

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810134807.9

[43] 公开日 2010 年 2 月 3 日

[11] 公开号 CN 101639476A

[22] 申请日 2008.7.31

[21] 申请号 200810134807.9

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基础
医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 张贺秋 冯晓燕 陈 坤 宋晓国
王国华

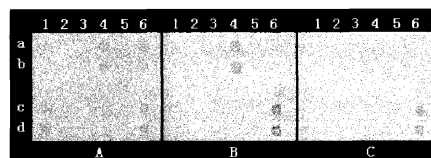
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种可视化结核抗体检测蛋白芯片、制备方法
及用途

[57] 摘要

本发明公开了一种利用克隆表达的七种结核杆菌特异优势表位抗原研制的可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片，还公开了该蛋白芯片的制备方法及用途。本发明将七种结核杆菌特异优势表位抗原点于修饰的基片上，制备可检测七种结核抗体的多靶点蛋白微阵列，建立免疫金银染色检测系统替代芯片原有荧光标记物。通过本发明检测系统的应用，无需使用芯片荧光扫描仪，通过目测及简单的图像扫描即可对芯片的反应结果进行判断，达到对结核病检测之目的。可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片敏感性分别为 98.5% 和 96.6%，特异性为 93.3%，显著高于痰涂片和痰菌培养方法，并且显著提高了痰涂片和痰菌培养阴性患者的检出率，可用于结核病的临床辅助诊断，具有一定的临床应用前景。



1. 一种可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片，其特征在于蛋白芯片上固定有 SEQ ID NO: 1-7 所示的 7 种结核杆菌特异优势表位抗原。
2. 根据权利要求 1 所述蛋白芯片，其特征在于还固定有阳性对照抗原和阴性对照抗原。
3. 制备权利要求 1 或 2 所述蛋白芯片的方法，包括以下步骤：
 - (1) 制备 SEQ ID NO: 1-7 所示的 7 种结核杆菌特异优势表位抗原；
 - (2) 将制备的抗原固定于芯片基片；
 - (3) 用封闭液进行封闭，然后干燥。
4. 根据权利要求 3 所述方法，其中固定上述抗原于芯片基片采用点接触法。
5. 根据权利要求 3 所述方法，其中所述芯片基片为氨基硅烷化的玻片。
6. 权利要求 1 或 2 所述蛋白芯片在检测抗结核杆菌抗体中的用途。

一种可视化结核抗体检测蛋白芯片、制备方法及应用

技术领域

本发明涉及一种可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片，具体涉及一种多靶点结核抗体检测的蛋白芯片，还涉及该芯片的制备方法及应用。

发明背景

近年来，结核病死灰复燃，全球大约 1/3 的人口感染结核杆菌，每年死于结核病的人数约 300 万人。我国第四次结核病流行病学抽样调查报告显示，我国现有活动性肺结核患者 451 万，菌阳肺结核患者 196 万。而且近年来我国结核病感染人数呈逐渐上升趋势，其数量居传染病首位。因此，结核病的早发现、早诊断、早治疗显得尤为重要。传统的细菌学诊断技术是结核病诊断的“金标准”，被沿用至今，但由于它存在检测耗时长、敏感性低、特异性较差等缺点，一直难以满足临床诊断的需要。血清学免疫诊断技术由于其操作简便、快速、稳定性好等固有优势，仍然是结核病辅助诊断的重要工具。然而，目前结核抗体检测试剂在特异性和敏感性方面仍存在问题，主要原因是所采用的抗原不能满足高特异敏感性诊断试剂的要求。在先前的研究中，我们克隆表达了七种特异性强并具有互补性的结核杆菌抗原（38kD、ESAT-6、CFP10、MPT64、Mtb8、Mtb8.4 和 Mtb16.3），在本研究中我们进一步通过生物信息学软件分析筛选优势表位，并成功克隆表达了优势表位抗原。利用这些优势表位抗原研制成检测结核抗体的可视化抗体检测蛋白芯片。该方法与传统痰涂片和痰菌培养方法相比，大大提高了结核病检测的敏感性和特异性，有望用于结核病辅助诊断。

38kD 抗原是一种脂蛋白和主要免疫原，是目前最为常用的结核病诊断抗原之一。Wilkinson 报道用 38kD 抗原检测肺结核病人血液，敏感性与特异性分别为 65.6%和 95.8% (J Clin Microbiol, 35(3):553-557 (1997))。

早期分泌性抗原性靶 (ESAT-6) 和培养滤液蛋白 10 (CFP10) 是结核病免疫诊断中两个很有前途的抗原，具有较强的细胞免疫活性，在抗结核感染的免疫回忆应答中起重要作用。这两个抗原均由 RD1 区编码，该区只存在于致病性结核杆菌基因组中，所有 BCG 菌株基因组中均缺乏该区域。联合应用 ESAT-6 和 CFP10 诊断结核病发现混合抗原敏感性较单抗原增加，而不降低其特异性。所以，ESAT-6 和 CFP10 可有望成为诊断动物和人致病性结核杆菌感染的特异性抗原。

MPT64 是结核杆菌生长最早分泌的主要蛋白，仅在结核杆菌及牛型杆菌中存在。虽然 Lyashchenko 等的研究结果表明，以 MPT64 蛋白作为抗原检测抗结核抗体的阳性率在各种结核杆菌分泌性蛋白中是较低的，但如果与其它蛋白形成融合蛋白则有可能具有较好的稳定性 (Clin Diagn Lab Immunol, 7(2):155-160 (2000))。因此，MPT64 蛋白有希望成为结核病血液学诊断的组合抗原的候选者之一。

Mtb8.4(Rv1174c)、Mtb8(Rv0379)和 Mtb16.3(Rv2185c)广泛存在于结核杆菌中，其在结核病诊断方面的意义仍然不清楚。Mtb8.4 是新近从结合杆菌培养物滤液中纯化分离得到的一种的低分子量蛋白抗原，Coler 等学者的研究更进一步揭示 Mtb8.4 是患有潜伏结合杆菌感染的个体中重要的免疫活性 T 细胞抗原，在确定致病性结合杆菌感染中具有重要作用 (J Immunol., 161: 2356-2364 (1998))。Mtb8 可能是转运蛋白质，仅在 Houghton 的研究中将 Mtb8 与其它几种抗原 (Mtb11、Mtb48、38kD 等) 组成融合抗原用于检测结核病，表明 Mtb8 与其它

几种抗原一起有可能增强 38kD 抗原的反应活性 (Clin Diagn Lab Immun, 9(4):883-891 (2002))。而 Mtb16.3 是一种未知功能蛋白质, 有研究表明 Mtb16.3 与 Mtb9.7 组合有助于提高对与 HIV 混合感染的结核患者的检出率。

不同结核杆菌抗原检测同一病人血液, 其反应性有所不同, 而且各抗原之间存在一定的互补性。其原因可能在于结核杆菌抗原多而复杂, 在宿主体内表达的数量、种类或时机可能随病人的个体免疫背景和病程而异, 表现出不同的抗体谱。因此, 将多种抗原制备成蛋白芯片, 联合检测可以在保证特异性的基础上有助于提高检测敏感性, 是研制高特异性和高敏感性诊断试剂的发展方向。

王海波等应用 3 种结核抗原建立结核杆菌抗体检测蛋白芯片, 并与 ELISA 进行比较, 敏感性和特异性分别为 69.9%和 84.9%。我们将结核杆菌 7 种优势表位抗原制备成多靶点蛋白芯片, 建立的免疫金银可视化抗体检测蛋白芯片检测结核病人血液样品技术, 该技术简便易行、敏感性高、特异性强。我们初步结果分析, 本结核杆菌可视化抗体检测蛋白芯片与痰涂片检测方法相比, 敏感性为 98.5%, 显著高于痰涂片检测方法的敏感性 35.4%; 与痰菌培养检测方法相比, 敏感性为 96.6%, 显著高于痰菌培养检测方法的敏感性 48.3%。其原因可能在于两方面, 一方面是我们选用了七种结核杆菌抗原, 抗原之间存在互补性, 有助于提高检出率; 另一方面, 免疫金银染色可视化蛋白芯片检测技术基本原理是利用银显影液和胶体金颗粒的催化作用, 理论上只要有 2 个金原子存在便可以有效催化银的氧化还原反应, 具有很强的信号放大效应。因此, 本可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片可以用于结核病的临床辅助诊断, 提高痰涂片和痰菌培养阴性患者的检出率。此外, 由于本研究采用结核杆菌特异的优势表位抗原, 在一定程度上保证了检测的特异性。通过对献血员血液样本的检测, 计算本可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片的特异性为 93.3%, 也证明可以满足临床需

求。

生物芯片技术是 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一，是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术，具有重大的基础研究价值，又具有明显的产业化前景。蛋白芯片是用于蛋白质功能研究及其相互作用分析的生物芯片，采用原位合成、机械点样或共价结合等方法将多肽、蛋白、酶、抗原、抗体固定于基片形成分子点阵。利用生物分子与蛋白芯片的探针分子发生杂交或相互作用，检测和分析蛋白质的一项技术。目前对蛋白芯片反应信号的检测主要有荧光法、酶显色法和免疫金—银显色法。荧光法是蛋白芯片通常采用的信号检测系统，主要利用激光共聚焦扫描仪对杂交信号进行高通量检测和分析，具有自动化程度高、灵敏度高的特点，但需要购买昂贵的芯片扫描仪和专业人员，无法在基层医疗单位推广。酶显色法主要利用标记的辣根酶或者其他生化酶与特定的显色液相互作用，根据芯片矩阵的颜色变化对反应结果进行分析的过程，但灵敏度和特异性低。免疫金—银显色法主要利用胶体金进行蛋白质标记并通过银进行直接显色，该方法既具有高的灵敏度和特异性，同时又无需增添设备，是可视化芯片的重要模式，具有广泛的应用潜力和前景。但目前国内外尚无应用可视化免疫金银蛋白芯片检测结核病的相关报道。

发明内容

为了解决目前结核病检测检出率低、特异性差的缺点，本发明提供了一种利用克隆表达的七种结核杆菌特异优势表位抗原，制备可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片的制备方法及用途。

本发明的蛋白芯片采用免疫金银检测系统显色芯片。

为了实现多靶点结核抗体的高效平行检测的目的，本发明通过对蛋白芯片领域的深入研究，提出了一种用于检测结核抗体，采用的多靶点可视化蛋白芯

片技术，同时检测结核患者血清中多种抗体，从而建立可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片。

本发明的可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片，不同于以往的结核抗体检测芯片，是建立在七种特异的结核杆菌特异表位抗原基础上的结核抗体多靶点蛋白芯片，并利用“胶体金—银染”显色系统达到芯片检测结果可视化目的。本发明提供的蛋白芯片，仅用 1 滴样本就可以检测到血清与 7 个多个靶点抗原的反应情况，实现了检测的高通量、平行性和高效性。

为实现上述目的，发明人设计了由 7 个多靶点结核抗原组成的矩阵，每个矩阵上点有 7 种结核杆菌抗原，每种抗原设 2 个平行点。阴性对照点为抗原空白对照和 pBVIL1 空载体，阳性对照点为人 IgG。采用点接触法将 7 种结核抗原固定于芯片基片上，与结核病患者血清相互作用，采用“胶体金—银染”使芯片显色，通过结果判断，研究结核患者血清与各个靶点抗原的反应情况，统计患者血清中结核抗体反应性，并分析其临床意义。

本发明是通过以下技术方案得以实现的：首先制备结核表位抗原，利用分子生物学方法进行制备，将制备的结核抗原纯化后进行预处理，采用点接触法制备结核抗体多靶点检测芯片，封闭并干燥，获得本发明的蛋白芯片。在使用该芯片进行结核抗体检测时，将结核病患者血清与芯片进行反应，漂洗后采用胶体金标记蛋白反应，用硝酸银溶液显色，可以目视或用普通图像扫描仪记录结果，分析其临床意义。

本发明可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片可以对患者血清中 7 种抗结核杆菌抗体进行检测，结果显示，与痰涂片和痰菌培养检测方法的敏感性相比，可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片敏感性分别为 98.5%和 96.6%，特异性为 93.3%，显著高于现有金标准检测方法。所制备的可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片可用于结核病的临床辅助诊断，大大提高痰涂片和痰菌培养阴性患者的检出率。

与现有技术相比，本发明具有以下特点：

1. 本发明建立在可视化蛋白芯片检测技术基础上

本发明所涉及的结核杆菌特异优势表位抗原共有 7 种，采用蛋白芯片法可通过一次加样就能达到检测患者血清中 7 种抗体反应程度，检测效率远高于现有的酶联检测技术和金标试剂，采用“胶体金—银染”可实现蛋白芯片检测结果的可视化，无需购买昂贵的芯片扫描仪，适合临床推广。

2. 本发明具有一定的临床意义。

本发明所采用的多靶点抗原是具有结核杆菌特异的表位，它集中了目前大部分检测用抗原。7 种抗体具有各自的临床意义，与临床研究关系密切。

附图说明

图 1 纯化后结核杆菌特异表位抗原的 SDS-PAGE 分析，其中 1. ESAT-6；2. CFP10；3. 38kD；4. Mtb8；5. Mtb8.4；6. Mtb16.3；7. MPT64；M. 低分子量蛋白标准。

图 2 可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片反应矩阵设计图，其中 1a 和 1b 为 ESAT-6 抗原；2a 和 2b 为 Mtb8 抗原；3a 和 3b 为 Mtb8.4 抗原；4a 和 4b 为 CFP10 抗原；5a 和 5b 为 Mtb16.3 抗原；6a 和 6b 为 38kD 抗原；1c 和 1d 为 MPT64 抗原；2c、2d、3c 和 3d 为 IL1 阴性对照；4c、4d、5c 和 5d 为 pBVIL1 空载体阴性对照；6c 和 6d 为 IgG 阳性对照。

图 3 可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片检测结果及判定，其中 A 为 85729 号 TB 患者血清样本，判定为阳性；B 为 85518 号 TB 患者血清样本，判定为可疑；C 为 1 号 Donor 血清样本，判定为阴性。

具体实施方式

实施例 1 可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片反应矩阵设计和芯片制备

一、材料

原核表达载体 pBVIL1 由本室构建。结核杆菌 7 种特异抗原基因质粒由本室构建并保存。实验所需 Pyrobest DNA 聚合酶和 Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品，DNA 限制性内切酶 Sal I、Xho I 和 Xba I，以及 T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司。阴离子交换柱 Q-Sepharose FF 和凝胶过滤柱 Sephardex G-50 购自于 Pharmacia Biotech 公司，脲、蔗糖购自于北京化学试剂公司，溶菌酶、BSA 购自于 Promega 公司，修饰的玻璃基片由深圳益盛堂公司提供。

二、方法结果

1. 结核杆菌 7 种特异表位抗原的制备

根据特异表位抗原肽段的核苷酸序列设计合成上下游引物，所使用的限制性内切酶分别为 *Bam*HI 和 *Xho* I。

用于扩增特异表位抗原肽段 38kD 的引物序列如下：

38kD-F: 5'-GGGATCCGCGGCGGGCTGTGGCTCGA-3'

38kD-R: 5'-GCTCGAGGCTGGAAATCGTCGCGA-3'

用于扩增特异表位抗原肽段 ESAT6 的引物序列如下：

ESAT6-F: 5'-GGGATCCCATTCCTCCTTGACGA-3'

ESAT6-R: 5'-GCTCGAGGTTTCAGCTCGGTAGCCGT-3'

用于扩增特异表位抗原肽段 CFP10 的引物序列如下：

CFP10-F: 5'-CGGATCCGAAGCAGCCAATAAGCAG-3'

CFP10-R: 5'-GCTCGAGCGAGGACAGCGCCTGCTG-3'

用于扩增特异表位抗原肽段 MPT64 的引物序列如下：

MPT64-F: 5'-GGGATCCCCCAAGACCTACTGCGA-3'

MPT64-R: 5'-GCTCGAGCGGCGCTATCGATACCT-3'

用于扩增特异表位抗原肽段 Mtb8 的引物序列如下：

Mtb8-F: 5'-GGGATCCACCAGCCCCACATCCT-3'

Mtb8-R: 5'-GCTCGAGAATGACCCGAGCGACGCGGA-3'

用于扩增特异表位抗原肽段 Mtb8.4 的引物序列如下:

Mtb8.4-F: 5'-GGGATCCCCGGGGTCGCCTCCGCA-3'

Mtb8.4-R: 5'-GCTCGAGTTGCGCGGCCATGGCA-3'

用于扩增特异表位抗原肽段 Mtb16.3 的引物序列如下:

Mtb16.3-F: 5'-GGGATCCCGGACAAGACGACACAGA-3'

Mtb16.3-R: 5'-GCTCGAGGCCCTCGACTCGTTTCTT-3'

以结核杆菌 7 种特异抗原基因质粒为模板, 分别扩增了 38kD、ESAT-6、CFP10、MPT64、Mtb8、Mtb8.4 和 Mtb16.3 特异表位抗原肽段的基因片段。PCR 扩增条件如下: 预变性 95℃ 2 分钟, 变性 94℃ 30 秒; 复性 58℃ 30 秒; 延伸 72℃ 30-90 秒 (随基因长度不同而不同), 扩增 32 个循环, 再 72℃ 延伸 7 分钟。PCR 扩增所得的片段通过电泳鉴定, 表明均得到相应大小的基因片段。将 PCR 产物用限制性内切酶酶切并连接入经相同限制性内切酶酶切的 pBVIL1 载体, 测序由利嘉富诚生物技术有限公司完成。

用所得到的重组质粒转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 热诱导表达, 收集菌体, 将沉淀称湿重, 用 10 倍体积的 20 mmol/L pH8.0 TE 缓冲液将沉淀悬起, 加入溶菌酶(1mg/ml 悬液), 在室温下磁力搅拌 10 分钟。在冰浴中超声波破碎菌, 每次超 30 秒钟, 间隔 30 秒钟, 共超 10 次。8℃, 1,2000rpm, 离心 20 分钟, 弃上清, 沉淀用 1mol/L NaCl (用 TE 配制)洗一次, 再用 TE 洗 2 次, 收集沉淀。沉淀用 8 M 脲 (用 PH8.0 TE 配制)溶解, 加 1% β -巯基乙醇。再于 20℃ 1,2000 rpm 离心 10 分钟, 去沉淀取上清。将上述溶解的包涵体溶液过 Q-Sepharose FF 阴离子交换柱, 用平衡液 (pH8.0, 20mmol/L TE 含 6 mol/L 脲, 0.1% β -巯基乙醇)清洗后, 用不同浓度的 NaCl (用平衡液配制)洗脱, 收集各洗脱峰, 经 SDS-PAGE 鉴定, 收集 0.05mol/L NaCl 洗脱峰。再过 Sephardex G-50 凝胶过滤

柱，收集第一洗脱峰。纯化的抗原进行 SDS-PAGE 分析，结果表明获得了纯度较高的特异表位抗原肽段（图 1）。

2. 可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片反应矩阵的设计

设计了由 7 中结核杆菌特异表位抗原组成的反应矩阵，每个矩阵上点有 7 种结核杆菌抗原、IL1 阴性对照、pBVIL1 空载体阴性对照和 IgG 阳性对照，每种抗原设 2 个平行点。图 2 为可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片反应矩阵设计图模式图，其中 1a 和 1b 为 ESAT-6 抗原；2a 和 2b 为 Mtb8 抗原；3a 和 3b 为 Mtb8.4 抗原；4a 和 4b 为 CFP10 抗原；5a 和 5b 为 Mtb16.3 抗原；6a 和 6b 为 38kD 抗原；1c 和 1d 为 MPT64 抗原；2c、2d、3c 和 3d 为 IL1 阴性对照；4c、4d、5c 和 5d 为 pBVIL1 空载体阴性对照；6c 和 6d 为 IgG 阳性对照。

3. 可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片的制备

运用点接触法进行点样，每点点样量为 1 nL，抗原浓度为 1mg/mL，0.01mol/L PBS (pH=7.4) 溶解稀释抗原。点样后将芯片室温放置 4h，封闭液 0.1 mol/L PBS (1%BSA, pH=7.4) 封闭 2 小时，以封闭基片表面未结合的空白位点。用滤纸将微阵列周围的液体吸干后干燥，4℃保存备用。

实施例 2 结核病患者和正常献血员血液样品抗体的检测及信号采集

一、材料

胶体金标记蛋白 A、对苯二酚柠檬酸钠、柠檬酸、硝酸银购自北京化学试剂公司。

二、方法结果

1. 胶体金制备

采用柠檬酸三钠还原法制备成 15nm 粒径胶体金溶液，取 1% 四氯化金 1ml 加入 99ml 去离子水稀释成浓度为 0.01%，取 100 ml 0.01%四氯化金水溶液加热至沸腾，迅速加入 1% 柠檬酸三钠 1.0ml，煮沸约 5 分钟后出现透明橙红色时停止加热，待冷却后加入去离子水补充至原体积。制备好的胶体金溶液应为透明

橙红色，无沉淀。电镜下观察无聚集，分散均匀，测定其平均直径为 15nm。合格的胶体金溶液 4℃ 保存备用。

2. 胶体金标记 A 蛋白探针制备

用去离子水配制 0.1M 碳酸钾和 3%的聚乙二醇（分子量 20,000）。首先用 0.1M 碳酸钾调节胶体金溶液 pH 至 6.0，按胶体金溶液与 A 蛋白的最佳比例（一般按 1ml 胶体金溶液标记 10 μ g A 蛋白）。室温搅拌 15 分钟后，加入 3% 的 PEG 使其终浓度为 0.05%，继续充分搅拌混匀 15 分钟，室温静置 30 分钟，4℃ 14000 rpm 离心 45 分钟，沉淀用含 0.01M PBS(1% BSA、0.2% 叠氮钠，pH7.2-7.4)溶解，再次 4℃ 14000rpm 离心 45 分钟，沉淀加入初始体积 1/10 的 0.01M PBS(1% BSA、0.2% 叠氮钠，pH7.2-7.4) 缓冲液溶解，0.22 μ m 硝酸纤维素膜除菌过滤后，4℃ 保存备用。

3. 结核病患者和正常献血员血液样品抗体的检测及信号采集

分别将结核病患者和正常献血员血液样品 1:10 稀释，每矩阵 30 μ L，与芯片室温孵育 1h。用 PBST 洗涤 5 次，加入胶体金标记 A 蛋白探针，每矩阵 30 μ L 室温孵育 30 分钟，洗涤 5 次后，再用双蒸水洗涤 2 次。加入新鲜配制的银显影 A 液 20 μ L，B 液 20 μ L，轻轻振荡，避光作用 10 分钟。用双蒸水洗涤后凉干。目视或使用 Canon LiDE20 扫描仪分析各点的显色强度。结果判断原则：7 种抗原中任何 2 种或 2 种以上抗原阳性均判定为阳性，仅 1 种抗原阳性判定为可疑，7 种抗原均为阴性判定为阴性（图 3）。

实施例 3 可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片临床应用

一、材料

实施例 2 所研制的可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片。临床结核病患者阳性血液样本和正常献血员血液样本。

二、方法结果

用所研制的可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片检测结核病患者和献血员的血液样品，按照结果判定原则判定阴性或阳性结果，并与痰涂片和痰菌培养结果进行比较，结果见表1。

在48例临床确诊结核病人中，痰涂片阳性17例，阴性31例，敏感性为35.4%。而可视化抗体检测蛋白芯片检测阳性47例，可疑1例，敏感性为98.5%。其中痰涂片17例阳性样品，可视化抗体检测蛋白芯片也均为阳性；而在痰涂片31例阴性样品中，可视化抗体检测蛋白芯片检测29份阳性，2份可疑，见表2。

在29例临床确诊结核病人中，痰菌培养阳性14例，阴性15例，敏感性48.3%。而可视化抗体检测蛋白芯片检测阳性28例，1例可疑，敏感性96.6%。其中痰菌培养14例阳性样品，可视化抗体检测蛋白芯片也均为阳性；而在痰菌培养15例阴性样品中，可视化抗体检测蛋白芯片检测14例阳性，1例可疑，见表3。

30份献血员样品中可视化抗体检测蛋白芯片检测出1例阳性，1例可疑。特异性为93.3%。

表1 可视化多靶点结核抗体蛋白芯片检测结核病患者和献血员血液样品与痰涂片和痰菌培养结果的比较

No	Status	ESAT-6	Mtb8	Mtb8.4	CFP10	Mtb16.3	38kD	MPT64	芯片结果	痰涂片	痰菌培养
85701	TB	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—
64040	TB	+	—	—	++	—	—	+	+	—	ND
85759	TB	+	—	—	+++	—	++	—	+	+	+
85713	TB	+	—	—	++	—	++	—	+	—	ND
85689	TB	—	—	—	+	—	+	—	+	+	+
85749	TB	—	+++	—	+	—	++	—	+	+	ND
85518	TB	—	—	—	+	—	—	—	±	—	ND
85707	TB	±	—	—	++	—	+	—	+	—	ND

85714	TB	++	—	+	++	—	+++	±	+	—	—
85652	TB	+	—	+	++	—	+++	+	+	+	+
85900	TB	+	—	+	+++	—	+	—	+	+	—
85463	TB	+	—	—	++	±	+	—	+	—	ND
85694	TB	—	—	++	+	—	+++	—	+	+	+
85470	TB	+	—	—	++	—	+	—	+	+	+
85487	TB	±	—	—	+	—	+	—	+	—	ND
85473	TB	+	+	+	++	—	+++	±	+	+	+
85657	TB	—	—	—	++	—	+	—	+	—	ND
85661	TB	±	—	—	++	—	+	—	+	—	+
85643	TB	—	—	—	+	—	+	—	+	—	ND
85680	TB	—	—	—	+	—	—	—	±	—	—
85721	TB	+	—	—	+	+	+	±	+	—	—
85728	TB	±	—	—	++	+	+	—	+	+	+
85700	TB	+	—	—	++	—	+	—	+	—	ND
85705	TB	±	—	—	+	—	+	—	+	—	—
85695	TB	+	+	±	++	—	+++	—	+	—	+
85489	TB	±	—	—	++	—	+	—	+	—	—
85704	TB	±	+	—	±	±	++	±	+	—	—
56377	TB	+	—	—	++	—	—	—	+	—	—
85486	TB	+	—	—	++	—	+	—	+	—	—
85627	TB	+	—	±	+	—	—	—	+	—	ND
85450	TB	+	—	±	++	+	++	—	+	—	—
85479	TB	+	+	+	+	+	++	+	+	+	—
85662	TB	—	—	—	++	—	—	—	+	+	ND
85484	TB	+	—	±	+	—	+	—	+	—	ND
85655	TB	++	—	++	+	±	+	—	+	—	—
56741	TB	+	—	—	+	—	++	+	+	—	—
85729	TB	—	—	—	++	—	++	++	+	+	+
71656	TB	+	+	—	++	—	+++	±	+	+	+
85536	TB	±	—	+	++	—	—	—	+	—	ND
85650	TB	±	—	—	++	—	±	—	+	—	ND
85622	TB	—	—	—	++	—	—	—	+	+	+
85614	TB	+	—	±	+	—	+	—	+	—	ND
85517	TB	+	—	—	—	—	++	+++	+	+	+
85496	TB	—	—	—	++	+	±	—	+	+	+
85495	TB	±	+++	—	+	—	+++	+	+	+	ND
85651	TB	±	+	±	++	—	±	—	+	—	ND
85502	TB	±	—	—	++	—	±	—	+	—	ND

85644	TB	+	—	+	++	—	+	—	+	—	—
1	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
2	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
3	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
4	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
5	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
6	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
7	Donor	—	—	—	+	—	—	—	±		
8	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
9	Donor	—	—	—	+	—	+	—	+		
10	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
11	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
12	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
13	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
14	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
15	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
16	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
17	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
18	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
19	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
20	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
21	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
22	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
23	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
24	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
25	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
26	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
27	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
28	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
29	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		
30	Donor	—	—	—	—	—	—	—	—		

ND: no detection

表 2 结核杆菌可视化抗体检测蛋白芯片与痰涂片检测结果比较

蛋白芯片				
痰涂片	+	—	可疑	合计
+	17	0	0	17
—	29	0	2	31
合计	46	0	2	48

表 3 结核杆菌可视化抗体检测蛋白芯片与痰菌培养检测结果比较

蛋白芯片				
痰菌培养	+	—	可疑	合计
+	14	0	0	14
—	14	0	1	15
合计	28	0	1	29

序列表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所

<120> 一种可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片、其制备方法及用途

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 354

<212> PRT

<213> 结核杆菌(Mycobacterium tuberculosis)

<400> 2

Ala Ala Gly Cys Gly Ser Lys Pro Pro Ser Gly Ser Pro Glu Thr Gly
1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Thr Val Ala Thr Thr Pro Ala Ser Ser Pro Val Thr
20 25 30

Leu Ala Glu Thr Gly Ser Thr Leu Leu Tyr Pro Leu Phe Asn Leu Trp
35 40 45

Gly Pro Ala Phe His Glu Arg Tyr Pro Asn Val Thr Ile Thr Ala Gln
50 55 60

Gly Thr Gly Ser Gly Ala Gly Ile Ala Gln Ala Ala Ala Gly Thr Val
65 70 75 80

Asn Ile Gly Ala Ser Asp Ala Tyr Leu Ser Glu Gly Asp Met Ala Ala
85 90 95

His Lys Gly Leu Met Asn Ile Ala Leu Ala Ile Ser Ala Gln Gln Val
100 105 110

Asn Tyr Asn Leu Pro Gly Val Ser Glu His Leu Lys Leu Asn Gly Lys
115 120 125

Val Leu Ala Ala Met Tyr Gln Gly Thr Ile Lys Thr Trp Asp Asp Pro
130 135 140

Gln Ile Ala Ala Leu Asn Pro Gly Val Asn Leu Pro Gly Thr Ala Val
145 150 155 160

Val Pro Leu His Arg Ser Asp Gly Ser Gly Asp Thr Phe Leu Phe Thr

165					170					175					
Gln	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	Asp	Pro	Glu	Gly	Trp	Gly	Lys	Ser	Pro	Gly
			180					185					190		
Phe	Gly	Thr	Thr	Val	Asp	Phe	Pro	Ala	Val	Pro	Gly	Ala	Leu	Gly	Glu
		195					200					205			
Asn	Gly	Asn	Gly	Gly	Met	Val	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	Thr	Pro	Gly	Cys
	210					215					220				
Val	Ala	Tyr	Ile	Gly	Ile	Ser	Phe	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Gln	Arg	Gly
225						230					235				240
Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gly	Asn	Phe	Leu	Leu	Pro
				245					250					255	
Asp	Ala	Gln	Ser	Ile	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr
			260					265					270		
Pro	Ala	Asn	Gln	Ala	Ile	Ser	Met	Ile	Asp	Gly	Pro	Ala	Pro	Asp	Gly
		275					280					285			
Tyr	Pro	Ile	Ile	Asn	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Ile	Val	Asn	Asn	Arg	Gln	Lys
	290					295					300				
Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Phe	Leu	His	Trp	Ala	Ile
305						310					315				320
Thr	Asp	Gly	Asn	Lys	Ala	Ser	Phe	Leu	Asp	Gln	Val	His	Phe	Gln	Pro
				325					330					335	
Leu	Pro	Pro	Ala	Val	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Ala	Leu	Ile	Ala	Thr	Ile
			340					345					350		

Ser Ser

<210> 2
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 结核杆菌

<400> 4

His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala

1	5	10	15
Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys	20	25	30
Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn	35	40	
<210> 3			
<211> 37			
<212> PRT			
<213> 结核杆菌			
<400> 6			
Glu Ala Ala Asn Lys Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn	5	10	15
Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln	20	25	30
Gln Ala Leu Ser Ser	35		
<210> 4			
<211> 154			
<212> PRT			
<213> 结核杆菌			
<400> 8			
Pro Lys Thr Tyr Cys Glu Glu Leu Lys Gly Thr Asp Thr Gly Gln Ala	5	10	15
Cys Leu Ile Gln Met Ser Asp Pro Ala Tyr Asn Thr Asn Ile Ser Leu	20	25	30
Pro Ser Tyr Tyr Pro Asp Gln Lys Ser Leu Glu Asn Tyr Ile Ala Gln	35	40	45
Thr Arg Asp Lys Phe Leu Ser Ala Ala Thr Ser Ser Thr Pro Arg Glu	50	55	60
Ala Pro Tyr Glu Leu Asn Ile Thr Ser Ala Thr Tyr Gln Ser Ala Ile	65	70	75
Pro Pro Arg Gly Thr Gln Ala Val Val Leu Lys Val Tyr Gln Asn Ala	85	90	95

Gly Gly Thr His Pro Thr Thr Thr Tyr Lys Ala Phe Asp Trp Asp Gln
100 105 110

Ala Tyr Arg Lys Pro Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Trp Gln Ala Asp Thr
115 120 125

Asp Pro Leu Pro Val Val Phe Pro Ile Val Gln Gly Glu Leu Ser Lys
130 135 140

Gln Thr Gly Gln Gln Val Ser Ile Ala Pro
145 150

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 结核杆菌

<400> 10

Thr Ser Pro Thr Ser Trp Glu Gln Ala Ala Ala Glu Ala Val Gln Arg
1 5 10 15

Ala Arg Asp Ser Val Asp Asp Ile Arg Val Ala Arg Val Ile
20 25 30

<210> 6
<211> 64
<212> PRT
<213> 结核杆菌

<400> 12

Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Val Asp Ala Val Ile Asn Thr Thr
1 5 10 15

Cys Asn Tyr Gly Gln Val Val Ala Ala Leu Asn Ala Thr Asp Pro Gly
20 25 30

Ala Ala Ala Gln Phe Asn Ala Ser Pro Val Ala Gln Ser Tyr Leu Arg
35 40 45

Asn Phe Leu Ala Ala Pro Pro Pro Gln Arg Ala Ala Met Ala Ala Gln
50 55 60

<210> 7
<211> 143
<212> PRT

<213> 结核杆菌

<400> 14

Ala Asp Lys Thr Thr Gln Thr Ile Tyr Ile Asp Ala Asp Pro Gly Glu
1 5 10 15

Val Met Lys Ala Ile Ala Asp Ile Glu Ala Tyr Pro Gln Trp Ile Ser
20 25 30

Glu Tyr Lys Glu Val Glu Ile Leu Glu Ala Asp Asp Glu Gly Tyr Pro
35 40 45

Lys Arg Ala Arg Met Leu Met Asp Ala Ala Ile Phe Lys Asp Thr Leu
50 55 60

Ile Met Ser Tyr Glu Trp Pro Glu Asp Arg Gln Ser Leu Ser Trp Thr
65 70 75 80

Leu Glu Ser Ser Ser Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gly Thr Tyr Arg Leu
85 90 95

Ala Pro Lys Gly Ser Gly Thr Glu Val Thr Tyr Glu Leu Ala Val Asp
100 105 110

Leu Ala Val Pro Met Ile Gly Met Leu Lys Arg Lys Ala Glu Arg Arg
115 120 125

Leu Ile Asp Gly Ala Leu Lys Asp Leu Lys Lys Arg Val Glu Gly
130 135 140

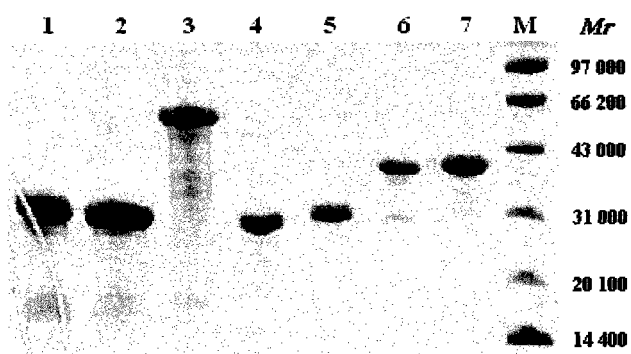


图 1

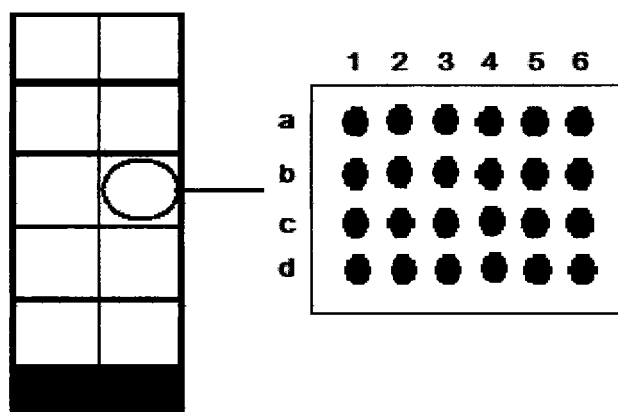


图 2

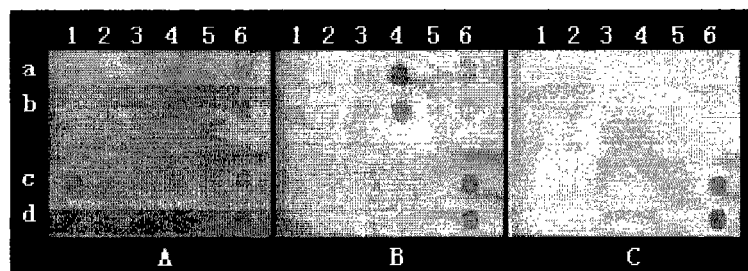


图 3

专利名称(译)	一种可视化结核抗体检测蛋白芯片、制备方法及应用		
公开(公告)号	CN101639476A	公开(公告)日	2010-02-03
申请号	CN200810134807.9	申请日	2008-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	张贺秋 冯晓燕 陈坤 宋晓国 王国华		
发明人	张贺秋 冯晓燕 陈坤 宋晓国 王国华		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
其他公开文献	CN101639476B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用克隆表达的七种结核杆菌特异优势表位抗原研制的可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片，还公开了该蛋白芯片的制备方法及应用。本发明将七种结核杆菌特异优势表位抗原于修饰的基片上，制备可检测七种结核抗体的多靶点蛋白微阵列，建立免疫金银染色检测系统替代芯片原有荧光标记物。通过本发明检测系统的应用，无需使用芯片荧光扫描仪，通过目测及简单的图像扫描即可对芯片的反应结果进行判断，达到对结核病检测之目的。可视化多靶点结核抗体检测蛋白芯片敏感性分别为98.5%和96.6%，特异性为93.3%，显著高于痰涂片和痰菌培养方法，并且显著提高了痰涂片和痰菌培养阴性患者的检出率，可用于结核病的临床辅助诊断，具有一定的临床应用前景。

