

[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

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03147315.6

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1479099A

[22] 申请日 2003.7.5 [21] 申请号 03147315.6

[71] 申请人 福建省卫生防疫站

地址 350001 福建省福州市津泰路 76 号

[72] 发明人 严延生 邓艳琴

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸

[57] 摘要

本发明公开了一种用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸。恙虫病，又称丛林斑疹伤寒，是由恙虫病东方体引起的以发热、皮疹、虫咬溃疡(焦痂)和浅表淋巴结肿大为主要特征的发热性疾病，严重者出现肝脾肿大、腹水，救治不及时可导致死亡。本发明利用基因工程技术，克隆恙虫病东方体的免疫优势抗原的结构基因，并在大肠杆菌内表达，以方便地获得大量廉价的重组抗原，纯化后即可用于免疫学诊断。由此方法得到的重组抗原及快速诊断试纸克服了现有恙虫病诊断方法的局限性，可以快速、简便地诊断恙虫病，无需特殊仪器，无需训练有素的专业人员，可以满足基层医院、农村卫生院等临床检测的需要，而且大大的降低了成本，方便了患者。

1. 一种用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断试纸的溶液制备, 其特征是:

溶液配方为:

(1) 重组抗原溶解液: SDS 0.1%
 甘氨酸 250 mmol/L
 Tris.Cl 25 mmol/L

(2) 胶体金溶液: 2~5/万的四氯金酸, 加 1~2%柠檬酸三钠还原成中等大小的胶体金颗粒;

(3) 二抗: 抗人 IgG、抗人 IgM 多抗, 购自 Sigma 公司;

(4) 包被缓冲液: 1~3%蔗糖 in PBS;

(5) 基础缓冲液: 购自厦门波生生物技术有限公司;

(6) 反应缓冲液: 0.01~0.05%NaN₃ in PBS;

(7) PBS: 在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄和 0.24g KH₂PO₄, 用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2~7.6, 加水定容至 1L。

2. 一种用于恙虫病诊断的重组抗原的制备工艺流程, 其特征是:

重组抗原的工艺流程为:

(1) 从恙虫病东方体 Karp 株基因组中扩增出 *sta56* 基因的 ORF 或其中的大片段, 用 TA 克隆技术将此大片段克隆;

(2) 以该重组质粒为模板, 扩增出截短的 *sta56* 片段, 定向插入 pET30a 载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达; Western blot 证实该重组蛋白能被恙病患者阳性血清所识别;

(3) 采用电洗脱方法纯化重组蛋白: 对大量诱导时收集的菌体进行超声粉碎后, 将超声上清进行制备电泳, 确定目标条带在凝胶中的位置, 切下含目标蛋白的凝胶胶置于透析袋中进行电洗脱; 纯化样品进行 SDS-PAGE, 确定纯度并

进行蛋白定量。

3.一种用于恙虫病诊断的重组抗原的快速诊断试纸,其特征是:

试纸制作工艺为:

- (1) 以胶体金标记重组抗原和鼠 IgG ;
- (2) 两种金标抗原溶液混合后充分浸润玻璃纤维纸, 置冻干机冻干;
- (3) 羊抗人 μ 链 1.0~5.0mg/ml、羊抗人 IgG 1.0~5.0mg/ml 与羊抗鼠 IgG 单抗 1.0~5.0mg/ml 包被 NC 膜, 自然晾干;
- (4) 将吸水纸、NC 膜、吸附和未吸附金标抗原的玻璃纤维组装成检测 IgM、IgG 和总 Ig 试纸条。

用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸

技术领域

本发明涉及疾病诊断的抗原，具体说是一种用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸。

背景技术

恙虫病，又称丛林斑疹伤寒 (scrub typhus)，是由恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*, Ot) 引起的以发热、皮疹、虫咬溃疡 (焦痂) 和浅表淋巴结肿大为主要特征的发热性疾病，严重者出现肝脾肿大、腹水，救治不及时可导致死亡。恙虫病主要流行于亚洲和太平洋地区，即东起新几内亚，西至阿富汗，南起新西兰和澳大利亚北部沿海地区，北至日本、俄罗斯远东滨海地区。我国有 23 个省报道发现恙虫病，近年来恙虫病疫区有扩大的趋势。

恙虫病的临床症状中，虫咬溃疡是其特异性的体征，但由于虫咬溃疡大都部位隐蔽，数量少，对其检出率的报道各地差异较大，因此必须辅以实验室检查以便及时确诊。恙虫病东方体是严格的专性细胞内寄生的微生物，繁殖慢，纯化繁琐，因而难以获得大量纯化的恙虫病东方体抗原，限制了检验方法的发展。传统的诊断方法，如外斐氏试验 (Weil-Felix test)、免疫过氧化物酶试验 (IIP)、间接免疫荧光抗体检测 (IFAT) 等，均以血清学反应为基础，但因各自的局限性而限制了它们的使用。外斐氏试验虽然操作简单，但对恙虫病诊断缺乏敏感性和特异性；IFAT 具有很好的敏感性和特异性，但需要荧光显微镜和训练有素的专业人员，难以在农村、基层医院及现场使用；IIP 虽然以普通光学显微镜代替了荧光显微镜或甚至不需要显微镜，但仍然需要培养和纯化恙虫病东方体，需要昂贵的组织培养设备。因此，急需建立一种简便、快速并能克服上述局限的血清学诊断方法，以满足恙虫病东方体临床检测的需要。

恙虫病东方体 56kD 抗原 (Scrub typhus antigen, Sta56) 作为恙虫病东方体表面含量最丰富的外膜蛋白，可占菌体总蛋白的 10~15%；免疫原性强，最常被宿主免疫系统所识别；Sta56 可与株特异性单抗和群特异性单抗反应，表明

Sta56 存在株特异性表位和群特异性表位,因而 Sta56 是恙虫病诊断抗原的主要候选者之一。

胶体金是一种处于半还原状态的悬浮颗粒,能迅速吸附蛋白质等大分子而不影响其活性,胶体金具有易分辨的红至紫红色,在与大分子结合后,易于用肉眼识别,不需二级放大即可直接观察结果,胶体金诊断产品因而可直接进入没有复杂检测设备的诊所甚至家庭里。近年来,以早孕检测试纸为代表的胶体金免疫诊断试剂已进入千家万户,给人们的生活带来很大的方便。

从包括中国专利等有关资料检索表明,目前尚未有利用基因工程方法获得的重组抗原用于恙虫病的诊断及恙虫病快速诊断试纸的相关报道。

发明内容

为了克服现有技术尚未有利用基因工程方法获得的重组抗原用于恙虫病的诊断,本发明提出了用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

一. 本发明涉及的溶液配方为:

- | | | |
|--------------|---------|------------|
| (1) 重组抗原溶解液: | SDS | 0.1% |
| | 甘氨酸 | 250 mmol/L |
| | Tris.Cl | 25 mmol/L |

(2) 胶体金溶液: 3~5/万的四氯金酸,加 1~2%柠檬酸三钠制备成胶体金颗粒;

(3) 二抗: 抗人 IgG、抗人 IgM 多抗,购自 Sigma 公司;

(4) 包被缓冲液: 1~3%蔗糖 in PBS;

(5) 基础缓冲液: 购自厦门波生生物技术有限公司;

(6) 反应缓冲液: 0.01~0.05%NaN₃ in PBS;

(7) PBS: 在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄和 0.24g KH₂PO₄,用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2~7.6,加水定容至 1L。

二. 本发明重组抗原的工艺流程:

(1) 从恙虫病东方体 Karp 株基因组中扩增出 *sta56* 基因的 ORF 或其中的大片段,用 TA 克隆技术将此大片段克隆;

(2) 以该重组质粒为模板,扩增出截短的 *sta56* 片段,定向插入 pET30a 载

体,转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达; Western blot 证实该重组蛋白能被恙虫病阳性血清所识别;

(3) 采用电洗脱方法纯化重组蛋白: 对大量诱导时收集的菌体进行超声粉碎后, 将超声上清进行制备电泳, 确定目标条带在凝胶中的位置, 切下含目标蛋白的凝胶胶置于透析袋中进行电洗脱; 纯化样品进行 SDS-PAGE, 确定纯度并进行蛋白定量。

三. 本发明的试纸制作工艺

- (1) 以胶体金标记重组抗原和鼠 IgG;
- (2) 两种金标抗原溶液混合后充分浸润玻璃纤维纸, 置冻干机冻干;
- (3) 羊抗人 μ 链 1.0~5.0mg/ml、羊抗人 IgG 1.0~5.0mg/ml 与羊抗鼠 IgG 单抗 1.0~5.0mg/ml 包被 NC 膜, 自然晾干;
- (4) 将吸水纸、NC 膜和吸附了金标抗原的玻璃纤维组装成检测 IgM、IgG 和总 Ig 试纸条。

用本发明制作的重组抗原及利用重组抗原制作成的试纸条就可以用于恙虫病的临床诊断了。

本发明的有益效果是: 本发明利用基因工程技术, 克隆恙虫病东方体的免疫优势抗原的结构基因, 并在大肠杆菌内表达, 以方便地获得大量廉价的重组抗原, 纯化后即可用于免疫学诊断。由此方法得到的重组抗原及快速诊断试纸克服了现有恙虫病诊断方法的局限性, 可以快速、简便地诊断恙虫病, 无需特殊仪器, 无需训练有素的专业人员, 可以满足基层医院、农村卫生院等临床检测的需要, 而且大大的降低了成本, 方便了患者。同时本发明诊断精确度高, 从而使患者能够得到及时的治疗, 达到了防治的目的。

具体实施方式

实施例 1:

重组抗原的制备

(1) 从恙虫病东方体 Karp 株基因组中扩增出 *sta56* 基因的 ORF 中 1053bp 的大片段, 用 TA 克隆技术将此大片段克隆;

(2) 以该重组质粒为模板, 扩增出 957bp 的片段, 定向插入 pET30a 载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 0.2mMIPTG 诱导表达; Western blot 证实该重组

蛋白能被恙虫病患者阳性血清所识别；

(3) 电洗脱方法纯化重组蛋白：对大量诱导时收集的菌体进行超声粉碎后，将超声上清加 6× 加样缓冲液上样，先 80V 电泳，当样品前沿进入分离胶后，升至 110–120V，电泳过夜。电泳毕卸胶，蒸馏水漂洗后用 0.3mol/L CuCl_2 染色至目的蛋白带清晰可见(背景为浅蓝色，蛋白带呈空斑状)小心切下目的蛋白带。将含目的蛋白的胶块置于洗脱液(250mM EDTA, 250mM Tris-HCl, pH9.0)中以去除 Cu^{2+} ，室温下温育 10 分钟，更换洗脱液后重复两次。将胶块封于透析袋中，并加入 30ml 电泳缓冲液(即重组抗原溶解液)，置水平电泳槽中电泳，80V, 50min 电泳结束后，吸出透析袋中液体，约 30ml。纯化样品进行 SDS-PAGE，确定纯度并进行蛋白定量。

实施例 2：

快速诊断试纸的制作

(1) 取 3/万四氯金酸 1000ml，加热至沸腾，加入 1% 柠檬酸三钠溶液 25ml，继续煮沸 5 分钟，待胶体金溶液颜色由有蓝经紫变红后，自然冷却后备用；

(2) 取胶体金溶液 1ml，加入 0.2M K_2CO_3 10 μl 、50 μg 纯化抗原，搅匀后静置 1h；

(3) 加入 20%牛血清白蛋白 25 μl 、20% PEG 20,000 15 μl ，8,000r/min，离心 8min，弃上清；

(4) 沉淀加入 1ml 基础缓冲液悬浮，即为金标抗原溶液；

(5) 同法标记鼠 IgG；

(6) 两种金标抗原溶液混合后充分浸润玻璃纤维纸，置冻干机冻干；

(7) 羊抗鼠 IgG 单抗 3.0mg/ml、羊抗人 IgG 3.0mg/ml、羊抗人 μ 链 1.0mg/ml 分别在 NC 膜的上、中、下位置包被 NC 膜，自然晾干；或羊抗鼠 IgG 单抗 3.0mg/ml、重组抗原溶液 2mg/ml 在 NC 膜的上、下三分之一处包被 NC 膜，自然晾干；

(8) 在约 10cm 宽的底板上，将吸水纸、NC 膜、吸附了金标抗原的玻璃纤维和未吸附抗原的玻璃纤维组装成检测 IgM 与 IgG 和检测总 Ig 的试纸条。

评价：在试纸条的玻璃纤维上加 3 μl (检测 IgM 和 IgG) 或 5 μl 待检血清 (检测总 Ig)，再滴加 1~2 滴反应液。观察金标抗原释放后 NC 膜上检测线和对照线的反应情况，检测线 and 对照线同时出现红色条带判为阳性，仅对照线出现

红色条带判为阴性，对照线未出现条带为无效试验。金标免疫层析法检测 IgM、IgG、总 Ig 的敏感性分别为 92.3%，90.9%和 98.6%；特异性分别为 94.7%，94.7%和 93.3%。

专利名称(译)	用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸		
公开(公告)号	CN1479099A	公开(公告)日	2004-03-03
申请号	CN03147315.6	申请日	2003-07-05
[标]发明人	严延生 邓艳琴		
发明人	严延生 邓艳琴		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/558 G01N33/569		
CPC分类号	Y02A50/59		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于恙虫病诊断的重组抗原及其快速诊断的试纸。恙虫病，又称丛林斑疹伤寒，是由恙虫病东方体引起的以发热、皮疹、虫咬溃疡(焦痂)和浅表淋巴结肿大为主要特征的发热性疾病，严重者出现肝脾肿大、腹水，救治不及时可导致死亡。本发明利用基因工程技术，克隆恙虫病东方体的免疫优势抗原的结构基因，并在大肠杆菌内表达，以方便地获得大量廉价的重组抗原，纯化后即可用于免疫学诊断。由此方法得到的重组抗原及快速诊断试纸克服了现有恙虫病诊断方法的局限性，可以快速、简便地诊断恙虫病，无需特殊仪器，无需训练有素的专业人员，可以满足基层医院、农村卫生院等临床检测的需要，而且大大的降低了成本，方便了患者。