

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 11/00

C12Q 1/02

G01N 33/53

G01N 33/531

G01N 33/569



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00119570.0

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1216074C

[22] 申请日 2000.8.4 [21] 申请号 00119570.0

[71] 专利权人 华东师范大学

地址 200062 上海市中山北路 3663 号

[72] 发明人 钱旻 白艳军

审查员 陈晓平

[74] 专利代理机构 上海德昭专利事务所

代理人 张斌盛

权利要求书 2 页 说明书 17 页

[54] 发明名称 日本血吸虫虫卵抗原模拟肽及其筛选

[57] 摘要

本发明提供一种日本血吸虫虫卵抗原模拟肽、筛选及其在血吸虫病诊断中的应用，属生物技术领域。利用噬菌体表面展示技术筛选出本血吸虫虫卵抗原模拟肽，再将其用于血吸虫病诊断中，通过测定其 OD 值，与健康人的检验结果对比即可以诊断出是否患有血吸虫病。具有制备简单易行、成本低，检测效果好的优点，是目前诊断血吸虫病的较佳方法之一。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种日本血吸虫虫卵抗原模拟肽，其特征在于多肽序列为： $\text{NH}_2$ —L—Q—R—A—N—R—T—R—Y—G—T—E—T—H—Q—COOH。

2、一种日本血吸虫虫卵抗原模拟肽的筛选方法，其特征在于：利用噬菌体表面展示技术筛选过程如下：将日本血吸虫虫卵抗原的单克隆抗体 6B12，固定在聚苯乙烯酶标板上，加入噬菌体随机 15—肽文库，其多样性为  $10^8$ ，从 15—肽噬菌体文库中筛选与 6B12 有特异性结合力的噬菌体，洗涤以去除非特异性结合的噬菌体，然后用 pH 值为 2.5 的洗脱液将结合在单抗 6B12 上的噬菌体洗脱下来，中和后感染大肠杆菌 K91Kan，扩增后将噬菌体提取纯化，即为第一轮富集噬菌体，将其作为第二轮筛选的起始物，用提高亲和力的筛选方法，经过三轮筛选后，得到与 6B12 结合特异性强、亲和力高的噬菌体多肽，再将第三轮筛选的噬菌体单克隆化，并结合 ELISA、竞争 ELISA 和 Western—blot 方法挑选出与 6B12 有强阳性反应的噬菌体克隆，然后进行鉴定，证明与单抗 6B12 结合的位点是噬菌体的 PIII 蛋白质所携带外源多肽。

3、如权利要求 2 所述的日本血吸虫虫卵抗原模拟肽的筛选方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 包板：单克隆抗体 6B12 用 CBS 稀释，包板浓度为  $10\mu\text{g}/\text{孔}$ ，包板体积为  $100\mu\text{l}$ ，置于  $4^\circ\text{C}$  下孵育大于 16 小时；

(2) 洗板：加入  $200\mu\text{l}$  PBST05 洗板液静置 5 分钟，重复洗三次，尽量甩干板孔中的液体；

(3) 封阻：加入  $200\mu\text{l}$  1% BSA 于  $37^\circ\text{C}$  封阻 1 小时，同(2)洗板；

(4) 加入噬菌体库：加入 100 $\mu$ l 含 1% BSA 的 PBST 稀释至  $Tu=10^{10}$  的噬菌体溶液，37 $^{\circ}$ C 慢摇孵育 1 小时，同(2)洗板；

(5) 洗脱：加入 100 $\mu$ l pH2.2, 0.1N HCl, 0.1% BSA 洗脱液，反应 15 分钟，再加入 40 $\mu$ l pH9.5, 1M Tr i s—HCl 中和液，使其 pH 值变为中性；

(6) 感染：在 15—ml 指管中先放入 160 $\mu$ l 大肠杆菌 K91Kan 感受态细胞，再加入上述洗脱的 140 $\mu$ l 噬菌体溶液，室温感染 15 分钟；

(7) 诱导：加入 300  $\mu$  l LB—0.02Tet 后，37 $^{\circ}$ C 震荡，培养 30 分钟；

(8) 涂板：取 6 $\mu$ l 的培养液涂平板以计算噬菌体的得率，其余的培养液涂布到三个大培养皿上，37 $^{\circ}$ C 培养过夜；

(9) 次日将培养皿上的菌落用 LB 液体培养基冲洗下来转入离心管中，37 $^{\circ}$ C 震荡，培养 1 小时后，将噬菌体纯化出来并测定其效价，作为下一轮筛选的噬菌体溶液；

(10) 重复以上的筛选步骤，进行第二和第三轮筛选，并且逐渐降低 McAb—6B12 的包板浓度，第二轮为 1 $\mu$ g/孔，第三轮为 0.1  $\mu$  g/孔；

(11) 测定并纪录每次筛选噬菌体的输入量和输出量，通过计算每一轮的噬菌体得率来检验噬菌体的富集情况；

(12) 用 McAb—6B12 包板，对第三轮筛选得到的噬菌体溶液作 ELISA 分析，结果使得噬菌体溶液对 McAb—6B12 的亲合力得到了较大的提高，这表明与 McAb—6B12 有亲和力的噬菌体得到了有效地富集。

## 日本血吸虫虫卵抗原模拟肽及其筛选

### 所属技术领域

本发明涉及一种日本血吸虫虫卵抗原模拟肽，即一种利用噬菌体表面展示技术筛选的，能模拟日本血吸虫虫卵抗原的噬菌体多肽，还涉及该日本血吸虫虫卵抗原模拟肽的筛选方法以及其在血吸虫病诊断中的应用，属生物技术领域。

### 背景技术

血吸虫广泛分布于世界各地，尤其是发展中国家。有五种血吸虫可以感染人体并引起人体的血吸虫病。在我国以日本血吸虫为主，日本血吸虫的虫卵产量比其他虫种都高，即使在产卵量相同的情况下，其虫卵的致病作用也比其他虫种的大，虫卵的沉积可引起血管的堵塞、组织坏死、肉芽肿反应和组织纤维化。因此虫卵在日本血吸虫对人体的致病过程中有着重要的作用。对于血吸虫病的研究，发展理想的诊断试剂和疫苗是两个主要方面。最初，血吸虫病的诊断方法以常规粪检为主的病原学检查，这种方法因工作量大、漏检率高，不能满足疫情检测的需要；目前虫卵抗原用于临床检测是诊断血吸虫病的主要方法之一。Dunne D, Hillyer GV, Vazquez G 等在《美国热带医学与卫生杂志》(Am J Trop Med Hyg 1988;38:508)中记载：将可溶性虫卵抗原 (Soluble Egg Antigen, SEA) 用阳离子交换色谱法分离纯化得到纯化片段虫卵 (Cation Exchange Fraction, CEF6) 分子抗原，而虫卵 CEF6 分子抗原是导致环卵沉淀现象产生的重要成分之一，目前主要用于曼氏血吸虫病的诊断。但是，目前虫卵抗原主要是用实验动物来制备的，这样要耗费大量的动物，因此制备成本高，且制备方法较为烦琐。本发明正是利用免疫诊断方法，利用

噬菌体表面展示技术筛选出的日本血吸虫虫卵抗原模拟肽，检测血吸虫病人的血清，以达到诊断的效果。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种日本血吸虫虫卵抗原模拟肽。

本发明的另一目的在于提供一种简单易行、成本低的日本血吸虫虫卵抗原模拟肽的筛选方法。

本发明的另一目的在于提供该日本血吸虫虫卵抗原模拟肽在血吸虫病诊断中的应用。

本发明所述的日本血吸虫虫卵抗原模拟肽具有如下外源多肽序列：

$\text{NH}_2\text{—L—Q—R—A—N—R—T—R—Y—G—T—E—T—H—Q—COOH}$ 。

本发明所述的日本血吸虫虫卵抗原模拟肽由噬菌体表面展示技术筛选而得，即在噬菌体表面表达外源抗原表位或外源肽，并制成库，而随机肽噬菌体表面展示技术则是表达的外源肽是具有一定长度且随机合成的。然后通过特异性结合物(如单抗)的亲富集、筛选与之相结合的噬菌体，这样就得到了相对应的抗原表位或肽，并在大肠杆菌中可大量增殖，因此一个重组噬菌体所展示的特异性表位只要被鉴定，那么此噬菌体就可以成为特异性抗原的无限来源。

利用噬菌体表面展示技术筛选日本血吸虫虫卵抗原模拟肽的过程如下：

将由中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供日本血吸虫虫卵抗原的单克隆抗体 6B12，6B12 为实验室编号，固定在聚苯乙烯酶标板上，加入由美国密苏里大学的 GP. Smith 教授赠送的噬菌体随机 15—肽文

库，其多样性为  $10^8$ ，从 15—肽噬菌体文库中筛选与 6B12 有特异性结合力的噬菌体，洗涤以去除非特异性结合的噬菌体，然后用 pH 值为 2.5 的洗脱液将结合在单抗 6B12 上的噬菌体洗脱下来，中和后感染美国密苏里大学的 GP. Smith 教授赠送的大肠杆菌 K91Kan，扩增后将噬菌体的提取纯化，即为第一轮的富集噬菌体，将其作为第二轮筛选的起始物，用提高亲和力的筛选方法，经过三轮筛选后，得到与 6B12 结合特异性强、亲和力高的噬菌体多肽，再将第三轮筛选的噬菌体单克隆化，并结合 ELISA、竞争 ELISA 和 Western—blot 方法挑选出与 6B12 有强阳性反应的噬菌体克隆，然后进行鉴定，证明与单抗 6B12 结合的位点是噬菌体的 PIII 蛋白质所携带外源多肽。

通过上述操作，从 400 个单克隆化的噬菌体中挑选出 43 个与单抗 6B12 有高亲和力的噬菌体，再从 43 个噬菌体中挑选出 13 个与 6B12 的决定簇有特异性反应的目标噬菌体，对这 13 个目标噬菌体所插入的外源多肽进行编码 DNA 序列分析后，发现这 13 个目标噬菌体所携带的编码 DNA 序列完全相同，都是：5' —AAT—GTT—TCT—CGT—TGT—TCT—TGC—GCT—ATG—CCT—TGG—CTT—TGG—GTG—GTT' 3，其相应的外源多肽序列为：NH<sub>2</sub>—L—Q—R—A—N—R—T—R—Y—G—T—E—T—H—Q—COOH，从氨基酸组成来看，该肽段偏碱性，具有很强的亲水性。

本发明提供的日本血吸虫虫卵抗原模拟肽在检测血吸虫病中的应用，所采用的方法是用 ELISA 检测法，先包被抗原，再加入血清，然后

加入过氧化物酶标记的抗人 IgG 结合物,经洗板后加入 OPD 底物显色液,用酶标仪测定其 OD 值,与健康人的检验结果对比即可以诊断出是否患有血吸虫病。

本发明与已有技术相比所具有如下优点和积极效果:

目前用于日本血吸虫病诊断的虫卵抗原都是来源于人工感染的实验动物,因而要耗费大量的动物,制备成本高,且制备方法比较烦琐。而用本发明所采用的方法筛选到的模拟虫卵抗原则可克服这些缺点:

1. 噬菌体多肽易生产、易分离,因而价廉;
2. 噬菌体稳定且保存时间长;
3. 易进一步进行改造以满足不同的需要;
4. 噬菌体具有免疫原性因而免疫时无需佐剂;
5. 提供了一种快速鉴定免疫优势中和抗原决定簇的有效方法。

#### 具体实施方式

一、本实施例所用的主要实验材料和试剂及其来源:

##### (一) 实验材料

- 1、噬菌体随机 15-肽文库(多样性为  $10^8$ )、K91Kan 大肠杆菌,由美国密苏里大学的 GP. Smith 教授赠送的;
- 2、日本血吸虫虫卵抗原的单克隆抗体 6B12、日本血吸虫虫卵抗原由中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供;
- 3、兔抗 M13 血清由澳大利亚动物健康研究所提供;
- 4、羊抗兔酶标抗体(Goat anti-Rabbit HRP)、羊抗鼠酶标抗体(Goat anti-Mouse HRP)购自丹麦 DAKO 公司;

5、邻苯二胺 (OPD)、二氨基联苯胺 (DAB)、酶标板均购自美国 Nanc 公司；

## (二) 主要试剂

### 1、培养基：

#### (1) 大肠杆菌 K91Kan 液体培养基 (LB 培养基)

蛋白胨 (Bacto-Tryptone)	10 g/L
酵母粉 (Yeast extract)	5 g/L
NaCl	10 g/L

加入适量的 dH<sub>2</sub>O 充分溶解后，用 1N 的 NaOH 将 pH 值调到 7.0—7.5 之间，最后用 dH<sub>2</sub>O 定容至 1L，分装后高压灭菌。

#### (2) LB 固体培养基

上述分装好的液体培养基加入 1.5% 的琼脂后再进行高压灭菌即可。

#### (3) 高营养液体培养基 (TB)

K—PBS (0.17M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—0.72M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhydrous)	2.31g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhydrous)	12.54g
dH <sub>2</sub> O 加至	100ml
高压灭菌	

#### TB 培养基：

蛋白胨 (Bacto-Tryptone)	12 g
酵母粉 (Yeast extract)	24g/L

甘油 (Glycerol)	4 ml
dH <sub>2</sub> O 加至	900ml
高压灭菌	

#### (4) 选择培养基:

将高压灭菌后的 LB 固体培养基加热完全溶解，待到冷却至 50℃ 左右时加入所需的抗生素，充分混合，在培养基凝固之前浇制平板。

#### 2、抗生素的配制:

卡那霉素储备液的配制：卡那霉素 (kanamycin) 1000×：用 ddH<sub>2</sub>O 溶解 100mg/ml，过滤灭菌，-20℃ 保存；

四环素储备液的配制：四环素 (tetracycline) 1000×：用高压灭菌的 50%甘油溶解 40mg/ml，-20℃ 避光保存；

#### 3、PEG—NaCl:

PEG8000	100 g
NaCl	116.9 g
dH <sub>2</sub> O	475ml

于 1L 的烧杯中搅拌溶解，高压灭菌，终体积应为 600ml，4℃ 避光保存。

#### 4、包板液—pH9.6, 50mM 碳酸盐缓冲液 (CBS):

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
dH <sub>2</sub> O 定容至	1000ml

## 5、洗板液：

## 10×pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS)

NaCl	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	29 g
KCl	2 g
dH <sub>2</sub> O 定溶至	1000ml

## 洗板液—pH7.4 PBS, 0.05% Tween 20, (PBST05)

Tween 20	0.5ml or 5ml for PBST5
1×PBS 加至	1000ml

## 6、封阻液：PBST05—1%BSA，同时也是酶标抗体的稀释液

## 7、洗脱液 (elution buffer)：

1M Tris—HCl, pH2.5 (adjust with glucine)	10ml
BSA	10mg
高压灭菌	

## 8、中和液 (neutralize buffer)：

Tris	12.1g
HCl adjust pH to 9.5	
dH <sub>2</sub> O 定容至	100ml
高压灭菌	

## 9、TBS：

1M Tris—HCl, pH7.5	5ml
NaCl	0.9g
dH <sub>2</sub> O 加至	100ml
高压灭菌	

10、 OPD（邻苯二胺）底物显色液：

(1) OPD 底物缓冲液（PCS）：

柠檬酸	4.66g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	18.4 g
dH <sub>2</sub> O 加至	1000ml
于 4℃ 保存	

(2) OPD 底物显色液：

PCS	9ml
过氧化脲（5mg/ml）	1ml
OPD	4mg

11、 酶终止液：2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

12、 DAB 底物显色液：

10 mM Tris—HCl pH7.5	9ml
过氧化脲（5mg/ml）	1ml
DBA	6mg
30%NiCl	100 μ l

## 二、方法

### （一）噬菌体的扩增、纯化和定量：

## 1、噬菌体的扩增和纯化：

- (1) 取 1ml 的 LB 液体培养基于 15-ml 的指管中，加入 1 $\mu$ l 的卡那霉素 (100mg/ml)，将大肠杆菌 K91Kan 接入，37 $^{\circ}$ C 震荡 (230rpm) 培养过夜；
- (2) 将 1ml 的 K91Kan 培养液转入 10mlTB 溶液中继续震荡培养 2 小时 45 分钟 (至 1:10 稀释后 OD<sub>600</sub>=0.2)，37 $^{\circ}$ C 震荡 (100rpm) 培养 10—15 分钟，即为感受态细胞；
- (3) 将噬菌体原库 (10<sup>11</sup> 颗粒) 加入到感受态细胞中，继续震荡 (100rpm) 培养 15 分钟，将培养物转入 100mlLB—0.02Tet(0.02% 四环素) 中 37 $^{\circ}$ C 震荡 (230rpm) 培养 30 分钟，加入 100 $\mu$ l 四环素 (20mg/ml) 继续培养 24 小时；
- (4) 培养物于 4 $^{\circ}$ C、8000rpm 离心 15 分钟，取上清液加入 15%PEG 充分混合并置于 4 $^{\circ}$ C 下沉淀过夜；
- (5) 4 $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 40 分钟，弃去上清液，加入 TBS1ml 充分溶解，4 $^{\circ}$ C 8000rpm 离心 10 分钟，将上清液转入另一个干净的小离心管中，加入 15%PEG 充分混合并置于 4 $^{\circ}$ C 下沉淀大于 4 小时，离心后用 200 $\mu$ l 的 TBS 溶液溶解，加入 0.7%DMSO 于 4 $^{\circ}$ C 保存。

## 2、噬菌体的定量

本实施例采用噬菌体转染大肠杆菌 K91Kan 形成的转导子数目 (Tu) 来进行噬菌体的定量：

- (1) 取 1ml 的 LB 液体培养基于 15-ml 的指管中，加入 1 $\mu$ l 的卡那

霉素（100mg/ml），将大肠杆菌 K91Kan 接入，37℃ 震荡（230rpm）培养过夜；

- （2）将 1ml 的 K91Kan 培养液转入 10mlTB 溶液中继续震荡培养 2 小时 45 分钟（1:10 稀释后  $OD_{600}=0.2$ ），37℃ 震荡（100rpm）培养 10—15 分钟，即为感受态细胞；
- （3）取大肠杆菌 K91Kan 感受态细胞 10 $\mu$ l 于 15-ml 指管中并与 10 $\mu$ l 一定稀释度（ $10^x$ ）的噬菌体溶液混合，室温保持 10 分钟；
- （4）加入 1ml LB—0.02Tet（0.02%四环素）液体培养基，37℃ 震荡（270rpm）培养 30 分钟；
- （5）取 100 $\mu$ l 培养液涂平板（Kan100—Tet10 LB 固体培养基平板），37℃ 培养过夜；
- （6）对培养皿中菌落进行记数（y），计算噬菌体溶液的效价= $y \times 10^{x+3}$ Tu/ml。

## （二）目标噬菌体的筛选：

- （1）包板：单克隆抗体 6B12 用 CBS(pH9.6, 50mM 碳酸盐缓冲液) 稀释，包板浓度为 10 $\mu$ g/孔，包板体积为 100 $\mu$ l，置于 4℃ 下大于 16 小时；
- （2）洗板：加入 200 $\mu$ l PBST05 洗板液静置 5 分钟，重复洗三次，尽量甩干板孔中的液体；
- （3）封阻：加入 200 $\mu$ l 1%BSA 于 37℃ 封阻 1 小时，同(2)洗板；
- （4）加入噬菌体库：加入 100 $\mu$ l PBST05-1%BSA 稀释至 Tu= $10^{10}$  的

- 噬菌体溶液，37℃慢摇孵育1小时，同(2)洗板；
- (5) 洗脱：加入 100μl 洗脱液(pH2.2, 0.1N HCl 0.1% BSA)反应 15 分钟，再加入 40μl 中和液(pH9.5, 1M Tr i s—HCl)使其 pH 值变为中性；
- (6) 感染：在 15—ml 指管中先放入 160μl 大肠杆菌 K91Kan 感受态细胞，再加入上述洗脱的 140μl 噬菌体溶液，室温感染 15 分钟；
- (7) 诱导：加入 300 μ l LB—0.02Tet 后，37℃震荡(270rpm)培养 30 分钟；
- (8) 涂板：取 6μl 的培养液涂平板以计算噬菌体的得率，其余的培养液涂布到三个大培养皿上，37℃培养过夜；
- (9) 次日将培养皿上的菌落用 LB 液体培养基冲洗下来转入离心管中，37℃震荡(270rpm)培养 1 小时后，将噬菌体纯化出来并测定其效价，作为下一轮筛选的噬菌体溶液；
- (10) 重复以上的筛选步骤，进行第二和第三轮筛选，并且逐渐降低 McAb—6B12 的包板浓度(第二轮为 1μg/孔，第三轮为 0.1 μ g/孔)；
- (11) 测定并纪录每次筛选噬菌体的输入量和输出量，通过计算每一轮的噬菌体得率来检验噬菌体的富集情况；
- (12) 用 McAb—6B12( 1mg / ml 的浓度作 1: 1000 稀释)包板，对第三轮筛选得到的噬菌体溶液(浓度均调整为  $T_{\mu}=10^{10}$ )作 ELISA 分析，结果使得噬菌体溶液对 McAb—6B12 的亲合力得到了较大

的提高，这表明与 McAb—6B12 有亲和力的噬菌体得到了有效地富集。

(三)单个目标噬菌体的筛选与鉴定：

1、用 ELISA 的方法挑选出与单抗 6B12 有较高亲和力的单个噬菌体：

(1) 噬菌体的单克隆化：用牙签轻触第三次筛选得到的噬菌体感染大肠杆菌 K91Kan 所形成的单菌落，并将其投入已放有 1ml LB—Kan100—Tet40 液体培养基的 15-ml 指管中，37℃ 震荡(270rpm)培养 24 小时；

(2) 离心除去菌体，得到上清液，随机测定 6 个样品的效价，平均为  $10^{10}$ T $\mu$ ；

(3) 用 1mg / ml 单抗 6B12 作 1:1000 稀释后包被 96 孔酶标板，检测上述每个噬菌体的上清液对单抗 6B12 的反应，并以噬菌体对单抗 6B12 反应的 OD<sub>490</sub> 值比阴性对照高出 5 倍挑选出高阳性反应的噬菌体。

2、用竞争 ELISA 的方法挑选出与 McAb—6B12 有特异性反应的噬菌体：

(1) 用 1mg / ml McAb—6B12 作 1:1000 稀释后包被 96 孔酶标板，洗板，封阻；

(2) 每孔加入 50 $\mu$ l 上清液和 50 $\mu$ l 的日本血吸虫卵抗原(1:50 稀释)，设阳性对照孔为加入 50 $\mu$ l 噬菌体溶液和 50 $\mu$ l 的 PBS，37℃ 孵育 1 小时；洗板；

(3) 加入 Rabbit anti—M13 血清(1:5000), 37℃ 孵育 1 小时, 洗板;

(4) 加入 Goat anti—Rabbit HRP, 37℃ 孵育 1 小时, 洗板, 显色后测定 OD<sub>490</sub> 值; 与阳性孔比较以 OD<sub>490</sub> 值下降 50% 或 50% 以上的为目标噬菌体;

### 3、用点印迹检测目标噬菌体与单抗体 6B12 的作用:

(1) 将目标噬菌体用点样器点在 NC 纸上, 待第一次的样品变干后, 重复点样 2—3 次;

(2) 将 NC 纸转入已放有 5ml 1% BSA 的热封口袋中, 37℃ 慢摇孵育 1 小时, 进行封阻;

(3) 将 NC 纸放入 TBS 中漂洗三次, 3 分钟 / 次;

(4) 依照步骤 (2) 和 (3) 的操作依次将 NC 纸与 5ml McAh—6B12(20μg / ml) 和 5ml Goat—anti—Mouse HRP(1:1000) 进行孵育;

(5) 将漂洗过的 NC 纸转入 DAB 底物显色液中, 等到出现明显的条带后将 NC 纸取出, 用清水稍加漂洗自然干燥后保存。

### 4、用 Western—blot 来验证目标噬菌体的 pIII 蛋白与单抗 6B12 的反应:

(1) 将 13 个目标噬菌体依照上述噬菌体的扩增与纯化大量制备, 只是将最终培养体积改为 600ml;

(2) 用 Beckman 全自动紫外扫摇仪粗略测定步骤 (1) 所制备的

噬菌体浓度为  $10^{14}$  颗粒 / ml;

- (3) 采用 12% 胶浓度进行 SDS—PAGE, 上样量为 20 $\mu$ l/孔, 恒压 120 伏, 1.5 小时;

12% SDS—PAGE 试剂的配制:

B 液 (4 $\times$ )

2M Tris—HCl, pH8.8	75 ml
10%SDS	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	21 ml
可 4 $^{\circ}$ C 保存几个月	

C 液 (4 $\times$ )

0.5M Tris—HCl, pH6.8	50 ml
10%SDS	4 ml
ddH <sub>2</sub> O	46 ml
可 4 $^{\circ}$ C 保存几个月	

SDS—PAGE 12% 分离胶的配制:

ddH <sub>2</sub> O	3.5 ml
B 液	2.5 ml
30%Acr—Bis	4.5ml
10%APS	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

浓缩胶的配制:

ddH <sub>2</sub> O	2.3 ml
B 液	1 ml
30%Acr—Bis	670 $\mu$ l

10%APS	
TEMED	30 $\mu$ l
	5 $\mu$ l

电极缓冲液(5 $\times$ )的配制:

Tris	15.1g
Glycine	94g
SDS 10%	50ml
ddH <sub>2</sub> O	1000ml

样品缓冲液(2)()的配制:

1.0M Tris—HCl, pH6.8	1.0ml
甘油	2.0ml
10%SDS	4.0ml
1% 溴酚蓝	0.2ml
ddH <sub>2</sub> O	1.8ml
巯基乙醇	1.0ml

注意: 不含巯基乙醇的样品缓冲液可保存于室温, 临用前加入

- (4) 将电泳好的一块凝胶进行染色以显示噬菌体的电泳全条带;
- (5) 将电泳好的另一块凝胶转入电转移缓冲液中平衡 20 分钟;
- (6) 电转移: 采用 NC 纸、恒压 100 伏、50 分钟可以得到较好的结果;

转移缓冲液:

Tris	3.03g
甘氨酸(Glycine)	14.41 g

甲醇 200ml

ddH<sub>2</sub>O 加至 1000ml

(7) 电转移后将凝胶进行染色处理, NC 纸放入丽春红 S 染液中染色 5 分钟以观察蛋白条带转移的情况;

丽春红 S 染液: 0.5g 丽春红(Ponceau S)溶解于 1 ml 的冰乙酸中, dH<sub>2</sub>O 加至 1000ml。注意: 临用前配制

(8) 如果转移的比较好, 将 NC 按照操作方法 3.4 所述进行显色。

5、依据 3 的步骤, 可以用兔抗 M13 血清显示噬菌体蛋白质全条带。

(四) 对目标噬菌体进行 DNA 序列测定: 用 Pharmacia 测序试剂盒测定, 该目标噬菌体的编码 DNA 序列是: 5' —AAT—GTT—TCT—CGT—TGT—TCT—TGC—GCT—ATG—CCT—TGG—CTT—TGG—GTG—GTT' 3, 其相应的外源多肽序列为: NH<sub>2</sub>—L—Q—R—A—N—R—T—R—Y—G—T—E—T—H—Q—COOH。

(五) 目标噬菌体用于 ELISA 检测血吸虫病人血清, 以达到检测血吸虫病诊断的目的:

(1) 包被抗原: 目标噬菌体溶液用 CBS 作 1:200 稀释, 以 100μl/孔包被酶标板, 4℃ 过夜, 1% BSA 37℃ 封阻 1 小时, 洗板;

(2) 湖北省粪检阳性的血吸虫病人血清 12 份, 以 PBS—0.05% Tween20 作 1:100 稀释, 每孔加入 100μl, 37℃ 孵育 1 小时; 同时上海市正常人血清 5 份, 1:100 稀释后, 100μl / 孔, 37℃ 孵育 1 小时, 洗板;

(3) 加入过氧化物酶标记的抗人 IgG 结合物(自制)(1: 500 稀释)100 $\mu$ l / 孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 洗板;

(4) 加入 OPD 底物显色液(用 pH5.0 醋酸盐缓冲液配), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟后, 用 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 酶标仪测定 490nm 波长时的 OD 值。

(5)结果:

12 名血吸虫病人血清的 OD 值分别为:

1.34      1.14      1.20      1.07      1.77      1.10      1.07  
0.93      1.24  
1.07      0.99      0.74

5 名健康人血清的 OD 值分别为:

0.67    0.43    0.73    0.96    0.69

用 t 值检验,  $t=0.0025$   $t<0.005$ ,  $PI>95\%$ 。表明用该噬菌体多肽在检测病人血清与健康人血清时, 有显著的差异。

专利名称(译)	日本血吸虫虫卵抗原模拟肽及其筛选		
公开(公告)号	<a href="#">CN1216074C</a>	公开(公告)日	2005-08-24
申请号	CN00119570.0	申请日	2000-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
[标]发明人	钱旻 白艳军		
发明人	钱旻 白艳军		
IPC分类号	C07K11/00 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/569		
其他公开文献	CN1286261A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种日本血吸虫虫卵抗原模拟肽、筛选及其在血吸虫病诊断中的应用，属生物技术领域。利用噬菌体表面展示技术筛选出本血吸虫虫卵抗原模拟肽，再将其用于血吸虫病诊断中，通过测定其OD值，与健康人的检验结果对比即可以诊断出是否患有血吸虫病。具有制备简单易行、成本低，检测效果好的优点，是目前诊断血吸虫病的较佳方法之一。