



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114933639 A

(43) 申请公布日 2022.08.23

(21) 申请号 202210481435.7

A61K 39/12 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.05

A61P 31/20 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72) 发明人 邵军军 李俊惠 刘伟 常惠芸

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139

专利代理师 马鑫

(51) Int. Cl.

C07K 14/01 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白及其制备
方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白及其制备方法和用途。所述的p72N抗原表位蛋白选自p72N1~p72N11抗原表位蛋白中的任意一种或是由p72N1~p72N11抗原表位蛋白中任意两种以上串联后得到的多表位蛋白,所述的p72N1~p72N11抗原表位蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.1~11所示。本发明以我国分离的ASFVpig/HLJ/2018毒株的主要结构蛋白p72N为对象,利用生物信息学技术结合免疫学方法,预测、筛选ASFV的抗原表位,绘制这些蛋白的抗原表位图谱,最终确定了11个抗原表位(肽)为非洲猪瘟病毒p72N蛋白的抗原表位。这些候选抗原表位的获得,极大地节省了传统抗原表位筛选的成本和时间,提高了免疫学方法验证具有良好免疫保护功能的抗原表位的效率,对研发ASF新型疫苗和检测技术具有十分重要的意义。

1. 非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白,其特征在于,所述的p72N抗原表位蛋白选自p72N1、p72N2、p72N3、p72N4、p72N5、p72N6、p72N7、p72N8、p72N9、p72N10、p72N11抗原表位蛋白中的任意一种或是由p72N1、p72N2、p72N3、p72N4、p72N5、p72N6、p72N7、p72N8、p72N9、p72N10、p72N11抗原表位蛋白中任意两种以上串联后得到的多表位重组蛋白,所述的p72N1、p72N2、p72N3、p72N4、p72N5、p72N6、p72N7、p72N8、p72N9、p72N10、p72N11抗原表位蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.1-11所示。

2. 如权利要求1所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白,其特征在于,所述的p72N抗原表位蛋白的一端与GST标签连接。

3. 如权利要求1所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白,其特征在于,所述的p72N抗原表位蛋白是由p72N1、p72N7抗原表位蛋白串联后,相邻抗原表位间引入间隔子序列GGGS,然后将其编码基因序列与噬菌体AP205基因分别依次克隆至线性化的原核表达载体pET-28a(+),构建噬菌体展示多表位的重组表达质粒,通过大肠杆菌表达得到的GST-多表位重组蛋白。

4. 权利要求1-3任一项所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白在制备检测非洲猪瘟病毒抗体试剂中的用途。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述的试剂为ELISA检测试剂。

6. 一种非洲猪瘟病毒抗体间接ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中含有权利要求1-3任一项所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白。

7. 如权利要求6所述的非洲猪瘟病毒抗体间接ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中还含有稀释液、洗涤液、封闭液、HRP标记山羊抗猪IgG抗体、显色液以及终止液。

非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗原表位蛋白及其制备方法和用途,特别涉及一种非洲猪瘟病毒p72抗原表位蛋白及其制备方法和用途。本发明属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)感染猪引起的一种急性烈性传染病,死亡率高达100%。世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须通报动物疫病,我国列为重点防范的一类动物传染病。

[0003] 非洲猪瘟病毒作为一个有百年历史的重要动物病毒,对疫苗的研究从未间断,但至今仍然缺乏可用于防控实践安全、有效、可鉴别诊断的疫苗。

[0004] 针对非洲猪瘟病毒及其复杂,保护性抗原/抗原表位谱不详,已成为制约基因工程疫苗研究的关键科学问题,本发明开展了非洲猪瘟病毒保护性抗原/抗原表位发掘研究,以解决非洲猪瘟病毒保护性抗原/抗原表位图谱不详,制约基因工程疫苗研究缺乏关键材料的困境,以期研发非洲猪瘟基因工程疫苗提供物质基础和技术支撑。

[0005] 本发明以非洲猪瘟病毒p72 (B646L) 结构蛋白的一级结构氨基酸序列为材料,通过抗原表位数据库,预测了p72的N端基因编码蛋白(1-1011bp,编码1-324AA,命名为p72N)的抗原表位,并根据相应氨基酸序列合成与之相对应的肽。通过免疫学方法筛选能与非洲猪瘟病毒阳性血清发生特异性免疫反应的抗原表位(合成肽或表位重组蛋白),并将其与文献报道的进行比较。结果显示,预测的抗原表位均能与非洲猪瘟病毒阳性血清发生特异性免疫反应,为非洲猪瘟病毒p72蛋白的抗原表位。其中p72N9和p72N10为优势抗原表位。此外,当这些抗原表位两个或多个随机组合可以显著提高抗原表位的免疫活性(如p72N1N7)。这些单抗原表位、或多个抗原表位串联的获得,为研发非洲猪瘟检测试剂及其试剂盒、单抗制备和安全、可鉴别诊断表位疫苗等急需战略防控产品奠定了基础。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种非洲猪瘟病毒p72抗原表位蛋白及其制备方法和用途。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用了以下技术手段:

[0008] 本发明利用TMHMM软件对ASFVp72N蛋白的跨膜区域进行预测,该软件是一种基于隐马尔可夫数学模型建立的用于预测蛋白质的跨膜区域,准确率高达97%~98%(Krogh et al,2001)。结果显示,在p72N蛋白无跨膜区域。然后,利用IEDB Analysis Resource和ABCpred软件对ASFV p72N蛋白的B细胞线性表位进行预测,阈值设为不低于0.5的为候选抗原表位。IEDB Analysis Resource是通过神经网络(ANN)和支持向量机(SVM)建模预测抗原表位,其中有关免疫表位均选自在PubMed可获得的科学出版物数据,对多肽的亲水性、柔韧性、易接近性、转角、暴露表面、极性和抗原倾向等参数进行分析(Jespersen et al,2017),在ASFVp72N蛋白上确定了9个抗原表位。ABCpred是基于人工神经网络(ANN)的模型,通过

对Bcipep数据库的表位数据训练建立的预测B细胞抗原表位数据库软件(Saha et al, 2007),在ASFVp72蛋白上确定了34个抗原表位。以上述4个数据库中全部得分值不低于0.6为标准,最终确定了p72N蛋白的11个抗原表位。接着,本发明通过建立间接ELISA方法,根据抗原表位(合成肽)与ASFV感染阳性血清发生免疫反应结果,确定具有免疫活性的抗原表位。结果显示,预测的所有抗原表位均能与非洲猪瘟病毒阳性血清发生特异性免疫反应,与阴性对照血清相比,差异显著($p < 0.001$),结果充分显示筛选得到的抗原表位均为p72N蛋白抗原表位,其中p72N9免疫反应性最强,为优势抗原表位。为了克服抗原表位小分子特性及免疫反应弱的缺点,提高抗原表位筛选的准确性,本发明利用基因操作技术,将抗原表位DNA序列插入携带GST标签的原核表达载体pGEX-4T-1,构建重组表达质粒,表达并纯化GST-表位重组蛋白。此外,为了提高抗原表位的效价,将不同抗原表位串联后,通过噬菌体展示技术,将其展示到噬菌体表面。通过亲和层析法纯化重组蛋白,利用建立的间接ELISA方法鉴定抗原表位。结果表明,单个肽段引入GST载体后与合成肽 OD_{450nm} 相比,单表位重组蛋白的免疫反应性得到了明显的增强,抗原表位完全抗原化后免疫反应性增强显著优于单个合成肽。多表位与噬菌体基因串联后,多表位重组蛋白免疫反应性显著优于单抗原表位完全抗原化。

[0009] 在上述研究的基础上,本发明提出了一种非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白,所述的p72N抗原表位蛋白选自p72N1、p72N2、p72N3、p72N4、p72N5、p72N6、p72N7、p72N8、p72N9、p72N10、p72N11抗原表位蛋白中的任意一种或是由p72N1、p72N2、p72N3、p72N4、p72N5、p72N6、p72N7、p72N8、p72N9、p72N10、p72N11抗原表位蛋白中任意两种以上串联后得到的多表位重组蛋白,所述的p72N1、p72N2、p72N3、p72N4、p72N5、p72N6、p72N7、p72N8、p72N9、p72N10、p72N11抗原表位蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.1-11所示。

[0010] 其中,优选的,所述的p72N抗原表位蛋白的一端与GST标签连接。

[0011] 其中,优选的,所述的p72N抗原表位蛋白是由p72N1、p72N7抗原表位蛋白串联后,相邻抗原表位间引入间隔子序列GGGS,然后将其编码基因序列与噬菌体AP205基因分别依次克隆至线性化的原核表达载体pET-28a(+),构建噬菌体展示多表位的重组表达质粒,通过大肠杆菌表达得到的GST-多表位重组蛋白。

[0012] 进一步的,本发明还提出了所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白在制备检测非洲猪瘟病毒抗体试剂中的用途。

[0013] 其中,优选的,所述的试剂为ELISA检测试剂。

[0014] 进一步的,本发明还提出了所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白或其重组蛋白在设计、制备非洲猪瘟疫苗中的用途。

[0015] 更进一步的,本发明还提出了一种非洲猪瘟病毒抗体间接ELISA检测试剂盒,所述的试剂盒中含有以上任一项所述的非洲猪瘟病毒p72N抗原表位蛋白。

[0016] 其中,优选的,所述的试剂盒中还含有稀释液、洗涤液、封闭液、HRP标记山羊抗猪IgG抗体、显色液以及终止液。

[0017] 相较于现有技术,本发明的有益效果是:

[0018] 1、利用不同的生物信息学工具筛选抗原表位得到的结果是不同的,是由于每种软件的所采用的算法不同而导致的。虽然该方法对于表位的筛选具有速度快、易于操作和成本低等优点,但是,只采用一种方法筛选和鉴定抗原表位可能存在准确性低、结果误差较

大,无法获得系统、全面的抗原表位,特别是一些蛋白中优势抗原表位的获得,因此,需要通过多种方法系统全面的预测和筛选抗原表位。为了获得具有良好免疫效果的ASFV抗原表位,用于ASF基因工程疫苗的研究,本发明以我国分离的ASFV pig/HLJ/2018毒株的主要结构蛋白p72N为对象,利用生物信息学技术结合免疫学方法,预测、筛选ASFV的抗原表位,绘制这些蛋白的抗原表位图谱。根据不同软件的算法结果,综合分析获得数据,最终确定了11个抗原表位(肽)为非洲猪瘟病毒p72N蛋白的抗原表位。这些候选抗原表位的获得,极大地节省了传统抗原表位筛选的成本和时间,提高了免疫学方法验证具有良好免疫保护功能的抗原表位的效率。也将对研发ASF新型疫苗和检测技术具有十分重要的意义。

[0019] 2、为了克服抗原表位小分子特性及免疫反应弱的缺点,提高抗原表位筛选的准确性,本发明利用基因操作技术,将抗原表位DNA序列插入携带GST标签的原核表达载体pGEX-4T-1,构建重组表达质粒,表达并纯化GST-表位重组蛋白。此外,为了提高抗原表位的效价,将不同抗原表位串联后,通过噬菌体展示技术,将其展示到噬菌体表面。通过亲和层析法纯化重组蛋白,利用建立的间接ELISA方法鉴定抗原表位。结果表明,单个肽段引入GST载体后与合成肽OD_{450nm}相比,单表位重组蛋白的免疫反应性得到了明显的增强,抗原表位完全抗原化后免疫反应性增强显著优于单个合成肽。多表位与噬菌体基因串联后,多表位重组蛋白免疫反应性显著优于单抗原表位完全抗原化。这一研究策略为今后高效筛选抗原表位提供了理论依据和技术支撑,具有十分重要的意义。

[0020] 3、通过生物信息学技术结合免疫学技术,可以快速、高通量精准筛选抗原表位,绘制非洲猪瘟病毒保护性抗原表位图谱,为以鉴定的保护性抗原表位为元件,以自组装蛋白分子为骨架,设计重组非洲猪瘟表位抗原、研发其疫苗提供了物质基础,对开发安全有效的非洲猪瘟疫苗具有十分重要的意义。

附图说明

[0021] 图1为IEDB软件预测p72N蛋白的抗原表位;

[0022] 图2为非洲猪瘟病毒p72N蛋白抗原表位(合成肽)鉴定结果;

[0023] 注释:****P<0.0001,***P<0.0001,**P<0.01表示差异极显著;*表示差异显著(P<0.05);P>0.05差异不显著;

[0024] 图3为非洲猪瘟病毒p72N蛋白抗原表位(重组蛋白)鉴定结果;

[0025] 注释:****P<0.0001,***P<0.0001,**P<0.01表示差异极显著;*表示差异显著(P<0.05);P>0.05差异不显著。

具体实施方式

[0026] 以下通过具体实施例对本发明进行详细描述,以使本领域技术人员能够容易地根据本说明书的公开内容实施本发明。以下所描述的实施例仅是本发明的较佳实例而已,并非对本发明做出其他形式的限制。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它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0027] 实施例1生物信息学方法预测ASFV p72N蛋白的表位

[0028] 1材料

[0029] ASFV氨基酸序列的获得:通过NCBI中的GenBank获取ASFV pig/HLJ/2018 毒株

(NCBI登录号:MK333180.1)中p72(QBH90570.1)的N端部分基因(1-1011bp) 编码的氨基酸序列(1-324AA),命名为p72N,具体的氨基酸序列如下:

[0030] MASGGAFCLIAN DGKADKI I LAQDLLNSRISNIKNVNSY GKPDPPEPTLSQ IEETHLVHFNAHF KPY VPVGF EYNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFHDM VGHHLGACHSSWQDAPIQGTSQMG AHGQLQTFPRNGY DWDNQTPLEGAVY TLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERLYENVRFDVNGNSLDEYSSDVT TLVRKFCI PGDKMTGYKHLVGQEVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDEN DTQRTCSHTNPKFLSQHF PENSHNIQTAG KQDITPITDATYLDIRRN VHYSCNGP QTPKYYQ (SEQ ID NO.12)

[0031] 2方法

[0032] 2.1生物信息学预测ASFVp72N蛋白的抗原表位

[0033] 利用生物信息学在线工具预测ASFVp72N蛋白的抗原表位,本发明采用的生物信息学预测软件如下:

[0034] (1) TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 是基于隐马尔可夫数学模型预测蛋白跨膜区域的一种在线软件,对蛋白质的跨膜区域进行分析,位于非跨膜区域的氨基酸序列确定为候选的抗原表位区域。

[0035] (2) IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/main/>) 是通过神经网络(ANN)和支持向量机(SMM)建模预测抗原表位,其中有关免疫表位均选自在PubMed可获得的科学出版物数据,对多肽的亲水性、柔韧性、易接近性、转数、暴露表面、极性和抗原倾向等参数进行分析。判断标准:得分 ≥ 0.5 。

[0036] (3) ABCpred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) 是基于人工神经网络(ANN)的模型,通过对Bcipep数据库的表位数据训练建立的预测B细胞抗原表位数据库。判断标准:得分 ≥ 0.5 。

[0037] 2.2ASFVp72N蛋白候选抗原表位的确定

[0038] 根据每个软件的判断标准综合分析,将三个软件中获得的共性的、最优的抗原表位确定为本发明预测的最佳候选抗原表位。

[0039] 2.3与文献报道抗原表位比对分析

[0040] 将本发明筛选的抗原表位与文献报道的抗原表位氨基酸序列(表1)进行比对分析,以确定本发明采用生物信息学技术预测的候选抗原表位与文献报道抗原表位的异同。评价生物信息学技术预测筛选抗原表位的可靠性、系统性和完整性。

[0041] 表1文献报道抗原表位氨基酸序列

命名	位置(氨基酸)	序列(5'-3')
p72G1	156-165	TLVDPFGRPI
p72G2	265-280	QRTCSHTNPKFLSQHF
p72G3	280-294	FPENSHNIQTAGKQD
p72G4	290-303	AGKQDITPITDATY

[0043] 3结果

[0044] 3.1生物信息学预测ASFV p72N蛋白的抗原表位

[0045] (1) TMHMM在线工具预测蛋白质的跨膜区结构:通过TMHMM软件分析p72N蛋白的跨

膜区域,分析结果表明,p72N蛋白无跨膜区域。

[0046] (2) IEDB在线工具预测蛋白质的B细胞线性抗原表位:设置阈值为不低于 0.5(黄色区域表示为可能的抗原表位)。结果显示,p72N蛋白有9个候选B细胞线性抗原表位,分别位于31aa-52aa、65aa-89aa、116aa-151aa、160aa-171aa、185aa-189aa、193aa-206aa、217aa-236aa、248aa-308aa和313aa-321aa(图1)。

[0047] (3) ABCpred在线工具预测蛋白质的B细胞抗原表位:阈值设置为不低于 0.5,表位长度设置为16个氨基酸。分别在ASFVp72N(表2)确定了34个抗原表位,结果如下:

[0048] 表2 ABCpred软件预测p72N蛋白的抗原表位

Rank	Sequence	Start position	Score
1	ITPIIDATYLDIRRV	295	0.94
1	GERLYENVRFVNGNS	184	0.94
1	FGRPIVPGTKNAYRNL	161	0.94
2	VRPHTGPTLGNKLT	77	0.92
3	DAPIQGTSMGAHGQL	119	0.89
4	GQEVSVETSGPLLCN	229	0.87
4	GAHGQLQTFPRNGYDW	129	0.87
5	TPTLGNKLTFGIPQYG	83	0.86
5	QIEETHLVHFNAHFKP	51	0.86
5	LVYYCEYPGERLYENV	176	0.86
6	GHHILGACHSSWDAP	106	0.85
7	KSYGKPDPEPTLSQIE	38	0.83
8	PGDKMTGYKHLVGQEV	217	0.82
9	HFPENSHNIQTAGKQD	279	0.80
10	FGIPQYGDFFHDMVGH	92	0.79
10	TDENDTQRTCSTHTNPK	259	0.79
10	KPHQSKPILTDENDTQ	250	0.79
11	HFKPYVPVGFYENKVR	63	0.78
12	SGGAFCLANDGKADK	3	0.77
13	QDLLNSRISNIKNVVK	23	0.76
14	TYLDIRRVHYSNGP	302	0.75
14	DWDNQTPLEGAVYTLV	143	0.75
15	DKILAQDLLNSRISN	17	0.74
16	YTLVDPFGRPIVPGTK	155	0.73
17	PVGFYENKVRPHTGTP	69	0.72
17	DVNGNSLDEYSSDVT	194	0.72
18	EGTSGPLLCNIHDLHK	235	0.71
18	PGTKNAYRNLVYYCEY	167	0.71
19	EYSSDVTTLVRKFCIP	202	0.70
20	QTFPRNGYDWDNQITPL	135	0.69
21	TLVRKFCIPGDKMTGY	209	0.65
22	RTCSTHTNPKFLSQHFP	266	0.64
23	DPEPTLSQIEETHLVH	44	0.55
23	NVHYSNGPQTPKYQ	309	0.55

[0049]

[0050] 3.2确定ASFV p72N蛋白候选抗原表位

[0051] 根据每个预测软件评分标准:TMHMM软件分析蛋白质的跨膜区域,IEDB和ABCpred软件预测表位,氨基酸序列得分越高成为候选抗原表位的可能性越大,以此为标准。发明人综合分析3种预测方法的结果,最终确定了p72N蛋白最可能的抗原表位,即p72N蛋白可能的抗原表位11个,分别依次命名为 p72N1~p72N11(表3)。

[0052] 表3ASFV p72N蛋白候选抗原表位

命名	氨基酸 区段	氨基酸序列 (5' → 3')	SEQ ID NO.
p72N1	31-52	SNIKNVNKSYGKPDPEPTLSQI	1
p72N2	65-89	KPYVPVGF EY NKVRPHTGTPTLGNK	2
p72N3	116-144	SWQDAPIQGT SQMGAHGQLQTFPRNGYDW	3
p72N4	160-171	PFGRPIVPGTKN	4
[0053] p72N5	185-189	ERLYE	5
p72N6	194-206	DVNGNSLDEYSSD	6
p72N7	217-237	PGDKMTGYKHLVGQEV SVEGT	7
p72N8	250-274	KPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPK	8
p72N9	266-281	RTCSHTNPKFLSQHFP	9
p72N10	275-294	FLSQHFPENSHNIQTAGKQD	10
p72N11	295-308	ITPITDATYLDIRR	11

[0054] 3.3与文献报道抗原表位比对分析结果

[0055] 将上述生物信息学软件筛选与文献中已报道的抗原表位氨基酸序列进行比对分析,结果如表4所示,有7个抗原表位为本发明首次发现,为p72N1(30-S NIKNVNKSYGKPDPEPTLSQI-51)、p72N2(64-KPYVPVGF EY NKVRPHTGTPT LGNK-88)、p72N3(115-SWQDAPIQGT SQMGAHGQLQTFPRNGYDW-143)、p72N5(184-ERLYE-188)、p72N6(193-DVNGNSLDEYSSD-205)、p72N7(216-PGDKMTGYKHLVGQEV SVEGT-236);此外,研究还获得了与文献报道具有相关性但又有区别的抗原表位,包括p72N4(159-PFGRPIVPGTKN-170)、p72N8(249-KPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPK-273)、p72N9(265-RTCSHTNPKFLSQHFP-280)、p72N10(274-FLSQHFPENSHNIQTAGKQD-293)和p72N11(294-ITPITDATYLDIRR-307)。

[0056] 表4p72N蛋白候选抗原表位与文献报道抗原表位氨基酸序列差异分析

命名	来源	位置	氨基酸 (5'-3')
p72N1	本发明筛选	31~52	SNIKNVNKSYGKPDPEPTLSQI
p72N2	本发明筛选	65~89	KPYVPVGFYENKVRPHTGTPTLGNK
p72N3	本发明筛选	116~144	SWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRN GYDW
p72N4	本发明筛选	160~171	<u>PFGRPI</u> VPGTKN
p72G1	文献报道	156~165	TLVD <u>PFGRPI</u>
p72N5	本发明筛选	185~189	ERLYE
[0057] p72N6	本发明筛选	194~206	DVNGNSLDEYSSD
p72N7	本发明筛选	217~237	PGDKMTGYKHLVGQEVSVEGT
p72N8	本发明筛选	250~274	KPHQSKPILTDENDT <u>QRTCSHTNPK</u>
p72N9	本发明筛选	266~281	<u>RTCSHTNPKFLSQHF</u> P
p72G2	文献报道	265~280	<u>QRTCSHTNPKFLSQHF</u>
p72N10	本发明筛选	275~294	FLSQH <u>FPENSHNIQTAGKQD</u>
p72N11	本发明筛选	295~308	<u>ITPITDATY</u> LDIRR
p72G3	文献报道	280~294	<u>FPENSHNIQTAGKQD</u>
p72G4	文献报道	290~303	<u>AGKQDITPITDATY</u>

[0058] 4小结

[0059] 本发明利用TMHMM软件预测p72N蛋白质的跨膜区域,结果显示,p72N 没有跨膜区域。利用IEDB软件确定了上述p72N结构蛋白的候选抗原表位9个。而ABCpred软件确定了上述蛋白的候选抗原表位数目则更多,即p72N蛋白33 个。本发明综合分析上述结果后,最终确定了p72N蛋白的11个抗原表位。

[0060] 实施例2ASFVp72N蛋白抗原表位的鉴定

[0061] 1材料

[0062] 1.1主要实验试剂及仪器

[0063] MK100购自Takara公司;非洲猪瘟阳性血清购自中国兽医药品监察所;血清稀释液购自百迪泰生物公司;TMB显色液购自SurModics公司;10×PBS缓冲溶液和10×PBST缓冲溶液购自北京索莱宝科技有限公司;HRP标记山羊抗猪IgG 抗体购自Sigma公司;Carbonate-Bicarbonate Buffer购自西格玛奥德里奇(上海) 贸易有限公司;酶标仪购自Thermo公司。

[0064] 1.2实验主要试剂配制

- [0065] (1) 5% BSA: 5g BSA, 加入1×PBST定容至100mL。
- [0066] (2) CBS: 一个胶囊溶于100mL ddH₂O中。
- [0067] (3) 1×PBS缓冲溶液: 100mL 10×PBS缓冲溶液, 加入去离子水定容至1L。
- [0068] (4) 1×PBST缓冲溶液: 100mL 10×PBST缓冲溶液, 加入去离子水定容至 1L。
- [0069] (5) 封闭液: 5g脱脂奶粉, 加入1×PBST定容至100mL。
- [0070] 2方法
- [0071] 2.1 ASFVp72N蛋白候选抗原表位的合成
- [0072] 以实施例1生物信息学软件TMHMM、IEDB和ABCpred预测的结果综合分析, 将最终在p72N蛋白中确定的11个表位, 委托生物试剂公司合成肽段, 纯度均达到95%以上。
- [0073] 2.2 筛选抗原表位间接ELISA方法的优化
- [0074] 利用棋盘滴定法确定最佳ELISA反应条件, 随机选取p72N蛋白表位肽中的 3个合成肽作为包被抗原, 以非洲猪瘟感染阳性血清作为一抗(抗体稀释浓度分别为1:50、1:100和1:200), HRP标记山羊抗猪IgG抗体为二抗, 建立并优化间接ELISA方法以确定最佳的抗体浓度。具体操作步骤参考Takara Peptide Coating Kit说明书完成, 如下:
- [0075] (1) 使用试剂盒中的稀释液稀释合成的抗原表位(肽)浓度为4μg/ml, 分别包被于试剂盒中所带的96孔反应板(Reaction plate), 每孔50μL。
- [0076] (2) 立即向抗原包被孔中分别加入10μL Coupling reagent, 室温避光孵育2h。
- [0077] (3) 弃液, 使用去离子水洗涤5次后, 每次洗涤轻微震荡, 并拍干。
- [0078] (4) 封闭: 使用试剂盒中的Blocking buffer, 每孔中分别加入200μL, 室温避光封闭1h。
- [0079] (5) 弃液, 使用去离子水洗涤5次后, 每次洗涤轻微震荡, 并拍干。
- [0080] (6) 孵育一抗: 加入血清稀释液稀释至1:50、1:100和1:200的ASFV感染阳性血清(100μL/孔), 37℃避光孵育1h, 并设立阴性对照(阴性对照的血清为未感染ASFV的血清)。
- [0081] (7) 弃液, 使用1×PBST洗涤5次后, 每次洗涤轻微震荡, 并拍干。
- [0082] (8) 孵育二抗: 向每孔中分别加入1:10000(抗体的推荐浓度)的HRP标记山羊抗猪IgG抗体(100μL/孔), 空白对照空除外, 37℃避光孵育1h。
- [0083] (9) 弃液, 使用1×PBST洗涤5次后, 每次洗涤轻微震荡, 并拍干。
- [0084] (10) 显色: 加入TMB底物溶液(100μL/孔), 37℃避光显色15min。
- [0085] (11) 测定: 加入2M稀硫酸终止反应(100μL/孔), 轻微混匀, 使用酶标仪测定OD₄₅₀吸光度值。
- [0086] 2.3 间接ELISA筛选抗原表位(合成肽)
- [0087] 使用Takara Peptide Coating Kit中的稀释液将合成的所有肽段稀释至4μg/ml作为包被抗原, 分别包被于96孔Reaction plate, 每个样品设置3个重复并设立阴性对照, ASFV感染阳性血清在p72N肽段中的孵育浓度分别是1:100、1:100、1:100和1:50, HRP标记山羊抗猪IgG抗体为1:10000, 其他具体的操作步骤参考 2.2。
- [0088] 3结果
- [0089] 3.1 间接ELISA方法的优化结果
- [0090] 根据棋盘滴定法结果(表5)确定ELISA最佳抗体浓度, 确定阳性血清/阴性血清比值最大, 为最佳抗体浓度, 综合分析, 确定p72N蛋白肽段的最佳反应抗体浓度分别是1:100、

1:100、1:100和1:50。

[0091] 表5间接LEISA阴阳性血清最佳浓度优化

	样品稀释度	样品	p72N2	p72N7	p72N11
[0092]	1:50	阳性	0.9384	0.9653	3.1728
		阴性	0.4970	0.9398	0.9175
	1:100	阳性	0.4522	0.5316	2.0099
		阴性	0.3120	0.5093	0.4103
[0093]	1:200	阳性	0.3357	0.2301	0.9964
		阴性	0.1728	0.2214	0.2094

[0094] 3.2间接ELISA方法筛选抗原表位结果

[0095] 以非洲猪瘟病毒阳性血清作为标准筛选抗体,通过采用ELISA方法筛选和鉴定生物信息学在线工具预测的ASFVp72N蛋白的抗原表位。如图2所示,利用实验室建立的合成肽间接ELISA,用非洲猪瘟病毒阳性血清鉴定预测的非洲猪瘟病毒p72N蛋白的抗原表位。结果显示,预测的所有抗原表位(表3)均能与非洲猪瘟病毒阳性血清发生特异性免疫反应,与阴性对照血清相比,差异显著($p < 0.001$),结果充分显示表3中的抗原表位均为p72N蛋白抗原表位。其中p72N9 免疫反应性最强,为优势抗原表位。

[0096] 实施例3GST-单表位、多表位重组蛋白表达及抗原表位鉴定

[0097] 1材料

[0098] 1.1主要实验试剂及仪器

[0099] 高亲和力GST纯化介质和High Affinity Ni-Charged Resin FF购自南京金斯瑞生物科技有限公司;还原性谷胱甘肽购自上海麦克林生化科技有限公司;E.coli BL21 (DE3)感受态细胞、氨苄青霉素、IPTG和硫酸卡那霉素购自上海生工生物工程股份有限公司;Rosetta感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司;12mL和 30mL层析柱购自北京索莱宝科技有限公司;96孔板购自康宁(美国)公司。

[0100] 立式电压力灭菌器(上海申安医疗器械厂),制冰机(Scotsman,美国),电热恒温水槽(DK-8D型,上海精宏实验设备有限公司),大型离心机(Thermo,美国),PCR仪、电泳仪、高分辨率凝胶成像仪(Bio-Rad,美国),PH计(Sartorius,德国),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),水平电泳槽(北京六一生物科技有限公司)

[0101] 1.2实验主要试剂配制

[0102] (1) LB液体培养基:10g胰蛋白胍(Tryptone),5g酵母提取物(Yeast extract),10g氯化钠(NaCl),加入去离子水,调至pH7.0,定容至1L,121℃高压灭菌,冷却后4℃保存。

[0103] (2) 100mg/mL氨苄青霉素溶液:5g氨苄青霉素粉末,加入高压后的去离子水定容至50mL,0.22μm滤器过滤除菌,分装,-20℃保存。

[0104] (3) 100mg/mL卡那青霉素溶液:5g卡那青霉素粉末,加入高压后的去离子水定容至50mL,0.22μm滤器过滤除菌,分装,-20℃保存。

[0105] (4) 8×Binding Buffer缓冲溶液:4M NaCl、160mM Tris-HCl、40mM咪唑,加入去离子水800mL,调至pH 7.9,定容至1L。

[0106] (5) 1×Binding Buffer缓冲溶液:75mL 8×Binding Buffer缓冲溶液,加入去离子水定容至600mL。

[0107] (6) 5×SDS-PAGE电泳缓冲溶液:15.1g Tris-HCL,5.0g SDS,94.0g甘氨酸,加入去离子水定容至1L。

[0108] (7) 1×SDS-PAGE电泳缓冲溶液:200mL 5×SDS-PAGE电泳缓冲溶液,加入去离子水定容至1L。

[0109] (8) 10%SDS溶液:10gSDS,加入去离子水定容至100mL。

[0110] (9) 10%过硫酸铵:1g过硫酸铵,加入去离子水定容至10mL。

[0111] (10) 考马斯亮蓝R-250染色液:1g考马斯亮蓝R-250粉末,250mL异丙醇,100mL冰醋酸,加入去离子水定容至1L。

[0112] (11) 考马斯亮蓝脱色液:100mL冰乙酸,50mL无水乙醇,加入去离子水定容至1L。

[0113] (12) 10×Glutathione reconstitution Buffer:500mmol Tris-Hcl加入去离子水800mL,调pH至8.0,然后加无离子水定容至1L。

[0114] (13) 10×GST Elution Buffer:1g还原型谷胱甘肽溶于32.5mL 10×Glutathione reconstitution Buffer。

[0115] (14) 1×GST Elution Buffer:10×GST Elution Buffer稀释为1×GST Elution Buffer,现用现配。

[0116] 2方法

[0117] 2.1pGEX-4T-1/抗原表位重组表达质粒的构建、重组蛋白的表达及纯化

[0118] 2.1.1pGEX-4T-1/抗原表位重组表达质粒的构建

[0119] 将生物信息学预测的候选ASFVp72N蛋白中的抗原表位与文献报道的抗原表位碱基序列5'端和3'端,分别引入特异性酶切位点BamHI/NotI作为目的基因,然后将其插入BamHI/NotI线性化的原核表达载体pGEX-4T-1,构建重组质粒。所有重组质粒全部委托生物公司合成。测序结果同源率为100%。

[0120] 2.1.2抗原表位重组蛋白的表达及纯化

[0121] 具体操作方法如下:

[0122] (1) 采用热激法将阳性重组质粒分别转化至E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞中, LB (Amp+) 培养板筛选阳性重组菌。

[0123] (2) 挑阳性单菌落接种于适量的LB (Amp+) 液体培养基中,37℃220rpm 过夜培养。

[0124] (3) 按1:100接种于新鲜配制的氨苄青霉素抗性的液体LB培养基中,37℃ 220rpm 培养4h,吸取1mL,加入IPTG (终浓度为1mmol/mL),37℃220rpm诱导4h,4℃离心10min (3000g) 收获菌体,弃上清。

[0125] (4) 用冷1×PBS重悬沉淀 (每50mL培养基所需3mL冷1×PBS),4℃离心 10min (3000g) 收获沉淀,弃上清。

[0126] (5) 1×PBS重悬沉淀,超声波破碎法在冰上破碎菌体。离心,收集上清,用同样冷1×PBS重悬沉淀。

[0127] (6) 分别吸取等量的可溶组分和不溶组分,SDS-PAGE分析GST-融合蛋白的表达含量及形式。

[0128] (7) 取适量高亲和力GST纯化介质至层析柱中,用10倍柱体积冷1×PBS 洗涤。

[0129] (8) 将含有GST融合蛋白的澄清液体加入到层析柱中,4℃结合1-2h左右,待液体全部流出层析柱后,立即加入冷的1×PBS (20倍柱体积) 清洗柱子。

[0130] (9) 用现配1×GST Elution Buffer (5-10倍柱体积) 洗脱融合蛋白,SDS-PAGE 电泳分析洗脱蛋白。

[0131] 2.2噬菌体展示多表位重组表达质粒的构建、表达及纯化

[0132] 2.2.1噬菌体展示多表位重组表达质粒的构建

[0133] 将筛选的肽段依次进行串联,为了保证抗原表位的独立性,相邻抗原表位间引入间隔子序列GGGS,然后将其编码基因序列与噬菌体AP205基因分别克隆至 NcoI/XhoI线性化的原核表达载体pET-28a (+),构建噬菌体展示多表位的重组表达质粒,通过大肠杆菌表达多表位的重组蛋白,命名如表6。所有抗原表位重组表达质粒均由生物公司合成并完成鉴定。

[0134] 表6抗原表位串联方式

	单个表位命名	多表位串联命名
[0135]	p72N1	p72N1N7
	p72N7	

[0136] 2.2.2噬菌体展示多表位重组蛋白的表达及纯化

[0137] 具体操作方法如下:

[0138] (1) 采用热激法将阳性重组质粒分别转化至E.coli Rosetta感受态细胞中, LB (Kan+) 培养板筛选阳性重组菌。

[0139] (2) 挑阳性单菌落接种于适量的LB (Kan+) 液体培养基中,37℃220rpm 过夜培养。

[0140] (3) 按1:100接种于新鲜配制的卡那霉素抗性的液体LB培养基中,37℃ 220rpm 培养4h,吸取1mL,加入IPTG (终浓度为1mmol/mL),37℃220rpm诱导4h,4℃离心10min (3000g) 收获菌体,弃上清。

[0141] (4) (5) (6) 同2.1.2。

[0142] (7) 取适量高亲和力His纯化介质至层析柱中,用10倍柱体积1×Binding 洗涤。

[0143] (8) 将含有His融合蛋白的澄清液体加入到层析柱中,4℃结合1-2h左右,待液体全部流出层析柱后,立即加入1×Binding洗涤,然后用含有不同浓度咪唑的Binding Buffer 清洗柱子,依次为20mM、30mM、40mM和50mM。

[0144] (9) 最后用含500mM咪唑的Binding Buffer洗脱融合蛋白,SDS-PAGE电泳分析洗脱蛋白。

[0145] 2.3间接ELISA鉴定抗原表位 (抗原表位重组蛋白)

[0146] 具体操作方法如下:

[0147] (1) 包被:用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释纯化的GST-抗原表位重组蛋白抗原浓度为1μg/ml,包被96孔反应板,每孔100μL,每个样品3孔重复,4℃过夜。

[0148] (2) 洗涤:弃液,每孔分别加入1×PBST洗涤,使用摇床轻微晃动,共5次,弃液并拍干。

[0149] (3) 封闭:每孔分别加入100μL 1×PBST稀释的5%BSA,37℃避光孵育2h。

[0150] (4) 洗涤:同(2)。

[0151] (5) 孵育ASFV阳性血清:每孔分别加入100 μ L(血清稀释液稀释至1/100),并设立阴性对照(未感染ASFV的血清),37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0152] (6) 洗涤:同(2)。

[0153] (7) 孵育HRP标记山羊抗猪IgG抗体:每孔分别加入血清稀释液稀释至 1/10000(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0154] (8) 洗涤:同(2)。

[0155] (9) 显色:每孔分别加入100 μ L TMB底物溶液,37 $^{\circ}$ C避光显色15min。

[0156] (10) 终止:每孔分别加入100 μ L 2M硫酸终止反应,轻微摇晃混匀后,测定OD₄₅₀吸光度值。

[0157] 2.4数据分析

[0158] 应用统计学GraphPad Prism 7软件中的ttest检验对实验中获得的数据进行差异显著性分析(****P<0.0001,***P<0.001,**P<0.01表示差异极显著;*P<0.05表示差异显著;P>0.05差异不显著)。

[0159] 3结果

[0160] 3.1GST-抗原表位重组蛋白的表达、纯化

[0161] SDS-PAGE结果显示,p72N蛋白的所有抗原表位蛋白,在大肠杆菌中均实现了表达,而且所有蛋白以可溶性形式表达,大小与预期结果相符,均为25kDa左右,采用亲和层析柱纯化,获得系列化GST-抗原表位重组蛋白。

[0162] 3.3抗原表位的鉴定结果

[0163] 如图3所示,在p72N蛋白中,筛选到2个优势抗原表位p72N9和p72N10,重组 p72N9和p72N10蛋白的OD450nm极显著高于其它蛋白(本文筛选和文献报道的抗原表位),肽段p72N9与文献报道的p72G3和p72G4差异极显著,肽段p72N10与文献报道的p72G2差异极显著,本发明筛选的肽段p72N11与文献报道的p72G4差异极显著;重组p72N17蛋白的OD450nm显著高于单表位重组蛋白的免疫反应性,重组GST-p72N9蛋白的OD450nm极显著高于重组p72N9蛋白。

[0164] 4小结

[0165] p72蛋白中,抗原表位p72N10(275-FLSQHPENSHNIQTAGKQD-294aa)比已知的抗原表位p72G3(280-FPENSHNIQTAGKQD-294)的5'端多5个氨基酸(FLSQH),与已知的抗原表位p72G4(290-AGKQDITPITDATY-303)除了氨基酸AGKQD相同外,其长短和两端的氨基酸序列均不同,该抗原表位的免疫反应性则明显优于已知的两个表位,故本发明中获得抗原表位为p72蛋白的新优势抗原表位;抗原表位p72N11(295-ITPITDATYLDIRR-308)与p72G4(290-AGKQDITPITDATY-303)相比5'端少5个氨基酸(AGKQD),3'端多5个氨基酸(LDIRR),该抗原表位的免疫反应性明显优于文献报道的,说明两端的氨基酸可能对抗原表位的免疫反应性有抑制作用,故本发明中获得抗原表位为 p72蛋白新的抗原表位;p72N9(266-RTCSHTNPKFLSQHFP-281)与已知的抗原表位p72G2(265-QRTCSHTNPKFLSQHF-280)相比5'端少1个氨基酸(R),3'端多1个氨基酸(R),该抗原表位的免疫反应性明显优于文献报道的,说明两端的氨基酸对抗原表位的免疫反应性有很大的影响,故本发明中获得抗原表位更优;由于抗原表位p72N9和p72N10的免疫反应性明显优于本发明的其他抗原表位和文献中已报道的抗原表位,所以p72N9和p72N10为p72蛋白的新优势抗原表位。

[0166] 获得的p72N蛋白抗原表位的用途包括用于非洲猪瘟病毒感染血清学的检测试剂及其试剂盒(ELISA, WB、胶体金层析试纸条等),非洲猪瘟表位疫苗及其与该表位相关任何疫苗的研制(表位单价/多价疫苗,以表位为基础的合成肽疫苗,以及与其他病原抗原表位或抗原串联研究诊断试剂盒疫苗等),抗原表位单抗制备等研究。这些抗原表位的成功获得对非洲猪瘟病毒血清学检测、检测试剂盒研制、免疫效果评价和疫苗研制等具有十分重要的意义。

<400> 4

Pro Phe Gly Arg Pro Ile Val Pro Gly Thr Lys Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 5

Glu Arg Leu Tyr Glu

1 5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 6

Asp Val Asn Gly Asn Ser Leu Asp Glu Tyr Ser Ser Asp

1 5 10

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 7

Pro Gly Asp Lys Met Thr Gly Tyr Lys His Leu Val Gly Gln Glu Val

1 5 10 15

Ser Val Glu Gly Thr

20

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 8

Lys Pro His Gln Ser Lys Pro Ile Leu Thr Asp Glu Asn Asp Thr Gln

1 5 10 15

Arg Thr Cys Ser His Thr Asn Pro Lys

20

25

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 9

Arg Thr Cys Ser His Thr Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gln His Phe Pro
1 5 10 15

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 10

Phe Leu Ser Gln His Phe Pro Glu Asn Ser His Asn Ile Gln Thr Ala
1 5 10 15

Gly Lys Gln Asp
 20

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 11

Ile Thr Pro Ile Thr Asp Ala Thr Tyr Leu Asp Ile Arg Arg
1 5 10

<210> 12

<211> 324

<212> PRT

<213> African swine fever virus

<400> 12

Met Ala Ser Gly Gly Ala Phe Cys Leu Ile Ala Asn Asp Gly Lys Ala
1 5 10 15

Asp Lys Ile Ile Leu Ala Gln Asp Leu Leu Asn Ser Arg Ile Ser Asn
 20 25 30

Ile Lys Asn Val Asn Lys Ser Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Glu Pro Thr
 35 40 45

Leu Ser Gln Ile Glu Glu Thr His Leu Val His Phe Asn Ala His Phe
 50 55 60

Lys Pro Tyr Val Pro Val Gly Phe Glu Tyr Asn Lys Val Arg Pro His
65 70 75 80

Thr Gly Thr Pro Thr Leu Gly Asn Lys Leu Thr Phe Gly Ile Pro Gln
 85 90 95

Tyr Gly Asp Phe Phe His Asp Met Val Gly His His Ile Leu Gly Ala
 100 105 110

Cys His Ser Ser Trp Gln Asp Ala Pro Ile Gln Gly Thr Ser Gln Met

115	120	125
Gly Ala His Gly Gln Leu Gln Thr Phe Pro Arg Asn Gly Tyr Asp Trp		
130	135	140
Asp Asn Gln Thr Pro Leu Glu Gly Ala Val Tyr Thr Leu Val Asp Pro		
145	150	155
Phe Gly Arg Pro Ile Val Pro Gly Thr Lys Asn Ala Tyr Arg Asn Leu		
165	170	175
Val Tyr Tyr Cys Glu Tyr Pro Gly Glu Arg Leu Tyr Glu Asn Val Arg		
180	185	190
Phe Asp Val Asn Gly Asn Ser Leu Asp Glu Tyr Ser Ser Asp Val Thr		
195	200	205
Thr Leu Val Arg Lys Phe Cys Ile Pro Gly Asp Lys Met Thr Gly Tyr		
210	215	220
Lys His Leu Val Gly Gln Glu Val Ser Val Glu Gly Thr Ser Gly Pro		
225	230	235
Leu Leu Cys Asn Ile His Asp Leu His Lys Pro His Gln Ser Lys Pro		
245	250	255
Ile Leu Thr Asp Glu Asn Asp Thr Gln Arg Thr Cys Ser His Thr Asn		
260	265	270
Pro Lys Phe Leu Ser Gln His Phe Pro Glu Asn Ser His Asn Ile Gln		
275	280	285
Thr Ala Gly Lys Gln Asp Ile Thr Pro Ile Thr Asp Ala Thr Tyr Leu		
290	295	300
Asp Ile Arg Arg Asn Val His Tyr Ser Cys Asn Gly Pro Gln Thr Pro		
305	310	315
Lys Tyr Tyr Gln		320

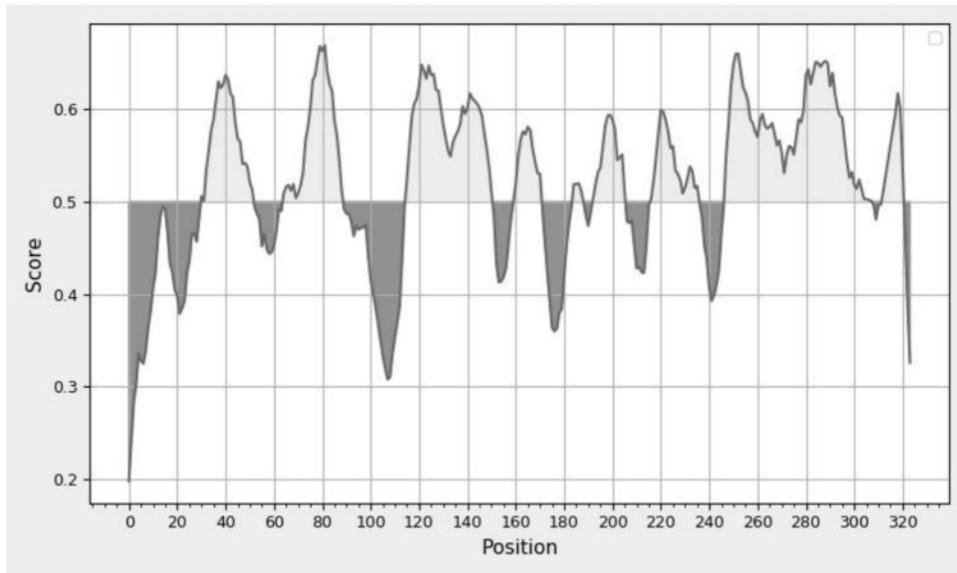


图1

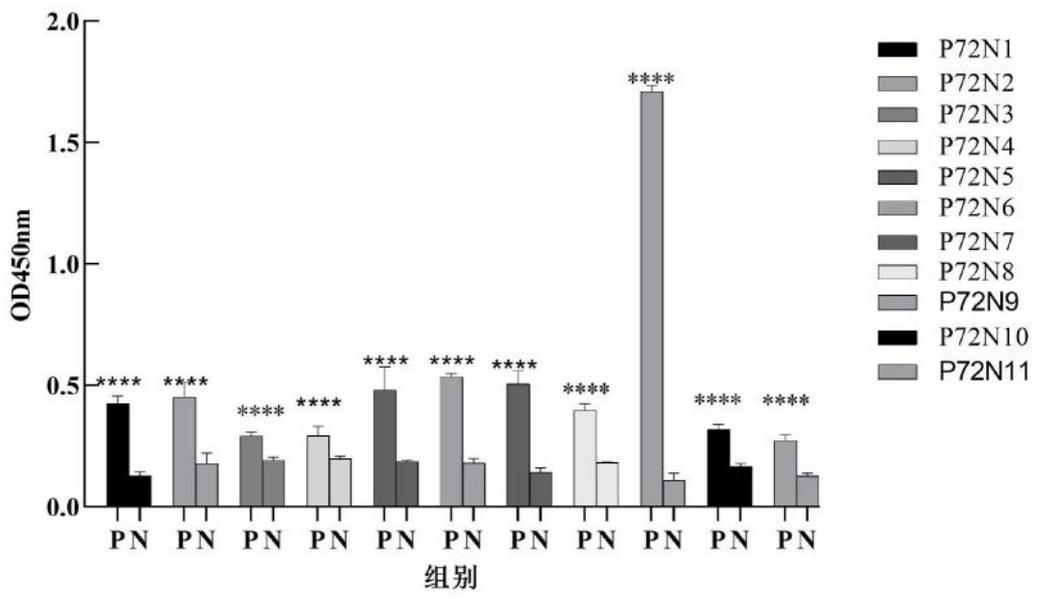


图2

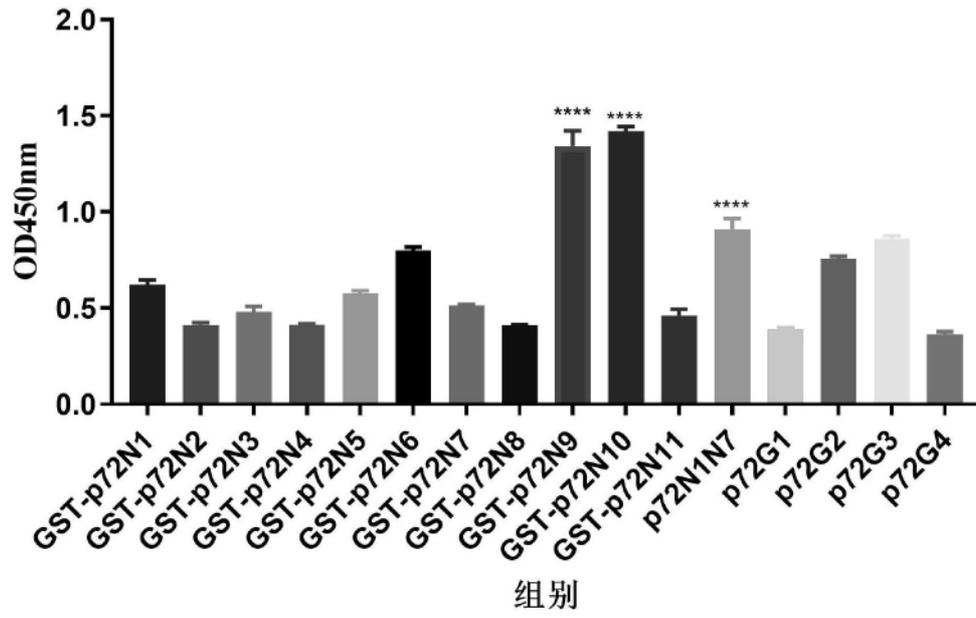


图3