



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102071205 A

(43) 申请公布日 2011.05.25

(21) 申请号 200910252895.7

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2009.12.01

A61K 39/395 (2006.01)

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

A61K 48/00 (2006.01)

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 207 号

A61P 33/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(72) 发明人 许学年 冯正 董玉婷 周岩
包意芳 徐斌

(74) 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司 31128

代理人 严新德

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

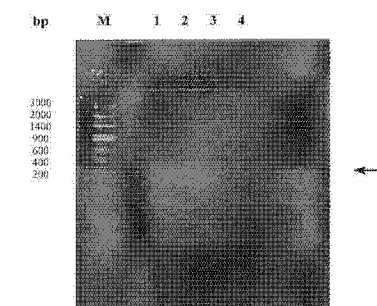
权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 7 页

(54) 发明名称

华支睾吸虫的特异性抗原及用途

(57) 摘要

本发明提供了一种华支睾吸虫的特异性抗原,还提供了特异性的结合华支睾吸虫的特异性抗原的抗体。本发明还提供了一种分离的蛋白质,由华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码。本发明还提供了一种含有一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的载体。本发明还提供了一种疫苗和试剂盒。本发明还提供了上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原、抗体、疫苗和试剂盒在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。本发明的华支睾吸虫 Cs1 抗原具有较高的免疫原性,易制备多 / 单克隆抗体,进而进一步应用于抗原检测等方面。实验动物 (小鼠) 对该抗原免疫应答较强。



1. 一种华支睾吸虫的特异性抗原,其特征在于:所述的抗原基因具有 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列、或者与 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列、或者其部分经过取代、缺失或者添加后由 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所衍生的具有抗原性的核苷酸序列。

2. 一种抗体,其特征在于:它特异性的结合权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原。

3. 如权利要求 2 所述的一种抗体,其特征在于:所述的抗体为单克隆抗体。

4. 一种分离的蛋白质,其特征在于:由权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码、或者与权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列达 90% 以上的核苷酸序列所编码、或者由部分经过取代、缺失或者添加后的权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码。

5. 如权利要求 4 所述的分离的蛋白质,其特征在于:其氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、或者对 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸后的由 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

6. 一种载体,其特征在于:所述载体含有权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因。

7. 一种宿主细胞,其特征在于:所述的细胞含有权利要求 6 所述的载体,或者所述的细胞用权利要求 1 所述的所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因转化或转染。

8. 一种疫苗,其特征在于:包括权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原、或者权利要求 2 所述的抗体、或者权利要求 4 所述的分离的蛋白质、或者权利要求 6 所述的载体。

9. 权利要求 1 所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

10. 权利要求 2 所述的抗体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

11. 权利要求 4 所述的分离的蛋白质在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

12. 权利要求 8 所述的疫苗在制备治疗、或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

13. 一种试剂盒,其特征在于:含有权利要求 1 所述的抗原、或者权利要求 2 所述的抗体。

华支睾吸虫的特异性抗原及用途

技术领域：

[0001] 本发明属于生物工程领域，尤其涉及一种华支睾吸虫，具体来说是一种华支睾吸虫的特异性抗原及用途。

背景技术：

[0002] 华支睾吸虫病 (Clonorchiasis sinensis) 是由华支睾吸虫 [Clonorchis sinensis, Cs] 感染所引起的人兽共患病。该病主要分布于亚洲，如中国、日本、韩国（为韩国主要人体寄生虫）、朝鲜、越南、东南亚等国家。估计全球有 3500 万人感染。在我国，除新疆、内蒙古、甘肃、青海、西藏、宁夏等省、自治区未见报道外，其余 25 个省、市、自治区以及台湾省和香港特别行政区都已有该病的流行报道或病例报告。由于移民的流动，以及日益频繁的 global 范围的旅游和经济活动，在一些非流行区和发达国家（包括北美和西欧）该病的病例报告也越来越多。

[0003] 根据卫生部于 2001 年 6 月～2004 年底在全国（除台湾、香港、澳门外）进行的人体重要寄生虫病现状调查结果显示，华支睾吸虫感染率比 1990 年全国寄生虫病分布调查的结果上升了 75%，其中广东、广西、吉林 3 省（区）分别上升了 182%、164% 和 630%。估计目前全国华支睾吸虫感染者达 1200 多万人。华支睾吸虫病是我国少数个别几个呈现上升趋势的寄生虫病之一，该病的防治工作已迫在眉睫。

[0004] 在我国南方（如广东、广西）及部分北方地区（如东北 3 省的朝鲜族居住区），当地人群有吃生的或未煮熟的淡水鱼肉的习惯，鱼肉中活的囊蚴被摄入人体，引起人的感染。这些地区居民虽知吃“鱼生”会感染本病，但饮食习惯一时难以改变。而且随着生活水平的提高，以往不吃或很少吃“鱼生”的人群也开始吃“鱼生”，现在生鱼片的风味吃法在非流行区，特别是大中城市也很盛行。同时由于市场开放，流行区含华支睾吸虫囊蚴的鱼运往各地，因此城镇居民感染华支睾吸虫的人数有增加的趋势。

[0005] 华支睾吸虫成虫寄生于人或其它终宿主的肝胆管内，虫体的分泌 / 代谢产物及虫体本身的机械刺激，可引起胆管，特别是引起次级胆管的炎症反应，中度感染胆管可出现局限性扩张，胆管上皮增生、管壁增厚、管腔狭窄，如合并细菌感染，可引起胆管炎和胆管肝炎，周围纤维组织增生，晚期可发生肝硬化。有证据表明，华支睾吸虫感染可增加患者患胆管癌 (CLG) 的风险，华支睾吸虫感染相关性肝胆管肿瘤是华支睾吸虫病流行区一个重要的公共卫生问题。

[0006] 为了快速诊断、及时治疗和有效控制华支睾吸虫病，需要特异、灵敏、简便的方法检测人群中华支睾吸虫的感染。

[0007] 对于华支睾吸虫病人的诊断，传统的粪便检查仍是目前确诊华支睾吸虫病的主要方法。但由于患者依从性较差，且华支睾吸虫虫卵较小易于漏检，该方法有一定的缺陷。

[0008] 目前在现场防治工作中较广泛地应用了免疫诊断方法（主要是 ELISA 法）。但是仍存在问题：对健康人有不同程度的假阳性，对华支睾吸虫病人有一定的假阴性，对其它寄生虫（血吸虫、并殖吸虫）感染也有一定的交叉反应。Yong TS 应用 ELISA 方法检测

48 例华支睾吸虫病人血清抗体,只有 75% 的阳性反应,但在 28 例正常对照和 16 例并殖吸虫病例中,分别出现了 7.1% 和 37.5% 的假阳性。

[0009] 已有研究资料表明一些寄生虫的排泄分泌抗原 (ESA) 或重组的 ESA 可应用于寄生虫病的血清学诊断。Kim SI 用 ESA 来检测活动性华支睾吸虫病病人血清相应抗体动态反应,发现 30kDa 和 7kDa 区带与患者血清呈强阳性反应,而与吡喹酮治疗 6 个月后的病人血清反应较弱,其中 7kDa 区带未见与卫氏并殖吸虫病、横川后殖吸虫病、华支睾吸虫病患者痊愈后的血清起交叉反应,特异性比 30kDa 区带更强,据此认为 7kDa 抗原可作为活动性华支睾吸虫病的标志性诊断抗原。Min-Ho CHOI 对华支睾吸虫的排泄分泌抗原 (ESA) 检测抗体的 ELISA 法和成虫粗抗原 (CA) 检测抗体的 ELISA 法的诊断价值进行了比较和评估。ESA 检测抗体的 ELISA 法的特异性显著高于用 CA 检测抗体的 ELISA 法 (前者特异性为 93.1%, 后者为 87.8%), 表明 ESA 用于检测华支睾吸虫患者血清抗体优于粗抗原。因此,与华支睾吸虫的 CA 相比,ESA 作为华支睾吸虫病的诊断抗原具有更高的特异性和敏感性。然而传统的虫源性抗原制备复杂,质量可控性较低,制备量有限,难以适应大规模查病的需求。

[0010] 此外,由于该虫寄生于肝胆管这一特定的部位,决定了宿主血清中的抗原和抗体水平较低,难以检测 (也是目前该病缺乏良好诊断试剂的原因),但在粪样中却有 ESA 的存在。Yong TS 等鉴定了与 IgE 抗体反应的华支睾吸虫抗原,发现 28kDa 的抗原与 IgE 反应最强,该蛋白也存在于粪便排泄物中。Sirisinha S 等人用单克隆抗体 ELISA (Monoclonal antibody ELISA, McAb-ELISA) 检测麝猫后睾吸虫患者粪样中的抗原,能检测的抗原最低量为 0.05ng-0.1ng。研究表明,检测患者粪样中的特异抗原,可提供早期诊断、现症患者确诊及疗效考核的依据。

[0011] 而诊断抗体或抗原的特性决定着粪样和血清中抗原或血清抗体检测等免疫学方法的诊断效果。同时由于难以取得高纯度的特异抗原或大量的天然抗原,故使用分子生物学技术,构建特异性重组抗原的技术路线是寻找合适抗原的必由之路。

发明内容:

[0012] 本发明的目的在于提供一种华支睾吸虫的特异性抗原及用途,所述的这种抗原及用途要解决现有技术中诊断华支睾吸虫病的特异性和敏感性不高等技术问题。

[0013] 本发明提供了一种华支睾吸虫的特异性抗原,所述的抗原基因具有 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列、或者与 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列同源性达 90% 以上的核苷酸序列、或者其部分经过取代、缺失或者添加后由 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列所衍生的具有抗原性的核苷酸序列。

[0014] 本发明还提供了一种抗体,它特异性的结合上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原。

[0015] 进一步的,所述的抗体为单克隆抗体。

[0016] 本发明还提供了一种分离的蛋白质,由上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码、或者与上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列达 90% 以上的核苷酸序列所编码、或者由部分经过取代、缺失或者添加后的上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码。

[0017] 进一步的,所述的分离的蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示、或者对 SEQ ID

NO :2 所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或者几个氨基酸后由 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列所衍生的氨基酸序列。

[0018] 本发明还提供了一种载体,所述的载体含有上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因。

[0019] 本发明还提供了一种宿主细胞,所述的细胞含有上述的载体,或者所述的细胞用上述的所述的一种华支睾吸虫的特异性抗原基因转化或转染。

[0020] 本发明还提供了一种疫苗,包括上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原、或者上述的抗体、或者上述的分离的蛋白质、或者上述的载体。

[0021] 本发明还提供了上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0022] 本发明还提供了上述的抗体在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0023] 本发明还提供了上述的分离的蛋白质在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0024] 本发明还提供了上述的的疫苗在制备治疗、或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。

[0025] 本发明还提供了一种试剂盒,含有上述的抗原、或者上述的抗体。

[0026] 本文中的术语“表达载体”,是指本领域中常用的细菌质粒、酵母质粒及其它各种病毒载体。本发明中适用的载体包括但不限于:在细菌中表达用的载体(原核表达载体)、在酵母中表达用的载体(如毕赤酵母载体)、在哺乳动物细胞中表达用的载体(逆转录病毒载体、腺病毒载体等)。在一优选实施方式中,所述表达载体为大肠杆菌表达载体。本领域技术人员可利用 DNA 重组技术等一系列技术,构建含本发明所述编码融合蛋白的 DNA 序列、合适的转录和翻译调控序列、启动子及选择性标记基因等特定元件的表达载体。上述载体可用来转化、转染合适的宿主细胞,以便获得所需要的融合蛋白。

[0027] 本发明的宿主细胞可以是原核细胞,也可以是真核细胞,如,细菌细胞、哺乳动物细胞等。宿主细胞在转化或转染含本发明所述编码融合蛋白的基因序列后,即构成工程化细胞或细胞株,可用于生产所需融合蛋白。本领域技术人员能够恰当地选择适当的载体、宿主细胞,并熟知如何将载体高效地转化或转染入宿主细胞中,所用方法包括但不限于:氯化钙法、电穿孔法用于细菌细胞,脂质体包裹、电融合法用于哺乳动物细胞等真核细胞。

[0028] 本发明的宿主细胞可以通过常规方法培养、诱导来表达所需要的融合蛋白,包括发酵过程和纯化工艺。上述表达的蛋白可在细胞内、细胞膜上或分泌到细胞周质、细胞外。根据需要,可利用融合蛋白的物理的、化学的以及其它生物学特性,进行分离纯化。方法包括但不限于:裂菌,离心,盐析,分子筛色谱,离子交换色谱,吸附色谱,反向色谱,以及常规的变性、复性处理等,这些方法均是本领域技术人员所熟知的。

[0029] 本发明通过对本发明人构建的华支睾吸虫成虫 cDNA 表达文库,用采自广西壮族自治区的华支睾吸虫病人混合血清,使用免疫筛选法筛出华支睾吸虫 Cs1 抗原。经同源性比较,本发明的华支睾吸虫 Cs1 抗原是迄今为止还没有公开的华支睾吸虫新颖的特异性抗原。通过华支睾吸虫 Cs1 抗原的表达纯化,已进一步建立了高特异性和敏感性的华支睾吸虫病诊断初步方法;并易制备多/单克隆抗体,可应用华支睾吸虫病的科研和防治等不同

方面;本发明的疫苗具有预防华支睾吸虫感染的效果。本发明的试剂盒还可以用来检测华支睾吸虫病。

附图说明:

[0030] 图1是华支睾吸虫抗原Cs15'RACE扩增cDNA片段1%凝胶电泳图,M:DNA marker,1-4:扩增cDNA片段(约200bp)。

[0031] 图2是pBluescript SK_Cs1噬菌粒EcoRI/XhoI双酶切1%凝胶电泳图,M1: λ DNA/HindIII+EcoRI Marker,M2: Φ X174DNA/BsuRI(HaeIII)Marker,1-2:pBluescript SK_Cs1噬菌粒EcoRI/XhoI双酶切结果(在160bp处,尚有一条不清晰的条带)。

[0032] 图3是pET28a NcoI/HindIII双酶切和Cs1-NcoI PCR扩增1%的琼脂糖凝胶电泳,M:DNA Marker;1-2:pET28a NcoI/HindIII双酶切结果;3-4:Cs1-NcoI PCR扩增结果(约610bp)。

[0033] 图4是pET28a-CS1-NCOI质粒NcoI/HindIII双酶切1%的琼脂糖凝胶电泳图,其中,M:DNA Marker;1:pET28a-CS1-NCOI质粒NcoI/HindIII双酶切结果。

[0034] 图5是pET28b-CS1 BL21(DE3)重组蛋白表达鉴定16%的聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);1:pET28b-CS1 BL21(DE3)未诱导;2:pET28b-CS1 BL21(DE3)诱导;3:诱导上清;4:诱导沉淀。

[0035] 图6是pET28a-CS1-NcoI BL21(DE3)重组蛋白表达鉴定16%的聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);1:pET28a-CS1-NcoI BL21(DE3)未诱导;2:pET28a-CS1-NcoI BL21(DE3)诱导;3:诱导上清;4:诱导沉淀。

[0036] 图7是pET28b-CS1 BLR(DE3)重组蛋白表达鉴定12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);1:pET28b-CS1 BLR(DE3)未诱导;2:pET28b-CS1 BLR(DE3)诱导;3:诱导上清;4:诱导沉淀。

[0037] 图8是pET28a-CS1-NcoI BLR(DE3)重组蛋白表达鉴定12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);1:pET28a-CS1-NcoI BLR(DE3)未诱导;2:pET28a-CS1-NcoI BLR(DE3)诱导;3:诱导上清;4:诱导沉淀。

[0038] 图9是pET28a-CS1DS-NcoI B21(DE3)重组蛋白表达鉴定12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,,其中,M:Protein Marker(FERMENTAS MBI);1:pET28a-CS1DS-NcoI BL21(DE3)未诱导;2:pET28a-CS1DS-NcoIBL21(DE3)诱导;3:诱导上清;4:诱导沉淀。

[0039] 图10是pET28b-CS1 BL21(DE3)不可溶性蛋白纯化12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein marker;1:流出液(F)pH8.0;2-4:Buffer C液1、3、5管(pH6.3);5-9:Buffer D液1-5管(pH5.9);10-14:Buffer E液1-5管(pH4.5),其中,pET28b-CS1 BL21(DE3)不可溶性蛋白集中在pH4.5的洗脱液中。

[0040] 图11是pET28b-CS1 BL21(DE3)可溶性蛋白纯化12%聚丙烯酰胺凝胶电泳图,M:Protein marker;1:pET28b-CS1未诱导;2:pET28b-CS1 IPTG诱导3:Ni-NTA纯化流出液(不含咪唑);4-7:含20mM咪唑洗涤液管1、3、5、7;8-9:含50mM咪唑洗脱液1、2管;10-11:含100mM咪唑洗脱液1、2管;12-14:含250mM咪唑洗脱液1、2、3管,其中,pET28b-CS1 BL21(DE3)可溶性蛋白集中在含50-250mM咪唑的洗脱液中。

[0041] 图12是pET28a-CS1-NcoI BL21(DE3)可溶性与不可溶性蛋白纯化12%聚丙烯

酰胺凝胶电泳图, M:Protein marker; 1:流出液 (F); 2-8:含 250mM 咪唑可溶性蛋白洗脱液 1-7 管; 9-14:不可溶性蛋白 Buffer E 液 1-6 管 (pH4.5), 其中, pET28a-CS1-NcoI BL21 (DE3) 可溶性蛋白集中在含 250mM 咪唑的洗脱液中。不可溶性蛋白集中在在 pH4.5 的洗脱液中。

[0042] 图 13 是 pET28b-CS1 DS-NcoI BL21 (DE3) 可溶性蛋白纯化 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图, pET28b-CS1DS-NcoI BL21 (DE3) 可溶性蛋白集中在含 100-250mM 咪唑的洗脱液中。其中, M:Protein marker; 1:Ni-NTA 纯化流出液; 2-3:含 20mM 咪唑洗涤液 2、4 管; 4-6:含 50mM 咪唑洗脱液 1-3 管; 7-9:含 100mM 咪唑洗脱液 1-3 管; 10-14:含 250mM 咪唑洗脱液 1-5 管。

[0043] 图 14 是 pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白检测血清抗体散点图。

[0044] 为了便于理解, 以下将通过具体的实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是, 这些描述仅仅是示例性的描述, 并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述, 本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见了, 而这些等价修改, 均应属于本发明所限定的范围。

具体实施方式

[0045] 以下所述实验方法, 没有具体说明的, 均按照《分子克隆实验指南》, 2002 年, 科学出版社) 所述方法进行。

[0046] 实施例 1 华支睾吸虫成虫 cDNA 文库的构建

[0047] 用采自广西壮族自治区的华支睾吸虫囊蚴, 通过灌胃法感染猫 5 只。40 天后, 检查粪便虫卵, 然后剖杀, 收集华支睾吸虫成虫, 用灭菌的生理盐水冲洗干净, 液氮保存。

[0048] 利用 TRIzol (GIBCO/BRL 公司) 试剂盒抽提华支睾吸虫成虫 (1 克华支睾吸虫成虫压积, 液氮保存) 的总 RNA。

[0049] 采用 mRNA 纯化试剂盒 (mRNA Purification Kit, Amersham 公司), 从提取的总 RNA 中纯化 mRNA。具体步骤见产品说明书。

[0050] 华支睾吸虫成虫 cDNA 文库采用定向克隆法, 利用 ZAP-cDNASynthesis Kit (Stratagene 公司) 构建。参照试剂盒说明书操作, 主要过程包括:

[0051] 1. cDNA 第一链的合成, 应用含有 Xho I 内切酶位点的多聚 T 引物, 为了使 cDNA 第一链在合成过程中不受限制性内切酶的破坏, 用 5- 甲基 dCTP 替代 dNTP 中的 dCTP, 使合成的 DNA 半甲基化, 从而在 Xho I 消化 cDNA 时, 只有位于多聚 T 引物内的非甲基化位点可被裂解;

[0052] 2. cDNA 第二链的合成, 由 RNase H 消化第一链合成产物 mRNA-DNA 杂合体中的 RNA, 产生的 cDNA 片段作为引物在 DNA 聚合酶 I 作用下合成第二链;

[0053] 3. 用 Pfu DNA 聚合酶将合成的双链 cDNA 的末端补平, 之后在补平的双链 DNA 的 5' 端加上含有 EcoR I 酶切位点的接头 (adaptor), 并使接头磷酸化;

[0054] 4. 用限制性内切酶 Xho I 消化, 消化后的双链 DNA 通过 SepharoseCL-2B 凝胶柱层析, 进行分级分离, 去除游离接头;

[0055] 5. 将分离后的 DNA 片段合并浓缩, 连接到 Uni-ZAP XR 载体上;

[0056] 6. 最后用包装抽提液 (GigapackIII Gold Packing Extract, Stratagene) 包装

噬菌体蛋白外壳。

[0057] 华支睾吸虫成虫 cDNA 文库构建完成后,进一步对文库滴度及插入片段平均长度等进行检测。

[0058] 检测计算结果,华支睾吸虫成虫 cDNA 文库的滴度为 1.43×10^6 pfu/ml。

[0059] 从文库中随机挑取 16 个重组克隆进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物鉴定。重组克隆扩增片段长度范围在 0.6kb ~ 2kb。平均插入片段长度为 1.1kb。

[0060] 重组插入率为 99.6%。

[0061] 实施例 2cDNA 文库的免疫筛选

[0062] 噬菌体感染:

[0063] 取 XL1-blue MRF' 菌液 200 μ l 与适量 cDNA 文库噬菌体液混合(根据文库滴度预先确定,约 3000 噬菌斑/每板),37℃温育 15 分钟后,加入 3ml 48℃的上层琼脂(top agar)混匀,立即铺于 NZY 培养基平板上。室温下凝固 10 分钟,于 42℃孵育。

[0064] 融合蛋白的诱导表达:

[0065] 观察到噬菌斑出现后(约 3.5 小时),用经 IPTG(15mM/L)浸泡 30 分钟的硝酸纤维素膜(Hybond-C extra, Amersham, NC)覆盖平板,于 37℃再培育 3.5 小时;取出平板 4℃冷却 15 分钟,然后用针在膜以及板上做上标记。将膜取下置于 TBST 中洗 3 次,每次 10 分钟,然后浸于 NC 膜浸在封闭液中,室温,轻微振荡,封闭过夜。

[0066] 将 NC 膜从封闭液中取出,用 TBST 洗膜 2 次,每次 5 分钟。加入华支睾吸虫病人混合血清(采自广西壮族自治区)(5ml/膜)室温下轻微振荡 3 小时。再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 分钟。加入二抗(5ml/膜)即羊抗人碱性磷酸酶结合物(AP-GAH, BIO-RAD, 1 : 3000 稀释)室温下反应 1 小时,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 分钟,用 TBS 洗膜 2 次,每次 5 分钟,洗去残留的 Tween20。

[0067] 将 NC 膜从 TBS 中取出,用 Whatman 3MM 的滤纸吸干多余的溶液,放入 AP buffer 浸泡 NC 膜 3 分钟。

[0068] 用 Color Development Solution 稀释 NBT 至终浓度 0.3mg/ml, BCIP 终浓度为 0.15mg/ml(BCIP 应逐滴加入已稀释的 NBT 中,防止沉淀形成。),配制成 NBT-BCIP 显色液。将 NC 膜浸入 NBT-BCIP 显色液中,在暗处进行显色反应直到阳性斑点清晰可见。终止显色反应。

[0069] 根据 NC 膜上阳性斑点在原培养板上的相应位置,挑取阳性噬菌斑,再经过复筛、三筛使得阳性噬菌体单克隆化。

[0070] 实施例 3 噬菌体删除环化为 pBluescript SK_噬菌粒及提取噬菌粒

[0071] E. coli XL1-blue MRF' 于 LB 培养基(含有 10mM MgSO₄, 0.2%麦芽糖, 15 μ g/ml Tet) 中培养过夜。次日,取培养液 100 μ l 转接到新的 LB 培养基中,37℃, 200rpm 振荡培养约 2 小时。培养液经 2000g, 离心 10 分钟,沉淀细菌,用 10mM MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ = 1.0。在细菌培养管中加入 200 μ l E. coli XL1-blue MRF' 重悬液、50 μ l 含有阳性噬菌体的 SM buffer 和 1 μ l 辅助噬菌体。将细菌培养管放置于 37℃水浴中 15 分钟。然后加入 3ml LB, 于 37℃振荡培养 5 小时。取出细菌培养管,在 65℃加热 20 分钟,然后 3000g, 离心 15 分钟,将上清转入一个新离心管中,置于 4℃保存。

[0072] SOLR 菌于 LB 培养基(含有 10mM MgSO₄, 50 μ g/ml Kan) 中振荡培养,然后 2000g,

离心 10 分钟,用 10mM MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ = 1.0,在 1.5ml Ep 离心管中加入 200 μl SOLR 和上述制备的上清保存液 1 μl,在 37℃温育 15 分钟,然后取出 25 μl 均匀涂布于 LB(含 100 μg/ml Amp)琼脂平板上,37℃倒置培养过夜。

[0073] 培养基上生长的菌落,即为含华支睾吸虫 cDNA 插入片段的 pBluescript SK₋噬菌粒的 SOLR 菌落。

[0074] 使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒[爱思进生物技术(杭州)有限公司]提取 pBluescript SK₋噬菌粒。

[0075] 实施例 4Cs1 抗原基因的分离

[0076] 使用华支睾吸虫病人混合血清(采自广西壮族自治区)筛选华支睾吸虫成虫(采自广西壮族自治区)cDNA 文库(使用 Stratagene 公司的 The ZAP-cDNA synthesis Synthesis Kit 构建),获得的阳性克隆,经删除环化为 pBluescript SK₋Cs1。由上海 Invitrogen 公司测序,得到华支睾吸虫 Cs1 抗原基因的部分 mRNA 序列(如 SEQ ID NO:6 所示)。使用 Invitrogen 公司的试剂盒(5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends),使用下列引物(GSP1:TGCGACCATCCGCATCG;GSP2:GATGTGCTCGAGCCTGAAG,上海 Invitrogen 公司合成)反转录并扩增的 cDNA 片段,插入 pGEM-T Easy Vector(Promega 公司),经测序(由上海 Invitrogen 公司测序),获得华支睾吸虫 Cs1 抗原基因的全长序列,如 SEQ ID NO:1 所示,共 733 碱基,23 位为起始子(ATG),617 位为终止子(TAG),推导的 Cs1 抗原氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示,Cs1 抗原含 198 个氨基酸。Cs1 5' RACE 扩增 cDNA 片段 1%凝胶电泳图如图 1 所示。

[0077] 实施例 5 表达载体的构建

[0078] 1. pET28b-Cs1 表达载体的构建

[0079] 将 pBluescript SK₋Cs1 噬菌粒,用 EcoRI/XhoI(NEB 公司)限制性内切酶作部分双酶切,37℃反应 15 分钟。

[0080] 酶切产物在 1%的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下切割分离的目的片段,用 E. Z. N. A. Ultra-**Sep**® Gel Extraction Kit(Omiga 公司)纯化回收目的片段(718bp)。因 Cs1 抗原基因在 pBluescript SK₋中插入片段含有两个 XhoI 酶切位点,所以在部分酶切的条件下,插入片段呈现三个片段(718、559 和 159bp),如图 2 所示。

[0081] pET28b 表达载体同样用 EcoRI/XhoI(NEB 公司)限制性内切酶作双酶切,37℃反应过夜。酶切产物在 1%的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下切割分离的目的片段,用 E. Z. N. A. Ultra-**Sep**® Gel Extraction Kit(Omiga 公司)纯化回收。

[0082] 将目的片段和载体片段按 8:1 摩尔比进行连接,连接体系中含 T4DNA 连接酶(NEB 公司)1ul,10×T4 ligase buffer 2ul,去离子水,目的片段和载体片段共计体积为 20ul 于 1.5ml Eppendorf 管中 16℃连接过夜,构建成 pET28b-Cs1 的原核表达的重组质粒。

[0083] 取连接的 pET28b-CS1 重组质粒与刚溶化的 E. coli DH5α 感受态细胞(天根公司)混合,冰浴 30 分钟,于 42℃热激 1 分钟,再经冰浴放置 3min,无菌条件下加入 1ml 的 SOC 培养基,37℃,200rpm,振荡培养 1 小时。然后,将菌液于 3500rpm,离心 3 分钟,弃去部分上清,留约 100 μl 重悬菌体。将重悬液涂布于 LB 平板(含 50 μg/ml 的 Kan)上,待吸收后于 37℃倒置培养过夜。

[0084] 转化的 DH5a 细菌在 LB 培养基(含 50 μg/ml 的 Kan),200rpm,振荡培养过夜。将

菌液于 3500rpm, 离心 10 分钟, 收集细菌。使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒 [爱思进生物技术 (杭州) 有限公司] 提取质粒, 并由上海 Invitrogen 公司测序, 证实目的片段插入正确。

[0085] 取提取的 pET28b-CS1 重组质粒再次转化 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞 (Novagen 公司), 方法同上。该重组蛋白 (pET28b-CS1 重组质粒) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :3 所示。

[0086] 2. pET28a-CS1-NcoI 表达载体的构建

[0087] 根据 Cs1 基因的序列, 设计如下引物 (由上海 Invitrogen 公司合成) :

[0088] PF-CS1-NCOI :

[0089] 5' CATGCCATGGGGATGAAACCGCAACTTGATATAC 引入 NcoI 位点

[0090] PR-CS1-NCOI :

[0091] 5' CCCAAGCTTTGATATGATTCTTCGTAGAAT 引入 HindIII 位点

[0092] 以 pBluescript SK_Cs1 噬菌粒为模板, 进行 PCR 扩增。反应体系 50ul, 其中模板 0.2ul, 双向引物各 1ul, dNTP (赛百胜公司) 1ul, 10×buffer 5ul, platinum Taq 酶 (Invitrogen 公司) 0.5ul, 50mM 镁离子 1.5ul, 去离子水 39.8ul。反应条件为预变性 95℃ 5 分钟; 变性 95℃ 1 分钟; 退火 50℃ 1 分钟; 复性 72℃ 1 分钟; 循环 30 次, 最后一个循环复性延长至 7 分钟, 样品保存于 4℃。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (如图 3 所示), 在紫外灯下切割分离的目的片段, 用 E. Z. N. A. Ultra-Sep® Gel Extraction Kit (Omega 公司) 纯化回收。

[0093] pET28a 表达载体质粒, 用 NcoI、HindIII 限制性内切酶 (NEB 公司) 酶切过夜; 使用小牛肠碱性磷酸酶 (CIP, NEB 公司) 去磷酸化。酶产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (如图 3 所示), 在紫外灯下切割分离的目的片段, 用 E. Z. N. A. Ultra-Sep® Gel Extraction Kit (Omega 公司) 纯化回收。

[0094] 纯化回收的 Cs1-NcoI PCR 片段同样使用 NcoI、HindIII 限制性内切酶双酶切。并使用上述同样方法回收。

[0095] 将目的片段和载体片段按 8 : 1 摩尔比进行连接, 连接体系中含 T4DNA 连接酶 (NEB 公司) 1ul, 10×T4 ligase buffer 2ul, 去离子水, 目的片段和载体片段共计体积为 20ul 于 1.5ml Eppendorf 管中 16℃ 连接过夜, 构建成 pET28b-CS1-NcoI 的原核表达的重组质粒。

[0096] 连接好的表达载体转化至 DH5a, 提取质粒后, 验证插入序列无误。并进一步转化 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞。该重组蛋白 (pET28b-CS1-NcoI 重组质粒) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :4 所示。

[0097] 3. pET28a-CS1DS-NcoI 表达载体的构建

[0098] 以 Pci I、Hind III 限制性内切酶 (NEB 公司) 酶切 pET28a-CS1-NCOI 质粒。凝胶电泳共有四个片段 : 76bp、526bp、2260bp、3000bp (如图 4 所示), 用 E. Z. N. A. Ultra-Sep® Gel Extraction Kit (Omega 公司) 割胶纯化 526bp 片段, 与 pET28a 表达载体质粒 (NcoI、Hind III 限制性内切酶双酶切) 连接。连接好的表达载体转化至 DH5a, 提取质粒, 验证插入序列无误后, 并进一步转化 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞。pET28a-CS1DS-NcoI 重组蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :5 所示。

[0099] 实施例 6 重组蛋白的表达鉴定及纯化

[0100] 转化好的表达宿主菌接种于 4ml 的 LB 培养基（含 50 μ g/ml 的 Kan）中，于 37℃，200rpm，振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 时，取出 2ml 菌液加入 2 μ l 1M 的 IPTG 进行诱导，剩余的 2ml 菌液不加 IPTG 作为对照，37℃，200rpm，振荡培养 4 小时。将培养好的菌液于 4℃，经 5000rpm 离心 10 分钟收集菌体，弃去上清。向诱导管和对照管中分别加入 200 μ l 0.15M 的 PBS 重悬菌体。分别从诱导管和对照管中取出 5 μ l 的重悬液，加入 2×SDS-PAGE 加样缓冲液 5 μ l，混匀后于 100℃煮沸 5 分钟变性。以 8 μ l/孔样品进行 SDS-PAGE 分析（浓缩胶为 5%，分离胶为 12%或 16%）。电泳条件为浓缩胶 80V，分离胶 100V。电泳结束后，用染色液染色 4 小时，再用脱色液脱色，直到蛋白条带清晰可见。

[0101] 结果：

[0102] pET28b-CS1BL21 (DE3) 在 1mM 的 IPTG 条件下 37℃诱导，在 43KD 处可见明显的重组蛋白条带。该重组蛋白主要位于沉淀中，少量位于上清。如图 5 所示。

[0103] pET28a-CS1-NcoI BL21 (DE3) 在 1mM 的 IPTG 条件下 37℃诱导，在 42KD 处可见明显的重组蛋白条带。该重组蛋白主要位于沉淀中，少量位于上清。如图 6 所示。

[0104] pET28b-CS1、pET28a-CS1-NcoI 在 E. coli BLR(DE3) 表达宿主菌 (NOvagen 公司) 中也可经诱导产生大量的重组蛋白，如图 7、8 所示。

[0105] pET28a-CS1DS-NcoI BL21 (DE3) 在 1mM 的 IPTG 条件下 37℃诱导，在 42KD 处可见明显的重组蛋白条带。该重组蛋白主要位于上清中，如图 9 所示。

[0106] 重组蛋白的纯化

[0107] 诱导后的菌液 (500ml) 经 4000rpm, 4℃，离心 10 分钟，弃尽上清。按每克细菌糊加入 5ml 的比例，向菌体中加入 BugBuster®蛋白抽提剂 (NOvagen 公司)，并加入 5Kunit Lysozyme (每克细菌糊，NOvagen 公司) 以及 125u Benzoylase 核酸酶 (每克细菌糊，NOvagen 公司)，充分悬浮沉淀后，室温振荡 30min。然后于 4℃，9000rpm 离心 10 分钟。

[0108] 可溶性蛋白的纯化

[0109] 取 1ml 的 Ni-NTA Agarose (Qiagen 公司) 装柱，加入大量 0.15M 的 PBS 冲洗，除去残留的乙醇。

[0110] 将离心后的诱导细菌上清液加入到已经处理好的 Ni-NTA Agarose 中，置于摇床上，室温振荡 60-90 分钟，使蛋白与 Ni-NTA Agarose 充分结合。

[0111] 停止振荡后，待 Ni-NTA Agarose 沉降，打开柱子下面的塞子，收集流出的液体。

[0112] 用 4 倍床体的 Washing Buffer 洗柱两次，收集流出的液体。

[0113] 然后用 2-4 倍床体的含不同浓度咪唑的 Elution Buffer 洗涤柱子，分别收集洗脱液。

[0114] 将收集的液体进行 SDS-PAGE 电泳检测分析，检测蛋白纯化的效果。

[0115] 不可溶性蛋白的纯化

[0116] 取 1ml 的 Ni-NTA Agarose (Qiagen 公司) 装柱，加入大量 0.15M 的 PBS 冲洗，除去残留的乙醇。然后加入 2 倍床体的 Buffer B 平衡。

[0117] 将离心后的诱导细菌沉淀物，按每克 5ml 的比例加入 Lysis Buffer B (pH8.0) 混匀，室温振荡 30-60 分钟。然后，经 9000rpm, 4℃，离心 10 分钟。取保留上清液加入到已经处理好的 Ni-NTA Agarose 中，置于摇床上，室温振荡 60 分钟，使蛋白与 Ni-NTA Agarose 充分

结合。

[0118] 停止振荡后,待 Ni-NTA Agarose 沉降,打开柱子下面的塞子,收集流出的液体。

[0119] 然后用 2-4 倍床体的不同 pH 值的 Buffer C、D、E 洗涤柱子,分别收集洗脱液。

[0120] 将收集的液体进行 SDS-PAGE 电泳检测分析,检测蛋白纯化的效果。结果如图 10、11、12 和 13 所示。

[0121] 实施例 7 酶联免疫吸附试验检测抗体

[0122] 1. 间接 ELISA 方法检测血清中的抗体

[0123] 用重组蛋白包被酶标板 (Nunc 公司,96 孔板),4℃过夜;1% BSA37℃封闭 1 小时;分别加入 1 : 100 稀释的华支睾吸虫病人、正常人血清 100ul,37℃反应 1.5 小时;加入 100 μ l 的 HRP 标记羊抗人 IgG (Sigma 公司,1 : 10000 稀释),37℃反应 1 小时;加入底物 TMB (天根公司)显色,酶标仪 450nm 读取数值。

[0124] 重组蛋白抗原检测抗体效果的初步评价

[0125] 随机选取采自广西横县的华支睾吸虫病人血清 10 份混合为阳性混合血清,随机抽取 10 份采自华支睾吸虫病非流行区的广西靖西市的正常人血清混匀为阴性混合血清。重组抗原 pET28b-CS1 的可溶性纯化蛋白、不可溶性纯化蛋白、pET28a-CS1-NcoI 的可溶性纯化蛋白、不可溶性纯化蛋白的包被浓度分别为 4、2、4 和 4ug/ml,每孔 100ul。以上述间接 ELISA 方法检测血清中的抗体。

[0126] 结果如下:

[0127]	包被抗原	混合阳性 血清 OD 值	混合阴性 血清 OD 值	阴阳性 OD 值的 比值
	pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白	0.496	0.066	7.57
	pET28b-CS1 可溶性纯化蛋白	0.532	0.142	3.76
	pET28a-CS1-NcoI 不可溶性纯化 蛋白	0.496	0.090	5.54
	pET28a-CS1-NcoI 可溶性纯化蛋 白	0.499	0.117	4.28

[0128] 结果表明 4 类纯化的重组蛋白均可较好的区分混合阳性血清和阴性血清。

[0129] 2. pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白检测抗体效果的进一步评价

[0130] 对采自广西横县的 35 份华支睾吸虫病人血清,采自华支睾吸虫病非流行区的广西靖西市的 36 份正常人血清,15 例血吸虫病人血清和 9 例肺吸虫病人血清,以上述间接 ELISA 方法检测血清中的抗体。重组抗原 pET28b-CS1 的不可溶性纯化蛋白的包被浓度分别为 10ug/ml,每孔 100ul。

[0131] ELISA 结果如下:

[0132] 36 份正常人血清平均 OD 值 = 0.057, SD = 0.0234 (去除一个离散较远的数值)。以均值的 2.1 倍为判断标准,OD 值大于 0.120 为阳性。36 份粪检阴性的正常人血清中,

有 2 例大于 0.120。以 pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白检测抗体的 ELISA 方法的特异性 = $34/36 \times 100\% = 94.4\%$ 。

[0133] 35 份粪检阳性血清平均 OD 值 = 0.362, SD = 0.234, 其中 30 例血清 OD 值大于 0.120。建立的 ELISA 方法的敏感性 = $30/35 \times 100\% = 85.7\%$ 。

[0134] 本 ELISA 方法的总符合率 = $(34+30)/(36+35) \times 100\% = 90.1\%$ 。

[0135] 15 例血吸虫病人血清和 9 例肺吸虫病人血清的 OD 值均小于 0.120, 无一呈现假阳性。该 ELISA 方法特异性较高, 与血吸虫、肺吸虫抗体无交叉反应。

[0136] pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白检测各类血清中的特异性抗体的散点图见图 14。

[0137] pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白检测血清中特异性抗体间接 ELISA 结果

诊断样品	OD 值	阳性界值	样品	阳性	阴性
	($\bar{x} \pm SD$)	(阴性均值 2.1 倍)	数	数	数
[0138]	华支睾吸虫病人血清	0.362 ± 0.234	35	30	5
	正常人血清	0.057 ± 0.023	36	2	34
	血吸虫病人血清	0.059 ± 0.029	15	0	15
	肺吸虫病人血清	0.040 ± 0.014	9	0	9

[0139] 实施例 8 华支睾吸虫 Cs1 抗原免疫原性检测

[0140] 选用 pET28b-CS1 不可溶性和可溶性纯化蛋白, 分别免疫 6 只 Balb/c 小鼠。每鼠接种抗原 30ug, 首次接种使用福氏完全佐剂 (Sigma 公司), 皮下注射; 每隔 3 周, 使用福氏不完全佐剂 (Sigma 公司) 加强, 腹腔注射, 共强化免疫 4 次。取小鼠尾血, 间接 ELISA 方法检测小鼠免疫血清 (分别以 pET28b-CS1 不可溶性和可溶性纯化蛋白 2ug/ml 浓度, 100ul 包被酶标板, 二抗为 Sigma 公司的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 1 : 5000 稀释)。

[0141] 结果:

[0142] 以 pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 用 pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白 2ug/ml 浓度, 100ul 包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测。平均 OD 值为 0.710, SD 为 0.033; 正常小鼠及 PBS 空白对照的 OD 值分别为 0.055、0.055。

[0143] 以 pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 用 pET28b-CS1 可溶性纯化蛋白 2ug/ml 浓度, 100ul 包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测。平均 OD 值为 0.677, SD 为 0.017; 正常小鼠及 PBS 空白对照的 OD 值分别为 0.077、0.056。

[0144] 以 pET28b-CS1 可溶性纯化蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 用 pET28b-CS1 可溶性纯化蛋白 2ug/ml 浓度, 100ul 包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测。平均 OD 值为 0.641, SD 为 0.020; 正常小鼠及 PBS 空白对照的 OD 值分别为 0.077、0.056。

[0145] 以 pET28b-CS1 可溶性纯化蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 用 pET28b-CS1 不可溶性纯化蛋白 2ug/ml 浓度, 100ul 包被酶标板, 间接 ELISA 方法检测。平均 OD 值为 0.685, SD 为 0.021; 正常小鼠及 PBS 空白对照的 OD 值分别为 0.055、0.055。

[0146] 具体结果如下表所示:

[0147] pET28b-CS1 重组纯化蛋白免疫效果间接 ELISA 检测结果

[0148]

免疫抗原		可溶性纯化蛋白	不可溶性纯化蛋白	可溶性纯化蛋白	不可溶性纯化蛋白
免疫鼠编号	1	0.628	0.702	0.712	0.742
	2	0.611	0.661	0.654	0.694
	3	0.642	0.664	0.669	0.690
	4	0.634	0.656	0.674	0.654
	5	0.672	0.683	0.698	0.735
	6	0.661	0.693	0.704	0.744
正常鼠/PBS 空白对照		0.077	0.056	0.055	0.055
ELISA 检测包被抗原		可溶性纯化蛋白 2ug/ml		不可溶性纯化蛋白 2ug/ml	

[0149] 实验结果表明,无论是 pET28b-CS 1 可溶性纯化蛋白,还是不可溶性纯化蛋白,均具有很强的免疫原性,易制备多 / 单克隆抗体。实验小鼠对 2 组重组抗原均可产生强烈的免疫应答。

[0150] 实施例 9 华支睾吸虫 Cs1 抗原同源性比较

[0151] 使用 Blastp 对 GenBank 中 nr 库进行同源性比较,结果如下:

[0152] Search database NOn-redundant protein sequences(nr)using Blastp(protein-protein BLAST)

[0153]

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(Bits)	Value
emb CAX64066.1 conserved Plasmodium protein, unkNOwn functio...	54.3	7e-06
ref XP_001349168.1 hypothetical protein [Plasmodium falcipar...	53.9	9e-06
ref YP_001321224.1 triple helix repeat-containing collagen [...	51.2	5e-05
ref ZP_05227486.1 RfbE [Mycobacterium intracellulare ATCC 13...	47.4	8e-04
ref XP_001137791.1 PREDICTED: hypothetical protein [Pan trog...	45.4	0.003
gb AAH96211.1 PRB3 protein [Homo sapiens]	44.7	0.005
sp Q04118.2 PRB3_HUMAN RecName: Full=Basic salivary proline-r...	43.5	0.011
ref NP_006240.4 proline-rich protein BstNI subfamily 3 precu...	43.5	0.012

[0154]

gb EAW96230.1	proline-rich protein BstNI subfamily 3 [Homo s...	43.1	0.015
ref XP_001613963.1	ubiquitin-conjugating enzyme domain conta...	41.2	0.060
gb ACF35339.1	fiilensin [Cavia porcellus]	39.3	0.23
emb CAA30728.1	proline-rich protein G1 [Homo sapiens]	39.3	0.24
ref XP_001776976.1	predicted protein [Physcomitrella patens ...	38.9	0.30
ref YP_896770.1	exosporium protein [Bacillus thuringiensis s...	38.9	0.32
gb ABU49875.1	mucin [Schistosoma mansoni]	38.1	0.43
gb ACE88754.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC6...	38.1	0.52
gb ACE88790.1	polymorphic mucin variant C7/2/25r2.1 [Schisto...	38.1	0.55
gb ACE88791.1	polymorphic mucin variant C7/2/25r2.2 [Schisto...	38.1	0.55
gb ACE88792.1	polymorphic mucin variant C7/2/25r2.3 [Schisto...	37.7	0.57
gb ACE88793.1	polymorphic mucin variant C7/2/25r2.4 [Schisto...	37.7	0.58
gb ACE88794.1	polymorphic mucin variant C7/2/25r2.5 [Schisto...	37.7	0.59
gb ACE88814.1	polymorphic mucin variant IC2/2/25r2.2 [Schist...	37.4	0.73
gb ACE88831.1	polymorphic mucin variant IC6/2/25r2.3 [Schist...	37.4	0.77
ref NP_570367.1	collagen alpha 1(I) chain precursor [Synecho...	37.4	0.84
sp P10163.3 PRB4_HUMAN	RecName: Full=Basic salivary proline-r...	37.4	0.94
gb ACE88795.1	polymorphic mucin variant C7/2/30r2 [Schistoso...	37.0	0.98
gb ACE88808.1	polymorphic mucin variant IC10/2/30r2.2 [Schis...	37.0	1.0
gb ACE88767.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC9...	37.0	1.0
gb ACE88806.1	polymorphic mucin variant IC10/2/25r2 [Schisto...	37.0	1.1
gb ABU49878.1	mucin [Schistosoma mansoni]	37.0	1.1
gb ACE88807.1	polymorphic mucin variant IC10/2/30r2.1 [Schis...	37.0	1.2
gb ACE88813.1	polymorphic mucin variant IC11/2/30r2.2 [Schis...	36.6	1.3
gb ACE88821.1	polymorphic mucin variant IC3/2/30r2 [Schistos...	36.6	1.3
gb ACE88758.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC7...	36.6	1.4
gb ACE88733.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC1...	36.2	1.9
gb ACE88822.1	polymorphic mucin variant IC3/2/40r2 [Schistos...	35.8	2.5
gb ACE88724.1	polymorphic mucin truncated splice variant C3/...	35.8	2.5
gb ACE88787.1	polymorphic mucin variant C6/1/40r2.2 [Schisto...	35.4	3.3
gb ACE88728.1	polymorphic mucin truncated splice variant C4/...	35.4	3.3
gb ACE88773.1	polymorphic mucin variant C10/1/40r2.1 [Schist...	35.4	3.4
gb ACE88788.1	polymorphic mucin variant C6/1/40r2.3 [Schisto...	35.4	3.5
gb ACE88786.1	polymorphic mucin variant C6/1/40r2.1 [Schisto...	35.4	3.6
gb ACE88774.1	polymorphic mucin variant C10/1/40r2.2 [Schist...	35.0	3.8
ref NP_664542.1	collagen-like protein SclB [Streptococcus py...	35.0	3.9
gb ACE88753.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC6...	35.0	4.2
gb ACE88747.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC4...	35.0	4.6
gb ACE88737.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC1...	34.7	4.7
gb ACE88738.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC1...	34.7	4.9
gb ACE88746.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC4...	34.7	5.0
gb ACE88739.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC1...	34.7	5.3
gb ACE88789.1	polymorphic mucin variant C6/2/80r2 [Schistoso...	34.3	6.3
gb ACE88759.1	polymorphic mucin truncated splice variant IC7...	34.3	6.4

[0155]

ref YP_002743725.1	cell surface-anchored protein SclH [Strep...	33.9	8.4
--------------------	--	------	-----

[0156] 与第一例: conserved Plasmodium protein, unkNOwn function[Plasmodium falciparum 3D7] 的氨基酸一致性仅为 37%。如下所示:

[0157] emb|CAX64066.1| conserved Plasmodium protein, unkNOwn function[Plasmodium falciparum3D7]

[0158] Length = 1066

[0159] Score = 54.3bits(129), Expect = 7e-06, Method:Composition-based stats.

[0160] Identities = 32/85(37%), Positives = 40/85(47%), Gaps = 9/85(10%)

[0161] Query 75 DPESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVK 134

[0162] ++DG DD P KP GD++G DD P KP GD++G DD P K

[0163] Sbjct 745 ETKEDGQKGDDKPNGDDKPNGDDKPNG---DDKPNGDDKPNGDDKPNG---DDKPNGD DK 798

[0164] Query 135 PQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD 159

[0165] P GD++G DD P KP D

[0166] Sbjct 799 PNGDDKPNG---DDKPNGDDKPN SD 820

[0167] Score = 42.0bits(97), Expect = 0.035, Method:Composition-based stats.

[0168] Identities = 29/85(34%), Positives = 36/85(42%), Gaps = 9/85(10%)

[0169] Query 79 DGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQ GD 138

[0170] D DD P KPGD+ +G DD P KPGD+ +G DD P KP D

[0171] Sbjct 767 DKPNGDDKPNGDDKPNGDDKPNG---DDKPNGDDKPNGDDKPNG---DDKPNGDDKPN SD 820

[0172] Query 139 PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESD 163

[0173] D +DD S K D++

[0174] Sbjct 821 ---DKQSSDDKRN SDDKQNSDDKQN 842

[0175] Score = 41.2bits(95), Expect = 0.053, Method:Composition-based stats.

[0176] Identities = 34/106(32%), Positives = 42/106(39%), Gaps = 15/106(14%)

[0177] Query 58 NADDADGAQSSPVKGECD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQ GD 117

[0178] N DD P G+ P DD P KP GD++G DD P KP GD

[0179] Sbjct 758 NGDDKPNGDDKP-NGDDKPN-----GDDKPNGDDKPNGDDKPNG---DDKPNGDDKPN GD 808

[0180] Query 118 PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESD 163

[0181] ++G DD P S K D D +DD S K D++

[0182] Sbjct 809 DKPNG---DDKPN SDDKQSSD---DKRN SDDKQNSDDKQNSDDKQN 848

[0183] Score = 35.4bits(80), Expect = 3.0, Method:Composition-based stats.

[0184] Identities = 34/112(30%), Positives = 42/112(37%), Gaps = 11/112(9%)

[0185] Query 58 NADDADGAQSSPVKGECD PESDGAV-ADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKP QG 116

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb BC096210.3 Homo sapiens proline-rich protein BstNI subfam...	52.4	9e-05
gb BC096209.3 Homo sapiens proline-rich protein BstNI subfam...	52.4	9e-05
gb BC096211.1 Homo sapiens proline-rich protein BstNI subfam...	52.0	1e-04
gb AC010176.12 Homo sapiens 12 BAC RP11-711K1 (Roswell Park ...	52.0	1e-04
ref NM_006249.4 Homo sapiens proline-rich protein BstNI subf...	50.8	3e-04
gb CP000724.1 Alkaliphilus metalliredigens QYMF, complete ge...	50.4	3e-04
emb X07881.1 Human gene PRB3L for proline-rich protein G1	49.3	8e-04
ref NG_013305.1 Homo sapiens proline-rich protein BstNI subf...	48.5	0.002
emb X07637.1 Human PRB3 gene (PRB3S) for G1 protein, exon 3	48.1	0.002
ref XM_001137791.1 PREDICTED: Pan troglodytes hypothetical L...	45.8	0.009
gb AC193211.4 Pan troglodytes BAC clone CH251-646O21 from ch...	43.5	0.043
gb AC193209.3 Pan troglodytes BAC clone CH251-562J12 from ch...	43.5	0.043
gb AC192834.3 Pan troglodytes BAC clone CH251-398J20 from ch...	43.5	0.049

17

gb CP001337.1	Chloroflexus aggregans DSM 9485, complete geNOME	43.1	0.066
dbj AK098523.1	Homo sapiens cDNA FLJ25657 fis, clone TST00324	40.0	0.50
ref NM_120511.1	Arabidopsis thaliana KTF1 (KOW DOMAIN-CONTAINING)	39.7	0.66
gb AC213901.5	MACACA MULATTA BAC clone CH250-175D19 from chr...	37.7	2.3
gb AC206545.3	Pongo abelii BAC clone CH276-487H8 from chromo...	37.7	2.5
emb X07715.1	Human gene PRB4 for proline-rich protein Po, al...	37.4	3.1
gb AF247176.1	Synthetic construct plasmid pSB3278 RP...	37.4	3.1
gb AC140118.11	Homo sapiens 12 BAC RP13-507P19 (Roswell Park...	36.6	4.9
gb EU827599.1	Cavia porcellus fiilensin (BFSP1) mRNA, comple...	36.6	5.1
[0203]	与第一例 :conserved Plasmodium protein, unknown function[Plasmodium falciparum 3D7] 的氨基酸一致性仅为 33%。如下所示 :		
[0204]	gb BC096210.3 Homo sapiens proline-rich protein BstNI subfamily 3, mRNA(cDNA clone MGC:116863 IMAGE:40004741), complete cds		
[0205]	Length = 1058		
[0206]	GENE ID :5544 PRB3 proline-rich protein BstNI subfamily 3[Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)		
[0207]	Score = 52.4bits(124), Expect = 9e-05, Method :Compositional matrix adjust.		
[0208]	Identities = 35/104(33%), Positives = 37/104(35%), Gaps = 0/104(0%)		
[0209]	Frame = -2		
[0210]	Query 76 PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQV		
	KP 135		
[0211]	P G D PP P G P G D PP P G P G D PP P		
[0212]	Sbjct 454 PGRGGGPWDWFPPCGGGPSGFPGRGGGPWDWFPPCGGCPSGFPGRGGGPWDWFPPCGG		
	GP 275		
[0213]	Query 136 QGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVAGDAPPSQVKPQG 179		
[0214]	G P G D PP +P G P G G PP +P G		
[0215]	Sbjct 274 SGFPGRGGGPWDWLPPCGGRPSGFPGGGGVRWGWFPCCGRRPSG 143		
[0216]	Score = 45.1bits(105), Expect = 0.014, Method :Compositional matrix adjust.		
[0217]	Identities = 34/109(31%), Positives = 36/109(33%), Gaps = 5/109(4%)		
[0218]	Frame = -2		
[0219]	Query 83 ADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVADDAPPSQVKPQGDPE		
	SD 142		
[0220]	D PP P G P G D PP P G P G D PP P G P		
[0221]	Sbjct 496 WDWFPCCGGGPSGFPGRGGGPWDWFPPCGGGPSGFPGRGGGPWDWFPPCGGCPSGFPG		
	RG 317		
[0222]	Query 143 GAVADDAPPSQVKPQGD PESDGAVAGDAPPSQVKPQ-----GEIRMRKF 186		
[0223]	G D PP P G P G PP +P G+R F		
[0224]	Sbjct 316 GGPWDWFPPCGGGPSGFPGRGGGPWDWLPPCGGRPSGFPGGGGVRWGWFW 170		

[0225] Score = 44.7bits(104), Expect = 0.020, Method:Compositional matrix adjust.

[0226] Identities = 41/136(30%), Positives = 54/136(39%), Gaps = 0/136(0%)

[0227] Frame = +3

[0228] Query 59 ADDADGAQSSPVKGECDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQG
DP 118

[0229] ++G P K E P G + PP KP+G P G + PP KP+G P

[0230] Sbjct 231 GNQSQGPPPRPGKPEGPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGQPPQGGNQSQGPPPRPGKPE
GPP 410

[0231] Query 119 ESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVAGDAPPSQV
KPQ 178

[0232] G + PP KP+G P G + PP KP+G P G +PP KP+

[0233] Sbjct 411 PQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPQGGNQSQGPPPHPGKPEGPPQGGNQSQGPPPRPGK
PE 590

[0234] Query 179 GEIRMRKFRCQFIILR 194

[0235] G +Q R

[0236] Sbjct 591 GPPPQGGNQSQGPPPR 638

[0237] Score = 44.7bits(104), Expect = 0.020, Method:Compositional matrix adjust.

[0238] Identities = 41/136(30%), Positives = 54/136(39%), Gaps = 0/136(0%)

[0239] Frame = +3

[0240] Query 59 ADDADGAQSSPVKGECDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQG
DP 118

[0241] ++G P K E P G + PP KP+G P G + PP KP+G P

[0242] Sbjct 294 GNQSQGPPPRPGKPEGQPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPQGGNQSQGPPPRPGKPEG
PP 473

[0243] Query 119 ESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVAGDAPPSQVK
PQ 178

[0244] G + PP KP+G P G + PP KP+G P G + PP KP+

[0245] Sbjct 474 PQGGNQSQGPPPHPGKPEGPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPQGGNQSQGPPPRPGK
PE 653

[0246] Query 179 GEIRMRKFRCQFIILR 194

[0247] G +Q R

[0248] Sbjct 654 GPPPQGGNQSQGPPPR 701

[0249] Score = 43.5bits(101), Expect = 0.049, Method:Compositional matrix adjust.

[0250] Identities = 39/121(32%), Positives = 51/121(42%), Gaps = 0/121(0%)

[0251] Frame = +3

[0252] Query 59 ADDADGAQSSPVKGECDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQG

DP 118

[0253] ++G P K E P G + PP KP+G P G + PP KP+G P

[0254] Sbjct 357 GNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPHPGKPEG
PP 536

[0255] Query 119 ESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVAGDAPPSQVK
PQ 178

[0256] G + PP KP+G P G + PP KP+G P G + PP KP+

[0257] Sbjct 537 PQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGK
E 716

[0258] Query 179 G 179

[0259] G

[0260] Sbjct 717 G 719

[0261] Score = 43.1bits(100), Expect = 0.055, Method :Compositional matrix
adjust.

[0262] Identities = 28/86(32%), Positives = 31/86(36%), Gaps = 0/86(0%)

[0263] Frame = -2

[0264] Query 76 PESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQV
KP 135

[0265] P G D PP P G P G D PP P G P G D PP +P

[0266] Sbjct 391 PGRGGGPWDWFPPCGGCPSGFPGRGGGPWDWFPPCGGGPSGFPGRGGGPWDWLPPCGG
RP 212

[0267] Query 136 QGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPE 161

[0268] G P G PP +P G P+

[0269] Sbjct 211 SGFPGGGVRWGWFPFCGRRPSGFPD 134

[0270] Score = 43.1bits(100), Expect = 0.062, Method :Compositional matrix
adjust.

[0271] Identities = 40/126(31%), Positives = 51/126(40%), Gaps = 0/126(0%)

[0272] Frame = +3

[0273] Query 69 PVKGECDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVAD
DA 128

[0274] P K E P G + PP KP+G P G + PP KP+G P G +

[0275] Sbjct 198 PGKPEGRPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGQPPQGGNQSQ
GP 377

[0276] Query 129 PPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVAGDAPPSQVKPQGEIRMRKF
RC 188

[0277] PP KP+G P G + PP KP+G P G + PP KP+G +

[0278] Sbjct 378 PPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPHPGKPEGPPPPQGGN
QS 557

[0279] Query 189 QFIILR 194

[0280] Q R

[0281] Sbjct 558 QGPPPR 575

[0282] Score = 40.4bits(93), Expect = 0.36, Method :Compositional matrix adjust.

[0283] Identities = 34/106(32%), Positives = 44/106(41%), Gaps = 0/106(0%)

[0284] Frame = +3

[0285] Query 59 ADDADGAQSSPVKGECDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQG
DP 118

[0286] ++G P K E P G + PP KP+G P G + PP KP+G P

[0287] Sbjct 420 GNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPHPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEG
PP 599

[0288] Query 119 ESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDG 164

[0289] G + PP KP+G P G + PP KP+G P G

[0290] Sbjct 600 PQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGSPSQGG 737

[0291] Score = 38.1bits(87), Expect = 2.1, Method :Compositional matrix adjust.

[0292] Identities = 34/100(34%), Positives = 43/100(43%), Gaps = 0/100(0%)

[0293] Frame = +3

[0294] Query 80 GAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVADDAPPSQVKPQG
DP 139

[0295] G PP KP+G P G + PP KP+G P G + PP KP+G P

[0296] Sbjct 168 GNQPQRTPPPPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEG
QP 347

[0297] Query 140 ESDGAVADDAPPSQVKPQGDPESDGAVAGDAPPSQVKPQG 179

[0298] G + PP KP+G P G + PP KP+G

[0299] Sbjct 348 PQGGNQSQGPPPRPGKPEGPPPPQGGNQSQGPPPRPGKPEG 467

[0300] 通过同源性比较,说明华支睾吸虫 Cs1 抗原基因是一个新颖的华支睾吸虫特异性抗原。

[0301] 序列表

[0302] <110> 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

[0303] <120> 华支睾吸虫的特异性抗原及用途

[0304] <160>6

[0305] <170>PatentIn version 3.3

[0306] <210>1

[0307] <211>733

[0308] <212>DNA

[0309] <213> 华支睾吸虫 Cs1 抗原

[0310] <400>1

[0311] atttgggtatg tttcaggcaa tcatggggat gaaaccgcaa cttgtatact tcatcttcat 60

[0312] tcaactcgtc actgctgagt gtttggcaga aaacatgtct gaggacatit tagacgcgga 120

[0313] agccaaattt atagaaagtc taaaagcact ccgggacata ccaaatactt caggctcgag 180

[0314]	cacatctaatt ttaaacgccg acgatgcgga tggatgcgcaa tcaagtccag tgaaaggaga	240
[0315]	atgtgaccct gaatcagatg gagctgttgc ggatgatgcg ccaccaagtc aagtgaacc	300
[0316]	gcaaggtgac cctgaatcag atggagctgt tgcggatgat gcgccacca gtcaagtga	360
[0317]	accgcaaggt gacctgaat cagatggagc tgttgcggat gatgcgccac caagtcaagt	420
[0318]	gaaaccgcaa ggtgaccctg aatcagatgg agctgttgcg gatgatgcgc caccaagtca	480
[0319]	agtgaaccg caaggtgacc ctgaatcaga tggagctgtt gcgggtgatg cgccaccaag	540
[0320]	tcaagtgaaa ccgcaaggtg agattcgtat gcgtaaattc cgatgtcaat ttataattct	600
[0321]	acgaagaatc atatcatagt taatcccga ttgatgttct agaaaactag tgatgagagt	660
[0322]	tgacaataaa ttgttaaatt ttctgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	720
[0323]	aaaaaaaaaa aaa	733
[0324]	<210>2	
[0325]	<211>198	
[0326]	<212>PRT	
[0327]	<213> 华支睾吸虫 Cs1 抗原	
[0328]	<400>2	
[0329]	Met Gly Met Leu Pro Gly Leu Val Thr Pro Ile Pro Ile Gly Leu Val	
[0330]	1 5 10 15	
[0331]	Thr Ala Gly Cys Leu Ala Gly Ala Met Ser Gly Ala Ile Leu Ala Ala	
[0332]	20 25 30	
[0333]	Gly Ala Leu Pro Ile Gly Ser Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ile Pro Ala	
[0334]	35 40 45	
[0335]	Thr Ser Gly Ser Ser Thr Ser Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly	
[0336]	50 55 60	
[0337]	Ala Gly Ser Ser Pro Val Leu Gly Gly Cys Ala Pro Gly Ser Ala Gly	
[0338]	65 70 75 80	
[0339]	Ala Val Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ser Gly Val Leu Pro Gly Gly Ala	
[0340]	85 90 95	
[0341]	Pro Gly Ser Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ser Gly Val	
[0342]	100 105 110	
[0343]	Leu Pro Gly Gly Ala Pro Gly Ser Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala	
[0344]	115 120 125	
[0345]	Pro Pro Ser Gly Val Leu Pro Gly Gly Ala Pro Gly Ser Ala Gly Ala	
[0346]	130 135 140 145	
[0347]	Val Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ser Gly Val Leu Pro Gly Gly Ala Pro	
[0348]	150 155 160	
[0349]	Gly Ser Ala Gly Ala Val Ala Gly Ala Ala Pro Pro Ser Gly Val Leu	
[0350]	165 170 175	
[0351]	Pro Gly Gly Gly Ile Ala Met Ala Leu Pro Ala Cys Gly Pro Ile Ile	
[0352]	180 185 190	

[0353] Leu Ala Ala Ile Ile Ser
 [0354] 195
 [0355] <210>3
 [0356] <211>234
 [0357] <212>PRT
 [0358] <213>pET28b-CS1 重组蛋白
 [0359] <400>3
 [0360] Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 [0361] 1 5 10 15
 [0362] Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
 [0363] 20 25 30
 [0364] Asp Pro Asn Ser Ala Arg Gly Lys Pro Gln Leu Val Tyr Phe Ile Phe
 [0365] 35 40 45
 [0366] Ile Gln Leu Val Thr Ala Glu Cys Leu Ala Glu Asn Met Ser Glu Asp
 [0367] 50 55 60
 [0368] Ile Leu Asp Ala Glu Ala Lys Phe Ile Glu Ser Leu Lys Ala Leu Arg
 [0369] 65 70 75 80
 [0370] Asp Ile Pro Asn Thr Ser Gly Ser Ser Thr Ser Asn Leu Asn Ala Asp
 [0371] 85 90 95
 [0372] Asp Ala Asp Gly Ala Gln Ser Ser Pro Val Lys Gly Glu Cys Asp Pro
 [0373] 100 105 110
 [0374] Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys
 [0375] 115 120 125
 [0376] Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro
 [0377] 130 135 140
 [0378] Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val
 [0379] 145 150 155 160
 [0380] Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu
 [0381] 165 170 175
 [0382] Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro
 [0383] 180 185 190
 [0384] Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Gly Asp Ala Pro Pro
 [0385] 195 200 205
 [0386] Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Glu Ile Arg Met Arg Lys Phe Arg Cys
 [0387] 210 215 220
 [0388] Gln Phe Ile Ile Leu Arg Arg Ile Ile Ser
 [0389] 225 230
 [0390] <210>4
 [0391] <211>211

[0392] <212>PRT
 [0393] <213>pET28b-Cs1-NcoI 重组蛋白
 [0394] <400>4
 [0395] Met Gly Met Lys Pro Gln Leu Val Tyr Phe Ile Phe Ile Gln Leu Val
 [0396] 1 5 10 15
 [0397] Thr Ala Glu Cys Leu Ala Glu Asn Met Ser Glu Asp Ile Leu Asp Ala
 [0398] 20 25 30
 [0399] Glu Ala Lys Phe Ile Glu Ser Leu Lys Ala Leu Arg Asp Ile Pro Asn
 [0400] 35 40 45
 [0401] Thr Ser Gly Ser Ser Thr Ser Asn Leu Asn Ala Asp Asp Ala Asp Gly
 [0402] 50 55 60
 [0403] Ala Gln Ser Ser Pro Val Lys Gly Glu Cys Asp Pro Glu Ser Asp Gly
 [0404] 65 70 75 80
 [0405] Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp
 [0406] 85 90 95
 [0407] Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val
 [0408] 100 105 110
 [0409] Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala
 [0410] 115 120 125
 [0411] Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala
 [0412] 130 135 140
 [0413] Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro
 [0414] 145 150 155 160
 [0415] Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Gly Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys
 [0416] 165 170 175
 [0417] Pro Gln Gly Glu Ile Arg Met Arg Lys Phe Arg Cys Gln Phe Ile Ile
 [0418] 180 185 190
 [0419] Leu Arg Arg Ile Ile Ser Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His
 [0420] 195 200 205
 [0421] His His His
 [0422] 210
 [0423] <210>5
 [0424] <211>187
 [0425] <212>PRT
 [0426] <213>pET28a-CS1DS-NcoI 重组蛋白
 [0427] <400>5
 [0428] Met Ser Glu Asp Ile Leu Asp Ala Glu Ala Lys Phe Ile Glu Ser Leu
 [0429] 1 5 10 15
 [0430] Lys Ala Leu Arg Asp Ile Pro Asn Thr Ser Gly Ser Ser Thr Ser Asn

[0431]	20	25	30
[0432]	Leu Asn Ala Asp Asp Ala Asp Gly Ala Gln Ser Ser Pro Val Lys Gly		
[0433]	35	40	45
[0434]	Glu Cys Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro		
[0435]	50	55	60
[0436]	Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala		
[0437]	65	70	75
[0438]	Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser		
[0439]	85	90	95
[0440]	Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln		
[0441]	100	105	110
[0442]	Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Asp Asp Ala Pro Pro Ser		
[0443]	115	120	125
[0444]	Gln Val Lys Pro Gln Gly Asp Pro Glu Ser Asp Gly Ala Val Ala Gly		
[0445]	130	135	140
[0446]	Asp Ala Pro Pro Ser Gln Val Lys Pro Gln Gly Glu Ile Arg Met Arg		
[0447]	145	150	155
[0448]	Lys Phe Arg Cys Gln Phe Ile Ile Leu Arg Arg Ile Ile Ser Lys Leu		
[0449]	165	170	175
[0450]	Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His		
[0451]	180	185	
[0452]	<210>6		
[0453]	<211>703		
[0454]	<212>mRNA		
[0455]	<213> 华支睾吸虫 Cs1 抗原基因		
[0456]	<400>6		
[0457]	gaaaccgcaa cttgtatact ttatcttcat tcaactggtc actgctgagt gtttggcaga	60	
	aaacatgtct gaggacatct tagacgcgga agccaaatct atagaaagtc taaaagcact	120	
	ccgggacata ccaataactt caggctcgag cacatctaata ttaaaccgac acgatgcgga	180	
	tgggtgcgcaa tcaagtccag tgaaaggaga atgtgaccct gaatcagatg gagctgttgc	240	
	ggatgatgcg ccaccaagtc aagtgaacc gcaaggtgac cctgaatcag atggagctgt	300	
	tgcggatgat gcgccaccaa gtcaagtga accgcaaggt gaccctgaat cagatggagc	360	
	tgttgcggat gatgcgccac caagtcaagt gaaaccgcaa ggtgaccctg aatcagatgg	420	
	agctgtttgc gatgatgcgc caccaagtca agtgaaccg caaggtgacc ctgaatcaga	480	
	tggagctgtt gcgggtgatg cgccaccaag tcaagtgaac ccgcaagggt agattcgtat	540	
	gcgtaaattc cgatgtcaat ttataattct acgaagaatc atatcatagt taatcccgga	600	
	ttgatgttct agaaaactag tgatgagagt tgacaataaa ttgttaaatt ttctggaaaa	660	
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	703	

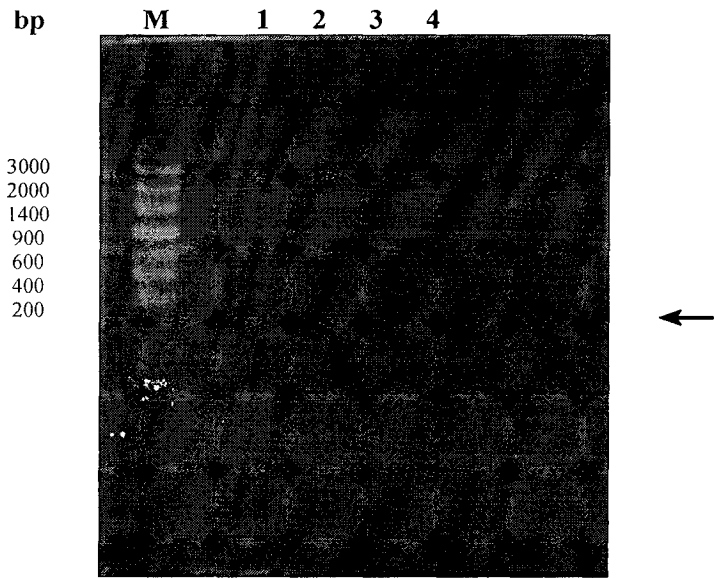


图 1

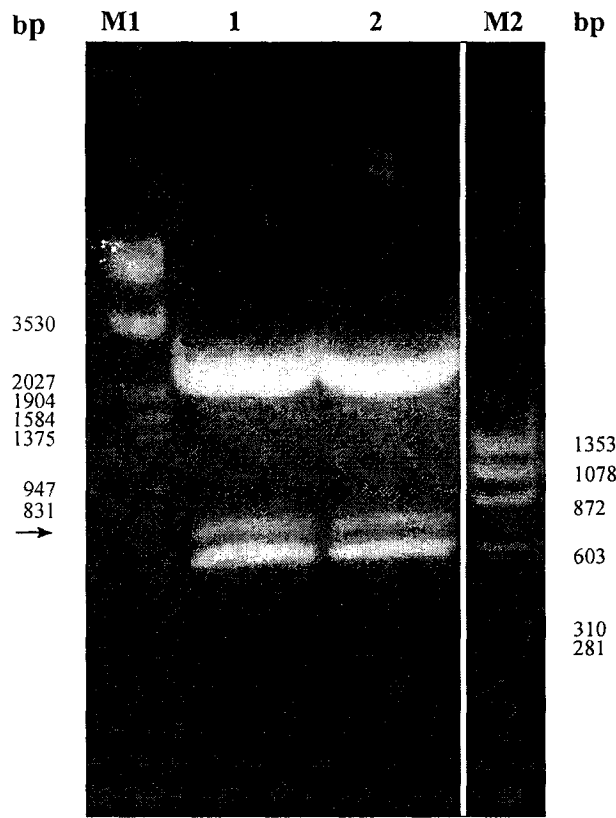


图 2

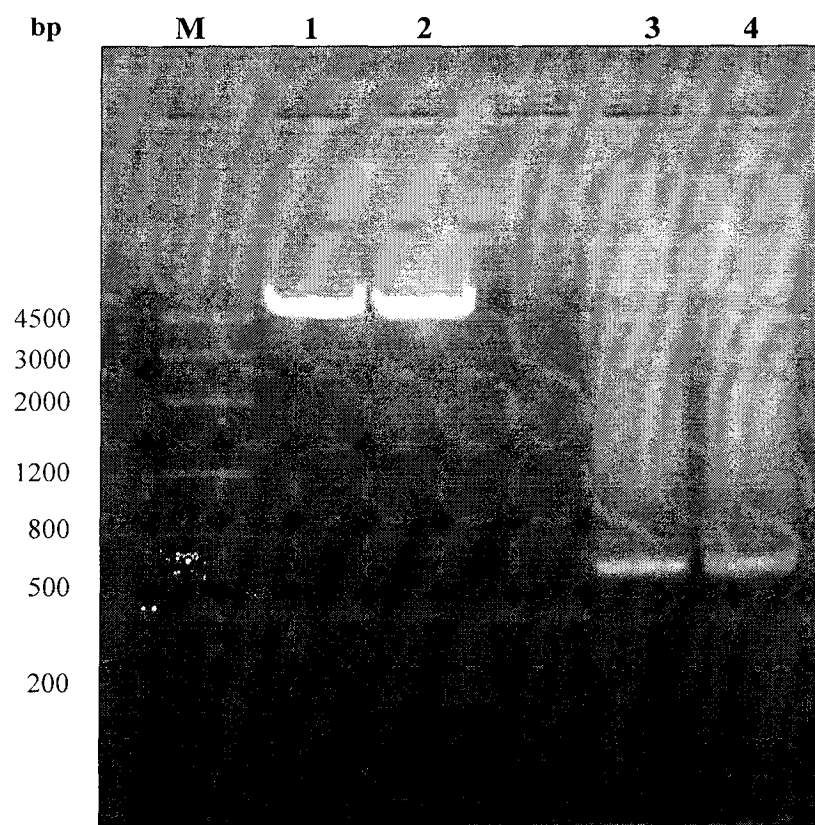


图 3

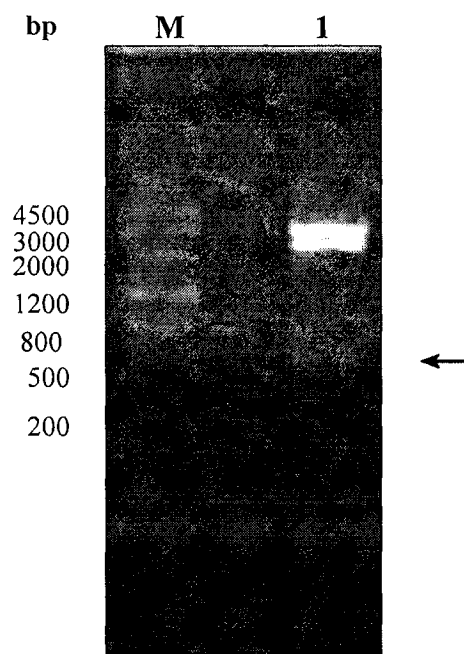


图 4

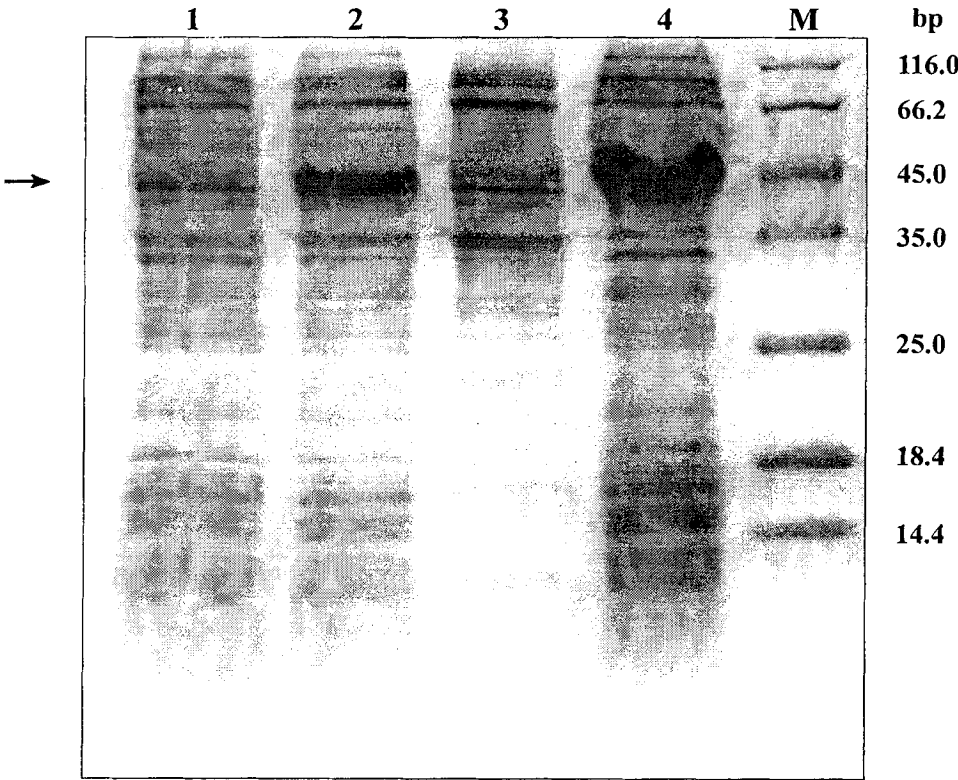


图 5

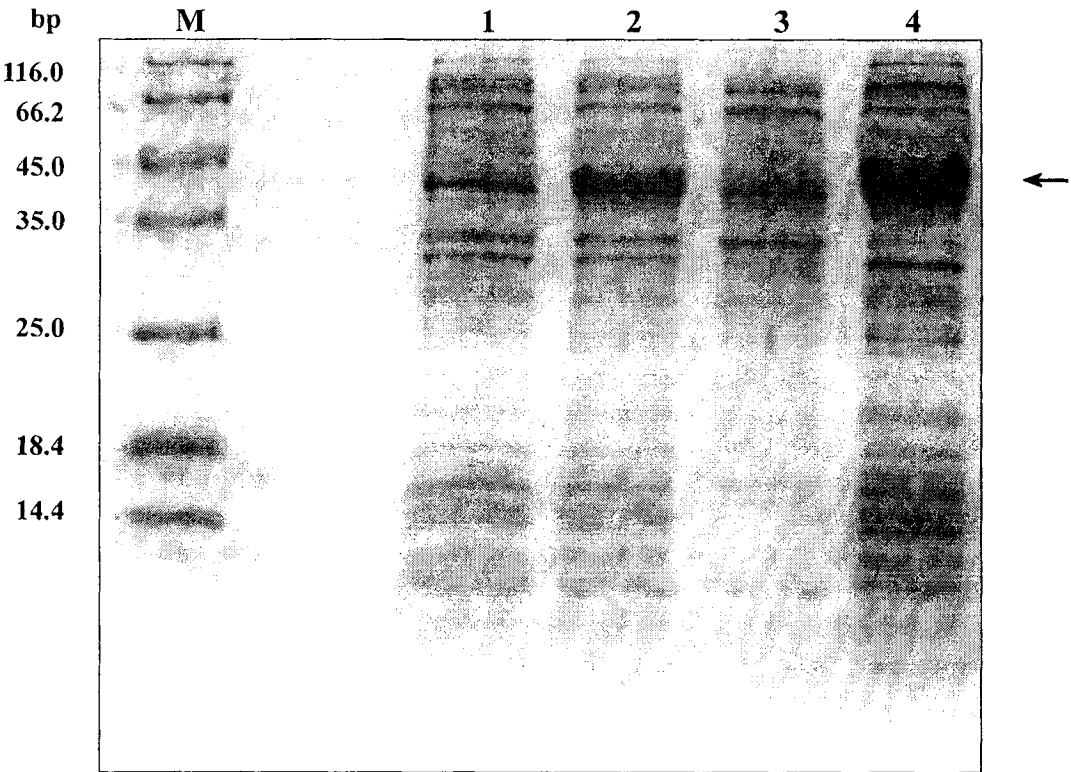


图 6

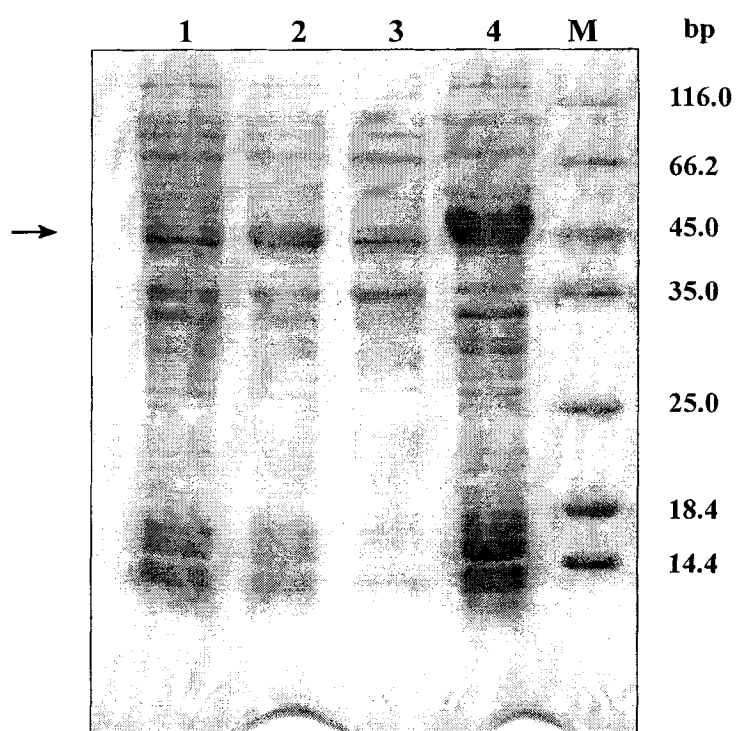


图 7

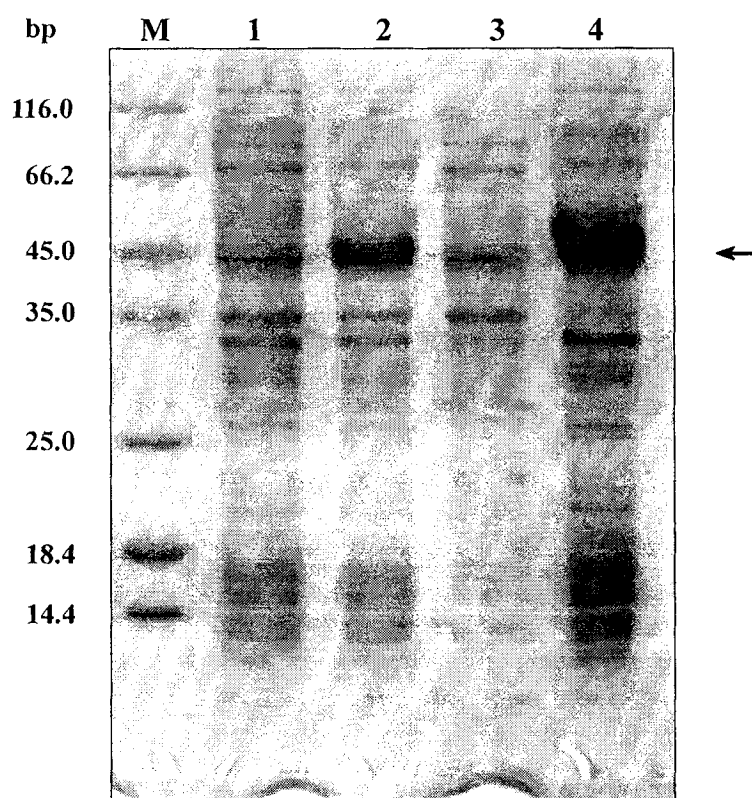


图 8

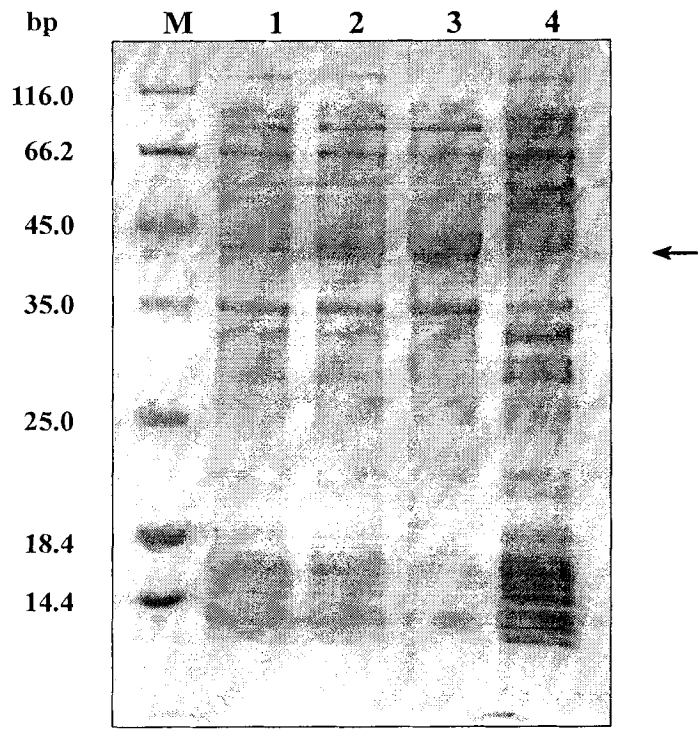


图 9

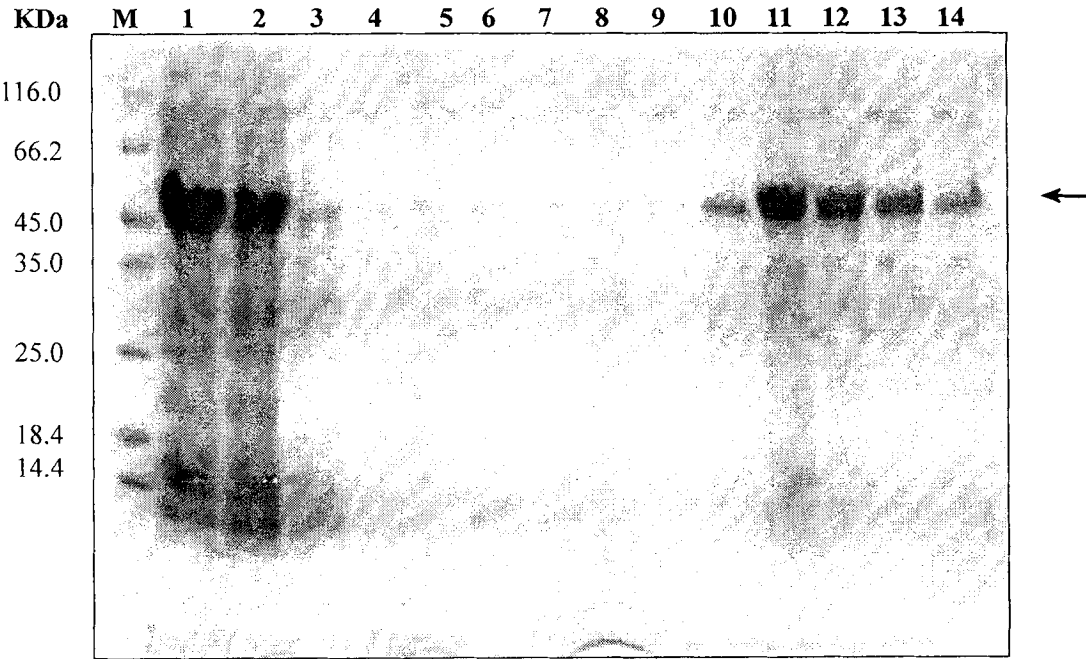


图 10

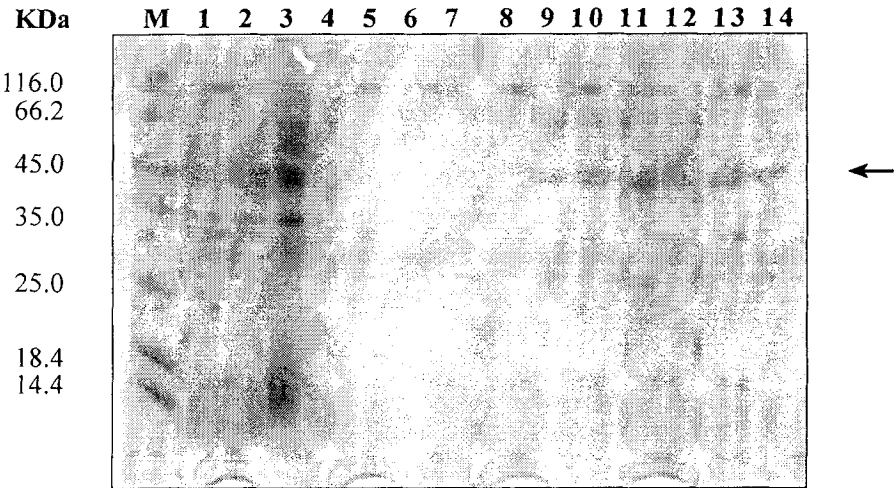


图 11

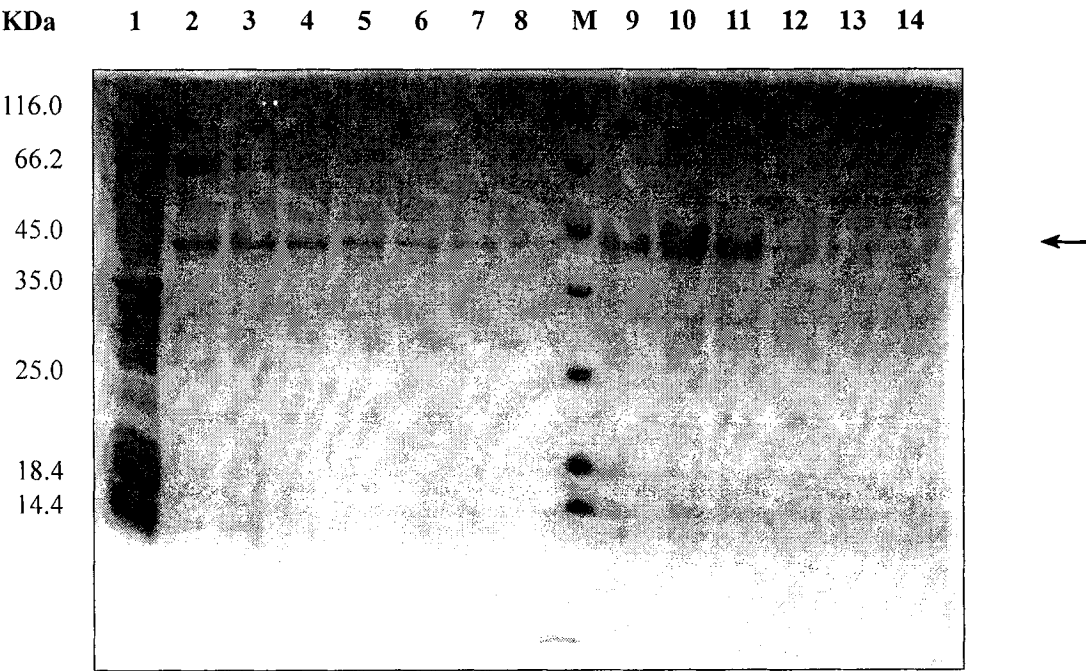


图 12

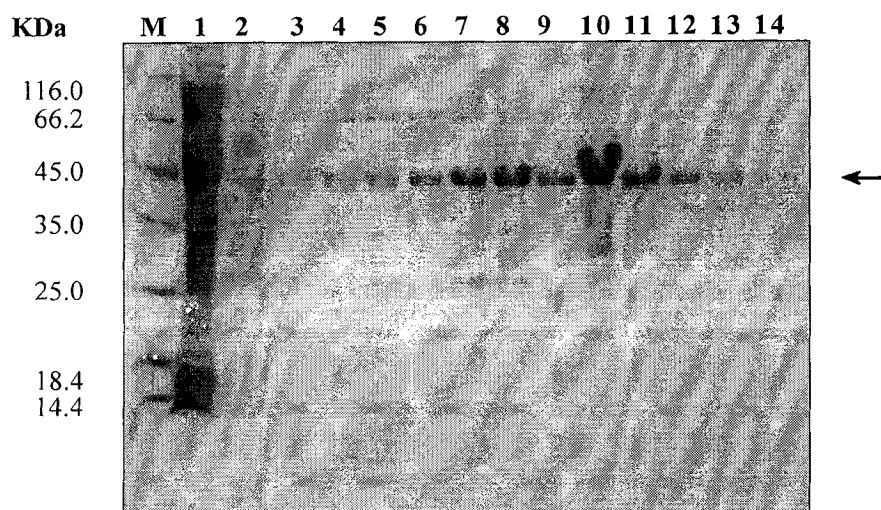


图 13

pET28b-CS1不可溶性纯化蛋白检测血清抗体散点图

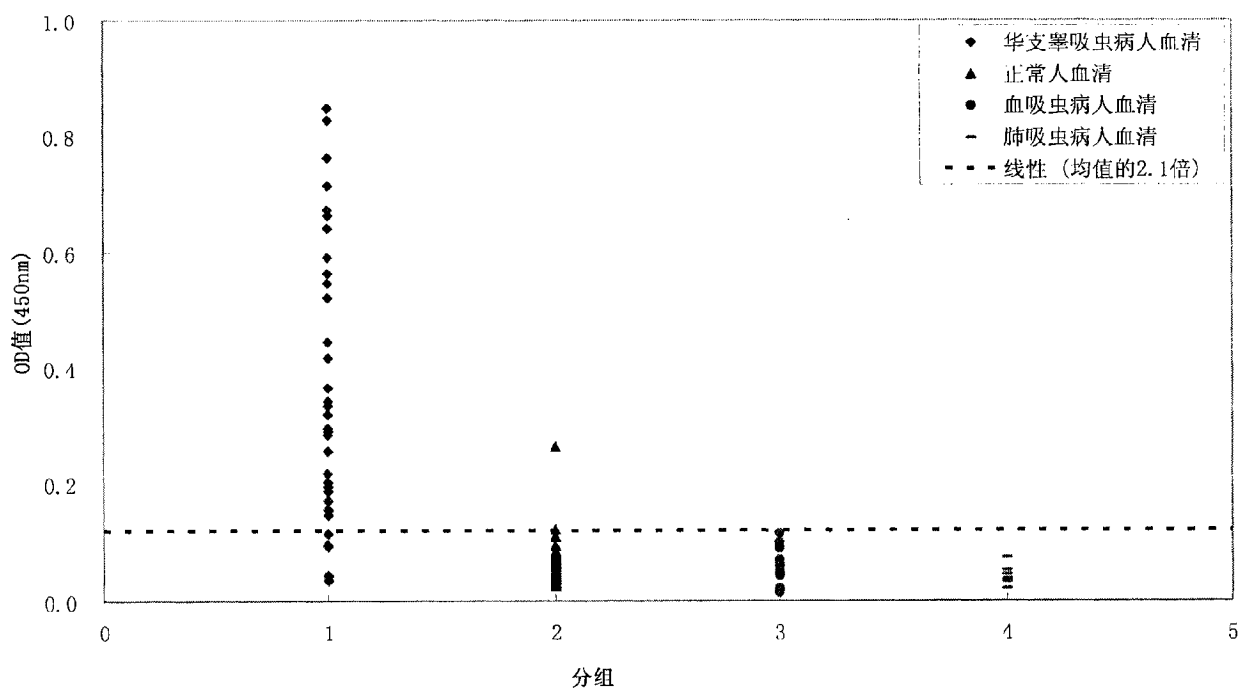


图 14

专利名称(译)	华支睾吸虫的特异性抗原及用途		
公开(公告)号	CN102071205A	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	CN200910252895.7	申请日	2009-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
[标]发明人	许学年 冯正 董玉婷 周岩 包意芳 徐斌		
发明人	许学年 冯正 董玉婷 周岩 包意芳 徐斌		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/435 C07K16/18 C12N15/63 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P33/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0003 A61K38/00 C07K14/43559 A61P33/10		
其他公开文献	CN102071205B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种华支睾吸虫的特异性抗原，还提供了特异性的结合华支睾吸虫的特异性抗原的抗体。本发明还提供了一种分离的蛋白质，由华支睾吸虫的特异性抗原基因的核苷酸序列所编码。本发明还提供了一种含有一种华支睾吸虫的特异性抗原基因的载体。本发明还提供了一种疫苗和试剂盒。本发明还提供了上述的一种华支睾吸虫的特异性抗原、抗体、疫苗和试剂盒在制备治疗、诊断或者预防华支睾吸虫病的药物中的应用。本发明的华支睾吸虫Cs1抗原具有较高的免疫原性，易制备多/单克隆抗体，进而进一步应用于抗原检测等方面。实验动物(小鼠)对该抗原免疫应答较强。

