



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101900727 A

(43) 申请公布日 2010.12.01

(21) 申请号 201010194736.9

*C12N 15/70* (2006.01)

(22) 申请日 2010.06.01

*C12N 1/21* (2006.01)

(83) 生物保藏信息

*C07K 19/00* (2006.01)

CCTCC NO:M208244 2008.12.04

*C12R 1/19* (2006.01)

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街  
1号

(72) 发明人 郭爱珍 于清龙 刘冬光 涂玲玲  
陈颖钰 廖娟红 凌洁玉 陈焕春

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001  
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

*G01N 33/558* (2006.01)

*G01N 33/544* (2006.01)

*G01N 33/532* (2006.01)

*C12N 15/62* (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页 序列表 4 页  
附图 9 页

(54) 发明名称

一种应用 Rv3872 新型融合蛋白制备的牛结核抗体鉴别检测试纸条

(57) 摘要

本发明属于动物传染病基因工程技术领域。公开了一种利用 RV3872、ESAT6 和 CFP10 三基因融合蛋白制备的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及制备方法与应用。以融合蛋白作为胶体金标记抗原和硝酸纤维素膜上检测区的捕获抗原建立胶体金免疫层析试纸条。本发明试剂条对牛结核抗体的检测具有特异性强和灵敏度高的突出优点,能同时鉴别检测卡介苗免疫和非结核分枝杆菌感染。本发明包括一种重组大肠杆菌 (*Escherichia coli*)BL21/pET28a-MPBrce, 该菌株表达牛分枝杆菌 RCE 蛋白,其保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC NO:M208244。

1. 一种牛结核抗体的检测试纸条,其包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC背衬,其特征在于,在PVC背衬(7)上按顺序依次粘附有样品垫(1)、结合垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4);所述的结合垫(2)上包被有保藏号为CCTCC NO:M208244的重组大肠杆菌所表达的Rv3872-CFP10-ESAT6蛋白与胶体金的标记物;所述的硝酸纤维素膜(3)上分别包被有Rv3872-CFP10-ESAT6蛋白的检测线(5)、抗Rv3872-CFP10-ESAT6蛋白IgG构成的质控线(6);

其中,Rv3872-CFP10-ESAT6蛋白是以牛分支杆菌全基因组为模板克隆Rv3872、CFP10和ESAT6基因,构建三种基因融合表达的原核表达载体,并在大肠杆菌中表达得到。

2. 一种表达Rv3872-CFP10-ESAT6蛋白的重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21/pET28a-RCE,保藏在中国典型培养物保藏中心,其保藏号为CCTCC NO:M208244。

3. 权利要求2所述的的重组大肠杆菌在制备牛结核抗体检测试纸条上的应用。

## 一种应用 Rv3872 新型融合蛋白制备的牛结核抗体鉴别检测纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及动物细菌学与动物传染病学技术领域。具体地说,是一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应,快速、鉴别检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 牛结核病是一种由牛分枝杆菌引起的慢性消耗性人兽共患病,被国际动物卫生组织(OIE)定的必须通报的疾病之一。2001年和2002年的部分统计结果表明我国个别省市奶牛结核病阳性率高达10%以上。牛结核病的防控措施是“检疫-扑杀”,即采用牛提纯结核菌素(PPD)变态反应进行检疫,对检出的阳性牛进行扑杀。皮内变态反应的基本过程是剃毛、量皮厚、注射结核菌素、72小时后再次量皮厚。该方法具有较多缺陷,如牛结核菌素成分复杂,与环境分枝杆菌和卡介苗具有共同成份而使变态反应出现非特异性反应;感染后期的敏感性降低;结果判断主观性强;操作复杂,劳动强度大,需要时间长等,这些均使我国“检疫-扑杀”政策的实施效果大打折扣;此外,皮试反应只能进行活体现场检测,不能保存样品并进行回顾性分析。除牛外,其它动物的皮试反应未进行过标准化。野生动物因为难以捕捉,很难进行皮试反应。因此,临床上需要一种适合于不同动物、操作简便、能鉴别卡介苗免疫和环境分枝杆菌感染的灵敏特异的检测方法。胶体金试纸条就是一种被认为适合于“栏圈旁”检测的简易方法。该方法是20世纪80年代发展起来的一项新的免疫分析方法,是应用胶体金标记技术,以胶体金作为示踪物,应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。它具有简便,快速,特异性强,灵敏度高,费用低的优点。依据胶体金免疫层析技术,在国内外无论人医应用方面,还是兽医应用方面,都已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测试纸条。

[0003] 由于牛结核感染过程中抗体产生较晚,且不同时期出现针对不同蛋白的抗体,因此,针对单个蛋白设计的抗体检测方法虽然简便但灵敏度不高。各个科学家都在通过同时应用多种诊断抗原以提高灵敏度,这种方法被称为“鸡尾酒”法(Siguo Liu, Sheping Guo, Chunlai Wang, Meili Shao, Xiuhua Zhang, YangGuo and Qiang Gong. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 2006, 3; C. Aagaard, M. Govaerts, V. Meikle, A. J. Vallecillo, J. A. Gutierrez-Pabello, F. Suarez-Güemes, [J]. McNair, A. Cataldi, C. Espitia, P. Andersen, and J. M. Pollock, Optimizing Antigen Cocktails for Detection of Mycobacterium bovis in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity, [J]. *Clin Microbiol*, 2006, 44(12): 4326-4335; Cockle PJ, Gordon SV, Hewinson RG, Vordermeier HM. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of Mycobacterium bovis in cattle [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(10): 1119-1124; Kanaujia GV, Garcia MA, Bouley DM, et al. Detection of early

secretory antigenic target-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates[J]. *Comp Med* 2003, 53(6):602-606)。本课题组前期研究中,进行了多种牛分枝杆菌特异性抗原蛋白的融合表达,最后发现, Rv3872、CFP10、ESAT6 的融合蛋白作用牛结核诊断抗原具有灵敏度高、特异性好、可区别卡介苗免疫与非结核分枝杆菌的干扰。

[0004] Rv3872 和 CFP10 及 ESAT6 蛋白同属牛分枝杆菌的差异基因区 (RD1 区), 是 ESAT6-CFP10 复合体转运系统中的关键因子, 敲除 Rv3872 会中止复合体的合成与分泌, 可能参与了复合体的合成、分泌过程 (Priscille Brodin, Laleh Majlessi, Laurent Marsollier, Marien I. de Jonge, Daria Bottai, Caroline Demangel, Jason Hinds, Olivier Neyrolles, Philip D. Butcher, Claude Leclerc, Stewart T. Cole, and Roland Brosch, Dissection of ESAT-6 System 1 of Mycobacterium tuberculosis and Impact on Immunogenicity and Virulence. *Infection and Immunity*, 2006, 74(1):88-98)。有研究证明结核分枝杆菌的 Rv3872 能诱导结核病人产生显著的抗体反应 (P. Mukherjee, M. Dutta, P. Datta, A. Dasgupta, R. Pradhan, M. Pradhan, M. Kundu, J. Basu and P. Chakrabarti, The RD1-encoded antigen Rv3872 of Mycobacterium tuberculosis as a potential candidate for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13(2):146-152), 鉴于牛分枝杆菌与结核分枝杆菌在基因组水平上有 99.95% 的同源性, 提示该蛋白可能具有应用于牛结核血清学诊断的潜力。

[0005] 申请者的前期工作即授权专利 (专利号 ZL 2006101665510; 发明名称: 检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条, 授权公告日: 2009 年 6 月 3 日) 也是一种牛结核抗体检测方法, 但该方法不具备鉴别诊断功能, 不能区分卡介苗和非结核分枝杆菌感染, 而本发明是针对毒力型牛分枝杆菌的特异性早期分泌蛋白设计的免疫胶体金试纸条, 除了具上已授权专利的灵敏度与特异性外, 还具有鉴别诊断的新功能。

## 发明内容

[0006] 本发明目的在于克服现有技术的不足, 提供一种应用 Rv3872 新型融合蛋白制备的牛结核抗体鉴别检测试纸条, 该试纸条适合于早期鉴别诊断, 具有特异性强、灵敏度高, 操作简便, 检测快速、准确的特点, 专门用于检测牛结核病的抗体的免疫层次试纸条, 为我国牛结核病防治提供一种新型试剂盒和新方法。

[0007] 鉴于以上三种牛分支杆菌特异性分泌蛋白的 Rv3872、CFP10 和 ESAT6 的特性, 以及现阶段牛结核诊断方法研究现状, 本发明以牛分支杆菌全基因组为模板克隆了 Rv3872 (基因登录号: NC 002945)、CFP10 基因 (基因登录: NC 002945) 和 ESAT6 基因 (基因登录号 NC002945), 并构建了三种基因融合表达的原核表达载体, 在大肠杆菌中表达。在所述的每种蛋白 (Rv3872、CFP10 和 ESAT6) 之间加入了连接序列以最大限度地保证融合蛋白中各个蛋白的空间构象和活性不受影响 (见图 8)。对纯化的 Rv3872-CFP10-ESAT6 融合蛋白活性进行了鉴定和 ELISA 初步验证 (刘冬光, 郭爱珍等, 融合蛋白 Rv3872/CFP-10/ESAT-6 的制备及在牛结核诊断中的初步应用, *中国奶牛*, 2009(10):7-11), 表明上述三蛋白融合抗原的牛结核抗体检出率显著高于由申请人所在的农业微生物学国家重点实验室自行克隆表达的 CFP10-ESAT6 二蛋白融合抗原 (张桂荣、郭爱珍等, 间接 ELISA 检测牛分枝杆菌抗体方法的建立及初步应用. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(29):555-560; 张书环、郭爱珍等, 牛分枝

杆菌抗原 MPB70、MPB83、CFP-10 和 ESAT-6 的融合表达及相关特性分析. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(12):1238-1242), 因此, 本发明应用新型融合蛋白制备成牛结核抗体鉴别诊断胶体金免疫层析试纸条, 证实该产品具有简便、灵敏、特异等优点, 为牛结核病的快速鉴别诊断提供了更加有效的工具。

[0008] 本发明总体技术路线如附图 1 所示。

[0009] 本发明通过以下技术方案实现：

[0010] 一种牛结核抗体的检测试纸条, 其包括样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和 PVC 背衬。在 PVC 背衬 (7) 上按顺序依次粘附有样品垫 (1)、结合垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3)、吸水垫 (4); 所述的结合垫 (2) 上包被有保藏号为 CCTCC NO :M208244 的重组大肠杆菌所表达的 Rv3872-CFP10-ESAT6 蛋白与胶体金的标记物; 所述的硝酸纤维素膜 (3) 上分别包被有 Rv3872-CFP10-ESAT6 蛋白的检测线 (5)、抗 Rv3872-CFP10-ESAT6 蛋白 IgG 构成的质控线 (6);

[0011] 其中, Rv3872-CFP10-ESAT6 蛋白是以牛分支杆菌全基因组为模板克隆 Rv3872、CFP10 和 ESAT6 基因, 并构建三种基因融合表达的原核表达载体, 并在大肠杆菌中表达得到。

[0012] 一种适用于检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条的制备方法, 其步骤包括：

[0013] 1) 克隆牛分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 基因并在重组大肠杆菌中表达, 表达牛分枝杆菌 RCE 蛋白的重组大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21/pET-28a-RCE, 该重组大肠杆菌已于 2008 年 12 月 4 日送交位于湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏, 保藏号为 CCTCC NO :M208244。

[0014] 2) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金；

[0015] 3) 将 RCE 蛋白加入步骤 2) 制备的胶体金中, 得到 RCE 蛋白-胶体金标记物；

[0016] 4) 将得到 RCE 蛋白-胶体金标记物包被在结合垫 (3) 上；

[0017] 5) 将步骤 1) 表达纯化 RCE 蛋白包被在硝酸纤维素膜 (4) 上构成检测线 (5); 并将纯化 RCE 蛋白的 IgG 包被在硝酸纤维素膜 (3) 上构成质控线 (6);

[0018] 6) 在所述的 PVC 背衬 (7) 上按顺序依次粘附所述的样品垫 (1)、结合垫 (3)、硝酸纤维素膜 (4)、吸水垫 (7), 得到所述的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条、将试纸条装到专门的透明外壳 (9) 中、血清稀释液 (8) 专指用于该检测试纸条血清样本稀释的溶液。

[0019] 本发明选用牛分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 作为检测线, 牛分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 作为胶体金标记物, 利用间接法来检测待测血清样品中是否含有 RCE 抗体。当待检样品中为牛结核抗体阳性时, 血清 RCE 抗体与 RCE 蛋白-胶体金标记物结合之后, 在检测线处遇到 RCE 抗原就会出现颜色深浅不同的红色条带, 质控线处出现红色条带, 表示阳性反应 (二条带)。否则只有质控线处出现红色条带 (一条带), 表示阴性反应。

[0020] 本检测试纸条 (如附图 2 所示结构图) 由样品垫 (2)、结合垫 (3)、硝酸纤维素膜 (4)、吸水垫 (7) 按图示的顺序依次粘附在 PVC 背衬 (1) 上组装而成的。结合垫上包被有本发明制备的 RCE 蛋白-胶体金标记物, 硝酸纤维素膜上包被有检测线 (5) 和质控线 (6), 其中检测线为本发明制备的牛分枝杆菌特异抗原蛋白 RCE, 质控线为本发明制备的提纯抗 RCE 蛋白 IgG。所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC 背衬均购自 Millipore 公司。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有以下突出的优点:

[0022] 1、与专利号 ZL 2006101665510 的授权专利比较,本发明具有鉴别和检测双重功能,可区分卡介苗和非结核分枝杆菌,同时具有早期检测功能。

[0023] 2、本发明具有特异性强,灵敏度高,检测时间短(5-10 分钟)的特点。

[0024] 3、本发明的检测试纸条不需要任何特殊仪器、设备,检测成本低。

[0025] 4、本发明的检测试纸条操作简便,不需由专业人员操作。

[0026] 5、本发明的检测试纸条储存方便,对温度要求不高,在 2 ~ 8℃ 下有效保存期可达两年。

## 附图说明

[0027] SEQ ID NO :1 是牛分枝杆菌特异性融合抗原蛋白的核苷酸序列表

[0028] 图 1 :本发明的总体技术路线图

[0029] 图 2 :本发明检测试纸条的组装示意图

[0030] 图中 :1 为 PVC 背衬,2 为样品垫,3 为结合垫,4 为硝酸纤维素膜,5 为检测线,6 为质控线,7 吸收垫

[0031] 图 3 :本发明检测试纸条结果判定示意图

[0032] 图中 :A :为阳性标准品结果,B :为阳性样品结果,C :为阴性样品结果,D、E :为试纸条失效。图 4 :本发明检测试纸条结果判定图

[0033] 图中 :A :为阳性结果,D :为阴性样品结果,B 和 C :为试纸条失效。

[0034] 图 5 :pET-28a(+) 原始质粒载体物理图谱。

[0035] 图 6 :是本发明 PCR 扩增 Rv3872 电泳图谱 ;图中 :M 为 DL2000 ;1 为阴性对照 ;2 为扩增后得到的 321bp 的 Rv3872 片段,其中包括酶切位点和连接序列 (Linker) 长度。

[0036] 图 7 :为 PCR 扩增 CFP10 和 ESAT6 电泳图谱。图中 :M 为 DL2000 ;1,3 为阴性对照 ;2 为 348bp 的 CFP10 目的片段,其中包括酶切位点和连接序列 (Linker) 长度 ;4 为 341bp 的 ESAT6 目的片段,其中包括酶切位点和连接序列 (Linker) 长度。

[0037] 图 8 :是本发明中三基因融合重组原核表达载体 pET-28a-Rv3872-CFP10-ESAT6 (即 pET-28a-RCE) 构建流程图。

[0038] 图 9 :是本发明中所构建包含 CFP10-ESAT6 融合基因的中间质粒 pET-28a-CFP10-ESAT6 (即 pET-28a-CE) 的图谱。

[0039] 图 10 :是本发明中所构建包含 Rv3872-CFP10-ESAT6 三基因的重组表达载体质粒 pET-28a-Rv3872-CFP10-ESAT6 (即 pET-28a-RCE) 的图谱。

[0040] 图 11 :是本发明中重组中间融合基因 CFP10-ESAT6PCR 扩增后的电泳图谱。图中 :M 为 DL2000 ;1 为扩增后 643bp 的 CFP10-ESAT6 融合基因片段 (包括连接序列和两端酶切位点) ;2 为阴性空白对照。

[0041] 图 12 :是重组中间融合质粒 pET-28a-CFP10-ESAT6 构建后酶切鉴定电泳图谱。图中 :M1 为 DL2000 ;M2 为 DL15000 ;1 为 HindIII 和 NotI 双酶切 pET-28a-CFP10-ESAT6 质粒后出现 5363bp 和 636bp 左右的两个片段 ;2,3 为 NotI 和 HindIII 分别单酶切 pET-28a-CFP10-ESAT6 质粒出现 5999bp 左右的片段。

[0042] 图 13 :是本发明中制备的 RCE 蛋白表达形式鉴定图谱。图中 :M 为蛋白分子量标

准 ;1 为 IPTG 诱导的空载体对照 ;2 为菌液经 IPTG 诱导后的情况 ;3 为超声波破碎菌体离心后上清取样 ;4 为超声波破碎菌体离心后沉淀取样。

[0043] 图 14 :是本发明中制备的 RCE 蛋白最佳表达条件。在图 12A 中 :M 为蛋白分子量标准 ;1 为 0.8mmol/L IPTG (分子克隆实验指南建议浓度) 诱导空载体对照 ;2 为 IPTG 终浓度为 0.4mmol/L 诱导 ;3 为 IPTG 终浓度为 0.6mmol/L 诱导 ;4 为 IPTG 终浓度为 0.8mmol/L 诱导 ;5 为 IPTG 终浓度为 1.0mmol/L 诱导。在图 12B 中 :M 为蛋白分子量标准 ;1 为 0.4mmol/L IPTG 诱导空载体 ;2 为 :0.4mmol/L IPTG 诱导 2h ;3 为 0.4mmol/L IPTG 诱导 3h ;4 为 0.4mmol/L IPTG 诱导 5h ;5 为 0.4mmol/L IPTG 诱导 6h。

[0044] 图 15 :是本发明中制备的 RCE 蛋白 Western-Blot 图。图中 :M 为蛋白分子量标准 ;1 为牛结核阳性血清 ;2 为正常牛血清。

[0045] 图 16 :是本发明中制备的 RCE 蛋白浓度测定标准曲线图。图 16A 和图 16B 为蛋白标准品做两次重复分别所得标准曲线及公式。

[0046] 图 17 :制备好的胶体金电镜照片。

[0047] 图 18 :牛结核 RCE 抗体快速检测测试纸条。

## 具体实施方式

[0048] 实施例 1 (制备实施例)

[0049] (一) 牛分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 基因的克隆及在重组大肠杆菌中表达并纯化的方法参见 (专利申请号 :200910060913.1 ;公开号 CN101538578,公告日 :2009 年 9 月 23 日) 报道的方法。

[0050] (二) 提纯 RCE 蛋白的 IgG 抗体

[0051] 将含有 RCE 抗体的血清 4000r/min 离心 10 分钟取上清用于提纯 :取 10ml 上清于 4℃,12000r/min 离心 10 分钟,弃杂质,然后加入 40ml 0.06M pH4.5 的醋酸盐缓冲液,再在室温 (25℃) 下缓慢加入 330 μ l 辛酸,边滴加边搅拌。缓慢加入饱和硫酸铵至终浓度为 45%,用 0.01M PBS (pH7.4) 溶解后透析过夜。SDS-PAGE 电泳分析 (如附图 11 所示) 显示有两条带,一条为 IgG 重链,一条为 IgG 轻链。用紫外分光光度计测定纯化多抗在 280nm 和 260nm 波长时的光吸收值 (OD),按公式  $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$  计算多抗浓度。调整溶液体积,使其终浓度为 2.5mg/ml。利用该抗体作为质控线。

[0052] 实施例 2 (制备实施例)

[0053] 牛分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 抗体诊断试纸条组装及制备方法

[0054] 1、RCE 试纸条包括 :

[0055] 样品垫 (2)、结合垫 (3)、硝酸纤维素膜 (4)、吸水垫 (7) 和 PVC 背衬 (1) 为商购,其具体结构是 :在 PVC 背衬 (1) 上按顺序依次粘附有样品垫 (2)、结合垫 (3)、硝酸纤维素膜 (4)、吸水垫 (7);所述的结合垫 (3) 上包被有 MPBrce 蛋白 - 胶体金标记物 ;所述的硝酸纤维素膜 (4) 上分别包被有纯化的 RCE 蛋白的检测线 (5)、纯化 RCE 蛋白 IgG 构成的质控线 (6)。

[0056] 2 胶体金的制备 :

[0057] 用超纯水将 1% 氯金酸稀释成 0.01%,置磁力加热搅拌器上搅拌煮沸,按每 100ml 0.01% 氯金酸加入 2.0ml 1% 柠檬酸三钠,继续煮沸,直到液体呈橙红色即停止加热,冷却

至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物,有效期一年,胶体金电镜照片如附图 17。

[0058] 3RCE 蛋白-胶体金标记物制备:

[0059] 磁力搅拌下,用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.0,按每 ml 胶体金加入 2.3  $\mu$ L 1.0mg/mL MPBrce 蛋白,继续搅拌混匀 60min,加入 10% PEG20000 至终浓度为 1%,继续搅拌混匀 30min。3500rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 30min,弃沉淀,上清 7500rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 30min,弃上清,沉淀用 0.02M pH8.0 的硼酸盐缓冲液(配方:硼酸 0.1237g, PEG-200001g,用超纯水定容至 1000ml,调 pH 至 8.0)洗涤两次,用二十分之一初始胶体金体积的 0.02M pH8.0 的硼酸盐缓冲液(配方:硼酸 0.1237g,聚乙二醇(PEG)-200001g,用超纯水定容至 1000ml,调 pH 至 8.0)将沉淀重悬,置 4 $^{\circ}$ C 备用,有效期 60 天。

[0060] 4 结合垫的包被

[0061] 将结合垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液(配方及制备:20g 牛血清白蛋白(BSA),25g 蔗糖,3g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-10,0.2gNaN<sub>3</sub> NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2g,用超纯水定容至 1000ml)中 30min 后,于 37 $^{\circ}$ C 烘干。然后用 Biodot 点膜仪将制备好的 RCE 蛋白-胶体金标记物均匀包被在结合垫上,每厘米结合垫包被 9  $\mu$ l MPBrce 蛋白-胶体金标记物,冷冻真空干燥,真空封装,置 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0062] 5 样品垫的处理

[0063] 将样品垫浸泡于 0.01M pH 7.4 磷酸缓冲液(配方及制备:20g BSA,25g 蔗糖,3gPVP-10,0.2gNaN<sub>3</sub> NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2g,用超纯水定容至 1000ml)中 30min 后,于 37 $^{\circ}$ C 烘干,真空封装,置 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0064] 6 硝酸纤维素膜的包被

[0065] 用 Biodot 点膜仪将纯化的牛型分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE(浓度为 2mg/mL)包被于硝酸纤维素膜作为检测线,包被量为 0.6  $\mu$ l/cm,检测线靠近结合垫端,距结合垫垫端约 8mm;用 Biodot 点膜仪将纯化的猪 IgG 抗体(浓度 2mg/ml)包被于硝酸纤维素膜作为质控线,包被量为 0.8  $\mu$ l/cm,质控线靠近吸水垫,距吸收垫约 8mm,两线距离 5~8mm。室温干燥,封装备用。

[0066] 7 试纸条的组装

[0067] 将样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)、吸水垫(7)按图 2 所示的顺序依次粘附在 PVC 背衬(1)上,切成 3mm 宽的小条,装到塑料透明外壳(9)中真空封装。2~8 $^{\circ}$ C 保存,有效期 2 年;常温保存,有效期 12 个月。

[0068] 实施例 3(应用实施例)

[0069] 牛结核抗体的免疫胶体金试纸条使用方法

[0070] 1、血清样品的预处理

[0071] 血清样品经 4000rpm/min 离心 10min 去掉血细胞,-20 $^{\circ}$ C 长期保存,4 $^{\circ}$ C 短期保存。

[0072] 2、检测步骤

[0073] 用吸管吸取 40  $\mu$ l 待检血清与 40  $\mu$ l 血清稀释液混合均匀后缓慢滴加在胶体金试纸条的样品垫上,20 分钟后观察结果。

[0074] 3、结果判定

[0075] 如图 3 所示,若待测样品试纸条检测线颜色明显深于阳性标准品试纸条检测线颜

色,同时质控线上出现红色条带则判断为阳性样品,即待测样品中有牛结核分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 的抗体,说明该牛为结核病牛;若待测样品试纸条检测线无颜色出现,同时质控线上出现红色条带则判断为阴性样品,即待测样品中没有牛结核分枝杆菌特异性分泌蛋白 RCE 的抗体,说明该牛为结核阴性牛;若待测样品试纸条检测线颜色介于阳性标准品和阴性标准品试纸条检测线颜色之间,同时质控线上出现红色条带则判断为可疑样品,说明该牛疑似结核病;如果质控线上没有红色条带出现,则该试纸条无效。

[0076] 实施例 4(应用实施例)

[0077] 本发明的应用效果举例(如附图 18)

[0078] 本例中所指的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸检测方法参照实施例 3 所述的操作步骤,其检测结果如表 1、表 2 和表 3。

[0079] 1、特异性试验

[0080] 按实施例 3 所述方法进行试验,检测牛结核阳性血清,牛结核阴性血清(按照常规的 PPD 皮试、ELISA 和病理学和细菌学检验方法操作)、副结核病牛血清、布病牛血清、弓形虫病牛血清和口蹄疫牛血清(均购自中国兽药监察所)。试验结果表明(见表 1),副结核病牛血清、布病牛血清、弓形虫病牛血清和口蹄疫牛血清样品检测线无颜色出现,同时质控线上出现红色条带。本发明试纸条与牛的其他疾病无交叉反应,显示本发明试纸条具有好的特异性。

[0081] 表 1 特异性试验

[0082]

疾病种类	牛结核阳性对照	牛结核阴性对照	副结核	布病阳性牛血清	弓形虫	口蹄疫
检测结果	+	-	-	-	-	-

[0083] 注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

[0084] 2、敏感性试验

[0085] 按实施例 3 所述方法进行试验,将 200 份临床牛血清样品用牛结核病抗体检测试纸条检测,并且与 TST 检测做比较。牛结核病抗体检测试纸条与 TST 的比较(结果见表 2)。TST 阳性牛 100 头,其中试纸条检测判断 85 头为阳性,阳性符合率为 68%。TST 阴性牛 100 头,其中试纸条检测判断 115 头为阴性,阴性符合率为 83%。总符合率为 75.5%。

[0086] 表 2 牛结核 RCE 抗体检测试纸条与 TST 的比较

[0087]

本发明的试纸条				
		阳性	阴性	合计
TST	阳性	68	32	100
	阴性	17	83	100
合计		85	115	200

[0088] 用牛分枝杆菌 RCE 抗体检测胶体金试纸条与韩国进口的牛结核抗体检测胶体金试纸条同时检测了 240 份临床牛血清样品,结果显示:本发明的试纸条检测 62 为阳性,韩国试纸条阳性牛 61 头,共同检出 60 份,其中阳性符合率为 97% (59/61)。韩国试纸条阴性牛 179 头,其中本研究试纸条检测判断为阴性的有 176 头,阴性符合率为 98% (176/179)。总符合率为 98% (59+176/240)。说明本发明的试纸条与韩国试纸条具有很高的符合率(表 2)。

[0089] 表 3 本发明的试纸条与同类韩国试纸条的比较

[0090]

本发明的试纸条			
韩国同类试纸条	阳性	阴性	合计
阳性	59	2	61
阴性	3	176	179
合计	62	178	240

[0091]

[0092] 3、临床样品的检测

[0093] 按实施例 3 所述方法进行试验,对湖北省黄冈地区 11 个牛场的 1003 份血清进行检测,结果见表 4。检测样品阳性率为 7.00% -65.00% (见表 4),由此可见牛结核病分布较广。临床应用证明该试剂盒准确性、重复性、敏感性、特异性良好,适合临床大量血清抗体检测和疾病诊断,在清除牛结核病传染源和控制牛结核病的临床实践中具有重要的意义。

[0094] 尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明,但是不能认为是对本发明范围的限制,本发明的范围由所附权利要求书限定。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰形式同样落在本发明的保护范围内。

[0095] 表 4 本发明的牛结核病抗体检测试纸条的临床应用情况

[0096]

样品来源	血清样品数量	血清阳性数量	血清检测阳性率
牛场 1	18	5	27.78%
牛场 2	22	8	36.36%
牛场 3	28	3	10.71%
牛场 4	37	15	40.54%
牛场 5	43	4	9.30%
牛场 6	49	10	20.41%
牛场 7	60	39	65.00%
牛场 8	73	29	39.73%
牛场 9	100	7	7.00%
牛场 10	195	15	7.69%
牛场 11	378	35	9.26%
共计	1003	170	16.47%

## 序列表

<110> 华中农业大学  
 <120> 一种应用 Rv3872 新型融合蛋白制备的牛结核抗体鉴别检测试纸条  
 <130>  
 <141>2010-04-28  
 <160>2  
 <170>PatentIn version 3.1  
 <210>1  
 <211>1053  
 <212>DNA  
 <213> 牛分枝杆菌 (Mycobacterium bovis)  
 <220>  
 <221>gene  
 <222>(1).. (1053)  
 <223>  
 <220>  
 <221>CDS  
 <222>(1).. (1053)  
 <223>  
 <400>1  
 atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc ggc ctg gtg ccg 48  
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 1 5 10 15  
 cgc ggc agc cat atg gct agc atg act ggt gga cag caa atg ggt cgc 96  
 Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg  
 20 25 30  
 gga tcc gaa ttc gaa aaa atg tca cat gat ccg atc gct gcc gac att 144  
 Gly Ser Glu Phe Glu Lys Met Ser His Asp Pro Ile Ala Ala Asp Ile  
 35 40 45  
 ggc acg caa gtg agc gac aac gct ctg cac ggc gtg acg gcc ggc tcg 192  
 Gly Thr Gln Val Ser Asp Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser  
 50 55 60  
 acg gcg ctg acg tcg gtg acc ggg ctg gtt ccc gcg ggg gcc gat gag 240  
 Thr Ala Leu Thr Ser Val Thr Gly Leu Val Pro Ala Gly Ala Asp Glu  
 65 70 75 80  
 gtc tcc gcc caa gcg gcg acg gcg ttc aca tcg gag ggc atc caa ttg 288  
 Val Ser Ala Gln Ala Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu  
 85 90 95

ctg gct tcc aat gca tcg gcc caa gac cag ctc cac cgt gcg ggc gaa	336
Leu Ala Ser Asn Ala Ser Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu	
100 105 110	
gcg gtc cag gac gtc gcc cgc acc tat tcg caa atc gac gac ggc gcc	384
Ala Val Gln Asp Val Ala Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala	
115 120 125	
gcc ggc gtc ttc gcc gaa ggt ggt ggt ggt gga aag ctt gca gag atg	432
Ala Gly Val Phe Ala Glu Gly Gly Gly Gly Gly Lys Leu Ala Glu Met	
130 135 140	
aag acc gat gcc gct acc ctc gcg cag gag gca ggt aat ttc gag cgg	480
Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly Asn Phe Glu Arg	
145 150 155 160	
atc tcc ggc gac ctg aaa acc cag atc gac cag gtg gag tcg acg gca	528
Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val Glu Ser Thr Ala	
165 170 175	
ggt tcg ttg cag ggc cag tgg cgc ggc gcg gcg ggg acg gcc gcc cag	576
Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln	
180 185 190	
gcc gcg gtg gtg cgc ttc caa gaa gca gcc aat aag cag aag cag gaa	624
Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu	
195 200 205	
ctc gac gag atc tcg acg aat att cgt cag gcc ggc gtc caa tac tcg	672
Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser	
210 215 220	
agg gcc gac gag gag cag cag cag gcg ctg tcc tcg caa atg ggc ttc	720
Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe	
225 230 235 240	
ggt ggc ggt gga agc ggc ggt ggc gga agc ggc ggt ggc ggc agc atg	768
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met	
245 250 255	
aca gag cag cag tgg aat ttc gcg ggt atc gag gcc gcg gca agc gca	816
Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala	
260 265 270	
atc cag gga aat gtc acg tcc att cat tcc ctc ctt gac gag ggg aag	864
Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys	
275 280 285	
cag tcc ctg acc aag ctc gca gcg gcc tgg ggc ggt agc ggt tcg gag	912
Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu	
290 295 300	

gcg tac cag ggt gtc cag caa aaa tgg gac gcc acg gct acc gag ctg 960  
 Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu  
 305 310 315 320  
 aac aac gcg ctg cag aac ctg gcg cgg acg atc agc gaa gcc ggt cag 1008  
 Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln  
 325 330 335  
 gca atg gct tcg acc gaa ggc aac gtc act ggg atg ttc gca tag 1053  
 Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala  
 340 345 350

<210>2

<211>350

<212>PRT

<213> 牛分枝杆菌 (Mycobacterium bovis)

<400>2

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg  
 20 25 30  
 Gly Ser Glu Phe Glu Lys Met Ser His Asp Pro Ile Ala Ala Asp Ile  
 35 40 45  
 Gly Thr Gln Val Ser Asp Asn Ala Leu His Gly Val Thr Ala Gly Ser  
 50 55 60  
 Thr Ala Leu Thr Ser Val Thr Gly Leu Val Pro Ala Gly Ala Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Val Ser Ala Gln Ala Ala Thr Ala Phe Thr Ser Glu Gly Ile Gln Leu  
 85 90 95  
 Leu Ala Ser Asn Ala Ser Ala Gln Asp Gln Leu His Arg Ala Gly Glu  
 100 105 110  
 Ala Val Gln Asp Val Ala Arg Thr Tyr Ser Gln Ile Asp Asp Gly Ala  
 115 120 125  
 Ala Gly Val Phe Ala Glu Gly Gly Gly Gly Gly Lys Leu Ala Glu Met  
 130 135 140  
 Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly Asn Phe Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val Glu Ser Thr Ala  
 165 170 175  
 Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gln  
 180 185 190  
 Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu

195	200	205
Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser		
210	215	220
Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser Gln Met Gly Phe		
225	230	235
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met		
245	250	255
Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala		
260	265	270
Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys		
275	280	285
Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu		
290	295	300
Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu		
305	310	315
Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln		
325	330	335
Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala		
340	345	350

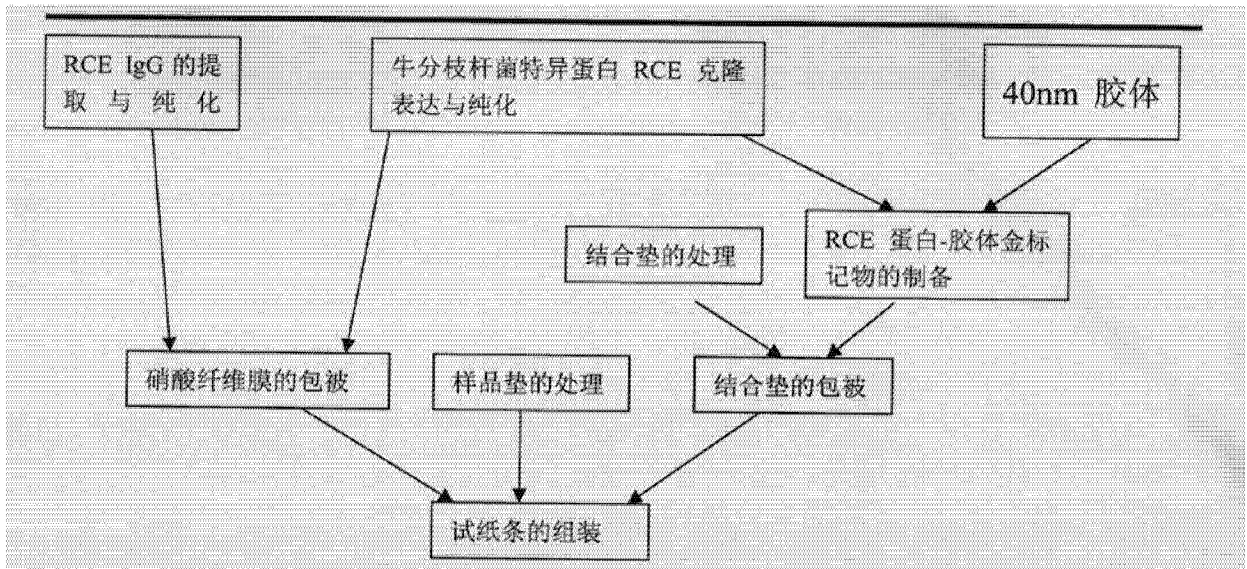


图 1

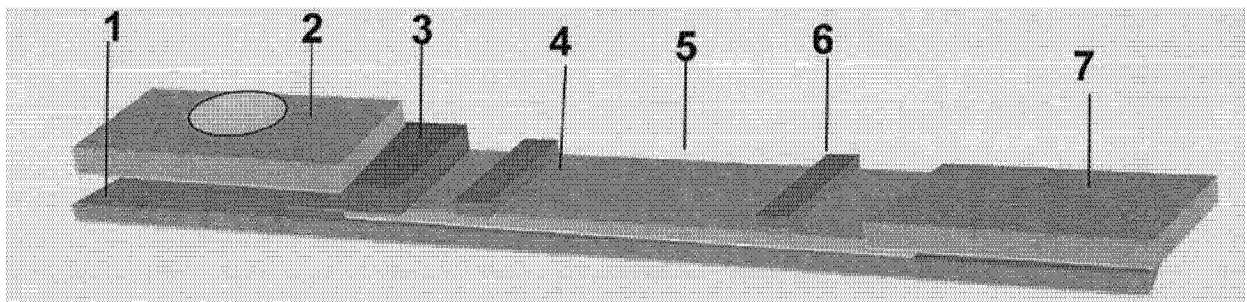


图 2

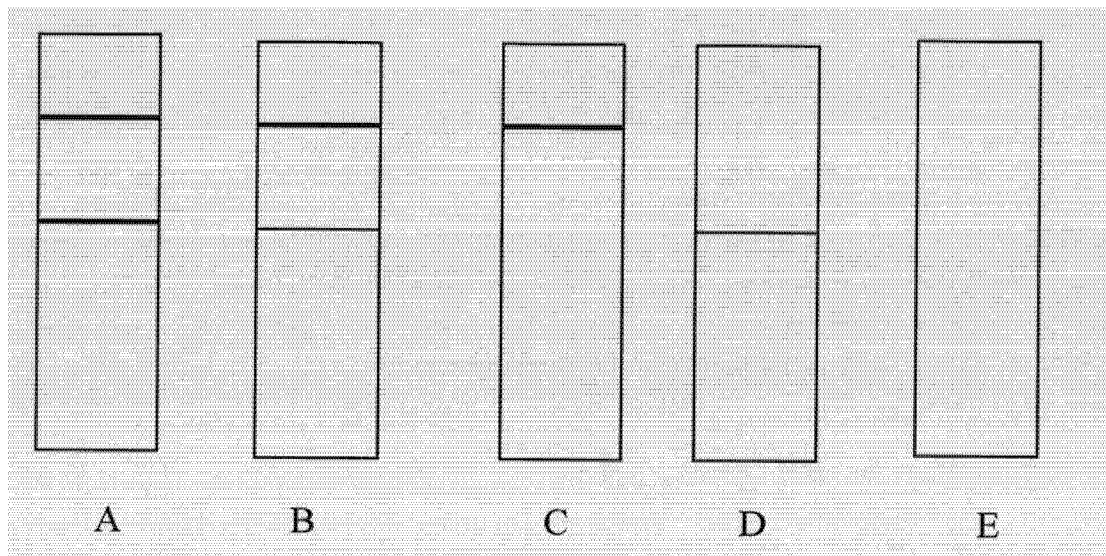


图 3

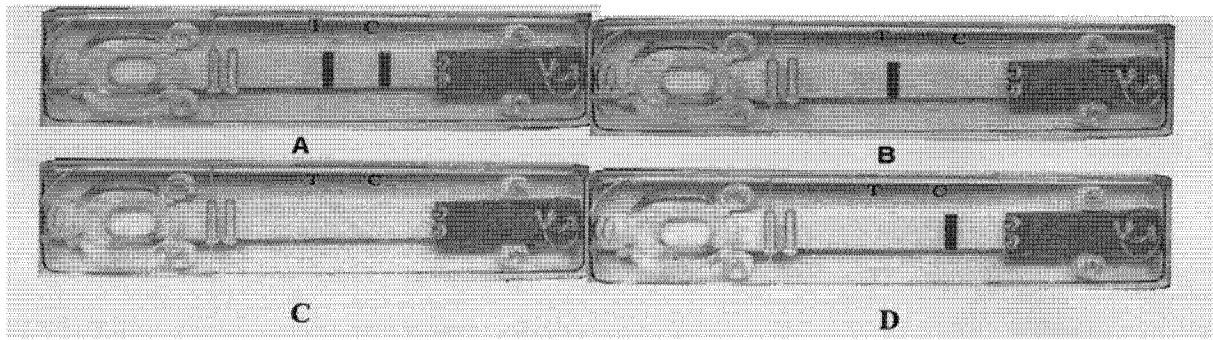


图 4

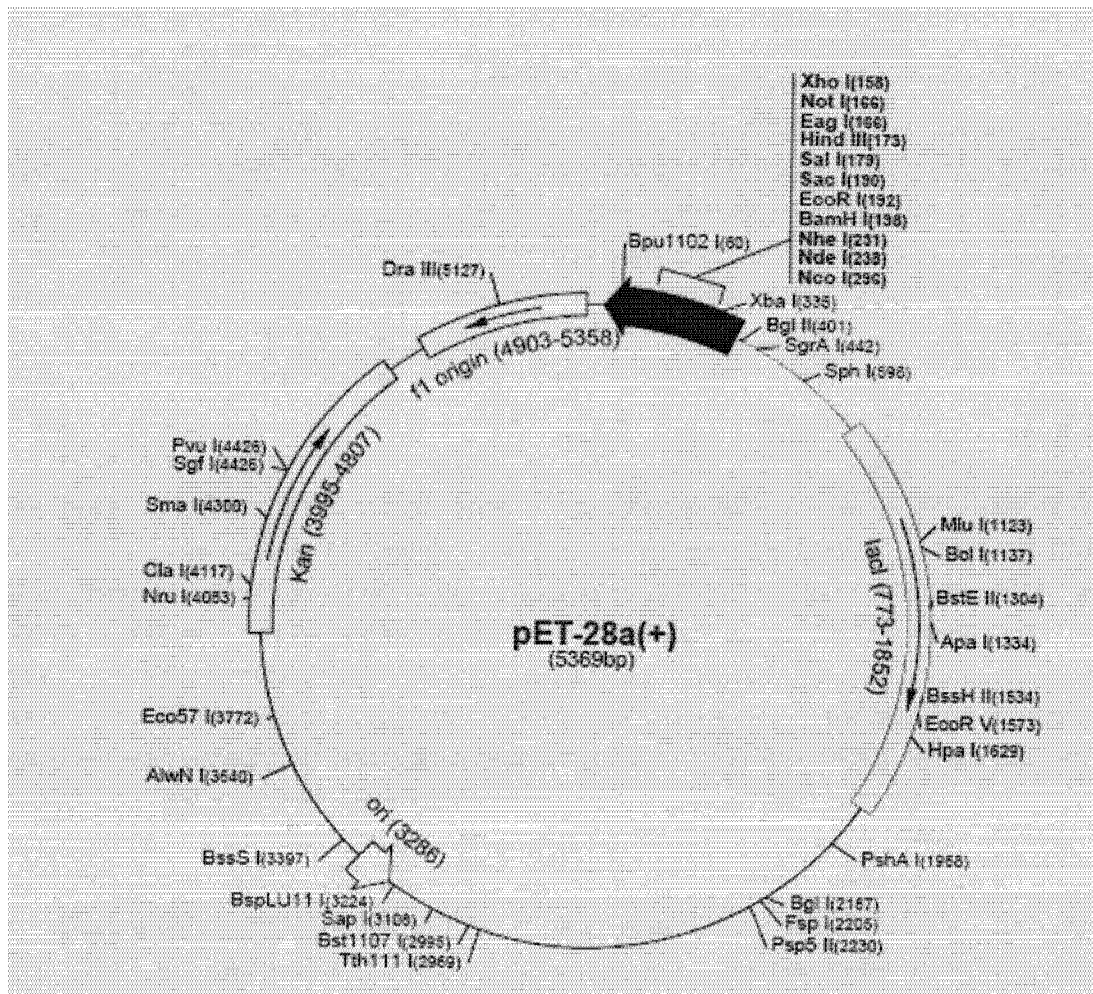


图 5

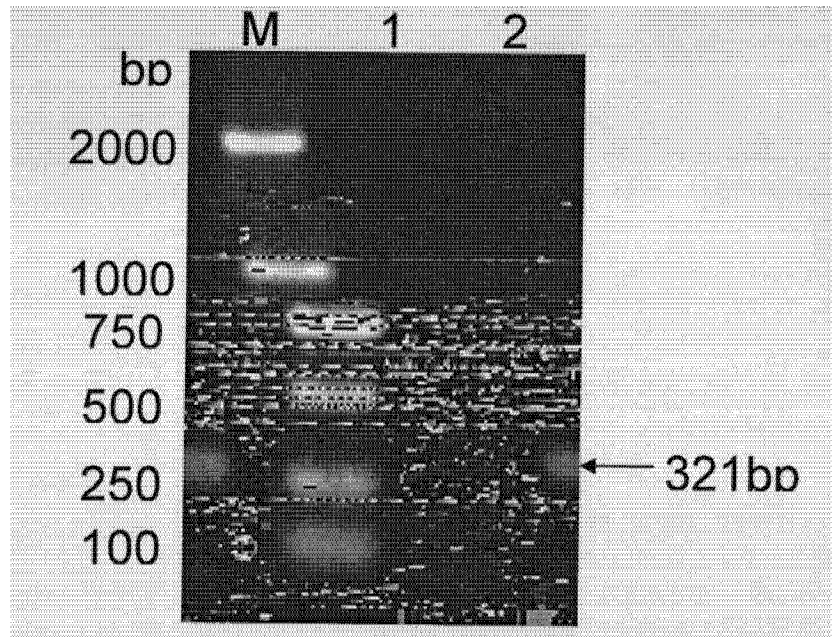


图 6

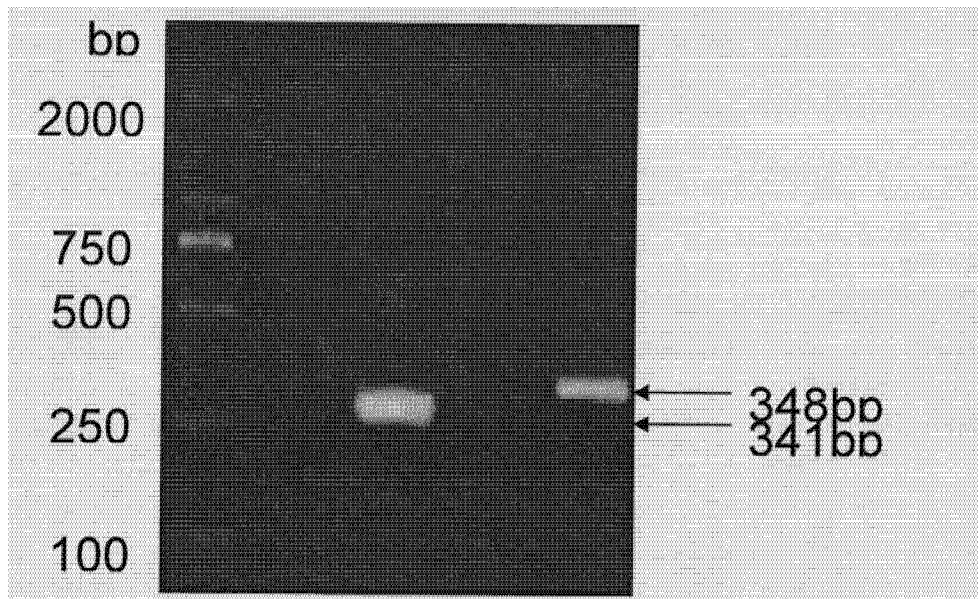


图 7

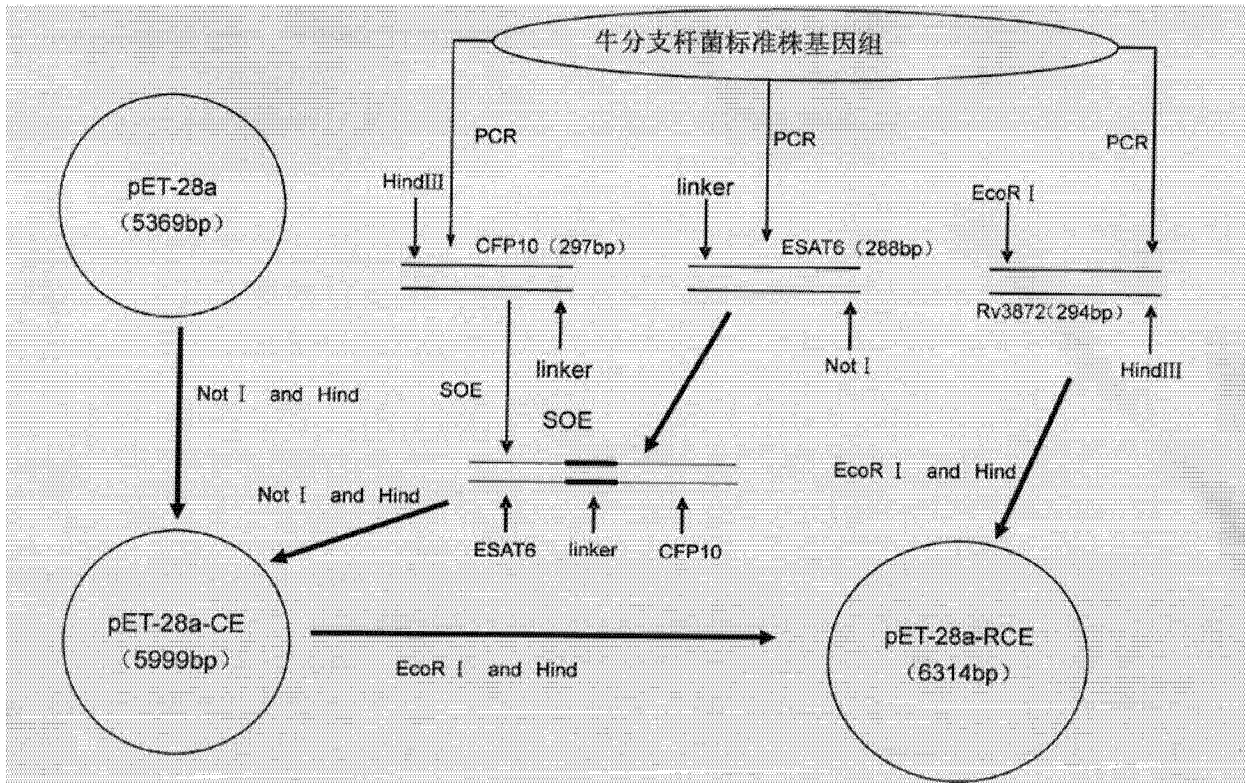


图 8

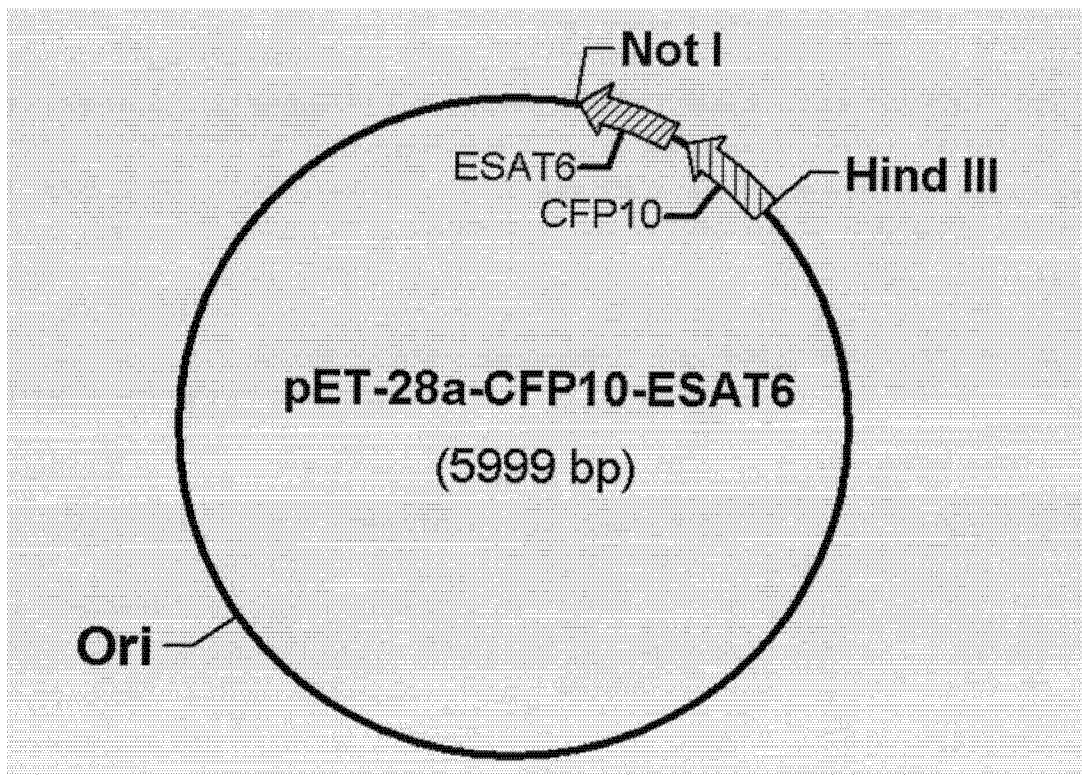


图 9

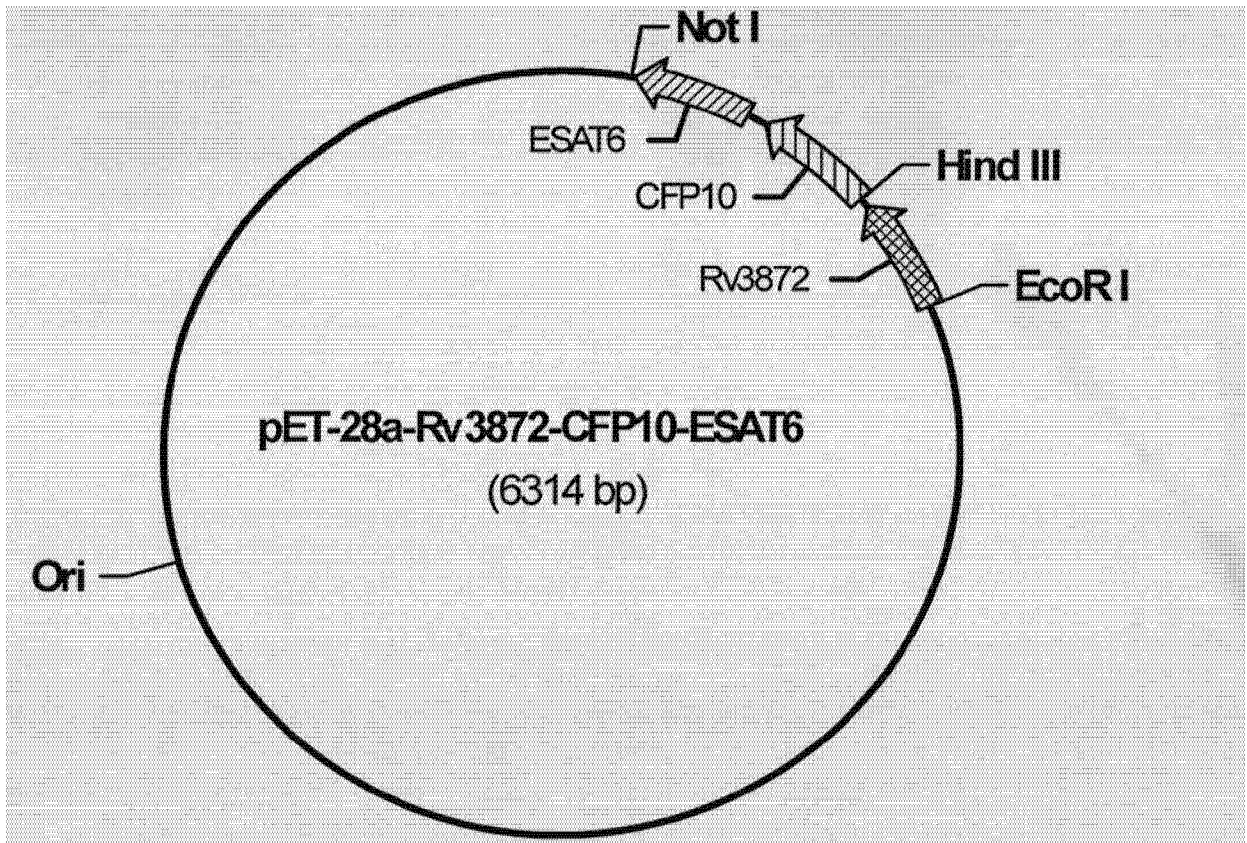


图 10

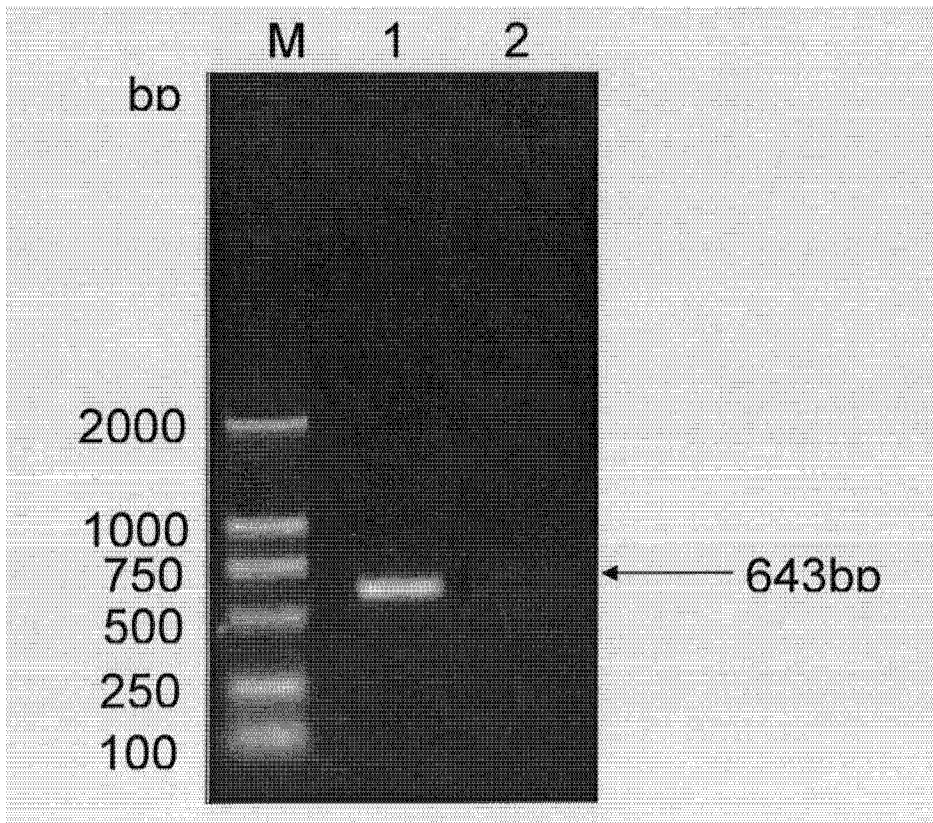


图 11

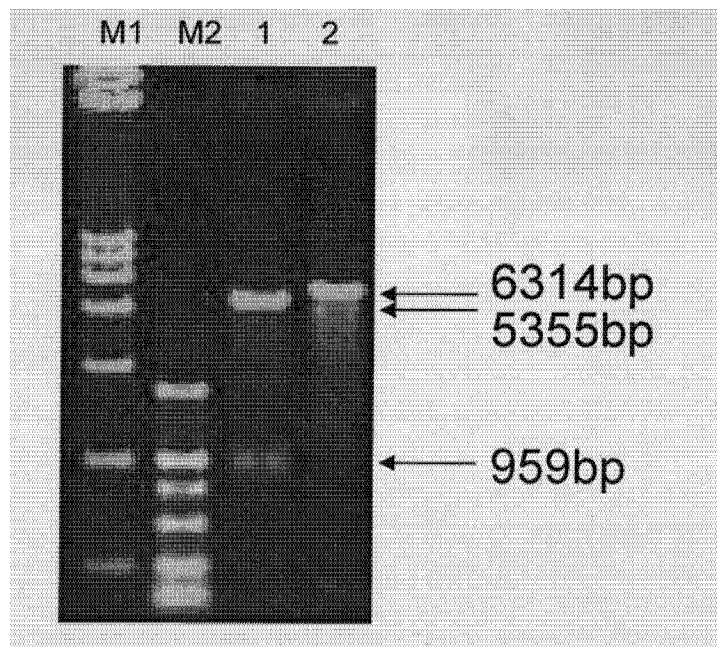


图 12

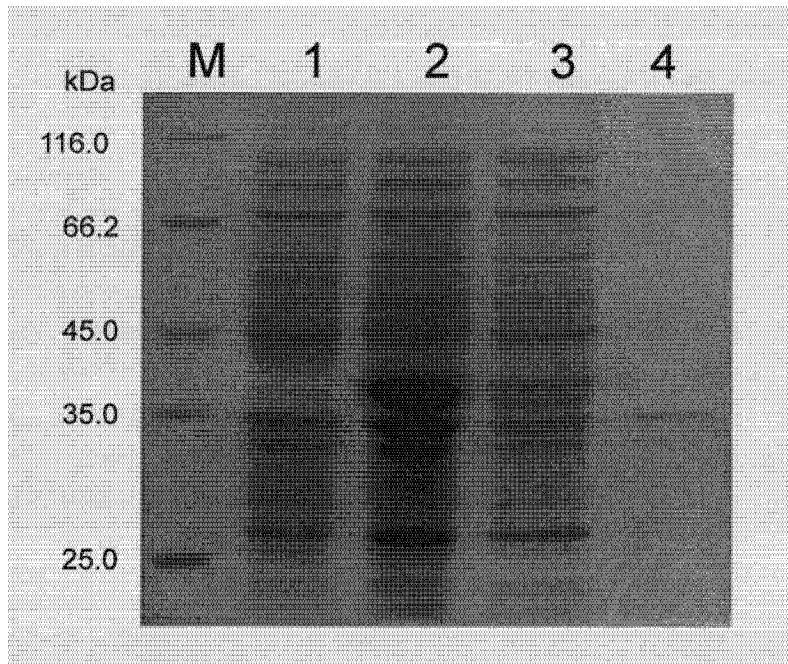


图 13

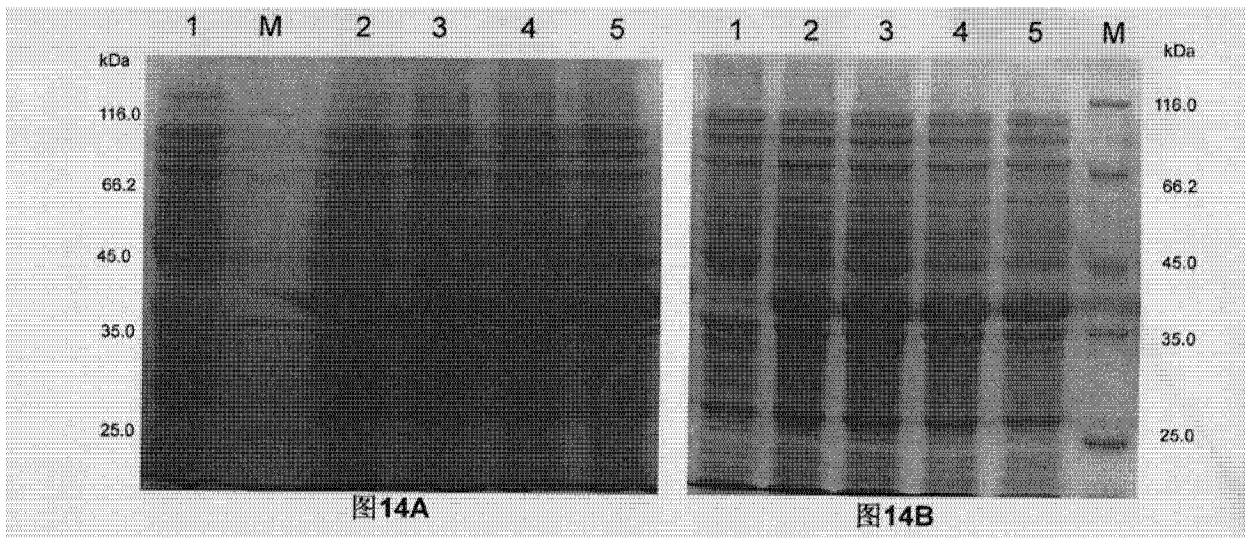


图 14

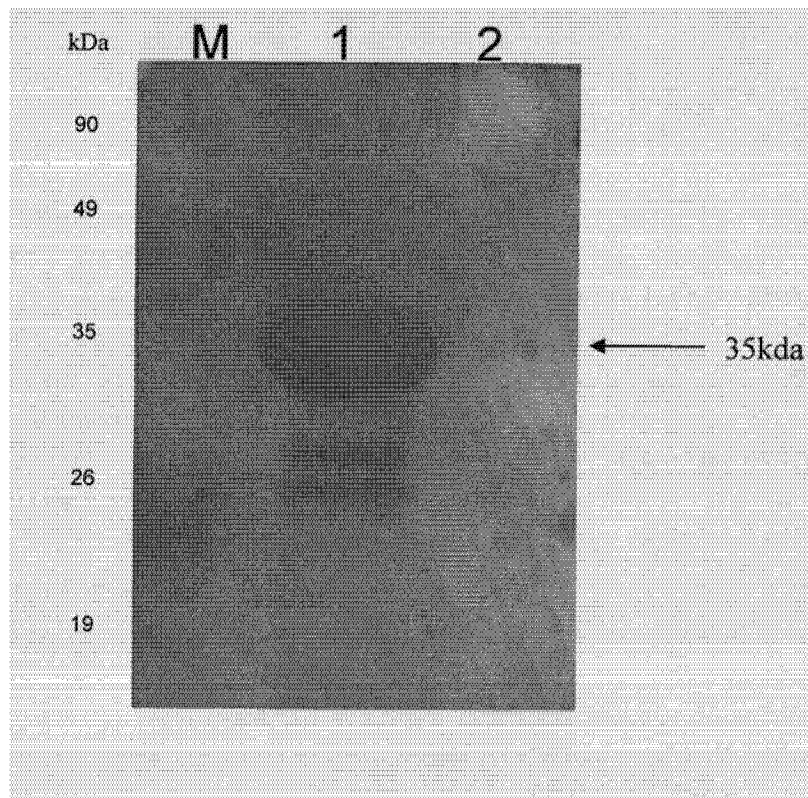


图 15

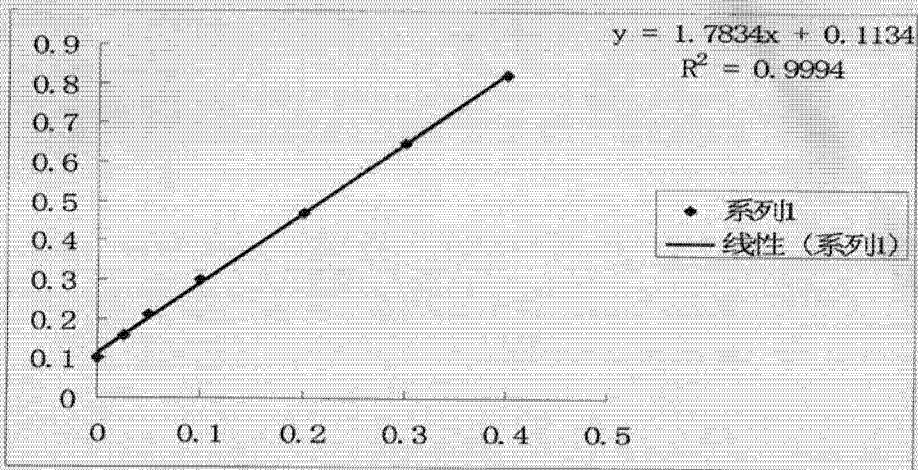


图 16A

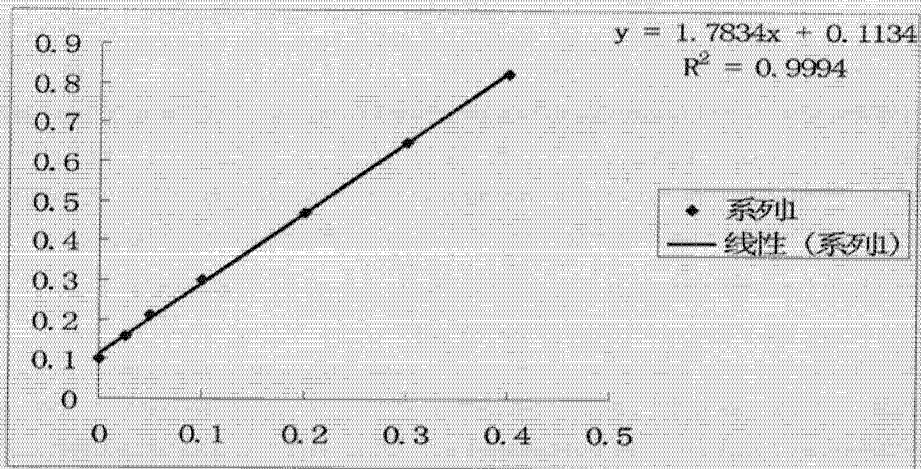


图 16B  
图 16

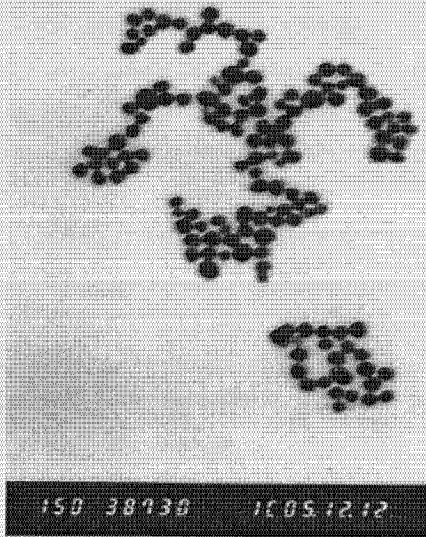


图 17

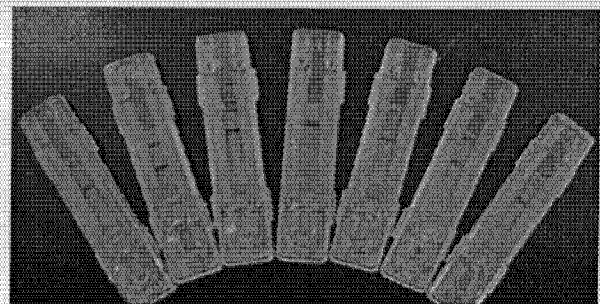


图 18

专利名称(译)	一种应用Rv3872新型融合蛋白制备的牛结核抗体鉴别检测试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN101900727A</a>	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	CN201010194736.9	申请日	2010-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	郭爱珍 于清龙 刘冬光 涂玲玲 陈颖钰 廖娟红 凌洁玉 陈焕春		
发明人	郭爱珍 于清龙 刘冬光 涂玲玲 陈颖钰 廖娟红 凌洁玉 陈焕春		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532 C12N15/62 C12N15/70 C12N1/21 C07K19/00 C12R1/19		
代理人(译)	王敏锋		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于动物传染病基因工程技术领域。公开了一种利用RV3872、ESAT6和CFP10三基因融合蛋白制备的检测牛结核抗体的免疫胶体金试纸条及制备方法与应用。以融合蛋白作为胶体金标记抗原和硝酸纤维素膜上检测区的捕获抗原建立胶体金免疫层析试纸条。本发明试剂条对牛结核抗体的检测具有特异性强和灵敏度高的突出优点，能同时鉴别检测卡介苗免疫和非结核分枝杆菌感染。本发明包括一种重组大肠杆菌(Escherichia coli)BL21/pET28a-MPBrce，该菌株表达牛分枝杆菌RCE蛋白，其保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏号为CCTCC NO：M208244。

疾病种类	牛结核阳	牛结核阴	副结核	布病阳性	弓形虫	口蹄疫
	性对	性对		牛血		
	照	照		清		
检测结果	+	.	.	.	.	.