

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610166551.0

[51] Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1995332A

[22] 申请日 2006.12.30

[21] 申请号 200610166551.0

[71] 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

[72] 发明人 郭爱珍 张书环 陈焕春 谭亚娣
晁彦杰 陈颖钰 钦博 吕文
匡有吉

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书1页 说明书12页 附图6页

[54] 发明名称

检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及制备方法

[57] 摘要

本发明属于动物细菌学与动物传染病学技术领域。具体涉及一种检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及其制备方法。本发明的试纸条是由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬组装而成。在PVC背衬上按顺序依次粘附有样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫；所述的结合垫上包被有MPB83蛋白-胶体金标记物；所述的硝酸纤维素膜上分别包被有由纯化的MPB70蛋白构成的检测线和由纯化的兔抗MPB83蛋白IgG构成的质控线。本发明还公开了牛分枝杆菌特异性抗原MPB83的制备。用于试纸条的特异性抗原之一的重组大肠杆菌Escherichia coli BL21/pET28a-MPB83保藏在CCTCC，保藏编号：CCTCC NO：M206142。本发明的试纸条具有特异性强，灵敏度高，可应用于牛结核抗体的检测。

1、表达牛分枝杆菌 MPB83 蛋白的重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET28a-mpb83 保藏在 CCTCC，保藏编号：CCTCC NO:M206142。

2、包含权利要求 1 的检测试纸条。

3、权利要求 2 所述的试纸条，其特征在于，所述的试纸条是用于检测牛结核抗体的试纸条。

4、权利要求 3 所述的试纸条，包括样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）和 PVC 背衬（7），其特征在于，在 PVC 背衬（7）上按顺序依次粘附有样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）；所述的结合垫（2）上包被有 MPB83 蛋白—胶体金标记物；所述的硝酸纤维素膜（3）上分别包被有纯化的 MPB70 蛋白构成的检测线（5）和纯化的兔抗 MPB83 蛋白的 IgG 构成的质控线（6）。

5、一种适用于检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条的制备方法，其步骤包括：

1) 克隆牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83，转化大肠杆菌，得到保藏编号为 CCTCC NO:M206142 的重组大肠杆菌并使其表达；

2) 将步骤 1) 所述的 MPB83 蛋白和保藏编号为 CCTCC NO: M205135 的 MPB70 蛋白进行纯化；

3) 将步骤 2) 制备的 MPB83 蛋白免疫健康家兔，得到兔抗 MPB83 IgG 抗体；

4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；

5) 将步骤 2) 制备的 MPB83 蛋白加入步骤 4) 制备的胶体金中，得到 MPB83 蛋白—胶体金标记物；

6) 将步骤 5) 制备的 MPB83 蛋白—胶体金标记物包被在结合垫（2）上；

7) 将步骤 2) 制备的 MPB70 蛋白包被在硝酸纤维素膜（3）上构成检测线（5）；并将步骤 2) 制备的兔抗 MPB83 蛋白的 IgG 包被在硝酸纤维素膜（3）上构成质控线（6）；

8) 在所述的 PVC 背衬（7）上按顺序依次粘附所述的样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4），得到所述的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条。

6、权利要求 1 所述的重组大肠杆菌在制备牛结核抗体检测试纸条中的应用。

检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及制备方法

技术领域

本发明涉及动物细菌学与动物传染病学技术领域。具体涉及一种检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及其制备方法。

背景技术

牛结核病是一种严重危害奶牛业的人兽共患传染病，由牛分枝杆菌感染所致。被国际动物卫生组织（OIE）定为B类动物传染病。牛结核给世界农业造成的损失大于牛的其他各种疾病的损失总和，每年超过30亿美元。牛分枝杆菌不但可以感染牛及其它多种哺乳动物，而且可感染人。国内外的人结核病原学调查均发现，牛分枝杆菌是人结核的重要病因之一。因此，世界卫生组织专家委员会第七次会议报告指出：除非消灭牛结核，否则人类结核病的控制是不会成功的（王忠仁，牛结核病与人结核病的相互关系，中国防痨杂志，2005，27(5)：123-125）。

由于目前为止尚未发现有效药物与疫苗用于牛结核病的防治，根除牛结核病主要采取检疫与扑杀阳性牛的国际通用政策。结核菌素（purified protein derivatives, PPD）又称为纯化蛋白衍生物，是结核分枝杆菌在液体培养基中生长时产生的代谢物质，含有多种抗原成分，用于检测结核病时敏感性较高。因此，结核菌素皮内变态反应是国际动物卫生组织与我国认可的法定检疫方法。但由于结核菌素可能包含有与其它分枝杆菌相同的非特异性抗原组份，检测时容易出现假阳性；结核菌素皮内变态反应对感染后期的开放性结核及全身性结核不敏感，而此阶段正是结核患者传播疾病的危险时期。以上原因使结核菌素皮内变态反应的特异性受到质疑。此外，结核菌素皮内变态反应只能进行活体试验，而不能对保存的样品进行回顾性分析，更不适用于野生动物和边远山区的牛结核病普查。

针对目前国内外普遍采用的牛结核病诊断方法——结核菌素皮内变态反应的缺陷，本申请人的农业微生物国家重点实验室动物病原分室研制出了一种用间接血凝方法检测牛结核抗体的试剂盒（专利申请号：200510019996.1）。鉴于当时的技术，该试剂盒还有下列一些需要改进的地方，如该试剂盒中只用到MPB70单一抗原，检测的敏感度有待进一步提高；所用的1%致敏绵羊红细胞在4℃下保存期只有半年。

Greenwald 证明MPB83和MPB70是牛分枝杆菌主要的特异性分泌抗原（Greenwald R, Esfandiari J, Lesellier S et al. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diag Microbiol Infect Dis*, 2003, 46:197-203.）。MPB83是一种菌体表面相关脂蛋白，在体内不仅引发细胞免疫，而且引发体液免疫，具有免疫原性和免疫保护（Feng C G, Palendira U C, Demangel J M, et al. Priming by DNA immunization

augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* bacille calmette-guerin against tuberculosis[J]. Infect Immun, 2001, 69: 4174-4176.)。MPB83是早期分泌靶蛋白(O'Loan CJ, Pollock JM, Hanna J, Neill SD. Immunoblot analysis of humoral immune responses to *Mycobacterium bovis* in experimentally infected cattle: early recognition of a 26-kilodalton antigen[J]. Clin Diag Lab Immunol, 1994,1: 608-611.)，可被疾病早期的人和动物免疫系统识别，因而对结核病的早期诊断具有重要意义。

MPB70 是牛分枝杆菌特异性分泌蛋白质，分泌量占毒力牛分枝杆菌培养基蛋白总量的10%，是牛分枝杆菌感染过程中重要的体液和细胞免疫目标抗原(Harboe M, Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG [J]. Am Rev Resp Dis. 1984, 129:444-452)，也是PPD的主要成分之一。在牛分枝杆菌中成熟的MPB70蛋白很稳定，是理想的检测抗原(Mark D. Carr, Marieke J. Bloemink, Ellen Dentten et al. Solution Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex Protein MPB70[J]. Biological Chemistry. 2003, 278(44): 43736-43743.)。MPB83与MPB70有61%同一性的同源蛋白质(Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG [J]. Infect Immun. 1981, 31(3): 1152-1160.)，本研究室分别用酶联免疫吸附法(ELISA)和琼脂扩散法证明了MPB70能与MPB83的抗血清反应，而MPB83也能与MPB70的抗血清反应，这说明MPB70与MPB83具有共同的抗原决定簇。

胶体金免疫层析(gold-immunochromatography assay GICA)是20世纪80年代发展起来的一项新的免疫分析方法，是应用胶体金标记技术，以胶体金作为示踪物，应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。它具有简便，快速，特异性强，灵敏度高，费用低的优点。

目前，将胶体金免疫层析技术应用于体外检测牛结核病抗体在国内仍属空白，国外商品化的试剂盒只有韩国Animal Genetics, Inc公司生产的“Anigen Rapid Bovine TB Ab Test Kit”，该试剂盒是将MPB70蛋白作为检测抗原，特异性很好，但敏感性不高，会在临床上出现漏检。本申请人研发的“检测牛结核病抗体的免疫胶体金试纸条”同时应用MPB70和MPB83两个蛋白作为检测抗原在国内外尚属首例，具有高特异性和高敏感性。

发明内容

本发明目的在于克服现有技术的不足，提供一种特异性强、灵敏度高，抗原蛋白便于贮存和携带的检测牛结核病的抗体的免疫胶体金试纸条及其制备方法，为我国牛结核病防治提供一种简便的检测和诊断方法及工具。

本发明的总体技术路线图如附图1所示。

本发明通过以下技术方案实现：

为了实现本发明，申请人构建了一种能分泌牛结核分枝杆菌抗原MPB83的重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET28a-mpb83，该菌株于2006年12月21日保藏在中国典型培养物

保藏中心（CCTCC），其保藏号为 CCTCC NO: M206142。利用该重组菌株分泌的 MPB83 作为胶体金标记抗原。

本发明所用到的另一个能分泌牛结核分枝杆菌抗原 MPB70 的重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET28a-mpb70，保藏编号为 CCTCC NO: M205135，利用该重组菌株分泌的 MPB70 作为检测线的包被抗原。

如附图2所示，本发明的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条，它包括样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）和PVC背衬（7），其具体结构是：在PVC背衬(7)上按顺序依次粘附有样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）；所述的结合垫（2）上包被有MPB83蛋白—胶体金标记物；所述的硝酸纤维素膜（3）上分别包被有由纯化的MPB70蛋白构成的检测线（5）和由纯化的兔抗MPB83蛋白IgG构成的质控线（6）。上述材料除抗原和抗体以外，均购自Millipore公司。

制备上述检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条的方法，其步骤包括：

- 1) 克隆牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83，转化大肠杆菌，得到保藏编号为 CCTCC NO:M206142 的重组大肠杆菌并使其表达；
- 2) 将步骤 1) 所述的 MPB83 蛋白和保藏编号为 CCTCC NO: M205135 的 MPB70 蛋白进行纯化；
- 3) 将步骤 2) 制备的 MPB83 蛋白免疫健康家兔，得到兔抗 MPB83 IgG 抗体；
- 4) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；
- 5) 将步骤 2) 制备的 MPB83 蛋白加入步骤 4) 制备的胶体金中，得到 MPB83 蛋白—胶体金标记物；
- 6) 将步骤 5) 制备的 MPB83 蛋白—胶体金标记物包被在结合垫（2）上；
- 7) 将步骤 2) 制备的 MPB70 蛋白包被在硝酸纤维素膜（3）上构成检测线（5）；并将步骤 2) 制备的兔抗 MPB83 蛋白的 IgG 包被在硝酸纤维素膜（3）上构成质控线（6）；
- 8) 在所述的 PVC 背衬（7）上按顺序依次粘附所述的样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4），得到所述的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条。

本发明克隆了牛分枝杆菌特异性抗原 MPB83 的编码基因，构建了原核表达载体，使其在大肠杆菌中表达，对 MPB83 蛋白进行纯，备用。同时对 MPB70 蛋白也进行纯化，备用。选用提纯的 MPB70 作为检测线的包被抗原，用提纯的 MPB83 作为胶体金标记抗原，利用双抗原夹心来检测待测样品（血清）中的相应抗体，根据检测线条带颜色深浅或有无来判断待测样品液中是否含有 MPB83 和 MPB70 抗原的抗体。如果质控线上没有红色条带出现，则该试纸条失效（使用方法具体参见实施例）。

与现有国内外牛结核抗体检测试剂盒相比，本发明具有以下突出的优点：

- 1、本发明的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条同时用到两个牛结核分枝杆菌分泌的抗原蛋白即 MPB83 和 MPB70，因此既具有高特异性又具有高敏感性。

- 2、本发明的检测试纸条检测时间短（20 分钟）且不需要任何特殊仪器、设备，检测成本低。
- 3、本发明的检测试纸条操作简便，不需由专业人员操作。
- 4、本发明的检测试纸条储存方便，对温度要求不高，在 4~8℃ 下有效保存期可达两年；在室温下可保存 12 个月。

附图说明

图 1：本发明的总体技术路线图

图 2：本发明检测试纸条的组装示意图

图中：1 为样品垫，2 为结合垫，3 为硝酸纤维素膜，4 为吸收垫，5 为检测线，6 为质控线，7 为 PVC 背衬

图 3：本发明检测试纸条结果判定示意图

图中：A：为阳性标准品结果， B：为阳性样品结果， C：为阴性样品结果， D、E：为试纸条失效。

图 4：是本发明的载体构建物理图。

图 5：*mpb83* 基因 PCR 扩增结果。

图中：1, 2, 3：扩增出的目的基因； M：DL 2000 的分子量标准

图 6：重组质粒 pET28a-*mpb83* 酶切鉴定结果

图中：M1：DL15000 的分子量标准（由上到下依次为 15000bp、10000bp、7500bp、5000bp、2500bp、1000bp、250bp）； M2：DL2000 的分子量标准（由上到下依次为 2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp）； p：BL21/pET28a(+); rp：BL21/pET28a-*mpb83*

注：编号 1-4 为来自不同单菌落的转化子； 2 号为酶切后鉴定正确的重组质粒

图 7：是本发明诱导表达的牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83 的 SDS-PAGE 电泳图，图 7 显示在不同 IPTG 诱导浓度和诱导时间下 MPB83 蛋白表达情况

图 8：纯化的 MPB83 蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳图

图中：M：蛋白质分子量标准； 1,2：提纯的 MPB83 蛋白

图 9：纯化的 MPB83 蛋白的 Western blot 分析图

图中：M：蛋白质分子量标准； 1：纯化的 MPB83 蛋白与牛结核病阴性血清作用； 2：纯化的 MPB83 蛋白与牛结核病阳性血清作用

图 10：纯化的兔抗 MPB83 蛋白 IgG 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳图

图中：M：蛋白质分子量标准； 1,2：提纯的 MPB83 蛋白 IgG

具体实施方式

实施例 1（制备实施例）

- （一）牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83 基因的克隆及其在重组大肠杆菌中的表达和纯化
- 1 牛型分枝杆菌特异性抗原基因 *mpb83* cDNA 序列的克隆

(1) PCR 引物设计与合成

根据 Genbank 中 *mpb83* 基因序列（登录号：GI: 31794050）设计上下游引物。上游引物引入 *EcoRI* 酶切位点（如引物中的下划线所示），设计 6 个保护碱基，下游引物引入 *HindIII* 酶切位点（如引物中的下划线所示），设计 6 个保护碱基。本发明的引物由北京奥科生物公司合成。

mpb83 上游引物：5'-AGTTCAGAAATTCATGATCAACGTTTCAGGCCAAAC-3'

mpb83 下游引物：5'-ACGTCGAAAGCTTTTACTGTGCCGGGGGCATCA-3'

(2) MPB83 蛋白质编码基因扩增与处理

将牛型分枝杆菌标准株（(*Mycobacterium bovis* AF2122/97，该菌株由湖北出入境检验检疫局郭明星研究员惠赠，其基因序列已经在Genebank登录，登录号为：NC002945）细菌培养物加少量双蒸水煮沸10min裂解菌体，离心后取上清液作为PCR模板。PCR扩增反应体系为：10×Taq Buffer5.0μl，25mmol/LMgCl₂ 1.0μl，2mmol/L dNTPs 1.5μl，20μmol/L上、下游引物各1.0μl，TaqDNA聚合酶1.0μl，模板3μl，无菌双蒸水加至50μl。PCR反应条件：94℃变性4min，进入30个循环（94℃变性30sec，60℃复性30sec，72℃延伸2min），最后72℃延伸10min。扩增的PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析，一条大小660bp的*mpb83*基因片段(如附图5)。使用DNA凝胶快速回收试剂盒（购自上海生物工程公司）纯化*mpb83*基因片段。

2 牛型分枝杆菌特异性抗原基因 *mpb83* 原核表达载体的构建

(1) 重组大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α/ pET28a-*mpb83* 的构建

将 PCR 产物进行回收，纯化后，与克隆载体 pMD18-T（一个商业质粒载体，购买自大连宝生物有限公司）连接，转化大肠杆菌 DH5α，筛选阳性克隆子，小量提取质粒，用限制内切酶对重组质粒进行酶切鉴定，经 0.8%琼脂糖凝胶电泳，证实其大小与预期符合；经测序证实该片段无碱基误配。

用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切 pET28a(+)（购自 invitrogen 公司）和 PCR 产物，用 DNA 凝胶快速回收试剂盒（购自上海生物工程公司）纯化回收，然后用 T4ligase 连接进行粘末端连接，16℃水浴过夜，转化 DH5α 感受态细菌，37℃培养，挑菌，提取重组质粒，酶切鉴定(如附图 6)。该重组表达质粒被命名为 pET28a-*mpb83*。

3 重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/ pET28a-*mpb83* 的构建（如附图 4）

将序列鉴定正确的重组表达载体 pET28a-*mpb83* 转化至大肠杆菌 BL21（大肠杆菌菌株购自 Stratagene 公司）感受态细胞，涂布 LB 卡那霉素（至终浓度为 50μg/mL）平皿，挑选平皿上单个阳性菌落（BL21/pET28a-*mpb83*），接入 LB 液体培养基中 37℃振荡培养至对数生长期（OD₆₀₀=0.6-0.8），向培养基中加入异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG）诱导表达，然后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳和 Western-blot 检测（萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T 主编，分子克隆实验指南，金冬雁，黎孟枫等译，第二版，科学出版社，北京，1992 版），

同时将原载体 pET28a 同步转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞, 作为空白对照菌 (BL21/pET-28a)。

3 牛型分枝杆菌特异性抗原蛋白 MPB83 的原核诱导表达

(1) 最佳诱导物浓度及最佳诱导时间的确定

挑取单个重组大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21/pET28a-mpb83 菌落至 5mL LB 培养基, 加卡那霉素至终浓度为 50 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 8 小时后放 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。用含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基将该菌液按 1:100 比例稀释后, 分装至 2 支细菌培养瓶中 (10mL/瓶), 置 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至对数生长期 (OD₆₀₀=0.6-0.8), 加入诱导剂异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度分别为 0.4、0.8mmol/L, 分别在诱导后第 0、1、2、3、4 小时取 1mL 细菌培养物, 12000r/min 离心收集菌体, PBS 漂洗沉淀并用 50 μ L 重悬, 加入 40 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液和 10 μ L DTT, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min, 取 20 μ L 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳分析 (如附图 7) (萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 主编, 《分子克隆实验指南》, 第二版, 北京科学出版社, 1992 版)。根据 MPB83 蛋白表达情况确定 IPTG 最佳诱导浓度为 0.8mmol/L, 最佳诱导时间为 3 小时。

(2) 牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83 的大量诱导表达和蛋白纯化

从平皿上挑取单个菌落至 5mL LB 培养基, 卡那霉素 (Kan) 至终浓度为 50 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至混浊 (约 8 小时), 放 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。取该菌液 2mL 加入 200mL LB/Kan 培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C 摇床培养约 3h 至 OD₆₀₀=0.6-0.8, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L, 继续诱导培养 3h。

诱导的菌体经离心、超声波破碎后提取包涵体, 经纯化、变性、复性和透析等处理后分装于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。参照萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 主编, 《分子克隆实验指南》, 第二版, 北京科学出版社, 1992 版报道的方法对纯化的蛋白 (如附图 8 所示) 进行 western blot 分析, 结果如附图 9, 证实该重组大肠杆菌可以特异性地表达牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83, 表达的蛋白以包涵体的形式存在大肠杆菌 BL21 中, 且具有免疫学活性。

(二) 兔抗 MPB83 蛋白 IgG 的制备与提纯

将纯化的 MPB83 蛋白免疫健康家兔, 制备高特异性、高效价的兔抗 MPB83 蛋白高免血清, 将含有 MPB83 抗体的兔血清 4000r/min 离心 10 分钟取上清按以下步骤提纯: 取 10ml 上清于 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 10 分钟, 弃杂质, 然后加入 40ml 0.06M pH4.5 的醋酸盐缓冲液, 再在室温 (25 $^{\circ}$ C) 下缓慢加入 330 μ L 辛酸, 边滴加边搅拌。缓慢加入饱和硫酸铵至终浓度为 45%, 用 0.01M PBS (pH7.4) 溶解后透析过夜。SDS 聚丙烯酰胺凝胶变性电泳分析 (如附图 10) 显示有两条蛋白带, 一条为 IgG 重链, 一条为 IgG 轻链。用紫外分光光度计测定纯化多抗在 280nm 和 260nm 波长时的光吸收值 (OD), 按公式 $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 计算多抗浓度。调整溶液体积, 使其终浓度为 10mg/ml。利用该抗体包被硝酸纤维素膜上的质控线。

(三) 牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB70 基因的克隆及其在重组大肠杆菌中的表达和纯化

牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白MPB70基因的克隆及其在重组大肠杆菌中的表达和纯化的方法步骤参见专利申请号为200510019996.1, 发明名称为“一种适用于牛结核抗体检测的试剂盒及应用”说明书所公布的内容。

实施例2（制备实施例）

牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83 和 MPB70 抗体诊断试剂盒组装及制备方法

1、试剂盒组装：

本发明的试剂盒组成如下：样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）和 PVC 背衬（7），具体结构和装配顺序是：在 PVC 背衬（7）上按顺序依次粘附有样品垫（1）、结合垫（2）、硝酸纤维素膜（3）、吸水垫（4）；所述的结合垫（2）上包被有 MPB83 蛋白-胶体金标记物；所述的硝酸纤维素膜（3）上分别包被有纯化的 MPB70 蛋白构成的检测线（5）和纯化的兔抗 MPB83 蛋白 IgG 构成的质控线（6）。

2 胶体金的制备：

用超纯水将 1%氯金酸稀释成 0.01%，置磁力加热搅拌器上搅拌煮沸，按每 100 ml 0.01% 氯金酸加入 2.0 ml 1%柠檬酸三钠，继续煮沸，直到液体呈橙红色即停止加热，冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物，有效期一年。

3 MPB83 蛋白-胶体金标记物制备：

磁力搅拌下，用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 6.5，按每 ml 胶体金加入 2 μ L 500 μ g/mL MPB83 蛋白，继续搅拌混匀 30 min，加入 10%BSA 至终浓度为 1%，静置 30 min。12000 rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 30min，弃上清，沉淀用 0.02M pH9.0 的硼酸盐缓冲液（配方：硼酸 0.1237g,PEG-20000 1g，用超纯水定容至 1000ml，调 pH 至 9.0）洗涤两次，用二十分之一初始胶体金体积的 0.02M pH9.0 的硼酸盐缓冲液（配方：硼酸 0.1237g,PEG-20000 1g，用超纯水定容至 1000ml，调 pH 至 9.0）将沉淀重悬，置 4 $^{\circ}$ C 备用，有效期 60 天。

4 结合垫的包被

将结合垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液（配方及制备：20g BSA，25g 蔗糖，3g 聚乙烯吡咯烷酮（PVP-10），0.2gNaN₃ NaCl 8g，KCl 0.2g，Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g，KH₂PO₄ 0.2g，用超纯水定容至 1000ml）中 30 min 后，于 37 $^{\circ}$ C 烘干。然后用 Biodot 点膜仪将制备好的 MPB83 蛋白-胶体金标记物均匀包被在结合垫上，每厘米结合垫包被 9 μ lMPB83 蛋白-胶体金标记物，真空干燥，真空封装，置 4 $^{\circ}$ C 备用。

5 样品垫的处理

将样品垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液（配方及制备：20g 牛血清白蛋白（BSA），25g 蔗糖，3gPVP-10，0.2gNaN₃，NaCl 8g，KCl 0.2g，Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g，KH₂PO₄ 0.2g，用超纯水定容至 1000ml）中 30 min 后，于 37 $^{\circ}$ C 烘干，真空封装，置 4 $^{\circ}$ C 备用。

6 硝酸纤维素膜的包被

用 Biodot 点膜仪将纯化的牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB70(浓度为 3mg/mL)包被于硝酸纤维素膜作为检测线,包被量为 0.6 μ l/cm,检测线靠近结合垫端,距结合垫端约 8mm;用 Biodot 点膜仪将纯化的兔抗 MPB83 蛋白的 IgG 抗体(浓度 2mg/ml)包被于硝酸纤维素膜作为质控线,包被量为 0.6 μ l/cm,质控线靠近吸水垫,距吸水垫约 8mm,两线距离 5~8 mm。37 $^{\circ}$ C 烘干,封装备用。

7 试纸条的组装

将样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4)按图 2 所示的顺序依次粘附在 PVC 背衬(7)上,切成 3mm 宽的小条,真空封装。4~8 $^{\circ}$ C 保存,有效期 2 年;常温保存,有效期 12 个月。

实施例 3 (应用实施例)

牛结核抗体的免疫胶体金试纸条使用方法

1、血清样品的预处理

取牛血清样品经 4000rpm/min 离心 10min 去掉血细胞,20 $^{\circ}$ C 长期保存,4 $^{\circ}$ C 短期保存。

2、检测步骤

用吸管吸取 150 μ l 待检血清缓慢滴加在胶体金试纸条的加样孔上,20 分钟后观察结果。

3、结果判定

如图3所示,若待测样品试纸条检测线颜色明显深于阳性标准品试纸条检测线颜色,同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品,即待测样品中有牛结核分枝杆菌特异性分泌蛋白 MPB83和MPB70的抗体,说明该牛为结核病牛;若待测样品试纸条检测线无颜色出现,同时质控线上出现红色条带则判断为阴性样品,即待测样品中没有牛结核分枝杆菌特异性分泌蛋白MPB83和MPB70的抗体,说明该牛为结核阴性牛;若待测样品试纸条检测线颜色介于阳性标准品和阴性标准品试纸条检测线颜色之间,同时质控线上出现红色条带则判断为可疑样品,说明该牛疑似结核病;如果质控线上没有红色条带出现,则该试纸条无效。

实施例 4 (应用实施例)

本发明的应用效果举例

本实施例中所指的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸检测方法参照实施例 3 所述的操作步骤,其检测结果如表 1、表 2 和表 3。

1、特异性试验

按实施例 3 所述方法进行试验,检测牛结核阳性和牛结核阴性血清(由本实验室保存,经 PPD 皮试、ELISA、病理学和细菌学检验)、副结核病牛血清、布病牛血清、弓形虫病牛血清和口蹄疫牛血清(均购自中国兽医监察所)。试验结果(见表 1)表明,副结核病牛血清、布病牛血清、弓形虫病牛血清和口蹄疫牛血清样品检测线均无颜色出现,同时质控线上出现红色条带。本发明试纸条与牛的其他疾病无交叉反应,显示本发明试纸条具有好的特异

性。

表1 本发明的试纸条的特异性试验

疾病种类	牛结核阳性对照	牛结核阴性对照	副结核	布病	弓形虫	口蹄疫
检测结果	+	-	-	-	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

2、敏感性试验

按实施例3所述方法进行试验，将10份牛结核阳性血清倍比稀释后用本发明研制的试纸条检测，并与本申请人在前研制出的间接血凝检测牛结核抗体的试剂盒（200510019996.1专利申请的试剂盒）和韩国同类试纸条进行比较（结果见表2）。比较结果显示：本发明研制的试纸条敏感性明显高于200510019996.1专利申请的试剂盒（间接血凝）和韩国同类试纸条。

表2 本发明试纸条与本申请人在前专利申请和韩国同类试纸条的敏感性试验结果

阳性血清样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
200510019996.1 专利申请的试剂盒(间接血凝)	256	512	512	512	512	512	128	512	512	512
韩国胶体金试纸条	512	1024	1024	1024	1024	1024	512	1024	1024	1024
本发明试纸条	1024	2048	2048	2048	2048	2048	1024	2048	2048	2048

注：表2中第1行的数字表示待检的从1份-10份阳性血清，表第2-4行的数字表示能检测到阳性最高稀释倍数。

3、与结核菌素皮内变态反应（TST）比较试验

按实施例3所述方法进行试验，将61份临床牛血清样品用本发明研制的牛结核病抗体检测试纸条检测，并与TST方法做比较（结果见表3）。比较结果显示：TST阳性牛9头，其中试纸条检测判断3头为阴性，阳性符合率为66.66%。TST阴性牛52头，其中试纸条检测判断43头为阴性，阴性符合率为82.69%。总符合率为80.33%。

表3 本发明的试纸条与TST方法的比较

	本发明的试纸条			合计
		阳性	阴性	
TST 方法	阳性	6	3	9
	阴性	9	43	52
合计		15	46	61

4、重复性试验

按实施例3所述方法进行试验，将挑选的10份阳性和10份阴性样品使用5个不同批次

(061201、061202、061203、061204、061205)的本发明研制的试纸条进行检测,结果显示该试纸条具有较好的重复性,变异系数<10% (结果如表 4-1 和 4-2 所示)。

表 4-1 不同批次的本发明的试剂盒检测 8 份已知的阳性样品的结果

样品批次	1	2	3	4	5	6	7	8
061201	+	+	+	+	+	+	+	+
061202	+	+	+	+	+	+	+	+
061203	+	+	+	+	+	+	+	+
061204	+	+	+	+	+	+	+	+
061205	+	+	+	+	+	+	+	+
CV	0							

表 4-2 不同批次的本发明的试剂盒检测 8 份已知的阴性样品结果

样品批次	1	2	3	4	5	6	7	8
061201	-	-	-	-	-	-	-	-
061202	-	-	-	-	-	-	-	-
061203	-	-	-	-	-	-	-	-
061204	-	-	-	-	-	-	-	-
061205	-	-	-	-	-	-	-	-
CV	0							

5、保存期试验

(1) 高温条件下对本发明的试纸条的破坏作用

将本发明研制的5批(批次号为060815、060930、061020、061112、061201)试纸条于37℃存放6天后,按实施例3所述方法进行试验,与保存在4℃的同批试纸条同时检测10份牛结核阴性血清和10份牛结核阳性血清。结果显示:37℃作用6天对本发明的试纸条无破坏作用(如表5-1和5-2所示)

表5-1 高温(37℃作用6天)对本发明的试纸条破坏作用(阳性血清的检测结果)

阳性血清	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
060815	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37℃作 用6天	060930	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	061020	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	061112	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	061201	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	060815	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4℃保存	060930	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	061020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	061112	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	061201	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表5-2 高温（37℃作用6天）对本发明的试纸条的破坏作用（阴性血清的检测结果）

阳性血清	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
37℃作用6天	060815	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	060930	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	061020	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	061112	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	061201	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4℃保存	060815	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	060930	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	061020	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	061112	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	061201	-	-	-	-	-	-	-	-	-

（2）室温保存期试验

将同一批制备的本发明的试纸条，分别在4℃和室温保存1至12个月，于0个月、3个月、6个月、9个月和12个月取出，按实施例3所述方法进行试验，检测1份倍比稀释的阳性血清进行保存期敏感性试验，检测10份已知的阳性和阴性血清进行保存期特异性试验，观察其敏感性、特异性和稳定性，以确定试纸条的保存期。结果显示：本发明的试纸条经室温保存12个月以上其特异性、敏感性均不发生改变（试验结果如5-3所示）。

表5-3 不同保存期限内本发明的试纸条敏感性试验结果

	标准阳性血清稀释度										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
0个月	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3个月	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6个月	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9个月	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12个月	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表5-4 不同保存期限内本发明的试纸条特异性试验结果

	10份已知阳性血清									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0个月	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3个月	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
6个月	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9个月	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
12个月	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	10份已知阴性血清									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0个月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3个月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6个月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9个月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12个月	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6、临床样品的检测

按实施例3所述方法进行试验,对来自不同试验地区1004份牛血清进行检测,结果见表6。检测样品阳性率为5.26%—70.5%。临床应用证明本发明的试剂盒准确性、重复性、敏感性、特异性良好,适合临床大量血清抗体检测和疾病诊断,在清除牛结核病传染源和控制牛结核病的临床推广应用具有重要的意义。

表6 本发明的试纸条的临床应用情况

样品来源	血清样品数量	血清阳性数量	血清检测阳性率
试验地1	78	55	70.5%
试验地2	37	15	40.54%
试验地3	35	2	5.71%
试验地4	61	15	24.59%
试验地5	394	30	7.6%
试验地6	399	21	5.26%
总计	1004	138	13.75%

尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明,但是不能认为是对本发明范围的限制,本发明的范围由所附权利要求书限定。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰形式同样落在本发明的保护范围内。

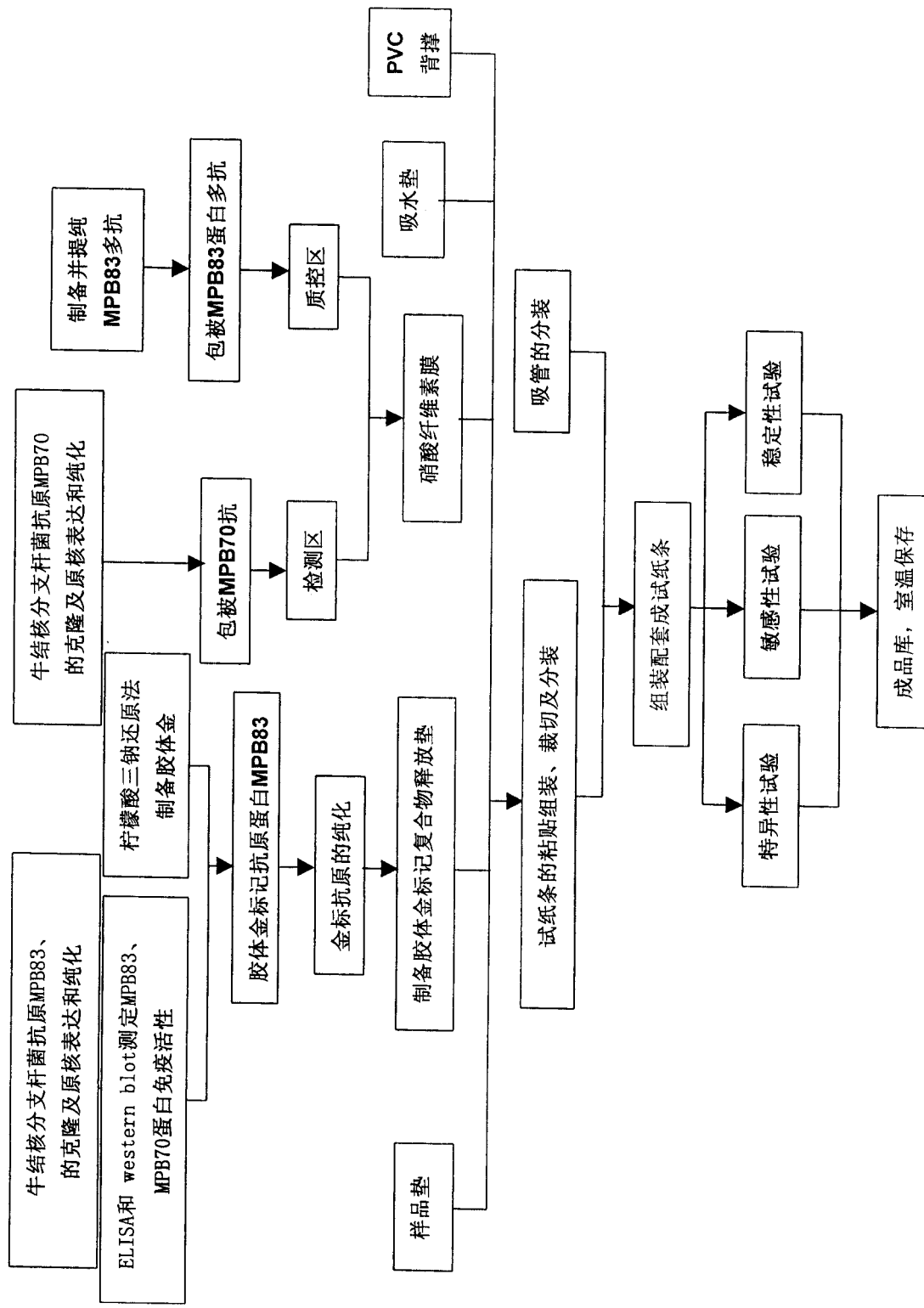


图 1

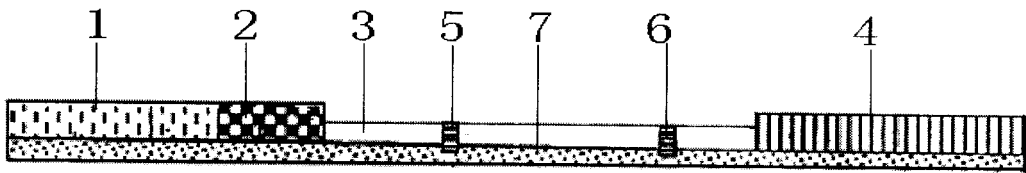


图 2

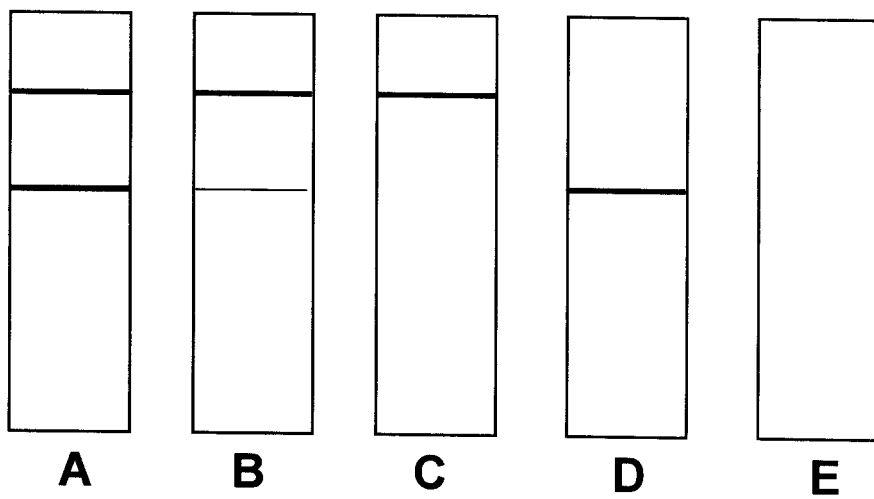


图 3

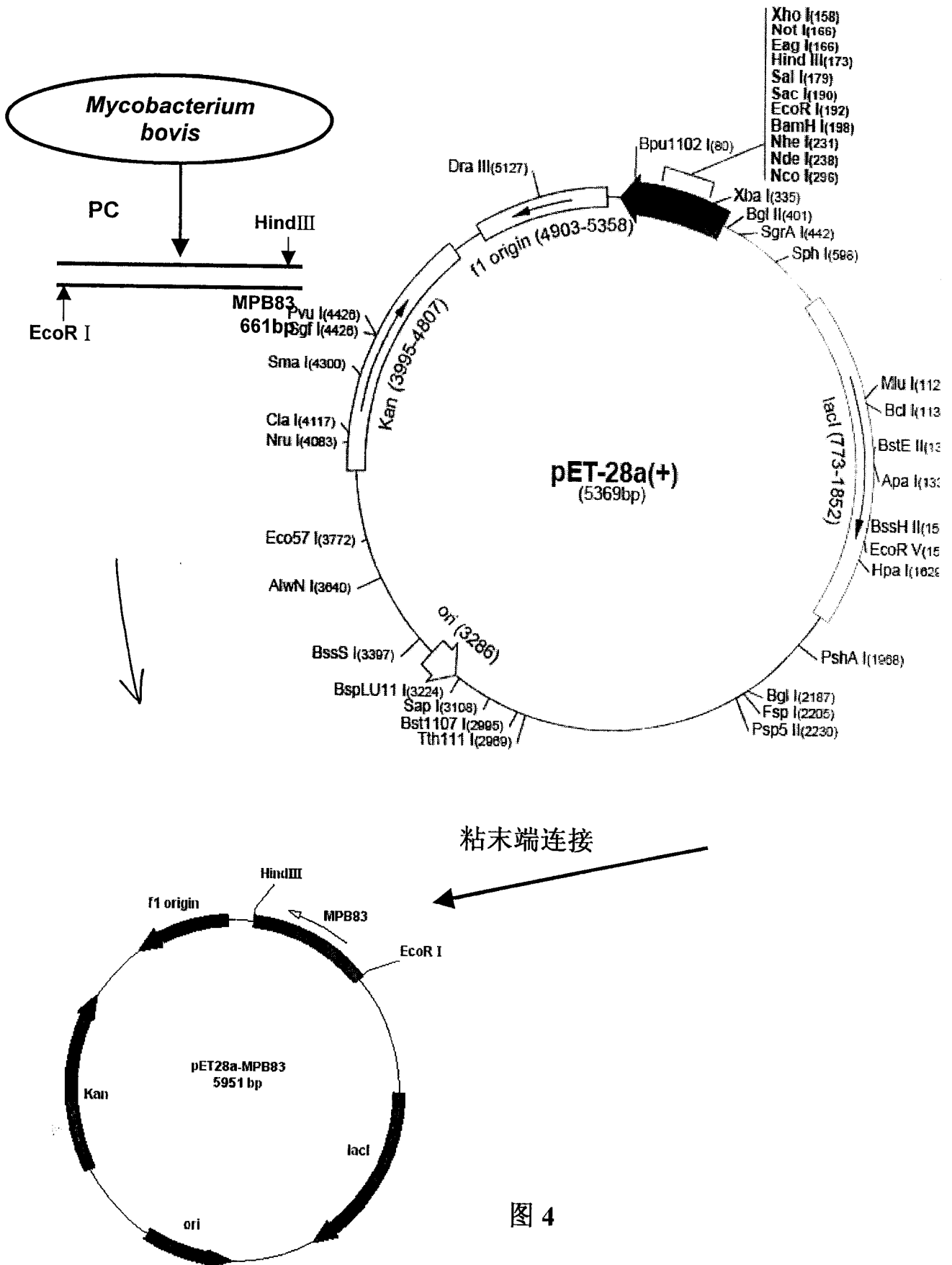


图 4

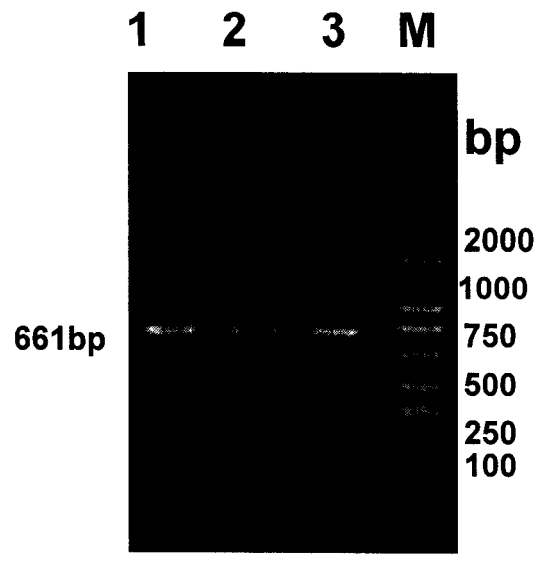


图 5

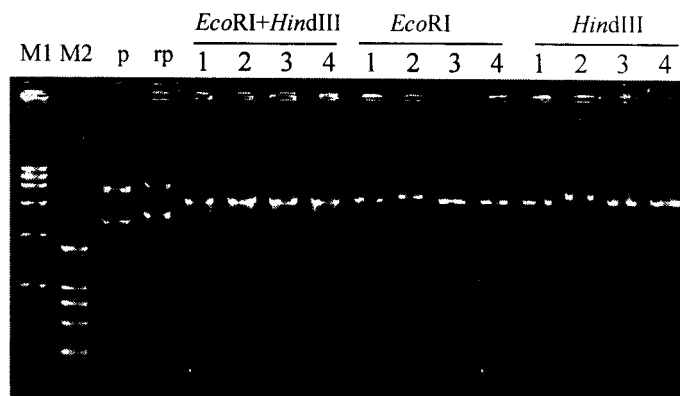


图 6

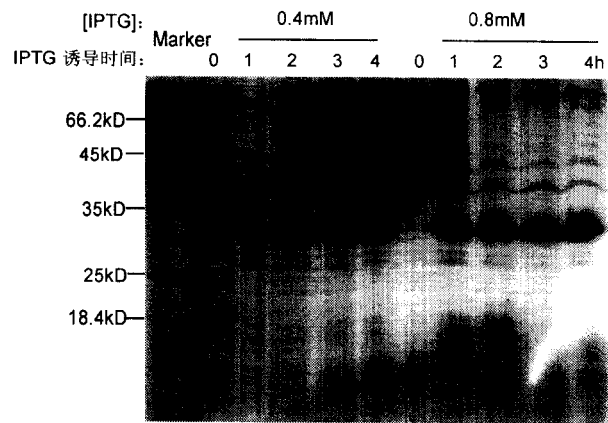


图 7

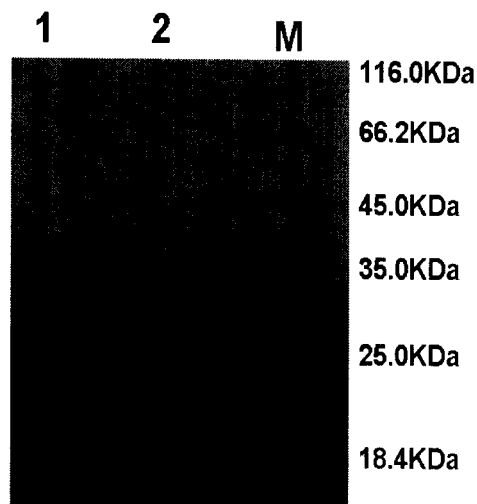


图 8

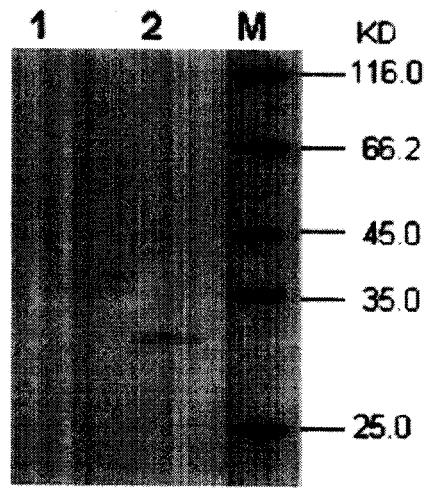


图 9

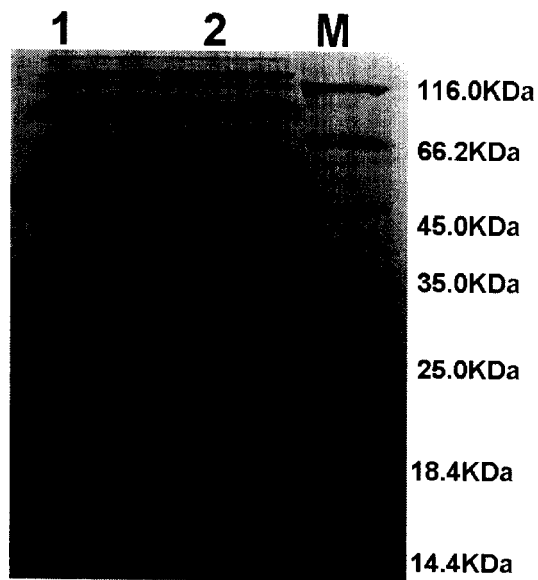


图 10

