

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101661044 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 16

(21) 申请号 200810042130. 6

(22) 申请日 2008. 08. 27

(73) 专利权人 复旦大学附属华山医院
地址 200031 上海市乌鲁木齐中路 12 号
专利权人 复旦大学

(72) 发明人 张文宏 陈嘉臻 王森 苏晓迪
张颖 王洪海 张舒 邵凌云

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268
代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

审查员 许珊萍

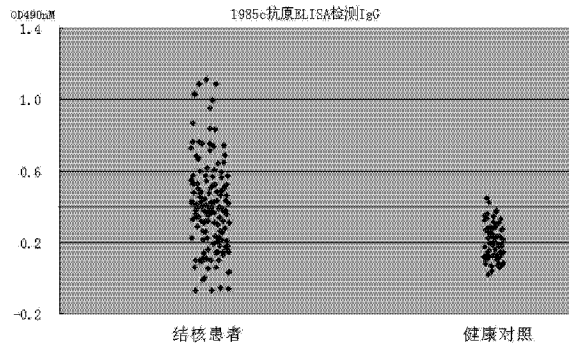
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种结核病诊断试剂及试剂盒

(57) 摘要

本发明属诊断试剂领域,涉及含结核分支杆菌 Rv1985c 蛋白的诊断试剂及试剂盒。本发明可对受试者血液或体液作出是否感染结核分支杆菌的快速诊断,从免疫胶体金的 15 分钟到 ELISA 的 5 个小时不等。作为诊断试剂用于被临床证实的活动性结核时,单独使用 Rv1985c 抗原检测敏感性达到 59%,特异性 96%;与其他诊断抗原(如与对照抗原 LAM/38kDa)合并使用使,可进一步提高诊断敏感性,达 75%,具有较高临床应用价值。本发明的检测只需要单份血清样品,化验简单、快速、不需要专业实验室设备,成本低廉,当天可得到结果,非常适合广大乡镇农村医院和战地条件下的结核感染检测。



1. 一种结核病诊断试剂,其特征在于含结核杆菌 Rv1985c 蛋白抗原,该蛋白抗原具有序列 1 的氨基酸序列,所述的结核杆菌 Rv1985c 蛋白抗原包含 303 个氨基酸,分子量 32.8kDa,等电点 pI 为 9.05。

2. 按权利要求 1 所述的结核病诊断试剂,其特征在于,所述的结核杆菌 Rv1985c 蛋白作为抗原由结核分枝杆菌或其它分枝杆菌表达,经抗原或结核杆菌感染人体后,使 B 淋巴细胞产生相应抗体,该抗体与所述的 Rv1985c 蛋白抗原特异结合。

3. 按权利要求 2 所述的结核病诊断试剂,其特征在于,所述的抗体通过抗原抗体免疫反应被检测。

4. 按权利要求 3 所述的结核病诊断试剂,其特征在于,所述的抗原抗体免疫反应包括定量或定性的沉淀实验,免疫荧光实验,小吞噬实验, E 花环实验, ELISA 实验,斑点免疫金渗滤实验和胶体金免疫层析法实验。

5. 一种快速检测结核病的试剂盒,其特征在于包含如权利要求 1 所述的结核杆菌 Rv1985c 蛋白抗原 ;所述试剂盒通过酶联免疫吸附实验进行检测。

一种结核病诊断试剂及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属诊断试剂领域,涉及结核病诊断试剂及试剂盒,具体涉及含结核分支杆菌 Rv1985c 蛋白的诊断试剂及试剂盒。

背景技术

[0002] 结核病是当今全球面临的主要公共健康问题之一,它的病原体是结核分枝杆菌,属分枝杆菌属。据报道,全世界每年约有 800-1000 万新发结核病例,每年有 200-300 万人因此而失去生命。结核病已成为引起成年人死亡的头号传染病。据 WHO 报道,全球三分之一的人口(约 20 亿)已感染了结核杆菌,如不采取措施,近 10 年内还将有约 3 亿人受结核杆菌感染。据第四次全国流行病学调查显示,我国受结核杆菌感染人数超过 4 亿,每年有 13 万人死于结核病,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。

[0003] 特异性抗原诊断一直是确认病原体感染及评估感染状况较为可靠的方法,且有早期诊断价值,已经在 HBV、HCV、HIV 等疾病的诊断方面获得了广泛的应用。目前,临床结核病诊断广泛使用皮肤检测试剂:结核分枝杆菌纯蛋白衍生物(PPD)。然而,结核分枝杆菌纯蛋白衍生物存在与环境分枝杆菌以及结核病疫苗即卡介苗(*M. bovis* BCG)菌株的交叉反应,其诊断价值被削弱。而血清学检测具有快速、特异、简便和廉价等特点,因此,研制出安全简便的特异性血清学诊断试剂极为迫切。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种新型的结核病诊断试剂,具体涉及含结核分支杆菌 Rv1985c 蛋白的诊断试剂。

[0005] 本发明公开了一种基于血清学方法的结核杆菌检测抗原 Rv1985c 蛋白。该来自于卡介苗基因组相对结核分枝杆菌缺失的区域(RD2 区),由结核分枝杆菌基因 Rv1985c 所编码的蛋白。结核杆菌 Rv1985c 蛋白包含 303 个氨基酸,分子量 32.8kDa,等电点 pI 为 9.05。该蛋白具有序列 1 的氨基酸序列。

[0006] 所述的 Rv1985c 蛋白可由结核分枝杆菌或其它少数几种分枝杆菌表达,该抗原感染人体后或经结核杆菌感染后,能被 Th 细胞所识别,刺激合成 B 细胞生长和分化因子。在 Rv1985c 抗原和 B 细胞分化因子的共同作用下 B 细胞活化和增值,并最终在淋巴器官的 T 细胞区中分化成为浆细胞,并产生针对该抗原的抗体,该抗体能够特异地与 Rv1985c 蛋白发生免疫反应。通常抗体存在于体液或其它介质中,包括痰液、血清、尿液、脑髓液、肺泡灌洗液、胸腔积液等。抗体生物学实质是一类免疫球蛋白,主要分为 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE 五类,其中具有诊断价值的主要是 IgG 和 IgM。

[0007] 所述的 Rv1985c 蛋白能制成诊断试剂用于结核病的免疫反应检测。

[0008] 本发明所涉及的可用于检测的免疫反应包括凝集实验,沉淀实验,免疫荧光实验,小吞噬实验, E 花环实验, ELISA 实验,斑点免疫金渗滤实验,胶体金免疫层析法等。典型诊断用免疫试验是酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA),

由于大多数蛋白都可与塑料或聚酯板非特异性结合,可通过将含抗体的待测样品与包被 Rv1985c 抗原的塑料板相互作用,形成的抗原抗体复合物与酶联的第二抗体进行反应,洗去未结合的酶标抗体,加入底物后产生带有颜色的产物,在检测仪上测得增加的光吸收值。

[0009] 本发明上下文中所述蛋白除了通常所指的一种氨基酸聚合物,还应该包括其类似物。所述类似物,是指其特性与所述蛋白相同,包括其同样可以与抗体特异性地结合。通常包含一部分蛋白序列,代表性的是所述类似物具有相同的形状、大小、柔韧性、电子排布等。

[0010] 上述抗原的典型类似物是肽。它可与上述蛋白序列同源。这种同源肽通常具有至少 75% 的同源性,优选至少 90%、95% 的同源性。其不同一般来自于氨基酸残基的替换、插入、缺失和修饰,可发生在序列的 N 端、C 端或其他任何位置上。具有代表性的是类似物可以结合到相同的抗体分子上,且类似物中处于等价位置上的氨基酸与原始肽中的那些抗原序列相同或保守。

[0011] 所述的修饰,通常指的是天然的转录后修饰或人工修饰。修饰可提供化学部分的改变,包括氨基、乙酰基、羟基、卤素基团和碳水化合物基团。具有代表性的是一种是氨基酸侧链的修饰,即形成一个或多个非天然氨基酸。

[0012] 所述的蛋白和多肽可以通过天然分离获得,也可以通过人工合成。一种具有代表性的方法是用较长的融合蛋白制备上述肽段,此融合蛋白包含上述代表性的肽段序列。所述肽也可由多肽经过物理或化学裂解所产生。

[0013] 此外,本说明书中涉及所有氨基酸序列都是从 N 端到 C 端的。

[0014] 本发明的另一重要目的是提供一种快速检测结核感染的方法,主要包括以下步骤:

[0015] a) 使用 Rv1985c 抗原包被 96 孔板或其他吸附蛋白介质;

[0016] b) 采集待测样品,通常是受试者的血清,稀释一定倍数;

[0017] c) 将稀释后样品加入介质中与 Rv1985c 反应;

[0018] d) 加入酶联或胶体金等染料偶联试剂,该试剂能与 Rv1985c 抗原抗体复合物特异反应。典型的试剂如:酶联 Rv1985c 多肽,Protein A,抗 IgG、IgM 二抗等;

[0019] e) 直接显色或加入显色剂显色;

[0020] f) 肉眼或仪器读取颜色的改变,以超过一定域值的颜色改变判定为阳性检测。

[0021] 具体可参照实施方案 1 和 2。

[0022] 值得注意的是,该方法至少使用 Rv1985c 一种抗原用于检测相应抗体,但不局限于该种抗原。与其他有较高诊断价值的结核抗原,如 LAM, 38kDa, 30kDa, 16KDa, A60 等抗原一起使用,可以提高检测的阳性检出率。

[0023] 实施例 1 中,联合使用 LAM 和 38KDa 抗原,可使阳性检测率从 59% 提高到 75%,同时检测保持很高的特异性。

[0024] 本发明的再一个目的是提供一种快速检测结核病的诊断试剂盒。它包含上述重组蛋白 Rv1985c 和 Rv1985c 抗体的阳性对照试剂,这类试剂可以是含 Rv1985c 阳性抗体的动物血清或通过杂交瘤细胞培育出的 Rv1985c 单克隆抗体。如待测者体液中抗体的滴度超过了阳性对照试剂,则判定为阳性。

[0025] 本发明的试剂盒中,除了有重组抗原 Rv1985c 和其特异性抗体外,还应有用于检测的各种试剂和器具,包括各种缓冲液、稀释液、反应液和终止液。在本发明的一个实施例

中,结核检测试剂盒还包括如下试剂和物品:

[0026] 1) 包被缓冲液(0.05M 碳酸盐缓冲液), pH9.6 :1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 。

[0027] 2) 洗涤液(PBST), pH7.4 :8g NaCl , 0.2g KCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.5ml Tween-20, 1L H_2O 。

[0028] 3) 封闭液(0.1% BSA/PBS), pH7.4 :8g NaCl , 0.2g KCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1g BSA(牛血清白蛋白), 1L H_2O 。

[0029] 4) 底物缓冲液, 0.2M Na_2HPO_4 (28.4克/L) 25.7ml, 0.1M 柠檬酸(19.2克/L) 24.3ml, 加蒸馏水 50ml。

[0030] 5) 显色液:20ml 底物缓冲液, 8mg OPD, 25 μ l 30% H_2O_2 。

[0031] 6) 终止液(2M H_2SO_4), 200ml :21.32ml H_2SO_4 , 178.68ml H_2O 。

[0032] 7) 过氧化物酶标记山羊抗人 IgG 和 IgM。

[0033] 8) 96孔酶标板(Nalge Nunc International)

[0034] 本发明提供了特异性和敏感性俱佳的结核快速检测试剂,可对受试者血液或体液作出是否感染结核分支杆菌的快速诊断,从免疫胶体金的15分钟到ELISA的5个小时不等。作为诊断试剂用于被临床证实的活动性结核时,单独使用 Rv1985c 抗原检测敏感性达到59%,特异性96%;与其他诊断抗原(如与对照抗原 LAM/38kDa)合并使用使,可进一步提高诊断敏感性,达75%,具有较高临床应用价值。本发明的检测只需要单份血清样品,化验简单、快速、不需要专业实验室设备,成本低廉,当天可得到结果,非常适合广大乡镇农村医院和战地条件下的结核感染检测。

附图说明

[0035] 图1是1985c抗原ELISA检测结果。

具体实施方式

[0036] 实施例1制备结核检测试剂及试剂盒

[0037] 本发明的试剂盒中,含有重组抗原 Rv1985c 和其特异性抗体,还含有用于检测的各种试剂和器具,包括各种缓冲液、稀释液、反应液和终止液,具体包括如下试剂和物品:

[0038] 1) 包被缓冲液(0.05M 碳酸盐缓冲液), pH9.6 :1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 。

[0039] 2) 洗涤液(PBST), pH7.4 :8g NaCl , 0.2g KCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.5ml Tween-20, 1L H_2O 。

[0040] 3) 封闭液(0.1% BSA/PBS), pH7.4 :8g NaCl , 0.2g KCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.1g BSA(牛血清白蛋白), 1L H_2O 。

[0041] 4) 底物缓冲液, 0.2M Na_2HPO_4 (28.4克/L) 25.7ml, 0.1M 柠檬酸(19.2克/L) 24.3ml, 加蒸馏水 50ml。

[0042] 5) 显色液:20ml 底物缓冲液, 8mg OPD, 25 μ l 30% H_2O_2 。

[0043] 6) 终止液(2M H_2SO_4), 200ml :21.32ml H_2SO_4 , 178.68ml H_2O 。

[0044] 7) 过氧化物酶标记山羊抗人 IgG 和 IgM。

[0045] 8) 96孔酶标板(Nalge Nunc International)

[0046] 实施例2ELISA实验检测肺结核

[0047] 检测的样本为血清,采集全血加入 2.0mg/ml 的 EDTA 抗凝剂后,离心 3000rpm, 10min 后,收集上清部分。保存时可以分装入冻存管存放入 -70 度冰箱。此实施例样本分为两组:肺结核患者和健康者对照。

[0048] 肺结核患者是从 2007 年 5 月起在济南的山东省肺科医院、重庆的肺科医院组织招募的。健康对照者一部分来源于上述医院(非结核病患者或医务人员),另一部分是 2008 年 4 月在复旦大学、上海华山医院组织招募的非结核病患者或医务人员。

[0049] 两组人群的收录标准如下:

[0050] 肺结核患者:临床痰涂片或结核分枝杆菌培养阳性,临床检查与 X 射线检查结果相符, HIV 检测阴性。

[0051] 健康者:接种过 BCG 疫苗,无发热,近期无结核病人接触史的健康人群。HIV 检测阴性。表 1 是样本统计资料。

[0052] 表 1

[0053]

	肺结核病人 (P)	健康对照 (H)
人数	146	68
所在城市	重庆 (126) 济南 (20)	上海 (31) 济南 (37)
年龄分布	15 ~ 75	20 ~ 62

[0054] 检测步骤:

[0055] (1) 包被:Rv1985c 抗原溶解于包被缓冲液中 (5ug/ml);100ul/孔;4℃过夜

[0056] (2) 洗板:洗涤液 300ul/孔,3min,洗 3 次;

[0057] (3) 封闭:封闭液,300ul/孔,37℃孵育 1h;

[0058] (4) 洗板:洗涤液 300ul/孔,3min,洗 3 次;

[0059] (5) 加血清:按 IgG1:500, IgM1:100 稀释后的待测血清,100ul/孔,37℃孵育 1h;

[0060] (6) 洗板:洗涤液 300ul/孔,3min,洗 5 次;

[0061] (7) 加酶标二抗:新鲜稀释的酶标抗体 (1:10000) 100ul/孔,37℃孵育 1h;

[0062] (8) 洗板:洗涤液 300ul/孔,3min,洗 5 次;

[0063] (9) 显色:新鲜配置的显色液,100ul/孔,37℃ 5-10min

[0064] (10) 终止:2MH₂SO₄, 50ul/孔;

[0065] (11) 测定:酶标仪调至 492nm,以第一个空白 PBS 对照孔调零后测各孔 OD 值。

[0066] 统计和判定:

[0067] 以健康对照者血清标本的平均 OD 值加上 2 倍标准方差 (standard deviation SD) 作为判断标准,若病人血清标本 OD 值大于此标准,即判断为阳性,反之则为阴性。

[0068] 利用 SPSS (Statistics Package for Social Science) 对结核病人和健康对照者两组之间进行统计分析,采用非配对分组 t-检验 (independent group t-test) 进行组别间差别的显著性测定,若 P<0.05,为样品间存在显著性差异;若 P<0.01,为样品间存在极显著性差异。

[0069] Pathozyme MycoG 对照实验:

[0070] 所述的 Pathozyme MycoG 是英国 Omega Diagnostics 公司生产的检测人血清中由于分枝杆菌感染而产生 IgG 抗体的试剂。Myco G 应用有较高诊断价值的 LAM 和 38KDa 抗

原,其检测特异性极高,敏感性较好,已被国际上部分机构和医院所采用。

[0071] 按照标准说明书操作流程,对上述结核病人和健康对照者 214 例样本进行检测。

[0072] 结果显示,Rv1985c 在肺结核病人中的血清 IgG 敏感性为 49% (71/146 人),特异性为 97% (2/68 人),对病人和健康对照的阳性检出率进行 t 检验, $t < 0.001$,有极显著差异;Rv1985c 在肺结核病人中的血清 IgM 敏感性为 20% (29/145 人),特异性为 97% (2/68 人),对病人和健康对照的阳性检出率进行 t 检验, $t = 0.001$,表明肺结核病人与健康人群 Rv1985c 抗体 IgG 和 IgM 水平均有显著性差异,即结核病人显著高于健康人。

[0073] 联合 IgG 和 IgM 考虑,本方法检测结核病人的敏感性为 59% (85/145 人),特异性为 96% (3/68 人)。对照方法 Pathozyme MycoG 检测的敏感性为 35% (51/146 人),特异性为 98.5% (1/68 人)。与对照方法相比,本方法具有更高的检测敏感性,能多检出 14% 的阳性患者,同时特异性与对照方法相当,都大于 95%。如与对照抗原 LAM/38kDa 一同使用,可进一步提高检测敏感性,达到 75% (109/146),同时特异性仍然保持较高 94% (4/68)。

[0074] 表 2 是抗原 Rv1985c 抗原在结核患者中的检测结果。

[0075]

	IgG	IgM	IgG+IgM
敏感性	49% (71/146)	20% (29/145)	59% (85/145)
特异性	97% (2/68)	97% (2/68)	96% (3/68)

[0076] 实施例 3 胶体金标记检测

[0077] 1. 取 0.01% HAuCl₄ 水溶液 100ml,加入 1% 枸橼酸三钠水溶液 2ml,加热煮沸 15min ~ 30min,直至颜色变红且不变。

[0078] 2. 将 Rv1985c 抗原与制备好的胶金以 1:2 比例混合,加入终浓度为 1% 的 BSA 作为稳定剂,加入终浓度为 0.1% 的叠氮钠作为防腐剂。

[0079] 3. 于硝酸纤维膜上加入 Rv1985c 抗原 10ul,放置过夜。

[0080] 4. 第二天加入封闭液 (1% BSA 溶液) 5min

[0081] 5. 加入稀释后待测血清,可采用 1:10 稀释

[0082] 6. PBS 洗一遍后加入上述标记好胶体金抗原

[0083] 7. 反应 5-15 分钟后判读结果,经肉眼观察,如有红色条带即判定为阳性,否则为阴性。

[0084] 结果显示,15 分钟可判定结果,作为诊断试剂用于被临床证实的活动性结核时,单独使用 Rv1985c 抗原检测敏感性达到 59%,特异性 96%;与其他诊断抗原 (如与对照抗原 LAM/38kDa) 合并使用使,可进一步提高诊断敏感性,达 75%。

[0085] SEQUENCE LISTING

[0086] <110> 复旦大学附属华山医院,复旦大学

[0087] <120> 一种结核病诊断试剂及试剂盒

[0088] <130>11

[0089] <160>1

[0090] <170>PatentIn version3.1

[0091] <210>1

[0092] <211>303

[0093] <212>PRT

[0094] <213> 结核杆菌

[0095] <400>1

[0096]

Met Val Asp Pro Gln Leu Asp Gly Pro Gln Leu Ala Ala Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Val Val Glu Leu Gly Ser Phe Asp Ala Ala Ala Glu Arg Leu His Val
 20 25 30

Thr Pro Ser Ala Val Ser Gln Arg Ile Lys Ser Leu Glu Gln Gln Val
 35 40 45

Gly Gln Val Leu Val Val Arg Glu Lys Pro Cys Arg Ala Thr Thr Ala
 50 55 60

Gly Ile Pro Leu Leu Arg Leu Ala Ala Gln Thr Ala Leu Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Ala Leu Ala Glu Met Gly Gly Asn Ala Ser Leu Lys Arg Thr Arg
 85 90 95

Ile Thr Ile Ala Val Asn Ala Asp Ser Met Ala Thr Trp Phe Ser Ala
 100 105 110

Val Phe Asp Gly Leu Gly Asp Val Leu Leu Asp Val Arg Ile Glu Asp
 115 120 125

Gln Asp His Ser Ala Arg Leu Leu Arg Glu Gly Val Ala Met Gly Ala
 130 135 140

Val Thr Thr Glu Arg Asn Pro Val Pro Gly Cys Arg Val His Pro Leu
 145 150 155 160

Gly Glu Met Arg Tyr Leu Pro Val Ala Ser Arg Pro Phe Val Gln Arg
 165 170 175

[0097]

His Leu Ser Asp Gly Phe Thr Ala Ala Ala Ala Lys Ala Pro Ser
180 185 190

Leu Ala Trp Asn Arg Asp Asp Gly Leu Gln Asp Met Leu Val Arg Lys
195 200 205

Ala Phe Arg Arg Ala Ile Thr Arg Pro Thr His Phe Val Pro Thr Thr
210 215 220

Glu Gly Phe Thr Ala Ala Ala Arg Ala Gly Leu Gly Trp Gly Met Phe
225 230 235 240

Pro Glu Lys Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ala Asp Gly Ser Phe Val Arg
245 250 255

Val Cys Asp Ile His Leu Asp Val Pro Leu Tyr Trp Gln Cys Trp Lys
260 265 270

Leu Asp Ser Pro Ile Ile Ala Arg Ile Thr Asp Thr Val Arg Ala Ala
275 280 285

Ala Ser Gly Leu Tyr Arg Gly Gln Gln Arg Arg Arg Arg Pro Gly
290 295 300

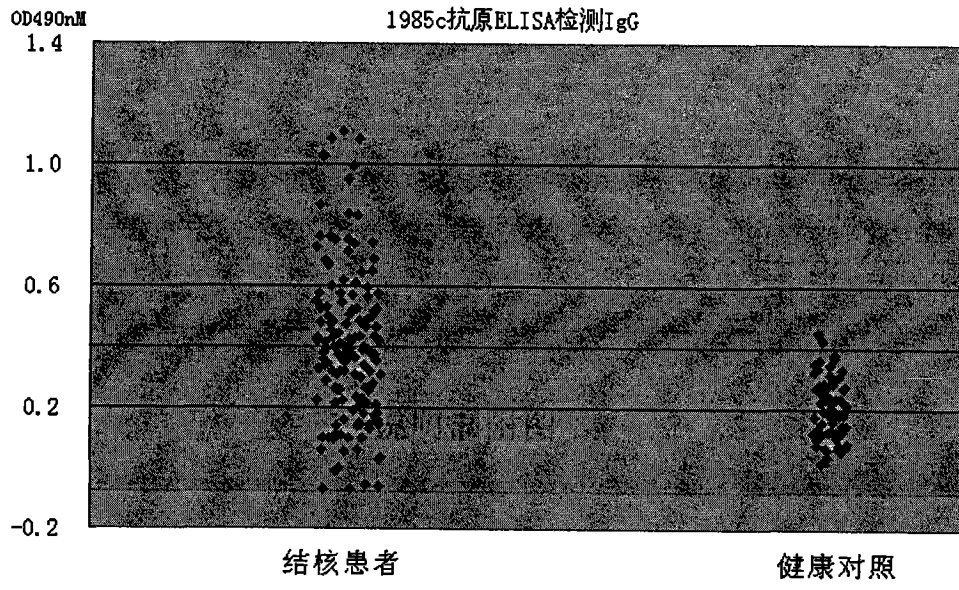


图 1

专利名称(译)	一种结核病诊断试剂及试剂盒		
公开(公告)号	CN101661044B	公开(公告)日	2013-10-16
申请号	CN200810042130.6	申请日	2008-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院 复旦大学		
[标]发明人	张文宏 陈嘉臻 王森 苏晓迪 张颖 王洪海 张舒 邵凌云		
发明人	张文宏 陈嘉臻 王森 苏晓迪 张颖 王洪海 张舒 邵凌云		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	吴桂琴		
其他公开文献	CN101661044A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属诊断试剂领域，涉及含结核分支杆菌Rv1985c蛋白的诊断试剂及试剂盒。本发明可对受试者血液或体液作出是否感染结核分支杆菌的快速诊断，从免疫胶体金的15分钟到ELISA的5个小时不等。作为诊断试剂用于被临床证实的活动性结核时，单独使用Rv1985c抗原检测敏感性达到59%，特异性96%；与其他诊断抗原(如与对照抗原LAM/38kDa)合并使用使，可进一步提高诊断敏感性，达75%，具有较高临床应用价值。本发明的检测只需要单份血清样品，化验简单、快速、不需要专业实验室设备，成本低廉，当天可得到结果，非常适合广大乡镇农村医院和战地条件下的结核感染检测。

