



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110615846 A

(43)申请公布日 2019.12.27

(21)申请号 201910798719.7

(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 袁娜娜 张霁月
沈元曦 林矫矫 洪炆 马以桐

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(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)

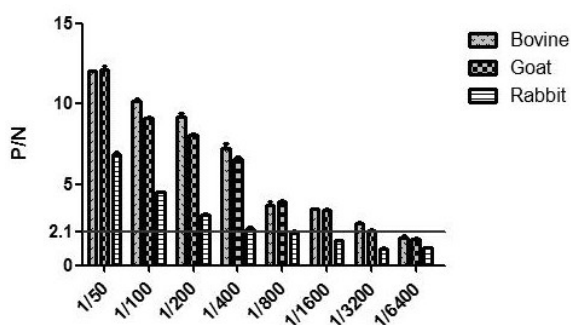
权利要求书2页 说明书7页
序列表2页 附图6页

(54)发明名称

一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的
双功能蛋白及其ELISA试剂盒

(57)摘要

本发明属于基因工程领域。具体而言,本发明提供一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白及其ELISA试剂盒,尤其涉及密码子优化的一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA,包括链球菌蛋白G(SPG)片段和SA蛋白。本发明提供的ELISA试剂盒的特异性、敏感性和稳定性较好,具有良好的应用前景。



1. 一种兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA,其特征就在于所述双功能蛋白G-SA包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和SA蛋白,所述链球菌蛋白G (SPG) 片段为含有SPG的C3区段的序列。

2. 如权利要求1所述的兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA
其中,链球菌蛋白G (SPG) 片段和SA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;
SA蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示。

3. 如权利要求1所述的兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA,所述双功能蛋白G-SA的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

4. 一种兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA的表达方法,所述方法为:根据G蛋白的C3片段的基因序列,从含有C3片段的菌液中PCR扩增出C3序列;

通过PCR从含有SA序列的菌液中扩增出SA序列;

先将扩增出的SA序列双酶切后,连接到表达载体上,经鉴定后再将C3片段双酶切后连接上去,构建重组蛋白的原核表达质粒;

将所述表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导剂表达蛋白;

经破碎、纯化后制得融合蛋白G-S。

5. 如权利要求4所述的表达方法,其中,步骤(1)中使用的引物对如SEQ ID NO.1、2所示;

步骤(2)中使用的引物对如SEQ ID NO.3、4所示。

6. 一种用于免疫分析的产品,所述产品包括权利要求1所述的一种兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA。

7. 如权利要求6所述的产品,产品的形式可为探针(传感器)、试纸条、芯片、试剂盒等,在使用时,将本发明所述的融合蛋白与其它现有的商业试剂(如酶标抗体、荧光标记抗体、显色剂、底物等)混合,可用于各种形式的免疫分析,例如抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛查、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

8. 如权利要求7所述的产品,所述产品为ELISA试剂盒,所述ELISA试剂盒中包括:权利要求1所述的双功能蛋白G-SA;、封闭液(5%脱脂奶粉),酶标二抗(HRP标记的生物素和亲和素),PBST,显色液(TMB底物液)、终止液(2 mol/L硫酸)。

9. 如权利要求8的ELISA试剂盒的非诊断目的的应用,所述应用为抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛查、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

10. 如权利要求9所述的应用,所述应用具体步骤为: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(下同);

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;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;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;将重组蛋白以5%脱脂奶粉稀释至0.125 μ g/ml,0.25 μ g/ml,0.5 μ g/ml,1 μ g/ml,2 μ g/ml,4 μ g/ml,8 μ g/ml,16 μ g/ml,加入bio-HRP,AV-HRP至稀释度为1:1000,1:2000,37 $^{\circ}$ C 孵育2h;

得rSPG-SA-biotin-HRP-AV-HRP混合液;将混合液每孔60ul加入酶标板中,37℃孵育2h,PBST洗涤3-5次,每次5min;

TMB显色液每孔100ul,显色15min,2M H₂SO₄每孔50ul终止反应,读取OD_{450nm}值。

一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白及其 ELISA试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,特别涉及一种兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA及其ELISA试剂盒。

背景技术

[0002] 目前,感染人类的吸虫有三种:即分布于亚洲的日本血吸虫,非洲中部及拉丁美洲的曼式血吸虫和非洲北部的埃及血吸虫,在中国仅日本血吸虫流行,分布于我国长江流域及南方12省,市,自治区,多为我国很重要的农业生产基地,日本血吸虫病是一种分布广泛、危害严重的人兽共患寄生虫病,对人民的健康及国家发展危害严重。

[0003] 血吸虫病诊断技术主要包括病原学诊断和免疫学诊断两种,病原学诊断技术以粪便等样本中检查虫卵或孵化毛蚴为手段,但该法检出率较低,对轻度感染或早期感染的检测漏检率极高,不利于疾病的早期诊断。免疫学诊断技术检测主要包括抗原和血清抗体,相比病原学诊断技术具有简便,高效,依从性高等优势,日益受到重视并在业界研发下发展迅速。

[0004] 链球菌蛋白G是一种能够和多种哺乳动物的IgG以及人血清白蛋白(HSA)相结合的蛋白质,SPG同IgG的亲力强,结合谱广。研究表明,SPG的三个同源的氨基酸序列C1、C2和C3区域与抗体IgGFc端的结合相关,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。

[0005] 链霉亲和素(streptavidin,SA)是由链霉菌Streptomycesavidinii分泌的一种四聚体蛋白,与亲和素(avidin,AV)有相似生物学特性。SA可高度特异性地与生物素结合,一分子链霉亲和素可以与四分子生物素结合,形成生物素-链霉亲和素系统。该系统被认为是最稳定的非共价相互作用之一,并在生物技术领域具有广泛的应用,如分子标记、分子定位和靶向药物递送。

[0006] 酶联免疫吸附试验是免疫学诊断技术的一种,该方法具有高度特异性,敏感性,检测结果与粪检阳性符合率达95%-99%。ELISA技术飞速发展,出现了诸多衍生试验,如快速ELISA,微波ELISA,Dot-ELISA等均具有良好的特异性和敏感性。

[0007] BSA系统作为ELISA法的一种,可显著提高标记免疫检测的灵敏度,在免疫学领域应用广泛。但是常规的BSA法同样不可避免的用到酶标的二抗,根据不同物种来源的一抗,二抗也需要做相应的调整,增加了实验成本也给实验结果准确性带来影响。

发明内容

[0008] 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。

[0009] 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SA的特点,将

这两段基因连接起来,重构一种兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA。

[0010] 为了实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

一种兼有IgG 结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA,包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和SA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SA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;

SA蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示;

所述双功能蛋白G-SA的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;

本发明同时提供一种密码子优化的序列,对SPG和SA序列进行密码子优化,拼接后蛋白表达量提高,可溶性增加。

[0011] 本发明同时提供一种双功能蛋白G-SA的构建方法,所述方法为:根据G蛋白的C3片段的基因序列,从含有C3片段的菌液中PCR扩增出C3序列;

(1) 通过PCR从含有SA序列的菌液中扩增出SA序列;

(2) 先将扩增出的SA序列双酶切后,连接到表达载体上,经鉴定后再将C3片段双酶切后连接上去,构建重组蛋白的原核表达质粒;

(3) 将所述表达载体、共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白;

(4) 经破碎、纯化后制得融合蛋白G-SA

其中,步骤(1)中使用的引物对如SEQ ID NO.1、2所示;

步骤(2)中使用的引物对如SEQ ID NO.3、4所示;

上述方法中,融合蛋白基因的表达、纯化可采用本领域常规用于蛋白表达纯化的方法,例如将融合蛋白基因克隆入表达载体,将表达载体和/或共表达载体转入表达宿主中培养,活化至对数生长期后加入诱导蛋白,经破碎、纯化后得到融合蛋白。其中,本发明对表达载体、表达宿主的种类和类别不作限定,可选用本领域常规用于遗传修饰的载体和宿主,具体的,表达载体可为pET-28、pET-32、pET-15或pET-11的等,;表达宿主可选自大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、棒状杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母或哺乳动物细胞。

[0012] 本发明中,克隆可通过例如链式酶聚合反应(PCR)完成。

[0013] 进一步的,本发明提供一种ELISA试剂盒,其中所述ELISA试剂盒,所述ELISA试剂盒中包括:双功能蛋白G-SA、封闭液(5%脱脂奶粉),酶标二抗(HRP标记的生物素亲和素),PBST,显色液(TMB底物液)、终止液(2 mol/L硫酸)。

[0014] 同时,本发明提供一种ELISA试剂盒的非诊断目的的应用,所述应用为抗体检测、抗体筛选、抗原检测、病原检测、蛋白检测、蛋白相互作用筛选、高通量靶标蛋白检测、蛋白-核酸相互作用分析、药物筛选等。

附图说明

[0015] 图1SPG的结构示意图。

[0016] 图2 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;1:G-SA序列;2:C3序列;3.SA序列。

[0017] 图3重组质粒的双酶切鉴定,其中,M:核酸标志物1:PET-28a空载体;2:G-SA基因。

[0018] 图4 SDS-PAGE分析pET-28a(+)-C3-SA表达情况,其中,M:蛋白标志物;0:无IPTG诱导;1、2、4、6、8: IPTG诱导1h,2h,4h,6h,8h。

[0019] 图5 SDS-PAGE分析pET-28a(+)-C3-SA上清蛋白纯化情况

M:蛋白标志物;1:超声破碎上清液;2:上样后;3:超声破碎沉淀;4:Binding Buffer纯化后;5:Washing Buffer纯化后;6:Strip Buffer纯化后。

[0020] 图6 Western blotting检测G-SA蛋白与不同物种IgG、生物素以及His抗体的结合活性

图A:1:蛋白maker;2:鼠抗兔;图B:1:蛋白maker;2:驴抗羊;

图C:1:蛋白maker;2:羊抗鼠;图D:1:蛋白maker;2:兔抗山羊;

图E:1:蛋白maker;2:HRP-bio;图F:1:蛋白maker;2:His抗体。

[0021] 图7 G-SA与不同物种抗体、生物素的亲和常数曲线

图8新型ELISA系统模式图

图9 重组蛋白最适孵育浓度摸索

图10 新型ELISA检测法的多物种检测,灵敏度检测

图11新型ELISA检测法的多物种检测,特异性检测。

具体实施方式

[0022] 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。

[0023] 实施例1重组蛋白的构建

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;含SA、SPG质粒、质粒pET-28a(+)为实验室保存。

[0024] SA对应文献:[1]訾静,张月娟,万一.核心链霉亲和素在毕赤酵母中的表达及纯化[J].中国生物制品学杂志,2018,31(05):485-488.

SPG对应文献:[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.

1.2 重组蛋白的构建和合成

根据spG的C片段以及链霉亲和素基因序列,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。

[0025] 表1 扩增引物

引物名称	引物序列
C区上游引物 T1	CCG GGA TCC ACT TAC AAA C(SEQ ID NO.1)
C区下游引物 T3	GCT ACC ACC ACC ACC ACT G(SEQ ID NO.2)
SA区上游引物 T4	GAT CCG AGC AAA GAT AGC AAA GCC C(SEQ ID NO.3)
SA区下游引物 T2	GGC CTC GAG TTATTG CTGAAC AG(SEQ ID NO.4)

转入BL21中。

[0026] 1.3 重组质粒鉴定

对重构的重组蛋白序列进行进行PCR反应,反应体系如下:

组分	所需用量 (μ l)
TaKaRaTaq™ Hot Start Version	25
基因序列	1
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	20
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℃	3min
94℃	30s
退火温度	30s 30 cycles
72℃	1min
72℃	10min
4℃	infinite

退火温度如下表:

引物	退火温度
T1	52℃
T2	62℃
T3	60℃
T4	60.2℃

对PCR产物进行电泳鉴定(图2)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680bp。C3片段大小约为170bp,SA片段大小约为480bp。

[0027] (C3片段PCR对应上下游引物:SEQ ID NO.1、2;SA PCR对应上下游引物:SEQ ID NO.3、4;全片段PCR对应上下游引物:SEQ ID NO.1、4)。

[0028] 实施例2重组蛋白的表达和纯化

2.1 重组质粒的表达

时相:

(1)挑取适量含有目的片段的BL21穿刺菌,接种于5ml含Kan+的LB液体培养基中,置于37℃震荡培养箱中,250rpm震荡培养。

[0029] (2)当生长至对数期(OD₆₀₀约为0.6时),加入终浓度为0.1mmol/L的IPTG进行诱导表达。在诱导表达前、诱导表达后1h、2h、4h、6h、8h分别取0.5ml菌液,应用SDS-PAGE电泳分析最佳诱导时间。

[0030] SDS-PAGE分析显示(图4),重组质粒pET-28a(+)-C3-SA在大肠杆菌BL21(DE3)中成功表达,且1mmol/L IPTG诱导后1-8h表达量随着时间的增长变化不明显,诱导2h后表达量达到最高并趋于稳定。当诱导时间超过4h时,杂蛋白的表达量不断增加,使得目的蛋白的表达量减少,所以选择诱导时间为2h时最佳。

[0031] 大量表达:

(1)挑取适量含有目的片段的BL21穿刺菌,接种于150ml含Kan+的LB液体培养基中,置

于37℃震荡培养箱中,250rpm震荡培养。

[0032] (2) 当生长至对数期(OD₆₀₀约为0.6时),加入终浓度为0.1mmol/L的IPTG进行诱导表达,将诱导后的菌液5000rpm离心15min弃上清,沉淀用10ml Binding buffer重悬,反复冻融三次后,冰浴超声破碎25min(超2s隔9s)后5000rpm离心15min,收集沉淀和上清。

[0033] (3) 将离心后的沉淀用5ml 8mol 尿素重悬,冰上溶解2h,重复上述离心步骤,收集上清。

[0034] (4) 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。

2.2 重组蛋白的纯化

使用Ni-NTA Hisbind Resin对重组蛋白进行纯化(Ni-NTA Hisbind Resin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。

[0035] (8) 将上述收集的溶液进行SDS-PAGE电泳,分析蛋白纯化情况。

[0036] SDS-PAGE分析显示(图5),重组质粒pET-28a(+)-G-SA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。

[0037] 实施例3重组蛋白活性鉴定

3.1 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,130mA,75min。

[0038] (2) 将NC膜浸泡于PBST稀释的5%脱脂奶粉中,室温封闭2h。

[0039] (3) 将封闭后的NC膜用PBST洗涤三次,每次5min。

[0040] (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,生物素(用PBST 1:2000稀释)作为抗体,室温孵育1h。

[0041] (5) 将孵育后的NC膜用PBST洗涤三次,每次10min。

[0042] (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。

[0043] 结果显示重组蛋白具有与兔IgG,驴IgG,鼠IgG,羊IgG,生物素等的结合能力。(图6)

3.3 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。

[0044] (2) 用包被液将蛋白从10μg/ml开始进行倍比稀释,共进行8个稀释度,以100μl每孔包被于96孔板上,每个浓度设置3个重复,4℃包被过夜。

[0045] (3) 将96孔板用PBST洗涤三次,200μl每孔,每次5min。

[0046] (4) 加入用PBST稀释的5%脱脂奶粉的溶液,150μl每孔,37℃封闭2h。

[0047] (5) 将96孔板用PBST洗涤三次,200 μ l每孔,每次5min。

[0048] (6) 将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,生物素,用PBST按1:500、1:1000、1:2000、1:4000进行倍比稀释,100 μ l每孔,37℃孵育2h。

[0049] (7) 将96孔板用PBST洗涤三次,200 μ l每孔,每次5min。

[0050] (8) 加入TMB进行显色,100 μ l每孔,室温反应15min。

[0051] (9) 加入2mol/L H₂SO₄终止反应,30 μ l每孔,读取OD450值。

[0052] 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,亲和曲线如图7所示根据拟合的曲线,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,结果见表2。

[0053] 表2 G-SA与不同物种抗体、生物素的亲和常数

抗体	亲和常数
山羊	4.12*10 ⁴
驴	1.26*10 ⁵
兔	5.12*10 ⁴
鼠	1.03*10 ⁵
HRP-bio	7.73*10 ⁴

结果显示该重组蛋白同时具有SPG与不同物种IgG结合的能力以及SA的与生物素结合的功能,是一种新型的双功能重组蛋白。经western和ELISA测亲和常数均显示重组蛋白具有与IgG的结合能力和与生物素的结合能力。

[0054] 实施例4 日本血吸虫病新型ELISA诊断试剂盒的优化

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100 μ l包被于酶标板中,4℃包被过夜,PBST洗涤3次,每次5min;以PBST配制5%脱脂奶粉,每孔200 μ l,37℃2h,PBST洗涤3-5次,每次5min;牛日本血吸虫阴阳性血清1:100稀释,每孔80 μ l,37℃2h,PBST洗涤3-5次,每次5min;将重组蛋白以5%脱脂奶粉稀释至0.125ug/ml,0.25ug/ml,0.5ug/ml,1ug/ml,2ug/ml,4ug/ml,8ug/ml,16ug/ml,加入bio-HRP,AV-HRP至稀释度为1:1000,1:2000,37℃孵育2h。得rSPG-SA-biotin-HRP-AV-HRP混合液;将混合液每孔60 μ l加入酶标板中,37℃孵育2h,PBST洗涤3-5次,每次5min。TMB显色液每孔100 μ l,显色15min,2M H₂SO₄每孔50 μ l终止反应,读取OD450nm值。模式图如图8所示,结果见图9,结果如下,最适重组蛋白浓度确定为16ug/ml,此时P/N值最大,为9.649。

[0055] 优化后BSA系统检测血吸虫病效果分析

实验确定的最佳条件如下,抗原包被浓度为10ug/ml;封闭液为5%脱脂奶粉;重组蛋白用5%脱脂奶粉稀释至16ug/ml,加入bio-HRP,AV-HRP至稀释度为1:1000,1:2000,37℃孵育2h,得16ug/ml rSPG-SA-biotin-HRP-AV-HRP混合液。以上述实验确定的最佳条件,同时检测兔,牛,羊日本血吸虫阴阳性血清,血清进行梯度稀释,检测此实验方法同时进行多物种检测的可行性及其灵敏度,结果见图10,兔日本血吸虫阳性血清最高可稀释至1:800仍检出阳性,而牛、羊日本血吸虫阳性血清在1:3200稀释度是仍检出阳性,说明此法灵敏度极高,具有较高的实用价值。

[0056] 以上述实验确定最佳条件,诊断抗原为日本血吸虫虫卵可溶性抗原(SEA),其余操作同前,检测牛日本血吸虫阳性血清,牛大片吸虫阳性血清,羊东毕吸虫阳性血清,羊捻转

血矛阳性血清,设牛,羊标准阴性血清对照,检测此实验方法与捻转血矛线虫,东毕吸虫,大片吸虫的交叉性,结果见图11,在1:50血清稀释度时,牛大片吸虫阳性血清检出为阳性,P/N值 ≥ 2.1 ,但是随着血清稀释度的提高,牛大片吸虫、羊捻转血矛线虫,羊东毕吸虫阳性血清均检测为阴性,说明血清稀释度在1:100及以上时,日本血吸虫为诊断抗原的新型ELISA检测法与捻转血矛线虫、东毕吸虫。大片吸虫没有交叉性;牛日本血吸虫阳性血清检测稀释至1:1600仍检出阳性,提示,此法特异性较好。

<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>一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白及其ELISA试剂盒

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> C区上游引物

<400> CCG GGA TCC ACT TAC AAA C

<210>2

<211> 19

<212> DNA

<213> C区下游引物

<400> GCT ACCACC ACC ACC ACT G

<210>3

<211> 25

<212> DNA

<213> SA区上游引物

<400> GAT CCG AGC AAA GAT AGC AAA GCC C

<210>4

<211> 23

<212> DNA

<213> SA区下游引物

<400> GGC CTC GAG TTA TTG CTG AAC AG

<210>5

<211>675

<212> DNA

<213> 重组蛋白G-SA的核苷酸序列

<400>ACTTACAACTTGTTATTAATGGTAAAACGCTGAAGGGTGAAACCACCACCAAAGCGGTGGATGCCG
AAACCGCGCAGAAGGCCTTTAAGCAGTACGCCAACGACAATGGCGTGGATGGTGTGGACCTACGACGACGCGACC
AAAACCTTTTCGTGTTACCGAAGGCGGTGGTGGCAGTGGTGGTGGTGGTAGCGATCCGAGCAAAGATAGCAAAGCCCA
AGTGAGTGCCGCGGAAGCCGGCATTACGGGTACGTGGTACAACCAGCTGGGCAGCACCTTCATTGTTACGGCGGGTG
CCGATGGTGCCCTCACCGGTACGTACGAAAGCGCGGTTGGCAATGCCGAAAGCCGTTACGTGCTGACCGGTCGTTAT
GATAGTGCGCCAGCGACCGATGGTAGTGGTACCGCGCTGGGTTGGACCGTTGCGTGGAAGAACAACCTACCGCAATGC
CCATAGCGCCACGACGTGGAGCGGTCAGTACGTTGGCGGTGCCGAAGCCCGTATCAATACGCAGTGGCTGCTGACCA
GCGGTACGACCGAAGCGAATGCGTGGAAGTACGCTGGTGGGCCACGATACGTTACCAAGGTGAAGCCAAGCGCC
GCGAGCATCGATGCGGCCAAAAAAGCCGGCGTGAATAATGGCAACCTCTAGACGCTGTTTCAGCAATAA

<210>6

<211>165

<212>DNA

<213> 重组蛋白SPG片段的核苷酸序列

<400>ACTTACAACTTGTTATTAATGGTAAAACGCTGAAGGGTGAAACCACCACCAAAGCGGTGGATGCCG
AAACCGCGCAGAAGGCCTTTAAGCAGTACGCCAACGACAATGGCGTGGATGGTGTGGACCTACGACGACGCGACC
AAAACCTTTCGTGTTACCGAA

<210>7

<211>480

<212> DNA

<213> 重组蛋白SA片段的核苷酸序列

<400>GATCCGAGCAAAGATAGCAAAGCCCAAGTGAGTGCCGCGGAAGCCGGCATTACGGGTACGTGGTACA
ACCAGCTGGGCAGCACCTTCATTGTTACGGCGGGTGCCGATGGTGCCCTCACCGGTACGTACGAAAGCGCGGTTGGC
AATGCCGAAAGCCGTTACGTGCTGACCGGTCGTTATGATAGTGCGCCAGCGACCGATGGTAGTGGTACCGCGCTGGG
TTGGACCGTTGCGTGGAAGAACAACCTACCGCAATGCCCATAGCGCCACGACGTGGAGCGGTCAGTACGTTGGCGGTG
CCGAAGCCCGTATCAATACGCAGTGGCTGCTGACCAGCGGTACGACCGAAGCGAATGCGTGGAAGAGTACGCTGGTG
GGCCACGATACGTTACCAAGGTGAAGCCAAGCGCCGCGAGCATCGATGCGGCCAAAAAGCCGGCGTGAATAATGG
CAACCCTCTAGACGCTGTTTCAGCAATAA

<210>8

<211>30

<212> DNA

<213>连接序列的核苷酸序列

<400>GGCGGTGGTGGCAGTGGTGGTGGTGGTAGC

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

图1

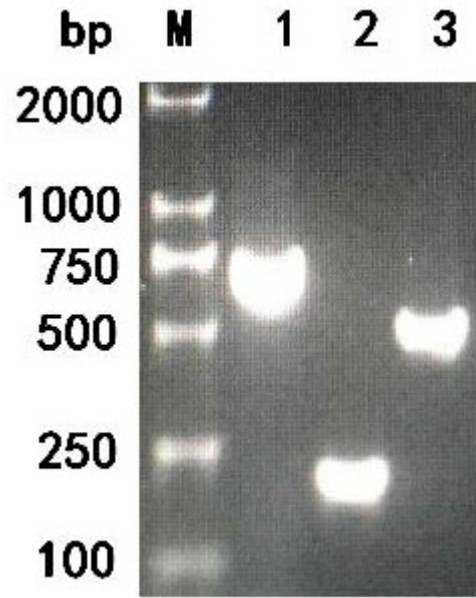


图2

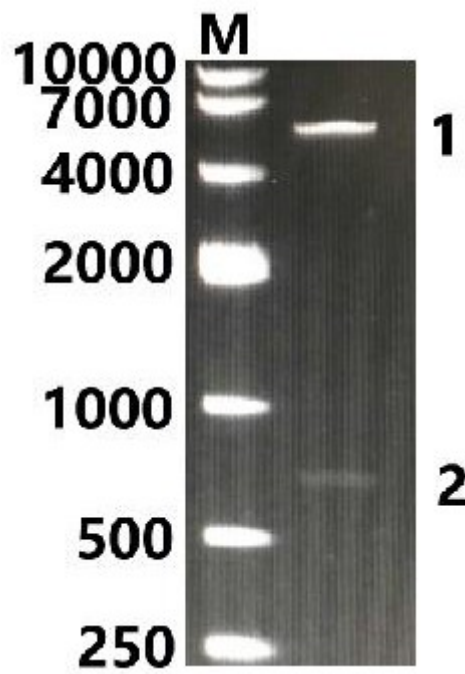


图3

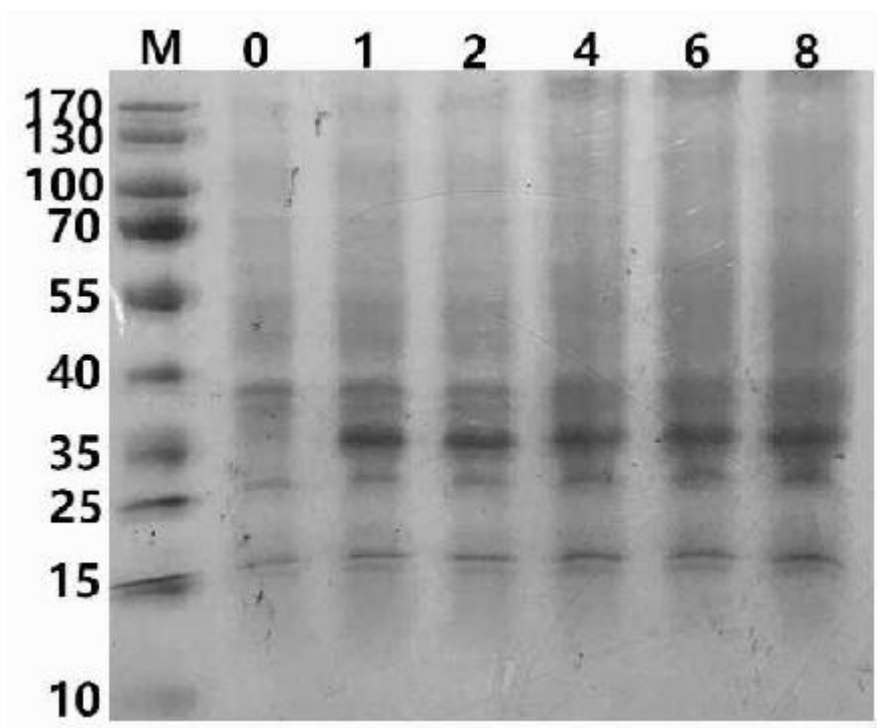


图4

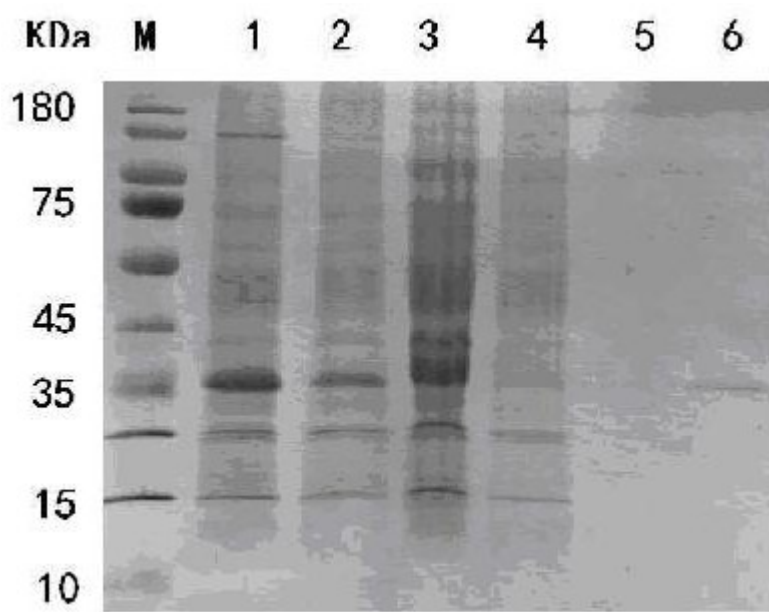


图5

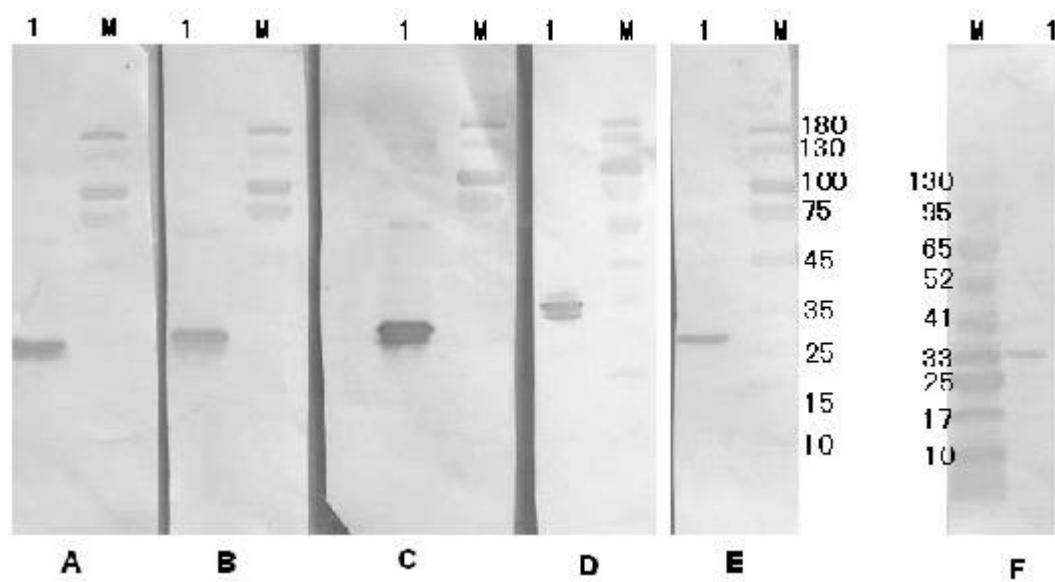


图6

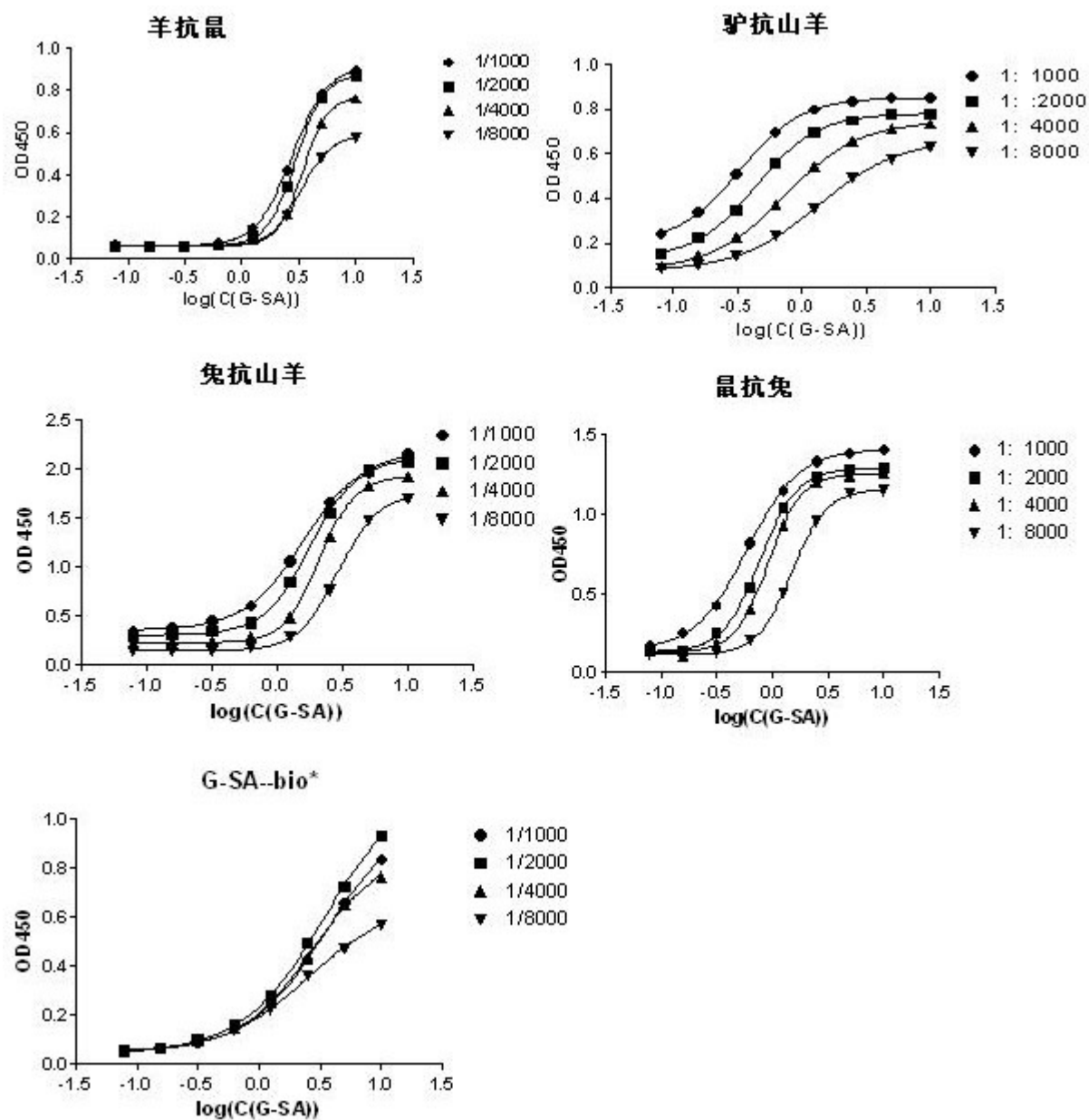


图7

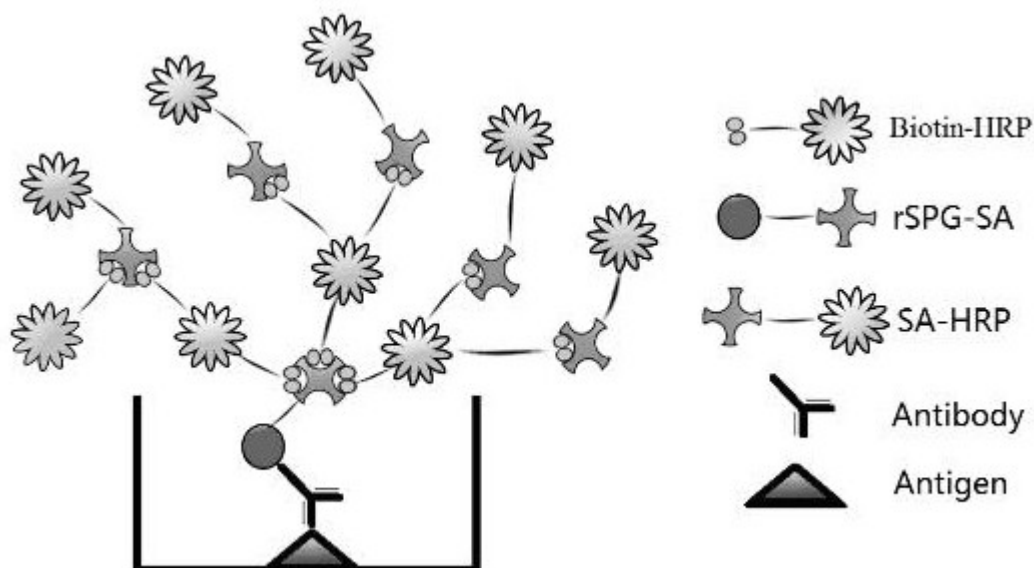


图8

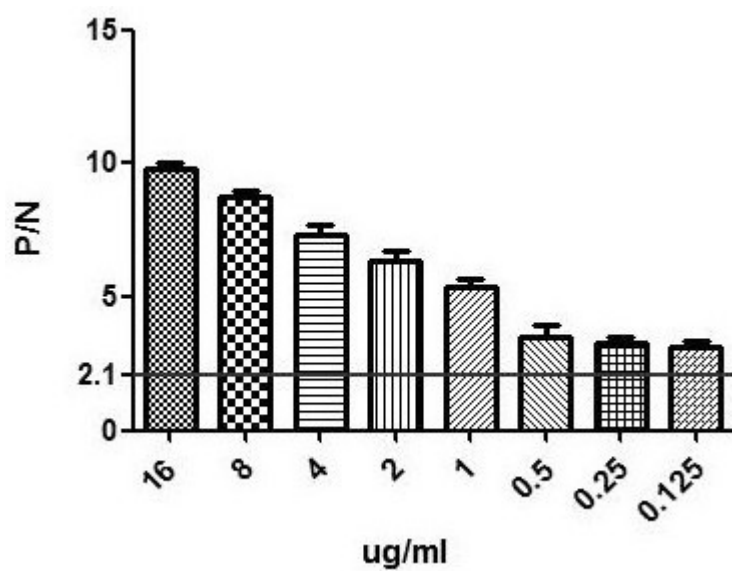


图9

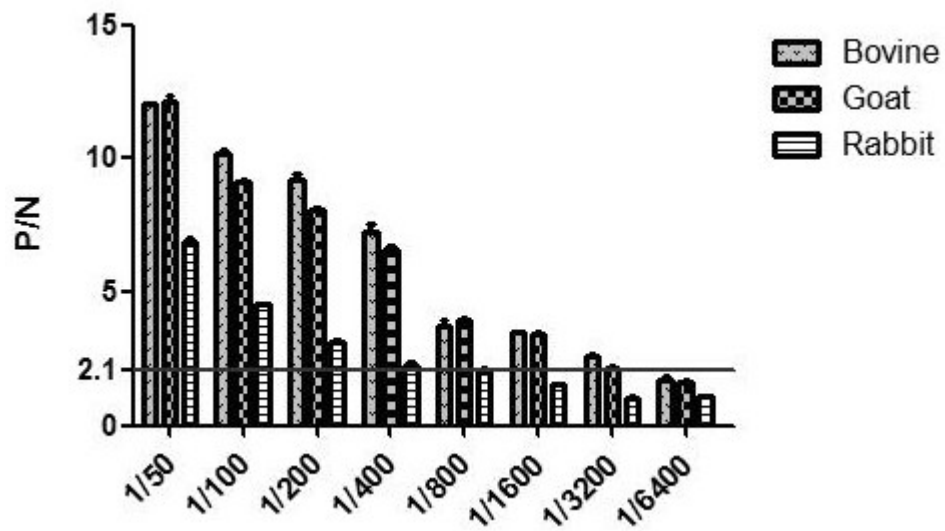


图10

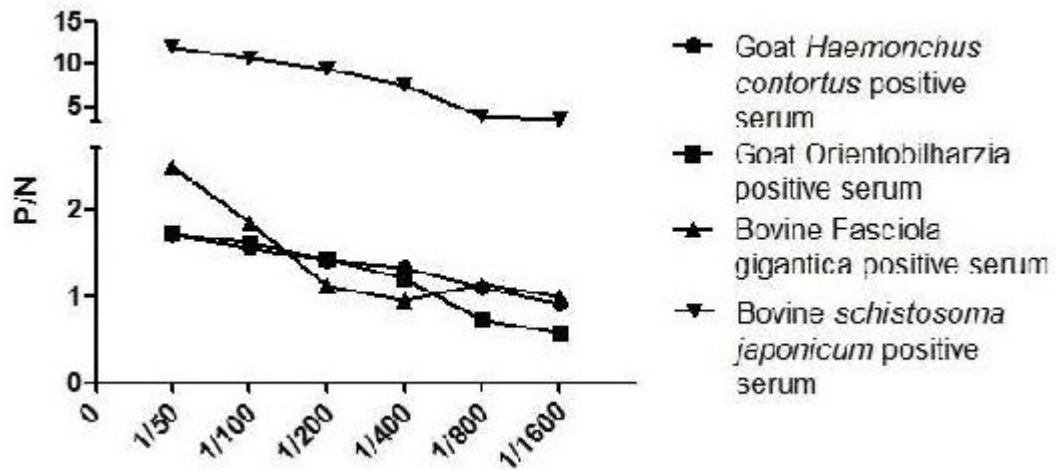


图11

专利名称(译)	一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白及其ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN110615846A	公开(公告)日	2019-12-27
申请号	CN201910798719.7	申请日	2019-08-27
[标]发明人	朱传刚 袁娜娜 张霁月 沈元曦 林矫矫 洪炆		
发明人	朱传刚 纪荣毅 袁娜娜 张霁月 沈元曦 林矫矫 洪炆 马以桐		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/70 C12N15/62 G01N33/535 G01N33/68 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/315 C07K2319/00 C12N15/70 C12N2800/22 G01N33/535 G01N33/581 G01N33/6845 G01N33/6854		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于基因工程领域。具体而言，本发明提供一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白及其ELISA试剂盒，尤其涉及密码子优化的一种兼有IgG结合活性及生物素结合活性的双功能蛋白G-SA，包括链球菌蛋白G (SPG) 片段和SA蛋白。本发明提供的ELISA试剂盒的特异性、敏感性和稳定性较好，具有良好的应用前景。

