[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710118118.4

[43] 公开日 2008 年 1 月 9 日

[11] 公开号 CN 101100673A

[22] 申请日 2007.6.29

[21] 申请号 200710118118.4

[71] 申请人 北京现代高达生物技术有限责任公司

地址 100055 北京市宣武区广外大街 180 号中国新纪元大厦 704 室

[72] 发明人 张小刚

[74] 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所

代理人 吴 锦

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 3 页

[54] 发明名称

一种结核分枝杆菌重组融合蛋白及其应用

[57] 摘要

本发明提供了一种结核分枝杆菌重组融合蛋白，还提供了该重组融合蛋白在制备单抗、多抗、检测试剂盒及蛋白芯片中的应用。采用本发明提供的结核分枝杆菌重组融合蛋白制备的结核分枝杆菌诊断试剂盒，与市场上的同类试剂盒相比，具有特异性强、灵敏度高等优点，很好的满足了结核(TB)感染临床诊断的需要。

1、一种编码结核分枝杆菌重组融合蛋白的融合基因，其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2、一种结核分枝杆菌重组融合蛋白，其特征在于它由权利要求1所述的融合基因编码，其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3、一种结核分枝杆菌重组融合蛋白的表达载体pET-28b-38Kd-16 Kd，其特征在于它是将权利要求1所述的基因插入到质粒pET-28b上得到的重组质粒，其质粒图谱如附图1所示。

4、一种表达结核分枝杆菌重组融合蛋白的工程菌株，其特征在于它含有权利要求3所述的表达载体pET-28b-38Kd-16 Kd，其宿主菌为大肠杆菌。

5、一种结核分枝杆菌抗体IgG酶联免疫检测试剂盒，它包括TB抗原和酶标二抗，其特征在于所述TB抗原是由根据权利要求2所述的重组融合蛋白制得，其中抗原包被量为1.0-8.0μg/孔，酶标二抗工作浓度为2.0-16.0mg/mL。

6、根据权利要求5所述的检测试剂盒，其特征在于抗原包被量为2.0μg/孔，酶标二抗工作浓度为4.0mg/mL。

7、一种结核分枝杆菌抗体IgG诊断试剂盒，它包括TB抗原、胶体金标记TB抗原和质控线包被兔抗TB抗体，其特征在于所述TB抗原和胶体金标记TB抗原均是由根据权利要求2所述的重组融合蛋白制得。

8、根据权利要求7所述的试剂盒，其特征在于抗原喷点浓度为0.25-2.0mg/mL，金标记抗原染色液的工作浓度为OD值50.0-100.0，抗原喷点量为0.5-1.75μL/cm，金标记抗原喷点量为0.5-1.75μL/cm，质控线抗TB抗体包被浓度为0.5-2.0 mg/mL，反应膜封闭时间为45－75分钟，反应膜干燥条件为相对湿度25%－30%下干燥30－75分钟，金标记抗原垫干燥条件为相对湿度25%-30%下干燥3－5小时，标本检测反应时间为15℃～30℃下反应10－30分钟。

9、根据权利要求8所述的试剂盒，其特征在于抗原喷点浓度为1.0mg/mL，金标记抗原染色液的工作浓度为OD值80.0，抗原喷点量为1.0μL/cm，金标

记抗原喷点量为 1.0μL/cm, 质控线抗 TB 抗体包被浓度为 1.0 mg/mL，反应膜封闭时间为 60 分钟，反应膜干燥条件为相对湿度 25%－30%下干燥 60 分钟，金标记抗原垫干燥条件为相对湿度 25%-30%下干燥 4 小时，标本检测反应时间为 15℃～30℃下反应 25－30 分钟，温度低于 15℃时标本检测反应时间延长 10 分钟。

10、根据权利要求 2 所述的结核分枝杆菌重组融合蛋白在制备单抗、多抗、检测试剂盒及蛋白芯片中的应用。

一种结核分枝杆菌重组融合蛋白及其应用

技术领域

本发明涉及基因工程领域，具体地涉及一种结核分枝杆菌重组融合蛋白及其应用。

背景技术

结核病是由结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis，TB)感染所致的人类疾病，是分支杆菌病的主要类型，主要通过呼吸道传播。自1882年德国科学家Rrobert Koch发现TB以来，全球约有两亿人死于TB，且疫情发展日趋严重。据WHO预计，全球现有TB病人2000万，如不控制今后10年还将有9000万人发病。我国现有3.3亿结核菌感染者，肺结核病人600多万，其中有严重传染性的病人150万，每年死于结核病的达25万人。因此，结核病的预防、早期诊断和及时治疗是高度关注的课题。MTB有H37Rv与H37Ra两种标准菌株，前者为毒力株而后者为减毒突变株，它们均来源于1934年的人肺H37分离株。与一些临床分离株不同的是，H37Rv对药物敏感、利于基因工程操作并在TB动物模型中保留了完整毒力，因而该菌株被广泛应用于TB相关的生物医药研究(MTb H37Rv project at Sanger Institute, NCBI)。目前常用的结核病诊断方法有胸部X光透视和主要依靠患者痰液、胸水、支气管肺泡液的显微镜直接涂片检查（AFP）和培养法，以及分子生物学和血清学检查，这些方法多基于高特异性的抗原建立。

本发明提供了一种用基因工程方法生产的结核重组融合蛋白作为抗原，与常用抗原相比特异性更强，用其作为抗原制备的免疫诊断试剂盒，可为结核病感染的检测提供更为特异、准确的工具。

发明内容

（一）要解决的技术问题

本发明的目的是提供一种结核分枝杆菌重组融合蛋白，并提供该结核分枝杆菌重组融合蛋白在制备单抗、多抗、检测试剂盒及蛋白芯片中的应用。

（二）技术方案

本发明提供了一种编码结核分枝杆菌重组融合蛋白的融合基因，其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

本发明还提供了一种结核分枝杆菌重组融合蛋白，该重组融合蛋白由所述融合基因编码，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

本发明提供了一种结核分枝杆菌重组融合蛋白的表达载体 pET-28b-38Kd-16Kd，该表达载体是将所述融合基因插入到质粒 pET-28b 上得到的重组质粒，其质粒图谱如附图 1 所示。

本发明又提供了一种表达结核分枝杆菌重组融合蛋白的工程菌株，该工程菌株含有表达载体 pET-28b-38Kd-16Kd，其宿主菌为大肠杆菌。

本发明还提供了一种结核分枝杆菌抗体 IgG 酶联免疫检测试剂盒，它包括 TB 抗原和酶标二抗，其中 TB 抗原是由是由前述的结核分枝杆菌重组融合蛋白制得，抗原包被量为 1.0-8.0μg/孔，酶标二抗工作浓度为 2.0-16.0mg/mL。优选地，抗原包被量为 2.0μg/孔，酶标二抗工作浓度为 4.0mg/mL。

本发明提供了一种结核分枝杆菌抗体 IgG 诊断试剂盒，它包括 TB 抗原、胶体金标记 TB 抗原和质控线包被兔抗 TB 抗体，其中所述 TB 抗原和胶体金标记 TB 抗原均是由前述的结核分枝杆菌重组融合蛋白制得。

本发明所述的结核分枝杆菌抗体 IgG 诊断试剂盒，抗原喷点浓度为 0.25-2.0mg/mL，金标记抗原染色液的工作浓度为 OD 值 50.0-100.0，抗原喷点量为 0.5-1.75μL/cm，金标记抗原喷点量为 0.5-1.75μL/cm, 质控线抗 TB 抗体包被浓度为 0.5-2.0 mg/mL，反应膜封闭时间为 45－75 分钟，反应膜干燥条件为相对湿度 25%－30%下干燥 30－75 分钟，金标记抗原垫干燥条件为相对湿度 25%-30%下干燥 3－5 小时，标本检测反应时间为 15℃～30℃下反应 10－30 分钟。

优选地，抗原喷点浓度为 1.0mg/mL，金标记抗原染色液的工作浓度为 OD 值 80.0，抗原喷点量为 1.0μL/cm，金标记抗原喷点量为 1.0μL/cm, 质控线抗 TB 抗体包被浓度为 1.0 mg/mL，反应膜封闭时间为 60 分钟，反应膜干燥条件为相对湿度 25%－30%下干燥 60 分钟，金标记抗原垫干燥条件为相对

湿度 25%-30%下干燥 4 小时，标本检测反应时间为 15℃～30℃下反应 25－30 分钟，温度低于 15℃时标本检测反应时间延长 10 分钟。

本发明还公开了所述的结核分枝杆菌重组融合蛋白在制备单抗、多抗及蛋白芯片中的应用。

（三）有益效果

采用本发明提供的结核分枝杆菌重组融合蛋白制备的诊断试剂盒，与市场上的同类试剂盒相比，具有特异性强、灵敏度高等优点，很好的满足了 TB 感染临床诊断的需要。

附图说明

图 1 是表达质粒 pET-28b-38Kd-16Kd 的构建流程图;

图 2 是表达质粒 pET-28b-38Kd-16Kd 酶切产物电泳图，其中 1 表示 DNA Marker， 2、3、4 分别表示酶切后的三个阳性菌，5 表示酶切前的重组质粒;

图 3 是结核分枝杆菌重组融合蛋白纯化电泳图，其中 1 表示细胞裂解后的上清，2 表示细胞裂解后的沉淀，3 表示纯化的 TB 蛋白;

图 4 是结核分枝杆菌重组融合蛋白 Western Blot 鉴定图，其中 1 表示诱导前菌体总蛋白，2 表示诱导后菌体总蛋白。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的保护范围。

实施例1 结核分枝杆菌重组融合蛋白的制备

1.1 基因融合

通过计算机分析 TB H37Rv 基因组全序列，选择其强抗原表位 38kDa 蛋白(GENEBANK locus: YP_177770)和 16kDa(GENEBANK locus: NP_214765)的 DNA 序列为模板，设计扩增引物为:

38kD扩增引物:

38-16a: atcgCATATGtgtggctcgaaaccaccgagc 61.9% Tm: 72.59

38-16b: GATTGTTCATACCACCACCACCGCTGGAAATCGTCGCGATCGC 53% Tm: 86

16kD扩增引物:

38-16c: ggtggtggtggtATGAACAATCTCGCATTG 50% Tm:76

38-16d: atcgCTCGAGCTACTTCGTGATGGCGATGC 57% Tm:74

50 mL 扩增体系: ddH_2O 31.5 mL, 10×buffer 5.0 mL, 4×dNTP 4.0 mL, 上、下游引物混液 4.0 mL, DNA 1.5 mL, Taqplus 0.2 mL(1 U)。

取结核分支杆菌 H37RV 的菌体,加 100mL 蛋白酶 K(10mg/mL),置 56℃水浴消化 4 小时,用常规酚/氯仿法纯化,用上述引物进行 PCR 扩增。其中,38Kd 上游引物和 16Kd 下游引物分别增加了 Nde Ⅰ和 Xho Ⅰ酶切位点。

将克隆片段进行修饰,产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后切割,将含 DNA 条带的胶块按 DNA 快速纯化试剂盒 (购自六合通-北京 TAKARA 公司,产品名称: TAKARA MiniBEST Plasmid purification)说明回收 DNA。然后再以 38kDa 和 16kDa 基因片段为模板用连接 PCR 扩增 38kDa 和 16kDa 融合基因,中间以 4 个 Gly (ggtggtggtggt) 连接。

质粒 DNA 和 38Kd－16Kd 均经内切酶切,50 mL 体系: 10 x buffer 5.0 mL, DNA 12 mL , Xho Ⅰ和 Nde Ⅰ各 15 U,ddH2O 补至 50 mL; 37℃水浴 6 h。50 mL 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离,切割 DNA 条带琼脂块,并按 DNA 快速纯化试剂盒说明回收 DNA。

将融合基因片段克隆至 pET-28b 质粒 (具有 Xho Ⅰ和 Nde Ⅰ酶切位点,购自华美生物公司),20 mL 连接体系: ddH_2O15.0 mL, 10 x buffer 2.0 mL, PET-28b 2.0 mL, Pab 1.0 mL, T_4DNA 连接酶 20 U。质粒自身连接对照,20 mL 连接反应体系: ddH_2O 16.0 mL, 10 x buffer 2.0mL, PET-28b 2.0 mL, T4DNA 连接酶 20 U。按上述加样后,混匀、稍离心,14℃-16℃连接过夜。转化 *E. coli* 涂平板 (含有 15 微克/毫升卡那霉素的 LB 固体培养基) 并挑克隆提质粒测序,确定序列正确的克隆。重组质粒的酶切(NdeI/XhoI)电泳图如附图 2 所示。

1.2 产物测序

测序引物为：S38-16(GCTGGAAATCGTCGCGATCAA)及 T7 promoter 和 T7 terminator 的通用引物。 所有扩增引物和测序引物的合成以及重组质粒序列 pET-28b-38Kd-16 Kd 的测定都由华大基因公司提供服务。测得目的融合基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

1.3 目的蛋白的表达、纯化

将验证正确克隆的质粒（pET-28b-38Kd-16 Kd），转化大肠杆菌 BL21（DE3，购自华美生物公司）宿主菌，目的蛋白在包含体内进行表达：将含有 38－16k 基因的 BL21（DE3）宿主菌培养到 OD 0.6，用终浓度 1mM IPTG 诱导表达，4 小时之后收集菌体、超声破碎、高速离心、收集沉淀。对收集的沉淀用 Ni 柱（Pharmcia 公司 chelating sephrose fast flow）进行纯化，用如下溶液洗脱：300mM 咪唑，20mM Tris，500Mm NaCl，8M Urea。38kDa 和 16kDa 融合基因表达蛋白共 512 个氨基酸，氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

1.4 融合蛋白检定

1.4.1 纯度和分子量的测定：经 SDS－PAGE 电泳检测（蛋白上样量 10μg），为单一区带，薄层扫描鉴定纯度为 95.4%。分子量约为 54kD，检测结果见附图 3。

1.4.2 浓度测定：经 Folin-酚法测定，以牛血清白蛋白作为标准参比品，抗原蛋白浓度为 3.5±0.12mg/mL。

1.4.3 活性测定：用间接 ELISA 方法测定。包被量 2.0μg/孔，使用内部质控血清测定 OD 值，结果见表 1。

表 1 抗原活性测定结果

		抗 TB 阳性血清			抗 TB 阴性血清		
		P1	P2	P3	N1	N2	N3
测定 OD 值	1	0.863	1.236	0.382	0.022	0.091	0.050
	2	0.826	1.176	0.326	0.021	0.089	0.056
	3	0.926	1.261	0.415	0.019	0.095	0.049
	4	0.895	1.198	0.362	0.026	0.083	0.057
	5	0.928	1.271	0.378	0.025	0.095	0.046
$\bar{X}$±SD		0.888 ±0.043	1.228 ±0.041	0.373 ±0.032	0.023 ±0.0029	0.091 ±0.0050	0.052 ±0.0047

抗原抗体反应：采用蛋白印记技术（Western Blot），以抗人结核 IgG 抗体阳性人血清测试 TB 融合抗原，可见阳性反应，SDS－PAGE 并证实抗原的分子量为 54KD。结果见附图 4。

1.4.4 融合蛋白稳定性测定：

蛋白质浓度的稳定性测定，分三次测定保存的结核抗原溶液的蛋白质浓度的稳定性，结果见表 2.

表 2.结核蛋白的浓度测定

抗原	批号	蛋白浓度测定（mg/mL）		
		第 1 次（3 个月）	第 2 次（6 个月）	第 1 次（12 个月）
rTBA	04－1	1.02	1.00	1.01
rTBA	04－2	1.10	1.04	1.03
rTBA	04－3	1.00	1.01	1.00

测试结果显示，-85℃保存的结核抗原溶液的蛋白质浓度非常稳定。

结核抗原活性的稳定性测定，分三次喷点-85℃保存的结核抗原并制成胶体金试剂盒，以企业质控参比品进行测定结果见表 3.

表 3 结核抗体企业质控参比品的考核结果

样品	第一次	第二次	第三次
N1	－	－	－
N2	－	－	－
P1	＋	＋	＋
P2	＋	＋	＋
P3	＋	＋	＋
P4	＋	＋	＋
P5	＋	＋	＋

测定结果显示，-85℃保存的结核抗原的免疫活性稳定。

注：本发明所用样本由全军结核病研究中心提供。由临床细菌学检查及临床 X 线等临床确诊的结核病患者血清结核抗体 IgG 阳性的感染者及阴性血清、血浆制成。30 支样品，其中 15 支抗人结核抗体 IgG 阴性参考品（N）;

15 支抗人结核抗体 IgG 阳性参考品（P）。

实施例 2 酶联免疫法（ELISA）检测结核分枝杆菌抗体 IgG 的建立

采用间接 ELISA 方法检测结核分枝杆菌抗体 IgG，可用于 TB 抗原活性的检定和 TB 感染的辅助诊断。为确定抗原包被量和酶标二抗工作浓度，以阳性和阴性参考品为测试样品，采用方阵滴定法选择最佳抗原包被量和相应的酶标二抗工作浓度，见下表 4。

表 4 最佳抗原包被量和相应的酶标二抗工作浓度的选择

酶标二抗 IgG 浓度(mg/ml)	包被重组 TB 抗原量(μg/孔)	参考品			
		P1	P2	P3	N1
2.0	0.5	0.101	0.309	0.025	0.017
	1.0	0.122	0.337	0.025	0.019
	2.0	0.323	0.892	0.091	0.021
	4.0	0.405	0.978	0.099	0.020
4.0	0.5	0.411	0.988	0.092	0.015
	1.0	0.817	1.098	0.103	0.014
	2.0	0.825	1.245	0.396	0.022
	4.0	0.867	1.352	0.409	0.026
8.0	0.5	0.402	0.305	0.110	0.089
	1.0	0.573	0.348	0.112	0.090
	2.0	0.712	1.261	0.399	0.098
	4.0	1.359	1.271	0.863	0.141
16.0	0.5	0.890	1.343	0.426	0.098
	1.0	1.003	1.351	0.614	0.108
	2.0	1.291	1.355	0.859	0.134
	4.0	1.406	1.401	0.928	0.201

注：以阳性和阴性参考品为测试样品，阴性参考品出现任何一份阳性即判断出现假阳性结果，在表中即以“±”表示；阳性参考品出现任何一份阴性即判定出现假阴性结果，在表中即以“±”表示。

根据测试结果，在抗原包被量为 2.0μg/孔，酶标二抗使用浓度为 4mg/ml 时，检测结果最佳，故以 TB 重组抗原 2.0μg/孔包被微孔板和 4mg/ml 酶标二抗 IgG，建立结核分枝杆菌抗体 IgG 酶联免疫检测法（间接 ELISA）。

实施例 3 结核分枝杆菌抗体 IgG 诊断试剂盒（胶体金法）的制备及性能检定

2.1 试剂盒组成及制备

本发明试剂盒以纯化的结核分枝杆菌（TB）特异性融合蛋白作为抗原，采用双抗原夹心法。使用时加入待检血清，如样品中含有抗 TB 特异性抗体，则先与金标记 TB 抗原结合，前行再与膜表面的相应 TB 抗原结合形成复合物而呈现紫红颜色。如样品中无抗 TB 特异性抗体，则只有质控线颜色，其颜色强度直接与样品中存在的抗 TB 特异性抗体 IgG 的量呈正比。

试剂盒主要组成成分为测试板，包括加样区、金标抗原包被膜区、抗原包被检测区、质控区和吸水垫区。

2.1.1 质控线包被兔抗 TB 抗体:（购自北京赛蒂克生物技术公司，蛋白浓度为 4.0±0.15mg/mL，免疫琼脂双扩散效价≥1:16）。

2.1.2 胶体金标记 TB 抗原：胶体金直径 30nm 胶体金颗粒，原液光密度 OD 不小于 10.0。

2.1.3 条件优化

2.1.3.1 抗原和金标抗原包被浓度的确定：采用方阵滴定选择最佳抗原包被浓度和相应的金标记抗原工作浓度，见下表 5。

表 5 最佳抗原和相应的金标记抗原工作浓度的选择

标记抗原	抗原浓度（mg/mL）						
浓度（OD 值）	2.00	1.5	1.25	1.00	0.75	0.50	0.25
50.0	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
60.0	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-
70.0	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
80.0	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
90.0	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
100.0	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-

注：以阳性和阴性血清质控参比品为测试样品，阴性参考品出现任何一份阳性即判断出现假阳性结果，在表中即以“+/”表示；阳性参考品出现任何一份阴性即判定出现假阴性结果，在表中即以“-/”表示。

根据测试结果，在抗原喷点量为 1.0μL/cm 和金标记抗原喷点量为 1.0μL/cm 的条件下，选定最佳抗原喷点浓度为 1.0mg/mL，金标记抗原染色液

的工作浓度为 OD 值 80.0。

2.1.3.2 最佳抗原喷点量的确定:在已确定最佳抗原喷点浓度为 1.0mg/mL 和最佳金标记抗原喷点浓度为 OD 值 80.0 的基础上，采用方阵滴定选择最佳抗原喷点量（见表 6）

表 6 最佳抗原喷点量的确定

样品 NO	抗原喷点量（μL/cm）					
	1.75	1.5	1.25	1.00	0.75	0.50
N1	-	-	-		--	-
N2	-	-	-		--	-
N3	±	-	-	-	-	-
P1	+	+	+	+	+	+
P2	+	+	+	+	+	-
P4	+	+	+	+	+	-
P5	+	+	+	+	+	+

根据测试结果，选定最佳抗原喷点量为 1.0μL/cm.

2.1.3.3 最佳金标记抗原喷点量的确定； 在已确定最佳抗原喷点浓度为 1.0mg/mL，喷点量为 1.0μL/cm 和最佳金标记抗原喷点浓度为 OD 值 80.0 的基础上，采用方阵滴定选择最佳金标记抗原喷点量（见表 7）。

表 7 最佳金标记抗原喷点量的确定

样品 NO	金标记抗原喷点量（μL/cm）					
	1.75	1.5	1.25	1.00	0.75	0.50
N1	-	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	-	-	-
N3	-	-	--	-	-	
P1	+	+	+	+	+	+
P2	+	+	+	+	+	+
P4	+	+	+	+	+	-

根据测试结果，选定最佳金标记抗原喷点量为 1.0μL/cm。

2.1.3.4 质控线抗 TB 抗体包被浓度的选择

抗 TB 抗体包被量为 1μL/cm。质控线抗 TB 包被浓度选择的实验结果见表 8。

表 8 质控线抗 TB 包被浓度的选择

包被抗 TB 抗体浓度(mg/mL)			抗 TB 阴性反应血清
测试结果	反应 5 分钟	0.5	-
		1.0	+
		1.5	+
		2.0	++
	反应 10 分钟	0.5	+
		1.0	++
		1.5	+++
		2.0	+++
	反应 15 分钟	0.5	+
		1.0	+++
		1.5	+++
		2.0	+++
	反应 20 分钟	0.5	++
		1.0	+++
		1.5	+++
		2.0	+++
	反应 25 分钟	0.5	++
		1.0	+++
		1.5	+++
		2.0	+++
测试结果	反应 30 分钟	0.5	++
		1.0	+++
		1.5	+++
		2.0	+++

-：未出现对照线； +:对照线清晰； +++：对照线线清晰粗大。

表 8 显示，兔抗 TB 抗体与本试验中所用金标抗原有较好的反应性。1.0 mg/mL 浓度的抗 TB 包被基本上能够较好地显示对照效果，继续提高抗体浓度未能明显提高反应强度。因而选择 1.0 mg/mL 抗 TB 的浓度作为质控线包被浓度。

2.1.3.5 反应膜封闭时间的选择

硝酸纤维素膜包被 TB 抗原和抗 TB 抗体后，经封闭液封闭可以有效地降

低非特异性反应。对反应膜封闭时间的选择实验结果见表 9。

表 9 反应膜封闭时间（37℃）的选择实验结果

反应时间	15 分	30 分	45 分	60 分	75 分
阴性血清	×	×	–	–	–
阳性血清	×	×	+ +	+ +	+ +

–：阴性反应；±：可疑阳性；+ + 阳性反应；×：反应膜背景模糊

表 9 表明，封闭时间不同对正确反映实验结果有一定的影响。封闭时间过短会造成反应膜背景模糊，影响结果判读。本实验的结果表明封闭 45 分钟－75 分钟，封闭效果较好，有助于提高实验结果的准确性。选择封闭 60 分钟为生产控制条件。

2.1.3.6 反应膜干燥条件的选择

表 10 反应膜干燥条件选择的实验结果

相对湿度（%） 37℃保存时间(天)	抗 TB 阳性反应血清											
	干燥 30 分钟			干燥 45 分钟			干燥 60 分钟			干燥 75 分钟		
	20	25	30	20	25	30	20	25	30	20	25	30
0	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
3	++	+	+	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
6	+	–	–	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
9	-	–	–	+	++	++	+	++	++	+	++	++
12	–	–	–	+	++	++	+	++	++	+	++	++

反应膜适宜的干燥条件不仅与试剂的灵敏度有关，而且与试剂的稳定性关系更为密切。表 10 的结果表明，在相对湿度为 20%环境下,干燥时间短则试剂的稳定性差，干燥时间长则影响反应结果的准确性。在相对湿度为 25%、30%的环境下干燥时间为 45 分钟、60 分钟、75 分钟时，反应结果比较接近，都有较好的敏感度和稳定性。考虑到在生产过程中的可控性，采用相对湿度 25%－30%、干燥 60 分钟的条件为生产中的干燥条件。

2.1.3.7 金标记抗原垫干燥时间的选择

表 11 金标记抗原垫干燥时间选择的实验结果

相对湿度(%) / 37℃保存时间(天)	抗TB阳性反应血清血清								
	干燥3小时			干燥4小时			干燥5小时		
	20	25	30	20	25	30	20	25	30
0	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
3	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
6	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
9	++	++	++	++	++	++	++	++	++
12	+	++	++	+	++	++	+	++	++

金标记抗原垫干燥在37℃条件下。表11显示，干燥环境相对湿度过低可能影响反应强度。在比较适宜的干燥环境下，干燥时间3小时、4小时、5小时干燥效果比较接近，试剂的反应敏感性及稳定性均较好。故选用相对湿度25%-30%、干燥4小时为生产控制条件。

2.1.3.8 标本检测反应时间的选择

表12 标本检测反应时间的选择实验结果（A）

反应环境温度(℃) / 反应时间(分)	抗TB阴性反应血清				
	10	15	20	25	30
5	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
25	-	-	-	±	±
30	—	—	—	+	±
40	—	—	—	+	+

表 13 标本检测反应时间的选择实验结果（B）

反应温度(℃) / 反应时间(分)	抗 TB 阳性反应血清														
	弱阳性					阳性					强阳性				
	10	15	20	25	30	10	15	20	25	30	10	15	20	25	30
5	−	−		−	−	±	+	+	+	+	±	+	++	++	++
10	−	−	−	±	±	±	+	++	++	++	++	++	++	++	++
15	±	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
20	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
25	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
30	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
40	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

表 12 和表 13 表明，在通常室温条件下（15℃～30℃），抗 TB 阳性或强阳性反应血清在反应后 5－10 分钟即可出现明确的阳性反应结果。抗 TB 弱阳性反应血清在常温下反应时，需要较长的反应时间，在反应 25－30 分钟时可获得明确的阳性反应结果。抗 TB 阴性血清在通常室温条件下（15℃～30℃），反应在 30 分钟内，基本能正确反映测定血清性质。反应时间过长有可能造成假阳性。因此，将结果判定时间确定在反应 25－30 分钟时判定反应结果。考虑到特殊情况下，可能实际工作的室温低于 15℃，影响反应结果，采取延长 10 分钟反应时间的措施，也可获得比较满意的结果。

2.1.4 试剂盒的制造

1） 检测板的包被：NC 膜的预切割、粘贴，将抗原以 pH7.2、0.02mol/L PBS 缓冲液稀释至最佳浓度，质控抗 TB 抗体以 pH7.2、0.02mol/L PBS 缓冲液稀释至最佳浓度，分别以优化条件喷点于 NC 膜上，干燥、封闭、干燥；

封闭液配方： 0.02mol/L PBS 缓冲液（pH7.2，含 0.25%脱脂奶粉）。

2）金标记抗原的粘贴：以 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH8.0）配制金标记抗原溶液，包被于玻璃纤维模上，干燥后粘贴于包被好的检测板；

3）组装： 检测板切割成测试条，装配、密封包装。

2.1.5 检测方法及结果分析

1）取出测试板，置于一平面操作台上，平衡至室温。

2）加样：微量加样器于加样孔加入未稀释的待测血清 100μl。

3）15-20 分钟内观察并记录结果。强阳性结果可在 5 分钟出现，弱阳性和阴性结果需等待 20 分钟观察。阳性：判读窗口（C 和 T 位置）出现两条紫红色线条；阴性：判读窗口仅出现一条紫红色线条（C 位置）；无效：判读窗口无紫红色线条。

2.2 试剂盒性能评价

2.2.1 对 30 份 TB 参考品的检测结果

应用本发明制备的试剂盒，对 TB 抗体参考品进行了检测，检测结果见表 14。

表 14 对 30 份 TB 抗体参考品检测结果

抗 TB 抗体阳性反应血清		抗 TB 抗体阴性反应血清	
标本	结果	标本	结果
P1	++	N1	-
P2	++	N2	-
P3	++	N3	-
P4	+++	N4	-
P5	++	N5	-
P6	++	N6	-
P7	++	N7	-
P8	++	N8	-
P9	+++	N9	-
P10	++	N10	-
P11	+++	N11	-
P12	++	N12	-
P13	+	N13	-
P14	++	N14	-
P15	+++	N15	-

精密性血清			
C1	+	C1	+
C1	+	C1	+
C1	+	C1	+
C1	+	C1	+
C1	+	C1	+

-:阴性反应；+:阳性反应；++:较强阳性反应；+++:强阳性反应。

从试验的结果可以看出，阴性、阳性符合率均达100%。因此我们认为采用这一检测系统是可行的。

2.2.2 对HBV、HCV、HAV和梅毒等抗体阳性血清的交叉反应测试

采用本发明试剂盒对HBV（乙型肝炎）、HCV（丙型肝炎）、HAV（甲型肝炎）、癌症和非结核病呼吸系统患者血清的交叉反应，以进一步评价其特异性，对上述确认患者血样进行了测试，结果见下表。

表15 HBV、HCV、HAV和梅毒等抗体阳性血清的交叉反应测试结果

受检样品	考核试剂盒（金标法）				受检样品
分 组	阳性数	阴性数	合计	阳性率（%）	来 源
HBV抗体阳性血清	0	50	50	0.00	全军结核病中心
HCV抗体阳性血清	0	50	50	0.00	同上
HAV抗体阳性血清	0	40	40	0.00	同上
癌症患者血 清	0	40	40	0.00	同上
非结核病呼吸系统患者血清	0	100	100	0.00	同上
合 计	0	280	28	0.00	

结果显示该试剂盒与上述患者血样无交叉反应发生。

2.2.3 对梅毒（RF）阳性血清、血脂、胆红素和血红蛋白等干扰物的交叉反应检测

表16 对梅毒（RF）阳性血清、血脂、胆红素和血红蛋白等干扰物的测试结果

受检样品	考核试剂盒（金标法）				受检样品
分 组	阳性数	阴性数	合计	阳性率（%）	来 源
RF 阳性					
血 清	0	30	30	0.00	全军结核病中心
高血脂					
血 清	0	60	60	0.00	同上
黄疸病人					
血 清	1	59	60	1.67	同上
溶血后					
血 浆	0	60	60	0.00	同上
合 计	1	209	210	0.48	

结果显示该试剂盒与 RF 阳性血清、血脂、胆红素和血红蛋白等干扰物的交叉反应未超过正常人血清样品的假阳性率。

2.2.4 与国外同类产品比较等试验资料

以本发明试剂盒与上海澳普生物医药有限公司生产的新一代结核抗体快速诊断试剂盒作比较。对 215 份阳性血清和 XX 阴性血清进行了比较检测，结果见下表

表 17 与上海澳普结核抗体试剂盒的比较测试结果

北京现代高达金标	上海澳普结核抗体试剂盒检测结果		合计
检测试剂盒结果	阳 性	阴 性	
阳 性	174(A)	2(B)	176(A + B)
阴 性	26(C)	228(D)	254(C + D)
合 计	200(A + C)	230(B + D)	430(A + B + C + D)

真实性和预示值计算分析:

表 18 真实性和预示值计算分析

计 算 方 法	计 算 结 果
灵敏度 = A/(A+C)*100%	174/(174+26)=87.0%

特异度 = D/(B+D)*100%	228/(2+228)=99.1%
假阳性率 = B/B+D)*100%	2/(2+228)=0.8%
假阴性率 = C/B+D)*100%	26/(2+228)=11.3%
粗一致 = (A+D)/(A+B+C+D) *100%	(174+228)/(174+2+26+228)=93.4%
调整一致性 = 1/4(A/(A+B) +A/(A+C)+D/(C+D)+D/(B+D)) *100%	1/4(174/(174+2)+174/(174+26)+228/(26+228) +228/(2+228))=93.6%
约登指数 = (A/(A+C)+D/(B+D)) - 1	(174/(174+26)+228/(2+228))=0.861
阳性试验的预示值 = A/(A+B) *100%	174/(174+2)=98.8
阴性试验的预示值 = D/(C+D) *100%	228/(26+228)=89.7%

本发明试剂盒与参比品上海澳普结核抗体试剂盒的检测符合率为 93.49%。

2.2.5 临床考核

沈阳市胸科医院，安徽省肺科医院和太原市结核病医院三家的临床考核结果如下:

表 19 结核抗体 IgG 检测结果

单位	受检人数	痰菌(+)	痰菌(-)	非结核疾病	献血员
安徽省肺科医院	350	100 (92) *	100 (63)	100 (8)	50 (2)
沈阳市胸科医院	350	100 (83)	100 (63)	100 (10)	50 (2)
太原市结核病医院	350	100 (82)	100 (51)	100 (11)	50 (3)

* ( ) 内为试剂盒检测阳性例数

表 20 结核抗体 IgG 检测结果

分组	安徽省肺科医院 (%)	沈阳市胸科医院 (%)	太原市结核病医院 (%)
结核病人	77.5 (155/200)	73.0 (146/200)	66.5 (133/200)
非结核呼吸疾病组	11.0 (11/100)	10.0 (10/100)	11.0 (11/100)
献血员组	4.0 (2/50)	4.0 (2/50)	6.0 (3/50)

经沈阳市胸科医院，安徽省肺科医院和太原市结核病医院三家的临床考核结果，本发明试剂盒（胶体金法）已经达到国家规定的质量要求，并与国内外同类产品无统计学意义上的质量差异。

序列表

<110> 北京现代高达生物技术有限公司

<120> 一种结核分枝杆菌重组融合蛋白及其应用

<130> GD0702

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1530

<212> DNA

<213> 结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)

<400> 1

tgtggctcga aaccaccgag cggttcgcct gaaacgggcg ccggcgccgg tactgtcgcg 60

actacccccg cgtcgtcgcc ggtgacgttg gcggagaccg gtagcacgct gctctacccg 120

ctgttcacct gtggggtccg gcctttcacg agaggtatcc gaacgtcacg atcaccgctc 180

agggcaccgg ttctggtgcc gggatcgcgc aggccgccgc cgggacggtc aacattgggg 240

cctccgacgc ctattgtcgg aaggtgatat ggccgcgcac aaggggctga tgaacatcgc 300

gctagccatc tccgctcagc aggtcaacta caacctgccc ggagtgagcg agcacctcaa 360

gctgaacgga aaagtcctgg cgccatgtac cagggcacca tcaaaacctg ggacgacccg 420

cagatcgctg cgctcaaccc cggcgtgaac ctgcccggca ccgcggtagt tccgctgcac 480

cgctccgacg ggtccggtga caccttctgt tcacccagta cctgtccaag caagatcccg 540

agggctgggg caagtcgccc ggcttcggca ccaccgtcga cttcccggcg gtgccgggtg 600

cgctgggtga gaacggcaac ggcggcatgg tgaccgttgc gccgagacac cgggctgcgt 660

ggcctatatc ggcatcagct tcctcgacca ggccagtcaa cggggactcg gcgaggccca 720

actaggcaat agctctggca atttcttgtt gcccgacgcg caagcattca ggccgcggcg 780

gctggcttcg catcgaaaac cccggcgaac caggcgattt cgatgatcga cgggcccgcc 840

ccggacggct acccgatcat caactacgag tacgccatcg tcaacaaccg caaaaggacg 900

ccgccaccgc gcagaccttg caggcatttc tgcactgggc gatcaccgac ggcaacaagg 960

cctcgttcct cgaccaggtt catttccagc cgctgccgcc cgcggtggtg aagttgctga 1020

cgcgttgatc gcgacgattt ccagcggtgg tggtggtatg aacaatctcg cattgtggtc 1080

gcgtccggtg tgggacgttg agccctggga ccgctggcta cgtgacttct tcggccctgc 1140

cgcacgacgg actggtaccg cccggtcgcc ggagacttca cgccggccgc cgagatcgtc 1200

aaggatggcg cgacgcggtg gtccgtttgg aactgcccgg cattgacgtc gacaaggacg 1260

tcaacgtcgg cttgaccctg gccagccggt gagccgcctg gtgatccgcg gcgaacaccg 1320

cgacgagcac acgcaagcgc cggagacaaa gacggccgca ccctgcgtga gatccgctac 1380

ggatcattcc gccgccgttc cggctgcccg cgcacgtcac cagcgaggcc atcgcggctt 1440

cctatgacgc cggtgtgctg accgccgggt tgccggcgcc tacaaggccc cagccgaaac 1500

tcaggcgcag cgcatcgcca tacgaagtag 1530

<210> 2

<211> 512

<212> PRT

<213> 结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221> misc_feature

<222> (349)..(349)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 2

Cys Gly Ser Lys Pro Pro Ser Gly Ser Pro Glu Thr Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Thr Val Ala Thr Thr Pro Ala Ser Ser Pro Val Thr Leu Ala Glu

20 25 30

Thr Gly Ser Thr Leu Leu Tyr Pro Leu Phe Asn Leu Trp Gly Pro Ala
35 40 45

Phe His Glu Arg Tyr Pro Asn Val Thr Ile Thr Ala Gln Gly Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ala Ala Gly Thr Val Asn Ile Gly
65 70 75 80

Ala Ser Asp Ala Tyr Leu Ser Glu Gly Asp Met Ala Ala His Lys Gly
85 90 95

Leu Met Asn Ile Ala Leu Ala Ile Ser Ala Gln Gln Val Asn Tyr Asn
100 105 110

Leu Pro Gly Val Ser Glu His Leu Lys Leu Asn Gly Lys Val Leu Ala
115 120 125

Ala Met Tyr Gln Gly Thr Ile Lys Thr Trp Asp Asp Pro Gln Ile Ala
130 135 140

Ala Leu Asn Pro Gly Val Asn Leu Pro Gly Thr Ala Val Val Pro Leu

145 150 155 160

His Arg Ser Asp Gly Ser Gly Asp Thr Phe Leu Phe Thr Gln Tyr Leu
165 170 175

Ser Lys Gln Asp Pro Glu Gly Trp Gly Lys Ser Pro Gly Phe Gly Thr
180 185 190

Thr Val Asp Phe Pro Ala Val Pro Gly Ala Leu Gly Glu Asn Gly Asn
195 200 205

Gly Gly Met Val Thr Gly Cys Ala Glu Thr Pro Gly Cys Val Ala Tyr
210 215 220

Ile Gly Ile Ser Phe Leu Asp Gln Ala Ser Gln Arg Gly Leu Gly Glu
225 230 235 240

Ala Gln Leu Gly Asn Ser Ser Gly Asn Phe Leu Leu Pro Asp Ala Gln
245 250 255

Ser Ile Gln Ala Ala Ala Ala Gly Phe Ala Ser Lys Thr Pro Ala Asn
260 265 270

Gln Ala Ile Ser Met Ile Asp Gly Pro Ala Pro Asp Gly Tyr Pro Ile
275 280 285

Ile Asn Tyr Glu Tyr Ala Ile Val Asn Asn Arg Gln Lys Asp Ala Ala
290 295 300

Thr Ala Gln Thr Leu Gln Ala Phe Leu His Trp Ala Ile Thr Asp Gly
305 310 315 320

Asn Lys Ala Ser Phe Leu Asp Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro
325 330 335

Ala Val Val Lys Leu Ser Asp Ala Leu Ile Ala Thr Xaa Gly Gly Gly
340 345 350

Gly Met Asn Asn Leu Ala Leu Trp Ser Arg Pro Val Trp Asp Val Glu
355 360 365

Pro Trp Asp Arg Trp Leu Arg Asp Phe Phe Gly Pro Ala Ala Thr Thr
370 375 380

Asp Trp Tyr Arg Pro Val Ala Gly Asp Phe Thr Pro Ala Ala Glu Ile

385 390 395 400

Val Lys Asp Gly Asp Asp Ala Val Val Arg Leu Glu Leu Pro Gly Ile
405 410 415

Asp Val Asp Lys Asp Val Asn Val Glu Leu Asp Pro Gly Gln Pro Val
420 425 430

Ser Arg Leu Val Ile Arg Gly Glu His Arg Asp Glu His Thr Gln Asp
435 440 445

Ala Gly Asp Lys Asp Gly Arg Thr Leu Arg Glu Ile Arg Tyr Gly Ser
450 455 460

Phe Arg Arg Ser Phe Arg Leu Pro Ala His Val Thr Ser Glu Ala Ile
465 470 475 480

Ala Ala Ser Tyr Asp Ala Gly Val Leu Thr Val Arg Val Ala Gly Ala
485 490 495

Tyr Lys Ala Pro Ala Glu Thr Gln Ala Gln Arg Ile Ala Ile Thr Lys
500 505 510

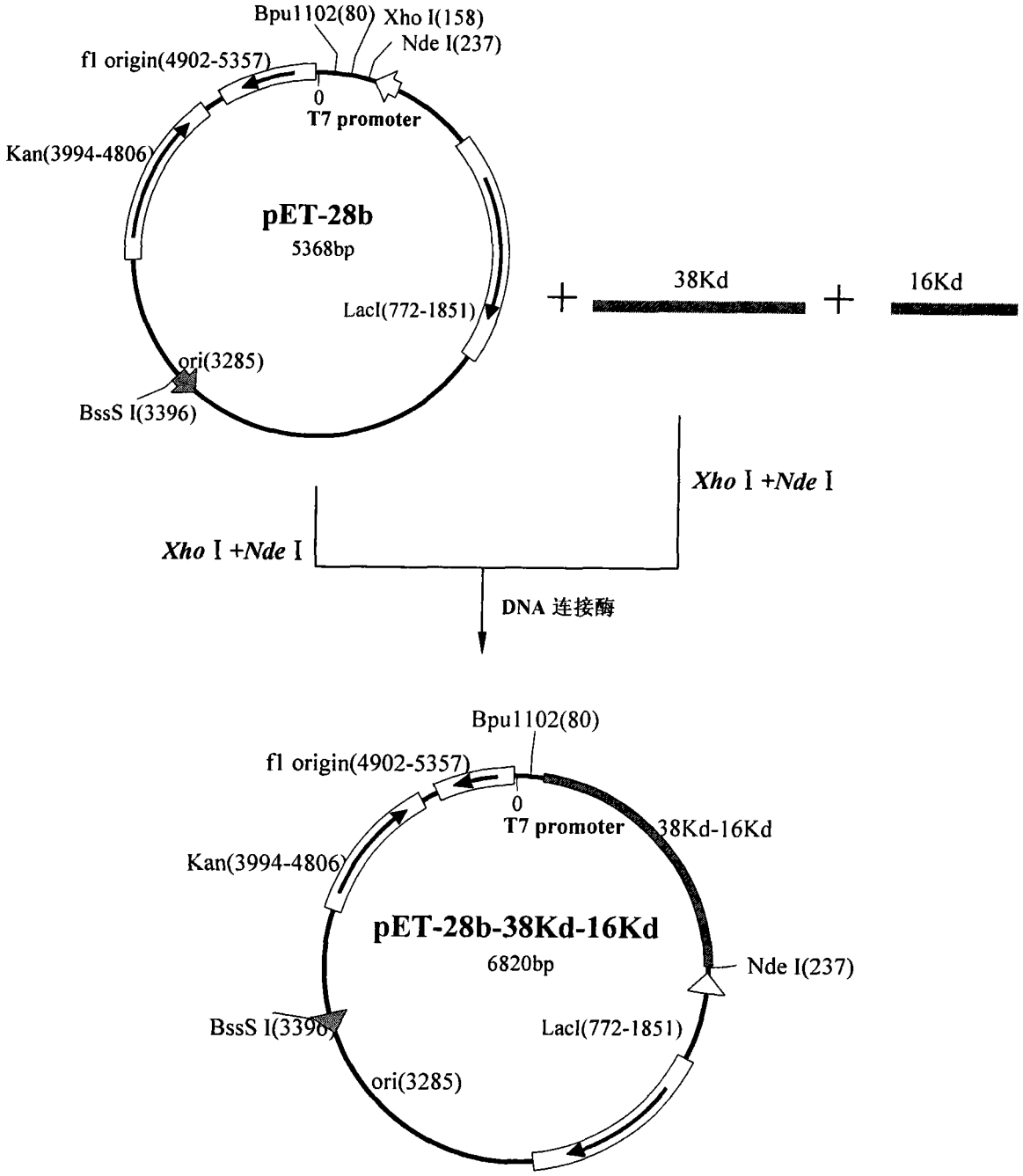
Bpu1102(80)
Xho I(158)
Nde I(237)
f1 origin(4902-5357)
0
T7 promoter
Kan(3994-4806)
pET-28b
5368bp
LacI(772-1851)
ori(3285)
BssS I(3396)
38Kd
16Kd
Xho I +Nde I
Xho I +Nde I
DNA 连接酶
Bpu1102(80)
f1 origin(4902-5357)
0
T7 promoter
38Kd-16Kd
Kan(3994-4806)
pET-28b-38Kd-16Kd
6820bp
Nde I(237)
BssS I(3396)
LacI(772-1851)
ori(3285)

图1

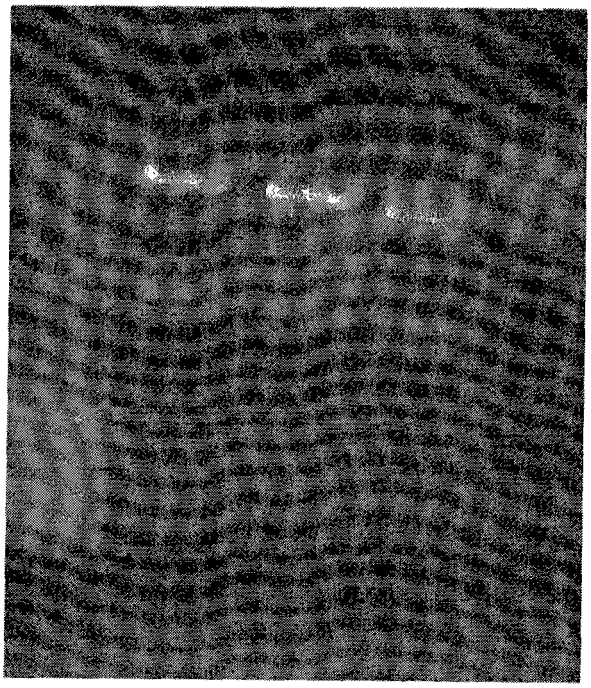

图2

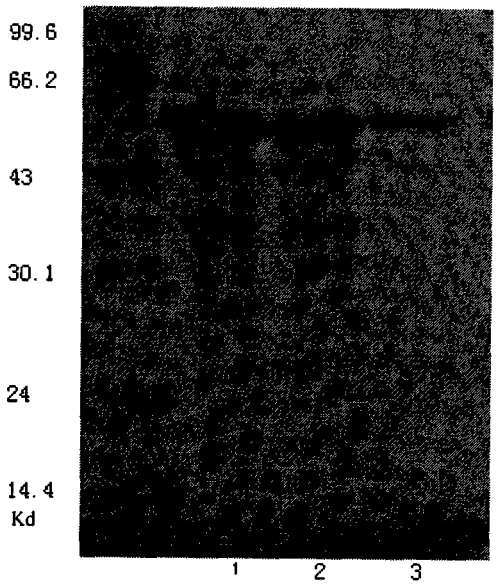

图 3

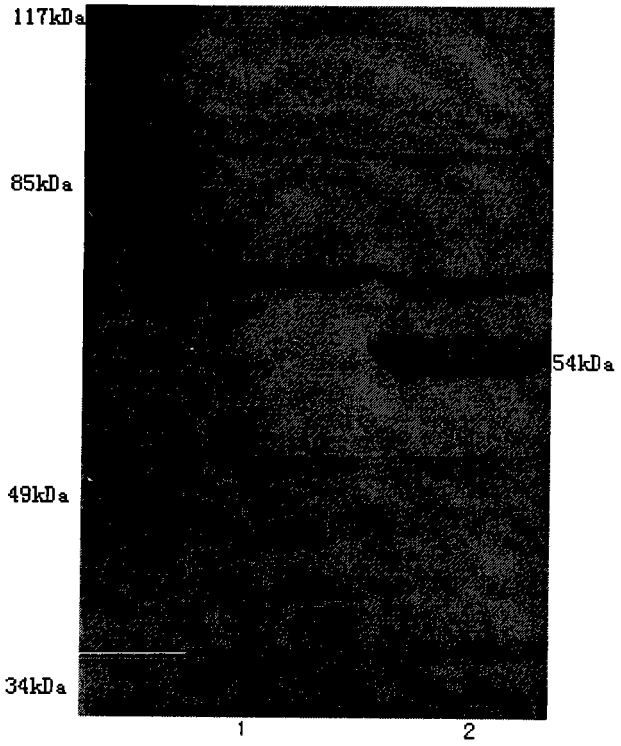

图 4

专利名称(译)	一种结核分枝杆菌重组融合蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN101100673A	公开(公告)日	2008-01-09
申请号	CN200710118118.4	申请日	2007-06-29
[标]发明人	张小刚		
发明人	张小刚		
IPC分类号	C12N15/62 C07K19/00 C12N1/21 G01N33/53 C07K16/00		
代理人(译)	吴锦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种结核分枝杆菌重组融合蛋白，还提供了该重组融合蛋白在制备单抗、多抗、检测试剂盒及蛋白芯片中的应用。采用本发明提供的结核分枝杆菌重组融合蛋白制备的结核分枝杆菌诊断试剂盒，与市场上的同类试剂盒相比，具有特异性强、灵敏度高等优点，很好的满足了结核(TB)感染临床诊断的需要。

		抗TB阳性血清			抗TB阴性血清		
		P1	P2	P3	N1	N2	N3
测定OD值	1	0.863	1.236	0.382	0.022	0.091	0.050
	2	0.826	1.176	0.326	0.021	0.089	0.056
	3	0.926	1.261	0.415	0.019	0.095	0.049
	4	0.895	1.198	0.362	0.026	0.083	0.057
	5	0.928	1.271	0.378	0.025	0.095	0.046
$\bar{X}\pm SD$		0.888 ±0.043	1.228 ±0.041	0.373 ±0.032	0.023 ±0.0029	0.091 ±0.0050	0.052 ±0.0047