



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102250231 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201010178684. 6

(22) 申请日 2010. 05. 19

(73) 专利权人 中国疾病预防控制中心寄生虫病
预防控制所

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 207 号

(72) 发明人 许学年 周岩 董玉婷 包意芳
徐斌 冯正

(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.

C07K 14/435(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 33/12(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 2604688 Y, 2004. 02. 25, 全文.

MX PA02004417 A, 2004. 07. 16, 全文.

CN 101586161 A, 2009. 11. 25, 全文.

审查员 王岩

权利要求书1页 说明书16页

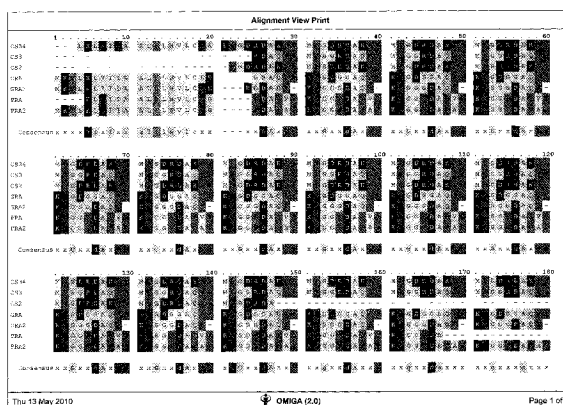
序列表9页 附图7页

(54) 发明名称

华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原及其应用

(57) 摘要

本发明提供了三种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原, 还提供了三种特异性的结合华支睾吸虫的特异性抗原的抗体。本发明还提供了三种分离的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原蛋白, 由华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码。本发明还提供了三种含有华支睾吸虫的特异性抗原基因的载体。本发明还提供了三种试剂盒。本发明还提供了上述的三种华支睾吸虫的特异性抗原蛋白、抗体、载体和试剂盒在制备诊断华支睾吸虫病的应用。本发明的华支睾吸虫 PPMP 型抗原具有较高的免疫原性, 易制备多 / 单克隆抗体, 进而进一步应用于抗原检测等方面, 实验证明实验动物 (小鼠) 对该抗原免疫应答较强。



1. 一种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原基因,其特征在于:所述的抗原基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。
2. 一种分离的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原蛋白,其特征在于:由权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原基因的核苷酸序列所编码。
3. 一种分离的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原蛋白,其特征在于:其氨基酸序列如 SEQ ID NO :5 所示。
4. 权利要求 2 所述的一种分离的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原蛋白在制备抗体中的用途。
5. 如权利要求 4 所述的用途,其特征在于:所述的抗体为单克隆抗体。
6. 一种载体,其特征在于:含有权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原基因。
7. 如权利要求 6 所述的载体,其特征在于:其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO :9 所示。
8. 一种宿主细胞,其特征在于:含有权利要求 6 所述的载体,或者所述的细胞用权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原基因转化或转染。
9. 一种试剂盒,其特征在于:含有权利要求 2 或者权利要求 3 所述的一种分离的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原蛋白。

华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原及其应用

技术领域：

[0001] 本发明属于生物工程领域,尤其涉及一种华支睾吸虫,具体来说是一种华支睾吸虫的特异性抗原 PPMP 型抗原及其应用。

背景技术：

[0002] 华支睾吸虫病(*Clonorchiasis sinensis*)是由华支睾吸虫[*Clonorchis sinensis*, Cs]感染所引起的人兽共患病。该病主要分布于亚洲,如中国、日本、韩国(为韩国主要人体寄生虫)、朝鲜、越南、东南亚等国家。估计全球有 3500 万人感染。在我国,除新疆、内蒙古、甘肃、青海、西藏、宁夏等省、自治区未见报道外,其余 25 个省、市、自治区以及台湾省和香港特别行政区都已有该病的流行报道或病例报告。由于移民的流动,以及日益频繁的 global 范围的旅游和经济活动,在一些非流行区和发达国家(包括北美和西欧)该病的病例报告也越来越多。

[0003] 根据卫生部于 2001 年 6 月~2004 年底在全国(除台湾、香港、澳门外)进行的人体重要寄生虫病现状调查结果显示,华支睾吸虫感染率比 1990 年全国寄生虫病分布调查的结果上升了 75%,其中广东、广西、吉林 3 省(区)分别上升了 182%、164% 和 630%。估计目前全国华支睾吸虫感染者达 1200 多万人。华支睾吸虫病是我国少数个别几个呈现上升趋势的寄生虫病之一,该病的防治工作已迫在眉睫。

[0004] 在我国南方(如广东、广西)及部分北方地区(如东北 3 省的朝鲜族居住区),当地人群有吃生的或未煮熟的淡水鱼肉的习,鱼肉中活的囊蚴被摄入人体,引起人的感染。这些地区居民虽知吃“鱼生”会感染本病,但饮食习惯一时难以改变。而且随着生活水平的提高,以往不吃或很少吃“鱼生”的人群也开始吃“鱼生”,现在生鱼片的风味吃法在非流行区,特别是大中城市也很盛行。同时由于市场开放,流行区含华支睾吸虫囊蚴的鱼运往各地,因此城镇居民感染华支睾吸虫的人数有增加的趋势。

[0005] 华支睾吸虫成虫寄生于人或其它终宿主的肝胆管内,虫体的分泌/代谢产物及虫体本身的机械刺激,可引起胆管,特别是引起次级胆管的炎症反应,中度感染胆管可出现局限性扩张,胆管上皮增生、管壁增厚、管腔狭窄,如合并细菌感染,可引起胆管炎和胆管肝炎,周围纤维组织增生,晚期可发生肝硬化。有证据表明,华支睾吸虫感染可增加患者患胆管癌(CLG)的风险,华支睾吸虫感染相关性肝胆管肿瘤是华支睾吸虫病流行区一个重要的公共卫生问题。

[0006] 为了快速诊断、及时治疗和有效控制华支睾吸虫病,需要特异、灵敏、简便的方法检测人群中中华支睾吸虫的感染。

[0007] 对于华支睾吸虫病人的诊断,传统的粪便检查仍是目前确诊华支睾吸虫病的主要方法。但由于患者依从性较差,且华支睾吸虫虫卵较小易于漏检,该方法有一定的缺陷。

[0008] 目前在现场防治工作中较广泛地应用了免疫诊断方法(主要是 ELISA 法)。但是仍存在问题:对健康人有不同程度的假阳性,对华支睾吸虫病人有一定的假阴性,对其它寄生虫(血吸虫、并殖吸虫)感染也有一定的交叉反应。Yong TS 应用 ELISA 方法检测 48

例华支睾吸虫病人血清抗体,只有 75% 的阳性反应,但在 28 例正常对照和 16 例并殖吸虫病例中,分别出现了 7.1% 和 37.5% 的假阳性。

[0009] 已有研究资料表明一些寄生虫的排泄分泌抗原(ESA)或重组的 ESA 可应用于寄生虫病的血清学诊断。Kim SI 用 ESA 来检测活动性华支睾吸虫病病人血清相应抗体动态反应,发现 30kDa 和 7kDa 区带与患者血清呈强阳性反应,而与吡喹酮治疗 6 个月后的病人血清反应较弱,其中 7kDa 区带未见与卫氏并殖吸虫病、横川后殖吸虫病、华支睾吸虫病患者痊愈后的血清起交叉反应,特异性比 30kDa 区带更强,据此认为 7kDa 抗原可作为活动性华支睾吸虫病的标志性诊断抗原。Min-Ho CHOI 对华支睾吸虫的排泄分泌抗原(ESA)检测抗体的 ELISA 法和成虫粗抗原(CA)检测抗体的 ELISA 法的诊断价值进行了比较和评估。ESA 检测抗体的 ELISA 法的特异性显著高于用 CA 检测抗体的 ELISA 法(前者特异性为 93.1%,后者为 87.8%),表明 ESA 用于检测华支睾吸虫患者血清抗体优于粗抗原。因此,与华支睾吸虫的 CA 相比,ESA 作为华支睾吸虫病的诊断抗原具有更高的特异性和敏感性。然而传统的虫源性抗原制备复杂,质量可控性较低,制备量有限,难以适应大规模查病的需求。

[0010] 此外,由于该虫寄生于肝胆管这一特定的部位,决定了宿主血清中的抗原和抗体水平较低,难以检测(也是目前该病缺乏良好诊断试剂的原因),但在粪样中却有 ESA 的存在。Yong TS 等鉴定了与 IgE 抗体反应的华支睾吸虫抗原,发现 28kDa 的抗原与 IgE 反应最强,该蛋白也存在于粪便排泄物中。Sirisinha S 等人用单克隆抗体 ELISA (Monoclonal antibody ELISA, McAb-ELISA) 检测麝猫后睾吸虫患者粪样中的抗原,能检测的抗原最低量为 0.05ng-0.1ng。研究表明,检测患者粪样中的特异抗原,可提供早期诊断、现症患者确诊及疗效考核的依据。

[0011] 而诊断抗体或抗原的特性决定着粪样和血清中抗原或血清抗体检测等免疫学方法的诊断效果。同时由于难以取得高纯度的特异抗原或大量的天然抗原,故使用分子生物学技术,构建特异性重组抗原的技术路线是寻找合适抗原的必由之路。

发明内容:

[0012] 本发明的目的在于提供三种华支睾吸虫的特异性抗原及应用,所述的这三种华支睾吸虫的特异性抗原及应用要解决现有技术诊断华支睾吸虫病的方法特异性和敏感性不高的技术问题。

[0013] 本发明提供了一种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs34),所述的抗原基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 所示、或者所述的抗原基因的核苷酸序列与 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列同源性达 90% 以上、或者其部分经过取代、缺失或者添加后如 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列所衍生的具有抗原性的核苷酸序列。

[0014] 本发明还提供了一种分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白质,由上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs34)的核苷酸序列所编码、或者与上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs34)的核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列所编码、或者由部分经过取代、缺失或者添加后的上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs34)的核苷酸序列所编码。

[0015] 进一步的,上述分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :4 所示、或者对 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个

或者几个氨基酸后的由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

[0016] 进一步的,上述分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :7 所示、或者对 SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸后的由 SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

[0017] 进一步的,上述分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :8 所示、或者对 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸后的由 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

[0018] 本发明还提供了一种抗体,特异性的结合上述的一种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白。

[0019] 进一步的,所述的抗体为单克隆抗体。

[0020] 本发明还提供了一种载体,含有上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs34)。

[0021] 本发明还提供了一种宿主细胞,含有上述的载体,或者用上述的所述的一种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原基因(Cs34)转化或转染。

[0022] 本发明还提供了一种疫苗,含有上述的一种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白、或者上述的抗体、或者上述的载体。

[0023] 本发明还提供了上述的一种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0024] 本发明还提供了上述的抗体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0025] 本发明还提供了上述的疫苗在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0026] 本发明还提供了上述的载体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0027] 本发明还提供了一种试剂盒,含有上述的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs34)蛋白、或者上述的抗体。

[0028] 本发明还提供了第二种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs2),所述的抗原基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO :2 所示、或者或者所述的抗原基因的核苷酸序列与 SEQ ID NO :2 所示核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列、或者其部分经过取代、缺失或者添加后如 SEQ ID NO :2 所示核苷酸序列所衍生的具有抗原性的核苷酸序列。

[0029] 本发明还提供了第二种分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs2)蛋白,由上述的第二种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs2)的核苷酸序列所编码、或者与上述的第二种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs2)的核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列所编码、或者由部分经过取代、缺失或者添加后的上述的第二种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs2)的核苷酸序列所编码。

[0030] 进一步的,上述的分离的分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs2)蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :5 所示、或者对 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸后的由 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

[0031] 本发明还提供了第二种抗体,特异性的结合上述的第二种华支睾吸虫的特异性

PPMP 型抗原(Cs2)蛋白。

[0032] 进一步的,所述的抗体为单克隆抗体。

[0033] 本发明还提供了第二种载体,含有上述的第二种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs2)。

[0034] 进一步的,上述的载体的氨基酸序列如 SEQ ID NO :9 所示。

[0035] 本发明还提供了第二种宿主细胞,含有上述的第二种载体,或者用上述的所述的第二种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原基因(Cs2)转化或转染。

[0036] 本发明还提供了第二种疫苗,含有上述的第二种分离的华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs2)蛋白、或者第二种所述的抗体、或者上述的第二种载体。

[0037] 本发明还提供了上述的第二种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs2)蛋白在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0038] 本发明还提供了上述的第二种抗体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0039] 本发明还提供了上述的第二种疫苗在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0040] 本发明还提供了上述的第二种载体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0041] 本发明还提供了第二种试剂盒,含有上述的第二种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs2)蛋白、或者上述的第二种抗体。

[0042] 本发明还提供了第三种华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs3),所述的抗原基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO :3 所示、或者或者所述的抗原基因的核苷酸序列与 SEQ ID NO :3 所示核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列、或者其部分经过取代、缺失或者添加后如 SEQ ID NO :3 所示核苷酸序列所衍生的具有抗原性的核苷酸序列。

[0043] 本发明还提供了第三种分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs3)蛋白,由上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs3)的核苷酸序列所编码、或者与上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs3)的核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列所编码、或者由部分经过取代、缺失或者添加后的上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs3)的核苷酸序列所编码。

[0044] 进一步的,上述第三种分离的华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原(Cs3)蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :6 所示、或者对 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸后的由 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

[0045] 本发明还提供了第三种抗体,特异性的结合上述的第三种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs3)蛋白。

[0046] 进一步的,所述的抗体为单克隆抗体。

[0047] 本发明还提供了第三种载体,含有上述的第三种华支睾吸虫的特异性抗原基因(Cs3)。

[0048] 进一步的,上述的第三种载体的氨基酸序列如 SEQ ID NO :10 所示。

[0049] 本发明还提供了第三种宿主细胞,含有上述的第三种载体,或者用上述的第三种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原基因(Cs3)转化或转染。

[0050] 本发明还提供了第三种疫苗,含有上述的第三种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs3)蛋白、或者上述的第三种抗体、或者第三种载体。

[0051] 本发明还提供了第三种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs3)蛋白在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0052] 本发明还提供了第三种上述的抗体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0053] 本发明还提供了第三种上述疫苗在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0054] 本发明还提供了第三种上述的载体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0055] 本发明还提供了第三种一种试剂盒,含有上述的第三种华支睾吸虫的特异性 PPMP 型抗原(Cs3)蛋白、或者上述的第三种抗体。

[0056] 本文中的术语“表达载体”,是指本领域中常用的细菌质粒、酵母质粒及其它各种病毒载体。本发明中适用的载体包括但不限于:在细菌中表达用的载体(原核表达载体)、在酵母中表达用的载体(如毕赤酵母载体)、在哺乳动物细胞中表达用的载体(逆转录病毒载体、腺病毒载体等)。在一优选实施方式中,所述表达载体为大肠杆菌表达载体。本领域技术人员可利用 DNA 重组技术等一系列技术,构建含本发明所述编码融合蛋白的 DNA 序列、合适的转录和翻译调控序列、启动子及选择性标记基因等特定元件的表达载体。上述载体可用来转化、转染合适的宿主细胞,以便获得所需要的融合蛋白。

[0057] 本发明的宿主细胞可以是原核细胞,也可以是真核细胞,如,细菌细胞、哺乳动物细胞等。宿主细胞在转化或转染含本发明所述编码融合蛋白的基因序列后,即构成工程化细胞或细胞株,可用于生产所需融合蛋白。本领域技术人员能够恰当地选择适当的载体、宿主细胞,并熟知如何将载体高效地转化或转染入宿主细胞中,所用方法包括但不限于:氯化钙法、电穿孔法用于细菌细胞,脂质体包裹、电融合法用于哺乳动物细胞等真核细胞。

[0058] 本发明的宿主细胞可以通过常规方法培养、诱导来表达所需要的融合蛋白,包括发酵过程和纯化工艺。上述表达的蛋白可在细胞内、细胞膜上或分泌到细胞周质、细胞外。根据需要,可利用融合蛋白的物理的、化学的以及其它生物学特性,进行分离纯化。方法包括但不限于:裂菌,离心,盐析,分子筛色谱,离子交换色谱,吸附色谱,反向色谱,以及常规的变性、复性处理等,这些方法均是本领域技术人员所熟知的。

[0059] 通过对本发明人构建的华支睾吸虫成虫 cDNA 表达文库,用采自广西壮族自治区的华支睾吸虫病人混合血清,使用免疫筛选法筛选华支睾吸虫成虫 cDNA 表达文库。共获得 51 个阳性克隆,有 44 个克隆完成测序。发现其中 3 例蛋白氨基酸序列中含有特异性 KPPMPGDRDA 或 QPPMPGGRDA 重复串列序列,因均含有 PPMP 序列特征,故命名为华支睾吸虫 PPMP 型抗原。并将含有 KPPMPGDRDA 重复串列序列的该类抗原称为 PPMP I 型抗原,含有 QPPMPGGRDA 重复串列序列的则称为 PPMP II 型抗原。经同源性比较,本发明的华支睾吸虫 PPMP 型抗原是迄今为止还没有公开的华支睾吸虫新颖的特异性抗原。但与华支睾吸虫的 GRA(富甘氨酸蛋白)、Glycine rich antigen2(富甘氨酸蛋白 2)、PRA(富脯氨酸蛋白)和 PRA2(富脯氨酸蛋白 2)等具有较高的同源性。通过华支睾吸虫抗原 PPMP I 型抗原 Cs2 抗原和 PPMP II 型抗原 Cs3 抗原的表达纯化,已进一步建立了高特异性和敏感性的华支睾吸虫病

诊断初步方法;并易制备多/单克隆抗体,可应用华支睾吸虫病的科研和防治等不同方面。本发明的试剂盒还可以用来检测华支睾吸虫病。

附图说明:

[0060] 图1、图2是华支睾吸虫PPMP型抗原基因Alignment分析结果。图中1-3号序列为本发明人获得的华支睾吸虫PPMP型抗原基因Cs34、Cs2和Cs3的氨基酸序列,GRA为Glycine rich antigen序列,GRA2为Glycine rich antigen2序列,PRA为Proline rich antigen序列(注:本发明人对原序列中不正确的编码进行了修正),PRA2为Proline rich antigen2序列。

[0061] 图3是将Cs34抗原全长氨基酸序列传送至SignalP3.0Server(网址:<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),使用神经网络法(NN)进行在线信号肽剪切位点分析图。

[0062] 图4将Cs34抗原全长氨基酸序列传送至SignalP3.0Server(网址:<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),使用隐马可夫模型(HMM)进行在线信号肽剪切位点分析图。

[0063] 图5是pBluescript SK_Cs2噬菌粒EcoRI/XhoI双酶切1%的琼脂糖凝胶电泳图,M:DNA Marker;1:pBluescript SK_Cs2质粒EcoRI/XhoI双酶切结果(755bp)。

[0064] 图6是pET28b质粒EcoRI/XhoI双酶切的1%的琼脂糖凝胶电泳图,M:DNA Marker;1:pET28b质粒NcoI/XhoI双酶切结果。

[0065] 图7是pBluescript SK_Cs3噬菌粒和pET28b质粒EcoRI/XhoI双酶切的1%的琼脂糖凝胶电泳图,M:DNA Marker;1:pET28b质粒NcoI/XhoI双酶切结果。2:pBluescript SK_Cs3质粒EcoRI/XhoI双酶切结果(1157bp)。

[0066] 图8是pET28b-Cs2[BLR(DE3)宿主菌]重组蛋白表达鉴定12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);NI:pET28b-Cs2未诱导;I:pET28b-Cs2诱导;S:诱导上清;P:诱导沉淀。

[0067] 图9是pET28b-Cs3[BLR(DE3)pLysS宿主菌]重组蛋白表达鉴定12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);NI:pET28b-Cs3未诱导;I:pET28b-Cs3诱导;S:诱导上清;P:诱导沉淀。

[0068] 图10是pET28b-Cs2[BLR(DE3)宿主菌]可溶性蛋白纯化12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein marker;1:Ni-NTA纯化流出液(含10mM咪唑);2-3:含20mM咪唑洗涤液管4、6;4-9:含50mM咪唑洗脱液1-6管;9-11:含100mM咪唑洗脱液1-3管;12-14:含250mM咪唑洗脱液1-3管,其中,pET28b-Cs2可溶性蛋白集中在含50mM-100mM咪唑的洗脱液中。

[0069] 图11是pET28b-Cs3[BLR(DE3)pLysS宿主菌]可溶性蛋白纯化12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein marker;1:Ni-NTA纯化流出液(含10mM咪唑);2-3:含20mM咪唑洗涤液管4、6;4-9:含50mM咪唑洗脱液1-6管;10-12:含100mM咪唑洗脱液1-3管;13-14:含250mM咪唑洗脱液1-2管,其中,pET28b-Cs3可溶性蛋白集中在含50mM-100mM咪唑的洗脱液中。

[0070] 图12是pET28b-CS2可溶性纯化蛋白ELISA法检测各类血清抗体散点图。

[0071] 图13是pET28b-CS3可溶性纯化蛋白ELISA法检测各类血清抗体散点图。

[0072] 为了便于理解,以下将通过具体的实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指

出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述,本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见了,而这些等价修改,均应属于本发明所限定的范围。

具体实施方式:

[0073] 以下所述实验方法,没有具体说明的,均按照《分子克隆实验指南》,2002年,科学出版社)所述方法进行。

[0074] 实施例1 华支睾吸虫成虫 cDNA 文库的构建

[0075] 用采自广西壮族自治区的华支睾吸虫囊蚴,通过灌胃法感染猫5只。40天后,检查粪便虫卵,然后剖杀,收集华支睾吸虫成虫,用灭菌的生理盐水冲洗干净,液氮保存。

[0076] 利用 TRIzol (GIBCO/BRL 公司) 试剂盒抽提华支睾吸虫成虫(1克华支睾吸虫成虫压积,液氮保存)的总 RNA。

[0077] 采用 mRNA 纯化试剂盒(mRNA Purification Kit, Amersham 公司),从提取的总 RNA 中纯化 mRNA。具体步骤见产品说明书。

[0078] 华支睾吸虫成虫 cDNA 文库采用定向克隆法,利用 ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 公司) 构建。参照试剂盒说明书操作,主要过程包括:

[0079] 1. cDNA 第一链的合成,应用含有 Xho I 内切酶位点的多聚 T 引物,为了使 cDNA 第一链在合成过程中不受限制性内切酶的破坏,用 5-甲基 dCTP 替代 dNTP 中的 dCTP,使合成的 DNA 半甲基化,从而在 Xho I 消化 cDNA 时,只有位于多聚 T 引物内的非甲基化位点可被裂解;

[0080] 2. cDNA 第二链的合成,由 RNase H 消化第一链合成产物 mRNA-DNA 杂合体中的 RNA,产生的 cDNA 片段作为引物在 DNA 聚合酶 I 作用下合成第二链;

[0081] 3. 用 Pfu DNA 聚合酶将合成的双链 cDNA 的末端补平,之后在补平的双链 DNA 的 5' 端加上含有 EcoR I 酶切位点的接头(adaptor),并使接头磷酸化;

[0082] 4. 用限制性内切酶 Xho I 消化,消化后的双链 DNA 通过 Sepharose CL-2B 凝胶柱层析,进行分级分离,去除游离接头;

[0083] 5. 将分离后的 DNA 片段合并浓缩,连接到 Uni-ZAP XR 载体上;

[0084] 6. 最后用包装抽提液(Gigapack III Gold Packing Extract, Stratagene) 包装噬菌体蛋白外壳。

[0085] 华支睾吸虫成虫 cDNA 文库构建完成后,进一步对文库容量及插入片段平均长度等进行检测。

[0086] 检测计算结果,华支睾吸虫成虫 cDNA 文库的容量为 1.43×10^6 pfu/ml。

[0087] 从文库中随机挑取 16 个重组克隆进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物鉴定。重组克隆扩增片段长度范围在 0.6kb ~ 2kb。平均插入片段长度为 1.1kb。

[0088] 重组插入率为 99.6%。

[0089] 实施例 2 cDNA 文库的免疫筛选

[0090] 噬菌体感染:

[0091] 取 XL1-blue MRF' 菌液 200 μ l 与适量 cDNA 文库噬菌体液混合(根据文库滴度预先确定,约 3000 噬菌斑 / 每板),37°C 温育 15 分钟后,加入 3ml 48°C 的上层琼脂(top agar)

混匀,立即铺于 NZY 培养基平板上。室温下凝固 10 分钟,于 42℃ 孵育。

[0092] 融合蛋白的诱导表达:

[0093] 观察到噬菌斑出现后(约 3.5 小时),用经 IPTG(15mM/L) 浸泡 30 分钟硝酸纤维素膜(Hybond-C extra, Amersham, NC) 覆盖平板,于 37℃ 再培育 3.5 小时;取出平板 4℃ 冷却 15 分钟,然后用针在膜以及板上做上标记。将膜取下置于 TBST 中洗 3 次,每次 10 分钟,然后浸于 NC 膜浸在封闭液中,室温,轻微振荡,封闭过夜。

[0094] 将 NC 膜从封闭液中取出,用 TBST 洗膜 2 次,每次 5 分钟。加入华支睾吸虫病人混合血清(采自广西壮族自治区)5ml/膜,室温下轻微振荡 3 小时。再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 分钟。加入二抗(5ml/膜)即羊抗人碱性磷酸酶结合物(AP-GAH, BIO-RAD, 1:3000 稀释)室温下反应 1 小时,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 分钟,用 TBS 洗膜 2 次,每次 5 分钟,洗去残留的 Tween20。

[0095] 将 NC 膜从 TBS 中取出,用 Whatman3MM 的滤纸吸干多余的溶液,放入 AP buffer 浸泡 NC 膜 3 分钟。

[0096] 用 Color Development Solution 稀释 NBT 至终浓度 0.3mg/ml, BCIP 终浓度为 0.15mg/ml (BCIP 应逐滴加入已稀释的 NBT 中,防止沉淀形成。),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。终止显色反应。

[0097] 根据 NC 膜上阳性斑点在原培养板上的相应位置,挑取阳性噬菌斑,再经过复筛、三筛使得阳性噬菌体单克隆化。

[0098] 实施例 3 噬菌体删除环化为 pBluescript SK_ 噬菌粒及提取噬菌粒

[0099] E. coli XL1-blue MRF' 于 LB 培养基(含有 10mM MgSO₄, 0.2% 麦芽糖, 15 μg/ml Tet)中培养过夜。次日,取培养液 100 μl 转接到新的 LB 培养基中,37℃, 200rpm 振荡培养约 2 小时。培养液经 2000g, 离心 10 分钟,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 SMbuffer 和 1 μl 辅助噬菌体。将细菌培养管放置于 37℃ 水浴中 15 分钟。然后加入 3ml LB, 于 37℃ 振荡培养 5 小时。取出细菌培养管,在 65℃ 加热 20 分钟,然后 3000g, 离心 15 分钟,将上清转入一个新离心管中,置于 4℃ 保存。

[0100] SOLR 菌于 LB 培养基(含有 10mM MgSO₄, 50 μg/ml Kan)中振荡培养,然后 2000g, 离心 10 分钟,用 10mM MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ = 1.0, 在 1.5ml Ep 离心管中加入 200 μl SOLR 和上述制备的上清保存液 1 μl, 在 37℃ 温育 15 分钟,然后取出 25 μl 均匀涂布于 LB(含 100 μg/ml Amp) 琼脂平板上,37℃ 倒置培养过夜。

[0101] 培养基上生长的菌落,即为含华支睾吸虫 cDNA 插入片段的 pBluescript SK_ 噬菌粒的 SOLR 菌落。

[0102] 使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒 [爱思进生物技术(杭州)有限公司] 提取 pBluescript SK_ 噬菌粒。

[0103] 实施例 4 华支睾吸虫 PPMP 型抗原基因的分离

[0104] 筛选获得的阳性克隆,经删除环化为 pBluescript SK_ 质粒。由上海 Invitrogen 公司测序,共得到 3 个华支睾吸虫 PPMP 型抗原基因的部分 mRNA(cDNA) 序列。分别是华支睾吸虫 Cs34、Cs2 和 Cs3 基因,插入片段长度分别为 1044、734 和 1136 个碱基。

- [0105] 华支睾吸虫 Cs34 基因的 mRNA (cDNA) 序列如 SEQ ID NO :1 所示。
- [0106] 华支睾吸虫 Cs2 基因的 mRNA (cDNA) 序列如 SEQ ID NO :2 所示。
- [0107] 华支睾吸虫 Cs3 基因的 mRNA (cDNA) 序列如 SEQ ID NO :3 所示。
- [0108] Cs34、Cs2 和 Cs3 克隆中插入的 cDNA 片段推导的蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO :4-6 所示, Cs34、Cs2 和 Cs3 蛋白分别含 265、157 和 284 个氨基酸。
- [0109] 华支睾吸虫 Cs34 基因的氨基酸序列如 SEQ ID NO :4 所示。
- [0110] 华支睾吸虫 Cs2 基因的氨基酸序列如 SEQ ID NO :5 所示。
- [0111] 华支睾吸虫 Cs3 基因的氨基酸序列如 SEQ ID NO :6 所示。
- [0112] 实施例 5 华支睾吸虫 Cs34 抗原同源性比较
- [0113] 使用 Blastp 对 GenBank 中 nr 库进行同源性比较, 结果如下 :
- [0114]

Search database NOn-redundant protein sequences (nr) using Blastp (protein-protein BLAST)

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb AAD33058.1 AF136608_1 antigen Cs44 [Clonorchis sinensis]	249	2e-64
gb EAW95432.1 hCG1645603, isoform CRA_b [Homo sapiens]	187	7e-46
gb AAC61699.1 antigen [Clonorchis sinensis]	186	2e-45
sp Q25060.1 LWA_HYDEC RecName: Full=LWamide neuropeptides; Co...	132	2e-29
gb AAM18465.1 AF461711_1 proline rich antigen 2 [Clonorchis s...	127	1e-27
gb AAM18463.1 AF461709_1 glycine rich antigen 2 [Clonorchis s...	125	2e-27
ref XP_844266.1 hypothetical protein [Trypanosoma brucei TRE...	111	7e-23
ref ZP_03206353.1 multiple banded antigen [Ureaplasma urealy...	106	2e-21
gb AAT79412.1 multiple banded antigen [Ureaplasma urealyticum]	105	3e-21
sp Q27409.1 FP1_MYTGA RecName: Full=Adhesive plaque matrix pr...	102	2e-20
ref XP_001625536.1 predicted protein [Nematostella vectensis...	97.1	1e-18
gb ABD75543.1 orf1ab polyprotein [Human coronavirus HKU1]	95.5	4e-18
sp Q25460.1 FP1_MYTED RecName: Full=Adhesive plaque matrix pr...	94.4	9e-18
gb AAT79415.1 multiple banded antigen [Ureaplasma urealyticum]	92.4	3e-17
ref XP_002243306.1 hypothetical protein BRAFLDRAFT_139244 [B...	90.5	1e-16
ref ZP_02558216.1 multiple banded antigen [Ureaplasma urealy...	90.1	1e-16
gb AAX23968.1 foot protein 1 [Mytilus edulis]	88.6	5e-16
ref XP_001601102.1 PREDICTED: similar to Sec24B protein, put...	84.7	6e-15
gb AAK35165.1 proline-rich antigen [Clonorchis sinensis]	84.7	7e-15
ref ZP_02696229.1 conserved hypothetical protein [Ureaplasma...	82.0	5e-14

[0115]

ref XP_001818288.1	hypothetical protein [Aspergillus oryzae ...	80.1	2e-13
ref XP_001714252.1	PREDICTED: similar to RE32881p [Homo sapi...	80.1	2e-13
gb EED57898.1	cell surface protein, putative [Aspergillus fl...	79.0	4e-13
ref XP_001377293.1	PREDICTED: hypothetical protein [Monodelp...	78.2	7e-13
ref XP_001114423.1	PREDICTED: MAGE-like protein 2 [Macaca mu...	75.9	3e-12
ref XP_220903.4	PREDICTED: similar to calcium binding and co...	74.3	9e-12
gb ABK24691.1	unknown [Picea sitchensis]	71.6	5e-11
ref NP_001024021.1	hypothetical protein H39E23.3 [Caenorhabd...	67.0	1e-09
ref XP_001493076.2	PREDICTED: similar to MAGEL2 protein [Equ...	60.1	2e-07
ref XP_001137791.1	PREDICTED: hypothetical protein [Pan trog...	56.6	2e-06
ref XP_001671474.1	Hypothetical protein CBG17606 [Caenorhabd...	54.3	9e-06
ref XP_001697432.1	predicted protein [Chlamydomonas reinhard...	54.3	1e-05
ref YP_001107629.1	PE-PGRS family protein [Saccharopolyspora...	52.4	3e-05
gb AAH96211.1	PRB3 protein [Homo sapiens]	47.0	0.002
gb AAH96210.1	PRB3 protein [Homo sapiens] >gb AAH96209.1 PR...	45.8	0.004
ref NP_006240.4	proline-rich protein BstNI subfamily 3 precu...	45.4	0.005
gb EAW96230.1	proline-rich protein BstNI subfamily 3 [Homo s...	45.1	0.006
ref XP_002249737.1	hypothetical protein BRAFLDRAFT_111807 [B...	41.6	0.061
gb AAF71700.1	AF206618_1 carboxyl-ester lipase [Gorilla gorilla]	41.2	0.094
ref XP_808957.1	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL...	37.7	1.0
ref XP_581873.3	PREDICTED: similar to MAGEL2 protein [Bos ta...	37.7	1.1
sp Q04118.1	PRB3_HUMAN RecName: Full=Basic salivary proline-r...	37.4	1.1
ref NP_001078199.1	structural constituent of cell wall [Arab...	36.2	2.7
ref XP_820135.1	trans-sialidase [Trypanosoma cruzi strain CL...	35.0	6.2
ref XP_001303156.1	agglutinin [Trichomonas vaginalis G3] >gb...	34.7	7.2

[0116] 与第一例 :antigen Cs44[Clonorchis sinensis] 的氨基酸一致性为 55%, 同源性为 63%。如下所示 :

[0117]

gb|AAD33058.1|AF136608_1 antigen Cs44 [Clonorchis sinensis]
Length=274

Score = 249 bits (636), Expect = 2e-64, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 150/271 (55%), Positives = 172/271 (63%), Gaps = 6/271 (2%)

```

Query 1  LKLTISAALFLNVLC---SAEP---GDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDA 54
          LKL I ALFLNVLC A+P GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A
Sbjct 4  LKLVIIIGALFLNVLC LDGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGA 63

Query 55 KPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDA 114
          +PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A
Sbjct 64 QPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGA 123

Query 115 KPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDA 174
          +PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A

```

[0118]

```

Sbjct 124 QPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGA 183

Query 175 KPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDAKPPMPGDRDA 234
          +PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A+PP GD A
Sbjct 184 QPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGAQPPKSGDGGGA 243

Query 235 QPPMSGAQRPF SHWIAGWFLVLLAVKASDHF 265
          QPP SGAQRPF SHWIAGWFLV L VKASDHF
Sbjct 244 QPPKSGAQRPF SHWIAGWFLVPLEVKASDHF 274

```

[0119] 实施例 6 华支睾吸虫 PPMP 型抗原基因的 Alignment 分析

[0120] 本发明人发现的 3 例 PPMP 型抗原氨基酸序列,使用 Omega2.0 软件与 Glycine rich antigen 等序列一同进行多序列 alignment 分析,经手工调整后,alignment 分析如图 1 及图 2 所示。Alignment 分析表明:华支睾吸虫 PPMP 抗原基因是一类多同源基因家族。PPMP I 型抗原的 Cs34 和 Cs2 序列基本相同,具有相同“KPPMPGDRDA”十氨基酸重复串列序列,但 Cs2 基因的 N 端缺失,Cs34 基因含有部分 N 端结构。而 PPMP II 型的 Cs3 基因的十氨基酸重复串列序列为“QPPMPGDRDA”,重复串列结构中有二个氨基酸发生了改变,该基因的 N 端同样缺失。该类抗原与华支睾吸虫的 GRA、GRA2、PRA 和 PRA2 蛋白的 N 和 C 端结构序列高度一致,并含有高度疏水区,由大量的疏水性氨基酸组成。由此可推:Cs34 抗原的全长氨基酸序列如 SEQ ID NO :7 所示,含 268 个氨基酸。

[0121] 实施例 7 华支睾吸虫 Cs34 抗原基因的 SignalP 分析

[0122] 将 Cs34 抗原全长氨基酸序列传送至 SignalP3.0Server (网址: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),使用神经网络法(NN)进行在线信号肽剪切位点分析,结果如图 3 和下面计算结果:

[0123]

data

```

>Sequence length = 268
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 21 0.513 0.32 YES
max. Y 21 0.622 0.33 YES
max. S 6 0.969 0.87 YES
mean S 1-20 0.828 0.48 YES
      D 1-20 0.725 0.43 YES

```

Most likely cleavage site between pos. 20 and 21: CSA-EP

[0124] 使用隐马尔可夫模型(HMM)进行在线信号肽剪切位点分析,结果如图 4 和下面的计算结果:

[0125]

```
# data
```

```
>Sequence
```

```
Prediction: Signal peptide
```

```
Signal peptide probability: 0.991
```

```
Signal anchor probability: 0.000
```

```
Max cleavage site probability: 0.741 between pos. 20 and 21
```

[0126] 根据 SignalP 分析结果,表明华支睾吸虫 Cs34 抗原确实含有信号肽结构。信号肽剪切位点位于第 20 和第 21 个氨基酸之间。经信号肽剪切后的成熟 Cs34 抗原的氨基酸序列(含 248 个氨基酸)如 SEQ ID NO :8 所示。含 248 个氨基酸,预测分子量为 26.61kDa。

[0127] 由此可见 Cs2 和 Cs3 基因虽然缺失 N 端序列,但已含有成熟抗原蛋白的全部编码区域。

[0128] 实施例 8pET28b-Cs2 表达载体的构建

[0129] 将 pBluescript SK_Cs2 噬菌粒,用 EcoRI/XhoI (NEB 公司)限制性内切酶,37°C 双酶切过夜。酶切产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳(见图 5),在紫外灯下切割分离的目的片段,用 E. Z. N. A. **Ultra-Sep**[®] Gel Extraction Kit (Omiga 公司)纯化回收目的片段(755bp)。

[0130] pET28b 表达载体同样用 EcoRI/XhoI (NEB 公司)限制性内切酶作双酶切,37°C 反应过夜。酶切产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳(见图 6),在紫外灯下切割分离的目的片段,用 E. Z. N. A. **Ultra-Sep**[®] Gel Extraction Kit (Omiga 公司)纯化回收。

[0131] 将目的片段和载体片段按 8 :1 摩尔比进行连接,连接体系中含 T4DNA 连接酶(NEB 公司) 1uL,10×T4ligase buffer2uL,去离子水,目的片段和载体片段共计体积为 20uL 于 1.5ml Eppendorf 管中 16°C 连接过夜,构建成 pET28b-Cs2 的原核表达的重组质粒。该重组蛋白的氨基酸序列(含 196 个氨基酸)如 SEQ ID NO :9 所示。预测分子量为 20.98kDa。

[0132] 连接好的表达载体转化至 DH5a,提取质粒后,验证插入序列无误。并进一步转化 E. coli BLR(DE3) 感受态细胞。

[0133] 实施例 9pET28b-Cs3 表达载体的构建

[0134] 将 pBluescript SK_Cs3 噬菌粒,用 EcoRI/XhoI (NEB 公司)限制性内切酶,37°C 双酶切过夜。酶切产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳(见图 7),在紫外灯下切割分离的目的片段,用 E. Z. N. A. **Ultra-Sep**[®] Gel Extraction Kit (Omiga 公司)纯化回收目的片段(755bp)。

[0135] pET28b 表达载体同样用 EcoRI/XhoI (NEB 公司)限制性内切酶作双酶切,37°C 反应过夜。酶切产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳(见图 7),在紫外灯下切割分离的目的片段,用 E. Z. N. A. **Ultra-Sep**[®] Gel Extraction Kit (Omiga 公司)纯化回收。

[0136] 将目的片段和载体片段按 8 :1 摩尔比进行连接,连接体系中含 T4DNA 连接酶(NEB 公司) 1uL,10×T4ligase buffer2uL,去离子水,目的片段和载体片段共计体积为 20uL 于 1.5ml Eppendorf 管中 16°C 连接过夜,构建成 pET28b-Cs3 的原核表达的重组质粒。该重组蛋白的氨基酸序列(含 323 个氨基酸)如 SEQ ID NO :10 所示。预测分子量为 33.05kDa。

[0137] 连接好的表达载体转化至 DH5a,提取质粒后,验证插入序列无误。并进一步转化 E. coli BLR(DE3)pLysS 感受态细胞。

[0138] 实施例 10 重组蛋白的表达鉴定及纯化

[0139] 转化好的表达宿主菌接种于 4ml 的 LB 培养基(含 50 μ g/ml 的 Kan)中,于 37 $^{\circ}$ C, 200rpm, 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 时,取出 2ml 菌液加入 2 μ l 1M 的 IPTG 进行诱导,剩余的 2ml 菌液不加 IPTG 作为对照,37 $^{\circ}$ C, 200rpm, 振荡培养 4 小时。将培养好的菌液于 4 $^{\circ}$ C, 经 5000rpm 离心 10 分钟收集菌体,弃去上清。向诱导管和对照管中分别加入 200 μ l 0.15M 的 PBS 重悬菌体。分别从诱导管和对照管中取出 5 μ l 的重悬液,加入 2 \times SDS-PAGE 加样缓冲液 5 μ l, 混匀后于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分钟变性。以 8 μ l/ 孔样品进行 SDS-PAGE 分析(浓缩胶为 5%, 分离胶为 12% 或 16%)。电泳条件为浓缩胶 80V, 分离胶 100V。电泳结束后,用染色液染色 4 小时,再用脱色液脱色,直到蛋白条带清晰可见。

[0140] 结果:

[0141] pET28b-Cs2、pET28b-Cs3 在 1mM 的 IPTG 条件下 37 $^{\circ}$ C 诱导,分别在 22、39Ku 处可见重组蛋白表达条带。重组蛋白仅在上清中有表达。如图 8、9 所示。

[0142] 重组蛋白的纯化

[0143] 诱导后的菌液(500ml)经 4000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 10 分钟,弃尽上清。按每克细菌糊加入 5ml 的比例,向菌体中加入 BugBuster[®]蛋白抽提剂(Novagen 公司),并加入 5Ku rLysozyme (每克细菌糊,Novagen 公司)以及 125u Benzonase 核酸酶(每克细菌糊,Novagen 公司),充分悬浮沉淀后,室温振荡 30min。然后于 4 $^{\circ}$ C, 9000rpm 离心 10 分钟。

[0144] 可溶性蛋白的纯化

[0145] 取 1ml 的 Ni-NTA Agarose (Qiagen 公司)装柱,加入大量 0.15M 的 PBS 冲洗,除去残留的乙醇。

[0146] 将离心后的诱导细菌上清液加入到已经处理好的 Ni-NTA Agarose 中,置于摇床上,室温振荡 60-90 分钟,使蛋白与 Ni-NTA Agarose 充分结合。

[0147] 停止振荡后,待 Ni-NTA Agarose 沉降,打开柱子下面的塞子,收集流出的液体。

[0148] 用 4 倍床体的 Washing Buffer 洗柱两次,收集流出的液体。

[0149] 然后用 2-4 倍床体的含不同浓度咪唑的 Elution Buffer 洗涤柱子,分别收集洗脱液。

[0150] 将收集的液体进行 SDS-PAGE 电泳检测分析,检测蛋白纯化的效果。pET28b-Cs2 在 E. coli BLR(DE3) 宿主菌、pET28b-Cs3 在 E. coli BLR(DE3)pLysS 宿主菌中的可溶性重组蛋白纯化结果如图 10、11 所示。

[0151] 实施例 11 酶联免疫吸附试验检测抗体

[0152] 1. 间接 ELISA 方法检测血清中的抗体方法

[0153] 用重组蛋白包被酶标板(Nunc 公司, 96 孔板), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 1%BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时; 分别加入 1:100 稀释的华支睾吸虫病人、正常人血清 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 1.5 小时; 加入 100 μ l 的 HRP 标记羊抗人 IgG (Sigma 公司, 1:10000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时; 加入底物 TMB (天根公司) 显色, 酶标仪 450nm 读取数值。

[0154] 2. pET28b-Cs2 可溶性纯化蛋白检测抗体效果评价

[0155] 对采自广西横县的 35 份华支睾吸虫病人血清, 采自华支睾吸虫病非流行区的广西靖西市的 36 份正常人血清, 15 例日本血吸虫病人血清、15 例并殖吸虫病人血清和 13 例猪囊尾蚴病人血清, 以上述间接 ELISA 方法检测血清中的抗体。重组抗原 pET28b-Cs2 的可

溶性纯化蛋白的包被浓度为 0.5ug/ml, 每孔 100ul。

[0156] ELISA 结果如下：

[0157] pET28b-Cs2 可溶性纯化蛋白检测血清中特异性抗体间接 ELISA 结果

诊断样品	OD 值	阳性界值	样品数	阳性数	阴性数
	($\bar{X} \pm SD$)	(阴性平均值+2SD)			
[0158] 华支睾吸虫病人血清	0.218±0.175	0.096	35	26	9
广西正常人血清	0.047±0.025	0.096	36	2	34
日本血吸虫病人血清	0.048±0.027	0.096	15	1	14
并殖吸虫病人血清	0.040±0.042	0.096	15	1	14
猪囊尾蚴病人血清	0.047±0.025	0.096	13	1	12
[0159] 上海正常人血清	0.031±0.014	0.096	10	0	10

[0160] 36 份正常人血清平均 OD 值 =0.047, SD=0.0247。以正常人血清均值加上 2 倍 SD 为判断标准, OD 值大于 0.096 为阳性。

[0161] 36 份粪检阴性的正常人血清中, 有 2 例大于 0.096。以 pET28b-CS2 不可溶性纯化蛋白检测抗体的 ELISA 方法的特异性 =34/36×100%=94.4%。

[0162] 35 份粪检阳性血清平均 OD 值 =0.218, SD=0.175, 其中 26 例血清 OD 值大于 0.096。建立的 ELISA 方法的敏感性 =26/35×100%=74.3%。

[0163] 本 ELISA 方法的总符合率 = (34+26) / (36+35) ×100%=84.5%。

[0164] 15 例日本血吸虫病人血清、15 例并殖吸虫病人血清和 13 例猪囊尾蚴病人血清中, 各有一例的 OD 值大于 0.096, 假阳性率分别为 6.67%、6.67% 和 7.69%。该 ELISA 方法特异性较高, 与血吸虫、并殖吸虫、猪囊尾蚴抗体无明显交叉反应, 假阳性率同正常人血清。

[0165] pET28b-Cs2 可溶性纯化重组蛋白 ELISA 法检测各类血清中的特异性抗体的散点图见图 12。

[0166] 3. pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白检测抗体效果评价

[0167] 对采自广西横县的 35 份华支睾吸虫病人血清, 采自华支睾吸虫病非流行区的广西靖西市的 36 份正常人血清, 15 例日本血吸虫病人血清、15 例并殖吸虫病人血清和 13 例猪囊尾蚴病人血清, 以上述间接 ELISA 方法检测血清中的抗体。重组 pET28b-Cs3 的可溶性纯化蛋白的包被浓度为 0.5ug/ml, 每孔 100ul。

[0168] ELISA 结果如下：

[0169] pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白检测血清中特异性抗体间接 ELISA 结果

诊断样品	OD 值	阳性界值	样品数	阳性数	阴性数
	($X \pm SD$)	(阴性平均值+2SD)			
[0170] 华支睾吸虫病人血清	0.235 ± 0.170	0.066	35	30	5
广西正常人血清	0.037 ± 0.015	0.066	36	2	34
日本血吸虫病人血清	0.053 ± 0.045	0.066	15	1	14
并殖吸虫病人血清	0.035 ± 0.017	0.066	15	1	14
猪囊尾蚴病人血清	0.044 ± 0.020	0.066	13	1	12
上海正常人血清	0.026 ± 0.010	0.066	10	0	10

[0171] 36 份正常人血清平均 OD 值 = 0.037, SD=0.0146。以正常人血清均值加上 2 倍 SD 为判断标准, OD 值大于 0.066 为阳性。

[0172] 36 份粪检阴性的正常人血清中, 有 2 例大于 0.066。以 pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白检测抗体的 ELISA 方法的特异性 = $34/36 \times 100\% = 94.4\%$ 。

[0173] 35 份粪检阳性血清平均 OD 值 = 0.235, SD=0.170, 其中 30 例血清 OD 值大于 0.066。建立的 ELISA 方法的敏感性 = $30/35 \times 100\% = 85.7\%$ 。

[0174] 本 ELISA 方法的总符合率 = $(34+30) / (36+35) \times 100\% = 90.1\%$ 。

[0175] 15 例日本血吸虫病人血清、15 例并殖吸虫病人血清和 13 例猪囊尾蚴病人血清中, 各有 1 例的 OD 值大于阳性界值, 假阳性率分别为 6.67%、6.67% 和 7.69%。该 ELISA 方法特异性较高, 与血吸虫、并殖吸虫、猪囊尾蚴抗体无明显交叉反应, 假阳性率同正常人血清。

[0176] pET28b-Cs3 可溶性纯化重组蛋白 ELISA 法检测各类血清中的特异性抗体的散点图见图 13。

[0177] 实施例 12 华支睾吸虫 Cs2 抗原免疫原性检测

[0178] 用 pET28b-Cs2 可溶性纯化重组蛋白, 免疫 5 只 Balb/c 小鼠。每鼠接种抗原 30ug, 首次接种使用福氏完全佐剂 (Sigma 公司), 皮下注射; 每隔 3 周, 使用福氏不完全佐剂 (Sigma 公司) 加强, 腹腔注射, 共强化免疫 4 次。取小鼠尾血, 间接 ELISA 方法检测小鼠免疫效果。以 pET28b-Cs2、pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白 (浓度为 0.5ug/ml, 100ul) 分别包被酶标板, 二抗为 Sigma 公司的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 1:5000 稀释。

[0179] 结果: 以 pET28b-Cs2、pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白分别包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测。免疫小鼠血清的平均 OD 值分别为 0.500、0.517, SD 分别为 0.019、0.019; 正常小鼠血清的 OD 值分别为 0.075、0.072; PBST 空白对照的 OD 值分别为 0.058、0.061。

[0180] 具体结果如下表所示:

[0181] 华支睾吸虫 Cs2 重组蛋白免疫效果间接 ELISA 检测结果

[0182]

	Cs2 重组蛋白包被的结果	Cs3 重组蛋白包被的结果
#1 鼠	0.504	0.512
#2 鼠	0.468	0.486
#3 鼠	0.521	0.527
#4 鼠	0.490	0.542
#5 鼠	0.517	0.518
正常鼠	0.075	0.072
PBST	0.058	0.061

[0183] 实验结果表明, pET28b-Cs2 重组蛋白, 具有很强的免疫原性, 实验小鼠对重组抗原可产生强烈的免疫应答, 易制备多 / 单克隆抗体。Cs2 重组蛋白的氨基酸序列已含有 Cs34 抗原的所有的氨基酸序列特征, Cs2 的抗原决定簇已涵盖 Cs34 的所有抗原决定簇。故可知: Cs34 抗原也具有较好的免疫原性。重组蛋白的小鼠多抗对 Cs3 重组蛋白也存在强烈的交叉反应。

[0184] 实施例 13 华支睾吸虫 Cs3 抗原免疫原性检测

[0185] 用 pET28b-Cs3 可溶性纯化重组蛋白, 免疫 5 只 Balb/c 小鼠。每鼠接种抗原 30ug, 首次接种使用福氏完全佐剂 (Sigma 公司), 皮下注射; 每隔 3 周, 使用福氏不完全佐剂 (Sigma 公司) 加强, 腹腔注射, 共强化免疫 4 次。取小鼠尾血, 间接 ELISA 方法检测小鼠免疫效果。以 pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白 (浓度为 0.5ug/ml, 100ul) 包被酶标板, 二抗为 Sigma 公司的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 1:5000 稀释。

[0186] 结果: 以 pET28b-Cs3 可溶性纯化蛋白包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测。免疫小鼠血清的平均 OD 值为 0.500, SD 分别为 0.023; 正常小鼠血清的 OD 值为 0.076; PBST 空白对照的 OD 值为 0.059。

[0187] 具体结果如下表所示:

[0188] 华支睾吸虫 Cs3 重组蛋白免疫效果间接 ELISA 检测结果

[0189]

#1 鼠	0.474
#2 鼠	0.495
#3 鼠	0.543
#4 鼠	0.489
#5 鼠	0.501
正常鼠	0.076
PBST	0.059

[0190] 实验结果表明, pET28b-Cs3 重组蛋白, 具有很强的免疫原性, 实验小鼠对重组抗原可产生强烈的免疫应答, 易制备多 / 单克隆抗体。

序列表

<110> 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

<120> 华支睾吸虫特异性 PPMP 型抗原及其应用

<160>10

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>1044

<212>cDNA

<213> 华支睾吸虫 Cs34

<400>1

```

cctgaaactt actatcagtg cagccctctt cctcaatggt ctgtgttcag cagaacctgg 60
agaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 120
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 180
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 240
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 300
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 360
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 420
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 480
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 540
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 600
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 660
tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg tgaccgcgat gcaaaacctc ctatgccagg 720
tgctcaacga cegtttagtc actggatcgc tggttggttc ttggttctec tggcagtcaa 780
ggcctccgat cacttetgat ttccatgtgc aaacggacgc geatcgeccc aaaatactat 840
gtgtgttgag ctttgacatc atgcatctaa cgtacgcttc tegccatttt gtggatttta 900
tttaattcgg catacgaacta ttcatttgtg ctactccgaa caatatctgc ataatccatg 960
acttttcgcg tttctggatg atgaagtaca ttatataacc catgtttatt acactttttc 1020
cctctaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1044

```

<210>2

<211>734

<212>cDNA

<213> 华支睾吸虫 Cs2

<400>2

gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat 60
 gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat 120
 gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat 180
 gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat 240
 gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat 300
 gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gccaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat 360
 gtcaggtgac cgcgatgcaa aacctcctat gtcaggtgct caacgaccgt ttagtcaactg 420
 gatcgctggt tggttcttgg ttctcctggc agtcaaggcc tccgatcact tetgatttcc 480
 atgtgcaaac ggacgcgcat cgccccaaaa tactatgtgt gttgagcttt gacatcatgc 540
 atctaacgta cgcttctcgc cttttgtgg attttattta attcggcata cgactattca 600
 tttgtgctac tccgaacaat atctgcataa tccatgactt ttgcgcttc cggatgatga 660
 agtacattat ataacctatg tttattacac tttttccctc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720
 aaaaaaaaaa aaaa 734

<210>3

<211>1136

<212>cDNA

<213> 华支睾吸虫 Cs3

<400>3

ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 60
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 120
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 180
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 240
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 300
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 360
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 420
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 480
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 540
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg 600
 ccgcatgca caacctccta tgccaggtgg ccgcatgca caacctccta agtcagatgg 660
 ccgcatgca caacctccta agtcagatgg ccgcatgca caacctccta agtcagatgg 720
 ccgcatgca caacctccta agtcagatgg ccgcatgca caacctccta agtcagatgc 780
 tcaacgaccg ttagtcaact ggatcgctgg ttggttcttg gttctcctgg cagtcaaggc 840
 ctccgateac ttttgattcc catgtgcaaa cggacgcgca tcgccccaaa atactatgtg 900
 tgttgagctt tgacatcatg catctaacgt acgcttctcg ccattttgtg gattttattt 960
 aattcggcat acgactatc atttgtgtta ctccgaacaa tatttgcata atccatgact 1020
 tttgcgcttc ccgatgatg aagtacatta tataacctat gtttattacc cttttccct 1080
 taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1136

<210>4

<211>265

<212>PRT

<213> 华支睾吸虫 Cs34

<400>4

Leu Lys Leu Thr Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Asn Val Leu Cys Ser

1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg

20 25 30

Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met

35 40 45

Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala

50 55 60

Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly

65 70 75 80

Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro

85 90 95

Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg

100 105 110

Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met

115 120 125

Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala

130 135 140

Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly

145 150 155 160

Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro

165 170 175

Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg

180 185 190

Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met

195 200 205

Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala

210 215 220

Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Ser Gly

225 230 235 240

Ala Gln Arg Pro Phe Ser His Trp Ile Ala Gly Trp Phe Leu Val Leu

245 250 255

Leu Ala Val Lys Ala Ser Asp His Phe

260 265

<210>5

<211>157

<212>PRT

<213> 华支睾吸虫 Cs2

<400>5

Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala

1 5 10 15

Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly

20 25 30

Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro

35 40 45

Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg

50 55 60

Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met

65 70 75 80

Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala

85 90 95

Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly

100 105 110

Asp Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Ser Gly Asp Arg Asp Ala Gln Pro

115 120 125

Pro Met Ser Gly Ala Gln Arg Pro Phe Ser His Trp Ile Ala Gly Trp

130 135 140

Phe Leu Val Leu Leu Ala Val Lys Ala Ser Asp His Phe

145 150 155

<210>6

<211>284

<212>PRT

<213> 华支睾吸虫 Cs3

<400>6

Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro

1 5 10 15

Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp

20 25 30

Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro

35 40 45

Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln

50 55 60

Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro
 85 90 95
 Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp
 100 105 110
 Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro
 115 120 125
 Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln
 130 135 140
 Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly
 145 150 155 160
 Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro
 165 170 175
 Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp
 180 185 190
 Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro
 195 200 205
 Gly Gly Gly Asp Ala Gln Pro Pro Lys Ser Asp Gly Arg Asp Ala Gln
 210 215 220
 Pro Pro Lys Ser Asp Gly Gly Asp Ala Gln Pro Pro Lys Ser Asp Gly
 225 230 235 240
 Arg Asp Ala Gln Pro Pro Lys Ser Asp Gly Gly Asp Ala Gln Pro Pro
 245 250 255
 Lys Ser Asp Ala Gln Arg Pro Phe Ser His Trp Ile Ala Gly Trp Phe
 260 265 270
 Leu Val Leu Leu Ala Val Lys Ala Ser Asp His Phe
 275 280

<210>7

<211>268

<212>PRT

<213> 华支睾吸虫 Cs34 抗原

<400>7

Met Lys Phe Leu Lys Leu Thr Ile Ser Ala Ala Leu Phe Leu Asn Val
 1 5 10 15
 Leu Cys Ser Ala Glu Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro
 20 25 30
 Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys

35 40 45
 Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp
 50 55 60
 Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro
 65 70 75 80
 Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp
 85 90 95
 Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro
 100 105 110
 Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys
 115 120 125
 Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp
 130 135 140
 Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro
 145 150 155 160
 Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp
 165 170 175
 Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro
 180 185 190
 Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys
 195 200 205
 Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp
 210 215 220
 Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Gln Pro Pro
 225 230 235 240
 Met Ser Gly Ala Gln Arg Pro Phe Ser His Trp Ile Ala Gly Trp Phe
 245 250 255
 Leu Val Leu Leu Ala Val Lys Ala Ser Asp His Phe
 260 265

<210>8

<211>248

<212>PRT

<213> 华支睾吸虫 Cs34 抗原

<400>8

Glu Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp
 1 5 10 15
 Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro
 20 25 30

Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys
 35 40 45
 Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp
 50 55 60
 Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro
 65 70 75 80
 Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp
 85 90 95
 Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro
 100 105 110
 Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys
 115 120 125
 Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp
 130 135 140
 Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro
 145 150 155 160
 Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp
 165 170 175
 Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro
 180 185 190
 Gly Asp Arg Asp Ala Lys Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Lys
 195 200 205
 Pro Pro Met Pro Gly Asp Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Ser Gly Ala
 210 215 220
 Gln Arg Pro Phe Ser His Trp Ile Ala Gly Trp Phe Leu Val Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Val Lys Ala Ser Asp His Phe
 245

<210>9

<211>196

<212>PRT

<213> 原核表达的重组质粒 pPET28b-Cs2

<400>9

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
 20 25 30

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

<210>10

<211>323

<212>PRT

<213> 原核表达的重组质粒 pPET28b-Cs3

<400>10

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

	85	90	95
Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala			
	100	105	110
Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly			
	115	120	125
Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro			
	130	135	140
Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg			
	145	150	155
155	160		
Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met			
	165	170	175
Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala			
	180	185	190
Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly			
	195	200	205
Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro			
	210	215	220
Pro Met Pro Gly Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Arg			
	225	230	235
235	240		
Asp Ala Gln Pro Pro Met Pro Gly Gly Gly Asp Ala Gln Pro Pro Lys			
	245	250	255
Ser Asp Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Lys Ser Asp Gly Gly Asp Ala			
	260	265	270
Gln Pro Pro Lys Ser Asp Gly Arg Asp Ala Gln Pro Pro Lys Ser Asp			
	275	280	285
Gly Gly Asp Ala Gln Pro Pro Lys Ser Asp Ala Gln Arg Pro Phe Ser			
	290	295	300
His Trp Ile Ala Gly Trp Phe Leu Val Leu Leu Ala Val Lys Ala Ser			
	305	310	315
315	320		
Asp His Phe			

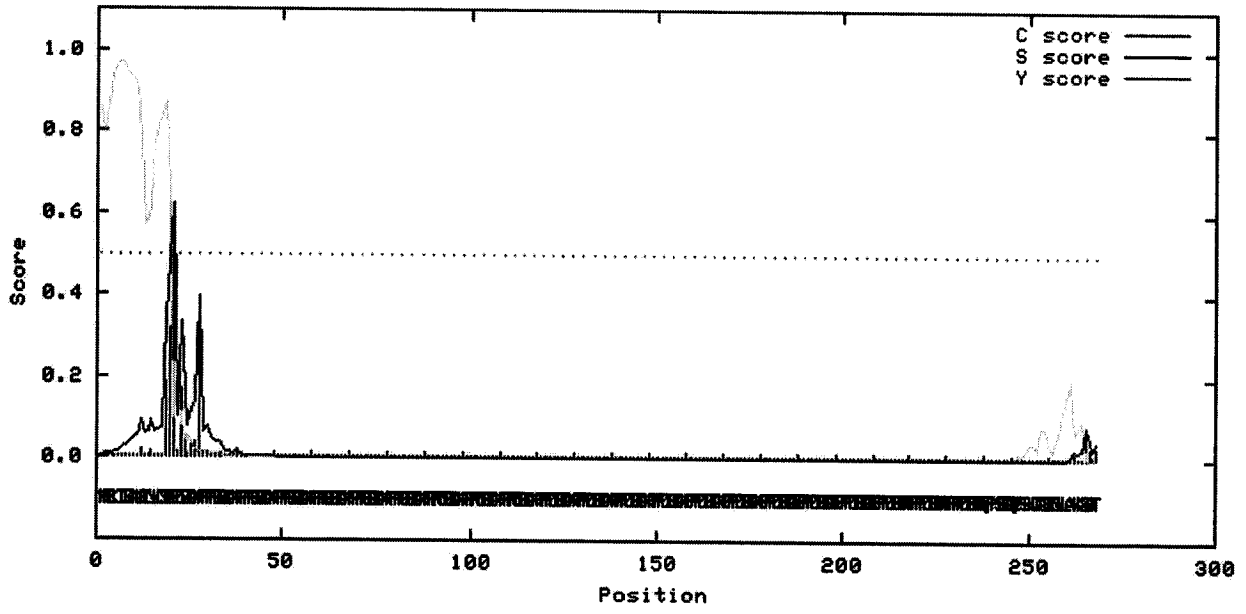


图 3

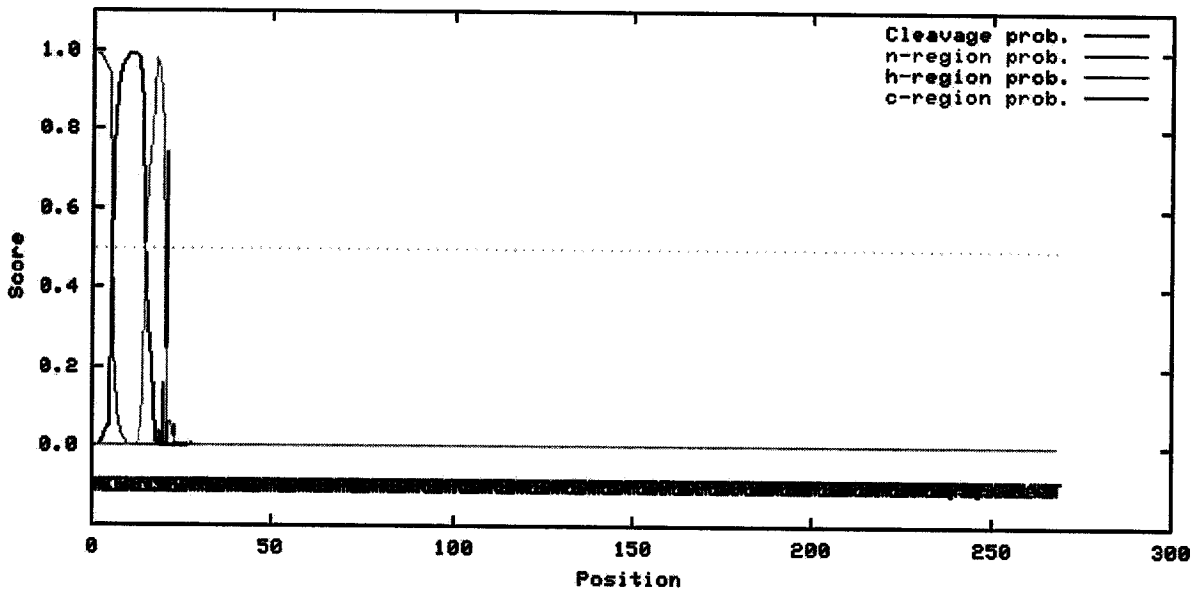


图 4

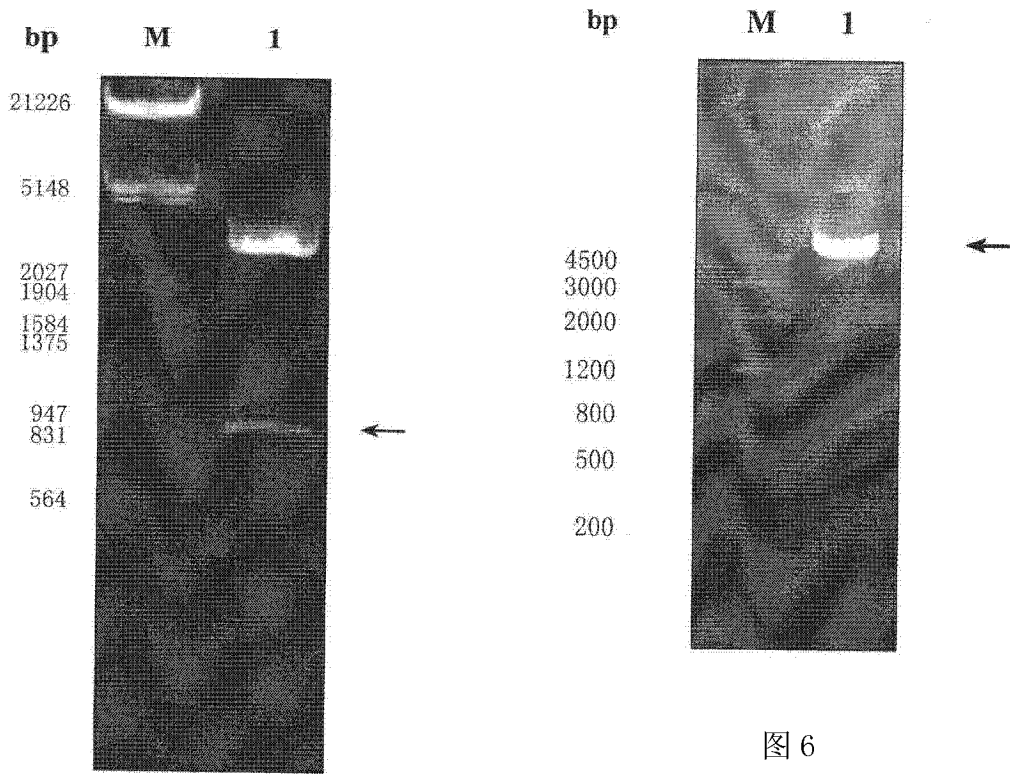


图 6

图 5

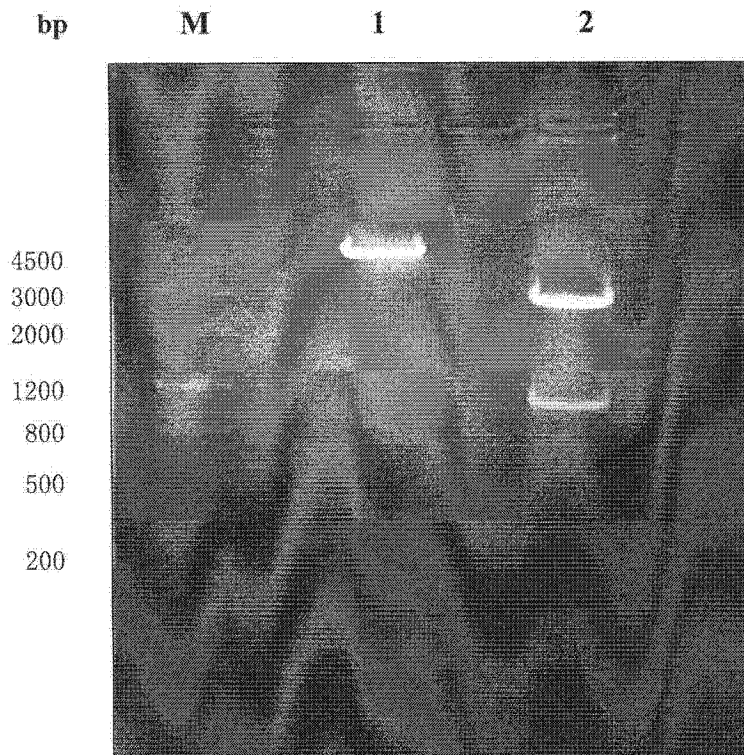


图 7

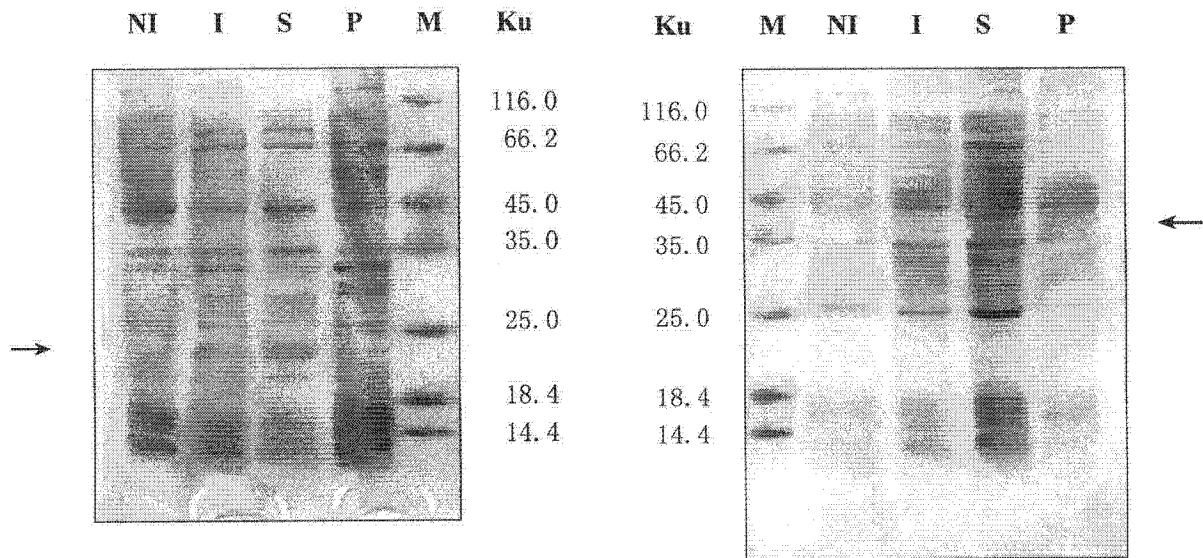


图 8

图 9

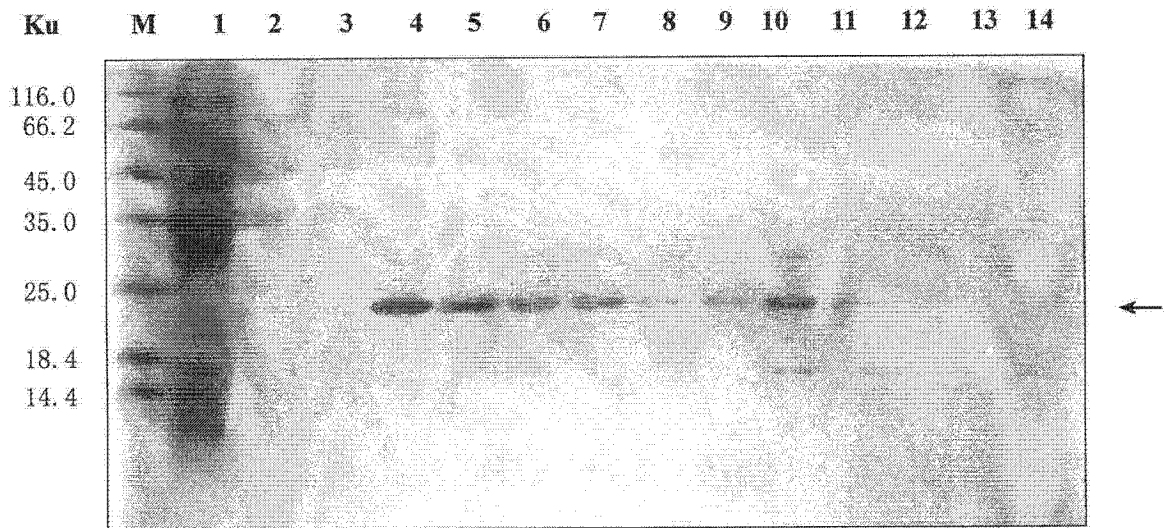


图 10

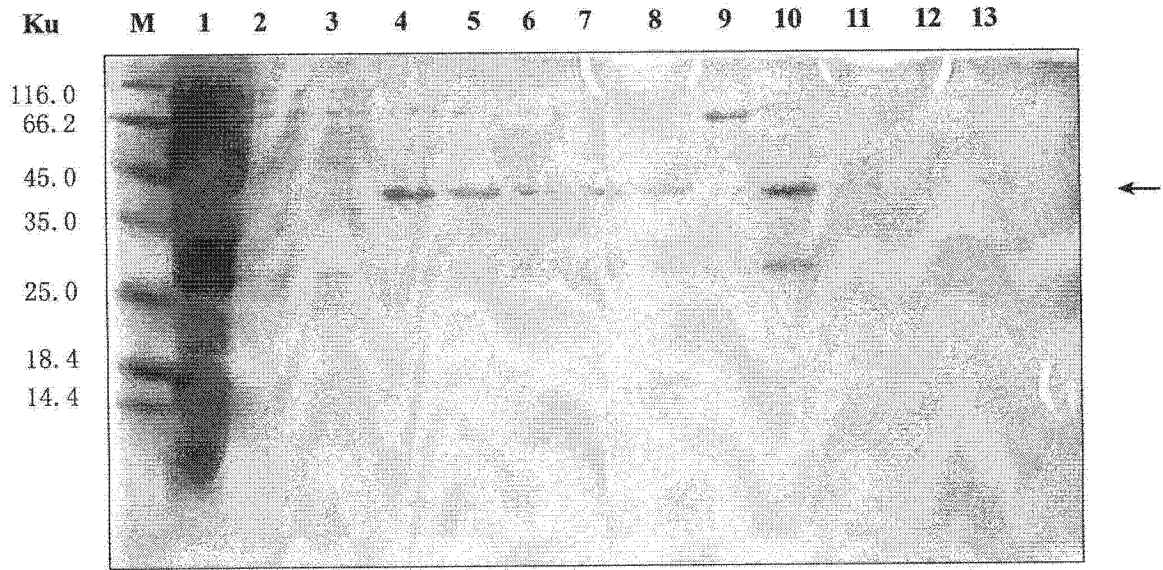


图 11

Cs2可溶性纯化重组蛋白检测血清抗体散点图

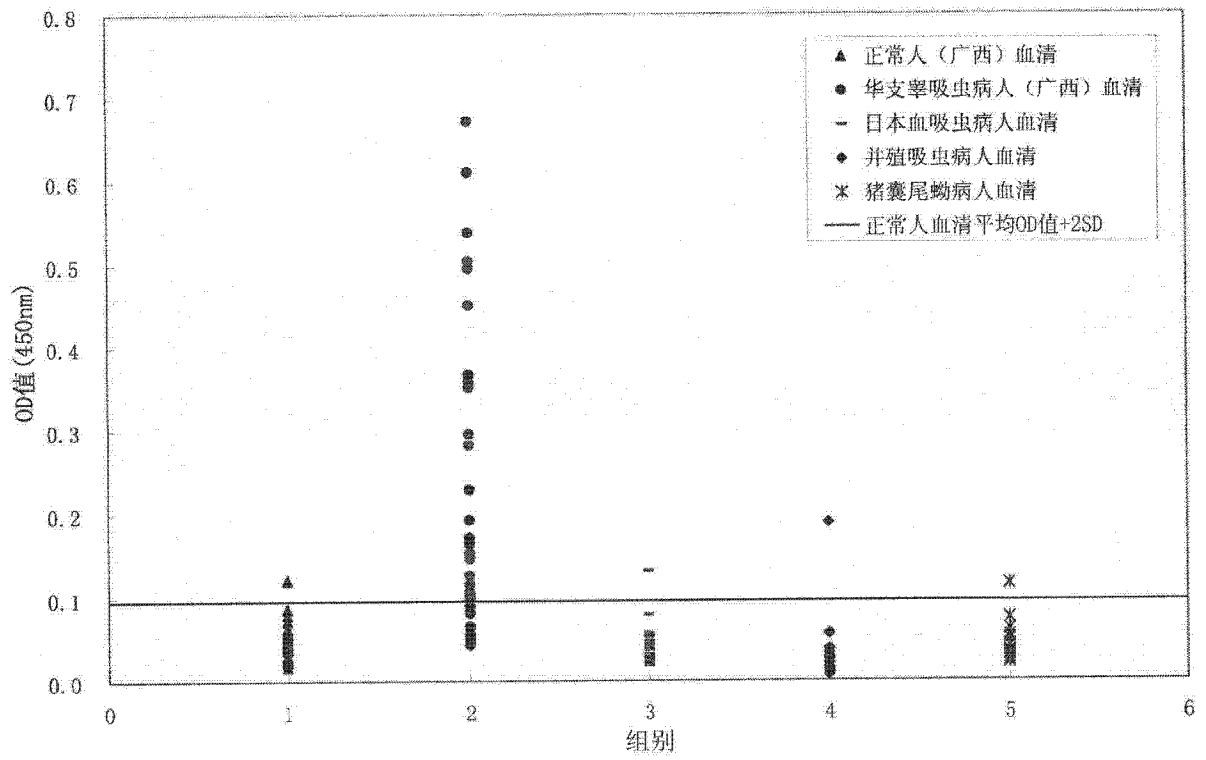


图 12

Cs3可溶性纯化蛋白检测血清抗体

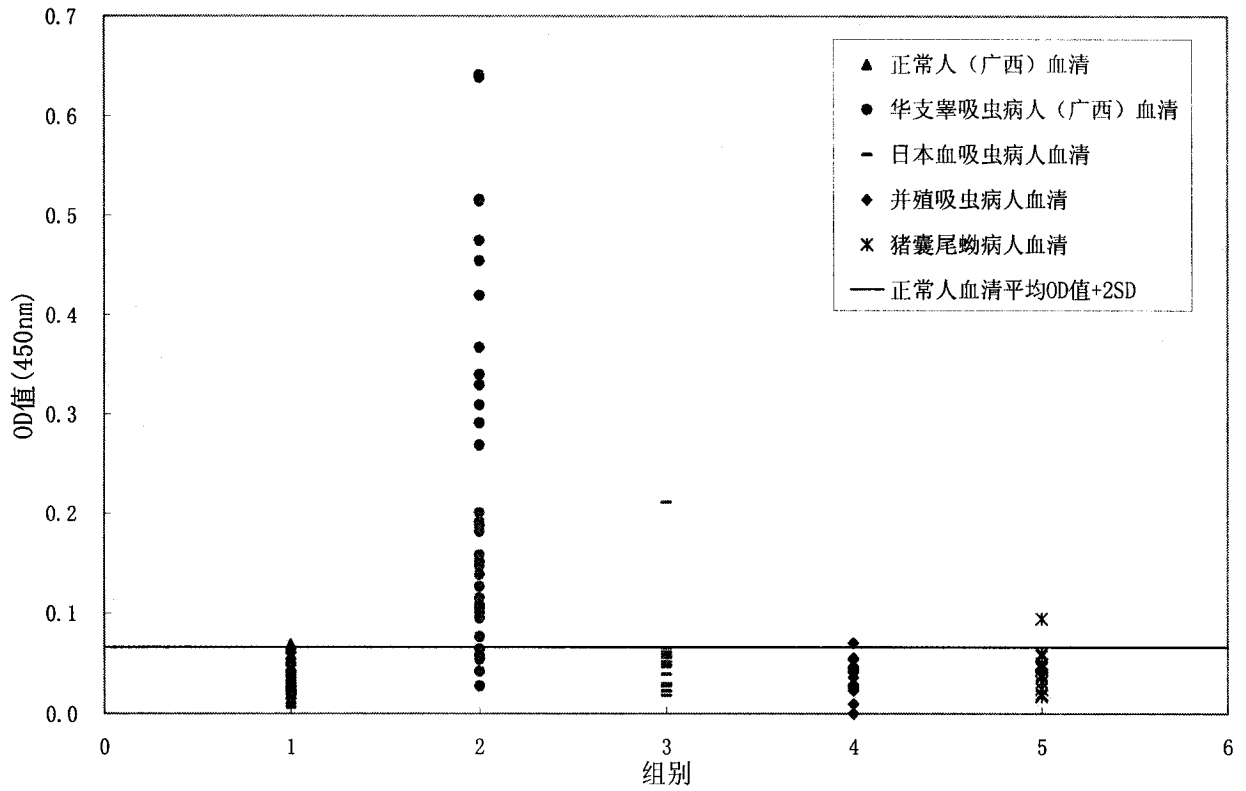


图 13

专利名称(译)	华支睾吸虫特异性PPMP型抗原及其应用		
公开(公告)号	CN102250231B	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201010178684.6	申请日	2010-05-19
[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	许学年 周岩 董玉婷 包意芳 徐斌 冯正		
发明人	许学年 周岩 董玉婷 包意芳 徐斌 冯正		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/18 C12N15/12 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K48/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P33/12 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 C07K14/43559 C07K16/18 G01N33/6803 G01N2333/43547		
审查员(译)	王岩		
其他公开文献	CN102250231A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了三种华支睾吸虫的特异性PPMP型抗原，还提供了三种特异性的结合华支睾吸虫的特异性抗原的抗体。本发明还提供了三种分离的华支睾吸虫的特异性PPMP型抗原蛋白，由华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码。本发明还提供了三种含有华支睾吸虫的特异性抗原基因的载体。本发明还提供了三种试剂盒。本发明还提供了上述的三种华支睾吸虫的特异性抗原蛋白、抗体、载体和试剂盒在制备诊断华支睾吸虫病的应用。本发明的华支睾吸虫PPMP型抗原具有较高的免疫原性，易制备多/单克隆抗体，进而进一步应用于抗原检测等方面，实验证明实验动物(小鼠)对该抗原免疫应答较强。

