(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102181450 A
(43)申请公布日 2011.09.14

(21)申请号 201110053721.5

(22)申请日 2011.03.07

(71)申请人 首都医科大学
地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条10号

(72)发明人 诸欣平 杨静 杨雅平 秦佳佳

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 程泳

(51)Int.Cl.
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)
C12N 15/11(2006.01)
C07K 14/435(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 33/10(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页
序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

旋毛虫Ts27基因、其编码蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明涉及旋毛虫Ts27基因和其编码的蛋白。本发明还涉及含有Ts27基因的重组载体和重组细胞，以及与Ts27基因编码蛋白特异性结合的抗体。本发明还涉及所述Ts27基因、其编码蛋白、抗体用于制备诊断动物和人旋毛虫感染的检测试剂的用途以及检测试剂盒。本发明的Ts27基因重组蛋白免疫动物后能够产生高滴度的抗体，并且Ts27基因重组蛋白能够特异性地被旋毛虫感染的动物或人血清所识别。

CN 102181450 A

1. 分离的多核苷酸分子，其含有选自以下的核苷酸序列：

a. SEQ ID NO:1 所示序列或 SEQ ID NO:1 所示序列中的编码序列；

b. 与 a 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 的核苷酸序列不同的序列；

c. 在高等严紧条件下能够与上述 a 或 b 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列；

d、对上述 a 或 b 所示核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列；

e、与上述 a 或 b 所示核苷酸序列具有至少 90％同一性的核苷酸序列；和

f. 与上述 a ～ e 所示序列互补的序列。

2. 分离的蛋白，其氨基酸序列由权利要求 1 的多核苷酸分子编码。

3. 权利要求 2 的蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

4. 重组载体，其含有权利要求 1 所述的多核苷酸分子。

5. 重组细胞，其含有权利要求 4 的重组载体。

6. 抗体，其可特异性地结合权利要求 2 或 3 的蛋白，所述抗体优选单克隆抗体或多克隆抗体。

7. 药物组合物，其含有权利要求 2 或 3 的蛋白，或者权利要求 6 的抗体，以及药学上可接受的载体。

8. 寡核苷酸分子，其为根据权利要求 1 的多核苷酸分子的核苷酸序列设计的引物或探针，所述引物能够扩增权利要求 1 的多核苷酸分子，所述探针能够特异性地与权利要求 1 的多核苷酸分子杂交。

9. 试剂盒，其包含权利要求 1 的多核苷酸分子、权利要求 2 或 3 的蛋白、权利要求 6 的抗体或权利要求 8 的寡核苷酸分子。

10. 权利要求 1 的多核苷酸分子、权利要求 2 或 3 的蛋白、权利要求 6 的抗体或权利要求 8 的寡核苷酸分子用于制备诊断动物或人中旋毛虫感染的检测试剂中的用途。

旋毛虫 Ts27 基因、其编码蛋白及其用途

技术领域

[0001]　本发明涉及一种旋毛虫基因，具体涉及一种旋毛虫 Ts27 基因、其编码的蛋白，以及所述基因和蛋白的用途。

背景技术

[0002]　旋毛形线虫（Trichinella spiralis，简称旋毛虫），可感染人及 150 多种动物，它所引起的旋毛虫病是一种人畜共患寄生虫病，呈全球性分布，严重地威胁了人类健康并对畜牧业造成巨大经济损失。旋毛虫生活史简述如下：当人或动物宿主生食或半生食含旋毛虫囊包的肉类（猪肉、狗肉等），囊包内幼虫在胃液、肠液作用下逸出并在小肠内发育为成虫。雌、雄虫交配后雌虫产新生幼虫。新生幼虫侵入肠粘膜淋巴管或静脉，随淋巴和血循环到达宿主横纹肌继续发育。旋毛虫的致病过程分为三期：侵入期、幼虫移行及囊包形成期，即在该虫生活史的每个环节均可使宿主致病。

[0003]　旋毛虫病临床表现复杂多样，诊断较困难，给及时的治疗造成一定难度，因此该病的免疫诊断及预防成为当务之急。目前常用的旋毛虫病的诊断方法有两种：一种是病原学检查即肌肉活组织检查，从患者肌肉组织中查出旋毛虫幼虫是最准确的诊断方法。但因受摘取肌肉组织部位局限性的影响，在发病早期和轻度感染者肌肉活检阳性率不高。而且由于是有创检查，病人很难接受此种检查方法。第二种是血清学检查，检测 IgG 水平。用于检测抗旋毛虫抗体的血清学方法有间接血凝试验（IHAT）、间接荧光抗体试验（IFAT）、乳胶凝集试验（LAT）、免疫酶染色试验（IEST）、酶联免疫印渍技术（ELIB）及 ELISA 等。其中 ELISA 因其具有经济、检测方法标准化、敏感性比较稳定等优点，现在是常规检测旋毛虫感染的血清学方法。目前在 ELISA 检测中常用的抗原有肌幼虫排泄 - 分泌（excretory-secretory，ES）抗原、不同虫期虫体抗原或重组蛋白如 53kDa 和人工合成的泰威糖（tyvelose，3，6- 双脱氧己糖）抗原等。但 ES 和虫体抗原与并殖吸虫、华支睾吸虫、日本血吸虫和囊尾蚴等存在交叉反应，故特异性较差。而重组蛋白虽然能够提高特异性，但其敏感性不高。

[0004]　由于旋毛虫病原体不能在体外大量传代培养，限制了抗原的获取；加之旋毛虫抗原的复杂性、多样性，造成目前尚无很好的高敏感度高特异性的抗原作为诊断候选抗原。

发明内容

[0005]　为了获得更好的诊断候选抗原，发明人通过大量的实验寻找并克隆了旋毛虫抗原新基因 Ts27 基因，通过重组表达和纯化获得了 Ts27 基因的重组蛋白，进一步获得了特异性抗体，并用实验证明 Ts27 基因编码蛋白具有良好的免疫原性和特异性。

[0006]　本发明的一个方面涉及分离的多核苷酸分子，其含有选自以下的核苷酸序列：

[0007]　a. SEQ ID NO：1 所示序列或 SEQ ID NO：1 所示序列中的编码序列；

[0008]　b. 与 a 的核苷酸序列编码相同序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而与 a 的核苷酸序列不同的序列；

[0009]　c. 在高等严紧条件下能够与上述 a 或 b 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列；

[0010]　d、对上述 a 或 b 所示核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列；

[0011]　e、与上述 a 或 b 所示核苷酸序列具有至少 90％同一性的核苷酸序列；和

[0012]　f. 与上述 a ～ e 所示序列互补的序列。

[0013]　在本发明的一个实施方案中，为 SEQ ID NO：1 所示序列或其编码序列，即 SEQ ID NO：1 序列中第 1 位至第 693 位碱基所示的序列。

[0014]　本发明的另一方面涉及分离的蛋白，其氨基酸序列由本发明的多核苷酸分子编码。

[0015]　在本发明的一个实施方案中，其氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示。

[0016]　本发明的另一方面涉及含有本发明多核苷酸分子的重组载体，和含有所述重组载体的重组细胞。在本发明的一个实施方案中，所述重组载体为将 Ts27 基因片段插入 PET-28a(+) 所获得的载体。在本发明的一个实施方案中，所述重组细胞为将本发明的重组载体转化入大肠杆菌 BL21 株所得到的细胞。

[0017]　本发明的另一方面涉及抗体，其可特异性地结合本发明的蛋白，所述抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0018]　所述单克隆或多克隆抗体可以通过本领域常规的免疫方法制备。例如可从被免疫动物的血清中得到和分离多克隆抗体，并使用常规方法试验其对抗原的特异性。或者，也可使用由培养的连续细胞系生产抗体分子的任何技术制备并分离单克隆抗体。

[0019]　在本发明的一个实施方案中，将 Ts27 基因重组蛋白免疫小鼠，可以获得高滴度的抗体血清，得到针对 Ts27 基因编码蛋白的多克隆抗体。

[0020]　本发明的另一方面涉及药物组合物，其含有本发明的蛋白，或者本发明所述的抗体，以及药学上可接受的载体。

[0021]　本发明的另一方面涉及寡核苷酸分子，其为根据本发明的多核苷酸分子的核苷酸序列设计的引物或探针，所述引物能够扩增多核苷酸分子，所述探针能够特异性地与多核苷酸分子杂交。

[0022]　在本发明的一个实施方案中，所述寡核苷酸分子为引物，所述引物序列为 SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4 所示序列。

[0023]　本发明的另一方面涉及一种试剂盒，其包含本发明所述的多核苷酸分子、本发明所述的蛋白、本发明所述的抗体或本发明所述的寡核苷酸分子。

[0024]　本发明的另一方面涉及本发明的多核苷酸分子、蛋白、抗体或寡核苷酸分子用于制备诊断动物或人中旋毛虫感染的检测试剂中的用途。

[0025]　可以用上述的多核苷酸分子作为诊断试剂，检测被旋毛虫感染的动物体液或组织样品中旋毛虫特异性多核苷酸。

[0026]　上述的蛋白可用作诊断试剂，以检测新近被旋毛虫感染的、或已被旋毛虫感染的动物血液或血清样品中旋毛虫特异性抗体的存在；或者可用作抗原产生旋毛虫特异性抗体（例如单克隆或多克隆抗体），可以使用所述抗体作为诊断试剂，例如以 Western 印迹检测法等标准技术筛选动物细胞、组织或体液样品中的旋毛虫特异性蛋白质。

[0027]　本发明的寡核苷酸分子可用于疾病的鉴别诊断，例如可使用适当设计的引物检测动物组织或体液等样品中旋毛虫特异性多核苷酸分子的存在。特异性扩增产物的产生可支

持旋毛虫感染的诊断，而缺少扩增的产物则可能指示没有感染。

[0028]　本发明的核苷酸序列可以用免疫筛选从旋毛虫 cDNA 基因文库中获得。本发明还涉及该序列的变异体，例如一个或多个碱基的缺失、添加或替换，但不改变所编码的蛋白质的功能。变异体可以是天然存在的等效变异体或非天然存在的变异体。

[0029]　本发明的蛋白可以通过构建上述基因的原核或真核表达载体，转化到适合的宿主细胞中，从培养物中纯化蛋白来制备。本发明的蛋白包括 SEQ ID NO：2 所示蛋白，以及具有等效功能的它的衍生物、片段或类似物。

[0030]　在本发明的实施方案中，发明人利用分子生物学技术，如：cDNA 文库免疫筛选、分子克隆、聚合酶链式反应 (PCR)、DNA 序列测定、Southern 杂交、Western 印迹杂交法，克隆鉴定了旋毛虫抗原新基因 Ts 27 基因；利用基因表达及免疫学技术获得该基因的重组蛋白及高效价免疫血清；并对该蛋白的免疫原性、敏感性和特异性进行了分析。

[0031]　具体达到的技术指标为：

[0032]　1. 在本发明中采用 cDNA 文库免疫筛选获得该基因的 cDNA 序列。长 1096bp，编码的蛋白质含 231 个氨基酸。

[0033]　2. 旋毛虫 Ts27 基因的 231 个氨基酸重组蛋白在大肠杆菌 BL21 株中获得表达并纯化。

[0034]　3. 旋毛虫 Ts27 基因重组蛋白免疫动物获高滴度抗 Ts27 免疫血清。

[0035]　4. 旋毛虫 Ts27 基因重组蛋白为感染旋毛虫的病人血清、病猪血清、病兔、病鼠血清所识别。并与 Ts27 基因重组蛋白免疫血清发生反应。

[0036]　发明的有益效果

[0037]　本发明发现了旋毛虫 Ts27 基因 cDNA；获得了纯化的 Ts27 基因重组蛋白并进行了免疫学研究，实验证明 Ts27 基因编码蛋白具有较好的免疫原性、敏感性和特异性，为旋毛虫病的诊断提供了新的候选抗原。

附图说明

[0038]　图 1Ts27 基因重组蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化的 SDS-PAGE 电泳图，其中

[0039]　泳道 1 为蛋白分子量 Marker，

[0040]　泳道 2 为未经 IPTG 诱导的全菌蛋白，

[0041]　泳道 3 为 IPTG 诱导后的空载体全菌蛋白，

[0042]　泳道 4 为 IPTG 诱导后的转化有 Ts27 基因的大肠杆菌的全菌蛋白，

[0043]　泳道 5 为纯化的 Ts27 基因重组蛋白，

[0044]　箭头所指为重组蛋白带。

[0045]　图 2 鉴定 Ts27 基因重组蛋白的免疫特性的 Western 印迹图，其中

[0046]　泳道 1 为蛋白质标准分子量，

[0047]　泳道 2 为纯化的 Ts27 基因重组蛋白与旋毛虫病人血清反应，

[0048]　泳道 3 为纯化的 Ts27 基因重组蛋白与感染旋毛虫的猪血清反应，

[0049]　泳道 4 为纯化的 Ts27 基因重组蛋白与感染旋毛虫的兔血清反应，

[0050]　泳道 5 为纯化的 Ts27 基因重组蛋白与感染旋毛虫的鼠血清反应，

[0051]　泳道 6 为纯化的 Ts27 基因重组蛋白与 Ts27 基因重组蛋白免疫鼠血清反应。

[0052] 图 3 鉴定 Ts27 基因重组蛋白敏感性和特异性的 Western 印迹图，一抗为不同人血清，其中

[0053] 图 A 中，泳道 1-19 为旋毛虫感染病人血清

[0054] 图 B 中，泳道 1-15 为不同寄生虫病人血清（其中 1-3 为蛔虫病人血清；4-5 钩虫病人血清；6-7 为鞭虫病人血清；8-10 华支睾吸虫病人血清；11-13 为血吸虫病人血清；14-15 为绦虫病人血清）

[0055] 图 C 中，泳道 1-10 为健康人血清

具体实施方式

[0056] 在本发明中，典型地，“杂交条件”根据测量杂交时所用条件的“严紧性”程度来分类。严紧性程度可以以例如核酸结合复合物或探针的解链温度（Tm）为依据。例如，“最大严紧性”典型地发生在约 Tm-5℃（低于探针 Tm 5℃）；“高等严紧性”发生在 Tm 以下约 5-10℃；“中等严紧性”发生在探针 Tm 以下约 10-20℃；“低严紧性”发生在 Tm 以下约 20-25℃。作为替代，或者进一步地，杂交条件可以以杂交的盐或离子强度条件和 / 或一或多次的严紧性洗涤为依据。例如，6×SSC ＝极低严紧性；3×SSC ＝低至中等严紧性；1×SSC ＝中等严紧性；0.5×SSC ＝高等严紧性。从功能上说，可以采用最大严紧性条件确定与杂交探针严紧同一或近严紧同一的核酸序列；而采用高等严紧性条件确定与该探针有约 80％或更多序列同一性的核酸序列。

[0057] 对于要求高选择性的应用，典型地期望采用相对严紧的条件来形成杂交体，例如，选择相对低的盐和 / 或高温度条件。Sambrook 等（Sambrook，J. 等（1989）分子克隆，实验室手册，Cold Spring Harbor Press，Plainview，N.Y.）提供了包括中等严紧性和高等严紧性在内的杂交条件。

[0058] 为便于说明，用于检测本发明的多核苷酸与其它多核苷酸杂交的合适的中度严紧条件包括：用 5×SSC、0.5％ SDS、1.0mM EDTA(pH8.0) 溶液预洗；在 50-65℃下在 5×SSC 中杂交过夜；随后用含 0.1％ SDS 的 2×、0.5× 和 0.2×SSC 在 65℃下各洗涤两次 20 分钟。本领域技术人员应当理解，能容易地操作杂交严紧性，如改变杂交溶液的含盐量和 / 或杂交温度。例如，在另一个实施方案中，合适的高度严紧杂交条件包括上述条件，不同之处在于杂交温度升高到例如 60-65℃或 65-70℃。

[0059] 在本发明中，所述对 SEQ ID NO：1 所示的核苷酸序列进行一个或多个碱基的取代、缺失、添加修饰的核苷酸序列，是指分别或同时在所述核苷酸序列的 5’端和 / 或 3’端，和 / 或序列内部进行例如不超过 2-45 个，或者不超过 2-30 个，或者不超过 3-20 个，或者不超过 4-15 个，或者不超过 5-10 个，或者不超过 6-8 个的分别用逐个连续整数表示的碱基的取代、缺失、添加修饰。

[0060] 通过一种多核苷酸进行说明，其所具有的核苷酸序列例如与 SEQID NO：1 的参考核苷酸序列至少具 95％的“同一性”是指：在 SEQ IDNO：1 的参考核苷酸序列之每 100 个核苷酸中，该多核苷酸的核苷酸序列除了含有多达 5 个核苷酸的不同外，该多核苷酸之核苷酸序列与参考序列相同。换句话说，为了获得核苷酸序列与参考核苷酸序列至少 95％相同的多核苷酸，参考序列中多达 5％的核苷酸可被删除或被另一核苷酸替代；或可将一些核苷酸插入参考序列中，其中插入的核苷酸可多达参考序列之总核苷酸的 5％；或在一些核苷

酸中，存在删除、插入和替换的组合，其中所述核苷酸多达参考序列之总核苷酸的5%。参考序列的这些突变可发生在参考核苷酸序列的5'或3'末端位置，或在这些末端位置之间的任意地方，它们或单独散在于参考序列的核苷酸中，或以一个或多个邻近的组存在于参考序列中。

[0061] 在本发明中，用于确定序列同一性和序列相似性百分数的算法是例如BLAST和BLAST 2.0算法，它们分别描述在Altschul等(1977)Nucl.Acid.Res.25:3389-3402和Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-410。采用例如文献中所述或者默认参数，BLAST和BLAST 2.0可以用于确定本发明的核苷酸序列同一性百分数。执行BLAST分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

[0062] 在本发明中，所述与SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列具有至少90%的序列同一性的核苷酸序列包括与SEQ ID NO:1所公开序列基本同一的多核苷酸序列，例如当采用本文所述方法(例如采用标准参数的BLAST分析)时，与本发明多核苷酸序列相比含有至少90%序列同一性、优选至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高的序列同一性的那些序列。

[0063] 在本发明中，所述寡核苷酸分子较好是至少长约15nt，更好是长约25nt，尤其是至少50nt，并可在高度严紧条件下与一种或多种上述多核苷酸分子杂交。所说的高度严紧条件是在6XSSC/0.5%焦磷酸钠中洗膜，并且洗膜温度对于长约14碱基者为大约37℃，长约17碱基者为大约48℃，长约20碱基者为大约55℃，长约23碱基者为大约60℃。本发明的较长寡核苷酸分子的其他杂交条件可由本领域技术人员按照标准技术来确定。在本发明的实施方案中，本发明的寡核苷酸分子互补于本发明上述多核苷酸分子至少之一的一部分。

[0064] 本文所用的术语"多核苷酸分子"、"寡核苷酸分子"、"编码序列"等是指单链或双链的DNA和RNA分子，可包含一个或多个原核序列，cDNA序列，包含外显子和内含子的基因组DNA序列，化学合成的DNA和RNA序列，以及有义和相应的反义链。

[0065] 生产和操作本文公开的多核苷酸分子及寡核苷酸分子的方法是本领域技术人员已知的，并可按照已描述的重组技术(参见Maniatis等，1989，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约；Ausubel等，1989，分子生物学当前技术，Greene Publishing Associates & Wiley Interscience，NY；Sambrook等，1989，分子克隆，实验室手册，第2版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约；Innis等(编)，1995，PCR策略，Academic Press，Inc.，San Diego；和Erlich(编)，1992，PCR技术，牛津大学出版社，New York)完成。

[0066] 在本发明中，所述Ts27基因重组蛋白、Ts27基因编码蛋白和Ts27蛋白为同一含义，均指根据Ts27基因cDNA序列中的编码序列翻译得到的蛋白。

[0067] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0068] 实施例1 旋毛虫Ts27基因的克隆及序列分析

[0069] 1. 筛选血清的制备

[0070]　收集旋毛虫肌幼虫(国际标准虫株 ISS533),实验猪(五指山小型猪),20kg/ 头,共 4 头,经口感染旋毛虫肌幼虫 20000 条,新西兰大耳白兔和 BALB/C 小鼠各 2 只,经口分别感染旋毛虫肌幼虫 4000 条和 500 条,4 周后获人工感染猪血清、感染兔血清以及感染鼠血清。经 ELISA 测定血清滴度,感染猪血清达 1 ∶ 10000 以上,感染兔血清以及感染鼠血清达 1 ∶ 1000 以上。

[0071]　2. 免疫筛选表达文库

[0072]　旋毛虫成虫 λZAPIIcDNA 表达文库购自刘明远(参考文献《中国旋毛虫分离株成虫和新生幼虫基因文库的构建和筛选》,中国兽医学报,1998,18(2):147-150.)。

[0073]　1μl 旋毛虫成虫 λZAP II cDNA 表达文库,稀释液加入 600μl 宿主菌 XL1-Blue 中,37℃,吸附 20 分钟加入顶层琼脂,倒置于 42℃温箱中培养至有针尖大小的噬菌斑长出。把硝酸纤维素膜铺在平板上,放在 37℃温箱培养过夜。第二天在室温下将膜做好标记,从平板上揭下,浸入实施例 1 制备的旋毛虫感染猪血清 (1 ∶ 10000)2 小时,用 TBST(TBS 含 0.5% Tween20) 洗膜 3 次,再把膜浸入二抗工作液 -1 ∶ 10000 辣根过氧化物酶 - 兔抗猪 IgG(Sigma 公司)2 小时。将膜浸入显色液 DAB 中 (Pierce 公司),显色充分后,加入 H_2O 终止反应。用 1 ∶ 10000 实施例 1 制备的旋毛虫感染猪血清进一步筛选获得的阳性噬菌斑,经三轮复筛,获得 74 个阳性噬菌斑。随后进行阳性噬菌斑的体内剪切。将 500μl 宿主菌 XL1-Blue 和 500μl 筛选得到的阳性噬菌斑液(可以根据情况改变加入量)加入至 5ml 的 NZY Broth 中,37℃振摇培养 4 ～ 5hr,再加入 3 滴氯仿,37℃,振摇培养 15min,3000rpm,4℃离心 15min 后,用 1.5ml 离心管分装上清,每管加 5μl 氯仿,4℃保存备用。将 200μl 宿主菌 XL1-Blue、150μl 上述扩增后噬菌体上清和 5μl 辅助噬菌体混合,37℃水浴 15min ;加入 3ml 的 LB 液体培养基,37℃,振摇培养 3hr ;65℃水浴 20min ;4000rpm,4℃离心 15min 后取上清分装,即为噬菌体体内剪切后的上清。取 4μl 体内剪切后的上清加入至 200μl 宿主菌 SOLR 中,37℃,水浴 15min ;涂布于平板上,进行蓝白筛选,白色菌落为阳性克隆。经 PCR 鉴定后,选取 Ts27 克隆进行 DNA 序列测定。

[0074]　3.Ts27cDNA 序列与编码的氨基酸分析

[0075]　Ts27 基因的 cDNA 长 1096bp,编码 231 个氨基酸,其理论分子量为 26.2KD。以下为 Ts27 基因的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :1) 和其表达蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

[0076]　GAAAATATGGCACATAGCAATGAAAATGtTGACtTTATGaAATATGCaAtTGAGGAgGCTCCAGCTGCG
gCATTTTACATTCCAGAATATTTTAaTGACaAGGAGGAAGAGTTTTATACACAGCAGATATATTCAGCTCCCGCTCC
GAAATGGACTAGCCTTAGTGCTAGGCGtTTGCTAAATTACGGAGGTATTGTTGGCAAAAAGGGACTCATTCAAGTTA
ATGATATACCTTTCTGGTTACGTGCACTGATGAAGCGGGTTTGTAAGTCAGTACCATTGTTTACTCCAGGTAATGAA
CCGAATCATGTTCTAATCAATGAATATTTACCTGGTCAAGGAATTATGCCTCATACTGATGGGCCAGCTTATTTTCC
TGTGGTTGCCAACATTACTTTGGGGAGTCATACTGTGCTTGATCTCTATGAAACAGAAACGAGAAATTATATTGGAT
CATTTCTCCTTGAACGGAAAAGCTTATTAATAATTTCTGAGCAGCTGTATGTAAATTTCCAGCATGGTATCAAAGAA
GTTAAAGAAGATGAAATCAGTGAAAAAATACTAAACTATAAATTATGCTCAGAAAAGTATAGTAGCGAAGAAAAAAT
TCCTCGTAAAACACGAATATCCATTACAATTCGAAACGTGCCGAAAACGATTACAGCTTTTACAGCTGTTTTCAATA
ACCGTGCATGAATACGCATGGGATGCTGGATTCCAGTGAAAATTTTACCGAGAGAGACTATCTCGGTTATTATTAAA
GTTCGTTTCTCATTCGATGTTCATTGCCAAGTCAGATTGATTTTTTTAATCTAATTGTTCATTGATTCAAATTTCTT
TTTTTTGATTAGTTGCTAAATGTTCATTTCATTGTCCAAATATTTCCATTGACGATTATGTGACTTTATCATTTATG

TAATAATCGTTTTCTTTTACATTTCACACGTTTCAGCAATCAGTATTTTtAATATCAATTTTTTCGtTATTTTATATTTTGTtATTGTAcCATGATGAAATTTTATaAAATATGATAGCAATAGATAGGTCAACAAAAGCAGCAAAATATATtAAAAAAAAAAAAAAAAACtCgAGGGGC(SEQ ID NO:1);(其中第1位至第693位碱基所示序列为编码序列,即黑色下划线之间的序列)

[0077] ENMAHSNENVDFMKYAIEEAPAAAFYIPEYFNDKEEEFYTQQIYSAPAPKWTSLSARRLLNYGGIVGKKGLIQVNDIPFWLRALMKRVCKSVPLFTPGNEPNHVLINEYLPGQGIMPHTDGPAYFPVVANITLGSHTVLDLYETETRNYIGSFLLERKSLLIISEQLYVNFQHGIKEVKEDEISEKILNYKLCSEKYSSEEKIPRKTRISITIRNVPKTITAFTAVFNNRA(SEQ IDNO:2)。

[0078] 实施例2制备Ts27基因重组蛋白及免疫血清

[0079] 1.Ts27基因原核表达及纯化

[0080] (1)扩增Ts27基因:

[0081] 以实施例1获得的阳性克隆pBluescript/Ts27菌液为模板进行全菌PCR扩增,引物为

[0082] 5'-CGGGATCCGAAAA TATGGCACATAGCAATG-3'(SEQ ID NO:3); 和 5'-CGCTCGAGTGCACGGTTA TTGAAAACAGC-3'(SEQ ID NO:4)。

[0083] 扩增条件:95℃ 5min;94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 2min,35个循环;72℃ 10min。

[0084] (2)扩增纯化后的Ts27基因片段经BamH Ⅰ和Xho Ⅰ酶切后,亚克隆于原核表达载体PET-28a(+)。正确的重组质粒转化大肠杆菌BL21株,经37℃ 150转/分1.0mM IPTG诱导3小时后,将菌液分装至50ml离心管中,11000rpm,4℃离心5min,弃上清,收集菌体,用200ml的20mM Tris-HCl(pH7.9)充分悬浮。加入1ml蛋白酶抑制剂II(Protease Inhibitor Cocktail Set II)。在冰上充分超声,超声输出强度85%,每次6秒,间隔3秒;11000rpm,4℃离心15min,弃上清,收集包涵体及细胞碎片;再用100ml的20mM Tris-HCl(pH7.9)悬浮沉淀。加入新鲜配制的溶菌酶溶液至终浓度为100μg/ml,置于冰上30min,期间用玻璃棒不断搅拌;在冰上充分超声,超声输出强度85%,每次6秒,间隔3秒;11000rpm,4℃离心15min,弃上清,获得Ts27基因重组蛋白,重组蛋白经His-binding(Novagen公司)亲和层析柱纯化后,经电洗脱仪洗脱使纯度更高,纯度达80%以上(图1)。

[0085] 2.Ts27基因重组蛋白免疫血清的制备

[0086] 纯化的Ts27重组蛋白与佐剂ISA 50V混合后,经皮肤多点注射免疫BALB/c小鼠(25μg/只),每2周加强1次,共加强2次。初次免疫5周后摘眼球取血,采集的血液置室温放置2~3hr后,3000rpm,4℃离心10min;取上清,3000rpm,4℃离心10min。收集血清并分装,-80℃保存备用。ELISA测定抗体效价高达1:80000以上。

[0087] 实施例3Ts27基因重组蛋白的免疫特性

[0088] 1.酶联免疫吸附(ELISA)检测

[0089] 以1μg实施例2制备的Ts27基因重组蛋白为抗原包被96孔酶标板,一抗为待检血清,一抗待检血清分别为旋毛虫病人血清(35例,华中科技大学提供,工作浓度为1:200)、感染旋毛虫的兔及鼠血清(各2例,实施例1制备,工作浓度均为1:1000),感染旋毛虫的猪血清(2例,实施例1制备,工作浓度均为1:10000)。二抗为辣根过氧化物酶标记的相应二抗(羊抗鼠、羊抗兔、羊抗人二抗,购自北京中杉金桥生物公司产品,兔抗猪二抗购自Sigma,工作浓度为1:5000),将健康人血清、未感染旋毛虫的正常兔、猪和鼠

血清设为阴性对照。

[0090] 实验结果表明，该蛋白可与旋毛虫病人血清、感染旋毛虫的兔、猪及鼠血清产生阳性反应，OD 值与阴性血清比值大于 2.0。说明 Ts27 基因的重组蛋白具有特异的免疫原性，是极具潜力的诊断试剂。

[0091] 2.Western 印迹分析

[0092] 实施例 2 制备的纯化的 Ts27 基因表达蛋白 (200ng) 经 SDS-PAGE 电泳后，转移至 PVDF 膜，用 ECL 化学发光试剂盒 (Amersham 公司) 检测，分别以病人血清 1 ： 200(华中科技大学提供)、感染猪血清 1 ： 10000、感染兔血清 1 ： 1000、感染鼠血清 1 ： 1000(上述三种血清均为实施例 1 制备)、Ts27 基因重组蛋白免疫鼠血清 (实施例 2 制备)1 ： 10000 作为第一抗体，二抗与本实施例的 1 中相同。结果显示约 33KDa 处均呈现一明显的蛋白印迹带 (图 2)，进一步表明 Ts27 基因重组蛋白具有良好的免疫原性，可为感染旋毛虫的人、猪、兔、鼠血清及 Ts27 基因重组蛋白免疫血清所识别，且特异性好，可用于旋毛虫感染的诊断。

[0093] 实施例 4Ts27 基因表达蛋白敏感性和特异性的鉴定

[0094] 1. 酶联免疫吸附 (ELISA) 检测

[0095] 以 1μg 实施例 2 制备的 Ts27 基因重组蛋白为抗原包被 96 孔酶标板，一抗为待检血清，一抗待检血清分别为旋毛虫病人血清 (35 例，华中科技大学提供，工作浓度为 1 ： 200)、其他寄生虫感染病人血清 (蛔虫病人、钩虫病人、鞭虫病人、华支睾吸虫病人、日本血吸虫病人、猪带绦虫病人血清各 5 例，华中科技大学提供，工作浓度均为 1 ： 200)，健康人血清 (10 例，首都医科大学寄生虫教研室职工，工作浓度均为 1 ： 200)。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗人二抗 (购自北京中杉金桥生物公司产品，工作浓度为 1 ： 5000)，将健康人血清设为阴性对照。该蛋白可与旋毛虫病人血清产生阳性反应，OD 值与阴性血清比值大于 2.0。同时，该蛋白不与其他寄生虫感染病人血清发生反应，说明 Ts27 基因的重组蛋白具有特异的免疫原性，敏感性为 91.4% (32/35)，特异性为 100% (0/35)，是极具潜力的诊断抗原。

[0096] 2.Western 印迹分析

[0097] 实施例 2 制备的纯化的 Ts27 基因表达蛋白 (100ng) 经 SDS-PAGE 电泳后，转移至 PVDF 膜，用 ECL 化学发光试剂盒 (Amersham 公司) 检测，分别以旋毛虫病人血清、其他寄生虫病人血清 (蛔虫病人、钩虫病人、鞭虫病人、华支睾吸虫病人、日本血吸虫病人、猪带绦虫病人血清各 5 例，华中科技大学提供) 以及健康人血清 10 例 (首都医科大学寄生虫教研室职工)，工作浓度为 1 ： 200，二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗人二抗 (购自北京中杉金桥生物公司产品，工作浓度为 1 ： 5000)。结果显示有 32 例旋毛虫病人血清与 Ts27 基因表达蛋白反应，在约 33KDa 处均呈现一明显的蛋白印迹带，有 3 例不反应，而其他病人血清以及正常人血清与 Ts27 基因表达蛋白均未出现杂交信号 (附图 3)。敏感性和特异性与 ELISA 一致，进一步表明 Ts27 基因重组蛋白具有良好的敏感性和特异性，可用于旋毛虫感染的诊断。

[0098] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001]

序列表

<110> 首都医科大学

<120> 旋毛虫Ts27基因、其编码蛋白及其用途

<130> IDC110022

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 1096
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 1
gaaaatatgg cacatagcaa tgaaaatgtt gactttatga aatatgcaat tgaggaggct 60

ccagctgcgg cattttacat tccagaatat tttaatgaca aggaggaaga gttttataca 120

cagcagatat attcagctcc cgctccgaaa tggactagcc ttagtgctag gcgtttgcta 180

aattacggag gtattgttgg caaaaaggga ctcattcaag ttaatgatat acctttctgg 240

ttacgtgcac tgatgaagcg ggtttgtaag tcagtaccat tgtttactcc aggtaatgaa 300

ccgaatcatg ttctaatcaa tgaatattta cctggtcaag gaattatgcc tcatactgat 360

gggccagctt attttcctgt ggttgccaac attactttgg ggagtcatac tgtgcttgat 420

ctctatgaaa cagaaacgag aaattatatt ggatcatttc tccttgaacg gaaaagctta 480

ttaataattt ctgagcagct gtatgtaaat ttccagcatg gtatcaaaga agttaaagaa 540

gatgaaatca gtgaaaaaat actaaactat aaattatgct cagaaaagta tagtagcgaa 600

gaaaaaattc ctcgtaaaac acgaatatcc attacaattc gaaacgtgcc gaaaacgatt 660

acagctttta cagctgtttt caataaccgt gcatgaatac gcatgggatg ctggattcca 720

gtgaaaattt taccgagaga gactatctcg gttattatta aagttcgttt ctcattcgat 780

gttcattgcc aagtcagatt gattttttta atctaattgt tcattgattc aaatttcttt 840

tttttgatta gttgctaaat gttcatttca ttgtccaaat atttccattg acgattatgt 900

gactttatca tttatgtaat aatcgttttc ttttacattt cacacgtttc agcaatcagt 960

atttttaata tcaatttttt cgttatttta tattttgtta ttgtaccatg atgaaatttt 1020

ataaaatatg atagcaatag ataggtcaac aaaagcagca aaatatatta aaaaaaaaaa 1080

aaaaaactcg aggggc 1096

<210> 2
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 2

Glu Asn Met Ala His Ser Asn Glu Asn Val Asp Phe Met Lys Tyr Ala
1 5 10 15

Ile Glu Glu Ala Pro Ala Ala Ala Phe Tyr Ile Pro Glu Tyr Phe Asn
20 25 30

Asp Lys Glu Glu Glu Phe Tyr Thr Gln Gln Ile Tyr Ser Ala Pro Ala
35 40 45

[0002]

Pro Lys Trp Thr Ser Leu Ser Ala Arg Arg Leu Leu Asn Tyr Gly Gly
    50   55   60

Ile Val Gly Lys Lys Gly Leu Ile Gln Val Asn Asp Ile Pro Phe Trp
65   70   75   80

Leu Arg Ala Leu Met Lys Arg Val Cys Lys Ser Val Pro Leu Phe Thr
                85   90   95

Pro Gly Asn Glu Pro Asn His Val Leu Ile Asn Glu Tyr Leu Pro Gly
            100   105   110

Gln Gly Ile Met Pro His Thr Asp Gly Pro Ala Tyr Phe Pro Val Val
        115   120   125

Ala Asn Ile Thr Leu Gly Ser His Thr Val Leu Asp Leu Tyr Glu Thr
    130   135   140

Glu Thr Arg Asn Tyr Ile Gly Ser Phe Leu Leu Glu Arg Lys Ser Leu
145   150   155   160

Leu Ile Ile Ser Glu Gln Leu Tyr Val Asn Phe Gln His Gly Ile Lys
                165   170   175

Glu Val Lys Glu Asp Glu Ile Ser Glu Lys Ile Leu Asn Tyr Lys Leu
            180   185   190

Cys Ser Glu Lys Tyr Ser Ser Glu Glu Lys Ile Pro Arg Lys Thr Arg
        195   200   205

Ile Ser Ile Thr Ile Arg Asn Val Pro Lys Thr Ile Thr Ala Phe Thr
    210   215   220

Ala Val Phe Asn Asn Arg Ala
225   230

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 3
cgggatccga aaatatggca catagcaatg 30

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 4
cgctcgagtg cacggttatt gaaaacagc 29

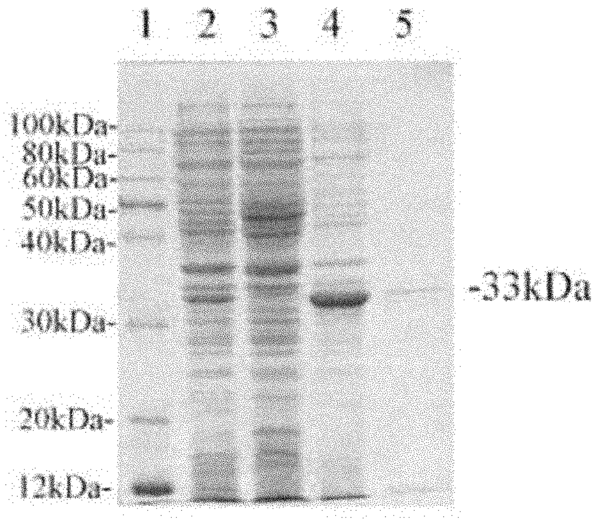
1 2 3 4 5
100kDa-
80kDa-
60kDa-
50kDa-
40kDa-
30kDa-
20kDa-
12kDa-
-33kDa

图 1

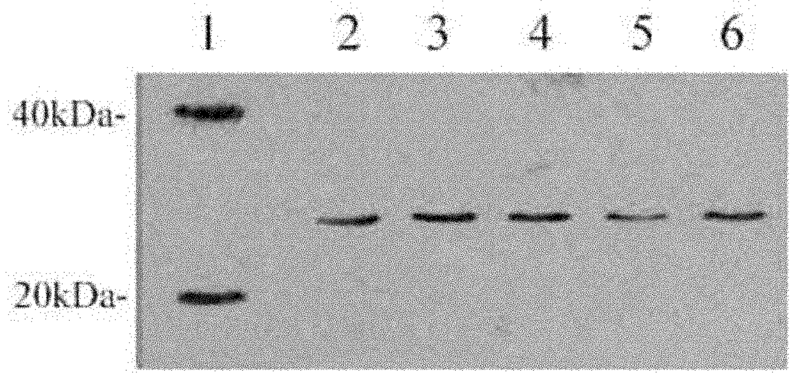
1 2 3 4 5 6
40kDa-
20kDa-

图 2

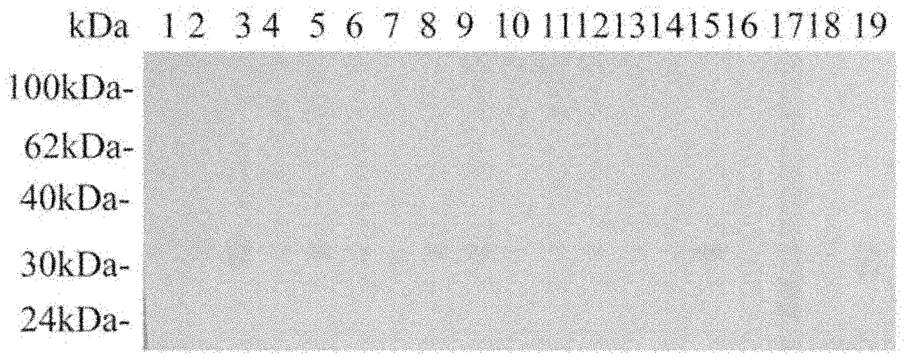
kDa 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
100kDa-
62kDa-
40kDa-
30kDa-
24kDa-

图 3-A

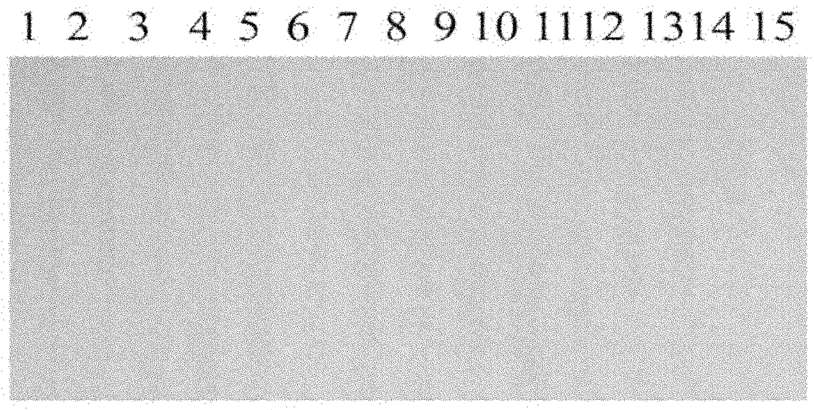

图 3-B

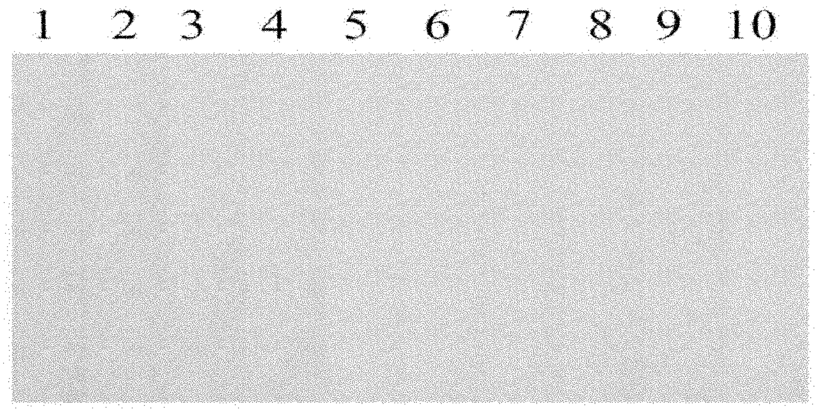

图 3-C

patsnap

专利名称(译)	旋毛虫Ts27基因、其编码蛋白及其用途		
公开(公告)号	CN102181450A	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN201110053721.5	申请日	2011-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
[标]发明人	诸欣平 杨静 杨雅平 秦佳佳		
发明人	诸欣平 杨静 杨雅平 秦佳佳		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/11 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/577 G01N33/53 A61K38/17 A61K39/395 A61P33/10		
代理人(译)	程泳		
其他公开文献	CN102181450B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及旋毛虫Ts27基因和其编码的蛋白。本发明还涉及含有Ts27基因的重组载体和重组细胞，以及与Ts27基因编码蛋白特异性结合的抗体。本发明还涉及所述Ts27基因、其编码蛋白、抗体用于制备诊断动物和人旋毛虫感染的检测试剂的用途以及检测试剂盒。本发明的Ts27基因重组蛋白免疫动物后能够产生高滴度的抗体，并且Ts27基因重组蛋白能够特异性地被旋毛虫感染的动物或人血清所识别。