



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108267582 A

(43)申请公布日 2018.07.10

(21)申请号 201611251800.6

(22)申请日 2016.12.30

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

(72)发明人 朱传刚 王钊哲 许瑞 林矫矫

陈兆国 洪炆 陆珂 李浩

吴思敏 李嘉静 江嘉欣

(74)专利代理机构 上海硕力知识产权代理事务

所(普通合伙) 31251

代理人 郭桂峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

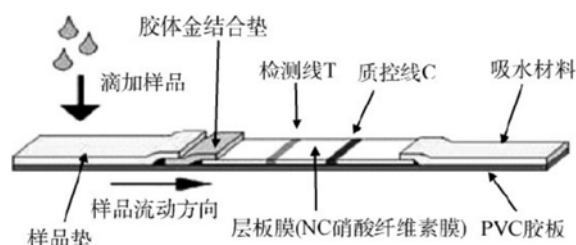
### (54)发明名称

弓形虫胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

法

### (57)摘要

本发明提供了一种弓形虫病检测胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条包括依照样品流动方向依次排列的样品垫、胶体金结合垫、检测线、质控线和吸水材料,其中,检测线中包括弓形虫特异性抗原。本发明提供的弓形虫胶体金免疫层析试纸条能够简单、方便的对人及多种哺乳类动物弓形虫进行快速检测。



1. 一种弓形虫胶体金免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述试纸条包括依照样品流动方向依次排列的样品垫、胶体金结合垫、检测线、质控线和吸水材料, 其中, 检测线中包括弓形虫特异性抗原。

2. 如权利要求1所述的弓形虫胶体金免疫层析试纸条, 其中, 所述弓形虫特异性抗原为重构的弓形虫SAG1和SAG2膜表面抗原的融合蛋白。

3. 如权利要求1所述的弓形虫胶体金免疫层析试纸条, 其中, 所述弓形虫特异性抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

4. 如权利要求1所述的弓形虫胶体金免疫层析试纸条, 其中, 所述检测线中, 所述弓形虫特异性抗原的划线量为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ – $3\mu\text{L}/\text{cm}$ ; 更优选为 $2\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

5. 如权利要求1所述的弓形虫胶体金免疫层析试纸条, 其中, 所述质控线包括链球菌蛋白G。

6. 如权利要求1所述的弓形虫胶体金免疫层析试纸条, 其中, 所述链球菌蛋白G的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

7. 一种制备弓形虫胶体金免疫层析试纸条的方法, 其中, 所述方法包括步骤:

(1) 制备弓形虫特异性抗原

使用基因工程菌表达制备SEQ ID NO.1所示的弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2的融合蛋白的抗原表位rSAG作为弓形虫特异性抗原;

(2) 制备重组链球菌蛋白G

使用基因工程菌表达制备SEQ ID NO.2所示的重组链球菌蛋白G (rSPG);

(3) 制备胶体金探针

向胶体金溶液中逐滴加入步骤(2)制得的rSPG, 获得胶体金探针, 将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫上;

(4) 胶体金免疫层析试纸条的制备

将NC膜贴于底板上, 之后用胶体金点样系统进行划线; 分别用rSAG和rSPG作为检测线和质控线, 划线后烘干; 将金标垫、样品垫、吸水纸依次贴于含有NC膜的底板上。

8. 如权利要求7所述的方法, 其中, 步骤(1)中, 将SEQ ID NO.3所示的基因与PET-28a (+) 载体连接后, 转化至BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取完整单个菌落于含Kana的LB液体培养基中振荡培养, 加入 $1\text{mmol}/\text{L}$ 的IPTG诱导, 使用His亲和层析柱对表达的重组蛋白进行纯化, 获得弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2的融合蛋白rSAG作为弓形虫特异性抗原。

9. 如权利要求7所述的方法, 其中, 步骤(3)中, 将 $100\text{mL}$ 去离子水和 $1\text{mL}$  1%氯金酸置于 $250\text{mL}$ 锥形瓶中, 加热至沸腾; 缓慢加入 $1.5\text{mL}$ 的柠檬酸三钠, 观察到溶液颜色由淡黄变黑最后逐渐稳定成紫红色后, 继续煮沸 $15\text{min}$ , 冷却至室温后定容到原体积; 用0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 调节胶体金溶液pH至5.0; 逐滴加入 $1.2\text{mL}$   $1\text{mg}/\text{mL}$ 的rSPG, 振荡 $15\text{min}$ 后静置 $15\text{min}$ ; 加入 $10\text{mL}$  10% PEG20000, 使其终浓度为1%, 振荡 $15\text{min}$ 后静置 $15\text{min}$ ;  $2000\text{r}/\text{min}$ 离心 $20\text{min}$ , 弃沉淀;  $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 $30\text{min}$ , 弃上清, 沉淀用 $20\text{mL}$  TBS重悬; 将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫上, 使 $1.0\text{cm}^2$ 的金标垫中含有 $100\mu\text{L}$ 的胶体金探针, 将金标垫置于 $-80^\circ\text{C}$ 放置 $2\text{h}$ , 真空干燥。

10. 如权利要求7所述的方法, 其中, 步骤(4)中, 将NC膜贴于底板上, 之后用胶体金点样系统进行划线; 分别用rSAG和rSPG作为检测线(T线)和质控线(C线), 划线后将底板置于 $37^\circ\text{C}$

℃烘箱过夜烘干;将金标垫、样品垫、吸水纸依次贴于含有NC膜的底板上,用贴条机以0.3cm的宽度切条。

## 弓形虫胶体金免疫层析试纸条及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,本发明涉及一种弓形虫胶体金免疫层析试纸条及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 弓形虫是一种分布广泛的,专性细胞内寄生虫,在感染人或动物后可通过胎盘方式垂直传播,造成胎儿畸形,早产,神经系统发育障碍;也可经口传播,如饮用未经灭菌的奶制品,或使用未熟的肉类;对宿主选择性不强,可寄生在多种动物的有核细胞中,并侵害多种组织器官。其中羊是较易感动物,在感染后表现出流产、产死胎和弱畜,给人类和养殖业造成严重威胁。

[0003] 为了寻找敏感、特异、快速的诊断方法,国内外学者在弓形虫病诊断方面进行了大量研究。目前,常见的弓形虫病诊断方法有病原学方法、分子生物学方法、免疫学方法等,但多出现检出率不高,操作繁杂,灵敏度低等缺点,为适应基层大规模普查的需要,有必要研制出针对多种动物的快速检测试剂盒,以便能够简单、方便的对弓形虫进行检测。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种弓形虫胶体金免疫层析试纸条及其制备方法,以便能够简单、方便的对弓形虫进行检测。

[0005] 本发明提供了一种弓形虫胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条包括依照样品流动方向依次排列的样品垫、胶体金结合垫、检测线、质控线和吸水材料,其中,检测线中包括弓形虫特异性抗原。

[0006] 优选地,所述弓形虫特异性抗原为弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2重构抗原表位的融合蛋白。

[0007] 优选地,所述弓形虫特异性抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 优选地,所述检测线中,所述弓形虫特异性抗原的划线量为 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ – $3\mu\text{L}/\text{cm}$ ;更优选为 $2\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0009] 优选地,所述质控线包括链球菌蛋白G。

[0010] 优选地,所述链球菌蛋白G的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0011] 本发明还提供了一种制备弓形虫胶体金免疫层析试纸条的方法,所述方法包括步骤:

[0012] (1) 制备弓形虫特异性抗原

[0013] 使用基因工程菌表达制备SEQ ID NO.1所示的弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2的融合蛋白rSAG作为弓形虫特异性抗原;

[0014] (2) 制备重组链球菌蛋白G

[0015] 使用基因工程菌表达制备SEQ ID NO.2所示的重组链球菌蛋白G(rSPG);

[0016] (3) 制备胶体金探针

[0017] 向胶体金溶液中逐滴加入步骤(2)制得的rSPG,获得胶体金探针,将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫上;

[0018] (4) 胶体金免疫层析试纸条的制备

[0019] 将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线;分别用rSAG和rSPG作为检测线和质控线,划线后烘干;将金标垫、样品垫、吸水纸依次贴于含有NC膜的底板上。

[0020] 优选地,步骤(1)中,将SEQ ID NO.3所示的基因与PET-28a(+)载体连接后,转化至BL21(DE3)感受态细胞,挑取完整单个菌落于含Kana的LB液体培养基中振荡培养,加入1mmol/L的IPTG诱导,使用His亲和层析柱对表达的重组蛋白进行纯化,获得弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2的融合蛋白rSAG作为弓形虫特异性抗原。

[0021] 优选地,步骤(3)中,将100mL去离子水和1mL1%氯金酸置于250mL锥形瓶中,加热至沸腾;缓慢加入1.5mL的柠檬酸三钠,观察到溶液颜色由淡黄变黑最后逐渐稳定成紫红色后,继续煮沸15min,冷却至室温后定容到原体积;用0.2%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液pH至5.0;逐滴加入1.2mL 1mg/mL的rSPG,振荡15min后静置15min;加入10mL 10%PEG20000,使其终浓度为1%,振荡15min后静置15min;2000r/min离心20min,弃沉淀;10000r/min离心30min,弃上清,沉淀用20mL TBS重悬;将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫上,使1.0cm<sup>2</sup>的金标垫中含有100μL的胶体金探针,将金标垫置于-80℃放置2h,真空干燥;

[0022] 优选地,步骤(4)中,将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线;分别用rSAG和rSPG作为检测线(T线)和质控线(C线),划线后将底板置于37℃烘箱过夜烘干;将金标垫、样品垫、吸水纸依次贴于含有NC膜的底板上,用贴条机以0.3cm的宽度切条。

[0023] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0024] 图1为试纸条的结构示意图。

[0025] 图2显示了PET28(a)-SAG蛋白表达结果;M:蛋白标志物;1:无IPTG诱导;2-9: IPTG诱导后1-8h。

[0026] 图3显示了PET28(a)-SAG纯化结果及Western blot分析;A:M:蛋白标志物;1:纯化前超声破碎后的上清液;2:加样后的流穿液;3:纯化的重组蛋白rSAG;B:M:蛋白标志物;1:重组蛋白与小鼠弓形虫病阳性血清反应条带。

[0027] 图4显示了试纸条与小鼠弓形虫血清样品反应结果;A:重组蛋白含量为2μL/cm的阳性血清反应;B:重组蛋白含量为1μL/cm的阳性血清反应;C:阴性血清反应。

## 具体实施方式

[0028] 本发明以胶体金为标记物,利用特异性抗原抗体反应,制备的胶体免疫层析试纸条。本发明在原核表达系统中表达出的特异性目的蛋白,具有蛋白产量高、操作简单、费用低廉等优势。本研究对弓形虫抗原基因进行生物学分析,设计并合成弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2多表位重构基因,构建原核表达质粒,对重组的目的蛋白进行表达纯化及抗原性检测,之后进行弓形虫胶体金免疫层析试纸条的制备,为有效防控弓形虫病奠定基础。

[0029] 具体地,为了研制一种可用于检测弓形虫的快速诊断胶体金免疫层析试纸条,本研究对弓形虫表面抗原SAG1和SAG2的基因片段进行重构合成,与PET28a(+)载体连接后,转化至大肠埃希氏杆菌BL21(DE3)中表达,利用His亲和层析柱对融合蛋白进行纯化,获得SAG重组蛋白,Western blot对重组蛋白免疫原性进行分析。用PET28a(+)-SAG重组蛋白及重组蛋白G分别划线,作为检测线和质控线,制作胶体金免疫层析试纸条,利用小鼠弓形虫阳性血清及小鼠阴性血清检验胶体金免疫层析试纸条检查效果。本研究成功表达纯化了SAG抗原表位的重组蛋白;重组蛋白具有抗原性;以此多抗原表位的重组蛋白作为检查抗原研制了胶体金免疫层析试纸条,能够快速检测弓形虫的阳性血清,为基层弓形虫病的快速诊断奠定了基础。

[0030] 链球菌蛋白G

[0031] 链球菌蛋白G(streptococcal protein G,SPG)是一种能与人类及多种动物IgG结合的链球菌细胞壁蛋白,最早在1973年由Kronvall报道。A、C、G群链球菌的细胞壁及培养上清均含该蛋白,且其特性与葡萄球菌蛋白A(SPA)明显不同。1984年,Bjorck等将这种蛋白统称为链球菌蛋白G,并对其进行了分离纯化。目前,SPA由于具有与抗体Fc端结合的特性,较为广泛的应用于免疫学实验中,而SPG与SPA相比,IgG的结合力更强,结合谱更广。为获得一种能高效结合IgG的工具蛋白,将SPG基因的IgG结合片段进行重构,只保留蛋白与IgG的Fc端特异性结合的C区,用重组蛋白G对胶体金免疫层析试纸条的质控线进行划线。

[0032] 在本发明的一个优选地实施例中,重组蛋白G(rSPG)的氨基酸序列如下:  
TYKLVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLVIN  
GKTLKGETTTEAVDAATAEKAFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLIVINGKTLKGE  
TTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWYDDATKTFTVTE(SEQ ID NO.2);

[0033] 其编码基因如下:

[0034]

GGATCCACTTACAACTGGTTATTAATGGTAAAAACCTGAAAGGCGAAACCACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTAC  
TGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGA  
CCTTTACCGTTACTGAAAAACCAGAAGTGATCGATGCGTCTGAACTGACCCAGCCGTGACCACTTACAACTGGTT  
ATTAATGGTAAAAACCTGAAAGGCGAAACCACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACA  
ATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGATGATGCGACTAAGACCTTTACCGTTACTGAAAAAC  
CAGAAGTGATCGATGCGTCTGAACTGACCCAGCCGTGACCACTTACAACTGGTTATTAATGGTAAAAACCTTGAAA  
GGCGAAACAACCTACTAAAGCAGTAGACGCAGAACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGT  
TGATGGTGTGTTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGAATAAGAATTC(SEQ ID NO.4)。

[0035] 弓形虫SAG

[0036] 弓形虫速殖子是机体免疫系统识别的主要部位,其表膜蛋白抗原(SAG)由SAG基因家族编码。SAG1位于弓形虫速殖子表面,可以诱导宿主的免疫应答;SAG2是速殖子表膜的另—主要抗原,可介导弓形虫速殖子的入侵,这两种抗原均具有较强的免疫原性。有研究表明,弓形虫感染后的血清抗体能够识别SAG1和SAG2表面抗原。因此,将重组SAG蛋白作为胶体金免疫层析试纸条的检测线进行划线。

[0037] 在本发明的一个优选地实施例中,弓形虫膜表面抗原SAG1和SAG2的融合蛋白rSAG的氨基酸序列如下:

[0038]

ASDPPLVANQVVTCDDKSTGGTALTEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTSGSPEAEDSWWTGDSASLDGGKGDDAQG  
SYGADSTLGPVKLSAEGPTTGGDGVKVPQDNNQYCSGTTLTGCNEKGS LTENPWQGNASSDKGATLTIKKEAFPAES  
KSVIIIGCTGGSPEKHGGAAGSAKSAAGTAGSSTTETPAPIECTAGATKTV DAPSSGSGGLTISPSGEGDV FYGKECT  
DSRGSVQQPAKGPATYTLSDGTPEKPGGEAGAPAGRNDGSSAPTPKDGSPGADGRVTS GFDPVS (SEQ ID  
NO.1) ;

[0039] 其编码基因如下:

[0040]

GGATCCGCCAGCGATCCGCCGCTGGTTGCCAACCAGGTTGTGACCTGCCCTGACAAAAAGAGCACCAGGTGGTACCGC  
ACTGACCGAACC GCCGACCCTGGCCTATAGCCCGAATCGTCAGATTGTCCGCCCGGCACCACCAGCAGCTGTACCA  
GTGGCAGCCCGGAAGCAGAAGATAGCTGGTGGACCGGTGATAGTGCCAGCCTGGATGGTGGTAAAGGCGATGATGCC  
CAGGGTAGCTATGGCGCCGATAGCACCTGGGCCCTGTAACTGAGTGCCGAAGGCCCTACCACAGGTGGTGTATGG  
TGTGAAGGTGCCGAGGATAACAACCAGTATTGCAGCGGCACCACCCTGACCGGCTGTAACGAAAAAGGCAGCCTGA  
CCGAGAATCCGTGGCAGGGTAATGCCAGCAGCGATAAAGGCGCCACACTGACCATCAAAAAGGAAGCCTTTCCGGCC  
GAAAGCAAGAGCGTTATCATTGGCTGCACCGGTGGTAGTCCGGA AAAACATGGTGGTGCAGCAGGTAGTGCCAAAAG  
CGCCGAGGTACCGCCGGTAGTAGCACCAACCGAAACCCCGGCCCGATTGAATGTACCGCCGGTGCAACCAAAACCG  
TTGATGCCCCGAGCAGCGGTAGCGGTGGTCTGACCATTAGTCCGAGTGGTGAGGGTGATGTGTTCTACGGTAAGGAG  
TGCACCGATAGCCGCGGTAGTGTGCAGCAGCCGGCAAAAAGTCCGGCCACCTATACCCTGAGCTATGATGGCAGCCC  
GGAGAAACCGGGTGGTGAAGCAGGTGCCCCGGCCGGTCGTAATAATGATGGTAGCAGTGCCCCGACCCGAAAGACG  
GTAGCCCGGGTGCAGATGGTCTGTTACCAGCGCTTTGATCCGGTTAGCCTGTAAAAGCT (SEQ ID NO.3)。

[0041] 下面结合具体实施例,进一步陈述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如美国Sambrook.J等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译,北京:科学出版社,2002年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0042] 实施例1

[0043] 1材料和方法

[0044] 1.1材料

[0045] 1.1.1质粒、菌种

[0046] E.coli BL21 (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司;质粒PET-28a (+) 为实验室保存。

[0047] 1.1.2相关试剂

[0048] 限制性内切酶BamHI、HindIII、T4DNA连接酶、2×PCR mix购自TaKaRa生物工程(大连)有限公司;ProteinRuler II (12-120 kDa) 购自北京全式金生物技术有限公司;弓形虫小鼠阳性血清为实验室分离保存;羊抗鼠IgG-HRP购自北京康为世纪生物科技有限公司;重组Protein G为实验室纯化保存。硝酸纤维素膜(Sartorius CN140)、玻璃纤维素膜(GL0194)、PVC胶板(DB-6) 购自上海杰一生物技术有限公司;氯金酸购自Sigma公司;其他化学试剂均为分析纯。

[0049] 1.2方法

[0050] 1.2.1弓形虫SAG重组基因的构建表达

[0051] 从GenBank中查出已公布的编码弓形虫表面抗原的SAG基因序列,分别分析SAG1和SAG2的T细胞抗原表位,合并抗原表位集中区段组建并优化目的基因序列,将目的基因与PET-28a(+)载体连接后,转化至BL21(DE3)感受态细胞,挑取完整单个菌落于含Kana的LB液体培养基中振荡培养,加入1mmol/L的IPTG诱导,使用His亲和层析柱对表达的重组蛋白进行纯化,Western blot检测重组蛋白的免疫原性。

[0052] 利用上述类似的方法制备SEQ ID NO.2所示的重组蛋白G(rSPG)。

[0053] 1.2.2胶体金最佳PH及最佳蛋白标记量的确定

[0054] 分别用K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和HCl调节1mL胶体金溶液pH至3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,加入50μL重组G蛋白,震荡10min后室温放置10min;然后每管分别加入100μL 10%NaCl溶液,震荡10min后室温放置10min;观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最低pH值。将胶体金溶液调至标记的最佳pH值后,依次加入浓度为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50μg/mL的rSPG,震荡10min后室温放置10min;然后每管分别加入100μL 10%NaCl溶液,震荡10min后室温放置10min,观察胶体金颜色变化,记录保持红色的最小重组蛋白G用量。

[0055] 1.2.3胶体金探针的制备

[0056] 烧制及贮存胶体金的所有玻璃器皿在酸缸中浸泡24h,取出后用去离子水反复冲洗,烘干备用。将100mL去离子水和1mL1%氯金酸置于250mL锥形瓶中,加热至沸腾。缓慢加入1.5mL的柠檬酸三钠,观察到溶液颜色由淡黄变黑最后逐渐稳定成紫红色后,继续煮沸15min,冷却至室温后定容到原体积。用0.2%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液PH至最佳值5.0。逐滴加入1.2mL 1mg/mL(浓度为12μg/mL)的rSPG,振荡15min后静置15min;加入10mL10%PEG20000,使其终浓度为1%,振荡15min后静置15min;2000r/min离心20min,弃沉淀;10000r/min离心30min,弃上清,沉淀用20mLTBS(1/5原体积)重悬。将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫上,使1.0cm<sup>2</sup>的金标垫中含有100μL的胶体金探针,将金标垫置于-80℃放置2h,真空干燥。

[0057] 1.2.4胶体金免疫层析试纸条的制备

[0058] 将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线。分别用rSAG和rSPG(0.5mg/mL)作为检测线(T线)和质控线(C线),SAG重组蛋白划线设置两个划线量,分别是1μL/cm、2μL/cm,重组蛋白G划线量是1μL/cm,划线后将底板置于37℃烘箱过夜烘干。将金标垫、样品垫、吸水纸依次贴于含有NC膜的底板上,用贴条机以0.3cm的宽度切条。试纸条的结构如图1所示。

[0059] 1.2.5试纸条检测结果的判定

[0060] 吸取待检血清滴加到试纸条的样品垫上,静置5min,若T线和C线均显色,则结果为阳性;T线不显色,C线显色,则样品为阴性;若C线不显色,则试纸条无效。阳性血清按1:10、1:20、1:40、1:80稀释,观察出现阳性反应的最高稀释倍数。

[0061] 2结果

[0062] 2.1重组蛋白表达纯化及Western blot鉴定结果

[0063] PET28(a)-SAG在大肠埃希氏菌杆菌BL21(DE3)中成功表达,并顺利纯化出大小约50kD的重组蛋白。Western blot结果显示,重组蛋白能够与小鼠阳性血清发生特异性结合,具有较好的免疫原性。实验结果如图2、3所示。

[0064] 2.2胶体金免疫层析试纸条检测小鼠血清

[0065] 重组蛋白rSAG划线量为2 $\mu$ L/cm的试纸条与阳性血清反应明显,rSAG划线量为1 $\mu$ L/cm的阳性血清反应不明显,结果反映为阳性;阳性血清浓度稀释至1:40仍可检测到明显的阳性反应;两种划线浓度制备的试纸条与阴性血清均不反应,结果反映为阴性(图4)。

[0066] 刚地弓形虫广泛存在于温血动物中,其中猫科动物为其终宿主和重要的传染源,中间宿主包括哺乳动物、鸟类、鱼类和爬行类等,现已知弓形虫存在于全球至少200多种动物体内,具有严重的危害性。目前,常见的弓形虫病诊断方法有病原学方法、分子生物学方法、免疫学方法等。其中病原学方法主要以从病料中直接检查速殖体或卵囊作为确诊标准,虽然操作简单,但判断需要一定的经验,而且检出率不高。分子生物学方法主要采用PCR技术进行诊断,其特点是灵敏、特异并可在早期做出诊断,但操作方法繁琐,时间长且费用较高,不易做基层推广。免疫学方法主要是采用IHA和ELISA法,IHA判断结果存在一定主观性;ELISA法过程繁琐,检测时间长,费用高。因此,寻找一种简便、快速、灵敏度高的诊断方法势在必行。

[0067] 本发明主要以截短的SAG1和SAG2基因表达的多抗原表位融合蛋白作检测线,SAG1和SAG2抗原都是弓形虫速殖子期特异性表膜抗原,以糖磷脂酰化形式锚定在细胞膜上,以阻止吞噬细胞对侵袭的弓形虫进行吞噬消化。SAG1主要与弓形虫毒力相关;SAG2与弓形虫入侵宿主细胞有密切的关系。有研究表明,弓形虫感染后的血清抗体能够识别SAG1和SAG2表面抗原,并已证实该基因编码的重组抗原可作为诊断抗原,用于弓形虫速殖子感染的免疫学检测。本发明发现了这两个蛋白的T细胞抗原表位,将这些抗原表位串联在一起集中表达,以取代原蛋白。这种方法将两个蛋白的抗原信息整合在一起,保留了两个蛋白的大部分抗原信息,克服了各自蛋白的缺点,显著地提高了检测的灵敏性和特异性。同时利用原核表达重组抗原,不仅产量高,易于纯化,可确保诊断抗原的规范化生产和质量控制。

[0068] 胶体金颗粒表面带阴性电荷,可以与蛋白质的正电荷基团通过静电感应发生物理吸附,物理吸附作用对蛋白质的生物活性影响较小,从而更容易标记。本次研究利用柠檬酸三钠还原法制备胶体金并标记重组G蛋白。该试纸条应用的重组G蛋白保留了G蛋白同多种哺乳动物血清IgG的Fc段结合特性,去除了同IgG的Fab段和血清白蛋白结合部位,不仅提高了同IgG的结合力,而且减少了非特异性反应。因此,本试纸条可以作为多种哺乳动物弓形虫病的血清抗体检测。

[0069] 用弓形虫的标准阴阳性血清检测研制的试纸条,获得了预期结果。本发明初步建立了快速检测弓形虫病的诊断方法,制备的试纸条灵敏度高、特异性强能够方便的用于哺乳动物弓形虫病的检测。

[0070] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

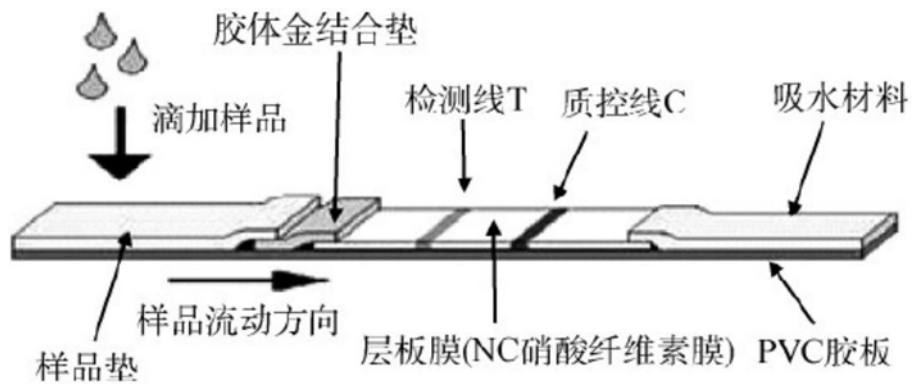


图1

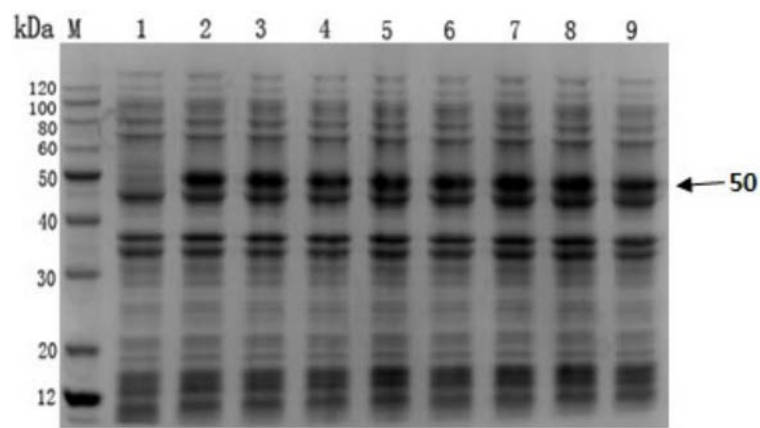


图2

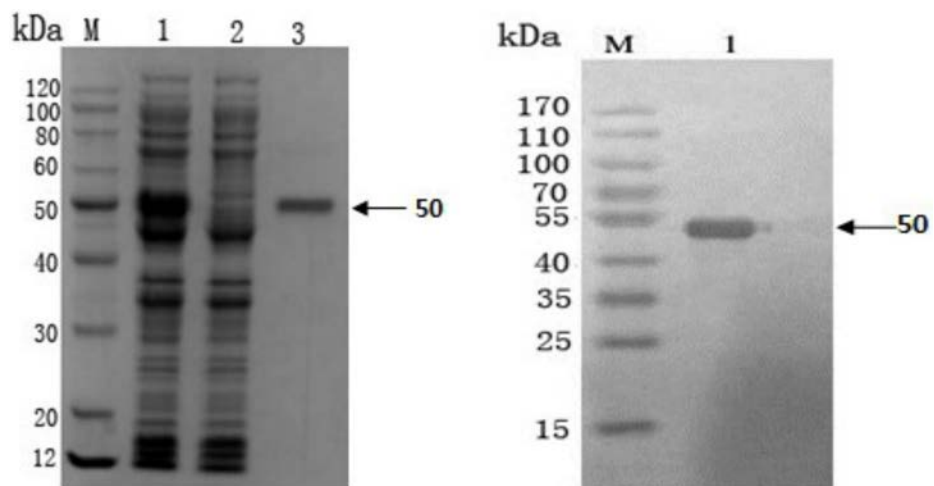


图3



图4

|                |                                                                       |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 弓形虫胶体金免疫层析试纸条及其制备方法                                                   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108267582A</a>                                          | 公开(公告)日 | 2018-07-10 |
| 申请号            | CN201611251800.6                                                      | 申请日     | 2016-12-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国农业科学院上海兽医研究所                                                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国农业科学院上海兽医研究所                                                        |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国农业科学院上海兽医研究所                                                        |         |            |
| [标]发明人         | 朱传刚<br>王钊哲<br>许瑞<br>林矫矫<br>陈兆国<br>洪炆<br>陆珂<br>李浩<br>吴思敏<br>李嘉静<br>江嘉欣 |         |            |
| 发明人            | 朱传刚<br>王钊哲<br>许瑞<br>林矫矫<br>陈兆国<br>洪炆<br>陆珂<br>李浩<br>吴思敏<br>李嘉静<br>江嘉欣 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531                                      |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/558 G01N33/531 G01N33/54306 G01N2333/45                        |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                        |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供了一种弓形虫病检测胶体金免疫层析试纸条，所述试纸条包括依照样品流动方向依次排列的样品垫、胶体金结合垫、检测线、质控线和吸水材料，其中，检测线中包括弓形虫特异性抗原。本发明提供的弓形虫胶体金免疫层析试纸条能够简单、方便的对人及多种哺乳类动物弓形虫进行快速检测。

