



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102174109 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 07

(21) 申请号 201110023812. 4

C12R 1/19(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 21

(71) 申请人 中华人民共和国吉林出入境检验检疫局

地址 130000 吉林省长春市普阳街 1301 号

(72) 发明人 杨怀宁 浦昀 徐卉 邵丽筠
李娟 柴景春 邹红 王振国
谢兵 赵大力 王英超 刘洋
徐宏 寇玲

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司
22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

G07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/571(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

序列表 1 页 附图 2 页

(54) 发明名称

艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白,可制备 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,能够同时联合检测艾滋和梅毒病毒,对两种疾病可以同时进行联合检测,用肉眼进行结果判读,不需特殊仪器,为现场快速检测如血液中心街头义务献血员筛查、家庭自助检测、国境口岸出入境人员疾病筛查等和现场流行病学调查,以及其他一些需要快速检测的机构提供了一种方便快捷准确低廉的检测方法。

1. 一种艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白,具有下述氨基酸残基序列之一的蛋白质:
 - 1) 序列表中的 SEQ ID No :1 和 SEQ ID No :2 ;
 - 2) 将序列表中 SEQ ID No :1 和 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加得到的蛋白质。
2. 权利要求 1 所述融合蛋白的制备方法,包括主要优势抗原原核表达载体的构建、主要优势抗原的表达、鉴定与纯化。
3. HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针制备方法包括胶体金制备、胶体金溶液的最佳 pH 确定、最适标记抗原量的确定和 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针制备及纯化。
4. GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,包括样品处理垫、金标结合物垫、硝酸纤维素膜、吸水纸垫和垫板,其特征在于:金标结合物垫含有 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针;测试带上含有含有 HIV 和 TP 基因工程重组抗原;对照带上含有抗含有 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的抗体。
 5. 权利要求 4 所述试纸的制备方法,包括以下步骤:
 - 1) 将玻璃纤维素膜用适当的磷酸缓冲液进行预处理,得到样品处理垫;
 - 2) 将步骤 3) 得到的 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针,包被到玻璃纤维素膜上,得到金标结合物垫,将其粘贴在步骤 1) 得到的样品垫上;
 - 3) 制备硝酸纤维素膜的检测线和对照线,将其粘贴在 2) 得到的金标结合物垫上;
所述测试带上 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原浓度分别为 500 μ g/mL、200 μ g/mL;所述对照带上抗 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原的抗体浓度分别为 1.0mg/mL;
 - 4) 将吸水纸垫粘贴在步骤 3) 得到的硝酸纤维素膜的远离所述测试带的一端;
 - 5) 将步骤 4) 得到的试纸紧密连接于一垫板;
 - 6) 将步骤 5) 得到的带有垫板的试纸按所需大小切割,转入塑料层析盒,该层析盒对应于样品垫处设有点样口,对应于测试带和对照带的部位设有观测窗,即为 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,加干燥剂后密封包存。

艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明公开一种艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白及其制备方法,还进一步提供 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸条及制备方法,可同时快速检测艾滋和梅毒抗体,适用于现场快速检测和流行病学调查,属于免疫学检测领域。

背景技术

[0002] 艾滋和梅毒(以下简称:HIV 和 TP)是严重危害公共健康的传染病,两种病传播途径均为性传播,母婴传播,血液传播。近年来,艾滋病和梅毒的发病率都呈现上升趋势,尽早检出病例,对于及时就医、及时控制可起到积极的作用。

[0003] 胶体金免疫层析技术(Gold Immuno-Chromatographic Assay, GICA)是一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的一种新型的固相标记免疫检测技术,在生物性、医学检验领域得到了日益广泛的应用,具有简便、快速、不需任何仪器设备、成本低廉、保存时间长等优点,在微生物检测领域具有巨大的发展潜力。

[0004] 现在已有的商品化的胶体金试纸条是对艾滋或梅毒抗体分别检测,操作费时而不方便,且绝大部分是进口试剂,合计检测成本较高,目前尚没有一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸条的报道。

发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白及制备方法,用于制备同时检测艾滋和梅毒的试剂产品。

[0006] 本发明还公开了一种 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,能够同时联合检测艾滋和梅毒病毒。

[0007] 本发明所提供艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白,具有下述氨基酸残基序列之一的蛋白质:

HIV 融合蛋白氨基酸残基序列:序列表中的 SEQ ID No :1 ;

TP 融合蛋白氨基酸残基序列:序列表中的 SEQ ID No :2。

[0008] 将序列表中 SEQ ID No :1 和 SEQ ID No :2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加得到的蛋白质。

[0009] 本发明所提供艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白的制备,包括主要优势抗原原核表达载体的构建、主要优势抗原的表达、鉴定与纯化;

本发明所提供的制备 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针方法包括胶体金制备、胶体金溶液的最佳 pH 确定、最适标记抗原量的确定和 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针制备及纯化。

[0010] 所提供的 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,由样品处理垫、金标结合物垫、硝酸纤维素膜、吸水纸垫和垫板五部分组成。玻璃纤维素膜制备的样品处理垫紧密连接于含有 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针的金标结合物垫;所述金标垫紧密

连接于硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上设有一条测试带和一条对照带,测试带上含有含有 HIV 和 TP 基因工程重组抗原,对照带上含有抗含有 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的抗体;所述硝酸纤维素膜紧密连接于吸水材料制备的吸水纸垫;上述试纸紧密连接于一垫板;上述带有垫板的试纸按所需大小切割,转入塑料层析盒,该层析盒对应于样品垫处设有点样口,对应于测试带和对照带的部位设有观测窗,即为 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,加干燥剂后密封包存。

[0011] 本发明所提供的制备 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的方法,包括以下步骤:

1) 主要优势抗原原核表达载体的构建

查找相关文献,选择艾滋病病毒和梅毒螺旋体 2 种病原体的主要优势抗原表位,并确定其核苷酸序列,设计特异 PCR 引物,通过 PCR 扩增,获得含有目的抗原基因的片段,将目的片段插入原核表达质粒,并转化到适宜的感受态细胞中,经 ABI 核酸自动测序分析仪进行序列分析重组是否正确。

[0012] HIV 融合蛋白基因 DNA 序列:序列表中的 SEQ ID No :1 ;

TP 融合蛋白核苷酸序列:序列表中的 SEQ ID No :2。

[0013] 2) 主要优势抗原的表达与鉴定

挑选经测序分析重组正确的阳性单菌落,经过对表达条件进行优化(主要是诱导表达时间的优化),接种于具有抗性的 LB 培养液培养,经 IPTG 诱导蛋白表达,收集菌体用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定主要优势抗原的表达。

[0014] 3) 主要优势抗原的纯化

按照 INVITROGEN 公司镍离子亲和纯化操作手册对目的蛋白进行纯化,4℃保存备用。

[0015] 本发明所提供的制备 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针方法包括以下步骤:

1) 胶体金制备 参考柠檬酸三钠还原法和微波技术,通过电子显微镜观察,确定制备 40 nm 胶体金颗粒的氯化金与柠檬酸三钠的最佳比例。

[0016] 2 胶体金溶液的最佳 pH 确定 利用 Gene Runner 3.00 分析软件对 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的等电点进行了预测,用 25mM K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 分别调整至等电点附近,加入过量的 HIV 和 TP 基因工程重组抗原作用,观察胶体金颜色,确定胶体金溶液的最佳 pH。

[0017] 3) 最适标记抗原量的确定 原则是以胶体金颜色没有发生改变的蛋白质加入量最少的基础上,增加 30% 的蛋白质含量为最适标记量,因而大量制备时的抗原浓度应该是测定值的 1.3 倍。通过观察一定比例的胶体金和 HIV、TP 重组抗原混合液的颜色变化,确定最适标记抗原量。

[0018] 4) HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针制备及纯化 取最佳 pH 值的胶体金溶液, HIV 和 TP 重组抗原按最佳 pH 值和最适标记量,滴加入胶体金溶液中,并加入稳定剂 PEG20000,离心后用含 PEG20000 的 PBS 溶液将沉淀重悬,4℃保存备用。

[0019] 本发明所提供的制备 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸的方法包括以下步骤:

1) 将玻璃纤维素膜用适当的磷酸缓冲液进行预处理,得到样品处理垫;

2) 将 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针,包被到玻璃纤维素膜上,得到金

标结合物垫,将其粘贴在步骤 1)得到的样品垫上;

3) 制备硝酸纤维素膜的检测线和对照线,将其粘贴在 2)得到的金标结合物垫上;

所述测试带上 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原浓度分别为 500 μ g/mL、200 μ g/mL;所述对照带上抗 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原的抗体浓度分别为 1.0mg/mL。

[0020] 4) 将吸水纸垫粘贴在步骤 4)得到的硝酸纤维素膜的远离所述测试带的一端;

5) 将步骤 5)得到的试纸紧密连接于一垫板;

6) 将步骤 6)得到的带有垫板的试纸按所需大小切割,转入塑料层析盒,该层析盒对应于样品垫处设有点样口,对应于测试带和对照带的部位设有观测窗,即为 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,加干燥剂后密封包存。

[0021] 本发明分别选择 HIV 和 TP 的主要优势抗原表位,原核表达 HIV 和 TP 的基因工程重组抗原,并进行胶体金标记;制备胶体金-HIV 抗原、TP 抗原结合物垫;将 HIV 和 TP 的基因工程重组抗原通过喷点设备分别喷点固定在已预处理合格的硝酸纤维素膜上;采用双抗原夹心法,分别检测人血液中的 HIV 抗体和 TP 抗体。

[0022] 本发明利用免疫胶体金技术制备一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,其原理是用 HIV 和 TP 基因工程重组抗原分别包被硝酸纤维素膜形成两条测试带,用以捕捉检测样品中的 HIV 或 TP 抗体,然后用标记了 HIV 或 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针检测,若检测样品中含有 HIV 或 TP 抗体,经过短暂层析后即可在测试带处出现相应可见的层析带。此外,所述硝酸纤维素膜的另一区域包被有抗 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的抗体,形成两条对照带,无论检测样品中是否含有 HIV 或 TP 抗体,标记了 HIV 或 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针与抗 HIV 或 TP 基因工程重组抗原的抗体结合,经过短暂层析后在对照带处出现两条可见的层析带,若未出现该条带,证明试纸失效。

[0023] 本发明的免疫层析试纸检出结果与 ELISA 法一致,可达到与 ELISA 法同样的特异性和灵敏性,并更加简便快捷,而且检测成本低廉。

[0024] 本发明的积极效果在于:提供一种艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白,可制备 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸,能够同时联合检测艾滋和梅毒病毒,对两种疾病可以同时进行联合检测,用肉眼进行结果判读,不需特殊仪器,为现场快速检测如血液中心街头义务献血员筛查、家庭自助检测、国境口岸出入境人员疾病筛查等和现场流行病学调查,以及其他一些需要快速检测的机构提供了一种方便快捷准确低廉的检测方法。

附图说明

[0025] 图 1、图 3 为本发明试纸条组装示意图;

1. 样品处理垫;2. 金标结合物垫;3. 硝酸纤维素膜;4. 吸水纸垫;5, 6. 垫板;T₁, T₂. 检测线;C. 质控线。

[0026] 图 2 为本发明试纸条实验结果模式;

A 艾滋阳性检测结果;B 梅毒阳性检测结果;C 艾滋和梅毒均阳性检测结果;D 艾滋和梅毒均阴性检测结果。

具体实施方式

[0027] 下列实例中所用的方法如无特别说明均为常规方法。

[0028] 材料:氯化金 (HAuCl₄)、柠檬酸三钠 (NaC₆H₅O₇)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP40) 均购自 Sigma 公司;牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Roch 公司;硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、样品垫、吸水垫均购自 Millipore 公司。

[0029] 菌株质粒:菌株 DH5 α、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) plysS 购自 NOVAGEN 公司;质粒 pRSET-B、pGEM-T 购自 PROMEGA 公司。

[0030] 实施例 1:

HIV 和 TP 基因工程重组融合蛋白抗原的制备

(1) HIV-1/2 和 TP 主要优势抗原基因的获得

在 Genbank 数据库中检索 HIV-1 和 2 型病毒的全基因序列,并确定其主要优势抗原 gp41、gp120 和 gp36、gp125 基因序列,人工合成获得重组基因模板,PCR 获得大量基因。HIV 基因模板 PCR 引物如下:

Sense primer:

GGATCCAGTTAAAATCGAACCGCTG

Anti-sense primer:

AGCTTTCACAGGTCTTCTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCCGACGGCGCGTAGTTA。

[0031] TP 基因模板 PCR 引物如下:

Sense primer:

GCGGATCCATGTGTTTCTTGACCACTGT

Anti-sense primer:

GCGAATTCTCAGGTCTTCTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCCGCTTCTTTTTCACCACG

其中 GGATCC 为 *BamH I* 酶切位点,GAATTC 为 *EcoR I* 酶切位点,AAGCTT 为 *Hind III* 酶切位点,斜体为 myc 标签序列。

[0032] 扩增的反应体系如下:10×PCR buffer 5 μl,10mM dNTP mixture 1 μl,50mM MgCl₂ 1.5 μl,模板 1 μl,Platinum Taq 酶 0.2 μl,无菌双蒸水 39.3 μl,总体积为 50 μl。PCR 反应循环参数为:95℃ 5min,(95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min) 30 个循环,72℃ 10min。PCR 反应完成后,产物用 Gel Extraction kit (OMEGA 公司)进行纯化回收。

[0033] (2) HIV-1/2 和 TP 主要优势抗原表达载体 pRSET-B 的获得

先将基因纯化回收片段和 pRSET-B 大片段基因调到合适浓度,按片段和载体摩尔比为 3:1 与 pRSET-B 大片段载体连接,反应体系如下:10×Ligase Buffer 1 μl,pRSET-B 大片段 (100ng)1 μl,插入片段 1 μl,T₄DNA 连接酶 1 μl,无菌双蒸水 6 μl。将反应物混匀后,16℃ 水浴 3h,然后 4℃ 过夜反应。然后将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞进行克隆筛选。待转化细胞单克隆形成后,挑取单克隆转入 5ml LB 培养基(Amp 100 μg/ml)中 37℃ 200rpm 培养 12h 后收获菌体,用 OMEGA 质粒小量提取试剂盒提取质粒,并进行 *BamH I* / *Hind III* 双酶切鉴定和 DNA 序列测定。

[0034] (3) HIV-1/2 和 TP 主要优势抗原表达与鉴定

主要操作按照 INVITROGEN 公司 pRSET-B 表达载体的操作说明书进行,其中不同的部分加以描述,以 HIV 重组融合蛋白蛋白表达为例:将 -70℃ 保存的表达菌株按 1:100 转接入 5ml LB 培养基(Amp 100μg/ml)中 37℃ 200rpm 培养 12h,然后按 1:100 转接入 10ml 新鲜的 LB 培养基(此时抗生素可加可不加)中 37℃ 200rpm 继续培养,当 OD₆₀₀=0.4-0.6 时,取出

1ml 培养物以 12000rpm 收获菌体, -20℃冻存, 作为诱导 0h 表达对照。然后在剩余的培养物中加入 IPTG (终浓度 1mM) 37℃ 200rpm 培养以诱导蛋白的表达。每隔 1h 取出 1ml 培养物以 12000rpm 收获菌体, 冻存于 -20℃备用。共诱导 6h。待诱导结束后, 将收获的菌体进行 SDS-PAGE 或 Western blot 鉴定目的蛋白的表达。

[0035] (4) HIV-1/2 和 TP 主要优势抗原的纯化

进行镍离子亲和纯化。镍离子亲和纯化的具体操作主要参考 INVITROGEN 公司的操作说明书(ProBond™ Purification System; For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins. Catalog no. K850-01, K851-01, K852-01, K853-01, K854-01, R801-01, R801-15 Version K 2 September 2004 ; 25-0006) 进行, 主要描述如下:

蛋白 6ml (溶于 8M 尿素, 并调 pH 值为 8.0) 加入到平衡完成的镍离子亲和柱中, 使蛋白与树脂结合 30min, 期间上下颠倒柱子数次以便蛋白与亲和树脂充分结合。然后取掉柱子下端封闭帽(snap-off cap), 让液体依靠重力自主流出; 加 6ml Denaturing Binding Buffer (pH8.0) 洗柱子两次; 6ml Denaturing Wash Buffer (pH6.0) 洗柱子两次; 6ml Denaturing Wash Buffer (pH5.3) 洗柱子两次; 2-4ml Denaturing Elution Buffer (pH4.0) 洗脱目的蛋白。在纯化过程中, 将各组分液体收集, -20℃保存以备后续 SDS-PAGE 分析目的蛋白所在组分及其纯度, 并进行 Western blot 鉴定。

[0036] 实施例 2:

HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针制备:

1) 胶体金制备 参考柠檬酸三钠还原法和微波技术, 通过电子显微镜观察, 确定制备 40 nm 胶体金颗粒的氯化金与柠檬酸三钠的最佳比例。其操作步骤简述如下: 将 100 mL 0.1 g/L 的氯化金在微波炉中煮沸, 在高速搅拌的状态下, 迅速加入 0.70、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 等不同体积新鲜制备的 10 g/L 柠檬酸三钠, 当溶液颜色变成深蓝色后, 放置微波炉中继续加热 5 min, 室温冷却后补足所失水分, 25mM K_2CO_3 调整胶体金溶液的 pH, 0.22 μm 滤膜过滤后 4℃保存备用。同时通过电子显微镜下观察粒径大小及颗粒均匀程度。

[0037] 2) 胶体金溶液的最佳 pH 确定 利用 Gene Runner 3.00 分析软件对 HIV 和 TP 基因工程重组抗原的等电点进行了预测, HIV 基因工程重组抗原的等电点预测值为 6.35, TP 基因工程重组抗原的等电点预测值为 6.68。用 25mM K_2CO_3 将胶体金溶液的 pH 分别调整至等电点附近, 各取 1 mL 不同 pH 的胶体金分别加入过量的 HIV 和 TP 基因工程重组抗原, 作用 45 min 后加入 100 μL 100 g/L NaCl, 4℃静置 2 h 后观察胶体金颜色。胶体金颜色没有发生改变的最低 pH 为胶体金溶液的最佳 pH。测定结果显示, HIV 基因工程重组抗原在 pH7.0、pH7.4 的胶体金溶液中能够保持颜色不变, TP 基因工程重组抗原在 pH7.3、pH7.7 的胶体金溶液中能够保持颜色不变, 因此判定 HIV 基因工程重组抗原和胶体金结合的最佳 pH 值为 7.0, TP 基因工程重组抗原和胶体金结合的最佳 pH 值为 7.3。

[0038] 3) 最适标记抗原量的确定 分别取 5mL 胶体金溶液, 用 25mM K_2CO_3 将 pH 值分别调为 7.0 和 7.3。同时将 HIV 基因工程重组抗原溶液 pH 值调为 7.0, 将 TP 基因工程重组抗原溶液 pH 值调为 7.3。然后分别将调好 pH 值的 HIV 和 TP 基因工程重组溶液在 0-50 $\mu g/mL$ 范围内用无菌双蒸水稀释 10 个梯度, 在 96 孔板中分别取 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μL 加入 1 mL 胶体金中, 用超纯水补足体积, 作用 45 min 后加入 100 μL 100 g/L

NaCl, 4 °C 静止 2 h。测定结果显示, HIV 基因工程重组抗原在 $\geq 25 \mu\text{g/mL}$ 时均能够使胶体金溶液中保持颜色不变, TP 基因工程重组抗原在 $\geq 15 \mu\text{g/mL}$ 时均能够使胶体金溶液中保持颜色不变, 因此判定 HIV 基因工程重组抗原和胶体金结合的最小浓度为 $25 \mu\text{g/mL}$, TP 基因工程重组抗原和胶体金结合的最小浓度为 $15 \mu\text{g/mL}$ 。在大量制备时, 原则是以胶体金颜色没有发生改变的蛋白质加入量最少的基础上, 增加 30% 的蛋白质含量为最适标记量, 因而大量制备时的抗原浓度应该是测定值的 1.3 倍。

[0039] 4) HIV 和 TP 基因工程重组抗原的免疫胶体金探针制备及纯化 取 30mL 最佳 pH 值的胶体金溶液置于硅化的干净烧杯中, 按最佳 pH 值和最适标记量, 在磁力搅拌下将 $975 \mu\text{g}$ HIV 基因工程重组抗原和 $585 \mu\text{g}$ TP 基因工程重组抗原溶液分别缓慢滴加入胶体金溶液中。滴加完成后, 继续中速搅拌 20min, 并加入稳定剂 PEG20000, 使其终浓度为 0.2%, 防止蛋白与胶体金聚合发生沉淀, 继续搅拌 30 min。待反应完全后, 将胶体金溶液置于新的 50ml 离心管中 $1000g, 4^\circ\text{C}$ 低速离心 20min 去除反应过程中凝聚的沉淀; 小心吸出上清转入新的 50ml 离心管中 $14000g, 4^\circ\text{C}$ 离心 40min (GS-15R 型高速冷冻离心机, BECKMAN)。仔细吸出上清, 沉淀物用 3mL 含 0.2% PEG20000 的 PBS 溶液 (含 0.02% NaN_3) 将沉淀重悬, 4°C 保存备用。

[0040] 实施例 3:

制备 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸:

1) 将玻璃纤维素膜 ($300 \times 20 \text{ mm}$) 浸泡于 $0.01 \text{ mol/L pH } 7.4$ 磷酸缓冲液 ($20 \text{ g BSA}, 25 \text{ g}$ 海藻糖, $3 \text{ g PVP40}, 0.2 \text{ g NaN}_3, 8 \text{ g NaCl}, 0.2 \text{ g KCl}, 2.9 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}, 0.2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$, 用超纯水定容至 1000 mL) 中 30 min 后, 于 37°C 烘干, 得到样品处理垫, 真空封装, 置 4°C 备用。

[0041] 2) 将 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原进行胶体金标记, BioDot 点膜仪以每厘米 $50 \mu\text{L}$ 的量喷到玻璃纤维素膜上 ($300 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$), 得到金标结合物垫, 冷冻干燥机抽干后备用; 将其粘贴在步骤 1) 得到的样品垫上;

3) 将 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原和抗 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原的抗体利用自动微量喷点设备, 固定在已预处理合格的硝酸纤维素膜上, 分别作为检测线和对照线, 两条线中间间隔 0.5 cm ; 将其粘贴在 2) 得到的金标结合物垫上;

所述测试带上 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原浓度分别为 $500 \mu\text{g/mL}$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$; 所述对照带上抗 HIV 和 TP 两种基因工程重组抗原的抗体浓度分别为 1.0 mg/mL 。

[0042] 4) 将吸水纸垫粘贴在步骤 3) 得到的硝酸纤维素膜的远离所述测试带的一端;

5) 上述试纸紧密连接于一垫板, 组合成为试纸条;

6) 上述带有垫板的试纸按所需大小切割, 转入塑料层析盒, 该层析盒对应于样品垫处设有点样口, 对应于测试带和对照带的部位设有观测窗, 即为 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸, 加干燥剂后密封包存。见图 1。

[0043] 试验例 1:

GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸效果评价

1) 收集艾滋病阳性血清和梅毒阳性血清各 10 份, 阴性对照血清 50 份, 作为样品检测液备用;

2) 取实例 3 制备的 GICA 一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸, 分别向样品孔中加

入步骤 1) 中的样品检测液 3 滴(约 100 μ L), 5min 后开始观察结果, 观察 15min。结果表明 10 份阳性血清均在测试带和对照带处出现一条红色沉淀线, 检测结果呈阳性; 50 份阴性对照血清均在测试带处不显色, 在对照带处出现一条红色沉淀线, 检测结果呈阴性。见图 2、图 3。

SEQ ID No :1

VKIEPLGVAPTKAKRRVVERGGGGRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCGGGGRGPDRPEGIEEEEGGEQD
RDRSIRLVNGGGGNYTDIIYSLIEESQNQQEKNEQELLALDKWASLWNWFGGGGWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLL
GIWGCSGKLICTTNVPWNSSWGGGGAIEKYLKDQAQLNSWGCAFRQVCHTTPWVNESLTPDWNMTWQEWKQVRY
LEANISQSLEQAQIQQEKMYELQKLNWDVFGNGGGGSLVFHSQPINKRPRQAWCWFKGNWTGGGGCQFNMTGLE
RDKKKQYNETWYSKDVVCEGGGNCNMTWFLNWIENNTTHRNYAPC

SEQ ID No :2

CVSCTTVCPHAGKAKAEKVECALKGGIFRGTLPAADCPGIDTTVTFNADGTAQKVELALEKKSAPSPLTYRG
TWMVREDGIVELSLVSSEQSKAPHEKELYELIDSNSVRYMGAPGAGKPSKEMAPFYVLKTKKGGGGGSASGAKEEA
EKKAAEQRALLGGGGVLSKQETEDSRGRKKWEYETDPSVGGGGVYDYQHKEGRFKSQDADYHRVGGGGARRGEKEA

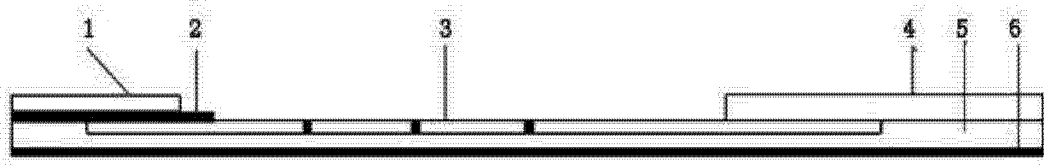


图 1

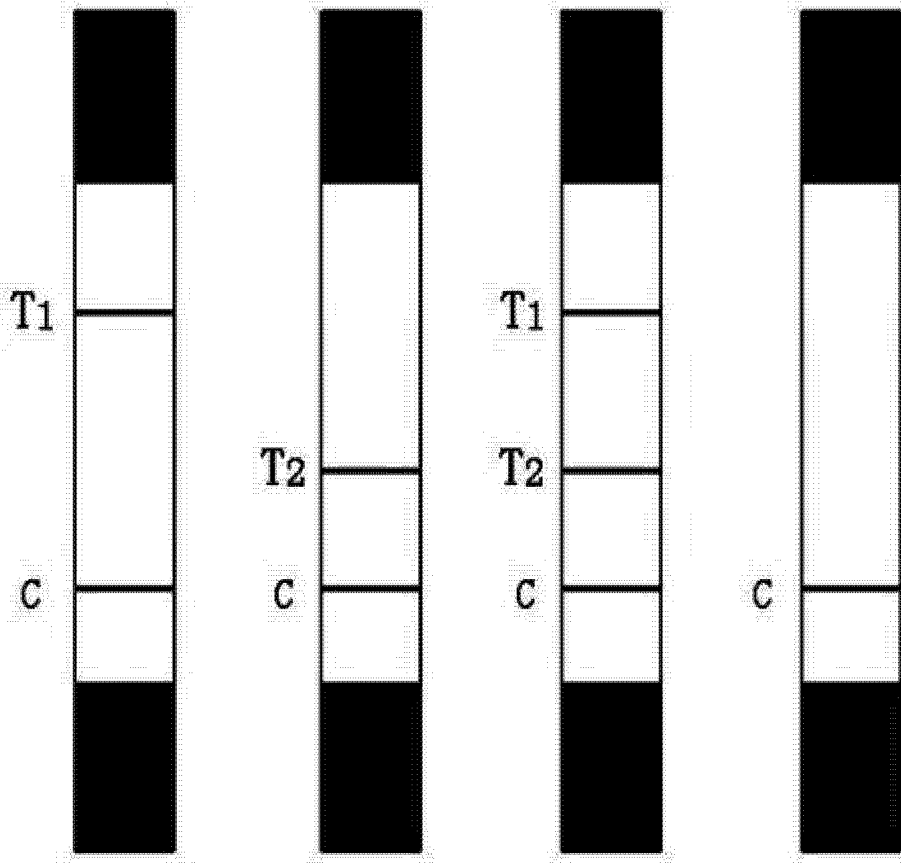


图 2

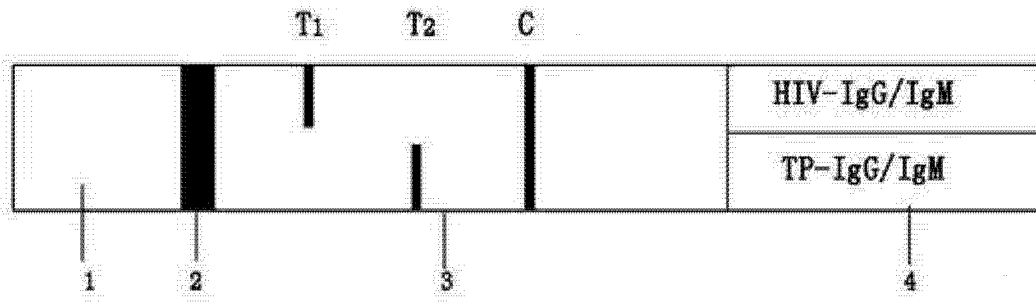


图 3

专利名称(译)	艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102174109A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201110023812.4	申请日	2011-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	中华人民共和国吉林出入境检验检疫局		
申请(专利权)人(译)	中华人民共和国吉林出入境检验检疫局		
当前申请(专利权)人(译)	中华人民共和国吉林出入境检验检疫局		
[标]发明人	杨怀宁 浦昀 徐卉 邵丽筠 李娟 柴景春 邹红 王振国 谢兵 赵大力 王英超 刘洋 徐宏 寇玲		
发明人	杨怀宁 浦昀 徐卉 邵丽筠 李娟 柴景春 邹红 王振国 谢兵 赵大力 王英超 刘洋 徐宏 寇玲		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/70 G01N33/531 G01N33/571 C12R1/19		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种艾滋病病毒和梅毒螺旋体融合蛋白，可制备GICA一步双联快速检测艾滋和梅毒抗体试纸，能够同时联合检测艾滋和梅毒病毒，对两种疾病可以同时进行联合检测，用肉眼进行结果判读，不需特殊仪器，为现场快速检测如血液中心街头义务献血员筛查、家庭自助检测、国境口岸出入境人员疾病筛查等和现场流行病学调查，以及其他一些需要快速检测的机构提供了一种方便快捷准确低廉的检测方法。

