



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104155450 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201410410477. 7

权利要求 4-5.

(22) 申请日 2014. 08. 20

CN 201926664 U, 2011. 08. 10, 说明书第 0067 段.

(73) 专利权人 厦门大学附属中山医院

CN 1405565 A, 2003. 03. 26, 全文.

地址 361004 福建省厦门市思明区湖滨南路 201-209 号

审查员 胡玉连

(72) 发明人 张惠林 林丽蓉 童曼莉 刘莉莉 杨天赐 张长弓

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所 (普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1916633 A, 2007. 02. 21, 说明书第 10 页、

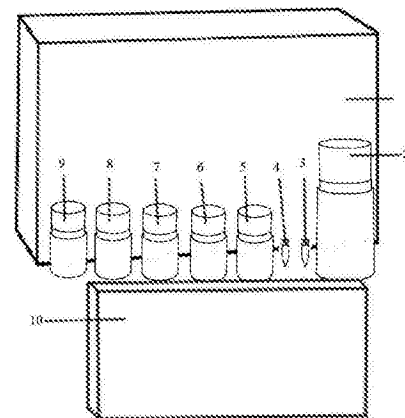
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法, 涉及梅毒的检测。试剂盒设有浓缩洗涤液瓶、阴阳性对照品瓶、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、反应终止液瓶、包被有重组抗原微孔板。以梅毒螺旋体有传染性标准株 Nichol 株和梅毒螺旋体无传染性的标准株 Reiter 株, 采用蛋白组学方法, 通过双向电泳分离梅毒螺旋体蛋白质组, 用不同病人或感染动物的血清鉴定出具有强免疫原性的蛋白质, 寻找抗原标志物。用于梅毒确认试验, 提高诊断灵敏度和特异性, 缩短窗口期。可灵敏检测出梅毒螺旋体抗体并定量鉴定, 价格便宜, 操作简单, 结果准确。



1. 梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒设有外包装盒、浓缩洗涤液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、反应终止液瓶、包被有重组抗原微孔板;

浓缩洗涤液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、反应终止液瓶和包被有重组抗原微孔板装在外包装盒内;

浓缩洗涤液瓶内装有浓缩洗涤液,阴性对照品瓶内装有阴性对照品,阳性对照品瓶内装有阳性对照品,生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶内装有生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记亲和素瓶内装有辣根过氧化物酶标记亲和素,TMB 显色液 A 瓶内装有 TMB 显色液 A,显色液 B 瓶内装有显色液 B,反应终止液瓶内装有反应终止液;

所述 TMB 显色液 A 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5' -Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液;

所述显色液 B 为 3% 的过氧化氢溶液;

所述制备方法,包括以下步骤:

1) 提取梅毒螺旋体 Nichol 株和 Reiter 株外膜蛋白进行双向电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,用梅毒血清进行免疫印迹实验,获得特征性的免疫印迹斑点,取对应的蛋白点进行质谱分析,分别找出 Nichol 株和 Reiter 株具有较高免疫原性的外膜蛋白,并找出 Nichol 株特有而 Reiter 株缺少的高免疫原性的外膜蛋白;

2) 在梅毒螺旋体的全基因组序列中找出对应基因,设计引物并构建相应的表达载体,研究不同诱导条件对重组目标蛋白在大肠杆菌中表达量的影响,获得最佳诱导条件,大量扩增目标蛋白,收集过表达的目标蛋白进行纯化,纯度高于 90% 后,进行后续研究;

3) 将步骤 2) 候选抗原,通过免疫大鼠获得其相应多克隆抗体,采用酶联免疫方法测定抗体滴度,并使用免疫印迹方法验证这些重组抗原的免疫原性;

4) 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得梅毒螺旋重组抗原;

5) 将步骤 (4) 中的梅毒螺旋重组抗原用包被缓冲液稀释至 20ug/mL,以每孔 0.1mL 加入微孔板中,4°C 包被 24h;取出抗原板,风干;用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0% 脱脂奶粉,每孔 0.2mL,4°C 封闭 24h,取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次,室温风干、消毒、密封备用,得重组抗原包被微孔板;

6) 以人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链为抗原免疫 Balb/c 小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

7) 将抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体与活化的生物素混合进行标记,透析去除未结合的生物素,制备生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体;

8) 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记,得辣根过氧化物酶标记亲和素;

9) TMB 显色液 A 采用市售品;

10) 显色液 B 采用市售品;

11) 配制溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液,其中 Tween-20 的终浓度为 0.05%,得浓缩洗涤液,使用时用蒸馏水进行 20 倍稀释;

12) 配制 2mmol/L 的硫酸作为反应终止液;

13) 由非梅毒感染的健康人群血清配制梅毒螺旋体 IgG 抗体阴性对照品,使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值小于 0.1;所述 OD450nm 为主波长,450nm 是测定的样本显色吸光值;

14) 由梅毒患者的阳性血清配制梅毒螺旋体 IgG 抗体阳性对照品,使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值大于 0.5;所述 OD450nm 为主波长,450nm 是测定的样本显色吸光值;

15) 将生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、TMB 显色液 A、显色液 B、浓缩洗涤液、反应终止液、阴性对照品、阳性对照品分别装在瓶中,再将生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、浓缩洗涤液瓶、反应终止液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶以及包被有重组抗原微孔板装入外包装盒中,得到梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒。

2. 如权利要求 1 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于在步骤 4) 中,所述重组抗原为梅毒螺旋体致病株 Nichol 株高表达,而梅毒非致病株 Reiter 株无表达。

3. 如权利要求 2 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述梅毒螺旋体致病株 Nichol 株为 *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain Nichol;所述梅毒非致病株 Reiter 株为 *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain Reiter。

## 梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及梅毒的检测,尤其是涉及梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 梅毒是梅毒螺旋体引起的性传播性疾病,近年来在国内的发病率居高不下,梅毒的防控已成为我国公共卫生服务的主要任务之一。

[0003] 梅毒的实验室诊断方法主要有如下几种([1]林丽蓉,杨波,潘锡涛,等.潜在的血源传播患者梅毒血清学检测方法的选择.中华医院感染学杂志.2010,20(10):1491-1494):

[0004] (1) 病原学检测:梅毒螺旋体感染早期,当梅毒抗体还未产生或含量较低时,暗视野显微镜查找螺旋体成为最早的实验室诊断方法,但易受取材技术、取材部位、样本中梅毒螺旋体含量、局部用药及送检时间等诸多因素影响,灵敏度较低。

[0005] (2) 抗体检测试验:梅毒螺旋体不能进行体外培养,诊断主要依赖于实验室检查,现有的血清学检测灵敏度、特异性不高,任何一种检测方法均存在缺陷,临床漏诊和误诊率较高。

[0006] 用于梅毒血清学检验的抗原主要以重组抗原 TPN15、TPN17、TPN37、TPN44.5、TPN47 为主([2]Lin, L. R., Z. G. Fu, et al. "Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to Treponema pallidum with TPN17 and TPN47." Diagnostic microbiology and infectious disease. 2010. 68(3):193-200.),这些抗原大多来源于梅毒螺旋体外膜,但不能区分是否为致病性螺旋体所致。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0008] 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒,设有:

[0009] 外包装盒、浓缩洗涤液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、反应终止液瓶、包被有重组抗原微孔板;

[0010] 浓缩洗涤液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、反应终止液瓶和包被有重组抗原微孔板装在外包装盒内;

[0011] 浓缩洗涤液瓶内装有浓缩洗涤液,阴性对照品瓶内装有阴性对照品,阳性对照品瓶内装有阳性对照品,生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶内装有生物素标

记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记亲和素瓶内装有辣根过氧化物酶标记亲和素, TMB 显色液 A 瓶内装有 TMB 显色液 A, 显色液 B 瓶内装有显色液 B, 反应终止液瓶内装有反应终止液;

[0012] 所述 TMB 显色液 A 为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液;

[0013] 所述显色液 B 为 3% 的过氧化氢溶液。

[0014] 所述浓缩洗涤液可采用溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 其中 Tween-20 的终浓度为 0.05%, 使用时用蒸馏水进行 20 倍稀释。

[0015] 所述阴性对照品为梅毒螺旋体总抗体阴性对照品, 由非梅毒感染的健康人群血清配制而成, 使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值小于 0.1; 所述 OD450nm 为主波长, 450nm 是测定的样本显色吸光值。

[0016] 所述阳性对照品为梅毒螺旋体总抗体阳性对照品, 由梅毒患者的阳性血清配制而成, 用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值大于 0.5; 所述 OD450nm 为主波长, 450nm 是测定的样本显色吸光值。

[0017] 所述 TMB 显色液 A 为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液, 商品名叫 TMB 显色液 A, 市售品可购自厦门波生生物科技有限公司。

[0018] 所述显色液 B 为 3% 的过氧化氢溶液, 商品名叫显色液 B, 市售品可购自厦门波生生物科技有限公司。

[0019] 所述反应终止液可采用摩尔浓度 2mmol/L 的硫酸。

[0020] 所述瓶可采用聚乙烯瓶。

[0021] 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0022] 1) 提取梅毒螺旋体 Nichol 株和 Reiter 株外膜蛋白进行双向电泳后, 转移至硝酸纤维素膜上, 用梅毒血清进行免疫印迹实验, 获得特征性的免疫印迹斑点, 取对应的蛋白点进行质谱分析, 分别找出 Nichol 株和 Reiter 株具有较高免疫原性的外膜蛋白, 并找出 Nichol 株特有而 Reiter 株缺少的高免疫原性的外膜蛋白;

[0023] 2) 在梅毒螺旋体的全基因组序列中找出对应基因, 设计引物并构建相应的表达载体。研究不同诱导条件对重组目标蛋白在大肠杆菌中表达量的影响, 获得最佳诱导条件, 大量扩增目标蛋白, 收集过表达的目标蛋白进行纯化, 纯度高于 90% 后, 进行后续研究;

[0024] 3) 将步骤 2) 候选抗原, 通过免疫大鼠获得其相应多克隆抗体, 采用酶联免疫方法测定抗体滴度, 并使用免疫印迹方法验证这些重组抗原的免疫原性;

[0025] 4) 采用基因克隆技术, PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA, 并插入大肠杆菌中使其表达, 得梅毒螺旋重组抗原;

[0026] 在步骤 4) 中, 所述重组抗原为梅毒螺旋体致病株 Nichol 株高表达, 而梅毒非致病株 Reiter 株无表达; 所述梅毒螺旋体致病株 Nichol 株为 *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain Nichol; 所述梅毒非致病株 Reiter 株为 *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain Reiter。

[0027] 5) 将步骤 (4) 中的梅毒螺旋重组抗原用包被缓冲液稀释至 20ug/mL, 以每孔 0.1mL

加入微孔板中,4℃包被 24h;取出抗原板,风干;用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0%脱脂奶粉,每孔 0.2mL,4℃封闭 24h,取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次,室温风干、消毒、密封备用,得重组抗原包被微孔板;

[0028] 6) 以人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链为抗原免疫 Ba1b/c 小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0029] 7) 将抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体与活化的生物素混合进行标记,透析去除未结合的生物素,制备生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体;

[0030] 8) 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记,得辣根过氧化物酶标记亲和素;

[0031] 9) TMB 显色液 A 采用市售品,可购自厦门波生生物科技有限公司;

[0032] 10) 显色液 B 采用市售品,可购自厦门波生生物科技有限公司;

[0033] 11) 配制溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液,其中 Tween-20 的终浓度为 0.05%,得浓缩洗涤液,使用时可用蒸馏水进行 20 倍稀释;

[0034] 12) 配制 2mmol/L 的硫酸作为反应终止液;

[0035] 13) 由非梅毒感染的健康人群血清配制梅毒螺旋体 IgG 抗体阴性对照品,使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值小于 0.1;所述 OD450nm 为主波长,450nm 是测定的样本显色吸光值;

[0036] 14) 由梅毒患者的阳性血清配制梅毒螺旋体 IgG 抗体阳性对照品,使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值大于 0.5;所述 OD450nm 为主波长,450nm 是测定的样本显色吸光值;

[0037] 15) 将生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、TMB 显色液 A、显色液 B、浓缩洗涤液、反应终止液、阴性对照品、阳性对照品分别装在瓶中,再将生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、浓缩洗涤液瓶、反应终止液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶以及包被有重组抗原微孔板装入外包装盒中,得到梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒。

[0038] 本发明提供了一种梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒,可用于临床标本中梅毒特异性抗体的检测。能准确地检测出致病性梅毒螺旋体抗体,为梅毒检测提供一种高效、简便的技术手段。

[0039] 本发明以国际公认的梅毒螺旋体有传染性标准株 Nichol 株和梅毒螺旋体无传染性的标准株 Reiter 株,采用蛋白组学的方法,通过双向电泳分离梅毒螺旋体蛋白质组,再用不同病人(或感染动物)的血清鉴定出具有强免疫原性的蛋白质,寻找抗原标志物。作为梅毒螺旋体早期诊断的抗原标志物,建立一种灵敏、特异的梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素-亲和素酶联检测技术,用于梅毒确认试验,提高实验诊断的灵敏度和特异性,缩短窗口期,对梅毒防治具有重要意义。且本发明的产品不仅可以灵敏检测出梅毒螺旋体抗体,并且可以对其进行精确的定量鉴定,价格便宜,操作简单,结果准确,环保无污染,具有长远的好处。

## 附图说明

[0040] 图 1 为所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒实施例的结构组成示意图。

## 具体实施方式

[0041] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。

[0042] 参见图 1, 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒实施例, 设有:

[0043] 外包装盒 1、浓缩洗涤液瓶 2、阴性对照品瓶 3、阳性对照品瓶 4、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶 5、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶 6、TMB 显色液 A 瓶 7、显色液 B 瓶 8、反应终止液瓶 9、包被有重组抗原微孔板 10; 浓缩洗涤液瓶 2、阴性对照品瓶 3、阳性对照品瓶 4、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶 5、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶 6、TMB 显色液 A 瓶 7、显色液 B 瓶 8、反应终止液瓶 9 和包被有重组抗原微孔板 10 装在外包装盒 1 内。

[0044] 浓缩洗涤液瓶 2 内装有浓缩洗涤液, 阴性对照品瓶 3 内装有阴性对照品, 阳性对照品瓶 4 内装有阳性对照品, 生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶 5 内装有生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记亲和素瓶 6 内装有辣根过氧化物酶标记亲和素, TMB 显色液 A 瓶 7 内装有 TMB 显色液 A, 显色液 B 瓶 8 内装有显色液 B, 反应终止液瓶 9 内装有反应终止液。

[0045] 所述 TMB 显色液 A 为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液。

[0046] 所述显色液 B 为 3% 的过氧化氢溶液。

[0047] 所述浓缩洗涤液可采用溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 其中 Tween-20 的终浓度为 0.05%, 使用时用蒸馏水进行 20 倍稀释。

[0048] 所述阴性对照品为梅毒螺旋体总抗体阴性对照品, 由非梅毒感染的健康人群血清配制而成, 使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值小于 0.1; 所述 OD450nm 为主波长, 450nm 是测定的样本显色吸光值。

[0049] 所述阳性对照品为梅毒螺旋体总抗体阳性对照品, 由梅毒患者的阳性血清配制而成, 用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值大于 0.5; 所述 OD450nm 为主波长, 450nm 是测定的样本显色吸光值。

[0050] 所述 TMB 显色液 A 为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液, 商品名叫 TMB 显色液 A, 市售品可购自厦门波生生物科技有限公司。

[0051] 所述显色液 B 为 3% 的过氧化氢溶液, 商品名叫显色液 B, 市售品可购自厦门波生生物科技有限公司。

[0052] 所述反应终止液可采用摩尔浓度 2mmol/L 的硫酸。

[0053] 所述瓶可采用聚乙烯瓶。

[0054] 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0055] 1) 提取梅毒螺旋体 Nichol 株和 Reiter 株外膜蛋白进行双向电泳后, 转移至硝酸纤维素膜上, 用梅毒血清进行免疫印迹实验, 获得特征性的免疫印迹斑点, 取对应的蛋白点进行质谱分析, 分别找出 Nichol 株和 Reiter 株具有较高免疫原性的外膜蛋白, 并找出

Nichol 株特有而 Reiter 株缺少的高免疫原性的外膜蛋白；

[0056] 2) 在梅毒螺旋体的全基因组序列中找出对应基因,设计引物并构建相应的表达载体。研究不同诱导条件对重组目标蛋白在大肠杆菌中表达量的影响,获得最佳诱导条件,大量扩增目标蛋白,收集过表达的目标蛋白进行纯化,纯度高于 90%后,进行后续研究；

[0057] 3) 将步骤 2) 候选抗原,通过免疫大鼠获得其相应多克隆抗体,采用酶联免疫方法测定抗体滴度,并使用免疫印迹方法验证这些重组抗原的免疫原性；

[0058] 4) 采用基因克隆技术,PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA,并插入大肠杆菌中使其表达,得梅毒螺旋重组抗原；所述重组抗原为梅毒螺旋体致病株 Nichol 株高表达,而梅毒非致病株 Reiter 株无表达；所述梅毒螺旋体致病株 Nichol 株为 *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain Nichol；所述梅毒非致病株 Reiter 株为 *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain Reiter。

[0059] 5) 将步骤 (4) 中的梅毒螺旋重组抗原用包被缓冲液稀释至 20ug/mL,以每孔 0.1mL 加入微孔板中,4℃包被 24h；取出抗原板,风干；用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0%脱脂奶粉,每孔 0.2mL,4℃封闭 24h,取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次,室温风干、消毒、密封备用,得重组抗原包被微孔板；

[0060] 6) 以人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链为抗原免疫 Balb/c 小鼠,通过杂交瘤技术,筛选获得稳定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株；

[0061] 7) 将抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体与活化的生物素混合进行标记,透析去除未结合的生物素,制备生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体；

[0062] 8) 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记,得辣根过氧化物酶标记亲和素；

[0063] 9) TMB 显色液 A 采用市售品,可购自厦门波生生物科技有限公司；

[0064] 10) 显色液 B 采用市售品,可购自厦门波生生物科技有限公司；

[0065] 11) 配制溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液,其中 Tween-20 的终浓度为 0.05%,得浓缩洗涤液,使用时可用蒸馏水进行 20 倍稀释；

[0066] 12) 配制 2mmol/L 的硫酸作为反应终止液；

[0067] 13) 由非梅毒感染的健康人群血清配制梅毒螺旋体 IgG 抗体阴性对照品,使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值小于 0.1；所述 OD450nm 为主波长,450nm 是测定的样本显色吸光值；

[0068] 14) 由梅毒患者的阳性血清配制梅毒螺旋体 IgG 抗体阳性对照品,使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值大于 0.5；所述 OD450nm 为主波长,450nm 是测定的样本显色吸光值；

[0069] 15) 将生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、TMB 显色液 A、显色液 B、浓缩洗涤液、反应终止液、阴性对照品、阳性对照品分别装在瓶中,再将生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB 显色液 A 瓶、显色液 B 瓶、浓缩洗涤液瓶、反应终止液瓶、阴性对照品瓶、阳性对照品瓶以及包被有重组抗原微孔板装入外包装盒中,得到梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒。

[0070] 以下给出具体实施例。

[0071] 实施例一

[0072] 参见图 1, 本发明所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒设有外包装盒 1、浓缩洗涤液 2、阴性对照品 3、阳性对照品 4、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体 5、辣根过氧化物酶标记亲和素 6、TMB 显色液 A 7、显色液 B 8、反应终止液 9、包被有重组抗原微孔板 10。

[0073] 所述梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0074] (1) 外膜蛋白的免疫蛋白质组学研究:

[0075] 提取梅毒螺旋体 Nichol 株和 Reiter 株外膜蛋白进行双向电泳后, 转移至硝酸纤维素膜上, 用梅毒血清进行免疫印迹实验, 获得特征性的免疫印迹斑点, 取对应的蛋白点进行质谱分析。分别找出 Nichol 株和 Reiter 株具有较高免疫原性的外膜蛋白, 并找出 Nichol 株特有而 Reiter 株缺少的高免疫原性的外膜蛋白。

[0076] (2) 候选蛋白的克隆纯化

[0077] 在梅毒螺旋体的全基因组序列中找出对应基因, 设计引物并构建相应的表达载体。研究不同诱导条件对重组目标蛋白在大肠杆菌中表达量的影响, 获得最佳诱导条件, 大量扩增目标蛋白。收集过表达的目标蛋白进行纯化。纯度高于 90% 后, 进行后续研究。

[0078] (3) 对候选蛋白的免疫原性进行检测

[0079] 将步骤 (2) 候选抗原, 通过免疫大鼠获得其相应多克隆抗体。采用酶联免疫方法测定抗体滴度, 并使用免疫印迹方法验证这些重组抗原的免疫原性。

[0080] (4) 制备重组抗原:

[0081] 采用基因克隆技术, PCR 扩增编码梅毒螺旋体抗原的 DNA, 并插入大肠杆菌中使其表达, 得梅毒螺旋重组抗原;

[0082] (5) 重组抗原包被微孔板

[0083] 将步骤 (4) 中的梅毒螺旋重组抗原用包被缓冲液稀释至 20ug/mL, 以每孔 0.1mL 加入微孔板中, 4°C 包被 24h; 取出抗原板, 风干; 用 0.01mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液配制的 1.0% 脱脂奶粉, 每孔 0.2mL, 4°C 封闭 24h, 取出用磷酸盐缓冲液洗涤 5 次, 室温风干、消毒、密封备用。

[0084] (6) 制备抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体

[0085] 以人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 通过杂交瘤技术, 筛选获得稳定分泌抗人 IgG 单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0086] (7) 抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体生物素标记

[0087] 将抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体与活化的生物素混合进行标记, 透析去除未结合的生物素, 制备生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体;

[0088] (8) 亲和素辣根过氧化物酶标记

[0089] 采用过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记;

[0090] (9) TMB 显色液 A 为市售品, 购自厦门波生生物科技有限公司;

[0091] (10) 显色液 B 为市售品, 购自厦门波生生物科技有限公司;

[0092] (11) 浓缩洗涤液

[0093] 浓缩洗涤液为溶有 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 其中 Tween-20 的终浓度为 0.05%, 使用时用蒸馏水进行 20 倍稀释。

[0094] (12) 反应终止液

[0095] 配制 2mmol/L 的硫酸作为反应终止液；

[0096] (13) 对照品

[0097] 梅毒螺旋体 IgG 抗体阴性对照品：由非梅毒感染的健康人群血清配制而成，使用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值小于 0.1；

[0098] 梅毒螺旋体 IgG 抗体阳性对照品：梅毒患者的阳性血清配制而成，用本试剂盒进行检测其 OD450nm 吸光值大于 0.5；

[0099] 所述 OD450nm 为主波长，450nm 是测定的样本显色吸光值；

[0100] (14) 制备梅毒螺旋体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒

[0101] 包被有重组抗原微孔板、生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、TMB 显色液 A、显色液 B、浓缩洗涤液、反应终止液、阴性对照品、阳性对照品和外包装盒共同组成的梅毒螺旋体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒。

[0102] 步骤 (14) 所述生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、TMB 显色液 A、显色液 B、浓缩洗涤液、反应终止液、阴性对照品和阳性对照品均装在相应的聚乙烯瓶中。

[0103] 实施例二

[0104] 以下给出采用梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒检测患者的临床标本中的梅毒螺旋体抗体：

[0105] (1) 标本处理：血清：静脉血 5mL，置 37℃ 水浴 30min，3000g 离心 10min，上清为检测样品备用。

[0106] (2) 加样：加 100 $\mu$ L 的标本和 50 $\mu$ L 生物素标记抗人 IgG 特异性片段  $\gamma$  链单克隆抗体于反应孔中，同时作空白、阴性和阳性对照孔。37℃ 孵育 1h。

[0107] (3) 洗涤：用洗涤缓冲液洗五次后扣干。

[0108] (4) 加酶：在每孔中加辣根过氧化物酶标记亲和素各 100  $\mu$ L，置 37℃ 孵育 30min。

[0109] (5) 洗涤：用洗涤缓冲液洗五次后扣干。

[0110] (6) 显色：于每反应孔中依次加入 TMB 显色液 A 和显色液 B 各 50  $\mu$ L，置 37℃ 孵育 15min。

[0111] (7) 测定：每孔中加入反应终止液 50  $\mu$ L，然后在 450nm 处读取各孔的吸光度值。

[0112] (8) 结果判断：反应孔 OD 值 / 阴性对照孔 OD 值 < 2.1，则该标本应视为阴性，如果反应孔 OD 值 / 阴性对照孔 OD 值均  $\geq$  2.1，可判断为阳性，确诊为梅毒。

[0113] 实施例三

[0114] 以下给出梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的性能检定

[0115] (1) 阳性标本符合率

[0116] 用梅毒特异性抗体阳性参比血清 50 份检定，计算阳性符合率。

[0117] (2) 阴性标本符合率

[0118] 用梅毒特异性抗体阴性参比血清 50 份检定，计算阴性符合率。

[0119] (3) 批内差异

[0120] 同一批次试剂盒，用特征性血清检测，要求 CV  $\leq$  10%。

[0121] (4) 批间差异

- [0122] 不同批次试剂盒,用特征性血清检测,要求  $CV \leq 12\%$ 。
- [0123] (5) 干扰试验
- [0124] 用溶血、脂血和黄疸标本各 50 例进行的干扰实验检测。
- [0125] (6) 交叉反应
- [0126] 采用本试剂盒,进行系统性红斑狼疮 ( $n = 50$ )、类风湿病 ( $n = 50$ )、免疫性肝炎 ( $n = 50$ ) 等自身免疫系统疾病的检测,观察交叉反应。
- [0127] (7) 稳定性检测
- [0128] 应用 Arrhenius 法则,将试剂盒放置  $37^{\circ}\text{C}$  20 天后检测,以上各项指标无显著变化,确保成品在室温干燥条件下保存,有效期为 18 个月。
- [0129] 以下给出梅毒螺旋体 IgG 抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒的交叉反应测定:
- [0130] 采用本发明的试剂盒检测梅毒螺旋体 Nichol 株的兔感染实验血清标本,结果为强阳性,而 Reiter 株的兔感染实验血清标本结果为阴性。

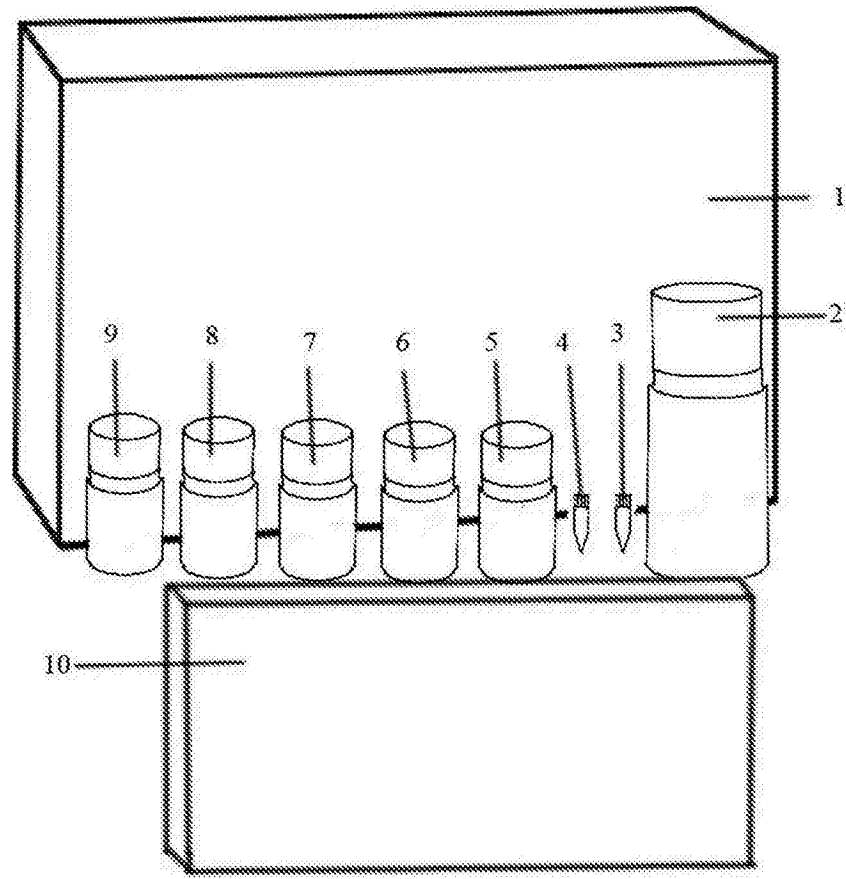


图 1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 梅毒螺旋体IgG抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN104155450B</a>                   | 公开(公告)日 | 2016-02-17 |
| 申请号            | CN201410410477.7                               | 申请日     | 2014-08-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 厦门大学附属中山医院                                     |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 厦门大学附属中山医院                                     |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 厦门大学附属中山医院                                     |         |            |
| [标]发明人         | 张惠林<br>林丽蓉<br>董曼莉<br>刘莉莉<br>杨天赐<br>张长弓         |         |            |
| 发明人            | 张惠林<br>林丽蓉<br>董曼莉<br>刘莉莉<br>杨天赐<br>张长弓         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/531                          |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/531 G01N33/571 G01N33/6842              |         |            |
| 其他公开文献         | CN104155450A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

梅毒螺旋体IgG抗体生物素亲和素酶联免疫检测试剂盒及其制备方法，涉及梅毒的检测。试剂盒设有浓缩洗涤液瓶、阴阳性对照品瓶、生物素标记抗人IgG特异性片段γ链单克隆抗体瓶、辣根过氧化物酶标记亲和素瓶、TMB显色液A瓶、显色液B瓶、反应终止液瓶、包被有重组抗原微孔板。以梅毒螺旋体有传染性标准株Nichol株和梅毒螺旋体无传染性的标准株Reiter株，采用蛋白组学方法，通过双向电泳分离梅毒螺旋体蛋白质组，用不同病人或感染动物的血清鉴定出具有强免疫原性的蛋白质，寻找抗原标志物。用于梅毒确认试验，提高诊断灵敏度和特异性，缩短窗口期。可灵敏检测出梅毒螺旋体抗体并定量鉴定，价格便宜，操作简单，结果准确。

