



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101846677 B

(45) 授权公告日 2013.06.26

(21) 申请号 200910218156.6

(22) 申请日 2009.12.30

(73) 专利权人 吉林大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 5333
号吉林大学畜牧兽医学院

(72) 发明人 闫广谋 张楠 宫鹏涛 李建华
张西臣 杨举

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1390949 A, 2003.01.15,

CN 101320039 A, 2008.12.10,

赵海等. 结核分枝杆菌重要诊断用抗原研
究进展. 《生物技术通讯》. 2009, 第 20 卷 (第 3
期), 436-438.

审查员 王瑶

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种牛结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条
及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种结核杆菌抗体免疫检测胶体金试纸条及其制备方法。用金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 标记胶体金制成胶体金抗体检测试纸条的金胶垫。CFP10 和 MPT64 蛋白是致病性结核杆菌高特异性、免疫原性蛋白。从结核杆菌基因组中克隆出 CFP10 和 MPT64 基因, 把它连接到 pET-28a 上, 构建成两个原核表达重组质粒, 把这两个质粒转化到大肠杆菌中, 表达出 CFP10 和 MPT64 蛋白, 蛋白纯化后, 以混合蛋白为抗原包被硝酸纤维素膜作为检测线, 同金胶垫一起装备成本发明的免疫胶体金试纸条。本发明试纸条能区分人与动物是接种 BCG 还是野毒感染。可用于检测动物血清中的结核杆菌抗体, 具有特异性强, 灵敏度高、稳定性好、方便、快捷的特点, 对结核杆菌的监测、诊断、净化和控制具有重要意义和实际应用价值。

1. 一种结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条,特征在于:以金黄色葡萄球菌 A 蛋白 SPA 标记胶体金制作金标垫,以结核杆菌 CFP10 和 MPT64 蛋白包被硝酸纤维膜作为检测抗原线,用兔抗牛 IgG 或兔抗羊 IgG 作为质控线。

2、权利要求 1 所述的结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条的制备方法,主要包括以下步骤:

(1) 用 SPA 标记胶体金,制备成胶体金探针,把它喷在玻璃纤维膜上制成胶体金垫;

(2) 设计一对引物,以牛结核杆菌基因组为模板,用 PCR 扩增、并纯化出 CFP10 和 MPT64 基因;

(3) 把步骤(2)中所得基因连接到质粒 pET-28a 的 Nde I 和 Sal I 位置上,构建成原核表达重组质粒,转化到大肠杆菌中,表达出 CFP10 和 MPT64 蛋白;用组氨酸结合树脂柱纯出 CFP10 和 MPT64 蛋白;

(4) 用(3)中的纯化的 CFP10 和 MPT64 蛋白为诊断抗原包被硝酸纤维膜作为胶体金检测试纸条的检测线,检测牛时用兔抗牛 IgG、检测羊时用兔抗羊 IgG 作为质控线;

(5) 将样品垫、结合垫、硝酸纤维膜、吸水滤纸按从上到下依次固定于 PVC 板上,制备成检测试纸条。

一种牛结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明提供一种牛结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条,用于动物结核杆菌抗体的检测,本发明还公开了上述试纸条的制备方法,属于血清学检测技术领域。

背景技术

[0002] 牛结核病的检测,在我国主要靠血清学变态反应(GB/T 18645-2002),该检测方法人为操作因素大,主要靠眼观,主观因素较多,误差较高。另外,传统的方法还不能把接种 BCG 的牛,从感染野毒菌的牛区分开来,对流行病学调查,疫源的布控带来了严重的干扰。因此发明一种方便、快捷、准确,并能区分人与动物是野毒感染还是接种 BCG 的诊断方法和诊断工具有重要的现实意义。

[0003] CFP10 基因和 MPT64 基因只存在于致病性结核分枝杆菌群(包括人型结核杆菌、牛型结核杆菌和非洲分枝杆菌),而人与动物所用的结核菌病疫苗 BCG 菌株缺乏这些基因(或者基因沉默)。并且 CFP10、MPT64 蛋白在人与动物身上表现出高免疫原性。因此 CFP10 蛋白和 MPT64 蛋白可以作为诊断动物和人致病性结核分枝杆菌感染的特异性诊断试剂。

[0004] 免疫胶体金技术自问世以来,得到了迅速发展。已广泛应用于免疫组织(或细胞)化学检测和免疫学检测领域,特别是胶体金免疫层析技术具有操作简单、检测快速灵敏、结果清楚,易于判断和保存,且无需任何仪器设备等优点,适合于临床的快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

[0005] 经检索未见有结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条公开的文献报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是公开一种检测结核杆菌抗体免疫胶体金试纸条,解决了当前结核杆菌病检测特异性低,不准确、误差多、灵敏度低的缺点,不能区分人与动物是野毒感染还是人工感染。

[0007] 本发明还提供了上述试纸条的制备方法,适用于工业化生产。

[0008] 本发明的检测结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条,是以金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)标记胶体金制作金标垫,以结核杆菌 CFP10 和 MPT64 蛋白包被硝酸纤维膜作为检测抗原线(T),用兔抗牛 IgG 作为质控线(C)。

[0009] 本发明检测试纸条的制备方法如下:

[0010] 用金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)标记胶体金技术制作金标垫。再克隆出结核杆菌 CFP10 和 MPT64 基因,把它连接到原核表达载体 pET-28a 上,而后把重组质粒转化大肠杆菌中,表达并纯化出 CFP10 和 MPT64 蛋白,用纯化的 CFP10 和 MPT64 蛋白包被硝酸纤维膜作为检测线抗原线(T);检测牛时用兔抗牛 IgG 作为质控线(C),即得检测试纸条。

[0011] 本发明用纯化的 CFP10 和 MPT64 蛋白为检测抗原,就能特异性的检测出动物血清中是否含有结核杆菌抗体,而接种 BCG 的人与动物却没有该抗体。用纯化的 CFP10 和 MPT64 蛋白进一步的制备出胶体金试纸条,保留了其特异性强的特点,并增强了其灵敏度高、稳定

性。

[0012] 本发明结核杆菌抗体检测胶体金试纸条的积极效果在于：检测特异性高、灵敏度高、准确性高、稳定性好、方便、快捷，并能区分人与动物是自然感染还是接种了BCG。具有操作简单、检测快速、结果清楚，易于判断和保存，且无需任何仪器设备等优点，适合于临床的快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

附图说明

[0013] 图1为胶体金抗体检测试纸条测试结果图片。

具体实施方式

[0014] 下列实施例旨在进一步举例说明，而不是限制本发明。本领域技术人员可以理解到，在不背离本发明的精神和原则的前提下，对本发明的任何平行改变和改动都将落入本发明的待批权利要求范围内。

[0015] 实施例1

[0016] 胶体金探针的制备

[0017] 1、材料及方法

[0018] (1) 兔抗牛 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司；兔抗牛 IgG、购自北京意宏安生物科技有限公司；蛋白定量试剂盒购自联星生物科技公司。

[0019] (2) 胶体金的制备

[0020] 采用柠檬酸钠还原法，取硅化过的三角瓶，加入 100mL 去离子水及 1mL 1% 氯金酸，微波炉加热沸腾；迅速加入不同剂量的 1% 柠檬酸三钠，此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液很快变成灰色，继而转成黑色，随后逐渐稳定成红色。全过程约 3min，继续煮沸 15min，冷却后用去离子水补足体积至 100mL。电镜下观察胶体金颗粒的平均直径、分散程度及均匀度。

[0021] (3) 胶体金标记 SPA 探针的制备

[0022] 取 100mL 三角瓶，加入 50mL 胶体金；三角瓶中加入磁性转子后放置在磁力搅拌器上，开启搅拌器边搅拌边加入 0.1mol/L K_2CO_3 ，调 pH 至 6.2 左右；根据胶体金总量计算出所要标记的 SPA 总量。加入金标抗体封闭液，加入 10% 稳定剂 BSA 至终浓度为 1%，继续搅拌 35min；然后 4℃，3000rpm 离心 30min，弃沉淀；上清液 4℃，13000rpm 离心，40min，弃上清加入金标抗体洗涤液重悬沉淀；4℃，13000rpm 离心，40min，弃上清，重复洗涤 2～3 次，最后的沉淀物用金标保存液做适量稀释。

[0023] (4) 金标垫的制备：选用优质的玻璃纤维膜浸入 0.01mol/L PBS(pH6.2)+1% BSA+0.2% Tween-20+0.05mol/L NaCl 配置的溶液中，37℃ 浸泡 30min，取出置常温条件下通风干燥，干燥条件下保存备用。

[0024] 将处理好的玻璃纤维膜切割成 0.55cm 左右宽的长条，长度依需要而定。称取蔗糖少量，将其加到上述制备的胶体金标记 SPA 探针溶液中，使之充分溶解混匀，然后均匀地加到玻璃纤维膜上，4℃ 放置 4h，在低温条件下风干，即为金标垫。

[0025] (5) 为了更好完成上述试验，应补充以下实验。

[0026] SPA 与胶体金结合的最佳 pH 的确定：用 0.1mol/L K_2CO_3 结合精密 pH 试纸调节胶

体金溶液 pH 依次为 4.0-9.0, 每隔 0.5 个 pH 值为一个检测梯度。每管加入 1mg/mL 的 SPA 50 μ L, 在振荡器上混匀, 室温下放置 20 分钟。然后每孔分别加入 100 μ L 10% NaCl 溶液, 混匀, 室温放置 4h, 观察胶体金颜色变化, 记录保持和空白对照颜色一致的最低 pH, 即为最佳的标记 pH。

[0027] SPA 与胶体金结合的最佳标记量确定: 取 1.5mL 离心管若干, 分别加入已调整为最佳标记 pH(6.2) 的胶体金 1mL, 各管依次加入 0、5、10、15、...、50 μ L 浓度为 1.0mg/mL 的 SPA, 振荡器上混匀, 室温放置 20min。然后每孔加入 100 μ L 的 10% NaCl 溶液, 室温下放置 1h, 观察颜色变化, 颜色仍保持红色的最小蛋白量即为最佳蛋白标记量。

[0028] (6) 胶体金标记 SPA 探针的鉴定

[0029] 用有 Formvar 膜的镍网沾取金标蛋白溶液, 空气中干燥后磷钨酸复染, 透射电镜下观察。

[0030] 2、结果

[0031] 胶体金偶联 SPA 后在电镜下观察, 可见金颗粒外周有明显的低电子密度晕圈, 表明金颗粒表面吸附有蛋白质。

[0032] 实施例 2

[0033] 结核杆菌 CFP10 和 MPT64 蛋白基因的克隆、表达及 CFP10 和 MPT64 蛋白的纯化

[0034] 1、材料与方法

[0035] (1) 菌株及质粒

[0036] 结核杆菌 S19、大肠杆菌 DH5a、大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 pET28a+ 载体由军事医学科学院第 11 所 5 室保存, pMD18-T simple vector 购自 TakaRa 公司。

[0037] (2) 相关分子生物学操作

[0038] 细菌总 DNA 的提取、PCR 扩增、质粒重组、大肠杆菌感受态制备、转化、质粒提取等操作按《分子克隆》所述方法进行; T4 连接酶、DNA 的回收纯化按照试剂盒说明书进行 (购自 TakaRa 公司); DNA 测序委托上海生工生物工程公司完成。

[0039] (3) CFP10 和 MPT64 基因的扩增及克隆

[0040] 设计 5' 端带有限制性内切酶 Nde I 位点的上游引物:

[0041] 5' -catatggctgatctcgcaaagatcggtt-3' 和

[0042] Sal I 酶切位点的下游引物

[0043] 5' -gtcgacttacttgagttcaaccaaggc-3',

[0044] 以结核杆菌 S19 基因组 DNA 中为模板扩增 CFP10 和 MPT64 基因。反应条件: 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 58℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。将 PCR 产物与 pMD18-T simple vector 连接构建重组质粒 pMDCFP10 和 MPT64。

[0045] (4) 重组质粒 pETCFP10 和 MPT64 的构建

[0046] 用限制性内切酶 Nde I 与 Sal I 同时消化 pMDCFP10 和 MPT64 与 pET28a+, 分别凝胶回收纯化 CFP10 和 MPT64 与线性化的 pET28a+ 基因片段。用 T4 连接酶使之连接, 而成重组质粒 pETCFP10 和 MPT64。

[0047] (5) 蛋白的 SDS-PAGE 分析及纯化

[0048] 将重组表达质粒 pETCFP10 和 MPT64 转化大肠杆菌 LB21 (DE3) 中, 挑取阳性克隆菌在 LB 培养基中, 37℃ 180rpm 振荡培养过夜, 而后 1 : 100 的比例接种至 5mL LB 培养基中,

37℃培养至 $OD_{600} = 0.38$, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L , 诱导表达 4h 后收菌。将 1.5mL 菌液离心取沉淀加入 $50\mu\text{L}$ 灭菌水和 $50\mu\text{L}$ $2\times\text{SDS}$ 蛋白上样缓冲液, 震荡混匀后沸水煮 15min 后稍离心, 取上清 $20\mu\text{L}$ 进行 12% 的 SDS-PAGE 分析。经组氨酸结合树脂柱纯化回收可溶性蛋白, 得到高纯度的蛋白, 蛋白电泳可见单一蛋白条带。

[0049] 2、结果

[0050] 1. CFP10 和 MPT64 蛋白纯化后 SDS-PAGE 检测

[0051] 将层析纯化的 CFP10 和 MPT64 蛋白经 SDS-PAGE 检测可见一清晰条带, 经凝胶扫描纯度 96%。

[0052] 实施例 3

[0053] 结核病高特异性免疫胶体金抗体检测试纸条组装及测试

[0054] 1、材料方法

[0055] (1) 材料 2992、903、8964 型样品垫 (sample pad)、Ahlstrom 8964 型玻璃纤维膜 (conjugate release membrane)、Sartorius CN140、AE99 和 PRIMA60 型硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane)、470 和 2727 型吸水垫 (absorbent pad)、 $6\text{cm}\times 30\text{cm}$ 、 $8\text{cm}\times 30\text{cm}$ 型 PVC 底板均为上海金标生物科技有限公司产品。

[0056] (2) 样品垫的处理

[0057] 取优质的样品垫浸入 0.01mol/L PBS (pH 为 7.4) 加入 0.05% 的 Tween-20 配成的溶液中, 37℃浸泡 30min, 取出置常温条件下通风干燥, 干燥条件下保存备用。

[0058] (3) 硝酸纤维膜的处理

[0059] 将硝酸纤维膜浸入有甲醇溶液内浸泡 10min, 取 0.01mol/L 2222LPBS (pH7.4)、BSA、Tween-20、NaCl、蔗糖配置硝酸纤维膜的处理液, 调节溶液的最终 pH 值为 6.5 左右; 将膜 37℃浸泡 30min, PBS 洗涤数次, 置于低温条件下风干, 彻底干燥。

[0060] (4) T 线及 C 线的点膜方法

[0061] 将纯化好的 CFP10 和 MPT64 蛋白和羊抗牛 IgG 用最佳缓冲液分别稀释至最佳浓度。将稀释好的 CFP10 和 MPT64 蛋白溶液装入 BIODOT 划膜机喷头 2, 固定在距硝酸纤维膜下边缘 1.1cm 的位置上, 稀释好的用兔抗牛 IgG (检测牛时) 或兔抗羊 IgG (检测羊时) 装入 BIODOT 划膜机喷头 1, 固定在距硝酸纤维膜下边缘 1.6cm 的位置上。T 线与 C 线间的距离为 5.0mm, 参数均为 $1.0\mu\text{L/cm}$ 喷在硝酸纤维膜上。将已喷好的硝酸纤维膜 4℃放置待风干后备用。

[0062] (5) T 线及 C 线条件的优化

[0063] 设置几组不同的抗体浓度对硝酸纤维膜的 T 线 (检测线) 和 C 线 (质控线) 进行优化, 选出最优的一组作为金标浓度 (T 线) 和包被浓度 (C 线)。并对 T 线与 C 线喷膜量、喷膜速度等因素进行优化。

[0064] (6) 试纸条的组装

[0065] 按照底板上划定的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜及吸水纸的尺寸, 裁定符合要求的材料和制备相关的金标垫。将包被好的硝酸纤维膜粘到 PVC 底板上, 小心抹平膜面。将金标垫紧靠硝酸纤维膜下边缘粘到 PVC 底板上。将样品垫一部分重叠在金标垫上一起粘到 PVC 底板上, 并对齐抹平。将吸水纸紧一部分重叠在硝酸纤维膜下边缘粘到 PVC 底板上, 并对齐抹平。用切条机切成 3.5mm 宽的试纸, 在装配区将切好的试纸放入装有干燥剂的包装

袋内。

[0066] 2、结果

[0067] 取一滴待检血清样本滴加在制备好的试纸条的加样区,样品开始在硝酸纤维素膜上扩散,待金标垫释放完全后,硝酸纤维素膜上出现了清晰的 T 线和 C 线。

[0068] 实施例 4

[0069] 胶体金抗体检测试纸条性能的测定及实践

[0070] 1、胶体金抗体检测试纸条敏感性

[0071] 将长春市某奶牛场提供的确诊牛血清,将其稀释到 4000 倍,胶体金试纸条检测呈阳性结果,血清稀释度超过 4000 倍时,试纸条检测显色不清晰(如图 1);其中,1、2 为阴性对照,3、4 为稀释 2000 倍血清检测结果,5、6 为稀释 4000 倍血清检测结果。胶体金试纸条的灵敏度符合本发明的要求。

[0072] 2、胶体金抗体检测试纸条重复性

[0073] 进行 8 次重复试验,检测结果相一致,说明该方法具有可重复性。

[0074] 3、胶体金抗体检测试纸条稳定性

[0075] 4℃放置的布病胶体金检测试纸条定期以标准阳性样本检测,结果显示 60 天以前的均呈稳定的阳性反应达到本发明的目的。

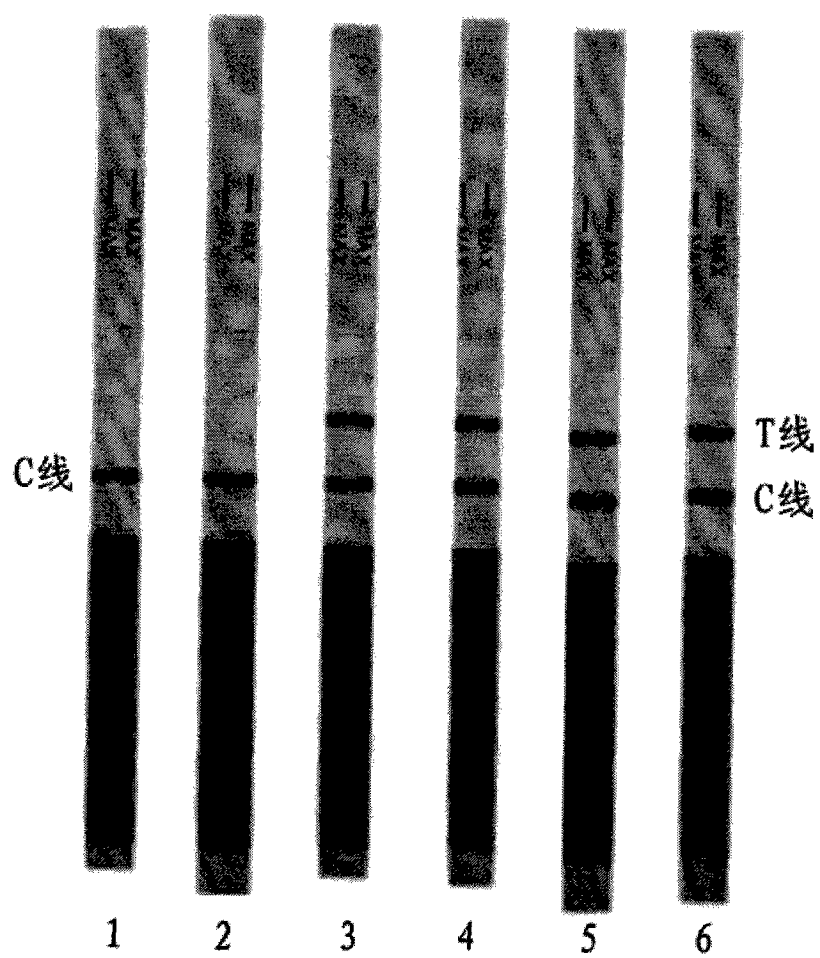


图 1

专利名称(译)	一种牛结核杆菌抗体免疫胶体金检测试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN101846677B	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN200910218156.6	申请日	2009-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	闫广谋 张楠 宫鹏涛 李建华 张西臣 杨举		
发明人	闫广谋 张楠 宫鹏涛 李建华 张西臣 杨举		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	陈宏伟		
审查员(译)	王瑶		
其他公开文献	CN101846677A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种结核杆菌抗体免疫检测胶体金试纸条及其制备方法。用金黄色葡萄球菌A蛋白(SPA)标记胶体金制成胶体金抗体检测试纸条的金胶垫。CFP10和MPT64蛋白是致病性结核杆菌高特异性、免疫原性蛋白。从结核杆菌基因组中克隆出CFP10和MPT64基因，把它连接到pET-28a上，构建成两个原核表达重组质粒，把这两个质粒转化到大肠杆菌中，表达出CFP10和MPT64蛋白，蛋白纯化后，以混合蛋白为抗原包被硝酸纤维膜作为检测线，同金胶垫一起装备成本发明的免疫胶体金试纸条。本发明试纸条能区分人与动物是接种BCG还是野毒感染。可用于检测动物血清中的结核杆菌抗体，具有特异性强，灵敏度高、稳定性好、方便、快捷的特点，对结核杆菌的监测、诊断、净化和控制具有重要意义和实际应用价值。