



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108276470 A

(43)申请公布日 2018.07.13

(21)申请号 201710014519.9

(22)申请日 2017.01.06

(71)申请人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518052 广东省深圳市坪山新区金沙社区金辉路16号

(72)发明人 饶微 刘振华 何海华

(74)专利代理机构 深圳市盈方知识产权事务所  
(普通合伙) 44303

代理人 杨贤

(51)Int.Cl.

C07K 1/14(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

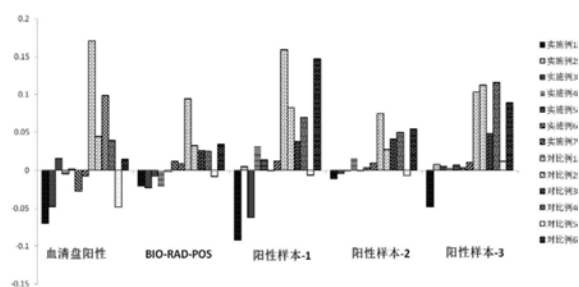
权利要求书1页 说明书12页 附图2页

### (54)发明名称

细胞裂解液、提取胞内蛋白的方法、制备弓形虫抗原的方法和试剂盒

### (57)摘要

本发明属于体外诊断试剂领域,涉及生物物质的提取、制备和检测,尤其涉及一种细胞裂解液,使用该细胞裂解液提取胞内蛋白,比如弓形虫膜抗原,的方法,以及使用所述弓形虫膜抗原的试剂盒。本发明的细胞裂解液包括氨基酸、变性剂、糖类和醇类。和现有技术相比,本发明采用新的裂解液配方,使得胞内蛋白充分释放,提高了回收率,从而提高临床诊断检测的灵敏度和特异性。同时,本发明的新裂解液促进蛋白的紧密折叠,稳定其构象,同时增强其热稳定性,保证检测试剂的稳定存储。



1. 一种细胞裂解液,其包括氨基酸、变性剂、糖类和醇类。
2. 如权利要求1所述的细胞裂解液,其特征在于,所述氨基酸的含量为基于细胞裂解液总体积的0.5-2wt%,和/或所述氨基酸选自以下一种或多种:甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸和苏氨酸。
3. 如权利要求1所述的细胞裂解液,其特征在于,所述变性剂的含量为基于细胞裂解液总体积的0.5-2wt%,和/或所述变性剂选自以下一种或多种:Tween-20、Tween-80、Triton X-100、NP-40、CHAPS、CHAPS0、Triton X-114、Brij-35、Brij-58和SDS。
4. 如权利要求1所述的细胞裂解液,其特征在于,所述糖类的含量为基于细胞裂解液总体积的0.5-2wt%,和/或所述糖类选自以下一种或多种:葡聚糖、甘露糖、蔗糖和麦芽糖。
5. 如权利要求1所述的细胞裂解液,其特征在于,所述醇类的含量为基于细胞裂解液总体积的3-6wt%,和/或所述醇类选自以下一种或多种:PEG400、PEG4000、PEG6000、PEG3350、甘露醇和山梨醇。
6. 如权利要求1所述的细胞裂解液,其特征在于,所述细胞裂解液的pH为6.5-7.4。
7. 如权利要求1所述的细胞裂解液,其特征在于,所述氨基酸选自以下一种或多种:甘氨酸和丙氨酸。
8. 一种提取胞内蛋白的方法,包括用权利要求1-7任一项所述的细胞裂解液处理细胞,获得胞内蛋白。
9. 一种制备弓形虫膜抗原的方法,包括用权利要求1-7任一项所述的细胞裂解液处理弓形虫虫体,任选进行机械分离处理,获得弓形虫膜抗原。
10. 一种弓形虫膜抗原,其通过权利要求9的方法制备。
11. 一种试剂盒,包括:
  - (1) 磁性微球溶液,所述磁性微球被弓形虫P30单抗包被,所述弓形虫P30单抗与通过权利要求9的方法制备的弓形虫膜抗原形成免疫复合物;
  - (2) 抗人IgM二抗标记的发光标记物;和任选的
  - (3) 低点校准品溶液和高点校准品溶液。
12. 如权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物,和/或所述发光标记物的浓度为0.1-1mg/L
13. 如权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述磁性微球的浓度为0.5-3mg/mL。
14. 如权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述弓形虫P30单抗的浓度为20-300μg/mL,和/或所述弓形虫膜抗原的浓度为0.5-1.5mg/mL。
15. 如权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述抗人IgM二抗的浓度为10-100μg/L,和/或所述抗人IgM二抗选自IgG和IgM。
16. 如权利要求15所述的试剂盒,其特征在于,所述抗人IgM二抗为鼠源或兔源的二抗。

## 细胞裂解液、提取胞内蛋白的方法、制备弓形虫抗原的方法和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断试剂领域,涉及生物物质的提取、制备和检测,尤其涉及一种细胞裂解液,使用该细胞裂解液提取胞内蛋白,比如弓形虫膜抗原,的方法,以及使用所述弓形虫膜抗原的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 细胞内蛋白的提取在体外诊断抗原制备领域具有广泛的应用,尤其一些关键抗原原料蛋白,存在于细胞内的含量少,且大部分是低丰度蛋白抗原,因此对细胞内蛋白进行提取显得尤为重要,提取到高浓度、具有免疫学功能的蛋白是体外诊断过程中的关键部分。

[0003] 胞内蛋白的提取过程大致包括配制特定配方的裂解液,对细胞进行裂解方式的选择,其涉及蛋白酶抑制剂的选择以抑制蛋白酶的活性。对于一些变性类蛋白,可先使其充分溶解,并进行折叠改装、解聚合处理等等,同时需除去细胞内的核酸、糖类、脂类以及提取过程涉及到的酚类等物质,并最终获得蛋白粗提物,以及在此基础上进一步进行蛋白提纯工艺。

[0004] 目前国内外关于应用到体外诊断的胞内蛋白的提取主要采用不同裂解液进行预处理,并采用超声破碎、反复冻融或者反复吹打混匀等机械方式进行进一步纯化,随后高速离心获得上清,即为所需的抗原。其中不同的裂解液主要有各种非离子变性剂及两性变性剂如CHAPS、Triton X-100等等,并将其置于一定的缓冲体系中,同时加入蛋白酶抑制剂进行蛋白抽提,所获得的蛋白混合物包含诊断所用原料的特异性成分。其中不同的裂解液组成是影响胞内蛋白提取的重要因素,目前常用的细胞裂解缓冲液有Life Technology的RIPA裂解缓冲液、IP裂解缓冲液、M-PER哺乳动物蛋白提取试剂等,其中RIPA缓冲液主要由Triton X-100、Deoxycholate、SDS等组成,包括100mM NaCl、10% Triton X-100、0.1% SDS和50mM Tris。

[0005] 特别针对弓形虫膜抗原的处理,现有技术采用不含非离子变性剂的裂解液处理腹腔细胞,获得单细胞弓形虫速殖子,进而采用含有非离子变性剂的裂解液对该速殖子细胞进行进一步裂解处理,离心所得上清即为弓形虫膜抗原。

[0006] 现有技术所用裂解液对于胞内蛋白的提取仍然存在瓶颈,所提取的目标蛋白量低,且许多蛋白不稳定,易降解,导致用于体外诊断项目的检测灵敏度和特异性低,且诊断试剂盒中所用抗原或者包被后的抗原热稳定性差,不利于长期保存。

### 发明内容

[0007] 为了解决现有技术中存在的部分或者全部技术问题,发明人进行了深入的研究。现意外发现包括氨基酸、变性剂、糖类和醇类的细胞裂解液可以获得更好的胞内蛋白提取效果。通过对细胞内总蛋白进行粗提取,本发明可以获得含有特异性目标蛋白的抗原混合物,并进一步以此作为免疫学体外诊断的抗原原料,实现更高的检测灵敏度、特异性和/或

稳定性。

[0008] 本发明一方面提供一种用于胞内抗原的提取并促进其稳定保存的裂解液,该裂解液至少包含以下成分:0.5-2wt%的氨基酸;0.5-2wt%的变性剂;0.5-2wt%的糖类和3-6wt%的醇类,所述组分含量均基于裂解液的总体积。在一个更为具体的实施方案中,裂解液还包含0.1M的PBS(磷酸盐缓冲液)和基于总体积10%的甘油。

[0009] 下面对各个主要组分作具体说明。

[0010] 1.氨基酸类物质

[0011] 发明人发现,一些氨基酸组分可以促进蛋白的稳定性保存,尤其是不带电荷的氨基酸,如甘氨酸和丙氨酸,因此对于蛋白构象和活性的稳定具有促进作用。适用于本发明的其它氨基酸还包括:脯氨酸、酪氨酸和苏氨酸等。

[0012] 2.变性剂(又称去污剂)

[0013] 在生物学或生物化学实验室使用的变性剂都是作用比较温和的表面活性剂,是用来破坏细胞膜(裂解细胞)以释放细胞内的物质。它们可以破坏蛋白质-蛋白质、蛋白质-脂质、脂质-脂质之间的连接,使蛋白质发生结构上的变性,防止蛋白质结晶。

[0014] 适用于本发明的变性剂包括Tween-20、Tween-80、Triton X-100、NP-40、CHAPS、CHAPS0、Triton X-114、**Brij®-35**、Brij-58、SDS等离子、非离子或两性变性剂,它们具有乳化、分散、增溶的作用,同时不破坏蛋白的结构。

[0015] 本发明优选Tween-20作为变性剂,因其具有复性抗原的作用,并且能提高抗体特异性的结合能力。

[0016] 3.糖类物质

[0017] 发明人发现在裂解液中添加糖类会促使蛋白采取一种更加紧密的折叠形式,从而减少聚集,更好地维持天然膜抗原的构象和活性。

[0018] 适合在本发明的裂解液中添加的糖类物质有:葡聚糖、甘露糖、蔗糖和麦芽糖等。

[0019] 4.醇类物质

[0020] 发明人发现,在添加醇类,比如PEG等,的裂解液中,膜蛋白会优先与水相互作用,此时PEG被排斥在蛋白质区域外,这种情况下,膜蛋白表面就比其内部具有更多的水分子和更少的PEG,因此在非冷冻状态下更有利于蛋白的长期稳定储存。

[0021] 适用于本发明的醇类包括PEG400、PEG4000、PEG6000、PEG3350、甘露醇和山梨醇等。

[0022] 本发明的裂解液可以应用于不同的细胞内蛋白(胞内蛋白)的提取,所述胞内蛋白包括但不限于:培养的天然哺乳动物细胞抗原和原代细胞内抗原、昆虫细胞内抗原、基因工程表达重组细胞内抗原及上面提到的细胞,即培养的天然哺乳动物细胞、原代细胞、昆虫细胞和基因工程表达重组细胞,的内膜蛋白等。

[0023] 本发明另一方面提供裂解液的制备方法,其包括以下步骤:

[0024] 步骤1):将裂解液所涉及的组分(比如PBS缓冲液、氨基酸类物质、变性剂、糖类物质、醇类物质和甘油等)按照所需比例进行混匀;

[0025] 步骤2):调节pH,例如6.5-7.4;

[0026] 步骤3):定容到固定体积即得裂解液。

[0027] 本发明另一方面提供一种提取胞内蛋白的方法,该方法包括采用本发明的细胞裂

解液处理细胞以获得胞内蛋白。

[0028] 在更为具体的本发明的另一方面,提供了一种制备弓形虫膜抗原的方法,包括用本发明的细胞裂解液处理弓形虫虫体,任选进行机械分离(比如离心、超声等)处理,以获得弓形虫膜抗原,所述细胞裂解液包括氨基酸、变性剂、糖类和醇类。

[0029] 具体来说,制备弓形虫膜抗原的方法可以包括以下步骤:

[0030] 步骤1:在小鼠腹腔中接种弓形虫,小鼠病发后抽取含弓形虫的腹腔液;

[0031] 步骤2:将所收集的腹腔液离心(转速:3000-10000rpm;时间:5-15min),收集弓形虫虫体沉淀,用缓冲液清洗,过滤获得的弓形虫虫体;

[0032] 步骤3:往弓形虫虫体中加入本发明提供的裂解液,进行超声处理,获取上层清液,即得到弓形虫膜蛋白;超声处理的参数可以是:超声频率:10%-20%;超声时间:超声2-4s,暂停2-3s,总时间2-6min。

[0033] 本发明的另一方面提供通过本发明的裂解液或者上述制备方法制备得到的弓形虫膜抗原。

[0034] 本发明的另一方面提供一种用于诊断弓形虫感染的免疫试剂或试剂盒,包括以下组分:

[0035] (1) 磁性微球溶液,所述磁性微球被弓形虫P30单抗包被,所述弓形虫P30单抗与弓形虫膜抗原形成免疫复合物,即形成磁球-P30单抗-抗原所形成的磁性微球溶液;有关弓形虫P30基因的更多信息可参见:郭凯,弓形虫主要抗原的研究进展,蚌埠医学院学报2012年4月底37卷第4期,pp486-489;

[0036] 优选地,磁性微球的浓度为:0.5-3mg/mE;

[0037] 优选地,P30单抗的浓度为:20-300μg/mL;

[0038] 优选地,弓形虫膜抗原的浓度为:0.5-1.5mg/mL;

[0039] 优选地,磁球溶液中含有30-100mM的TRIS缓冲液;

[0040] (2) 抗人IgM二抗标记的发光标记物,

[0041] 优选地,所述发光标记物选自鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物、吡啶酯、吡啶酯酸-NHS酯、吡啶酸丙磺酸钠盐、9-吡啶羧酸、光泽精;

[0042] 优选地,发光标记物的浓度为:0.1-1mg/L;

[0043] 优选地,所述抗人IgM二抗包括但不限于IgG和IgM,具体的可以是鼠源或兔源的二抗;

[0044] 优选地,所述单克隆抗体的浓度为:10-100μg/L;

[0045] (3) 任选的缓冲液,其优选包含浓度为0.1-0.5mg/mL的羊抗人IgA和/或0.1-0.5mg/mL的羊抗人IgG;

[0046] (4) 任选的低点校准品溶液,优选浓度为:1-5ng/mL;

[0047] (5) 任选的高点校准品溶液,优选浓度为:15-30ng/mL。

[0048] 试剂盒中的所述各组分均可含有BSA和防腐剂,BSA浓度为0.01%-0.5%,防腐剂可为山梨酸钾、苯甲酸钠、叠氮钠、亚硝酸钠、Proclin系列中的任一种或两种以上的混合物。

[0049] 在本发明的上下文中,若无特别说明,组分的百分比含量指的是质量/体积(w/v)比,如0.5%的BSA指的是100mL的溶液里面含有0.5g的BSA。

[0050] 本发明的另一方面提供本发明试剂或试剂盒的制备方法,该方法涉及采用本发明提供或者通过本发明方法制备的弓形虫膜抗原。

[0051] 本发明的另一方面包括将上述试剂或试剂盒应用于半自动或全自动免疫分析仪的方法,以及进一步用于检测弓形虫IgM抗体的方法和用途。

[0052] 不局限于理论,发明人认为,和现有技术相比,本发明采用新的裂解液配方,将氨基酸、变性剂、糖类物质和醇类物质结合起来,对天然胞内蛋白、重组表达细胞等进行处理,使得胞内蛋白充分释放,提高了回收率,获得含有更多有效抗原成分的混合物,从而提高临床诊断检测的灵敏度和特异性。同时,通过组合物中的氨基酸、糖类和醇类组分促进蛋白的紧密折叠,稳定其构象,同时增强其热稳定性,保证检测试剂的稳定存储。

## 附图说明

[0053] 图1显示抗原于37℃放置3天后的检测结果变化;

[0054] 图2显示抗原于37℃放置7天后的检测结果变化;

[0055] 图3显示抗原于37℃放置15天后的检测结果变化。

## 具体实施方式

[0056] 下面通过具体实施例结合附图对本发明作进一步描述。本发明的范围不局限于实施例。

[0057] 下述实施例通过弓形虫膜抗原的纯化进行裂解液效果的评价。在TORCH诊断项目中,弓形虫的检测所用抗原对免疫学诊断方法的特异性、敏感性和稳定性有重要影响。目前检测所用抗原来自弓形虫接种小鼠腹水细胞或者基因重组表达的弓形虫抗原,通过现有技术方案处理获得的抗原临床检测特异性和敏感度较低。对感染弓形虫的小鼠腹水内腹腔细胞进行抽提后,获得活力与抗原结构均未改变的速殖子,然后采用不同裂解液处理腹腔细胞速殖子,并结合超声破碎的方式获得弓形虫膜抗原。

[0058] 下述实施例所述弓形虫虫株为RH株,来源于本实验室保存(购自中山大学生命科学学院),虫株活力强,可直接接种于KM小鼠(昆明小鼠)进行繁殖。

[0059] 实施例1

[0060] 1) 取一支弓形虫冻存虫株(200μL),立即置于37℃于1min内完全解冻,

[0061] 2) 采用1mL注射器将上述解冻的弓形虫虫株注射于小鼠腹腔,

[0062] 3) 3-4天后小鼠发病(竖毛、呼吸困难、蜷缩闭目、腹部膨大),脱颈处死,

[0063] 4) 快速置于75%酒精进行全身表面消毒,

[0064] 5) 取出小鼠固定,剪开腹部皮肤,暴露腹膜,

[0065] 6) 用无菌注射器(5mL)抽取2~3mL 0.1M PBS (pH 7.2),注射入腹腔(不能损伤内脏),随即轻轻按摩腹部,使PBS和腹腔液混匀,

[0066] 7) 收集腹腔液,置于无菌试管中,重复取PBS进行腹腔注射,直至回抽的腹腔液变清亮,

[0067] 8) 显微镜下镜检弓形虫速殖子数量,

[0068] 9) 将所收集的腹腔液分装于1.5mL离心管,4℃,10000rpm离心5min,

[0069] 10) 将上述离心后的速殖子沉淀物用PBS重悬清洗一次,同样条件离心操作,取速

殖子沉淀物置于-80℃保存;

[0070] 11) 配制弓形虫虫体处理液,成分如下:

[0071] 0.1M PBS+0.5%甘氨酸+2%Tween-20+1%蔗糖+6%PEG400+10%甘油,

[0072] 可按以下具体步骤配制100mL处理液:

[0073] ①将称量后的各个组分置于100mL烧杯中,

[0074] ②加入80mL水溶解,

[0075] ③调节pH至约7.2,

[0076] ④定容至100mL,

[0077] 12) 从-80℃取出弓形虫虫体(即速殖子沉淀物),立即置于冰上,取上述处理液500 μL重悬虫体,加入10 μL 100mM PMSF,混匀,

[0078] PMSF即苯甲基磺酰氟,为一种蛋白酶抑制剂,抑制丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,凝血酶)和巯基蛋白酶(如木瓜蛋白酶),

[0079] 13) 置于冰中,进行超声处理,超声参数设置如下:

[0080] 3mm变幅杆;12%功率;超声总时间:2min;超声时间:2s;暂停时间:2s,

[0081] 14) 超声之后,置于4℃,过夜17h,

[0082] 15) 14000rpm,4℃离心30min,

[0083] 16) 取上清,测定浓度。

[0084] 实施例2-用Triton X-100替换实施例1中的Tween-20,其余和实施例1一致。

[0085] 实施例3-用麦芽糖替换实施例1中的蔗糖,其余和实施例1一致。

[0086] 实施例4-用山梨醇替换实施例1中的PEG400,其余和实施例1一致。

[0087] 实施例5-用丙氨酸替换实施例1中的甘氨酸,其余和实施例1一致。

[0088] 实施例6-将弓形虫虫体处理液的成分替换为0.1M PBS+1%甘氨酸+1%Tween-20+2%蔗糖+8%PEG400+10%甘油),其余和实施例1一致。

[0089] 实施例7-将弓形虫虫体处理液的成分替换为0.1M PBS+2%甘氨酸+2%Tween-20+1%蔗糖+7%PEG400+10%甘油),其余和实施例1一致。

[0090] 对比例1-将弓形虫虫体处理液的成分替换为0.1M PBS+10%甘油,其余和实施例1一致。

[0091] 对比例2-与上述实施例1步骤一致,步骤11)中所用处理液无甘氨酸,其余成分和浓度不变。

[0092] 对比例3-与上述实施例1步骤一致,步骤11)中所用处理液无PEG400,其余成分和浓度不变。

[0093] 对比例4-与上述实施例1步骤一致,步骤11)中所用处理液无蔗糖,其余成分和浓度不变。

[0094] 对比例5-与上述实施例1步骤一致,步骤11)中所用处理液无Tween-20,其余成分和浓度不变。

[0095] 对比例6-采用现有技术文献(杨惠珍、姜昌斌等,弓形虫虫膜蛋白抗原制备方法的探讨,1993:6(4))中记载的方法提取弓形虫膜抗原,步骤如下:

[0096] (1) 弓形虫RH株速殖子106接种小鼠腹腔,3天后取腹腔液用PBS-EDTA离心清洗一次,经含纤维素粉CF-11的玻璃珠过滤,沉淀物用双蒸水稀释10倍,冻融3次,超声粉碎

(20000Hz/min, 3min×3次, 置冰浴中)。再经10000r/min×30min, 4℃离心, 去上清,

[0097] (2) 将上述沉淀物用PBS稀释10倍, 按照20mmol/L加入CHAPS, 4℃振摇20-30min, 100000g离心60min, 上清即为提取的膜抗原蛋白。

[0098] 功能性测试

[0099] 将上述各实施例和对比例制备的弓形虫膜抗原按照以下描述的检测试剂盒进行检测, 利用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的全自动化学发光免疫分析仪 Maglumi 2000Plus进行评估, 以验证灵敏度、特异性和热稳定性。

[0100] 试剂盒主要包括以下组分:

[0101] (1) 弓形虫P30单抗包被磁性微球, 并与上述弓形虫膜抗原形成免疫复合物, 即磁球-P30单抗-弓形虫膜抗原所形成的磁性微球溶液,

[0102] P30单抗的工作浓度: 60μg/mL

[0103] 磁性微球工作浓度: 1.4mg/mL

[0104] 弓形虫膜抗原工作浓度: 1.3mg/mL,

[0105] 其中含50mM TRIS缓冲液和0.2%叠氮钠;

[0106] (2) 发光标记物, 即鼠抗人单克隆IgM抗体标记的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 (ABEI),

[0107] ABEI的工作浓度: 1.3mg/mL

[0108] 鼠抗人单克隆IgM抗体工作浓度: 60μg/mL,

[0109] 其中含0.3%牛血清蛋白和0.2%叠氮钠;

[0110] (3) 缓冲液, 含0.3mg/mL羊抗人IgA和0.3mg/mL羊抗人IgG,

[0111] 其中含0.3%牛血清蛋白和0.2%叠氮钠;

[0112] (4) 低点校准品, 3ng/mL, 含3ng/mL牛血清制品和0.2%叠氮钠;

[0113] (5) 高点校准品, 20ng/mL, 含25ng/mL牛血清制品和0.2%叠氮钠;

[0114] (6) 样本 (用含羊抗人IgA和羊抗人IgG的样本稀释液1:11预稀释)。

[0115] 将上述膜抗原、P30单抗包被的磁性微球形成的复合物与样本混匀、外加磁场沉淀, 去掉上清液, 用洗液清洗沉淀复合物3次, 再加入N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 (ABEI) 标记的鼠抗人IgM单克隆抗体, 形成待测抗体与磁性微球-P30单抗-弓形虫抗原和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 (ABEI) 标记的鼠抗人IgM单克隆抗体的免疫复合物, 外加磁场沉淀, 去掉上清液, 用洗液清洗沉淀复合物3次, 直接进入样本测量室, 仪器自动泵入化学发光激发物1-NaOH和2-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 自动监测3秒钟内即发出相对光强度 (RLU), 并得到检测结果。



[0116]

1. 灵敏度和特异性比较

选取已通过其他临床确诊分别为弓形虫IgM阳性和弓形虫IgM阴性的成人检验样本各100例，使用以上7个不同实施例和6个对比例得到的抗原进行化学发光检测，结果如下表1-2所示。

表 1. 不同实施例抗原的化学发光检测结果

检测方法	实施例 1		实施例 2		实施例 3		实施例 4		实施例 5		实施例 6		实施例 7	
临床诊断	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
阳性 100 例	2	98	5	95	3	97	6	94	5	95	3	97	7	93
阴性 100 例	99	1	97	3	97	3	98	2	94	6	95	5	94	6
数据分析	A: 98% B: 99%		A: 95% B: 97%		A: 97% B: 97%		A: 94% B: 98%		A: 95% B: 94%		A: 97% B: 95%		A: 93% B: 94%	

注：A：阳性检出率；B：阴性检出率

表 2. 不同对比例抗原的化学发光检测结果

检测方法	对比例 1		对比例 2		对比例 3		对比例 4		对比例 5		对比例 6	
临床诊断	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
阳性 100 例	90	10	32	68	35	65	29	71	52	48	25	75
阴性 100 例	99	1	85	15	78	22	84	16	81	19	90	10
数据分析	A: 10% B: 99%		A: 68% B: 85%		A: 65% B: 78%		A: 71% B: 84%		A: 48% B: 81%		A: 75% B: 90%	

注：A：阳性检出率；B：阴性检出率

[0117]

2. 热稳定性比较 (相同测试条件, 不同放置时间, 37°C)  
表 3. 37°C放置 0 天的热稳定性化学发光检测结果

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4	对比例 5	对比例 6
血清盘阳性	182635	160216	175428	174218	160231	152649	162319	17201	92035	70124	62101	12312	100121
血清盘阴性	3564	4028	4218	4528	4021	4218	3597	3128	4157	3624	3918	4126	4581
BIO-RAD-NEG	6234	5232	4152	4867	3687	3695	4029	3918	4625	5211	4625	3212	6120
BIO-RAD-POS	850238	740215	735684	724157	731248	730215	725489	18261	92154	82121	71004	21243	202015
阳性样本-1	202518	162102	152541	165247	162518	156987	160232	9016	71001	62221	41012	9625	120124
阳性样本-2	172304	151223	160124	162487	162318	152489	160318	11024	82353	62201	51225	8958	102113
阳性样本-3	192316	160201	152849	152367	170219	160318	175468	16261	80013	82004	71245	10010	112541
阴性样本-1	2100	4301	3249	4518	5961	4018	3968	3624	7012	7124	6921	5649	2541
阴性样本-2	3012	4011	4871	4578	4518	4291	4628	4126	6325	7421	5236	5414	4218
阴性样本-3	2134	2135	4057	5326	4015	4159	3849	4261	8121	5264	5314	4628	3251

[0118]

表 4. 37°C放置 3 天的热稳定性化学发光检测结果

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	对比例 1	对比例 例2	对比例 例3	对比例 例4	对比例 例5	对比例 6
血清盘阳性	195421	167857	172654	174986	165294	156845	163549	14256	88025	63215	59685	12908	98658
血清盘阴性	3415	5021	6021	5624	4621	5126	4562	3685	4262	4518	5621	4023	3256
BIO-RAD-NEG	6325	5214	5218	5016	4951	5023	4868	4518	4612	5001	4601	3012	6025
BIO-RAD-POS	867509	756876	741257	739586	732546	721569	718967	16548	89216	80012	69256	21410	195216
阳性样本-1	221245	152104	161254	160123	160215	156984	158259	7581	65147	59874	38156	9687	102487
阳性样本-2	174147	151796	160231	159876	162321	151896	158749	10203	80131	59684	48713	9021	96589
阳性样本-3	201481	169870	158968	152012	151789	168958	159696	173598	14582	78096	63012	9889	102546
阴性样本-1	2214	4215	4012	5012	4121	5023	4857	4125	7214	7012	6901	5512	3012
阴性样本-2	3215	3968	3569	4120	3269	4015	5961	4019	6325	7304	5128	5021	3025
阴性样本-3	2018	2215	4129	3621	3879	3621	4652	3029	8012	5124	5249	5124	4012

[0119]

表 5. 37°C放置 7 天的热稳定性化学发光检测结果

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	对 比 例1	对 比 例2	对 比 例3	对 比 例4	对 比 例5	对 比 例6
血清盘阳性	200145	168768	172634	162354	170215	162518	165974	8515	65847	48574	46258	12654	75148
血清盘阴性	3012	4982	5961	4821	5029	4519	5019	3218	4857	5126	5528	5160	4921
BIO-RAD-NEG	6315	5172	4581	5128	4879	4827	5218	3029	4520	4857	4415	3014	5978
BIO-RAD-POS	830210	750254	750218	721587	740231	715984	724587	7418	65124	52698	60124	20145	178595
阳性样本-1	230254	178956	154879	165239	170215	160231	152694	6235	51248	32156	25698	10214	78954
阳性样本-2	175941	150784	154267	162138	164521	162594	163248	6958	63254	41528	36548	9851	69587
阳性样本-3	201358	169793	165497	170218	159689	160231	152487	9518	62154	41258	51226	12014	96215
阴性样本-1	2318	4165	3689	4152	5013	4587	3654	3019	7145	6857	6787	5478	2984
阴性样本-2	3104	3912	4581	4519	5289	5126	5941	3514	6259	7158	4967	4987	2948
阴性样本-3	2104	2157	3679	5013	4128	4851	4218	4027	7858	4968	5017	5029	3927

[0120]

表 6. 37°C放置 15 天的热稳定性化学发光检测结果

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	对 比 例1	对比例 2	对 比 例3	对 比 例4	对 比 例5	对 比 例6
血清盘阳性	176534	149876	142518	142574	135628	142597	138697	3218	10248	7215	8021	9635	36287
血清盘阴性	2659	2157	4851	3528	3649	4019	4518	4018	2367	3025	3128	3629	2365
BIO-RAD-NEG	6218	4517	3218	3219	3961	3628	7018	3627	4012	2654	3024	2654	5128
BIO-RAD-POS	830147	701927	685964	678549	691247	689748	682516	4518	15875	8241	9024	9651	82647
阳性样本-1	231547	156743	132894	135942	142564	158794	142159	5247	8257	6587	6324	8527	32587
阳性样本-2	170247	147896	128967	130218	132549	159857	162015	4578	7145	7548	5218	7458	32189
阳性样本-3	185747	146273	135947	124789	132649	128967	122157	5217	9027	9621	6289	7159	42187
阴性样本-1	2289	3700	4018	3629	3211	3698	3987	4571	2578	3541	3012	2059	2038
阴性样本-2	2968	3658	4157	3684	3228	4517	4218	4920	3012	2058	2981	2159	2157
阴性样本-3	2117	2018	3219	4521	4627	3665	3867	4126	2147	3654	2015	3018	2518

[0121] 3. 结果分析：  
[0122] 灵敏度和特异性分析

[0123] (1) 从实施例结果可以看出,7个不同实施例的阳性检出率和阴性检出率都在90%以上,说明通过本发明提供的细胞裂解液或本发明提供的方法制备的弓形虫膜抗原对弓形虫的检测灵敏度和特异性有大幅度的提高,并且实施例1最高,分别为98%和99%,说明实施例1具有相对更好的灵敏度和特异性;

[0124] (2) 从以上各个实施例和对比例的结果可以看出,各实施例中,阳性检出率明显高于各对比例,说明通过本发明提供的细胞裂解液或本发明提供的方法制备的弓形虫膜抗原对弓形虫的检测灵敏度有大幅度的提高;

[0125] (3) 对比例中,阴性检出率相对较高,主要因为采用对比例中的方案,弓形虫抗原没有有效提取,且无法维持其正确构象,因此会导致阳性样本无法检出,而趋向于阴性。

#### [0126] 热稳定性分析

[0127] (1) 图1所示为表4同表3相比较,对其各阳性指标热稳定进行分析得到的结果,计算方式为:表3中各阳性指标与表4的差值除以表3的检测结果,即各阳性指标于37℃放置3天后,所测光强度下降的百分比。

[0128] 从图1中可以看出,各实施例和对比例所处理的抗原于37℃放置3天后,热稳定性下降不明显,但总体趋势为实施例热稳定性高于对比例,其中实施例1热稳定性效果最佳,对比例1热稳定性效果最差。

[0129] (2) 图2所示为表5同表3相比较,对其各阳性指标热稳定进行分析得到的结果,计算方式为:表3中各阳性指标与表5的差值除以表3的检测结果,即各阳性指标于37℃放置7天后,所测光强度下降的百分比。

[0130] 从图2中可以看出,抗原于37℃放置7天后,热稳定性开始下降,但各实施例下降程度低于对比例。

[0131] (3) 图3所示为表6同表3相比较,对其各阳性指标热稳定进行分析得到的结果,计算方式为:表3中各阳性指标与表6的差值除以表3的检测结果,即各阳性指标于37℃放置15天后,所测光强度下降的百分比。

[0132] 从图3中可以看出,抗原于37℃放置15天后,热稳定性开始下降明显,实施例下降程度最低,而对比例下降非常显著,尤其对比例1直接降低为阴性值,说明本发明方法获得的膜抗原热稳定性更好,可以在非冷冻状态中长期保存。

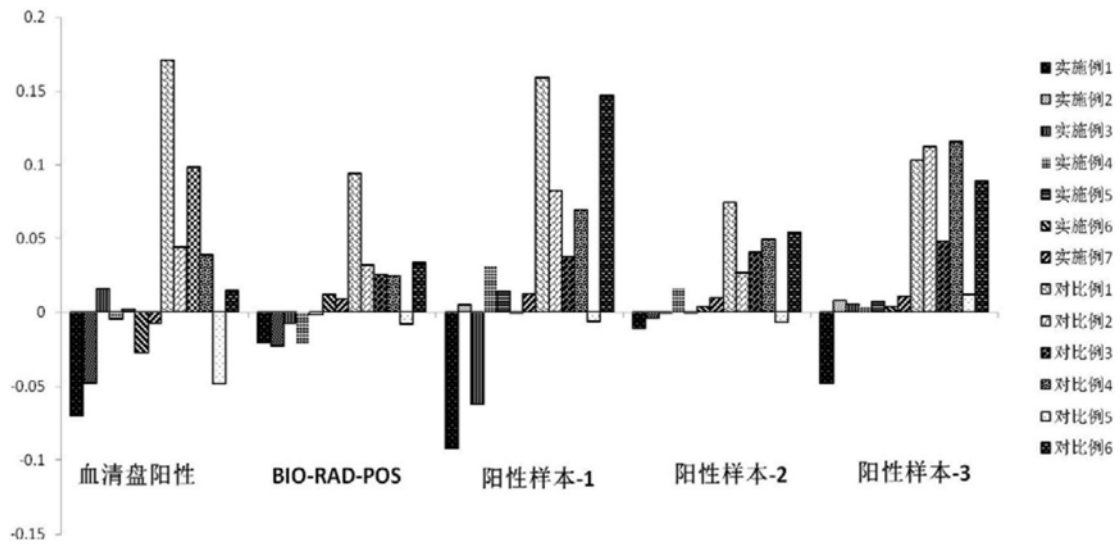


图1

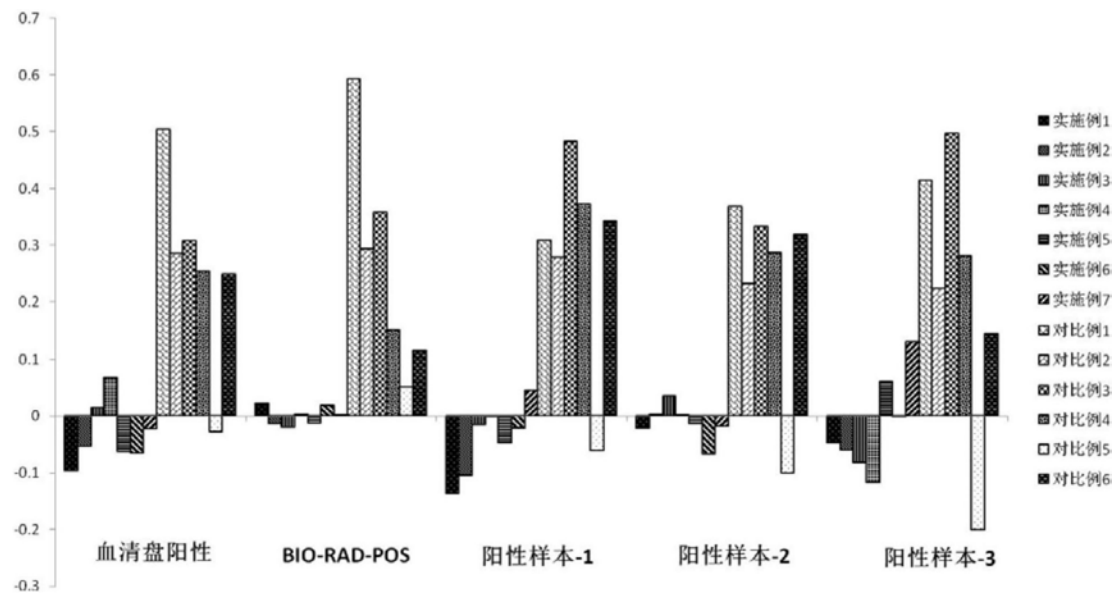


图2

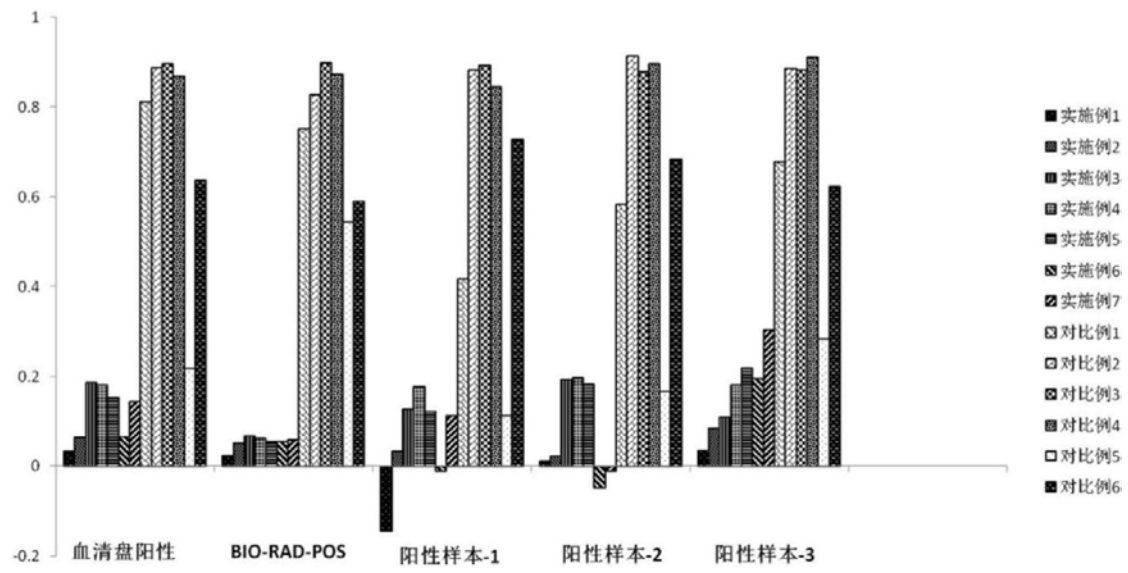


图3



