

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810141653.6

[43] 公开日 2009年4月8日

[11] 公开号 CN 101403746A

[22] 申请日 2008.7.18

[21] 申请号 200810141653.6

[71] 申请人 深圳市菲鹏生物股份有限公司
地址 518054 广东省深圳市南山区南山大道
南油第四工业区三栋东六楼

[72] 发明人 何志强 孙兴宝 胡鹏 田晓红
孟媛 夏良雨 王宁燕 王红
李泓彦 邓波 崔鹏

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘冬 林毅斌

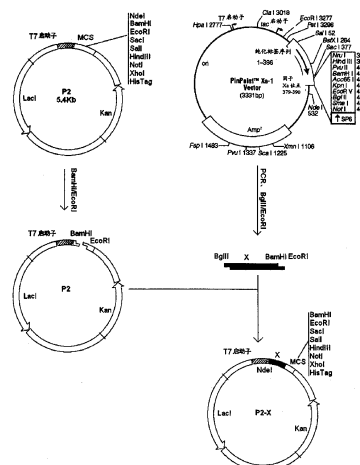
权利要求书1页 说明书17页 附图3页

[54] 发明名称

用于免疫检测的缀合物

[57] 摘要

本发明提供一种缀合物，其包括融合蛋白、抗原部分和任选的标记物。这种融合蛋白具有优良的可标记性能，其与抗原组合成的融合抗原，在与标记物偶联之后，可以使抗原可溶性好，并保持抗原的天然免疫性，此标记缀合物用于免疫检测时，可以大大提高检测的灵敏度。



1. 一种缀合物，包括融合蛋白、抗原部分和任选的标记物，其特征是所述融合蛋白是包含 SEQ ID NO: 1 的序列或者与 SEQ ID NO: 1 有 90% 或以上同源性的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的缀合物，其中所述标记物包括酶、化学发光物质、荧光物质、放射性物质、胶体以及它们的组合。

3. 根据权利要求 1 所述的缀合物，其抗原部分为与传染性疾病、内分泌、肿瘤或药物相关的抗原。

4. 根据权利要求 1 所述的缀合物，其抗原部分为病毒性或细菌性传染性疾病的相关抗原。

5. 根据权利要求 1 所述的缀合物，其抗原部分包括但不限于艾滋病病毒抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、风疹病毒抗原、人巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒 1 型抗原、单纯疱疹病毒 2 型抗原、狂犬病毒抗原、人类 T 淋巴细胞白血病病毒抗原、登革热病毒抗原、人乳头瘤病毒抗原、西尼罗河病毒抗原、森林脑炎病毒抗原、麻疹病毒抗原、流感病毒抗原、副流感病毒抗原、水痘病毒抗原、艾柯病毒型抗原、柯萨奇病毒抗原、乙型脑炎病毒抗原、柯萨奇病毒抗原、EB 病毒抗原、腮腺炎病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、包柔氏螺旋体抗原、沙眼衣原体抗原、肺炎衣原体抗原、鹦鹉热衣原体抗原、解脲脲原体抗原、肺炎支原体抗原、结核分枝杆菌抗原、幽门螺旋杆菌抗原、淋球菌抗原、疟原虫抗原、枯氏锥虫抗原、弓形虫抗原。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项的缀合物在制备诊断试剂盒中的用途。

7. 一种试剂盒，包含权利要求 1-5 中任一项所述的缀合物。

用于免疫检测的缀合物

技术领域

本发明涉及免疫检测领域，具体地说是涉及一种用于免疫检测的缀合物。

背景技术

免疫检测 (immunoassay, IA) 是应用免疫学技术测定标本的方法。在临床检验中主要通过抗原抗体反应检测体液中的抗体或抗原性物质。免疫检测是一种敏感的测定方法，抗原抗体反应后直接测定形成的沉淀或浊度，敏感度可达 5~10 μ g/ml。但在临床检验中，某些待测物在标本中的含量远低于这一水平，因此要寻找增加敏感度的方法。标记的免疫检测是将检测试剂中的抗原或抗体用可微量测定的物质加以标记，通过测定标记物来提高敏感度。标记物有很多种，包括酶、化学发光物质、荧光物质、放射性物质、胶体以及上述物质的组合，其作用都是为了提高免疫检测的灵敏度，使其达到肉眼可分辨的水平或者机器可读出的水平。在放射免疫检测和酶免疫检测中，标记物分别为放射性核素和酶，最后通过测定放射性和酶活力来计算待检物的量，敏感度可比直接测定沉淀物提高数百至数千倍。

免疫检测中，双抗原夹心法广泛应用于酶免疫检测、基于胶体的检测以及荧光检测等方面。双抗原夹心法主要原理是：在固相支持物上面包被抗原，封闭之后，加入待检标本，之后加入第二抗原标记之后的缀合物，先前形成的抗原-抗体复合物再与之结合成抗原-抗体-标记抗原复合物，然后借助一定的手段将信号放大，得出最终的判定结果。

免疫检测中，捕获法的应用也非常普遍。血清中针对某些抗原的特异性 IgM 常和特异性 IgG 同时存在，后者会干扰 IgM 抗体的测定。因此测定 IgM 抗体多用捕获法，先将所有血清 IgM (包括异性 IgM 和非特异性 IgM)

固定在固相上，在去除 IgG 后再加入特异性抗原-标记物，显色。

竞争法可用于抗原及半抗原的定量测定，也可用于测定抗体。以测定抗原为例，将特异性抗体吸附于固相载体上，加入待测抗原和一定量的已知抗原-标记物，使二者竞争地与固相抗体结合，经过洗涤分离，最后结合于固相的抗原-标记物与待测抗原含量呈负相关。

本发明中所述的缀合物，就是指上面提到的免疫检测中融合蛋白-抗原-标记物的复合物。缀合物的活性对免疫检测的灵敏度有着决定性的影响，而高活性的缀合物需要具备两个条件：一方面，缀合物中单位抗原上结合的标记物要尽可能多；另一方面，缀合物中抗原的免疫学活性要尽可能高。因此，在标记物和标记方法限定的情况下，制备的缀合物活性好坏是由融合蛋白-抗原的特点决定的，高活性的缀合物其融合蛋白-抗原需要具备的条件是：

1. 可溶性好，折叠构象正确。抗原的免疫学活性很大程度依赖于其空间构象，尤其是对抗原上面的构象型表位。抗原在表达时，如果作为包涵体的形式，一般来说都是没有正确折叠的。这种溶解性不好的抗原在标记之后一般活性不佳。

2. 抗原表达量大，有利于大量生产。这一点是本领域技术人员公知的。

很多抗原在和标记物偶联之后，其缀合物的活性很低。通常的解决方法就是在抗原上融合表达一段融合蛋白，从而使表达出来的融合抗原在上述方面表现更好，从而具备优良的标记性能。

现有技术中普遍采用的融合蛋白有 TRX、GST、DSBA 等，这些融合蛋白的标记性能可以满足一般的缀合物制备要求。在美国专利 5312737 中，将 HCV 蛋白与所谓的 CKS 蛋白融合表达，但是 CKS 融合蛋白并不具有较好的标记性能。

本发明的融合蛋白部分，与 GeneBank 号为 U47628 的 PinPoint Xa-1 载体的融合蛋白属于同一来源，在论文《多表位融合 HCV 抗原的构建与双抗原夹心检测 anti-HCV 可行性研究》（李保昌；中国人民解放军军事医学科学院；2004 年）中也有应用，但是 PinPoint Xa-1 载体其融合蛋白是用于使

目的蛋白生物素化，利用生物素-亲和素系统来纯化蛋白之用。而本发明采用的融合蛋白在此基础上有创造性的改进：本发明的融合蛋白区段做了缩短和优化，并且创造性的作为增强可溶性表达以及提高标记后灵敏度的融合蛋白应用于免疫检测的标记物上面。

发明内容

本发明发现，通过融合表达本发明的融合蛋白和抗原，可大大增加融合抗原的标记性能。融合抗原的灵敏度比 TRX、GST、DSBA 的融合抗原有很显著的提高，而特异性、稳定性又能达到或超过现有的几种融合蛋白的水平。

因此，本发明提供一种缀合物，其包括融合蛋白、抗原部分和任选的标记物，其中融合蛋白与抗原部分连接，包含 SEQ ID NO: 1 的序列或者与 SEQ ID NO: 1 有 90% 或以上同源性的序列。

在另一方面，本发明还提供包含所述融合抗原编码核酸序列的载体和该载体所转化的宿主细胞。

在另一方面，本发明还提供上述缀合物的制备方法，所述方法包括通过化学偶联的方法将标记物与融合蛋白和/或抗原结合。

在另一方面，本发明还提供利用上述缀合物所生产的试剂盒。

最后，本发明还涉及所述缀合物在免疫检测中的用途。

抗原

本发明中使用的抗原指可在免疫反应中与抗体结合的任何物质。本发明中使用的抗原可为任何本领域已知的可用于免疫检测的抗原。在一个实施方案中，抗原部分为与传染性疾病、内分泌、肿瘤或药物相关的抗原。在另一个实施方案中，抗原部分为病毒性或细菌性传染性疾病的相关抗原。在再一个实施方案中，抗原部分包括但不限于艾滋病毒抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒抗原、庚型肝炎病毒抗原、风疹病毒抗原、人巨细胞病毒抗原、

单纯疱疹病毒 1 型抗原、单纯疱疹病毒 2 型抗原、狂犬病毒抗原、人类 T 细胞白血病毒抗原、登革热病毒抗原、人乳头瘤病毒抗原、西尼罗河病毒抗原、森林脑炎病毒抗原、麻疹病毒抗原、流感病毒抗原、副流感病毒抗原、水痘病毒抗原、艾柯病毒抗原、柯萨奇病毒抗原、乙型脑炎病毒抗原、柯萨奇病毒抗原、EB 病毒抗原、腮腺炎病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、包柔氏螺旋体抗原、沙眼衣原体抗原、肺炎衣原体抗原、鹦鹉热衣原体抗原、解脲脲原体抗原、肺炎支原体抗原、结核分枝杆菌抗原、幽门螺旋杆菌抗原、淋球菌抗原、疟原虫抗原、枯氏锥虫抗原、弓形虫抗原。

融合蛋白

本发明中使用的术语“融合蛋白”是指与目的抗原融合表达成融合抗原的蛋白，此融合抗原与标记物偶联，用于检测目的病原体，可以显著提高检测的灵敏度，同时又具备很好的特异性和稳定性。在一个实施方案中，融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。在另一个实施方案中，融合蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 有 90% 或以上的同源性。

融合抗原

本发明中使用的术语“融合抗原”为融合蛋白与目的抗原的融合表达产物。

缀合物

本发明中使用的术语“缀合物”为标记有标记物的融合抗原。

标记物

本发明中使用的术语“标记物”指在免疫检测中可被检测到的物质。所述标记物可选自任何本领域中使用的适合本发明的标记物，包括酶、化学发光物质、荧光物质、放射性物质、胶体以及它们的组合。

本发明中使用的酶可为任何合适的酶，包括但不限于辣根过氧化物酶、

碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶。

本发明中使用的化学发光物质可为任何合适的化学发光物质，包括但不限于鲁米诺及其衍生物、光泽精、甲壳动物荧光素及其衍生物、联吡啶钌及其衍生物、吡啶酯及其衍生物、二氧环乙烷及其衍生物、洛粉碱及其衍生物、过氧草酸盐及其衍生物。

本发明中使用的荧光物质可为任何合适的荧光物质，包括但不限于异硫氰酸荧光素、罗丹明及其衍生物、铕及其衍生物、量子点及其衍生物、稀土络合物及其衍生物。

本发明中使用的放射性物质可为任何合适的放射性物质，包括但不限于钶、钷、铀、钷、钆、钷。

本发明中使用的胶体可为任何合适的胶体，包括但不限于胶体金、胶体硒、胶体银、乳胶。

融合抗原的产生

抗原的基因的获取，可以采用人工合成核苷酸序列的方式，或者从大肠杆菌基因组以及其它物种的基因组扩增而来，或者可通过基因工程修饰天然基因组的序列而得到。本发明优选人工合成序列，这样可以依照大肠杆菌使用较多的密码子合成基因，从而保证融合蛋白的表达量不受密码子偏好的限制。以大肠杆菌基因组作为模板 PCR 扩增获取本发明融合蛋白的基因，其方法是分子生物学普遍采用的方法，不需要赘叙。

标记物与融合抗原的结合

本发明的标记物可与融合抗原以本领域已知的任何方式结合。优选通过化学偶联的方法将标记物与融合抗原结合。进一步优选采用过碘酸钠法，标记物经 NaIO_4 氧化后形成的醛化物可与融合抗原的氨基相连，形成希夫氏碱，后者可进一步用 NaBH_4 (或乙醇胺) 还原生成稳定的缀合物。

根据上文的描述，本领域普通技术人员容易理解，标记物可连接在融

合抗原的任何合适残基上，包括但不限于氨基、羧基、羟基或巯基。优选标记物连接在融合抗原的氨基上。

根据以上本发明的描述，本发明的融合蛋白其酸碱性和氨基酸分布均匀，使表达的融合蛋白亲水性很好，有利于蛋白表达在上清部分，从而使目的抗原的空间构象折叠的更加接近天然抗原，而且，此融合蛋白分子量大小适中，不会过大从而对目的抗原的生物活性产生影响。以上特点，使表达出来的抗原具有很高活性，尤其是用在免疫检测中的酶标记缀合物或者胶体标记缀合物时，灵敏度、特异性、稳定性等均显著优于目前常用的载体所表达的抗原。

本发明的目的、特征及优点将结合实施例，参照附图作进一步详细阐述。应当理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限定本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 0989)中所述的条件，或者试剂盒生产厂家推荐的方法。

附图说明

图 1: 载体 P2 的图谱。

图 2: 带有 X 融合蛋白的载体 P2-X 的构建过程。

图 3: P2-X-艾滋病病毒抗原质粒的构建过程。

具体实施方式

实施例 1 构建带有 X 融合蛋白的载体 P2-X

本发明参考专利 FPCH04160045P 构建了表达质粒 P2，也就是本发明所使用的克隆载体，在实施本发明的过程中 P2 并不是必须表达载体，其上游的增强子在本发明中也不起实质作用，构建此载体只是为了克隆方便，其它许多表达载体如 pET-24a(+)(美国 Novagen 公司，货号 69749-3)均可用于实施本发明。

参照 GeneBank 号为 U47628 的 PinPoint Xa-1 质粒(美国 Promega

Corporation 公司, 货号: V2020)上 Biotin purification tag DNA 编码的蛋白序列, 选取第 21 氨基酸至第 102 氨基酸的区段, 用 Oligo 软件计算机辅助设计该区段的引物, 引物序列为: 上游引物 5'-GGGAGATCTCACCATCACCATCACCATCACCATTACACGAAAACCCGAT-3', 5'端带有 BglIII 酶切位点和三个保护碱基, 以及 8 个 His 的标签, 下游引物 5'-GGTGAATTCTTAGGATCCCTCAACCTTGCCGTCGGTG-3', 5'端带有 BamHI、EcoRI 酶切位点, 两个酶切位点之间加入一个终止密码子, 最末端带有三个保护碱基。

以 PinPoint Xa-1 质粒作为模板, 用上面设计的两条引物, PCR 扩增 X 融合蛋白。PCR 条件为: 94°C, 5 分钟×1 个循环, (94°C, 30 秒钟, 55°C, 30 秒钟, 72°C, 30 秒钟)×30 个循环, 72°C, 10 分钟×1 个循环。PCR 产物回收(本发明所使用的分子生物学提取和回收试剂盒均购自上海华舜生物工程有限公司)之后, 用 BglIII 和 EcoRI 酶(本发明所采用的各种分子生物学用酶均购自大连宝生物工程有限公司)同时酶切, 之后回收酶切产物, 连接到用 BamHI 和 EcoRI 酶切之后的 P2 载体上, 就得到了改造好的载体 P2-X。

实施例 2 构建含有 HIV 融合抗原基因的表达质粒

PCR 扩增 HIV 的 env 基因(CengBank 号为 AF321145)中第 1486-1836bp 的 DNA 序列, 其上游引物带有 BamHI 位点, 下游引物带有 EcoRI 位点且 EcoRI 位点之前带有终止密码 TAA。PCR 片段克隆到经过 BamHI 和 EcoRI 酶切之后的 P2-X 载体, 得到的阳性克隆为 P2-X-HIV。

实施例 3 含有 HIV 融合抗原的表达和纯化

将 P2-X-HIV 质粒转化大肠杆菌 ER2566(美国 New England Biolabs 公司), 涂布于含 100ug/ml 硫酸卡那霉素(上海生工生物工程技术有限公司, 以下简称生工, 货号 KB0286)的 LB 平板上, 37°C 过夜培养, 挑取单克隆, 用含同一浓度卡那霉素的 500ml LB 培养基 37°C 振荡培养至 OD600 1.0 左右, 用终浓度为 0.5mM 的 IPTG(生工, 货号 IB0168)进行诱导, 诱导条件

为：37℃，200rpm，4小时。4℃ 5000rpm 离心 20分钟收集菌体，每升菌液的菌体用 10ml 裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl)重悬，超声破碎，4℃ 12000rpm 离心 20分钟，经 SDS-PAGE 电泳鉴定后，大部分蛋白分布在裂解上清液中，收集上清，加入 0.25 倍上清体积的饱和硫酸铵溶液，4℃ 12000rpm 离心 20分钟，收集沉淀，用 10ml 平衡缓冲液(10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 5mM 咪唑(美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号 I5513), pH8.0)溶解，用 10 倍柱床体积的平衡缓冲液平衡 Ni-NTA 亲和柱(Qiagen 公司, 货号 30210)之后，加入蛋白样，用 10 倍介质体积的平衡缓冲液洗去未结合的蛋白，再用 5 倍体积洗脱缓冲液(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM 咪唑, pH8.0)，洗脱目的蛋白，测定蛋白浓度，-20℃保存备用。P2-X-HIV 质粒表达纯化之后的融合抗原在下文简写为 P2-X-HIVAg，其它的名称以此类推。

实施例 4 用融合抗原标记 HRP 以制备含有 HRP 的缀合物

缀合物的制备采用 NaIO₄ 氧化法。称取 10mg 辣根过氧化物酶(HRP, 英国 Biozyme laboratories 公司, 货号: HRP4)溶解于 1ml 超纯水中，再缓慢滴加 1ml 超纯水新鲜配制的 5mg/ml NaIO₄(生工, 货号 ST1244)溶液，室温下避光轻柔搅拌 40 分钟后加入 20%乙二醇(生工, 货号 E0582)溶液 0.05ml, 室温下避光搅拌 40 分钟。然后立即加入事先对 100mM, pH 9.51 碳酸盐缓冲液透析 2 小时, 2.5mg/ml 的纯化好的 P2-X-HIVAg 抗原 1ml, 4℃ 避光对 100mM, pH 9.51 碳酸盐缓冲液透析过夜。次日，向混合物中滴加 0.1ml 新鲜配制的 4mg/ml NaBH₄(生工, 货号 ST1268)溶液，混匀，4℃ 静置 2 小时。将上述溶液装入透析袋中，对 PBS 缓冲液(150mM, pH7.4)透析，4℃ 过夜。加入酶保护剂及终浓度 50%的甘油混匀后-20℃避光保存备用。P2-X-HIVAg 融合抗原标记 HRP 之后的缀合物在以下的文字中称为 P2-X-HIVAg-HRP，其它的名称以此类推。

实施例 5 含有 HRP 的缀合物用于双抗原夹心法 ELISA 检测 HIV 抗

体

将 P2-HIVAg 抗原以一定比例用碳酸盐缓冲液(50mM, pH9.51)稀释, 100ul/孔加入酶标板(深圳金灿华实业有限公司辐照酶标板), 4℃包被 24 小时, 次日用 PBST(10mM PB, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH7.4)洗涤液洗板二次, 拍干, 120ul/孔加入含 30%新生牛血清 (北京元亨圣马生物技术研究所), 8%蔗糖, 5%酪蛋白(美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号 C-8645), 1%β-巯基乙醇(生工, 货号 M0482), 150mM NaCl 的 pH7.4, 10mM PB 封闭液, 37℃封闭 2 小时, 甩掉孔内液体, 拍干, 置室温 20-25℃、湿度 55%-65%、有通风设备的房间内风干。封装于加有干燥剂的铝膜袋中, 包被完毕。

在包被酶标板中先加入 100ul 待测样品、阴性参照样品(正常人阴性血清)、阳性参照样品(HIV 抗体阳性血清)对照, 37℃温育 30 分钟; 用 PBST 洗涤液洗板五次, 拍干。再 100ul/孔加入含有 20%新生牛血清, 以一定比例稀释的 P2-X-HIVAg-HRP 缀合物的 pH7.4 的 20mM PB 缓冲液, 37℃温育 30 分钟; 用 PBST 洗涤液洗板五次, 拍干。

每孔加入含 0.5%过氧化氢尿素(生工, 货号 UB1753)、4.76%三水合乙酸钠、0.9%冰醋酸的显色剂 A 及含 0.32%TMB(生工, 货号 TB0514)、5mM 柠檬酸、0.5mM EDTA-2Na、5%甲醇、2%二甲基甲酰胺的显色剂 B 各 50ul, 37℃避光显色 10 分钟。每孔加 50ul, 含 2M 硫酸的终止液终止反应, 酶标仪 450nm 波长(参考波长 630nm)空白孔校零后读取 OD 值。

截值(Cutoff Value(COV))计算: $COV = \text{阴性对照平均 OD 值} \times 2.0$ (阴性对照 OD 值低于 0.075 按 0.075 计算, 高于 0.075 按实际 OD 值计算), 待测样品 OD 值 $\geq COV$ 为阳性, 待测样品 OD 值 $< COV$ 为阴性。

本发明的融合蛋白 X 连接 HIV 目的蛋白之后表达的抗原, 标记 HRP 之后的缀合物, 用于双抗原夹心法 ELISA 检测 HIV 抗体, 灵敏度、特异性、准确性、重复性、稳定性、精密性等指标均优于 P2、pET-30a、pET-32a、pET-39a、pGEX-4T-1 等表达载体表达的 HIV 抗原标记 HRP 之后的缀合物。

(1)灵敏度

我们用同样的方法选择最佳的标记条件, 将 P2-X-HIVAg、P2-HIVAg、

pET-32a-HIVAg、pGEX-4T-1-HIVAg、pET-30a-HIVAg、pET-39a-HIVAg 分别标记,并用同样的方法选择各自的最佳使用比例,再用二步夹心法在同一环境统一的试剂的条件在对 100 份的系列稀释比例的血清进行检测,得到了表 1 的结果,结果表明本发明融合蛋白连接 HIV 基因并标记后和 P1、pET-32a、pGEX-4T-1、pET-30a、pET-39a 等表达载体连接 HIV 抗原并标记后对各稀释度血清反应的灵敏度差异均具有统计意义($P < 0.05$)。由此可见,本发明融合蛋白连接 HIV 型抗原并标记后的灵敏度有较大的提高。

表 1 本发明融合蛋白 X 连接 HIV 抗原表达的融合抗原制备的 HRP 缀合物在用于双抗原夹心法 ELISA 检测 HIV 抗体时的灵敏度比较

缀合物	100 份血中检测出的份数				
	血清稀释度(倍)				
	1	25	50	100	200
P2-X-HIVAg-HRP	100	100	100	98	95
P2-HIVAg-HRP	100	96	82	70	54
pET-30a-HIVAg-HRP	100	98	89	75	60
pET-32a-HIVAg-HRP	100	100	98	95	92
pET-39a-HIVAg-HRP	100	98	94	89	81
pGEX-4T-1-HIVAg-HRP	100	100	96	92	85

(2)、特异性

用 P2-HIVAg 包被 96 孔板,用 P2-X-HIVAg-HRP、P2-HIVAg-HRP、pET-32a-HIVAg-HRP、pGEX-4T-1-HIVAg-HRP、pET-30a-HIVAg-HRP、pET-39a-HIVAg-HRP 缀合物作为酶标记物分别组成试剂盒,用二步夹心法在相同条件下分别分别检测了 3000 份临床阴性血清,P2-X-HIVAg-HRP 假阳性率为 0.033%,P2-HIVAg-HRP、pGEX-4T-1-HIVAg-HRP 假阳性率为 0.067%,pET-30a-HIVAg-HRP、pET-32a-HIVAg-HRP 的假阳性率为 0.1%、pET-39a-HIVAg-HRP 假阳性率为 0.2%。

(3)、重复性

对阴、阳性待测样品各 240 份,采用不同时不同批次不同操作者进行多次检测,考查 P2-X-HIVAg-HRP 用于组成试剂盒后判定结果的重复性,结果显示本发明 P2-X-HIVAg-HRP 用于组成的试剂盒对阴、阳性判定结果的重复性为 100%。这表明本融合蛋白用于基因克隆及 HRP 标记的再现性

好，重复性高。

(4)、稳定性

将本发明的融合蛋白连接抗原后表达的蛋白 P2-X-HIVAg，以及标记 HRP 的抗原酶 P2-X-HIVAg-HRP 分别 37℃ 考核 144 小时，取出后与同时 4℃ 存放的抗原和抗原酶在同一条件下检测相同的阴、阳性质控血清，抗原包被后间接法检测，抗原酶稀释成工作液后二步夹心法检测，其结果见表 2 和表 3。实验表明，本发明融合蛋白用来表达的抗原和表达抗原标记后的稳定性好。

表 2 P2-X-HIVAg 抗原稳定性实验结果

试剂保存状态	线性	CV 值	阳性对照 均值	阴性对照 均值	阴、阳性 质控血清
4℃ 存放	99.90%	7%	2.210	0.030	两条件下标本测 得 OD 值
37℃ 考核 144 小时	99.90%	6%	2.181	0.028	无明显差异

表 3 P2-X-HIVAg-HRP 抗原酶稳定性实验结果

试剂保存状态	线性	CV 值	阳性对照 均值	阴性对照 均值	阴、阳性 质控血清
4℃ 存放	99.90%	6%	2.412	0.010	两条件下标本测 得 OD 值
37℃ 考核 144 小时	99.90%	5%	2.368	0.008	无明显差异

(5)、精密性

在用 P2-HIVAg 包被的同一反应板上对同一份已知阳性标本，多次平行做大于等于 10 孔重复间接法检测，得到各孔的检测 OD 值，计算其 CV 值均低于 15%；在同一反应板上对同一份已知阳性标本，用 P2-X-HIVAg-HRP 稀释的酶当作酶工作液多次平行做大于等于 10 孔重复二步夹心法检测，得到各孔的检测 OD 值，计算其 CV 值均低于 10%，说明本试剂盒精密性较好。

实施例 6 含有胶体金的的缀合物的制备

取 100ml 超纯水于 500ml 圆底烧瓶中，放到加热搅拌器上加热至沸腾，加入 1ml 1% 氯金酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)的水溶液，沸腾后加入 1ml 1

%的柠檬酸钠(美国 Sigma-Aldrich 公司),继续加热 10 分钟后放置自然冷却。取 10ml P2-X-HIVAg 抗原装入透析袋中,对 10mM PBS PH 7.4 缓冲液透析 8 小时,其间每 1 小时换一次缓冲液。取 10ml 胶体金,用 0.2M K_2CO_3 溶液调节胶体金的 pH 至 6~7,加入 200ug P2-X-HIVAg 抗原,继续搅拌 5~10 分钟。在上述混合液中加入 0.5ml 2%BSA 溶液,继续搅拌 5 分钟。将上述混合液装入合适的离心管中。5000rpm 离心 10 分钟,吸出上清,将沉淀收集至一合适容器;对上清再用 10000rpm 离心 15 分钟,重复第一次离心的操作;对上清再用 12000rpm 离心 30 分钟,弃掉上清,将三次离心的沉淀收集到同一离心管中,用胶体金稀释液定容至 1ml。将上述沉淀于-4℃冰箱中保存。金标记好的 P2-X-HIVAg 抗原命名为 P2-X-HIVAg-AU。采用如下方式确定最佳使用效价:将 P2-X-HIVAg-AU 用胶体金稀释液稀释 x 个稀释度,每个稀释度不少于 1ml,即稀释好的 HIV 金标工作液,浸泡合适大小的固相载体(如玻璃纤维、聚酯膜、无纺布等),用已知检定合格的 HIV 包被抗原包被硝酸纤维素膜(Milipore 公司),用夹心法做胶体金免疫试验,从 x 个条件中选择灵敏度最高,特异性最好的条件,即 P2-X-HIVAg-AU 的最佳比例。本领域技术人员应领会, x 为相对有限的数目,并且大于等于试验次数。

实施例 7 本发明融合蛋白连接 HIV 抗原后标记胶体金的缀合物用于双抗原夹心法金标检测 HIV 抗体

本发明融合蛋白连接 HIV 抗原后标记胶体金的缀合物用于双抗原夹心法金标检测 HIV 抗体,其灵敏度、特异性、准确性、重复性、稳定性、精密性等指标均优于 P2、pET-30a、pET-32a、pET-39a、pGEX-4T-1 等表达载体连接 HIV 抗原后标记缀合物的对应性能。

(1)灵敏度

我们用同样的方法选择最佳的标记条件,将 P2-X-HIVAg、P2-HIVAg、pET-30a-X-HIVAg、pET-32a-X-HIVAg、pET-39a-X-HIVAg、pGEX-4T-1-X-HIVAg 分别标记,并用同样的方法选择各自的最佳使用浓度,

制成胶体金试纸条在同样的条件下对 100 份的系列稀释比例的血清进行检测, 得到了表 4 的结果, 结果表明本发明融合蛋白连接 HIV 抗原并标记胶体金后和 P2、pET-30a、pET-32a、pET-39a、pGEX-4T-1 等表达载体连接 HIV 抗原并标记胶体金后对各稀释度血清反应的灵敏度差异均具有统计意义($P < 0.05$)。由此可见, 本发明融合蛋白连接 HIV 抗原并标记后的灵敏度有较大的提高。

表 4 本发明融合蛋白 X 连接 HIV 基因表达的融合抗原制备的胶体金缀合物在用于胶体金检测 HIV 阳性血清的 HIV 抗体时的灵敏度比较

缀合物	100 份血中检测出的份数				
	血清稀释度(倍)				
	1	25	50	100	200
P2-X-HIVAg-AU	100	100	99	96	91
P2-HIVAg-AU	100	95	82	70	54
pET-30a-HIVAg-AU	100	100	95	86	77
pET-32a-HIVAg-AU	100	100	98	94	90
pET-39a-HIVAg-AU	100	100	90	81	65
pGEX-4T-1-HIVAg-AU	100	100	97	93	88

(2) 特异性

本发明的融合蛋白 X 连接抗原后, 使抗原可溶性明显增加, 利于纯化, 且更利于胶体金的标记, 与其他融合蛋白比特异性明显改善。我们用 P2-X-HIVAg-AU、P2-HIVAg-AU、pET-30a-HIVAg-AU、pET-32a-HIVAg-AU、pET-39a-HIVAg-AU、pGEX-4T-1-HIVAg-AU 用相同的包被硝酸纤维素膜组装成胶体金试纸条, 用双抗原胶体金夹心法在同条件下分别分别检测了 2000 份临床阴性血清, P2-X-HIVAg-AU 假阳性率为 0.45%, P2-HIVAg-AU 假阳性率为 1%、pET-30a-HIVAg-AU 假阳性率为 0.85%、pET-32a-HIVAg-AU 假阳性率为 1.4%、pET-39a-HIVAg-AU 假阳性率为 1.1%、pGEX-4T-1-HIVAg-AU 假阳性率为 0.65%。

(3) 重复性

对阴、阳性待测样品各 200 份, 采用不同时不同批次不同操作者进行多次检测, 考查 P2-X-HIVAg-AU 组装成的试纸条后判定结果的重复性, 结果显示本发明 P2-X-HIVAg-AU 组装成的试纸条对阴、阳性判定结果的重复

性为 100%。这表明本融合蛋白用于基因克隆及胶体金标记的再现性好，重复性高。

(4)稳定性

将本发明的融合蛋白连接抗原后表达的蛋白 P2-X-HIVAg, 以及胶体金标记的 P2-X-HIVAg-AU 分别 37℃ 考核 7 天, 取出后与同时 4℃ 存放的抗原和抗原金标复合物在同一条件下检测相同的阴、阳性质控血清, 抗原用同样方法标记, 与抗原金标复合物分别稀释成工作液后制成胶体金成品条检测, 其结果见表 5 和表 6。实验表明, 本发明融合蛋白用来表达的抗原和表达抗原标记后的稳定性好。

表 5 P2-X-HIVAg 抗原稳定性实验结果

试剂保存状态	HIV 稳定性 阳性质控 1	HIV 稳定性 阳性质控 2	HIV 稳定性 阳性质控 3	阴性对照 均值	阴、阳性 质控血清
4℃ 存放	+	++	++++	-	两条件下标本 检测的显色程 度无明显差异
37℃ 考 核 7 天	+	++	++++	-	

表 6 P2-X-HIVAg-AU 抗原金标复合物稳定性实验结果

试剂保存状态	HIV 稳定性 阳性质控 1	HIV 稳定性 阳性质控 2	HIV 稳定性 阳性质控 3	阴性对照 均值	阴、阳性 质控血清
4℃ 存放	+	++	++++	-	两条件下标本 检测的显色程 度无明显差异
37℃ 考 核 7 天	+	++	++++	-	

(5)精密性

在用 P2-X-HIVAg-AU 稀释成工作液后制成胶体金成品条检测同一份已知阳性标本, 多次平行做 10 次重复检测, 得到各检测条的结果均为阳性, 且各检测条的显色程度也无显著差异, 说明本试剂条精密性较好。

实施例 8 本发明融合蛋白与 PinPoint Xa-1 载体其融合蛋白 (biotin purification tag) 的对比

采用与前述类似的方式, 构建了带有 PinPoint Xa-1 载体其融合蛋白 (biotin purification tag) 的新载体, 命名为 P2-Y, 此载体连接上 HIVAg, 质

粒命名为 P2-Y-HIVAg。随后的转化、诱导、表达鉴定、纯化、标记 HRP 或者 AU 都跟 P2-X-HIVAg 类似，不作赘述。

(1)融合抗原的表达量对比

用凝胶分析软件分析 SDS-PAGE 胶结果，P2-X-HIVAg 表达量占总蛋白的 10%，而 P2-Y-HIVAg 的表达量占总蛋白的 2% 不到。由此可见，本发明融合蛋白连接 HIV 抗原其表达量比 PinPoint Xa-1 载体其融合蛋白 (biotin purification tag) 有较大优势。

(2)融合抗原的溶解性对比

P2-X-HIVAg 的菌诱导，菌体经过破碎之后，90% 分布在上清之中，因此，P2-X-HIVAg 的可溶性部分总蛋白的 9%。而 P2-Y-HIVAg 只有 50% 左右分布在上清之中，因此，P2-Y-HIVAg 的可溶性部分仅仅占总蛋白的 1%。由此可见，本发明融合蛋白连接 HIV 抗原其融合抗原溶解性比 PinPoint Xa-1 载体其融合蛋白 (biotin purification tag) 有较大优势。

(3)融合抗原标记 HRP 之后的性能 (灵敏度、特异性) 对比

P2-X-HIVAg-HRP 与 P2-Y-HIVAg-HRP 的灵敏度对比结果见表 7，其结果表明，P2-X-HIVAg-HRP 与 P2-Y-HIVAg-HRP 灵敏度相比，有较大优势。

采用与前述类似的方式，对比 P2-X-HIVAg-HRP 与 P2-Y-HIVAg-HRP 的特异性，P2-X-HIVAg-HRP 假阳性率为 0.033%，P2-Y-HIVAg-HRP 假阳性率为 0.033%，基本相当。

表 7 P2-X-HIVAg-HRP 与 P2-Y-HIVAg-HRP 的灵敏度对比

缀合物	100 份血中检测出的份数				
	血清稀释度(倍)				
	1	25	50	100	200
P2-X-HIVAg-HRP	100	100	100	98	95
P2-Y-HIVAg-HRP	100	99	97	90	82

(4)融合抗原标记 AU 之后的性能 (灵敏度、特异性) 对比

P2-X-HIVAg-AU 与 P2-Y-HIVAg-AU 的灵敏度对比结果见表 8，其结果表明，P2-X-HIVAg-AU 与 P2-Y-HIVAg-AU 灵敏度相比，有较大优势。

采用与前述类似的方式,对比 P2-X-HIVAg-AU 与 P2-Y-HIVAg-AU 的特异性, P2-X-HIVAg-AU 假阳性率为 0.45%, P2-Y-HIVAg-AU 假阳性率为 0.4%, 无明显差异。

表 8 P2-X-HIVAg-AU 与 P2-Y-HIVAg-AU 的灵敏度对比

缀合物	100 份血中检测出的份数				
	血清稀释度(倍)				
	1	25	50	100	200
P2-X-HIVAg-AU	100	100	99	96	91
P2-Y-HIVAg-AU	100	99	95	89	67

序 列 表

(1) 基本信息:

(iii) 序列数量: 1

(2) SEQ ID NO: 1:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 82 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 拓扑学结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

SHENPMGTILFGGGTGGAPAPAAGGAGAGKAGEGEIPAPLAGTVS
KILVKEGDTVKAGQTVLVLEAMKMETEINAPTDGKVE

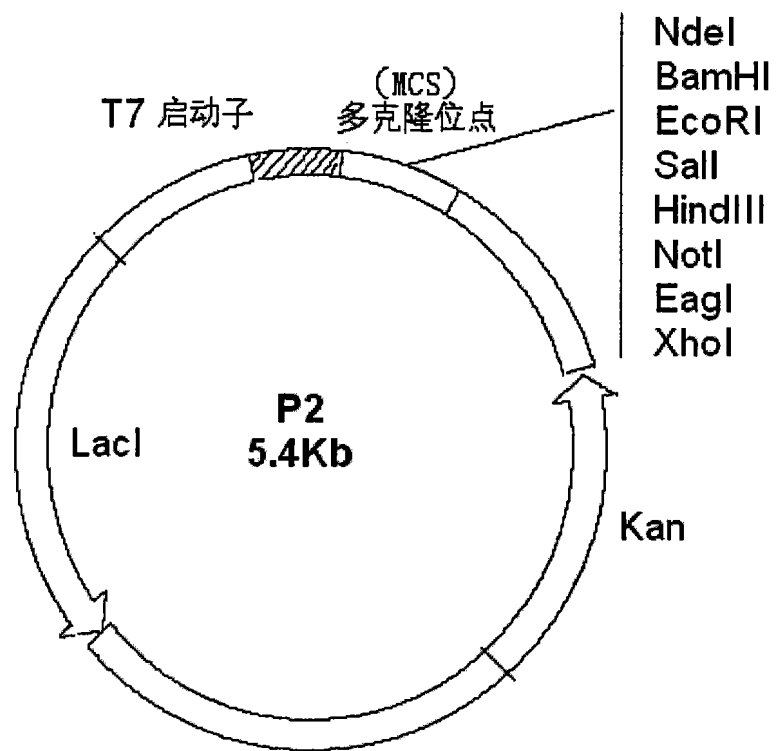


图 1

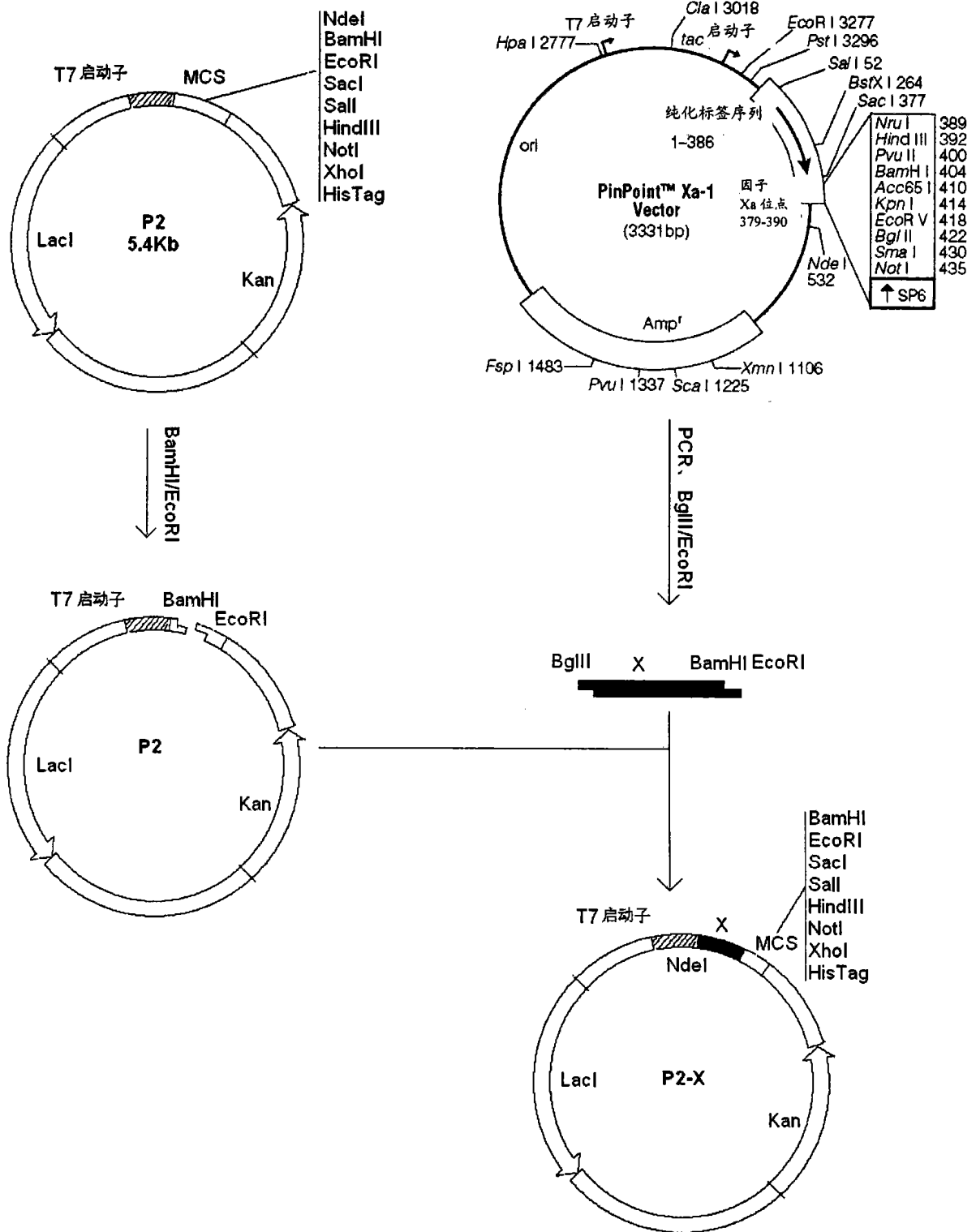


图 2

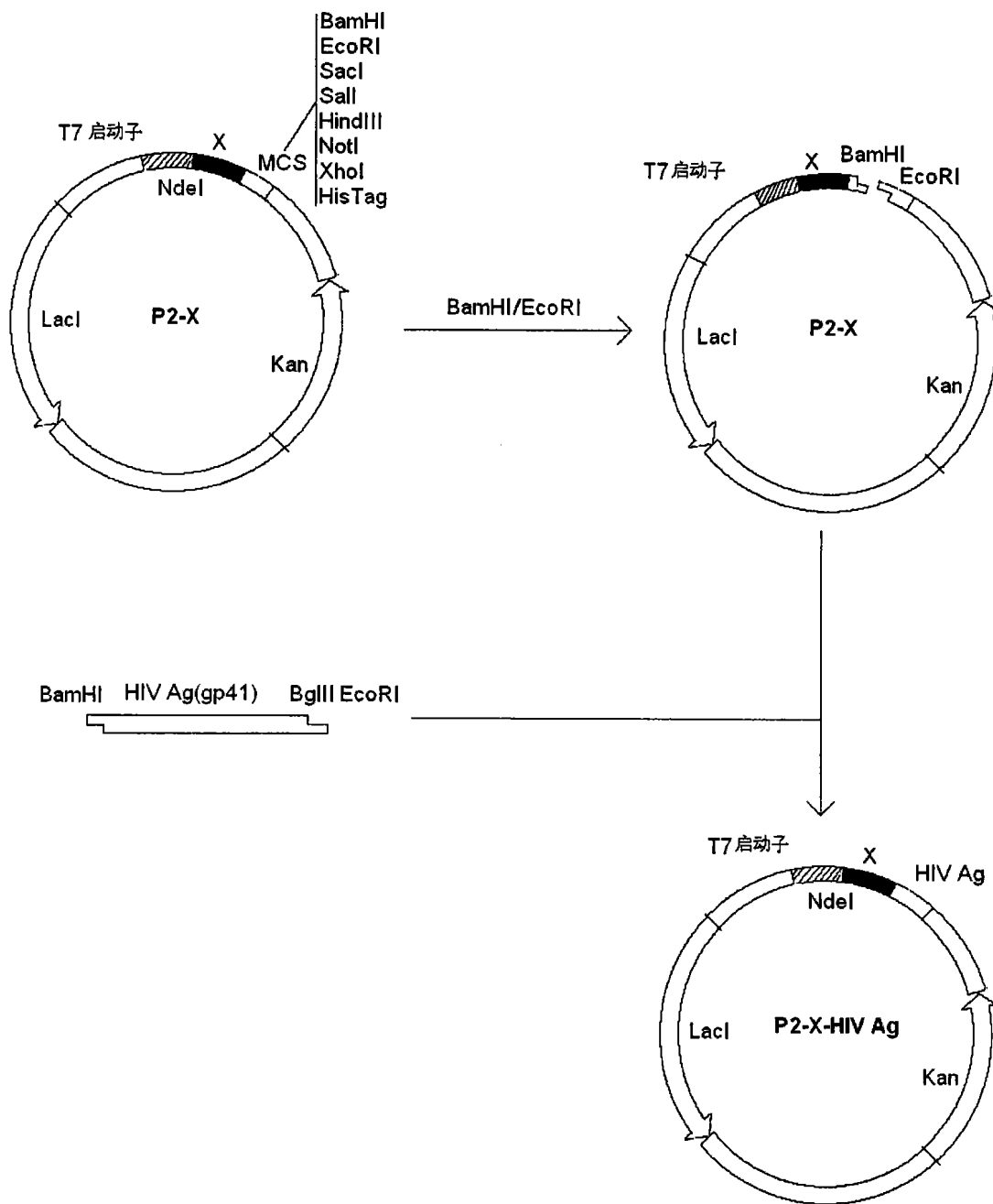


图 3

专利名称(译)	用于免疫检测的缀合物		
公开(公告)号	CN101403746A	公开(公告)日	2009-04-08
申请号	CN200810141653.6	申请日	2008-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市菲鹏生物股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市菲鹏生物股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东菲鹏生物有限公司		
[标]发明人	何志强 孙兴宝 胡鹏 田晓红 孟媛 夏良雨 王宁燕 王红 李泓彦 邓波 崔鹏		
发明人	何志强 孙兴宝 胡鹏 田晓红 孟媛 夏良雨 王宁燕 王红 李泓彦 邓波 崔鹏		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/53 Y02A50/54		
代理人(译)	刘冬 林毅斌		
其他公开文献	CN101403746B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种缀合物，其包括融合蛋白、抗原部分和任选的标记物。这种融合蛋白具有优良的可标记性能，其与抗原组合成的融合抗原，在与标记物偶联之后，可以使抗原可溶性好，并保持抗原的天然免疫性，此标记缀合物用于免疫检测时，可以大大提高检测的灵敏度。

