

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年1月14日 (14.01.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/004904 A2

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/44 (2006.01) C07K 14/11 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01) C12R 1/93 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/088748
- (22) 国际申请日: 2015年9月1日 (01.09.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410328217.5 2014年7月10日 (10.07.2014) CN
- (71) 申请人: 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 (INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES, CHINA) [CN/CN]; 中国北京市丰台区东大街20号中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, Beijing 100071 (CN)。
- (72) 发明人: 吴军 (WU, Jun); 中国北京市丰台区东大街20号中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, Beijing 100071 (CN)。 刘波 (LIU, Bo); 中国北京市丰台区东大街20号中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, Beijing 100071 (CN)。 唱韶红 (CHANG, Shaohong); 中国北京市丰台区东大街20号中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, Beijing 100071 (CN)。 巩新 (GONG, Xin); 中国北京市丰台区东大街20号中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, Beijing 100071 (CN)。 王莎 (WANG, Sha); 中国北京市丰台区东大街20号中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, Beijing 100071 (CN)。
- (74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路9号5号楼15A层, Beijing 100055 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 不包括国际检索报告, 在收到该报告后将重新公布(细则 48.2(g))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则 26 之二.3 和 48.2(b)(vii))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING INFLUENZA HEMAGGLUTININ GLYCOPROTEIN POLYMER NANOPARTICLES

(54) 发明名称: 一种流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for preparing influenza virus hemagglutinin glycoprotein polymer nanoparticles. The method prepares an influenza virus hemagglutinin glycoprotein polymer having a complete space structure. Disclosed is a method for preparing influenza virus hemagglutinin glycoprotein polymer nanoparticles, comprising the following steps: enabling the expression of the encoding gene of an influenza virus hemagglutinin (HA), of which the N-terminal upstream contains a signal peptide sequence and contains a C-terminus transmembrane domain sequence, in yeast; conducting cell breaking on the yeast, adding a removal agent so as to obtain a solution containing influenza virus hemagglutinin glycoproteins; purifying the solution and preparing to obtain influenza virus hemagglutinin glycoprotein polymer nanoparticles with hemagglutinin activity. Using recombinant yeast to prepare influenza virus hemagglutinin glycoprotein polymer nanoparticles also has the advantages of short cycles of engineered strain building, rapid growth, high safety, and being adaptable to scalable production.

(57) 摘要: 本发明公开了一种流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的制备方法, 利用该方法可以制备出空间结构完整的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物。本发明公开一种制备流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的方法, 包括如下步骤: 使N端上游含有信号肽序列、并包含C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素HA的编码基因在酵母中表达; 将所述酵母进行细胞破碎, 加入去污剂, 获得含流感病毒血凝素糖蛋白的溶液; 将所述溶液进行纯化, 制备得到具有血凝活性的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒。用重组酵母制备流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒还具有工程菌株构建周期短、生长快、易于大规模生产、安全性高等特点。

WO 2016/004904 A2

一种流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备方法

技术领域

5 本发明涉及一种流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备方法，属于生物技术领域。

背景技术

10 流行性感冒简称流感，是由甲、乙、丙三型流感病毒分别引起的急性呼吸道传染病。流感疫苗接种是预防流感的重要手段。流感血凝素是流感病毒表面的主要蛋白之一，以三聚体形式存在，是流感病毒表面参与宿主细胞吸附和入侵的重要成分，其诱发的中和性抗体可以阻断病毒在宿主细胞表面的吸附和入侵，因此是流感疫苗的主要成分。流感血凝素变异、重配快，各种新型流感频发，如近年来爆发的 H5N1 高致病性禽流感、H1N1 甲型流感、H7N9 高致病性禽流感等均引起了严重的问题。新疫情爆发后，疫苗的快速研发和生产是疫情控制的关键。

15 现有的流感疫苗主要是全病毒灭活疫苗、裂解疫苗或在此基础上纯化获得的亚单位疫苗，这些疫苗都是通过流感病毒减毒株或重配株的鸡胚培养获得病毒，经病毒纯化、灭活或进一步裂解、纯化制备的。鸡胚流感疫苗生产技术存在的主要问题是，病毒生产受限于合格鸡胚的供应，病毒毒株的重配、减毒和鸡胚适应需要大量时间，且存在不确定性。制备的疫苗除作为主要有效成分的流感血凝素外，还含有病毒的其它蛋白，及鸡胚来源蛋白。疫苗的蛋白纯度低，易引起过敏等副反应。且 20 有些亚型的病毒经灭活剂甲醛等的灭活后，抗原性可能发生改变，导致疫苗部分无效。近年来哺乳动物细胞替代鸡胚培养流感病毒的技术取得发展，但该技术只解决了鸡胚供应受限和 GMP 生产的问题，上述其它问题依然存在。而且还受限于细胞规模化生产的能力。通过基因工程技术，重组表达和制备高度纯化的流感血凝素可望为这些问题的解决提供新途径。

25 流感病毒血凝素 HA 蛋白的命名来源于病毒颗粒通过 HA 蛋白与特异性含唾液酸的受体结合，凝集血红细胞。其合成是首先经转录、翻译后在细胞内质网合成含有 562~566 个氨基酸的 HA 蛋白前体 (HA0)，即血凝素前体；流感病毒 RNA 编码的血凝素 (HA) 成熟蛋白约含 550 个氨基酸残基，包括重链 (HA1) 和轻链 (HA2) 两部分，两者中间的碱性氨基酸位点在成熟病毒颗粒向细胞外芽生释放时，受细胞特异 30 蛋白酶水解切开，成为通过二硫键相连的 HA1 和 HA2。而未经蛋白酶切割前的流感血凝素又被称为流感血凝素前体 (HA0)。这种特异性切割是流感病毒与宿主细胞膜融合必须的，但与流感血凝素与受体的结合无关，特异蛋白酶切割前后的流感血凝素都具有相同的抗原性和受体结合活性，HA0 分子水解为 HA1 和 HA2，是病毒感染性的先决条件。为方便叙述，除特殊说明外，本发明所述流感血凝素或 HA 均包 35 括流感血凝素前体 (HA0) 和特异蛋白酶切割后形成的二硫键相连的 HA1 和 HA2。

流感血凝素 HA 单体的分子量约为 60KD，流感病毒表面的 HA 以三聚体 (HA-trimer) 形式组成刺突，这种三聚体结构是其与唾液酸受体结合必需的。一

些动物如鸡、豚鼠等的红细胞表面具有能与流感病毒 HA 三聚体结合的唾液酸化糖基。病毒表面的多个 HA 刺突与不同红细胞表面的多个唾液酸化糖基结合，红细胞表面的多个唾液酸化糖基又与多个病毒表面的 HA 刺突结合，可形成病毒与红细胞的互相交联，形成血凝现象。由于流感病毒感染宿主细胞时的黏附过程也是通过流感病毒 HA 三聚体与宿主细胞表面的唾液酸化糖基结合实现的。因此血凝活性是检验 HA 受体结合活性的重要方法，血凝抑制实验是研究抗体是否具有阻断流感病毒 HA 三聚体与受体结合的中和活性的重要方法。不同表达系统和制备方法获得的重组 HA 在结构、糖基化、诱导中和抗体的能力等方面存在明显不同。Athmaram, TN 等用酵母成功分泌表达并纯化获得了 2009 新型 H1N1 流感的 HA0，但制备的 HA0 用 FPLC 纯化时主要以单体和少量三聚体形式存在，以 10 μ g/只和 50 μ g/只的剂量两次免疫小鼠后血凝抑制活性仅为 1:32。未见酵母制备流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的报道。

发明公开

本发明提供了一种流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备方法。

15 本发明提供了一种制备流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的方法，包括如下步骤：使 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因（HA 基因）在酵母中表达；将所述酵母进行细胞破碎，加入去污剂，获得含流感病毒血凝素糖蛋白的溶液；将所述溶液进行纯化，制备得到具有血凝活性的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒。

20 所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 在信号肽序列之前还含有 Kozak 序列，Kozak 序列为 5' -aaacg-3'。

所述细胞破碎和加入去污剂之间具体还含有离心得沉淀的步骤。

所述加入去污剂和获得含流感病毒血凝素糖蛋白的溶液之间具体还含有离心得上清的步骤。

25 所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的分子量大于 670KD。

所述具有血凝活性的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒在电镜下呈现玫瑰花环结构，证明其至少是由 3 个以上的三聚体形成，3 个流感病毒血凝素蛋白前体 HA0 组成的 HA0 三聚体分子量约为 180KD，因而证明流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒至少由 9 个以上流感病毒血凝素蛋白前体 HA0 参与形成聚合物纳米颗粒，其中流感病毒血凝素蛋白前体 HA0 形成 HA0 三聚体。

30 上述方法中，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因在酵母中表达的方法为：将含有 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因的重组表达载体转化酵母，培养得到转化的酵母，再诱导使基因表达。

35 所述酵母可为毕赤酵母、汉逊酵母或乳酸克鲁维酵母。

所述诱导使基因表达的步骤具体为：将所述转化的酵母进行培养，并诱导基因的表达。

所述培养具体为摇瓶培养或发酵罐培养，根据控制所述编码基因表达的启动子的不同，可以采用先培养所述转化的酵母至一定密度，再诱导基因表达的方法，也可以采用在培养所述转化的酵母的同时诱导基因表达的方法，其中前一种方法更有利于提高酵母工程菌的稳定性。

- 5 所述信号肽为所述 HA 基因自身的信号肽或其它可在相应酵母中起作用的其它信号肽。所述其它可在相应酵母中起作用的其它信号肽为酿酒酵母 α 交配因子信号肽、 α 淀粉酶信号肽或白蛋白的信号肽。所述白蛋白的信号肽具体为血清白蛋白的信号肽。

10 上述任一所述的方法中，所述流感病毒的血凝素 HA 为 H1、H3、H5 或 H7 血清型流感病毒的 HA。上述任一所述的方法中，所述 H1、H3、H5 或 H7 血清型流感病毒的 HA 分别为 H1N1、H3N2、H5N1 或 H7N9 流感病毒的 HA。

上述任一所述的方法中，所述重组表达载体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入含有 AOX 启动子的载体得到。所述重组表达载体具体是将所述含有信号肽序列和 C-端穿膜区序列的流
15 感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入 pPICZ α 的 *NotI* 和 *NspV* 酶切位点间，并 *BgIII* 线性化得到。所述酵母为毕赤酵母。所述流感病毒具体为 H7N9 禽流感病毒，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因具体如 SEQ ID No. 4 所示。所述 H7N9 禽流感病毒为 A/Hongzhou/1/2013 (H7N9)。所述流感病毒具体为甲型 H1N1 流感病毒，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含
20 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因具体如 SEQ ID No. 14 所示。所述甲型 H1N1 流感病毒具体为 A/FortMonmouth/1/47 (H1N1)。所述流感病毒具体为甲型 H3N2 流感病毒，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因具体如 SEQ ID No. 21 所示。所述甲型 H3N2 流感病毒具体为 A/reassortant/NYMC X-223A (Texas/50/2012 x PuertoRico/8/1934) (H3N2)。

25 上述任一所述的方法中，所述重组表达载体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入含有 MOX 启动子的载体得到。所述重组表达载体具体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入 pPICZ α 的 *NotI* 和 *BstB I* 酶切位点间，得到中间载体 1；再将中间载体 1 的 AOX 启动子替换为汉逊酵母的醇
30 氧化酶启动子 MOX，再用 *BgIII* 线性化得到。所述酵母为汉逊酵母，具体为多型汉逊酵母。所述 MOX 启动子是以多型汉逊酵母的基因组 DNA 为模板，以 SEQ ID No. 9 和 SEQ ID No. 10 所示的 DNA 分子为引物进行 PCR 扩增得到 MOX 启动子。所述将中间载体 1 的 AOX 启动子替换为汉逊酵母的醇氧化酶启动子 MOX 的方法具体为将所述 PCR 扩增得到的 MOX 启动子进行 *BgIII* 酶切，并进行磷酸化，获得 5' 端为 *BgIII*
35 酶切粘性末端，3' 端磷酸化的 MOX 启动子；将中间载体 1 用 *NspV* 单酶切后用 Klenow fragment 大片段酶和 dNTP 补平，得到片段，回收片段后，再用 *BgIII* 酶切，切除 AOX 启动子，得到切除 AOX 启动子的中间载体 1；将 5' 端为 *BgIII* 酶切粘性末端，

3' 端磷酸化的 MOX 启动子与切除 AOX 启动子的中间载体 1 连接。所述流感病毒具体为 H5N1 禽流感病毒, 所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因具体如 SEQ ID No. 8 所示。所述 H5N1 禽流感病毒具体为 A/duck/Guangxi/27/2003 (H5N1)。

5 上述任一所述的方法中, 所述重组表达载体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入含有 LAC4 启动子的载体得到。所述重组表达载体具体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入 pKLAC1 的 *Hind*III 和 *Not*I 酶切位点间, 再用 *Sac*II 线性化得到。所述酵母为乳酸克鲁维酵母。所述流感病毒
10 具体为 H7N9 禽流感病毒, 所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因具体如 SEQ ID No. 17 所示。所述 H7N9 禽流感病毒具体为 A/Hongzhou/1/2013 (H7N9)。

上述任一所述的方法中, 所述细胞破碎的方法为物理方法、生物方法或化学方法。所述物理方法具体为玻璃珠振荡法、高压匀浆法或球磨法。所述生物方法具体
15 为酶裂解法。所述化学方法具体为碱裂解法。所述去污剂为非离子型去污剂或弱离子型去污剂。所述非离子型去污剂具体为曲拉通、吐温或乙基苯基聚乙二醇。所述弱离子型去污剂具体为脱氧胆酸盐或 3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸盐。所述曲拉通具体为 TritonX-100。所述吐温具体为 Tween20。所述乙基苯基聚乙二醇具体为 NP-40。

20 所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒表达后位于所述酵母的细胞膜上。所述去污剂的作用是从所述酵母细胞膜上溶解所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒并较好地保持其结构。

上述任一所述的方法中, 所述将所述溶液进行纯化的方法包括阳离子交换层析和/或阴离子交换层析和/或凝胶排阻层析。所述阳离子交换层析的填料具体为
25 Sepharose FF SP。所述阴离子交换层析的填料具体为 Source 30Q。所述凝胶排阻层析的填料具体为 Superdex200。

所述纯化过程中根据各步骤纯化组分是否有 HA 条带和血凝活性判断其是否含有所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的组分, 如果该组分有 HA 条带和血凝活性就为含有所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的组分。

30 所述纯化后获得的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒中非流感病毒血凝素蛋白含量 $\leq 20\%$, 具体为 $\leq 10\%$;

所述 HA 包含流感病毒血凝素前体 HA0 和特异蛋白酶切割后形成的二硫键相连的 HA1 和 HA2。

由上述任一所述的方法制备得到的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒制
35 备的流感疫苗也属于本发明的保护范围;

所述疫苗具体还包含佐剂。所述佐剂具体为铝佐剂, 例如氢氧化铝佐剂。

附图说明

图 1 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的阳离子交换层析的检测结果。

图 2 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的阴离子交换层析的检测结果。

5 图 3 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的凝胶排阻色谱层析的检测结果。

图 4 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的糖基化检测。

10 图 5 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的 TPCK 处理的胰蛋白酶酶切结果。

图 6 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的血凝活性检测。

图 7 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的分子排阻色谱分析。

15 图 8 为重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的电子显微镜照相。

图 9 为用重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒制备的流感疫苗效果评价。

20 图 10 为重组汉逊酵母制备的 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的糖基化检测。

图 11 为重组汉逊酵母制备的 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的分子排阻色谱分析。

图 12 为重组汉逊酵母制备的 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的血凝活性检测。

25 图 13 为重组汉逊酵母制备的 H5N1 高致病性禽流感病毒血凝素糖蛋白聚合物的流感疫苗效果评价。

图 14 为重组毕赤酵母制备的 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的糖基化检测。

30 图 15 为重组毕赤酵母制备的 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的分子排阻色谱分析。

图 16 为重组毕赤酵母制备的 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的血凝活性检测。

图 17 为用重组毕赤酵母制备的 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒得到的流感疫苗效果评价。

35 图 18 为重组乳酸克鲁维酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的糖基化检测。

图 19 为重组乳酸克鲁维酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的

分子排阻色谱分析。

图 20 为重组乳酸克鲁维酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的血凝活性检测。

5 图 21 为用重组乳酸克鲁维酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒得到的流感疫苗效果评价。

图 22 为重组毕赤酵母制备的 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的糖基化检测。

图 23 为重组毕赤酵母制备的 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的血凝活性检测。

10 图 24 为用重组毕赤酵母制备的 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒得到的流感疫苗效果评价。

图 25 为实施例 7 中的血凝活性检测。

图 26 为实施例 8 中的血凝活性检测。

图 27 为实施例 9 中的血凝活性检测。

15 实施发明的最佳方式

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。为方便叙述，除特殊说明外，本发明所述流感血凝素或 HA 均包括流感血凝素前体 (HA0) 和特异蛋白酶切割后形成的二硫键相连的 HA1 和 HA2。pPICZ α 载体购自 Invitrogen 公司。毕赤酵母 X-33 购自 Invitrogen 公司。TPCK 处理胰蛋白酶 (TPCK-Trypsin) 购自 Sigma 公司。Pyrobest DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。pKLAC1 购自 NEB。乳酸克鲁维酵母购自 NEB。H7N9 流感重配疫苗株 (NIBRG-268) 在文献“杨娟, 郑亚明, 冯录召, 余宏杰. 人用 H7N9 禽流感疫苗研发进展, 中华预防医学杂志, 2014, 48 (2)”中公开过, 公众可从中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所获得。

实施例 1、重组毕赤酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒

一、重组表达载体的构建

30 (一) 根据 Genbank (KC853766) (A/Hongzhou/1/2013 (H7N9)) 的流感 HA 全长氨基酸序列, 根据酵母偏爱密码子和基因高表达原则优化编码基因, 合成 SEQ ID No. 1 所示的 DNA 分子。

(二) 设计并合成如下引物:

HA7-3: 5' -ATCGCGCCGCTTAAATACAGATAGTACATCTCAT-3' (SEQ ID No. 2)

35 下划线所示序列为 *NotI* 酶切识别位点。

HA7-5: 5' -ATCTTCGAAACGATGAACACCCAAATACTGGTTTTTC-3' (SEQ ID No. 3)

下划线所示序列为 *NspV* 酶切识别位点。

(三) 以 SEQ ID No. 1 所示的 DNA 分子为模板, 以 HA7-3 和 HA7-5 为引物, 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 扩增产物, 该产物的序列如 SEQ ID No. 4 所示, SEQ ID No. 4 中自 5' 末端起第 8 位至第 12 位为 Kozak 序列, 第 13 至第 66 位为信号肽编码序列, 第 67 位至第 1695 位为 HA 基因, 第 1585 至第 1668 位为 C 端穿膜区序列。

- 5 (四) *NspV* 和 *NotI* 双酶切 SEQ ID No. 4 所示的 DNA 分子, 得到基因片段; *NspV* 和 *NotI* 双酶切 pPICZ α 载体得到载体大片段; 将基因片段与载体大片段连接, 得到重组质粒, 将其命名为 pPICZ α -HA7。将 pPICZ α -HA7 测序, 结果正确。

二、重组酵母的构建和筛选

- 10 将约 10 μ g pPICZ α -HA7 质粒, 用 *Bgl*III 线性化, 用 1/10 体积的 3M 醋酸钠水溶液和 3 倍体积的无水酒精沉淀线性化的质粒。用体积百分含量为 70% 的乙醇水溶液洗两次以除去其中的盐, 晾干, 加入约 30 μ L 水重悬沉淀, 获得用于转化的 pPICZ α -HA7 线性化质粒。

- 15 以下步骤中制备酵母电转化感受态细胞的方法参照 Invitrogen 公司的相关手册和 “Molecular Cloning, A laboratory Manual (Fourth Edition)”, 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York。

- 20 将毕赤酵母 X-33 在 YPD 平板(酵母提取物 10g/L, 胰蛋白胨 20g/L, 葡萄糖 20g/L, 琼脂 15g/L) 上用划线法分离单克隆, 28 $^{\circ}$ C 温箱培养 2 天。接种一个单克隆至一个装有 10mL YPD 液体培养基(酵母提取物 10g/L, 胰蛋白胨 20g/L, 葡萄糖 20g/L) 的 50mL 三角瓶中, 28 $^{\circ}$ C 过夜培养至 OD₆₀₀ 约为 2, 得到菌液。再将 0.1-0.5mL 菌液接种到含有 500mL YPD 液体培养基的 3.5L 摇瓶中, 培养过夜至 OD₆₀₀ 至 1.3-1.5 之间。将菌液转移至无菌的离心瓶中, 4 $^{\circ}$ C, 1500g 离心 10 分钟。用 500mL 预冷的无菌水重悬菌体, 4 $^{\circ}$ C, 1500g 离心 10 分钟收获细胞, 用 250mL 预冷的无菌水再洗一次。用 20mL 预冷的无菌 1M 山梨醇重悬菌体, 4 $^{\circ}$ C, 1500g 离心 10 分钟收获细胞, 用预冷的 1M 山梨醇重悬菌体至终体积为 1.5mL, 得到菌悬液。

- 25 取 80 μ L 菌悬液与 10 μ L 用于转化的 pPICZ α -HA7 线性化质粒, 在微量离心管中混匀, 得到混合物, 将其置冰上 5min, 将混合物转移到一个冰冷的 0.2cm 电转杯中, 电穿孔细胞 (Bio-Rad Gene Pulser, 2000V, 25 μ F, 200 Ω), 再立即向电转杯中加入 1mL 冰冷的 1M 山梨醇, 并小心地将混合物(转化细胞)转移至 15mL 培养管。

- 30 将培养管放在 28 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1h, 不要摇动。然后加入 1mL YPD 液体培养基后在 28 $^{\circ}$ C, 250rpm 的摇床中孵育 3h。取 200 μ L 转化细胞涂布到含 100 μ g/mL Zeocin 的 YPD 平板上。28 $^{\circ}$ C 温箱培养 2-5 天, 至形成单克隆。

- 35 随机挑取单克隆接种到 2ml YPD 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 48h, 按体积比 5% 的接种量接种到 BMGY 培养基(酵母提取物 10g/L, 胰蛋白胨 20g/L, pH6.0, 100mmol/L 磷酸缓冲液, 1.34g/100ml 的 YNB, 4 \times 10⁻⁵g/100ml Biotin, 1g/100ml 的甘油) 中, 24h 后加入体积百分含量为 0.5% 的甲醇诱导表达, 每 12h 补加 1 次, 诱导 60h 后离心收集菌体。每 1ml 菌液离心收获的菌体用 100 μ l PBS 重悬, 加入 1/4 体积的酸洗玻璃珠(直径 425-600 μ m 或 0.5mm), 每个样品以最大速度涡旋震荡 1 分钟,

重复六次,每两次涡旋震荡中间冰浴两分钟以防蛋白降解。用低温微量离心机 4℃, 3500g 离心 1 分钟,沉淀玻璃珠和未破损的细胞,得到上清即为破菌液。取破菌液先用 PBS 按照 1:20 体积比稀释后,再用 PBS 按照 1:2 体积比系列稀释后,用 1% 鸡红细胞进行血凝活性分析(方法见“郭元吉等《流行性感病毒及其实验技术》,北京,中国三峡出版社,1997)。挑取具有血凝活性的破菌液对应的克隆(重组毕赤酵母单克隆),用于流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备。

三、工程酵母发酵

种子培养:将步骤二得到的血凝活性高的重组毕赤酵母单克隆接种到新鲜 MD 平板(1.34g/100ml YNB, 4×10^{-5} g/100ml Biotin, 1g/100ml 葡萄糖, 1.5g/100ml 琼脂粉)上,培养,并挑取其上的单克隆菌落接种于 YPD 液体培养基中,24℃,250 rpm 培养约 48 h。再转接于 YPD 液体摇瓶培养基 300mL 中,接种量为 1%,25℃,250rpm 培养,至菌密度 OD600 大于 10,得到种子液。

发酵培养:配制发酵培养基 2.1L (H_3PO_4 3.5mL/L, K_2SO_4 2.4g/L, KOH 0.65g/L, $CaSO_4$ (无水) 0.14g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.95g/L, 甘油 40.0g/L, PTM1 1.2mL/L, 0.02g/100ml 的生物素 0.5mL/L,余量为水。其中 PTM1 的组成为: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6.0g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.0g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 65g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 20g/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5g/L, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2g/L, KI 0.1g/L, 浓 H_2SO_4 5mL/L), 加入到 5L 发酵罐,121℃,30min 高压灭菌。待发酵罐降至室温,用氨水调节 pH6.0。

以 10% 的接种量将种子液接入发酵罐,氨水控制 pH6.0,温度为 28℃,调节搅拌转速和通气量维持在溶氧 10% 以上。当甘油耗尽时,溶氧回升,开始流加补料生长培养基(50g/100ml 的甘油水溶液(含 12mL/L PTM1, 2mL/L 500×生物素(购自北京欣经科生物技术有限公司)), 40ml/h, 流加 6-8h, 停止补料。开始甲醇诱导,温度维持在 24℃,用氨水溶液将 pH 调为 6.4。起始阶段,无水甲醇以 2.4mL/h 开始流加,每小时增加 2.4mL 100% 甲醇,5h 后增至 12mL/h,此时为诱导 0 小时,之后每 12h 取样。诱导 48h 后结束发酵,发酵液于 4℃,7000 rpm/min 离心 20min。用水重悬为 40g/100ml 的悬液,高压匀浆仪破菌(1200bar, 破菌 3 次),得匀浆液,该匀浆液用于流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的纯化。

四、流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的纯化

(一) 500ml 步骤三得到的匀浆液中加 50g PEG2000, 搅拌溶解 0.5h, 7000 rpm 离心 20min, 收集沉淀, 弃上清; 沉淀加 500ml 体积的溶液(该溶液中含 10mM Tris-HCl, 体积百分含量 2% TritonX-100 (曲拉通, 非离子型去污剂), 5g/100ml 的甘油, 余量为水) 重悬, 搅拌溶解 2h。8000 rpm 离心 20min, 收集上清, 用磷酸盐调节 pH 为 6.0, 用水稀释至电导低于 2.5ms/cm, 得上样液。

(二) 阳离子色谱柱(色谱介质为 Sepharose FF SP(购自 GE), 床层为 $\emptyset 5.0 \times 15$ cm, 检测波长为 280nm, 室温) 先用 A 液平衡(A 液: 含有 1g/100ml 的 Tween20、5g/100ml 甘油, 余量为 20mM pH6.0 的 PB) 后, 将步骤(一) 的上样液以 50ml/min 流速上样, 用 A 液同样流速冲洗至 A280 小于 0.2, 换用 B 液(B 液: 含有 1g/100ml 的 Tween20、

5g/100ml 甘油, 余量为 20mM pH6.86 的 PB) 平衡, 用 15%C 液 (A 液中添加终浓度为 150mM 的 NaCl)、100%C 液洗脱 (A 液中添加终浓度为 1M 的 NaCl), 得到 15%C 液、100%C 液的洗脱峰, 结果如图 1 中 A 所示。

图 1 中, 1-6 代表 15%C 液洗脱得到的 1-6 收集管的洗脱液, 100%C 代表 100%C 液的洗脱液, 3+endoH 代表 3 收集管的洗脱液用 EndoH 酶切后的样品, 柱前代表上样液, M 代表蛋白 marker。

将图 1 中 A 的 1-6 收集管的洗脱液、100%C 液的洗脱液以及柱前样品进行还原 SDS-PAGE 分析, 结果如图 1 中 B 所示, 图 1B 中箭头所示为 HA 组分的条带。

图 1 表明, HA 组分所在的样品为 15%C 液的洗脱液。

10 (三) 收集含有 HA 组份的 15%C 液的洗脱液进行阴离子交换层析 (色谱介质为 Source 30Q (购自 GE), 床层为 $\varnothing 1.6 \times 15\text{cm}$, 检测波长为 280nm, 室温)。具体步骤如下: 将 15%C 液的洗脱样品用 A 液 (A 液: 1g/100ml Tween20、5g/100ml 的甘油, 余量为 20mM pH8.1 的 Tris-HCl) 进行 10 倍稀释, 以 10ml/min 的速度上样结束后, 用 B 液平衡 (B 液: 1g/100ml Tween20、5g/100ml 的甘油, 余量为 15 20mM pH7.5 的 Tris-HCl), 再分别用 10% C 液 (该步骤的 A 液中添加终浓度为 100mM 的 NaCl)、100%C 液洗脱 (该步骤的 A 液中添加终浓度为 1M 的 NaCl), 最后用 0.5M NaOH 水溶液进行洗脱, 得到各洗脱组分, 结果如图 2 中 A 所示。

图 2 中, Q 穿代表上样时未被 Source 30Q 结合的样品; 10%C 代表 10% C 液的洗脱液; 100%C 代表 100%C 液的洗脱液; NaOH 代表 0.5M NaOH 水溶液的洗脱液。

20 将纯化前的样品 (步骤 (二) 得到的 15%C 液的洗脱液)、没有被 Q 柱 (Source 30Q) 吸附而穿出的样品、10% C 液洗脱液 (第一管收集液以及第二管收集液、第三管收集液)、利用 100%C 液进行洗脱的收集液, 利用 0.5M NaOH 水溶液进行洗脱的收集液进行还原 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 中 B 所示。图 2B 中, Q 柱前代表纯化前的样品 (步骤 (二) 得到的 15%C 液的洗脱液), Q 穿代表没有被 Q 柱 (Source 30Q) 25 吸附而穿出的样品, 1 代表 10% C 液洗脱第一管收集液, 2 代表 10% C 液洗脱第二管收集液, 3 代表 10% C 液洗脱第三管收集液, 100%C 代表 100%C 液进行洗脱的收集液, NaOH 代表利用 0.5M NaOH 水溶液进行洗脱的收集液, M 代表蛋白 marker。箭头所示为 HA 条带。

图 2 表明, 该步骤的纯化获得了纯度提高的 HA 样品, 去除了部分杂蛋白, HA 30 组分所在的样品为该步骤的 10%C 液的洗脱液。

(四) 收集步骤 (三) 10% C 液洗脱组分 4ml, 进行凝胶排阻色谱层析 (色谱介质为 Superdex200 (购自 GE), 床层为 $\varnothing 1.6 \times 90\text{cm}$, 检测波长为 280nm, 室温), 将步骤 (三) 10% C 液洗脱组分 4ml 上样后, 用洗脱液 (洗脱液: 含有 0.1M NaCl 的 pH 7.0 的 20mM PB) 进行洗脱, 流速 1ml/min, 结果如图 3A 所示。

35 图 3A 中, 箭头表示的第一个洗脱主峰为纯化的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒, 测定其蛋白浓度为 0.33mg/ml。

将步骤 (三) 10% C 液洗脱组分、EndoH 酶切的凝胶排阻色谱层析纯化得到的

H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒以及凝胶排阻色谱层析纯化得到的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒进行还原 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3 中 B 所示。

图 3 中, 柱前代表步骤 (三) 10% C 液洗脱组分, HA+endoh 代表 EndoH 酶切的凝胶排阻色谱层析纯化得到的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒, HA 代表凝胶排阻色谱层析纯化得到的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒, M 代表蛋白 marker。箭头所示为 HA 条带。

图 3 表明, 该步纯化获得纯度较高的 HA 纯品, 并利用 EndoH 糖苷酶进行了分析, 表明其发生了正确的糖基化修饰。

五、流感病毒血凝素糖蛋白聚合物的结构分析

用 N-糖苷酶 F (PNGF) (购自 NEB) 处理, 分析糖基切除前后的分子量变化, 以分析步骤四制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒, 具体步骤如下: 取 20ul 步骤四纯化的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 (浓度为 330ug/ml), 按 N-糖苷酶 F (PNGF) 的酶切方法对其进行处理, 同时设不加酶对照组和加样品对照组。将各样品进行还原 SDS-PAGE 检测, 结果如图 4 所示。

图 4 中, PNGF 代表 N-糖苷酶 F, HA +PNGF 代表步骤四制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒中加入了 N-糖苷酶 F, HA 代表步骤四制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒, M 代表蛋白 marker。箭头所示为 HA 条带。

图 4 表明, 未用 PNGF 处理的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的 HA0 分子量约为 64KD, PNGF 处理后, 分子量下降为约 60KD, 与未糖基化的 HA0 成熟蛋白的理论分子量 (60172Da) 一致。说明步骤四制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒是糖蛋白。

组成 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的组分 HA0 的 N 端 5 个氨基酸序列分析结果为 DKIXL, 其中 X 为未测到, 这与 H7N9 病毒 HA 成熟蛋白 (HA0) N 端理论序列一致 (理论序列为 DKICL, 其中 C 在 Edman 法测序时会被破坏, 不能测到)。说明 HA 的信号肽已被成功切除。

六、胰蛋白酶切割的 HA 制备

为了制备被蛋白酶特异切割成 HA1 和 HA2 的 HA, 取浓度为 330ug/ml 的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 1ml, 加 TPCK 处理的胰蛋白酶 16ug, 冰浴处理 1 小时, 作为实验组。同时另取同样的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 1ml, 100°C 水浴处理 5 分钟进行变性, 冰浴冷却, 加 TPCK 处理的胰蛋白酶 16ug, 同样冰浴处理 1 小时, 作为对照组。

蛋白酶特异切割不仅可用于制备切割 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒, 而且也是分析 HA0 的高级结构是否正确的重要方法, 具有流感病毒三聚体高级结构的 HA0 只有 HA1 与 HA2 间的碱性氨基酸位点裸露, 才可以被胰蛋白酶特异性地切割为分子量约 40KD 的 HA1 和分子量约 25KD 的 HA2。而不具有正确高级结构的 HA0 则可以被胰蛋白酶切成大小不等的各种片段。

将 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒、实验组和对照组进行还原 SDS-PAGE,

检测结果如图 5 所示。

图 5 中，HA 代表 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，HA+胰酶为实验组，HA 变性+胰酶为对照组。箭头代表 HA0 条带。

图 5 表明，HA0 被胰蛋白酶切割后，非还原 SDS-PAGE 电泳分析其分子量为 64KD 与未切割 HA0 相似，而还原电泳分析发现，HA0 已被特异性切割成了分子量为 40kD 和 24kD 的两个片段，与 HA1 和 HA2 的分子量一致。说明本发明获得的 HA0 被胰蛋白酶特异性切割成了由二硫键连接的 HA1 和 HA2 亚基构成的 HA。而该 HA0 经加热破坏高级结构后，再用胰酶切割，非还原电泳和还原电泳分析均未发现特异性条带，说明 HA0 已被胰蛋白酶切成了大小不等的各种片段。因此本发明的 HA0 具有流感病毒血凝素相同的高级结构。

七、血凝实验

取上述制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，先用 PBS 按照体积比 1: 10 稀释，然后再用 PBS 按照体积比 1: 2 系列稀释，以生理盐水为对照，用 1% 鸡红细胞进行血凝活性分析，具体方法见“郭元吉等《流行性感病毒及其实验技术》，北京，中国三峡出版社，1997”。

血凝活性检测结果如图 6 所示。

图 6 中，第一排从左至右为从 1: 20 开始 2 倍系列稀释的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，第二排为生理盐水对照。

图 6 表明，H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒具有明显的血凝活性，鸡血凝效价达到 1: 8000。因此本发明的流感血凝素（H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒）具有唾液酸受体结合活性。

八、为了分析制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的分子大小，对其进行 SEC(分子排阻凝胶色谱)分析，仪器为 Agilent1290 高效液相色谱仪(Agilent Technologies Co)，紫外检测器，检测波长 214nm，TSKG4000SW_{XL} Ø7.8×30cm 色谱柱和 TSK Guardcolumn SW_{XL} 保护柱（购自 Tosoh Bioscience LLC）分析，以含有 100mM NaCl 的 20mM PB 为流动相，流速 0.5ml/min。用 SEC 分子量标准（购自苏州赛分科技有限公司）分析标定，结果如图 7 所示。

图 7 中，A 的上图为分子量标准蛋白的色谱图，各分子量的保留时间分别为：670KD, 20.593min; 150KD, 22.478min; 44KD, 24.074min; 17.6KD, 25.363min; 1.35KD, 26.966min)。A 的下图为 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的色谱图。

图 7B 中的面积百分比报告如下：

图 9 中, 纵坐标为血凝抑制效价 (HI), 横坐标为分组, 0.0 为对照组, 7.5 为实验组。图 9 表明, 对照组小鼠的血清没有产生血凝抑制, 实验组小鼠血清血凝抑制效价均大于 1: 40, 平均血凝抑制效价为 1: 640。一般认为流感疫苗诱导的血凝抑制效价大于 1: 40 即可为机体提供有效的免疫保护。因此, 用重组酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒可以用于制备流感疫苗。

实施例 3、汉逊酵母制备的 H5N1 高致病性禽流感病毒血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒

一、重组表达载体的构建

10 (一) 根据 Genbank (EU263353.1) (A/duck/Guangxi/27/2003(H5N1)) 的流感 HA 全长氨基酸序列, 根据酵母偏爱密码子和基因高表达原则优化编码基因, 合成 SEQ ID No. 5 所示的 DNA 分子。

(二) 设计并合成如下引物:

15 HA5-5: 5' -ATCTTCGAAACGatggagaaaatagtgtcttc-3' (SEQ ID No. 6)
下划线所示序列为 *BstB* I 酶切识别位点。

HA5-3: 5' -ATCGCGCCGCttaaattgcaaattctgcattg-3'。(SEQ ID No. 7)
下划线所示序列为 *NotI* 酶切识别位点。

20 (三) 以 SEQ ID No. 5 所示的 DNA 分子为模板, 以 HA5-3 和 HA5-5 为引物, 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 扩增产物, 该产物的序列如 SEQ ID No. 8 所示, 该序列从自 5' 末端起依次包含了 Kozak 序列、信号肽编码序列、HA 基因 (包含 C 端穿膜区序列)。

NotI 和 *BstB* I 双酶切 SEQ ID No. 8 所示的 DNA 分子, 得到基因片段; *NotI* 和 *BstB* I 双酶切 pPICZ α 载体得到载体大片段; 将基因片段与载体大片段连接, 得到重组质粒, 将其命名为 pPICZ-^(H5N1)HA。将 pPICZ-^(H5N1)HA 测序, 结果正确。

25 (四) 为了适应在汉逊酵母中表达, 将 pPICZ-^(H5N1)HA 中的 AOX 启动子替换为汉逊酵母的醇氧化酶启动子 MOX。

1、根据汉逊酵母启动子的核苷酸序列, 合成引物 MOX5: 5' -ATCAGATCTTCGACGCGGAGAACGATCT-3' (SEQ ID No. 9, 下划线部分为 *BglII* 酶切识别位点) 和 MOX3: 5' -TGTTTTGTACTTTAGATTGATG-3' (SEQ ID No. 10)。

30 2、以多型汉逊酵母 ATCC 26012 (可美国典型微生物菌种保藏中心获得) 基因组为模板, 以 MOX5 和 MOX3 为引物, 利用 Pyrobest DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 得到 MOX 启动子片段。

PCR 体系: 1 μ g 基因组 DNA, 4 μ l dNTP (2.5mM), 5 μ l 10 \times Pyrobest Buffer, 1 μ l 10 μ M MOX5 引物, 1 μ l 10 μ M MOX3 引物, 0.5 μ l Pyrobest DNA 聚合酶, 37.5 μ l 水, 总体积 50 μ l。

PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec, 55 $^{\circ}$ C 退火 30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增产物为约 1.5kb 的目的片段，将其用 *Bg*/III 酶切，并对酶切片段进行磷酸化，获得 5' 端为 *Bg*/III 酶切粘性末端，3' 端磷酸化的 1.5kb 的 MOX 启动子。

3、将 pPICZ-^(H5N1)HA 载体用 *Nsp*V 单酶切后用 Klenow fragment 大片段酶和 dNTP 补平，电泳回收后，再用 *Bg*/III 酶切，切除 AOX 启动子。

5 电泳回收切除 AOX 启动子片段的载体，将该载体与上述 5' 端为 *Bg*/III 酶切粘性末端，3' 端为磷酸化的 1.5kb 的 MOX 启动子连接，获得用汉逊酵母醇氧化酶启动子 MOX 控制的 H5N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒基因表达的载体，记作 pMOXZ-HA5。

二、将 pMOXZ-HA5 载体用 *Bg*/III 线性化后，电转化多型汉逊酵母 (ATCC 26012
10 (可美国典型微生物菌种保藏中心获得))，并将转化的细胞涂布到含 100 μg/mL Zeocin 的 YPD 平板(酵母提取物 10g/L, 胰蛋白胨 20g/L, 葡萄糖 20g/L, 琼脂 15g/L) 上。30° C 温箱培养 2-4 天，至形成单克隆。随机挑取单克隆接种到 2ml YPD (酵母提取物 10g/L, 胰蛋白胨 20g/L, 葡萄糖 20g/L) 液体培养基中，30°C 培养 24-48h，
15 按 5% 的接种量接种到 BMGY 培养基 (酵母提取物 10g/L, 胰蛋白胨 20g/L, pH6.0, 100mmol /L 磷酸缓冲液, 1.34g/100ml 的 YNB, 4×10⁻⁵g/100ml Biotin, 1g/100ml 的甘油) 中，24h 后加入体积百分含量为 0.5% 甲醇诱导表达，每 12h 补加 1 次，诱导 60h 后离心收集菌体和上清。破菌液的制备以及血凝活性分析同实施例 1 中步骤二。筛选高血凝活性的阳性菌株命名为 Hans (pMOX-HA5)。

三、H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备

20 挑取 Hans (pMOX-HA5) 单菌落接种于 3ml YPD 液体培养基中，30°C, 250 rpm 生长 1-2 天，至菌密度 OD₆₀₀ 大于 10，以体积比 2% 转接至装有 100ml YPD 液体培养基的 1L 摇瓶中，30°C, 250rpm 培养 24 小时，以体积比 5% 转接至 10 个装有 150ml BMGY 液体培养基的 1L 摇瓶中，30°C, 250rpm 培养 24 小时，加入体积百分含量为 0.5% 的甲醇诱导表达，每 12h 补加 1 次甲醇，诱导 60h 后离心收集菌体。用实施例 1 中
25 步骤二的方法破菌并测定其血凝活性，挑取具有血凝活性的破菌液对应的克隆用实施例 1 中步骤三的方法进行工程酵母发酵，采用实施例 1 中步骤四的方法纯化获得 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，将其记为 ^(H5N1)HA_(Hans)。

四、还原 SDS-PAGE 分析 ^(H5N1)HA_(Hans) 分子量约为 66KD (此处的分子量约为 66KD 的条带是 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的 HA0 组分)。

30 用 N-糖苷酶 F (PNGF) 处理 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，方法同实施例 1 中的步骤五，分析糖基切除前后的分子量变化，发现用 PNGF 切除糖基后 ^(H5N1)HA_(Hans) (该 H5N1 高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的 HA0 组分) 的分子量下降为 60kD，结果如图 10 所示。

对 ^(H5N1)HA_(Hans) 进行分子排阻色谱 (SEC) 分析，方法同实施例 1 中的步骤八，
35 结果如图 11 所示。图 11 中，上图为分子量标准蛋白的色谱图，下图为 ^(H5N1)HA_(Hans) 的色谱图，发现 ^(H5N1)HA_(Hans) 的保留时间小于 670kD 的分子量标准的保留时间，该蛋白多聚物纳米颗粒是分子量大于 670kD 的多聚体。

对^(H5N1)HA_(Hans)进行鸡红细胞血凝活性分析,方法同实施例1中的步骤七,结果如图12所示,图12中,第一排从左至右为从1:20开始2倍系列稀释的^(H5N1)HA_(Hans),第二排为生理盐水对照,发现^(H5N1)HA_(Hans)具有明显的血凝活性。

5 用实施例2相同的方法制备^(H5N1)HA_(Hans)流感疫苗、免疫小鼠,并在加强免疫后一个星期采血得血清进行血凝抑制实验(方法见“郭元吉等《流行性感病毒及其实验技术》,北京,中国三峡出版社,1997”),结果如图13所示,图13中,纵坐标为血凝抑制效价(HI),横坐标为分组,0.0为对照组,7.5为实验组,发现实验组小鼠血清的平均血凝抑制效价达到1:240。

10 因此,汉逊酵母制备的H5N1高致病性禽流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒可以用于制备流感疫苗。

实施例4、毕赤酵母制备的H1N1流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒

一、重组表达载体的构建

15 (一)合成来源于H1N1流感病毒(A/FortMonmouth/1/47(H1N1))的SEQ ID No. 11。
(二)设计并合成如下引物:

HA1-5: 5' -ATCTTCGAAACGatgaaagcaaaactactgac-3' (SEQ ID No. 12)

下划线所示序列为*NspV*酶切识别位点。

HA1-3: 5' -gatGCGGCCGctcagatgcatattctgcattg-3' (SEQ ID No. 13)

下划线所示序列为*NotI*酶切识别位点。

20 (三)以SEQ ID No. 11为模板,以HA1-5和HA1-3为引物,利用Pyrobest DNA聚合酶进行PCR扩增,得到PCR扩增产物,如SEQ ID No. 14所示,SEQ ID No. 14中自5'末端起第8至第12位为Kozak序列,第13至第63位为信号肽序列,第64位至第1713位为HA基因,第1594至第1677位为C端穿膜区序列。

25 *NspV*和*NotI*双酶切SEQ ID No. 14所示的DNA分子,得到基因片段;*NspV*和*NotI*双酶切pPICZ α 载体得到载体大片段;将基因片段与载体大片段连接,得到重组质粒,将其命名为pPICZ α -HA1。将pPICZ α -HA1测序,结果正确。

二、重组酵母的构建和筛选

30 将约10 μ g pPICZ α -HA1质粒,用*Bgl*III线性化,并转化毕赤酵母菌X-33,最终获得具有血凝活性的破菌液对应的克隆(重组毕赤酵母单克隆),用于H1N1流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备,具体方法同实施例1中的步骤二。

三、工程酵母发酵同实施例1中的步骤三。

四、H1N1流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的纯化同实施例1中的步骤四,将其记为^(H1N1)HA。

35 五、还原SDS-PAGE分析^(H1N1)HA分子量约为66KD(此处的分子量约为66KD的条带是H1N1流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的HA0组分)。

用N-糖苷酶F(PNGF)处理H1N1流感病毒血凝素糖蛋白聚合物^(H1N1)HA,方法同实施例1中的步骤五,分析糖基切除前后的分子量变化,发现用PNGF切除糖基后

凝素糖蛋白（H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的 HA0 组分）的分子量下降为 61kD，结果如图 14 所示。

对 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H1N1)HA 进行分子排阻色谱（SEC）分析，方法同实施例 1 中的步骤八，结果如图 15 所示。图 15 中，上图为分子量标准蛋白的色谱图，下图为^(H1N1)HA 的色谱图，发现^(H1N1)HA 的保留时间小于 670kD 的分子量标准的保留时间，该流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒是分子量大于 670kD 的多聚体。

对 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H1N1)HA 进行鸡红细胞血凝活性分析，方法同实施例 1 中的步骤七，结果如图 16 所示，图 16 中，第一排从左至右为从 1:20 开始 2 倍系列稀释的^(H1N1)HA，第二排为生理盐水对照，发现^(H1N1)HA 具有良好的血凝活性。

电镜照片显示^(H1N1)HA 形成 20-50nm 的多聚体颗粒。

用实施例 2 相同的方法制备 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H1N1)HA 流感疫苗、免疫小鼠，并在加强免疫后一个星期采血得血清进行血凝抑制实验（方法见“郭元吉等《流行性感病毒及其实验技术》，北京，中国三峡出版社，1997”），结果如图 17 所示，图 17 中，纵坐标为血凝抑制效价（HI），横坐标为分组，0.0 为对照组，7.5 为实验组，发现实验组小鼠血清的平均血凝抑制效价达到 1:320。

因此，毕赤酵母制备的 H1N1 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H1N1)HA 可以用于制备流感疫苗。

实施例 5、乳酸克鲁维酵母制备 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒

一、重组表达载体的构建

（一）设计并合成如下引物：

HA7-HindIII-5: 5' -ATCAAGCTTACGATGAACACCCAAATACTGGTTTTTC-3' (SEQ ID No. 15)

下划线所示序列为 *HindIII* 酶切识别位点。

HA7-3: 5' -ATCGCGCCGCTTAAATACAGATAGTACATCT-3' (SEQ ID No. 16)。

下划线所示序列为 *NotI* 酶切识别位点。

（二）以 SEQ ID No. 1 所示的 DNA 分子为模板，以 HA7-3 和 HA7-HindIII-5 为引物，进行 PCR 扩增，得到 PCR 扩增产物，该产物的序列如 SEQ ID No. 17 所示，该分子自 5' 末端起依次包含 Kozak 序列，信号肽编码序列，HA 基因（含有 C 端穿膜区序列）。

（三）*HindIII* 和 *NotI* 双酶切 SEQ ID No. 17 所示的 DNA 分子，得到基因片段；*HindIII* 和 *NotI* 双酶切乳酸克鲁维酵母表达载体 pKLAC1 得到载体大片段；将基因片段与载体大片段连接，得到重组质粒，将其命名为 pKLAC1-^(H7N9)HA7。

二、重组酵母的构建和筛选

将约 10μg pKLAC1-^(H7N9)HA7 质粒，用 *SacII* 线性化，用 1/10 体积的 3M 醋酸钠

和 3 倍体积的无水酒精沉淀线性化的质粒。用体积百分含量为 70%的乙醇水溶液洗两次以除去其中的盐，晾干，约 30 μ L 水重悬沉淀，获得用于转化的 pKLAC1-(H7N9)HA7 线性化质粒。

制备乳酸克鲁维酵母电转化感受态细胞的方法同实施例 1 中的步骤二。

5 取 80 μ L 感受态细胞与 10 μ L 用于转化的 pKLAC1-(H7N9)HA7 线性化质粒，在微量离心管中混匀，得到混合物。将其置冰上 5min，将混合物转移到一个冰冷的 0.2cm 电转杯中。电穿孔细胞 (Bio-Rad Gene Pulser, 1500V, 25 μ F, 200 Ω)，再立即向电转杯中加入 1mL 冰冷的 1M 山梨醇，并小心地将混合物 (转化细胞) 转移至 15mL 培养管中。

10 将离心管放在 28 $^{\circ}$ C 温箱孵育 2h，不要摇动。取 200 μ L 转化细胞涂布于含有 5 mM 乙酰胺的 YCB 平板 (制备方法参见 NEB 公司提供的 K. lactis Protein Expression Kit) 上 28 $^{\circ}$ C 培养 3-4 天直至单克隆出现。

随机挑取单克隆接种到 2ml YPD 液体培养基中，28 $^{\circ}$ C 培养 48h，按体积比 5% 的接种量接种到 YPGal 液体培养基 (酵母提取物 10g/L，胰蛋白胨 20g/L，半乳糖 15 20g/L，余量为水) 中，60h 后离心收集菌体。每 1ml 菌液离心收获的菌体用 100 μ l PBS 重悬，制备破菌液的方法同实施例 1 中的步骤二，并用 1% 鸡红细胞进行血凝活性分析 (方法见 “郭元吉等 《流行性感病毒及其实验技术》，北京，中国三峡出版社，1997)。挑取具有血凝活性的破菌液对应的克隆 (重组毕赤酵母单克隆) 用于 H7N9 流感病毒血凝素糖蛋白聚合物的制备。

20 三、工程酵母发酵

种子培养方法和发酵培养方法同实施例 1 中的步骤三，仅将诱导剂由半乳糖替代甲醇。

四、H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的纯化方法同实施例 1 中的步骤四，将其记为 (H7N9)HA_(K. lactis)。

25 五、流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的结构分析方法同实施例 1 中的步骤五。

还原 SDS-PAGE 分析 (H7N9)HA_(K. lactis) (HA0 单体) 分子量约为 66KD，用 PNGF 切除糖基后分子量下降为 61KD，结果如图 18 所示。

六、对 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 (H7N9)HA_(K. lactis) 进行分子排阻色谱 (SEC) 分析，方法同实施例 1 中的步骤八，结果如图 19 所示。图 19 中，上图为 30 分子量标准蛋白的色谱图，下图为 (H7N9)HA_(K. lactis) 的色谱图，发现 (H7N9)HA_(K. lactis) 的保留时间小于 670kD 的分子量标准的保留时间，该流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒是分子量大于 670kD 的多聚体，由于 HA0 单体的分子量为 64KD，三聚体的分子量约为 180KD，说明 (H7N9)HA_(K. lactis) 为含 9 个以上 HA0 单体形成的多聚体。

七、将制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 (H7N9)HA_(K. lactis) 负染后用 35 50,000 倍电子显微镜照相发现该流感血凝素为至少 3 个以上 HA0 三聚体形成的多聚体颗粒。

八、对 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H7N9)HA_(K. lactis) 进行鸡红细胞血凝活性分析，方法同实施例 1 中的步骤七，结果如图 20 所示，图 20 中，第一排从左至右为从 1:20 开始 2 倍系列稀释的^(H7N9)HA_(K. lactis)，第二排为生理盐水对照，发现^(H7N9)HA_(K. lactis) 具有良好的血凝活性。

5 九、用重组乳酸克鲁维酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H7N9)HA_(K. lactis) 制备流感疫苗

将^(H7N9)HA_(K. lactis) 用 pH7.4 的 PBS 分别稀释到 0 μg、6 μg、12 μg / 50 μl 三个不同的剂量组，同时，每组均添加等体积的 1.2mg/ml Al(OH)₃ 佐剂，制成流感疫苗，为实验组注射液。同时，设上述溶液中不加^(H7N9)HA_(K. lactis) 的溶液为对照组注射液。

10 免疫方案、方式、采血时间和血凝抑制的标准血凝素的步骤同实施例 2。

血清中中和抗体的血凝抑制活性结果如图 21 所示。

图 21 表明，对加强免疫后 7 天的血清进行血凝抑制活性分析，实验组小鼠的平均血凝抑制效价达到 1:320。

因此，用重组乳酸克鲁维酵母制备的 H7N9 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒^(H7N9)HA_(K. lactis) 可以用于制备流感疫苗。

实施例 6、毕赤酵母制备的 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒

一、重组表达载体的构建

20 (一) 根据 Genbank (A/reassortant/NYMC X-223A (Texas/50/2012 x PuertoRico/8/1934) (H3N2)) (请确认该病毒的名称是准确的) 上获得流感 HA 全长序列，合成 SEQ ID No. 18 所示的 DNA 分子。

(二) 设计并合成如下引物：

HA3-5: 5' -ATCTTCGAAACGatgaagactatcattgcttt -3' (SEQ ID No. 19)

下划线所示序列为 *NspV* 酶切识别位点。

25 HA3-3: 5' - gatgcgccgctcaaatgcaaatgttgacctaattgttgcctt-3' (SEQ ID No. 20)

下划线所示序列为 *NotI* 酶切识别位点。

30 (三) 以 SEQ ID No. 18 所示的 DNA 分子为模板，以 HA3-5 和 HA3-3 为引物，利用 Pyrobest DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，得到 PCR 扩增产物，如 SEQ ID No. 21 所示。

SEQ ID No. 21 所示的 DNA 分子从 N 端到 C 端依次含有 Kozak 序列、信号肽、HA 基因序列 (含有 C 端穿膜区序列)

35 SEQ ID No. 21 中自 5' 末端起第 8 位至第 12 位为 Kozak 序列、第 13 至第 60 位为信号肽序列，第 61 至第 1713 位为 HA 基因，第 1600 至第 1674 位为 C 端穿膜区序列。

NspV 和 *NotI* 双酶切 SEQ ID No. 21 所示的 DNA 分子，得到基因片段；*NspV* 和 *NotI* 双酶切 pPICZ α 载体得到载体大片段；将基因片段与载体大片段连接，得到重

组质粒，将其命名为 pPICZ α -HA3，将 pPICZ α -HA3 测序，结果正确。

二、重组酵母的构建和筛选

5 将约 10 μ g pPICZ α -HA3 质粒，用 *Bgl*III 线性化，并转化毕赤酵母菌 X-33，最终获得具有血凝活性的破菌液对应的克隆（重组毕赤酵母单克隆），用于 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备，具体方法同实施例 1 中的步骤二。

三、工程酵母发酵同实施例 1 中的步骤三。

四、H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的纯化同实施例 1 中的步骤四，将其记为 ^(H3N2)HA。

10 五、还原 SDS-PAGE 分析 ^(H3N2)HA 分子量约为 66KD，该条带是 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的 HA0 组分。

用 N-糖苷酶 F (PNGF) 处理 ^(H3N2)HA，方法同实施例 1 中的步骤五，分析糖基切除前后的分子量变化，发现用 PNGF 切除糖基后血凝素糖蛋白 HA0 组分的分子量下降为 61kD，结果如图 22 所示。

15 六、对 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 ^(H3N2)HA 进行分子排阻色谱 (SEC) 分析，方法同实施例 1 中的步骤八，结果显示 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 ^(H3N2)HA 是分子量大于 670kD 的多聚体。

20 七、对 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 ^(H3N2)HA 进行鸡红细胞血凝活性分析，方法同实施例 1 中的步骤七，结果如图 23 所示，图 23 中，第一排从左至右为从 1:20 开始 2 倍系列稀释的 ^(H3N2)HA，第二排为生理盐水对照，发现 ^(H3N2)HA 具有良好的血凝活性。

八、用实施例 2 相同的方法制备 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 ^(H3N2)HA 流感疫苗、免疫小鼠，并在加强免疫后一个星期采血得血清进行血凝抑制（方法见“郭元吉等《流行性感病毒及其实验技术》，北京，中国三峡出版社，1997”），结果如图 24 所示。

25 图 24 中，纵坐标为血凝抑制效价 (HI)，横坐标为分组，0.0 为对照组，7.5 为实验组。图 24 表明，实验组小鼠血清的平均血凝抑制效价达到 1:320。

因此，毕赤酵母制备的 H3N2 流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒 ^(H3N2)HA 可以用于制备流感疫苗。

30 实施例 7、流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒阳离子交换层析

将实施例 1 中步骤四的 (一) 得到的上样液只进行步骤 (二) 的阳离子色谱柱纯化，得到 15%C 液洗脱峰，将该组分进行血凝活性检测，方法同实施例 1 中步骤七，结果如图 25 所示。

35 图 25 中，第一排从左至右为从 1:20 开始 2 倍系列稀释的 15%C 液洗脱峰，第二排为生理盐水对照。图 25 表明，该组分中含有流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，且具有血凝活性。

实施例 8、流感病毒血凝素蛋白聚合物纳米颗粒阴离子交换层析

将实施例 1 中步骤四的（一）得到的上样液直接进行步骤（三）阴离子交换层析，得到 10% C 液洗脱峰，将其进行血凝活性检测，方法同实施例 1 中步骤七，结果如图 26 所示。

- 5 图 26 中，第一排从左至右为从 1:20 开始 2 倍系列稀释的 10% C 液洗脱峰，第二排为生理盐水对照。图 26 表明，该组分中含有流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，且具有血凝活性。

实施例 9、流感病毒血凝素蛋白聚合物纳米颗粒凝胶排阻层析

- 10 将实施例 1 中步骤四的（一）得到的上样液只进行步骤（四）的凝胶排阻色谱层析，收集第一个洗脱主峰，对其进行血凝活性检测，方法同实施例 1 中步骤七，结果如图 27 所示。

- 15 图 27 中，第一排从左至右为从 1:20 开始 2 倍系列稀释的洗脱主峰，第二排为生理盐水对照。图 27 表明，该组分中含有流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒，且具有血凝活性。

实施例 10、ELISA 方法测定不同去污剂溶解后收集上清中的流感病毒血凝素蛋白聚合物纳米颗粒含量

- 20 实施例 1 中步骤三得到发酵液之后，将发酵液于 4℃，7000 rpm 离心 20min。用水重悬为 40g/100ml 的悬液，高压匀浆仪破菌(1200bar，破菌 3 次)，得匀浆液，将酵母 500ml 匀浆液中加 50g PEG2000，搅拌溶解 0.5h，7000 rpm 离心 20min，收集沉淀，弃上清；沉淀加 500ml 体积的溶液（该溶液含 10mM Tris-HCl，去污剂（曲拉通、吐温、乙基苯基聚乙二醇或较弱的离子型去污剂脱氧胆酸盐、CHAPS（3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸盐）），5g/100ml 甘油，余量为水）重悬，搅拌溶解 2h。超速离心 2 h，收集上清，用磷酸盐调节 pH 为 6.0，取各个样品做 ELISA 分析。

- 30 ELISA 分析方法测定收集上清中的血凝素含量（方法参照汪家政、范明 主编《蛋白质技术手册》（科学出版社，2000 年））：样品用抗原包被液（0.15g/100ml Na₂CO₃，0.293 g/100ml NaHCO₃，pH9.6，余量为水）稀释 100 倍，然后各取 100 μL 样品加入酶联板中，4℃ 包被过夜，一抗为兔抗 HA7（1:500）（用 PBS 稀释）（该抗体购自北京博菲康生物技术有限公司），二抗为羊抗兔 IgG-HRP（1:1000）（用 PBS 稀
- 35 释）（该抗体购自华美生物工程有限公司），每孔各加 100 μL 显色液（1.84g/100ml Na₂HPO₄·12H₂O，0.5 g/100ml 柠檬酸，临用前再加 0.04 g/100ml OPD 和体积百分含量 0.15% 的 H₂O₂），37℃ 避光温育 15min，最后每孔加 20 μL 终止液（2M H₂SO₄）以终止显色，其中阳性克隆孔内呈现一定的颜色变化，反映出 HA 的含量，空白（以无血凝素样品的孔为空白）及阴性孔内没有明显的颜色变化。于 492nm 处酶联仪上读取数据，结果如表 1 所示。

表 1 表明，各种去污剂均有效果，能检测到上清中的流感病毒血凝素蛋白聚合物纳米颗粒，其中 2g/100ml TritonX-100(曲拉通)效果最好，其次 5g/100ml Tween20 (吐温) 和 2g/100ml 脱氧胆酸盐，再次是 2g/100ml NP-40 (乙基苯基聚乙二醇) 和 2g/100ml CHAPS，但不用去污剂处理，几乎检测不到流感病毒血凝素蛋白聚合物纳米颗粒，说明去污剂处理是本发明中重要步骤之一。

表1 ELISA分析方法测定不同去污剂溶解后收集上清中的流感病毒血凝素蛋白聚合物纳米颗粒含量

去污剂 终浓度	TritonX-100	Tween20	NP-40	脱氧胆酸盐	CHAPS
0	0.030±0.001	0.040±0.004	0.033±0.002	0.042±0.001	0.032±0.002
1 g/100ml (W/V)	1.767±0.042	1.443±0.022	1.342±0.052	1.565±0.033	1.253±0.037
2 g/100ml (W/V)	1.915±0.047	1.445±0.027	1.692±0.027	1.776±0.019	1.699±0.023
5 g/100ml (W/V)	1.888±0.032	1.715±0.012	1.666±0.013	1.630±0.022	1.565±0.017

工业应用

利用本发明的方法制备的流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的分子量大于 670KD，单体 (HA0) 为分子量为60KD左右的糖蛋白，并且由其制备的疫苗可以诱导产生高效价的中和抗体。本发明首次公开了用酵母制备流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的方法，该纳米颗粒未融合外源的载体蛋白，不存在反复接种引起对载体蛋白免疫反应的问题，且本发明提供的重组酵母菌具有构建周期短、生长快、易于大规模生产、安全性高等特点，使其非常适合于在流感等突发传染病和其它应急条件下，进行疫苗高效研发和大规模生产。

权利要求

- 1、一种制备流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的方法，包括如下步骤：
使 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编
5 码基因在酵母中表达；将所述酵母进行细胞破碎，加入去污剂，获得含流感病毒血
凝素糖蛋白的溶液；将所述溶液进行纯化，制备得到具有血凝活性的流感病毒血凝
素糖蛋白聚合物纳米颗粒。
- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述使 N 端上游含有信号肽序
列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因在酵母中表达的方
10 法为：将含有 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝
素 HA 的编码基因的重组表达载体转化酵母，培养得到转化的酵母，再诱导使基因
表达。
- 3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述酵母为毕赤酵母、汉逊酵
母或乳酸克鲁维酵母。
- 15 4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述流感病毒的血凝素 HA 为
H1、H3、H5 或 H7 血清型流感病毒的 HA。
- 5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于：所述 H1、H3、H5 或 H7 血清型
流感病毒的 HA 分别为 H1N1、H3N2、H5N1 或 H7N9 流感病毒的 HA。
- 6、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述重组表达载体是将含有所
20 述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编
码基因插入含有 AOX 启动子的载体得到的。
- 7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述重组表达载体是将含有所
述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编
码基因插入 pPICZ α 的 *NotI* 和 *NspV* 酶切位点间，并用 *BglIII* 线性化得到的。
- 25 8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述流感病毒为 H7N9 禽流感病
毒，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素
HA 的编码基因如 SEQ ID No. 4 所示。
- 9、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述流感病毒为甲型 H1N1 流感
病毒，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素
30 HA 的编码基因如 SEQ ID No. 14 所示。
- 10、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述流感病毒为甲型 H3N2 流
感病毒，所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝
素 HA 的编码基因如 SEQ ID No. 21 所示。
- 11、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述重组表达载体是将含有所
35 述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编
码基因插入含有 MOX 启动子的载体得到的。
- 12、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于：所述重组表达载体是将含有

所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入 pPICZ α 的 *NotI* 和 *BstB I* 酶切位点间, 得到中间载体 1; 再将中间载体 1 的 AOX 启动子替换为汉逊酵母的醇氧化酶启动子 MOX, 再用 *BgIII* 线性化得到的。

5 13、根据权利要求 12 所述的方法, 其特征在于: 所述汉逊酵母为多型汉逊酵母。

14、根据权利要求 13 所述的方法, 其特征在于: 所述 MOX 启动子是以多型汉逊酵母的基因组 DNA 为模板, 以 SEQ ID No. 9 和 SEQ ID No. 10 所示的 DNA 分子为引物进行 PCR 扩增得到 MOX 启动子。

10 15、根据权利要求 12 所述的方法, 其特征在于: 所述将中间载体 1 的 AOX 启动子替换为汉逊酵母的醇氧化酶启动子 MOX 的方法为将所述 PCR 扩增得到的 MOX 启动子进行 *BgIII* 酶切, 并进行磷酸化, 获得 5' 端为 *BgIII* 酶切粘性末端, 3' 端磷酸化的 MOX 启动子; 将中间载体 1 用 *NspV* 单酶切后用 Klenow fragment 大片段酶和 dNTP 补平, 得到片段, 回收片段后, 再用 *BgIII* 酶切, 切除 AOX 启动子, 得到
15 切除 AOX 启动子的中间载体 1; 将 5' 端为 *BgIII* 酶切粘性末端, 3' 端磷酸化的 MOX 启动子与切除 AOX 启动子的中间载体 1 连接。

16、根据权利要求 12 所述的方法, 其特征在于: 所述流感病毒为 H5N1 禽流感病毒, 所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因具体如 SEQ ID No. 8 所示。

20 17、根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于: 所述重组表达载体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因插入含有 LAC4 启动子的载体得到的。

18、根据权利要求 17 所述的方法, 其特征在于: 所述重组表达载体是将所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码
25 基因插入 pKLAC1 的 *HindIII* 和 *NotI* 酶切位点间, 再用 *SacII* 线性化得到的。

19、根据权利要求 18 所述的方法, 其特征在于: 所述流感病毒为 H7N9 禽流感病毒, 所述 N 端上游含有信号肽序列、并包含 C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素 HA 的编码基因如 SEQ ID No. 17 所示。

20、根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于: 所述细胞破碎的方法为物理方
30 法、生物方法或化学方法。

21、根据权利要求 20 所述的方法, 其特征在于:

所述物理方法为玻璃珠振荡法、高压匀浆法或球磨法;

所述生物方法为酶裂解法;

所述化学方法为碱裂解法。

35 22、根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于: 所述去污剂为非离子型去污剂或弱离子型去污剂。

23、根据权利要求 22 所述的方法, 其特征在于:

所述非离子型去污剂为曲拉通、吐温或乙基苯基聚乙二醇；

所述弱离子型去污剂为脱氧胆酸盐或 3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸盐。

24、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述将所述溶液进行纯化的方法包括阳离子交换层析和/或阴离子交换层析和/或凝胶排阻层析。

25、根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于：

所述阳离子交换层析的填料为 Sepharose FF SP；

所述阴离子交换层析的填料为 Source 30Q；

所述凝胶排阻层析的填料为 Superdex200；

10 所述纯化过程中根据各步骤纯化组分是否有 HA 条带和血凝活性判断其是否含有所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的组分，如果该组分有 HA 条带和血凝活性就为含有所述流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒的组分。

26、由权利要求 1 所述方法制备得到的流感病毒血凝素糖蛋白聚合物纳米颗粒制备的流感疫苗。

15 27、根据权利要求 26 所述的流感疫苗，其特征在于：所述疫苗还包含佐剂；所述佐剂具体为铝佐剂，再具体为氢氧化铝佐剂。

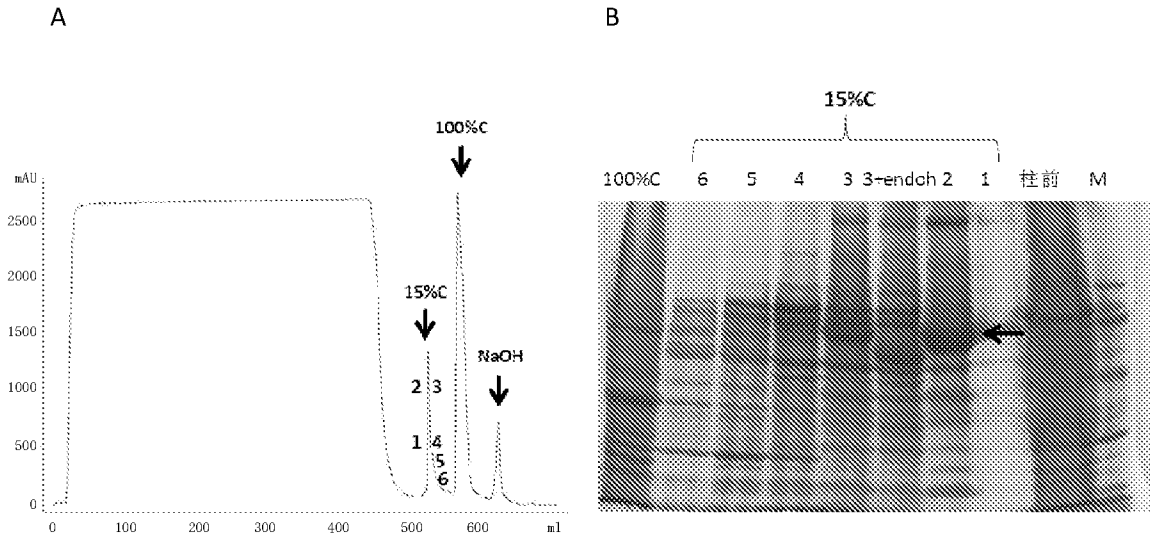


图 1

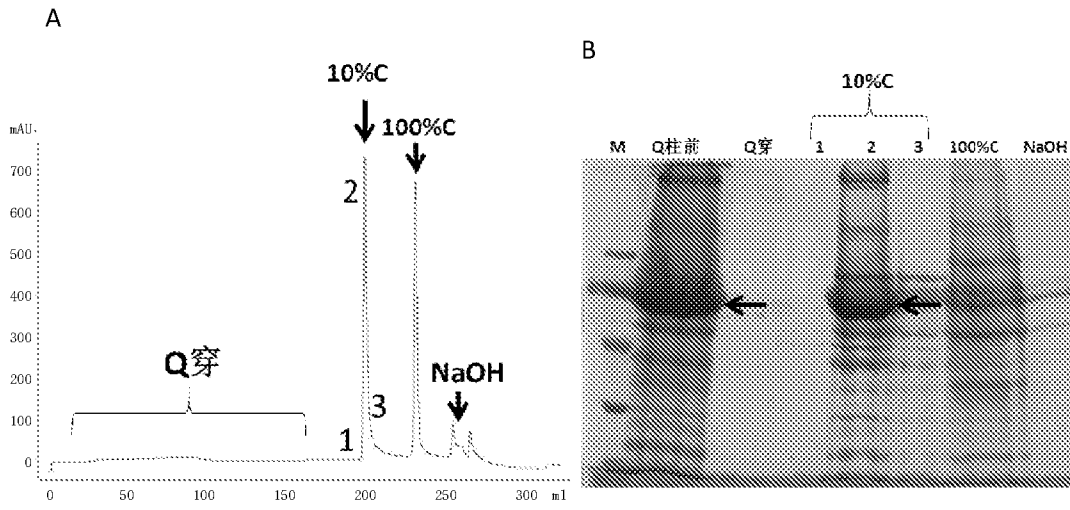


图 2

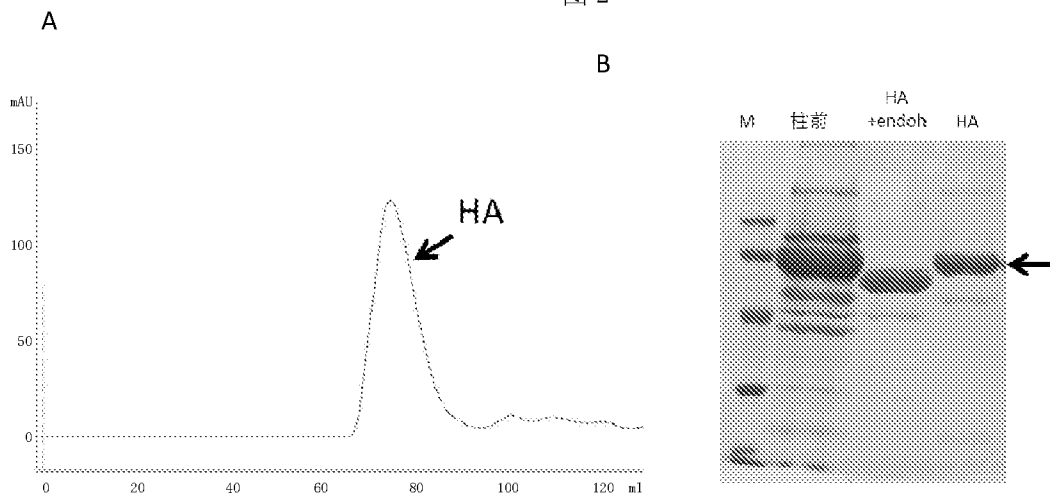


图 3

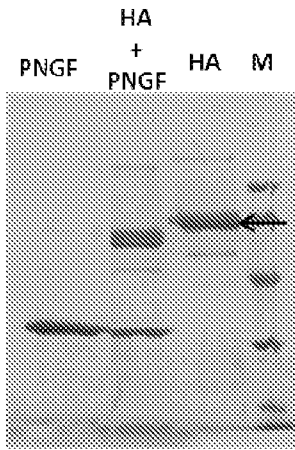


图 4

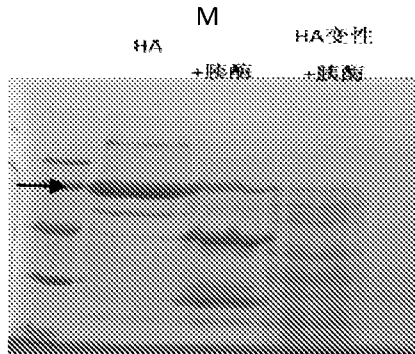


图 5

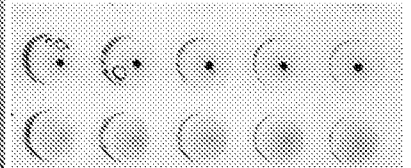
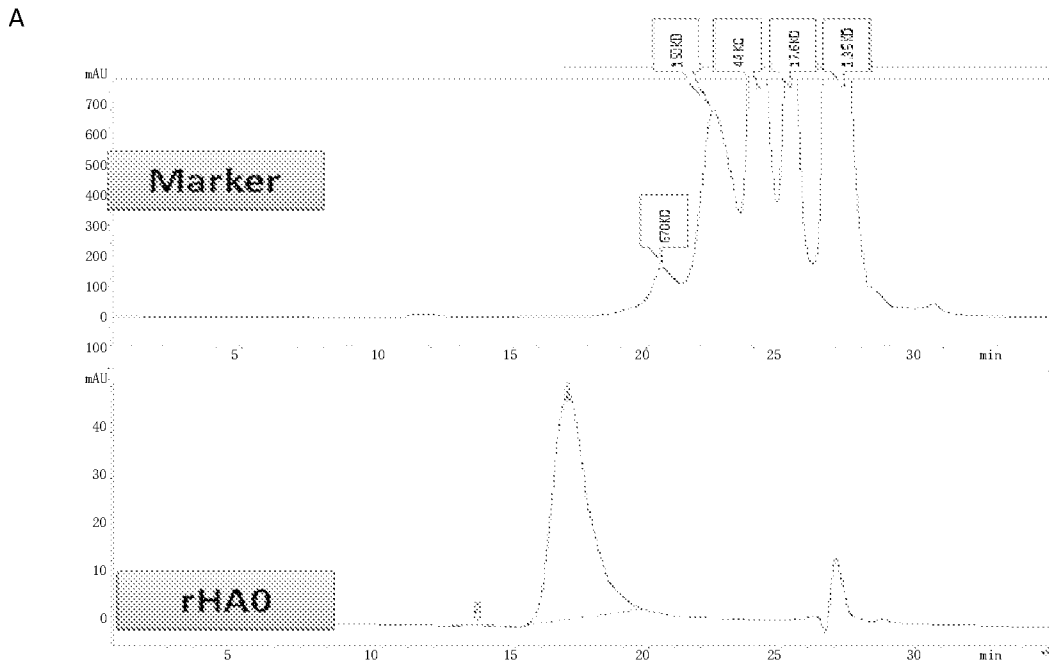


图 6



B

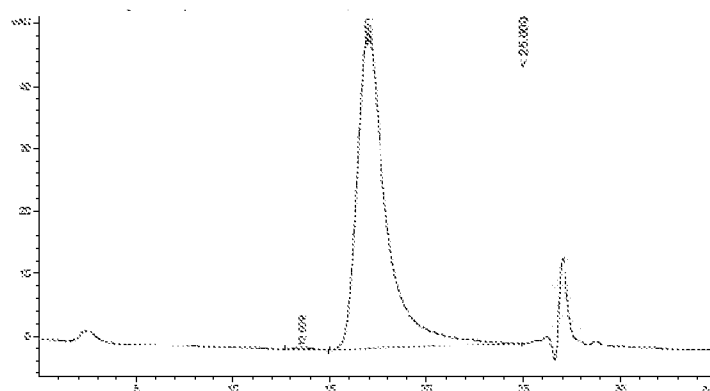


图 7

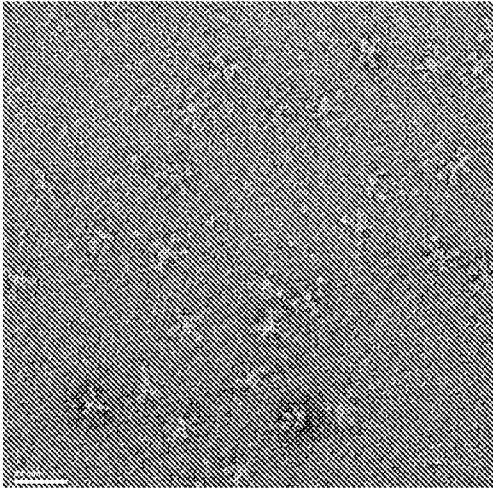


图 8

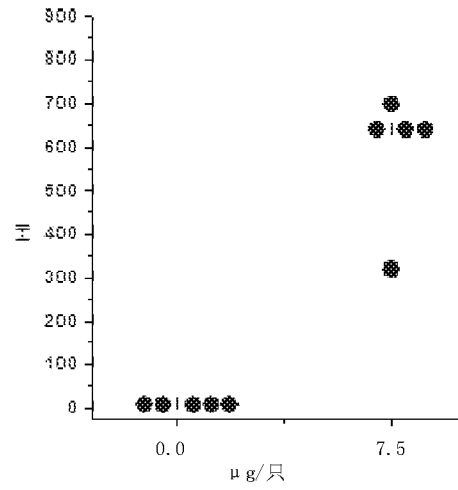


图 9

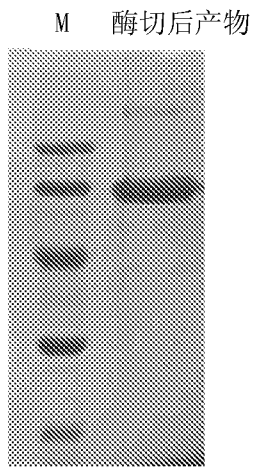


图 10

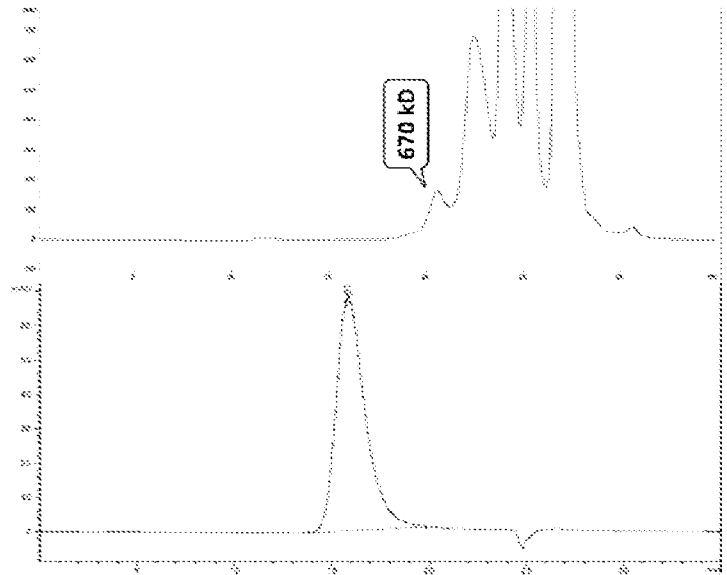


图 11

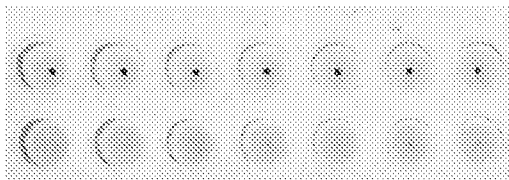


图 12

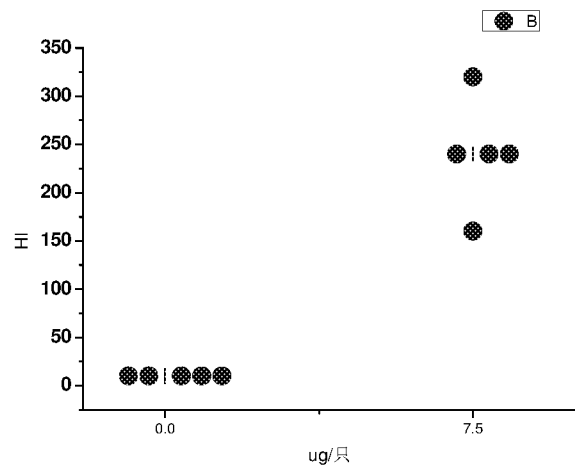


图 13

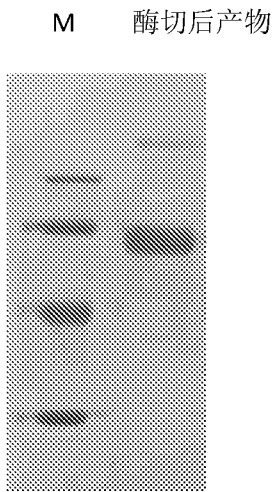


图 14

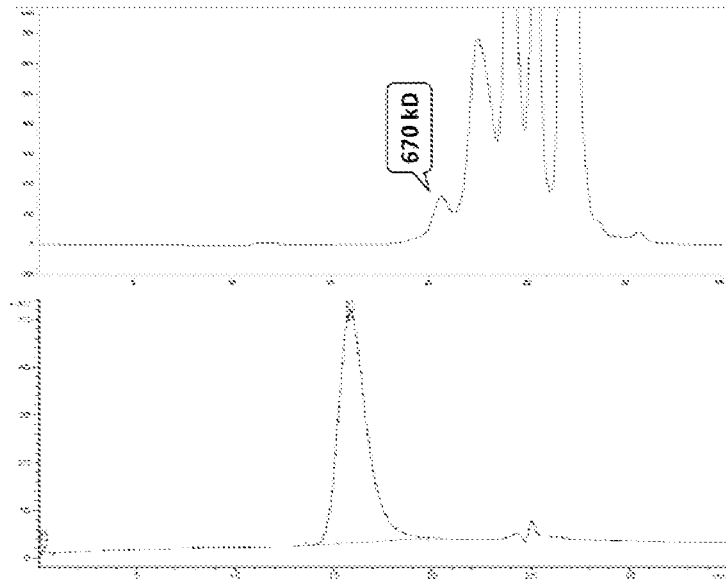


图 15

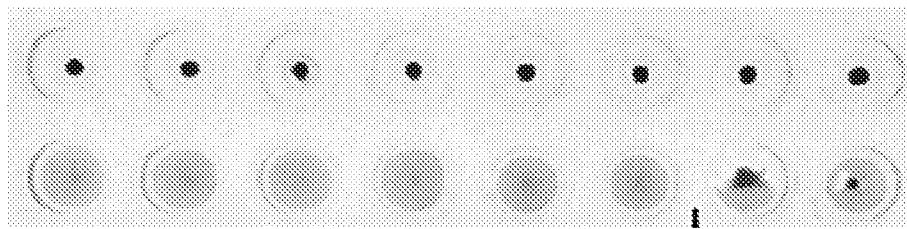


图 16

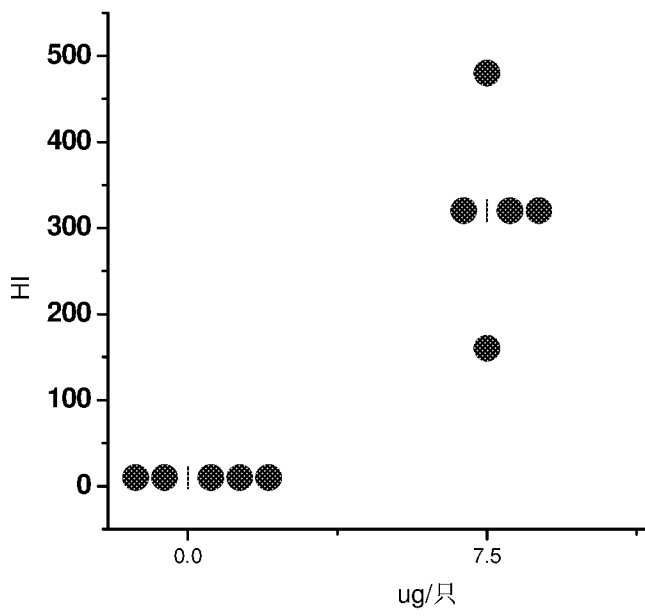


图 17

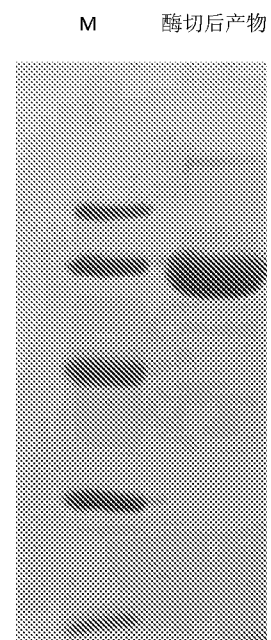


图 18

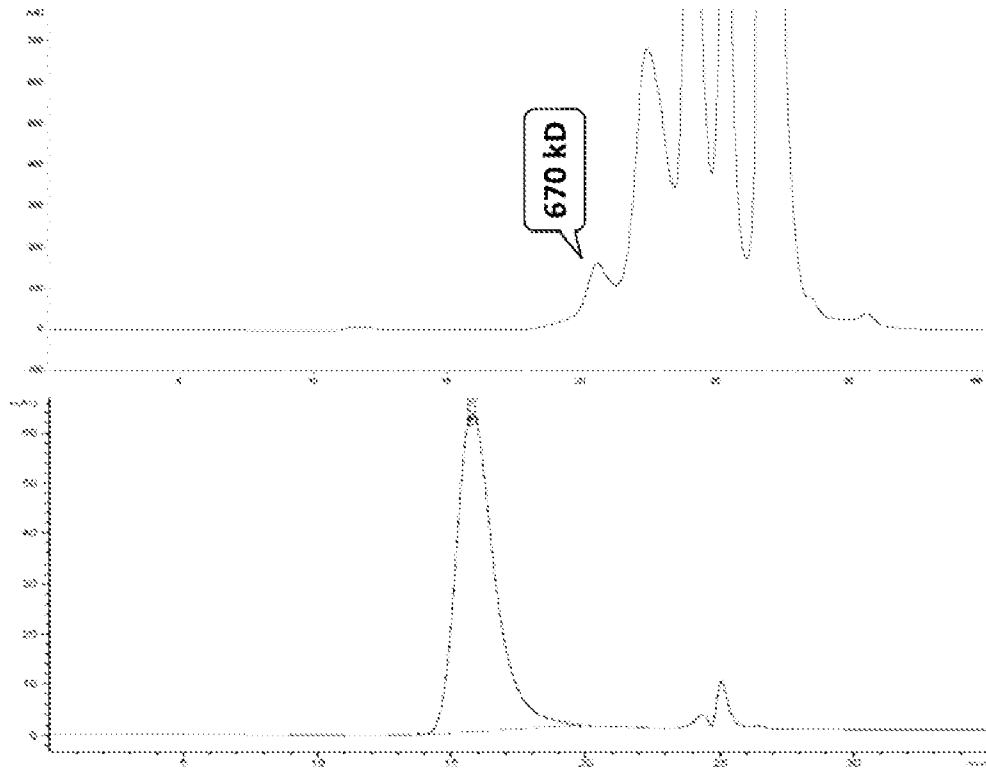


图 19

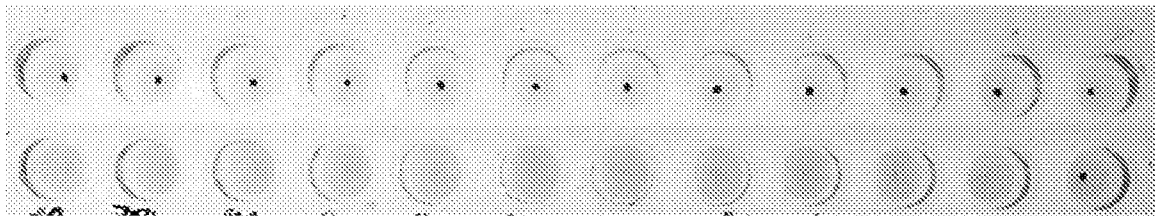


图 20

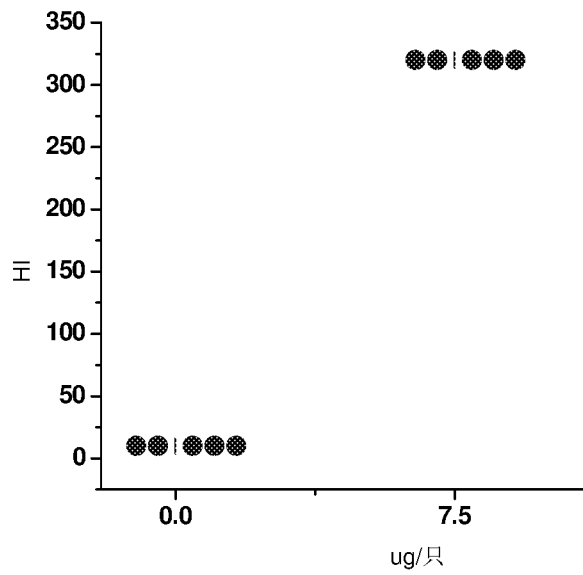


图 21

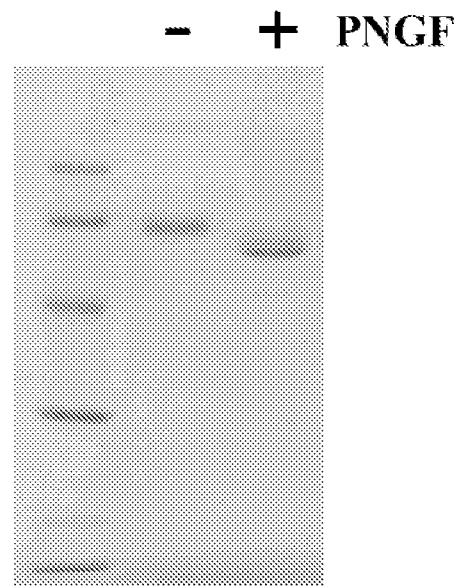


图 22

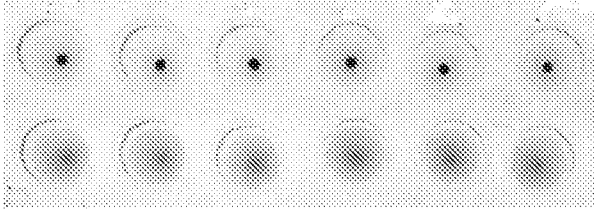


图 23

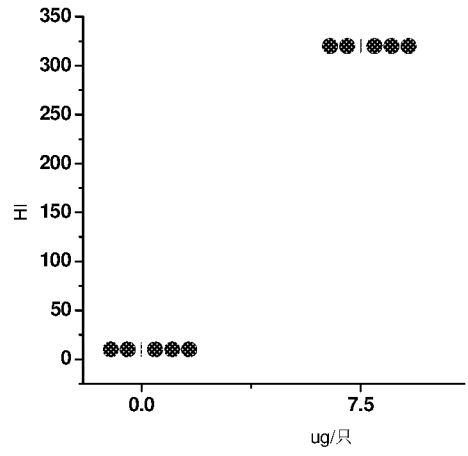


图 24

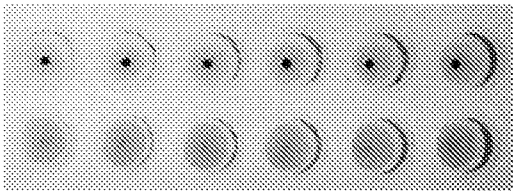


图 25



图 26

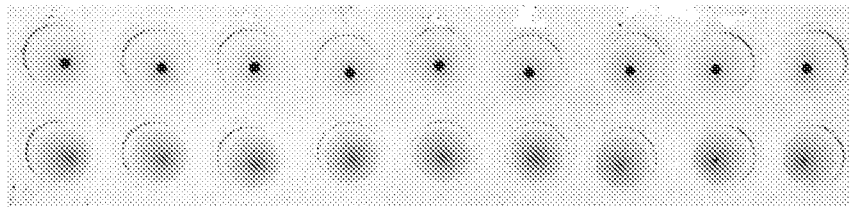


图 27