

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102286093 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 21

(21) 申请号 201110212854. 2 *C12N 1/21* (2006. 01)
(22) 申请日 2011. 07. 27 *C07K 16/28* (2006. 01)
(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基 *G01N 33/53* (2006. 01)
础医学研究所 *C12R 1/19* (2006. 01)
地址 100850 北京市海淀区海淀区太平路
27 号
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
(72) 发明人 何竞 曹务春 宋晓国 杨锡琴
王国华 张贺秋 江佳富 刘玮
詹琳 蒋宝贵
(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246
代理人 史二元
(51) Int. Cl.
C07K 14/705 (2006. 01)
C12N 15/12 (2006. 01)
C12N 15/63 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种嗜吞噬细胞无形体抗原及含有该抗原的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了属于人粒细胞无形体病检测技术领域的一种嗜吞噬细胞无形体抗原及含有该抗原的试剂盒。本发明的抗原含有优势 B 细胞表位, 在最大地保留抗原反应性的前提下, 尽量减少无关序列造成的交叉反应性。本发明利用 ELISA 方法和免疫层析法检测抗体, 较之免疫荧光法可大大提高检测的灵敏度, 具有快速、简便的特点, 适合基层医院使用, 尤其 IgM 抗体检测采用 IgM 捕获法, 与间接 ELISA 技术相比, 具有较高的特异性。

1. 一种嗜吞噬细胞无形体抗原,其特征在于,所述抗原为含有优势 B 细胞表位的长肽,其氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 4、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 6、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 8 或 SEQ ID No. 9 所示。

2. 编码权利要求 1 任何一项所述的长肽的多核苷酸。

3. 包含权利要求 2 任何一项所述的多核苷酸的表达载体。

4. 包含权利要求 3 任何一项所述的表达载体的工程菌。

5. 根据权利要求 1 任何一项所述的长肽制备的抗体。

6. 一种检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgG 抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述任一抗原。

7. 一种检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述任一抗原。

8. 一种检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述任一抗原。

一种嗜吞噬细胞无形体抗原及含有该抗原的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于人粒细胞无形体病检测技术领域,具体涉及一种嗜吞噬细胞无形体抗原及含有该抗原的试剂盒。

背景技术

[0002] 人粒细胞无形体病 (Human granulocytic anaplasmosis, HGA) 是由嗜吞噬细胞无形体 (*Anaplasma phagocytophilum*) 感染人末梢血中性粒细胞引起,以发热伴白细胞、血小板减少和多脏器功能损害甚至死亡为主要临床表现的新发疾病。人粒细胞无形体病是硬蜱叮咬人体而引起的人兽共患性疾病。1994 年美国报告首例人粒细胞无形体病病例 (Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(3) : 589-595.)。2006 年我国在安徽省发现首例人粒细胞无形体病病例,此后通过回顾性血清学与分子生物学调查发现我国浙江、山东、河南及湖北等省份均存在 HGA 病例 (Zhang L, Liu Y, Ni D., et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*, 2008, 300(19) : 2263-2270. Zhang S, Hai R, Li W, et al. Seroprevalence of human granulocytotropic anaplasmosis in central and southeastern China. *Am J Trop Med Hyg*, 2009, 81(2) : 293-295. Zhang L, Shan A, Mathew B, et al. Rickettsial Seroepidemiology among farm workers, Tianjin, People ' s Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(6) : 938-940. Chahan B, Jian Z, Xuan X., et al. Serological evidence of infection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in domestic animals in Xinjiang Uygur Autonomous Region area, China. *Vet Parasitol*, 2005, 134(3-4) : 273-278.)。由于该病为新发疾病,相关的研究稍显薄弱,一旦疾病爆发可能由于技术储备不足而导致诊断不明,贻误治疗甚至引起恐慌。

[0003] 目前实验室检测主要有包括血清及病原学检测:(1) 急性期血清间接免疫荧光抗体 (IFA) 检测嗜吞噬细胞无形体 IgM 抗体阳性。(2) 急性期血清 IFA 检测嗜吞噬细胞无形体 IgG 抗体阳性。(3) 恢复期血清 IFA 检测嗜吞噬细胞无形体 IgG 抗体滴度较急性期有 4 倍及以上升高。(4) 全血或血细胞标本 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体特异性核酸阳性,且序列分析证实与嗜吞噬细胞无形体的同源性达 99% 以上。(5) 分离到病原体。

[0004] 由于人粒细胞无形体病无特异性临床表现,早期诊断较困难。病原学检测包括 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体特异性核酸阳性以及分离病原体。其中 PCR 检测不适宜基层医院使用,其检测的阳性率也偏低;病原体的分离更需一定的设备和技术储备,不易成功。目前我国血清学检测使用的免疫荧光试剂主要依赖美国进口,价格非常昂贵,而且制备荧光片需大量培养嗜吞噬细胞无形体,荧光片的制备很难标准化和产业化,因此利用免疫荧光方法进行大规模的样品检测受到限制,再者,由于荧光片制备采用感染的全细胞易产生交叉反应性,影响检测的特异性。

[0005] 由于人粒细胞无形体病是硬蜱叮咬人体而引起的,因此开展蜱传播疾病的鉴别诊

断显得尤为重要。嗜吞噬细胞无形体的早期诊断对控制其传播具有重要意义,而特异性抗原则是实验室诊断优劣的关键所在。目前开展嗜吞噬细胞无形体的研究力量严重不足,尚缺乏高灵敏度、高特异性的血清检测试剂。

[0006] 而酶联免疫检测方法灵敏、简便被广泛用于病原体的抗体检测,具有广阔的应用前景。依据其采用抗原的不同,分为全菌体、基因工程表达重组抗原等。全菌体抗原也需要大量培养病原体,抗原的均一性、可重复性差,且其纯化方法很难标准化,因此可能带来非特异性反应的问题,同样存在产业化的困难,因此利用全菌体抗原进行大规模的样品检测也受到限制。基因工程抗原无需培养病原体,容易标准化和产业化,已成功应用于丙型肝炎病毒、梅毒螺旋体等不能体外培养的病原体的血清学检测。国外已有报道采用基因工程抗原(全蛋白重组抗原)研制酶联免疫试剂用于抗体检测,但全长的重组蛋白存在交叉反应(全长的 MSP5 重组蛋白与 AM(A marginale) 存在交叉反应)和表达量低等问题,因此研究开发重组表位抗原有望提高血清学检测的特异性和灵敏度,而且获得的优势诊断表位抗原不需细胞培养,适合大量样品的检测需求。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种嗜吞噬细胞无形体抗原。

[0008] 本发明的目的还在于提供编码上述抗原的多核苷酸及其表达载体和工程菌。

[0009] 本发明的目的还在于提供一种检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgG 抗体的试剂盒。

[0010] 本发明的目的还在于提供一种检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的试剂盒。

[0011] 本发明的目的还在于提供一种检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析试剂盒。

[0012] 一种嗜吞噬细胞无形体抗原,所述抗原为含有优势 B 细胞表位的长肽,其氨基酸序列如序列表中 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 4、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 6、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 8 或 SEQ ID No. 9 所示。

[0013] 编码权利要求 1 任何一项所述的长肽的多核苷酸。

[0014] 包含权利要求 2 任何一项所述的多核苷酸的表达载体。

[0015] 包含权利要求 3 任何一项所述的表达载体的工程菌。

[0016] 根据权利要求 1 任何一项所述的长肽制备的抗体。

[0017] 一种检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgG 抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述任一抗原。

[0018] 一种检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述任一抗原。

[0019] 一种检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含权利要求 1 所述任一抗原。

[0020] 本发明的有益效果:1、本发明是建立高效表达的嗜吞噬细胞无形体重组抗原的基础上,可有效地避免费时费力的病原体培养,降低了检测成本,易于标准化。2、本发明抗原含有优势 B 细胞表位,在最大地保留抗原反应性的前提下,尽量减少无关序列造成的交叉反应性。表位抗原表达量高,克服全基因抗原表达量低不易制备的缺点。3、本发明利用 ELISA 方法和免疫层析法检测抗体,较之免疫荧光法可大大提高检测的灵敏度,具有快速、

简便的特点,适合基层医院使用。尤其 IgM 抗体检测采用 IgM 捕获法,与间接 ELISA 技术相比,具有较高的特异性。

附图说明

[0021] 图 1 为 MSP2 的 B 细胞表位分析;1-5 代表 MSP2 优势表位区段。

[0022] 图 2 为 MSP5 的 B 细胞表位分析;横线为 MSP5 优势表位区段。

[0023] 图 3 为 160KD 的 B 细胞表位分析;横线为 160KD 优势表位区段。

[0024] 图 4 为 130KD 的 B 细胞表位分析;横线为 130KD 优势表位区段。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。

[0026] 以下实施例未说明的实验步骤参照《分子克隆实验指南》第三版,或参照相应试剂盒的说明书。

[0027] 实施例 1 抗原基因序列的获得

[0028] 根据 GenBank 中的嗜吞噬细胞无形体 MSP2、MSP5、160KD 和 130KD 基因序列,设计引物,以感染嗜吞噬细胞无形体的小鼠血清基因组 DNA 为模板,分别 PCR 扩增相应的基因,PCR 扩增条件如下:95℃ 预变性 2 分钟,94℃ 30 秒,50℃ 30 秒,72℃ 30-90 秒(依据基因长度而定),扩增 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 分钟。回收 PCR 产物,将其连接至 pMD19 克隆载体中,将重组质粒进行 DNA 序列测定。

[0029] 用于 MSP2 基因扩增的引物序列如下:

[0030] MSP2-F(SEQ ID No. 10),MSP2-R(SEQ ID No. 11)。

[0031] 用于 MSP5 基因扩增的引物序列如下:

[0032] MSP5-F(SEQ ID No. 12),MSP5-R(SEQ ID No. 13)。

[0033] 用于 160KD 基因扩增的引物序列如下:

[0034] 160KD-409F(SEQ ID No. 14),160KD-1595R(SEQ ID No. 15);160KD-1371F(SEQ ID No. 16),160KD-1914R(SEQ ID No. 17);160KD-1574F(SEQ ID No. 18),160KD-2374R(SEQ ID No. 19);160KD-1985F(SEQ ID No. 20),160KD-3377R(SEQ ID No. 21);160KD-2997F(SEQ ID No. 22),160KD-3890R(SEQ ID No. 23);160KD-3732F(SEQ ID No. 24),160KD-4559R(SEQ ID No. 25);160KD-4264F(SEQ ID No. 26),160KD-5190R(SEQ ID No. 27);160KD-4924F(SEQ ID No. 28),160KD-5405R(SEQ ID No. 29)。

[0035] 用于 130KD 基因扩增的引物序列如下:

[0036] 130KD-226F(SEQ ID No. 30),130KD-1361R(SEQ ID No. 31);130KD-742F(SEQ ID No. 32),130KD-2247R(SEQ ID No. 33);130KD-1277F(SEQ ID No. 34),130KD-2636(SEQ ID No. 35);130KD-2410F(SEQ ID No. 36),130KD-3238R(SEQ ID No. 37);130KD-2838F(SEQ ID No. 38),130KD-3700R(SEQ ID No. 39)。

[0037] 将用上述引物扩增出来的片段拼接,得到 MSP2、MSP5、160KD 和 130KD 基因序列。

[0038] 实施例 2 抗原的 B 细胞表位预测

[0039] 将实施例 1 克隆出来的 MSP2、MSP5、160KD 和 130KD 基因序列 DNA 序列翻译为氨基酸序列,利用 BioSun 软件分析嗜吞噬细胞无形体 MSP2、MSP5、160KD 和 130KD 等抗原的线性

B细胞表位,首先输入其氨基酸序列,然后用BioSun生物学软件中蛋白质模块的B细胞表位分析,所得表位分布图见图1-4,结合BLAST分析结果,最终确定各个优势表位抗原区段的序列。

[0040] MSP2 优势表位抗原区段的氨基酸序列为:

[0041] MSP2-1(SEQ ID No. 1);MSP2-3(SEQ ID No. 2);MSP2-4(SEQ ID No. 3);MSP2-5:(SEQ ID No. 4)。

[0042] MSP5 优势表位抗原区段的氨基酸序列为:(SEQ ID No. 5)。

[0043] 160KD 优势表位抗原区段的氨基酸序列为:

[0044] 160KD-1(SEQ ID No. 6);160KD-2(SEQ ID No. 7)。

[0045] 130KD 优势表位抗原区段的氨基酸序列为:

[0046] 130KD-1(SEQ ID No. 8);130KD-2(SEQ ID No. 9)。

[0047] 实施例3目的基因的克隆

[0048] 采用大肠杆菌优势密码子,将实施例2所述优势表位抗原区段的氨基酸序列反推成核苷酸序列,设计引物,采用重叠PCR的方法合成上述表位抗原的基因。将目的基因连接入pMD19克隆载体中测序。

[0049] 分别合成基因片段,各需要2-3轮退火延伸PCR反应,第一轮PCR反应体系为百泰克公司2×PCR反应液25μl、双蒸水23μl、XF1及XR1引物各1μl,其中X代表待合成基因,PCR反应条件为94℃1分钟,94℃1分钟,55℃1分钟,72℃1分钟,5个循环;第2-3轮PCR反应体系为百泰克公司2×PCR反应液25μl、双蒸水22μl、XF2(或XF3)及XR2(或XF3)引物各1μl,其中X代表待合成基因,第一轮(或第二轮)PCR产物1μl,反应条件为PCR反应条件为94℃3分钟后,94℃1分钟,55℃1分钟,72℃1分钟,30个循环后再72℃延伸5分钟,即获得待合成的基因。

[0050] PCR引物设计如下:

[0051] MSP2-1F1(SEQ ID No. 40),MSP2-1R1(SEQ ID No. 41);

[0052] MSP2-1F2(SEQ ID No. 42),MSP2-1R2(SEQ ID No. 43);

[0053] MSP2-3F1(SEQ ID No. 44),MSP2-3R1(SEQ ID No. 45);

[0054] MSP2-3R2(SEQ ID No. 46),MSP2-3F2(SEQ ID No. 47);

[0055] MSP2-4F1(SEQ ID No. 48),MSP2-4R1(SEQ ID No. 49);

[0056] MSP2-4F2(SEQ ID No. 50),MSP2-4R2(SEQ ID No. 51);

[0057] MSP2-5F1(SEQ ID No. 52),MSP2-5R1(SEQ ID No. 53);

[0058] MSP2-5F2(SEQ ID No. 54),MSP2-5R2(SEQ ID No. 55);

[0059] MSP5F1(SEQ ID No. 56),MSP5R1(SEQ ID No. 57);

[0060] MSP5F2(SEQ ID No. 58),MSP5R2(SEQ ID No. 59);

[0061] 160KD-1F1(SEQ ID No. 60),160KD-1R1(SEQ ID No. 61);

[0062] 160KD-1F2(SEQ ID No. 62),160KD-1R2(SEQ ID No. 63);

[0063] 160KD-1F3(SEQ ID No. 64),160KD-1R3(SEQ ID No. 65);

[0064] 160KD-2F1(SEQ ID No. 66),160KD-2R1(SEQ ID No. 67);

[0065] 160KD-2F2(SEQ ID No. 68),160KD-2R2(SEQ ID No. 69);

[0066] 160KD-2F3(SEQ ID No. 70),160KD-2R3(SEQ ID No. 71);

- [0067] 130KD-1F1 (SEQ ID No. 72), 130KD-1R1 (SEQ ID No. 73) ;
- [0068] 130KD-1F2 (SEQ ID No. 74), 130KD-1R2 (SEQ ID No. 75) ;
- [0069] 130KD-1F3 (SEQ ID No. 76), 130KD-1R3 (SEQ ID No. 77) ;
- [0070] 130KD-2F1 (SEQ ID No. 78), 130KD-2R1 (SEQ ID No. 79) ;
- [0071] 130KD-2F2 (SEQ ID No. 80), 130KD-2R2 (SEQ ID No. 81) ;
- [0072] 130KD-2F3 (SEQ ID No. 82), 130KD-2R3 (SEQ ID No. 83) 。
- [0073] 合成的 MSP2-1 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 84 所示 ;
- [0074] 合成的 MSP2-3 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 85 所示 ;
- [0075] 合成的 MSP2-4 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 86 所示 ;
- [0076] 合成的 MSP2-5 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 87 所示 ;
- [0077] 合成的 MSP5 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 88 所示 ;
- [0078] 合成的 160KD-1 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 89 所示 ;
- [0079] 合成的 160KD-2 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 90 所示 ;
- [0080] 合成的 130KD-1 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 91 所示 ;
- [0081] 合成的 130KD-2 表位抗原区段的 DNA 序列如序列表 SEQ ID No. 92 所示。
- [0082] 实施例 4 抗原的表达与纯化
- [0083] 将测序正确的目的基因, 克隆入原核表达载体 pBVIL-1 质粒中, 转化 HB101 挑选阳性克隆并测序。将测序正确的重组原核表达质粒 pBVIL-1 系列载体转化到 HB101 受体菌中, 经 42°C 诱导后提取包涵体, 采用变性条件镍亲和和层析纯化抗原, 具体操做简述如下 :
- [0084] 取以上合成基因产物及 pBVIL-1 表达载体各 30 μ l 分别放于 Eppendorf 离心管中, 各加入 10 \times buffer (D) 4 μ l、XhoI (10u/ μ l) 和 XbaI (12u/ μ l) 各 1 μ l, 加灭菌蒸馏水至 40 μ l, 置 37°C 水浴酶切 3 小时。
- [0085] 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳纯化和回收 : PCR 产物及载体 pBVIL1 经双酶切后, 用 1.2% 琼脂糖凝胶进行上海华舜生物工程有限公司生产的小量胶回收试剂盒回收纯化, 具体操作按试剂盒说明书进行。
- [0086] 于灭菌 Eppendorf 离心管中加入上述酶切后的载体及目的基因各 1 μ l、10 \times T4DNA Ligase buffer 1 μ l、T4DNA Ligase (12u/u1) 1 μ l, 加灭菌蒸馏水至 10 μ l, 置 16°C 过夜。
- [0087] 在超净工作台中, 用无菌吸头取 100 μ l 感受态细胞悬液于 Eppendorf 中, 加入上述连接物 5 μ l, 轻轻旋转混匀, 冰浴 30 分钟。立即转移到 42°C 水浴中放置 2 分钟, 每管加入 0.5ml LB 培养基 (不加抗生素), 30°C 水浴摇床培养 60 分钟后, 各取 0.2ml 分别涂于 LB 琼脂培养基平皿上 (含抗生素), 室温晾干后, 置 37°C 恒温箱倒置培养过夜。挑选数个菌落, 分别接种于 LB 中 (5ml/管), 培养过夜, 次日各取 0.1ml 转移到 LB 中 (2ml/管), 37°C 培养 3 小时, 42°C 诱导培养 5 小时, 收菌, 用 SDS-PAGE 鉴定, 选择高表达的作为下一步大量表达用菌株, 并测序鉴定。
- [0088] 表达菌株 10 μ l 接种于 LB 培养基中, 37°C 培养过夜, 次日按 2% 的比例转种于 LB 培养基, 37°C 培养约 3 小时, 当 OD600 值达到 0.7 时, 转至 42°C 诱导培养 5 小时, 收集菌液, 6000rpm 离心 20 分钟, 弃上清, 收集沉淀部分。
- [0089] 用 10 倍体积的 20mmol/L pH8.0 TE 缓冲液将沉淀悬起, 加入溶菌酶 (1mg/ml 悬

液),在室温下磁力搅拌 10 分钟。在冰浴中超声波破碎菌,每次超 30 秒钟,间隔 30 秒钟,共超 10 次。4℃,1,2000rpm,离心 20 分钟,弃上清,沉淀用 1mol/L NaCl(用 TE 配制)洗一次,再用 TE 洗 2 次,收集沉淀。沉淀用 8M 脲(用 pH8.0TE 配制)溶解,加 1% β-巯基乙醇。再于 20℃,1,2000rpm,离心 10 分钟,去沉淀取上清。

[0090] 采用变性条件镍亲和层析纯化抗原。洗脱抗原采用 SDS-PAGE 进行纯化鉴定。

[0091] 实施例 5:诊断用表位抗原的蛋白芯片和 ELISA 筛选

[0092] 采用蛋白芯片结合 ELISA 方法,用嗜吞噬细胞无形体感染动物(小鼠和绵羊)和疑似患者的血清对上述获得的表位抗原进行抗原性评价,筛选用于诊断的表位抗原。蛋白芯片法:采用点接触法制备芯片,封闭室温 2h,洗片,晾干 4℃备用,加入稀释的血清室温反应(湿盒)1h,洗液洗,加入 cy3 标记的二抗(1:400)室温反应(湿盒)0.5h,洗片,上机扫描。

[0093] ELISA 方法:包被重组表位抗原,建立间接 ELISA 方法,检测感染鼠和绵羊的系列血清的 IgG 抗体:碳酸盐缓冲液溶解抗原约 2 μg/ml,包被酶联板,4℃过夜,次日 1% BSA 封闭,干燥备用。将待测血清 10 倍稀释,37℃孵育 30min 后洗板,加入辣根过氧化物酶标记的抗 IgG(二抗),37℃孵育 20min 后洗板,显色剂显色 10min,用酶标仪读取 450nm 吸光值。A 值大于 Cut off 为阳性,A 值大于 Cut off 为阴性。

[0094] 实施例 6

[0095] 本实施例涉及一种利用实施例 2 所述抗原用于间接 ELISA 方法检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgG 抗体的试剂盒和捕获 ELISA 方法检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的试剂盒及其使用方法。

[0096] 检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgG 抗体的试剂盒:试剂盒包含实施例 2 所述任一抗原,碳酸缓冲液,酶联板,牛血清白蛋白,辣根过氧化物酶标记的抗 IgG 抗体,TMB 显色液。

[0097] 该试剂盒的使用方法:将纯化好的抗原用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液浓度稀释为 2 μg/ml,包被酶联板,每孔 100 μl,4℃过夜,1% BSA 封闭 2 小时后,拍干备用。每孔加入 1:10 倍稀释的待测血清样本,37℃ 30 分钟,弃液,用洗涤液洗板 5 次后弃液,拍干,加入辣根过氧化物酶标记的抗 IgG(二抗)100 μl,37℃温浴 20 分钟,弃液洗板 5 次拍干。加 TMB 显色液:A 和 B 液各 50 μl,37℃避光显色 10 分钟,每孔加入终止液 50 μl,用酶标仪读取 450nm 吸光值。

[0098] 嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的试剂盒:试剂盒包含辣根过氧化物酶标记的实施例 2 所述任一抗原,抗 IgM-μ 链单抗包被酶联板,牛血清白蛋白,TMB 显色液。

[0099] 该试剂盒的使用方法:抗 IgM-μ 链单抗包被酶联板(PBS 稀释到 2 μg/ml),每孔 100 μl,4℃过夜后弃液,蒸馏水冲洗 3 次,拍干,每孔加入 1% BSA 100 μl,室温 2 小时,弃液。每孔加入 1:10 的待测血清样本,37℃ 30 分钟,弃液,用洗涤液洗板 5 次后弃液,拍干,加入辣根过氧化物酶标记的嗜吞噬细胞无形体抗原 100 μl,37℃温浴 20 分钟,弃液洗板 5 次拍干。加 TMB 显色液:A 和 B 液各 50 μl,37℃避光显色 10 分钟,每孔加入终止液 50 μl,用酶标仪读取 450nm 吸光值。

[0100] 实施例 7

[0101] 本实施例涉及一种利用实施例 2 所述抗原用于双抗原夹心方法检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析试剂盒和捕获方法检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的免

疫层析试剂盒及其使用方法。

[0102] 用于双抗原夹心方法检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析试剂盒,包含实施例 2 所述任一抗原,样品垫,结合垫,吸收垫,硝酸纤维素膜,胶体金探针,兔免疫血清。

[0103] 双抗原夹心方法检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析条的制备:免疫层析检测条由样品垫、结合垫硝酸纤维素膜及吸收垫四部分组成。样品垫和结合垫用玻璃纤维,吸收垫用吸水滤纸。玻璃纤维膜上加胶体金探针,硝酸纤维素膜上包被嗜吞噬细胞无形体抗原(检测带)及兔免疫血清(质控带)。以纯化的嗜吞噬细胞无形体抗原划线作为检测带(浓度 4mg/ml),参数 0.1ul/mm 划线;检测线与质控线间距离约为 7mm。兔免疫血清浓度为 5mg/ml,直接划线,参数 0.1ul/mm。标记结束的胶体金溶液以含 5%蔗糖、5% BSA 的 0.1mmol/L Tris 溶液重悬,调节至 OD₅₃₀ 为 2,浸湿结合垫后 37℃干燥 2h。将吸收垫、样品垫及处理后的结合垫硝酸纤维素膜叠加,组装成完整的层析条,然后切割层析条,宽度 3mm/条,室温干燥避光保存。

[0104] 检测及结果判读:将制备好层析条的样品垫端插入待测液约 1cm,或手工加样 80ul,当液体上行到吸收垫时,取出平放,20min 后,检测带和质控带均出现红色为阳性,只有质控带出现红色为阴性,检测带和对照带均不显色,则为试剂失效,需换新的层析条重测。

[0105] 用于捕获方法检测嗜吞噬细胞无形体血清抗体的免疫层析试剂盒,包含辣根过氧化物酶标记的实施例 2 所述任一抗原,样品垫,结合垫,吸收垫,硝酸纤维素膜,抗 IgM- μ 链单抗,兔免疫血清,胶体金探针。

[0106] 捕获方法检测嗜吞噬细胞无形体血清 IgM 抗体的免疫层析的制备:免疫层析检测条由样品垫、结合垫硝酸纤维素膜及吸收垫四部分组成。样品垫和结合垫用玻璃纤维,吸收垫用吸水滤纸。玻璃纤维膜上加胶体金探针,硝酸纤维素膜上包被抗 IgM- μ 链单抗(检测带)及兔免疫血清(质控带)。以辣根过氧化物酶标记的嗜吞噬细胞无形体抗原划线作为检测带(浓度 1mg/ml),参数 2ul/mm 划线;检测线与质控线间距离约为 7mm。兔免疫血清浓度为 1mg/ml,直接划线,参数 2ul/mm。标记结束的胶体金溶液以含 5%蔗糖、5% BSA 的 0.1mmol/L Tris 溶液重悬,调节至 OD₅₃₀ 为 2,浸湿结合垫后 37℃干燥 2h。将吸收垫、样品垫及处理后的结合垫硝酸纤维素膜叠加,组装成完整的层析条,然后切割层析条,宽度 3mm/条,室温干燥避光保存。

[0107] 检测及结果判读:将制备好层析条的样品垫端插入待测液约 1cm,或手工加样 80ul,当液体上行到吸收垫时,取出平放,20min 后,检测带和质控带均出现红色为阳性,只有质控带出现红色为阴性,检测带和对照带均不显色,则为试剂失效,需换新的层析条重测。

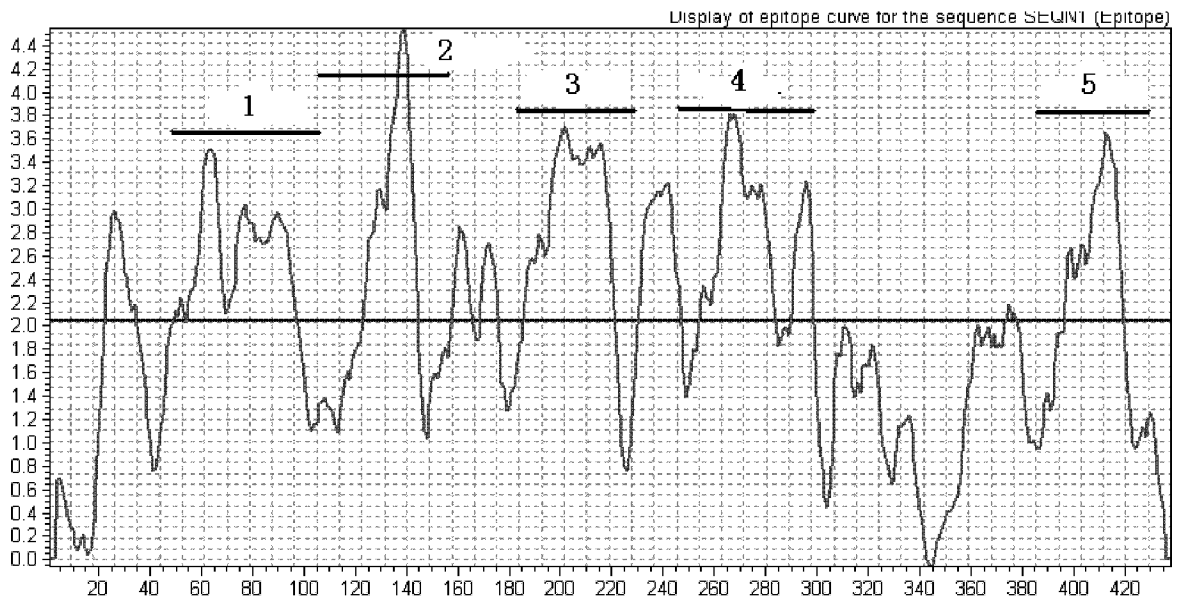


图 1

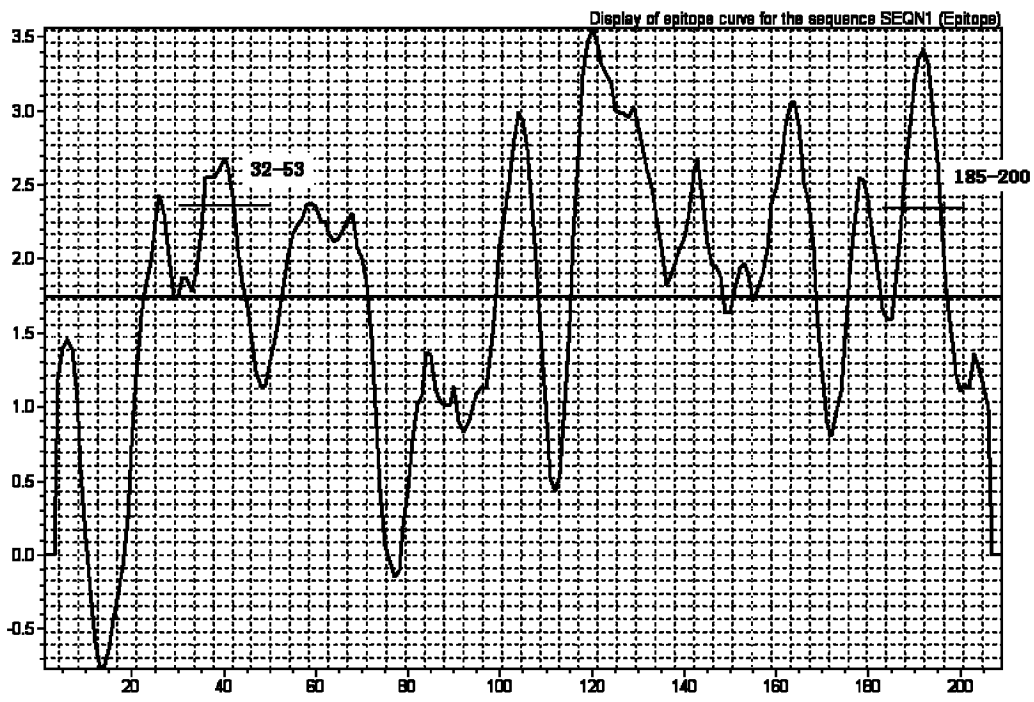


图 2

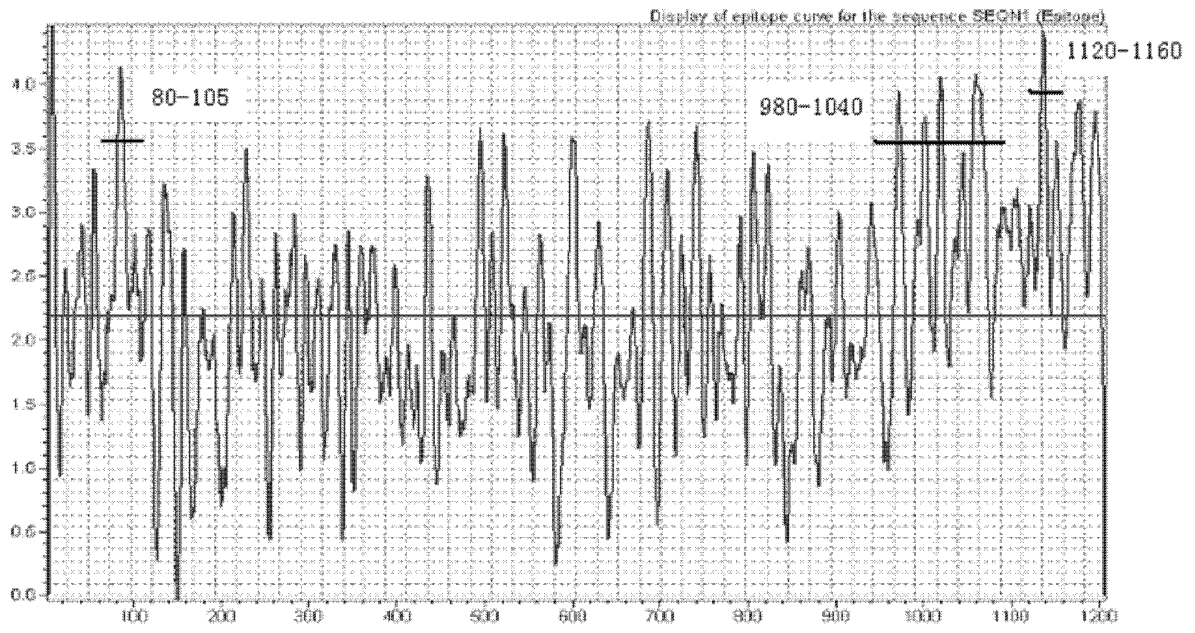


图 3

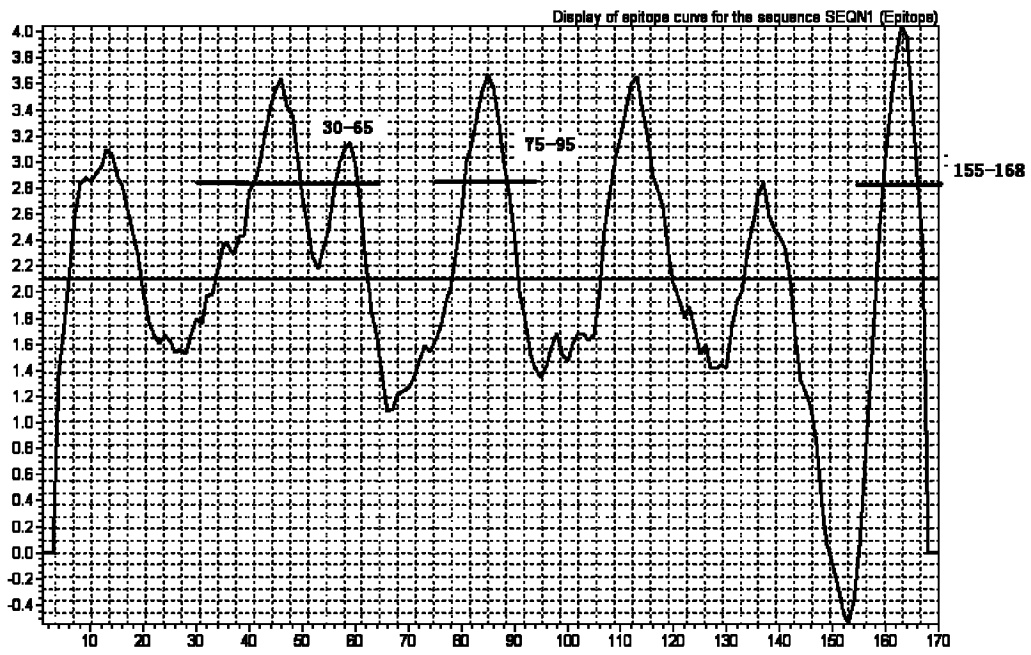


图 4

专利名称(译)	一种嗜吞噬细胞无形体抗原及含有该抗原的试剂盒		
公开(公告)号	CN102286093A	公开(公告)日	2011-12-21
申请号	CN201110212854.2	申请日	2011-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所 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基础医学研究所 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基础医学研究所 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	何竞 曹务春 宋晓国 杨锡琴 王国华 张贺秋 江佳富 刘玮 詹琳 蒋宝贵		
发明人	何竞 曹务春 宋晓国 杨锡琴 王国华 张贺秋 江佳富 刘玮 詹琳 蒋宝贵		
IPC分类号	C07K14/705 C12N15/12 C12N15/63 C12N1/21 C07K16/28 G01N33/53 C12R1/19		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了属于人粒细胞无形体病检测技术领域的一种嗜吞噬细胞无形体抗原及含有该抗原的试剂盒。本发明的抗原含有优势B细胞表位，在最大地保留抗原反应性的前提下，尽量减少无关序列造成的交叉反应性。本发明利用ELISA方法和免疫层析法检测抗体，较之免疫荧光法可大大提高检测的灵敏度，具有快速、简便的特点，适合基层医院使用，尤其IgM抗体检测采用IgM捕获法，与间接ELISA技术相比，具有较高的特异性。

