

[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 200810044409.8

[51] Int. Cl.

*C12N 15/12 (2006.01)*  
*C12N 15/70 (2006.01)*  
*C07K 14/435 (2006.01)*  
*A61K 48/00 (2006.01)*  
*A61P 33/10 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年1月21日

[11] 公开号 CN 101348787A

[22] 申请日 2008.5.19

[21] 申请号 200810044409.8

[71] 申请人 四川农业大学

地址 625014 四川省雅安市雨城区新康路 46 号

[72] 发明人 杨光友 何光志 汪 涛 彭雪蓉

[74] 专利代理机构 成都信博专利代理有限责任公  
司

代理人 舒启龙 卓仲阳

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 5 页

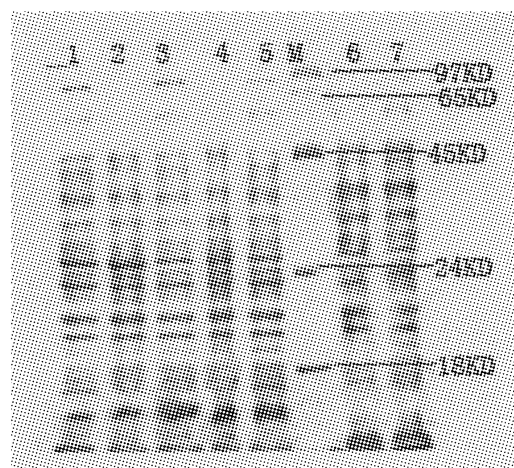
## [54] 发明名称

大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用

## [57] 摘要

本发明公开了大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，属大熊猫西氏蛔虫的防治及检测领域。包括设计出西氏蛔虫抗原基因引物；采用 RT-PCR 法将蛔虫总 RNA 逆转录合成 cDNA，再以 cDNA 为模板，PCR 扩增出目的产物；将纯化的目的产物与 pMD18-T 载体连接，转至 DH5 $\alpha$ ，感受态细菌；经平板筛选培养，选取阳性重组克隆，培养后测序出抗原基因为 Bs-Ag1 基因、Bs-Ag2 基因、Bs-Ag3 基因。再进行重组质粒构建、诱导表达和重组蛋白纯化，将测序正确的重组质粒，转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞，进行蛋白的大量表达。其产物经检测、免疫试验以及对试验动物抗体 IgG 的 ELISA 检测分析：大熊猫西氏蛔虫抗原 Bs-Ag1、Bs-Ag2 和 Bs-Ag3 基因可以作为蛔虫制备基因工

和 Bs-Ag3 具有良好的反应原性，可以用来构建以 ELISA 方法检测感染大熊猫蛔虫。



1、大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于：大熊猫西氏蛔虫抗原按照下述步骤制备：

(1) 以大熊猫蛔虫成虫或二期幼虫为模板，用 RNA 试剂盒法提取大熊猫蛔虫总 RNA。

(2) 根据猪蛔虫的抗原基因序列设计大熊猫蛔虫Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因引物，所述引物对的序列为：上游：CGCGGATCCcaaggacctcaaggaccaccac（含BAMHI酶切位点）；下游：5- CCCAAGCTTCTAgccttgcatctctttttg-3（含HINDIII酶切位点）。

(3) 采用RT-PCR法将大熊猫总RNA逆转录合成cDNA，再以cDNA为模板进行PCR扩增，扩增出目的产物Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因。

(4) 将回收纯化的目的产物直接与 pMD18-T 载体连接后，转化至受体细胞大肠杆菌 K-12 的衍生菌 DH5 $\alpha$ 。感受态细菌，经含有氨苄青霉素的平板筛选培养，培养于 3ml LB 培养基中，培养 14--16h 后，取 2 $\mu$ l 培养的重组克隆菌液为模板，经过菌落 PCR 鉴定，1%琼脂糖凝胶电泳检测。选取阳性重组克隆，小规模扩大培养后，进行测序。

2、根据权利要求 1 所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于大熊猫西氏蛔虫抗原经测序结果其抗原基因为 Bs-Ag1 基因、Bs-Ag2 基因、Bs-Ag3 基因三个基因（基因序列见序列表 1、2、3）。

3、根据权利要求 1 所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于：构建大熊猫西氏蛔虫抗原重组蛋白的原核表达载体，进行重组质粒 PET28a(+)-Bs-Ag1、PET28a(+)-Bs-Ag2 和 PET32a(+)-Bs-Ag3 的构建，包括如下步骤：（以 PET28a(+)-Bs-Ag1 为例）

(1) 将测序正确的阳性菌经培养后，离心去沉淀抽提 PET28a(+)质粒，用 BamHI 和 HindIII 在 37 $^{\circ}$ C 下，进行水浴酶切 2h，回收大片段与纯化后的 Bs-Ag1 基因；用 BamHI 和 HindIII 进行双酶切后，回收酶切产物中 Bs-Ag1 基因进行连接反应。

(2) 诱导表达和重组蛋白的纯化，将测序正确的重组质粒，用上述方法转化到大肠杆菌BL21感受态细胞，根据表达的观察结果，进行蛋白的大量表达，收集

诱导表达菌。将所得细菌沉淀经反复冻融和超声裂解后，依次用含0、2、4 mol / L尿素的1×结合蛋白缓冲液洗涤沉淀；随后用含8 mol / L尿素的1×结合蛋白缓冲液重悬沉淀，冰上放置1 h，使包涵体蛋白完全溶解。将重组蛋白Bs-Ag1于4℃条件下分别在含8 mol / L尿素的PBS溶解，将溶液于4℃保存。

4、根据权利要求1所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于：分别将纯化的重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3与弗氏完全佐剂1：1混和皮下接种免疫小白鼠，基础免疫后进行两次加强免疫，并在最后一次免疫后一周对小白鼠攻虫，7天后杀小白鼠取其肝、肺脏，经贝尔曼法收集幼虫，记录结果并对结果进行统计学分析，证明PET28(a)-Bs-Ag1、PET28a(+)-Bs-Ag2和PET32a(+)-Bs-Ag3蛋白具有较高的免疫保护力，对宿主保护力分别达到60.7%、56.7%和61.2%，与其它组差异极显著；Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因可作为蛔虫制备基因工程疫苗的候选基因。

5、根据权利要求1所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于：

用大熊猫蛔虫重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3作为抗原进行ELISA方法试验，对免疫后的鼠血清进行ELISA检测，发现保护力高的Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3-FCA组其血清中抗体水平检出时间早，而且抗体滴度高，证实重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3具有良好的反应原性，可以用来构建以ELISA方法检测感染大熊猫蛔虫。

## 大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用

### 技术领域

本发明属蛔虫的防治及其检测领域，尤其涉及到大熊猫西氏蛔虫的制备及其应用。

### 背景技术

大熊猫蛔虫病的病原为西氏蛔虫 (*Ascaris schroederi*)。蛔虫通常寄生于小肠。但在口腔、喉头、气管及胃内亦曾有发现，也可钻进与肠管相通的管道如胰管、胆管内，引起阻塞及炎症。甚至导致死亡。学者冯文和解剖 33 具野外大熊猫尸体，对其死亡原因作了分析：野生大熊猫感染蛔虫为 100%，大熊猫感染蛔虫的直接、间接死亡率为 66.67%，严重危及大熊猫物种的生存。由于蛔虫病症状表现不一，蛔虫对大熊猫的危害根据其产生数量可分为三类：第一为感染虫体数较少，约 100 条以下，表现为大熊猫营养不良，尤其是表现为生长发育迟缓。第二为中度感染虫数，约 100 ~ 300 条，大熊猫表现为营养不良性消瘦、贫血、厌食、腹泻、腹痛或肠道功能紊乱等症状。第三为重度感染，虫数在 300 条以上。蛔虫寄生后引起并发症，如肠炎、肠梗阻、肠穿孔、异位寄生可致肝坏死、胰腺出血性坏死、肺炎等，直接威胁大熊猫的生命（张华，张再历. 大熊猫蛔虫病的诊治，甘肃畜牧兽医，2002（6）：25-26.）。感染大熊猫蛔虫的诊断常用粪便直接涂片法或饱和盐水漂浮法等方法。但由于蛔虫的特殊生活史，其通过粪便检查检出虫卵时，往往宿主已经被幼虫在体内的移行而危害了大熊猫的机体。相对其它虫种来说，蛔虫的免疫诊断技术研究较少。因此蛔虫的早期诊断显得尤为重要。由于对宿主感染蛔虫后引起的免疫研究，有学者提出了大熊猫蛔虫感染的早期诊断、流行病学调查以及血清学方法考核防治效果的问题，蛔虫感染的免疫诊断应该受到重视（冯汉利. 博士论文. 苏云金杆菌晶体蛋白对猪蛔虫的作用及猪蛔虫重组 As37 蛋白的免疫保护研究）。现代分子生物学技术的发展为蛔虫疫苗的研制展示了广阔的前景。因此如何利用分子生物学与免疫学的方法对大熊猫西氏蛔虫进行防疫或筛选出抗原疫苗在野外快速检测寄生虫等引起的疾病，也是大熊猫疾病防治的重要课题之一。

本发明的目的是公开一种大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用。

## 发明内容

实现本发明目的的技术方案是这样的：

一种大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于大熊猫西氏蛔虫抗原按照下述步骤制备：

(1) 以大熊猫蛔虫成虫或二期幼虫为模板，用 RNA 试剂盒法提取大熊猫蛔虫总 RNA。

(2) 根据猪蛔虫的抗原基因序列设计大熊猫蛔虫Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因引物，所述引物对的序列（以BS-Ag1基因为例）：上游：

5' -CGCGGATCCCAAGGACCTCAAGGACCACCAC-3'（含 *Bam*HI酶切位点）；下游引物：

5' -CCCAAGCTTCTAGCCTTGCATCTCTTTTGG-3'（含 *Hind*III酶切位点），

(3) 采用RT-PCR法将大熊猫总RNA逆转录合成cDNA，再以cDNA为模板进行PCR扩增，扩增出目的产物Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因。

(4) 将回收纯化的目的产物直接与 pMD18-T 载体连接后，转化至受体细胞大肠杆菌 K-12 的衍生菌 DH5  $\alpha$ 。感受态细菌，经含有氨苄青霉素的平板筛选培养，培养于 3ml LB 培养基中，培养 14--16h 后，取 2  $\mu$ l 培养的重组克隆菌液为模板，经过菌落 PCR 鉴定，1%琼脂糖凝胶电泳检测。选取阳性重组克隆，小规模扩大培养后，进行测序。

所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于大熊猫西氏蛔虫抗原经测序结果其抗原基因为 Bs-Ag1 基因、Bs-Ag2 基因、Bs-Ag3 基因三个基因（基因序列见基因序列列表图 1）。

所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，其特征在于构建大熊猫西氏蛔虫抗原重组蛋白的原核表达载体，进行重组质粒 PET28a(+)-Bs-Ag1、PET28a(+)-Bs-Ag2 和 PET32a(+)-Bs-Ag3 的构建，包括如下步骤：（以 PET28a(+)-Bs-Ag1 为例）

(1) 将测序正确的阳性菌经培养后，离心去沉淀抽提 PET28a(+) 质粒，用 *Bam*HI 和 *Hind*III 在 37°C 酶切 2h，回收大片段与纯化后的 Bs-Ag1 基因；用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行双酶切后，回收酶切产物中 Bs-Ag1 基因进行连接反应。

(2) 诱导表达和重组蛋白的纯化，将测序正确的重组质粒，转化到大肠杆菌

BL21感受态细胞,根据表达的观察结果,进行蛋白的大量表达,收集诱导表达菌。收集表达菌离心,用缓冲液(0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0)进行悬浮,加入溶菌酶至100  $\mu$ g/ml,细胞悬液放在-20℃冰箱20min后,取出溶解经超声裂解后,依次用含0、2、4mol/L尿素的1×结合蛋白缓冲液(5mmol/L 咪唑, 0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0)洗涤沉淀;随后用含8mol/L尿素的1×结合蛋白缓冲液重悬沉淀,冰上放置1h,使包涵体蛋白完全溶解;16000×g离心30min去除不可溶物,以孔径0.45  $\mu$ m的NC膜过滤收集上清液。经His结合树脂纯化,以缓冲液(6mol/L 尿素, 60mmol/L 咪唑, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0)洗去杂蛋白,以洗脱液(6mol/L尿素, 1mol/L咪唑, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0)洗脱目的蛋白。将纯化的重组蛋白于4℃分别在含4mol/L、2mol/L尿素的PBS及PBS溶液中依次进行透析,将溶液置于-20℃保存。

所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用,其特征还在于分别将纯化的重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3与弗氏完全佐剂1:1混和皮下接种免疫小白鼠,基础免疫后进行两次加强免疫,并在最后一次免疫后一周对小白鼠攻虫,7天后杀小白鼠取其肝、肺脏,经贝尔曼法收集幼虫,记录结果并对结果进行统计学分析,证明pet28(a)-Bs-Ag1、PET28a(+)-Bs-Ag2和PET32a(+)-Bs-Ag3蛋白具有较高的免疫保护力,对宿主保护力分别达到60.7%、56.7%和61.2%,与其它组差异极显著;Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因可作为蛔虫制备基因工程疫苗的候选基因。

所述的大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用,其特征还在于:用大熊猫蛔虫重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3作为抗原进行ELISA方法试验,对免疫后的鼠血清进行ELISA检测,发现保护力高的rBs-Ag1、rBs-Ag2和rBs-Ag3-FCA组其血清中抗体水平检出时间早,而且抗体滴度高,证实重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和其产物经过检测并进行免疫保护试验以及对试验动物抗体IgG的ELISA检测分析结果表明:Bs-Ag3具有良好的反应原性,可以用来构建ELISA方法来检测感染大熊猫蛔虫。

按照本发明所说的技术方案实施后,取得如下的积极效果和作用(BS-Ag1为例)。

纯化回收后的PCR产物直接与PMD18-T载体相连,转化*E. coli* DH5  $\alpha$  感受态细胞,挑取阳性克隆进行测序,测序结果经BLAST搜索发现与猪蛔虫L2R59抗原基因

(GenBank accession no: AB057441) 同源率为90%。

本发明选用 Pet28a (+) 原核表达系统, 此系统含有 kan 抗性基因, 其诱导物为 IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)。通过利用 DNAMAN 软件对大熊猫蛔虫 Bs-Ag1 基因的酶切位点进行分析, 发现该基因 O R F 去掉编码信号肽序列后的碱基序列中不含 *HindIII* 和 *BamHI* 酶切位点, 而表达载体 PET28a(+) 中含有 *HindIII* 和 *BamHI* 酶切位点, 所以在设计上游和下游基因引物中分别引入了 *HindIII* 和 *BamHI* 酶切位点, 以便定向克隆至 PET28a(+) 表达载体。

用 *HindIII* 及 *BamHI* 消化阳性克隆质粒, 将其目的片段与相同酶消化的 PET28a(+) 表达载体连接, 得到了表达 Bs-Ag1 的原核表达 rBs-Ag1。大熊猫蛔虫 Bs-Ag1 通过软件预测, 阅读框能编码 146 个氨基酸, 分子量 15.857, pI9.61; 去掉 16 个氨基酸信号肽后, 能编码 132 个氨基酸的分子量分子量 14.127, pI9.49, 130 个氨基酸。通过 BLAST 搜索结果发现: 大熊猫蛔虫的 Bs-Ag1 和猪蛔虫 L2R59 抗原基因编码的氨基酸 (BAB67769.1) 同源率高达 90%; 可以看出 Bs-Ag1 阅读框编码氨基酸的同源性较高都是线虫抗原和线虫的基因产物。说明 Bs-Ag1 是线虫特有基因的产物。因此, Bs-Ag1 基因可作为蛔虫制备基因工程疫苗的候选基因。用大熊猫蛔虫重组表达蛋白作为抗原进行了 ELISA 方法的初步探讨。对免疫后的鼠血清进行 ELISA 检测, 结果证实, 所说的重组蛋白具有良好的反应原性, 可以用来建立 ELISA 方法以提高检测感染大熊猫蛔虫的诊断手段。

#### 附图说明

图 1 为本发明所说的大熊猫蛔虫 Bs-Ag1 基因、Bs-Ag2 基因、Bs-Ag3 基因三个基因序列列表。

图 2 为本发明所说的大熊猫蛔虫 Bs-Ag1 和猪蛔虫 L2R59 去掉信号肽的碱基序列同源性比较图。

图 3 为本发明所说的重组质粒 PET28a(+)-BS-Ag1 用 *BamHI* 酶切和 *HindIII* 双酶切后构建成的片段图。

图 4 为本发明所说的重组质粒表达蛋白 SDS-PAGE 图。

图 5 为本发明所说的重组质粒表达蛋白 Western-blot 图。

#### 注释说明:

1、本发明所涉及的菌株和质粒 基因克隆菌株 *E. coli* DH5α、表达菌株 BL21

(DE3) 购于成都博瑞克生物公司；克隆载体PMD18-T购自天泰生物公司，表达载体Pet28a(+)由四川农业大学寄生虫免疫研究室保存。

2、酶、主要试剂 *ECORI*、*HINDIII*限制性内切酶、RT试剂盒、TaqDNA聚合酶、T4DNA连接酶和DNA Marker均为TakaRa公司产品、考马斯亮蓝、溶菌酶、DTT（大连宝生物）公司产品；RNA基因组抽提、质粒抽提、胶回收、PCR产物纯化等试剂盒购于上海华舜公司。IPTG、SDS购于上海生工公司；兔抗大熊猫蛔虫IgG由四川农业大学寄生虫免疫研究室自己制备；2×TaqPCR MasterMix、山羊抗鼠IgG-HRP、山羊抗兔IgG-HRP：购于成都博瑞克生物公司。

### 具体实施方式

结合附图给出实施例并做出进一步的说明。首先利用大熊猫粪便沉淀法收集蛔虫卵，用含2%福尔马林的生理盐水培养皿内，加盖，置25-28℃温箱内培养，3-4周就能获得大量的感染性虫卵，将其大熊猫蛔虫感染性虫卵人工感染白兔，每只灌胃3,500个，每间隔一周重复一次。每次免疫前对试验动物耳静脉采血，免疫四次后经琼扩法测定其效价待血清效价达到1:8时心脏采血，收集分离血清，分装小管，-20℃保存备用，以此获得兔抗大熊猫蛔虫阳性血清供下一步试验时用。将收集的大熊猫蛔虫成虫从-70℃冰箱取出，经冻过低温的研钵中磨成粉末，然后参照总RNA提取试剂盒使用说明书，提取大熊猫蛔虫总RNA，-70℃保存备用。也可以选用蛔虫的二期幼虫获得大熊猫蛔虫总RNA的提取。

以大熊猫蛔虫BS-Ag1基因为例，根据猪蛔虫的抗原基因序列，结合本发明需用表达载体的特点，利用引物设计软件Primer 5.0设计合成如下一对引物：上游引物：5'-CGCGGATCCCAAGGACCTCAAGGACCACCAC-3'（含*BamHI*酶切位点）；下游引物：5'-CCCAAGCTTCTAGCCTTGCATCTCTTTTGG-3'（含*HindIII*酶切位点），引物委托宝生物工程（大连）有限公司合成实施。

参照TaKaRa公司RT试剂盒的使用说明书进行反转录合成cDNA，再以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系为：2×TaqPCR MasterMix 25 μL；cDNA产物：3 μL；无菌水：22 μL；上下游引物各1.5 μL。反应混合物进行PCR，反应程序为：95℃预变性5min；95℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸45s，循环扩增30次，最后72℃延伸10min。扩增结束后取PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

采用胶回收纯化试剂盒回收PCR扩增出的目的产物(400-500bp左右)，将回

收纯化的目的产物直接与 pMD18-T 载体连接后, 将连接产物转化 *E. coli* DH5  $\alpha$  感受态细胞, 经含有氨苄青霉素的平板筛选培养, 挑取菌落培养于 3ml LB 培养基中, 培养 14-16h 后, 取 10  $\mu$ l 培养的重组克隆菌液为模板, 用引物做菌落 PCR 鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。选取 3 个阳性重组克隆, 小规模扩大培养后, 进行测序。测得基因序列见图 1 (基因序列正在提交)。

图2是大熊猫蛔虫Bs-Ag1基因和猪蛔虫L2R59去掉信号肽的碱基序列同源性比较图。大熊猫蛔虫Bs-Ag1基因与猪蛔虫L2R59抗原基因去掉编码信号肽后的碱基的序列同源性为90%。阅读框有450个碱基。

大熊猫蛔虫 Bs-Ag1 基因开放阅读框共 450bp, 能编码 146 个氨基酸, 分子量 15.857, pI9.61; 信号肽共 48 个碱基能编码 16 个氨基酸信号肽, 去掉信号肽后能编码 132 个氨基酸的分子量 14.127, pI9.49, 130 个氨基酸。并通过 BLAST 搜索同源性高的线虫抗原基因编码氨基酸, 大熊猫蛔虫 Bs-Ag1 基因阅读框编码的氨基酸和猪蛔虫 L2R59 抗原基因阅读框编码的氨基酸 (BAB67769.1) 同源性高达 90%。

为了构建大熊猫西氏蛔虫抗原重组蛋白的原核表达载体, 需要进行重组质粒 PET28a(+)-Bs-Ag1、PET28a(+)-Bs-Ag2 和 PET32a(+)-Bs-Ag3 的构建, 包括如下步骤: 本实施例仅以 PET28a(+)-Bs-Ag1 为例说明。

(1) 重组质粒的构建 *HindIII*及*BamHI*消化阳性克隆质粒, 将其目的片段与相同酶消化的PET28a(+)表达载体连接。连接反应体系为: Bs-Ag1基因片段: 6  $\mu$ l, PET28a(+)质粒: 1  $\mu$ l, 5xLigase: 4l, T4DNALigase: 8  $\mu$ l, Autoclanted: 6  $\mu$ l, 混合后置16 $^{\circ}$ C连接5h, 转化DH5  $\alpha$  感受态细胞混匀后冰浴30min—1h, 然后42 $^{\circ}$ C水浴90sec, 取出冰浴3-5min, 加预热的适量LB培养基在37 $^{\circ}$ C低转速摇床培养在含Amp的LB琼脂平皿上进行筛选, 用接种环挑取菌落, 在含Kan (100.0  $\mu$ g/mL) 的LB液体培养基中, 250-300r/min 37 $^{\circ}$ C恒温摇床过夜。在这一过程中需要对重组PET28a(+)/Bs-Ag1质粒的鉴定。酶切鉴定用*BamHI*和*HindIII*对重组质粒在37 $^{\circ}$ C进行双酶切2h, 用1%琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物。图3是本发明所说的重组质粒PET28a(+)用*BamHI*酶切和*HindIII*双酶切后构建成的片段图。可以看出将重组质粒PET28a(+)-Bs-Ag1用*BamHI*和*HindIII*双酶切后电泳, 可见两条大小分别约为大片段6kb和小片段400~500kb的片段, 表明重组质粒构建成功。

(2) SDS-PAGE 将构建好的表达载体转入转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性克隆进行测序, 测序结果正确的克隆菌抽提质粒转化到 *E. coli* BI21 中进行表达, 收集菌液离心, 分别取上清和沉淀经超声波破碎后离心, SDS-PAGE 分析显示表达蛋白主要以包涵体形式存在。当 OD<sub>600</sub>=0.8, 1mMIPTG 时, 分别取诱导表达 0、1、2、3、4、5h 的菌液进行 SDS-PAGE, 在蛋白分子量 18.00KD 以下出现蛋白条带, 与预期蛋白的分子量 14.127KD 相符。图 4 为本发明所说的重组质粒表达蛋白 SDS-PAGE 分析图。

(3) 重组蛋白的纯化 收集表达菌离心, 用缓冲液 (0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0) 进行悬浮, 加入溶菌酶至 100  $\mu$ g/ml, 细胞悬液放在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 20min 后, 取出溶解经超声裂解后, 依次用含 0、2、4mol/L 尿素的 1 $\times$  结合蛋白缓冲液 (5mmol/L 咪唑, 0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0) 洗涤沉淀; 随后用含 8mol/L 尿素的 1 $\times$  结合蛋白缓冲液重悬沉淀, 冰上放置 1h, 使包涵体蛋白完全溶解; 16000 $\times$ g 离心 30min 去除不可溶物, 以孔径 0.45  $\mu$ m 的 NC 膜过滤收集上清液。经 His 结合树脂纯化, 以缓冲液 (6mol/L 尿素, 60mmol/L 咪唑, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0) 洗去杂蛋白, 以洗脱液 (6mol/L 尿素, 1mol/L 咪唑, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl pH8.0) 洗脱目的蛋白。将纯化的重组蛋白于 4 $^{\circ}$ C 分别在含 4mol/L、2mol/L 尿素的 PBS 及 PBS 溶液中依次进行透析, 将溶液置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

(4) Western blot 将纯化后的表达产物进行 Western blot 分析, 同时用空表达载体 Pet28a(+) (不含目标片段) 的表达产物做空白对照。结果发现, 空白载体不能与第一步所做的兔抗大熊猫蛔虫阳性血清发生反应, 而含有目标片段的重组载体菌表达产物则可与兔抗大熊猫蛔虫阳性血清发生反应, 出现显色带。图 5 为本发明所说的重组质粒表达蛋白 Western-blot 分析图。

(5) 免疫保护试验 分别将纯化的重组蛋白 Bs-Ag1 与弗氏完全佐剂 1:1 混和皮下接种免疫小白鼠, 基础免疫后进行两次加强免疫, 并在最后一次免疫后一周对小白鼠攻虫, 7d 后杀小白鼠取其肝、肺脏经贝尔曼法收集幼虫, 记录结果见表 1。

表 1 各组小鼠攻虫后肝脏和肺脏幼虫数统计结果 larvae

组别	动物数	平均检虫数	减虫率
----	-----	-------	-----

Groups	Number of mice	Mean number of larvae	Reduction of larvae infective rate
对照组 Control	10	55.857±3.2071 <sup>b</sup>	-----
佐剂组 FCA	10	53.8576±2.4103 <sup>b</sup>	-----
免疫组 Immunization	10	18.000±2.165025 <sup>a</sup>	67.77%

对结果进行统计学分析，免疫组与对照组相比虫体明显减少了67.77%，免疫组虫与佐剂组和对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ )，FCA组与对照组相比，两者差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

(6) 对试验动物抗体IgG的ELISA检测分析 鼠血清样本IgG的ELISA检测OD630, 各组动物免疫前后血清样品用ELISA检测IgG, 统计结果表明(表2)。在免疫后第14d、第28d、第42d免疫组鼠血清中均能检测到特异性IgG抗体, 并且抗体水平逐渐上升免疫组与对照组、FCA组差异极显著 ( $p < 0.01$ )，FCA组与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表2 免疫前后血清 IgG ELISA 检测统计结果 (OD630)

组别	第0天	第14天	第28天	第42天
免疫组	0.1313±0.0031	0.282±0.021 <sup>a</sup>	0.558±0.055 <sup>a</sup>	0.692±0.032 <sup>a</sup>
FCA组	0.1313±0.0031	0.131±0.00153 <sup>b</sup>	0.141±0.0040 <sup>b</sup>	0.149±0.0038 <sup>b</sup>
对照组	0.1313±0.0031	0.131±0.00153 <sup>b</sup>	0.131±0.0025 <sup>b</sup>	0.134±0.0040 <sup>b</sup>

注：同列肩标不同字母表示差异极显著 ( $p < 0.01$ )，相同字母表示差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

本发明所说的其产物经过检测并进行免疫保护试验以及对试验动物抗体IgG的ELISA检测分析结果再次证实了所说的大熊猫西氏蛔虫抗原Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因可以作为蛔虫制备基因工程疫苗的候选基因。大熊猫蛔虫重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3具有良好的反应原性，可以用来构建以ELISA方法检测感染大熊猫蛔虫。

## 1. 大熊猫西氏蛔虫---- Bs-Ag1 基因的基因序列

ggtttaattacccaagtttgaggtgctcgtttgaggataaaacttctcaagaaaagcagccgcat  
 tcaaaaatgaaagtgctgataat tttcgtcgcgaattggttgatagcctttgcaCAAGCCACCACCA  
 TTCTTAGTCGGTGCACCCGCTAATGTCGTCGCCGAATTCAAAACAGCTCCTTAATGGAGCTCCTGATA  
 AAACCGATGCTGAAAATATTGAGAATTGGGTCTAAAGTAAAGACAGAGTACAACAAATTCAAAGCA  
 CAAATGCAGCAAGGTAAGGCTAGAGCTGATGCTGCCATCGAGCATCTATTGCAAGGTTCTCGCCGG  
 CCGCTAAGGCAGCCGATGCACAATTAACCGCAAATCCAAATCTCAAAGGACGTGAAAAACAACAGAA  
 AATCACCAGCCTCATTCAAGTACGATCCGAACCTcaaaaagagatgcaaggctagacgtgaag  
 agcgagagtattcagcaat tttccctcatttactattgacattcaatgtgatacaatcgtttttagag  
 taataaactatactattcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

## 2. 大熊猫西氏蛔虫---- Bs-Ag2 基因的基因序列

gcacgaggctcatcgtgtgttattctcgttctagtcgatcggccttcaacttcgtttgtgcagcgctc  
 taacgaaatgaagtatctcatcacagttacttgccatttcgcttagctcttggtgaggaCAAACAC  
 CATCACGCGTACCACCCTTCTTGTTGGTGCACCCGAAAGTGTGTTCTTTGAACTGATTA AAAAGGA  
 CGAAGACTGAAATTGAAGCCGATATCGATGCATTTGTCGCTAAATTAGGTGGTGA CTACCCGAATAAA  
 TTCAAAGCGTTCAAAGAAGAACATGAAGCAGAATATAAATTGACAGCAATTTGAAGACACCAA ACTTA  
 ATGGAATCAGAAACGACAAAAAAGGAAGGGAAAGTCTACCTAAAGCAGTTCGGGATGAACTCGAAaa  
 ggcaatcgctggcggtgcgtaagctcatatcgctatcgtaacacaccttaattgctgacttcgt  
 gtaataaagctatttgcttcgttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

## 3. 大熊猫西氏蛔虫---- Bs-Ag3 基因的基因序列

GGCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTCCGGAATTCGAGAAG  
 CTTATGGCTTGCCTCGTCATCATCAAGTGGTCCTTCAATG  
 TTCAATGTAAGTTCAACGTTGGCCTCTCCAGCTTCACTTGTGATATTGCA  
 AGTGTAGGTGCCGCTGTCTTGGCCTTGTAATTCTTCAACTCAGGCTGAACTTAATGCGGCTCGACTC  
 CTTCAATTTCTTTCTTTTCGGGTTCAAGCCAGATCACCTCGGGATTTTGGTCGGCCTGGAATCCAATAT

CGACATGATAGCCGGGTCA  
CCTTGCGGTACTTCGAACTTAACGGTGAATGTTGCCGTAAGCTTTCCCGA  
TTCATTTTTAGCTGTGCATACGAACTGACCGGCGTCCTCTTCTTTTGTCG  
GTTCTTTGATTTCCATTCTGCGACGATTCATCCCCCTTTTG  
CCATACAAATGTTGGTACTTGGCGCGAAATTCATAACCA  
TGA CTTGCCCATCGTCGCGAGATGAAATCTGTGGCTTCTCAACAAAAGTC  
GGT GCGCTGAATCCTGTCAGTTTGAGGTTGAAGTTGGCATTGCCCTTTCC  
ATGAGGGTTAACAATAGCGCATCGATAAGCGCCAGCATCGCTGTCAGCGA  
GCCTTACCCTCGGGCATCTCGCTTAAACTGGCGGATCCCGAATCTCTAGA  
GGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCA

图 1

```

L2R59      CAAGGACCTCAAGGACCACCACCGTTCTTAGTCGGTGCACCCGCTAATGTCGTTGCCGAA
Bs-Ag1     CAAGGACCTCAAGGACCACCACCTTCTTAGTCGGTGCACCCGCTAATGTCGTCGCCGAA
*****
L2R59      TTCAAACAAATCATCACTGGAGCACCGGATAAAACCGATGCTGAAATTGACCGCGATATT
Bs-Ag1     TTCAAACAGCTCCTTAATGGAGCTCCTGATAAAACCGATGCTGAAATTGATCGCGATATT
***** ** * * ***** ** *****
L2R59      GAGAACTGGGTCGCCCGACAAGGACCAAAAATAAAGACAGAATTCAATAAATTCAAAACG
Bs-Ag1     GAGAATTGGGTCGCCCGACAAGAACCTAAAGTAAAGACAGAGTACAACAAATTCAAAGCA
***** ***** ** ** ***** * ** ***** *
L2R59      CAAATGCAGCAAGGCAAGGCCAGAGCTGAGGCTGCCCATCGGGCATCTATTGCAAAGTTC
Bs-Ag1     CAAATGCAGCAAGGTAAGGCTAGAGCTGATGCTGCCCATCGAGCATCTATTGCAAGGTT
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
L2R59      TCGCCAGCCGCTAAGGCAGCCGACGCACAGTTGACCGCAATAGCCGATAACCCAAATCTC
Bs-Ag1     TCGCCGGCCGCTAAGGCAGCCGATGCACAATTAACCGCAATAGCCGATAATCCAAATCTC
***** ***** ***** ** ***** ***** *****
L2R59      AAAGGACGAGAAAAGCAACAGAAAATTA CTGCCTCCTTCAGTCATTGCCAGCTGCAGTG
Bs-Ag1     AAAGGACGTGAAAAACAACAGAAAATCACCAGCCTCATTTCAGTCATTGCCAGCTGCAGTA
***** ***** ***** ** ***** ***** *****
L2R59      CAAGCCGAATTTCAAAAAGAGATGCAAGGCTAG
Bs-Ag1     CGATCCGAACTTCAAAAAGAGATGCAAGGCTAG
* * ***** *****

```

注：相同序列用\*表示

图 2

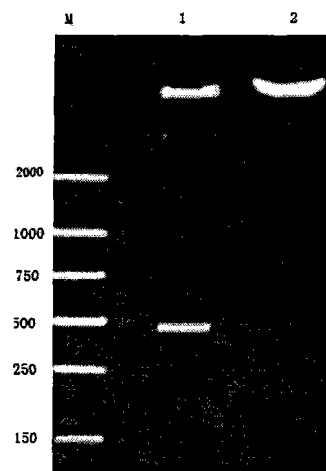


图 3

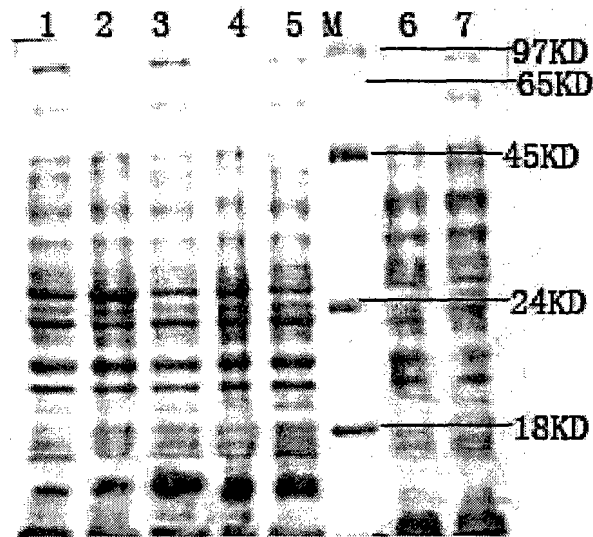


图 4

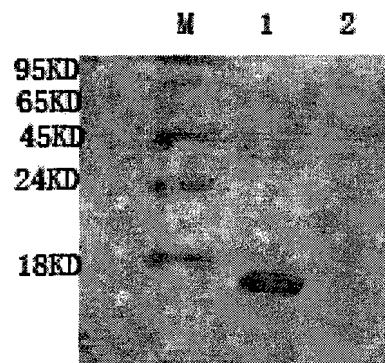


图 5

专利名称(译)	大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101348787A</a>	公开(公告)日	2009-01-21
申请号	CN200810044409.8	申请日	2008-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	杨光友 何光志 汪涛 彭雪蓉		
发明人	杨光友 何光志 汪涛 彭雪蓉		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/70 C07K14/435 A61K48/00 A61P33/10 G01N33/53		
其他公开文献	CN101348787B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了大熊猫西氏蛔虫抗原的制备及其应用，属大熊猫西氏蛔虫的防治及检测领域。包括设计出西氏蛔虫抗原基因引物；采用RT-PCR法将蛔虫总RNA逆转录合成cDNA，再以cDNA为模板，PCR扩增出目的产物；将纯化的目的产物与pMD18-T载体连接，转至DH5α，感受态细菌；经平板筛选培养，选取阳性重组克隆，培养后测序出抗原基因为Bs-Ag1基因、Bs-Ag2基因、Bs-Ag3基因。再进行重组质粒构建、诱导表达和重组蛋白纯化，将测序正确的重组质粒，转化到大肠杆菌BL21感受态细胞，进行蛋白的大量表达。其产物经检测、免疫试验以及对试验动物抗体IgG的ELISA检测分析：大熊猫西氏蛔虫抗原Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3基因可以作为蛔虫制备基因工程疫苗的候选基因，其重组蛋白Bs-Ag1、Bs-Ag2和Bs-Ag3具有良好的反应原性，可以用来构建以ELISA方法检测感染大熊猫蛔虫。

