

[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 200910083026.6

[51] Int. Cl.
C07K 14/24 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)
C07K 1/26 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 16 日

[11] 公开号 CN 101531709A

[22] 申请日 2009.4.24

[21] 申请号 200910083026.6

[71] 申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

地址 102206 北京市昌平区流字 5 号

[72] 发明人 张建中 王 鹏 闫笑梅 赵 飞
肖 迪

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司
代理人 黄 健

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 2 页

[54] 发明名称

切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法及相关应用

[57] 摘要

本发明提供了一种切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法及相关应用。所述的切割鼠疫耶尔森氏杆菌 F1 抗原的方法包括：对 F1 抗原进行切割，得到两个以上切割片段，且使其中至少两个片段各包含至少一个完整线性表位。该方法可以进一步用于分析鼠疫 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位反应情况，即，本发明还提供了一种分析 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位反应性的方法，该方法包括步骤：按照所述的切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法将 F1 抗原切割成两个以上切割片段，并以至少两个有免疫反应性的切割片段分别对所述对 F1 抗体阳性样品进行免疫分析，如果 F1 抗体阳性样品与两个以上的切割片段具有反应性，可用于排除位点交叉反应。

1、一种切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法，该方法包括：

对 F1 抗原进行切割，得到两个以上切割片段，且使其中至少两个片段各包含至少一个完整线性表位。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述切割片段具有免疫反应性，且这些切割片段易于分离识别。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其中是采用羟胺作为切割剂对 F1 抗原进行切割。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其中，所述切割条件为：羟胺浓度为 20~30% (v/v)，反应 pH 值为 8.5~9.5，反应温度 42~48℃，反应时间 24~36h。

5、根据权利要求 3 所述的方法，该方法包括步骤：

将 F1 抗原溶于 pH8.5~9.5、1.0~2.0M 的 Tris-Cl 缓冲液中，F1 浓度 10~20ug/μl；

向上述溶液中加入羟胺，使羟胺终浓度 20%~30% (v/v)，金属浴 42~48℃，反应 24~36h。

6、一种分析 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位反应性的方法，该方法包括步骤：

按照权利要求 1~5 任一项所述的切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法，将 F1 抗原切割成两个以上切割片段；

以至少两个各包含至少一个完整线性表位的切割片段分别对所述 F1 抗体阳性样品进行免疫印迹分析。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其中，采用羟胺作为切割剂对 F1 抗原进行切割，该方法还包括去除切割剂以使切割产物复性的步骤，所述去除切割剂以使切割产物复性的步骤包括：

将经羟胺作用后的切割产物溶液加入 10~20 倍体积的双蒸水，冷冻干

燥；然后向其中加入与原切割产物 $2/3 \sim 3/2$ 体积的双蒸水溶解，并用 HCl 调其 pH 值至 6.5~7.5 之间。

8、根据权利要求 6 所述的方法，该方法还包括将所述切割片段进行分离的步骤，分离方法为采用 Tricine-SDS-PAGE 进行小分子电泳，其中分离胶、间隔胶及浓缩胶分别是 $7 \pm 0.5\text{cm}$ 、 $2 \pm 0.5\text{cm}$ 、 $1 \pm 0.5\text{cm}$ ，电泳条件：50~70V 1~2 h，80~100V 4~6 h。

9、根据权利要求 6~8 任一项所述的方法，其中，在以至少两个各包含至少一个完整线性表位的切割片段分别对所述 F1 抗体阳性样品进行免疫印迹分析时，F1 抗体阳性样品与两个以上的切割片段均具有反应性，与 F1 抗体阳性样品与一个以下切割片段具有反应性相比，F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位交叉反应可能性小。

10、一种分析蛋白 A 抗体阳性样品与蛋白 A 线性表位反应性的方法，该方法包括步骤：

将蛋白 A 切割成两个以上切割片段，且使其中至少两个片段各包含至少一个完整线性表位；

以至少两个各包含至少一个完整线性表位的切割片段分别对所述蛋白 A 抗体阳性样品进行免疫分析。

切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法及相关应用

本发明基于以下受资助的课题：

国家高技术研究计划项目：《鼠疫特异性诊断新技术的建立及应用评价》，项目编号：2006AA2Z4A7。

技术领域

本发明涉及一种切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法及相关应用，具体还涉及一种分析蛋白 A（如 F1 抗原）抗体阳性样品与蛋白 A 线性表位反应性的方法。

背景技术

鼠疫（Plague）是由耶尔森氏鼠疫杆菌（*Yersinia pestis*）引起的自然疫源性烈性传染病，是一个古老却迄今仍严重威胁人类的传染病，其席卷全球的三次大流行，夺走了数亿人们的生命。近年来，世界鼠疫疫情呈上升趋势，世界卫生组织已将鼠疫列为重新抬头的传染病，因此鼠疫的威胁依然存在，一旦暴发，那将是人类的灾难。

鼠疫免疫检测是鼠疫防治工作中的一个重要环节，其在鼠疫的发现、疫区处理及临床诊断中发挥至关重要的作用。回顾鼠疫免疫检测的历史，主线是围绕 F1 抗原的历史。F1 抗原是由耶尔森氏鼠疫杆菌 pMT1 质粒上 *cafI* 基因编码的一种荚膜蛋白，自然状态下以单体及聚合体形式存在，其单体分子量约为 15.5 kD，具体氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示（EMBL 号：P26948[22-170]）。

长期以来，F1 抗原被认为是鼠疫杆菌的特异性抗原，基于 F1 的检测抗

体的方法被认为是较可信的鼠疫检测和诊断方法。然而，2003年，在某些自然人群中发现3%左右的F1抗体阳性者，其中最高滴度的F1抗体为1:2560，对以F1抗原为基础的检测鼠疫抗体的方法提出了挑战。自然人群血清F1抗体阳性问题是长期困扰鼠疫领域的一难点问题，当前对这一问题的探讨只是在理论方面的一些猜想，一种观点认为是鼠疫疫苗的残余效价；一种观点认为是针对鼠疫F1抗原的位点交叉引起的；也有观点认为是鼠疫弱毒株感染所致。然而，由于受当前技术的限制，比如，在当前寻找确定样品中抗体是针对抗原分子哪个或哪些位点的研究方法中，通过化学合成多肽及克隆表达多肽的方法是较为通用的方法，但这些方法往往需要对蛋白全长进行重叠步进式设计，工作量比较大，而且常常由于步进距离的不合理，漏掉一些位点甚至找不出反应性位点；采用蛋白酶解或切割蛋白并结合片段分离技术、质谱鉴定等技术来寻找并确定反应性位点也是用来分析表位的方法，但该方法往往在分析蛋白的自身组成后，难以确定具体切割方案并找到合适的切割试剂，从而限制了其应用，目前利用实质性的方法去解释、验证自然人群血清F1抗体阳性问题并没有进展。

自然人群中检测到高滴度F1抗体的现象中，是与F1抗原的位点交叉反应，还是真正针对F1抗原的反应，解决这一疑问成为解释自然人群F1抗体阳性问题的重要环节，而这一解释直接关系到鼠疫防治工作的策略制定。

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种切割F1抗原的方法，以用于进一步分析解释上述自然人群血清F1抗体阳性问题。

本发明的另一目的在于提供一种分析F1抗体阳性样品与F1抗原线性表位反应性的方法。

本发明的另一目的在于建立一种分析蛋白A抗体阳性样品与蛋白A线

性表位反应性的方法。

Leenu Sabhnani 等人（参见 Identification of immunodominant epitope of F1 antigen of *Yersinia pestis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000 Feb; 27(2): 155-62）通过亲水性、分子表面可及性指数、可塑性、抗原性及两性氨基酸构成等指标综合分析推测，F1 抗原上至少存在 5 个线性表位，分别位于如 SEQ ID NO: 1 所示 F1 抗原氨基酸序列的第 75~85 位、第 84~102 位、第 102~116 位、第 116~128 位、第 121~144 位；并通过实验证实，表位第 121~144 位可以与高稀释的 F1 抗血清起反应，表位 102~116 位有较高的免疫原性，可以刺激机体产生较高效价抗体。也有学者认为第 75~85 位是最主要的 B 细胞表位（参见 Zav'yalov V, Denesyuk A, Zav'yaloova G, et al. Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis*. Immunol Lett, 1995, 45: 19~22.）。

抗原的 B 细胞表位分为构象表位和线性表位。申请人在既往的采用常规操作针对自然人群 F1 抗体阳性血清的免疫印迹分析研究中发现，转移在 PVDF 膜上的 F1 分子由于 SDS 的存在失去了其天然构象，而自然人群 F1 抗体阳性人血清对该失去天然构象的 F1 抗原也有反应（自然人群 F1 抗体阳性人血清与 F1 抗原的免疫印迹分析结果具体请见图 1，其中：泳道 1.分子量标准，泳道 2.鼠疫病人血清，泳道 3.鼠疫免疫兔血清，泳道 4.自然人群 F1 抗体阳性血清(浙江)，泳道 5.F1 抗体阴性人血清；从图中可以看出，自然人群 F1 抗体阳性人血清与经 SDS-PAGE 电泳后的 F1 抗原免疫印迹反应呈阳性；因天然 F1 抗原存在聚合体形式，因此阳性反应时出现两个条带，其中 15kD 附近的条带是 F1 单体，36kD 处是 F1 的一种聚合体），说明如果是交叉反应，则是线性表位的交叉。

既然确定自然人群 F1 抗体阳性人血清与 F1 抗原分子线性表位反应，那么如果能确定自然人群 F1 抗体阳性人血清是针对一个表位还是多个表位反应，对分析解释自然人群 F1 抗体阳性人血清的实质，具有较重大的意义。

为此，一方面，本发明提供了一种切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法，该方法包括：对 F1 抗原进行切割，得到两个以上切割片段，且使其中至少两个片段各包含至少一个完整线性表位。

利用本发明的切割方法，可以使 F1 抗原的线性表位分属于不同切割片段，之后可对这些切割片段进行免疫分析，将能为分析解决自然人群 F1 抗体阳性问题提供有力手段。

根据本发明的具体实施方案，在对 F1 抗原进行切割时，应使所述切割片段保持免疫反应性，且这些切割片段易于分离识别。

在本发明的一具体实施方案中，本发明是采用羟胺（Hydroxylamine）作为切割剂对 F1 抗原进行切割。羟胺可以特性性切割位点 Asn-Gly，从而可以将 F1 抗原从 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 34 位、第 103 位后切断，将 F1 切为三个片段，三个片段的具体序列分别为：如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 1~34 位、如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 35~103 位以及如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 104~149 位。本发明中，还可以通过 ExPASy 网站下在线软件 Compute pI/Mw，计算出利用羟胺切割 F1 所得片段的分子量及等电点，具体请参见下表：

	切点数	切点位置	片段氨基酸数	大约分子量(KD)	等电点(PI)
羟胺	2	34 103	34	3.6	4.32
			69	7.3	4.60
			46	4.7	4.78

根据本发明的优选具体实施方案，本发明中在采用羟胺对 F1 进行切割时，优化的切割条件为：羟胺浓度 20~30% (v/v)，反应 pH 值 8.5~9.5，反应温度 42~48℃，反应时间 24~36 h。

在本发明的一更优选的具体实施方案中，本发明的切割 F1 抗原的方法包括步骤：

- ① 将 F1 抗原溶于 pH8.5~9.5、1.0~2.0M 的 Tris-Cl 溶液中，F1 浓度

10~20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，可轻轻混匀；

② 向上述溶液中加入羟胺（通常使用 50%（v/v）羟胺），使羟胺终浓度 20%~30%（v/v），轻轻混匀，注意不要产生气泡，金属浴 42~48℃，反应 24~36h。

本发明还通过电泳的分析方法（请参见实施例 1、实施例 3），证实利用羟胺对 F1 抗原进行切割，确实能得到上述三个大小分别是约 7.3 kD（如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 35~103 位）、4.7 kD（如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 104~149 位）、3.6 kD（如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 1~34 位）的切割片段。

本发明的切割 F1 抗原的方法，可以成功地将 F1 抗原的线性表位分属于不同的切割片段上（五个预测线性中，约 7.3kD 的切割片段上带 2 个完整线性表位，约 4.7kD 的切割片段上带 3 个线性表位（其中有两个完整的线性表位）），为蛋白位点分析提供有力手段，有助于进一步分析解决自然人群 F1 抗体阳性问题。

另一方面，本发明还提供了一种分析 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位反应性的方法，该方法包括步骤：

按照本发明所述的切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法，将 F1 抗原切割成两个以上切割片段；

以至少两个各包含一个完整线性表位的切割片段分别对所述 F1 抗体阳性样品进行免疫印迹分析。

本领域的普通技术人员已知，线性表位指蛋白质的一级结构，即氨基酸排列顺序。一个线性表位通常由 8~15 个氨基酸组成，按最少的 8 个计算，由 20 个氨基酸组成特定的一段 8 个氨基酸序列的可能性是 20^8 分之一。如果一个蛋白与另一个蛋白有一个线性位点交叉，这种可能性在 20^8 分之一；如果是两个位点交叉，则这种可能性在 20^{16} 分之一左右，这么小的概率可以认为是不可能发生的，一旦证明有两个表位相同就支持为是同一蛋白。

在本发明的方法中，由于已将 F1 抗原切割，使线性表位分属，在至少两个各包含至少一个不同完整线性表位的切割片段分别对所述 F1 抗体阳性样品进行免疫分析时，F1 抗体阳性样品与两个以上的切割片段均具有反应性，与 F1 抗体阳性样品与一个以下切割片段具有反应性相比，或与 F1 抗体阳性样品仅与完整 F1 具有反应性相比，F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位交叉反应可能性小（F1 抗体阳性样品若为假阳性，则与两个以上 F1 抗原线性表位均有交叉反应可能性小）。如果 F1 抗体阳性样品与两个以上的切割片段具有反应性，基本上则可排除位点交叉，应该是针对 F1 全分子的反应。如果 F1 抗体阳性样品仅与一个切割片段具有反应性，或与所有切割片段均不具有反应性，则说明 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原之间的反应很有可能是由于位点交叉造成的。

可以理解，本发明的分析 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位反应性的方法同样也适用于其他蛋白与该蛋白抗体阳性样品之间的反应特征分析。据此，本发明还提供了一种分析蛋白 A 抗体阳性样品与蛋白 A 线性表位反应性的方法，该方法包括步骤：

①将蛋白 A 切割成两个以上切割片段，且使其中至少两个片段各包含至少一个完整的线性表位优选为独特的线性表位；（所述的蛋白 A 应包含至少两个线性表位）

②以至少两个各包含至少一个完整线性表位的切割片段分别对所述蛋白 A 抗体阳性样品进行免疫印迹分析。

如果蛋白 A 抗体阳性样品与两个以上的切割片段具有反应性，则基本可排除线性表位的交叉反应。如果蛋白 A 抗体阳性样品仅与一个切割片段具有反应性，或与所有切割片段均不具有反应性，则说明蛋白 A 抗体阳性样品与蛋白 A 之间的反应有可能是由于位点交叉造成的。

在本发明的一具体实施方案中，本发明应用所述的分析 F1 抗体阳性样品与 F1 抗原线性表位反应性的方法对自然人群血清 F1 抗体阳性现象进行

了分析（请参见实施例 4，该实施例也是证实对 F1 进行切割的真正应用意义所在）。其中，将所切割得到的三个切割片段分别与被检血清进行免疫印迹分析。如果至少两个各带有至少一个完整线性表位的有免疫反应性的切割片段都显色，则位点交叉的可能性很小；如果只有一个片段显色，则很有可能是由于位点交叉而引起的反应。该实验结果显示，自然人群 F1 抗体阳性血清与其中两个切割片段（大小分别是 7.3 kD、4.7 kD）具有反应性，最小片段（3.6 kD）没有反应性，说明该血清至少与 F1 分子上两个位点反应，基本可排除位点交叉造成的假阳性反应的可能性。此外，该结果与 EV 免疫兔血清与 F1 切割片段的免疫印迹结果一致，也与预测中结果一致。

在本发明的一具体实施方案中，是使用化学试剂羟胺对 F1 抗原进行切割。发明人在实际研究中发现，切割产物在有切割剂羟胺存在的情况下，是无免疫反应性的（将有羟胺存在下的切割产物与 EV 免疫兔血清进行免疫印迹分析，均无反应性），因此，根据本发明的具体实施方案，本发明的方法中，还包括去除切割剂以使切割产物复性的步骤。发明人经过大量反复试验摸索，建立了去除羟胺的方法，该方法主要是利用冷冻干燥技术，成功地去除了切割产物中的羟胺，具体地说，所述方法包括步骤：

将经羟胺作用后的切割产物溶液加入 10~20 倍体积的双蒸水，冷冻干燥；然后向其中加入与原切割产物 $2/3 \sim 3/2$ 体积优选等体积的双蒸水溶解，并用 HCl 调其 pH 值至 6.5~7.5 之间。

根据本发明的更具体的实施方案，本发明中的去除切割剂以使切割产物复性的操作可以按照以下步骤进行：

①将经羟胺作用后的切割产物分装；分装的目的是为了便于冻干；

②向各管中各加入 10~20 倍体积的双蒸水，轻轻混匀；发明人在研究中发现，该步骤中稀释用双蒸水的量较为关键，将直接影响冻干时将羟胺彻底去除的效果；本发明中优选加入双蒸水使其中羟胺浓度稀释为 1%~2% (v/v)；

③将上述各管放入 $-60 \sim -80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，冷冻使样品凝固（通常的冷冻时间可为10min~2h），以便于后续冷冻干燥；

④冷冻凝固后的样品迅速转入冷冻干燥机，冷冻干燥，优选的冷冻干燥条件为： -50°C 以下冷井温度，冷冻干燥时间可根据样品量多少而不同，本发明中优选要求真空度达 $\leq 0.1\text{mbar}$ ，更优选 $\leq 0.07\text{mbar}$ 即可；

⑤取出冷冻干燥后的各管，向其中加入与原切割产物等体积的双蒸水，然后各缓慢加入浓HCl，使其pH值至6.5~7.5之间。

本发明通过上述方法，成功地去除了羟胺并使切割产物复性(即具有免疫反应性)，其验证是通过免疫印迹实验证实（参见实施例4）。

本发明的去除羟胺并使切割产物复性这一关键技术的建立，使本发明的分析F1抗体阳性样品与F1抗原反应类型的方法的实际应用成为可能。

根据本发明的具体实施方案，本发明在将F1抗原切割后，还包括将所述切割片段进行分离的步骤，以利后续各片段分别与F1抗体阳性样品进行免疫分析实验。

所述的将切割片段进行分离的方法可以采用柱层析、电泳等方法，通常的柱层析需要较大的样品量，且相差1~3KD的小分子分离难度很大，本发明综合分析，优选采用电泳的方法。

在本发明的一优选具体实施方案中，是采用Tricine-SDS-PAGE进行小分子电泳，将三个切割片段分离，该方法是一种高分辨率的小分子电泳。具体操作可以按照现有技术的记载进行，例如可参照曹佐武在“有效分离1kD小肽的Tricine-SDS-PAGE方法”（《中国生物工程杂志》2004年1月24卷1期）中的记载进行操作。根据本发明的优选实施方案，本发明还特别设计了电泳中所用到的胶液以及电极缓冲液配方。所述胶分为分离胶、间隔胶及浓缩胶，其高度分别是 $7\pm 0.5\text{cm}$ 、 $2\pm 0.5\text{cm}$ 、 $1\pm 0.5\text{cm}$ ；电泳条件是50~70V 1~2h，80~100V 4~6h；上样量优选为 $2\mu\text{l}$ 左右。样品中高的离子强度，小体积的上样量保证电泳分辨率。本发明中，成功地将所述F1的三个

切割片段进行了分离（参见实施例 4），为鉴定切割效果以及将各切割片段分别与 F1 抗体阳性样品进行免疫分析研究提供保证。

综上所述，本发明通过提供一种切割 F1 抗原的方法，将 F1 抗原成功切割，使线性表位分属。本发明还提供了一种去除切割剂的方法，即通过冷冻干燥的方法将羟胺挥发去除；经蛋白复性处理后，本发明成功获得有免疫反应性的 F1 切割片段。本发明还通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳的方法，成功将 F1 三个切割片段分离，为鉴定切割效果及后续的免疫印迹分析提供了保证。本发明方法的建立，使分析 F1 抗体阳性血清中抗体与 F1 位点反应性有了新的手段，并成功给出了自然人群中 F1 抗体阳性是针对真正鼠疫 F1 抗原反应的实验支持，对鼠疫防治工作的策略制定具有重要意义。

附图说明

图 1 为自然人群 F1 抗体阳性人血清与 F1 抗原的免疫印迹分析结果(图片来源：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 鼠疫室)。其中，泳道 1：分子量标准；泳道 2：鼠疫病人血清；泳道 3：鼠疫免疫兔血清；泳道 4：自然人群 F1 抗体阳性血清(浙江)；泳道 5：F1 抗体阴性人血清。

图 2 为羟胺切割 F1 分子产物电泳图。其中，泳道 a：超低分子量蛋白（肽）标准；泳道 b：完整 F1 分子；泳道 c：25%羟胺切割所得 F1 分子片段。

图 3 为经不同 pH 值条件下复性后的 F1 切割片段与 EV 免疫血清的免疫印迹图。其中，泳道 a：完整 F1 分子；泳道 b：未复性的 F1 切割片段；泳道 c：F1 切割片段在 pH6.5 下复性；泳道 d：F1 切割片段在 pH7.0 下复性；泳道 e：F1 切割片段在 pH7.5 下复性；泳道 f：超低分子量标准。

图 4 为羟胺切割 F1 分子并经复性后产物的电泳图。其中，泳道 a：超低分子量蛋白（肽）标准；泳道 b：完整 F1 分子；泳道 c：25%羟胺切割并经复性所得 F1 分子片段。

图 5 为 F1 切割片段与自然人群 F1 抗体阳性人血清的免疫印迹图。其中，泳道 a：F1 切割片段与自然人群 F1 抗体阳性人血清反应；泳道 b：超低分子量标准。

具体实施方式

为了更清楚地理解本发明，现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件，例如参见 Sambrook 等人的《分子克隆实验指南》（第三版）（Cold Spring Harbor Lab(CSHL) Press, 2001）中所述的条件，或按照制造商所建议的条件。

实施例 1、F1 抗原的切割

本实施例中，主要是采用羟胺（Hydroxylamine）作为切割剂对 F1 抗原进行切割，使其线性表位分属于不同的切割片段。

一、实验材料：

1. F1 抗原：购自青海省疾病预防控制中心地方病预防控制所，天然 F1 抗原；
2. 羟胺：Fluka 试剂，~50% in H₂O, (RT)；
3. 1.5M Tris-Cl (pH9.0)：称取 Tris 9.06 克，加双蒸水 48.5ml，加 37%浓 HCl 约 1.5ml，调 pH 值至 9.0。

二、实验方法：

1. 称取 1mg F1 抗原，以 50 μ l 1.5M Tris-Cl (pH9.0)溶解；
2. 向上述含有 F1 抗原的溶液中加入 50 μ l 50%羟胺，用吸头轻轻混匀，注意不要产生气泡；
3. 将上述混匀液转入金属浴，45℃ 24h；
4. 取出后置于 4℃冰箱待用。
5. 将上述所得到的切割产物取 2 μ l 进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析，

电泳条件：60V 1h，80V 4h。

三、实验结果

结果请参见图 2 所示，F1 抗原在未切割之前是一条约 15.5KD 的条带（泳道 b），切割之后出现 5 条带（泳道 c），通过分子量比对（泳道 a：超低分子量蛋白（肽）标准），自上而下分别是 12.0kd、10.9kd、7.3 kD、4.7 kD、3.6 kD。而根据在线预测，所得到的 3 个理论片段与后三个片段分子量完全吻合，而前两个片段分别是只发生一处切割的片段，这说明本实验 F1 分子以羟胺切割是成功的。

实施例 2、F1 抗原切割产物的复性

本实施例主要是去除实施例 1 所得切割产物中的化学切割剂羟胺，并对切割产物进行复性。主要操作如下：

一、试剂及仪器

1. 浓 HCl：有效含量 36%~38%，北京化工厂；
2. F1 切割产物：实施例 1 中得到的产物；
3. 仪器：冷冻干燥机(Christ)；超低温冰箱(-80℃)；

二、实验方法

1. 将 F1 切割产物按 10 μ l /管，分装；
2. 向各管中分别加入 100 μ l 双蒸水，轻轻混匀；
3. 将各分装管置入-80℃冰箱中，冷冻 2h 左右；
4. 迅速转入冷冻干燥机(预制冷 20min)，冻干，冷井温度在-50℃以下，至真空度达 ≤ 0.07 mbar，冻干时间 4h 左右；
5. 取出后，向其中加入 10 μ l 双蒸水，然后每管缓慢加入 37%浓 HCl(0.6 μ l 左右)，使其 pH 值至 6.5~7.5 之间。

三、实验结果

通过实施例 4 验证 F1 切割片段复性效果。其中，将经复性的三个片段

与 EV 免疫兔血清进行免疫印迹试验, 结果 EV 免疫兔血清与其中两个切割片段 (大小分别是 7.3 kD、4.7 kD) 具有反应性, 最小片段没有反应性。说明采用上述方法可使切割片段成功复性。图 3 为该实验过程中 F1 切割片段与 EV 免疫血清的免疫印迹图, 其中, 泳道 a: 完整 F1 分子; 泳道 b 未复性的 F1 切割片段; 泳道 f: 超低分子量标准, 泳道 c、d、e 分别显示的是, 复性过程中, 冻干后, 用双蒸水溶解, 且用浓 HCl 分别调 pH 值的梯度 (6.5、7.0、7.5), 从显色可以看出, pH 从 6.5 到 7.5 都是合适的。

实施例 3、电泳分离 F1 抗原切割片段

本实施例采用 Tricine-SDS-PAGE 进行小分子电泳, 胶分为分离胶、间隔胶及浓缩胶, 分别是 7cm、2cm、1cm, 电泳条件是 60V 1h, 80V 4h, 样品中高的离子强度, 以及 2 μ l 左右的上样量保证电泳分辨率。

一、设备及试剂

1. 设备: 电泳仪 (amersham pharmacia biotech, Hoefer miniVE), 图像扫描仪 (amersham pharmacia biotech, ImageScanner), 脱色摇床。

2. 电泳缓冲液:

负极缓冲液: Tricine(Solarbio): 17.92 g

Tris: 12.114 g

SDS: 1 g

H₂O 定容至 1000 ml

正极缓冲液: Tris: 24.228 g

浓 HCl: 1.5 ml

H₂O 定容至 1000 ml

3. 交联度分别为 3%和 6%的浓度为 49.5%(0.495T)胶液的配制:

	丙烯酰胺 (Biomol 50073)	甲叉聚丙烯酰胺 (Fluka 66670)	d ₂ H ₂ O
0.495T 3%C 胶	24g	0.75g	定容至 50ml
0.495T 6%C 胶	23.25g	1.5g	定容至 50ml

4. 电泳胶的配制:

	分离胶(5ml)	间隔胶(5ml)	浓缩胶(5ml)
H ₂ O	1.2ml	2.2ml	4.0ml
0.495T 3%C 胶	—	1.0ml	0.5ml
0.495T 6%C 胶	1.5ml	—	—
Tris-Cl 缓冲液	1.7ml (1.5M pH8.8)	1.7ml(1.5M pH8.8)	1.5ml(1M pH6.8)
甘油	0.5ml	—	—
SDS(10%)	50μl	50μl	50μl
AP(过硫酸胺, SIGMA)	50μl	50μl	50μl
TEMED	2.5μl	2.5μl	5μl

5. 其它: 考马斯亮兰(R250)染液, 脱色液, SDS(10%), 1.5M pH8.8 Tris-Cl 缓冲液, 1M pH6.8 Tris-Cl 缓冲液, 均按 Sambrook 等人的《分子克隆实验指南》(第三版)(Cold Spring Harbor Lab(CSHL) Press, 2001)中所述相关方法进行配制; 4×上样缓冲液(鼎国生物)。

二、实验方法

1. 制胶: 按电泳胶的配方, 依次配制分离胶、间隔胶及浓缩胶, 其高度分别大致是 7cm、2cm、1cm;

2. 制样: 取实施例 2 中复性好的切割产物样品 6μl, 加入 4×上样缓冲液 2μl, 用吸头轻轻混匀, 100℃沸水中煮沸 5min;

3. 上样: 取处理好的样品 2μl, 缓慢加入上样孔;

4. 电泳: 加好电极缓冲液, 装好电泳仪后打开电源, 先行 60V 1h, 待样品进入分离胶后, 行 80V, 约 4 h 后, 在溴酚蓝移至离下界面约 1cm 处结束电泳;

5. 染色: 先将染色液用水浴加热至 60℃左右, 将胶块切去浓缩胶与间隔胶部分放入染色液, 摇床 30min;

6. 脱色: 将染好的胶块置入脱色液中, 摇床约 2 h, 至电泳条带清晰;

7. 图像扫描: 将胶块置入扫描仪, 去除气泡, 使用 MagicScan 进行扫描保存图形。

三、实验结果

结果请参见图 4 所示,可以看出,采用本发明的电泳方法,能将三个切割片段有效分离,以利后续免疫印迹分析。

实施例 4、对鼠疫免疫兔血清(自然人群 F1 抗体阳性人血清)的免疫分析

本实施例是证实对 F1 进行切割的真正应用意义的实验部分。具体步骤为:将复性后的 F1 切割片段进行 Tricine-甘油-SDS-PAGE 电泳,然后将电泳后的胶转移至 PVDF 膜上,然后与被检血清进行免疫印迹分析。具体如下:

一、试剂

- 1、Tricine-SDS-PAGE 电泳试剂:见实施例 3 电泳实验;
- 2、转膜缓冲液:甘氨酸 2.9g; Tris 5.8g; SDS 0.37g; 甲醇 200ml; 加 ddH₂O 定容至 1000ml;
- 3、0.01M PBS(pH7.4): NaCl 8.0g; KCl 0.2g; Na₂HPO₄ 1.44g; KH₂PO₄ 0.24g; 加 ddH₂O 至 1000ml;
- 4、稀释缓冲液:含 0.05%吐温 20 的 0.01M PBST; 洗涤缓冲液:含 0.1%吐温 20 的 0.01M PBST;
- 5、膜封闭液(5%脱脂奶粉,现配):脱脂奶粉 1.0g 溶于 20ml 的 0.01M PBS 中;
- 6、SPA-HRP:辣根过氧化物酶标记的 SPA,工作浓度 1:2000,中彬试剂;
- 7、显色液(辣根过氧化物酶):DAB 6.0mg, 0.01M PBS 10.0ml, H₂O₂ 10 μ l, 注意现用现配;
- 8、其它用于免疫印迹的试剂:用于半干式转膜的滤纸板,预染分子量 Marker, PVDF 膜;

9、F1 抗原切割片段：10mg/ml，实施例 2 中制备得到；鼠疫免疫兔血清：按照常规方法自制，主要是用 EV 全菌免疫新西兰兔三次制得，F1 抗体效价 1：1000；自然人群 F1 抗体阳性人血清：1 份，2003 年采自浙江省，F1 抗体效价 1：1280。

二、操作步骤

（一）电泳：每孔加样 F1 切割片段 2 μ l，电泳条件为 60V 1h，80V 4h；
（参见实施例 3）

（二）转膜：（半干式转移）

1、膜处理：预先裁好与胶块同样大小的 PVDF 膜，浸入甲醇中 40s 进行活化；取出后转入转膜液中；

2、电泳结束后将胶条割至合适大小，放入转膜液中，同时将裁好的滤纸板也放入转膜液中；

3、将上述浸有 PVDF 膜、电泳胶及滤纸板的转膜液置于摇床上，缓慢摇动 20min；

4、转膜：按从下至上依次为滤纸板、PVDF 膜、凝胶、滤纸板的顺序置于转膜仪中，滤纸板、凝胶、PVDF 膜精确对齐(或自下而上逐渐减小)，每一步用玻璃棒去除气泡，将多余的液体吸干，安装好转膜仪，接通电源，恒压 20~25V，转移 1.5~3h；

5、封闭：将 PVDF 膜自转膜仪中取出，置于膜封闭液中，室温下摇床封闭过夜。

（三）免疫反应：

1、用洗涤缓冲液洗膜，5min $\times$ 3 次；

2、以稀释缓冲液按 1：100 分别稀释血清(免疫兔血清和自然人群 F1 抗体阳性人血清)，将洗好的膜放入稀释液中，液体必须覆盖膜的全部，37 $^{\circ}$ C 摇床摇动 1h；

3、弃血清稀释液，以洗涤缓冲液分别洗膜，5min $\times$ 3 次；

- 4、将 SPA-HRP 以稀释液稀释至工作浓度，将上述洗好的膜转入，平稳摇动，37℃摇床摇动 1h；
- 5、弃 SPA-HRP 稀释液，以洗涤缓冲液分别洗膜，5min×3 次；
- 6、将上述洗好的膜置入显色液，避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

三、实验结果

实验结果请详见图 3、图 5。其中，图 3 为该实验过程中 F1 切割片段（pH6.5、7.0、7.5 复性）与 EV 免疫血清的免疫印迹图，图 5 为该实验过程中 F1 切割片段（pH7.0 复性）与自然人群 F1 抗体阳性人血清的免疫印迹图。鼠疫免疫兔血清及自然人群 F1 抗体阳性人血清的免疫印迹图显示，在分子量 7.3kD 与 4.7kD 处，都有显色，且两条带显色深浅相近。

四、结论

自然人群 F1 抗体阳性人血清与 F1 分子切割形成的两个较大片段都有反应，说明该血清中的抗体很可能是真正针对鼠疫 F1 抗原的抗体，这一结论说明自然人群 F1 抗体阳性人血清的形成与鼠疫相关免疫有关。

序列表

<110> 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

<120> 切割耶尔森氏鼠疫杆菌 F1 抗原的方法及相关应用

<130> GAI09CN0366C

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 149

<212> PRT

<213> 耶尔森氏鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*)

<400> 1

Ala Asp Leu Thr	Ala Ser Thr Thr	Ala Thr Ala Thr	Leu Val Glu Pro
1	5	10	15

Ala Arg Ile Thr	Leu Thr Tyr Lys	Glu Gly Ser Pro	Ile Thr Ile Met
20	25	30	

Asp Asn Gly Asn	Ile Asp Thr Glu	Leu Leu Val Gly	Thr Leu Thr Leu
35	40	45	

Gly Gly Tyr Lys	Thr Gly Thr Thr	Ser Thr Ser Val	Asn Phe Thr Asp
50	55	60	

Ala Ala Gly Asp	Pro Met Tyr Leu	Thr Phe Thr Ser	Gln Asp Gly Asn
65	70	75	80

Asn His Gln Phe	Thr Thr Lys Val	Ile Gly Lys Asp	Ser Arg Asp Phe
85	90	95	

Asp Ile Ser Pro	Lys Val Asn Gly	Glu Asn Leu Val	Gly Asp Asp Val
100	105	110	

Val Leu Ala Thr Gly Ser Gln Asp Phe Phe Val Arg Ser Ile Gly Ser
115 120 125

Lys Gly Gly Lys Leu Ala Ala Gly Lys Tyr Thr Asp Ala Val Thr Val
130 135 140

Thr Val Ser Asn Gln
145

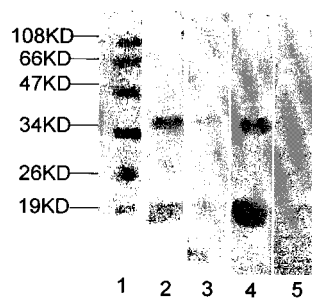


图 1

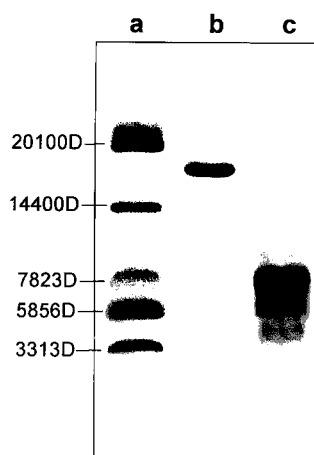


图 2

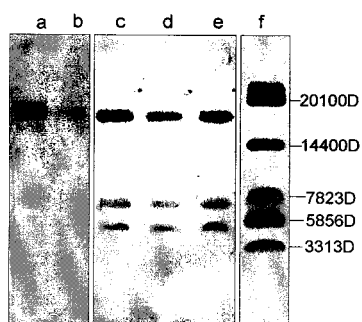


图 3

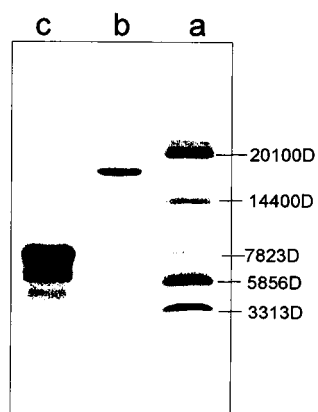


图 4

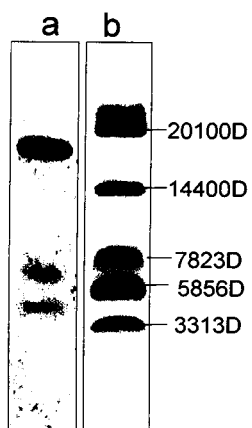


图 5

专利名称(译)	切割耶尔森氏鼠疫杆菌F1抗原的方法及相关应用		
公开(公告)号	CN101531709A	公开(公告)日	2009-09-16
申请号	CN200910083026.6	申请日	2009-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心传染病预防控制所		
[标]发明人	张建中 王鹏 闫笑梅 赵飞 肖迪		
发明人	张建中 王鹏 闫笑梅 赵飞 肖迪		
IPC分类号	C07K14/24 C07K11/12 C07K11/26 G01N33/53		
代理人(译)	黄健		
其他公开文献	CN101531709B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种切割耶尔森氏鼠疫杆菌F1抗原的方法及相关应用。所述的切割鼠疫耶尔森氏杆菌F1抗原的方法包括：对F1抗原进行切割，得到两个以上切割片段，且使其中至少两个片段各包含至少一个完整线性表位。该方法可以进一步用于分析鼠疫F1抗体阳性样品与F1抗原线性表位反应情况，即，本发明还提供了一种分析F1抗体阳性样品与F1抗原线性表位反应性的方法，该方法包括步骤：按照所述的切割耶尔森氏鼠疫杆菌F1抗原的方法将F1抗原切割成两个以上切割片段，并以至少两个有免疫反应性的切割片段分别对所述对F1抗体阳性样品进行免疫分析，如果F1抗体阳性样品与两个以上的切割片段具有反应性，可用于排除位点交叉反应。

	丙烯酰胺(Biomol 50073)	甲叉聚丙烯酰胺(Fluka 66670)	d ₂ H ₂ O
0.495T 3% C 胶	24g	0.75g	定容至 50ml
0.495T 6% C 胶	23.25g	1.5g	定容至 50ml