

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510034586.4

[51] Int. Cl.

C07K 14/45 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月15日

[11] 公开号 CN 1861633A

[22] 申请日 2005.5.10

[21] 申请号 200510034586.4

[71] 申请人 陈晓光

地址 510515 广东省广州市白云区京溪沙太南路1023号东院C栋B门804号

共同申请人 李 华

[72] 发明人 陈晓光 李 华

[74] 专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司

代理人 宣国华

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

[54] 发明名称

一种基于重组抗原的弓形虫检测试剂盒

[57] 摘要

本发明是从弓形虫主要表面抗原基因 SAG1 中切取 542 - 1218 片段 (tSAG1)，将其亚克隆到可溶性表达载体 pET32a(+) 中，并转化大肠杆菌，构建工程菌 pET32a - tSAG1/BL21，经 IPTG 诱导高效表达，表达菌的超声裂解上清经 Ni - NTA 和 Sephadex - G75 纯化，包被 ELISA 板微孔，构建抗体检测试剂盒，同样地将上述纯化的重组抗原点样 NC 膜上，构建胶体金检测试纸条。本发明还利用纯化的重组抗原免疫小鼠，制备抗弓形虫 SAG1 蛋白的单克隆抗体，并利用该单克隆抗体构建如上所述的 ELISA 和胶体金试剂盒用以检测弓形虫 SAG1 循环抗原。

1、一种重组弓形虫主要表面抗原蛋白 (rSAG1), 在变性条件下测定时, 其分子量范围在 20—25kDa 范围内; 其融合蛋白在变性条件下测定时, 其分子量范围在 39—43kDa 范围内。

2、如权利要求1的重组弓形虫主要表面抗原蛋白, 其cDNA序列为SEQ ID NO: 1所示的序列; 其氨基酸序列为SEQ ID NO: 2所示的序列。

3、如权利要求 1 或 2 所限定之蛋白质编码基因的表达载体为 pET32a(+)-tSAG1。

4、一种如权利要求 3 所限定之的表达载体 PET32a(+)-tSAG1 的转化菌株, 即工程菌 pET32a(+)-tSAG1/BL21。

5、权利要求 1 或 2 所限定之蛋白质的方法, 包括:

- (a) 用 PCR 等方法从弓形虫 cDNA 文库或基因组 DNA 中获取目的蛋白的编码基因 tSAG1;
- (b) 将目的蛋白的编码基因 tSAG1 克隆至可溶性表达载体 pET32a(+), 并转化大肠杆菌如 BL21 等, 构建工程菌 pET32a(+)-tSAG1/BL21;
- (c) 上述工程菌在一定条件下, 经 IPTG 诱导后高效表达目的蛋白 rSAG1;
- (d) 高效表达的目标菌超声裂解上清经 Ni-NTA 和 Sephadex-G75 纯化, 获得较高纯度的目的蛋白;
- (e) 对上述 (d) 所获得的重组蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 确认具有 41kDa 左右分子量的特定蛋白质的存在;
- (f) 对上述 (e) 所获得的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移至 NC 膜或 PVDF 膜上, 进行 western blotting, 鉴定所获得蛋白的免疫反应性。

6、一种能用于弓形虫或弓形虫病的检测和/或诊断方法, 包括:

- (a) 使用如权利要求 1 或 2 所限定的重组蛋白质或其抗原片段与待测样

本接触，检测针对弓形虫的抗体；

(b) 使如权利要求 1 或 2 所限定的重组蛋白质或其抗原片段的单克隆抗体与待测样本接触，检测样本中弓形虫循环抗原。

7、如权利要求 6 所述的方法，待测样本是人和动物的血清、脑脊液、尿液、唾液、羊水等所有体液样本。

8、用于弓形虫检测和/或诊断的如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段的用途，此种检测是在体外进行的。

9、一种用于检测和/或诊断弓形虫的试剂盒，该试剂盒包含如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段，其试剂盒可以是 ELISA 试剂盒和/或胶体金试剂盒或其他任何品种的试剂盒。

10、一种能够利用如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段免疫动物制备单克隆抗体或多克隆抗体，用此单克隆抗体或多克隆抗体组建检测弓形虫病患者体内的针对如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段的抗原表位。

## 一种基于重组抗原的弓形虫检测试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种基于重组抗原的弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 检测试剂盒, 这种试剂盒是利用重组抗原及其相应的单克隆抗体组建的检测和/或诊断样品中弓形虫抗体或相应抗原, 这种抗原或单克隆抗体的筛选与鉴定、试剂盒的组成成分、检测步骤及应用情况。

### 背景技术

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种专性细胞内寄生的医学原虫, 能感染几乎所有恒温动物 (包括人类), 引起弓形虫病, 全世界近 1/3 的人口受到威胁。弓形虫是一种机会性致病原虫, 在免疫功能正常的人内通常形成包囊, 造成隐性感染; 但当免疫功能下降时 (如肿瘤患者、器官移植者及 AIDS 患者等), 弓形虫可在宿主体内播散引起弓形虫病甚至导致死亡。妇女在妊娠期初次感染弓形虫可引起流产、畸胎、死胎, 或引起胎儿先天性弓形虫病, 表现为智力低下、视网膜脉络膜炎、失明等, 这些症状可在胎儿出生时或是成长过程中出现。弓形虫感染也是家畜/家禽流产、畸胎、死产的主要原因之一, 对畜牧业生产危害严重。因此, 弓形虫病的诊断, 尤其是弓形虫现症感染的及时诊断成为弓形虫病防治工作的重点。

目前, 国内外普遍采用免疫学方法检测血清中的弓形虫 IgG、IgM 及 IgG 亲和力, 所用抗原多是从感染动物中收集或经组织/细胞培养的弓形虫速殖子抗原。但这种制备速殖子抗原的方法昂贵费时, 纯度低, 试剂盒批间差异大, 不易标准化。

在原核表达系统中表达特异的目的蛋白, 因蛋白产量高、操作简单、费用低廉而被许多研究者选用。SAG1 (P30) 蛋白是弓形虫速殖子期特异性抗原, 在不同虫株之间具有高度的保守性, 大量实验证明 SAG1 蛋白具有良好的免疫原性, 是弓形虫病诊断和疫苗研究的重要候选抗原分子。但 SAG1 蛋白是一个高度构象依赖的蛋白, 其空间结构的形成主要依赖二硫键的正确连接。原核表达系统 (如大肠杆菌) 缺乏蛋白质翻译后的修饰功能, 因此以往在大肠杆菌中获得的重组 SAG1 蛋白大都形成包涵体, 表达产物由于错误折叠而不具有特异的免疫反应性, 需经复杂的变性、复性过程才能恢复部分活性。另外, SAG1 全基因克隆到大肠杆菌中时, 由于对宿主菌的毒性较大, 表达量不高。

本发明是从弓形虫 SAG1 全长基因中截取其主要抗原表位的编码区域，使其在大肠杆菌中得到高效表达，并且这种表达是可溶性的，表达的重组蛋白无需复性即能具有良好的免疫活性。本发明还筛选针对该重组蛋白的单克隆抗体，建立一套基于重组抗原及其单克隆抗体的弓形虫感染检测体系（包括 ELISA 检测弓形虫 IgG 和 IgM 抗体、IgG 亲和力、SAG1 循环抗原，免疫胶体金检测 IgG 和 IgM 抗体和 SAG1 循环抗原等），该体系由于抗原可批量生产，易于标准化控制。

## 发明内容

本发明是从弓形虫主要表面抗原基因 SAG1 中切取 542-1218 片段(tSAG1)，将其亚克隆到可溶性表达载体 pET32a(+) 中，并转化大肠杆菌，构建工程菌 pET32a-tSAG1/BL21，经 IPTG 诱导高效表达，表达菌的超声裂解上清经 Ni-NTA 和 Sephadex-G75 纯化，包被 ELISA 板微孔，构建抗体检测试剂盒，同样地将上述纯化的重组抗原点样 NC 膜上，构建胶体金检测试纸条。本发明还利用纯化的重组抗原免疫小鼠，制备抗弓形虫 SAG1 蛋白的单克隆抗体，并利用该单克隆抗体构建如上所述的 ELISA 和胶体金试剂盒用以检测弓形虫 SAG1 循环抗原。

这样，在第一个方面，本发明提供了经改造的重组弓形虫主要表面抗原蛋白（rSAG1）截短片段的编码基因序列：

```

ATGGGTTTCA CTCTTAAGTG CCCTAAAACA GCGCTCACAG AGCCTCCCAC TCTTGCGTAC 60
TCACCCAACA GGCAAATCTG CCCAGCGGGT ACTACAAGTA GCTGTACATC AAAGGCTGTA 120
ACATTGAGCT CCTTGATTCC TGAAGCAGAA GATAGCTGGT GGACGGGGGA TTCTGCTAGT 180
CTCGACACGG CAGGCATCAA ACTCACAGTT CCAATCGAGA AGTTCCCCGT GACAACGCAG 240
ACGTTTGTGG TCGGTTGCAT CAAGGGAGAC GACGCACAGA GTTGTATGGT CACAGTGACA 300
GTACAAGCCA GAGCCTCATC GGTGCTCAAT AATGTCGCAA GGTGCTCCTA CGGTGCAGAC 360
AGCACTCTTG GTCCGTCAA GTTGTCTGCG GAAGGACCCA CTACAATGAC CCTCGTGTGC 420
GGGAAAGATG GAGTCAAAGT TCCTCAAGAC AACAATCAGT ACTGTTCCGG GACGACGCTG 480
ACTGGTTGCA ACGAGAAATC GTTCAAAGAT ATTTTGCCAA AATTAAGTGA GAACCCGTGG 540
CAGGGTAACG CTTCGAGTGA TAAGGGTGCC ACGCTAACGA TCAAGAAGGA AGCATTTCCTA 600
GCCGAGTCAA AAAGCGTCAT TATTGGATGC ACAGGGGGAT CGCCTGAGAA GCATCACTGT 660
ACCGTGAAAC TGGAGTTTGC CGGGGCTGCA GGTAA 696

```

在第二个方面，本发明提供了重组弓形虫主要表面抗原蛋白（rSAG1）在变性条件下测定时，其分子量范围在 20—25kDa 范围内；其融合蛋白在变性条件下测定时，其分子量范围在 39—43kDa 范围内。

适合地，所述的重组抗原蛋白质具有以下序列：

1 METGlyPheThrLeuLysCysProLysThrAlaLeuThrGluProProThrLeuAlaTyr

21 SerProAsnArgGlnIleCysProAlaGlyThrThrSerSerCysThrSerLysAlaVal  
 41 ThrLeuSerSerLeuIleProGluAlaGluAspSerTrpTrpThrGlyAspSerAlaSer  
 61 LeuAspThrAlaGlyIleLysLeuThrValProIleGluLysPheProValThrThrGln  
 81 ThrPheValValGlyCysIleLysGlyAspAspAlaGlnSerCysMETValThrValThr  
 101 ValGlnAlaArgAlaSerSerValValAsnAsnValAlaArgCysSerTyrGlyAlaAsp  
 121 SerThrLeuGlyProValLysLeuSerAlaGluGlyProThrThrMETThrLeuValCys  
 141 GlyLysAspGlyValLysValProGlnAspAsnAsnGlnTyrCysSerGlyThrThrLeu  
 161 ThrGlyCysAsnGluLysSerPheLysAspIleLeuProLysLeuThrGluAsnProTrp  
 181 GlnGlyAsnAlaSerSerAspLysGlyAlaThrLeuThrIleLysLysGluAlaPhePro  
 201 AlaGluSerLysSerValIleIleGlyCysThrGlyGlySerProGluLysHisHisCys  
 221 ThrValLysLeuGluPheAlaGlyAlaAlaGly 231

或者与该序列实质上同源的序列。在氨基酸水平上，如果大量重要的氨基酸序列显示同源性，可以看作蛋白质序列和另一个蛋白质序列实质上同源。随着优先等级的增加，至少 40%，50%，60%，70%，80%90%，95%，甚至 99%的氨基酸可以是同源的。

在第三个方面，一种如权利要求 1 或 2 所限定之蛋白质编码基因的表达载体 pET32a(+)-tSAG1。

在第四个方面，一种如权利要求 3 所限定之的表达载体 PET32a(+)-tSAG1，的转化菌株，即工程菌 PET32a(+)-tSAG1/BL21。

在第五个方面，一种获得如权利要求 1、权利要求 2 和权利要求 3 所限定之蛋白质的方法，该方法包括：

- (a) 用 PCR 等方法从弓形虫 cDNA 文库或基因组 DNA 中获取目的蛋白的编码基因 tSAG1；
- (b) 将目的蛋白的编码基因 tSAG1 克隆至可溶性表达载体 pET32a(+)，并转化大肠杆菌如 BL21 等，构建工程菌 pET32a(+)-tSAG1/BL21；
- (c) 上述工程菌在一定条件下，经 IPTG 诱导后高效表达目的蛋白 rSAG1；
- (d) 高效表达的目标菌超声裂解上清经 Ni-NTA 和 Sephadex-G75 纯化，获得较高纯度的目的蛋白；
- (e) 对上述 (d) 所获得的重组蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，确认具

有 41kDa 左右分子量的特定蛋白质的存在；

- (f) 对上述 (e) 所获得的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，电转移至 NC 膜或 PVDF 膜上，进行 western blotting, 鉴定所获得蛋白的免疫反应性。

在第六个方面，本发明提供了一种能用于弓形虫或弓形虫病的检测和/或诊断方法。该方法包括：

- (a) 使如权利要求 1 或 2 所限定的重组蛋白质或其抗原片段与待测样本接触，检测针对弓形虫的抗体；  
(b) 使如权利要求 1 或 2 所限定的重组蛋白质或其抗原片段的单克隆抗体与待测样本接触，检测样本中弓形虫循环抗原。

特别是，可以利用本发明的重组蛋白质或其抗原片段、或其抗原片段组合物检测 IgG 抗体和/或 IgM 抗体。适合地，待测样本是生物样品，例如人和动物的血清、脑脊液、尿液、唾液、羊水等所有体液样本。

在第七个方面，本发明提供了用于弓形虫检测和/或诊断的如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段的用途。此种检测是在体外进行的。

本发明的重组蛋白抗原或抗原组分可作为弓形虫病检测和/或诊断试剂盒的一部分，这样，在第五个方面，一种用于检测和/或诊断弓形虫的试剂盒，该试剂盒包含如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段，其试剂盒可以是 ELISA 试剂盒和/或胶体金试剂盒或其他任何品种的试剂盒。

此外，还可以用本发明的重组蛋白抗原或其抗原片段诱导弓形虫的免疫反应。这样在另一方面，本发明提供了一种能够利用如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段免疫动物制备单克隆抗体或多克隆抗体，用此单克隆抗体或多克隆抗体组建检测弓形虫病患者体内的针对如权利要求 1 或 2 所限定的蛋白质或其抗原片段的抗原表位（循环抗原）。

与已有技术相比有如下优点：

1. 目前弓形虫检测试剂盒的包被抗原都是采用弓形虫速殖子全虫抗原，不仅抗原获得困难，而且批间差异大。利用重组蛋白构建试剂盒不仅抗原容易获得，节约成本，而且可以大批量制备，质量易于控制，故易于试剂盒的标准化生产。目前尚没有用弓形虫重组抗原组建的弓形虫病诊断试剂盒问世。
2. 我们在大肠杆菌中进一步以可溶性形式表达成熟 SAG1 蛋白片段，表达的重组蛋白无需复性即能具有良好的免疫活性；利用高密度发酵生产 rSAG1，收获工程菌产量可达 26g/L 以上，其蛋白表达量达菌体蛋白的 30%，经 Ni 柱、超滤和分子筛纯化后可达 90% 以上的纯度。经 ELISA 检测弓形虫感染的动物血清和弓形虫病人血清以及健康动物血清和健康人血清，结果其敏感性和特异性均达 90% 以上，检测系统的重复性和稳定性均优于目前市售同类产品。

## 附图说明

图 1 重组质粒的酶切图谱

- 1: pET32a(+) Nco I 单酶切;
- 2: pET32a(+)-tSAG1 Nco I 单酶切;
- 3: PET32a(+)-tSAG1 Nco I +HindIII 双酶切;
- 4: DNA 标准

图 2 目的蛋白占菌体蛋白的百分含量分析

图 3a Ni 柱纯化后的目的蛋白纯度电泳图

- 1 Ni 柱纯化的 rSAG1
- 2 标准分子量蛋白
- 3 纯化前菌体蛋白超声裂解上清

图 3b Ni 柱纯化后的目的蛋白含量分析

图 4 纯化 rSAG1 蛋白与兔血清的 Western-blot 结果

- 1: 正常兔血清;
- 2: 弓形虫速殖子免疫兔血清;
- 3: 低分子量标准蛋白

图 5 rSAG1 包被 ELISA 板的最佳浓度曲线

图 6 五株单克隆抗体（腹水）的亚类测定

1:Y3A8; 2:Y3E10; 3:Y5G11; 4:K3A3; 5:K7H3

图7 五株单克隆抗体（腹水）与弓形虫速殖子抗原的 Western-blot 分析

1: K7H3; 2: K3A3; 3: Y5G11; 4: Y3E10; 5: Y3A8; 6: 正常兔血清; 7: 弓形虫速殖子免疫兔血清; 8: 低分子量标准蛋白

## 具体实施方式

### 实施例一 pET32a(+)-tSAG1 的构建

提取转化菌重组质粒 DNA，与空载质粒 DNA 进行 1% 琼脂糖电泳，而后分别进行单酶切及双酶切鉴定，pET32a(+)-tSAG1 阳性重组质粒经 Nco I 单酶切可见大小约 6600bp 左右的单条带，经 Nco I +HindIII 双酶切后可产生大小约 5900bp 及 700bp 两条带，与预期结果相符。而 pET32a(+) 经 Nco I 单酶切后只有 5900bp 一条带，以上结果表明已获得了 pET32a (+) -tSAG1 重组质粒（图 1）。

### 实施例二 工程菌 pET32a(+)-tSAG1/BL21 诱导表达

pET32a(+)-tSAG1/BL21 经 IPTG 诱导后，经 SDS-PAGE 分析，在约 40kDa 处出现特异性表达带，与预期分子量基本吻合。空载体在 21kDa 的位置表达了硫氧还蛋白（Thioredoxin, *Trx*），而空载体、重组质粒在诱导前均未出现特异的表达蛋白条带。重组菌经超声波破菌后，14000rpm 离心 20min，分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE，结果显示目的蛋白主要以可溶性形式表达。目的蛋白占菌体蛋白的 34.36%。（图 2）

### 实施例三 Ni 柱纯化后 rSAG1 的纯度

将重组蛋白在优化条件下进行大量表达，经超声破菌后，重组蛋白大部分以可溶性形式存在于超声上清中，上清中的重组蛋白经 Ni-NTA 一步纯化后，纯度可达 60 以上%，该纯化的重组蛋白再经 Sephadex-G75 纯化后可获得 90% 以上的纯度（图 3）。

### 实施例四 Ni 柱纯化后 rSAG1 的免疫活性

将纯化的 rSAG1 与弓形虫速殖子免疫兔血清进行 Western-blot, 结果显示重组蛋白与弓形虫速殖子免疫兔血清在约 40kDa 处有一特异性反应条带, 而与正常兔血清无明显反应条带出现 (图 4)

### 实施例五 rSAG1 检测人血清的 ELISA 结果

经 ELISA 测定, 弓形虫速殖子免疫兔血清针对 rSAG1 的最适工作稀释度为 1:300 左右, rSAG1 的最佳包被浓度约为 0.2ug/孔 (图 5)。

以 rSAG1 抗原和弓形虫速殖子超声抗原包被 ELISA 板微孔, 用间接 ELISA 法检测人血清中 IgG 抗体, 共检测 60 份人血清。结果 20 份血清两种抗原检测均为阳性, 13 份血清两种抗原检测均为阴性; rSAG1 抗原检测为阳性而弓形虫速殖子抗原检测为阴性的 14 份, rSAG1 抗原检测为阴性而弓形虫速殖子抗原检测为阳性的 13 份。经配对计数资料的  $\chi$  检验, 应用二项分布原理计算双侧精确概率,  $P=1.000$ , 说明两种方法检测的阳性率无显著性差异。

表 1-1 不同抗原对弓形虫 IgG 抗体检测结果比较表

		ToxoAg		合计
		阳性	阴性	
rSAG1蛋白	阳性	20	14	34
	阴性	13	13	26
合计		33	27	60

### 实施例六 rSAG1 单克隆抗体的亚类鉴定

经 Mouse monoclonal antibody isotyping kit 测定, 5 株单克隆抗体重链均为 IgG1, 轻链均为  $\kappa$  链 (图 6)。

### 实施例七 单克隆抗体的特异性鉴定

5 株单克隆抗体均能识别在还原条件下分子量约为 30KDa 的天然 SAG1 抗原, 与 rSAG1 在约 40KDa 处有特异性反应条带, 而与 pET 单体蛋白无反应条带出现 (图 7)。

### 实施例七 单克隆抗体的效价

五株杂交瘤细胞诱生的腹水经 Smartspec™3000 测定, 蛋白浓度分别为:

Y3A8: 42.2mg/ml; Y3E10: 33.14mg/ml; Y5G11: 29.93mg/ml; K3A3: 32.24mg/ml, K7H3: 29.44mg/ml。分别用 rSAG1 (包被浓度为 0.2ug/孔) 和弓形虫速殖子抗原 (包被浓度为 2ug/孔) 作为包被抗原, 用间接 ELISA 方法测定 5 株单克隆抗体 (腹水) 的效价。5 株单抗均能与重组和天然 SAG1 抗原发生特异性反应, P/N 均大于 2.1。

间接 ELISA 测定 5 株单克隆抗体 (腹水) 效价

单抗	重组 SAG1 包被浓度: 0.2ug/孔			弓形虫速殖子抗原 包被浓度: 2ug/孔		
	效价	OD <sub>450</sub>	P/N	效价	OD <sub>450</sub>	P/N
Y3A8	1:5120000	0.210	3.5	1:320	0.245	2.34
Y3E10	1:2560000	0.169	2.82	1:80	0.296	2.82
Y5G11	1:320000	0.208	3.47	1:80	0.222	2.12
K3A3	1:2560000	0.170	2.83	1:40	0.259	2.47
K7H3	1:80000	0.184	3.07	1:80	0.275	2.62

直接 ELISA 测定标记单抗效价

标记单抗	重组 SAG1 包被浓度: 0.2ug/孔			弓形虫速殖子抗原 包被浓度: 2ug/孔		
	效价	OD <sub>450</sub>	P/N	效价	OD <sub>450</sub>	P/N
HRP-Y3A8	1:1280	0.31	5.17	1:10	0.177	2.13
HRP-K7H3	1:5120	0.27	4.5	1:20	0.208	2.51

序列表

- <110> (陈晓光, 李华)
- <120> (一种基于重组抗原的弓形虫检测试剂盒)
- <140>
- <141>
- <160> 2
- <210> 1
- <211> 695
- <212> cDNA
- <213> 刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).....(695)
- <220>
- <221> mutation
- <222> (1).....(6), (15), (693).....(695)
- <400> 1

```

ATGGGTTTCA CTCTTAAGTG CCCTAAAACA GCGCTCACAG AGCCTCCCAC TCTTGCGTAC 60
TCACCCAACA GGCAAATCTG CCCAGCGGGT ACTACAAGTA GCTGTACATC AAAGGCTGTA 120
ACATTGAGCT CCTTGATTCC TGAAGCAGAA GATAGCTGGT GGACGGGGGA TTCTGCTAGT 180
CTCGACACCG CAGGCATCAA ACTCACAGTT CCAATCGAGA AGTTCCCCGT GACAACGCAG 240
ACGTTTGTGG TCGGTTGCAT CAAGGGAGAC GACGCACAGA GTTGTATGGT CACAGTGACA 300
GTACAAGCCA GAGCCTCATC GGTCTGCAAT AATGTCGCAA GGTGCTCCTA CGGTGCAGAC 360
AGCACTCTTG GTCCTGTCAA GTTGTCTGCG GAAGGACCCA CTACAATGAC CCTCGTGTGC 420
GGGAAAGATG GAGTCAAAGT TCCTCAAGAC AACAATCAGT ACTGTTCCGG GACGACGCTG 480
ACTGGTTGCA CTGAGAAATC GTTCAAAGAT ATTTTGCCAA AATTAAGTGA GAACCCGTGG 540
CAGGGTAACG CTTGAGTGA TAAGGGTGCC ACGCTAACGA TCAAGAAGGA AGCATTTCGA 600
GCCGAGTCAA AAAGCGTCAT TATTGGATGC ACAGGGGGAT CGCCTGAGAA GCATCACTGT 660
ACCGTGAAAC TGGAGTTTGC CCGGGCTGCA GGTTAA 696
    
```

- <210> 2
- <211> 231
- <212> PRT
- <213> 刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1).....(231)
- <220>
- <221> MUTAGEN
- <222> (1).....(2), (5), (231)
- <400> 2

```

Met Gly Phe Thr Leu Lys Cys Pro Lys Thr Ala Leu Thr Glu Pro
1      5      10      15
Pro Thr Leu Ala Tyr Ser Pro Asn Arg Gln Ile Cys Pro Ala Gly
20     25     30
Thr Thr Ser Ser Cys Thr Ser Lys Ala Val Thr Leu Ser Ser Leu
35     40     45
Ile Pro Glu Ala Glu Asp Ser Trp Trp Thr Gly Asp Ser Ala Ser
50     55     60
Leu Asp Thr Ala Gly Ile Lys Leu Thr Val Pro Ile Glu Lys Phe
65     70     75
Pro Val Thr Thr Gln Thr Phe Val Val Gly Cys Ile Lys Gly Asp
80     85     90
Asp Ala Gln Ser Cys Met Val Thr Val Thr Val Gln Ala Arg Ala
95     100    105
Ser Ser Val Val Asn Asn Val Ala Arg Cys Ser Tyr Gly Ala Asp
110    115    120
Ser Thr Leu Gly Pro Val Lys Leu Ser Ala Glu Gly Pro Thr Thr
125    130    135
Met Thr Leu Val Cys Gly Lys Asp Gly Val Lys Val Pro Gln Asp
140    145    150
Asn Asn Gln Tyr Cys Ser Gly Thr Thr Leu Thr Gly Cys Asn Glu
155    160    165
    
```

---

Lys	Ser	Phe	Lys	Asp	Ile	Leu	Pro	Lys	Leu	Thr	Glu	Asn	Pro	Trp
				170					175					180
Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Ser	Asp	Lys	Gly	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys
				185					190					195
Lys	Glu	Ala	Phe	Pro	Ala	Glu	Ser	Lys	Ser	Val	Ile	Ile	Gly	Cys
				200					205					210
Thr	Gly	Gly	Ser	Pro	Glu	Lys	His	His	Cys	Thr	Val	Lys	Leu	Glu
				215					220					225
Phe	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly									
				230	231									

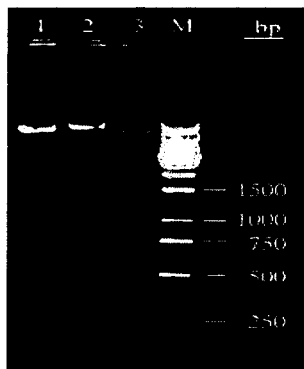


图 1

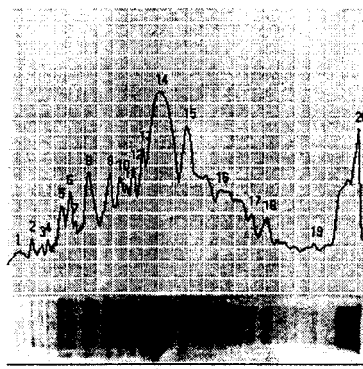


图 2



图 3a

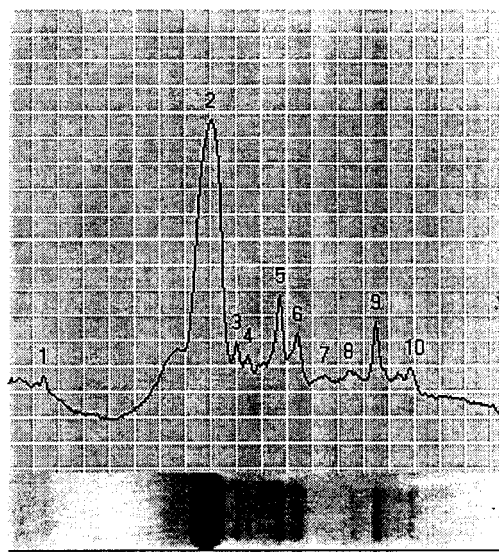


图 3b

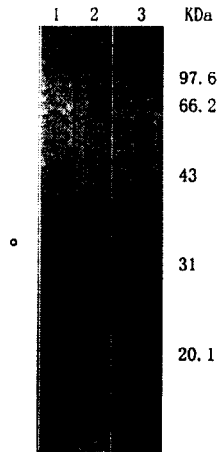


图 4

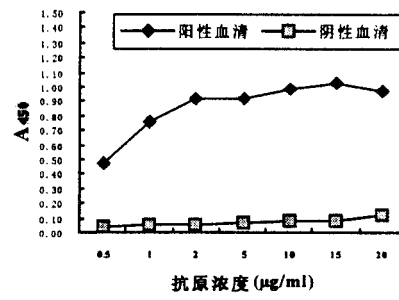


图 5

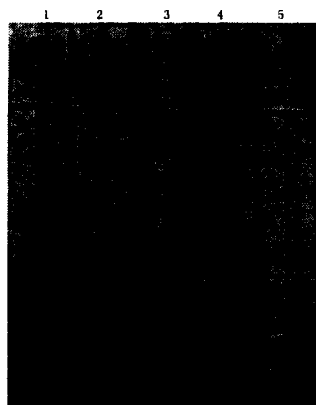


图 6

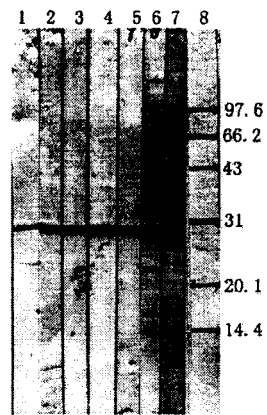


图 7

专利名称(译)	一种基于重组抗原的弓形虫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1861633A</a>	公开(公告)日	2006-11-15
申请号	CN200510034586.4	申请日	2005-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	陈小光 李华		
申请(专利权)人(译)	陈晓光 李华		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市绿诗源生物技术有限公司		
[标]发明人	陈晓光 李华		
发明人	陈晓光 李华		
IPC分类号	C07K14/45 C12N15/63 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68		
其他公开文献	CN1861633B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明是从弓形虫主要表面抗原基因SAG1中切取542 - 1218片段(tSAG1)，将其亚克隆到可溶性表达载体pET32a(+)中，并转化大肠杆菌，构建工程菌pET32a - tSAG1/BL21，经IPTG诱导高效表达，表达菌的超声裂解上清经Ni - NTA和Sephadex - G75纯化，包被ELISA板微孔，构建抗体检测试剂盒，同样地将上述纯化的重组抗原点样NC膜上，构建胶体金检测试纸条。本发明还利用纯化的重组抗原免疫小鼠，制备抗弓形虫SAG1蛋白的单克隆抗体，并利用该单克隆抗体构建如上所述的ELISA和胶体金试剂盒用以检测弓形虫SAG1循环抗原。

