

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810141800.X

[43] 公开日 2009年4月29日

[11] 公开号 CN 101419237A

[22] 申请日 2008.9.3

[21] 申请号 200810141800.X

[71] 申请人 深圳市东湖医院

地址 518020 广东省深圳市罗湖区布心路
2019号

[72] 发明人 陈心春 周伯平 杨倩婷 张明霞

[74] 专利代理机构 深圳市中知专利商标代理有限公司

代理人 吕晓蕾

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

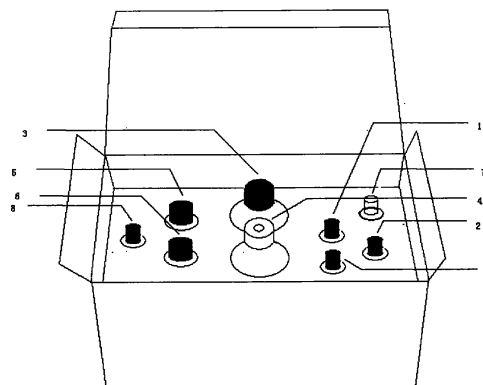
[54] 发明名称

结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒及特异性抗原制取方法

[57] 摘要

一种结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒及特异性抗原制取方法，其试剂盒包括试剂盒体、以及设置在盒体中的检验试剂，所述的检验试剂包括阳性标准液、显色剂、浓缩洗涤剂 and 稀释液，它还包括结核分枝杆菌特异性抗原、包被的抗 INF - γ 抗体和载体蛋白偶联物的酶标二抗；所述结核分枝杆菌特异性抗原为结核分枝杆菌 ESAT - 6 和 EIS 基因表达的融合蛋白；所述的抗 INF - γ 抗体为鼠源性 IgG 抗体。特异性抗原制取方法是筛选合适的结核菌特异性抗原 ESAT - 6 与 EIS 组合，制成的重组融合蛋白含有二者主要的抗原决定簇。本发明重组融合蛋白明确含有适合不同 HLA 限制的 T 细胞表位，不会因为不同人群由于 HLA 分布不同而影响结

测试，本发明已显示出比当前同类产品更优异的特异性和灵敏性。



- 1、 一种结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒，它包括试剂盒体、以及设置在盒体中的检验试剂，所述的检验试剂包括阳性标准液、显色剂、浓缩洗涤剂 and 稀释液，其特征在于它还包括结核分枝杆菌特异性抗原、包被的抗 INF- γ 抗体和载体蛋白偶联物的酶标二抗；所述结核分枝杆菌特异性抗原为结核分枝杆菌 ESAT-6 和 EIS 基因表达的融合蛋白。
- 2、 如权利要求 1 中所述的结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒，其特征在于所述的抗 INF- γ 抗体为鼠源性 IgG 抗体。
- 3、 如权利要求 1 中所述的结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒，其特征在于所述的载体蛋白偶联物为碱性磷酸酶，通过戊二醛法交联在酶标二抗体上。
- 4、 如权利要求 1 中所述的结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒，其特征在于所述的包被的抗 IFN- γ 抗体与载体蛋白的偶联物的载体的物质为聚偏二氯乙烯。
- 5、 一种权利要求 1 中所述的结核分枝杆菌特异性抗原的制取方法，其特征在于它包括如下的步骤：
 - A: 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组序列为模板，通过 genebank 中报道的 ESAT6 和 EIS 基因序列分别设计 ESAT-6 和 EIS 基因的扩增引物 SEQ NO. 1/SEQ NO. 2 和 SEQ NO. 3/SEQ NO. 4 扩增 ESAT-6 和 EIS 基因；通过在 SEQ NO. 2 和 SEQ NO. 3 中加入互补的碱基作为 linker，等量 ESAT-6 和 EIS 基因二次扩增后获得融合蛋白基因 SEQ NO. 5；
 - B: 通过在扩增引物中加入对应载体的酶切位点，融合蛋白基因转入表达载体，然后将编码本发明的 ESAT-6 和 EIS 融合基因可操作地连于表达调控序列，可以形成蛋白表达载体，重组表达质粒转入宿主细胞并表达相应融合蛋白，蛋白序列为 SEQ NO. 6(497AA)；
 - C: 表达的融合蛋白，通过凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白免疫杂交 (western blotting) 进行反应原性分析；表达的融合蛋白采用标准的蛋白分离纯化技术纯化，用亲和层析法获得纯化重组结核菌融合蛋白，然后对纯化蛋白

进行纯度和内毒素含量分析，作为抗原应用的重组蛋白的纯度要达到 98% 以上，LPS 含量小于 0.02%；

D: 直接应用 eBioscience 公司的抗人 IFN- γ 鼠源性 IgG；将 IgG 作为包被原吸附于以 PVDF 板作为基质外层包裹的固相凹孔内，并用 0.1% 小牛血清蛋白的 PBS 封闭后完成预包被板的制作。

- 6、如权利要求 5 中所述的结核分枝杆菌特异性抗原的制取方法，其特征在于所述的分离纯化重组蛋白方法可用离子交换层析方法或疏水层析方法。
- 7、如权利要求 5 中所述的结核分枝杆菌特异性抗原的制取方法，其特征在于所述的宿主细胞为原核细胞或真核细胞，且与表达质粒相匹配。
- 8、如权利要求 7 中所述的结核分枝杆菌特异性抗原的制取方法，其特征在于所使用的宿主细胞是大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RP。

结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒及特异性抗原制取方法

技术领域:

本发明涉及一种结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒及特异性抗原制取方法,它属于医学免疫诊断学技术领域。

背景技术:

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染性疾病,是当前感染性疾病的头号杀手,全球有约1/3的人口感染结核菌,每年有约800万新发结核病例,死亡170万。造成上述严重流行情况的原因是多方面的,其中,缺乏早期、特异、敏感的诊断技术和试剂是一个重要原因。目前结核病和结核菌感染的诊断主要有以下技术:1)微生物学检查,包括细菌涂片显微镜检查、结核菌培养、核酸检测;2)免疫学检查,包括抗体检测、PPD皮试、特异性IFN- γ 检测。除特异性IFN- γ 检测外,其他检测技术的敏感性和/或特异性均不理想。针对特异性IFN- γ 检测,目前市场上已有主要应用抗原为30KD, 14KD, 19KD蛋白等的结核菌感染血清诊断试剂盒,并且通过进一步联合应用ESAT-6蛋白提高了对结核菌检测的敏感性和特异性以满足临床的需要。但由于这些试剂盒采用特异性多肽抗原容易受到不同人群白细胞抗原(HLA)分布的差别而影响结果,同时,不同地区结核菌及其他分枝杆菌感染情况也影响检测的结果。因此,上述试剂盒在像中国这样的发展中国家人群中检测效果并不理想。同时,这些试剂盒(澳大利亚的Cellestis公司生产的Quantiferon-TB-Gold试剂盒和英国Oxford Immun公司生产的T.Spot-TB试剂盒)价格昂贵,不适合中国市场使用。近年来,几种包括EIS(enhance intracellular survival)蛋白在内的新发现的结核菌抗原极有可能明显改变这方面的缺失。作为一种可溶性分泌型蛋白,EIS在早期的研究中被确认为结核分枝杆菌的特异性抗原。本发明者在2006年对EIS蛋白作过充分的研究并证实了EIS作为结核菌抗原的特异性。但EIS能提高结核菌在巨噬细胞中的生存能力并促进结核菌往其他正常淋巴细胞扩散被认为是主要的致病因子并导致Th1/Th2免疫调节紊乱,因此EIS并未被应用于结核菌感染检测。

另一方面，目前结核病治疗缺乏客观、量化的疗效判定指标。目前结控部门推行的短期化疗标准疗程，没有充分考虑治疗个体化因素。结核病治疗疗程确定的主要依据：1) 痰细菌学检查结果，一般的病人在抗痨治疗 2 个月内即转为阴性，此后的治疗不可能再有细菌学检查结果作为检测的依据；2) 放射学检查，以病变的阴影变化为依据来指导治疗，但绝大部分病人在经过急性期后，阴影的改变不明显，而且也很难定量分析，更难以客观。因此，这些指标均不能客观和量化的评价结核病抗痨治疗的效果。而结核病的治疗除考虑合理的医疗费用外，还有两个特殊性：1) 抗痨治疗的副作用大，过渡治疗增加毒副作用发生的几率，2) 患者体内残留的结核菌是结核病人再发的重要原因，疗程不足是复发的主要原因。因此，需要一种能够全程、客观、量化的判断标准来评价结核病的的治疗效果。

发明内容：

本发明的目的是提供一种具有克服现有结核菌感染酶联免疫斑点检测试剂特异性和敏感性不足的结核菌感染酶联免疫斑点诊断试剂盒以及特异性抗原制取方法。

本发明的目的是这样实现的：

一种结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒，它包括试剂盒体、以及设置在盒体中的检验试剂，所述的检验试剂包括阳性标准液、显色剂、浓缩洗涤剂 and 稀释液，它还包括结核分枝杆菌特异性抗原、包被的抗 INF- γ 抗体和载体蛋白偶联物的酶标二抗；所述结核分枝杆菌特异性抗原为结核分枝杆菌 ESAT-6 和 EIS 基因表达的融合蛋白。

所述的抗 INF- γ 抗体为鼠源性 IgG 抗体。

所述的载体蛋白偶联物为碱性磷酸酶，通过戊二醛法交联在酶标二抗体上。

所述的包被的抗 INF- γ 抗体与载体蛋白的偶联物的载体的物质为聚偏二氯乙烯。

一种权利要求 1 中所述的结核分枝杆菌特异性抗原的制取方法，它包括如下的步骤：

A: 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组序列为模板，通过 genebank 中报道的 ESAT6

(GenBank 基因文库号 AF420491) 和 EIS (GenBank 基因文库号 AF144099) 基因序列分别设计 ESAT-6 和 EIS 基因的扩增引物 SEQ NO.1/SEQ NO.2 和 SEQ NO.3/SEQ NO.4 扩增 ESAT-6 和 EIS 基因; 通过在 SEQ NO.2 和 SEQ NO.3 中加入互补的碱基作为 linker, 等量 ESAT-6 和 EIS 基因二次扩增后获得融合蛋白基因 SEQ NO.5;

引物序列:

SEQ NO.1 5'-CCGGAATTCGATGACAGAGCAGCAGTGG-3';

SEQ NO.2 5'-GCT GCCGCCACCGCCGGATCC GCCACCGCCGCT TCCACC GCCACCGAAGCCTGCGAACATCCCAGTGACGT-3';

SEQ NO.3 5'-GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGATCCGGCGGTGGC GGCAGCATGTTCCCTACTGGCCGCGGCCAGTTTCA-3';

SEQ NO.4 5'-CCCAAGCTTTAACTCGAACGCGGTCTGGACGGGAA-3'

SEQ NO.5

5'-ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGC
GCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCCCTCCTTGACGAGGGGAAG
CAGTCCCTGACCAAGCTCGCAGCGGCTGGGGCGGTAGCGGTTCCGGAGGC
GTACCAGGGTGTCCAGCAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACA
ACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATG
GCTTCGACCGAAGGCAACGTCACTGGGATGTTTCGCAGGTGGCGGTGGAAG
CGGCGGTGGCGGATCCGGCGGTGGCGGCAGCATGTTCCCTACTGGCCGCGG
CCAGTTTCACCGATTTTCATCGGCCCTGAATCAGCGACCGCCTGGCGGACCC
TGGTGCCACCGACGGAGCGGTGGTGGTCCGCGATGGTGCCGGCCCGGGT
TCTGAGGTGGTTCGGGATGGCGCTGTACATGGATCTGCGGTTGACGGTGCCT
GGTGAAGTGGTGTCCCGACCGCCGGTCTCAGTTTCGTCGCGGTGGCGCC
GACGCATCGCCGGCGCGGCTTGCTGCGCGCGATGTGCGCCGAACTGCACC
GCCGCATAGCCGATCCGGCTATCCGGTTCGCGGCACTGCATGCTAGCGAGG
GCGGCATCTACGGCCGGTTCGGCTACGGGCCCGCTACCACCTTGATGAGC
TGACGGTTCGACCGACGCTTCGCGCGCTTTCACGCCGACGCACCGGGCGGC
GGCCTAGGTGGCAGCAGCGTCCGGTTGGTCAGACCCACCGAGCATCGCGG
CGAGTTTGAGGCGATCTACGAGCGATGGCGCCAGCAGGTGCCGGGCGGGC
TGCTACGCCCGCAGGTGCTCTGGGACGAGCTGCTGGCAGAATGCAAAGCC
GCGCCCGGTGGAGACCGTGAATCGTTCGCGTTACTGCATCCCGACGGGTAC
GCGCTGTACCGGGTGGATCGCACCGATCTCAAGCTAGCGCGCGTCAGCGA
ACTCAGGGCGGTAACCGCAGATGCGCATTGTGCGTTGTGGCGGGCCCTGAT
TGGCCTCGACTCCATGGAGCGAATCAGCATCATCACCCATCCACAGGACCC
GTTACCCACCTGCTCACCGATAACCGACTGGCCCGCACTACCTGGCGCCA

GGACGGCCTGTGGTTGCGCATCATGAACGTACCGGCCGCACTCGAGGCGC
GTGGTTACGCTCACGAAGTTGGCGAGTTTTCCACGGTCCTCGAGGTATCCG
ATGGCGGCCGGTTCGCGCTCAAGATCGGTGACGGCCGTGCGCGGTGTACC
CCGACCGATGCGGCAGCCGAGATCGAAATGGATCGGGACGTACTGGGCAG
CCTTTACCTTGAGCGCACCCGCGCTTCGACGTTAGCCGCCGCTAACCGGTT
GCGCACCAAAGATTCCCAGCTGCTTCGTCGACTCGACGCGGCGTTTGCCA
GTGATGTTCCCGTCCAGACCCGCGTTCGAGTTC-3'

B: 通过在扩增引物中加入对应载体的酶切位点, 融合蛋白基因转入表达载体, 然后将编码本发明的 ESAT-6 和 EIS 融合基因可操作地连于表达调控序列, 可以形成蛋白表达载体, 重组表达质粒转入宿主细胞并表达相应融合蛋白, 蛋白序列为 SEQ NO. 6 (497AA);

SEQ NO. 6

MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQ
GVQKWDATATELNALQNLARTISEAGQAMASTEAGNVVTGMFAGGGGSGG
GGSGGGGSMFLAAASFTDFIGPESATAWRTLVPDGDGAVVVRDAGPGSEVV
GMALYMDLRLTVPGEVVLPTAGLSFVAVAPTHRRRGLLRAMCAELHRRRIADS
GYPVAALHASEGGIYGRFGYGPATTLHELTVDRRFARFHADAPGGGLGGSSV
RLVRPTEHRGEFEAIYERWRQQVPGLLRPQVLWDELLAECKAAPGGDRESF
ALLHPDGYALYRVDRTDLKLARVSELRAVTADAHCALWRALIGLDSMERISIIT
HPQDPLPHLLTDTRLARTTWQDGLWLRIMNVPAALEARGYAHEVGEFSTVL
EVSDGGRFALKIGDGRARCTPTDAAAEIEMDRDVLGSLYLGAHRASTLAAAN
RLRTKDSQLLRRLDAAFASDVPVQTAFEF

C: 表达的融合蛋白, 通过凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白免疫杂交 (western blotting) 进行反应原性分析; 表达的融合蛋白采用标准的蛋白分离纯化技术纯化, 用亲和层析法获得纯化重组结核菌融合蛋白, 然后对纯化蛋白进行纯度和内毒素含量分析, 作为抗原应用的重组蛋白的纯度要达到 98%以上, LPS 含量小于 0.02%;

D: 直接应用 eBioscience 公司的抗人 IFN- γ 鼠源性 IgG; 将 IgG 作为包被原吸附于以 PVDF 板作为基质外层包裹的固相凹孔内, 并用 0.1%小牛血清蛋白的 PBS 封闭后完成预包被板的制作。

所述的分离纯化重组蛋白方法可用离子交换层析方法或疏水层析方法。

所述的宿主细胞为原核细胞或真核细胞, 且与表达质粒相匹配。

所使用的宿主细胞是大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RP。

本发明的结核分枝杆菌 IFN- γ 的酶联免疫斑点检测试剂盒通过提供特有的高特异性和敏感性的重组 ESAT-6 和 EIS 融合蛋白为刺激抗原, 建立检测结核菌

抗原特异性 IFN- γ 的 Elispot 试剂盒，用于结核菌感染的诊断及疗效判定。

本发明通过筛选合适的结核菌特异性抗原 ESAT-6 与 EIS 组合，制成的重组融合蛋白含有二者主要的抗原决定簇。同时本发明的重组融合蛋白明确含有适合不同 HLA 限制的 T 细胞表位，不会因为不同人群由于 HLA 分布不同而影响结果。通过对不同人群的结核病人和健康人的临床测试，本发明已显示出比当前同类产品更优异的特异性和灵敏性。

附图说明：

图 1 为本发明的 ESAT-6&EIS 融合蛋白表达示意图

图 2 为本发明临床实施的统计分析结果

图 3 为本发明与同类产品检验结果比较

图 4 是本发明的酶联免疫斑点试剂盒的结构示意图

具体实施方式：

下面结合附图 1、图 2、图 3、图 4，对本发明进行进一步的说明：

本发明所述的结核菌酶联免疫斑点检测试剂盒包括结核分枝杆菌特异性抗原、预包被的抗 IFN- γ 抗体和酶标二抗。

其中，所述结核分枝杆菌特异性抗原为结核分枝杆菌 ESAT-6 和 EIS 基因表达的融合蛋白；包被的抗 IFN- γ 抗体为 IgG 抗体，抗体可为多种动物源性，在本发明中抗体优选为鼠源性抗体；所述载体蛋白偶联物为辣根过氧化酶联亲和素，辣根过氧化物可通过戊二醛法交联在二抗体上，上述二抗可为抗鼠或抗兔 IFN- γ 抗体；固定抗 IFN- γ 抗体与载体蛋白的偶联物的载体的物质很多，如聚苯乙烯，纤维素，聚丙烯酰胺，聚乙烯，聚丙烯，聚偏二氯乙烯等，本实施例中使用的是聚偏二氯乙烯（PVDF）。该载体的形式可以为试管、微量反应板凹孔，小珠，小圆片等，本实施例选择使用的是微量反应板凹孔。

为了方便同时进行大量样本的检测，所述试剂盒还包括 PHA 标准液，显色剂，浓缩洗涤剂 and 稀释液。

具体实施方案如下：

以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组序列为模板，通过 genbank 中报道的 ESAT6（GenBank 基因文库号 AF420491）和 EIS（GenBank 基因文库号 AF144099）基因序列分别设计 ESAT-6 和 EIS 基因的扩增引物 SEQ NO.1/SEQ NO.2 和 SEQ

NO. 3/SEQ NO. 4 扩增 ESAT-6 和 EIS 基因；通过在 SEQ NO. 2 和 SEQ NO. 3 中加入互补的碱基作为 linker，等量 ESAT-6 和 EIS 基因二次扩增后获得融合蛋白基因 SEQ NO. 5 (1491bp)。具体采用 AXYGEN 核酸提取试剂盒提取结核分枝杆菌标准株 H37Rv 基因组 DNA，具体操作方法按常规说明书。用 PCR 方法扩增 ESAT-6 和 EIS 基因。扩增所用引物序列为 SEQ NO. 1/SEQNO. 2 和 SEQ NO. 3/SEQ NO. 4。以扩增出的 ESAT-6 和 EIS 基因片段各取等量 DNA 为模板用 SEQ NO. 1 和 SEQ NO. 4 扩增出 ESAT-6 和 EIS 融合基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后按 QIAquick GEL Extraction kit 回收目的基因片断，具体操作按常规说明书进行。

引物序列：

SEQ NO. 1 5'-CCGGAATTCGATGACAGAGCAGCAGTGG-3'；

SEQ NO. 2 5'-GCT GCCGCCACCGCCGGATCC GCCACCGCCGCT TCCACC GCCACCGAAGCCTGCGAACATCCCAGTGACGT-3'；

SEQ NO. 3 5'-GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGATCCGGCGGTGGC GGCAGCATGTTCTACTGGCCGCGGCCAGTTTCA-3'；

SEQ NO. 4 5'-CCCAAGCTTTAACTCGAACGCGGTCTGGACGGGAA-3'

SEQ NO. 5

5'-ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTTTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGC
GCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCATTCCCTCCTTGACGAGGGGAAG
CAGTCCCTGACCAAGCTCGCAGCGGCCTGGGGCGGTAGCGGTTCGGAGGC
GTACCAGGGTGTCCAGCAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACA
ACGCGCTGCAGAACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATG
GCTTCGACCGAAGGCAACGTCCTGTTGATGTTTCGACAGGTGGCGGTGGAAG
CGGCGGTGGCGGATCCGGCGGTGGCGGCAGCATGTTCTACTGGCCGCGG
CCAGTTTCACCGATTTTCATCGGCCCTGAATCAGCGACCGCCTGGCGGACCC
TGGTGCCACCGACGGAGCGGTGGTGGTCCGCGATGGTGCCGGCCCGGGT
TCTGAGGTGGTTCGGGATGGCGCTGTACATGGATCTGCGGTTGACGGTGCCT
GGTGAAGTGGTGCTCCCGACCGCCGGTCTCAGTTTCGTCGCGGTGGCGCC
GACGCATCGCCGGCGCGGCTTGTGCGCGGATGTGCGCCGAACTGCACC
GCCGCATAGCCGATTCCGGCTATCCGGTCGCGGCCTGTCATGCTAGCGAGG
GCGGCATCTACGGCCGGTTCGGCTACGGGCCCGCTACCACCTTGCATGAGC
TGACGGTCGACCGACGCTTCGCGCGCTTTCACGCCGACGCACCGGGCGGC
GGCCTAGGTGGCAGCAGCGTCCGGTTGGTTCAGACCCACCGAGCATCGCGG
CGAGTTTGAGGCGATCTACGAGCGATGGCGCCAGCAGGTGCCGGGCGGGC
TGCTACGCCCGCAGGTGCTCTGGGACGAGCTGCTGGCAGAATGCAAAGCC

GCGCCCGGTGGAGACCGTGAATCGTTCGCGTACTGCATCCCGACGGGTAC
 GCGCTGTACCGGGTGGATCGCACCGATCTCAAGCTAGCGCGCGTCAGCGA
 ACTCAGGGCGGTAACCGCAGATGCGCATTGTGCGTTGTGGCGGGCCCTGAT
 TGGCCTCGACTCCATGGAGCGAATCAGCATCATCACCCATCCACAGGACCC
 GTTACCCACCTGCTCACCGATACCCGACTGGCCCGCACTACCTGGCGCCA
 GGACGGCCTGTGGTTGCGCATCATGAACGTACCGGCCGCACTCGAGGCGC
 GTGGTTACGCTCACGAAGTTGGCGAGTTTTCCACGGTCCTCGAGGTATCCG
 ATGGCGGCCCGGTTTCGCGCTCAAGATCGGTGACGGCCGTGCGCGGTGTACC
 CCGACCGATGCGGCAGCCGAGATCGAAATGGATCGGGACGTACTGGGCAG
 CCTTTACCTTGGAGCGCACCCGCGCTTCGACGTTAGCCGCCGCTAACCGGTT
 GCGCACCAAAGATTCCCAGCTGCTTCGTCGACTCGACGCGGGCGTTTGCCA
 GTGATGTTCCCGTCCAGACCGCGTTCGAGTTC-3'

通过在扩增引物中加入对应载体的酶切位点，融合蛋白基因转入表达载体（可选用本领域已知的各种载体，如市售的载体，然后将编码本发明的 ESAT-6 和 EIS 融合基因可操作地连于表达调控序列，可以形成蛋白表达载体（在本发明的一个实施例中，所用的质粒为 pET21b+）。重组表达质粒转入宿主细胞并表达相应融合蛋白，蛋白序列为 SEQ NO. 6 (497AA)。所用宿主细胞可使用原核细胞或真核细胞等，需要与表达质粒相匹配。具体操作方式：经琼脂凝胶纯化的目的基因产物，取 5 μ l 连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109 菌株。挑取转化菌单菌落提取质粒，EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定后进行序列分析以证实插入片段序列方向是否正确。选取含有基因表达载体的菌株进行 DNA 分析，以获取带有正确读码框的表达载体。将含有正确读码框的重组载体转化到大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RP 中，在含 Amp (100 μ g/ml) 的琼脂中再次筛选重组菌株，用 QIAGEN Plasmid Kit 大量制备质粒 DNA，用灭菌生理盐水稀释成浓度为 1-2 μ g/ μ l，紫外分光光度计定量。

SEQ NO. 6

MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLDDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQ
 GVQQKWDATATELNALQNLARTISEAGQAMASTEKNVTGMFAGGGGSGG
 GSGGGGSMFLAAASFTDFIGPESATAWRTLVPDGA VVVRD GAGPGSEVV
 GMALYMDLRLTVPGEVVLPTAGLSFVAVAPTHRRRGLLRAMCAELHRRIADS
 GYPVAALHASEGGIYGRFGYGPATTLHELTVDRRFARFHADAPGGGLGGSSV
 RLVRPTEHRGEFEAIYERWRQQVPGLLRPQVLWDELLAECKAAPGGDRESF
 ALLHPDGYALYRVDRTDLKLARVSELRAVTADAHCALWRALIGLDSMERISIIT
 HPQDPLPHLLTDTRLARTTWRQDGLWLRIMNVPAALEARGYAHEVGEFSTVL
 EVSDGGRFALKIGDGRARCTPTDAAAEIEMDRDVLGSLYLGAHRASTLAAAN
 RLRTKDSQLLRLDAAFASDVPVQTAFEF

重组蛋白在原核与真核细胞中的表达,通过凝胶电泳(SDS-PAGE)及蛋白免疫杂交(western blotting)进行反应原性分析。具体操作方式:把得到的 ESAT-6 和 EIS 融合蛋白基因及 pET 载体 DNA 分别用 EcoR I 和 Hind III 双酶切再用 T4DNA 连接酶处理 16h (16°C) 克隆到原核表达载体 pET21b+质粒中在大肠杆菌中表达,在变性条件下用 Ni 亲合法纯化带有多聚组氨酸标签的重组蛋白。重组蛋白表达的免疫印迹(Western blotting)分析。SDS-PAGE 检测后,凝胶上的蛋白通过电转移装置转移到硝酸纤维素(NC)膜上,NC 膜放入封闭液中室温下封闭 2h,用 1xPBS 洗漂 3 次,每次 10min;再将 NC 膜放入杂交袋中,加入 1:25 或 1:50 稀释的结合杆菌单抗血清 5ml,封闭后室温下缓慢振荡过夜,同前洗膜三次,加入 1:2000 稀释的 HPR-标记二抗,37°C 温育 1h;同前洗膜 3 次,加入预先混合底物液,室温显色至适当将 NC 膜转移至蒸馏水终止反应。结果如图 1 所示,表明能表达上述融合基因编码的蛋白质。表达的融合蛋白采用标准的蛋白分离纯化技术纯化,获得纯化重组结核菌融合蛋白。分离纯化重组蛋白有多种方法,例如离子交换层析,疏水层析,亲和层析等,在本实施例中使用的是亲和层析法。然后对纯化蛋白进行纯度和内毒素含量分析,作为抗原应用的重组蛋白的纯度要达到 98%以上,LPS 含量小于 0.02%。

本实施例中直接应用 eBioscience 公司的抗人 IFN- γ 鼠源性 IgG。将 IgG 作为包被原吸附于以 PVDF 板作为基质外层包裹的固相凹孔内,并用 0.1%小牛血清蛋白的 PBS 封闭后完成预包被板的制作。检测前,先活化预包被板。然后加入分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6 和 EIS 融合蛋白刺激放入的人血淋巴细胞,待测细胞释放 IFN- γ ,再加入酶标二抗,使之结合;拍板后加入辣根素酶标亲和素,显色后终止,测定斑点总数并分析结果。

本发明试剂盒临床应用

一、样品来源

深圳宝安区某自然村 209 例健康人群的结合菌感染筛选。

二、检测步骤和结果

按照实施例 4 中操作分离采集血液的 PBMC,在活化预包被好的平板中,每孔加入 100 μ l,细胞浓度为 2×10^5 cells/孔。背景阴性对照孔中不入任何刺激物,阳性照每孔加入 1 μ L PHA 标准液,终浓度 5ug/mL。加入 ESAT-6 和 EIS 的

融合蛋白（用 Lympho-Spot™ 无血清培养基或者 RPMI1640 配制成终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{孔}$ ）到实验孔。当加完所有的样品之后，盖板上盖，放入 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养 16-36 h。第二天洗板后加入检测抗体孵育 1h，再加入酶联亲和素孵育 1 小时，最后加入显色剂显色。待显色洗板后，通过 ELISPOT 读板仪斑点计数，并记录斑点的各种参数，做统计分析。结果如图 2，其中平均每 2×10^5 细胞中 IFN- γ 阳性细胞数为 4.153 ± 12.91 (mean \pm SD)。按 mean \pm 1SD 为判断阳性反应的阈值，则真正健康人群中阳性率为 $12/209 = 5.747\%$ ，说明本发明的试剂盒具有很好的特异性。

本发明与国外相似 ELISPOT 产品比较

一、样品来源

共 200 例样本其中 100 例来自本发明人单位确诊肺结核病人，100 例健康对照组来自本发明人单位员工，某学校在校生及某物业管理公司员工。本发明试剂盒所用标本采集按实施例 6 所述，QuantiFERON-TB-GOLD 检测用试剂盒提供采血管采集 3ml。

二、检测方法及其结果

200 例样本均采用本发明的试剂盒及 QuantiFERON-TB-GOLD 进行平行检测。其中试剂盒检测按照上述操作规程操作，全血干扰素测定按 QuantiFERON-TB-GOLD 试剂盒说明书进行操作。结果如图 3 所示，本发明的试剂盒在检测肺结核患者敏感度（86.3%阳性率）明显高于 TB-GOLD（77.2%阳性率）。

本实施例中结核菌感染的酶联免疫斑点检测试剂盒的结构：

试剂盒的结构如图 4 所示，包括箱体，铝膜真空包装 96 孔/48 孔酶标板 10，泡沫托架，泡沫托架上制有凹孔，图中 1~9 标号试剂瓶，均为安放在泡沫托架的凹孔内，泡沫托架及酶标板安放在盒体内。其中酶标板由塑料制架和可分解的塑料条组成。所述的放置在试剂瓶 1~9 中的试剂组合的具体构成如表 1 所示。

表 1

标号	名称	标识	规格	存储条件、保质期
1	生物素标记抗体	蓝盖 0.5ml 管	50 μl	4 $^{\circ}\text{C}$ ，6 个月
2	辣根过氧化酶亲和素	红盖 0.5ml 管	50 μl	4 $^{\circ}\text{C}$ ，6 个月
3	复溶液 R (20X)	蓝盖 15ml 管	10 μl	4 $^{\circ}\text{C}$ ，6 个月
4	浓缩洗涤液 (50X)	无色 15ml 管	10 μl	4 $^{\circ}\text{C}$ ，6 个月

5	底物显色液 I (20X)	粉盖 1.5ml 管	500 μ l	4 $^{\circ}$ C, 6 个月
6	底物显色液 II (20X)	棕盖 1.5ml 管	500 μ l	4 $^{\circ}$ C, 6 个月
7	底物显色液 III (20X)	无色 0.5ml 管	50 μ l	4 $^{\circ}$ C, 6 个月
8	阳性标准液 (PHA)	绿盖 0.5 ml 管	50 μ l	4 $^{\circ}$ C, 6 个月
9	ESAT-6&EIS 融合蛋白	紫盖 0.5ml 管	5 μ g	4 $^{\circ}$ C, 6 个月

本发明通过建立以上检测 IFN- γ 细胞因子的 ELISPOT 方法并配备其他相关试剂, 制备成结核分枝杆菌抗原 ELISPOT 试剂盒。

试剂盒重复性试验:

从三批预包被的 PVDF 板中, 每板各抽出 40 个微孔, 测定同一浓度 PHA 标准液刺激同一样品外周淋巴细胞后产生的斑点数, 重复测定 3 次, 计算差异系数。结果表明差异系数范围在 10-15%。

试剂盒保存期试验:

试剂盒保存条件为 2-8 $^{\circ}$ C, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的膜表外观、斑点显色效果测试、阳性检测均与新制试剂盒相同。考虑在运输和使用过程中, 会有非常保存条件出现, 将试剂盒在 37 $^{\circ}$ C 保存的条件下放置 6 天, 进行加速老化试验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生, 将试剂盒放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 5 天, 测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常, 从以上结果可以得出试剂盒可以在 2-8 $^{\circ}$ C 至少保存 6 个月以上。

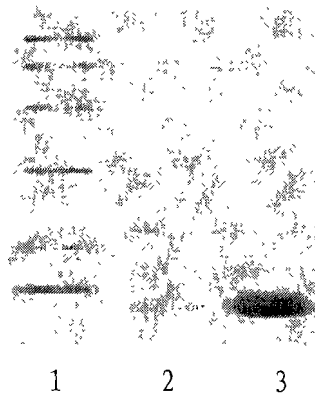


图 1

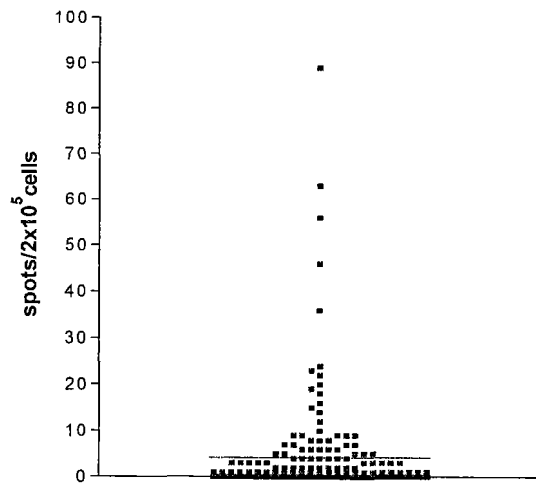


图 2

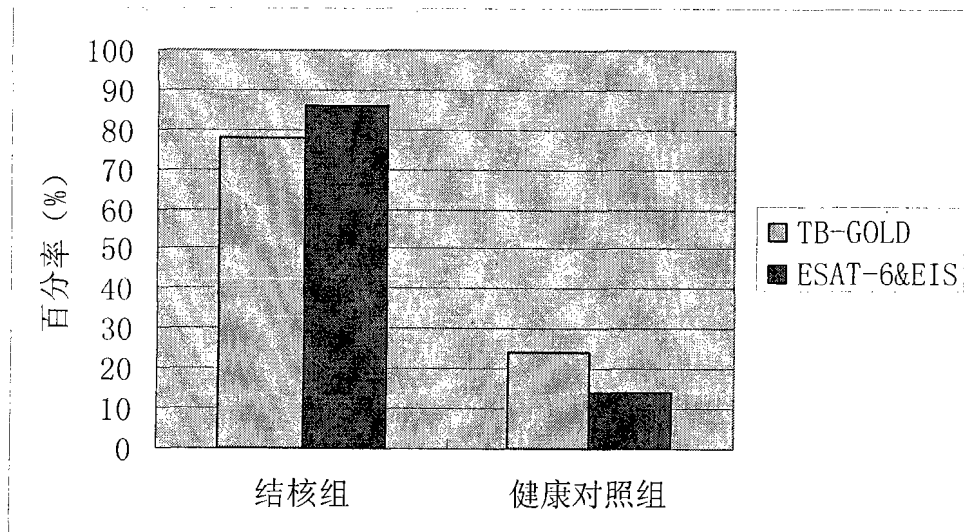


图 3

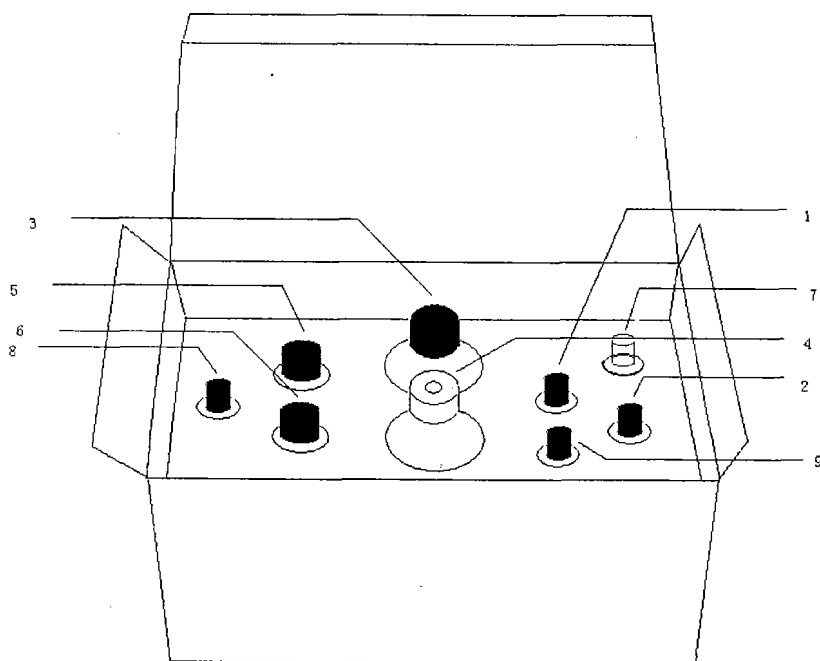


图 4

专利名称(译)	结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒及特异性抗原制取方法		
公开(公告)号	CN101419237A	公开(公告)日	2009-04-29
申请号	CN200810141800.X	申请日	2008-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市东湖医院		
申请(专利权)人(译)	深圳市东湖医院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市第三人民医院		
[标]发明人	陈心春 周伯平 杨倩婷 张明霞		
发明人	陈心春 周伯平 杨倩婷 张明霞		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
其他公开文献	CN101419237B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种结核菌感染的酶联免疫斑点诊断试剂盒及特异性抗原制取方法，其试剂盒包括试剂盒体、以及设置在盒体中的检验试剂，所述的检验试剂包括阳性标准液、显色剂、浓缩洗涤剂 and 稀释液，它还包括结核分枝杆菌特异性抗原、包被的抗INF - γ 抗体和载体蛋白偶联物的酶标二抗；所述结核分枝杆菌特异性抗原为结核分枝杆菌ESAT - 6和EIS基因表达的融合蛋白；所述的抗INF - γ 抗体为鼠源性IgG抗体。特异性抗原制取方法是筛选合适的结核菌特异性抗原ESAT - 6与EIS组合，制成的重组融合蛋白含有二者主要的抗原决定簇。本发明重组融合蛋白明确含有适合不同HLA限制的T细胞表位，不会因为不同人群由于HLA分布不同而影响结果。通过对不同人群的结核病人和健康人的临床测试，本发明已显示出比当前同类产品更优异的特异性和灵敏性。

