



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102167748 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 31

(21) 申请号 201110037374. 7

C12N 15/70(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 02. 14

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 江苏省血吸虫病防治研究所

地址 214064 江苏省无锡市滨湖区梅园杨巷
117 号

申请人 无锡赛德科技开发有限公司

(72) 发明人 余传信 王玠 张伟 钱春艳
宋丽君 殷旭仁 梁幼生 高琪

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

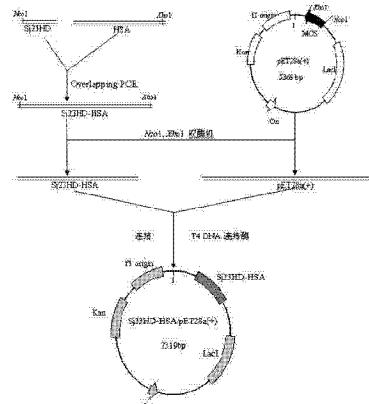
序列表 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段融合蛋白及其在血吸虫感染免疫诊断中的应用

(57) 摘要

一种日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段融合蛋白及其在血吸虫感染免疫诊断中的应用，属于寄生虫病的免疫学诊断技术领域。本发明涉及日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段(Sj23HD)与人血清白蛋白(HSA)的融合蛋白，它含有两个多肽区，第 1 区为日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段，第 2 区为人血清白蛋白，第 1 区的 C 末端与第 2 区的 N 末端直接相连，中间不加任何连接肽，其结构式是：Sj23HD-HSA。所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白保留了 Sj23HD 的反应原性，同时具有更高的稳定性。该 Sj23HD-HSA 融合蛋白作为检测抗原通过免疫印渍法对血吸虫感染进行诊断具有更高的敏感性与特异性。



1. 一种日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段与人血清白蛋白的融合蛋白,其称之为 Sj23HD-HSA 融合蛋白,其特征在于所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白由 2 个多肽区组成,1 区为日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段 Sj23HD,其 2 区为人血清白蛋白 HSA ;1 区通过 C 末端与 2 区的 N 末端直接连接,中间不加任何连接肽,其结构式是 :Sj23HD-HSA ;

所述的 23kDa 膜蛋白大亲水肽段 Sj23HD 为日本血吸虫 23kDa 膜蛋白氨基酸序列的第 110 到 163 位氨基酸,与 Sj23HD 的氨基酸序列 SEQ ID NO :1 保持有至少 90% 的同源性;

所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,2 区多肽选自人血清白蛋白 HSA,2 区多肽的氨基酸序列与人血清白蛋白 HSA 的氨基酸序列 SEQ ID NO :2 保持有至少 90% 的同源性。

2. 根据权利要求 1 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,其基因的核苷酸序列编码为 SEQ ID NO :3。

3. 根据权利要求 1 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :4。

4. 权利要求 1 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白的表达,其特征在于将编码 Sj23HD-HSA 融合蛋白的重组核苷酸片段 SEQ ID NO :3 插入到一种表达载体中构建重组表达载体 Sj23HD-HSA/pET28a(+),然后将重组表达载体 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 转化入一种宿主细胞大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达该 Sj23HD-HSA 融合蛋白。

5. 权利要求 1 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白的制备方法,其特征在于包括转录,翻译,蛋白分离和纯化,以及鉴定步骤。

6. 权利要求 1 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白的应用,其特征在于在血吸虫感染免疫诊断中所使用的检测血吸虫特异性抗体的抗原。

一种日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段融合蛋白及其在 血吸虫感染免疫诊断中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段融合蛋白抗原制备及基于免疫印渍方法对血吸虫感染进行早期诊断的试剂盒及检测方法，属于寄生虫病免疫诊断技术领域。

背景技术

[0002] 血吸虫病是严重危害我国及世界上热带与亚热带地区人民身体健康的严重公共卫生问题。中国仍有 449 个县有血吸虫病流行，近 44 万血吸虫病人，约 2.3 亿人口受到血吸虫感染的威胁。对血吸虫感染的病人、家畜、野生动物等传染源进行诊断，及时给予治疗，消灭传染源，阻断血吸虫病的传播是血吸虫病防治的关键措施。血吸虫感染诊断常用技术包括如下几种：

病原学检测

采用 KATO-KATZ 法检测血吸虫感染病人粪便中的血吸虫虫卵，或通过毛蚴孵化法检测粪便样本中是否有虫卵并能孵化出血吸虫幼虫毛蚴。病原学诊断是血吸虫感染诊断的金标准，缺点是必须是在血吸虫在宿主体内发育成熟产卵后并排出体外之后才能做出诊断，时间上滞后，不能进行早期诊断。该方法操作烦琐，不易被接受，容易漏诊。

核酸检测

采用 DNA 探针杂交，聚合酶链反应(PCR)或环介导同温 DNA 扩增技术(LAMP 法)检测血吸虫感染病人、动物血清样本，粪便样本中的血吸虫特异性 DNA 片段，来确定宿主体内是否有血吸虫感染。此类方法的检测效果与病原学检测效果相似，具有血吸虫活动性感染的诊断价值，缺点是操作烦琐，成本高，难以在血吸虫病防治基层机构推广应用。

免疫学检测

免疫学检测方法包括皮试、循环抗原检测和血清抗体检测三类方法。

[0005] 皮试：是将血吸虫成虫抗原接种到人体的皮内，通过观察其在一定时间范围内的致敏效果来判断受试者是否感染血吸虫。该方法的特点是操作简便，在 20 世纪 60-80 年代被广泛用于血吸虫病的筛查，缺点是对人体有损害和副作用，结果特异性差，并受到受试者的遗传及身体状况的影响，目前该方法已被弃用。

[0006] 循环抗原检测：循环抗原是指进入宿主血液循环的血吸虫虫体蛋白成分，是体内存在血吸虫的标志，检测血吸虫的循环抗原具有病原学诊断价值。该方法的建立必须制备抗循环抗原的特异性单克隆抗体，建立以单克隆抗体检测循环抗原酶联免疫学方法或其它检测方法。由于目前对血吸虫循环抗原的成分不清楚，难以获得非常好的特异性单克隆抗体，虽然国内外均报道了一些血吸虫循环抗原的检测方法，但是敏感性都比较低，不能满足现场血吸虫感染查病的需要。

[0007] 循环抗体的检测：循环抗体是指血吸虫进入人体后其抗原成分刺激机体的免疫系统产物的抗血吸虫循环抗原特异性抗体，特异性抗体的出现一般在血吸虫感染宿主后 1-2

周,出现比较早,有早期诊断价值。针对某些特定抗原的抗体在治疗后能快速转阴,具有疗效考核价值。常用检测抗体的方法有很多,包括:酶联免疫吸附法(ELISA),免疫层析法(试纸条法),免疫渗滤法,间接血凝法(IHA),环卵沉淀法(COPT),免疫磁珠法等。它们的共同特点是以血吸虫的抗原与被试者血清进行反应,观察被试者体内是否有抗血吸虫抗原的特异性抗体存在。其共同的缺点是所用的抗原均为血吸虫可溶性虫卵抗原或成虫抗原,这种抗原为混合抗原。由于虫卵或成虫可溶性抗原的成分十分复杂,有一些成分可能与其它物种的成分有同源性,易与其它寄生虫感染血清发生交叉反应,产生假阳性结果。使用重组血吸虫抗原理论上可以避免上述交叉反应的产生,但是由于重组血吸虫抗原多数是从大肠杆菌中制备,纯化的重组血吸虫抗原难免会混杂有大肠杆菌抗原成分,而大肠杆菌是人体及动物的体内的正常菌群,因而会引起假阳性结果。交叉反应与假阳性问题是当前抗体检测所必须解决的问题。

[0008] 循环抗体检测的另一方法就是免疫印渍法。它的原理是采用聚丙烯凝胶电泳能按分子量的大小将混合抗原各种成分分开,形成分子量大小不同的蛋白质条带,将这些蛋白质条带通过电转移方法转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上,再与血吸虫感染患者血清反应,通过观察血吸虫抗原蛋白条带是否与受试者血清发生反应即可判断受试者是否感染过血吸虫。该方法的特点是特异性好,不易产生交叉反应及假阳性结果;敏感性高于常规酶联免疫吸附方法;如果使用血吸虫童虫期的抗原作为检测抗原,则具有早期诊断价值。

发明内容

[0009] 本发明目的是提供一种以重组融合蛋白为检测抗原检测宿主血清中抗日本血吸虫 23kDa 膜蛋白分子特异性抗体 IgG 或 IgM 免疫印渍方法,可以解决当前血吸虫抗体检测方法特异性和早期诊断价值不足的问题。

[0010] 本发明的技术方案:为达到上述目的,本发明选择日本血吸虫 23kDa 膜蛋白分子的大亲水肽段与人血清白蛋白的融合蛋白,记为 Sj23HD-HSA 融合蛋白,作为抗血吸虫抗原特异性抗体的检测抗原。

[0011] 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白由 2 个多肽区组成,1 区为日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段(Sj23HD),其 2 区为人血清白蛋白(HSA)。1 区通过 C 末端与 2 区的 N 末端直接连接,中间不加任何连接肽。其结构式是:Sj23HD-HSA。

[0012] 所述的 23kDa 膜蛋白大亲水肽段(Sj23HD)为日本血吸虫 23kDa 膜蛋白分子氨基酸序列的第 110 到 163 位氨基酸,与 Sj23HD 的氨基酸序列 SEQ ID NO:1 保持有至少 90% 的同源性。

[0013] 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,2 区多肽选自人血清白蛋白 HSA,2 区多肽的氨基酸序列与人血清白蛋白 HSA 的氨基酸序列 SEQ ID NO:2 保持有至少 90% 的同源性。

[0014] 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,其基因核苷酸序列编码为 SEQ ID NO:3。

[0015] 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:4。

[0016] 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白的表达,在于将编码 Sj23HD-HSA 融合蛋白的重组核苷酸片段 SEQ ID NO:3 插入到一种表达载体中构建重组表达载体 Sj23HD-HSA/pET28a(+),然后将重组表达载体 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 转化入一种宿主细胞大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达该 Sj23HD-HSA 融合蛋白。

[0017] 所述的 Sj23HD-HSA 融合蛋白的制备方法,包括转录,翻译,蛋白分离和纯化,以及鉴定步骤。

[0018] 所述 Sj23HD-HSA 融合蛋白的特征是能使 Sj23HD 多肽趋于稳定,不易被降解,并提高 Sj23HD 肽段作为血吸虫特异性抗体检测抗原的敏感性与特异性。

[0019] 所述 Sj23HD-HSA 融合蛋白的应用,是用于通过免疫学方法检测血吸虫特异性抗体的抗原,用于血吸虫感染患者的筛查与诊断。包括但不限于酶联免疫吸附法(ELISA),免疫印渍法(Immunoblot),免疫层析法,免疫渗滤法,放射免疫法,时间分辨荧光法(TRFIA),免疫磁珠法,等等。

[0020] 本发明为了使获得表达的 Sj23HD-HSA 融合蛋白能够有效地被纯化,在 Sj23HD-HSA 融合蛋白的 C 末端人工加上一个 5 个组氨酸(His)标签,可使之经镍螯合胶进行亲和纯化。

[0021] 本发明优选的表达质粒是 pET28a(+) (美国 MERCK 公司产品),适合在大肠杆菌工程菌中表达。但是,本发明中的 Sj23HD-HSA 融合蛋白也可选择利用其它质粒来表达,这些表达质粒包括但是不局限于原核、真核表达系统常用的质粒。

[0022] 具体地,该表达质粒含有适当的启动子,用以控制融合蛋白的表达。这些启动子包括但是不局限于以下所述的 T7 启动子,优选的启动子为 T7。

[0023] 本发明提供构建 Sj23HD-HSA 融合蛋白的表达质粒的构建方法及工程菌构建方法。

[0024] 首先克隆获得一重组多聚核苷酸序列,该序列含有编码 Sj23HD 多肽区的核苷酸序列区和编码 HSA 多肽区的核苷酸序列区。编码 Sj23HD 多肽区的氨基酸序列与序列 SEQ ID NO :1 保持有至少 90% 的同源性。编码 HSA 多肽区的氨基酸序列与序列 SEQ ID NO :2 保持有至少 90% 的同源性。

[0025] 具体地,通过 PCR 技术,从人胎肝来源的 RNA 中反转录 PCR 获得编码 HSA 多肽区的核苷酸片段,并使 HSA 片段的 3' 端带有 *Xho*1 的酶切位点。编码 Sj23HD 多肽区的核苷酸片段是通过人工合成获得的,并使其 5' 端带有 *Nco*1 酶切位点,3' 端带有 HSA 基因序列的部分核苷酸序列。将编码 Sj23HD 多肽区的核苷酸片段与编码 HSA 多肽区的核苷酸片段混合,采用重叠聚合酶链反应方法将此二基因片段融合成一个编码 Sj23HD-HSA 融合蛋白的完整基因片段。将 Sj23HD-HSA 融合基因片段克隆到 TA 克隆载体 pGEM-T 中构建重组质粒 Sj23HD-HSA/pGEM-T 进行 DNA 序列分析,确定其基因序列的正确性。然后将此 Sj23HD-HSA 基因片段通过 *Nco*1, *Xho*1 酶切位点插入到表达质粒 pET28a(+) 中构建重组表达质粒 Sj23HD-HSA/pET28a(+)。将该重组表达质粒转化到大肠杆菌 DH5 α ,再转种到含有氨苄青霉素(AMP)的 LB 平板(1% 的蛋白胨,0.5% 的酵母抽提物,1% 氯化钠,琼脂粉 1.2%,氨苄青霉素 100 μ g/mL)进行繁殖和保种。

[0026] 本发明表达 Sj23HD-HSA 融合蛋白的重组质粒 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 可在多种大肠杆菌中表达,其优选的菌株是大肠杆菌 BL21 (DE3)。

[0027] 本发明提供一种工程菌大规模表达 Sj23HD-HSA 融合蛋白的方法。具体地,将含有重组表达质粒 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 的单个菌落接种到选择性培养基 LB (1% 的蛋白胨,0.5% 的酵母抽提物,1% 氯化钠,氨苄青霉素 100 μ g/mL) 中,37°C 振摇过夜。第二天按 1 : 10 稀释接种到新鲜的 LB 培养基中,37°C 振摇培养 4h ($OD_{600} \approx 0.4$), 加入异丙基硫代半乳

糖苷(IPTG)诱导表达融合蛋白 Sj23HD-HSA。

[0028] 融合蛋白的表达,可以通过一般的蛋白生化手段检测,包括但不限于: SDS-PAGE, Western blotting 等。

[0029] 本发明也提供一种 Sj23HD-HSA 融合蛋白的分离纯化方法。

[0030] 具体地,该分离纯化方法利用了 Sj23HD-HSA 的 C 末端带有 5 个 His 标签,可以与镍螯合胶结合的特点,选用镍螯合亲和层析柱进行亲和纯化,成功地捕获了表达产物中的 Sj23HD-HSA 融合蛋白,目标蛋白质的纯度可以达 95% 以上。

[0031] 本发明也提供了一种鉴定 Sj23HD-HSA 融合蛋白免疫反应性的方法。

[0032] 具体地,以纯化的重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白与福氏佐剂混合,免疫 C57BL/6J 小鼠,连续加强免疫 2 次后,通过酶联免疫吸咐法测定小鼠血清中是否有抗 Sj23HD 特异性抗体产生。

[0033] 本发明提供一种以重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白检测血吸虫感染动物的体内特异性抗血吸虫抗原抗体的血吸虫病诊断的免疫印渍方法或试剂盒。

[0034] 具体地,将 Sj23HD-HSA 融合蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后采用电转移方法将 Sj23HD-HSA 融合蛋白条带转移到硝酸纤维素(NC)膜上,将含有 Sj23HD-HSA 融合蛋白条带的 NC 膜与受试者血清反应,加入酶标记抗 IgG 二抗后,用底物 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)显色,观察受试者血清中是否有抗 Sj23HD 分子特异性抗体存在,对受试者是否被血吸虫感染过做出判断。

[0035] 本发明的有益效果:血吸虫 23kDa 膜蛋白分子存在于除虫卵以外的血吸虫发育各个阶段,该 23kDa 膜蛋白分子大亲水肽段具有很好的血吸虫病诊断价值。本发明采用基因重组技术制备 Sj23HD-HSA 融合蛋白可以提高 Sj23HD 分子大亲水肽段的稳定性,采用免疫印渍法检测抗 Sj23HD 分子大亲水肽段的特异性抗体可以提高该抗原分子诊断血吸虫感染的敏感性与特异性,尤其是对初次感染血吸虫的病人与动物保虫宿主的诊断,具有血吸虫感染的早期诊断价值,将有良好的应用前景。

附图说明

[0036] 图 1 表达 Sj23HD-HSA 融合蛋白的重组质粒构建流程图

图 2 Sj23HD-HSA 融合蛋白基因片段

1、1kb DNA 分子量标志物

2、纯化的 Sj23HD-HSA 融合蛋白基因片段

图 3 重组表达质粒构建结果

1、重组表达质粒 Sj23HD-HSA/pET28a (+)

2、表达质粒 pET28a (+)

3、1kb DNA 分子量标志物

图 4 重组质粒 Sj23HD-HSA/pET28a (+) 酶切分析结果(*Nco*1+*Xho*1)

1、1kb DNA 分子量标志物

2、未被酶切的重组表达质粒 Sj23HD-HSA/pET28a (+)

3、经 *Nco*1, *Xho*1 双酶切的 Sj23HD-HSA/pET28a (+) 质粒 DNA 产物

图 5、重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白诱导表达结果

- 1、含重组表达质粒 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 转化子细菌的表达产物
- 2、含表达质粒 pET28a(+) 转化子细菌的表达产物
- 3、不含任何质粒的宿主菌 Ecoli. BL21 (DE3) 的表达产物
- 4、蛋白质分子量标志物

图 6 重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白纯化产物

- 1、蛋白质分子量标志物
- 2、纯化的 Sj23HD-HSA 融合蛋白

图 7 重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白免疫反应特异性

- 1、蛋白质分子量标志物
- 2、重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白与健康人血清反应
- 3、重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白与血吸虫病人血清反应
- 4、重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白与肺吸虫病人血清反应
- 5、重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白与肝吸虫病人血清反应。

具体实施方式

[0037] 下面提供的实施例可以详细地解释本发明的主要内容,但不局限于以下这些内容。

[0038] 实施例 1 :人血清白蛋白基因克隆

人血清白蛋白基因通过 RT-PCR 技术,从人胎肝组织的 mRNA 中反转录合成而来,具体制备方法如下 :

1、人胎肝 mRNA 的制备

取新鲜分离的人胎肝组织 0.5g,在液氮中冷冻后,在陶瓷研钵中粉碎,再用 GE Healthcare 公司的 mRNA 纯化试剂盒(Illustra QuickPrep™ mRNA purification kit) 制备纯化 mRNA,操作方法严格按试剂盒的操作说明书。用紫外分光光度计测 mRNA 的纯度与含量。

[0039] 2、HSA 基因扩增

2. 1 引物设计 :

HSA1: 5' -GATGCACACAAGAGTGAGGT-3'

HSA2: 5' -AACTCGAGTTATAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGC-3' 。

[0040] 2. 2 第一链 cDNA 合成

采用 Phusion™ RT-PCR Kit(购自 NEB 北京分公司),在一个 0.2mL 的 PCR 管中,加入 mRNA 2 μL(约 10ng),10 mM dNTP 混合物 1 μL,0.1 μL oligo(dT) primer 1 μL,加无离子水至终体积 10 μL。混匀,离心收集于管底。65℃ 水浴预变性 5min,置冰上冷却。加入 10× 反转录缓冲液 2 μL,反转录酶混合物 2 μL,无核糖核酸酶水(无 Rnase 水)6 μL,混匀,离心收集于管底。25℃ 保温 10min,再在 40℃ 保温 30min 以合成第一链 cDNA。80℃ 保温 5min 以终止反应。

[0041] 2. 3 目的基因扩增

在一个 0.2mL 的 PCR 管中,加入 2×PhusionMaster Mix 25μL,第一链 cDNA 3μL,引物 HSA1 0.5μL (25μM),HSA2 0.5μL (25μM),加无核糖核酸酶水到终体积 50μL。PCR 条件 :98

℃ 30 Sec ;然后 98℃变性 10 Sec ;65℃、30 Sec, 72℃、50 Sec, 一共 30 个循环 ;最后, 72℃、保温 5min。采用低融点琼脂糖凝胶电泳方法回收纯的 HSA 基因片段。具体是用 0.5% 的 agarose 胶电泳 PCR 扩增产物, 切下分子量约 1800bp 左右的目的 DNA 条带, 再用 Promega 公司的 PCR 产物回收试剂盒纯化 HSA 基因 DNA 片段。

[0042] 实施例 2 :Sj23HD 基因合成

Sj23HD 基因是利用人工合成方法制备。为了便于将 Sj23HD 基因与 HSA 基因融合, 以及便于基因克隆, 在合成的过程中在 Sj23HD 的 5' 端带上了一个 *Nco*1 的酶切位点, 在其 3' 端带上部分 HSA 基因的 5' 端 DNA 序列。合成后的 Sj23HD 基因如 SEQ ID NO :5。基因序列的合成是由上海英俊生物技术有限公司完成。

[0043] 实施例 3 :Sj23HD-HSA 融合蛋白基因的构建与序列分析

Sj23HD-HSA 融合蛋白基因的制备是根据 Overlapping PCR 的原理进行的。

[0044] 引物设计 :

Sj23HD1: 5' -CATGGATGACTGGTGCTCT-3' ,

HSA2: 5' -AACTCGAGTTATAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGC-3' 。

[0045] 基因扩增 :

在一个 0.2mL 的 PCR 管中, 加入 2×Phusion Master Mix 25μL, 合成的 Sj23HD 基因片段 2μL, 纯化的 HSA 基因片段 2μL (此 2 个基因片段的分子比例尽可能调节到 1 : 1), 加无离子水到终体积 48μL, 98℃ 30 Sec ;65℃退火 30 Sec, 72℃延伸 2 min, 在冰上冷却反应管。加入引物 Sj23HD1, HSA2 各 1μL, 混匀, 离心收集反应物于管底。然后按以下条件进行基因扩增 :98℃、10 Sec ;65℃、20 Sec, 72℃、50 Sec, 一共 30 个循环 ;最后, 72℃、保温 5min。采用 Promega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒, 纯化合成的 Sj23HD-HSA 基因片段, 如图 2 所示。

[0046] TA 克隆与序列分析

Sj23HD-HSA 的 3' 端加腺嘌呤(A)尾巴 将纯化的 Sj23HD-HSA 片段置于 PCR 反应管中, 加入 10× Taq DNA 聚合酶链反应缓冲液 10μL, MgCl₂ 10μL (25 mmol/L), dATP 1μL (10 mmol/L), Taq DNA 聚合酶 1μL (5 U/μL), 加灭菌无离子水至 100μL, 在 PCR 仪上 72 ℃保温 30 min, 使 Sj23HD-HSA 的 3' 端加上“A”尾巴。用 Promega 公司的酶切产物纯化试剂盒纯化加 A 尾后的 Sj23HD-HSA 基因 DNA 片段。再用 Promega 公司的 PCR 产物回收试剂盒纯化 HSA 基因 DNA 片段。将 Sj23HD-HSA 片段与 TA clone 载体 pGEM-T (美国 PROMEGA 公司产品) 按照 3 : 1 的比例混合, 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接, 反应体系如下 :2× 1ligase buffer 5 μL, pGEM-T vector 1μL (50ng), Sj23HD-HSA 基因片段 3μL, T4 DNA ligase 1μL, 总体积 10μL。混匀后, 短暂离心, 16℃水浴连接过夜, 形成重组质粒 Sj23HD-HSA/pGEM-T。

[0047] 电转化 :步骤为 1)取 5μL 连接产物加入到 50μL 感受态细胞 E. coli DH5 α 中, 小心混匀, 勿使有气泡产生, 放置冰浴上 30 min。2)将连接产物与 E. coli DH5 α 的混合物转移到冰上预冷的狭缝为 0.1cm 的电击杯中, 勿使有气泡产生, 小心拭去电击杯外的冷凝水。3)设置电脉冲仪(BIO-RAD)脉冲参数 :电压 2.5 kV, 电容 25 μF, 电阻 200 Ω。将电击杯插入电脉冲仪电击槽内, 同时按住两个脉冲电极保持至放电为止。4)取出电击杯, 加入 0.5 mL 37℃ 预热的 SOC 培养基, 混匀后将电击后的菌液转移到一无菌玻璃试管中, 37℃、200 rpm 振荡培养 40 min。5)取 200μL 菌液均匀涂布于表面预先涂有 40μL X-gal (40 mg/mL) 的 LB 平板上(含 Amp 100μg/mL)。室温下放置待平板上的菌液完全吸收后, 倒置平板于 37℃

培养箱过夜。在 LB 平板上出现白色菌落可初步判定为阳性克隆，蓝色菌落为阴性克隆。将白色菌落细菌送到上海英俊公司进行 DNA 序列分析。

[0048] 实施例 4 :Sj23HD-HSA 融合蛋白表达质粒的构建

以下以 Sj23HD-HSA 融合基因为例，说明表达载体质粒的构建。

[0049] 本发明采用 pET28a(+) 为表达载体质粒，其制备方法为常用分子生物学方法。即通过培养含有表达载体的菌种，提取获得该质粒。制备质粒后 -20℃ 保存待用。

[0050] 具体如下，对表达载体质粒 pET28a(+) 及重组质粒 Sj23HD-HSA/pGEM-T 分别进行 *Nco*1、*Xho*1 双酶切。具体条件如下。质粒 DNA 10μL, *Nco*1 1μL, *Xho*1 1μL, 10× 酶切缓冲液 5μL ;ddH₂O 33μL, 总体积为 50μL。37℃ 恒温水浴锅内温浴 3 小时，通过琼脂糖凝胶电泳回收线性化的 pET28a(+) 质粒 DNA 和 Sj23HD-HSA DNA 片段，通过琼脂糖凝胶电泳回收分子量约 2000 bp 的 Sj23HD-HAS DNA 片段和分子量约 5000bp 的 pET28a(+) 质粒 DNA 片段。将回收的 Sj23HD-HSA DNA 片段与表达质粒 pET28a(+) DNA 片段连接，构建融合蛋白表达质粒 Sj23HD-HSA/pET28a(+)。连接体系为 10uL, 双酶切的 pET28a(+) 质粒与双酶切 Sj23HD-HSA DNA 的摩尔比为 1 : 2-10, 10×T4 DNA ligase 缓冲液 1μL, T4 DNA ligase 1μL, 加无菌水至总体积为 10μL。连接反应 16℃ 恒温水浴内温浴 16 小时。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。阳性克隆的鉴定是通过含 Ampicillin 的 LB 平板挑选阳性克隆，抽提质粒，并通过双酶切分析确定目的基因是否被插入到表达载体中(图 3,4 所示)。

[0051] 实施例 5 :Sj23HD-HSA 融合蛋白表达工程菌的构建

本发明利用电转化方法和 Sj23HD-HSA 融合基因为例，说明 Sj23HD-HSA 融合蛋白表达工程菌构建的方法。具体方法如下。

[0052] 首先挑选含有 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 重组质粒的细菌克隆，提取质粒 DNA。然后，用电转化的方法把质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。

[0053] 质粒 DNA 提取方法按 Promega 公司质粒 DNA 纯化试剂盒操作说明进行。

[0054] 电转化方法转化大肠杆菌具体如下。

[0055] 先进行感受态细胞的准备。挑取新鲜的 BL21 (DE3) 单菌落，接种至含有 3mL LB 液体培养基的试管中，37℃、200r/min 培养过夜。然后取 1mL 的培养物接种至含有 500mL 新鲜 LB 培养基的 2L 三角摇瓶中，37℃、250-300r/min 培养过夜，至 OD₆₀₀ 小于 0.4。将细菌培养物置于冰上冷却，2500g 离心 20min，去上清，用 500mL 的冰预冷的 ddH₂O 将菌体沉淀重悬。离心后，再用 250mL 的冰预冷的 10% 的甘油溶液将菌体沉淀重悬。再离心，用 10mL 的冰预冷的 10% 的甘油溶液将菌体沉淀重悬。再离心，用冰预冷的 10% 的甘油溶液将菌体沉淀重悬，调节菌液 OD_{600nm}=10.0。以每管 100 μL 的体积分装感受态细胞，-70℃ 保存备用。

[0056] 电击转化，具体如下。

[0057] 将 Sj23HD-HSA/pET28a(+) 重组质粒 DNA 溶解在 5~10μL TE 溶液中，与 80μL 的上述感受态菌体混匀，转至 0.1cm 狹缝的预冷电转化杯中，冰浴 10min。然用 1.8kv 电压、25μF 电容、200 Ω 电阻的条件进行电击。电击完毕后，加入 1mL 37℃ 预温的 LB 液体培养基悬浮，并转至无菌的玻璃试管中，37℃、250-300r/min 培养 40min。将菌液涂布到含有卡那霉素的 LB 平板上，置于 37℃ 培养过夜。

[0058] 实施例 6 :Sj23HD-HSA 融合蛋白表达和纯化

重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白的表达

将表达菌株接种于 50mL LB 液体培养基中 (Kan, 100 μ g/mL), 37°C、200 rpm 过夜培养。取 10mL 过夜培养菌液, 按照 1 : 100 分别接种于 1,000 mL LB 肉汤培养基中 (Kan, 100 μ g/mL) 中, 37°C、200 rpm 振荡培养, 培养 3 ~ 4 h 至菌液

$OD_{600\text{ nm}}$ 约为 0.5。加入 IPTG 至终浓度为 1 mM, 继续培养 4 h。4°C、5,000 rpm 离心 10 min, 收集所有细菌。取少量的细菌进行 SDS-PAGE 电泳, 观察目的蛋白的表达情况(图 5), 用 100 mL PBS 重悬浮细菌沉淀。-30°C 反复冻融 2 ~ 3 次, 冰浴中超声破碎细菌 7 次(功率 200W), 每次 20 sec, 间隔 20 sec。裂解液以 14,000 \times g、4 °C 离心 10 min, 收集沉淀。

[0059] 重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白的纯化

上柱样本的准备: 将上述裂解物沉淀用去离子水悬浮, 再以 12,000 g 离心 10 min, 去上清, 再加入去离子水悬浮, 如此洗涤 3 次。沉淀物用 Buffer A (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH 8.0) 溶解, 再以同样的条件超声 4 次, 打碎其中的 DNA; 再以 12,000 g 离心, 上清液经 0.45 μ m 孔径的微孔滤膜过滤。

[0060] 轻轻混匀 Ni 树脂, 取 2mL 装入试剂盒提供的层析柱中, 使 Ni 树脂自然沉降于底部。待液体流尽后, 加入 10mL 的 Buffer A 预平衡。将 Buffer A 处理好的样本加入柱中, 控制流速在 15mL/h。上样完毕, 用 20mL Buffer A 洗柱, 直至流出液的 $A_{280\text{nm}}$ 接近于零。再用 20mL Buffer B (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH 6.3) 洗柱, 洗去杂蛋白。然后用 Buffer C (100mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M 尿素, pH 4.5) 洗脱目的蛋白。SDS-PAGE 电泳观察目的蛋白的纯度。如图 6 所示。

[0061] 实施例 7: 重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白免疫反应性分析

将 100 μ g 融合蛋白 Sj23HD-HSA 进行 12%SDS-PAGE, 电泳结束后立即用半干转印缓冲液 (Tris 5.82g, glycine 2.93g, methanol 200mL, 用双蒸水定容至 1L) 平衡胶 15min。准备预先切割好的厚滤纸和硝酸纤维素膜(切割至与电泳凝胶大小一致), 使用前放置于半干转印缓冲液中浸泡 15~30min。将转膜装置的各组件从下至上依次按阳极、滤纸、NC 膜、凝胶、滤纸、阴极的顺序放好, 滤纸、NC 膜、凝胶精确对齐, 每一步都要去除气泡。在室温, 恒电压 20V 条件下电转化 30min。硝酸纤维素 (NC) 膜用 5% 脱脂牛奶 PBST (PBS 含 0.05% Tween-20) 封闭, 室温 1 h 或 4°C 过夜; 将 NC 膜纵切成 0.3cm 宽的长条, 编上号码, 分别放入含 1mL (1:500 稀释) 血吸虫病人血清的水化盘槽内, 置室温摇床上反应 1 h。用 TBST 洗涤 NC 膜条 3 次, 每次 10min, 加入用 PBS 作 1:10000 稀释的 IgG-HRP 或 1:1000 稀释的 IgM-HRP, 室温反应 1 h。再用 TBST 洗涤 3 次后用 3,3'-二氨基联苯胺钠盐 (DAB) 底物液 (6mg DAB 溶于 10mL PBS 中, 用前加 10 μ L H₂O₂) 显色 2 min, 用蒸馏水漂洗 NC 膜条终止反应, 观察结果。显示重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白可以与血吸虫感染病人血清发生特异性反应, 而与肺吸虫, 肝吸虫病人血清不发生交叉反应, 与健康人血清亦不发生反应, 显示出良好的特异性。如图 7 的 2、3、4、5 所示。

[0062] 实施例 8: 重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白检测血吸虫感染小鼠

按实施例 7 的方法, 将重组 Sj23HD-HSA 融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 采用电转印法转移到 NC 膜上。被切成膜条后分别与感染后的 7、10、14、18、21、28 天小鼠血清反应, 同时以常规酶联免疫法做对照。结果发现免疫印渍法的敏感性比常规酶联免疫吸附法高。感染后 21 天常规酶联免疫法的阳性率为 60%, 而免疫印渍法的阳性率为 80%, 两者有显著的差异性。如表 1 所示。

[0063] 表 1 两种方法检测血吸虫感染后不同时间小鼠血清抗 Sj23HD 抗体 IgG 阳性率的比较

Time (d)	Trans-BlotSD(%)	ELISA (%)
0	0	0
7	10	0
10	10	0
14	30	10
18	50	40
21	80	60
28	100	90

序列表

<110> 江苏省血吸虫病防治研究所、无锡赛德科技开发有限公司

<120> 一种日本血吸虫 23kDa 膜蛋白大亲水肽段融合蛋白及其在血吸虫感染免疫诊断中的应用

<160> 5

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 63

<212> PRT

<213> 日本血吸虫 23kDa 膜蛋白(23 kDa membrane protein of Schistosoma japonicum)

<400> 1

Met Thr Gly Ala Leu Glu Asn Pro Asn Glu	10	15
5		
Met Asp Lys Ile Gln Thr Ser Phe His Cys	Cys Gly Val Lys Gly	
20	25	30
Pro Asp Asp Tyr Lys Gly Asn Val Pro Ala	Ser Cys Lys Glu Gly	
35	40	45
Gln Glu Val Tyr Val Gln Gly Cys Leu Ser	Val Phe Ser Ala Phe	
50	55	60
Leu Lys Arg		
63		

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 585

<212> PRT

<213> 人血清白蛋白

<400> 2

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly	15	
5	10	
Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr	30	
20	25	
Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu		

	35		40		45		
Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys		
					Thr		
				Cys	Val		
				Ala	Asp		
					Glu		
	50				55		60
Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu		
					His		
				Thr	Leu		
					Phe		
					Gly		
					Asp		
					Lys		
					Leu		
					Cys		
	65				70		75
Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg		
					Glu		
				Thr	Tyr		
					Gly		
					Glu		
					Met		
					Ala		
					Asp		
					Cys		
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro		
					Glu		
				Arg	Arg		
					Asn		
					Glu		
					Cys		
	95				100		105
Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn		
					Leu		
				Pro	Arg		
					Leu		
					Val		
					Arg		
					Pro		
					Glu		
	110				115		120
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala		
					Phe		
				His	Asp		
					Asn		
					Glu		
					Glu		
					Thr		
					Phe		
					Leu		
	125				130		135
Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu		
					Ile		
				Ala	Arg		
					Arg		
					His		
					Pro		
					Tyr		
	140				145		150
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe		
					Phe		
				Ala	Lys		
					Arg		
					Tyr		
					Lys		
	155				160		165
Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala		
					Ala		
				Asp	Lys		
					Ala		
					Cys		
	170				175		180
Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg		
					Asp		
				Gl	Glu		
					Gly		
					Lys		
	185				190		195
Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala		
					Ser		
				Leu	Gln		
					Lys		
					Phe		
	200				205		210
Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val		
					Ala		
				Arg	Leu		
					Ser		
					Gln		
					Arg		
					Phe		
	215				220		225
Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val		
					Ser		
				Lys	Leu		
					Val		
					Thr		
	230				235		240
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys		
					His		
				Asp	Leu		
					Phe		
	245				250		255
Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala		
					Lys		
				Tyr	Ile		
					Cys		
	260				265		270
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys		
					Glu		
				Cys	Cys		
					Glu		
	275				280		285
Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala		
					Glu		
				Val	Glu		
					Asn		
	290				295		300
Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala		
					Ala		
				Asp	Phe		
					Val		
	305				310		315
Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu		
					Ala		
				Lys	Asp		
					Val		
	320				325		330

Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu
					335			340						345
Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
					350				355					360
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp
					365				370					375
Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln
					380				385					390
Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn
					395				400					405
Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr
					410				415					420
Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser
					425				430					435
Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu
					440				445					450
Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu
					455				460					465
Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser
					470				475					480
Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu
					485				490					495
Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His
					500				505					510
Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys
					515				520					525
Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr
					530				535					540
Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val
					545				550					555
Glu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu
					560				565					570
Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu
					575				580					585

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 1950

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

atgactggtg	ctctggaaaa	tccaaacgag	gaaataacgg	caaccatgga	taagatacaa	60
acatcatcc	attgttgtgg	agtcaaagggt	ccagacgatt	ataaaggaa	tgtgccagca	120
tcatgtaaag	aaggcaaga	agtttatgtt	cagggttgc	tatctgtctt	tagtgcattc	180
ttaaaacgca	acgatgcaca	caagagttag	gttgctcatc	gatttaaaga	tttgggagaa	240
gaaaatttca	aagccttgg	gttgattgcc	tttgctcagt	atcttcagca	gtgtccattt	300
gaagatcatg	taaaatttagt	gaatgaagta	actgaatttg	caaaaacatg	tgttgctgat	360
gagtcagctg	aaaattgtga	caaattcaatt	catacccttt	ttggagacaa	attatgcaca	420
gttgcaactc	ttcgtaaac	ctatggtaa	atggctgact	gctgtgcaaa	acaagaacct	480
gagagaaatg	aatgcttctt	gcaacacaaa	gatgacaacc	caaaccctccc	ccgattggtg	540
agaccagagg	ttgatgtgat	gtgcactgct	tttcatgaca	atgaagagac	attttgaaa	600
aaatacttat	atgaaattgc	cagaagacat	ccttactttt	atgccccgga	actcctttc	660
tttgctaaaa	ggtataaagc	tgctttaca	gaatgttgcc	aagctgctga	taaagctgcc	720
tgcctttgc	caaagctcga	tgaacttcgg	gatgaaggg	aggcttcgtc	tgccaaacag	780
agactcaagt	gtgccagtct	ccaaaaattt	ggagaaagag	cttcaaagc	atggcagta	840
gctgcctga	gccagagatt	tccaaagct	gagtttgag	aagtttccaa	gttagtgaca	900
gatcttacca	aagtccacac	ggaatgctgc	catggagatc	tgcttgaatg	tgctgatgac	960
agggcggacc	ttgccaagta	tatctgtgaa	aatcaagatt	cgatctccag	taaactgaag	1020
gaatgctgtg	aaaaacctct	gttggaaaaaa	tcccactgca	ttgccgaagt	ggaaaatgat	1080
gagatgcctg	ctgacttgcc	ttcatttagct	gctgatttg	ttgaaagtaa	ggatgtttgc	1140
aaaaactatg	ctgaggcaaa	ggatgtcttc	ctggcattgt	ttttgtatga	atatgcaaga	1200
aggcatcctg	attactctgt	cgtgctgctg	ctgagacttg	ccaagacata	tgaaaccact	1260
ctagagaagt	gctgtgccgc	tgcagatct	catgaatgct	atgccaagg	gttcgatgaa	1320
tttaaacctc	ttgtggaaga	gcctcagaat	ttaatcaaac	aaaattgtga	gcttttgag	1380
cagttggag	agtacaattt	ccagaatgct	ctattagttc	gttacaccaa	gaaagtaccc	1440
caagtgtcaa	ctccaactct	tgttagaggc	tcaagaaacc	tagaaaaagt	gggcagcaaa	1500
tgttgtaaac	atcctgaagc	aaaaagaatg	ccctgtgcag	aagactatct	atccgtggc	1560
ctgaaccagt	tatgtgtgtt	gcatgagaaa	acgccagtaa	gtgacagagt	caccaaatgc	1620
tgcacagaat	ccttggtgaa	caggcgacca	tgcatttcag	ctctggaaagt	cgatgaaaca	1680
tacgttccca	aagagttaa	tgctgaaaca	ttcaccttcc	atgcagatat	atgcacactt	1740
tctgagaagg	agagacaaat	caagaaacaa	actgcacttg	ttgagctcgt	gaaacacaag	1800
cccaaggcaa	caaaagagca	actgaaagct	gttatggatg	atttcgacgc	ttttgttagag	1860
aagtgcgtca	aggctgacga	taaggagacc	tgctttgccg	aggaggtaa	aaaacttgg	1920
gctgcaagtc	aagctgcatt	aggcttataa				1950

<210> SEQ ID NO: 4

<211> 649

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 4

Met	Thr	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Pro	Asn	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr
				5					10					15
Met	Asp	Lys	Ile	Gln	Thr	Ser	Phe	His	Cys	Cys	Gly	Val	Lys	Gly
				20					25					30
Pro	Asp	Asp	Tyr	Lys	Gly	Asn	Val	Pro	Ala	Ser	Cys	Lys	Glu	Gly
				35					40					45
Gln	Glu	Val	Tyr	Val	Gln	Gly	Cys	Leu	Ser	Val	Phe	Ser	Ala	Phe
				50					55					60
Leu	Lys	Arg	Asn	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe
				65					70					75
Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala
				80					85					90
Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys
				95					100					105
Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp
				110					115					120
Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly
				125					130					135
Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu
				140					145					150
Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys
				155					160					165
Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val
				170					175					180
Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu
				185					190					195
Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His
				200					205					210
Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr
				215					220					225
Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala
				230					235					240
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala
				245					250					255
Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe

	260		265		270	
Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln	
	275				280	285
Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr	
	290				295	300
Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu	
	305				310	315
Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu	
	320				325	330
Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys	
	335				340	345
Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp	
	350				355	360
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu	
	365				370	375
Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe	
	380				385	390
Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr	
	395				400	405
Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr	
	410				415	420
Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala	
	425				430	435
Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn	
	440				445	450
Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr	
	455				460	465
Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro	
	470				475	480
Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly	
	485				490	495
Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met	
	500				505	510
Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys	
	515				520	525
Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys	
	530				535	540
Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu	

545	550	555
Glu Val Asp Glu Thr	Tyr Val Pro Lys Glu	Phe Asn Ala Glu Thr
560	565	570
Phe Thr Phe His Ala	Asp Ile Cys Thr Leu	Ser Glu Lys Glu Arg
575	580	585
Gln Ile Lys Lys Gln	Thr Ala Leu Val Glu	Leu Val Lys His Lys
590	595	600
Pro Lys Ala Thr Lys	Glu Gln Leu Lys Ala	Val Met Asp Asp Phe
605	610	615
Ala Ala Phe Val Glu	Lys Cys Cys Lys Ala	Asp Asp Lys Glu Thr
620	625	630
Cys Phe Ala Glu Glu	Gly Lys Lys Leu Val	Ala Ala Ser Gln Ala
635	640	645
Ala Leu Gly Leu		
649		

<210> SEQ ID NO: 5

<211> 216

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

catggatgac tggtgctctg gaaaatccaa acgagggaaat aacggcaacc atggataaga	60
tacaaacatc attccattgt tgtggagtca aagggtccaga cgattataaa ggaaatgtgc	120
cagcatcatg taaagaaggg caagaagttt atgttcaggg ttgtctatct gtcttagtg	180
cattcttaaa acgcaacgat gcacacaaga gtgaggt	217

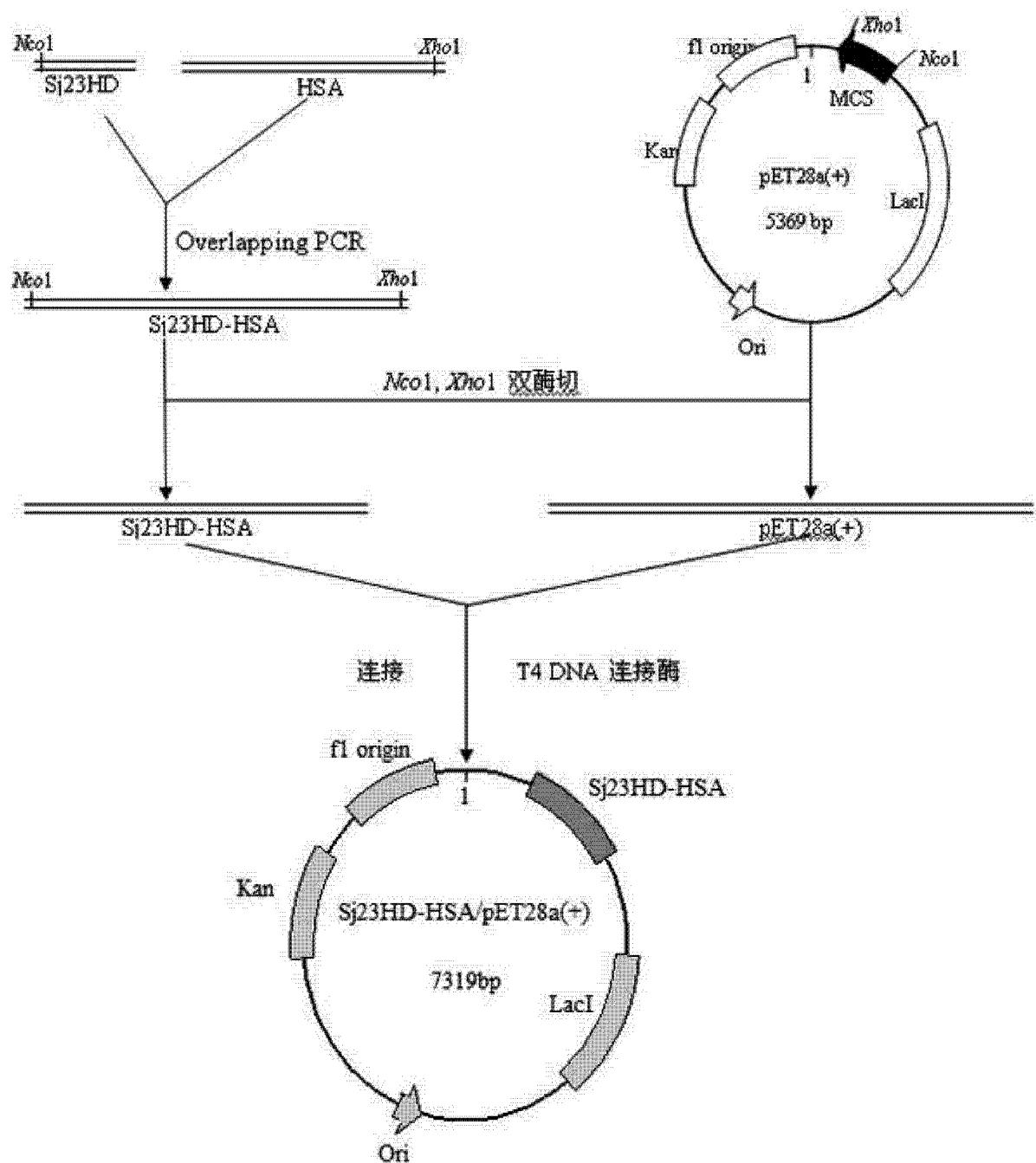
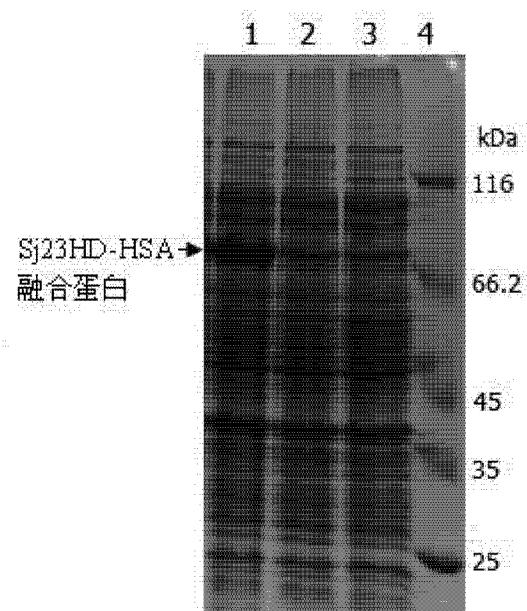
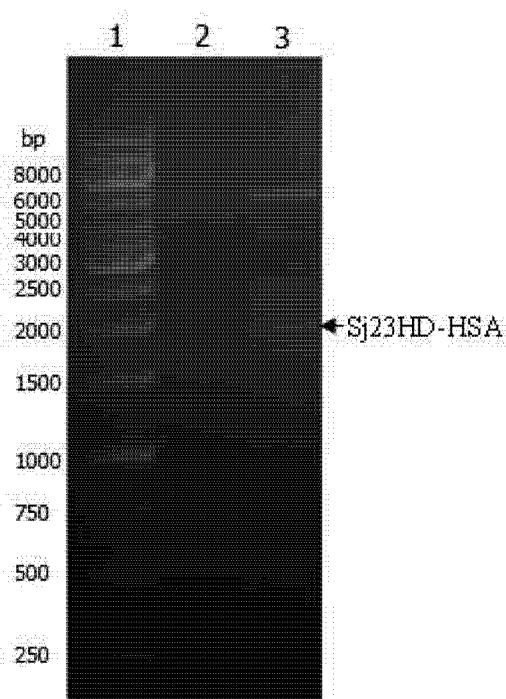
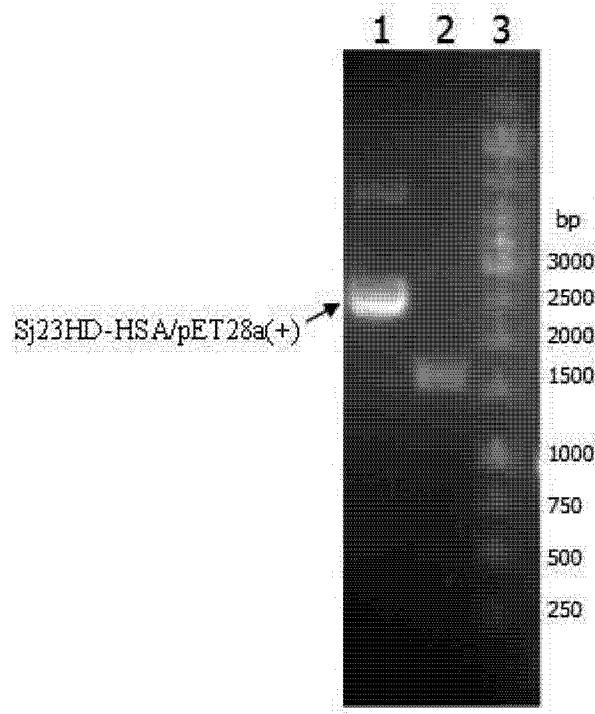
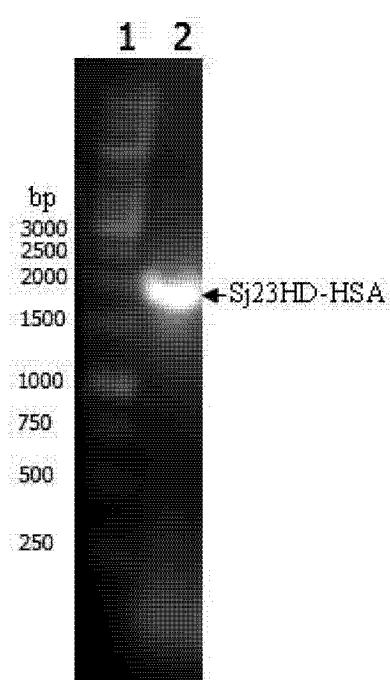


图 1



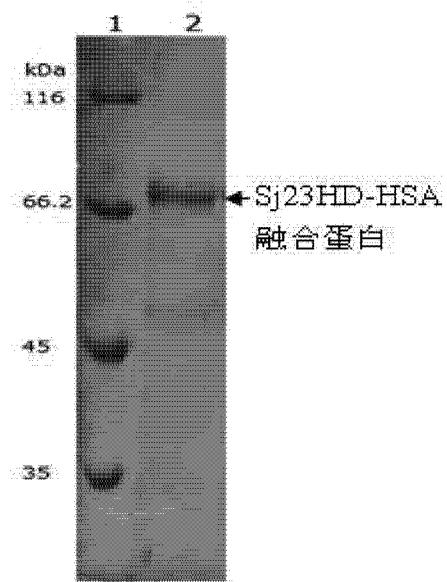


图 6

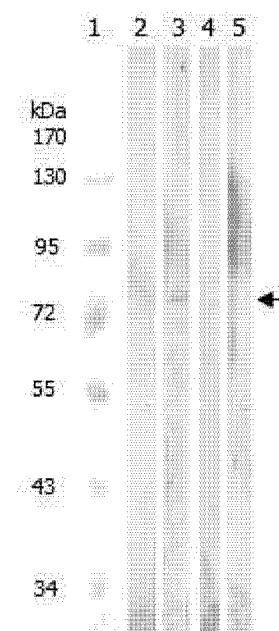


图 7

专利名称(译)	一种日本血吸虫23kDa膜蛋白大亲水肽段融合蛋白及其在血吸虫感染免疫诊断中的应用		
公开(公告)号	CN102167748A	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	CN201110037374.7	申请日	2011-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省血吸虫病防治研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省血吸虫病防治研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省血吸虫病防治研究所		
[标]发明人	余传信 王玠 张伟 钱春艳 宋丽君 殷旭仁 梁幼生 高琪		
发明人	余传信 王玠 张伟 钱春艳 宋丽君 殷旭仁 梁幼生 高琪		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 C12N15/70 G01N33/53		
其他公开文献	CN102167748B		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

一种日本血吸虫23kDa膜蛋白大亲水肽段融合蛋白及其在血吸虫感染免疫诊断中的应用，属于寄生虫病的免疫学诊断技术领域。本发明涉及日本血吸虫23kDa膜蛋白大亲水肽段(Sj23HD)与人血清白蛋白(HSA)的融合蛋白，它含有两个多肽区，第1区为日本血吸虫23kDa膜蛋白大亲水肽段，第2区为人血清白蛋白，第1区的C末端与第2区的N末端直接相连，中间不加任何连接肽，其结构式是：Sj23HD-HSA。所述的Sj23HD-HSA融合蛋白保留了Sj23HD的反应原性，同时具有更高的稳定性。该Sj23HD-HSA融合蛋白作为检测抗原通过免疫印渍法对血吸虫感染进行诊断具有更高的敏感性与特异性。

