



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104651328 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201410848967. 5

*C07K 19/00*(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 12. 31

*G01N 33/53*(2006. 01)

*C12Q 1/68*(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

地址 200025 上海市黄浦区瑞金二路 207 号

申请人 复旦大学附属华山医院  
内蒙古民族大学

(72) 发明人 张颀 胡薇 陈英 贾利芳 冯正  
陈军虎 刘杰 奥·乌力吉 徐斌  
莫筱瑾

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51) Int. Cl.

*C12N 9/04*(2006. 01)

*C12N 15/53*(2006. 01)

*C07K 16/40*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书17页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种新的细粒棘球绦虫阳性抗原及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种新的细粒棘球绦虫阳性抗原及其应用。具体地,本发明提供了细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶(*Echinococcus granulosus* lactate dehydrogenase, EgLDH)或其基因、或其检测试剂的用途,它们被(i)用于制备细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的阳性抗原;和/或(ii)用于制备诊断细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的试剂或试剂盒。本发明的该抗原对细粒棘球绦虫的诊断敏感性和特异性均非常高,诊断效能远高于其他常规的细粒棘球绦虫抗原。

1. 一种细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 (*Echinococcus granulosus* lactate dehydrogenase, EgLDH) 或其基因、或其检测试剂的用途,其特征在于, (i) 用于制备细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的阳性抗原;和 / 或 (ii) 用于制备诊断细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的试剂或试剂盒。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述的细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 EgLDH 选自下组:

(a) 如 SEQ ID NO. :1 所示的多肽;

(b) 将 SEQ ID NO:1 氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基取代、缺失或添加而形成的具有免疫原性的衍生多肽;

(c) 与 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的同源性  $\geq 90\%$ , 较佳地  $\geq 95\%$  的具有免疫原性的多肽;或

(d) 具有免疫原性的多肽 (a)-(c) 的片段。

3. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述的 EgLDH 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO. :2 所示。

4. 一种抗体,其特征在于,所述的抗体能与 SEQ ID NO. :1 所示的多肽特异性结合。

5. 一种抗原-抗体复合物,其特征在于,所述的复合物包括:

(i) SEQ ID NO. :1 所示的多肽;

(ii) 与 (i) 中的多肽特异性结合的抗体。

6. 权利要求 5 所述抗原-抗体复合物的用途,其特征在于,用于:

(a) 制备检测细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的试剂或试剂盒;和

(b) 用作检测细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的阳性对照。

7. 一种细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有一容器,所述的容器中含有细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶或其基因。

8. 如权利要求 7 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括酶结合液、反应底物和任选的说明书,较佳地,所述的试剂盒还可包括选自下组的组分:反应终止液、样本稀释液、和洗涤液。

9. 一种诊断或非诊断性的检测样本中是否感染细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的方法,其特征在于,包括步骤:

(1) 制备 SEQ ID NO. :1 所示的细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶作为抗原;

(2) 将步骤 (1) 中得到的抗原与待检测样本接触;

(3) 检测样本中是否含有权利要求 5 所述的抗原-抗体复合物;

其中,若步骤 (3) 中的样本出现所述的抗原-抗体复合物,则表明所述的样本感染了细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴)。

10. 如权利要求 9 所述的方法,所述的样本包括血液样本 (包括全血, 血清, 血浆样本)、组织液样本、尿液样本、唾液样本、粪便样本。

## 一种新的细粒棘球绦虫阳性抗原及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及寄生虫病诊断领域。具体地,本发明涉及一种可用于诊断细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的新抗原。

[0002] 相关资助

[0003] 本发明受到以下基金的资助:国家自然科学基金(81201315);中国博士后基金(2014M551331);国家重大科技专项(2009ZX10004-302);中国疾病预防控制中心青年基金(2013A103);上海市卫生和计划生育委员会科研课题(20124174)。

### 背景技术

[0004] 细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)的幼虫(棘球蚴)寄生于人体所引起的细粒棘球蚴病(*Cyst echinococcosis*),也叫囊型包虫病(*Cystic hydatid di sease*),是一种严重危害人体健康和生命安全、影响社会经济发展的人兽共患病,是世界棘球蚴病的主要疾病负担,也是我国重点防治的寄生虫病之一。该病呈全球性分布,具不完全报道,全球至少 100 个国家存在细粒棘球绦虫的流行。高度流行区主要在欧亚大陆,非洲的北部和东部,澳大利亚及南美洲。我国是世界细粒棘球蚴病的高发区,预计我国该病的疾病负担占据全球的 40%。2004 年全国人体重要寄生虫病调查表明,棘球蚴病的人均患病率 1.08%,据估算我国有 60 ~ 130 万棘球蚴病人,受威胁人口约 6600 万,27 个省、自治区、直辖市有病例报道,98%是细粒棘球蚴病例,每年细粒棘球蚴病手术病例约 2000 例。

[0005] 目前对棘球蚴病的诊断主要以患者自述症状、医生局部体检为依据。由于细粒棘球蚴呈封闭性寄生于人体的内部脏器,传统的病原学方法无法诊断,须辅以物理和其他实验方法。

[0006] 现行诊断主要以医学影像法为判断标准。B 超诊断是目前棘球蚴病诊断与流行病学调查的主要方法,但采用 B 超进行疾病筛查仍存在问题。例如,对检验人员技术水平及经验要求高,极易与肝癌、肝血管瘤及肝囊肿混淆,且很难对 2 厘米以内的包囊进行准确诊断。

[0007] 免疫学检测是人体棘球蚴病重要的辅助诊断方法。当包囊的影像学形态不典型时,免疫诊断具有鉴别诊断的意义;免疫学检测的敏感性和特异性对患者的及时发现与治疗随访也起到了重要作用;对流行区的流行病学调查、防治规划的制定及防治效果的考核免疫学诊断更具有重要的参考价值。棘球蚴病血清学诊断有着长久的发展史,几乎所有已经出现的免疫学诊断方法都被用于人体棘球蚴病诊断。然而,至今没有一种可行的诊断工具、试剂盒或方法可以普遍应用到棘球蚴病临床实践中。提高人体棘球蚴病血清学诊断试剂的检测效能是我国棘球蚴病防治中亟待解决的问题。

[0008] 由于循环抗原检测的低敏感性,抗体检测仍然是棘球蚴病临床诊断和流行病学普查中使用最广泛的方法。抗体检测的敏感性和特异性与实验中所用的抗原密切相关。细粒棘球蚴病的抗原可来源于囊液、原头蚴、囊壁。其中囊液抗原(HCF)研究的最多,是目前最主要的诊断抗原来源。囊液成分复杂,有虫体分泌物及虫体表面脱落的物质,具有很强的抗原性。但不同宿主及同一宿主的不同寄生部位,囊液的抗原性相差很大,据报道其敏感性可达

75%~95%，但其特异性不高，且常与其他绦虫、线虫和吸虫有交叉反应。此外，天然来源的粗囊液成分复杂性，不宜于进行质量控制和标准化，产量低，是目前细粒棘球蚴病血清学诊断试剂效能低，产品不能标准化的重要原因。

[0009] 分析粗抗原组分，采用基因工程的方法制备重组抗原替代天然抗原，是解决上述问题，提高细粒棘球蚴病诊断试剂效能的一种重要途径。抗原 B (AgB) 是细粒棘球蚴包囊液中含最丰富的组分之一，其亚单位 EgAgB1 和 EgAgB2 的重组蛋白是目前公认的最有前景的细粒棘球蚴病诊断抗原。目前报道的天然抗原 B 对囊型包虫病诊断有一定的敏感性和特异性，但往往敏感性较低，但 AgB 为基础制备的多肽抗原如 P176、P175、P177 等虽然可以提高诊断的特异性，但灵敏性往往降低。

[0010] 除此之外，也陆续有新的诊断抗原被发现，但到目前为止，这些已经报道的抗原对细粒棘球蚴病检测的灵敏度和特异性在实际诊断中仍在很大局限性，无法满足实际诊断的要求。因此，本领域迫切需要开发一种可有效提高细粒棘球蚴病诊断的灵敏度和特异性的抗原。细粒棘球绦虫 LDH 作为一种新的有效进行细粒棘球蚴病诊断的抗原尚未有报道。

[0011] 因此，本领域迫切需要开发一种可有效提高细粒棘球绦虫的诊断灵敏度和特异性的抗原。

## 发明内容

[0012] 本发明的目的就是提供一种可有效提高细粒棘球蚴病的诊断灵敏度和特异性的抗原，及其制法和应用。

[0013] 在本发明第一方面，提供了一种细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 (*Echinococcus granulosus* lactate dehydrogenase, EgLDH) 或其基因、或其检测试剂的用途，它们被 (i) 用于制备细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的阳性抗原；和 / 或 (ii) 用于制备诊断细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的试剂或试剂盒。

[0014] 在另一优选例中，所述的细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 EgLDH 选自下组：

[0015] (a) 如 SEQ ID NO. :1 所示的多肽；

[0016] (b) 将 SEQ ID NO. :1 氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基取代、缺失或添加而形成的具有免疫原性的衍生多肽；

[0017] (c) 与 SEQ ID NO. :1 所示氨基酸序列的同源性  $\geq 90\%$ ，较佳地  $\geq 95\%$  的具有免疫原性的多肽；或

[0018] (d) 具有免疫原性的多肽 (a)-(c) 的片段。

[0019] 在另一优选例中，所述抗原组合中的抗原针对的抗体不相同。

[0020] 在另一优选例中，所述的 EgLDH 基因的 GenBank 登陆号为 HM748917.1

[0021] 在另一优选例中，所述的 EgLDH 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO. :2 所示。

[0022] 在另一优选例中，所述的衍生多肽保留了 SEQ ID NO. :1 所示多肽至少 80%、90%、95% 以上的免疫原性。

[0023] 在另一优选例中，所述的衍生多肽由 SEQ ID NO. :1 所示多肽经 1-50 个，较佳地 1-30 个，更佳地 1-20 个，最佳地 1-10 个氨基酸取代、缺失或添加而形成，且所述的衍生多肽具有免疫原性。

[0024] 在另一优选例中，所述的检测试剂包括细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶的抗体、检测细

粒棘球绦虫乳酸脱氢酶编码序列的探针、或其组合。

[0025] 在另一优选例中,所述的试剂盒含有一容器,所述的容器内含有 EgLDH 或与 EgLDH 特异性结合的抗原-抗体复合物。

[0026] 在另一优选例中,所述容器内含有与 EgLDH 特异性结合的抗原-抗体复合物作为阳性对照。

[0027] 在本发明的第二方面,提供了一种抗体,所述的抗体能与 SEQ ID NO.:1 所示的多肽特异性结合。

[0028] 在本发明的第三方面,提供了一种抗原-抗体复合物,所述的复合物包括:

[0029] (i) SEQ ID NO.:1 所示的多肽;

[0030] (ii) 与 (i) 中的多肽特异性结合的抗体。

[0031] 在本发明的第四方面,提供了本发明第三方面所述抗原-抗体复合物的用途,它被用于:

[0032] (a) 制备检测细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的试剂或试剂盒;和

[0033] (b) 用作检测细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的阳性对照。

[0034] 在本发明的第五方面,提供了一种细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有一容器,所述的容器中含有细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶或其基因。

[0035] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括酶结合液、反应底物和任选的说明书,较佳地,所述的试剂盒还可包括选自下组的组分:反应终止液、样本稀释液、和洗涤液。

[0036] 在本发明的第六方面,提供了一种诊断或非诊断性的检测样本中是否感染细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的方法,包括步骤:

[0037] (1) 制备 SEQ ID NO.:1 所示的细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶作为抗原;

[0038] (2) 将步骤(1)中得到的抗原与待检测样本接触;

[0039] (3) 检测样本中是否含有本发明第三方面所述的抗原-抗体复合物;

[0040] 其中,若步骤(3)中的样本出现所述的抗原-抗体复合物,则表明所述的样本感染了细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)。

[0041] 在另一优选例中,所述的样本包括血液样本(包括全血,血清,血浆样本)、组织液样本、尿液样本、唾液样本、粪便样本。

[0042] 应理解,在本发明范围内,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0043] 图 1 显示了 EgLDH 基因 PCR 扩增结果。图中各泳道如下:M:分子量标准,1:EgLDH 基因扩增产物(箭头所示)。

[0044] 图 2 显示了重组质粒 pET-28a-EgLDH 转化大肠杆菌后菌落 PCR 扩增产物检测结果。图 A 中各泳道如下:M:分子量标准,1,3:空载质粒菌体,2,4:携带 EgLDH 基因(箭头所示)菌体;图 B 中各泳道如下:1:pET28a-EgLDH 质粒扩增产物(箭头所示),M:分子量标准。

[0045] 图 3 显示了重组蛋白 EgLDH 表达与纯化分析结果。图 A 中各泳道如下 :M :标准分子量蛋白, 1 :空载菌体蛋白, 2 :未诱导菌体蛋白, 3 :诱导后菌体裂解上清 (箭头所示为目标蛋白), 4 :诱导后菌体裂解沉淀 ;图 B 中各泳道如下 :M :标准分子量蛋白, 1 :纯化后的重组 EgLDH (箭头所示), 2 :纯化前含 EgLDH 蛋白的可溶性菌体蛋白

[0046] 图 4 显示了 EgLDH, HCF, EgAgB1 抗原的 ELISA 实验结果。

[0047] 图 5 显示了本发明一个实施例中蛋白浓度测定的标准曲线。

### 具体实施方式

[0048] 本发明人经过广泛而深入的研究, 首次意外地发现细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 (EgLDH) 可以作为免疫原性极强的用于诊断细粒棘球绦虫抗原, 该抗原对细粒棘球绦虫的诊断敏感性和特异性均非常高。基于本发明, 可将 EgLDH 作为细粒棘球绦虫的诊断抗原, 从而进一步将其用于制备诊断和检测细粒棘球绦虫 (或细粒棘球蚴) 的试剂或试剂盒。在此基础上, 完成了本发明。

[0049] LDH 抗原

[0050] 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是广泛存在于动、植物及微生物细胞内的一种重要功能酶, 是糖酵解途径的关键酶之一, 在 NADH 和 NAD<sup>+</sup> 的辅助下, LDH 可催化丙酮酸与乳酸之间的可逆反应, 释放能量供机体所需。

[0051] 在本发明中, 首次应用细粒棘球绦虫 LDH 为抗原进行细粒棘球蚴病诊断标志物, 并通过实验证明, 该细粒棘球绦虫 LDH 有助于显著提高细粒棘球蚴病诊断的灵敏度和特异性。

[0052] 细粒棘球绦虫 LDH 的氨基酸序列和核苷酸序列的信息如下 :

[0053] EgLDH 的氨基酸序列 :

[0054] MSVEGLLLPLEMEQCFGRERKVSVVGAGAVGTAAVFAIMTKGIANTVALYDIDEDRCNGEVMDDLQGSFLFLESCRVIIGGKDIKTADSDIVVVVTAGARQAVGESRLNLVQRNVDIFKKLIPTLVEQSPKCILVIVTNPVDIMTYVSWKLSGFPQHRVLGSGTMLD TARFRHILGEKLVNHP SA IHGYVVGEGDSSVPVWSRVTVGGANLCDIYPKIGQAGPDDFASIHKAVVDSAYEIIIRMKGCTAWAIGLCCASLCNAILRNKIVIPVSTSLKGKLG I KEEVFTSVPCIVDSSGVS AVINLEYSPEKQSLLASVETLQKIIAGIKW (SEQ ID NO. :1)

[0055] EgLDH 核苷酸序列 :

[0056] Atgtctgtggaggggttgttgccttggagatggaacagtgttttggcggtgagcggaaaggtttctgttgttgggtgcgggagcagtaggcacggcagcgggtgttgcctattatgactaaaggtattgcaaacactgtcgtctctacgatattgacgaagatagatgcaacgggtgaagtgatggacttggaccaaggetcactgtttctggagtcttgtagagtaattggtggcaagatataacgaagactgcggaactcggatategtttagtaaacagctggggcccggcaagctgttggcgaatccagattgaacctgttcaacgcaatgttgatataatttaaaaaactaatcctactctcgttgaacaagcccaagtgcaattctcgttatcgttacaaatccagttgatatacatgacctatgtctcctggaagttaagcggctttccacagcactcgtgtcttaggatctggaacctgcttgacactgctagatttcggcacattcttggcgagaagttgaatgtgcaatccttagtgccatacacgggttacgtagtcggcgaacatggagactcgagtgtgccagtatggagtagggtgaccgttgggtggagcaaatctctgtgacatttatcccaagatcggccaagcggcgatcccagcattttgcttccattcacaaggetgttgtcgatagcgcctacgaaatcatcgcataagggctgcaactgcttgggcataggtctctgttgcgcctcctgtgtaatgcgattctgcgaaacaagaaaattgtgattccagtttccacctacttaagggcaaac

tggtatcaaagaggaggtgttcacgagcgtgccctgtatagtcgacagcagcggcgtgtctgcagtgatcaacctcg  
agtattcgcctagtgagaaacaaagcctgttgccagtggtgagactcttcagaagattatcgcaggcatcaagtgg  
tga(SEQ ID NO. :2)

[0057] 阳性抗原

[0058] 在本发明中,术语“抗原”或“阳性抗原”可互换使用,都指能够与细粒棘球绦虫抗体特异结合的蛋白或多肽。抗原是指能够刺激产生(特异性)免疫应答,并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体外结合,发生免疫效应(特异性反应)的物质。抗原的基本特性有两种,一是诱导免疫应答的能力,也就是免疫原性,二是与免疫应答的产物发生反应,也就是抗原性。

[0059] 如本文所用,“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质,原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和蛋白是没有分离纯化的,但同样的多聚核苷酸或蛋白如从天然状态中同存在的其他物质中分开,则为分离纯化的。“分离的阳性抗原”是指所述抗原基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化阳性抗原。基本上纯的蛋白抗原在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。抗原的纯度能用氨基酸序列分析。

[0060] 本发明的抗原可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主,本发明的抗原可以是糖基化的和非糖基化的。本发明的抗原还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0061] 本发明还包括抗原的片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然抗原相同的生物学功能或活性的抗原。本发明的抗原片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的抗原,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的抗原,或(iii)抗原与另一个化合物(比如延长抗原半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的抗原,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此抗原序列而形成。这些片段、衍生物和类似物属于本领域技术人员公知的范围。

[0062] 在本发明中,术语“抗原”还包括具有相同功能的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。

[0063] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的抗原的化学衍生形式如乙酰化、羧基化、糖基化。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。

[0064] 抗原编码序列

[0065] 编码本发明抗原的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码

链。术语“编码本发明抗原的多核苷酸”可以是包括编码此抗原的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和 / 或非编码序列的多核苷酸。

[0066] 本发明还涉及上述多核苷酸的变异体。此多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%, 较佳地至少 70%, 更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。

[0067] 本发明的核苷酸序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法, 可根据本发明所公开的有关核苷酸序列, 尤其是开放阅读框序列来设计引物, 并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板, 扩增而得有关序列。一旦获得了有关的序列, 就可以用重组法来大量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体, 再转入细胞, 然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。此外, 还可用人工合成的方法来合成有关序列, 尤其是片段长度较短时。通常, 通过先合成多个小片段, 然后再进行连接可获得序列很长的片段。可以完全通过化学合成来得到编码本发明抗原 (或其片段, 或其衍生物) 的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子 (或如载体) 和细胞中。此外, 还可通过化学合成将突变引入本发明抗原序列中。

[0068] 应用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法 (Saiki, et al. Science 1985 ;230 : 1350-1354) 被优选用于获得本发明的基因。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择, 并可用常规方法合成。

[0069] 抗原制备方法

[0070] 本发明抗原的制备方法有以下步骤:

[0071] (1). 用编码本发明阳性抗原的多核苷酸 (或变异体), 或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0072] (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;

[0073] (3). 从培养基或细胞中分离、纯化本发明抗原。

[0074] 本发明中, 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含抗原编码 DNA 序列和合适的转录 / 翻译控制信号的表达载体。包含上述适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体, 可以用于转化适当的宿主细胞, 以使其能够表达蛋白质。

[0075] 宿主细胞可以是原核细胞, 如细菌细胞; 或是低等真核细胞, 如酵母细胞; 或是高等真核细胞, 如哺乳动物细胞。代表性例子有: 大肠杆菌, 链霉菌属; 鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞; 真菌细胞如酵母; 植物细胞; 果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞; CHO、COS、293 细胞、或 Bowes 黑素瘤细胞的动物细胞等。用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时, 能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获, 用  $\text{CaCl}_2$  法处理, 所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用  $\text{MgCl}_2$ 。如果需要, 转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物, 可选用如下的 DNA 转染方法: 磷酸钙共沉淀法, 常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0076] 获得的转化子可以用常规方法培养, 表达本发明抗原蛋白。根据所用的宿主细胞,

培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0077] 抗原蛋白可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化抗原蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0078] 试剂盒

[0079] 本发明还提供了一种检测细粒棘球绦虫的试剂盒。一般地,本发明的试剂盒包括以下组分:容器或载体;以及位于所述容器内或载体上的 EgLDH 蛋白、基因或其检测试剂。在另一优选例中,所述试剂盒还包括酶结合液、反应底物和任选的说明书。更佳地,所述的试剂盒还可包括选自下组的组分:反应终止液、样本稀释液、和洗涤液。一种优选的可用于检测细粒棘球绦虫的试剂盒包括:容器以及位于容器内的包被液、辣根过氧化物酶标记的鼠(或羊)抗人 IgG(H+L) 抗体、底物液 TMB、稀浓硫酸反应终止液和样本稀释液。更佳地,还含有空白对照、阳性和阴性对照和作以监控检测过程是否符合标准。

[0080] 本发明的主要优点在于:

[0081] 1. 抗原灵敏度高,不受检测样本感染度的影响,敏感度较高。

[0082] 2. 高特异性,本发明的抗原检测待测样本,其假阳率极低。

[0083] 3. 操作简便,抗原可以使用通用的 ELISA 法读取荧光强度值。

[0084] 4. 结果稳定,重复性高。

[0085] 下面结合具体实施例,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并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室指南(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和分数按重量计算。

[0086] 通用方法和材料

[0087] 主要试剂:

[0088]

TaKaRa PrimeStar <sup>®</sup> GXL DNA polymerase	天根生化科技有限公司, 北京
TAE Buffer	天根生化科技有限公司, 北京
DNA Marker	天根生化科技有限公司, 北京
<i>Xho</i> I, <i>Bam</i> H I 限制性内切酶	New England Biolabs
Taq DNA 聚合酶	北京赛百盛基因技术有限公司
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN 公司, 德国
Cloning Enhancer,	QIAGEN 公司, 德国
In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Kit	Clontech 公司, 美国
BugBuster <sup>®</sup> 蛋白抽提试剂	Novagen
96 孔聚苯乙烯酶标板	美国 Thermo 公司
HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体	美国 Sigma 公司

[0089]

TMB 显色剂	天根生化科技有限公司, 北京
---------	----------------

[0090] 主要仪器：

[0091]

PTC-200 PCR 仪	BIO-RAD 伯乐公司, 美国
蛋白电泳系统	BIO-RAD 伯乐公司, 美国
隔水式电热恒温培养箱	上海跃进医疗器械厂, 上海
TS-1 型脱色摇床	江苏海门市麒麟医用仪器厂
低温离心机	Heraeus 贺利氏公司, 德国
ÄKTA <sup>™</sup> pure	通用电气医疗集团, 瑞典

[0092] 试验材料：

[0093] 细粒棘球绦虫 cDNA、大肠杆菌 DH5a、大肠杆菌 BL21 (DE3)、质粒 pET-28a、评估用细粒棘球绦病人血清和健康人血清、囊液抗原 (HCF)、EgAgB1 多肽抗原均由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所提供。

[0094] 实施例 1 :细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, EgLDH) 基因的克隆

[0095] 1. 1EgLDH 基因的扩增：

[0096] 1. 1. 1 目的基因引物设计：

[0097] 根据已知 EgLDH 编码全长序列 (GenBank 登陆号 :HM748917. 1), 利用 Primer

Premier 5 软件设计引物：

[0098] EgLDH-F:5'-AATGGGTCGC GGATCCATGTCTGTGGAGGGGTTG-3' (SEQ ID NO.:3),斜体为与载体同源序列,下划线为 XhoI 酶切位点。

[0099] EgLDH-R:5'-GGTGGTGGTG CTCGAGTTATCACCCTTGATGCCTGC-3' (SEQ ID NO.:4),斜体为与载体同源序列,下划线为 BamHI 酶切位点(华大基因公司合成)。

[0100] 1.1.2PCR 扩增目的基因：

[0101] 以细粒棘球绦虫 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增目的基因,PCR 反应体系如下：

[0102]

dNTP Mixture (2.5 mM each)	2.0 $\mu$ l
5 x Buffer	5.0 $\mu$ l
Template DNA	1.0 $\mu$ l
Primer F	1.0 $\mu$ l
Primer R	1.0 $\mu$ l
DNA Polymerase	1.0 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9.0 $\mu$ l
总体积	20.0 $\mu$ l

[0103] 反应条件如下：

[0104]

98° C	2.0 min	
98° C	10.0 s	} 30 cycles
55° C	30.0 s	
68° C	2.0 min	
68° C	10.0 min	
4° C	+∞	

[0105] PCR 产物使用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳,130V,约 30min。结果如图 1 所示。PCR 结果显示,约 966bp 处有一条清晰的目的条带,与预期片段的大小相符,表明成功扩增出 EgLDH 目的基因。

[0106] 1.1.3 目的基因纯化：

[0107] 采用 QIAGEN 公司的 QIAquick<sup>®</sup> 胶回收试剂盒对 PCR 扩增出的目的基因进行纯化,具体操作如下：

[0108] (1) 电泳结束后,用干净、锋利的刀片将 DNA 目的片段从琼脂糖凝胶上切割下来。

[0109] (2) 将切割下来的凝胶块捣碎置于离心管中并称重,加入 3 倍于凝胶体积的 Buffer QG。

[0110] (3) 将离心管置于 50°C 水浴中孵育 10min,为加速凝胶溶解,每隔 2-3min 将离心管

取出上下颠倒混匀。

[0111] (4) 待凝胶完全溶解后,观察离心管内液体颜色是否与 Buffer QG 未溶胶前的颜色基本一致;若管内液体变为橙色或紫色,需加入 10  $\mu$ l 3M 的醋酸钠 (pH5.0) 调节 pH 值。

[0112] (5) 向离心管中加入 1 倍凝胶体积的异丙醇并混匀。

[0113] (6) 试剂盒中的 QIAquick spin column 置于 2ml 收集管中;将离心管中的液体加入 QIAquick spin column 中,13000rpm,离心 1min,弃滤液。

[0114] (7) 将 QIAquick spin column 置回原离心管中,加入 500  $\mu$ l Buffer QG, 13000rpm 离心 1min,弃滤液。

[0115] (8) 向 QIAquick spin column 中加入 750  $\mu$ l Buffer PE 洗柱,静置 2-5min, 13000rpm 离心 1min,弃滤液。

[0116] (9) 于 13000rpm,再次离心 2min,以除去残留的 Buffer PE。

[0117] (10) 将 QIAquick spin column 置于新的 1.5ml 离心管中;加入 30  $\mu$ l Buffer EB 于 QIAquick spin column 的膜中央,静置 4min,13000rpm,离心 1min,收集洗脱液,保存于 -20 $^{\circ}$ C。

[0118] (11) 用琼脂糖凝胶电泳检测回收效率,并估算 DNA 片段的浓度。

[0119] 实施例 2:载体的线性化

[0120] 2.1 制备空载质粒 pET-28a:

[0121] 将 pET-28a 质粒的载体菌 (Novagen) 涂板,PCR 鉴定单菌落后提取质粒,双酶切使质粒线性化,操作如下:

[0122] (1) 将 1  $\mu$ l 保种载体菌液用 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 稀释,吸取 100  $\mu$ l 涂板至 Kana 抗性的 LB 固体培养基上。37 $^{\circ}$ C 放置约 1h 至表面液体吸收,倒置平板,37 $^{\circ}$ C 培养 16h。

[0123] (2) 随机挑取 4 个单菌落,分别吹打至 20  $\mu$ l LB 培养液中,取 3  $\mu$ l 作为模板,进行 PCR 验证,体系如下:

[0124]

Template DNA	1.0 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M each)	1.0 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M each)	1.0 $\mu$ l
2 $\times$ MasterMix	12.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ l
总体积	25.0 $\mu$ l

[0125] 反应条件:

[0126]

94 ° C	3.0 min	
94 ° C	30 s	} 30 cycles
55 ° C	40 s	
72 ° C	4.0 min	
72 ° C	10 min	
4 ° C	+∞	

[0127] 反应完毕后,将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (2  $\mu$ l EB 替代物 /40ml), 130V, 25min。

[0128] (3) 将 PCR 鉴定正确的菌液加入 5ml Kana 抗性 LB 培养液中,混匀后置于 37°C 摇床, 200rpm/min, 振荡培养 12-16h。

[0129] (4) 依据 Axygen 质粒 DNA 小量提取试剂盒说明提取 pET-28a 载体,操作如下:

[0130] ①取约 4ml 过夜培养的菌液, 12000 $\times$ g, 1min 离心, 弃去上清;

[0131] ②加入 250  $\mu$ l Buffer S1, 使细菌沉淀悬浮, 并吹打均匀且无小的菌块残留;

[0132] ③加入 250  $\mu$ l Buffer S2, 上下温和翻转 4-6 次, 均匀混合从而使菌体充分裂解。此过程不超过 5min;

[0133] ④加入 350  $\mu$ l Buffer S3, 上下温和翻转混合 6-8 次, 12000 $\times$ g, 10min 离心;

[0134] ⑤将④中离心上清转移到制备管 (制备管置于离心管内), 12000 $\times$ g, 1min 离心, 弃去滤液;

[0135] ⑥重新将上述制备管置于离心管, 加入 500  $\mu$ l Buffer W1, 12000 $\times$ g, 1min 离心, 并弃去滤液;

[0136] ⑦重新将上述制备管置于离心管, 加入 700  $\mu$ l Buffer W2, 12000 $\times$ g, 1min 离心, 弃去滤液。该步重复一次。

[0137] ⑧重新将上述制备管置于离心管, 12000 $\times$ g, 1min 空转离心;

[0138] ⑨将制备管置于新的 1.5ml 离心管中, 于制备管中央加入 30  $\mu$ l Eluent, 室温放置 1min, 12000 $\times$ g, 1min 离心。

[0139] ⑩测定质粒浓度。

[0140] 2.2 空载质粒 pET-28a 的双酶切:

[0141] (1) 将步骤 (4) 中抽提的质粒进行 Xho I/BamH I 双酶切:

[0142]

Vector (300 ng/ $\mu$ l)	7.0 $\mu$ l
10 $\times$ buffer	2.0 $\mu$ l
Xho I	2.0 $\mu$ l
BamH I	2.0 $\mu$ l
0.1% BSA	4.5 $\mu$ l
Sterile water	23.0 $\mu$ l
总体积	40.0 $\mu$ l

[0143] (2) 参照 E. Z. N. A. Ultra-Sep Gel Extraction 胶回收产物试剂盒说明书纯化双酶

切后的质粒产物,操作如下:

[0144] ①琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段。

[0145] ②片段完全分离后,在紫外灯下迅速切取所需条带,DNA 在紫外灯下曝光时间不超过 30s。

[0146] ③称取凝胶块的重量,按照每 1g 凝胶加入 1ml Binding Buffer 对应量,加入适量体积的 Binding Buffer,55-60℃水浴至凝胶完全溶解(约 7-10min)。每隔 2-3min 振荡一次。

[0147] ④把 HiBind DNA 柱子套在 2ml 收集管。

[0148] ⑤将 DNA/凝胶混合液转移至套在 2ml 收集管的 HiBind DNA 柱子中,10,000×g 离心 1min。

[0149] ⑥倒去滤液,把柱子装回收集管中。

[0150] ⑦把柱子重新装回收集管,加入 300ul Binding Buffer,按上述条件离心,弃去滤液。

[0151] ⑧把柱子重新装回收集管,加入 700ul SPW Wash Buffer,按上述条件离心,弃去滤液。注意:使用前 Wash Buffer 必须用无水乙醇稀释。可重复此步骤一次。

[0152] ⑨弃去滤液,把柱子重新装回收集管,13000×g 离心空柱 2min 以甩干柱子基质。

[0153] ⑩把柱子装在干净的 1.5ml 离心管上,加入 30-50 μl,65℃预热的 Elution Buffer 到柱子基质上,室温静置 2min。13000×g 离心 2min 洗脱出 DNA。

[0154] 酶切好的线性化质粒按照 1.13 的方法进行纯化回收,用于 3.1 中重组质粒的构建。

[0155] 实施例 3:重组质粒的构建与鉴定

[0156] 3.1 重组质粒的构建与转化:

[0157] 使用 In-Fusion<sup>®</sup>HD Cloning Kit 对 1.1 中扩增成功的基因,2.2 中线性化的质粒进行无缝克隆。步骤如下:

[0158] (1) 于 5 μl PCR 产物中加入 2 μl Cloning Enhancer。

[0159] (2) 将上述混合物置于 PCR 仪中,首先 37℃反应 15min,然后 80℃反应 15min。

[0160] (3) 克隆反应体系如下:

[0161]

10×Buffer	1.0 μl
In-Fusion Enzyme	1.0 μl
Vector (~100 ng/μl)	0.5 μl
Insert	7.0 μl
ddH <sub>2</sub> O	0.5 μl
总体积	10.0 μl

[0162] (4) 将上述配好的反应体系放入 PCR 仪中,37℃孵育 15min,50℃孵育 15min 后,取出放冰上。

[0163] (5) 将上述体系加至含 100 μl DH5α 感受态细胞的离心管中,缓慢吹打 3~5 次,冰浴 30min。

[0164] (6) 装有 DH5a 感受态细胞的离心管 42℃水浴 60s,然后快速冰浴 2min。

[0165] (7) 向每管 DH5a 感受态细胞中加入 900  $\mu$ l 不含抗性的 LB 培养基, 混匀后置于 37°C, 150rpm/min 震荡培养 45min。

[0166] (8) 5000 $\times$ g 离心 30s, 取 800  $\mu$ l 上清, 吹打混匀沉淀分别涂板至卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上。37°C 正置 1h 至液体吸收, 倒置平板, 37°C 过夜培养。

[0167] (9) 每个平板随机挑取单菌落 4 个, 至于 20  $\mu$ l LB 培养液中, 吸取 3  $\mu$ l 作为模板进行菌落 PCR 验证, 反应体系如下:

[0168]

Template	3.0 $\mu$ l
T7	1.0 $\mu$ l
T7ter	1.0 $\mu$ l
2 $\times$ MasterMix	12.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ l
总体积	25.0 $\mu$ l

[0169] 反应条件如下:

[0170]

94 ° C	2.0 min	} 30 cycles
94 ° C	30.0 s	
55 ° C	30.0 s	
72 ° C	3.0 min	
72 ° C	10.0 min	
4 ° C	+ $\infty$	

[0171] PCR 反应产物使用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳 130V 约 30min。其结果显示成功克隆出目的基因。如图 2 所示。

[0172] (10) 将条带大小正确的菌液加至 3ml 含卡那霉素的 LB 培养液中, 37°C, 200rpm/min 振荡培养过夜。

[0173] (11) 取 700  $\mu$ l 菌液并加 300  $\mu$ l 50% 甘油于 -80°C 保种。

[0174] 3.2 抽提重组质粒及鉴定:

[0175] 对菌落 PCR 鉴定正确的重组菌采用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒 (Axygen, 美国) 抽提质粒 DNA, 具体操作过程如下。

[0176] (1) 取约 4ml 过夜培养的菌液, 12000 $\times$ g, 1min 离心, 弃去上清。优化一: 每一重组质粒对应的菌液平行两管。

[0177] (2) 加入 250  $\mu$ l Buffer S1, 使细菌沉淀悬浮, 并吹打均匀且无小的菌块残留。

[0178] (3) 加入 250  $\mu$ l Buffer S2, 上下温和翻转 4-6 次, 均匀混合从而使菌体充分裂解。

[0179] (4) 加入 350  $\mu$ l Buffer S3, 上下温和翻转混合 6-8 次, 12000 $\times$ g, 10min 离心。

[0180] (5) 将 (4) 中离心上清转移到制备管 (制备管置于离心管内), 12000 $\times$ g, 1min 离心, 弃去滤液。优化二: 每一重组质粒对应两管菌液裂解后的离心上清转移至同一制备管。

[0181] (6) 重新将上述制备管置于离心管,加入 500  $\mu$ l Buffer W1,12000 $\times$ g,1min 离心,并弃去滤液;

[0182] (7) 重新将上述制备管置于离心管,加入 700  $\mu$ l Buffer W2,12000 $\times$ g,1min 离心,弃去滤液。该步重复一次。

[0183] (8) 重新将上述制备管置于离心管,12000 $\times$ g,1min 空转离心。

[0184] (9) 将制备管置于新的 1.5ml 离心管中,于制备管中央加入 30  $\mu$ l Eluent,室温放置 1min,12000 $\times$ g,1min 离心。

[0185] (10) 测定质粒浓度并送华大基因公司测序,检测插入片段序列是否正确,测序分析结果表明插入片段序列正确,重组质粒 pET-28a-EgLDH 构建成功。

[0186] 实施例 4:重组质粒在 *E. coli* 中的表达及鉴定

[0187] 4.1 重组质粒 pET-28a-EgLDH 在 *E. coli* 中的表达及鉴定

[0188] 4.1.1 重组质粒的转化与目的蛋白的表达:

[0189] (1) 将测序正确的重组质粒 pET-28a-EgLDH 约 40ng 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜(转化方法同实施例 3.1)。

[0190] (2) 次日,随机挑取 3 个单菌落接种于 3ml LB(含 50  $\mu$ g/L 卡那霉素)中,37 $^{\circ}$ C,180rpm,培养至 OD600 约接近 0.8-1.0。

[0191] (3) 取出 300ul 加 700ul 甘油作为菌种,再取 1ml 作为诱导前对照,剩余菌液中加终浓度为 1mM 的 IPTG 进行诱导,37 $^{\circ}$ C,200rpm,继续培养 4h。

[0192] (4) 将诱导前和诱导后菌液各取 10  $\mu$ l,加入 2X SDS-PAGE 上样缓冲液 10  $\mu$ l,混匀后于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5min 变性。每个样品中加入 15  $\mu$ l 的样品,进行 SDS-PAGE 分析,分离胶 12%,浓缩胶 5%,凝胶配方如下:

[0193] 12%分离胶

[0194]

蒸馏水	1.3 ml
30% Acr-Bis (1:29)	1.7 ml
1M Tris pH 8.8	1.9 ml
10% SDS	0.05 ml

[0195]

10%过硫酸铵	0.05 ml
TEMED 0.002	0.05 ml
总体积	5.0 ml

[0196] 5%分离胶

[0197]

蒸馏水	2.1 ml
30% Acr-Bis (1:29)	0.5 ml
1M Tris pH 6.8	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10%过硫酸铵	0.03 ml
TEMED 0.002	0.003 ml
总体积	3.0 ml

[0198] 电压设置为：分离胶 80V, 30min；浓缩胶 120V, 60min。取下凝胶后用染色液液染色 1 小时，再用脱色液脱色至蛋白条带清晰可见。

[0199] (5) 如图 3A 所示，经 IPTG 诱导表达后较诱导前的菌体出现了一条分子量约 36kDa 的清晰表达条带，与预期蛋白大小相符，即为重组质粒 pET-28a-EgLDH 表达蛋白。重组蛋白 EgLDH 表达菌株构建成功。

[0200] 4.1.2 重组蛋白溶解性鉴定：

[0201] (1) 将 4.1.1 中构建成功的重组菌的菌液吸取 1.5  $\mu$ l 接种到 15ml LB 培养基（含 50  $\mu$ g/L 卡那霉素）中，37 $^{\circ}$ C, 165rpm 摇菌培养 7h。

[0202] (2) 再转接至 500ml LB 培养基（加卡那霉素 50mg/L）中，37 $^{\circ}$ C, 165rpm, 继续培养至 OD600 约 1 为止。

[0203] (3) 加终浓度为 1mM 的 IPTG 进行诱导，37 $^{\circ}$ C, 200rpm, 继续培养 4h。

[0204] (4) 将培养好的菌吸取 3ml, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 离心 2min 收集菌体。剩余菌于 4 $^{\circ}$ C, 5000rpm, 离心 20min, 弃上清, 沉淀用 20ml 1xPBS 重悬后再次离心（同上次）收集沉淀 -25 $^{\circ}$ C 冻存储用。

[0205] (5) 向 3ml 菌液收集的菌体沉淀中加 50  $\mu$ l BugBuster 蛋白抽提剂 (Novagen) 和核酸酶（加 1% 的量），充分重悬沉淀后置摇床上室温裂解 1h。

[0206] (6) 将细菌裂解液于 4  $\mu$ l, 12000rpm, 离心 10min 分上清和沉淀。沉淀用适当体积的 1xPBS 重悬, 分别取出 5  $\mu$ l 上清和重悬的沉淀与 2xSDS-PAGE 上样缓冲液混匀后进行 SDS-PAGE 胶验证表达蛋白的溶解性, 结果显示重组蛋白存在可溶性表达。如图 3A（箭头处为目的蛋白）所示。

[0207] 实施例 5：重组蛋白的纯化

[0208] 5.1 重组蛋白的纯化：

[0209] (1) 取步骤 4.1.2 的 (4) 中收集的菌体沉淀, 加入蛋白酶抑制剂, 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 充分重悬沉淀后超声裂解：超声 3s, 间隔 6s, 共 10min。

[0210] (2) 将裂解液于 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm, 离心 45min, 收集上清并过 0.22 $\mu$ m 滤膜。

[0211] (3) 采用 Ni-NTA 亲和层析柱进行纯化, 分别以 50mmol/L 去除杂蛋白, 以 500mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白, 收集每次洗脱穿出液。

[0212] (4) 将收集的纯化蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。如图 3B（箭头处为目的蛋白）所示, 其结果显示纯化效果达 90% 以上。

[0213] 5.2 纯化蛋白浓度测定：

[0214] 采用 BCA 蛋白质定量试剂盒（天根）测定蛋白质浓度, 按照说明书进行操作：

[0215] (1) 标准品的稀释：用 1x PBS 稀释 BSA 标准样品, 按 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml

ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.025mg/ml 和空白做对照。

[0216] (2) 配置 BCA 工作液: 依据样品数量, 将试剂 A 和试剂 B 按体积比 50:1 配置适量体积的工作液并充分混匀。

[0217] (3) 分别取 20  $\mu$ l 以稀释好的标准样品和待测的样品, 加入到 96 孔板, 每孔中再加入 200  $\mu$ l 的工作液, 充分混匀后放置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

[0218] (4) 用紫外分光光度计于 562nm 处检测其吸光度。

[0219] (5) 根据标准蛋白浓度和相应的吸光值利用 EXCEL 绘制标准曲线, 根据该标准曲线获得待测样品的蛋白浓度的计算公式, 如图 5 所示。

[0220] (6) 根据图 5 所示的计算公式算出样品的 (即纯化的 EgLDH) 蛋白浓度为 0.166/ml。

[0221] 实施例 6 重组纯化蛋白的抗原性鉴定:

[0222] 6.1 重组 EgLDH 抗原的 ELISA 评估:

[0223] (1) 采用包被液稀释重组 EgLDH 抗原至 39.5  $\mu$ g/ml, 囊液抗原 (HCF) 至 10  $\mu$ g/ml, AgB1 多肽抗原至 2.19  $\mu$ g/ml, 稀释后的抗原分别包被 96 孔酶标板, 100  $\mu$ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0224] (2) 次日, 用 PBST 洗板 3 次, 每次 5min, 再加入 2% BSA, 100  $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 封闭 2 小时。

[0225] (3) 用 PBST 洗板 3 次, 每次 5min, 然后加入 1:100 稀释的病人血清和正常人血清, 100  $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 反应 1 小时。每板同时设一个阳性对照、阴性对照和空白对照。

[0226] (4) 用 PBST 洗板 3 次, 每次 5 分钟, 然后加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体 (Sigma) 100  $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 反应 1 小时。

[0227] (5) 用 PBST 洗板 3 次, 每次 5 分钟, 后加入 100  $\mu$ l/孔的 TMB 底物溶液 (避光), 室温显色后加 2M 浓硫酸, 100  $\mu$ l/孔, 终止反应。

[0228] (6) 用酶标仪读取 450nm 的数值, 结果如图 4。

[0229] (7) 以阴性血清 OD<sub>450</sub> 平均值加 2 倍标准差 (M+2 $\times$ SD) 为 Cut off 值, 计算其重组抗原蛋白的敏感性, 特异性及约等指数 (即正确指数)。其中, 敏感性 = (真阳性血清数 / 病人血清数)  $\times$  100%; 特异性 (特异性 = 真阴性血清数 / 正常人血清数)  $\times$  100%; 约等指数 = 灵敏度 + 特异度 - 1

[0230] (8) 检测结果列于表 1。

[0231] 表 1 重组 EgLDH, EgAgB1 及囊液抗原 (HCF) ELISA 检测结果

[0232]

抗原名称	灵敏度 (%)	特异性 (%)	约等指数
EgLDH	88	98	0.86
HCF	93	94	0.87
EgAgB1	68	96	0.64

[0233] 重组 EgLDH 的 ELISA 检测 Cut off 为 0.195, 敏感性为 88%, 特异性为 98%, 约等指数 0.86; 囊液抗原 (HCF) ELISA 检测 Cut off 为 0.226, 敏感性为 93%, 特异性为 94%, 约等指数 0.87; EgAgB1 多肽抗原 ELISA 检测 Cut off 为 0.106, 敏感性为 68%, 特异性为

96%，约等指数 0.64。

[0234] 对比例 1

[0235] 钙网蛋白 (Calreticulin, CRT) 是内质网主要的钙结合蛋白之一。存在于除红细胞之外的所有细胞中。结合钙的能力极强。由于钙网蛋白的基因组成和氨基酸序列高度保守，提示其在维持细胞功能中具有重要地位。最近几年研究发现，钙网蛋白与寄生虫感染免疫有密切关系，例如包括抗凝血作用，参与宿主免疫应答，参与宿主自身免疫，进行免疫逃避等重要功能。

[0236] 本发明人除对本发明中提到的 EgLDH, HCF, EgAgB1 进行了 ELISA 评估外，还对包括细粒棘球绦虫的钙网蛋白基因 (GenBank 登陆号 :EF587757.1) 在内的几十种蛋白采用本发明中提及的克隆、表达方法进行了重组蛋白的制备，并获得了电泳纯度  $\geq 90\%$  重组蛋白。

[0237] 采用与本发明相同的血清样本对这些不同的重组的细粒棘球绦虫蛋白进行分析，结果表明绝大多数候选蛋白都缺乏足够的灵敏度和特异性。例如，以钙网蛋白抗原为例，其 ELISA 评价结果显示，该重组抗原对细粒棘球绦虫病检测的灵敏度仅为 56%，特异性 96%，约登指数 0.52。与此相反，同一实验条件下 EgLDH 的约登指数高达 0.86。本发明中的重组 EgLDH 抗原的诊断效能远远高于重组的细粒棘球绦虫钙网蛋白做为抗原检测细粒棘球绦虫病的诊断效能。

[0238] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。





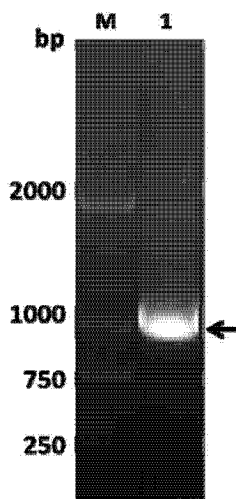


图 1

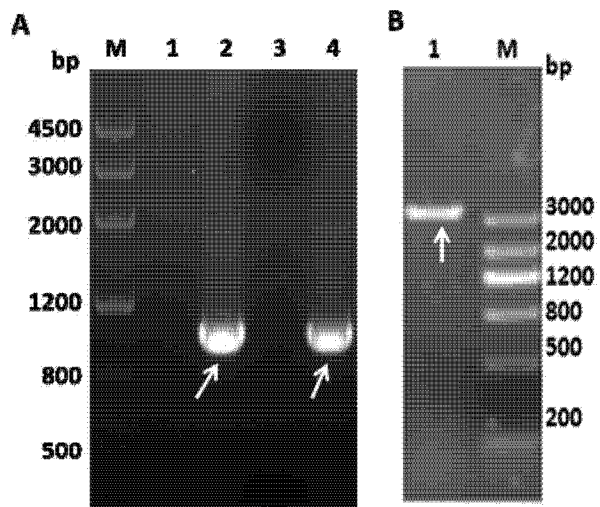


图 2

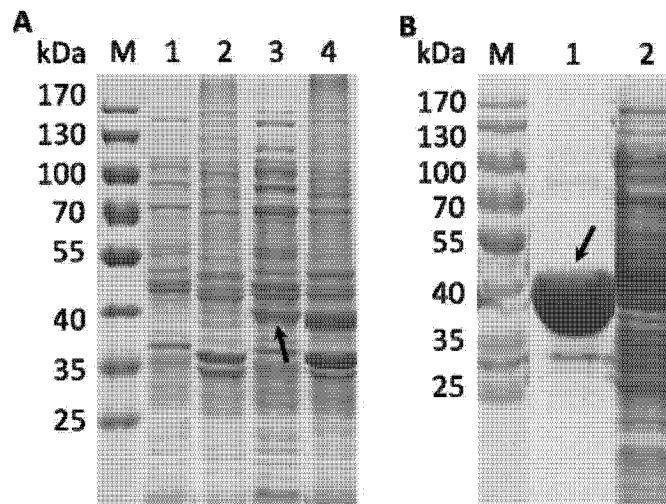


图 3

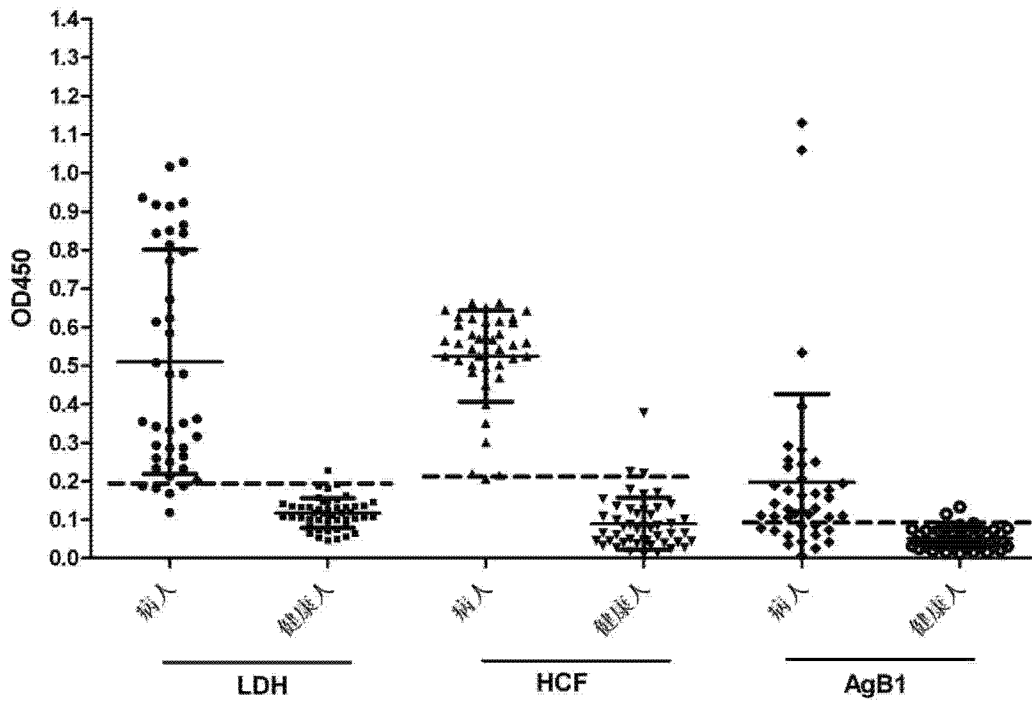


图 4

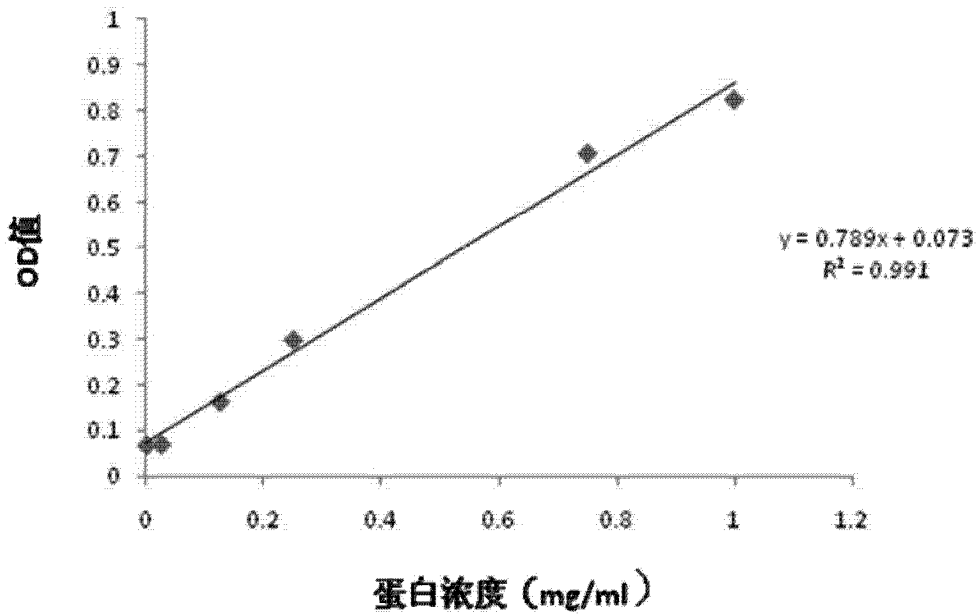


图 5

专利名称(译)	一种新的细粒棘球绦虫阳性抗原及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104651328A</a>	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201410848967.5	申请日	2014-12-31
[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 复旦大学附属华山医院 内蒙古民族大学		
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 复旦大学附属华山医院 内蒙古民族大学		
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 复旦大学附属华山医院 内蒙古民族大学		
[标]发明人	张颀 胡薇 陈英 贾利芳 冯正 陈军虎 刘杰 奥乌力吉 徐斌 莫筱瑾		
发明人	张颀 胡薇 陈英 贾利芳 冯正 陈军虎 刘杰 奥·乌力吉 徐斌 莫筱瑾		
IPC分类号	C12N9/04 C12N15/53 C07K16/40 C07K19/00 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C12N9/0006 G01N33/573		
代理人(译)	崔佳佳 马莉华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种新的细粒棘球绦虫阳性抗原及其应用。具体地，本发明提供了细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶(*Echinococcus granulosus* lactate dehydrogenase, EgLDH)或其基因、或其检测试剂的用途，它们被(i)用于制备细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的阳性抗原；和/或(ii)用于制备诊断细粒棘球绦虫(或细粒棘球蚴)的试剂或试剂盒。本发明的该抗原对细粒棘球绦虫的诊断敏感性和特异性均非常高，诊断效能远高于其他常规的细粒棘球绦虫抗原。

