



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1866015 B

(45) 授权公告日 2012.05.09

(21) 申请号 200610012120.9

G01N 33/52 (2006.01)

(22) 申请日 2006.06.06

G01N 33/532 (2006.01)

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军
医科院微生物流行病研究所

(56) 对比文件

CN 1632584 A, 2005.06.29, 权利要求 7-10.

CN 1632584 A, 2005.06.29, 权利要求 1-6.

CN 1465590 A, 说明书第 3 页第 5 段.

(72) 发明人 端青 朱虹 宋立华 张美玲
檀华 何君

审查员 杨冀川

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

检测鹦鹉热衣原体感染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鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸及其制备方法,该试纸包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针或抗鸡 IgG 标记胶体金探针的金标垫、纤维膜和吸水垫;所述纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线为鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白,所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体或可与抗鸡 IgG 结合的抗体;当所述金标垫含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针时,所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体;当所述金标垫含有抗鸡 IgG 标记胶体金探针时,所述质控线为可与抗鸡 IgG 结合的抗体。该免疫层析试纸特异性强、敏感、简便、快速,与 IHA 方法相比,更适合于临床、突发事件以及基层的鹦鹉热衣原体病诊断。

1. 一种检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸,包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针或抗鸡 IgG 标记胶体金探针的金标垫、纤维膜和吸水垫;所述纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线为鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白,所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体或可与抗鸡 IgG 结合的抗体;当所述金标垫含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针时,所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体;当所述金标垫含有抗鸡 IgG 标记胶体金探针时,所述质控线为可与抗鸡 IgG 结合的抗体;

所述检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的制备方法,包括以下步骤:

1) 将鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白喷到纤维膜上,包被纤维膜的一个区域,得到检测线;将可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体溶液或可与抗鸡 IgG 结合的抗体溶液喷到纤维膜上,包被纤维膜的另一区域,得到质控线;37°C 干燥 0.5~1.0 小时,然后将其距质控线较近的一端粘贴在吸水垫上;

2) 制备金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 标记胶体金探针;将金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 标记胶体金探针溶于质量百分比浓度为 0.25-0.4% 的四硼酸钠溶液中,使其终质量百分比浓度为 5-10%,然后将玻璃纤维膜、树脂分别浸入上述探针溶液中,得到金标垫,在 -20°C~-50°C 冰冻 5~8 小时后,冷冻抽干后,分别将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的距质控线较远的一端;

3) 在步骤 2) 中的金标垫的另一端再粘贴样品垫,得到检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸;

所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针,按下述方法制备:用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%,煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作:加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液 1.6-1.8ml,继续煮沸 10-15 分钟,用纯水恢复至 100ml,冷却至室温后用 K_2CO_3 调 pH 至 6-7,搅拌加入 0.7mg 金黄色葡萄球菌蛋白 A 或 0.8mg 鼠抗鸡 IgG,20min-30min 后加入 2ml 10% 的聚乙二醇 (20000),继续搅拌 20min-30min,9000rpm-12000rpm 离心 25min-35min,弃上清,沉淀即为金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针或鼠抗鸡 IgG 标记胶体金探针;所述百分比浓度为质量百分比浓度;

所述鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白的制备方法如下:

设计引物,扩增具有专利号为 02146790.0 的发明专利的序列表中序列 1 的核苷酸序列片段,其中引物上带有 Nco I 和 Hind III 酶识别位点;然后,将扩增片段用 Nco I 和 Hind III 双酶切,将其插入到载体 pET32a(+) 的 Nco I 和 Hind III 酶识别位点之间得到含有鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白的编码基因的重组载体,将该重组载体转入受体菌 BL21 (DE3),筛选得到表达具有专利号为 02146790.0 的发明专利的序列表中序列 2 的氨基酸残基序列的蛋白质的工程菌;

将上述得到的工程菌接种在 LB 平板,37°C 培养 20~24 小时,挑取单个典型菌落接种 10ml LB 肉汤,37°C 摇床震荡培养 10~12 小时,采取 1:10 扩大培养法直至进入发酵反应器;发酵培养基为 2×YT 培养基,发酵时以 1:50 的体积比接种;发酵中控制温度 37°C,搅拌转数 350~500rpm,通气量 1L 培养基 1L/min 空气,发酵反应器以 1mol/L NaOH 和 30% NaH_2PO_4 调节发酵液 pH7.0;记录发酵液吸光度,当发酵液 A 值达到 0.8 时加入诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷使其终浓度为 0.02mmol/L,并下调温度至 26°C,搅拌转数和通气量

不变；诱导 3-4 小时后，全部发酵结束；

鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白的提取和纯化：发酵菌液以 8000g-9000g 离心 10-15 分钟收集菌体沉淀，按每 g 湿重菌体加 1ml 纯水，放入匀浆机中，使菌体在低渗环境下匀浆破碎；收集匀浆液即为粗制 MOMP 抗原；取粗制 MOMP 抗原 100 μ l 按常规法进行 SDS-PAGE 分析，结果在 51Kd 处有一条明显的蛋白带，蛋白含量约占总蛋白量 50% 以上；

取粗制鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白，4 $^{\circ}$ C 8000g-9000g 离心 10-15 分钟，弃沉淀，收集上清，上清于 4 $^{\circ}$ C 10000g-12000g 离心 10-15 分钟，弃上清，收集沉淀包含体，包含体再用 PBS 洗 3 次，4 $^{\circ}$ C 10000g-12000g 离心 10-15 分钟收集沉淀包含体，按每 g 湿重包含体加入含 8mol/L 尿素 PBS 30ml，37 $^{\circ}$ C 吹打至包含体溶解并蛋白变性，收集变性 MOMP 于透析袋中，分别用递减尿素含量的 PBS 透析液 1000ml 透析，不同透析液各透析 4 小时进行蛋白复性，收集复性后蛋白液，4 $^{\circ}$ C 10000g-12000g 离心 10-15 分钟，弃沉淀，收集上清即为纯化后的 MOMP 抗原；

所述纤维膜的包被方法如下：

分别用 0.01M pH 7.2 磷酸缓冲液稀释所述鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白至 2 ~ 3mg/ml 用于包被检测线；用 0.01M pH 7.2 的 PBS 分别稀释羊抗人 IgG 2.5mg/ml 或羊抗鼠 IgG 2-3mg/ml 分别用于包被质控线；用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 2.5mm 厚硝酸纤维素膜上，形成相互分离的检测线和质控线，37 $^{\circ}$ C 干燥 2.5h，制成质控线分别为羊抗人 IgG 或羊抗鼠 IgG 的两种 NC 膜。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述抗鸡 IgG 为鼠抗鸡 IgG。

3. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体为抗人 IgG、抗羊 IgG、抗兔 IgG、抗豚鼠 IgG、抗猪 IgG、抗小鼠 IgG、抗猴 IgG；所述可与抗鸡 IgG 结合的抗体为抗鼠 IgG。

4. 根据权利要求 3 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体为羊抗人 IgG；所述可与抗鸡 IgG 结合的抗体为羊抗鼠 IgG。

5. 根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述纤维膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜；所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成。

6. 权利要求 1-5 任一所述检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的制备方法，包括以下步骤：

1) 将鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白喷到纤维膜上，包被纤维膜的一个区域，得到检测线；将可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体溶液或可与抗鸡 IgG 结合的抗体溶液喷到纤维膜上，包被纤维膜的另一区域，得到质控线；37 $^{\circ}$ C 干燥 0.5 ~ 1.0 小时，然后将其距质控线较近的一端粘贴在吸水垫上；

2) 制备金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 标记胶体金探针；将金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 标记胶体金探针溶于质量百分比浓度为 0.25-0.4% 的四硼酸钠溶液中，使其终质量百分比浓度为 5-10%，然后将玻璃纤维膜、树脂分别浸入上述探针溶液中，得到金标垫，在 -20 $^{\circ}$ C ~ -50 $^{\circ}$ C 冰冻 5 ~ 8 小时后，冷冻抽干后，分别将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的距质控线较远的一端；

3) 在步骤 2) 中的金标垫的另一端再粘贴样品垫，得到检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于:所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体为抗人 IgG、抗羊 IgG、抗兔 IgG、抗豚鼠 IgG、抗猪 IgG、抗小鼠 IgG、抗猴 IgG;所述可与抗鸡 IgG 结合的抗体为抗鼠 IgG。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于:所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体为羊抗人 IgG;所述可与抗鸡 IgG 结合的抗体为羊抗鼠 IgG;所述纤维膜为硝酸纤维膜或醋酸纤维膜;所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成。

9. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于:所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针,按下述方法制备:用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%,煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作:加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 1.6-1.8ml,继续煮沸 10-15 分钟,用纯水恢复至 100ml,冷却至室温后用 K_2CO_3 调 pH 至 6-7,搅拌加入 0.7mg 金黄色葡萄球菌蛋白 A 或 0.8mg 鼠抗鸡 IgG,20min-30min 后加入 2ml 10%的聚乙二醇 (20000),继续搅拌 20min-30min,9000rpm-12000rpm 离心 25min-35min,弃上清,沉淀即为金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针或鼠抗鸡 IgG 标记胶体金探针;所述百分比浓度为质量百分比浓度。

检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸及其制备方法。

背景技术

[0002] 鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*, Cps) 能感染各种鸟类、家禽和家畜,引起多种疾病。该病不仅造成畜牧业和家禽业的经济损失,而且还严重威胁着人类健康。Cps 的主要宿主是鸟和禽类,哺乳动物和人类密切接触后也可感染。澳大利亚和新西兰等农牧业国家将 Cps 列为必须控制的最重要的病原微生物之一。由于 Cps 具有较强的致死性和失能性,因此是经典的生物战剂。

[0003] Cps 可引起人群的鹦鹉热、发热、头痛、咳嗽、间质性肺炎及心肌炎等;可引起人的关节炎、尿道炎、结膜炎综合症;200 种动物可感染发病,引起动物的肺炎、大脑炎、结膜炎、肠炎、关节炎、尿道炎、阴道炎、付睾炎、宫颈炎、胎盘炎,导致孕畜流产、死胎、不孕等。Cps 除引起禽类和某些哺乳动物、尤其是反刍动物严重疾病外,还可在人密切接触患病动物后感染,因此 Cps 是人兽共患病原菌,另外,由于 Cps 的严重致病性和易传染性,一直被国际社会公认为重要的细菌性生物战剂之一。

[0004] Cps 检测和防疫工作一直受到各国重视,我国已将 Cps 列为进出口产品检疫清单的新法规之中。我国禽、畜类衣原体感染也十分严重,Cps 是比较常见的导致牛、羊和其它哺乳动物流产的病原体,调查表明,引种频繁的大、中型集约化饲养场感染率在 8 ~ 50% 之间;发生过感染的禽、畜场中,动物群的流产率和死胎率远高于安全场。养鸡场鸡的发病日龄一般在 15 日龄,死亡集中在 32 ~ 49 日龄,病程多在 14 ~ 20 天,发病率平均为 20%,死亡率为 10 ~ 30%。

[0005] 经典的 Cps 检测方法是鸡胚致死及中和试验等,但由于其操作较烦琐、耗时较长,不适合在临床和现场使用。目前使用的鹦鹉热衣原体血清检测方法有 ELISA 方法,使用的鹦鹉热衣原体血清检测试剂有鹦鹉热衣原体间接血凝 (IHA) 诊断试剂盒。所需时间均比免疫层析试纸检测方法长并且不易在现场使用。因此,研究衣原体敏感、特异、快速、简便的检测方法和试剂非常必要。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸 (Immuno-Chromatographic Assay, ICA)。

[0007] 本发明所提供的检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸,包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针或抗鸡 IgG 标记胶体金探针的金标垫、纤维膜和吸水垫;所述纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线,所述检测线为鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白 (MOMP),所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体或可与抗鸡 IgG 结合的抗体;当所述金标垫含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针时,所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体;当所述金标垫含有抗鸡 IgG 标记胶体金探

针时,所述质控线为可与抗鸡 IgG 结合的抗体。

[0008] 当所述金标垫含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针,所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体时,所述免疫层析试纸用于检测哺乳动物鹦鹉热衣原体感染;当所述金标垫含有抗鸡 IgG 标记胶体金探针,所述质控线为可与抗鸡 IgG 结合的抗体时,所述免疫层析试纸用于检测鸡鹦鹉热衣原体感染。

[0009] 所述抗鸡 IgG 优选为鼠抗鸡 IgG。

[0010] 所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体可为抗人 IgG、抗羊 IgG、抗兔 IgG、抗豚鼠 IgG、抗猪 IgG、抗小鼠 IgG、抗猴 IgG 等。

[0011] 所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体优选为羊抗人 IgG;

[0012] 所述纤维膜可为硝酸纤维膜或醋酸纤维膜。

[0013] 为了使用更加方便,所述吸水垫的下面还紧密连接有背板。背板的材料可以是多种多样的,如塑料、树脂、PVC 板等。

[0014] 所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成,如由玻璃纤维膜、吸水纸、树脂等制成。

[0015] 本发明的第二个目的是提供上述检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸的制备方法。

[0016] 本发明所提供的检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 将鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白喷到纤维膜上,包被纤维膜的一个区域,得到检测线;将可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体溶液或可与抗鸡 IgG 结合的抗体溶液喷到纤维膜上,包被纤维膜的另一区域,得到质控线;37℃干燥 0.5~1.0 小时,然后将其距质控线较近的一端粘贴在吸水垫上;

[0018] 2) 制备金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 标记胶体金探针;将金黄色葡萄球菌蛋白 A 或抗鸡 IgG 标记胶体金探针溶于质量百分比浓度为 0.25-0.4% 的四硼酸钠溶液中,使其终质量百分比浓度为 5-10%,然后将玻璃纤维膜、树脂分别浸入上述探针溶液中,得到金标垫,在 -20℃~-50℃冰冻 5~8 小时后,冷冻抽干后,分别将其粘贴在步骤 1) 得到的纤维膜的距质控线较远的一端;

[0019] 3) 在步骤 2) 中的金标垫的另一端再粘贴样品垫,得到检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸。

[0020] 所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体可为抗人 IgG、抗羊 IgG、抗兔 IgG、抗豚鼠 IgG、抗猪 IgG、抗小鼠 IgG、抗猴 IgG 等。

[0021] 所述可与抗鸡 IgG 结合的抗体为抗鼠 IgG。

[0022] 所述可与金黄色葡萄球菌蛋白 A 结合的抗体优选为羊抗人 IgG;所述可与抗鸡 IgG 结合的抗体优选为羊抗鼠 IgG。

[0023] 为了使用更加方便,所述吸水垫的下面还粘贴有背板。

[0024] 所述方法中,所述纤维膜可为硝酸纤维膜、醋酸纤维膜;

[0025] 所述方法中,所述金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 或抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针,可按下述方法制备:用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%,煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作:加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液 1.6-1.8ml,继续煮沸 10-15 分钟,用纯水恢复至

100ml,冷却至室温后用 K_2CO_3 调 pH 至 6-7,搅拌加入 0.7mg 金黄色葡萄球菌蛋白 A 或 0.8mg 鼠抗鸡 IgG,20min-30min 后加入 2ml 10% 的聚乙二醇 (20000),继续搅拌 20min-30min,9000rpm-12000rpm 离心 25min-35min,弃上清,沉淀即为金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针或鼠抗鸡 IgG 标记胶体金探针;所述百分比浓度为质量百分比浓度。

[0026] 所述抗鸡 IgG 优选为鼠抗鸡 IgG。

[0027] 其中,调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度可为 0.1mol/L-0.3mol/L,优选为 0.2mol/L。

[0028] 在实际应用中,所述纤维膜的厚度可为 2.5-3mm;所述金标垫的厚度可为 30-70mm;所述样品垫的厚度可为 0.1-0.2mm。

[0029] 本发明的检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸原理:检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸是将鸚鵡热衣原体 MOMP 蛋白包被在 NC 膜上,用于捕捉血清中鸚鵡热衣原体抗体,然后用标记了 SPA 的免疫胶体金探针(用于哺乳动物)或鼠抗鸡 IgG 抗体(用于鸡)标记胶体金探针检测;阳性血清样品鸚鵡热衣原体抗体(IgG 和 IgM)的 Fc 端与金颗粒上的 SPA 结合,Fab 端与纤维膜上的鸚鵡热衣原体 MOMP 蛋白结合,层析 2 分钟后出现肉眼可见的沉淀线。

[0030] 本发明的检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸简单、易操作,非专用人员参照说明书即可利用该试纸检测鸚鵡热衣原体感染。并且,本发明的试纸比 ELISA 和 IHA 方法等常用的检测方法具有更好的稳定性。实验证明本发明的检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸特异性强、敏感、简便、快速,2 分钟即可出结果,与 IHA 方法相比,更适合于现场诊断,如临床、突发事件以及基层的鸚鵡热衣原体病诊断。

附图说明

[0031] 图 1 为检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的结构示意图

具体实施方式

[0032] 材料

[0033] 氯金酸 ($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$),分析纯,上海试剂一厂;

[0034] 柠檬酸三钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$),分析纯,北京化工厂;

[0035] 碳酸钾 (K_2CO_3),分析纯,北京化工厂;

[0036] 金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA),购于 Amersham Pharmacia Biotech 公司;

[0037] 羊抗人 IgG(提取人的 IgG 免疫羊获得,具体方法见《免疫化学研究进展》,李成文著,中国科学技术出版社,1993 年);

[0038] 鸚鵡热衣原体(鸡)阳性血清购自北京市兽药生物制品厂。

[0039] 下述实施例所述的方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0040] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0041] 实施例 1、两种检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的制备

[0042] 如图 1 所示,检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸由依次紧密串联的吸水垫 4、硝酸纤维膜 (NC 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。

[0043] 1、鸚鵡热衣原体 MOMP 抗原的制备

[0044] 鸚鵡热衣原体 MOMP 抗原是具有专利号为 02146790.0 的发明专利的序列表中序列 2 的氨基酸残基序列的蛋白质。具体可按如下方法制备：

[0045] 设计引物，扩增具有专利号为 02146790.0 的发明专利的序列表中序列 1 的核苷酸序列片段（鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白的编码基因），其中引物上带有 Nco I 和 Hind III 酶识别位点。然后，将扩增片段用 NcoI 和 Hind III 双酶切，将其插入到载体 pET32a(+)（购自 NOVAGEN 公司）的 Nco I 和 Hind III 酶识别位点之间得到含有鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白的编码基因的重组载体，将该重组载体转入受体菌 BL21 (DE3)（购自 NOVAGEN 公司），筛选得到表达具有专利号为 02146790.0 的发明专利的序列表中序列 2 的氨基酸残基序列的蛋白质的工程菌。

[0046] 将上述得到的工程菌接种在 LB 平板（含氨苄青霉素 90 ~ 100 μ g/ml），37 $^{\circ}$ C 培养 20 ~ 24 小时，挑取单个典型菌落接种 10ml LB 肉汤，37 $^{\circ}$ C 摇床震荡（250 ~ 300rpm）培养 10 ~ 12 小时，采取 1 : 10 扩大培养法（如 10ml 菌液接种 100ml LB 肉汤）直至进入发酵反应器。发酵培养基为 2 \times YT 培养基，发酵时以 1 : 50 的体积比接种。发酵中控制温度 37 $^{\circ}$ C，搅拌转数 350 ~ 500rpm，通气量 1L 培养基 1L/min 空气，发酵反应器以 1mol/L NaOH 和 30% NaH_2PO_4 调节发酵液 pH7.0；记录发酵液吸光度（550nm 处 A 值），当发酵液 A 值达到 0.8 时加入诱导剂异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷（IPTG）使其终浓度为 0.02mmol/L，并下调温度至 26 $^{\circ}$ C，搅拌转数和通气量不变。诱导 3-4 小时后，全部发酵结束。

[0047] MOMP 抗原的提取和纯化：发酵菌液以 8000g-9000g 离心 10-15 分钟收集菌体沉淀，按每 g 湿重菌体加 1ml 纯水，放入匀浆机中，使菌体在低渗环境下匀浆（ $12 \pm 1\text{kpa}/\text{cm}^2$ ）破碎。收集匀浆液即为粗制 MOMP 抗原。取粗制 MOMP 抗原 100 μ l 按常规法进行 SDS-PAGE 分析，结果在 51Kd 处有一条明显的蛋白带，蛋白含量约占总蛋白量 50% 以上。

[0048] 取粗制 MOMP 抗原 4 $^{\circ}$ C 8000g-9000g 离心 10-15 分钟，弃沉淀，收集上清，上清于 4 $^{\circ}$ C 10000g-12000g 离心 10-15 分钟，弃上清，收集沉淀包含体，包含体再用 PBS(0.01M, pH7.0) 洗 3 次，4 $^{\circ}$ C 10000g-12000g 离心 10-15 分钟收集沉淀包含体，按每 g 湿重包含体加入含 8mol/L 尿素 PBS(0.01mol/L, pH7.0) 30ml，37 $^{\circ}$ C 吹打至包含体溶解并蛋白变性，收集变性 MOMP 于透析袋中，分别用递减尿素含量（6mol/L、3mol/L、1.5mol/L、0.75mol/L）的 PBS(0.01M, pH7.0) 透析液 1000ml 透析，不同透析液各透析 4 小时进行蛋白复性，收集复性后蛋白液，4 $^{\circ}$ C 10000g-12000g 离心 10-15 分钟，弃沉淀，收集上清即为纯化后的 MOMP 抗原。

[0049] 2、金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA) 或鼠抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针的制备

[0050] 1) 制备胶体金溶液：用水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%，煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作：加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液 1.6-1.8ml，继续煮沸 10-15 分钟，用纯水恢复至 100ml，冷却至室温后用 0.2M 的 K_2CO_3 调 pH 至 6-7，搅拌加入 SPA0.7mg 或鼠抗鸡 IgG 0.8mg，20min-30min 后加入 10% 的聚乙二醇 (20000) 2ml，继续搅拌 20min-30min，9000g-12000g 离心 25min-35min，弃上清，沉淀即为 SPA 标记胶体金探针或鼠抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针；用 0.25% 四硼酸钠保存液恢复至原体积的十分之一，即 10ml，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

[0051] 2) 金标垫 2 的制备：取 SPA 标记胶体金探针（检测哺乳动物）或鼠抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针（检测鸡）5ml 加入 0.5g 蔗糖，充分溶解均匀加在玻璃纤维膜上，-20 $^{\circ}$ C ~ -50 $^{\circ}$ C 放置 10 小时，冻干机抽干，得到含有 SPA 标记胶体金探针的金标垫或含

有鼠抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针的金标垫。

[0052] 3、NC 膜 3 的包被：

[0053] 分别用 0.01M pH 7.2 磷酸缓冲液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, Na_2HPO_4 1.07g, 去离子水 1000ml) 稀释步骤 1 中制备的鸚鵡热衣原体 MOMP 抗原至 2 ~ 3mg/ml 用于包被检测线。用 0.01M pH 7.2 的 PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, Na_2HPO_4 1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水 1000ml) 分别稀释羊抗人 IgG 2.5mg/ml (检测哺乳动物) 或羊抗鼠 IgG 2-3mg/ml (检测鸡) 分别用于包被质控线。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 2.5mm 厚硝酸纤维素膜上, 形成相互分离的检测线和质控线, 37°C 干燥 2.5h, 制成质控线分别为羊抗人 IgG 或羊抗鼠 IgG 的两种 NC 膜。

[0054] 4、检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的制备

[0055] 1) 检测鸡鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的制备

[0056] 将吸水垫 (玻璃纤维膜) 4 用双面胶粘贴在具有检测线和质控线的 NC 膜 3 的离质控线较近的一端, 将质控线为羊抗鼠 IgG 的 NC 膜 3 的离质控线较远端用双面胶粘贴在步骤 2 中制备的含有鼠抗鸡 IgG 抗体标记胶体金探针金标垫 2 的一端; 在金标垫 2 的另一端用双面胶粘贴 0.15mm 厚的玻璃纤维膜样品垫 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, 即为检测鸡鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

[0057] 2) 检测哺乳动物鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的制备

[0058] 将吸水垫 (玻璃纤维膜) 4 用双面胶粘贴在具有检测线和质控线的 NC 膜 3 的离质控线较近的一端, 将质控线为羊抗人 IgG 的 NC 膜 3 的离质控线较远端用双面胶粘贴在步骤 2 中制备的含有 SPA 标记胶体金探针的金标垫 2 的一端; 在金标垫 2 的另一端用双面胶粘贴 0.15mm 厚的玻璃纤维膜样品垫 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, 即为检测哺乳动物鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

[0059] 4、检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的原理

[0060] 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 时使干片上的金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针或抗鸡 IgG 标记胶体金探针复溶, 并带动其向硝酸纤维素膜 3 渗移。若标本中有待测特异抗体, 其可与金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针或抗鸡 IgG 标记胶体金探针结合, 此复合物流至检测线 5 即被固相抗原所获, 在膜上显出红色反应线条。过剩的金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针或抗鸡 IgG 标记胶体金探针继续前行, 至质控线 6 与固相 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。

[0061] 5、检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的使用方法

[0062] 将鸚鵡热衣原体感染的哺乳动物或鸡血清样品用生理盐水按 1 : 40 稀释, 以正常的哺乳动物血清或鸡血清为对照, 也用生理盐水按 1 : 40 稀释, 分别用步骤 4 制备的检测哺乳动物鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸或检测鸡鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸各 1 条, 将免疫层析试纸的样品垫浸入经上述稀释的血清样品中, 2min 后开始观察结果, 15min 观察终止。以血清效价 1 : 40 以上为阳性诊断标准, 免疫层析试纸检测出现 1 条红色 (质控线) 沉淀线, 为鸚鵡热衣原体血清学诊断阴性, 即鸚鵡热无衣原体感染; 免疫层析试纸检测出现 2 条红色 (检测线和质控线) 沉淀线, 为鸚鵡热衣原体血清学诊断阳性, 即有鸚鵡热衣原体感染, 质控线和检测线处均无红色沉淀线, 说明试纸失效。

[0063] 实施例 2、检测临床血清样品的效果实验

[0064] 用实施例 1 制备的检测哺乳动物鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸检测 93 份鸚鵡热衣原体感染牛血清,检测鸡鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸检测 250 份鸚鵡热衣原体感染鸡血清,将鸚鵡热衣原体感染的牛或鸡血清样品用生理盐水按 1 : 40 稀释,以正常的牛血清或鸡血清为对照,也用生理盐水按 1 : 40 稀释,以血清效价 1 : 40 以上为阳性诊断标准。

[0065] 检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸检测牛血清样品结果表明:在 93 份衣原体感染的牛血清中,69 份为阳性,24 份为阴性。50 份正常牛(对照)经免疫层析试纸检测全部为阴性。与鸡胚致死及中和试验检测结果一致。

[0066] 检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸检测鸡血清结果表明:在 250 份衣原体感染的鸡血清中,82 份为阳性,168 份为阴性。50 份正常鸡 ICA 检测全部为阴性。与鸡胚致死及中和试验检测结果一致。

[0067] 实施例 3、与 ELISA 方法、IHA 方法比较检测效果

[0068] 用实施例 1 制备的检测哺乳动物的鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸检测(ICA 检测)22 份牛血清,用检测鸡鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸检测(ICA 检测)22 份鸡血清。同时用实施例 1 制备的鸚鵡热衣原体 MOMP 抗原通过 ELISA 方法进行检测。这些血清来自同一地区的鸚鵡热衣原体患病牛(或患病鸡)和正常牛(或正常鸡),用于检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸的特异性评价,具有良好的可比性。

[0069] 检测结果表明 22 份牛血清(经 ELISA 和 IHA 方法检验为鸚鵡热衣原体阳性),用 ICA 试剂盒检验 19 份阳性,经进一步验证,该 22 份牛血清中只有 19 份阳性,且与本发明的 ICA 试剂盒的各样品检测结果一致,证明本发明的 ICA 试剂盒准确;7 份牛血清来自与上述鸚鵡热衣原体患病同一地区的正常牛血清,在 ELISA 和 ICA 中全部为阴性;25 份鸡血清(经 ELISA 和 IHA 方法检验为鸚鵡热衣原体阳性),用 ICA 试剂盒检验 23 份阳性,经进一步验证,该 25 份鸡血清中只有 23 份阳性,且与本发明的 ICA 试剂盒的各样品检测结果一致,证明本发明的 ICA 试剂盒准确;5 份鸡血清来自与上述鸚鵡热衣原体患病鸡同一地区的正常鸡,在 ELISA 和 ICA 中全部为阴性。结果说明实施例 1 中制备的检测鸚鵡热衣原体感染的免疫层析试纸(ICA)与 ELIS 和 IHA 方法比较,在检测牛血清样品或鸡血清样品中都具有较好的一致性和准确性。

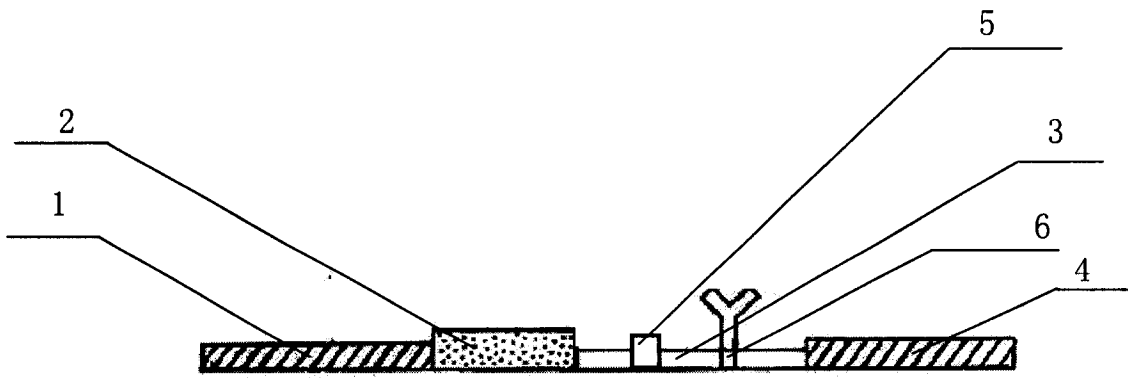


图 1

专利名称(译)	检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN1866015B	公开(公告)日	2012-05-09
申请号	CN200610012120.9	申请日	2006-06-06
[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 朱虹 宋立华 张美玲 檀华 何君		
发明人	端青 朱虹 宋立华 张美玲 檀华 何君		
IPC分类号	G01N33/544 G01N21/78 G01N33/52 G01N33/532		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1866015A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测鹦鹉热衣原体感染的免疫层析试纸及其制备方法，该试纸包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针或抗鸡IgG标记胶体金探针的金标垫、纤维膜和吸水垫；所述纤维膜包被有相互分离的检测线和质控线，所述检测线为鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白，所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白A结合的抗体或可与抗鸡IgG结合的抗体；当所述金标垫含有金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针时，所述质控线为可与金黄色葡萄球菌蛋白A结合的抗体；当所述金标垫含有抗鸡IgG标记胶体金探针时，所述质控线为可与抗鸡IgG结合的抗体。该免疫层析试纸特异性强、敏感、简便、快速，与IHA方法相比，更适合于临床、突发事件以及基层的鹦鹉热衣原体病诊断。

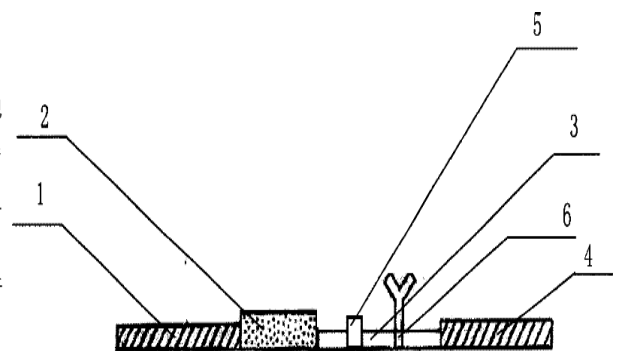


图 1