



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111077300 A

(43)申请公布日 2020.04.28

(21)申请号 201811227991.1

(22)申请日 2018.10.22

(71)申请人 吉林大学

地址 130011 吉林省长春市前进大街2699
号

(72)发明人 李建华 刘天 张西臣 宫鹏涛
李新 杨举 李赫

(74)专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

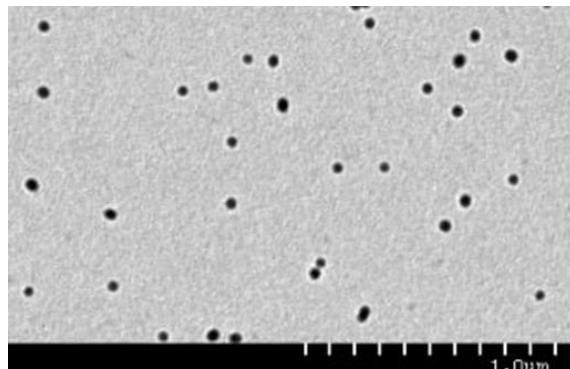
权利要求书2页 说明书5页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种肝片吸虫假定蛋白基因及胶体金免疫
层析试纸

(57)摘要

本发明公开一种肝片吸虫假定蛋白基因,同时
还提供了利用肝片吸虫假定蛋白基因制成的
胶体金免疫层析试纸,利用肝片吸虫假定蛋白制
成肝片吸虫感染检测胶体金试纸条,具有简便、
易操作、具有高灵敏性、高特异性、时间短等特
点,结果清晰可见,适用于临床现场检测和大规
模的流行病学调查。



1. 一种肝片吸虫假定蛋白基因 (Hypothetical protein D915_11650基因), 其特征在于:

基因序列如SEQ No.1所示。

2. 用于扩增权利要求1所述的肝片吸虫假定蛋白基因的nest-PCR扩增引物, 具有以下序列:

F: 5' -CGAGCTCATGGTCTTGCTGAGGAACGACAG-3'

R: 5' -CCCAAGCTTCACTGACCATATCACCGAGATC-3'。

3. 如权利要求1所述的一种肝片吸虫假定蛋白基因制备方法, 包括以下步骤:

1) λ 噬菌体插入基因的克隆

插入基因片段扩增引物序列由上海生工合成, 如下:

F: 5' -CTCGGGAACGCGGCCATTGTGTTGGT-3' ;

R: 5' -ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3' ;

2) 开放性阅读框 PCR 扩增

根据开放性阅读框基因序列, 用 Primer5.0 软件进行引物设计, 限制性内切酶分别为 SacI、Hind III:

F: 5' -CGAGCTCATGGTCTTGCTGAGGAACGACAG-3' ;

R: 5' -CCCAAGCTTCACTGACCATATCACCGAGATC-3' ;

以肝片吸虫假定蛋白 D915_11650基因扩增产物为模板进行开放性阅读框的 PCR 扩增

3) 肝片吸虫假定蛋白 D915_11650基因克隆载体构建

将目的片段与 pMD-18T 载体连接, 连接产物转化入感受态, 对重组质粒进行鉴定以及双酶切鉴定;

4) 肝片吸虫假定蛋白 D915_11650表达载体构建

目的基因基因与 pET-28a 质粒连接, 连接产物转化入感受态, 并进行双酶切验证。

4. 一种检测肝片吸虫感染胶体金免疫层析试纸条, 主要包括玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸水纸、PVC底板; 其特征在于:

金标垫上的金标抗体为金黄色葡萄球菌A蛋白 (SPA), 硝酸纤维素膜上的指示线T线包被肝片吸虫假定蛋白 D915_11650、C线包被兔抗SPA抗体。

5. 如权利要求4所述的一种检测肝片吸虫感染胶体金免疫层析试纸条制备方法, 通过克隆、表达纯化肝片吸虫假定蛋白 D915_11650重组蛋白, 利用柠檬酸三钠还原法烧制胶体金溶液, 之后利用胶体金对金黄色葡萄球菌A蛋白 (SPA) 抗体进行标记, 制备金标垫, 组装试纸条, 肝片吸虫假定基因 D915_11650蛋白作为检测线、兔抗SPA抗体作为质检线, 包括以下步骤:

1) 胶体金的烧制

利用柠檬酸三钠还原法, 向99mL ddH2O中加入1mL 1%氯金酸, 沸腾后加入1mL 1%柠檬酸三钠, 制备40nm胶体金颗粒;

2) 金标抗体pH确定

利用K₂CO₃梯度标记法, 确定金标最佳pH, 0.2mol/L K₂CO₃加入量为2 μ L;

3) 金标抗体的制备

利用摸索好的最佳K2C03加入量通过胶体金对SPA进行标记,标记后的金标抗体溶解于复溶液中4℃保存待用或直接滴加于金标垫上;

4) NC膜上T线假定蛋白 D915_11650蛋白包被浓度的确定

将T线假定蛋白 D915_11650蛋白稀释成2、1、0.5、0.25、0.125mg/mL,每个试纸条包被1 μ L,按照常规条件进行操作,观察结果T线的显色情况,确定T线多抗的最佳包被浓度1mg/mL;

5) NC膜上C线兔抗SPA抗体包被浓度的确定

将C线兔抗SPA抗体稀释成2、1、0.5、0.25、0.125mg/mL,每个试纸条包被1 μ L,按照常规条件进行操作,观察结果C线的显色情况,确定0.5mg/mL为C线最佳包被浓度。

一种肝片吸虫假定蛋白基因及胶体金免疫层析试纸

技术领域

[0001] 本发明公开一种肝片吸虫假定蛋白基因,同时还提供了利用肝片吸虫假定蛋白基因制成的胶体金免疫层析试纸,用于牛羊肝片吸虫感染的血清检测,属于免疫学技术领域。

背景技术

[0002] 肝片吸虫寄生在牛、羊等反刍动物的肝脏和胆管内,引起宿主急性或慢性的肝炎和胆管炎的人畜共患寄生虫病。该病呈世界性分布,常呈地方性流行,多雨年份能促进本病的流行严重威胁人畜的健康,并对畜牧业的发展造成阻碍。肝片吸虫病的检测常规方法是检查粪便中是否含有肝片吸虫幼虫来确诊,在实践应用中有诸多不方便之处,目前,缺乏简便、快速的肝片吸虫病免疫诊断方法。

发明内容

[0003] 本发明提供一种肝片吸虫假定蛋白基因(Hypothetical protein D915_11650基因),是利用羊肝片吸虫阳性血清对肝片吸虫 cDNA 文库进行筛选得到的,大小为1005bp,在核苷酸同源性分析中未发现与其同源的基因,是一个新基因。

[0004] 本发明进一步提供了肝片吸虫假定蛋白基因制成的胶体金免疫层析试纸,具有快速便捷、操作简单、不需要特殊仪器等特点,适合临床现场检测及大规模流行病学调查。

[0005] 本发明所述的一种肝片吸虫假定蛋白基因(Hypothetical protein D915_11650基因),其特征在于:

基因序列如SEQ No.1所示。

[0006] 用于扩增肝片吸虫假定蛋白基因的nest-PCR扩增引物,具有以下序列:

F: 5' -CGAGCTCATGGTTCTGCTGAGGAACGACAG-3'

R: 5' -CCCAAGCTTCAACTGACCATATCACCGAGATC-3'。

[0007] 本发明所述的一种肝片吸虫假定蛋白基因制备方法,包括以下步骤:

1) λ 噬菌体插入基因的克隆

插入基因片段扩增引物序列由上海生工合成,如下:

F: 5' -CTCGGAAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3' ;

R: 5' -ATACGACTCACTATAGGCGAATTGGCC-3' ;

2) 开放性阅读框 PCR 扩增

根据开放性阅读框基因序列,用 Primer5.0 软件进行引物设计,限制性内切酶分别为 SacI、Hind III:

F: 5' -CGAGCTCATGGTTCTGCTGAGGAACGACAG-3' ;

R: 5' -CCCAAGCTTCAACTGACCATATCACCGAGATC-3' ;

以肝片吸虫假定蛋白 D915_11650基因扩增产物为模板进行开放性阅读框的 PCR 扩增

3) 肝片吸虫假定蛋白 D915_11650基因克隆载体构建

将目的片段与 pMD-18T 载体连接, 连接产物转化入感受态, 对重组质粒进行鉴定以及双酶切鉴定;

4) 肝片吸虫假定蛋白 D915_11650 表达载体构建

目的基因基因与 pET-28a 质粒连接, 连接产物转化入感受态, 并进行双酶切验证。

[0008] 本发明提供的一种检测肝片吸虫感染胶体金免疫层析试纸条, 主要包括玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜、吸水纸、PVC 底板; 其特征在于:

金标垫上的金标抗体为金黄色葡萄球菌A蛋白 (SPA), 硝酸纤维素膜上的指示线T线包被肝片吸虫假定蛋白 D915_11650、C线包被兔抗SPA抗体。

[0009] 本发明所述的一种检测肝片吸虫感染胶体金免疫层析试纸条制备方法, 通过克隆、表达纯化肝片吸虫假定蛋白 D915_11650 重组蛋白, 利用柠檬酸三钠还原法烧制胶体金溶液, 之后利用胶体金对金黄色葡萄球菌A蛋白 (SPA) 抗体进行标记, 制备金标垫, 组装试纸条, 肝片吸虫假定基因 D915_11650 蛋白作为检测线、兔抗SPA抗体作为质检线, 步骤如下:

1) 胶体金的烧制

利用柠檬酸三钠还原法, 向99mL ddH₂O中加入1mL 1%氯金酸, 沸腾后加入1mL 1%柠檬酸三钠, 制备40nm胶体金颗粒;

2) 金标抗体pH确定

利用K₂CO₃梯度标记法, 确定金标最佳pH, 0.2mol/L K₂CO₃加入量为2μL;

3) 金标抗体的制备

利用摸索好的最佳K₂CO₃加入量通过胶体金对SPA进行标记, 标记后的金标抗体溶解于复溶液中4℃保存待用或直接滴加于金标垫上;

4) NC膜上T线假定蛋白 D915_11650蛋白包被浓度的确定

将T线假定蛋白 D915_11650蛋白稀释成2、1、0.5、0.25、0.125mg/mL, 每个试纸条包被1μL, 按照常规条件进行操作, 观察结果T线的显色情况, 确定T线多抗的最佳包被浓度1mg/mL;

5) NC膜上C线兔抗SPA抗体包被浓度的确定

将C线兔抗SPA抗体稀释成2、1、0.5、0.25、0.125mg/mL, 每个试纸条包被1μL, 按照常规条件进行操作, 观察结果C线的显色情况, 确定0.5mg/mL为C线最佳包被浓度。

[0010] 本发明经原核表达可得到 36kDa 左右的蛋白条带, 经Western blot检测该蛋白具有良好的反应原性, 可作为检测肝片吸虫的诊断性抗原。

[0011] 本发明的积极效果在于: 公开了一种肝片吸虫假定蛋白基因, 并利用肝片吸虫假定蛋白制成肝片吸虫感染检测胶体金试纸条, 具有简便、易操作、具有高灵敏性、高特异性、时间短等特点, 结果清晰可见, 适用于临床现场检测和大规模的流行病学调查。

附图说明

[0012] 图1为透射电镜观察金颗粒;

图2为透射电镜观察金标探针;

图3为特异性试验结果图;

图4为敏感性试验结果图。

具体实施方式

[0013] 下列实施例旨在进一步举例说明,而不是限制本发明。本领域技术人员可以理解到,在不背离本发明的精神和原则的前提下,对本发明的任何平行改变和改动都将落入本发明的待批权利要求范围内。

[0014] 实施例1

一、肝片吸虫假定蛋白 D915_11650重组蛋白基因的克隆、表达

1、 λ 噬菌体插入基因的克隆

插入基因片段扩增引物序列由上海生工合成,如下:

F: 5'-CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3' ;

R: 5'-ATACGACTCACTATAGGCGAATTGGCC-3' ;

2、开放性阅读框 PCR 扩增

根据开放性阅读框基因序列,用 Primer5.0 软件进行引物设计,限制性内切酶分别为 SacI、Hind III:

F: 5'-CGAGCTCATGGTCTTGCTGAGGAACGACAG-3' ;

R: 5'-CCCAAGCTTCAACTGACCATATCACCGAGATC-3' ;

以肝片吸虫假定蛋白 D915_11650基因扩增产物为模板进行开放性阅读框的 PCR 扩增

3、肝片吸虫假定蛋白 D915_11650基因克隆载体构建

将目的片段与 pMD-18T 载体连接,连接产物转化入感受态,对重组质粒进行鉴定以及双酶切鉴定。

[0015] 4、肝片吸虫假定蛋白 D915_11650表达载体构建

目的基因基因与 pET-28a 质粒连接,连接产物转化入感受态,并进行双酶切验证;基因序列如SEQ No.1所示。

[0016] 实施例2 肝片吸虫感染检测胶体金试纸条的制备

1、方法

(1)胶体金的烧制

利用柠檬酸三钠还原法,向99mL ddH₂O中加入1mL 1%氯金酸,沸腾后加入1mL 1%柠檬酸三钠,制备40nm胶体金颗粒;

(2)金标抗体最佳pH确定

利用K₂CO₃梯度标记法,通过观察颜色变化,确定金标最佳PH;

(3)金标抗体的制备

利用摸索好的最佳K₂CO₃加入量通过胶体金对SPA进行标记,标记后的金标抗体溶解于复溶液中4℃保存待用或直接滴加于金标垫上;

(4) NC膜上T线假定蛋白 D915_11650蛋白包被浓度的确定

将T线假定蛋白 D915_11650蛋白稀释成2、1、0.5、0.25、0.125mg/mL,每个试纸条包被1 μ L,按照常规条件进行操作,观察结果T线的显色情况,确定T线多抗的最佳包被浓度;

(5) NC膜上C线免抗SPA抗体包被浓度的确定

将C线免抗SPA抗体稀释成2、1、0.5、0.25、0.125mg/mL,每个试纸条包被1 μ L,按照常规条件进行操作,观察结果C线的显色情况,确定C线抗体的最佳包被浓度。

[0017] 结果**(1) 胶体金的烧制**

胶体金溶液颜色均匀透明,透射电镜观察颗粒大小基本一致,约40nm左右,分散均匀,没有聚集,可用于下一步试验(附图1),透射电镜观察颗粒大小基本一致,约40nm左右,分散均匀,没有聚集;

(2) 金标抗体最佳pH确定

确定胶体金标记抗体的最适0.2mol/L K₂CO₃加入量为2μL;

(3) 金标抗体的制备

通过透射电镜观察,金颗粒周围有一圈蛋白晕,分散性较好,无聚集现象,表明标记成功(附图2),通过透射电镜观察,金颗粒周围有一圈蛋白晕,分散性较好,无聚集现象;

(4) NC膜上T线假定蛋白 D915_11650蛋白最佳包被浓度的确定

蛋白浓度稀释到0.5mg/mL时T线显色仍较为明显,故选择1mg/mL为T线最佳包被浓度;

(5) NC膜上C线免抗SPA抗体最佳包被浓度的确定

结果显示当抗体浓度稀释到0.5mg/mL包被时C线显色最明显,故选择0.5mg/mL为C线最佳包被浓度。

[0018] 实施例3**胶体金试纸条的制备**

硝酸纤维素膜21mm,样品垫24mm、金标垫9mm、吸水纸32mm从下到上依次粘贴于PVC底板上,样品垫压金标垫2mm,金标垫压NC膜2mm,吸水纸压NC膜2mm;依次粘贴好后,用切纸机将组装的试纸板切成每条宽度为4mm的试纸条,T线包被肝片吸虫假定基因 D915_11650蛋白、C线包被免抗SPA抗体即可。

[0019] 试验例1 胶体金免疫层析试纸条性能测试**1、方法**

为了测试实施例2制备的试纸条的试验性能,需要进行一系列的试验,其中包括特异性试验、敏感性试验、重复性试验、保存期试验;

(1) 特异性试验

分别取肝片吸虫阳性参照样品、华支睾吸虫阳性样品,双腔吸虫阳性样品、捻转血矛线虫阳性样品、健康羊血清做阴性对照,按照常规方法进行操作,判断各种血清之间有无交叉反应,从而评价试纸条的特异性(见图3),只有肝片吸虫参照阳性样品(a) T线显色,华支睾吸虫阳性样品(b)、双腔吸虫阳性样品(c)、捻转血矛线虫阳性样品(d)健康羊血清(e) T线均无显色,表明无交叉反应,特异性良好;

(2) 敏感性试验

将肝片吸虫阳性血清进行倍比稀释(1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640),按常规操作观察试纸条显色情况。当用肉眼无法观察到T线,并且C线依旧清晰可见时,此时的稀释度即为该方法的最低检出浓度(见图4),将肝片吸虫阳性血清进行倍比稀释(1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640),结果1:160倍稀释时T线仍有显色,所以该试纸条敏感性为1:160;

(3) 重复性试验

取肝片吸虫阳性血清及阴性血清,使用3个不同批次的试纸条按上述方法进行试验,每

个样品做三次重复,根据膜片显色情况,确定该方法的重复性情况;

(4) 稳定性试验

将试纸条分别于4℃密封保存,室温密封保存。分别在1个月、2个月、3个月几个时间点分别对参照阳性样品进行检测,观察两种环境各试纸条的显色情况,从而判断试纸条检测的稳定情况;

(5) 试纸条检测阳性血清符合率试验

应用已经建立的胶体金试纸条检测方法,对4份肝片吸虫参照阳性样品进行检测,根据检出的阳性样品数,评价该方法阳性符合率;

(6) 试纸条的初步应用

应用所组装的试纸条对25份羊血清样品(其中包括4份肝片吸虫感染参照样品,21份长春地区临床样品)进行检测,4份参照样品检出率为100%,21份临床样品结果均为阴性。

[0020] 结果

(1) 特异性试验

结果只有肝片吸虫参照阳性样品(a) T线显色,华支睾吸虫阳性样品(b)、双腔吸虫阳性样品(c)、捻转血矛线虫阳性样品(d)健康羊血清(e) T线均无显色,表明无交叉反应,特异性良好。(附图3)

(2) 敏感性试验

结果1:160倍稀释时T线仍有显色,所以该试纸条敏感性为1:160。(附图4)

(3) 重复性试验

结果阴性样品的三次重复效果较好,结果比较一致,表明试纸条的重复性良好;

(4) 保存期试验

结果表明4°、室温存放1个月、2个月、3个月依旧能够显示正确结果, T/C线显色情况均也无太大区别,但4°存放4个月时出现金标垫释放不够完全,且释放速度变慢,但仍能指示正确结果,说明该试纸条至少可以存放四个月以上;

(5) 试纸条检测阳性粪便符合率试验

应用已经建立的胶体金试纸条检测方法,对4份肝片吸虫虫参照阳性粪便进行检测,结果表明,4份样本均检测为阳性,说明该试纸条的阳性符合率为100%;

(6) 试纸条的初步应用

应用所组装的试纸条对临床25份羊血清样品(其中包括4份肝片吸虫感染参照样品,21份长春地区临床样品)进行检测,4份参照样品检出4份,检出率为100%,21份临床样品结果均为阴性。

序列表

<110> 吉林大学

<120> 一种肝片吸虫假定蛋白基因及胶体金免疫层析试纸

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1005

<212> DNA

<213> 肝片吸虫(肝片吸虫)

<400> 1

atggttcttg ctgaggaacg acagatttag ctaacacttc tggccgtgct cccctatgga 60
ctagaaacat tctggccaga taacaccgccc caatttagcgt ggaatgcttag gtcatctgat 120
tcattcaaataatcaacg tcgatcaatc cggtcaggag tagggcaaga tcatgttcgg 180
catccgggac aattattcaa aatgaatcca aatcgacgtg ttggcgaaaa gccgaaggac 240
gagaacgacg tgggtgattt gggatccata acaacgcagg aaatttcgca cagagatgtg 300
gaagatatgg aactaaatgg agaaattgat cgtccattcg cagcttatca tcggttctct 360
acgaaatgga tccagttta cgaagaccga cgattcaatc ttctcttat gaatgacatt 420
ttggcagcag tctacatatg tctgggttgtt gccatttgc tggtttactt cattttcga 480
ccatccaacc gactgttttc cggcaatatg acctgttacc atggctactg ttttgtacga 540
aatatgagca gatcatctgt tatgccagct catcatcagc cgacacaccga cgcctatcat 600
ccggttactt ggactccatc gctgatcgcc attgccctga tcgcatatgg cctgggtgtt 660
ttgttcagaa ttactttaac cacaataaac gcgggaaatg taaacaactg ggctgtggct 720
gtattttgtt tttcggtgtt gattcatgctg tgcgtacatt tagatcgaaa ttggtttgtt 780
gcattccacc caatctttg gctgaaagggt gtgtcgacaca ctttttcga accactgctc 840
ataattatttgcctt caccacattt caagctgtgg taaatcttcc atacgtgcag 900
gttcaaagac tagactttaa ttccgaactg gttcgccatt ctatcttgat tcaggaatcg 960
gaaaagcgta acaacaacaa agatctcggt gatatggtca gttga 1005

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列(人工序列)

<400> 2

cgagctcatg gttcttgctg aggaacgaca g 31

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(人工序列)

<400> 3

cccaagctt caactgacca tatcaccgag atc 33

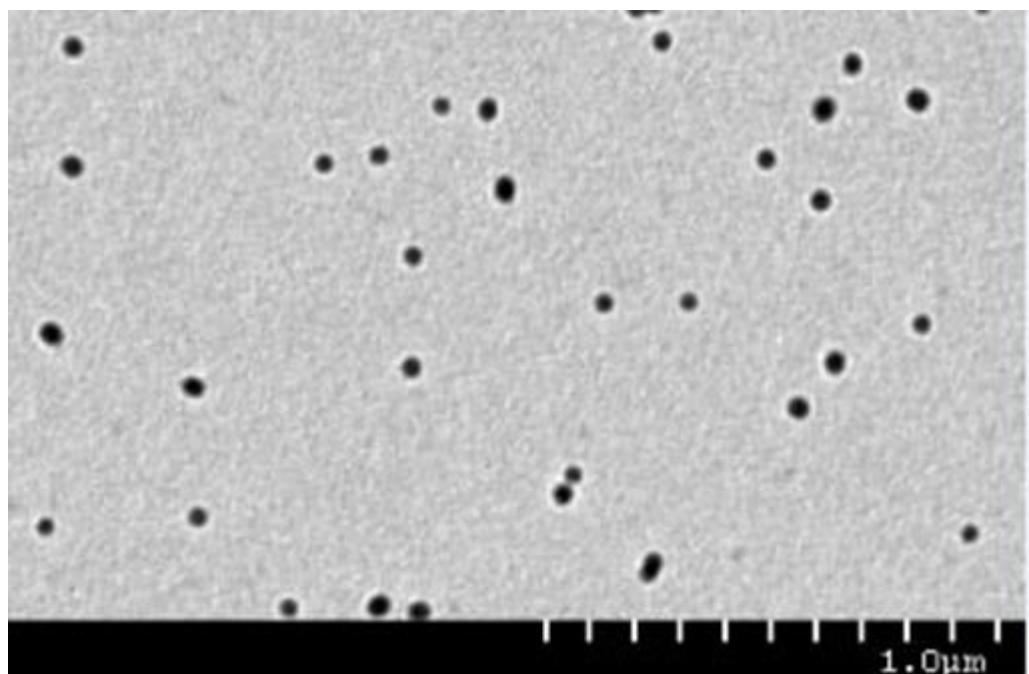


图1

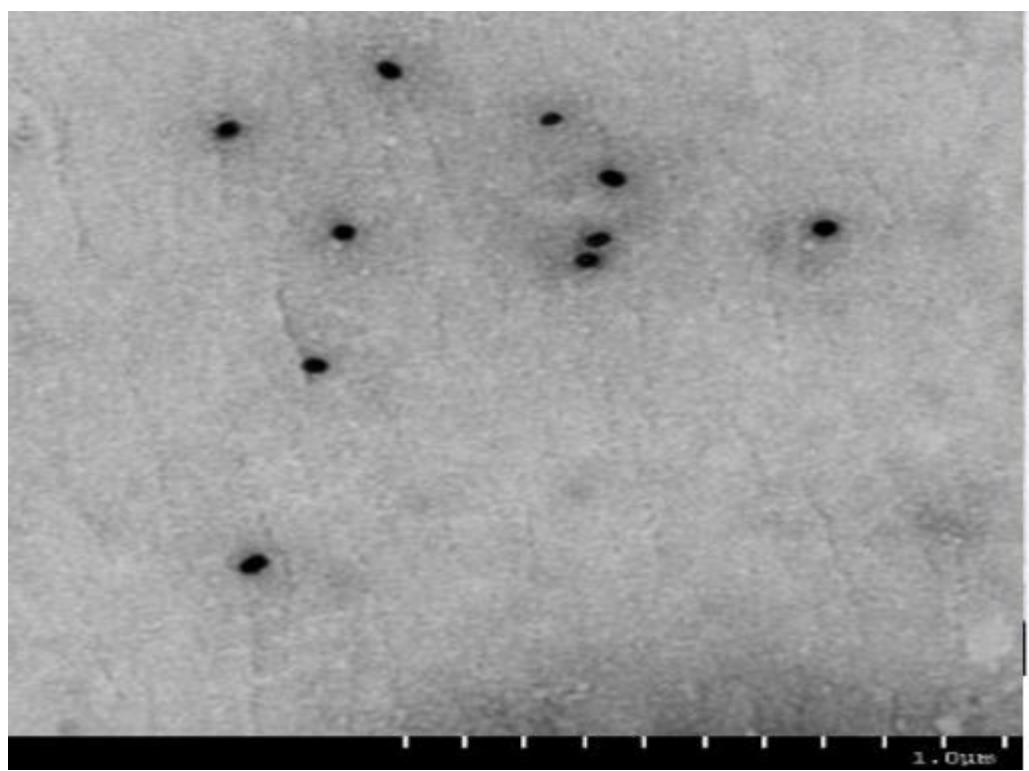


图2

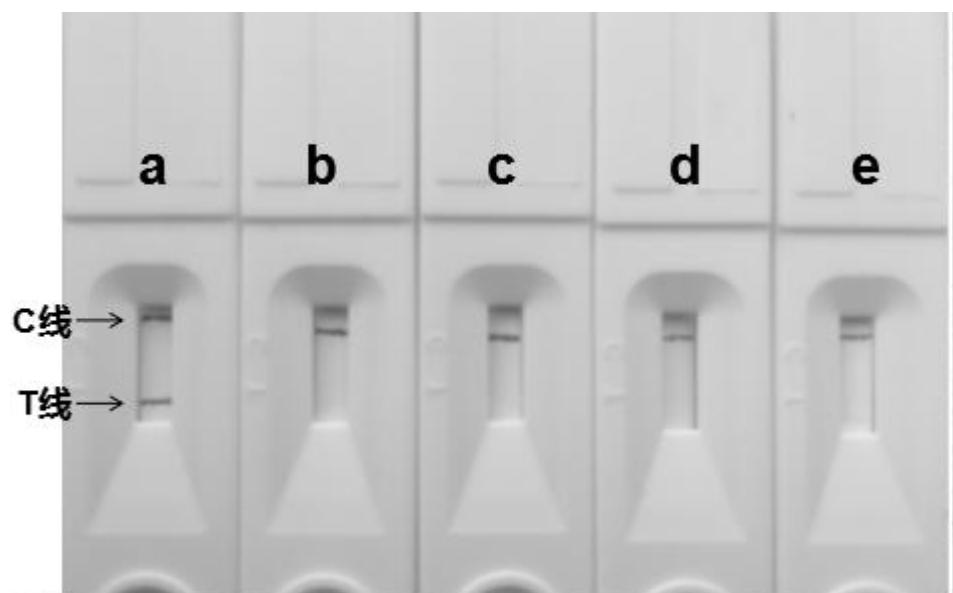


图3

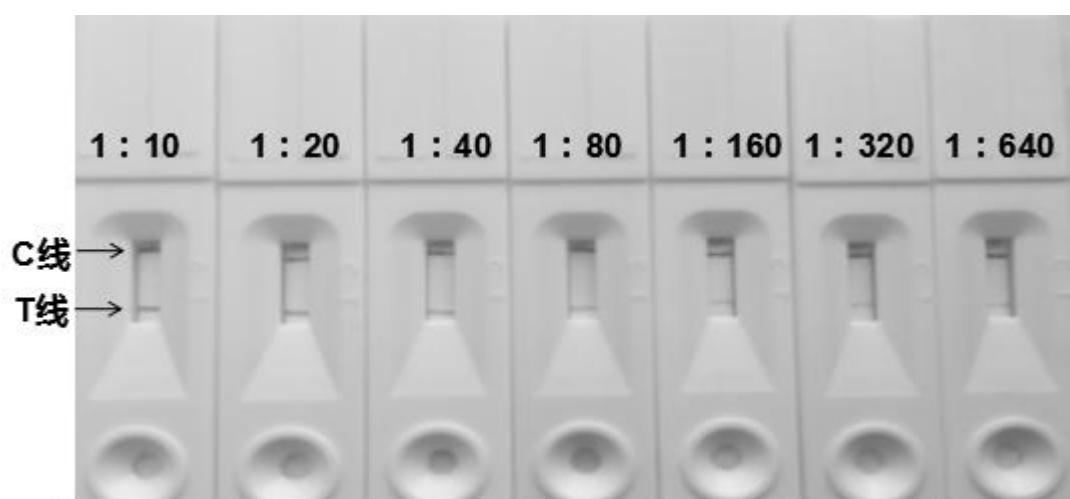


图4

专利名称(译)	一种肝片吸虫假定蛋白基因及胶体金免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN111077300A	公开(公告)日	2020-04-28
申请号	CN201811227991.1	申请日	2018-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	李建华 刘天 张西臣 宫鹏涛 李新 杨举 李赫		
发明人	李建华 刘天 张西臣 宫鹏涛 李新 杨举 李赫		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开一种肝片吸虫假定蛋白基因，同时还提供了利用肝片吸虫假定蛋白基因制成的胶体金免疫层析试纸，利用肝片吸虫假定蛋白制成肝片吸虫感染检测胶体金试纸条，具有简便、易操作、具有高灵敏性、高特异性、时间短等特点，结果清晰可见，适用于临床现场检测和大规模的流行病学调查。

