

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/543

G01N 33/569

G01N 33/535

G01N 33/532

C07K 16/00

[21] 申请号 200510006633.4

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1645145A

[22] 申请日 2005.1.7

[21] 申请号 200510006633.4

[30] 优先权

[32] 2004.8.9 [33] CN [31] 200410041634.8

[71] 申请人 中国人民解放军南京军区南京总医院

地址 210002 江苏省南京市中山东路 305 号

[72] 发明人 李芳秋 邵海枫

[74] 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司

代理人 夏平 刘成群

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法及试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一检测白念珠菌菌丝蛋白抗体诊断白念珠菌侵袭性感染的方法及试剂盒。该方法通过从噬菌体表面展示肽库中用抗白念珠菌菌丝蛋白 P47 的单克隆抗体进行筛选,然后经扩增、纯化制备模拟抗原或制备白念珠菌菌丝蛋白 P47 天然抗原,然后将所得抗原包被固相支持物,加入将待测的生物学样本孵育、清洗,再加入经标记的针对人抗体的第二抗体孵育、清洗,检测孵育混合物中免疫结合复合物的存在即可。该试剂盒包括 ELISA 试剂盒和胶体金试剂盒。使用该方法测定白念珠菌菌丝蛋白抗体,可快速、简单、高效地进行白念珠菌侵袭性感染的检测;该试剂盒成本低、使用方便、特异性高。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体方法，其特征在于具体检测步骤如下：
 - a. 制备模拟抗原或天然抗原：模拟抗原是从噬菌体表面展示肽库中用抗白念珠菌菌丝蛋白 P47 的单克隆抗体进行筛选获得；天然抗原是白念珠菌菌丝蛋白 P47；
 - b. 用上述模拟抗原或天然抗原包被固相支持物；
 - c. 将待测的生物学样本加入经包被的固相支持物上，在适合抗原抗体结合的条件下孵育，清洗去除任何未结合的成分；
 - d. 加入经标记的针对人抗体的第二抗体，在适合抗原抗体结合的条件下孵育，清洗去除任何未结合的成分；
 - e. 检测孵育混合物中免疫结合复合物的存在。
- 2、根据权利要求 1 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于所述模拟抗原是用白念珠菌菌丝蛋白 P47 的单克隆抗体从噬菌体表面展示肽库中筛选出的噬菌体经扩增、纯化得到的模拟抗原。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于所述模拟抗原为展示在噬菌体表面的氨基酸序列如下的 12 肽中的任一个或几个：
 - 1)GlyGlnGluAlaAlaIleProThrSerAspMetPhe (SEQ ID No.1)
 - 2)TyrPrpProLeuMetSerAlaLeuLysLysLeuPro (SEQ ID No.2)
 - 3)HisTrpGluTyrThrThrSerProHisProArgLeu (SEQ ID No.3)。
- 4、根据权利要求 1 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于所述的天然抗原是指经超声处理白念珠菌菌丝，再经 Con A- Sepharose 柱层析纯化的白念珠菌菌丝蛋白 P47。
- 5、根据权利要求 1 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于所述适合抗原抗体结合的条件是指孵育抗原抗体混合物的温度和时间，其中温度为 4℃~50℃，时间为 2 分钟至 24 小时；优选温度为室温至 43℃，时间为 2 分钟至 2 小时。
- 6、根据权利要求 1 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于检测方法可采用 ELISA 方法或免疫胶体金渗滤法；其中采用 ELISA 方法时孵育抗原抗体混合物的温度为 37℃~43℃，时间为 30 分钟至 1 小时；采用免疫胶体金渗滤法时孵育抗原抗体混合物的温度为室温，时间为数分钟。

7、根据权利要求 1 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于所述的生物学样本是指来自受试者的血液、血清或血浆。

8、根据权利要求 1 所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其特征在于所述的第二抗体是指用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶或胶体金标记的抗人 IgG 抗体或抗人 IgM 抗体。

9、一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的 ELISA 试剂盒，其特征在于，其试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原：由权利要求 1 得到的模拟抗原或天然抗原；
- 2) 固相支持物：可采用微孔板，用于包被上述模拟抗原或天然抗原；
- 3) 酶标抗体：用辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 或抗人 IgM；
- 4) 阳性对照血清或阴性对照血清；
- 5) 酶标抗体稀释液：PBS；
- 6) 底物溶液：A 液：0.06%过氧化脲，0.01M pH4.5 柠檬酸缓冲液；
B 液：0.06%TMB，0.01M pH4.5 柠檬酸缓冲液；
- 7) 洗涤液：PBS，含 0.01%吐温-20；
- 8) 终止液：1M 硫酸。

10、一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的胶体金试剂盒，其特征在于，其试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原：由权利要求 1 得到的模拟抗原或天然抗原；
- 2) 反应装置：一是小扁盒，分盒体和盒盖，盒盖上有圆孔；二是吸水填料，装在盒体内，三是置于吸水材料上、盒盖下的硝酸纤维素膜；硝酸纤维素膜用于固定上述模拟抗原或天然抗原以及作为质控的人 IgG 或人 IgM；
- 3) 胶体金标记抗体：用胶体金标记的抗人 IgG 或抗人 IgM。

检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法及试剂盒

技术领域

本发明涉及白念珠菌侵袭性感染的检测方法，特别是涉及一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法及试剂盒。

背景技术

白念珠菌（*C.albican*），又称白假丝酵母菌，常存在于人体口腔、咽喉、肠道、阴道粘膜等处，是重要的条件致病菌，在免疫功能明显下降（如器官移植、糖尿病、恶性肿瘤、血液病、严重营养不良等），或大量使用抗菌素导致菌群失调时，该菌可引起严重的全身侵袭性感染。白念珠菌侵袭性感染的实验室诊断难度比较大，由于该菌是条件致病菌，在人体多部位栖息，经常引起浅表感染，临床分离阳性时不易判断是否致病；另外，许多深部标本无法采集，不能用培养法分离，这些都降低了诊断率。虽然目前认为单次血培养中分离出白念珠菌即可明确侵袭性感染的诊断，但血培养方法的敏感性低。探索血清学诊断方法在国内外进行了许多年，有人检测抗全菌的抗体，由于这种抗体普遍存在于人的血清中，诊断价值不理想。随着研究的深入，人们发现白念珠菌的菌丝壁上大量存在的纤维蛋白黏着受体是白念珠菌能够侵入人体内皮细胞和基膜引起侵袭性感染的重要物质，因而认为检测白念珠菌菌丝蛋白抗体，对侵袭性感染的诊断意义更大。国外报道检测抗体的方法诊断白念珠菌感染的特异性和敏感性可分别达93%和80%，而且73%的阳性结果可早于血培养2天，有些病例可早于血培养15天获得诊断结果。这些信息提示，对侵袭性感染有诊断价值的抗体是菌丝蛋白P47的抗体，检测白念珠菌菌丝蛋白抗体有助于尽早实施抗真菌治疗。

检测白念珠菌菌丝蛋白抗体需要P47蛋白（SDS-PAGE电泳显示相对分子量47000，下同）作为检测试剂，但该蛋白的提取和纯化过程复杂，制备比较困难，因此需要改进制备方法。在新型诊断试剂研究中，噬菌体表面展示技术是一种快速、有效、简便的方法。噬菌体展示技术的原理是将化学合成的随机寡核苷酸序列插入噬菌体基因组，在噬菌体表面表达出各种氨基酸随机组合的短肽，通过与特定的靶标反应，使展示特定多肽的噬菌体从噬菌体肽库中筛选出来，通过大肠杆菌使选择出的噬菌体扩增，然后进行序

列测定，获得相应的氨基酸序列、结构和功能信息，实现了高通量筛选，成为一种有效的分子筛选方法。

发明内容

本发明的目的是提供快速、简单、高效的检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法。

本发明的另一个目的是提供快速、高效检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的ELISA试剂盒和免疫胶体金试剂盒。

本发明的技术方案是根据噬菌体展示肽具有模拟天然抗原表位的功能设计的一种新的技术方案。本发明用特异性单克隆抗体对噬菌体随机展示肽库进行亲和淘筛，制备出白念珠菌菌丝蛋白模拟抗原。实验证明模拟抗原与P47具有相同的反应性，与抗白念珠菌菌丝蛋白抗体具有较强的亲和能力，与感染者血清反应良好。

本发明的目的是通过下列措施来实现的：

一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，具体检测步骤如下：

- a. 制备模拟抗原或天然抗原：模拟抗原是从噬菌体随机展示肽库中用抗白念珠菌菌丝蛋白P47的单克隆抗体进行筛选获得；天然抗原是白念珠菌菌丝蛋白P47；
- b. 用上述模拟抗原或天然抗原包被固相支持物；
- c. 将待测的生物学样本加入经包被的固相支持物上，在适合抗原抗体结合的条件下孵育，清洗去除任何未结合的成分；
- d. 加入经标记的针对人抗体的第二抗体，在适合抗原抗体结合的条件下孵育，清洗去除任何未结合的成分；
- e. 检测孵育混合物中免疫结合复合物的存在。

所述的检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中模拟抗原是用白念珠菌菌丝蛋白P47的单克隆抗体从噬菌体表面展示肽库中筛选出的噬菌体经扩增、纯化得到的模拟抗原。

所述的检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中模拟抗原为展示在噬菌体表面的氨基酸序列如下的12肽中的任一个或几个：

- 1)GlyGlnGluAlaAlaIleProThrSerAspMetPhe (SEQ ID No.1)
- 2)TyrPrpProLeuMetSerAlaLeuLysLysLeuPro (SEQ ID No.2)
- 3)HisTrpGluTyrThrThrSerProHisProArgLeu (SEQ ID No.3)。

所述的检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中天然抗原是指经超声处理白念珠菌菌丝，再经Con A- Sepharose柱层析纯化的白念珠菌菌丝蛋白P47。

所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中适合抗原抗体结合的条件是指孵育抗原抗体混合物的温度和时间，其中温度为4℃~50℃，时间为2分钟至24小时；优选温度为室温至43℃，时间为2分钟至2小时。

所述的一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中检测方法可采用ELISA方法或免疫胶体金渗滤法；采用ELISA方法时孵育抗原抗体混合物的温度为37℃~43℃，时间为30分钟至1小时；采用免疫胶体金渗滤法时孵育抗原抗体混合物的温度为室温，时间为数分钟。

所述的检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中生物学样本是指来自受试者的血液、血清或血浆。

所述的检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法，其中第二抗体是指用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体或抗人IgM抗体，或胶体金标记的抗人IgG或抗人IgM抗体。

一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的ELISA试剂盒，其试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原：由上述方法制备得到的模拟抗原或天然抗原；
- 2) 固相支持物：可采用微孔板，用于包被上述模拟抗原或天然抗原；
- 3) 酶标抗体：用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的白念珠菌菌丝蛋白P47抗人IgG或抗人IgM；
- 4) 阳性对照血清或阴性对照血清；
- 5) 酶标抗体稀释液：PBS
- 6) 底物溶液：A液：0.06%过氧化脲，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；
B液：0.06%TMB，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；
- 7) 洗涤液：PBS，含0.01%吐温-20；
- 8) 终止液：1M硫酸。

一种检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的免疫胶体金试剂盒，其试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原：由上述方法制备得到的模拟抗原或天然抗原；
- 2) 反应装置：一是小扁盒，分盒体和盒盖，盒盖上有圆孔；二是吸水填料，装在盒体内，三是置于吸水材料上、盒盖下的硝酸纤维素膜；硝酸纤维素膜用于固定上述模拟抗原或天然抗原以及作为质控的人IgG或IgM；
- 3) 胶体金标记抗体：用胶体金标记的抗人IgG或抗人IgM。

本发明的有益效果：

1、可获得纯化的高滴度的白念珠菌菌丝蛋白模拟抗原：以固相化的抗白念珠菌菌丝蛋白单克隆抗体对噬菌体展示肽库进行多轮淘筛，可使与抗体特异性结合的噬菌体得以大大富集。选择与白念珠菌菌丝蛋白特异性抗体反应最强的噬菌体克隆，在大肠杆菌 ER2738株中大量增殖，培养物上清经PEG8000沉淀2次，获得纯化的噬菌体颗粒，经滴定得知噬菌体滴度为 10^{12} /ml，用于包被时稀释10000倍，包被的噬菌体数约为 10^7 /孔。

2. 检测方法特异、高效、重复性好：本发明在已制备P47蛋白单克隆抗体（见实施例1）的基础上，从噬菌体展示随机肽库淘筛白念珠菌菌丝蛋白的模拟抗原，用于检测病人体内白念珠菌抗体。

10份经培养确证为白念珠菌侵袭性感染、用P47蛋白作为抗原检测抗体阳性的病人血清，用模拟抗原检测均为阳性，敏感性为100%，且阳性程度与用P47抗原检测结果相符；1例白念珠菌痰培养和血培养同时阳性的病人标本，用本方法检测3个月内留取的多份标本，抗体均为阳性；而其他17例仅痰培养阳性患者的血标本，反复检测抗体均为阴性。服用免疫抑制剂的病人中，对16例患者多份血样作了重复测定，其中对3例患者采样3次，5例采样2次，2例采样4次，1例采样5次，都得到阴性结果，另外1例患者采样5次，4次结果为阳性，1次为阴性，3例采样2次，1例采样4次，结果均为阳性，说明方法的特异性和重复性良好。

3. 临床应用效果好：用模拟抗原作ELISA，检测了100名志愿献血者血清白念珠菌菌丝蛋白P47抗体，2名阳性，阳性率2%；134例服用免疫抑制剂环孢素A的病人43例检出白念珠菌蛋白P47抗体，阳性率33%，其具体结果见表1。

表1 本发明对134例服用免疫抑制剂环孢素A患者检测结果

病人类别	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)
肾移植受者	34	61	36
各类肾炎	8	19	30
其他	1	11	8
合计	43	134	33

注：各类肾炎包括慢性肾炎，慢性肾衰，肾病综合症；其他组包括多发性骨髓瘤，系统性红斑狼疮等疾病。

经 χ^2 检验证明，服用免疫抑制剂的3组患者检测阳性率无明显差异， $P=4.62$ ；健康人群（2%检出阳性）与病人组差异有显著性。

本发明用模拟抗原建立的ELISA方法，其敏感性、特异与直接使用P47蛋白抗原检测结果相符；10例确诊为白念珠菌侵袭性感染的患者血清，应用本法检测均为阳性；17例仅痰培养阳性而血培养阴性患者应用本方法无一例检出抗体，这说明痰培养阳性的患者并不意味着白念珠菌的全身侵袭性感染，应用本方法能够辅助诊断白念珠菌的深部侵袭性感染。本发明提供的试剂盒使用方便、特异性高、成本低。

具体实施方式

以下通过实施例对本发明作进一步的说明。

1. 标本来源：正常对照组血清取自100名正常献血者。白念珠菌培养阳性组包括临床确诊为白色念珠菌侵袭性感染、多次多部位培养出白念珠菌，抗P47抗体阳性的患者血清10份；血培养和痰培养同时生长白念珠菌的患者血清1份，仅痰培养阳性患者血清标本17份。服用免疫抑制剂患者组为服用免疫抑制剂环孢素A的肾移植和肾炎等患者134例共166份血标本。

2. 主要试剂：

随机12肽噬菌体展示文库及相应宿主菌E.coli ER2738 为BioLabs公司产品。

包被液：0.1mol/L NaHCO₃，pH9.6。

封闭液：5.0g/L 牛血清白蛋白，0.2g/L NaN₃，溶于包被液中。

解脱液：0.2mol/L 甘氨酸-HCl，pH 2.2，1.0g/L牛血清白蛋白。

中和液：1mol/L Tris-HCl，pH 9.1。

终止液：1M硫酸。

TBS：50mmol/L pH 7.5 Tris-HCl，150mmol/L NaCl。

TBS-T：TBS中加入 0.1% Tween 20。

PBS：KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HCO₄.12H₂O 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, 蒸馏水溶至1000ml。

PBS-T：PBS中加入0.05% Tween 20。

底物溶液：A液：0.06%过氧化脲，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；

B液：0.06%TMB，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；

3. 统计学处理采用 χ^2 检验。

实施例1

1.1 天然白念珠菌菌丝蛋白P47的制备

白念珠菌C1株（自中国科学院皮肤病研究所引进）接种于含15%小牛血清的RPMI1640培养液中，37℃震荡培养7小时，镜下观察95%以上的菌体转为菌丝相，3000×g离心30分钟收集菌体，生理盐水洗3次后，用含1mmol/L苯甲磺酰氟的蒸馏水制备菌悬液，冰浴条件下超声破壁粉碎，3000×g离心30分钟去除细胞碎片，上清液用70%饱和硫酸铵盐析，用PBS透析除盐。过Con A- Sepharose 4B亲和层析柱去甘露糖和甘露糖蛋白，收集相对分子量47000的蛋白，得到P47蛋白，即天然抗原。

1.2 白念珠菌菌丝蛋白P47模拟抗原的制备

1.2.1 制备白念珠菌菌丝蛋白P47单克隆抗体：将P47蛋白免疫Balb/c小鼠0.2mg/次，每次间隔7天，待血清双向免疫扩散效价达1:32，用杂交瘤技术制备单克隆抗体。单克隆抗体的纯化采用聚乙二醇（PEG）沉淀法。取杂交瘤腹水5ml，用VBS（4mmol/L巴比妥，0.15mol/L NaCl，0.8mmol/L Mg²⁺，0.3mmol/L Ca²⁺）稀释一倍，加SiO₂粉260mg，不时摇动，30min后离心，取上清，以除去腹水中的脂肪。再用终浓度6.25%和5%的聚乙二醇（PEG6000）各沉淀一次，末次离心的沉淀物用2ml含0.5mol/L NaCl的VBS溶解。纯化后的抗体用于包被微孔板。

1.2.2 亲和淘筛：参照BioLabs公司噬菌体展示肽库使用手册进行。筛选过程中各步骤均无菌操作。用pH9.6的包被液将P47单克隆抗体稀释为120 μg/ml，加入板条微孔，150 μl/孔，4℃过夜。甩去包被液，在无菌吸水纸上拍尽残液，各孔加满封闭液，4℃ 1h，弃去封闭液，用TBS-T洗6次。从原始肽库中取10 μl与1ml TBS-T混合后加入单克隆抗体包被的微孔，100 μl/孔，共10孔，室温轻摇30min。用TBS-T洗板10次。加解脱液100 μl/孔，室温轻摇8min，吸出各孔洗脱液合并为一管，加40 μl中和液，将pH调到7.2。取1 μl洗脱物滴定噬斑数，其余洗脱物接种对数生长早期的宿主菌E.coli ER2738，37℃剧烈振荡培养4.5 h，进行噬菌体扩增。扩增培养物离心取上清液，用PEG 8000 4℃沉淀过夜。次日离心，用1ml TBS悬浮沉淀，进行第二轮淘筛。如此进行三轮筛选。挑选与抗体亲和力高的数十个噬菌体克隆进行DNA序列测定，得到三个优势克隆的氨基酸序列为：

- 1) GlyGlnGluAlaAlaIleProThrSerAspMetPhe (SEQ ID No.1)
- 2) TyrPrpProLeuMetSerAlaLeuLysLysLeuPro (SEQ ID No.2)
- 3) HisTrpGluTyrThrThrSerProHisProArgLeu (SEQ ID No.3)。

1.2.3 模拟抗原的扩增和纯化：参照BioLabs公司噬菌体展示肽库使用手册进行。挑宿主菌E.coli ER2738单个菌落至液体LB培养基中，37℃震荡培养到对数生长期，接种筛选出的噬菌体，继续震荡培养4.5h。将培养物转移至离心管，4℃下12000r/min 离心25min，取上清液，加入1/6体积的PEG/NaCl（20%PEG8000，2.5mol/L NaCl）4℃沉淀过夜。再次4℃，12000rpm离心25min，弃上清液，沉淀用TBS溶解，4℃，12000rpm离心10min，上清再用1/6体积的PEG/NaCl 冰浴中沉淀至少1h，离心去上清，沉淀用TBS溶解，即得到所需的模拟抗原。

1.3 ELISA方法：模拟抗原（或天然抗原）用 pH9.6，0.1mol/L NaHCO₃包被液稀释（1 μg/ml），包被聚苯乙烯反应板，4℃过夜。次日每孔加封闭液100 μl，37℃ 1h。用TBS-T洗5次，每次3min。分别将受试者血清（或血液或血浆）用含10%小牛血清的PBS溶液作1：100稀释，加入微孔反应板，每次实验均设空白对照、阴性对照和阳性对照，37℃温育45min；PBS-T洗5次。加辣根过氧化物酶标记的抗人IgG抗体或辣根过氧化物酶标记的抗人IgM抗体（简称酶标抗人IgG抗体、酶标抗人IgM抗体，下同），37℃ 45min；PBS-T洗3次。加入底物溶液，37℃10min，加终止液，测450nm吸光度，结果的判定以正常对照组吸光度的平均值加3SD为正常值上限，超过此上限者判为阳性。

实施例2

检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的ELISA试剂盒组成为：

1) 包被抗原：氨基酸序列为SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3的模拟抗原中的任一种，或三种等量混合；

2) 固相支持物：聚苯乙烯板微孔反应板，用于包被上述模拟抗原；

3) 酶标抗体：用酶标抗人IgG或酶标抗人IgM；

4) 阴性对照血清；

5) 酶标抗体稀释液：PBS；

6) 底物溶液：A液：0.06%过氧化脲，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；

B液：0.06%TMB，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；

7) 洗涤液：PBS，含0.01%吐温-20；

8) 终止液：1M硫酸。

实施例3

检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的ELISA试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原：白念珠菌菌丝蛋白P47抗原；
- 2) 固相支持物：聚苯乙烯板微孔反应板，用于包被上述菌丝蛋白P47抗原；
- 3) 酶标抗体：用酶标抗人IgG或酶标抗人IgM；
- 4) 阴性对照血清；
- 5) 酶标抗体稀释液，PBS；
- 6) 底物溶液：A液：0.06%过氧化脲，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；
B液：0.06%TMB，0.01M pH4.5柠檬酸缓冲液；
- 7) 洗涤液：PBS，含0.01%吐温-20；
- 8) 终止液：1M硫酸。

实施例4

检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的胶体金试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原：由实施例1得到的模拟抗原或天然抗原；
- 2) 反应装置：上述模拟抗原或天然抗原点于其中的硝酸纤维素膜上；
- 3) 胶体金标记抗体：用胶体金标记的抗人IgG或抗人IgM；

反应装置包括三个部分：一是小扁盒，分盒体和盒盖，盒盖上有圆孔；二是吸水填料，装在盒体内，三是置于吸水材料上、盒盖下的硝酸纤维素膜；硝酸纤维素膜用于固定上述模拟抗原或天然抗原以及作为质控的人IgG或IgM；

固相点样膜的制备：将硝酸纤维素膜切成直径1cm的圆片，在圆片中央加1 μ l 模拟抗原或天然抗原（1 μ g/ml），抗原点的上方点1 μ l（0.2mg/ml）人IgG（用于测定IgG型抗白念珠菌菌丝蛋白抗体）或人IgM（用于测定IgM型抗白念珠菌菌丝蛋白抗体）作为质控点，室温干燥。将固相点样膜与其他材料装配成反应装置。

测定方法：1、在反应装置的圆孔内加100 μ l含10g/L牛血清白蛋白，0.05%Tween 20的PBS，待渗入；2、加入待测血清50 μ l，待渗入；3、加PBS100 μ l，待渗入；4、加100 μ l胶体金标记抗人IgG或抗人IgM抗体（与质控点对应），待渗入；5、加100 μ l PBS，洗去未结合的胶体金标记抗体。

观察结果：3分钟内若在膜中央的抗原点处出现红色斑点为阳性，否则为阴性；膜上方的质控点为试验有效标志，无论是阴性或阳性结果质控点均应显示红色。

序 列 表

<110> 中国人民解放军南京军区南京总医院

<120>检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法及试剂盒

<160> 3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213>人工序列

<400> 1

Gly Gln Glu Ala Ala Ile Pro Thr Ser Asp Met Phe

1 5 10 12

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Tyr Prp Pro Leu Met Ser Ala Leu Lys Lys Leu Pro

1 5 10 12

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213>人工序列

<400> 3

His Trp Glu Tyr Thr Thr Ser Pro His Pro Arg Leu

1

5

10

12

专利名称(译)	检测白念珠菌菌丝蛋白抗体的方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN1645145A	公开(公告)日	2005-07-27
申请号	CN200510006633.4	申请日	2005-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区南京总医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区南京总医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军南京军区南京总医院		
[标]发明人	李芳秋 邵海枫		
发明人	李芳秋 邵海枫		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/532 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569		
代理人(译)	夏平 刘成群		
优先权	200410041634.8 2004-08-09 CN		
其他公开文献	CN1294418C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一检测白念珠菌菌丝蛋白抗体诊断白念珠菌侵袭性感染的方法及试剂盒。该方法通过从噬菌体表面展示肽库中用抗白念珠菌菌丝蛋白P47的单克隆抗体进行筛选，然后经扩增、纯化制备模拟抗原或制备白念珠菌菌丝蛋白P47天然抗原，然后将所得抗原包被固相支持物，加入将待测的生物学样本孵育、清洗，再加入经标记的针对人抗体的第二抗体孵育、清洗，检测孵育混合物中免疫结合复合物的存在即可。该试剂盒包括ELISA试剂盒和胶体金试剂盒。使用该方法测定白念珠菌菌丝蛋白抗体，可快速、简单、高效地进行白念珠菌侵袭性感染的检测；该试剂盒成本低、使用方便、特异性高。

表1 本发明对134例服用免疫抑制剂环孢素A患者检测结果

病人类别	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
肾移植受者	34	61	36
各类肾炎	8	19	30
其他	1	11	8
合计	43	134	33

注：各类肾炎包括慢性肾炎，慢性肾衰，肾病综合症；其他组包括多发性骨髓瘤，