

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/558 G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03140430.8

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1595156A

[22] 申请日 2003.9.8 [21] 申请号 03140430.8

[71] 申请人 热带病研究所

地址 510515 广东省广州市同和第一军医大
学院内热带病研究所

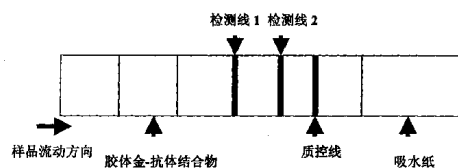
[72] 发明人 李明 吴英松 李妍 李林海
宁云山

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 3 页

[54] 发明名称 检测疟原虫谷氨酸脱氢酶抗原的方法

[57] 摘要

本发明涉及检测疟原虫抗原的方法，特别是涉及使用自测式免疫层析法(ICT) 检测体液样品中的疟原虫谷氨酸脱氢酶(GDH) 抗原，并借以诊断恶性疟或间日疟的方法。 本发明进一步涉及用于所说的方法的层析条。



ISSN 1008-4274

- 1、以免疫层析技术检测血液样品中的恶性疟原虫或间日疟原虫抗原的方法，特征在于其中所使用的抗体是抗疟原虫谷氨酸脱氢酶（GDH）抗体。
- 2、根据权利要求1的方法，特征在于所说的抗体是抗恶性疟原虫 GDH 抗体。
- 3、根据权利要求1的方法，特征在于所说的抗体是抗恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 交叉反应性抗体。
- 4、根据权利要求1的方法，特征在于所说的抗体是单克隆抗体。
- 5、用于权利要求1所述检测方法的抗体。
- 6、根据权利要求5的抗体，特征在于所说的抗体是仅与恶性疟原虫 GDH 结合的抗体。
- 7、根据权利要求5的抗体，特征在于所说的抗体是可与恶性疟原虫和间日疟原虫结合的交叉反应性抗体。
- 8、根据权利要求5的抗体，所说的交叉反应性抗体是用胶体金或乳胶颗粒标记的。
- 9、根据权利要求5的抗体，所说的交叉反应性抗体可与恶性疟原虫 GDH 的不同抗原决定基结合。
- 10、用于检测血液样品中恶性疟原虫和间日疟原虫的检测条，其中包括试剂载体条，及其上面吸附的抗恶性疟原虫 GDH 抗体、抗恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 交叉反应性抗体，以及抗 GDH 抗体的第二抗体。

检测疟原虫谷氨酸脱氢酶抗原的方法

发明的所属领域

本发明涉及检测疟原虫抗原的方法，特别是涉及使用自测式免疫层析法 (ICT) 检测体液样品中的疟原虫谷氨酸脱氢酶 (GDH) 抗原，并借以诊断恶性疟或间日疟的方法，以及用于该方法的检测条。

发明的背景

疟疾是广泛流行于热带、亚热带及温带边缘地区的一种重要虫媒传染病。在所有虫媒传染性疾病中，疟疾是发病率和死亡率最高的疾病之一。目前世界上仍有 90 多个国家、24 亿人生活在疟疾流行区。每年有 5 亿人发病，250 多万人死亡。发病和死亡的病例中，90% 是在非洲和亚洲的贫穷国家。据不完全统计，目前中国全国估计每年有 25—30 万人发病。另外，疟疾还是造成进入疟区部队非战斗减员的主要疾病之一。面对疟疾对人类造成的严重威胁，世界卫生组织 (WHO) 提出进一步研究与开发更有效的疟疾防治药物和诊断技术，以达到 2010 年全球疟疾死亡人数减少 50%，2015 年再减少 50% 的目标。

由于受各种因素的影响，疟疾疫苗的研制进展缓慢，因此实现疟疾的快速有效的诊断和治疗就显得尤为重要。八十年代以来，随着分子生物学的发展和基因诊断技术的出现，疟疾诊断方法也在不断改进，显示了较高的敏感性和特异性，且实现了疟疾的早期快速诊断。然而，这些方法都需要使用复杂的仪器设备和条件，所以难以在基层推广应用。

以检测疟原虫特异性抗原为基础的免疫学方法具有快速、简便、可靠等优点，在疟疾诊断上日益受到重视。

目前常用的检测方法中，所使用的靶抗原主要是相对特异的疟原虫富组氨酸蛋白 II (HRP II) 和乳酸脱氢酶 (LDH)。但基于靶抗原 HRP II 的诊断方法

(Parasight-F 及 ICT)存在某些缺点, 这些缺点包括: 由于 HRPII 只存在于无性期和早期配子体中, 故不能检测仅含有成熟配子体的血液样品; 临床症状已消失、血液中虫体已被清除之后, HRPII 仍会存在很长一段时间; 由于抗 HRPII 单克隆抗体可能与类风湿因子产生交叉反应, 因而可能导致假阳性。

相对地, 基于以 LDH 为靶抗原的诊断方法则较好地解决了这些问题。与传统的镜检法相比, 其敏感性在 86%至 93%之间, 特异性在 92%至 97%之间, 其准确性高于已知以疟原虫 HRP II 为诊断靶抗原的 Parasight-F 和 ICT 方法。

发明目的

本发明的一个目的是提供一种以免疫层析技术检测血液样品中的恶性疟原虫或间日疟原虫抗原的方法, 特征在于其中所使用的抗体是抗疟原虫谷氨酸脱氢酶 (GDH) 抗体。

根据本发明方法的一个优选实施方案, 特征在于所说的抗体是抗恶性疟原虫 GDH 抗体。

根据本发明方法的另一个优选实施方案, 特征在于所说的抗体是抗恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 的交叉反应性抗体(以下简称为交叉反应性抗体)。

根据本发明方法的优选实施方案, 特征在于所说的抗体是单克隆抗体。

本发明的另一个目的是提供用于本发明的检测方法的抗体。

根据本发明抗体的一个优选实施方案, 特征在于所说的抗体仅与恶性疟原虫 GDH 结合的抗体。

根据本发明抗体的另一个优选实施方案, 所说的抗体是可与恶性疟原虫和间日疟原虫结合的交叉反应性抗体。

根据本发明抗体的再一个优选实施方案, 所说的交叉反应性抗体是用胶体金或乳胶颗粒标记的。

根据本发明的再一个优选实施方案, 其中所说的胶体金颗粒的粒度为 20-30nm。

根据本发明的再一个优选实施方案, 其中所说的血液样品可以是血浆、全血或血清。

根据本发明抗体的再一个优选实施方案，所说的交叉反应性抗体可与恶性疟原虫 GDH 的不同抗原决定基结合。

本发明的再一个目的是提供用于检测血液样品中恶性疟原虫或间日疟原虫的检测条，其中包括试剂载体条、抗恶性疟原虫 GDH 抗体、抗恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 交叉反应性抗体，以及羊或兔抗小鼠 IgG 抗体的第二抗体。

附图简要说明

图 1 显示恶性疟原虫基因组 PCR 扩增结果。其中泳道 M 是分子量标志；泳道 1, 2 是 PCR 产物；泳道 3 是阴性对照

图 2 显示 pGEX-GDH 重组质粒的酶切鉴定。其中泳道 1-5 是 pGEX-GDH 的 *EcoR* I+*Sal* I 酶切片段；泳道 6 是 pGEX-4T-1 的 *EcoR* I+*Sal* I 酶切片段；泳道 7 是 PCR 产物；泳道 M 是分子量标志。

图 3 显示重组蛋白的 SDS-PAGE 分析。其中泳道 M 是蛋白质分子量标准；泳道 1 是 pGEX-4T-1/BL21；泳道 2 是 pGEX-GDH/BL21；泳道 3 是 pGEX-GDH/BL21 超声处理后的上清；泳道 4 是 pGEX-GDH/BL21 超声处理后的沉淀；泳道 5 是经 3mol/L 尿素洗后的包涵体；泳道 6 是纯化的重组蛋白质。

图 4 显示重组蛋白的 Western-blot 分析。其中泳道 M 是蛋白质分子量标准；泳道 1 是 pGEX-GDH/BL21；泳道 2 是 pGEX-4T-1/BL21。

图 5 显示多克隆抗体的 Western-blot 分析。其中泳道 M 是蛋白质分子量标准；泳道 1 是间日疟原虫；泳道 2 是恶性疟原虫；泳道 3 是正常人红细胞。

图 6 显示用于本发明检测方法的检测试剂载体条上的试剂分布模式图。

发明的详细描述

以免疫学为基础的血清学检测，由于其具有操作简便快速和结果易于判定等优点，所以已成为疟疾诊断的主要方法。免疫学检测主要是利用单克隆抗体检测疟原虫的特异性抗原（即所谓抗原捕获法）。目前报道的被检抗原主要是 HRP II 和 LDH。

根据疟疾流行区偏僻、落后的特点，迄今已开发了多种适合疟疾流行区现场使用的免疫层析检测方法和相应的试剂条，例如检测恶性疟原虫的商品检测条

ParaSight-F(dipstick)和 ICT Malaria *P. f*(ICT1), 以及同时检测恶性疟原虫和非恶性疟原虫的商品检测条 OptiMAL 和 ICT Malaria *P. f/P. v* (ICT2)等。这些检测方法和检测条基本上都是基于疟原虫 HRP II 或 LDH 抗原的。其原理为利用硝酸纤维素膜 (NC) 制备免疫层析测试条, 在 NC 上包被抗被检抗原的一株单克隆抗体作为捕获带, 同时, 将另一株单克隆抗体偶联在胶体金或乳胶上作为检测试剂。当样品溶液和检测试剂通过捕获带时, 二者形成的复合物即被包被在膜上的抗体捕捉, 如果样品中含有被检抗原, 则捕获带可发生颜色反应, 并且颜色反应的强弱与样本中的抗原浓度成正比。虽然这些方法和检测条同样具有使用上简便快捷, 不需特殊仪器和适于基层医院或防疫部门大面积普查使用等优点, 但它们的特异性和敏感性仍受到一定的限制。

为了进一步寻找具有更高特异性和敏感性的靶抗原, 近年来人们也已对疟原虫的另一种重要代谢酶—谷氨酸脱氢酶 (GDH) 引起了的关注。

GDH 是一种普遍存在于生物体内对碳、氮代谢起重要作用的酶, 在疟疾的整个红内期均能表达。该酶催化谷氨酸脱氨基生成 α -酮戊二酸, 并使辅酶 I 和 II 由氧化型 (NAD^+ 、 NADP^+) 转化为还原型 (NADH 、 NADPH)。以前的研究已揭示, 疟原虫 GDH 与脊椎动物组织的 GDH 在理化性质、酶学特性及生物学活性上均有较大差异, 如疟原虫 GDH 活性不受嘌呤核苷酸 (GTP、ADP) 的影响, 而脊椎动物组织的 GDH 可被 GTP、ADP 激活或抑制; 疟原虫 GDH 以辅酶 II 为其辅酶, 而脊椎动物组织的 GDH 可以辅酶 I 或 II 作为辅酶。临床和实验研究证据表明, 疟原虫比其宿主细胞更易受氧化压力影响。因此, 参与巯基代谢及参与还原型辅酶 II (NADPH) 再生的脱氢酶对于疟原虫免受宿主体内氧化剂损伤及维持生存起着极其重要的作用。疟原虫 GDH 被认为是 NADPH 生成的主要来源, 而且更为重要的是, 宿主红细胞内没有此酶。另外, Ling 等人 (Ling IT, et al. 1986; Parasitology. 92:313-324) 的研究结果初步证明, 疟原虫 GDH 可能具有一定的种属特异性。Rodriguez-Acosta 等人 (Rodriguez-Acosta A, et al. 1998; Braz J Med Biol Res. 31:1149-1155; Rodriguez-Acosta A, et al. 1999; Indian J Med Res. 109:152-156) 利用变形杆菌 GDH 交叉反应性抗体检测疟疾感染者血浆和疟原虫培养上清中的 GDH 酶活性, 借以诊断恶性疟原虫感染并取得了较满意的结果, 因而推测有可能使用谷氨酸脱氢酶作为疟疾的诊断分子。由于疟原虫 GDH

只能由活虫体产生，而且血液中疟原虫量与 GDH 水平呈线性关系，所以也可能根据血液中的 GDH 水平监测感染过程和抗疟药物的治疗效果。基于上述这些发现，本发明人试图利用已知的免疫层析检测系统，以疟原虫 GDH 作为靶抗原，完成恶性疟或间日疟的诊断。

因此，本发明的一个目的是提供一种以免疫层析技术同时检测血液样品中的恶性疟原虫或间日疟原虫抗原的方法，特征在于其中所使用的抗体是抗疟原虫 GDH 抗体。

如前所述，虽然目前常用的检测方法基本上都是检测相对特异的疟原虫 HRP II 和 LDH，但包括我们实验室在内的有关基础研究表明，有可能使用具有种属特异性并只能由活虫体产生的，特别是红细胞内不存在的疟原虫谷氨酸脱氢酶作为检测疟原虫的靶抗原。事实上，我们初步实验结果显示，以疟原虫谷氨酸脱氢酶为靶抗原的疟原虫检测方法比以疟原虫 HRP II、LDH 为靶抗原的方法具有更好的特异性和敏感性。

因此，根据本发明方法的一个优选实施方案，本发明方法中使用的抗体是抗恶性疟原虫 GDH 抗体、抗恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 的交叉反应性抗体，以及胶体金颗粒标记的交叉反应性抗体。所说的抗体最好单克隆抗体。并且所说的抗体是哺乳动物特别是小鼠来源的。

可以使用本领域已知的常规方法制备并用胶体金或乳胶颗粒标记所说的单克隆抗体（参见实施例 1）。其中，最好使用带有红颜色的胶体金颗粒标记抗体，并且所说的胶体金颗粒的粒度最好是在 20-30nm 之间。

本发明的方法可用于同时检测恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH，也可以检测单一的恶性疟原虫 GDH 或间日疟原虫 GDH。

在本发明的基于免疫层析技术（ICT）的疟原虫抗原检测方法中，使用对液体样品和溶液态检测试剂有很好吸附和扩散能力纤维素材料，特别是硝酸纤维素（NC）或玻璃纤维素薄膜作为载体。例如在同时检测恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 的情况下，可以在 NC 膜上设置分别包被抗恶性疟原虫 GDH 抗体的检测线 1、包被交叉反应性抗体的检测线 2，以及上端包被抗小鼠 IgG 抗体（第二抗体）的质控线。为了避免试剂溶液和/或介质的流溢，层析条的顶端可接有一

段吸水纸。其中所说的第二抗体可以是羊或兔抗小鼠 IgG 抗体，并且可以是纯化的单克隆或多克隆抗体。

使用本发明的方法检测血液样品中恶性疟原虫 GDH 或间日疟原虫 GDH 时，将层析条置于含有被检样品中，如待检样品中存在疟原虫 GDH，它首先与胶体金标记的抗恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 的交叉反应性抗体结合，疟原虫 GDH 和胶体金-抗体结合物接触到检测线 1 处的抗恶性疟原虫 GDH 抗体时，如果被检样品中存在有恶性疟原虫抗原，该抗原与检测试剂形成的复合物即可被包被在层析条上检测线 1 处的抗恶性疟原虫 GDH 抗体捕获，形成恶性疟特异抗体-恶性疟原虫 GDH 抗原-交叉反应抗体复合物，部分胶体金颗粒便在此处沉着而显示出一条红色带。当检测试剂的其余部分通过检测线 2 时，如果被检样品中存在有恶性疟原虫或间日疟原虫抗原，该抗原与检测试剂形成的复合物即可被包被在层析条上检测线 2 处的恶性疟原虫和间日疟原虫交叉抗体捕获，形成新的交叉反应抗体-恶性疟原虫或间日疟原虫 GDH 抗原-交叉反应抗体复合物，并且又有部分胶体金颗粒在此线上沉着而显示出一条红色带。因此，本发明的层析条可用于同时检测恶性疟原虫 GDH 或间日疟原虫 GDH 抗原。

为了确保试剂条检测的可靠性和准确性，层析条上检测线的上端还设有预包被了羊或兔抗小鼠免疫球蛋白 (IgG) 抗体 (第二抗体) 的质控线。当含有恶性疟特异抗体-恶性疟原虫 GDH 抗原-交叉反应抗体复合物或交叉反应抗体-恶性疟 GDH 或间日疟 GDH 抗原-交叉反应抗体复合物的溶液继续向前泳动并接触到包被在质控线处的第二抗体时，如果用于捕获疟原虫表面 GDH 抗原的抗疟原虫 GDH 抗体是特异的并且是特定哺乳动物来源的，上述抗体-抗原-抗体复合物便可与该第二抗体结合，形成新的抗体-抗原-抗体-第二抗体复合物，并且携带于复合物中的胶体金颗粒同样会在该质控线上沉着而显示出一条红色带 (参见实施例 2)。

因此，基于上述反应原理，层析完成后可根据层析条上各检测线处有无红色线条来判定检测结果，并可根据颜色的深浅对被检材料进行半定量分析。一般说来，阳性反应为质控线出现阳性的前提下，两条检测至少出现一条。第一检测线呈红色或第一和第二检测线同时呈红色判断为恶性疟原虫感染。仅第二检测线呈红色判断为间日疟原虫感染。阴性反应则只在质控线上显示红颜色。

总之，本发明的基于 ICT 技术检测血液样品中疟原虫抗原的方法，由于使用具有种属特异性并只能由活虫体产生的，特别是红细胞内不存在的疟原虫谷氨酸脱氢酶作为检测疟原虫的靶抗原，所以本发明的方法不仅具有较高阳性活虫检出率，而且与使用组氨酸蛋白 II (HRP II) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的已有方法相比，本发明的方法还表现有更好的特异性和准确性。因此，本发明为疟疾诊断领域提供了一种可供选择的新方法。

实施例

实施例 1：抗疟原虫抗体的制备

本实施例举例描述本发明的恶性疟原虫和间日疟原虫免疫层析法中所使用的抗疟原虫抗体材料的制备。

(1) PCR 扩增恶性疟原虫 GDH 基因

以恶性疟原虫基因组 DNA 为模板，PCR 法扩增 GDH 基因片段，引物为：

GDH-P₁: 5' -CCTCGAATTCATGAGTGCTCTTAAAGACAA-3' (SEQ ID NO:1)

GDH-P₂: 5' -CCCTGTCGACTTAAAAAC AACCTTGTTCA-3' (SEQ ID NO:2)。

反应在 50 μ l 体系中进行。循环参数为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，94 $^{\circ}$ C 60 秒 \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 40 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90 秒，共 33 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳显示在约 1430bp 处有一特异扩增条带，分子量大小与已报道的恶性疟原虫 Thailand 株的 GDH 一致(图 1)。

(2) 重组表达质粒的构建及鉴定

PCR 产物经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀后溶解于水中并用 EcoR I/Sal I 双酶消化。取 30 μ l 连接混合物转化 TG1 感受态细胞。被转化的细胞经 37 $^{\circ}$ C 培养过夜挑取 9 个单菌落，分别培养后，以提取的质粒 DNA 为模板 PCR 扩增得到大小约 1430bp 的单一条带。上述克隆质粒进一步用 EcoR I+Sal I 双酶切后可产生约 4900bp 及 1430bp 两条带，而空载体酶切后只有 4900bp 的一条带(图 2)。测定的恶性疟原虫海南株 (FCC1/HN) 的 GDH 基因编码区序列 (GenBank 登录号为 AY040586)，显示其全度长为 1410bp，其中无内含子，A+T/G+C 构成比为 2.27:1，符合恶性疟原虫结构基因富含 A+T 碱基的特点。预测其编码 470 个氨

基酸，分子量为 52KD，等电点约为 7.43。结果表明 GDHpf 基因已被正确克隆到 pGEX-4T-1 载体中，从而得到定名为 pGEX-GDH 的重组质粒。

(3) 表达产物分析

将阳性克隆株接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中保温过夜，次日按 1% (V/V) 比例转入相应的新鲜培养液中。当培养物的 OD₆₀₀ 值达到 0.8 时，加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L，30℃ 诱导培养 4 小时收菌。经 SDS-PAGE 检测，可见重组子表达产物显示为一条分子量约为 66KDa 的新的蛋白条带，作为对照的空质粒载体的表达产物则只显示一条约 29KDa 的条带(图 3)。用制备性电泳法纯化的重组蛋白为抗原并使用鼠抗恶性疟原虫血清对表达产物进行 ELISA 分析，结果可见鼠抗恶性疟原虫血清能够与 pGEX-GDH 表达产物反应，而与 BL21 和 pGEX-4T-1 转化菌的表达产物无反应。然后将工程菌的表达产物电转移至硝酸纤维素膜上，以鼠抗恶性疟原虫血清为抗体进行 Western 印迹分析，结果显示在 66KDa 蛋白处出现一特异性反应条带，而 pGEX-4T-1 转化的细菌则未见相应的带(图 4)。

用纯化后的重组蛋白免疫小鼠，40 天后以琼脂扩散法检测效价达 1:16。Western-blot 分析结果显示该血清能识别恶性疟原虫和间日疟原虫分子量约为 49KDa 处的虫源蛋白，但与红细胞则几乎无反应(图 5)，上述结果为以疟原虫 GDH 作为疟疾诊断靶抗原提供了免疫学依据。。

(4) 抗恶性疟原虫 GDH 抗体的制备

使用 19-21 周龄的 Balb/C 小鼠作为被免疫动物。首先用纯化的恶性疟原虫 GDH 75 μg 加等体积完全弗氏佐剂乳化后，皮下多点注射进行基础免疫。2 周后，以在不同完全弗氏佐剂中乳化的同样剂量蛋白进行追加免疫。追加免疫后 2 周，再次用不含弗氏佐剂的同样剂量蛋白腹腔注射，以进行加强免疫。末次免疫后，从动物的尾静脉采血并测试抗体效价。必要时，可于处死动物分离脾细胞前 3 天，再加强免疫一次。

血清抗体效价达到足够的水平后，处死动物并分离脾细胞，按适当比例将被免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞混合并在 PEG-4000 作用下融合之。

适当稀释恶性疟原虫 GDH 并纯化蛋白后，用所得稀释液包被微量滴定板，然后以间接 ELISA 法检测杂交瘤阳性克隆，并用有限稀释法对检出的阳性克隆

进行亚克隆。经四次亚克隆后，共筛选出 15 株分泌抗恶性疟原虫 GDH 的杂交瘤细胞株。进一步试验表明，其中有 11 株为恶性疟原虫特异性的，4 株为既能与恶性疟原虫 GDH 发生反应，又能与间日疟原虫 GDH 发生交叉反应。经配对实验得到一株仅与恶性疟原虫 GDH 产生反应的单克隆抗体(5C3)；两株可与恶性疟原虫 GDH 和间日疟原虫 GDH 发生交叉反应，且可与不同结合位点结合的单克隆抗体(2H1 和 14B9)。

ELISA 试验表明，在体外培养条件下，得自杂交瘤培养物上清的抗体 5C3、2H1 和 14D9 的效价分别为 1: 512、1: 256 和 1: 256。在体内培养条件下，得自动物腹水液的抗体效价为分别 1: 25600、1: 12800 和 1: 12800。进一步的抗体分型实验结果显示，5C3 杂交瘤细胞分泌的抗体类型为 IgG1，2H1 和 14B9 杂交瘤细胞分泌的抗体类型均为 IgG2a。对三株杂交瘤细胞的形态学观察可见，它们的染色体数目范围在 92—110 之间，并且大多数为端着丝点，少数为亚中部及中央着丝点。

(3) 14B9 单克隆抗体的纯化和胶体金标记

用蛋白 G Sepharose 4 Fast Flow 柱 (Amersham) 纯化腹腔内接种杂交瘤 (细胞株 14B9) 后得到的小鼠腹水液。采用柠檬酸三钠还原法制备 20-30nm 胶体金颗粒。取纯化的单抗 14B9 0.5mg，在磁力搅拌条件下缓慢加到 20ml 胶体金溶液中并室温搅拌 30 分钟，然后加入 10%BSA 0.8ml 并室温搅拌 5 分钟，最后再加入 10%PEG 0.4ml 并室温搅拌 5 分钟。处理后，将所得到的胶体金-抗体结合物于 4℃ 15000rpm 离心 60 分钟。离心后，收集沉淀物并溶解于 2ml 保存液中，然后用 0.45 μ m 滤膜过滤。取胶体金-抗体结合物原液 2ml，用稀释液稀释至 14ml。将用作层析条的玻璃纤维素膜浸泡在胶体金-抗体溶液 10 分钟，37℃ 烤干后热合封口并置于 4℃ 下保存备用。

(4) 抗体固相硝酸纤维素膜的制备

用固相溶液(0.02mol/L PB, pH8.0)将纯化的 5C3 和 2H1 单抗稀释至 3mg/ml，同时取羊抗小鼠 IgG 用固相溶液稀释至 1mg/ml。将三种抗体分别点样在硝酸纤维素膜上(5C3、2H1 和羊抗小鼠 IgG 分别加样于检测线 1、检测线 2 和质控线处)，然后将硝酸纤维素膜置于封闭液(1%脱脂奶粉)中 37℃ 孵育 1 小时。保温后，在洗涤液(0.02mol/L PB, pH7.0)中将负载固相化抗体的硝酸纤维素膜浸洗二

次，然后室温风干并置 4℃ 下保存。

(5) 免疫层析条的制作

按图 6 所示，在双面胶白色塑料板 25mm 端内侧粘附抗体固相硝酸纤维素膜；在双面胶白色塑料板 25mm 端中间粘附金标抗体结合物-玻璃纤维素膜条，并在其上面覆盖一条 25mm 宽的玻璃纤维素膜条并与抗体固相硝酸纤维素膜重叠 2mm，再粘附一层白色胶带；在双面胶白色塑料板 50mm 端粘附 32mm 宽吸水纸与抗体固相硝酸纤维素膜重叠 2mm，并粘附一层白色胶带；在切条机上切成 5mm 宽的条带，即完成免疫层析条的制作。

实施例 2：血液样品中疟原虫的检测

本实施例举例描述使用本发明的抗疟疾单克隆抗体，以免疫层析法检测血液样品中恶性疟原虫或间日疟原虫的方法。

具体步骤如下：用裂解液将 10ul 血样稀释至 100ul，加入反应盘内并将制备的免疫层析条垂直放于反应盘上，待稀释的血样全部吸收到条上并用 PBS-Tween20 (pH7.4) 洗涤后，即可清晰看到反应结果。阳性反应为质控线出现阳性的前提下，两条检测至少出现一条。第一检测线呈红色或第一和第二检测线同时呈红色判断为恶性疟原虫感染。仅第二检测线呈红色判断为恶性疟原虫感染。阴性反应则只有一条红色的质控线。

在实验室研究的基础上，我们使用本发明的方法共检测了门诊可疑疟疾患者血液样品 89 份。以镜检法检查的结果作为标准，对使用疟原虫 GDH 和疟原虫 LDH 作为被检抗原检测疟原虫感染的结果进行比较，结果如下列表 1 所示。

表 1. GDH 检测法和 LDH 检测法检测疟疾的比较

镜检		GDH 检测条		LDH 检测条	
种类	例数	阳性	阴性	阳性	阴性
恶性疟原虫	35	32	3	30	5
间日疟原虫	18	18	0	17	1
混合感染	8	8	0	8	0
阴性	28	0	28	1	27

由表 1 所示的结果可以看出,镜检法检查 89 份样品中有 61 (68.54%) 份检出疟原虫,其中 35 (57.38%) 份为恶性疟原虫, 18 (29.51%) 份为间日疟原虫, 8 (13.11%) 份为两种疟原虫混存。由于以疟原虫 LDH 和 GDH 为靶抗原的 ICT 法都不能诊断混合感染,因此镜检法检出的 8 份混合感染的血样在 ICT 检测法中都判定为恶性疟原虫感染。以疟原虫 LDH 为靶抗原的 ICT 法则检出 56 (62.92%) 份阳性血样,其中 38 (67.86%) 份为恶性疟原虫, 17 (30.36%) 份为间日疟原虫。本发明的以 GDH 为被检抗原的 ICT 方法检出 58 (65.17%) 份阳性血样,其中 40 (68.97%) 份为恶性疟原虫, 18 (31.03%) 份为间日疟原虫。

以镜检法为参考标准, GDH 检测法和 LDH 检测法检测疟疾的阳性检出符合率分别为 95.08%和 90.16%, 特异度分别为 100% (28/28) 和 96.43 (27/28)。

序列表

<110> 热带病研究所

<120> 检测疟原虫谷氨酸脱氢酶抗原的方法

<140>

<141>

<160> 3

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 1

CCTCGAATTC ATGAGTGCTC TTAAAGACAA

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 2

CCCTGTCGAC TTAAAAACAA CCTTGTCA

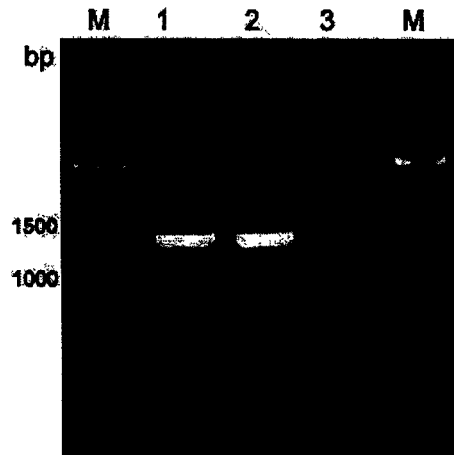


图 1

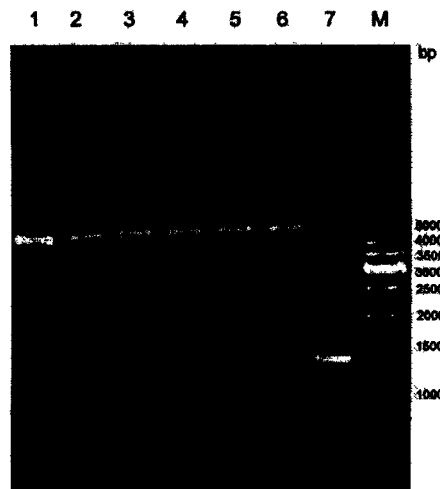


图 2

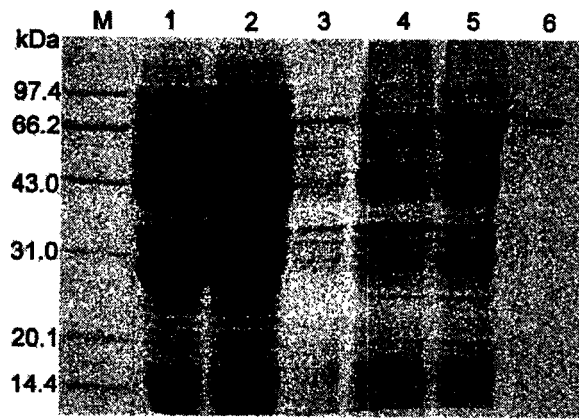


图 3

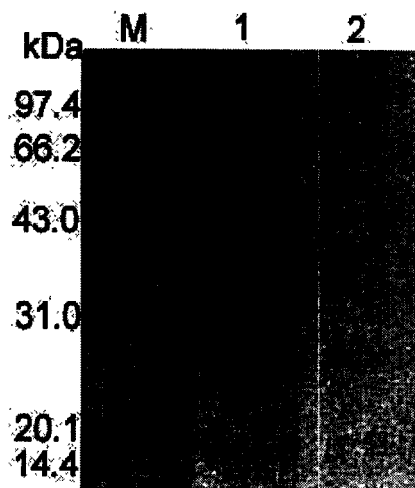


图 4

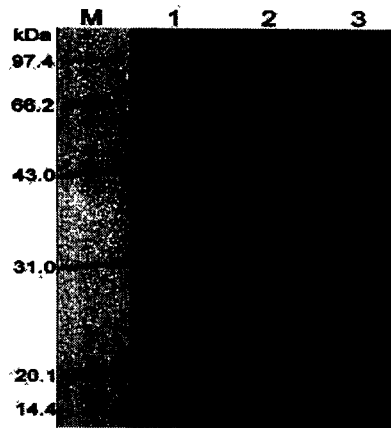


图 5

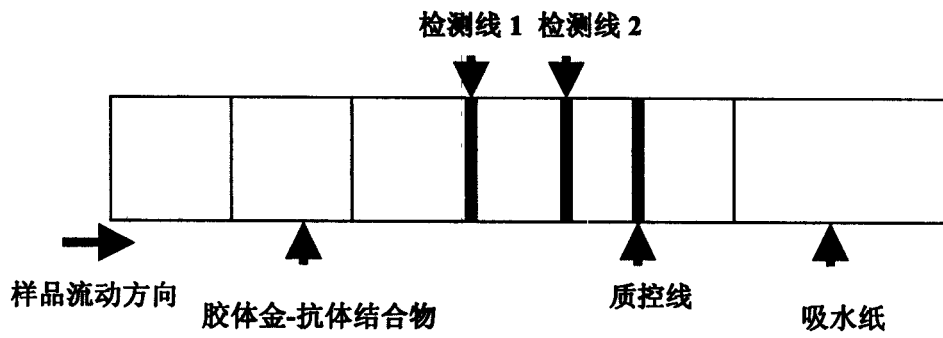


图 6

专利名称(译)	检测疟原虫谷氨酸脱氢酶抗原的方法		
公开(公告)号	CN1595156A	公开(公告)日	2005-03-16
申请号	CN03140430.8	申请日	2003-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	热带病研究所		
申请(专利权)人(译)	热带病研究所		
当前申请(专利权)人(译)	热带病研究所		
[标]发明人	李明 吴英松 李妍 李林海 宁云山		
发明人	李明 吴英松 李妍 李林海 宁云山		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558 G01N33/569		
CPC分类号	Y02A50/58		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测疟原虫抗原的方法，特别是涉及使用自测式免疫层析法(ICT)检测体液样品中的疟原虫谷氨酸脱氢酶(GDH)抗原，并借以诊断恶性疟或间日疟的方法。本发明进一步涉及用于所说的方法的层析条。

