



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113666988 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 19

(21) 申请号 202110768626.7

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2021.07.07

(71) 申请人 上海裕隆生物科技有限公司

地址 200233 上海市徐汇区钦州北路1089号50号厂房第4层

(72) 发明人 穆海东 汪宁梅 李敏

(74) 专利代理机构 上海泮成知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 31425

代理人 徐洋洋

(51) Int. Cl.

C07K 14/165 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

G12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

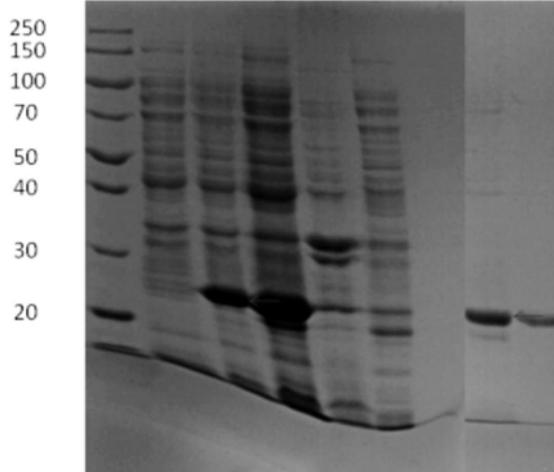
(54) 发明名称

新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,包括下列步骤:S1,预测:预测蛋白的N端结构域的氨基酸序列;S2,表达:通过大肠杆菌可溶性表达的方式表达所述蛋白;S3,纯化:通过镍亲和柱的结合,杂蛋白洗涤和洗脱的方法纯化所述的蛋白,即获得目标蛋白粗品;S4,精细纯化:目标蛋白通过分子筛进一步纯化,去除杂蛋白,即得到高纯度的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域。本发明可以使得面临突入其来的疫情,快速获得所需要的抗原,大概用一周的时间以较低成本制备出足量的抗原,用于诊断试剂的研发生产。

千道尔顿 标准 诱导前 诱导后 上清 沉淀 流穿 洗杂 洗脱 洗脱



1. 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,其特征在于,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID N0.1所示,包括下列步骤:

S1,预测:预测蛋白的N端结构域的氨基酸序列;

S2,表达:通过大肠杆菌可溶性表达的方式表达所述蛋白;

S3,纯化:通过镍亲和柱的结合,杂蛋白洗涤和洗脱的方法纯化所述的蛋白,即获得目标蛋白粗品;

S4,精细纯化:目标蛋白通过分子筛进一步纯化,去除杂蛋白,即得到高纯度的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域;

所述S3中,使用镍亲和柱纯化的方法,所述目标蛋白的纯化包括三个步骤:

步骤一:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,pH 7.4溶液溶解的破菌后的上清上样1毫升镍柱;

步骤二:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,10毫摩尔/升的咪唑,pH 7.4的溶液洗涤去除杂蛋白。

步骤三:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,250毫摩尔/升的咪唑,pH 7.4的溶液洗脱得到目标蛋白粗品。

2. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,其特征在于,所述大肠杆菌包括大肠杆菌密码子优化的基因合成、大肠杆菌转化和表达、大肠杆菌破菌和大肠杆菌上清的获得。

3. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,其特征在于,在步骤S4中,得到的粗品进一步通过分子筛的纯化。

4. 根据权利要求3所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,其特征在于,使用分子筛柱子Superdex200 16/60,流速1毫升/分钟,收集吸收峰位置的组分,跑胶分析确认目标分子和纯度。

5. 根据权利要求1-4任一项权利要求所述的制备方法,其特征在于,在步骤S4中,所述的目标蛋白的纯度大于90%。

6. 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域蛋白在2019新型冠状病毒诊断试剂上的应用。

新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术检测技术领域,具体涉及新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒2019-n-CoV感染的肺炎以发热、乏力、干咳等为主要表现,少数患者伴有鼻塞、流涕、腹泻等上呼吸道和消化道症状。重症病例多在一周后出现呼吸困难,严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍。迄今新型冠状病毒2019-n-CoV引起的COVID-19还没有针对性的特效药。一些个案报道的治疗药物仍需更多的临床实践证明效果。研究有效的诊断试剂,早诊断、早隔离、切断传播途径,有助于控制疫情蔓延。

[0003] 新型冠状病毒2019-n-CoV核酸检测有较高的特异性和灵敏度,但是该检测方法对技术要求高,容易出现假阴性,标本需要特殊处理,要求具备PCR扩增仪及凝胶电泳等专业的仪器设备,对新型冠状病毒的检测用时长,需专业技术人员操作和判断检测结果,无法应用于社区、基层医院、机场、海关甚至家庭等基层的早期初步筛查。

[0004] 因此,亟需一种更早期、更准确、更快捷、更有效的检测新型冠状病毒2019-n-CoV感染的诊断试剂,进行早期鉴别诊断,抗体快速诊断试剂面临巨大的需求,抗体检测需要制备抗原抗体相互作用的抗原,本发明提供了一种新型冠状病毒编码的最丰富的蛋白核衣壳蛋白N端结构域。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法及应用,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0007] 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,包括下列步骤:

[0008] S1,预测:预测蛋白的N端结构域的氨基酸序列;

[0009] S2,表达:通过大肠杆菌可溶性表达的方式表达所述蛋白;

[0010] S3,纯化:通过镍亲和柱的结合,杂蛋白洗涤和洗脱的方法纯化所述的蛋白,即获得目标蛋白粗品;

[0011] S4,精细纯化:目标蛋白通过分子筛进一步纯化,去除杂蛋白,即得到高纯度的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域;

[0012] 所述S3中,使用镍亲和柱纯化的方法,所述目标蛋白的纯化包括三个步骤:

[0013] 步骤一:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,pH 7.4溶液溶解的破菌后的上清上样1毫升镍柱;

[0014] 步骤二:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化

钠,10毫摩尔/升的咪唑,pH 7.4的溶液洗涤去除杂蛋白。

[0015] 步骤三:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,250毫摩尔/升的咪唑,pH 7.4的溶液洗脱得到目标蛋白粗品。

[0016] 优选地,所述大肠杆菌包括大肠杆菌密码子优化的基因合成、大肠杆菌转化和表达、大肠杆菌破菌和大肠杆菌上清的获得。

[0017] 优选地,在步骤S4中,得到的粗品进一步通过分子筛的纯化。

[0018] 优选地,使用分子筛柱子Superdex200 16/60,流速1毫升/分钟,收集吸收峰位置的组分,跑胶分析确认目标分子和纯度。

[0019] 优选地,在步骤S4中,所述的目标蛋白的纯度大于90%。

[0020] 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域蛋白在2019新型冠状病毒诊断试剂上的应用。

[0021] 抗体检测快速诊断试剂的核心原料是抗原,上述2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域是很好的目标分子。

[0022] 本发明提供的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域,该结构域氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,其制备方法通过以下技术方案得以实现:克隆2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的基因序列;将合成的基因序列插入pET28a表达载体中,该序列是根据大肠杆菌密码子的偏好性经过优化的,利用此表达载体转化BL21(DE3),BL21(DE3)是一种工程化的细胞,用于体外大量表达目标蛋白,挑取单克隆,培养细胞,经诱导表达目标蛋白,再通过破菌,离心收集菌液上清,经过镍亲和柱以及分子筛等柱纯化得到2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域。

[0023] 2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域用在胶体金法新冠病毒抗体检测试剂中,胶体金标记的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域蛋白用在试剂条的金垫上,抗人的抗体划线用作T线,该方案实施的胶体金检测试剂条具有特异性强,灵敏度高的特点。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0025] 本发明可以使得面临突入其来的疫情,快速获得所需要的抗原,大概用一周的时间以较低成本制备出足量的抗原,用于诊断试剂的研发生产。

附图说明

[0026] 图1是本发明的流程图;

[0027] 图2是本发明实施例制备方法的流程图;

[0028] 图3是SDS-PAGE分析2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域蛋白的纯化。

具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0030] 实施例1

[0031] 本实施例的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,所述蛋白的氨

基酸序列如SEQ ID NO.1所示,包括下列步骤:

[0032] S1,预测:预测蛋白的N端结构域的氨基酸序列;

[0033] S2,表达:通过大肠杆菌可溶性表达的方式表达所述蛋白;

[0034] S3,纯化:通过镍亲和柱的结合,杂蛋白洗涤和洗脱的方法纯化所述的蛋白,即获得目标蛋白粗品;

[0035] S4,精细纯化:目标蛋白通过分子筛进一步纯化,去除杂蛋白,即得到高纯度的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域;

[0036] 所述S3中,使用镍亲和柱纯化的方法,所述目标蛋白的纯化包括三个步骤:

[0037] 步骤一:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,pH 7.4溶液溶解的破菌后的上清上样1毫升镍柱;

[0038] 步骤二:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,10毫摩尔/升的咪唑,pH 7.4的溶液洗涤去除杂蛋白。

[0039] 步骤三:使用10毫摩尔/升的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐,150毫摩尔/升的氯化钠,250毫摩尔/升的咪唑,pH 7.4的溶液洗脱得到目标蛋白粗品。

[0040] 本实施例的大肠杆菌包括大肠杆菌密码子优化的基因合成、大肠杆菌转化和表达、大肠杆菌破菌和大肠杆菌上清的获得。

[0041] 本实施例的在步骤S4中,得到的粗品进一步通过分子筛的纯化。

[0042] 本实施例的使用分子筛柱子Superdex200 16/60,流速1毫升/分钟,收集吸收峰位置的组分,跑胶分析确认目标分子和纯度。

[0043] 本实施例的在步骤S4中,所述的目标蛋白的纯度大于90%。

[0044] 本实施例的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域蛋白在2019新型冠状病毒诊断试剂上的应用。

[0045] 如图1所示,根据本发明一种典型的实施方式,提供了一种2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,该制备方法包括下列步骤:

[0046] S1预测:预测所述的蛋白的受体结合结构域的氨基酸序列;

[0047] S2表达:通过大肠杆菌包涵体表达的方式表达所述的蛋白;

[0048] S3纯化:通过亲和柱以及杂蛋白洗涤的方法纯化所述的蛋白,即获得目标蛋白粗品;

[0049] S4精细纯化:粗品通过分子筛进一步纯化,去除杂蛋白,即得到高度纯化的2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域。

[0050] 如图2所示,根据本发明一种典型的实施方式,提供了一种2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的制备方法,该制备方法包括下列步骤:

[0051] 首先预测2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域,选定如氨基酸序列SEQ ID NO.1所示的序列,合成经过大肠杆菌密码子优化过的基因序列,构建到表达载体pET28a;

[0052] 用上述表达质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞,用抗生素筛选成功转化的细胞;

[0053] 挑取单克隆,接入几毫升培养基里,生长10小时,制备甘油菌以方便后续培养;

[0054] 较大量的细胞培养,直到光密度达到0.75左右,加入终浓度1毫摩尔/升诱导剂异

丙基-β-D-硫代半乳糖,诱导目标蛋白表达,37度培养4小时。

[0055] 收集细胞,破碎,纯化目标蛋白,主要是离心收集细胞,菌体破碎,离心收集破菌后的上清。

[0056] 制备镍柱,用双蒸水和缓冲液分别洗涤和平衡柱子,将上述上清液离心后,以1-2毫升/分钟的流速过柱子,用含20毫摩尔/升咪唑的缓冲液洗涤杂蛋白,用250毫摩尔/升咪唑的缓冲液洗脱;

[0057] 分子筛对于目标蛋白的进一步纯化:上述洗脱后的溶液进一步浓缩,浓缩到5毫克/毫升左右,上样1-2毫升经Superdex200 16/60,1毫升/分钟流速,收集吸收峰。

[0058] SDS-PAGE跑胶分析纯度和表达量,纯度达到90%以上,一升的表达量可达到上百毫克。如图3所示是SDS-PAGE分析2019新型冠状病毒核衣壳蛋白N端结构域的纯化。

[0059] 序列表SEQ ID NO.1:

[0060] SDNGPQNQRNAPRITFGGSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRG
QGVPINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI IWVATEGALNTPKDH
IGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALAL。

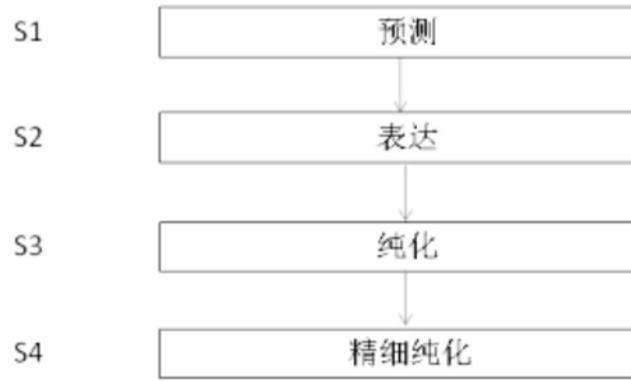


图1



图2

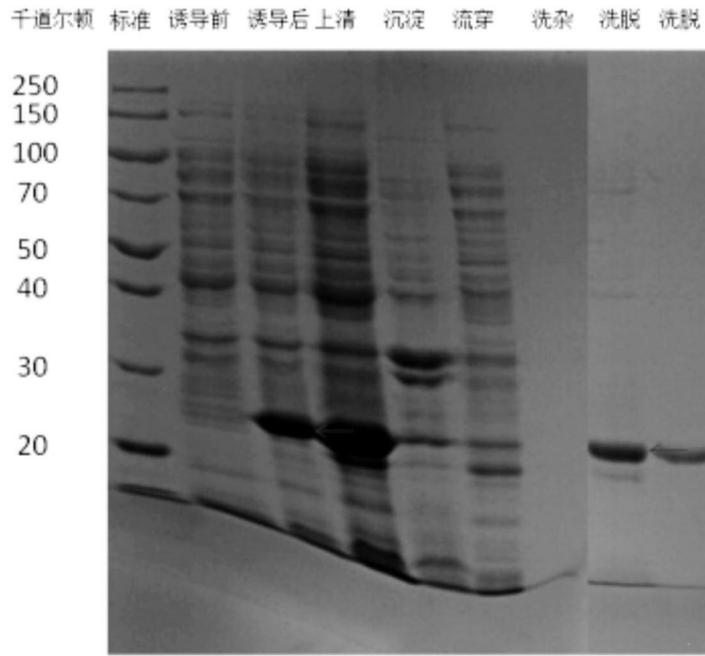


图3