

[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 200510135583.X

[51] Int. Cl.

C12N 15/33 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月4日

[11] 公开号 CN 1990869A

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

[22] 申请日 2005.12.30

[21] 申请号 200510135583.X

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

地址 150010 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

[72] 发明人 王笑梅 高宏雷 付朝阳 高玉龙

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司

代理人 孙皓晨

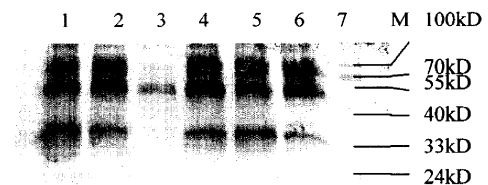
权利要求书1页 说明书19页 附图2页

[54] 发明名称

鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA、其表达载体、所表达的重组蛋白及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种新的鸡传染性法氏囊病病毒 VP2c DNA (SEQ ID NO: 1)、其表达载体的构建、所表达的重组 VP2 蛋白及该重组蛋白在制备抗鸡传染性法氏囊病蛋白亚单位基因工程疫苗中的应用。本发明鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 能够在酵母细胞中高效表达, 所表达的重组蛋白具有鸡传染性法氏囊病病毒天然蛋白的生物学活性和免疫原性。将本发明所表达的重组蛋白制成疫苗, 免疫鸡实验结果表明: 本发明蛋白亚单位疫苗能有效诱导机体产生特异性的体液免疫应答, 使免疫鸡获得 90% 的抵抗高致病力 vvIBDV 致死性攻击的保护, 并可有效阻止病毒在体内的增殖。



- 1.一种改造的鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA, 其特征是具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。
- 2.含有权利要求 1 cDNA 的重组酵母表达载体。
- 3.一种用权利要求 2 的重组酵母表达载体转化的宿主细胞。
- 4.一种鸡传染性法氏囊病病毒重组 VP2 蛋白, 其特征是由权利要求 1 的 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列所编码。
- 5.一种制备权利要求 4 重组 VP2 蛋白的方法, 包括以下步骤:
培养用权利要求 2 的重组酵母表达载体所转化的酵母细胞, 诱导重组 VP2 蛋白的表达, 回收并纯化所表达的重组 VP2 蛋白。
- 6.按照权利要求 5 的方法, 其特征是所述的酵母细胞是 SMD1168 毕赤酵母细胞 (SMD1168 *Pichia* strain)。
- 7.一种抗鸡传染性法氏囊病的蛋白亚单位基因工程疫苗, 其特征是该疫苗含有有效量的权利要求 4 的重组 VP2 蛋白。
- 8.按照权利要求 7 的蛋白亚单位基因工程疫苗, 其特征是该疫苗还含有药学上可接受的佐剂、载体或赋型剂。
- 9.权利要求 1 的鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 在制备防治或诊断鸡传染性法氏囊病药物中的用途。
- 10.权利要求 4 的鸡传染性法氏囊病病毒重组 VP2 蛋白在制备防治或诊断鸡传染性法氏囊病药物中的用途。

鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA、其表达载体、所表达的重组蛋白及应用

技术领域

本发明涉及一种 cDNA, 尤其涉及一种人工改造的鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA、其表达载体的构建、所表达的重组 VP2 蛋白及该重组蛋白在制备抗鸡传染性法氏囊病疫苗中的应用。

背景技术

鸡传染性法氏囊病是能够引起鸡体免疫抑制的重要的病毒病, 严重危害着世界的养鸡业。传统疫苗在防制该病的历史中起到非常重要的作用, 随着该病近年来呈现的新的变化-血清型变异株, 超强毒株的出现, 使得对该病的防制越来越棘手, 传统疫苗的研制速度已经有些难于跟上该病的变化。快速的开发新型有效的能防制变异和超强毒株的新型疫苗的要求尤为迫切。蛋白亚单位基因工程疫苗是去除遗传物质但又保留病毒抗原性的安全疫苗, 不存在散毒的危险。该疫苗的开发和应用将为防制当前流行的鸡传染性法氏囊病提供有效的工具和手段, 并可为防制禽类免疫抑制病提供有效的参考和经验。

甲醇酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是近几年发展起来的一个真核表达系统, 它不仅象原核生物一样操作简便、酵母细胞容易培养、生长快速、成本低廉、适于大规模工业化发酵生产, 而且能对重组蛋白进行正确的折叠和翻译后加工修饰, 如糖基化、甲基化以及 β -折叠等。酵母表达系统是所有表达系统中表达量最高的, 可以达到克/升以上, 有的表达量高达 12 克/升。酵母表达载体有分泌型和非分泌型, 分泌型可以将所表达的蛋白分泌到液体培养基中去, 且酵母本身分泌的蛋白非常少, 杂蛋白非常少, 易于纯化。*Pichia pastoris* 具有可利用甲醇作为碳源和能源等独特的优势, 被认为是分泌表达或非分泌表达外源基因的一种优秀工程菌。

Jagadish 等用不同载体在酵母中表达了 IBDV 的大片段, 结果表明, 以非

融合蛋白形式表达的多聚蛋白经翻译后或翻译过程中的加工，可产生正确的 VP3，但检测不到 VP2。但以融合蛋白形式表达的蛋白前体可产生稳定的 VP2 和 VP3，说明在表达的多聚蛋白的 N 末端需要有部分酵母蛋白序列的保护，否则可能会被蛋白酶水解。Macreadie 等用酵母表达了 IBDV 大片段。用转化的酵母裂解液 100-200 μ L（相当于 50 μ g VP2）与弗氏不完全佐剂乳化后注射 SPF 鸡，可刺激产生很高的 ELISA 抗体和中和抗体。用 1mL 免疫鸡的血清腹腔注射 1 日龄雏鸡，第二天用 100CID₅₀ 的 IBDV 攻毒，三天后检测法氏囊含毒量。结果表明，免疫鸡血清可对雏鸡提供很好的保护。Fahey 等用酵母表达了 IBDV VP2，制成油佐剂苗后免疫 10 周龄 SPF 鸡。免疫 2 周后可检测到抗体，然后持续上升，免疫后 6 周 ELISA 抗体滴度达高峰，中和抗体效价 8 周后达到高峰。

研究表明，用酵母表达的 IBDV VP2 免疫，其效果与传统疫苗一样。比起用 SPF 鸡法氏囊或细胞培养物制备的传统 IBD 疫苗，酵母菌的培养简单、方便，所需培养基价格也较低，表达产物经过粗提即可应用。因此，用酵母表达生产的 IBD 亚单位苗将具有更好的应用前景。

原有的 IBDV VP2 基因在酵母中的表达效率不高，需要对其进行分子改造和修饰，以提高其在酵母细胞中的表达效率，进一步用所得到的重组 VP2 蛋白制成抗鸡传染性法氏囊病蛋白亚单位疫苗。

发明内容

本发明首先所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，将鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 进行分子改造和修饰，提供一种适合在酵母细胞中高效表达的鸡传染性法氏囊病病毒人工 VP2 cDNA。

本发明首先所要解决的技术问题是通过以下技术途径来实现的：

一种适合在酵母细胞中高效表达的鸡传染性法氏囊病病毒人工 VP2 cDNA，其具有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。

本发明在不改变原有鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 所编码的氨基酸序列的前提下，按照毕赤酵母密码子的选择偏向对鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 密码子进行优化，规避了一些可能降低表达的序列，得到了一种新的适

合在酵母细胞中高效表达的鸡传染性法氏囊病病毒人工 VP2 cDNA 序列。

本发明所要解决第二个技术问题是提供一种含有 SEQ ID NO.1 所示核苷酸序列的重组酵母表达载体及含有该重组酵母表达载体的细胞系。

本发明所要解决第二个技术问题是以下技术途径来实现的：

一种重组酵母表达载体，含有 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列。

本发明的重组酵母表达载体可通过本领域的常规方法构建而成，即将将 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列插入到酵母表达载体合适的限制性酶切位点之间，使 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列可操作的与酵母细胞表达调控序列相连接。作为本发明的一个最优选的实施方案，优选为将 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列插入到酵母表达载体 pPICZαC 的 *Xho*II 和 *Xba*I 限制性酶切位点之间，使该核苷酸序列位于 *AOX1* 启动子的下游并受其调控，得到重组酵母表达载体。

本发明所构建的重组酵母表达载体可通过常规的方法转化宿主细胞，所述的宿主细胞可为毕赤酵母细胞（*Pichia pastoris*）、啤酒酵母细胞（*Saccharomyces cerevisiae*）或乳酸酵母细胞（*Hansenula polymorpha*）。作为本发明的一个最优选的实施方案，优选为将重组酵母表达载体采用电转化的方法转化 SMD1168 毕赤酵母株（SMD1168 *Pichia* strain）。

本发明所要解决第三个技术问题是提供一种鸡传染性法氏囊病病毒重组 VP2 蛋白，该重组蛋白具有鸡传染性法氏囊病病毒天然蛋白的生物学活性和免疫原性。

本发明所要解决第三个技术问题是以下技术途径来实现的：

一种鸡传染性法氏囊病病毒重组 VP2 蛋白，该重组 VP2 蛋白主要由 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列所编码。

本发明所要解决的第四个技术问题是提供一种制备鸡传染性法氏囊病病毒重组 VP2 蛋白的方法。

本发明所要解决的第四个技术问题是以下技术途径来实现的：

一种制备鸡传染性法氏囊病病毒重组 VP2 蛋白的方法，包括以下步骤：

培养用本发明重组酵母表达载体所转化的酵母细胞，诱导重组 VP2 蛋白的表达，回收并纯化所表达的重组 VP2 蛋白。

上述制备重组 VP2 蛋白的方法中, 优选的, 所述的酵母细胞是 SMD1168 毕赤酵母株 (SMD1168 *Pichia* strain)。

本发明所要解决的再一个技术问题是提供一种蛋白亚单位基因工程疫苗, 该基因工程亚单位疫苗可有效的防治鸡传染性法氏囊病。

本发明所要解决的再一个技术问题是以下技术途径来实现的:

一种抗鸡传染性法氏囊病的蛋白亚单位基因工程疫苗, 该疫苗含有免疫上有效剂量的本发明的重组 VP2 蛋白。

本发明重组 VP2 蛋白可按照本领域常规的方法制备成蛋白亚单位基因工程疫苗。例如, 可参照下述方法来制备: 以磷酸盐缓冲液 (PBS, PH7.4, 0.01M, pH7.4, PBS 的具体配制方法: NaCl 8g; KCl 0.2g; Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g; KH₂PO₄ 0.5g, 加水溶解后定容至 1 升) 将重组 VP2 蛋白溶液稀释为 400μg/mL, 然后将重组蛋白溶液与白油司盘佐剂按 1:1 混合放入胶体磨匀质机中, 使其乳化。亚单位疫苗的分装量为 250ml/瓶和 500ml/瓶两种, 分装后的疫苗放 4~8⁰C 保存。

为了达到更好的免疫效果, 本发明蛋白亚单位基因工程疫苗还可含有药理学上可接受的载体或赋型剂等。

一个本发明优选的技术方案的整体描述:

应用 RT-PCR 技术扩增自行分离的国内鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株基因组 A 片段, 基因测序后, 应用软件 DNASTAR 根据毕赤酵母密码子偏嗜表将 IBDV VP2 基因编码进行分子改造和修饰, 得到适应在毕赤酵母细胞中表达的新的基因序列, 将新的基因序列人工合成后, 将其克隆入 T 载体, 然后亚克隆入酵母表达载体。以电转化方法转化酵母感受态细胞, 抗生素筛选, PCR 鉴定, 得到重组酵母菌株。对重组酵母菌株进行小规模诱导表达, 筛选得到稳定表达的高表达菌株, 并将其驯化为工程菌株。对工程菌进行大规模诱导, 表达量达到 0.4g/L 的水平。经琼脂扩散试验 (AIDT)、SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及 Western blot 检测证明表达的重组蛋白具有鸡传染性法氏囊病病毒天然蛋白的生物学活性和免疫原性。

本发明的鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 能够在酵母细胞中高效表达 (表达量达到 0.4g/L 的水平), 所表达的重组蛋白具有鸡传染性法氏囊病病毒天然蛋白的生物学活性和免疫原性, 将所表达的重组蛋白制成亚单位疫苗,

免疫鸡实验结果表明：该鸡传染性法氏囊病亚单位疫苗能有效诱导机体产生特异性的体液免疫应答，使免疫鸡获得 90%的抵抗高致病力 vvIBDV 致死性攻击的保护，并可有效阻止病毒在体内的增殖，实验结果说明，本发明蛋白亚单位基因工程疫苗能够有效防治鸡传染性法氏囊病。

用酵母表达的重组 VP2 蛋白免疫，其效果与传统疫苗一样。比起用 SPF 鸡法氏囊或细胞培养物制备的传统 IBD 疫苗，酵母菌的培养简单、方便，所需培养基价格也较低，表达产物经过粗提即可应用。因此，本发明蛋白亚单位疫苗与现有的疫苗相比将具有更好的应用前景。

蛋白亚单位基因工程疫苗是去除遗传物质但又保留病毒抗原性的安全疫苗，不存在散毒的危险。本发明亚单位疫苗将为防制当前流行的鸡传染性法氏囊病提供有效的工具和手段，并可为防制禽类免疫抑制病提供有效的参考和经验，投入应用后既能有效的防止疫病造成的损失，同时也降低了养殖成本，具有重要的科学意义和应用价值，并能带来更好的经济效益和社会效益。

本发明蛋白亚单位基因工程疫苗的用法与用量：

用法：经由肌肉注射。

用量：雏鸡 0.3mL/羽，成年鸡 0.5mL/羽

附图说明

图 1 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 基因与载体构建图谱。

图 2 IBDV A 片段的 RT-PCR 结果。

M、DNA 分子量标准 DL15000+DL2000(TaKaRa 公司)；1、IBDV OF243 基因 3.1Kb；2、超纯水为模板 PCR 对照。

图 3 重组毕赤酵母表达载体 PCR 鉴定结果。

1、2、IBDV VP2 基因 1.3Kb；M、1Kb DNA 分子量标准 (MBI 公司)。

图 4 酵母重组子鉴定结果。

1-6、为 Mut⁺表型重组酵母株；M、1Kb DNA 分子量标准 (NEB 公司)。

图 5 重组酵母株诱导蛋白 Western blot 结果。

1、pPICZ α C/SMD1168 空载体重组酵母菌对照；1-7 不同株 pPICZ α VP2/SMD1168 重组酵母菌分泌蛋白；M、蛋白分子量标准。

以下通过实施例来进一步描述本发明的制备方法及其有益效果，应该理解的是，这些实施例仅用于例证的目的，决不限本发明的保护范围。

具体实施方式

材料和试剂

1 病毒 鸡传染性法氏囊病病毒超强毒 Gx 株由本发明人实验室分离。

2 菌种和载体 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 由本实验室制作。毕赤酵母菌种 SMD1168 和载体 pPICZ α C 购自美国 Invitrogen 公司，pMD18-T 购自大连 TaKaRa 生物公司。

3 试验试剂 反转录酶 superscriptTM II 购自 Invitrogen 公司，Expand High Fidelity PCR System 购自德国 Roche 公司，其他试剂为分析纯。琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司。

[实施例 1] 重组鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 cDNA 的合成与克隆

1 病毒 RNA 的提取 将感染鸡传染性法氏囊病病毒超强毒 Gx (vvIBDV-Gx)株的 SPF 鸡法氏囊用研磨器研磨。取 200 μ l 病料补加 TE(PH8.0)至 500 μ l，加入 5 μ l 蛋白酶 K 和 10%SDS 50 μ l，56 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时。加入等体积酚/氯仿抽提 3 次，等体积氯仿抽提一次。移出上清至另一 1.5ml 离心管，加入 1/10 体积 NaAc(3M,PH5.2)、等体积异丙醇，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 2 小时。4 $^{\circ}$ C、12000 转/分、离心 15 分钟，用 75%乙醇洗一次。真空干燥，将 RNA 用无 RNA 酶去离子水重新溶解。

2 基因组 A 片段 RF243 基因的获得 对提取的病毒 RNA 进行 RT-PCR，应用随机引物进行 RT 反应，反应体系为 20 μ l，按照 superscriptTM II 反转录试剂说明进行操作。设计特异性扩增 RF243 PCR 引物，引物序列为：Paf:5`-gcggaattcgatgacgaacctgcaagatcaaac-3`，Par:5`-ccgaattccaaggtcctcatcagagacc-3`，以 RT 产物为模板，加 10 μ l 入 PCR 反应体系中，PCR 反应体系为 100 μ l，其他溶液按照 Expand High Fidelity PCR System 说明书添加，反应条件如下：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min，循环参数为 94 $^{\circ}$ C 10sec、55 $^{\circ}$ C 20sec、72 $^{\circ}$ C 3min，循环 30 次，72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

经过 RT-PCR 扩增 IBV-Gx 株病毒 RNA 得到长度为 3.1Kb (SEQ ID NO:

3) 的片段(图 2)。该片段包含 IBV A 片段基因完整的大开放阅读框, 基因测序结果及其推导出的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4)。

应用华舜琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物, 按照说明书操作。PCR 产物与 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌感受态细胞。碱裂解法提取质粒, 用 PCR 进行鉴定, PCR 鉴定引物及条件同上, 鉴定正确重组质粒送交大连 TaKaRa 生物公司测序。

3、VP2 基因的优化改造及合成 将毕赤酵母密码子偏嗜表输入 DNASTAR 软件 Editseq 中, 以步骤 2 中测得序列为原型, 以软件进行分子改造和修饰, 获得的新基因序列 (SEQ ID NO: 1) 进行人工合成。

4、优化后 VP2 基因的扩增 以优化基因序列为模板设计特异性扩增 VP2 基因引物, 在引物两端引入 Xho I 和 Xba I 酶切位点。引物序列为: Pvp2f:5'-gcgctcgagaagagagaggctgaagcaatgactaacttgc-3', Pvp2r:5'-gcctctagaagcaccagcgatcttcaatgg-3', 以人工合成的基因为模板进行 PCR 扩增, 反应体系 100 μ l, 模板 2 μ l, 其它溶液按照 Expand High Fidelity PCR System 说明书添加, 反应条件如下: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 3min, 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 10sec、55 $^{\circ}$ C 20sec、72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

[实施例 2] 重组酵母载体的构建及鉴定

1、重组酵母载体的构建 将优化 VP2 基因和酵母载体分别用 Xho I 和 Xba I 酶切, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。载体用 CIAP 去磷酸化。外源片段及载体用 T₄DNA 连接酶进行连接反应。构建图谱见图 1。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。

2、重组质粒的提取及鉴定 将相应抗生素按作用浓度加入低盐 LB 中(筛选 pPICZ α VP2 质粒抗生素选择 ZeocinTM), 挑取单菌落接种 LB。碱裂解法提取质粒。用 PCR 方法进行鉴定, PCR 鉴定引物及条件同实施例 1, PCR 扩增出 1.3Kb 条带(图 3), 将鉴定正确质粒送交大连 TaKaRa 生物公司测序, 测序结果表明扩增的基因符合合成基因测序的结果, 基因插入正确, 与载体读码框相符。

[实施例 3] 重组酵母载体的转化、重组酵母菌株的检测和筛选

1、转化酵母感受态细胞 将重组酵母载体用 Sac I 酶切线性化, 转化酵

母感受态细胞,按照 Invitrogen 公司毕赤酵母电转化指导方法进行。将转化后酵母菌涂布含有抗生素的 YPDS 平板(筛选 pPICZ α VP2 转化的重组酵母菌抗生素选择 ZeocinTM)。

2、酵母重组子的筛选和鉴定 挑取 10 个酵母单菌落,接种 5ml 含有抗生素的 YPD,过夜培养,离心,弃去培养液,用 5ml 灭菌去离子水洗一次。应用蛋白酶 K、SDS 过夜消化酵母菌,离心,将上清液转至另一 1.5ml 离心管,酚、氯仿抽提 3 次,无水乙醇沉淀。应用 AOX1 5'及 3'引物进行 PCR,PCR 条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C3min,循环参数为 94 $^{\circ}$ C1min、55 $^{\circ}$ C1min、72 $^{\circ}$ C1min,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

应用蛋白酶 K-SDS 消化酵母菌,提取酵母 DNA,用 AOX1 5'及 3'引物进行 PCR,当外源基因片段整合进入酵母基因组,则 PCR 产物中应当有一条比外源基因片段长 593bp 左右的 DNA 片段,否则只有一条约 2.2Kb 左右的 AOX 基因片段。当外源片段与酵母基因组整合正确时酵母表型为 Mut⁺,这时 PCR 产物中会出现外源基因片段+593bp 及 2.2Kb 两条 DNA 片段,整合不正确时酵母表型为 Mut^s,这时 PCR 产物中只有外源基因片段+593bp DNA 片段,见图 4,通过筛选,获得 545 株重组酵母。

3、酵母重组子的小规模诱导表达 将 PCR 鉴定表型为 Mut⁺重组酵母菌株接种 25ml BMGY,30 $^{\circ}$ C 摇瓶培养(RPM300),培养菌密度至 OD₆₀₀ 为 8 时离心(3000g,5min),用 5ml BMMY 重新悬浮酵母细胞,继续 30 $^{\circ}$ C 摇瓶培养(RPM300)。每 24 小时补加无水甲醇至 1%浓度,吸取菌液 100 μ l,离心,将上清移入另一 1.5ml 离心管中,冻存于-70 $^{\circ}$ C 冰箱。接入 BMMY 后 120 小时收取全部菌液,离心,将上清移入另一灭菌容器,冻存于-70 $^{\circ}$ C 冰箱。

4、表达蛋白的鉴定 挑取不同株酵母诱导表达,将小规模诱导收获的样品取 50 μ l,加入 2 倍 SDS 上样缓冲液 50 μ l,煮沸 10 分钟,进行 SDS-PAGE 电泳、Western blot(参照《分子克隆》第二版)测定表达量,阳性重组酵母菌株分泌蛋白可以和抗 IBDV 单克隆抗体反应见图 5,同一株酵母不同时间表达蛋白从 24 小时起能够得到肉眼量,随着时间延长,72 小时蛋白浓度最大。不同株酵母相同时间表达蛋白的表达量是不同的,凭借 SDS-PAGE 筛选到表达量高的菌株优化为工程菌株,表达量达到 400mg/L。Western-blot 结果证明表

达蛋白能够和特异性抗体发生免疫反应。

试验例 1 本发明重组蛋白免疫原性的测定

将实施例 2 所制备的重组蛋白与油佐剂 1:1 乳化,按乳化后的蛋白含量分 3 个剂量: 100 μ g/ml、200 μ g/ml、1000 μ g/ml。取 4 周龄 SPF 鸡 50 只,分 5 组,每组 10 只。1、2、3 组为本发明重组蛋白免疫组:1 组免疫剂量为 50 μ g /0.5ml/只,2 组免疫剂量为 100 μ g /0.5ml/只,3 组免疫剂量为 500 μ g /0.5ml/只;4 组为常规灭活疫苗(鸡传染性法氏囊病灭活疫苗,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所维科生物技术开发公司)免疫组,免疫剂量为 0.5ml/只;免疫途径均为胸肌注射法;5 组为无免疫对照组。各组免疫后每 7 天采血,检测琼扩抗体,并于免疫后 14 天各组取 5 只攻毒,各组余下的 5 只于免疫后 28 天时攻毒。攻毒后观察 7 天,记录死亡数,计算保护率。试验在负压隔离器(澳大利亚进口)中进行。

免疫 14 天后攻毒,攻毒后 7 天,常规灭活苗免疫组存活率为 100%,本发明亚单位疫苗免疫组存活率为 80%以上,未免疫攻毒对照组存活率为 20%。免疫 28 天后攻毒,攻毒后 7 天,常规灭活疫苗组存活率为 100%,本发明亚单位疫苗免疫组存活率为 100%,未免疫攻毒对照组存活率为 20%。攻毒结果表明,用本发明 IBDV 重组 VP2 蛋白免疫 SPF 鸡,可以产生抵抗超强毒 IBDV 致死攻击的免疫保护力。

试验例 2 本发明抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗毒理学试验

为了考察试验鸡对本发明抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗免疫接种后的毒理学反应,本试验采用大剂量接种的方法分析了本发明基因工程亚单位疫苗接种后疫苗与机体之间的相互关系。

具体试验如下:

将实施例 2 所制备的重组蛋白与油佐剂按 1:1 比例乳化,对 7 日龄、14 日龄和 60 日龄的试验鸡进行胸肌注射,每只鸡接种 1ml(相当于 2 个免疫剂量),接种后观察鸡群的精神状态以及局部的反应情况。

结果,所有试验鸡的注射局部均出现结节,注射后第 7 天周围组织形成肉牙肿,未吸收部分形成包囊。所有试验鸡均无其他全身反应,精神食欲不受影响,发育正常。试验表明,即使用 2 倍疫苗免疫剂量注射试验鸡,也不

会引起试验鸡严重的临床反应，试验结果说明，本发明蛋白亚单位疫苗是安全的，既可用于 5 周龄以上的鸡的免疫，又可用于 2 周龄雏鸡的免疫，甚至可以对 1 周龄的鸡实施免疫接种。

表 1 本发明疫苗的安全性试验结果

疫苗种类	日龄	鸡数	鸡体反应
本发明疫苗	7	40	无任何全身反应，精神、食欲正常
	14	20	无任何全身反应，精神、食欲正常
	50	20	无任何全身反应，精神、食欲正常

试验例 3 本发明抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗环境释放安全性评价

2004 年 6 月至 2004 年 12 月，在黑龙江哈尔滨市（原太平区）民主乡哈尔滨兽医研究所试验动物饲养场对本发明抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗进行了环境释放，总的试验规模为 5000 羽份。

具体试验方法及结果如下：

1 鸡传染性法氏囊病病毒基因蛋白在鸡体内的抗体消长

以 50 μ g 本发明重组蛋白免疫试验鸡，疫苗接种后的 6 个月内随机从免疫鸡群抽取鸡 40 只，并从同批的非免疫鸡取去同样大小的样本作为试验对照，采集血样，用 AG 试验检测鸡群血清抗体的产生情况，血清学监测结果表明，免疫后 1 周开始出现抗体反应，效价达到 $3.12 \pm 0.45 \log_2$ ，免疫后 8 周达到高峰效价为 $5.31 \pm 0.36 \log_2$ 。以后每月抗体效价逐渐消减，到 150 天抗体效价仍能达到 $4.07 \pm 0.21 \log_2$ ，180 天抗体效价能达到 $3.38 \pm 0.67 \log_2$ 。疫苗接种后的 6 个月每 30 天，随机从免疫鸡群抽取鸡 10 只，并从同批的非免疫鸡群取同样大小的样本作为试验对照，用鸡传染性法氏囊病病毒 vvIBVDV-GX 株超强毒攻击，鸡群接种亚单位疫苗之后免疫保护作用出现于免疫后的 10 天。免疫后 150 天仍能使免疫鸡群 80% 的免疫鸡获得超强毒攻击后的保护。免疫后不同时间抗体效价及鸡群对强毒攻击的保护结果（见表 2）。

表 2 本发明疫苗免疫持续期试验结果

免疫时间	分 组	AG 抗体效价	超强毒攻击保护率 (vvIBDV-Gx 株)
免疫前	免疫组	0	-
	对照组	0	-
7 天	免疫组	3.12±0.45log ₂	-
	对照组	0	-
14 天	免疫组	4.08±0.22log ₂	-
	对照组	0	-
21 天	免疫组	4.83±0.61log ₂	-
	对照组	0	-
30 天	免疫组	-	9/10
	对照组	-	0/10
35 天	免疫组	5.17±0.15log ₂	-
	对照组	0	-
48 天	免疫组	5.31±0.36log ₂	-
	对照组	0	-
60 天	免疫组	5.10±0.63log ₂	10/10
	对照组	0	0/10
90 天	免疫组	4.86±0.51log ₂	10/10
	对照组	0	0/10
120 天	免疫组	4.55±0.23log ₂	9/10
	对照组	0	1/10
150 天	免疫组	4.07±0.21log ₂	8/10
	对照组	0	0/10
180 天	免疫组	3.38±0.67log ₂	7/10
	对照组	0	0/10

2 细胞传代对重组毕赤酵母菌株稳定性的影响

将本发明重组酵母菌株连续传代到 20 次，取第 5、10、15、20 代菌株进行诱导表达，蛋白表达量没有差异，将表达蛋白用磷酸盐缓冲液 (PBS,PH7.4) 稀释到 200 μ g/mL,然后将重组蛋白溶液与白油司盘佐剂按 1:1 混合放入胶体磨匀质机中，使其乳化，以制备的亚单位疫苗免疫试验鸡，以 50 μ g /0.5ml/羽经胸肌注射接种途径。免疫后 28 天攻击鸡传染性法氏囊病病毒 vvIBDV-GX 株超强毒，各代次酵母表达蛋白制备疫苗均可达到 95%以上的保护率，保护试验表明，不同代次重组酵母菌株诱导表达蛋白制成的亚单位疫苗对免疫鸡的保护效果没有发生改变，都可以使免疫鸡抵抗鸡传染性法氏囊病病毒 vvIBVDV-GX 株超强毒的攻击，证明插入的外源基因能在酵母的长期传代过

程中稳定地遗传并表达出重组 VP2 蛋白，表达蛋白能刺激机体产生针对鸡传染性法氏囊病病毒的免疫反应，鸡群使用重组疫苗不会有免疫失败的安全隐患（见表 3）。

表 3 不同代次重组酵母菌株表达蛋白对鸡的保护效果

组 别	强毒攻毒后保护率 (vvIBDV-Gx 株)
第 5 代酵母表达蛋白	20/20
第 10 代酵母表达蛋白	19/20
第 15 代酵母表达蛋白	20/20
第 20 代酵母表达蛋白	19/20
非免疫对照	0/20

3 表达抗鸡传染性法氏囊病亚单位疫苗重组酵母菌株对环境的转移情况

试验结束后的 1、2、3、4、8、12 周，采集试验鸡场的饲料、饮水、尘土、粪便和笼具的擦拭物，保存于 50%甘油缓冲盐水中，玻璃研磨器研磨后制成 1:2 稀释的匀浆液，接种含有 Zeocin™ 抗生素的 YPD 培养液中，摇动培养过夜，对培养液离心，用北京天为时代公司酵母基因组提取试剂盒提取酵母 DNA，用 PCR 方法进行跟踪检测。PCR 使用引物：pu5'-tactattgccagcattgctgc-3，pr5'-ggggacccgcgaacggat-3'。条件 94℃/3 分钟；94℃/30 秒，56℃/30 秒，72℃/3 分 30 秒，30 个循环；最后 72℃延伸 10 分钟。PCR 检测结果（表 4）表明，试验结束后不能分离到重组酵母，说明本发明重组酵母菌在环境中没有残留。

表 4 试验结束后重组酵母菌株在环境中的残留

检测方法	试验结束后周数					
	1	2	3	4	8	12
样 品						
PCR 检测	—	—	—	—	—	—
PCR 检测	—	—	—	—	—	—
PCR 检测	—	—	—	—	—	—
PCR 检测	—	—	—	—	—	—
PCR 检测	—	—	—	—	—	—

试验证明，本发明抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗对鸡群是安全的，而且免疫接种鸡免疫后不出现不良反应；试验鸡免疫后，迅速产生抗

体，使机体能够抵抗鸡传染性法氏囊病病毒野毒的侵袭；试验结束后，环境中没有转基因微生物的残留。

综上所述，本发明抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗免疫后可以刺激机体产生高滴度的抗体，抗体持续期长达 6 个月以上，使免疫鸡获得对鸡传染性法氏囊病病毒长时间的保护，保护率为 95%以上，免疫期可达 3 个月。表达鸡传染性法氏囊病病毒蛋白的重组酵母菌株可以稳定表达病毒蛋白，其表达的蛋白免疫原性各代次间没有差异。试验结束后环境中检测不出重组酵母菌的存在，证明本测试对象本身对鸡群非常安全、可靠，不会对环境造成危害。因此，用酵母表达的抗鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗是一种安全性极高的疫苗。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
 <120> 鸡传染性法氏囊病病毒VP2 cDNA、其表达载体、所表达的重组蛋白及应用
 <130> 12
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223>
 <400> 1
 atgactaact tgcaagacca aactcaacaa atcgttccat tcatcagatc cttgttgatg 60
 ccaactactg gtccagcttc catcccagac gacactttgg agaagcacac ttgagatcc 120
 gagacttcca cttacaactt gactgttggg gacacttggt ccggtttgat cgttttcttc 180
 ccaggtttcc caggttccat cgttgggtct cactacactt tgcaatccaa cggttaactac 240
 aagttcgacc aatgttgtt gactgctcaa aacttgccag cttcctacaa ctactgtaga 300
 ttggtttcca gatccttgac tttgatagcc tccactttgc cagggttggg ttacgctttg 360
 aacggtaact tcaacgctgt tactttccaa ggttccttgt ccgagttgac tgacgtttcc 420
 tacaacgggt tgatgtccgc tactgctaac atcaacgaca agatcggtaa cgttttgggt 480
 ggtgagggtg ttactgtttt gtccttgcca acttcctacg acttggggtta cgtagattg 540
 ggtgacccaa tcccagctat cggtttgac ccaaagatgg ttgctacttg tgactcctcc 600
 gacagaccaa gagttlacac taccactgct gctgacgact accaattctc ctccaatac 660
 caagctgggt gtgttactat cactttgttc tccgctaaca tcgacgctat cacttccttg 720
 tccatcgggt gtgagttggt tttccaaact tccgttcaag gttgatctt gggtgctact 780
 atctacttga tcggtttcga cggtagctct gttatcacta gagctgttgc tgctgacaac 840
 ggtttgactg ctggtactga caacttgatg ccattcaaca tcggtatccc aactccgag 900
 atcactcaac caatcacttc catcaagttg gagatcgta cttccaagtc cgggtggtcaa 960
 gctggtgacc aatgtcctg gtccgcttcc gggtccttgg ctgttactat ccacgggtgt 1020
 aactaccag gtgctttgag accagttact ttgggtgctt acgagagagt tgctactggt 1080
 tccgttggtta ctgttgctgg tgtttccaac ttcgagttga tcccaaacc agagttggt 1140
 aagaacttgg ttactgagta cggtagattc gaccaggtg ctatgaacta cactaagttg 1200
 atcttgcagg agagagacag attgggtatc aagactgttt ggccaactag agagtacact 1260
 gacttcagag agtacttcat ggagggtgct gacttgaact cccattgaa gatcgtggt 1320
 gct 1323
 <210> 2
 <211> 3039
 <212> DNA
 <213> chicken infectious busal disease viru
 <400> 2
 atgacgaacc tgcaagatca aacccaacag attgttccgt tcatcggag ctttctgatg 60

ccaacaaccg gaccggcgtc cattccggac gacaccctag agaagcacac tctcaggtca 120
 gagacctcga cctacaattt gactgtgggg gacacagggc cagggctaata tgtctttttc 180
 cctggtttcc ctggcicaat tgtgggtgct cactacacac tgcagagcaa tgggaactac 240
 aagttcgtc agatgctcct gacggcccag aacctaccgg ccagctacaa ctactgcagg 300
 ctagtgagtc ggagtcttac agtgaggcca agcacactcc ctgggtggcg ttatgcacta 360
 aatggcacca taaacgccgt gaccttccaa ggaagcctga gtgaactgac agatgttagc 420
 tacaatgggt tgatgtctgc aacagccaac atcaacgaca aaatcgggaa cgtcctagta 480
 ggggaagggg taacctcct cagcttacc acatcatatg atcttgggta tgtgagactc 540
 ggtgaccca tccccgtat agggctcgac ccaaaaatgg tagcaacatg tgacagcagt 600
 gacaggccca gagtctacac cataactgca gccgatgatt accaattctc atcacagtac 660
 caagcaggtg gggtacaat cacactgttc tcagctaata tcgatccat cacaagtctc 720
 agcatcgggg gagaactcgt gtttcaaaca agcgtccaag gccttatact ggggtctacc 780
 atctacctta taggtttga tgggactcgc gtaatcacca gagctgtggc cgcagacaat 840
 gggctaaccg ccggcactga caaccttat ccattcaata ttgtattcc aaccagcgag 900
 ataaccagc caatcacatc catcaaacg gagatagtaa cctccaaaag tgggtgtcag 960
 gcgggggacc agatgcatg gtcagcaagt gggagcctag cagtacgat ccacggtggc 1020
 aactatccag gggccctccg tcccgtcaca ctagtagcct acgaaagagt ggcaacagga 1080
 tctgtcgta cggtcgccgg ggtgagcaac ttcgagctga tcccaaatcc tgaactagca 1140
 aagaacctgg tcacagaata cggccgattt gaccaggag ccatgaacta cacaaaattg 1200
 atactgagtg agaggaccg tcttggcacc aagaccgtat ggccaacaag ggagtacact 1260
 gactttcgcg agtacttcat ggaggtggcc gacctcaact ctcccctgaa gattgcagga 1320
 gcatttggct tcaagacat aatccgggcc ctaaggagga tagctgtgcc ggtggatctt 1380
 acattgttcc cccccccg tcccctagcc catgcaattg gggaaggtgt agactacctg 1440
 ctggcgatg aggcacaggc tgcttcagga actgctcgag ccgctcagg aaaagcaaga 1500
 gctgcctcag gccgcataag gcagctaact ctgcgcccg acaaggggta cgaggtagtc 1560
 gcgaatctgt tcagggtgcc ccagaatcct gtagtcgacg ggattctcgc ticacctggg 1620
 atactccgcg gtgcacaca cctcgaactg gtgttgagag aggggtccac gctattccct 1680
 gtggtcatca cgacagtga agatgccatg acacccaaag cactgaacag caaatgttt 1740
 gctgtcattg aaggcgtgag agaagatctc caacctccat ctcaaagagg atccttcata 1800
 cgaactctct ccggacatag agtctatgga tatgctccag atggggtact tccactggag 1860
 actgggagag attacaccgt ggtccaata gatgatgtct gggacgacag cattatgctg 1920
 tccaaagacc catacctcc tatttgggga aacagtggaa acctagccat agcttacatg 1980
 gatgtgtttc gaccxaaagt ccccatccat gtggccatga cgggagccct caacgcctat 2040
 ggcgagattg agaacgtgag cttitagaagc accaagctcg ccaactgcaca ccgacttggc 2100
 ctcaagttgg ctggctccgg tgcatttgc gtgaacaccg ggtccaactg ggcgacgttt 2160
 atcaaactgt ttctcaca tccacgcgac tgggacaggc tcccttacct caaccttcca 2220
 taccttccac ccaatgcagg acgcccagc gacctggcta tggccgcttc agagttcaaa 2280

gaaacccccg aactcgagag cgccgtcaga gccatggaag cagcagccaa cgtggaccca 2340
 ctgttccatt ctgcgctcag tgtgttcag tggctggaag aaaatgggat tgtgaccgac 2400
 atggccaact tcgactcag cgaccgaac gcccatcgga tgcgcaattt tctcgaaac 2460
 gcaccacaag caggcagcaa gtcgcaaaga gccaaagtac ggacagcagg ctacggagtg 2520
 gaggccccgg gccccactcc agaggaagca cagagggaaa aagacacacg gatctcaaag 2580
 aagatggaga ctatgggcat ctactttgca acaccagaat gggtagcact caatgggcac 2640
 cgggggccaa gccccggcca gctgaagtac tggcagaaca cagagaaaat acctgatcca 2700
 aacgaggact acctagacta cgtgcatgca gagaagagcc ggttggcatc agaagaacaa 2760
 atcctaaggg cagctacgct gatctacggg gctccaggac aggcagagcc accccaagcc 2820
 ttcatagacg aagtcgcaa agtctatgaa atcaacatg ggcgtggccc caaccaagaa 2880
 cagatgaaag atctgctctt gactgcatg gagatgaagc atcgcaatcc caggcgggct 2940
 ccaccaaacg ccaagccaaa acccaatggt ccaacacaga gacccctgg tcggctgggc 3000
 cgctggatca gggtgtctc tgatgaggac cttgagtga 3039

<210> 3
 <211> 1012
 <212> PRT
 <213> chicken infectious busal disease virus
 <400> 3

Met Thr Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
20 25 30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
35 40 45

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Ser Asn Gly Asn Tyr
65 70 75 80

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
85 90 95

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
115 120 125

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
145 150 155 160

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly

Pro Ala Ala Pro Leu Ala His Ala Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr Leu
 465 470 475 480
 Leu Gly Asp Glu Ala Gln Ala Ala Ser Gly Thr Ala Arg Ala Ala Ser
 485 490 495
 Gly Lys Ala Arg Ala Ala Ser Gly Arg Ile Arg Gln Leu Thr Leu Ala
 500 505 510
 Ala Asp Lys Gly Tyr Glu Val Val Ala Asn Leu Phe Gln Val Pro Gln
 515 520 525
 Asn Pro Val Val Asp Gly Ile Leu Ala Ser Pro Gly Ile Leu Arg Gly
 530 535 540
 Ala His Asn Leu Asp Cys Val Leu Arg Glu Gly Ala Thr Leu Phe Pro
 545 550 555 560
 Val Val Ile Thr Thr Val Glu Asp Ala Met Thr Pro Lys Ala Leu Asn
 565 570 575
 Ser Lys Met Phe Ala Val Ile Glu Gly Val Arg Glu Asp Leu Gln Pro
 580 585 590
 Pro Ser Gln Arg Gly Ser Phe Ile Arg Thr Leu Ser Gly His Arg Val
 595 600 605
 Tyr Gly Tyr Ala Pro Asp Gly Val Leu Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asp
 610 615 620
 Tyr Thr Val Val Pro Ile Asp Asp Val Trp Asp Asp Ser Ile Met Leu
 625 630 635 640
 Ser Lys Asp Pro Ile Pro Pro Ile Val Gly Asn Ser Gly Asn Leu Ala
 645 650 655
 Ile Ala Tyr Met Asp Val Phe Arg Pro Lys Val Pro Ile His Val Ala
 660 665 670
 Met Thr Gly Ala Leu Asn Ala Tyr Gly Glu Ile Glu Asn Val Ser Phe
 675 680 685
 Arg Ser Thr Lys Leu Ala Thr Ala His Arg Leu Gly Leu Lys Leu Ala
 690 695 700
 Gly Pro Gly Ala Phe Asp Val Asn Thr Gly Ser Asn Trp Ala Thr Phe
 705 710 715 720
 Ile Lys Arg Phe Pro His Asn Pro Arg Asp Trp Asp Arg Leu Pro Tyr
 725 730 735
 Leu Asn Leu Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ala Gly Arg Gln Tyr Asp Leu
 740 745 750
 Ala Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala
 755 760 765

Val Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe His Ser
 770 775 780

Ala Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp
 785 790 795 800

Met Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn
 805 810 815

Phe Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys
 820 825 830

Tyr Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu
 835 840 845

Glu Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr
 850 855 860

Met Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His
 865 870 875 880

Arg Gly Pro Ser Pro Gly Gln Leu Lys Tyr Trp Gln Asn Thr Arg Glu
 885 890 895

Ile Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys
 900 905 910

Ser Arg Leu Ala Ser Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile
 915 920 925

Tyr Gly Ala Pro Gly Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu
 930 935 940

Val Ala Lys Val Tyr Glu Ile Asn His Gly Arg Gly Pro Asn Gln Glu
 945 950 955 960

Gln Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn
 965 970 975

Pro Arg Arg Ala Pro Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Val Pro Thr
 980 985 990

Gln Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Ala Val Ser Asp
 995 1000 1005

Glu Asp Leu Glu
 1010

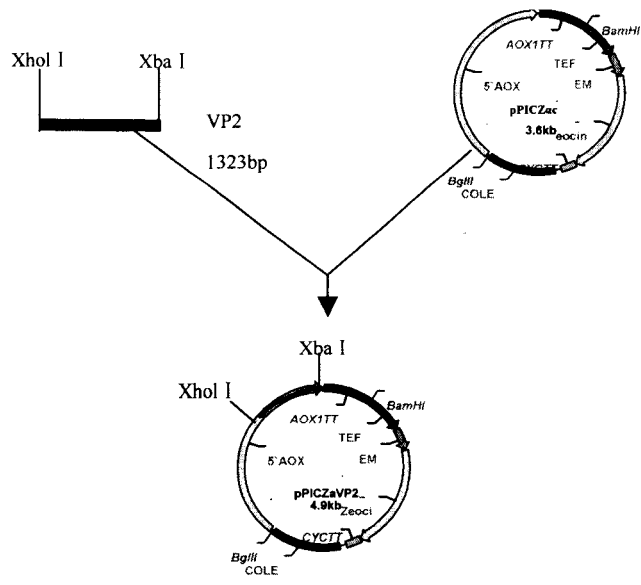


图 1

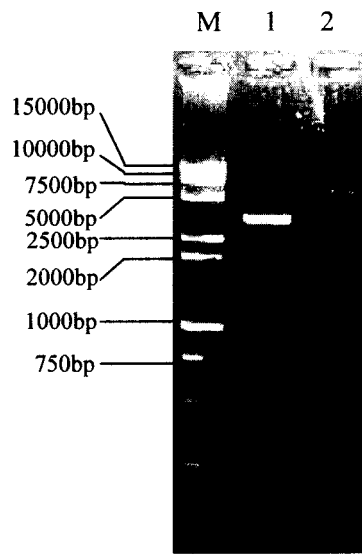


图 2

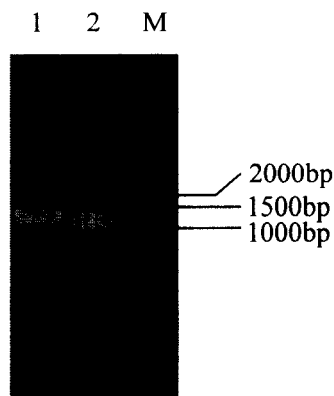


图 3

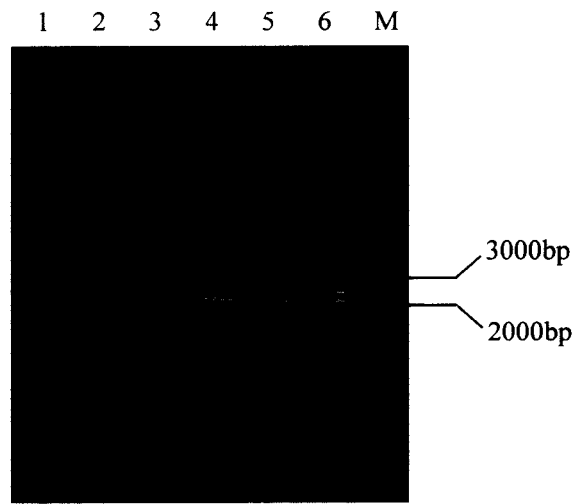


图 4

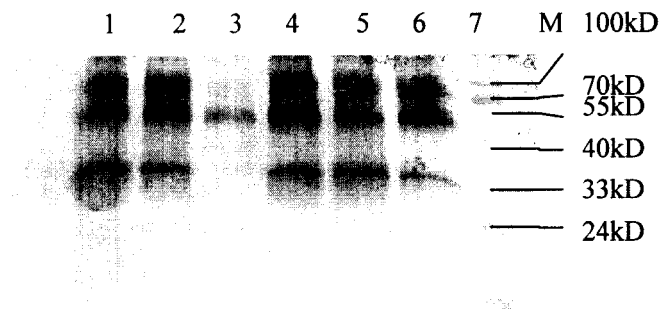


图 5

专利名称(译)	鸡传染性法氏囊病病毒VP2 cDNA、其表达载体、所表达的重组蛋白及应用		
公开(公告)号	CN1990869A	公开(公告)日	2007-07-04
申请号	CN200510135583.X	申请日	2005-12-30
[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	王笑梅 高宏雷 付朝阳 高玉龙		
发明人	王笑梅 高宏雷 付朝阳 高玉龙		
IPC分类号	C12N15/33 C12N15/81 C07K14/005 C12P21/02 C12N1/19 A61K39/12 C12Q1/68 G01N33/53 C12R1/84		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN100475963C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新的鸡传染性法氏囊病病毒VP2 cDNA(SEQ ID NO : 1)、其表达载体的构建、所表达的重组VP2蛋白及该重组蛋白在制备抗鸡传染性法氏囊病蛋白亚单位基因工程疫苗中的应用。本发明鸡传染性法氏囊病病毒VP2 cDNA能够在酵母细胞中高效表达,所表达的重组蛋白具有鸡传染性法氏囊病病毒天然蛋白的生物学活性和免疫原性。将本发明所表达的重组蛋白制成疫苗,免疫鸡实验结果表明:本发明蛋白亚单位疫苗能有效诱导机体产生特异性的体液免疫应答,使免疫鸡获得90%的抵抗高致病力vIBDV致死性攻击的保护,并可有效阻止病毒在体内的增殖。

