



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107860927 A

(43)申请公布日 2018.03.30

(21)申请号 201711020872.4

(22)申请日 2017.10.27

(71)申请人 江苏浩欧博生物医药股份有限公司
地址 215123 江苏省苏州市苏州市工业园
区星湖街218号生物纳米园C6栋101

(72)发明人 李庆春 胡桂元 钱林 周延庆
杨阳

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 汪青

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

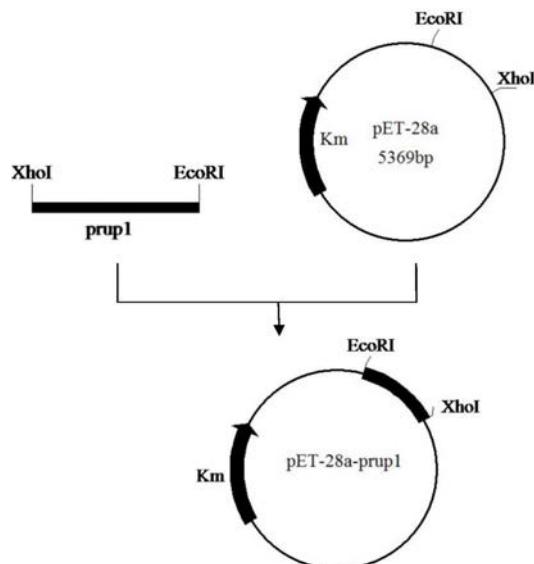
权利要求书2页 说明书6页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法和检测
试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种过敏原Pru p1蛋白的制
备方法,包括以下步骤:1)合成Pru p1全基因;2)
将步骤1中的所述Pru p1基因片段与载体pET-
28a进行连接,形成重组质粒pET-28a-Pru p1;3)
将所述重组质粒pET-28a-Pru p1转化到大肠杆
菌BL21中构建重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1,进
行过敏原Pru p1的表达;4)采用亲和层析方法进
行纯化,从而得到过敏原Pru p1蛋白。本发明的
一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,人工合成
Pru p1基因,并利用大肠杆菌作为载体生产该重
组过敏原Pru p1,不但降低了成本,而且所得蛋
白的理化性质和免疫性质均和天然组分一致,稳
定性好,使得重组过敏原Pru p1进一步应用于过
敏诊断产品的开发得以实现。



1.一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)合成Pru p1全基因;

2)将步骤1中的所述Pru p1基因片段与载体pET-28a进行连接,形成重组质粒pET-28a-Pru p1;

3)将所述重组质粒pET-28a-Pru p1转化到大肠杆菌BL21中构建重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1,进行过敏原Pru p1蛋白的表达;

4)采用亲和层析方法进行纯化,从而得到过敏原Pru p1蛋白。

2.根据权利要求1所述的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,所述重组质粒pET-28a-Pru p1的制备步骤为:将步骤1)中合成的所述Pru p1基因片段和所述载体pET-28a经过相同的双酶切,之后琼脂糖凝胶电泳并回收和纯化,用连接酶过夜连接两基因片段。

3.根据权利要求1所述的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,所述步骤还包括所述重组质粒pET-28a-Pru p1的检测:将所述重组质粒pET-28a-Pru p1热激转化到所述大肠杆菌BL21细胞中,形成所述重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1,使用卡那霉素抗性平板筛选所述重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1,并提取重组质粒pET-28a-Pru p1,然后对重组质粒pET-28a-Pru p1进行双酶切后,对双酶切后释放出基因片段的长度与合成的Pru p1基因片段和酶切后载体pET-28a的基因片段长度进行对比。

4.根据权利要求1所述的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,步骤3)中所述的亲和层析方法为镍柱亲和层析法。

5.根据权利要求4所述的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,所述的镍柱亲和层析法包括如下步骤:将得到的所述重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1接种至含有卡那霉素的LB培养基中,培养至OD₆₀₀=0.6,加入诱导剂,诱导离心后收集菌体,进行超声破碎,离心后分离上清和沉淀,所述沉淀用尿素溶解后上镍柱,洗去非特异性结合蛋白,之后用洗脱缓冲液洗脱下过敏原Pru p1蛋白并收集。

6.根据权利要求1所述的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,所述步骤还包括采用蛋白质免疫印迹法鉴定纯化后的所述过敏原Pru p1蛋白。

7.根据权利要求6所述的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,其特征在于,所述鉴定包括如下步骤:将纯化后的过敏原Pru p1蛋白经SDS-PAGE分离后电转移至PVDF膜,用脱脂奶粉在室温下封闭,以抗人Pru p1兔源多克隆抗体为一抗,孵育过夜,洗膜,最后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,孵育后洗膜,加入显色液进行显影,鉴定过敏原Pru p1蛋白。

8.一种过敏原Pru p1特异性IgE抗体的检测试剂盒,包括抗原试剂,所述抗原试剂包括偶联有生物素的过敏原Pru p1蛋白,其特征在于,所述过敏原Pru p1蛋白为根据权利要求1-7任意一项所述过敏原Pru p1蛋白的制备方法所制得的过敏原Pru p1蛋白。

9.根据权利要求8所述的一种过敏原Pru p1特异性IgE抗体的检测试剂盒,其特征在于,所述偶联有生物素的过敏原Pru p1蛋白的制备步骤如下:将过敏原Pru p1蛋白加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,所述过敏原Pru p1蛋白与所述生物素的摩尔比为1:20,再用磷酸盐缓冲液透析。

10.一种过敏原Pru p1特异性IgE抗体的检测试剂盒的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

- 1) 将用链霉亲和素标记的磁微粒、生物素标记的过敏原Pru p1蛋白和待检样本混匀并反应,反应后置于磁场中静置并去上清,得到第一溶液;
- 2) 向所述第一溶液中加入碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgE二抗混匀并反应,反应后置于磁场中静置并去上清,得到第二溶液;
- 3) 向所述第二溶液中加入发光底物并反应,检测发光强度;
- 4) 利用已知浓度的校准品绘制发光强度标准曲线,根据步骤3)得到的发光强度对照所述标准曲线,计算得出待测血清样本中特异性IgE的含量。

一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法和检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和过敏诊断领域,具体涉及一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法和包括偶联有生物素的过敏原Pru p1蛋白的检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 过敏性疾病是当前世界性的重大卫生学问题,被世界卫生组织(WHO)列为二十一世纪重点防治的三大疾病之一,其发病人口约占到世界人口的15%-30%,我国大约有5-10%的人正在受过敏原的侵扰。

[0003] 过敏性疾病是患者吸入、摄入或者注入含有致敏成分的物质,即称为过敏原或变应原后触发机体的B细胞产生特异性免疫球蛋白E(Immunoglobulin E; IgE),从而引发过敏反应(或称变态反应;Allergy)的疾病及相关症状,如过敏性哮喘、枯草热、荨麻疹、过敏性鼻炎、湿疹、结膜炎及胃肠道I型过敏性疾病及严重过敏反应等。

[0004] 桃中重要的致敏蛋白组分为Pru p1,Pru p3和Pru p4,其中Pru p1是属于PR-10蛋白家族中的一种,大小约为17kDa,与苹果、桦树等具有广泛的交叉反应性。Pru p1作为桃的一种重要组分过敏原,在过敏诊断和脱敏治疗方面都有着广泛的应用。

[0005] 题为《桃过敏原表达鉴定和免疫分析》的博士论文中成功应用大肠杆菌表达系统纯化到Pru p1过敏原,但是其采用的方法是以桃果皮和桃幼嫩叶片为材料,以CTAB法提取总RNA,去除基因组DNA后逆转录为cDNA,方法复杂,操作繁琐。同时研究发现桃中所含天然的Pru p1很低,且在提取的过程中,Pru p1很容易降解,化学结构易发生改变,使得从桃中提取致敏蛋白组分Pru p1的方法受到了极大地限制。因此,研究一种经济、高效的方法来生产单一组分过敏原Pru p1有着至关重要的意义。

发明内容

[0006] 有鉴于此,为了达到上述目的,本发明提供了一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,利用该方法生产桃重组过敏原Pru p1不但降低了成本,而且所得到蛋白的理化性质和免疫性质均和天然组分一致,稳定性好,使得重组过敏原Pru p1进一步应用于过敏诊断产品的开发得以实现。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用以下的技术方案:

[0008] 一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 合成Pru p1全基因;

[0010] 2) 将步骤1中的所述Pru p1基因片段与载体pET-28a进行连接,形成重组质粒pET-28a-Pru p1;

[0011] 3) 将所述重组质粒pET-28a-Pru p1转化到大肠杆菌BL21中构建重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1,进行过敏原Pru p1的表达;

[0012] 4) 采用亲和层析方法进行纯化,从而得到过敏原Pru p1蛋白。

[0013] 优选地，所述重组质粒pET-28a-Pru p1的制备步骤为：将步骤1)中合成的所述Pru p1基因片段和所述载体pET-28a经过相同的双酶切，之后琼脂糖凝胶电泳并回收和纯化，用连接酶过夜连接两基因片段。

[0014] 优选地，所述步骤还包括所述重组质粒pET-28a-Pru p1的检测：将所述重组质粒pET-28a-Pru p1热激转化到所述大肠杆菌BL 21细胞中，形成所述重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1，使用卡那霉素抗性平板筛选所述重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1，并提取重组质粒pET-28a-Pru p1，然后对重组质粒pET-28a-Pru p1进行双酶切后，对双酶切后释放出基因片段的长度与合成的Pru p1基因片段和酶切后载体pET-28a的基因片段长度进行对比。

[0015] 优选地，步骤3)中所述的亲和层析方法为镍柱亲和层析法。

[0016] 进一步优选地，所述的镍柱亲和层析法包括如下步骤：将得到的所述重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1接种至含有卡那霉素的LB培养基中，培养至OD₆₀₀=0.6，加入诱导剂，诱导离心后收集菌体，进行超声破碎，离心后分离上清和沉淀，所述沉淀用尿素溶解后上镍柱，洗去非特异性结合蛋白，之后用洗脱缓冲液洗脱下过敏原Pru p1蛋白并收集。

[0017] 优选地，所述步骤还包括采用蛋白质免疫印迹法鉴定纯化后的所述过敏原Pru p1蛋白。

[0018] 进一步优选地，所述鉴定包括如下步骤：将纯化后的过敏原Pru p1蛋白经SDS-PAGE分离后电转移至PVDF膜，用脱脂奶粉在室温下封闭，以抗人Pru p1兔源多克隆抗体为一抗，孵育过夜，洗膜，最后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗，孵育后洗膜，加入显色液进行显影，鉴定过敏原Pru p1蛋白。

[0019] 本发明还提供了一种过敏原Pru p1特异性IgE抗体的检测试剂盒，包括抗原试剂，所述抗原试剂包括偶联有生物素的过敏原Pru p1蛋白，所述过敏原Pru p1蛋白为根据权利要求1-7任意一项所述过敏原Pru p1蛋白的制备方法所制得的过敏原Pru p1蛋白。

[0020] 优选地，所述偶联有生物素的过敏原Pru p1蛋白的制备步骤如下：将过敏原Pru p1蛋白加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中，所述过敏原Pru p1蛋白与所述生物素的摩尔比为1:20，再用磷酸盐缓冲液透析。

[0021] 本发明还提供了一种过敏原Pru p1特异性IgE抗体的检测试剂盒的检测方法，包括如下步骤：

[0022] 1) 将用链霉亲和素标记的磁微粒、生物素标记的过敏原Pru p1蛋白和待检样本混匀并反应，反应后置于磁场中静置并去上清，得到第一溶液；

[0023] 2) 向所述第一溶液中加入碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgE二抗混匀并反应，反应后置于磁场中静置并去上清，得到第二溶液；

[0024] 3) 向所述第二溶液中加入发光底物并反应，检测发光强度；

[0025] 4) 利用已知浓度的校准品绘制发光强度标准曲线，根据步骤3)得到的发光强度对照所述标准曲线，计算得出待测血清样本中特异性IgE的含量。

[0026] 由于以上技术方案的实施，本发明与现有技术相比具有如下优点：本发明的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法，人工合成Pru p1全基因，并利用大肠杆菌作为载体生产桃重组过敏原Pru p1，不但降低了成本，而且所得蛋白的理化性质和免疫性质均和天然组分一致，稳定好，使得重组过敏原Pru p1进一步应用于过敏诊断产品的开发得以实现。

附图说明

- [0027] 图1为本发明实施例一中质粒pET-28a-Pru p1的构建示意图；
- [0028] 图2为本发明实施例七的重组蛋白Pru p1的SDS-PAGE分析图；
- [0029] 图3为本发明实施例八的纯化后过敏原Pru p1蛋白的蛋白质印迹法鉴定图；
- [0030] 图4为实施例十的检测试剂盒与进口试剂盒检测的对比结果。

具体实施方式

- [0031] 下面结合附图对本发明优选的实施方式进行详细说明。
- [0032] 实施例一Pru p1全基因合成
 - [0033] 通过在NCBI (National Center for Biotechnology Information, 美国国立生物技术信息中心) 上查找到的Pru p1 ([GenBank: DQ251187.1](#)) 基因序列, 合成得到大小约为492bp的Pru p1基因, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示, 氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
- [0034] 实施例二构建重组质粒pET-28a-Pru p1
 - [0035] 将载体pET-28a和实施例一中合成的Pru p1基因片段经过EcoRI/XhoI相同的双酶切, 琼脂糖凝胶电泳并回收和纯化, T4DNA连接酶过夜连接上述两基因片段, 形成重组质粒pET-28a-Pru p1。
- [0036] 实施例三重组菌BL 21/pET-28a-Prup1的构建
 - [0037] 本实施例中的载体选择为大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)。将实施例二中得到的重组质粒pET-28a-Pru p1热激转化到大肠杆菌E.coli BL21细胞, 形成重组菌BL 21/pET-28a-Prup1。
- [0038] 实施例四重组质粒pET-28a-Pru p1的检测
 - [0039] 使用卡那霉素抗性平板筛选实施例三中的重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1, 并提取重组质粒pET-28a-Pru p1, 然后对重组质粒pET-28a-Pru p1经EcoRI/XhoI双酶切, 检测到释放出的基因片段大小约为5.4kb和0.5kb, 与合成的Pru p1基因片段和酶切后载体pET-28a的基因片段长度相接近, 表明重组质粒pET-28a-Pru p1构建成功。
- [0040] 实施例五过敏原Pru p1蛋白的表达
 - [0041] 将实施例四中构建的重组菌BL21/pET-28a-Pru p1与原始菌E.coli BL21 (DE3) 分别接种于10mL含卡那霉素的LB培养基中, 37℃振荡培养过夜, 次日按1%的接种量转接于100mL/500mL LB培养基中, 37℃培养至OD₆₀₀达到0.6左右, 加入终浓度为0.6mmol/L的IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖昔), 37℃诱导4h, 10000r/min离心10min收集菌体, 用pH7.0的Tris-HCl缓冲清洗液清洗2次, 最后悬浮在10mL且pH7.0的Tris-HCl缓冲液中, 超声波破碎处理细胞悬浮液, 12000r/min离心10min分离上清和沉淀, 进行SDS-PAGE (12%) 电泳检测, 鉴定该诱导条件下过敏原Pru p1蛋白的表达情况。
- [0042] 实施例六采用亲和层析方法进行纯化
 - [0043] 实施例五中的破细胞沉淀用6mol/L的尿素溶解后上镍亲和柱, 加入平衡缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl, pH8.5, 0.5mol/L氯化钠, 20mmol/L咪唑) 平衡柱子, 将过敏原Pru p1蛋白液上样, 待样品上完后, 用平衡缓冲液洗去非特异性结合蛋白; 之后用5倍柱体积的洗脱缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 0.5mol/L氯化钠, 250mmol/L咪唑) 洗脱下过敏原

Pru p1蛋白并收集。

[0044] 实施例七过敏原Pru p1蛋白的SDS-PAGE检测

[0045] 采用SDS-PAGE检测洗脱下来的蛋白样品,对纯化的蛋白用pH8.0的Tris-HCl进行透析,具体步骤如下:

[0046] 将收集到的菌体用20mL PBS重悬,采用超声破碎的方法(超声功率为300w),每工作2s暂停8s,超声时间为15min,接着12000rpm离心10min,最后采用真空浓缩的方法进行蛋白样品的浓缩,最后浓缩至50倍(100mL菌体到2mL悬浮液),加入适量5X loading buffer煮沸;所有样品取15μL上样,经5-12% SDS-PAGE电泳分离,检测过敏原Pru p1蛋白的表达,检测结果如图2所示,图中M表示蛋白Marker;1代表重组菌BL21/pET-28a-Pru p1诱导前细胞内蛋白;2代表重组菌BL21/pET-28a-Pru p1诱导后细胞内蛋白;3代表纯化后蛋白。

[0047] 从图2中可以看出,3号泳道可检测到蛋白信号,分子量大小17.7kDa左右;2号泳道可在相同的位置检测到明显的信号,与预期的分子量大小类似;1号泳道在相同的位置几乎检测不到信号。实验结果说明重组大肠杆菌可以特异性表达桃组分过敏原Pru p1蛋白。

[0048] 实施例八Western blot(蛋白质印迹法)鉴定纯化后的过敏原Pru p1蛋白

[0049] 取纯化后的过敏原Pru p1蛋白经SDS-PAGE电泳并转移至PVDF膜上,50g/L脱脂奶粉室温封闭1.5h,分别用体积比1:500稀释的抗人Pru p1兔源多克隆抗体为一抗,4℃孵育过夜,TBST(缓冲液,包括Tris-HCl,NaCl,Tween20)洗膜3次,最后加入体积比1:500稀释的HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗兔二抗进行杂交,37℃孵育1h,TBST洗膜3次,加入eECL显色液避光显色,检测结果如图3所示,图中M代表蛋白Marker;1表示纯化后过敏原Pru p1蛋白。由结果可知,该系统中表达且纯化出的蛋白是预期所需的桃组分过敏原Pru p1蛋白。

[0050] 实施例九生物素标记的过敏原Pru p1

[0051] 将纯化后的桃组分过敏原Pru p1蛋白加入到溶于二甲基甲酰胺的生物素中,其中过敏原Pru p1蛋白与生物素的摩尔比为1:20,室温条件下充分混合反应30min,反应后的溶液用0.01mol/L、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液透析。BCA法测定生物素标记的Pru p1溶液的浓度,并调整其浓度到0.1-1.0ug/ml。

[0052] 实施例十过敏原Pru p1特异性IgE抗体的检测试剂盒及其应用

[0053] 本实施例的检测试剂盒包括偶联有生物素的过敏原Pru p1蛋白的抗原试剂、抗人IgE抗体试剂、磁微粒分离试剂、化学发光底物、校准品、质控品、清洗液等。

[0054] 本实施例的检测试剂盒应用于定量检测血清中桃组分过敏原Pru p1特异性IgE抗体(纳米磁微粒化学发光法)。

[0055] 对比例一

[0056] 本对比例中的检测试剂盒与实施例十中的检测试剂盒除了抗原试剂中的抗原制备方法不同外,其余成分及来源均相同。

[0057] 本对比例中的过敏原Pru p1为按照题为《桃过敏原表达鉴定和免疫分析》的博士论文中第四章节中桃过敏原Pru p1家族成员重组表达和鉴定中所提到的方法进行制备。

[0058] 实施例十一检测试剂盒的检测方法

[0059] 用实施例十和对比例一中的检测试剂盒定量检测血清桃组分过敏原Pru p1特异性IgE抗体的方法,其步骤为:

[0060] 1)将链霉亲和素标记的磁微粒、生物素标记的过敏原Pru p1蛋白和待检样本混匀

并反应,反应后置于磁场中静置并去上清,得到第一溶液;

[0061] 2) 向第一溶液中加入碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgE二抗混匀并反应,反应后置于磁场中静置并去上清,得到第二溶液;

[0062] 3) 向所述第二溶液中加入发光底物并反应,检测发光强度;

[0063] 4) 利用已知浓度的校准品绘制发光强度标准曲线,根据步骤(3)得到的发光强度对照所述标准曲线,计算得出待测血清样本中特异性IgE的含量。

[0064] 实施例十二性能比较

[0065] (1) 灵敏度

[0066] 实施例十与对比例一中的检测试剂盒的灵敏度对比。

[0067] 表1灵敏度对比数据

[0068]

测试参数	分析灵敏度	功能灵敏度
实施例十	<0.01	0.12
对比例一	0.03	0.20

[0069] 从表1的数据中可以看出,实施例十制备的Pru p1与对比例一中方法所制备的Pru p1相比,具有更高的灵敏度,可用于桃过敏原检测试剂盒的制备以及相关应用。

[0070] (2) 稳定性

[0071] 对实施例十与对比例一中生物素标记的桃过敏原配制成检测试剂进行稳定性实验,分别在37℃放置1天、4天、7天、10天,以4℃放置10天的试剂作为对照,测试发光值并计算信号保留率,结果见下表。

[0072] 表2稳定性对比数据

[0073]

信号保留率	1天	4天	7天	10天
实施例十	95.5%	90.6%	83.9%	81.8%
对比例一	91.4%	88.2%	80.7%	79.3%

[0074] 表2中的数据表明:实施例十中制备的Pru p1与对比例一中方法所制备的Pru p1相比,具有更加优异的稳定性,可用于桃过敏原检测试剂盒的制备。

[0075] (3) 实施例十中的检测试剂盒的分析性能及稳定性,如下表所示:

[0076] 表3分析性能结果表

[0077]	测试参数	空白检测限 (IU/ml)	批内精密度(%)	批间精密度(%)	准确度(%)
	测试值	0.02	5.2	8.3	96.1

[0078] 上表中的结果表明,实施例十中的检测试剂盒性能优异,说明实施例六中纯化后的过敏原Pru p1蛋白能够满足过敏诊断试剂开发设定的要求,而且热稳定性良好。

[0079] (4) 将实施例十的检测试剂盒与进口试剂盒进行检测结果对比,结果如图4所示。结果表明实施例十中的检测试剂盒临床符合率高,并且与国外知名公司同类产品检测结果具有良好的相关性。

[0080] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明

精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 江苏浩欧博生物医药股份有限公司
<120> 一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法和检测试剂盒及其检测方法
<130> 2017
<160> 2
<170> SIPOSequenceListing 1.0
<210> 1
<211> 486
<212> DNA
<213> Prunus persica
<400> 1
atgggtgtct tcacatatga gagcgagttc acctctgaga tccaccacc aagattgttc 60
aaggccttg tcctcgatgc tgacaacctt gtcctaaga ttgctccaca ggcaattaag 120
cattctgaaa tccttgaagg agatggcggc cccggaacca tcaagaagat cacttcggc 180
gaaggcagcc agtacggcta cgtgaagcac aagattgact ccattgacaa agaaaaccat 240
tcatacagct acaccttgat cgaaggagat gcttggag acaatcttga gaagatctcg 300
tacgagacca agttggtggc atcccccagc ggaggatcca tcatcaagag caccagccac 360
taccacacca agggagatgt tgagatcaag gaagagcatg tcaaggccgg caaagagaag 420
gcctcaaatac tcttcaagct cattgagacc tacctaagg gccaccccgta tgcctacaac 480
ctcgag 486
<210> 2
<211> 162
<212> PRT
<213> 桃(Prunus persica)
<400> 2
Met Gly Val Phe Thr Tyr Glu Ser Glu Phe Thr Ser Glu Ile Pro Pro
1 5 10 15
Pro Arg Leu Phe Lys Ala Phe Val Leu Asp Ala Asp Asn Leu Val Pro
20 25 30
Lys Ile Ala Pro Gln Ala Ile Lys His Ser Glu Ile Leu Glu Gly Asp
35 40 45
Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Thr Phe Gly Glu Gly Ser Gln
50 55 60
Tyr Gly Tyr Val Lys His Lys Ile Asp Ser Ile Asp Lys Glu Asn His
65 70 75 80
Ser Tyr Ser Tyr Thr Leu Ile Glu Gly Asp Ala Leu Gly Asp Asn Leu
85 90 95
Glu Lys Ile Ser Tyr Glu Thr Lys Leu Val Ala Ser Pro Ser Gly Gly

100	105	110
Ser Ile Ile Lys Ser Thr Ser His Tyr His Thr Lys Gly Asp Val Glu		
115	120	125
Ile Lys Glu Glu His Val Lys Ala Gly Lys Glu Lys Ala Ser Asn Leu		
130	135	140
Phe Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Leu Lys Gly His Pro Asp Ala Tyr Asn		
145	150	155
Leu Glu		160

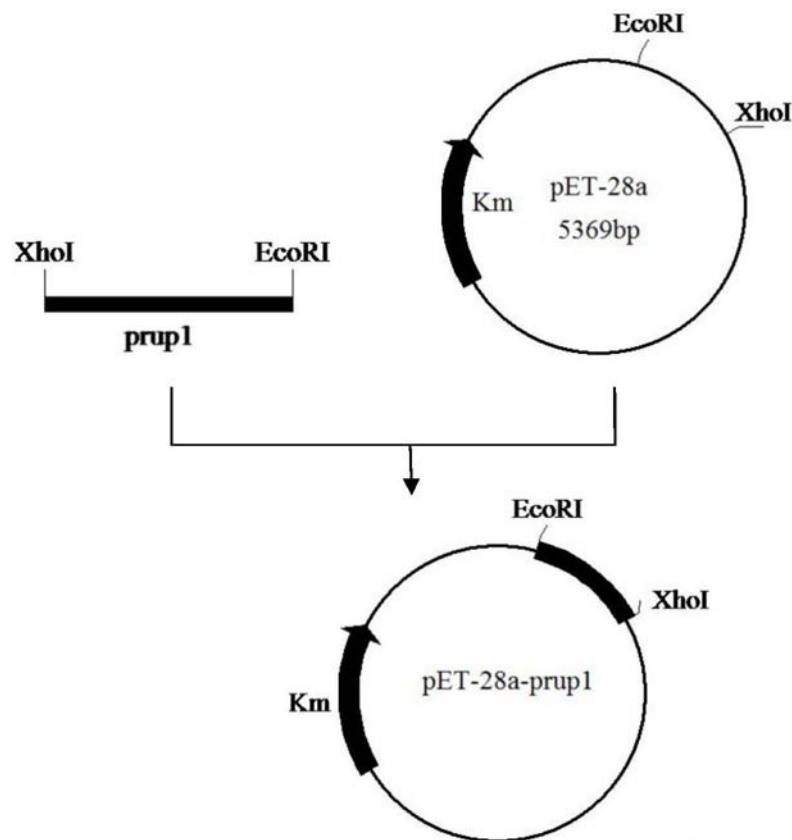


图1

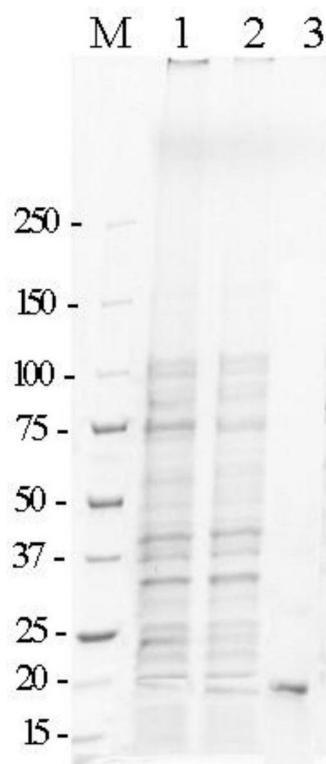


图2

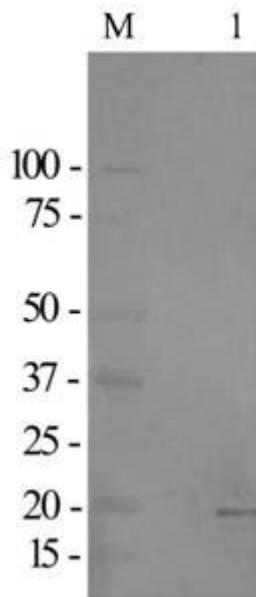
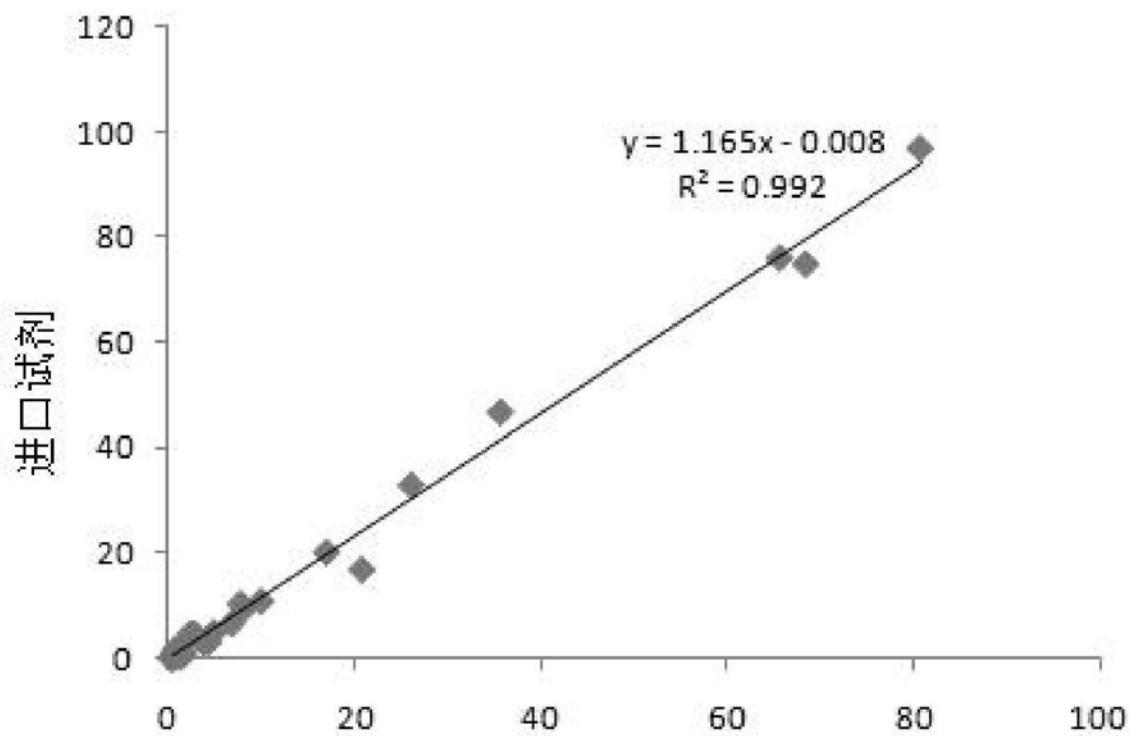


图3



桃组分过敏原Prup1特异性IgE抗体检测（纳米磁微粒化学发光法）

图4

专利名称(译)	一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法和检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN107860927A	公开(公告)日	2018-03-30
申请号	CN201711020872.4	申请日	2017-10-27
[标]发明人	李庆春 胡桂元 钱林 周延庆 杨阳		
发明人	李庆春 胡桂元 钱林 周延庆 杨阳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N2333/47		
代理人(译)	汪青		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法，包括以下步骤：1) 合成Pru p1全基因；2) 将步骤1中的所述Pru p1基因片段与载体pET-28a进行连接，形成重组质粒pET-28a-Pru p1；3) 将所述重组质粒pET-28a-Pru p1转化到大肠杆菌BL21中构建重组菌BL 21/pET-28a-Pru p1，进行过敏原Pru p1的表达；4) 采用亲和层析方法进行纯化，从而得到过敏原Pru p1蛋白。本发明的一种过敏原Pru p1蛋白的制备方法，人工合成Pru p1基因，并利用大肠杆菌作为载体生产桃重组过敏原Pru p1，不但降低了成本，而且所得蛋白的理化性质和免疫性质均和天然组分一致，稳定性好，使得重组过敏原Pru p1进一步应用于过敏诊断产品的开发得以实现。

