

[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 200510017147.2

[51] Int. Cl.

G12N 15/31 (2006.01)

G12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 16 日

[11] 公开号 CN 1818066A

[22] 申请日 2005.9.21

[21] 申请号 200510017147.2

[71] 申请人 吉林大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号

[72] 发明人 柳增善 于师宇 孟宪梅

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限责任公司

代理人 魏征骥

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种食物中毒菌多联融合毒素及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种食物中毒菌多联融合毒素及其用途,属于生物技术领域。肉毒梭菌毒素 A 基因 Hc、金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因 SEA、B 基因 SEB、大肠杆菌 O 157: H7veroB 亚基毒素基因 VT_{1B}、VT_{2B},用连接序列 linker 串联起来形成 Hc - VT_{1B} - SEA - VT_{2B} - SEB,及其所编码表达的可溶性食物中毒菌多联融合毒素蛋白及其用途。优点及有益效果在于:得到抗 5 种细菌毒素的血清抗体,与五种毒素具有非常高的特异性和反应敏感性,同时与一定范围相近型别的毒素有交叉反应,用以解决目前食品检测过程复杂而又较为漫长,缺乏广泛性多联融合毒素试剂盒的问题。

1、一种食物中毒菌多联融合毒素的核苷酸序列，其特征在于：5个毒素基因：肉毒梭菌毒素 A 基因 Hc、金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因 SEA、B 基因 SEB、大肠杆菌 O 157:H7 veroB 亚基毒素基因 VT_{1B}、VT_{2B}，用连接序列 linker 串联起来形成 Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB。

2、根据权利要求 1 所述的食物中毒菌多联融合毒素的核苷酸序列，其特征在于：Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1。

3、根据权利要求 2 所述的食物中毒菌多联融合毒素的核苷酸序列，其所编码表达的可溶性食物中毒菌多联融合毒素蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2。

4、一种抗原，由如权利要求 2 所述的食物中毒菌多联融合毒素核酸序列表达产生，该表达产生的是基因工程菌表达的可溶性蛋白。

5、一种抗体，采用如权利要求 4 所述抗原，用 2mg/次加等体积的完全佛氏佐剂免疫家兔第一次，每隔 7 天再分别以同样量蛋白和不完全佛氏佐剂免疫家兔 4 次，测抗体效价后采血获得血清。

6、如权利要求 5 所述的抗体在制备食品毒素检测试剂盒中的应用。

一种食物中毒菌多联融合毒素及其用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体包括多联融合细菌毒素及其建立方法，成为广谱性免疫学检测方法的开始。

背景技术

食物中毒菌是食品卫生中经常遇到的问题，细菌（毒素）性食物中毒又是最常见的形式之一。对食品中细菌检验的常规方法是在检验时要鉴定每一个细菌（毒素）及其型别，优点是科学准确，但这个过程复杂而又较为漫长，对产毒菌株在分离后再确定是否为产毒株或什么种类的毒素。目前使用的快速检测方法又难以满足检测覆盖面广的要求。在食品中病原或毒素的检测方法学方面，一是寻找精确的检测技术，另一方面是寻找快速检测技术，再就是寻找广泛性的检测技术。对于食品中或其他领域的细菌或细菌毒素还没有广泛意义的检测方法，能够在较短时间内同时判断食品中是否含有可疑食物中毒菌或毒素，而不管哪种菌或毒素；如果阴性就表明在一定范围内该食品安全，如果阳性则需要在限定范围内进一步确定检测。这在食品工业具有重要的经济学意义，在食品卫生与安全上有时甚至比精确检验更有意义。在多联融合细菌毒素的基础上所建立的这种方法有可能成为广谱性免疫学检测方法的开始。

发明内容

本发明提供一种食物中毒菌多联融合毒素及其用途，以解决目前食

品检测过程复杂而又较为漫长，缺乏广泛性多联融合毒素试剂盒的问题。本发明采取的技术方案是：

5个毒素基因：肉毒梭菌毒素A基因 Hc、金黄色葡萄球菌肠毒素A基因 SEA、B基因 SEB、大肠杆菌 O157:H7 veroB 亚基毒素基因 VT_{1B}、VT_{2B}，用连接序列 linker 串联起来形成 Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB。

Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1。

食物中毒菌多联融合毒素的核苷酸序列，其所编码表达的可溶性食物中毒菌多联融合毒素蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2。

一种抗原，由食物中毒菌多联融合毒素核酸序列表达产生，该表达产生的是基因工程菌表达的可溶性蛋白。

一种抗体，采用该上述抗原，用 2mg/次加等体积的完全佛氏佐剂免疫家兔第一次，每隔 7 天再分别以同样量蛋白和不完全佛氏佐剂免疫家兔 4 次，测抗体效价后采血获得血清。

上述抗体在制备食品毒素检测试剂盒中的应用。

本发明的优点及有益效果在于：将大肠杆菌 O157: H7、金黄色葡萄球菌和肉毒梭菌三种菌的 5 个毒素基因或片段用 linker 串联起来得 Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB，2928bp，在 pET22-b 中获得包涵体和可溶性两种表达产物。免疫家兔，得到抗 5 种细菌毒素的血清抗体，与五种毒素具有非常高的特异性和反应敏感性，同时与一定范围（同属内）相近型别的毒素有交叉反应，这样就获得了在一定范围内有限交叉的广谱性抗体。为多基因抗原串联及在食物中毒菌或毒素广谱、快速筛检方法的建立奠定了方法学基础。用以解决目前食品检测过程复杂而又较为漫

长, 缺乏广泛性多联融合毒素试剂盒的问题

附图说明

图 1、本发明基因 PCR 的 linker 连接和扩增。

图 2、SDS-PAGE 电泳结果, M: 蛋白 marker, 1、未诱导的 HVSVS-pET-226, 2、37℃包涵体蛋白上清, 3、37℃包涵体蛋白, 4、25℃包涵体蛋白上清, 5、25℃包涵体蛋白, 6、4h/2PTG 诱导的 HVSVS-pET-226 重组质粒。

具体实施方式

实施例 1 本发明食物中毒菌多联融合毒素的核苷酸序列的制备

材料和方法

1.1 菌株

金黄色葡萄球菌 A\B (26072, 26075) *Staphylococcus aureus* A\B (26072, 26075), 肉毒梭菌 A (62A) *Clostridium botulinum* A (62A), 大肠杆菌 O157:H7 *E.coli* O157:H7; other strains: 绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 金黄色葡萄球菌 C (C_1 , C_2) *Staphylococcus aureus* C (C_1 , C_2), 金黄色葡萄球菌 E *Staphylococcus aureus* E, 单核细胞增多性李氏杆菌 *Listeria monocytogene*, 小肠结肠耶氏菌(52207) *Yersinia enterocolitica* (52207), 弗氏耶氏菌 *Yersinia frederiksenii*, 中间型耶氏菌 *Yersinia intermedia*, 克氏耶氏菌 *Yersinia kristensenii*, 假结核耶氏菌 *Yersinia pseudotuberculosis*, 鼠疫耶氏菌 *Yersinia pestis*, 副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*, 亚利桑那沙门氏菌 *Salmonella arizonae*, 副伤寒沙门氏

菌 A *Salmonella paratyphi* A, 副伤寒沙门氏菌 C *Salmonella paratyphi* C, 猪霍乱沙门氏菌 *Salmonella choleraesuis*, 肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*, 伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*, 鸡沙门氏菌 *Salmonella pullorum*, 都柏林沙门氏菌 *Salmonella Dublin*, 伦敦沙门氏菌 *Salmonella London*, 阿伯丁沙门氏菌 *Salmonella aberdeen*, 纽波特沙门氏菌 *Salmonella newport*, 蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus*, 枯草杆菌 *Bacillus subtilis*, 炭疽杆菌 (弱毒株) *Bacillus anthracis*(low toxic strain), 空肠弯杆菌 *Campylobacter jejuni*, 宋内氏志贺氏菌 *Shigella sonnei*, 魏氏梭菌 *Clostridium welcii*, 肉毒梭菌 B *Clostridium botulinum* B, 肉毒梭菌 C *Clostridium botulinum*, C..

1.2 分子克隆

1.2.1 引物和连接序列 linker:

引物:

P1 5'-CCA TGG ACC TTT CCA AAT ACG TAG ATA ATC-3'

P2 5'-CGT GCC CGG ACC CAG TGG CCT TTC TCC CCA TC-3'

P3 5'-ACT GGG TCC GGG TCC GGG CAC GCC TGA TTG TGT AAC TGG-3'

P4 5'-TGC CCG GAC CCG GAC CAC GAA AAA TAA CTT CGA TGA ATC-3'

P5 5'-TTC GTG GTC CGG GTC CGG GCA GCG AGA AAA GCG AAG AAA-3'

P6 5'-GCC CGG ACC ACT TGT ATA TAA ATA TAT ATC AAT-3'

P7 5'-AAG TGG TCC GGG TCC GGG CGC GGA TTG TGC TAA AGG

TAA-3'

P8 5'-TCG CCC GGA CCC GGA CCG TCA TTA TTA AAC TGC ACT

TCA-3'

P9 5'-TGA CGG TCC GGG TCC GGG CGA GAG TCA ACC AGA

TCC TAA-3'

P10 5'-CTC GAG TTA TTC AAA TAC CCG AAC AGT AAT ACT-3'

Linker:5'-ggt ccg ggt ccg ggc-3'

1.2.2 基因组提取

按 Vitagene 基因组提取说明书分别提取肉毒梭菌毒素 A 的基因 Hc, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3、金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的基因 SEA, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4、金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的基因 SEB, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5、大肠杆菌 O 157:H7 veroB 亚基毒素基因 VT_{1B}, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 和大肠杆菌 O 157:H7 veroB 亚基毒素基因 VT_{2B}, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 7。

1.2.3 PCR 扩增目的基因 Hc (肉毒梭菌毒素 A 的重链无毒性片段): 94℃ 5min, 94℃ 1min, 68℃ 1min, 72℃ 1min, 每退火一个循环下降 1℃, 至 33℃, 35 循环, 4℃ 保存, 其它毒素基因的 PCR 条件: 94℃ 5min, 94℃ 1min, 43℃ (SEA), 48℃ (SEB), 57℃ (VT_{2B}), 55℃ (VT_{1B}), 50sec, 72℃ 1min。Hc:1338bp, VT_{1B}:2137bp, VT_{2B}:210bp, SEB:414bp, SEA:699bp。

1.2.3 连接毒素基因 Hc1332bp, VT_{1B} 207bp, VT_{2B} 210bp, SEA 699bp, SEB 414bp, Linker。重组基因全长为 2928bp。见图 1,

第一次 PCR: Hc、VT_{1B}、SEA、VT_{2B}、SEB, 扩增 5 个基因片段;

第二次 PCR: VT_{1B}-SEA、VT_{2B}-SEB, 扩增两个基因连接产物:

第三次 PCR: VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB , 扩增四个基因连接产物:

第四次 PCR: Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB , 扩增五个基因连接产物。

该重组基因 Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1。

经测序表明重组毒素基因分别为原基因或部分基因序列。

实施例 2 本发明重组毒素的表达与纯化

Hc-VT_{1B}-SEA-VT_{2B}-SEB 基因, 以下简称 HVSVS, pET-22b 表达载体、在宿主菌 *E.coli* DH5 α 中分别在 37℃ 或 25℃、1~6h, 或者过夜表达, 1mmol/L IPTG 诱导。在 pET-22b 表达载体表达的可溶性蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 切下目的蛋白带, 回收后作为免疫原。见图 2。

HVSVS 在 pET-22b 中 37℃、4h 的表达形式为可溶性 (5.29%) 和包涵体 (4.69%) 两种, 以 1mmol/L IPTG 诱导。25℃ 时几乎全是可溶性表达蛋白 (9.9%)。表达蛋白分子量为 112.33kDa。大部分可溶性蛋白位于胞浆, 小部分位于细胞周质。

该食物中毒菌多联融合毒素蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2。

实施例 3 抗重组毒素抗体的制备

用 TE (pH8.0) 缓冲液将表达菌体沉淀悬起, 用超声波将表达菌体打碎后, 离心, 去沉淀; 上清装入透析袋中, 用 PEG20000 透析浓缩 2h, 浓缩后的上清经 SDS-PAGE 电泳后切下目的蛋白带, 于匀浆器中使之浆化, 用 2 倍的 TE (pH8.0) 缓冲液混匀, 置 4℃ 12h, 期间振摇 3~4 次, 然后用 10000r/min 离心 20min, 上清即为融合毒素 HVSVS 表达蛋白。用紫外分光光度计测定蛋白浓度。用纯化的可溶性表达蛋白 2mg/次加等体积的完全佛氏佐剂用注射器混匀法混匀或完全乳化后免疫家兔第

一次,采取背部皮下多点注射法。以后每间隔7天再分别以同样量蛋白和不完全佛氏佐剂混合后免疫家兔4次。最后一次免疫7天心脏采血,37℃1h,使血液凝固,再放4℃过夜,使血块收缩。10000g离心10min分离获得血清。用琼脂扩散或ELISA方法测抗体效价后按常规采血获得血清。

实施例4 抗体特性鉴定

用琼脂扩散试验和ELISA测定抗体效价:琼脂扩散用1.8%琼脂,血清分别稀释 $0^{\times}$, $2^{\times}$, $4^{\times}$, $8^{\times}$, $16^{\times}$, $32^{\times}$ 等几个稀释倍数,24~48h后观察抗原抗体沉淀带的情况;ELISA方法用pH9.6的包被液稀释5种天然毒素几个稀释度,每孔加100μL,然后分别测定其敏感度。用同属内的毒素和29种其它常见食源性病原菌做特异性检测。见表1。

表1 抗体特异性 (OD_{490nm})

菌株或毒素	O157	VT1	VT2	Hc	C.b _A	C.b _B	C.b _C	HVSVS
OD _{490nm}	1.003	2.979	2.144	2.322	2.337	1.059	1.088	2.916
阴性对照	0.262	0.366	0.302	0.352	0.377	0.399	0.414	0.307
菌株或毒素	SEA	SEB	A	B	E	C ₁	C ₂	—
OD _{490nm}	2.402	2.412	0.803	0.674	0.418	0.613	0.698	—
阴性对照1	0.321	0.323	0.353	0.298	0.293	0.324	0.292	—

注: A、B、E、C₁、C₂为金黄色葡萄球菌, C.b_A、C.b_B、C.b_C为肉毒梭菌。

琼脂扩散试验表明, VT_{1B}为 $64^{\times}$,其它毒素的抗体效价均为 $16^{\times}$ 。ELISA试验结果表明, VT_{1B}为 $51200^{\times}$,SEA为 $6400^{\times}$,VT_{2B}为 $12800^{\times}$,Hc为 $6400^{\times}$,SEB为 $6400^{\times}$ 。可溶性表达蛋白和包涵体免疫家兔产生的抗体效价几乎相同。与相关毒素属以外的毒素和其它26种常见食源性病原菌培养物没有明显可见的ELISA反应,但与在这三种菌属内的毒素有一定的交叉反应。抗体与对应毒素的ELISA反应敏感性分别为Hc31.25ng/mL,VT_{1B}3.75ng/mL,SEA125.00ng/mL,VT_{2B}7.50ng/mL,SEB62.

50ng/mL。

实施例 5 模拟食物样品的检测

将 5 种产毒菌种培养物与牛奶混合，制备成 5 个稀释系列，血清被稀释成 $3000\times$ ，用 ELISA 测定模拟食物样品，每个稀释系列模拟样品 30 份。

对于乳的模拟样品的共 150 份样品的 ELISA 检测均出现了阳性结果，而对照并有杂菌干扰的样品均为阴性。不同稀释度测定结果表明，ELISA 的检测敏感性可达 4×10^{-2} ng 毒素/mL 乳。见表 2

表 2 模拟样品（乳）ELISA 敏感性测定

毒素	稀 释					阴性
	4 (μ g)	4×10^{-1}	4×10^{-2}	4×10^{-3}	4×10^{-4}	对照
BoNTs	2.02	2.00	1.60	1.40	0.70	0.15
SEA	2.22	2.10	1.50	1.40	0.65	0.20
SEB	2.13	2.10	1.60	1.43	0.70	0.18
VT	2.73	2.42	2.00	2.00	1.60	0.80

实施例 6 食品中细菌毒素 ELISA 检测试剂盒

试剂和材料

- 1、聚苯乙烯塑料微量组织培养板
- 2、包被液（pH9.6mol 碳酸盐缓冲液）
- 3、洗涤液（pH7.4、0.01molPBS）
- 4、保温液（含 BSA0.1g,0.05%PBS-Tween-20/100mL）
- 5、底物溶液：①pH5.0,0.2mol 的磷酸盐—柠檬酸缓冲液；②用磷酸盐—柠檬酸缓冲液 100mL，现用现配，加入邻苯二胺（OPD）40mg,30%H₂O₂0.15mL
- 6、终止液（2molH₂SO₄）

7、血清抗体（3000 倍稀释）

8、酶标羊抗兔抗体（1:400 倍稀释）

操作方法

1. 样品处理

乳类食品：鲜奶可直接作为样品，如果浓稠的用 PBS 稀释 2 倍。

肉类食品：将肉粉碎后用 PBS 稀释 3 倍，取上清作为测定样品。

2. 抗原包被：用百百液做 10 倍稀释后，每孔加 100 μ L，不家抗原作空白对照，4℃过夜。

3. 洗涤：用洗涤液洗涤 3 次，每次浸润 3 分钟，沥干。

4. 将保温液稀释的血清每孔加 100 μ L，37℃1 小时。

5. 同样洗涤 3 次。

6. 加入酶标二抗 100 μ L / 孔，37℃1 小时。

7. 同样洗涤 3 次。

8. 加入底物，100 μ L / 孔，置暗盒内显色 20 分钟。

9. 加入终止液 50 μ L / 孔，静止 5 分钟。

10. 490nm 测 OD 值。与阴性值相差两倍以上即为阳性。

<110> 吉林大学畜牧兽医学院

<120> 食物中毒菌多联融合毒素

<130> liuzs2005

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2928

<212> DNA

<213> 人工

<400> 1

```

atggaccttt ccaaatacgt agataatcaa agattattat ctacatttac tgaatatatt      60
aagaatatta ttaatacttc tatattgaat ttaagatatg aaagtaatca tttaatagac      120
ttatctaggt atgcatcaaa aataaatatt ggtagtaaag taaattttga tccaatagat      180
aaaaatcaaa ttcaattatt taatttagaa agtagtaaaa ttgaggtaat tttaaaaaat      240
gctattgtat ataatagtat gtatgaaaat tttagtacta gcttttggat aagaattcct      300
aagtatttta acagtataag tctaaataat gaatatacaa taataaattg tatggaaaat      360
aattcaggat ggaaagtatc acttaattat ggtgaaataa tctggacttt acaggatact      420
caggaaataa aacaagagt agtttttaaa tacagtcaaa tgattaatat atcagattat      480
ataaacagat ggatttttgt aactatcact aataatagat taaataactc taaaatttat      540
ataaatggaa gattaataga tcaaaaacca atttcaaatt taggtaatat tcatgctagt      600
aataatataa tgtttaaatt agatggttgt agagatacac atagatatat ttggataaaa      660
tattttaatc tttttgataa ggaattaaat gaaaaagaaa tcaaagattt atatgataat      720
caatcaaatt caggtatttt aaaagacttt tggggtgatt atttacaata tgataaacca      780
tactatatgt taaatttata tgatccaaat aaatatgtcg atgtaaataa tgtaggtatt      840

```

agaggttata tgtatcttaa agggcctaga ggtagcgtaa tgactacaaa catttattta	900
aattcaagtt tgtatagggg gacaaaattt attataaaaa aatatgcttc tggaaataaa	960
gataatattg ttagaaataa tgatcgtgta tatattaatg tagtagttaa aaataaagaa	1020
tataggttag ctactaatgc atcacaggca ggcgtagaaa aaatactaag tgcattagaa	1080
ataacctgat taggaaatct aagtcaagta gtagtaatga agtcaaaaaa tgatcaagga	1140
ataacaaata aatgcaaaat gaatttaca gataataatg ggaatgatag aggctttata	1200
ggatttcac agtttaataa tatagctaaa ctagtagcaa gtaattggtta taatagacaa	1260
atagaaagat ctagtaggac tttgggttgc tcatgggaat ttattcctgt agatgatgga	1320
tggggagaaa ggccactggg tccgggtccg ggcacgcctg attgtgtaac tggaaagggtg	1380
gagtatacaa aatataatga tgacgatacc ttacagtta aagtgggtga taaagaatta	1440
ttaccaaca gatggaatct tcagtctctt cttctcagt cgcaaattac ggggatgact	1500
gtaaccatta aaactaatgc ctgtcataat ggagggggat tcagcgaagt tatttttcgt	1560
ggtccgggtc cgggcagcga gaaaagcgaa gaaataaatg aaaaagattt gcgaaaaaag	1620
tctgaattgc agggaacagc tttaggcaat cttaacaaa tctattatta caatgaaaaa	1680
gctaaaactg aaaataaaga gagtcacgat caatttttac agcatactat attgtttaaa	1740
ggctttttta cagatcattc gtggtataac gatttattag tagattttga ttcaaaggat	1800
attgttgata aatataaagg gaaaaaagta gacttgatg gtgcttatta tggttatcaa	1860
tgtgcgggtg gtacacaaa caaacagct tgtatgtatg gtggtgtaac gttacatgat	1920
aataatcgat tgaccgaaga gaaaaaagtg ccgatcaatt tatggctaga cggtaaacia	1980
aatacagtac ctttggaac ggttaaaacg aataagaaaa atgtaactgt tcaggagttg	2040
gatcttcaag caagacgtta ttacaggaa aaatataatt tatataactc tgatgttttt	2100
gatgggaagg ttcagagggg attaactgtg tttcatactt ctacagaacc ttcggttaat	2160

```

tacgatttat ttggtgctca aggacagtat tcaaatacac tattaagaat atatagagat 2220
aataaaacga ttaactctga aaacatgcat attgatatat atttatatac aagtgggtccg 2280
gggccgggcg cggattgtgc taaaggtaaa attgagtttt ccaagtataa tgaggatgac 2340
acatttacag tgaaggttga cgggaaagaa tactggacca gtcgctggaa tctgcaaccg 2400
ttactgcaaa gtgctcagtt gacaggaatg actgtcacia tcaaattccag tacctgtgaa 2460
tcaggctccg gatttgctga agtgcagttt aataatgacg gtccgggtcc gggcgagagt 2520
caaccagatc ctaaaccaga tgagttgcac aaatcgagta aattcactgg tttgatggaa 2580
aatatgaaag ttttgtatga tgataatcat gtatcagcaa taaacgttaa atctatagat 2640
caatttctat actttgactt aatatattct attaaggaca ctaagttagg gaattatgat 2700
aatgttcgag tcgaatttaa aaacaaagat ttagctgata aatacaaaga taaatacgta 2760
gatgtgtttg gagctaatta ttattatcaa tgttattttt ctaaaaaaac gaatgatatt 2820
aattcgcac aaactgacaa acgaaaaact tgtatgtatg gtggtgtaac tgagcataat 2880
ggaaaccaat tagataaata tagaagtatt actgttcggg tatttgaa 2928

```

<210> 2

<211> 976

<212> PRT

<213> 人工

<400> 2

```

Met Asp Leu Ser Lys Tyr Val Asp Asn Gln Arg Leu Leu Ser Thr Phe
1           5           10           15

```

```

Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Ile Ile Asn Thr Ser Ile Leu Asn Leu Arg
          20           25           30

```

```

Tyr Glu Ser Asn His Leu Ile Asp Leu Ser Arg Tyr Ala Ser Lys Ile
          35           40           45

```

```

Asn Ile Gly Ser Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Asp Lys Asn Gln Ile
          50           55           60

```

Gln Leu Phe Asn Leu Glu Ser Ser Lys Ile Glu Val Ile Leu Lys Asn
 65 70 75 80

Ala Ile Val Tyr Asn Ser Met Tyr Glu Asn Phe Ser Thr Ser Phe Trp
 85 90 95

Ile Arg Ile Pro Lys Tyr Phe Asn Ser Ile Ser Leu Asn Asn Glu Tyr
 100 105 110

Thr Ile Ile Asn Cys Met Glu Asn Asn Ser Gly Trp Lys Val Ser Leu
 115 120 125

Asn Tyr Gly Glu Ile Ile Trp Thr Leu Gln Asp Thr Gln Glu Ile Lys
 130 135 140

Gln Arg Val Val Phe Lys Tyr Ser Gln Met Ile Asn Ile Ser Asp Tyr
 145 150 155 160

Ile Asn Arg Trp Ile Phe Val Thr Ile Thr Asn Asn Arg Leu Asn Asn
 165 170 175

Ser Lys Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Pro Ile Ser
 180 185 190

Asn Leu Gly Asn Ile His Ala Ser Asn Asn Ile Met Phe Lys Leu Asp
 195 200 205

Gly Cys Arg Asp Thr His Arg Tyr Ile Trp Ile Lys Tyr Phe Asn Leu
 210 215 220

Phe Asp Lys Glu Leu Asn Glu Lys Glu Ile Lys Asp Leu Tyr Asp Asn
 225 230 235 240

Gln Ser Asn Ser Gly Ile Leu Lys Asp Phe Trp Gly Asp Tyr Leu Gln
 245 250 255

Tyr Asp Lys Pro Tyr Tyr Met Leu Asn Leu Tyr Asp Pro Asn Lys Tyr
 260 265 270

Val Asp Val Asn Asn Val Gly Ile Arg Gly Tyr Met Tyr Leu Lys Gly
 275 280 285

Pro Arg Gly Ser Val Met Thr Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Ser Leu
 290 295 300

Tyr Arg Gly Thr Lys Phe Ile Ile Lys Lys Tyr Ala Ser Gly Asn Lys
 305 310 315 320

Asp Asn Ile Val Arg Asn Asn Asp Arg Val Tyr Ile Asn Val Val Val
 325 330 335

Lys Asn Lys Glu Tyr Arg Leu Ala Thr Asn Ala Ser Gln Ala Gly Val
 340 345 350

Glu Lys Ile Leu Ser Ala Leu Glu Ile Pro Asp Val Gly Asn Leu Ser
 355 360 365

Gln Val Val Val Met Lys Ser Lys Asn Asp Gln Gly Ile Thr Asn Lys
 370 375 380

Cys Lys Met Asn Leu Gln Asp Asn Asn Gly Asn Asp Ile Gly Phe Ile
 385 390 395 400

Gly Phe His Gln Phe Asn Asn Ile Ala Lys Leu Val Ala Ser Asn Trp
 405 410 415

Tyr Asn Arg Gln Ile Glu Arg Ser Ser Arg Thr Leu Gly Cys Ser Trp
 420 425 430

Glu Phe Ile Pro Val Asp Asp Gly Trp Gly Glu Arg Pro Leu Gly Pro
 435 440 445

Gly Pro Gly Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr Lys
 450 455 460

Tyr Asn Asp Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu Leu
 465 470 475 480

Phe Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln Ile
 485 490 495

Thr Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly Gly
 500 505 510

Gly Phe Ser Glu Val Ile Phe Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ser Glu Lys
 515 520 525

Ser Glu Glu Ile Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser Glu Leu Gln
 530 535 540

Gly Thr Ala Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr Asn Glu Lys
545 550 555 560

Ala Lys Thr Glu Asn Lys Glu Ser His Asp Gln Phe Leu Gln His Thr
565 570 575

Ile Leu Phe Lys Gly Phe Phe Thr Asp His Ser Trp Tyr Asn Asp Leu
580 585 590

Leu Val Asp Phe Asp Ser Lys Asp Ile Val Asp Lys Tyr Lys Gly Lys
595 600 605

Lys Val Asp Leu Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Tyr Gln Cys Ala Gly Gly
610 615 620

Thr Pro Asn Lys Thr Ala Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Leu His Asp
625 630 635 640

Asn Asn Arg Leu Thr Glu Glu Lys Lys Val Pro Ile Asn Leu Trp Leu
645 650 655

Asp Gly Lys Gln Asn Thr Val Pro Leu Glu Thr Val Lys Thr Asn Lys
660 665 670

Lys Asn Val Thr Val Gln Glu Leu Asp Leu Gln Ala Arg Arg Tyr Leu
675 680 685

Gln Glu Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Ser Asp Val Phe Asp Gly Lys Val
690 695 700

Gln Arg Gly Leu Ile Val Phe His Thr Ser Thr Glu Pro Ser Val Asn
705 710 715 720

Tyr Asp Leu Phe Gly Ala Gln Gly Gln Tyr Ser Asn Thr Leu Leu Arg
725 730 735

Ile Tyr Arg Asp Asn Lys Thr Ile Asn Ser Glu Asn Met His Ile Asp
740 745 750

Ile Tyr Leu Tyr Thr Ser Gly Pro Gly Pro Gly Ala Asp Cys Ala Lys
755 760 765

Gly Lys Ile Glu Phe Ser Lys Tyr Asn Glu Asp Asp Thr Phe Thr Val
770 775 780

Lys Val Asp Gly Lys Glu Tyr Trp Thr Ser Arg Trp Asn Leu Gln Pro
785 790 795 800

Leu Leu Gln Ser Ala Gln Leu Thr Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Ser
805 810 815

Ser Thr Cys Glu Ser Gly Ser Gly Phe Ala Glu Val Gln Phe Asn Asn
820 825 830

Asp Gly Pro Gly Pro Gly Glu Ser Gln Pro Asp Pro Lys Pro Asp Glu
835 840 845

Leu His Lys Ser Ser Lys Phe Thr Gly Leu Met Glu Asn Met Lys Val
850 855 860

Leu Tyr Asp Asp Asn His Val Ser Ala Ile Asn Val Lys Ser Ile Asp
865 870 875 880

Gln Phe Leu Tyr Phe Asp Leu Ile Tyr Ser Ile Lys Asp Thr Lys Leu
885 890 895

Gly Asn Tyr Asp Asn Val Arg Val Glu Phe Lys Asn Lys Asp Leu Ala
900 905 910

Asp Lys Tyr Lys Asp Lys Tyr Val Asp Val Phe Gly Ala Asn Tyr Tyr
915 920 925

Tyr Gln Cys Tyr Phe Ser Lys Lys Thr Asn Asp Ile Asn Ser His Gln
930 935 940

Thr Asp Lys Arg Lys Thr Cys Met Tyr Gly Gly Val Thr Glu His Asn
945 950 955 960

Gly Asn Gln Leu Asp Lys Tyr Arg Ser Ile Thr Val Arg Val Phe Glu
965 970 975

<210> 3

<211> 1338

<212> DNA

<213> 肉毒梭菌毒素 A

<400> 3

atggaccttt ccaaatacgt agataatcaa agattattat ctacatttac tgaatatatt 60

aagaatatta ttaatacttc tatattgaat ttaagatatg aaagtaatca tttaatagac	120
ttatctaggt atgcatcaaa aataaatatt ggtagtaaag taaattttga tccaatagat	180
aaaaatcaaa ttcaattatt taatttagaa agtagtaaaa ttgaggaat tttaaaaaat	240
gctattgtat ataatagtat gtatgaaaat tttagtacta gcttttggat aagaattcct	300
aagtatttta acagtataag tctaaataat gaatatacaa taataaattg tatggaaaat	360
aattcaggat ggaaagtatc acttaattat ggtgaaataa tctggacttt acaggatact	420
caggaaataa aacaaagagt agtttttaaa tacagtcaaa tgattaatat atcagattat	480
ataaacagat ggatttttgt aactatcact aataatagat taaataactc taaaatttat	540
ataaatggaa gattaataga tcaaaaacca atttcaaatt taggtaatat tcatgctagt	600
aataatataa tgtttaaatt agatggttgt agagatacac atagatatat ttggataaaa	660
tattttaatc tttttgataa ggaattaaat gaaaaagaaa tcaaagattt atatgataat	720
caatcaaatt caggtatttt aaaagacttt tggggtgatt atttacaata tgataaacca	780
tactatatgt taaatttata tgatccaaat aaatatgtcg atgtaaataa tgtaggtatt	840
agaggttata tgtatcttaa agggcctaga ggtagcgtaa tgactacaaa catttattta	900
aattcaagtt tgtatagggg gacaaaattt attataaaaa aatatgcttc tggaaataaa	960
gataatattg ttagaaataa tgatcgtgta tatattaatg tagtagttaa aaataaagaa	1020
tataggttag ctactaatgc atcacaggca ggcgtagaaa aaataactaag tgcattagaa	1080
atacctgatg taggaaatct aagtcaagta gtagtaatga agtcaaaaaa tgatcaagga	1140
ataacaaata aatgcaaaat gaatttaca gataataatg ggaatgatat aggctttata	1200
ggatttcac agtttaataa tatagctaaa ctagtagcaa gtaattggta taatagacaa	1260
atagaaagat ctagtaggac tttgggttgc tcatgggaat ttattcctgt agatgatgga	1320
tggggagaaa ggccactg	1338

<210> 4
 <211> 699
 <212> DNA
 <213> 金黄色葡萄球菌肠毒素 A

<400> 4
 agcgagaaaa gcgaagaaat aaatgaaaaa gatttgcgaa aaaagtctga attgcaggga 60
 acagcttttag gcaatcttaa acaaatctat tattacaatg aaaaagctaa aactgaaaaat 120
 aaagagagtc acgatcaatt tttacagcat actatattgt ttaaaggctt ttttacagat 180
 cattcgtggt ataacgattt attagtagat ttgattcaa aggatattgt tgataaatat 240
 aaagggaaaa aagtagactt gtatggtgct tattatgggt atcaatgtgc gggtggtaca 300
 ccaaacaaaa cagcttgtat gtatggtggt gtaacgttac atgataataa tcgattgacc 360
 gaagagaaaa aagtgccgat caatttatgg ctagacggta aacaaaatac agtacctttg 420
 gaaacggtta aaacgaataa gaaaaatgta actgttcagg agttggatct tcaagcaaga 480
 cgttatttac aggaaaaata taatttatat aactctgatg tttttgatgg gaagggtcag 540
 aggggattaa tcgtgtttca tacttctaca gaaccttcgg ttaattacga tttatttggt 600
 gctcaaggac agtattcaaa tacactatta agaatatata gagataataa aacgattaac 660
 tctgaaaaca tgcattattga tatatattta tatacaagt 699

<210> 5
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 金黄色葡萄球菌肠毒素 B

<400> 5
 gagagtcaac cagatcctaa accagatgag ttgcacaaat cgagtaaatt cactggtttg 60
 atggaaaata tgaaagtttt gtatgatgat aatcatgtat cagcaataaa cgtaaattct 120
 atagatcaat ttctatactt tgacttaata tattctatta aggacactaa gttaggaat 180
 tatgataatg ttcgagtcga atttaaaaac aaagatttag ctgataaata caaagataaa 240

tacgtagatg tgtttggagc taattattat tatcaatgtt atttttctaa aaaaacgaat 300

gatattaatt cgcatcaaac tgacaaacga aaaacttgta tgtatggtgg tgtaactgag 360

cataatggaa accaattaga taaatataga agtattactg ttcgggtatt tgaa 414

<210> 6

<211> 213

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 O 157:H7 veroB

<400> 6

atggatacgc ctgatttgtt aactggaaag gtggagtata caaaatataa tgatgacgat 60

acctttacag ttaaagtggg tgataaagaa ttatttacca acagatggaa tcttcagtct 120

cttcttctca gtgcgcaaata tacggggatg actgtaacca ttaaaactaa tgcctgtcat 180

aatggagggg gattcagcga agttatTTTT cgt 213

<210> 7

<211> 210

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 O 157:H7 veroB

<400> 7

gcggattgtg ctaaaggtaa aattgagttt tccaagtata atgaggatga cacatttaca 60

gtgaagggtg acgggaaaga atactggacc agtcgctgga atctgcaacc gttactgcaa 120

agtgctcagt tgacaggaat gactgtcaca atcaaatacca gtacctgtga atcaggctcc 180

ggatttgctg aagtgcagtt taataatgac 210

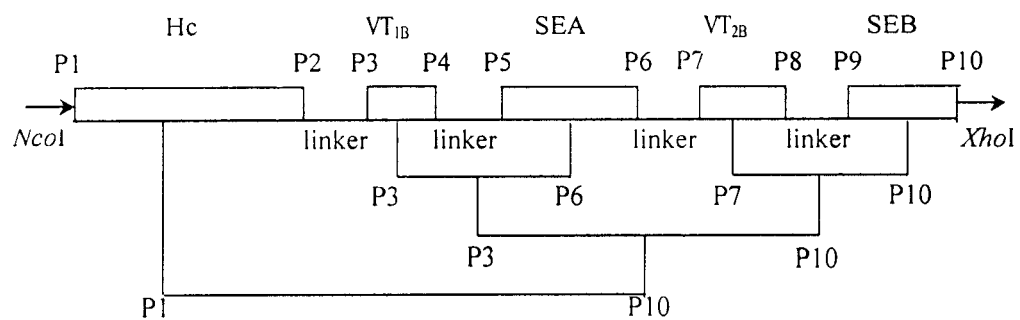


图 1

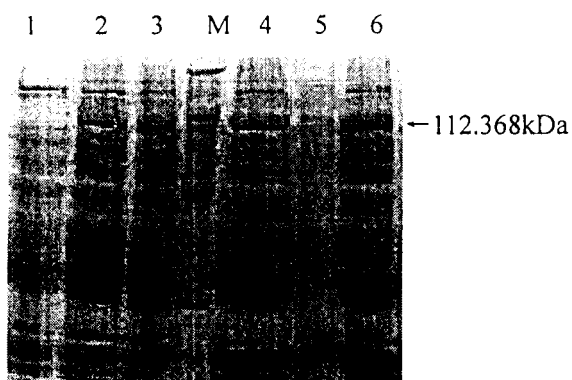


图 2

专利名称(译)	一种食物中毒菌多联融合毒素及其用途		
公开(公告)号	CN1818066A	公开(公告)日	2006-08-16
申请号	CN200510017147.2	申请日	2005-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	柳增善 于师宇 孟宪梅		
发明人	柳增善 于师宇 孟宪梅		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/62 C07K14/195 C07K19/00 C07K16/12 G01N33/53		
其他公开文献	CN100368546C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种食物中毒菌多联融合毒素及其用途，属于生物技术领域。肉毒梭菌毒素A基因Hc、金黄色葡萄球菌肠毒素A基因SEA、B基因SEB、大肠杆菌O 157：H7veroB亚基毒素基因VT1B、VT2B，用连接序列linker串联起来形成Hc - VT1B - SEA - VT2B - SEB，及其所编码表达的可溶性食物中毒菌多联融合毒素蛋白及其用途。优点及有益效果在于：得到抗5种细菌毒素的血清抗体，与五种毒素具有非常高的特异性和反应敏感性，同时与一定范围相近型别的毒素有交叉反应，用以解决目前食品检测过程复杂而又较为漫长，缺乏广泛性多联融合毒素试剂盒的问题。

