



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102707052 B

(45) 授权公告日 2015.03.11

(21) 申请号 201210147678.3

(22) 申请日 2012.05.11

(73) 专利权人 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 朱鸿飞 贾红 鑫婷 侯绍华  
袁维峰 郭晓宇

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101533017 A, 2009.09.16,

CN 102183649 A, 2011.09.14,

CN 101533018 A, 2009.09.16, 全文.

CN 101923091 A, 2010.12.22, 全文.

Adam O. Whelan, et al..Development of a Skin Test for Bovine Tuberculosis for Differentiating Infected from Vaccinated Animals. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.2010, 第48卷(第9期), 3176-3181.

刘娜等. 比较基因组学平台的设计与实现. 《南方医科大学学报》.2010, 第30卷(第2期), 219-223.

徐广贤等. 牛结核杆菌与人肺结核杆菌基因组组的比较. 《中国科技论文在线》.2006, 1-6.

李平俊. 牛分支杆菌TB10.4重组蛋白的克隆表达及生物活性研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2011, D050-65.

贾浩等. 结核疫苗研究进展和未来展望. 《中国科技论文在线》.2008, 1-8.

Katalin A. Wilkinson, et al..Efficient Ex Vivo Stimulation of Mycobacterium tuberculosis-Specific T Cells by Genetically Detoxified Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Antigen Toxoids. 《INFECTION AND IMMUNITY》.2005, 第73卷(第5期),

S.Flores-Villalva, et al..Specificity of the Tuberculin Skin Test Is Modified by Use of a Protein Cocktail Containing ESAT-6 and CFP-10 in Cattle Naturally Infected with Mycobacterium bovis. 《Clinical and Vaccine Immunology》.2012, 第19卷(第5期), 797-803.

Winnie Bergstedt, et al..First-in-Man Open Clinical Trial of a Combined rdESAT-6 and rCFP-10 Tuberculosis Specific Skin

(续)

审查员 赵晓明

权利要求书1页 说明书14页  
序列表5页 附图6页

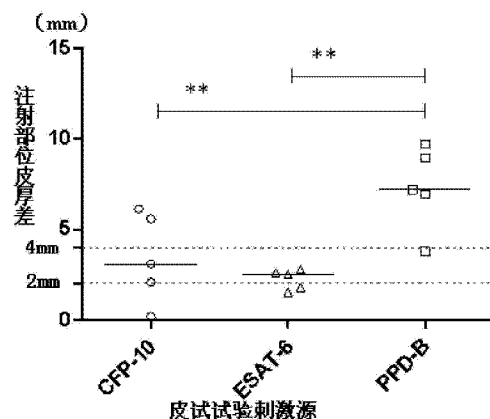
(54) 发明名称

含重组蛋白混合物的牛结核病检测试剂

(57) 摘要

本发明属于免疫检测领域。本发明提供了牛分枝杆菌感染检测的试剂及方法。所述检测试剂包括作为特异性刺激原的重组蛋白混合物,该蛋白混合物能够刺激牛分枝杆菌感染动物产生DTH反应及刺激外周血淋巴细胞释放IFN-γ。本发明的检测试剂克服了现有技术的缺陷,具有较强的灵敏度和特异性,并且生物安全好、成本低廉、可标准化生产,因而能有效用于牛结核病的临床检测。

测。



CN 102707052 B

[ 接上页 ]

(56) 对比文件

期), e11277.

Test Reagent. 《PloS One》. 2010, 第 5 卷 ( 第 6

1. 一种用于牛分枝杆菌感染检测的试剂,该试剂包括三种重组表达的牛分枝杆菌蛋白的混合物,其中所述的三种重组表达的牛分枝杆菌蛋白为 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4,混合比例为 1~2:1~2:1~2,所述三种重组表达的牛分枝杆菌蛋白 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 编码基因的核苷酸序列分别为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3,该试剂去除了内毒素。

2. 权利要求 1 所述的用于牛分枝杆菌感染检测的试剂,其中所述三种重组表达的牛分枝杆菌蛋白的混合比例为 1:1:1 或 2:2:1 或 1:1:2。

3. 一种制备权利要求 1 所述牛分枝杆菌感染检测试剂的方法,该方法包括:

(a) PCR 扩增获得 3 种编码基因;

(b) 重组表达步骤 (a) 获得的编码基因得到 3 种重组蛋白;

(c) 将步骤 (b) 获得的 3 种蛋白按比例混合得到牛分枝杆菌感染检测试剂;

其中步骤 (a) 使用 3 对引物,其中第一引物对的核苷酸序列为 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5,第二引物对的核苷酸序列为 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7,第三引物对的核苷酸序列为 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9,其中步骤 (a) 中的 3 种编码基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3。

4. 权利要求 3 所述的制备牛分枝杆菌感染检测试剂的方法,其中步骤 (b) 中的重组表达的具体操作为:将含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的重组质粒 PET 分别转化至 E. coli BL21 感受态细胞中,挑取单菌落接种至 10mL 含终浓度 25  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37°C 200r/min 震荡培养过夜,将 1ml 培养物接种于 100ml 含终浓度 25  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37°C 200r/min 震荡培养至 OD<sub>600nm</sub> = 0.6 时,加入终浓度为 1mM 的 IPTG,22°C,160rpm 震荡培养 10h,6000r/min 离心 10min 收集菌体,用 40mL pH7.4 的 PBS 洗涤两次,10ml pH7.4 的 PBS 重悬后,冰浴超声破碎菌体,破碎后混合物经 12000rpm,4°C 离心 30min 后取上清,蛋白上清液经  $\phi$ 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤,用金属镍亲和层析柱纯化,并用脱盐层析柱进行脱盐,将重组蛋白置换到 pH7.4 的 PBS 缓冲溶液中。

## 含重组蛋白混合物的牛结核病检测试剂

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域。本发明涉及用于牛分支杆菌感染检测的新型试剂盒及方法。

### 背景技术

[0002] 牛结核病 (Bovine Tuberculosis) 主要是由牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 感染引起的一种人畜共患的慢性传染病, 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染也可引起。世界各国均有发生, 危害十分严重, 给畜牧业带来巨大的经济损失和贸易限制, 目前世界范围内约有 5000 万头牛感染了结核病, 每年因此损失 30 多亿美元。该病能通过未经巴氏消毒的奶及奶制品、接触污染的气溶胶或者动物尸体等传染给人, 从而严重威胁着公共卫生安全及人类健康, 因此具有非常重要的公共卫生意义。世界卫生组织 (WHO) 指出: “在存在牛结核病的国家, 人类始终受到威胁, 除非消灭牛结核病, 否则人类结核病的控制是不会成功的。” 目前, 一些较发达国家和地区, 如美国、澳大利亚和北欧等已基本消灭了牛结核病。但牛结核病在我国依然是最常见的多发性疾病之一, 1985 年和 1987 年两次全国奶牛抽样调查结果显示, 牛结核病的患病率分别达 5.83% 和 5.43%。近年来, 随着个体养牛户的增加, 结核病的阳性检出率正逐年上升。目前我国一些省区牛结核病的发病率已达 10.18% 以上, 甚至更高。

[0003] 牛结核菌素皮内变态反应试验 (GB/T 18646) 为世界动物卫生组织 (OIE) 规定的牛结核病检验的标准方法。结核菌素又称为纯化蛋白衍生物 (purified protein derivatives, PPD), 是将牛型或禽型分枝杆菌菌株接种适宜培养基培养, 收获培养物, 经灭活、滤过除菌、提纯或浓缩制成, 其实际上是牛型或禽型分枝杆菌菌株在液体培养基中生长时产生的代谢物质, 含有多种抗原成分, 其中部分的抗原在禽分枝杆菌、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌及非致病性环境分枝杆菌中广泛存在, 致使 PPD 检验的特异性较差, 在实际检测时容易出现假阳性, 而且 PPD 生产工艺复杂, 生产过程中需要培养具有毒力的牛分枝杆菌, 很难保证其安全性及各批次间 PPD 质量的稳定。

[0004] 90 年代后期国外发展起来的以 PPD 为抗原的  $\gamma$ -干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 释放试验明显提高了牛分枝杆菌检测的灵敏性, 其原理为: 致敏的外周血淋巴细胞在体外培养过程中, 通过特异抗原 (如 PPD) 刺激后被活化, 从而高水平表达并分泌 IFN- $\gamma$ , 通过相应的技术手段对培养上清中 IFN- $\gamma$  的释放水平进行检测 (如 ELISA) 从而判断其是否感染, 其结果与淋巴细胞增生试验具有很好的相关性。该方法避免了对机体的侵入性实验, 可以短时间内多次重复实验, 同时也摒弃了结核菌素试验中操作和判断上的主观性, 因此具有非常广泛的应用前景, 已在澳大利亚、新西兰等国家进行了大量的田间试验, 目前国外已将该类牛结核病检测试剂盒商品化, 并被 OIE 所推荐使用, 但因使用 PPD 作为刺激原, 在实际使用过程中不可避免出现假阳性。

[0005] 为了提高牛分枝杆菌检测特异性, 国内外学者开始利用基因重组技术, 重组表达了牛分枝杆菌的多种特异性蛋白, 例如 6kDa 早期分泌性抗原性靶 (The early secreted

antigenic target6ku protein ESAT-6)、MPB-64、MPB-70、MPB-63、热休克蛋白 65 (Heat shock protein 65, HSP-65)、抗原 85B (antigen 85B, Ag-85B)、10kDa 的培养滤液抗原(10kDa culture filtrate antigen, CFP-10) 等。然后,用这些重组蛋白中的一种或者多种混合(又称“鸡尾酒法”)作为包被抗原进行酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 检测,通过检测牛血清中相应的抗体水平进行牛结核病的血清学检测,该方法虽然一定程度上提高了检测的特异性,但其敏感性不够理想,特别是感染早期及免疫低下者常出现假阴性。

[0006] 因此,研究更加敏感、特异的牛结核病新型检测抗原和检测方法,是控制牛结核病当务之急。

[0007] 本发明人通过基因重组技术表达了牛分枝杆菌的多种特异性蛋白,并将其进行组合,使得刺激原克服了 PPD 的缺点,具有了生物安全、组分明确、含量稳定、成本低廉的优点。用多个重组蛋白进行组合作为刺激原替代 PPD 进行皮内变态反应实验和 IFN- $\gamma$  释放试验进行了反复研究,将两种方法结合,很好地提高了实验特异性的同时,也克服了单一抗原或“多抗原鸡尾酒”血清学检测敏感度不高等缺陷。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供用于牛分枝杆菌感染检测的新型试剂及方法。

[0009] 本发明的发明原理为:由于在皮内变态反应和  $\gamma$ -IFN 释放试验中使用传统的 PPD 作为刺激原时,存在着成分复杂,特异性差的缺点,而现有用来替代 PPD 作为刺激原的重组牛结核杆菌蛋白的敏感性不理想。本发明选择重组表达了牛分枝杆菌的三种特异性蛋白质 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4, CFP-10 和 ESAT-6 属于同一个基因家族,具有相同的操纵子,两基因方向一致,共用一个启动子,协同表达,CFP-10 的 C 端与 ESAT-6 相连,形成紧密的异二聚体结构,这种结构与细菌致病性和毒力有关, TB10.4 蛋白是 ESAT-6 家族蛋白之一,其基因仅存在于结核杆菌复合体中,能诱导机体产生较强的 Th1 型免疫反应,该蛋白可以被结核患者和 BCG 免疫个体强烈识别(70%),并且识别的个体会产生高水平的 IFN- $\gamma$ ,因此该蛋白作为检测抗原使用会大大提高检测的敏感性。本发明尝试用这些重组蛋白或其混合物替代 PPD 作为刺激原,检测牛分枝杆菌感染。

[0010] 本发明提供了一种用于牛分枝杆菌感染检测的试剂,该试剂包括两种或三种重组表达的牛分枝杆菌蛋白的混合物,该重组蛋白混合物能够有效刺激牛分枝杆菌感染动物产生 DTH 反应及刺激感染动物外周血淋巴细胞释放 IFN- $\gamma$ 。

[0011] 在本发明的一个实施方案中,所述试剂包括选自 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 中的两种或三种牛分枝杆菌蛋白的混合物。

[0012] 在本发明的优选实施方案中,所述试剂包括重组表达的牛分枝杆菌蛋白 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 的混合物。

[0013] 三种重组蛋白 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 的混合比例为 1<sup>~</sup>2 : 1<sup>~</sup>2 : 1<sup>~</sup>2,包括但不限于 1 : 1 : 1、2 : 2 : 1 和 1 : 1 : 2,其中优选为 1 : 1 : 1。

[0014] 在本发明的一个具体实施方案中,所述三种重组蛋白 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 的编码基因分别具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列。

[0015] 本发明对所述三种重组蛋白及其混合物进行了皮内变态反应和 IFN- $\gamma$  释放试

验,实验结果证明:(1)本发明所述重组蛋白的混合物作为刺激原时,其检测的特异性和灵敏度优于 PPD 作为刺激原的皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验;(2)本发明所述重组蛋白的混合物作为刺激原时,其检测的特异性和灵敏度优于单一重组蛋白;(3)重组蛋白混合物作为刺激原时,其检测的特异性和灵敏度优于相同蛋白的串联共表达产物。

[0016] 在各种不同成分不同比例的重组蛋白混合物中,由 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 三种成分等比例混合的混合物作为刺激原进行 IFN- $\gamma$  释放试验时,能特异性的检测牛分枝杆菌感染牛,且敏感度最高,最小刺激量可达 10  $\mu$ g/ml。

[0017] 另一方面,本发明提供了用于制备牛分枝杆菌感染检测试剂的引物,其中包括 3 对引物,其中第一引物对的核苷酸序列为 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5,第二引物对的核苷酸序列为 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7,第三引物对的核苷酸序列为 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0018] 另一方面,本发明提供了所述引物在制备牛分枝杆菌感染检测或诊断试剂中的用途。

[0019] 另一方面,本发明提供了一种制备牛分枝杆菌感染检测试剂的方法,该方法包括:(a) PCR 扩增获得 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 的编码基因;(b) 重组表达步骤(a)获得的编码基因得到 3 种重组蛋白;(c) 将步骤(b)获得的 3 种蛋白按比例混合得到牛分枝杆菌感染检测试剂。

[0020] 在一个实施方案中,PCR 扩增所用 3 对引物的核苷酸序列分别为 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 以及 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。

[0021] 在一个实施方案中,PCR 扩增的 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 编码基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3。

[0022] 在一个实施方案中,其中步骤(b)中的重组表达的具体操作为:将含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 的重组质粒 PET 分别转化至 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞中,挑取单菌落接种至 10mL 含终浓度 25  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 200r/min 震荡培养过夜,将 1ml 培养物接种于 100ml 含终浓度 25  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 200r/min 震荡培养至 OD<sub>600nm</sub>=0.6 时,加入终浓度为 1mM 的 IPTG,22 $^{\circ}$ C,160rpm 震荡培养 10h。6000r/min 离心 10min 收集菌体,用 40mL PBS(pH7.4)洗涤两次,10ml PBS(pH7.4)重悬后,冰浴超声破碎菌体,破碎后混合物经 12000rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 30min 后取上清。蛋白上清液经  $\phi$ 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤,用金属镍亲和层析柱按操作手册在蛋白纯化仪进行纯化,并用脱盐层析柱进行脱盐,将重组蛋白置换到 PBS (pH7.4)缓冲溶液中。

[0023] 在一个实施方案中,其中步骤(c)中的混合比例混合比例为 1 $\sim$ 2 : 1 $\sim$ 2 : 1 $\sim$ 2,包括但不限于 1 : 1 : 1、2 : 2 : 1 和 1 : 1 : 2,其中优选为 1 : 1 : 1。

[0024] 另一方面,本发明提供了一种用于检测牛分支杆菌感染的方法,该方法包括下述步骤:

[0025] a) 在牛的颈部上 1/3 处剃毛,并用游标卡尺测量该部位的皮肤厚度;b) 在剃毛部位用 1ml 注射器皮内注射 0.1ml 终浓度为 0.5mg/ml 的本发明所述的重组蛋白混合物;c) 注射 72h 后,游标卡尺测量注射部位的皮肤厚度,并计算该部位注射前后的皮厚差。

[0026] 该方法的判断标准为:当皮厚差小于 2mm 时判定为阴性,皮厚差  $\geq$  2mm 时判定为牛分枝杆菌感染阳性。

[0027] 另一方面,本发明还提供了一种用于检测牛分支杆菌感染的方法,该方法包括:a)采集 10ml 肝素锂抗凝血,以 0.75ml/孔的剂量将其分装于 48 孔细胞培养板,一孔加入终浓度为 1  $\mu$ g 的本发明所述的重组蛋白混合物,另一孔加入等摩尔量的 PET (pET32a(+)) 空载体的标签蛋白)蛋白。b)37 $^{\circ}$ C 培养 24h,收集上层血浆作为待检样品。c)用 ELISA 方法检测血浆样品中牛 IFN- $\gamma$  的释放水平。其中步骤 c) 中所述的用 ELISA 检测待检血浆样品中牛 IFN- $\gamma$  释放水平的具体操作为:①用 ELISA 包被缓冲液将 IFN- $\gamma$  单抗稀释至蛋白质含量为 20  $\mu$ g/ml,每孔酶标板加入 100  $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液(PBST)洗板 3 次,每次 3min,②每孔酶标板先加入 50  $\mu$ l 样品稀释液,再加入 50  $\mu$ l 待检样品(同时做空白对照,阴性对照及阳性对照孔)至含有样品稀释液的孔中,混匀,封板,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,③用洗涤缓冲液洗板 3 次,每次 3min,④各反应孔中加入 100  $\mu$ l 新鲜配制的辣根过氧化物酶标记兔抗牛二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,⑤用洗涤缓冲液洗涤 3 次,每次 3min,⑥各反应孔中加入 100  $\mu$ l 新鲜配制的底物溶液,37 $^{\circ}$ C,避光孵育 30min (从加入底物至第一个孔中时开始计时),⑦各反应孔中加入 50  $\mu$ l 终止液,轻轻摇动混匀。按照与加入底物相同的顺序、相同的速度加入终止液,终止后 5min 内读出 OD<sub>450nm</sub> 值,以 620-650nm 作为参照波长。

[0028] 该方法的判断标准为:当待检血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 -PET 对照的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1,判为阳性,反之,则判为阴性。

#### 附图说明:

[0029] 图 1. 牛分枝杆菌特异性蛋白 PCR 扩增产物电泳结果。泳道 M:DL2000plus 分子量 Markwer;泳道 1:CFP-10 基因产物;泳道 2:ESAT-6PCR 扩增产物;泳道 3:TB10.4PCR 扩增产物。

[0030] 图 2. 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳结果。泳道 1:pET-32a(+)) 空载体标签蛋白(PET)纯化产物对照;泳道 2:CFP-10 重组蛋白纯化产物;泳道 3:ESA-6 重组蛋白纯化产物;泳道 4:TB10.4 重组蛋白纯化产物。

[0031] 图 3. 重组蛋白的 B 细胞活性检测结果,每个圆点表示同一份样本的两个重复检测结果的平均值。

[0032] 图 4. CFP-10 和 ESAT-6 分别作为皮内变态反应试验刺激原的作用效果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差。

[0033] 图 5. CFP-10 与 ESAT-6 等比例混合或串联作为皮内变态反应试验刺激原的作用效果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差,AB 代表 CFP-10 与 ESAT-6 等比例混合,CD 代表 CFP-10 与 ESAT-6 串联表达的融合蛋白 CFP10/ESAT-6。

[0034] 图 6. 重组蛋白 TB10.4 作为 CFP-10 和 ESAT-6 的补充抗原的作用效果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差,AB 代表 CFP-10 与 ESAT-6 等比例混合,ABT 代表 CFP-10、ESAT-6 及 TB10.4 三者等比例混合。

[0035] 图 7. 三种重组蛋白以不同混合方式作为皮内变态反应试验刺激原的作用效果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差,ABT 代表 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 等比例混合,CDT 代表串联表达 CFP-10/ESAT-6 与 TB10.4 以 2:1 的比例混合。

[0036] 图 8. 重组蛋白 ABT 混合物的剂量筛选结果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差。

[0037] 图 9. 重组蛋白的混合比例筛选。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差, ABT1 代表重组蛋白 CFP10、ESAT-6 及 TB10.4 以 1 : 1 : 1 混合, ABT2 代表重组蛋白 CFP10、ESAT-6 及 TB10.4 以 1 : 1 : 2 混合。

[0038] 图 10. 载体标签蛋白 PET 作为皮内变态反应试验刺激原检测结果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差, PET 代表载体标签蛋白。

[0039] 图 11. 重组蛋白 ABT 混合物作为皮内变态反应试验刺激原检测牛结核阴性牛结果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差, ABT 代表 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 等比例混合作为刺激原, 蛋白终浓度为 0.5mg/ml。

[0040] 图 12. 重组蛋白 ABT 混合物作为皮内变态反应试验刺激原临床检测结果。每个点代表一个动物某注射部位的皮厚差, 左图代表检测的 72 头结核病阳性牛数据, 右侧图为 131 头结核病阴性牛数据。

#### [0041] 本发明的优点

[0042] 本发明的检测牛分枝杆菌感染的新型检测试剂具有特异性高、生物安全、组分明确、含量稳定、成本低廉、可标准化生产等优点, 本发明的含重组蛋白混合物的牛结核病检测试剂及检测方法克服了牛分枝杆菌血清学检测方法和以 PPD 为刺激原的皮内变态反应试验及 IFN- $\gamma$  释放试验的不足, 具有较强的特异性和敏感性, 因此可用于牛结核病的临床检测。

[0043] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。

[0044] 本领域技术人员应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而绝不对本发明的范围构成任何限制。除另有说明外, 本申请中的所有科技术语都具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。本申请中引用的任一专利、专利申请和出版物在此引入作为参考。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常采用常规条件例如 Sambrook 等人, 分子克隆 : 实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的方法。

## 实施例

[0045] 实施例 1 重组质粒 PET-ESAT-6、PET-CFP-10 和 PET-TB10.4 的构建

[0046] 1.1 牛分枝杆菌基因组 DNA 的提取

[0047] 用 *M. bovis* Vallee III 菌株 (中国兽医药品监察所提供) 培养物, 参照细菌基因组 DNA 小量快速提取试剂盒 (购自北京博大泰克基因技术有限公司) 产品说明书所述方法进行。

[0048] 1.2 引物的设计

[0049] 根据 GenBank 中 *M. bovis* AF2122/97 基因组 DNA (登录号为 BX248333) 的 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 基因序列设计特异性引物, 上游引物携带 Bam H I 酶切位点, 下游引物携带 Hind III 酶切位点, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物的核苷酸序列见表 1 (下划线处为保护性碱基及酶切位点)。

[0050] 表 1 PCR 引物名称、序列及扩增产物的大小

[0051]

引物名称	引物序列	产物大小
CFP-10-F	5'- <u>cgcggatcc</u> ATggCAgAgATgAAgACCgAT-3'	303bp
CFP-10-R	5'- <u>cccaagctt</u> TCAgAAgCCCATTgCgAggAC-3'	
ESAT-6-F	5'- <u>cgcggatcc</u> ATGACAgAgCAgCAgTggAAT-3'	288bp
ESAT-6-R	5'- <u>cccaagctt</u> TgCgAACATCCCAGTgACgT-3'	
TB10.4-F	5'- <u>cgcggatcc</u> ATgTCgCAAATCATgTACAAC-3'	291bp
TB10.4-R	5'- <u>cccaagctt</u> CTAgCCgCCCCATTTgg-3'	

[0052] 1.3 重组质粒的构建及鉴定

[0053] 以 1.1 中提取的牛分枝杆菌基因组 DNA 为模板,用表 1 中的引物对分别扩增 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 基因,具体反应体系如下:

[0054]

灭菌去离子水	16.5 $\mu$ L
2 $\times$ GC buffer	25 $\mu$ L
10 mM dNTP	2 $\mu$ L
<i>pfu</i> (3U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
正向引物(10pmol/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
反向引物(10pmol/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L
DNA 模板	2 $\mu$ L

[0055] 上述三个基因的扩增反应条件相同,均为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10min,95 $^{\circ}$ C 变性 30s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。PCR 扩增产物电泳检测,结果见图 1,其中牛分枝杆菌 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 基因产物分别约为 303bp、288bp 和 291bp,与预期大小一致。

[0056] 用琼脂糖胶回收试剂盒(购自 OMEGA, USA) 分别回收纯化上述 PCR 产物,然后将 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 分别用 Bam H I 和 Hind III 双酶切后,定向克隆到 pET32a(+) 载体中,获得的重组质粒经双酶切和测序鉴定正确后,分别命名为 PET-CFP-10、PET-ESAT-6 和 PET-TB10.4。

[0057] 实施例 2 重组蛋白 CFP-10、ESAT-6 及 TB10.4 的表达及纯化

[0058] 2.1 重组蛋白的诱导表达、纯化

[0059] 将实施例 1 制备的重组质粒 PET-CFP-10、PET-ESAT-6 和 PET-TB10.4 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中,挑取单菌落接种至 10mL 含终浓度 25  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 200r/min 震荡培养过夜,将 1ml 培养物接种于 100ml 含终浓度 25  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 200r/min 震荡培养至 OD<sub>600nm</sub>=0.6 时,加入终浓度为 1mM 的 IPTG,22 $^{\circ}$ C,160rpm 震荡培养 10h。6000r/min 离心 10min 收集菌体,用 40mL PBS(pH7.4) 洗涤两次,10ml PBS (pH7.4)重悬后,冰浴超声破碎菌体,破碎后混合物经 12000rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 30min 后取上清。蛋白上清液经  $\phi$ 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤,用金属镍亲和层析柱(His Trap FF Crude column,购自 GE 公司)按操作手册在蛋白纯化仪(AKTA purifier,购自 GE 公司)上进

行纯化,并用脱盐层析柱(HiTrap 26/10Desalting column,购自 GE 公司)进行脱盐,将重组蛋白置换到 PBS (pH7.4)缓冲溶液中,纯化产物经 12%SDS-PAGE 电泳进行检测,如图 2。SDS-PAGE 电泳结果(见图 2)显示三个重组蛋白的分子量均约为 30Ku,与预期大小一致。

#### [0060] 2.2 重组蛋白的内毒素去除及定量

[0061] 由于 2.1 中制备的重组蛋白由大肠杆菌表达,为防止可能含有的内毒素注入机体后会引发发热等副反应,需去除重组蛋白中内毒素。具体操作为:向重组蛋白溶液中加入 1%的 Triton X-114,4℃间断混匀 30min,37℃水浴 10min,室温 20000g 离心 10min,取上清,如此重复 2 次,可去除重组蛋白中绝大部分的内毒素。收获的蛋白溶液经  $\phi 0.22\mu\text{m}$  滤器无菌过滤,用蛋白定量试剂盒(BCA 法)(购自 SINOPCR 公司)定量后,无菌分装并冻存于 -80℃。

#### [0062] 实施例 3 重组蛋白 CFP-10、ESAT-6 及 TB10.4 的活性检测

#### [0063] 3.1 重组蛋白的细胞免疫活性鉴定

[0064] ①用传统的牛 PPD 皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验筛选牛结核阳性牛和健康牛各 5 头,无菌条件下每头牛各采集肝素抗凝血 10ml,8h 内室温(22±5℃)运送到实验室。②将抗凝血加入到 48 孔组织培养板,0.75ml/孔,分别无菌加入牛 PPD、禽 PPD、PBS (pH7.4)、空载体标签蛋白 PET、重组蛋白 CFP10、ESAT-6、TB10.4 (PET 与重组蛋白等摩尔量加入,CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 的终浓度均为 10ug/ml) 50  $\mu\text{l}$ /孔,震荡混匀后 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24h。③小心吸取 200  $\mu\text{l}$  的上层血浆,转入 1.5ml 离心管中备用(血浆可在 2-8℃贮存 7 天,-20℃可贮存几个月)。按照牛 IFN- $\gamma$  检测试剂盒(购自北京测迪公司)说明书进行操作,记录各个样品的 OD<sub>450nm</sub> 读值,结果见表 2。

#### [0065] 表 2. 重组蛋白的细胞免疫活性检测结果

[0066]

	牛号	B-PPD	A-PPD	PBS	PET	CFP-10	ESAT-6	TB10.4
牛结核病 阳性牛	1	1.5856	0.8755	0.0609	0.1183	1.8459	1.3335	0.1351
	2	1.9938	0.2665	0.0624	0.1040	1.2234	0.1607	0.3297
	3	1.3159	0.0922	0.0624	0.1072	1.8898	0.3811	0.6914
	4	0.6680	0.0827	0.0816	0.1219	0.2393	0.1944	0.3680
	5	0.8908	0.1058	0.0796	0.1393	0.8449	0.5736	1.5373
健康牛	6	0.2505	0.2395	0.0652	0.1321	0.1880	0.1148	0.1825
	7	0.0736	0.0608	0.0616	0.1150	0.1301	0.1280	0.1191
	8	0.2360	0.1833	0.0676	0.1059	0.1186	0.1147	0.1068
	9	0.1553	0.1284	0.0714	0.1066	0.1218	0.1338	0.0940
	10	0.1753	0.1524	0.0758	0.1166	0.1203	0.1105	0.1020

[0067] 判定标准:当牛 IFN- $\gamma$  阴性对照 <0.130、牛 IFN- $\gamma$  阳性对照 >0.700 时检测结果有效,如重组蛋白刺激后的血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 - 阴性对照刺激原刺激后的血浆样品的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1,判为阳性,反之,则判为阴性。

[0068] 表 2 结果显示,载体的标签蛋白 PET 刺激牛结核阳性牛或健康牛的全血后,IFN- $\gamma$  的释放量均没有增加,这表明与牛分枝杆菌特异性蛋白(CFP10、ESAT-6、TB10.4)融合表达的载体标签蛋白 PET 对牛的外周血淋巴细胞没有刺激作用,不产生非特异性反应,从而排

除了标签蛋白对试验结果的影响。重组蛋白 CFP10、ESAT-6、TB10.4 刺激健康牛的全血时, IFN- $\gamma$  的释放量没有增加, 而刺激牛分枝杆菌感染牛的外周淋巴细胞时, IFN- $\gamma$  的释放量显著增加, 这表明三种牛分枝杆菌特异性重组蛋白均具有良好的细胞免疫活性, 可以特异性的检测牛分枝杆菌感染, 但不同牛分枝杆菌感染动物个体对各个蛋白的反应性并不相同, 例如 1 号牛对 CFP-10 和 ESAT-6 的反应性好, 而 2 号牛对 CFP-10 和 TB10.4 的反应活性好, 然而 CFP-10、ESAT-6、TB10.4 三者可以互为补充, 从而提高检测的敏感度。

### [0069] 3.2 重组蛋白的体液免疫活性鉴定

[0070] 将重组蛋白 CFP-10、ESAT-6、TB10.4 和 PET 分别以 1 $\mu$ g/ml 的浓度包被 ELISA 反应板, 检测 240 份健康牛的血清, 获得各个蛋白的 cutoff 值(阴性样本的平均值加上 2 倍的标准误), PET、CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 的 cutoff 值分别为 0.096、0.139、0.145、和 0.15; 再用相同操作方法检测 289 份经 PPD 皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验鉴定为牛结核病阳性牛的血清样品, 检测结果见图 3。

[0071] 结果表明:载体标签蛋白 PET 与牛结核病牛阳性血清及阴性血清均未发生反应, 而三种重组蛋白 CFP-10、ESAT-6、TB10.4 均与牛结核病牛阳性血清发生特异性反应, 具有良好的 B 细胞免疫活性, 并且均不与健康牛的血清发生反应, 表明重组蛋白 CFP-10、ESAT-6、TB10.4 均具有良好的特异性。但是这三种重组蛋白对各个牛分枝杆菌感染牛的反应性不同, 其中的单个蛋白均不能检测出所有阳性样本, 与 3.1 的结论相吻合。

[0072] 虽然本发明实验证实三种重组蛋白均具有良好的细胞免疫和体液免疫活性, 但是由于单一重组蛋白不能够检测出所有阳性样本, 因此本发明人考虑将所述重组蛋白联合应用。

[0073] 下面本发明人将通过皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验, 比较三种重组蛋白不同混合配比方式的实验效果。

### [0074] 实施例 4 最佳反应条件的建立

#### [0075] 4.1 皮内变态反应筛选重组蛋白最佳工作方式

[0076] 用皮内变态反应筛选牛结核病阳性牛, 2 个月后按照以下分组进行皮内变态反应试验, 用于筛选合适的刺激原。以下实验中 A 为重组蛋白 CFP-10, B 为重组蛋白 ESAT-6, T 为重组蛋白 TB10.4, PET 为载体标签蛋白, CD 为本发明人用原核表达系统表达和纯化的 CFP-10/ESAT6 重组串联蛋白, 注射用重组蛋白的总浓度均为 0.5mg/ml, 注射剂量为 0.1ml, ABT 的组合比例为 1 : 1 : 1。

#### [0077] 4.1.1 单个重组蛋白皮内变态反应实验

[0078] 从上述结核阳性牛中随机选择 5 头牛, 在颈部上 1/3 处进行剃毛, 在颈部一侧分别注射 CFP-10 和 ESAT-6, 另一侧注射牛 PPD, 分别在注射前、注射后 72h 测量皮肤厚度, 计算皮厚差。实验结果见图 4。

[0079] 结果表明, CFP-10 在作为皮内变态反应试验刺激原时, 比 ESAT-6 引起的迟发型过敏反应(DTH)强, 但这两个重组蛋白分别单独作用时的效果均显著小于 PPD 引起的反应。

#### [0080] 4.1.2 重组蛋白混合物与重组共表达产物间的比较

[0081] 从上述结核阳性牛中随机选择 5 头牛, 在颈部上 1/3 处进行剃毛, 在颈部一侧分别注射 CFP-10 与 ESAT-6 混合液(比例为 1 : 1)和串联表达的 CFP-10/ESAT-6 重组蛋白, 另一侧注射牛 PPD, 分别在注射前、注射后 72h 测量皮肤厚度, 计算皮厚差。实验结果见图 5。

结果表明 CFP-10 与 ESAT-6 等比例混合的作用效果要优于二者串联表达产物,但均略差于 PPD 的刺激效果。

#### [0082] 4.1.3 重组蛋白混合成分之间比较

[0083] 从上述结核阳性牛中随机选择 5 头牛,在颈部上 1/3 处进行剃毛,在颈部一侧分别注射 CFP-10 与 ESAT-6 混合液(比例为 1:1)和三种重组蛋白 CFP-10、ESAT-6 及 TB10.4 的混合物(比例为 1 : 1 : 1),另一侧注射牛 PPD,分别在注射前、注射后 72h 测量皮肤厚度,计算皮厚差。实验结果见图 6.。

[0084] 结果表明 CFP-10、ESAT-6 与 TB10.4 三种重组蛋白的混合效果要好于两种重组蛋白(CFP-10 与 ESAT-6)混合的作用效果。

#### [0085] 4.1.4 重组蛋白混合方式的比较

[0086] 从上述结核阳性牛中随机选择 5 头牛,在颈部上 1/3 处进行剃毛,在颈部一侧分别注射 ABT 混合液(CFP-10、ESAT-6 与 TB10.4 等比例混合)和 CDT 混合液(串联表达的 CFP-10/ESAT-6 与 TB10.4 以 2 : 1 比例混合),另一侧注射牛 PPD,分别在注射前、注射后 72h 测量皮肤厚度,计算皮厚差。实验结果见图 7。

[0087] 结果表明,三种重组蛋白不同比例混合都有很好的作用效果,其中等比例混合的作用效果更佳。

#### [0088] 4.1.5 重组蛋白作用剂量筛选

[0089] 随机筛选结核阳性牛 10 头,其中在 5 头牛颈部一侧注射不同蛋白总浓度的 ABT 混合液,一点的注射浓度为 0.5mg/ml,另一点为 0.2mg/ml 的 ABT 混合液,另一侧注射牛 PPD;另外 5 头牛一侧注射蛋白总浓度分别为 0.3mg/ml 或 0.1mg/ml 的 ABT 混合液,另一侧注射牛 PPD,检测结果见图 8.,结果表明重组蛋白 ABT 混合物的终浓度为 0.5mg/ml 时,产生的刺激效果最好。

#### [0090] 4.1.6 重组蛋白混合比例的筛选

[0091] 将 CFP10、ESAT-6 及 TB10.4 三种重组蛋白以不同比例混合,ABT1 代表重组蛋白 CFP10、ESAT-6 及 TB10.4 以 1 : 1 : 1 混合,ABT2 代表重组蛋白 CFP10、ESAT-6 及 TB10.4 以 1 : 1 : 2 混合。随机选择结核阳性牛 5 头,一侧分别注射以 ABT1 混合液和 ABT2 混合液,另一侧注射牛 PPD,结果见图 9。

[0092] 结果表明,三种重组蛋白 CFP10、ESAT-6 及 TB10.4 以 1 : 1 : 1 混合(ABT1)和以 1 : 1 : 2 (ABT2)比例混合都有很好的刺激效果,1 : 1 : 1 比例的组合方式效果更好。

#### [0093] 4.2 IFN- $\gamma$ 释放试验筛选重组蛋白最佳工作方式

##### [0094] 4.2.1 重组蛋白为刺激原的 IFN- $\gamma$ 释放试验时蛋白比例筛选

[0095] 从以上牛结核病阳性牛中筛选 3 头牛采集肝素锂抗凝血 10ml,8h 内室温(22 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)运送到实验室,将抗凝血加入到 48 孔组织培养板,0.75ml/孔,空载体标签蛋白 PET、重组蛋白 CFP10、ESAT-6、TB10.4 的混合液 ABT (重组蛋白 ABT 混合液和 PET 以等摩尔量加入,并且重组蛋白 ABT 之间的比例梯度设为 :1 : 1 : 1,2 : 2 : 1 和 1 : 1 : 2)各 50  $\mu$  l,震荡混匀后 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24h。③小心吸取 200  $\mu$  l 的上层血浆,转入 1.5ml 离心管中备用(血浆可在 2-8 $^{\circ}$ C 贮存 7 天,-20 $^{\circ}$ C 可贮存几个月),按照 Bovigam IFN- $\gamma$  检测试剂盒(购自北京测迪公司)说明书进行操作,记录各个样品的 OD<sub>450nm</sub> 读值,结果详见表 3。

##### [0096] 表 3. 重组蛋白 ABT 比例优化实验结果

	OD <sub>450</sub> ABT-OD <sub>450</sub> PET			
	1:1:1	2:2:1	1:1:2	
[0097]	<b>1</b>	<b>0.4659</b>	<b>0.3207</b>	<b>0.2097</b>
	<b>2</b>	<b>0.3071</b>	<b>0.1397</b>	<b>0.0037</b>
	<b>3</b>	<b>3.4657</b>	<b>3.3612</b>	<b>3.2622</b>

[0098] 判断标准为：检查阳性对照和阴性对照的 OD<sub>450nm</sub> 值，当牛 IFN- $\gamma$  阴性对照 < 0.130、牛 IFN- $\gamma$  阳性对照 > 0.700 时检测结果有效，不同混合比例的重组蛋白 ABT 作为刺激原时，判断标准为重组蛋白 ABT 刺激后的血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 - 等摩尔量的 PET 刺激原刺激后的血浆样品的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1，判为阳性，反之，则判为阴性。表 3 中的结果表明三种重组蛋白 CFP10、ESAT-6、TB10.4 以 1 : 1 : 1 混合时，刺激效果最佳。

[0099] 4.2.2 重组蛋白作为 IFN- $\gamma$  释放试验刺激源的剂量筛选

[0100] 用牛 PPD 皮内变态反应试验筛选 3 头牛结核病阳性牛和 3 头健康牛，分别采集肝素锂抗凝血 10ml，8h 内室温 (22 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C) 运送到实验室，将抗凝血加入到 48 孔组织培养板，0.75ml/孔，各孔分别无菌加入空载体标签蛋白 PET、重组蛋白 ESAT-6、CFP-10、TB10.4 的混合液 ABT (重组蛋白 ABT 混合液和 PET 以等摩尔量加入，并且重组蛋白的浓度梯度设为：100、50、20、10、5 和 2  $\mu$ g/ml) 各 50  $\mu$ l，震荡混匀后 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24h。小心吸取 200  $\mu$ l 的上层血浆，转入 1.5ml 离心管中备用 (血浆可在 2-8 $^{\circ}$ C 贮存 7 天，-20 $^{\circ}$ C 可贮存几个月)，按照牛 IFN- $\gamma$  检测试剂盒 (购自北京测迪公司) 说明书进行操作，记录各个样品的 OD<sub>450nm</sub> 读值。

[0101] 判定结果前检查阳性对照和阴性对照的 OD 值，当牛 IFN- $\gamma$  阴性对照 < 0.130、牛 IFN- $\gamma$  阳性对照 > 0.700 时检测结果有效，不同浓度的重组蛋白作为刺激原时，判断标准为重组蛋白 ABT 刺激后的血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 - 等摩尔量的 PET 刺激原刺激后的血浆样品的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1，判为阳性，反之，则判为阴性。结果如表 4。

[0102] 表 4. 不同浓度重组蛋白 ABT 作为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验的检测结果

[0103]

刺激原	重组蛋白浓度 (ug/ml)					
	100	50	20	10	5	2
牛分枝杆菌感染牛	1.0302	0.8730	0.8012	0.4289	0.5695	0.3348
	1.7368	1.7173	1.7036	1.4950	1.0878	0.7652
	0.3067	0.3229	0.3272	0.2074	0.0757	0.0362
PBS 对照组	0.0009	0.0369	0.0182	-0.0067	-0.0136	-0.0172
	-0.0198	0.0519	0.0025	0.0019	0.0072	-0.0108
	0.0533	0.0082	0.0165	-0.0210	-0.0023	-0.0297

[0104] 实验结果表明：重组蛋白混合物 ABT 作为刺激原进行 IFN- $\gamma$  释放试验时，可以检测牛分枝杆菌感染牛，且非常敏感，最小刺激量可达 10  $\mu$ g/ml。

[0105] 实施例 5 特异性和敏感性实验

[0106] 5.1 皮内变态反应特异性实验

[0107] 随机选取 5 头牛，在颈部上 1/3 处选取两点 (间隔 20cm 以上)，分别注射牛 PPD 和

50ug 的载体标签蛋白 PET,于注射前和注射 72h 后测量皮肤厚度,结果见图 10,结果显示标签蛋白对各种牛均不产生反应,表明该标签蛋白并不引起非特异性反应。

[0108] 选取 PPD 皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验筛选的 131 头阴性健康牛,在第一次皮内变态反应试验结束 2 个月后,于颈部上 1/3 处选取两点(间隔 20cm 以上),分别注射牛 PPD 和浓度为 0.5mg/ml 的本发明所述重组蛋白混合溶液各 0.1ml,分别于注射前和注射 72h 后测量皮肤厚度,结果见图 11,结果表明本发明所述重组蛋白混合液在健康牛并不引起非特异性反应。

[0109] 5. 2IFN- $\gamma$  释放实验的特异性和敏感性

[0110] 为了验证本发明所述重组蛋白作为 IFN- $\gamma$  释放实验检测刺激原的特异性和敏感性,从连续五年牛结核病检测阴性牛场筛选 12 头 1~2 月龄的犊牛,在实验前分别用牛 PPD 皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放实验进行检测,检测结果显示筛选的 12 头牛均为阴性健康牛。

[0111] 将这 12 头牛随机分为四组,四组实验动物分别颈静脉注射人工感染 *M. bovis* 6800110<sup>4</sup>CFU (我国分离自结核病牛的强毒株,用于制造和检验牛型结核菌素)、*M. bovis* BCG10<sup>4</sup>CFU (弱毒株,对牛、小动物和人均没有致病性,用于制造弱毒疫苗)、*M. avium* P18 10<sup>4</sup>CFU (分离自结核病鸡的强毒株,用于制造和检验禽型结核菌素)、和等体积的 PBS (pH7.4);以上菌株均由中国兽医药品监察所提供。

[0112] 在感染后 1 个月时采集肝素锂抗凝血 10ml,8h 内室温(22±5℃)运送到实验室,首先将抗凝血加入到 48 孔组织培养板,0.75ml/孔,各孔分别无菌加入牛 PPD、禽 PPD、PBS (pH7.4)、空载体标签蛋白 PET、重组蛋白 ESAT-6、CFP-10、TB10.4 的混合液 ABT (重组蛋白 ABT 混合液和 PET 以等摩尔量加入,重组蛋白的浓度设为 20  $\mu$ g/ml) 各 50  $\mu$ l,震荡混匀后 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24h。小心吸取 200  $\mu$ l 的上层血浆,转入 1.5ml 离心管中备用(血浆可在 2-8℃ 贮存 7 天,-20℃ 可贮存几个月),按照牛 IFN- $\gamma$  检测试剂盒(购自北京测迪公司)说明书进行操作,记录各个样品的 OD<sub>450nm</sub> 读值,结果见表 5。

[0113] 判定标准:当牛 IFN- $\gamma$  阴性对照 <0.130、牛 IFN- $\gamma$  阳性对照 >0.700 时检测结果有效,如牛 PPD 刺激后的血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 - PBS 对照刺激原刺激后的血浆样品的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1,同时,牛 PPD 刺激后的血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 - 禽对照刺激原刺激后的血浆样品的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1,判为阳性,反之,则判为阴性;重组蛋白作为刺激原时,判断标准为重组蛋白 ABT 刺激后的血浆样品 OD<sub>450nm</sub> 值 - 等摩尔量的 PET 刺激原刺激后的血浆样品的 OD<sub>450nm</sub> 值  $\geq$  0.1,判为阳性,反之,则判为阴性。

[0114] 表 5. 不同刺激源的 IFN- $\gamma$  释放试验的检测结果

[0115]

刺激原	B-PPD	A-PPD	PBS	ABT	PET
牛分枝杆菌感染牛	2.2314	1.2076	0.1168	0.8012	0.1028
	1.1899	0.2170	0.1472	1.7036	0.1147
	0.5091	0.3404	0.1108	0.3272	0.0745
BCG 感染牛	0.6817	0.0785	0.0701	0.1136	0.0742
	2.3080	0.0958	0.0816	0.1006	0.0826
	0.1944	0.1335	0.0940	0.1161	0.0845
禽分枝杆菌感染牛	0.1676	1.4637	0.0664	0.0768	0.0764
	0.2116	1.9710	0.0650	0.1017	0.0550
	0.3263	1.5173	0.0675	0.0885	0.0775
PBS 对照组	0.2431	0.2864	0.0797	0.1182	0.0724
	0.1047	0.1249	0.0872	0.1025	0.0824
	0.2024	0.2219	0.0824	0.0865	0.0706

[0116] 实验结果表明 :PPD 作为刺激原时无法区分 BCG 和牛分枝杆菌感染,但是重组蛋白混合物 ABT 作为刺激原进行 IFN- $\gamma$  释放试验时,可以特异性的检测牛分枝杆菌感染牛,并能够鉴别牛分枝杆菌感染和 BCG 以及禽分枝杆菌感染。

[0117] 实施例 6 使用本发明的检测试剂进行临床检测

[0118] 6.1 重组蛋白作为皮内变态反应试验刺激原进行临床试验

[0119] 用牛 PPD 和 ABT 重组蛋白混合液在临床进行皮内变态反应试验,于牛颈部上 1/3 处剃毛,两点之间间隔 20cm 以上,分别注射 0.1ml 的牛 PPD 和 ABT (重组蛋白的浓度为 0.5mg/ml, CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 之间比例为 1 : 1 : 1),在注射前和注射后 72h 用游标卡尺测量皮肤厚度,计算注射前后的皮厚差。皮内变态反应判定标准 :牛 PPD 作为刺激原时,皮厚差 < 2mm 时为阴性,2mm  $\leq$  皮厚差 < 4mm 时为可疑,皮厚差  $\geq$  4mm 时判定为阳性,疑似动物需要复检 ;重组蛋白 ABT 作为刺激原时,皮厚差  $\geq$  2mm 时判定为阳性。

[0120] 为了统计数据的方便,将 PPD 皮内变态反应试验中皮厚差  $\geq$  2mm 的个体均按阳性动物计算,与 IFN- $\gamma$  释放试验和 ABT 重组蛋白皮内变态反应试验比较检测的特异性和敏感性,结果见表 6。

[0121] 表 6.

[0122]

ABT 为刺激原的皮内变态反应试验			
		阳性	阴性
IFN- $\gamma$ 释放试验/皮内变态反应试验	阳性	60 (A)	12 (C)
	阴性	2 (B)	129 (D)

[0123] ABT 为刺激原的皮内变态反应试验相对于皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验的灵敏度 =A/(A+C)  $\times$  100%=83.3%

[0124] ABT 为刺激原的皮内变态反应试验相对于皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验的特异性 =D/(B+D)  $\times$  100%=99.2%

[0125] ABT 为刺激原的皮内变态反应试验与皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验检测

符合率 = (A+D) / (A+B+C+D) × 100% = 93.1%

[0126] 阳性牛 : 经 IFN- $\gamma$  释放试验、牛 PPD 皮内变态反应试验检测判定为双阳性的牛共 72 头, 这 72 头的牛 PPD 皮内变态反应试验和重组蛋白 ABT 为刺激原的皮内变态反应试验检测结果如图 12 (阳性牛);

[0127] 阴性牛 : 经 IFN- $\gamma$  释放试验、牛 PPD 皮内变态反应试验检测判定为双阴性的牛共 131 头, 这 131 头牛 PPD 皮内变态反应试验和重组蛋白 ABT 为刺激原的皮内变态反应试验检测结果如图 12 (阴性牛)。

[0128] 实验结果表明 : ABT 重组蛋白混合物作为刺激原进行皮内变态反应试验时, 与传统的牛 PPD 皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验的检测符合率可达 93.1%, 检测的灵敏度可以达到 83.3%, 特异性达到 99.2%。这些试验数据表明 CFP-10、ESAT-6 和 TB10.4 重组蛋白混合物作为皮内变态反应试验的刺激原具有较高的灵敏度和特异性, 可以作于牛结核病临床检测。

[0129] 6.2ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验的临床试验

[0130] 分别用 PPD 皮内变态反应试验、以 PPD 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验和本发明建立的以重组蛋白 ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验对 324 头牛结核疑似牛同时进行检测, 皮内变态反应判定标准 : 牛 PPD 作为刺激原时, 皮厚差 < 2mm 时为阴性, 皮厚差  $\geq$  2mm 时判定为阳性, 疑似动物需要复检 ; 重组蛋白 ABT 作为刺激原时, 皮厚差  $\geq$  2mm 时判定为阳性。本发明建立的 ABT 作为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验与 PPD 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验和 PPD 皮内变态反应试验比较检测的特异性和敏感性, 结果见表 7 及表 8。

[0131] 表 7. ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验对于 PPD 皮内变态反应试验的敏感性和特异性分析

[0132]

		PPD 为刺激原的 IFN- $\gamma$ 释放试验	
		阳性	阴性
ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$ 释放试验	阳性	150 (A)	1 (C)
	阴性	47 (B)	126 (D)

[0133] ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验对于 PPD 皮内变态反应试验的检测灵敏度 = A / (A+C) × 100% = 99.3%

[0134] ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验对于 PPD 皮内变态反应试验的检测特异性 = D / (B+D) × 100% = 72.8%

[0135] ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验对于 PPD 皮内变态反应试验的检测符合率 = (A+D) / (A+B+C+D) × 100% = 85.19%

[0136] 表 8. ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验对于以 PPD 作为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验的敏感性和特异性分析

[0137]

		PPD 皮内变态反应试验	
		阳性	阴性
ABT 为刺激原的 IFN- $\gamma$ 释放试验	阳性	151 (A)	0 (C)
	阴性	73 (B)	100 (D)

[0138] ABT 作为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验的检测灵敏度 =  $A / (A + C) * 100\% = 100\%$

[0139] ABT 作为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验的检测特异性 =  $D / (B + D) * 100\% = 57.8\%$

[0140] ABT 作为刺激原的 IFN- $\gamma$  释放试验与 PPD 皮内变态反应试验的检测符合率 =  $(A + D) / (A + B + C + D) * 100\% = 77.47\%$

[0141] 实验数据表明,本发明的检测特异性非常高,与传统的 PPD 皮内变态反应试验和 IFN- $\gamma$  释放试验相比均可达到 99% 以上,敏感性能够达到 72% 以上,符合率可到 77% 以上。

## 序列表

<110> 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

<120> 含重组蛋白混合物的牛结核病检测试剂

<130>

<160> 9

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 303

<212> DNA

<213> 牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)

<220>

<221> 基因

<222> (1)..(303)

<400> 1

atggcagaga tgaagaccga tgccgctacc ctcgcgagg aggcaggtaa ttcgagcgg 60

atctccggcg acctgaaaac ccagatcgac caggtggagt cgacggcagg ttcgttgag 120

ggccagtggc gcggcgccgc ggggacggcc gccaggccg cggtggtgag cttccaagaa 180

gcagccaata agcagaagca ggaactcgac gagatctcga cgaatattcg tcaggccggc 240

gtccaatact cgagggccga cgaggagcag cagcaggcgc tgtcctcgca aatgggcttc 300

tga 303

<210> 2

<211> 288

<212>	DNA	
<213>	牛分枝杆菌( <i>Mycobacterium bovis</i> )	
<220>		
<221>	基因	
<222>	(1).. (288)	
<400>	2	
	atgacagagc agcagtgga tttcgcgggt atcgaggccg cggcaagcgc aatccaggga	60
	aatgtcacgt ccattcattc cctccttgac gaggggaagc agtccctgac caagctcgca	120
	gcggcctggg gcggtagcgg ttcggaggcg taccagggtg tccagcaaaa atgggacgcc	180
	acggctaccg agctgaacaa cgcgctgcag aacctggcgc ggacgatcag cgaagccggt	240
	caggcaatgg cttegaccga aggcaacgtc actgggatgt tcgcatag	288
<210>	3	
<211>	291	
<212>	DNA	
<213>	牛分枝杆菌( <i>Mycobacterium bovis</i> )	
<220>		
<221>	基因	
<222>	(1).. (291)	
<400>	3	
	atgtcgcaaa tcatgtacaa ctaccccgcg atgttgggtc acgccgggga tatggccgga	60
	tatggccgca cgctgcagag cttgggtgcc gagatcgccg tggagcagge cgcgttgcag	120
	agtgcgtggc agggcgatac cgggatcacg tatcaggcgt ggcaggcaca gtggaaccag	180
	gccatggaag atttggtgcg ggcctatcat gcgatgtcca gcacccatga agccaacacc	240

atggcgatga tggcccgcga cacggccgaa gccgccaat ggggcggcta g

291

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 引物

<222> (1)..(30)

<400> 4

cgcgatcca tggcagagat gaagaccgat

30

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 引物

<222> (1)..(31)

<400> 5

cccaagcttt cagaagccca tttgcgagga c

31

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 引物

<222> (1).. (30)

<400> 6

cgcggatcca tgacagagca gcagtggaat

30

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 引物

<222> (1).. (29)

<400> 7

cccaagcttt gccaacatcc cagtgcagt

29

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 引物

<222> (1).. (30)

<400> 8

cgcggatcca tgtcgcaaat catgtacaac

30

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 引物

<222> (1)..(26)

<400> 9

cccaagcttc tagcgcgcc atttgg

26

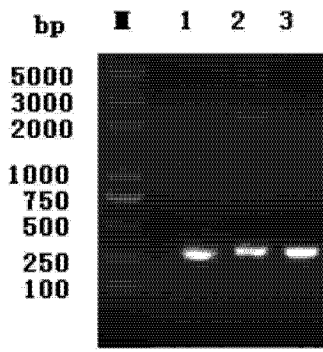


图 1

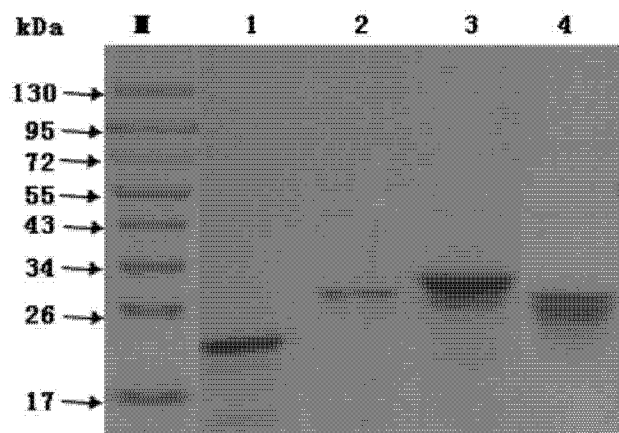


图 2

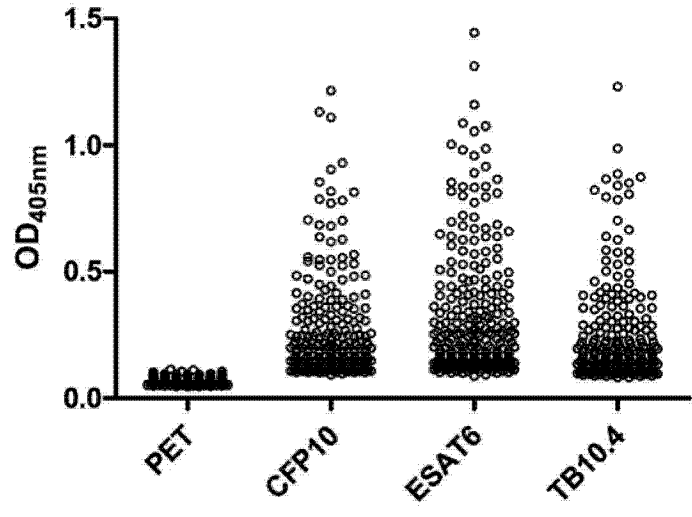


图 3.

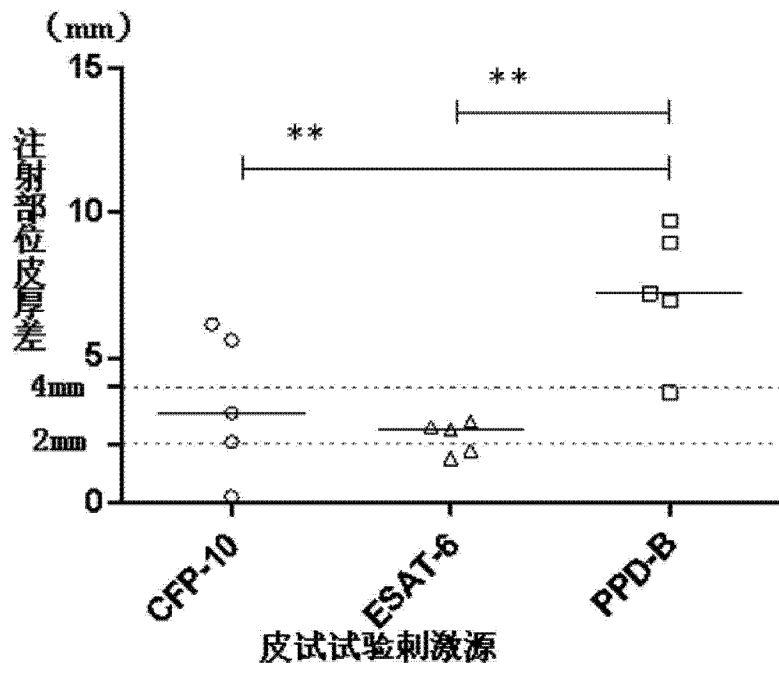


图 4.

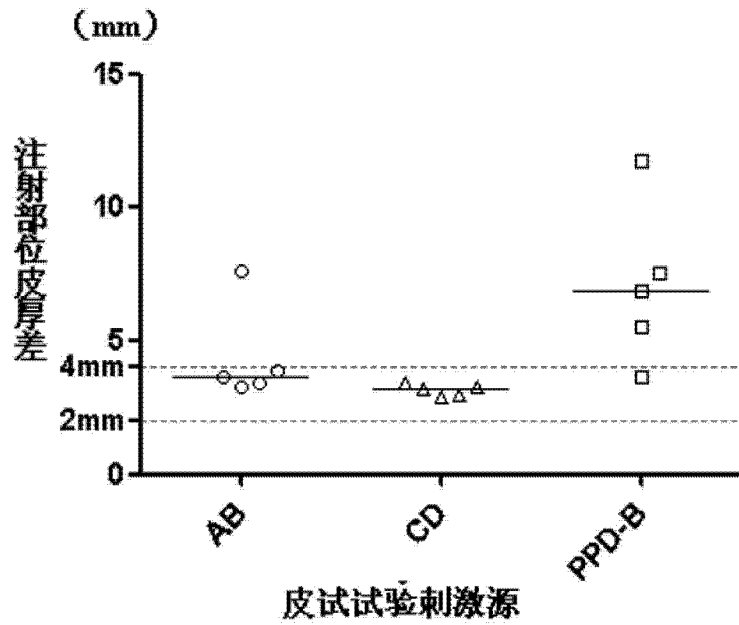


图 5.

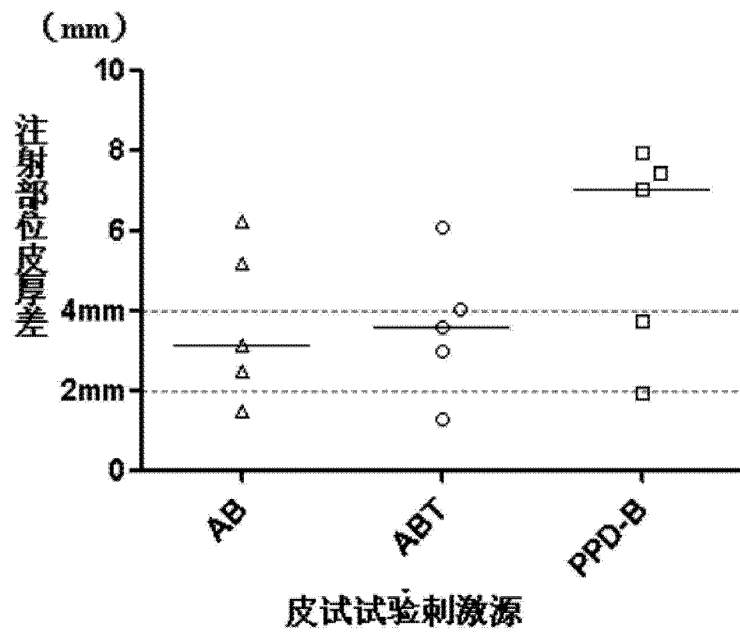


图 6.

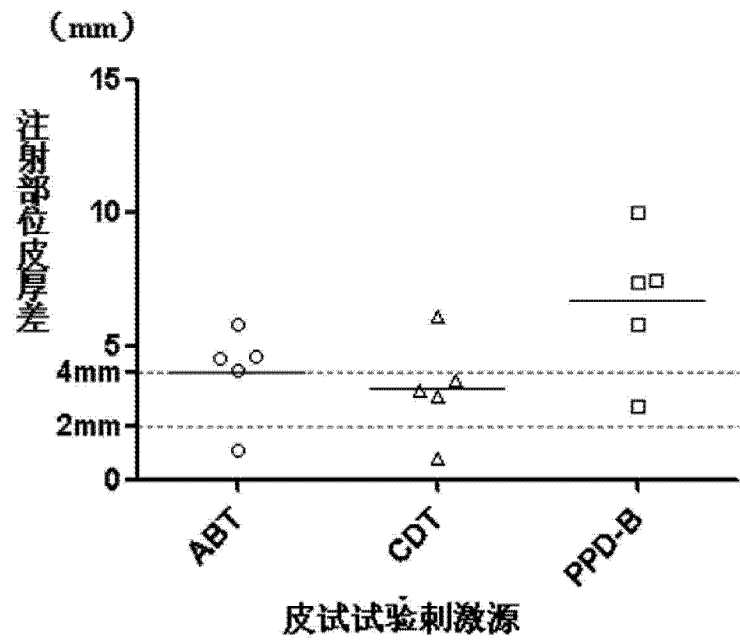


图 7.

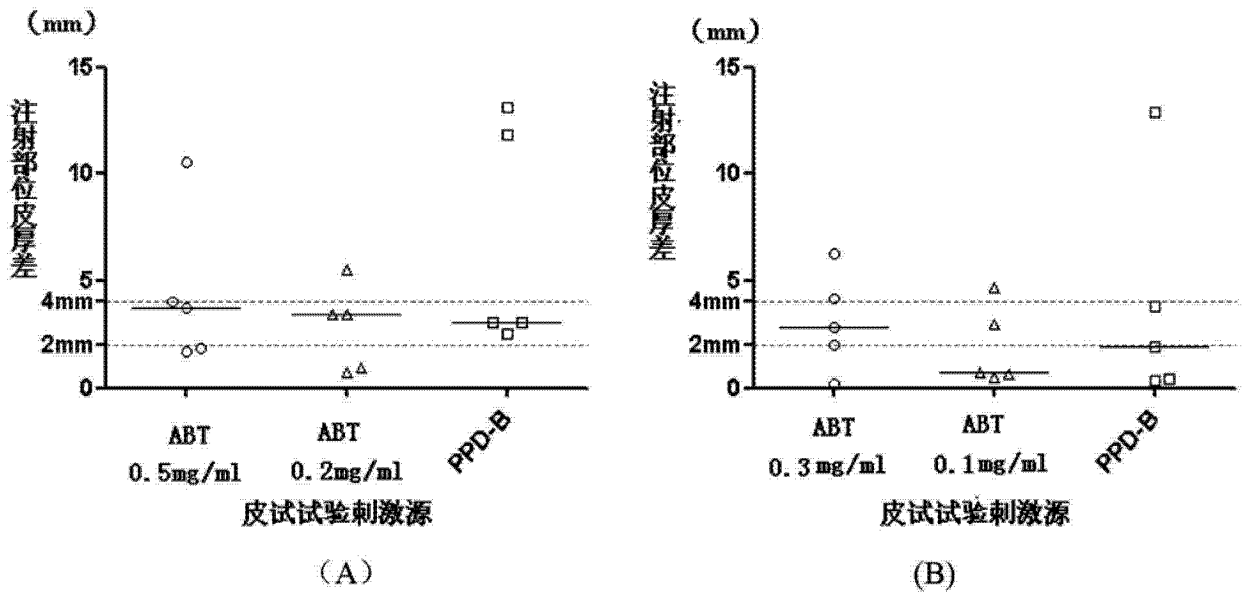


图 8.

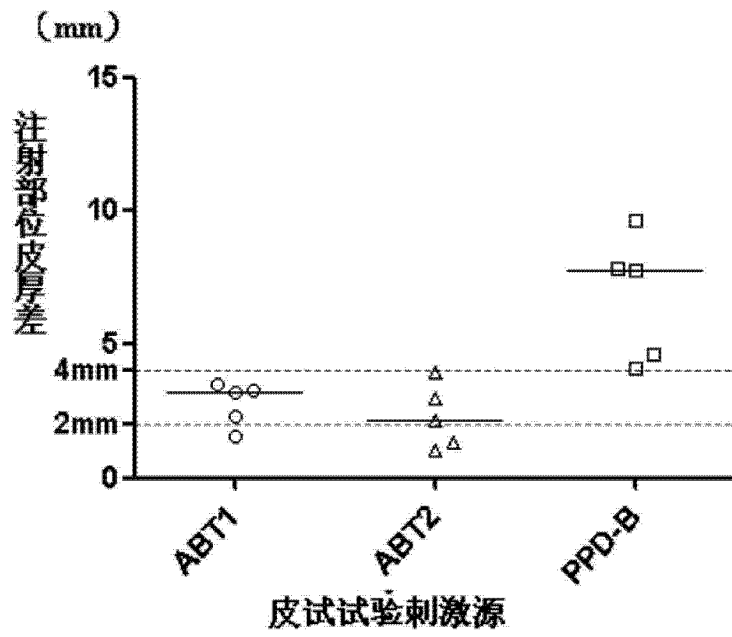


图 9.

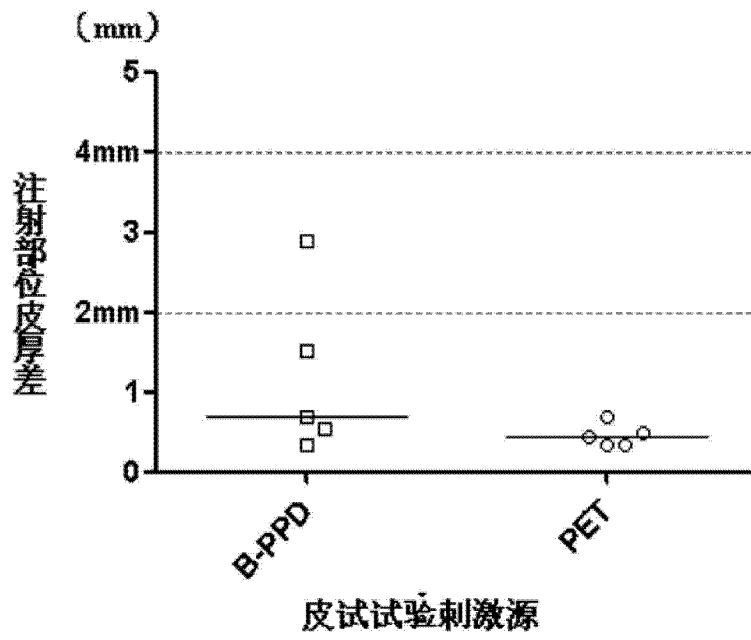


图 10.

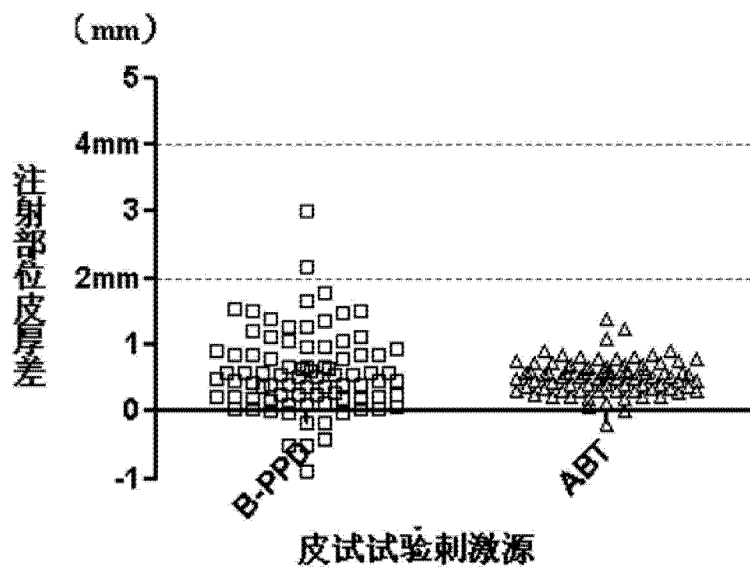


图 11

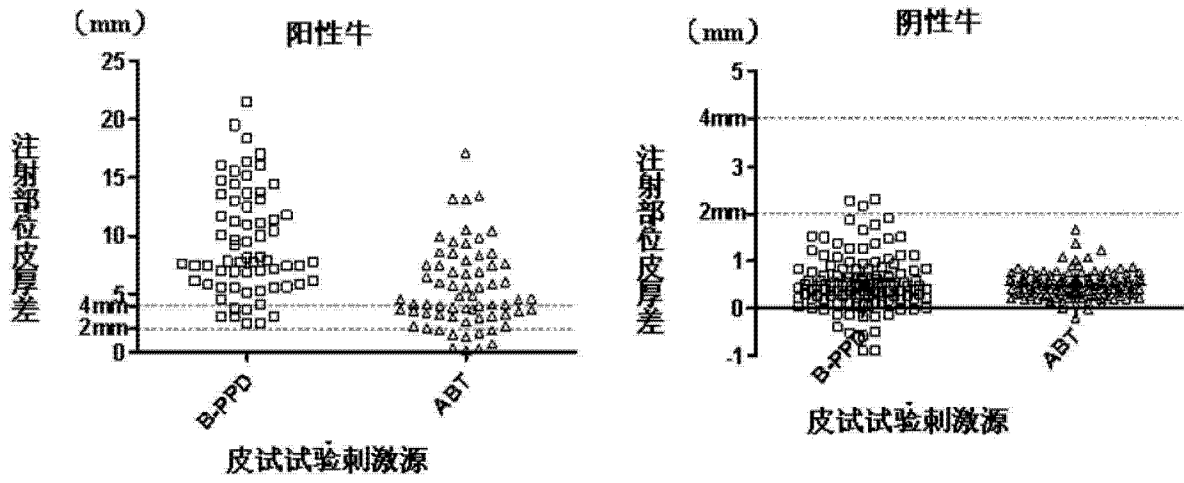


图 12

