背板的免疫层析试纸装入试剂盒中, 该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口, 对应于检测线和质控线的部位设有观测窗。

[0015] 本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的方法。

[0016] 本发明所提供的制备上述检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

[0017] 1) 制备牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 抗原，将牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 抗原配比混合溶液喷到纤维素膜上形成检测线，将能与金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体溶液喷到所述纤维膜的另一区域形成质控线，然后将吸水垫粘贴在所述纤维素膜的远离所述测试带的一端；

[0018] 2) 制备金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的免疫胶体金探针溶液，将玻璃纤维膜或聚脂膜浸入该免疫胶体金探针溶液，得到金标垫，将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维素膜的靠近所述检测线的一端；

[0019] 3) 将在步骤 2) 中得到的金标垫上远离所述检测线的一端粘贴样品垫，得到检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸。

[0020] 在上述检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的制备方法中，步骤 1) 中所述检测包被抗原来自本发明的发明人对牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白进行的分别克隆表达，优选为 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白的混合配比抗原；所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异性抗体为以金黄色葡萄球菌蛋白 A 为抗原免疫动物得到的抗体，所述免疫动物的选择是多种多样的，如羊、兔、猴、鸡或鼠等常用的免疫动物；所述检测线含有 MPB70 的浓度为 1-3mg/mL、MPB83 的浓度为 1-3mg/mL、ESXA 和 ESXB 的浓度为 1-3mg/mL，其中 ESXA 和 ESXB 的抗原比例为 1 : 1-1 : 1.8，所述质控线含有的能与金黄色葡萄球菌蛋白 A 特异结合的抗体的浓度可为 3-5mg/mL。

[0021] 所述步骤 1) 中的 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 四种蛋白的混合配比抗原可按下述方法制备：

[0022] 1) 扩增序列 1 的基因；

[0023] 2) 将目的片段与表达载体相连转入大肠杆菌；

[0024] 3) 筛选阳性克隆；

[0025] 4) 诱导表达得到目的蛋白。

[0026] 所述步骤 1) 中的干燥温度可为 30-45℃，优选为 37℃，干燥时间可为 2.5-3.5 小时。

[0027] 步骤 2) 中牛型结核分枝杆菌抗原特异性抗体标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法可包括以下步骤：

[0028] A. 将  $\text{HAuCl}_4$  配制成 0.01% 水溶液，取 100mL 加热至沸，搅动下准确加入 1.6mL 的 1% 柠檬酸三钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 水溶液，继续加热煮沸 (优选为 10-12 分钟)，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，得到胶体金溶液，冷却后用水恢复至原体积；

[0029] B. 将步骤 1) 获得的胶体金溶液的 pH 值调至 8.5-9.5，每 100mL 胶体金溶液加入终浓度为 12  $\mu\text{g/mL}$  的金黄色葡萄球菌蛋白 A，搅拌 25-35 分钟，加入 5mL 10% BSA，搅拌 20-30 分钟，再加入 1mL 10% PEG20000，搅拌 20-30 分钟，先在 20,000-23,500rpm 下离心 25-35 分钟，弃上清，用 0.05-0.1M 的四硼酸钠溶液洗涤沉淀，并将其保存于 8-10mL

0.05-0.1M 的四硼酸钠溶液中，得到嗜金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的胶体金探针溶液。

[0030] 在上述金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的免疫胶体金探针溶液的制备方法中，可用  $K_2CO_3$  溶液或 HCl 溶液调 pH 值为 8.5-9.5，所述调节 pH 值的  $K_2CO_3$  溶液的浓度可为 0.15-0.25M，优选为 0.2M；所述调节 pH 值 HCl 溶液的浓度可为 0.08-0.12mol/L，优选为 0.1mol/L。为弥补因加热蒸发损失的水分，可用水将胶体金溶液恢复至原体积。

[0031] 为使金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的免疫胶体金探针与玻璃纤维膜或聚脂膜更好地结合，可向步骤 2) 中的金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记的免疫胶体金探针溶液中添加 0.05-0.1g/mL 蔗糖；为使金标垫更易与纤维素膜粘贴，可将金标垫在  $-20^{\circ}C$  至  $-50^{\circ}C$  冷冻 10-12 小时，并将其冷冻抽干后，再与纤维素膜粘贴。

[0032] 所述吸水垫和样品垫均由吸水材料制备。

[0033] 检测样品时可将上述检测牛型结核分枝杆菌抗原的免疫层析试纸的样品垫直接浸于样品中；为使使用更加方便，所述检测牛型结核分枝杆菌抗原的免疫层析试纸的背面还紧密连接一背板，背板材料的选择是多种多样的，如塑料、树脂或聚氯乙烯板 (PVC 板) 等，再将该带有背板的免疫层析试纸装入试剂盒中，该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口，对应于检测线和质控线的部位设有观测窗。

[0034] 在实际应用中，所述纤维素膜可为硝酸纤维素膜 (NC 膜) 或醋酸纤维素膜，宽度控制在 2.5-3.0mm 为宜；所述吸水垫可为吸水纸，宽度为 20-40mm，厚度为 0.1-0.2mm；所述金标垫的宽度为 5-10mm；所述样品垫为玻璃纤维膜，宽度为 20-40mm。

[0035] 本发明提供了一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法。该试纸利用了免疫胶体金技术及双抗夹心检测法，用其检测牛型结核分枝杆菌抗体的基本原理是：用牛型结核分枝杆菌抗原包被纤维素膜，用以捕捉标本中的结核分枝杆菌抗体，然后用标记了金黄色葡萄球菌蛋白 A 的免疫胶体金探针进行检测。本发明的免疫层析试纸具有以下优点：1) 敏感性及特异性高：实验室考核结果显示，本发明的免疫层析试纸可用于检测牛型结核分枝杆菌血清标本，并且不与其他生物发生交叉反应；2) 检测方法简单、快速：检测过程中标本处理简单，不需要专门仪器和人员培训，非专业技术人员按照说明书即可操作，并可迅速观察结果，标本中的牛结核分枝杆菌抗体经过约 5 分钟的纸层析后，即可出现肉眼可见的沉淀线，从而为牛结核病的诊断隔离争取了时间，很适合突发事件现场和基层使用；3) 制备方法简单，成本低廉，易于进行工业化生产。本发明将在牛型结核分枝杆菌抗体的检测及其相关疾病的诊断和治疗中发挥重要作用，应用前景广阔。

[0036] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

## 附图说明

[0037] 图 1 为检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的正面和纵截面结构示意图

## 具体实施方式

[0038] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法；所述百分含量如无特别说明均为质量 / 体积百分含量或体积 / 体积百分含量。

[0039] 材料：

- [0040] 硝酸纤维膜 (NC 膜)、样品垫和吸水滤纸, 购自 Millipore 公司。
- [0041] 塑料背板, 购自北京燕华公司。
- [0042] 实施例 1、牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 的制备
- [0043] 1、利用 PCR 方法对 MPB70 全 DNA 进行扩增, 其引物是:
- [0044] 1: 5' -CGCGGATCCATGAAGGTAAAGAACAATTGC-3' ;
- [0045] 2: 5' -CCCAAGCTTTTACGGAGGCATTAGCACGCTGT-3' 。
- [0046] 利用 PCR 方法对 MPB83 全 DNA 进行扩增, 其引物是:
- [0047] 1: 5' -CGCGGATCCATGATCAACGTTTCAGGCAAACC-3' ;
- [0048] 2: 5' -CCCAAGCTTTTACAGCACCGTATCGATCATG-3' 。
- [0049] 利用 PCR 方法对 ESXA 全 DNA 进行扩增, 其引物是:
- [0050] 1: 5' -CGCGGATCCATGACCATCAACTATCAATTCGG-3' ;
- [0051] 2: 5' -CCCAAGCTTTTAGGCCAGCTGGAGCCGAC-3' 。
- [0052] 利用 PCR 方法对 ESXB 全 DNA 进行扩增, 其引物是:
- [0053] 1: 5' -GGATCCATGGCAGAGATGAAGACCG-3' ;
- [0054] 2: 5' -AAGCTT TCAGAAGCCATTTGCGAGG-3' 。
- [0055] 以上引物均引入 BamHI 和 HindIII 酶切序列
- [0056] 2、将目的片段从 T 载体上切下, 与经相同酶切的 pET32a(+) 载体相连, 转入表达型菌体 BL21(DE3) 中。
- [0057] 3、挑取阳性菌落, 菌液和培养液的比例为 1 : 50, 同时加入 Amp(1 : 1000), 37℃、250rpm 摇床培养 4 小时, 至菌液  $OD_{600} = 0.7-0.9$ , 加入 IPTG 至终浓度 1mM, 继续培养 5 小时, 离心集菌。
- [0058] 4、用含 30% 蔗糖, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0 的溶液重悬, 冰浴 30min, 离心集菌。
- [0059] 5、用超声缓冲液 (50mM  $NaH_2PO_4$  pH7.8, 300mM NaCl) 重悬菌体沉淀至适当浓度, 超声破碎 60 分钟, 30 秒间歇 18 秒, 超声次数 40 次, 功率 35%。
- [0060] 6、10000rpm 离心 15 分钟, 弃上清 (需经 SDS-PAGE 证实不含目的蛋白后再弃掉), 沉淀即为包涵体。
- [0061] 7、生理盐水重悬沉淀, 10000rpm 离心 15 分钟, 弃上清 (需经 SDS-PAGE 证实不含目的蛋白后再弃掉)。
- [0062] 8、生理盐水重悬沉淀 8000rpm 离心 15 分钟, 弃上清 (需经 SDS-PAGE 证实不含目的蛋白后再弃掉)。
- [0063] 9、生理盐水重悬沉淀, 超声破碎 60 分钟, 10000rpm 离心 15 分钟, 弃上清 (需经 SDS-PAGE 证实不含目的蛋白后再弃掉)。
- [0064] 10、将沉淀用 10% Triton x-100 重悬, 磁力搅拌器搅拌 30min, 8000rpm 离心 15 分钟, 弃上清 (需经 SDS-PAGE 证实不含目的蛋白后再弃掉)。
- [0065] 11、用含 8M 尿素的缓冲液 ( $NaH_2PO_4$  0.1M, Tris-HCl pH8.0, 0.01M) 溶解沉淀。
- [0066] 12、12000rpm 离心 15 分钟, 上清即为含重组蛋白的缓冲液, 置含 6M 尿素的复性液 (100mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH8.0, 0.2M 盐酸精氨酸, 0.004M 氧化型谷胱甘肽, 0.002M 还原型谷胱甘肽) 中透析 4 小时以上。

- [0067] 13、转置含 4M 尿素的复性液中透析 4 小时以上。  
[0068] 14、转置含 2M 尿素的复性液中透析 4 小时以上。  
[0069] 15、转置含 1M 尿素的复性液中透析 4 小时以上。  
[0070] 16、转置蒸馏水中中透析 4 小时以上。  
[0071] 17、获得复性的牛型结核分枝杆菌重组 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB。

## [0072] 二、制备免疫胶体金探针

### [0073] 1、制备胶体金溶液

[0074] 采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒，具体方法为：将  $\text{HAuCl}_4$  (购自 Sigma 公司，1g/瓶包装) 配制成 0.01% 水溶液，取 100mL 加热至沸腾，搅动下准确加入 1.6mL 的 1% 柠檬酸三钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 水溶液，液体颜色稳定成葡萄酒红色，即得到胶体金溶液。冷却后用蒸馏水恢复至原体积，制成颗粒直径为 25nm 的胶体金颗粒。

### [0075] 2、确定胶体金偶联抗体饱和浓度

[0076] 用 0.2M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (或 0.1M HCl) 调节胶体金溶液 pH 8.5-9.5，准备 4 支洁净试管，分别加入 1mL 胶体金溶液。将金黄色葡萄球菌蛋白 A (购于 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 稀释为 1mg/mL，分别向 3 支试管中加入 5  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{l}$ 、15  $\mu\text{l}$ ，另一支为对照，混匀后于室温下放置 5 分钟，加入 10% NaCl 水溶液，混匀，静置 10-20 分钟后观察液体颜色。胶体金溶液颜色不变时所含最少抗体量，即为稳定 1mL 胶体金所需抗体的最适浓度，以此为基础增加 20% 抗体量，即为胶体金偶联抗体饱和浓度。结果表明：维持胶体金溶液颜色不变的抗体量为 10  $\mu\text{l}$ ，即 10  $\mu\text{g/mL}$ ，选择偶联抗体浓度为 12  $\mu\text{g/mL}$ 。

### [0077] 3、金标垫的制备

[0078] 按上述方法配制含有浓度为 12  $\mu\text{g/mL}$  的金黄色葡萄球菌蛋白 A 免疫胶体金探针溶液 50mL，搅拌 30 分钟 (25-35 分钟均可)，加 1mL 10% PEG20000，搅拌 25 分钟 (20-30 分钟均可)，20,000 ~ 23,500rpm 离心 25-30 分钟，弃上清，将沉淀用四硼酸钠洗涤 1 次后用四硼酸钠保存液收集沉淀 5mL。取金标探针 5mL 加入 0.5g 蔗糖，充分溶解后均匀加在玻璃纤维膜上，-35 $^{\circ}\text{C}$  (-20 $^{\circ}\text{C}$  ~ -50 $^{\circ}\text{C}$  均可) 放置 11 小时 (10-12 小时均可)，冻干机抽干，得到金标垫。

## [0079] 三、牛型结核分枝杆菌抗体快速检测试纸的制备

[0080] 如图 1 所示，本发明检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸由吸水垫 4、硝酸纤维膜 3、金标垫 2 和玻璃纤维膜样品垫 1 四部分组成；硝酸纤维膜 3 上包被有检测线 5 和质控线 6。该试纸的制备方法包括以下步骤：

### [0081] 1) NC 膜 3 的包被

[0082] 用 0.01M、pH7.2 的 PB 缓冲液 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.07g, 去离子水 1000mL) 稀释 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 抗原，将经稀释的四种抗原溶液混合，至每毫升溶液中 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 抗原的含量分别为 2mg、1mg、3mg、2.5mg，用于包被检测线。用 0.01M pH 7.2 PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.39g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水 1000mL) 稀释羊抗人 IgG (用人的 IgG 免疫羊获得，具体制备方法见《免疫化学研究进展》，李成文著，中国科学技术出版社，1993 年) 至浓度为 4mg/mL，用于包被质控线。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 2.5mm 厚的硝酸纤维素膜 (购自 Millipore 公司) 上，形成相互分离的检测线 5 和质控线 6，37 $^{\circ}\text{C}$  干燥 3h (2.5-3.5h 均

可)。

[0083] 2) 牛型结核分枝杆菌抗体快速检测试纸的制备

[0084] 将吸水垫 4 用双面胶粘贴在包被的硝酸纤维膜 3 的一端；将包被的 NC 膜 3 用双面胶粘贴在步骤 2 中制备的金标垫 2 的一端；在金标垫 2 上用双面胶粘贴玻璃纤维膜样品垫 1；再最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上，按所需大小切割，即为检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸，加干燥剂后密封保存。

[0085] 四、检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试剂盒的制备

[0086] 为了方便使用，将步骤三制备的牛型结核分枝杆菌抗体快速检测的免疫层析试纸的下面再紧密连接一塑料背板，再将该带有背板的试纸装入试剂盒中，加干燥剂后密封保存。该试剂盒对应于样品垫的部位设有点样口，对应于对照带和测试带的部位设有观测窗。

[0087] 五、牛型结核分枝杆菌快速检测试纸的使用方法和原理

[0088] 测定时将试纸条样品垫 1 浸入液体标本中，样品垫 1 即吸取液体向上端移动，流经金标垫 2 时使干片上的免疫金复合物溶液，并带动其向硝酸纤维膜 3 渗移。若标本中有待测特异抗体，其可与免疫金复合物的抗体结合，此抗原抗体复合物流至检测线 5 即被固相抗原所获，在膜上显出红色反应线条。过剩的免疫金复合物继续前行，至质控线 6 与固相羊抗人 IgG 结合，而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

[0089] 实施例 2、牛型结核分枝杆菌抗体的检测及与其它相关细菌血清样品的交叉试验

[0090] 一、其它相关细菌血清样品的交叉试验

[0091] 用购自军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验研究中心的大肠埃希氏菌(保藏号 270014)、沙门氏菌(保藏号 460046)、痢疾志贺氏菌(保藏号 51258)、绿脓假单胞菌(保藏号 10101)、鼠疫菌(保藏号 410050)、布鲁氏菌(保藏号 55227)、金黄色葡萄球菌(保藏号 26067)的抗血清样品作为样品检测液备用，以牛型结核分枝杆菌抗血清检测液为对照。

[0092] 结果报告：以血清效价 1 : 40 以上为阳性诊断标准，仅于质控观测窗口“C”(质控线)处出现 1 条红色沉淀线(对照)，为与嗜肺军团菌无交叉反应；于检测观测窗口“T”(检测线)和质控观测窗口“C”(质控线)处出现 2 条红色沉淀线(样品和对照)，为与嗜肺军团菌有交叉反应；如质控观测窗口“C”(质控线)处未出现红色沉淀线，则说明检测试纸失效，此时无论检测观测窗口“T”(检测线)处是否出现沉淀线，检测结果不成立。

[0093] 用实施例 1 制备的包被牛型结核分枝杆菌 MPB70、MPB83、ESXA 和 ESXB 抗原和羊抗人 IgG 的免疫层析试纸对上述抗血清样品进行检测，结果对照为阳性，其它检测样品为阴性，证明本发明的免疫层析试纸可用于牛型结核分枝杆菌抗体的快速检测，特异性高。

[0094] 实施例 3、实验室考核

[0095] 1、样品制备

[0096] 将购自军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验研究中心的嗜肺军团菌 1-10 型、大肠埃希氏菌、沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、绿脓假单胞菌、鼠疫菌、布鲁氏

菌、金黄色葡萄球菌的抗血清样品用生理盐水按 1 : 40 比例稀释后作为样品检测液备用。

### [0097] 2、实验方法

[0098] 取实施例 1 制备的装有本发明检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的试剂盒，分别于点样口中加入上述样品检测液 3 滴 (约 150ul)，2 分钟后开始观察结果，15 分钟观察终止。

[0099] 结果报告：仅于质控观测窗口“C”(质控线)处出现 1 条红色沉淀线为阴性，即无牛型结核分枝杆菌抗体检出；于检测观测窗口“T”(检测线)和质控观测窗口“C”(质控线)处出现 2 条红色沉淀线为阳性，即有牛型结核分枝杆菌抗体检出；如质控观测窗口“C”(质控线)处未出现红色沉淀线，则说明检测试纸失效，此时无论检测观测窗口“T”(检测线)处是否出现沉淀线，检测结果不成立。

### [0100] 3、实验结果

[0101] 本发明的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸的实验室考核结果如表 1 所示，由表 1 可以看出，本发明的检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸可以检出牛型结核分枝杆菌抗体，且不与大肠埃希氏菌、沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、绿脓假单胞菌、鼠疫菌、布鲁氏菌、金黄色葡萄球菌发生交叉反应。上述检测结果证明本发明的免疫层析试纸可用于牛型结核分枝杆菌抗体的快速检测，并具有较高的灵敏度及特异性。

[0102] 表 1 本发明检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸(胶体金法)的实验室考核结果

[0103]

细菌	株号	血清型	样品稀释度 1 : 40
牛型结核分枝杆菌	C70-8		+
大肠埃希氏菌	270014		-
沙门氏菌	460046		-
痢疾志贺氏菌	51258		-
绿脓假单胞菌	10101		-
鼠疫菌	410050		-
布鲁氏菌	55227		-
金黄色葡萄球菌	26067		-

[0104] 序列表

[0105] <160>8

[0106] <210>1

[0107]	<211>582	
[0108]	<212>DNA	
[0109]	<213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)	
[0110]	<400>1	
[0111]	atgaaggtaa agaacacaat tgcggcaacc agtttcgagg cgcccgccct ggcggctctg	60
[0112]	gcggtggctg tctaccgcc ggcggccgca ggcgatctgg tgggccggg ctgcgcggaa	120
[0113]	tacgcggcag ccaatccac tgggccggcc tcggtgcagg gaatgtcga ggaccggctc	180
[0114]	gcggtggcgg cctcgaaca tccggagttg acaacgctga cggtgact gtcggccag	240
[0115]	ctcaatccgc aagtaacct ggtggacacc ctcaacagcg gtcagtacac ggtgttcga	300
[0116]	ccgaccaacg cggcatttag caagctgcc gcatccacga tcgacgagct caagaccaat	360
[0117]	tcgtactgc tgaccagcat cctgacctac cacgtagtgg ccggccaaac cageccggcc	420
[0118]	aacgtcgtc gcaccgtca gaccctccag ggcgccagcg tgacggtgac cggtcagggt	480
[0119]	aacagcctca aggtcggtaa cgccgacgtc gtctgtgtg ggtgtctac cgccaacgcg	540
[0120]	acggtgtaca tgattgacag cgtgctaag cctccggcgt aa	582
[0121]	<210>2	
[0122]	<211>603	
[0123]	<212>DNA	
[0124]	<213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)	
[0125]	<400>1	
[0126]	atgatcaacg ttcaggccaa accggccgca gcagcgagcc tcgacgcat cgcgattgcg	60
[0127]	ttcttagcgg gttgttcgag caccaaacc gtgtcgaag acaccagccc gaaaccggcg	120
[0128]	accagcccgg cggcgcccgt taccagcggc gcaatggctg accccgacg ggacctgatt	180
[0129]	ggtcgtgggt gcgcgaata cgccgcaaa aatcccaccg gtcccggatc ggtggccgga	240
[0130]	atggcgcaag acccggtcgc taccgcggt tcaacaacc cgatgctcag taccctgacc	300
[0131]	tcggtctgt cgggcaagct gaaccggat gtgaatctgg tcgacacct caacggcggc	360
[0132]	gagtacaccg ttttcgccc caccaacgcc gattcgaca agctgccggc ggccactatc	420
[0133]	gatcaactca agactgacgc caagctgctc agcagcatcc tgacctacca cgtgatagcc	480
[0134]	ggccaggcga gtccgagcag gatcgacggc accatcaga ccctgcaagg tgccgacctg	540
[0135]	acggtgatag gcgcccgcga cgacctatg gtcaacaac ccggtttggt atgtggcgga	600
[0136]	gttacaccg ccaacgcgac ggtgtacatg atcgatacgg tgctgatgcc cccggcacag	660
[0137]	taa	663
[0138]	<210>3	
[0139]	<211>288	
[0140]	<212>DNA	
[0141]	<213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)	
[0142]	<400>1	
[0143]	atgacagacg agcagtggaa tttcgcgggt atcgaggccg cggcaagcgc aatccaggga	60
[0144]	aatgtcaegt ccattcattc cctcctgac gagggaagc agtcctgac caagctcga	120
[0145]	gcggcctggg gcggtagcgg ttcggaggcg taccagggtg tcagcaaaa atgggacgcc	180

[0146]	acggctaccg agctgaacaa cgcgctgcag aacctggcgc ggacgatcag cgaagccggt	240
[0147]	caggcaatgg cttcgaccga aggcaacgtc actgggatgt tcgcatag	288
[0148]	<210>4	
[0149]	<211>303	
[0150]	<212>DNA	
[0151]	<213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)	
[0152]	<400>1	
[0153]	atggcagaga tgaagaccga tgccgctacc ctgcgcgagg aggcaggtaa ttcgagcgg	60
[0154]	atctccggcg acctgaaaac ccagatcgac caggtggagt cgacggcagg ttcgttgag	120
[0155]	ggccagtggc gcggcgcggc ggggacggcc gccaggccg cggtggtgag ctccaagaa	180
[0156]	gcagccaata agcagaagca ggaactcgac gagatctcga cgaatattcg tcaggccggc	240
[0157]	gtccaatact cgagggccga cgaggagcag cagcaggcgc tgtcctcgca aatgggcttc	300
[0158]	tga	303
[0159]	<210>5	
[0160]	<211>193	
[0161]	<212>PRT	
[0162]	<213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)	
[0163]	<400>2	
[0164]	Met Lys Val Lys Asn Thr Ile Ala Ala Thr Ser Phe Ala Ala Ala	
[0165]	1                    5                    10                    15	
[0166]	Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Val Ser Pro Pro Ala Ala Ala	
[0167]	20                    25                    30	
[0168]	Gly Asp Leu Val Gly Pro Gly Cys Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Asn	
[0169]	35                    40                    45	
[0170]	Pro Thr Gly Pro Ala Ser Val Gln Gly Met Ser Gln Asp Pro Val	
[0171]	50                    55                    60	
[0172]	Ala Val Ala Ala Ser Asn Asn Pro Glu Leu Thr Thr Leu Thr Ala	
[0173]	65                    70                    75	
[0174]	Ala Leu Ser Gly Gln Leu Asn Pro Gln Val Asn Leu Val Asp Thr	
[0175]	80                    85                    90	
[0176]	Leu Asn Ser Gly Gln Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Ala Ala	
[0177]	95                    100                    105	
[0178]	Phe Ser Lys Leu Pro Ala Ser Thr Ile Asp Glu Leu Lys Thr Asn	
[0179]	110                    115                    120	
[0180]	Ser Ser Leu Leu Thr Ser Ile Leu Thr Tyr His Val Val Ala Gly	
[0181]	125                    130                    135	
[0182]	Gln Thr Ser Pro Ala Asn Val Val Gly Thr Arg Gln Thr Leu Gln	
[0183]	140                    145                    150	

[0184]	Gly Ala Ser Val Thr Val Thr Gly Gln Gly Asn Ser Leu Lys Val		
[0185]		155	160 165
[0186]	Gly Asn Ala Asp Val Val Cys Gly Gly Val Ser Thr Ala Asn Ala		
[0187]		170	175 180
[0188]	Thr Val Tyr Met Ile Asp Ser Val Leu Met Pro Pro Ala		
[0189]		185	193
[0190]	<210>6		
[0191]	<211>220		
[0192]	<212>PRT		
[0193]	<213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)		
[0194]	Met Ile Asn Val Gln Ala Lys Pro Ala Ala Ala Ala Ser Leu Ala		
[0195]	1	5	10 15
[0196]	Ala Ile Ala Ile Ala Phe Leu Ala Gly Cys Ser Ser Thr Lys Pro		
[0197]		20	25 30
[0198]	Val Ser Gln Asp Thr Ser Pro Lys Pro Ala Thr Ser Pro Ala Ala		
[0199]		35	40 45
[0200]	Pro Val Thr Thr Ala Ala Met Ala Asp Pro Ala Ala Asp Leu Ile		
[0201]		50	55 60
[0202]	Gly Arg Gly Cys Ala Gln Tyr Ala Ala Gln Asn Pro Thr Gly Pro		
[0203]		65	70 75
[0204]	Gly Ser Val Ala Gly Met Ala Gln Asp Pro Val Ala Thr Ala Ala		
[0205]		80	85 90
[0206]	Ser Asn Asn Pro Met Leu Ser Thr Leu Thr Ser Ala Leu Ser Gly		
[0207]		95	100 105
[0208]	Lys Leu Asn Pro Asp Val Asn Leu Val Asp Thr Leu Asn Gly Gly		
[0209]		110	115 120
[0210]	Glu Tyr Thr Val Phe Ala Pro Thr Asn Ala Ala Phe Asp Lys Leu		
[0211]		125	130 135
[0212]	Pro Ala Ala Thr Ile Asp Gln Leu Lys Thr Asp Ala Lys Leu Leu		
[0213]		140	145 150
[0214]	Ser Ser Ile Leu Thr Tyr His Val Ile Ala Gly Gln Ala Ser Pro		
[0215]		155	160 165
[0216]	Ser Arg Ile Asp Gly Thr His Gln Thr Leu Gln Gly Ala Asp Leu		
[0217]		170	175 180
[0218]	Thr Val Ile Gly Ala Arg Asp Asp Leu Met Val Asn Asn Ala Gly		
[0219]		185	190 195
[0220]	Leu Val Cys Gly Gly Val His Thr Ala Asn Ala Thr Val Tyr Met		
[0221]		200	205 210

[0222] Ile Asp Thr Val Leu Met Pro Pro Ala Gln  
 [0223] 215 220  
 [0224] <210>7  
 [0225] <211>95  
 [0226] <212>PRT  
 [0227] <213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)  
 [0228] Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala  
 [0229] 1 5 10 15  
 [0230] Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp  
 [0231] 20 25 30  
 [0232] Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly  
 [0233] 35 40 45  
 [0234] Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala  
 [0235] 50 55 60  
 [0236] Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr  
 [0237] 65 70 75  
 [0238] Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val  
 [0239] 80 85 90  
 [0240] Thr Gly Met Phe Ala  
 [0241] 95  
 [0242] <210>8  
 [0243] <211>100  
 [0244] <212>PRT  
 [0245] <213> 牛型结核分枝杆菌 (Mycobacterium bovis AF2122/97)  
 [0246] Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala  
 [0247] 1 5 10 15  
 [0248] Gly Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp  
 [0249] 20 25 30  
 [0250] Gln Val Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly  
 [0251] 35 40 45  
 [0252] Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu  
 [0253] 50 55 60  
 [0254] Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn  
 [0255] 65 70 75  
 [0256] Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln  
 [0257] 80 85 90  
 [0258] Gln Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe  
 [0259] 95 100

专利名称(译)	一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101692089A</a>	公开(公告)日	2010-04-07
申请号	CN200910177452.6	申请日	2009-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	端青 赵海 朱虹 何君 檀华 李岩伟		
发明人	端青 赵海 朱虹 何君 檀华 李岩伟		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测牛型结核分枝杆菌抗体的免疫层析试纸及其制备方法。该试纸包括样品垫、紧密连接于所述样品垫一端的含有金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针的金标垫、与所述金标垫的另一端紧密连接的硝酸纤维膜和紧密连接于所述硝酸纤维膜另一端的吸水垫；所述硝酸纤维膜被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线含有牛型结核分枝杆菌抗原，所述质控线含有能与所述金黄色葡萄球菌蛋白A特异结合的抗体。本发明的免疫层析试纸具有简便性、敏感性、特异性和快速性的优点，适于临床和现场使用。

细菌	株号	血清型	样品稀释度 1 : 40
牛型结核分枝杆菌	C70-8		+
大肠埃希氏菌	270014		-
沙门氏菌	460046		-
痢疾志贺氏菌	51258		-
绿脓假单胞菌	10101		-
鼠疫菌	410050		-
布鲁氏菌	55227		-
金黄色葡萄球菌	26067		-

序列表