



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102690336 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201210189716. 1

(22) 申请日 2012. 06. 11

(71) 申请人 中国科学院武汉病毒研究所
地址 430071 湖北省武汉市武昌小洪山

(72) 发明人 周鹏 韩正刚 石正丽

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏峰

(51) Int. Cl.

C07K 14/165 (2006. 01)

C12N 15/50 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

序列表 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白免疫决定区及制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白免疫决定区及制备方法和用途,其步骤是:A、以蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 基因为模板设计引物,扩增;B、通过上述扩增后得到的片段用 BamHI 和 XhoI 酶切后连接于表达载体 pET32a 上,并测序确定无误;C、将重组质粒纯化后,转化 BL21 感受态细胞,挑取单克隆进行培养,在终浓度为 0.3mMIPTG 的培养基中 30 度诱导;收集菌体超声波破碎后进行纯化,用 HisTag 纯化试剂盒进行纯化,纯化后在 SDS-PAGE 中检测蛋白的纯度,得到目的蛋白。该方法简单易行,操作方便,易于生产;该肽段具有最好的免疫原性,在鉴定小鼠抗 S 单克隆抗体表位中的应用方法特异性好,操作简单,易于重复。

1. 一种分离的蛋白质,其序列为 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 所述蛋白的制备方法,其步骤是:
 - A. PCR 扩增:以蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 基因为模板设计引物,扩增:
正向引物:5' -TGCCGGATCCATTGATTGTGCTCA-3',即为 SEQ ID NO. 8;
反向引物:5' -CAGTGTCGACTTAAGAAAGGTCTCTCTCAAA-3',即为 SEQ ID NO. 9;
PCR 反应的试剂如下:将 5 μ l 的 10xTaq 聚合酶缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物、0.25 μ l 的 TaqDNA 聚合酶、1 μ l 含 Rp3-S 基因的质粒 pCDNA3.1-Rp-S,引物对各用 1 μ l 和 37.75 μ l 的无菌水混合;
PCR 反应条件:94°C 预变性 300 秒、94°C 变性 30 秒、56°C 复性 30 秒、72°C 延伸 60 秒,循环 30 次后 72°C 最后延伸 600 秒;
 - B、通过上述扩增后得到的片段用 BamHI 和 XhoI 酶切后连接于表达载体 pET32a 上,并测序确定无误;
 - C、将重组质粒纯化后,转化 BL21 感受态细胞,在培养于含氨苄青霉素抗性平板上;次日挑取单克隆进行培养,然后在终浓度为 0.3mM IPTG 的培养基中 30°C 诱导 6 小时;收集菌体超声波破碎后进行纯化,用 His Tag 纯化试剂盒进行纯化,纯化后在 SDS-PAGE 中检测蛋白的纯度,即得到目的蛋白。
3. 权利要求 1 所述蛋白在鉴定小鼠抗 S 单克隆抗体表位中的应用。

蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白免疫决定区及制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体涉及一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(Rp3-S)免疫决定区,同时还涉及一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(Rp3-S)免疫决定区的制备方法,还涉及一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(Rp3-S)免疫决定区的用途。

背景技术

[0002] SARS 冠状病毒是 2002-2003 年在中国暴发的 SARS 的病原。而蝙蝠 SARS 样冠状病毒与 SARS 冠状病毒存在很高的同源性。自 2005 年被本课题组首次发现后,世界范围内均有关于类似病毒报道,但关于蝙蝠 SARS 样冠状病毒免疫原性的报道却不多。香港大学通过信息学分析认为,该病毒有逃逸并传播于人类的危险。研究表明,蝙蝠 SARS 样冠状病毒与 SARS 冠状病毒的主要差异在 S 蛋白,即主要负责和细胞受体结合、诱导机体产生中和抗体的蛋白。蝙蝠 SARS 样冠状病毒只要获得人 SARS 冠状病毒 S 蛋白上的一小段,便可以对小鼠致病。由此可见,此病毒有潜在致病性。因而,关于该病毒免疫原性的研究对于设计特异性疫苗或诊断方法就显得特别重要。

[0003] 申请人前期的工作发现,蝙蝠 SARS 样冠状病毒感染的蝙蝠血清与人 SARS 冠状病毒 S 蛋白有交叉反应,但不能中和人 SARS 冠状病毒,说明蝙蝠 SARS 样冠状病毒和人 SARS 冠状病毒 S 蛋白之间存在着很大的差异。这可以归因于两个病毒 S 蛋白与受体结合的部分,即诱导机体产生中和抗体的区域存在着相对较低的同源(图 1)。

[0004] 本课题组在前期的工作中利用假病毒入侵实验证实了蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 蛋白的免疫决定区位于其受体结合区对应的区域。该免疫决定区的具体位置的确定对于设计蝙蝠 SARS 样冠状病毒特异诊断、保护性疫苗、和抗病毒药物的研发极为重要。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供了一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒(Rp3)刺突蛋白(Rp3-S)免疫决定区蛋白,其氨基酸序列为 SEQ ID NO.1 所示。该决定区信息为首次鉴定,可用于蝙蝠 SARS 样冠状病毒的特异性的诊断。

[0006] 本发明的另一个目的是在于提供了一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(Rp3-S)免疫决定区蛋白的制备方法。该方法简单易行,操作方便,易于生产。

[0007] 本发明的再一个目的是在于提供了一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(Rp3-S)中的 S280-455 多肽片段在鉴定小鼠抗 S 单克隆抗体表位中的应用。该方法特异性好,操作简单,实验易于重复。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术措施:

[0009] 一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(S)免疫决定区蛋白及其制备方法,它包括以下步骤:

[0010] 根据本课题组前期的工作,申请人比较了蝙蝠 SARS 样冠状病毒和 SARS-CoV S

蛋白免疫原性的差别,认识到它们免疫显性区的差异可能在于其受体结合区。然而,申请人依然不清楚其免疫显性区的具体氨基酸位置。为此,申请人将 S 基因(GenBank 序列号 :DQ071615, 在基因组核苷酸序列的位置 : :21486-25211bp) 序列截成 6 段(图 2), 分别进行原核蛋白表达,而后应用了鼠源的全长 S 单抗克隆抗体、多克隆抗体鉴定 S 免疫决定区的具体位置。

[0011] A. Rp3-S 六个截断的片段的 PCR 扩增 :

[0012] Rp3-S 蛋白的 S1 区及其截断的五个区域分别为 :1-666aa,表达的蛋白命名为 S1-666,核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 所示 ;1-81aa,表达的蛋白命名为 S1-82 核苷酸序列为 SEQ ID NO. 3 所示 ;82-280aa,表达蛋白质命名为 S82-280,核苷酸序列为 SEQ ID NO. 4 所示 ;280-455aa,表达的蛋白质命名为 S280-455,核苷酸序列为 SEQ ID NO. 5 所示 ;429-574aa,表达的蛋白质命名为 S429-574,核苷酸序列为 SEQ ID NO. 6 所示 ;561-666aa,蛋白质命名为 S561-666,核苷酸序列为 SEQ ID NO. 7 所示。

[0013] 根据六个片段的核苷酸序列,设计的 6 对引物如下 :

[0014] 1-666 :正向 :5' -GGCCGAATTCATGAAAATTTTAAT-3',

[0015] 反向 :5' -CAGTGTGCGACTTAAGACATAGTGTAAGCCAC-3',

[0016] 1-81aa :正向 :5' -GGCCGATCCATGAAAATTTTAAT-3',

[0017] 反向 :5' -ACTTGTGCGACGTAGGTAAACCTAT-3' ;

[0018] 82-280aa :正向 :5' -GGCCGATCCTTTGACAATCCTAT-3' ,

[0019] 反向 :5' -CTCAGTCGACAATAGCATTGGTAA-3' ;

[0020] 280-455aa :正向 :5' -TGCCGATCCATTGATTGTGCTCA-3',即为 SEQ ID NO. 8,

[0021] 反向 :5' -CAGTGTGCGACTTAAGAAAGGTCTCTCTCAAA-3' ,即为 SEQ IDNO. 9 ;

[0022] 429-574aa :正向 :5' -GGACGGATCCACTGCAAAGCAGGATCAA-3' ,

[0023] 反向 :5' -GAACGTCGACTGTTCTGGTGAATTAC-3' ;

[0024] 561-666aa :正向 :5' -GGCTGGATCCCCATGCTCTTTTGG-3' ;

[0025] 反向 :5' -CAGTGTGCGACTTAAGACATAGTGTAAGCCAC-3'。

[0026] PCR 反应的试剂如下 :将 5 μ l 的 10xTaq 聚合酶缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物、0.25 μ l 的 TaqDNA 聚合酶、1 μ l 含 Rp3-S 基因的质粒 pCDNA3.1-Rp-S(Ren, W., Qu, X., Li, W., Han, Z., Yu, M., Zhang, S., Wang, L. F., Deng, H., Shi, Z. Difference in receptor usage between SARS coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J Virol*, 2008, 82(4):1899 - 1907), 引物对各用 1 μ l 和 37.75 μ l 的无菌水混合。PCR 反应条件 :94 $^{\circ}$ C 预变性 300 秒、94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、56 $^{\circ}$ C 复性 30 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒,循环 30 次后 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 600 秒。

[0027] B. 载体构建 :

[0028] 通过上述扩增后得到的 Rp3-S1 通过 BamHI 和 XhoI 酶切后连接于表达载体 pMAL-C2X(购自 New England Biolabs),五个截断片段通过 BamHI 和 XhoI 酶切后分别连接于表达载体 pET32a 上(购自 Novagen)。所有的构建质粒都通过测序确定无误。

[0029] C. 蛋白的表达和纯化 :

[0030] 将重组质粒纯化后,转化 BL21 (购自 Promega) 感受态细胞,再培养于含氨苄青霉素 (Amp) 抗性平板上。次日挑取单克隆进行培养,然后在终浓度为 0.3mMIPTG 的培养基中

30℃诱导 6 小时。收集菌体超声波破碎后进行纯化。以 pMALc2x 载体表达的 S1 蛋白需要用 MBP 树脂柱进行纯化,用 pET32a 表达载体上带有 His Tag 标签,表达的蛋白均用 His Tag 纯化试剂盒进行纯化。所有纯化步骤均按照 Promega 公司的 His-band 试剂盒说明进行。纯化后在 SDS-PAGE 中检测蛋白的纯度(图 3),即得到目的蛋白。所有的蛋白纯度都达到了 90% 以上。

[0031] D. 蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S DNA 免疫的小鼠血清的制备:

[0032] pCDNA3.1-Rp3-S 被以体内电击的方式注射 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,分别在 0、3 和 5 周时免疫小鼠,在第八周的时候提取小鼠血清,这些血清即为含蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 蛋白多克隆抗体的抗血清。同时采健康小鼠的血清一份作为阴性对照,共五份血清样本,阳性血清样本依次命名为 Rp-S1~Rp-S4。

[0033] E. 一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(Rp3-S)免疫决定区蛋白的确立,其步骤为:

[0034] 首先用 5 个纯化的截断 S1 蛋白作为包被抗原,小鼠抗 S 蛋白血清作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠二抗进行 ELISA 反应。结果显示 5 只小鼠血清与 5 个蛋白反应各异(图 4)。

[0035] 结果显示,大多数免疫小鼠血清都可以与 S280-455 和 S561-666 反应:Rp-S1~Rp-S4 四份免疫小鼠血清都可与 S280-455 反应,Rp-S1, Rp-S3 和 Rp-S4 与 S561-666 反应,只有 Rp-S2 一份血清与 S429-574 反应,没有血清可以跟 S1-82 及 S82-455 反应。鉴于 S561-666 区段存在着冠状病毒中非常保守的免疫显性区,因而不能作为蝙蝠 SARS 样冠状病毒特异检测的表位,而 S280-455 存在着蝙蝠 SARS 样冠状病毒和人 SARS 冠状病毒 S 蛋白主要区别之一,因而申请人认为 S280-455 存在着可以被小鼠抗体识别且可被应用的主要免疫决定表位,其氨基酸序列为 SEQ ID NO. 1 所示。

[0036] 该肽段具有最好的免疫原性,是 S 蛋白的主要免疫区,而该区域与人 SARS 冠状病毒 S 蛋白的主要免疫决定区并不完全重叠,此发现对于构建针对蝙蝠 SARS 样冠状病毒的特异检测方法,以及设计针对该病毒的疫苗都要重要的意义,在未来该类病毒特异鉴定工作中具有良好的前景。

[0037] 一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白免疫决定区蛋白在鉴定小鼠抗 S 单克隆抗体表位中的应用,其步骤为:

[0038] A. 小鼠抗蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 单克隆抗体的制备:申请人将含蝙蝠 SARS 样冠状病毒 Rp3 株 S 蛋白的假病毒(HIV/Rp3-S)作为抗原在 BALB/c 小鼠中按照标准方法(Evan, G. I et al, 1985, Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Mol Cell Biol 5:3610-6.)制备。将挑选阳性的克隆扩大培养并腹腔注射入同来源小鼠,并收集腹水。其效价随后通过 ELISA 进行鉴定。为了避免这些单克隆抗体与载体 pET32a tag (购自 Novagen) 的交叉反应,在应用之前,所有的单抗均用含 pET32a tag 的细菌裂解物进行了中和。

[0039] B. 用 S280-455 鉴定小鼠抗 S 单克隆抗体的蛋白杂交反应。用 S280-455 蛋白作为抗原,小鼠抗 S 单克隆抗体作为检测抗体进行蛋白杂交反应。筛选到四个 S 蛋白单克隆抗体,命名 SmAb1-SmAb4,均可以特异的识别 S280-455 而不是 pET32a Tag 或其它四个截断表达的 S 蛋白。这些数据印证了 S280-455 是主要的免疫决定区(图 5)。

[0040] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

[0041] 首先, 鉴定出的蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 蛋白主要免疫决定区 S280-455, 该肽段具有最好的免疫原性, 是 S 蛋白的主要免疫区, 而该区域与人 SARS 冠状病毒 S 蛋白的主要免疫决定区并不完全重叠, 此发现对于构建针对蝙蝠 SARS 样冠状病毒的特异检测方法, 以及设计针对该病毒的疫苗都要重要的意义, 在未来该类病毒特异鉴定工作中具有良好的前景;

[0042] 其次, 提供的蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白(S) 免疫决定区蛋白的制备方法, 该方法简单易行, 操作方便, 易于生产;

[0043] 再次, 提供的 S280-455 多肽片段在鉴定小鼠抗 S 单克隆抗体表位中的应用方法特异性好, 操作简单, 易于重复。

附图说明

[0044] 图 1 为一种蝙蝠 SARS 样冠状病毒 Rp3-S 对应于 SARS 冠状病毒 Tor2-S 蛋白的受体结合区示意图。

[0045] 图中数字为氨基酸位点。下划线部分为两者差异最大的部分, 也是 Tor2-S 蛋白与受体结合核心部分。

[0046] 图 2 为一种全长的蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S1 部分及五个截断的 S 片段示意图。

[0047] 图 3 为一种 Rp3-S 蛋白的 S1 区及其五个截断的 SARS 样冠状病毒 S 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 示意图。蛋白均带有 20kD 的标签。

[0048] 图 4 为蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S1 上可被小鼠 S 抗体识别的免疫显性区示意图。

[0049] 截断表达的 S 蛋白作为包被抗原, 它们与四份 Rp3-S DNA 免疫的小鼠血清(命名为 Rp-S1 到 Rp-S4) 反应。一份正常鼠血清用作阴性对照。数据表示为平均值 ± 标准误差。

[0050] 图 5 为一种鉴定 Rp3 S1 小鼠单抗的效价及其所识别的表位示意图。

[0051] 在蛋白杂交反应中, 只有 S280-455 可以被单抗识别。单抗 1 :250 稀释使用。图中的数字 :1, pET32a tag 蛋白 ;2, S280-455 蛋白。

具体实施方式

[0052] 实施例 1 :设计扩增蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 基因截断片段, 其步骤是 :

[0053] 基于本实验室前期工作得到的蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 基因的序列(GenBank 序列号 :DQ071615, 在基因组核苷酸序列的位置 :21486-25211), 分别设计引物进行 PCR 扩增获取 Rp3-S1 及其五个截断 S 的目的基因。引物分别如下 :

[0054] 1-666 :正向 :5' -GGCCGAATTCATGAAAATTTTAAT-3' ,

[0055] 反向 :5' -CAGTGTCGACTTAAGACATAGTGTAAGCCAC-3' ;

[0056] 1-81aa :正向 :5' -GGCCGGATCCATGAAAATTTTAAT-3' ,

[0057] 反向 :5' -ACTTGTCGACGTAGGTAAACCTAT-3' ;

[0058] 82-280aa :正向 :5' -GGCCGGATCCTTTGACAATCCTAT-3' ;

[0059] 反向 :5' -CTCAGTCGACAATAGCATTGGTAA-3' ;

[0060] 280-455aa :正向 :5' -TGCCGGATCCATTGATTGTGCTCA-3' ,

[0061] 反向 :5' -CAGTGTCGACTTAAGAAAGGTCTCTCTCAAA-3' ;

[0062] 429-574aa :正向 :5' -GGACGGATCCACTGCAAAGCAGGATCAA-3' ,

[0063] 反向 :5' -GAACGTCGACTGTTCTGGTGAATTAC-3' ;

[0064] 561-666aa :正向 :5' -GGCTGGATCCCCATGCTCTTTTGG-3' ,

[0065] 反向 :5' -CAGTGTGCGACTTAAGACATAGTGTAAGCCAC-3' 。

[0066] 每个基因各用上述的一对引物进行 PCR 扩增。PCR 反应的试剂如下 :将 5 μ l 的 10xTaq 聚合酶缓冲液、4 μ l 的 dNTP 混合物、0.25 μ l 的 TaqDNA 聚合酶、1 μ l 含有 pcDNA3.1-Rp3-S 质粒,引物对各用 1 μ l,和 37.75 μ l 的无菌水混合。PCR 反应条件 :94 $^{\circ}$ C 预变性 300 秒、94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、56 $^{\circ}$ C 复性 30 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒,循环 30 次后 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 600 秒。

[0067] 实施例 2 :

[0068] 蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 截断蛋白重组表达载体的构建及其表达和纯化,其步骤是 :

[0069] 用限制性内切酶 BamHI 和 XhoI (Takara 公司产品)对回收的 PCR 产物和表达载体 pET32a 质粒进行酶切。酶切反应 :BamHI 和 XhoI 各 1 μ l,10 倍 H 缓冲液 2 μ l, PCR 产物或 pET32a 质粒 50-100ng,加无菌水至总体积为 20 μ l。37 $^{\circ}$ C 1 小时,酶切产物经 DNA 回收后用 T4DNA 连接酶 (Takara 公司产品)将 PCR 产物与表达载体 pET32a 连接。连接反应 :T4DNA 连接酶 (1U/ μ l) 1 μ l,PCR 产物与表达载体 pET32a 的摩尔比为 3 :1,并且 DNA 总量为 0.1 μ g,5 倍连接酶反应缓冲液 4 μ l,加无菌水至总体积为 20 μ l,16 $^{\circ}$ C 放置 24 小时。

[0070] 将 2 μ l 连接反应液加到 60 μ l 的 DH5 α 感受态细胞,混匀,电击转化,37 $^{\circ}$ C 摇床 (220rpm) 温育 1 小时 ;摇匀菌液,取 100 μ l 涂布于 LB/AP⁺ 琼脂平板上,待菌液吸干后倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 小时,观察结果。次日挑取单菌落 10 个,于 4ml 含氨苄的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。待菌液培养结束,取菌液提取质粒并以 BamHI 和 XhoI 进行酶切鉴定。有插入片段的阳性克隆子送测序公司进行测序分析。

[0071] 挑选阳性单克隆,接种新鲜 Amp LB 培养基。250rpm,37 $^{\circ}$ C,震荡培养过夜。第三天,将过夜培养菌液,按 1:100 比例,接种新鲜 LB 培养基,同样加入 Amp 抗性。于 37 $^{\circ}$ C,250rpm 震荡培养 3-4 小时,至菌液浓度达到 OD₂₆₀=0.6 ~ 1.0,此时细菌达到对数生长期。加入终浓度为 0.3mM 的 IPTG 进行诱导表达。250rpm,30 $^{\circ}$ C,继续震荡培养 6 小时,离心收获菌体。用 PBS 溶液洗涤两遍后,重悬于适量 0.01mol/L PBS 中(浓缩比例为 200ml 原始菌液到 20mlPBS 中)。-80 $^{\circ}$ C 反复冻融三次后,进行超声波破碎和蛋白纯化。因为 pET32a 表达载体上带有 His Tag 标签,所以表达的蛋白可以用 His Tag 纯化试剂盒 (Hisband, 购自 Novagen)进行纯化。纯化过程如下 :首先对诱导细胞进行超声波破碎,之后,16000rpm,4 $^{\circ}$ C,离心 15min,收取上清,用 0.45 μ m 孔径过滤器过滤。接下来用 His Bind 纯化试剂盒纯化,主要步骤包括 :首先,依次加入 3 倍的双蒸水,5 倍的 Charge Buffer,3 倍的 Binding Buffer 对柱子进行平衡 ;将过滤后的上清通过柱子 ;依次加入 10 倍的 Binding Buffer,6 倍的 Wash Buffer 洗涤 ;最后用 6 倍的 Elute Buffer 进行蛋白洗脱。全部纯化完毕后,对 His Bind 纯化柱子进行再生。最终纯化出的蛋白均通过 SDS-PAGE、蛋白浓度测定保证纯度达到 95% 以上和浓度大于 100ng/ μ l (图 3)。

[0072] 1-81aa 经表达后得到的蛋白质命名为 S1-82 ;82-280aa 经表达后得到的蛋白质为 S82-280 ;280-455aa 经表达后得到的蛋白质命名为 S280-455 ;429-574aa 经表达后得到的蛋白质命名为 S429-574 ;561-666aa 经表达后得到的蛋白质命名为 S561-666。

[0073] 实施例 3 :

[0074] 蝙蝠 SARS 样冠状病毒 S 截断片段与 S DNA 免疫的小鼠血清的 ELISA 反应。

[0075] 小鼠抗全长 S 的血清来自于 DNA 免疫的以下质粒 :构建于 pCDNA3.1(+) 密码子优化过的 Rp3-S (Ren et al, 2008, Journal of Virology, Difference in Receptor Usage between Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus and SARS-Like Coronavirus of Bat Origin)) 以及 pCDNA3.1(+) 空载体质粒(Introgen 公司) 被用作阴性对照。将 30 μ g 质粒用 30 μ l 的 PBS 稀释后以体内电击的方式注射 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 实验共分为 2 组(详见 zhou et al, 2009, BBRC, Immunogenicity difference between the SARS coronavirus and the batSARS-like coronavirus spike(S) proteins), 每组有 5 只小鼠。分别在 0、3 和 5 周时免疫小鼠, 在第八周的时候取小鼠血清。5 只被 Rp3-S 免疫的小鼠血清命名为 Rp-S1~Rp-S4, Pre-bleed 为免疫前小鼠血清对照组。

[0076] 制得抗体后, 申请人进行酶联免疫反应测定表达片段与抗体的反应性。方法如下 : 首先用纯化的蛋白包被 96 孔酶标板, 每孔加入 100 μ l 底物包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日, 取出用 PBS-T (含有体积比为 0.1% 的 Tween-20 的 PBS) 洗涤三次, 每次 5 分钟。然后, 加入 3% (质量体积比) 牛血清蛋白, 200 μ l 每孔, 37 $^{\circ}$ C, 静置 1 小时, 进行封闭。1 个小时后, 取出, PBS-T 洗涤三次, 每次 5 分钟。洗涤之后进行待测抗血清的检测。每孔加入待测血清, 终体积为 100 μ l。同时, 做正常血清和 PBS 溶液的阴性对照组。37 $^{\circ}$ C, 孵育 1 小时后, 取出反应样品, PBS-T 洗涤五次, 每次 3 分钟。以 1 : 4000 比例稀释 HRP 标记羊抗鼠二抗(武汉三鹰公司), 每孔加入 100 μ l。37 $^{\circ}$ C, 再次孵育 1 小时。取出, PBS-T 再次洗涤五次后, 依次加入底物 A (体积比 30% 过氧化氢)、B (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺, TMB 缓冲液) 液各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 避光显色 5 分钟。最后, 每孔加入 50 μ l 2M/L H₂SO₄ 终止反应。酶标仪读取 OD450 的值。OD 值大于阴性对照孔的 2.1 倍确定为阳性反应。结果如图 4 所示 : 大多数被免疫的小鼠血清都可以与 S280-455 和 S561-666 反应 :Rp-S1~Rp-S4 四份小鼠血清都可与 S280-455 反应, Rp-S1, Rp-S3 和 Rp-S4 与 S561-666 反应, 只有 Rp-S2 一份血清与 S429-574 反应, 没有血清可以跟 S1-82 及 S82-280 反应。鉴于 S561-666 区段存在着冠状病毒中非常保守的免疫显性区, 因而不能作为蝙蝠 SARS 样冠状病毒特异检测的表位, 而 S280-455 存在着蝙蝠 SARS 样冠状病毒和人 SARS 冠状病毒 S 蛋白主要区别之一, 因而申请人认为 S280-455 存在着可以被小鼠抗体识别且可被应用的主要免疫决定表位, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO. 1 所示。

[0077] 实施例 4 :

[0078] S280-455 在鉴定 S 小鼠单克隆抗体识别表位中的应用, 其应用过程为 :

[0079] 针对 Rp3-S- 的假病毒 (HIV/Rp3-S) 制备过程如下 :利用 HIVNL4-3 (Δ ENV) luc 质粒(缺失囊膜基因 ENV, 带有一个荧光素酶报告基因), 外来质粒表达的人 SARS-CoVBJ01, SL-CoVRp3 S 蛋白或一个 RBD 区被替换为 SSARS 的嵌合体 SSL, 替代 ENV 蛋白的位置, 构成 HIV/BJ01-S、HIV/Rp3-S 或 HIV/CS310-518 假病毒, 假病毒的感染成功与否可用荧光素酶的活性表示。具体的包装步骤如下 :

[0080] 转染前一天将 293T 细胞按 4×10^6 /皿密度接种于 10cm 直径细胞培养皿中, 转染前给 293T 细胞换新鲜培养基(或者换一半培养基), 转染时分 2 个 1.5ml 离心管 : 离心管 A (CaCl₂+DNA 混合物) 500 μ l (用超纯水补齐), 包括 :HIV-luc 质粒 pNL-Luc-E-R- (Rong

Liu, Benjamin Chen and Nathaniel R. Landau. Use of Luciferase Reporter Viruses for Studying HIV Entry. HIV Protocols, Methods in Molecular Medicine, 1999, HIV Volume 17, I, 35-40, DOI:10.1385/0-89603-369-4:35) 12 μ g, Rp3-S 表达质粒 pCDNA3.1-Rp3-S DNA 12 μ g, 向上述 DNA 溶液中加入 62 μ l 12M CaCl_2 , 轻轻吹吸混匀。取一个新的 1.5ml 离心管(管 B), 加入 500 μ l 12xHBS (280mMNaCl, 1.5mM Na_2HPO_4 , 50mMHepes, pH 7.10), 将 500 μ l 管 A 溶液逐滴加入管 B 溶液中, 边加入边用枪头或轻弹混匀, 室温放置 20-30min, 将上述 1ml 混合液体逐滴均匀地加入 293T 细胞培养皿中, 转染 8 至 12h 之后给细胞换新鲜培养基 10ml, 转染 48h 后, 收集 293T 细胞的培养基上清, 3000 转低速离心 5min 去除细胞碎片, 上清再用 0.45 μ m 滤器过滤除去细小细胞碎片及可能的细菌, 将过滤好的病毒上清分装冻存于 -80°C 或直接用于感染试验。

[0081] 针对 S 全长的鼠源单抗制作过程如下: 申请人首先将含 Rp3-S 的假病毒 (HIV/Rp3-S) 注射 BALB/c 小鼠, 然后将小鼠杀死后将其脾脏细胞取出并与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合而成) 进行融合。杂交瘤细胞培养上清以 ELISA 进行 Rp3-S 抗体阳性筛选, 包被抗原为假病毒 HIV/Rp3-S 和纯化的 Rp3-S1 (实施例 4)。将挑选阳性的克隆扩大培养并腹腔注射入同来源小鼠, 并收集腹水。其效价随后通过 ELISA 进行鉴定。为了避免这些单克隆抗体与 pET32a tag 的交叉反应, 在应用之前, 所有的单抗均用含 pET32a tag 的细菌裂解物进行了中和。

[0082] 接下来应用蛋白杂交试验测试 S 蛋白片段中单克隆抗体的抗原表位, 其步骤是:

[0083] 用 1 \times 样品处理液 (50mM Tris-HCl (pH6.8), 2% (W/V) SDS, 0.1% (W/V) 溴酚蓝, 10% (V/V) 甘油, 1% (W/V) β -巯基乙醇) 纯化的 S 片段蛋白并在沸水浴中煮 10 分钟, 然后以 12% 的 SDS-PAGE 进行分离。然后将蛋白胶或进行考马斯亮蓝染色或转到 PVDF 膜上。PVDF 膜在含 5% (质量体积比) 脱脂奶粉的 TBS (20mMTris base, 137mMNaCl, pH 7.6) 溶液中封闭过夜。用 TBST (含体积比为 0.1% Tween-20TBS 溶液) 洗涤 3 次, 每次 10min。然后以 1:1000 稀释的 DNA 免疫得到的 S 蛋白抗体、1:250 稀释的 S 蛋白单抗 37 $^\circ\text{C}$ 孵育一小时, 抗体孵育液为含 1% (质量体积比) 脱脂奶粉的 TBST。弃去一抗孵育液, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10min。加入 AP 标记 1:2000 稀释的羊抗鼠二抗 37 $^\circ\text{C}$ 孵育一小时。弃去二抗孵育液, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10min。PVDF 膜在 10mL 碱性磷酸酶显色液 (33 μ l 5-溴-4-氯吲哚磷酸盐 +66 μ l 氯化硝基四氮唑蓝) 避光显示, 并及时终止反应。所有的四个单抗均可以特异的识别 S280-455 而不是 pET32a Tag 或其它四个截断表达的 S。这些数据印证了该区域是重要的免疫显性区。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院武汉病毒研究所

<120> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白免疫决定区及制备方法和用途

<130> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒刺突蛋白免疫决定区及制备方法和用途

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 176

<212> PRT

<213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒

<400> 1

Ile Asp Cys Ala Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys Thr Ile Lys
1 5 10 15

Asn Phe Asn Val Ser Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val
 20 25 30

Ser Pro Thr Gln Glu Val Ile Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Arg Cys
 35 40 45

Pro Phe Asp Lys Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Pro Asn Val Tyr Ala
 50 55 60

Trp Glu Arg Thr Lys Ile Ser Asp Cys Val Ala Asp Tyr Thr Val Leu
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro
85 90 95

Ser Lys Leu Ile Asp Leu Cys Phe Thr Ser Val Tyr Ala Asp Thr Phe
100 105 110

Leu Ile Arg Ser Ser Glu Val Arg Gln Val Ala Pro Gly Glu Thr Gly
115 120 125

Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys
130 135 140

Val Ile Ala Trp Asn Thr Ala Lys Gln Asp Gln Gly Gln Tyr Tyr Tyr
145 150 155 160

Arg Ser His Arg Lys Thr Lys Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Leu Ser
165 170 175

<210> 2

<211> 1998

<212> DNA

<213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒

<400> 2

atgaaaattt taattcttgc tttcctagct agtctagcta aagcacaaga aggatgtggc 60

attatcagtc gaaaacctca gccaaaaatg gcacaagtct cttcttctcg tagagggtgtg 120

tactataatg atgacatttt tcgttcta atgtactacacc tgacgcagga ttatttctgt 180

ccatttgatt caaatttaac acagtacttt tctcttaatg ttgattcaga taggtttacc 240

tactttgaca atcctatnttt agacttttggg gacggcgtct acttcgctgc tactgaaaag	300
tctaattgtaa ttaggggctg gatttttggg tccactttcg ataacacaac ccagtcagct	360
gttatagtta ataattccac acacattatt atacgtgtgt gcaacttcaa cttatgtaaa	420
gaacctatgt atacagtgtc tcgtgggtgca caacaatcat cttgggttta tcagagtgc	480
ttcaattgca catatgatag agtggaaaa agctttcagc tcgacactgc tcctaaaact	540
ggaaatttta aagacctacg tgagtatgtc tttagaatc gggatggctt tctcagtgtt	600
taccaaactt atacagctgt taatttacct agaggattac ctattggctt ttcagttttg	660
aggccaattc tcaaactgcc ctttgggaatt aacattacat cttatagagt tgttatggct	720
atgttttagcc aaactacttc taatttccca ccagaaagtg ctgcttatta tgttggtaat	780
ttaaaataca ccactttcat gcttagtttt aatgaaaatg ggactattac caatgctatt	840
gattgtgctc aaaaccact tgctgaacta aatgcacca ttaaaaattt caatgctcagc	900
aagggaatct accaaacatc taacttcaga gtttcgcca ctcaggaagt tattagattc	960
ccaaacatta caaatcgttg tcttttgac aaagttttta atgctacacg ctttcctaat	1020
gtgtatgcgt gggagagaac taaaatttct gattgtgttg ctgactacac tgttctctac	1080
aactcaactt ctttctcaac ttttaagtgc tatggagttt ctccttctaa gttgattgat	1140
ttatgcttta caagtgtgta tgctgacaca ttcttgataa gatcttcaga agtaagacaa	1200
gttgaccgg gtgaaactgg tgcattgct gactataatt acaagctgcc tgatgatttt	1260
actggttgcg taatagcctg gaatactgca aagcaggatc aaggtcagta ttactacagg	1320
tctcaccgga agactaaact taaaccttt gagagagacc tttcttctga tgaaaatgg	1380
gtacgtactc ttagtactta cgacttctac cctagtgtgc cggttgctta tcaggetact	1440

agggtggttg tactgtcatt tgaactacta aacgcacctg caacagtttg tggacctaaa	1500
ttatccacac aacttggttaa gaaccagtgt gtcaatttta attttaatgg actcaaaggt	1560
actggtgttt tgactgaate atcaaagaga tttcagtcac ttcaacaatt tggtcgtgac	1620
acgtctgatt ttactgactc cgtgcgtgac ccacaaacat tagaaatact tgacatttca	1680
ccatgctctt ttggtggtgt tagtgtaatt acaccaggaa caaatgcttc ttctgaagtg	1740
gctgttcttt atcaagatgt taactgtact gacgtgccag cagcaattca tgcagatcaa	1800
ctaacaccag cttggcgtgt ttattcaact ggaacaaatg ttttccaaac acaggctggc	1860
tgtcttatag gagctgaaca tgttaatgct tcgtatgagt gtgacatccc tattggtgct	1920
ggcatttggtg ctagctacca tacagcttct actttacgta gtgtaggtca gaaatccatt	1980
gtggcttaca ctatgtct	1998
<210> 3	
<211> 243	
<212> DNA	
<213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒	
<400> 3	
atgaaaattt taattcttgc tttcctagct agtctagcta aagcacaaga aggatgtggc	60
attatcagtc gaaaacctca gccaaaaatg gcacaagtct cttcttctcg tagaggtgtg	120
tactataatg atgacatttt tcgttctaata gtactacacc tgacgcagga ttatttctg	180
ccatttgatt caaatthaac acagtacttt tctcttaatg ttgattcaga taggtttacc	240
tac	243

<210>	4	
<211>	597	
<212>	DNA	
<213>	蝙蝠 SARS 样冠状病毒	
<400>	4	
	tttgacaatc ctatTTtaga cTTtggtgac ggcgtctact tcgctgctac tgaaaagtct	60
	aatgtaatta ggggctggat tTTtggttcc actttcgata acacaacca gtcagctggt	120
	atagTTaata attccacaca cattattata cgtgtgtgca acttcaactt atgtaaagaa	180
	cctatgtata cagtgtctcg tggTgcacaa caatcatctt gggTTtatca gagtgcattc	240
	aattgcacat atgatagagt ggaaaaaage tttcagctcg aactgctcc taaaactgga	300
	aTTTTaaag acctacgtga gtatgtcttt aagaatcggg atggctttct cagtgtttac	360
	caaacttata cagctgttaa tttacctaga ggattaccta ttggcttttc agTTTTgagg	420
	ccaattctca aactgccctt tggaattaac attacatctt atagagttgt tatggctatg	480
	tttagccaaa ctacttctaa tttectacca gaaagtgtg cttattatgt tggtaatTTa	540
	aaatacacca cTTTcatgct tagTTTTaat gaaaatggga ctattaccaa tgctatt	597
<210>	5	
<211>	525	
<212>	DNA	
<213>	蝙蝠 SARS 样冠状病毒	
<400>	5	
	gattgtgctc aaaaccact tgctgaacta aaatgcacca ttaaaaattt caatgtcage	60
	aagggaatct accaaacatc taacttcaga gTTtcgccaa ctcaggaagt tattagattc	120
	ccaaacatta caaatcgttg tcctTTtgac aaagTTTTa atgctacacg cTTTcctaat	180

gtgtatgcgt gggagagaac taaaatttct gattgtgttg ctgactacac tgttctctac	240
aactcaactt ctttctcaac ttttaagtgc tatggagttt ctccttctaa gttgattgat	300
ttatgcttta caagtgtgta tgctgacaca ttcttgataa gatcttcaga agtaagacaa	360
gttgaccgg gtgaaactgg tgtcattgct gactataatt acaagctgcc tgatgatttt	420
actggttgcg taatagcctg gaatactgca aagcaggatc aaggtcagta ttactacagg	480
tctcaccgga agactaaact taaacctttt gagagagacc tttct	525

- <210> 6
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒

<400> 6	
actgcaaagc aggatcaagg tcagtattac tacaggtctc accggaagac taaacttaaa	60
ccttttgaga gagacctttc ttctgatgaa aatgggtgtac gtactcttag tacttacgac	120
ttctacccta gtgtgceggg tgcttatcag gctactaggg tggttgtact gtcattttaa	180
ctactaaacg cacctgcaac agtttgtgga cctaaattat ccacacaact tgtaagaac	240
cagtgtgtca attttaattt taatggactc aaaggtactg gtgttttgac tgaatcatca	300
aagagatttc agtcatttca acaatttggg cgtgacacgt ctgattttac tgactccgtg	360
cgtgaccac aaacattaga aatacttgac atttcacat gctcttttgg tgggttagt	420
gtaattacac caggaaca	438

- <210> 7
 <211> 306
 <212> DNA

<213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒	
<400> 7	
ccatgctctt ttggtggtgt tagtgtaatt acaccaggaa caaatgcttc ttctgaagtg	60
gctgttcttt atcaagatgt taactgtact gacgtgccag cagcaattca tgcagatcaa	120
ctaacaccag cttggcgtgt ttattcaact ggaacaaatg ttttccaaac acaggctggc	180
tgtcttatag gagctgaaca tgттаатgct tcgtatgagt gtgacatccc tattggtgct	240
ggcatttgtg ctagctacca tacagcttct actttacgta gtgtaggtca gaaatccatt	300
gtggct	306
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒	
<400> 8	
tgccgatcc attgattgtg ctca	24
<210> 9	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 蝙蝠 SARS 样冠状病毒	
<400> 9	
cagtgtcgac ttaagaaagg tctctctcaa a	31

Rp3 : IDCAQNPLAELKCTIKNENVSKGIYQTSNFRVSPTEQEVIRFPNITNRCPEFDKVFNATREFPNVYAWERTKISDCVADYTVLY
 Tor2 : VDCSQNPLAELKCSVKSEFIDKGIYQTSNFRVSPTEQEVIRFPNITNRCPEGEVFNATKFEPSVYAWERTKISNVCVADYSVLY

Rp3 : NSTSESTFKCYGVSPSKLDLCFTSVYADTEFLRSSEVVRQVAPGETGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTAQQDQ-----Q
 Tor2 : NSTSESTFKCYGVSA TKLNDLCF SNVYADSFVVKSEEDVVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFTGCVLAWNTRNIDATSTGNIN

Rp3 : YNYRSHRKTTLKPFERDLS-----SDE-----NGYRTLSTYDFYPSVPPVAYCATRVVVLSEPELLNAPATVCGPKLSTQ
 Tor2 : YNYRYLRHCKLRPFERDISNVPESPDGKECTPPALNCYWPLNDYGFYTTGIGYQPYRVVVLSEPELLNAPATVCGPKLSTQ

图 1

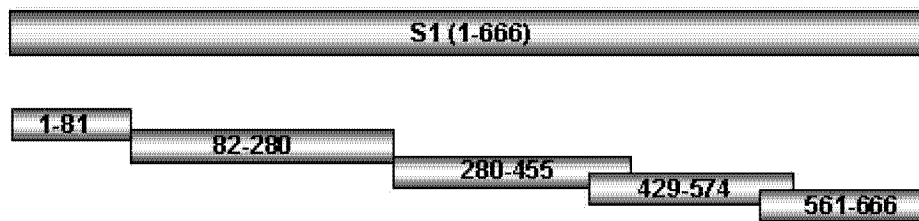


图 2

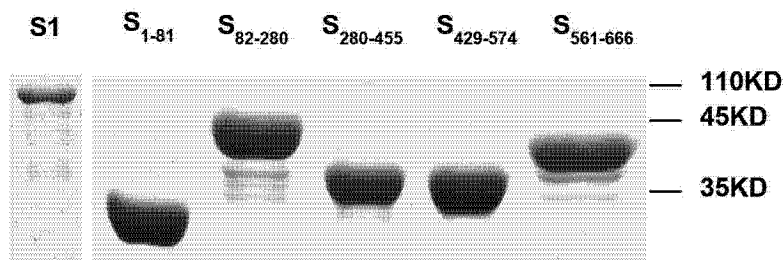


图 3

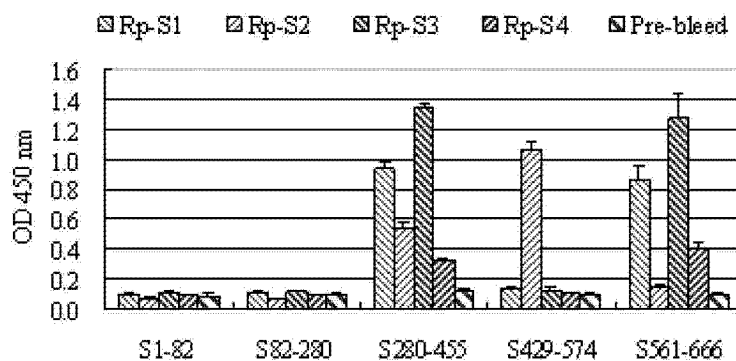


图 4

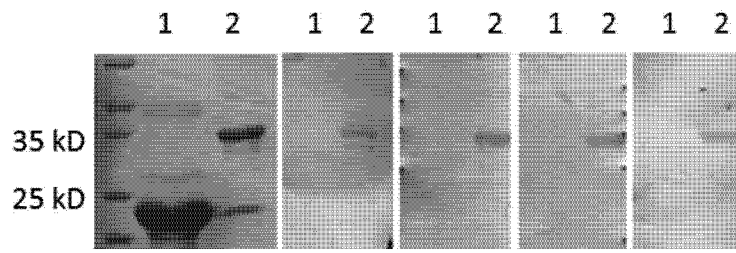


图 5