



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102181461 A

(43) 申请公布日 2011.09.14

(21) 申请号 201110002914.8

A61K 39/145(2006.01)

(22) 申请日 2011.01.07

A61P 31/14(2006.01)

(71) 申请人 江西科技师范学院

A61P 31/16(2006.01)

地址 330000 江西省南昌市昌北开发区枫林大道

A61P 31/20(2006.01)

(72) 发明人 刘仁荣 徐玲

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

C12N 15/63(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

C07K 2/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

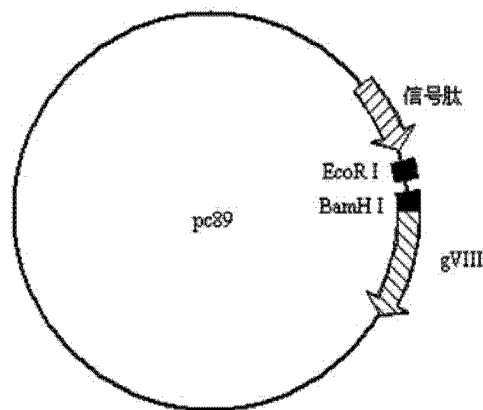
权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种在丝状噬菌体上高密度表达目的多肽的方法和用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,通过构建能表达成含肠激酶酶切位点天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸(DDDDK)序列与目的多肽核酸序列的重组噬菌体,使目的多肽 N 端连接肠激酶酶切位点,表达产物经肠激酶作用,将氨基端的肠激酶酶切位点 DDDDK 切除,使目的多肽直接位于丝状噬菌体主要衣壳蛋白氨基端。有效地保留了 pC89 原有的表达密度高等优点,又解决了 pC89 表达的多肽氨基端必定携带五个氨基酸残基的缺陷,保证了多肽直接暴露于主要衣壳蛋白氨基端,进一步增强了多肽的特异性,使得表达出来的模拟表位肽与抗体的结合效率提高了 10 倍以上。



1. 一种在丝状噬菌体上高密度表达目的多肽的方法,其特征在于包含下列步骤:

(1)人工序列的设计与合成:用化学方法合成二条5'端分别有*EcoRI*和*BamHI*核酸内切酶位点的互补核苷酸序列,其含有能表达成肠激酶酶切位点天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸(DDDDK)的核苷酸序列以及目的多肽的核苷酸序列;

(2)序列导入噬菌体载体 pC89:将二条互补序列退火后形成的 DNA 片段与经*EcoRI*和*BamHI*酶切的噬菌体载体 pC89 在 DNA 连接酶作用下连接,连接产物转化感受态的大肠杆菌(*Escherichacoli*)细胞,选择性培养基培养,挑单菌落进行阳性克隆鉴定;

(3)重组噬菌体的表达与纯化:阳性克隆加入诱导物和辅助噬菌体进行扩增培养,收获并纯化表达有肠激酶酶切位点 DDDDK 和目的多肽的重组噬菌体;

(4)将获得的重组噬菌体经肠激酶酶切,得到高密度表达在丝状噬菌体主要衣壳蛋白氨基端的目的多肽。

2. 权利要求 1 所述方法得到的高密度目的多肽作为竞争抗原在免疫学检测方法中的应用。

3. 权利要求 2 所述的应用,其特征在于以所得的高密度目的多肽作为竞争抗原替代人工化学合成抗原用于免疫学检测。

4. 权利要求 2 或 3 所述的应用,其特征为将所得的赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位肽、黄曲霉毒素 B₁ 高密度模拟表位肽、玉米赤霉烯酮高密度模拟表位肽、桔霉素高密度模拟表位肽用于免疫学检测。

5. 权利要求 1 所述方法得到的高密度目的多肽作为难以获得或传染性强的病毒抗原的替代品,应用于检测这些病毒的相应抗体。

6. 权利要求 5 所述的应用,其特征为将所得艾滋病病毒高密度抗原表位肽、甲型 H1N1 流感病毒高密度抗原表位肽、流感病毒 H3N2 高密度抗原表位肽或丙肝病毒高密度抗原表位肽作为检测抗原,用于免疫学检测。

7. 权利要求 1 所述方法得到的高密度抗原表位肽在制作亚单位疫苗的应用。

8. 权利要求 7 所述应用,其特征在于猪圆环病毒 II 型的高密度抗原表位肽、甲型 H1N1 流感病毒高密度抗原表位肽、流感病毒 H3N2 高密度抗原表位肽、丙肝病毒高密度抗原表位肽在制作其亚单位疫苗中的应用。

一种在丝状噬菌体上高密度表达目的多肽的方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及多肽表达,具体涉及一种将多肽表达在丝状噬菌体的方法及其应用。

技术背景

[0002] 噬菌体展示技术 (phage display) 是一种基因表达筛选技术, 通过将目的基因插入噬菌体衣壳蛋白的基因中, 使外源基因产物与衣壳蛋白融合, 伸展在噬菌体表面, 并从表达的外源蛋白的噬菌体群体 (库) 中筛选出带有特异外源蛋白的重组噬菌体, 以直接检测表达产物的某些活性。丝状噬菌体是一种丝状病毒颗粒, 长 880nm, 直径 6 ~ 7 nm, 其基因组为 6.4 kb 单链环状 DNA, 编码 10 种不同蛋白质。其主要衣壳蛋白 (gp8) 有 2700 个左右拷贝, 围绕 DNA 呈螺旋对称管状排列, 覆盖于噬菌体的体部。gp8 蛋白的 N 端游离在外, 外源肽通过柔性接头与其 N 端连接, 这一结构对于在主要外壳蛋白表面展示外源多肽具有特殊意义。通过分子生物学方法, 将目的多肽的基因导入至噬菌体的主要衣壳蛋白 gp8 基因上, 可以获得融合表达有目的多肽的噬菌体。由于主要衣壳蛋白 gp8 的拷贝数量有 2700-3000 个, 因此可得到高密度的表达的多肽, 目前, 在丝状噬菌体病毒表达的高密度多肽可主要用于以下三个方面:

1、有毒有害化学物质模拟表位肽的表达及其在免疫学检测方法中的应用研究

当前, 大量有毒有害化学物质如黄曲霉毒素 B₁、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮等对人体健康和环境造成了严重危害, 以酶联免疫吸附分析方法为代表的免疫学检测方法具有较高的灵敏度和特异性, 对样品的纯度要求不高, 且操作简单, 特别适合于大批量样本的检测, 已被广泛应用黄曲霉毒素 B₁、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮等有毒有害物质的快速检测。

[0003] 大多数有毒有害物质属小分子物质, 没有供二株不同抗体结合的表位, 必须采用竞争免疫分析方法进行检测。因此, 需要制备用于竞争免疫分析的竞争抗原。常规制备竞争抗原用化学方法将这些有毒有害物质与载体偶联, 该方法存在以下弊病: ①试剂本身含有有毒有害物质, 若操作不慎, 会对生产和操作人员的健康造成极大的危害, 并可导致二次污染等环保隐患。②大多数标准品依赖进口, 部份标准品难以获得且价格昂贵, 使检测试剂的成本居高不下。③偶联反应的重复性差, 部份标准品不稳定, 致使检测产品的质量难以控制。

[0004] 由此, 科学家们设想用有毒有害物质的替代品参与免疫竞争反应, 建立无毒的免疫学检测方法。新兴的噬菌体随机肽库展示技术可高效挑选出能与靶分子相结合的噬菌体, 并利用这些噬菌体再感染大肠杆菌进行扩增, 即可获得能模拟该靶分子表位的肽 (模拟表位肽)。将这些有毒有害物质的模拟表位肽的基因导入至噬菌体的主要衣壳蛋白 gp8 基因上, 可得到表达在丝状噬菌体表面的高密度模拟表位; 噬菌体在保存条件下相当稳定, 易于扩增, 吸附力强, 可做成固相竞争抗原, 从而达到替代有毒有害物质竞争抗原, 建立无毒免疫检测方法及产品的目的。

[0005] 2、难以获得或传染性强的病毒的抗原表位肽的表达及其在免疫学检测方法中的应用

在临床上,通常对乙肝病毒、丙肝病毒和艾滋病病毒等的诊断需要检测患者血液中相应抗体,就必须使用这些病毒的相关抗原,而这些病毒一般是具有较强传染性或难以在体外培养的病毒,因此这些病毒的抗原难以通过常规手段获得。有不少通过基因工程的方法,将这些病毒的抗原进行大规模制备。噬菌体随机肽库展示技术也为这些抗原的制备提供了新的切入点。将这些病毒的抗原表位肽的基因导入至噬菌体的主要衣壳蛋白 gp8 基因上,可得到表达在丝状噬菌体表面的高密度抗原表位;噬菌体在保存条件下相当稳定,易于扩增,吸附力强,可做成检测抗原,用于这些病毒的抗体检测,从而达到替代病毒抗原,建立无病毒免疫检测方法及产品的目的。

[0006] 3、高密度抗原表位肽在制作亚单位疫苗的应用

用抗原表位氨基酸序列制备的疫苗称为抗原表位疫苗,包括合成肽疫苗和重组抗原表位亚单位疫苗。本发明涉及的是重组亚单位疫苗。合成肽与载体分子连接后可诱导很好的免疫应答,但很少能在接种动物中产生长期保护性免疫反应。而重组抗原表位亚单位疫苗采用 DNA 重组的方式,外源抗原表位可插入载体分子上,并可在真核或原核系统中进行复制和表达。迄今人们已经发展了许多这样的具有颗粒样结构的外源抗原表位表达载体系统,如 HBV 核心抗原 (HBcAg) 和 HBsAg 载体系统,在重组杆状病毒中表达的 HIV-1 gag 蛋白载体系统、轮状病毒 (RV) Vp6 蛋白载体系统、蓝舌病毒核心颗粒载体系统,以及丝状的和二十面体的噬菌体载体系统等。利用丝状噬菌体系统表达的亚单位苗具有培养条件简单,成本低、噬菌体易于提纯和保存等优点,是一种很有应用潜力的亚单位疫苗表达系统。

[0007] 丝状噬菌体载体 pC89 是一个常用的噬菌体主要衣壳蛋白表达载体,曾应用于制备乙型肝炎病毒亚单位疫苗和人心肌肌钙蛋白 I 抗原及抗原表位的免疫原性等研究,在国内外众多实验室都有保存。如国内第三军医大学免疫研究所吴玉章万瑛、南京药科大学沈子龙和山西农业大学刘志宗等,以下是罗列的部分相关论文:

Ø 猪肺炎支原体 P46 基因特异性噬菌体随机肽库的构建 《畜牧与兽医》2009 年 10 期 - 刘志宗,葛亚明,宁红梅,张映,聂向庭

Ø 用 pIII 及 pVIII 噬菌体展示系统展示抗原和抗原表位的免疫原性的研究 《中国药科大学学报》2004 年 6 期 - 吴国球,劳心珍,孙宏伟,黄立新,张粉梅,钱娟英,卢惠霞,沈子龙

Ø 丝状噬菌体呈现颗粒的免疫特性和抗原递呈途径研究 [学位论文] 万瑛, 2002 - 第三军医大学:免疫学

Ø 人心肌肌钙蛋白 I 及其抗原表位的噬菌体展示及化学发光免疫分析检测方法的建立 [学位论文] 吴国球, 2003 - 中国药科大学:微生物与生化药学

Ø 乳腺癌原位和骨转移靶向载体研究 [学位论文] 董坚, 2008 - 昆明医学院:外科学

Ø 乳腺癌基因治疗特异性多肽载体的研究 [学位论文] 刘为青, 2008 - 昆明医学院:肿瘤学

研究证明丝状噬菌体展示疫苗能有效激发细胞免疫和体液免疫,它不仅用来表达有毒有害物质模拟表位肽,表达难以获得或传染性强的病毒的抗原表位肽,还能用于发展多肽疫苗。

[0008] 该载体巧妙地在丝状噬菌体主要衣壳蛋白 gp8 的信号肽(或称前导肽)与成熟肽核苷酸序列之间构建了两个酶切位点(且唯一):*EcoR* I 和 *BamH* I (见图 1),目的多肽对应

的核酸序列可通过基因工程手段插入,构建重组的噬菌体载体(见图 2),将其转化到宿主菌后,再加入辅助噬菌体进行超感染扩增,就可获得重组噬菌体,目的多肽会随 gp8 蛋白的表达、成熟而暴露于重组噬菌体主要衣壳蛋白的氨基端。

[0009] 利用噬菌体 gp8 展示系统具有三大独特优势:1)多肽密度高。由于外源多肽拷贝数量大,可获得高密度多肽分子,产生足够的免疫效力。2)易于纯化。重组噬菌体为温和噬菌体,成熟的噬菌体可分泌到培养基中,纯化步骤简单、不要求昂贵的试剂与设备,在一般的实验室条件下就可以完成。3)成本低廉。噬菌体载体的宿主为大肠杆菌,培养简单,成本低,为疫苗的普及提供可能。

[0010] 但是, pC89 载体也存在一些不足之处,本发明人通过多年的研究验证表明:当将赭曲霉毒素 A 等有毒有害物质的模拟表位肽导入到主要衣壳蛋白 gp8 后,虽然可以实现高密度表达,表达的模拟表位肽也可以与抗体结合,但结合效率较低。同样,如果将一些病毒的保护性抗原表位肽采用 pC89 载体表达亚单位疫苗,有时会改变原有保护性抗原表位肽的抗原性,使该疫苗的特异性受到干扰,直接影响疫苗的保护效果。因此,迄今为止,采用 pC89 载体所表达的模拟表位或亚单位疫苗都没有真正形成有效的产品。那么提供一种方法,对 pC89 载体以上缺点进行弥补改善,提高其表达出来的模拟表位肽与抗体的结合效率及其制备疫苗时的特异性等,显得非常有必要。

发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题是提供一种方法,既能保留丝状噬菌体 pC89 表达密度高等优点,又能解决目前用 pC89 载体表达出来的模拟表位肽与抗体结合率较低、制备出的亚单位疫苗的特异性受到干扰等问题。

[0012] 经过本发明人的多年研究发现,以上缺点是由于 pC89 载体的先天缺陷造成的:*EcoR I* 酶切位点 GAATTC 及其上游的 9 个核苷酸序列所编码的 5 个氨基酸残基 AEGEF 在 gp8 蛋白的表达,在前导肽切除后,仍然保留在目的多肽的 N 端,使目的多肽不能完全暴露,根据以往的免疫学理论,抗体与线性抗原表位的结合只与抗原表位的氨基酸序列有关,而与抗原表位以外的其它氨基酸序列无关。因此,一般认为:这几个多余的氨基酸(*EcoR I* 酶切位点 GAATTC 上游的 9 个核苷酸序列所编码的 5 个氨基酸残基 AEGEF)不会对抗原抗体的结合产生影响。因此,国内外学者在使用该载体表达目的多肽时,都没有考虑到这几个多余氨基酸的影响。

[0013] 事实上,本发明人实验表明正是这几个多余氨基酸(*EcoR I* 酶切位点 GAATTC 上游的 9 个核苷酸序列所编码的 5 个氨基酸残基 AEGEF)的存在,使得当将赭曲霉毒素 A 等有毒有害物质的模拟表位肽导入到主要衣壳蛋白 gp8 后,虽然可以实现高密度表达,表达的模拟表位肽也可以与抗体结合,但由于多余氨基酸表达产生空间位阻的影响,使目的多肽在丝状噬菌体 gp8 蛋白上不能完全暴露,抗体与模拟表位的结合的效率受到影响,结合效率较低。另外,由于前面这几个多余的氨基酸的存在,在一些病毒的保护性抗原表位肽采用 pC89 载体表达亚单位疫苗时,会引入新的抗原表位,甚至改变原有保护性抗原表位肽的抗原性,导致该疫苗的特异性受到干扰,直接影响疫苗的保护效果。

[0014] 为了解决以上问题,本发明提出了以下的解决方案:将多肽表达在丝状噬菌体主要衣壳蛋白 gp8 氨基端的方法,暨为丝状噬菌体 pC89 的先天缺陷提供后天补救措施。该

补救措施的思想为“先加后减”，通过构建含肠激酶酶切位点天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸(DDDDK)序列与目的多肽核酸序列的重组噬菌体(见图3)，使目的多肽N端连接肠激酶酶切位点，表达产物经肠激酶作用，将氨基端的肠激酶酶切位点DDDDK切除，使目的多肽直接位于丝状噬菌体主要衣壳蛋白氨基端。

[0015] 具体来说，为解决上述技术问题本发明提供如下技术方案，它包括如下步骤：

(1)人工序列的设计与合成：用化学方法合成二条5'端分别有*EcoRI*和*BamHI*核酸内切酶位点的互补核苷酸序列，其含有能表达成肠激酶酶切位点天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸(DDDDK)的核苷酸序列、以及目的多肽的核苷酸序列；

(2)序列导入噬菌体载体pC89：将二条互补序列退火后形成的DNA片段与经*EcoRI*和*BamHI*酶切的噬菌体载体pC89在DNA连接酶作用下连接，连接产物转化感受态的大肠杆菌(*Escherichacoli*)细胞，选择性培养基培养，挑单菌落进行阳性克隆鉴定；

(3)重组噬菌体的表达与纯化：阳性克隆加入诱导物和辅助噬菌体进行扩增培养，收获并纯化表达有肠激酶酶切位点DDDDK和目的多肽的重组噬菌体。

[0016] (4)将获得的重组噬菌体经肠激酶酶切，得到高密度表达在丝状噬菌体主要衣壳蛋白氨基端的目的多肽。

[0017] 作为本发明的变化，在人工序列的设计与合成中，还可以在表达成肠激酶酶切位点DDDDK的核苷酸序列前端接上能表达成任意短肽的核苷酸序列。由于肠激酶可以将表达产物的肠激酶位点连带肠激酶前端连接的任意氨基酸片段酶切去除，所以在表达成肠激酶酶切位点DDDDK的核苷酸序列前端接或不接能表达成任意短肽(0-100个氨基酸长度)的核苷酸序列，其酶切后得到的高密度模拟表位肽相同。

[0018] 那么，在人工序列的设计与合成中，用化学方法合成二条5'端分别有核酸内切酶位点*EcoRI*和*BamHI*的互补核苷酸序列，其含有能表达成肠激酶酶切位点DDDDK的核苷酸序列、目的模拟表位。即使在能表达成肠激酶酶切位点DDDDK的核苷酸序列前端接上能表达成任意短肽(0-100个氨基酸长度)的核苷酸序列，也落入本发明的保护范围之内。

[0019] 结合附图4来说明：DDDDK为肠激酶酶切位点，GAATTC为*EcoRI*酶切位点，在肠激酶酶切位点前还可以接上能表达成任意短肽(0-100个氨基酸长度)的核苷酸序列，图中以(NNN)_m, m=0-100来表示，接不接上(NNN)_m, m=0-100，表达产物经肠激酶酶切后得到的高密度模拟表位肽相同。

[0020] 本发明还涉及到上述方法得到的高密度目的多肽作为竞争抗原或检测抗原在免疫学检测方法中的应用。

[0021] 该方法在免疫学检测方法中的应用，特别涉及到以所得的高密度模拟表位肽作为竞争抗原替代人工化学合成赭曲霉毒素A、黄曲霉毒素B₁、玉米赤霉烯酮和桔霉素等抗原用于免疫检测。

[0022] 该方法的应用，还涉及到方法得到的高密度目的多肽作为难以获得或传染性强的病毒抗原的替代品，应用于检测这些病毒的相应抗体。特别涉及到将依方法所得的艾滋病高密度抗原表位肽、甲型H1N1流感病毒高密度抗原表位肽、流感病毒H3N2高密度抗原表位肽或丙肝高密度抗原表位肽作为检测抗原替代纯化的病毒抗原用于检测抗病毒抗体的方法和产品。

[0023] 本发明还涉及到该方法得到的高密度抗原表位肽在制作亚单位疫苗的应用。

[0024] 还特别涉及到猪圆环病毒 II 型的高密度抗原表位肽、甲型 H1N1 流感病毒高密度抗原表位肽、流感病毒 H3N2 高密度抗原表位肽、丙肝病毒高密度抗原表位肽在制作其亚单位疫苗中的应用。

[0025] 本发明具有如下优点：本发明制备出的多肽，不仅延承了丝状噬菌体主要衣壳蛋白表达载体所具有的密度高等优点，而且弥补了 pC89 质粒表达的多肽氨基端必定携带五个氨基酸残基的“先天缺陷”，保证了多肽直接暴露于主要衣壳蛋白氨基端，进一步增强了多肽的特异性，使得表达出来的模拟表位肽与抗体的结合效率提高了 10 倍以上。重组表达并经肠激酶处理的噬菌体颗粒直接展现外源蛋白、易于制备纯化且较为稳定。表达产物同样无需偶联载体蛋白，可直接提纯后作为检测抗原广泛应用于赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、艾滋病病毒、丙型肝炎病毒等的免疫学检测中，并且可以扩增，使成本大为降低，且安全无毒保护了操作人员的身体健康，具有良好的经济效益和市场前景；同时，用于制备亚单位疫苗时，减少了 pC89 携带的五个氨基酸残基表达产物可能干扰疫苗特异性的问题。

附图说明

[0026] 图 1 为 pC89 原载体。

[0027] 图 2 为一般方法构建的 pC89 重组载体。

[0028] 图 3 为本专利方法构建的 pC89 重组载体 [含能表达成肠激酶酶切位点天冬氨酸 - 天冬氨酸 - 天冬氨酸 - 天冬氨酸 - 赖氨酸 (DDDDK) 的核苷酸序列]。

[0029] 图 4 为本专利方法构建的 pC89 重组载体局部序列。

[0030] 图 5 无毒 ELISA 分析方法中赭曲霉毒素 A 标准品以及合成多肽的竞争抑制曲线。

[0031] 图 6 赭曲霉毒素 A 标准品与合成多肽的剂量关系回归直线图。

[0032] 图 7 合成多肽的竞争抑制曲线。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明作进一步说明，但所述实施例不以任何形式限制本发明。

[0034] 实施例 1。

[0035] 赭曲霉毒素 A 的高密度分子模拟表位肽的制备方法

(1) 模拟表位表达载体的构建及鉴定

根据赭曲霉毒素 A 的模拟表位序列，用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列，其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及赭曲霉毒素 A 模拟表位核苷酸序列。合成 T₁: 5' - AATTCgACgACgACgACAAgATTCgTCCTATggTg - 3' (*EcoRI*) 和 T₂: 5' - GATCCACCATAGGACGAATCTTGTCGTCGTCGTCG - 3' (*BamHI*)，加 dd H₂O 分别配成 20pmol/μL 的寡聚核苷酸单链溶液，各取 10 μL 混合后，置于 PCR 仪，65°C 保温 10 min，然后缓慢降温至室温。下划线部分为核酸内切酶位点，边框部分为 DDDDK 的核苷酸序列，加粗部分为模拟表位的核苷酸序列，下同此。

[0036] (2) 序列导入噬菌体载体扩增、鉴定；

取 pC89 质粒 DNA 32 μL (30 μg)，加 10 × 酶切 buffer 4 μL，*EcoRI* (10 U/μL)

2 μ L, *Bam*HI (10 U/ μ L) 2 μ L, 37°C 酶切 2 h, 65°C 20 min 灭活, 2.5 % 琼脂糖电泳观察结果。在紫外灯下迅速切下目的条带, 用 UNIQ₁₀ 胶回收试剂盒回收。将回收后的 pC89 DNA 片段与双链寡聚核苷酸连接。连接反应体系: 双链寡聚核苷酸 4 μ L, pC89 载体 DNA 4 μ L, T4 DNA ligase (10 U/ μ L) 1 μ L, 10 \times T4 DNA ligation buffer 1 μ L, 总体积 10 μ L, 16°C 连接过夜。连接液全量转化大肠杆菌感受态细胞, 热激后涂布已加入 40 μ L X-gal (4 mg/mL) 及 4 μ L IPTG (40 mg/mL) 的含 Amp 的 LB 平板, 37°C 培养过夜, 挑单菌落扩增细胞进行阳性克隆鉴定。

[0037] (3) 重组噬菌体的表达

经鉴定后的阳性克隆挑单菌落接种于 2 mL Amp + Tet 双抗 SOC 培养液中, 37°C 振荡培养 2 h, 转移至 400 mL Amp + Tet 双抗 SOC 培养液中, 37°C 振荡培养至 A₆₀₀ 约 0.4 时, 加入 1×10^{12} PFU 的辅助噬菌体 VCSM13, 37°C 振荡培养 1 h, 再加入终浓度为 70 mg/L 的卡那霉素以及终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37°C 振荡培养过夜。

[0038] (4) 高密度模拟表位蛋白的纯化:

将培养液 4°C 10000 rpm 离心 10 min, 上清液加入 PEG/NaCl, 4°C 沉淀过夜; 4°C 10000 rpm 离心 15 min, 去上清, 再用 1 mL TBST 悬浮噬菌体, 加入 PEG/NaCl 冰上孵育 60 min; 4°C 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 200 μ L TBST 悬浮并测滴度, 4°C 保存。

[0039] (5) 肠激酶酶切: 取纯化好的模拟表位蛋白 50 μ L, 加入 1 μ L 肠激酶, 22°C 过夜, 纯化, 4°C 或 -20°C 保存。

[0040] (6) 抗体结合性能测定:

A、用磷酸缓冲溶液 (PBS, pH 7.2) 将高密度表位蛋白配制成 40、20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 μ g/mL 的浓度, 按每条酶标板一个浓度 (每条 8 个孔), 每孔 100 μ L 加入酶标板中, 4°C 过夜。

[0041] B、倾去包被液, PBST (PBS 加 0.2% 的吐温 20) 洗涤三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干, 每孔加入 300 μ L 3% 的脱脂牛奶 (溶于 PBST) 作为封阻液, 37°C 保温保湿 1 小时; 倾去封阻液, PBST 洗涤三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干。

[0042] C、将抗体用 PBS 倍比稀释成 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 和 1:64000 的浓度, 依次加入各条处理好的酶标板板孔中, 最后一孔加入 PBS 作空白对照, 37°C 保温保湿 1 小时。

[0043] D、PBST 洗板三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗抗体 (酶标二抗), 37°C, 保温保湿 1 小时。

[0044] E、PBST 洗板三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 OPD 或 TMB 底物液 100 μ L, 37°C 保温保湿避光反应 10 分钟后, 每孔加入 50 μ L 2M H₂SO₄ 终止反应, 以空白对照孔调零, 在酶标仪上测定酶标板 492 nm (OPD) 或 450 nm (TMB) 的吸光值,

F、根据吸光值在 1.5-2.0 左右的最低表位蛋白包被浓度和最大抗体稀释倍数比较抗体的结合性能。包被浓度越低, 抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好。

[0045] 结果: (按此实施例, 表位蛋白包最低被浓度为 2.5 μ g/mL, 最大抗体稀释倍数为 1:20000。包被浓度越低, 抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好。)

实施例 2

作为实施例 1 的变化, 在人工合成序列合成中, 在能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核

根据赭曲霉毒素 A 的模拟表位序列,用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,其含有能表达成赭曲霉毒素 A 模拟表位的核苷酸序列。

[0053] 同样 $T_3: 5' - \underline{\text{AATTCATTCgTCCTATggTg}} - 3' \text{ (EcoRI)}$ 和 $T_4: 5' - \underline{\text{GATCCACCATAGGACGAATG}} - 3' \text{ (BamHI)}$,各取 10 μL 混合后,置于 PCR 仪,65 $^\circ\text{C}$ 保温 10 min,然后缓慢降温至室温。

[0054] 其它步骤同实施例 1 (无需肠激酶酶切步骤)。

[0055] 结果分析:(按此实施例,在抗体结合性能测定中,模拟表位蛋白包最低被浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,最大抗体稀释倍数为 1:4000。那么,对比实施例 1、2、3、4,切除多余氨基酸后,表达产物与抗体的结合性能均为切除前表达产物的 20 倍。可见,切除多余氨基酸后,表达产物与抗体的结合性能大为提高。同时,实施例 1-4 相互比较,可发现在能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列前端接上 0-100 长度的短肽,不影响肠激酶酶切后产物与抗体的结合性能。)

实施例 6 黄曲霉毒素 B₁ 的高密度分子模拟表位肽的制备方法

(1) 模拟表位表达载体的构建及鉴定

根据黄曲霉毒素 B₁ 的模拟表位序列,用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及黄曲霉毒素 B₁ 模拟表位。现以一黄曲霉毒素 B₁ 模拟表位肽为例,

合成 $T_1: 5' - \underline{\text{AATTCgACgACgACgACAAgCATCCTAgTgATCCgCgTCATGGG}} - 3' \text{ (EcoRI)}$ 和 $T_2: 5' - \underline{\text{gATCCCCATgACgCggATCACTAggATgCTTgTCgTCgTCgTCg}} - 3' \text{ (BamHI)}$,加 dd H₂O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μL 混合后,置于 PCR 仪,65 $^\circ\text{C}$ 保温 10 min,然后缓慢降温至室温。

[0056] n 及核酸内切酶位点的核苷酸序列,以其中一模拟表位肽为例其它步骤同实施例 1。同时以未切除多余氨基酸的序列导入作为对照组。

[0057] 结果:(按此实施例,在抗体结合性能测定中,切除多余氨基酸前的对照组,模拟表位蛋白包最低被浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$,最大抗体稀释倍数为 1:2000。切除多余氨基酸后表位蛋白包最低被浓度为 3.0 $\mu\text{g/mL}$,最大抗体稀释倍数为 1:20000。包被浓度越低,抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好。)

实施例 7 玉米赤霉烯酮的高密度分子模拟表位肽的制备方法

(1) 模拟表位表达载体的构建及鉴定

根据玉米赤霉烯酮的模拟表位序列,用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及玉米赤霉烯酮模拟表位。现以一玉米赤霉烯酮模拟表位肽为例,

合成 $T_1: 5' - \underline{\text{AATTCgACgACgACgACAAgGATGCTGTCATCCTGTTGATG}} - 3' \text{ (EcoRI)}$ 和 $T_2: 5' - \underline{\text{gATCCATCAACAGGATGACAGCATCCTTGTGTCGTCGTCg}} - 3' \text{ (BamHI)}$,加 dd H₂O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μL 混合后,置于 PCR 仪,65 $^\circ\text{C}$ 保温 10 min,然后缓慢降温至室温。

[0058] 其它步骤同实施例 1。同时以未切除多余氨基酸的序列导入作为对照组。

[0059] 结果:(按此实施例,在抗体结合性能测定中,切除多余氨基酸前的对照组,模拟表

位蛋白包最低被浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$, 最大抗体稀释倍数为 1:2000。切除多余氨基酸后表位蛋白包最低被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 最大抗体稀释倍数为 1:60000。包被浓度越低, 抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好。)

实施例 8 桔霉素高密度分子模拟表位肽的制备方法

根据桔霉素的模拟表位序列, 用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列, 其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及桔霉素模拟表位。现以一桔霉素模拟表位肽为例,

合成 T_1 : 5' - AATTCgACgACgACgACAAgACGCATAAGGCGGGCCTCCG -3' (*EcoRI*) 和 T_2 : 5' - GATCCGAGGCCCGCCTTATGCGTCTTGTCGTCGTCGTCg -3' (*BamHI*), 加 dd H₂O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液, 各取 10 μL 混合后, 置于 PCR 仪, 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 然后缓慢降温至室温。

[0060] 其它步骤同实施例 1。同时以未切除多余氨基酸的序列导入作为对照组。

[0061] 结果:(按此实施例, 在抗体结合性能测定中, 切除多余氨基酸前的对照组, 模拟表位蛋白包最低被浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$, 最大抗体稀释倍数为 1:2000。切除多余氨基酸后表位蛋白包最低被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 最大抗体稀释倍数为 1:40000。包被浓度越低, 抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好。)

实施例 9 桔霉素高密度分子模拟表位肽的制备方法

作为实施例 8 的变化, 在人工合成序列合成中, 在能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列前端接上能表达成任意短肽(0-100 个氨基酸长度)的核苷酸序列, 本发明以两条序列分别接上 CAGCAT 和 ATGCTG 为例说明:

合成 T_1 : 5' - AATTCCAGCATgACgACgACgACAAgACGCATAAGGCGGGCCTCCG -3' (*EcoRI*) 和 T_2 : 5' - GATCCGAGGCCCGCCTTATGCGTCTTGTCGTCGTCGTCATGCTGg -3' (*BamHI*), 加 dd H₂O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液, 各取 10 μL 混合后, 置于 PCR 仪, 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 然后缓慢降温至室温。

[0062] 其它步骤同实施例 1。

[0063] 实施例 10 艾滋病病毒抗原表位肽的制备方法

(1) 抗原表位表达载体的构建及鉴定

根据艾滋病病毒 HIV-1 gp41 蛋白抗原表位序列, 用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列, 其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及艾滋病病毒 HIV-1 gp41 蛋白表位。现以一艾滋病病毒 HIV-1 gp41 蛋白表位肽为例, 合成 T_1 : 5' - AATTCGGGCCTgACgACgACgACAAgCCACTGCACGCTCGGCTGCCG -3' (*EcoRI*)

和 T_2 : 5' - GATCCGCCAGCCGAGCGTGCAGTGGCTTGTCGTCGTCGTCAGGCCCGg -3' (*BamHI*), 加 dd H₂O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液, 各取 10 μL 混合后, 置于 PCR 仪, 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 然后缓慢降温至室温。

[0064] 其它步骤同实施例 1。同时以未切除多余氨基酸的序列导入作为对照组。

[0065] 结果:(按此实施例, 在抗体结合性能测定中, 切除多余氨基酸前的对照组, 模拟表位蛋白包最低被浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$, 最大抗体稀释倍数为 1:2000。切除多余氨基酸后表位蛋白包最低被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 最大抗体稀释倍数为 1:120000。包被浓度越低, 抗体稀释倍

数越大则抗体结合性能越好)。

实施例 11 甲型 H1N1 流感病毒抗原表位肽的制备方法

(1) 抗原表位表达载体的构建及鉴定

根据甲型 H1N1 流感病毒抗原表位序列,用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及甲型 H1N1 流感病毒抗原表位。现以一甲型 H1N1 流感病毒抗原表位肽为例,

合成 T_1 : 5' - AATTCgACgACgACgACAAgCATCCTAgTgATCCgCgTCATGGG -3' (*EcoRI*) 和 T_2 : 5' - gATCCCCATgACgCggATCACTAggATgCTTgTCgTCgTCgTCg -3' (*BamHI*), 加 dd H_2O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μL 混合后,置于 PCR 仪,65 $^{\circ}C$ 保温 10 min,然后缓慢降温至室温。

[0066] 其它步骤同实施例 1。同时以未切除多余氨基酸的序列导入作为对照组。

[0067] 结果:(按此实施例,在抗体结合性能测定中,切除多余氨基酸前的对照组,模拟表位蛋白包最低被浓度为 20 $\mu g/mL$,最大抗体稀释倍数为 1:2000。切除多余氨基酸后表位蛋白包最低被浓度为 1.0 $\mu g/mL$,最大抗体稀释倍数为 1:40000。包被浓度越低,抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好)。

[0068] 实施例 12 流感病毒 H3N2 高密度抗原表位的制备方法

(1) 抗原表位表达载体的构建及鉴定

根据流感病毒 H3N2 抗原表位序列,用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,其含有能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列、以及流感病毒 H3N2 抗原表位核苷酸序列。现以一流感病毒 H3N2 抗拟表位肽为例:

合成 T_1 : 5' - AATTCgACgACgACgACAAgGGGACTCCTCCTTATCCTCCG -3' (*EcoRI*) 和 T_2 : 5' -GATCCGGAGGATAAGGAGGAGTCCCCTTGTCGTCGTCGTCg (*BamHI*), 加 dd H_2O 分别配成 20pmol/ μL 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μL 混合后,置于 PCR 仪,65 $^{\circ}C$ 保温 10 min,然后缓慢降温至室温。

[0069] 其它步骤同实施例 1。同时以未切除多余氨基酸的序列导入作为对照组。

[0070] 结果:(按此实施例,在抗体结合性能测定中,切除多余氨基酸前的对照组,模拟表位蛋白包最低被浓度为 20 $\mu g/mL$,最大抗体稀释倍数为 1:2000。切除多余氨基酸后表位蛋白包最低被浓度为 1.0 $\mu g/mL$,最大抗体稀释倍数为 1:40000。包被浓度越低,抗体稀释倍数越大则抗体结合性能越好)。

实施例 13

猪圆环病毒 II 型噬菌体表达载体亚单位疫苗的制备方法

(1) 猪圆环病毒 II 型 p VIII 噬菌体表达载体的构建

猪圆环病毒衣壳蛋白基因位于 ORF2 上,其编码的衣壳蛋白是 PCV2 的主要衣壳蛋白和免疫原性蛋白。其中第 117 ~ 131 位氨基酸残基构成的多肽对 PCV2 抗血清有特异性,它们对应的核苷酸序列是构建 PCV2 基因重组疫苗的首选序列。用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,包含猪圆环病毒衣壳蛋白 ORF2 第 117 ~ 131 位氨基酸对应的核苷酸序列和能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列。

[0071] T_1 :

5' AATTCGACGACGACGACAAGGgagtgaggctccagtgctgttattctagatgataactttgtaacg 3' (*EcoRI*)

和 T2:

5' gataCGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCCTTGTCGTCGTCGTCG-3' (*BamHI*), 加 dd H₂O 分别配成 20pmol/ μ L 的寡聚核苷酸单链溶液, 各取 10 μ L 混合后, 置于 PCR 仪, 65°C 保温 10 min, 然后缓慢降温至室温。

[0072] (2) 序列导入、鉴定:

取 pC89 质粒 DNA 32 μ L (30 μ g), 加 10 \times 酶切 buffer 4 μ L, *EcoRI* (10 U/ μ L) 2 μ L, *BamHI* (10 U/ μ L) 2 μ L, 37°C 酶切 2 h, 65°C 20 min 灭活, 2.5% 琼脂糖电泳观察结果。在紫外灯下迅速切下目的条带, 用 UNIQ₁₀ 胶回收试剂盒回收。将回收后的 pC89 DNA 片段与双链寡聚核苷酸连接。连接反应体系: 双链寡聚核苷酸 4 μ L, pC89 载体 DNA 4 μ L, T4 DNA ligase (10 U/ μ L) 1 μ L, 10 \times T4 DNA ligation buffer 1 μ L, 总体积 10 μ L, 16°C 连接过夜。连接液全量转化大肠杆菌感受态细胞, 热激后涂布已加入 40 μ L X-gal (4 mg/mL) 及 4 μ L IPTG (40 mg/mL) 的含 Amp 的 LB 平板, 37°C 培养过夜, 挑单菌落扩增细胞进行阳性克隆鉴定。

[0073] (3) 融合蛋白的表达与纯化

经鉴定后的阳性克隆挑单菌落接种于 2mL Amp + Tet 双抗 SOC 培养液中, 37°C 振荡培养 2h, 转移至 400mL Amp + Tet 双抗 SOC 培养液中, 37°C 振荡培养至 A600 约 0.4 时, 加入 1×10^{12} PFU 的 VCSM13, 37°C 振荡培养 1 h, 再加入终浓度为 70mg/L 的卡那霉素以及终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 37°C 振荡培养过夜。将培养液 4°C 10000rpm 离心 10min, 上清液加入 PEG/NaCl, 4°C 沉淀过夜; 4°C 10000rpm 离心 15min, 去上清, 再用 1 mL TBST 悬浮噬菌体, 加入 PEG/NaCl 冰上孵育 60 min; 4°C 离心 15min, 去上清, 沉淀用 200 μ L TBST 悬浮并测滴度, 4°C 保存。

[0074] (4) 肠激酶酶切: 取纯化好的模拟表位蛋白 50 μ L, 加入 1 μ L 肠激酶, 22°C 过夜, 纯化, 4°C 或 -20°C 保存。

[0075] (5) 特异性抗体的鉴定

将经酶切后的纯化重组噬菌体按常规程序免疫动物, 采血后分离抗血清。首先通过化学方法合成目的多肽, 再通过以下 ELISA 方法检测抗体效价:

A、用磷酸缓冲溶液 (PBS, pH7.2) 将化学方法合成目的多肽配制成 5 - 200 μ g/mL 的浓度, 每孔 100 μ L 加入酶标板中, 4°C 过夜。

[0076] B、倾去包被液, PBST (PBS 加 0.2% 的吐温 20) 洗涤三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干, 每孔加入 300 μ L 3% 的脱脂牛奶 (溶于 PBST) 作为封阻液, 37°C 保温保湿 1 小时; 倾去封阻液, PBST 洗涤三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干。

[0077] C、将免疫后的抗血清用 PBS 倍比稀释成 1:1000、1:2000、1:4000、1:10000、1:20000、1:40000、1:80000、1:160000、1:320000 和 1:640000 的浓度, 依次加入各条处理好的酶标板板孔中, 最后一孔加入 PBS 作空白对照, 37°C 保温保湿 1 小时。未经免疫的血清同样处理做阴性对照。

[0078] D、PBST 洗板三次, 每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗抗体 (酶标二抗), 37°C, 保温保湿 1 小时。

[0079] E、PBST 洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 OPD 或 TMB 底物液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温保湿避光反应 10 分钟后,每孔加入 50 μ L 2M H_2SO_4 终止反应,以空白对照孔调零,在酶标仪上测定酶标板 492nm (OPD)或 450nm (TMB)的吸光值,选取抗血清与阴性血清吸光值比大于 2.1 时最大的抗体稀释度为特异性抗体的效价。

[0080] 结果:按此实施例,特异性抗体的测定效价为 1:40000。

[0081] 实施例 14

切除多余氨基酸在亚单位疫苗中带来的效果比较试验

为了对比采用此发明带来的实质性改变,猪圆环病毒 II 型噬菌体表达载体亚单位疫苗的制备方法

(1) 猪圆环病毒 II 型 p VIII 噬菌体表达载体的构建

用化学方法合成二条 5' 端分别有核酸内切酶位点 *EcoRI* 和 *BamHI* 的互补核苷酸序列,包含猪圆环病毒衣壳蛋白 ORF2 第 117 ~ 131 位氨基酸对应的核苷酸序列,不包含能表达成肠激酶酶切位点 DDDDK 的核苷酸序列。

[0082] T1:

5' AATTCGgagtgaggctccagtgctgttattctagatgataactttgtaacg 3' (*EcoRI*)

和 T2: 5' gataCGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCG -3'

(*BamHI*),加 dd H_2O 分别配成 20pmol/ μ L 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μ L 混合后,置于 PCR 仪,65 $^{\circ}$ C 保温 10 min,然后缓慢降温至室温。

[0083] (2) 序列导入、鉴定:

取 pC89 质粒 DNA 32 μ L (30 μ g),加 10 \times 酶切 buffer 4 μ L, *EcoRI* (10 U/ μ L) 2 μ L, *BamHI* (10 U/ μ L) 2 μ L,37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h,65 $^{\circ}$ C 20 min 灭活,2.5 % 琼脂糖电泳观察结果。在紫外灯下迅速切下目的条带,用 UNIQ₁₀ 胶回收试剂盒回收。将回收后的 pC89 DNA 片段与双链寡聚核苷酸连接。连接反应体系:双链寡聚核苷酸 4 μ L, pC89 载体 DNA 4 μ L, T4 DNA ligase (10 U/ μ L) 1 μ L,10 \times T4 DNA ligation buffer 1 μ L,总体积 10 μ L,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接液全量转化大肠杆菌感受态细胞,热激后涂布已加入 40 μ L X-gal (4 mg/mL) 及 4 μ L IPTG (40 mg/mL) 的含 Amp 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑单菌落扩增细胞进行阳性克隆鉴定。

[0084] (3) 融合蛋白的表达与纯化

经鉴定后的阳性克隆挑单菌落接种于 2mL Amp + Tet 双抗 SOC 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h,转移至 400mL Amp + Tet 双抗 SOC 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A600 约 0.4 时,加入 1×10^{12} PFU 的 VCSM13,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h,再加入终浓度为 70mg/L 的卡那霉素以及终浓度为 1mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。将培养液 4 $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 10min,上清液加入 PEG/NaCl,4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜;4 $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 15min,去上清,再用 1 mL TBST 悬浮噬菌体,加入 PEG/NaCl 冰上孵育 60 min;4 $^{\circ}$ C 离心 15min,去上清,沉淀用 200 μ L TBST 悬浮并测滴度,4 $^{\circ}$ C 保存或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0085] (4) 特异性抗体的鉴定

将未经酶切后的纯化重组噬菌体按常规程序免疫动物,采血后分离抗血清。首先通过化学方法合成目的多肽,再通过 ELISA 方法检测抗体效价:

A、用磷酸缓冲溶液 (PBS, pH7.2) 将化学方法合成目的多肽配制成 5 - 200 μ g/mL 的

浓度,每孔 100 μ L 加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0086] B、倾去包被液,PBST (PBS 加 0.2% 的吐温 20) 洗涤三次,每次在厚叠吸水纸上扣干,每孔加入 300 μ L 3% 的脱脂牛奶(溶于 PBST)作为封阻液,37 $^{\circ}$ C 保温保湿 1 小时;倾去封阻液,PBST 洗涤三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。

[0087] C、将免疫后的抗血清用 PBS 倍比稀释成 1:1000、1:2000、1:4000、1:10000、1:20000、1:40000、1:80000、1:160000、1:320000 和 1:640000 的浓度,依次加入各条处理好的酶标板板孔中,最后一孔加入 PBS 作空白对照,37 $^{\circ}$ C 保温保湿 1 小时。未经免疫的血清同样处理做阴性对照。

[0088] D、PBST 洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗抗体(酶标二抗),37 $^{\circ}$ C,保温保湿 1 小时。

[0089] E、PBST 洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 OPD 或 TMB 底物液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 保温保湿避光反应 10 分钟后,每孔加入 50 μ L 2M H_2SO_4 终止反应,以空白对照孔调零,在酶标仪上测定酶标板 492nm (OPD) 或 450nm (TMB) 的吸光值,选取抗血清与阴性血清吸光值比大于 2.1 时最大的抗体稀释度为特异性抗体的效价。

[0090] 结果:按此实施例,特异性抗体的测定效价为 1:2000。对比实施例 13,切除多余氨基酸后,免疫产生的特异性抗体效价提高了 20 倍。可见,本发明可有效提高目的多肽的免疫特异性。

[0091] 实施例 15

甲型 H1N1 流感病毒噬菌体表达亚单位疫苗的制备方法

(1) 噬菌体表达载体的构建

化学合成序列:

T1 :5' - AATTCGGGCTgACgACgACgACAAgCCACTGCACGCTCGGCTGCCG- 3' (*EcoRI*)

和 T2 :5' - GATCCGGCAGCCGAGCGTGCAGTGGCTTGTGTCGTCGTCAGGCCGg -3' (*BamHI*),加 dd H_2O 分别配成 20pmol/ μ L 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μ L 混合后,置于 PCR 仪,65 $^{\circ}$ C 保温 10 min,然后缓慢降温至室温,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0092] 其它步骤同实施例 13

实施例 16 流感病毒 H3N2 噬菌体表达亚单位疫苗的制备方法

(1) 噬菌体表达载体的构建

用化学方法合成序列:

T1 :5' - AATTCgACgACgACgACAAgGGGACTCCTCCTTATCCTCCG- 3' (*EcoRI*)

和 T2 :

5' - GATCCGGAGGATAAGGAGGAGTCCCCTTGTGTCGTCGTCg- 3' (*BamHI*),加 dd H_2O 分别配成 20pmol/ μ L 的寡聚核苷酸单链溶液,各取 10 μ L 混合后,置于 PCR 仪,65 $^{\circ}$ C 保温 10 min,然后缓慢降温至室温,-20 $^{\circ}$ C 保存。

[0093] 其它步骤同实施例 13

实施例 17 赭曲霉毒素 A 的高密度分子模拟表位肽的在赭曲霉毒素 A 酶联免疫吸附检测方法中的应用

(1) 取实施例 1 - 4 中酶切纯化后的高密度模拟表位蛋白,紫外分光光度计测定其在 280nm 的吸光值(A280nm),根据 Warburg-christian 公式:蛋白质浓度(mg/mL)

=1.55A280nm-0.76A260nm, 确定其蛋白浓度。

[0094] (2) 采用方阵滴定确定高密度模拟表位蛋白和抗赭曲霉毒素 A 抗体的最佳使用浓度。具体如下：

A、用磷酸缓冲溶液(PBS, pH7.2)将高密度模拟表位蛋白配制成40、20、10、5、2.5、1.25和0.625 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度,按每条酶标板一个浓度(每条8个孔),每孔100 μL 加入酶标板中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

[0095] B、倾去包被液,PBST(PBS加0.2%的吐温20)洗涤三次,每次在厚叠吸水纸上扣干,每孔加入300 μL 3%的脱脂牛奶(溶于PBST)作为封阻液,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温保湿1小时;倾去封阻液,PBST洗涤三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。

[0096] C、将抗赭曲霉毒素 A 抗体用 PBS 倍比稀释成 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 和 1:64000 的浓度,依次加入各条处理好的酶标板板孔中,最后一孔加入 PBS 作空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温保湿1小时。

[0097] D、PBST 洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 100 μL 辣根过氧化物酶标记的抗抗体(酶标二抗),37 $^{\circ}\text{C}$,保温保湿1小时。

[0098] E、PBST 洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加 OPD 或 TMB 底物液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温保湿避光反应10分钟后,每孔加入50 μL 2M H_2SO_4 终止反应,以空白对照孔调零,在酶标仪上测定酶标板492nm(OPD)或450nm(TMB)的吸光值,根据所有孔吸光值进行比较选择吸光值在1.5左右最低的高密度模拟表位蛋白包被浓度和最大的抗体稀释度即为高密度模拟表位蛋白和抗赭曲霉毒素 A 抗体的最佳使用浓度。

[0099] (3) 通过化学合成模拟表位多肽,制作标准曲线确定合成模拟表位多肽与赭曲霉毒素 A 标准品的剂量关系,以之替代赭曲霉毒素 A 标准品。具体实施如下：

A、根据方阵滴定确定的赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白的浓度。高密度模拟表位蛋白溶于0.1M pH8.6 的 NaHCO_3 ,100 μL /孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。

[0100] B、PBST 洗板四次,3%脱脂牛奶300 μL /孔 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2h。

[0101] C、PBST 洗板四次,各孔分别加入不同浓度的赭曲霉毒素 A 标准品(40000,20000,10000,5000,2500,1250,625,312.5,156,100,50和0 pg/mL)、合成模拟表位多肽50 μL (40000,20000,10000,5000,2500,1250,625,312.5,156,100,50和0 pg/mL),再全部加入方阵滴定确定的抗赭曲霉毒素 A 抗体50 μL ,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温保湿1h。

[0102] D、PBST 洗涤6次,加入辣根过氧化物酶标记的抗抗体(100 μL /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 作用1h。

[0103] E、洗涤6次。联苯二胺(OPD)显色,2M H_2SO_4 终止反应,测定492nm波长光密度(OD值),计算各浓度的结合率,结合率(%) = $B/B_0 \times 100\%$ (B_0 为不加赭曲霉毒素 A 或不加合成多肽的OD值,B为加赭曲霉毒素 A 或加入合成多肽的OD值)。

[0104] F、根据赭曲霉毒素 A 的浓度和结合率绘制赭曲霉毒素 A 竞争抑制曲线,根据合成模拟表位多肽的浓度和结合率绘制多肽竞争抑制曲线,通过参照标准曲线中相同结合率可得出标准品赭曲霉毒素 A 与合成模拟表位多肽的剂量关系。

[0105] (4) 高密度模拟表位蛋白作为竞争抗原替代赭曲霉毒素 A 人工抗原,合成模拟表位多肽替代赭曲霉毒素 A 标准品用于 ELISA 检测样品中赭曲霉毒素 A 的含量,具体步骤如下：

A、根据方阵滴定确定的最佳高密度模拟表位蛋白浓度,用磷酸缓冲溶液(PBS, pH7.2)

稀释,在酶标板中每孔加 100 μ L 高密度模拟表位蛋白,4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0106] B、倾去包被液,PBST(PBS加0.2%的吐温20)洗涤三次,每次在厚叠吸水纸上扣干,每孔加入300 μ L 3%的脱脂牛奶(溶于PBST)作为封阻液,37 $^{\circ}$ C保温保湿1小时;倾去封阻液,PBST洗涤三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。

[0107] C、在酶标板各孔中加入浓度为40000,20000,10000,5000,2500,1250,625,312.5,156,100,50和0 μ g/mL的合成模拟表位多肽(溶于35%甲醇PBS)或待测样品(样品粉碎后用5倍体积的70%甲醇PBS提取样品,涡旋振荡10min,5000rpm离心10min后定性滤纸过滤,加入同等体积的PBS稀释)50 μ L,再全部加入以PBS稀释的抗赭曲霉毒素A抗体50 μ L,同时设置空白对照(以PBST代替抗体),37 $^{\circ}$ C,保温保湿1小时;

D、PBST洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加100 μ L辣根过氧化物酶标记的抗抗体(酶标二抗),37 $^{\circ}$ C,保温保湿1小时

E、PBST洗板三次,每次在厚叠吸水纸上扣干。每孔加OPD或TMB底物液100 μ L,37 $^{\circ}$ C保温保湿避光反应10分钟后,每孔加入50 μ L 2M H_2SO_4 终止反应,以空白对照孔调零,在酶标仪上测定酶标板492nm(OPD)或450nm(TMB)的吸光值,计算各浓度的结合率,结合率(%) = $B/B_0 \times 100\%$ (B_0 为合成模拟表位多肽浓度为0时的吸光值,B为合成模拟表位多肽各浓度的吸光值),同样计算各待测样品孔的结合率(B为待测样品孔的吸光值),以各合成模拟表位多肽浓度的常用对数值(1gC)为横坐标,各浓度合成模拟表位多肽相应的结合率($B/B_0\%$)为纵坐标制作竞争抑制曲线。

[0108] F、以各待测样品孔的结合率对应的纵坐标,查标准曲线对应的横坐标,再通过步骤(3)确定的合成模拟表位多肽与赭曲霉毒素A标准品的剂量关系的标准曲线,即可得出样品中赭曲霉毒素A的含量,或可用酶联免疫吸附检测方法专用分析软件对数据进行分析得出结果。

[0109] 结果:

根据赭曲霉毒素A的浓度和结合率绘制赭曲霉毒素A竞争抑制曲线,根据合成模拟表位多肽的浓度和结合率绘制多肽竞争抑制曲线(图5),通过参照标准曲线中相同结合率可得出标准品赭曲霉毒素A与合成模拟表位多肽的剂量关系(图6)。利用多肽做标准品得出的标准品竞争抑制曲线见图7。通过图6和图7,根据不同样品在ELISA实验中测得的结合率,就可测定样品中赭曲霉毒素A的含量。

[0110] 实施例 18

将实施例 17 中的合成模拟表位多肽替换成高密度模拟表位肽,其余同实施例 17。

[0111] 实施例 19

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为黄曲霉毒素 B_1 、黄曲霉毒素 B_1 标准品、黄曲霉毒素 B_1 抗体、黄曲霉毒素 B_1 高密度模拟表位蛋白,其余同实施例 17。

[0112] 实施例 20

将实施例 19 中的合成模拟表位多肽替换成高密度模拟表位肽,其余同实施例 19。

[0113] 实施例 21

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为玉米赤霉烯酮、玉米赤霉烯酮标准品、玉米赤霉烯酮

抗体、玉米赤霉烯酮高密度模拟表位蛋白,其余同实施例 17。

[0114] 实施例 22

将实施例 21 中的合成模拟表位多肽替换成高密度模拟表位肽,其余同实施例 21。

实施例 23

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为桔霉素、桔霉素标准品、桔霉素抗体、桔霉素高密度模拟表位蛋白,其余同实施例 17。

[0115] 实施例 24

将实施例 23 中的合成模拟表位多肽替换成高密度模拟表位肽,其余同实施例 23。

实施例 25

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为艾滋病抗原、艾滋病抗原标准品、艾滋病抗体、艾滋病抗原高密度模拟表位蛋白,其余同实施例 17。

[0116] 实施例 26

将实施例 25 中的合成模拟表位多肽替换成高密度模拟表位肽,其余同实施例 25。

实施例 27

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为甲型 H1N1 流感病毒抗原、甲型 H1N1 流感病毒抗原标准品、甲型 H1N1 流感病毒抗体、甲型 H1N1 流感病毒抗原高密度模拟表位蛋白,其余同实施例 17。

[0117] 实施例 28

将实施例 27 中的合成模拟表位多肽替换成高密度模拟表位肽,其余同实施例 27。

实施例 29

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为流感病毒 H3N2 抗原、流感病毒 H3N2 抗原标准品、流感病毒 H3N2 抗体、流感病毒 H3N2 高密度抗原表位蛋白,其余同实施例 17。

[0118] 实施例 30

将实施例 29 中的合成模拟表位多肽替换成高密度抗原表位肽,其余同实施例 29。

实施例 31

将实施例 17 中的赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 A 标准品、抗赭曲霉毒素 A 抗体、赭曲霉毒素 A 高密度模拟表位蛋白分别替换为丙肝抗原、丙肝抗原标准品、丙肝抗体、丙肝抗原高密度抗原表位蛋白,其余同实施例 17。

[0119] 实施例 32

将实施例 31 中的合成模拟表位多肽替换成高密度抗原表位肽,其余同实施例 31。

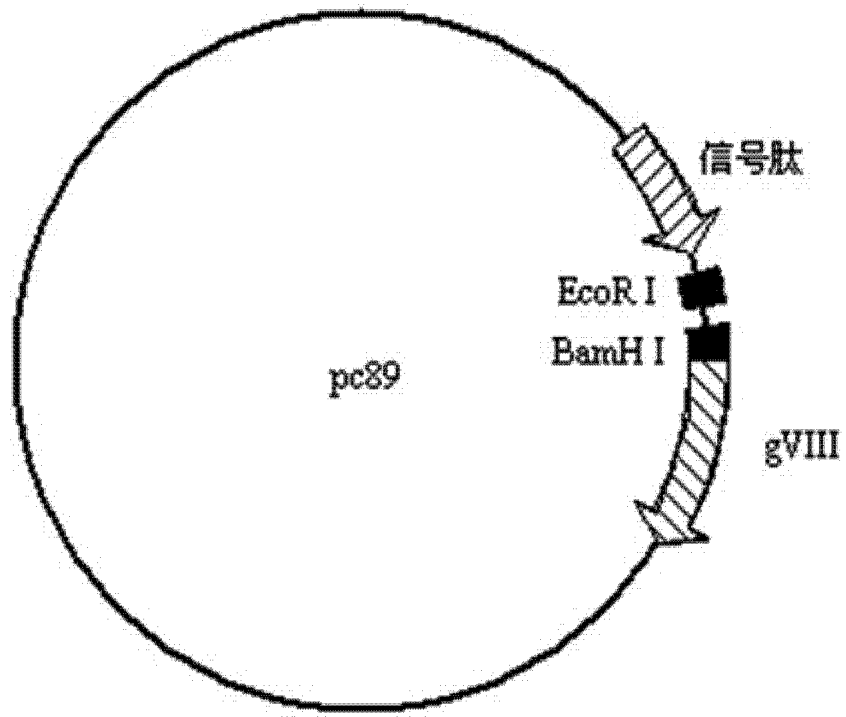


图 1

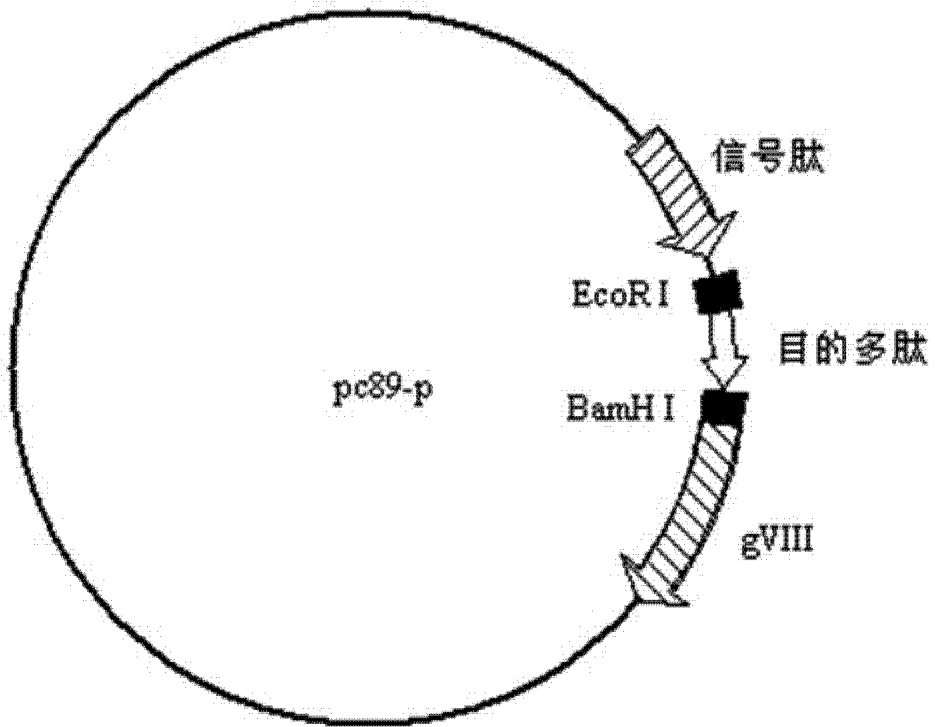


图 2

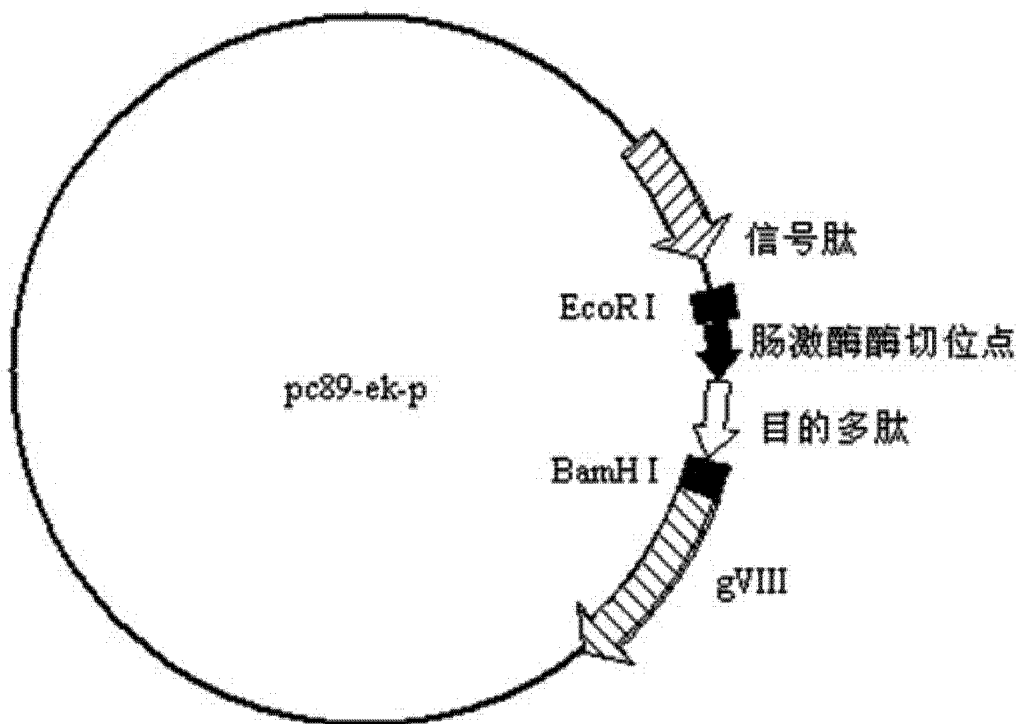


图 3

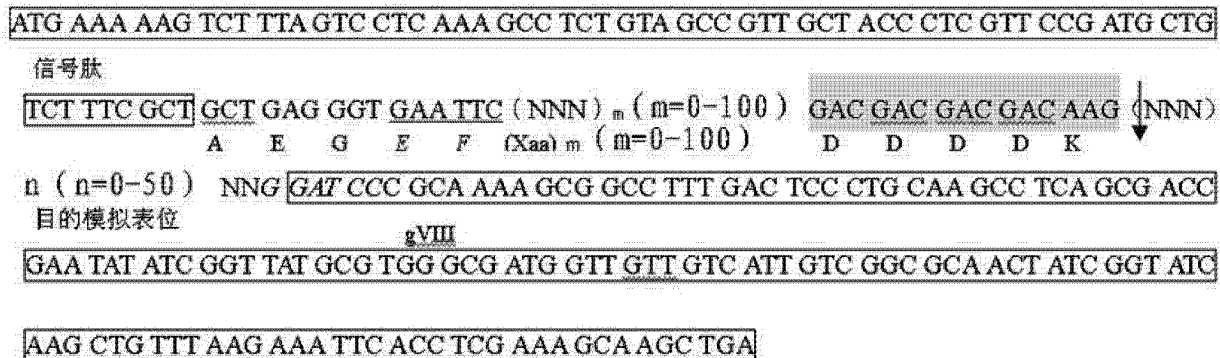


图 4

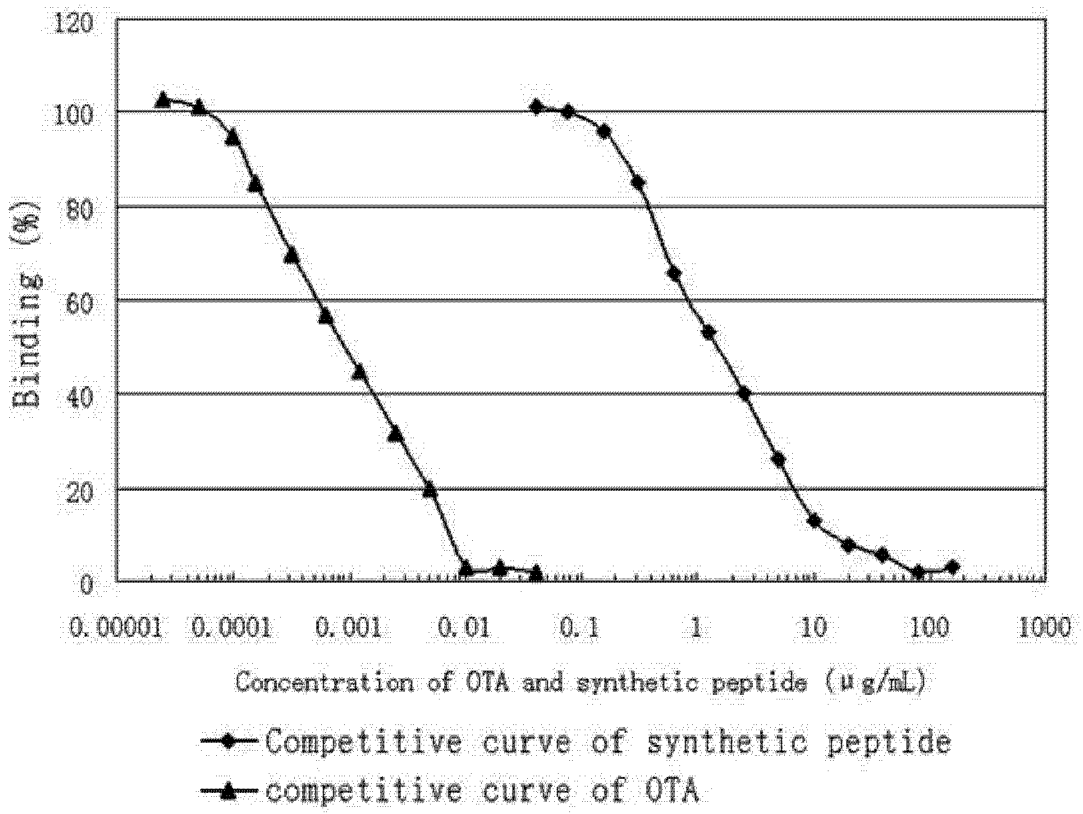


图 5

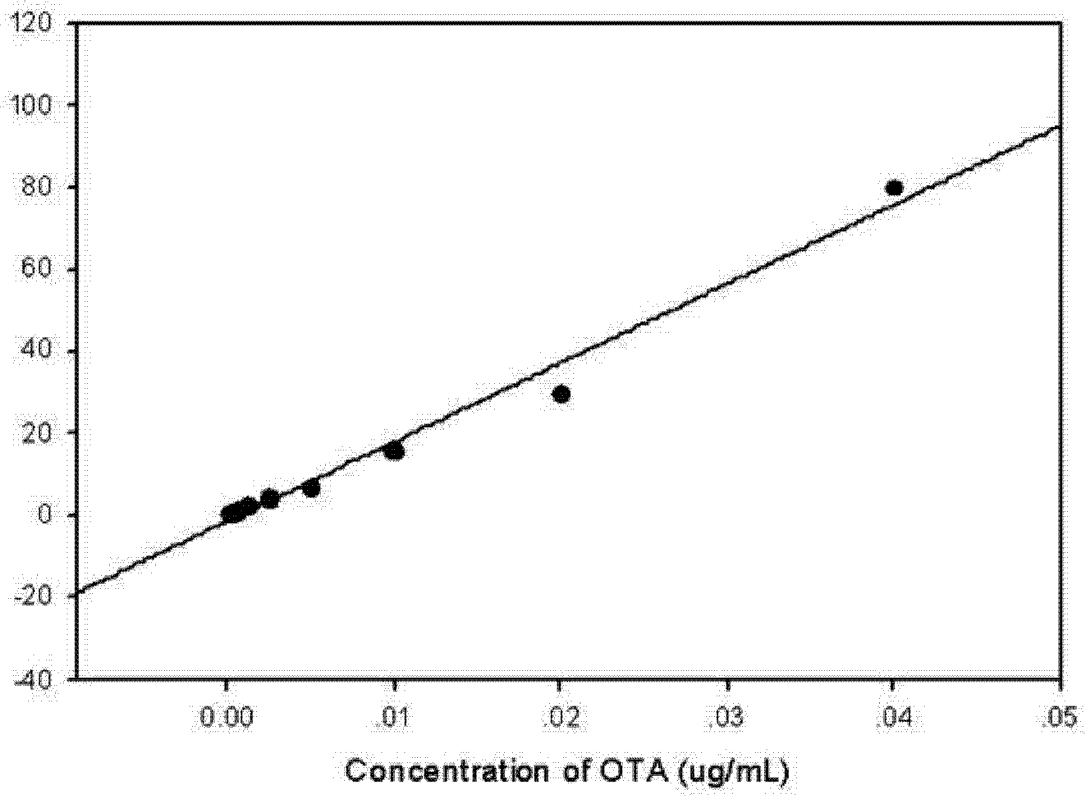


图 6

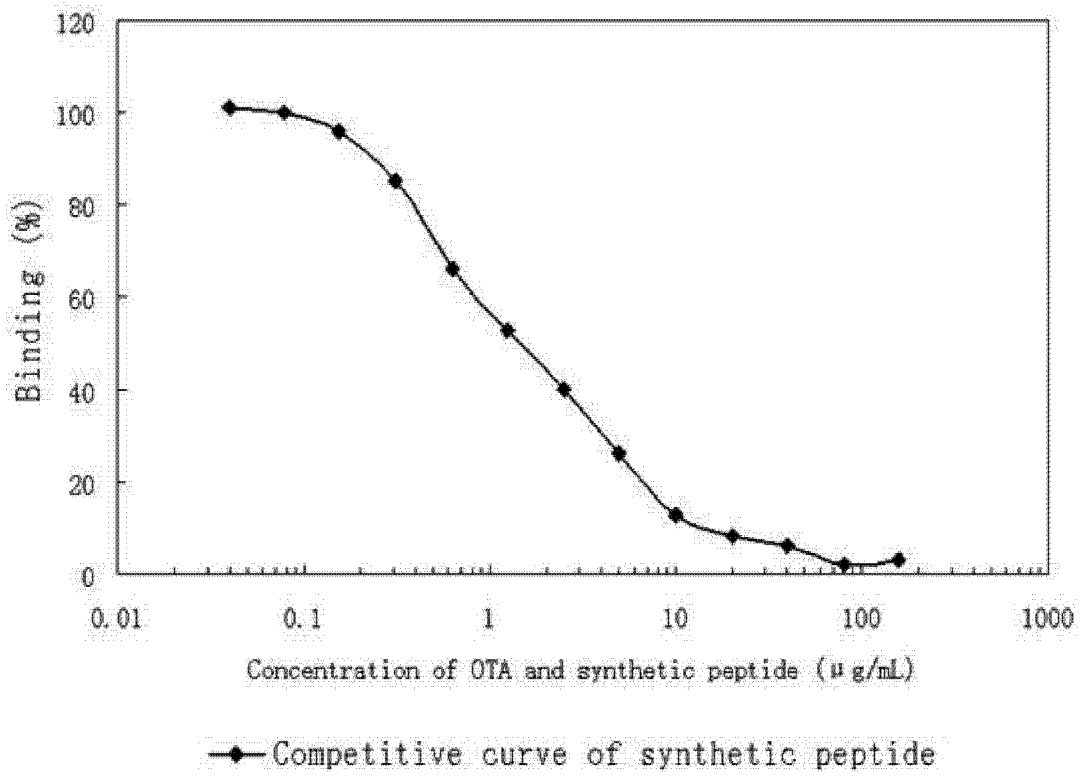


图 7

专利名称(译)	一种在丝状噬菌体上高密度表达目的多肽的方法和应用		
公开(公告)号	CN102181461A	公开(公告)日	2011-09-14
申请号	CN201110002914.8	申请日	2011-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
申请(专利权)人(译)	江西科技师范学院		
当前申请(专利权)人(译)	江西科技师范学院		
[标]发明人	刘仁荣 徐玲		
发明人	刘仁荣 徐玲		
IPC分类号	C12N15/63 C12N7/01 C07K2/00 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/12 A61K39/145 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/20		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，通过构建能表达成含肠激酶酶切位点天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸 (DDDDK) 序列与目的多肽核酸序列的重组噬菌体，使目的多肽N端连接肠激酶酶切位点，表达产物经肠激酶作用，将氨基端的肠激酶酶切位点DDDDK切除，使目的多肽直接位于丝状噬菌体主要衣壳蛋白氨基端。有效地保留了pC89原有的表达密度高等优点，又解决了pC89表达的多肽氨基端必定携带五个氨基酸残基的缺陷，保证了多肽直接暴露于主要衣壳蛋白氨基端，进一步增强了多肽的特异性，使得表达出来的模拟表位肽与抗体的结合效率提高了10倍以上。

