



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102168100 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 31

(21) 申请号 201110037747. 0

C12N 1/21 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 14

C07K 19/00 (2006. 01)

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

C07K 16/40 (2006. 01)

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 207 号

A61K 39/00 (2006. 01)

A61P 33/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(72) 发明人 汪俊云 朱慧慧 高春花 杨玥涛 石锋

(74) 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司 31128

代理人 严新德

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 9/10 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

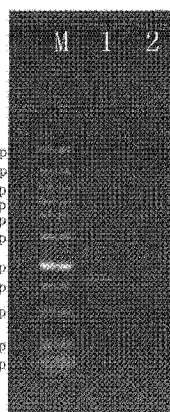
权利要求书 1 页 说明书 11 页
序列表 3 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途

(57) 摘要

本发明属于生物工程领域,提供了一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因,其碱基序列如SEQ ID NO :1 所示。本发明还提供了上述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质。上述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质,其氨基酸序列如SEQ ID NO :2 所示,或者与SEQ ID NO :3 所示的1-219 位氨基酸序列相同。本发明获得的重组蛋白可以用于囊型包虫病患者的免疫诊断,用该重组蛋白包板,用 ELISA 方法检测囊型包虫病、泡型包虫病、囊尾蚴病、其它寄生虫病患者以及健康人血清,获得的敏感性和特异性分别为 72. 41% 和 92. 36%。



1. 一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因,其碱基序列如 SEQ ID NO :1 所示。
2. 权利要求 1 所述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质。
3. 如权利要求 2 所述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示,或者与 SEQ ID NO :3 所示的 1-219 位氨基酸序列相同。
4. 一种表达载体,其特征在于:含有权利要求 1 所述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因。
5. 一种融合蛋白,其特征在于:含有权利要求 1 所述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白。
6. 一种宿主细胞,其特征在于:由权利要求 4 所述的表达载体转化或者转导。
7. 一种抗体,其能与权利要求 2 所述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因编码的蛋白质特异性结合。
8. 权利要求 2 所述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因编码的蛋白质在制备用于免疫囊型包虫病疫苗中的应用。
9. 权利要求 4 所述的一种表达载体在制备用于诊断囊型包虫病的诊断试剂中的应用。
10. 权利要求 5 所述的一种融合蛋白在制备用于诊断囊型包虫病的诊断试剂中的应用。
11. 权利要求 7 所述的一种抗体在制备用于诊断囊型包虫病的诊断试剂中的应用。

一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,尤其涉及一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途。

背景技术

[0002] 包虫病 (Hydatid Disease) 又称为棘球蚴病 (Echinococcosis), 是棘球绦虫的中绦期幼虫寄生于人体和动物所引起的疾病, 它是一种严重危害人畜健康的人兽共患寄生虫病。棘球绦虫种类较多, 能感染人类的棘球属绦虫有 4 种: 细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg)、多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em)、少节棘球绦虫 (*Echinococcus oligarthrus*) 和伏氏棘球绦虫 (*Echinococcus vogeli*)。这 4 种棘球绦虫可引起不同类型的棘球蚴病。我国存在两种棘球蚴病, 即细粒棘球蚴病 (*echinococcosis granulosa*), 又称囊型包虫病 (*cystic echinococcosis*, CE) 和多房棘球蚴病 (*echinococcosis multilocularis*), 又称泡型包虫病 (*alveolar echinococcosis*, AE)。

[0003] 包虫病是一个重要的世界性公共卫生问题, 广泛流行于欧、亚、非和地中海区域沿岸国家, 以及澳洲和南美。在我国, 包虫病主要流行于西部的农牧区, 其中新疆、青海、甘肃、宁夏、西藏、内蒙和四川西部最为严重, 是世界上包虫病的高流行区。此外, 吉林、陕西、云南、贵州和河南等省局部地区也有小范围流行, 我国流行区受威胁人口约 7000 万。卫生部《全国人体重要寄生虫病现状调查》报告显示, 内蒙古、吉林、河南、四川、贵州、云南、陕西、甘肃、青海、宁夏、新疆、西藏等 12 省 (区) 包虫病患病率为 1.084%, 据此推算, 目前流行区约有病人 38 万人。由于 B 超诊断结果有一定的漏检率, 实际患病病人数可能达 60 万人以上。血清学检查发现人群的感染率平均为 11.98%, 感染人数约为 700 万人。

[0004] 包虫病不但给患者带来极大的痛苦和沉重的经济负担, 且发病的高峰为 20-50 岁的青壮年, 给社会带来极大的压力, 系西部农牧区群众因病致贫, 因病返贫的重要原因。此外, 由于包虫病在牛羊的感染率相当高 (可达 90%), 每年因包虫病也给我国畜产品造成的经济损失达数十亿。因此包虫病不但严重危害人民的生命健康, 而且严重影响社会和经济、边疆稳定。在政府的重视下, 包虫病的防治工作正在全面开展, 为满足包虫病诊断和现场流行病学调查的需要, 研制合适的包虫病检测方法是当务之急。

[0005] 囊型包虫病的诊断主要依据流行病学史、临床表现、影像学检查、病原学检查和免疫学检测。目前对囊型包虫病的诊断极大地依赖影像学方法, 如 X 光检查、B 型超声检查、CT 扫描、核磁共振等物理诊断方法。虽然影像学技术已广泛应用, 且能对包块损害的部位、大小和物理性状等做出较为明确的判断, 但不能进行早期诊断 (影像学诊断出的囊型包病人大多已不太适合药物治疗), 且不易与一些囊肿、脓肿或肿块相鉴别。由于影像检查设备携带不便, 加之昂贵, 且对操作人员的技术要求较高, 在疾病诊断与流行病学调查中 (特别在边远地区连电力供应都受到限制) 的应用受到限制。

[0006] 免疫学检测方法具有敏感特异的特点, 且可用于早期诊断, 在各种疾病诊断中得

到广泛应用,在囊型包虫病诊断中的应用也受到高度重视,国内外对其研究也不断深入,而研究的重点在于获得合适的抗原以提高诊断产品的性能。

[0007] 棘球蚴病免疫诊断抗原的研究经历了粗抗原、纯化抗原和重组抗原三个阶段。总的来说,粗抗原的诊断敏感性高,但是特异性较低;纯化抗原在粗抗原的基础上提高了诊断的特异性,但是敏感性有所降低;而重组抗原的特异性较高,且易于标准化,但目前公认具诊断价值的重组 Ag5 和 AgB 与其他寄生虫的相关分子具有共同表位,存在交叉反应,且高比例的囊型包虫病患者血清学反应为阴性,不能满足诊断的需要。因此,进一步开展对细粒棘球绦虫抗原的筛选研究,寻找具有更高敏感性和特异性的抗原组分,提高对囊型包虫病的诊断效率,是当前棘球蚴病免疫诊断研究的一项重要内容。

[0008] 构建 cDNA 文库并对其进行免疫筛选是获得新抗原基因的一个重要方法。将某种生物基因组转录的全部 mRNA 经反转录产生的 cDNA 片段分别与克隆载体重组,并将其引入到相应的宿主细胞中(一般为 *E. coli*)繁殖和扩增,理论上此群体就包含有该物种的全部 mRNA 信息,称该生物基因组的 cDNA 文库。基因组含有的基因在特定的组织细胞中只有一部分表达,而且处在不同环境条件、不同分化时期的细胞其基因表达的种类和强度也不尽相同,所以 cDNA 文库具有组织细胞特异性。cDNA 文库比基因组 DNA 文库小得多,能够比较容易从中筛选克隆得到细胞特异表达的基因。但对真核细胞来说,从基因组 DNA 文库获得的基因与从 cDNA 文库获得的不同,基因组 DNA 文库所含的是带有内含子和外显子的基因组基因,而从 cDNA 文库中获得的是已经过剪接、去除了内含子的 cDNA。

[0009] cDNA 文库的构建主要包括 mRNA 的获得、cDNA 第一链的合成、cDNA 第二链的合成、双链 cDNA 的克隆和包装。

[0010] cDNA 文库的筛选方法主要有:

[0011] 1. 核酸杂交

[0012] 是最常用,最可靠的方法之一,可大规模地分析文库的克隆子。所用的探针主要有:1) 同源探针:至少含有所需 cDNA 克隆的一部分确切序列。常用于以一个部分克隆分离 cDNA 文库中的全长克隆。2) 部分同源探针:探针的序列与所要筛选的 cDNA 克隆的序列相关但不相同。常用于克隆家族基因。3) 总 cDNA 探针:通过反转录酶均匀掺入放射性核苷酸或通过总的或分级分离得到的 poly(A)+mRNA 进行末端标记而获得 cDNA 探针。4) cDNA 扣除探针:从第一种 mRNA 制备 cDNA 探针,连续多次与 20 倍过量的第二种 mRNA 杂交;回收未杂交的 cDNA 探针,再与 100 倍过量的第一种 mRNA 杂交,使得原 mRNA 中的一些特异序列得到高度富集。主要用于探测 cDNA 文库中与调节水平有所差别的 mRNA 克隆。5) 合成寡核苷酸探针

[0013] 2. 特异性免疫学检测

[0014] 在 cDNA 表达文库中,目的基因的表达产物能与特异性抗体发生免疫学反应,通过酶学的方法加以检测

[0015] 3. cDNA 克隆的同胞检测

[0016] 将 cDNA 文库分成若干组含有 10-100 个克隆子的易于处理的亚 cDNA 文库,对每组亚 cDNA 文库进行检测,当鉴定出阳性库后再不断将其分成更细的库进行检测,直到获得阳性单克隆。

发明内容

[0017] 本发明的目的在于提供一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途,所述的这种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途要解决现有技术中诊断囊型包虫病的效果不佳,不能进行早期诊断的技术问题。

[0018] 本发明提供了一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因(本发明命名为 L1),其碱基序列如 SEQ ID NO :1 所示。其中,29-31 位的 ATG 对应 mRNA 的起始密码子 AUG,686-688 位的 TAG 对应 mRNA 的终止密码子 UAG。

[0019] 本发明提供了上述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质。

[0020] 进一步的,上述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质,其氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示,或者与 SEQ ID NO :3 所示的 1-219 位氨基酸序列相同。

[0021] 本发明提供了一种表达载体,含有上述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因。

[0022] 本发明提供了一种融合蛋白,含有上述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白。。

[0023] 本发明提供了一种宿主细胞,由上述的表达载体转化或者转导。

[0024] 本发明提供了一种抗体,其能与上述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因编码的蛋白质特异性结合。

[0025] 本发明提供了上述的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因编码的蛋白质在制备用于免疫囊型包虫病的疫苗中的应用。

[0026] 本发明提供了上述的一种表达载体在制备用于诊断囊型包虫病的诊断试剂中的应用。

[0027] 本发明提供了上述的一种融合蛋白在制备用于诊断囊型包虫病的诊断试剂中的应用。

[0028] 本发明提供了上述的一种抗体在制备用于诊断囊型包虫病的诊断试剂中的应用。

[0029] 本发明所使用的细粒棘球绦虫原头节 (*Echinococcus granulosus* protoscolex) 采自新疆患囊型包虫病的绵羊。细粒棘球绦虫 cDNA 文库的构建:首先离心分离得到细粒棘球绦虫原头节,提取总 RNA,纯化得到 mRNA;然后合成 cDNA 第一链;合成 cDNA 第二链;将双链 cDNA 连接到 λ ZAP-II 载体中,而后包装到 λ ZAP-II 噬菌体中。构建 cDNA 文库的库容量为 1.8×10^5 pfu/mL。

[0030] 本发明每次用 10 名囊型包虫病患者混合血清对细粒棘球绦虫 cDNA 文库进行免疫筛选,获得了含有细粒棘球绦虫基因的阳性噬菌斑,将噬菌斑进行删除环化,使目的基因连接在环化至 *E. coli* SOLR 菌株内的 Pbluescript SK- 载体上,并将重组载体送生物公司测序,获得目的基因的序列。

[0031] 本发明获得的目的基因长度为 849bp,编码 219 个氨基酸的蛋白,所编码细粒棘球绦虫钙网织蛋白的分子量约为 28032 道尔顿。将目的基因的序列在 NCBI 中进行 Blastn 比对分析,未发现与其同源性较高的基因,进行 Blastx 比对分析发现其编码蛋白为细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶(如 SEQ ID NO :3 所示)。

[0032] 本发明提取包含目的基因的 Pbluescript SK- 载体,根据目的基因的序列,选择合适的核酸内切酶 (*EcoRI*) 将目的基因从 Pbluescript SK- 载体中切下,用同样的内切酶酶

切表达载体 pGEX-3x, 将酶切产物同时进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下将目的片段切下, 纯化, 将目的基因和表达载体的纯化产物连接, 转化 E. coli DH5a 细胞, 挑取单菌落测序检测连接成功与否, 将连接成功的重组载体从 E. coli DH5a 细胞中提取出来, 转化 E. coli BL21 (DE3) 细胞, 表达、纯化重组蛋白。

[0033] 本发明获得的重组蛋白可以用于囊型包虫患者的免疫诊断, 用该重组蛋白包板, 用 ELISA 方法检测囊型包虫病、泡型包虫病、囊虫病、其它寄生虫病患者以及健康人血清, 获得的敏感性和特异性分别为 72.41% (63/87) 和 92.36% (133/144), 目前诊断囊型包虫病效果最佳的天然纯化抗原 B 的诊断敏感性和特异性分别为 86.81% (79/91) 和 73.07% (95/130), 可见与天然纯化抗原 B 相比, 谷胱甘肽转移酶的诊断敏感性稍差 ($P < 0.05$), 但是其诊断特异性优于天然纯化抗原 B ($P < 0.05$), 与其它寄生虫病的交叉反应较少, 可与其它抗原联合应用诊断囊型包虫病。

附图说明

[0034] 图 1 为 cDNA 文库在 NZY 培养基上形成的噬菌斑。

[0035] 图 2 为本发明的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因在 NCBI 上进行 Blastx 同源性分析, 与同源性最高的氨基酸序列比对图。

[0036] 图 3 为本发明的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因编码蛋白的二级结构分析图。

[0037] 图 4 为本发明的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因编码蛋白的结构域分析图。

[0038] 图 5 为 Pbluescript SK-/L1 重组质粒和 pGEX-3X 表达载体酶切鉴定图, 其中 M: DNA 分子量标准; 1: 酶切下来的目的片段 L1 及 Pbluescript SK-载体; 2: 酶切后的 pGEX-3X 载体。

[0039] 图 6 为 Pbluescript SK-/L1 基因重组质粒和 pGEX-3X 表达载体纯化后的琼脂糖凝胶电泳图, 其中 M: DNA 分子量标准; 1: 酶切下来的目的片段 L1; 2: 酶切后的 pGEX-3X 载体。

[0040] 图 7 为本发明的一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶新基因在 E. coli BL21 (DE3) 细胞中诱导表达后进行的 10% SDS-PAGE 图, 其中 M: 标准分子量; 1: 未诱导的 pGEX-3X 空质粒; 2: 经 IPTG 诱导的 pGEX-3X 空质粒; 3: 未诱导的 pGEX-3X/L1; 4: 经 IPTG 诱导的 pGEX-3X/L1; 5: pGEX-3X/L1 表达克隆菌体裂解上清; 6: pGEX-3X/L1 表达克隆菌体裂解沉淀; 7: 菌体裂解上清经 Glutathione Sepharose 4B 树脂吸附后的流出液; 8-13: 纯化柱洗脱液。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实例, 进一步阐述本发明, 应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。

[0042] 实施例 1 细粒棘球绦虫 cDNA 文库的构建

[0043] 1. 总 RNA 的分离和 mRNA 的纯化

[0044] 取约 1mL-80 °C 冻存的细粒棘球绦虫原头节, 用 Trizol 法提取总 RNA, 用

GEHealthcare 公司的 quickprep™ mRNA Purification Kit 纯化 mRNA。

[0045] 2. cDNA 合成

[0046] (1) 合成 cDNA 的第一链

[0047] 在一个无 RNA 的 1.5mLependorf 中,加入如下反应体系:

[0048]	10×first strand buffer	5 μ L
[0049]	甲基化 dNTP	3 μ L
[0050]	Linker-primer(1.4 μ g/ μ L)	2 μ L
[0051]	DETP-treated water	14 μ L
[0052]	Rnase Block Ribonuclease	
[0053]	Inhibitor(40U/ μ L)	1 μ L
[0054]	mRNA 样品 (5 μ g)	22 μ L

[0055] -----

[0056] 47 μ L

[0057] 混合反应物,在室温中静置 10min,允许引物与模板退火,然后加入 3 μ L Accu-Script-RT,使总体积达到 50 μ L,轻轻混匀,稍离心,然后在 42℃温育 1h,1h 后将反应物从 42℃转移到冰上。

[0058] (2) 合成 cDNA 第二链

[0059] 将下列试剂加入第一链合成的反应管:

[0060]	10×Second strand buffer	20 μ L
[0061]	Second strand dNTP mixture	6 μ L
[0062]	灭菌双蒸水	114 μ L
[0063]	RNase H(1.5U/ μ L)	2 μ L
[0064]	DNA Polymerase I(9.0U/ μ L)	11 μ L

[0065] -----

[0066] 153 μ L

[0067] 轻轻混匀,稍离心,置于 16℃水浴中培育 2.5h,2.5h 后,将反应物转入冰浴中。

[0068] (3) 平端化 cDNA 末端

[0069] 将 23 μ L 平端化的 dNTP 混合物以及 2 μ L pfu 酶加入已经合成的 cDNA 双链中,混匀,稍离心,置于 72℃水浴中(不超过 30min),然后移出反应物,加入 200 μ L 苯酚和氯仿混合物(1:1),混匀,涡旋。室温下,15000rpm 离心 2min,将上层液转入一新的离心管中,然后加入同体积的氯仿,涡旋,再次在室温下 15000rpm 离心 2min,然后将上层液移至一新的离心管中,加入下列试剂沉淀 cDNA:

[0070]	3M 乙酸钠	20mL
[0071]	无水乙醇	400 μ L

[0072] 混匀,置于 -20℃冰箱中过夜。

[0073] 将过夜的 cDNA 自冰箱中取出,4℃,15000rpm 离心 1h,弃上清,轻轻加入 70%醇洗涤沉淀物(不摇晃),常温下,15000rpm 离心 2min,弃上清,抽干沉淀(5-10min),用 9 μ L EcoRI ligase buffer 重新溶解沉淀物,4℃培育至少 30min。

[0074] (4) 连接 EcoRI 接头

[0075] 将下列试剂加至平端 cDNA 和连接头中：

[0076] 10×ligase buffer 1 μ L

[0077] 10mM rATP 1 μ L

[0078] T4DNAligase(4U/μ L) 1 μ L

[0079] 简单离心,8℃培育过夜。

[0080] (5) 磷酸化 EcoRI 末端

[0081] 将过夜的反应物于 70℃水浴中放置 30min,终止连接酶活性,简单离心,在室温中冷却反应物 5min,然后向反应物中加入下列试剂：

[0082] 10×ligase buffer 1 μ L

[0083] 10mM rATP 2 μ L

[0084] 灭菌双蒸水 5 μ L

[0085] T4Polynucleotide

[0086] kinase(5U/μ L) 2 μ L

[0087] 在 37℃水浴中温育 30min,然后移至 70℃加热 30min,以灭活激酶。将反应物简单离心,置于室温中冷却 5min。

[0088] (6) XhoI 消化酶切

[0089] 在反应物中加入下列试剂：

[0090] XhoI buffer supplement 28 μ L

[0091] XhoI(40U/μ L) 3 μ L

[0092] 37℃培育 1.5h,然后在反应管内加入下列试剂：

[0093] 10×STE buffer 5 μ L

[0094] 无水乙醇 125 μ L

[0095] 置于 -20℃冰箱,过夜沉淀。

[0096] 3. 对样品进行大小分级

[0097] (1) 将反应物从冰箱取出,4℃,15000rpm 离心 15min。弃上清,抽干沉淀,用 14 μ L 1×STE buffer 重新溶解沉淀,加 3.5 μ L 装柱燃料至样品中。

[0098] (2) 安装分离柱

[0099] 从 1mL 移液管的顶部移去塑料包装,用无菌的镊子小心地拔出移液管内的棉塞,使管内剩余棉塞 3-4mm,用无菌的剪刀减去拔出的部分。用洗耳球将管内的 3-4mm 棉塞推至管的尖部。剪下一段约 8mm 长的连接管,用其将 1mL 的移液管和 10mL 的注射器针筒连接起来,移液管和针筒间不能有空隙,抽出筒芯,使针筒成为滴柱的贮液库。然后用架子固定滴柱。

[0100] (3) 加样

[0101] 装柱前,通过颠倒 Sepharose CL-2B 凝胶过滤介质,使树脂混匀,将 2mL 的移液管插入针筒,加入 1×STE buffer(该步骤不能使液体中出现气泡),立即加入混匀的 Sepharose CL-2B 凝胶过滤介质,待介质沉下后,再加入剩余树脂,直至树脂平面距移液管于针筒的连接面约为 0.635cm。将 1×STE buffer 加入针筒以清洗柱子,清洗时保证 buffer 以恒定的速度流出,用至少 10mL 的 1×STE buffer 来清洗。当树脂上仅存留约 50 μ L 的 1×STE buffer 时,立即将 cDNA 样品加入柱子,轻轻将 cDNA 打入柱底,但不能干扰到树脂以

免影响 cDNA 的分离,一旦样品进入到 Sepharose CL-2B 凝胶过滤介质,用加样枪在连接管内加入 1×STEbuffer,贴壁,缓慢加入 3mL 1×STE buffer 于针筒内,当 cDNA 流过柱底时,染液将逐步扩散,严密跟踪染液的进程。

[0102] (4) 收集样品

[0103] 用 200 μL 离心管收集分级物,当染液前锋到达移液管的 -0.5cm 处时,开始收集,每管收集 3 滴,连续收集至染液尾端到达 0.3cm 处,每管收集约 100 μL,将收集得的 cDNA 样品(共 11 管)编号,放入 -20℃ 冰箱。

[0104] 将收集得的 cDNA 样品分管进行非变性 SDS-PAGE 电泳,将能观察到 DNA 条带的 cDNA 管中的样品混合,以备下一步实验。

[0105] 4. 双链 cDNA 的连接和包装

[0106] (1) 双链 cDNA 的连接

[0107] 按下列连接体系将双链 cDNA 与 λ ZAP-II 载体连接:

[0108]	cDNA	1.0 μL
[0109]	10×ligase buffer	0.5 μL
[0110]	T4ligase	0.5 μL
[0111]	10mM rATP (PH7.5)	0.5 μL
[0112]	λ ZAP-IIvector	1.0 μL
[0113]	灭菌双蒸水	1.5 μL

[0114] -----
[0115] 5.0 μL

[0116] 连接反应:4℃ 水浴连接过夜。

[0117] (2) 连接产物的包装

[0118] 从 -80℃ 冰箱中快速移出包装抽提液,用手握住包装抽提液管,待其刚好融化便立即加入连接好的 cDNA 1.0 μL,轻轻搅拌一下,快速离心 3-5 秒,然后将包装抽提液管置于 22℃ 水浴中 2h,而后加入 500 μL SM buffer 和 20 μL 氯仿,轻轻混匀,简单离心以沉淀碎片,取上清液即为 cDNA 文库。

[0119] 实施例 2cDNA 文库的免疫筛选

[0120] 1. 筛库血清的处理

[0121] 取手术确诊的囊性包虫病患者混合血清 100 μL (10 份,每份 10 μL),加入 1mL 用 TBST 作 1:10 稀释的 E. coli XL1-blue MRF' 裂解液,于室温吸附过夜后,5000g 离心 10min,将上清液转移至新的离心管中,用抗体稀释液稀释,使血清终浓度为 1:200,于 4℃ 保存。

[0122] 2. cDNA 文库的免疫筛选

[0123] 2.1 初筛

[0124] 2.1.1 细菌培养

[0125] 用无菌枪头挑取 E. coli XL1-blue MRF' 划线接种于 LB 培养平板(含 15 μg/mL Tet),37℃ 倒置培养过夜。次日,挑取 E. coli XL1-blue MRF' 的单菌落于 3mL LB 培养基(含 10mM MgSO₄,0.2% 麦芽糖,15 μg/mL Tet)中,37℃,200rpm 振荡培养过夜。次日,取培养液 100 μL 转接到新的 3mL LB 培养基中,37℃,200rpm 振荡培养约 2h。

[0126] 将培养液 2000rpm, 离心 10min, 弃上清液后, 用 10mM MgSO₄ 重悬沉淀, 测定 OD 值, 并稀释到 OD₆₀₀ = 0.5。NZY 平板用前于 37°C 温育 1h, 以除去平板表面的水滴。

[0127] 2.1.2 噬菌体感染

[0128] 于微波炉中溶解 NZY Top Agar, 50°C 水浴温育。将上述菌液 200 μL 和细粒棘球蚴的 cDNA 文库 (噬菌体液) 5 μL 在 15mL 的培养管内混匀, 37°C 温育 15min。向上述混合物中加入 3mL NZY Top Agar, 颠倒混匀, 立即铺在 NZY 培养基上, 轻轻摇晃使其平铺, 室温下凝固 10min。于 42°C 培养箱育板, 直至观察到可见的噬菌斑出现 (约 4h20min) (如图 1 所示)。

[0129] 2.1.3 融合蛋白的诱导表达

[0130] 用灭菌的 ddH₂O 稀释 IPTG 至 10mM, 使用前 20min 将硝酸纤维素膜标记后浸泡入 IPTG 中, 浸透后取出, 用滤纸吸干多余的溶液, 避免噬菌斑间产生交叉。标记平板, 将对应的 NC 膜覆盖到平板上 (用镊子夹住 NC 膜从平板的一边将膜轻轻放下, 避免产生气泡), 37°C 培育 3.5h。

[0131] 把平板转移到 4°C 冰箱, 冷却 10min, 然后用针头在 NC 膜, 平板上的不对称三点做好标记后, 用镊子将 NC 膜从平板上轻轻剥离, 平板封口后存放于 4°C 冰箱。将 NC 膜放入 TBST (约 25mL/膜) 中至少洗三次, 每次至少 15min, 除去残留的 NZY Top Agar。将 NC 膜浸在封闭液中 (约 8mL/膜), 室温轻微振荡, 封闭过夜。

[0132] 2.1.4 表达目的融合蛋白噬菌斑的检测

[0133] 将 NC 膜从封闭液中取出, 用 TBST (约 25mL/膜) 洗膜两次, 每次至少 5min。加入筛库血清 (约 8mL/膜), 室温下轻微振荡 3h 后将血清回收。再用 TBST 洗膜 3 次 (约 25mL/膜), 每次至少 10min。加入羊抗鼠碱性磷酸酶结合物 (用抗体稀释液 1 : 8000 稀释) (约 8mL/膜), 室温下反应 1h, 用 TBST 洗膜三次, 每次至少 10min, 用 TBS 洗膜 2 次, 每次 5min, 洗去残留的 Tween 20。

[0134] 将 NC 膜从 TBS 中取出, 用滤纸吸干多余的溶液, 放入 AP Buffer 浸泡 3min。

[0135] 用 Color Development Solution 稀释 NBT 至终浓度为 0.3mg/mL, BCIP 终浓度为 0.15mg/mL (将 BCIP 逐滴加入 NBT 中, 防止形成沉淀), 配制成 NBT-BCIP 显色液。将 NC 膜浸入 NBT-BCIP 显色液中, 在暗处进行显色反应直到阳性斑点清晰可见 (一般不超过 10min)。

[0136] 将 NC 膜从 NBT-BCIP 显色液中取出, 加入另一盛有终止液的容器中, 终止显色反应。取出 NC 膜, 室温下风干, 避光保存。

[0137] 2.1.5 阳性克隆定位

[0138] 根据 NC 膜上阳性斑点在原始 LB 培养板上的相应位置, 挑取单个阳性噬菌斑, 置于 200 μL SM buffer (含 1 滴氯仿) 中, 室温下放置 30min, 使噬菌体颗粒扩散出琼脂块后, 4°C 保存。记录每个噬菌斑的阳性反应强度。

[0139] 2 复筛

[0140] 将保存有阳性克隆的 SM buffer 取出 1 μL, 用 SM buffer 稀释至 10 μL, 取 1 μL 按照之前的方法进行噬菌体展示, 目的是获得单一的阳性噬菌斑克隆。

[0141] 3 三筛

[0142] 重复复筛的步骤, 直至平板上出现 100% 的阳性克隆。

[0143] 实施例 3 阳性噬菌体删除环化为 pbluescript 重组质粒

[0144] 挑取 LB 培养基中的 E. coli XL1-blue MRF' 单菌落于 3mL LB 培养基 (含 10mM

MgSO₄, 0.2% 麦芽糖, 15 μg/mL Tet) 中, 37°C, 200rpm 振荡培养过夜。次日, 取培养液 100 μL 转接到新的 3mL LB 培养基中, 37°C, 200rpm 振荡培养约 2h。培养液经 5000g, 5min 离心沉淀细菌, 用 10mM MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ = 1.0。在细菌培养管中加入 200 μL E. coli XL1-blue MRF' 重悬液、50 μL 含有阳性噬菌体的 SM buffer 和 1 μL 辅助噬菌体。将细菌培养管放置于 37°C 水浴中 15min, 然后加入 3mL LB 培养基, 于 37°C 振荡培养 5h。取出细菌培养管, 在 65°C 加热 20min, 然后 3000g 离心 15min, 将上清转入一个新 Ep 管中, 置于 4°C 保存。

[0145] SOLR 菌于 LB 培养基 (含有 10mM MgSO₄, 50 μg/mL Kan) 然后 5000g, 5min 离心沉淀细菌, 用 10mM MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ = 1.0, 在 1.5mL EP 管中加入 200 μL SOLR 菌和前面的上清保存液 5 μL, 置于 37°C 水浴中 15min, 然后取出 100 μL 均匀涂布于 LB (含 100 μg/mL Amp) 琼脂平板上, 37°C 倒置培养过夜。

[0146] 实施例 4 pbluescript 重组质粒的提取、检测和分析

[0147] 挑取删除环化后的 SOLR 菌单菌落于 LB (含 100 μg/mL Amp) 液体培养基中, 37°C, 200rpm 振荡培养过夜。次日, 用 OMEGA 公司的 Plasmid Mini Kit I 抽提环化后的质粒 DNA, 用 30 μL ddH₂O 将质粒 DNA 洗脱。

[0148] 将提取的质粒送生工生物技术有限公司进行序列测定 (T3, T7 通用引物), 将序列在 NCBI 中进行 Blastx 和 Blastn 同源性分析, 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> 在网站进行结构域分析, 确定正确的阅读框架; 在 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html 网站进行二级结构分析, 在 <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/> 网站进行结构域分析。(如图 2、图 3 和图 4 所示)。将本发明的基因的碱基序列在 NCBI 中进行 Blastx 分析, 未发现具有同源性的基因。如图 2 可知, 将本发明的基因的碱基序列在 NCBI 中做 Blastx 分析, 其编码蛋白的序列与 SEQ ID NO: 3 的 1-219 位氨基酸序列相同。如图 3 所示, 对本发明基因的编码蛋白进行二级结构分析, 其 α-螺旋占 47.49%, β-片层占 6.85%, 而无规卷曲结构占 45.66%。由于 α-螺旋和 β-片层两种结构有氢键维持, 化学键键能比较高, 不易变形, 能够较牢固的维持蛋白的高级结构, 很难与适合的抗体结合, 且经常位于蛋白质的内部, 不易形成抗原表位。而蛋白质的转角及无规卷曲等柔性结构则比较松散, 易于发生扭曲、盘旋并容易出现在蛋白的表面, 所以成为表面抗原的可能性较大。而该序列近一半的二级结构为无规卷曲, 说明该序列具有含有 B 细胞表位的结构基础。如图 4 所示, 对该发明的基因编码蛋白进行结构域分析可知, 该序列含有谷胱甘肽转移酶的结构域。

[0149] 实施例 5 目的基因的克隆、转化

[0150] 根据目的基因的序列, 选择合适的核酸内切酶 (EcoRI) 将目的基因从 Pbluescript SK- 载体中切下, 同时用同样的内切酶酶切表达载体 pGEX-3X, 酶切体系如下:

[0151] 10×Buffer Tango 18 μL

[0152] EcoRI 6 μL

[0153] XhoI 6 μL

[0154] 重组载体 /pGEX-3X 载体 9 μL

[0155] 灭菌双蒸水 51 μL

[0156] -----

[0157] 90 μ L

[0158] 酶切反应条件 :37 $^{\circ}$ C 酶切 16h

[0159] 如图 5 和图 6 所示,将酶切产物分别进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下将凝胶中的目的片段 (~ 1400bp) 和表达载体 (~ 5000bp) 切下,用 Solarbio 公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化,将目的基因和表达载体用 T4 连接酶连接,连接体系如下:

[0160] T4 ligase 1 μ L

[0161] T4 ligase buffer 1 μ L

[0162] pGEX-3X 载体 4 μ L

[0163] 目的基因 4 μ L

[0164] -----

[0165] 10 μ L

[0166] 连接反应条件 :16 $^{\circ}$ C 下过夜连接

[0167] 取 5 μ L 连接产物转化 E. coli DH5a 细胞,具体方法为:将 5 μ L 的连接产物与 200 μ L E. coli DH5a 感受态细胞混匀,冰浴 30 分钟,之后于 42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 90 秒钟,再置于冰上 1-2 分钟,然后加入 800 μ L 预热的 SOC 培养基,37 $^{\circ}$ C,200rpm 震荡培养 45 分钟,取 200 μ L 菌液涂 LB+Amp 平板,倒置于 37 $^{\circ}$ C 温箱过夜培养。

[0168] 在平板中挑取 5-10 个单菌落,分别置于 5mLLB+Amp 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm 过夜震荡培养,送生工生物技术有限公司测序检测连接是否成功,将连接成功的重组载体,用 OMEGA 公司的 Plasmid Mini Kit I 抽提质粒,取 1 μ L 质粒照以上方法转化 E. coli BL21 (DE3) 细胞。同时取 1 μ L pGEX-3X 空载体转化 E. coliDH5a 细胞。

[0169] 实施例 6 重组蛋白的表达和纯化

[0170] 1. 重组蛋白的小量表达

[0171] 分别取转化重组载体及含有 pGEX-3X 空载体的 E. coli BL21 (DE3) 单菌落于 3mLLB(含 100 μ g/mL Amp) 培养基,37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养过夜,而后再将 1mL 菌液加入到 2mL 新鲜 LB(含 100 μ g/mL Amp) 培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养 2h,而后加入 IPTG 至终浓度为 1mM,37 $^{\circ}$ C,200rpm 诱导表达 3h。离心收集菌体,用 PBS 溶液洗两次,将两者同时进行 10% SDS-PAGE 电泳,观察重组蛋白是否表达。

[0172] 2. 重组蛋白的大量表达

[0173] 取确定表达的 E. coli BL21 (DE3) 单菌落于 100mLLB(含 100 μ g/mL Amp) 培养基,37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养过夜,而后再将 100mL 菌液加入到 1000mL 新鲜 LB(含 100 μ g/mL Amp) 培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm 振荡培养 2h,而后加入加入 IPTG 至终浓度为 1mM,28 $^{\circ}$ C,200rpm 诱导表达 4h。离心收集菌体,用 PBS 溶液洗两次,而后在液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴中反复冻融三次,加入 20 倍压积的 PBS 溶液,超声 8 次(每次 30s,间隔 1min),而后加入 4mL 20% TritonX-100 溶液至终浓度为 1%,冰上搅拌 1h 后,20000g 离心 30min,收集上清和沉淀,进行 10% SDS-PAGE 电泳,以检验蛋白的溶解性。如图 7 所示。

[0174] 3. 重组蛋白的纯化

[0175] 由于该蛋白存在于上清中,故用 GE Healthcare 公司的 Glutathione Sepharose4B 纯化柱纯化上清获得重组蛋白,具体操作方法按照纯化柱的说明书进行,获得重组蛋白的

浓度为 3.7mg/mL。

[0176] 实施例 7 重组蛋白的实验室评价

[0177] 1. 天然 AgB 的纯化

[0178] 取新鲜羊肝包囊液,以 1000g 离心 30min,吸上清液入透析袋,用 pH5.0 的 5mM 乙酸缓冲液于 4℃ 下透析过夜,50000g 离心 30min,弃上清以除去白蛋白。沉淀用 0.2MPBS(pH8.0)溶解,加 40%饱和硫酸铵,离心除去沉淀球蛋白。随后样品(上清)在水浴中煮沸 15min,50000g 离心 1 小时。弃沉淀,上清为 AgB。

[0179] 2. ELISA

[0180] 以 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释的纯化的天然 AgB 和重组蛋白 L₁ 包被 96 孔酶标板,每孔 100 μl (每孔抗原量为 1 μg),4℃ 过夜。PBS-T 缓冲液洗涤 3 次,每次五分钟,之后用含 5%脱脂奶粉的 PBS 溶液 37℃ 封闭 1h。同法用 PBS-T 缓冲液洗涤 3 次后每孔加入 1 : 200 稀释的囊型包虫病、泡型包虫病、囊虫病、其它寄生虫病患者以及健康人血清 100 μl,37℃ 孵育 1 小时。PBS-T 洗涤后加入用 PBS 稀释 (1 : 30,000) 的羊抗人 IgG 辣根过氧化物酶结合物,每孔 100 μl,37℃ 孵育 1 小时。PBS-T 洗涤后,每孔加入 100 μl 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物系统室温反应 5min 后,加 100 μl 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。在酶标仪上以 450nm 波长读取 OD 值。以 60 个非疫区健康人血清的酶标 OD 值均值加 3 个标准差 (X+3SD) 定为阳性阈值。每份血清做两个孔,如果两孔的平均值大于或等于阳性阈值判为阳性。

[0181] 3. 结果

[0182] 用本发明实施例 6 制备的重组蛋白 L₁ 进行实验室评价结果如表 1 所示。由表 1 可以看出本发明的重组蛋白 L₁ 获得的敏感性和特异性分别为 72.41% (63/87) 和 92.36% (133/144),目前诊断囊型包虫病效果最佳的天然纯化抗原 B 的诊断敏感性和特异性分别为 87.36% (76/87) 和 84.72% (122/144),两者的敏感性和特异性均没有显著性差异 (P > 0.05)。

[0183] 表 1 重组蛋白 L₁ 和天然纯化 AgB 对包虫病患者和其它寄生虫病患者血清的反应性

血清类型	例数	抗原类型	
		纯化 AgB	重组抗原 L ₁
囊型包虫病	87	76	63
泡型包虫病	20	17	9
[0184] 囊尾蚴病	25	5	2
血吸虫病	12	0	0
弓形虫病	10	0	0
肺吸虫病	8	0	0
肝吸虫病	9	0	0
健康人	60	0	0

[0185] 可见与天然纯化抗原 B 相比,谷胱甘肽转移酶的诊断敏感性稍差 (P < 0.05),但是其诊断特异性优于天然纯化抗原 B (P < 0.05),与其它寄生虫病的交叉反应较少,可与其它抗原联合应用诊断囊型包虫病。

[0001]

序列表

<110> 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

<120> 一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 849

<212> DNA

<213> 细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因

<400> 1

```

gaattcggca cgaggtgctt gccttgaat ggctcccact ctggcttact gggatatcag      60
agggcttgcg gaacagagtc gacttctgct gaagtacttg gaagtcgagt acgatgacaa      120
gcgatataag attggttcca ctccaacttt tgatcgtagt gcatggctgt cggagaagtt      180
ctctttgggt ctcgactttc ccaatttccc ctactacatt gacggcgact tcaagttgac      240
tcagtcaggg gctatcttgg aatatattgc ttagtagacac ggcatgattc cggattgcaa      300
aaagcgacgg gcagtgctgc acatgcttca atgcgaggtt gtggatttgc gcatggcggt      360
tacgaggact tgttatagtc cggatttga gaagtgaag ccaggttat ttgagacgct      420
ggctcagaaa ctgccgaact ttgaggcgta tttgggtgag aaggaatggc tcaactggta      480
taagatcaac tatcccgact ttagtctatg cgagctgttg aaccagctga tgaagttga      540
gccaacgtgt ctcgagaagt atcccagact gaaggcctac ttgtcgcggt ttgagaact      600
gctgcattg agggactaca tggettogaa ggagtcaag actcgtccat gcaatggagc      660
aagtgcaaaa tggcgtggig actgttaggt gactgtcctt gttgaggtgt tgctgcttcc      720
gctttttacc gttgttgc ttagatagct taattgtttt aataatatat gggcaaaat      780
ttgtgactg tgtgttaaaa aaaaaaaaaa aactcgagac tagttctctc tctccctcgt      840
gccgaattc

```

<210> 2

<211> 219

<212> PRT

<213> 细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶蛋白

<400> 2

```

Met Ala Pro Thr Leu Ala Tyr Trp Asp Ile Arg Gly Leu Ala Glu Gln
1           5           10          15

```

[0002]

Ser Arg Leu Leu Leu Lys Tyr Leu Glu Val Glu Tyr Asp Asp Lys Arg
 20 25 30
 Tyr Lys Ile Gly Ser Thr Pro Thr Phe Asp Arg Ser Ala Trp Leu Ser
 35 40 45
 Glu Lys Phe Ser Leu Gly Leu Asp Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Asp Gly Asp Phe Lys Leu Thr Gln Ser Gly Ala Ile Leu Glu Tyr Ile
 65 70 75 80
 Ala Asp Arg His Gly Met Ile Pro Asp Cys Lys Lys Arg Arg Ala Val
 85 90 95
 Leu His Met Leu Gln Cys Glu Val Val Asp Leu Arg Met Ala Phe Thr
 100 105 110
 Arg Thr Cys Tyr Ser Pro Asp Phe Glu Lys Leu Lys Pro Gly Leu Phe
 115 120 125
 Glu Thr Leu Ala Gln Lys Leu Pro Asn Phe Glu Ala Tyr Leu Gly Glu
 130 135 140
 Lys Glu Trp Leu Thr Gly Asp Lys Ile Asn Tyr Pro Asp Phe Ser Leu
 145 150 155 160
 Cys Glu Leu Leu Asn Gln Leu Met Lys Phe Glu Pro Thr Cys Leu Glu
 165 170 175
 Lys Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Tyr Leu Ser Arg Phe Glu Asn Leu Pro
 180 185 190
 Ala Leu Arg Asp Tyr Met Ala Ser Lys Glu Phe Lys Thr Arg Pro Cys
 195 200 205
 Asn Gly Ala Ser Ala Lys Trp Arg Gly Asp Cys
 210 215

<210> 3
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶蛋白

<400> 3

Met Ala Pro Thr Leu Ala Tyr Trp Asp Ile Arg Gly Leu Ala Glu Gln
 1 5 10 15
 Ser Arg Leu Leu Leu Lys Tyr Leu Glu Val Glu Tyr Asp Asp Lys Arg
 20 25 30
 Tyr Lys Ile Gly Ser Thr Pro Thr Phe Asp Arg Ser Ala Trp Leu Ser
 35 40 45
 Glu Lys Phe Ser Leu Gly Leu Asp Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile
 50 55 60
 Asp Gly Asp Phe Lys Leu Thr Gln Ser Gly Ala Ile Leu Glu Tyr Ile
 65 70 75 80

[0003]

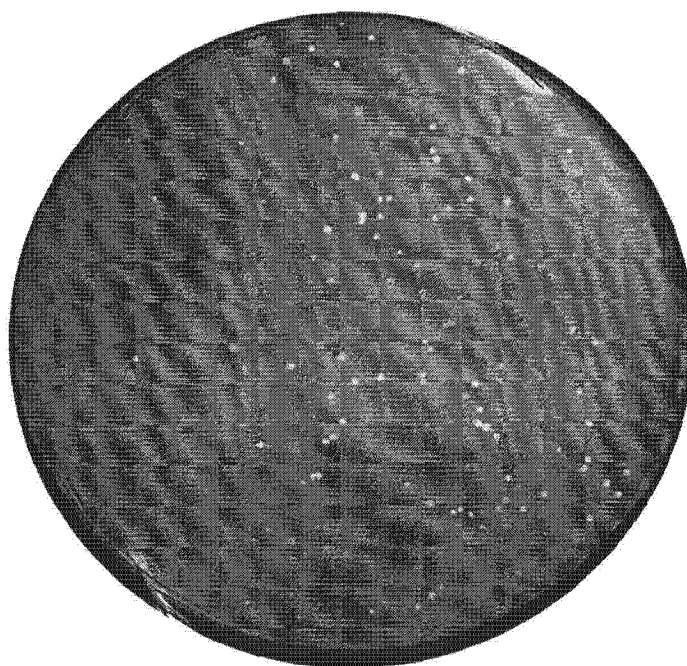


图 1

```

> gb|AAB66318.1| glutathione S-transferase [Echinococcus granulosus]
  gb|AAD16438.1| glutathione S-transferase [Echinococcus granulosus]
Length=219

Score = 459 bits (1182), Expect = 2e-127
Identities = 219/219 (100%), Positives = 219/219 (100%), Gaps = 0/219 (0%)
Frame = +2

Query  29  MAPILAYWDIRGLAEQSRLLKYLEVEYDDKRYKIGSTPTFD RSAWLSEKFSLGLDFFNL 208
                MAPILAYWDIRGLAEQSRLLKYLEVEYDDKRYKIGSTPTFD RSAWLSEKFSLGLDFFNL
Sbjct  1   MAPILAYWDIRGLAEQSRLLKYLEVEYDDKRYKIGSTPTFD RSAWLSEKFSLGLDFFNL 60

Query  209  PYYIDGDFKLTQSGAILEYIADRHGMIPDCKKRRAVLHMLQCEVVDLRMAFTRICYSPDF 388
                PYYIDGDFKLTQSGAILEYIADRHGMIPDCKKRRAVLHMLQCEVVDLRMAFTRICYSPDF
Sbjct  61   PYYIDGDFKLTQSGAILEYIADRHGMIPDCKKRRAVLHMLQCEVVDLRMAFTRICYSPDF 120

Query  389  EKLPGLFETLAQKLPNFEAYLGEKEWLTGDKINYPDFSLCELLNQLMKFEPTCLEKYPR 568
                EKLPGLFETLAQKLPNFEAYLGEKEWLTGDKINYPDFSLCELLNQLMKFEPTCLEKYPR
Sbjct  121  EKLPGLFETLAQKLPNFEAYLGEKEWLTGDKINYPDFSLCELLNQLMKFEPTCLEKYPR 180

Query  569  LKAYLSRFENLPALRDYMASKEFKTRPCNGASAKWRGDC 685
                LKAYLSRFENLPALRDYMASKEFKTRPCNGASAKWRGDC
Sbjct  181  LKAYLSRFENLPALRDYMASKEFKTRPCNGASAKWRGDC 219
    
```

图 2

Hierarchical Neural Network result for : UNK_127590

Abstract Guerneur, Y. PhD Thesis

View HNN in: [\[AnTheProt \(PC\) , Download...\]](#) [\[HELP\]](#)

```

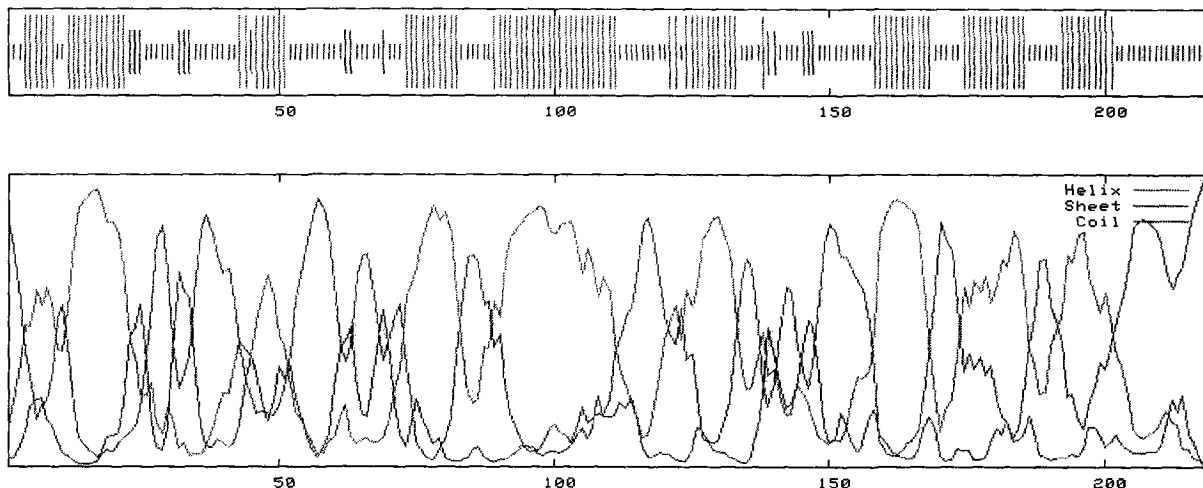
      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLLLKYLEVEYDDKRYKIGSTPTFDRSAWLSEKFSGLGLDFPNLPYYIDGDFKL
ccccchhhhhhccccchhhhhhhhhhhheeecccccccccchhehhhhhcccccccccccccccccccccc
TQSGAILEYIADRHGMI PDCKKRRAVLHMLQCEVVDLRMAFTRICYSPDFEKLKPLGFETLAQKLPNFEA
ccccchhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
YLGEKEWLTGDKINYPDFSLCELLNQLMKFEPTCLEKYPRLKAYLSRFENLPAIRDYMASKEFKTRPCNG
cccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
ASAKWRGDC
cccccccccc

```

Sequence length : 219

HNN :

Alpha helix	(Hh) :	104 is	47.49%
3 ₁₀ helix	(Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee) :	15 is	6.85%
Beta turn	(It) :	0 is	0.00%
Bend region	(Ss) :	0 is	0.00%
Random coil	(Cc) :	100 is	45.66%
Ambiguous states (?)	:	0 is	0.00%
Other states	:	0 is	0.00%



Prediction result file (text): [\[HNN\]](#)

图 3

InterProScan Results			
Table View Raw Output XML Output Original Sequences SUBMIT ANOTHER JOB			
SEQUENCE: Sequence PROCA: Protein DIS: Disorder LENGTH: 312 aa			
InterPro IP002381 Family InterPro SRS	Glutathione S-transferase, Mu class PRO1067 GSTRNEFRABM		
InterPro IP002045 Domain InterPro SRS	Glutathione S-transferase, N-terminal PRO1068 GST_N PRO1069 GST_NTER		
InterPro IP002045 Domain InterPro SRS	Glutathione S-transferase, C-terminal PRO1068 GST_C		
InterPro IP010942 Domain InterPro SRS	Glutathione S-transferase, C-terminal-like B3DEA1.10-1050.10 GST_C_like B3F4T518 GST_C_like		
InterPro PRO12335 Domain InterPro SRS	Thioredoxin fold G3DEA.3.49-30.10 Thioredoxin_fold		
InterPro PRO12336 Domain InterPro SRS	Thioredoxin-like fold B3F51223 Thioredoxin-like_fold		
InterPro PRO17933 Domain InterPro SRS	Glutathione S-transferase/hloride channel, C-terminal PRO1406 GST_CTER		
NOIPR unIntegrated	unintegrated PTHR11571 PTHR11571 PTHR11571.EP3 PTHR11571.EP3		

图 4

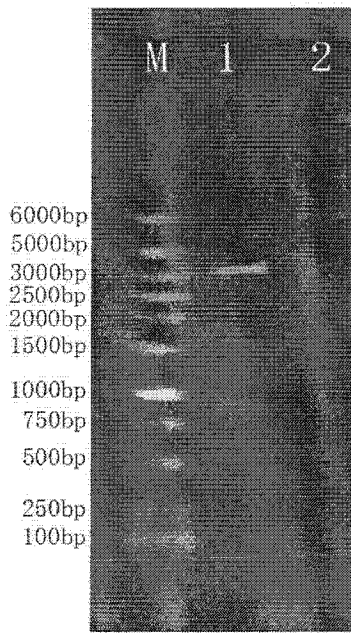


图 5

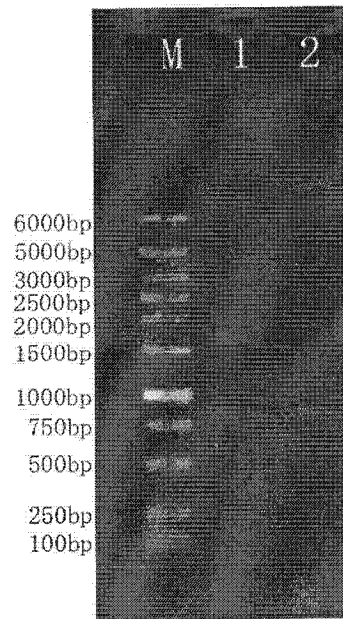


图 6

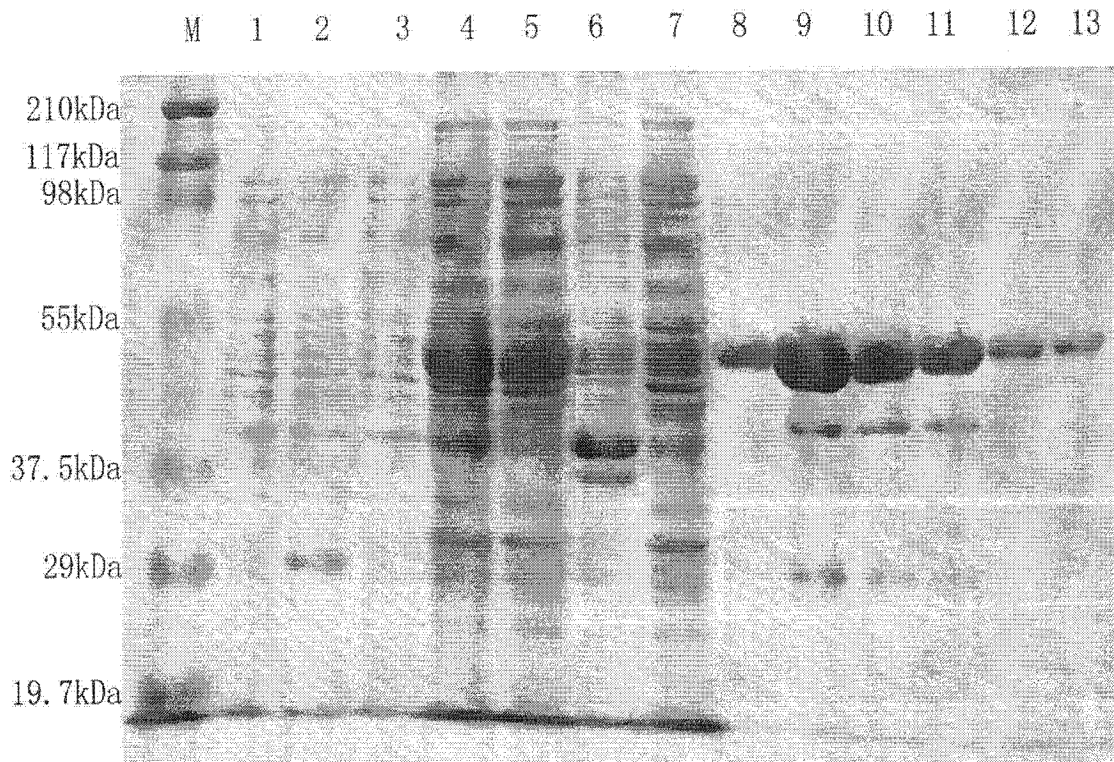


图 7

专利名称(译)	一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因及其用途		
公开(公告)号	CN102168100A	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	CN201110037747.0	申请日	2011-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
[标]发明人	汪俊云 朱慧慧 高春花 杨玥涛 石锋		
发明人	汪俊云 朱慧慧 高春花 杨玥涛 石锋		
IPC分类号	C12N15/54 C12N9/10 C12N15/63 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C07K19/00 C07K16/40 A61K39/00 A61P33/00 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物工程领域，提供了一种细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因，其碱基序列如SEQ ID NO：1所示。本发明还提供了上述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质。上述的细粒棘球绦虫谷胱甘肽转移酶基因所编码的蛋白质，其氨基酸序列如SEQ ID NO：2所示，或者与SEQ ID NO：3所示的1-219位氨基酸序列相同。本发明获得的重组蛋白可以用于囊型包虫病患者的免疫诊断，用该重组蛋白包板，用ELISA方法检测囊型包虫病、泡型包虫病、囊尾蚴病、其它寄生虫病患者以及健康人血清，获得的敏感性和特异性分别为72.41%和92.36%。

