[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 39/00
A61K 31/12
A61K 39/395
G01N 33/569
A61P 31/12

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410056004.8

[43] 公开日 2005 年 6 月 15 日

[11] 公开号 CN 1626241A

[22] 申请日 2000.7.26
[21] 申请号 200410056004.8
分案原申请号 00810998.2
[30] 优先权
[32] 1999. 8. 3 [33] EP [31] 99202545.2
[32] 2000. 1.24 [33] EP [31] 00200248.3
[71] 申请人 阿克佐诺贝尔公司
地址 荷兰阿纳姆
[72] 发明人 M·C·W·范霍尔滕
J·M·福拉克
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 罗菊华
权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 12 页

[54] 发明名称 源自白斑综合征病毒的蛋白质及其应用

[57] 摘要

本发明涉及源自白斑综合征病毒的四种估计大小为 28kDa(VP28)、26kDa(VP26)、24kDa(VP24)和 19kDa(VP19)的主要蛋白质的分离和特性鉴定，以及它们在疫苗的制备中的应用，这种疫苗是被用来保护甲壳动物抵抗白斑综合征病毒感染的。本发明进一步提供编码上述蛋白质的核酸序列以及它们在上述蛋白质的重组制备中的应用。另外，本发明还提供对抗上述蛋白质的抗体，和这些抗体在被动免疫接种中的应用，以及包含上述核酸或抗体的诊断试剂盒。

ISSN1008-4274

1. 用于在甲壳动物中预防和/或治疗白斑综合征的疫苗，其包含药学上可接受的载体和蛋白质，所说的蛋白质含有 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 的疫苗，其特征在于该疫苗包含具有 SEQ ID NO: 3 或 10 所示氨基酸序列的蛋白质、具有 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的蛋白质、和具有 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的蛋白质的混合物。

3. 用于在甲壳动物中预防或治疗白斑综合征的载体疫苗， 其特征在于所述疫苗含有减毒的细菌或病毒，所述的细菌或病毒在它的基因组中包含编码白斑综合征病毒蛋白质的异源核酸序列，所说的白斑综合征病毒蛋白质包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

4. 来源于白斑综合征病毒的结构蛋白质， 其特征在于所述蛋白质的氨基酸序列是 SEQ ID NO: 6 中描述的氨基酸序列。

5. 编码白斑综合征病毒的结构蛋白质的核酸序列，其特征在于所述结构蛋白质具有 SEQ ID NO: 6 中所描述的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 4 的结构蛋白质用作药物的用途。

7. 药物组合物，其含有药学上可接受的载体和至少一种根据权利要求 4 的结构蛋白质或至少一种根据权利要求 5 的核酸序列。

8. 抗根据权利要求 4 的结构蛋白质的抗体。

9. 疫苗或药物制剂，含有药学上可接受的载体或赋形剂以及至少一种根据权利要求 8 的抗体。

10. 用于检测白斑综合征病毒的诊断试剂盒，其特征在于所述试剂盒包含根据权利要求 5 的核酸序列或根据权利要求 8 的抗体。

源自白斑综合征病毒的蛋白质及其应用

技术领域

本发明涉及源自白斑综合征病毒的蛋白质，编码上述蛋白质的核酸序列，以及所述蛋白质在制备用于预防和/或治疗甲壳动物白斑综合征（White Spot Sydrone）的疫苗中的应用。

背景技术

白斑综合征病毒(WSSV)在东南亚大部分地区的虾中是一个主要的病毒性疾病。该病毒在甲壳动物中有很宽的宿主范围(Flegel,1997)，而且在各个隔离群之间只有很小的遗传变异(Lo 等,1999)。电子显微镜术(EM)研究显示病毒颗粒有包膜，呈杆状到弹头样外观，长度大约 275 nm，宽大约 120 nm，在一端有一个尾样附件。失去包膜的核壳呈交叉网格型外观，大小约 300 nm x 70 nm（Wongteerasupaya 等,1995)。这个病毒颗粒的形态学，它的核定位和它的形态发生学令人想起昆虫中的杆状病毒(Durand 等,1997)。本来白斑综合征病毒被分类作为杆状病毒科的一个未指定成员(Francki 等,1991)，因此该病毒曾经被称做系统性外中胚层杆状病毒(SEMBV)或白斑杆状病毒(WSBV)。目前由于缺乏分子数据，白斑综合征病毒不再被纳入这个科(Murphy 等,1995)。限制性核酸内切酶分析显示其病毒的双链 DNA 大小超过 200kb(Yang 等,1997)。

白斑综合征病毒的暴发在东南亚的养殖虾中会引起虾群的大规模死亡。该疾病的特征是虾的甲壳、附肢和角皮出现白斑，肝胰腺呈淡红色。被感染的虾显示嗜睡、进食迅速减少等征候，在 3 到 5 天内这些虾就会死亡。白斑综合征病毒的暴发导致虾养殖工业的严重损失，因而强烈需要一种能对白斑综合征病毒的感染具有保护作用的疫苗。能在这样的疫苗中使用的白斑综合征病毒主要结构蛋白质的鉴定和表征能够为发展这种疫苗提供方法。

本发明的公开

四种主要白斑综合征病毒蛋白质 VP28(28 kDa)、VP26(26 kDa)、VP24(24 kDa)和 VP19(19 kDa)已经被鉴定出来，其分子量是根据它们在考马斯亮蓝染色的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE)中的迁移率来估计的。VP26 和 VP24 是核壳蛋白质,而 VP28 和 Vp19 是包膜蛋白质。白斑综合征病毒蛋白质的氨基端（N 端）氨基酸残基已通过蛋白质测序获得,并用来鉴定白斑综合征病毒基因组上的那些基因(分别是 vp28，vp26，vp24,vp19)。如图 2b 所述，vp26 的可读框(ORF)包含 555 个核苷酸(SEQ ID No:1)，推导的 VP26 氨基酸序列含有 184 个氨基酸残基(SEQ ID No:3)，也一同描述在图 2b 中。vp26 的一个第二个可读框包含 612 个核苷酸，显示于 SEQ ID No:9，推导出其氨基酸序列含有 204 个氨基酸残基，它被单独描述为 SEQ ID No:10。vp28 的可读框包含 615 个核苷酸(SEQ ID No:2)，在图 2c 中与被推导出的氨基酸序列（SEQ ID No:4）一起被描述。被推导出的 VP28 的氨基酸序列含有 204 个氨基酸。VP26 和 VP28 都含有一个位于 N 端的假定的穿膜区和许多假定的 N-和 O-糖基化位点。vp26 和 vp28 基因的可读框分别编码理论大小为 20 kDa 和 22 kDa 的蛋白质。VP26 和 VP28 的理论上的氨基酸序列被直接的蛋白质测序确认。VP26 和 VP28 理论上的大小与根据它们在考马斯亮蓝染色的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS- PAGE）中的迁移率而测得的大小相差 6kDa,这个大小差异可以被翻译后修饰作用：例如糖基化、磷酸化等来解释。VP24 的 N 末端氨基酸序列和 VP19 的部分氨基酸序列分别被描述为 SEQ ID No:5 和 6。vp24 的完整可读框包含 627 个核苷酸，描述于 SEQ ID No:11，与被推导出的 VP24 氨基酸序列一起被描述；推导出的 VP24 氨基酸序列有 208 个残基，单独描述于 SEQ ID No:12。四个蛋白质和它们各自的核苷酸序列是白斑综合征病毒所特有的。

本发明首次提供了构建重组疫苗的方法，用于保护甲壳动物抵抗白斑综合征病毒的感染。已经被鉴定和定性描述过的四种白斑综合征病毒主要蛋白质 VP28，VP26，VP24 和 VP19 被发现很适合用来制备

亚单位疫苗，用于保护甲壳动物抵抗白斑综合征病毒的感染。通过使用重组工艺技术，本发明的核苷酸序列的克隆和特异性可以用于生产白斑综合征病毒的这些结构蛋白质。这样，就能获得重组的白斑综合征病毒结构蛋白，并基本上去除其他的白斑综合征病毒蛋白质。这种分离的白斑综合征病毒结构蛋白质能用来制造亚单位疫苗，以保护甲壳动物抵抗白斑综合征病毒的感染。可供选择的是，将编码白斑综合征病毒结构蛋白的核苷酸序列用来制备载体疫苗，用于保护甲壳动物抵抗白斑综合征病毒感染。而且，本发明的核苷酸序列也能用于诊断目的，例如检测本地是否存在白斑综合征病毒。此外，本发明的白斑综合征病毒蛋白质还能用来制备白斑综合征病毒特异性抗体。这些抗体能用来制备白斑综合征病毒疫苗，为甲壳动物提供被动免疫。该抗体也能用于诊断目的，例如检测白斑综合征病毒在甲壳动物中或在本地是否存在。

因此，本发明的第一目的是提供白斑综合征病毒的结构蛋白质。更明确地说，本发明提供结构蛋白质 VP24，VP26，VP28 和 VP19。本发明特别提供含有如图 2b(SEQ ID No:3)所示氨基酸序列或其衍生序列(例如 SEQ ID No:10)的 VP26 蛋白质，以及含有如图 2c(SEQ ID No:4)所示的氨基酸序列或其衍生序列的 VP28。本发明进一步提供含有如 SEQ ID No:5 所示的 N 末端氨基酸序列 MHMWGVYAAILAGLTLILVVISIVVTNIELNKKLDKKDK 或其衍生序列的 VP24 蛋白质，以及含有 SEQ ID No:6 所示的部分氨基酸序列 I V L I S I (G/V) ILVLAVMNV (P/A/T) M G P K K D S 或其衍生序列的 VP19 蛋白质。优选 VP24 蛋白质具有如 SEQ ID No:12 所示的氨基酸序列或由此衍生的序列。必须认识到，那些含有 SEQ ID No: 3,4,5,6,10 或 12 中所述氨基酸序列的衍生序列的蛋白质也在本发明的范围之内。为了本发明的目的，蛋白质氨基酸序列的衍生物被理解为是与 SEQ ID No:3,4,10 或 12 所描述的氨基酸序列或 SEQ ID No:5 或 6 所描述的部分氨基酸序列相比，包含了变更的氨基酸序列，而上述的变更不影响该蛋白质的抗原性或免疫原性。为了本发明的目的，本发明所说的蛋白质抗原性应被理解为是该蛋白质

诱发可以识别所述白斑综合征病毒蛋白质和/或与该蛋白质反应的抗体的能力。而免疫原性应被理解为是该蛋白质在甲壳动物中诱发保护反应，对抗白斑综合征病毒感染的能力。

依照本发明，可在序列中发生的变更可以是由于例如整个序列中一个或多个氨基酸的保守氨基酸替代，缺失，插入，倒位或添加所造成的。被认为并不改变免疫特性的氨基酸替代已经被人描述过了。相关氨基酸之间的氨基酸置换或在进化过程中频繁发生的替代尤其是发生在：丝氨酸/丙氨酸，丝氨酸/甘氨酸，天冬氨酸/甘氨酸，天冬氨酸/天冬酰胺，异亮氨酸/缬氨酸之间(见 Dayhof，M.D.，蛋白质序列与结构图谱(Atlas of protein sequence structure)，Nat. Biomed. Res. Found.，Washington D.C.，1978，vol. 5，suppl. 3)。以此信息为基础，Lipman 和 Pearson 发展出用于迅速和敏感的蛋白质比较(Science，1985，第 227 卷，1435-1441)以及判定具有序列同源性的蛋白质和多肽之间的功能相似性的方法。有几个计算机程序，例如 FASTA，TFASTA，BLAST 以及一些类似程序，可用于判定具有给定氨基酸序列的蛋白质或多肽和其衍生物之间的序列同源性。序列之间的最佳匹配区能自动地被这些程序确定。因此根据本发明的衍生蛋白质仍然有能力诱生可识别白斑综合征病毒结构蛋白质，并与之发生反应的抗体；或有能力在接受过接种的甲壳动物中诱发保护性反应，保护他们抵抗白斑综合征病毒的感染。依照本发明，可以被使用的其他衍生蛋白质是白斑综合征病毒蛋白质的片段，条件是所述片段仍然能诱生可识别白斑综合征病毒结构蛋白质并与之发生反应的抗体，或能在接受过接种的甲壳动物中诱发保护性反应，保护他们抵抗白斑综合征病毒的感染。

第二方面，本发明提供编码一个或多个白斑综合征病毒结构蛋白质的核酸序列。更优选本发明提供分别编码主要结构蛋白质 VP24、VP26、VP28 和/或 VP19 的核酸序列。本发明特别提供 SEQ ID No:1 或 9、SEQ ID No:2 或 SEQ ID No:11 中描述的 vp26，vp28 和 vp24 的核酸序列，它们分别编码 VP26，VP28 和 VP24。这些各自的核苷酸序列起始于编码推导出的氨基酸序列第一个甲硫氨酸残基的密码子 ATG，

直到编码羧基端（C 末端）氨基酸残基的密码子为止。为了本发明的目的，必须认识到那些与 SEQ ID No: 1，2，9 或 11 中描述的核苷酸序列具有序列同源性的核苷酸序列也在本发明的范围之内。就本发明而言，本发明所指的序列同源性可考虑为至少 70%，优选 75%，更优选 80%，甚至更优选 85%。高度优选的序列是那些与 SEQ ID No:1，2，9 或 11 所描述的序列的同源性为至少 90%，更优选 95%的核酸序列。

就本发明而言，序列同源性是通过把目的核苷酸序列与 SEQ ID No:1，SEQ ID No:2 或 SEQ ID No:11 所述序列的相应部分进行比较而得出的。就本发明而言，这个序列同源性百分率被定义为被比较的序列之间的相同核苷酸的百分率。序列同源性可以由例如 BLAST N 等计算机程序确定，这些程序能自动地判定最佳的匹配区。

依照本发明具有序列同源性的核酸序列可以通过常规的克隆和杂交技术，使用 SEQ ID No:1，2，11 或 9 描述的核酸序列之一或该序列的片段，很容易地从密切相关的白斑综合征病毒株中分离出来。为此目的，杂交应在严格的条件下完成，优选在高度严格条件下完成。严格的杂交条件应被理解为指的是洗涤条件为 1 x SSC 溶液，0.1% SDS，温度 65℃；高度严格条件指的是洗涤条件中 SSC 浓度降低趋向 0.3x SSC。这个具体信息不应该被如此狭隘地解释以致需要排除错误鉴定的碱基。本文公开的具体序列可以很容易地被用来分离来自其他毒株的同源核苷酸序列。

与 SEQ ID No:1，2 或 11 所描述的核酸序列之一具有同源性的核酸序列可编码如下蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID No:3，4，10，12 所描述的氨基酸序列之一或 SEQ ID No:5 或 6 所描述的部分氨基酸序列之一相比，包含了变更，然而所说的变更并不影响上述蛋白质的抗原性和免疫原性。编码 VP26 蛋白质的一个同源核苷酸序列的例子就是 SEQ ID No:9 所描述的核苷酸序列，它所编码的 VP26 蛋白质与 SEQ ID No:3 所描述的氨基酸序列相比，包含有某些变更。

本发明的白斑综合征病毒蛋白质可以经由标准的生物化学分离和纯化方法获得，或者它们也可经由一般的重组技术而制备。本发明的

核苷酸序列特别适合用于基本上没有其他白斑综合征病毒蛋白质的白斑综合征病毒结构蛋白质的重组生产。该核苷酸序列被整合进能够表达该蛋白质的合适表达载体之内，用上述表达载体转化合适的宿主细胞，在一种合适的培养基中培养该宿主细胞。所表达的蛋白质可以从细胞或培养基中分离和纯化。合适的表达载体是包含复制和表达必须的调控区的那些质粒、粘粒、病毒、YAC's(酵母人工染色体）及其他载体。表达载体能被带到一种宿主细胞中进行表达。合适的宿主细胞有，例如细菌，酵母细胞，昆虫细胞和哺乳动物细胞。这种表达技术在本领域已经广为人知(Sambrooke 等，分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning:a laboratory Manual），冷泉港实验室出版社，冷泉港，1989;King 和 Possee,1992).

第三方面，本发明提供疫苗，其含有白斑综合征病毒毒粒的结构蛋白质 VP24、VP26、VP28 或 VP19 中的一种或多种，以及药学上可接受的载体。更明确地说，本发明的这种疫苗包含白斑综合征病毒毒粒蛋白质 VP24、VP26、VP28 或 VP19，或二者或更多种上述蛋白质的组合。优选地，本发明的这种疫苗含有 VP24，而这种 VP24 蛋白质含有 SEQ ID No:12 中描述的氨基酸序列，或者 SEQ ID No:5 中描述的 N 末端氨基酸序列，或者上述两种序列的衍生序列；或者这种疫苗含有 VP26，而这种 VP26 蛋白质含有 SEQ ID No:3 或者 SEQ ID No:10 中描述的氨基酸序列，或者上述任意一种序列的衍生序列；或者这种疫苗含有 VP28，而这种 VP28 蛋白质含有 SEQ ID No:4 中描述的氨基酸序列或者该序列的衍生序列；或者这种疫苗含有 VP19，而这种 VP19 蛋白质含有 SEQ ID No:6 中描述的 N 端氨基酸序列或者该序列的衍生序列；或者这种疫苗含有所述蛋白质中二种或更多种蛋白的组合。更优选的是本发明的这种疫苗包含白斑综合征病毒蛋白质 VP26 和 VP28，以及任选的 VP24。

除此之外，本发明的核酸序列可以被用来制造载体疫苗（vector vaccine），对甲壳动物进行接种，以对抗白斑综合征病毒的感染。载体疫苗应被理解为是一种经过改造的、活的减毒细菌或病毒疫苗，以

致它们的遗传物质中含有一个或多个插入的异源核苷酸序列。这些所谓的载体细菌或病毒能够共表达由被插入的核苷酸所编码的异源蛋白质。因此，第四方面，本发明提供一种含有活的减毒细菌或病毒，以及药学上可接受的载体的载体疫苗，其中所说的细菌或者病毒已经被改造过，以致它们的遗传物质中含有一个或多个本发明的核苷酸序列。

本发明的疫苗能用来保护甲壳动物，例如虾：包括但并不仅限于来自对虾科（Penaeidae）的成员，例如斑节对虾(P.monodon)、南美白对虾(P.vannamei)，中国对虾（P.chinensis），墨吉对虾(P.merguensis)、或新对虾属的种（Metapeaeus spp.）；对虾：包括但并不仅限于来自长臂虾科(Palaemonidae)的成员，例如沼虾属的种（Macrobrachium spp.），或长臂虾属的种（Palaemon spp.）；龙虾：包括但不仅限于来自龙虾科（Palinuridae）和海蟑虾科（Nephropidae)的成员，举例来说，如（Calinectes spp.）、Palinurus spp.，龙虾属的种（Panuliris spp.），或螯龙虾属的种（Homarus spp.）；蝲蛄：包括但并不仅限于来自河虾科（Astacidae）的成员，例如 Astacus spp.，Procambarus spp.，和 Oronectes spp.；以及蟹：包括但并不仅限于来自黄道蟹科（Cancridae）和梭子蟹科（Portuidae）的成员，例如：黄道蟹属的种（Cancer spp.），Callinectes spp.，Carcinus spp. 以及梭子蟹属的种（Portunus spp.）。

本发明的疫苗可以依照那些对本领域专业人员而言已经广为人知的技术来制备，例如在下文中被描述过的技术：Remington 药物科学（Remingtong′s Pharmaceutical Sciences），第 18 版（1990），编者：A.R.Gennaro 等，第 72 章，第 1389-1404 页，费城药剂学和科学学院。

本发明的疫苗含有有效量的一种或多种本发明蛋白质、载体细菌或病毒，和药学上可接受的载体。在此所使用的术语“有效”被定义为足以在甲壳动物中诱发保护性反应的量。载体或蛋白质的量将依赖于所使用载体或蛋白质的类型、给药途径、给药时间、接受接种的动物

种类、以及年龄、一般健康状况、温度和饮食情况。

大体上,每只动物可以使用的剂量为 0.01 到 1000 μg 蛋白质,优选 0.5 到 500 μg,更优选 0.1 到 100 μg。如果使用病毒载体疫苗,大体上每只动物可以使用的剂量为 10^3 到 10^8 pfu(噬斑形成单位)。

本发明所指的适合在本发明的疫苗中使用的药学上可接受的载体是无菌并且生理学上相容的,例如:无菌水、盐水、水性缓冲液例如碱金属磷酸盐(例如 PBS)、醇、多元醇等。除此之外本发明的疫苗可能包含其它添加剂,例如佐剂,稳定剂,抗氧化剂,防腐剂和其他添加剂。

合适的佐剂包括但并不仅限于铝盐或凝胶,卡波姆(carbomers),非离子嵌段共聚物,维生素 E ,monophospheryllipid A,胞壁酰二肽,油乳剂,葡聚糖,细胞因子,皂角甙例如 Quil A,以及其他类似物。佐剂的添加量依赖于该佐剂本身的性质。

适合在本发明的疫苗中使用的稳定剂包括但并不仅限于糖类:例如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、糊精和葡萄糖; 蛋白质类:例如白蛋白或酪蛋白; 以及缓冲液如碱性磷酸盐。

合适的防腐剂包括,硫柳汞和乙汞硫代水杨酸及其他。

本发明的疫苗可经由注射,浸渍,浸浴,喷雾或气溶胶,或口服给药。对甲壳动物而言,优选的方式是疫苗经由浸渍或口服给药,尤其是在商业性水产养殖场。

就口服给药方式而言,疫苗优选和合适的载体混合后口服给药,例如,与纤维素、食物或可代谢的物质,如α纤维素或蔬菜或动物来源的不同的油类混合。本发明的疫苗特别优选的食物载体是活饲料生物,它们可以将疫苗装入自己体内,合适的活饲料生物包括但并不仅限于类似浮游生物的非选择性滤食动物,优选的是轮形动物、Artemia 的成员等。高度优选盐水虾 Artemia sp..

通过使用本领域专业人员已知的一般技术,本发明的蛋白质可以用来制备抗体。优选这些蛋白质被用来生产特异性单克隆抗体。本发明抗体可以按照标准的技术制备。那些将蛋白质免疫动物,例如老鼠,

以及选择产生该蛋白质特异性单克隆抗体的杂交瘤的操作步骤在本领域中已经广为人知（见：例如 Cligan 等(编辑)，免疫学当前方法（current protocols in immunology），1992;Kohler和Milstein, Nature 256, 第 495-497 页，1975;Steenbakkers 等，Mol. Biol.Rep.19, 第 125-134 页，1994）。获得的抗体可以用于诊断学，在当地检测白斑综合征病毒，或在甲壳动物中检测白斑综合征病毒的存在。本发明的核苷酸序列也适合用于诊断。上述的序列或其片段能用于例如 PCR 技术方面，在当地或在甲壳动物中检测白斑综合征病毒的存在。因此，另一方面，本发明还提供诊断试剂盒，其中包含本发明的一种或多种核苷酸序列或抗体。

本发明所诱生的抗 VP28，VP26，VP24 和 VP19 蛋白质的抗体可以进一步用来为甲壳动物的被动免疫制造抗体疫苗。因此，在另一方面，本发明提供被动免疫疫苗以对抗白斑综合征病毒，上述的疫苗含有抗 VP28，VP26，VP24 或 VP19，或上述任意二种或多种蛋白质的组合的抗体。这样的疫苗可以使用如上所述的标准技术进行制备。优选制备通过口服给药的抗体疫苗，其中，抗体和可食用的载体例如鱼饲料混合。更优选的是这种疫苗是由鸡蛋中制备的抗体(IgY 抗体)制备的。

下列实施例是用来举例说明本发明而不应该被解释成是以任何方式限制本发明。

附图说明

图 1

白斑综合征病毒蛋白质。（A）负染的完整病毒颗粒的透射电子显微镜（TEM）照片。(B)负染的白斑综合征病毒核壳的透射电子显微镜照片。(C) 纯化的白斑综合征病毒 15%考马斯染色的 SDS-PAGE 凝胶。泳道 1：低分子量蛋白质标准。泳道 2：来自未感染虾的纯化“白斑综合征病毒颗粒”。泳道 3：纯化的白斑综合征病毒颗粒。泳道 4：纯化的白斑综合征病毒核壳。

图 2

白斑综合征病毒 VP26 和 VP28 的核苷酸序列。(A)VP26 和 VP28 在白斑综合征病毒基因组片段上的定位。(B)VP26 和(C)VP28 的核苷酸和蛋白质序列。vp26 和 vp28 各自的可读框,从编码推导出的氨基酸序列第一个甲硫氨酸残基的 ATG 密码子开始。N 末端氨基酸序列用粗体字表示;推测的 N-糖基化位点的位置被用下划线表示,推测的 O-糖基化位点用双重的下划线表示。VP28 的简并引物位置的核苷酸序列用斜体字表示。

图 3

(A) VP26 和 (B) VP28 的疏水图。

图 4

白斑综合征病毒结构蛋白质在昆虫细胞中的杆状病毒表达,15% SDS-PAGE 凝胶和蛋白质印迹法(Western 印迹法)分析。(A) Sf21 细胞提取物的考马斯染色凝胶。泳道 1:低分子量蛋白质标准。泳道 2:模拟感染。泳道 3:AcMNPV-wt(野生型)感染。泳道 4:AcMNPV-GFP 感染。泳道 5:AcMNPV- WSSVvp26 感染。泳道 6:AcMNPV- WSSVvp28 感染。泳道 7:白斑综合征病毒。(B) 使用抗纯化的白斑综合征病毒的多克隆抗体的蛋白质印迹。

图 5

抗结构蛋白 VP28 的抗血清对虾体内白斑综合征病毒的中和。阴性对照:接受 NaCl 溶液的虾。阳性对照:接受白斑综合征病毒但未接受抗血清的虾。免疫前血清:接受白斑综合征病毒和免疫前血清的虾。VP28 抗血清:接受病毒和抗 VP28 抗血清的虾。

图 6

给虾接种白斑综合征病毒蛋白质。阴性对照:只接受 NaCl 溶液的虾。阳性对照:接受 NaCl 溶液和白斑综合征病毒的虾。组 3:用 VP24 进行接种的虾。组 4:用 VP26c 进行接种的虾。组 5:用 VP28 进行接种的虾。组 6:用 VP24, VP26c 和 VP28 的混合物进行接种的虾。

实施例

方法

白斑综合征病毒的制备和纯化

在本研究中使用的病毒是从泰国的受感染的斑节对虾（Penaeus monodon）中分离出来的。受感染组织在TN缓冲液(20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, PH 值 7.4)中被匀浆化, 在以 1,700 x g 离心沉淀 10 分钟之后，过滤上清液(0.45 μM 过滤器)。滤液被肌肉注射进健康的斑节对虾体内开始感染，注射部位在第四腹节外侧区。4 天后，从垂死的虾体内提取血淋巴, 与作为抗凝剂的改良 Alsever 溶液 (Rodriguez 等, 1995)混合。在用 TNE(20 mM Tris-HCL, 400 mM NaCl, 5mM EDTA, PH 值 7.4)溶液稀释之后，在 4℃以 1,700 x g 速度离心 10 分钟，将血淋巴与血细胞相互分离。将病毒颗粒在 4℃以 45,000 x g 离心沉淀 1 小时，沉淀物用 TN 溶液重新悬浮。

用 Nonidet P40（NP40）处理病毒颗粒，去除病毒包膜。在病毒溶液中加入 1%的 NP40，室温下处理 30 分钟并轻微振荡。核壳在 4℃以 80,000 x g 离心沉淀 30 分钟，沉淀物用 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, PH 值 7.5)溶液溶解。

病毒颗粒的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

为进行蛋白质分析，在 15% SDS-PAGE 凝胶中对白斑综合征病毒的病毒颗粒制品(有包膜的病毒颗粒，核壳和阴性对照)进行分析。使用考马斯亮蓝染色法使蛋白质在 SDS-PAGE 凝胶中显色。

电子显微镜检查

为进行透射电子显微镜检查(TEM), 病毒悬液被负载在透明塑胶（Formvar）包被的, 碳稳定的镍载网(400 网孔)上, 用磷钨酸做负染(2% PTA)，样本用 Philips CM12 电子显微镜观察。

核酸纯化

将纯化的病毒颗粒在 45℃用蛋白酶 K(0.2 mg/ml)和十二烷基肌氨酸钠(1%)处理 3 小时, 分离病毒 DNA。继而用酚/氯仿抽提，用 TE 溶液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, PH 值 7.5)进行透析。纯化和浓缩后

的 DNA 用带有标准的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

质粒构建

白斑综合征病毒亚基因组片段被克隆到 pBluescript SK +(Stratagene 公司)质粒之内，并被使用标准的技术(Sambrook 等,1989)转化进大肠杆菌（E.coli）DH5α体内。DNA 的分离，限制性内切酶消化，琼脂糖凝胶电泳和菌落转移是依照标准的程序进行的(Sambrook 等,1989)。聚合酶链反应（PCR）是使用自设合成引物来进行的。编码 VP28 N 末端的 DNA 是从白斑综合征病毒总 DNA 中用 PCR 方法扩增出来的,使用的引物是以 VP28 的 N 末端氨基酸序列为基础的简并性引物。所使用的正向引物是 5'CA*GAATTC*TCDATNGTYTTNGTNAC 3'(SEQ ID No:7)，反向引物是有 EcoRI 位点（斜体字）的 5' CA*GAATTC*ATGGAYYTNWSNTTYAC 3'(SEQ ID No:8)(D = A, T 或 G;N =A, C, G 或 T;Y = C 或 T;W = A 或 T;S = C 或 G)。VP24 的 N 末端序列是从白斑综合征病毒总 DNA 中用 PCR 方法扩增出来的，使用的引物是一套以 VP24 的 N 末端氨基酸序列为基础的简并性引物。5' CA*GAATTC*ATGCAYATGTGGGGNGT 3'(SEQ ID No:13)被用做正向引物，而 5'CA*GAATTC*YTTRTCYTTYTTRTCIARYTT 3'(SEQ ID No:14)作为反向引物，两者均包含 EcoRI 位点(斜体字)。

DNA 测序和计算机分析

要测序的质粒 DNA 经由 QIAprep Miniprep 系统或 JETstar 质粒纯化系统(Qiagen 公司)被纯化。测序采用通用的 pBluescript 正向和反向核苷酸引物，以及订制合成的引物以两条链进行。使用 Applied Biosytems 自动化 DNA 测序仪(Eurogentec，比利时)进行自动测序。

读出的序列用 UWGCG 计算机程序进行分析(版本 10.0)。使用 FASTA,TFASTA(Pearson &Lipman,1988)和 BLAST(Altschul 等,1997)程序将 DNA 和推导出的氨基酸序列与更新过的 GenBank/EMBL，SWISSPORT 和 PIR 数据库进行比较。

细胞和病毒

草地贪夜蛾（Spodoptera frugiperda）(Sf-AE-21)细胞(Vaughn

等,1977)被培养在补充了 10%胎牛血清(FCS)的 Grace's 昆虫培养基(GIBCO BR 公司)中。苜蓿银蚊夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)(Smith 和 Summers,1982)的 E2-株被当作野生型(wt)病毒使用。常规的细胞维持培养和病毒感染步骤是依照已经出版的操作步骤进行的(Smith 和 Summers,1987; King 和 Possee,1992)。

重组体改造

Bac-to-Bac 系统(GIBCO BRL 公司)在昆虫细胞中被用来过量表达白斑综合征病毒 VP24(SEQ ID No:12)、VP26(SEQ ID No:3)、VP26c(SEQ ID No:10)和 VP28(SEQ ID No:4)。为了在昆虫细胞感染后容易检测和滴定 Bac-to-Bac 重组体,绿色荧光蛋白(GFP)基因被引入 pFastBac-DUAL 载体 p10 启动子的下游。GFP 基因来自 pVL92GFP 质粒(Reilander 等,1996),是将该质粒用 Xba I 和 Kpn I 消化之后得到的。700 bp 包含 GFP 的片段被琼脂糖凝胶电泳和 GlassMAX 纯化方法(GIBCO BRL)分离,使用 DNA 聚合酶钝化其末端,插入 pFastBac-DUAL 质粒 p10 启动子的下游多克隆区 II 的 Sma 1 位点。所得到的质粒被命名为 pFastBac-D/GFP,在它的多角体蛋白启动子的下游有一个供外源基因插入的 I 区。只表达受 p10 启动子调控的 GFP 的重组病毒依照 Bac-to-Bac 系统程序(GIBCO BRL)构建完成,该病毒被称为 AcMNPV-GFP。

对含有据推测是完整的 vp26(SEQ ID No: 1)和 vp28(SEQ ID No:2)可读框(ORFs)的白斑综合征病毒质粒进行 PCR 扩增反应,在 ORFs 的 3'端引进一个 BamH I 位点,在 ORFs 的 5'端引入一个 Hind III 位点。vp26(SEQ ID No:1)和 vp28(SEQ ID No:2) 首先被克隆到 pET28a 载体(Novagen 公司)之内,用 BamHI 和 Not I 酶切割,将其插入质粒 pFastBac-D/GFP 的多角体蛋白启动子的下游。获得的质粒被分别命名为 pFastBac-D/G-vp26 和 pFastBac-D/G-vp28。vp26c(SEQ ID No:9)和 vp24(SEQ ID No:11)也从含有推测的可读框(ORFs)的质粒中经由 PCR 扩增出来,并通过引物在 ORFs 的 5'端引进一个 BamH I 位点,在 ORFs 的 3'端引入一个 EcoR I 位点。经消化后,vp26c(SEQ ID No:9)

和 vp24(SEQ ID No:11)的可读框被插入 pFastBac-D/GFP 质粒多角体蛋白启动子的下游，获得质粒 pFastBac-D/G-vp26c 和 pFastBac-D/G-vp24。能从 p10 启动子表达 GFP 和从多角体蛋白启动子表达 VP24(SEQ ID No:12)，VP26(SEQ ID No:3)，vp26c(SEQ ID No:10)或 VP28(SEQ ID No:4)的重组病毒依照 Bac-to-Bac 系统程序(GIBCO BRL)构建完成，分别被命名为 AcMNPV-WSSVvp24，AcMNPV-WSSVvp26，AcMNPV- WSSVvp26c 和 AcMNPV-WSSVvp28。

SDS-PAGE，蛋白质序列分析和免疫印迹法

将受野生型苜蓿银蚊夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)以及重组的表达异源性蛋白质(GFP，VP26,VP28)的 AcMNPV 感染的昆虫细胞在 15% SDS-PAGE 凝胶中分析。使用考马斯亮蓝染色法使蛋白质着色而可见。半干印迹可以在聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride)(PVDF)膜(Bio-Rad 公司)上进行，使用的是 CAPS 缓冲液(10 mM CAPS 在 10%甲醇中)；或在 Immobilon™-P(Millipore 公司)膜上进行，使用 Tris-甘氨酸缓冲液(25 mM Tris 碱,192 mM 甘氨酸,10%(v/v)甲醇，PH 值 8.3)。使用考马斯亮蓝染色法使蛋白质在 PVDF 膜上显色。来自白斑综合征病毒病毒颗粒标本的主要蛋白质带从滤膜上被切下并进行 N 末端序列测定(ProSeq 公司,麻萨诸塞州)。

Immobulon-P 膜在 TBS 溶液(0.2 M NaCl，50 mM Tris-HCL,PH 值 7.4)中用 2%低脂奶粉(Campina 公司，荷兰)封闭。免疫检测是通过下面的步骤来进行的：室温下，在含有 0.2% 低脂奶粉的 TBS 中将印迹与 1:2000 稀释的多克隆兔抗白斑综合征病毒血清(来自 P.C. Loh 教授的惠赠，檀香山大学,夏威夷)一起孵育 1 小时。然后，用 1:2000 稀释的，结合了辣根过氧化物酶(Amersham 公司)的抗兔抗体与之结合，使用 "增强的化学发光-光检测试剂盒"(Amersham 公司)进行检测。

VP28 多克隆抗体

白斑综合征病毒主要的包膜结构蛋白 VP28 在昆虫细胞中被杆状病毒 AcMNPV- WSSVvp28 所表达，使用 Prepcell(Biorad 公司)和分段收集器进行纯化。包含 VP28 的部份被收集和浓缩。将纯化的 VP28 蛋白质

注射进兔子以制备多克隆抗体。用纯化的白斑综合征病毒颗粒对抗体进行蛋白质印迹法测试，抗体对来自白斑综合征病毒毒粒的 VP28 反应良好。将这个 VP28 抗毒血清用于白斑综合征病毒中和实验中。

白斑综合征病毒原种

白斑综合征病毒(WSSV)病毒原种是从蝲蛄 Procambarus clarkii 的血淋巴中提纯出来的，它在一周以前被肌肉注射了低浓度的白斑综合征病毒。血淋巴经由连续蔗糖梯度离心而纯化，吸出病毒条带。病毒在被沉淀后，又在 TE 溶液(PH 值 7.5)中被重新溶解。病毒原种被保存在 -70°C 直到在实验中使用。

蛋白质接种

白斑综合征病毒主要的包膜结构蛋白质 VP28(SEQ ID No:4)和核壳蛋白质 VP26c(SEQ ID No:10)和 VP24(SEQ ID No:12)在昆虫细胞中用杆状病毒 AcMNPV-WSSVvp28、AcMNPV- WSSVvp26c 和 AcMNPV-WSSVvp24 表达，这些病毒从 P10 启动子表达 GFP，从多角体蛋白启动子表达白斑综合征病毒结构蛋白。感染 3 天后，收获受感染的昆虫细胞，并用超声波打碎细胞。上清液用来接种斑节对虾（P.monodon）。

实验中使用 6 组虾：

组别	组名	接种	加强免疫	攻击	各组虾的个数
1	阴性对照	330 mM NaCl	330 mM NaCl	330 mM NaCl	10
2	阳性对照	330 mM NaCl	330 mM NaCl	WSSV	10
3	VP28	VP28	VP28	WSSV	15
4	VP26c	VP26c	VP26c	WSSV	15
5	VP24	VP24	VP24	WSSV	15
6	混合物（MIX）	混合物	混合物	WSSV	15

在“混合物”中，等体积的 VP28，VP26c 和 VP24 溶液在注射之前混合。接种疫苗后 5 天，对这些虾进行加强注射。二天之后用白斑综合

征病毒(病毒原种,见中和实验)注射攻击。注射后，对这些虾进行6天的监测，死虾经电子显微镜检查白斑综合征病毒是否存在。

结果

分离白斑综合征病毒蛋白质用于测序

使用纯化的病毒制剂并以肌内注射的方式感染斑节对虾。在感染后四天，从受白斑综合征病毒感染的动物的血淋巴中分离病毒。从未受感染的虾体内提取血淋巴作为阴性对照。这些标本被用来进行电子显微镜检查，分析白斑综合征病毒毒粒的存在和纯度。在未受感染动物的样品中,没有观察到病毒颗粒，但是在受感染动物的样品中，观察到许多主要包膜的病毒颗粒(图 1a)。用 NP40 处理后，病毒的包膜被从病毒颗粒上去除，剩下纯的核壳(图 1b)。该核壳具有白斑综合征病毒核壳所特有的表面分节的外观特性(Durand 等,1997)。有包膜的病毒颗粒的蛋白质和核壳蛋白质可以被 SDS-PAGE 分开(图 1c)。病毒颗粒中的四个主要的多肽可以根据它们的表观分子量而识别出来，它们的表观分子量分别是 28(VP28)，26(VP26),24(VP24)，和 19 kDa(VP19)。数个较不明显的带也被观察到，其中大约六个带位于 30 到 65 kDa 之间，至少七个弱的蛋白质带位于 86 kDa 到 130 kDa 的范围之内。来自血淋巴的三个主要的蛋白质带也与病毒颗粒一起被纯化,位于 67 kDa 到 78 kDa 之间。在这个区域中的较小的蛋白质带不能在这个凝胶中被观察到(图 1)。其大小代表着主要的白斑综合征病毒蛋白质 VP28 和 VP19 的蛋白条带在包含纯化核壳的泳道(图 1c)中并不存在，如此看来它们像是起源于病毒的包膜或间层。VP26 和 VP24 在核壳和病毒颗粒的泳道上都存在,表示它们起源于核壳。

SDS-PAGE 凝胶上的内容物通过半干印迹的方法被转移到一个聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上，主要的病毒蛋白质带被切下和测序。VP28 和 VP26 中有超过 40 个氨基酸被从 N 端测序(分别显示在图 2b 和 2c 中，用粗体字显示)。VP26 的 N 末端序列包含了 MEFGNLTNLDVAIIAILSIAIIALIVIMVIMIVFNTRVGRSVVAN。VP28 N 末端测序得出的氨基酸序列是

MDLSFTLSVVSAILAITAVIAVFIVIFRYHNTVTKTIEtHsD,其中39位的苏氨酸和41 位的丝氨酸是不确定的。这两个N末端序列都是疏水的(图3)。经由 N 末端肽测序所获得的 VP24 N 末端氨基酸序列是MHMWGVYAAILAGLTLILVVISIVVTNIELNKKLDKKDK(SEQ ID No:5)。VP19 的N末端被发现是封闭的,由CNBr 消化 N 末端封闭肽所获得的VP19 的部分内部序列是 IVLISI(G/V)ILVLAVMNV(P/A/T)MGPKKDS(SEQ ID No:6)。在VP19不完全的序列中,第7位氨基酸残基可能是G或V,第17位可能是P,A或T残基。

24 kDa 蛋白质基因的定位和序列

根据VP24 N末端蛋白质序列,发展出了一组简并的PCR引物,正向引物是 5'CA*GAATTC*ATGCAYATGTGGGGNGT 3'(SEQ ID No:13),而反向引物则是 5'CA*GAATTC*YTTRTCYTTYTTRTCIARYTT 3'(SEQ ID No: 14),两者都包含EcoRI位点(斜体字)。使用白斑综合征病毒基因组 DNA 为模板进行PCR扩增。获得了一个 133 bp 长的片段,并经由2%琼脂糖凝胶纯化之后,插入pBluescript SK+质粒中并测序。这种PCR 产品的序列与白斑综合征病毒VP24的N末端蛋白质序列(SEQ ID No:5)相吻合,从而在白斑综合征病毒质粒文库筛选实验中被作为探针使用(Sambrook等,1989),用来识别VP24完整的可读框。一个能与这个片段进行杂交的18 kbp BamHI片段被挑选出来进行进一步的分析。

包含627个核苷酸的完整vp24可读框和这个基因的启动子区域在18 kbp BamHI 片段上被发现。翻译的起始密码子处于有利的区域(AAA*ATG*C)中,可以有效地起始真核翻译(Kozak,1989)。在启动子区域中,排列着一段 A/ T 富集序列,但是没有发现共有序列 TATA 盒。polyA信号与翻译中止密码子重叠。vp24可读框(SEQ ID No: 11)编码一段208个氨基酸(SEQ ID No:12)的推导出的蛋白质,其中氨基酸序列包含经实验证实的 VP24 N 末端序列(SEQ ID No:5)。 VP24 的理论大小有 23 kDa,等电点 8.7。在 VP24 里面发现有四个可能的 N-糖基化位点(N-{P}-[ST]-{P}),一个O-糖基化位点(Hansen 等,1998)和9个可能的磷酸化位点([ST]-X-X-[DE]或[ST-X-[RK])。但是不知道是否

其中任何一个修饰确实发生过。在 VP24 中没有发现其他存在于 PROSITE 据库中的基序。208 个氨基酸的计算机分析显示在 VP24 的 N 末端存在一个强疏水区,包括一段推测的由第 6 到第 25 个氨基酸形成的跨膜α-螺旋。Gamier 等人(1978)的算法还预测在该蛋白质中存在数个其他的α-螺旋和β-片层。

26 kDa 蛋白质基因的定位和序列

部分 Hind III 和 BamH I 白斑综合征病毒基因组文库被构建于 pBluescript-SK+ 质粒中(van Hulten 等,2000),从许多白斑综合征病毒片段中获得末端的核苷酸序列。编码 VP26 的 N 末端序列的核苷酸序列存在于 6 kb BamHI 片段的近末端(图 2a)。围绕甲硫氨酸起始密码子的序列(AAAATGG)与 Kozak 规则中有关真核翻译的有效起始的描述相吻合(Kozak,1989)。VP26 的非翻译引导序列只有 49 个核苷酸可以被判定,一直伸展到末端 BamH I 位点(图 2a)。

6 kb BamHI 片段包含了一个 555 nt 的可读框,包括那些编码 VP26 N 末端氨基酸的序列(图 2b),polyA 信号存在于 VP26 的翻译终止密码子下游 94 个核苷酸(nt)处。此可读框(VP26)编码一个含有 184 个氨基酸的蛋白质,理论大小为 20 kDa。这个推导出的蛋白质是碱性的,等电点为 9.4。存在三个可能的 N-糖基化位点(N-{P}-[ST]-{P}),以及三个使用 NetOglyc 程序推测出的 O-糖基化位点(图 2b)(Hansen 等,1998)。发现了十三个可能的磷酸化位点 ([ST]-X-X-[DE]或[ST]-X-[RK]),但是没有发现其他存在于 PROSITE 数据库中的基序。VP26 的 184 氨基酸的疏水性分析显示一个强的疏水区域存在于该蛋白质的 N 端(图 3a)。这个区域包含了一个推测的、由第 12 到第 34 位氨基酸构成的、呈α-螺旋形式的跨膜锚钩。锚钩的后面是一个含有两个精氨酸的带正电荷区,这暗示其羧基端是朝向细胞质一侧的(Sonnhammer 等,1998)。除α-螺旋外,在这个跨膜区内,根据 Gamier 等(1978)发现的法则,发现从第 127 位到第 141 位有一个潜在的β-片层。在该蛋白质中只有一个半胱氨酸,显示其不能在内部蛋白质之间形成二硫键交联。这个半胱氨酸位于蛋白质的 C 末端部分,在 VP28 中也

是如此。

28 kDa 蛋白质基因的定位和序列

从白斑综合征病毒末端片段序列翻译得不到 VP28 的氨基酸序列。根据这个多肽的 N 末端序列发展出一套简并引物。正向引物是 5'CA*GAATTC*TCDATNGTYTTNGTNAC 3' (SEQ ID No:7)，而反向引物是有 EcoRI 位点(斜体字)的 5'CA*GAATTC*ATGGAYYTNWSNTTYAC 3'(SEQ ID No:8)。序列上的引物定位如图 2c 所示。使用白斑综合征病毒 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。获得一个 128 bp 长的片段，并且该序列经过 2.5%琼脂糖凝胶纯化以后，被克隆到 pBluescript SK+质粒之内并进行测序。该核苷酸序列编码白斑综合征病毒 VP28 的 N 末端蛋白质序列，这个 128bp 片段还被用在菌落筛选实验中，作为探针来对数个白斑综合征病毒质粒文库进行鉴定(Sambrook 等，1989)。一个 3 kb Hind III 片段由于能与这个片段进行杂交而被留做进一步分析。

612 nt 的完整可读框(vp28)和这个基因的启动子区域在这个 3 kb Hind III 片段上被发现(图 2c)。甲硫氨酸起始密码子(GTCATGG)处于有利的环境中，可以有效地起始真核翻译(Kozak，1989)。在启动子区域中，排列着一段 A/T 富集序列，但是没有发现共有的 TATA 盒。polyA 信号位于翻译终止密码子下游 55 核苷酸处。这个可读框编码一个含有 204 个氨基酸的推测蛋白质，包括 N 末端测序的氨基酸在内。这个酸性的蛋白质的理论上的大小是 22 kDa，等电点 4.6。发现有五个潜在的 N-糖基化位点(N-{P}-[ST]-{P})，二个 O-糖基化位点(Hansen 等，1998)(图 2c)和 9 个潜在的磷酸化位点([ST]-X-X-[Pe]或[ST]-X-[RK])。(在 VP28 中没有发现其他存在于 PROSITE 数据库中的基序。

计算机分析显示这个 204 个氨基酸的蛋白质在其 N 端有一个强疏水区(图 3b)，包括一个推测的、由第 9 到第 27 位氨基酸形成的穿膜α-螺旋序列。和 VP26 一样，穿膜锚钩的后面是一个带正电荷区，这暗示该蛋白质可能具有由外向内的方向。在序列的 C 末端部分发现了另外的一个疏水区，它可能组成一个穿膜序列。然而，Gamier 等的算法

(1978)没有预测出在VP28的这个位置存在α-螺旋。该算法预测在89到99位氨基酸处存在另一个α-螺旋,但是该蛋白没有β-片层。和VP26一样，在VP28中也只有一个半胱氨酸,这个半胱氨酸位于蛋白质的C末端部分。

重组的 vp24，vp26 和 vp28 的表达和分析。

采用Bac-to-Bac系统(GIBCO BRL)在昆虫的细胞中制备能够表达推导的白斑综合征病毒颗粒蛋白质VP24，VP26，VP26c和VP28的重组杆状病毒。vp24，vp26，vp26c和vp28基因(分别是SEQ ID No:11，SEQ ID No:1，SEQ ID No:9和SEQ ID No:2)被克隆到pFastBac-D/GFP质粒的多角体蛋白启动子的下游,该质粒包含一个位于 p10 启动子的下游的GFP基因。从pFastBac-D/GFP(对照)质粒以及分别带有vp24，vp26,vp26c 和 vp28 基因的质粒中产生重组病毒，这些重组病毒分别被命名为 AcMNPV-GFP，AcMNPV-WSSVvp24，AcMNPV-WSSVvp26，AcMNPV-WSSVvp26c和AcMNPV-WSSVvp28。所有的重组病毒都受p10启动子调控表达 GFP;后四者还在多角体蛋白启动子的调控下分别表达VP24(SEQ ID No:12)，VP26(SEQ ID No:3)，VP26c(SEQ ID No:10)和VP28(SEQ ID No:4)。

受 AcMNPV-wt，AcMNPV-GFP，AcMNPV-WSSVvp26 和 AcMNPV-WSSVvp28感染的Sf21细胞的提取物在15% SDS-PAGE凝胶中进行分析。在受野生型AcMNPV感染的细胞中(图4a,泳道3)可见一条32 kDa的带，它代表多角体蛋白。在那些含有被 AcMNPV-GFP 感染的细胞的提取物(泳道 4)，以及被表达白斑综合征病毒蛋白质的重组病毒感染的细胞的提取物(泳道5和6)的泳道中,可以观察到一个大约29 kDa的GFP 蛋白质带。受AcMNPV-GFP感染的细胞中的GFP的表达，比那些受同时从多角体蛋白启动子表达白斑综合征病毒蛋白质(泳道 5 和 6)的杆状病毒感染的细胞中的GFP表达要高。用紫外线照射那些受不同的 AcMNPV 重组病毒感染的细胞后，这很容易观察到，其中：受 AcMNPV-GFP 感染的细胞的 GFP 萤光是最强的(资料未显示)。由多角体蛋白启动子调控的白斑综合征病毒蛋白质的表达与由p10启动子调控的GFP的表达

相比，前者明要高(泳道 5 和 6)。在受 AcMNPV-WSSVvp26 感染的细胞提取物中，可以观察到一个 21 kDa 蛋白质的强表达，它很有可能代表白斑综合征病毒的 VP26(泳道 5)。在受 AcMNPV-WSSVvp28 感染的细胞中可观察到 28 kDa 蛋白质的强表达(泳道 6)。在这些凝胶中，通过使用抗 GFP 抗血清，GFP 的位置被蛋白质印迹分析所确认(数据未显示)。

用野生型和重组的 AcMNPV 感染 Sf21 细胞，取样在 SDS-PAGE 凝胶中电泳，然后进行蛋白质印迹分析。一种抗白斑综合征病毒毒粒的多克隆抗体被用来检测重组的 VP26 和 VP28(图 4b)。VP26 和 VP28 都在这些细胞提取物中被很好地检测到。VP26 在分子量为 21 kDa 的位置处被检测到，这与考马斯亮蓝染色凝胶结果相符(图 4a，泳道 5；图 4b，泳道 5)。重组 VP28 与来自白斑综合征病毒颗粒的 VP28 在凝胶上移动到同一位置，该位置所代表的分子量明显高于这个蛋白质的理论大小 22 kDa。就象从这些样品的非常低的本底反应所能观察出来的那样，该多克隆抗体没有与昆虫细胞(泳道 2)或杆状病毒(泳道 3 和 4)的蛋白质发生较多的交叉反应。

将受 AcMNPV-WSSVvp26c 以及 AcMNPV-WSSVvp24 感染的 Sf21 细胞的提取物在 15% SDS-PAGE 凝胶中进行分析。一个低分子量标准和纯化的白斑综合征病毒颗粒也在相同的凝胶中分析。在含有受 AcMNPV-WSSVvp26c 以及 AcMNPV-WSSVvp24 感染的细胞的泳道中，可以观察到一个 29 kDa 的弱带，它代表 GFP，在受感染的细胞经紫外线照射之后可以很清楚地被观察到。此外在含有受 AcMNPV-WSSVvp26c 感染的细胞的泳道中，可以观察到一个 26 kDa 的强表达带，与在白斑综合征病毒颗粒中的 26 kDa 带出现在凝胶中的相同位置。在包含受 AcMNPV-WSSVvp24 感染的细胞的泳道，可以观察到一个清晰的 24 kDa 带，与白斑综合征病毒颗粒所具有的 24 kDa 蛋白质的位置相一致。为了证明在受 AcMNPV-WSSVvp26c 感染的细胞中的 26 kDa 带，和在受 AcMNPV-WSSVvp24 感染的细胞中的 24 kDa 带，与在白斑综合征病毒颗粒中的 26 kDa 和 24 kDa 蛋白质相一致，使用抗白斑综合征病毒颗粒的一个多克隆抗体对这个凝胶进行蛋白印迹分析。在受

AcMNPV-WSSVvp26c 感染的细胞中的 26 kDa 带，以及在受 AcMNPV-WSSVvp24 感染的细胞中的 24 kDa 带都被很好地检测到了。

VP26 和 VP28 的相关性

以 GenBank/EMBL，SWISSPORT 和 PIR 数据库为基础，使用 FASTA，TFASTA 和 BLAST 程序，对白斑综合征病毒的 VP24，VP26，VP26c 和 VP28 进行了同源性搜索。没有发现它们与存储在 GenBank 中的序列有明显的同源关系，它们既不与杆状病毒包膜或衣壳蛋白质有同源关系，也不与来自其他的大的 DNA 病毒的结构蛋白质有同源关系。

中和实验

病毒原种的滴度从滴定实验中获得。病毒原种被稀释 1 x 10^7 到 5 x 10^{11} 倍，在每个稀释度，都要取该稀释度的病毒液给 10 只虾(斑节对虾，3-4 个月大)进行肌内注射，每只注射 10 μl。白斑综合征病毒原种的 1 x 10^8 倍稀释液在 7 到 12 天后可引起 50%的虾死亡。在进一步的实验中将会用到这个稀释度。

4 群虾用于中和实验：

组别	组名	注射	每组中虾的个数
1	阴性对照	330 mM NaCl	10
2	阳性对照	WSSV	10
3	免疫前血清	WSSV + 免疫前血清	15
4	VP28 抗血清	WSSV + VP28 抗血清	15

给每只虾注射的病毒的总量在所有的组中都是恒定不变的，都等于 10 μl 的病毒原种的 1 x 10^8 倍稀释液。组 3 中的血清浓度和组 4 是相同的(每次注射都含有 1ul 的白斑综合征病毒和 9 ul 血清)。在注射之后，虾被监视 4 个星期，死虾要经过电子显微镜检查以确定白斑综合征病毒的存在。结果如图 5 所示。

在组 1，即阴性对照组中，没有一只虾因感染白斑综合征病毒而死亡，因此死亡率是 0%。在阳性对照(组 2)中，在 23 天之后，死亡率达到 100%。免疫前血清(在兔子被注射 VP28 蛋白质之前采集的血清)

加入白斑综合征病毒的组(组 3)，在 25 天内死亡率达到 100%。VP28 抗毒血清加入白斑综合征病毒的组(组 4)，所有的虾都活着，死亡率为 0%。这些结果显示 VP28 抗毒血清在斑节对虾中能够中和白斑综合征病毒的感染。

蛋白质免疫接种

用 5 μl(初次接种)和 10 ul(加强免疫)不同的蛋白质溶液对组 3-6 进行免疫接种。免疫接种时，组 3 接受了 2.5μg VP28 蛋白质，组 4 接受了 3.6μg VP26c 蛋白质，组 5 接受了 0.7 μg VP24 蛋白质。组 6 接受了由等体积的 VP28,VP26c 以及 VP24 溶液所组成的混合物，总共 2.7ug 蛋白质。加强免疫时，这些虾所接受的蛋白质的量就更高了:组 3 为 9.6 ug VP28 蛋白质,组 4 为 5.7 ug VP26c 蛋白质,组 5 为 5.9 ug VP24 蛋白质，组 6 为合计 7.1 ug 的混合蛋白质。所有这些组里的虾都被注射了 10 ul 1 x 10^8 倍稀释的白斑综合征病毒原种溶液。

免疫接种的结果如图 6 所示。在组 1，即阴性对照组中，没有一只虾因感染白斑综合征病毒而死亡，因此死亡率是 0%。在组 2 中，在注射后 1 天，虾就因为感染白斑综合征病毒而开始死亡，并且死亡率在不断增加。虽然这些虾所接受的白斑综合征病毒的剂量与中和实验中的虾所接受的剂量完全相同，但是组 2 中的虾更早地开始死亡。这或许是由于本实验进行多次注射而引起对虾的压力所造成的结果。在组 3-5(虾分别被接种了 VP24，VP26c 和 VP28)中的死亡率被延迟，在组 6(虾被接种了 VP24，VP26c 和 VP28 的混合物)中，没有一只虾因为感染白斑综合征病毒而死亡，因此死亡率是 0%。对在接种中使用的各蛋白质的剂量进行优化也会增强抗白斑综合征病毒感染的保护效果。

参考文献

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A.. Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., 和 Lipman, D. (1997). Gapped BLAST 和 PSI-BLAST:新一

代蛋白质数据库搜索程序.*Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Durand, S., Lightner, D. V., Redman, R. M., 和 Bonami, J. R. (1997). 白斑综合征杆状病毒的超微结构和形态发生学。*Diseases Aquat. Organisms* 29, 205-211.

Flegel, T. W. (1997). 泰国黑虎虾（斑节对虾）*(Penaeus monodon)*的主要病毒性疾病。*World J. Microbiol. Biotechnol.* 13,433-442.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L, 和 Brown, F. (1991). "病毒的分类和命名: 国际病毒分类学委员会第五次报告" Springer-Verlag, New York.

Gamier, J., Osguthorpe, D.J. 和 Robson, B. (1978)预测球蛋白的二级结构的单一方法精确性和实施的分析。 *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.

Hansen, J. E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A. A., Williams, K. L, 和 Brunak, S. (1998). NetOglyc: 根据序列上下文和表面易接近性预测粘蛋白型O-糖基化位点 。*Glycoconj. J.* 15,115-130.

King, L. A., 和 Possee, R. D. (1992). " 杆状病毒表达系统." Chapman & Hall, London.

Kozak, M. (1989). 翻译的扫描模型: 一个更新 . *J. Cell Biol.* 108, 229-241.

Lo, C. F., Hsu, H. C., Tsai, M. F., Ho, C. H., Peng, S. E., Kou, G. H., 和 Lightner, D. V. (1999). 虾白斑综合征病毒的不同地区临床样本的特殊基因组片断分析 . *Diseases Aquat. Organisms..*

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., 和 Summers, M. D. (1995). "病毒的分类和命名: 国际病毒分类学委员会第六次报告". Virus Taxonomy Springer-Verlag, New York.

Pearson, W. R., 和 Lipman, D. J. (1988). 改良的生物学序列分析工具。Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448.

Reilander, H., Haase, W., 和 Maul, G. (1996). 维多利亚多管水母绿色荧光蛋白在昆虫细胞中使用杆状病毒表达系统的功能性表达 . *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 219, 14-20.

Rodriguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., 和 Bachere, E. (1995).由单克隆抗体检定的虾血细胞和血浆成分的特点 *J. Cell Sci.* 108, 1043-1050.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., 和 Maniatis, T. (1989). "分子克隆: 实验室手册"第二版. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Smith, G. E., 和 Summers, M. D. (1978). 杆状病毒基因组的限制性核酸内切酶分析. *Virology* 89, 517-527

Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G. 和 Krogh, A. (1998) 一个预测蛋白质序列中的穿膜螺旋的隐藏的马尔可夫模型 . *In* Proc. Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology (J. Glasgow *et* .al, Eds), p. 175-182, AAAI Press.

van Hulten, M. C. W., Tsai, M.-F., Schipper, C. A., Lo, C.-F., Kou, G.-H., 和 Vlak, J. M. (2000). 含有核糖核酸还原酶和重复序列的虾白斑综合征病毒的基因组片段分析 . *Journal of General Virology,* 81, 307-316.

Van Hulten, M. C. W., Westenberg, M., Goodall, S. D. & Vlak, J. M. (2000). 两个主要的虾白斑综合征病毒颗粒蛋白质基因的鉴定。*Virology* 266, 227-236.

Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., 和 McCawiey, P.W. (1977). 来自昆虫草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）（鳞翅目夜蛾科）的两个细胞系的建立 . *In Vitro* 13, 213-7. , .

Wonteerasupaya, C., Vickers, J. E., Sriurairatana, S., Nash, G. L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., 和 Flegel, T. W. (1995). 一种出现在外胚层和中胚层来源的细胞中并在黑虎虾（斑节对虾）中引起很高死亡率的非闭塞性系统性杆状病毒。 *Diseases Aquat. Organisms* 21, 69-77.

Yang, F., Wang, W., Chen, R. Z., 和 Xu, X. (1997). 一种简单和有效的纯化对虾杆状病毒 DNA 的方法。*J. Virol. Meth.* 67, 1-4.

序列表

<110> Akzo Nobel NV

<120> 源自白斑综合征病毒的蛋白质及其应用

<130> 1999484BI

<140>
<141>

<150> EP 99202545.2
<151> 1999-08-03

<150> EP 00200248.3
<151> 2000-01-24

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 555
<212> DNA
<213> 白斑综合征病毒

<400> 1
atggaatttg gcaacctaac aaacctggac gttgcaatta ttgcaatctt gtccattgca 60
atcattgctc taatcgttat catggttata atgattgtat tcaacacacg tgttggaaga 120
agcgtcgtcg ctaattatga tcagatgatg cgagtcccaa ttcaaagaag ggcaaaggta 180
atgtcaattc gtggagagag gtcctacaat actcctcttg gaaaggtggc catgaagaat 240
ggtctctccg ataaggacat gaaggatgtt tctgctgatc ttgtcatctc taccgtcaca 300
gccccaagga ctgatcccgc tggcactggg gccgagaact ctaacatgac tttgaagatc 360
ctcaacaaca ctggcgtcga tctcttgatc aacgacatta ctgttcggcc aactgttatt 420
gcaggaaaca ttaagggaaa tactatgtcg aacacttact tctcgagcaa ggacattaaa 480
tcttcatctt caaaaattac cctcattgac gtgtgcagca aatttgaaga cgcgcagcct 540
tcgaagctac aatga 555

<210> 2
<211> 615
<212> DNA
<213> 白斑综合征病毒

<400> 2
atggatcttt ctttcactct ttcggtcgtg tcggccatcc tcgccatcac tgctgtgatt 60
gctgtattta ttgtgatttt taggtatcac aacactgtga ccaagaccat cgaaacccac 120

```
acagacaata tcgagacaaa catggatgaa aacctccgca ttcctgtgac tgctgaggtt 180
ggatcaggct acttcaagat gactgatgtg tcctttgaca gcgacacctt gggcaaaatc 240
aagatccgca atggaaagtc tgatgcacag atgaaggaag aagatgcgga tcttgtcatc 300
actcccgtgg agggccgagc actcgaagtg actgtggggc agaatctcac ctttgaggga 360
acattcaagg tgtggaacaa cacatcaaga aagatcaaca tcactggtat gcagatggtg 420
ccaaagatta acccatcaaa ggcctttgtc ggtagctcca acacctcctc cttcaccccc 480
gtctctattg atgaggatga agttggcacc tttgtgtgtg gtaccacctt tggcgcacca 540
attgcagcta ccgccggtgg aaatcttttc gacatgtacg tgcacgtcac ctactctggc 600
actgagaccg agtaa                                                  615
```

<210> 3
<211> 184
<212> PRT
<213> 白斑综合征病毒

<400> 3

```
Met Glu Phe Gly Asn Leu Thr Asn Leu Asp Val Ala Ile Ile Ala Ile
  1               5                  10                  15

Leu Ser Ile Ala Ile Ile Ala Leu Ile Val Ile Met Val Ile Met Ile
            20                  25                  30

Val Phe Asn Thr Arg Val Gly Arg Ser Val Val Ala Asn Tyr Asp Gln
         35                  40                  45

Met Met Arg Val Pro Ile Gln Arg Arg Ala Lys Val Met Ser Ile Arg
     50                  55                  60

Gly Glu Arg Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Gly Lys Val Ala Met Lys Asn
 65                  70                  75                  80

Gly Leu Ser Asp Lys Asp Met Lys Asp Val Ser Ala Asp Leu Val Ile
                85                  90                  95

Ser Thr Val Thr Ala Pro Arg Thr Asp Pro Ala Gly Thr Gly Ala Glu
            100                 105                 110

Asn Ser Asn Met Thr Leu Lys Ile Leu Asn Asn Thr Gly Val Asp Leu
        115                 120                 125

Leu Ile Asn Asp Ile Thr Val Arg Pro Thr Val Ile Ala Gly Asn Ile
    130                 135                 140

Lys Gly Asn Thr Met Ser Asn Thr Tyr Phe Ser Ser Lys Asp Ile Lys
145                 150                 155                 160

Ser Ser Ser Ser Lys Ile Thr Leu Ile Asp Val Cys Ser Lys Phe Glu
```

165 170 175

Asp Ala Gln Pro Ser Lys Leu Gln
180

<210> 4
<211> 204
<212> PRT
<213> 白斑综合征病毒

<400> 4
Met Asp Leu Ser Phe Thr Leu Ser Val Val Ser Ala Ile Leu Ala Ile
1 5 10 15

Thr Ala Val Ile Ala Val Phe Ile Val Ile Phe Arg Tyr His Asn Thr
20 25 30

Val Thr Lys Thr Ile Glu Thr His Thr Asp Asn Ile Glu Thr Asn Met
35 40 45

Asp Glu Asn Leu Arg Ile Pro Val Thr Ala Glu Val Gly Ser Gly Tyr
50 55 60

Phe Lys Met Thr Asp Val Ser Phe Asp Ser Asp Thr Leu Gly Lys Ile
65 70 75 80

Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Asp Ala Gln Met Lys Glu Glu Asp Ala
85 90 95

Asp Leu Val Ile Thr Pro Val Glu Gly Arg Ala Leu Glu Val Thr Val
100 105 110

Gly Gln Asn Leu Thr Phe Glu Gly Thr Phe Lys Val Trp Asn Asn Thr
115 120 125

Ser Arg Lys Ile Asn Ile Thr Gly Met Gln Met Val Pro Lys Ile Asn
130 135 140

Pro Ser Lys Ala Phe Val Gly Ser Ser Asn Thr Ser Ser Phe Thr Pro
145 150 155 160

Val Ser Ile Asp Glu Asp Glu Val Gly Thr Phe Val Cys Gly Thr Thr
165 170 175

Phe Gly Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ala Gly Gly Asn Leu Phe Asp Met
180 185 190

Tyr Val His Val Thr Tyr Ser Gly Thr Glu Thr Glu
195 200

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> 白斑综合征病毒

<400> 5
Met His Met Trp Gly Val Tyr Ala Ala Ile Leu Ala Gly Leu Thr Leu
1 5 10 15

Ile Leu Val Val Ile Ser Ile Val Val Thr Asn Ile Glu Leu Asn Lys
20 25 30

Lys Leu Asp Lys Lys Asp Lys
35

<210> 6
<211> 24
<212> PRT
<213> 白斑综合征病毒

<220>
<221> UNSURE
<222> (7)
<223> Xaa=Gly 或 Val

<220>
<221> UNSURE
<222> (17)
<223> Xaa=Pro 或 Ala 或 Thr

<400> 6
Ile Val Leu Ile Ser Ile Xaa Ile Leu Val Leu Ala Val Met Asn Val
1 5 10 15

Xaa Met Gly Pro Lys Lys Asp Ser
20

<210> 7

<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：引物序列

<400> 7
cagaattctc datngtyttn gtnac 25

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：引物序列

<400> 8
cagaattcat ggayytnwsn ttyac 25

<210> 9
<211> 615
<212> DNA
<213> 白斑综合征病毒

<400> 9
atggaatttg gcaacctaac aaacctggac gttgcaatta ttgcaatctt gtccattgca 60
atcattgctc taatcgttat catggttata atgattgtat tcaacacacg tgttggaaga 120
agcgtcgtcg ctaattatga tcagatgatg cgagtcccaa ttcaaagaag ggcaaaggta 180
atgtcaattc gtggagagag gtcctacaat actcctcttg gaaaggtggc catgaagaat 240
ggtctctccg ataaggacat gaaggatgtt tctgctgatc ttgtcatctc taccgtcaca 300
gccccaagga ctgatcccgc tggcactggg gccgagaact ctaacatgac tttgaagatc 360
ctcaacaaca ctggcgtcga tctcttgatc aacgacatta ctgttcggcc aactgttatt 420
gcaggaaaca ttaagggaaa tactatgtcg aacacttact tctcgagcaa ggacattaaa 480
tcttcatctt caaaaattac cctcattgac gtgtgcagca aatttgaaga cggcgcagcc 540
ttcgaagcta caatgaacat tggattcacc tccaagaatg tgatcgatat caaggacgaa 600
atcaagaaga agtaa 615

<210> 10
<211> 204
<212> PRT
<213> 白斑综合征病毒

<220>
<223> 人工序列描述：引物；n是脱氧肌苷

<400> 10

Met Glu Phe Gly Asn Leu Thr Asn Leu Asp Val Ala Ile Ile Ala Ile
1 5 10 15

Leu Ser Ile Ala Ile Ile Ala Leu Ile Val Ile Met Val Ile Met Ile
20 25 30

Val Phe Asn Thr Arg Val Gly Arg Ser Val Val Ala Asn Tyr Asp Gln
35 40 45

Met Met Arg Val Pro Ile Gln Arg Arg Ala Lys Val Met Ser Ile Arg
50 55 60

Gly Glu Arg Ser Tyr Asn Thr Pro Leu Gly Lys Val Ala Met Lys Asn
65 70 75 80

Gly Leu Ser Asp Lys Asp Met Lys Asp Val Ser Ala Asp Leu Val Ile
85 90 95

Ser Thr Val Thr Ala Pro Arg Thr Asp Pro Ala Gly Thr Gly Ala Glu
100 105 110

Asn Ser Asn Met Thr Leu Lys Ile Leu Asn Asn Thr Gly Val Asp Leu
115 120 125

Leu Ile Asn Asp Ile Thr Val Arg Pro Thr Val Ile Ala Gly Asn Ile
130 135 140

Lys Gly Asn Thr Met Ser Asn Thr Tyr Phe Ser Ser Lys Asp Ile Lys
145 150 155 160

Ser Ser Ser Ser Lys Ile Thr Leu Ile Asp Val Cys Ser Lys Phe Glu
165 170 175

Asp Gly Ala Ala Phe Glu Ala Thr Met Asn Ile Gly Phe Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Val Ile Asp Ile Lys Asp Glu Ile Lys Lys Lys
195 200

<210> 11

<211> 627
<212> DNA
<213> 白斑综合征病毒

<220>
<223> 人工序列描述：引物

<400> 11
atgcacatgt gggggttta cgccgctata ctggcgggtt tgacattgat actcgtggtt 60
atatctatag ttgtaaccaa catagaactt aacaagaaat tggacaagaa ggataaagac 120
gcctaccctg ttgaatctga aataataaac ttgaccatta acggtgttgc tagaggaaac 180
cactttaact ttgtaaacgg cacattacaa accaggaact atggaaaggt atatgtagct 240
ggccaaggaa cgtccgattc tgaactggta aaaaagaaag gagacataat cctcacatct 300
ttacttggag acggagacca cacactaaat gtaaacaaag ccgaatctaa agaattagaa 360
ttgtatgcaa gagtatacaa taatacaaag agggatataa cagtggactc tgtttcactg 420
tctccaggtc taaatgctac aggaagggaa ttttcagcta acaaatttgt attatatttc 480
aaaccaacag ttttgaagaa aaataggatc aacacacttg tgtttggagc aacgtttgac 540
gaagacatcg atgatacaaa taggcattat ctgttaagta tgcgattttc tcctggcaat 600
gatctgttta aggttgggga aaaataa 627

<210> 12
<211> 208
<212> PRT
<213> 白斑综合征病毒

<400> 12
Met His Met Trp Gly Val Tyr Ala Ala Ile Leu Ala Gly Leu Thr Leu
1 5 10 15

Ile Leu Val Val Ile Ser Ile Val Val Thr Asn Ile Glu Leu Asn Lys
20 25 30

Lys Leu Asp Lys Lys Asp Lys Asp Ala Tyr Pro Val Glu Ser Glu Ile
35 40 45

Ile Asn Leu Thr Ile Asn Gly Val Ala Arg Gly Asn His Phe Asn Phe
50 55 60

Val Asn Gly Thr Leu Gln Thr Arg Asn Tyr Gly Lys Val Tyr Val Ala
65 70 75 80

Gly Gln Gly Thr Ser Asp Ser Glu Leu Val Lys Lys Lys Gly Asp Ile
85 90 95

Ile Leu Thr Ser Leu Leu Gly Asp Gly Asp His Thr Leu Asn Val Asn
100 105 110

```
Lys Ala Glu Ser Lys Glu Leu Glu Leu Tyr Ala Arg Val Tyr Asn Asn
        115                 120                 125

Thr Lys Arg Asp Ile Thr Val Asp Ser Val Ser Leu Ser Pro Gly Leu
    130                 135                 140

Asn Ala Thr Gly Arg Glu Phe Ser Ala Asn Lys Phe Val Leu Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Lys Pro Thr Val Leu Lys Lys Asn Arg Ile Asn Thr Leu Val Phe Gly
                165                 170                 175

Ala Thr Phe Asp Glu Asp Ile Asp Asp Thr Asn Arg His Tyr Leu Leu
            180                 185                 190

Ser Met Arg Phe Ser Pro Gly Asn Asp Leu Phe Lys Val Gly Glu Lys
        195                 200                 205
```

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：引物

<400> 13
cagaattcat gcayatgtgg ggngt 25

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：引物；n是脱氧肌苷

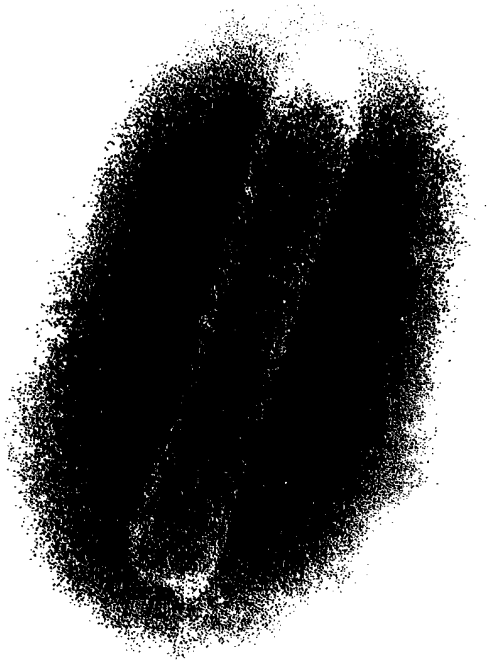
<400> 14
cagaattcyt trtcyttytt rtcnarytt 29

图 1A



231000x 放大

图 1B



231000x 放大

图 1C

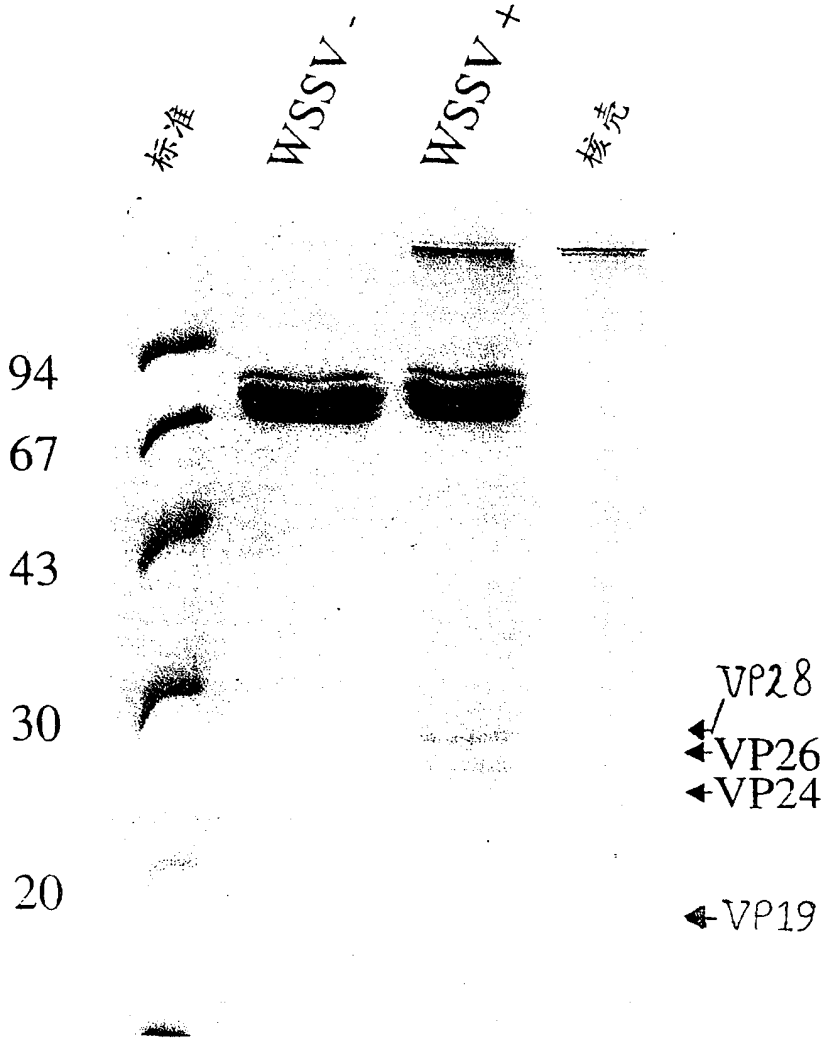


图 2a

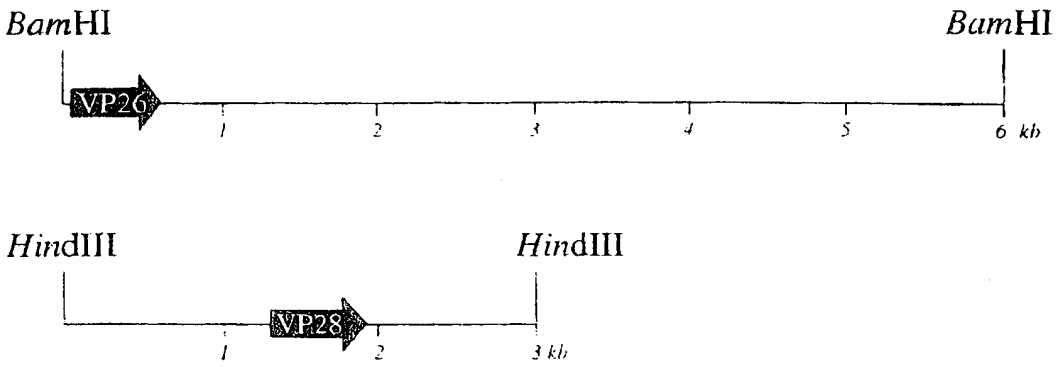
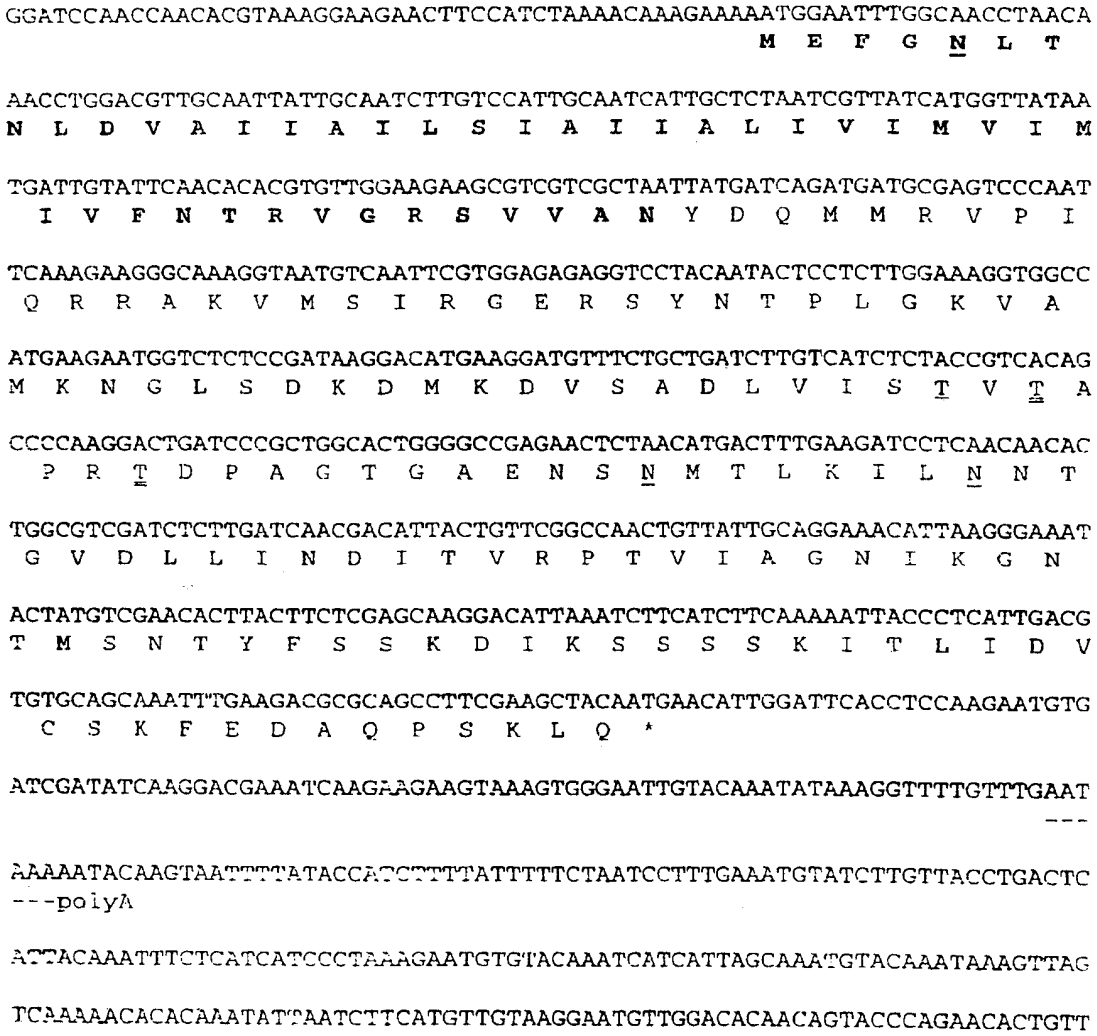


图 2b


GGATCCAACCAACACGTAAAGGAAGAACTTCCATCTAAAACAAAGAAAAATGGAATTTGGCAACCTAACA
M E F G N L T
AACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTTGTCCATTGCAATCATTGCTCTAATCGTTATCATGGTTATAA
N L D V A I I A I L S I A I I A L I V I M V I M
TGATTGTATTCAACACACGTGTTGGAAGAAGCGTCGTCGCTAATTATGATCAGATGATGCGAGTCCCAAT
I V F N T R V G R S V V A N Y D Q M M R V P I
TCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATTCGTGGAGAGAGGTCCTACAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCC
Q R R A K V M S I R G E R S Y N T P L G K V A
ATGAAGAATGGTCTCTCCGATAAGGACATGAAGGATGTTTCTGCTGATCTTGTCATCTCTACCGTCACAG
M K N G L S D K D M K D V S A D L V I S T V T A
CCCCAAGGACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCCGAGAACTCTAACATGACTTTGAAGATCCTCAACAACAC
P R T D P A G T G A E N S N M T L K I L N N T
TGGCGTCGATCTCTTGATCAACGACATTACTGTTCGGCCAACTGTTATTGCAGGAAACATTAAGGGAAAT
G V D L L I N D I T V R P T V I A G N I K G N
ACTATGTCGAACACTTACTTCTCGAGCAAGGACATTAAATCTTCATCTTCAAAAATTACCCTCATTGACG
T M S N T Y F S S K D I K S S S S K I T L I D V
TGTGCAGCAAATTTGAAGACGCGCAGCCTTCGAAGCTACAATGAACATTGGATTCACCTCCAAGAATGTG
C S K F E D A Q P S K L Q *
ATCGATATCAAGGACGAAATCAAGAAGAAGTAAAGTGGGAATTGTACAAATATAAAGGTTTTGTTTGAAT

AAAAATACAAGTAATTTTTATACCACCTTTTATTTTTCTAATCCTTTGAAATGTATCTTGTTACCTGACTC
---polyA
ATTACAAATTTCTCATCATCCCTAAAGAATGTGTACAAATCATCATTAGCAAATGTACAAATAAAGTTAG
TCAAAAACACACAAATATTAATCTTCATGTTGTAAGGAATGTTGGACACAACAGTACCCAGAACACTGTT

图 2c

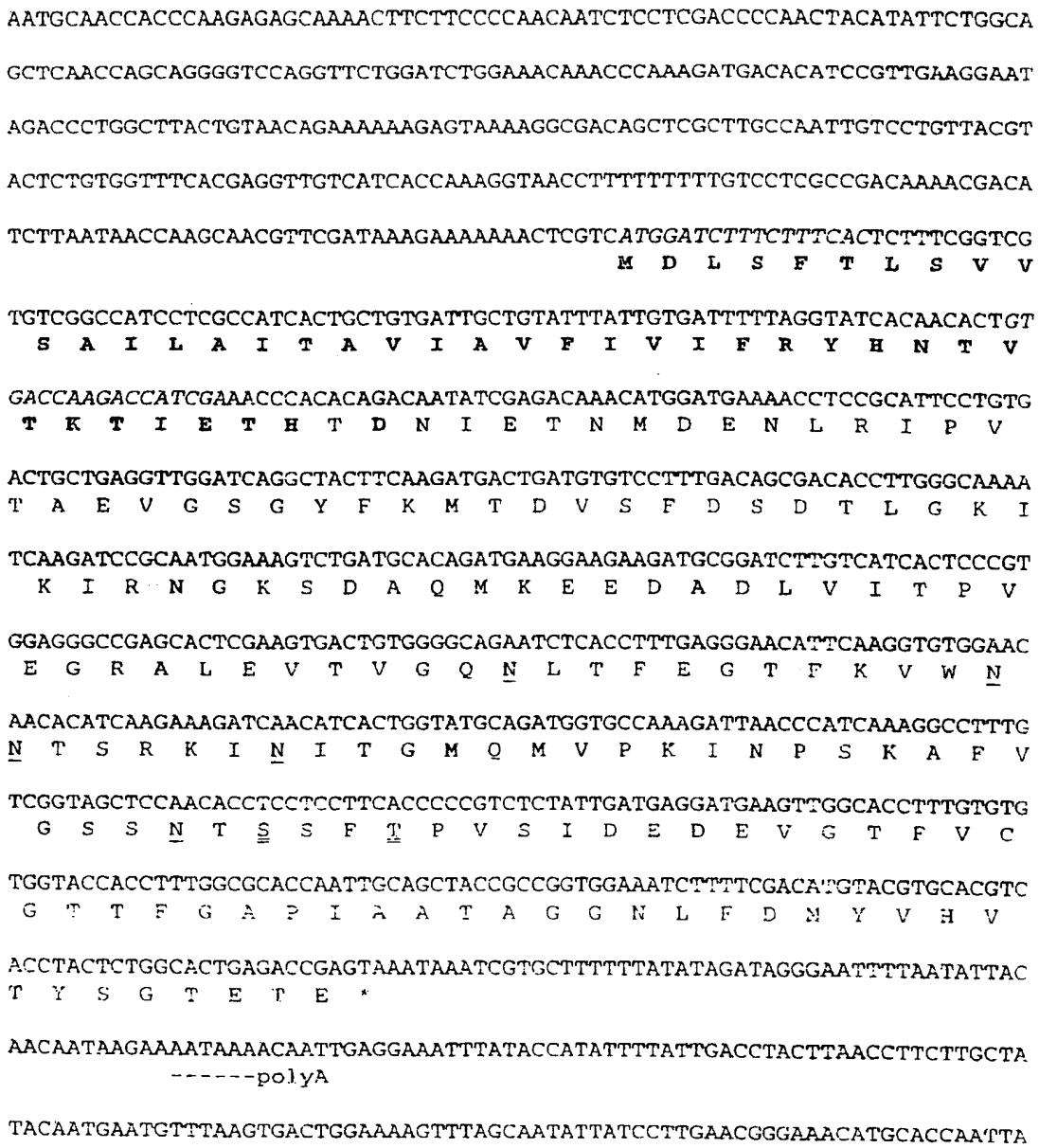

AATGCAACCACCCAAGAGAGCAAAACTTCTTCCCCAACAATCTCCTCGACCCCAACTACATATTCTGGCA
GCTCAACCAGCAGGGGTCCAGGTTCTGGATCTGGAAACAAACCCAAAGATGACACATCCGTTGAAGGAAT
AGACCCTGGCTTACTGTAACAGAAAAAAGAGTAAAAGGCGACAGCTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTACGT
ACTCTGTGGTTTCACGAGGTTGTCATCACCAAAGGTAACCTTTTTTTTTGTCCTCGCCGACAAAACGACA
TCTTAATAACCAAGCAACGTTCGATAAAGAAAAAAACTCGTCATGGATCTTTCTTTCACTCTTTCGGTCG
M D L S F T L S V V
TGTCGGCCATCCTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTTAGGTATCACAACACTGT
S A I L A I T A V I A V F I V I F R Y H N T V
GACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCCTGTG
T K T I E T H T D N I E T N M D E N L R I P V
ACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAAA
T A E V G S G Y F K M T D V S F D S D T L G K I
TCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGATCTTGTCATCACTCCCGT
K I R N G K S D A Q M K E E D A D L V I T P V
GGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAAC
E G R A L E V T V G Q N L T F E G T F K V W N
AACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTG
N T S R K I N I T G M Q M V P K I N P S K A F V
TCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTG
G S S N T S S F T P V S I D E D E V G T F V C
TGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTC
G T T F G A P I A A T A G G N L F D M Y V H V
ACCTACTCTGGCACTGAGACCGAGTAAATAAATCGTGCTTTTTTATATAGATAGGGAATTTTAATATTAC
T Y S G T E T E *
AACAATAAGAAAATAAAACAATTGAGGAAATTTATACCATATTTTATTGACCTACTTAACCTTCTTGCTA
------polyA
TACAATGAATGTTTAAGTGACTGGAAAAGTTTAGCAATATTATCCTTGAACGGGAAACATGCACCAATTA

图 3a

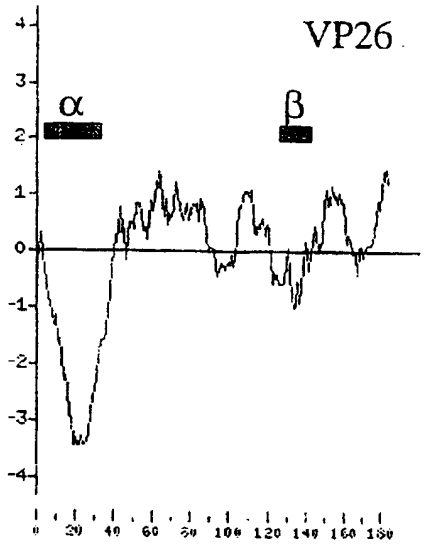


图 3b

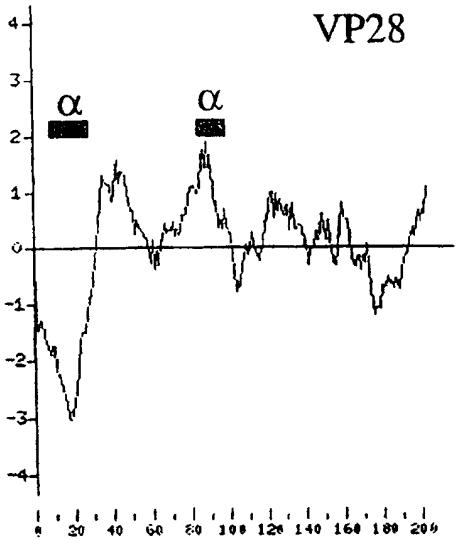


图 4a

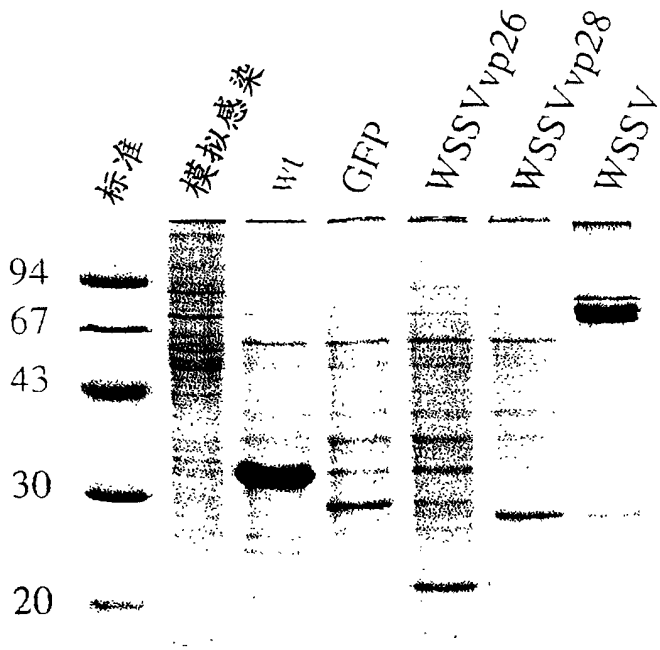


图 4b

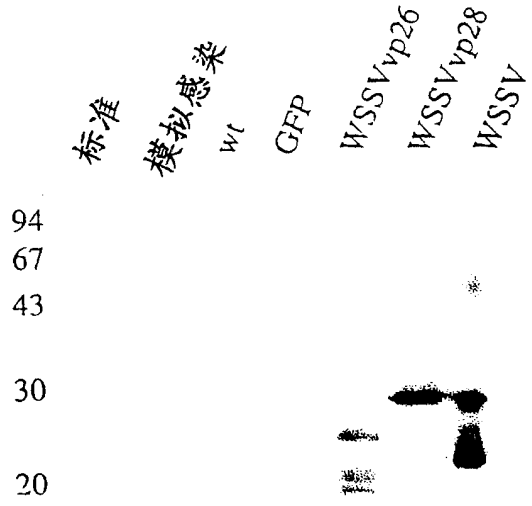


图 5

中和实验

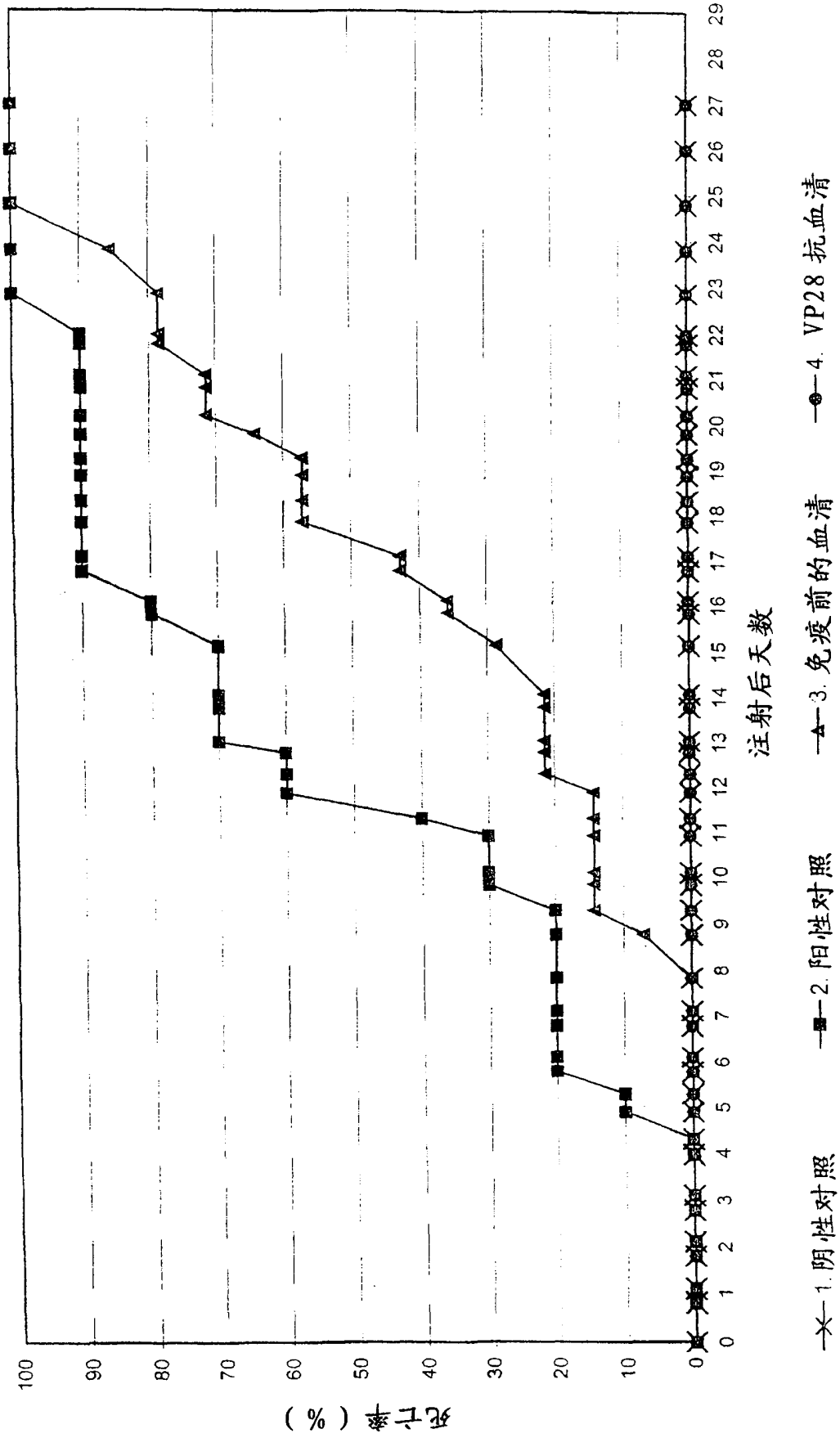
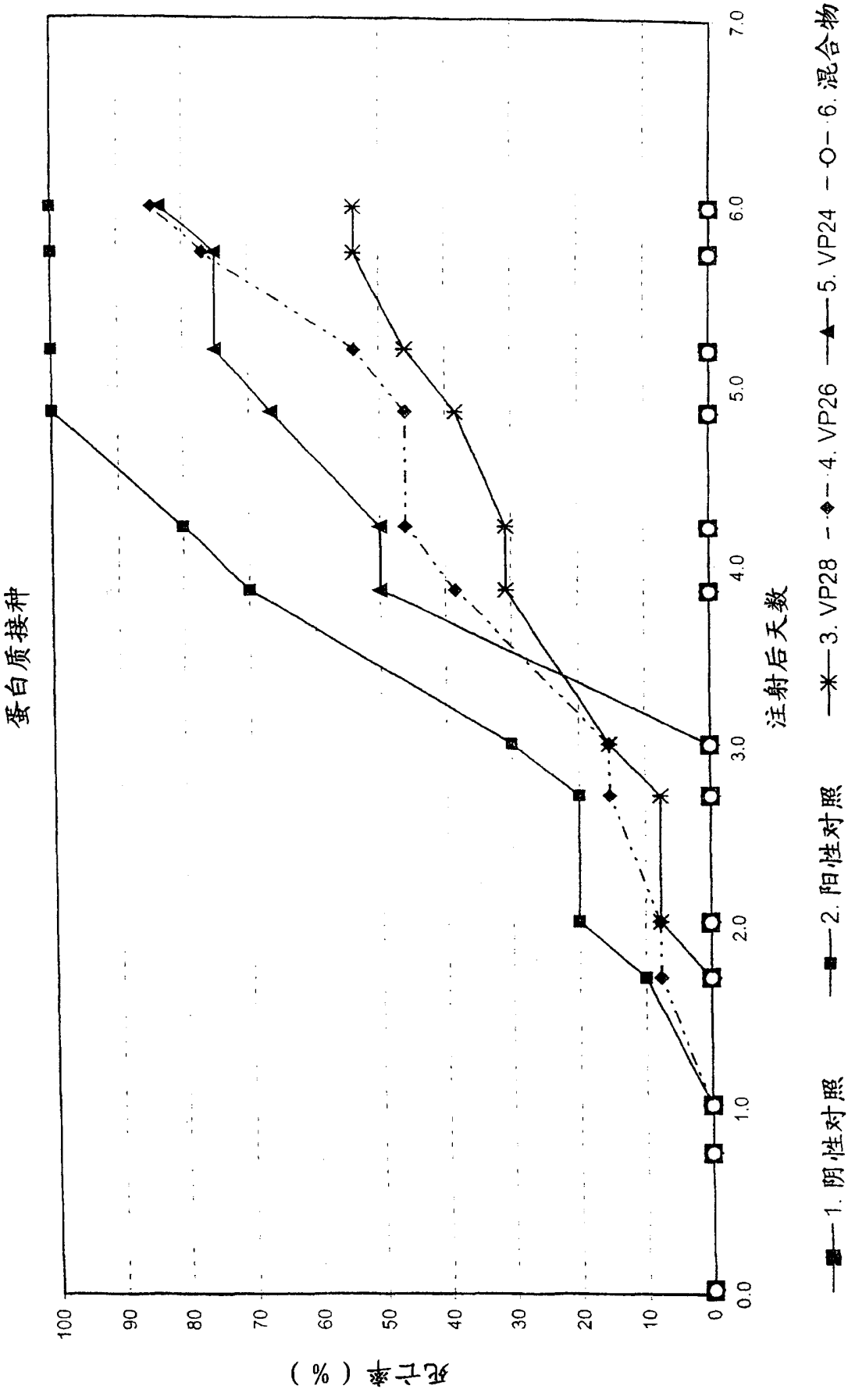

死亡率（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
注射后天数
1. 阴性对照
2. 阳性对照
3. 免疫前的血清
4. VP28 抗血清

图 6


蛋白质接种
死亡率（%）
注射后天数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
1. 阴性对照
2. 阳性对照
3. VP28
4. VP26
5. VP24
6. 混合物