



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821627. X

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1639574A

[22] 申请日 2002. 10. 8 [21] 申请号 02821627. X
 [30] 优先权
 [32] 2001. 10. 31 [33] US [31] 60/334,811
 [86] 国际申请 PCT/IB2002/004125 2002. 10. 8
 [87] 国际公布 WO2003/038434 英 2003. 5. 8
 [85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 29
 [71] 申请人 辉瑞产品公司
 地址 美国康涅狄格州
 [72] 发明人 戴维·A·布雷克
 黛安娜·M·里特

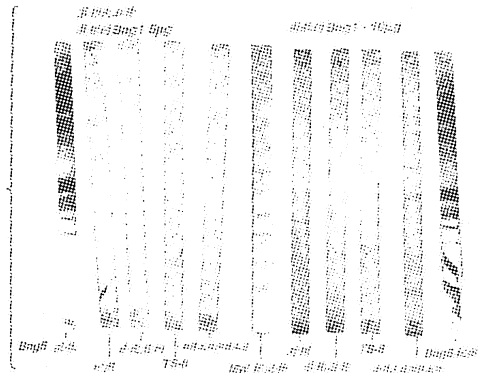
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 7 页 序列表 5 页
 附图 2 页

[54] 发明名称 新孢虫的血清学检测

[57] 摘要

本发明涉及接种新孢虫的动物的血清学检测，其通过将受试血清与能和新孢虫反应的蛋白质作用来进行。该蛋白可以是全长的天然或重组新孢虫或刚地弓形体慢殖子融合蛋白或者是截短的融合蛋白或者是它们的片段。可以将该蛋白用于任何大量测定，包括酶联免疫吸附测定(ELISA)，放射免疫测定(RIA)，Western 印迹和其他合适形式的免疫测定。



1. 区分天然新孢子血清反应阳性动物与用新孢子接种的动物的一种方法，其包括从动物获得血清样品和将该血清与刚地弓形体蛋白接触并检测血清结合抗体的存在。
- 5 2. 权利要求 1 的方法，其中所述刚地弓形体蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述刚地弓形体蛋白包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。
- 10 4. 权利要求 2 的方法，其中所述刚地弓形体蛋白是 BAG-1。
5. 权利要求 2 的方法，其中所述刚地弓形体蛋白是 BAG-5。
6. 权利要求 1 的方法，其中将所述蛋白附着于支持物。
7. 权利要求 1 的方法，其中检测用以证明结合抗体存在的蛋白的步骤用 Western 印迹进行。
- 15 8. 权利要求 1 的方法，其中检测用以证明结合抗体存在的蛋白的步骤用放射免疫测定法进行。
9. 权利要求 1 的方法，其中检测用以证明结合抗体存在的蛋白的步骤用酶联免疫吸附测定进行。
10. 权利要求 1 的方法，进一步包括测定结合于所述蛋白的抗体的量。
- 20 11. 对怀疑感染了新孢子的动物的诊断方法，其包括从动物获得血清样品和将该血清与刚地弓形体蛋白接触并检测血清结合抗体的存在。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述刚地弓形体蛋白包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或者 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。
13. 权利要求 12 的方法，其中所述刚地弓形体蛋白是 BAG-1 或者
- 25 BAG-5。
14. 检测血清样品中新孢子抗体的方法，其包括将该血清与刚地弓形体蛋白接触并检测血清中结合抗体的存在。
15. 区分天然新孢子血清反应阳性动物与用新孢子疫苗接种动物的一种方法，其包括从所述动物获得血清样品和将该血清与刚地弓形体蛋白片
- 30 段接触并检测血清结合抗体的存在。

新孢虫的血清学检测

5 发明领域

本发明涉及用受试血清与能和新孢虫(*Neospora caninum*)反应的蛋白质作用的方法进行新孢虫感染的血清学检测。

发明背景

10 在许多种动物中新孢虫和刚地弓形体(*Toxoplasma gondii*)是密切相关的致病的原生动植物寄生虫。新孢虫已经被认为是牛和其他动物流产,神经学相关的肢体缺陷和新生儿死亡率的原因。刚地弓形体是绵羊流产的常见原因。有效的控制新孢虫病和弓形体病需要快速诊断。因此开发有效的针对新孢虫的诊断试验是重要的。

15 有几种本领域已知的试验能够判断动物是否已经暴露过新孢虫。但是,迄今没有开发出可以区分新孢虫天然血清阳性动物和新孢虫接种动物和/或新孢虫血清反应阴性(未接种)动物的诊断试验和方法。

发明概述

20 本发明首次提供一种区分新孢虫天然血清阳性动物和新孢虫疫苗接种过的动物的方法。本发明也提供用血清学测定判断动物是否已感染新孢虫的方法。

本发明一方面提供检测血清样品中新孢虫抗体的方法,其通过将血清与刚地弓形体蛋白接触并检测血清中结合抗体的存在。

25

附图简述

图 1 显示对截短的 BAG1-GST 的 Western 印迹反应

泳道 1: 抗全长 BAG1-GST 的兔抗血清(阳性对照)

泳道 2: 天然的(naïve)血清反应阴性母牛的血清(阴性对照)

30 泳道 3: 新孢虫灭活疫苗免疫 49 天的母牛的混合抗血清

泳道 4: 新孢虫减毒疫苗免疫 49 天的母牛的混合抗血清

泳道 5: 自然感染的血清反应阳性的母牛的混合抗血清

泳道 6: 分子量标准(kDa)

图 2: 显示对截短的和全长的 BAG1-GST 的 Western 印迹反应

泳道 1 - 4: 截短的 BAG1-GST 抗原

5 泳道 5: 分子量标准(kDa)

泳道 6 - 9: 全长 BAG1-GST 抗原

泳道 1, 6: 天然的血清反应阴性母牛的血清(阴性对照)

泳道 2, 7: 新孢子虫灭活疫苗免疫 119 天的母牛的混合抗血清

泳道 3, 8: 新孢子虫减毒疫苗免疫 119 天的母牛的混合抗血清

10 泳道 4, 9: 自然感染的血清反应阳性母牛的血清

泳道 5: 分子量标准(kDa)

发明详述

本发明提供一种测定系统，其能够区分接种的和自然暴露于新孢虫的
15 血清反应阳性动物。依照本发明，已经发现刚地弓形体和新孢虫的蛋白只
存在于天然血清反应阳性的动物中。以本发明方法提供的测定结果为基础，
现在可以将新孢虫血清反应阴性的动物及以前用新孢虫为基础的疫苗接种
过的动物(参见例如，美国序列第 09 / 260, 414 号“减毒活新孢虫疫苗”，
在此引入以作参考和美国序列第 09 / 138, 985 号“新孢虫疫苗”，在此引
20 入以作参考)与血清反应阳性(即天然暴露的)动物可靠地区分和隔离。

暴露过新孢虫的动物的血清会与刚地弓形体和新孢虫蛋白以及它们的
片段反应。“反应”意思是形成可检测到的抗原 - 抗体复合物。抗原抗体复
合物的形成是预示着动物天然感染了新孢虫。以前接种过新孢虫的动物的
血清和天然新孢虫血清反应阴性的动物的血清不会与刚地弓形体和新孢虫
25 蛋白以及它们的片段反应。因此，本发明提供区分接种过(血清反应阴性)
和天然暴露于新孢虫 - 血清反应阳性的动物的方法。

而且，依照本发明，如果希望，可以基于本发明的测定结果对新孢虫
血清阳性动物进行接种。本发明所考虑的动物包括牛(cattle)，小牛(calves)，
公牛(bulls)，母牛(cows)和阉牛(steer)。优选地，将本发明的方法应用于母牛，
30 最优选，应用于小牛。

按照本发明，源于刚地弓形体或新孢虫的任何纯化的，天然的或重组的慢殖子抗原或其片段，可被用作本发明的血清学测定的检测抗原。“片段”意思是全长的刚地弓形体或新孢虫蛋白的部分肽段，其提供存在于动物血清中的抗体识别的表位。按照本发明，全长刚地弓形体或新孢虫蛋白的截断形式也理解为片段。

在一个实施方案中，全长慢殖子抗原谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白(BAG-1)是检测抗原，(SEQ ID NO.2)。在另一实施方案中，缺少 BAG-1 的 N-末端 28 个氨基酸的截短的 BAG-1-GST 融合蛋白是检测抗原，(SEQ ID NO.3)。在本领域中 BAG-1 也称作 BAG-5。本发明打算将自然感染新孢虫的动物的抗血清或者接种过新孢虫的动物的抗血清或者未经过感染(uninfected)的抗血清用作试验样品。

按照本发明，当慢殖子抗原或其片段被固定在固相支持物上时，其反应性便提供了检测新孢虫抗体的方法。特别是，本发明方法的进行可以通过将动物血清样品与慢殖子-阶段的蛋白或其片段接触，然后反应形成抗原抗体复合物，并用传统的检测和定量方法检测反应产生的复合物。“抗体”意思是能与抗原上特异表位结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是多克隆的混合物或者是单克隆的。抗体可以是天然来源或者重组来源的完整的免疫球蛋白，也可以是完整免疫球蛋白的免疫反应部分。

已知有许多检测抗原抗体复合物的量和/或其存在与否的方法，所有这些方法也是本发明所考虑的。例如，Western 印迹测定的进行可以通过将抗原附着于固体支持物如硝酸纤维素纸上，将该纸与血清检测样品保温，并检测硝酸纤维素滤纸上在全长(约 55kDa)或截短的(约 51kDa)刚地弓形体 BAG1-GST 蛋白预期分子量处特异条带存在与否。在两个预期分子量处的任何一处存在条带，都说明该动物是新孢虫血清阳性。相反地，两个预期分子量处的任何一处条带都缺失说明该动物是接种过的。

本发明也考虑用 Western 印迹测定，其中将抗原附着在硝酸纤维素纸上并且将抗原用有染料附着的抗体染色。也可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)，其中抗原或抗体是用酶标记的。本发明也打算用放射免疫测定法，其中抗原或抗体是用放射性元素标记的。

本发明打算提供检测动物血清中新孢虫抗体的存在 / 量或缺失的方法。因此, 含有测定试剂(assay)和阳性和 / 或阴性反应对照, 和其他必需成分的诊断测定试剂盒可以按照本发明所讲授来组合。

本领域的技术人员可以理解, 在不背离广义描述的本发明的精神或范围情况下, 可以对具体实施方案所示的本发明进行许多变动和 / 或修改。因此, 这些实施方案在各个方面只作说明而不是限制。

实施例 1

新孢虫血清反应阴性动物和新孢虫接种动物的抗血清

10 可以使用任何血清反应阴性或 PCR 阴性动物的血清样品, 该动物随后接受新孢虫速殖子(tachyzoite)为基础的改良活疫苗, 灭活的或亚单位为基础的疫苗。在本实施例中, 经有资格的兽医诊断实验室(Washington State Diagnostic Lab, Pullman, WA)用诊断性 ELISA 试验判定 4 个月龄小牛是血清反应阴性。将小牛在 0 天和 21 天用基于速殖子的 i)改良的、活的、减毒新孢虫疫苗(USPTO 专利申请第 09 / 260, 414 号“减毒活新孢虫疫苗”, 在此引入以作参考), 或者 ii)灭活的、全细胞匀浆物新孢虫疫苗(USPTO 专利申请第 09 / 138, 985 号“新孢虫疫苗”, 在此引入以作参考)接种。两种疫苗都是基于速殖子抗原的, 以该抗原作为疫苗的保护成分。新孢虫改良的、活的、减毒疫苗每剂含有 5×10^7 Ncts-8 个速殖子并且皮下给予 3 个血清反
15 应阴性动物。新孢虫灭活的匀浆物疫苗每剂含有 100ug 总速殖子蛋白, 配制在皂角甙为基础的佐剂中(750ug Quil A/150ug 胆固醇)并经皮下给予 3 个血清反应阴性动物。接种后 49 和 119 天, 将每种疫苗组的 3 个小牛的血清收集, 汇集并分装冻存于 -20°C 直至进行血清学测定试验(参见实施例 4)。

25 实施例 2

新孢虫自然感染的, 血清反应阳性动物的抗血清

可以使用任何自然感染的, 血清反应阳性或 PCR 阳性动物的血清样品。在本实施例中, 经有资格的兽医诊断实验室(Washington State Diagnostic Lab, Pullman, WA)用诊断性 ELISA 试验判定所购牛群中每个动物的血清学状态。
30 将该试验报告为血清反应阳性的 21 个动物进行鉴定。将每个血清反应阳性

动物的血清样品收集, 汇集, 并分装冻存于 -20°C 直至进行血清学测定试验(参见实施例 4)。

实施例 3

5 新孢子血清学试验使用的慢殖子抗原

可以使用任何纯化的, 天然的或重组的新孢子或刚地弓形体慢殖子蛋白(刚地弓形体慢殖子蛋白 BAG1; Genebank 编号 U23944)。在本实施例中, 使用刚地弓形体慢殖子抗原, BAG1(本领域也称作 BAG5)的两种不同的重组制备的形式。第一种形式是用亲和层析从大肠杆菌表达和纯化的全长
10 BAG1-谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白(S. F. Parmley, et. al. 1995. Mol. Biochem. Parasit. 73: 253-257, 在此引入以作参考)。第二种形式是用亲和层析从大肠杆菌表达和纯化的、缺少头 28 个氨基酸的截短的 BAG1-GST 融合蛋白(Parmley et al., 1995)。将纯化的、重组的全长 BAG1-GST 和截短的 BAG1-GST 蛋白冻存在 -20°C 直至进行血清学测定试验(实施例 4)。

15

实施例 4

血清学试验

可以使用任何本领域已知的以抗体为基础的检测试验(ELISA, 竞争 ELISA, RIA, Western 印迹等等)。在本实施例中, 使用 Western 印迹测定。
20 将总量 5mg 的刚地弓形体全长 BAG1-GST 或截短的 BAG1-GST 蛋白溶解, 与 $5 \times$ 变性上样缓冲液(Pierce, IL.)混合并上样至预制的 4 - 20% Tris-甘氨酸连续梯度凝胶(Novex, San Diego, CA) 的 $1\text{mm} \times 2$ 孔上。将凝胶按照生产商的说明书于 125V 电泳 1.5 小时。于 25V 持续 1 小时将凝胶印迹于 $20 \mu\text{M}$ 硝酸纤维素膜上(Bio-Read, Hercules, CA)。将膜干燥并切成同样长度 / 宽度
25 的条。将这些条在封闭缓冲液(含 5%脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液(PBS))中室温保温过夜, 用 PBS 洗涤, 然后与血清检测样品(上面实施例 1 或 2 来源的)保温。

将实施例 1 和 2 来源的分装的血清检测样品在室温溶解并用 PBS 配制
成 1:200 的新鲜制备的稀释液。将天然的血清反应阴性的母牛血清用作阴性
30 对照(1:200 稀释)。抗全长 BAG1-GST 的兔抗血清用作阳性对照(M.

McAllister 惠赠; M. McAllister, et. al., 1996. J. Parasitol. 82 (2): 354-355)并在使用前用 PBS 作 1:12,500 稀释。

将每个试验条(实施例 3 制备的)加入每个稀释的血清样品并于室温保温 1 小时。将所述条在含有 0.05% Tween 20 的 PBS(PBST)中短暂洗涤 2 次并加入亲和纯化的、磷酸酶标记的山羊抗牛 IgG 1:400 的 PBS 稀释液(KPL, Gaithersburg, MD.)。于室温保温 1 小时后,将所述条在 PBST 中短暂洗涤 2 次,然后在磷酸酶底物 BCIP/NBT(KPL, Gaithersburg, MD.)中保温。适当显色后(大约 10 分钟)将所述条短暂放于双蒸水中终止酶反应。然后将所述条在空气中干燥。结果如图 1 所示。

10

实施例 5

血清学试验的解释

血清学检测阳性指示试验血清样品和新孢子虫或刚地弓形体慢殖子抗原之间特异反应的存在。在本实施例中,通过判定在全长(大约 55kDa)或截短的(51kDa)刚地弓形体 BAG1-GST 蛋白预期分子量处特异条带的存在或缺失,来检测实施例 4 中使用的条的特异反应。

如图 1 所示,泳道 5,在与新孢子虫自然感染的牛汇集血清保温的条中,存在大约 52 - 55kDa 的条带,说明在新孢子虫自然感染的血清反应阳性试验样品和截短的 BAG1-GST 慢殖子抗原之间有特异反应。相反,图 1 的泳道 3 和 4,未检测到抗 55kDa BAG1-GST 蛋白的反应,说明新孢子虫接种的试验样品缺乏特异反应。

如图 2 所示,泳道 4 和 9,在与新孢子虫自然感染的牛汇集血清保温的条中,存在大约 52 - 55kDa 条带,说明在新孢子虫自然感染的血清反应阳性试验样品和截短的(泳道 4)或全长的(泳道 9)BAG1-GST 慢殖子抗原之间有特异反应。相反,图 2 的泳道 2 和 7,用新孢子虫灭活疫苗免疫 119 天的母牛汇集抗血清未检测到抗任何一种形式 BAG1-GST 蛋白的反应。相似地,图 2 的泳道 3 和 8,用新孢子虫减毒疫苗免疫 119 天的母牛汇集抗血清未检测到抗任何一种形式 BAG1-GST 蛋白的反应。

本发明中描述的对刚地弓形体重组慢殖子抗原反应的差异证明利用慢殖子抗原的血清学试验可以区分或诊断新孢子虫自然感染的和新孢子虫接种的动物。源自新孢子虫(例如 SEQ ID No.1 或 2)或新孢子虫(例如 SEQ ID No. 3

或 4)的任何纯化的, 天然的或重组的慢殖子抗原或其片段, 可被用作此诊断试验的检测抗原。任何源自新孢子虫自然感染的或新孢子虫接种的动物的抗血清可被用作此诊断试验的试验样品。

<110> 辉瑞产品公司 (PFIZER PRODUCTS INC.)

<120> 新孢虫的血清学检测

<130> PC23020A

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1219

<212> DNA

<213> 刚地弓形体 (Toxoplasma gondii)

<220>

<221> CDS

<222> (219)..(905)

<220>

<221> CDS

<222> (303)..(905)

<400> 1

tgcttttgcc aaaggagacc tgtgtgcaga ggacttcgct gctaaaaagc agaagagtgc 60

acggcgtgtg tagctcagtg gcatttcggg actcggctctt gcgtcgttcg cgactggagc 120

tcgtcgtctg tgagagcgtc aaactagga gaagggcgcc gccagagcgt tcgaaaatt 180

atctgcaaag cccaggtccc gtatgatatt caaaaaag atg gcg ccg tca gca tcg 236

Met Ala Pro Ser Ala Ser

1

5

cat ccg ccg gga gct tgt cca ccg gga tgt acc aag cat cct gct act 284

His Pro Pro Gly Ala Cys Pro Pro Gly Cys Thr Lys His Pro Ala Thr

10

15

20

gcg aca gcc att tcc ccg agt gga gtg tgt ccc atg cgt gcg ttc cat 332

Ala Thr Ala Ile Ser Pro Ser Gly Val Cys Pro Met Arg Ala Phe His	
25	30
35	
ccc gcg ggg cct cac tca cat ttc tca tgt tac gat gat ctc aga aat	380
Pro Ala Gly Pro His Ser His Phe Ser Cys Tyr Asp Asp Leu Arg Asn	
40	45
50	
agg ctg agt cac gac aaa aat gtt cga ccg gtc gcc tct caa cag cta	428
Arg Leu Ser His Asp Lys Asn Val Arg Pro Val Ala Ser Gln Gln Leu	
55	60
65	70
gac tat ttg gat gaa gta agc ccg ttt gct ctg gcg tac tac cct ccc	476
Asp Tyr Leu Asp Glu Val Ser Pro Phe Ala Leu Ala Tyr Tyr Pro Pro	
75	80
85	
ccg ttt tgg ggt gga gtc ggt ctt aat ccc atc gac gat atg ttg ttc	524
Pro Phe Trp Gly Gly Val Gly Leu Asn Pro Ile Asp Asp Met Leu Phe	
90	95
100	
gag acg gcc ctc acc gca aac gaa atg atg gag gac atc acg tgg aga	572
Glu Thr Ala Leu Thr Ala Asn Glu Met Met Glu Asp Ile Thr Trp Arg	
105	110
115	
ccc aga gtc gac gtg gag ttc gac agc aaa aag aag gaa atg att att	620
Pro Arg Val Asp Val Glu Phe Asp Ser Lys Lys Lys Glu Met Ile Ile	
120	125
130	
ttg gct gac ttg cca ggt ctt cag aaa gat gac gta acc ata gaa gtc	668
Leu Ala Asp Leu Pro Gly Leu Gln Lys Asp Asp Val Thr Ile Glu Val	
135	140
145	150
gac aac gga gcc atc gtt atc aaa gga gag aag acc tcg aaa gaa gcg	716
Asp Asn Gly Ala Ile Val Ile Lys Gly Glu Lys Thr Ser Lys Glu Ala	
155	160
165	
gag aaa gtg gac gat ggc aaa aca aag aac att ttg act gag cga gtg	764
Glu Lys Val Asp Asp Gly Lys Thr Lys Asn Ile Leu Thr Glu Arg Val	
170	175
180	
tcc ggt tat ttt cgc gcc cgg ttc cag ctc ccg agt aat tac aag ccc	812
Ser Gly Tyr Phe Arg Ala Arg Phe Gln Leu Pro Ser Asn Tyr Lys Pro	
185	190
195	
gac gga atc agt gcg gca atg gac aac ggc gtt cta cgt gtc acg atc	860

Gly Ala Lys Gln Gln Ile Ser Val Lys
 195 200

<210> 4

<211> 672

<212> DNA

<213> 新孢虫 (Neospora caninum)

<400> 4

```

cccccttctt ctctccgttt caagatgagc aagctcagca cagacggcct gaagaaggcc 60
atcggagaga tcttgagggg ctgcgaggaa aagaagagaa agttcgtgga gaccgtcgag 120
cttcagatcg gtttgaagga ttacgacacc caaagagaca agcgtttcag cggaagcgtg 180
aggcttccta acgtcccccg cccccgatg cgcgtgtgcg tgatgggaga tgctgtgcat 240
tgcgagcaag caaaggagct gggactggaa ttcatggacg tggaggctat gaagaagttg 300
aacaagaaca agaagcttgt gaagaaactc gcacggaagt acgacgcttt cctggcctcg 360
caagtgttga ttccgagat cccccgtctc ctgggtccgg gtcttaacaa ggcgggcaaa 420
ttcccgacgc ttatcactca caacgataag ctcgaggata agattcagga natcaagagc 480
tcaatcaaat tccaactcag aaaggtgcct gtgcatggtg tcgccgtcng gcacgtcgac 540
atgacggagg agcaactgcg cgtgaacctg aactggcca tcaacttctt tgtctctctg 600
ctgaagaaga actggaacag cgtgagaacg ctgcacatca agagcaccat gggcaagcct 660
cagcagattt ac 672

```

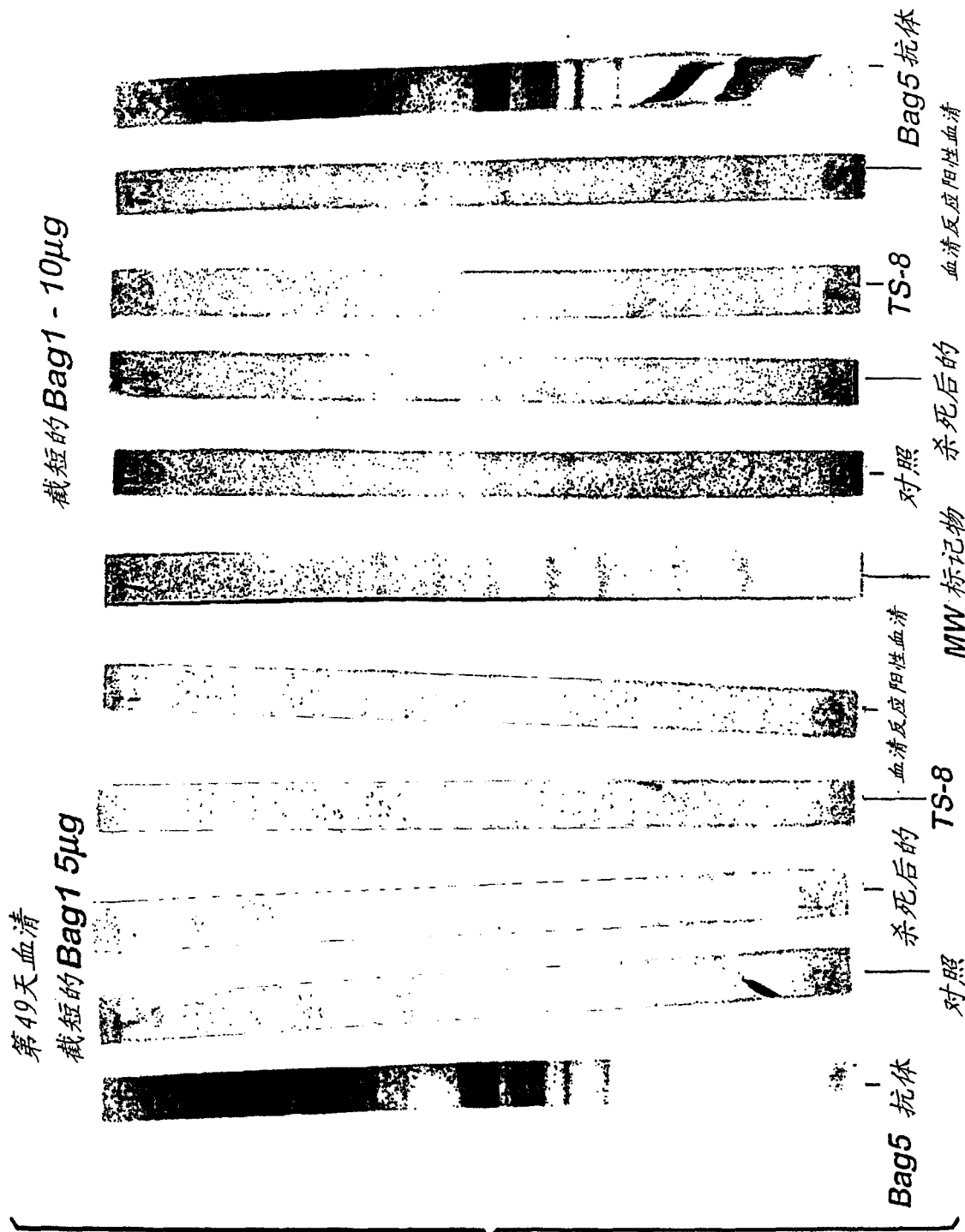
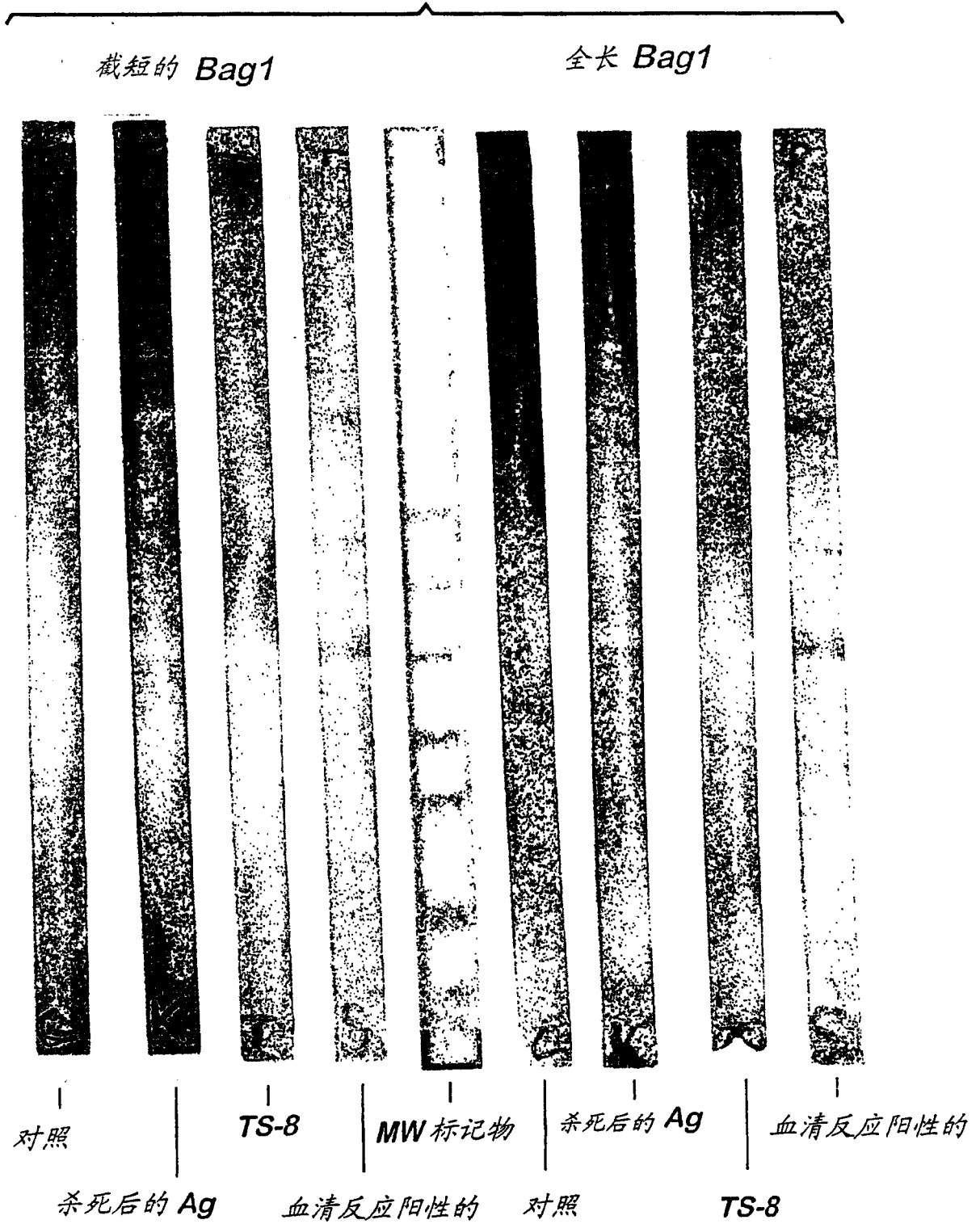


图 1

图 2



专利名称(译)	新孢虫的血清学检测		
公开(公告)号	CN1639574A	公开(公告)日	2005-07-13
申请号	CN02821627.X	申请日	2002-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	戴维 A 布雷克 黛安娜 M 里特		
发明人	戴维·A·布雷克 黛安娜·M·里特		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/45 C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56905 G01N2333/44 G01N2333/45 G01N2469/20		
优先权	60/334811 2001-10-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及接种新孢虫的动物的血清学检测，其通过将受试血清与能和新孢虫反应的蛋白质作用来进行。该蛋白可以是全长的天然或重组新孢虫或刚地弓形体慢殖子融合蛋白或者是截短的融合蛋白或者是它们的片段。可以将该蛋白用于任何大量测定，包括酶联免疫吸附测定(ELISA)，放射免疫测定(RIA)，Western印迹和其他合适形式的免疫测定。

