



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110540602 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201910804798.8

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

申请人 上海杰一生物技术有限公司

(72)发明人 朱传刚 王钊哲 周志平 冒丽
刘冀 李嘉静 纪荣毅 沈元曦

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

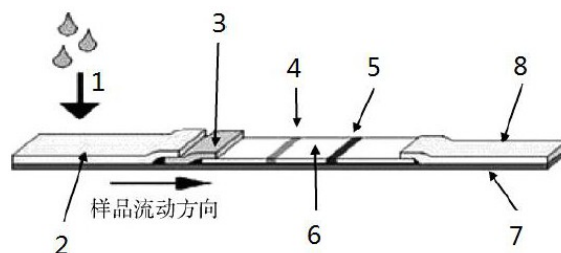
权利要求书2页 说明书6页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白
胶体金试纸条

(57)摘要

本发明提供一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金免疫层析试纸条的制备,所述弓形虫胶体金免疫层析试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫。检测时所需的标本量极小,不需要特殊仪器,肉眼直接判读结果,且检测简便快速,特异性强,灵敏度高,准确可靠,成本低,应用广泛。



1. 一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白,其特征在于所述重组蛋白是对弓形虫GRA1和GRA7蛋白抗原表位进行分析,合并抗原表位集中区段,两个抗原表位间以GG、GS密码子相连,建立新的目的基因片段,对大肠杆菌使用频率低的密码子进行优化,将其替换成能编码同一氨基酸的大肠杆菌偏爱的密码子,在5'端加上BamHI (GGATCC)酶切位点;3'端加入终止密码子TAA,最后在其前后端加入BamH I (GGATCC)和Hind III (AAGCTT)酶切位点,合成后的序列总长度为663bp,GC%为58.52%,如SEQ ID NO.1所示。

2. 一种用于免疫分析的产品,所述产品包括权利要求1所述的融合蛋白。

3. 如权利要求4的产品,产品的形式为一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条,所述胶体金试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫;所述样品垫、胶体金结合垫、层板膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,样品垫的一端设在胶体金结合垫的一端上,胶体金结合垫的另一端设在层板膜的一端上,吸收垫的一端设在层板膜的另一端上,检测线、质控线依次设在层板膜上;在检测线处包被GRA1和GRA7重组蛋白,在质控线处包被选用His标记的链球菌重组蛋白(His-rSPG)。

4. 如权利要求3所述的一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条的制备方法,所述制备方法包括如下步骤:

蛋白表达、纯化获得的重组蛋白rGRA;

硝酸纤维素膜的点样:将rGRA稀释至0.5mg/ml,用于检测线(T线)的划线,将小鼠抗His标签单克隆抗体稀释至0.5mg/ml用于质控线(C线)的划线;将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线,划线量均为1 μ l/cm,划线后将底板放置于37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干2小时,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月;

制备胶体金:烧制及贮存胶体金的所有玻璃器皿在酸缸中浸泡24 h,取出后用去离子水反复冲洗,烘干备用;将100 mL去离子水和1 mL 1%氯金酸置于250mL锥形瓶中,加热至沸腾;缓慢加入1.5 mL的柠檬酸三钠,观察到溶液颜色由淡黄变黑最后逐渐稳定成紫红色后,继续煮沸15 min,冷却至室温后定容到原体积;用0.2% K₂CO₃调节胶体金溶液PH至最佳值5.0;逐滴加入1.2 mL 1 mg/mL(浓度为12 μ g/mL)的链球菌重组蛋白rSPG(实验室制备保存),振荡15 min后静置15 min;加入10 mL 10% PEG20000,使其终浓度为1%,振荡15 min后静置15 min;2000 r/min离心20 min,弃沉淀;10000 r/min离心30 min,弃上清,沉淀用20 mL TBS(1/5原体积)重悬;将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫(上海杰一生物技术有限公司)上,使1.0 cm²的金标垫中含有100 μ L的胶体金探针,将金标垫置于-80 $^{\circ}$ C放置2 h,真空干燥;

胶体金与抗原的标记:重组链球菌蛋白G的胶体金标记:将制备的胶体金溶液用K₂CO₃调节至pH为5.0,逐滴加入重组链球菌蛋白G,使其终浓度为10 μ g/ml,室温震荡15分钟,静置15分钟;在溶液中加入封闭液,使其终浓度为1%,室温震荡15分钟,静置15分钟;11000r/min离心40分钟,弃上清,沉淀用复溶液复溶至原溶液体积的1/5,颜色应为均匀的酒红色;金标垫的制备:浸金法制备金标垫,将制备好的胶体金探针均匀滴加于金标垫上,使1.0cm²的金标垫中含有100 μ l胶体金探针;将金标垫放置于多功能冻干机中真空干燥,冻干完毕后,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月;

胶体金免疫层析试纸条的制备:将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线;

分别用rGRA和rSPG(0.5 mg/mL)作为检测线(T线)和质控线(C线),GRA重组蛋白分别设1.5、0.75mg/mL两种浓度,划线量为1 μ L/cm,链球菌重组蛋白(rSPG)(实验室保存)浓度为1mg/mL,划线量是1 μ L/cm,划线后将底板置于37 $^{\circ}$ C烘箱过夜烘干;将金标垫、样品垫、吸水纸(上海杰一生物技术有限公司)依次贴于含有NC膜(上海杰一生物技术有限公司)的底板上,用贴条机以0.3 cm的宽度切条。

一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检疫技术领域,具体地说,涉及一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白,同时涉及一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条。

背景技术

[0002] 弓形虫病是世界范围内流行的一种人兽共患寄生虫病,在感染人或动物后可通过胎盘方式垂直传播,造成胎儿畸形,早产,神经系统发育障碍;也可经口传播,如饮用未经灭菌的奶制品,或使用未熟的肉类。弓形虫对宿主选择性不强,可寄生在多种动物的有核细胞中,并侵害多种组织器官,对人类及动物健康造成严重的威胁。为了研制一种可快速检测弓形虫的诊断试剂,需要对抗原标志物进行筛选。以往国内外学者多用从感染动物中收集或经组织、细胞培养的弓形虫速殖体作为抗原,该方法虽然特异性好,但抗原纯度较低,成分复杂,价格昂贵。而在原核表达系统中表达出的特异性目的蛋白产量高、操作简单、费用低廉,成为众多学者研究的对象。

[0003] 临床中对弓形虫的检测常采用PCR、ELISA等方法,但多因操作繁琐,耗时长,费用高等缺点,不适用与基层的推广,因此,寻找一种简便、快速、灵敏度高的诊断方法势在必行。胶体金免疫层析技术(GICA)作为一种快速诊断技术已广泛应用于多种疾病的监测,包括寄生虫病的诊断。Xu等利用血吸虫可溶性虫卵蛋白作为抗原研制用于检测血清血吸虫的胶体金免疫层析试纸条,该诊断方法不仅操作简便,而且具有较好的敏感性和特异性;Srivastava等利用利士曼原虫rK39抗原和胶体金标记蛋白A建立GICA检测技术,结果显示,该方法检测的敏感性和特异性分别为97.6%和92.6%,上述研究也进一步证明了胶体金免疫层析试纸条在寄生虫病快速检测中发挥的重要作用。目前研究比较多的弓形虫的表面抗原(SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、SAG3 (P43)、SAG4 (P18))、虫体棒状体抗原(ROP1、ROP2)、致密颗粒蛋白(GRA1、GRA7)等。采用重组DNA技术制备的重组抗原可以克服完整弓形虫抗原的缺点,能快速、经济地制备无限量特异重组弓形虫抗原。

发明内容

[0004] 本发明主要解决的技术问题是提供一种快速、高灵敏的免疫检测产品及方法,实现高效、高密度的免疫检测。

[0005] 为了实现上述技术方案,本发明提供一种融合蛋白,一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白,将GRA1和GRA7中的信号肽和C端疏水序列排除,截取可溶性表达部位的B细胞抗原表位信息,对表达这两个基因抗原表位的重组基因进行重构。

[0006] 本发明同时提供一种弓形虫诊断试纸条,采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金并标记链球菌重组蛋白rSPG,以GRA1和GRA7重组蛋白作为GICA试纸条的检测线,rSPG作为质控线,研制GICA。

[0007] 为了实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白,合并抗原表位集中区段,两个抗原表位间

以GG、GS密码子相连,建立新的目的基因片段;

其中,所述重组蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;

本发明同时提供一种用于免疫分析的产品,所述产品包括本发明所述的融合蛋白。

[0008] 产品以试纸条的形式存在时,可将本发明复合物置于检测线,用于捕获目标分子,采用金标纳米粒子等进行检测;进一步的,当复合物融合不同的功能配体时,可实现多种目标分子的同时检测。

[0009] 进一步的,提供一种利用上述GRA1和GRA7重组蛋白制备的弓形虫胶体金免疫层析试纸条。

[0010] 所述弓形虫胶体金免疫层析试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫;所述样品垫、胶体金结合垫、层板膜和吸收垫依次粘贴在载体板上表面,样品垫的一端设在胶体金结合垫的一端上,胶体金结合垫的另一端设在层板膜的一端上,吸收垫的一端设在层板膜的另一端上,检测线、质控线依次设在层板膜上;在检测线处包被GRA1和GRA7重组蛋白,在质控线处包被选用His标记的链球菌重组蛋白(His-rSPG)。

[0011] 所述载体板可采用PVC板。

[0012] 本发明提供了一种采用胶体金免疫层析技术建立弓形快速检测试剂,可用于全血、血清、血浆及脑脊液等标本中弓形虫的检测。检测时所需的标本量极小,不需要特殊仪器,肉眼直接判读结果,且检测简便快速,特异性强,灵敏度高,准确可靠,成本低,应用广泛。

[0013] 有益效果

(1) 申请人分析GRA1、GRA7的蛋白结构,在GRA1内选择7个B细胞抗原表位,在GRA7内选择抗原表位集中的4个片段,将这11个片段通过两个丙氨酸结构进行串联,使得抗原表位尽量不相互影响。将重新分析的氨基酸序列反推出碱基序列并进行密码子优化,使得新重构基因符合原核表达。然后构建相应的原核表达质粒,获得了展现弓形虫多表位的新型重组蛋白。该蛋白具有His标签,实现了亲和层析的纯化,表达量高,纯化方便,且检测相关的抗体灵敏性高。由于重组蛋白是GRA1和GRA7联合的,因此可以对弓形虫不同阶段产生的抗体均可检测。

[0014] (2) 在本研究中,我们采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金并标记链球菌重组蛋白rSPG,以GRA1和GRA7重组蛋白作为GICA试纸条的检测线,rSPG作为质控线,研制GICA弓形虫诊断试纸条。通过对小鼠阳性阴性血清进行检测,结果显示,该试纸条可与小鼠阳性血清发生反应,但与阴性血清不反应。通过对不同猪场猪血清进行检测结果显示,GICA法猪弓形虫检出率与标准ELISA和PCR法检测结果相比具有较高的重合性,由此也进一步说明该试纸条可用于临床中弓形虫的检测。

附图说明

[0015] 图1 重组蛋白rGRA合成示意图。

[0016] 图2 pET-32a(+)-GRA重组质粒构建图。

[0017] 图3 重组质粒的鉴定,其中,A. 菌液PCR鉴定结果,其中:M:核酸标志物;l:rGRA PCR产物;B. 双酶切鉴定结果,其中:M:核酸标志物;l:rGRA,酶切产物。

[0018] 图4重组蛋白的纯化和鉴定，

A:重组蛋白溶解性分析 M:蛋白标志物;1:重组蛋白上清液;2:重组蛋白沉淀;3:纯化后重组蛋白

B:Western-blot检测重组蛋白 M:蛋白标志物;1重组蛋白与小鼠弓形虫阳性血清结合能力检测

图5 rGRA重组蛋白抗原ELISA活性鉴定结果

图6 胶体金免疫层析试纸条示意图,其中,1,样品;2、样品垫;3、胶体金结合垫;4、检测线;5、质控线;6层板膜;7、PVC胶板;8、吸水垫。

[0019] 图7弓形虫检测试剂条检测效果鉴定,其中A:1.5 mg/mL的重组蛋白rGRA与小鼠阴性血清反应结果; B:0.75 mg/mL的的重组蛋白rGRA与小鼠阳性血清反应结果;C:1.5 mg/mL的重组蛋白rGRA与小鼠阳性血清反应结果。

具体实施方式

[0020] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0021] 实施例1重组蛋白GRA1和GRA7(简称为rGRA)的构建

BALB/c鼠标准弓形虫阴阳性血清为实验室保存;待检猪血清分别采自上海爱森肉食品有限公司,重庆腾驰食品有限公司,上海深蓝养殖场,各50份样品。

[0022] 对弓形虫GRA1和GRA7蛋白抗原表位进行分析,合并抗原表位集中区段,两个抗原表位间以GG、GS密码子相连,建立新的目的基因片段。对大肠杆菌使用频率低的密码子进行优化,将其替换成能编码同一氨基酸的大肠杆菌偏爱的密码子,在5'端加上BamH I (GGATCC)酶切位点;3'端加入终止密码子TAA,最后在其前后端加入BamH I (GGATCC)和Hind III (AAGCTT)酶切位点,合成后的序列总长度为663bp,GC%为58.52%,如SEQ ID NO.1所示。将序列交由苏州金唯智生物科技有限公司合成,得到目的基因片段,构建过程如图1所示。

[0023] 如图2所示,将pET-32a (+)质粒(上海华津生物科技有限公司)与rGRA重组序列连接后,将重组质粒pET-32a (+)-GRA转化至大肠埃希氏杆菌BL21 (DE3) (北京全式金生物技术有限公司)中,在含有氨苄青霉素的LB固体培养基上培养10 h后,挑取完整的单克隆菌落至LB液体培养基上37℃过夜培养,后进行菌液PCR、双酶切(BamH I和Hind III)、测序鉴定。

[0024] 对PCR产物进行电泳鉴定(图3A)和双酶切鉴定(图3B),菌液PCR鉴定结果显示,目的条带大小约为950bp(含目的基因及部分载体基因序列);重组质粒经双酶切后扩增出大小为663bp的目的基因片段,与预期结果相符;测序结果显示与所设计序列一致。目的基因片段大小为909 bp。

[0025] 将鉴定正确的菌液在IPTG(北京全式金生物技术有限公司)诱导下表达,并对重组蛋白的溶解性进行分析,Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒(北京康为世纪生物技术有限公司)对融合蛋白进行纯化。SDS-PAGE电泳结果显示(图4A),表达产物经纯化后在50kDa处获得纯度较高的目的蛋白。Western blot结果显示(图4B),重组蛋白能够与小鼠弓形虫阳性血清发生特异性结合。

[0026] 实施例2 rGRA重组蛋白抗原活性鉴定

同上,按照说明书的记载进行操作,纯化后的重组蛋白进行SDS-PAGE电泳后将蛋白转移到PDVF膜(美国Millipore)上。5%脱脂奶粉封闭2h后,加入1:100稀释的BLAB/c小鼠标准弓形虫阳性血清(实验室保存)孵育1.5h。之后加入山羊抗鼠IgG-HRP(北京康为世纪)孵育1h,HRP-DAB显色试剂盒(北京天根生物科技有限公司)显色,观察结果。

[0027] 根据棋盘法测定抗原结果显示,融合蛋白在1.25 μ g/mL包被时依然能够与800倍稀释的弓形虫感染的小鼠阳性血清发生阳性反应,说明该重组蛋白具有较强的抗原性,在临床上可作为抗原区分阴性、阳性血清(图5)。

[0028] 实施例3 胶体金免疫层析试纸条的制备

1、蛋白表达:如实施例1所述的诱导表达、纯化获得的重组蛋白rGRA。

[0029] 2、硝酸纤维素膜的点样:将rGRA稀释至0.5mg/ml,用于检测线(T线)的划线,将小鼠抗His标签单克隆抗体稀释至0.5mg/ml用于质控线(C线)的划线。将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线,划线量均为1 μ l/cm,划线后将底板放置于37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干2小时,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月。

[0030] 3、制备胶体金:烧制及贮存胶体金的所有玻璃器皿在酸缸中浸泡24 h,取出后用去离子水反复冲洗,烘干备用。将100 mL去离子水和1 mL 1%氯金酸置于250mL锥形瓶中,加热至沸腾。缓慢加入1.5 mL的柠檬酸三钠,观察到溶液颜色由淡黄变黑最后逐渐稳定成紫红色后,继续煮沸15 min,冷却至室温后定容到原体积。用0.2% K_2CO_3 调节胶体金溶液PH至最佳值5.0。逐滴加入1.2 mL 1 mg/mL(浓度为12 μ g/mL)的链球菌重组蛋白rSPG(实验室制备保存),振荡15 min后静置15 min;加入10 mL 10% PEG20000,使其终浓度为1%,振荡15 min后静置15 min;2000 r/min离心20 min,弃沉淀;10000 r/min离心30 min,弃上清,沉淀用20 mL TBS(1/5原体积)重悬。将制备好的胶体金探针均匀的滴加于金标垫(上海杰一生物技术有限公司)上,使1.0 cm^2 的金标垫中含有100 μ L的胶体金探针,将金标垫置于-80 $^{\circ}$ C放置2 h,真空干燥。

[0031] 4、胶体金与抗原的标记:重组链球菌蛋白G的胶体金标记。将制备的胶体金溶液用 K_2CO_3 调节至pH为5.0,逐滴加入重组链球菌蛋白G,使其终浓度为10 μ g/ml,室温震荡15分钟,静置15分钟。在溶液中加入封闭液,使其终浓度为1%,室温震荡15分钟,静置15分钟。11000r/min离心40分钟,弃上清,沉淀用复溶液复溶至原溶液体积的1/5,颜色应为均匀的酒红色。金标垫的制备。浸金法制备金标垫,将制备好的胶体金探针均匀滴加于金标垫上,使1.0 cm^2 的金标垫中含有100 μ l胶体金探针。将金标垫放置于多功能冻干机中真空干燥,冻干完毕后,密封于锡箔袋,内置干燥剂,有效期为15个月。

[0032] 5、胶体金免疫层析试纸条的制备

将NC膜贴于底板上,之后用胶体金点样系统进行划线。分别用rGRA和rSPG(0.5 mg/mL)作为检测线(T线)和质控线(C线),GRA重组蛋白分别设1.5、0.75mg/mL两种浓度,划线量为1 μ L/cm,链球菌重组蛋白(rSPG)(实验室保存)浓度为1mg/mL,划线量是1 μ L/cm,划线后将底板置于37 $^{\circ}$ C烘箱过夜烘干。将金标垫、样品垫、吸水纸(上海杰一生物技术有限公司)依次贴于含有NC膜(上海杰一生物技术有限公司)的底板上,用贴条机以0.3 cm的宽度切条。制备获得的胶体金免疫层析试纸条示意图如图6所示。

[0033] 吸取适量待检样品滴加到试纸条的样品垫上,静置5 min,若T线和C线均显色,则结果为阳性;T线不显色,C线显色,则样品为阴性;若C线不显色,则试纸条无效。阳性血清按

浓度比1:10、1:20、1:40、1:80稀释,观察出现阳性反应的最高稀释倍数。

[0034] 6、试纸条判定标准的建立弓形虫抗体检测试纸条采用胶体金免疫层析技术,当试纸条插入阳性样品后,样品中的IgG与金标垫上金标记的具有His标签的r-SPG蛋白结合形成复合物,复合物在包被膜迁移的过程中,样品中特异性的IgG与检测线(T)上的rGRA形成金标记His- r-SPG蛋白-IgG-抗原复合物,在检测线处显色,随后在质控线处富余的金标记His-r-SPG蛋白-IgG复合物与质控线处的小鼠抗His标签单克隆抗体形成小鼠抗His标签单克隆抗体-金标记His-r-SPG蛋白-IgG复合物,从而使质控线(C)显色,反之,阴性样品时,检测线(T)无抗原,就不能形成金标记His- r-SPG蛋白-IgG-抗原复合物,检测线(T)也就不显色,只能与质控线上的小鼠抗His标签单克隆抗体结合形成小鼠抗His标签单克隆抗体-金标记His-r-SPG蛋白复合物而显色。所以,我们制定了试纸条的结果判定标准为:阳性检测线处(T)和质控线处(C)各出现一条紫红色条带,判定为阳性;阴性仅在质控线处(C)出现一条紫红色条带,检测线(T)处未出现一条紫红色条带,判定为阴性。无效在质控线处(C)无明显条带出现,判定为无效。

[0035] 7、弓形虫检测试剂条检测效果鉴定

1.5 mg/mL的重组蛋白rGRA划线时,与小鼠阴性血清不反应,结果为阴性(图7A); 0.75 mg/mL的重组蛋白rGRA划线时,与1:10稀释的小鼠阳性血清反应不明显,结果为弱阳性(图7B); 1.5 mg/mL的重组蛋白rGRA划线时,与1:10稀释的小鼠阳性血清反应明显,结果为强阳性(图7C),由此说明重组蛋白划线浓度为1.5 mg/mL,样品稀释浓度为1:10,为达到最佳的检测效果。

[0036] 利用制备的GICA试纸条对不同猪场采集的血清样品进行检测结果显示,三家猪场样品检出率分别为26%、24%和30%(表1),与标准ELISA和PCR检测结果基本一致,以上结果说明,该弓形虫GICA试纸条具有较高的检出率,可用于弓形虫的快诊断。

[0037] 表1 GICA法检测猪血清效果评价

血清	份数	GICA		ELISA		PCR	
		阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
A	50	13	26%	10	20%	15	30%
B	50	12	24%	10	20%	14	28%
C	50	15	30%	13	26%	16	32%

8、试纸条敏感性检测。采用试制的3批弓形虫抗体检测试纸条对已知阴性样品、发病动物血清样品进行检测,结果显示,检测10份已知阴性血清样品,结果均为阴性;对20份已知发病动物血清样品检出率为100%(20/20)。

[0038] 9、试纸条特异性检测。采用3批弓形虫抗体检测试纸条对10份弓形虫阳性血清、10份弓形虫阴性血清、10份猪瘟阳性血清、10份猪蓝耳病阳性血清进行检测,结果显示,本研究对10份已知弓形虫阳性血清的阳性检出率为100%(10/10);对10份已知弓形虫阴性血清的检测结果均为阴性,对其它非弓形虫的阳性血清检测不存在交叉反应,表明本试纸条特异性良好。

[0039] 应当理解,虽然上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明内容作了详尽的描述,但在本发明的基础上,可以对之进行一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是

显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围内。

<110>中国农业科学院上海兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心),
上海杰一生物技术有限公司

<120>一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 663

<212> DNA

<213> rGRA全长序列

<400>GGATCCGAAGGCGGTGACAATCAGAGCAGCGCAGTGAGCGATGGTGGTGGTGGTACCGGTCAGGGTC
TGGGCATTGGTGGTAGCTATCGTGTGGAACGCCGACAGGTAATCCGGATGGCGGTGCAAGCGATGGCAGCTATAGC
GAGGTGGGTAATGTGAACGGTAGTAGCATGCAGCGTGGCGGCGGTGAAACCGTGAAGAAGCCATCGAAGATGTGGC
CCAGGCAGAAGGTCTGAACAGCGAACAGACCCTGGGTAGCCAGCTGGAAAAAGACAAACAGCAGCTGAAAGGCGGCG
CAACCGCCAGCGATGATGAAGGCGGCTTTTTTCGATGGTCAGGCCCGGTTGATAGTCTGCGCCCGACCAATGCCGGT
GTGGATAGCAAAGGCACCGACGATCATCTGACCACCAGCATGGATAAAGCCAGCGTTGAAAGCCAGCTGCCGCGTCG
CGAACCTCTGGAAACCGAACCGGACGAACAGGAAGAGGTGGGTAGCGTGCGCAGCGATGCCGAAGTGACCGATGACA
ACATCTACGAGGAGCACACCGATCGCAAAGTGGTGCCGCGAAAAGCGAAGGCAAACGTAGCGGTGGCGAACTGACC
GAAGAACAGCAGCGCGGTGATGAACCGCTGACCACCGGTCAGAACGTGTA AAAAGCTT

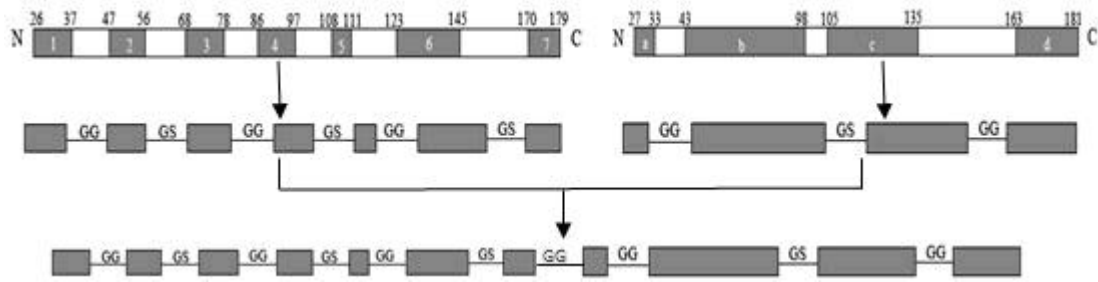


图1

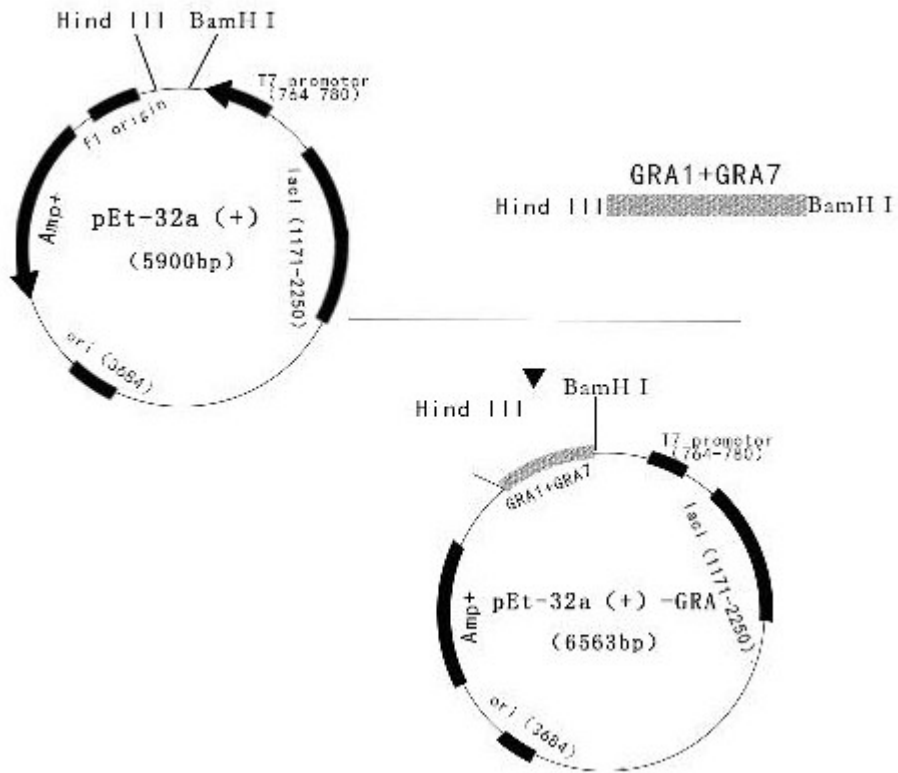


图2

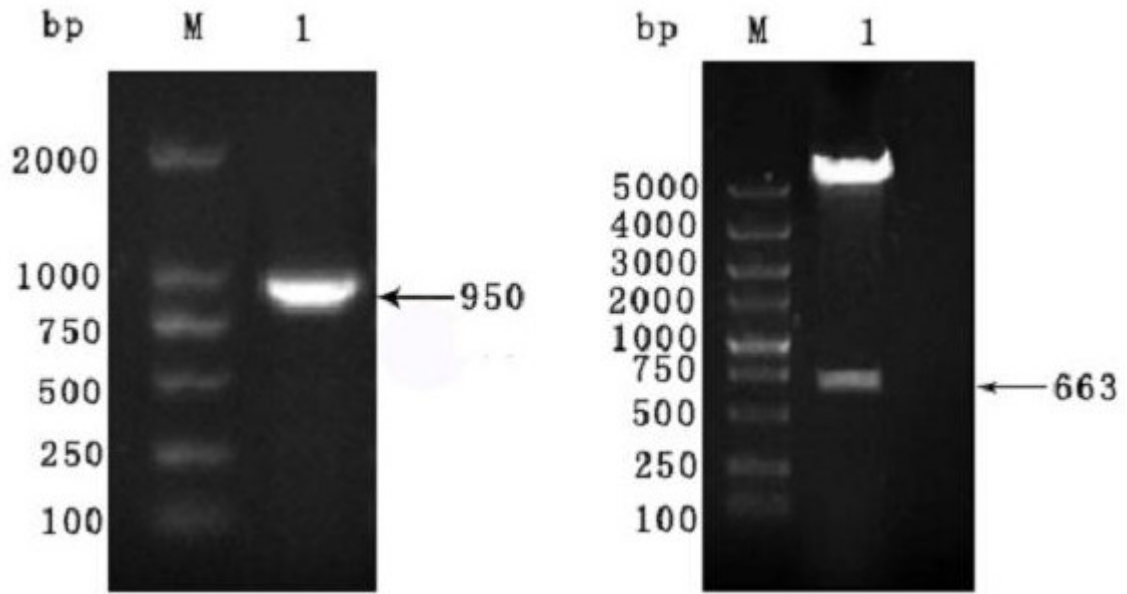


图3

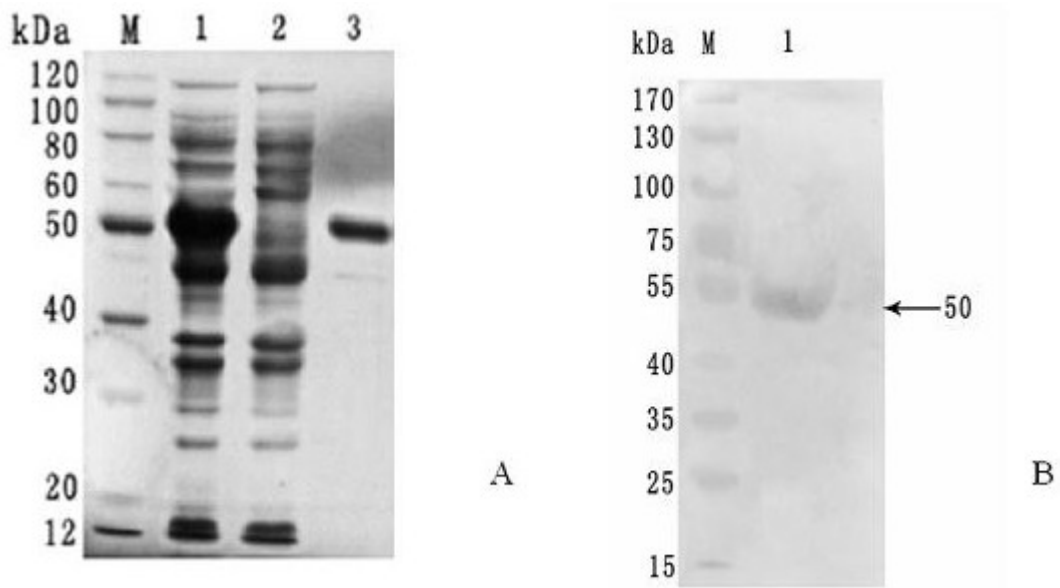


图4

血清稀释倍数	重组蛋白稀释倍数 (20 μ g/mL)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
小鼠弓形虫阳性血清	1:50	2.116	2.082	1.944	1.575	1.262
	1:100	2.086	1.940	1.917	1.526	1.233
	1:200	2.062	1.805	1.773	1.465	1.226
	1:400	1.968	1.626	1.547	1.391	1.131
	1:800	1.809	1.448	1.356	1.189	1.052
小鼠弓形虫阴性血清	1:50	0.193	0.173	0.210	0.169	0.119
	1:100	0.223	0.238	0.186	0.145	0.112
	1:200	0.142	0.173	0.153	0.139	0.101
	1:400	0.120	0.097	0.090	0.104	0.100
	1:800	0.159	0.125	0.131	0.116	0.082

图5

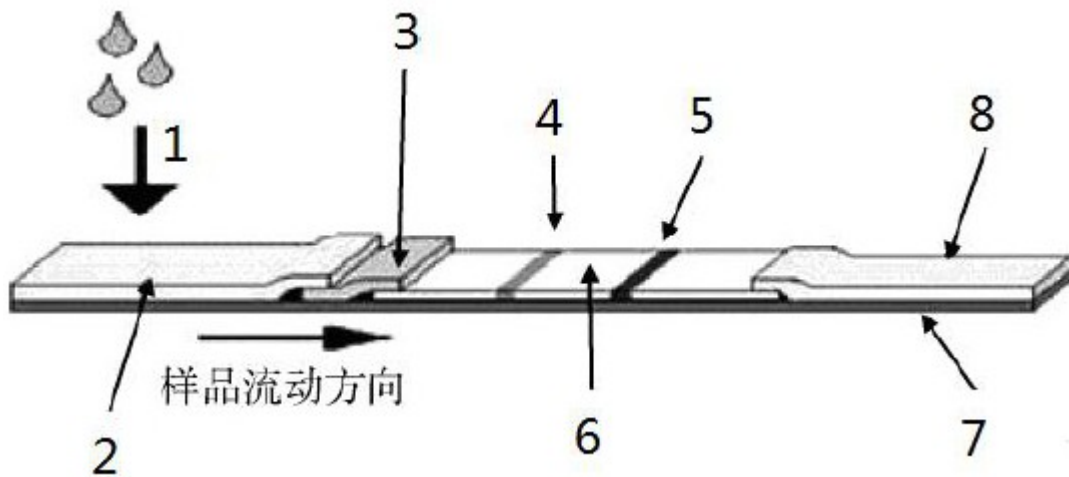


图6

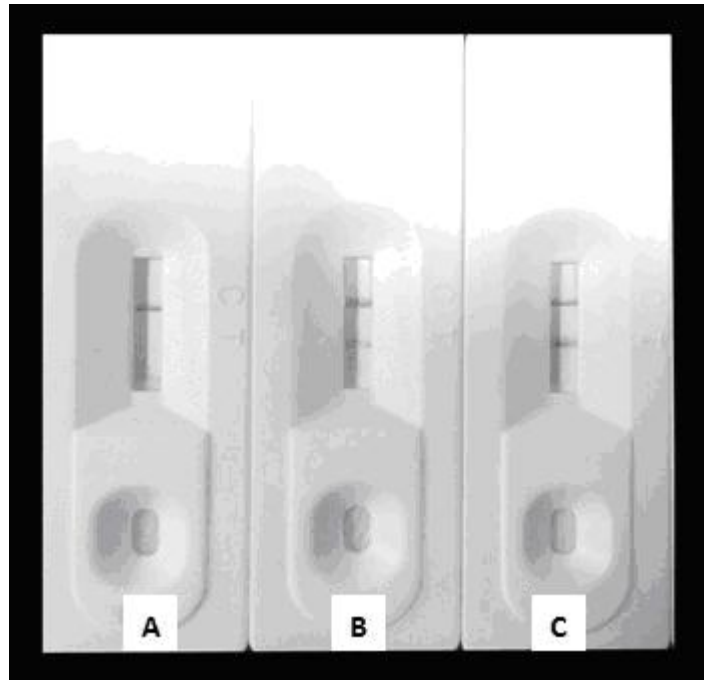


图7

专利名称(译)	一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条		
公开(公告)号	CN110540602A	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN201910804798.8	申请日	2019-08-28
[标]发明人	朱传刚 王钊哲 周志平 刘冀 李嘉静 沈元曦		
发明人	朱传刚 王钊哲 周志平 冒丽 刘冀 李嘉静 纪荣毅 沈元曦		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/70 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/45 C07K2319/00 C12N15/70 C12N2800/22 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56905 G01N33/587 G01N2333/45		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种弓形虫表面抗原GRA1和GRA7重组蛋白胶体金试纸条的制备，所述弓形虫胶体金免疫层析试纸条设有载体板、样品垫、胶体金结合垫、层板膜、检测线、质控线和吸收垫。检测时所需的标本量极小，不需要特殊仪器，肉眼直接判读结果，且检测简便快速，特异性强，灵敏度高，准确可靠，成本低，应用广泛。

