



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117924439 B

(45) 授权公告日 2024.07.16

(21) 申请号 202410126776.1

C12N 15/31 (2006.01)

(22) 申请日 2024.01.30

C12N 1/21 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/70 (2006.01)

申请公布号 CN 117924439 A

G01N 33/569 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.04.26

(56) 对比文件

(73) 专利权人 重庆新赛亚生物科技有限公司

CN 102721815 A, 2012.10.10

地址 400714 重庆市北碚区京东方大道388号

CN 115058442 A, 2022.09.16

(72) 发明人 张念林 左云国 宋中豪 孙婵 唐菲菲

审查员 李萌

(74) 专利代理机构 重庆西南华渝专利代理有限公司 50270

专利代理师 冯晓超

(51) Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)

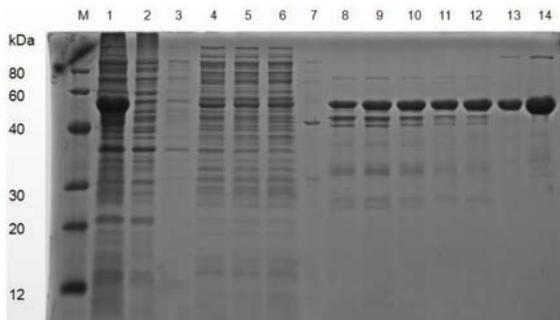
权利要求书1页 说明书9页  
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

重组CagA蛋白及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于幽门螺杆菌诊断产品技术领域,具体涉及一种重组CagA蛋白及其制备方法和应用。该重组CagA蛋白包含如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。该重组CagA蛋白在使用免疫层析法检测阳性患者血清相关抗体的分型方法中有较高的准确性,使用该重组CagA蛋白分别检测强阳性、弱阳性和阴性血清样本中的CagA抗体,阳性分型结果显示,与参考试剂盒结果相比,使用本发明的重组CagA蛋白进行检测的I型符合率可以达到89.19%,I型假阳率可以低至4.92%,II型符合率可以达到90.00%,阴性符合率可以达到90.32%;与临床碳呼吸实验结果相比,阴性样本结果符合率可以达到97.6%。



1. 重组CagA蛋白,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 编码权利要求1所述的重组CagA蛋白的基因。
3. 根据权利要求2所述的基因,其特征在于,包含如SEQ ID NO.2所示的序列。
4. 重组表达载体,其特征在于,包含权利要求2或3所述的基因。
5. 重组表达菌株,其特征在于,包含权利要求2或3所述的基因或权利要求4所述的重组表达载体。
6. 权利要求1所述的重组CagA蛋白的制备方法,其特征在于,包括:将权利要求5所述的重组表达菌株进行培养即得到重组CagA蛋白。
7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,培养包括:将重组表达菌株在25°C-39°C,120rpm-200rpm培养至 $OD_{600}=0.2-0.7$ ;然后加入IPTG诱导表达,25°C-39°C,120rpm-200rpm,表达得包含重组CagA蛋白的菌液。
8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,包括:(1)培养结束后,将菌液8500g-12000g,2°C-8°C进行离心,得沉淀,沉淀进行重悬得混悬液;(2)将混悬液超声破碎,10000g-15000g,2°C-8°C离心得上清液;(3)上清液纯化得重组CagA蛋白。
9. 幽门螺杆菌分型检测试剂或试剂盒,其特征在于,包含权利要求1所述的重组CagA蛋白。
10. 权利要求1所述的重组CagA蛋白在制备幽门螺杆菌检测试剂或试剂盒中的应用。

## 重组CagA蛋白及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于幽门螺杆菌诊断产品技术领域,具体涉及一种重组CagA蛋白及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是一类可以引起人胃上皮细胞持续感染,并导致严重并发症(消化性溃疡疾病、胃癌和胃粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤)发展的细菌。其中,作为参与幽门螺杆菌对胃上皮细胞持续感染的主要毒力因子细胞毒素相关基因A(CagA),其是一种120kDa-145kDa的癌蛋白,存在于约50%-70%的幽门螺杆菌菌株中(分泌CagA的幽门螺杆菌是强毒力菌株,不分泌CagA的幽门螺杆菌为弱毒力菌株)。CagA通过4型分泌系统(T4SS)易位到胃上皮细胞,已被证明在疾病发展中发挥重要作用;具体地,CagA通过影响不同的信号通路,促进炎症、增殖、运动和细胞极性的改变,介导宿主胃上皮细胞的一系列细胞内效应,从而增加肿瘤和胃炎的风险。

[0003] 人体在感染分泌CagA幽门螺杆菌后,体内会存在CagA抗体,现有技术可以通过在体外重组表达CagA蛋白,然后作为CagA抗原利用免疫层析、化学发光等检测技术,检测人体内是否存在CagA抗体,从而为诊断HP感染、分型提供帮助。

[0004] 但是,目前现有的检测试剂或试剂盒中的重组CagA蛋白与CagA抗体的结合价较低,导致对幽门螺杆菌的分型检测准确率较低。

### 发明内容

[0005] 本发明就是构建一种重组CagA蛋白,以及公开了表达该蛋白的基因片段、重组表达载体、重组表达菌株以及制备方法;该重组CagA蛋白与人体内对应抗体有较强的结合能力,可以很好的利用在幽门螺杆菌体外诊断的试剂中,有较高的诊断准确性。具体技术方案如下:

[0006] 本发明一方面提供一种重组CagA蛋白,其包含如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0007] 本发明另一方面通过一种编码上述重组CagA蛋白的基因片段。

[0008] 本发明再一方面提供一种重组表达载体,包含本发明的基因片段。

[0009] 本发明再一方面提供一种重组表达菌株,其包含本发明中的基因片段或本发明中的重组表达载体。

[0010] 本发明再一方面提供一种本发明中重组CagA蛋白的制备方法,包括:将本发明中的重组表达菌株进行培养即得到重组CagA蛋白。

[0011] 本发明再一方面提供一种幽门螺杆菌分型检测试剂,其包含本发明中的重组CagA蛋白。

[0012] 本发明再一方面提供一种幽门螺杆菌分型检测试剂盒,其包含本发明中的重组CagA蛋白或本发明中的幽门螺杆菌分型检测试剂。

[0013] 本发明再一方面提供一种本发明中的重组CagA蛋白在制备幽门螺杆菌检测试剂

或试剂盒中的应用。

[0014] 本发明有益效果至少包括：

[0015] 本发明中提供的重组CagA蛋白在使用免疫层析法检测阳性患者血清相关抗体的分型方法中有较高的准确性,使用该重组CagA蛋白分别检测强阳性、弱阳性和阴性血清样本中的CagA抗体,阳性分型结果显示,与参考试剂盒结果相比,使用本发明的重组CagA蛋白进行检测的I型符合率可以达到89.19% (样本数37),I型假阳率可以低至4.92% (样本数61),II型符合率可以达到90.00% (样本数30),阴性符合率可以达到90.32% (样本数31);与临床碳呼吸实验结果相比,阴性样本结果符合率可以达到97.6% (样本数82)。

[0016] 本发明提供的重组CagA蛋白的制备方法可制备得到大量可溶性重组CagA蛋白。

### 附图说明

[0017] 图1为CagA表达后纯化电泳图,其中,M:marker,1:表达上清,2:流穿,3:5mM咪唑洗脱液4-6:20mM咪唑洗脱液7:50mM咪唑洗脱液8-12:100mM咪唑洗脱液13-14:200mM咪唑洗脱液。

### 具体实施方式

[0018] 所举实施例是为了更好地对本发明进行说明,但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0019] 本文中使用的术语仅用于描述特定实施例,并且无意于限制本公开。除非在上下文中具有明显不同的含义,否则单数形式的表达包括复数形式的表达。如本文所使用的,应当理解,诸如“包括”、“具有”、“包含”之类的术语旨在指示特征、数字、操作、组件、零件、元件、材料或组合的存在。在说明书中公开了本发明的术语,并且不旨在排除可能存在或可以添加一个或多个其他特征、数字、操作、组件、部件、元件、材料或其组合的可能性。如在此使用的,根据情况,“/”可以被解释为“和”或“或”。

[0020] 本发明构建了一种重组CagA蛋白,以及公开了表达该蛋白的基因片段、重组表达载体、重组表达菌株以及制备方法;该重组CagA蛋白与人体内对应抗体有较强的结合能力,可以很好的利用在幽门螺杆菌体外诊断的试剂中。

[0021] 因此,本发明实施例提供一种重组CagA蛋白,其包含如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0022] SEQ ID NO.1:

[0023] QTEAAFNPQQFINNLQVAFLKVDNAVASYDPDQKPIVDKNDNRDNRQAFDGLISQLREEYSNKAIAKNPTK  
KDQYFSDFINKSNLINKDSLIDIGSSIKSFQKFGTQRYRIFTSWVSHQNDPSKINTRSIRNFMENIIQPPIPDDK  
EKAFLKSAKQSFAGIIIGNQIRTDQKFMGVDFEFLKERQEAENGEPTGGDWLDIFLSFVFNKEQSSDVKEAINQ  
EPVPHVQPDIATTTTHIQGLPP。

[0024] 需要说明的是,蛋白重组表达技术是利用大肠杆菌、哺乳动物细胞等表达系统,在生物体外/体内将蛋白质大量表达的生物技术,其根据已知的蛋白质序列,在DNA序列层面进行改造,使该蛋白更容易地在表达系统中得到有效的表达,再经纯化获得高纯度的有效蛋白。相对于从自然界提取天然的蛋白质,重组表达技术具有重复性好、可编辑、相对廉价、

保护稀有物种等优点。另外,本发明中提供的重组CagA蛋白在使用免疫层析法检测阳性患者血清相关抗体的分型方法中有较高的准确性,经过试验验证可以得知,阳性分型结果显示,与参考试剂盒结果相比,使用本发明的重组CagA蛋白进行检测的I型符合率可以达到89.19%(样本数37),I型假阳率可以低至4.92%(样本数61),II型符合率可以达到90.00%(样本数30),阴性符合率可以达到90.32%(样本数31);与临床碳呼吸实验结果相比,阴性样本结果符合率可以达到97.6%(样本数82)。

[0025] 还需要说明的是,现有的重组CagA蛋白结构与天然蛋白存在一定差异,由于蛋白质的结构是决定蛋白质之间相互作用的关键因素,这种结构差异可能会导致重组CagA与体内抗体的结合价低于天然抗原,从而影响应用端的诊断结果,拉低了相关体外诊断方法的准确性。本发明中的重组CagA蛋白与体内抗体的结合价高于现有的重组CagA蛋白。

[0026] 本发明另一实施例提供一种编码上述重组CagA蛋白的基因片段。需要说明的是,本发明中的编码上述重组CagA蛋白的基因片段可以是任意可以编码上述如SEQ ID NO.1所示氨基酸序列片段的基因片段,也可以优选该基因片段针对大肠杆菌(*Escherichia coli*)密码子优化后的片段。

[0027] 在一些具体实施例中,编码上述重组CagA蛋白的基因片段包含如SEQ ID NO.2所示的序列。

[0028] SEQ ID NO.2:

[0029] CAAACCGAAGCGGCTTTTAACCCGCAGCAATTTATCAACAATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGTTGATAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAACCAATCGTTGATAAGAATGATAGGGATAACAGGCAAGCTTTGATGGAATCTCGCAATTAAGGGAAGAATACTCCAATAAGGCGATCAAAAATCCTACCAAAAAGGATCAGTATTTTTCAGACTTTATCAATAAGAGCAATGATTTAATCAACAAAGACAGTCTCATTGATATAGGTTCTTCATAAAAAGCTTCAGAAATTTGGGACTCAGCGTTACCGAATTTTCACAAGTTGGGTGCCATCAAACGATCCGTCTAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGACAAAGAAAAAGCAGAGTTTTGAAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATCATTATAGGGAATCAAATCCGAACGGATCAAAGTTCATGGGCGTGTGTTGATGAATTTCTTGAAAGAAAGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATTTTTATCATTGTATTTAACAAAGAACAATCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTCCCCATGTCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCCACATACAAGGCTTACCGCCT。

[0030] 本发明再一实施例提供一种重组表达载体,包含本发明的基因片段。需要说明的是,可以将本发明中的基因片段搭配表达载体,构建重组表达载体进行基因片的表达。

[0031] 在一些具体实施例中,上述的重组表达载体中用于表达本发明中的基因片的表达载体为pET-32a载体。如上所述,可以将本发明中的基因片段搭载在pET-32a载体上进行表达;当然,应当理解的是,pET-32a载体只是本发明中的一种优选,包括但不限于pET-32a载体。

[0032] 还需要说明的是,本发明中的重组表达载体可以是包括相互独立包装的本发明中的基因片段和表达载体;也可以将本发明中的基因片段装载在表达载体上的融合后的重组表达载体。

[0033] 本发明再一实施例提供一种重组表达菌株,其包含本发明中的基因片段或本发明中的重组表达载体。应当理解的是,本发明中的基因片段或重组表达载体表达需要借助宿主细胞进行表达,宿主细胞可以为本领域所公知的,优选大肠杆菌。

[0034] 还需要说明的是,本发明中的重组表达菌株可以是包括相互独立包装的本发明的重组表达载体和宿主细胞,也可是将本发明中的基因片段以及重组表达载体转入到表达菌株中后的重组表达菌株。

[0035] 本发明再一实施例提供一种本发明中重组CagA蛋白的制备方法,包括:将本发明中的重组表达菌株进行培养即得到重组CagA蛋白。

[0036] 在一些具体实施例中,上述培养包括:将本发明中的重组表达菌株在25°C-39°C, 120rpm-200rpm培养至 $OD_{600}=0.2-0.7$ ;然后加入IPTG诱导表达,25°C-39°C,120rpm-200rpm,表达得包含重组CagA蛋白的菌液。

[0037] 在一些具体实施例中,上述培养更优选包括:将本发明中的重组表达菌株在37°C, 180rpm培养至 $OD_{600}=0.4-0.5$ ;然后加入IPTG(终浓度0.1mM-1mM)诱导表达,30°C,180rpm,表达4h-8h(更优选为6h)得包含重组CagA蛋白的菌液。在该培养条件下,可以在最温和的条件最快培养得到最多的包含重组CagA蛋白的菌液。

[0038] 在一些具体实施例中,上述的制备方法还包括:(1)培养结束后,将菌液8500g-12000g,2°C-8°C进行离心,得沉淀,沉淀进行重悬得混悬液;(2)将混悬液超声破碎,10000g-15000g,2°C-8°C离心得上清液;(3)上清液纯化得重组CagA蛋白。

[0039] 在一些具体实施例中,上述的制备方法还可以优选包括:(1)培养结束后,将菌液9500g,4°C进行离心3-8分钟(更优选5分钟),得沉淀,沉淀使用纯化平衡液(0.02MPB、0.5MNaCl)进行重悬得混悬液;(2)将混悬液超声破碎,12000g,4°C离心4分钟-15分钟(更优选10分钟)得上清液;(3)上清液纯化得重组CagA蛋白。在该优选条件下,可以在最短时间得到最多且最纯的重组CagA蛋白。

[0040] 本发明再一实施例提供一种幽门螺杆菌分型检测试剂,其包含本发明中的重组CagA蛋白。需要说明的是,可以将本发明中的重组CagA蛋白与其他辅助检测试剂组合成检测试剂用于幽门螺杆菌的分型检测。

[0041] 本发明再一实施例提供一种幽门螺杆菌分型检测试剂盒,其包含本发明中的重组CagA蛋白或本发明中的幽门螺杆菌分型检测试剂。需要说明的是,为了幽门螺杆菌的分型检测更加便捷,可以将幽门螺杆菌分型检测试剂制备成试剂盒的形式,试剂盒的形式为本领域所已知的,比如包括试剂瓶、说明书或试剂盒的隔板等。

[0042] 本发明再一实施例提供一种本发明中的重组CagA蛋白在制备幽门螺杆菌检测试剂或试剂盒中的应用。需要说明的是,重组CagA蛋白与人体内对应抗体有较强的结合能力,该重组CagA蛋白分别检测强阳性、弱阳性和阴性血清样本中的CagA抗体,结果符合率(与碳呼吸实验结果)可以高达97.6%,所以可以将其用于制备幽门螺杆菌检测试剂或试剂盒中。另外,幽门螺杆菌检测试剂或试剂盒可以是ELISA试剂或ELISA试剂盒。

[0043] 为了更好地理解本发明,下面结合具体示例进一步阐明本发明的内容,但本发明的内容不仅仅局限于下面的示例。

[0044] 一、重组CagA蛋白制备

[0045] (一) 扩增获得CagA序列

[0046] 从HP菌株(NCTC 11637,购买自广东省微生物菌种保藏中心)基因组DNA中扩增获得CagA序列,第31bp-756bp,具体如下:

[0047] CAAACCGAAGCGGCTTTTAACCCGCAGCAATTTATCAACAATCTTCAAGTGGCTTTTCTTAAAGTTGA

TAACGCTGTCGCTTCATACGATCCTGATCAAAAACCAATCGTTGATAAGAATGATAGGGATAACAGGCAAGCTTTT  
 GATGGAATCTCGCAATTAAGGGAAGAATACTCCAATAAGGCGATCAAAAATCCTACCAAAAAGGATCAGTATTTTT  
 CAGACTTTATCAATAAGAGCAATGATTTAATCAACAAAGACAGTCTCATTGATATAGGTTCTCCATAAAAAGCTT  
 TCAGAAATTTGGGACTCAGCGTTACCGAATTTTCACAAGTTGGGTGTCCCATCAAAAACGATCCGTCTAAAATCAAC  
 ACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCTATCCCTGATGACAAAGAAAAAGCAGAGTTTT  
 TGAAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGGAATCATTATAGGGAATCAAAATCCGAACGGATCAAAAAGTTCATGGGCGT  
 GTTTGATGAATTCTTGAAAGAAAGGCAAGAAGCAGAAAAAATGGAGAGCCTACTGGTGGGGATTGGTTGGATATT  
 TTTTATCATTTGTATTTAACAAAGAACAATCTTCTGATGTCAAAGAAGCAATCAATCAAGAACCAGTTCCCATG  
 TCCAACCAGATATAGCCACTACCACCACCCACATACAAGGCTTACCGCCT。

[0048] (二) 加入酶切位点

[0049] (1) PCR扩增目的条带

[0050] 使用PrimerSTAR HSDNA酶进行PCR扩增。设计引物,通过PCR延长CagA序列,在序列两段加入酶切位点Sal I、保护性碱基、Xho I和15bp-18bp同源臂(不包括酶切位点);其中,PCR引物如下表1所示,PCR体系如下表2所示,PCR程序如下表3所示。

[0051] 表1PCR反应引物

[0052]	CagA-Sal-F	CCGAATTCGAGCTCCGTCGACCAAACCGAAGCGGCTTTTAAC
	CagA-Xho-R	GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGAGGCGTAAGCCTTGTATGTG

[0053] 表2PCR反应体系

[0054]	组分	体积/质量
	5×PrimeSTARBuffer (Mg <sup>2+</sup> Plus)	10μL
	dNTPMixture (2.5mM each)	4μL
	CagA-Sal-F	1μL
	CagA-Xho-R	1μL
	Template	<200ng
	PrimeSTARHSDNAPolymerase (2.5U/μl)	0.5μL
	灭菌水	补充至50μL

[0055] 表3PCR反应程序

步骤序号	循环数	温度	时间
1	1	98℃	3min
2	28	98℃	10s
		60℃	5s
		72℃	45s
3	1	72℃	7min
4	1	12℃	∞

[0058] (2) 核酸电泳:每管扩增产物中加入10μL 6×Loading Buffer(北京全式金生物,货号GH101-01),混匀,将PCR产物全部点样,DL5000 Marker(TaKaRa,货号3428Q)取20μL点样,160V,20min。

[0059] (3) 胶回收:凝胶成像仪拍照,切下目的条带,称重;按DNA凝胶快速纯化试剂盒(北京全式金,货号EG101-02)操作;使用微量分光光度计检测浓度。

[0060] (三) 构建重组表达载体

[0061] 通过同源重组的方式将表达序列连接到经SalI和XhoI酶切后的pET-32a载体中, 具体如下:

[0062] (1) 酶切载体

[0063] 1) 先将pET-32a载体与SalI和XhoI酶按以下表4中的体系混合;

[0064] 表4pET-32a载体与SalI和XhoI酶混合体系

组分	体积/质量
SalI	2.5 $\mu$ L
XhoI	2.5 $\mu$ L
10 $\times$ HBuffer	5 $\mu$ L
pET-32a	<2.5 $\mu$ g
灭菌水	补充至50 $\mu$ L

[0066] 2) 在PCR仪中37 $^{\circ}$ C反应2-4小时。经核酸电泳检测酶切情况, 被切开的载体条带在5000bp左右, 未切开的载体在3000bp附近。

[0067] (2) 同源重组连接目的片段和载体

[0068] 1) 使用翌圣生物的Hieff Clone<sup>®</sup> Plus One Step Cloning Kit(货号10911)进行同源重组, 将步骤(二)中回收的目的片段与线性化的pET-32a载体、同源重组酶按以下表5中的体系混合;

[0069] 表5pET-32a载体、同源重组酶混合体系

组分	体积/质量
CagA 片段	47 ng
线性化的 pET-32a	118 ng
2 $\times$ Hieff Clone <sup>®</sup> Enzyme Premix	10 $\mu$ L
灭菌水	补充至 20 $\mu$ L

[0071] 2) 在PCR仪中50 $^{\circ}$ C反应25分钟, 置于冰上冷却5分钟后进行下一步操作。

[0072] (3) 转化

[0073] 1) -80 $^{\circ}$ C冰箱取出一管DH5 $\alpha$ 感受态, 加入20 $\mu$ L同源重组产物, 从底部旋转轻吸混匀;

[0074] 2) 冰浴30min, 42 $^{\circ}$ C水浴90s, 冰浴3min;

[0075] 3) 无菌操作加入500 $\mu$ L无抗LB, 37 $^{\circ}$ C, 180rpm摇床培养1h30min;

[0076] 4) 取100 $\mu$ L培养物, 100 $\mu$ L无菌水, 涂布于LB(Amp+/Kana)平板, 37 $^{\circ}$ C倒置培养16h左右。

[0077] (4) 菌检

[0078] 1) 挑斑: 挑单菌落于500 $\mu$ L LB(含Amp+)中, 37 $^{\circ}$ C, 180rpm摇床培养4h左右; 经PCR检测(反应体系如表6所示, 反应条件如表7所示)载体转化情况;

[0079] 表6PCR检测反应体系(25 $\mu$ L)

	试剂	
	酶: 2×Taq Master Mix	12.5μL
[0080]	引物	CagA-Xho-R 1μL
		T7 F (通用引物) 1μL
	模板 (菌液)	1μL
	ddH <sub>2</sub> O	9.5μL

[0081] 注:通用引物比自身引物多扩增出500bp

[0082] 表7PCR检测反应条件

[0083]	序号	1	2	3	4	2~4: 28 个循环	5	6
	温度	94°C	94°C	57°C	72°C		72°C	12°C
	时间	3min (质粒) 5min (菌液)	20s	20s	1min24s		5min	∞

[0084] 2) PCR后经核酸电泳检测,目的条带在1350bp左右,将菌检成功的菌液进行测序,测序结果与预期序列相符则表明载体构建成功。

[0085] (四) 构建重组表达菌株

[0086] 重组表达载体构建经测序确认无误后,将质粒菌扩繁,使用 EasyPure<sup>®</sup> PlasmidMiniPrep Kit (北京全式金生物,货号EM101-02) 提取质粒,按步骤(三)中第(3)~(4)条转入表达菌株BL21 (DE3)。

[0087] (五) 重组表达菌株进行表达

[0088] (1) 将重组表达菌株扩大培养,37°C,180rpm培养至OD<sub>600</sub>=0.46,加入IPTG (终浓度1mM) 诱导表达,30°C,180rpm,6h;

[0089] (2) 表达完成后,将菌液收集,9500g,4°C,离心5分钟,弃上清,沉淀用纯化所用平衡液 (适量) 溶解得菌体混悬液;

[0090] (3) 将上一步收集的菌体混悬液使用超声破碎仪冰浴破碎,45分钟;

[0091] (4) 破碎后将菌液离心,12000g,4°C,10分钟;将上清收集到离心管中为可溶性蛋白;沉淀为包涵体蛋白;包涵体蛋白可以用适量纯化平衡液溶解。

[0092] (五) 蛋白纯化

[0093] 取适量蛋白样品,SDS-PAGE检测蛋白条带,其检测结果如图1泳道1所示;确定蛋白有可溶性表达后,将可溶性蛋白通过可以结合His标签的亲层析填料 (天地人和,Ni-NTA Beads,货号SA004025) 纯化;纯化流程具体如下:

[0094] (1) 纯化平衡液组分:20mMPB、0.5MNaCl,PH=7.4;纯化洗脱液组分:20mMPB、0.5MNaCl,5mM-500mM咪唑 (浓度梯度为5mM、10mM、20mM、50mM、100mM、200mM、500mM咪唑),PH=7.4;

[0095] (2) 将约5mL填料装填在重力柱中,使用10倍柱体积的超纯水清洗填料,使用4倍柱体积纯化平衡液 (0.02MPB、0.5MNaCl) 平衡填料;将表达上清蛋白上样,在2-8°C缓慢通过填料 (流速<1mL/min),重复一次;

[0096] (3) 依次使用咪唑浓度从低到高 (5-500mM) 的洗脱液洗脱蛋白,在洗脱时使用 Quick Start Bradford 1×Dye Reagent (后称快检液) 检测洗脱液中的蛋白质,取10u1流穿液加入200u1快检液,蛋白会让棕色的快检液变蓝。在每个咪唑浓度的洗脱液蛋白浓度较

低后更换下一个咪唑浓度的洗脱液。

[0097] (4) 蛋白洗脱完后,使用5倍柱体积纯化平衡液清洗填料柱,使用10倍柱体积超纯水清洗填料柱,使用3倍柱体积20%乙醇清洗填料柱,并用20%乙醇封存填料。

[0098] 经SDS-PAGE检测纯化洗脱液中的蛋白条带,结果如图1所示,M:marker,1:表达上清,2:流穿,3:5mM咪唑洗脱液,4-6:20mM咪唑洗脱液,7:50mM咪唑洗脱液,8-12:100mM咪唑洗脱液,13-14:200mM咪唑洗脱液;收集纯化到的目的蛋白,装入透析袋,使用PEG20000浓缩蛋白,然后使用含10%甘油的PBS透析;纯化后浓缩蛋白进行超滤、冻干或硫酸铵沉淀。

[0099] 二、重组CagA蛋白性能验证

[0100] (一) 与临床碳呼吸实验对比

[0101] 使用本实验制备的CagA抗原检测临床碳呼吸实验阴性样本中的抗体,结果与临床碳呼吸实验符合率达97.6%(样本数82),需要说明的是,碳呼吸实验就是临床使用的方法,该方法只能判断阴阳性,不能判断强阳和弱阳,而CagA抗体只在强阳性患者体内有,所以跟临床结果只能比较阴性结果,来检测假阳性。

[0102] (二) 与现有试剂盒检测结果对比

[0103] 使用双抗夹心法,经免疫层析法检测(试剂盒来源:深圳伯劳特生物制品有限公司),反应性良好,结果如下表8所示。

[0104] 表8重组CagA蛋白用于HP分型检测结果

CagA 与伯劳特试剂盒对比结果	伯劳特	CagA			
		I 型	II 型	阴性	合计
I 型		33	3	1	37
II 型		2	27	1	30
阴性		1	2	28	31
合计		36	32	30	98

[0106] 按照上表8显示的结果计算I型符合率(重组CagA与伯劳特试剂盒共同测得的I型/伯劳特测得I型总数)、I型假阳率(重组CagA测得I型且伯劳特测得非I型样本数/伯劳特测得非I型样本总数)、II型符合率(重组CagA与伯劳特试剂盒共同测得的II型/伯劳特测得II型总数)和阴性符合率(重组CagA与伯劳特试剂盒共同测得的阴性/伯劳特测得阴性总数),结果如下表9所示。

[0107] 表9不同分型符合率

I型符合率	89.19%
I型假阳率	4.92%
II型符合率	90.00%
阴性符合率	90.32%

[0109] 由表9可以得知,与参考试剂盒结果相比,使用本发明的重组CagA蛋白进行检测的I型符合率为89.19%,I型假阳率为8.33%,II型符合率为90.00%,阴性符合率为90.32%;整体来看,分型检测符合率较高,假阳性率较低。

[0110] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本

发明的权利要求范围。

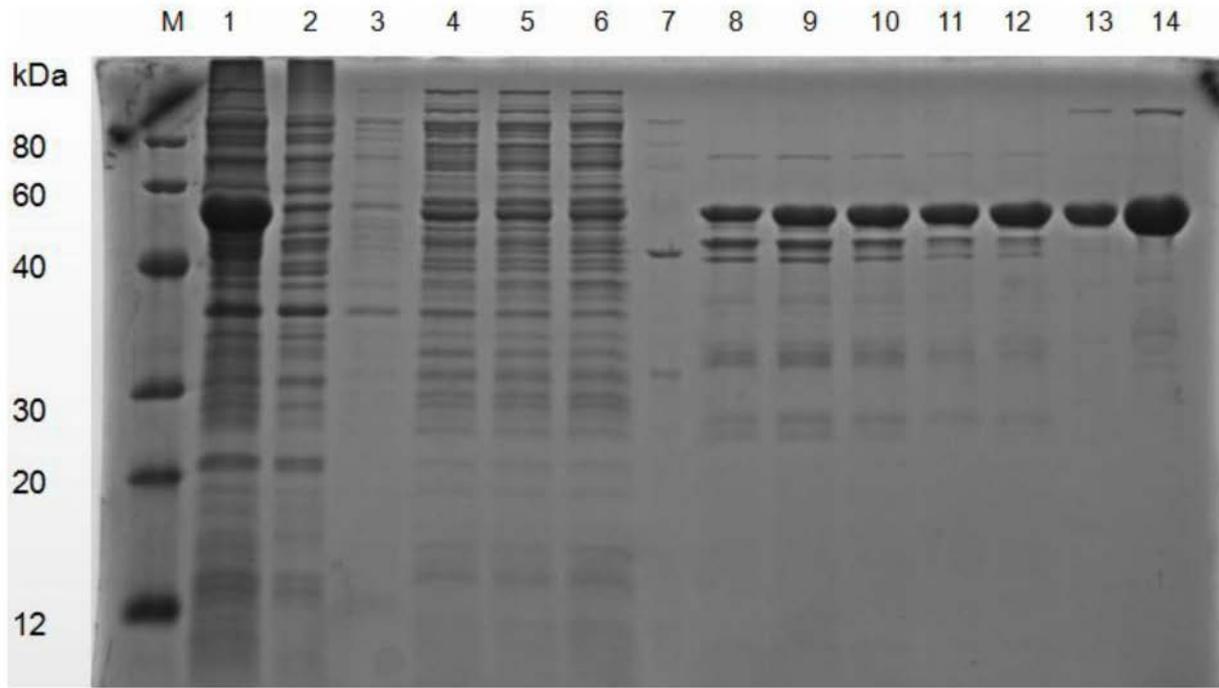


图1