



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105233302 B

(45)授权公告日 2018.10.19

(21)申请号 201410328217.5

A61P 31/16(2006.01)

(22)申请日 2014.07.10

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 101405026 A,2009.04.08,

申请公布号 CN 105233302 A

CN 103209990 A,2013.07.17,

(43)申请公布日 2016.01.13

张晓红等.甲型H1N1流感病毒血凝素HA1在糖基工程毕赤酵母中的表达.《生物技术通讯》.2012,第23卷(第1期),第1-5页.

(73)专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
生物工程研究所

TN Athmaram et.al..Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of

地址 100071 北京市丰台区东大街20号

Novel H1N1 elicits neutralizing

(72)发明人 吴军 刘波 唱韶红 巩新 王莎

antibodies in rabbits and mice.《Virology Journal》.2011,第524卷(第8期),摘要、第1页右栏最后1段、第3页右栏第1段、第9-10页、Figure 1.

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 陈晓庆

审查员 崔娟娟

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页

序列表6页 附图13页

(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)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。

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基因在酵母中表达的方法为将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;

所述酵母为毕赤酵母、汉逊酵母或乳酸克鲁维酵母。

3. 根据权利要求1或2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。

4. 根据权利要求3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。

5. 根据权利要求4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基因插入含有AOX启动子的载体得到,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基因插入pPICZα的NotI和NspV酶切位点间,并用Bg1II线性化得到;

所述酵母为毕赤酵母;

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基因如SEQ ID No.4所示;

或,

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HA基因如SEQ ID No.14所示;

或,

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基因如SEQ ID No.21所示。

6. 根据权利要求4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基因插入含有MOX启动子的载体得到,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基因插入pPICZα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Bg1II线性化得到;

所述酵母为汉逊酵母;所述汉逊酵母为多型汉逊酵母;

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的方法为将所述PCR扩增得到的MOX启动子进行Bg1II酶切,并进行磷酸化,获得5'端为Bg1II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Bg1II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Bg1II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基因具体如SEQ ID No.8所示。

7. 根据权利要求4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基因插入含有LAC4启动子的载体得到，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基因插入pKLAC1的HindIII和NotI酶切位点间，再用SacII线性化得到；

所述酵母为乳酸克鲁维酵母；

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基因如SEQ ID No.17所示。

8. 根据权利要求或2所述的方法，其特征在于：所述细胞破碎的方法为物理方法、生物方法或化学方法；

所述去污剂为非离子型去污剂或弱离子型去污剂。

9. 根据权利要求8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；

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。

10. 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于：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；

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，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。

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

[0001] 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

[0002] 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。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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(Virology Journal 2011, 8:524; Virus Genes 2012 45:440-451; J Ind Microbiol Biotechnol 2013, 40:245-255)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。

发明内容

[0006] 本发明公开了一种流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的制备方法。

[0007] 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;

[0008] 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基因在信号肽序列之前还含有Kozak序列,Kozak序列为5' -aaacg-3' ;

[0009] 所述加入去污剂和细胞破碎之间具体还含有离心得沉淀的步骤;

[0010] 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;

[0011] 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;

[0012] 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。

[0013] 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基因在酵母中表达的方法为将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;

[0014] 所述酵母为毕赤酵母、汉逊酵母或乳酸克鲁维酵母;

[0015] 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;

[0016] 所述培养具体为摇瓶培养或发酵罐培养,根据控制所述HA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HA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HA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;

[0017] 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；

[0018] 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；

[0019] 所述白蛋白的信号肽具体为血清白蛋白的信号肽。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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基因插入含有AOX启动子的载体得到，具体是将所述含有信号肽序列和C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素HA基因插入pPICZ α 的NotI和NspV酶切位点间，并Bg1III线性化得到；

[0023] 所述酵母为毕赤酵母；

[0024] 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基因具体如SEQ ID No.4所示；

[0025] 所述H7N9禽流感病毒为A/Hongzhou/1/2013 (H7N9)；

[0026] 或，

[0027] 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C-端穿膜区序列的流感病毒的血凝素HA基因具体如SEQ ID No.14所示；

[0028] 所述甲型H1N1流感病毒具体为A/FortMonmouth/1/47 (H1N1)；

[0029] 或，

[0030] 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基因具体如SEQ ID No.21所示；

[0031] 所述甲型H3N2流感病毒具体为A/reassortant/NYMC X-223A (Texas/50/2012x PuertoRico/8/1934) (H3N2)。

[0032] 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基因插入含有MOX启动子的载体得到，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Bg1III线性化得到；

[0033] 所述酵母为汉逊酵母，具体为多型汉逊酵母；

[0034] 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；

[0035] 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Bg1III酶切，并进行磷酸化，获得5'端为Bg1III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Bg1III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Bg1III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；

- [0036] 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基因具体如SEQ ID No.8所示;
- [0037] 所述H5N1禽流感病毒具体为A/duck/Guangxi/27/2003 (H5N1)。
- [0038] 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基因插入含有LAC4启动子的载体得到,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基因插入pKLAC1的HindIII和NotI酶切位点间,再用SacII线性化得到;
- [0039] 所述酵母为乳酸克鲁维酵母;
- [0040] 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基因具体如SEQ ID No.17所示。
- [0041] 所述H7N9禽流感病毒具体为A/Hongzhou/1/2013 (H7N9)。
- [0042] 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;
- [0043] 所述物理方法具体为玻璃珠振荡法、高压匀浆法或球磨法;
- [0044] 所述生物方法具体为酶裂解法;
- [0045] 所述化学方法具体为碱裂解法;
- [0046] 所述去污剂为非离子型去污剂或弱离子型去污剂;
- [0047] 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;
- [0048] 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;
- [0049] 所述曲拉通具体为TritonX-100;
- [0050] 所述吐温具体为Tween20;
- [0051] 所述乙基苯基聚乙二醇具体为NP-40;
- [0052] 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;
- [0053] 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。
- [0054] 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。
- [0055] 所述阳离子交换层析的填料具体为Sepharose FF SP;
- [0056] 所述阴离子交换层析的填料具体为Source30Q;
- [0057] 所述凝胶排阻层析的填料具体为Superdex200;
- [0058] 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,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。
- [0059] 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 $\leq 10\%$;
- [0060] 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。
- [0061] 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备的流感疫苗也属于本发明的保护范围;

[0062] 所述疫苗具体还包含佐剂；

[0063] 所述佐剂具体为铝佐剂,再具体为氢氧化铝佐剂。

[0064] 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。

附图说明

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 图25为实施例7中的血凝活性检测。

[0090] 图26为实施例8中的血凝活性检测。

[0091] 图27为实施例9中的血凝活性检测。

具体实施方式

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] pPICZ α 载体购自Invitrogen公司。

[0096] 毕赤酵母X-33购自Invitrogen公司。

[0097] TPCK处理胰蛋白酶(TPCK-Trypsin)购自Sigma公司。

[0098] 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。

[0099] Pyrobest DNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。

[0100] pKLAC1购自NEB。

[0101] 乳酸克鲁维酵母购自NEB。

[0102] 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

[0103] 一、重组表达载体的构建

[0104] (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。

[0105] (二) 设计并合成如下引物:

[0106] HA7-3:5' -ATCGCGGCCGCTTAAATACAGATAGTACATCTCAT-3' (SEQ ID No.2)

[0107] 下划线所示序列为NotI酶切识别位点。

[0108] HA7-5:5' -ATCTTCGAAACGATGAACACCCAAATACTGGTTTTTC-3' (SEQ ID No.3)

[0109] 下划线所示序列为NspV酶切识别位点。

[0110] (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。

[0111] (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pPICZα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pPICZα-HA7。将pPICZα-HA7测序,结果正确。

[0112] 二、重组酵母的构建和筛选

[0113] 将约10μg pPICZα-HA7质粒,用BgIII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30μL水重悬沉淀,获得用于转化的pPICZα-HA7线性化质粒。

[0114] 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)”,2012Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York。

[0115] 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℃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℃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500mLYPD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℃,1500g离心10分钟。用500mL预冷的无菌水重悬菌体,4℃,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℃,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。

[0116] 取80μL菌悬液与10μL用于转化的pPICZα-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,25μF,200Ω),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。

[0117] 将培养管放在28℃温箱孵育1h,不要摇动。然后加入1mL YPD液体培养基后在28℃,250rpm的摇床中孵育3h。取200μL转化细胞涂布到含100μg/mL Zeocin的YPD平板上。28℃温箱培养2-5天,至形成单克隆。

[0118] 随机挑取单克隆接种到2mL YPD液体培养基中,28℃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, 4×10^{-5} g/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 $^{\circ}$ C, 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。

[0119] 三、工程酵母发酵

[0120] 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 $^{\circ}$ C, 250rpm培养约48h。再转接于YPD液体摇瓶培养基300mL中, 接种量为1%, 25 $^{\circ}$ C, 250rpm培养, 至菌密度OD600大于10, 得到种子液。

[0121] 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, PTM 11.2mL/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 $^{\circ}$ C, 30min高压灭菌。待发酵罐降至室温, 用氨水调节pH 6.0。

[0122] 以10%的接种量将种子液接入发酵罐, 氨水控制pH 6.0, 温度为28 $^{\circ}$ C, 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 \times 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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 7000rpm/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。

[0123] 四、流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的纯化

[0124] (一) 500ml步骤三得到的匀浆液中加50g PEG2000, 搅拌溶解0.5h, 7000rpm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% Triton X-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。8000rpm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。

[0125] (二) 阳离子色谱柱(色谱介质为Sepharose FF SP(购自GE), 床层为 0.5×15 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 pH 6.0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 pH 6.86

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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 图1表明,HA组分所在的样品为15% C液的洗脱液。

[0129] (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Source30Q(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。

[0130] 图2中,Q穿代表上样时未被Source30Q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。

[0131] 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(Source30Q)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。

[0132] 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(Source30Q)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。

[0133] 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组分所在的样品为该步骤的10% C液的洗脱液。

[0134] (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pH7.0的20mM PB)进行洗脱,流速1ml/min,结果如图3A所示。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 五、流感病毒血凝素糖蛋白聚合物的结构分析

[0140] 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20 μ l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330 μ g/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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 六、胰蛋白酶切割的HA制备

[0145] 为了制备被蛋白酶特异切割成HA1和HA2的HA,取浓度为330 μ g/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16 μ g,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 $^{\circ}$ 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16 μ g,同样冰浴处理1小时,作为对照组。

[0146] 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。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 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。

[0150] 七、血凝实验

[0151] 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”。

[0152] 血凝活性检测结果如图6所示。

[0153] 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。

[0154] 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。

[0155] 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}07.8×30cm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。

[0156] 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。

[0157] 图7B表明H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒纯度达到了99.69%。

[0158] 图7表明,H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒在该条件分析下,保留时间为16.971min,说明其分子量明显大于670KD,由于HA0单体的分子量为64KD,其三聚体的分子量约为180KD,说明H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒为含9个以上HA0单体形成的多聚体,而胰蛋白酶切割实验和血凝实验均表明H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒具有流感血凝素的三聚体高级结构,因此,该H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒为三个以上HA0三聚体形成的多聚体。

[0159] 将制备的H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒负染后用50,000倍电子显微镜照相,结果如图8所示。

[0160] 图8中的标尺为20纳米。

[0161] 图8表明,H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒为至少3个以上血凝素三聚体(此处的血凝素三聚体是指三个HA0单体聚合形成的三聚体)尾部在内聚合,头部向外突出,形成的多聚体颗粒,直径约20-50纳米。

[0162] 实施例2、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流感疫苗

[0163] 将实施例1制备的H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒用pH7.4的PBS稀释至7.5μg/50μl,添加等体积的1.2mg/ml Al(OH)₃佐剂(购自GE公司,商品名为Rehydragel@LV),制成流感疫苗,为实验组注射液。同时,设其中不加H7N9流感血凝素糖蛋白多聚物纳米颗粒的溶液为对照组注射液。

[0164] 实验组和对照组每组5只小鼠,每组每只小鼠后腿肌肉注射相应组的注射液100μ

1.第一次注射三个星期后加强免疫一次,加强免疫后一个星期采血得血清进行血凝抑制实验,血凝抑制实验的标准血凝素为WHO(世界卫生组织)推荐的英国国立生物标准与参考品研究所NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control,a centre of the Medical and Healthcare products Regulatory Agency(MHRA),United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland,)提供的H7N9流感重配疫苗株(NIBRG-268)的鸡胚培养病毒经1:2000甲醛灭活后制备.H7N9流感重配疫苗株(NIBRG-268)的鸡胚培养病毒经1:2000甲醛灭活后制备的病毒制备标准血凝素、稀释和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”。

[0165] 各组小鼠血清中中和抗体的血凝抑制活性结果如图9所示。

[0166] 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。

[0167] 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。

[0168] 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

[0169] 一、重组表达载体的构建

[0170] (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。

[0171] (二)设计并合成如下引物:

[0172] HA5-5:5'-ATCTTCGAAACGatggagaaaatagtgtcttc-3'(SEQ ID No.6)

[0173] 下划线所示序列为BstB I酶切识别位点。

[0174] HA5-3:5'-ATCGCGCCGCTtaaattgcaaattctgcattg-3'。(SEQ ID No.7)

[0175] 下划线所示序列为NotI酶切识别位点。

[0176] (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N端到C端依次包含了Kozak序列、信号肽序列、HA基因(包含C端穿膜区序列)。

[0177] 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。

[0178] (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。

[0179] 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BgIII酶切识别位点)和MOX3:5'-TGTTTTTGTACTTTAGATTGATG-3'(SEQ ID No.10)。

[0180] 2、以多型汉逊酵母ATCC26012(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。

[0181] PCR体系:1 μ g基因组DNA,4 μ l dNTP(2.5mM),5 μ l10 \times Pyrobest Buffer,1 μ l10 μ M

MOX5引物,1 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。

[0182] 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。

[0183] PCR扩增产物为约1.5kb的目的片段,将其用BglIII酶切,并对酶切片段进行磷酸化,获得5'端为BglIII酶切粘性末端,3'端磷酸化的1.5kb的MOX启动子。

[0184] 3、将pPICZ-(H5N1)HA载体用NspV单酶切后用Klenow fragment大片段酶和dNTP补平,电泳回收后,再用BglIII酶切,切除AOX启动子。

[0185] 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BglIII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。

[0186] 二、将pMOXZ-HA5载体用BglIII线性化后,电转化多型汉逊酵母(ATCC26012(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 μ g/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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C培养24-48h,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 \times 10 $^{-5}$ g/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)。

[0187] 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

[0188] 挑取Hans(pMOX-HA5)单菌落接种于3mlYPD液体培养基中,30 $^{\circ}$ C,250rpm生长1-2天,至菌密度OD600大于10,以体积比2%转接至装有100mlYPD液体培养基的1L摇瓶中,30 $^{\circ}$ C,250rpm培养24小时,以体积比5%转接至10个装有150mlBMGY液体培养基的1L摇瓶中,30 $^{\circ}$ 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)。

[0189] 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)。

[0190] 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。

[0191] 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,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。

[0192] 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。

[0193] 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。

[0194] 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。

[0195] 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

[0196] 一、重组表达载体的构建

[0197] (一)合成来源于H1N1流感病毒(A/FortMonmouth/1/47(H1N1))的SEQ ID No.11。

[0198] (二)设计并合成如下引物:

[0199] HA1-5:5'-ATCTTCGAAACGatgaaagcaaaactactgatc-3'(SEQ ID No.12)

[0200] 下划线所示序列为NspV酶切识别位点。

[0201] HA1-3:5'-gatGCGGCCGctcagatgcatattctgcattg-3'(SEQ ID No.13)

[0202] 下划线所示序列为NotI酶切识别位点。

[0203] (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。

[0204] 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pPICZα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pPICZα-HA1。将pPICZα-HA1测序,结果正确。

[0205] 二、重组酵母的构建和筛选

[0206] 将约10μg pPICZα-HA1质粒,用BglIII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。

[0207] 三、工程酵母发酵同实施例1中的步骤三。

[0208] 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。

[0209] 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)。

[0210] 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切除糖基后血凝素糖蛋白(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。

[0211] 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。

[0212] 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。

[0213] 电镜照片显示^(H1N1)HA形成20-50nm的多聚体颗粒。

[0214] 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。

[0215] 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。

[0216] 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

[0217] 一、重组表达载体的构建

[0218] (一)设计并合成如下引物:

[0219] HA7-HindIII-5:5' -ATCAAGCTTACGATGAACACCCAAATACTGGTTTTTC-3' (SEQ ID No.15)

[0220] 下划线所示序列为HindIII酶切识别位点。

[0221] HA7-3:5' -ATCGCGCCGCTTAAATACAGATAGTACATCT-3' (SEQ ID No.16)。

[0222] 下划线所示序列为NotI酶切识别位点。

[0223] (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,该分子从N端到C端依次包含Kozak序列,信号肽序列,HA基因(含有C端穿膜区序列)。

[0224] (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。

[0225] 二、重组酵母的构建和筛选

[0226] 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30μL水重悬沉淀,获得用于转化的pKLAC1-^(H7N9)HA7线性化质粒。

[0227] 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。

[0228] 取80μL感受态细胞与10μL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,25μF,200Ω),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。

[0229] 将离心管放在28℃温箱孵育2h,不要摇动。取200μL转化细胞涂布于含有5mM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℃培养3-4天直至单克隆出现。

[0230] 随机挑取单克隆接种到2ml YPD液体培养基中,28℃培养48h,按体积比5%的接种量接种到YPGa1液体培养基(酵母提取物10g/L,胰蛋白胨20g/L,半乳糖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100u1PBS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。

[0231] 三、工程酵母发酵

[0232] 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。

[0233] 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)。

[0234] 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。

[0235] 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。

[0236] 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。

[0237] 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。

[0238] 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。

[0239] 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

[0240] 将^(H7N9)HA(K.lactis)用pH7.4的PBS分别稀释到0μg、6μg、12μg/50μl三个不同的剂量组,同时,每组均添加等体积的1.2mg/mlAl(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。

[0241] 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。

[0242] 血清中中和抗体的血凝抑制活性结果如图21所示。

[0243] 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。

[0244] 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。

[0245] 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

[0246] 一、重组表达载体的构建

[0247] (一)根据Genbank (A/reassortant/NYMC X-223A (Texas/50/2012x 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。

[0248] (二)设计并合成如下引物:

[0249] HA3-5:5' -ATCTTCGAAACGatgaagactatcattgcttt-3' (SEQ ID No.19)

[0250] 下划线所示序列为NspV酶切识别位点。

[0251] HA3-3:5' -gatgcggccgctcaaatgcaaatgttgacctaataatgttgccctt-3' (SEQ ID No.20)

[0252] 下划线所示序列为NotI酶切识别位点。

[0253] (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,。

[0254] 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)

[0255] 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。

[0256] 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。

[0257] 二、重组酵母的构建和筛选

[0258] 将约10 μ g pPICZ α -HA3质粒,用BglII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。

[0259] 三、工程酵母发酵同实施例1中的步骤三。

[0260] 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。

[0261] 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。

[0262] 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。

[0263] 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。

[0264] 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。

[0265] 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。

- [0266] 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。
- [0267] 图24表明,实验组小鼠血清的平均血凝抑制效价达到1:320。
- [0268] 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。
- [0269] 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
- [0270] 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。
- [0271] 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。
- [0272] 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。
- [0273] 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
- [0274] 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。
- [0275] 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。
- [0276] 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。
- [0277] 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
- [0278] 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。
- [0279] 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。
- [0280] 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。
- [0281] 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
- [0282] 实施例1中步骤三得到发酵液之后,将发酵液于4℃,7000rpm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,7000rpm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2h,收集上清,用磷酸盐调节pH为6.0,取各个样品做ELISA分析。
- [0283] 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 Na₂CO₃,0.293g/100ml NaHCO₃,pH9.6,余量为水)稀释100倍,然后各取100μL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稀释)(该抗体购自华美生物工程有限公司),每孔各加100μL显色液(1.84g/100ml Na₂HPO₄·12H₂O,0.5g/100ml柠檬酸,临用前再加0.04g/100ml

OPD和体积百分含量0.15%的H₂O₂), 37℃避光温育15min, 最后每孔加20μL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。

[0284] 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。

[0285] 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

[0286]

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

序列表

<110>中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所
 <120>一种流感病毒糖蛋白多聚物的米糠粉的制作方法
 <160>21

<210>1
 <211>1683
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223>
 <400>1

atgaacacc	aaatactggt	tttcgctcta	atfgotata	tcactacca	tgcgtataa	60
acctgttgg	gacacatgc	tgtatatac	ggacgaaag	taaacacctt	aacagaacgt	120
gggttagag	tagttaatg	caagaaaca	gtggaatga	caaacatccc	tagaatttgc	180
ttaaaagaa	aaagaacag	agacttaga	zagtgcggt	tactgggaa	tattacggg	240
ctctctcaat	gtgaccaat	tctggaatt	tccagagcc	tgaattatga	aagaaggag	300
ggttccgatg	tgtgtatcc	ggaaagttc	gtcaatgaag	aagccttgcg	tcaaatcttg	360
cgagaatcag	gaggaaatga	taaggaggt	atgggttca	catcttcagg	tattagaact	420
aacggctgta	caagtgcatg	cagaaggta	gtagtctct	ttaacccga	aatgaaatgg	480
ttgtttgcca	atactgataa	tgtctgcttt	ccanagatga	ctaagtctta	caagaacana	540
cgaaaatctc	tcgaccttat	cgtttggggt	atttatcatr	taagtctaac	tgcagaatcg	600
accagctctt	atggtgctgg	aaacaagtt	gttatcagtt	gttctcttaa	ttattaacag	660
tcaatttgcg	catctccggg	cgctctctc	caagttaaag	gaatttctgg	tagaatagat	720
ttctactggc	taactgctaa	tcaaaatgac	aeggtgactt	ttagttttaa	tggggctttt	780
atcgcacctg	atagggcatc	ttctcttjaga	gggaagtcca	tgggtatcca	atctggtgtt	840
caagtgatg	ccaaattgtg	gggtgatgt	tateacagtg	gtgggactat	tatatccaat	900
tgtccctccc	agaaacttga	ttccagagct	gtcgttaaat	gtcccaagata	cgtaagcaaa	960
ggttccctac	tatttggctac	cggtafjgaag	aacttcccag	aaatctccaaa	gggtagagga	1020
ttgtctggag	ctatagctgg	ttttatagaa	aatggatggg	aaggtttaat	agatggatgg	1080
tccggactca	gaatctcaaaa	tgtctcaagg	gagggtactg	ctgctgaatc	taagtataca	1140
cagtccagca	tccgaccaat	ctccggtaaa	tjgaacccgac	ttattgagaa	gaatcaacca	1200
caatttcgag	tgattgacaa	cgagttcaat	gaagttaga	agcagattgg	caatgtcaat	1260
aactggacca	gagatctcat	tactgaggtc	tgtttctaga	acgcagattt	gttggttgct	1320
atggaaaac	aacataccat	tgatcttgc	gattcagaga	tggataaac	gtacgagaga	1380
gftaaaggg	agttacgtga	gaatccagaa	gaggatgaa	ctggctgctt	tgaactcttt	1440
caaaaatgtg	atgacgactg	catggcaagt	atcaggaaca	ajactiatga	ccactccaaa	1500
tccgagaaag	aagcaatgca	aaacagaatc	caagttgacc	ctgttaaac	gtcttctctg	1560
tacaagactg	tatctcttgg	gtttagtttc	ggggctctct	gctttatitc	gcttgcactt	1620
gftatgggtc	ttgtctcat	atgtgtgaaa	aacggcaata	tgagahgtac	tatctgtatt	1680
taa					1683	

<210>2
 <211>35
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223>
 <400>2

atcgggggccg	cttaaatata	gatagtacat	ctcat			35
-------------	------------	------------	-------	--	--	----

<210>3
 <211>36
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223>
 <400>3

atcttggaaa	cgatgaatcc	ccaaatactg	gttttgcctc	taattgctat	catccctacc	60
aatgtctgata	aaatttgttt	gggacabcat	gctgtatcta	abggcatgaa	agtaaacact	120
ttaccagaac	gtgggttaga	ggtagctaat	gcaacggaaa	cagtggaaag	taccacatcc	180
cttagaattc	gtctaaaggg	aaaaagaaaca	gtagaattag	gacagtggcg	tttaactggga	240
actattacgg	gccctctca	atgtgaccaa	ttctggaa	tttcgcaga	cttgattatt	300
gaaagaaggg	agggctccga	tgtgtgttat	ccgggaagt	togtcaatga	agaagccttg	360
cgtaaatctt	tjcgagaatc	aggaggaatc	gataaaggag	ctahgggtt	ccactattca	420
ggtatctaga	ctaaacggctc	tacaagtgca	tgcagaaggt	caagtagtcc	ctttcacccc	480
gaaatgaaat	ggttgttgtc	paatactgat	aatgctctct	ttccacagat	gactaaagtct	540
tacaagaaca	caagaaaatc	tcccgccctt	atcgtttggg	gfaattcaica	tccagtgcca	600
actgcagaa	agaccaaagt	ttatgttagt	ggaacaaagt	tagttacagt	tggttcttct	660
aaatataca	agtcatttgc	gccatctccc	ggcgtctgta	caacaagttaa	aggaatttct	720
ggtagaatag	atcttccactg	gctaatgcta	aatccaaaty	acacggtgac	tttagtttct	780
aatggggctt	ttcttcgacc	tgatagggca	ctttttttga	gagggaagtc	catgggtatc	840

<210>4
 <211>1706
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223>
 <400>4

atcttctgaaa	cgatgaatcc	ccaaatactg	gttttgcctc	taattgctat	catccctacc	60
aatgtctgata	aaatttgttt	gggacabcat	gctgtatcta	abggcatgaa	agtaaacact	120
ttaccagaac	gtgggttaga	ggtagctaat	gcaacggaaa	cagtggaaag	taccacatcc	180
cttagaattc	gtctaaaggg	aaaaagaaaca	gtagaattag	gacagtggcg	tttaactggga	240
actattacgg	gccctctca	atgtgaccaa	ttctggaa	tttcgcaga	cttgattatt	300
gaaagaaggg	agggctccga	tgtgtgttat	ccgggaagt	togtcaatga	agaagccttg	360
cgtaaatctt	tjcgagaatc	aggaggaatc	gataaaggag	ctahgggtt	ccactattca	420
ggtatctaga	ctaaacggctc	tacaagtgca	tgcagaaggt	caagtagtcc	ctttcacccc	480
gaaatgaaat	ggttgttgtc	paatactgat	aatgctctct	ttccacagat	gactaaagtct	540
tacaagaaca	caagaaaatc	tcccgccctt	atcgtttggg	gfaattcaica	tccagtgcca	600
actgcagaa	agaccaaagt	ttatgttagt	ggaacaaagt	tagttacagt	tggttcttct	660
aaatataca	agtcatttgc	gccatctccc	ggcgtctgta	caacaagttaa	aggaatttct	720
ggtagaatag	atcttccactg	gctaatgcta	aatccaaaty	acacggtgac	tttagtttct	780
aatggggctt	ttcttcgacc	tgatagggca	ctttttttga	gagggaagtc	catgggtatc	840

[0001]

[0002]

caatctgggt. tteaagtcga. tgcacaattgt. gaaggtgatt. gttatcacag. tggggggact.	900
atttatatcca. atttgccect. ccggaacatt. gattccagag. ctgtcggtaa. atgtccaaaga.	980
tacgtttaaag. aaggttcctt. acctatggtt. accggataga. agaaagttcc. agaaatacca.	1020
aaggggtagag. gattgttcgg. agctatagcc. ggttttatag. aaaatggatg. ggaaggttta.	1080
atagatggat. ggtaccgatt. tagacatcaa. aatgcctcaag. gtagaggtac. tgcctctgac.	1140
tctaatctta. caacgtcagc. aatggacaa. afcaacggta. aattgaaccg. acctattgag.	1200
aagactaacct. aaccaattcga. gctgattgac. aacgaattca. atgaaattga. gaagcagatf.	1260
ggcaatgcca. ttaactggac. cagagattct. attactgagg. torggctcca. caacgcccga.	1320
tgtttggttg. ctatygaaaa. tcaacatacc. attyatcttg. ctgattcaga. gatggataaa.	1380
ctgtaccaga. gacttaagag. gcagttacgt. gagaatgcaq. aagagggatgg. aactggctgt.	1440
tctgaaatct. ttcacaaatg. tgatgacgac. tgcactggcaa. gtatcaggaa. caactactac.	1500
gaacctctca. aataccgaga. agaagcaatg. caaaaacgaa. tccagattga. cctgtttaa.	1560
ctgtctcttg. gatacaaaqa. cgttatctct. tggtttagtt. tccggggcttc. ctgctttatf.	1620
tgtcttgcca. tctgtatggg. tctgtctctc. atatgtgtga. aaaaagccaa. tatgagatgt.	1680
actatcagba. tttaaagcgg. cgcgat.	1700
<210>6	
<211>1787	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>6	
atgggaaaa. tagtgcctct. ccttgcaata. gtcagttctg. ttadaagtga. tcaagattgc.	60
attggttacc. atgcaaacaa. ctggacaagc. caggttgaca. caataactga. aagcaaggtt.	120
actgttacaac. atgcccacaaa. cactactgaa. aagcacacaca. accggaaact. ctgcgactca.	180
actyggatga. agcctctaat. tttgagagat. tgtatgttag. atggatgct. cctcggaaaa.	240
cctatgtctg. accgaattcat. caactgcctg. gaatggctct. acatagttga. gaaggtcaac.	300
ccagctcaatg. acctctgtta. cctaggggat. ttcaaugact. atgaaagaat. gaacacabca.	360
ctgagcagaa. taaaaccatt. tggaaaaatt. cagatctatc. ccaaaaagtc. ttggctcaat.	420
cactgaagct. catesgggt. gactctaga. tctccataca. atgggaagtc. ctctcttctc.	480
agaaatctg. tatgtcttat. caaaaagaac. agtgcatacc. caacaaataa. gaggagctac.	540
aataatacca. accaagaaga. tcttttgata. ctgtggggga. ttcaacctcc. taatgatcgc.	600
gcagagcaaa. caaagctcta. tcaagaacca. atcaactata. ttccatctgg. aactcaaca.	660
ctgaacctga. gattggtctc. aaaaatagct. actagatcra. aagtaaacgg. gaaaagtga.	720
agaatggagt. tctctggac. aattttaag. ccgaatgat. caatcaatt. ccgagatcat.	780
ggaaattcca. ctgctccgga. atatgcatc. aaaaactcra. agaaaaggga. ctcaagcaat.	840
atgaaaagt. aattggaata. tggtaactgc. aacaccaagt. gtcacaactc. aatggggctg.	900
ataaactcta. gcctgcccct. ccacaacata. caacctctca. ccactgggga. gtcgcccaaa.	960
tatgtgaaat. caaacagat. agtctctgct. actggaactca. gaaatctccc. tcaaaagagag.	1020
agaagaagaa. aaaaagggg. actatttga. gctatagcag. gttttataga. gggagatgg.	1080
cagggaaatg. tagatggtg. gtatgggtat. caacctagca. atgagcaggg. gactggatac.	1140
gctgcagaca. aagaatccac. tcaaaagga. atagatggag. tcaaccaaaa. ggtcaactgc.	1200
atcattggca. aaatgaacac. tcahtttgag. gccgttgaa. gggaaatcaa. taacttagaa.	1260
aggagatag. aaaaattaaa. caagaagatg. gaagaggat. tcttagatgt. ctggaactat.	1320
aactgcgaaa. tcttggtctc. catgaaaat. gggagaantc. tagaatttca. tcaactcaat.	1380
ctcaagaacc. ttttaagaca. ggtccgacta. cagcttaggy. ataactgaaa. gtagctgggt.	1440
aactggtctt. tccagttcta. tcaacaatgt. gataatgaa. gtatggaaa. tgtaaaaaac.	1500
gggacctatg. actaccctgg. gttattagaa. gaagcaagca. taaacagaga. ggaataaagt.	1560
ggagtaaaat. tggaaatcaat. gggaaactac. caaactctgt. caatttatcc. aacagtggcg.	1620
agttccctag. cactggcaat. caatgtagct. ggtctatctt. targgatgtg. ctccaatgga.	1680
tgtttacaat. gcagaatttg. catttaa.	1707
<210>6	
<211>31	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>6	
atcttcgaaa. cgaatggaga. aatagttctt. c.	31
<210>7	
<211>32	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>7	
accgaggccg. cttaaatgca. aactctgcat. tg.	32
<210>8	
<211>1730	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>8	
actctcgaaa. cgaatggaga. aatagttctt. ctcttcgaaa. tagtcaagtt. tgttaaaagt.	60
gatrcaagatt. gcattggtta. ccctgcacaa. aactcgcagc. agcgggttga. caacaataatg.	120
gaaaagaatg. ttactgttac. acatgcccaa. aacatactgg. aaaaagacaca. caactggaaa.	180
ctctggatc. tagatggagt. gaagctctca. attttagagc. atctgtagtt. agctggatgg.	240
ctctctggaa. accctatgtg. tgaagaatc. atcaactgtc. cggaaaggtc. ttacatagtg.	300

ggaagaagca atccagccaa tgaacctgtg taaccagggg atttcaacga ctatgaagaa	320
ctgaatcacc taactggcag aataaacat tttagaaaa tteagatpat ccccaaaagt	420
tcttggccca atcatgaagc ctatcaggg gtgagctcag cctgtccata caatgggaag	480
tcttctttt ccagaaatgt ggtatggctt atcaaaaaga acagtgcata cccaacaata	540
aagggagctt acaataatac caaccaagaa gatcttttga taetgtgggg gattaccatc	600
cttaatgatg aggcagggca aacaagctc tatcaaacr caatcaacta tatttcact	660
ggaacatcaa caactgaaca gagattgctc ccaaaaatag taactagatc caatgtaacg	720
gggcaaaagt gaagaatgga gttctcttgg acaactttaa agccgaatga tgcacataat	780
tctgagagtc atggaaattt cattgctctg gaatatgat caaaaattgt caagaaatgg	840
gactcagcaa ttatgaaaay tgaattggaa taatgttaact gcaaacacaa gtgtcaaac	900
caatggggg cgataaacct taactatgca tccacaaca tacaacctct caccatcggg	960
gagtgcacca aatatgtgaa atcaaacaga ttatctcttg cgaactggact cagaataacc	1020
ctcaaaagg agagaagaa aaaaagaga ggaacttttg gagctatagc aggttttata	1080
gagggagagt ggcaggggat ggtatggtt tggatgggt atcaccatag caatgagcag	1140
gggagtgagt acgtgcaga caaagaatcc aotcaaggg caatgagtg agtcaaacat	1200
aaggctaacb cyatcatfgg caaatgaac aotcaagttg aggcagttg aagggatctc	1260
aataacttag aaaggggat agaaaatca caaagaaga tggagaagcg attctatgat	1320
agtgtgaact akcaatgctga acttctggtt ctatgggaaa atgagagaac tctagacttt	1380
catgactcaa atgtcaagaa ccttcaagac aagctccgac taacagctag ggataatgca	1440
aaggagcttg gtaactggtg tttcagttc tatcacaact gtgataatga atgtatggaa	1500
agtgtaaaa accggagctg tgaactccg cgttatcag aagaaagcaag actaaacaga	1560
ggggaataaa gtggagttaa attggaatca atgggaattt acccaatact gctaatctat	1620
taaacagctg agagttctct agcacggca atcatggtag ctggtctat tttatggagt	1680
tctctcaatg gatcgttaca atgcaagaatt tycatttaag aggcctcgat	1740
<210>9	
<211>28	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>9	
atcagatctt cgaacgggag aacgatct	28
<210>10	
<211>23	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>10	
tgtttttgta ctttagattg atg	23
<210>11	
<211>1701	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>11	
atgaaagcaa aactaetgat cctgttatgt gcacttttag ctacagatgc agacacaata	60
tgtataggct accatgogaa caactcaacc gacactgttg acscagtact cgaaaaagaa	120
gtgactgtag caaactctgt aaaaactact gaagacagcc acaacgggaa attatgcaga	180
tcaaaagaaa tagcccaact acaatgggg aaatgtaaca ttgcaggatg gatcttagga	240
aacccagaat gccaatcact gctttctaa agatcaatgt cctacatgac agaaaacca	300
aactctgaga atygaaacatg ttaaccagga gatcttcgac actatgagga actgagggag	360
caatctgact cagtgctcat attcagaga ttgaaatat tcccacaagga aagatcatg	420
cccacaacca acataaccag agggatcacg gcagaatgct cccatcgggg gaaagcagt	480
ttttacaaaa ahttgccttg cctgagggag acaaatggct ctataccaaa gctgagcag	540
tcctatgtag acaataaaga gaaagaagtc ctgtgctat gggatgttca tcaccgctc	600
aactatagag atcaaaagac cctctatgg aaagaaaatg cttatgtctc tgtatgctc	660
tcaactata acagggagat caccocggaa atagcagaaa gaeccaaaag aagaggctaa	720
gtggggagaa tgaactatta ctggaatttg ctagaaccag gagaacaaat aatattggag	780
gcaaatgaaa atctaatagc gctatggat gcttttgcct tgagttagagg ctttggatca	840
ggatcatca cctcaaacgc atcaatggat gaatgtgaca cgaagtgtca aapapccag	900
ggagctatag acagtagtet cctcttcaag aatatacacc cagtcacaa atggagagtg	960
cccataatcy tcaagagtae caaattgag atggttatag gattaaggaa catccatcc	1020
attcaatcca gaggtctggt tggagcatt gcctgttcca ttgagggggg atycactgga	1080
atgatagat gartggtatgg ttaaccatca cagaatgaac agggatctgg ctatgctgag	1140
gactcaaaaac gcaacaaaaa tgcdaataac gggattatca ataaagtgaa ctctgttatc	1200
gagaaaatga acactcaatt cabagctgtg ggtcaagaa tcaacaatct agaaaaaga	1260
atggaaaact taataaaaa agttgatgat ggaattctgg acatttggac acacaatgca	1320
gaattgttgg tctctactga aaatgaaagg ccttgggat tccatgactc aaatgtgaag	1380
aatctgtatg agaaggtaaa aaaccaatta aggaataatg caaaggaat aggaacggg	1440
tgttttgagt tctaaccaca gtgtaacat gaatgcattg aaagtgtaaa aatggcaat	1500
tatgatctcc caaaatatt agaggaatca aagttaaca gggaaaaat tgarggagtg	1560
aaatggatc caatgggggt ctatcagatc ctggggatct actcaactgt ggcagttca	1620
ctggctcttc tggctctctt gggggcaatc agctctgga tgtattctaa tgggtctttg	1680
caatgcaaaa katgactctg a	1701
<210>12	
<211>33	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	

[0003]

[0004]

<223>	
<400>12	
.atcttcgaaa cgatgaaagc aaaaactactg atc	33
<210>13	
<211>32	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>13	
gatgcggccg ctccgatgca tattctgcct tg	32
<210>14	
<211>1724	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>14	
atcttcgaaa cgatgaaagc aaaaactactg atctctctca tctgcaacttc agctaacgat 60	
gcagacacaa tctgtatagg ctaccatcgc aaaaactcaa ccgcaactgt tgcacacgta 120	
ctccaaaaga atctgcaagt gacacactct gtaaaccttae tccagagacag ccacaacagg 180	
aaattatgca gatctaaagg aatagctcca ctacaactgg ggaatcgtaa ccttcgccga 240	
tggatcttag gaaaccacag atctgactca ctgctctcta agaatctatg gctctcaact 300	
gcagaaacaa caaacctcga gaatggacaa tgttaccacg gagatctcgc cgaactagag 360	
gaactgaggg agcaattcag ctcaagtctc caattccgag gatctgaaat atctcccaag 420	
gaaagatcat ggcctcaaca caactcaacc agaggagtta cggcagcatg ctcccaatgct 480	
gggaacagca gtttttaca. aaacttgctc tggctgagcg agacaactgg ctctcaacaa 540	
aggtctgaca agtctatgt gaacaaatca gagaagaag tctctgtctg atgggtgtgt 600	
ctctaccgcc ctcaactatg ggaatcaaac accctctatc ggaagagaaa tctctatgtc 660	
tctctcagtg ctctcaatta taabagggga tctccctcgg aactagcaga aagatctaaa 720	
gtcaagaggtc aagcagggag aatgaactat taactggaat tctctgaaac ccgagatcaa 780	
ataactattg aggcacatgg aaactcaata gcgcactgtg atgctctcgc actgagtaga 840	
ggctctggat cagggaatcat cactctcaac gcaatcattg atgaattctg caagaaagt 900	
caaacapccc agggagctat aaacagtagt ctcccttttc agaataatca cccagtcaca 960	
ataggagagt gcccaaaaat cgtcaagagt accaaattga ggaatggtac aggatcaagg 1020	
aacatcccat caatctaac cagaggtctg ctctgagcna ttgcaggctt catctagggg 1080	
ggatgacctg gaatcttaga tggatggtat ggttacnate atcagaatga acaggatctc 1140	
ggctatgctg cggatcaaaa aagcaacaaa gctcaactta accggattac aataaaggtg 1200	
aactctgcta tccgagaaat gaacactcaa tcaacagctg tgggtcaaga attcaacaaa 1260	
ctcagaaaaa gaatggaaaa cttaaataaa aaagtctgag atggaattct ggaactcttg 1320	
acacataaat cagaattgtt gcttctatct gaaaatgaaa ggaactttga ctctccatga 1380	
tcacaactga agaactctga tggagaaagt aaaaaccatc taaggaacaa tgcagaagaa 1440	
ataggaaaag ggtgctttga gttctacac aagtgttaaca atgcaatgat ggaagctcta 1500	
aaaaaatgaa ctctatgata cccaataat tccagggaac caaagttaaa ccgggaaaaa 1560	
attgatggag tgaaaattgga atcaattggg gctctatcaga tctctggcat ctactcaact 1620	
gtctcagctc caatggtgct tctgctcctc ctgggggaaa tcaagctctg gatgctctct 1680	
atctggctctc tgcgaatcag aatctgcatc tggagggccg cctc	1724
<210>15	
<211>36	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>15	
atcaagctta cgatgaaacac ccaaaaactg gttttc	36
<210>16	
<211>32	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>16	
atcgcggccg cttaaatata gatagtcacat ct	32
<210>17	
<211>1706	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>17	
atcaagctta cgatgaaacac ccaaaaactg gttttcctc taatrgctat cctccctcgc 60	
aatgctgata aaatttgttt gggacacpat gctgtatcta acggcacgaa agtaaacact 120	
ctaacagaac gtcgggtaga ggtagttaat gccacggaaa cagtggaacg taccacacatc 180	
ccpagaattt gctcaaaagg aaaaagacaa gttagcttag gacagtgcgg ttctaccggg 240	
actattccgg gccctctca atgtgacaaa ttctctgaa tttccagcaga cctgattatt 300	
gaaagaaagg aggtctcaga tctctgttat ccacggaggt tctgcaatga agaagcctty 360	
agctcaattc tgcgagaaac agggagatc gataagagg cctatgggtt cactatctca 420	
ggtattcaga ctcaaggctc taccagtcca tgcagaaggt cagdtagctc cttttaccgc 480	
gaaatcaaac ggttctgttc caatactgat aatctctct tccacagat gactaaagtc 540	
ctcaagaaaa caccgaaatc tcccgctct atcgtctggg gtaatcacca tccaggtcca 600	
actgcagaac agaccagct ctctggtagt ggaacaagt tagttacagt tggctctctc 660	

[0005]

..aacttcaac agtcatttct gccatctctc ggcgctcgtc caacsagttaa cggaaattctc	720
ggtagaataag atttccactg gctaatgcta aatccaaaatg acacggtagc ttttagcttt	780
aatggggctt ctatccgacc tgcataggca tctttcttga gagggaaagt cactggctacc	840
caatctgggt tccaaagtga tgcctaatgt gagggtagat gttatcaatg tggtagggact	900
acttatccca atctgcccct ccagaacatt gatccacagc ctgtcggtaa atgccaaga	960
tcctgttaag aacgtccct acctatggct accggatga agaaagctcc agaaatacca	1020
aagggtagag gattgttcgg agctatagcc ggttttatag aaaaaggatg ggaaggttta	1080
atagatggat ggtaaggatt tagacataca aatctctcaag tggagggtae tgcctgtgac	1140
tataagctca cacagtcagc aatcagataa atccctggta aattgaatcg acttatgag	1200
aagactaac acaatttoga gctgattgac aacgagttca atgaagtga gaagcagatc	1260
ggcaatgtca ttaactggac cagagattct attactgagg tctggcttta caacgctgag	1320
ttgttggttg ctatggaaaa ccaacatacc attgatcttg ctgattcaga gatggataaa	1380
ctgtaccaga gacttaagag gcagttacgt gagaatgcag aagaggtatg aactggctgt	1440
ttgaaattc ttcacaaaat tgcagcagc tgcattggca gttatcaggaa caatacttat	1500
gaccacatca aatacagaga agaaagcatg caaaaacaga tccagattga cccgtttaa	1560
ctgtctcttg gatcaaaaag cgttatctct tggtttagct cggggacctc ctgcttatct	1620
ttgattgcca ttgttatggg tctgtctctc atatgtgtga aaaaaggcaa catgagatg	1680
actatctgta tttaaagggc cggcat	1706
<210>18	
<211>1701	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>18	
atgaagaata acattgcttt gagctadatt ctatgtctgg ttttgcctba aaaaattort	60
ggaaatgaca atagcaaggc aacgctctgc cttggggcac atgcagtabc aaacyjaacc	120
atagtgaaaa caatcaacga tgcctgaatt gaagtctact atgctactga actggtctca	180
aatctctcaa taggtgaaat atggcagatg cctctatcaga tctctgatgg agaaaaatgc	240
acatcaatag atgctctatt gggagactct cagtgtgatg gctttcaaaa taagsaatgg	300
gaactttttg ttgaacgaag caaagcttac agcaactgtr acccttatga tgtctcggac	360
tatgctctcc tttagtcaact agttgcctca tccggcaca tggagtttaa caatgaaagc	420
ttcaatttgg atggagtcac tcaaaaacga acaagtctcg cttrcatagg gagctctaat	480
aatagttctc tttagtagat aaattgggtg acccaactta acttcaata cccagcattg	540
aacgtgacta tgcataaaa tgaacaattc gacaaattgt acaatttgggg ggtcaccpac	600
cgggttaccg caaaggacca aatctctctg taagtcaac cctcaggaaq aatcaccgta	660
tctaccaaaa gaagcaacca agctgttaac ccgaatatcg gatttagacc cagaataagc	720
aataaactca ccagaataag cactatctg acaaatgtaa aaccgggaga caatactttg	780
atcaaacgca cagggaatct aattgctctc aggggttaet tcaaaatagc aagtgggaaa	840
agctcaataa ttagatcagc tgcaccatt ggcataatga agtctgaatc cactactcca	900
aatggaaagc tcccgaatg caaaccttc caaaatgtaa acaggatpac atacgggccc	960
gttccagatc atgttaagca aagcactctg aaattggcaa caggaatgct gaatgtacca	1020
gggaaacaaa cttagagcat atttggcaga atagcgggtt tcaatagaaa tggttgggag	1080
ggaaatgggt atggttggta cggtttcagg catcaaaatc ctgagggaaq aggcacagca	1140
gagatctcca aaagcaactc agcagcaatc gatcaaatca atgggaagct gaatcaattg	1200
atcgggaaaa ccaacagaaa atctcatcag attgaaaaay aattctcaga agtagaaggc	1260
agaattcagc accttgagaa atatgtctgag gacactaaaa tagatctctg gtcatabaac	1320
ggagagcttc ttgttgcctc ggaagaccaa cacaacaattg atctaatga ctcaaaaaatg	1380
aacaaactgc ttgaaaaaac aaagaagcaa ctgagggaaa atgctgagga tatgggcaat	1440
ggttgtttca aatatacca caaattgtgac aattgctgca taggatcaat cagaatggca	1500
acttatgacc accatgtata ccagatgaa goalttaaac accggttcca gatcaaggga	1560
gttgaagctga agtcagggtc caaayattgg atcctatgga ttctctttgc catatcatgt	1620
ttttttcttt gttgtgcttt gttgggttc ataatgtgg cctgccaaaa gggcaacatc	1680
aggtgcacaa tttgcaattg a	1701
<210>19	
<211>32	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>19	
actttgaaa agatgaagac taicattgct tt	32
<210>20	
<211>44	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>20	
gactcggccg ctcaaatgca aatgttgcac cttaatgttc cctt	44
<210>21	
<211>1724	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>21	
atcttcgaaa cgatgaagac tatcattgct ttgaagctaca ttctatgctt ggttttcgct	60
caaaaacttc ctggaaatga caatagcagc gcaacgctgt gacttggca ccatgcagta	120
caaaaaggaa cgaratgtaa acaatcacg aatgacgcaa ttgagttac taatgctact	180

[0006]

gaactggctc	agaattectc	aataggtyaa	atatyggaca	gtectcatca	gaccttgaat	240
ggagaaaact	gcacactaat	agatgcttta	ttgggaagac	ctcagtytga	tgcttccaa	260
aataagaaa	gggaccttct	tgctgaaaga	agcaaaagcc	acagcaactg	ctacccttat	280
gctgtgcccg	atbatgectc	ctttaggtea	ctagttgect	catccgggac	actggagttt	300
aacaaatgaa	gcttcaattg	gaatggagt	actcaaaaag	gaacaagttc	tgcttgacaa	320
agggatctta	ataatagttt	ctttagttag	tttaatttgg	tgaccactt	aaacttcaaa	340
taccocagat	tgaactgtac	tatgccaaac	aatgacaat	ttgacaaatt	gtacacttgg	360
ggggttcaac	accggttac	ggacaaggac	caaatcttcc	tgtatgctca	accatcagga	380
agaatccag	tatctaccaa	aagaagctca	caagctgtaa	tcccgaatat	gggattttag	400
cccagaataa	ggaaataacc	tgcagaaata	agcatttatt	ggacaatagt	aaaactcggg	420
gacatacttt	tgattaacag	cacaggyaat	ctaaatgctc	ctaggggtta	cttcaaaaa	440
cyaaagtggg	aaagctcaat	aatggagtaa	gatgcaacca	ttggcaaatg	caagtctgaa	460
tgcacocctc	caaatggaag	ctttcccaat	gacaaaacct	tccaaaatgt	aaacaggatc	480
acatacgggg	ccctgcccag	atagtctaa	caaaagcact	tgaatttggc	aacaggaatg	500
gggaatgtac	cagagaaaca	aactagaggc	atatttggcg	caatagcggg	tctcctagaa	520
aatggttggg	aggyaattgt	ggatggttgg	tacggtttca	ggcatcaaaa	tctcagggga	540
agaggacaag	cagcagatct	caaaagcact	caagcagcaa	tngatcaaat	caatgggaag	560
ctgaatcga	tgcctgggaa	aactaacgag	aaatccact	agattgaaaa	agaattctca	580
gaagtgaagg	ggagaattca	ggactctgag	aaatctctg	aggaactcaa	aatagatctc	600
tggctataca	accggagact	tcttcttgc	ctggagaacc	aaactacaat	tgatctaac	620
gacttcagaaa	tgaacaaact	gtttgaaaa	acaagaagc	aaatgagga	aaatgcttag	640
gctatgggca	atggttgttt	caaaaatata	cacaaatgtg	acaatgcttg	catagatcca	660
atcagaaatg	gaacttatga	ccagatgta	tacagagatg	aagcaatcaa	caaccggctc	680
cagatcaagg	gagttgagct	gaagtcaagg	tacaaagatc	ggatcctatg	gattctortt	700
gccatatact	gtttttgct	ttgtgttct	ttgttgggt	tcatcatttg	ggcctgcaaa	720
aaaggaacca	ctaggtgcaa	caattgcaat	tyagcggcag	caac		740

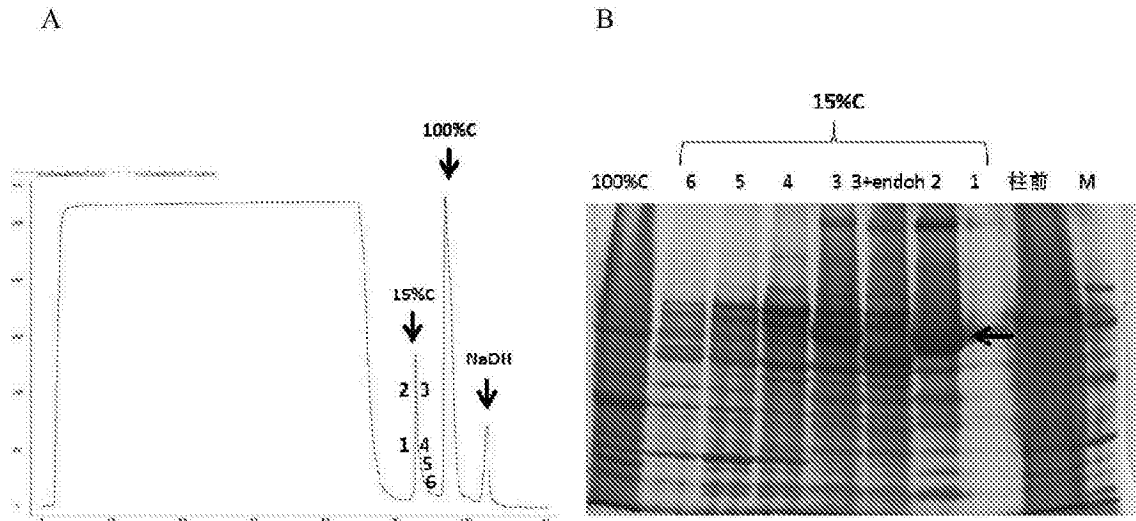


图1

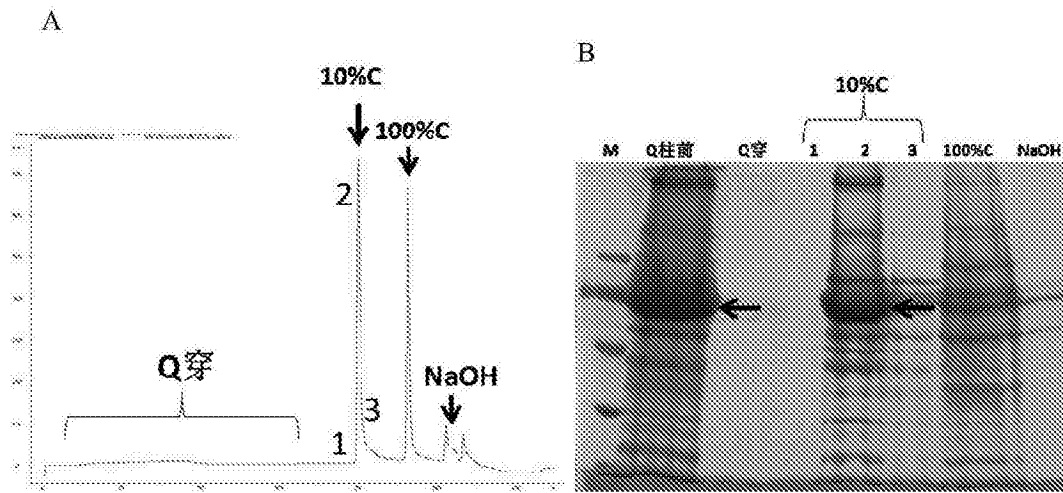


图2

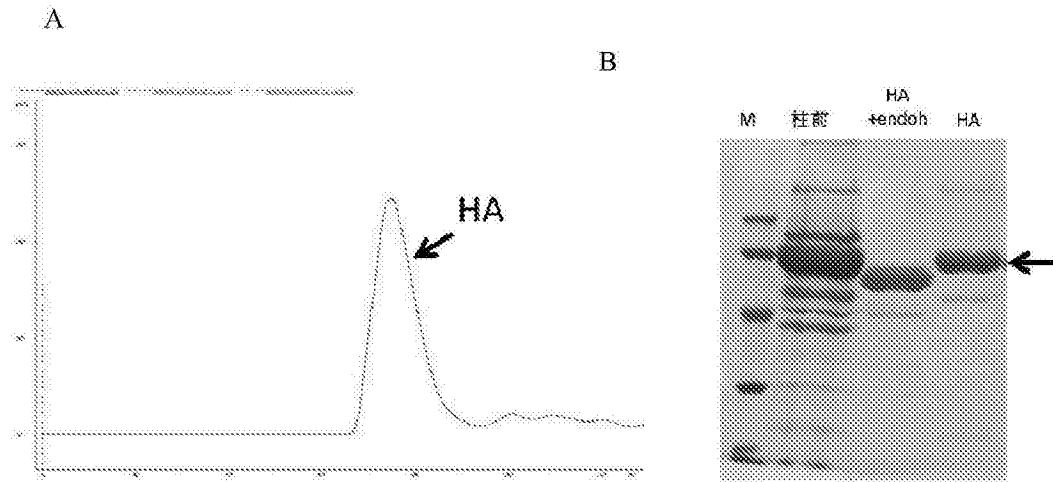


图3

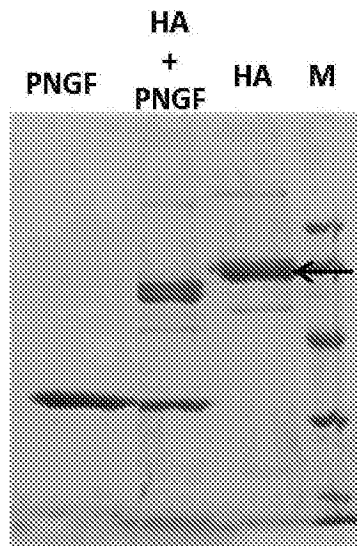


图4

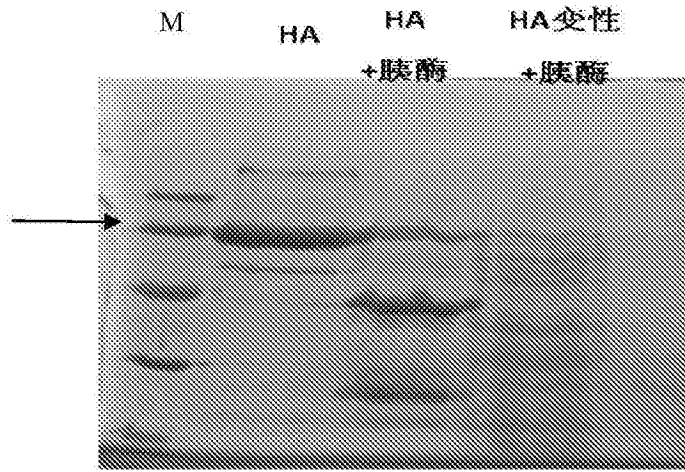


图5

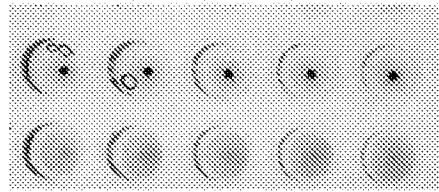
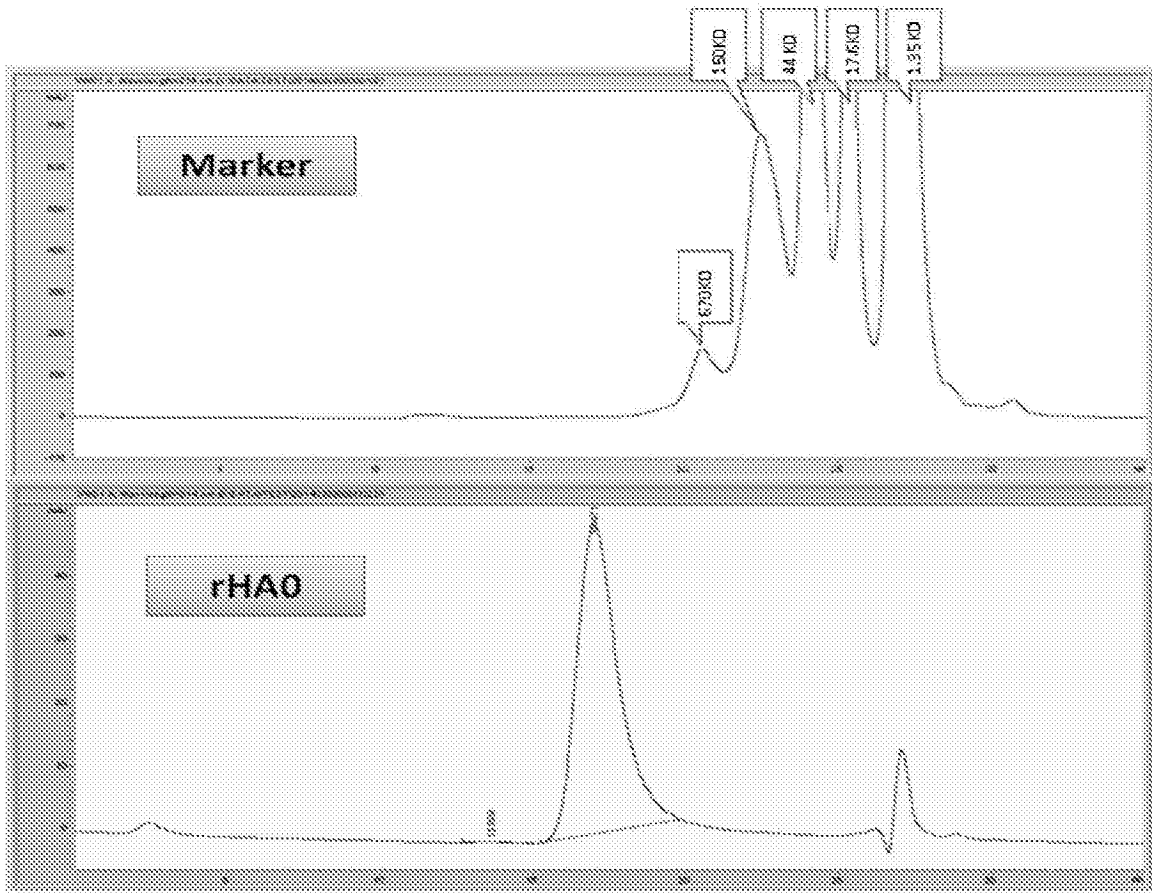


图6

A



B

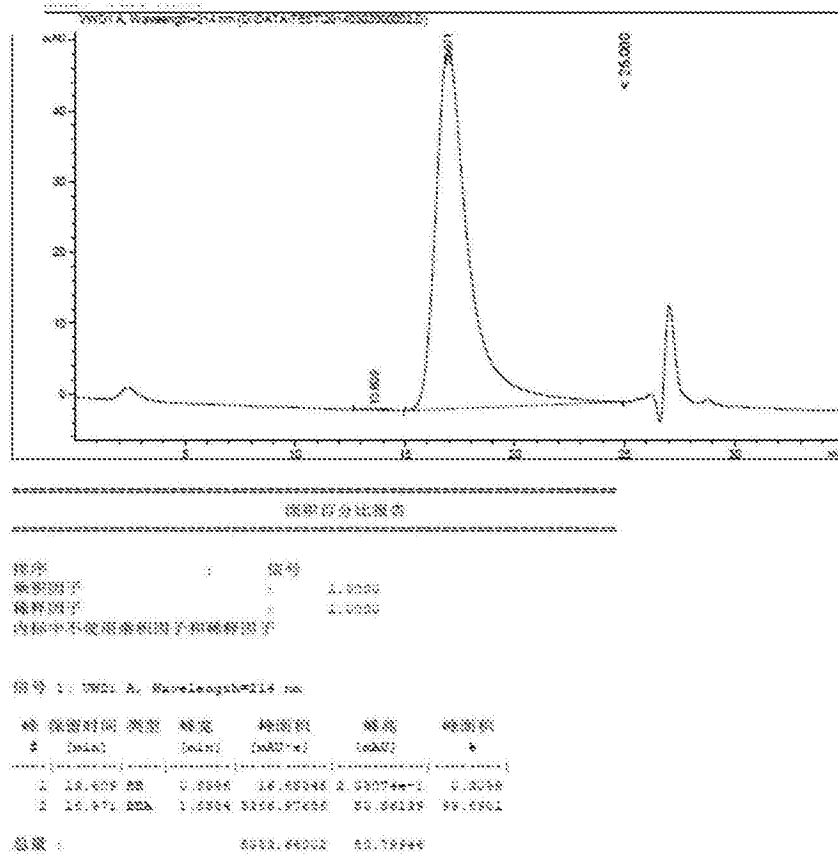


图7

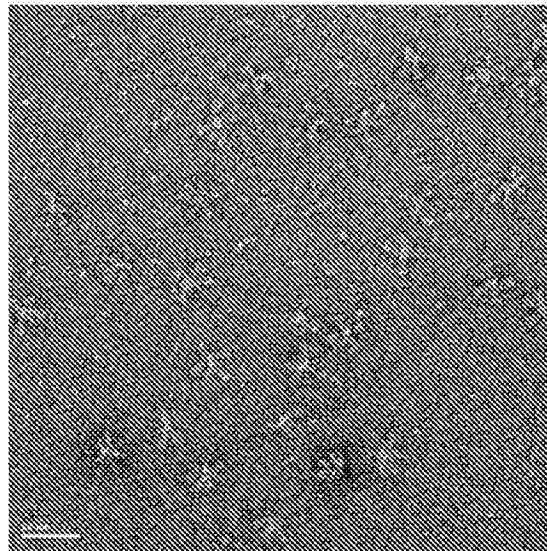


图8

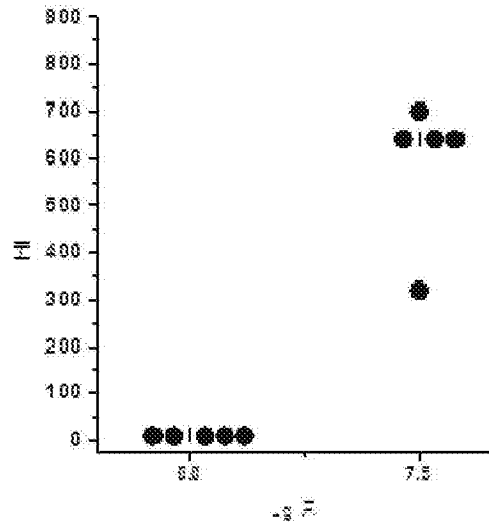


图9

M 酶切后产物

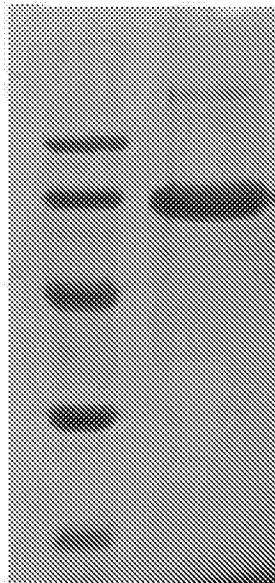


图10

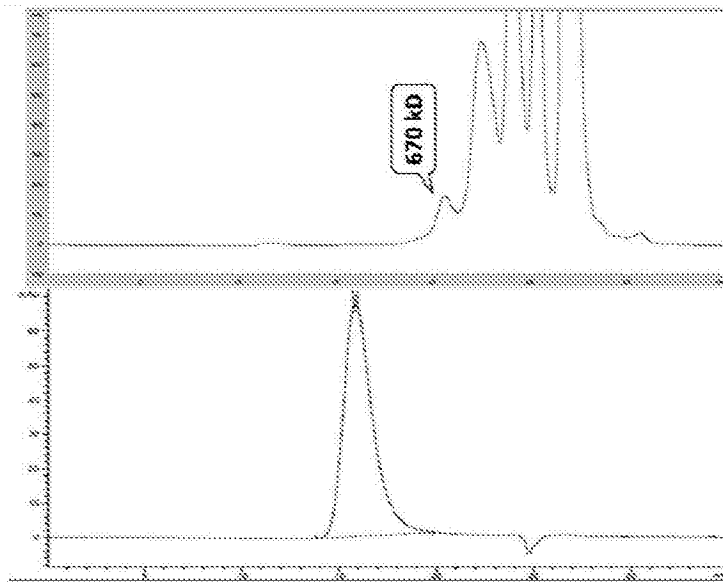


图11

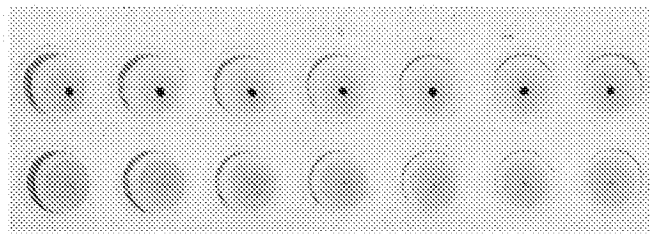


图12

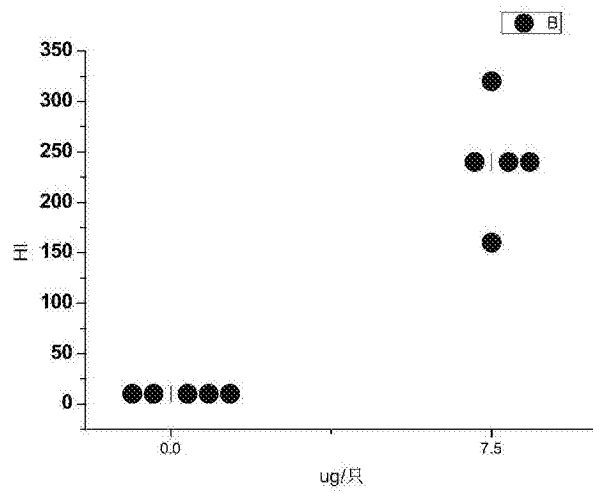


图13

M 酶切后产物

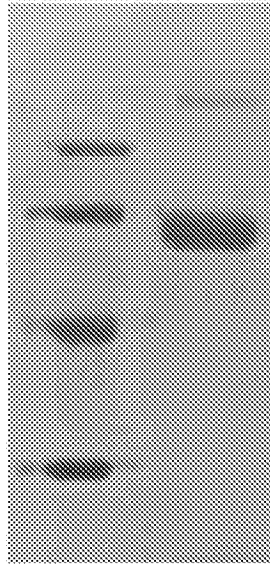


图14

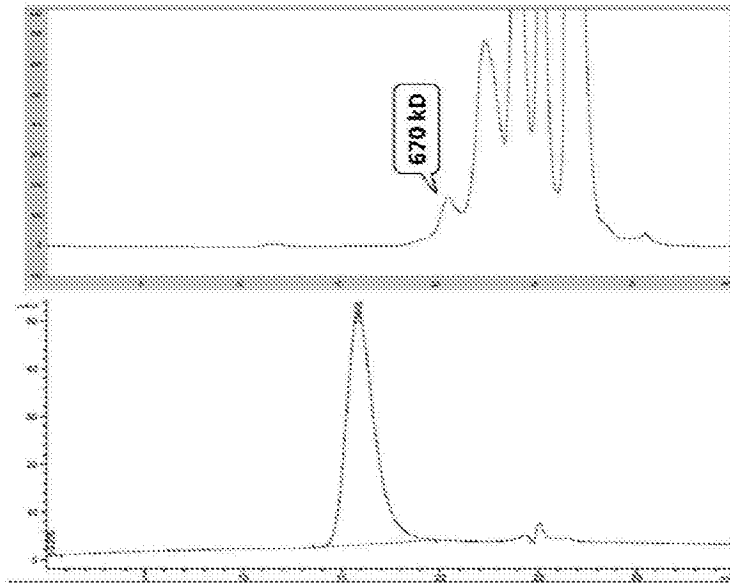


图15

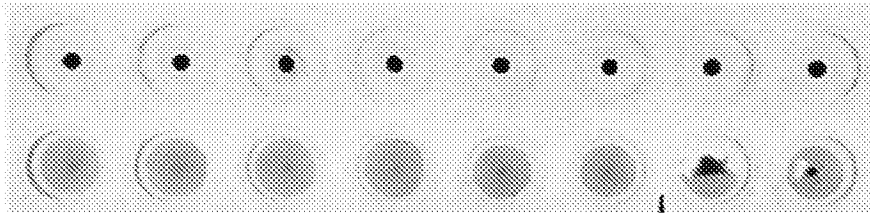


图16

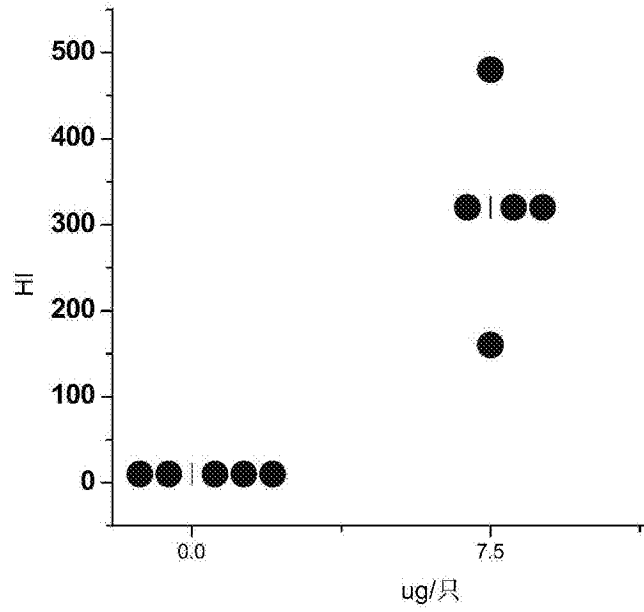


图17

M 酶切后产物

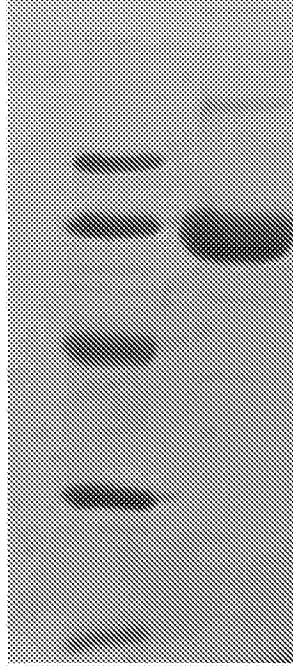


图18

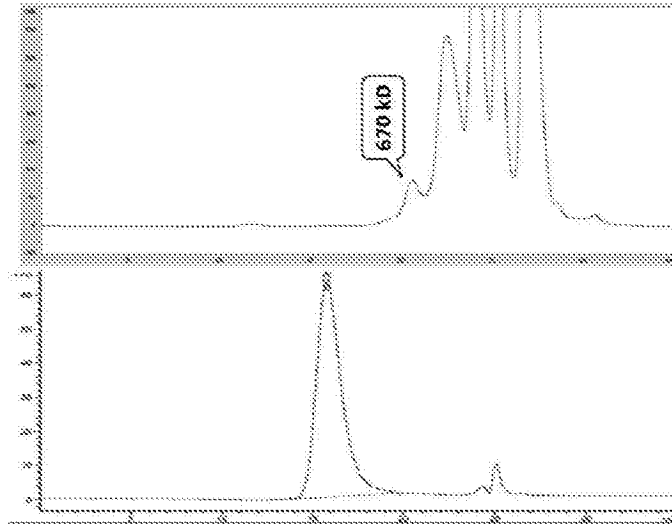


图19

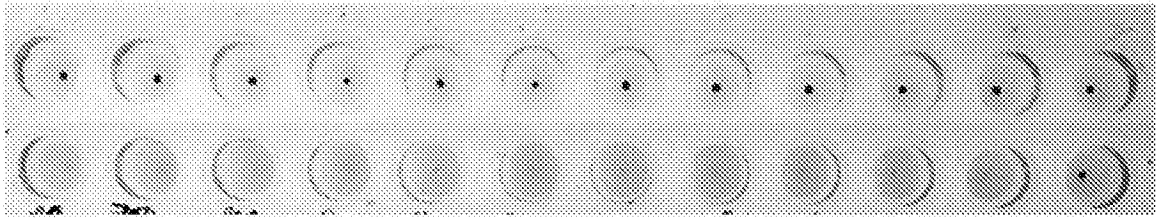


图20

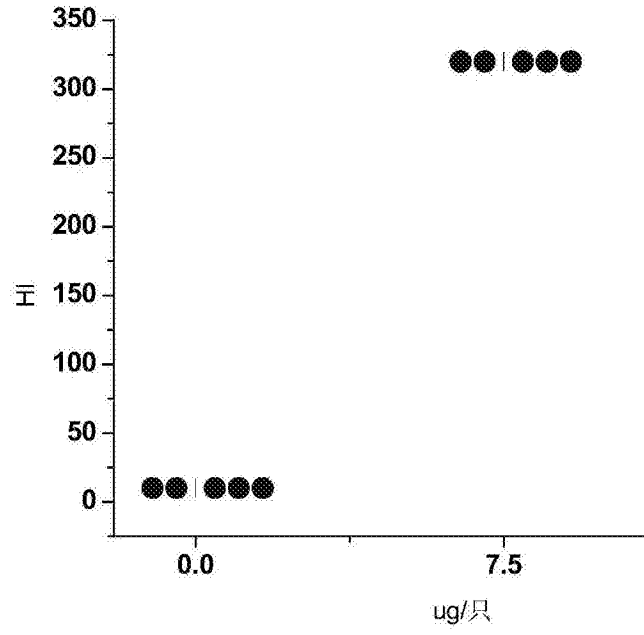


图21

- + PGEF



图22

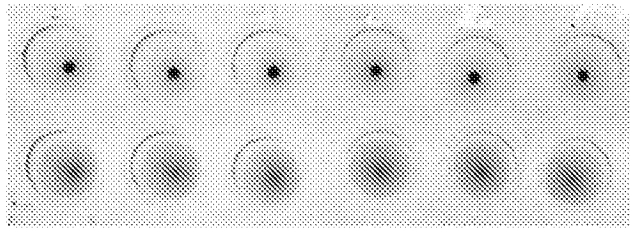


图23

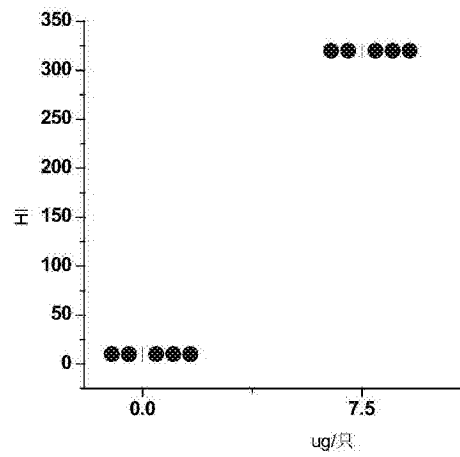


图24

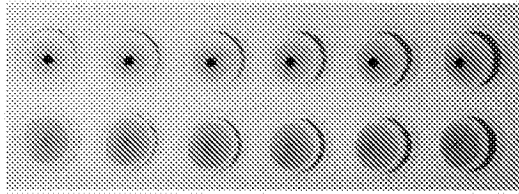


图25

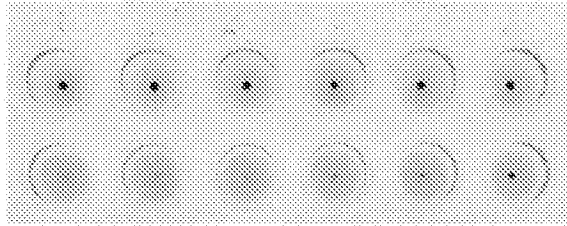


图26

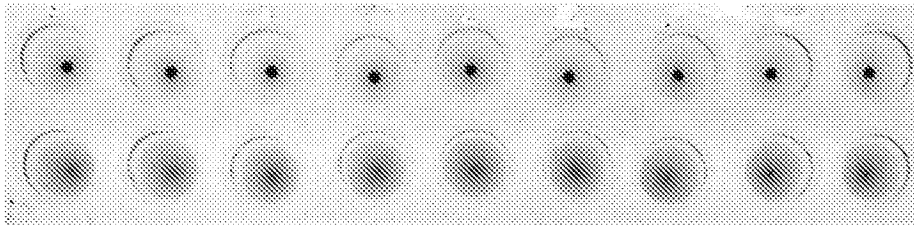


图27