



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110724201 A

(43)申请公布日 2020.01.24

(21)申请号 201911053066.6

(22)申请日 2019.10.31

(71)申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市洪山区南李路
28号

(72)发明人 杨波 胡征 王毅

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 余晓雪

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书5页 说明书13页

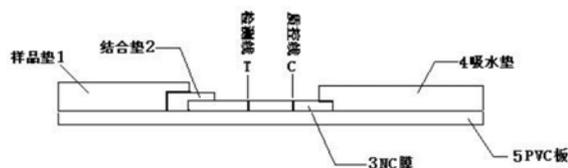
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测法

(57)摘要

本发明涉及一种基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的制备方法,该检测卡由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC板组成,结合垫上喷涂有彩色乳胶微球偶联的抗鲍曼不动杆菌表面蛋白多重表位融合抗原多克隆抗体,硝酸纤维素膜包被有抗鲍曼不动杆菌表面蛋白多重表位融合抗原多克隆抗体的检测线和羊抗兔IgG抗体的质控线。当加入的样品中含有鲍曼不动杆菌时,鲍曼不动杆菌首先与乳胶-兔抗鲍曼不动杆菌表面蛋白多克隆抗体形成复合物,在毛细作用下迁移至包被有鲍曼不动杆菌表面蛋白多克隆抗体的检测线时被捕捉,检测线呈相应的彩色,因而可检测样品中是否含有鲍曼不动杆菌。该检测卡具有快速、简捷、灵敏度高,特异性好的优点。



1. 一种鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA), 其特征在于: 所述鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 的蛋白质序列是:

MFDGNYLDPVEGNSTEVGLKSAWFDGRLNGTLALYHIKQDNLAQEAGQVTRNGVKETYRYRAAKGATSEGFEV
EVSGQITPDWNITAGYSQFSAKDANDADVNTQLPRKMIQSFTTYKLPKLENI TVGGGVNWQSSTVYNAKNPKKVI
EKVEQGDYALVNLMARYQITKDFSAQLNINNVFGSGSGSGSLGYTFQDTQHNNGGKDGELTNGPELQDDLFV
GAALGIELTPWLGFEAEYNQVKGDVDGLAAGAAYKQKQINGNFYVTSDLITKNYDSKIKPYVLLGAGHYKYEIPDL
SYHNDEEGTLGNAGVGAFWRLNDALSLRTEARGTYN;

用于编码所述鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 的核酸基因全序列是:

CATATGTTTCGATGGCAACTACCTGGACCCGGTAGAAGGTAAGTCTACTGAAGTTGGTCTCAAATCCGCT

NdeI

TGGTTTGACGGCCGCTCTGAACGGTACCCTGGCTCTGTACCACATCAAACAGGACAACCTGGCACAGGAAG
CGGGCCAAGTTACCCGTAACGGTGTAAAGAGACTTACTACCGTGCAGCGAAAGGCGCTACATCCGAAGG
TTTTGAAGTTGAAGTATCAGGTCAGATCACTCCAGATTGGAACATCACCGCAGGTTACTCTCAATTTTCTGC
TAAGGACGCGAACGATGCGGACGTAAACACTCAGCTTCCGCGTAAAATGATCCAGAGCTTCACTACCTATA
AACTGCCTGGTAAACTGGAAAACATCACAGTTGGCGGTGGCGTAAACTGGCAGTCTTCTACCTACGTGAAC
GCAAAAAACCCGAAAAAAGTAATCGAAAAAGTTGAGCAGGGTGACTACGCTCTGGTAAACCTGATGGCGC
GTTACCAGATCACTAAGGACTTTTCTGCACAGCTTAACATTAACAACGTTTTTCGGTGGTTCTGGTGGTTCTG
GTGGTTCTGGTGGTTCTCTGGGTTACACCTTCCAGGATACTCAGCACAACAACGGCGGTAAAGACGGTGAA
CTGACCAACGGTCCGGAAGTGCAGGACGACCTGTTCGTTGGTGTCTGCGCTGGGTATCGAAGTACTCCGT
GGCTGGGTTTCGAAGCCGAGTATAACCAGGTTAAGGGTGACGTGGATGGCCTGGCAGCGGGTGTGAATA
CAAACAGAAACAGATCAACGGTAACTTCTACGTTACCAGCGACCTGATTACCAAGAACTATGACTCTAAAA
TCAAACCGTATGTTCTGCTGGGTGCGGGCCACTACAAATACGAAATCCCGGACCTTTCCTATCACAACGAC
GAGGAAGGCACTCTGGGTAACGCGGGTGTGGTGTCTTCTGGCGTCTGAACGACGCTCTGTCTCTGCGTAC
CGAAGCTCGTGGTACCTATAACTAAGGATCC.

BamHI

2. 一种鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 的制备方法, 其特征在于: 所述制备方法: 分别获取鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue及表面蛋白OmpA胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段并找到该肽段基因编码序列, 优化肽段基因编码序列, 并将优化后的肽段基因编码序列用柔性连接肽的编码序列进行连接, 形成融合基因; 所述鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue及表面蛋白OmpA在NCBI蛋白质数据库中的accession number分别为KMV27515及AJF83030; 所述柔性连接肽的序列是gsgsgsgsgsgs; 同时在该融合基因的5' 引入酶切位点NdeI、3' 端引入终止信号TAA和酶切位点BamHI后化学合成全基因序列, 记为FhuOmp;

所述FhuOmp的基因全序列是:

CATAIGTTCGATGGCAACTACCTGGACCCGGTAGAAGGTAACCTCTACTGAAGTTGGTCTCAAATCCGCT

NdeI

TGGTTTGACGGCCGTCTGAACGGTACCCTGGCTCTGTACCACATCAAACAGGACAACCTGGCACAGGAAG
CGGGCCAAGTTACCCGTAACGGTGTAAAGAGACTTACTACCGTGCAGCGAAAGGCGCTACATCCGAAGG
TTTTGAAGTTGAAGTATCAGGTCAGATCACTCCAGATTGGAACATCACCCGAGGTTACTCTCAATTTCTGC
TAAGGACGCGAACGATGCGGACGTAAACACTCAGCTTCCGCGTAAAATGATCCAGAGCTTCACTACCTATA
AACTGCCTGGTAAACTGGAAAACATCACAGTTGGCGGTGGCGTAAACTGGCAGTCTTCTACCTACGTGAAC
GCAAAAAACCCGAAAAAAGTAATCGAAAAAGTTGAGCAGGGTGACTACGCTCTGGTAAACCTGATGGCGC
GTTACCAGATCACTAAGGACTTTTCTGCACAGCTTAACATTAACAACGTTTTTCGGTGGTTCTGGTGGTTCTG
GTGGTTCTGGTGGTTCTCTGGGTTACACCTTCCAGGATACTCAGCACAACAACGGCGGTAAAGACGGTGAA
CTGACCAACGGTCCGGAACCTGCAGGACGACCTGTTCGTTGGTGTCTGCGCTGGGTATCGAACTGACTCCGT
GGCTGGGTTTCGAAGCCGAGTATAACCAGGTTAAGGGTGACGTGGATGGCCTGGCAGCGGGTGTGAATA
CAAACAGAAACAGATCAACGGTAACTTCTACGTTACCAGCGACCTGATTACCAAGAACTATGACTCTAAAA
TCAAACCGTATGTTCTGCTGGGTGCGGGCCACTACAAATACGAAATCCCGGACCTTCTCTATCACAACGAC
GAGGAAGGCACTCTGGGTAAACGCGGGTGTGGTGTCTTCTGGCGTCTGAACGACGCTCTGTCTCTGCGTAC
CGAAGCTCGTGGTACCTATAACTAAGGATCC;

BamHI

所述FhuOmp基因编码的蛋白质序列为鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue的509-688aa及表面蛋白OmpA的31-173aa;两段蛋白序列中间以柔性连接肽进行连接;将此基因片段按常规方法克隆入原核表达载体pET-28a(+),用IPTG诱导重组大肠杆菌表达,用Ni²⁺亲和层析法纯化重组His-FhuOmp蛋白;

所述FhuOmp基因编码的蛋白质序列是:

MFDGNYLDPVEGNSTEVGLKSAWFDGRLNGLTALYHIKQDNLAQEAGQVTRNGVKETYRRAAKGATSEGFEV
EVSGQITPDWNITAGYSQFSAKDANDADVNTQLPRKMIQSFTTYKLPKLENI TVGGGVNWQSSTVYVNAKNPKKVI
EKVEQGDYALVNLMARYQITKDFSAQLNINNVFGSGGSGGSLGYTFQDTQHNNGGKDGELTNGPELQDDLFV
GAALGIELTPWLGFEAEYNQVKGDVDGLAAGA EYKQKQINGNFYVTSDLITKNYDSKIKPYVLLGAGHYKYEIPDL
SYHNDEEGLTGNAGVGFWRNDALSLRTEARGTYN。

3.一种用于制备鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体的方法,其特征在于:所述方法是:将如权利要求2所述的重组His-FhuOmp蛋白作为免疫抗原,与弗氏佐剂混合后反复人工免疫健康的新西兰大白兔,抽血进行效价测定,分离高效价重组蛋白抗体并进行纯化,最终获得鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体。

4.一种鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA),其特征在于:所述鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)的蛋白质序列是:

MAVKVRTQLAAEYIRSGDLDSAKRSLDQALSVDSDATANMMMGILLQQEGSKSNLEKAEHYFKRAISSEPD
NAQARNNYGTYLYQMERYNDAIEQFRIAGATLGYDQRYQALENLGRIYKLGNIASAEKTFKQALLANRDSYISML
ELAEIFYLQQEAAAAAKEAAAAKGSIEAIVGGYNFYQSKFNALQGWRQPGSTIKPFLYALALERGMPYSMVNDSP
ITIGKWTPKNSDGRYLGMIPLRRALYLSRNTVSVRLQLTVGIERTRQLFMDFGLQEDQIPRNYTIALGTPQVLP IQ

MATGYATFANGGYRVQPHFIQRIEDAYGKVIYEAKPEY;

用于编码所述鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 的核酸基因全序列是:

CATATGGCGGTTAAGGTACGCACTCAACTGGCGGCTGAATATATCCGTTCAGGTGATCTGGACTCCGCG

NdeI

AAACGCTCCCTGGACCAGGCCCTGAGCGTTGACTCTCGTGACGCGACAGCAAACATGATGATGGGCATCCT
GCTGCAGCAGGAGGGCTCTAAATCTAACCTGGAGAAAGCGGAGCACTACTTCAAACGTGCTATCAGTTCTG
AACCGGATAACGCTCAGGCGCGCAACAACCTATGGTACCTATCTGTACCAGATGGAACGTTATAACGACGCG
ATTGAACAGTTTCGTATCGCAGGTGCGACCCCTGGGTTATGATCAGCGTTATCAGGCGCTGGAAAACCTGGG
CCGCATCTACCTGAAGCTGGGTAACATCGCCAGCGCTGAAAAAAGCTTTCAAGCAGGCACTGCTGGCGAAC
CGTGACTCTACATCTCTATGCTGGAGCTGGCTGAAATCTTTTACCTGCAGCAGGAAGCTGCTGCTGCTAAA
GAAGCTGCTGCTGCTAAAGGCTCTATCGAAGCTATCGTAGGTGGTTACAACCTTCTACCAGTCCAAGTTAAC
CGTGCGCTCCAGGGCTGGCGCCAGCCGGGCTCTACCATTAAACCTTTCTGTACGCTCTGGCTCTGGAACG
TGGCATGACCCCGTACAGCATGGTAAACGATTCTCCGATCACTATTGGTAAATGGACCCCAAAAAATTCTGA
CGGCCGTTACCTGGGTATGATCCCGCTGCGTTCGCGCTCTGTACCTGTCCCGTAACACTGTATCCGTTTCGTCT
GCTGCAGACTGTTGGCATCGAACGTACCCGCCAACTGTTTATGGATTTTCGGTCTGCAGGAAGACCAGATT
CACGTAACACTACACTATCGCTCTGGGCACTCCGCGAGTACTGCCGATCCAGATGGCTACCGGCTACGCTACTT
TCGCTAATGGCGGCTACCGTGTTCAGCCACATTTCCAGCGTATCGAAGACGCGTATGGTAAAGTAATTT
ACGAAGCTAAACCGGAATATAAGGATCC.

BamHI

5. 一种鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 的制备方法, 其特征在于: 所述制备方法是: 分别获取鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf及表面蛋白ponA胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段并找到该肽段基因编码序列, 优化该肽段基因编码序列, 并将此二段序列用刚性连接肽的编码序列进行连接, 形成融合基因; 所述鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf及表面蛋白ponA在NCBI蛋白质数据库中的accession number分别为AJF80497及ADX05080; 所述刚性连接肽的序列是eaaakeaaak; 同时在该融合基因的5' 引入酶切位点NdeI、3' 端引入终止信号TAA和酶切位点BamHI后化学合成全基因序列, 记为PilPon;

所述PilPon基因全序列是:

CATATGGCGGTTAAGGTACGCACTCAACTGGCGGCTGAATATATCCGTT CAGGTGATCTGGACTCCGCG

NdeI

AAACGCTCCCTGGACCAGGCCCTGAGCGTTGACTCTCGTGACGCGACAGCAAACATGATGATGGGCATCCT
GCTGCAGCAGGAGGGCTCTAAATCTAACCTGGAGAAAAGCGGAGCACTACTTCAAACGTGCTATCAGTTCTG
AACCGGATAACGCTCAGGCGCGCAACAACCTATGGTACCTATCTGTACCAGATGGAACGTTATAACGACGCG
ATTGAACAGTTTCGTATCGCAGGTGCGACCCTGGGTTATGATCAGCGTTATCAGGCGCTGGAAAACCTGGG
CCGCATCTACCTGAAGCTGGGTAACATCGCCAGCGCTGAAAAAACTTCAAGCAGGCACCTGCTGGCGAAC
CGTGACTCCTACATCTCTATGCTGGAGCTGGCTGAAAATCTTTTACCTGCAGCAGGAAGCTGCTGCTGCTAAA
GAAGCTGCTGCTGCTAAAGGCTCTATCGAAGCTATCGTAGGTGGTTACAACCTTCTACCAGTCCAAGTTAAC
CGTGCGCTCCAGGGCTGGCGCCAGCCGGGCTCTACCATTAAACCTTTCTGTACGCTCTGGCTCTGGAACG
TGGCATGACCCCGTACAGCATGGTAAACGATTCTCCGATCACTATTGGTAAATGGACCCCAAAAAATTCTGA
CGGCCGTTACCTGGGTATGATCCCGCTGCGTTCGCGCTCTGTACCTGTCCCGTAACACTGTATCCGTTCTGCT
GCTGCAGACTGTTGGCATCGAACGTACCCGCCAACTGTTTATGGATTTCCGGTCTGCAGGAAGACCAGATTC
CACGTAACACTACACTATCGCTCTGGGCACTCCGCGAGTACTGCCGATCCAGATGGCTACCGGCTACGCTACTT
TCGCTAATGGCGGCTACCGTGTTCAGCCACATTCATCCAGCGTATCGAAGACGCGTATGGTAAAGTAATTT
ACGAAGCTAAACCGGAATATAAGGATCC;

BamHI

所述PilPon编码的蛋白质序列是：

MAVKVRTQLAAEYIRSGDLDSAKRSLDQALSVDSDATANMMMGILLQQEGSKSNLEKAEHYFKRAISSEPD
NAQARNNYGTYLYQMERYNDAIEQFRIAGATLGYDQRYQALENLGRIYLLKGNIASAEKTFKQALLANRDSYISML
ELAEIFYLQQEAAAAKEAAAAKGSIEAIVGGYNFYQSKFNALQGWRQPGSTIKPFLYALALERGMTPYSMVNDSP
ITIGKWTPKNSDGRYLGMIPLRRALYLSRNTVSVRLQLTVGIERTRQLFMDFGLQEDQIPRNYTIALGTPQVLPIQ
MATGYATFANGGYRVQPHFIQRIEDAYGKVIYEAKPEY;

所述PilPon基因编码的蛋白质序列是鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf的28-184aa及表面蛋白ponA的406-572aa,两个蛋白序列中间以刚性连接肽进行连接;将此基因片段按常规方法克隆入原核表达载体pET-28a(+),用IPTG诱导重组大肠杆菌表达,用Ni²⁺亲和层析法纯化重组His-PilPon蛋白。

6.一种用于制备鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体的方法,其特征在于:所述的方法是将如权利要求5所述的重组His-PilPon蛋白作为免疫抗原,与弗氏佐剂混合后反复人工免疫健康的新西兰大白兔,抽血进行效价测定,分离高效价重组蛋白抗体并进行纯化,最终获得鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体。

7.一种基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡,其特征在于:所述基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡包括包被有鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体的乳胶微球标记物以及包被有鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体的硝酸纤维素膜。

8.用于制备如权利要求7所述的基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

1) 制备鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体以及鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 抗体;

2) 制备鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体的乳胶微球标记物:

2.1) 乳胶微球的活化

取浓度为10%的彩色羧基化聚苯乙烯乳胶微球溶液1mL,加入9mLMES缓冲液后混匀,加入NHS以及EDC,至二者的终浓度均为1mg/mL,在室温下缓慢混匀30分钟,孵育结束后19000g离心20分钟,去上清,沉淀用10mL硼砂缓冲液重悬,振荡,超声处理后即成活化后的乳胶微球;所述MES缓冲液中组分及含量是:0.1mol/LMES,所述MES缓冲液的pH=8.5;所述硼砂缓冲液中组分含量为0.1mol/LNa₂B₄O₇,所述硼砂缓冲液的pH=8.5;所述彩色羧基化聚苯乙烯乳胶微球的粒径是100nm;

2.2) 乳胶微球标记物的制备:

用硼砂缓冲液将步骤1)所得的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体稀释成1mg/mL;取10mL鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体加入10mL活化乳胶微球,缓慢混匀30分钟后19000g离心10分钟,去上清;沉淀用10mL含有1%酪蛋白的硼砂缓冲液重悬,经超声粉碎后重复离心1次,去上清;沉淀同法重悬,经超声粉碎后重复离心1次,去上清;沉淀用10mL含有1%酪蛋白的硼砂缓冲液重悬,即为鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体的乳胶微球标记物;所述硼砂缓冲液中组分含量为0.1mol/L Na₂B₄O₇,所述硼砂缓冲液的pH=8.5;

3) 结合垫的制备:

向聚酯纤维材质的结合垫上喷涂步骤2)所得到的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体的乳胶微球标记物,每平方厘米聚酯纤维膜的喷涂量为10μL乳胶微球标记物;喷涂完后在相对湿度不超过30%的环境中在37℃下烘干,25℃密封干燥保存;

4) 抗体固相硝酸纤维素膜的制备:

用硼砂缓冲液将步骤1)所得的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 抗体稀释成1.5mg/mL后用喷膜仪包被到硝酸纤维素膜上的检测线位置作为检测线捕获抗体,包被参数为1μL/cm;将羊抗兔IgG喷涂到硝酸纤维素膜上的质控线位置作为控制线捕获抗体,浓度为1mg/mL,包被参数为1μL/cm;包被完后将该硝酸纤维素膜放在相对湿度不超过30%的环境中,于37℃下烘干,25℃密封干燥保存;所述硼砂缓冲液中组分含量为0.1mol/LNa₂B₄O₇,所述硼砂缓冲液的pH=8.5;

5) 样品垫的制备:

取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液中浸泡至少3h以上,再置于生物安全柜内37℃通风干燥后,剪裁成所需的规格,25℃密封干燥保存;至此制得样品垫;

所述样品垫处理液中各组分含量分别是:0.01mol/LNa₂B₄O₇、2g/L氯化钠、20g/L酪蛋白、10ml/L吐温-20以及10ml/L消泡剂S-17;所述样品垫处理液的pH=8.5;

6) 检测卡的组装:

分别将吸水滤纸材质的吸水垫、抗体固相硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫、依次粘贴在PVC底板上,硝酸纤维素膜上所述质控线靠近吸水垫端,所述检测线靠近样品垫端,再切割成一定宽度的检测卡,密封包装,干燥低温保存;至此制得基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡。

基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测法。

背景技术

[0002] 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)为非发酵革兰阴性杆菌,广泛存在于自然界,属于条件致病菌。该菌是医院感染的重要病原菌,主要引起呼吸道感染,也可引发菌血症、泌尿系感染、继发性脑膜炎、手术部位感染、呼吸机相关性肺炎等。对常用抗生素的耐药率有逐年增加的趋势,并引起临床医生和微生物学者的严重关注。国内资料表明, *A. baumannii*约占临床分离的不动杆菌的70%以上。*A. baumannii*对第三代和第四代头孢菌素的耐药率已达63.0%~89.9%,对四种氨基糖苷类(阿米卡星、庆大霉素、奈替米星、妥布霉素)和环丙沙星的耐药率菌达96.3%。我国目前的绝大多数菌株对亚胺培南、美罗培南、头孢派酮/舒巴坦和多黏菌素B保持敏感,但在呼吸道感染的治疗中效果较差。综上所述,鉴于近年鲍曼不动杆菌的耐药率有进一步上升的趋势,这应当引起临床医师及微生物界的高度重视。临床医师应重视获得性鲍曼不动杆菌感染,与临床微生物实验室密切协作,加强感染的监测,有效预防和控制感染。

[0003] 目前检测呼吸道中该病原体的方法主要以传统方法为主,即分离鉴定法,该方法所需时间长,一般要2-3天,很难满足快速鉴定的需要;近几年发展起来的PCR技术,是一种快速、灵敏、特异性好的技术,但是目前该技术还是依赖于传统方法的前增菌步骤,而增菌液中往往还有PCR抑制剂,从而影响扩增的效果。同时,该技术还需要专业的检测设备,不适合进行床旁检测。以抗体为基础的免疫学检测已成为人体病原微生物检测不可或缺的重要技术手段。目前已发展了多种特异性免疫检测技术,如放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、荧光免疫分析(FIA)、化学发光免疫分析(CIA)、免疫沉淀反应、免疫凝集反应、ELISA检测试剂盒、免疫胶体金试纸条、免疫乳胶检测试剂等。其中免疫乳胶试纸条等多种以抗体为基础的免疫学检测技术,以其简便、快速、灵敏、准确、实用的特点已成为病原微生物检测不可或缺的重要手段。因而,研究开发具有自主知识产权的病原微生物的抗体,是开发拥有自主知识产权的ELISA检测方法、乳胶微球标记检测法等的基础。

[0004] 抗原成分的选择是检测特异性的关键。鲍曼不动杆菌fhuE receptor、OmpA、PilF及PonA蛋白均是位于细胞表面的重要分子,本研究选用具有种间特异性的表面蛋白fhuE receptor、OmpA、PilF及PonA等作为抗原,制备特异性良好的多克隆抗体,并将其应用于制备鲍曼不动杆菌乳胶微球免疫层析检测卡。

发明内容

[0005] 本发明的目的是以多克隆抗体为基础,通过免疫乳胶标记技术研制一种操作简单、成本低廉、快捷迅速的检测鲍曼不动杆菌的乳胶微球免疫层析检测卡。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 一种基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的制备方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

[0008] 1) 鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体制备:

[0009] 分别获取鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue及表面蛋白OmpA胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段并找到该肽段基因编码序列,优化肽段基因编码序列,并将优化后的肽段基因编码序列用柔性连接肽的编码序列进行连接,形成融合基因;所述鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue及表面蛋白OmpA在NCBI蛋白质数据库中的accession number分别为KMV27515及AJF83030;所述柔性连接肽的序列是ggsgsgsgsgs;同时在该融合基因的5' 引入酶切位点NdeI、3' 端引入终止信号TAA和酶切位点BamHI后化学合成全基因序列,记为FhuOmp;

[0010] 所述FhuOmp的基因全序列是:

[0011] CATATGTTTCGATGGCAACTACCTGGACCCGGTAGAAGGTAACTCTACTGAAGTTGGTCTCAAATCCGCT

[0012] NdeITGGTTTGACGGCCGTCTGAACGGTACCCTGGCTCTGTACCACATCAAACAGGACAACCTGGCACAGGAAGCGGGCCAAGTTACCCGTAACGGTGTTAAAGAGACTTACTACCGTGCAGCGAAAGGCGCTACATCCGAAGTTTTGAAGTTGAAGTATCAGGTCAGATCACTCCAGATTGGAACATCACCGCAGGTTACTCTCAATTTTCTGCTAAGGACGCGAACGATGCGGACGTAACACTCAGCTTCCGCGTAAAATGATCCAGAGCTTCACTACCTATAAACTGCCTGTAAACTGGAAAACATCACAGTTGGCGGTGGCGTAAACTGGCAGTCTTCTACCTACGTGAACGCAAAAAACCCGAAAAGTAATCGAAAAAGTTGAGCAGGGTACTACGCTCTGGTAAACCTGATGGCGCGTTACCAGATCACTAAGGACTTTTCTGCACAGCTTAACATTAACAACGTTTTCGGTGGTTCTGGTGGTTCTGGTGGTTCTGGTGGTTCTCTGGGTTACACCTTCCAGGATACTCAGCACAACAACGGCGGTAAAGACGGTGAACCTGACCAACGGTCCGGAACCTGCAGGACGACCTGTTTCGTTGGTGTGCGCTGGGTATCGAACTGACTCCGTGGCTGGGTTTCGAAGCCGAGTATAACCAGGTTAAGGGTGACGTGGATGGCCTGGCAGCGGGTGTGAATACAAACAGAAACAGATCAACGGTAACTTCTACGTTACCAGCGACCTGATTACCAAGAACTATGACTCTAAAATCAAACCGTATGTTCTGCTGGGTGCGGGCCACTACAAATACGAAATCCCGGACCTTTCTATCACACGACGAGGAAGGCACTCTGGGTAACGCGGGTGTGGTGCTTTCTGGCGTCTGAACGACGCTCTGTCTCTGCGTACCGAAGCTCGTGGTACCTATAACTAAGGATCC;

[0013] BamHI

[0014] 所述FhuOmp基因编码的蛋白质序列是:

[0015] MFDGNYLDPVEGNSTEVGLKSAWFDGRLNGLALYHIKQDNLAEAGQVTRNGVKETYRRAAKG ATSEGEFEVSVSGQITPDWNI TAGYSQFSAKDANDADVNTQLPRKMIQSFTTYKLPKLENI TVGGGVNWSSTYVNAKNPKKVIEKVEQG DYALVNL MARYQITKDFSAQLNINNVFGGSGGSGGSLGYTFQDTQHNNGGKDGELTNGPELQDDL FVGAALGIELTPWLGFEAEYNQVKGDVDGLAAGA EYKQKQINGNFYVTSDL I TKNYDSKIKPYVLLGAGHYKYEIPDLSYHNDEEGTLGNAGVGFWRNLNDALSLRTEARGTYN;

[0016] 所述FhuOmp基因编码的蛋白质序列为鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue的509-688aa及表面蛋白OmpA的31-173aa;两段蛋白序列中间以柔性连接肽ggsgsgsgsgs进行连接;将此基因片段按常规方法克隆入原核表达载体pET-28a(+),用IPTG诱导重组大肠杆菌表达,用Ni²⁺亲和层析法纯化重组His-FhuOmp蛋白;将该重组蛋白作为免疫抗原,与弗氏佐剂混合后反复人工免疫健康的新西兰大白兔,抽血进行效价测定,分离高效价重组蛋白抗体并进行纯化,最终获得鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体;

[0017] 2) 鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 抗体的制备:

[0018] 分别获取鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf及表面蛋白ponA胞外结构域中抗原表位最

为丰富的肽段并找到该肽段基因编码序列,优化该肽段基因编码序列,并将此二段序列用刚性连接肽的编码序列进行连接,形成融合基因;所述鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf及表面蛋白ponA在NCBI蛋白质数据库中的accession number分别为AJF80497及ADX05080;所述刚性连接肽的序列是eaaakeaaak;同时在该融合基因的5'引入酶切位点NdeI、3'端引入终止信号TAA和酶切位点BamHI后化学合成全基因序列,记为PilPon;

[0019] 所述PilPon基因全序列是:

[0020] CATATGGCGGTTAAGGTACGCACTCAACTGGCGGCTGAATATATCCGTTCAGGTGATCTGGACTCCGCG

[0021] NdeIAAACGCTCCCTGGACCAGGCCCTGAGCGTTGACTCTCGTGACGCGACAGCAAACATGATGATGGGCATCCTGCTGCAGCAGGAGGGCTCTAAATCTAACCTGGAGAAAGCGGAGCACTACTTCAAACGTGCTATCAGTTCTGAACCGGATAACGCTCAGGCGCGCAACAACCTATGGTACCTATCTGTACCAGATGGAACGTTATAACGACGCGATTGAACAGTTTTCGTATCGCAGGTGCGACCCTGGGTTATGATCAGCGTTATCAGGCGCTGGAAAACCTGGGCCGCATCTACCTGAAGCTGGGTAACATCGCCAGCGCTGAAAAAATTTCAAGCAGGCACTGCTGGCGAACCGTGACTCCTACATCTCTATGCTGGAGCTGGCTGAAATCTTTTACCTGCAGCAGGAAGCTGCTGCTGCTAAAGAAGCTGCTGCTGCTAAAGGCTCTATCGAAGCTATCGTAGGTGGTTACAACCTTACCAGTCCAAGTTAACCGTGCCTCCAGGGCTGGCGCCAGCCGGGCTCTACCATTAAACCTTTCCTGTACGCTCTGGCTCTGGAACGTGGCATGACCCCGTACAGCATGGTAAACGATTCTCCGATCACTATTGGTAAATGGACCCCAAAAAATTTGACGGCCGTTACCTGGGTATGATCCCCTGCGTCGCGCTCTGTACCTGTCCCGTAACACTGTATCCGTTCTGTGCTGCAGACTGTTGGCATCGAACGTACCCGCCAAC TGTTTATGGATTTCCGGTCTGCAGGAAGACCAGATTCCACGTAACACTACTATCGCTCTGGGCACTCCGCAGGTACTGCCGATCCAGATGGCTACCGGCTACGCTACTTTCGCTAATGGCGGCTACCGTGTTCCAGCCACATTTTCATCCAGCGTATCGAAGACCGTATGGTAAAGTAATTTACGAAGCTAAACCGGAATATAAGGATCC;

[0022] BamHI

[0023] 所述PilPon编码的蛋白质序列是:

[0024] MAVKVRTQLAAEYIRSGDLDSAKRSLDQALSVDSDATANMMMGILLQQEGSKSNLEKAEHYFKRAISSEPDNAQARNNYGTYLYQMERYNDAIEQFRIAGATLGYDQRYQALENLGRIYKLGNIASAETFKQALLANRDSYISMLELAEIFYLQQEAAAAAKEAAAAKGSIEAIVGGYNYFYQSKFNALQGWRQPGSTIKPFLYALALERGMTYPYSMVNDSPITIGKWTPKNSDGRYLGMIPLRRALYLSRNTVSVRLQLTVGIERTRQLFMDFGLQEDQIPRNYTIALGTPQVLPIQMATGYATFANGGYRVQPHFIQRIEDAYGKVIYEAKPEY;

[0025] 所述PilPon基因编码的蛋白质序列是鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf的28-184aa及表面蛋白ponA的406-572aa,两个蛋白序列中间以刚性连接肽eaaakeaaak进行连接;将此基因片段按常规方法克隆入原核表达载体pET-28a(+),用IPTG诱导重组大肠杆菌表达,用Ni²⁺亲和层析法纯化重组His-PilPon蛋白;将该重组蛋白作为免疫抗原,与弗氏佐剂混合后反复人工免疫健康的新西兰大白兔,抽血进行效价测定,分离高效价重组蛋白抗体并进行纯化,最终获得鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体;

[0026] 3) 制备鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhuc+OmpA)抗体的乳胶微球标记物:

[0027] 3.1) 乳胶微球的活化

[0028] 取浓度为10%的彩色羧基化聚苯乙烯乳胶微球溶液1mL,加入9mLMES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)缓冲液后混匀,加入NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)以及EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐盐酸盐),至二者的终浓度均为1mg/mL,在室温下缓慢混匀30分钟,孵育结束后19000g离心20分钟,去上清,沉淀用10mL硼砂缓冲液

(0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH8.5)重悬,振荡,超声处理后即成活化后的乳胶微球;所述MES缓冲液中组分及含量是:0.1mol/LMES,所述MES缓冲液的pH=8.5;所述硼砂缓冲液中组分含量为0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$,所述硼砂缓冲液的pH=8.5;所述彩色羧基化聚苯乙烯乳胶微球的粒径是100nm;

[0029] 3.2) 乳胶微球标记物的制备

[0030] 用硼砂缓冲液将步骤1)所得的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体稀释成1mg/mL;取10mL鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体加入10mL活化乳胶微球,缓慢混匀30分钟后19000g离心10分钟,去上清;沉淀用10mL含有1%酪蛋白的硼砂缓冲液重悬,经超声粉碎后重复离心1次,去上清;沉淀同法重悬,经超声粉碎后重复离心1次,去上清;沉淀用10mL含有1%酪蛋白的硼砂缓冲液重悬,即为鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体的乳胶微球标记物;所述硼砂缓冲液中组分含量为0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$,所述硼砂缓冲液的pH=8.5;

[0031] 4) 结合垫的制备:

[0032] 向聚酯纤维材质的结合垫上喷涂步骤3)所得到的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体的乳胶微球标记物,每平方厘米聚酯纤维膜的喷涂量为10 μL 乳胶微球标记物;喷涂完后在相对湿度不超过30%的环境中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干,25 $^{\circ}\text{C}$ 密封干燥保存;

[0033] 5) 抗体固相硝酸纤维素膜的制备:

[0034] 用硼砂缓冲液将步骤2)所得的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体稀释成1.5mg/mL后用喷膜仪包被到硝酸纤维素膜上的检测线位置作为检测线捕获抗体,包被参数为1 $\mu\text{L}/\text{cm}$;将羊抗兔IgG喷涂到硝酸纤维素膜上的质控线位置作为控制线捕获抗体,浓度为1mg/mL,包被参数为1 $\mu\text{L}/\text{cm}$;包被完后将该硝酸纤维素膜放在相对湿度不超过30%的环境中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干,25 $^{\circ}\text{C}$ 密封干燥保存;所述硼砂缓冲液中组分含量为0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$,所述硼砂缓冲液的pH=8.5;

[0035] 6) 样品垫的制备

[0036] 取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液中浸泡至少3h以上,再置于生物安全柜内37 $^{\circ}\text{C}$ 通风干燥后,剪裁成所需的规格,25 $^{\circ}\text{C}$ 密封干燥保存;至此制得样品垫;

[0037] 所述样品垫处理液中各组分含量分别是:0.01mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、2g/L氯化钠、20g/L酪蛋白、10ml/L吐温-20以及10ml/L消泡剂S-17;所述样品垫处理液的pH=8.5;

[0038] 7) 检测卡的组装

[0039] 分别将吸水滤纸材质的吸水垫、抗体固相硝酸纤维素膜、结合垫、样品垫、依次粘贴在PVC底板上,硝酸纤维素膜上所述质控线靠近吸水垫端,所述检测线靠近样品垫端,再切割成一定宽度的检测卡,密封包装,干燥低温保存;至此制得基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡。

[0040] 本发明的优点是:

[0041] (1) 本发明采用结构分析,基因优化等方式,构建了两个全新的融合基因,通过可溶性过表达,首次成功获得了可溶性的重组Fhue/OmpA融合蛋白及Pilf/ponA融合蛋白。该两种融合蛋白表达量高,制备成本低廉,蛋白可溶性好,抗原性强,用其制备抗体效价高,成本低。

[0042] (2) 本发明首次利用鲍曼不动杆菌表面上的四个蛋白暴露区制备的抗体效价高,

针对的抗原位点多,捕获力强,不存在位点竞争问题,检测卡灵敏度高。其对鲍曼不动杆菌标准菌株ATCC19606的检测灵敏度达到 2×10^4 CFU/mL,明显高于微生物传统检测方法,并且具有快速、高效等优点。

[0043] (3) 该检测卡特异性好,用6株鲍曼不动杆菌菌株和18株非鲍曼不动杆菌标准菌株(包含绝大部分呼吸道常见病原体)进行的特异性实验,结果显示本发明的检测卡具有良好的特异性和稳定性,其可检出所有所试的鲍曼不动杆菌,而与所有非鲍曼不动杆菌标准菌株均无交叉反应,十分适合临床非诊断性应用。

[0044] (4) 该检测卡在常温下可保质两年,有效延长保质期并降低保存条件;非专业人士用该检测试纸即可完成全程检测,操作简单,有利于该法的推广和普及;整个检测过程最快可以在10min内完成,更适合于床旁检测。

附图说明

[0045] 图1是本发明所提供的基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的爆炸结构示意图;

[0046] 图2是本发明所提供的基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的结构示意图;

[0047] 其中:

[0048] 1-样品垫;2-结合垫;3-NC膜;4-吸水垫;5-PVC板。

具体实施方式

[0049] 本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

[0050] 本发明使用或采用的各种材料的来源

[0051] 1、乳胶微球:本发明中所用乳胶微球为羧基化修饰的聚苯乙烯乳胶微球,为上海甄准生物科技有限公司产品,大小为100nm,颜色为红色,产品的平均直径公差在10%以内,形式为10%固体水悬液,产品货号MSI-CAR100NM。

[0052] 2、玻璃纤维素膜:厚度为0.45-0.55mm,吸水量为600-800mg/m²,玻璃纤维直径为0.6-3μm,具有良好的亲水性,购买于上海金标生物科技有限公司(型号为BT50)。

[0053] 3、聚酯纤维膜:厚度为0.25-0.35mm,爬速为15-40mm/60s,具有极好的亲水性,用于结合垫的制备,购买于上海金标生物科技有限公司(型号为VL98)。

[0054] 4、硝酸纤维素膜:型号为Millipore Corp SHF135,有衬板,购买于Millipore公司。

[0055] 5、吸水滤纸:厚度为0.95mm,吸水速度为60s/4cm,吸水量为700mg/cm²,具有良好的吸水性,作为制作吸水垫的材料。购买于上海金标生物科技有限公司(型号为CH37K)。

[0056] 6、底板:为高白度PVC材质,表面涂布单层高聚合物压敏胶SM31,购买于上海金标生物科技有限公司。

[0057] 7、本发明所用到的微生物样品均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0058] 8、pET28a(+):大肠杆菌表达载体,从美国Novagen公司引进。

[0059] 9、大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3):购自上海北诺生物科技有限公司。

[0060] 10、羊抗兔IgG:为博士德生物工程有限公司产品,产品货号BA1039,浓度为1mg/

ml。

[0061] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

[0062] 实施例1

[0063] 鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhue+OmpA) 抗体的制备:

[0064] 1.1) 鲍曼不动杆菌FhuOmp融合基因的克隆

[0065] 获取鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue及OmpA (其NCBI蛋白质数据库中的accession number分别为KMV27515及AJF83030) 胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段并找到其基因编码序列,优化其基因编码序列,并将此二序列用柔性连接肽 (ggsggsggsggs) 的编码序列进行连接,形成融合基因。同时在该融合基因的5' 引入酶切位点NdeI、3' 端引入终止信号TAA和酶切位点BamHI后化学合成全基因序列,记为FhuOmp。其基因全序列及编码的氨基酸序列如列表所示。具体的说,FhuOmp基因编码的蛋白质序列为鲍曼不动杆菌表面蛋白Fhue的509-688aa及表面蛋白OmpA的31-173aa,两个蛋白序列中间以柔性连接肽 (ggsggsggsggs) 进行连接。将此基因序列交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因化学合成,交货时该人工合成的基因片段连于载体pUC57上。将含有该段人工合成的DNA片段的载体pUC57用NdeI及BamHI进行双酶切后按常规方法回收目的片段,备用。同时采用NdeI及BamHI对载体pET-28a (+) 进行双酶切,并按常规分子生物学方法将经双酶切后获得的FhuOmp基因连入pET-28a (+) 载体中,并转化大肠杆菌TOP10,构建pET-FhuOmp表达载体。经酶切和序列测定证实表达载体构建无误。该载体表达重组FhuOmp融合蛋白。

[0066] 1.2) 鲍曼不动杆菌FhuOmp融合蛋白的表达与纯化

[0067] 将上述鉴定正确的阳性克隆菌培养后提取质粒,按常规技术转入感受态E.coli BL21 (DE3) 中,转化完成后将菌液涂布于含50 μ g/mL卡那霉素的LB平板上,按常规方法筛选表达菌株。挑取pET-FhuOmp转化的具有外源蛋白表达能力的单个菌落并接种入100mL LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C培养过夜。取出菌液后,按1:100接种于100mL含有50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基中,于30 $^{\circ}$ C培养至OD600=0.6时,加入1mol/L IPTG至终浓度为0.5mmol/L,于18 $^{\circ}$ C摇菌培养,诱导融合蛋白表达。诱导12h后于8000r/min下离心10min收集菌体。将此菌体用50mL Buffer A (50mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;pH7.4) 洗涤3次并用50mL上样缓冲液 (50mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;5mM咪唑,pH7.4) 重悬后进行超声破碎,操作条件为:功率50W,工作时间2s,间隔时间3s,报警温度60 $^{\circ}$ C,总时间30min。超声完成后,12000g离心15min分别收集沉淀和上清后进行电泳检测。发现重组FhuOmp融合蛋白以部分溶解形式存在于菌体中 (另一部分以包涵体形式存在)。薄层扫描显示,该重组蛋白占细菌总蛋白的30%以上。而将未经序列优化的野生型FhuOmp基因按上述同样方式进行表达,表达产物仅占菌体总蛋白的4%左右,表达量微弱,说明基因优化效果良好。将上述获得的超声破碎上清液用0.45 μ m的滤膜进行过滤后用His Trap affinity columns (GE healthcare公司产品),按照说明书的方法进行重组FhuOmp蛋白的纯化。具体方法如下:

[0068] 1.2.1) 连接层析系统,该系统包括进样管、蠕动泵 (上海沪西分析仪器厂,型号DHL-A)、层析柱 (GE healthcare公司产品,商品名His Trap affinity columns) 及紫外检测器 (上海沪西分析仪器厂,型号HD1),柱体积为2ml,预热紫外检测仪30min左右至读数稳定;

[0069] 1.2.2) 校对T%:调节光亮旋钮至显示100%;

- [0070] 1.2.3) 旋转灵敏度至合适位置,一般用0.2A;
- [0071] 1.2.4) 以上样缓冲液平衡层析系统,至读数稳定后旋转“调零”至显示“000”;
- [0072] 1.2.5) 上蛋白样品,流速控制在5ml/min以内,收集穿透液;
- [0073] 1.2.6) 用上样缓冲液洗去未结合的蛋白,此过程中记录读数,直到读数不再变化为止,收集洗脱液;
- [0074] 1.2.7) 用Buffer A+10mM咪唑进行洗脱,收集洗脱峰;
- [0075] 1.2.8) 用Buffer A+20mM咪唑进行洗脱,收集洗脱峰;
- [0076] 1.2.9) 用Buffer A+40mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0077] 1.2.10) 用Buffer A+100mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0078] 1.2.11) 用Buffer A+150mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0079] 1.2.12) 取各洗脱峰样品100 μ l进行SDS-PAGE电泳;
- [0080] 1.2.13) 结果发现,目标蛋白在100mM咪唑时被洗脱下来,纯度在90%以上,经bradford试剂盒进行蛋白质浓度测定后,调整浓度为0.2mg/mL,备用。至此制得鲍曼不动杆菌FhuOmp融合蛋白。
- [0081] 1.3) 鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体的制备
- [0082] 1.3.1) 将步骤(1.2)所制鲍曼不动杆菌FhuOmp融合蛋白与福氏完全佐剂混合,乳化后作为免疫原免疫雄性新西兰兔2只,每只兔子皮下注射总量为2ml,抗原总量为2mg/只。后每隔两周用FhuOmp融合蛋白与福氏不完全佐剂形成的乳化液免疫一次,共免疫5次,抗原用量与初次免疫相同。五免后3-5天进行心脏大量取血,置37 $^{\circ}$ C 1小时,然后放冰箱4 $^{\circ}$ C过夜,隔天取血清。
- [0083] 1.3.2) 多克隆抗体效价的测定
- [0084] 以FhuOmp融合蛋白为包被抗原,包被浓度为5 μ g/ml,每孔包被100 μ l,利用间接ELISA法检测血清抗体水平。实验组血清稀释倍数依次为:1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400、1:204800;
- [0085] ELISA板包被牛血清白蛋白作为阴性对照,用酶联检测仪测定OD450,满足P/N值>2.1为阳性。结果显示2只兔子的血清抗体效价均达到1:102400,说明免疫效果较好。
- [0086] 1.3.3) 多克隆抗体的提取
- [0087] 用GE-HiTrap Protein A HP预装柱,按说明书纯化抗体,具体操作如下:
- [0088] 1.3.3.1) 取5mL抗血清,加入0.5mL 1M Tris (pH8.0) 调节到pH8.0,20,000g离心20min除去沉淀。
- [0089] 1.3.3.2) 上柱后用10倍柱体积buffer A(100mM Tris-Cl,pH 8.0)洗涤后,再用10倍柱体积buffer B(10mM Tris-Cl,pH 8.0)洗涤。
- [0090] 1.3.3.3) 用大约三倍柱体积的IgG洗脱缓冲液(100mM glycine,pH 3.0)洗脱IgG。(收集管内先预装0.1mL IgG-中和缓冲液(1M Tris-Cl,pH 8.0),每管装0.9mL洗脱液)
- [0091] 1.3.3.4) 用50倍体积Tris(10mM Tris-Cl,pH 8.0)对洗脱液进行透析。
- [0092] 1.3.3.5) 超滤浓缩后,调整浓度为5mg/ml,-70 $^{\circ}$ C保存备用。至此制得鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体。
- [0093] 实施例2
- [0094] 鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体的制备:

[0095] 2.1) 鲍曼不动杆菌PilPon融合基因的克隆

[0096] 获取鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf及ponA(其NCBI蛋白质数据库中的accession number分别为AJF80497及ADX05080)胞外结构域中抗原表位最为丰富的肽段并找到其基因编码序列,优化其基因编码序列,并将此二序列用刚性连接肽(eaaakeaaak)的编码序列进行连接,形成融合基因。同时在该融合基因的5'引入酶切位点NdeI、3'端引入终止信号TAA和酶切位点BamHI后化学合成全基因序列,记为PilPon。其基因全序列及编码的氨基酸序列如列表所示。具体的说,PilPon基因编码的蛋白质序列为鲍曼不动杆菌表面蛋白Pilf的28-184aa及表面蛋白ponA的406-572aa,两个蛋白序列中间以刚性连接肽(eaaakeaaak)进行连接。将此基因序列交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因化学合成,交货时该人工合成的基因片段连于载体pUC57上。将含有该段人工合成的DNA片段的载体pUC57用NdeI及BamHI进行双酶切后按常规方法回收目的片段,备用。同时采用NdeI及BamHI对载体pET-28a(+)进行双酶切,并按常规分子生物学方法将经双酶切后获得的PilPon基因连入pET-28a(+)载体中,并转化大肠杆菌TOP10,构建pET-PilPon表达载体。经酶切和序列测定证实表达载体构建无误。该载体表达重组PilPon融合蛋白。

[0097] 2.2) 鲍曼不动杆菌PilPon融合蛋白的表达与纯化

[0098] 将上述鉴定正确的阳性克隆菌培养后提取质粒,按常规技术转入感受态E.coli BL21(DE3)中,转化完成后将菌液涂布于含50 μ g/mL卡那霉素的LB平板上,按常规方法筛选表达菌株。挑取pET-PilPon转化的具有外源蛋白表达能力的单个菌落并接种入100mL LB培养基中,于37 $^{\circ}$ C培养过夜。取出菌液后,按1:100接种于100mL含有50 μ g/mL卡那霉素的LB培养基中,于30 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀=0.6时,加入1mol/L IPTG至终浓度为0.5mmol/L,于37 $^{\circ}$ C摇菌培养,诱导融合蛋白表达。诱导4h后于8000r/min下离心10min收集菌体。将此菌体用50mL Buffer A(50mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;pH7.4)洗涤3次并用50mL上样缓冲液(50mM Na₃PO₄,0.5M NaCl;5mM咪唑,pH7.4)重悬后进行超声破碎,操作条件为:功率50W,工作时间2s,间隔时间3s,报警温度60 $^{\circ}$ C,总时间30min。超声完成后,12000g离心15min分别收集沉淀和上清后进行电泳检测。发现重组PilPon融合蛋白以溶解形式存在于菌体中。薄层扫描显示,该重组蛋白占细菌总蛋白的20%以上。而将未经序列优化的野生型PilPon基因按上述同样方式进行表达,未见表达产物,说明基因优化成功,效果良好。将上述获得的超声破碎上清液用0.45 μ m的滤膜进行过滤后用His Trap affinity columns(GE healthcare公司产品),按照说明书的方法进行重组PilPon蛋白的纯化。具体方法如下:

[0099] (1) 连接层析系统,该系统包括进样管、蠕动泵(上海沪西分析仪器厂,型号DHL-A)、层析柱(GE healthcare公司产品,商品名His Trap affinity columns)及紫外检测器(上海沪西分析仪器厂,型号HD1),柱体积为2ml,预热紫外检测仪30min左右至读数稳定;

[0100] (2) 校对T%:调节光亮旋钮至显示100%;

[0101] (3) 旋转灵敏度至合适位置,一般用0.2A;

[0102] (4) 以上样缓冲液平衡层析系统,至读数稳定后旋转“调零”至显示“000”;

[0103] (5) 上蛋白样品,流速控制在5ml/min以内,收集穿透液;

[0104] (6) 用上样缓冲液洗去未结合的蛋白,此过程中记录读数,直到读数不再变化为止,收集洗脱液;

[0105] (7) 用Buffer A+10mM咪唑进行洗脱,收集洗脱峰;

- [0106] (8) 用Buffer A+20mM咪唑进行洗脱,收集洗脱峰;
- [0107] (9) 用Buffer A+40mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0108] (10) 用Buffer A+60mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0109] (11) 用Buffer A+100mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0110] (12) 用Buffer A+150mM咪唑洗脱,收集洗脱峰;
- [0111] (13) 取各洗脱峰样品100ul进行SDS-PAGE电泳;
- [0112] (14) 结果发现,目标蛋白在60mM咪唑时被洗脱下来,纯度在90%以上,经bradford试剂盒进行蛋白质浓度测定后,调整浓度为0.2mg/mL,备用。至此制得鲍曼不动杆菌PilPon融合蛋白。
- [0113] 2.3) 鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 抗体的制备
- [0114] 2.3.1) 将步骤2.2) 所制鲍曼不动杆菌PilPon融合蛋白与福氏完全佐剂混合,乳化后作为免疫原免疫雄性新西兰兔2只,每只兔子皮下注射总量为2ml,抗原总量为2mg/只。后每隔两周用PilPon融合蛋白与福氏不完全佐剂形成的乳化液免疫一次,共免疫5次,抗原用量与初次免疫相同。五免后3-5天进行心脏大量取血,置37°C 1小时,然后放冰箱4°C过夜,隔天取血清。
- [0115] 2.3.2) 多克隆抗体效价的测定
- [0116] 以PilPon融合蛋白为包被抗原,包被浓度为5 μ g/ml,每孔包被100 μ l,利用间接ELISA法检测血清抗体水平。实验组血清稀释倍数依次为:1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400、1:204800;
- [0117] ELISA板包被牛血清白蛋白作为阴性对照,用酶联检测仪测定OD450,满足P/N值>2.1为阳性。结果显示2只兔子的血清抗体效价均达到1:102400,说明免疫效果较好。
- [0118] 2.3.3) 多克隆抗体的提取
- [0119] 用GE-HiTrap Protein A HP预装柱,按说明书纯化抗体,具体操作如下:
- [0120] 2.3.3.1) 取5mL抗血清,加入0.5mL 1M Tris (pH8.0) 调节到pH8.0,20,000g离心20min除去沉淀。
- [0121] 2.3.3.2) 上柱后用10倍柱体积buffer A (100mM Tris-Cl, pH 8.0) 洗涤后,再用10倍柱体积buffer B (10mM Tris-Cl, pH 8.0) 洗涤。
- [0122] 2.3.3.3) 用大约三倍柱体积的IgG洗脱缓冲液 (100mM glycine, pH 3.0) 洗脱IgG。(收集管内先预装0.1mL IgG-中和缓冲液 (1M Tris-Cl, pH 8.0), 每管装0.9mL洗脱液)
- [0123] 2.3.3.4) 用50倍体积Tris (10mM Tris-Cl, pH 8.0) 对洗脱液进行透析。
- [0124] 2.3.3.5) 超滤浓缩后,调整浓度为5mg/ml, -70°C 保存备用。至此制得鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Pilf+ponA) 抗体。
- [0125] 实施例3
- [0126] 制备鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原 (Fhuc+OmpA) 抗体的乳胶微球标记物:
- [0127] 3.1) 乳胶微球的活化
- [0128] 取浓度为10%的红色羧基化聚苯乙烯乳胶微球 (100nm) 溶液1mL, 加入9mL 2-(N-吗啉基) 乙磺酸 (MES) 缓冲液 (0.1mol/LMES, pH8.5) 后混匀; 用MES缓冲液配制10mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 及10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐盐酸盐 (EDC) 溶液;

[0129] 将1mL NHS溶液以及1mL EDC溶液依次加入聚苯乙烯乳胶微球(100nm)溶液中,在室温下缓慢混匀30分钟,孵育结束后19000g离心20分钟,去上清,沉淀用10mL硼砂缓冲液(0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH8.5)重悬,振荡,超声处理(超声破碎仪产品型号:YJ92-IIDN,功率50W,工作时间2s,间隔时间3s,报警温度60℃,总时间30min)后即成活化后的乳胶微球。

[0130] 3.2) 乳胶微球标记物的制备

[0131] 用硼砂缓冲液(0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH8.5)将步骤1所得的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体稀释成1mg/mL。取10mL鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体加入10mL活化乳胶微球,缓慢混匀30分钟后19000g离心10分钟,去上清。沉淀用10mL含有1%酪蛋白的硼砂缓冲液重悬,经超声粉碎(超声破碎仪产品型号:YJ92-IIDN,功率50W,工作时间2s,间隔时间3s,报警温度60℃,总时间30min)后19000g重复离心1次(10分钟),去上清。沉淀同法重悬,经超声粉碎后再19000g重复离心1次(10分钟),去上清。沉淀用10mL含有1%酪蛋白的硼砂缓冲液重悬,即为鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Fhue+OmpA)抗体的乳胶微球标记物。

[0132] 实施例4

[0133] 结合垫的制备:

[0134] 将聚酯纤维膜裁成后规格为4cm×0.8cm/条,向剪裁好的膜上滴加实施例3中制备好的乳胶微球标记物32μL。喷涂完后在相对湿度为20%的环境中在37℃下烘干12h,25℃密封干燥保存。

[0135] 实施例5

[0136] 抗体固相硝酸纤维素膜的制备:

[0137] 将硝酸纤维素膜剪成4cm×2.3cm大小。将用硼砂缓冲液(0.1mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH8.5)将实施例2所得的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体及羊抗兔IgG分别稀释成1.5mg/mL及1mg/mL;将稀释好的鲍曼不动杆菌多重表位融合抗原(Pilf+ponA)抗体装入BIODOT划膜仪喷头1中,设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上,形成检测线,其与硝酸纤维素膜的边距为0.8cm;将稀释好的羊抗兔IgG装入BIODOT划膜仪喷头2中,设置1.0μl/cm的量喷于硝酸纤维素膜上作为质控线,其与检测线间距为0.7cm。包被完后将该硝酸纤维素膜放在相对湿度为20%的环境中,于37℃下烘干12h,25℃密封干燥保存。

[0138] 实施例6

[0139] 样品垫的制备:

[0140] 配制不同配方的样品垫处理液,观察乳胶微球标记抗体的释放效果,通过多次正交试验优化,得到最优的样品垫处理液配方(0.01mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 2g/L氯化钠, 20g/L酪蛋白, 10ml/L吐温-20, 10ml/L消泡剂S-17, pH 8.5)。取玻璃纤维素膜一张,将其在样品垫处理液中浸泡3h,再置于生物安全柜内37℃通风干燥12h后,剪裁成规格为4cm×3cm/条,25℃密封干燥保存,即制得样品垫。至此制得样品垫。经试验证实该样品垫的使用,大大提高了结合垫上乳胶微球标记抗体的释放率,达到了较好的应用效果。

[0141] 实施例7吸水垫的裁剪

[0142] 将购买于上海金标生物科技有限公司型号为CH37K的吸水滤纸剪裁成规格为4cm×3cm/条,备用。

[0143] 实施例8PVC板的裁剪

[0144] 将购买于上海金标生物科技有限公司型号为SM31的高白度PVC板剪裁成规格为4cm×8.5cm/条,备用。

[0145] 实施例9检测卡的组装

[0146] 如图1以及图2,将NC膜3、结合垫2、吸水垫4和样品垫1依次粘在单面PVC板5上,其中结合垫2、吸水垫4均层叠在NC膜3上,分别与NC膜3重叠约2mm,样品垫1层叠于结合2上,二者重叠约2mm。NC膜3上划有检测线T和质控线C。用切割机将粘贴好的检测板切成宽为4mm检测卡,将做好的检测卡与干燥剂一起装入铝箔袋内密封保存。

[0147] 实施例10检测卡的使用方法:

[0148] 10.1) 待检样本的处理

[0149] 按常规方法获得待检者的咽拭子,将其插入装有500 μ L的样品处理液(0.01mol/L Na₂B₄O₇, 2g/L氯化钠, 20ml/L吐温-20)的软质塑料管中,挤压塑料管壁,使拭子上的样品充分溶解。

[0150] 10.2) 加入待检样本,判定结果

[0151] 取100 μ L样品加入随机抽取组装的检测卡中,样品液中的鲍曼不动杆菌与结合垫上的乳胶微球标记的抗体结合并在层析作用下与检测线(T线)抗体结合,室温下作用10min,阳性结果出现两条红色线,即检测线T线和质控线C线;若检测样品中不含鲍曼不动杆菌,阴性结果只在质控线C线出现一条红色线,显示该样品中没有鲍曼不动杆菌。

[0152] 实施例11检测卡的性能测定:

[0153] 11.1) 特异性分析

[0154] 为了验证本发明的基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的特异性,按照实施例9及实施例10所述的检测卡的组成和使用方法对浓度均为 2×10^5 CFU/mL的6株鲍曼不动杆菌菌株及17株非鲍曼不动杆菌标准菌株进行了检测,见表1。结果表明,本发明检测卡对所有6株鲍曼不动杆菌菌株的检测结果均为阳性,而对其他17株呼吸道常见病原微生物的检测结果均为阴性。该检测卡显示出良好的特异性。

[0155] 表1

菌株名称	检测结果结果
鲍曼不动杆菌ATCC 19606	阳性
鲍曼不动杆菌ATCC 17961	阳性
鲍曼不动杆菌ATCC 19003	阳性
鲍曼不动杆菌ATCC 17957	阳性
鲍曼不动杆菌ATCC 19568	阳性
鲍曼不动杆菌ATCC 17904	阳性
人肺炎支原体ATCC 15531	阴性
铜绿假单胞菌ATCC 27853	阴性
人流感嗜血杆菌ATCC 49247	阴性
卡他莫拉菌ATCC 46327	阴性
副流感嗜血杆菌ATCC 7901	阴性
嗜肺军团菌ATCC 33152	阴性
化脓性链球菌ATCC 19615	阴性
金黄色葡萄球菌ATCC 25923	阴性
人肺炎链球菌ATCC 49619	阴性
肺炎克雷伯菌ATCC 700603	阴性
阴沟肠杆菌ATCC 13047	阴性
大肠埃希菌ATCC 25922	阴性
假丝酵母菌ATCC 10231	阴性
甲型流感病毒ATCC VR-1743	阴性
乙型流感病毒ATCC VR-790	阴性
呼吸道合胞病毒ATCC VR26	阴性
腺病毒ATCC VR-3	阴性

[0158] 同时,对浓度为 2×10^5 CFU/mL的120株鲍曼不动杆菌临床分离株用本检测卡进行检测,结果均显示阳性,显示出该检测卡对临床分离的鲍曼不动杆菌的高度检测覆盖性。

[0159] 11.2) 敏感性测定

[0160] 将鲍曼不动杆菌ATCC19606菌株接种于羊血巧克力培养基,35℃培养36小时后,生理盐水10倍梯度稀释,同时平板计数,得到菌体浓度为 10^8 - 10^3 CFU/mL的菌体溶液,然后将100μL菌体溶液滴加于样品垫上,按照实施例9及实施例10所述的检测卡组成和使用方法将

进行检测。结果表明本发明检测卡的检测敏感性为 2×10^4 CFU/mL。

[0161] 11.3) 稳定性试验

[0162] 将检测卡干燥密封后分别置于4℃、25℃、37℃，并分别在6个月，12个月，18个月，21个月，24个月后用其检测鲍曼不动杆菌ATCC19606的生理盐水稀释液，并观察结果。

[0163] 将检测卡干燥密封后，分别在4℃和25℃放置6-24个月，仍能检测到强阳性结果；在37℃放置6-18个月，也能检测到阳性结果，但当放置21-24个月，检测到的阳性结果减弱。表明该检测卡至少可在4℃或25℃保存2年。

[0164] 最后说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管通过参照本发明的优选实施例已经对本发明进行了描述，但本领域的普通技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围。

序列表

<110> 湖北工业大学

<120> 基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测法

<141> 2019-10-31

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1020

<212> DNA

<213> FhuOmp基因序列 (FhuOmp)

<400> 1

```

catatgttcg atggcaacta cctggaccgc gtagaaggta actctactga agttggtctc 60
aaatccgctt ggtttgacgg cegtetgaac ggtaccctgg ctctgtacca catcaaacag 120
gacaacctgg cacaggaagc gggccaagtt acccgtaacg gtgttaaaga gacttactac 180
cgtgcagcga aaggcgctac atccgaaggt tttgaagttg aagtatcagg tcagatcact 240
ccagattgga acatcaccgc aggttactct caatthtctg ctaaggacgc gaacgatgcg 300
gacgtaaaca ctcagcttcc gcgtaaaatg atccagagct tcactaccta taaactgcct 360
ggtaaactgg aaaacatcac agttggcggg ggcgtaaact ggcagtcttc tacctacgtg 420
aacgcaaaaa acccgaaaaa agtaatcgaa aaagttgagc agggtgacta cgctctggta 480
aacctgatgg cgcgttacca gatcactaag gactthtctg cacagcttaa cattaacaac 540
gtthtctggg gttctgggtg ttctgggtgg tctgggtggt ctctgggtta caccttccag 600
gatactcagc acaacaacgg cggtaaagac ggtgaactga ccaacgggtc ggaactgcag 660
gacgacctgt tcggtgggtg tgcgctgggt atcgaactga ctccgtggct gggthtccgaa 720
gccgagtata accaggthta gggtgacgtg gatggcctgg cagcgggtgc tgaatacaaa 780
cagaaacaga tcaacggtaa cttctacgtt accagcgacc tgattaccaa gaactatgac 840
tctaaaatca aaccgtatgt tctgctgggt gcgggacct acaaatcga aatcccggac 900
ctthtctatc acaacgacga ggaaggcact ctgggtaacg cgggtgttgg tgctthtctg 960
cgtctgaacg acgctctgtc tctgcgtacc gaagctcgtg gtacctataa ctaaggatcc 1020

```

<210> 2

<211> 336

<212> PRT

<213> FhuOmp蛋白序列 (FhuOmp)

<400> 2

```

Met Phe Asp Gly Asn Tyr Leu Asp Pro Val Glu Gly Asn Ser Thr Glu
1           5           10           15
Val Gly Leu Lys Ser Ala Trp Phe Asp Gly Arg Leu Asn Gly Thr Leu
           20           25           30
Ala Leu Tyr His Ile Lys Gln Asp Asn Leu Ala Gln Glu Ala Gly Gln

```

35	40	45
Val Thr Arg Asn Gly	Val Lys Glu Thr Tyr Tyr	Arg Ala Ala Lys Gly
50	55	60
Ala Thr Ser Glu Gly Phe	Glu Val Glu Val Ser Gly	Gln Ile Thr Pro
65	70	75
Asp Trp Asn Ile Thr	Ala Gly Tyr Ser Gln Phe	Ser Ala Lys Asp Ala
85	90	95
Asn Asp Ala Asp Val	Asn Thr Gln Leu Pro Arg	Lys Met Ile Gln Ser
100	105	110
Phe Thr Thr Tyr Lys	Leu Pro Gly Lys Leu Glu	Asn Ile Thr Val Gly
115	120	125
Gly Gly Val Asn Trp	Gln Ser Ser Thr Tyr Val	Asn Ala Lys Asn Pro
130	135	140
Lys Lys Val Ile Glu	Lys Val Glu Gln Gly Asp	Tyr Ala Leu Val Asn
145	150	155
Leu Met Ala Arg Tyr	Gln Ile Thr Lys Asp Phe	Ser Ala Gln Leu Asn
165	170	175
Ile Asn Asn Val Phe	Gly Gly Ser Gly Gly Ser	Gly Gly Ser Gly Gly
180	185	190
Ser Leu Gly Tyr Thr	Phe Gln Asp Thr Gln His	Asn Asn Gly Gly Lys
195	200	205
Asp Gly Glu Leu Thr	Asn Gly Pro Glu Leu Gln	Asp Asp Leu Phe Val
210	215	220
Gly Ala Ala Leu Gly	Ile Glu Leu Thr Pro Trp	Leu Gly Phe Glu Ala
225	230	235
Glu Tyr Asn Gln Val	Lys Gly Asp Val Asp Gly	Leu Ala Ala Gly Ala
245	250	255
Glu Tyr Lys Gln Lys	Gln Ile Asn Gly Asn Phe	Tyr Val Thr Ser Asp
260	265	270
Leu Ile Thr Lys Asn	Tyr Asp Ser Lys Ile Lys	Pro Tyr Val Leu Leu
275	280	285
Gly Ala Gly His Tyr	Lys Tyr Glu Ile Pro Asp	Leu Ser Tyr His Asn
290	295	300
Asp Glu Glu Gly Thr	Leu Gly Asn Ala Gly Val	Gly Ala Phe Trp Arg
305	310	315
Leu Asn Asp Ala Leu	Ser Leu Arg Thr Glu Ala	Arg Gly Thr Tyr Asn
325	330	335

<210> 4

<211> 1025

<212> DNA

<213> PilPon基因序列 (PilPon)

<400> 4

```

catatggcgg ttaaggtacg cactcaactg gcggtgaat atatccgttc aggtgatctg 60
gactccgcga aacgctccct ggaccaggcc ctgagcgttg actctcgtga cgcgacagca 120
aacatgatga tgggcatcct gctgcagcag gagggtctta aatctaacct ggagaaagcg 180
gagcactact tcaaactgac tatcagttct gaaccggata acgctcaggc gcgcaacaac 240
tatggtacct atctgtacca gatggaacgt tataacgacg cgattgaaca gtttcgtatc 300
gcaggtgcga ccctgggtta tgatcagcgt tatcaggcgc tggaaaacct gggccgcatc 360
tacctgaagc tgggtaacat cgccagcgtt gaaaaaactt tcaagcaggc actgctggcg 420
aaccgtgact cctacatctc tatgctggag ctggctgaaa tcttttacct gcagcaggaa 480
gctgctgctg ctaaagaagc tgetgctgct aaaggctcta tcgaagctat cgtaggtggt 540
tacaacttct accagtccaa gttaaccgtt gcgctccagg gctggcgcca gccgggctct 600
accattaaac ctttctgta cgetctggct ctggaacgtg gcatgacccc gtacagcatg 660
gtaaacgatt ctccgatcac tattggtaaa tggaccccaa aaaattctga cggccgttac 720
ctgggtatga tcccgtcgc tcgctctctg tacctgtccc gtaaacctgt atccgttcgt 780
ctgctgcaga ctgttggcat cgaacgtacc cgccaactgt ttatggattt cggctctcag 840
gaagaccaga ttccacgtaa ctacactatc gctctgggca ctccgcaggt actgccgatc 900
cagatggcta ccggtacgc tactttcgtt aatggcggct accgtgttca gccacatttc 960
atccagcgta tcgaagacgc gtatggtaaa gtaatttacg aagctaaacc ggaatataag 1020
gatcc 1025

```

<210> 4

<211> 338

<212> PRT

<213> PilPon蛋白序列 (PilPon)

<400> 4

```

Met Ala Val Lys Val Arg Thr Gln Leu Ala Ala Glu Tyr Ile Arg Ser
1           5           10           15
Gly Asp Leu Asp Ser Ala Lys Arg Ser Leu Asp Gln Ala Leu Ser Val
           20           25           30
Asp Ser Arg Asp Ala Thr Ala Asn Met Met Met Gly Ile Leu Leu Gln
           35           40           45
Gln Glu Gly Ser Lys Ser Asn Leu Glu Lys Ala Glu His Tyr Phe Lys
           50           55           60
Arg Ala Ile Ser Ser Glu Pro Asp Asn Ala Gln Ala Arg Asn Asn Tyr
65           70           75           80
Gly Thr Tyr Leu Tyr Gln Met Glu Arg Tyr Asn Asp Ala Ile Glu Gln
           85           90           95
Phe Arg Ile Ala Gly Ala Thr Leu Gly Tyr Asp Gln Arg Tyr Gln Ala

```

100	105	110
Leu Glu Asn Leu Gly Arg Ile Tyr	Leu Lys Leu Gly Asn Ile Ala Ser	
115	120	125
Ala Glu Lys Thr Phe Lys Gln Ala Leu Leu Ala Asn Arg Asp Ser Tyr		
130	135	140
Ile Ser Met Leu Glu Leu Ala Glu Ile Phe Tyr Leu Gln Gln Glu Ala		
145	150	155
Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Ser Ile Glu Ala Ile		
165	170	175
Val Gly Gly Tyr Asn Phe Tyr Gln Ser Lys Phe Asn Arg Ala Leu Gln		
180	185	190
Gly Trp Arg Gln Pro Gly Ser Thr Ile Lys Pro Phe Leu Tyr Ala Leu		
195	200	205
Ala Leu Glu Arg Gly Met Thr Pro Tyr Ser Met Val Asn Asp Ser Pro		
210	215	220
Ile Thr Ile Gly Lys Trp Thr Pro Lys Asn Ser Asp Gly Arg Tyr Leu		
225	230	235
Gly Met Ile Pro Leu Arg Arg Ala Leu Tyr Leu Ser Arg Asn Thr Val		
245	250	255
Ser Val Arg Leu Leu Gln Thr Val Gly Ile Glu Arg Thr Arg Gln Leu		
260	265	270
Phe Met Asp Phe Gly Leu Gln Glu Asp Gln Ile Pro Arg Asn Tyr Thr		
275	280	285
Ile Ala Leu Gly Thr Pro Gln Val Leu Pro Ile Gln Met Ala Thr Gly		
290	295	300
Tyr Ala Thr Phe Ala Asn Gly Gly Tyr Arg Val Gln Pro His Phe Ile		
305	310	315
Gln Arg Ile Glu Asp Ala Tyr Gly Lys Val Ile Tyr Glu Ala Lys Pro		
325	330	335
Glu Tyr		

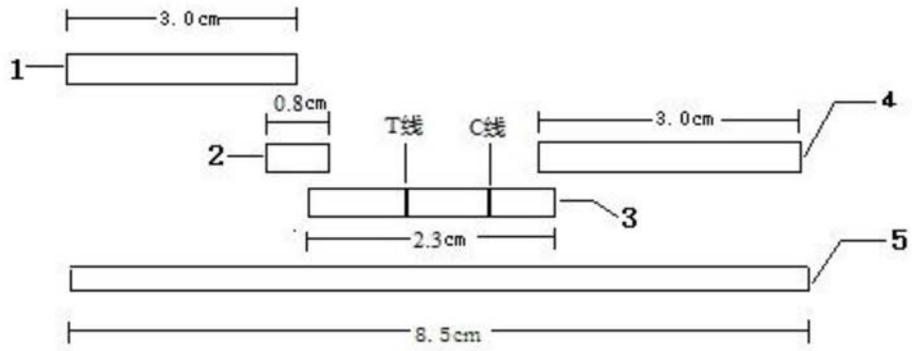


图1

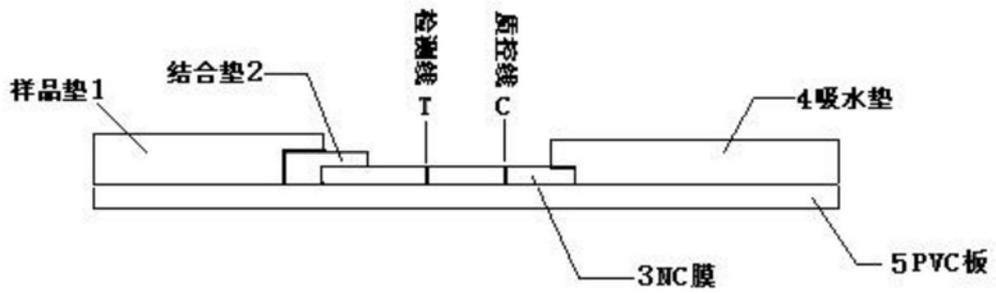


图2

专利名称(译)	基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测法		
公开(公告)号	CN110724201A	公开(公告)日	2020-01-24
申请号	CN201911053066.6	申请日	2019-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	湖北工业大学		
申请(专利权)人(译)	湖北工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖北工业大学		
[标]发明人	杨波 胡征 王毅		
发明人	杨波 胡征 王毅		
IPC分类号	C07K19/00 C12N15/62 C12N15/70 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/212 C07K2319/00 C12N15/70 G01N33/531 G01N33/56911		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于多重表位融合抗原的鲍曼不动杆菌感染快速检测卡的制备方法，该检测卡由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫、PVC板组成，结合垫上喷涂有彩色乳胶微球偶联的抗鲍曼不动杆菌表面蛋白多重表位融合抗原多克隆抗体，硝酸纤维素膜包被有抗鲍曼不动杆菌表面蛋白多重表位融合抗原多克隆抗体的检测线和羊抗兔IgG抗体的质控线。当加入的样品中含有鲍曼不动杆菌时，鲍曼不动杆菌首先与乳胶-兔抗鲍曼不动杆菌表面蛋白多克隆抗体形成复合物，在毛细作用下迁移至包被有鲍曼不动杆菌表面蛋白多克隆抗体的检测线时被捕捉，检测线呈相应的彩色，因而可检测样品中是否含有鲍曼不动杆菌。该检测卡具有快速、简捷、灵敏度高，特异性好的优点。

