

doi:10.11816/cn.ni.2016-160539

• 论 著 •

解脲支原体金标免疫层析检测试剂盒的研制

李克生¹, 杜惠芬¹, 武建海¹, 潘鹏歌¹, 范丽赞¹, 付宝权², 曾潮宁¹

(1. 兰州雅华生物技术有限公司, 甘肃 兰州 730050; 2. 中国农科院兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 研制一种解脲支原体(Uu)胶体金免疫层析试剂盒,用于临床快速检测、流行病学调查。方法 原核表达解脲支原体 MB(Uu-MB)蛋白,制备 Uu-MB 单抗后胶体金标记,采用双抗体夹心法制备试剂盒,评价试剂盒的特异性、敏感性、稳定性及符合率。结果 对 Uu 阳性培养物和 Uu-MB 具有良好特异性;37℃放置 12 d 质量稳定;试剂盒与(Uu)支原体分离鉴别管的检测阳性率分别为 29.59%和 71.42%;Uu 金标检测试剂盒与 Uu 分离鉴别管的阳性、阴性符合率为 41.28%、100.0%;Uu 分离鉴别管培养物经 PCR 鉴定,两者的阳性、阴性符合率为 100%、75.65%。结论 研制的试剂盒操作简便,具有特异性强、敏感性高等特点,是一种适宜普及推广的 Uu 感染检测产品。

关键词: 解脲支原体; MB 抗原; 单克隆抗体; 金标免疫层析试剂盒

中图分类号: R375 文献标识码: A 文章编号: 1005-4529(2016)23-5325-04

Development of colloidal gold immunochromatography kit of *Ureaplasma urealyticum*

LI Ke-sheng*, DU Hui-fen, WU Jian-hai, PAN Peng-ge, FAN Li-yun, FU Bao-quan, ZENG Chao-ning

(* Lanzhou Yahua Biotech Co, Ltd, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop a colloidal gold immunochromatography kit for rapid clinical detection and epidemiological investigation of *Ureaplasma urealyticum* (Uu). **METHODS** After the Uu-MB antigen was expressed and monoclonal antibodies of the Uu-MB were prepared and coupled with colloidal gold, the detection kit was developed based on the double antibody sandwich technique. The specificity, sensitivity, stability, and coincidence of the kit were evaluated. **RESULTS** The testing result had a strong specificity to Uu positive culturing and the Uu-MB protein, and the quality was stable after placing at 37℃ for 12 days. Moreover, the detection results showed that the kit had 29.59% positive rate and the (Uu) identification tube had 71.42%, and the positive and negative coincidence between them were 41.28% and 100.0% respectively. Furthermore, the cultures of (Uu) identification tube were tested by PCR, and the positive coincidence was 100% and the negative coincidence was 75.65%. **CONCLUSION** Our study suggested that the colloidal gold immunochromatography kit has easy operation, high specificity and sensibility, which makes it suitable for detection of Uu infection.

Key words: *Ureaplasma urealyticum*; MB antigen; McAb; colloidal gold immunochromatography kit

解脲支原体(Uu)不仅能引起广泛的泌尿生殖系统感染,非淋菌性尿道炎,导致不孕不育,还与胎儿的羊膜早破、产、围产期病态和病死率及新生儿呼吸道疾病相关^[1-6]。解脲支原体还可引起男性非淋菌性尿道炎、慢性前列腺炎和附睾炎及男性不育^[7-11]。本研究旨在应用基因工程技术原核表达 MB 抗原 N 端蛋白,应用单克隆抗体技术制备高性能 Uu-MB 单克隆抗体,应用金标免疫层析技术研制一种双抗体夹心-胶体金免疫层析检测试剂盒,

现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3)细胞,表达质粒 pET30a 由中国农业科学院兰州兽医研究所提供;解脲支原体 3 型 MB 抗原 N 端基因(336 bp)从 NCBI Genbank 下载,基因两端分别添加 EcoRI 和 XhoI 酶切位点,由上海生物工程技术服务有限公司合成构建至表达载体 pET30a 上。

1.1.2 工具酶及主要试剂 工具酶,T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;异丙基硫代半乳糖

收稿日期: 2016-06-30; 修回日期: 2016-08-25

基金项目: 国家国际科技合作专项项目(2014DFA32070)

通信作者: 杜惠芬, E-mail: shwjshzhx@163.com

(IPTG)、卡那霉素等购自上海生物工程技术服务有限公司; 氯金酸($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、HT 液(H: 胸腺嘧啶核苷; T: 次黄嘌呤)、A 液(氨基喋呤)、聚乙二醇(PEG-1000)、鼠源单克隆抗体同型试剂盒为 Sigma 公司产品; 硝酸纤维素膜(NC)为 PALL 有限公司产品; 牛血清白蛋白为上海洛神生物有限公司产品; 新生胎牛血清由兰州民海生物技术公司提供; DMEM 干粉培养基(Gibico)和羊抗鼠 IgG-HRP 由北京博奥森生物制品公司提供; Balb/c 小鼠由兰州大学基础医学院实验动物室提供; SP2/0 细胞由甘肃省医学科学院医学生物技术研究中心提供。

1.1.3 解脲支原体培养试剂盒 (Uu) 支原体分离鉴别管, 珠海市银科医学工程有限公司产品, 批号: 1108161, 1106291。

1.1.4 解脲支原体 MB 基因 PCR 引物 由苏州金唯智生物科技有限公司设计合成。

1.1.5 临床样本 196 份生殖道分泌物棉拭子采自甘肃妇幼保健院门诊 98 个病例(每个病例采双份)。

1.1.6 参照抗原及其他微生物 重组沙眼衣原体 MOMP 蛋白由课题单位表达; 沙眼衣原体阳性培养物和阴性培养物由杭州正知生物技术公司提供; 解脲支原体阳性培养物和阴性培养物, 大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和李斯特杆菌培养物由课题单位实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 解脲支原体 MB 蛋白原核表达纯化及单克隆抗体制备 根据 NCBI Genbank 解脲支原体 3 型 MB 抗原 N 端 1/3 保守区序列合成目的基因, 亚克隆至 pET30a, 重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达, Ni-NTA 纯化, 免疫印迹技术检测 MB 蛋白的免疫活性。纯化的解脲支原体 MB 蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行 PEG 融合, HAT 筛选阳性细胞孔, 有限稀释法获得单克隆阳性株, 阳性细胞株注射小鼠腹控制备腹水单克隆抗体, 硫酸铵沉淀和凝胶层析纯化抗体, 鼠源单克隆抗体同型试剂盒鉴定抗体亚类, 叠加实验分析抗体的抗原结合位点。

1.2.2 胶体金制备及金标检测试剂盒制备 用超纯水配制 1% 的氯金酸溶液, 煮沸后按 1.5 ml/100ml 比例加入 1% 的柠檬酸三钠溶液, 继续煮 15 min, 冷却得到胶体金溶液。用 0.2 mol/L K_2CO_3 调胶体金溶液 pH 值至 8.4, 在磁力快速搅拌下加 Uu-MB 单抗(1B1), 1.2 mg/100 ml, 持续搅拌 15 min, 按 250 mg/100 ml 加入牛血清白蛋白, 继续搅

拌 5 min, 2 000 rpm/min 离心 15 min, 弃沉淀, 上清按 10 000 rpm/min 离心 30 min, 弃上清, 沉淀物溶于稀释液中(0.01M pH7.4 Tris~HCl, 含 50 mg/100 ml 分子量 20 000 的聚乙二醇), 比例为 10 ml/100ml。金标单抗溶液浸泡玻璃纤维, 25 °C 干燥备用。用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 稀释 Uu-MB 单抗(4A11)和羊抗鼠 IgG 抗体, 浓度为 1 mg/ml, 用 ZX-1000 型点膜仪在硝酸纤维素膜上包被检测线和控制线, 包被量为 1 $\mu\text{l}/\text{cm}$, 37 °C 干燥。在 PVC 塑料板上依次粘附硝酸纤维素膜、吸样玻璃纤维垫、浸金玻璃纤维垫、吸水滤纸, 用专用切刀切成 0.3×8 cm 的条, 组装于专用塑料卡盒内组成金标检测卡, 加干燥剂用铝箔袋密封独立包装备用。

1.2.3 特异性和敏感性测试 用 Uu-MB 金标检测卡检测工程表达 Uu-MB 蛋白, 解脲支原体培养物, 解脲支原体空白培养液, 重组沙眼衣原体 MOMP 蛋白, 沙眼衣原体细胞培养液, 重组人型支原体 Lmp1 蛋白, 大肠杆菌液、沙门氏菌液、李斯特杆菌液和志贺氏菌培养液。以 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 按 80、60、40、20、10、5、2.5、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 500、200、100、50、30 ng/mL 稀释重组 Uu-MB 蛋白, 用 Uu-MB 金标检测卡进行检测。检测时先在检测卡加样孔加入 10 μl 检测样品, 再加入 100 μl 样品稀释液, 3~5 min 后观察结果, 20 min 内检测结果有效。阳性结果: 结果显示窗 T 和 C 处同时出现两条红色线; 阴性结果: 只在 C 处出现一条红色线, T 处不显色; 无效结果: T 和 C 处均不显色。样品稀释液为 0.01 mol/L pH7.2 PBS。

1.2.4 重复性测试 分别取解脲支原体培养物和空白培养液 3 份, 用 Uu-MB 金标检测卡测试, 每份样本重复测试 10 次。

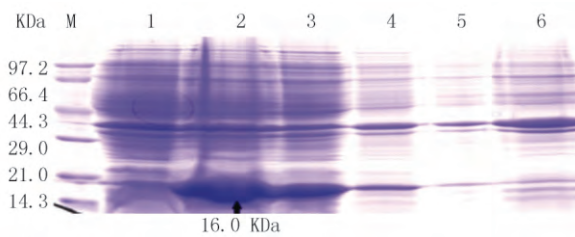
1.2.5 稳定性试验 将 Uu-MB 金标检测卡条置 37 °C, 分别于第 3、5、7、9 和 12 天取检测卡分别检测解脲支原体培养物和空白培养液 10 份。

1.2.6 Uu-MB 金标检测卡与培养法 分别用 Uu-MB 金标检测卡和 (Uu) 支原体分离鉴别管对 98 份生殖道拭子样本同时进行检测。将来自每个病例的 2 份样本, 一份用于培养, 另一份用于金标检测, 对 (Uu) 支原体分离鉴别管培养物进行 PCR 复核检测。金标检测按上述方法进行检测和结果判定, 培养法按试剂盒说明书进行操作; PCR 所使用的 Uu-MB 通用引物: UMS-125 (5' GTATTTGCAATCTT-TATATGTTTTTC-3'), UMA226 (5' CAGCTGATGTA-AGTGCAGCATTAATTC-3'); PCR 条件: 94 °C 10 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 72 °C 10

min, 共 30 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果

2.1 Uu-MB 蛋白原核表达及纯化 解脲支原体 3 型 MB 抗原 N 端基因通过酶切位点 EcoRI、XhoI 将其构建到 pET30a, 获得重组质粒 pET30a-MB, 测序及序列对比分析结果准确。重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 细胞, 经 1mM IPTG 诱导, 成功表达出 MB 抗原 N 端融合蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 其分子量大约为 16kDa(含载体部分约 5.7kDa), 与预期值相符。目的蛋白在细胞中以可溶形式存在, 见图 1。



注: M. 蛋白分子量标准; 1. 未诱导的转化菌; 2. IPTG 诱导后的转化菌; 3. 超声破碎后上清; 4. 2M 尿素洗涤沉淀; 5. 2M 尿素洗涤沉淀; 6. 8M 尿素溶解沉淀。

图 1 SDS-PAGE 分析 MB 抗原 N 端蛋白在 *E. coli* BL21 中的表达情况

Figure 1 SDS-PAGE analysis of N-end protein of MB antigen expressed in *E. coli* BL21

2.2 Uu-MB 单克隆抗体制备 经融合、克隆筛选, 共获得 3 株能稳定分泌 Uu-MB 单克隆抗体的杂交瘤细胞株: 1B1、4A11 和 4F12。三株杂交瘤细胞株的小鼠腹水效价均在 1.6×10^6 以上, 其抗体亚类均为 IgG1, 抗原结合位点配对分析显示 1B1 和 4A11 的叠加率可达 77%, 见表 1。

表 1 Uu 金标检测试剂盒与培养法对比检测结果

Table 1 The comparison result between Uu colloidal gold immunochromatography kit and culture tube

金标法	培养法		
	阳性	阴性	合计
阳性	29	0	29
阴性	41	28	69
合计	70	28	98

2.3 特异性和敏感性 Uu-MB 金标检测试剂盒检测结果显示, 只有 Uu-MB 蛋白和解脲支原体培养物检测结果为阳性; 解脲支原体空白培养液, 重组沙眼衣原体 MOMP 蛋白, 沙眼衣原体细胞培养液, 重

组人型支原体 Lmp1 蛋白, 大肠杆菌液、沙门氏菌液、李斯特杆菌液和志贺氏菌液检测结果均为阴性。试剂盒对 Uu-MB 重组蛋白抗原的最低检测限为 100 ng/ml, 最高检测限为 20 μ g/ml。

2.4 重复性 用 Uu-MB 金标检测卡检测解脲支原体培养物 3 份和空白培养液 3 份, 结果显示每份样本 10 次测定结果一致。

2.5 稳定性 Uu-MB 金标检测卡置 37 $^{\circ}$ C, 分别于第 3、5、7、9 和 12 天取检测卡检测解脲支原体培养物 10 份和空白培养液 10 份, 检测结果保持不变。

2.6 与培养法和 PCR 比较 用 Uu 金标检测试剂盒, Uu 分离鉴别管和 PCR 对 98 份生殖道拭子样本同时进行检测。结果 Uu-MB 金标检测卡和 Uu 分离鉴别管检测阳性率分别为 29.59% 和 71.42%; Uu 金标检测试剂盒与 Uu 分离鉴别管的阳性符合率为 41.28%, 阴性符合率为 100.0%, 见表 2。Uu 分离鉴别管培养物经 PCR 再检测, 两者的阳性符合率为 100.00%, 阴性符合率为 75.65%, 见表 3, 图 2。

表 2 Uu-MB 单克隆抗体性能分析

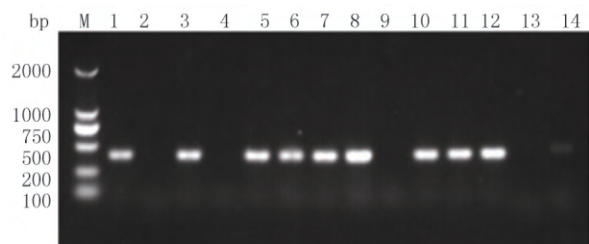
Table 2 The characteristic analysis of monoclonal antibody against Uu-MB

项 目	抗体亚类	腹水效价	抗原结合位点叠加率(%)		
			4F12	4A11	1B1
1B1	IgG1	1.28×10^7	35.2	77	...
4A11	IgG1	1.26×10^7	45.2	...	77
4F12	IgG1	1.6×10^6	...	45.2	35.2

表 3 培养法与 PCR 对比检测结果

Table 3 The comparison result between culture tube and PCR detection

培养法	PCR		
	阳性	阴性	合计
阳性	61	9	70
阴性	0	28	28
合计	61	37	98



注: M. 蛋白分子量标准; 1~14. 临床样本。

图 2 PCR 分析临床样本中 Uu-MB

Figure 2 PCR analysis of Uu-MB in patients specimens

3 讨论

解脲支原体(Uu)是临床常见的病原微生物,快速有效的检测诊断方法对其治疗十分重要。在现有的实验室检测诊断技术中,免疫学检测是一项快速、简便的技术,它依靠抗原-抗体的特异性结合性能保证检测的准确性,及利用抗原或抗体蛋白可示踪标记的性能实现检测的快捷性。解脲支原体 MB 抗原暴露于其细胞表面,具有属特异性,是免疫学检测的理想靶抗原。

本试验原核表达了 Uu-MB 抗原,应用单抗技术制备了解脲支原体 MB 单克隆抗体,在此基础上研制了一种 Uu 金标检测试剂盒,它具备快速、简便和经济等特点,检测过程不需要任何仪器设备和实验场地,3~5 min 出结果,适合住院和门诊患者的快速检测及家庭自行检测。对 Uu 的阳性培养物,重组 Uu-MB 及沙眼衣原体和其他相关微生物检测结果显示,试剂盒具有较好的特异性。对重组 Uu-MB 的检测灵敏度可达 100 ng/ml。重复性和稳定性试验结果显示试剂盒检测结果的重复性好,37 °C 条件下 12 d 质量稳定,按照生物制品稳定性试验加速破坏试验的方法,37 °C 相当于于室温 1.6 个月计算,试剂盒的有效期可以保质 18 个月。试剂盒和 Uu 分离鉴别管及 PCR 对 98 份生殖道拭子样本检测结果显示,试剂盒和 Uu 分离鉴别管的检测阳性率分别为 29.59% 和 71.42%;Uu 金标检测试剂盒与 Uu 分离鉴别管的阳性符合率为 41.28%,阴性符合率为 100.0%,说明虽然试剂盒相对于培养法阳性率低,但特异性高。此外,Uu 分离鉴别管培养物经 PCR 再次检测,两者的阳性符合率为 100.00%,阴性符合率为 75.65%,说明培养法特异性差,假阳性的比例较高(24.35%),其阳性率高的原因一方面可能是样本中 Uu 在培养过程中数量得到了增殖,另一方面是培养法有较高比例的假阳性。

综合各方面因素,本试剂盒是一种适宜普及推

广的 Uu 感染检测试剂产品。

参考文献

- [1] Canet E, Dantal J, Blanche G, et al. Tuberculosis following kidney transplantation: clinical features and outcome. A French multicentre experience in the last 20 years[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11): 3773-3778.
- [2] 陈建飞, 钟文华, 何缦, 等. 解脲支原体感染与早产关系的研究[J]. *世界最新医学信息文摘(电子版)*, 2015, 15(35): 36-36.
- [3] 彭端亮, 李永文, 赵鹃, 等. 淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、解脲支原体感染与女性不孕症的关系[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(23): 80.
- [4] Baka S, Kouskouni E, Antonopoulou S, et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms[J]. *Urology*, 2009, 74(1): 62-66.
- [5] 孙霞, 胡敏, 王郁玲, 等. 解脲支原体、沙眼衣原体感染与胎膜早破的关系及对妊娠结局的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(23): 79.
- [6] Kirchner L, Helmer H, Heinze G, et al. Amnionitis with *Ureaplasma urealyticum* or other microbes leads to increased morbidity and prolonged hospitalization in very low birth weight infants[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007, 134(1): 44-50.
- [7] 张明忠, 汪琳. 男性生殖道解脲支原体感染及血清睾酮水平对精液质量的影响[J]. *数理医药学杂志*, 2014, 27(6): 656-657.
- [8] Qian L, Bian GR, Li HB, et al. Effects of *Ureaplasma urealyticum* infection on sperm quality and concentrations of nitric oxide and cytokine in the semen of infertile males[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 75(6): 605-608.
- [9] Waites KB, Katz B, Schelonka RL. *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* as neonatal pathogens[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(4): 757-789.
- [10] Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, et al. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum* [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 757-762.
- [11] Kokkayil P, Dhawan B. *Ureaplasma*: current perspectives [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2015, 33(2): 205-214.