



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110596395 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201910693054.3

(22)申请日 2019.07.30

(71)申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防
控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路155号

(72)发明人 刘起勇 秦伟 宋秀平 栗冬梅

(74)专利代理机构 北京五洲洋和知识产权代理
事务所(普通合伙) 11387

代理人 荣红颖 刘素霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

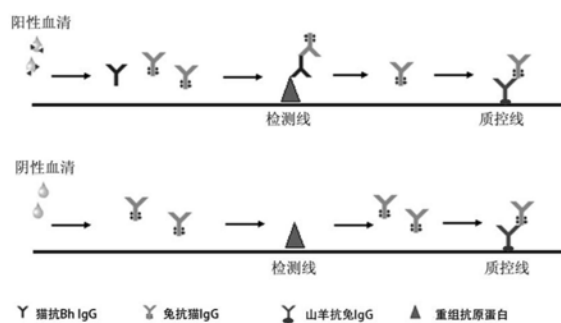
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测
卡及其试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡,该检测卡包括:基础背板、样本垫、金标垫、检测膜、吸水垫。样本垫、金标垫、检测膜、吸水垫依次排列设置在基础背板上部。金标垫中包被有兔抗猫抗体IgG。检测膜上设置有检测线和质控线,检测线上包被有汉赛巴尔通体抗原,质控线上包被有山羊抗兔IgG。该检测卡能够有效检测血清样本中的汉赛巴尔通体抗体,特异性好,敏感性高。



1. 一种快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡,所述检测卡包括:基础背板、样本垫、金标垫和检测膜;

所述样本垫、所述金标垫和所述检测膜依次沿样本走向排列布置在所述基础背板上;

所述金标垫中包被有胶体金标记的第二物种抗待检测物种IgG;

所述检测膜上设置有检测线,所述检测线上包被有汉赛巴尔通体抗原蛋白。

2. 如权利要求1所述的胶体金检测卡,其特征在于:

所述待检测物种为猫。

3. 如权利要求1所述的胶体金检测卡,其特征在于:

所述检测膜上还设置有质控线,所述质控线位于所述检测线之后,所述质控线上包被有第三物种抗第二物种IgG。

4. 如权利要求1所述的胶体金检测卡,其特征在于,所述汉赛巴尔通体抗原蛋白选自:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的蛋白、保持免疫原性且在如SEQ ID NO.2所示蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的如SEQ ID NO.2所示蛋白的突变体;

(2) 氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示的蛋白、保持免疫原性且在如SEQ ID NO.3所示蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的如SEQ ID NO.3所示蛋白的突变体;

(3) 含有如SEQ ID NO.2所示氨基酸序列且保持免疫原性的第一融合蛋白、保持免疫原性且在所述第一融合蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的所述第一融合蛋白的突变体;或者

(4) 含有如SEQ ID NO.3所示氨基酸序列且保持免疫原性的第二融合蛋白、保持免疫原性且在所述第二融合蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的所述第二融合蛋白的突变体。

5. 如权利要求3所述的胶体金检测卡,其特征在于:

所述第二物种抗待检测物种IgG为兔抗猫IgG;

所述第三物种抗第二物种IgG为:山羊抗兔IgG。

6. 如权利要求1所述的胶体金检测卡,其特征在于,所述胶体金标记的第二物种抗待检测物种IgG的制备步骤为:

(i) 以30-80:1的质量比将平均颗粒直径为35-45nm的胶体金与第二物种抗待检测物种IgG混合,得到混合液;

(ii) 离心所述混合液,弃上清液,得到沉淀物;

(iii) 将所述沉淀物溶解于Tris-HCl缓冲溶液中,得到所述胶体金标记的第二物种抗待检测物种IgG。

7. 如权利要求1所述的胶体金检测卡,其特征在于:

所述检测卡还包括吸水垫,所述吸水垫设置在所述基础背板上且位于所述检测膜后面;

所述吸水垫、所述检测膜的与所述金标垫位于所述基础背板的同一侧。

8. 如权利要求1所述的胶体金检测卡,其特征在于:

所述检测卡还包括设置于所述基础背板外部的壳体,所述壳体上设置有加样孔和观察窗;

所述加样孔位于所述样本垫上方;

所述观察窗位于所述检测膜上方。

9. 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括权利要求1-8任一项所述的胶体金检测卡, 优选地, 所述试剂盒还包括用于从待检测物种中获取血清的试剂。

10. 如权利要求1-8中任一项所述的胶体金检测卡在非诊断目的的汉赛巴尔通体抗体检测或汉赛巴尔通体鉴别测试中的用途。

快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种汉赛巴尔通体可视化快速检验技术,具体涉及一种快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡以及包含该检测卡的试剂盒。

背景技术

[0002] 巴尔通体是巴尔通体科内的一个亚变形杆菌属,是一种微曲、革兰氏阴性、嗜血、杆状且苛养、生长缓慢的兼性胞内病原体,对绝大多数的哺乳动物宿主具有很强的适应性,主要通过节肢动物传播^[1]。已从人类、家畜和野生动物中分离或检测到38种不同的巴尔通体^[2]。近年来,随着我国宠物数量的提升以及在媒介生物传染病新形势下,巴尔通体的研究的重要性不断上升。

[0003] 犬、猫及人中检测出的相关巴尔通体种属中,至少有13种巴尔通菌属或亚种被认为是人类疾病的病原体。其中杆菌样巴尔通体、五日热巴尔通体和汉赛巴尔通体导致了大多数临床疾病^[3]。由于其他巴尔通菌属的血清学检测在人群中的检查中很少进行,从而难以从患者标本中分离到这些细菌。文森巴尔通体伯格霍夫亚种以及其他种属仅仅被认为是人类疾病的可能原因^[4]。

[0004] 而与宠物最相关的巴尔通体种属为克氏巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体、汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体和文森巴尔通体伯格霍夫亚种。所有这些物种都与猫或狗的严重疾病有关,并且都具有导致人畜共患病的潜在危险^[5]。

[0005] 准确诊断巴尔通体感染的诊断和鉴定方法仍然是具有挑战性的工作。目前尚无阴性结果可确保无感染的诊断技术。最常用检测急慢性感染的技术是微生物培养技术、聚合酶链反应(PCR)^[6]。

[0006] 包括裂解离心、细胞培养分离和生长富集等在内的专业培养技术是确认巴尔通体感染的“金标准”。巴尔通体培养的最佳生物样本是血液、脑脊液、关节液、病理性积液和组织活检^[7]。由于巴尔通菌属苛养、生长缓慢,因此需要的检测周期较长,即使经过长时间孵育后的阴性培养并不能排除巴尔通体感染的可能性^[8]。

[0007] PCR检测巴尔通体可以使用多种特异性引物通过DNA测序来确定该物种^[9]。但由于其需要使用专门的仪器的特点,限制了其在病媒现场检测的能力。

[0008] 血清转化可通过记录抗体滴度在2-3周的时间内是否升高4倍来确认急性巴尔通体感染^[4]。但迄今为止很少使用血清学或其他诊断方法来检测患有急性起病的猫或狗。

[0009] 免疫组织化学与其他抗原检测技术相比的主要优势是能够直接识别组织样本(如心脏瓣膜或淋巴器官)中的微生物。但对生物整体的检测没有太大优势。

[0010] 参考文献:

[0011] 1、Breitschwerdt EB,Maggi RG,Chomel BB,Lappin MR.Bartonellosis:an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings.J Vet Emerg Crit Care.2010;20:8-30.

[0012] 2、Lappin MR,Kordick DL,Breitschwerdt EB.Bartonella spp.antibodies and

DNA in aqueous humour of cats.J Feline Med Surg.2000;2:61-8.

[0013] 3、Lamas C,Curi A,Bóia M,Lemos E.Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil-a review.Mem Inst Oswaldo Cruz.2008;103:221-35.

[0014] 4、Breitschwerdt EB,Maggi RG,Varanat M,Linder KE,Weinberg G.Isolation of Bartonella vinsonii subsp.berkhoffii genotype II from a boy with epithelioid hemangioendothelioma and a dog with hemangiopericytoma.J Clin Microbiol.2009;47:1957-60.

[0015] 5、Breitschwerdt EB.Bartonellosis,One Health and all creatures great and small.Vet Dermatol.2017;28:96-21.

[0016] 6、Clarridge JE,Raich TJ,Pirwani D,Simon B,Tsai L,Rodriguez-Barradas MC,et al.Strategy to detect and identify Bartonella species in routine clinical

[0017] 7、Lee SA,Plett SK,Luetkemeyer AF,Borgo GM,Ohliger MA,Conrad MB,et al.Bartonella quintana aortitis in a man with AIDS,diagnosed by needle biopsy and 16S rRNA gene amplification.J Clin Microbiol.2015;53:2773-6.

[0018] 8、Burzo ML,Antonelli M,Pecorini G,Favuzzi AMR,Landolfi R,Flex A.Fever of unknown origin and splenomegaly:a case report of blood culture negative endocarditis.Medicine.2017;96:e9197.

[0019] 9、Diddi K,Chaudhry R,Sharma N,Dhawan B.Strategy for identification& characterization of Bartonella henselae with conventional molecular methods.Indian J Med Res.2013;137:380-7.

发明内容

[0020] 本发明首先根据相关文献,选择17kDa蛋白作为抗原,通过查找Genebank上的基因序列,对汉赛巴尔通体特有P17基因(片段长度为525bp)进行PCR扩增并克隆到pEASY载体上,经酶切鉴定后,将重组质粒转化到大肠杆菌中进行原核诱导表达,后经过Ni-NTA柱纯化获得纯度及浓度较高的重组蛋白,该重组蛋白作为汉赛巴尔通体特异性抗原。

[0021] 在此基础上将NC膜(即检测膜)的质控线上包被羊抗兔IgG,检测线上包被上文所制的重组蛋白,将金标记的兔抗猫IgG复合物铺在结合垫(即金标垫)上,配合加样垫(即样本垫)和吸收垫(即吸水垫)组装成胶体金试纸条。

[0022] 较为具体地,本发明第一方面提供了一种快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡,所述检测卡包括:基础背板、样本垫、金标垫和检测膜;

[0023] 所述样本垫、所述金标垫和所述检测膜依次沿样本走向排列布置在所述基础背板上;

[0024] 所述金标垫中包被有胶体金标记的第二物种抗待检测物种IgG;

[0025] 所述检测膜上设置有检测线,所述检测线上包被有汉赛巴尔通体抗原蛋白。

[0026] 在一些实施方式中,所述待检测物种为猫。

[0027] 在一些实施方式中,所述检测膜上还设置有质控线,所述质控线位于所述检测线

之后,所述质控线上包被有第三物种抗第二物种IgG。

[0028] 在一些实施方式中,所述汉赛巴尔通体抗原蛋白选自:

[0029] (1) 氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的蛋白、保持免疫原性且在如SEQ ID NO.2所示蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的如SEQ ID NO.2所示蛋白的突变体;

[0030] (2) 氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示的蛋白、保持免疫原性且在如SEQ ID NO.3所示蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的如SEQ ID NO.3所示蛋白的突变体;

[0031] (3) 含有如SEQ ID NO.2所示氨基酸序列且保持免疫原性的第一融合蛋白、保持免疫原性且在所述第一融合蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的所述第一融合蛋白的突变体;或者

[0032] (4) 含有如SEQ ID NO.3所示氨基酸序列且保持免疫原性的第二融合蛋白、保持免疫原性且在所述第二融合蛋白基础上进行化学修饰的蛋白、或保持免疫原性的所述第二融合蛋白的突变体。

[0033] 在一些实施方式中,所述第二物种抗待检测物种IgG为兔抗猫IgG。

[0034] 在一些实施方式中,所述第三物种抗第二物种IgG为:山羊抗兔IgG。

[0035] 在一些实施方式中,所述胶体金标记的第二物种抗待检测物种IgG的制备步骤为:

[0036] (i) 以30-80:1的质量比将平均颗粒直径为35-45nm的胶体金与第二物种抗待检测物种IgG混合,得到混合液;

[0037] (ii) 离心所述混合液,弃上清液,得到沉淀物;

[0038] (iii) 将所述沉淀物溶解于Tris-HCl缓冲溶液中,得到所述胶体金标记的第二物种抗待检测物种IgG。

[0039] 在一些实施方式中,所述检测卡还包括吸水垫,所述吸水垫设置在所述基础背板上且位于所述检测膜后面;

[0040] 所述吸水垫、所述检测膜的与所述金标垫位于所述基础背板的同一侧。

[0041] 在一些实施方式中,所述检测卡还包括设置于所述基础背板外部的壳体,所述壳体上设置有加样孔和观察窗;

[0042] 所述加样孔位于所述样本垫上方;

[0043] 所述观察窗位于所述检测膜上方。

[0044] 本发明第二方面提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括本发明第一方面所述的胶体金检测卡。

[0045] 在一些实施方式中,所述试剂盒还包括用于从待检测物种中获取血清的试剂。

[0046] 本发明第三方面提供了如本发明第一方面所述的胶体金检测卡在非诊断目的的汉赛巴尔通体抗体检测或汉赛巴尔通体鉴别测试中的用途。

[0047] 本发明快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金试剂盒检测速度快,灵敏度高。

附图说明

[0048] 图1为本发明快速检测巴尔通体的胶体金检测卡构造示意图;

[0049] 图2为本发明快速检测巴尔通体的胶体金检测卡使用原理示意图;

[0050] 图3为本发明快速检测巴尔通体的胶体金检测卡敏感性测试照片。

具体实施方式

[0051] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明实施方式作进一步地详细描述。

[0052] 本发明利用建立胶体金试纸检测方法分别对布鲁氏杆菌、五日热巴尔通体等多种致病菌的阳性血清进行检测,证实所建立的Bh胶体金具有高敏感性、特异性和准确性,为宠物猫Bh感染的诊断提供了一个快速、简便、准确的可视化检测方法。

[0053] 本发明将原核表达和免疫胶体金技术相结合,建立了快速检测Bh感染的可视化方法与试剂盒。

[0054] 实施例1、Bh的17kDa类抗原蛋白基因的扩增

[0055] 生物材料来源:汉赛巴尔通体(Bh, *B. henselae*),生物材料来自中国疾病预防控制中心传染病所媒介室自行采集并保存的一株来自北京猫的汉赛巴尔通体。

[0056] 在巧克力平板培养基(配方:蛋白胨10g、牛肉粉3g、氯化钠5g、脱纤维羊血50mL、琼脂15g、蒸馏水补至1L)中培养该株汉赛巴尔通体,取Bh对数生长期培养物于1.5mL离心管,震荡混匀,得到Bh悬浊液。

[0057] 根据GenBank登录号CP020742.1的1584762-1585286位编码的基因(登陆地址:

[0058] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP020742.1?from=1584762&to=1585286>)的Bh的17kDa类抗原蛋白基因序列设计如下所示上游引物和下游引物。

[0059] 上游引物p1序列(命名为:SEQ ID NO.5):

[0060] 5'—CGCGGATCCATGATAAGAAAAACAGTTCCCAAC—3'

[0061] 下游引物p2序列(命名为:SEQ ID NO.6):

[0062] 5'—GCCCTCGAGTTAGCCTTTTAGGGTTTTTAAAACGT—3'

[0063] 配制25 μ l PCR反应体系,包括上游引物p1和下游引物p2(浓度均为10 μ M)各0.5 μ l, 2XPCR Mix 12.5 μ l, dd H₂O 9.5 μ l, Bh悬浊液2 μ l。将所有试剂预充分混匀后放入PCR仪进行PCR扩增,得到PCR扩增产物。反应条件如下表1所示:

[0064] 表1.PCR反应程序

	温度	时间	循环数
	95 °C	5 min	1 cycle
[0065]	95 °C	35 s	
	56 °C	30 s	35 cycles
	72 °C	30 s	
	72 °C	8 min	1 cycle

[0066] PCR产物经测序验证,其中对应的编码序列为SEQ ID NO.1,具体序列为:

[0067] ATGATAAGAAAAACAGTTCCCAACACCACTTTCCATACACGTGTACGCGATGAATCAATTGGTGGAGAT
AATCCTTATCGATGGCAAGAGGTGAACAGCGATGCATATTTTAAAGGGAAACGAGTTATTCTTTTTTCTTCTTCTGG
AGCTTTTACCCCTACTTGCTCAACCTTTCAGCTTCCTGATTTTGAAAACTCTATGATGAATTTAAAAAGTTGGCA
TTGATGAAATTTATTGCCTTTCCGTCAATGATGCTTTTGTGATGAACGCTTGGGGAAAAGCACAAGGTATTAAAAAC
GTAAAATTAATCCCTGATGGCTCAGGTGAATTCACACGAAAAATGGGTATGCTGGTTGCTAAAGACAATGTTGGTTT

TGGAATGCGCTCATGGCGCTATGCTGCTGTGATCAATGATGGTGTGATTGAACATTGGTTTGAAGAACAAGGTTTTT
CAGATAATTGCGCAACAGATCCTTATGAAGTCTCCTCACCACAAAACGTTTTAAAAACCCTAAAAGGCTAA

[0068] 序列SEQ ID NO.1中的编码区序列对应的蛋白序列为SEQ ID NO.2,具体序列为:

[0069] MIRKTVPNNTTFHTRVRDESIGGDNPYRWQEVNSDAYFKGKRVILFSLPGAFTPTCSTFQLPDFEKLIDE
FKKVGIDEIYCLSVNDAFVMNAWGKAQGIKNVKLIPDGSGEFTRKMGMLVAKDNVGFMRSWRYAAVINDGVIEHWF
EEQGFSDNCATDPYEVSSPQNVLKTLLG

[0070] 实施例2、Bh 17kDa重组抗原蛋白设计与合成

[0071] 取1 μ L浓度为15ng/ μ L的pEASY[®]-Blunt El Expression Vector(购买自北京全式金生物技术有限公司的pEASY[®]-Blunt El Expression Kit中的载体,目录号CE111-01);取4 μ L实施例1所得纯化PCR产物DNA,按照试剂盒使用说明书将载体与PCR产物连接,室温静置10分钟后加入50 μ L刚刚解冻的trans BL21 (ED3)感受态,轻弹混匀,冰浴30min。42 $^{\circ}$ C水浴热激30秒,冰浴2min后取200 μ L液体涂板,37 $^{\circ}$ C培养过夜。

[0072] 挑取少量过夜培养物至50mL含60 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基的锥形瓶中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀=0.6。在锥形瓶中加入1.0mmol/L IPTG,37 $^{\circ}$ C震荡培养4h后取10ml培养物12000r/min,离心1min,弃上清,每100mg菌体加入1-5ml细菌裂解液(细菌裂解液的成分为:50mM Tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1vol% Triton x-100、1vol% Sodium deoxycholate、0.1vol% SDS)(每1ml细菌裂解液中已加入10 μ l蛋白酶抑制剂混合物(AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin A)),4 $^{\circ}$ C条件下超声波裂解菌体,功率200W,工作5s,间歇5s,有效工作时间20min,得到细菌裂解液。

[0073] 重组载体经测序得到如下序列,命名为SEQ ID NO.4,其中,下划线所示的序列为来自Bh的17kDa类抗原蛋白基因,方框所示的序列为融合蛋白的融合部分的序列:

[0074] CCTCCCATAGTACGCATACCGGGAGGGAAGAATATTCCAACTTCAGTTTTTGCCCCCCCCGAAAAA
CCGCGGGACGGCCTCTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGA
G A T A T A C A T ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAG

CGAATTGGCCCTTCGCGGATCCATGATAAGAAAAACAGTTCCCAACACCACTTTCCATACACG
TGACGCGATGAATCAATTGGTGGAGATAATCCTTATCGATGGCAAGAGGTGAACAGCGATGCATATTTTAAAGGGA
AACGAGTTATTCTTTTTTCTTCTGAGCTTTTACCCCTACTTGCTCAACCTTTCAGCTTCTGATTTTGAAAAA
CTCTATGATGAATTTAAAAAGTTGGCATTGATGAAATTTATTGCCTTTCCGTCAATGATGCTTTTGTGATGAACGC
TTGGGGAAAAGCACAAGGTATTAAAAACGTAAAAATTAATCCCTGATGGCTCAGGTGAATTCACACGAAAAATGGGTA
TGCTGGTTGCTAAAGACAATGTTGGTTTTGGAATGCGCTCATGGCGCTATGCTGCTGTGATCAATGATGGTGTGATT
GAACATTGGTTTGAAGAACAAGGTTTTTTCAGATAATTGCGCAACAGATCCTTATGAAGTCTCCTCACCACAAAACGT
TTTTAAAAACCCTAAAAGGCTAACTCGAGGGCAAGGGCCAATTTCGAGCTCAACGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC
GAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCCCGTGGGGGCGCATAGAGAAGTGTTTCG
TGAAGAAGTTTTTTTGGTAGATAGGAAGTAGACTATACTCCGGATATCCCGCAAGATGCCAGGTAATTACCGTGCAT
AACCAGGCCGTATGCCTAACGGGGTCCCAGGTTGACGGTGCCAGAGAATGTGCATAGAACCCAGTGTTAGATTTCCT
ACACCGGTGGCCGT

[0075] 重组蛋白命名为SEQ ID NO.3,具体氨基酸序列为:

[0076] MRGSHHHHHGMASELALRGSMIRKTVPNNTTFHTRVRDESIGGDNPYRWQEVNSDAYFKGKRVLFLSLP
GAFTPTCSTFQLPDFEKLYDEFKKVGIDEIYCLSVNDAFVMNAWGKAQG IKNVKLIPDGSGEFTRKMGMLVAKDNVG
FGMRSWRYAAVINDGVIEHWFEQGFSDNCATDPYEVSSPQNVLKTLLG

[0077] 实施例3、Bh 17kDa重组抗原蛋白纯化

[0078] 取干净的Ni-NTA柱子(康维世纪,CW0894S),加入2mL提前用20%乙醇浸泡的预装液。静置30min后放走液体后加入0.5mol/L的咪唑水溶液过柱,再用pH7.4的PBS一柱体积过柱。

[0079] 将实施例2所制备的细菌裂解液(主要成分为:破碎细菌成分、50mM Tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1vol% Triton x-100、1vol% Sodium deoxycholate、0.1vol% SDS、蛋白酶抑制剂混合物)过柱子3~5次,将目的蛋白完全的吸附在柱子上。用0.2mol/L咪唑水溶液和0.01mol/L的pH为7.4的PBS混合液过柱子3~5次,清洗杂蛋白。用0.5mol/L咪唑水溶液和0.01mol/L的pH为7.4的PBS混合液过柱子3~5次,洗脱目的蛋白,得到纯化的Bh 17kDa重组抗原蛋白。

[0080] 实施例4、Bh 17kDa重组抗原蛋白的特异性试验

[0081] 1号血清为汉赛巴尔通体阳性血清(经IFA方法确认),2号血清为布鲁氏杆菌阳性血清(经IFA方法确认),3号血清为五日热巴尔通体阳性血清(经IFA方法确认),4号血清为汉赛巴尔通体阴性血清(经IFA方法确认)。

[0082] 用以上四种血清与实施例3制备的纯化重组抗原蛋白建立滴度方阵,用间接ELISA法测定酶标板各孔OD₄₅₀值,以此来判断是否存在交叉反应。每份检测三次,检测结果及分析结果参见如下表2。

[0083] 表1中检测的检测值数字代表吸光度。

[0084] 2-4号样本检测结果均与1号阳性样本偏差较大,结果表明该蛋白在巴尔通体种属内及种属外均有较高的特异性。

[0085] 表2检测特异性测试结果

血清编号	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数
1(+)	0.674	0.662	0.666	0.667	0.00506	0.76%
2布	0.053	0.052	0.053	0.053	0.00044	0.83%
3五	0.062	0.067	0.063	0.064	0.00201	3.13%
4(-)	0.079	0.077	0.080	0.079	0.00116	1.47%

[0087] 汉赛巴尔通体阳性对照与布鲁氏杆菌阳性血清及五日热巴尔通体阳性血清的P/N值皆大于2.5,证明该蛋白有高度特异性。

[0088] 实施例5、Bh 17kDa重组抗原蛋白的敏感性试验

[0089] 取6份Bh阳性血清样品,分别独立地使用0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液对其进行等倍稀释,共配制1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800不同的稀释浓度,将表达纯化的17kDa重组抗原蛋白用0.01mol/L、pH7.4的PBS缓冲液作为稀释液做等倍稀释,建立滴度方阵,用间接ELISA法测定酶标板各孔OD₄₅₀值。以Bh阴性血清样品作为对照,分别独立地对其进行等倍稀释,共配制1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800不同的稀释浓度,将所测OD₄₅₀值列于表3-4,计算得出P/N值,列于表5。

[0090] 在表3、4中,六行是代表六个平行样品,每一列是不同稀释度,数值代表波长450时

液体的吸光度。

[0091] 在每个稀释度下,阳性代表六份阳性血清样品分别在该稀释度下独立测试的OD₄₅₀值,所有阴性均为同一份阴性质控血清样品在该稀释度下独立测试的OD₄₅₀值。

[0092] 在特定稀释度下,任一样品的阳性血清OD₄₅₀值与阴性血清的OD₄₅₀值的比值称作该稀释度下的P/N值,所有的P/N值记录在表5当中。

[0093] 表3检测敏感性测试结果 (1)

	血清稀释 倍数	1: 100		1: 200		1:400		1:800	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
[0094]	样品 1 (A)	1.2708	0.1232	1.0858	0.0856	0.8542	0.0586	0.7756	0.0600
	样品 2 (A)	1.2457	0.1149	1.0755	0.0916	0.8961	0.0637	0.7477	0.0660
	样品 3 (A)	1.0542	0.1000	0.9184	0.0721	0.8361	0.0553	0.7556	0.0539
	样品 4 (A)	1.2583	0.1102	1.1090	0.0753	0.9379	0.0525	0.7449	0.0474
	样品 5 (A)	1.2718	0.0977	1.0286	0.0735	0.8570	0.0632	0.7849	0.0628
	样品 6 (A)	1.2676	0.1004	1.0760	0.0744	0.9095	0.0623	0.4148	0.0530

[0095] 表4检测敏感性测试结果 (2)

	血清稀释 倍数	1:1600		1:3200		1:6400		1:12800	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
[0096]	样品 1 (A)	0.5538	0.0558	0.3562	0.0391	0.1869	0.0341	0.0208	0.0280
	样品 2 (A)	0.5013	0.0553	0.3162	0.0391	0.1659	0.0321	0.0236	0.0286
	样品 3 (A)	0.5087	0.0470	0.3236	0.0386	0.1698	0.0337	0.0234	0.0277
[0097]	样品 4 (A)	0.5427	0.0400	0.3171	0.0335	0.1664	0.0292	0.0284	0.0228
	样品 5 (A)	0.5487	0.0549	0.3250	0.0479	0.1705	0.0384	0.0387	0.0390
	样品 6 (A)	0.4836	0.0372	0.2646	0.0470	0.1388	0.0377	0.0390	0.0267

[0098] 表5检测P/N值结果

	血清稀释倍数	1: 100	1: 200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
[0099]	样品 1 (P/N)	10.3132	12.6902	14.5794	12.9302	9.9250	9.1190	5.4841	0.7427
	样品 2 (P/N)	10.8462	11.7411	14.0657	11.3239	9.0588	8.0952	5.1725	0.8252
	样品 3 (P/N)	10.5442	12.7419	15.1092	14.0086	10.8317	8.3855	5.0450	0.8448
	样品 4 (P/N)	11.4177	14.7222	17.8496	15.7059	13.5698	9.4722	5.6987	1.2456
	样品 5 (P/N)	13.0238	14.0000	13.5515	12.5037	10.0000	6.7864	4.4390	0.9923
	样品 6 (P/N)	12.6204	14.4625	14.5970	7.8246	13.0000	5.6337	3.6850	1.4607

[0100] 当稀释比达到1:6400时P/N值依然大于2.5,且在稀释比达到1:400时P/N值最大,证明该蛋白具有高度灵敏性且符合检测的使用要求。

[0101] 在本发明中检测卡的滴加待检测血清样本端也成为前端,检测卡的另一端称为后端,样本流向是从前向后,前后只是为了方便检测卡结构的描述,不对本发明技术方案构成限制。

[0102] 实施例6、Bh胶体金试纸检测方法的建立及操作步骤

[0103] 1胶体金标抗体的制备。

[0104] 采用柠檬酸三钠还原法(操作步骤为:烧瓶置于电热套式恒温器中,加入干净搅拌子,1ml 1%氯金酸水溶液(北京莱贝赛斯生物科技有限公司)、99ml ddH₂O,低速搅拌并加热沸腾。迅速一次性加入1ml 1%柠檬酸三钠(北京莱贝赛斯生物科技有限公司)水溶液,继续煮沸。观察溶液颜色变化,由浅黄→黑色→紫色→紫红色,当完全变为紫红色时,继续加热10分钟后停止加热,冷却至室温。)制备得到平均颗粒直径为40nm的胶体金溶液。吸取1mL胶体金溶液加入试管中,向其中加入10μg兔抗猫抗体IgG(购自北京博奥龙免疫技术有限公司,货号为0F02026),37℃下恒温缓慢振荡30min;然后于4℃、9000r/min离心1h,弃上清液,沉淀溶解于0.1mol/L的Tris-HCl缓冲溶液中(pH=8.0),即得到10μg/mL的胶体金标记的兔抗猫抗体IgG,将制备好的溶液4℃密封保存,备用。

[0105] 2胶体金检测卡的制备。

[0106] 本发明的快速检测巴尔通体的胶体金试剂盒中检测卡构造示意图参见图1,检测卡包括基础背板以及从前端到后端依次设置于基础背板某一侧面上的4个部分:样本垫、金标垫、检测膜[其上靠近前端一侧为检测线(T线)和靠近后端一侧为质控线C线]、吸水垫。其中基础背板优选为PVC背板,样本垫的材质为普通吸水纸,长度为2cm;检测膜为NC膜(硝酸纤维素膜),长度为2cm;吸水垫的材质为普通吸水纸,长度为5cm;金标垫的材质是玻璃纤维膜,长度0.5cm。

[0107] 将前述步骤制备的胶体金标记的兔抗猫抗体IgG用移液枪均匀滴加到金标垫基材玻璃纤维膜上,保证金标垫基材充分浸润,放在真空干燥箱中37℃干燥10min,取出,形成浸润了兔抗猫抗体IgG的金标垫。

[0108] 检测膜的制备:在硝酸纤维素膜的检测线(T线)位置包被经PBS(0.01mol/L,pH=7.4)缓冲液稀释至2mg/mL的实施例3制备的纯化后重组蛋白抗原,其中包被最低量为0.5-1μl/cm长度,在质控线(c线)位置包被经PBS(0.01mol/L,pH=7.4)缓冲液稀释至2mg/mL的山羊抗兔IgG(购自北京博奥龙免疫技术有限公司,货号为0F02000),其中包被最低量为0.5-1μl/cm长度,室温下干燥30min后得到检测膜。

[0109] 检测卡的组装顺序依次为:在大块的基础背板的中间区域先贴上制备好的检测膜,金标垫贴在检测膜的前方区域,为保证良好的接触,金标垫的后端压在检测膜的前端上,金标垫于检测膜的叠加长度优选为2mm;再在金标垫的前方贴上样本垫,样本垫的后端压在金标垫的前端,二者叠加长度优选为2mm;最后将吸水垫贴在检测膜的后方,吸水垫的前端压在检测膜的后端上,二者叠加长度优选为2mm,将大块试纸板切割为宽度为4mm的试纸条(检测卡)。将制备好的试纸条置于放有干燥剂的锡箔袋内,4℃保存备用。金标垫、检测膜、吸水垫和样本垫均位于PVC基础背板的同一侧。为了美观和卫生,可将得到的试纸条至于壳体内,其中壳体上对应样本垫的位置设置有加样孔,对应检测线和质控线的位置设置

有观察窗口。

[0110] 实施例7、Bh胶体金试纸检测方法结果判定

[0111] 下面以检测猫是否感染汉赛巴尔通体为例进行说明,当然本发明检测卡并不限于仅检测猫是否感染汉赛巴尔通体,当检测其他动物比如狗是否感染汉赛巴尔通体时,则需要将金标垫上的胶体金标记的兔抗猫抗体IgG改为胶体金标记的兔抗狗抗体IgG,由此保证待检测动物的血清IgG可以与金标垫上的IgG发生抗原抗体结合。

[0112] 本检测卡的待检测试样应为待检测生物的血清,其血清的制备方法可以采用常规方法进行制备。

[0113] 使用原理示意图参见图2。具体检测原理为:当猫感染汉赛巴尔通体时,猫血清中会存在抗汉赛巴尔通体抗体,因此猫血清中的抗巴尔通体抗体可与金标垫中胶体金标记的兔抗猫抗体IgG结合,继续扩散后又与检测线上包被的巴尔通体抗原(实施例3所获得的重组蛋白)发生结合,因此在检测膜的检测线(T线)上会出现特异性的胶体金条带;随着胶体金标记兔抗猫抗体IgG的迁移,会与质控线上包被的羊抗兔IgG结合,在质控线(C线)也会出现条带。

[0114] 当生物未感染汉赛巴尔通体时,由于血清中没有汉赛巴尔通体的抗体,因此在检测膜的检测线(T线)上不出现特异性的条带;但随着胶体金标记的兔抗猫抗体IgG复合物的迁移,其会与质控线上包被的羊抗兔IgG结合,因此在质控线(C线)上会出现肉眼可见的条带。

[0115] 由此可知,当猫感染汉赛巴尔通体时,检测线和质控线都显示胶体金颜色;当猫未感染汉赛巴尔通体时,检测线不显示胶体金颜色,质控线显示胶体金颜色。如果质控线不显示胶体金颜色,说明本次检测结果不可靠。

[0116] 用微量移液器取200 μ L待检测的猫血清,滴加于试纸条或称为检测卡的样本垫上,静置10分钟,用肉眼观察,若质控线(C线)和检测线(T线)均显色,则检测结果判为阳性;若仅质控线显色,则检测结果判为阴性;若质控线不显色,则检测结果判为无效。

[0117] 实施例8、Bh胶体金试纸检测方法敏感性试验

[0118] 将经IFA方法确认的汉赛巴尔通体阳性血清分别用PBS(0.01mol/L, pH=7.4)缓冲液稀释1:32倍、1:64倍、1:128倍、1:256倍、1:512倍,分别滴加到实施例6所制备得到的检测卡的样本垫上,检测膜上的显色情况参见图3,其中A、B、C、D、E分别依次代表稀释1:32倍、1:64倍、1:128倍、1:256倍、1:512倍所测试的检测卡,其中,质控线均显色,说明检测卡有效,而检测限上肉眼可见显色的最大稀释度为1:128倍。检测结果表明,当Bh阳性血清稀释比为1:128时,都可检测出清晰胶体金阳性条带,结果表明该检测方法的肉眼观察的灵敏度可达到稀释比为1:128,证实该检测方法具有高度的敏感性。

[0119] 实施例9、Bh胶体金试纸检测法与分离培养法对样本检测的对比实验

[0120] 取65份北京猫血液样品分别用本发明实施例6建立的Bh胶体金检测卡检测方法与分离培养法对上述样品进行检测,统计两种检测方法的检测结果。计算Bh胶体金试纸检测方法与分离培养法的敏感性、特异性及符合率。

[0121] 65份北京猫血液样品的Bh胶体金试纸检测方法与分离培养法结果见表6。经统计学分析,Bh胶体金试纸检测方法的敏感性和特异性分别为95.65%和97.68%,与分离培养法的符合率为96.92%,证实建立的Bh胶体金试纸检测方法是一种具有特异性高和敏感性

强的Bh感染可视化检测方法。

[0122] 表6. 65份北京猫血液样品的Bh检测统计

n=65		分离培养		总数
		阳性数	阴性数	
[0123]	胶体金	22	1	23
	试纸条	1	41	42
总数		23	42	65

[0124] 本发明具有如下优点：本发明提供了一种新的用于检测Bh感染的可视化检测方法。与常规FIA方法相比，胶体金试纸法具有对仪器设备要求低（不需要仪器）、检测速度快（2-10min）、检测结果的可视化（可以直接用肉眼观察检测结果）等优点，这些优点使得本发明建立的胶体金试纸法可以用于宠物医院或疫区现场猫Bh感染的快速检测和诊断。

[0125] 由技术常识可知，本发明可以通过其它的不脱离其精神实质或必要特征的实施方案来实现。因此，上述公开的实施方案，就各方面而言，都只是举例说明，并不是仅有的。所有在本发明范围内或在等同于本发明的范围内的改变均被本发明包含。

序列表

<110> 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

<120> 快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡及其试剂盒

<130> C1CNCN190395-IV190111

<160> 6

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 525

<212> DNA

<213> 汉赛巴尔通体 (B. henselae)

<400> 1

```

atgataagaa aaacagttcc caacaccact ttccatacac gtgtacgca tgaatcaatt 60
ggtggagata atccttatcg atggcaagag gtgaacagcg atgcatatTT taaaggga 120
cgagttattc ttttttctct tcctggagct tttacccta cttgctcaac ctttcagctt 180
cctgattttg aaaaactcta tgatgaattt aaaaaagttg gcattgatga aatttattgc 240
ctttccgtca atgatgcttt tgcataaac gcttggggaa aagcacaagg tattaataaac 300
gtaaaattaa tccctgatgg ctacagtgaa ttcacacgaa aaatgggtat gctggttgct 360
aaagacaatg ttggttttgg aatgcgctca tggcgctatg ctgctgtgat caatgatggt 420
gtcattgaac attggtttga agaacaaggt ttttcagata attgcgcaac agatccttat 480
gaagtctcct caccacaaaa cgttttaaaa accctaaaag gctaa 525

```

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> 汉赛巴尔通体 (B. henselae)

<400> 2

```

Met Ile Arg Lys Thr Val Pro Asn Thr Thr Phe His Thr Arg Val Arg
1           5           10           15
Asp Glu Ser Ile Gly Gly Asp Asn Pro Tyr Arg Trp Gln Glu Val Asn
          20           25           30
Ser Asp Ala Tyr Phe Lys Gly Lys Arg Val Ile Leu Phe Ser Leu Pro
          35           40           45
Gly Ala Phe Thr Pro Thr Cys Ser Thr Phe Gln Leu Pro Asp Phe Glu
          50           55           60
Lys Leu Tyr Asp Glu Phe Lys Lys Val Gly Ile Asp Glu Ile Tyr Cys
65           70           75           80
Leu Ser Val Asn Asp Ala Phe Val Met Asn Ala Trp Gly Lys Ala Gln
          85           90           95
Gly Ile Lys Asn Val Lys Leu Ile Pro Asp Gly Ser Gly Glu Phe Thr

```

	100					105					110						
Arg	Lys	Met	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Lys	Asp	Asn	Val	Gly	Phe	Gly	Met		
	115					120					125						
Arg	Ser	Trp	Arg	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Asn	Asp	Gly	Val	Ile	Glu	His		
	130					135					140						
Trp	Phe	Glu	Glu	Gln	Gly	Phe	Ser	Asp	Asn	Cys	Ala	Thr	Asp	Pro	Tyr		
145						150					155					160	
Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Gln	Asn	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Lys	Gly				
	165					170											
<210> 3																	
<211> 195																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)																	
<400> 3																	
Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Met	Ala	Ser	Glu	Leu		
1				5				10						15			
Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Met	Ile	Arg	Lys	Thr	Val	Pro	Asn	Thr	Thr	Phe		
	20					25					30						
His	Thr	Arg	Val	Arg	Asp	Glu	Ser	Ile	Gly	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Arg		
	35					40					45						
Trp	Gln	Glu	Val	Asn	Ser	Asp	Ala	Tyr	Phe	Lys	Gly	Lys	Arg	Val	Ile		
	50					55					60						
Leu	Phe	Ser	Leu	Pro	Gly	Ala	Phe	Thr	Pro	Thr	Cys	Ser	Thr	Phe	Gln		
65						70					75					80	
Leu	Pro	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Tyr	Asp	Glu	Phe	Lys	Lys	Val	Gly	Ile		
	85					90					95						
Asp	Glu	Ile	Tyr	Cys	Leu	Ser	Val	Asn	Asp	Ala	Phe	Val	Met	Asn	Ala		
	100					105					110						
Trp	Gly	Lys	Ala	Gln	Gly	Ile	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly		
	115					120					125						
Ser	Gly	Glu	Phe	Thr	Arg	Lys	Met	Gly	Met	Leu	Val	Ala	Lys	Asp	Asn		
	130					135					140						
Val	Gly	Phe	Gly	Met	Arg	Ser	Trp	Arg	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Asn	Asp		
145						150					155					160	
Gly	Val	Ile	Glu	His	Trp	Phe	Glu	Glu	Gln	Gly	Phe	Ser	Asp	Asn	Cys		
	165					170					175						
Ala	Thr	Asp	Pro	Tyr	Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Gln	Asn	Val	Leu	Lys	Thr		
	180					185					190						
Leu	Lys	Gly															

195

<210> 4

<211> 1041

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

```
cctcccatag tacgcatacc gggagggaag aatattccaa acttcagttt ttgccccccc 60
cggaaaaaacc gcgggacggc ctctggaatt gtgagcggat aacaattccc ctctagaaat 120
aattttgttt aactttaaga aggagatata catatgcggg gttctcatca tcatcatcat 180
catggtatgg ctagcgaatt ggcccttcgc ggatccatga taagaaaaac agttcccaac 240
accactttcc atacacgtgt acgcgatgaa tcaattgggtg gagataatcc ttatcgatgg 300
caagaggtga acagcgatgc atattttaaa gggaaacgag ttattctttt ttctcttctt 360
ggagctttta cccctacttg ctcaaccttt cagcttcttg attttgaaaa actctatgat 420
gaatttaaaa aagttggcat tgatgaaatt tattgccttt ccgtcaatga tgcttttgtc 480
atgaacgctt ggggaaaagc acaaggtatt aaaaacgtaa aattaatccc tgatggctca 540
ggtgaattca cacgaaaaat gggatatgctg gttgctaaag acaatgttgg ttttggaatg 600
cgctcatggc gctatgctgc tgtgatcaat gatggtgtca ttgaacattg gtttgaagaa 660
caaggttttt cagataattg cgcaacagat ccttatgaag tctcctcacc aaaaacgtt 720
ttaaaaaccc taaaaggcta actcgagggc aagggccaat tcgagctcaa cgatccggct 780
gctaacaaag cccgaaagga agctgagttg gctgctgcac gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
aaggccccgt gggggcgcgc agagaagtgt tcgtgaagaa gtttttttgg tagataggaa 900
gtagactata ctccggatat cccgcaagat gccaggtaat taccgtgcat aaccaggccg 960
tatgcctaac ggggtcccag gttgacggtg ccagagaatg tgcatagaac ccagtgttag 1020
atttcctaca ccggtggccg t 1041
```

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

```
cgcgatcca tgataagaaa aacagttccc aac 33
```

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

```
gccctcgagt tagcctttta gggtttttaa aacgt 35
```

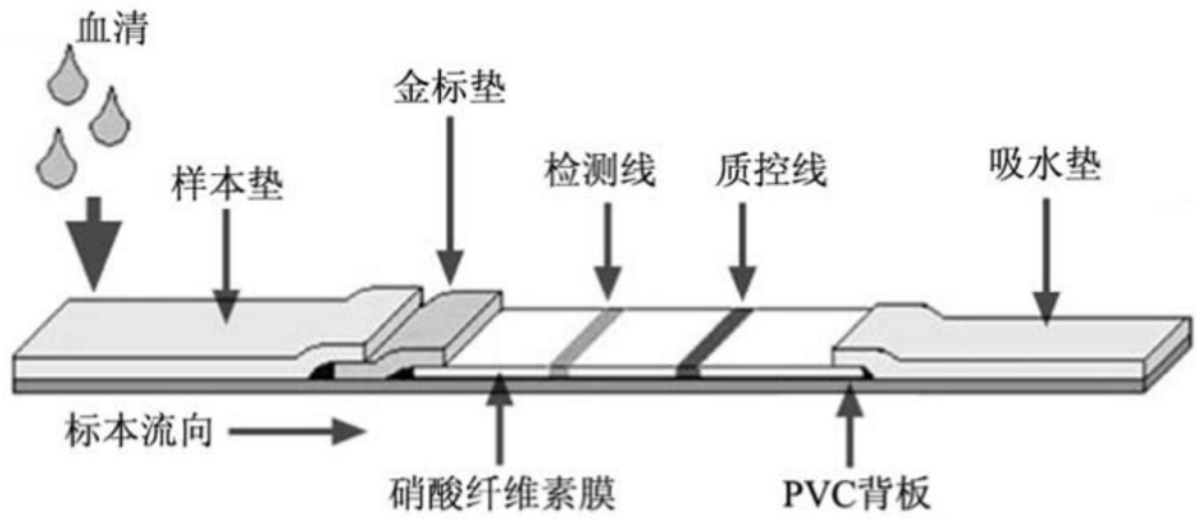


图1

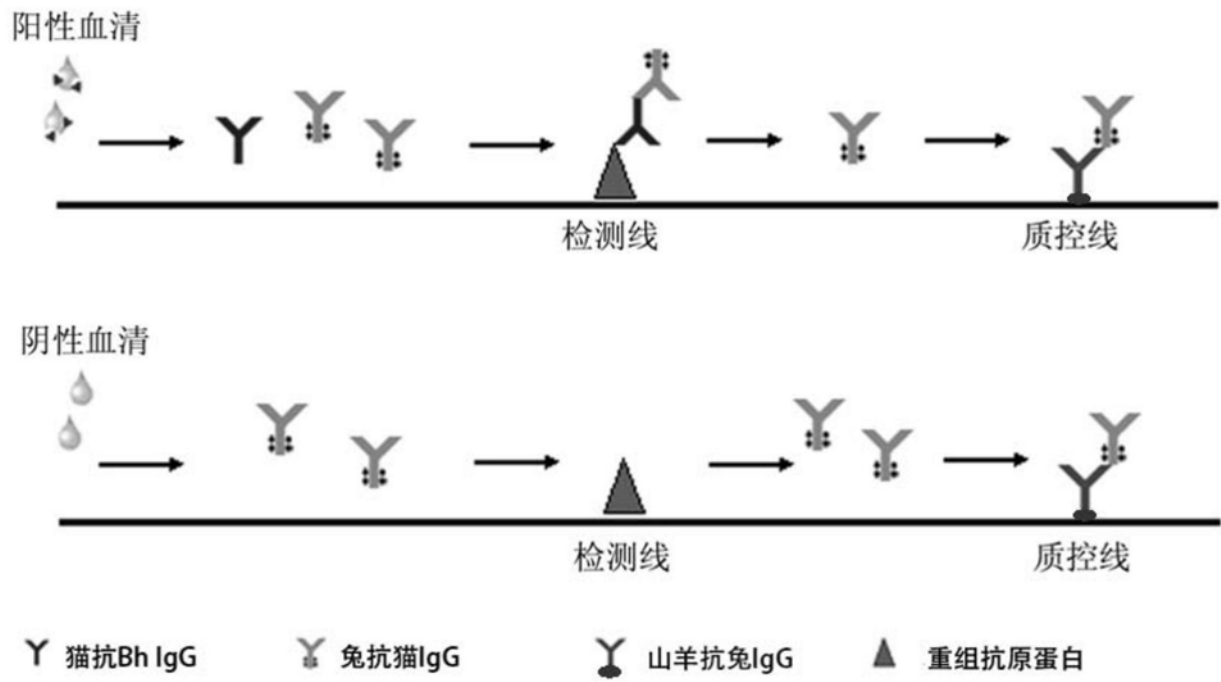


图2

专利名称(译)	快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡及其试剂盒		
公开(公告)号	CN110596395A	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN201910693054.3	申请日	2019-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	刘起勇 秦伟 宋秀平 栗冬梅		
发明人	刘起勇 秦伟 宋秀平 栗冬梅		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/569 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/587 G01N33/6854		
代理人(译)	刘素霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测汉赛巴尔通体抗体的胶体金检测卡，该检测卡包括：基础背板、样本垫、金标垫、检测膜、吸水垫。样本垫、金标垫、检测膜、吸水垫依次排列设置在基础背板上部。金标垫中包被有兔抗猫抗体IgG。检测膜上设置有检测线和质控线，检测线上包被有汉赛巴尔通体抗原，质控线上包被有山羊抗兔IgG。该检测卡能够有效检测血清样本中的汉赛巴尔通体抗体，特异性好，敏感性高。

