

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810141799.0

[51] Int. Cl.

C07K 14/10 (2006.01)

C12N 15/51 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/125 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月28日

[11] 公开号 CN 101353374A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/14 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

[22] 申请日 2008.9.8

[21] 申请号 200810141799.0

[71] 申请人 深圳市菲鹏生物股份有限公司

地址 518054 广东省深圳市南山区南山大道
南油第四工业区三栋六楼东侧

[72] 发明人 胡 洋 孙兴宝 孙 婧 何志强

胡 鹏 李泓彦 曹 菲 崔 鹏

权利要求书 1 页 说明书 13 页

[54] 发明名称

原核表达的甲型肝炎病毒重组抗原

[57] 摘要

本发明涉及一种重组甲型肝炎病毒抗原，此抗原采用甲型肝炎病毒基因，利用基因工程重组技术，在大肠杆菌系统中表达出甲型肝炎病毒蛋白，表达的蛋白自组装形成甲型肝炎病毒的五聚体或空衣壳抗原，五聚体或空衣壳抗原可以作为甲型肝炎病毒疫苗之用，具有生产周期短、产量高、成本低的优点。本发明的甲型肝炎病毒重组抗原，还可以用于甲型肝炎病毒抗体的检测。

1. 一种甲型肝炎病毒重组抗原，其特征在于该甲型肝炎病毒重组抗原是利用基因工程重组技术，在大肠杆菌系统中表达的甲型肝炎病毒五聚体或空衣壳。

2. 根据权利要求1的甲型肝炎病毒重组抗原，其表达时的诱导温度在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，诱导转速为 $160 \pm 10\text{rpm}$ ，诱导的 IPTG 浓度为 $0.250 \pm 0.05\text{mM}$ 。

3. 根据权利要求1的甲型肝炎病毒重组抗原，其表达方式为采用双顺反子表达，其中 P1-2A 基因区为第一顺反子表达，3ABC 或者 3C 基因区为第二顺反子。

4. 根据权利要求1-3的甲型肝炎病毒重组抗原，其具有强免疫原性并引起甲型肝炎的保护性免疫应答。

5. 根据权利要求1-3的甲型肝炎病毒重组抗原，其制备的单纯的和联合疫苗的用途。

6. 根据权利要求1-3的甲型肝炎病毒重组抗原，其用于制备甲型肝炎病毒抗体检测试剂盒。

7. 根据权利要求1-3的甲型肝炎病毒重组抗原，其相应的表达质粒、表达菌株。

8. 根据权利要求1-3的甲型肝炎病毒重组抗原的制备方法。

原核表达的甲型肝炎病毒重组抗原

技术领域

本发明涉及一种甲型肝炎病毒抗原，具体地说，是涉及一种在大肠杆菌系统中表达形成的甲型肝炎病毒的五聚体或空衣壳，及其产生方法，以及五聚体或空衣壳作为疫苗或者诊断试剂的用途。

背景技术

甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)。属微小RNA病毒科，新型肠道病毒72型。人类感染甲肝病毒后，大多表现为亚临床或隐性感染，仅少数人表现为急性甲型肝炎。一般可完全恢复，不转为慢性肝炎。

甲肝病毒主要通过粪-口途径传播，潜伏期为15~45天，病毒常在患者转氨酶升高前的5~6天就存在于患者的血液和粪便中。发病2~3周后，随着血清中特异性抗体的产生，血液和粪便的传染性也逐渐消失，长期携带病毒者极罕见。

甲肝病毒的基因组是正单链RNA，全长约7.5kb，编码253kDa的多聚蛋白(polyprotein)(Cohen等, Journal of Virology(1987), 61: 3035-3039)。该多蛋白经过翻译和翻译后的剪切和拼接，产生结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4和2A)和非结构蛋白(2B、2C、3A、3B、3C和3D)。

甲肝病毒颗粒的组装过程大致如下：多聚蛋白被3C蛋白酶切割出P1-2A前体。P1-2A前体在2A的作用下，每5个前体集聚成一个13S前体。13S前体被3C蛋白酶切割成VP0(VP4+VP2)、VP3、VP1-2A(VP1+P2A)，并组合成14S前体。12个14S前体装配成70S病毒空壳或者140S的完整病毒(内含基因组RNA)，同时去除2A。蛋白酶3C同样参与了切割P1-2A，这个步骤促进五聚体形成。病毒衣壳蛋白的空间构象对于中和抗体的产生很重要。甲肝病毒的病毒粒子显示中和的免疫优势抗原位点在不同甲肝病毒毒株中严格保守。在甲肝病毒的五聚体上排列了五个构象性表位。这些表位是由于在五聚体装配期间它们中存在的抗原位点的构象变化或由于表

位片段重新组装而形成的。五聚体以及病毒颗粒都诱导中和抗体，因此它们对疫苗开发很有用（stapleton 等，Journal of Virology (1993)，67: 1080-1085）。

目前市场上天然甲肝疫苗有两种类型，一种是减毒活疫苗，是指保留一定的剩余毒力和免疫性制成疫苗，接种人体后，使机体产生一定的感染而获得免疫力。一种是灭活疫苗，价格较高，副作用小，例如科兴、葛兰素史克、瑞士博尔纳、默沙东、赛诺非巴斯德等厂家的产品。

天然甲肝减毒活疫苗由于具有潜在的基因突变导致恢复毒性和感染力的潜在危险，所以逐步将会被淘汰。公开资料显示，目前发达国家已全部淘汰了减毒活疫苗，全部采用灭活疫苗。天然甲肝灭活疫苗由于需要采用细胞培养病毒的方式。例如，培养 MRC-5 细胞，然后接种甲肝病毒，在长时间培养增殖病毒之后，收获细胞，破碎，去除细胞碎片，浓缩病毒，经过一系列的纯化过程之后，灭活，最终生产为疫苗。

此类真核细胞生产的甲肝灭活疫苗的缺陷是：由于真核细胞的增殖速度比原核细胞慢，培养条件苛刻，控制流程繁琐，所以产量很低，生产周期很长，而且生产的成本也比较高。

近年来有关甲肝病毒分子生物学和免疫学进展很快，正通过各种途径研制甲型肝炎基因工程疫苗。大致有以下几种方法：合成多肽、由原核或真核细胞中表达的 HAV 蛋白中获得亚单位疫苗、活病毒载体或合成病毒疫苗、表达的病毒空颗粒。

如前所述，由于甲肝疫苗的免疫原性依赖于病毒外壳蛋白的切割、折叠、组装成为五聚体或者更为高级的病毒空壳，而合成多肽的方式制备的甲肝疫苗并不具备上述特征，这种途径制备的疫苗，没有针对天然病毒的中和性表位，因此并不能产生保护性。

含有甲肝病毒整个 ORF 的重组杆状病毒能表达出甲肝病毒的多聚蛋白体，在昆虫细胞表达系统也能成功表达，此外，构建在哺乳动物细胞中表达甲肝病毒多蛋白的重组牛痘病毒，也是可行的。这些表达系统都可以进行多聚蛋白的切割和加工，以及五聚体和病毒空壳的组装。此前有描述在

杆状病毒系统和牛痘中表达的甲肝病毒重组疫苗的专利，如专利申请 W09111460 和 US5605692 (Thomas 等, 1997 年 2 月 25 日)，其中开放读框 (ORF) 的序列用于免疫原性衣壳和五聚体的制备，并保护了获得甲肝病毒衣壳的方法，顺式和反式方向表达结构区和 P3 区的方法以及双顺反子构建体。以上专利提到的甲型肝炎病毒抗原或者疫苗，都是采用的真核细胞表达系统，但是，真核细胞来表达 HAV 蛋白作为疫苗或者作为 HAV 抗体诊断试剂的原材料时有很大的局限性：真核细胞增殖速度慢，培养条件苛刻，控制流程繁琐，所以产量很低，生产周期很长，生产的成本比较高。

大肠杆菌表达系统具有周期短、费用低、表达量大的优点，能够在较短时间内获得大量的表达产物，而且所需的成本相对比较低廉，所以用它作为基因工程重组甲肝疫苗以及诊断试剂原材料是一种全新的选择。

由于甲肝疫苗的免疫原性依赖于病毒外壳蛋白的切割、折叠、组装成为 14S 五聚体或者更为高级的 70S 病毒空壳，原核表达系统目前还没有解决重组甲肝病毒蛋白的切割、复性和组装效率低的难题，所以一直没有真正的原核表达系统重组甲肝疫苗出现。

Albert Bosch 提到在大肠杆菌中可以表达出来 HAV 14S 五聚体和 70S 病毒空壳 (Journal of General Virology (2002), 83, 359-368.)，但是，这个方案存在很大的缺陷：(1) HAV 全长 ORF 表达，因为目的蛋白为 253Kda，所以目的蛋白合成效率低下，表达量非常小；(2) HAV 全长 ORF 或者 VP1-2A 表达时，由于诱导温度相对过高，转速相对过快，诱导剂量相对过大，导致目的蛋白合成速度太快，以至于没有足够的时间进行折叠，大部分目的蛋白形成没有活性的包涵体，而具有活性的五聚体或空衣壳比例太少；(3) 采用 VP1-2A 表达时，由于没有 P3 区的蛋白酶切割，导致很难形成五聚体或空衣壳。

目前，HAV 的免疫学检测主要是 IgM 检测，采用的也是天然培养的病毒裂解液，其面临的缺陷和困难和甲肝病毒疫苗一样。

综上所述，HAV 五聚体或空衣壳的原核表达，仍然是一个难题。

发明内容

本发明是为了提供一种重组甲型肝炎病毒抗原，此抗原采用甲型肝炎病毒基因，利用基因工程重组技术，在大肠杆菌系统中表达出甲型肝炎病毒蛋白，表达的蛋白经自组装形成甲型肝炎病毒的五聚体或空衣壳抗原。五聚体或空衣壳抗原可以作为甲型肝炎病毒疫苗之用，具有生产周期短、产量高、成本低的优点。本发明的甲型肝炎病毒重组抗原，还可以作为甲型肝炎病毒诊断试剂盒的一部分。本发明的目的可以通过以下的技术方案实现：

名词解释

为了更加清楚的表达本发明的内容，所以有必要对本发明中使用的术语予以解释。本发明中使用的术语除非另有说明，否则具有以下含义。

本发明中使用的术语“五聚体”为5个VP1、5个VP2、5个VP3、5个VP4经过组装形成的蛋白聚体，它具有和天然甲肝病毒壳体中的五聚体相似的高级结构，由于它的沉降系数为14S，因此又可称为“14S多聚体”。

本发明中使用的术语HAV病毒“空衣壳”为HAV病毒的病毒外壳，不含HAV基因组，其沉降系数为70S，因此又可称为“70S多聚体”。

本发明中使用的术语“高级结构”意指蛋白质分子的主链与侧链原子的相互作用，形成特定的空间构象，主要指蛋白质形成的四级结构，这种四级结构是蛋白质单体所不具备的空间结构。HAV病毒外壳蛋白特有的的高级结构，可以对机体产生具有很强中和性的抗体，是HAV疫苗必需具备的特点。

本发明中使用的术语“标记物”指HRP等，也可指包含HRP等的“标记复合物”。

技术方案

培养HAV病毒适合生长的细胞，感染HAV病毒，等病毒达到一定浓度之后，收获细胞，裂解，提取病毒RNA，设计HAV的引物，RT-PCR获得HAV的P1-2A以及3ABC或者3C基因的cDNA，连接到T载体，测序分析序列正确性，然后把目的基因插入表达载体。本发明的HAV基因的获取还有其它方式，例如：人工合成法。

由于 HAV 基因的 P1 区表达的蛋白是形成病毒外壳五聚体的主要部分，2A 跟 P1 区在一起可以辅助五聚体的形成，3ABC 或者 3C 是蛋白酶区，可以把多聚蛋白切割。因此，本发明采取的表达策略是双顺反子表达，将 P1-2A 基因设计成一个 ORF，作为第一个顺反子，3ABC 基因设计成另外一个 ORF，作为第二个顺反子，将两者串联在一个载体之上。由于原核生物的核糖体可以顺着翻译几个相邻的 ORF，所以在 P1-2A 的蛋白翻译完成之后，核糖体不会离开 mRNA，接着翻译 3ABC 或者 3C 区。

这种双顺反子表达的好处是，3ABC 区或者 3C 蛋白酶可以在菌体内切割 P1-2A，使其组装成为 14S 的五聚体，以及 70S 的病毒空壳。将带有此双顺反子的质粒，转化到大肠杆菌之中，经过诱导，使目的基因得到表达，收集菌体，破碎，纯化多聚体。

本发明的表达系统为大肠杆菌表达系统，它具有周期短、费用低、表达量大的特点，所以非常适合实施本发明。为了使目的蛋白不至于过快表达，聚集成为未组装的包涵体，本发明选择比较温和的诱导措施，把诱导温度设定在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 度，让目的蛋白更加缓慢的表达，从而使 3C 蛋白酶有充分的时间切割，以及五聚体以及病毒空壳有充分的时间形成，本发明的最佳表达温度为 25 度。另外一种方案是，减少诱导剂的加入量，让目的蛋白更加缓慢的表达，从而使 3C 蛋白酶有充分的时间切割，以及五聚体以及病毒空壳有充分的时间形成。本发明采用的又一方案是，降低诱导时的转速，让目的蛋白更加缓慢的表达，从而使 3C 蛋白酶有充分的时间切割，以及五聚体以及病毒空壳有充分的时间形成，本发明的诱导转速设定在 $160 \pm 10\text{rpm}$ ，优选 160rpm 。基于以上同样的目的，本发明降低 IPTG 的浓度，使蛋白表达更加缓慢，温和，IPTG 的浓度设定在 $0.250 \pm 0.05\text{mM}$ ，优选为 0.250mM 。

本发明可以采取超声、表面活性剂、反复冻融的方式破碎细菌。在破碎菌体的时候，为了避免剧烈的破碎，本发明优选的破碎方案是反复冻融，结合溶菌酶处理，使菌体内部的 HAV 五聚体以及病毒空壳温和的释放出来。

HAV 五聚体以及病毒空壳的纯化方式可以有多种，例如抗体柱亲和层

析、离子交换、凝胶过滤。本发明优选离子交换和单克隆抗体柱亲和层析，抗体具备的条件就是只针对 HAV 的五聚体以及病毒壳体反应，但是不和 HAV 的蛋白单体反应。本发明的亲和层析抗体，优选为单克隆抗体 K2-4F2，此单抗为美国北卡罗来纳州教堂山北卡罗来纳州立大学医疗系 STANLEY M. LEMON 教授馈赠，根据作者同意之后，在此公布，参考文献 Antigenic Structure of Human Hepatitis A Virus Defined by Analysis of Escape Mutants Selected against Murine Monoclonal Antibodies。K2-4F2 是一株针对 HAV 的五聚体以及病毒壳体反应，但是不和 HAV 的蛋白单体反应的单克隆抗体（参见文献 Intrinsic Signals for the Assembly of Hepatitis A Virus Particles），利用此抗体制备的亲和层析柱可以很方便的纯化 HAV 的 HAV 的五聚体以及病毒壳体，去除菌体裂解物、核酸、以及未组装的 HAV 的蛋白单体。

本发明分开 14S 五聚体和 70S 病毒空衣壳的亲和层析抗体，抗体具备的条件就是只针对 HAV 的病毒壳体反应，但是不和 HAV 病毒的五聚体、蛋白单体反应，优选为单克隆抗体 K34-C8，此单抗为美国北卡罗来纳州教堂山北卡罗来纳州立大学医疗系 STANLEY M. LEMON 教授馈赠，根据作者同意之后，在此公布，参考文献 Antigenic Structure of Human Hepatitis A Virus Defined by Analysis of Escape Mutants Selected against Murine Monoclonal Antibodies。K34-C8 是一株针对 HAV 的 70S 病毒壳体反应，但是不和 HAV 的蛋白单体以及 14S 五聚体反应的单克隆抗体（参见文献 Antigenic and immunogenic properties of recombinant hepatitis A virus 14S and 70S subviral particles），利用此抗体制备的亲和层析柱可以很方便的分开 14S 五聚体和 70S 病毒空衣壳。

本发明的甲型肝炎病毒重组抗原，具有免疫原性并引起甲型肝炎的保护性免疫应答，可以用来制备联合疫苗，或者 HAV 单纯疫苗。

本发明的甲型肝炎病毒重组抗原，可以作为甲型肝炎诊断试剂盒的一部分。

发明优点

(1) 采用大肠杆菌表达, 具有周期短、费用低、表达量大的优点, 能够在较短时间内获得大量的表达产物, 而且所需的成本相对比较低廉;

(2) 采用双顺反子表达, P1-2A 区作为第一个顺反子, 3ABC 或者 3C 作为第二个顺反子, 这样表达的 P3 区蛋白酶就可以在菌体内切割 P1-2A 区表达产物, 使其最终形成具有高级结构的 14S 五聚体和 70S 病毒空衣壳;

(3) 采用经过优化的蛋白表达条件 (诱导温度在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 诱导转速为 $160 \pm 10\text{rpm}$, IPTG 浓度为 $0.250 \pm 0.05\text{mM}$), 降低了目的蛋白形成包涵体的机会, 可以更大量地收获具有高级结构的 14S 五聚体和 70S 病毒空衣壳。

本发明的目的、特征及优点将结合实施例, 参照附图作进一步详细阐述。应当理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用来限定本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如 Sambrook 等人, 分子克隆实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 0989) 中所述的条件, 或者甲肝疫苗以及诊断试剂盒生产厂家推荐的方法。本发明人曾经在申请号为 CN101160413 的中国专利中提到一种 P2 载体, 以其作为起始载体来进行说明本发明的实施例, 但是它跟 P2 相似的载体也可以实现本发明。

具体实施例

实施例 1 含有甲肝病毒基因的表达载体构建

(1) HAV 基因组的提取

取 HAV 病毒感染的 Vero 细胞培养物 0.5ml, 在液氮中冻实之后, 取出, 立即解冻, 如此反复 5 次。冻融之后的样品用病毒 RNA 提取试剂盒 (上海生工生物工程服务有限公司, 货号: SK1321) 提取 RNA。

(2) HAV cDNA 的获得以及双顺反子质粒的构建

根据 NCBI 搜索 HAV 的代表性基因序列, 分析其保守性, 设计 HAV 基因 P1-2A 区的一对引物, 上游引物为 GAG GGA TCC ATT CAA TCA GTT GAT AGG ACT, 带有 BamHI 酶切位点, 下游引物为 GGG GAA TTC AAT TTG TTC TTT AAT TTC CTG AAC TC, 带有终止密码子 TAA 和 EcoRI 酶切位点。采用上述引物, 以提取的 HAV RNA 为模板, 用 AMV RT-PCR 试剂盒 (上海生工生物工程服务

有限公司, 以下简称生工, 货号: BS251), 按照试剂盒推荐的条件, 制备 HAV 基因 P1-2A 区 cDNA, PCR (本发明的 Taq 酶为 TaKaRa 公司产品, 货号: DRR001A), PCR 条件为: 94℃, 5 分钟 × 1 个循环, (94℃, 45 秒钟, 55℃, 45 秒钟, 72℃, 120 秒钟) × 30 个循环, 72℃, 10 分钟 × 1 个循环。PCR 产物回收之后, 连接到 PMD-18T 载体上面 (大连 TaKaRa 公司), 测序证明序列正确之后, 将此带有 HAV 基因 P1-2A 区的 PMD-18T 质粒用 BamHI 和 EcoRI 酶切 (本发明所采用的各种分子生物学用酶均购自大连 TaKaRa 公司) 之后, 回收 P1-2A 产物, 插入到 BamHI 和 EcoRI 酶切之后的 P2 载体里面, 转化大肠杆菌 ER2566 (此菌株从基因酷 www.genecool.com 交换而来, 编号: B0007), PCR 筛选阳性克隆, 命名为 P2-P1/2A, 提取质粒。

根据 NCBI 搜索 HAV 的代表性基因序列, 分析其保守性, 设计 3ABC 区的一对引物, 上游引物为 GGG GAA TTC GGA ATT TCA GAT GAT AAT GAT AGT, 带有 EcoRI 酶切位点, 下游引物为 GGG AAG CTT TTA CTG ACT TTC AAT TTT CTT ATC AAT, 带有终止密码子 TAA 和 HindIII 酶切位点。采用上述相同的方式获得 HAV 基因的 3ABC 区 cDNA, 以此 cDNA 为模板, PCR 扩增出 3ABC 区, PCR 条件为: 94℃, 5 分钟 × 1 个循环, (94℃, 45 秒钟, 55℃, 45 秒钟, 72℃, 60 秒钟) × 30 个循环, 72℃, 10 分钟 × 1 个循环。产物回收之后, 连接到 PMD-18T 载体上面, 测序证明序列正确之后, 将此带有 HAV 基因 3ABC 区的 PMD-18T 质粒用 BamHI 和 EcoRI 酶切之后, 回收 3ABC 产物, 插入到 EcoRI 和 HindIII 酶切之后的 P2-P1/2A 质粒里面, 转化大肠杆菌 BL21, PCR 法筛选阳性克隆菌株, 即为双顺反子表达所用的克隆 P2-P1/2A-3ABC, 挑选阳性克隆, 提取质粒, 测序证明序列无误, 进行后续步骤。

实施例 2 甲肝病毒蛋白的表达, 五聚体以及病毒壳体的纯化

(1) 甲肝病毒蛋白的表达

将 P2-P1/2A-3ABC 质粒转化大肠杆菌 ER2566, 涂布于含 100ug/ml 硫酸卡那霉素 (上海生工生物工程技术服务有限公司, 货号: KB0286) 的 LB 平板上, 37℃ 过夜培养, 挑取单克隆, 用含同一浓度卡那霉素的 500ml LB 培养基 37℃ 振荡培养至 OD600 达 0.5 左右, 用终浓度为 0.250mM 的 IPTG (生

工, 货号: IB0168) 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 转速 160rpm, 8 小时。诱导之后, 将培养液 4℃ 5000rpm 离心 20 分钟收集菌体, 用 5ml 裂解液(50mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮, 反复冻融 5 次, 然后对 20mM pH7.4 的 PBS (配方: 配方 pH7.4: 磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 0.24g, 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄) 1.44g, 氯化钠(NaCl) 8.0g, 氯化钾(KCl) 0.2g, 加水至 1000mL) 透析 24 小时, 加入终浓度 250 μg/ml 的溶菌酶(Lysozyme, Seebio Biotech, Inc, 货号: 151330), 37 度处理 1 小时。

(2) 五聚体以及病毒空衣壳的离子交换预纯化

采用离子交换预纯化甲型肝炎病毒的五聚体和空衣壳, 层析柱为 DEAE-5PW 21.5 × 15cm(日本 TOSOH 公司), 柱体积为 50.5ml, 流速为 4ml/min。首先用 3 倍左右柱体积的 PBS 缓冲液预先平衡柱床, 用紫外检测器检测 280nm 的吸收值 (UV280), 待 UV280 小于 0.001AU 之后, 将检测器的吸收值归零, 加入溶菌酶处理之后的表达产物, 上样完毕, 以 2 倍柱床体积的 PBS 继续穿透层析柱, 然后, 用 3 倍柱体积 pH7.4 的 PB+0.5M NaCl 缓冲液进行洗脱, 收集洗脱液。将洗脱液再用 pH7.4 的 PBS 透析, 将 PEG20000 置于透析袋周围, 用来吸收洗脱液里面的水分, 使洗脱液浓缩至原体积的 1/3 体积为止。

(3) 五聚体以及病毒空衣壳的单克隆抗体柱亲和层析精纯化

采用溴化氰活化琼脂糖凝胶 4B (CNBr-4B) (法玛西亚公司, 货号: 17-0430-01), 按照说明书推荐的方案, 分别偶联上 K2-4F2 以及 K34-C8 抗体。按照法玛西亚公司推荐的纯化条件, 使用 CNBr-4B/K2-4F2 抗体柱纯化上述 HAV 的五聚体和空衣壳。

(4) 甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳的分离

采用 CNBr-4B/K34-C8 抗体柱分离五聚体和空衣壳, 其具体的分离和回收方法, 也按照按照法玛西亚公司 CNBr-4B 说明书推荐的方案进行。

实施例 3 本发明的甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳作为疫苗的安全性和保护性验证

(1) 安全性验证

通过皮下注射、肌肉注射和静脉注射三种免疫途径，观察本发明的甲肝病毒重组五聚体以及病毒壳体的安全性。实验动物采用8周龄健康BALB/c小鼠，每组30只，剂量为25mg/kg。各组小鼠给药之后，其外观、活动、精神状态、食欲、皮毛、呼吸等均无明显毒性反应，观察14天，无一死亡，处死小鼠，观察心肝脾肺肾，也未见明显异常。此结果表明，本发明的甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳作为甲型肝炎疫苗，是完全具有安全性的。

(2) 保护性验证

本发明的大肠杆菌表达的甲肝病毒重组五聚体，经铝佐剂吸附后，分别以5 μ g、10 μ g和20 μ g剂量免疫恒河猴，28天时以相同剂量加强免疫1次，3周后分别以不同病毒滴度的HAV静脉攻击。结果，每个剂量免疫组及对照组各有3只恒河猴接受10⁷病毒滴度HAV感染，对照组3只恒河猴均被成功感染，2只出现肝炎；20 μ g免疫组3只恒河猴均未被感染；10 μ g和5 μ g免疫组各有2只恒河猴未被感染，另1只恒河猴出现短暂感染，免疫恒河猴均未出现肝炎。3个剂量免疫组及对照组另外3只恒河猴，接受10⁴病毒滴度HAV感染，对照组3只恒河猴均被感染，1只出现肝炎；而免疫恒河猴均未被感染，也未出现肝炎。大肠杆菌表达的甲肝病毒重组五聚体空衣壳，重复以上的恒河猴实验，得到的结果也类似。此结果表明，本发明的甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳作为甲型肝炎疫苗可以完全预防HAV导致的肝炎，并保护大多数恒河猴不被HAV感染。

实施例4 本发明的甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳作为甲型肝炎诊断试剂的免疫反应性

(1) 甲型肝炎病毒抗原-HRP标记复合物的制备

采用NaIO₄氧化法。称取10mg辣根过氧化物酶(HRP，英国Biozyme laboratories公司，货号：HRP4)溶解于1ml超纯水中，再缓慢滴加1ml超纯水新鲜配制的5mg/ml NaIO₄(生工，货号ST1244)溶液，室温下避光轻柔搅拌40分钟后加入20%乙二醇(生工，货号E0582)溶液0.05ml，室温下避光搅拌40分钟。然后立即加入事先对100mM，pH 9.51碳酸盐缓冲液透析2小时，2.5mg/ml的纯化好的甲型肝炎病毒五聚体抗原1ml(事先用pH7.4

的 PBS 缓冲液稀释到 1mg/ml)，4℃避光对 100mM，pH 9.51 碳酸盐缓冲液透析过夜。次日，向混合物中滴加 0.1ml 新鲜配制的 4mg/ml NaBH₄(生工，货号 ST1268)溶液，混匀，4℃静置 2 小时。将上述溶液装入透析袋中，对 PBS 缓冲液(150mM，pH7.4)透析，4℃过夜，加入酶保护剂及终浓度 50%的甘油混匀后-20℃避光保存备用。甲型肝炎病毒空衣壳的标记，也按照相同方式进行。

(2) 甲型肝炎病毒抗原-HRP 标记复合物用来检测 HAV IgM 标本

将抗人 IgM μ 链抗体用 PBS 稀释到 1 μg/ml，100ul/孔加入酶标板(深圳金灿华实业有限公司辐照酶标板)，4℃包被 24 小时，次日用 PBST(10mM PB，150mM NaCl，0.05% Tween-20，pH7.4)洗涤液洗板二次，拍干，120ul/孔加入含 30%新生牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所)，8%蔗糖，5%酪蛋白(美国 Sigma-Aldrich 公司，货号 C-8645) 150mM NaCl 的 pH7.4，10mM PB 封闭液，37℃封闭 2 小时，甩掉孔内液体，拍干，置室温 20-25℃、湿度 55%-65%、有通风设备的房间内风干。在包被酶标板中先加入 100ul 待测样品、阴性参照样品(正常人阴性血清)、阳性参照样品(HAV IgM 抗体阳性血清)对照，37℃温育 30 分钟；用 PBST 洗涤液洗板五次，拍干。再 100ul/孔加入含有 20%新生牛血清，以 pH7.4 的 20mM PB 缓冲液 1: 2500 稀释的五聚体-HRP 标记复合物，37℃温育 30 分钟；用 PBST 洗涤液洗板五次，拍干。

每孔加入含 0.5%过氧化氢尿素(生工，货号 UB1753)、4.76%三水合乙酸钠、0.9%冰醋酸的显色剂 A 及含 0.32%TMB(生工，货号 TB0514)、5mM 柠檬酸、0.5mM EDTA-2Na、5%甲醇、2%二甲基甲酰胺的显色剂 B 各 50ul，37℃避光显色 10 分钟。每孔加 50ul，含 2M 硫酸的终止液终止反应，酶标仪 450nm 波长(参考波长 630nm)空白孔校零后读取 OD 值。

截值(Cutoff Value (COV))计算： $COV = \text{阴性对照平均 OD 值} \times 2.0$ (阴性对照 OD 值低于 0.075 按 0.075 计算，高于 0.075 按实际 OD 值计算)，待测样品 OD 值 $\geq COV$ 为阳性，待测样品 OD 值 $< COV$ 为阴性。

(3) 甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳制备的试剂盒效果考察

按照上述检测方式，采用上海科华生物工程股份有限公司和英科新创

(厦门) 科技有限公司的 HAV IgM 检测试剂盒作为对照试剂盒。

①灵敏度：用本发明的试剂盒与对照试剂盒，在同样的条件下对 100 份系列稀释比例的 HAV IgM 血清进行检测，得到了表 1 的结果，此结果表明，甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳制备的 HAV IgM 试剂盒的灵敏度跟对照试剂盒差别不大。

表 1 甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳制备的 HAV IgM 检测试剂盒灵敏度结果

标记方法	100 份血中检测出的份数				
	血清稀释度(倍)				
	1	10	50	250	1000
五聚体试剂盒	100	87	70	57	39
空衣壳试剂盒	100	89	72	60	43
上海科华试剂盒	100	90	74	58	42
英科新创试剂盒	100	88	75	61	44

②特异性：用本发明的试剂盒与对照试剂盒，在同样的条件下对 3000 份 HAV IgM 临床阴性血清进行检测，结果是，五聚体 HAV IgM 检测试剂盒的特异性为 99.8%，假阳率为 0.1%；空衣壳 HAV IgM 检测试剂盒的特异性为 99.7%，假阳率为 0.3%；上海科华 HAV IgM 检测试剂盒的特异性为 99.9%，假阳率为 0.1%；英科新创 HAV IgM 检测试剂盒的特异性为 99.7%，假阳率为 0.3%。此结果表明，甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳制备的 HAV IgM 检测试剂盒，特异性要显著好于对照试剂盒。

③稳定性：

将本发明的甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳抗原溶液放在 37℃ 考核 7 天，取出后与同时 4℃ 存放的抗原，制备成 HAV IgM 检测试剂盒，在同一条件下检测相同的 HAV IgM 阴、阳性血清，以考察甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳抗原的稳定性，结果如表 2、3 所示。

将本发明的甲型肝炎病毒五聚体抗原-HRP 标记物和空衣壳抗原-HRP 标记物放在 37℃ 考核 7 天，取出后与同时 4℃ 存放的标记物，制备成 HAV IgM 检测试剂盒，在同一条件下检测相同的 HAV IgM 阴、阳性血清，以考察甲型肝炎病毒五聚体抗原-HRP 标记物和空衣壳抗原-HRP 标记物的稳定性，结

果如表 4、5 所示。

表 2 甲型肝炎病毒五聚体抗原的稳定性实验结果 (OD 值)

保存状态	HAV 质控 1	HAV 质控 2	HAV 质控 3	阴性对照	阴、阳性质控血清
4℃ 存放	0.458	1.098	2.312	0.024	无明显差异
37℃, 7 天	0.446	1.021	2.229	0.022	

备注: COV = 0.150.

表 3 甲型肝炎病毒空衣壳抗原的稳定性实验结果 (OD 值)

保存状态	HAV 质控 1	HAV 质控 2	HAV 质控 3	阴性对照	阴、阳性质控血清
4℃ 存放	0.487	1.135	2.557	0.031	无明显差异
37℃, 7 天	0.466	1.089	2.415	0.029	

备注: COV = 0.150.

表 4 甲型肝炎病毒五聚体抗原-HRP 标记物的稳定性实验结果 (OD 值)

保存状态	HAV 质控 1	HAV 质控 2	HAV 质控 3	阴性对照	阴、阳性质控血清
4℃ 存放	0.572	1.067	2.254	0.027	无明显差异
37℃, 7 天	0.549	1.014	2.214	0.030	

备注: COV = 0.150.

表 4 甲型肝炎病毒空衣壳抗原-HRP 标记物的稳定性实验结果 (OD 值)

保存状态	HAV 质控 1	HAV 质控 2	HAV 质控 3	阴性对照	阴、阳性质控血清
4℃ 存放	0.596	1.250	2.614	0.032	无明显差异
37℃, 7 天	0.588	1.236	2.588	0.028	

备注: COV = 0.150.

此实验表明, 本发明的甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳抗原以及它们各自的 HRP 标记物的稳定性较好。

④精密性:

用甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳抗原制备的试剂盒检测同一份已知 HAV IgM 阳性标本, 做 10 次重复检测, 得到各次的结果均为阳性, 且各检测的 OD 值也无显著差异, 说明甲型肝炎病毒五聚体和空衣壳抗原制备的 HAV IgM 试剂盒精密性较好。

专利名称(译)	原核表达的甲型肝炎病毒重组抗原		
公开(公告)号	CN101353374A	公开(公告)日	2009-01-28
申请号	CN200810141799.0	申请日	2008-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市菲鹏生物股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市菲鹏生物股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市菲鹏生物股份有限公司		
[标]发明人	胡洋 孙兴宝 孙婧 何志强 胡鹏 李泓彦 曹菲 崔鹏		
发明人	胡洋 孙兴宝 孙婧 何志强 胡鹏 李泓彦 曹菲 崔鹏		
IPC分类号	C07K14/10 C12N15/51 C12N15/70 C12N1/21 A61K39/125 G01N33/53 A61P31/14 C12R1/19		
CPC分类号	Y02A50/54		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种重组甲型肝炎病毒抗原，此抗原采用甲型肝炎病毒基因，利用基因工程重组技术，在大肠杆菌系统中表达出甲型肝炎病毒蛋白，表达的蛋白自组装形成甲型肝炎病毒的五聚体或空衣壳抗原，五聚体或空衣壳抗原可以作为甲型肝炎病毒疫苗之用，具有生产周期短、产量高、成本低的优点。本发明的甲型肝炎病毒重组抗原，还可以用于甲型肝炎病毒抗体的检测。

标记方法	100份血中检测出的份数				
	血清稀释度(倍)				
	1	10	50	250	1000
五聚体试剂盒	100	87	70	57	39
空衣壳试剂盒	100	89	72	60	43
上海科华试剂盒	100	90	74	58	42
英科新创试剂盒	100	88	75	61	44