



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110511282 A

(43)申请公布日 2019. 11. 29

(21)申请号 201910792463.9

(22)申请日 2019.08.27

(71)申请人 中国农业科学院上海兽医研究所
(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

地址 200241 上海市闵行区紫月路518号

(72)发明人 朱传刚 纪荣毅 荆怡 沈元曦
林矫矫 洪炆 马以桐

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 9/16(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图3页

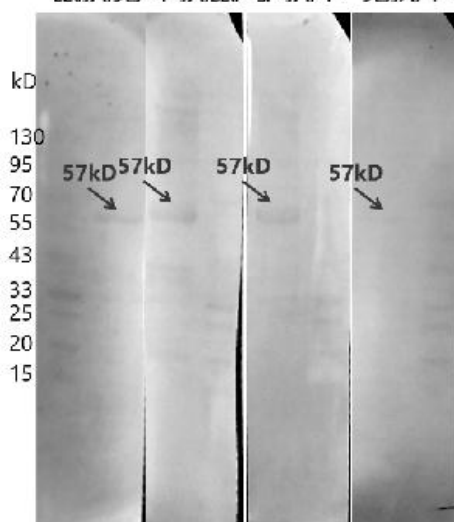
(54)发明名称

一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP及其ELISA检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP及其ELISA检测试剂盒,利用本发明的ELISA试剂盒测定牛、羊、兔样品,证实多物种血清诊断可行。本发明的试剂盒制备过程简单、易行,具有灵敏度高、准确性和稳定性好等优点。

鼠抗兔 羊抗鼠 驴抗羊 兔抗羊



1. 一种用于免疫分析的产品，所述产品包括双功能蛋白SPG-ALP，产品的形式可为探针（传感器）、试纸条、芯片、试剂盒等；所述双功能蛋白SPG-ALP，其特征在于所述双功能蛋白SPG-ALP兼有IgG 结合活性及ALP结合活性，包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和ALP蛋白，所述链球菌蛋白G (SPG) 片段为含有SPG的C3区段的序列，优选的，链球菌蛋白G (SPG) 片段和ALP蛋白之间的连接序列为如SEQ ID NO.8所示；所述链球菌蛋白G (SPG) 片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示；ALP蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示，更优选的，所述双功能蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

2. 如权利要求1所述的产品，所述产品为试剂盒，所述试剂盒还可包括缓冲液、洗涤液、稀释液或显色剂等。

3. 如权利要求2所述的产品，所述试剂盒包括：

酶标板；

酶标记的重组双功能蛋白SPG-ALP；

稀释液：PBST；

封闭液：5%脱脂奶粉；

洗涤液：PBST；

阳性对照：日本血吸虫阳性血清；

阴性对照：日本血吸虫阴性血清；

显色液：PNPP显色液；

终止液：2M H_2SO_4 。

4. 权利要求1-3所述的产品在免疫分析中的应用。

5. 一种利用重组蛋白SPG-ALP非诊断目的的检测血清中日本血吸虫抗体的方法，所述方法包括如下步骤：

(1) 制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原，用碳酸盐缓冲液稀释虫卵可溶性抗原稀释至终浓度10ug/ml；每孔100ul包被于酶标板中，4℃包被过夜，PBST洗涤3-次，每次5min；

(2) 以PBST配制5%脱脂奶粉，每孔200ul，37℃2h，PBST洗涤3-5次，每次5min；

(3) 牛日本血吸虫阴阳性血清1:100稀释，每孔80ul，37℃2h，PBST洗涤3-5次，每次5min；

(4) 将重组蛋白SPG-ALP以0.1mg/ml，每孔60ul，37℃孵育2h，PBST洗涤3-5次，每次5min；

(5) PNPP显色液每孔100ul，2M H_2SO_4 每孔50ul终止反应，测定 A_{562nm} ，整理结果。

一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP及其ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质检测用融合蛋白及蛋白质检测方法,特别涉及一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP,进一步涉及含有上述双功能蛋白SPG-ALP的ELISA检测试剂盒。

背景技术

[0002] 目前,酶联免疫吸附测定法(ELISA)是免疫学诊断中的一项重要技术,不但应用于多种病原微生物所引起的传染病、寄生虫病及非传染病等方面的免疫学诊断,也应用于分子抗原和抗体的测定,其应用范围日益扩大,已逐渐成为21世纪生物医学领域研究的主流。现有ELISA试剂盒的基本特征是,其探针板是在孔内表面上以随机分布的方式固定有抗原或抗体的塑料或玻璃微孔板,其标记系统含有酶标记的抗原或抗体或抗抗体和底物,其应用在于检测样品中与固定化探针相应的抗体或抗原。根据探针板上和标记系统中不同的抗原-抗体组合,ELISA方法可细分为间接法,双抗体夹心法和双抗原夹心法等。例如,对抗原包被板(探针板上固定的是特异抗原),检测时样品中的目标抗体和探针抗原发生特异性结合,如果标记系统中的酶标物为酶标特异抗原则是双抗原夹心法,如果标记系统中的酶标物为酶标抗抗体则是间接法;如果探针板上固定的是特异抗体,检测时样品中的目标抗原和探针板上的抗体探针发生特异性反应,标记系统中的标记物为酶标特异抗体则是双抗体夹心法。不管那种方法,洗去未结合的酶标物后,加入标记系统中的底物溶液,显色检测OD值,即可对结合的目标抗体或者目标抗原进行定性或定量检测。

[0003] 链球菌蛋白G(SPG)的结构从N段开始,有三个同源结构区域A1、A2、A3,每个同源结构都由24个氨基酸组成,同时这三个同源结构被51个氨基酸组成的同源区域B1、B2隔开,接着是一个间隔区域S,随后是55个氨基酸组成的同源结构区C1、C2、C3,它们之间又被D1和D2区所隔开,C3区之后为亲水区域W,最后为M区(Sjobring,1991)。有研究表明,SPG的三个同源的氨基酸序列C1、C2和C3区域抗体IgG Fc端的结合相关,并且C1和C2区只有2个氨基酸序列不同,C1和C3区有6个氨基酸序列不同,并且C3区与抗体IgG的结合能力相当于C1区的7倍(Kobatake,1990)。而SPG的A、B区则具有与抗体Fab段结合以及与血清白蛋白结合的活性,被认为会起到干扰抗体与抗原的作用以及带来非特异性反应的问题。

[0004] 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)是非特异性磷酸单酯酶,可以催化几乎所有的磷酸单酯的水解反应,生成无机磷酸和相应的醇、酚、糖等,还可以催化磷酸基团的转移反应。ALP存在于除高等植物外几乎所有的生物体内,可直接参加磷代谢,在钙、磷的消化、吸收、分泌及骨化过程中发挥了重要的作用。

[0005] 使用通过化学反应使碱性磷酸酶等酶和G蛋白结合而得的酶标记G蛋白,来代替标记二抗。G蛋白是来自链球菌的细胞壁的蛋白质,具有与几乎所有哺乳动物的IgG发生结合的性质。若使用这样的酶标记G蛋白,则能够与多种免疫种的一抗结合,即使在对多种目标物质(抗原)进行检测的情况下,也可以不准备与各物质分别特异性结合的抗体,通用性高。但是,使用用碱性磷酸酶等酶标记的酶标记G蛋白的方法存在检测灵敏度低的问题。此外,

也存在热稳定性差的种类,有时会在处理中失活。碱性磷酸酶标记抗体或G蛋白等活性物质的方法,涉及到化学偶联,偶联后提纯,透析,浓缩等繁琐步骤;而且由于本身生物大分子的特点,偶联的结合位点多样,使得获得偶联的产品复杂化,难以保证产品的统一,不仅可能造成酶的失活,结合的生物大分子的失活,而且影响稳定性。而ELISA检测中酶标二抗的特异性结合问题期待解决。对于与目标物质(抗原)特异性结合的一抗,需要与其特异性结合的标记二抗,在检测多种目标物质(抗原)时,需要准备分别与多种一抗特异性结合的标记二抗,通用性差。

发明内容

[0006] 本发明主要解决的技术问题是提供一种快速、高灵敏的免疫检测产品及方法,实现高效、高密度的免疫检测,并可对多种家畜和人的特异性抗体进行检测。

[0007] 为了实现上述技术方案,本发明提供一种融合蛋白,基于SPG C3区和ALP的特点,将这两段基因连接起来,重构一种兼有IgG 结合活性及ALP结合活性的双功能蛋白SPG-ALP。

[0008] 上述双功能蛋白SPG-ALP,包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和ALP蛋白,所述链球菌蛋白G (SPG) 片段为含有SPG的C3区段的序列;

其中,链球菌蛋白G (SPG) 片段和ALP蛋白之间的连接序列为如SEQ ID NO.8所示

所述链球菌蛋白G (SPG) 片段的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

ALP蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

所述双功能蛋白SPG-ALP的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

对SPG和ALP序列进行密码子优化,拼接后蛋白表达量提高,可溶性增加。

[0009] 本发明同时提供一种用于免疫分析的产品,所述产品包括本发明所述的融合蛋白SPG-ALP。

[0010] 优选的,本发明提供一种含有上述检测蛋白的试剂盒,所述试剂盒包括:

酶标板 ;

酶标记的重组蛋白:SPG-ALP;

稀释液: PBST;

封闭液:5%脱脂奶粉;

洗涤液: PBST;

阳性对照: 日本血吸虫阳性血清;

阴性对照: 日本血吸虫阴性血清;

显色液: PNPP显色液;

终止液: 2M H₂SO₄。

[0011] 此外,本发明还提供一种本发明所述的基于融合蛋白SPG-ALP在免疫分析中的应用。

[0012] 有益效果

(1) 本发明将SPG基因的IgG结合片段进行重构,只保留蛋白G能与抗体IgG的Fc端特异性相结合的C3区,并连接ALP,制备的重组蛋白具有IgG 结合活性及ALP结合活性的双功能。

[0013] (2) 本发明的融合蛋白SPG-ALP可高效、高密度的捕获目标分子,达到快速、高灵敏

的检测。

[0014] (3) 本发明的融合蛋白SPG-ALP制备过程简单、易行,可适用于不同的免疫检测模式,如可用于间接ELISA、夹心ELISA、免疫PCR等,仅仅是替换原有检测方法中的一种试剂,不改变原有操作步骤,不需要额外的设备和仪器。

附图说明

[0015] 图1 SPG的结构示意图。

[0016] 图2 大肠杆菌的碱性磷酸酶(ALP)反应机理

图3重组质粒的双酶切鉴定,其中,M:核酸标志物;1:全序列片段;2:双酶切切下ALP序列,跑胶结果为ALP片段与完整质粒切去ALP片段之后留下的片段。

[0017] 图4对重组蛋白的原核表达质粒,进行PCR鉴定,其中,M:核酸标志物;C3:体系中加入的引物序列为C3片段两端所设计的引物序列;ALP:体系中加入的引物序列为ALP片段两端所设计的引物序列;全:体系中加入的引物序列为SPG-ALP片段两端所设计的引物序列。

[0018] 图5 SDS-PAGE分析pET-28a(+)-SPG-ALP表达情况,其中,M:蛋白标志物;0h:无IPTG诱导;1h-6h: IPTG诱导1h,2h,4h,6h。

[0019] 图6 重组蛋白与pNPP反应活力测定结果 ALP:重组蛋白SPG-ALP

图7 Western blotting检测SPG-ALP蛋白与不同物种IgG的结合活性。

具体实施方式

[0020] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0021] 实施例1重组蛋白G的构建

1.1 生物材料

大肠埃希氏杆菌BL21购自南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒pET-28a(+)为实验室保存,密码子优化的ALP和SPG为实验室保存([1]、[2])。

[0022] [1]许瑞,赵登云,洪炆,陆珂,李浩,林矫矫,冯金涛,徐玉梅,朱传刚.链球菌蛋白G的结构域重构、表达及鉴定[J].中国动物传染病学报,2015,23(05):46-52.

[2]E. coli alkaline phosphatase gene, complete cds. GenBank: M13345.1

1.2 重组蛋白SPG-ALP的构建和合成

根据spG的C片段以及ALP基因序列,利用Primer5软件设计引物,分别在上游和下游引物中加入酶切位点,引物序列如表1所示。

[0023] 表1 扩增引物

引物名称	引物序列
C3区上游引物	CGCGGA TCC ACT TAC AAA C(SEQ ID NO.1)
C3区下游引物	CCG GAA TTC TGA GCC CCC ACC(SEQ ID NO.2)
ALP区上游引物	CCGGAA TTCCCT GTT CTG(SEQ ID NO.3)
ALP区下游引物	GGC CTC GAGTTA TTT CAG CCC(SEQ ID NO.4)

利用实验室已有保存含有C3片段的大肠杆菌DH5a菌株作为模版,上述C3上下游引物进行PCR扩增,获得C3基因序列。

[0024] 优化后的ALP序列如SEQ ID NO.7所示,其中对ALP序列进行信号肽分析,功能区分析等,获得该基因的基本情况。选择代表酶功能的基因序列3'端添加TAA终止密码子。检测基因序列的大肠杆菌稀有密码子,将其统一替换成编码同一氨基酸的大肠杆菌偏爱的密码子,最后应用ALP区上下游引物PCR扩增获得新的基因序列并插入PET-28-a质粒,转化DH5a进行鉴定。(ALP序列为金唯智公司合成)

上述质粒鉴定正确后,用限制性核酸内切酶将PCR扩增的C3片段两端切出粘性末端,含有ALP序列的PET28-a质粒切出带有能与C3片段的粘性末端相连的缺口,反应体系如下:

组分	所需用量 (μl)
10×Quick Cut Buffer	2
C3 片段	5
BamH 1	1.5
EcoR 1	1.5
ddH ₂ O	40
Total	50

37℃ 4h

组分	所需用量 (μl)
10×Quick Cut Buffer	2
质粒	5
BamH 1	1.5
EcoR 1	1.5
ddH ₂ O	40
Total	50

37℃ 4h

为了使体系中的目的片段保持较好的状态,对两个反应体系进行换体系

(1) 加TE补足100微升,再加400微升Solition SN(用Promega试剂盒的Binding Buffer代替) 和100微升的Solution B,混匀。

[0025] (2) 将吸附柱放入EP管中,将液体转移至吸附柱上,开盖室温静置2min。盖上盖子,10000rpm 室温离心1min,弃废液。

[0026] (3) 加入600微升Wash Solution,10000rpm室温离心1min,弃废液,此步骤重复一次。

[0027] (4) 10000rpm 室温空离2min,开盖挥发酒精。(约5~10min)

(5) 将吸附柱转移至一新EP管,在柱膜中央加水(30微升),开盖,室温静置2~5min。(提高洗涤温度有助于提高DNA的洗脱效率)

(6) 10000rpm高速离心1min,离心管内液体即为回收的DNA片段,可立即使用或者 -20°备用。

[0028] 连接

(1)将质粒载体DNA PET-28a(+)与插入的DNA片段混合制备成5~10 μ l的DNA溶液。用TE buffer(10mM Tris-HCL,1mM EDTA,pH8.0),溶解DNA。载体DNA与插入的DNA的摩尔数比一般为0.03 μ mol:0.03~0.3 μ mol。

[0029] (2)向上述DNA 溶液中加入等体积(5~10 μ l)的Solution 1,混匀。

[0030] (3)16 $^{\circ}$ 反应30min。

[0031] (4)反应可直接用于细菌转化,利用LB培养基(K+)筛选鉴定阳性质粒。

[0032] 1.3 重组质粒鉴定

对重构的SPG-ALP序列进行进行PCR反应,反应体系如下:

组分	所需用量(μ l)
TaKaRaTaq TM Hot Start Version	25
基因序列	2
上游引物(10 μ M) SEQ ID NO.1	2
下游引物(10 μ M) SEQ ID NO.4	2
ddH ₂ O	19
Total	50

将各组分混匀后,短暂离心置于PCR仪中进行反应,反应参数如下:

温度	反应时间
94 $^{\circ}$ C	3min
94 $^{\circ}$ C	30s
56 $^{\circ}$ C	30s 30 cycles
72 $^{\circ}$ C	1min
72 $^{\circ}$ C	10min
4 $^{\circ}$ C	infinite

对PCR产物进行电泳鉴定(图4)和双酶切鉴定(图3),测序鉴定结果显示与设计的序列一致。目的基因全片段大小约为1518bp。C3片段大小约为165bp,ALP片段大小约为1353bp。

[0033] (C3片段对应上下游引物:SEQ ID NO.1、2;ALP对应上下游引物:SEQ ID NO.3、4;全片段对应上下游引物:SEQ ID NO.1、4)

实施例2重组蛋白的表达和纯化

2.1 重组质粒的表达

(1)挑取适量含有目的片段的BL21,分别接种于5ml和150ml含Kan+的LB液体培养基中,置于37 $^{\circ}$ C震荡培养箱中,250rpm震荡培养。

[0034] (2)当生长至对数期(OD₆₀₀约为0.6时),加入终浓度为1mmol/L的IPTG进行诱导表达。在诱导表达前、诱导表达后1h、2h、4h、6h分别取0.5ml菌液,应用SDS-PAGE电泳分析最佳诱导时间。

[0035] (3)将诱导后的菌液12000rpm离心20min弃上清,沉淀用20ml 1 $\times$ PBS重悬,反复冻融三次后,冰浴超声破碎20min(超2s隔9s)后12000rpm离心15min,收集沉淀和上清。

[0036] (4)将离心后的沉淀用5ml 8mol 尿素重悬,重复上述离心步骤,收集上清。

[0037] (5)将超声后上清、沉淀重悬后上清,分别加入等体积蛋白电泳缓冲液,用SDS-

PAGE电泳分析表达产物的可溶性。

SDS-PAGE分析显示(图5),重组质粒pET-28a(+)-SPG-ALP在大肠杆菌BL21(DE3)中成功表达,且1mmol/L IPTG诱导后1-6h表达量随着时间的增长而增加,诱导2h后表达量达到一定高度且后期增加量不明显。

[0038] 2.2 重组蛋白的纯化

使用Ni-NTA Hisbind Resin对重组蛋白进行纯化(序列号:70666-3),按照试剂盒说明书进行操作,简易操作步骤如下:

- (1)取5ml树脂加入新空柱中静置平衡,当液面降到树脂表面时,依次进行以下步骤;
- (2)用2CV ddH₂O*2,charge buffer *3,binding buffer*2;
- (3) 上样前留50ul;
- (4) 3CV Binding Buffer*3(刚加上需要留50ul下清);
- (5) 3CV Wash Buffer*2,同留50ul;
- (6) 2CV Elution Buffer*2,同留50ul;
- (7) 少量Strip Buffer(3ml),反复上样,全留,同取50ul。

[0039] (8) 将上述收集的溶液进行SDS-PAGE电泳,分析蛋白纯化情况。

[0040] 2.3 重组蛋白的透析

- (1)根据最后收集到的蛋白量,剪取适当长度的透析袋,水浴,80℃以上,5min。

[0041] (2)准备2L PBS 透析液,将透析袋小心转移至透析液中,用夹子夹紧两端,检漏。

[0042] (3)取下一端的夹子,加入纯化好的蛋白,尽量赶出气泡,再用夹子夹紧。

[0043] (4)在透析液中放入小转子,置于磁力搅拌机上,低速转动,确保液体在流动即可,若转速太大则可能引起蛋白结晶。

[0044] (5)24h 之后,将蛋白小心转移至一个新的离心管中,-20℃,保存备用。

[0045] SDS-PAGE分析显示,重组质粒pET-28a(+)-G-ALP表达的蛋白在超声上清和沉淀中均存在,沉淀中的蛋白含量高于上清中的蛋白含量,表明该蛋白具有一定的水溶性。重组蛋白超声上清经过Ni-NTAHisbindResin纯化后,在经过Strip Buffer洗脱后,得到纯化。

[0046] 实施例3重组蛋白SPG-ALP的酶活力

3.1 PNPP显色液no-PNPP配制

组分	所需用量(g)
Glycine	7.51
MgCl ₂	0.203
ZnCl ₂	0.136

去离子水定容至1L,调节PH至7.9。每1ml显色液中加入1mg PNPP固体粉末配成PNPP显色液,现配现用。

[0047] 3.2 ELISA法检测重组蛋白的碱性磷酸酶反应活性。

[0048] ELISA板按下列方案加入反应内容,37℃避光反应,取出测量405nm处的OD值。

	实验组	PBS对照组	无底物对照组
组分(各100μl)	重组蛋白 SPG-ALP	PBS	重组蛋白 SPG-ALP
	PNPP 显色液	PNPP 显色液	显色液 no-PNPP
体积(μl)	200	200	200

[0049] ELISA法将重组蛋白SPG-ALP与PNPP进行反应,测定重组蛋白的碱性磷酸酶活力,结果如图6所示。该结果显示,ALP催化PNPP显色,且排除显色液自我分解可能性及重组蛋白自身颜色影响最终结果可能性。显示反应与对照组具有显著差异,与商品化的酶标碱性磷酸酶的显色反应的OD值无差异。

[0050] 实施例4 SPG-ALP重组蛋白活性鉴定

4.1 Western blotting检测重组蛋白与IgG的结合活性

(1)将纯化后的蛋白进行SDS-PAGE电泳,之后将蛋白转移至NC膜上,140mA,90min。

[0051] (2)将NC膜浸泡于PBST稀释的5%脱脂奶粉中,室温封闭2h。

[0052] (3)将封闭后的NC膜用PBST洗涤三次,每次5min。

[0053] (4)将NC膜用HRP标记的山羊抗小鼠IgG,兔抗山羊IgG,小鼠抗兔IgG,驴抗山羊IgG,用PBST 1:2000稀释)作为抗体与图不相符,室温孵育1h。

[0054] (5)将孵育后的NC膜用PBST洗涤三次,每次10min。

[0055] (6)将NC膜用DAB双组份显色液试剂盒进行显色,显色后用流水冲洗,终止反应。

[0056] 结果显示,重组蛋白与鼠、羊、驴、兔的抗体都具有结合活性(图7)。

[0057] 4.2 ELISA法测定重组蛋白与不同物种IgG亲和常数

(1)用BCA法测定重组蛋白的浓度,并用商品化的标准蛋白G (SPG) 作为对照。

[0058] (2)用包被液将蛋白从10 μ g/ml开始进行倍比稀释,共进行8个稀释度,以100 μ l每孔包被于96孔板上,每个浓度设置3个重复,4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0059] (3)将96孔板用PBST洗涤三次,200 μ l每孔,每次5min。

[0060] (4)加入用PBST稀释的5%脱脂奶粉的溶液,150 μ l每孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h。

[0061] (5)将96孔板用PBST洗涤三次,200 μ l每孔,每次5min。

[0062] (6)将HRP标记的山羊抗鼠、兔抗山羊、鼠抗兔、驴抗山羊这四种二抗,分别用PBST按1:1000、1:2000、1:4000、1:8000进行倍比稀释,100 μ l每孔,37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0063] (7)将96孔板用PBST洗涤三次,200 μ l每孔,每次5min。

[0064] (8)加入TMB进行显色,100 μ l每孔,室温反应15min。

[0065] (9)加入2mol/L H₂SO₄终止反应,30 μ l每孔,读取OD450值。

[0066] 将透析后的重组蛋白分别测定浓度,用不同的浓度分别包被96孔板作为抗原,之后将倍比稀释的二抗加入平板中,与抗原结合。以OD450值作为纵坐标,以抗原浓度的对数值作为横坐标,进行曲线拟合。

[0067] 根据拟合的曲线,代入相应的公式中,分别计算亲和常数K_a,将得到的K_a值取其平均数,获得了重组蛋白的亲和常数值,其中,重组蛋白SPG-ALP与兔、驴、鼠、山羊的亲和常数分别为兔:5.41 $\times 10^4$ 、驴:4.35 $\times 10^4$ 、小鼠:3.76 $\times 10^4$ 、山羊:7.48 $\times 10^4$ 。

[0068] 结果显示重组蛋白SPG-ALP与兔、驴、鼠、山羊IgG均具有结合活性,具有多物种IgG的结合能力。重组后蛋白具有SPG上C区的功能,重组的蛋白不影响其原蛋白功能。

[0069] 实施例5重组蛋白SPG-ALP检测血清中日本血吸虫抗体

(1)制备日本血吸虫虫卵可溶性抗原,用碳酸盐缓冲液稀释虫卵可溶性抗原稀释至终浓度10 μ g/ml。每孔100 μ l包被于酶标板中,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST洗涤3次,每次5min;

(2)以PBST配制5%脱脂奶粉,每孔200 μ l,37 $^{\circ}$ C 2h,PBST洗涤3-5次,每次5min;

(3)牛日本血吸虫阴阳性血清1:100稀释,每孔80 μ l,37 $^{\circ}$ C 2h,PBST洗涤3-5次,每次

5min;

(4) 将重组蛋白SPG-ALP以0.1mg/ml, 每孔60u1, 37℃孵育2h, PBST洗涤3-5次, 每次5min。

[0070] (5) PNPP显色液每孔100u1, 2M H₂SO₄每孔50u1终止反应, 测定A_{562nm}, 整理结果。

[0071] 以上述实验步骤测定牛、羊、兔各10份血清日本血吸虫阳性血清和牛、羊、兔标准阴性血清, 血清1:100稀释, 测定A_{562nm}数值, 检测该方法的多物种血清的检测可行性。结果如表1, 兔、牛、羊日本血吸虫阳性血清检测读值均高于0.21, 标准阴性血清检测结果低于0.1, 阳性血清P/N值均大于等于2.1, 提示, 以此种方法做多物种血清诊断可行。

[0072] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改, 并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此, 本发明不限于上述实施例, 本领域技术人员根据本发明的揭示, 不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

[0073] 表1, 多物种血清检测

物种	阳性血清										阴性血清
编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	阴性血清
牛	0.4372	0.3769	0.2963	0.4392	0.3312	0.3602	0.2974	0.3546	0.4464	0.4097	0.08912
羊	0.4623	0.4091	0.3422	0.4102	0.5491	0.3764	0.3365	0.3214	0.3624	0.4527	0.09532
兔	0.2341	0.3452	0.3342	0.4268	0.3486	0.3348	0.5109	0.4257	0.4092	0.3549	0.09829

<110>中国农业科学院上海兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心上海分中心)

<120>一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP及其ELISA检测试剂盒

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> C区上游引物

<400> CGCGGA TCC ACT TAC AAA C

<210>2

<211>21

<212> DNA

<213> C区下游引物

<400> CCG GAA TTC TGA GCC CCC ACC

<210>3

<211>18

<212> DNA

<213> ALP区上游引物

<400> CCGGAA TTCCCT GTT CTG

<210>21

<211> 23

<212> DNA

<213> ALP区下游引物

<400> GGC CTC GAGTTA TTT CAG CCC

<210>5

<211>1533

<212> DNA

<213> 重组蛋白SPG-ALP的核苷酸序列

<400>GGA TCC ACT TAC AAA CTG GTT ATT AAT GGT AAA ACC TTG AAA GGC GAA ACA
ACT ACT AAA GCA GTA GAC GCA GAA ACT GCA CAA AAA GCC TTC AAA CAA TAC GCT AAC
GAC AAC GGT GTT GAT GGT GTT TGG ACT TAT GAT GAT GCG ACT AAG ACC TTT AGG GTA
ACT GAA GGC GGT GGG GGC TCA GGA GGT GGG GGC TCAGAA TTC CCT GTT CTG GAA AAC
CGG GCT GCG CAA GGC GAT ATT ACG GCC CCG GGC GGC GCC CGT CGT CTG ACG GGT GAT
CAA ACC GCG GCG CTG CGT GAT AGT CTG AGC GAT AAG CCG GCG AAG AAC ATC ATT CTG
CTC ATT GGC GAT GGC ATG GGC GAT AGC GAG ATC ACC GCC GCG CGT AAT TAT GCC GAA
GGC GCC GGC GGC TTT TTC AAA GGT ATC GAC GCG CTG CCA CTG ACC GGC CAA TAC ACC
CAC TAC GCG CTG AAC AAG AAG ACC GGC AAG CCG GAC TAT GTG ACG GAT AGT GCC GCC
AGT GCC ACC GCG TGG AGT ACC GGC GTT AAA ACC TAC AAT GGC GCG CTG GGC GTG GAC

ATC CAC GAG AAA GAC CAC CCG ACC ATT CTC GAA GCG AAA GCG GCG GGT CTG GCG ACG
GGT AAT GTT AGC ACC GCG GAA CTG CAA GAT GCC ACC CCA GCC GCG CTG GTT GCG CAT
GTT ACG AGC CGC AAA TGT TAT GGC CCG AGT GCG ACG AGT GAG AAA TGC CCG GGT AAC
GCG CTG GAA AAG GGC GGT AAA GGC AGT ATT ACC GAA CAG CTG CTG AAT GCC CGT GCC
GAC GTT ACG CTC GGT GGTGGT GCG AAA ACG TTC GCC GAA ACG GCG ACC GCG GGT GAG
TGG CAA GGT AAA ACG CTC CGC GAA CAA GCG CAA GCC CGT GGT TAC CAA CTG GTT AGT
GAT GCG GCC AGT CTG AAC AGC GTT ACG GAG GCC AAT CAG CAA AAA CCG CTG CTG GGT
CTG TTC GCG GAC GGT AAT CCG GTT CGC TGG CTG GGC CCG AAA GCC ACG TAC CAC GGT
AAC ATC GAC AAA CCA GCC GTG ACG TGC ACC CCG AAT CCG CAA CGC AAT GAC AGT GTT
CCG ACC CTC GCG CAG ACG GAT AAA GCG ATC GAG CTG CTG AGC AAG AAC GAG AAA GGC
TTC TTT CTG CAA GTT GAA GGT GCG AGC ATC GAC AAA CAA GAT CAT GCG GCC AAT CCG
TGT GGC CAG ATT GGT GAG ACG GTG GAT CTG GAT GAA GCC GTT CAG CGC GCG CTG GAA
TTT GCG AAG AAA GAG GGC AAC ACG CTG GTG ATT GTG ACC GCC GAT CAT GCG CAC GCC
AGT CAA ATT GTT GCC CCG GAT ACC AAA GCG CCG GGT CTG ACC CAA GCG CTG AAT ACC
AAA GAC GGT GCC GTG GTT AGC TAT GGC AAC AGC GAA GAG GAT AGC CAA GAA CAT ACG
GGC AGT CAG CTG CGT ATC GCC GCC TAT GGT CCG CAT GCG GCG AAT GTT GTT GGT CTG
ACC GAT CAG ACC GAT CTG TTT TAT ACC AAA GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAACTC GAG

<210>6

<211>165

<212>DNA

<213> 重组蛋白SPG片段的核苷酸序列

<400> ACT TAC AAA CTG GTT ATT AAT GGT AAA ACC TTG AAA GGC GAA ACA ACT ACT
AAA GCA GTA GAC GCA GAA ACT GCA CAA AAA GCC TTC AAA CAA TAC GCT AAC GAC AAC
GGT GTT GAT GGT GTT TGG ACT TAT GAT GAT GCG ACT AAG ACC TTT AGG GTA ACT GAA

<210>7

<211>1320

<212> DNA

<213> 优化后重组蛋白ALP片段的核苷酸序列

<400> GAA TTC CCT GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCG CAA GGC GAT ATT ACG GCC CCG
GGC GGC GCC CGT CGT CTG ACG GGT GAT CAA ACC GCG GCG CTG CGT GAT AGT CTG AGC
GAT AAG CCG GCG AAG AAC ATC ATT CTG CTC ATT GGC GAT GGC ATG GGC GAT AGC GAG
ATC ACC GCC GCG CGT AAT TAT GCC GAA GGC GCC GGC GGC TTT TTC AAA GGT ATC GAC
GCG CTG CCA CTG ACC GGC CAA TAC ACC CAC TAC GCG CTG AAC AAG AAG ACC GGC AAG
CCG GAC TAT GTG ACG GAT AGT GCC GCC AGT GCC ACC GCG TGG AGT ACC GGC GTT AAA
ACC TAC AAT GGC GCG CTG GGC GTG GAC ATC CAC GAG AAA GAC CAC CCG ACC ATT CTC
GAA GCG AAA GCG GCG GGT CTG GCG ACG GGT AAT GTT AGC ACC GCG GAA CTG CAA GAT
GCC ACC CCA GCC GCG CTG GTT GCG CAT GTT ACG AGC CGC AAA TGT TAT GGC CCG AGT
GCG ACG AGT GAG AAA TGC CCG GGT AAC GCG CTG GAA AAG GGC GGT AAA GGC AGT ATT
ACC GAA CAG CTG CTG AAT GCC CGT GCC GAC GTT ACG CTC GGT GGT GGT GCG AAA ACG

TTC GCC GAA ACG GCG ACC GCG GGT GAG TGG CAA GGT AAA ACG CTC CGC GAA CAA GCG
CAA GCC CGT GGT TAC CAA CTG GTT AGT GAT GCG GCC AGT CTG AAC AGC GTT ACG GAG
GCC AAT CAG CAA AAA CCG CTG CTG GGT CTG TTC GCG GAC GGT AAT CCG GTT CGC TGG
CTG GGC CCG AAA GCC ACG TAC CAC GGT AAC ATC GAC AAA CCA GCC GTG ACG TGC ACC
CCG AAT CCG CAA CGC AAT GAC AGT GTT CCG ACC CTC GCG CAG ACG GAT AAA GCG ATC
GAG CTG CTG AGC AAG AAC GAG AAA GGC TTC TTT CTG CAA GTT GAA GGT GCG AGC ATC
GAC AAA CAA GAT CAT GCG GCC AAT CCG TGT GGC CAG ATT GGT GAG ACG GTG GAT CTG
GAT GAA GCC GTT CAG CGC GCG CTG GAA TTT GCG AAG AAA GAG GGC AAC ACG CTG GTG
ATT GTG ACC GCC GAT CAT GCG CAC GCC AGT CAA ATT GTT GCC CCG GAT ACC AAA GCG
CCG GGT CTG ACC CAA GCG CTG AAT ACC AAA GAC GGT GCC GTG GTT AGC TAT GGC AAC
AGC GAA GAG GAT AGC CAA GAA CAT ACG GGC AGT CAG CTG CGT ATC GCC GCC TAT GGT
CCG CAT GCG GCG AAT GTT GTT GGT CTG ACC GAT CAG ACC GAT CTG TTT TAT ACC AAA
GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAA CTC GAG

<210>8

<211>30

<212> DNA

<213>连接序列的核苷酸序列

<400>GGC GGT GGG GGC TCA GGA GGT GGG GGC TCA

	Ss	E	A1	B1	A2	B2	A3	S	C1	D1	C2	D2	C3	W	M
--	----	---	----	----	----	----	----	---	----	----	----	----	----	---	---

图1

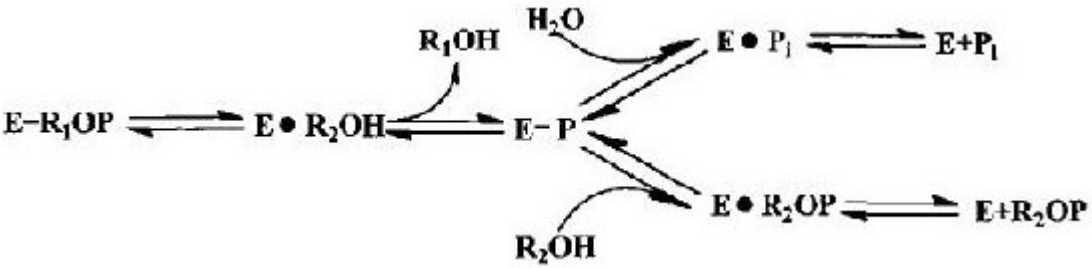


图2

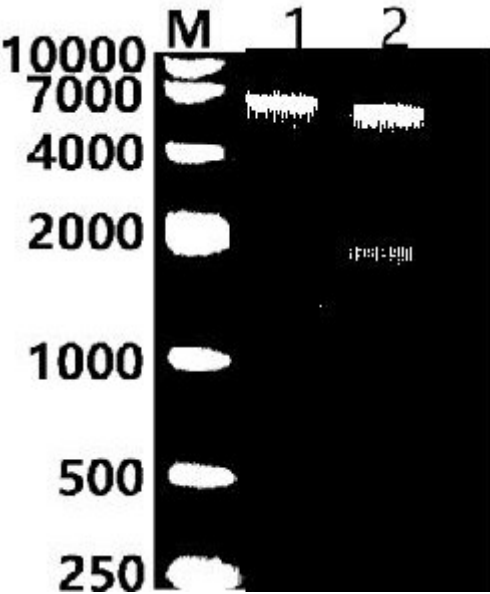


图3

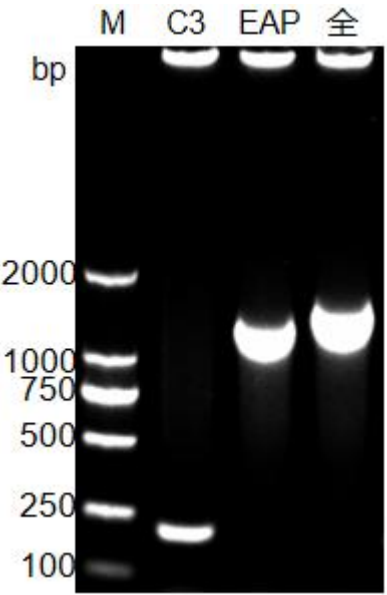


图4

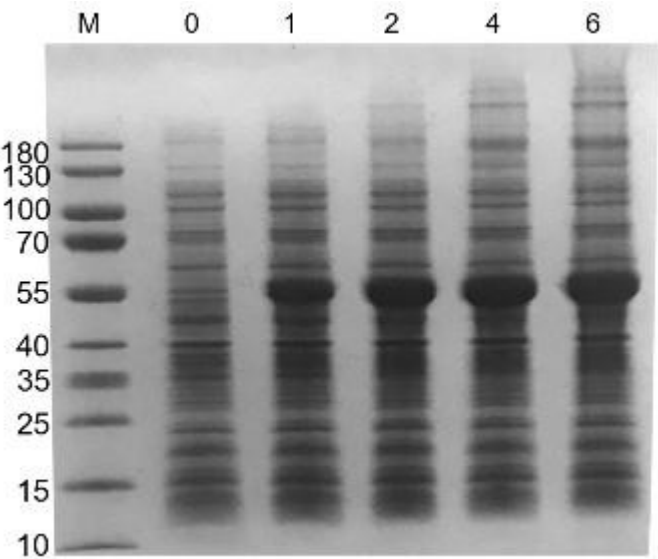


图5

样品 (各100ul)	EAP	PBS	EAP
	PNPP显色液	PNPP显色液	显色液 no-PNPP
OD值 (405nm)	1.2039	0.0492	0.095

图6

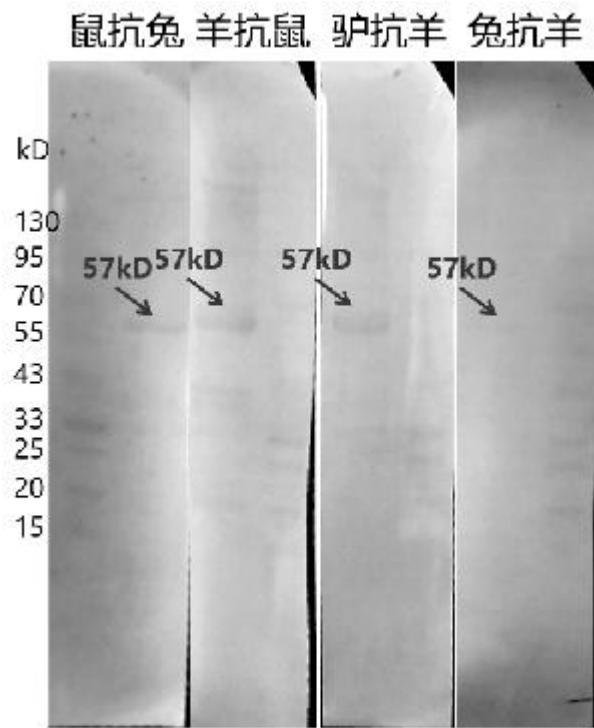


图7

专利名称(译)	一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP及其ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110511282A	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201910792463.9	申请日	2019-08-27
[标]发明人	朱传刚 荆怡 沈元曦 林矫矫 洪炆		
发明人	朱传刚 纪荣毅 荆怡 沈元曦 林矫矫 洪炆 马以桐		
IPC分类号	C07K19/00 C12N9/16 C12N15/70 C12N15/62 G01N33/535 G01N33/68 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/315 C07K2319/61 C12N9/16 C12N15/70 C12N2800/22 C12Y301/03001 G01N33/535 G01N33/581 G01N33/6854		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用于抗体酶标的双功能蛋白SPG-ALP及其ELISA检测试剂盒，利用本发明的ELISA试剂盒测定牛、羊、兔样品，证实多物种血清诊断可行。本发明的试剂盒制备过程简单、易行，具有灵敏度高、准确性和稳定性好等优点。

