

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810069914.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 101319224A

[51] Int. Cl. (续)

C12R 1/19 (2006.01)

[22] 申请日 2008.7.1

[21] 申请号 200810069914.8

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号

[72] 发明人 张锡林

[74] 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司

代理人 赵荣之

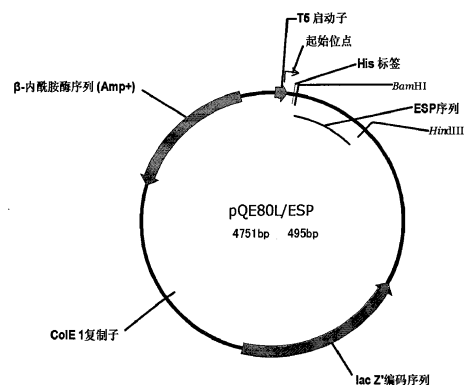
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用

[57] 摘要

本发明公开了肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用；本发明的重组表达载体含有肺吸虫排泄分泌蛋白的编码基因，其核苷酸序列如 SEQ ID No. 1 所示，表达载体为 pQE-80L；本发明的工程菌含有本发明的重组表达载体，宿主菌为大肠杆菌；利用本发明的重组表达载体制备肺吸虫排泄分泌蛋白的方法，包括工程菌的构建、培养、诱导表达及表达产物的纯化 4 个步骤；所制得的肺吸虫排泄分泌蛋白可用于制备肺吸虫病检测试剂或检测装置；本发明构建的重组表达载体和工程菌，具有表达量高，表达稳定的优点；通过本发明方法制备肺吸虫排泄分泌蛋白，蛋白收率高且免疫反应性高。



1、肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体，其特征在于：含有肺吸虫排泄分泌蛋白的编码基因，其核苷酸序列如 SEQ ID No.1 所示；表达载体为 pQE-80L。

2、肺吸虫排泄分泌蛋白的工程菌，其特征在于：含有权利要求 1 所述的肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体，宿主菌为大肠杆菌。

3、根据权利要求 2 所述的肺吸虫排泄分泌蛋白的工程菌，其特征在于：所述宿主菌为大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株。

4、利用权利要求 1 所述重组表达载体制备肺吸虫排泄分泌蛋白的方法，包括以下步骤：

a. 工程菌的构建

将权利要求 1 所述重组表达载体转化入宿主菌感受态细胞，用含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选培养，获得阳性克隆菌，即工程菌；

b. 工程菌的培养

将步骤 a 所得工程菌接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，于温度 37℃ 振荡过夜；

c. 工程菌的诱导表达

取步骤 b 过夜培养菌液，按 1 : 100 的比例接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，于温度 37℃ 振荡培养 1 小时，加入异丙基硫代半乳糖苷即 IPTG 诱导剂至终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ ，继续培养 5-6 小时，收集菌液，离心，去除上清液，细菌沉淀用磷酸盐缓冲液即 PBS 洗涤 3 次后，用 5 倍体积的细菌裂解液重悬，于冰浴下超声，取超声后的匀浆物离心，收集上清液；

d. 表达产物的纯化

取步骤 c 收集的上清液，利用重组表达载体在表达蛋白氨基端引入的 6 个组氨酸标签，以 Ni^{2+} -NTA 树脂亲和层析法进行纯化，即得肺吸虫排泄分泌蛋白，置 4℃ 保存。

5、根据权利要求 4 所述的制备肺吸虫排泄分泌蛋白的方法，其特征在于：

所述步骤 a 使用的宿主菌为大肠杆菌。

6、根据权利要求 5 所述的制备肺吸虫排泄分泌蛋白的方法，其特征在于：
所述步骤 a 使用的宿主菌为大肠杆菌 BL21（DE3）菌株。

7、利用权利要求 1 所述重组表达载体制得的肺吸虫排泄分泌蛋白在制备肺吸虫病检测试剂或检测装置中的应用。

肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及基因工程领域，特别涉及肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用。

背景技术

肺吸虫病 (Paragonimiasis) 是一种常见和重要的人兽共患寄生虫病，散在流行于我国10多个省、市、自治区，致病虫种主要为卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*) 和斯氏狸殖吸虫 (*Pagumogonimus skrjabini*)，尤其斯氏狸殖吸虫作为仅在我国流行的一种吸虫，其在人体内不能发育成熟，而以幼虫在人体内移行、窜扰，常常引起游走性皮下包块或结节，脑占位性病变和内脏损伤等肺外型寄生虫表现，造成多器官、组织的损害。肺吸虫病由于临床症状不典型，易与其他疾病混淆，病原学检查又难以发现虫卵、虫体，目前主要采用免疫学方法进行确诊，但现有的免疫学方法存在一些缺陷，如诊断抗原主要为虫体粗抗原，易与其它吸虫出现交叉反应；无疗效考核作用；各实验室采用的诊断抗原标准不一致，无法对各实验室的检测结果进行比较；天然抗原的获得日益困难等，因此，迫切需要研制新的肺吸虫病免疫诊断抗原。

半胱氨酸蛋白酶 (Cysteine protease) 是多种寄生虫分泌、排泄的一种蛋白水解酶，也是免疫优势抗原，并具有明显的种、属特异性。发明人研究发现，斯氏狸殖吸虫的半胱氨酸蛋白酶对宿主具有免疫原性和反应性，能诱导免疫反应，可作为肺吸虫病的免疫诊断抗原；因该蛋白酶的免疫组化反应呈现虫体的肠道、排泄囊内，其编码基因杂交定位在成虫的肠壁、体壁，故将该蛋白酶又称为肺吸虫排泄分泌蛋白 (Excretory-secretory protein, ESP)。

由于天然肺吸虫ESP蛋白来源有限，难以大规模生产，不能满足临床免疫诊

断的需要,而利用分子生物学手段、技术对肺吸虫ESP蛋白进行cDNA克隆、构建重组表达载体并诱导表达是解决此问题的一个重要方法,因此,本领域迫切需
要开发能够高效表达肺吸虫ESP蛋白的重组表达载体、工程菌和制备方法。

发明内容

有鉴于此,为了能够高效表达肺吸虫 ESP 蛋白,并且表达稳定、表达产物免疫反应性高,本发明的目的之一在于提供一种肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体,含有肺吸虫 ESP 蛋白的编码基因,其核苷酸序列如 SEQ ID No.1 所示,表达载体为 pQE-80L。

本发明的目的之二在于提供一种肺吸虫 ESP 蛋白的工程菌,含有所述肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体,宿主菌为大肠杆菌。

进一步,所述宿主菌为大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株。

本发明的目的之三在于提供利用所述重组表达载体制备肺吸虫 ESP 蛋白的方法,包括以下步骤:

a. 工程菌的构建

将所述肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体转化入宿主菌感受态细胞,用含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选培养,获得阳性克隆菌,即工程菌;

b. 工程菌的培养

将步骤 a 所得工程菌接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,于温度 37℃ 振荡过夜;

c. 工程菌的诱导表达

取步骤 b 过夜培养菌液,按 1:100 的比例接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,于温度 37℃ 振荡培养 1 小时,加入异丙基硫代半乳糖苷即 IPTG 诱导剂至终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,继续培养 5-6 小时,收集菌液,离心,去除上清液,细菌沉淀用磷酸盐缓冲液即 PBS 洗涤 3 次后,用 5 倍体积的细菌裂解液重悬,于冰浴下超声,取超声后的匀浆物离心,收集上清液;

d. 表达产物的纯化

取步骤 c 收集的上清液, 利用重组表达载体在表达蛋白氨基端引入的 6 个组氨酸标签, 以 Ni^{2+} -NTA 树脂亲和层析法进行纯化, 即得肺吸虫 ESP 蛋白, 置 4°C 保存。

进一步, 所述步骤 a 使用的宿主菌为大肠杆菌;

进一步, 所述步骤 a 使用的宿主菌为大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株。

本发明的目的之四在于提供利用所述重组表达载体制得的肺吸虫 ESP 蛋白在制备肺吸虫病检测试剂或检测装置中的应用。

本发明的有益效果在于: 本发明构建的肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体和工程菌, 具有表达量高, 表达稳定的优点; 利用本发明的重组表达载体制备肺吸虫 ESP 蛋白的方法, 蛋白收率高且免疫反应性高; 用制得的肺吸虫 ESP 蛋白免疫动物, 可制备特异性抗体, 还可进一步制备肺吸虫病检测试剂或检测装置; 采用肺吸虫 ESP 蛋白和其多克隆抗体制得的肺吸虫病检测试剂盒和检测装置, 具有高度特异、敏感性, 并具有疗效考核作用, 可以准确、快速、简便地进行肺吸虫病的诊断与鉴别诊断、以及疗效考核, 具有重要的临床应用价值。

本发明的其他优点、目标, 和特征在某种程度上将在随后的说明书中进行阐述, 并且在某种程度上, 基于对下文的考察研究对本领域技术人员而言将是显而易见的, 或者可以从本发明的实践中得到教导。本发明的目标和其他优点可以通过下面的说明书和权利要求书来实现和获得。

附图说明

为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚, 下面将结合附图和优选实施例对本发明作进一步的详细描述, 其中:

图 1 为肺吸虫 ESP 蛋白编码基因 RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图;

图 2 为双酶切阳性克隆质粒的琼脂糖凝胶电泳图;

图 3 为重组表达载体 pQE-80L/ESP 的定向构建流程图;

图 4 为大肠杆菌诱导表达产物的 SDS-PAGE 图。

具体实施方式

本发明采用分子生物学方法,从斯氏狸殖吸虫成虫中提取虫体总 RNA,通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)获得肺吸虫 ESP 蛋白的编码 DNA 序列,将此 DNA 序列克隆入原核表达载体中,构建重组表达载体,并转化入宿主菌中,经过反复筛选和表达量检测,获得高效稳定表达肺吸虫 ESP 蛋白的工程菌,为肺吸虫 ESP 蛋白的高效大规模生产提供了基础。

许多表达载体可用于肺吸虫 ESP 蛋白的原核表达,如 pET22b(+),PinPoint™ Xa-1 T、pQE-80L 等。本发明通过比较研究发现, pQE-80L 是一种特别优选的载体。pQE-80L 属于 pDS 质粒家族,来源于 pDS56/RBS II 和 pDS781/RBS II-DHFRS 质粒,是基于噬菌体 T5 启动子的转录翻译系统,带有两个乳糖操纵子识别序列,可以增加乳糖阻滞蛋白的结合从而保证功能强大的 T5 启动子受阻滞调控,避免菌体生长前期高表达对菌体生长的影响,同时减少菌体蛋白酶对目的蛋白的降解,从而大大提高目的蛋白的表达量,特别适宜于对宿主菌有毒性的目的蛋白的表达; pQE-80L 还可使表达蛋白的氨基端带上 6 个组氨酸标签(His-tag),利用 $6 \times \text{His-tag}$ 与 Ni^{2+} 的高度亲和力,方便采用 Ni^{2+} -NAT 树脂亲和层析法对目的蛋白进行纯化,使其纯度达 90%以上,同时也利于用抗 His 的抗体进行鉴定。

可用于构建本发明工程菌的宿主菌没有特别限制,代表性例子包括 DH5 α 、JM109、M15、BL21 等多种大肠杆菌。本发明通过比较研究发现,大肠杆菌 BL21(DE3)菌株是特别优选的宿主菌。BL21(DE3)大肠杆菌为 Lon 蛋白酶和 Omp T 蛋白酶缺陷型,在进行表达产物的纯化时可以保持目的蛋白的稳定,使其不被降解。

利用本发明的重组表达载体构建工程菌,所得工程菌可用常规方法进行培养及诱导表达,制备肺吸虫 ESP 蛋白。本发明通过系统研究发现,在培养条件下,诱导温度和时间对肺吸虫 ESP 蛋白的表达影响最大,特别优选的诱导表达方法为采用含氨苄青霉素的液体 LB 培养基,于温度 37℃ 振荡培养 1 小时后,再加入 IPTG 诱导剂至终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,并继续培养 5-6 小时。采用此方

法制备肺吸虫 ESP 蛋白, 蛋白表达量可由常规培养条件下的 4% 提高到 20% ($P < 0.05$), 在扩大培养的条件下, 产量将进一步提高。

以下将参照附图, 对本发明的优选实施例进行详细的描述。应当理解, 优选实施例仅为了说明本发明, 而不是为了限制本发明的保护范围。优选实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如分子克隆实验指南 (第三版, J. 萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译, 科学出版社, 2002 年) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

(一) 肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体的构建

1、引物的设计与合成

根据卫氏并殖吸虫以及其它寄生虫半胱氨酸蛋白酶的保守氨基酸序列, 设计并合成如下兼并引物 (兼并引物是代表编码单个氨基酸所有不同碱基可能性的不同序列的混合物): P1: 5' -tca (ag) gg (agct) ca (ag) tg (ct) gg (agct) tc (agct) tg (ct) tgg-3' (SEQ ID No. 3); P2: 5' -cca (ag) ct (ag) tt (ct) tt (agct) ac (ag) atc ca (ag) ta-3' (SEQ ID No. 4); 上述引物序列括号内为该位点不同的碱基序列;

2、肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的 RT-PCR 扩增

取 2 条斯氏狸殖吸虫成虫 (共 60 mg), 经体积百分浓度为 0.1% 的焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水溶液洗净后, 置匀浆器内, 立即加入 Tripure 试剂 (美国 Roche 公司) 2 ml 于冰浴下匀浆, 按照 Tripure 试剂说明提取虫体总 RNA;

采用 RT-PCR 试剂盒 (北京博大泰克生物基因技术有限责任公司) 进行逆转录及 cDNA 扩增:

逆转录制备 cDNA, 以提取的虫体总 RNA 为模板, 以 Oligo(dT)₁₆ 为逆转录引物, 反应体系为: 浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的总 RNA 10 μl 、浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 Oligo(dT)₁₆ 1 μl 、5 $\times$ MMLV 酶反应缓冲液 4 μl 、浓度为 10 mmol/L 的 dNTPs 1 μl 、MMLV 逆转录酶 200 U、Rnasin 20 U、双蒸水补充至总体积为 20 μl ; 反应条件为: 37°C 水浴 2 小时, 95°C 变性 5 分钟终止反应;

PCR 扩增双链 cDNA, 以逆转录制备的 cDNA 为模板, 以步骤 1 所述兼并引物 P1、P2 为上下游引物, 反应体系为: 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 5 μl 、浓度为 10 mmol/L

的 dNTPs 1 μ l、10 倍稀释的模板 4 μ l、浓度为 10 μ mol/L 的上、下游引物各 2 μ l、Taq DNA 聚合酶 3 U、浓度为 25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 溶液 2 μ l、双蒸水补充至总体积为 50 μ l；反应条件为：94 $^{\circ}C$ 预变性 5 分钟，然后 94 $^{\circ}C$ 变性 1 分钟、43 $^{\circ}C$ 退火 2 分钟、72 $^{\circ}C$ 延伸 2 分钟，共 45 个循环，最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 分钟；

PCR 结束后，采用质量百分浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，结果如图 1 所示，其中 1 泳道为 PCR 分子量标准，2 泳道为 PCR 产物，从图可知，在约 500 bp 的位置出现一条特异性 DNA 条带，与理论预测值相符；

采用 Silver Beads DNA 胶回收试剂盒（上海生物工程技术服务有限公司）对 PCR 产物进行纯化，按照试剂盒说明操作，选择约 500 bp 的目的片段进行切胶回收纯化；

3、肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的克隆和阳性克隆质粒的筛选

将步骤 2 所得纯化的目的片段与 pMD18-T 载体（宝生物工程(大连)有限公司）进行 TA 连接，连接方法为：浓度为 10 ng/ μ l 的目的片段 5 μ l、浓度为 50 ng/ μ l 的 pQE-80L 载体 1 μ l、10 $\times$ 缓冲液 1 μ l、T4 DNA 连接酶 200 U、双蒸水补充至总体积为 10 μ l，置温度 16 $^{\circ}C$ 孵育 8 小时，构建重组克隆载体 pMD18-T/ESP；

将重组克隆载体 pMD18-T/ESP 转化入 $CaCl_2$ 法制备的 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞，转化方法为：将浓度为 10 ng/ μ l 的重组克隆载体 5 μ l 加入到细胞密度为 2×10^9 的感受态细胞 100 μ l 中，冰浴 30 分钟，42 $^{\circ}C$ 水浴热休克 90 秒，立即冰浴 2 分钟，再加入液体 LB 培养基，于温度 37 $^{\circ}C$ ，150 r/min 振摇 1 小时，制得转化细胞；

取转化细胞涂布于蓝白斑筛选培养基平板上，于温度 37 $^{\circ}C$ 倒置过夜，从平板上随机挑取数个白斑，接种到含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，于温度 37 $^{\circ}C$ 、150 r/min 振摇过夜，碱裂解法小量提取质粒，用 EcoR I、Hind III 双酶切和 PCR 法鉴定阳性克隆质粒，酶切方法为：浓度为 300 ng/ μ l 的阳性克隆质粒 10 μ l、浓度为 20 U/ μ l 的 EcoR I 和 Hind III 内切酶各 1 μ l、10 $\times$ 缓冲液 3 μ l、双蒸水补充至总体积为 30 μ l，置温度 37 $^{\circ}C$ 孵育 4 小时，酶切产物进行琼

脂糖凝胶电泳,结果显示两条 DNA 带,其中一条约 500 bp,与目的片段大小一致;以经双酶切鉴定为阳性克隆的质粒为模板,采用兼并引物 P1、P2 为上下游引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,获得一条约 500 bp 的条带,与步骤 2 所得 PCR 产物产生的条带大小一致;

4、肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的序列测定

取步骤 3 所得阳性克隆质粒,委托上海生物工程技术服务有限公司测定插入片段的序列,获得 495bp 的 cDNA 序列(如 SEQ ID No.1 所示),在 Genbank 中进行注册,登录号为 AY083923;根据所得 cDNA 序列,用 DNASIS 程序推导出其编码的氨基酸序列(如 SEQ ID No.2 所示),并与相关虫种的半胱氨酸蛋白酶进行氨基酸序列同源性比较分析,分析结果显示,该序列与相关虫种的半胱氨酸蛋白酶存在较高同源性,组成半胱氨酸催化三联体的半胱氨酸、组氨酸和天冬酰胺残基高度保守;

5、肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的 PCR 扩增

根据步骤 4 所得 cDNA 序列,结合 pQE-80L 表达载体上的内切酶位点,设计如下特异性引物: P3: 5'-cgggatcccaaggtcaatgttgctc-3' (SEQ ID No.5),下划线部分为 BamH I 酶切位点; P4: 5'-ccaagcttgattgttaaaaatagttgg-3' (SEQ ID No.6),下划线部分为 Hind III 酶切位点;

以步骤 3 所得阳性克隆质粒为模板,以特异性引物 P3、P4 为上下游引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后进行切胶回收纯化,再按照步骤 3 所述方法进行克隆和阳性克隆质粒的筛选,阳性克隆质粒经测序验证克隆序列的顺序正确性;

6、肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体的构建

将步骤 5 经测序鉴定的阳性克隆质粒用 BamH I 和 Hind III 进行双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2 所示,其中 1 泳道为酶切产物,2 泳道为 DNA 分子量标准,从图可见两条 DNA 带,其中一条约 500 bp,与目的片段大小一致;将此 DNA 片段进行切胶回收纯化,并与按相同方法经 BamH I 和 Hind III 双酶切消化后的 pQE-80L 载体进行 TA 连接,定向构建重组表达载体

pQE-80L/ESP, 其构建流程如图 3 所示。

(二) 肺吸虫 ESP 蛋白的工程菌的构建

取(一)构建的肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体 pQE-80L/ESP, 转化入 CaCl_2 法制备的 BL21 (DE3) 大肠杆菌 (美国 Novagen 公司) 感受态细胞, 并涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 于温度 37°C 正置 1 小时, 倒置过夜, 从 LB 平板上随机挑取 3 个白色菌落, 接种于液体 LB 培养基中, 于温度 37°C 、 150 r/min 振摇过夜, 提取质粒, 以质粒为模板, 采用特异性引物 P3、P4 为上下游引物进行 PCR 扩增, 以琼脂糖凝胶电泳初步鉴定有无插入片段后, 再通过序列测定确保插入方向正确, 测序结果表明实验获得的质粒为含有肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的重组表达载体 pQE-80L/ESP, 则实验获得的含有该重组表达载体的阳性克隆菌, 即为成功构建的工程菌 pQE-80L/ESP-BL21。

(三) 利用重组表达载体 pQE-80L/ESP 制备肺吸虫 ESP 蛋白

1、工程菌的构建

利用(一)构建的肺吸虫 ESP 蛋白的重组表达载体 pQE-80L/ESP, 按照(二)所述方法构建工程菌 pQE-80L/ESP-BL21;

2、工程菌的培养

取步骤 1 所得工程菌菌落, 同时设 pQE-80L 空载体转化菌落和 BL21 (DE3) 空菌株菌落为对照, 接种于 3 ml 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 于温度 37°C 、 150 r/min 振摇过夜;

3、工程菌的诱导表达

取 $300\text{ }\mu\text{l}$ 步骤 2 过夜培养菌液, 接种于 30 ml 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 于温度 37°C 、 200 r/min 振摇培养 1 小时, 加入浓度为 200 mmol/L 的 IPTG 诱导剂 $300\text{ }\mu\text{l}$, 继续培养 5 小时, 收集菌液, $9\text{ }000\text{ g}$ 离心 5 分钟, 去除上清液, 细菌沉淀用等体积的浓度为 0.01 mol/L 、pH 值为 7.2 的 PBS 洗涤 3 次后, 用 5 倍体积的细菌裂解液重悬, 再于冰浴下超声, 条件为超声 5 秒间隔 5 秒, 重复 50 次, 功率 200 W , 取超声后的匀浆物离心, 收集上清液;

4、表达产物的纯化

取步骤 3 收集的上清液，利用重组表达载体在表达蛋白氨基端引入的 6 个组氨酸标签，以 Ni^{2+} -NTA 树脂（德国 Qiagen 公司）亲和层析法进行纯化，按照说明书中所述步骤操作，即得肺吸虫 ESP 蛋白，置 4℃ 保存。

（四）鉴定

1、重组表达载体的遗传稳定性

方法：挑取本发明工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 的原代及第 10、25、50 代菌株单菌落，分别接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，于温度 37℃ 培养过夜，菌液经适当稀释后涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上，置温度 37℃ 培养 12-16 小时，再随机挑选 100 个菌落接种到含氨苄青霉素的 LB 平板上，置温度 37℃ 培养 12-16 小时，统计长出的菌落数，计算质粒丢失率。

结果：见表 1。

结论：本发明工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 在 LB 平板传代过程中，具有良好的遗传稳定性，重组表达载体 pQE-80L/ESP 可以稳定保留。

表 1、本发明工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 传代时的遗传稳定性

代次	质粒丢失率 (%)
0	0
10	0
25	1
50	2

2、肺吸虫 ESP 蛋白的表达量

方法：取（三）肺吸虫 ESP 蛋白制备步骤 3 收集的上清液，采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测肺吸虫 ESP 蛋白的表达情况；并用凝胶薄层扫描仪（Bio-Rad 公司）和 Quantity-one 软件测定肺吸虫 ESP 蛋白的表达量，同时与采用相同方法构建的其它工程菌 pET22b (+) /ESP-BL21、PinPoint™ Xa-1 T/ESP-JM109 的肺吸虫 ESP 蛋白表达量进行比较。

结果：表达产物的 SDS-PAGE 图见图 4，其中 1 泳道为 pQE-80L/ESP-BL21 菌株，2 泳道为 BL21 (DE3) 空菌株，3 泳道为 pQE-80L 空载体转化菌株，4 泳道为蛋白质分子量标准，从图可知，肺吸虫 ESP 蛋白被 BL21 (DE3) 大肠杆菌在 IPTG 诱导下高效表达，表达产物分子量大小为 22 kDa，与预计大小相一致。

肺吸虫 ESP 蛋白的表达量测定结果见表 2，本发明工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 表达的肺吸虫 ESP 蛋白在菌体总蛋白中所占比例为 27.4%，而工程菌 pET22b(+) /ESP-BL21、PinPoint™ Xa-1 T/ESP-JM109 的肺吸虫 ESP 蛋白表达量分别为 20.1%、12.4%。

结论：本发明构建的重组表达载体 pQE-80L/ESP 和工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 能够高效表达肺吸虫 ESP 蛋白。

表 2、几种工程菌的肺吸虫 ESP 蛋白表达量比较

工程菌	肺吸虫 ESP 蛋白表达量 (%)
pQE-80L/ESP-BL21	27.4
pET22b (+) /ESP-BL21	20.1
PinPoint™ Xa-1 T/ESP-JM109	12.4

3、肺吸虫 ESP 蛋白的免疫反应性

方法：采用半胱氨酸蛋白酶抑制剂捕获酶联免疫吸附法 (Cystatin Capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 测定肺吸虫 ESP 蛋白的效价。取微量反应板，每孔加入浓度为 0.1 mol/L、pH 值为 9.6、含有浓度为 1μg/ml 的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cystatin) 的碳酸盐缓冲液 100 μl，置温度 4℃ 过夜，用 PBST (含有 Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次，加入质量百分浓度为 1% 的脱脂奶粉溶液 100 μl，置温度 37℃ 封闭 2 小时，用 PBST 洗涤 2 次；将肺吸虫 ESP 蛋白分别按 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 和 1:640 作倍比稀释，再加至反应孔中，每孔 100 μl，同时设阳性对照 (标准斯氏狸殖吸虫排泄分泌抗原) 和阴性对照，置温度 4℃ 过夜，加入 1:100 稀释的斯氏狸殖吸虫感染者血清

100 μl, 置温度 37℃ 孵育 2 小时, 加入 1 : 5000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的第二抗体 100 μl, 置温度 37℃ 孵育 2 小时, 加入新制底物缓冲液 100 μl, 置温度 37℃ 孵育 30 分钟, 加入浓度为 2 mol/L 的硫酸 0.05 ml 终止反应, 反应液用 PBS 稀释后, 用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度; 同时与采用相同方法构建的其它工程菌 pET22b (+) /ESP-BL21、PinPoint™ Xa-1 T/ESP-JM109 表达的肺吸虫 ESP 蛋白的效价进行比较。

结果: 见表 3, 本发明工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 表达的肺吸虫 ESP 蛋白的效价为 1 : 640, 而工程菌 pET22b (+) /ESP-BL21、PinPoint™ Xa-1 T/ESP-JM109 表达的肺吸虫 ESP 蛋白的效价分别为 1 : 320、1 : 160。

结论: 本发明工程菌 pQE-80L/ESP-BL21 表达的肺吸虫 ESP 蛋白免疫反应性高。

表 3、几种工程菌表达的肺吸虫 ESP 蛋白的免疫反应性比较

工程菌	肺吸虫 ESP 蛋白的效价
pQE-80L/ESP-BL21	1 : 640
pET22b (+) /ESP-BL21	1 : 320
PinPoint™ Xa-1 T/ESP-JM109	1 : 160

(五) 肺吸虫 ESP 蛋白的应用

免疫印迹 (Western blotting) 实验显示, 肺吸虫 ESP 蛋白具有良好的免疫反应性, 可作为肺吸虫病特异诊断抗原。采用本发明的重组表达载体, 转化宿主菌, 诱导表达肺吸虫 ESP 蛋白, 再用所得肺吸虫 ESP 蛋白免疫动物, 可制备特异性抗体, 还可进一步制得肺吸虫病检测试剂或检测装置。实验证实, 采用肺吸虫 ESP 蛋白和其多克隆抗体制得的肺吸虫病检测试剂盒和检测装置, 具有高度特异、敏感性, 与肝吸虫病、血吸虫病的交叉反应干扰小, 假阳性率低于 ELISA 法, 并具有疗效考核作用, 在肺吸虫病经有效药物治疗后 3-6 月, 检测结果将转阴, 转阴率高于 ELISA 法, 可以准确、快速、简便地进行肺吸虫病

的诊断与鉴别诊断、以及疗效考核，具有重要的临床应用价值。

1、制备肺吸虫病检测试剂盒

一种肺吸虫病检测试剂盒，包括检测条、样品稀释液，检测条由样品垫和吸收垫顺序贴附于带背衬的检测层上构成；检测层上包被有抗人 IgG 抗体形成的检测线和抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体形成的质控线；样品稀释液为浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 7.0-7.2 的 PBS，内含浓度为 5-8 $\mu\text{g/ml}$ 的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1% 的牛血清白蛋白即 BSA；试剂盒内还可设置样品稀释孔。所述检测试剂盒的具体制备方法见中国发明专利申请“肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法”，申请号 2008100695857，申请日 2008.4.25。

2、制备肺吸虫病检测装置

一种肺吸虫病检测装置，包括标记垫、检测层，标记垫中含有胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白；检测层上包被有抗人 IgG 抗体形成的检测线和抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体形成的质控线；包被有检测线和质控线的检测层贴附于背板上，样品垫、标记垫及吸收垫顺序贴附于检测层上，盖板扣盖在贴附有样品垫、标记垫及吸收垫的检测层上；盖板上设有加样孔和观察孔。所述检测装置的具体制备方法见中国发明专利申请“肺吸虫病检测装置及其制备方法”，申请号 2008100695842，申请日 2008.4.25。

3、肺吸虫病检测试剂盒或检测装置的检测方法与结果判定

检测试剂盒的检测方法：取待测血清 15-20 μl 置样品稀释孔内，用样品稀释液稀释至 50 μl ；取出检测条，将检测条的样品垫端浸入制备好的样品中，放置约 5-10 分钟，观察结果。

检测装置的检测方法：取出检测装置，在加样孔内加入待测血清 15-20 μl ，放置约 5-10 分钟，观察结果。

结果判定：当检测条（或检测装置）出现肉眼可见的紫红色质控线，同时出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阳性，记为“+”；检测线颜色越深，说明被检测样品的抗体水平越高；当检测条（或检测装置）出现肉眼可见的紫

红色质控线，没有出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阴性，记为“-”；当检测条（或检测装置）没有出现肉眼可见的紫红色质控线，不管是否出现肉眼可见的紫红色检测线，结果都判为检测条（或检测装置）失效，应废弃。

4、肺吸虫病检测试剂盒或检测装置的鉴定

(1) 特异性

方法：采用本发明所述检测试剂盒或检测装置对肺吸虫病患者、肝吸虫病患者、血吸虫病患者和健康者血清进行检测，并与 ELISA 法进行比较；ELISA 法为常规方法，即将抗原包被于 PVC 条板，取待测血清 10 μ l，加入 PBS 90 μ l，置温度 37℃ 孵育 30 分钟，洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的第二抗体，置温度 37℃ 孵育 30 分钟，洗涤 3 次，3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺（TMB）显色，酶标仪测定 OD 值，待检孔 OD 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性。

结果：见表 4。本发明所述检测试剂盒或检测装置和 ELISA 法检测肺吸虫病患者血清抗体的阳性率分别为 96.5%（55/57）和 100.0%（57/57），两法间差异无显著性（ $P > 0.05$ ）；采用本发明所述检测试剂盒和检测装置检测肝吸虫病患者血清、血吸虫病患者血清和健康者血清，除血吸虫病患者血清的交叉反应率为 5.0% 外，其余两者均为阴性，假阳性率低于 ELISA 法。

结论：本发明所述检测试剂盒或检测装置具有高度特异性，可以用于肺吸虫病的诊断，以及肺吸虫病与其它吸虫病的鉴别诊断。

表 4、本发明所述检测试剂盒或检测装置与 ELISA 法检测不同血清的结果

血清来源	检测 例数	本发明所述检测试剂盒 或检测装置		ELISA 法	
		阳性例数	阳性率 (%)	阳性例数	阳性率 (%)
肺吸虫病患者	57	55	96.5	57	100.0
肝吸虫病患者	20	0	0	3	15.0
血吸虫病患者	20	1	5.0	15	75.0
健康者	50	0	0	1	2.0

(2) 敏感性

方法：采用本发明所述检测试剂盒或检测装置对 28 例疑似肺吸虫病患者血清进行检测，并与 ELISA 法进行比较；ELISA 法为常规方法。

结果：见表 5。两种方法检测结果的总符合率为 100%（21/28）。经 χ^2 检验，两法间差异无显著性（ $P > 0.05$ ）。检测结果呈阳性的 21 例病人最终确诊为肺吸虫病患者，因此，两种方法的敏感性均为 100%。

结论：本发明所述检测试剂盒或检测装置具有高度敏感性。

表 5、本发明所述检测试剂盒或检测装置与 ELISA 法检测敏感性比较

本发明所述检测试剂盒 或检测装置	ELISA 法		合计
	+	-	
+	21	0	21
-	0	7	7
合计	21	7	28

(3) 疗效考核作用

方法：在肺吸虫病患者经有效药物治疗后 3 个月与 6 个月，采用本发明所述检测试剂盒或检测装置对 7 例肺吸虫病患者血清进行检测，并与 ELISA 法进行比较；ELISA 法为常规方法。

结果：采用本发明所述检测试剂盒或检测装置进行检测，7 例肺吸虫病患者经有效药物治疗后 3 个月，有 4 例转阴，转阴率 57.1%；治疗后 6 个月，7 例全部转阴，转阴率 100.0%；而采用 ELISA 法分别于治疗后 3 个月、6 个月检测，无 1 例转阴。

结论：采用本发明所述检测试剂盒或检测装置进行检测，转阴率明显高于 ELISA 法，可用于肺吸虫病的疗效考核。

尽管通过参照本发明的某些优选实施例，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。

<110> 中国人民解放军第三军医大学

<120> 肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用

<160> 2

<210> 1

<211> 495

<212> RNA

<213> 斯氏狸殖吸虫 (Pagumogonimus skrjabini)

<220>

<221> CDS

<222> (1) ... (495)

<400> 1

caa ggt caa tgt ggc tcc tgc tgg gcg ttt tcg gta gta gga aat 45
Gln Gly Gln Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Val Gly Asn
1 5 10 15

att gaa ggt caa tgg ttt ctc aag acc ggt cag ctt atc agt ctg 90
Ile Glu Gly Gln Trp Phe Leu Lys Thr Gly Gln Leu Ile Ser Leu
20 25 30

agc aaa cag caa ttg gtc gat tgt gac aag gtg gac cac gga tgc 135
Ser Lys Gln Gln Leu Val Asp Cys Asp Lys Val Asp His Gly Cys
35 40 45

aat ggt gga tgg cca cca tac aca tac ggc gag atc aaa cgg ttg 180
Asn Gly Gly Trp Pro Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Ile Lys Arg Leu
50 55 60

ggt ggc tta gag acg caa caa gac tat ccc tat att gga aga cag 225
Gly Gly Leu Glu Thr Gln Gln Asp Tyr Pro Tyr Ile Gly Arg Gln
65 70 75

caa acg tgt aga atg gat aag tcg aag ttg ttg acg aaa atc gac 270

Gln	Thr	Cys	Arg	Met	Asp	Lys	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Asp		
				80					85					90		
ggg	tca	att	gtt	ctg	gag	aga	gat	gag	tat	aaa	cag	gca	gct	tgg	315	
Gly	Ser	Ile	Val	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu	Tyr	Lys	Gln	Ala	Ala	Trp		
				95					100					105		
ctc	gca	gaa	cac	gga	cca	atg	gct	tca	act	ctc	aat	gcc	aat	tat	360	
Leu	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Ala	Asn	Tyr		
				110					115					120		
ctt	cag	tac	tac	cga	tcc	gga	atc	agt	cat	ccg	tcc	agg	tat	gag	405	
Leu	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Gly	Ile	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Tyr	Glu		
				125					130					135		
tgt	aat	cct	gct	aga	ctg	aac	cac	ggc	gta	ctg	act	gtg	ggc	tat	450	
Cys	Asn	Pro	Ala	Arg	Leu	Asn	His	Gly	Val	Leu	Thr	Val	Gly	Tyr		
				140					145					150		
ggc	acg	gaa	aat	ggc	att	ccc	tac	tgg	att	gtt	aaa	aat	agt	tgg	495	
Gly	Thr	Glu	Asn	Gly	Ile	Pro	Tyr	Trp	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Trp		
				155					160					165		

<210> 2

<211> 165

<212> PRT

<213> 斯氏狸殖吸虫 (Pagumogonimus skrjabini)

<400> 2

Gln	Gly	Gln	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Val	Val	Gly	Asn		
1				5					10					15		
Ile	Glu	Gly	Gln	Trp	Phe	Leu	Lys	Thr	Gly	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu		
				20					25					30		
Ser	Lys	Gln	Gln	Leu	Val	Asp	Cys	Asp	Lys	Val	Asp	His	Gly	Cys		
				35					40					45		
Asn	Gly	Gly	Trp	Pro	Pro	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu		
				50					55					60		

Gly Gly Leu Glu Thr Gln Gln Asp Tyr Pro Tyr Ile Gly Arg Gln
65 70 75

Gln Thr Cys Arg Met Asp Lys Ser Lys Leu Leu Thr Lys Ile Asp
80 85 90

Gly Ser Ile Val Leu Glu Arg Asp Glu Tyr Lys Gln Ala Ala Trp
95 100 105

Leu Ala Glu His Gly Pro Met Ala Ser Thr Leu Asn Ala Asn Tyr
110 115 120

Leu Gln Tyr Tyr Arg Ser Gly Ile Ser His Pro Ser Arg Tyr Glu
125 130 135

Cys Asn Pro Ala Arg Leu Asn His Gly Val Leu Thr Val Gly Tyr
140 145 150

Gly Thr Glu Asn Gly Ile Pro Tyr Trp Ile Val Lys Asn Ser Trp
155 160 165

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：兼并引物 P1，括号内为该位点不同的碱基序列。

<400> 3

tca (ag) gg (agct) ca (ag) tg (ct) g g (agct) tc (agct) tg (ct) tgg 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：兼并引物 P2，括号内为该位点不同的碱基序列。

<400> 4

cca (ag) ct (ag) tt (ct) tt (agct) a c (ag) atcca (ag) ta 18

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 特异性引物 P3

<400> 5

cgggatccca aggtcaatgt ggctc 25

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 特异性引物 P4

<400> 6

ccaagcttga ttgttaaaaa tagttgg 27

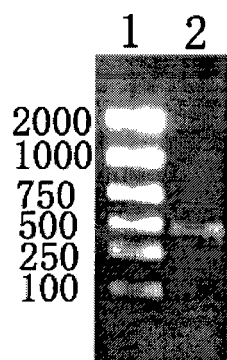


图 1

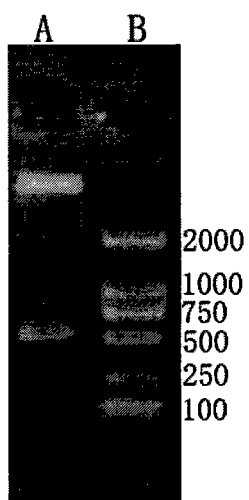


图 2

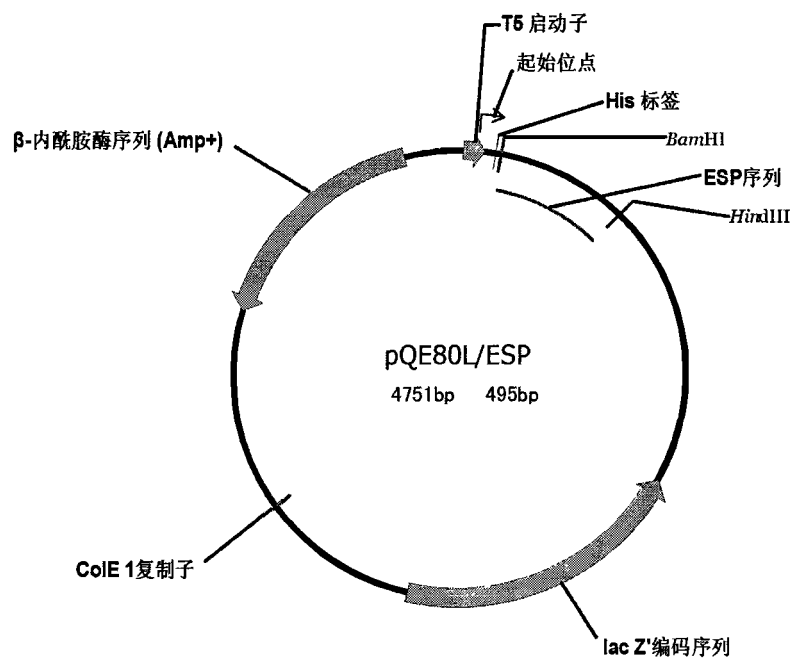


图 3

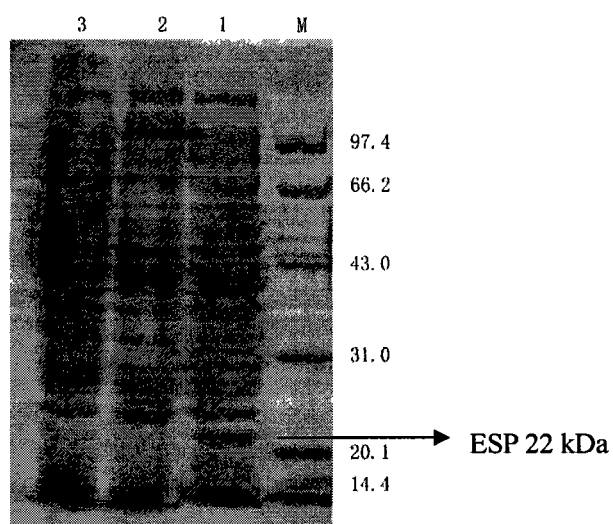


图 4

专利名称(译)	肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN101319224A	公开(公告)日	2008-12-10
申请号	CN200810069914.8	申请日	2008-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	张锡林		
发明人	张锡林		
IPC分类号	C12N15/70 C12N15/12 C12N1/21 C07K14/435 C07K1/14 G01N33/53 C12R1/19		
其他公开文献	CN101319224B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了肺吸虫排泄分泌蛋白的重组表达载体、工程菌、制备方法及其应用；本发明的重组表达载体含有肺吸虫排泄分泌蛋白的编码基因，其核苷酸序列如SEQ ID No.1所示，表达载体为pQE - 80L；本发明的工程菌含有本发明的重组表达载体，宿主菌为大肠杆菌；利用本发明的重组表达载体制备肺吸虫排泄分泌蛋白的方法，包括工程菌的构建、培养、诱导表达及表达产物的纯化4个步骤；所制得的肺吸虫排泄分泌蛋白可用于制备肺吸虫病检测试剂或检测装置；本发明构建的重组表达载体和工程菌，具有表达量高，表达稳定的优点；通过本发明方法制备肺吸虫排泄分泌蛋白，蛋白收率高且免疫反应性高。

