

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510103292.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100401066C

[22] 申请日 2005.9.23

[21] 申请号 200510103292.2

[73] 专利权人 中国人民解放军第三〇九医院

地址 100091 北京市海淀区黑山扈甲 17 号

[72] 发明人 张灵霞 吴雪琼

[56] 参考文献

CN1105181A 1995.7.12

US6127326A 2000.10.3

JP2004166564A 2004.6.17

CN1420123A 2003.5.28

WO0104151A2 2001.1.18

AU779495B B2 2005.1.27

审查员 李 冰

[74] 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所

代理人 廖元秋

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

基于组合蛋白的结核分枝杆菌金标诊断试剂

[57] 摘要

本发明属于医学免疫诊断技术领域，涉及基于组合蛋白的结核分枝杆菌金标诊断试剂，采用结核分枝杆菌主要分泌蛋白 ESAT6、MPT64、PstS - 1、Ag85B 的 B 细胞抗原决定簇重新组合为一组蛋白作抗原，作为结核病的临床血清学诊断的特异性地检测抗体。本发明将结核分枝杆菌主要分泌蛋白的 B 细胞抗原决定簇基因进行组合并通过基因工程手段表达、纯化得到一个新蛋白，通过金标渗滤法检测结核病人血清。本发明灵敏度高，操作简单，检测快速、省时，特异性强，能区分是因为接种卡介苗、以及与环境多种非结核分枝杆菌接触而造成的致敏还是真正的结核分枝杆菌感染，可广泛用于临床结核病的临床血清学诊断。

1. 一种基于组合蛋白的结核分枝杆菌的金标诊断试剂，其特征在于，采用结核分枝杆菌主要分泌蛋白 ESAT6、MPT64、PstS-1、Ag85B 的 B 细胞抗原决定簇重新组合为一个蛋白作抗原，作为结核病的临床血清学诊断的特异性地检测抗体；所述结核分枝杆菌主要分泌蛋白的 B 细胞抗原决定簇组合蛋白的编码基因为：

```
ATG ACA GAG CAG CAG TGG AAT TTC GCG GGT ATC GAG GCC GCG GCA AGC GCA ATC
CAG GGA  GGC TGT GGC TCG AAA CCA CCG AGC GGT TCG CCT GAA ACG GGC GCC GGT
CCA ACG ACC ACG TAC AAG GCC TTC GAT TGG GAC CAG GCC TAT CGC AAG CCA ATC ACC
TAT  GGT CCC TCG AGT GAC CCG GCA TGG GAG CGC AAC GAC CCT ACG CAG CAG  AGC
TTC CTC GAC CAG GCC AGT CAA CGG GGA CTC GGC GAG GCC CAA  GCT CAG CTC AAC
GCC ATG AAG GGT GAC CTG CAG AGT TCG TTA GGC GCC。
```

## 基于组合蛋白的结核分枝杆菌金标诊断试剂

### 技术领域

本发明属于医学免疫诊断技术领域，涉及利用结核分枝杆菌主要分泌蛋白 ESAT6、MPT64、PstS-1、Ag85B 抗原决定簇组合而成的新蛋白进行结核分枝杆菌诊断检测的试剂及其在临床结核病的诊断中的应用。

### 发明背景

当前，由于耐药和耐多药结核病的增多，流动人口的增加以及艾滋病和结核病合并感染，造成结核病在全球范围内回升。结核病仍然是当今全球最严重的传染病之一，全球有三分之一的人口约有 20 亿人感染过结核分枝杆菌，每年约有 1000 万新感染者，每年有约 300 万人死于结核病。中国现有结核病病人 500 万，占全球的四分之一，且下降趋势缓慢，耐药率高达 46%，被列为“特别引起警示的国家和地区”之一。

结核病的临床诊断对于结核病的早发现和早治疗具有重要意义。目前结核病诊断的主要手段有病原菌的涂片染色镜检和分离培养、结核菌素皮肤试验以及血清学检测等。涂片染色镜检基于结核杆菌抗酸染色特性达到检测的目的，但该方法存在灵敏度低、特异性差的缺点（灵敏度为 10-20%）。分离培养法检查往往需 4-8 周或更长的时间，常延误临床的诊断和治疗。结核分枝杆菌侵入人体后，会引起人体的细胞免疫和体液免疫，以细胞免疫为基础的 PPD 皮试是临床上广泛应用的比较简便的结核菌感染的检测方法，但特异性较差。以体液免疫为基础的结核病特异性抗体的检测已经成为结核病诊断的一种重要的辅助手段。早期，人们将 PPD 作为抗原通过 ELISA 法来检测抗体，这种方法具有一定的局限性。一、PPD 是一种混合性抗原，很多蛋白不仅结核分枝杆菌有，其他分枝杆菌也具有。很难鉴别结核病与环境分枝杆菌感染者以及卡介苗接种阳转者。二、ELISA 法需专人操作，不同人操作，不同批试剂，结果有很大不同，稳定性较差，而且时间也较长，需 2-3 小时。临床标本难做到随到随检测，限制了其推广。后来，金标渗滤法应用到结核病人抗体的检测，大大缩短了检测的时间（仅 10-20 分钟），降低了反应中人为因素的影响，在一定程度上提高了特异性，现在临床应用的多是由这一方法制备的试剂盒。但仅用单一蛋白作抗原，就降低了检测的敏感性，而且金标法检测临床标本的敏感性本身就低于 ELISA 法，而且重组蛋白也含有不同的抗原决定簇，有一定的交叉反应，敏感性和特异性都需进一步提高。

ESAT-6、MPT64、PstS-1、Ag85 是结核分枝杆菌的主要分泌蛋白，能引起人体的保护性免疫反应。且 ESAT6、MPT64 在大部分环境及卡介苗中缺失，PstS-1 在卡介苗中的含量也只是结核分枝杆菌的十分之一。1998 年，Morten 等报道了 ESAT6 的 B 细胞抗原决定簇，Thomas 等报道了 MPT64 的抗原决定簇，PstS-1、Ag85B 的抗原决定簇也已被报道。

市售结核病血清检测试剂 IC-TB 卡中含 PstS-1 完整蛋白,其敏感性和特异性均有待提高;其他蛋白未见制成血清学检测试剂的报道。

## 发明内容

本发明的目的是为克服已有技术的不足之处,提出一种基于组合蛋白的结核分枝杆菌的金标诊断试剂,该试剂灵敏度高,特异性强,且操作简便、快速,不需要人员培训及昂贵的仪器设备,可广泛用于临床结核病的临床血清学诊断。

### 本发明的特点及良好效果

本发明将结核分枝杆菌主要分泌蛋白 ESAT-6、MPT64、PstS-1、Ag85B 的结核分枝杆菌特异性的 B 细胞抗原决定簇的氨基酸进行组合。通过常规的计算机软件分析组合蛋白的空间结构,选择空间结构合理的组合蛋白,再通过常规的基因工程手段,将组合蛋白在体外表达、纯化、并制备结核分枝杆菌的抗体检测金标试剂。

利用本发明的组合蛋白作为抗原可检测针对由 ESAT-6、MPT64、PstS-1、Ag85B 蛋白作抗原所产生的结核病特异性抗体,比单一完整蛋白检测的敏感性和特异性有所提高。结核分枝杆菌主要分泌蛋白 B 细胞抗原决定簇组合蛋白与免疫金银染色联合应用,理论上可从 2 个方面提高检测的敏感性和特异性。同时,还具有金标渗滤法快速、易操作的特点,便于临床推广应用,对于结核病检测,确诊具有重要意义。可广泛用于临床结核病的临床血清学诊断。

本发明中的组合蛋白也可为包被抗原,制备结核分枝杆菌抗体 ELISA (间接法) 检测试剂。本发明中生产的抗体也可作为包被抗体,制备结核分枝杆菌抗原 ELISA (双抗体夹心法) 检测试剂。

## 具体实施方式

本发明提出的结核分枝杆菌的金标诊断试剂制备实施例,包括以下步骤:

1) 从文献中找出 ESAT-6、MPT64、PstS-1、Ag85B 蛋白结核分枝杆菌特异的 B 细胞抗原决定簇的氨基酸,进行组合,通过计算机软件预测组合蛋白的空间结构,选择空间结构合理的组合,合成组合蛋白的编码基因如下:

ATG ACA GAG CAG CAG TGG AAT TTC GCG GGT ATC GAG GCC GCG GCA AGC GCA ATC  
CAG GGA GGC TGT GGC TCG AAA CCA CCG AGC GGT TCG CCT GAA ACG GGC GCC GGT  
CCA ACG ACC ACG TAC AAG GCC TTC GAT TGG GAC CAG GCC TAT CGC AAG CCA ATC ACC  
TAT GGT CCC TCG AGT GAC CCG GCA TGG GAG CGC AAC GAC CCT ACG CAG CAG AGC  
TTC CTC GAC CAG GCC AGT CAA CGG GGA CTC GGC GAG GCC CAA GCT CAG CTC AAC  
GCC ATG AAG GGT GAC CTG CAG AGT TCG TTA GGC GCC, 该编码基因两端含酶切位点  
BamH I 和 HindIII;

2) 将上述合成的基因片段进行 PCR 扩增,将扩增产物克隆 T 载体上,对重组子进

行 BamH I 和 HindIII 酶切及测序鉴定, 用合成片段两端的酶切位点, 从 T 载体上切下目的片段, 克隆到表达载体 PET24b 上, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达, 培养至 OD600 为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 0.1M 诱导表达, 通过凝胶电泳及 Western Blotting 进行鉴定分析;

3)、采用凝胶 (Pharmacia 公司 chelating sephrose fast flow 生产), 经过金属整合层析来纯化表达蛋白;

4)、将购买纯化的人 IgG (从经科宏达公司) 采用标准的免疫程序免疫家兔制备抗人 IgG 抗体 (还可包括 IgM、IgA);

5)、通过柠檬酸还原法制备胶体金; 即 0.01% 氯化金水溶液 100ml 加热煮沸, 磁力搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 4ml, 继续加热煮沸使溶液呈亮红色为止; 冷却后调 pH 至 5.8, 按每 ml 胶体金加 6ug 兔抗人 IgG 的比例, 将二者混合, 加入适量聚乙而醇, 然后高速离心纯化。

6)、经方阵滴定, 确定检测蛋白的浓度 2mg/ml, 取 1ul 滴在纤维素滤膜上, 并取 2mg/ml 的人 IgG 1ul 滴在纤维素滤膜上, 制备金标渗滤板。并配备封闭缓冲液 (0.02mol/L Ph7.4 的 Tris-HCL 缓冲液, 含 1%BSA, 0.05% Tween-20), 洗涤缓冲液 (0.02mol/L Ph7.4 的 Tris-HCL 缓冲液, 0.05% Tween-20)。制备结核分枝杆菌金标渗滤抗体检测试剂。

7)、在结核分枝杆菌金标渗滤抗体检测试剂的基础上, 配备银染液 (乙酸银 0.11%, 对苯二酚 0.35%, 阿拉伯树胶 7.14%) 等试剂; 制备结核分枝杆菌金标渗滤 (银加强) 抗体检测试剂。

上述各制备步骤均为常规成熟技术。

本发明的应用实施例:

**实施例 1: 金标渗滤抗体检测试剂检测结核分枝杆菌抗体**

取金标渗滤板一块, 加封闭液 2-4 滴, 待封闭液完全渗干后, 加入病人血清 2-4 滴, 待血清完全渗干后, 加入洗涤缓冲液 2-4 滴, 待洗涤缓冲液完全渗干后, 加入金标二抗 2-4 滴, 二抗渗干后, 加入洗涤缓冲液 2-4 滴, 等 5-10 分钟, 待左边质控点完全显色后, 观察右边点是否显色, 若呈红色则为阳性结果, 若无点出现则为阴性结果。

**实施例 2: 金标渗滤 (银加强) 抗体检测试剂检测结核分枝杆菌抗体**

取金标渗滤板一块, 加封闭液 2-4 滴, 待封闭液完全渗干后, 加入病人血清 2-4 滴, 待血清完全渗干后, 加入洗涤缓冲液 2-4 滴, 待洗涤缓冲液完全渗干后, 加入金标二抗 2-4 滴, 二抗渗干后, 加入洗涤缓冲液 2-4 滴, 等 5-10 分钟, 待左边质控点完全显色后, 加银加强试剂 2-4 滴, 5-10 分钟后, 观察右边点是否显色, 若呈黑色则为阳性结果, 若无点出现则为阴性结果。

本发明的效果实验如表 1

表 1 不同试剂检测不同人血清（各 200 份）的阳性率

血清类型	检测试剂	
	FD 结核杆菌抗体诊断盒	本发明试剂
结核病人血清	48%	61%
健康人血清	5%	2%

由上结果可见本发明试剂检测结核病人血的敏感性为 61%，特异性为 98%，高于 FD 结核杆菌抗体诊断盒的 48%和 95%。

专利名称(译)	基于组合蛋白的结核分枝杆菌金标诊断试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN100401066C</a>	公开(公告)日	2008-07-09
申请号	CN200510103292.2	申请日	2005-09-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
[标]发明人	张灵霞 吴雪琼		
发明人	张灵霞 吴雪琼		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 C07H21/00		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1844929A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于医学免疫诊断技术领域，涉及基于组合蛋白的结核分枝杆菌金标诊断试剂，采用结核分枝杆菌主要分泌蛋白ESAT6、MPT64、PstS-1、Ag85B的B细胞抗原决定簇重新组合为一组蛋白作抗原，作为结核病的临床血清学诊断的特异性地检测抗体。本发明将结核分枝杆菌主要分泌蛋白的B细胞抗原决定簇基因进行组合并通过基因工程手段表达、纯化得到一个新蛋白，通过金标渗滤法检测结核病人血清。本发明灵敏度高，操作简单，检测快速、省时，特异性强，能区分是因为接种卡介苗、以及与环境多种非结核分枝杆菌接触而造成的致敏还是真正的结核分枝杆菌感染，可广泛用于临床结核病的临床血清学诊断。

血清类型	检测试剂	
	PD 结核杆菌抗体诊断盒	本发明试剂
结核病人血清	48%	61%
健康人血清	5%	2%