



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101613402 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 28

(21) 申请号 200810115513. 1

WO 2007025390 A1, 2007. 03. 08, 全文 .

(22) 申请日 2008. 06. 25

Chen, C 等 . YP_001199755. 1. 《Protein NCBI》. 2007, 1-2.

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病学研究所

审查员 尹军团

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号

(72) 发明人 姜永强 郑玉玲 耿红冉 张炜
李文君 袁媛 熊国华

(51) Int. Cl.

C07K 14/315 (2006. 01)

C12N 15/31 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

A61K 39/09 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1955310 A, 2007. 05. 02, 全文 .

CN 1065490 A, 1992. 10. 21, 全文 .

CN 101163499 A, 2008. 04. 16, 全文 .

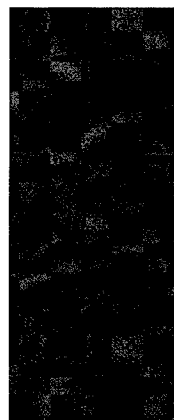
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种猪链球菌 2 型表面蛋白、其制备方法及用途

(57) 摘要

本发明公开了一种猪链球菌 2 型表面蛋白, 还公开了该蛋白质的制备方法及用途。该蛋白质可用作诊断靶标, 用于开发猪链球菌 2 型的诊断试剂。同时又是重要的保护性抗原, 可用于制备疫苗。



1. 一种猪链球菌 2 型表面蛋白,其特征在于:氨基酸序列如序列表中序列 6 所示。
2. 一种编码权利要求 1 所示猪链球菌 2 型表面蛋白的核酸,其特征在于:核酸序列如序列表中序列 5 所示。
3. 含有权利要求 1 或 2 的表面蛋白编码基因的重组质粒。
4. 根据权利要求 3 的重组质粒,其中所述编码重组质粒采用 pET32a 或 pET28a。
5. 含有权利要求 1 或 2 的表面蛋白编码基因的大肠杆菌。
6. 权利要求 1 所述表面蛋白的制备方法,包括如下步骤:
 - (1) 克隆该表面蛋白基因;
 - (2) 将基因与大肠杆菌表达质粒相连接,转化大肠杆菌;
 - (3) 诱导表达;
 - (4) 对表达产物进行分离纯化。
7. 根据权利要求 6 所述方法,其中大肠杆菌表达质粒为 PET32a,大肠杆菌为 E. coli BL21。
8. 权利要求 1 所述的蛋白在制备猪链球菌 2 型诊断试剂中的应用。
9. 根据权利要求 8 所述应用,其中所述诊断试剂为胶体金快速诊断试剂。
10. 权利要求 1 所述的蛋白在制备猪链球菌 2 型疫苗中的应用。

一种猪链球菌 2 型表面蛋白、其制备方法及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细菌蛋白,具体地说涉及一种猪链球菌 2 型的表面蛋白,还涉及该蛋白质的制备方法以及用途。

背景技术

[0002] 猪链球菌 (*Streptococcus suis*), 属于兰氏分类法的 R 群, 有 35 个血清型, 以猪链球菌 2 型流行最广, 致病性最强。自丹麦在 1968 年最早报道人感染猪链球菌病后, 20 世纪 70 年代以来, 欧美部分国家和香港地区均报道过猪链球菌病例, 主要以脑膜炎为主, 中毒性休克综合征 (TSS) 少见, 未见暴发流行。我国于 1998 年和 2005 年两次在江苏和四川暴发人感染猪链球菌 2 型疫情, 不同于国外人感染病例以脑膜炎为主的特点, 临床表现为休克型和脑膜炎型。多数病例死于中毒性休克综合征 (TSS), 病理改变主要表现为全身多器官受损, 败血症伴弥漫性血管内凝血 (DIC)。人猪链球菌病已成为严重威胁我国人民健康的一种新的人畜共患病, 如何有效地预防和控制猪链球菌感染已成为科学家们面临的重要研究难题。

[0003] 由于对毒力因子和保护性抗原了解甚少, 同一血清型的菌株在不同的地区毒力也不尽相同, 高致病性猪链球菌感染缺乏有效的诊断靶标; 对该类病原的分离鉴定主要依靠传统的分离培养和生化鉴定, 然后用猪链球菌高免血清进行凝集试验分型。但家畜广泛携带链球菌, 许多菌株毒力低, 因此仅仅靠生化反应检测猪链球菌是远远不够的, 必须建立针对特异毒力因子的检测手段, 以区分弱毒株和强毒株。以上情况都阻碍了有效的猪链球菌病疫苗的研制及对感染的及时诊断与控制。

[0004] 纵观国外猪链球菌病疫苗的研制情况, 主要经历了全菌免疫和抗原蛋白免疫两个阶段。上世纪 90 年代, 有研究者以福尔马林灭活的猪链球菌进行静脉注射能刺激被免疫猪产生调理化的抗体 [Holt ME, Enright MR, Alexander TJ. (1990) Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci.* 48:23-7]。也有研究者通过筛选无毒力的猪链球菌突变体, 如温度敏感性突变体、链霉素依赖性突变体等来获得具有保护性的全菌疫苗 [Kebede M, Chengappa MM, Stuart JG. (1990) Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. *Vet Microbiol.* 22:249-57. Foster N, Staats JJ, Chengappa MM. (1994) Isolation, characterization and protection studies in mice of a streptomycin-dependent mutant of *Streptococcus suis* type 1/2. *Vet Res Commun.* 18:155-63.], 但是灭活的全菌免疫常会引起免疫综合征等副作用。后续有研究者利用猪链球菌相关毒力因子溶菌酶释放蛋白 (MRP)、胞外因子 (EF) 结合油包水型乳剂 (WO) 和氢氧化铝佐剂 (AH) 作为疫苗, 对其保护性和毒副作用作了评价, 发现用 MRP+EF/WO 免疫的猪与用全菌/WO 免疫的猪具有同等有效的抗-MRP 和抗-EF 滴度, 而且在免疫后的存活猪中, 没有观察到明显的临床表征 [Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE. (2001) Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus*

suis serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec.* 148 :473-7.]. 也有人用纯化的溶血素 (SLY) 作为疫苗免疫小鼠, 发现能对小鼠产生完全保护作用, 免受毒力株的伤害 [Jacobs AA, Loeffen PL, van den Berg AJ, Storm PK. (1994) Identification, purification, and characterization of athiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun.* 62 : 1742-8.]. 但猪链球菌的毒力因子较常时间以来就呈现出时空上的相对多样性, 虽然 MRP、EF 与毒力高度相关, 但与欧洲致病株不同的是多数加拿大致病株不表达 MRP 和 EF, 且 MRP 和 EF 的 2- 型猪链球菌缺失突变体与野生型一样同样具备毒力 [Gottshalk M, Lebrun A, Wisselink HJ, Dubreuil JD, Smith HE, Vecht U. (1998) Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* 62 :75-79.]. 我国流行株和非流行株都表达 MRP, 且动物实验显示流行株培养分泌的上清并不引起病变, 单靠现了解的 MRP、EF、SLY 等毒力因子不足以解释我国 2- 型猪链球菌的致病机理, 使用 MRP 作为人免疫疫苗产生抗体中和 MRP 可能难以达到理想的效果。而在国内, 猪链球菌疫苗的研制还处于起步状态, 即灭活的全菌疫苗 [王卓, 舒秀伟, 王文成. 猪链球菌病二价灭活疫苗候选株培养条件的优化及其安全性试验. (2004) *中国药兽杂志*. 38 : 34-36.]. 因此有必要根据我国实际情况, 研制适合我国的 2- 型猪链球菌的新型疫苗, 发掘新的具有免疫原性的毒力因子是寻找新型疫苗的重要途径。一般来说, 表面暴露蛋白和细胞壁附着蛋白常被作为疫苗的候选靶标和血清学诊断试剂。近 10 年来, 也有研究者试图寻找有免疫原性的猪链球菌表面细胞壁蛋白作为疫苗的候选分子, 1996 年 Haataja S 等分离并鉴定出一种半乳糖抑制型黏附素, 在 23 种血清型的猪链球菌中, 用免疫印迹的方法均能检测到这种黏附素的存在, 发现具有很强的免疫原性和调理功能, 适合作为疫苗候选分子 [Haataja S, Tikkanen K, Hytonen J, Finne J. (1996) The Gal alpha 1-4 Gal-binding adhesin of *Streptococcus suis*, a gram-positive meningitis-associated bacterium. *Adv Exp Med Biol.* 408 :25-34.]. 2005 年 Okwumabua O 等人通过对 2- 型猪链球菌的全基因组进行筛选, 发现一种分子量为 38kDa 蛋白, 具有很好的免疫原性和保护性, 认为这种蛋白是较好的疫苗候选分子并且适合用作诊断试剂的开发, 这种蛋白的生物学功能以及与致病机理的关系正在进一步研究中 [Okwumabua O, Chinnapakkagari S. (2005) Identification of the gene encoding a 38-kilodalton immunogenic and protective antigen of *Streptococcus suis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12 :484-90]. 目前在获得具有免疫原性的蛋白方面, 还缺乏有力的手段, 传统生物学方法鉴定免疫原性蛋白是困难的, 需要构建基因文库, 然后用相应血清筛选, 该方法耗时较长, 不能实现高通量筛选, 并可能存在假阳性反应。免疫蛋白质组是一种快速、高效筛选候选诊断靶标的方法, 通过将 2D 电泳分辨率高和质谱直接鉴定蛋白质的优势结合, 直接选取 2D 电泳胶上有免疫反应的蛋白点, 以质谱方法进行鉴定, 因此, 借助免疫蛋白质组学手段则完全可能在较短时间内快速高效的筛选并鉴定免疫原性蛋白, 尤其对猪链球菌研究相对较少的病原微生物来说, 更有可能短时间内鉴定多个全新的免疫原性蛋白。

发明内容

[0005] 本发明公开了一种猪链球菌 2 型新型表面蛋白、其制备方法及其用途。

[0006] 本发明所公开的猪链球菌 2 型表面蛋白具有序列表中序列 4 或序列 6 所示的氨基酸序列,编码该表面蛋白的基因具有序列表中序列 3 或序列 5 所示的核苷酸序列。其中序列 4 和序列 6 前 40 个氨基酸为信号肽,序列 5 前 120 个核苷酸为信号肽编码基因。该蛋白命名为 0186,编码该蛋白的基因在除无毒株外的猪链球菌 2 型菌株中广泛存在,呈现一定的多态性,在不同的菌株中表现为序列表中序列 3 或序列 5 两种长度不同的序列。

[0007] 该表面蛋白是通过免疫蛋白质组鉴定的 2 型猪链球菌新的免疫原性抗原分子,目前根据猪链球菌基因组注释的结果,仅有该基因开放阅读框架的预测,尚未有该蛋白在猪链球菌中表达的报道,也未有该基因功能的线索。

[0008] 免疫印迹实验证明该表面蛋白在不同菌株中其表达存在差异,在强毒株中高表达,而在国外弱毒株中不表达。

[0009] 本发明还公开了上述表面蛋白的制备方法,该方法包括如下步骤:

[0010] 首先克隆该表面蛋白基因:可通过 PCR 方法进行,首先设计合成引物,在引物两端可添加酶切位点和保护性碱基,然后按照 PCR 方法,用猪链球菌制备的模板,在一定条件下进行扩增,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,并回收产物进行酶切,确定表面蛋白基因。然后是表达该表面蛋白基因的重组质粒制备:将制备的表面蛋白基因与大肠杆菌表达载体相连接,表达载体可以为原核表达载体,可采用商业的原核表达载体,如大肠杆菌表达载体 pET32a,制备表达载体,并转化大肠杆菌,制备重组菌,利用菌落 PCR 和限制性内切酶进行重组菌的筛选和鉴定;对重组菌进行 IPTG 诱导表达;超声波破碎重组菌,收集上清,以 GE 镍亲和层析柱进行纯化。

[0011] 本发明还公开了上述表面蛋白的用途。该蛋白可用作诊断靶标,用于开发猪链球菌 2 型的诊断试剂,同时又是重要的保护性抗原,可用于制备疫苗。首先是该蛋白质在制备猪链球菌快速诊断试剂中的应用。如利用该表面蛋白免疫动物制备抗体,可用于制备猪链球菌 2 型诊断试剂。该抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体。如采用该蛋白制备的多克隆抗体标记胶体金、猪链球菌全菌免疫制备的多克隆抗体喷膜,制成夹心法胶体金快检试剂。

[0012] 本发明还公开了表面蛋白在制备猪链球菌 2 型疫苗中的应用。该蛋白制备的免疫血清调理的全血杀伤实验发现该蛋白具有与全菌免疫相当的保护性,可作为重点疫苗候选和诊断分子。

[0013] 本发明首先将该表面蛋白鉴定为猪链球菌 2 型新的免疫原性抗原分子。已通过基因工程方法制备了该抗原并制备了相应抗体,通过免疫印迹验证了该抗原分子在强毒株中高表达,而在弱毒株中不表达。

[0014] 在诊断试剂研制方面,传统的 PCR 方法并不能真正反映毒力因子的表达情况,操作也较为繁琐,在一些卫生技术条件差的地方根本就难以实现。生化鉴定虽然能较可靠的检测鉴定出 2- 型猪链球菌,但其必需以分离出的纯菌为基础,并且不能区分出强毒株和弱毒株。因此本研究通过基因组学、免疫蛋白质组学、抗原功能研究找到能代表我国 2- 型猪链球菌毒力因子以及在强弱毒株中存在差异的毒力因子来作为诊断试剂候选分子。在此基础上结合胶体金技术开发能快速检测 2- 型猪链球菌以及强弱毒株的试剂盒,不仅检测时间大大缩短,更难得的是该表面蛋白为靶标的检测方法用于快速检测猪链球菌 2 型强弱毒株的区别检测。同时通过抗体调理的全血杀菌试验证实:该蛋白制备的免疫血清可显著提高人全血的杀菌作用,与猪链球菌全菌免疫血清的调理杀菌作用相当,是新的高效保护性

抗原,可作为重点疫苗候选分子。

附图说明

[0015] 图 1 为猪链球菌 2 型表面蛋白 0186 的 PCR 结果图谱。

[0016] 图 2 为重组质粒酶切图谱。其中 1 为重组质粒,2 为空质粒,3 为 DL15000,4 为载体,5 为 0186 片段。

[0017] 图 3 为重组质粒表达图谱,其中 1 为低分子量蛋白标准,从上至下依次为 97.4kDa,66.2kDa,43.0kDa,31.0kDa,20.0kD,2 为诱导后,3 为诱导后,4 为空质粒。

[0018] 图 4 为猪链球菌 2 型表面蛋白 0186 的纯化蛋白电泳图。

[0019] 图 5 为抗体介导的调理吞噬试验。

[0020] 图 6 为胶体金试纸条检测图。其中检测样品:1 为 PBS,2,4,5 为猪链球菌强毒株,3 为猪链球菌弱毒株。

具体实施方式

[0021] 实施例一猪链球菌 2 型表面蛋白 0186 的表达纯化,免疫原性及抗体介导的调理吞噬试验

[0022] 1 材料和方法

[0023] 1.1 菌株和质粒

[0024] 猪链球菌 2 型 98HAH12 株 [Chen C,Tang J,Dong W,Wang C,Feng Y,et al(2007) A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomicsof *S. suis* 2Chinese Isolates.PLoS ONE 2(3):e315];大肠杆菌 DH5a,BL21,均为国际标准株;表达载体 pET32a(+) 为 Novagen 公司产品。

[0025] 1.2 酶和试剂

[0026] EcoRI 和 XhoI 等限制性内切酶以及 Taq 酶、dNTPs、DL15000 分子量标准等 PCR 所用试剂均为宝生物工程(大连)有限公司产品;DNA 回收试剂盒为天为公司产品;镍亲和层析柱为 GE 公司产品;质粒提取盒为 V-gene 公司产品;弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品;Amp 为中诺药业产品。

[0027] 1.3PCR 引物设计及 0186 核酸序列,蛋白序列

[0028] 根据所要扩增的片段,设计一对引物,引物两端分别添加 EcoRI 和 XhoI 酶切位点和保护性碱基,引物 P1 和 P2 可扩增猪链球菌 2 型 0186 基因开放阅读框(ORF)全长 1566bp 的片断。引物序列分别为:

[0029] 上游引物 P1:见序列表中序列 1;下游引物 P2:见序列表中序列 2。

[0030] 核酸序列

[0031] > 0186 putative surface anchored protein

[0032] 见序列表中序列 3。

[0033] 蛋白序列

[0034] > 0186 putative surface-anchored protein 182345:184030forward MW: 61260

[0035] 见序列表中序列 4。

[0036] 1.4 PCR 扩增

[0037] 按下列顺序和条件依次加入各反应物并进行 PCR 扩增。猪链球菌 2 型模板 DNA 2 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 3 μ L, 引物 P1 和 P2(5 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 37 μ L, LA-Taq 酶 (5U/ μ L) 1 μ L。扩增的条件为 :94 $^{\circ}$ C 7min ;94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 7min。

[0038] 1.5 PCR 产物的回收和酶切

[0039] PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 后以 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 并以 EcoRI 和 XhoI 37 $^{\circ}$ C 酶切 3h。

[0040] 1.6 重组质粒的构建和鉴定

[0041] 在含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 肉汤中接种携带 pET32a 空质粒的 DH5 α 大肠杆菌单菌落, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 ~ 16h 后, 1% 转接入 100 μ g/mL Amp 的新鲜 LB 肉汤 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6h, 以质粒抽提试剂盒抽提质粒。EcoR I 和 Xho

[0042] I 双酶切后, 以 DNA 回收试剂盒回收酶切产物。将 PCR 双酶切回收产物与空质粒双酶切回收产物进行连接, 并转化感受态的 DH5 α 宿主菌。感受态细菌的制备、转化均按常规方法进行, 利用菌落 PCR 和限制性内切酶酶切进行重组菌的筛选和鉴定。

[0043] 1.7 重组质粒的测序和序列分析

[0044] 重组质粒的序列测定采用 Sanger 双脱氧末端终止法, 由北京三博远志生物技术有限公司完成, 以验证其阅读框架, 并以 BLAST 软件进行同源性分析。

[0045] 1.8 重组质粒在大肠杆菌中的表达和纯化

[0046] 将重组质粒按常规方法转化感受态的大肠杆菌 BL21, 利用 Amp 抗性筛选重组菌, 挑单菌落接种 LB 肉汤中 (含 100 μ g/mL Amp), 30 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 2 ~ 4h, 当菌液浓度 OD₆₀₀ 达 0.5 ~ 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 继续剧烈振荡培养 2 ~ 4h。6000r/min 离心 10min, 沉淀以蒸馏水重悬, 加等体积的 2 \times 电泳上样缓冲液煮沸 10min, SDS-PAGE 检测。含空 pET32a(+) 的大肠杆菌 BL21 亦同样经 IPTG 诱导处理后, SDS-PAGE 检测表达情况。以超声波破碎诱导的重组菌, 收集上清, 以 GE 镍亲和层析柱进行亲和层析, 具体步骤按使用说明书进行。

[0047] 1.9 重组蛋白动物免疫试验

[0048] 将收集的蛋白以 pH7.2 10mmol/L 的 PBS 稀释至 0.1mg/ml, 加入等量的弗氏完全佐剂, 皮下免疫 Wistar 大鼠 (购自军事医学科学院试验动物中心), 0.5ml/只; 以后 3-5 周, 分别以 0.2, 0.4, 0.8, 1.6mg/ml 加弗氏不完全佐剂加强免疫, 第 7 周断尾取血 ELISA 法测抗体效价。同时设立全菌免疫对照组和空白对照组 (pET32a 空质粒转化 BL21, 诱导表达 Trx 蛋白, 以此蛋白免疫大鼠为空白对照)。以硫酸铵沉淀法制备抗血清。

[0049] 1.10 抗体介导的调理吞噬

[0050] 血平板刮取猪链球菌 2 型单菌落, 接入 THB 培养基, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 孵箱培养 8h 后转接新鲜 THB 培养基培养 8h 至对数生长期。取 1ml 菌液 (约 1 \times 10⁸CFU/ml) 13,000rpm, 1.0min 集菌, PBS 洗菌并重悬, 调整至 10⁶CFU/ml, 涂血平板, 记为初始菌量。取 50 μ l (\approx 10⁶CFU/ml) 菌液加入 100 μ l 抗体, 37 $^{\circ}$ C 15min 后冰上 15min; 加入 350 μ l 健康人全血 37 $^{\circ}$ C, 3h; 加入 55 μ l 1% saponin, 冰上 20min; 反复吹打后稀释涂血平板, 16h 后血平板记数单克隆。

[0051] 1.11 小鼠的免疫和攻毒

[0052] 6 周雌性 Balb/C 小鼠每次用 20 μ g 与弗氏佐剂混合的纯化蛋白皮下免疫,共免疫 2 次,间隔 2 周,第 1 次免疫采用弗氏完全佐剂,第 2 次采用弗氏不完全佐剂,以同等条件下免疫的硫氧还蛋白 (Trx) 为对照。第二次免疫一周后攻毒,每只小鼠腹腔接种悬浮于 1ml THB 培养基 (Todd-Hewitt broth) 猪链球菌 5×10^8 CFU,攻毒后观察 7 天记录发病率和死亡率。

[0053] 2. 结果

[0054] 2.1 PCR 结果 :PCR 产物经电泳后,出现一条约 1560bp 的条带,大小与预期一致,见图 1。

[0055] 2.2 重组质粒的鉴定

[0056] 0186 基因片段经回收,以 EcoR I 和 Xho I 酶切位点定向克隆至 pET-32a 中,获得重组质粒,命名为 0186-pET-32a。重组质粒转化感受态的 DH5 α 宿主菌,经 Amp 抗性筛选得到重组菌。提取重组质粒,经 EcoR I 和 Xho I 双酶切,得到 4340bp 和 1560bp 左右的片断,说明 0186 片断以成功克隆,见图 2。

[0057] 2.3 重组质粒的表达

[0058] 重组 BL21 转化菌经 IPTG 诱导后,菌体 SDS-PAGE 显示有一条 97kD 的蛋白带,表达量占菌体总蛋白的 53%,而含 pET32a(+) 空载体的 BL21 菌在该处无特异条带。见图 3。经镍柱纯化获得纯化的 0186 蛋白。见图 4。

[0059] 2.4 测序结果和序列分析

[0060] 克隆的序列长度经测序为 1566bp,如序列表中序列 3 所示,翻译后为 522 个氨基酸残基,见序列表中序列 4。

[0061] 2.5 重组蛋白抗体介导的调理吞噬作用

[0062] 经 GE 镍亲和层析柱层析获得纯化的重组蛋白 r0186,分别加弗氏完全和不完全佐剂免疫后,制备抗血清,进行间接杀菌试验。杀菌率计算 : $(CFU_{Trx} - CFU_{0186}) / CFU_{Trx}$ 。Trx 为从含 pET32a(+) 空载体的大肠杆菌 BL21 镍柱纯化的硫氧还蛋白。

[0063] 抗体介导的调理吞噬试验 :分别用猪链球菌 2 型全菌 ;猪链球菌 2 型分泌上清 ;0186 重组蛋白 ;MRP 重组蛋白免疫大鼠后的大鼠血清调理健康人血,进行人全血对猪链球菌 2 型活菌的杀伤试验。186 重组蛋白的抗血清调理人全血对猪链球菌 2 型的杀伤率接近猪链球菌 2 型菌体免疫的抗血清,但略低于 MRP 蛋白的抗血清。见图 5。

[0064] 2.6 重组蛋白对小鼠攻毒的保护作用

[0065] 接种细菌 10 个小时后,对照组表现出临床症状,如发烧和对刺激反应缓慢,48 小时内对照组死亡率为 100% (10/10),而 0186 重组蛋白免疫组的动物临床症状轻微,持续时间短,死亡率为 50% (5/10)。48 小时后各组小鼠不再死亡。提示该重组蛋白对猪链球菌引起的小鼠致死具有显著保护作用。

[0066] 实施例二 186 胶体金检测试纸条的制备过程

[0067] 1. 抗体的处理

[0068] 用 186 免疫大鼠和猪链球菌免疫新西兰兔获得的免疫血清经辛酸-硫酸铵沉淀法或蛋白 A 柱纯化后用 0.01M 的 PBS 透析过夜,10,000r/min 离心 30min,收集上清测定浓度后备用。

[0069] 2. 胶体金的制备 (柠檬酸钠还原法)

[0070] 将 HAuCl_4 先配成 1% 的水溶液, 取 100ml 纯水加热至沸腾. 搅动下同时加入 1ml 1% 的 HAuCl_4 和 1.5ml 柠檬酸三钠水溶液. 继续加热煮沸 15min 左右, 观察到加入液体后颜色先变成黑, 随后慢慢变成酒红色, 看到酒红色后继续加热 3-5min 后停止加热, 得到的即为直径约 25nm 的胶体金, 冷却后 4℃ 避光保存。

[0071] 3. 胶体金探针的最佳 pH 值

[0072] 取 1.5ml 离心管加入 1ml 胶体金, 将胶体金 pH 值调节为一系列从 6 到 9 的梯度, 每两个梯度之间相差 0.5。加入用 0.01mol/L 的 PBS (pH7.2) 稀释为 0.2mg/ml 的大鼠抗体 100 μ l, 混匀后静置 2h。观察颜色变化, 颜色开始发生变化的前一管的 pH 值再略提高一点即为胶体金的最佳 pH 值。结果为 pH8.2。

[0073] 4. 标金抗体最低稳定量

[0074] 在标记前, 首先测定能稳定一定量胶体金所需要的最小抗体用量, 测量其最小保护量必须在最佳 pH 值和离子浓度情况下进行。将胶体金调至 pH8.2。用 0.01mol/L 的 PBS (pH7.2) 稀释大鼠抗体至 0.2mg/ml。按下表操作。

[0075] 表 1 试管观察法测定稳定胶体金最小标记量

[0076]

试剂	试 管 号										对 照 管
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
抗体 (μ l)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
PBS (μ l)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
胶体金 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀, 放置 2min											
10%NaCl (μ l)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

摇匀, 放置 2h 观察

[0077] 静置后观察, 含抗体量少的管呈现出由红变蓝的聚沉现象, 而加入抗体达到或超过最低稳定量的试管中的溶液则保持红色不变。使红色保持不变的抗体含量最低的试管的抗体量就是抗体的最适保护量, 在此基础上增加 20% 为稳定胶体金的抗体使用量。结果为 5 μ g/ml。

[0078] 5. 胶体金探针的制备

[0079] 取制备好调 pH8.2 的胶体金 1ml 置于 1.5ml EP 管中, 加 0.2mg/ml 的大鼠抗体 25 μ l, 混匀 5min 后, 加 10% BSA 100 μ l, 混匀 10min 后 12000r/min、4℃、30min 离心两次, 用重悬液重悬; 再 1000r/min、4℃、4min 离心一次, 上清及为胶体金探针, 4℃ 保存。

[0080] 6. 胶体金试纸条的制备

[0081] 胶体金试纸条由样品垫、胶金垫、NC膜和吸收垫四部分组成。样品垫和胶金垫用玻璃纤维，吸收垫用吸水滤纸。胶金垫上加胶体金探针，37℃干燥 3h。NC膜上包被兔抗猪链球菌抗体（检测带）及兔抗大鼠免疫血清（质控带）。喷好膜后 37℃干燥 2h。将吸收垫、样品垫及处理后的胶金垫、NC膜叠加粘到PVC板上，组装成完整的试纸条，然后切割成 4mm/条，干燥避光保存。

[0082] 7. 检测及结果判读

[0083] 取 40 μl 待测样品和 40 μl 样品处理液加到制备好的试纸条样品垫上，10min 后，检测带和质控带均出现红色的为阳性，只有质控带出现红色的为阴性，检测带和质控带均不显色则试纸条无效。见图 6。

[0084] 猪链表面蛋白 2. SEQ

[0085] 序列表

[0086] <110> 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

[0087] <120> 一种猪链球菌 2 型表面蛋白、其制备方法及其用途

[0088] <130>

[0089] <160>6

[0090] <170>PatentIn version 3.3

[0091] <210>1

[0092] <211>31

[0093] <212>DNA

[0094] <213>

[0095] <400>1

[0096] gcgaattcac gacagagact tcaacagcta c 31

[0097] <210>2

[0098] <211>30

[0099] <212>DNA

[0100] <213>

[0101] <400>2

[0102] cgctcgagga tttgatcttt agatTTTTTg 30

[0103] <210>3

[0104] <211>1566

[0105] <212>DNA

[0106] <213>

[0107] <400>3

[0108] acgacagaga cttcaacagc tactcaagtt gaagcaatgg cгааagtga agaagttcag 60

[0109] aagcttgtga aagaattaga aaaagagctg ggggaactag ataaggttcc aagttatggt 120

[0110] gatgctcaag attattctta tcagaaggct ttgtgggaag agtttttaag aattggaaaa 180

[0111] gataatatgg actatgcttc aaaaatgaaa gcagatgaca agtttttcca taaggttaaa 240

[0112] ggggatttga atgattttaa atatcaaata aaagtggaaa actatatccg tcaggttgca 300

[0113] gaattgcgaa agaaatacc tggtgataat acaattgagg aagaatataa tgcgcattta 360

[0153]	100	105	110
[0154]	Asp Lys Phe Phe His Lys Val Lys Gly Asp Leu Asn Asp Phe Lys Tyr		
[0155]	115	120	125
[0156]	Gln Ile Lys Val Glu Asn Tyr Ile Arg Gln Val Ala Glu Leu Arg Lys		
[0157]	130	135	140
[0158]	Lys Tyr Pro Gly Asp Asn Thr Ile Glu Glu Glu Tyr Asn Ala His Leu		
[0159]	145	150	155
[0160]	Lys Gln Asp Glu Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gln Glu Gly Ala Thr Leu		
[0161]	165	170	175
[0162]	Arg Asp Tyr Val Asp Arg Glu Ala Ser Glu Ala Met Gly Arg Ile Lys		
[0163]	180	185	190
[0164]	Gln Arg Val Ala Glu Leu Glu Lys Ser Lys Gln Pro Gln Pro Ser Pro		
[0165]	195	200	205
[0166]	Ala Asp Glu Pro Ala Pro Ala Pro Lys Glu Glu Glu Thr Pro Ala Pro		
[0167]	210	215	220
[0168]	Lys Glu Glu Asp Thr Pro Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro		
[0169]	225	230	235
[0170]	Thr Pro Glu Val Asp Pro Ala Pro Thr Pro Ile Pro Asp Thr Pro Lys		
[0171]	245	250	255
[0172]	Ala Glu Glu Glu Ala Pro Thr Pro Val Pro Asp Thr Pro Ala Pro Lys		
[0173]	260	265	270
[0174]	Glu Asp Glu Val Pro Ala Pro Ile Pro Asp Ala Pro Thr Pro Lys Val		
[0175]	275	280	285
[0176]	Glu Glu Glu Thr Gln Glu Pro Lys Thr Glu Glu Lys Ala Pro Glu Thr		
[0177]	290	295	300
[0178]	Lys Glu Glu Thr Pro Thr Pro Val Pro Asp Thr Pro Ala Pro Lys Glu		
[0179]	305	310	315
[0180]	Asp Glu Val Pro Ala Pro Met Pro Asp Ala Pro Ala Pro Lys Ala Glu		
[0181]	325	330	335
[0182]	Glu Glu Val Pro Ala Pro Thr Pro Met Pro Glu Thr Pro Met Asp Lys		
[0183]	340	345	350
[0184]	Pro Lys Thr Asp Lys Val Glu Ser Asp Lys Gln Met Pro Glu Ala Lys		
[0185]	355	360	365
[0186]	Gln Pro Glu Met Glu Gln Pro Lys Ala Glu Asp Met Pro Lys Glu Glu		
[0187]	370	375	380
[0188]	Met Pro Lys Ser Glu Gln Pro Lys Ala Glu Asp Ser Ala Pro Lys Thr		
[0189]	385	390	395
[0190]	Ala Val Pro Glu Val Ala Pro Lys Thr Ala Glu Lys Pro Lys Leu Asp		
[0191]	405	410	415

[0192]	Phe Thr Thr Lys Glu Arg Lys Val Glu Glu Ala Leu Pro Ile Lys Glu	
[0193]	420	425 430
[0194]	Glu Ile Arg Tyr Asp Ala Ser Leu Pro Leu Gly Lys Ser Tyr Leu Leu	
[0195]	435	440 445
[0196]	Gln Glu Gly Lys Ala Gly Lys Lys Val Ser Val Tyr Gln Asp Val Ile	
[0197]	450	455 460
[0198]	Val Asp Gly Lys Val Val Ala Thr Asn Leu Leu Ser Glu Thr Val Val	
[0199]	465	470 475 480
[0200]	Glu Gly Gln Asn Arg Ile Leu Val Lys Gly Ser Leu Glu Met Lys Lys	
[0201]	485	490 495
[0202]	Glu Glu Val Lys Thr Thr Pro Ser Val Gln Ser Asn Pro Thr Leu Ser	
[0203]	500	505 510
[0204]	His Lys Gly Ala Pro Ser Ala Asn Lys Ala Thr Leu Pro Ala Thr Gly	
[0205]	515	520 525
[0206]	Glu Gln Arg Asn Asn Leu Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Ile	
[0207]	530	535 40
[0208]	Ser Leu Ala Val Val Ala Thr Ala Ile Asn Lys Lys Ser Lys Asp Gln	
[0209]	545	550 555 560
[0210]	Ile	
[0211]	<210>5	
[0212]	<211>1899	
[0213]	<212>DNA	
[0214]	<213>	
[0215]	<400>5	
[0216]	atggaaactg caaataaaaa attcagatat agtattcgtta aatttaaagt cggcgttaggc	60
[0217]	tcggtgctga ttgctacttg cttacttggg gcgggagtct cgacaccaac cgcttttgcg	120
[0218]	acgacagaga cttcaacacc tactcaagtt gaagcaatgg cгааagtga agaagttcag	180
[0219]	aagcttgtga aagaattaga aaaagagctg ggggaactag ataaggttcc aagttatggt	240
[0220]	gatgctcaag attattctta tcagaaggct ttgtgggaag agtttttaag aattggaaaa	300
[0221]	gataatatgg actatgcttc aaaaatgaaa gcagatgaca agtttttcca taaggttaaa	360
[0222]	ggggatttga atgattttaa atatcaata aaagtggaaa actatatccg tcaggttgca	420
[0223]	gaattgcaa agaaataccc tggatgataat acaattgagg aagaatataa tgcgcattta	480
[0224]	aagcaagacg aaggcaagag tatagctagc caagaggcgc ctaccttaag agactacggt	540
[0225]	gatagagaag caagtgaggc catgggcaga attaagcaac gagttgctga actggaaaaa	600
[0226]	tcaaaacaac cccagccaag tcccgcagat gagccagctc cagctccaaa agaggaagac	660
[0227]	actccagctc caacaccgaa agtagaagat gaaacacagg agccgaaaac agaagagaag	720
[0228]	gcaccagaga cгааagaaga aactccaact ccaacaccaa aagaggaagg gattccggca	780
[0229]	ccaattccag acgtccagc gccgaaagca gaggacgaag ttccggcacc aaaagaggaa	840
[0230]	gaaaccccag ctccaaaaga ggaggacact ccggcaccgg acgcagcccc agctccagct	900

[0270]	130	135	140
[0271]	Lys Tyr Pro Gly Asp Asn Thr Ile Glu Glu Glu Tyr Asn Ala His Leu		
[0272]	145	150	155
[0273]	Lys Gln Asp Glu Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gln Glu Gly Ala Thr Leu		
[0274]	165	170	175
[0275]	Arg Asp Tyr Val Asp Arg Glu Ala Ser Glu Ala Met Gly Arg Ile Lys		
[0276]	180	185	190
[0277]	Gln Arg Val Ala Glu Leu Glu Lys Ser Lys Gln Pro Gln Pro Ser Pro		
[0278]	195	200	205
[0279]	Ala Asp Glu Pro Ala Pro Ala Pro Lys Glu Glu Asp Thr Pro Ala Pro		
[0280]	210	215	220
[0281]	Thr Pro Lys Val Glu Asp Glu Thr Gln Glu Pro Lys Thr Glu Glu Lys		
[0282]	225	230	235
[0283]	Ala Pro Glu Thr Lys Glu Glu Thr Pro Thr Pro Thr Pro Lys Glu Glu		
[0284]	245	250	255
[0285]	Gly Ile Pro Ala Pro Ile Pro Asp Ala Pro Ala Pro Lys Ala Glu Asp		
[0286]	260	265	270
[0287]	Glu Val Pro Ala Pro Lys Glu Glu Glu Thr Pro Ala Pro Lys Glu Glu		
[0288]	275	280	285
[0289]	Asp Thr Pro Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Glu		
[0290]	290	295	300
[0291]	Val Asp Pro Ala Pro Thr Pro Ile Pro Asp Thr Pro Lys Ala Glu Glu		
[0292]	305	310	315
[0293]	Glu Ala Pro Thr Pro Val Pro Asp Thr Pro Ala Pro Lys Glu Asp Glu		
[0294]	325	330	335
[0295]	Val Pro Ala Pro Ile Pro Asp Ala Pro Thr Pro Lys Val Glu Glu Glu		
[0296]	340	345	350
[0297]	Thr Gln Glu Pro Lys Thr Glu Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Glu Glu		
[0298]	355	360	365
[0299]	Thr Pro Thr Pro Ala Pro Asp Ala Glu Pro Ala Pro Thr Pro Val Pro		
[0300]	370	375	380
[0301]	Asp Thr Pro Ala Pro Lys Glu Asp Glu Val Pro Ala Pro Met Pro Asp		
[0302]	385	390	395
[0303]	Ala Pro Ala Pro Lys Ala Glu Glu Glu Val Pro Ala Pro Thr Pro Met		
[0304]	405	410	415
[0305]	Pro Glu Thr Pro Met Asp Lys Pro Lys Thr Asp Lys Val Glu Ser Asp		
[0306]	420	425	430
[0307]	Lys Gln Met Pro Glu Ala Lys Gln Pro Glu Met Glu Gln Pro Lys Ala		
[0308]	435	440	445

[0309]	Glu Asp Met Pro Lys Glu Glu Met Pro Lys Ser Glu Gln Pro Lys Ala
[0310]	450 455 460
[0311]	Glu Asp Ser Ala Pro Lys Thr Ala Val Pro Glu Val Ala Pro Lys Thr
[0312]	465 470 475 480
[0313]	Ala Glu Lys Pro Lys Leu Asp Phe Thr Thr Lys Glu Arg Lys Val Glu
[0314]	485 490 495
[0315]	Glu Ala Leu Pro Ile Lys Glu Glu Ile Arg Tyr Asp Ala Ser Leu Pro
[0316]	500 505 510
[0317]	Leu Gly Lys Ser Tyr Leu Leu Gln Glu Gly Lys Ala Gly Lys Lys Val
[0318]	515 520 525
[0319]	Ser Val Tyr Gln Asp Val Ile Val Asp Gly Lys Val Val Ala Thr Asn
[0320]	530 535 540
[0321]	Leu Leu Ser Glu Thr Val Val Glu Gly Gln Asn Arg Ile Leu Val Lys
[0322]	545 550 555 560
[0323]	Gly Ser Leu Glu Met Lys Lys Glu Glu Val Lys Thr Thr Pro Ser Val
[0324]	565 570 575
[0325]	Gln Ser Asn Pro Thr Leu Ser His Lys Gly Ala Pro Ser Ala Asn Lys
[0326]	580 585 590
[0327]	Ala Thr Leu Pro Ala Thr Gly Glu Gln Arg Asn Asn Leu Ala Leu Val
[0328]	595 600 605
[0329]	Gly Leu Gly Leu Ala Gly Ile Ser Leu Ala Val Val Ala Thr Ala Ile
[0330]	610 615 620
[0331]	Asn Lys Lys Ser Lys Asp Gln Ile
[0332]	625 630

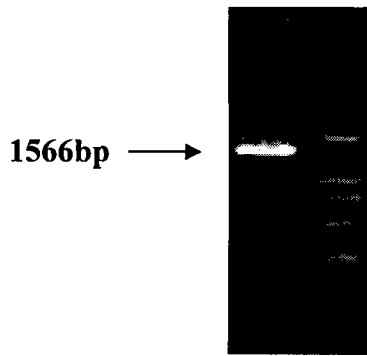


图 1

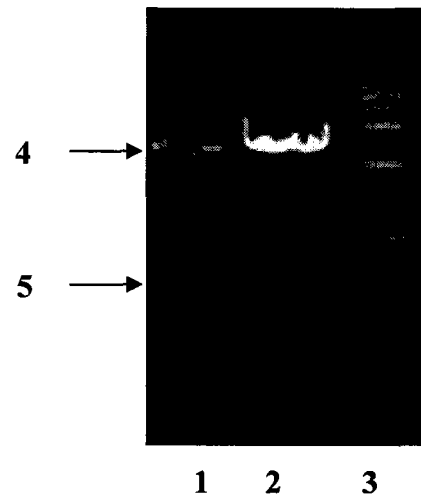


图 2

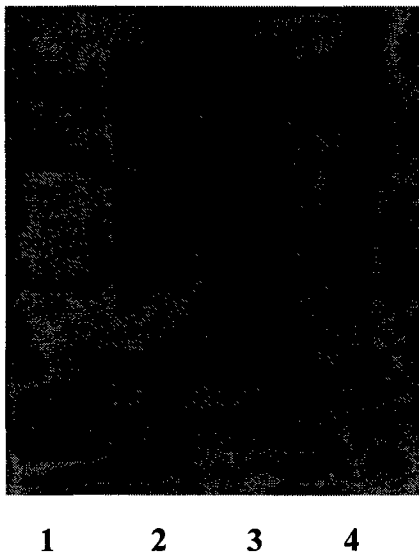


图 3

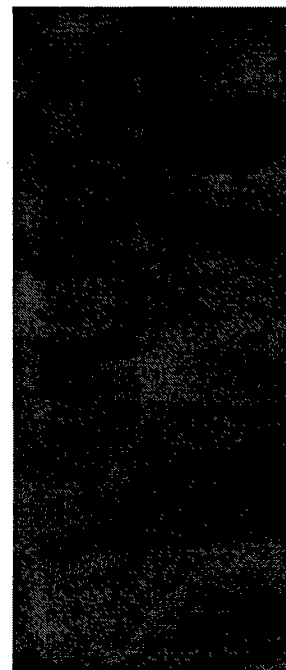


图 4

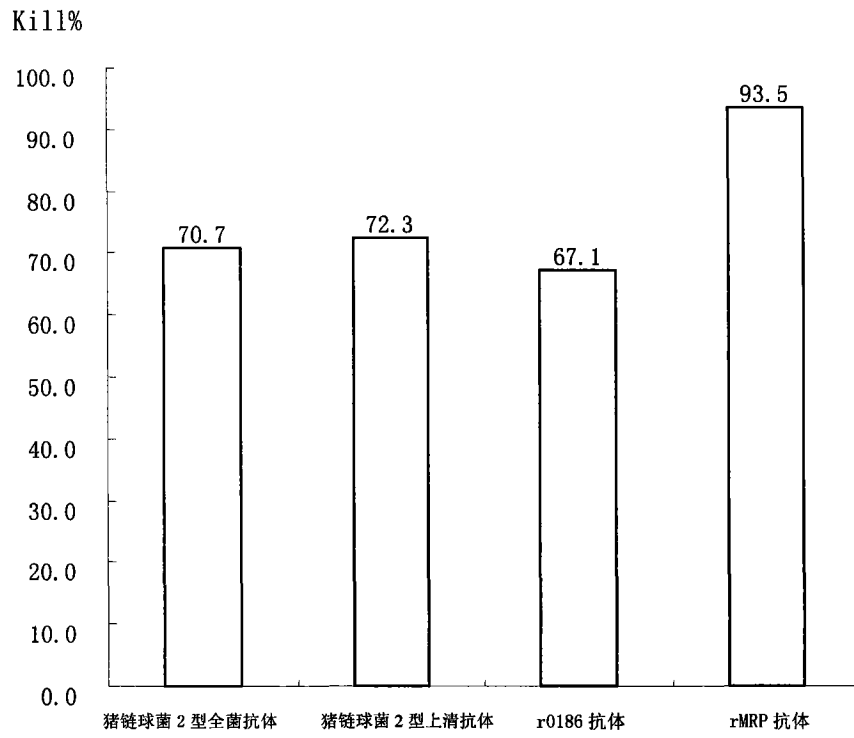


图 5

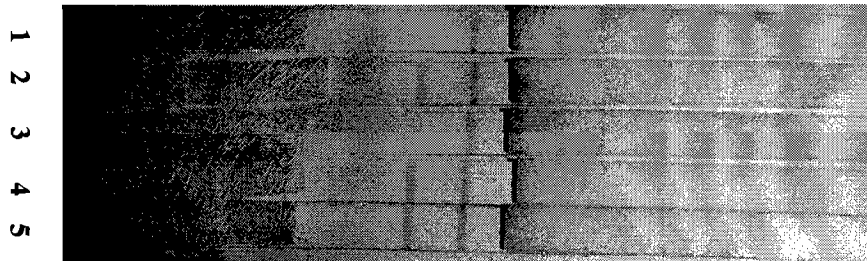


图 6