



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104428417 B

(45)授权公告日 2020.05.05

(21)申请号 201280062015.X

(22)申请日 2012.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104428417 A

(43)申请公布日 2015.03.18

(30)优先权数据
102011121069.9 2011.12.13 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/DE2012/001205 2012.12.12

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/107436 DE 2013.07.25

(83)生物保藏信息
DSM 25405 2011.11.29
DSM 25406 2011.11.29
DSM 25407 2011.11.29

(73)专利权人 维罗疫苗有限公司
地址 德国哈雷

(72)发明人 K·布罗伊尼希 S-E·贝伦斯

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 李振东 过晓东

(51)Int.Cl.

C12N 15/81(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/02(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

(56)对比文件

US 20110293659 A1, 2011.12.01, 说明书第2页第13段-第3页第23段, 权利要求1-25.

US 20110293659 A1, 2011.12.01, 说明书第2页第13段-第3页第23段, 权利要求1-25.

W0 90151140 A1, 1990.12.13, 第5页第14-27行, 第13页实施例2, 表2, 3.

Jackwood, D.J et al. Infectious bursal disease virus isolate D78 segment A polyprotein gene, partial cds.《GenBank: EU162087.1》.2008,

Jacob Pitcovski et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens.《Vaccine》.2003, 第21卷4736-4743.

审查员 李有朝

权利要求书1页 说明书17页
序列表10页 附图7页

(54)发明名称

利用针对确定抗原产生保护性体液免疫应答的重组酵母进行的接种

(57)摘要

本发明涉及用来针对确定抗原产生体液免疫应答的重组乳酸克鲁维酵母、制备这些酵母、以及将其用于针对含有这些抗原的病原体 and 恶性细胞进行预防接种。

1. 乳酸克鲁维酵母类型的重组酵母,该重组酵母具有对传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 的 VP2 抗原进行编码的基因作为外源基因,其被整合到酵母基因组中,并且该重组酵母能表达传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 的 VP2 抗原作为外源蛋白,其特征在于,乳酸克鲁维酵母的重组菌株选自:

乳酸克鲁维酵母 DSM 25405,

乳酸克鲁维酵母 DSM 25406, 以及

乳酸克鲁维酵母 DSM 25407。

2. 根据权利要求 1 所述的重组酵母,其特征在于,使用重组酵母作为亚单位标记疫苗。

3. 根据权利要求 2 所述的重组酵母,其特征在于,将亚单位标记疫苗用于区别接种的个体与自然感染的个体。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的重组酵母,其特征在于,亚单位标记疫苗同时具有佐剂特性。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的重组酵母,其特征在于,亚单位标记疫苗有免疫原性。

6. 根据权利要求 1 至 3 之一所述的重组酵母,其特征在于,整合外源基因不需要附加载体序列或者选择标记。

7. 根据权利要求 1 至 3 之一所述的重组酵母,其特征在于,组成性表达外源基因。

8. 根据权利要求 1 至 3 之一所述的重组酵母,其特征在于,可以诱导表达外源基因。

9. 根据权利要求 1 至 3 之一所述的重组酵母,其特征在于,可以间接通过表达内源报告基因将外源基因表达量化。

10. 根据权利要求 1 至 3 之一所述的重组酵母,其特征在于,外源基因可以表达具有抗原特性的外源蛋白。

11. 根据权利要求 1 至 3 之一所述的重组酵母,其特征在于,重组酵母可以诱导或者组成性表达具有与 SEQ ID NO:4 一致的氨基酸序列的 IBDV VP2-T2S 蛋白或者具有与 SEQ ID NO:6 一致的氨基酸序列的 IBDV oVP2-T2S 蛋白作为外源蛋白。

12. 具有外源基因的表达载体,其特征在于,所述外源基因具有与 SEQ ID NO:3 或者 SEQ ID NO:5 一致的核酸序列。

13. 根据权利要求 12 所述的表达载体,其特征在于,外源基因对具有与 SEQ ID NO:4 一致的氨基酸序列的 IBDV VP2-T2S 蛋白进行编码,或者对具有与 SEQ ID NO:6 一致的氨基酸序列的密码子优化的 oVP2-T2S 蛋白进行编码。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的表达载体,其特征在于,表达载体是载体 K1p3 或者与 SEQ ID NO:10 一致的 K1p3-MCS。

利用针对确定抗原产生保护性体液免疫应答的重组酵母进行的接种

发明领域

[0001] 本发明涉及用来针对确定抗原产生体液免疫应答的重组酵母、制备这些酵母、以及将其用于针对含有这些抗原的病原体 and 恶性细胞进行预防接种。

[0002] 技术现状

[0003] 疫苗被用来预防疾病(预防性疫苗)或者治疗已患上的疾病(免疫治疗性疫苗)。预防接种计划已在过去大约100年中为减少传染病作出了很大贡献。自从大约20年以来才开发使用免疫治疗性疫苗,用于治疗病毒、细菌或寄生虫引起的持续感染,或者治疗致癌疾病。接种的目的是针对病原体或者恶性(肿瘤基因)细胞诱导(基本上是T和NK细胞介导的)细胞免疫应答和/或者(基本上是B细胞/抗体介导的)体液免疫应答。

[0004] 传统疫苗均含有弱毒或者灭活形式的完整病原体,包括其基因物质、DNA 或者RNA形式的核酸。制备这些传统疫苗大多需要特殊安全措施和/或者使用试验动物和/或者使用细胞培养物;通常还必须使用冷链进行存放和运输,很麻烦。此外还有制备过程中(例如源自试验动物或者细胞培养物)的物质在接种个体中产生副作用或者引起病原体意外复活的潜藏危险。即使诊断方面也存在一些问题:例如对家畜进行接种时,可能无法将接种后的动物与自然感染的动物区别开来,使得基于新感染检测的预警系统可能会失灵。因此开发了仅含有病原体部分结构的“亚单位”疫苗,前提条件是已经知道相应病原体的“主要抗原”。主要抗原大多是免疫系统能够识别的病原体表面成分,例如病毒包膜或者病毒衣壳的蛋白,这些也能在不完整病毒颗粒的情况下诱导体液免疫应答和/或者细胞免疫应答,并且能在宿主中诱导对病毒的免疫记忆。由于“亚单位接种”缺少病原体的典型成分,因此可以通过鉴别诊断区分接种个体与自然感染的个体;因此所讨论的也是“亚单位标记疫苗”。许多亚单位疫苗的缺点是制备复杂,而且免疫原性经常不充分:可以高效培育病原体本身(有以上所述的限制),必须采用基因技术,以成本高昂而且大多效率低下的方法制备其主要抗原,并且必须以很大的花费将其净化。所获得的亚单位疫苗很敏感,同样必须进行冷藏运输,稳定性很小。鉴于这些原因,大多数疫苗均基于包含完整病原体的传统原理。例如,防治传染性家禽法氏囊病(IBD)的大多数疫苗目前多数基于引起IBD 的传染性法氏囊病病毒(IBDV)的弱毒或者灭活病毒。

[0005] 人们尝试使用佐剂来弥补亚单元疫苗的免疫原性较弱的问题。佐剂是经验证明有免疫刺激作用的物质,能够以非特异性而且经常很少令人理解的方式增强免疫反应。迄今为止仅仅批准了很少供人使用的佐剂,例如在美国获准用于人的佐剂是铝盐、氢氧化铝和磷酸铝。然而铝盐配方会引起相关疫苗的储存困难。此外这些佐剂无法与所有抗原一起发挥充分的作用。

[0006] 可以采用基因技术在不同的宿主细胞中制备外源蛋白,大多数亚单元疫苗均属于外源蛋白。除了肠内细菌大肠杆菌之外,还将可以在细胞培养物中繁殖的哺乳动物细胞、植物细胞和各种真菌确立为宿主体系。可以用特别低廉的成本大规模培育细菌和真菌之类的微生物体系。数十年以来已经按常规将酵母、毕赤酵母和克鲁维酵母菌属的酵母细胞用来

表达外源蛋白。与细菌相比,酵母细胞的优点是真核生物,也就是在很多方面等同于动物细胞,并且能够以天然或者近似天然的形式,以低廉成本在酵母中制备真核生物蛋白,也就是在动物细胞中形成并且/或者必须能够起作用的蛋白(Bathurst,1994;Gellissen&Hollenberg,1997)。以往仅仅将酵母用于生产外源蛋白,并且从酵母细胞中提纯蛋白,将其用作亚单位疫苗。近期以来才尝试将酵母本身或者将酵母的细胞碎片作为疫苗。

[0007] 自从大约5年以来尝试将酿酒酵母(“面包酵母”,*S.cervisiae*)本身用于接种疫苗:试验结果表明,可以通过皮下给药的酿酒酵母的抗原表达细胞激活树突状细胞,并且可以产生抗原特异性T细胞免疫应答,尤其是细胞毒性T细胞对某些抗原的应答。已证实这种细胞免疫应答对某些肿瘤细胞有保护作用,也就是进行疫苗接种之后,在接种后的动物中产生的肿瘤少于对照动物。目前也在肿瘤疾病的免疫治疗应用中测试该方法(Stubbs et al.,2001;Lu et al.,2004)。

[0008] 对基于酵母的疫苗接种进行描述的现有技术所公开的以下资料均为专业人士熟悉:

[0009] 例如20090304741、5830463、10738646和20070166323这一系列美国专利均描述了使用含有至少一种重组抗原的酿酒酵母进行免疫治疗。已证明这些酵母能有效刺激免疫反应,尤其是细胞介导的免疫反应。

[0010] W0/2006/044923公开了重组表达丙型肝炎病毒(HCV)的不同蛋白的酵母(酿酒酵母),所述酵母能够引起对这些HCV蛋白的免疫应答,主要是T细胞应答,并且应将其用来作为治疗慢性丙型肝炎的疫苗。

[0011] W0/2007/092792描述了使用重组酿酒酵母治疗流感病毒感染,使用不同酵母菌株的组合,给服这些酵母菌株可引起T细胞诱导,也就是可引起细胞免疫应答。

[0012] W0/2011/032119涉及了对基于酵母的患者免疫治疗的疗效加以改进的方法。该方法包括一种基于酵母的药剂,该药剂能调控CD4+TH17细胞的生产或者存活。

[0013] 没有哪一个专利中证明可使用酵母诱导对传染病或肿瘤的保护性体液免疫应答(本申请书的主题)。此外要么使用了酿酒酵母,或者使用了巴斯德毕赤酵母,但是没有使用乳酸克鲁维酵母(本申请书的主题)。

[0014] 与酿酒酵母一样,乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)也具有GRAS Status (GRAS: generally regarded as safe/公认为安全),也就是适合用于动物或者人(van Ooyen et al.2006)。尽管形貌非常类似于面包酵母,这两个菌种早在一亿多年之前就从共同的祖先朝向不同的方向进化。因此乳酸克鲁维酵母的很多特性有别于酿酒酵母。其中几个区别对于生物技术应用有很大意义。酿酒酵母的进化产生了专门进行酒精发酵的新陈代谢,因此丧失了祖先的很多基因。但是酒精发酵对于大多数酵母来说并不典型。如果存在氧并且线粒体呼吸真正允许以更多效率从糖转化输出能量,那么当葡萄糖浓度很高时就会在酿酒酵母中进行酒精发酵。可通过“葡萄糖抑制”在很大程度上抑制细胞“发电站”线粒体的功能。乳酸克鲁维酵母在线粒体的功能调节方面明显有别于酿酒酵母(Chen and Clark-Walker, 1995, Clark-Walker,2007)。与酿酒酵母相比,乳酸克鲁维酵母属于“Crabtree阴性”酵母。此类酵母在严格有氧条件下通常不会形成乙醇,而是通过线粒体活性将葡萄糖完全降解成CO₂并且形成ATP。该生理学特性十分重要,因为可在大规模发酵时显著提高生物质收率,使用这些酵母作为重组蛋白的生产菌能显著降低成本。此外对乳酸克鲁维酵母的研究已证

明,己糖激酶介导的葡萄糖信号传导途径中的突变能够改善异源基因表达 (Donnini et al., 2004)。呼吸基因的葡萄糖抑制作用降低是“Crabtree阴性”酵母的特征,并且可能与此类酵母中观察到的更好外源基因表达有关联。

[0015] 乳酸克鲁维酵母和酿酒酵母还在细胞壁葡聚糖成分中有很大的差异 (Backhaus et al., 2011);怀疑这些差异的原因是高尔基体中参与糖蛋白成熟的糖基转移酶不同:酿酒酵母中的糖蛋白含有多得多的磷酸甘露糖,乳酸克鲁维酵母中的糖蛋白则主要含有终端N-乙酰葡萄糖胺 (Raschke and Ballou, 1972)。认为酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母之间的这些区别在蛋白糖基化和分泌时以及在细胞壁生物合成过程中对于异源表达外源蛋白的细胞内定位、折叠、稳定性以及免疫原性有很大的影响 (Uccelletti et al., 2004)。

[0016] WO/2010/054649描述了乳酸克鲁维酵母的一种重组体系的制备。在所述的应用示例中使用从菌株VAK367-D4得到的重组菌株针对各种不同的抗原进行粘膜或者口服疫苗接种。但是口服/粘膜疫苗接种的缺点在于,必须使用大量的疫苗才能实现保护性免疫。

附图说明

[0017] 附图1所示为通过同源重组为出发菌株VAK367-D4制备具有外源基因 IBDV VP2的疫苗株VAK887的示意图。转化含有IBDV菌株D78的VP2 基因的质粒K1p3-MCS (SEQ ID No.: 10),通过同源重组将VP2外源基因插入染色体的LAC4基因位点之中,该基因位点已由于插入URA3基因而被破坏。重组为宿主基因组时将URA3基因替换成VP2基因,并且重新制备LAC4基因;选择不含尿嘧啶的乳糖培养基,即可获得重组酵母菌株。随后通过KIGAL80 启动子控制LAC4 (β -半乳糖苷酶)的表达,通过LAC4启动子控制VP2基因的表达。

[0018] 附图2A所示为通过菌株VAK887表达IBDV VP2,使用VP2特异性抗体进行Western印迹分析,与源菌株 (VAK367) 对照,并且与感染了IBDV的鸡细胞对照。附图2B所示为重组IBDV VP2以及突变IBDV VP2-T2S在不同的表达VP2的乳酸克鲁维酵母变异体中的表达分析。原始乳酸克鲁维酵母变异体VP2 (VAK887) 仅仅表达了适量的病毒蛋白。将VP2的氨基酸位置2上的苏氨酸替换成丝氨酸,可以在乳酸克鲁维酵母菌株VP2-T2S (VAK888) 中提高VP2蛋白表达。可以进一步提高的方式的增加KIGAIA基因计量 (VP2-T2S_GAL4=VAK890),或者使用酵母密码子优化的合成VP2基因 (oVP2-T2S=VAK910)。

[0019] 附图3证明在90℃温度下对本发明所述的酵母进行2小时热灭活没有导致重组的VP2-T2S蛋白丧失 (附图3A)。在SDS PAGE上从颗粒饲料中未灭活的酵母、灭活酵母以及酵母中各自分离等量的蛋白,与感染和没有感染 IBDV的家禽细胞中的细胞裂解液进行对照,在Western印迹中使用抗-VP2- 抗体进行测试。附图3还证明变异体VAK890中VP2-T2S的量约为每个酵母细胞0.7fg异源蛋白 (附图3B)。这里在Western印迹中对定量的净化 VP2-T2S进行了着色,与所抽取的乳酸克鲁维酵母 (菌株VAK890) 的发酵罐中一定数量细胞中的VP2进行对照,使用密度计分析结果。

[0020] 附图4对照使用乳酸克鲁维酵母变异体VAK890的完整酵母细胞进行口服接种,解释以皮下给药方式使用乳酸克鲁维酵母变异体VAK890的完整热灭活酵母细胞对小鼠进行接种。附图4A所示为免疫方案:进行了三次皮下免疫,各休息两周;两次饲喂两周进行对照。最后一次给服酵母之后两周 (箭头) 从经过治疗的小鼠体内抽取血清样品,在IBDV特异性ELISA (附图4B) 和 IBDV中和试验中检出存在抗VP2抗体 (附图4C)。附图4D使用表达VP2 的

乳酸克鲁维酵母(菌株K1 VP2-T2S_GAL4 (VAK890))治疗过的小鼠与使用野生型乳酸克鲁维酵母(菌株VAK367)治疗过的小鼠相比具有更高的抗体/中和抗体滴定量。此外还证明了皮下给服的乳酸克鲁维酵母(菌株VAK890)与使用乳酸克鲁维酵母(菌株VAK890)饲喂的小鼠相比具有明显更高的抗体/中和抗体滴定量。但是口服乳酸克鲁维酵母(菌株890)免疫的小鼠与使用野生型乳酸克鲁维酵母(菌株VAK367)相比也增大了抗体/中和抗体滴定量。

[0021] 附图5所示为使用乳酸克鲁维酵母变异体VP2-T2S_GAL4 (VAK890)的热灭活完整酵母细胞对鸡进行口服和皮下疫苗接种。要么使用短时间1/1/1/1/1 方案(1周饲喂,1周休息,1周饲喂,以此类推)或者使用较长的2/2/2方案进行口服疫苗接种(附图5A)。疫苗接种之后1周或者2周休息之后,使用 IBDV(菌株Edgar)以每个动物100EID₅₀的浓度感染所有经过治疗的动物(病毒challenge;黑色条柱)。在口服疫苗接种之后,尤其在应用延长的治疗方案之后,可以在多个动物中检测出病毒中和抗体的滴定量增大。而使用重组乳酸克鲁维酵母进行皮下疫苗接种则相反,在所有经过治疗的动物中产生了较高的病毒中和抗体滴定量(附图5B、C;IBDV特异性ELISA,IBDV中和试验)。没有使用重组乳酸克鲁维酵母治疗后的动物在感染IBDV之后死亡,无论使用了哪一种治疗方案。与此相比,对照组中的死亡率为10~35%(附图5C)。对经过治疗后的动物的法氏囊中的病变进行分析,结果证明在应用延长的治疗方案之后,大约10%口服治疗的动物在接种IBDV之后没有病毒感染征兆:使用了所谓的“病变评分”-得分1、2感染或者几乎没有感染受损的法氏囊;得分 3、4感染受损的法氏囊和严重受损的法氏囊。与此相比,皮下给服重组乳酸克鲁维酵母菌株VAK890的所有动物均表现出完全的IBDV疫苗免疫保护(附图5C)。

[0022] 附图6所示为载体Klp3-MCS (SEQ ID No.:10)的结构示意图。

[0023] 本发明的说明:

[0024] 专用人士均熟悉现有技术将重组酵母用于皮下疫苗接种的方法:Stubbs et al., (2001) Nat. Med. 7:625-629; Stubbs and Wilson (2002) Curr. Opin. Mol. Ther. 4:35-40; Wansley et al., (2008) Clin. Cancer Res. 14:4316-4325; US 5,830,463, WO/2006/044923; WO/2007/092792 und WO/2011/032119。但是在这些出版文献的实施例中所研究的仅仅是酿酒酵母。“酵母”是呈单细胞生长的真核微生物的总称,经过数百万年的差异进化,目前具有极为不同的特性(酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母大约进化了一亿年)。如果使用酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母对诸如动物或者人之类的高等真核生物进行疫苗接种,则应以这样的认识为出发点:酿酒酵母引发的免疫应答与乳酸克鲁维酵母引发的免疫应答有很大区别。这不仅适用于对酵母中表达的外源抗原的免疫应答,而且也适用于对酵母自身抗原的免疫应答。如果使用完整的酿酒酵母细胞进行皮下免疫,就会产生T细胞诱导,也就是细胞免疫应答。迄今为止现有技术并未证明使用重组酿酒酵母以简单途径(也就是直接施用表达单个抗原的菌株)实现对抗原的防护性体液免疫应答。

[0025] 以上述背景为出发点,本发明的任务在于提供一种能够用来针对某些抗原产生防护性体液免疫应答的方法。另一任务在于提供一种能够用来区别接种个体与自然感染个体的亚单位标记疫苗。另一任务在于制备一种同时具有很强佐剂特性并且因此而具有很强免疫原性的亚单位标记疫苗。

[0026] 制备一种基于酵母并且允许将外源基因靶向整合到酵母基因组之中的表达体系,即可解决这些任务。可以利用该体系快速(也就是在几周之内)制备表达外源基因的重组酵

母。可以在发酵罐中以低廉成本大量(例如千克范围(kg))繁殖这些酵母。采用调控表达和补料分批法进行发酵,也可以表达该酵母体系中的细胞毒性抗原。在表达外源基因之后对酵母进行热灭活,然后可以作为粉末进行储运,无需进行冷却。可以直接使用酵母粉末,也就是不需要继续分级,要么作为乳化液或者丸剂(参见实施例),或者作为亚单位标记疫苗。通过以下两个因素保证抗原表达以及有效防护性免疫所需的佐剂效应:(i)可以对所表达的外源蛋白进行靶向基因改造,(ii)表达酵母中的外源蛋白,并且以口服或者皮下形式直接使用酵母;酵母本身具有很强的佐剂效应。首选皮下给药。已制备一种重组酵母菌株;该酵母菌株表达一种特异性病毒抗原,并且可以将其用于本发明所述的皮下疫苗接种方法之中。已实现对相关病毒感染的完全预防性保护作用。仅仅使用了非常少量的酵母(若为家禽中的皮下给药,则在毫克范围内(mg))。仅需2~3次给药,就能实现该保护作用。

[0027] 本发明所述的方法不仅适用于人类医疗领域,而且也适用于兽医领域。首选将本发明所述的方法应用于兽医领域。

[0028] 利用酵母执行本发明所述的方法。适用的酵母例如是酵母菌属、毕赤酵母菌属和克鲁维酵母菌属的酵母。在一种优选的实施方式中,使用酵母菌属和克鲁维酵母菌属的酵母执行本发明所述的方法。尤其优先使用酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)。在最优先的实施方式中,使用乳酸克鲁维酵母执行本发明所述的方法。

[0029] 乳酸克鲁维酵母属于具有GRAS Status (GRAS:generally regarded as safe/公认为安全)的“食品级”酵母。与数千年以来经过实践考验作为食品添加剂的面包酵母一样,奶制品行业中经常使用的乳酸克鲁维酵母也是适用于食品行业的无害酵母。

[0030] 除了“现有技术”所述的发酵方法之外,乳酸克鲁维酵母与酿酒酵母相比还有能表达异源基因的诸多优点。乳酸克鲁维酵母属于“petite negative/弱阴性”酵母,也就是说,线粒体DNA的损失是致命的(由于线粒体膜电位骤降(Chen et al.,1995;Clark-Walker,2007))。线粒体功能与随 Ca^{2+} 变化的信号传导、活性氧化合物的生产、细胞的应激应答、蛋白糖基化以及细胞壁完整性密切相关。因此线粒体功能对重组糖蛋白的生产和细胞壁的成分有决定性影响。

[0031] 就酵母和哺乳动物而言,内质网中发生的蛋白N-糖基化的前期步骤相同。但是在高尔基体中发生的步骤则相互不同。存在于高尔基体中的羧基转移酶在不同的酵母菌种中各不相同,因此导致细胞壁中的糖蛋白成分有所差异。在乳酸克鲁维酵母中,糖蛋白具有终端N-乙酰葡萄糖胺,与酿酒酵母的磷酸甘露糖相反(Raschke和Ballou,1972)。这可能会在接种疫苗时大大影响相应酵母菌种对免疫系统的刺激。

[0032] 蛋白糖基化/分泌和细胞壁生物合成期间的化合物表明改变了 $\alpha 1,6$ -甘露糖基转移酶(KIOCH1)的乳酸克鲁维酵母突变体中的重组蛋白的分泌作用有所改善(Uccelletti et al.,2004)。蛋白糖基化过程中的变化还会影响重组蛋白的细胞内定位,重组蛋白在分泌过程中会由于错误折叠而受到抑制。

[0033] 乳酸克鲁维酵母是可以使用乳糖作为碳源和能量源的少数酵母种类之一。乳糖是一种价格便宜的糖,可作为乳清的成分大量产生(例如奶制品业的副产品)。乳酸克鲁维酵母可以利用乳糖达到与利用葡萄糖类似的生长率。已对调控参与乳糖代谢的基因进行了大量研究。 β -半乳糖苷酶启动子(LAC4)可以用来调控异源基因表达和重组蛋白的生产(van Ooyen et al.,2006,Breunig et al.,2000)。由于减少了葡萄糖阻遏作用,在含葡萄糖的

培养基中培育的乳酸克鲁维酵母培养物中加入乳糖,就能快速高效地诱导基因的异源表达。

[0034] 按照本发明所述,通过基因技术方法生成乳酸克鲁维酵母菌株,适宜是 VAK367-D4和该菌株的变异体,该菌株允许将外源基因靶向整合在酵母基因组的LAC4位点上(附图1)。该整合仅需要通过相应构建的质粒执行一个步骤;可以在不使用抗生素抗性基因的情况下选择重组菌株,将乳糖加入到培养基之中,就可以通过LAC4启动子诱导重组菌株中的外源基因表达。可以通过该方法在几周内生成整合了外源基因的乳酸克鲁维酵母细胞并且描述其特性。该体系的两个方面很重要:一方面能够以可重现的方式培育含有定量外源蛋白的酵母细胞(附图2、3),另一方面当用于对可塑性(易改变的)抗原(例如流感抗原血凝素)进行疫苗接种时,可以在短时间内生成新的酵母菌株,例如当出现新的潜在流行流感病毒株的时候。新生成的重组乳酸克鲁维酵母菌株极有可能具有与试验菌株类似的特性(例如在发酵罐中的生长特性)。将反式激活因子 KIGaI4的基因整合到酵母基因组之中还可以显著提高外源基因的表达率(Kuger et al.,1990)。

[0035] 在另一种实施方式中,使用一种特殊的乳酸克鲁维酵母菌株VAK367-D4 及其后代执行本发明所述的方法。生成了一系列(VAK)基于乳酸克鲁维酵母菌株VAK367-D4构建的重组变异体。总之这些变异体能诱导表达大量外源蛋白,或者该外源蛋白的结构域,或者与异种蛋白结构域融合的该外源蛋白的结构域。所使用的异种蛋白结构域可用来靶向刺激免疫应答(佐剂),或者靶向分隔酵母细胞中表达的外源蛋白。除了佐剂效应之外,分隔所表达的外源蛋白对于优化表达或者表达产物的表达而言很重要。

[0036] 在另一种实施方式中,使用VAK367-D4及其后代作为亚单位标记疫苗来执行本发明所述的方法。使用仅仅表达规定蛋白抗原(外源蛋白)的重组乳酸克鲁维酵母作为疫苗,鉴别诊断过程中辨别接种疫苗的个体与自然感染的个体。这些重组乳酸克鲁维酵母菌株(参见实施例)的其中一种已被成功用于口服和皮下接种。皮下给药获得了对接种对象的完全保护作用。本发明所述的“外源蛋白”指的是能够在人或者动物体内针对某种病原体或者致癌变异细胞产生保护性免疫应答、尤其可产生保护性体液免疫应答的所有肽、多肽和蛋白。外源蛋白可以源自于已描述其抗原特性的任何病原体或肿瘤,所述抗原能够单独诱导保护性免疫应答,尤其能诱导保护性体液免疫应答。

[0037] 在一种优选的实施方式中,外源蛋白可以源自于已描述其抗原特性的病原体(病毒,细菌,寄生虫),所述抗原能够单独诱导保护性免疫应答,尤其能诱导保护性体液免疫应答。举例如下:

[0038] 源自于寄生虫的外源蛋白

[0039] 美洲钩虫;十二指肠钩虫:ASP蛋白,分解血红蛋白的蛋白酶

[0040] 利什曼原虫:gp63,46kD前鞭毛体抗原,LACK

[0041] 疟原虫:CSP蛋白,CSA-1,CSA-3,EXP1,SSP2,STARP,SALSA,MSP1, MSP2,MSP3,AMA-1,GLURP,Pfs25,Pfs 28,Pvs25,Pvs 28,Pfs 48/45,Pfs 230

[0042] 血吸虫:TP1,Sm23,ShGSTs 26和28,副肌球蛋白,寄生虫肌球蛋白,Sm14

[0043] 源自于细菌的外源蛋白

[0044] 结核分支杆菌:Ag85A,Hsp65,R8307,19kD,45kD,10.4

[0045] 幽门螺杆菌:VacA,LagA,NAP,hsp,脲酶,过氧化氢酶

- [0046] A群链球菌:M,SCPA肽酶,外毒素SPEA和SPEC,纤维连接蛋白结合蛋白
- [0047] 肺炎链球菌:PspA,PsaA,BHV 3,BHV4
- [0048] 鼠伤寒沙门氏菌:Vi抗原
- [0049] 志贺菌:LPS
- [0050] 霍乱弧菌:CTB
- [0051] 大肠杆菌ETEC:LT,LT-ST,CTB
- [0052] 鼠疫耶尔森菌:F1,V
- [0053] 源自肿瘤细胞/肿瘤的外源蛋白(肿瘤相关抗原,TAA)
- [0054] CEA
- [0055] 5T4
- [0056] MUC1
- [0057] MART1
- [0058] HER-2
- [0059] 尤其优先选用源自病毒的外源蛋白。
- [0060] 杯状病毒科(诺瓦克,HEV):NV 60kD;HEV ORF2
- [0061] 呼肠弧病毒科(轮状):VP7,VP4
- [0062] 逆转录病毒科(HIV):Gag,Pol,Nef,Env,gp160,gp120,gp140,gp41
- [0063] 黄病毒科(黄病毒属:WNV,Dengue,YF,TBE,JEV):preM-Env,NS3,NS4,NS5
- [0064] 黄病毒科(瘟病毒属BVDV,CSFV,BDV.丙型肝炎病毒属HCV):E1,E2,E^{RNS}(Pesti),C,NS3,NS4,NS5
- [0065] 嗜肝DNA病毒科(HBV):HBS抗原
- [0066] 副粘病毒科(副粘病毒亚科:PIV-1,PIV-2,腮腺炎病毒,仙台病毒,PIV-2,PIV-4,麻疹病毒):M,HN,N,F
- [0067] 副粘病毒科(肺炎病毒亚科:RSV):F,G,SH,M
- [0068] 弹状病毒科(狂犬病):G
- [0069] 疱疹病毒科(EBV,HSV2):gp350/220(EBV),gB2,gD2(HSV)
- [0070] 冠状病毒科(SARS):CoV,N,M,S
- [0071] 正粘病毒科(流感A,B):HA,NA,M1,M2,NP
- [0072] 乳头瘤病毒科:L2,E6,E7
- [0073] 在本发明最优先的实施方式中,外源蛋白源自双RNA病毒科家族的代表性病毒,例如IBDV病毒,并且能够诱导保护性免疫应答,尤其是保护性体液免疫应答。
- [0074] 在本发明的一种优先实施方式中,产生乳酸克鲁维酵母VAK367-D4变异体VP2(VAK887)作为外源蛋白表达形成衣壳的传染性法氏囊病病毒(IBDV菌株D78)的VP2抗原(SEQIDN0.:1和2)。尤其优先选用乳酸克鲁维酵母 VAK367-D4变异体VP2-T2S(VAK888),该变异体中氨基酸位置2上的VP2 蛋白已变异(苏氨酸替换成丝氨酸;Jagadish et al.(1991)),并且具有与SEQ ID NR.:3和4一致的核苷酸序列或氨基酸序列。
- [0075] 在本发明的一种特别优选的实施方式中,产生优化的乳酸克鲁维酵母 VAK367-D4变异体,VP2T2S_GAL4,该变异体中氨基酸位置2上的VP2蛋白已变异(SEQ ID NO.:3和4),并且还含有至少两个KIGAL4基因 (VAK890)。尤其优先选用乳酸克鲁维酵母VAK367-D4变异

体, oVP2-T2S, 在其中通过酵母密码子优化的SEQ ID NO.:5核苷酸序列对VP2突变抗原进行编码, 或者在其中重组表达的VP2突变抗原具有与SEQ ID NO.:6一致的氨基酸序列。优化的乳酸克鲁维酵母oVP2-T2S_GAL4变异体(VAK911)具有以下优点:

[0076] -还通过突变使得外源蛋白稳定。

[0077] -可以通过反式激活因子的过度表达, 以及/或者通过序列的密码子优化实现VP2表达的显著提高(附图2)。

[0078] -整合附加的KIGAL4基因也与这种乳酸克鲁维酵母变异体的生长率较高有关联。

[0079] -这种乳酸克鲁维酵母变异体在高细胞密度发酵以及所表达的VP2蛋白的数量方面有很高的可重现性(附图3)。

[0080] 已按照布达佩斯条约于2011年11月29日在德国微生物菌种保藏中心 DSMZ (地址: Inhoffenstrasse 7B, 38124Braunschweig, Deutschland) 寄存了按照本发明所述产生的乳酸克鲁维酵母VP2-T2S_GAL4变异体, 寄存编号DSM 25405, 该变异体作为外源蛋白重组表达IBDV的VP2突变抗原, 并且含有 KIGAL4反式激活因子基因的其它拷贝(VAK890)。已按照布达佩斯条约于 2011年11月29日在德国微生物菌种保藏中心DSMZ (地址: Inhoffenstrasse 7B, 38124Braunschweig, Deutschland) 寄存了按照本发明所述产生的乳酸克鲁维酵母 oVP2-T2S变异体, 寄存编号DSM 25406, 该变异体作为外源蛋白重组表达IBDV的突变和密码子优化的VP2抗原(VAK910)。

[0081] 已按照布达佩斯条约于2011年11月29日在德国微生物菌种保藏中心 DSMZ (地址: Inhoffenstrasse 7B, 38124Braunschweig, Deutschland) 寄存了按照本发明所述产生的乳酸克鲁维酵母oVP2-T2S变异体, 寄存编号DSM 25407, 该变异体作为外源蛋白重组表达IBDV的突变和密码子优化的VP2抗原, 并且含有KIGAL4反式激活因子基因的其它拷贝(VAK911)。

[0082] 另一种实施方式涉及将本发明所述的重组酵母用在一种产生保护性免疫尤其是保护性体液免疫的方法之中, 这种方法包括以下步骤:

[0083] a) 培育、繁殖本发明所述的重组酵母,

[0084] b) 收获、灭活酵母,

[0085] c) 按照一种待确定的免疫方案施用重组酵母,

[0086] d) 滴定测定所形成的抗体, 并且/或者

[0087] e) 证实免疫。

[0088] 可以用任何常规可用的方法培育、繁殖本发明所述的重组酵母, 尤其优先选用能以低廉成本实现较高细胞产率的方法, 包括发酵, 尤其是高细胞密度发酵法。已证明特别适宜使用补料分批发酵操作程序进行发酵。

[0089] 在一种优选的实施方式中, 以口服/粘膜或者皮下施用重组酵母的方式实现防护性体液免疫。在本发明的一种特别优选的实施方式中, 皮下施用重组酵母。在本发明所述的方法中, 尤其优先使用乳酸克鲁维酵母、特别是转基因变异体 VAK367-D4和由此得到的变异体VAK890及其变异体进行皮下施用。在本发明所述的方法中应使用灭活/杀死的重组酵母细胞。在培育并且表达外源基因之后将酵母干燥, 接着将其灭活。可以用任何常规可用的方法进行灭活。特别适合在本发明所述的方法中使用热灭活(例如在90℃温度下进行2小时热灭活)。对于口服/粘膜免疫, 例如可以使用较短的1/1/1免疫方案(1周饲喂, 1周休息, 1周饲喂, 以此类推), 或者使用较长的2/2/2方案(2周饲喂, 2周休息, 2周饲喂, 以此类推)。

对于皮下接种,例如可以每隔两周进行两次或三次注射(附图4和5)。

[0090] 可使用所有常规方法来证实免疫。在本发明的一种实施方式中,测试病毒中和抗体的滴定量来证实免疫。例如可以进行特异性ELISA测试或者中和试验。在中和试验中给一定数量的IBD病毒掺入免疫动物或者对照动物的定量血清。随后通过如此处理后的病毒在细胞培养物中检测是否抑制感染(中和)。也可以在“攻击”试验中,例如在“病毒攻击”试验中检查是否免疫成功。为此可对经过治疗的动物施用一定剂量的病原微生物或病毒,该剂量通常不会导致未免疫的动物得病。如果动物在攻击试验之后没有得病,则证实免疫成功(附图5)。最后也可以通过免疫组织化学证实免疫。在攻击之后检查病原体的靶器官是否感染或者病变(附图5)。

[0091] 根据本发明已证明可以将从VAK367-D4得到的重组乳酸克鲁维酵母变异体成功用于皮下注射接种。实施例中所描述的菌株变异体VAK890能表达传染性法氏囊病病毒(IBDV;菌株D78)的VP2抗原。IBDV的VP2涉及形成病毒衣壳的蛋白。已知引发对VP2抗原的体液免疫应答就足以保护感染生物,预防相关病毒(IBDV)引起继发感染。一方面可以通过量化病毒中和抗体来诱发有效的体液免疫应答,另一方面则在病毒攻击之后通过“病毒攻击试验”和免疫组织化学证实预防性免疫应答。按照本发明所述,可以将重组乳酸克鲁维酵母或者源自菌株VAK367-D4的重组克鲁维酵母确定为90~100%有效的皮下注射保护性疫苗(90~100%相当于疫苗接种的“黄金标准”)(附图4和5)。因此已将重组乳酸克鲁维酵母或者源自菌株VAK367-D4的重组乳酸克鲁维酵母确定为针对传染性病原体(例如病毒)的“亚单位”标记疫苗。这意味着使用病毒的单个免疫原性蛋白亚单位作为抗原。用作“亚单位”标记疫苗意味着可以将其用来区别免疫生物与未免疫的感染生物。例如使用一种不仅能检测免疫用抗原的对应抗体、而且也能检测传染性病原体的另一种抗原的对应抗体的差异诊断方法,就能进行区别。使用源自菌株VAK367-D4的重组克鲁维酵母菌株 VAK890(DSM 25405)进行免疫,可以针对相应的病毒抗原产生很高的抗体滴定量。可以证明这些抗体能中和病毒。凭经验已经可以通过该特性和所测定的高滴定量得出这种体液免疫应答足以保护生物,防止相关病毒引起的继发感染。可以针对IBDV提供最终证据。产生高滴定量的病毒中和抗体在鸡模型中与完全防止接种动物继发病毒感染有关联(附图5)。使用乳酸克鲁维酵母,尤其是转基因变异体VAK367-D4及其后代,例如乳酸克鲁维酵母VP2-T2S_GAL4 (VAK890),与传统方法相比具有以下主要优点:

[0092] 1. 与酿酒酵母相比,乳酸克鲁维酵母的主要基本优点已在经历数百万年与酿酒酵母分歧的乳酸克鲁维酵母生理学特性方面得到了证明,可用于表达外源基因。

[0093] 2. 并非通过质粒载体、而是将外源基因靶向稳定整合到乳酸克鲁维酵母基因组的确定基因位点之中以后表达外源基因。这样就能在非选择性条件下使得蛋白表达有很高的重现性。这方面很重要,可通过在发酵罐中培养酵母菌株,以能够重现的方式产生疫苗。对于菌株VAK367-D4及其后代的口服接种原理已有描述(WO 20101054649A2)。本发明现已证明,使用少量酵母进行皮下接种,菌株VAK367-D4及其后代、尤其是乳酸克鲁维酵母VP2-T2S_GAL4 (VAK890)和oVP2-T2S_GAL4 (VAK911)就能引起有效的病毒感染防护作用。

[0094] 3. 可以诱导基因表达,并且提高转录激活因子Gal4的浓度和/或者对外源基因的核苷酸序列进行密码子优化使之适合于酵母宿主,就能进一步提高基因表达。确定补料分批发酵操作程序,也能高效生产细胞毒性抗原。

[0095] 4.将外源蛋白整合到VAK367-D4及其后代之中是“一步法”。也就是大约 3周之内就能产生新的重组菌株并且描述其特性;这一点特别重要,可针对改变后的病毒变异体快速开发有效疫苗。

[0096] 5.通过皮下施用乳酸克鲁维酵母类型的重组酵母尤其是菌株VAK367-D4 的重组酵母及其后代,不仅能在小鼠体内、而且也能在鸡体内产生保护性免疫应答。可想而知过程很简单:将定量灭活(热杀死)酵母细胞分2~3次注射到接种对象的皮下。最后一次注射之后两周检查接种对象的血清检查是否存在抗原特异性抗体以及功能。可以通过病毒中和试验证实该免疫应答主要、但并非仅仅基于中和抗体的产生(保护性体液免疫应答)。因此可以通过乳酸克鲁维酵母在皮下应用中诱导的免疫应答基本上有别于可以通过酿酒酵母诱导的免疫应答,主要是T细胞应答。因此乳酸克鲁维酵母的皮下应用方法基本上不同于酿酒酵母的皮下应用方法:乳酸克鲁维酵母可以作为亚单位疫苗应用于能够产生保护性体液免疫应答的抗原(例如病毒抗原,如传染性法氏囊病病毒、IBDV 的VP2抗原或者流感病毒的抗原血凝素HA),而酿酒酵母则可以作为亚单位疫苗应用于能够产生保护性细胞免疫应答的抗原(例如丙型肝炎病毒的NS3蛋白,或者如Her-2之类的肿瘤抗原)。诱导免疫应答形式的这些差别估计应归因于上述酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母细胞极为不同的特性。

[0097] 总之本发明对现有技术作出了很大贡献,并且与现有技术相比能提供很多有益的实施方式:

[0098] • 发明人已成功制备了能够用来区别接种个体与自然感染个体的亚单位标记疫苗。

[0099] • 还可以制备同时具有佐剂特性并且因此有很强免疫原性的亚单位标记疫苗。

[0100] • 可以多次应用本发明所述的亚单位标记疫苗。

[0101] • 本发明所述的亚单位标记疫苗能在接种对象体内产生系统性保护性免疫应答和免疫记忆。

[0102] • 也可以利用本发明制备细胞毒性抗原的对应疫苗。

[0103] • 本发明所述的方法能够以尽可能快的速度产生新的疫苗变异体。

[0104] • 接种方法的成本非常低廉。

[0105] • 制备本发明所述的疫苗不需要试验动物,或者培养物中不需要使用动物细胞或人细胞。

[0106] • 本发明所述的疫苗对温度不敏感,无需冷却即可进行储运。

[0107] • 在本发明所述的方法中不使用活的重组细胞或者生物。

[0108] • 使用本发明所述的方法不仅能够将疫苗的用量、而且也能将实现保护性免疫所需的应用次数限制在最低水平。

实施例

[0109] 1.产生乳酸克鲁维酵母菌株VAK367-D4(*metA ura3-5lac4::ScURA3*)。

[0110] 用于异源表达外源蛋白的出发菌株VAK367具有以下特性:允许以高细胞密度进行培养,不会释放可检出的细胞内蛋白。就此而言,该菌株有别于很多近亲的乳酸克鲁维酵母菌株。通过菌株CBS 2359的两轮诱变(Centraalbureau voor Schimmelcultures <http://www.fungalbiodiversitycentre.com>)得到菌株 VAK367,该菌株是氨基酸蛋氨酸和核苷碱

基尿嘧啶营养缺陷型菌株。已利用基因工程方法从菌株VAK367得到菌株VAK367-D4(已于2009年11月18日寄存在Braunschweig德国微生物菌种保藏中心DSMZ, 寄存编号DSM 23097), 方法是借助质粒pD4-2将LAC4基因的序列+358~+1181替换成 ScURA3基因。菌株VAK367-D4现在允许将外源基因整合在LAC4位点上, 无需附加的标记, 方法是选择乳糖生长。利用一种合适的整合载体, 例如 Klp3-MCS(附图6), 通过同源重组适当替换阻断盒, 从而在失去ScURA3标记的情况下重建完整的LAC4基因。(附图1)

[0111] 2. 产生一种允许诱导表达外源基因的整合载体。

[0112] 载体:Klp3-MCS

[0113] 载体:Klp3-MCS (SEQ ID NO.:10)

[0114] 载体Klp3-MCS (SEQ ID NO.:10) (附图6) 涉及一种基于YRp7的大肠杆菌载体, 该载体在酵母中不会自主复制, 因为已删除了ARS1序列。

[0115] Klp3-MCS (SEQ ID NO.:10) 含有乳酸克鲁维酵母LAC4启动子以及能够通过同源重组整合在LAC4位点上的序列。

[0116] 已在LAC4启动子和转录起点之间插入了含有TEF1终止子和KIGAL80 启动子的DNA片段, 因此在通过同源重组重建之后, 可以在KIGAL80启动子的控制下表达LAC4阅读框。通过转录因子KIGal4与LAC4启动子共同调控KIGAL80启动子 (Zenke et al.1993)。这种设计能够通过测量LAC4编码的 β -半乳糖苷酶追踪诱导外源基因表达。Klp3-MCS (SEQ ID NO.:10) 允许通过多克隆位点 (MCS) 中的其中一个唯一位点在LAC4启动子和TEF1终止子之间插入外源基因(附图6)。进行整合时利用合适的限制酶消化所得到的质粒, 使得表达盒与大肠杆菌载体序列分开。在转化为乳酸克鲁维酵母 VAK367-D4之后, 对表达盒进行染色体整合; 所得到的菌株不含细菌序列。

[0117] 3. 表达传染性法氏囊病病毒 (IBDV变异体D78) 的VP2抗原的乳酸克鲁维酵母变异体。

[0118] 制备重组酵母菌株

[0119] 借助以下寡核苷酸从质粒pD78A (Icard et al., 2008) 扩增针对IBDV D78 VP2编码的cDNA:

[0120] IBDV_AscI_fwd (5'-GGCGCGCCGATGACAAACCTGCAAGATC-3') (SEQ ID NO.:7), 含有AscI限制酶切位点, 以及

[0121] VP2_NotI_rev

[0122] (5'-ATAAGAATGCGCCGCTCACACAGCTATCCTCCTTATG-3')

[0123] (SEQ ID NO.:8) 含有NotI限制酶切位点。

[0124] 将以下核苷酸对用于生成VP2-T2S:

[0125] IBDV_S:T_AscI_fwd

[0126] (S'-GGCGCGCCGATGTCTAACCTGCAAGATCAAACCCA-3')

[0127] (SEQ ID NO.:9), 和VP2_NotI_rev(s.o.)。

[0128] 在检查并且确认核苷酸序列之后, 通过AscI和NotI切位点将扩增的 DNA片段克隆到载体Klp3-MCS (SEQ ID NO.:10) 之中(附图6)。然后整合到基因组之中(附图1)。具体来说, 利用限制酶EcoRI消化整合质粒, 并且将消化的片段转化为感受态VAK367-D4细胞。将转化细胞平铺在YEPD培养基上, 在30℃温度下过夜培养。为了查出阳性菌落, 将含有乳糖作为

碳源的 SM培养基上的转化板加倍,并且在30℃温度下培养2天。继续研究该方法所鉴别的阳性克隆。

[0129] 按照常规方法执行附加KIGAL4基因拷贝的基因组整合(Kuger et al. (1990)。密码子优化遵循酿酒酵母算法(mr.gene.com,Raab et al.,2010)。直接合成密码子优化的DNA片段。合成时已经嵌入了5'AscI和3'NotI限制酶切位点(mr.gene.com,Regensburg, Deutschland)。接着克隆到载体Klp3-MCS(SEQ ID NO.:10)之中。

[0130] Western印迹分析。

[0131] 将细胞团块重现悬浮于B60缓冲液之中(50mM HEPES-KOH pH 7.3;60 mM醋酸钾;5mM醋酸镁;0.1%Triton X100;10%甘油;1mM氟化钠;20mM磷酸甘油;10mM MgCl₂;1mM DTT;蛋白酶完全抑制剂(Roche)),然后利用玻璃微珠用力搅拌使其分解。离心分离提取物(14000转/分钟,20分钟,温度4℃),然后测定蛋白浓度。利用SDS-PAGE在12%凝胶中分离40 μg蛋白提取物。然后将蛋白转移到膜片上。使用α-IBDV兔抗血清(1:15,000; Granzow et al.,1997)和羊抗兔HRP偶联抗体(1:3000,Santa Cruz Biotechnology, Inc.),利用常规方法进行Western印迹分析。

[0132] Northern印迹分析。

[0133] 为了完全提取RNA,将5ml酵母培养物放在冰上冷却。在Prot K缓冲液(100mM Tris/HCl pH7.9,150mM NaCl,25mM EDTA,1%SDS)和50mg 蛋白酶K(Fermentas)中利用玻璃微珠强力晃动进行细胞裂解。将样品在35℃温度下培养1小时,然后萃取RNA,使用乙醇沉淀,并且重新悬浮于DEPC水中。与Engler-Blum等人1993年描述的一样进行了Northern分析,但是有一些偏差。在1%甲醛-琼脂凝胶上分离全部RNA中的5μg,并且将其转移到尼龙膜上(Amersham HybondTM-N+,GE Healthcare)。使用DIG标记的RNA 探针在68℃温度下培养膜,在有DIG-NTPs(Roche)存在的情况下通过体外转录PCR片段制备该探针。使用封闭液处理印迹,然后使用抗DIG碱性磷酸酶标记抗体(Roche)进行培养。利用常规方法测定碱性磷酸酶的活性。

[0134] 异源表达VP2的定量化。

[0135] 使用Saugar等人2005所述改进的操作程序.einer Hefekultur,die mit einem episomalen VP2Plasmid(pADH1-P_VP2-T2S)在选择性培养基(0.67% YNB,2%葡萄糖和以下添加剂:11mg/l Ade;14mg/l Tyr;各38mg/l His,Trp, Arg, Met;48mg/l Phe;各58mg/l Leu, Ile, Lys, Val, Thr)对已使用附加型 VP2质粒转化的20000DE酵母培养物进行培养。在收获并且用蒸馏水洗涤之后,在裂解缓冲液(10mM Tris(pH 8.0),150mM NaCl,20mM CaCl₂,1mM EDTA,蛋白酶完全抑制剂(Roche),pH 8.0)利用玻璃微珠将细胞分解。离心分离所得到的蛋白提取物(以10,000g离心力在4℃温度下分离1小时),使可溶部分在蔗糖缓冲液中形成20%(w/v)蔗糖垫(10mM Tris pH 8.0,150mM NaCl,20mM CaCl₂;含有蛋白酶完全抑制剂(Roche))。以170,000g离心力在4℃温度下离心分离3小时之后,将团块溶解于200μl蔗糖缓冲液之中,然后以114,000g离心力在蔗糖缓冲液中以20~53%蔗糖梯度继续离心分离17 小时。该梯度被收集在700μl部分中,然后利用SDS-PAGE和Western印迹对其进行分析。以这种方式可以浓缩、提纯异源表达VP2的寡聚蛋白复合物。可以检出蛋白,并且可以利用SDS PAGE和考马斯染色对照标准蛋白测定蛋白含量(未显示)。然后将纯化的VP2作为标准用在含有抗VP2抗体的对比 Western印迹之中。比较不同发酵中一定数量酵母细胞的VP2

含量(附图3)。

[0136] 酵母发酵和热灭活。

[0137] 在配有四个整备2升发酵罐的DasGip平行生物反应器系统(DasGip AG, Jülien, Deutschland)中进行所有试验发酵。通过Organobalance GmbH公司(德国柏林)或者在自备实验室10升工作容量的Biostat ED生物反应器(B.Braun Biotech, Melsungen, Deutschland)中进行生产规模的发酵。以补料分批法执行所有生产流程。使用含有2%酵母提取物和1%蛋白胨的复合培养基和20%乳糖补料液。将酵母培养物的温度保持在30℃,并且将 pO_2 控制在30%饱和度。在发酵期间加入2M NaOH或者2M H_3PO_4 将pH值保持在5.0。

[0138] 冷冻干燥酵母,然后在90℃温度下进行2小时热灭活,以备在小鼠和鸡体内进行试验。在使用该方法之后,每克细胞干重少于10个活细胞。

[0139] 4. 小鼠皮下注射

[0140] 为了给小鼠皮下注射表达传染性沙氏囊病病毒(IBDV变异体D78)的VP2抗原的乳酸克鲁维酵母变异体(VAK890),将用于第一次注射的干粉酵母与完全福氏佐剂(CFA)混合;在其它注射中将酵母与不完全福氏佐剂(IFA)混合(每200 μ l CFA或者IFA 100 μ g酵母材料)。每个个体每次免疫/加强注射 200 μ l乳化液(含有100 μ g酵母)。因此每次皮下免疫给老鼠个体施用的VP2 用量大约相当于18ng(附图3)。初次注射(0天)之后,每隔两周“加强”两次(第14天和第28天;附图4)。再经过两周之后,麻醉杀死动物获取血清。

[0141] 5. 鸡皮下注射

[0142] 将表达传染性沙氏囊病病毒(IBDV变异体D78)的VP2抗原的5mg干粉乳酸克鲁维酵母变异体(VAK890)溶解于750 μ l磷酸盐缓冲液/生理盐水(PBS)以及500 μ l灭菌蒸馏水之中,制备含有1.25ml IFA的乳化液,用于给鸡进行皮下注射。在第0天、第14天以及第28天注射500 μ l该乳化液(含有1mg酵母)(附图5)。因此给鸡个体每次免疫施用的VP2用量大约相当于 180ng(附图3、4)。

[0143] 6. 病毒“攻击”

[0144] 接种之后(附图5)在第42天以口服方式使接种的鸡感染IBDV菌株“Edgar”的100EID₅₀,经过六天之后测定死亡率。随后麻醉杀死动物获取血清,从动物中取出法氏囊,首先将其在10%中性缓冲福尔马林中固定24小时,接着将其埋入石蜡之中。

[0145] 7. 酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0146] 通过市面上可以买到的ELISA试剂盒IDEXX FlockChek®IBD ELISA kit (IDEXX Laboratories, Inc.)测定接着对象的血清中的IBDV特异性抗体滴定量。若为接种小鼠的血清,则使用与制造商不同的第二抗体(Sigma Aldrich)。

[0147] 8. 中和试验。

[0148] 根据Schröder等人2000年所述的操作程序进行中和试验,测定病毒中和抗体的浓度。

[0149] 9. 免疫组织化学。

[0150] 从埋入石蜡中的法氏囊制备4微米厚的器官切片。去除石蜡之后,按照标准程序使用苏木精和伊红将其着色。在显微镜下研究样品,以1~4评分等级确定“病变记分”(1=正常至10%卵泡萎缩;2=10~30%卵泡萎缩;3=30~70%卵泡萎缩;4=>70%萎缩)。

[0151] 结果

[0152] 制备、优化表达IBDV VP2的乳酸克鲁维酵母菌株

[0153] 制备整合了IBDV VP2基因的不同乳酸克鲁维酵母变异体。使用优化的变异体进行接种试验,该变异体中氨基酸位置2上的VP2蛋白已变异(苏氨酸替换成丝氨酸;Jagadish et al. (1991)),并且还包括串联整合了至少两个KIGAL4 基因(变异体VP2-T2S_GAL4;菌株VAK890)。还通过突变使得外源蛋白稳定;通过过度表达反式激活因子可以显著提高VP2表达(附图2)。整合附加的KIGAL4基因也与这种乳酸克鲁维酵母变异体的生长率较高有关联。对相关表达VP2的乳酸克鲁维酵母菌株VAK890的生长条件进行了优化,使得酵母能够以高密度和可重现的表达VP2的量进行发酵。完成制备之后冷冻干燥酵母,并且在90℃温度下灭活2小时。已经证实了灭活:每克灭活酵母材料少于10个存活酵母细胞。测定了每个酵母细胞的VP2含量:菌株VAK890每个酵母的异源VP2蛋白含量约为0.7fg(附图3)。

[0154] 小鼠和鸡皮下注射

[0155] 如上所述进行免疫;最后一次注射之后两周检查经过治疗的接种对象的血清中是否存在中和抗体。为此使用了IBDV特异性ELISA,并且进行了IBDV 中和试验(附图4和5)。还利用接种后的鸡进行了“病毒攻击”试验。给动物的病毒剂量为每个动物100EID50强毒性IBDV菌株“Edgar”,这一浓度会导致未接种的家禽患上明显的法氏囊病,死亡率约为10~35%(附图5)。在“病毒攻击”试验之后,通过免疫组织化学检查接种对象的法氏囊有无感染症状和病变,并且通过“病变评分”(附图5)描述其特性。

[0156] 无论是用小鼠进行的试验,还是用鸡进行的试验,均证明可以通过皮下注射乳酸克鲁维酵母菌株VAK890在所有经过治疗的动物中产生很高的病毒中和抗体滴定量(附图4B、4C;附图5B、5C)。同样能够证明可保护所有接种的鸡免遭病毒攻击,并且实际上在其法氏囊中没有任何病毒感染症状(附图5)。所有皮下接种了乳酸克鲁维酵母菌株VAK890的动物均表现出对VP2有显著的体液免疫应答。在一次加强接种之后就能观察到该免疫应答,据此推断:使用不完全福氏佐剂进行两次注射(免疫和一次加强),就足以形成保护。使用乳酸克鲁维酵母菌株VAK890接种的所有鸡均得到了保护,没有继发病病毒感染(附图5)。

[0157] 缩写

[0158] ARS1 自主复制序列;引起复制的DNA上的核苷酸序列

[0159] Asc I 限制性核酸内切酶Asc I

[0160] CFA 完全福氏佐剂

[0161] DNA 脱氧核糖核酸

[0162] DEPC 焦碳酸二乙酯

[0163] OIG-NTP 地高辛-核苷三磷酸

[0164] DSMZ 德国微生物菌种保藏中心

[0165] DTT 二硫苏糖醇

[0166] E.coli 大肠杆菌

[0167] EcoRI 限制性核酸内切酶EcoR I

[0168] EDTA 乙二胺四醋酸

[0169] EID50 鸡蛋或鸡胚感染剂量-使50%感染鸡蛋引起感染所需的传染性病毒数量

[0170] ELISA 酶联免疫吸附测定

[0171] GAL4 酵母特异性转录激活因子

- [0172] GRAS 公认为安全
- [0173] HEPES 2-(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基)-乙烷磺酸
- [0174] Hpa I 限制性核酸内切酶Hpa I
- [0175] HRP 辣根过氧化物酶
- [0176] IBDV 传染性法氏囊病病毒
- [0177] IFA 不完全福氏佐剂
- [0178] K.lactis 乳酸克鲁维酵母
- [0179] KIGAL4 对KIGal4/Lac9蛋白编码的乳酸克鲁维酵母基因
- [0180] KIGAL80 对KIGal80蛋白编码的乳酸克鲁维酵母基因
- [0181] LAC4 对 β -半乳糖苷酶编码的乳酸克鲁维酵母基因
- [0182] Not I 限制性核酸内切酶Not I
- [0183] ODE 光密度单位
- [0184] PBS 磷酸盐缓冲液/生理盐水
- [0185] PCR 聚合酶链反应
- [0186] RNA 核糖核酸
- [0187] S.cerevisiae 酿酒酵母
- [0188] Sal I 限制性核酸内切酶Sal I
- [0189] SDS 十二烷基硫酸钠
- [0190] SDS-PAGE 使用SDS条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳
- [0191] TEF1 Arxula adenivorans基因
- [0192] 对转录因子 EF-1 α 进行编码
- [0193] VP2 形成衣壳的I6DV病毒蛋白
- [0194] VP2-T2S 氨基酸位置2上的苏氨酸替换成丝氨酸的VP2
- [0195] VAK 疫苗株
- [0196] YEPD 酵母提取物蛋白胨葡萄糖
- [0197] YRp7 酿酒酵母-大肠杆菌穿梭载体,基因数据库登录号U03501 (Botstein et al.,1979)
- [0198] 参考文献清单
- [0199] Backhaus,K.et al.Milk and sugar:Regulation of cell wall synthesis in the milk yeast Kluyveromyces lactis.European Journal of Cell Biology 90,745-750 (2011) .
- [0200] Bathurst,I.C.Protein Expression in Yeast as an Approach to Production of Recombinant Malaria Antigens.The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50,20-26 (1994) .
- [0201] Botstein D,Falco,S.C.,Stewart,S.E.,Brennan,M.,Scherer,S.,Stinchcomb,D.T., Struhl,K.&Davis,R.W.Sterile host yeast (SHY):a eukaryotic System of biological Containment for recombinant DNA experiments.Gene 8,17-24 (1979) .
- [0202] Breunig et al.Regulation of primary carbon metabolism in Kluyveromyces lactis.Enzyme Microbial Technology 26,771-780 (2000) .

- [0203] Chen,X.J.&Clark-Walker,G.D.Specific mutations in alpha-and gamma-subunits of F1-ATPase affect mitochondrial genome integrity in the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*.EMBO Journal 14,3277-3286(1995) .
- [0204] Clark-Walker,G.D.The F1-ATPase inhibitor Inhl (IF1)affects suppression of mtDNA loss-lethality in *Kluyveromyces lactis*.FEMS Yeast Research 7,665-674 (2007) .
- [0205] Donnini,C.et al.Improved Production of Heterologous Proteins by a Glucose Repression-Defective Mutant of *Kluyveromyces lactis*.Applied and Environmental Microbiology 70,2632-2638(2004) .
- [0206] Engler-Blum,G.,Meier,M.,Frank,J.&Muller,G.A.Reduction of background Problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations.Analytical Biochemistry 210,235-244 (1993) .
- [0207] Gellissen G.&Hollenberg C.P.Application of yeasts in gene expression studies:a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*,*Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*-a review.Gene 190,87-97(1997) .
- [0208] Granzow,H.et al.A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4.Journal of Virology 71,8879-8885(1997) .
- [0209] Jagadish,M.N.,Laughton,D.L.,Azad,A.A.&Macreadie,I.G.Stable synthesis of viral protein 2 of infectious bursal disease virus in *Saccharomyces cerevisiae*.Gene 108,275-279(1991) .
- [0210] Icard,A.H.,Seilers,H.S.,&Mundt,E.Detection of infectious bursal disease virus isolates with unknown antigenic properties by reverse genetics.Avian Disease 52, 590-598.(2008)
- [0211] Kuger,P.,**Gödecke**,A.&Breunig,K.D.A mutation in the Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9results in glucose repression of its target genes.Nucleic Acids Research 18,745-751(1990) .
- [0212] Lu,Y.et al.Mutation-Selective Tumor Remission with Ras-Targeted,Whole Yeast-Based Immunotherapy.Cancer Research 64,5084-5088(2004) .
- [0213] Raab,D.,Graf,M.,Notka,F.,**Schödl**,T.&Wagner,R.The GeneOptimizer Algorithm:using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization.Systems and Synthetic Biology 4, 215-225(2010) .
- [0214] Raschke,W.C.&Ballou,C.E.Characterization of a yeast mannan containing N-acetyl-D-glucosamine as an immunochemical determinant.Biochemistry 11,3807-3816(1972) .
- [0215] Saugar,I.et al.Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus:An Amphipathic[alpha]Helix as a Molecular Switch.Structure 13,1007-1017(2005) .

- [0216] **Schröder**, A., van Loon, A.A.W.M., Goovaerts, D. & Mundt, E. Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. *Journal of General Virology* 81, 533–540 (2000).
- [0217] Stubbs, A.C. et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nature Medicine* 7, 625–629 (2001).
- [0218] Stubbs, A.C. & Wilson, C.C. Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses. *Current Opinion of Molecular Therapy* 4, 35–40 (2002).
- [0219] Uccelletti, D., Farina, F., Mancini, P. & Palleschi, C. KIPMR1 inactivation and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Biotechnology* 109, 93–101 (2004).
- [0220] Van Ooyen, A.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M., Jacobs, D.I., Colussi, P.A. & Taron, C.H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 6, 381–392 (2006).
- [0221] Wansley E.K. et al. Vaccination with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses. *Clinical Cancer Research* 14, 4316–4325 (2008).
- [0222] Zenke, F.T., Zachariae, W., Lunkes, A., & Breunig, K.D. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Molecular and Cellular Biology* 13, 7566–7576 (1993).

序列表

<110> 哈雷-维滕贝格马丁-路德大学
 <120> 利用针对确定抗原产生保护性体液免疫应答的重组酵母进行的接种
 <130> MLU_Breu_1
 <160> 10
 <170> BiSSAP 1.0
 <210> 1
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> Birnaviridae
 <220>
 <221> source
 <222> 1..1371
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Birnaviridae"
 <400> 1
 atgacaaacc tgcaagatca aacccaacag attgttccgt tcatacggag ctttctgatg 60
 ccaacaaccg gaccggcgtc cattccggac gacacctgg agaagcacac tctcaggta 120
 gagacctga cctacaattt gactgtgggg gacacagggt cagggtaat tgtctttttc 180
 cctggattcc ctggctcaat tgtgggtgct cactacacac tgcagggcaa tgggaactac 240
 aagttcgatc agatgtcctt gactgcccag aacctaccgg ccagttacaa ctactgcagg 300
 [0001] ctagtgagtc ggagtcctac agtgaggta agcacacttc ctggtggcgt ttatgcacta 360
 aacggcacca taaacgccgt gaccttccaa ggaagcctga gtgaactgac agatgttagc 420
 tacaatgggt tgatgtctgc aacagccaac atcaacgaca aaattgggaa cgtcctagta 480
 ggggaagggtg tcaccgtcct cagcttacc acatcatatg atcttgggta tgtgaggtt 540
 ggtgacccca ttcccgcaat agggcttgac ccaaaaatgg tagccacatg tgacagcagt 600
 gacaggccca gactctacac cataactgca gccgatgatt accaattctc atcacagtac 660
 caaccagggtg gggttaacaat cactactgtt tcagccaaca ttgatgccat cacaagcctc 720
 agcgttgggg gagagctcgt gtttcaaaca agcgtccacg gccttgtact gggcgccacc 780
 atctacctca taggctttga tgggacaacg gtaatcacca gggctgtggc cgcaacaat 840
 gggctgacga cgggcaccga caaccttatg ccattcaatc ttgtgattcc aacaacagag 900
 ataaccagc caatcacatc catcaaatg gagatagtga cctccaaaag tgggtggtcag 960
 gcaggggatc agatgtcatg gtcggcaaga gggagcctag cagtgcgat ccatggtggc 1020
 aactatccag gggccctccg tccgctcacg ctagtggcct acgaaagagt ggcaacagga 1080
 tccgtcgta cggtcgttg ggtgagcaac ttcgagctga tcccaaatcc tgaactagca 1140
 aagaacctgg ttacagaata cggccgattt gaccaggag ccatgaacta cacaatttg 1200
 atactgagtg agagggaccg tcttggcatc aagaccgtct ggccaacaag ggagtacact 1260
 gactttcgtg aatacttcat ggaggtggcc gacctcaact ctcccctgaa gattgcagga 1320
 gcattcggct tcaaagacat aatccgggcc ataaggagga tagctgtgtg a 1371
 <210> 2
 <211> 456

<212> PRT
 <213> Birnaviridae
 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..456
 <223> /mol_type="protein"
 /organism="Birnaviridae"

<400> 2
 Met Thr Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30
 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45
 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60
 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80
 Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95
 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110
 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190
 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205
 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270
 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445
 Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val
 450 455

<210> 3
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> Birnaviridae

<220>
 <221> source
 <222> 1..1371

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Birnaviridae"

<400> 3
atgtctaacc tgcaagatca aacccaacag attgttccgt tcatacggag ctttctgatg 60
ccaacaaccg gaccggcgtc cattccggac gacaccctgg agaagcacac tctcaggta 120
gagacctga cctacaattt gactgtgggg gacacagggt cagggctaata tgtctttttc 180
cctggattcc ctggctcaat tgtgggtgct cactacacac tgcagggcaa tgggaactac 240
aagtctgatc agatgtctct gactgcccag aacctaccgg ccagttacaa ctactgcagg 300
ctagttagtc ggagtctcac agtgaggta agcacacttc ctggtggcgt ttatgcacta 360
aacggcacca taaacgccgt gaccttccaa ggaagcctga gtgaactgac agatgttagc 420
tacaatgggt tgatgtctgc aacagccaac atcaacgaca aaattgggaa cgtcctagta 480
ggggaagggg tcaccgtcct cagcttacct acatcatatg atcttgggta tgtgaggctt 540
ggtgacccca ttcccgaat agggcttgac caaaaatgg tagccacatg tgacagcagt 600
gacaggccca gactctacac cataactgca gccgatgatt accaattctc atcacagtac 660
caaccagggt gggttaacaat cacactgttc tcagccaaca ttgatgcat cacaagcctc 720
agcgttgggg gagagctcgt gtttcaaaca agcgtccacg gccttgtact gggcgccacc 780
atctacctca taggctttga tgggacaacg gtaatcacca gggctgtggc cgcaaacaaat 840
gggtgacga cgggcaccga caaccttatg ccattcaatc ttgtgattcc aacaaacgag 900
ataaccagc caatcacatc catcaactg gagatagtga cctccaaaag tgggtggtcag 960
gcaggggatc agatgtcatg gtcggcaaga gggagcctag cagtgcagat ccatggtggc 1020
[0003] aactatccag gggccctcgc tcccgtaacg ctagtggcct acgaaagagt ggcaacagga 1080
tccgtcgta cggtcgctgg ggtgagcaac ttcgagctga tcccaaatcc tgaactagca 1140
aagaacctgg ttacagaata cggccgattt gaccaggag ccatgaacta caaaaattg 1200
atactgagt agagggaccg tcttggcatc aagaccgtct ggccaacaag ggagtacact 1260
gactttcgtg aatacttcat ggaggtggcc gacctcaact ctcccctgaa gattgcagga 1320
gcattcggct tcaaagacat aatccgggcc ataaggagga tagctgtgtg a 1371

<210> 4
<211> 456
<212> PRT
<213> Birnaviridae

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..456
<223> /mol_type="protein"
/organism="Birnaviridae"

<400> 4
Met Ser Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
1 5 10 15
Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
20 25 30
Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
35 40 45
Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50 55 60
Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
65 70 75 80
Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
85 90 95
Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190
 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
 195 200 205
 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
 210 215 220
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val His Gly Leu Val
 245 250 255
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
 260 265 270
 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
 275 280 285
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
 290 295 300
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445
 Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val
 450 455

[0004]

<210> 5
 <211> 1371
 <212> DNA
 <213> Birnaviridae

<220>
 <221> source
 <222> 1..1371
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Birnaviridae"

<400> 5
 atgtccaact tacaagacca aacccaacaa atcgctccctt ttatcagatc cttattaatg 60
 cctactaccg gtcctgcttc tattcctgat gacaccttgg aaaaacacac cttgagatcc 120
 gaaacttcaa cctataactt gactgtcggg gacactgggt ctggtttaat cgttttcttc 180
 cctgggttttc ctggttcaat tgtcgggtgcc cactatacct tacaaggtaa cggtaactat 240
 aagttcgatc aaatgttggt gaccgccc aaattgcctg cctcctataa ctattgtaga 300
 ttggtttcta gatctttaac cgtcagatca tccactttgc ctggtggtgt ctatgctttg 360
 aacggtacaa tcaacgctgt cacatttcaa ggttccttgt ccgaattgac cgatgtctcc 420
 tataacgggt taatgtccgc tactgccaat atcaatgaca aaattggtaa cgtcttagtc 480
 ggtgaagggt ttactgtttt gagtttgcca acctcttatg acttgggtta tgtcagattg 540
 ggtgacccta ttcctgctat cggtttagac caaaaatgg ttgccacttg tgactctagt 600

```

gatagaccaa gagtctatac catcactgct gccgatgact atcaattctc ctcccaatat    660
caacctggtg gtgtcactat caccttggtc tctgccaca tgcacgctat aacatctttg    720
tccgtcggtg gtgaattggt attccaaacc tccgtccatg gtttagtatt gggtgccacc    780
atctatttga ttggtttcga cggtaacaacc gtcattacta gagccgttgc tgccaacaat    840
ggtttaacca ctggtactga caacttgatg ccattcaact tggtaatccc taccaacgaa    900
atcacacaac caatcacatc catcaaattg gaaattgtca cctccaaatc cggtggtcaa    960
gccggtgacc aaatgtcatg gagtgctaga ggttcattag ccgtaacccat ccacggtggt   1020
aactatctcg gtgccttgag acctgtcact ttagtcgcct atgaaagagt tgctactggt   1080
tccgtcggtt ctgttgccgg tgtttcaaac ttcgaaatga tcccaaaccg agaattggcc   1140
aaaaacttgg ttaccgaata tggtagattc gaccctggtg ctatgaacta taaaaattg    1200
atcttatccg aaagagacag attgggtatc aaaactgtct ggcctactag agaataatcc   1260
gactttagag aatatttcat ggaagtcgcc gacttaaatt ccccatgaa aatcgccggt    1320
gcctttggtt ttaaggacat cattagagcc attagaagaa tagccgtctg a            1371

```

```

<210> 6
<211> 456
<212> PRT
<213> Birnaviridae

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..456
<223> /mol_type="protein"
      /organism="Birnaviridae"

```

```

[0005] <400> 6
Met Ser Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
1      5      10      15
Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
20     25     30
Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
35     40     45
Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
50     55     60
Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
65     70     75
Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
85     90     95
Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
100    105    110
Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
115    120    125
Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
130    135    140
Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
145    150    155
Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
160    165    170
Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
175    180    185
Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
190    195    200
Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
205    210    215
Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
220    225    230
Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val His Gly Leu Val
235    240    245
Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
250    255    260
Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
265    270    275
Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
280    285    290
295    300

```


Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
 305 310 315 320
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr
 325 330 335
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val
 340 345 350
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val
 355 360 365
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val
 370 375 380
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu
 385 390 395 400
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr
 405 410 415
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu
 420 425 430
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile
 435 440 445
 Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val
 450 455

<210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> synthetic construct

<220>
 <221> source
 <222> 1..28
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Oligonucleotide for PCR amplification"
 /organism="synthetic construct"

<400> 7
 ggcgcgccga tgacaaacct gcaagatc

28

[0006]

<210> 8
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> synthetic construct

<220>
 <221> source
 <222> 1..38
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Oligonucleotid für PCR Amplifikation"
 /organism="synthetic construct"

<400> 8
 ataagaatgc ggccgctcac acagctatcc tccttatg

38

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> synthetic construct

<220>
 <221> source
 <222> 1..35
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Oligonucleotid für die PCR-Amplifikation"
 /organism="synthetic construct"

<400> 9
 ggcgcgccga tgtctaacct gcaagatcaa accca

35

<210> 10
 <211> 8157
 <212> DNA
 <213> synthetic construct

<220>
 <221> source
 <222> 1..8157

```

<223> /mol_type="DNA"
        /note="plasmid vector"
        /organism="synthetic construct"

<400> 10
agggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatitt tctaaataca      60
ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa      120
aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt      180
ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca      240
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag      300
ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc      360
ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca      420
gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt      480
aagagaatta tgcagtgtcg ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct      540
gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt      600
aactgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga      660
caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact      720
tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc      780
acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttatigtg gataaatctg gagccggtga      840
gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt      900
agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtgta      960
[0007] gataggtgcc tactgatta agcatttgta actgtcagac caagtttact catatatact      1020
ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga      1080
taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctc cactgagcgt cagaccccggt      1140
agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca      1200
aacaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct      1260
ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtac ttctagtgtgta      1320
gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct      1380
aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc      1440
aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca      1500
gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga      1560
aagcgccacg cttcccgaag ggagaaagcg ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg      1620
aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtctctgt      1680
cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag      1740
cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt gctggccttt      1800
tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt      1860
tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat cagtgagcga      1920
ggaagcgga gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta      1980
atgcagctgg cacgacaggt ttcccgaact gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa      2040
tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac ttatgtctcc cggctcgtat      2100
gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta      2160

```

	cgccaagcgc gcaattaacc ctactataag ggaacaaaag ctgggtaccg ggcccgcgac	2220
	ctaaccattc aaatgattca taactatctc ctagccagaa ttcgtaccca actcttggga	2280
	aatcaggagg ctgatattcg ccagtaagct tcatagaagt gttcaagttt attttgttag	2340
	caaagatcgt gtacttctga acagtctcaa acccatagta aaatacaact ggggatatac	2400
	gagagttaac cgtgactaca gctagagaac cattagaacc tttttcgaca ctactccat	2460
	ggatgttttg cttcattaaa tcaatattgt acttcttcca gttcttaaag tccttaggtt	2520
	catcattatt cgttggaggc ctccagaaaag tgattgaaga accctcaaac ttgctggaaa	2580
	tttccttacc cttgaccttt aggccttcaa ttttacccaa caatttgtcc aagataaaat	2640
	gcaatccact ggattcaact gagacataac gtttaccgtc gttgatcttc gcagcttttt	2700
	ctgctgtctc tgtaacaaaa tcgggtacct tcaatggaag ttcagcttgg cccaggcaa	2760
	tttcatgacc tgcctttaga acaccagcat catctttcaa cacggcaaca acataagttg	2820
	tatcagaagg aatagtaaca gattcttctg gctttaaaga tggaacgtcg attgtcttc	2880
	ccgtgtcctt gtcgataaac aataagtggt ctgtcgtaat gaagtcgtgc ttatttgtga	2940
	ttgttacaga tccgtgcgca attttaatat gaacgggttc aataaccttc ttatactcta	3000
	caaggcccg agtaggatta tgctcactgt tacacaaacc atccatgatg aacactccgt	3060
	catgaacctc ttccttaaag tcaccacat aagcataagc tttatgcaac ttaccatctg	3120
	cagtactaac atcttcgaat tcaataccgt gatttgccca tcccagata aagccacctt	3180
	ggtaaaactt ctctttaga aacaactctt gatattcttt caaagagcca ggaccgttac	3240
	ccattgcatg gccgtactca cacaagatca aagccttttc aaacttacca ttttcatcag	3300
[0008]	tggtgttctt cctccacctt tcataattt caaatgttgg gtacatgaaa ctaaagatat	3360
	ctgcactcaa agcgttcaag tcacctcat aatgcacaag tctggtagga tccaattgtt	3420
	taattaactt gtacatggct ttgtgtttc tgccataaca agcttcgtta cccaaggacc	3480
	agataataat cgaaggatga ttgacatctc ttaggacaag ttgggaagct ctgtctaagt	3540
	acgcgacctc gtactctgga ttatctgata agtaatggc attaacatcg tagagtttat	3600
	ttttagtatc tggatattca gcctccaagt tcgtatgacg attaaatggc tcttgaacac	3660
	catgagtttc aagatctgcc tcgtcaatga cccagaagcc cagcttatcg aagaggtcat	3720
	acaccttagg atggtttgga taatgcgagt tacgaacagc attgatgtta aacttcttca	3780
	ttagaatcaa gtccctaaca acaaatcta atggcacagc tctaccgaac cttaggatgt	3840
	gatcatgtct gttgacacct ctaaagagaa tgtctttgcc attaacagta atgttaccgt	3900
	ccttcaactc cacttgtctg aaaccaacat ggtgttaat agattgaatc acactgccat	3960
	cagatccaat taaatccaac tggctactgt acaaagtagg attttctgcg gtccaatgtt	4020
	ctggggcctt gacgttgatc ttgaaagctg tttcttcgtt ctttttggtg gagaaggaaa	4080
	taaattcttt agttgaaaaa gtcgtgttcc cattctctc gttcaacaaa gagcttgcac	4140
	cgtaaacttt agatccatct tcaggttcgt aaagtgtgaa attgatgtga tcataagaag	4200
	aaccttgac atcaacttcc acagaaagct ctgcacctg atactgagag tccacaaaag	4260
	ttgtagtac cctaactctt tcaatatggg ccttcttagg caattttagt aaagaaacgt	4320
	ctctgtaaat accagagagc caccattgat cttggctctc gatataagtg gaatcggacc	4380
	acttgaanaac cttgacgacc actaagtttt cgccctcaga aacgtacttt tggatatcaa	4440
	attcagcccc gttacgggac cccttattga aaccacata ttgaccatta acataaagct	4500

	cgtaacaatt gtccacaccc tcaaatctca atctgtgctc gaacgactca atcgatttcg	4560
	aatctaattc aaaagttcta gcataaacac cagtaggatt tacagtggga ggatttggga	4620
	tgtcgattgg gatagggtac tgtacgttcg tgtaaattgg tttaccgtac ttccagtctt	4680
	cctgaagttc ccaatgggat ggcacagaaa tgggtctcca tttctttgcc gtttccagtt	4740
	ctaaattctt agcatccgga gcgtcaagag gtgcatcaaa caacgcaaaa gcccaggcc	4800
	cattgagaga ttcgaaaata tcctgatcat agtagtaagc cctagtaggc aatctatttt	4860
	cgtaaacctt tttggggttc cttaaattct caggaataag gcaagccatg gtgccgtcct	4920
	gccgagatat tgtgtacact ggatcaaata ataacacttt caaagtgact aaatcacaat	4980
	tgtxccaaaga tatactatag ctctctgttt aacctttata ttgtcaaaaa gggacaatga	5040
	atgaaagtac aaacacaaac acaaacacaa tggaaggagg tgtccagggt ggtgattcct	5100
	gactgtactg attcgacgga gttttatttg atttcgttga agtgggttaa gtgaataatt	5160
	cttgaattga gaggaacaaa gagtggataa aataacggaa tggagaggtc cgagcgatga	5220
	ataatgtacg attcggaaga ctatgagccg gctgaacctg aggttatgga ccaactaacgt	5280
	cctggttgac aagagtagtc atgtaataca aacgtaaagtg tatatttaa tagaatataa	5340
	gtagatatag ttaaaaagaa gaagaagaat agaaagaata agggatttag aaatttagag	5400
	tcattttaaa caattgataa cttgggttaa agctcgaagt tttgttgata gtagtttttt	5460
	ttttgtttt agttggtttg ttcaatagta taaggttaca ggggtgcgaga caaacgttgt	5520
	aacacttttc atctccccc gctaatacacc tagtcgagag ctctgttttcg acactggatg	5580
[0009]	gcggcgtagt tatcgaatcg acagcagtat agcgaccagc attcacatac gattgacgca	5640
	tgatattact ttctgcgcac ttaacttcgc atctgggcag atgatgtcga ggcgaaaaaa	5700
	aatataaatc acgctaacat ttgattaaaa tagaacaact acaatataaa aaaactatac	5760
	aatgacaag ttcttgaaaa caagaatctt tttattgtca gtactgagtc gaggcggccg	5820
	ctggccaccc ggggtctagag gcgcgccgtc gacggtacag cttctcgatg agtatgtgtg	5880
	tttatttttt ttttattttt tttgccaaat tctgtctttt cctaaatttc aagtgttgag	5940
	cttgttatcc gctcacaatt ccagcttttg tctcttcacc ttttccaact acaagcgcaa	6000
	cataacaaaa gaataataat tctcctaaga aacacaagcc tcatatacct ttcgagttag	6060
	ggaagaacat ctctctcat gatacacatt gattcgagct attaaatacc ttttctcaa	6120
	tcgaaatctc aagtaaaaca gcaatgaaaa cattacgtaa cttaaagggtg tcaccactag	6180
	aaatcatacc cttcacactc gacttcaagt agtgaatggt gtagcaacaa agtccaaata	6240
	ccaatgtcaa ccaagtaacc gaccgcacta ctagaaaaag acgctgttgc tcggaccaca	6300
	aatttccgct acacttttca caactatact gaagatacaa aaaacgtgtg tgggtatggc	6360
	tggtaccag gtcgcctggt taaaccaagt caacgtgata catatgtacg ttccaacact	6420
	aagcctaccc taagtttcgg ctcacaggct aggtatttat taacatgcaa gacaaggagg	6480
	aagcaaagca aagaccaacc gaaaccaccc agagcaccct gaactttgcg gtgaacagaa	6540
	ttccgcaaca tatctgagga taccatgata tcgttttcct actccatatg ggaatcacc	6600
	actgttgtcc gtaaataatga ccaaattcct accttgattc ctcacgaata atcgcagtc	6660
	gaaaagccgt tccaaaagcc agtccacagt ccatcaattg gtatgatgat tgtttttttg	6720
	ttcaaactga cacactaacg gtgtggaatg cgaagagtga gcttaccctt ctctctttg	6780

	ctagcagtac ttgcctacct acctactcta ctacgtgcc atattgtcta acattcggt	6840
	ttctctatatt ctacctggcc tggatggctc cgtctcgccc gcctcacaca catacattcc	6900
	tccccctctc gcctgcccc taataattaa acaagttaac aaaaggcggtt acctcttccg	6960
	catcctctcc aatctcatac gattccccctt tcatccgact tacccaacaa gatacaggat	7020
	ctcagtgaag gatccttcct gccctccctg tctgttgtct actctacatg cgacttggaa	7080
	ggccaaagga ctatcgcatg attattcgcc gggaacccgc gagttccctg ctcttttctt	7140
	tcaaaccagg cagcaaacca ggtgaacaca ctctgatgta gtgcagtccc taagtccttt	7200
	gaagattcgg ggagctagct acccacgcga atgtaacaaa agaacattta cttttgtggg	7260
	gggtggaaaa gtcgattagg atcttgcagc acagaaactg cgcaggggtt tttttcatct	7320
	tggagaagca actggctaaa ttcgacacaa aaaaaactg aaaaatggaa aataaaaaat	7380
	gaaaaagcaa gctgaattcg aagaaggag aattccgcct tctgcaacca cactaatggt	7440
[0010]	tggtagtcaa tagatacgca ttagaagggtt actattttat gagtcgatcc ccgcggtgga	7500
	gctccaattc gccctatagt gagtcgtatt acgcgcgctc actggccgctc gttttacaac	7560
	gtctgtactg ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca cateccccctt	7620
	tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca	7680
	gcctgaatgg cgaatggcgc gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg	7740
	tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgcgct cctttcgctt	7800
	tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	7860
	tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg	7920
	gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg	7980
	agtccacgtt cttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	8040
	cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg	8100
	agctgattta aaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaattt	8157

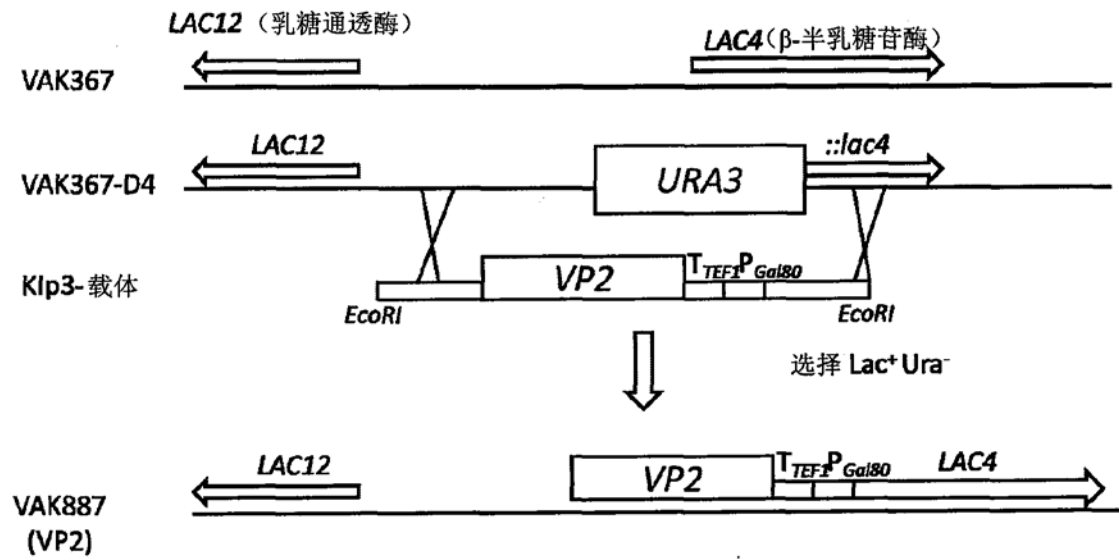


图1

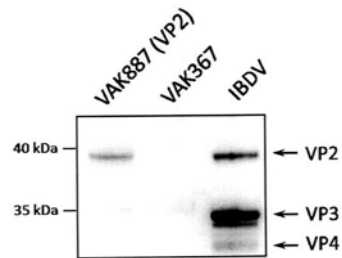


图2A

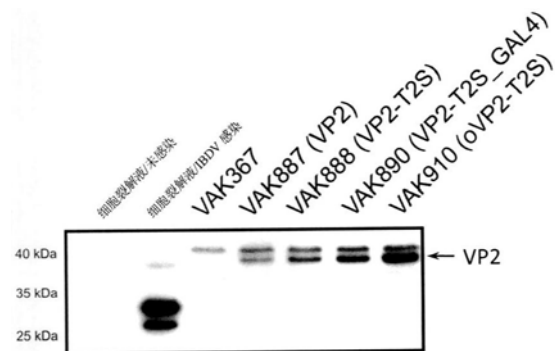


图2B

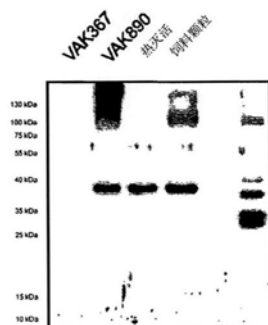


图3A

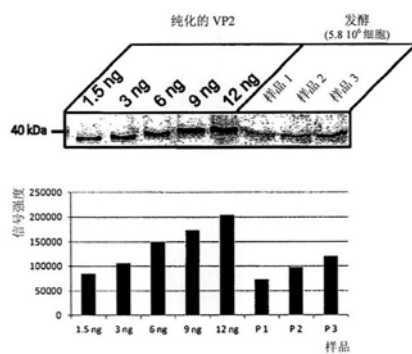


图3B

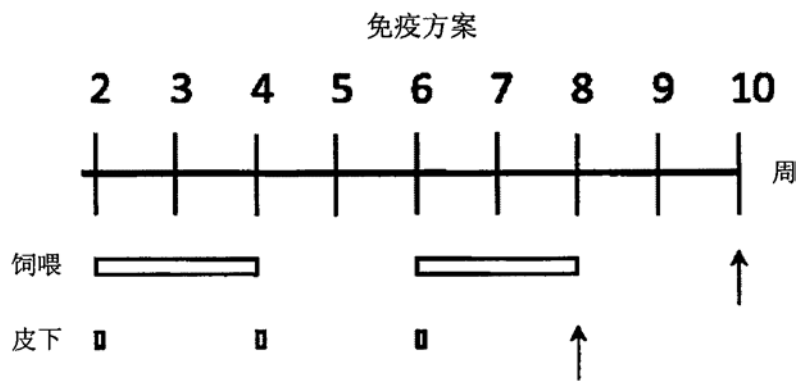


图4A

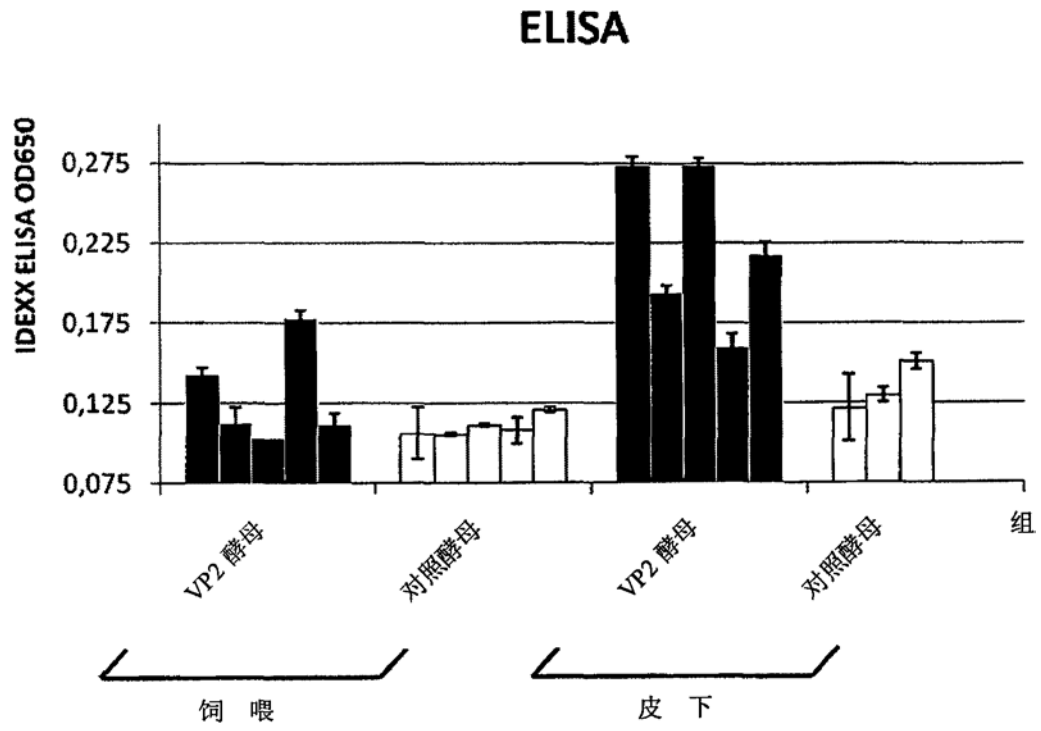


图4B

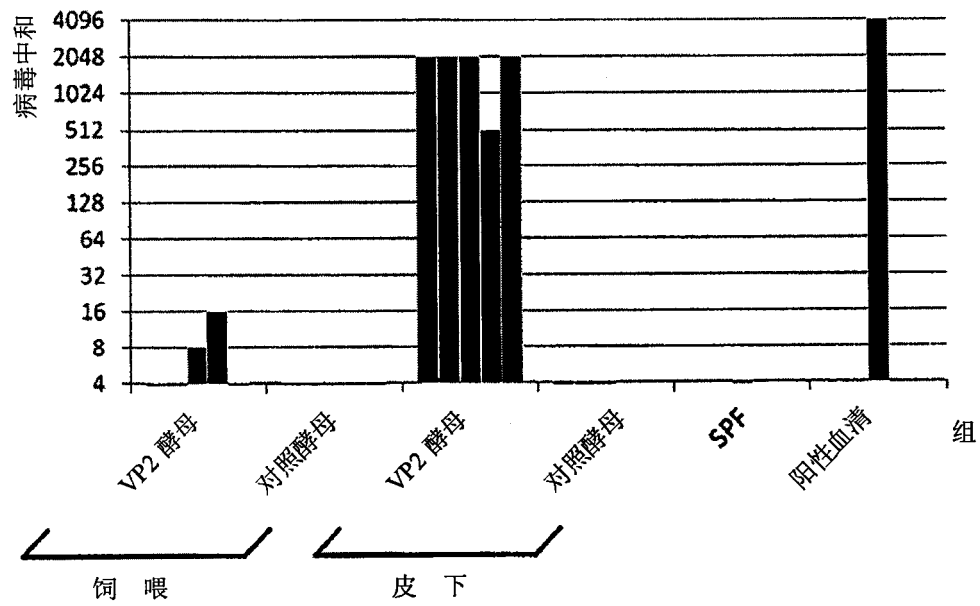


图4C

	组	ELISA	VN 编号 阳性
喂 饲	VP2 酵母	0.13 ± 0.031	40 %
	对照酵母	0.11 ± 0.006	0 %
下 皮	VP2 酵母	0.22 ± 0.05	100 %
	对照酵母	0.13 ± 0.015	0 %

图4D

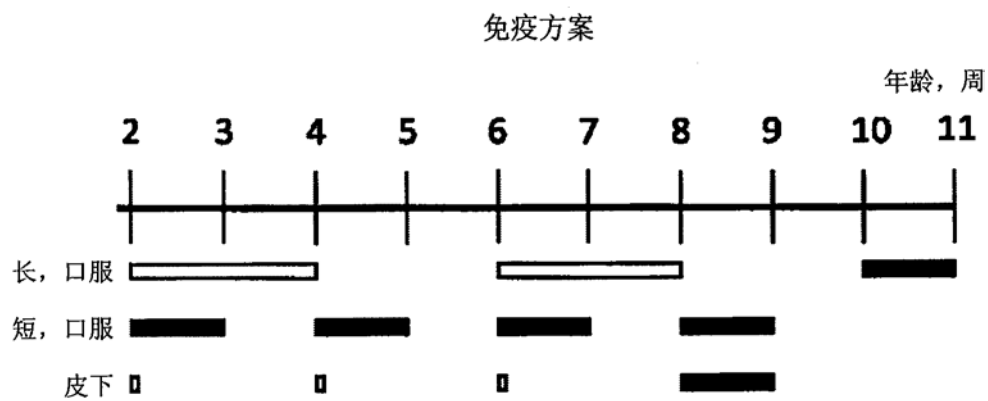


图5A

血清中和试验

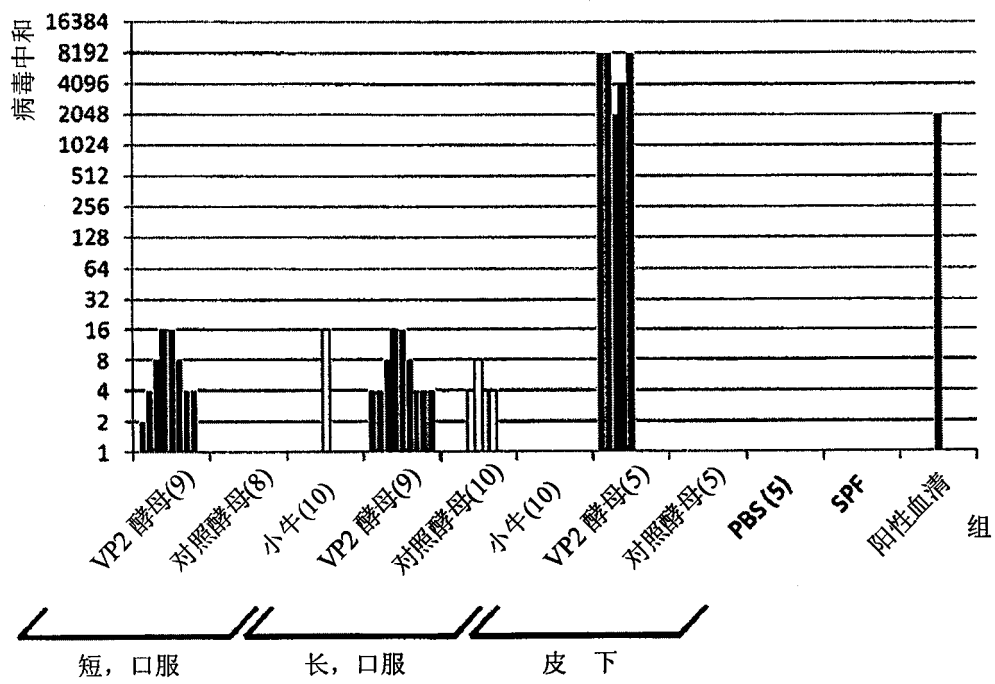


图5B

组	EISA (滴定量)	VN	死亡率	病变评分
VP2 酵母, 短(9)	1	6.89 ± 5.75	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
对照酵母, 短(8)	1	0	3/8	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
小牛, 短(10)	1	1.6 ± 5.06	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
VP2 酵母, 长(9)	35.56 ± 36.12	7.56 ± 5.08	0/9	1, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
对照酵母, 长(10)	9.4 ± 19.6	2 ± 2.91	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
小牛, 长(10)	4 ± 2.58	0	0/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
VP2 酵母, 长, 皂苷(10)	68.8 ± 70.87	6.8 ± 5.46	0/10	2, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
对照酵母, 长, 皂苷(9)	33.7 ± 38	0.89 ± 1.76	1/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
小牛, 长, 皂苷(9)	1	0	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
VP2 酵母(5)	2707 ± 823.4	3072 ± 1448.2	0/5	1, 1, 1, 1, 1, 3
对照酵母(5)	1	> 8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
PBS (5)	1	> 8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4

图 5C

图 5C

图5C

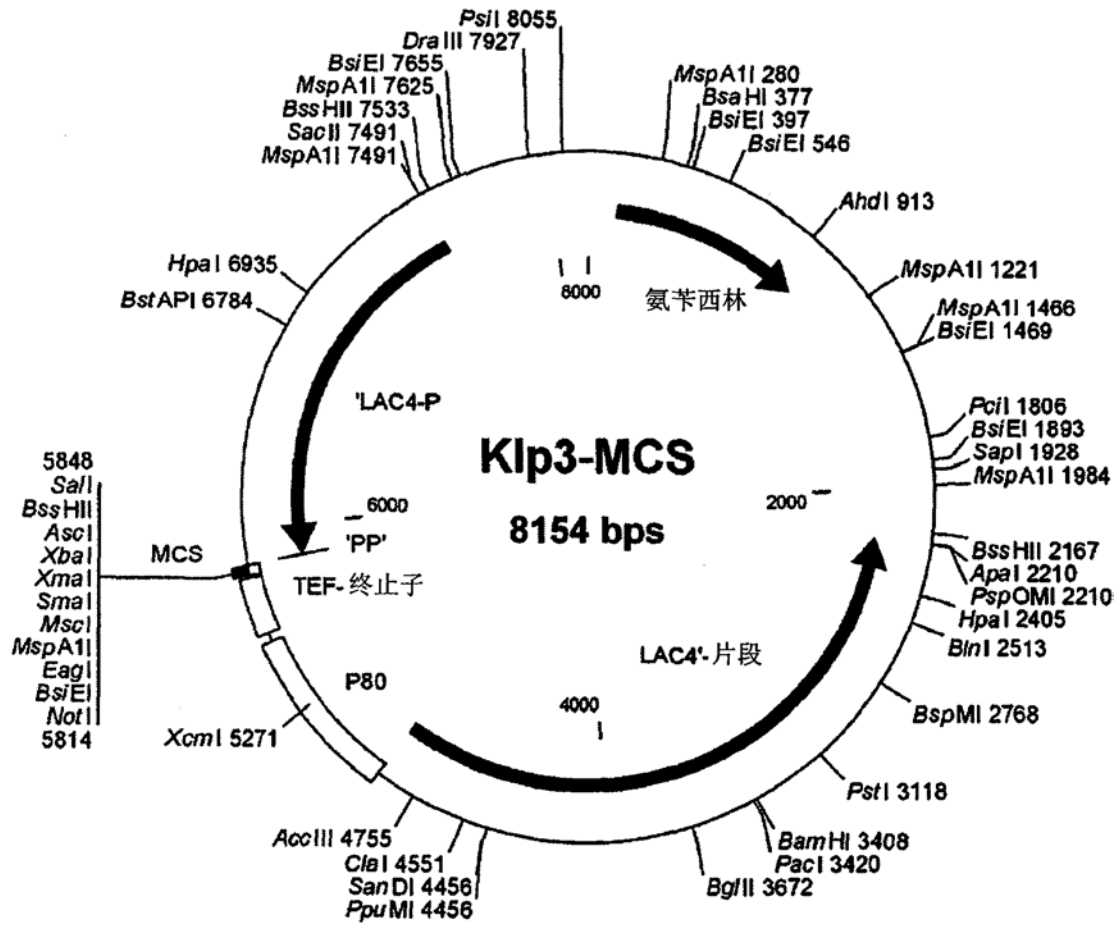


图6