

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610095107.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/571 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月21日

[11] 公开号 CN 1916633A

[22] 申请日 2006.9.8

[21] 申请号 200610095107.4

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号

[72] 发明人 邹全明 肖洁 郭刚 曾明
杨珺 钟情 宁亚蕾 张卫军

[74] 专利代理机构 重庆志合专利事务所

代理人 胡荣琿

权利要求书1页 说明书15页 附图3页

[54] 发明名称

检测梅毒螺旋体的方法及试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及联合使用基因重组表达的梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 检测早期梅毒感染的方法。TP0684 在梅毒感染早期即可刺激机体产生相应抗体，而且持续时间长；而 TP0453 抗原性强，含多个抗原决定簇，而且与其它种属螺旋体无交叉反应性。结合两种抗原的特性和优点，将其联合应用于梅毒检测从而大大提高了检测的敏感度和特异性。本发明进一步涉及使用该方法的用于梅毒早期检测的试剂盒。

1. 一种使用抗原组合物检测梅毒螺旋体抗体以诊断早期梅毒感染的方法，其特征在于其中所使用的抗原组合物是梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 的混合物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中所述梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 是以基因重组技术制备的。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，特征在于其中梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 分别具有序列 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中所示的序列。
4. 一种以酶联免疫吸附技术检测梅毒螺旋体感染的试剂盒，其特征在于其中所使用的抗原是梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 的组合形式。
5. 根据权利要求 4 的试剂盒，其特征在于该试剂盒包括（1）分别装有梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 同时包被的预包被酶联板、洗涤液、显色液、中止液、样品稀释液、标记的抗人 IgG、阴性对照样品、阳性标准品的加盖密封的试剂瓶或管，和（2）分隔并集中包装这些试剂瓶或管的包装盒。

检测梅毒螺旋体的方法及试剂盒

技术领域

本发明涉及医学免疫检测方法，特别是涉及使用新的梅毒特异性抗原，以免疫学方法检测早期梅毒感染的方法和试剂盒。

背景技术

梅毒是一种古老的性传播疾病。人类梅毒的病原体是梅毒螺旋体，亦称苍白螺旋体 (*Treponema pallidum*, TP)。该病原菌为专性人体寄生菌，很不容易人工培养。梅毒病程漫长，危害严重是众所周知的。早期侵犯生殖器和皮肤，晚期侵犯全身各器官，尤其是心血管和中枢神经系统。梅毒按传染途径可分为后天梅毒（获得性）和先天梅毒。青霉素对梅毒有很好的疗效，但不能防止 TP 再感染。

近年来全球梅毒发病率呈逐年上升趋势，据报道全世界每年约有一千二百万例新感染病例。特别是，梅毒与艾滋病的传播途径相同，一期梅毒黏膜或皮肤屏障缺损为人类免疫缺陷病毒（HIV）提供了进入人体的门户，螺旋体脂蛋白促使巨噬细胞释放细胞因子有利于 HIV 的复制，感染梅毒后会使感染和传播艾滋病的危险性大大增加。因此，WHO 已将梅毒列为严重危害人类健康的全球性公共卫生问题。为了有效控制梅毒的传播，中国的卫生部门亦已要求各医疗单位对婚前、献血、输血、手术、参军、招工，以及旅游、饮食服务及个体摊贩等行业从业人员必须进行梅毒的血清学筛查。

目前梅毒血清学检测常见的方法包括快速血浆反应素环状卡片实验（RPR）、甲苯胺红不加热血清实验（TRUST）、梅毒螺旋体明胶凝集实验（TPPA）、酶联免疫吸附方法（ELISA）等。RPR、TRUST 检查的是梅毒螺旋体非特异性抗体，灵敏度和特异性都较差（假阳性和假阴性率高达 30%）。TPPA 方法虽然特异性和灵敏度都较高，但所使用的天然螺旋体抗原来源困难、价格昂贵、操作复杂、判读结果易受主观因素干扰，而且难以实现自动化。近年来，用 ELISA 法检测梅毒螺旋体抗体最为普及。

目前使用的 ELISA 试剂盒绝大多数是利用基因重组的 TpN15(TP0171)、TpN17(TP0435)、TpN47(TP0574)、TpN44.5(TmpA\TP0768)等四种抗原检测梅毒患者血

清中相应的特异性抗体。这类试剂虽然对二期有较高的检出率，但特异性不好，孕妇、自身免疫性疾病、慢性迁延性肝炎病人时常出现假阳性结果。同时，对早期梅毒感染的检出能力较差（对一期梅毒的敏感性仅为 80%），窗口期较长，漏检的血液成为传染源后往往会引发严重后果。因此，寻找新的特异性和灵敏度更高的抗原来提高梅毒早期检出率是本领域研究急需解决的问题。

发明内容

本发明涉及医学免疫检测方法，特别是涉及使用新的梅毒特异性抗原，以免疫学方法检测早期梅毒感染的方法和试剂盒。

本发明的一个目的在于提供一种检测梅毒螺旋体抗体，用于诊断早期梅毒感染的方法，其中所使用的双抗原组合是梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453。

根据本发明的一个优选实施方案，梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 是以基因重组技术产生的，且富含抗原决定簇。

根据本发明的另一个优选实施方案，其中梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 分别具有序列表 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中所示的序列。

根据本发明的另一个优选实施方案，其中所说的方法是酶联免疫吸附技术间接法。

虽然有关 TP 进入机体内并引发免疫反应的机制尚不完全清楚，但目前普遍认为调理素介导的吞噬作用在机体早期清除 TP 病原体中起到重要作用。研究表明，膜蛋白和脂蛋白是 TP 的主要免疫原，能在病原体入侵早期刺激机体产生强烈的抗体反应。因此，脂蛋白抗原在梅毒感染检测中可能被用作重要的候选分子。

在已知的膜抗原中，TP0684 是一种糖结合蛋白 (TpMglB-2)，其基因编码甲基半乳糖苷 ABC 转位酶。实时荧光 PCR 检测发现，TP0684 抗原基因在梅毒感染兔模型中呈高表达，并在感染七天后即能与兔血清发生较强的反应，且这种强反应性存在于感染各期 (McKevitt M, Brinkman MB, McLoughlin M, et al. *Genome, Infect Immun.* 2005,73(7): 4445-4450)。因此，TP0684 抗原应是一种极有前景的梅毒特异性早期检测抗原。TP0453 抗原也是一种外膜蛋白，其整个分子的抗原性较强，并存在多个强抗原表位。该抗原与其它细菌膜抗原无同源性，并且与其他螺旋体属也不具有交叉反应。因此，该膜抗原

也为认为是梅毒抗体血清学检测的重要候选抗原 (Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, et al., J Clin Microbiol. 2003 Aug; 41(8): 3668-3674)。

本发明人在已有知识的基础上,结合了 TP0453 抗原特异性好和 TP0684 抗原能诱发早期免疫应答的两方面特性,以基因重组技术成功地克隆表达了这两种多肽并将两者联合应用于本发明的梅毒早期检测中。

可以使用常规的基因重组技术(例如参见 Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor laboratory,1989)完成重组载体的构建、蛋白质产物的表达、表达产物的纯化和鉴定等操作,并在此基础上制备用于本发明的重组 TP0453 抗原和 TP0684 抗原。简单地说,重组制备方法包括:

(1) 以梅毒螺旋体标准株(Nichols 株)的基因组序列为模板,分别设计 TP0684 和 TP0453 基因的引物,克隆 TP0684 和 TP0453 富含抗原决定簇基因片段;(2) 将上述克隆基因转入表达载体,表达相应的抗原蛋白;(3) 分离纯化上述表达蛋白。其中,基因扩增反应所使用的正向和反向寡核苷酸引物分别是 P0684 (1): 5' -TATCATATGAA GGAGAATTCTTGCACGGCG-3' (SEQ ID NO: 3), 和 (2): 5' -TTAGCGGCCGCGT ATTTGAGCTTGTCTGT-3'(SEQ ID NO: 4); P0453 (1): 5' -TAACCATGGCGTGG AAGGCATCAGT-3'(SEQ ID NO: 5), 和 (2): 5' -TTGAGCTCTTACGAACCTTCCC TTTTGG-3'(SEQ ID NO: 6)(参见实施例 1 和 2)。

可以使用各种已知的免疫学检测方法,利用本发明制备的梅毒螺旋体表面膜抗原材料检测样品中特异性抗体的存在极其相对量。但从经济实用角度考虑,其中优选的是酶联免疫吸附技术(ELISA)。因此,本发明的方法进一步包括:经方阵滴定,确定包被抗原(检测蛋白)的浓度,并用定量检测临床血清和质控参比品中的 TP0684、TP0453 抗体以获得基本参数。

本发明的另外一个目的在于提供一种利用梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 以常规免疫学检测技术早期检测梅毒感染的试剂盒,该试剂盒包括(1) 分别装有梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 同时包被的预包被酶联板、洗涤液、显色液、中止液样品稀释液、标记的抗人 IgG、阴性对照样品、阳性标准品的加盖密封的试剂瓶或管,和(2) 分隔并集中包装这些试剂瓶或管的包装盒。

根据本发明试剂盒的一个优选实施方案,梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 是以基

因重组技术产生的，且富含抗原决定簇。

根据本发明试剂盒的另一个优选实施方案，其中梅毒特异性抗原 TP0684 和 TP0453 分别具有序列 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 中所示的序列。

本发明摒弃目前梅毒检测试剂盒所采用的几个传统抗原的组合 (TpN15、TpN17、TpN47、TpN44.5)，选用重组产生的、特异性和灵敏度更高的梅毒特异性抗原分子 TP0684 和 TP0453 的混合物包被固相载体。并在该方法的基础上，制备了应用于本发明的梅毒检测方法的梅毒检测试剂盒。

酶联免疫吸附法 (ELISA) 是一种利用抗原抗体反应检测体液中抗体或抗原性物质的方法。该方法敏感性高，特异性强，可重复性好，而且可实现检测的自动化和标准化。用于检测抗体的 ELISA 试剂盒的关键是制备特异性的抗原。本发明中，发明人成功地克隆并表达了两种新的梅毒螺旋体表面膜抗原，解决了梅毒螺旋体的体外培养困难和天然抗原来源困难的问题，从而也为梅毒的早期检测和大规模普查提供了条件。

因此，本发明以基因重组梅毒螺旋体特异性抗原为基础，研制一种能检测梅毒抗体的酶联免疫试剂盒。本发明的试剂盒易于放大、可重复性好，而且生产成本底，极易在发展中国家特别是农村地区推广使用。与同类产品相比，由于本发明采用的是两种新型抗原 TP0684 和 TP0453。TP0684 在梅毒感染早期就能刺激机体产生相应抗体，而且持续时间长，因此在早期梅毒和潜伏梅毒检测中具有独特的检测价值。而 TP0453 抗原性强，含多个抗原决定簇，与其它种属无交叉反应性，中和两种抗原特性，将其联合应用不仅提高了检测的敏感性和特异性，而且可以显著提高早期梅毒的检出率。此外，由于选用了两种蛋白富含抗原决定簇的区段，应能进一步提高检测的特异性。经国家参考品评测和 200 份临床标本验证，本发明的试剂盒各项检测指标均完全符合国家标准，对一期梅毒的检出率达到 99%，二期梅毒可达 100%，而且特异性达到 100%，无假阳性出现 (参见实施例 3-5)。

附图说明

图 1 显示本发明的目的基因 TP0684 的 PCR 克隆扩增结果。其中泳道 1 为核酸(DNA)分子量标准 (Marker)；泳道 2 为目的基因 TP0684 PCR 扩增产物(1212bp)。

图 2 显示本发明的目的基因 TP0453 的 PCR 克隆扩增结果。其中泳道 1 为核酸(DNA)

分子量标准 (Marker); 泳道 2 为目的基因 TP0453 扩增产物(779bp)。

图 3 显示 TP0684 重组表达质粒的酶切鉴定结果。其中泳道 1 为核酸(DNA)分子量标准 (Marker); 泳道 2 为重组质粒 pET-22b-TP0684 *Nde I* 和 *Not I* 双酶切产物(1212bp)。

图 4 显示 TP0453 重组表达质粒的酶切鉴定。其中泳道 1 为核酸(DNA)分子量标准 (Marker); 泳道 2 为重组质粒 pET-28a-TP0453 *Not I* 和 *Sac I* 双酶切产物(779bp)。

图 5 显示 TP0684 基因重组菌诱导表达及表达形式 PAGE 电泳图结果。其中泳道 1 为空载体 pET-22b(+)/BL21 对照; 泳道 2 为 TP0684 基因重组菌诱导前 (0 小时); 泳道 3-6 为 TP0684 基因重组菌诱导 2, 4, 6, 8 小时; 泳道 7:蛋白质分子量标准 (Marker); 泳道 8 为 TP0684 基因重组菌诱导 3 小时; 泳道 9 为 TP0684 基因重组菌诱导 3 小时上清表达; 泳道 10 为 TP0684 基因重组菌诱导 3 小时包涵体表达。

图 6 显示 TP0453 基因重组菌诱导表达 PAGE 电泳图结果。其中泳道 1 为空载体 pET-28a(+)/BL21 对照; 泳道 2 为 TP0453 基因重组菌诱导前 (0h); 泳道 3-5 为 TP0684 基因重组菌诱导 2, 4, 6h; 泳道 6 为蛋白质分子量标准 (Marker)。

图 7 显示目的蛋白 TP0684 纯化效果 PAGE 电泳图结果。其中泳道 1 为包涵体溶解液 (纯化前样品); 泳道 2 为空泳道; 泳道 3,4,5,6 为目的蛋白洗脱峰样品; 泳道 7: 蛋白质分子量标准 (Marker)。

图 8 显示用于检测 TP0684 抗原与梅毒阳性血清的免疫反应性的 Western 印迹分析结果。其中 M 是蛋白质分子量标准 (Marker); 泳道 1 是空白对照; 泳道 2 是 TP0684 重组抗原与梅毒阳性血清反应条带。

图 9 显示用于检测 TP0453 抗原与梅毒阳性血清的免疫反应性的 Western 印迹分析结果。其中泳道 1 是蛋白质分子量标准 (Marker); 泳道 2 是 TP0453 重组抗原与梅毒阳性血清反应条带。

具体实施方式

实施例 1: 梅毒螺旋体特异性外膜蛋白 TP0684、TP0453 高效表达蛋白工程菌的构建

TP基因组DNA的制备: 梅毒螺旋体Nichols株由军事医学科学院提供, TP基因组的提取按照天为时代细菌基因组提取试剂盒操作说明进行。

根据Genbank公布的TP0684和TP0453基因核苷酸编码序列，分别选择富含抗原决定簇的区段(SEQ ID NO: 1;SEQ ID NO: 2)，用生物软件Primer Premier V5.0进行引物的设计和合成（下划线标示酶切位点），然后并对TP0684和TP0453基因进行聚合酶链反应（PCR），以扩增所需的扩增基因片段：

P0684 (1) : 5'-TATCATATGAAGGAGAATTCTTGCACGGCG-3', (SEQ ID NO: 3)
(其中以下划线标示 Nde I 酶切位点)；

P0684 (2) : 5'-TTAGCGGCCGCGTATTTGAGCTTGTCTGT-3', (SEQ ID NO: 4)
(其中以下划线标示 Not I 酶切位点)；

P0453 (1) : 5'-TAACCATGGCGTGGAAGGCATCAGT-3', (SEQ ID NO: 5)
(其中以下划线标示 Nco I 酶切位点)；

P0453 (2) : 5'-TTGAGCTCTTACGAACTTCCCTTTTGG-3' , (SEQ ID NO: 6)
(其中以下划线标示 Sac I 酶切位点)。

以梅毒螺旋体 Nichols 株基因组 DNA 作为模板，并使用上述引物分别对 TP0684 和 TP0453 基因进行 PCR 扩增，PCR 反应体系和程序如下：500 μ l 微量离心管中加入下列试剂：模板 DNA 4 μ l；10 \times PCR 缓冲液（不含 MgCl₂） 5 μ l；MgCl₂ 4 μ l；dNTPs(10mmol/L) 4 μ l；上、下游引物（0.025 mmol/L）各 1 μ l；Taq DNA 聚合酶（5u / μ l）0.25 μ l；加去离子水至终体积 50 μ l；混合后加入石蜡油 3 滴。反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 10 分钟后，94 $^{\circ}$ C,45 秒；59 $^{\circ}$ C,45 秒；72 $^{\circ}$ C,1 分钟,35 个循环周期，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

基因扩增结果如图 1 和 2 所示。

TP0684-pMD18-T 和 TP0453-pMD18-T 质粒的构建：PCR 产物经回收纯化后，分别与 pMD18-T-simple 载体（Takara 公司）在 16 $^{\circ}$ C 连接 4 小时。然后参照文献（萨母布鲁克 J.等,《分子克隆实验指南》,第 2 版,科学出版社）中所述的方法将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中，经蓝白斑筛选获得阳性重组子，提取质粒（pMD18-T）DNA，分别经 Nde I 和 Not I、Nco I 和 Sac I 双酶切鉴定后，得重组质粒 TP0684-pMD18-T 和 TP0453-pMD18-T。然后，按常规方法（J.Sambrook, Polyacrylamide gel electrophoresis 1.21-1.32,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Molecular cloning,1989）提取质粒，并对插入片段进行序列测定。

表达载体pET-22b-TP0684和 pET-28a-TP0453的构建：经DNA测序后，用*Nde* I 和 *Not* I 双酶切TP0684-pMD18-T与高效原核表达载体pET-22b(+), 并分别用*Nde* I 和 *Not* I 、*Nco* I 和 *Sac* I 双酶切TP0453-pMD18-T与高效原核表达载体pET-28a(+). 分别回收目的片段后于22℃下连接过夜。然后，将连接产物转化至大肠杆菌BL21中，分别通过Amp⁺抗性、Kan⁺抗性筛选和限制性内切酶酶切鉴定，得到重组原核表达载体pET-22b/TP0684 和 pET-28a/TP0453。酶切结果如图3和4所示。

重组基因工程菌的诱导表达：将重组工程菌分别接种于Amp⁺LB培养液和Kan⁺LB培养液中振荡培养。次日按1%比例转种于Amp⁺LB/Kan⁺LB培养液中。待OD₆₀₀≈0.8时，加入IPTG至终浓度为1mmol/L开始诱导。于诱导0、2、4、6、8小时取样并测定其OD₆₀₀值，同时以空载体菌作为诱导对照。煮沸提取全菌蛋白，采用15%Tricine-SDS-PAGE方法分析目的蛋白条带的相对含量。诱导表达结果如图5和6所示。

目的蛋白表达形式的鉴定：收集诱导表达的重组菌进行冰浴并超声破菌（300W，10秒，间隔10秒，重复50次）。差速离心（750g 30分钟）并去除残留的细胞碎片后，12000g 离心30分钟以分别收集上清和沉淀(即包涵体)，进行15%Tricine-SDS-PAGE分析以鉴定目的蛋白的表达方式。

有关操作具体步骤如下：

(1)使用质粒抽提试剂盒(Omega 公司生产)常规提取质粒 DNA, 并进行琼脂糖凝胶电泳分离（1.0%琼脂糖凝胶，1×TAE 缓冲液，120-150mA，电泳 20-40 分钟。50×TAE 储存液配方：2.0mol/L Tris 碱，1.0mol/L NaAc， 0.1mol/L Na₂EDTA；用冰醋酸调节 pH8.3）。

(2) 质粒 DNA 的酶切反应：质粒 DNA 2μl；10×缓冲液（见 Takara 公司产品说明书）1μl；限制性内切酶 *Nco* I 或 *Nde* I（10u/μl）0.5μl；限制性内切酶 *Nco* I 或 *Sac* I（10u/μl）0.5μl；用双蒸水补齐至 10μl；混合后 37℃温育 2-3 小时。

(3) 电泳分离和目的 DNA 的回收与纯化：在紫外灯下观察并切下琼脂糖凝胶上的目的 DNA 电泳带，然后移入 1.5ml EP 管中；加入 Omega 公司胶回收试剂盒的 DNA 结合缓冲液，65℃水浴使凝胶完全溶化并保持溶液 pH 在 5.0~6.0 之间。将溶胶液移入分离管，12000g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体。加入配套的洗涤缓冲液，12000g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体。重复洗涤 1 次；12000g 离心 1 分钟，分离管移置另一干净

1.5ml EP管, 加入一定体积的 TE 缓冲液, 65℃ 孵育 10 分钟, 12000g 离心 1 分钟, 取一定量电泳, UVP 紫外扫描仪检测回收纯化效果。

(4) 连接反应 (使用 Takara 公司生产的连接试剂盒): 通过紫外分光光度计检测目的 DNA 片段和载体片段的浓度, 根据外源片段与载体摩尔数比一般为 1:2~10 的原则, 设计连接反应体系如下: 目的 DNA 1μl; 质粒载体 1~2μl; 连接酶体系 5μl; 双蒸水 2~3μl; 总体积 10μl。16℃ 连接 12-16 小时。

(5) 感受态菌的制备 (CaCl₂ 法): 无菌接种环蘸取 -70℃ 冻存的细菌保种液, 三线法划线接种于 LB 平板上并于 37℃ 培养 12~16 小时。挑取单个菌落接种于 2ml LB 培养液中, 37℃ 摇床培养 12~16 小时。然后将过夜培养的 DH5a 按 1% 比例转种至 LB 培养液中, 37℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.4 时, 8000g 离心 5 分钟收集细菌。加入 1ml 预冷的 0.1M CaCl₂ 重悬沉淀, 冰水浴 3 小时。4℃ 8000g 离心 5 分钟后弃去上清。然后加入 100μl 预冷的 0.1M CaCl₂ 悬浮沉淀, 冰水浴 1 小时, 备用。

(6) 连接产物转化: 感受态菌液 100μl, 加入连接反应产物; 冰水浴 60 分钟, 42℃ 水浴热休克 90 秒, 迅速放置冰水浴 1~2 分钟; 加 100μl LB 培养液, 37℃ 摇床培养 1 小时; 以 8000g 离心 10 分钟, 吸弃 100μl 上清后混匀沉淀, 各取 50μl 涂布平板, 37℃ 孵箱培养过夜。

实施例 2: 重组菌的发酵培养和表达产物的分离与纯化

采用 B.Bron 10L 发酵罐, 按 10% 比例接种种子菌, 保持 70% 溶氧、温度 37℃、pH7.0。A₆₀₀ 未达到 2 时不加补料, 之后每 0.5 小时流加补料一次使葡萄糖、胰化蛋白胨和 8% 酵母抽提物的终浓度分别为 0.5%、0.2%、和 0.2%。在第 4 次补料后待葡萄糖浓度降为 0.1% 时加入 IPTG 500μmol/L 诱导 4 小时收菌。发酵过程在级联溶氧控制的分批培养基础上, 流加补料。

发酵过程所用培养基为改良 M9-CAA 培养基, 即在 M9-CAA 的基础上添加 0.6% 酵母浸出液和 2mg/L ZnCl₂·4H₂O、2mg/L CoCl₂·4H₂O、4mg/L FeSO₄·16H₂O、5mg/L H₃BO₃、1.6mg/L MnCl₂·4H₂O、4mg/L CuSO₄ 而成。发酵结束后回收菌液, 4℃ 离心 (8000g) 15 分钟。吸弃上清, 收集细菌, 称重后冻存备用。结果: 6LTP0684 发酵菌液可收获的细菌湿重为 320 克; 6LTP0453 发酵菌液的可收获细菌湿重为 400 克。

表达产物的分离和纯化:

包涵体提取：将高效表达的菌体 200-500g 以 TE 缓冲液 1: 10 (W/V) 比例悬浮，4℃ 预冷后采用细胞匀浆机使其混合均匀。采用高压均质机在压力为 40—70Mpa 的条件下进行破菌（共破菌 4~6 次）。破菌（细菌细胞破解率大于 98%）完毕后，取少量菌液涂片染色，显微镜下观察细胞的完整性，确保细胞破碎完全。随后以 500g 离心 25 分钟，弃沉淀，再以 15,000g 离心 40 分钟，弃上清收集沉淀。以 1: 10 (W/V) 的比例分别用洗涤液 A 和 B 各洗涤 2 次。洗涤条件为：4℃ 搅拌 20 分钟，15,000g 离心 40 分钟，收集包涵体沉淀；最后将包涵体用包涵体溶解液以 1: 10 (W/V) 的比例混合，4℃ 搅拌 3 小时，15,000g 离心 45 分钟，取上清作为下一步纯化的原料。

包涵体提取所用缓冲液的组成：TE 缓冲液：20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH 7.5；包涵体洗涤液 A：5 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris、1% Triton X-100，pH 7.5；包涵体洗涤液 B：20 mmol/L Tris、2mol/L Urea，pH 7.5；包涵体溶解液：1 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris、8 mol/L 尿素(pH 7.5)。

镍离子柱纯化：选择镍离子柱 HiTrap Chelating 进行纯化（镍离子柱填料选自 Q Sepharose HP、Q Sepharose FF、Q Sepharose），使用 20mmol/L PB,8mol/L 尿素，在 pH 7.5 条件下对目的蛋白进行纯化，使用 0.5mol/L 咪唑梯度洗脱。

Superdex 凝胶过滤层析纯化：步骤 2 所获目标蛋白经葡聚糖 PEG 透析袋内浓缩或超滤浓缩后用预平衡的凝胶过滤柱 Superdex 纯化（凝胶过滤柱填料选自 Superdex 75、Superdex 200、Superdex HR 10/30）。

纯化后的目的蛋白用聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）检定其纯度，并用 Lowry 法检测蛋白浓度。TP0684 蛋白包涵体纯化结果如附图 7 所示。

实施例 3. 抗原蛋白的免疫学活性分析

基本上按照《分子克隆》（萨母布鲁克 J., 费里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T., 分子克隆实验指南第 2 版,北京:科学出版社,1999,888-897)中所述的 Western 印迹分析方法,将 TP0684、TP0453 重组蛋白电转移至 NC 膜上,分别以临床收集的经 TPPA 法确认的梅毒病人阳性血清、健康人血清作为一抗,HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗,进行重组蛋白的免疫印迹检测。

免疫印迹结果显示,本发明的重组梅毒抗原蛋白 TP0684、TP0453 与已经过 TPPA 方法确诊的早期梅毒病人阳性血清有良好的免疫反应性(结果如图 8 和 9 所示),而与

梅毒阴性血清则不发生反应。

实施例 4. 梅毒螺旋体抗体检测试剂盒的制备

以重组制备的抗原蛋白为包被抗原，进行有条件的优化选择后，建立本发明的抗梅毒 IgG 抗体的间接 ELISA 检测方法。

酶联反应板的制备：将纯化的梅毒特异性外膜抗原 TP0684 和 TP0453 按 2: 1 比例混合后，用包被缓冲液（pH9.6 磷酸盐缓冲液：NaCO₃ 1.95g, NaHCO₃ 2.93g, H₂O 1000ml）稀释至 20μg/ml，以每孔 0.1ml 加微孔板中，然后 4℃ 包被 24 小时。取出抗原板，空干。用 0.01M（pH7.4）PBS（NaCL 8.0g, KH₂PO₄ 0.2g, KCL 0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, H₂O 1000ml）配制的 1.0%BSA（每孔 0.3ml）4℃ 封闭 24 小时。取出后，用含吐温的磷酸盐缓冲液洗涤 5 次，室温风干并密封备用。

其中所使用的样品稀释液为含有酪蛋白的磷酸盐缓冲液；酶-第二抗体结合物为辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体；所使用的显色系统为含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液的显色液 A 和含有四甲基联苯胺（TMB）的柠檬酸盐缓冲液的显色液 B。

实施例 5: 试剂盒使用方法（ELISA 间接法）

（1）.加样：取重组梅毒特异性抗原包被的预包被酶联板，每个实验设空白对照孔、阴性血清对照孔、阳性血清对照孔和样品孔。在各孔先加样品稀释液 50μl，然后依次加入阴性血清对照、阳性血清对照和待检血清各 50μl。混匀后，置 37℃ 孵育 30 分钟。（2）洗板：孵育结束，弃去板孔中的液体，用洗涤液洗板五次，扣干。（3）加酶标记的第二抗体：加入抗人 IgG 酶标抗体 100μl（空白对照孔不加），充分混匀，置 37℃ 孵育 30 分钟。（4）按照步骤 2 的方法再次洗板后进行显色：依次在各孔加显色液 A、B 液各 50μl，轻拍混匀，37℃ 避光显色 10 分钟。（5）终止（加终止液 50μl）反应后，进行读数并判定结果：用酶标仪对空白孔调零，在 450nm 波长测定各孔光吸收值（OD 值）。根据所测得的 OD 值与临界值的比值判定结果：若比值大于 1，则为阳性反应，说明样品中含有梅毒抗体；若比值小于 1，则为阴性反应，说明样品不含有梅毒抗体。

实施例 6: 试剂盒的临床验证

1)将 TP0684、TP0453 分别单独包被、联合包被 ELISA 测定板，对重庆西南医院输血科提供的 100 份梅毒阳性血清（男性 67 例，女性 33 例，年龄分布为 20-58 岁）进行了测定。TP0684 和 TP0453 按 2: 1 包被联合使用对梅毒抗体的检出率可达到 99%，明

显高于两者单独使用或按其它比例组合形式（结果如表 1 所示）。

表 1 不同抗原组合对 100 份梅毒阳性血清的测定结果

| 抗原名称 | 阳性例数 | 阴性例数 |
|----------------------|------|------|
| TP0684 | 87 | 13 |
| TP0453 | 76 | 24 |
| TP0684+TP0453 (1: 1) | 96 | 4 |
| TP0684+TP0453 (1: 2) | 92 | 8 |
| TP0684+TP0453 (2: 1) | 99 | 1 |

2) 将如上制得的 TP0684 和 TP0453 抗原蛋白按 2: 1 混合并混匀后, 联合包被固相载体并常规制备试剂盒。本发明的试剂盒经中国药品生物制品检定所用梅毒螺旋体抗体诊断试剂国家参考品检定结果显示: 阴性标准品符合率、阳性标准品符合率、灵敏度、精密性、稳定性均符合国家标准（结果如表 2 所示）。

表 2 新研制的 ELISA 试剂盒经国家参比品考核结果

| 检验项目 | 标准规定 | 本检验结果 |
|--------------|------------------------------------|---------------------|
| 阴性参考品 20 份 | 符合率 20/20 | 20/20 |
| 阳性参考品 10 份 | 符合率 10/10 | 20/20 |
| 精密性 | ≤15% | ≤10% |
| 灵敏度参考品 L1~L4 | L1 阳性, L2 阳性, L3 阳性 或阴性, L4 阴性。 | L1、L2、L3 阳性, L4 阴性。 |

3) 使用本发明的 ELISA 试剂盒（采用 TP0684 和 TP0453 组合抗原）和现有的 ELISA 试剂盒（此类试剂盒采用传统抗原 TP15、TP17、TP47 的组合），对临床确认的梅毒 I 期、II 期血清和正常人血清进行测定，并对两种试剂盒的检测效果进行比较。结果显示（如表 3）：本发明的 ELISA 试剂盒在灵敏度与特异性上都与确诊试剂 TPPA 无显著差异，尤其显示对早期梅毒的检出率高于 TPPA，其中对一期梅毒的检出率达到 99%，二期梅毒可达 100%，而且特异性达到 100%，无假阳性出现。特异性、灵敏性、重复性均优于现有试剂盒。因此，本发明的试剂盒特别适合用于梅毒抗体的大规模筛选和早期检测。

表3 本发明的 ELISA 试剂盒与已有试剂盒的比较

| 临床诊断 | 例数 | TPPA | | 本发明 ELISA 试剂 | | 现有国产 ELISA 试剂盒 | |
|--------|-----|------|-----|--------------|-----|----------------|----|
| | | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| I 期梅毒 | 50 | 48 | 2 | 49 | 1 | 46 | 4 |
| II 期梅毒 | 50 | 50 | 0 | 50 | 0 | 49 | 1 |
| 非梅毒 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 1 | 99 |

序列表

- <110> 中国人民解放军第三军医大学
 <120> 检测梅毒螺旋体的方法及试剂盒
 <130>
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 1209
 <212> DNA
 <213> 梅毒螺旋体特异性外膜蛋白 TP0684 核苷酸编码序列
 <400> 1

```

atgaaggaga attctgcac ggcgtgcagc agacggctcg cctgttctgt gggcgctgcg      60
gtgcttgtgg taggctgttc atccaagacg gatgtcacgc tcaacctga caagccccta      120
gtgttttta accgacagcc ctctgatccc ctacgggga aggttgacat ggctgccatg      180
aactggaacg acaaaccta ttacgtgggt ttgacgcta agtttgggtg tictatacag      240
ggaaagatga tctagactt cctgcctct tctgagtcct cggttgaccg caacggtgac      300
ggcatcatcg gttatgtct ttgcatcggf gacgtcgggc acaatgatic gaaagtccgc      360
accgagggta ttcgccgcgc gttgggcacg tggaccggct cctcggatcc gggacaggcg      420
aaagaaggcc aggcagtgtt aggaaggaaa tcctacaagg tggaggagct cgagggaaag      480
gcgatgacgg gaactgacgg ttccacttgg aatacgaatt ctgcaaccga gtcfaatgga      540
agctgggtgg caaagtctgc ggataagata gacctgttca tcicaaaca cgaccggatg      600
gcaatgggct gctcgcagcc gtccaattat ccgcgggggc tgcctatttt cggatacgac      660
gcaaatgagg acgcggtcga gtcggttggf aagggtgagc tcacggggac tgtctctcag      720
aacgtcgacg cgcaggctgt tgcagtgttg cagattatca ggaatttctc cgatggctcc      780
agcggggaag atgtgtctgc caacggtatt tcaagacctg acgcccatgg caacaagata      840
agcgcgcccc tgcagtactg ggaagatgtt aaagcatta tggccgataa ctggaggtc      900

```

acgagcgcga actggaaga gtacaccagg ggagcacggg atgcaggggt gcgacagga 960
 agtgcgccga cgaaaaaggi gctgctcact giccacaacg cgagcaatga ttccttgc 1020
 tctgcctatc ticcgcact gaagcattac gctccgctcc tgaatgoga tctcactgc 1080
 gtgcagggcg atggccaaaa cgagctaagt tgccttgata agtictactaa tctcgacatg 1140
 ttcgacgcgt tcgggtaaa catggtaaaa acgaactcgg gccctgacta tacagacaag 1200
 ctcaaatac 1209

<210> 2

<211> 779

<212> DNA

<213> 梅毒螺旋体特异性外膜蛋白 TP0453 核苷酸编码序列

<400> 2

cgtggaaggc atcagtagat ccgttggggg ttgtgggac tggtgagat ggttacctgt 60
 attccctgt agcggggaac gagaattiga ttctcgtat taccgagaac catgagtaa 120
 aggcagatat taaaaaata gtggacagga ctaccgagg ataccgtgct tttttgcc 180
 gatcaaaaga gtttcgittg ttcggaagcg gttcgtatcc atacccttt actaattga 240
 tttttctcg atccgatgc tggcacta cgaaacgga acacggaatc acgtactatg 300
 aaagtgaaca tacggacgt tcgattcctg cggcgatt ttctgtgtg attttggt 360
 cctccaaaag ggagcggatg agcaaatgc tctctggct cgttacccc gatcgaccg 420
 agttaccgcc tcgctttaa aaagaatga cgtcggagg tacgagccag actgttcac 480
 tctatataaa aaacgggga cacttatta ccaactgt gaatttccg cagcttaatt 540
 taccacttg ggcaatgaa ctgtactga ccgcggag gaatgagat ctitacagt 600
 tgagcttga cttgggaat gcaagataa atttccat acagtttta atctctgtg 660
 tgcttaacgc gcacattac gggggggg acaggtaat tattgaagac ggcacaatt 720
 ctgctgagcg tctgctcg ggtctctgt cgtgtactc caaaagggg agttcgtaa 779

<310> 1

| | | |
|-------|----------------------------------|----|
| <311> | 30 | |
| <312> | DNA | |
| <313> | 基于 TP0684 基因设计并人工合成的上游引物 | |
| <400> | 3 | |
| | tatcatatga aggagaattc ttgcacggcg | 30 |
| <410> | 2 | |
| <411> | 29 | |
| <412> | DNA | |
| <413> | 基于 TP06084 基因设计并人工合成的下游引物 | |
| <400> | 4 | |
| | ttagcggccg cgtatttgag ctgtctgt | 29 |
| <510> | 3 | |
| <511> | 25 | |
| <512> | DNA | |
| <513> | 基于 TP0453 基因设计并人工合成的上游引物 | |
| <400> | 5 | |
| | taaccatggc gtggaaggca tcagt | 25 |
| <610> | 4 | |
| <611> | 28 | |
| <612> | DNA | |
| <613> | 基于 TP0453 设计并人工合成的下游引物 | |
| <400> | 6 | |
| | ttgagctctt acgaacticc ctitttgg | 2 |

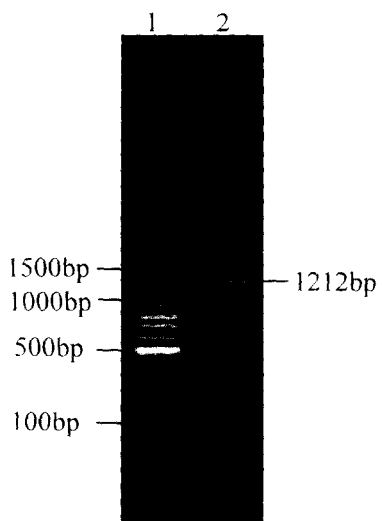


图 1

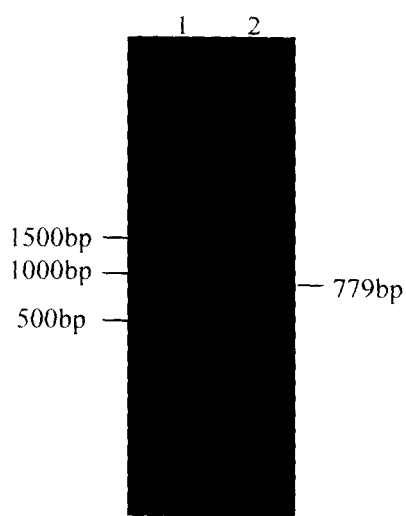


图 2

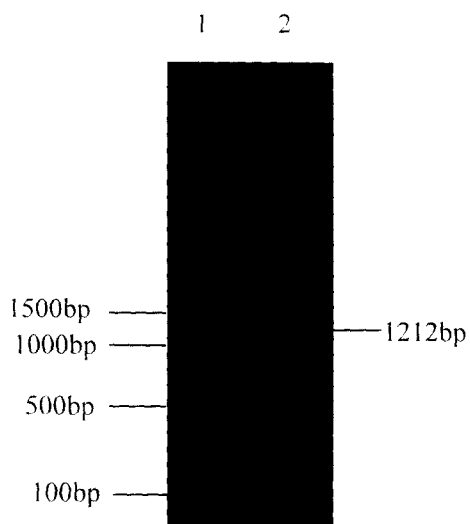


图 3

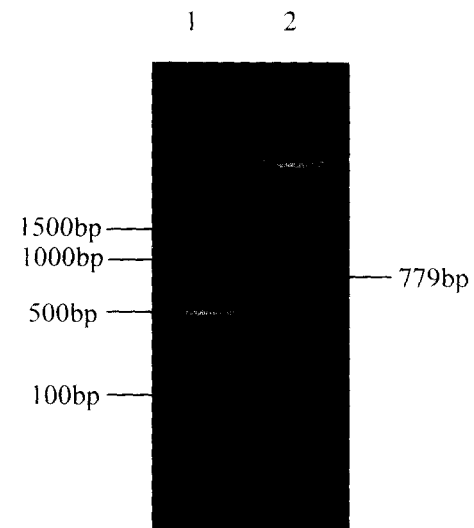


图 4

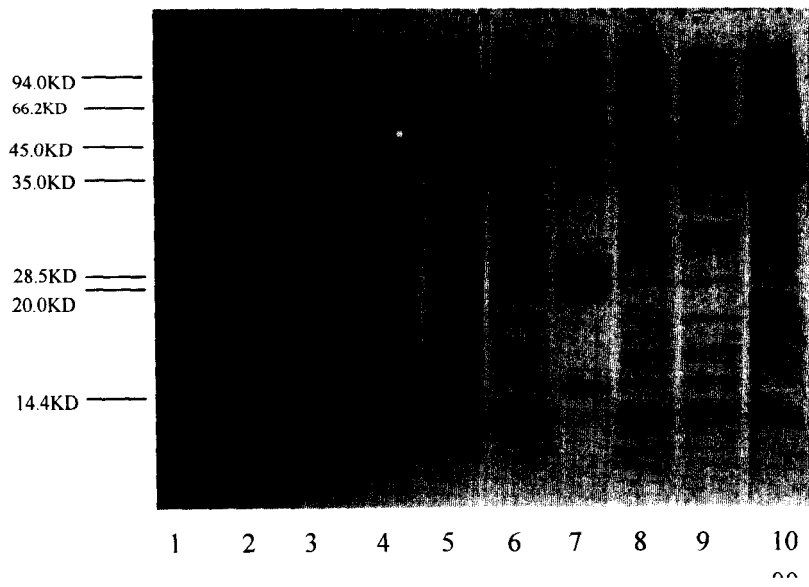


图 5

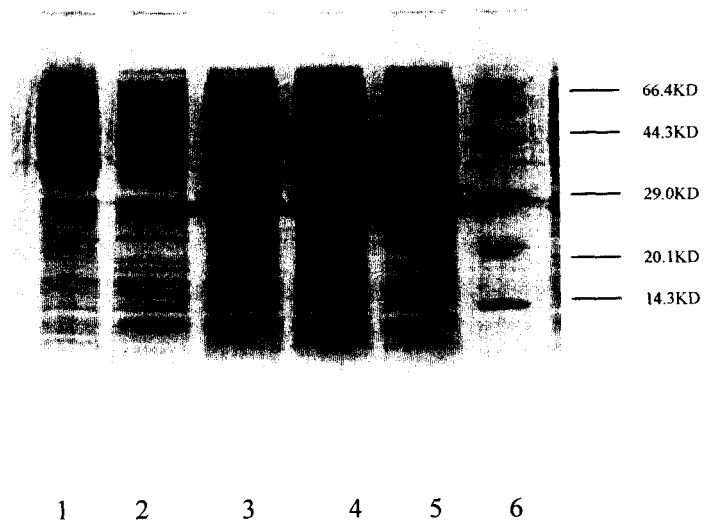


图 6

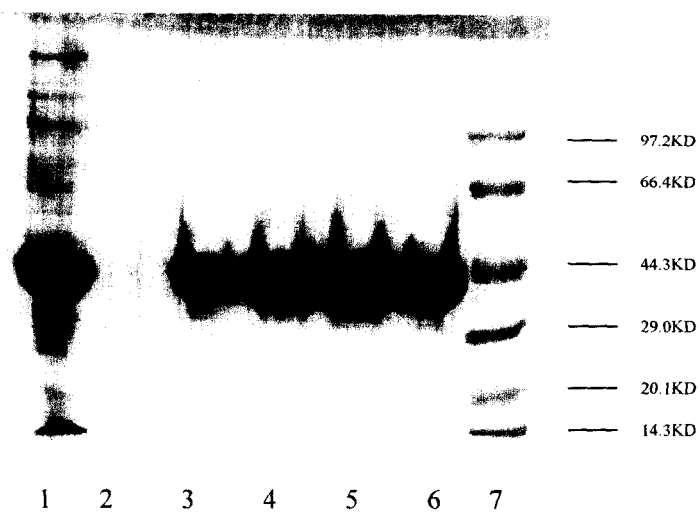


图 7

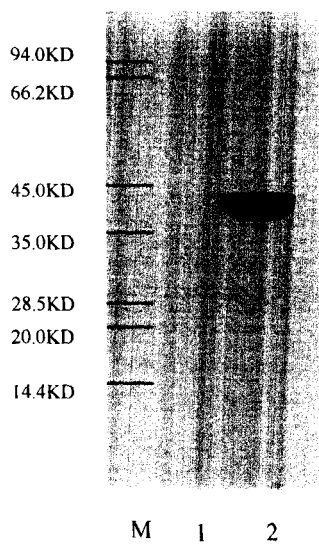


图 8

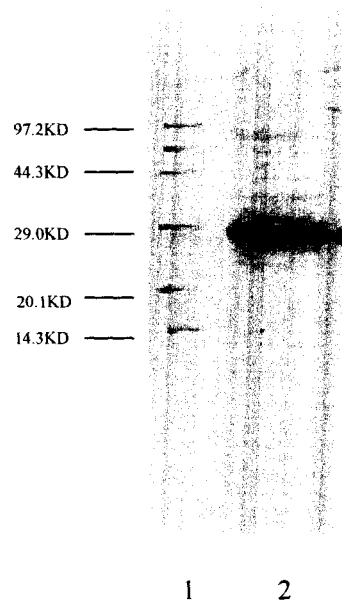


图 9

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测梅毒螺旋体的方法及试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN1916633A | 公开(公告)日 | 2007-02-21 |
| 申请号 | CN200610095107.4 | 申请日 | 2006-09-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第三军医大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第三军医大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第三军医大学 | | |
| [标]发明人 | 邹全明 肖洁 郭刚 曾明 杨璐 钟情 宁亚蕾 张卫军 | | |
| 发明人 | 邹全明 肖洁 郭刚 曾明 杨璐 钟情 宁亚蕾 张卫军 | | |
| IPC分类号 | G01N33/571 G01N33/543 G01N33/53 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及联合使用基因重组表达的梅毒特异性抗原TP0684和TP0453检测早期梅毒感染的方法。TP0684在梅毒感染早期即可刺激机体产生相应抗体，而且持续时间长；而TP0453抗原性强，含多个抗原决定簇，而且与其它种属螺旋体无交叉反应性。结合两种抗原的特性和优点，将其联合应用于梅毒检测从而大大提高了检测的敏感度和特异性。本发明进一步涉及使用该方法的用于梅毒早期检测的试剂盒。

