



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102279271 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201110178619. 8

(22) 申请日 2011. 06. 29

(73) 专利权人 贵阳中医学院

地址 550002 贵州省贵阳市东路 50 号贵阳
中医学院微生物教研室

(72) 发明人 何光志 田维毅 安传伟 王平
黄高 王文佳 俞琦 奚锦
王乾宇

(74) 专利代理机构 北京联创佳为专利事务所
(普通合伙) 11362

代理人 张浩宇

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101348787 A, 2009. 01. 21, 全文.

CN 101779126 A, 2010. 07. 14, 全文.

CN 102099680 A, 2011. 06. 15, 全文.

HIROSHI YAMASAKI, et al.. Development
of a Highly Specific Recombinant

Toxocara canis Second-Stage Larva
Excretory-Secretory Antigen for
Immunodiagnosis of Human Toxocariasis.
《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 2000, 第
38 卷 (第 4 期), 第 1409-1413 页.

Joseph D. Turner, et al.. Intensity of
intestinal infection with multiple worm
species is related to regulatory cytokine
output and immune hyporesponsiveness.
《Journal of Infectious Diseases》. 2008, 第
197 卷 (第 8 期), 第 1204-1212 页.

黎黎 等. ELISA 检测蛔虫感染的血清特异性
抗体. 《广西预防医学》. 1996, 第 2 卷 (第 3 期),
第 170-171 页.

沈丽英 等. ELISA 检测蛔虫感染者血清抗体的
观察. 《中国血吸虫病防治杂志》. 1993, 第 5 卷
(第 1 期), 第 49-50 页.

孙贵珍 等. 猪蛔虫不同抗原用于 ELISA
检测蛔虫抗体. 《中国寄生虫学与寄生虫病杂
志》. 1987, 第 5 卷 (第 2 期), 第 149-149 页.

审查员 赵晓明

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 3 页

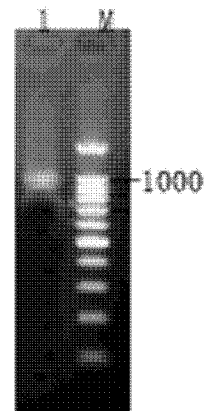
(54) 发明名称

重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间
接 ELISA 方法

(57) 摘要

本发明公开了一种重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原
检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法, 该方法以蛔虫
成虫虫体或者感染性虫卵的 RNA 为模板, 利用
RT-PCR 扩增出 ALAg 基因, 构建 ALAg 表达载体并
转化表达菌进行诱导表达, 纯化重组蛋白, 以纯化
蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法。本
发明建立了稳定而特异的抗蛔虫体 IgG 的间接
ELISA 检测方法, 可用于蛔虫感染的临床监测和
诊断, 适宜在基层和临床广泛推广。

CN 102279271 B



1. 一种非疾病诊断或治疗目的重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法,其特征在于,按照下列步骤进行:

(1) 重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原的制备

① 蛔虫成虫总 RNA 的提取和 RT

从 -70℃ 冰箱取出蛔虫成虫虫体或感染性虫卵,置于研钵中磨成粉末,然后按 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA,以抽提的总 RNA 为模板,反转录为 cDNA;

② ALAg 基因的扩增和克隆

以 cDNA 为模板,根据 Genbank 中公布的猪蛔虫抗原基因的序列,利用 Primer Primer 5.0 软件设计引物进行扩增蛔虫的 ALAg 基因,所述引物中,上游含 *BamH* I 酶切位点引物为: 5'-CGCGGATCC GCCAGTTTAAGCGAGATGC-3';下游含 *EcoR* I 酶切位点引物为: 5'-CCGGAATTC GAGAAGCTTATGCCTCGCTT-3';扩增产物用 DNA 胶回收试剂盒回收 ALAg 目的片段;将 ALAg 与 pMD18-T 载体连接,然后转化感受态细胞 DH5 α ,涂于含有氨苄青霉素的 LB 培养基上进行培养,挑取菌落经过菌落 PCR 鉴定后,抽提鉴定为阳性的菌株进行提取质粒 pMD18-T-ALAg 进行测序;

③ Pet28a+-ALAg 重组质粒构建及酶切鉴定

将测序正确的阳性菌,提取质粒 pMD18-T-ALAg,分别采用 *BamH* I 和 *EcoR* I 进行酶切 pMD18-T-ALAg 质粒和 Pet28a+ 表达载体,纯化目的片段进行连接成 Pet28a+-ALAg,并转入 DH5 α 中,涂于含有氨苄青霉素的 LB 培养基上进行培养,挑取菌落经过菌落 PCR 和酶切鉴定后,抽提鉴定为阳性的菌株进行提取质粒 Pet28a+-ALAg 进行测序;

④ 重组 Pet28a+-ALAg 质粒在大肠杆菌中的诱导表达

将测序正确的阳性质粒 Pet28a+-ALAg 转化 BL21-DE3 感受态细胞,加入 IPTG 进行诱导表达;

⑤ 重组 ALAg 蛋白的纯化

按 1: 100 比例将培养过夜的含有 Pet 28a+-ALAg 的 BL21-DE3 接种到新的 LB 液体培养基中,37℃ 快速振荡培养至细菌生长对数中期, $A_{550}=1.0$;在 IPTG 诱导下,进行重组 ALAg 蛋白的大量表达,收集诱导表达菌;离心后将细菌沉淀经反复冻融和超声裂解后,依次用含 0、2、4 mol/L 尿素的 1 \times 结合蛋白缓冲液洗涤沉淀;随后用含 8mol/L 尿素的 1 \times 结合蛋白缓冲液重悬沉淀,冰上放置 1 h,使包涵体蛋白完全溶解;16,000 \times g 离心 30min 去除不可溶物,以孔径 0.45mm 的 NC 膜过滤收集上清液;经 His 结合树脂纯化,以缓冲液洗去杂蛋白,以洗脱液洗脱重组 ALAg 蛋白;将纯化的重组蛋白于 4℃ 分别在含 4mol/L、2 mol/L 尿素的 PBS 及 PBS 溶液中依次进行透析,将溶液进行冷冻干燥后于 4℃ 保存;

(2) 以纯化后的重组 ALAg 蛋白作为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法

① 最佳抗原包被浓度及血清最佳稀释倍数的确定

将重组 ALAg 蛋白用 pH 为 9.6 的 0.05M 的碳酸盐稀释成为 25、10、5、1、0.5、0.1 μ g/mL 6 个浓度包被酶标板 100 μ L / 孔,每个浓度包被 1 列,于 37℃ 温浴 1 h 后放置于 4℃ 过夜,取出用含 0.05% Tween-20 的 PBS-T 洗涤 3 次,每次 3 min,然后每孔再加 1% 牛血清白蛋白(BSA)100 μ L 封闭液,37℃ 封闭 30 min;然后将已知蛔虫阳性血清和蛔虫阴性血清在酶标板上从 1:20、1:40、1:80、1:160 和 1:320 倍比稀释,分别加入上述已封闭的酶标板中,100 μ L/孔,37℃ 反应 1 h 后,洗涤 3 次,用封闭液作 1:8000 稀释辣根过氧化物酶标鼠抗

人 IgG 加入上述已封闭的酶标板, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 经洗涤后加入 TMB 底物溶液 100 μL /孔, 反应 15 min, 最后加入 100 μL 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定 OD 值, 同时用健康人血清作方阵滴定; 选择已知蛔虫阳性血清与蛔虫阴性血清 OD₄₉₀ 的 P/N 比值最大所对应的抗原、抗体稀释度作为判定标准;

②鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度的确定

将鼠抗人 IgG-HRP 作 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 和 1:16000 倍比稀释, 通过检测已知阳性和阴性血清, 来确定鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度;

③间接 ELISA 方法建立

将重组 ALAg 蛋白以最佳包被浓度包被酶标板 100 μL /孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗涤 3 次, 每次 3 min, 晾干; 加入 100 μL /孔封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 然后将待检血清按步骤(2)的步骤①中试验结果得出的最佳稀释倍数稀释后加入酶标板 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 洗涤 3 次, 晾干, 加入步骤(2)的步骤②试验结果得出的最佳工作浓度的鼠抗人 IgG-HRP 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 洗涤 3 次, 每次 3 min, 晾干, 加入 TMB 底物 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 最后加入 100 μL 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪测 OD₄₉₀ 值。

2. 根据权利要求 1 所述的非疾病诊断或治疗目的重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法, 其特征在于: 步骤(1)的步骤③中, 所述酶切鉴定的方法为: 分别选用 *BamH* I 和 *EcoR* I 两种限制性内切酶对提取 Pet28a+-ALAg 质粒进行双酶切鉴定, 酶切产物于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳后紫外检测结果; 将双酶切鉴定正确的菌液进行测序并分析。

3. 根据权利要求 1 所述的非疾病诊断或治疗目的重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法, 其特征在于: 步骤(1)的步骤④中, 将重组 Pet28a+-ALAg 质粒在大肠杆菌中进行诱导表达, 然后进行 SDS-PAGE 分析, 即: 取诱导和未诱导的细菌培养物离心后, 分别取沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 分析, 确定重组蛋白是包涵体表达还是可溶性表达。

重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛔虫的防治及检测技术,特别是重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原的制备及检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 蛔虫 (*Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758) 也称为人似蛔虫,似蛔虫病呈世界性分布,已经成为公共卫生问题之一。据报道,全世界约有 14.72 亿人感染似蛔虫。我国是似蛔虫感染较严重的国家之一,1990 年全国人体寄生虫分布调查似蛔虫感染率为 44.59%,分布范围遍及全国,尤其是农村地区,对群众健康和青少年儿童的生长发育危害较大。2008 年,孙凤华报道全国 31 个省(区、市)共检查 356629 人,似蛔虫平均感染率 12.72%。似蛔虫感染者轻度、中度和重度分别占 81.64%、16.64%和 1.50%,感染率自东向西明显升高,东部、中部和西部地区分别为 4.86%、16.47%、18.33%。蛔虫是世界上流行地域最广、感染人数最多的病原生物之一,是危害人民身体健康的重要疾病。每条雌虫平均每天可产卵 24 万个。感染期卵在人小肠内孵出幼虫,侵入肠粘膜和粘膜下层,钻入静脉或淋巴管,经肝、右心,到达肺,冲破肺泡毛细血管,进入肺泡,表现为机械性损伤、超敏反应、营养不良以及导致宿主肠道功能障碍。当大量幼虫在肺部移行时,引起似蛔虫性支气管炎肺炎、支气管哮喘或嗜酸性粒细胞增多症。严重时幼虫还可侵入脑、肝、脾、肾、眼和甲状腺等器官,引起异位寄生。甚至有幼虫通过胎盘进入胎儿体内寄生的报道。成虫掠夺营养和破坏肠粘膜影响吸收,导致消化不良和营养吸收障碍,从而引起儿童发育障碍,还可出现荨麻疹、皮肤瘙痒、结膜炎以及中毒性脑病等症状;似蛔虫可钻入开口于肠壁的各种管道(如胆管、胰腺管和阑尾),甚至钻入肝脏,可引起胆道蛔虫病、蛔虫性肠梗阻、蛔虫性胰腺炎或阑尾炎以及肝蛔虫病,也可上窜阻塞气管支气管,造成窒息,引起尿道和生殖器官蛔虫病及其他器官组织的蛔虫卵肉芽肿。

[0003] 蛔虫病的诊断往往根据临床症状,对粪便采用饱和硫酸镁漂浮集卵法发现蛔虫卵然后作出可确诊,但粪便检出时间晚而且检出率低,当通过粪便检查检出虫卵时,犬弓首蛔虫幼虫已经在犬体内移行造成肝脏、肺脏等器官或者组织损伤。相对其它虫种来说,蛔虫病的免疫诊断技术研究较少,因此发展也较缓慢。因此早期快速诊断蛔虫病具有重要的意义。近年来,由于宿主感染蛔虫后能够引起免疫反应,因此蛔虫感染的早期诊断,流行病学调查和血清学方法检测蛔虫抗体已经成为可能。但在蛔虫幼虫时期的排泄物和分泌物构成了一个糖蛋白家族,在这个家族中至少有六种蛋白具有明显的抗原性。分泌的糖蛋白在虫体表面形成一层保护膜,该膜在宿主体内定期脱落,这种定期蜕皮的行为是寄生虫试图混淆宿主免疫系统的表现,所以宿主要建立起完全保护性免疫要很长的时间。蛔虫特异性引物,通过 PCR 方法对组织内弓首蛔虫幼虫 ITS-2 片断进行扩增可以鉴定是否有幼虫感染。但是 PCR 需要一定仪器设备,不适宜在基层和临床推广。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法,用于蛔虫感染的临床监测,从而克服现有技术(粪检虫卵法)导致漏检或者检出率低的不足。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用如下的技术方案:一种重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法。该方法按照下列步骤进行:

[0006] (1) 重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原的制备

[0007] ①蛔虫成虫总 RNA 的提取和 RT

[0008] 从 -70°C 冰箱取出蛔虫成虫虫体或感染性虫卵,置于研钵中磨成粉末,然后按 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA;以抽提的总 RNA 为模板,反转录为 cDNA;

[0009] ② ALAg 基因的扩增和克隆

[0010] 以 cDNA 为模板,根据 Genbank 中公布的猪蛔虫抗原基因的序列,利用 Primer Primer 5.0 软件设计引物进行扩增蛔虫的 ALAg 基因,所述引物中,上游引物为: $5' -\text{CGCGATCC GCCAGTTTAAAGCGAGATGC}-3'$ (含 BamHI 酶切位点);下游引物为: $5' -\text{CCGGAA TTCGAGAAGCTTATGCCTCGCTT}-3'$ (含 EcoR I 酶切位点);扩增产物用 DNA 胶回收试剂盒回收 ALAg 目的片段;将 ALAg 与 pMD18-T 载体连接,然后转化感受态细胞 DH5 α ,涂于含有氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 培养基上进行培养,挑取菌落进行经菌落 PCR 鉴定后,抽提鉴定为阳性的菌株进行提取质粒 pMD18-T-ALAg 送往大连宝生物进行测序;

[0011] ③ Pet28a(+)-ALAg 重组质粒构建及酶切鉴定

[0012] 将测序正确的阳性菌,提取质粒 pMD18-T-ALAg,分别采用 BamH I 和 EcoR I 进行酶切 pMD18-T-ALAg 质粒和 Pet28a(+) 表达载体,纯化目的片段进行连接成 Pet28a(+)-ALAg,并转入 DH5 α 中,涂于含有氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 培养基上进行培养,挑取菌落进行经过菌落 PCR 和酶切鉴定后,抽提鉴定为阳性的菌株进行提取质粒 Pet28a(+)-ALAg 送往大连宝生物公司进行测序;

[0013] ④重组 Pet28a(+)-ALAg 质粒在大肠杆菌中的诱导表达

[0014] 将测序正确的阳性质粒 Pet28a(+)-ALAg 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,加入 IPTG 进行诱导表达;

[0015] ⑤重组 ALAg 蛋白的纯化

[0016] 按 1 : 100 比例将培养过夜的含有 Pet28a(+)-ALAg 的 BL21 (DE3) 接种到新的 LB 液体培养基中, 37°C 快速振荡培养至细菌生长对数中期, $A_{550} = 1.0$;在 IPTG 诱导下,进行重组 ALAg 蛋白的大量表达,收集诱导表达菌;离心后将细菌沉淀经反复冻融和超声裂解后,依次用含 0、2、4mol/L 尿素的 $1\times$ 结合蛋白缓冲液洗涤沉淀;随后用含 8mol/L 尿素的 $1\times$ 结合蛋白缓冲液重悬沉淀,冰上放置 1h,使包涵体蛋白完全溶解; $16,000\times g$ 离心 30min 去除不可溶物,以孔径 0.45mm 的 NC 膜过滤收集上清液;经 His 结合树脂纯化,以缓冲液洗去杂蛋白,以洗脱液洗脱重组 ALAg 蛋白;将纯化的重组蛋白于 4°C 分别在含 4mol/L、2mol/L 尿素的 PBS 及 PBS 溶液中依次进行透析,将溶液进行冷冻干燥后于 4°C 保存;

[0017] (2) 以纯化后的重组蛔虫 ALAg 蛋白做包被抗原建立间接 ELISA 检测方法的建立

[0018] ①最佳抗原包被浓度及血清最佳稀释倍数的确定

[0019] 将重组 ALAg 蛋白用 pH 为 9.6 的 0.05M 的碳酸盐稀释成为 25、10、5、1、0.5、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6 个浓度包被酶联板 $100\ \mu\text{L}/$ 孔,每个浓度包被 1 列,于 37°C 温浴 1h 后放置于 4°C 过夜,

取出用含 0.05% Tween-20 的 PBS-T 洗涤 3 次,每次 3min,然后每孔再加 1%牛血清白蛋白(BSA) 100 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 30min;然后将已知蛔虫阳性血清和蛔虫阴性血清在酶标板上从 1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160 和 1 : 320 倍比稀释,分别加入酶标板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后,洗涤 3 次,用封闭液作 1 : 8000 稀释辣根过氧化物酶标鼠抗人 IgG 加入酶联板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,经洗涤后加入 TMB 底物溶液 100 μ L/孔,反应 15min,最后加入 100 μ L 2mol/L 硫酸终止反应,用酶标仪在 490nm 波长下测定 OD 值,同时用健康人血清作方阵滴定;选择已知蛔虫阳性血清与蛔虫阴性血清 OD₄₉₀ 的 P/N 比值最大所对应的抗原、抗体稀释度作为判定标准。

[0020] ②鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度的确定

[0021] 将鼠抗人 IgG-HRP 作 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000 和 1 : 16000 倍比稀释,通过检测已知阳性和阴性血清,来确定鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度。

[0022] ③间接 ELISA 方法建立

[0023] 建立间接 ELISA 检测方法将重组 ALAg 蛋白以最佳包被浓度包被酶标板 100 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C 过夜,洗涤 3 次,每次 3min,晾干;加入 100 μ L/孔封闭液,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,然后将待检血清按步骤(2)的步骤①中试验结果得出的最佳稀释倍数稀释后加入酶标板 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗涤 3 次,晾干,加入步骤(2)的步骤②试验结果得出的最佳工作浓度的鼠抗人 IgG-HRP 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗涤 3 次,每次 3min,晾干,加入 TMB 底物 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 15min,最后加入 100 μ L 12mol/L 硫酸终止反应,用酶标仪测 OD₄₉₀ 值。

[0024] 上述的重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法,步骤(1)的步骤③中所述酶切鉴定的方法具体为:分别选用 BamH I 和 EcoR I 两种限制性内切酶对提取 Pet28a(+)-ALAg 质粒进行双酶切鉴定,酶切产物于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳后紫外检测结果;将双酶切鉴定正确的菌液进行测序并分析。

[0025] 前述的重组蛔虫 ALAg 蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接 ELISA 方法,步骤(1)的步骤④中,将重组 Pet28a(+)-ALAg 质粒在大肠杆菌中进行诱导表达,然后进行 SDS-PAGE 分析,所述 SDS-PAGE 分析方法为:取诱导和未诱导的细菌培养物离心后,分别取沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 分析,确定重组蛋白是包涵体表达还是可溶性表达。

[0026] 本发明的有益效果:与现有技术的粪检虫卵法相比,本发明以从 -70 $^{\circ}$ C 冰箱取出蛔虫成虫虫体或感染性虫卵的 RNA 为模板,利用 RT-PCR 扩增出 ALAg 基因,构建 ALAg 表达载体并转化表达菌进行诱导表达并进行纯化,以纯化蛋白为包被抗原,将包被抗原用稀释液稀释成为一系列的浓度包被酶联板孔,低温放置过夜,取出用洗涤液洗涤,然后每孔加入封闭液室温下封闭,然后将已知的抗蛔虫阳性血清和蛔虫阴性血清在酶标板上作倍比稀释,分别加入酶标板中孵育一定时间,用封闭液稀释鼠抗人 IgG-HRP 加入酶联板中进行反应,经洗涤后加入底物溶液反应,最后加终止液终止反应,用酶标仪测定 OD 值,同时用正常人血清作方阵滴定,选择已知的抗蛔虫阳性血清和蛔虫阴性血清 OD 值的比值(P/N)最大所对应的抗原、抗体稀释度作为判定标准,从而建立了 ELISA 方法用于蛔虫病的诊断。本发明经试验表明建立了稳定而特异的抗蛔虫体 IgG 的间接 ELISA 检测方法,可用于蛔虫感染的临床监测。而且用本发明的重组蛋白建立 ELISA 方法检测人的血清样本与传统的粪检虫卵法相比,其敏感性要高 5 倍。

附图说明

[0027] 图 1 是本发明的 ALAg 基因 RT-PCR 扩增产物电泳分析图,图中 M 为 100bpDNA 标准分子量,1 为 RT-PCR 扩增产物;

[0028] 图 2 是本发明的 ALAg 基因菌落 PCR 鉴定电泳分析图,图中 M 为 100bp DNA 标准分子量,1-6 为菌落 PCR 产物;

[0029] 图 3 是本发明的 ALAg 基因序列;

[0030] 图 4 是本发明的 ALAg 蛋白与其他氨基酸同系物同源性比较图;

[0031] 图 5 是本发明的 ALAg 基因碱基编码的氨基酸序列;

[0032] 图 6 是本发明的重组 Pet28a(+)-ALAg 质粒酶切鉴定图,图中 M 为标准分子量 (DL 10000Marker),1 为 Pet28a(+)-ALAg 双酶切产物;

[0033] 图 7 是本发明的重组质粒表达蛋白 Western-blotting,图中 M 为标准蛋白质,1 为采用 IPTG 诱导表达含 Pet28a(+)-ALAg 的 BL21 (DE3) 3h 的产物;2 为采用 IPTG 诱导表达含 Pet28a(+) 的 BL21 (DE3) 3h 的产物;3 为采用 IPTG 诱导表达含 Pet28a(+)-ALAg 的 BL21 (DE3) 3h 的纯化产物的免疫印迹分析;4 为采用 IPTG 诱导表达含 Pet28a(+) 的 BL21 (DE3) 3h 的纯化产物的免疫印迹分析。

[0034] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步的说明。

具体实施方式

[0035] 实施例 1。按照以下步骤进行:

[0036] 1、感染的感染性虫卵的制备

[0037] 将患有蛔虫病的新鲜的小孩粪便(通过粪检虫卵法确诊),采用反复沉淀法收集虫卵,置于事先备好的、用 2%福尔马林浸泡过的滤纸上。然后将滤纸放在用湿棉花垫底的培养皿内,加盖,置 25~28℃温箱内培养,3~4 周就能获得大量的感染性虫卵(培养过程中,为防止福尔马林的挥发,应时常补加一定量的 2%福尔马林溶液和生理盐水)。

[0038] 2、蛔虫成虫总 RNA 的提取和 RT

[0039] 从 -70℃冰箱取出感染性虫卵,按 RNA 提取试剂盒说明提取的成虫的总 RNA;以抽提的总 RNA 为模板,以 Oligo dT(18) 为反转录引物,按照逆转录试剂盒手册进行,其反应体系如下:42℃ 60min,95℃ 10min,4℃ 保存。

[0040] 3、ALAg 基因的扩增和克隆

[0041] 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。根据 Genbank 中公布的猪蛔虫抗原基因 (GenBank accession no:AB078971) 的序列,利用 Primer Primer 5.0 软件设计引物为:上游引物为:5'-CGCGGATCC GCCAGTTTAAGCGAGATGC-3' (含 BamH I 酶切位点);下游引物为:5'-CCGGAA TTCGAGAAGCTTATGCCTCGCTT-3' (含 EcoR I 酶切位点)。PCR 反应体系为:2×TaqPCR Master Mix:25 μL;cDNA 产物:3 μL;无菌水:19 μL,上下游引物各 1.5 μL。反应程序为:95℃ 预变性 5min;95℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 45s,循环扩增 30 次,最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分离。ALAg 目的片段与 pMD18-T 载体连接,然后转化感受态细胞,涂于含有氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 培养基上进行培养,挑取菌落进行经过菌落 PCR 和酶切鉴定后,抽提鉴定为阳性的菌株进行提取质粒,利用该质粒的氨苄抗性筛选得到转化子 pMD18-T-ALAg。将菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆菌株送往大连宝生物公司测序。

[0042] 4、ALAg 基因序列分析

[0043] 通过 BLAST 搜索与其同源性高的基因序列,通过 ORF Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测 ALAg 基因开放阅读框,并用 BLAST 验证。并通过 BLAST 搜索与 ALAg 基因阅读框编码的氨基酸序列 (ALAg 蛋白) 同源性高的其他同系物,并作比较。

[0044] 5、Pet28a(+)-ALAg 重组质粒构建

[0045] 经 BamH I 和 EcoR I 酶切的 pMD18-T-ALAg 和 Pet28a(+) 质粒的纯化回收产物,进行 16℃ 连接过夜,将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,并将其涂于含有氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 培养基平板中,在 37℃ 培养过夜,小量制备 PCR 检测为阳性的质粒 DNA。

[0046] 6、Pet28a(+)-ALAg 重组质粒的酶切鉴定

[0047] 分别选用 BamH I 和 EcoR I 两种限制性内切酶对提取质粒进行双酶切鉴定,酶切产物于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳后紫外检测结果。将双酶切鉴定正确的菌液送往大连宝生物公司测序。

[0048] 7、重组 Pet28a(+)-ALAg 质粒在大肠杆菌中的诱导表达

[0049] 将测序正确的克隆菌株抽提 Pet28a(+)-ALAg 质粒,转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑取含有 Pet28a(+)-ALAg 质粒的 BL21 (DE3) 菌落接入含有 AMP 的 LB 培养液中,于 37℃ 培养过夜;将 1mL 过夜培养物接种到 20mL 含 AMP 的 LB 培养液中,于 37℃ 下培养直至 A_{550} 值为 1.0。分别取出 5mL 培养物放在一个离心管中,作为未经异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导的对照;在剩余的培养物中加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,然后同对照培养物一起在 37℃ 继续培养;从培养 3h 的培养物 (包括对照培养物) 中取出 1mL 转移到离心管中,于室温以 $12,000 \times g$ 离心 1min,弃去上清液。

[0050] 8、SDS-PAGE 分析

[0051] 取诱导和未诱导的细菌培养物离心后,分别取沉淀和上清液 (确定是包涵体表达还是可溶性表达) 按 1 : 1 的比例加入 2x 上样缓冲液,混匀后,100℃ 沸水浴 5min,以 $10,000 \times g$ 离心 1s。用微量加样器在样品孔内分别加入待检样品 (10 μ l/孔),同时设标准蛋白 Marker 进行电泳,电泳完毕取出凝胶后,采用考马斯亮蓝 R-250 染色液进行染色。取出凝胶用脱色液进行脱色,直至蛋白条带清晰为止。

[0052] 9、重组蛋白的纯化

[0053] 按 1 : 100 比例将培养过夜的 Pet28a(+)-ALAg/BL21 (DE3) 接种到新的 LB 液体培养基中,37℃ 快速振荡培养至细菌生长对数中期 ($A_{550} = 1.0$)。在 IPTG 诱导下进行重组 ALAg 蛋白的大量表达,收集诱导表达菌。离心后将细菌沉淀经反复冻融和超声裂解后,依次用含 0、2、4mol/L 尿素的 1 \times 结合蛋白缓冲液洗涤沉淀;随后用含 8mol/L 尿素的 1 \times 结合蛋白缓冲液重悬沉淀,冰上放置 1h,使包涵体蛋白完全溶解; $16,000 \times g$ 离心 30min 去除不可溶物,以孔径 0.45mm 的 NC 膜过滤收集上清液。经 His 结合树脂纯化,以缓冲液洗去杂蛋白,以洗脱液洗脱目的蛋白。将纯化的重组蛋白于 4℃ 分别在含 4mol/L、2mol/L 尿素的 PBS 及 PBS 溶液中依次进行透析,将溶液进行冷冻干燥后于 4℃ 保存。

[0054] 10、最佳包被浓度及血清最佳稀释倍数的确定

[0055] 将重组 ALAg 蛋白用 0.05M 碳酸盐 (pH 9.6) 稀释成为 25、10、5、1、0.5、0.1 μ g/mL 6 个浓度包被酶联板 100 μ l/孔,每个浓度包被 1 列。于 37℃ 温浴 1h 后放置于 4℃ 过

夜,取出用 0.05% Tween-20 (PBS-T) 洗涤 3 次,每次 3min,然后每孔再加 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 100 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 30min。然后将已知蛔虫阳性血清和蛔虫阴性血清在酶标板上从 1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160 和 1 : 320 倍比稀释,分别加入酶标板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后,洗涤 3 次。用封闭液作 1 : 8000 稀释辣根过氧化物酶标鼠抗人 IgG (按说明书使用) 加入酶联板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,经洗涤后加入底物溶液 (TMB) 100 μ L/孔,反应 15min,最后加入 100 μ L 2mol/L 硫酸终止反应,用酶标仪在 490nm 波长下测定 OD 值。同时用健康人血清作方阵滴定。选择蛔虫阳性血清与蛔虫阴性血清 OD₄₉₀ 的比值 (P/N) 最大所对应的抗原、抗体稀释度作为判定标准。

[0056] 11、鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度的确定

[0057] 将鼠抗人 IgG-HRP 作 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000 和 1 : 16000 倍比稀释,通过检测已知阳性和阴性血清,来确定鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度。

[0058] 12、间接 ELISA 方法建立

[0059] 将重组 ALAg 以步骤 9 试验结果的最佳包被浓度包被酶标板,100 μ L/孔于 37 $^{\circ}$ C 过夜,洗涤 3 次,每次 3min,晾干;加入 100 μ L/孔封闭液,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,然后将待检血清按以步骤 10 试验结果的最佳稀释倍数稀释后加入酶标板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗涤 3 次,晾干,加入以步骤 11 试验结果的最佳工作浓度的鼠抗人 IgG-HRP 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗涤 3 次,每次 3min,晾干,加入 TMB 底物 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 15min,最后加入 100 μ L 2mol/L 硫酸终止反应,用酶标仪测 OD₄₉₀ 值。

[0060] 为验证本发明的效果,发明人进行了系列的试验,其试验结果如下:

[0061] 一、RT-PCR

[0062] 从感染性虫卵提取总 RNA 后,应用 RT-PCR 方法扩增得到约为 900 ~ 1000bp 左右的目的条带 (见图 1)。

[0063] 二、基因克隆菌落 PCR 鉴定

[0064] 回收纯化的目的产物与载体连接,转化感受态细菌 DH5 α ,取 1 μ L 培养的重组克隆菌液为模板做菌落 PCR 鉴定,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,表明菌落 PCR 扩增得到在 900 ~ 1000bp 左右的目的条带 (如图 2)。

[0065] 三、蛔虫 ALAg 基因的序列分析

[0066] 将经过菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆菌株提取质粒,送上海英俊生物有限公司进行测序。将测序结果进行分析,经 BLAST 搜索发现与猪蛔虫 AS37 抗原基因 ([AB078971](#)) 同源率为 95%,与西式贝蛔虫 Ag3 抗原基因 ([EU927450](#)) 的同源率为 92%。

[0067] 通过 ORF.Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 预测 ALAg 基因开放阅读框,并用 BLAST 验证,蛔虫 ALAg 基因的开放阅读框含有 963 个核苷酸,能编码 321 个氨基酸,分子量 35.91kDa, pI 为 6.19。通过 NCBI 搜索 ALAg 基因阅读框编码的氨基酸的同系物结果发现,ALAg 基因阅读框编码的氨基酸与猪蛔虫的 AS37 (GenBank accession no.: [BAC06575](#)) 的同源性达 91.59%;与西式贝蛔虫抗原基因 Ag3 (GenBank accession no.: [ACL31520](#)) 同源性达 91.28%;与链尾唇棘线虫的肌蛋白 -1 (GenBank accession no.: [XP_003137600](#)) 同源性达 89.1%;与马来丝虫的肌蛋白 -1 (GenBank accession no.: [XP_001899521](#)) 同源性达 88.79% (见图 4)。

[0068] 四、重组 Pet28a (+) ALAg 质粒的酶切鉴定

[0069] 从双酶切后的 PCR 产物中回收纯化的 ALAg 基因片段, 然后与同样双酶切 Pet28a(+) 表达载体连接, 构建 Pet28a(+)-ALAg 重组表达质粒, 转化大肠杆菌后 DH5 α , 挑取单个菌落, 提取质粒, 用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切鉴定, 可得到 pET32a(+) 载体骨架片段和 900 ~ 1000bp 的目的片段, 目的片段与预期大小相符 (见图 6), 鉴定结果表明, ALAg 基因片段已正确连接到 Pet28a(+) 载体中。

[0070] 五、SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

[0071] 将构建 Pet28a(+)-ALAg 重组表达质粒转化 E. coli DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆进行测序, 抽提测序结果正确的克隆菌的质粒转化到 E. coli BL21 中进行表达, 收集菌液离心, 分别取上清和沉淀经超声波破碎后离心, 经 SDS-PAGE 分析表明表达蛋白主要以包涵体形式存在。当 $A_{550} = 1$, 1Mm IPTG 时, 取诱导表达 3h 的菌液进行 SDS-PAGE。表达产物大小约为 36kDa, 而含空载体的细菌经诱导后无大小为 36KDa 表达条带, 将纯化后的表达产物进行 Western-blot 分析, 结果发现含空载体菌表达产物不能和已知蛔虫阳性血清发生反应, 而含重组载体菌表达产物则可与已知蛔虫阳性血清发生反应, 出现显色带。表达产物大小约 36KDa, 结果见图 7。

[0072] 六、包被抗原和抗体最佳工作浓度测定

[0073] 用已知蛔虫阳性血清和蛔虫阴性血清进行了方阵滴定 (3 次重复), 测得的平均 OD₄₉₀ 值分别见表 1 和表 2。可见当包被抗原 (Ag) 浓度为 1 μ g/mL、抗蛔虫抗体 (Ab) 为 1 : 80 时, 蛔虫阳性血清 OD₄₉₀ 值达 0.366, 而阴性血清 OD₄₉₀ 值为 0.025, 阳性孔显色明显, 阴性孔几乎无色。所以, 确定抗原包被浓度为 1 μ g/mL、抗体 1 : 80 倍稀释为 ELISA 的最佳工作浓度。

[0074] 表 1 已知蛔虫阳性血清 ELISA 方阵滴定结果的平均 OD 值

[0075]

Ab\Ag	25	10	5	1	0.5	0.1
1 : 20	1.473	1.263	1.123	0.863	0.534	0.075
1 : 40	1.350	1.054	0.853	0.535	0.243	0.053
1 : 80	0.832	0.626	0.250	0.366	0.217	0.035
1 : 160	0.356	0.312	0.252	0.190	0.065	0.029
1 : 320	0.090	0.073	0.062	0.025	0.007	0.000

[0076] 表 2 已知蛔虫阴性血清 ELISA 方阵滴定结果的平均 OD 值

[0077]

Ab\Ag	25	10	5	1	0.5	0.1
1 : 20	0.321	0.272	0.230	0.162	0.086	0.019
1 : 40	0.156	0.156	0.134	0.120	0.066	0.015

1 : 80	0.136	0.125	0.110	0.025	0.027	0.008
1 : 160	0.047	0.038	0.030	0.023	0.007	0.001
1 : 320	0.029	0.014	0.010	0.009	0.001	0.000

[0078] 七、鼠抗人 IgG-HRP 最佳工作浓度的确定结果

[0079] 鼠抗人 IgG-HRP 作 1 : 500、1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000 和 1 : 16000 倍比稀释,通过检测已知阳性和阴性血清,来确定鼠抗人 IgG-HRP 的最佳工作浓度。选取阳性对照 OD₄₉₀大于 1.0,在阴、阳性对照差异最大时,鼠抗人 IgG-HRP 的稀释度即为最佳工作浓度,此时鼠抗人 IgG-HRP 1 : 8000 的稀释浓度为最佳工作,结果见表 3。

[0080] 表 3 鼠抗人 IgG-HRP 最佳工作浓度结果

[0081]

组别	1 : 500	1 : 1000	1 : 2000	1 : 4000	1 : 8000	1 : 16000
阳性血清	1.406	1.243	1.124	1.098	1.002	0.854
阴性血清	0.347	0.286	0.198	0.152	0.096	0.087

[0082] 八、ELISA 阴阳性临界值的确定

[0083] 采 10 份健康人血清用 ELISA 法进行了检测,每个样品设一个重复,测得的 OD 值以 OD+3SD 公式计算,以 (0.1266+3×0.027516) 为临界值,计算出临界值 0.21。

[0084] 九、特异性试验

[0085] 用本试验建立的 ELISA 方法检测人的其他寄生虫病(钩虫、鞭虫和蛲虫病)阳性血清,同时设人已知蛔虫阳性、阴性血清为对照,结果表明所有人的其他寄生虫病阳性血清和蛔虫阴性血清全为阴性,而已知蛔虫阳性血清则为阳性,说明本方法具有很好的特异性。

[0086] 十、敏感性试验

[0087] 重组蛔虫 ALAg 基因蛋白按最佳包被浓度进行包被酶标板,将已知蛔虫阳性血清做 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1280 和 1 : 2560 等 9 个稀释浓度,其余按最佳反应条件进行 ELISA 试验,结果当已知蛔虫阳性血清稀释到 1 : 320 时通过酶标仪仍能判断阴性阳性的结果(见表 4)。

[0088] 表 4 敏感性试验结果

Ag (μg/mL)	人蛔虫阳性血清的稀释度								
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
[0089] 阳性血清	1.620	1.532	1.430	1.231	0.712	0.225	0.108	0.010	0.009
阴性血清	0.258	0.230	0.152	0.097	0.070	0.030	0.015	0.010	0.005

[0090] 十一、重复性试验

[0091] 取 10 份人血清样本用 2 批次包被的酶标板各重复检测 3 次,3 次重复检测的变异系数均在 4.5% 以下,表明所建立的间接 ELISA 方法具有较好的重复性。

[0092] 十二、本发明所述 ELISA 法和传统粪检虫卵法的对比试验

[0093] 用本发明建立的 ELISA 法检测 200 份来自农村小学生的血清样本,其阳性检出率

为 10.0% ;在对蛔虫的调查中,血清样本对应粪便样本并当场进行粪检虫卵法确定阳性率为 2.0%,结果表明本发明的间接 ELISA 法比传统的粪检虫卵法要敏感。

[0094] 本发明中所述的健康人血清是指从未患有蛔虫病的人血清,已知蛔虫阳性血清、蛔虫阴性血清以及人的其他寄生虫病阳性血清(钩虫、鞭虫和蛲虫),由贵阳中医学院微生物实验室保存。人血清样本,由贵阳中医学院附院提供。待检血清样本,采自贵州 5 个县农村小学生,共 200 份,在对蛔虫的调查中,血清样本对应粪便样本并当场进行粪检虫卵法确定阳性率为 2.0%。

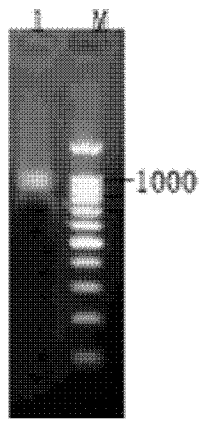


图 1

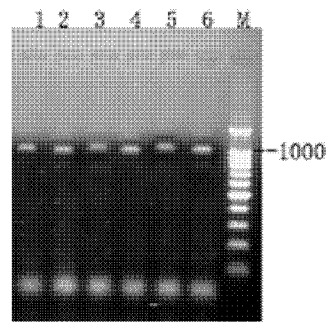


图 2

atgcccgagggttaaggctctccacttcccacaacaaccagtcgcgcgtcagaatgacgtcggatcttggagctggattgTtcttgaagcccagc
gtatccccgatatcaaatggttttacgatacgaccgaactaaagcaagataatcgattcaggtcagatcggacaatatggggaacgacgccttctcag
ccgttctcagattagagatctcgtgttagcgtgctggggcttatcgatcgcctattgtaatggtcatggaaagggcaatgccaattcaacctcaat
tgacaggattcagtcaccgacttttgtgagaagccacagatgtcatctcgagacgatgggcaagtcatggttatggaattcgcgccaagtctatct
caaaccaacatttगतgcaaatgggggatgagatcgtcgcagaatctgatcgagtaagatttgctgcatgaggaaccgattcaagttactatgct
gcttggattcaaagaaccaacgaccgaaaaggacccggtcagttcgtatgcacagctaagaatgaatcgggaaagcttacggcaacattcgccg
ttatgttgatgtaccgcaaggagcgcggacgtttaccggttccccaaatccttcagaagacgtcggattccggtgaccggccatcatgttcgatatt
ggattccgggcccacaaaaatccagaggatgatctggttgaacccgaaaggtataaaatgaaggagtcgagccgattaagttcagcctcacaccag
acggaggcgcgaacaggtttacagcccagctggagttgagaattacaaggccaaggatagcggcacctacacttgcaatatcaagaatgacgctg
gagaggccaacgtcgaacttacattaacattgccggaccgcttgatgatggtgctgacgatgcaagcgaggcataa

图 3

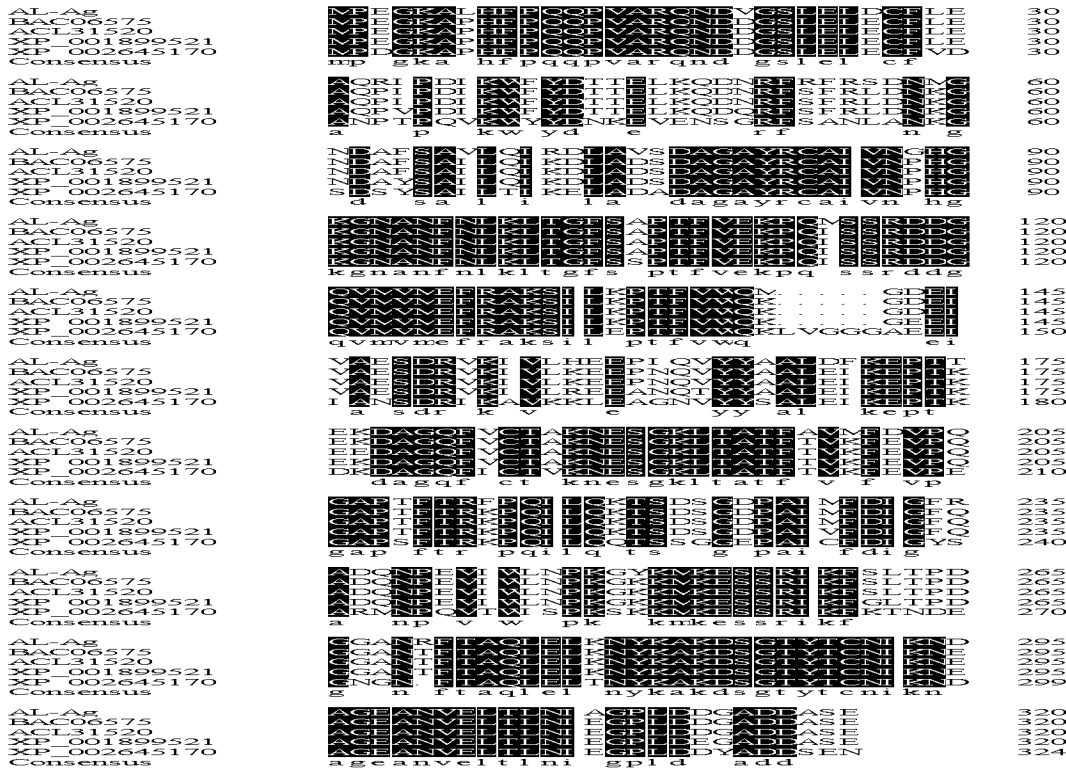


图 4

MPEGKALHFPQPVARQNDVGSLELDCFLEAQRIPDIKWFYDTTELKQDNRFRFRSDNMGND
 AFSAVLQIRDLAVSDAGAYRCAIVNGHGKGNANFNLKLTFGSAPTFVEKPMSSRDDGQVMV
 MEFRAKSILKPTFFVWQMGEIVAESDRVKIVLHEEPIQVYYAALDFKEPTTEKDAGQFVCTAK
 NESGKLTATFAVMFDVPQGAPTFTRFPQILQKTSDSGDPAIMFDIGFRADQNPEVIWLNPKGYK
 MKESSRIKFSLTPDGGANRFTAQLELKNYKAKDSGTYTCNIKNDAGEANVELTLNLAGPLDDG
 ADDASEA

图 5

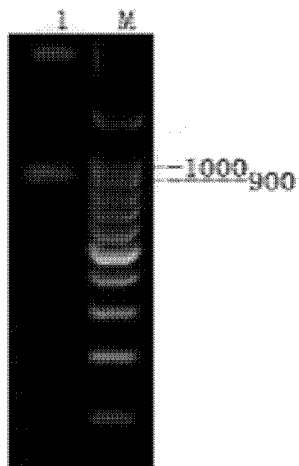


图 6

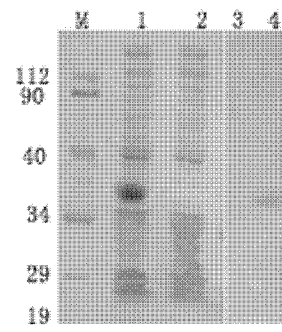


图 7

专利名称(译)	重组蛔虫ALAg蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接ELISA方法		
公开(公告)号	CN102279271B	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201110178619.8	申请日	2011-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	贵阳中医学院		
申请(专利权)人(译)	贵阳中医学院		
当前申请(专利权)人(译)	贵阳中医学院		
[标]发明人	何光志 田维毅 安传伟 王平 黄高 王文佳 俞琦 奚锦 王乾宇		
发明人	何光志 田维毅 安传伟 王平 黄高 王文佳 俞琦 奚锦 王乾宇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 C12N15/12 C12N15/70 C07K14/435		
代理人(译)	张浩宇		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102279271A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种重组蛔虫ALAg蛋白抗原检测抗蛔虫抗体间接ELISA方法，该方法以蛔虫成虫虫体或者感染性虫卵的RNA为模板，利用RT-PCR扩增出ALAg基因，构建ALAg表达载体并转化表达菌进行诱导表达，纯化重组蛋白，以纯化蛋白为包被抗原建立间接ELISA检测方法。本发明建立了稳定而特异的抗蛔虫体IgG的间接ELISA检测方法，可用于蛔虫感染的临床监测和诊断，适宜在基层和临床广泛推广。

