



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101932336 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 09

(21) 申请号 200880126037. 1

C12N 15/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 12. 31

C12N 15/09 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/017, 863 2007. 12. 31 US

(56) 对比文件

CN 1458167 A, 2003. 11. 26, 摘要.

CN 1458167 A, 2003. 11. 26, 摘要.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 02

审查员 吴永庆

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/088678 2008. 12. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/088950 EN 2009. 07. 16

(73) 专利权人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡

有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 埃里克·沃恩 梅里尔·谢弗

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

A61K 39/12 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表8页 附图8页

(54) 发明名称

有外来氨基酸插入的 PCV2 ORF2 病毒样颗粒

(57) 摘要

本发明包含涉及氨基酸序列的生成和使用的方法和组合物。具体而言,PCV2 ORF2 显示出作为病毒样颗粒是有用的,在将编码 PCV2 ORF2 的 DNA 插入表达系统时,它生成保留它们的免疫原性或抗原性的氨基酸序列。可以将对于 PCV2 而言外来的 DNA 序列“符合读码框地”附着至 ORF2 DNA,并表达整个序列,包括对于 PCV2 而言外来的 DNA。显示了此类序列保留它们的抗原性及因此它们在免疫原性组合物中的潜在效用。

1. 一种免疫原性组合物,其包含:
来自 PCV2 的氨基酸区段,所述 PCV2 氨基酸区段由 SEQ ID NO. 10 的序列组成;和
在所述 PCV2 氨基酸区段的氨基或羧基端附着至所述 PCV2 氨基酸区段的外来氨基酸区段,所述外来氨基酸区段来自除 PCV2 之外的生物体,其中
-所述附着在所述 PCV2 氨基酸区段的羧基端且所述外来氨基酸区段为 SEQ ID NO. 1 的序列;或
-所述附着在所述 PCV2 氨基酸区段的氨基端且所述外来氨基酸区段为 SEQ ID NO. 6 的序列。
2. 权利要求 1 的组合物,所述外来氨基酸区段与所述 PCV2 氨基酸区段可分开地检测。
3. 权利要求 2 的组合物,所述外来氨基酸区段是通过对所述外来氨基酸区段特异性的测定法可检测的。
4. 权利要求 3 的组合物,所述测定法包含单克隆抗体。
5. 权利要求 1 的组合物,所述组合物在接受其施用的动物中诱导免疫学应答。
6. 权利要求 5 的组合物,所述免疫学应答是对所述外来氨基酸区段特异性的。
7. 权利要求 5 的组合物,所述免疫学应答足以降低感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的发生率或减轻感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的严重性。
8. 权利要求 1 的组合物,所述外来氨基酸区段衍生自选自下组的生物体:微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 和猪流感病毒。
9. 权利要求 8 的组合物,所述外来氨基酸区段由选自下组的序列组成:SEQ ID NO. 1 和 6。
10. 权利要求 8 的组合物,所述组合物降低由微小隐孢子虫、猪流感病毒、及其组合引起的感染的发生率或严重性。
11. 权利要求 1 的组合物,其进一步包含选自下组的成分:佐剂、药学可接受载体、保护剂、稳定剂、及其组合。
12. 一种表达载体,其包含:
载体 DNA;和
自第一生物体物种衍生的 DNA,所述第一生物体物种是 PCV2,所述 DNA 来自 PCV2ORF2;
和
自第二生物体物种衍生的 DNA,其中所述第一和第二物种彼此不同且不同于衍生载体 DNA 的生物体物种,
且其中所述自 PCV2 衍生的 DNA 编码来自 PCV2 的氨基酸区段,所述 PCV2 氨基酸区段由 SEQ ID NO. 10 的序列组成;且
所述自第二生物体物种衍生的 DNA 编码在所述 PCV2 氨基酸区段的氨基或羧基端附着至所述 PCV2 氨基酸区段的外来氨基酸区段,所述外来氨基酸区段来自除 PCV2 之外的生物体,其中
-所述附着在所述 PCV2 氨基酸区段的羧基端且所述外来氨基酸区段为 SEQ ID NO. 1 的序列;或
-所述附着在所述 PCV2 氨基酸区段的氨基端且所述外来氨基酸区段为 SEQ ID NO. 6 的序列。

13. 权利要求 12 的表达载体,所述载体 DNA 来自杆状病毒。
14. 权利要求 12 的表达载体,所述 PCV2ORF2DNA 具有 SEQ ID NO. 7 的序列。
15. 权利要求 12 的表达载体,所述来自第二生物体物种的 DNA 编码在接受其施用的动物中诱导免疫学应答的氨基酸区段。
16. 权利要求 15 的表达载体,所述免疫学应答降低由所述第一生物体物种、所述第二生物体物种、及其组合引起的感染的临床、病理学、或组织病理学病征的发生率或严重性。
17. 权利要求 12 的表达载体,所述来自第二物种的 DNA 选自下组:微小隐孢子虫和猪流感病毒。
18. 一种生成抗原的方法,包括下述步骤:组合编码所述抗原的 DNA 与 PCV2DNA 以生成组合 DNA 插入物;并在表达系统中表达所述组合 DNA 插入物,其中
所述 PCV2DNA 编码来自 PCV2 的氨基酸区段,所述 PCV2 氨基酸区段由 SEQ ID NO. 10 的序列组成;且
所述 DNA 编码在所述 PCV2 氨基酸区段的氨基或羧基端附着至所述 PCV2 氨基酸区段的外来氨基酸区段,所述外来氨基酸区段来自除 PCV2 之外的生物体,其中
-所述附着在所述 PCV2 氨基酸区段的羧基端且所述外来氨基酸区段为 SEQ ID NO. 1 的序列;或
-所述附着在所述 PCV2 氨基酸区段的氨基端且所述外来氨基酸区段为 SEQ ID NO. 6 的序列。
19. 权利要求 18 的方法,所述除 PCV2 之外的生物体物种选自下组:微小隐孢子虫和猪流感病毒。
20. 权利要求 18 的方法,所述 PCV2DNA 具有 SEQ ID NO. 7 的序列。
21. 权利要求 18 的方法,所述表达系统包含杆状病毒表达系统。
22. 通过权利要求 18 的方法表达的抗原在制备疫苗或免疫原性组合物中的用途。

有外来氨基酸插入的 PCV2ORF2 病毒样颗粒

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 12 月 31 日提交的临时申请 61/017,863 的优先权权益,在此通过述及将其教导和内容收入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有计算机可读格式的序列表,通过述及将其教导和内容收入本文。

发明领域

[0005] 本申请关注 2 型猪圆环病毒 (PCV2) 病毒样颗粒作为载体用于表达期望氨基酸序列的用途。更具体的说,本申请关注此类载体用于表达病原体的免疫原性氨基酸序列的用途及后续如此表达的免疫原性氨基酸序列在免疫原性组合物中的用途。还要更具体的说,本申请关注来自 PCV2 的可读框 2 (ORF2) 作为载体用于表达期望氨基酸序列的用途。甚至更具体的说,本申请关注将外来氨基酸序列插入 PCV2 ORF2 及后续在表达系统中表达 ORF2 序列和外来氨基酸序列。还要更具体的说,本申请关注如此表达的序列在免疫原性组合物中的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 猪圆环病毒 2 (PCV2) 可读 ORF2 基因能在昆虫细胞培养物中表达。还已经显示了 PCV2ORF2 蛋白质有可能装配成病毒样颗粒 (VLP)。这些 VLP 本质上是空的 PCV2 壳体,而且是高度免疫原性的。将有关肽区域融合至病毒样颗粒的最早描述可能在 1986 年 (Delpeyroux et al. 1986. A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. Science. Jul 25 ;233 (4762) :472-5 (通过述及将其教导和内容收入本文))。

[0008] 已经显示了针对 CSL 30 聚物 (CSL 30-mer) 的单克隆抗体 (3E2) 在小鼠中经被动免疫疗法提供一些针对隐孢子虫感染的效能。环孢子配体 (CSL) 是 30 个氨基酸 (30 聚物) 的免疫原性蛋白质序列。已经确定了单克隆抗体 3E2 识别来自 CSL 的 N 端 30 个氨基酸内的表位。30 聚物的蛋白质序列为 AINGGGATLPQKLYLTPNVLTAGFAPYIGV (SEQ ID NO. 1)。此 CSL 30 聚物的肽可通过化学合成来生成,然后在疫苗制备中使用以在疫苗接种的动物中诱导抗体应答。通过用与佐剂组合的化学合成的 CSL 肽免疫,有可能生成抗 CSL 30 聚物免疫应答。然而,在商业性疫苗中使用化学合成的 CSL 肽的成本非常高。

[0009] 流感病毒分成三种类型,称作 A、B 和 C。A 和 B 型流感病毒对几乎每个冬天发生的呼吸道疾病流行负有责任,而且常常与住院率和死亡率升高有关。A 型流感病毒基于两种称作血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的病毒蛋白的差异分成亚型。流感病毒基质 1 (也称作 M1) 是装配和出芽所必需的至关重要蛋白质。HA 和 NA 与流感病毒 M1 相互作用;HA 经其胞质尾和跨膜域与 M1 结合。M2 蛋白在流感病毒的复制循环中是至关重要的,而且还是病毒包膜的必需成分,因为它有形成高度选择性的、受 pH 调节的、传导质子的通道的能力。M2 通道容许质子进入病毒的内部,而酸化削弱 M1 蛋白与核糖核酸核心的相互作用。

[0010] 流感病毒 M2 蛋白质是在收到病毒感染的细胞上丰富的四聚体、III 型跨膜蛋白。

M2e 是 A 型流感病毒 M2 蛋白的外部域。人 A 型流感病毒 M2e 序列只有 23-24 个氨基酸长, 而且贯穿众多流行和两次重大范围流行的发生保持几乎不变。值得注意的是, 虽然最近几年出现了多种 A 型猪流感株, 但是 A 型猪流感病毒的 M2e 区也保持相对不变。由于 M2e 区靶序列在 A 型流感病毒株中的保守性质, 认为 M2e 是流感疫苗的“通用”抗原。24 聚物 M2e 靶区序列的一种优选氨基酸序列为 MSLLETVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO. 6) (在本文中称作 M2ae1)。此 A 型流感 M2e 区 24 聚物的肽可通过化学合成来生成, 然后在疫苗制备中使用以在疫苗接种的动物中诱导抗体应答。通过用与佐剂组合的化学合成的 M2e 肽免疫, 有可能生成抗 A 型流感 M2e 24 聚物免疫应答。然而, 在商业性疫苗中使用化学合成的 M2e 肽的成本非常高。

[0011] 尚未提出使用 PCV2 ORF2 的病毒样颗粒特性作为系统或机械来表达氨基酸序列或蛋白质, 更不用说与 PCV2 ORF2 无关的或对于 PCV2 ORF2 而言外来的氨基酸序列或蛋白质。因而, 尚未提出使用 PCV2 ORF2 的病毒样颗粒特性作为载体来生成免疫学有关肽, 包括代表性例子 30 聚物 CSL 肽或 24 聚物 A 型流感 M2e 肽, 及后续在免疫原性组合物或疫苗中使用此类肽。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明证明了有可能使用 PCV2 ORF2 作为病毒样颗粒, 其包括或附着有对于天然 PCV2 ORF2 而言外来的, 但是仍然保留它们的免疫原性或抗原性的区段。具体而言, 本文中提供演示此类用途的例子。在优选的形式中, 对于 PCV2 ORF2 而言外来的核酸序列区段可在 ORF2 序列中附着或整合, 并在表达系统中表达。有利的是, 所表达的氨基酸区段保留它们的免疫学特性或抗原性。在优选的形式中, PCV2 ORF2 和外来氨基酸序列都保留它们的免疫学特性。外来序列可在氨基末端或羧基末端或端或者它们之间的任何位置对 PCV2 ORF2 序列附着或整合。所表达的外来氨基酸序列优选长度为至少 8 个, 而且更优选长度介于 8 个和 200 个氨基酸之间, 由此使得所插入的外来核酸区段长度为至少 24 个核苷酸, 而且更优选介于 24 个和 600 个核苷酸之间。任何特定核酸或氨基酸区段的优选长度会是本领域技术人员能确定的, 但是会优选基于氨基酸区段在动物中在施用它后诱导的免疫学应答来选择的。优选的外来氨基酸区段会降低由病原体引起的感染的临床和 / 或病理学或组织病理学病征的发生率或减轻其严重性, 该区段针对该病原体诱导免疫应答。优选的是, 该区段会与已知在动物中诱导免疫学应答的氨基酸区段具有至少 80%、更优选 85%、仍更优选 90%、甚至更优选 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、和最优选至少 99% 序列同源性。甚至更优选的是, 该区段会与已知在动物中诱导免疫学应答的氨基酸区段具有至少 80%、更优选 85%、仍更优选 90%、甚至更优选 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、和最优选至少 99% 序列同一性。优选的是, 当将氨基酸区段施用于需要它的动物时, 氨基酸区段会诱导免疫诱导, 其降低由衍生氨基酸区段的病原体引起的感染的临床、病理学、或组织病理学病征的发生率或减轻其严重性。如此, 本发明的一个方面鉴定降低由特定病原体引起的感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的发生率或减轻其严重性的氨基酸区段或表达氨基酸区段的核酸序列。这些氨基酸区段还可用于推导表达氨基酸区段的核酸序列, 然后将其插入载体, 优选 PCV2 ORF2, 在表达系统中表达, 优选杆状病毒表达系统, 回收, 并最后施用于需要它的动物。在一些优选的形式中, 表达产物保持完整, 而且外来氨基酸区段不与表达序列分开, 而在其它优选的形式中, 自表达序列取出或切出外来氨基酸区段。如此, 在下

文所述 CSL 序列的情况中,外来 CSL 序列在表达后可以作为 ORF2 序列的一部分留下并作为嵌合序列施用于需要它的动物,或者可以自 ORF2 序列切出外来 CSL 序列并分开或同时施用于需要它的动物。

[0014] 在一个优选的实施方案中,本发明提供使用 CSL 30 聚物的具体应用作为例子。在本文中通过将 CSL 30 聚物融合至载体蛋白 PCV2 ORF2,以划算的、免疫学上相关的方式提供 CSL 30 聚物。这是通过以如下方式创建 PCV2 ORF2CSL 杆状病毒而进行的,即其表达导致 CSL 30 聚物符合读码框地作为“尾”附着到 PCV2 ORF2 序列的羧基或氨基端上,或者符合读码框地整合到 PCV2ORF2 序列内。本文中的例子将 CSL 30 聚物尾附着于 PCV2 ORF2 蛋白的羧基端,但是本领域技术人员会理解,可以根据需要调整此位置,正如猪流感病毒氨基酸区段的例子进一步证明的,其附着于 PCV2 ORF2 氨基端以及 ORF2 序列内这两处。如此,当昆虫细胞被 PCV2 ORF2 CSL 杆状病毒感染时,它们会生成也含有 CSL 30 聚物作为“尾”的嵌合 PCV2 ORF2 VLP。此 PCV2 ORF2 可充当 CSL 30 聚物的载体。

[0015] 本发明还证明了将 CSL 30 聚物融合至 PCV2 ORF2 是免疫学上相关的,而且已经处于实践中。通过针对 PCV2 ORF2 蛋白的抗体以及通过针对 CSL 30 聚物的抗体检测到了昆虫细胞中的嵌合 PCV2 ORF2 CSL 表达的免疫学相关性 (relevance)。

[0016] 先前的工作证明了 PCV2 ORF2 蛋白能在昆虫细胞培养物中表达至很高水平,下游加工的量极小。本申请证明了 CSL 30 聚物能作为符合读码框的“尾”融合到 PCV2 ORF2 蛋白的羧基端上,使得 PCV2 ORF2 壳体会充当 CSL30 聚物的载体。嵌合 PCV2 ORF2 CSL 蛋白也在昆虫细胞培养物中表达至高水平,下游加工的量极小,这继而可用作划算的疫苗制备物中的抗原。有利的是,虽然针对 CSL 30 聚物的单克隆抗体 3E2 已经显示经被动免疫疗法在小鼠中提供一些针对隐孢子虫感染的效能,但是有可能的是针对 CSL 30 聚物的多克隆抗体应答可诱导更加有力和有效的针对隐孢子虫感染的应答。

[0017] 嵌合 PCV2 ORF2 CSL 抗原的一些潜在用途包括个体疫苗接种、被动免疫接种、和血清疗法。对于个体疫苗接种,将嵌合 PCV2 ORF2 CSL 抗原施用于需要它的动物以给动物个体疫苗接种来诱导针对隐孢子虫感染的保护性体液和 / 或细胞介导的应答。对于被动免疫接种,施用嵌合 PCV2 ORF2 CSL 抗原以诱导有力的针对 CSL 30 聚物的体液和 / 或细胞介导的应答,这能被动传递给养护的后代。此被动母体免疫继而会在后代中降低或预防隐孢子虫感染。对于血清疗法,施用嵌合 PCV2 ORF2 CSL 抗原诱导有力的针对 CSL 30 聚物的体液应答,这可用于血清疗法。可以用嵌合 PCV2 ORF2 CSL 超免疫大型动物 (即马) 以生成抗 CSL 30 聚物抗血清。可将该抗血清口服施用于临床上受影响的动物以降低由隐孢子虫感染引起的临床疾病。

[0018] 基于本发明,本领域技术人员还会认识到,氨基酸区段诸如 CSL 30 聚物和猪流感病毒 24 聚物能与另一病毒样颗粒载体 (即 PCV1、细小病毒、肠道病毒、和其它具有壳体结构的病毒) 融合。另外,PCV2 ORF2 VLP 可用于包装和携带外来 DNA (即编码有关抗原的或用于基因疗法的 DNA 疫苗)。

[0019] 本发明的又一个方面是使用本发明的方法表达的氨基酸在抗原性或免疫原性组合物或疫苗中的用途。此类组合物或疫苗可进一步与佐剂、药学可接受载体、保护剂、和 / 或稳定剂组合。

[0020] 如本文中所使用的,“佐剂”可包括氢氧化铝和磷酸铝、皂苷类例如 Quil A、

QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA)、GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL)、油包水乳剂、水包油乳剂、水包油包水乳剂。乳剂可特别基于轻液体石蜡油 (欧洲药典型); 类异戊二烯油诸如源自烯 (特别是异丁烯或癸烯) 寡聚化的角鲨烷或角鲨烯油; 含有线性羟基的酸或醇的酯, 更具体的说是植物油、油酸乙酯、丙二醇二 (辛酸酯 / 癸酸酯)、甘油三 (辛酸酯 / 癸酸酯) 或丙二醇二油酸酯; 分支脂肪酸或醇的酯, 特别是异硬脂酸酯。与乳化剂组合地使用油以形成乳剂。乳化剂优选是非离子型表面活性剂, 特别是山梨聚糖、二缩甘露醇 (例如脱水甘露醇油酸酯)、二醇、聚甘油、丙二醇和油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸或羟基硬脂酸的酯, 其任选是乙氧基化的, 和聚氧丙烯 - 聚氧乙烯共聚物嵌段, 特别是 Pluronic 产品, 尤其是 L121。参见 Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp 51-94 (1995) 及 Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997)。

[0021] 例如, 有可能使用《Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach》(M. Powell 和 M. Newman 编, Plenum Press, 1995) 第 147 页记载的 SPT 乳剂和这本书第 183 页记载的乳剂 MF59。

[0022] 佐剂的另一个例子是选自丙烯酸的或甲基丙烯酸的聚合物和马来酸酐与烯烃衍生物的共聚物的化合物。有利的佐剂化合物是丙烯酸的或甲基丙烯酸的聚合物, 它们是交联的, 尤其是用糖或多元醇的聚烯烃醚。这些化合物称作卡波姆 (carbomer) (Pharmeuropa Vol. 8, No. 2, June 1996)。本领域技术人员还可参见美国专利 No. 2, 909, 462, 其记载了用具有至少 3 个、优选不超过 8 个羟基, 至少三个羟基的氢原子被具有至少 2 个碳原子的不饱和脂肪族根 (radical) 取代的多羟基化合物交联的此类丙烯酸聚合物。优选的根是那些含有 2-4 个碳原子的, 例如乙烯基、烯丙基和其它乙烯不饱和基团。不饱和根自身可含有其它取代基, 诸如甲基。以名称 Carbopol (BF Goodrich, Ohio, USA) 销售的产品特别适合于含有此类佐剂的组合物。它们用烯丙基蔗糖或用烯丙基季戊四醇交联。这些聚合物在水中的溶解产生酸性溶液, 这会被中和, 优选至生理学 pH, 以给出会掺入免疫原性组合物、免疫学组合物或疫苗组合物自身的佐剂溶液。

[0023] 其它合适的佐剂包括但不限于 RIBI 佐剂系统 (Ribi Inc.)、嵌段共聚物 (CytRx, Atlanta GA)、SAF-M (Chiron, Emeryville CA)、单磷酸基脂质 A、Avridine 脂质 - 胺佐剂、来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的热不稳定肠毒素 (重组的或其它形式的)、霍乱毒素、IMS 1314 或胞壁酰二肽等。

[0024] 另外, 组合物可包括一种或多种药学可接受载体。如本文中所使用的“药学可接受载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂、吸收延迟剂、等等。

[0025] 如本文中所使用的, “保护剂”指抗微生物活性剂, 诸如例如庆大霉素、硫柳汞、等等。具体而言, 添加保护剂最优选用于制备多剂组合物。以有效防止感兴趣组合物被任何微生物污染或抑制任何微生物在感兴趣组合物内生长的浓度添加那些抗微生物活性剂。

[0026] 此外, 这种方法还可包括添加任何稳定剂, 诸如例如糖类、海藻糖、甘露醇、蔗糖等等, 以提高和 / 或维持产物保存期。

[0027] 如本文中所使用的及如本文中所提供的工艺中所使用的, PCV2 ORF2DNA 指 PCV2 隔离群内高度保守的结构域, 由此, 任何 PCV2 ORF2 会是 PCVORF2DNA 的有效来源。一种优

选的 ORF2 序列在本文中作为 SEQ ID NO. 7 提供。

[0028] 使用本发明的方法生成的氨基酸序列优选与天然的或“天然存在的”序列相同。天然存在的序列指以它们的天然状态找到的序列。例如,天然存在的 PCV2 ORF2 DNA 会是在对自猪动物中的 PCV2 分离或鉴定的全长 PCV2ORF2 序列测序时找到的 DNA 序列。然而,本领域技术人员理解,与天然序列相比,此类序列可修饰或改变多达 20% 的序列同源性且仍保留抗原性特征,使得它们在免疫原性组合物中 useful。当然,优选的是,与天然序列细胞,变异少于 15%、仍更优选少至 6-10%、且甚至更优选少于 5%、仍更优选少于 4%、甚至更优选少于 3%、仍更优选少于 2%、且最优选少于 1%。免疫学组合物的抗原性特征可以通过本领域知道的常规方法来评估。此外,当与处于其天然或天然存在形式的抗原相比,改良抗原赋予至少 70%、优选 80%、更优选 90% 的保护性免疫力时,改良抗原的抗原性特征仍然保留。如此,保护性免疫力一般会导致病原体感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的发生率或严重性降低。“临床、病理学、和 / 或组织病理学病征”的发生率或严重性的“降低”应当意味着当二者都被衍生所表达氨基酸序列的病原体感染时且对照组不接受所表达序列施用,与“对照组”动物相比接受所表达氨基酸序列施用的动物中临床病征的发生率或严重性有降低。在此语境中,术语“降低”指与如上文所定义的对照组相比降低至少 10%、优选 25%、甚至更优选 50%、最优选超过 100%。如本文中所使用的,“免疫原性组合物”指以对此类蛋白质或氨基酸的细胞和 / 或抗体介导的免疫应答在宿主中引发“免疫学应答”的氨基酸序列或蛋白质。优选的是,此免疫原性组合物能够赋予针对选定病原体的感染及与其有关的临床病征的保护性免疫力。在一些形式中,使用天然氨基酸序列或蛋白质的免疫原性部分作为此类组合物中的抗原性成分。如本文中所使用的,术语“免疫原性部分”指天然蛋白质和 / 或多核苷酸的截短和 / 或替代形式或者片段。优选的是,此类截短和 / 或替代形式或者片段会包含来自全长多肽的至少 8 个连续氨基酸。更优选的是,截短或替代形式或者片段会具有来自全长天然存在多肽的至少 10 个、更优选至少 15 个、和仍更优选至少 19 个连续氨基酸。进一步理解,此类序列可以是更大的片段或截短形式的一部分。

[0029] 正如本领域知道的,“序列同一性”指两条或更多条多肽序列或两条或更多条多核苷酸序列(即参照序列和要与参照序列比较的给定序列)之间的相关性。序列同一性如下确定,即在将序列最佳比对以生成最高程度的序列相似性(通过多串此类序列之间的匹配来确定)后比较给定序列与参照序列。在此类比对后,逐个位置地确认序列同一性,例如如果位于特定位置的核苷酸或氨基酸残基是相同的,那么序列在该位置是“相同的”。然后将鉴定出的此类位置的总数除以参照序列中核苷酸或残基的总数以给出 % 序列同一性。序列同一性可通过已知方法容易地计算,包括但不限于下述文献中所记载的,Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York(1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York(1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey(1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press(1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York(1991); 及 Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073(1988), 通过述及将其教导收入本文。确定序列同一性的优选方法设计成给出所测试序列之间的最大匹配。确定序列同一性的方法编写

成公众可得的确定给定序列间序列同一性的计算机程序。此类程序的例子包括但不限于 GCG 程序包 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research, 12(1) :387(1984))、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol, 215 :403-410(1990))。BLASTX 程序是公众自 NCBI 和其它来源可得的 (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S.F. et al., J. Molec. Biol, 215 :403-410(1990)), 通过述及将其教导收入本文)。这些程序使用缺省缺口权重最佳地比对序列以生成给定和参照序列之间最高水平的序列同一性。举例而言, 具有与参照核苷酸序列具有至少例如 85%、优选 90%、甚至更优选 95% “序列同一性”的核苷酸序列的多核苷酸, 意图表示, 除了给定多核苷酸序列可包括参照核苷酸序列每 100 个核苷酸多至 15 个、优选多至 10 个、甚至更优选多至 5 个点突变, 给定多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同。换言之, 在具有相对于参照核苷酸序列具有至少 85%、优选 90%、甚至更优选 95% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸中, 参照序列中多至 15%、优选 10%、甚至更优选 5% 的核苷酸可以删除或用另一种核苷酸替代, 或者可以将一定数目的核苷酸, 多至参照序列中总核苷酸的 15%、优选 10%、甚至更优选 5% 插入参照序列。参照序列的这些突变可发生于参照核苷酸序列的 5' 或 3' 端位置或那些末端位置之间的任何地方, 或是单个地散布在参照序列中的核苷酸间或是以一个或多个连续的组散布在参照序列内。类似地, 具有与参照氨基酸序列具有至少例如 85%、优选 90%、甚至更优选 95% 序列同一性的给定氨基酸序列的多肽, 意图表示, 除了给定多肽序列可包括参照氨基酸序列每 100 个氨基酸多至 15 个、优选多至 10 个、甚至更优选多至 5 个氨基酸改变, 该多肽的给定氨基酸序列与参照序列相同。换言之, 为了获得与参照氨基酸序列具有至少 85%、优选 90%、甚至更优选 95% 序列同一性的给定多肽序列, 参照序列中多至 15%、优选多至 10%、甚至更优选多至 5% 的氨基酸残基可以删除或用另一种氨基酸替代, 或者可以将一定数目的氨基酸, 多至参照序列中氨基酸残基总数的 15%、优选多至 10%、甚至更优选多至 5% 插入参照序列。参照序列的这些改变可发生于参照氨基酸序列的氨基或羧基端位置或那些末端位置之间的任何地方, 或是单个地散布在参照序列中的残基间或是以一个或多个连续的组散布在参照序列内。优选的是, 不相同的残基位置因保守氨基酸替代而不同。然而, 在确定序列同一性时, 保守替代不包括在匹配内。

[0030] 如本文中所使用的, “序列同源性”指确定两条序列的相关性的方法。为了确定序列同源性, 将两条或更多条序列最佳比对, 并在必要时引入缺口。然而, 与“序列同一性”不同, 在确定序列同源性时将保守氨基酸替代作为匹配计数。换言之, 为了获得与参照序列具有 95% 序列同源性的多肽或多核苷酸, 参照序列中 85%、优选 90%、甚至更优选 95% 的氨基酸残基或核苷酸必须匹配或包含另一种氨基酸或核苷酸的保守替代, 或者可以将一定数目的氨基酸或核苷酸, 多至参照序列中总氨基酸残基或核苷酸的 15%、优选多至 10%、甚至更优选多至 5% (不包括保守替代) 插入参照序列。优选的是, 同源序列包含至少一段 50 个、甚至更优选 100 个、甚至更优选 250 个、甚至更优选 500 个核苷酸。

[0031] “保守替代”指氨基酸残基或核苷酸用具有相似特征或特性 (包括大小、疏水性、等) 的另一种氨基酸残基或核苷酸替代, 使得总体功能性不显著变化。

[0032] “分离的”指“人为地”自其天然状态改变, 即, 如果它天然存在, 那么它已经改变或自其原始环境取出, 或二者兼之。例如, 活生物体中天然存在的多核苷酸或多肽不是“分离的”, 但是与其天然状态的共存材料分开的相同多核苷酸或多肽是“分离的”, 正如该术语在

本文中所采用的。

[0033] 本领域技术人员会理解,本文所述组合物可掺入已知的可注射的生理学可接受的无菌溶液。为了制备随时可用的溶液供胃肠外注射或输注用,等张水溶液诸如例如盐水或相应血浆蛋白质溶液是易得的。另外,本发明的免疫原性和疫苗组合物可包括稀释剂、等张剂、稳定剂、或佐剂。稀释剂可包括水、盐水、右旋糖、乙醇、甘油、等等。等张剂可包括氯化钠、右旋糖、甘露醇、山梨醇和乳糖等。稳定剂包括清蛋白和乙二胺四乙酸的碱金属盐等。合适的佐剂是上文所描述的那些。

[0034] 免疫原性组合物可进一步包括一种或多种其它免疫调控剂,诸如例如白介素、干扰素、或其它细胞因子。免疫原性组合物还可包括庆大霉素和硫柳汞。

[0035] 又一个方面涉及装有至少一剂本文所提供的蛋白质的免疫原性组合物的容器。所述容器可装有 1-250 剂免疫原性组合物,优选它装有 1、10、25、50、100、150、200、或 250 剂期望蛋白质或氨基酸序列的免疫原性组合物。

[0036] 又一个方面涉及包括任何上文所述容器和使用手册的试剂盒,所述使用手册包括将至少一剂蛋白质的免疫原性组合物施用入需要它的动物的信息。此外,依照又一个方面,所述使用手册包括关于第二次或更多次施用至少一剂氨基酸或蛋白质的免疫原性组合物的信息。优选的是,所述使用手册还包括信息施用免疫刺激剂的信息。如本文中所使用的,“免疫刺激剂”指能触发一般性免疫应答的任何药剂或组合物,优选不启动或提高特异性免疫应答,例如针对特定病原体的免疫应答。在优选的试剂盒中,进一步指示以合适的剂量施用免疫刺激剂。此外,试剂盒还可包含包括至少一剂免疫刺激剂的容器。

[0037] 然而,在此要理解,使用本发明的方法生成的抗原指包含至少一种如下抗原的任何组合物,所述抗原在施用于需要它的动物时能诱导、刺激或增强针对与所述抗原有关的感染的免疫应答。如本文中所使用的,术语“免疫原性蛋白质”、“免疫原性多肽”或“免疫原性氨基酸序列”指在宿主中引发针对包含所述免疫原性蛋白质、免疫原性多肽或免疫原性氨基酸序列的病原体的免疫或免疫学应答的任何氨基酸序列。如本文中所使用的,“免疫原性蛋白质”、“免疫原性多肽”或“免疫原性氨基酸序列”包括任何蛋白质的全长序列、其类似物、或其免疫原性片段。“免疫原性片段”指蛋白质包括一个或多个表位且如此引发针对有关病原体的免疫学应答的片段。在本发明的一个优选实施方案中,将基于蛋白质的抗体的免疫原性片段附着至 ORF2 序列的序列。这些基于蛋白质的抗原优选长度为至少 8 个氨基酸,且更优选长度介于 8 个和 200 个氨基酸之间。此类片段可使用本领域公知的多种表位定位技术来鉴定。参见例如 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。例如,线性表位可以通过例如在固体支持物上同时合成大量的肽(所述肽对应于蛋白质分子的各部分)并在肽仍附着至支持物时使肽与抗体反应来确定。此类技术是本领域已知的且记载于例如美国专利 No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715。类似地,构象表位易于通过测定氨基酸的空间构象来鉴定,诸如通过例如 x-射线晶体学和二维核磁共振。参见例如 Epitope Mapping Protocols, 见上文。合成抗原也包括在该定义内,例如多表位、侧翼表位、和其它重组或合成衍生的抗原。参见例如 Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249;

Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75 :402-408 ;Gardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998.

[0038] 对组合物或疫苗的“免疫学或免疫的应答”指宿主中对感兴趣组合物或疫苗的细胞和 / 或抗体介导的免疫应答的形成。通常,“免疫应答”包括但不限于下述一种或多种效应:特异性针对感兴趣组合物或疫苗中所包括的一种或多种抗原的抗体、B 细胞、辅助 T 细胞、抑制性 T 细胞、和 / 或细胞毒性 T 细胞和 / 或 γ T 细胞的生成或激活。优选的是,宿主会展现治疗性或保护性免疫学应答,使得对新感染的抗性会增强和 / 或疾病的临床严重性会降低。此类保护会表现为如上所述与宿主感染有关的症状(临床、病理学、和组织病理学)的发生率或严重性的降低,直至且包括完全缺失。

[0039] 如本文中所使用的,“免疫学活性成分”指在施用所述成分的动物中诱导或刺激免疫应答的成分。依照一个优选的实施方案,所述免疫应答针对所述成分或包含所述成分的微生物。依照另一个优选的实施方案,免疫学活性成分是减毒的微生物,包括改良活病毒(MLV)、杀死的微生物或至少是微生物的免疫学活性部分。

[0040] 如本文中所使用的,“微生物的免疫学活性部分”指微生物的含有蛋白质、糖、和 / 或糖蛋白的级分,其包含在施用所述成分的动物中诱导或刺激免疫应答的至少一种抗原。依照一个优选的实施方案,所述免疫应答针对微生物的所述免疫学活性部分或包含所述免疫学活性部分的微生物。

[0041] 另外,本发明的免疫原性和疫苗组合物可包括一种或多种兽医可接受载体。如本文中所使用的,“兽医可接受载体”包括任何和所有溶剂、发散介质、涂层、佐剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂、吸收延迟剂、等等。

[0042] 依照本发明的组合物可以皮内、气管内、或阴道内应用。组合物优选可以肌肉内或鼻内应用。在动物躯体中,能证明经静脉内注射或通过直接注射入靶组织来应用如上所述的药物组合物是有利的。对于系统应用,静脉内、血管内、肌肉内、鼻内、动脉内、腹膜内、口服、或鞘内(intrathecal)路径是优选的。皮下、真皮内(intradermally)、表皮内(intracutaneously)、贲门内 / 心内(intracardially)、小叶内、髓内、肺内或直接在待治疗组织(结缔、骨、肌肉、神经、上皮组织)中或附近可实现更加局部的应用。根据期望的治疗持续时间和效力,依照本发明的组合物可施用一次或数次,也是间歇地,例如每天一次持续数天、数周或数月,及以不同剂量。

[0043] “外来”氨基酸区段或“外来”DNA 区段应当指自不同物种衍生的此类区段。例如,CSL 30 聚物对于 PCV2 ORF2 而言是“外来”的,而且对于杆状病毒而言是外来的。

[0044] “氨基末端”或“羧基末端”应当分别意味着氨基端或羧基端。在氨基酸的语境中,任何附着至氨基或羧基端的外来氨基酸区段应当在非外来序列的第一个氨基酸之前或者在非外来序列的最后一个氨基酸之后。例如,如果将 M2ae1 区段附着至 PCV2 ORF2 的氨基端,那么 M2ae1 区段应当出现在 PCV2 ORF2 的第一个氨基酸之前,如附图所显示的。

[0045] 当某区段“衍生自”已知病原体或“与其有关”时,这应当指该区段的起源。例如,CSL 30 聚物“衍生自”微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)或“与其有关”,而 M2ae1 “衍生自”猪流感病毒或“与其有关”。

[0046] “诱导”或“引发”应当意味着引起。例如,施用 CSL 30 聚物在接受此类施用的动物中“诱导”或“引发”免疫应答。

[0047] “临床”病征应当指自活的动物直接可观察到的由病原体引起的感染的病征,诸如症状。代表性例子会取决于所选择的病原体,但是可包括诸如鼻涕、嗜睡、咳嗽、发烧、体重增加或减轻、脱水、腹泻、肿胀、跛 / 瘸、等等。

[0048] “病理学”病征应当指在显微镜或分子水平、通过生化测试、或用裸眼在验尸时可观察到的感染的病征。

[0049] “组织病理学”病征应当指源自感染的组织变化的病征。

[0050] 如此,本发明的一个方面提供包含来自 PCV2 的氨基酸区段和附着至 PCV2 氨基酸区段的外来氨基酸区段的免疫原性组合物,其中外来氨基酸区段来自除 PCV2 之外的生物体。一种优选的 PCV2 氨基酸区段包括可读框 2 或其免疫原性部分。在优选的形式中,PCV2 氨基酸区段与 SEQ ID NO. 7 具有至少 80% 序列同源性。优选的是,外来氨基酸区段衍生自在施用于动物后产生感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的病原体。甚至更优选的是,外来氨基酸序列是与已知病原体有关的或自己知病原体衍生的抗原。有利的事,外来氨基酸区段是与所述 PCV2 氨基酸区段分开地可检测的,意味着检测系统、测定法、单克隆抗体、免疫印迹、等等能够在 PCV2 氨基酸区段存在的情况中鉴定外来氨基酸区段的存在,以及辨别或区分 PCV2 氨基酸区段和外来氨基酸区段。优选的是,外来氨基酸区段是通过对外来氨基酸区段特异性的测定法可检测的。一种优选的测定法或测试包含对外来氨基酸区段特异性的单克隆抗体。优选的是,外来氨基酸区段与不附着至 PCV2 氨基酸区段的相同氨基酸区段相比保留它的免疫原性特性的至少 80%。组合物的特征在于它能够在接受其施用的动物中诱导免疫学应答。这种免疫学应答可以是对外来氨基酸区段、或对 PCV2 氨基酸区段、或对二者特异性的。优选的是,免疫学应答足以降低感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的发生率或减轻感染的临床、病理学、和 / 或组织病理学病征的严重性。如通过本文中的实施例所证明的,外来氨基酸序列对 PCV2 序列的附着可位于 PCV2 氨基酸区段的氨基末端或羧基末端,或者位于 PCV2 氨基酸区段的氨基和羧基末端之间的任何点。优选的外来氨基酸区段衍生自选自下组的生物体:微小隐孢子虫、猪流感病毒、及其组合。在优选的形式中,外来氨基酸区段保留天然序列的抗原特征且与选自下组的序列具有至少 80% 序列同源性:SEQ ID NO. 1 和 6。此类组合物会降低由衍生外来氨基酸区段或与外来氨基酸区段有关的生物体引起的感染的发生率或严重性。例如,对于 SEQ ID NO. 1 和 6,这些外来氨基酸区段分别衍生自微小隐孢子虫和猪流感病毒或与微小隐孢子虫和猪流感病毒有关且会降低微小隐孢子虫或猪流感病毒的发生率或减轻微小隐孢子虫或猪流感病毒的严重性,这取决于对动物施用哪种 SEQ ID NO.。有利的事,当包含外来氨基酸区段和 PCV2 氨基酸区段的组合物保持完整或在自 PCV2 区段切下外来区段后共施用时,也会降低 PCV2 的发生率或严重性。在一些优选的形式中,组合物会进一步包含选自下组的成分:佐剂、药学可接受载体、保护剂、稳定剂、及其组合。

[0051] 本发明的另一个方面提供包含载体 DNA 和自第一生物体物种衍生的 DNA 和自第二生物体物种衍生的 DNA 的表达载体,其中第一和第二生物体物种彼此不同且不同于衍生载体 DNA 的生物体物种。在一些优选的形式中,表达载体来自杆状病毒。本发明的一个实施方案包括 PCV2 作为第一生物体物种。当 PCV2 是第一生物体物种时,来自它的一种 DNA 区段是 PCV2 ORF2。在优选的形式中,PCV2 ORF2 DNA 与 SEQ ID NO. 7 具有至少 80% 序列同源性。在本发明的另一个实施方案中,来自第二生物体物种的 DNA 编码在接受其施用的动物

中诱导免疫学应答的氨基酸区段。为了本发明的目的可使用对于动物而言致病的任何生物体。优选的是,生物体会具有当施用于需要它的动物时诱导免疫学应答的氨基酸区段。还要更优选的是,所表达的氨基酸序列是与已知病原体有关的抗原。在优选的形式中,免疫学应答在降低由第一生物体物种、第二生物体物种、及这两种物种同时引起的感染的临床、病理学、或组织病理学病征的发生率或严重性方面会是有效的。在本发明的一个实施方案中,来自第二物种的 DNA 选自下组:微小隐孢子虫、大肠杆菌、及其组合。来自第二物种的 DNA 区段的具体代表性例子编码与选自下组的天然序列具有至少 80% 序列同源性且保留天然序列的抗原特征的氨基酸区段:SEQ ID NO. 1 和 6。

[0052] 本发明的另一个方面提供生成抗原的方法。优选的是,所述方法包括下述步骤:组合编码抗原的 DNA 与 PCV2 DNA 以生成组合 DNA 插入物,并在表达系统中表达组合 DNA 插入物。在优选的形式中,抗原具有约 8-200 个氨基酸的长度。优选的是,与 PCV2 DNA 组合的编码抗原的 DNA 衍生自不同于 PCV2 的生物体物种。可使用任何生物体物种,但优选的是,所表达的氨基酸序列是与已知病原体有关的抗原。代表性例子包括选自下组的生物体物种:微小隐孢子虫、猪流感病毒、及其组合。当使用微小隐孢子虫和猪流感病毒作为生物体物种时,优选的氨基酸区段会保留天然序列的抗原特征且与选自下组的序列:具有至少 80% 序列同源性 SEQ ID NO. 1 和 6。优选的 PCV2 序列会包括 ORF2,特别是 SEQ ID NO. 7 及保留天然序列的抗原特征且与 SEQ ID NO. 7 具有至少 80% 序列同源性的序列。一种优选的表达系统包含杆状病毒表达系统。

[0053] 本发明的另一个方面提供通过上文所述方法表达的抗原在疫苗和免疫原性组合物中的用途。优选的是,所述抗原与已知病原体有关。此类免疫原性组合物或疫苗可进一步包含选自下组的成分:佐剂、药学可接受载体、保护剂、稳定剂、及其组合。

[0054] 本发明的还有一个方面提供 PCV2ORF2 作为病毒样颗粒的用途。

[0055] 附图简述

[0056] 图 1a 是用家兔抗 CSL 血清染色的感染了 ORF2-CSL 杆状病毒的 SF 细胞的照片;

[0057] 图 1b 是用猪抗 PCV2 血清染色的感染了 ORF2-CSL 杆状病毒的 SF 细胞的照片;

[0058] 图 1c 是用山羊抗家兔 -FITC 染色的感染了 ORF2-CSL 杆状病毒的 SF 细胞的照片;

[0059] 图 2 是 SDS-PAGE 分析,验证了来自感染了杆状病毒的细胞的 ORF2-CSL 表达;

[0060] 图 3 是抗 PCV2,家兔免疫前第 0 天血清和家兔免疫后第 84 天血清中 ORF2-CSL 肽、和 ORF2-CSL 的点印迹结果;

[0061] 图 4a 是 Western 印迹照片,显示了 ORF2-CSL 蛋白;

[0062] 图 4b 是考马斯染色的印迹,显示了 ORF2 和 ORF2-CSL 蛋白;

[0063] 图 5 是有和无内部 AscI 限制性位点的 PCV2 ORF2 序列的比较;

[0064] 图 6 是有和无内部 M2ae1 氨基酸序列的 PCV2 ORF2 序列的比较;而

[0065] 图 7 是有和无氨基 M2ae1 氨基酸序列的 PCV2 ORF2 序列的比较。

[0066] 优选实施方案的详述

[0067] 下述实施例列出了依照本发明的优选材料和规程。然而,要理解的是,这些实施例只是作为例示而提供的,而且不应解释为对本发明总的范围的限制。

[0068] 实施例 1

[0069] 材料和方法;

[0070] CSL 30 聚物逆翻译

[0071] CSL 30 聚物肽的氨基酸序列为 AINGGGATLPQKLYLTPNVLTAGFAPYIGV (SEQ ID NO. 1)。使用果蝇属的最佳密码子选择将此 30 聚物氨基酸序列逆翻译成核苷酸序列。合成与 ORF2 基因 3' 端匹配的互补引物序列加 CSL 30 聚物的核苷酸序列。

[0072] 引物设计

[0073] PCV2-5-HA 引物 (SEQ ID NO. 2)

[0074] 5' -TGGATCCGCCATGACGTATCC-3' (PCV2 ORF2 ATG 起始位点标有下划线)

[0075] L-PCV2CSL 引物 (SEQ ID NO. 3)

[0076] 5' -AGATCTACACGCCGATGTAGGGGGCGAAGCCGGCGGTCAGCACGTTGGGGGTCAGGTACAGCTTC TGGGGCAGGGTGGCGCCGCCGCGTTGATGGCGGGTTCAAGTGGGGGGTCTTTAA-3'

[0077] 具有 C 端 CSL 尾的 PCV2ORF2 的 PCR

[0078] 先前已经克隆入 pGEM-T Easy 质粒 (Promega) 的 PCV2 ORF2 基因充当 PCR 反应的模板, 并与 Amplitaq Gold (Applied Biosystems) 及 PCV2-5-HA 和 L-PCV2CSL 引物混合。将 PCR 反应加热至 94°C 达 10 分钟。然后将 PCR 反应进行 40 个循环的 94°C 30 秒钟、40°C 30 秒钟、和 72°C 1 分钟。PCR 循环完成, 之后是最终循环 72°C 10 分钟。PCV2 ORF2 CSL PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳来显现。自凝胶纯化 PCR 产物, 并连接入 pGEM-T Easy 克隆载体, 转化入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 并筛选氨苄青霉素抗性。使用转化菌落来接种 3ml 含氨苄青霉素的 LB 肉汤, 并于 37°C 培养过夜。通过离心来收获过夜培养物的 1.5ml 等分试样, 并用 Qiagen Mini-Prep 质粒试剂盒提取质粒 DNA。然后通过双脱氧核苷酸测序来验证纯化的质粒 DNA。

[0079] 通过用限制酶 BamHI 和 NotI 消化, 自 pGEM-T Easy 质粒切出 PCV2 ORF2CSL 基因, 并连接入杆状病毒转移载体 pVL1393。然后使用 Qiagen Mini-Prep 质粒试剂盒纯化所得 PCV2 ORF2 CDL/pVL1393 质粒, 用于后续转染。

[0080] 含有 PCV2 ORF2 CSL 基因的重组杆状病毒的生成

[0081] 使用 ESCORT 转染试剂 (Sigma) 将 PCV2ORF2CDL/pVL1393 质粒和 **DiamondBac®** 线性化杆状病毒 DNA (Sigma) 共转染入 Sf9 昆虫细胞, 27°C 5 小时。除去转染培养基, 然后温和清洗转染细胞, 补充培养基, 并于 27°C 温育。5 天后, 收获含有所生成的重组杆状病毒的细胞上清液, 并保存于 4°C。用丙酮甲醇固定剩余的转染 Sf9 细胞, 并用于使用猪抗 PCV2 抗血清进行的免疫荧光测定法 (IFA) 以验证转染细胞中 PCV2 ORF2 的表达。

[0082] 将所收获的 PCV2 ORF2 CSL 重组杆状病毒上清液在 Sf9 细胞上噬斑纯化, 之后生成病毒原种。

[0083] 嵌合 PCV2 ORF2 CSL (融合有 CSL 30 聚物作为 C 端尾的 PCV2 ORF2 基因) 的观察和免疫学检测。

[0084] 对转染 Sf9 细胞实施 IFA 以检测 PCV2 ORF2、H5HA 或 H7HA 抗原。材料包括固定的 6 孔板、猪抗 PCV2、鸡抗 H5 和抗 H7、山羊-鸡 FITC、山羊抗鸡 FITC、家兔抗猪 FITC、1xPBS、和甘油 (50 : 50)。将 Sf9 细胞在 6 孔板中固定, 并用 1xPBS 漂洗。在每个孔中留 2ml PBS。向未转染 Sf9 细胞孔、PCV2ORF2-HA 转染孔、和 PCV2ORF2CSL 转染孔添加 20u1 猪抗 PCV2。抗 PCV2 血清处于 1 : 100 稀释度。将板打旋以混合。如上所述向未转染 Sf9 细胞孔、H7HA 转染孔、H7HA 转染孔、和 H5HA 转染孔添加 1 : 100 稀释的鸡抗 H5 和抗 H7。将板再次打旋以

混合。将板于 37℃温育 1 小时。除去一抗溶液。接着,将孔用 PBS 清洗 3 次,并除去最后一次清洗液。向每个孔添加 2ml PBS。接着,向有一抗 PCV2 抗血清的孔添加 20ml 家兔抗猪,并混合到一起。接着,向各孔添加 20ml 山羊抗鸡 FITC,并用一抗鸡血清处理和混合。将这些于 37℃温育 1 小时。除去 FITC 溶液,并将它们用 PBS 清洗 3 次。除去最后一次清洗液。接着,向每个孔添加 1ml 甘油,并通过手腕摇动除去过量的甘油。然后对每个孔观察特定荧光。结果指示生成了 H5HA 重组杆状病毒,正如 PCV2 ORF2-HA 和 CSL 重组体。

[0085] 实施例 2:来自受到杆状病毒感染的 SF+ 细胞(样品 070)的 ORF2-CSL 表达分析

[0086] 材料和方法:

[0087] 在 96、120、和 144 小时收集受到杆状病毒感染的 SF+ 细胞的样品(沉淀物和上清液),用于分析来自这些受到杆状病毒感染的 SF+ 细胞的 ORF2-CSL。对每份样品应用下述规程:将 SF+ 细胞样品融化,并取出上清液。将沉淀物重悬于 200ul 100mM NaHCO₃, pH 8.3, 并反复吸取以混合。然后让样品于室温(约 25-30℃)静置 30 分钟。然后将样品于 4℃以 20,000xg 离心 2 分钟。将上清液和沉淀物的碳酸氢盐溶胞物分开,并将整个样品保存于约 4℃的冰上。

[0088] 然后将沉淀物的碳酸氢盐溶胞物和上清液样品在 MOPS 缓冲液中的 10% Bis-Tris 凝胶上进行 SDS 聚丙烯酰胺细胞电泳(SDS-PAGE)分析。将 15ul 每份沉淀物碳酸氢盐溶胞物和 20ul 每份上清液样品加载到凝胶上它们各自指派的道中。第 1 道含有 10kDa 标志物。第 2 道含有来自 96 小时样品的沉淀物的 NaHCO₃ 溶胞物。第 3 道含有来自 120 小时样品的沉淀物的 NaHCO₃ 溶胞物。第 4 道含有来自 144 小时样品的沉淀物的 NaHCO₃ 溶胞物。第 5 道含有来自 96 小时样品的上清液。第 6 道含有来自 120 小时样品的上清液。第 7 道含有来自 144 小时样品的上清液。而第 8 道含有 20ul 未改变的 ORF2,充当对照。图 2 描绘了凝胶的结果。

[0089] 结果:

[0090] 分别含有来自 96、120 和 144 小时样品的沉淀物的碳酸氢盐溶胞物的第 2、3、和 4 道清楚地展示了 ORF2-CSL 的表达。结果提示 ORF2-CSL 确实自新杆状病毒构建物表达。ORF2-CSL 估算为比 ORF2 大约 3kDa,而且所观察到的分子量与估算一致。另外,观察到含有 120 小时和 144 小时样品的上清液的第 6 和 7 道中存在 ORF2-CSL,其存在比 144 小时样品强得多。随时间显现在上清液中观察到 ORF2-CSL 的事实提示 ORF2 的病毒样颗粒(VLP)结构仍然很大程度上是完整的。

[0091] 实施例 3

[0092] 材料和方法:

[0093] 此实施例展示用免疫前和免疫后家兔血清及猪抗 PCV2 血清进行的 ORF2、ORF2-CSL、和 CSL 肽的点印迹分析。在此实施例中使用三种蛋白质样品:标准 ORF2 蛋白、CSL 样品和来自受到杆状病毒感染的 SF+ 细胞的沉淀物(感染后 144 小时)的 ORF2-CSL 碳酸氢盐溶胞物。将 5ul 每份蛋白质样品点到一张硝酸纤维素上成一行,并标记每个点。此过程重复三次,得到三张点样相同的硝酸纤维素,含有来自每份好样品的一个点(总共三个点)。让每个点印迹干燥,然后在约 50ml TTBS+2%奶粉(w/v)中温育至少 1 小时。然后将膜与一抗一起温育。将第一张硝酸纤维素与在 TTBS+2%奶粉中 1:100 稀释的猪抗 PCV2 血清一起温育(印迹)1 小时。将第二张硝酸纤维素与在 TTBS+2%奶粉中 1:200 稀释的家兔免

疫前血清一起温育（印迹）1 小时。将第三张硝酸纤维素温育（印迹）与在 TTBS+2% 奶粉中 1 : 200 稀释的家兔免疫后血清一起 1 小时。

[0094] 将每个印迹用 TTBS (1x TBS 加 0.05% Tween20, 新鲜制备) 清洗三次, 两分钟。TBS 清洗液如下配制, 即向 292.2g NaCl 添加 200ml 1M Tris, pH 8, 用 HCl 将 pH 调节至 7.4, 通过添加水 (qs) 将溶液调至总体积 1L, 并过滤除菌。清洗后, 然后将膜与二抗一起温育。将第一张硝酸纤维素与在 TTBS+2% 奶粉中 1 : 1000 稀释的山羊抗猪 -HRP 一起温育 1 小时。将第二张硝酸纤维素与在 TTBS+2% 奶粉中 1 : 1000 稀释的山羊抗家兔 -HRP 一起温育 1 小时。将第三张硝酸纤维素与在 TTBS+2% 奶粉中 1 : 1000 稀释的山羊抗家兔 -HRP 一起温育 1 小时。然后将每个印迹用 TTBS 清洗两次, 两分钟, 然后用 PBS (10x PBS 1L) 清洗一次, 两分钟。PBS 清洗液如下配制, 即添加 0.96g 无水 NaH_2PO_4 (单碱)、13.1g 无水 NaH_2PO_4 (二碱) 和 87.7g NaCl, 将混合物溶于水, 并用 HCl 将 pH 调节至 7.4, 将溶液调至 1L, 并过滤除菌。

[0095] 然后将 10ml Opt-2CN 底物添加至每个印迹, 并让其显色不到约 5 分钟。用水漂洗每个印迹以终止该过程, 并分析。点印迹的结果可见图 3。

[0096] 结果:

[0097] 在第一张硝酸纤维素上, ORF2 和 ORF2-CSL 二者都与猪抗 PCV2 血清起反应, 指示 ORF2-CSL 的 ORF2 部分在结构上是完整的。来自第二张硝酸纤维素的结果指示 ORF2-CLS 也与家兔免疫前血清起反应。来自第三张硝酸纤维素的结果也提示 ORF2-CSL 的 CSL 部分如预期的那样 (在结构上是完整的), 因为它与家兔免疫后血清起反应。家兔免疫后血清有与 CSL 肽的反应性及免疫前血清或抗 PCV2 血清没有与 CSL 肽的反应性也证实了免疫后血清中的 CSL 反应性的特异性。总之, 这些结果强烈指示 CSL 肽作为与 ORF2 的融合蛋白表达。

[0098] 实施例 4: Western 印迹

[0099] 材料和方法:

[0100] 此实施例展示用家兔免疫后血清进行的来自受到杆状病毒感染的 SF+ 细胞 (感染后 144 小时) 的 ORF2 和 ORF2-CSL 沉淀物和上清液的 Western 印迹分析。将蛋白质样品在 MOPS 缓冲液中的 10% Bis-Tris 凝胶上进行 SDS-PAGE 分析。在相同凝胶上运行两组复制样品。第 1 道含有 10kDa 标志物。第 2 道含有预染色标志物。第 3 道含有来自受到杆状病毒感染的 SF+ 细胞感染后 144 小时沉淀物的 ORF2-CSL 碳酸氢盐溶胞物。第 4 道含有来自相同样品的 ORF2-CSL 上清液。第 5 道含有标准 ORF2 蛋白样品。SDS-PAGE 后, 在 Novex 印迹模块 (Novex; San Diego, CA) 中通过电泳 (30V 恒压超过约 1 小时) 将蛋白质自凝胶转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。转印迹后, 将样品道在约 50ml TTBS+2% 奶粉中温育至少 1 小时。然后将印迹切成两份复制印迹。一份用在 TTBS+2% 奶粉中 1 : 200 稀释的一抗家兔免疫后血清温育 / 印迹 1 小时, 而另一份干燥并染色以显示总蛋白质概况。第二份印迹的结果可见图 4B。

[0101] 然后将第一份印迹用 TTBS (1x TBS 加 0.05% Tween20, 新鲜制备) 清洗三次, 2 分钟。然后将印迹与在 TTBS+2% 奶粉中 1 : 1000 稀释的二抗山羊抗家兔 -HRP 一起温育 1 小时。温育后, 将印迹用 TTBS (1x TBS 加 0.05% Tween20, 新鲜制备) 清洗两次, 两分钟, 并用 PBS 清洗一次, 两分钟。然后使用 10ml Opti-4CN 底物显现印迹, 让印迹显色不到约 5 分钟。用水漂洗印迹以终止该过程, 并分析。此印迹的结果可见图 4A。

[0102] 实施例 5

[0103] 此实施例生成具有符合读码框的插入的 PCV2 ORF2 VLP, 所述插入为 24 个氨基酸的流感病毒 M2ae 区。

[0104] 材料和方法:

[0105] 具有 AscI 的 M2ae1 24 聚物

[0106] M2ae 124 聚物的氨基酸序列为 MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO. 6)。使用果蝇属的最佳密码子选择将 M2ae1 24 聚物氨基酸序列逆翻译成其核苷酸序列。实施 PCR 以添加侧翼 AscI 限制酶位点至 M2ae1 编码区。

[0107] 将 AscI 限制性位点引入 PCV2 ORF2 编码区

[0108] 使用定点诱变, 将 AscI 限制酶位点引入 PCV2 ORF2 的编码区 (SEQ ID NO. 7) (见图 5)。如图 5 所示, AscI 位点的引入将两处氨基酸变化引入 PCV2 ORF2 编码区, 即 Y36W (第 36 位氨基酸酪氨酸变成色氨酸, 即一种中性极性氨基酸被另一种中性极性氨基酸替换) 和 W38A (第 38 位氨基酸色氨酸变成丙氨酸, 即一种中性极性氨基酸被一种中性非极性氨基酸替换) (SEQ ID NO. 8)。

[0109] 将 M2ae1 插入 PCV2 ORF2 编码区

[0110] 关于将 M2ae1 区插入 PCV2 ORF2 (SEQ ID NO. 9) 的展现见图 6。简言之, 使用标准分子生物学方法, 将 M2ae1-AscI 区克隆入杆状病毒转移载体 pVL1393 中的 PCV2 ORF2 基因的 AscI 位点。然后使用 Qiagen Mini-Prep 质粒试剂盒纯化所得 PCV2 ORF2 内部 M2ae1/pVL1393 (命名为 A-34) 质粒, 用于后续转染。

[0111] 含有具有内部 M2ae1 的 PCV2 ORF2 的重组杆状病毒的生成

[0112] 使用 ESCORT 转染试剂 (Sigma) 将 A-34 PCV2 ORF2 内部 M2ae1/pVL1393 质粒和 **DiamondBac®** 线性化杆状病毒 DNA (Sigma) 共转染入 Sf9 昆虫细胞, 28°C 5 小时。除去转染培养基, 然后温和清洗转染细胞, 补充培养基, 并于 27°C 温育。5 天后, 收获含有所生成的重组杆状病毒的细胞上清液, 并保存于 4°C。用丙酮甲醇固定剩余的转染 Sf9 细胞, 并用于使用抗 A 型流感病毒 M2 单克隆抗体 14C2 进行的免疫荧光测定法 (IFA) 以验证转染 Sf9 细胞中 M2ae1 区的表达。所表达的包含 PCV2ORF2 和内部 M2ae1 区段的嵌合蛋白的序列在本文中作为 SEQ ID NO. 11 提供。

[0113] 随后通过在 Sf9 细胞上有限稀释来纯化收获的 A-34M2ae1 ORF2 PCV2 杆状病毒 DB 上清液, 之后生成病毒原种材料。

[0114] 具有内部 M2ae1 的 PCV2 ORF2 的免疫学检测

[0115] 先前通过 IFA 证实了受到 A-34 M2ae1 ORF2 PCV2 杆状病毒 DB 感染的 Sf9 细胞中 M2ae1 表达的验证。然而, 作为进一步证实 M2ae1 与 PCV2 ORF2 一起表达的手段, 对自受到杆状病毒感染的昆虫细胞培养物收获的 PCV2 ORF2 内部 M2ae1 上清液实施免疫印迹。

[0116] 简言之, 将自受到杆状病毒感染的昆虫细胞培养物收获的上清液印迹到 PVDF 膜上, 并测试免疫印迹中 PCV2 ORF2 和 / 或 M2ae1 抗原的存在。用于 PCV2 ORF2 免疫印迹检测的一抗是抗 PCV2 ORF2 单克隆抗体 6C4-2-4A3-5D10 和纯化的猪抗 PCV2 ORF2 IgG。用于 M2ae1 免疫印迹检测的一抗是抗 M2 单克隆抗体 14C2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 和猪抗 M2aeC5 血清。用于免疫印迹的相应二抗是 HRP 标记的山羊抗小鼠偶联物和山羊抗猪偶联物。使用 Opti-4CN 底物 (BioRad) 来进行免疫印迹的比色法检测。免疫印迹揭示了 PCV2 ORF2 和 M2ae1 抗原的存在。

[0117] 下文更为详细地描述了用于此实施例的材料和方法：

[0118] 材料和方法：

[0119] 为了纯化质粒，使用 QIAprep Spin MiniPrep (QIAGEN, Gaithersburg, MD) 并遵循制造商的方案。简言之，将 1.5ml 培养物以 14,000rpm 离心 1 分钟。丢弃上清液，之后重复离心规程并再次丢弃上清液。在 250ul 缓冲液 P1 中重建沉淀物，并添加至 250ul 缓冲液 P2，然后通过颠倒来混合。接着，添加 350ul 缓冲液 N3 并通过颠倒来混合，之后以 14,000rpm 离心 10 分钟。将上清液转移至离心管中的 QIAprep 旋转柱，以 14,000rpm 离心 60 秒，丢弃流出液并重新装配柱。接着，添加 750ul 缓冲液 PE 并以 14,000 离心 60 秒，丢弃流出液并重新装配柱。将柱以 14,000rpm 离心 1 分钟以使其干，然后将柱转移至一个新的 1.5ml 管。最后，添加 50ul H₂O，于室温温育 1 分钟，然后以 14,000rpm 离心 1 分钟，之后丢弃柱。

[0120] 为了切割、纯化、和连接 M2ae1 片段，使用 New England Biolabs (Ipswich, MA) 产品和规程实施限制性消化。简言之，将 6ul New England Biolabs 缓冲液 4、49ul DNA、和 5ul AscI 一起在 600ul 离心管中混合。将管于 37℃ 温育 1 小时，之后向每个管添加 3ul 6X 加载染料并摇匀。然后将所有反应加载到 1.5% 琼脂糖凝胶上，以约 100 伏运行 60 分钟，之后对凝胶拍照或扫描。自凝胶切下想要的条带并放置在 1.5ml 离心管中，之后每 10mg 凝胶片添加 10ul 膜结合溶液。将这漩涡震动并于 50-65℃ 温育，直至凝胶完全溶解。将迷你柱插入收集管，并将准备好的 DNA 转移至柱装配装置。将这于室温温育 1 分钟并以 14,000rpm 离心 1 分钟，之后丢弃流出液。清洗步骤包括添加 700ul 膜清洗溶液，以 14,000rpm 离心 1 分钟，丢弃流出液，添加 500ul 膜清洗溶液，以 14,000rpm 离心 5 分钟，丢弃流出液，然后开着盖以 14,000rpm 再次离心 1 分钟以干燥膜。洗脱步骤包括将迷你柱转移至 1.5ml 离心管，添加 50ul 不含核酸酶的 H₂O，于室温温育 1 分钟，以 14,000rpm 离心 1 分钟，丢弃柱，并保存于 -20℃，供将来使用。

[0121] 如下实施连接反应 (1)，即在 0.5ml 微量离心管中混合 1ul ORF2-AscI PVL1393 载体、7ul M2ae1 插入物、1ul 10X 连接缓冲液、和 1ul T4 DNA 连接酶。将这于 4℃ 温育过夜。

[0122] M2ae1/AscI-Orf2-PVL1393 的转化（转化 1）和 M2ae1 区段的重新连接使用常规方案来实施。简言之，在冰上融化 Max Effc 感受态 DHSx 细胞，并将 50ul 每份反应转移至 17x100mm pp Falcon 管。将额外的细胞在 EtOH/ 干冰浴中重新冷冻。接着，将 2ul 连接反应 1 添加至细胞并在冰上温育 30 分钟，之后将细胞于精确的 42℃ 热休克精确的 45 秒。将管放回冰上 2 分钟，之后添加 950ul SOC 并在约 225rpm 摇动中于 37℃ 温育 1 小时。然后，将 50 和 200ul 等分试样涂布在 LB 和 CIX 上，倒置并于 37℃ 温育过夜。

[0123] 如下实施连接反应 (2) 以重新连接 M2ae1，即在 0.5ml 微量离心管中混合 1ul AscI PVL 1393 载体、7ul 浓缩 M2ae1 插入物、1ul 10X 连接缓冲液、和 1ul T4DNA 连接酶。将这于 4℃ 温育过夜。

[0124] 为了将浓缩 M2ae1/AscI-ORF2-PVL1393 转化入细胞，使用常规方法实施转化反应 (2)。简言之，在冰上融化 Max Effc 感受态 DHSx 细胞，并将 50ul 每份反应转移至 17x100mm pp Falcon 管。将额外的细胞在 EtOH/ 干冰浴中重新冷冻。接着，将 2ul 连接反应 2 添加至细胞并在冰上温育 30 分钟，之后将细胞于精确的 42℃ 热休克精确的 45 秒。将管放回冰上 2 分钟，之后添加 950ul SOC 并在约 225rpm 摇动中于 37℃ 温育 1 小时。然后，将 50 和 200ul 等分试样涂布在 LB 和 CIX 上，倒置并于 37℃ 温育过夜。

[0125] 为了对菌落检查想要的克隆,使用下述参数和试剂建立 PCR 反应:1 个循环的 95℃ 5 分钟,35 个循环的 95℃ 15 秒钟、35 个循环的 50℃ 15 秒钟、35 个循环的 72℃ 60 秒钟,1 个循环的 72℃ 5 分钟和 1 个循环的 4℃ 无穷;12.5ul 2X Amplitaq Gold Mastermix、11.5ul 不含 RNA 酶/DNA 酶的水、0.5ul 引物 pvl-U、0.5ul 引物 gel-scrnL、和选定菌落。自 48 孔 2% 琼脂糖 E- 凝胶盒 (Invitrogen) 取出梳子。将精确的 10ul DEPC H₂O EMD 加载到每个孔中,并将含有 6X 加载染料的 10ul DNA 标志物和 10ul 样品添加至想要的孔。按下电源按钮,直至显示器显示“EG”。滑动到 E- 凝胶 Mother 基座上(当正确插入时,稳定的红色灯亮起),并再次按下电源按钮(灯会变成绿色以指示凝胶正在运行)。让凝胶运行约 20 分钟。然后培养选定的菌落,用于微量制备,即用一环选定的菌落接种 3ml LB 肉汤和 6ul CAR 种。然后将这在约 225rpm 摇动中于 37℃ 温育过夜。

[0126] 然后使用 QIAprep Spin MiniPrep 试剂盒依照制造商的指令及如上所述纯化质粒。

[0127] 为了启动 M2ae1/pGemT-easy 选定菌落的过夜培养用于质粒纯化和序列分析,然后培养一环选定菌落用于微量制备,即用选定的菌落接种 3ml LB 肉汤和 6ul CAR 种。然后将这在约 225rpm 摇动中于 37℃ 温育过夜。如上文关于 QIAprep Spin MiniPrep 所述将这些纯化。

[0128] 为了切出 M2ae 1 片段,依照 New England Biolabs 常规规程进行限制性消化。简言之,将 5ul New England Biolabs 缓冲液 4、25ul DNA、5ul AscI、和 15ul H₂O was mixed together 在 600ul 离心管中混合到一起。将管于 37℃ 温育 1 小时,之后向每个管添加 3ul 6X 加载染料并混匀。然后将反应加载到 1.5% 琼脂糖凝胶上,以约 100 伏运行 60 分钟,之后对凝胶拍照或扫描。

[0129] 接着,依照 QIAEX II 琼脂糖凝胶提取方案 (QIAGEN, QIAEX II Handbook 02/99) 纯化 M2ae1 片段,并通过连接反应 (3) 连接入 PVL 1393。简言之,为了将 M2ae 1 连接入 PVL 1393,将 2ul PVL 1393 载体、6ul AscI 浓缩 M2ae1 插入物、1ul 10X 连接缓冲液、和 1ul T4 DNA 连接酶在 0.5ml 微量离心管中混合到一起并于 4℃ 温育过夜。

[0130] 为了将 AscI-M2ae1/PVL1393 插入物转化入 DHSx 细胞,在冰上融化 MaxEffc 感受态 DHSx 细胞,并将 50ul 每份反应转移至 17x100mm pp Falcon 管。将额外的细胞在 EtOH/干冰浴中重新冷冻。接着,将 2ul 连接反应 2 添加至细胞并在冰上温育 30 分钟,之后将细胞于精确的 42℃ 热休克精确的 45 秒。将管放回冰上 2 分钟,之后添加 950ul SOC 并在约 225rpm 摇动中于 37℃ 温育 1 小时。然后,将 50 和 200ul 等分试样涂布在 LB 和 CIX 上,倒置并于 37℃ 温育过夜。

[0131] 为了用 AscII 限制性切割 ORF2-AscI-PVL1393,将 2ul New England Biolabs 缓冲液 4、2.5ul DNA、2ul AscI、和 12.5ul H₂O 在 600ul 离心管中混合到一起。将管于 37℃ 温育 1 小时,之后向每个管添加 3ul 6X 加载染料并混匀。然后将反应加载到 1.5% 琼脂糖凝胶上,以约 100 伏运行 60 分钟,之后对凝胶拍照或扫描。

[0132] 接着,纯化凝胶,并实施去磷酸化反应和另一项连接反应。凝胶纯化遵循 WIZARD SV 凝胶清洁的步骤。简言之,将迷你柱插入收集管,并将准备好的 DNA 转移至柱装配装置。将这于室温温育 1 分钟并以 14,000rpm 离心 1 分钟,之后丢弃流出液。清洗步骤包括添加 700ul 膜清洗溶液,以 14,000rpm 离心 1 分钟,丢弃流出液,添加 500ul 膜清洗溶液,以

14,000rpm 离心 5 分钟,丢弃流出液,然后开着盖以 14,000rpm 再次离心 1 分钟以干燥膜。洗脱步骤包括将迷你柱转移至 1.5ml 离心管,添加 50ul 不含核酸酶的 H₂O,于室温温育 1 分钟,以 14,000rpm 离心 1 分钟,丢弃柱,并保存于 -20℃,供将来使用。去磷酸化步骤包括向 16ul 凝胶纯化的质粒添加 2ul 10X SAP 缓冲液,然后添加 2ul SAP,之后于 37℃温育 15 分钟,然后于 65℃ 15 分钟灭活 SAP。然后实施如下连接反应,即将 4ul AscI-ORF2-PVL1393 载体、12ul AscI 切割的 M2aeI 插入物、2ul 10X 连接缓冲液、和 2ul T4DNA 连接酶在 0.5ml 微量离心管中混合到一起,并于 4℃温育过夜。

[0133] 为了将连接后的载体和插入物转化入感受态 DHSx,供繁殖和将来的筛选用,在冰上融化 Max Effc 感受态 DHSx 细胞,并将 50ul 每份反应转移至 17x100mm pp Falcon 管。将额外的细胞在 EtOH/干冰浴中重新冷冻。接着,将 2ul 连接反应 2 添加至细胞并在冰上温育 30 分钟,之后将细胞于精确的 42℃热休克精确的 45 秒。将管放回冰上 2 分钟,之后添加 950ul SOC 并在约 225rpm 摇动中于 37℃温育 1 小时。然后,将 50 和 200ul 等分试样涂布在 LB 和 CIX 上,倒置并于 37℃温育过夜。

[0134] 为了对转化子筛选期望插入物的存在,使用下述参数和试剂实施 Amplitaq Gold PCR 反应:1 个循环的 95℃ 5 分钟,35 个循环的 95℃ 20 秒钟、35 个循环的 50℃ 20 秒钟、35 个循环的 72℃ 20 秒钟,1 个循环的 72℃ 5 分钟和 1 个循环的 4℃无穷;12.5ul 2X Amplitaq Gold Mastermix、11.5ul 不含 RNA 酶/DNA 酶的水、0.5ul 引物 pvl-U、0.5ul 引物 ael scrnL、和选定菌落。自 48 孔 2%琼脂糖 E-凝胶盒 (Invitrogen) 取出梳子。将精确的 7.5ul DEPC H₂O EMD 加载到每个孔中,并将含有 6X 加载染料的 10ul DNA 标志物和 10ul 样品添加至想要的孔。按下电源按钮,直至显示器显示“EG”。滑动到 E-凝胶 Mother 基座上(当正确插入时,稳定的红色灯亮起),并再次按下电源按钮(灯会变成绿色以指示凝胶正在运行)。让凝胶运行约 20 分钟。然后培养选定的菌落,用于微量制备,即用一环来自 M2aeI-AscI/PVL1393 转化的选定菌落接种 3ml LB 肉汤和 6ul CAR 原种。然后将这在约 225rpm 摇动中于 37℃温育过夜。为了纯化质粒用于序列分析,依照制造商的指令使用 QIAprep Spin MiniPrep。简言之,将 1.5ml 培养物以 14,000rpm 离心 1 分钟。丢弃上清液,之后重复离心规程并再次丢弃上清液。在 250ul 缓冲液 P1 中重建沉淀物,并添加至 250ul 缓冲液 P2,然后通过颠倒来混合。接着,添加 350ul 缓冲液 N3 并通过颠倒来混合,之后以 14,000rpm 离心 10 分钟。将上清液转移至收集管中的 QIAprep 旋转柱,以 14,000rpm 离心 60 秒,丢弃流出液并重新装配柱。接着,添加 750ul 缓冲液 PE 并以 14,000 离心 60 秒,丢弃流出液并重新装配柱。将柱以 14,000rpm 离心 1 分钟以使其干,然后将柱转移至一个新的 1.5ml 管。最后,添加 50ul H₂O,于室温温育 1 分钟,然后以 14,000rpm 离心 1 分钟,之后丢弃柱。

[0135] 为了用杆状病毒 DNA 转染 sf9 昆虫细胞,在一个无菌 6ml 聚苯乙烯管中装配 96.4ul Excel 培养基、1ul DiamondBac Cur 病毒 DNA(1ug/ul)、和 3.6ul pVL1393 中的重组转移质粒(1ug)。向每个聚苯乙烯管添加 100ul ESCORT 和 Excell 的 1:20 主混合物,之后于室温温育 15 分钟以制备转染混合物(475ul Excell, 25ul ESCORT)。用 2ml 体积的 Excellent 清洗 Sf9 细胞的 6 孔板单层两次,在第二次清洗后将培养基留在细胞上。吸掉清洗培养基后,向 6 孔板的每个孔添加 0.8ml Excell,之后向 6 孔板的孔添加 0.2ml 转染混合物。将这于 28℃温育 5 小时,然后吸掉转染混合物。清洗细胞一次,然后添加 2ml TNM-FH 并于 28℃温育 120-144 小时。

[0136] 为了收获转染和固定细胞供 IFA 用,在生物安全橱中无菌收获来自转染 Sf9 细胞的上清液并转移至 2.0ml 冷冻管,之后向孔中剩余的 Sf9 细胞添加 1ml 冷的丙酮:甲醇 (50 : 50)。将这于室温温育 10 分钟,除去固定剂,并让板在通风橱中风干,之后将板保存于 4℃或更冷,供最终的 IFA 用。

[0137] 为了测试 Sf9 转染细胞中的 M2ae1 表达,实施间接免疫荧光测定法 (IFA)。将板在 PBS 中简短清洗以使固定细胞再水合,然后除去 PBS。接着,向孔中添加 500u1 一抗抗 M2ae1,并于 37℃温育 1 小时。除去一抗,并将孔用 PBS 清洗三次,除去最后一次清洗液。接着,向孔中添加 500u1 在 PBS 中 1 : 500 稀释的二抗抗家兔 FITC,并于 37℃温育 1 小时,之后除去二抗并将孔用 PBS 清洗三次,除去最后一次清洗液。接着,用约 0.5ml 甘油:水 (50 : 50) 包被孔,并除去过量的甘油:水,使得能用导致 UV 灯显微镜观察细胞层。

[0138] 为了找到受到杆状病毒感染的 Sf9 细胞的克隆,在第 50 代 Sf9 细胞上实施杆状病毒有限稀释。简言之,将杆状病毒材料在 TNM-FH 中 10 倍稀释。临实施稀释前,将杆状病毒材料简短漩涡震动以确保它彻底混匀。初始 10^{-1} 稀释通过将 0.1ml 杆状病毒转移入 0.9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-2} 稀释通过将 0.1ml 10^{-1} 稀释的杆状病毒转移如入 0.9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-3} 稀释通过将 1ml 10^{-2} 稀释的杆状病毒转移入 9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-4} 和每一项后续稀释 (直至 10^{-7}) 通过序贯地将 1ml 10^{-3} 稀释的杆状病毒转移入 9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。将稀释的杆状病毒材料添加至尽可能多的 96 孔板孔。将板堆叠并放入大的拉锁袋,在黑暗中于 28℃温育。然后在 4-7 天后自孔收获上清液。

[0139] 为了固定细胞和染色 M2ae1 ORF2 板以在 UV 灯下观看,在生物安全橱中使用多道移液器和无菌移液器尖头将上清液无菌转移至新的 96 孔板。装有上清液的板可短期保存于 4℃或长期保存于 -70℃。向孔中剩余的 Sf9 细胞添加 200u1 冷的丙酮:甲醇 (50 : 50),并将这于室温温育 10 分钟。除去固定剂,并将板在通风橱中风干,之后将板在 PBS 中简短清洗以使固定细胞再水合。然后除去 PBS,并向孔中添加 100u1 A 型流感病毒 M2(14C2) (Santa Cruz Biotech) 并于 37℃温育 1 小时。然后除去一抗,并将孔用 PBS 清洗三次,除去最后一次清洗液。接着,向孔中添加 100u1 二抗山羊 + 小鼠 FITC,并于 37℃温育 1 小时。然后除去二抗,并将孔用 PBS 清洗三次,除去最后一次清洗液。用约 0.5ml 甘油:水 (50 : 50) 包被孔,之后除去过量的甘油:水,并用倒置 UV 显微镜观察细胞层。

[0140] 通过在第 52 代 96 孔 Sf9 板上有限稀释第 1 代分离了一单个 M2ae1 ORF2PCV2 杆状病毒。简言之,将杆状病毒材料在 TNM-FH 中 10 倍稀释。临实施稀释前,将杆状病毒材料简短漩涡震动以确保它彻底混匀。初始 10^{-1} 稀释通过将 0.1ml 杆状病毒转移入 0.9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-2} 稀释通过将 0.1ml 10^{-1} 稀释的杆状病毒转移如入 0.9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-3} 稀释通过将 0.1ml 10^{-2} 稀释的杆状病毒转移入 9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-4} 和每一项后续稀释 (直至 10^{-6}) 通过序贯地将 0.1ml 在先 (例如 10^{-3} 用于 10^{-4} 稀释) 稀释的杆状病毒转移入 0.9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-7} 稀释通过将 1ml 10^{-6} 稀释的杆状病毒转移入 9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。 10^{-8} 稀释通过将 1ml 10^{-7} 稀释的杆状病毒转移入 9ml TNM-FH 并简短漩涡震动以混合来实施。接着,将 0.1ml 10^{-7} 和 10^{-8} 稀释的杆状病毒材料添加至尽可能多的 96 孔板孔。将板堆叠并放入大的拉锁袋,在黑暗中于 28℃温育。然后在 4-7 天后自孔

收获上清液。

[0141] 为了对 10^{-7} 和 10^{-8} 有限稀释实施 IFA, 将 Sf9 细胞固定并染色以检测 M2ae1ORF2PCV2 转染细胞的存在。简言之, 在生物安全橱中使用多道移液器和无菌移液器尖头将上清液无菌转移至新的 96 孔板。装有上清液的板可短期保存于 4°C 或长期保存于 -70°C 。向孔中剩余的 Sf9 细胞添加 200ul 冷的丙酮: 甲醇 (50 : 50), 并将这于室温温育 10 分钟。除去固定剂, 并将板在通风橱中风干, 之后将板在 PBS 中简短清洗以使固定细胞再水合。然后除去 PBS, 并向孔中添加 100ul 一抗 A 型流感病毒 M2(14C2) (Santa Cruz Biotech) 并于 37°C 温育 1 小时。然后除去一抗, 并将孔用 PBS 清洗三次, 除去最后一次清洗液。接着, 向孔中添加 100ul 二抗山羊 + 小鼠 FITC, 并于 37°C 温育 1 小时。然后除去二抗, 并将孔用 PBS 清洗三次, 除去最后一次清洗液。用约 0.5ml 甘油: 水 (50 : 50) 包被孔, 之后除去过量的甘油: 水, 并用倒置 UV 显微镜观察细胞层。结果呈阳性。

[0142] 为了自上述有限稀释扩增 M2ae1 ORF2 PCV2, 使用上清液。简言之, 向 Sf9 细胞 6 孔板的单个孔添加 100ul 相应的病毒, 之后将板于 28°C 放置在黑暗中。4-7 天后可收获上清液并固定细胞层。

[0143] 然后对选定的 M2ae1 内部 PCV2 ORF2 杆状病毒进行有限稀释扩增收获和 Sf9 细胞固定。简言之, 在生物安全橱中自转染 Sf9 细胞无菌收获上清液, 并转移至 2.0ml 冷冻管, 之后向孔中剩余的 Sf9 细胞添加 1ml 冷的丙酮: 甲醇 (50 : 50)。将这于室温温育 10 分钟, 除去固定剂, 并让板在通风橱中风干, 之后将板保存于 4°C 或更冷, 供最终的 IFA 用。

[0144] 结果

[0145] 使用上文所述方法, 证实了 M2ae1 片段的存在, 而且它的免疫原性或抗原性是可检测的。

[0146] 实施例 6

[0147] 此实施例证明 A 型流感病毒 M2ae1 区能作为氨基尾插至 PCV2 ORF2VLP。

[0148] 具有 3' -KpnI 的 M2ae1 24 聚物

[0149] M2ae1 24 聚物的氨基酸序列为 MSLLETVETPIRNEWGCRCNDSSD (SEQ ID NO. 6)。使用果蝇属的最佳密码子选择将 M2ae 124 聚物氨基酸序列逆翻译成核苷酸序列。使用特异性的寡核苷酸引物, 实施 PCR 以添加 3' -KpnI 限制酶位点至 M2ae1 编码区。

[0150] 将 KpnI 限制性位点引入到 PCV2ORF2 编码区的 5' 端上

[0151] 使用特异性的寡核苷酸引物, 实施 PCR 以添加 KpnI 限制酶位点至 PCV2ORF2 基因的 5' 端 (见图 7)。

[0152] 将氨基 M2ae1 连接到 PCV2 ORF2 的 5' 端上

[0153] 使用标准分子生物学方法, 将 M2ae1-KpnI 区克隆入 PCV2 ORF2 基因 (SEQ ID NO. 12) 的 5' 端 KpnI 位点。然后将氨基 M2ae1 PCV2 ORF2 区克隆入杆状病毒转移载体 pVL1393。然后使用 Qiagen Mini-Prep 质粒试剂盒纯化所得氨基 M2ae1PCV2ORF2/pVL1393 质粒, 用于后续转染。

[0154] 含有具有 M2ae1 尾的 PCV2 ORF2 的重组杆状病毒的生成

[0155] 使用 ESCORT 转染试剂 (Sigma) 将氨基 M2ae1 PCV2 ORF2/pVL1393 质粒和 **DiamondBac®** 线性化杆状病毒 DNA (Sigma) 共转染入 Sf9 昆虫细胞, 28°C 5 小时。除去转染培养基, 然后温和清洗转染细胞, 补充培养基, 并于 27°C 温育。5 天后, 收获含有所生成的

重组杆状病毒的细胞上清液,并保存于 4℃。用丙酮甲醇固定剩余的转染 Sf9 细胞,并用于使用抗 A 型流感病毒 M2 单克隆抗体 14C2 进行的免疫荧光测定法 (IFA) 以验证转染 Sf9 细胞中 M2ae1 区的表达。

[0156] 使用所收获的 PCV2ORF2 氨基 M2ae1 杆状病毒 DB 上清液来生成病毒原种材料。

[0157] PCV2ORF2 氨基 M2ae1 的免疫学检测

[0158] 先前通过 IFA 证实了受到 PCV2ORF2 氨基 M2ae1 杆状病毒 DB 感染的 Sf9 细胞中 M2ae1 表达的验证。然而,作为进一步证实 M2ae1 与 PCV2 ORF2 一起表达的手段,对自受到杆状病毒感染的昆虫细胞培养物收获的 PCV2 ORF2 氨基 M2ae1 上清液实施免疫印迹。

[0159] 简言之,将自受到杆状病毒感染的昆虫细胞培养物收获的上清液印迹到 PVDF 膜上,并测试免疫印迹中 PCV2 ORF2 和 / 或 M2ae1 抗原的存在。用于 PCV2 ORF2 免疫印迹检测的一抗是抗 PCV2 ORF2 单克隆抗体 6C4-2-4A3-5D10 和纯化的猪抗 PCV2 ORF2 IgG。用于 M2ae1 免疫印迹检测的一抗是抗 M2 单克隆抗体 14C2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 和猪抗 M2aeC5 血清。用于免疫印迹的相应二抗是 HRP 标记的山羊抗小鼠偶联物和山羊抗猪偶联物。使用 Opti-4CN 底物 (BioRad) 来进行免疫印迹的比色法检测。免疫印迹揭示了 ORF2 和 M2ae1 的存在。

[0001]

序列表

<110> 贝林格尔. 英格海姆维特梅迪卡有限公司 (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.)
Vaughn, Eric
Schaeffer, Merrill

<120> 有外来氨基酸插入的 PCV2 ORF2 病毒样颗粒

<130> 10-0079

<150> US 61/017,863

<151> 2007-12-31

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 微小隐孢子虫 (Cryptosporidium parvum)

<400> 1

Ala Ile Asn Gly Gly Gly Ala Thr Leu Pro Gln Lys Leu Tyr Leu Thr
1 5 10 15

Pro Asn Val Leu Thr Ala Gly Phe Ala Pro Tyr Ile Gly Val
20 25 30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 猪圆环病毒 (Porcine circovirus)

<220>

<221> misc_feature

<223> 引物

<400> 2

tggatccgcc atgacgtatc c 21

<210> 3

<211> 120

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 3

agatctacac gccgatgtag ggggcgaagc cggcggtcag cacgttgggg gtcaggtaca 60

gcttctgggg cagggtggcg ccgccgccgt tgatggcggg ttcaagtggg gggctcttaa 120

<210> 4

<211> 806

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有微小隐孢子虫 (Cryptosporidium parvum) 配体尾的 PCV2 ORF2

<400> 4

tggatccgcc atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag 60

ccatcttggc cagatcctcc gccgccgcc cttggctcgt ccccccgcc accgctaccg 120

[0002]

```

ttggagaagg aaaaatggca ttttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt      180
caaggctacc acagtcacaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga      240
cgactttgtt cccccgggag gggggaccaa caaaatctct atacccttg aatactacag      300
aataagaaag gttaaggttg aattctggcc ctgctccccc atcaccagg gtgatagggg      360
agtgggctcc actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac      420
ctatgaccca tatgtaaact actccctccg ccatacaatc ccccaacctt tctcctacca      480
ctcccggttac ttcacaccca aacctgttct tgactccact attgattact tccaacaaaa      540
taacaaaagg aatcagcttt ggctgaggct acaaacctct agaatgttg accacgtagg      600
cctcggcact gcgttcgaaa acagttaaata cgaccaggac tacaatatcc gigtaccat      660
gtatgtacaa ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttgaaccgg ccatcaacgg      720
cggcgggccc accctgcccc agaagctgta cctgaccccc aacgtgctga ccgccggctt      780
cgccccctac atcggcgtgt agatct      806

```

<210> 5

<211> 266

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有 CSL 尾的 PCV2 ORF2 的翻译

<400> 5

```

Gly Ser Ala Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His
1              5              10              15

```

```

Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Arg Pro Trp Leu
20              25              30

```

```

Val His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe
35              40              45

```

```

Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr
50              55              60

```

```

Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp
65              70              75              80

```

```

Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe
85              90              95

```

```

Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser
100              105              110

```

```

Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu
115              120              125

```

```

Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr
130              135              140

```

[0003]

Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His
145 150 155 160

Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr
165 170 175

Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr
180 185 190

Ser Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser
195 200 205

Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe
210 215 220

Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro Ala Ile Asn Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ala Thr Leu Pro Gln Lys Leu Tyr Leu Thr Pro Asn Val Leu
245 250 255

Thr Ala Gly Phe Ala Pro Tyr Ile Gly Val
260 265

<210> 6
<211> 24
<212> PRT
<213> 猪流感病毒(swine influenza virus)

<400> 6

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 7
<211> 702
<212> DNA
<213> 猪圆环病毒(Porcine circovirus)

<400> 7
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctegtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
acagtcacaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240
ccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccc atcacccagg gtgataggg agtgggctcc 360
actgctgta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
tatgtaaact actctcccg ccatacaatc cccaaccct tctctacca ctccggttac 480
ttcacacca aacctgttct tgactccact attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggctgagget acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600

[0004]

gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctggaaccct aa 702

<210> 8
<211> 702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 AscI 限制酶位点的 PCV2 ORF2

<400> 8
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgctggcg cgcccgagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
acagtcacaa cgccctcctg ggcgggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240
ccccggggag ggggggacaa caaaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccggtac 480
ttcacacca aacctgttct tgactccact attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggctgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca ctggaaccct aa 702

<210> 9
<211> 783
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCV2 ORF2 与猪流感(swine influenza) M2ael

<400> 9
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgctggcg cgccatgagc 120
ctgctgaccg aggtggagac ccccatccgc aacgagtggg gctgccgtg caacgatagc 180
agcgatcggc gcgccgaag gaaaaatggc atcttcaaca ccgcctctc ccgcacctc 240
ggatatactg tcaaggctac cacagtcaca acgcccctct gggcggtgga catgatgaga 300
tttaatatg acgactttgt tccccggga ggggggacca aaaaaatctc tatacccttt 360
gaatactaca gaataagaaa ggttaagggt gaattctggc cctgctcccc catcaccag 420
ggtgataggg gagtgggctc cactgctgtt attctagatg ataactttgt aacaaaggcc 480
acagccctaa cctatgacco atatgtaaac tactcctccc gccatacaat ccccaaccc 540
ttctctacc actccggtt ctccacccc aaacctgttc ttgactccac tattgattac 600
ttccaaccaa ataacaaaag gaatcagctt tggctgagge tacaacctc tagaaatgtg 660
gaccacgtag gcctcggcac tgcgttcgaa aacagtaaat acgaccagga ctacaatatc 720

[0005]

cgtgtaacca tgtatgtaca attcagagaa tttaatctta aagacccccc acttgaaccc 780

taa 783

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒(Porcine circovirus)

<400> 10

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
225 230

[0006]

```

<210> 11
<211> 260
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PCV2 ORF2 与内部猪流感 (swine influenza) M2ael

<400> 11

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1          5          10          15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20          25          30

Arg His Arg Trp Arg Ala Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
35          40          45

Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Arg Arg
50          55          60

Ala Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe
65          70          75          80

Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val
85          90          95

Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly
100         105         110

Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val
115         120         125

Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly
130         135         140

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

Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr
165         170         175

Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro
180         185         190

Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn
195         200         205

Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn Val Asp His Val Gly
210         215         220

Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile
225         230         235         240

Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro

```

[0007]

245	250	255
Pro Leu Glu Pro 260		
<210> 12		
<211> 774		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCV2 ORF2 与氨基猪流感 M2ae1		
<400> 12		
atgagtctgc tgactgaagt agaaacacca atacgcaatg agtggggctg ccgctgcaac	60	
gactcttctg atggtaccta tccaaggagg cgttaccgca gaagaagaca ccgccccgc	120	
agccatcttg gccagatcct ccgccgccgc ccttggtctg tccacccccg ccaccgctac	180	
cgttggagaa ggaaaaatgg catcttcaac acccgctct cccgcacctt cggatatact	240	
gicaggcta ccacagtcac aacgccctcc tgggcgggtg acatgatgag atttaattatt	300	
gacgactttg ttccccggg aggggggacc aacaaaatct ctataccctt tgaatactac	360	
agaataagaa aggttaaggt tgaattctgg ccttgctccc ccatcaccca gggatagagg	420	
ggagtgggct ccaactgctg tattctagat gataactttg taacaaaggc cacagcccta	480	
acctatgacc catatgtaaa ctactcctcc cgccatacaa tcccccaacc cttctcctac	540	
cactcccggt acttcacacc caaacctggt ctgactcca ctattgatta cttccaacca	600	
aataacaaaa ggaatcagct ttggctgagg ctacaaacct ctagaaatgt ggaccacgta	660	
ggcctcggca ctgcgttga aaacagtaaa tacgaccagg actacaatat cegtgttaacc	720	
atgtatgtac aattcagaga atttaattct aaagaccccc cacttgaacc ctaa	774	
<210> 13		
<211> 257		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCV2 ORF2 与氨基猪流感 M2ae1		
<400> 13		
Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly		
1 5 10 15		
Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Gly Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr		
20 25 30		
Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg		
35 40 45		
Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg		
50 55 60		
Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr		
65 70 75 80		

[0008]

Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met
85 90 95

Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys
100 105 110

Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu
115 120 125

Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser
130 135 140

Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu
145 150 155 160

Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln
165 170 175

Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp
180 185 190

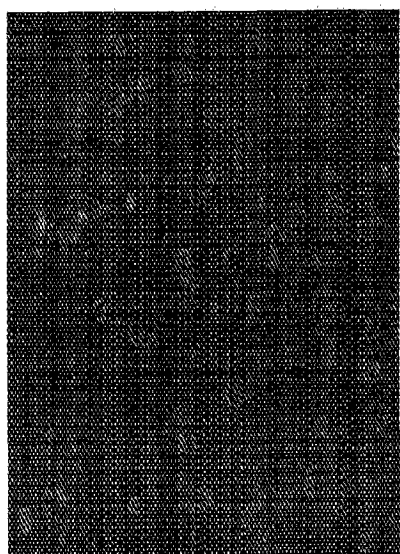
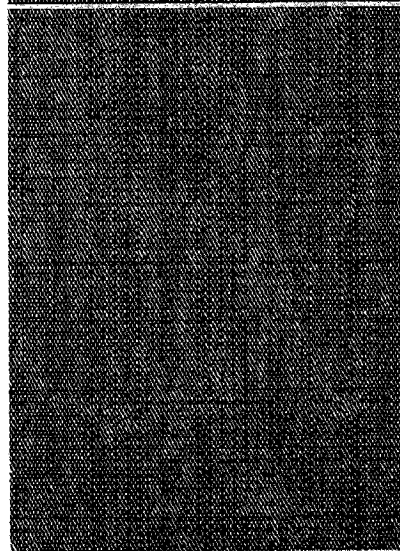
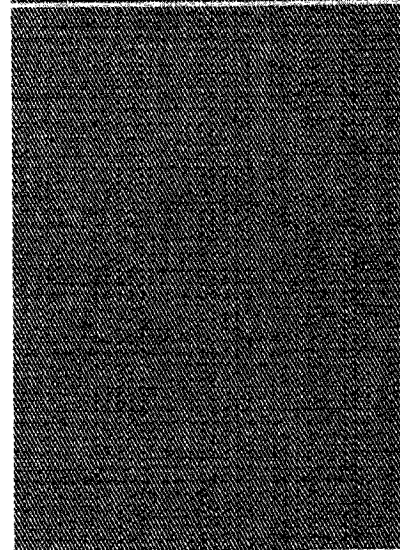
Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp
195 200 205

Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
210 215 220

Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr
225 230 235 240

Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu
245 250 255

Pro

受到 ORF2-CSL 杆状病毒感染的 SF 细胞**1a 用家兔抗 CSL 血清（家兔#13）染色****1b 用猪抗 PCV2 血清染色****1c 用山羊抗家兔 FITC 染色****图 1**

10% Bis-Tris/MOPS 凝胶

- 1) 10 kDa 标志物
- 2) 96hr 沉淀物的 NaHCO_3 溶胞物-15 μl
- 3) 120hr 沉淀物的 NaHCO_3 溶胞物-15 μl
- 4) 144hr 沉淀物的 NaHCO_3 溶胞物-15 μl
- 5) 96hr 上清液-20 μl
- 6) 120hr 上清液-20 μl
- 7) 144hr 上清液-20 μl
- 8) ORF2 Lot001-20 μl

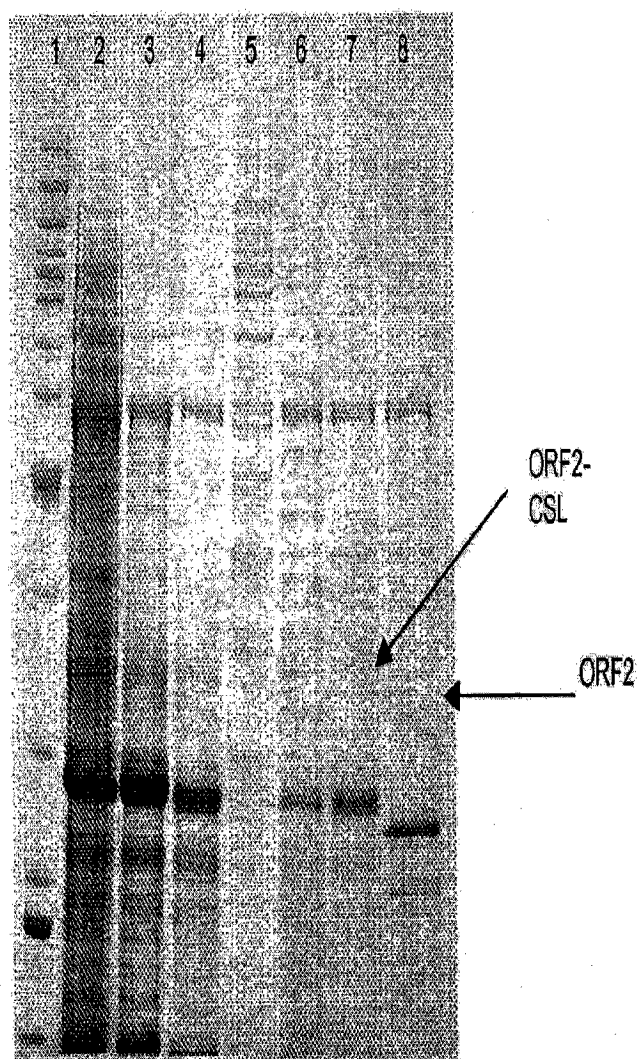


图 2

点印迹结果



图 3

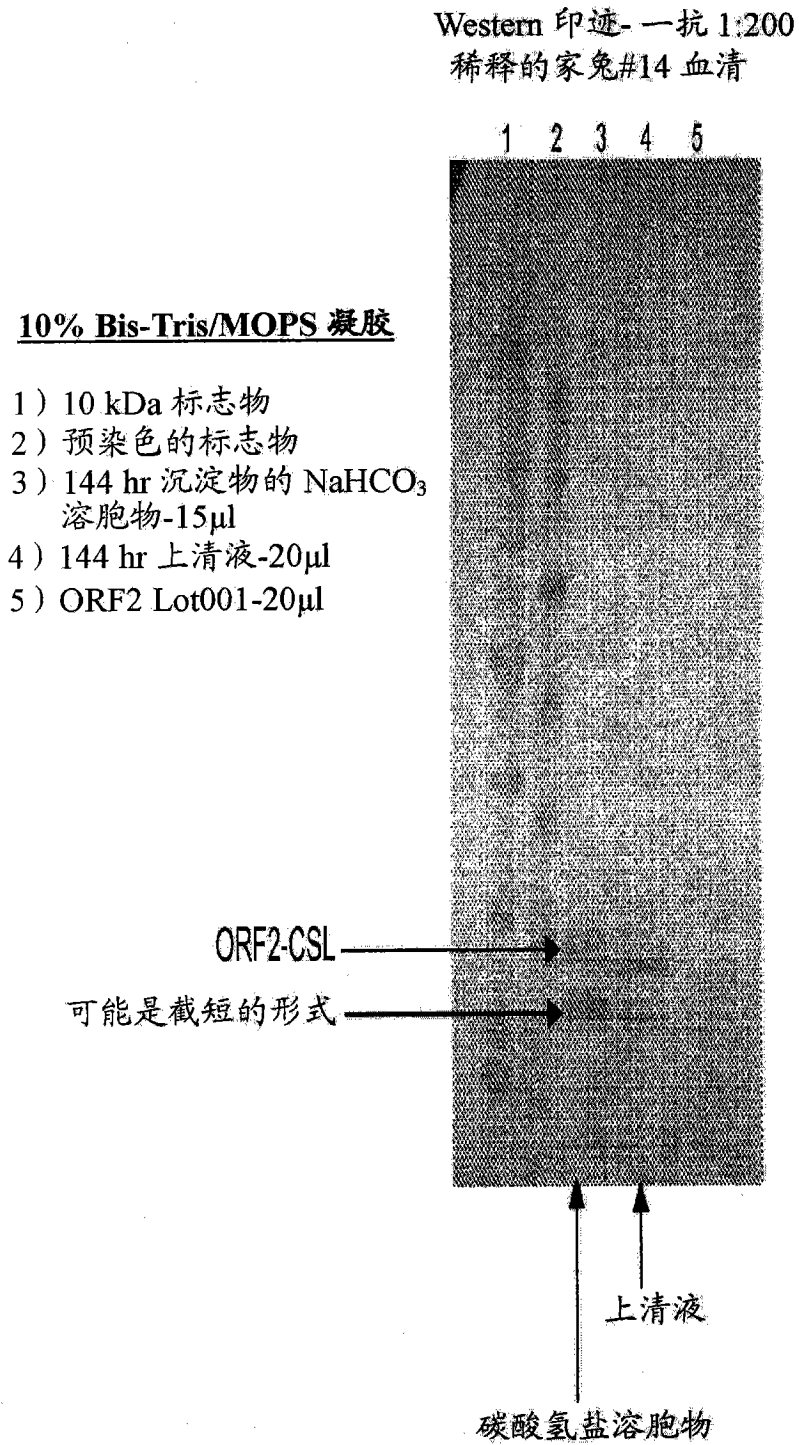


图 4a

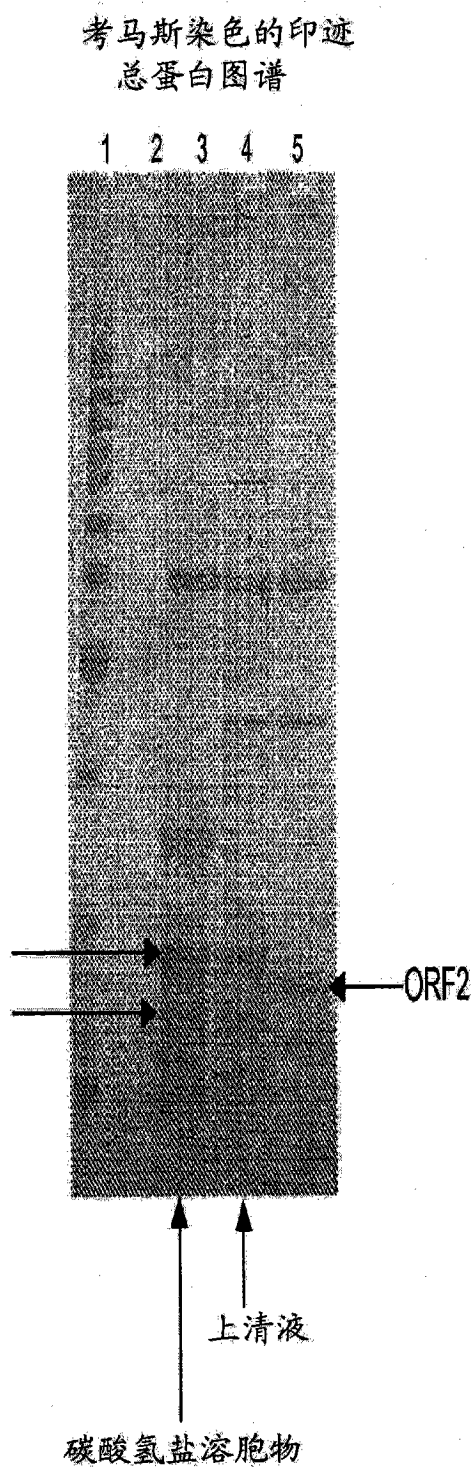


图 4b

```

M T Y P R R R Y R R R R R R R R S H L G Q I L R R R P W L V H P R H 34
>PCV2 AscI ATGACGTATCCAGGAGCGTTACCCGAGAAGAACACCGCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCCGCCCTGGTCCACCCCGCCACC 103
M T Y P R R R Y R R R R R R R R S H L G Q I L R R R R P W L V H P R H 34
>PCV2 ORF2 ATGACGTATCCAGGAGCGTTACCCGAGAAGAACACCGCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCCGCCCTGGTCCACCCCGCCACC 103

R W R R R R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V T T P S W A V 69
*AscI
>PCV2 AscI GCTGGCGGCCGGAAGAAAAATGGCATCTTCAACACCGCCCTCTCCCGCACCTTGGATATACCTGCAAGGTACACAGTCACAACGCCCTCCTGGCGGT 206
R Y R R R R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K A T T V T T P S W A V 69
>PCV2 ORF2 GCTACCGTTGGAGAAGAAAAATGGCATCTTCAACACCGCCCTCTCCCGCACCTTGGATATACCTGCAAGGTACACAGTCACAACGCCCTCCTGGCGGT 206

D M M R F N I D D F V P P G G G T N K I S I P F E Y Y R I R K V K V 103
>PCV2 AscI GGACATGATGAGATTAAATATTGACGACTTGTTCGCCGGGAGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGTTAAGTT 309
D M M R F N I D D F V P P G G G T N K I S I P F E Y Y R I R K V K V 103
>PCV2 ORF2 GGACATGATGAGATTAAATATTGACGACTTGTTCGCCGGGAGGGGGACCAACAAAATCTCTATACCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGTTAAGTT 309

E F W P C S P I T Q G D R G V G S T A V I L D D N F V T K A T A L T 137
>PCV2 AscI GAATTCGGCCCTGCTCCGCCATACACCCAGGTGATAGGGAGTGGGTCCACTGCTGTTATCTTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCT 412
E F W P C S P I T Q G D R G V G S T A V I L D D N F V T K A T A L T 137
>PCV2 ORF2 GAATTCGGCCCTGCTCCGCCATACACCCAGGTGATAGGGAGTGGGTCCACTGCTGTTATCTTAGATGATAACTTTGTAACAAAGGCCACAGCCCTAACCT 412

Y D P Y V N Y S S R H T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D 172
>PCV2 AscI ATGACCCATATGTAACTACTCTCCCGCCATACAAATCCCAACCTTCTCTACCACTCCCGTTACTTCACACCCCAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGA 515
Y D P Y V N Y S S R H T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D 172
>PCV2 ORF2 ATGACCCATATGTAACTACTCTCCCGCCATACAAATCCCAACCTTCTCTACCACTCCCGTTACTTCACACCCCAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGA 515

Y F Q P N N K R N Q L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K 206
>PCV2 AscI TTACTTCCAACCAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACTAGGCTCGGCACCTGCGTTCGAAAACAGTAAA 618
Y F Q P N N K R N Q L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K 206
>PCV2 ORF2 TTACTTCCAACCAATAACAAAAGGAATCAGCTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGGACCACTAGGCTCGGCACCTGCGTTCGAAAACAGTAAA 618

Y D Q D Y N I R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L E P * 233
>PCV2 AscI TACGACGAGACTACAATATCCGTGTACCATGTATGTACAATTCAGAGAAATTAATCTTAAAGACCCCTGACTTGAACCTTAA 702
Y D Q D Y N I R V T M Y V Q F R E F N L K D P P L E P * 233
>PCV2 ORF2 TACGACGAGACTACAATATCCGTGTACCATGTATGTACAATTCAGAGAAATTAATCTTAAAGACCCCTGACTTGAACCTTAA 702

```

PCV2 AscI = 添加了 AscI 位点的 PCV2 ORF2.

PCV2 ORF2 = 未修饰的 PCV2 ORF2.

图 5. 带 AscI 限制酶位点的 PCV2 ORF2 与未修饰 PCV2 ORF2 的比对

PCV2 AscI = 添加了 AscI 位点的 PCV2 ORF2.
Int M2ael = PCV2 AscI 编码区, 在 AscI 位点插入了 M2ael.

图 6. 序列比对指示 PCV2 AscI 编码区中插入了 M2ae1 区

```

M S L L T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D G T Y P R R R Y R R 34
    *KpnI
>aminoM2ae ATGAGTCTGCTGACTGAAGTAGAAACACCAATACCGCAATGAGTGGGGCTGCGGCTGCAACGACTCTCTGTAGTGGTACCTATCCAAAGGAGCGTTACCGCAGAA 103
    M      T Y P R R R Y R R 10
>PCV2 ORF2 ATG-----ACGTATCCAAGGAGCGGTTACCGCAGAA 31

R R H R P R S H L G Q I L R R R P W L V H P R H R Y R W R R K N G I F 69
>aminoM2ae GAAGACACCGCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCTCCGCGCGCCCGCTCCGTCACCCCGCCACCGTACCGTGGAGAGGAGGAAATGCGATCTT 206
    R R H R P R S H L G Q I L R R R P W L V H P R H R Y R W R R K N G I F 45
>PCV2 ORF2 GAAGACACCGCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCTCCGCGCGCCCGCTCCGTCACCCCGCCACCGTACCGTGGAGAGGAGGAAATGCGATCTT 134

N T R L S R T F G Y T V K A T T V T T P S W A V D M M R F N I D D F 103
>aminoM2ae CAACACCGCGCTCTCCGCGACCTTCGGATATATCTCAAGGCTACACAGTCACACCGCCCTCCTGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTT 309
    N T R L S R T F G Y T V K A T T V T T P S W A V D M M R F N I D D F 79
>PCV2 ORF2 CAACACCGCGCTCTCCGCGACCTTCGGATATATCTCAAGGCTACACAGTCACACCGCCCTCCTGGCGGTGGACATGATGAGATTTAATATTGACGACTTT 237

V P P G G G T N K I S I P F E Y Y R I R K V K V E F W P C S P I T Q 137
>aminoM2ae GTTCCCGCGGAGGGGGACCAACAATCTCTATACCCCTTTTGAATTAAGGTTGAATTTCTGGCCCTGCTCCCGCATCACCCAGG 412
    V P P G G G T N K I S I P F E Y Y R I R K V K V E F W P C S P I T Q 113
>PCV2 ORF2 GTTCCCGCGGAGGGGGACCAACAATCTCTATACCCCTTTTGAATTAAGGTTGAATTTCTGGCCCTGCTCCCGCATCACCCAGG 340

G D R G V G S T A V I L D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S S R H 172
>aminoM2ae GTGATAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTATCTAGATGATACTTTGTAAAGAGGCGCCACAGCCCTAACCTATGACCCCATATGTAAACTACTCTCCCGCCA 515
    G D R G V G S T A V I L D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S S R H 148
>PCV2 ORF2 GTGATAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTATCTAGATGATACTTTGTAAAGAGGCGCCACAGCCCTAACCTATGACCCCATATGTAAACTACTCTCCCGCCA 443

T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N N K R N Q 206
>aminoM2ae TACAATCCCCAACCCCTTCTCTACCACTCCCGTTACTTCACACCCAAACCTGTTCTTGTACTCCACTATGATTACTTCCAAACAAATAACAAAAGGAATCAG 618
    T I P Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N N K R N Q 182
>PCV2 ORF2 TACAATCCCCAACCCCTTCTCTACCACTCCCGTTACTTCACACCCAAACCTGTTCTTGTACTCCACTATGATTACTTCCAAACAAATAACAAAAGGAATCAG 546

L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K Y D Q D Y N I R V T 240
>aminoM2ae CTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGACACAGTAGGCTCGGCACTGCGTTCCGAAACAGTAATACGACCACTACAAATATCCGTGTAAACCA 721
    L W L R L Q T S R N V D H V G L G T A F E N S K Y D Q D Y N I R V T 216
>PCV2 ORF2 CTTTGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAAATGTGACACAGTAGGCTCGGCACTGCGTTCCGAAACAGTAATACGACCACTACAAATATCCGTGTAAACCA 649

M Y V Q F R E F N L K D P P L E P *
>aminoM2ae TGTATGTACAATTCAGAGAAATTTAATCTTAAAGACCCCGCCACTTGAACCCCTAA
    M Y V Q F R E F N L K D P P L E P *
>PCV2 ORF2 TGTATGTACAATTCAGAGAAATTTAATCTTAAAGACCCCGCCACTTGAACCCCTAA

```

aminoM2ae = 有氨基 M2ae1 的 PCV2 ORF2.
PCV2 ORF2 = 未修饰的 PCV2 ORF2.

图 7. 氨基 M2ae1PCV2 ORF2 与未修饰的 PCV2 ORF2 的比对