



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103911356 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201410171898. 9

(22) 申请日 2014. 04. 25

(71) 申请人 中国人民解放军第三〇九医院
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 赵卫国
冯金栋 梁艳

(74) 专利代理机构 北京市广友专利事务所有限
责任公司 11237

代理人 耿小强

(51) Int. Cl.

C12N 9/10(2006. 01)

C12N 15/54(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

C12R 1/32(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图1页

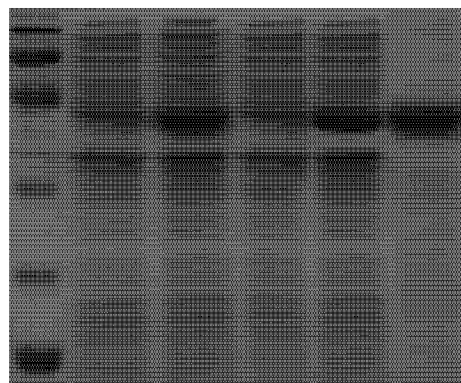
(54) 发明名称

结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 及其制备方法和应用,属于结核病医学免疫学检测领域。该结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示,利用基因工程技术制备,并应用该蛋白作为检测抗原组成的血液或尿液结核抗体化学发光酶免疫检测试剂盒。与目前商品化的抗体检测试剂盒相比,本发明所制备的结核分枝杆菌特异性融合蛋白,在结核病血清或尿液抗体检测方面均具有灵敏度高、特异性强、两种样本互补、并与其它抗原具有互补性的优点,可用于检测血清、尿液等体液标本中特异的抗结核抗体。

1 2 3 4 5 6



1. 一种结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC, 其特征在于: 所述的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 的核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

2. 如权利要求 1 所述的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 在 OTC 上游引物添加 Nhe I 酶切位点, 在下游引物添加 EcoR I 酶切位点, 将 PCR 扩增产物用 Nhe I 和 EcoR I 双酶切后, 插入用 Nhe I 和 EcoR I 双酶切后的 pET30aSETB 质粒载体中; 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 受体菌中; 经过质粒提取, 经 T7 和 T7t 双向测序验证, 获得核苷酸序列与设计完全一致的重组质粒 OTC/pET30aSETB;

(2) 将 OTC 大肠杆菌基因工程株经过诱导、表达、纯化, SDS-PAGE 电泳、鉴定及 ELISA 分析, 获得与实际设计相符的纯化重组蛋白。

3. 如权利要求 2 所述的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 的制备方法, 其特征在于: 所述的上游引物为:

5' - CTAGCTAGCATGATCAGGCATTTCTGCG - 3'

所述的下游引物为:

5' - CCGAATTCTTATGAGCGCTCCAGCAGCCA - 3'。

4. 如权利要求 1 所述的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 在制备结核抗体检测试剂盒中的应用。

5. 如权利要求 4 所述的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 在制备结核抗体检测试剂盒中的应用, 其特征在于: 所述的试剂盒为血液或尿液结核抗体化学发光酶免疫检测试剂盒。

结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 及其制备方法和应用,具体涉及应用基因工程技术制备的一种结核分枝杆菌特异性的重组蛋白 OTC 及其制备方法,并应用该蛋白作为检测抗原组成的血液或尿液结核抗体化学发光酶免疫检测试剂盒,属于结核病医学免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 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、与人免疫缺陷病毒 (HIV) 合并感染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。

[0003] 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。根据 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查结果显示,我国 15 岁及以上人群肺结核患病率 459/10 万 (结核病人约 597 万 /13 亿),其中传染性肺结核患病率 66/10 万 (传染性肺结核病人约 86 万 /13 亿),由此可见,菌阴肺结核占 85.6%。结核病死亡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。

[0004] 早期诊断、发现病人、选择敏感的抗结核药物进行有效治疗是控制结核病的关键。结核病的诊断方法有很多种,临床上常用的有胸部影像学检查、细菌学检查、血清学诊断、细胞因子检测、分子诊断等,但是每种方法都有一定的局限性,仍有大量的菌阴肺结核未能获得早期、快速的诊断。血清学检测因其简单、价廉、无需精密仪器,在基层医院就可以开展等优点,目前国内临床上常用于结核病的辅助诊断,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,但其灵敏度或特异性仍不能满足临床诊断的需求。为了提高血清学检测的灵敏度,目前检测的标本也有采用胸水、脑脊液、腹水,以提高结核性胸膜炎、结核性脑膜炎、结核性腹膜炎诊断的灵敏度。但目前国内外尚未见专门用于检测尿液标本中抗结核抗体的试剂盒。目前已发现不同结核病患者标本对不同结核分枝杆菌抗原产生不同水平的抗体,而同一个患者在疾病的不同阶段对不同抗原的免疫反应也不同,使得每一位患者血清识别抗原的种类、数目和水平都有很大的差异,抗原识别的个体差异是人类结核病体液免疫的主要特性。因此,本发明拟制备一种新的结核分枝杆菌重组蛋白抗原 OTC,应用化学发光酶免疫分析法检测血液或尿液中的抗结核 OTC 抗体水平,与其它血清抗体检测起互补作用,从而提高抗结核抗体检测的灵敏度,提高结核病人的发现率。此外,尿液标本来源方便,避免抽血化验给患者的痛苦,填补了国际空白。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为克服已有技术的不足,提供一种新型结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 及其制备方法,并应用该蛋白作为结核病抗体检测抗原制备血清或尿液结核 OTC 抗体化学发光酶免疫检测试剂盒,可与其它血清抗体检测起互补作用,以提高抗结核抗体检测的灵敏度。应用于结核病的快速诊断时,尿液标本来源方便,避免抽血化验给患者的痛苦。

[0006] 一种结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC,它的核苷酸序列(DNA 序列)如序列表中序列 1 所示。

[0007] OTC(ornithine carbamoyltransferase) 蛋白抗原是一种鸟氨酸氨基甲酰转移酶,蛋白分子量为 33025.2Da,参与鸟氨酸的生物合成。它存在于结核分枝杆菌培养滤液、细胞壁和细胞裂解液中,在活动性肺结核患者血液和尿液中高表达。重组 OTC 蛋白可被活动性结核病患者 IgG 抗体识别,而健康人 IgG 不能识别。因此,重组 OTC 蛋白用于血清或尿结核抗体检测,可与其它血清抗体检测起互补作用,以提高抗结核抗体检测的灵敏度,实现结核患者的早期发现。

[0008] 本发明提出的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC,是通过基因工程技术将其克隆、表达、纯化。

[0009] 本发明提出上述重组蛋白 OTC 的制备(构建)方法,包括如下步骤:

[0010] (1)OTC 蛋白的克隆:通过基因工程技术进行克隆。

[0011] 在 OTC 上游引物添加 Nhe I 酶切位点,在下游引物添加 EcoR I 酶切位点,将 PCR 扩增产物用 Nhe I 和 EcoR I 双酶切后,插入用 Nhe I 和 EcoR I 双酶切后的 pET30aSETB 质粒载体中;转化到大肠杆菌 BL21(DE3)受体菌中;经过质粒提取,经 T7 和 T7t 双向测序验证,获得核苷酸序列与设计完全一致的重组质粒 OTC/pET30aSETB,其核苷酸序列如序列表中序列 2 所示,表明已成功构建了 OTC 蛋白重组表达质粒。

[0012] (2)OTC 重组蛋白的鉴定:OTC 大肠杆菌基因工程株经过诱导、表达、纯化,SDS-PAGE 电泳、鉴定,及 ELISA 分析,表明获得的纯化的重组蛋白与实际设计的大小相符,并具有很好的抗原性。

[0013] 在步骤(1)中,扩增 OTC 基因的一对引物为:

[0014] 上游引物(含限制性内切酶 Nhe I 位点)

[0015] 5' - CTAGCTAGCATGATCAGGCATTTCTGCG - 3'

[0016] 下游引物(含限制性内切酶 EcoR I 位点)

[0017] 5' - CCGGAATTCTTATGAGCGCTCCAGCAGCCA - 3'

[0018] 本发明的结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 可应用于制备结核抗体诊断或检测试剂盒,即将该蛋白作为检测抗原组成的血液或尿液结核抗体化学发光酶免疫检测试剂盒,研究结果表明,应用化学发光酶免疫分析法检测血液或尿液中的抗结核抗体水平,两种标本抗体检测起互补作用,可提高抗结核抗体检测的灵敏度,提高结核病人的发现率。此外,尿液标本来源方便,避免抽血化验给患者的痛苦。

[0019] 本发明的特点及效果:

[0020] 本发明通过基因工程技术克隆、表达、纯化结核分枝杆菌重组蛋白 OTC,作为结核病抗体检测的抗原,用于检测结核病患者血清或尿液中的抗体水平。

[0021] 本发明人研究证明应用结核分枝杆菌 OTC 重组蛋白抗原检测结核病患者血清或

尿液中结核抗体的灵敏度和特异性分别为 28.6%、90.7%和 30.4%、94.4%，两种样本联合检测的灵敏度和特异性为 50.0%和 85.2%。

[0022] 本发明结核分枝杆菌重组蛋白 OTC 抗原可大规模生产，且成本相对较低。

[0023] 本发明的重组蛋白可作为新型结核抗体检测的联合抗原之一，用于检测尿、血清、胸水等体液样品中特异的抗结核抗体，从而用于结核病临床辅助诊断。

[0024] 与目前商品化的抗体检测试剂盒相比，本发明所制备的结核分枝杆菌特异性融合蛋白，在结核病血清或尿液抗体检测方面均具有灵敏度高、特异性强、两种样本互补、与其它抗原具有互补性的优点，可用于检测血清、尿液等体液标本中特异的抗结核抗体。

附图说明

[0025] 图 1 为 OTC/pET30aSETB 大肠杆菌工程菌 IPTG 诱导前后 SDS-PAGE 结果。

[0026] 图 2 为 OTC/pET30aSETB 大肠杆菌工程菌的表达形式和纯化的 SDS-PAGE 结果。

具体实施方式

[0027] 本发明提出的结核分枝杆菌特异性抗原重组蛋白及其制备方法和应用结合实施例及附图详细说明如下。

[0028] 结核分枝杆菌特异性抗原重组蛋白 OTC，是通过基因工程技术将其克隆、表达、纯化。

[0029] 所述的重组蛋白 OTC 的制备方法，包括：重组蛋白 OTC 的克隆：通过基因工程技术进行克隆。在 OTC 上游引物添加 *Nhe* I 酶切位点，在下游引物添加 *Eco*R I 酶切位点，将 PCR 扩增产物用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切后，插入用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切后的 pET30aSETB 质粒载体中。转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 受体菌中。经过质粒提取，经 T7 和 T7t 双向测序验证，获得核苷酸序列与设计完全一致的重组质粒 OTC/pET30aSETB，其核苷酸序列如序列表中序列 2 所示，表明已成功构建了 OTC 蛋白重组表达质粒。

[0030] 实施例 1

[0031] 一、通过基因工程技术克隆 OTC 蛋白编码基因：

[0032] 1、依据序列表中的序列 1 设计与合成扩增 OTC 基因的一对引物

[0033] 上游引物（含限制性内切酶 *Nhe* I 位点）

[0034] 5' — CTAGCTAGCATGATCAGGCATTTCTGCG — 3'

[0035] 下游引物（含限制性内切酶 *Eco*R I 位点）

[0036] 5' — CCGGAATTCTTATGAGCGCTCCAGCAGCCA — 3'

[0037] 扩增片段：942bp

[0038] 2、PCR 扩增 OTC 基因

[0039] 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 OTC 基因。PCR 反应程序：95℃ 5min；94℃ 1min，65℃ 1min，72℃ 2min，循环 30 次；最后 72℃ 延伸 7min。于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 942bp 的扩增 DNA 片段。

[0040] 3、回收目的基因片段：

[0041] 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,定量后,贮存于 -20°C 备用。

[0042] 4. 重组质粒的构建:

[0043] 用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切纯化后的 PCR 产物,用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切表达载体 pET30aSETB 质粒 DNA,于 1% 琼脂糖凝胶电泳,切取 OTC 基因片段和 pET30aSETB 质粒 DNA 片段,用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒纯化。定量后,OTC 基因片段与 pET30aSETB 质粒 DNA 片段按 2:1 的摩尔比混合,10 μ l 反应体系如下:

[0044]

2×连接缓冲液	5 μ l
pET30aSETB 载体	1 μ l
PCR 产物	2 μ l
<i>T</i> ₄ DNA 连接酶	1 μ l
无菌水 补至	10 μ l

[0045]

[0046] 混匀后置于 16°C 连接过夜, 75°C 灭活 10min,冰浴后直接进行转化。

[0047] 5. 大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞的制备:

[0048] 挑取大肠杆菌 DH5 α (或 BL21) 单菌落接种于 5ml LB 培养液中,置 37°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°C 振荡培养箱中于 200rpm 继续培养 2-3h,待菌浓度 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时,放入用冰预冷的大离心管中, 4°C 、4000rpm、离心 10min,弃上清;20ml 冰预冷的 0.1mol/L CaCl_2 重悬菌沉淀,冰浴 30min;于 4°C 、6000rpm、离心 10min,弃上清;用 4ml 0.1mol/L CaCl_2 重悬菌沉淀,置 4°C 冰箱放置过夜;次晨加入 1ml 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°C 保存备用。

[0049] 6. 连接产物的转化:

[0050] 次日取目的基因片段与载体 pET30aSETB 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°C 水浴箱热休克 90s,迅速取出冰浴 2min;加入 LB 培养液 400 μ l, 37°C 恒温摇床培养 1h;加入 X-Gal 160 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°C 恒温培养箱培育 14h。

[0051] 7. 质粒的提取:

[0052] 根据蓝白斑筛选,随机挑取白色菌落 6 个,分别接种于 5ml 含有 50 μ g/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。

[0053] (1) 质粒小量提取试剂的配制

[0054] 溶液 I :50mmol/L 葡萄糖

[0055] 25mmol/L Tris • CL (pH8.0)

[0056] 10mmol/L EDTA (pH8.0)

[0057] 在 101bf/in² ($6.895 \times 10^4 \text{Pa}$) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟;储存于 4°C 备用。

[0058] 溶液 II :0.2mmol/L NaOH,1% SDS 临用前配制

- [0059] 溶液III :5mol/L 乙酸钾 60ml
 [0060] 冰乙酸 11.5ml
 [0061] 去离子水 28.5ml
 [0062] 贮存于 4°C, 备用。

[0063] (2) 小量提取质粒

[0064] 分别取约 3.0ml 菌液置离心管中, 于 12,000rpm 离心 1min, 弃上清; 细菌沉淀重悬于 200 μ l 溶液 I 中, 冰浴 10min; 加 400 μ l 新配制的溶液 II, 冰浴 5min; 加 300 μ l 溶液 III, 冰浴 10min; 于 4°C 12,000rpm 离心 10min; 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 10min, 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°C 水浴 30min, 消化 RNA; 取 2 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测、定量, 置 -20°C 储存备用。

[0065] 8. 鉴定重组质粒:

[0066] (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 OTC/pET30aSETB。

[0067] (2) 序列测定: 直接挑选一个克隆进行 T7 和 T7t 双向测序验证测序。测序结果与设计的基因组序列一致, 其核苷酸序列如下, 在序列表中如序列 2 所示, 其中, GCTAGC 为 Nhe I, GAATTC 为 EcoR I。

[0068] GGGGGGGGGACATTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGT
 TCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGATCAGGCATTTCTGCGCGACGACGATCTGTCCCCGGCCGA
 ACAGGCCGAGGTGCTCGAGCTCGCGCCGAGCTGAAGAAAGACCCGGTTAGCCGTCGTCCCCTGCAAGGGCCGCGCG
 GGGTGGCGGTCATCTTCGACAAGAACTCCACCCGCACCCGGTTCTCCTTCGAGCTGGGCATCGCGCAGCTGGGCGGG
 CATGCCGTCGTCGTCGACAGCGGCAGCACCCAGCTGGGCCGCGACGAAACCCTGCAGGACACCGCAAAGGTGTTGTC
 CCGCTACGTCGATGCCATCGTCTGGCGAACCTTCGGCCAAGAGCGGCTGGACGCCATGGCGTCGGTCGCGACGGTGC
 CCGTGATCAACGCGCTCTCCGATGAGTTCATCCGTGTCAGGTGTTGGCCGACCTGCAGACCATCGCCGAACGCAAG
 GGGGCGCTGCGCGGCCTGAGGTTGTCTACTTCGGCGACGGCGCCAACAACATGGCCCACTCGCTGCTGCTCGGCGG
 GGTCACCGCGGGTATCCACGTCACCGTCGCGGCTCCCGAGGGCTTCCTGCCCGACCCGTCGGTGCGGGCCGCGGCCG
 AGCGCCGCGCCAGGATACCGGCGCCTCAGTGACTGTGACCGCTGACGCCACGCGGCCCGCCCGGCGCCGACGTT
 CTGGTCACCGACACCTGGACGTCGATGGGCCAGGAAAACGACGGGTTGGACCGAGTGAAGCCGTTTCGGCCGTTTCA
 GCTCAACTCGCGACTTCTGGCGCTGGCCGACTCGGATGCCATCGTGTTCATTGCCCTGCCGGCCCATCGCGGCGACG
 AGATCACCGACGCGGTGATGGACGGGCCGCGCAGCGGTTGTTGGGACGAGGCCGAAAACCGGCTGCACGCGCAGAAG
 GCGCTGCTGGTGTGGCTGCTGGAGCGCTCATAAGAATTCGAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACC
 ACTGAGATCCGGCTGCTAACAAGACCCGAAAAGAAGCGAGGGCT

[0069] 二、OTC 工程菌的诱导表达及鉴定

[0070] 将 OTC 大肠杆菌工程菌接种于 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 10ml 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 0.6 - 0.8 时, 加入 IPTG, 诱导 3 - 4hr。

[0071] 将 1 \times 载样缓冲液 150 μ l 加入来自 1ml 菌液的沉淀样本, 混悬后, 置 100°C 沸水浴 5min, 于 12000rpm 离心 10min, 取上清液 40 μ l 进行 13% 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。OTC/pET30aSETB 菌体在相对分子质量 34.6kDa 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, 结果见图 1。

[0072] 图 1 为 OTC/pET30aSETB 大肠杆菌工程菌 IPTG 诱导前后 SDS-PAGE 结果, 其中,

[0073] 1: 蛋白质分子量标准 (TaKaRa-D530A, 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1, 14.3kDa);

[0074] 2: 基因工程菌诱导前;

[0075] 3: 基因工程菌诱导后 1 小时;

[0076] 4: 基因工程菌诱导后 2 小时;

[0077] 5: 基因工程菌诱导后 3 小时;

[0078] 6: 基因工程菌诱导后 4 小时。

[0079] 三、OTC 重组蛋白的纯化

[0080] 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 OTC 融合蛋白, 13% SDS-PAGE 电泳可见纯化的 34.6kDa 蛋白呈一条带, 结果见图 2。

[0081] 图 2 为 OTC/pET30aSETB 大肠杆菌工程菌的表达形式和纯化的 SDS-PAGE 结果, 其中:

[0082] 1: 蛋白质分子量标准 (TaKaRa-D530A, 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1, 14.3kDa);

[0083] 2: 基因工程菌诱导前;

[0084] 3: 基因工程菌诱导后;

[0085] 4: 基因工程菌表达菌体超声破碎后高速离心分离出的上清 (可溶性部分) 样品;

[0086] 5: 基因工程菌表达菌体超声破碎后高速离心分离出的沉淀 (不可溶性部分) 样品;

[0087] 6: 纯化后蛋白样品。

[0088] 实施例 2

[0089] 将本发明实施例 1 所构建、纯化的 OTC 重组蛋白应用于结核病患者尿和血中结核抗体检测。以其作为化学发光免疫实验的诊断抗原, 应用于临床标本的试验, 获得了较好的诊断效果, 与目前商品化的三个结核抗体检测试剂盒比较, 显著地提高了结核病诊断的灵敏度。ELISA 检测程序如下所示:

[0090] 1. 实验标本: 共选择 103 例血清标本, 分为两组:

[0091] (1) 结核组: 临床上经影像学、实验室检查及抗结核治疗而确诊的活动性结核病患者 56 例, 其中男 33 例, 女 23 例, 平均年龄 40.8 ± 19.1 岁。包括肺结核、肺结核合并结核性胸膜炎、肺结核合并结核性脑膜炎、肺结核合并支气管结核、肺结核合并颈部淋巴结结核、肺结核合并腰椎结核、结核性胸膜炎、结核性脑膜炎合并结核性胸膜炎等。

[0092] (2) 非结核对照组: 临床上经影像学、实验室检查及治疗效果而确诊的非结核呼吸疾病患者 54 例, 其中男 34 例, 女 20 例, 平均年龄 58.5 ± 20.7 岁。包括肺炎、肺炎合并肺不张、肺炎合并脑脓肿、肺炎合并慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张合并感染、慢性支气管肺炎、肺脓肿、支气管哮喘、肺癌、支气管扩张合并感染、呼吸道感染、胸膜炎、肺间质纤维化等。

[0093] 2. 实验仪器和试剂

[0094] 仪器: 化学发光分析仪 KPS-KM, 北京科美东雅科技发展有限公司产品。

[0095] 试剂:OTC 重组蛋白,3 个商品化的结核抗体诊断试剂盒(分别为韩国 SD 标准诊断公司、上海奥普生物医药有限公司、北京现代高达生物技术有限责任公司),包被缓冲液(0.05mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH9.6),封闭液(PBS-10%小牛血清),洗涤液(PBST, PBS-0.05%吐温, pH7.4),样本稀释液(PBST-10%小牛血清, pH7.4),酶标第二抗体(HPR 标记的羊抗人 IgG),化学发光底物液(用前 15 分钟将 A 与 B 试剂按 1:1 配制)。

[0096] 3. 实验方法

[0097] (1) 抗原包被:用包被缓冲液将重组蛋白抗原稀释至 10 μ g/ml,每孔加 100 μ l。每板留 1 个孔,只加包被缓冲液,作为空白对照。置 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用 PBST 洗板 3 次,3 分钟/次。

[0098] (2) 封闭:每孔加 PBS-10%小牛血清 200 μ l,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次,3 分钟/次。

[0099] (3) 加待检样品:用 PBST-10%小牛血清按 1:10 稀释待检样品,充分混匀后,每孔加 100 μ l,做 2 个平行孔;同时做空白、阴性及阳性孔对照,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。用 PBST 洗板 3 次,3 分钟/次。

[0100] (4) 加酶标二抗:用 PBST-10%小牛血清新鲜稀释酶标第二抗体,充分混匀后,每孔加 100 μ l,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。用 PBST 洗板 6 次,8 分钟/次。

[0101] (5) 加底物液:每孔加 100 μ l 新鲜配制的化学发光底物液,立即放入化学发光分析检测仪,5 分钟读取发光值。

[0102] 4. 结果

[0103] 实验结果见表 1 和表 2。OTC 重组蛋白用作抗原检测血和尿中抗结核抗体的特异性(分别为 90.7%、94.4%)明显高于上海奥普生物医药有限公司的结核抗体诊断试剂盒(为 57.4%),与韩国 SD 标准诊断公司和北京现代高达生物技术有限责任公司的结核抗体诊断试剂盒(分别为 90.7%、88.9%)相当。OTC 重组蛋白检测血和尿中抗结核抗体的灵敏度(分别为 28.6%、30.4%)明显高于韩国 SD 标准诊断公司(为 12.5%)的结核抗体诊断试剂盒和传统的涂片和培养(为 14.3%),略高于北京现代高达生物技术有限责任公司(为 23.2%),显著低于上海奥普生物医药有限公司的结核抗体诊断试剂盒(为 82.1%)。应用 OTC 重组蛋白同时检测血和尿中抗结核抗体的灵敏度和特异性分别为 50.0% (28/56) 和 85.2% (8/54),两种标本同时检测可起互补作用,显著提高抗结核抗体检测的灵敏度,提高结核病人的发现率。本发明的重组蛋白用作抗原检测结核抗体无论是菌阳还是菌阴的活动性结核病患者均具有较高的检出率。结果表明:与现有商品化的结核抗体检测试剂盒和传统的涂片、培养相比,本发明所构建的结核分枝杆菌特异性重组蛋白,在对结核病诊断的灵敏度和特异性方面具有明显的优势。因此,本发明在结核病快速诊断方面具有广泛的应用前景。

[0104] 表 1 应用化学发光酶免疫方法检测结核和非结核血清或尿中抗结核抗体

[0105]

分 组	涂片和培 养阳性率 % (阳性数 /病例数)	商品化结核抗体诊断试剂盒检测血 结核抗体 阳性率% (阳性数/病例数)			重组 OTC 蛋白检测结核 抗体 阳性率% (阳性数/病例 数)	
		韩国 SD	上海奥普	北京现代 高达	血	尿
非结核 疾病组	未做	9.3(5/54)	42.6(23/54)	11.1(6/54)	9.3(5/54)	5.6(3/54)
结核病 组	14.3(8/56)	12.5(7/56)	82.1(46/56)	23.2(13/56)	28.6(16/56)	30.4(17/56)
	菌阳	37.5(3/8)	75.0(6/8)	37.5(3/8)	25.0(2/8)	37.5(3/8)
	菌阴	8.3(4/48)	83.3(40/48)	20.8(10/48)	29.2(14/48)	29.2(14/48)

[0106] 表 2 应用化学发光酶免疫方法检测结核血清或尿中抗结核抗体结果

[0107]

分 组		重组 OTC 蛋白检测尿结核抗体		合计
		阳性	阴性	
重组 OTC 蛋白 检测血结核抗 体	阳性	5	11	16
	阴性	12	28	40
	合计	17	39	56

[0001]

序列表

- <110> 中国人民解放军第三〇九医院
 <120> 结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 及其制备方法和应用
 <130>
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 924
 <212> DNA
 <213> 结核分枝杆菌特异性重组蛋白 OTC 的核苷酸序列
 <400> 1

```

atgacacagge atttctgcg cgacgacgat ctgteceegg ccgaacagge cgaggtgctc      60
gagctcgcgg ccgagetgaa gaaggaccgg gttagccgctc gtccctgca agggccgcgc      120
ggggtggcgg tcattctcga caagaactcc acccgcaccg ggtctcctt cgagctgggc      180
atcgcgcagc tgggcgggca tgccgtcgtc gtcgacagcg gcagcaccga gctgggcccg      240
gacgaaacec tgcaggacac cgcaaaggtg ttgtcccgct acgtcgatgc catcgctcgg      300
cgaaccttcg gecaagagcg gctggacgcc atggcgtegg tcgcgacggt gcccgatgc      360
aacgcgctct ccgatgagtt ccattccgtgt cagggtgttg ccgacctgca gaccatcgcc      420
gaacgcaagg gggcgctcgc cggcctgagg ttgtctact tcggcgacgg cgccaacaac      480
atgcccact cgctcgtcgt cggcggggtc accgcgggta tccacgtcac cgtcgcgget      540
cccgaggget tectgcccga cccgtcgggtg cgggcgcggg ccgagcgccg cgcccaggat      600
accggcgctt cgggtgactgt gaccgctgac gccacgcgg ccgcccggcg cgccgacgtt      660
ctggtcaccg acacctggac gtcgatgggc caggaaaacg acgggttgga ccgagtgaag      720
ccgtttcggc cgtttcagct caactcgcga cttctggcgc tggccgactc ggatgccatc      780
gtgttgcaat gctgcccggc ccattcgcgc gacgagatca ccgacgcggt gatggacggg      840
ccggccagcg cgggtgtgga cgaggccgaa aaccggctgc acgcgcagaa ggcgctgctg      900
gtgtggetgc tggagcgctc ataa      924

```

- <210> 2
 <211> 1113
 <212> DNA

[0002]

<213> 重组质粒 OTC/pET30aSETB 的核苷酸序列

<400> 2

```

gggggggggg acattcccct ctagaataat tttgtttaac ttttaagaagg agatatacat      60
atgcgggggtt ctcatcatca tcatcateat ggtatggcta gcatgacag gcatttctg      120
cgcgacgacg atctgtcccc ggccgaacag gccgaggtgc tcgagctcgc ggccgagctg      180
aagaaagacc cggttagccg tcgtcccctg caagggccgc gcggggtggc ggtcattctc      240
gacaagaact ccaccgcac ccggttctcc ttcgagctgg gcatcgcgca gctgggcggg      300
catgccgtcg tcgtcgacag cggcagcacc cagctgggcc gcgacgaaac cctgcaggac      360
accgcaaagg tgttgtcccg ctacgtgat gccatgtctt ggcgaaacctt cggccaagag      420
cggctggacg ccatggcgtc ggtcgcgacg gtgcccgtga tcaacgcgct ctccgatgag      480
ttccatecgt gtcaggtgtt ggccgacctg cagaccatcg ccgaacgcaa gggggegctg      540
cgcggcctga gtttgccta cttcggcgac ggcgccaaca acatggcca ctcgctgctg      600
ctcggcgggg tcaccgcggg tatccaegtc accgtcgcgg ctcccagagg ctctctgccc      660
gaccgctcgg tgcgggccgc ggccgagcgc cgcgccagg ataccggcgc ctcaagtact      720
gtgaccgctg acgcccacgc ggccgcccgc ggcgccgacg ttctggteac cgacacctgg      780
acgtcgatgg gccaggaaaa cgacgggttg gaccgagtga agccgtttcg gccgtttcag      840
ctcaactege gaattctgge getggccgac tcggatgcca tcgtgttgca ttgcctgccc      900
gcccacgccc gcgacgagat caccgaecgc gtgatggacg ggccggccag cgcggtgtgg      960
gacgaggccc aaaaccggct gcacgcgcag aaggecgtgc tggtgtgget gctggagcgc     1020
tcataagaat tcgaagcttg cggccgcact cgagcaccac caccaccacc actgagatcc     1080
ggctgctaac aaagcccga aagaagcagg gct                                     1113

```

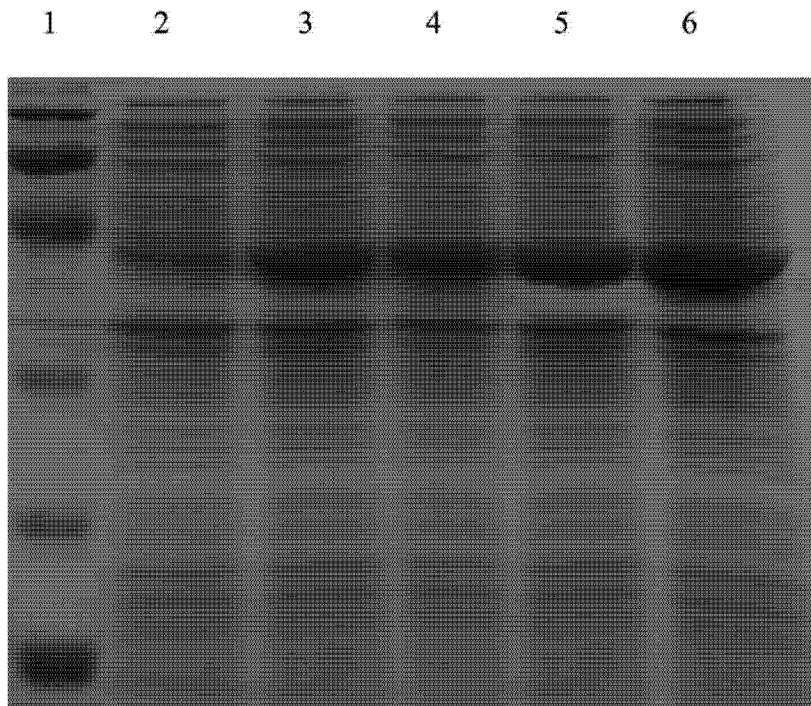


图 1

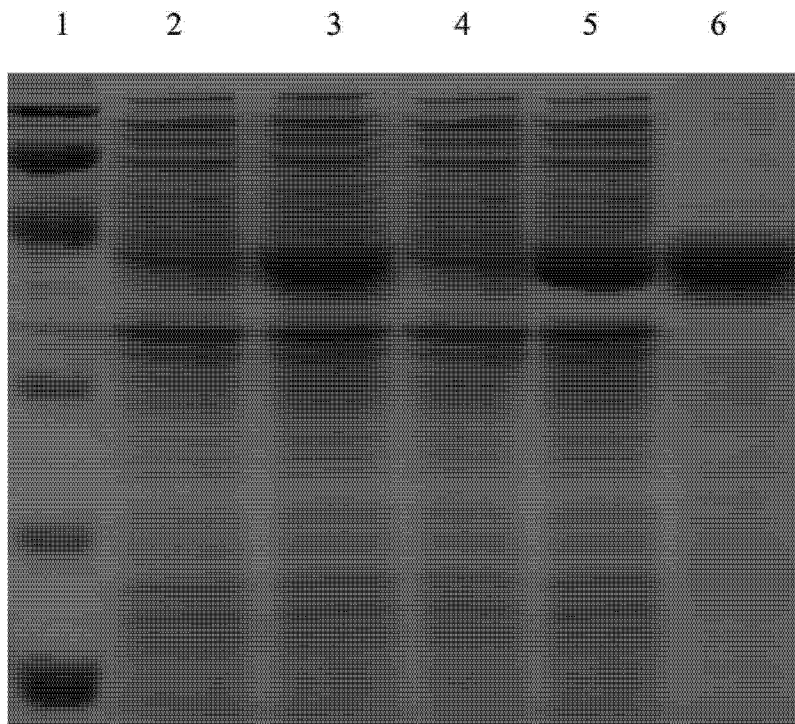


图 2

专利名称(译)	结核分枝杆菌特异性重组蛋白OTC及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103911356A	公开(公告)日	2014-07-09
申请号	CN201410171898.9	申请日	2014-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
[标]发明人	吴雪琼 阳幼荣 张俊仙 赵卫国 冯金栋 梁艳		
发明人	吴雪琼 阳幼荣 张俊仙 赵卫国 冯金栋 梁艳		
IPC分类号	C12N9/10 C12N15/54 C12N15/70 G01N33/53 C12R1/32		
CPC分类号	C12N9/1018 C12N15/70 C12Y201/03003 G01N33/573 G01N2333/91034 G01N2800/26		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种结核分枝杆菌特异性重组蛋白OTC及其制备方法和应用，属于结核病医学免疫学检测领域。该结核分枝杆菌特异性重组蛋白OTC的核苷酸序列如序列表中序列1所示，利用基因工程技术制备，并应用该蛋白作为检测抗原组成的血液或尿液结核抗体化学发光酶免疫检测试剂盒。与目前商品化的抗体检测试剂盒相比，本发明所制备的结核分枝杆菌特异性融合蛋白，在结核病血清或尿液抗体检测方面均具有灵敏度高、特异性强、两种样本互补、并与其它抗原具有互补性的优点，可用于检测血清、尿液等体液标本中特异的抗结核抗体。

