

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/005

G01N 33/569 G01N 33/531

A61K 39/12 A61P 31/12



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03132413.4

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1458167A

[22] 申请日 2003.6.2 [21] 申请号 03132413.4

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所  
地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街 427 号

[72] 发明人 童光志 韩凌霞 陈 艳 崔尚金  
王云峰 仇华吉

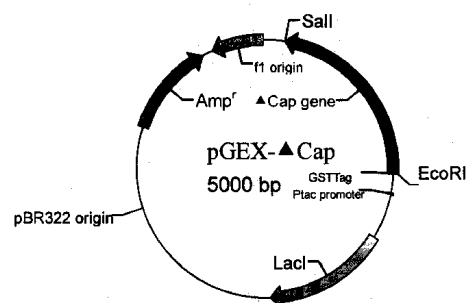
[74] 专利代理机构 哈尔滨东方专利事务所  
代理人 陈晓光

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原及其应用

[57] 摘要

截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原及其应用。 PCV - 2 基因组含 ORF1 和 ORF2, ORF1 编码病毒的复制酶, ORF2 编码病毒衣壳蛋白, 也是研究诊断和疫苗的唯一靶抗原。 本发明利用原核表达系统克隆表达 PCV - 2 衣壳蛋白基因 (Cap) 羧基端 393bp 部分, 表达的产物经纯化后用作诊断 PCV 感染的抗原或制备亚单位疫苗。 经用 PCV 阳性血清检测, 表达的部分衣壳蛋白具有良好的抗原反应性, 可作为诊断抗原应用于琼扩诊断技术, 酶联免疫吸附试验, 斑点酶联免疫吸附试验, 免疫荧光检测等检测 PCV - 2 感染产生的抗体, 此外, 表达的衣壳蛋白可进一步配以佐剂制备亚单位疫苗。



ISSN 1008-4274

1, 一种截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原, 其特征是: 利用原核表达系统克隆表达猪圆环病毒 2 型 (PCV-2) 衣壳蛋白基因 (Cap) 羧基端 393bp 部分, 表达的产物经纯化后用作诊断 PCV 感染的抗原, Cap 基因被截短, 只保留靠近羧基端 393bp 部分, 并在大肠杆菌中表达。

2, 一种上述的截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原的应用, 该截短的重组衣壳蛋白抗原可应用于琼扩诊断技术 (AGIP), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 斑点酶联免疫吸附试验 (Dot-ELISA), 免疫荧光抗体检测 (IF) 及免疫印渍试验 (Western Blot)。

3, 一种截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原的应用, 该截短的重组衣壳蛋白抗原可应用于检测猪圆环病毒感染后产生的抗体。

4, 一种截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白的应用, 体外表达该截短的重组衣壳蛋白可用于制备抗猪圆环病毒感染的亚单位疫苗。

## 截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原及其应用

技术领域：

本项发明是利用基因工程技术，在大肠杆菌中表达了猪圆环病毒 II 型 Cap 基因的羧基端部分，作为猪圆环病毒感染诊断用抗原和制备亚单位疫苗。

背景技术：

猪 II 型圆环病毒（PCV-2）是断乳仔猪多系统衰竭综合征（post-weaning multi-systemic wasting syndrome, PMWS）的主要病原。自 1991 年 PMWS 在北美最先发现以来，已在世界范围内流行。由于 PCV-2 经常与多种病原混合感染，除代表性的临床表现如消瘦、皮肤苍白、腹泻、呼吸障碍以及少量的黄疸之外，还包括神经症状、繁殖障碍、皮炎等。由于 PCV-2 病毒主要侵染猪的巨噬细胞，加剧了其它病原的致病力，给世界养猪业带来的损失日渐增大。建立便捷敏感特异的诊断方法对于有效控制此病十分重要。

发明内容：

本发明的目的：通过原核表达系统克隆表达 PCV-2 衣壳蛋白基因梭基端 393bp 序列，纯化表达的产物作为抗原或免疫原用于猪圆环病毒抗体检测或亚单位疫苗的制备。

本发明的目的是这样实现的：

截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原，利用原核表达系统克隆表达猪圆环病毒 2 型（PCV-2）衣壳蛋白基因（Cap）羧基端 393bp 部分，表达的产物经纯化后用作诊断 PCV 感染的抗原，Cap 基因被截短，只保留靠近羧基端 393bp 部分，并在大肠杆菌中表达。

上述的截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原的应用，该截短的重组衣壳蛋白抗原可应用于琼扩诊断技术（AGIP），酶联免疫吸附试验（ELISA），斑点酶联免疫吸附试验（Dot-ELISA），免疫荧光抗体检测（IF）及免疫印渍试验（Western Blot）。

截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原的应用，该截短的重组衣壳蛋白抗原可应用于检测猪圆环病毒感染后产生的抗体。

一种截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白的应用，体外表达该截短的重组衣壳蛋白可用于制备抗猪圆环病毒感染的亚单位疫苗。

本发明的有益效果及其所得到的新的本发明产品性能的测定：

1. 经用 PCV 阳性血清检测，表达的部分衣壳蛋白具有良好的抗原反应性，可作为诊断抗原应用于琼扩诊断技术，酶联免疫吸附试验，斑点酶联免疫吸附试验，免疫荧光检测等检测 PCV-2 感染产生的抗体，此外，表达的衣壳蛋白可进一步配以佐剂制备亚单位疫苗。
2. 国内对 PCV-2 的流行病学调查仍主要是利用多聚酶链式反应（PCR）进行病原学检测，其可信性受到由 PCR 的高度敏感性带来的假性结果的影响，而酶联免疫吸附试验成为优于病毒分离和 PCR 的血清学检测方法。
3. PCV-2 ORF1 编码与复制相关的 Rep 蛋白，ORF2 编码目前已知唯一的结构蛋白——壳蛋白 Cap。通过肽扫描（PEPSCAN）分析认定，PCV-2 的型特异性特征决定于 ORF2 编码的 Cap 蛋白，尤其在近羧基端的 393 个碱基中，本发明正是在这一点上取得了进步。
4. 该重组蛋白具有显著的抗原反应活性，通过对疑似患 PMWS 猪的淋巴组织经 PK15 细胞系培养后，从总 DNA 中扩增出 PCV-2 病毒基因组，以及 ORF1、ORF2 基因。在测定全病毒基因组核苷酸序列的基础上，利用原核融合表达载体 pGEX-6p-1，表达 PCV-2 的部分 ORF2 基因，并通过与 PCV-2 感染猪血清的酶联免疫吸附试验，验证了重组蛋白的抗原反应活性，具体过程见实施例。

#### 附图说明

图 1，猪圆环病毒 Cap 基因原核表达载体 pGEX- $\Delta$ Cap 结构示意图

图 2，重组蛋白的 SDS-PAGE 分析，M 蛋白标准分子量（116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4、14.4ku），箭头所指从上向下分别为 45、35、25ku；1. pGEX-6p-1 在 BL21 菌体中的诱导表达，GST 蛋白约为 29 ku；2. pGEX- $\Delta$ Cap 在 BL21 菌体中的诱导表达，GST- $\Delta$ Cap 约 40 ku；3. pPRO-Cap 在 DH5 $\alpha$  菌体中的诱导表达，His-Cap 约 35 ku；4.

pPRO-Rep 在 DH5 $\alpha$  菌体中的诱导表达, His-Rep 约 40 ku。

本发明的具体实施方式:

实施例 1:

截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原, 利用原核表达系统克隆表达猪圆环病毒 2 型(PCV-2)衣壳蛋白基因(Cap)羧基端 393bp 部分, 表达的产物经纯化后用作诊断 PCV 感染的抗原, Cap 基因被截短, 只保留靠近羧基端 393bp 部分, 并在大肠杆菌中表达。

截短表达的猪圆环病毒衣壳蛋白作为诊断抗原的具体过程:

将重组菌诱导大量表达后, PBS 重悬菌体, 超声波破碎。将初步纯化的表达产物包被酶标反应板, 37 $^{\circ}$ C 吸附 2 小时。PBST (0.01mol/L PBS+0.05%Tween20) 洗涤 3 次, 每次 10 分钟。用含 5%脱脂乳或 10%小牛血清的 PBST 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时, 同上洗涤。将 PCV-2 阳性猪血清和 SPF 猪阴性血清分别用 PBS 作一系列稀释后加入孔中, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 小时, 同上洗涤。辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG 抗体 (1:3000) 作用 1.5 小时, 同样洗涤。加底物显色缓冲液 (10ml 磷酸盐-柠檬酸缓冲液, pH5.0, 5mg OPD 和 0.15ml 3% $H_2O_2$ ), 避光显色。显色 5-10 分钟后, 每孔加 50  $\mu$ l 2mol/L  $H_2SO_4$  终止反应。酶标检测仪 492nm 波长下读数。结果发现重组蛋白能与 PCV 阳性血清发生很强的反应, 与阴性血清无反应。本项发明可以取代全病毒抗原用于 PCV-2 感染抗体的检测。

本产品的蛋白抗原活性:

a, PCV 病毒分离与 PCR 样品处理 取通过鉴别 PCR 证明有 PCV-2 感染的淋巴组织匀浆后, 接种无 PCV 污染的 PK15 细胞。37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后, 用 Hank's 碱性盐溶液配制的 300mmol/L 葡萄糖氨作用 30 分钟, 再培养 72 小时后冻融 3 次, 留作种毒; 以 1/10 体积比接种新鲜 50%融合生长的 PK15 细胞。检测时用胰蛋白酶消化成单细胞, PBS 洗涤, 溶于 TNE 缓冲液 (0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0), 其中蛋白酶 K 和 SDS 的终浓度分别为 100 $\mu$ g/ml 和 1%。50 $^{\circ}$ C 作用 2 小时, 苯酚、苯酚: 氯仿各抽提 1 次, 无水乙醇沉淀 2 小时后, 溶于适量 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 作为 PCR 模板。

2. 引物的设计与合成 根据 GenBank 中公布的序列 (序列号 AF201311), 设计一对特异性引物, 由大连宝生物工程公司合成, 扩增 PCV-2 CAP 基因全序列 (编码 Cap 蛋白)。Cap 上游引物 5'GGG GGA TCC TAT TAT TCA TTA AGG GTT AAG 3', Cap 下游引物 5'AGC AAG CTT CTT TCG TTT TC 3', 扩增 18nt-742nt。其中上游引物中包含 *Bam*HI 位点, 下游引物中包含 *Hind*III 位点, 加下划线表示, 使用浓度为 10pmol/ $\mu$ l。

3. Cap 基因的扩增及其克隆 Cap 基因的扩增条件: PCR 反应总体积为 50  $\mu$ l, 在 0.5ml PCR 管中依次加入去离子水 31  $\mu$ l, 上、下游引物各 2  $\mu$ l, dNTP5  $\mu$ l (各成分 2.5mmol/L), 10 $\times$ ExTaq 缓冲液 5  $\mu$ l, ExTaq 0.5  $\mu$ l, 模板 5  $\mu$ l。95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟后, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟、50 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 延伸 90 秒钟, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。同时以去离子水作空白对照。取 5  $\mu$ l PCR 产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。扩增产物用华舜公司的胶回收试剂盒回收, 依据 T-A 原理, 按照载体说明书与 pMD18T 载体连接, 通过 X-gal 和 IPTG、氨苄青霉素抗性以及限制性内切酶筛选重组克隆。获得的阳性重组质粒命名为 pPRO-Cap。

4. Cap 羧基端部分基因的克隆与表达 利用 Cap 基因内部 393 位的 *Eco*RI 位点和 pMD18T 载体上的 *Sal*I 位点, 将 pPRO-Cap 中的 Cap 基因羧基端部分 (约 393bp) 切下与表达载体 pGEX-6p-1 连接, 转化 BL21 感受态菌。通过氨苄青霉素抗性和限制性内切酶鉴定重组质粒, 得到的重组克隆命名为 pGEX- $\Delta$ CAP。

5. 重组质粒的表达及 SDS-PAGE 电泳 将含有重组质粒的大肠杆菌在新鲜培养基 (LB) 中振荡培养, 当菌液 OD<sub>600</sub> 值达 0.6-0.8 时, 加入无菌 IPTG, 使终浓度为 0.6mmol/L。3-4 小时后停止培养, 离心收集菌体, PBS 洗涤, 按 1/10 体积比浓缩, 与等体积的凝胶上样缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl, 200mmol/L DTT, 4%SDS, 0.2%溴酚兰, 20%甘油, pH6.8) 混合, 煮沸 5 分钟变性。利用 BioRAD 公司的蛋白质电泳装置做 SDS-PAGE。分离胶的丙烯酰胺浓度为 10%, 0.25%考马斯亮兰染色。同时以载体转化菌同样诱导表达作阴性对照。截短的 Cap 蛋白表达量占菌体蛋白总量 19.6%。

**实施例 2:**

上述的截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原的应用, 该截短的重组衣壳蛋白抗原可应用于琼扩诊断技术 (AGIP), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 斑点酶联免疫吸附试验 (Dot-ELISA), 免疫荧光抗体检测 (IF) 及免疫印渍试验 (Western Blot)。

**实施例 3:**

截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白抗原的应用, 该截短的重组衣壳蛋白抗原可应用于检测猪圆环病毒感染后产生的抗体。

**实施例 4:**

截短表达的猪圆环病毒 II 型衣壳蛋白的应用, 体外表达该截短的重组衣壳蛋白可用于制备抗猪圆环病毒感染的亚单位疫苗。

截短表达的猪圆环病毒衣壳蛋白作为免疫原制备亚单位疫苗的具体过程:

将含有重组质粒的大肠杆菌在新鲜培养基 (LB) 中振荡培养, 当菌液  $OD_{600}$  值达 0.6-0.8 时, 加入无菌 IPTG, 使终浓度为 0.6mmol/L。3-4 小时后停止培养, 离心收集菌体, PBS 重悬菌体, 超声波破碎, 经过分子筛柱层析纯化或不纯化直接配以适当的佐剂制备成亚单位疫苗, 肌肉注射用于预防猪圆环病毒感染。

**PCV-2 HT02 株全基因序列:**

```

1 CTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTATTATTCATTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTA
    |
    end of Cap

61 AGATTA AATTCTCTGAATTGTACATACATGGTTACACGGATGTTGTATTCTGGTCGTAT
121 ATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTTCCAGCAGTTTGTAGT
181 CTCAGCCACAGCTGATTTCTTTTGTGTTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGAATCTAGG
241 ACAGGTTTGGGGTAAAGTAGCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGG
301 GAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGGTGAGGGCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCA
361 TCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCTCTGTCACCCTGGGTGATTGGGGAGCAGGGC
421 CAGAATTCAACCTTAATCTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGGTTT
481 GAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAG
541 GAGGGCGTTTTGACTGTGGTTGCTTGATAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTG

```



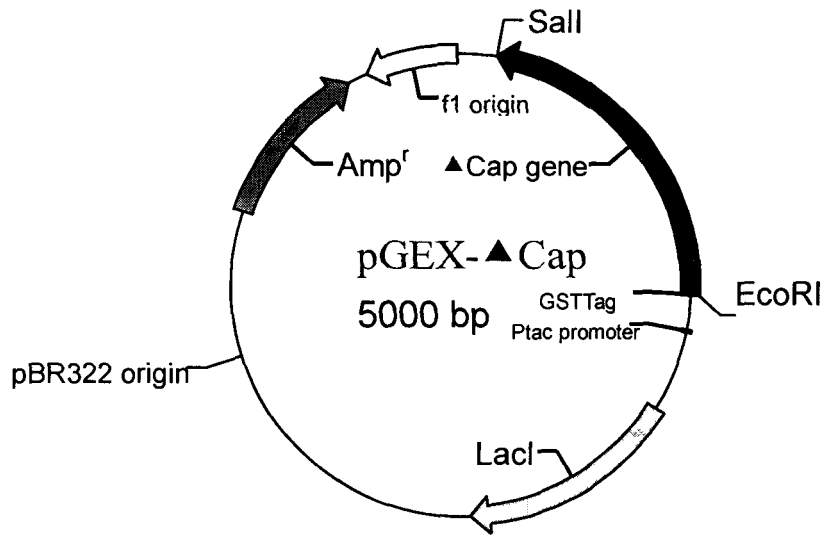


图 1,

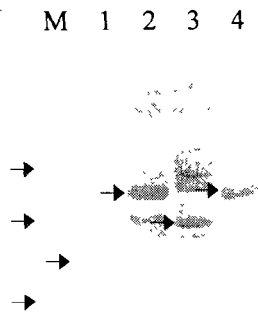


图 2

专利名称(译)	截短表达的猪圆环病毒II型衣壳蛋白抗原及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1458167A</a>	公开(公告)日	2003-11-26
申请号	CN03132413.4	申请日	2003-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	童光志 韩凌霞 陈艳 崔尚金 王云峰 仇华吉		
发明人	童光志 韩凌霞 陈艳 崔尚金 王云峰 仇华吉		
IPC分类号	A61K39/12 A61P31/12 C07K14/005 G01N33/531 G01N33/569		
代理人(译)	陈晓光		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

截短表达的猪圆环病毒II型衣壳蛋白抗原及其应用。PCV - 2基因组含ORF1和ORF2, ORF1编码病毒的复制酶, ORF2编码病毒衣壳蛋白, 也是研究诊断和疫苗的唯一靶抗原。本发明利用原核表达系统克隆表达PCV - 2衣壳蛋白基因(Cap)羧基端393bp部分, 表达的产物经纯化后用作诊断PCV感染的抗原或制备亚单位疫苗。经用PCV阳性血清检测, 表达的部分衣壳蛋白具有良好的抗原反应性, 可作为诊断抗原应用于琼扩诊断技术, 酶联免疫吸附试验, 斑点酶联免疫吸附试验, 免疫荧光检测等检测PCV - 2感染产生的抗体, 此外, 表达的衣壳蛋白可进一步配以佐剂制备亚单位疫苗。

