

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810019268.4

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月9日

[11] 公开号 CN 101215575A

[22] 申请日 2008.1.18

[21] 申请号 200810019268.4

[71] 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市钟灵街50号江苏省农科院科技处张初贤

[72] 发明人 王芳 薛家兵 范志宇 胡波
徐为中 张则斌 何孔旺

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司
代理人 张素卿

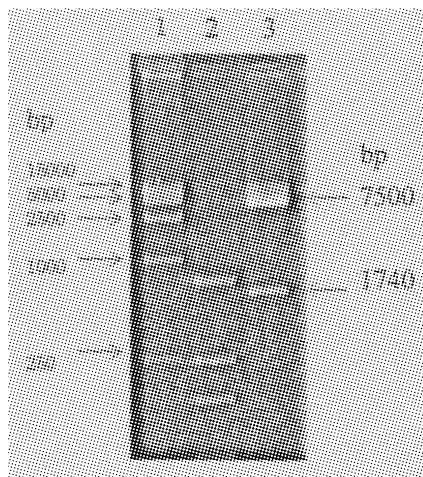
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒及疫苗

[57] 摘要

本发明涉及兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒及疫苗，属于生物制药领域。通过 RT-PCR 扩增兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白 VP60 全基因，通过分子生物学技术构建腺病毒重组载体，转染 HEK293-A 细胞，使 VP60 基因获得表达，然后以重组腺病毒表达的兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白 VP60 作为抗原，加上相应的佐剂制成兔病毒性出血症的基因工程疫苗。本发明可以提供一种免疫效果好、工艺简便的兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因工程疫苗，用于预防控制兔病毒性出血症。



1. 兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒,其特征是,由以下步骤构建而成:

1) 兔病毒性出血症病毒总 RNA 的提取

用 DEPC 处理过的水按体积比 1:10 加入发生兔病毒性出血症的兔肝脏组织中,研磨成悬液,装入用 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中,于-20℃反复冻融 3 次,在高速冷冻离心机上,以 7 200 r/min,离心 20 min,取上清 200 μL,加入 Trizol 800 μL,振荡混匀后,室温放置 10 min,加入氯仿 210 μL,剧烈振荡后,室温放置 1 min,4℃,10 000 r/min 离心 15 min,取上层水相 750 μL,加入 0.5 mL 异丙醇,混匀,-20℃放置 15 min,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,去上清,缓缓加入 75%乙醇 1 mL 洗涤,4℃ 8 000 r/min 离心 5 min,去上清,室温干燥 20 min,加入 DEPC 水 10 μL,使充分溶解;

2) 设计合成以下引物:

P3: 5' - CTAGGTACCATGGAGGGCAAA -3' Kpn I

P4: 5' - GCACTCGAGTCAGACATAAGAAA -3' Xho I

3) 扩增衣壳蛋白 VP60 基因:

反转录体系为: 10×Buffer 2 μl、10mM dNTPs 2 μl、下游引物 1 μl、RNA 酶抑制剂 0.5 μl、RNA 模板 12 μl, AMV 反转录酶 0.5 μl, DEPC 水 2 μl, 总体积为 20 μl, 瞬间离心混匀, 65℃反应 15min, 42℃孵育 1h, 95℃5min, -20℃保存备用;

PCR 反应体系为: 10×Reaction buffer 2.5 μl、25mM MgCl₂ 1.5 μl、2.5mM dNTPS 0.5 μl、50mM P1 0.5 μl、50mM P2 0.5 μl、模板 RNA 4.0 μl、ddH₂O 15 μl、EX Taq™ polymerase 0.5 μl, 总体积 25 μl, 瞬间离心混匀, 采用热盖进行 PCR 扩增反应: 94℃变性 3min, 94℃变性 1min, 57℃退火 1min, 72℃延伸 2min, 30 个循环后, 72℃延伸 10min, 结束反应; 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得的衣壳蛋白 VP60 基因扩增片段大小为 1740bp;

4) 重组腺病毒质粒 pAd-VP60 的构建:

将扩增的 VP60基因先克隆入腺病毒穿梭载体pShuttle-CMV, 获得重组质粒 pShuttle-CMV-VP60, 把重组质粒pShuttle-CMV-VP60 用Pme I 线性化, 并与腺病毒骨架载体pAd共同电转化BJ5183细胞, 经Pac I酶切鉴定, 获得阳性重组腺病毒质粒pAd-VP60。

5) 转染 将重组腺病毒质粒pAd-VP60转染 HEK293-A细胞, 经鉴定纯化获得重组病毒, 并冻存于4℃、-20℃和液氮中。

2、用权利要求 1 所述兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒制备的疫苗。

3、权利要求 2 所述疫苗的制备方法, 包括: 培养 HEK293-A 细胞至对数生长期, 接种相应重组病毒, 等细胞有病变后 5 天收毒, 测血凝 HA 效价, 用灭菌磷酸盐缓冲溶液 PBS PH 7.2 调整抗原溶液, 以 2%甲醛溶液灭活后按抗原: 铝胶佐剂为 9: 1 比例加入佐剂, 混匀, 即为获得的兔病毒性出血症基因工程疫苗。

4. 权利要求 1 所述重兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒真核表达的病毒性出血症病毒衣壳蛋白在制备兔病毒性出血症诊断抗原方面的应用。

兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒及疫苗

技术领域

本发明涉及兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒及疫苗，属于生物制药领域。

背景技术

兔病毒性出血症，又称兔瘟，是由兔病毒性出血症病毒（RHDV）引起的一种以急性、高度传染性、大面积死亡为特征的兔传染病，感染兔通常48~72 h死亡，主要特征为传染性极强、呼吸系统出血、肝坏死、脏器水肿、淤血和出血等变化，给全世界养兔业造成了巨大的经济损失。国际兽医局将该病列为B类传染病，我国农业部96号令颁布为二类疫病。RHDV出现比较突然且流行速度极快，现有研究结果表明世界范围内的所有RHDV分离株均为同一血清型，无论是遗传特性还是抗原性都很稳定。目前用兔病毒性出血症组织灭活疫苗免疫是预防该病的主要措施，疫苗的制备过程中必须以RHDV感染致死的兔内脏组织为原料。近年来，随着兔产品等行业的兴起以及其他动物疫苗等对家兔的需求的增加，市场对兔病毒性出血症疫苗的需求量增加了许多，但是用于制备组织灭活疫苗的非免疫兔的供应量却很不稳定，造成传统的组织灭活苗的成本不断增加，加之组织灭活苗存在散播强毒的潜在危险等种种缺点，而RHDV至今没有在细胞上传代成功，严重制约了更加安全、稳定的兔病毒性出血症疫苗的研制与生产，使人们对兔病毒性出血症疫苗的研究转向了既能起到保护作用，又能解决生物安全问题的基因工程疫苗的研制。

近年来的研究认为，RHDV属杯状病毒，含有一条单股正链RNA，由7437个核苷酸组成，与一般的杯状病毒不同，RHDV只有2个开放阅读框架(ORF)，并由ORF1的3'端部分序列编码RHDV衣壳蛋白VP60，其基因片段长度为1740 bp，共编码580个氨基酸，VP60是RHDV唯一的结构蛋白，与诱导抗病毒感染的免疫反应直接相关。

腺病毒表达载体系统是一种表达、递呈外源抗原的有效系统，重组病毒可激发人和多种动物特异性体液和细胞免疫。病毒表达载体具有许多优点，表达的蛋白经折叠和修饰后活性良好，目前腺病毒活疫苗已在美国批准使用，证明是安全、有效的，不易发生基因整合。因此，利用该系统表达的VP60蛋白制备成基因工程苗具有广阔的前景。另外，腺病毒可在肠道复制也可在呼吸道复制，还具有口服疫苗的发展前景。

发明内容

技术问题 本发明的目的是通过分子生物学技术构建腺病毒重组载体，转染HEK293-A细胞，使VP60基因获得表达，提供一种免疫效果好、工艺简便的兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因工程疫苗及其制备方法。

技术方案 本发明是通过RT-PCR扩增兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白VP60全基因，通过分子生物学技术构建腺病毒重组载体，转染HEK293-A细胞，使VP60基因获得表达，然后以重组腺病毒表达的兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白VP60作为抗原，加上相应的佐剂制成预防兔病毒性出血症的基因工程疫苗。

本发明采用的具体技术路线包括以下三个方面：

一、表达兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白 VP60 的重组腺病毒的获得

1) 兔病毒性出血症病毒总 RNA 的提取

用 DEPC 处理过的水按体积比 1 : 10 加入发生兔病毒性出血症的兔肝脏组织中，研磨成悬液，装入用 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中，于 -20℃ 反复冻融 3 次，在高速冷冻离心机上，以 7 200 r/min，离心 20 min，取上清 200 μL，加入 Trizol 800 μL，振荡混匀后，室温放置 10 min，加入氯仿 210 μL，剧烈振荡后，室温放置 1 min，4℃，10 000 r/min 离心 15 min，取上层水相 750 μL，加入 0.5 mL 异丙醇，混匀，-20℃ 放置 15 min，4℃ 10 000 r/min 离心 10 min，去上清，缓缓加入 75 % 乙醇 1 mL 洗涤，4℃ 8 000 r/min 离心 5 min，去上清，室温干燥 20 min，加入 DEPC 水 10 μL，使充分溶解；

2) 设计合成以下引物：

P3: 5' - CTAGGTACCATGGAGGGCAAA -3' Kpn I

P4: 5' - GCACCTCGAGTCAGACATAAGAAA -3' Xho I

3) 扩增衣壳蛋白 VP60 基因：

反转录体系为：10×Buffer 2 μl、10mM dNTPs 2 μl、下游引物 1 μl、RNA 酶抑制剂 0.5 μl、RNA 模板 12 μl，AMV 反转录酶 0.5 μl，DEPC 水 2 μl，总体积为 20 μl，瞬间离心混匀，65℃ 反应 15min，42℃ 孵育 1h，95℃ 5min，-20℃ 保存备用；

PCR 反应体系为：10×Reaction buffer 2.5 μl、25mM MgCl₂ 1.5 μl、2.5mM dNTPS 0.5 μl、50mM P1 0.5 μl、50mM P2 0.5 μl、模板 RNA 4.0 μl、ddH₂O 15 μl、EX Taq™ polymerase 0.5 μl，总体积 25 μl，瞬间离心混匀，采用热盖进行 PCR 扩增反应：94℃ 变性 3min，94℃ 变性 1min，57℃ 退火 1min，72℃ 延伸 2min，30 个循环后，72℃ 延伸 10min，结束反应；对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定，获得的衣壳蛋白 VP60 基因扩增片段大小为 1740bp；

4) 重组腺病毒质粒 pAd-VP60 的构建：

将扩增的 VP60 基因先克隆入腺病毒穿梭载体 pShuttle-CMV，获得重组质粒 pShuttle-CMV-VP60，把重组质粒 pShuttle-CMV-VP60 用 Pme I 线性化，并与腺病毒骨架载体 pAd 共同电转化 BJ5183 细胞，经 Pac I 酶切鉴定，获得阳性重组质粒 pAd-VP60；

5) 转染：将重组腺病毒质粒 pAd-VP60 转染 HEK293-A 细胞，经鉴定纯化获得重组病毒，并冻存于 4℃、-20℃ 和液氮中；

6) 重组病毒的鉴定

(1) RT-PCR 鉴定

收集感染重组病毒的细胞，以目的基因上下游引物进行 RT-PCR，1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果显示电泳条带为 1740bp，与目的基因大小一致，说明目的基因已经随病毒基因组整合入细胞中。

(2) 表达产物的鉴定

间接免疫荧光实验 (IFA)

将重组病毒接种对数生长期的细胞，培养至发生病变时用间接免疫荧光法（IFA）检测重组蛋白的表达，结果显示，重组感染的细胞具有很强的特异性荧光，而对照组细胞无特异的荧光，说明 VP60 蛋白得到表达，且表达产物存在于细胞内。

血凝试验（HA）和血凝抑制试验

重组病毒感染细胞裂解上清和细胞培养上清均能凝集 1%人“0”型红细胞悬液。同时表达的 VP60 蛋白的血凝特性可被 RHDV 高免血清所抑制，表明表达的 VP60 蛋白具有与 RHDV 相似的血凝活性。重组病毒真核表达的病毒性出血症病毒衣壳蛋白可用作兔病毒性出血症的诊断抗原方面。

二、表达重组兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白的动物免疫保护效果

测定重组兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白的 HA 效价，用灭菌生理盐水稀释至 HA 效价在 2^6 - 2^8 之间，按比例加入氢氧化铝胶佐剂，按不同剂量分组免疫非免疫家兔，并设对照组，于免疫后第 22 天以 HA 效价大于 10 的 RHDV 强毒肝脏悬液 1mL 攻击，观察 14 天，并记录结果，结果显示，免疫 HA 效价 2^6 重组蛋白 1 毫升的家兔就能抵抗兔病毒性出血症强毒的攻击。

三、疫苗制备：培养 HEK293-A 细胞至对数生长期，接种相应重组病毒，等细胞有病变后 5 天收毒，测血凝 HA 效价，用灭菌磷酸盐缓冲溶液 PBS PH 7.2 调整抗原溶液，以 2%甲醛溶液灭活后按抗原：铝胶佐剂为 9：1 比例加入佐剂，混匀，即为获得的兔病毒性出血症基因工程疫苗。

有益效果 本发明的特点和优点如下：本发明选取兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白 VP60 全基因作为目的基因进行表达，原因是此蛋白能诱导抗病毒性出血症病毒感染免疫反应，而且此蛋白是病毒性出血症病毒的唯一结构蛋白，具有良好的免疫原性；真核表达系统具有类似于哺乳动物细胞的翻译后修饰功能，使重组衣壳蛋白在结构和功能上更接近天然蛋白，试验的结果显示，表达的蛋白具有与病毒性出血症病毒相同的生物活性，同时真核表达载体系统是一种表达、递呈外源抗原的有效系统，重组病毒可激发人和多种动物特异性体液和细胞免疫。目前腺病毒活疫苗已在美国批准使用，证明是安全、有效的，不易发生基因整合。因此，利用此系统表达的 VP60 蛋白制备成基因工程疫苗具有很好的生物安全性；表达的重组蛋白无需特殊处理纯化就可用于疫苗配制，操作简便。

事实证明，本发明表达的重组蛋白具有良好的抗原性和与兔病毒性出血症病毒相似的血凝活性，因此是很好的兔病毒性出血症疫苗抗原。动物免疫试验结果显示，用重组兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白制成的疫苗免疫非免疫家兔，免疫后以 RHD 强毒攻击，免疫家兔获得 100%的保护作用，说明本发明在实际应用中具有良好的免疫效力，在兔病毒性出血症预防控制方面具有重要的应用价值，同时具备良好的生物安全性。

附图说明

图 1 腺病毒表达系统 RHDV VP60 基因 RT-PCR 结果

1. DNA 分子量标准(DL-2000); 2. RT-PCR 产物

图 2 腺病毒表达系统 pShuttle-CMV-VP60 的酶切鉴定

1. DL 15 000 Marker; 2. DL 2 000 Marker; 3. pShuttle-CMV- VP60 (Kpn I / Xho I)

图3 腺病毒表达系统重组 pAd-VP60 酶切鉴定结果

1. pAd-VP60 (Pac I); 2. DL 15 000 Marker

图4 腺病毒表达系统中重组腺病毒感染 HEK293-A 细胞的间接免疫荧光结果 具体实施方式

一、兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白 VP60 基因的扩增和 T/A 克隆

1、兔病毒性出血症病毒 (RHDV) 总 RNA 的提取

用 DEPC (diethylpyrocarbonate 焦碳酸二乙酯) 处理过的水按体积比 1:10 加入发生兔病毒性出血症的兔肝脏组织中, 研磨成悬液, 装入用 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中, 于 -20°C 反复冻融 3 次, 在高速冷冻离心机上, 以 7 200 r/min, 离心 20 min, 取上清 200 μ L, 加入 Trizol (TaKaRa 公司) 800 μ L, 振荡混匀后, 室温放置 10 min, 加入氯仿 210 μ L, 剧烈振荡后, 室温放置 1 min, 4°C, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上层水相 750 μ L, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀, -20°C 放置 15 min, 4°C 10 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 缓缓加入 75% 乙醇 1 mL 洗涤, 4°C 8 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 室温干燥 20 min, 加入 DEPC 水 10 μ L, 使充分溶解。

2、设计合成引物

根据 GenBank 数据库中的 RHDV 基因组序列 VP60 序列 (M67473), 利用 Primer 5.0 软件自行设计, 由大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 合成引物:

P3: 5' - CTAGGTACCATGGAGGGCAAA -3' (Kpn I)

P4: 5' - GCACTCGAGTCAGACATAAGAAA -3' (Xho I)

下划线部分为酶切位点

3、扩增衣壳蛋白 VP60 基因:

反转录体系为: 10 \times Buffer 2 μ L、10mM dNTPs 2 μ L、下游引物 1 μ L、RNA 酶抑制剂 0.5 μ L、RNA 模板 12 μ L, AMV 反转录酶 0.5 μ L, H₂O (DEPC 处理) 2 μ L, 总体积为 20 μ L, 瞬间离心混匀, 65°C 反应 15min, 42°C 孵育 1h, 95°C 5min, -20°C 保存备用。

PCR 反应体系为: 10 \times Reaction buffer 2.5 μ L、25mM MgCl₂ 1.5 μ L、2.5mM dNTPS 0.5 μ L、50mM P1 0.5 μ L、50mM P2 0.5 μ L、模板 RNA 4.0 μ L、ddH₂O 15 μ L、EX TaqTM polymerase 0.5 μ L, 总体积 25 μ L, 瞬间离心混匀, 采用热盖进行 PCR 扩增反应: 94°C 变性 3min, 94°C 变性 1min, 57°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min, 30 个循环后, 72°C 延伸 10min, 结束反应。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得的衣壳蛋白 VP60 基因扩增片段大小为 1740bp;

4、T/A 克隆与鉴定

电泳后将目的片段切下, 采用核酸凝胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit (TaKaRa 公司) 进行纯化 PCR 产物, 然后按照 pMD-19T-Vector 试剂盒说明, 将目的片段克隆入 pMD-19T-Vector (TaKaRa 公司), 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落培养并提取质粒, 经相应限制性酶切及电泳鉴定, 获得重组质粒 pMD-19T-VP60, 阳性克隆送至 TaKaRa (大连市) 进行测序。

5、扩增的 VP60 基因的序列比较与分析

利用DNASTAR 5.0序列分析软件对VP60的测序结果与GenBank上发表的VP60基因进行核苷酸序列的同源性分析。

二、重组腺病毒质粒 pAd-VP60 的构建:

将含有目的片段的pMD-19T-VP60质粒与腺病毒穿梭载体pShuttle-CMV（购自Stratagene公司）同时进行Kpn I 和Xho I 双酶切后，用T4 DNA连接酶进行连接，转化DH5 a 感受态细胞，双酶切鉴定后获得重组质粒pShuttle-CMV-VP60。把重组质粒pShuttle-CMV-VP60 用Pme I 线性化，并与腺病毒骨架载体pAdEasy-1共同电转化BJ5183细胞（购自Stratagene公司）经Pac I酶切鉴定，获得阳性重组质粒，构建出腺病毒重组质粒pAd-VP60。

三、转染细胞，获得重组病毒

1 转染细胞和纯化

转染前一天铺 HEK293-A 细胞到 24 孔板里过夜培养，第二天换无血清的 DMEM, 37°C 5% CO₂ 温箱中培养 2h, 每一孔取 Pac I 酶切线性化的重组质粒 pAd-VP60 5 μL, 脂质体 2 μL, 各用转染稀释液稀释至 50 μL, 轻轻混匀, 放置 20min, 加入对应的细胞孔中, 37°C 孵育。4~6 小时后换 2% 血清的 DMEM 1ml, 每天观察细胞病变。将第一代病毒液冻融两次后以 1% 体积比接种 HEK293-A 细胞传代, 得到第 2 代重组病毒。以第 2 代重组病毒为毒种进行一次蚀斑纯化。

2 鉴定

(1) RT-PCR检测mRNA

将接种重组腺病毒细胞和未接种重组腺病毒细胞各一瓶, 反复冻融 2 次, 取 200 微升提取 RNA, 以目的基因上下游引物进行 RT-PCR 检测, 结果显示从接种重组腺病毒细胞中扩增出 VP60 基因条带, 大小为 1740bp; 而未接种重组腺病毒细胞则没有, 说明目的基因已经随腺病毒基因组整合入 HEK293-A 细胞中。

(2) 表达产物的鉴定

间接免疫荧光实验 (IFA)

在 24 孔细胞培养板上, 将纯化的重组病毒接种对数生长期的细胞 HEK293-A 24 小时后, 与一瓶正常 HEK293-A 同时以 1:40 稀释度的兔免疫血清为一抗, 1:100 稀释度的荧光标记羊抗兔 IgG 为二抗, 进行间接免疫荧光染色检测重组蛋白的表达, 结果显示, 重组腺病毒感染的细胞 HEK293-A 具有很强的特异性荧光, 而对照组细胞无特异的荧光, 说明 VP60 蛋白得到表达, 且表达产物存在于 HEK293-A 细胞内。

血凝试验 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验

分别取感染重组病毒的细胞裂解上清和细胞培养上清 50 μL 于圆底大孔血凝板以生理盐水作 2× 倍比稀释后, 加入等体积 1% 人 “O” 型红细胞悬液, 振荡均匀后, 置于 4°C 作用 45 分钟, 观察结果 (HA), 同时以其他重组杆状病毒作为阴性对照, 以 RHD 病兔肝脏 1: 5 匀浆上清作为阳性对照。另外, 于圆底大孔血凝板加入 50 μL RHDV 血清, 然后以生理盐水作 2× 倍比稀释后, 加入 4 个血凝单位的表达蛋白于每孔, 将血凝板置 37°C 作用 30 分钟, 每孔加 1% 人 “O” 型红细胞悬液 50 μL, 立即摇匀, 置 4°C 作用 45 分钟, 观

察结果(HI)。结果显示,重组病毒感染细胞裂解上清和细胞培养上清均能凝集1%人“O”型红细胞悬液,RHD病兔肝脏1:5匀浆上清能凝集红细胞悬液,表明表达的VP60蛋白具有与RHDV一样的血凝特性。当接种重组病毒后4天收毒,发现感染细胞裂解上清和细胞培养上清血凝效价均可达 2^6 以上。同时表达的VP60蛋白的血凝特性可被RHDV高免血清所抑制,表明表达的VP60蛋白具有与RHDV相似的生物学活性。

四 免疫保护试验

1 免疫抗原的制备

将重组腺病毒接种于HEK293-A细胞,4天后收毒,测表达蛋白的HA效价,用无菌灭菌生理盐水将重组腺病毒表达产物稀释至HA效价 2^6 。

2 试验动物分组、接种及攻毒

将15只非免疫家兔于免疫前采血测HA效价,并分成3组,每组5只,第一组注射1mL上述抗原,第二组注射2mL上述抗原,第三组注射3mL上述抗原,第四组作为对照组,注射生理盐水,免疫期间每隔7天采一次血并测HI效价,于免疫后第22天以HA效价大于10的RHD强毒肝脏悬液(肝组织:灭菌生理盐水=1:9)1mL攻击,观察14天,并记录结果。

3 试验结果

15只非免疫家兔于免疫前采血测HI效价在 $2^0\sim 2^3$,第一组、第二组、第三组于攻毒后14天内全部健活,保护率为100%,这三组家兔在攻毒前血清HI效价在 $2^5\sim 2^7$ 之间,第四组攻毒后三天内全部死亡,症状为典型的兔病毒性出血症(表2)。

表2 不同剂量免疫后对RHDV的保护性

| 试验组 | 第一组 | 第二组 | 第三组 | 第四组 |
|---------|------|------|------|-----|
| 动物数量 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 攻毒后死亡数量 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 保护率 | 100% | 100% | 100% | 0% |

五、疫苗制备:培养HEK293-A细胞至对数生长期,接种相应重组病毒,等细胞有病变后5天收毒,测血凝HA效价,用灭菌磷酸盐缓冲溶液PBS PH 7.2调整抗原溶液,以2%甲醛溶液灭活后按抗原:铝胶佐剂为9:1比例加入佐剂,混匀,即为获得的兔病毒性出血症基因工程疫苗。

动物免疫试验结果显示,用重组兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白制成的疫苗免疫非免疫家兔,免疫后以RHD强毒攻击,免疫家兔获得100%的保护作用,说明本发明在实际应用中具有良好的免疫效力,在兔病毒性出血症预防控制方面具有重要的应用价值,同时具备良好的生物安全性。

 序列表

- <110> 江苏省农业科学院
 <120> 兔病毒性出血症病毒衣壳蛋白基因重组腺病毒及疫苗
 <130> 说明书
 <140> 00
 <141> 2008-01-12
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> 引物
 <222> (1)..(21)
 <223>
 <400> 1
 ctaggtacca tggaggca a 21
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工合成
 <220>
 <221> 引物
 <222> (1)..(23)
 <223>
 <400> 2
 gcactcgagt cagacataag aaa 23

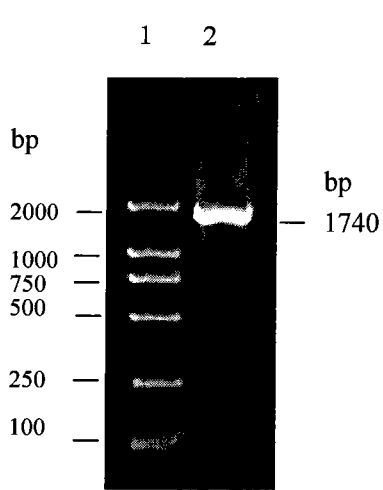


图 1

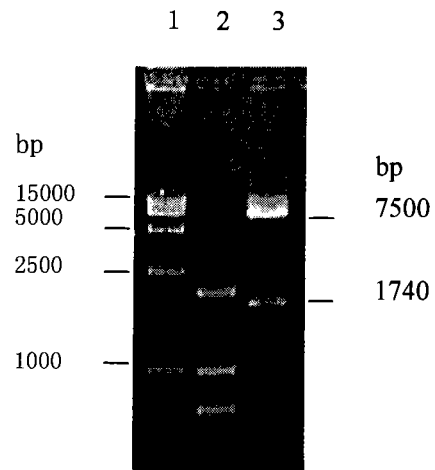


图 2

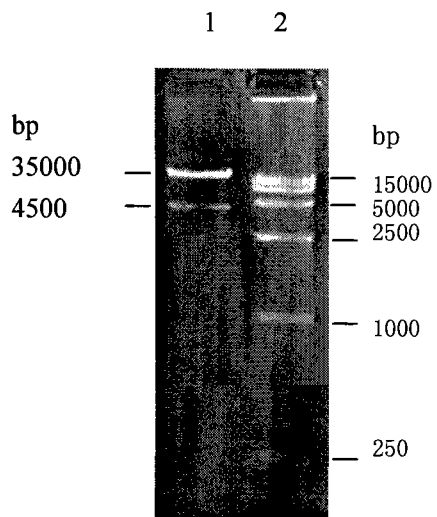


图 3

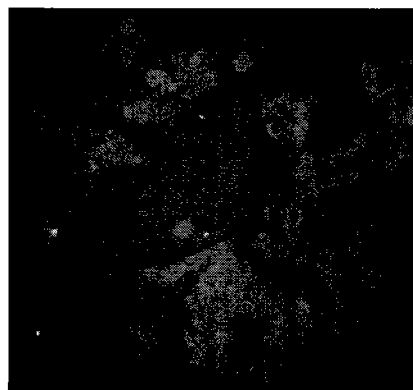


图 4