

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/547 G01N 33/577

G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02153181.1

[43] 公开日 2004 年 1 月 21 日

[11] 公开号 CN 1469125A

[22] 申请日 2002.11.26 [21] 申请号 02153181.1

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 15 [33] CN [31] 02124177.5

[71] 申请人 中国人民解放军第二六一医院

地址 100094 北京市海淀区上庄乡第 261 医院实验室

[72] 发明人 贾月萍 佟玉偏 张晓芳 陈昌松

祝 杨 王东香

[74] 专利代理机构 北京恒信悦达专利代理有限公司

代理人 王卫东

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 莱姆病试剂盒及检测莱姆病的方法

[57] 摘要

本发明涉及莱姆病检测试剂盒和检测方法。本发明的莱姆病试剂盒包括 P39 蛋白抗原包被的载体微孔板，酶标抗体，和底物液等。本发明的莱姆病试剂盒的优点是抗原免疫源性强、稳定、能批量生产，并用一套试剂和多个单克隆鼠抗人 IgG 抗体，解决了显色时交叉反应，使本底更清晰，该试剂盒操作简便，不需要特殊仪器一般医院检验科专业人员均可操作。能广泛用于流行病调查和单个病人检测。与其它检测方法比较易于推广。

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

- 1、一种莱姆病试剂盒，包括莱姆病螺旋体 P39 基因表达的 P39 蛋白抗原包被的载体微孔板，酶标抗体，和底物液。
- 2、根据权利要求 1 的莱姆病试剂盒，特征在于还包括 IgG 阳性标本，IgG 阴性标本，样品稀释液，洗涤液和终止液。
- 3、根据权利要求 1 或 2 的莱姆病试剂盒，其中底物液包括底物液 A 和 B，其中 A 包括柠檬酸，醋酸钠，过氧化脲和 H_2O ，底物液 B 包括柠檬酸，EDTA， H_2O 和四甲基联苯胺 (TMB)。
- 4、根据权利要求 1 或 2 的莱姆病试剂盒，其中终止液为 2N H_2SO_4 。
- 5、根据权利要求 1 的莱姆病试剂盒，其中酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的 2 株鼠抗人单克隆抗体。
- 6、一种检测莱姆病的方法，包括将莱姆病螺旋体 P39 基因表达的 P39 蛋白抗原按照一定的量包被于微孔板上，然后将病人血清和抗原发生特异性的抗原抗体反应，加入辣根酶标记过的抗人 IgG 抗体，加入底物进行显色反应。

莱姆病试剂盒及检测莱姆病的方法

发明领域

本发明涉及莱姆病试剂盒以及检测莱姆病的方法。

背景技术

莱姆病的血清学检测方法，主要是用已知抗原检测患者体内可能存在的针对莱姆病螺旋体的特异性抗体，最常用的方法是，间接免疫荧光试验（IFA）、酶联免疫吸附实验（ELISA）、免疫印迹实验（Western blotting）、分子生物学方法聚合酶链（PCR）、组织镜检与体外病原菌培养。

到目前为止，莱姆病的实验室诊断没有得到有效的解决，全球仍然没有统一的参考标准。

传统的血清学检测多采用莱姆病螺旋体全菌抗原作为标准抗原，交叉反应比较严重，如酶联免疫吸附实验（ELISA）。间接免疫荧光实验（IFA）和酶联免疫吸附实验（ELISA），就这两种方法比较，间接免疫荧光实验（IFA）是将菌体固定于载体上，加上病人的血清，在用荧光二抗来显色，其灵敏度低，人为干扰因素比较多。免疫印迹实验比较复杂，一般实验室不易做到。聚合酶链反应（PCR）是敏感特异的方法，但由于病人菌血症时间短且不规则，在临床实验室诊断中有其根本的局

限性，与 PCR 在诊断其他病原微生物方面一样，也具有明显的误导作用，目前仍处于实验室研究阶段。

关于莱姆病螺旋体特异抗体检测用抗原可分为以下几个发展阶段。

1、全菌抗原

1) 最传统的方法，有两种：

A. 一是将整个菌体吸附于抗原板上，方法与 IFA 一样只能检测到菌体表面的抗原，灵敏度和特异性都不满意，目前已被淘汰。

B. IFA 法（免疫荧光法）其特点同上，也是将菌体固定于载体上，但受人造的干扰比较多，如判定结果的标准，是在一个视野能看到有 50% 的菌体即为阳性，这只是多少的估计，必须在有经验的人指导下使用。由于菌体暴露的是表面抗原其灵敏度和特异性也不满意。现在虽然用，但趋于淘汰。

C. 对菌体进行超声波击碎制成可溶性抗原，它的优点是让菌体内部的抗原暴露出来得到检测机会。但是它的各种抗原比例是菌体本身的组成所决定，而实际上不同抗原在诊断中所起的作用是不一样的（即抗原性是不同的）同时它也不能排除莱姆病螺旋体和其它菌体有交叉的抗原存在

2) 提纯抗原，是应用一定的技术对莱姆病螺旋体内部分抗原进行提纯，提取主要免疫反应性抗原，使用最多的是用超速离心方法提取鞭毛蛋白，因为随着人们研究的深入和应用范围的增加，认识到病人在早期和晚期都产生对鞭毛蛋白的抗体，德国的 Klaus Hensen 用它做抗原发现灵敏度和特异性都高于全菌 ELISA，但由于没能去除交叉的鞭

毛蛋白成份，仍有假阳性的发生，为此，后来人们在合成抗原中仅对鞭毛蛋白中对莱姆病螺旋体特异的片段进行克隆表达，即基因工程抗原。

3) 基因工程抗原，随着研究的深入人们已经了解到哪些蛋白是主要的早期免疫反应性蛋白，利用分子克隆和表达技术对某些蛋白进行合成，用作 ELISA 抗原。

发明内容

莱姆病是近十年来在世界广泛流行的人畜共患新病种之一，其流行之广泛在世界有多个国家报道。我国已发现莱姆病疫源地区 17 个省市，22 个省市有莱姆病的报道。由于莱姆病对人体危害极大，又不易被临床医生认识，所以极易引起临床上的误诊误治，有些莱姆病病人长期得不到有效医治，造成终身残疾，甚至死亡，所以莱姆病的临床实验诊断成为我国近年来的重要研究课题，2001 年列入国家“十五”攻关计划。我院研究莱姆病已有十余年的历史，所以根据国外的资料，我们用我国自行分离的莱姆病螺旋体菌株 BmpA 即 P39 基因，成功的进行基因克隆。P39 基因在大肠杆菌中以天然蛋白形式得到高效表达（参阅佟玉品等人的“莱姆病螺旋体 T39 蛋白的基因克隆及在大肠杆菌的高效表达”，中国人兽共患病杂志，2000，16 卷，第 4 期，9-11 页）。表达的 P39 蛋白，在一系列的试剂组合作用下，较好的解决了以往的抗原交叉反应问题。用于 ELISA 检测临床莱姆病收到良好的社会效益，其抗原处于国家莱姆病实验诊断用抗原领先地位。填补了我国无检测莱姆病试剂盒的空白。

因此,本发明的目的是提供莱姆病试剂盒,该试剂盒特征在于包括 P39 蛋白抗原包被的载体微孔板,酶标抗体,和底物液。

本发明的试剂盒还可包括 IgG 阳性标本, IgG 阴性标本,样品稀释液,洗涤液和终止液。

优选,样品液稀释液包括: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , 马血清, 硫柳汞, 庆大霉素和 H_2O ; 酶标抗体稀释液包括 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , Casein, 硫柳汞, 庆大霉素, 马血清和 H_2O ; 洗液包括 NaCl , KCl , KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Tween-20 和 H_2O ; 底物液包括底物液 A 和底物液 B, 底物液 A 包括柠檬酸, 醋酸钠, 过氧化脲和 H_2O , 底物液 B 包括柠檬酸, EDTA, H_2O 和四甲基联苯胺 (TMB); 和终止液为 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ 。

实施方案

本发明的试剂盒的组成:

- 1) 聚苯乙烯微孔板 (深圳化工一厂)。
- 2) 酶标鼠抗人 IgG 抗体进行筛选, 选择协和基础研究所用辣根酶记, 2 株鼠抗人单克隆抗体, 混和抗体为应用二抗, 其使用浓度为 1:10000 (2D1 和 2D5)。
- 3) P39 蛋白抗原包被浓度的筛选, 应用浓度为 145ng/ml。该抗原用我国自行分离的莱姆病螺旋体菌株 BmpA 即 P39 基因, 成功的进行基因克隆, 在大肠杆菌中以天然蛋白形式高效表达来制取。
- 4) 试剂

A 封闭液

NaCl 8.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g Casein
2.5g 蔗糖 50 g 马血清 22 mL H_2O 1000mL

B 样品液稀释液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g NaCl 8.0g 马
血清 50mL 硫柳汞 0.5g 庆大霉素 2ml H_2O 1000mL

C 酶标抗体稀释液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.593g NaCl
8.0g
Casein 2.5 g 硫柳汞 0.5g 庆大霉素 2mL 马血清 50mL H_2O
1000mL

D 洗 液

NaCl 8.0g KCl 0.2g KH_2PO_4 2.0g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g Tween-20 1.0mL H_2O 1000mL

E 包被液

Na_2CO_3 1.59g NaHCO_3 2.93g H_2O 1000ml

F 底物液 A

柠檬酸 2.101g 醋酸钠 12.247g 过氧化脲 0.6g
 H_2O 1000ml

底物液 B

柠檬酸 2.101g EDTA 0.3g H_2O 1000ml

四甲基联苯胺 (TMB) 1.0g 溶于上液中

G 终止液 2N/H₂SO₄

5) 实验检测最佳温度 37℃

本发明莱姆病试剂盒的检测方法

本试剂盒采用了基因工程抗原 P39 包被 48 孔板, 底物为 TMB, 采用先进的样品稀释液配方, 使其稳定性好特异性强, 适合批量检测, 可供临床检验科或实验室诊断及莱姆病研究, 本试剂盒于 4℃ 保存, 有效期暂定为 6 个月。

- | | |
|---------------------|--|
| 1、预包被微孔条 | 5、样品稀释液 |
| 2、酶联试剂 | 6、PBST 洗涤液 |
| 3、IgG 阳性标本 (20 倍稀释) | 7、显色剂、A、B。 |
| 4、IgG 阴性标本 (20 倍稀释) | 8、终止液 (2M H ₂ SO ₄) |

操作步骤

- 1、洗涤液配制, 每瓶 PBST 洗涤液用蒸流水稀释至 400ml;
- 2、标本稀释, 用样品稀释液稀释 400 倍;
- 3、阳性和阴性对照血清的稀释, 盒内阳性和阴性对照血清已 20 倍稀释好, 用者只需吸取 10 μL 加入 200 μL 样品稀释液, 即为应用对照血清;
- 4、加样, 将稀释好的待检测样品及对照血清, 按顺序分别加入 100 μL 与微孔中;
- 5、温育, 置 37℃ 温育 60 分钟;
- 6、洗涤, 将孔内的液体甩干, 用洗涤液, 洗涤 3 次 × 5 分钟;

- 7、加酶联试剂每孔 100 μ L;
- 8、温育, 置 37℃温育 20 分钟;
- 9、洗涤, 将孔内的液体甩干, 用洗涤液, 洗涤 3 次 $\times$ 5 分钟;
- 10、显色, 每孔加显色剂 A、B 各一滴 (50 μ L) 混匀, 37℃或室温避光 5 分钟;
- 11、终止液, 每孔加一滴 (50 μ L) 混匀;
- 12、用酶标仪 450nm 测定各孔 OD 值。

结果判定

用空白调零点, 以 OD 值 > 0.200 为阳性

洗涤液的配制

NaCL	8.0g
KCL	0.2g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Tween ₂₀	1.0ml
蒸馏水	1000ml

本发明的优点:

ELISA (酶联免疫吸附试验) 是将特异性的莱姆病螺旋体抗原按照一定的量包被于微孔板上, 然后将病人血清和抗原发生特异性的抗原抗体反应, 加入辣根酶标记过的抗人 IgG 抗体, 加入底物进行显色反应。

该试剂盒应用基因工程抗原，其优点是抗原免疫源性强、稳定、能批量生产，并用一套试剂和多个单克隆鼠抗人 IgG 抗体，解决了显色时交叉反应，使本底更清晰，该试剂盒操作简便，不需要特殊仪器一般医院检验科专业人员均可操作。能广泛用于流行病调查和单个病人检测。与其它检测方法比较易于推广。

我国应用重组蛋白诊断莱姆病的工作尚未开展，而且急需建立一种简便，敏感，特异的血清学检测方法。为此，我们的试剂盒解决了这一问题。方便了临床的应用。

专利名称(译)	莱姆病试剂盒及检测莱姆病的方法		
公开(公告)号	CN1469125A	公开(公告)日	2004-01-21
申请号	CN02153181.1	申请日	2002-11-26
[标]发明人	贾月萍 佟玉磊 张晓芳 陈昌松 祝杨 王东香		
发明人	贾月萍 佟玉磊 张晓芳 陈昌松 祝杨 王东香		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/547 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	Y02A50/57		
代理人(译)	王卫东		
优先权	02124177.5 2002-07-15 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及莱姆病检测试剂盒和检测方法。本发明的莱姆病试剂盒包括P39蛋白抗原包被的载体微孔板，酶标抗体，和底物液等。本发明的莱姆病试剂盒的优点是抗原免疫源性强、稳定、能批量生产，并用一套试剂和多个单克隆鼠抗人IgG抗体，解决了显色时交叉反应，使本底更清晰，该试剂盒操作简便，不需要特殊仪器一般医院检验科专业人员均可操作。能广泛用于流行病调查和单个病人检测。与其它检测方法比较易于推广。