



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111196857 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202010080488.9

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2020.02.05

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G07K 16/10 (2006.01)

申请公布号 CN 111196857 A

G07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.05.26

G01N 33/558 (2006.01)

(73) 专利权人 杭州贤至生物科技有限公司

(56) 对比文件

地址 311100 浙江省杭州市余杭区东湖街

CN 110551187 A, 2019.12.10

道东湖北路488-1号16幢401室

EP 1803814 A1, 2007.07.04

(72) 发明人 项美华 王小娟 曹丹琴 武戎青

CN 101039955 A, 2007.09.19

冯俊涛 余铭恩

审查员 魏应亮

(74) 专利代理机构 杭州仁杰专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33297

专利代理师 张俊

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

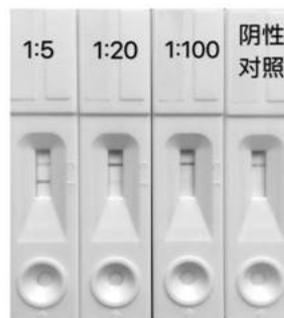
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种新型冠状病毒多表位重组抗原及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,公开了一种新型冠状病毒多表位重组抗原及其制备方法。本发明涉及一种重组抗原,该重组抗原包含新型冠状病毒多个优势抗原表位,并采用CHO细胞偏爱密码子将该重组抗原氨基酸序列转换为对应的核苷酸序列,化学合成该核苷酸序列并构建重组表达载体,从而提高该重组抗原在CHO细胞中的表达量。另外,经验证该重组抗原可与新型冠状病毒不同抗原免疫得到的鼠血清产生免疫学反应。



1. 一种新型冠状病毒多表位重组抗原,其特征在于该重组抗原如序列表SEQ ID No:1所示的氨基酸序列。
2. 一种新型冠状病毒多表位重组抗原,其特征在于该重组抗原如序列表SEQ ID No:2、SEQ ID No:3和SEQ ID No:4所示的氨基酸序列。
3. 一种核苷酸序列,其特征在于该核苷酸序列如序列表SEQ ID No:5所示,可编码权利要求1或2所述的新型冠状病毒多表位重组抗原。
4. 一种质粒载体,其特征在于该质粒载体含有权利要求3所述的核苷酸序列。
5. 一种菌株,其特征在于该菌株包含采用权利要求4所述的质粒载体。
6. 根据权利要求1或2所述的新型冠状病毒多表位重组抗原,其特征在于该重组抗原可与新型冠状病毒不同抗原免疫得到的鼠血清产生免疫学反应。
7. 一种新型冠状病毒多表位重组抗原的制备,其特征在于,包括:
 - (a) 人工设计并辅以计算机模拟新型冠状病毒S、E、M抗原的优势表位,化学合成包含BamHI和EcoRI酶切位点的核苷酸序列;
 - (b) 将化学合成产物BamHI和EcoRI双酶切后连接至同样BamHI和EcoRI双酶切的pTT5载体中,得重组质粒载体;
 - (c) 重组质粒转染CHO-K1细胞表达,细胞上清纯化透析即得SEQ ID No:1所示氨基酸序列的新型冠状病毒重组抗原。

一种新型冠状病毒多表位重组抗原及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,公开了一种新型冠状病毒多表位重组抗原及其制备方法。本发明涉及一种重组抗原,该重组抗原包含新型冠状病毒多个优势抗原表位,并采用CHO细胞偏爱密码子将该重组抗原氨基酸序列转换为对应的核苷酸序列,化学合成该核苷酸序列并构建重组表达载体,从而提高该重组抗原在CHO细胞中的表达量。另外,经验证该重组抗原可与新型冠状病毒不同抗原免疫得到的鼠血清产生免疫学反应。

背景技术

[0002] 2019新型冠状病毒,即“2019-nCoV”,是以前从未在人体中发现的冠状病毒新毒株。新型冠状病毒是以前从未在人体中发现的冠状病毒新毒株。冠状病毒是一个大型病毒家族,在系统分类上属冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus)。冠状病毒属的病毒是具外套膜(envelope)的正链单股RNA病毒,直径约80~120nm,其遗传物质是所有RNA病毒中最大的,只感染人、鼠、猪、猫、犬、禽类脊椎动物。冠状病毒粒子呈不规则形状,病毒粒子外包着脂肪膜,膜表面有三种糖蛋白:刺突糖蛋白(S,Spike Protein,是受体结合位点、溶细胞作用和主要抗原位点);小包膜糖蛋白(E,Envelope Protein,较小,与包膜结合的蛋白);膜糖蛋白(M,Membrane Protein),负责营养物质的跨膜运输、新生病毒出芽释放与病毒外包膜的形成)。其中刺突蛋白(spike protein)是冠状病毒最重要的表面蛋白,与病毒的传染能力相关。刺突蛋白含有两个亚基:S1和S2,其中S1主要包含受体结合区域(RBD),负责识别细胞受体,S2含有膜融合过程所需的基本元件。

[0003] 目前,新型冠状病毒检测以核酸分子检测为主,需要从痰液、咽拭子、肺泡灌洗液等样本中提取核酸分子,然后再采用荧光PCR方法进行检测,总共需要3个小时左右。该方法虽然准确度高,但是需要专门的操作场地、专业的操作人员,专业的设备,检测时间太长,要求较为苛刻,无法在基层医疗机构大面积使用。而新型冠状病毒疫情爆发后,疑似患者大量增加,急需一种检测产品能在短时间内快速鉴别筛查,而不仅仅是确诊。

发明内容

[0004] 设计目的:避免背景技术中的不足之处,设计一种新型冠状病毒多表位重组抗原及其制备方法,使得重组抗原能够识别新型冠状病毒特异性抗体,从而实现新型冠状病毒诊断,通过新型冠状病毒多表位重组抗原进行检测不仅能够增强检测灵敏度,而且不会导致检测结果失真。

[0005] 设计方案:为了实现上述设计目的。本申请:(1)以新型冠状病毒S、E、M为靶抗原,分析并选择三个特异性优势抗原表位,序列比较结果显示所选择的三个抗原表位与冠状病毒抗原之外的其它抗原序列无明显同源性。(2)将所选择的三个优势抗原表位序列通过柔性片段连接,并在序列碳端加His标签,得到重组抗原氨基酸序列。(3)采用中国仓鼠卵巢细胞(CHO)偏爱密码子,将重组抗原氨基酸序列转换为对应的核苷酸序列。(4)化学合成上一步骤得到的核苷酸序列,并通过酶切连接,将合成得到的核苷酸片段插入表达载体pTT5,构

建重组抗原表达载体。(5)重组抗原表达载体转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,筛选鉴定得到重组表达质粒。(6)重组表达质粒瞬转CHO细胞,7天后收集细胞上清。(7)上清通过镍琼脂糖亲和层析纯化得到重组抗原。(8)将重组抗原应用于胶体金快速检测试剂及ELISA平台,可识别新型冠状病毒不同抗原免疫得到的鼠血清。

[0006] 技术方案1:一种新型冠状病毒多表位重组抗原,该重组抗原具有如序列表SEQ ID No:1所示的氨基酸序列。

[0007] 技术方案2:一种新型冠状病毒多表位重组抗原,该重组抗原包含如序列表SEQ ID No:2、SEQ ID No:3和SEQ ID No:4所示的氨基酸序列。

[0008] 技术方案3:一种核苷酸序列,该核苷酸序列如序列表SEQ ID No:5所示,可编码权利要求1-2所述的新型冠状病毒多表位重组抗原。

[0009] 技术方案4:一种质粒载体,该质粒载体含有权利要求3所述的核苷酸序列。

[0010] 技术方案5:一种菌株,该菌株包含采用权利要求4所述的质粒载体。

[0011] 技术方案6:一种新型冠状病毒多表位重组抗原的制备,包括:(a)人工设计并辅以计算机模拟新型冠状病毒S、E、M抗原的优势表位,化学合成包含BamHI和EcoRI酶切位点的核苷酸序列;(b)将化学合成产物BamHI和EcoRI双酶切后连接至同样BamHI和EcoRI双酶切的pTT5载体中,得重组质粒载体;(c)重组质粒转染CHO-K1细胞表达,细胞上清纯化透析即得SEQ ID No:1所示氨基酸序列的新型冠状病毒重组抗原。

[0012] 本发明与背景技术相比,一是通过分子生物学技术,实现了新型冠状病毒不同抗原多个优势表位的串联表达,增强了抗原对冠状病毒抗体的识别能力,提高了灵敏度,同时排除了无关序列可能带来的假阳性风险,提高了特异性;二是采用CHO细胞作为表达宿主,并以CHO细胞偏爱密码子优化重组抗原对应的核苷酸序列,不仅使所表达抗原具有糖基化特点,并且提高了表达量;三是将重组抗原应用于胶体金快速检测试剂及ELISA平台,可识别新型冠状病毒不同抗原免疫得到的鼠血清。

附图说明

[0013] 图1是S抗原鼠血清的检测对照示意图。

[0014] 图2是E抗原鼠血清的检测对照示意图。

[0015] 图3是M抗原鼠血清的检测对照示意图。

具体实施方式

[0016] 以下实施例虽然对本发明的设计思路作了比较详细的文字描述,但是这些文字描述,只是对本发明设计思路的简单文字描述,而不是对本发明设计思路的限制,任何不超出本发明设计思路的组合、增加或修改,均落入到本发明的保护范围内。

[0017] 实施例1:新型冠状病毒优势抗原表位选择

[0018] 利用生物软件DNASTAR分析新型冠状病毒S、E、M抗原表位序列的亲水性、疏水性及抗原性,分别选择S抗原优势表位(SEQ ID No:2)、E抗原优势表位(SEQ ID No:3)和M抗原优势表位(SEQ ID No:4)。同时,序列比较结果表明所选择优势抗原表位序列特异性高,与冠状病毒抗原之外的其它抗原序列无明显同源性。

[0019] 实施例2:S、E、M抗原优势表位串联

[0020] 为增强重组抗原对新型冠状病毒抗体的识别能力,将S、E、M抗原优势表位通过柔性片段(GlyGlyGlyGlySer)连接,并在序列碳端加His标签,得到重组抗原氨基酸序列,其具体序列如序列表SEQ ID No:1所示。

[0021] 实施例3:优化编码重组抗原的核苷酸序列

[0022] 为了提高重组抗原表达量,在重组抗原氨基酸序列不变的前提下,根据CHO细胞偏爱密码子将编码重组抗原氨基酸序列转化为对应的核苷酸序列,具体序列如序列表SEQ ID No:5所示,并在其上下游分别添加酶切位点EcoRI和BamHI对应的核苷酸序列后,由杭州贤至生物科技有限公司合成。合成后的目的基因克隆于pMD19-T载体(宝生物工程大连有限公司)中。

[0023] 实施例4:构建重组抗原表达载体

[0024] 用限制性内切酶EcoRI和BamHI(宝生物工程大连有限公司)于37℃分别双酶切含目的基因的pMD19-T载体和pTT5载体12小时,酶切产物分别行1%琼脂糖凝胶电泳,并分别切胶回收目的基因和pTT5载体(本发明所使用的胶回收试剂盒均来自宁波中鼎生物技术有限公司)。使用T4连接酶(宝生物工程大连有限公司)将回收的目的基因和pTT5载体按一定的比例于4℃连接12小时后,连接产物转化DH5 α 感受态细胞(杭州贤至生物科技有限公司),并涂布于含氨苄青霉素抗性(50 μ g/mL)的LB平板,于37℃恒温培养12小时之后,于平板上挑取单克隆菌株至含氨苄青霉素抗性(50 μ g/mL)的LB液体培养基,37℃恒温摇床培养12小时后,采用质粒纯化试剂盒(本发明所使用的质粒纯化试剂盒均来自于宁波中鼎生物技术有限公司)提取质粒,经EcoRI和BamHI双酶切鉴定后得到正确的重组表达载体。

[0025] 实施例5:重组表达载体转染真核动物细胞及纯化

[0026] 将构建好的重组表达载体转染CHO-K1细胞。转染前一天将CHO-K1细胞按照 1×10^6 /ml的密度传代以保证转染时细胞活力,转染当天将细胞密度调整为 2×10^6 /ml进行转染。根据转染体系每毫升中加入3.2 μ g重组表达载体,再根据转染体系每毫升中加入4.8 μ g转染试剂PEI(Polyscience),边加边摇匀。37℃,6%二氧化碳摇床转速120rpm培养4小时后,加入1%500mM VPA(sigma)以及1%30g/L L-盐酸半胱氨酸(索莱宝生物科技有限公司),32℃,6%二氧化碳摇床转速120rpm培养6天后离心收集上清通过镍琼脂糖亲和层析柱(常州天地人和生物科技有限公司),20mM咪唑溶液去除杂蛋白,300mM咪唑溶液洗脱目的蛋白,收液后,4℃静置30分钟,转至截留分子量为10kD-12kD的透析袋中,于PBS(10mmol/L, pH7.4)中过夜透析。透析后立即取出并分装,于-20℃保存备用。

[0027] 20mM咪唑配制:咪唑1.36g,加10mmol/L, pH7.4 PBS溶液溶解定容至1000mL。

[0028] 300mM咪唑配制:咪唑10.2g,加10mmol/L, pH7.4 PBS溶液溶解定容至500mL。

[0029] 实施例6:鼠多抗制备

[0030] 取新型冠状病毒重组抗原及另外表达的新型冠状病毒S、E、M全长抗原,总共四种抗原分别免疫Balb/c小鼠,用弗氏完全佐剂进行乳化(共0.5ml,100 μ g抗原),皮下多点注射。15天后进行第二次免疫(加强免疫),即取抗原80 μ g,用弗氏不完全佐剂进行乳化(共0.5ml),皮下多点注射,再次间隔7天后,眼眶取血。

[0031] 实施例7:新型冠状病毒重组抗原鼠多抗纯化

[0032] 琼脂糖亲和介质Protein G层析柱(南京金斯瑞生物科技有限公司)平衡至室温,电脑核酸蛋白检测仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)预热20分钟,用10mmol/L, pH=7.4的

PBS溶液过柱洗涤至电脑核酸蛋白检测仪吸光度A显示为0。新型冠状病毒重组抗原鼠血清12000rpm离心5分钟后,取上清过0.45um滤膜后上样,随后加10mmol/L, pH=7.4的PBS溶液过柱洗涤至电脑核酸蛋白检测仪吸光度A显示为0。用0.1mol/L, pH=3.0的甘氨酸溶液洗脱。收集洗脱液后,加入0.5mol/L, pH=8.5的Tris-HCl缓冲液中和至pH=7.0,即为新型冠状病毒重组抗原多克隆抗体。

[0033] 甘氨酸溶液配制:甘氨酸7.5g,加超纯水溶解,定容至800ml,加HCl调pH=3.0

[0034] Tris-HCl缓冲液配制:Tris 75.4g,加超纯水搅拌溶解,定容至1000ml,加HCl约10ml,调pH=8.5。

[0035] 实施例8:制备胶体金垫

[0036] 取5ml 0.01%胶体金溶液加入0.2mol/L碳酸钾溶液10uL,充分混匀后加入50ug新型冠状病毒重组抗原,混匀,室温静置2小时后,加入500uL 10%BSA(牛血清白蛋白)溶液进行封闭,室温静置1小时,离心(6500rpm、20min),弃上清后,沉淀用500uL复溶液充分溶解。溶解后的金溶液采用喷金划膜仪(上海金标生物科技有限公司)将按照10uL/cm均匀喷涂于6mm宽的玻纤上,后置于电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)中37℃鼓风干燥1小时。

[0037] 相关溶液配方如下:

[0038] 0.01%胶体金溶液:1%氯金酸溶液1ml,1%柠檬酸溶液1.4ml,加超纯水加热溶解反应并定容至100ml。

[0039] 1%氯金酸溶液: $\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 粉末1g加超纯水溶解并定容至100ml。

[0040] 1%柠檬酸溶液:柠檬酸晶体1g加超纯水溶解并定容至100ml。

[0041] 0.2mol/L碳酸钾溶液:碳酸钾27.64克,加超纯水溶解并定容至1000ml。

[0042] 复溶液:Tris碱6.057g溶解于800ml超纯水中,用适量HCl调节pH至8.0,加超纯水定容到1000ml。

[0043] 实施例9:检测试纸条制备

[0044] 将新型冠状病毒重组抗原用包被液稀释至终浓度为1mg/ml,通过喷金划膜仪(上海金标生物科技有限公司)按照1uL/cm将其均匀包被于硝酸纤维素膜(Sartorius, CN140)上,为T线。

[0045] 将新型冠状病毒重组抗原鼠多抗(杭州贤至生物科技有限公司)用包被液稀释至终浓度为1mg/ml,通过喷金划膜仪(上海金标生物科技有限公司)按照1uL/cm将其均匀包被于硝酸纤维素膜(Sartorius, CN140)上,为C线。

[0046] 划膜包被结束后,将硝酸纤维素膜置于电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)中37℃鼓风干燥30分钟。

[0047] 依次将硝酸纤维素膜、胶体金垫、样品垫、吸水纸在PVC垫板上组装后切成宽4mm长条,装入卡壳后压紧。

[0048] 包被液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.9g,加双蒸水定容至1000mL (pH8.0)。

[0049] 实施例10:检测试纸条操作

[0050] 将实施例6制备得到的新型冠状病毒S、E、M全长抗原鼠血清及正常鼠血清,分别用生理盐水5倍、20倍、100倍稀释后,取100uL上样,室温放置15min后判读结果,具体结果如图1-图3所示。从结果可以看出,用新型冠状病毒重组抗原研发得到的检测试纸条可以检测新

型冠状病毒S、E、M全长抗原鼠血清。

[0051] 实施例11:ELISA检测

[0052] 将新型冠状病毒重组抗原经包被液稀释后(终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$),以 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入酶标板(深圳金灿华实业有限公司), 4°C 包被12小时后用洗涤液洗涤五次并拍干;加入封闭液, $150\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 封闭2小时,弃孔内液体,拍干;将实施例6制备得到的新型冠状病毒S、E、M全长抗原鼠血清及正常鼠血清,分别用生理盐水5倍、20倍、100倍稀释后, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 上样, 37°C 孵育1小时后,洗涤液洗涤五次并拍干;加入羊抗鼠HRP标记单抗(杭州贤至生物科技有限公司), $100\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育30分钟后,洗涤液洗涤五次并拍干;每孔加显色液A和显色液B各 $50\mu\text{L}$, 37°C 避光显色10分钟后,加终止液终止反应, $50\mu\text{L}/\text{孔}$,双孔复测,酶标仪 450nm 波长空白孔校零后读取OD值,具体数值见表1。

[0053] 相关溶液配方如下:

[0054] 包被液: Na_2CO_3 1.5g, NaHCO_3 2.9g,加双蒸水定容至1000mL(pH9.6)。

[0055] 封闭液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.68g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, NaCl 8.5g,20g牛血清白蛋白,加双蒸水定容至1000mL(pH7.4)。

[0056] 洗涤液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.68g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39g, NaCl 8.5g,Tween-20 0.5mL,加双蒸水定容至1000mL(pH7.4)。

[0057] 显色液A:200mg TMB溶于100mL无水乙醇,加双蒸水定容至1000mL。

[0058] 显色液B:柠檬酸2.1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71g,加双蒸水定容至1000mL。

[0059] 使用时:1mL显色液A+1mL显色液B+ $0.4\mu\text{L}$ 30% H_2O_2

[0060] 终止液:2M H_2SO_4 ,21.7mL浓 H_2SO_4 加双蒸水定容至1000mL。

[0061] 表1间接ELISA检测鼠血清

样品名称	S抗原鼠血清			E抗原鼠血清			M抗原鼠血清			正常鼠血清		
	5倍	20倍	100倍	5倍	20倍	100倍	5倍	20倍	100倍	5倍	20倍	100倍
[0062] 稀释倍数	2.768	1.429	0.432	2.221	1.048	0.287	2.555	1.355	0.369	0.093	0.055	0.045
检测值	2.851	1.495	0.443	2.195	1.006	0.272	2.494	1.307	0.352	0.087	0.059	0.051
平均值	2.809	1.462	0.438	2.208	1.027	0.280	2.525	1.331	0.361	0.090	0.057	0.048

[0063] SEQ ID N01:重组抗原的氨基酸序列;

[0064] SEQ ID N02:S抗原优势表位的氨基酸序列;

[0065] SEQ ID N03:E抗原优势表位的氨基酸序列;

[0066] SEQ ID N04:M抗原优势表位的氨基酸序列;

[0067] SEQ ID N05:编码重组抗原的核苷酸序列。

[0039]	210	215	220
[0040]	Leu Gly Arg Cys Asp Ile Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala		
[0041]	225	230	235 240
[0042]	Thr Ser Arg Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Leu Gly Ala Ser Gln His His		
[0043]		245	250 255
[0044]	His His His His		
[0045]		260	
[0046]	<210> 2		
[0047]	<211> 165		
[0048]	<212> PRT		
[0049]	<213> 新型冠状病毒(2019-nCoV)		
[0050]	<400> 2		
[0051]	Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn Ser Ala Ile		
[0052]	1	5	10 15
[0053]	Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala Leu Gly Lys		
[0054]		20	25 30
[0055]	Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu Val		
[0056]		35	40 45
[0057]	Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn Asp		
[0058]		50	55 60
[0059]	Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp Arg		
[0060]	65	70	75 80
[0061]	Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln Gln		
[0062]		85	90 95
[0063]	Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala Thr		
[0064]		100	105 110
[0065]	Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys		
[0066]		115	120 125
[0067]	Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ser Ala Pro His Gly		
[0068]		130	135 140
[0069]	Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe		
[0070]	145	150	155 160
[0071]	Thr Thr Ala Pro Ala		
[0072]		165	
[0073]	<210> 3		
[0074]	<211> 26		
[0075]	<212> PRT		
[0076]	<213> 新型冠状病毒(2019-nCoV)		
[0077]	<400> 3		

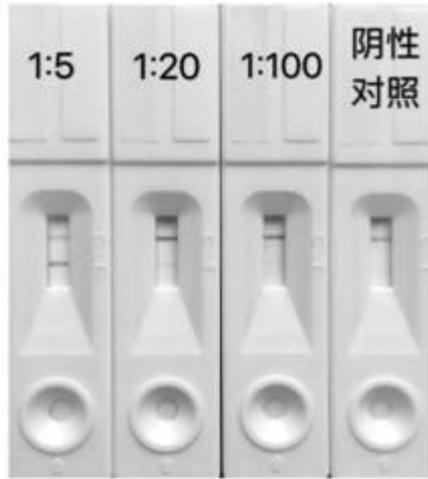


图1



图2

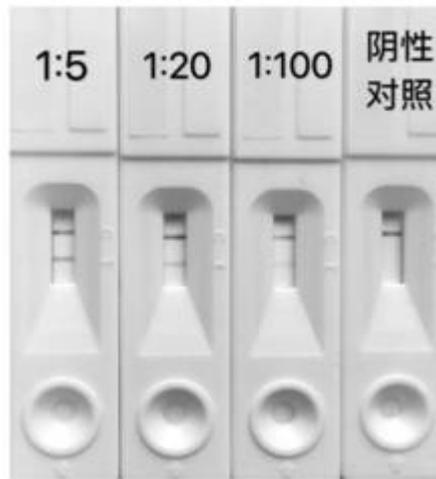


图3