

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510126416.9

[51] Int. Cl.

G12N 7/01 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
G12N 15/44 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月12日

[11] 公开号 CN 1800376A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

[22] 申请日 2005.12.8

[21] 申请号 200510126416.9

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

[72] 发明人 曹永长 谢青云 陈丽 马静云
毕英佐

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 向华

权利要求书1页 说明书18页 附图4页

[54] 发明名称

一种展示流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组 T4 噬菌体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种展示流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组 T4 噬菌体, 该重组 T4 噬菌体展示流感病毒非结构蛋白 NS1 与 T4 噬菌体 SOC 蛋白的融合蛋白。本发明进一步涉及重组 T4 噬菌体在检测流感抗体中的应用。本发明提供的重组 T4 噬菌体易于纯化, 展示在 T4 噬菌体表面的 NS1 蛋白具有完整的空间构象; 与 SOC 融合表达的 NS1 蛋白的拷贝数高; T4 噬菌体本身充当了 NS1 蛋白的载体; 当本发明提供的重组 T4 噬菌体作为抗原时, NS1 的免疫原性比单独的 NS1 蛋白强; 作为疫苗的抗原、或者作为免疫检测的抗原使用时, 和其它的蛋白表达系统表达的 NS1 蛋白相比具有明显的优点。

1、一种展示流感病毒非结构蛋白NS1的重组T4噬菌体，其特征在于蛋白NS1与T4噬菌体SOC蛋白组成融合蛋白，位于重组T4噬菌体头部表面。

2、根据权利要求1所述的重组T4噬菌体，其特征在于流感病毒非结构蛋白NS1为：

1) 具有SEQ ID NO: 2所示序列的蛋白质；

2) 具有SEQ ID NO: 2所示序列经改变、缺失或增加一个或若干个氨基酸残基仍具有流感病毒非结构蛋白NS1活性的蛋白质；或

3) 与SEQ ID NO: 2所示的氨基酸序列有80%以上的同源性且具有流感病毒非结构蛋白NS1活性的蛋白质。

3、根据权利要求1或2所述的重组T4噬菌体，其特征是编码流感病毒非结构蛋白NS1的核苷酸序列为：

1) SEQ ID NO: 1；

2) SEQ ID NO: 1经改变、缺失或增加一个或若干个核苷酸仍表达具有流感病毒非结构蛋白NS1活性的蛋白质的序列；或

3) 与SEQ ID NO: 1所示核苷酸序列中连续200碱基以上的区段有80%以上的同源性，且其表达产物仍具有流感病毒非结构蛋白NS1活性的核苷酸序列。

4、一种制备抗NS1的特异性抗体的方法，其特征在于将任意权利要求1-3的重组T4噬菌体作为抗原，直接免疫或将T4噬菌体与佐剂配合后制成疫苗免疫动物，获得抗NS1的特异性抗体。

5、根据权利要求4所述的方法，其特征是用于免疫的动物为兔、鸡、鼠、山羊。

6、一种体外检测动物血清中禽流感特异性抗体的方法，其特征在于将任意权利要求1-3的重组T4噬菌体作为抗原与动物血清反应，然后检测反应结果来评价血清中抗体是否存在。

7、根据权利要求6所述的方法，其中检测方法采用酶联免疫吸附法。

一种展示流感病毒非结构蛋白NS1的重组T4噬菌体及其应用

技术领域

本发明涉及基因工程领域，更具体地，涉及展示流感病毒非结构蛋白NS1的重组T4噬菌体的构建、表达和应用。本发明还涉及该重组T4噬菌体在检测流感抗体中的应用，特别是采用该重组T4噬菌体区分病毒感染禽群和疫苗免疫禽群。

背景技术

禽流感（Avian Influenza, AI）是由正黏病毒科A型流感病毒引起的禽类（家禽和野禽）的一种感染和/或疾病综合症。发生在鸡、鸭、鹅、鸽子等禽类和鸟类身上，但主要侵害火鸡和鸡，哺乳动物如猪、马、海豹、人等也可感染。根据禽流感病毒（Avian Influenza Virus, AIV）株的致病性、禽的种类、环境、饲养管理条件以及并发疾病等因素，感染后的禽只表现为无症状感染、轻度的上呼吸道症状、产蛋量下降到急性的致病性死亡等多种形式，直接影响鸡体的健康及其产品质量，是现代化养禽业难以对付的重要禽类呼吸道传染病之一，与马立克氏病、传染性法氏囊病、白血病、网状内皮增生症等一样，也是严重威胁家禽的重要免疫抑制病。被世界动物卫生组织列为A类动物疫病，我国将其列为一类动物疫病。

目前多采用“免疫”兼“扑杀”的措施来控制禽流感。中国大陆、墨西哥等国家和地区采用这一措施有效地控制了禽流感的流行。采用灭活疫苗免疫控制禽流感的方法越来越受到重视，越来越多的国家和地区采用免疫的方法。但随之而来的一个问题是，免疫造成了对疫情监测的干扰。因为传统的监测禽流感的血清学方法主要是两个：一是琼脂扩散试验（AGP），一是血凝抑制试验（HI）。这两种方法都不能区分禽流感疫苗免疫产生的抗体和禽流感病毒感染后产生的抗体。

禽流感病毒(AIV)为单股负链RNA病毒，属于正黏病毒科A型流感病毒属，A型流感病毒基因由8个不连续的病毒RNA节段组成。片段8即NS基

因在 8 个片段中最短，编码非结构蛋白，有两个读码框，可编码 2 种蛋白质即 NS1 和 NS2，两者的分子量分别为 25 kDa 和 14 kDa。这两种蛋白质大量存在于感染细胞中，NS1 主要在核内，NS2 主要在细胞浆内，在病毒粒子中存在少量的 NS2 蛋白成分。在感染的早期 NS1 被大量合成，而 NS2 在后期才会合成生产。在细胞感染的早期，可发现细胞核内有大量的 NS1 聚集，也可在细胞质内发现。作为病毒的非结构成分，这种蛋白的出现仅仅只局限在病毒感染期，而不会出现在成熟的禽流感病毒中，因而在使用灭活疫苗免疫时不会产生相应的抗体。因此，针对 NS1 蛋白的抗体只可能出现于野毒感染群中。从而可以将 NS1 及其抗体作为病毒感染机体的一个标记用以区分免疫群和感染群的鉴别诊断。

NS1 的作用最近受到了研究者们极大的兴趣。许多学者试图用 NS1 的表达产物作为抗原来鉴别 AIV 感染禽群和免疫禽群。为了获得大量纯化的 NS1 蛋白，一般采用基因工程的方法来表达 NS1 基因。目前采用的方法一般是在大肠杆菌表达系统中表达 NS1 蛋白。本发明采用一种新的表达方法——噬菌体展示技术来获得大量的具有活性的 NS1 蛋白。

噬菌体表面展示技术 (phage display) 是 80 年代发展起来的一项新的生物技术 (Smith,1985)，它能将外源多肽和蛋白质以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面，并保持相对独立的空间构象和生物活性。T4 噬菌体属于有尾噬菌体中 A 群 A2 亚群的典型成员，其基本形态结构是头长径约 95 nm，横径约为 65 nm。T4 噬菌体衣壳由 3 种必需衣壳蛋白组成：主要的衣壳蛋白 gp23 和 2 个次要衣壳蛋白 gp24、gp20。其中分子量为 45kDa 的 gp23 在每个病毒颗粒中有 960 个拷贝，而其余 2 个次要衣壳蛋白拷贝数较少，gp24 有 55 个拷贝，而 gp20 只有 12 个拷贝。此外，在衣壳的外表面包被着 2 种非必需外壳蛋白：分子量为 9 kDa 的 SOC 和分子量为 40 kDa 的 HOC，二者相距 7 nm，以对称的形式分布于噬菌体二十面体表面。SOC 和 HOC 仅提供噬菌体额外的稳定能力，是在噬菌体衣壳装配完成后才组装到衣壳表面的，它们的缺失不影响 T4 噬菌体的繁殖和感染。将外源蛋白与 T4 噬菌体表面的 SOC 或者 HOC 蛋白形成融合蛋白，从而可以获得具有外源蛋白的重组 T4 噬菌体。采

用这样的方法，获得了表达爱滋病毒（HIV）gp120 V3 肽、脊髓灰质炎病毒 VP1（Ren et al, 1996）、脑膜炎奈氏菌 PorA（Jiang et al, 1997）抗原蛋白、传染性囊病病毒 VP2（曹永长等，2003）、禽流感 H5 亚型和 H9 亚型 HA 蛋白（吕英姿等，2002）、口蹄疫 VP1 蛋白（史泉城等，2002）、鸡新城疫病毒 F 蛋白和 N 蛋白（刘铀等，2004）的重组 T4 噬菌体。

发明内容

（一）要解决的技术问题

本发明的目的是获得展示禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组 T4 噬菌体，并采用该重组 T4 噬菌体作为抗原，区分禽流感灭活疫苗免疫动物和禽流感病毒感染动物的抗体，即区分疫苗免疫动物和病毒感染动物。

（二）技术方案

本发明为一种展示流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组 T4 噬菌体，是流感病毒非结构蛋白 NS1 与 T4 噬菌体 SOC 蛋白组成融合蛋白，位于重组 T4 噬菌体头部表面。

本发明所述的重组 T4 噬菌体中，流感病毒非结构蛋白 NS1 为具有 SEQ ID NO: 2 所示序列的蛋白质；或具有 SEQ ID NO: 2 所示序列经改变、缺失或增加一个或若干个氨基酸残基仍具有流感病毒非结构蛋白 NS1 活性的蛋白质；或与 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列有 80% 以上的同源性且具有流感病毒非结构蛋白 NS1 活性的蛋白质。

本发明所述的重组 T4 噬菌体中，编码流感病毒非结构蛋白 NS1 的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 1；或 SEQ ID NO: 1 经改变、缺失或增加一个或若干个核苷酸仍表达具有流感病毒非结构蛋白 NS1 活性的蛋白质的序列；或与 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中连续 200 碱基以上的区段有 80% 以上的同源性，且其表达产物仍具有流感病毒非结构蛋白 NS1 活性的核苷酸序列。

本发明还提供了所述的重组 T4 噬菌体的应用，将重组 T4 噬菌体作为抗原，直接免疫或将 T4 噬菌体与佐剂配合后制成疫苗免疫动物，获得抗 NS1 的特异性抗体。

本发明的重组 T4 噬菌体应用，用于免疫的动物为兔、鸡、鼠、山羊。

本发明所述的重组T4噬菌体的另一种应用，是以重组T4噬菌体作为抗原检测动物血清中的禽流感特异性抗体，区分禽流感疫苗免疫动物和禽流感病毒感染动物的抗体，即区分流感病毒感染动物和流感病毒灭活疫苗免疫动物。

本发明中所述的应用，所使用的检测方法是酶联免疫吸附试验。

5 本发明提供的重组 T4 噬菌体是采用基因重组的方法获得的。其方法是：

(1) 首先采用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增 NS1 基因片段。提取禽流感病毒 RNA，以 F1 (5'-ATG GAT TCC AAC ACT G-3') 和 F2 (5'-TCA AAC TTC TGA CTC-3') 为引物，在 AMV 反转录酶作用下合成 NS1 基因的 cDNA，获得 RT 产物。RT 产物用作 PCR 扩增 NS1 基因片段的模板，
10 以 P1 (5'-ATG AAT TCT ATG GAT TCC AAC ACT G-3') 和 P2 (5'-ATG AAT TCG TCA AAC TTC TGA CTC-3') 为引物，按常规 PCR 方法扩增 NS1 基因，反应条件为：94℃ 预变性 3min；94℃ 变性 40 s，50℃ 退火 90 s，72℃ 延伸 90 s，循环 30 次；最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

15 (2) 采用 pR 质粒 (Ren et al, 1996; 任兆钧, 2004, CN1523114A) 构建重组质粒 pR-NS1。用 *EcoR* I 在 37℃ 消化 NS1 基因的 PCR 纯化产物，用 *EcoR* I 和 CIAP 在 37℃ 消化质粒 pR，接着在 T4 连接酶的作用之下，连接酶切回收后的 NS1 PCR 产物和质粒 pR，连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 。转化方法为常规 CaCl₂ 法。经氨苄青霉素 (Amp) 抗性筛选，获得了插入 NS1 基因的
20 重组子。然后用两对特异性引物 SOC-S (GAA TCA TAT GGC TAG TCT CGC GG) / P2 和 P1/P2 进行 PCR 筛选。挑取单菌落接种于 3 mL LA/Amp 培养液中，在 37℃ 以 200 r/m 振荡培养 16-20 小时。对 PCR 筛选阳性的细菌，离心收集菌体，抽提质粒，再经限制性内切酶消化鉴定和序列测定，获得重组质粒 pR-NS1。

25 (3) 将重组质粒 pR-NS1 和缺陷性 T4 噬菌体 T4-Z1 (Ren et al, 1996; 任兆钧, 2004, CN1523114A) 进行同源重组，获得展示 NS1 蛋白的重组 T4 噬菌体。

先用重组质粒 pR-NS1 转化大肠杆菌 DH5 α ，获得的大肠杆菌记为

E-NS1。然后进行以下操作：

在装入 500 μL SC 培养液的器皿中加入 1 μL 氨苄青霉素 (Amp)，然后加入 10 μL E-NS1，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至光密度值 OD_{600} 大约为 0.5 时，加入 50 μL T4-Z1，在 35 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/m 振荡培养至有细菌碎片出现。

- 5 在 1 个经高压灭菌 (15 lpf/in², 20min) 的试管中分别加入 600 μL 培养超过 12 小时的新鲜大肠杆菌 DH5 α ，不加溶菌酶，将在 2—10 $^{\circ}\text{C}$ 储存的高压灭菌 (15 lpf/in², 20min) 过的 SC 顶层培养基放在微波炉中溶解，待琼脂温度降到 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右的时候取 2 mL 倒入装有大肠杆菌 DH5 α 的试管中。将混合液在旋涡振荡器上混匀，立即倒在平皿上。等到琼脂完全冷凝时，在 SC 顶层培养基上分别点 10 μL 培养 12 小时以上的 E-NS1 细菌裂解液，待吸收完
10 毕后，放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 小时以上。

- 如果 E-NS1 中的质粒与 T4-Z1 发生了重组，成功地将 NS1 基因转入 T4 噬菌体中，则在没有加溶菌酶的培养皿上可以生长出噬菌斑。重新铺 SC 平板培养基，然后用灭菌牙签把生长出的噬菌斑在 SC 板上点梅花斑。放在 37 $^{\circ}\text{C}$
15 培养 12 小时以上。生长良好的梅花斑用消毒好的刀片将其剥下，浸泡在磷酸缓冲液中 6 小时以上。

采用 PCR 筛选 T4 噬菌体转化子。用特异性引物 P1/P2 从阳性梅花斑浸泡液中扩增到特异性条带，则说明已获得了展示 NS1 蛋白的重组 T4 噬菌体。

- SC 培养液按下列方法配制：每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone 和 5 g NaCl，
20 加双蒸水定容至 1000mL，15 lpf/in² 高压灭菌 20min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

SC 底层培养基按下列方法配制：每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone，5 g NaCl 和 12 g 琼脂粉，双蒸水定容至 1000mL，15 lpf/in² 高压灭菌 20min，冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ ，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5) 和 10 mL 25% 柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后倒平板，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

- 25 SC 顶层培养基按下列方法配制：每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone，5 g NaCl 和 7 g 琼脂粉，双蒸水定容至 1000mL，15 lpf/in² 高压灭菌 20min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用时加热溶解，冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ ，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5) 和 10 mL 25% 柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后备用。

(三) 有益效果

本发明具有明显的优点和效果。本发明提供的重组 T4 噬菌体易于纯化，展示在 T4 噬菌体表面的 NS1 蛋白具有完整的空间构象。由于 SOC 位点在 T4 噬菌体头部表面具有 960 个拷贝，所以与 SOC 融合表达的 NS1 蛋白的拷贝数高。由于 NS1 蛋白分布于 T4 噬菌体头部表面，因而 T4 噬菌体本身充当了 NS1 蛋白的载体，当本发明提供的重组 T4 噬菌体作为抗原时，NS1 的免疫原性比单独的 NS1 蛋白强。作为疫苗的抗原、或者作为免疫检测的抗原使用时，和别的蛋白表达系统表达的 NS1 蛋白相比，本发明所述的重组 T4 噬菌体具有明显的优点。

10 附图说明

图 1 为 NS1 基因的 PCR 扩增产物电泳图。M 为 DNA 分子量标准 DL2000 DNA Marker；1-4 为 NS1 基因 PCR 扩增产物；

图 2 为 pR-NS1 重组子的筛选结果。NS1 基因的 PCR 产物大小为 678bp；SOC-NS1 融合基因的 PCR 产物大小约 900 bp。M 为 DL2000 DNA Marker，1、5 为同一转化子，2、6 为同一转化子，3、7 为同一转化子，4、8 为同一转化子，其中 1、2、3、4 为 P1/P2 特异性引物扩增的 PCR 产物，5、6、7、8 为 SOC-S/P2 特异性引物扩增的 PCR 产物；

图 3 为重组整合质粒 pR-NS1 的构建示意图。pR 表示整合质粒，pR-NS1 表示插入了 NS1 基因的重组整合质粒。Amp^r 表示氨苄青霉素抗性，Kp^r 表示卡那霉素抗性。e、soc、den V 都是 T4 噬菌体上的基因。EcoR I、BamH I、Nde I、HindIII、Pst I、Pvu I 是质粒上的限制性内切酶位点；

图 4 为 NS1 蛋白在重组 T4 噬菌体 SOC 位点展示模式图。A 为重组整合质粒 pR-NS1；B 为缺陷型 T4 噬菌体 T4-Z1；C 为重组后携带有目的基因 NS1 的重组 T4 噬菌体 T4-NS1；

图 5 为重组 T4 噬菌体的 PCR 鉴定结果图。泳道 1-8 是含有 NS1 基因的重组噬菌体的 PCR 产物，M 为分子量标记；

图 6 为重组噬菌体 T4-NS1 的免疫印迹 (Western blot) 检测图。M 为预染色的蛋白质分子量标准；1 为重组噬菌体 T4-NS1。

具体实施方式

实施例 1 采用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增 NS1 基因片段

按照 RizolLS Reagent 说明书(GibcoBRL 公司产品)提取禽流感 H5N1 亚型病毒的 RNA, 以 F1 (5'-ATG GAT TCC AAC ACT G-3') 和 F2 (5'-TCA AAC TTC TGA CTC-3') 为引物, 在 AMV 反转录酶(TaKaRa 公司产品)作用下合成 NS1 基因的 cDNA, 获得 RT 产物。RT 反应条件如下: 42°C 60 min, 然后 95°C 3 min。RT 产物用作 PCR 扩增 NS1 基因片段的模板, 以 P1 (5'-ATG AAT TCT ATG GAT TCC AAC ACT G-3') 和 P2 (5'-ATG AAT TCG TCA AAC TTC TGA CTC-3') 为引物, 按常规 PCR 方法扩增 NS1 基因, 反应条件为: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 40 s, 50°C 退火 90 s, 72°C 延伸 90 s, 循环 30 次; 最后 72°C 延伸 10min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察到特异性条带 (图 1)。结果表明, 成功扩增得到了 NS1 的基因片段。

实施例 2 重组质粒 pR-NS1 的构建

采用 pR 质粒 (任兆钧, 2004,CN1523114A) 构建重组质粒 pR-NS1, 其构建过程如图 3 所示。用 *EcoR* I 在 37°C 消化 NS1 基因的 PCR 产物, 用 *EcoR* I 和 CIAP 在 37°C 消化质粒 pR, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接消化的 NS1 的 PCR 产物和质粒 pR。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。转化方法为常规 CaCl₂ 法。经 Amp^r 抗性筛选, 获得插入了 NS1 基因的重组子。然后用两对特异性引物 SOC-S (GAATCA TATGGCTAGTCTCGCGG) / P2 和 P1/P2 进行 PCR 筛选 (图 2)。挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37°C, 200 r/m 振荡培养 16-20 小时, 对 PCR 筛选阳性的细菌, 8000r/m 离心收集菌体, 用 E.Z.N.A.® Plasmid Minipreps Kit (Omega 公司产品) 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化鉴定和序列测定, 获得重组质粒, 鉴定正确的重组质粒命名为 pR-NS1。

实施例 3 重组噬菌体 T4-NS1 的获得

用重组质粒 pR-NS1 和缺陷性 T4 噬菌体 T4-Z1 (任兆钧, 2004, CN1523114A) 进行同源重组, 获得展示 NS1 蛋白的重组 T4 噬菌体。其构建过程如图 4 所示。先将重组质粒 pR-NS1 转化到大肠杆菌 DH5 α , 获得的大肠杆菌记为 E-NS1。然后进行以下操作:

在装入 500 μ L SC 培养液的器皿中加入 1 μ L 氨卞青霉素 (Amp), 然后加

入 10 μL E-NS1, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至光密度值 OD_{600} 大约为 0.5 时, 加入 50 μL T4-Z1, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/m 振荡培养至有细菌碎片出现。

在 1 个经高压灭菌 (15 lpf/in², 20min) 的试管中分别加入 600 μL 培养超过 12 小时的新鲜大肠杆菌 DH5 α , 不加溶菌酶, 将在 2-10 $^{\circ}\text{C}$ 储存的高压灭菌 (15 lpf/in², 20min) 过的 SC 顶层培养基放在微波炉中溶解, 待琼脂温度降到 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右的时候取 2 mL 倒入装有大肠杆菌 DH5 α 的试管中。将混合液在旋涡振荡器上混匀, 立即倒在已铺有 SC 底层培养基的平皿上。等到琼脂完全凝固时, 在 SC 顶层培养基上分别点 10 μL 培养 12 小时以上的 E-NS1 细菌裂解液, 待吸收完毕后, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 小时。

10 如果 E-NS1 中的质粒与 T4-Z1 发生了重组, 成功地将 NS1 基因转入 T4 噬菌体中, 则在没有加溶菌酶的平皿上可以生长出噬菌斑。重新铺 SC 平板培养基, 然后用灭菌牙签把生长出的噬菌斑在 SC 板上点梅花斑。放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 小时以上。生长良好的梅花斑用消毒好的刀片将其剥下, 浸泡在磷酸缓冲液中 6 小时。

15 采用 PCR 筛选 T4 噬菌体转化子。用特异性引物 P1/P2 从阳性梅花斑浸泡液中扩增到特异性条带 (图 5), 则说明已获得了展示 NS1 蛋白的重组 T4 噬菌体。

SC 培养液按下列方法配制: 每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone 和 5 g NaCl, 加双蒸水定容至 1000 mL, 15 lpf/in² 高压灭菌 20 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

20 SC 底层培养基按下列方法配制: 每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone, 5 g NaCl 和 12 g 琼脂粉, 双蒸水定容至 1000 mL, 15 lpf/in² 高压灭菌 20 min, 冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$, 加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5) 和 10 mL 25% 柠檬酸钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 摇匀后倒平板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

25 SC 顶层培养基按下列方法配制: 每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone, 5 g NaCl 和 7 g 琼脂粉, 双蒸水定容至 1000 mL, 15 lpf/in² 高压灭菌 20min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用时加热溶解, 冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$, 加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5) 和 10 mL 25% 柠檬酸钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 摇匀后备用。

实施例 4 用禽流感病毒直接感染小鼠制备小鼠抗禽流感抗体

将 30 只小鼠分成 3 组, 每组 10 只, 饲养于隔离器中, 每日饲喂灭菌的饮

水和饲料。8周龄左右时接种病毒。其中一组用活的 H5N1 亚型禽流感病毒经肌肉注射感染小鼠，每只小鼠 0.2ml 活病毒（病毒 HA 滴度为 $1:2^8$ ）；首次感染后第 9 天，再用同样剂量的病毒感染一次。另一组按同样的剂量、同样的方式用活的 H9N2 亚型禽流感病毒感染小鼠（病毒 HA 滴度为 $1:2^9$ ）。第三组按同样的剂量、同样的方式接种禽流感灭活疫苗（肇庆大华农生物科技公司产品）。首次接种后 15 天，对小鼠进行眼球采血，常规方法制备血清，采用血凝抑制实验（HI）测定其抗体水平，HI 效价为 $8 \log_2$ 以上。将血清样品分装后置 -20°C 保存备用。

实施例 5 重组噬菌体的免疫印迹（Western Blot）分析

大量培养重组噬菌体 T4-NS1，离心，按常规法用 PEG/NaCl 浓缩，当噬菌体滴度达到 10^{11} pfu/mL 时，进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 方法如下：取重组噬菌体 T4-NS1 和 T4 噬菌体 SOC 缺失株 T4-Z1 各 100 μL ，然后加入 $2 \times$ 上样缓冲液 100 μL ，混匀后，样品在 -80°C 冰箱和 37°C 烘箱内分别冻融三次。参照汪家政等（2000）编《蛋白质手册》方法制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）。积层胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%。将待检样品煮沸 5 min，取 30 μL 加入凝胶点样孔中，在电场作用下进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸。电压为 80 v/cm，待溴酚蓝到达积层胶底部时电压升高到 160 v/cm。待溴酚蓝接近凝胶底部时，停止电泳，取下凝胶。接着进行免疫印迹（Western Blot）分析。

Western Blot 分析方法如下：SDS-PAGE 电泳结束后，不对凝胶进行染色。剪一张与凝胶相同大小的硝酸纤维素膜及两张滤纸，与电泳之后的凝胶一起在室温浸泡在转移缓冲液中 15 min，按海绵-滤纸-凝胶-硝酸纤维素膜-滤纸-海绵的顺序安装转印夹。将转印夹中有膜的一侧接正极，并在 15V 的电压下转移 1.5 小时。转移后的膜用 5%脱脂奶粉 4°C 封闭过夜，弃去封闭液，用 TBS 洗膜 3 次。弃去 TBS，加入用 1%脱脂奶粉/PBS 以 1:100 倍稀释的禽流感病毒感染的小鼠血清（一抗），温和振摇 3 小时。弃去一抗，用 TBS 洗膜 3 次，每次约 10 min。弃去 TBS，加入用 1%脱脂奶粉/PBS 以 1:1000 倍稀释的二抗（辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体，珠海百奥公司），温和振摇至

少 1 小时。弃去二抗，用 TBS 洗膜 3 次，每次约 30 min。弃去 TBS，加入 DAB 溶液显色，轻摇硝酸纤维素膜，待显色达一定程度，用双蒸水洗膜终止显色反应。在 39 kDa 位置可见一特异性条带（图 6）。

实施例 6 用重组噬菌体免疫小鼠制备小鼠抗 NS1 抗体

- 5 将重组噬菌体制备成油乳剂疫苗，每 ml 含有 1×10^{10} pfu 以上的重组噬菌体。将 10 只小鼠饲养于隔离器中，每日饲喂干净的饮水和饲料。8 周龄左右时用重组噬菌体油乳剂疫苗免疫小鼠，每只小鼠 0.2ml，首次免疫 14 天后，再用同样剂量的疫苗加强免疫一次。加强免疫后 14 天，对老鼠进行眼球采血，常规方法制备血清，获得的血清样品分装后置 -20°C 保存备用，并用 ELISA 检测小鼠血清中 NS1 抗体水平。

实施例 7 用重组 T4 噬菌体作为抗原检测小鼠血清中 NS1 抗体

- 以重组 T4 噬菌体为包被抗原，用 ELISA 检测 NS1 抗体。ELISA 程序如下：将重组 T4 噬菌体用 PBST（PBS，pH7.2，含 0.05% 吐温 20）稀释为 1×10^8 pfu/ml，每孔加入 100 μL 稀释的重组 T4 噬菌体， 4°C 放置 12 小时以上。
- 15 用清洗缓冲液（PBS，pH7.2，含 0.05% 吐温 20）洗 3 次后，每孔加入 100 μL 5% 的脱脂奶粉/PBS， 37°C 放置 2 小时。用清洗缓冲液洗 3 次后，每孔加入 100 μL 用 1% 脱脂奶粉/PBS 稀释 100 倍的小鼠血清， 37°C 反应 1 小时。再用清洗缓冲液洗 3 次后，每孔加入 100 μL 用 1% 脱脂奶粉/PBS 稀释 1000 倍的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体（珠海百奥公司）， 37°C 反应 1 小时。
- 20 用清洗缓冲液洗 3 次后，每孔加入显色液（10 mg TMB 溶于 10 ml 无水乙醇）100 μL ，室温观察颜色变化。在 20min 时达到显色高峰，每孔加入 100 μL 终止液（1mol/L H_2SO_4 ），终止显色反应，在酶标仪上读取 OD_{450} 值。计算样品检测值（P）与阴性血清检测值（N）的比值 P/N，P/N 值大于 2.1 时，判定为阳性。
- 25 用该方法检测小鼠血清，发现禽流感病毒感染的小鼠血清和重组噬菌体油乳剂疫苗免疫的小鼠血清，其 P/N 值均大于 2.1，判定为阳性；而禽流感灭活疫苗免疫的小鼠血清的 P/N 值小于 2.1，判定为阴性（表 1）。

表 1 小鼠血清 ELISA 检测结果

抗血清	OD ₄₅₀ 值	P/N
感染 H5N1 禽流感病毒的小鼠血清	1.122	3.7
感染 H9N2 禽流感病毒的小鼠血清	1.058	3.5
禽流感灭活病毒免疫的小鼠血清	0.462	1.5
重组 T4 噬菌体免疫小鼠血清	1.213	4.0
小鼠阴性对照血清	0.303	--

实施例 8 用重组 T4 噬菌体作为抗原检测鸡血清中 NS1 抗体

ELISA 程序如下：将重组 T4 噬菌体用 PBST (PBS, pH7.2, 含 0.05% 吐温 20) 稀释为 1×10^8 pfu/ml, 每孔加入 100 μ L 稀释的重组 T4 噬菌体, 4 $^{\circ}$ C 放置 12 小时以上。用清洗缓冲液 (PBS, pH7.2, 含 0.05% 吐温 20) 洗 3 次后, 5 每孔加入 100 μ L 5% 的脱脂奶粉/PBS, 37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时。用清洗缓冲液洗 3 次后, 每孔加入 100 μ L 用 1% 脱脂奶粉/PBS 稀释 100 倍的鸡血清, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。再用清洗缓冲液洗 3 次后, 每孔加入 100 μ L 用 1% 脱脂奶粉/PBS 稀

10 释 1000 倍的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鸡 IgG 抗体 (美国 Sigma 公司), 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用清洗缓冲液洗 3 次后, 每孔加入显色液 (10 mg TMB 溶于 10 ml 无水乙醇) 100 μ L, 室温观察颜色变化。在 20min 达到显色高峰, 每孔加入 100 μ L 终止液 (1mol/L H₂SO₄), 终止显色反应, 在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值。计算样品检测值 (P) 与阴性血清检测值 (N) 的比值 P/N, P/N 值大于 2.1 时, 判定为阳性。

15 该方法具有良好的特异性。用该方法检测鸡新城疫 (ND) 特异性血清、鸡脑脊髓炎 (AE) 特异性血清、鸡传染性支气管炎 (IB) 特异性血清、鸡传染性喉气管炎 (ILT) 特异性血清、鸡传染性囊病 (IBD) 特异性血清, 无交叉反应性。对来自现场的 84 份鸡血清样品进行检测, 检出阳性 66 份, 阴性 18 份 (表 2)。

表 2 鸡血清 ELISA 检测结果

血清号	P/N	结果	血清号	P/N	结果	血清号	P/N	结果	血清号	P/N	结果
1	2.24	+	22	2.20	+	43	2.83	+	64	1.11	—
2	2.67	+	23	2.32	+	44	2.27	+	65	1.74	—
3	2.33	+	24	2.75	+	45	2.63	+	66	2.16	+
4	2.44	+	25	2.79	+	46	2.76	+	67	2.32	+
5	2.70	+	26	2.77	+	47	2.68	+	68	2.03	—
6	3.23	+	27	2.66	+	48	2.89	+	69	1.87	—

7	3.06	+	28	2.36	+	49	2.92	+	70	1.87	—
8	3.16	+	29	2.84	+	50	3.05	+	71	2.08	—
9	2.92	+	30	2.00	—	51	3.06	+	72	2.62	+
10	3.06	+	31	3.16	+	52	3.20	+	73	1.72	—
11	2.57	+	32	2.30	+	53	2.48	+	74	1.72	—
12	2.49	+	33	2.75	+	54	2.67	+	75	1.57	—
13	2.52	+	34	2.62	+	55	3.01	+	76	1.96	—
14	2.39	+	35	2.78	+	56	2.24	+	77	1.87	—
15	2.93	+	36	2.54	+	57	2.16	+	78	2.01	—
16	2.52	+	37	3.10	+	58	2.74	+	79	2.77	+
17	2.64	+	38	3.19	+	59	1.97	—	80	2.01	—
18	2.89	+	39	3.14	+	60	2.02	—	81	2.82	+
19	2.81	+	40	2.90	+	61	1.79	—	82	2.16	+
20	2.53	+	41	2.94	+	62	2.17	+	83	1.49	—
21	2.51	+	42	2.79	+	63	2.45	+	84	2.22	+

序列表

<110> 华南农业大学

<120> 一种展示流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组 T4 噬菌体及其应用

<130> SEQ ID NO: 1

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 654

<212> DNA

<213> Avian influenza virus

<400> 1

atggattcca acactgtgtc aagttccag gtagactgct ttctttggca tgtccgcaa 60

cgatttcag accaagaact gggatgccc ccatttctag accggcttcg ccgagatcag	120
aagtcctaa aaggaagagg cagcactctt ggtctggaca tcagaaccgc cactcgtgaa	180
ggaaagcata tagtggagcg gattctggag gaagagtcag atgaggcact taaaatgact	240
actgcttcag tgccagctcc acgctaccta actgacatga ctcttgaaga aatgtcaaaa	300
gattggtaa tgctcattcc caaacagaaa gtgacagggt ccctttgcat tagaatggac	360
caagctatag tggataaaaa catcacattg aaagcaaact tcagtgtgat tttaatcga	420
ctggaagctc taatactact tagagctttt acagacgaag gaacaatagt gggtgaaatc	480
catactgatg aggatgtcaa aaattcacca ttaccttctc ttccaggagc aattggggtc	540
ctcatcggag gatttgaatg gaatgataac acagttcgag tctctgaaac tctacagaga	600
ttcgcttggg gaaacagcga tgagaatggg agacctccac tcctcctaaa gtag	654

<110> 华南农业大学

<120> 一种展示流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组 T4 噬菌体及其应用

<130> SEQ ID NO: 2

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<400> 1

Met Asp Ser Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp

1

5

10

15

His Val Arg Lys Arg Phe Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe

20

25

30

Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Lys Gly Arg Gly Ser

35

40

45

Thr Leu Gly Leu Asp Ile Arg Thr Ala Thr Arg Glu Gly Lys His Ile

50

55

60

Val Glu Arg Ile Leu Glu Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr

65

70

75

80

Thr Ala Ser Val Pro Ala Pro Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu Glu

85

90

95

Glu Met Ser Lys Asp Trp Leu Met Leu Ile Pro Lys Gln Lys Val Thr

100

105

110

Gly Ser Leu Cys Ile Arg Met Asp Gln Ala Ile Val Asp Lys Asn Ile

115

120

125

Thr Leu Lys Ala Asn Phe Ser Val Ile Phe Asn Arg Leu Glu Ala Leu

130

135

140

Ile Leu Leu Arg Ala Phe Thr Asp Glu Gly Thr Ile Val Gly Glu Ile

145

150

155

160

His Thr Asp Glu Asp Val Lys Asn Ser Pro Leu Pro Ser Leu Pro Gly

165

170

175

Ala Ile Gly Val Leu Ile Gly Gly Phe Glu Trp Asn Asp Asn Thr Val

180

185

190

Arg Val Ser Glu Thr Leu Gln Arg Phe Ala Trp Arg Asn Ser Asp Glu

195

200

205

Asn Gly Arg Pro Pro Leu Pro Pro Lys

210

215

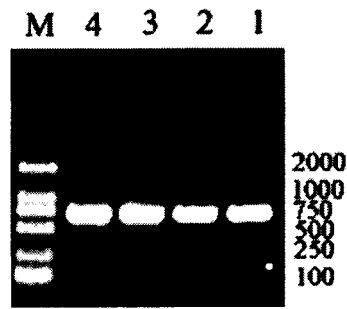


图 1

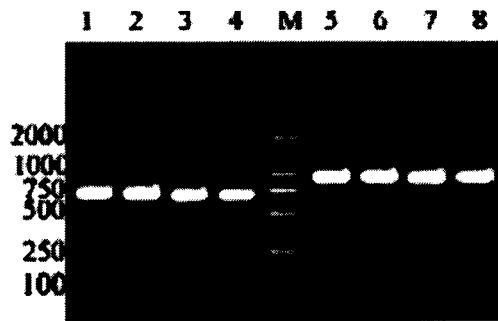


图 2

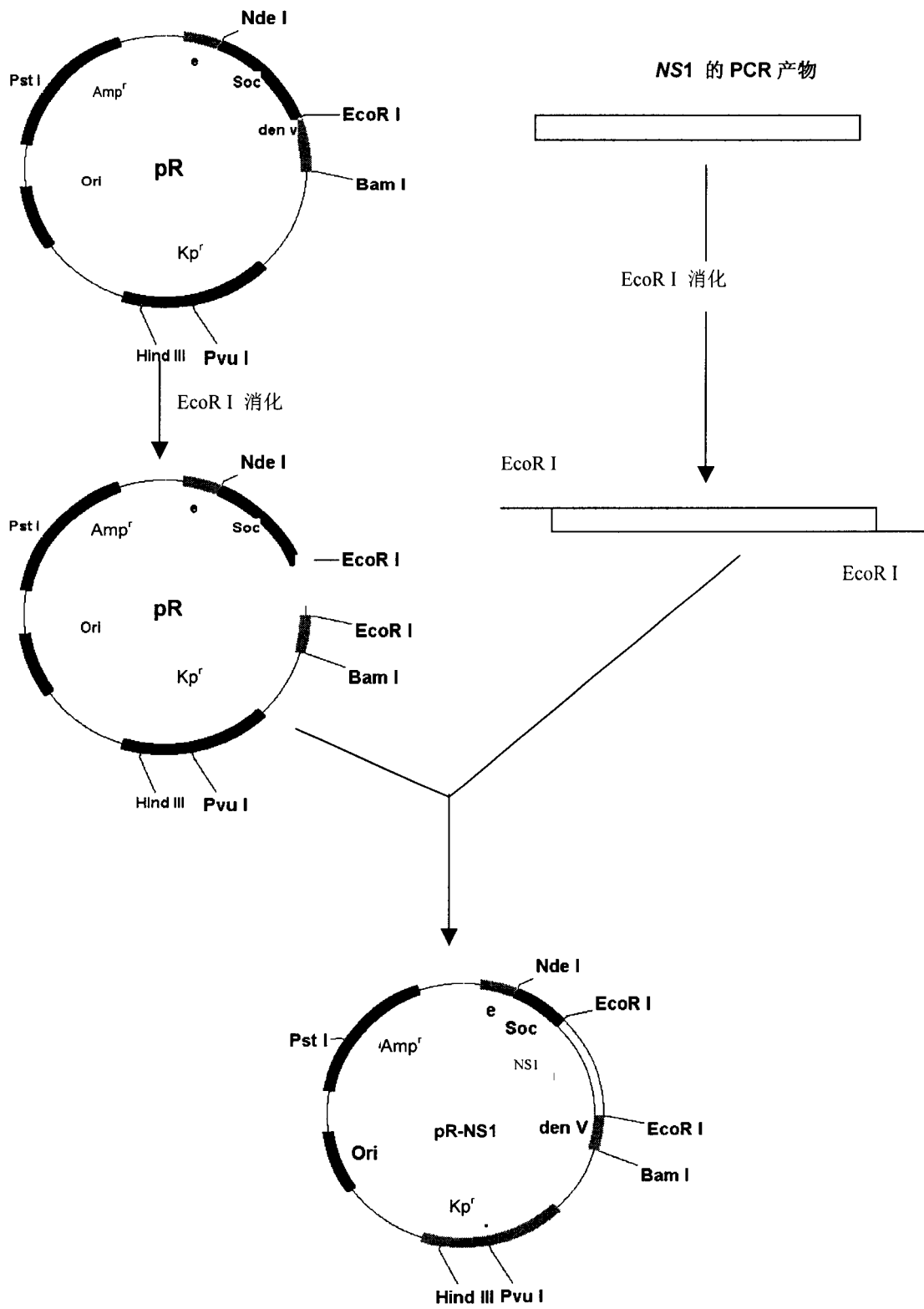
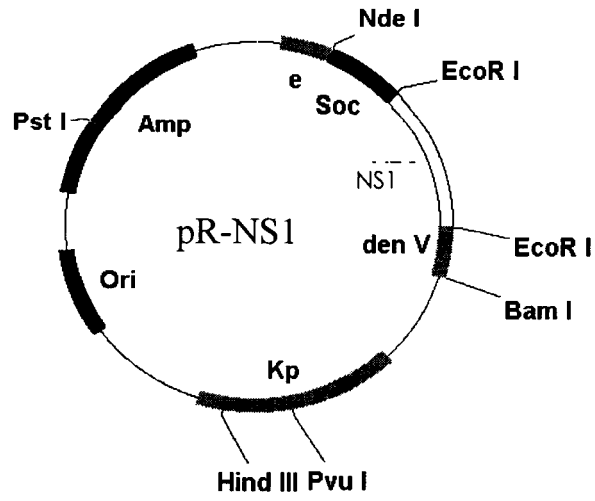
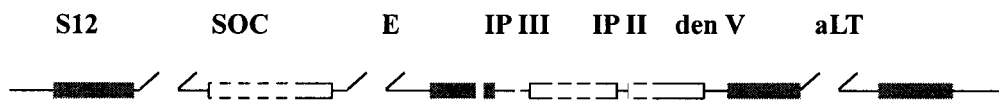


图 3

A



B



C

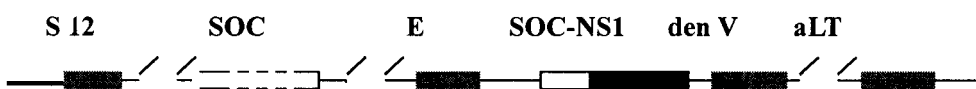


图 4

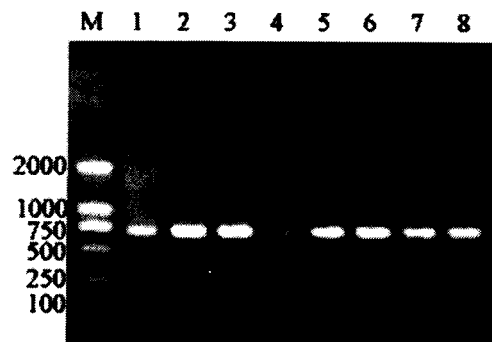


图 5

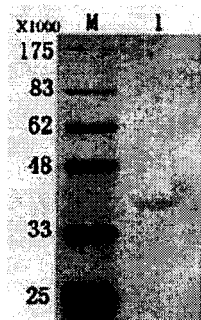


图 6

专利名称(译)	一种展示流感病毒非结构蛋白NS1的重组T4噬菌体及其应用		
公开(公告)号	CN1800376A	公开(公告)日	2006-07-12
申请号	CN200510126416.9	申请日	2005-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	曹永长 谢青云 陈丽 马静云 毕英佐		
发明人	曹永长 谢青云 陈丽 马静云 毕英佐		
IPC分类号	C12N7/01 C07K14/11 C07K19/00 C12N15/44 C07K16/18 C07K16/10 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/569		
代理人(译)	向华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种展示流感病毒非结构蛋白NS1的重组T4噬菌体，该重组T4噬菌体展示流感病毒非结构蛋白NS1与T4噬菌体SOC蛋白的融合蛋白。本发明进一步涉及重组T4噬菌体在检测流感抗体中的应用。本发明提供的重组T4噬菌体易于纯化，展示在T4噬菌体表面的NS1蛋白具有完整的空间构象；与SOC融合表达的NS1蛋白的拷贝数高；T4噬菌体本身充当了NS1蛋白的载体；当本发明提供的重组T4噬菌体作为抗原时，NS1的免疫原性比单独的NS1蛋白强；作为疫苗的抗原、或者作为免疫检测的抗原使用时，和别的蛋白表达系统表达的NS1蛋白相比具有明显的优点。

