

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810224021.6

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101382548A

[22] 申请日 2008.10.10

[21] 申请号 200810224021.6

[71] 申请人 中国人民解放军总医院第二附属医院
地址 100091 北京市海淀区黑山扈甲17号

[72] 发明人 吴雪琼 阳幼荣 张俊仙 李邦印
梁艳 李洪敏 张翠英 李娟

[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23页

[54] 发明名称

结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒及制备方法，属结核病医学免疫学诊断技术领域。本发明主要由检测抗原、酶联抗人 IgG 抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板所组成的一盒体，所述检测抗原采用结核分枝杆菌复合群菌种脂阿拉伯甘露糖 (LAM)、38kD 和 16kD 三种与 MPT63、MTB48、CFP10 - ESAT6 重组蛋白之中的任意 1 种或 1 种以上结核分枝杆菌重组蛋白组合作为检测抗原。本发明的结核分枝杆菌灵敏度高、特异性强、并具有互补性；可用于检测血清、胸水等体液样品中特异的抗结核抗体，辅助结核病的诊断和鉴别诊断。

1、一种结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒，主要由检测抗原、酶联抗人 IgG 抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板所组成的一盒体，其特征在于，所述检测抗原采用结核分枝杆菌复合群菌种脂阿拉伯甘露糖（LAM）、38kD 和 16kD 三种与 MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白之中的任意 1 种或 1 种以上结核分枝杆菌重组蛋白组合作为检测抗原。

2、如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述的结核分枝杆菌复合群菌种采用结核分枝杆菌。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒的制备方法，其特征在于：包括：

（1）检测抗原的制备：采用基因工程技术克隆、表达产生，经纯化分别得到 38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白抗原，从结核分枝杆菌复合群菌株中提纯制备得到 LAM；

（2）用稀释液分别稀释所述各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原，使各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原的浓度均为 1mg/ml，再将各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原稀释溶液混匀后除菌滤过，分装入一容器，1ml /支，冷冻干燥备用；

（3）试剂盒的装配：上述将 1mg/ml 的结核分枝杆菌各重组蛋白和糖抗原冷冻干燥管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 瓶、邻苯二胺 1 支、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后，置 4℃避光保存。

4、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，所述多种结核分枝杆菌抗原是采用基因工程技术将其中的两种或两种以上蛋白抗原融合表达产生。

5、如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述结核分枝杆菌抗原采用分别单独配制或混合配制。

结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒及制备方法

技术领域

本发明属于结核病医学免疫学检测技术领域，特别涉及由 LAM、38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白不同联合作为检测抗原组成的结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒。

背景技术

在全世界结核病依然是危害人类健康的主要传染病之一，1985 年以来艾滋病的流行、结核感染的移民和部分人群生活贫困等原因使美国等欧美发达国家结核病发病率呈回升趋势，尤其是结核菌耐药问题和非结核分枝杆菌病的发病率逐年上升使结核病治疗更是雪上加霜。目前全世界有结核病人约 2000 万，每年新增结核病人 800~1000 万，每年死亡人数约 200 万。

中国的结核病疫情相当严重，是全球 22 个结核病高负担国家之一，结核病人数位居世界第二，仅次于印度。2000 年第四次中国结核病流行病学抽样调查初步结果表明，中国有 5.5 亿人感染了结核菌；现有肺结核病人 451 万，其中传染性肺结核病人 196 万；每年死亡人数约 13 万，结核病死亡在中国各种死亡原因中居第 9 位，在传染病中居第一位。结核病也是 AIDS 感染者死亡的主要原因，根据 1996 年 WHO 统计每 3 个死亡的 AIDS 患者中就有一例死于合并结核，45-85% HIV 死亡者是由于结核病诊断延误所致。因此，结核病的早期诊断、早期治疗对结核病疫情的控制具有极其重要的意义，并可提高 HIV 患者的存活率。

抗结核抗体的检测是应用较广泛的一种简便、快速、价廉的结核病辅助诊断手段，尤其是对于那些诊断困难的菌阴肺结核、儿童结核病或肺外结核病具有实用价值，但存在灵敏度和特异性不高的问题。因此，建立一个敏感、特异、快速的血清学诊断试验可弥补目前诊断方法的不足。

酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是常用的抗体检测方法，虽操作步骤较多，需半天时间，但可半定量地检测抗体水平，可根据其抗体升高的程度，明确诊断，或确定可疑对象进行追踪观察；检测灵敏度较高，可达 70-80%；尤其是在体检、大面积普查时，大批量样本检测更可显示其优越性，成本较低。目前已有的结核抗体 ELISA 检测试剂盒主要由检测抗原、酶联抗人 IgG 抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板所组成，所用包被抗原有的是结核菌纯蛋白衍生物 (PPD)，由于 PPD 是结核菌培养滤液蛋白，含有许多分枝杆菌 (包括致病性分枝杆菌、环境中非致病性分枝杆菌和卡介苗) 共同的抗原，其检测的特异性差，

易出现假阳性；有的包被抗原采用结核菌胞膜抗原（见专利公开号 CN 1072265A），并采用酶联葡萄球菌 A 蛋白的免疫反应方法；还有的检测抗原采用 ESAT-6 和 CFP-10 融合蛋白抗原（见专利公开号 CN 1388378），它们采用的均是单一检测抗原。

南京大渊生物技术工程有限责任公司研制的结核抗体检测蛋白芯片试剂盒，该试剂盒以结核杆菌 LAM、38kD 和 16kD 蛋白为抗原，其灵敏度不高。另外它采用的是金标免疫斑点法，用硝酸纤维素膜为载体，将抗原固定在膜上，应用胶体金颗粒标记抗体，使抗原抗体反应在膜上快速进行，形成红色的结合物，通过肉眼观察结果，它虽简便、快速，但只能定性，不能定量，成本较高。

发明内容

本发明的目的是为克服已有技术的不足，提供一种结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒及制备方法，采用多种具有互补性的重组蛋白抗原联合作为结核病抗体检测抗原，可提高结核抗体检测的灵敏度和特异性。

本发明提出的结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒，主要由检测抗原、酶联抗人 IgG 抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板所组成的一盒体，其特征在于，所述检测抗原采用结核分枝杆菌复合群菌种脂阿拉伯甘露糖（LAM）、38kD 和 16kD 三种与 MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白之中的任意 1 种或 1 种以上结核分枝杆菌重组蛋白组合作为检测抗原。

本发明提出上述的试剂盒的制备方法，其特征在于：包括：

（1）检测抗原的制备：采用基因工程技术克隆、表达产生，经纯化分别得到 38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白抗原，从结核分枝杆菌复合群菌株中提纯制备得到 LAM；

（2）用稀释液分别稀释所述各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原，使各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原的浓度均为 1mg/ml，再将各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原稀释溶液混匀后除菌滤过，分装入一容器，1ml /支，冷冻干燥备用；

（3）试剂盒的装配：所述将 1mg/ml 的结核分枝杆菌各重组蛋白和糖抗原冷冻干燥管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 瓶、邻苯二胺 1 支、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后，置 4℃避光保存。

本发明的特点及技术效果：

本发明通过从结核分枝杆菌复合群菌株中提纯制备糖抗原 LAM 及通过基因工程技术克隆、表达、纯化结核分枝杆菌 38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白，通过多种不同的联合作为结核病抗体检测的抗原，制备^{新的}结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒，本试剂盒能用于半定量地检测结核病人的抗体水平。

本发明人研究证明应用结核分枝杆菌抗原组合 1（LAM+38kD+16kD）检测结核病人

的灵敏度和特异性为 67.8%、89.2%；抗原组合 2（LAM+38kD+16kD+MPT63）检测结核病人的灵敏度和特异性为 69.7%、86.1%；抗原组合 3（LAM+38kD+16kD+MPT63+CFP10-ESAT6）检测结核病人的灵敏度和特异性为 72.4%、83.6%；抗原组合 4（LAM+38kD+16kD+MTB48）检测结核病人的灵敏度和特异性为 69.2%、86.4%。PPD 皮试阴性健康人中假阳性率很低（<7.4%），假阳性主要出现在 PPD 皮试阳性的结核感染者和卡介苗接种者中。菌阳结核病人抗体的阳性率很高（>83%）。

本发明的关键试剂——结核分枝杆菌重组 38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 蛋白抗原可大规模生产，且成本相对较低。该试剂盒可特异地检测结核病患者血清、胸水等体液样品中抗体，只需半天时间，

本发明是由糖抗原和多种重组蛋白抗原组成的新型结核抗体检测试剂盒，可用于检测血清、胸水等体液样品中特异的抗结核抗体，可用于结核病临床血清学诊断。

具体实施方式

本发明提出的结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒及其制备方法结合实施例及附图详细说明如下：

本发明提出的结核抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒，主要由检测抗原、酶联抗人 IgG 抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板所组成的一盒体，其特征在于，所述检测抗原采用结核分枝杆菌复合群菌种脂阿拉伯甘露糖（LAM）、38kD 和 16kD 三种与 MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白之中的任意 1 种或 1 种以上结核分枝杆菌重组蛋白组合作为检测抗原。

所述的结核分枝杆菌复合群菌种采用结核分枝杆菌。

所述的试剂盒的制备方法，其特征在于：包括：

（1）检测抗原的制备：采用基因工程技术克隆、表达产生，经纯化分别得到 38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白抗原，从结核分枝杆菌复合群菌株中提纯制备得到 LAM；

（2）用稀释液（为常规的稀释液，例如 0.5M 氯化钠—20mM 磷酸氢二钠—2%甘露醇，pH 7.4，或磷酸盐缓冲液、生理盐水）分别稀释所述各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原，使各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原的浓度均为 1mg/ml，再将各结核分枝杆菌重组蛋白或糖抗原稀释溶液混匀后除菌滤过，分装入一容器，1ml /支，冷冻干燥备用；

（3）试剂盒的装配：上述将 1mg/ml 的结核分枝杆菌各重组蛋白和糖抗原冷冻干燥管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 瓶、邻苯二胺 1 支（每种组分的量可根据实际应用确定）、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后，置 4℃避光保存。

上述步骤（1）的多种结核分枝杆菌抗原可采用基因工程技术将其中的两种或两种以上蛋白抗原融合表达产生。

上述步骤(2)的各结核分枝杆菌抗原可采用分别单独配制或混合配制。

本发明的检测试剂盒应用时结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 重组蛋白作为结核病抗体多抗原 ELISA 检测试剂盒的抗原, LAM 包被在酶联板上的浓度为 $0.01 \mu\text{g}$ - $0.2 \mu\text{g}$, 38kD、16kD、MPT63、MTB48 和 CFP10-ESAT6 重组蛋白包被在酶联板上的浓度为 $0.5 \mu\text{g}$ - $2 \mu\text{g}$;

本发明的上述结核抗体 ELISA 检测试剂盒的使用方法:

(1) 抗原包被: 用包被缓冲液将 LAM 抗原稀释至 $0.1 \mu\text{g}$ - $2 \mu\text{g}/\text{ml}$, 重组蛋白抗原稀释至 5 - $20 \mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔加 $100 \mu\text{l}$ 。每板留 1 个孔, 只加包被缓冲液, 作为空白对照。置 4°C 过夜。次日用 PBST 洗板 3-5 次, 3-5 分钟/次。

(2) 封闭: 每孔加 PBST-1%BSA $200 \mu\text{l}$, 置 37°C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3-5 次, 3-5 分钟/次。

(3) 加待检样品: 用 PBST-1%BSA 稀释待检样品, 充分混匀后, 每孔加 $100 \mu\text{l}$, 做 2-3 个平行孔; 同时做空白、阴性及阳性孔对照, 置 37°C 孵育 40-60 分钟。用 PBST 洗板 3-5 次, 3-5 分钟/次。

(4) 加酶标二抗: 用 PBST-1%BSA 新鲜稀释酶标第二抗体, 充分混匀后, 每孔加 $100 \mu\text{l}$, 置 37°C 孵育 40-60 分钟。用 PBST 洗板 3-5 次, 3-5 分钟/次。

(5) 加底物液显色: 每孔加 $100 \mu\text{l}$ 新鲜配制的底物溶液, 置室温显色 5~10 分钟。

(6) 终止反应: 每孔加 50 - $100 \mu\text{l}$ 2M 硫酸。

(7) 酶标仪读数: 以空白对照孔调零后, 测各孔 OD 值, 若大于或等于规定的阳性 OD 值即为阳性。

本发明的多种检测抗原的制备实施例及检测试剂盒实施例分别说明如下:

一、38kD 重组蛋白可采用已有的商品, 也可通过以下基因工程技术制备:

1、引物设计与合成

上游引物(含限制性内切酶 NdeI 位点) $5'$ -GGT ATT CCA /TAT GT G TGG CTC GAA ACC ACC GAG C- $3'$

下游引物(含限制性内切酶 EcoRI 位点) $5'$ -GCA GTG ACG / AAT TCCTGG AAA TCG TCG CGA TCA AC- $3'$

扩增片段: 1079bp

2、PCR 扩增 38kD 基因

用上下游引物, 在 Taq plus I DNA 聚合酶的作用下, 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, 扩增 38kD 基因。PCR 反应程序: 95°C 5min; 94°C 1min, 66°C 1min, 72°C 2min, 循环 30 次; 最后 72°C 延伸 7min。于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 1079bp 的扩增 DNA 片段。

3、回收目的基因片段:

琼脂糖凝胶电泳结束后, 在长波紫外线照射下, 用干净的手术刀片在胶上切下要回收

DNA 的琼脂块，放入无菌的离心管中。参照琼脂糖 DNA 回收试剂盒中的说明书回收目的基因片段，具体方法如下：

向管中加入等体积的溶胶液（约 0.4ml），直至琼脂糖完全融化；向管中加入 0.6ml 琼脂糖 DNA 纯化树脂，充分混匀；将注射器插入微量离心柱拧紧，拔出注射器活塞，将树脂混合物加入注射筒，插入注射器活塞，缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；从微量离心柱上拔掉注射器，拔出注射剂活塞，将注射器插入微量离心柱拧紧，将 2ml I 型柱子清洗液加入注射筒，用注射器活塞缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；取下微量离心柱，将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧，向离心柱中加入 150 μ l II 型柱子清洗液，离心 1200rpm 2-3min 以清洗和干燥树脂；将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧，向离心柱中加入 40 μ l TE 缓冲液，静置一分钟，12,000rpm 离心 20s；回收 DNA 洗脱液，定量，浓度约为 50ng/ μ l。贮存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

4. 重组表达质粒的构建：

用限制性内切酶 Nde I、EcoRI 双酶切纯化后的 PCR 产物和表达载体 pET24b 质粒 DNA，于 1%琼脂糖凝胶电泳，切取 1058bp 的 38kD 基因片段和 5265bp 的 pET24b 质粒 DNA 片段，用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒纯化。定量后，38kD 基因片段与 pET24b 质粒 DNA 片段按

2:1 的摩尔比混合，10 μ l 反应体系如下：

2 \times 连接缓冲液	5 μ l
pET24b 载体	1 μ l
PCR 产物	2 μ l
T ₄ DNA 连接酶	1 μ l
无菌水 补至	10 μ l

混匀后置于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜，75 $^{\circ}$ C 灭活 10min，冰浴后直接进行转化。

5. 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞的制备：

挑取大肠杆菌 DH5 α （或 BL21）单菌落接种于 5ml LB 培养液中，置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中于 200rpm 培养过夜；次晨按 1/100 转种于 100ml LB 培养液中，置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中于 200rpm 继续培养 2-3h，待菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时，放入用冰预冷的大离心管中，4 $^{\circ}$ C、4000rpm、离心 10min，弃上清；20 ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，冰浴 30 min；于 4 $^{\circ}$ C、6000rpm、离心 10min，弃上清；用 4ml 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，置 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置过夜；次晨加入 1 ml 无菌甘油，吹打混合均匀，每 100 μ l 分装于一个 1.5ml 的离心管中，置-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

6. 连接产物的转化：

次日取目的基因片段与载体 pET24b 连接产物 5 μ l 加入含有 100 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的离心管中，冰浴 0.5h；放入 42 $^{\circ}$ C 水浴箱热休克 90s，迅速取出冰浴 2 min；加入 LB 培养液 400 μ l，37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养 1 h；加入 X-Gal 60 μ l，IPTG 4 μ l，混匀，取出 200-400 μ l 涂布于含有 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 平板上。倒置平板，放 37 $^{\circ}$ C 恒温培养

箱培育 14 h。

7. 质粒的提取:

根据蓝白斑筛选, 随机挑取白色菌落 6 个, 分别接种于 5 ml 含有 50ug/ml 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜; 根据《分子克隆》碱裂解方法, 小量提取质粒。

(1) 质粒小量提取试剂的配制

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖

25 mmol/L Tris · CL (pH 8.0)

10 mmol/L EDTA (pH 8.0)

在 10 lbf/in² (6.895×10⁴ Pa) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟; 储存于 4°C

备用。

溶液 II: 0.2 mmol/L NaOH, 1% SDS 临用前配制

溶液 III: 5 mol/L 乙酸钾 60 ml

冰乙酸 11.5 ml

去离子水 28.5 ml

贮存于 4°C, 备用。

(2) 小量提取质粒

分别取约 3.0 ml 菌液置离心管中, 于 12,000rpm 离心 1 min, 弃上清; 细菌沉淀重悬于 200 μl 溶液 I 中, 冰浴 10 min; 加 400 μl 新配制的溶液 II, 冰浴 5 min; 加 300 μl 溶液 III, 冰浴 10 min; 于 4°C 12,000rpm 离心 10 min; 上清液移入干净的离心管中, 加等体积酚、氯仿及氯仿各抽提一次; 加 2 倍体积的无水乙醇充分混合, 于 -20°C 放置 2h 沉淀 DNA; 于 4°C 12,000rpm 离心 10 min, 弃上清; 用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀一次, 室温充分干燥; 将沉淀溶于 20μl TE 缓冲液中, 加入无 DNA 酶的胰 RNA 酶, 使其终浓度为 20μg/ml, 于 37°C 水浴 30 min, 消化 RNA; 取 2μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测、定量, 置 -20°C 储存备用。

8. 鉴定重组质粒:

(1) PCR 扩增鉴定: 以挑选的菌落质粒 DNA 为模板, 以上游和下游引物进行 PCR 扩增鉴定。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳, 阳性重组质粒命名为 pET24b-38kD。

(2) 酶切鉴定: 取重组质粒 5 μl, 分别用限制性内切酶 Nde I、EcoRI 双酶切 3h; 于 1%琼脂糖凝胶中电泳。以 DNA 分子量标准及扩增产物为对照, 酶切后的片断与扩增片断一致。

(3) 序列测定: 直接挑选一个克隆送测序。测序结果与报道的基因组序列一致。

9. pET24b-38kD 工程菌的诱导表达及鉴定

将 pET24b-38kD 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑单克隆转种于 5ml 含 50ug/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 置 37°C 恒温振荡器培养过夜, 然后按 1% 转种到 10 ml 含

50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中，置 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时，加入 IPTG，诱导 4hr。

将 1 \times 载样缓冲液 150 μ l 分别加入来自 1ml 菌液的沉淀样本，混悬后，置 100 $^{\circ}$ C 沸水浴 5min，于 12000rpm 离心 10 min，取上清液 40 μ l 分别进行 SDS-PAGE，电泳条件为：积层胶恒流 10mA，分离胶恒压 15mA，待溴酚蓝电泳至凝胶底部，停止电泳。用考马斯亮蓝 R250 染色液染色 6h；用脱色液脱色至条带清晰。与对照菌 pET24b-BL21 (DE3) 相比，pET24b-38kD-BL21 (DE3) 沉淀部分在相对分子质量 38kD 位置附近有浓重的表达条带出现，诱导 3-4 小时表达量最多。

10. 38kD 重组蛋白的纯化

将诱导菌超声破碎后，采用 Novagen 公司生产的 His. Bind 蛋白纯化试剂盒按试剂盒说明书在变性条件下纯化 38kD 蛋白，SDS-PAGE 电泳可见纯化的 38kD 蛋白呈一条带，未见其他杂蛋白。

二、16kD 蛋白可采用已有的商品，也可通过以下基因工程技术制备 16kD 蛋白：

1、引物设计与合成

上游引物（5' 端含限制性内切酶 Nde I） 5' -CATATGGCCACCACCCTTCCC GTTCA-3'

下游引物（5' 端含限制性内切酶 Xho I） 5' -CTCGAGGTTGGTGGACCGGATCTGAA-3'

扩增片段：444bp

2、PCR 扩增 16kD 基因

用上下游引物，在 Taq plus I DNA 聚合酶的作用下，以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板，扩增 16kD 基因。PCR 反应程序：95 $^{\circ}$ C 5min；94 $^{\circ}$ C 30sec，60 $^{\circ}$ C 40sec，72 $^{\circ}$ C 1min，循环 32 次；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 444bp 的扩增 DNA 片段。

3、回收目的基因片段：

琼脂糖凝胶电泳结束后，在长波紫外线照射下，用干净的手术刀片在胶上切下要回收 DNA 的琼脂块，放入无菌的离心管中。参照琼脂糖 DNA 回收试剂盒中的说明书回收目的基因片段，具体方法如下：

向管中加入等体积的溶胶液（约 0.4ml），直至琼脂糖完全融化；向管中加入 0.6ml 琼脂糖 DNA 纯化树脂，充分混匀；将注射器插入微量离心柱拧紧，拔出注射器活塞，将树脂混合物加入注射筒，插入注射器活塞，缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；从微量离心柱上拔掉注射器，拔出注射剂活塞，将注射器插入微量离心柱拧紧，将 2ml I 型柱子清洗液加入注射筒，用注射器活塞缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；取下微量离心柱，将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧，向离心柱中加入 150 μ l II 型柱子清洗液，离心 1200rpm 2-3min 以清洗和干燥树脂；将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧，向离心柱中加入 40 μ l TE 缓冲液，静置一分钟，12,000rpm 离心 20s；回收 DNA

洗脱液，定量，浓度约为 50ng/μl。贮存于-20℃备用。

4、目的基因与 pGEM-T 载体连接：

参照 Promega 公司 pGEM-T vector System- I 产品说明，将纯化后 PCR 产物（50ng）与克隆载体 pGEM-T 连接，目的基因片段与载体片断按摩尔比 3:1 混合，10 ul 反应体系如下：

2×连接缓冲液	5μl
pGEM-T 载体	1μl
PCR 产物	3μl
T ₄ DNA 连接酶	1μl
无菌水 补至	10 μl

混匀后置于 4℃冰箱反应 12h，75℃灭活 10min，冰浴后直接进行转化。

5. 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞的制备：

挑取大肠杆菌 DH5 α（或 BL21）单菌落接种于 5ml LB 培养液中，置 37℃振荡培养箱中于 200rpm 培养过夜；次晨按 1/100 转种于 100ml LB 培养液中，置 37℃振荡培养箱中于 200rpm 继续培养 2-3h，待菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时，放入用冰预冷的大离心管中，4℃、4000rpm、离心 10min，弃上清；20 ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，冰浴 30 min；于 4℃、6000rpm、离心 10min，弃上清；用 4ml 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，置 4℃冰箱放置过夜；次晨加入 1 ml 无菌甘油，吹打混合均匀，每 100μl 分装于一个 1.5ml 的离心管中，置-70℃保存备用。

6. 连接产物的转化：

将目的基因片段与 PGEM-T 的连接产物 5μl 加入含有 100μl 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的离心管中，冰浴 0.5h；放入 42℃水浴箱热休克 90s，迅速取出冰浴 2 min；加入 LB 培养液 400μl，37℃恒温摇床培养 1 h；加入 X-Gal 60μl，IPTG 4μl，混匀，取出 200—400μl 涂布于含有 60ug/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上。倒置平板，放 37℃恒温培养箱培育 14 h。

7. 质粒的提取：

根据蓝白斑筛选，随机挑取白色菌落 6 个，分别接种于 5 ml 含有 60μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中，37℃振荡培养过夜；根据《分子克隆》碱裂解方法，少量提取质粒。

(1) 质粒少量提取试剂的配制

溶液 I： 50 mmol/L 葡萄糖

25 mmol/L Tris · CL (pH 8.0)

10 mmol/L EDTA (pH 8.0)

在 10 lbf/in² (6.895×10⁴ Pa) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟；储存于 4℃

备用。

溶液 II： 0.2 mmol/L NaOH，1% SDS 临用前配制

溶液III: 5 mol/L 乙酸钾 60 ml
冰乙酸 11.5 ml
去离子水 28.5 ml
贮存于 4℃, 备用。

(2) 小量提取质粒

分别取约 3.0 ml 菌液置离心管中, 于 12,000rpm 离心 1 min, 弃上清; 细菌沉淀重悬于 200 μ l 溶液 I 中, 冰浴 10 min; 加 400 μ l 新配制的溶液 II, 冰浴 5 min; 加 300 μ l 溶液 III, 冰浴 10 min; 于 4℃ 12,000rpm 离心 10 min; 上清液移入干净的离心管中, 加等体积酚、氯仿及氯仿各抽提一次; 加 2 倍体积的无水乙醇充分混合, 于 -20℃ 放置 2h 沉淀 DNA; 于 4℃ 12,000rpm 离心 10 min, 弃上清; 用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀一次, 室温充分干燥; 将沉淀溶于 20 μ l TE 缓冲液中, 加入无 DNA 酶的胰 RNA 酶, 使其终浓度为 20 μ g/ml, 于 37℃ 水浴 30 min, 消化 RNA; 取 2 μ l 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测、定量, 置 -20℃ 储存备用。

8. 鉴定重组质粒:

(2) PCR 扩增鉴定: 以挑选的菌落质粒 DNA 为模板, 以引物 P16a、P16b 进行 PCR 扩增鉴定。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳, 阳性重组质粒命名为 PGEM-16kDa。

(2) 酶切鉴定: 取重组质粒 5 μ l, 分别用限制性内切酶 Nde I、EcoRI 双酶切 3h; 于 1%琼脂糖凝胶中电泳。以 DNA 分子量标准及扩增产物为对照, 酶切后的片断与扩增片断一致。

(3) 序列测定: 直接挑选一个克隆送测序。测序结果与报道的基因组序列一致。

9. 重组表达质粒的构建:

用限制性内切酶 Nde I、EcoRI 双酶切 pGEM-16kDa 重组质粒 DNA 和表达载体 pET24b 质粒 DNA, 于 1%琼脂糖凝胶电泳, 切取 444bp 的 Rv1009 基因片段和 5265bp 的 pET24b 质粒 DNA 片段, 用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒纯化。定量后, 16kDa 基因片段与 pET24b 质粒 DNA 片段按 2:1 的摩尔比混合, 在 T_4 DNA 连接酶催化下, 于 16℃ 连接过夜, 次日取连接产物 5 μ l 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 置 37℃ 恒温箱孵育 14 h。挑选 5 个克隆分别转种于 5ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 置 37℃ 恒温振荡器培养过夜, 用碱裂解法提取质粒。

10. 重组表达质粒的鉴定

分别用牙签随机调取 6 个克隆, 提取质粒, 采用 PCR 扩增和双酶切鉴定方法挑选重组子; 鉴定正确的阳性克隆命名为 pET24b-16kDa。

11. pET24b-16kDa 工程菌的诱导表达及鉴定

将 pET24b-16kDa 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑单克隆转种于 5ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 置 37℃ 恒温振荡器培养过夜, 然后按 1% 转种到 10 ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 置 37℃ 恒温振荡器培养至 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8 时, 加

入 IPTG, 诱导 3—4hr。

将 1×载样缓冲液 150μl 加入来自 1ml 菌液的沉淀样本, 混悬后, 置 100℃沸水浴 5min, 于 12000rpm 离心 10 min, 取上清液 40 μl 进行 SDS-PAGE, 电泳条件为: 积层胶恒流 10mA, 分离胶恒压 15mA, 待溴酚蓝电泳至凝胶底部, 停止电泳。用考马斯亮蓝 R250 染色液染色 6h; 用脱色液脱色至条带清晰。与对照菌 pET24b-BL21 (DE3) 相比, pET24b-16kDa-BL21 (DE3) 菌体在相对分子质量 16kDa 位置附近有浓重的表达条带出现, 诱导 3-4 小时表达量最多。

12. 16kDa 重组蛋白的纯化

将诱导菌超声破碎后, 采用 Novagen 公司生产的 His. Bind 蛋白纯化试剂盒按试剂盒说明书纯化 16kDa 蛋白, SDS-PAGE 电泳可见纯化的 16kDa 蛋白呈一条带, 未见其他杂蛋白。

三、通过基因工程技术制备 MPT63 蛋白:

1、引物设计与合成

上游引物 (5' 端含限制性内切酶Nhe I) 5' —GCTAGCGCCTATCCCATCACCGGA—3'

下游引物 (5' 端含限制性内切酶 Xho I) 5' —CTCGAGCGGCTCCCAAATCAGCAG—3'

扩增片段: 402bp

2、PCR 扩增 MPT63 基因

用上下游引物, 在 Taq plus I DNA 聚合酶的作用下, 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, 扩增 MPT63 基因。PCR 反应程序: 95℃ 5min; 94℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 60 sec, 循环 30 次; 最后 72℃延伸 7min。于 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 402bp 的扩增 DNA 片段。

3、回收目的基因片段:

琼脂糖凝胶电泳结束后, 在长波紫外线照射下, 用干净的手术刀片在胶上切下要回收 DNA 的琼脂块, 放入无菌的离心管中。参照琼脂糖 DNA 回收试剂盒中的说明书回收目的基因片段, 具体方法如下:

向管中加入等体积的溶胶液 (约 0.4ml), 直至琼脂糖完全融化; 向管中加入 0.6ml 琼脂糖 DNA 纯化树脂, 充分混匀; 将注射器插入微量离心柱拧紧, 拔出注射器活塞, 将树脂混合物加入注射筒, 插入注射器活塞, 缓慢用力向下压, 排出所有的液体和气体; 从微量离心柱上拔掉注射器, 拔出注射剂活塞, 将注射器插入微量离心柱拧紧, 将 2ml I 型柱子清洗液加入注射筒, 用注射器活塞缓慢用力向下压, 排出所有的液体和气体; 取下微量离心柱, 将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧, 向离心柱中加入 150μl II 型柱子清洗液, 离心 1200rpm 2-3min 以清洗和干燥树脂; 将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧, 向离心柱中加入 40μl TE 缓冲液, 静置一分钟, 12,000rpm 离心 20s; 回收 DNA 洗脱液, 定量, 浓度约为 50ng/μl。贮存于-20℃备用。

4、目的基因与 pGEM-T 载体连接:

参照 Promega 公司 pGEM-T vector System- I 产品说明, 将纯化后 PCR 产物 (50ng) 与克隆载体 pGEM-T 连接, 目的基因片段与载体片断按摩尔比 3:1 混合, 10 μ l 反应体系如下:

2 \times 连接缓冲液	5 μ l
pGEM-T 载体	1 μ l
PCR 产物	3 μ l
T ₄ DNA 连接酶	1 μ l
无菌水 补至	10 μ l

混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 12h, 75 $^{\circ}$ C 灭活 10min, 冰浴后直接进行转化。

5. 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞的制备:

挑取大肠杆菌 DH5 α (或 BL21) 单菌落接种于 5ml LB 培养液中, 置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中于 200rpm 培养过夜; 次晨按 1/100 转种于 100ml LB 培养液中, 置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中于 200rpm 继续培养 2-3h, 待菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 放入用冰预冷的大离心管中, 4 $^{\circ}$ C、4000rpm、离心 10min, 弃上清; 20 ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀, 冰浴 30 min; 于 4 $^{\circ}$ C、6000rpm、离心 10min, 弃上清; 用 4ml 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置过夜; 次晨加入 1 ml 无菌甘油, 吹打混合均匀, 每 100 μ l 分装于一个 1.5ml 的离心管中, 置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

6. 连接产物的转化:

将目的基因片段与 pGEM-T 的连接产物 5 μ l 加入含有 100 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的离心管中, 冰浴 0.5h; 放入 42 $^{\circ}$ C 水浴箱热休克 90s, 迅速取出冰浴 2 min; 加入 LB 培养液 400 μ l, 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养 1 h; 加入 X-Gal 60 μ l, IPTG 4 μ l, 混匀, 取出 200-400 μ l 涂布于含有 60ug/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上。倒置平板, 放 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培育 14 h。

7. 质粒的提取:

根据蓝白斑筛选, 随机挑取白色菌落 6 个, 分别接种于 5 ml 含有 60 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜; 根据《分子克隆》碱裂解方法, 少量提取质粒。

(1) 质粒少量提取试剂的配制

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖

25 mmol/L Tris \cdot CL (pH 8.0)

10 mmol/L EDTA (pH 8.0)

在 10 lbf/in² (6.895 \times 10⁴ Pa) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟; 储存于 4 $^{\circ}$ C

备用。

溶液 II: 0.2 mmol/L NaOH, 1% SDS 临用前配制

溶液 III: 5 mol/L 乙酸钾 60 ml

冰乙酸 11.5 ml

去离子水 28.5 ml

贮存于 4℃，备用。

(2) 小量提取质粒

分别取约 3.0 ml 菌液置离心管中，于 12,000rpm 离心 1 min，弃上清；细菌沉淀重悬于 200 μl 溶液 I 中，冰浴 10 min；加 400 μl 新配制的溶液 II，冰浴 5 min；加 300 μl 溶液 III，冰浴 10 min；于 4℃ 12,000rpm 离心 10 min；上清液移入干净的离心管中，加等体积酚、氯仿及氯仿各抽提一次；加 2 倍体积的无水乙醇充分混合，于 -20℃ 放置 2h 沉淀 DNA；于 4℃ 12,000rpm 离心 10 min，弃上清；用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀一次，室温充分干燥；将沉淀溶于 20μl TE 缓冲液中，加入无 DNA 酶的胰 RNA 酶，使其终浓度为 20μg/ml，于 37℃ 水浴 30 min，消化 RNA；取 2μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测、定量，置 -20℃ 储存备用。

8. 鉴定重组质粒：

(3) PCR 扩增鉴定：以挑选的菌落质粒 DNA 为模板，以上游和下游引物进行 PCR 扩增鉴定。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳，阳性重组质粒命名为 PGEM-MPT63。

(2) 酶切鉴定：取重组质粒 5 μl，分别用限制性内切酶 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切 3h；于 1%琼脂糖凝胶中电泳。以 DNA 分子量标准及扩增产物为对照，酶切后的片断与扩增片断一致。

(3) 序列测定：直接挑选一个克隆送测序。测序结果与报道的基因组序列一致。

9. 重组表达质粒的构建：

用限制性内切酶 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切 pGEM-MPT63 重组质粒 DNA 和表达载体 pET24b 质粒 DNA，于 1%琼脂糖凝胶电泳，切取 402bp 的 MPT63 基因片段和 5235bp 的 pET24b 质粒 DNA 片段，用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒纯化。定量后，MPT63 基因片段与 pET24b 质粒 DNA 片段按 2:1 的摩尔比混合，在 T_4 DNA 连接酶催化下，于 16℃ 连接过夜，次日取连接产物 5μl 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，置 37℃ 恒温箱孵育 14 h。挑选 5 个克隆分别转种于 5ml 含 50ug/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中，置 37℃ 恒温振荡器培养过夜，用碱裂解法提取质粒。

10. 重组表达质粒的鉴定

分别用牙签随机调取 6 个克隆，提取质粒，采用 PCR 扩增和双酶切鉴定方法挑选重组子；鉴定正确的阳性克隆命名为 pET24b-MPT63。

11. pET24b-MPT63 工程菌的诱导表达及鉴定

将 pET24b-MPT63 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，挑单克隆转种于 5ml 含 50ug/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中，置 37℃ 恒温振荡器培养过夜，然后按 1% 转种到 10 ml 含 50μg/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中，置 37℃ 恒温振荡器培养至 OD_{600} 为 0.6 左右时，加入 IPTG，诱导 4hr。

将诱导菌超声破碎后的上清、沉淀部分分别进行 SDS-PAGE 分析。将 1× 载样缓冲液

150 μ l 分别加入来自 1ml 菌液的上清、沉淀样本,混悬后;置 100 $^{\circ}$ C沸水浴 5min,于 12000rpm 离心 10 min,取上清液 40 μ l 分别进行 SDS-PAGE,电泳条件为:积层胶恒流 10mA,分离胶恒压 15mA,待溴酚蓝电泳至凝胶底部,停止电泳。用考马斯亮蓝 R250 染色液染色 6h;用脱色液脱色至条带清晰。与对照菌 pET24b-BL21 (DE3)相比, pET24b-MPT63-BL21 (DE3) 上清液在相对分子质量 16-18kDa 位置附近有浓重的表达条带出现,诱导 4 小时表达量最多;而 pET24b-MPT63-BL21 (DE3)沉淀部分只见少量特异蛋白表达带, MPT63 工程菌是以细胞内可溶性蛋白的形式表达。

12. MPT63 重组蛋白的纯化

将诱导菌超声破碎后,采用 Novagen 公司生产的 His.Bind 蛋白纯化试剂盒按试剂盒说明书纯化 MPT63 蛋白, SDS-PAGE 电泳可见纯化的 MPT63 蛋白呈一条带,未见其他杂蛋白。

四、通过基因工程技术制备 CFP10-ESAT6 融合蛋白:

1、引物设计与合成

cfp10 引物设计:

P1(上游): 5' -CCGGATCCATGGCAGAGATGAAGAC-3'

P2(下游): 5' -GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCGCCACCGCCGCTTCCACCGCCACC

GAAGCCCATTTGCGAGGACAGCGCCT-3'

扩增片段: 353 bp

esat6 引物设计:

P3(上游): 5' -GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGC

GGCAGCATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTCGCGG-3'

P4(下游): 5' -CC AAGCTT TGCGAACATCCCAGTGA-3'

扩增片段: 338bp

2、PCR 扩增 cfp10 和 esat6 基因

分别用 P1、P2 和 P3、P4 引物,在 Taq plus I DNA 聚合酶的作用下,以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板,扩增 CFP10 和 ESAT6 基因。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 20sec, 60 $^{\circ}$ C 20sec, 72 $^{\circ}$ C 2min, 循环 25 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。于 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 353 bp (cfp10)、338bp (esat6) 的扩增 DNA 片段;回收这 2 个片段,分别取 1 μ l 回收片段作为模板,以 P1 和 P4 为引物扩增,于 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 681bp 的扩增 DNA 片段。

3、回收目的基因片段:

琼脂糖凝胶电泳结束后,用干净的手术刀片在胶上切下要回收 DNA 的琼脂块,放入无菌的 eppendorf 管中。判定 DNA 片段位置时,使用长波紫外线,照射时间尽可能短。参照琼脂糖 DNA 回收试剂盒中的说明书,具体方法如下:

向管中加入等体积的溶胶液(约 0.4ml), (可在 55-65 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5-15 min) 直至

琼脂糖完全融化；向管中加入 0.6ml 琼脂糖 DNA 纯化树脂，充分混匀；将注射器插入微量离心柱拧紧，拔出注射器活塞，将树脂混合物加入注射筒，插入注射器活塞，缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；从微量离心柱上拔掉注射器，拔出注射剂活塞，将注射器插入微量离心柱拧紧，将 2ml I 型柱子清洗液加入注射筒，用注射器活塞缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；取下微量离心柱，将微量离心柱插入一个新的 1.5ml eppendorf 管拧紧，向离心柱中加入 150 μ l II 型柱子清洗液，离心 1200rpm 2-3min 以清洗和干燥树脂；将微量离心柱插入一个新的 1.5ml eppendorf 管拧紧，向离心柱中加入 40 μ l TE 缓冲液，静置一分钟，12,000rpm 离心 20s；回收 DNA 洗脱液，定量，浓度约为 50ng/ μ l。贮存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

4、目的基因与 pGEM-T 载体连接：

参照 Promega 公司 pGEM-T vector System- I 产品说明，将纯化后 PCR 产物 (50ng) 与克隆载体 pGEM-T 连接，目的基因片段与载体片断按摩尔比 3:1 混合，10 μ l 反应体系如下：

2 \times 连接缓冲液 (Rapid ligation Buffer)	5 μ l
pGEM-T 载体 (pGEM-T vector)	1 μ l
PCR 产物 (PCR product)	0.6 μ l
T ₄ DNA 连接酶 (T ₄ DNA ligase)	1 μ l
无菌水 (dH ₂ O) 补足	10 μ l

混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 12h，或者室温反应 2h。75 $^{\circ}$ C 灭活 10min，冰浴后直接进行转化。

5. 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞的制备：

挑取大肠杆菌 DH5 α (或 BL21) 单菌落接种于 5ml LB 培养液中，37 $^{\circ}$ C，200rpm，培养过夜；次晨按 1/100 转种于 100ml LB 培养液中，37 $^{\circ}$ C，继续培养 2-3h，待菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时，放入用冰预冷的大离心管中，4 $^{\circ}$ C、4000rpm、离心 10min，弃上清；20 ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，冰浴 30 min；4 $^{\circ}$ C、6000rpm、离心 10min，弃上清；4ml 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，4 $^{\circ}$ C 冰箱放置过夜；次晨加入 1 ml 无菌甘油，吹打混合均匀，100 μ l 分装 1.5ml eppendorf 管，-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

6. 连接产物的转化：

将目的基因片段与 PGEM-T 的连接产物各 5 μ l 分别加入含有 100 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的离心管中，冰浴 0.5h；放入 42 $^{\circ}$ C 水浴箱热休克 90s，迅速取出冰浴 2 min；加入 LB 培养液 400 μ l，37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养 1 h；加入 X-Gal 60 μ l，IPTG 4 μ l，混匀，取出 200-400 μ l 涂布于含有氨苄青霉素 (60ug/ml) 的 LB 平板。倒置平板，放 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培育 14 h。

7. 质粒的提取：

根据蓝白斑筛选, 随机挑取白色菌落 6 个, 分别接种于 5 ml 含有氨苄青霉素 60 μ g/ml 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 取 3ml 菌沉淀, 根据《分子克隆》的碱裂解方法, 少量提取质粒。

(1) 质粒少量提取试剂的配制

溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖

25 mmol/L Tris \cdot CL (pH 8.0)

10 mmol/L EDTA (pH 8.0)

在 10 lbf/in² (6.895 \times 10⁴ Pa) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟; 储存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

溶液 II: 0.2 mmol/L NaOH, 1% SDS 临用前配

溶液 III: 5 mol/L 乙酸钾 60 ml

冰乙酸 11.5 ml

去离子水 28.5 ml

贮存于 4 $^{\circ}$ C, 备用。

(2) 少量提取质粒

分别取约 3.0 ml 菌液置试管中, 12,000rpm 离心 1 min, 弃上清; 菌体重悬于 200 μ l 溶液 I 中, 冰浴 10 min; 加 400 μ l 新配制的溶液 II, 冰浴 5 min; 加 300 μ l 溶液 III, 冰浴 10 min; 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10 min; 上清移入干净的管中, 加等体积酚、氯仿及氯仿各抽提一次; 2 倍体积的无水乙醇沉淀双链 DNA, 充分混合, -20 $^{\circ}$ C 放置 2h; 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10 min, 弃上清; 用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀一次, 室温充分干燥; 将沉淀溶于 20 μ l TE 中, 加入无 DNA 酶的胰 RNA 酶, 使其终浓度为 20 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 消化 RNA; 取 2 μ l 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测、定量, -20 $^{\circ}$ C 储存, 备用。

8. 鉴定重组质粒:

(4) PCR 扩增鉴定: 以挑选的菌落质粒 DNA 为模板, 以 P1、P4 引物进行 PCR 扩增鉴定。1%琼脂糖凝胶电泳, 阳性重组质粒命名为 PGEM-CFP10-ESAT6。

(2) 酶切鉴定: 取重组质粒 5 μ l, 分别用限制性内切酶双酶切 2h; 1%琼脂糖凝胶电泳。设置 DNA 分子量标准及扩增产物为参照, 观察酶切后片断是否与扩增目的片断一致。

(3) 序列测定: 直接挑选一个克隆送测序。测序结果与报道的基因组序列一致。

9. 重组表达质粒的构建:

用限制性内切酶 BamH I 及 HindIII 双酶切 pGEM-CFP10-ESAT6 重组质粒 DNA 和表达载体 pET28a 质粒 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳, 切取 630bp CFP10-ESAT6 基因片段和 5.344kb 片段, 用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒纯化。定量后, 基因片段与载体 DNA 按 2:1 的摩尔比混合, 在 T₄ DNA 连接酶催化下, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 次日取连接产物 5 μ l 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 14 h。挑选 3-5 个克隆分别转种于 5ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡

那霉素的 LB 培养液中，37℃恒温振荡器培养过夜，用碱裂解法提取质粒。

10. 重组表达质粒的鉴定

分别用牙签随机调取 6—7 个克隆，提取质粒，采用 PCR 扩增和双酶切鉴定方法挑选重组子；鉴定正确的阳性克隆命名为 pET28a-CFP10-ESAT6。

11. pET28a-CFP10-ESAT6 工程菌的诱导表达及鉴定

将 pET28a-CFP10-ESAT6 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，挑单克隆转种于 5ml 含 50ug/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中，37℃恒温振荡器培养过夜，然后按 1% 转种到 10 ml 含 50μg/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中，37℃恒温振荡器培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6—0.8 时，加入 IPTG，诱导 3—4hr。

将 1× 载样缓冲液 150μl 加入来自 1ml 菌液的沉淀样本，吹打混匀，100℃沸水浴 5min，12000g 离心 10 min，取上清 40 μl 进行 SDS-PAGE，电泳条件为：积层胶恒流 10mA，分离胶恒压 15mA，待溴酚蓝电泳至凝胶底部，停止电泳。用考马斯亮蓝 R250 染色液染色 6h；脱色液脱色至条带清晰，观察是否有目的蛋白表达条带。

应用 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2mM 浓度的 IPTG 诱导，pET28a-CFP10-ESAT6 大肠杆菌工程菌的蛋白表达量无明显区别。

与对照菌 pET28a-BL21 (DE3) 相比，pET28a-CFP10-ESAT6-BL21 (DE3) 菌体在相对分子质量 28kDa 位置附近有浓重的表达条带出现，诱导 3-4 小时时表达量最多，经激光密度扫描测定占菌体总蛋白的 40%左右。将诱导菌超声破碎后的上清液和沉淀部分进行 SDS-PAGE 分析，重组蛋白均出现在破碎的上清中，沉淀极少，说明该重组蛋白主要以可溶形式表达。

12. CFP10-ESAT6 重组蛋白的纯化

由于重组蛋白末端携带 6×组氨酸，它可通过形成配位键而与金属螯合亲和层析柱上固定化的某些二价金属离子（如镍）结合，按试剂盒说明书直接纯化重组蛋白，蛋白纯度达 90%以上。

五、通过基因工程技术制备 MTB48 蛋白：

1、引物设计与合成

上游引物（5' 端含限制性内切酶Nhe I） 5' - CCC AAGCTT CTT CGA CTC CTT ACT GTC CT-3'

下游引物（5' 端含限制性内切酶 HindIII） 5' -GCT AGC CAG TCG CAG ACG TGA CG-3'

扩增片段：1.4kb

2、PCR 扩增 MTB48 基因

用上下游引物，在 Taq plus I DNA 聚合酶的作用下，以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板，扩增 mtb48 基因。PCR 反应程序：95℃ 5min；94℃ 20 sec，60℃ 20 sec，72℃ 2min，循环 32 次；最后 72℃延伸 7min。于 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 1.4kb 的扩增 DNA

片段。

3、回收目的基因片段：

琼脂糖凝胶电泳结束后，在长波紫外线照射下，用干净的手术刀片在胶上切下要回收 DNA 的琼脂块，放入无菌的离心管中。参照琼脂糖 DNA 回收试剂盒中的说明书回收目的基因片段，具体方法如下：

向管中加入等体积的溶胶液（约 0.4ml），直至琼脂糖完全融化；向管中加入 0.6ml 琼脂糖 DNA 纯化树脂，充分混匀；将注射器插入微量离心柱拧紧，拔出注射器活塞，将树脂混合物加入注射筒，插入注射器活塞，缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；从微量离心柱上拔掉注射器，拔出注射剂活塞，将注射器插入微量离心柱拧紧，将 2ml I 型柱子清洗液加入注射筒，用注射器活塞缓慢用力向下压，排出所有的液体和气体；取下微量离心柱，将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧，向离心柱中加入 150 μ l II 型柱子清洗液，离心 1200rpm 2-3min 以清洗和干燥树脂；将微量离心柱插入一个新的 1.5ml 离心管拧紧，向离心柱中加入 40 μ l TE 缓冲液，静置一分钟，12,000rpm 离心 20s；回收 DNA 洗脱液，定量，浓度约为 50ng/ μ l。贮存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

4、目的基因与 pGEM-T 载体连接：

参照 Promega 公司 pGEM-T vector System- I 产品说明，将纯化后 PCR 产物（50ng）与克隆载体 pGEM-T 连接，目的基因片段与载体片断按摩尔比 3:1 混合，10 μ l 反应体系如下：

2 \times 连接缓冲液	5 μ l
pGEM-T 载体	1 μ l
PCR 产物	0.6 μ l
T ₄ DNA 连接酶	1 μ l
无菌水 补至	10 μ l

混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱反应 12h，75 $^{\circ}$ C 灭活 10min，冰浴后直接进行转化。

5. 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞的制备：

挑取大肠杆菌 DH5 α （或 BL21）单菌落接种于 5ml LB 培养液中，置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中于 200rpm 培养过夜；次晨按 1/100 转种于 100ml LB 培养液中，置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养箱中于 200rpm 继续培养 2-3h，待菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时，放入用冰预冷的大离心管中，4 $^{\circ}$ C、4000rpm、离心 10min，弃上清；20 ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，冰浴 30 min；于 4 $^{\circ}$ C、6000rpm、离心 10min，弃上清；用 4ml 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌沉淀，置 4 $^{\circ}$ C 冰箱放置过夜；次晨加入 1 ml 无菌甘油，吹打混合均匀，每 100 μ l 分装于一个 1.5ml 的离心管中，置-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

6. 连接产物的转化：

将目的基因片段与 pGEM-T 的连接产物 5 μ l 加入含有 100 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态

细胞的离心管中，冰浴 0.5h；放入 42℃水浴箱热休克 90s，迅速取出冰浴 2 min；加入 LB 培养液 400μl，37℃恒温摇床培养 1 h；加入 X-Gal 60μl，IPTG 4μl，混匀，取出 200—400μl 涂布于含有 60ug/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上。倒置平板，放 37℃恒温培养箱培育 14 h。

7. 质粒的提取：

根据蓝白斑筛选，随机挑取白色菌落 6 个，分别接种于 5 ml 含有 60μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中，37℃振荡培养过夜；根据《分子克隆》碱裂解方法，小量提取质粒。

(1) 质粒小量提取试剂的配制

溶液 I： 50 mmol/L 葡萄糖

25 mmol/L Tris · CL (pH 8.0)

10 mmol/L EDTA (pH 8.0)

在 10 lbf/in² (6.895×10⁴ Pa) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟；储存于 4℃

备用。

溶液 II： 0.2 mmol/L NaOH, 1% SDS 临用前配制

溶液 III： 5 mol/L 乙酸钾 60 ml

冰乙酸 11.5 ml

去离子水 28.5 ml

贮存于 4℃，备用。

(2) 小量提取质粒

分别取约 3.0 ml 菌液置离心管中，于 12,000rpm 离心 1 min，弃上清；细菌沉淀重悬于 200 μl 溶液 I 中，冰浴 10 min；加 400 μl 新配制的溶液 II，冰浴 5 min；加 300 μl 溶液 III，冰浴 10 min；于 4℃ 12,000rpm 离心 10 min；上清液移入干净的离心管中，加等体积酚、氯仿及氯仿各抽提一次；加 2 倍体积的无水乙醇充分混合，于 -20℃ 放置 2h 沉淀 DNA；于 4℃ 12,000rpm 离心 10 min，弃上清；用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀一次，室温充分干燥；将沉淀溶于 20μl TE 缓冲液中，加入无 DNA 酶的胰 RNA 酶，使其终浓度为 20μg/ml，于 37℃水浴 30 min，消化 RNA；取 2μl 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测、定量，置 -20℃ 储存备用。

8. 鉴定重组质粒：

(5) PCR 扩增鉴定：以挑选的菌落质粒 DNA 为模板，以上游和下游引物进行 PCR 扩增鉴定。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳，设 DNA 分子量标准为参照，阳性重组质粒命名为 PGEM-MTB48。

(2) 酶切鉴定：取重组质粒 5 μl，分别用限制性内切酶 Nhe I、Hind III 双酶切 2h；于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳。以 DNA 分子量标准及扩增产物为对照，酶切后的片断与扩增片断一致。

(3) 序列测定：直接挑选一个克隆送测序。测序结果与报道的基因组序列一致。

9. 重组表达质粒的构建:

用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind*III 双酶切 pGEM- MTB48 重组质粒 DNA, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 回收 1.4kb 基因片段。同样方法酶切表达载体 pET24b 质粒, 0.8%琼脂糖凝胶电泳回收 5.3kb 片段。用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒纯化两个回收产物。定量后, 基因片段与载体 DNA 按 2:1 的摩尔比混合, 在 *T₄* DNA 连接酶催化下, 16°C 连接过夜, 次日取连接产物 5 μ l 转化 *E. coli* *DH5 α* 感受态细胞, 37°C 恒温箱培育 14 h。挑选克隆 3-5 个分别转种于 5ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 37°C 恒温振荡器培养过夜, 用碱裂解法提取质粒。

10. 重组表达质粒的鉴定

分别用牙签随机调取 6 个克隆, 提取质粒, 采用 PCR 扩增和双酶切鉴定方法挑选重组子; 鉴定正确的阳性克隆命名为 pET24b- MTB48。

11. pET24b- MTB48 工程菌的诱导表达及鉴定

将 pET24b- MTB48 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑单克隆转种于 5ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 置 37°C 恒温振荡器培养过夜, 然后按 1% 转种到 10 ml 含 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 LB 培养液中, 置 37°C 恒温振荡器培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导 4-5hr。以空载体 pET24b 菌株菌株和工程菌诱导前菌液作为对照样本, 离心, 收集菌体, 备用。

将诱导菌超声破碎后的上清、沉淀部分分别进行 SDS-PAGE 分析。将 1 \times 载样缓冲液 150 μ l 分别加入来自 1ml 菌液的上清、沉淀样本, 混悬后, 置 100°C 沸水浴 5min, 于 12000rpm 离心 10 min, 取上清液 40 μ l 分别进行 SDS-PAGE, 电泳条件为: 积层胶恒流 10mA, 分离胶恒压 15mA, 待溴酚蓝电泳至凝胶底部, 停止电泳。用考马斯亮蓝 R250 染色液染色 6h; 用脱色液脱色至条带清晰。与对照菌 pET24b-BL21 (DE3) 相比, pET24b- MTB48-BL21 (DE3) 沉淀部分在相对分子质量约 50kDa 位置附近有浓重的表达条带出现, 诱导 4-5 小时表达量最多; 而 pET24b- MTB48-BL21 (DE3) 上清液部分只见少量特异蛋白表达带, MTB48 工程菌是以包涵体形式表达。

12. MTB48 重组蛋白的纯化

由于重组蛋白末端携带 6 \times 组氨酸, 它可通过形成配位键而与金属螯合亲和层析柱上固定化的某些二价金属离子 (如镍) 结合, 使重组蛋白直接纯化。MTB48 蛋白以不可溶形式表达, 因此选择含尿素的变性条件下纯化。将诱导菌超声破碎后, 采用 Novagen 公司生产的 His. Bind 蛋白纯化试剂盒按试剂盒说明书纯化 MTB48 蛋白, SDS-PAGE 电泳可见纯化的 MTB48 蛋白呈一条带, 未见其他杂蛋白。

六、结核分枝杆菌 LAM 可采用已有商品, 也可采用以下方法的制备:

1. 结核分枝杆菌 H37Rv 0.5 克加蒸馏水 15ml, 80°C 灭活 2h;
2. 超声粉碎, 12000rpm 离心 30min, 取上清;

3. 加等体积的苯酚颠倒混匀, 在 68-70℃水浴中使成匀相, 或冷却后于 8000 rpm 离心 10min, 取出水相;
4. 再加等体积的蒸馏水于酚相中萃取 1 次;
5. 合并 2 次水相, 离心去除沉淀;
6. 回收所得即为脂多糖, 低温贮存备用。

七、结核病抗体检测试剂盒的抗原的制备和贮存:

1. 稀释液(0.5M 氯化钠-20mM 磷酸氢二钠-2%甘露醇, pH 7.4)的配制: 称取 29.22g 氯化钠、7.1628g 磷酸氢二钠于 700ml 蒸馏水中, 加入 20g 甘露醇, 在磁力搅拌器上搅拌, 加入盐酸调节 pH 值至 7.4, 加双蒸馏水定容至 1000ml。
2. 用稀释液稀释选用的结核分枝杆菌重组蛋白和糖抗原, 使其浓度为 1mg/ml;
3. 混匀后除菌滤过, 分装入一容器, 1ml /支, 冷冻干燥, 置 4℃避光保存备用。

八、检测试剂盒中的酶联抗人 IgG 抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板, 均可采用常规公知技术制备或直接选用已知的商品。

以下结合具体本发明检测试剂盒的实施例详细说明本发明, 各实施例中的抗原原料均可通过上述制备方法获得, 但不应构成对本发明实施范围的限定。

实施例 1

(1)检测抗原的制备:用稀释液(0.5M 氯化钠-20mM 磷酸氢二钠-2%甘露醇, pH 7.4)分别稀释结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD 重组蛋白, 使各结核分枝杆菌重组蛋白的浓度均为 1mg/ml, 再将各结核分枝杆菌重组蛋白稀释溶液混匀后除菌滤过, 分装入一容器, 1ml /支, 冷冻干燥备用;

(2)试剂盒的装配: 将 1mg/ml 的结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD 重组蛋白冻干管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 小瓶、邻苯二胺 1 支、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后, 置 4℃避光保存。

实施例 2

(1)检测抗原的制备:用稀释液(磷酸盐缓冲液)分别稀释结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MPT63 重组蛋白, 使各结核分枝杆菌重组蛋白的浓度均为 1mg/ml, 再将各结核分枝杆菌重组蛋白稀释溶液混匀后除菌滤过, 分装入一容器, 1ml /支, 冷冻干燥备用;

(2)试剂盒的装配: 将 1mg/ml 的结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MPT63 重组蛋白冻干管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 小瓶、邻苯二胺 1 支、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后, 置 4℃避光保存。

实施例 3

(1) 检测抗原的制备: 用稀释液(生理盐水)分别稀释结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MPT63、CFP10-ESAT6 重组蛋白, 使各结核分枝杆菌重组蛋白的浓度均为 1mg/ml, 再将各结核分枝杆菌重组蛋白稀释溶液混匀后除菌滤过, 分装入一容器, 1ml /支, 冷冻干燥备用;

(2) 试剂盒的装配: 将 1mg/ml 的结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MPT63、CFP10-ESAT6 重组蛋白冻干管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 小瓶、邻苯二胺 1 支、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后, 置 4℃避光保存。

实施例 4

(1) 检测抗原的制备: 用稀释液(0.5M 氯化钠—20mM 磷酸氢二钠—2%甘露醇, pH 7.4) 分别稀释结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MTB48 重组蛋白, 使各结核分枝杆菌重组蛋白的浓度均为 1mg/ml, 再将各结核分枝杆菌重组蛋白稀释溶液混匀后除菌滤过, 分装入一容器, 1ml /支, 冷冻干燥备用;

(2) 试剂盒的装配: 将 1mg/ml 的结核分枝杆菌 LAM、38kD、16kD、MTB48 重组蛋白冻干管、辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清各 1 支、30%过氧化氢 1 小瓶、邻苯二胺 1 支、聚苯乙烯微孔反应板 1 块放入包装盒密封后, 置 4℃避光保存。

上述各实施例的应用

(1) 抗原包被: 用包被缓冲液将 LAM 抗原稀释至 $1\mu\text{g}/\text{ml}$, 重组蛋白抗原稀释至 $10\mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔加 $100\mu\text{l}$ 。每板留 1 个孔, 只加包被缓冲液, 作为空白对照。置 4℃过夜。次日用 PBST 洗板 3 次, 3 分钟/次。

(2) 封闭: 每孔加 PBST—1%BSA $200\mu\text{l}$, 置 37℃ 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次, 3 分钟/次。

(3) 加待检样品: 用 PBST—1%BSA 稀释待检样品, 充分混匀后, 每孔加 $100\mu\text{l}$, 做 2 个平行孔; 同时做空白、阴性及阳性孔对照, 置 37℃ 孵育 40 分钟。用 PBST 洗板 3 次, 3 分钟/次。

(4) 加酶标二抗: 用 PBST—1%BSA 新鲜稀释酶标第二抗体, 充分混匀后, 每孔加 $100\mu\text{l}$, 置 37℃ 孵育 40 分钟。用 PBST 洗板 3 次, 3 分钟/次。

(5) 加底物液显色: 每孔加 $100\mu\text{l}$ 新鲜配制的底物溶液, 置室温显色 10 分钟。

(6) 终止反应: 每孔加 $50\mu\text{l}$ 2M 硫酸。

(7) 酶标仪读数: 以空白对照孔调零后, 测各孔 OD 值, 若大于或等于规定的阳性 OD 值即为阳性。结果见表 1。

表 1 应用结核多抗原 ELISA 方法检测正常人和结核病人血清中抗结核抗体

分 组		抗结核抗体阳性率%				
		实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	
应用 1	正常人	PPD 阴性	3.2 (3/95)	3.2 (3/95)	5.3 (5/95)	3.2 (3/95)
		BCG 接种阳转	15.5 (15/97)	23.7 (23/97)	27.8 (27/97)	20.6 (20/97)
		健康人	9.33 (18/193)	13.5 (26/193)	16.6 (32/193)	12.4 (24/193)
	结核病人	菌阴	60.2 (65/108)	63.9 (69/108)	68.5 (74/108)	62.0 (67/108)
		菌阳	83.5 (86/103)	84.5 (87/103)	85.4 (88/103)	85.4 (88/103)
		结核病人	71.6 (151/211)	73.9 (156/211)	76.8 (162/211)	73.5 (155/211)
应用 2	正常人	PPD 阴性	8.8 (3/34)	14.7 (5/34)	17.6 (6/34)	11.8 (4/34)
		BCG 接种阳转	14.7 (5/34)	14.7 (5/34)	14.7 (5/34)	14.7 (5/34)
		健康人	11.8 (8/68)	14.7 (10/68)	20.6(11/68)	14.7 (10/68)
	结核病人	菌阴	62.5(15/24)	62.5(15/24)	71.8(17/24)	62.5(15/24)
		菌阳	87.5(14/16)	87.5(14/16)	87.5(14/16)	93.8(15/16)
		结核病人	71.2(42/59)	71.2(42/59)	76.3(45/59)	72.9(43/59)
应用 3	正常人	PPD 阴性	2.9(1/34)	2.9(1/34)	2.9(1/34)	2.9(1/34)
		PPD 阳性	18.2 (12/66)	19.7(13/66)	22.7(15/66)	21.2(14/66)
		健康人	13(13/100)	14(14/100)	16(16/100)	15(15/100)
	结核病人	菌阴	56.4(53/94)	58.5(55/94)	59.6(56/94)	56.4(53/94)
		菌阳	77.8(7/9)	77.8(7/9)	77.8(7/9)	77.8(7/9)
		结核病人	58.3(60/103)	60.2(62/103)	61.2(63/103)	58.3(60/103)
应用 4	结核性胸水	74.3 (26/35)	77.1 (27/35)	82.9 (29/35)	77.1 (27/35)	

实施例 1: LAM+38kD+16kD;

实施例 2: LAM+38kD+16kD+MPT63;

实施例 3: LAM+38kD+16kD+MPT63+CFP10-ESAT6

实施例 4: LAM+38kD+16kD+MTB48

上述各实施例效果总结:

本发明选择灵敏度高、特异性较强、并具有互补性的结核分枝杆菌多糖 LAM 及重组蛋白 38kD、16kD、MPT63、MTB48、CFP10-ESAT6 按自有的方法制备后，以不同组合联合作为结核病抗体检测试剂盒的抗原。通过 ELISA 方法评价四种不同抗原组合的试剂盒检测 360 例正常人和 373 例结核病人血清中抗结核抗体的灵敏度和特异性。以 6 种抗原检测正常人抗体 OD492 的平均值 (X) +2SD 为阳性界限值，下列四种抗原组合检测健康人和结核病人血清中抗结核抗体的阳性率见表 2：

表 2

分 组		抗结核抗体阳性率%			
		实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
正 常 人	PPD 阴性	4.3 (7/163)	5.5 (9/163)	7.4 (12/163)	4.9 (8/163)
	PPD 阳性	16.2 (32/197)	20.8 (41/197)	23.9 (47/197)	20.3 (40/197)
	健康 人	10.8 (39/360)	13.9 (50/360)	16.4 (59/360)	13.6 (49/360)
结 核 病 人	菌阴	58.8 (133/226)	61.5 (139/226)	65.0 (147/226)	59.7 (135/226)
	菌阳	83.6 (107/128)	84.4 (108/128)	85.2 (109/128)	85.9 (110/128)
	结核 病人	67.8 (253/373)	69.7 (260/373)	72.4 (270/373)	69.2 (258/373)

实施例 1 (LAM+38kD+16kD)；实施例 2 (LAM+38kD+16kD+MPT63)；实施例 3 (LAM+38kD+16kD+MPT63+CFP10-ESAT6)；抗原组合 4 (LAM+38kD+16kD+MTB48)。从表 1 可看出，实施例 1 检测结核病人的灵敏度和特异性为 67.8%、89.2%；实施例 2 检测结核病人的灵敏度和特异性为 69.7%、86.1%；实施例 3 检测结核病人的灵敏度和特异性为 72.4%、83.6%；实施例 4 检测结核病人的灵敏度和特异性为 69.2%、86.4%。虽然 PPD 皮试阳性和阴性健康人之间抗体水平差异并无显著性，但在 PPD 皮试阴性健康人中假阳性率很低，假阳性主要出现在 PPD 皮试阳性的结核感染者和卡介苗接种者中。虽然菌阳和菌阴两组结核病人之间抗体水平差异无显著性，但菌阳病人抗体的阳性率显著高于菌阴病人，菌阳病人的抗体水平也略高于菌阴病人。

专利名称(译)	结核抗体多抗原ELISA检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN101382548A	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200810224021.6	申请日	2008-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军总医院第二附属医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军总医院第二附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军总医院第二附属医院		
[标]发明人	吴雪琼 阳幼荣 张俊仙 李邦印 梁艳 李洪敏 张翠英 李娟		
发明人	吴雪琼 阳幼荣 张俊仙 李邦印 梁艳 李洪敏 张翠英 李娟		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及结核抗体多抗原ELISA检测试剂盒及制备方法，属结核病医学免疫学诊断技术领域。本发明主要由检测抗原、酶联抗人IgG抗体、底物、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、小牛血清和聚苯乙烯微孔反应板所组成的一盒体，所述检测抗原采用结核分枝杆菌复合群菌种脂阿拉伯甘露糖(LAM)、38kD和16kD三种与MPT63、MTB48、CFP10 - ESAT6重组蛋白之中的任意1种或1种以上结核分枝杆菌重组蛋白组合作为检测抗原。本发明的结核分枝杆菌灵敏度高、特异性强、并具有互补性；可用于检测血清、胸水等体液样品中特异的抗结核抗体，辅助结核病的诊断和鉴别诊断。

分 组		抗结核抗体阳性率%				
		实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	
应用 1	正常人	PPD 阴性	3.2 (3/95)	3.2 (3/95)	5.3 (5/95)	3.2 (3/95)
		BCG 接种 种阳 转	15.5 (15/97)	23.7 (23/97)	27.8 (27/97)	20.6 (20/97)
		健康 人	9.33 (18/193)	13.5 (26/193)	16.6 (32/193)	12.4 (24/193)
	结核 病人	菌阴	60.2 (65/108)	63.9 (69/108)	68.5 (74/108)	62.0 (67/108)
		菌阳	83.5 (86/103)	84.5 (87/103)	85.4 (88/103)	85.4 (88/103)
		结核 病人	71.6 (151/211)	73.9 (156/211)	76.8 (162/211)	73.5 (155/211)
应用 2	正常人	PPD 阴性	8.8 (3/34)	14.7 (5/34)	17.6 (6/34)	11.8 (4/34)
		BCG 接种 种阳 转	14.7 (5/34)	14.7 (5/34)	14.7 (5/34)	14.7 (5/34)
		健康 人	11.8 (8/68)	14.7 (10/68)	20.6 (11/68)	14.7 (10/68)
	结核 病人	菌阴	62.5 (15/24)	62.5 (15/24)	71.8 (17/24)	62.5 (15/24)
		菌阳	87.5 (14/16)	87.5 (14/16)	87.5 (14/16)	93.8 (15/16)
		结核 病人	71.2 (42/59)	71.2 (42/59)	76.3 (45/59)	72.9 (43/59)
应用 3	正常人	PPD 阴性	2.9 (1/34)	2.9 (1/34)	2.9 (1/34)	2.9 (1/34)
		PPD 阳性	18.2 (12/66)	19.7 (13/66)	22.7 (15/66)	21.2 (14/66)
		健康 人	13 (13/100)	14 (14/100)	16 (16/100)	15 (15/100)
	结核 病人	菌阴	56.4 (53/94)	58.5 (55/94)	59.6 (56/94)	56.4 (53/94)
		菌阳	77.8 (7/9)	77.8 (7/9)	77.8 (7/9)	77.8 (7/9)
		结核 病人	58.3 (60/103)	60.2 (62/103)	61.2 (63/103)	58.3 (60/103)
应用 4	结核性胸水	74.3 (26/35)	77.1 (27/35)	82.9 (29/35)	77.1 (27/35)	