



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102964435 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201110255827. 3

(22) 申请日 2011. 08. 31

(73) 专利权人 北京利德曼生化股份有限公司研  
发中心

地址 100176 北京市北京经济技术开发区宏  
达南路 5 号 1 号楼四层

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京风雅颂专利代理有限公  
司 11403

代理人 王安娜 李翔

(51) Int. Cl.

*C07K 14/315* (2006. 01)

*C12N 15/31* (2006. 01)

*C12N 15/63* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101302526 A, 2008. 11. 12, 全文.

CN 102010870 A, 2011. 04. 13, 全文.

陈希. 细菌溶血素的分类及代表性溶血素研  
究进展. 《中国农学通报》. 2008, 第 24 卷 (第 8  
期), 16-22.

审查员 吕健

权利要求书1页 说明书10页  
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

截短型溶血链球菌溶菌素 O 及利用其的检测  
试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种截短型溶血链球菌溶菌素 O 基因与 ASO 检测试剂盒。本发明人克隆部分 SLO 基因片段, 将该部分的 SLO 基因克隆到大肠杆菌等表达载体中, 使之产量表达并利于纯化。具体而言, 本发明人提供一种 DNA 序列, 其碱基序列如 SEQ ID NO :1 所示。根据本发明, 截短的 SLO 序列能使 SLO 蛋白的产量大大提高, 每升细菌培养物能纯化得到 150mg 以上的 SLO 蛋白, 纯度 90% 以上, 经过免疫学实验证明, 这一分段表达的 SLO 依然保持了特异的免疫原性。

1. 一种溶血链球菌溶血素 O, 其特征在于,  
所述溶血链球菌溶血素 O 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。
2. 一种 DNA, 其序列编码权利要求 1 所述的溶血链球菌溶血素 O。
3. 根据权利要求 2 所述的 DNA, 其序列为如 SEQ ID NO :1 所示的序列或其简并密码子突变序列。
4. 一种表达载体, 其含有权利要求 2 或 3 所述的 DNA 序列。
5. 一种制备溶血链球菌溶血素 O 的方法, 其包括用权利要求 4 所述的表达载体转化宿主细胞, 培养转化体, 获得重组的溶血链球菌溶血素 O。
6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述宿主细胞是大肠杆菌。
7. 一种抗溶血链球菌溶血素 O 检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包含缓冲液、叠氮钠以及包被权利要求 1 所述的溶血链球菌溶血素 O 的胶乳 ; 所述缓冲液为 : pH6.0-8.0 的磷酸盐缓冲液, 或 pH8.5-9.5 的硼酸缓冲液, 或 pH8.0-9.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 或 pH8.0-9.6 的碳酸缓冲液。
8. 根据权利要求 7 所述的抗溶血链球菌溶血素 O 检测试剂盒, 其中, 包含如下工序 : a) 将胶乳微球用缓冲液稀释, 将缓冲液溶解的权利要求 1 所述的溶血链球菌溶血素 O 加入到所述胶乳微球的稀释液中, 室温搅拌后, 收集沉淀 ; b) 用缓冲液重悬所述沉淀, 调整所述胶乳浓度至规定浓度。

## 截短型溶血链球菌溶菌素 O 及利用其的检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种重组蛋白基因以及试剂盒。更具体而言,涉及一种截短型溶血链球菌溶菌素 O 重组蛋白与 ASO 检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 溶血链球菌溶血素 O(Streptolysin O, SLO) 是多种溶血性链球菌都会表达的一种分泌型蛋白,人在感染溶血性链球菌后会对 SLO 产生特异抗体。抗链球菌溶血素 O(ASO) 的检测,是临床诊断溶血性链球菌感染的重要指标之一。提纯的 SLO 主要来源于溶血链球菌中 SLO 的提纯,以及在大肠杆菌表达菌株中表达 SLO 蛋白并纯化。以上两种方法均存在一些局限性,从溶血链球菌中提纯 SLO,得率低,难以大规模生产,同存在生物安全隐患;利用原核表达系统表达纯化 SLO,由于 SLO 蛋白对细菌细胞具有毒性,一般难以大量表达。在现有技术中已有人报道了,每升细菌培养物(7-8g 菌体湿重/升)能纯化出 38.8mg 左右蛋白,而其中目的蛋白的纯度只有 40%(参见非专利文献 1:Sandra Camprub<sup>1</sup>, Marc Bruguera, Francesca Canalias. International Journal of Biological Macromolecules, 38(2006)134-139)。175-574

[0003] 全长 SLO 基因是含有 571 个氨基酸残基(aa)的蛋白,通过结构预测发现,这一蛋白大致可以分为前后三个区域。其中,第一段区域 1-77 个 aa,是胞外分泌信号肽,具有细胞毒性;最后一段 459-571aa 具有细胞膜铆定功能,是 SLO 的毒性相关结构域(参见非专利文献 2:Silvia Weis, Michael Palmer. Biochimica et Biophysica Acta, 1510(2001)292-299)。我们选择对 101-400aa 的片段进行克隆表达。

[0004] 现有技术中报道的表达方案,一般只去除蛋白的信号肽部分,表达剩余大部分蛋白,但因为剩余部分的毒性影响细胞生长,产量也不高。由非专利文献 1 的记载可知,每升细菌培养物(7-8g 湿菌体/升)能纯化出 38.8mg 左右蛋白,而其中目的蛋白的纯度只有 40%。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的问题

[0006] 本发明的目的在于提供一种能在表达载体中大量表达 SLO 的基因以及基因工程菌,并利用该 SLO 制备 ASO 检测试剂盒。

[0007] 解决问题的手段

[0008] 本发明人将 SLO 的结构域(Domain)1 和 4 截去,将剩余的截短的 SLO 基因克隆到大肠杆菌等表达载体中,使之大量表达并利于纯化。具体而言,本发明人提供如下的技术方案。

[0009] 1. 一种 DNA 序列,其碱基序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0010] 2. 一种 DNA 序列,其为编码如下蛋白质的序列:

[0011] (a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示;

[0012] (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸序列且具有溶血链球菌溶血素 O 免疫原性的蛋白质。

[0013] 3. 一种溶血链球菌溶血素 O, 其特征在于,

[0014] (a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示;

[0015] (b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸序列且具有溶血链球菌溶血素 O 免疫原性的蛋白质。

[0016] 4. 一种表达载体, 其含有权利要求 1 或 2 所述的 DNA 序列。

[0017] 5. 一种制备溶血链球菌溶血素 O 的方法, 包括用技术方案 4 所述的表达载体转化宿主细胞, 培养转化体, 获得重组的制备溶血链球菌溶血素 O。

[0018] 6. 根据技术方案 5 所述的方法, 其特征在于, 宿主细胞是大肠杆菌。

[0019] 7. 一种抗溶血链球菌溶血素 O 检测试剂盒, 其特征在于, 包含缓冲液、叠氮钠以及包被技术方案 3 所述的溶血链球菌溶血素 O 的胶乳。

[0020] 8. 一种抗溶血链球菌溶血素 O 检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包含如下工序 :a) 将胶乳微球用缓冲液稀释, 将缓冲液溶解的技术方案 3 所述的溶血链球菌溶血素 O 加入到所述胶乳微球的稀释液中, 室温搅拌后, 收集沉淀 ;b) 用缓冲液重悬所述沉淀, 调整所述胶乳浓度至规定浓度。

[0021] 技术效果

[0022] 根据本发明, 截短的 SLO 序列能使 SLO 蛋白的产量大大提高, 每升细菌培养物能纯化得到 150mg 以上的 SLO 蛋白, 纯度 90% 以上。将 SLO 重组抗原用来研制 ASO 胶乳增强试剂盒, 发现研制的 ASO 试剂盒检测临床标本结果和对照 ASO 试剂盒测试结果相关性很好, 证明表达的 SLO 依然保持了特异的免疫原性。

## 附图说明

[0023] 图 1 是 ASO 试剂定标曲线, 曲线中的每一个点代表一个含量的校准品, X 轴表示 ASO 含量, Y 轴表示吸光度;

[0024] 图 2 是自制试剂和对照试剂测定 50 人份血清相关性分析相关性图表;

[0025] 图 3 是表示 SLO 基因的克隆的电泳图;

[0026] 图 4 是经 IPTG 的诱导过的截短型 SLO 蛋白电泳图, (+) 表示经 IPTG 的诱导, (-) 表示未经 IPTG 的诱导;

[0027] 图 5 是上清液和沉淀中的截短型 SLO 蛋白电泳图。

## 具体实施方式

[0028] 本发明的截短型溶血链球菌溶菌素 O 基因

[0029] 本发明提供一种碱基序列如 SEQ ID NO :1 所示的 DNA 序列, 以及编码如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列的 DNA 序列。根据简并密码子原理, 简并密码子之间的突变并不改变氨基酸序列, 这种突变不会影响蛋白质本身的性质, 因此, 这一类的变异也属于本申请的专利保护范围之内。此外, 与本发明提供的 DNA 序列对应的 RNA 序列也可实现本发明的效果。

[0030] 作为本发明的对象的基因序列, 并不限于前述 SEQ ID NO :1 所示的 DNA 序列以及其中的简并密码子突变序列, 还包括编码与该蛋白质具有同等功能的蛋白质的其他基因序

列。作为具有同等功能的蛋白质,例如可以为在 SEQ ID NO :2 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸序列且具有 SLO 免疫原性的蛋白质。

[0031] 本发明的基因序列可以通过 PCR 方式从链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的基因组 DNA 中扩增,或可通过基因合成获得,国内可以进行基因合成的公司有上海生工,上海旭冠,北京英骏等。

[0032] 本发明的蛋白质

[0033] 本发明还提供一种溶血链球菌溶血素 O,其特征在于,(a) 氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示;(b) 在 (a) 限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸序列且具有 SLO 免疫原性的蛋白质。

[0034] 此类蛋白质可以为由 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列中缺失、取代、插入和 / 或添加上述数量的氨基酸残基后的氨基酸序列组成,且具有 SLO 免疫原性的蛋白质。此外,此类蛋白质还可以为具有与 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列有约 70% 以上、更优选为 80% 以上、进一步优选为 90% 以上、最优选为 95% 以上的同一性的氨基酸序列且具有 SLO 免疫原性的蛋白质。

[0035] 此类蛋白质可通过使用《Molecular Cloning3》、《Current Protocols in Molecular Biology》等记载的定点诱变法获得。

[0036] 本发明中,在蛋白质的氨基酸序列中取代、缺失或添加一个或几个氨基酸序列,是指在同一序列中的任意 1 个或多个氨基酸序列的位置上的 1 个或多个氨基酸残基取代、缺失或添加,并且可同时发生取代、缺失或添加中的两种以上。

[0037] 下面例举可互相取代的氨基酸残基,同一组中包含的氨基酸残基可互相取代。A 组:亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、蛋氨酸、o-甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸;B 组:天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸;C 组:天冬酰胺、谷氨酰胺;D 组:赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙氨酸;E 组:脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸;F 组:丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸;G 组:苯丙氨酸、酪氨酸。

[0038] 本发明的蛋白质也可以通过 Fmoc 法(苄氧羰基法)、tBoc 法(叔丁氧羰基法)等化学合成法合成。并且,也可以利用 Advanced Chem Tech 公司、铂金埃尔默(Perkin Elmer)、Pharmacia 公司、Protein Technology Installment 公司、Synthecell-Vega 公司、PerSeptive 公司、岛津制作所等制造的肽合成仪进行化学合成。

[0039] 本发明的载体及使用该载体转化的大肠杆菌

[0040] 本发明提供含有上述基因序列的载体,所述载体是指携带靶 DNA 片段进入宿主细胞进行扩增和表达的工具。作为载体,可例举出质粒、噬菌体、病毒、粘粒等生物工程领域中常用的载体。本发明的载体通常包括表达盒,该表达盒含有的结构要素为:(1) 在宿主细胞内可转录的启动子;(2) 在该启动子的正义方向或反义方向上连接的上述基因序列;以及(3) 涉及 RNA 分子的转录终止以及多聚腺苷化作用,在宿主内起作用的信号。本发明中,优选表达载体为 pET28b 载体,优选宿主为大肠杆菌 DH5  $\alpha$ 、DE3,但本发明的载体和宿主并不限于此。

[0041] 分子克隆技术通常特指基因克隆(gene cloning)或 DNA 重组技术(recombinant DNA technology)。基因克隆主要包括:①连接外源基因和克隆载体,构建重组 DNA 分子,②

将重组 DNA 分子转入受体细胞,使外源基因随受体细胞分裂而得以复制、繁殖。

[0042] 基因克隆的基本方法主要有以下操作和结果:

[0043] (1) 包括有目的基因在内的 DNA 片断插入到空载体中,空载体包括可以包括多种常见的检测标记(例如荧光标记、抗生素标记等报告基因)和酶切位点。重组载体可以采用空载体本身多克隆位点的多种核酸内切酶(如 NdeI、NcoI、EcoRI、HindIII, BamHI 等),可以先用酶线性化空载体,与采用相同核酸内切酶处理的目的基因片段相连接,构建本发明的重组表达载体。本发明选用 NcoI 和 XhoI 双酶切 pET28b 及其连接的 PCR 产物片段,经连接酶连接,构建本发明的重组 pET28b-SLO。

[0044] (2) 重组载体 pET28b-SLO 可以通过生物分子学领域常见的方法重组表达质粒转化、转导或者转染到宿主细胞中,如氯化钙法化学转化,高压电击转化,本发明优选化学法进行转化;所述的宿主细胞可以为原核细胞或者真核细胞,包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、毕赤酵母细胞或者动植物细胞,本发明优选大肠杆菌细胞 BL21 (DE3)。

[0045] (3) 将重组表达质粒 pET28b-SLO 转化至 BL21 (DE3) 细胞中后,即得到生产 SLO 抗原的基因工程菌株,基因工程菌株经过大量培养、诱导后,可以通过离心方法分析重组细胞和培养基,用高压匀浆或者超声的方法破碎细胞,用离心或者过滤方法去除细胞碎片,用亲和层析方法从上清液中纯化 SLO 抗原。对纯化的 SLO 抗原可以用如下方法进行纯度确定,如电泳分析法(SDS-PAGE)、抗原抗体法、蛋白质谱法、扩散分析、恒溶度法等。

[0046] 本发明的 ASO 检测试剂盒以及使用方法

[0047] 本发明所述 SLO 抗原基因工程菌的构建方法和一种可以定量检测溶血素“O”试剂盒。

[0048] 优选的情况下,本发明的试剂盒包括 SLO 抗原、聚苯乙烯微球和牛血清白蛋白等,聚苯乙烯微球在试剂盒中的作用是起到胶乳增强作用,牛血清白蛋白是起稳定剂作用,由于用本发明所述的方法可以制备大量表达的 SLO 抗原,并且重组抗原的特异性很好,所以用本发明所述的 SLO 抗原制备的抗链球菌素 O 测定试剂盒具有灵敏度高的优点,并且可以进行规模化制备。免疫胶乳增强试剂盒由两种试剂组成:试剂 1 为酸碱缓冲液 +0.1% BSA 溶液,试剂 2 为:将包被好的微球用试剂 1 充分悬浮的乳浊液。可以使用的缓冲液包括:pH6.0-8.0 的磷酸盐缓冲液(50mM),pH8.5-9.5 的硼酸缓冲液,pH8.0-9.5 的 Tris-HCl 缓冲液,pH8.0-9.6 的碳酸缓冲液。优选 pH7.0-8.0 的缓冲液,但不仅限于上述缓冲液组分。为了保证乳浊液的分散性,有时也可以添加 0.1% TritonX-100。

[0049] 为了保证目的蛋白在试剂盒中的稳定性,可加入一定比例的叠氮钠(0.01% -0.1%),DTT(1mM)等试剂。

[0050] 抗链球菌素 O 测定试剂盒临床上用于测定人体血清或血浆中抗链球菌素 O 的含量。链球菌素 O(SLO)是链球菌的一种胞外产物,它能溶解细胞膜从而导致溶血。抗链球菌素(ASO)是 SLO 的抗体。ASO 测试能为早期的链球菌感染提供证据,主要应用于急性风湿热、链球菌感染后的血管球性肾炎、患有咽炎的个人以及其它急性感染的检验。

[0051] 上述 ASO 检测试剂盒的制备方法,包含如下工序:a)用浓度为 50mM 的 pH7.0 的磷酸盐缓冲液,将胶乳微球进行稀释,在分光光度计上检测 OD 值为 2.0-2.5(波长 600nm,光径 1cm),将缓冲液溶解的抗原加入到所述胶乳微球的稀释液中,以 50rpm/min 的搅拌速度,在室温下搅拌 3 小时,25000g 条件下离心 1 小时,收集沉淀;b)用含有 0.1% BSA 的 pH 为

7.0 的磷酸盐缓冲液重悬沉淀,并将浓度调整至 OD 值为 1.2-1.4(波长 600nm,光径 1cm)。

[0052] 实施例

[0053] 下面,通过实施例对本发明进行更进一步的说明,但是,本发明并不限于如下实施例。

[0054] 实验材料

[0055] 1 菌种

[0056] 本实验用到的大肠杆菌 DH5  $\alpha$  和 BL21 (DE3) 购自天根公司。

[0057] 链球菌 *Streptococcus pyogenes* 由军事医学科学院提供。

[0058] 2 载体

[0059] 本实验涉及到的表达载体 pET28b 由本实验室保存。

[0060] 3 引物

[0061] 本实验用到的引物 SLO-1/SLO-2 均为生工合成。

[0062] SLO-1 :ATCGCATATG AAACAAAACACTGCTAGTACAGAAAC, 附加 NdeI 酶切位点 ;SLO-2 : ATCGCTCGAG AGCTTCATTGCTGACACCTTTTC, 附加 XhoI 酶切位点。

[0063] 4 培养基 :

[0064] LB 培养基 :蛋白胨 :10g/L

[0065] 酵母粉 :5g/L

[0066] NaCl :10g/L

[0067] 121 $^{\circ}$ C 20min 灭菌。

[0068] 5 其他

[0069] 本实施例中所用到的 Taq 酶与 dNTP、限制性内切酶,修饰酶与连接酶等购自 Takara 公司,镍柱购自 GE Company 的 HisTrap H. P。

[0070] 实施例 1

[0071] 截短的 SLO 基因的克隆和表达载体的构建

[0072] 将链球菌菌种接种于肉浸液肉汤培养基 (Meat Infusion Broth), 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 18-24 小时。离心收集菌体,沉淀重新悬浮于 1ml TE (pH8.0) 中。加入 6  $\mu$ l 150mg/ml 的溶菌酶, 37 $^{\circ}$ C 作用 2h, 再加入 2mol/L NaCl 150  $\mu$ l, 10% SDS 110  $\mu$ l, 20mg/ml 的蛋白酶 K 3  $\mu$ l, 50 $^{\circ}$ C 作用 15min。之后将菌液分到 10ml 离心管中,加等体积的酚 :氯仿 :异戊醇 (25 :24 :1), 混匀后放置 5min。12000rpm 离心 10min, 吸取上清。重复抽提两次。在上清中加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀, 室温放置 10min。12000rpm 离心 10min, 沉淀用 75% 的乙醇洗涤、凉干后, 溶于 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中。

[0073] 按照 SLO 基因序列设计引物 SLO-1/SLO-2, 以纯化的链球菌 DNA 为模板, 扩增 SLO 的第 100-400 位 aa 的基因序列, 约 0.9kb, 参见图 3, 预计表达得到的蛋白大小为 30-35kD。将扩增正确的目的条带回收, 用 NcoI 和 XhoI 消化后, 连入同样酶切的 pET28b 载体。转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$ , 提取质粒并酶切鉴定, 得到的阳性克隆命名为 pET28b-SLO。将酶切鉴定为阳性的质粒转化表达菌种 BL21 (DE3), 然后涂布在含有卡那霉素 (100ug/ml) 的 LB 固体培养基上, 经抗性筛选可以得到 SLO 抗原基因工程菌。酶切阳性的质粒测序, 测序结果表明表达载体构建正确。实施例 2

[0074] 截短型 SLO 蛋白的表达

[0075] 从 LB 固体培养基上挑选 SLO 基因工程菌落,分别接种于含有 100ug/ml 的 LB 培养基中 37℃ 过夜培养,第二天 1:1000 稀释于 LB 培养基中,37℃ 培养至 OD2.0,加入终浓度 1mM 的 IPTG 进行诱导,4 小时后收获菌液。将未加 IPTG 的菌液作为未诱导的对照。

[0076] 分别取诱导前后的菌液各 500  $\mu$  l,离心后去上清,菌体用 200  $\mu$  l 的蛋白上样缓冲液重悬,煮沸 5min 后离心,上清用于 SDS-PAGE 检测。考马斯亮蓝的染色结果显示,经过 IPTG 的诱导,在预测的分子量处有一条特异的浓集的蛋白条带,而未诱导的菌体则没有,具体结果请见图 4。选择表达水平高的菌株为工程菌株。

[0077] 诱导后的细菌超声破碎后离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测,结果表明重组蛋白大部分以可溶形式存在于上清中,具体结果请见图 5。

[0078] SDS 电泳结果表明,在预期大小 (30-35kd) 很大一部分 SLO 蛋白都以可溶的形式在上清中存在,因此可用镍柱亲和层析的方法将目的蛋白纯化。纯化后电泳检测结果表明,目的蛋白的纯度可以达到 95% 以上。1L 培养基大约可纯化 150mg 目的蛋白。

[0079] 重组 SLO 蛋白的免疫原性测定

[0080] 本试验用 ELISA 方法验证了重组蛋白的免疫原性。ELISA 吸光值读数如表 1 所示。以 BSA 包被的小孔为阴性对照,对照与样品各做 3 个重复,ASO 的稀释度为 1:20000。ELISA 数据表明,重组的 SLO 蛋白与 ASO 有很强的特异免疫反应。

[0081] 表 1 SLO 重组蛋白的 ELISA 检测

[0082]

CK- (BSA)	0.003	0.001	-0.001
SLO 提纯蛋白	0.736	0.852	0.796

[0083] 实施例 3

[0084] 工程菌的保存、扩大培养及目的蛋白的纯化

[0085] 菌种保存方法:

[0086] 挑取 LB+Kan(100ug/ml) 固体平板上 pET28b-SLO 基因工程菌落,接种于 LB+kan(100ug/ml) 的液体培养基中,待 OD600 生长至 2.0 左右后,将其保存至含有甘油的冻存管中,甘油的终浓度为 15%。

[0087] 细胞活化和摇瓶发酵操作方法:

[0088] 取冻存管、待菌液溶解后,在 LB+Kan(100ug/ml) 固体平板上进行划线培养 (37℃),长出单菌落后,挑取单菌落接种于 LB+Kan(100ug/ml) 的液体培养基中,37℃ 150rpm/min 过夜培养 (约 12h),按 0.1% 的接种量接种于 LB+Kan(100ug/ml) 的液体培养基中 37℃ 220rpm/min 培养。待培养液生长到 OD600 = 1 左右时,加诱导剂 IPTG,终浓度为 1mM,30 度培养过夜,然后破胞提取 SLO 蛋白。

[0089] 蛋白的纯化:

[0090] 将发酵得到的菌体用上样缓冲液 (20mM PBS,0.5MNaCl,30mM 咪唑,pH7.4) 重悬,按照 1 克菌体加入 10ml 上样缓冲液 (Loading Buffer) 的比例充分悬浮菌体后,超声波破碎。离心后取上清用 0.45  $\mu$  M 的滤膜过滤,既为镍柱纯化的样品。

[0091] 将上述样品上柱,用 Loading Buffer 冲洗至 OD280 吸收值至直线,用 Elusion Buffer (20mM PBS,0.5MNaCl,300mM 咪唑,pH7.4) 洗脱,收集洗脱峰。

[0092] 实施例 4

[0093] ELISA 和 Western Blot 检测重组蛋白的抗原性

[0094] 用抗 SLO 阴性和阳性血清 1:10000 倍稀释后,按照 ELISA 操作规程包被,分别与提纯的重组蛋白反应。结果显示重组的 SLO 能区分阳性和阴性的血清。Western Blot 中,一抗为抗 SLO 阴性和阳性血清按照 1:10000 倍稀释,二抗为过氧化物酶标记的兔抗人 IgG1:4000 倍稀释液。结果与 ELISA 相同,表示重组 SLO 能够用于检测 SLO 的抗体。

[0095] 实施例 5

[0096] 胶乳增强法试剂盒配置

[0097] SLO 抗原与胶乳的交联:在洁净的容器中将微球用 PBS 稀释五倍,将 PBS 溶解的抗原(1mg/ml,每 0.1ml 胶乳加入 5ml 抗原)缓慢加入到不断搅拌的胶乳微球中。室温搅拌 4 小时;26000g 4 度离心一个小时,将离心管倒置,尽量将上清去除干净,留沉淀。用 PBS+0.1% BSA 缓冲液重悬:由于离心时间较长,沉淀贴壁较紧,重悬时需先用吸管尽量吹打均匀,但应尽量避免起泡沫。然后用超声破碎仪超声混匀(300w,0.6cm 的探头,超声 5 秒,暂停 5 秒,每个离心管超声 5 分钟~10 分钟),至没有明显颗粒。用缓冲液调整胶乳浓度为试剂盒要求浓度。免疫胶乳增强试剂盒由两种试剂组成:试剂 1 为酸碱缓冲液+0.1% BSA 溶液,试剂 2 为:将包被好的微球用试剂 1 充分悬浮的乳浊液。可以使用的缓冲液包括:pH7.0PB(50mM),pH8.5 硼酸缓冲液,pH8.0Tris-HCl 缓冲液,pH9.6 的碳酸缓冲液。优选 pH7.0-8.0 的缓冲液,但不仅限于上述缓冲液组分。

[0098] 为了保证目的蛋白在试剂盒中的稳定性,可加入一定比例的叠氮钠(0.01%-0.1%),DTT(1mM)等试剂。为了保证乳浊液的分散性,也可以添加 0.1% TritonX-100。

[0099] 实施例 6

[0100] ASO 胶乳试剂盒的应用

[0101] 测定步骤:250ul 试剂 1 加入 3 样本,于 37 度 5 分钟后加入 50ul 的试剂 2,在主波长为 600nm、付波长为 700nm 的条件下读取吸光度值,反应五分钟后读取另外一点的吸光度值,经计算得到吸光度差值。

[0102] 制作本发明 ASO 校准品的标准曲线:采用本发明的校准品(制备 5 种不同含量的 0,75IU/ml、150IU/ml、200IU/ml、300IU/ml 的 ASO 校准品),采用奥林帕斯 AU400 生化分析仪器,按照上述测定步骤测得本发明 ASO 校准品曲线。曲线中每个点代表一个含量的校准品。其中 X 轴表示 ASO 的含量;Y 轴表示吸光度。见图 1。

[0103] 相关性实验:

[0104] 使用上述实施例 5 制备的试剂盒(简称本发明试剂)和对照试剂(市售 ASO 试剂),采用奥林帕斯公司制造的 AU400 全自动生化分析仪器对 50 例人血清进行测定,对测定值进行分析。发明试剂按照与上述参数进行测定,对照试剂按照原厂家说明书参数进行测定,利德曼生产的抗链球菌素 O 测定试剂盒说明书所述参数进行测定,测值结果见表 2、图 2。

[0105] 由图 2 结果所知,发明试剂与对照试剂的相关系数为  $R^2 = 0.9994$ ,回归方程为  $Y = 1.0013X - 0.206$ 。该结果标明本试剂与对照试剂测定病人血清 ASO 含量的效果相关性良好,具有很好的特异性和准确性。本发明试剂不限于奥林帕斯 AU400 生化分析仪器,还适用于其它半自动和全自动生化分析仪器。

[0106] 表 2

	本发明试剂 (单位 IU/ml)	对照试剂 (单位 IU/ml)
1	26.84	26.14
2	31.86	30.52
3	57.3	56.15
4	20.43	21.41
[0107] 5	24.55	25.46
6	47.77	47.77
7	122.46	123.98
8	61.36	63.54
9	63.49	62.38

[0108]

10	67.16	66.54
11	235.12	234.56
12	122.98	123.69
13	80.95	83.45
14	22.75	22.63
15	45.63	46.78
16	277.56	278.94
17	211.32	213.45
18	125.64	123.45
19	156.78	158.45
20	78.89	79.65
21	36.78	33.45
22	289.42	290.12
23	45.65	46.58
24	76.54	77.45
25	123.43	120.89
26	136.54	138.42
27	294.6	290.58
28	289.34	288.75
29	266.59	270.32
30	28.92	27.54
31	38.46	39.17
32	56.12	55.45
33	66.46	68.12
34	77.63	78.45
35	75.12	73.15
36	102.01	102.35
37	111.35	119.5

[0109]	38	60.12	58.65
	39	91.23	89.72
	40	78.95	77.35
	41	28.12	26.46
	42	54.23	55.12
	43	47.23	45.13
	44	30.12	28.96
	45	268.34	268.32
	46	125.64	123.51
	47	165.35	165.42
	48	178.65	174.56
	49	187.35	185.46
	50	165.43	165.42

[0110] 工业实用性

[0111] 根据本发明,截短的 SLO 序列能使 SLO 蛋白的产量大大提高,每升细菌培养物能纯化得到 150mg 以上的 SLO 蛋白,纯度 90%以上,经过免疫学实验证明,这一分段表达的 SLO 依然保持了特异的免疫原性,因此,本发明极具工业实用价值。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

<110> 北京利德曼生化股份有限公司研发中心

<120> 截短型溶血链球菌溶菌素O及利用其的检测试剂盒

<130> OICN1030993

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

aaacaaaaca ctgctaglac agaaaccaca acgacaaglg agcaaccaa accagaaagt    60
agtgagctaa ctatcgaaaa agcaggtcag aaaatggatg atatgcttaa ctctaacgat    120
atgattaagc ttgctcccaa agaaatgcca ctagaatctg cagaaaaaga agaaaaaag    180
tcagaagaca aaaaaaagag cgaagaagat cacactgaag aatcaatga caagatttat    240
tactaaatt ataatgagct tgaagtactt gctaaaaatg gtgaaacat tgaaaatfff    300
gttcctaaag aaggcgtaa gaaagctgat aaatttattg tcattgaaag aaagaaaaa    360
aatatcaaca ctacaccagt cgatatttcc attattgact ctgtcactga taggacctat    420
ccagcagccc ttcagctggc taataaaggt tttaccgaaa acaaacccaga cgcggtagtc    480
accaagegaa acccacaana aatccatatt gatttaccag gtatgggaga caaagcaacg    540
gttgaggtea atgaccctac ctatgccaat gtttcaacag ctattgataa tcttgtaac    600
caatggcatg ataattatc tgggtgtaat acgcttctctg ccagaacaca atatactgaa    660
tcaatggtat attetaagtc acagattgaa gcagctctaa atgttaatag caaaatetta    720
gatggtactt taggcattga tttcaagtcg atttcaaaag gtgaaaagaa ggtgatgatt    780
gcagcataca agcaaatfff ttacaccgta tcagcaaac ttctaataa tctgcggat    840
gtgtttgata aatcagtgac ctttaaagat ttgcaacgaa aaggtgtcag caatgaagct    900

```

<210> 2

<211> 300

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

```

Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Ser Glu Gln Pro
1           5           10           15

Lys Pro Glu Ser Ser Glu Leu Thr Ile Glu Lys Ala Gly Gln Lys Met
                20           25           30

Asp Asp Met Leu Asn Ser Asn Asp Met Ile Lys Leu Ala Pro Lys Glu
                35           40           45

Met Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu Asp Lys
                50           55           60

Lys Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys Ile Tyr
65           70           75           80

```

[0002]

Ser Leu Asn Tyr Asn Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly Glu Thr  
 85 90 95

Ile Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp Lys Phe  
 100 105 110

Ile Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro Val Asp  
 115 120 125

Ile Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Arg Thr Tyr Pro Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gln Leu Ala Asn Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala Val Val  
 145 150 155 160

Thr Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly Met Gly  
 165 170 175

Asp Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn Val Ser  
 180 185 190

Thr Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr Ser Gly  
 195 200 205

Gly Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met Val Tyr  
 210 215 220

Ser Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys Ile Leu  
 225 230 235 240

Asp Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly Glu Lys  
 245 250 255

Lys Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val Ser Ala  
 260 265 270

Asn Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val Thr Phe  
 275 280 285

Lys Asp Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala  
 290 295 300

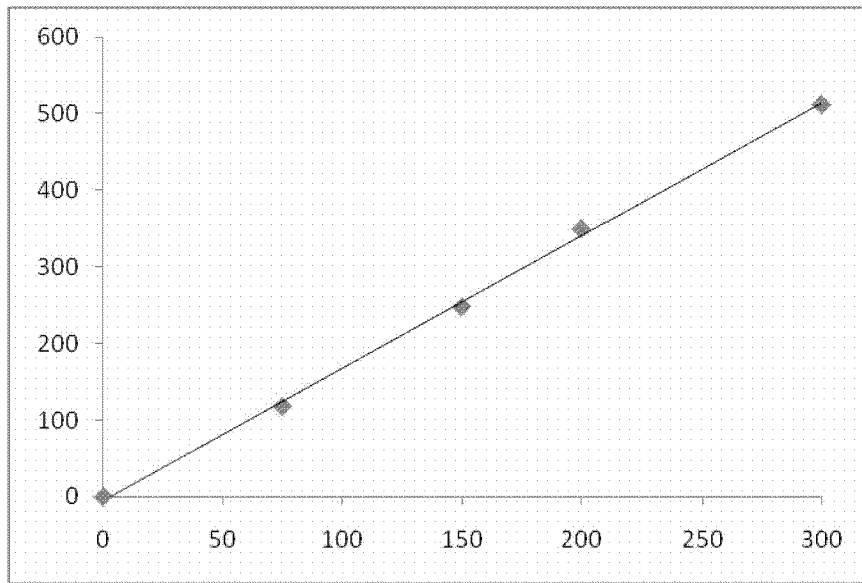


图 1

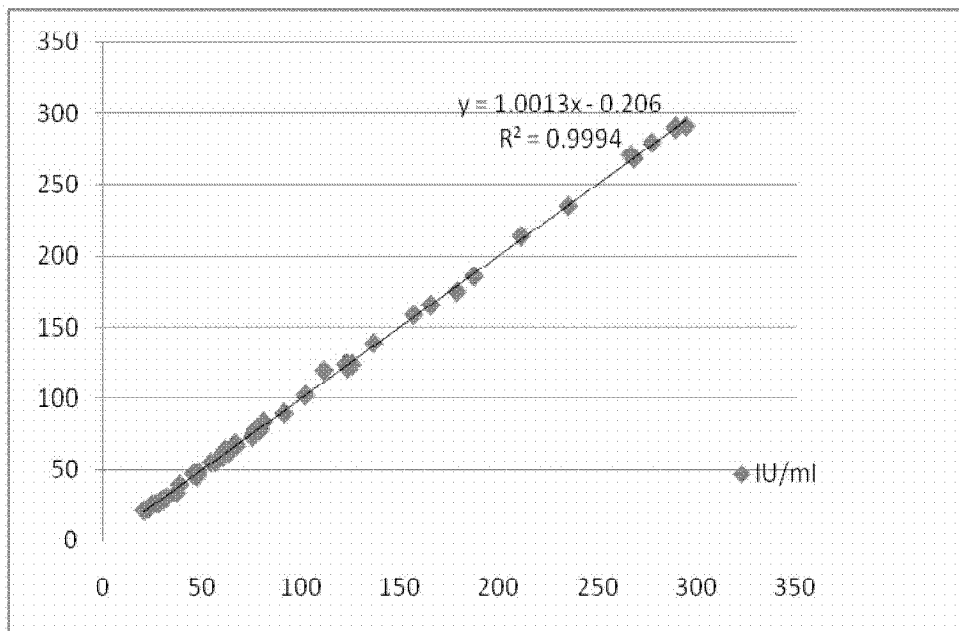


图 2

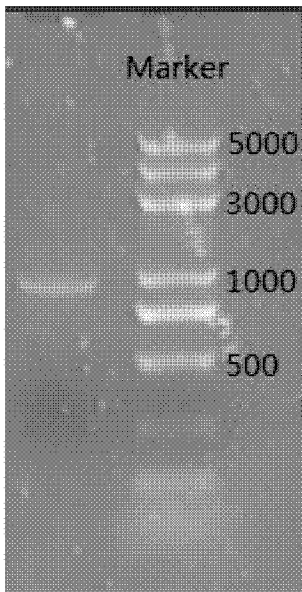


图 3

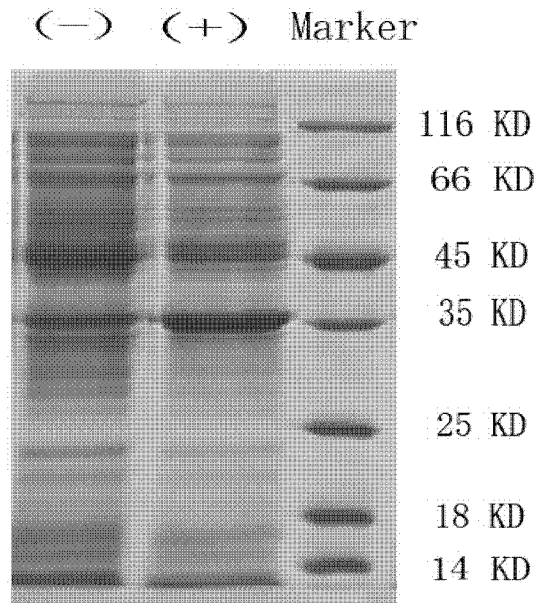


图 4

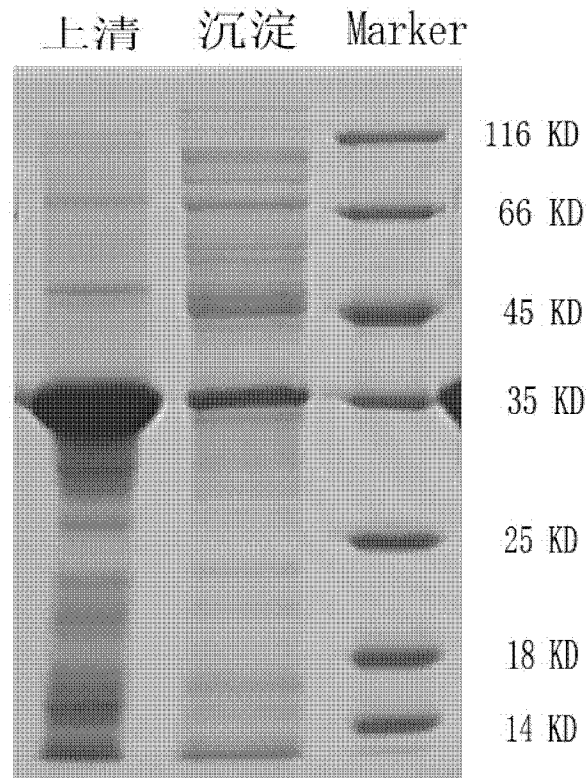


图 5

专利名称(译)	截短型溶血链球菌溶菌素O及利用其的检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102964435B</a>	公开(公告)日	2014-12-03
申请号	CN201110255827.3	申请日	2011-08-31
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	C07K14/315 C12N15/31 C12N15/63 G01N33/53		
代理人(译)	王安娜 李翔		
审查员(译)	吕健		
其他公开文献	CN102964435A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种截短型溶血链球菌溶菌素O基因与ASO检测试剂盒。本发明人克隆部分SLO基因片段，将该部分的SLO基因克隆到大肠杆菌等表达载体中，使之产量表达并利于纯化。具体而言，本发明人提供一种DNA序列，其碱基序列如SEQ ID NO：1所示。根据本发明，截短的SLO序列能使SLO蛋白的产量大大提高，每升细菌培养物能纯化得到150mg以上的SLO蛋白，纯度90%以上，经过免疫学实验证明，这一片段表达的SLO依然保持了特异的免疫原性。

CK-(BSA)	0.003	0.001	0.001
SLO 提纯蛋白	0.736	0.852	0.796