



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107056912 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201611145747.1

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.12.13

(71)申请人 崔玉宝

地址 224006 江苏省盐城市盐都区盐城路1号

(72)发明人 崔玉宝 王万相 周鹰 滕飞翔
俞黎黎

(74)专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237
代理人 刘辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/866(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

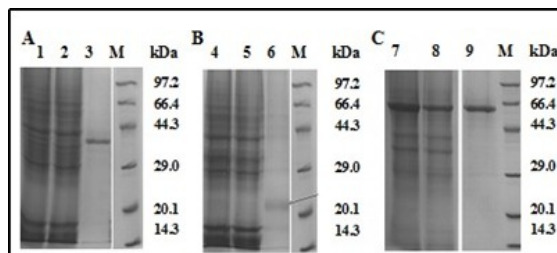
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法,包括以下步骤:质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4载体构建及鉴定;重组杆状病毒质粒转座及重组Bacmid鉴定;13)重组Bacmid转染及重组病毒扩增;重组蛋白纯化;重组蛋白复性;重组蛋白的免疫反应性。本发明的一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法,通过实现尘螨过敏原Der f 1、Der f 2和Der f 4在昆虫细胞中表达与纯化,通过ELISA验证重组蛋白的免疫反应性,该方法获得的重组蛋白纯度高,复性好,能够更精确地实现对环境中的尘螨过敏原的检测,医疗和实用价值很高,为定量监测环境中尘螨过敏原含量提供了重要的方法途径。



1. 一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法,其特征在于,包括以下步骤:

11) 质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4载体构建及鉴定:

分别以质粒pET28a(+)-Der f 1、pET28a(+)-Der f 2、pET28b(+)-Der f 4为模板,扩增目的基因Der f 1、Der f 2和Der f 4,PCR反应体系为:5 μ L 10 $\times$ LA PCR Buffer、0.5 μ L TaKaRa Pyrobest[®] DNA Polymerase、8 μ L dNTP、1 μ L上游引物F、1 μ L下游引物R、0.5 μ L质粒pET28a(+)-Der f 1或pET28a(+)-Der f 2或pET28a(+)-Der f 4、34 μ L ddH₂O,总反应体积为50 μ L;

反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性 2 min 后进入循环,循环参数为 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 2 min,循环数为 30;循环后 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min,电泳鉴定扩增产物的大小;琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段Der f 1或Der f 2或Der f 4;取pFastBacHT A质粒()进行双酶切,电泳胶回收后,分别与Der f 1或Der f 2或Der f 4连接得重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4,将此质粒转化感受态细胞Top 10,涂LB平板,次日用蓝白斑筛选法挑选发生重组的白色克隆,PCR验证;

12) 重组杆状病毒质粒转座及重组Bacmid鉴定:

将重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4分别转化大肠杆菌DH10Bac,涂LB平板(K⁺,tet⁺, gen⁺, X-gal, IPTG),37 $^{\circ}$ C培养;48h后,挑白色单克隆再转涂另一平板(K⁺,Tet⁺,Gen⁺,X-gal,IPTG),37 $^{\circ}$ C培养;48h后挑白色单克隆2个,摇菌,并抽提Bacmid,用PCR验证,上游引物为Der f 1“CTGGGGTGATAGCGGATAC”、Der f 2“GGTGTGTTTGGCTTGCGC”、Der f 4“CTGTCTGACATCTACGTTGG”,下游引物为M13R;

13) 重组Bacmid转染及重组病毒扩增:

取抽提的Bacmid DNA转染昆虫细胞Sf9,约4~6后收病毒,离心弃细胞碎片,取上清加至2% FBS,避光保存,此命名为P1 viral stock;以P1 virus stock在10 cm dish中感染Sf9细胞,约4~6天收病毒,命名为P2 viral stock;以P2 viral stock感染摇瓶中悬浮培养的Sf9细胞,4天后收病毒;

14) 重组蛋白纯化:

上述转染后第3代细胞培养物,置室温经4000g、10min离心收集昆虫细胞,加入1.5ml平衡buffer重悬,置冰上,使用超声波破碎仪破碎(超3 second停3second,200W,5个循环);然后置4 $^{\circ}$ C 13000 rpm离心30 min,取上清和破碎后的沉淀,分别用50 μ L的镍柱进行纯化,过程包括平衡、上样、洗杂、洗脱,(1)平衡,即用1ml的平衡 buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、10mM咪唑 5%甘油,pH8.0)平衡50 μ L的镍柱,离心弃去上清;(2)上样:上清样品加入到50 μ L的镍柱,4 $^{\circ}$ C混匀孵育2h,离心收集流穿;(3)洗杂:加入500 μ L洗杂buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、20mM咪唑、5%甘油,pH8.0)洗杂,重复洗3次;(4)洗脱:加入100 μ L洗脱buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、250 mM咪唑、5%甘油,pH8.0)洗脱,混匀孵育10min,离心收集洗脱产物;结束后,取破碎沉淀、破碎上清、流穿、洗脱进行SDS-PAGE电泳检测。

2. 根据权利要求1所述的利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法,其特征在于,在所述步骤11)之前还需设计引物:根据已公布的核酸序列分别设计Der f 1 (GenBank Accession No. EU095368)、Der f 2 (GenBank Accession No. FJ436110)、Der f 4 (GenBank Accession No. KJ400030)引物,其长度分别为963bp、441bp、1578bp;

一种权利要求1或2 所述的重组蛋白的方法获得的重组蛋白复性的方法,其特征在于,包括以下步骤:

收集洗脱获得的目的蛋白,使用0.22 μm 的膜过滤后,用截流量为10 KD的millipor超滤管进行浓缩;然后用50mM PBS、0.3M NaCl、10 mM咪唑5%甘油,pH 8.0的Buffer稀释4倍,然后置4℃混匀4h,然后对PBS 5%甘油pH 7.4的buffer彻底透析;复性好的目的蛋白使用0.22 μm 的膜过滤后,使用截流量为10KD的millipore 超滤管进行浓缩,浓缩后分装保存。

3. 一种验证权利要求1或2 所述的重组蛋白的方法获得的重组蛋白的免疫反应性的方法,其特征在于,包括以下步骤:

收集纯化获得的产物,复性后,以此重组蛋白为包被抗原,建立ELISA方法检测其与哮喘患儿血清的阳性结合率;ELISA检测操作流程为:①配制抗原包被液:吸取重组蛋白溶解在0.1M PBS缓冲液中,终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,制成包被溶液;②抗原包被:每孔包被100 μl ,包被温度:2-8℃过夜,包被时间:不少于15小时;③配制PBST洗液后洗板,每孔液量300 μl ,洗2次,拍干;④配制封闭液后进行封闭,每孔加封闭液300 μl ,封闭温度为37℃,封闭时间2小时;洗板5次,拍干;⑤血清按照1:4的比例稀释(样本稀释液稀释),加入100 μl /孔,4℃过夜;⑥PBST洗涤5次,拍干;⑦鼠抗人IgE-HRP(二抗):1:5000倍稀释,每孔100 μl ,37℃温育1h;⑧用PBST洗涤5次,拍干;⑨加入底物显色溶液,每孔100 μl ,避光显色15min;⑩加入终止液,50 μl /孔,酶标仪测定OD405值;同一份血清与同一重组过敏原测定三次,计算(平均值 $\pm$ SD);以此ELISA方法检测阴性血清的OD值,以其(平均值 $\pm$ 3SD)为阈值,高于此值者即为阳性。

一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及过尘螨过敏原检测技术领域,具体是一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白及验证方法。

背景技术

[0003] 尘螨是全球室内变应原最重要的来源之一,被证实是哮喘、过敏性鼻炎主要致敏原。对尘螨粗提浸混合物的分析表明约有30余种的可能引起机体产生IgE抗体的蛋白质。研究表明,第1组份和第2组份是尘螨提取液的主要致敏物质,85%以上的尘螨过敏性疾病患者对第1、2组分变应原皮肤试验阳性或IgE抗体检测呈阳性,此类患者体内尘螨特异性IgE绝大部分是因为这两组变应原引起,这两组变应原特异性IgE是机体总IgE的主要组成部分(Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. Int Arch Allergy Immunol 2002; 129(1): 1-18.[2] Thomas WR, Heinrich TK, Smith WA, Hales BJ. Pyroglyphid house dust mite allergens. Protein Pept Lett 2007; 14(10): 943-53.)。把尘螨粗提浸液中的第1、2组分清除后,剩余部分仍然具有致敏性(van der Zee et al.1988),其中第4组分非常重要,与血清特异性IgE 结合率均达到10%以上,被认为是中等效价变应原组分(mid-potency specificities)(Batard T, Hrabina A, Bi XZ, Chabre H, Lemoine P, Couret MN, et al. Production and proteomic characterization of pharmaceutical-grade Dermatophagoides pteronyssinus and Dermatophagoides farinae extracts for allergy vaccines. Int Arch Allergy Immunol 2006; 140(4): 295-305.)。为获得尘螨过敏性疾病患者最灵敏的检测指标,学术界认为应选用最具代表性的螨变应原分子进行检测,而不是用螨粗提浸液混合物。

[0004] 研究表明,重组变应原用于免疫诊断是有效的。采用21种不同的重组变应原诊断1600例患者,证实重组变应原并没有增加免疫诊断副反应(Schmid-Grendelmeier P, Cramer R. Recombinant allergens for skin testing. Int Arch Allergy Immunol 2001; 125:96-111)。以120例对屋尘螨粗提浸液皮试阳性的哮喘和/或鼻炎患者为研究对象,以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、毕氏酵母(*Pichia pastoris*)为工程菌生产的rDer p 1、rDer f 1、rDer p 2、rDer p 5、rBlo t 5及其含有第1、2组份的组合物DM1、DM2进行皮肤试验,并用ELISA方法对患者Der p 1、Der p 2特异性IgE进行定量检测,重组变应原的浓度为5mg/mL和50mg/mL;皮肤试验结果表明患者对第1组分、Der p 2和第5组份阳性率为78%、85%和48-55%,对DM1、DM2阳性率依次为95%、98%,DM1、DM2、屋尘螨粗提浸液皮肤反应的风团大小具有显著相关性;皮肤试验阳性反应强度与血清Der p 1、Der p 2特异性IgE抗体含量具有较强的相关性。分别采用nDer p 1和rDer p 1进行皮肤试验,二者风团大小显著相关($r=0.73, p<0.0001$),同理nDer f 1和rDer f 1皮肤试验风团大小正相关($r=0.87, p<$

0.0001);此项研究也表明机体对重组变应原具有较好的耐受性,并未发生副反应,用于诊断哮喘和/或鼻炎安全、有效(Kronqvist M, Johansson E, Whitley P, Olsson S, Gafvelin G, Scheynius A, van Hage-Hamsten M. A hypoallergenic derivative of the major allergen of the dust mite *Lepidoglyphus destructor*, Lep d 2.6Cys, induces less IgE reactivity and cellular response in the skin than recombinant Lep d 2. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001; 126:41-49.)。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法,该方法通过实现尘螨过敏原Der f 1、Der f 2和Der f 4在昆虫细胞中表达与纯化,通过ELISA验证重组蛋白的免疫反应性,为制备尘螨重组变应原提供了一种新方法。

[0006] 为实现上述发明目的。本发明的技术方案如下:

一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法,包括以下步骤:

11) 质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4载体构建及鉴定:

分别以质粒pET28a(+)-Der f 1、pET28a(+)-Der f 2、pET28b(+)-Der f 4为模板,扩增目的基因Der f 1、Der f 2和Der f 4,PCR反应体系为:5 μ L 10 $\times$ LA PCR Buffer、0.5 μ L TaKaRa Pyrobest[®] DNA Polymerase、8 μ L dNTP、1 μ L上游引物F、1 μ L下游引物R、0.5 μ L质粒pET28a(+)-Der f 1或pET28a(+)-Der f 2或pET28a(+)-Der f 4、34 μ L ddH₂O,总反应体积为50 μ L;

反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性2 min 后进入循环,循环参数为 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 2 min,循环数为 30;循环后 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min,电泳鉴定扩增产物的大小;琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段Der f 1或Der f 2或Der f 4;取pFastBacHT A质粒()进行双酶切,电泳胶回收后,分别与Der f 1或Der f 2或Der f 4连接得重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4,将此质粒转化感受态细胞Top 10,涂LB平板,次日用蓝白斑筛选法挑选发生重组的白色克隆,PCR验证。

[0007] 12) 重组杆状病毒质粒转座及重组Bacmid鉴定:

将重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4分别转化大肠杆菌DH10Bac,涂LB平板(K⁺, tet⁺, gen⁺, X-gal, IPTG),37 $^{\circ}$ C培养。48h后,挑白色单克隆再转涂另一平板(K⁺, Tet⁺, Gen⁺, X-gal, IPTG),37 $^{\circ}$ C培养;48h后挑白色单克隆2个,摇菌,并抽提Bacmid,用PCR验证,上游引物为Der f 1“CTGGGGTGATAGCGGATAC”、Der f 2“GGTGTGTTGGCTTGCGC”、Der f 4“CTGTCTGACATCTACGTTGG”,下游引物为M13R。

[0008] 13) 重组Bacmid转染及重组病毒扩增:

取抽提的Bacmid DNA转染昆虫细胞Sf9,约4~6后收病毒,离心弃细胞碎片,取上清加至2% FBS,避光保存,此命名为P1 viral stock;以P1 virus stock在10 cm dish中感染Sf9细胞,约4~6天收病毒,命名为P2 viral stock。以P2 viral stock感染摇瓶中悬浮培养的Sf9细胞,4天后收病毒。

[0009] 14) 重组蛋白纯化:

上述转染后第3代细胞培养物,置室温经4000g、10min离心收集昆虫细胞,加入1.5ml平

衡buffer重悬,置冰上,使用超声波破碎仪破碎(超3 second停3second,200W,5个循环);然后置4℃ 13000 rpm离心30 min,取上清和破碎后的沉淀,分别用50μL的镍柱进行纯化,过程包括平衡、上样、洗杂、洗脱,(1)平衡,即用1ml的平衡 buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、10mM咪唑 5%甘油,pH8.0)平衡50μl的镍柱,离心弃去上清;(2)上样:上清样品加入到50μl的镍柱,4℃混匀孵育2h,离心收集流穿;(3)洗杂:加入500μl洗杂buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、20mM咪唑、5%甘油,pH8.0)洗杂,重复洗3次;(4)洗脱:加入100μl洗脱buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、250 mM咪唑、5%甘油,pH8.0)洗脱,混匀孵育10min,离心收集洗脱产物。结束后,取破碎沉淀、破碎上清、流穿、洗脱进行SDS-PAGE电泳检测。

[0010] 进一步的,在所述步骤11)之前还需设计引物:根据已公布的核酸序列分别设计Der f 1 (GenBank Accession No. EU095368)、Der f 2 (GenBank Accession No. FJ436110)、Der f 4 (GenBank Accession No. KJ400030)引物,其长度分别为963bp、441bp、1578bp。

[0011] 一种上述重组蛋白复性的方法,包括以下步骤:

收集洗脱获得的目的蛋白,使用0.22 μm的膜过滤后,用截流量为10 KD的millipor超滤管进行浓缩;然后用50mM PBS、0.3M NaCl、10 mM咪唑5%甘油,pH 8.0的Buffer稀释4倍,然后置4℃混匀4h,然后对PBS 5%甘油pH 7.4的buffer彻底透析;复性好的目的蛋白使用0.22 μm的膜过滤后,使用截流量为10KD的millipore 超滤管进行浓缩,浓缩后分装保存。

[0012] 一种验证上述重组蛋白的免疫反应性的方法,包括以下步骤:

收集纯化获得的产物,复性后,以此重组蛋白为包被抗原,建立ELISA方法检测其与哮喘患儿血清的阳性结合率;ELISA检测操作流程为:①配制抗原包被液:吸取重组蛋白溶解在0.1M PBS缓冲液中,终浓度为1μg/ml,制成包被溶液;②抗原包被:每孔包被100μl,包被温度:2-8℃过夜,包被时间:不少于15小时;③配制PBST洗液后洗板,每孔液量300μl,洗2次,拍干;④配制封闭液后进行封闭,每孔加封闭液300μl,封闭温度为37℃,封闭时间2小时;洗板5次,拍干;⑤血清按照1:4的比例稀释(样本稀释液稀释),加入100μl/孔,4℃过夜;⑥PBST洗涤5次,拍干;⑦鼠抗人IgE-HRP(二抗):1:5000倍稀释,每孔100μl,37℃温育1h;⑧用PBST洗涤5次,拍干;⑨加入底物显色溶液,每孔100μl,避光显色15min;⑩加入终止液,50 μl/孔,酶标仪测定OD405值;同一份血清与同一重组过敏原测定三次,计算(平均值±SD);以此ELISA方法检测阴性血清的OD值,以其(平均值±3SD)为阈值,高于此值者即为阳性。

[0013] 本发明的一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白及验证方法,通过实现尘螨过敏原Der f 1、Der f 2和Der f 4在昆虫细胞中表达与纯化,通过ELISA验证重组蛋白的免疫反应性,该方法获得的重组蛋白纯度高,复性好,能够更精确地实现对环境中的尘螨过敏原的检测,医疗和实用价值很高,为定量监测环境中尘螨过敏原含量提供了重要的方法途径。

附图说明

[0014] 图1为重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4的PCR验证结果图;

图2为SDS-PAGE电泳检测Ni离子亲和层析纯化结果图;

图3为以rDer f 1为包被抗原用ELISA检测其IgE结合率结果图;

图4为以rDer f 2为包被抗原用ELISA检测其IgE结合率结果图；

图5为以rDer f 4为包被抗原用ELISA检测其IgE结合率结果图。

具体实施方式

[0015] 下面结合附图,对本发明提出的一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白及验证方法进行详细说明。

[0016] 在一个具体的实施例中,本发明的一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白及验证方法包括以下步骤:

1. 材料与方法

1.1 质粒、菌株、试剂

大肠杆菌DH10 Bac感受态细胞、pFastBacHT A质粒。

[0017] 质粒pET28a(+)-Der f 1、pET28a(+)-Der f 2、pET28b(+)-Der f 4为本室保存。

[0018] 血清:哮喘患儿血清样本由南京医科大学附属南京儿童医院提供。变应原特异性IgE检测采用德国MEDIWISS公司生产的敏筛(Allergy Screen)变应原检测系统,由德国MEDIWISS公司生产的Rapid Reader(Model: Read 100)专用阅读仪,配套汉化软件,孵育暗盒和固定频率的混匀仪组成,致敏原诊断试剂盒由德国MEDIWISS Analytic GmbH。以血清总IgE>200 IU/ml,粉尘螨特异性IgE阳性、浓度分级均大于2级为标准筛选得27份血清。阴性血清入选标准:患者既过敏史,体检正常,血清总IgE < 100 IU/ml,浓度分级均为0级,筛选获得5份阴性血清。

1.2 重组蛋白及验证的方法

1.2.1 引物设计

根据已公布的核酸序列分别设计Der f 1 (GenBank Accession No. EU095368)、Der f 2 (GenBank Accession No. FJ436110)、Der f 4 (GenBank Accession No. KJ400030)引物,其长度分别为963bp、441bp、1578bp。

[0020] 表1. PCR扩增时引物序列

目的基因	引物	引物序列	下划线为酶切位点
Der f1	上游	CGGGATCCACGTCACGCTTCAATCAAAAC	BamH I
	下游	GGGGTACCTCACATGATTACAACATATGG	Kpn I
Der f2	上游	GGGGATCCGATGATTTCAAAATCTTGTGCC	BamH I
	下游	CGGGTACCTTAATCACGGATTTTACCATG	Kpn I
Der f4	上游	CCTGCCATGGACTCTAAATTCTCTAACC	Nco I
	下游	CCAACTCGAGTTAAGATTCAACACGAGCACCG	Xba I

1.2.2 重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4载体构建及鉴定

分别以质粒pET28a(+)-Der f 1、pET28a(+)-Der f 2、pET28b(+)-Der f 4为模板,扩增目的基因Der f 1、Der f 2和Der f 4,PCR反应体系为:5μL 10×LA PCR Buffer、0.5μL TaKaRa Pyrobest® DNA Polymerase、8μL dNTP、1μL上游引物F、1μL下游引物R、0.5μL质粒pET28a(+)-Der f 1或pET28a(+)-Der f 2或pET28a(+)-Der f 4、34μL ddH₂O,总反应体积

为50 μ L。反应条件为:94℃变性 2 min 后进入循环,循环参数为 94 ℃ 30 s、55℃30 s、72 ℃ 2 min,循环数为 30。循环后 72 ℃延伸 10 min,电泳鉴定扩增产物的大小。琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段Der f 1或Der f 2或Der f 4。取pFastBacHT A质粒()进行双酶切,电泳回收后,分别与Der f 1或Der f 2或Der f 4连接得重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4,将此质粒转化感受态细胞Top 10,涂LB平板,次日用蓝白斑筛选法挑选发生重组的白色克隆,PCR验证。

[0021] 1.2.3 重组杆状病毒质粒转座及重组Bacmid鉴定

将重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4分别转化大学杆菌DH10Bac,涂LB平板(K^+ , tet^+ , gen^+ , X-gal, IPTG),37℃培养。48h后,挑白色单克隆再转涂另一平板(K^+ , Tet^+ , Gen^+ , X-gal, IPTG),37℃培养。48h后挑白色单克隆2个,摇菌,并抽提Bacmid,用PCR验证,上游引物为Der f 1“CTGGGGTGATAGCGGATAC”、Der f 2“GGTGT TTTGGCTTGCGC”、Der f 4“CTGTCTGACATCTACGTTGG”,下游引物为M13R。

[0022] 1.2.4 重组Bacmid转染及重组病毒扩增

取抽提的Bacmid DNA转染昆虫细胞Sf9,约4~6后收病毒,离心弃细胞碎片,取上清加至2% FBS,避光保存,此命名为P1 viral stock。以P1 virus stock在10 cm dish中感染Sf9细胞,约4~6天收病毒,命名为P2 viral stock。以P2 viral stock感染摇瓶中悬浮培养的Sf9细胞,4天后收病毒。

[0023] 1.2.5 重组蛋白纯化

取上述转染后第3代细胞培养物,置室温经4000g、10min离心收集昆虫细胞,加入1.5ml平衡buffer重悬,置冰上,使用超声波破碎仪破碎(超3 second停3second,200W,5个循环)。然后置4℃ 13000 rpm离心30 min,取上清和破碎后的沉淀,分别用50 μ L的镍柱进行纯化,过程包括平衡、上样、洗杂、洗脱,(1)平衡,即用1ml的平衡 buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、10mM咪唑 5%甘油,pH8.0)平衡50 μ L的镍柱,离心弃去上清;(2)上样:上清样品加入到50 μ L的镍柱,4℃混匀孵育2h,离心收集流穿;(3)洗杂:加入500 μ L洗杂buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、20mM咪唑、5%甘油,pH8.0)洗杂,重复洗3次;(4)洗脱:加入100 μ L洗脱buffer (50mM PBS、0.3M NaCl、250 mM咪唑、5%甘油,pH8.0)洗脱,混匀孵育10min,离心收集洗脱产物。结束后,取破碎沉淀、破碎上清、流穿、洗脱进行SDS-PAGE电泳检测。

[0024] 1.2.6 重组蛋白复性

收集洗脱获得的目的蛋白,使用0.22 μ m的膜过滤后,用截流量为10 KD的millipor超滤管进行浓缩。然后用50mM PBS、0.3M NaCl、10 mM咪唑5%甘油,pH 8.0的Buffer稀释4倍,然后置4℃混匀4h,然后对PBS 5%甘油pH 7.4的buffer彻底透析。复性好的目的蛋白使用0.22 μ m的膜过滤后,使用截流量为10KD的millipore 超滤管进行浓缩,浓缩后分装保存。

[0025] 1.2.7 ELISA验证重组蛋白的免疫反应性

收集纯化获得的产物,复性后,以此重组蛋白为包被抗原,建立ELISA方法检测其与哮喘患儿血清的阳性结合率。ELISA检测操作流程为:①配制抗原包被液:吸取重组蛋白溶解在0.1M PBS缓冲液中,终浓度为1 μ g/ml,制成包被溶液。②抗原包被:每孔包被100 μ L,包被温度:2~8℃过夜,包被时间:不少于15小时。③配制PBST洗液后洗板,每孔液量300 μ L,洗2次,拍干。④配制封闭液后进行封闭,每孔加封闭液300 μ L,封闭温度为37℃,封闭时间2小时。洗板5次,拍干。⑤血清按照1:4的比例稀释(样本稀释液稀释),加入100 μ L/孔,4℃过夜。

⑥PBST洗涤5次,拍干。⑦鼠抗人IgE-HRP(二抗):1:5000倍稀释,每孔100 μ l,37℃温育1h。⑧用PBST洗涤5次,拍干。⑨加入底物显色溶液,每孔100 μ l,避光显色15min。⑩加入终止液,50 μ l/孔,酶标仪测定OD₄₀₅值。同一份血清与同一重组过敏原测定三次,计算(平均值 $\pm$ SD)。以此ELISA方法检测阴性血清的OD值,以其(平均值 $\pm$ 3SD)为阈值,高于此值者即为阳性。

[0026] 2. 上述重组蛋白结果

2.1 重组质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4载体构建及鉴定

以本室保存的质粒pET28a(+)-Der f 1、pET28a(+)-Der f 2、pET28b(+)-Der f 4为模板,PCR扩增获得目的基因Der f 1、Der f 2、Der f 4后,分别与pFastBac HT A载体连接,PCR验证,琼脂糖凝胶电泳结果见图1。

[0027] 2.2 重组蛋白纯化及SDS-PAGE鉴定

组质粒分别转化大肠杆菌DH10Bac,涂LB平板,筛选阳性克隆后,抽提Bacmid,转染Sf9细胞,经三代培养后,收集昆虫细胞,超声波破碎,经镍亲和层样柱纯化,SDS-PAGE电泳验证结果见下图,与预期结果一致。根据生物学信息学软件预测,Der f 1、Der f 2、Der f 4相对分子质量分别为34.469 kDa、14.076 kDa、57.8575 kDa。SDS-PAGE电泳检测Ni离子亲和层析纯化结果如图2所示。

[0028] 2.3 重组蛋白的反应性

如图3所示,以rDer f 1为包被抗原用ELISA检测其IgE结合率,经粉尘螨粗提浸液皮肤挑刺试验阴性的5例健康体检合者OD值为(0.577),以其(平均值 $\pm$ 3SD=0.577+3*0.090)为阈值,其临界值(cut-off value)为0.848,高于此值者判为IgE阳性,据此推测本组约23(85.2%)例尘螨过敏性哮喘患者因第1组分致敏引起。

[0029] 如图4所示,以rDer f 2为包被抗原用ELISA检测其IgE结合率,经粉尘螨粗提浸液皮肤挑刺试验阴性的5例健康体检合者OD值为(0.673),以其(平均值 $\pm$ 3SD=0.673+3*0.092)为阈值,其临界值(cut-off value)为0.949,高于此值者判为IgE阳性,据此推测本组约24(88.9%)例尘螨过敏性哮喘患者因第2组分致敏引起。

[0030] 如图5所示,以rDer f 4为包被抗原用ELISA检测其IgE结合率,经粉尘螨粗提浸液皮肤挑刺试验阴性的5例健康体检合者OD值为(1.246),以其(平均值 $\pm$ 3SD=1.246+3*0.085)为阈值,其临界值(cut-off value)为1.502,高于此值者判为IgE阳性,据此推测本组约12(44.4%)例尘螨过敏性哮喘患者因第4组分致敏引起。

[0031]

表2. ELISA法检重组蛋白rDer f 1、rDer f 2和rDer f4与血清IgE结合反应情况

序号	年龄	性别	aDev f 1			aDev f 2			aDev f 4		
			平均值	标准差		平均值	标准差		平均值	标准差	
1	12	男	1.537	0.390	阳性	1.593	0.075	阳性	1.313	0.366	阴性
2	10	女	1.632	0.256	阳性	1.655	0.188	阳性	1.802	0.159	阳性
3	2	男	0.793	0.130	阴性	1.403	0.320	阳性	1.508	0.087	阳性
4	6	女	1.879	0.035	阳性	1.283	0.213	阳性	1.667	0.219	阳性
5	10	女	1.730	0.243	阳性	1.471	0.187	阳性	1.286	0.034	阴性
6	5	男	0.959	0.093	阳性	1.786	0.188	阳性	1.398	0.067	阴性
7	3	女	1.456	0.220	阳性	1.793	0.062	阳性	1.887	0.039	阳性
8	5	女	1.531	0.236	阳性	1.715	0.113	阳性	1.362	0.115	阴性
9	6	男	1.663	0.225	阳性	1.434	0.128	阳性	1.023	0.210	阴性
10	8	女	0.932	0.127	阳性	1.576	0.081	阳性	1.419	0.073	阴性
11	7	男	1.363	0.184	阳性	1.254	0.237	阳性	0.946	0.016	阴性
12	5	男	0.736	0.101	阴性	0.707	0.053	阴性	1.490	0.087	阴性
13	13	女	1.385	0.172	阳性	1.369	0.167	阳性	1.650	0.573	阳性
14	4	男	0.974	0.097	阳性	1.439	0.231	阳性	1.037	0.110	阴性
15	1	男	1.639	0.269	阳性	1.538	0.094	阳性	1.863	0.206	阳性
16	5	女	1.740	0.173	阳性	1.545	0.144	阳性	1.782	0.053	阳性
17	9	女	0.903	0.058	阳性	1.843	0.095	阳性	1.308	0.148	阴性
18	7	男	1.750	0.125	阳性	1.768	0.471	阳性	1.225	0.050	阴性
19	1	男	1.584	0.317	阳性	0.901	0.055	阴性	1.027	0.208	阴性
20	4	女	1.677	0.217	阳性	1.702	0.091	阳性	1.870	0.041	阳性
21	4	男	0.824	0.129	阴性	0.618	0.056	阴性	1.568	0.228	阳性
22	12	男	0.990	0.033	阳性	1.353	0.521	阳性	1.758	0.145	阳性
23	5	女	1.553	0.098	阳性	1.715	0.142	阳性	1.368	0.119	阴性
24	12	男	1.831	0.033	阳性	1.679	0.172	阳性	1.084	0.051	阴性
25	2	男	1.236	0.148	阳性	1.750	0.156	阳性	1.690	0.243	阳性
26	11	男	0.625	0.017	阴性	1.405	0.065	阳性	1.487	0.107	阴性
27	8	男	0.880	0.092	阳性	1.812	0.088	阳性	1.729	0.149	阳性
28	9	男	0.616	0.090		0.764	0.092		1.151	0.085	
29	5	女	0.657	0.577		0.761	0.673		1.157	1.246	
30	3	男	0.488	0.848		0.599	0.949		1.303	1.502	
31	7	男	0.652			0.562			1.288		
32	6	女	0.471			0.680			1.332		

本发明具体应用途径很多,以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进,这些改进也应视为本发明的保护范围。

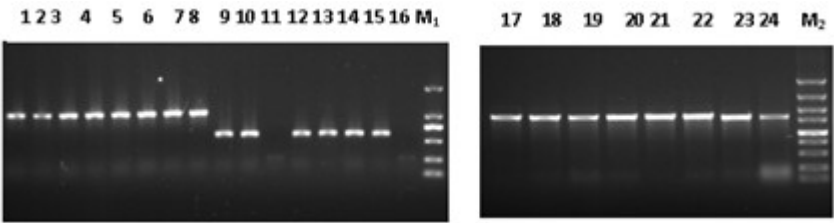


图1

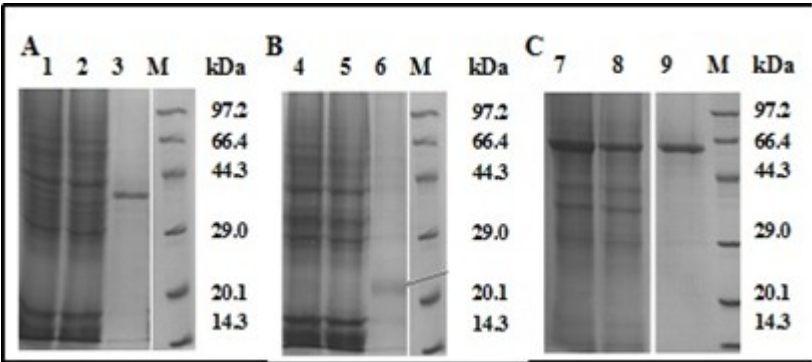


图2

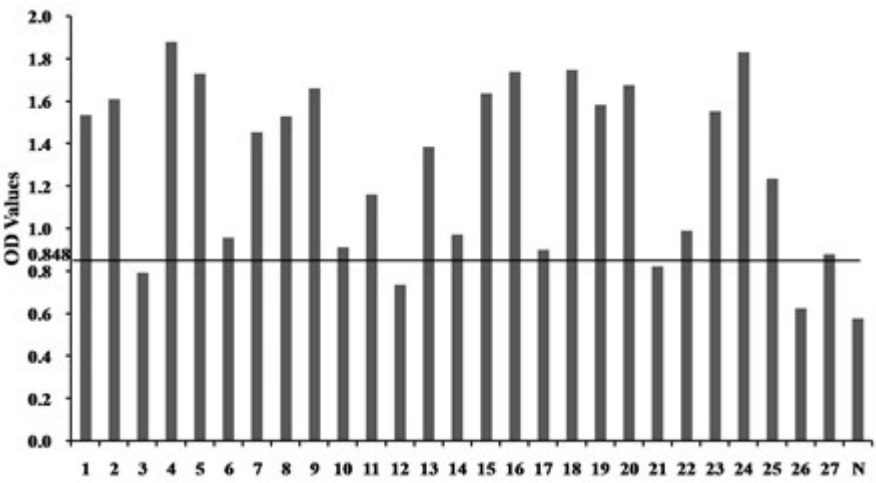


图3

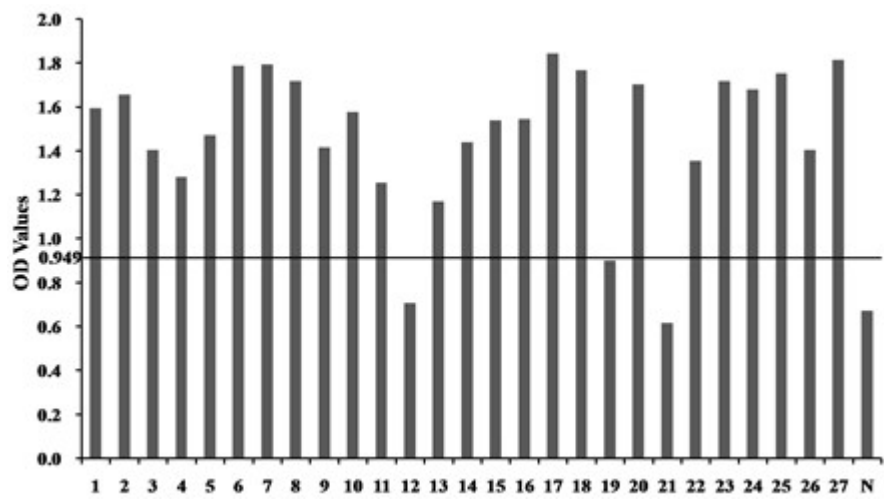


图4

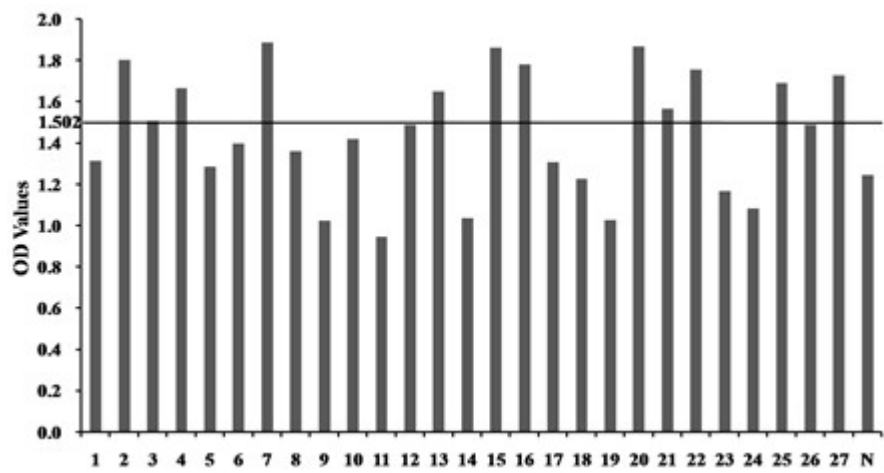


图5

专利名称(译)	一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法		
公开(公告)号	CN107056912A	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN201611145747.1	申请日	2016-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	崔玉宝		
申请(专利权)人(译)	崔玉宝		
当前申请(专利权)人(译)	崔玉宝		
[标]发明人	崔玉宝 王万相 周鹰 滕飞翔 俞黎黎		
发明人	崔玉宝 王万相 周鹰 滕飞翔 俞黎黎		
IPC分类号	C07K14/435 C12N15/12 C12N15/866 C12N5/10 G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/43531 C12N15/86 C12N2710/14043 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	刘辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法，包括以下步骤：质粒pFastBacHT A-Der f 1、pFastBacHT A-Der f 2、pFastBacHT A-Der f 4载体构建及鉴定；重组杆状病毒质粒转座及重组Bacmid鉴定；13) 重组Bacmid转染及重组病毒扩增；重组蛋白纯化；重组蛋白复性；重组蛋白的免疫反应性。本发明的一种利用夜蛾细胞生产尘螨过敏原重组蛋白的方法，通过实现尘螨过敏原Der f 1、Der f 2和Der f 4在昆虫细胞中表达与纯化，通过ELISA验证重组蛋白的免疫反应性，该方法获得的重组蛋白纯度高，复性好，能够更精确地实现对环境中的尘螨过敏原的检测，医疗和实用价值很高，为定量监测环境中尘螨过敏原含量提供了重要的方法途径。

