

[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 200910062496.4

[51] Int. Cl.

G12N 15/70 (2006.01)

G12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月16日

[11] 公开号 CN 101603046A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

[22] 申请日 2009.6.10

[21] 申请号 200910062496.4

[71] 申请人 武汉华美生物工程有限公司

地址 430070 湖北省武汉市洪山区关山一路

SBI 创业街特一号二单元 2302 室

[72] 发明人 华权高

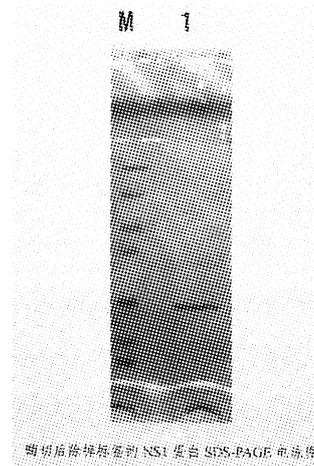
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种重组甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 的原核表达、纯化及其检测方法的建立

[57] 摘要

本发明属于人畜共患病研究领域，涉及一种人畜共患病的鉴别诊断方法。选择了公开的甲型 H1N1 加利福尼亚病毒株 (A/California/08/2009 (H1N1)) cDNA 序列中非结构蛋白 NS1 基因为研究内容，利用通过基因合成方法获得基因片段构建原核表达载体 pGEX-6P-1-NS1；将阳性重组质粒转化到大肠杆菌中得到重组菌株 (Escherichia coli BL21 rosseta/pGEX-6P-1-NS1)；通过多种层析方法获得纯化后的 H1N1 的非结构蛋白 NS1，并利用所述的表达蛋白通过免疫宿主动物获得特异性针对 H1N1 非结构蛋白 NS1 的多克隆或单克隆抗体，建立酶联免疫吸附试验鉴别诊断方法，用于区分甲型 H1N1 流感病毒感染与其他流感病毒感染的病人。



- 1、一种重组甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 的原核表达、纯化及其检测方法的建立。
- 2、根据权利要求 1 所述的原核表达，其特征是，使用装载有包含甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 基因的原核表达载体在原核宿主大肠杆菌中表达蛋白产物。
- 3、根据权利要求 1 所述的纯化，其特征是，将宿主表达出的带有标签的甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 蛋白利用亲和层析、分子筛、离子交换等方法提高重组蛋白纯度。
- 4、根据权利要求 1 所述的甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1，其特征是，与天然甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 具有相同或相似的免疫原性。
- 5、根据权利要求 1 所述的重组甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1，其特征是，该蛋白为加利福尼亚州发现甲型 H1N1 病毒株的非结构蛋白 NS1。
- 6、根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征是，使用重组甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1，通过免疫小鼠、家兔或通过噬菌体库，获得高特异性甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 的单抗、多抗、基因工程抗体，并通过获得的抗体及重组蛋白，基于免疫学方法建立包括但不限于免疫比浊法以及酶联免疫（ELISA）法的免疫学方法检测样品中人甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 浓度的方法。

一种重组甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 的原核表达、纯化及其检测方法的建立

技术领域

本发明属于人畜共患病研究领域，涉及一种人畜共患病的鉴别诊断方法。选择了公开的甲型 H1N1 加利福尼亚病毒株 (A/California/08/2009 (H1N1)) cDNA 序列中非结构蛋白 NS1 基因为研究内容，利用通过基因合成方法获得基因片段构建原核表达载体 pGEX-6P-1-NS1；将阳性重组质粒转化到大肠杆菌中得到重组菌株 (*Escherichia coli* BL21 rosseta/ pGEX-6P-1-NS1)；通过多种层析方法获得纯化后的 H1N1 的非结构蛋白 NS1，并利用所述的表达蛋白通过免疫宿主动物获得特异性针对 H1N1 非结构蛋白 NS1 的多克隆或单克隆抗体，建立酶联免疫吸附试验鉴别诊断方法，用于区分甲型 H1N1 流感病毒感染与其他流感病毒感染的病人。

背景技术

H1N1是一种病毒，是Orthomyxoviridae系列的一种病毒。它的宿主是鸟类和一些哺乳动物。有些H1N1病毒引起严重的疾病大多发生于家禽方面，而人类却很少出现。但经过鸟类和哺乳动物的传播和变异，这可能导致疫情或人类流感大面积传播。

H1N1的A型流感病毒于1918-1919年造成西班牙流感流行，导致2000万-4000万人死亡。1977年，H1N1与H3N2亚型病毒共同在人类流行，如果抗原变异或与其他流感病毒亚型发生基因重排产生新的病毒株，则极可能引起大流行。

研究表明，NS1蛋白仅在流感病毒感染的细胞中大量表达，而在正常病毒粒

子中不存在，同时经灭活疫苗免疫的动物也不会产生，因此，针对NS1蛋白的抗体可能只在流感病毒的宿主中存在，据此可以区分灭活疫苗免疫动物与活病毒感染动物。已有研究表明，非结构蛋白及其抗体可以作为病毒感染的一个重要标记。上述特点使NS1蛋白在流感病毒的监测和抗病毒研究中有着广阔的应用前景。

发明内容

本发明目的之一是提供一种重组甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 的原核表达与纯化的方法，为其抗体的制备提供高纯度抗原。

其中所述的重组蛋白的制备方法，它包括下列步骤：

(1) 公开的甲型 H1N1 加利福尼亚病毒 (A/California/08/2009 (H1N1)) cDNA 序列中非结构蛋白 NS1 基因为目的基因，通过基因合成的方法获得基因片段；

(2) 在原核表达载体 pGEX-6P-1 多克隆位点中定向插入甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白基因 NS1 的 DNA 序列，构建得到原核表达载体质粒 pGEX-6P-1-NS1；

(3) 将步骤(2)所说的原核表达载体质粒 pGEX-6P-1-NS1 转化至大肠杆菌 BL21 rosseta 感受态细胞，用氨苄霉素抗性筛选单个重组菌。

(4) 所述纯化具体是：pGEX-6P-1-NS1 在大肠杆菌 Rosetta 中表达，克隆接种至 3ml 含有 100ug/ml 氨苄青霉素的 LB 缓冲液，37℃，过夜，220rpm；将过夜培养物 1:100 稀释至 1L 含有 100ug/ml 氨苄青霉素的 LB 缓冲液，37℃，220rpm，培养 5h；加入终浓度为 0.1mM 的 IPTG，22℃，180rpm，继续培养 22h；以 8000g，15min，4℃ 离心收菌；菌体用 50mM Tris-cl，200mM NaCl pH8.0 悬起至 25ml，加入 5mg 溶菌酶，RT，0.5h；用超声破碎仪超声至溶液澄清，12000rpm，20min 离心 3 次；

将上清液使用GE healthcare的Glutathione-Sepharose4B柱料纯化，得到纯化融合蛋白。PSP酶切GST标签，柱料纯化，得到除去标签的NS1蛋白。

实验证明，纯化后NS1可溶性极高，一年内未有聚合物出现。

本发明提供的利用P_{gex}-6P-1系统融合表达再经酶切处理去掉标签制得的NS1蛋白，可以在大肠杆菌中成功表达，表达量与前人的结果类似，相对于真核表达，原核表达制备工程化抗体技术相对简单，成本更低；

本发明目的之二是提供一种基于特异性检测甲型H1N1流感病毒非结构蛋白NS1的免疫学方法的H1N1检测试剂盒。

将纯化后重组NS1蛋白作为抗原分别免疫家兔和小鼠，获得高特异性针对NS1蛋白的多克隆抗体及单克隆抗体；

6) 利用获得的抗体及高纯度的重组NS1蛋白，利用包括但不限于双夹心ELISA法、免疫比浊法等方法检测人体液中的NS1的含量；

所述鉴定的具体过程是包括但不限于用该蛋白包被ELISA酶标板制备ELISA抗原酶标板。用空白对照菌(*Escherichia coli* BL21 *rosseta*/pGEX-6T-1)诱导产物制备血清稀释液，按照普通ELISA方法检测待检血清。根据反应后的吸光值确定阴性、可疑、阳性的判断临界值。

按照如下的配方制备包被液、洗涤液、封闭液、稀释液、底物液、终止液：

包被液(25mmol 碳酸盐缓冲液)：Na₂CO₃ 2.322g, NaHCO₃ 2.352g, ddH₂O 加至 1000mL (pH9.6)。

1倍洗涤液：NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HP0₄ · 12H₂O 3.63g, KH₂P0₄ 0.44g, 双蒸水加至 1000mL (pH7.4)。

封闭液：2g 牛血清白蛋白（BSA）溶于 100mL 洗涤液。

稀释液：1g 牛血清白蛋白（BSA）溶于 100mL 洗涤液。

底物液：购买自天健生物制药（天津）有限公司。

终止液：2N H₂SO₄

将 NS1 抗原酶标板、洗涤液（25 倍）、稀释液、HRP 标记的抗人 IgG 抗体、底物缓冲液、终止液组装成 NS1-ELISA 鉴别诊断试剂盒。

本发明的有益效果是：

1、本发明的有益效果之一是生物安全性高。本发明所涉及到的原核表达载体 pGEX-6P-1 是分子生物学中常用的原核表达载体，没有生物危险性，在此基础上构建的原核表达载体 pGEX-6P-1-NS1 也没有任何生物危险性。重组大肠杆菌 BL21Rosseta/pGEX-6P-1-NS1 是将原核表达载体 pGEX-6P-1-NS1 转化至分子生物学中常用的大肠杆菌 BL21Rosseta 感受态细胞后经氨苄霉素抗性筛选获得，也不具生物危险性。本发明所用的抗原酶标板是用甲型 H1N1 流感病毒的非结构蛋白制备的，制备过程中不涉及活病毒，因此没有活病毒逃逸、扩散的潜在危险。

2、本发明的有益效果之二是生产成本低。本发明所提供的甲型 H1N1 流感鉴别诊断方法和诊断试剂盒所需抗原是甲型 H1N1 流感病毒的非结构蛋白。该蛋白可以通过重组大肠杆菌 BL21Rosseta/ pGEX-6P-1-NS1 在体外得到大量的表达，适合大规模的生产。

3、本发明的有益效果之三是提供的鉴别诊断试剂盒使用方便。本发明在提供了鉴别诊断方法的基础上，还将该方法所需的各种试剂组装成试剂盒，操作简单易行，非常适合临床大规模检测。

附图说明

图 1 显示 P_{gex}-6P-1 载体图谱。

图 2 NS1 融和蛋白小量表达鉴定 SDS-PAGE 电泳图。其中 1 为未诱导菌株，M 为蛋白分子量标准，从上到下依次为 115KD、66KD、45KD、35KD、25KD、18.4KD、14.4KD，2 为 1 号诱导后菌株，3 为 2 号诱导后菌株，4 为 3 号诱导后菌株，5 为 4 号诱导后菌株，6 为 5 号诱导后菌株，7 为 6 号诱导后菌株，8 为 7 号诱导后菌株，9 为 8 号诱导后菌株；

图 3 显示的是纯化后的 NS1 融和蛋白 SDS-PAGE 电泳图。其中 1 为纯化后的融和蛋白 1 号管蛋白，2 为纯化后的融和蛋白 2 号管蛋白，M 为蛋白分子量标准，从上到下依次为 115KD、66KD、45KD、35KD、25KD、18.4KD、14.4KD；

图 4 酶切后除掉标签的 NS1 蛋白 SDS-PAGE 电泳图。其中 1 为酶切后不带标签的 NS1 蛋白，M 为蛋白分子量标准，从上到下依次为 115KD、66KD、45KD、35KD、25KD、18.4KD、14.4KD；

专利具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例 1 甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 基因原核表达载体的构建

BamHI 及 SalI 酶切 PUC57-NS1 和载体 pGEX-6P-1，回收 NS1 基因和载体 pGEX-6P-1；然后用 T4 DNA ligase 连接，22 度水浴 1 小时，转化大肠杆菌 Rossetta 感受态细胞，37℃ 培养，从中随机挑选多个单菌落，分别放入 LB 液体培养基中

37℃培养 5 小时后, 菌体 OD 值约 0.6 时加 IPTG 至终浓度 1mM, 经小量表达鉴定, 挑取阳性克隆。。

实施例 2 甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 的大量诱导表达和蛋白纯化

pGEX-6P-1-NS1 在大肠杆菌 Rosetta 中表达, 克隆接种至 3ml 含有 100ug/ml 氨苄青霉素的 LB 缓冲液, 37℃, 过夜, 220rpm; 将过夜培养物 1: 100 稀释至 1L 含有 100ug/ml 氨苄青霉素的 LB 缓冲液, 37℃, 220rpm, 培养 5h; 加入终浓度为 0.1mM 的 IPTG, 22℃, 180rpm, 继续培养 22h; 以 8000g, 15min, 4℃离心收菌; 菌体用 50mM Tris-Cl, 200mM NaCl pH8.0 悬起至 25ml, 加入 5mg 溶菌酶, RT, 0.5h; 用超声破碎仪超声至溶液澄清, 12000rpm, 20min 离心 3 次; 将上清液使用 GE healthcare 的 Glutathione-Sepharose4B 柱料纯化, 得到纯化融合蛋白。PSP 酶切 GST 标签, 柱料纯化, 得到除去标签的 NS1 蛋白。

实施例 3 甲型 H1N1 感病毒 NS1-ELISA 鉴别诊断试剂盒构成

- 1.1 包被抗原的微孔板 (8 孔 × 12 条 × 1 块)
- 1.2 HRP 标记抗人 IgG 1 瓶 (120ul / 瓶)
- 1.3 25 倍洗涤液浓缩液 I 瓶 (20ml/瓶)
- 1.4 稀释液 2 瓶 (20ml/瓶)
- 1.5 底物液 1 瓶 (10ml/瓶)
- 1.6 终止液 1 瓶 (10ml/瓶)

实施例 4 甲型 H1N1 流感病毒 NS1-ELISA 操作步骤

- (1) 从 4℃ 冰箱中取出试剂盒, 平衡各组分至室温。
- (2) 取预包被的微孔条板 (根据标本多少, 可拆开分次使用), 除空白对照孔外, 每孔加入以样品稀释液 1: 40 稀释的待检样品, 每孔加 100ul, 同样 1:

40 稀释对照血清，设阳性对照 2 孔，阴性对照 2 孔，空白孔不加，轻轻振匀孔中样品（勿溢出），置 37℃ 温育 1 小时。

(3) 甩掉板孔中的溶液，用洗涤液洗板 3 次，200 u1/次，每次静置 3 分钟倒掉，最后一次拍干。

(4) 每孔加酶标二抗 100 u1，置 37℃ 温育 30 分钟。

(5) 洗涤 4 次，200 u1/次，每次静置 3 分钟倒掉，最后一次拍干。

(6) 每孔加底物 90u1，室温避光显色（30 分钟以内）。

(7) 每孔加终止液 50u1，15 分钟内测定结果。

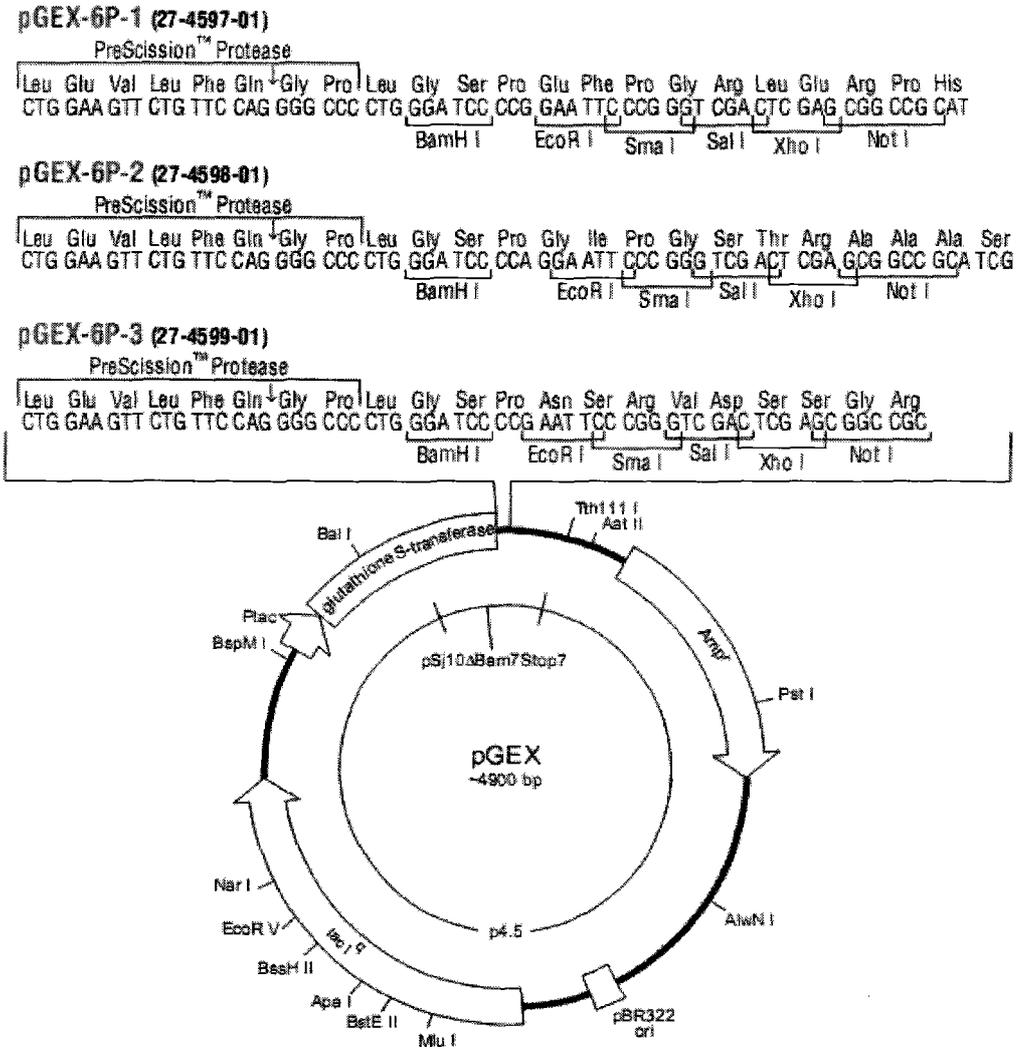


图 1 Pgex-6P-1 载体图谱

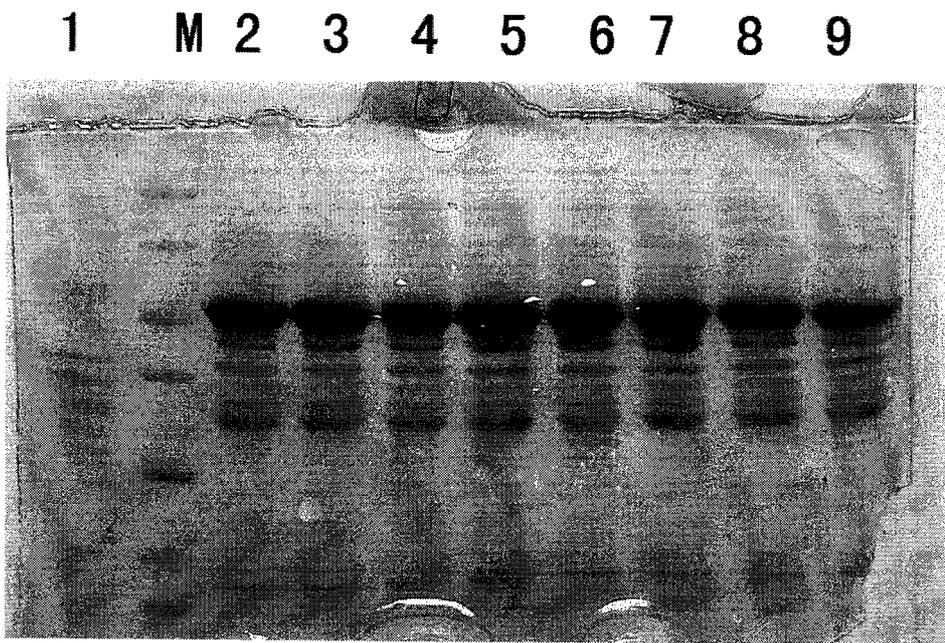


图 2 NS1 融和蛋白小量表达鉴定 SDS-PAGE 电泳图

M 1 2



图 3 纯化后的 NS1 融和蛋白 SDS-PAGE 电泳图



图 4 酶切后除掉标签的 NS1 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

专利名称(译)	一种重组甲型H1N1流感病毒非结构蛋白NS1的原核表达、纯化及其检测方法的建立		
公开(公告)号	CN101603046A	公开(公告)日	2009-12-16
申请号	CN200910062496.4	申请日	2009-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
[标]发明人	华权高		
发明人	华权高		
IPC分类号	C12N15/70 C12P21/02 C07K14/11 C07K1/16 C07K16/10 G01N33/543 G01N33/536 G01N33/53 C12R1/19		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于人畜共患病研究领域，涉及一种人畜共患病的鉴别诊断方法。选择了公开的甲型H1N1加利福尼亚病毒株(A/California/08/2009 (H1N1))cDNA序列中非结构蛋白NS1基因为研究内容，利用通过基因合成方法获得基因片段构建原核表达载体pGEX - 6P - 1 - NS1；将阳性重组质粒转化到大肠杆菌中得到重组菌株(Escherichia coli BL21 rosseta /pGEX - 6P - 1 - NS1)；通过多种层析方法获得纯化后的H1N1的非结构蛋白NS1，并利用所述的表达蛋白通过免疫宿主动物获得特异性针对H1N1非结构蛋白NS1的多克隆或单克隆抗体，建立酶联免疫吸附试验鉴别诊断方法，用于区分甲型H1N1流感病毒感染与其他流感病毒感染的病人。

