(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105671003 A
(43)申请公布日 2016.06.15

(21)申请号 201610155509.2

(22)申请日 2016.03.18

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:V201610 2016.03.14

(71)申请人 华南农业大学
地址 510642 广东省广州市天河区五山路483号

(72)发明人 谢青梅 薛瑜 封柯宇 毕英佐

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102
代理人 林丽明

(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
C12N 15/50(2006.01)
C07K 14/165(2006.01)
A61K 39/215(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

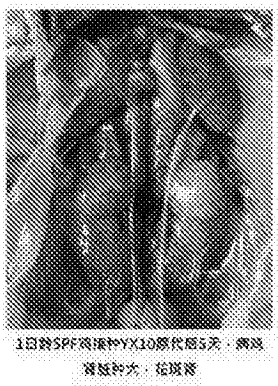
权利要求书1页 说明书8页
序列表7页 附图1页

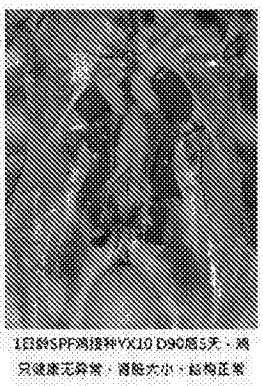
(54)发明名称

一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株

(57)摘要

本发明属于生物技术领域，公开了一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株，在2016年3月14保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:V201610，保藏地址为:中国，武汉，武汉大学;所述弱毒株对各种鸡只均安全，且无副反应，将所述弱毒株制成疫苗安全有效，可保护同源强毒的攻毒，具有实际和广泛的应用价值。





CN 105671003 A

1.一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株，其特征在于，在2016年3月14保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:V201610。

2．一种多肽，其特征在于，其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3．编码权利要求2所述多肽的核苷酸序列，其特征在于，所述序列如SEQ ID NO:1所示。

4．根据权利要求1所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株，其特征在于，所述疫苗YX10 D90株的基因编码的多肽序列如SEQ ID NO:2所示。

5．根据权利要求4所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株，其特征在于，所述疫苗YX10 D90株的基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示，或者在SEQ ID NO:1所述序列基础上经替换、缺失和/或添加一个或多个核苷酸且编码SEQ ID NO:2所述蛋白同等功能的基因序列。

6．权利要求1或4或5所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株在制备治疗鸡传染性支气管炎的药物中的应用。

7．一种防治鸡传染性支气管炎的疫苗，其特征在于，包括权利要求1或4或5所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株和药学上可以接受的冻干保护剂。

一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，更具体地，涉及一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株。

背景技术

[0002] 禽传染性支气管炎(Infectious bronchitis,IB)是由禽传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus,IBV)引起的鸡的一种急性、高度接触性传染的呼吸道疾病。主要特征为病鸡呼吸道症状，肾脏肿大、苍白，有大量尿酸盐沉积，甚至外观呈“花斑肾”；蛋鸡产蛋量和蛋的品质下降，幼雌鸡感染可引起输卵管永久性退化，导致产生“假母鸡”。除此之外，部分IBV毒株还可以引起肠道、腺胃、肌肉的病变。IBV可感染所有日龄、绝大多数种类的鸡，尤其是是1～5周龄的雏鸡非常易感，容易导致雏鸡生长迟缓、增重和饲料报酬降低、甚至死亡；并易引起霉形体混合感染和大肠杆菌等继发感染，从而导致鸡群死亡率增高，给全球养鸡业带来巨大的经济损失，IB是严重影响世界养禽业的重大传染病之一。

[0003] IBV属于套式病毒目(Nidovirales)，冠状病毒科(Coronaviridae)，冠状病毒属(Coronavirus)，为第三群禽冠状病毒的代表毒株。IBV为有囊膜的、不分节段的单股正链RNA病毒。IBV最突出的特点是血清型众多，且不同的血清型相互之间没有或仅有很低的交叉免疫原性。目前已经报道IBV的血清型或基因型至少有30多种，并且新的血清型、基因型和变异株仍然不断出现，不同血清型和基因型间的交叉保护力很弱，这给IB的诊断、防治带来了非常大的困难。

[0004] 疫苗在IBV的预防中起着非常重要的作用，目前，在我国使用的疫苗主要有灭活苗、弱毒苗。灭活苗主要在种鸡、蛋鸡开产前使用。但是仍存在灭活苗使用量大，需要配合佐剂，制备复杂，成本较高等众多问题。除此之外，灭活苗还不能引起粘膜免疫和细胞免疫，因此不能对气管提供有效的保护。弱毒活苗是由驯化好的毒株通过鸡胚的连续传代致弱后制备的。弱毒苗能有效刺激机体的免疫系统，可以同时激发细胞免疫、粘膜免疫和体液免疫，使用方便，生产成本低。一般我们主要用于肉鸡、种鸡和蛋鸡的首免。传支弱毒活疫苗从1956年开始在荷兰使用，H52，H120是目前全世界应用最广泛的活疫苗。尽管我国一直广泛使用Mass型疫苗(H120、H52)，近年来肾型传支还是在国内频繁广泛的爆。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服现有疫苗株不能够有效防制鸡传染性支气管炎病毒流行毒株的攻击，防制效果不理想的缺陷，提供一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株。

[0006] 本发明的第二个目的是提供所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株的应用。

[0007] 本发明的第三个目的是提供含有所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株的药物。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的：

一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株，在2016年3月14保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:V201610，保藏地址为:中国，武汉，武汉大学。

[0009] 发明人前期对2008～2015年中国分离株S1基因进行进化分析，结果与国内学者报道一致，类QX型IBV已成为我国最主要的IBV基因型，占分离株60%左右。类QX型与我国常用疫苗毒株(H120、H52、LDT3A、4/91等)S1基因相似度较低(70～85%)，进化距离较远。进一步研究发现，鸡群免疫国内主要弱毒疫苗(H120、H52、LDT3A、4/91等)，然后用类QX基因型毒株攻毒，表明商品疫苗毒株不能对目前的优势流行毒株提供足够的保护。

[0010] 本发明所述弱毒活疫苗YX10 D90株是由YX10强毒株经多次传代致弱，分离获得，具体是使用9～11日龄SPF鸡胚对YX10株进行连续传代致弱，每个代次通过尿囊腔接种5枚鸡胚，每胚接种200μL，置37℃孵育36～48h后，无菌收集鸡胚尿囊液，进行下一次传代。连续传至90代，命名为YX10 D90。

[0011] YX10 D90株的生物学特征如下：病毒尿囊液无血凝性，接种9～11日龄鸡胚可致鸡胚发育受阻或死亡，对SPF鸡无致病性，形态学观察为典型冠状病毒。

[0012] 本发明还提供一种多肽，其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0013] 本发明还提供编码所述多肽的核苷酸序列，所述序列如SEQ ID NO:1所示。

[0014] 经测序和分析，所述疫苗YX10 D90株的基因编码的多肽序列如SEQ ID NO:2所示；所述疫苗YX10 D90株的基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示，或者在SEQ ID NO:1所述序列基础上经替换、缺失和/或添加一个或多个核苷酸且编码SEQ ID NO:2所述蛋白同等功能的基因序列。

[0015] 本发明还提供所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株在制备治疗鸡传染性支气管炎的药物中的应用。

[0016] 本发明还提供含有所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株的药物；具体地，可以是疫苗，所述疫苗包括权利要求1或4或5所述鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株和药学上可以接受的冻干保护剂。

[0017] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明提供了一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株，在2016年3月14保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCC NO:V201610，保藏地址为:中国，武汉，武汉大学；所述弱毒株对各种鸡只均安全，且无副反应，将所述弱毒株制成疫苗安全有效，可保护同源强毒的攻毒，具有实际和广泛的应用价值。

附图说明

[0018] 图1为注射YX10 D90的弱毒疫苗的防治效果。

具体实施方式

[0019] 下面通过说明书附图和具体实施例对本发明进一步具体描述。本发明的设计思想或同类物质的简单替代属于本发明的保护范围。下述所使用的实验方法若无特殊说明，均为本技术领域现有常规的方法，所使用的配料或材料，如无特殊说明，均为通过商业途径可得到的配料或材料。

[0020] 实施例1 传染性支气管炎病毒YX10株分离鉴定

YX10由本实验室2010年从浙江湖州30日龄发病黄羽肉鸡中分离鉴定，具体过程如下：

(一)病毒的分离培养

无菌采集病死鸡肾脏、脾脏、肺脏、气管，按体积比1:5的比例(体积比)灭菌生理盐水，研磨，冻融3次，5000rpm离心20min，上清液过滤除菌后尿囊腔接种10日龄SPF鸡胚10枚，每胚接种0.2ml，接种后的鸡胚37℃孵育，每天照胚2次，弃去24小时之内的死亡胚，48小时取5枚收获尿囊液，其余继续孵育至144小时，记录鸡胚病变情况。如此盲传5代。收获的病毒存于-80℃。至第3代鸡胚呈现典型的传支病毒病变，表现为鸡胚发育迟缓、胚体蜷缩失水等。至第5代测定病毒含量为$10^{5.0}EID_{50}$/0.1ml。

[0021] (二)病毒鉴定

1、血凝性:1～5代收获的尿囊液进行血凝试验。结果各代次尿囊液对1%的鸡红细胞均不发生凝集，病毒无血凝性，排除为正粘病毒、副粘病毒、腺病毒等有血凝性的禽类病毒的可能性。

[0022] 2、PCR鉴定:第五代尿囊液200μl，TAKARA公司RNA提取试剂RNAiso Plus提取病毒RNA，用N基因引物进行RT-PCR。

[0023] 上游5'-CGGAGCAATAGCAAGAAAAGC-3'

下游: 5'-GCAGCAACCCACACTATACCATC-3'。

[0024] PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳，结果在500bp左右有目的条带，证明分离病毒为IBV。

[0025] 3、传支S1基因测序与分析

第五代尿囊液200μl，TAKARA公司RNA提取试剂RNAiso Plus提取病毒RNA，扩增S1基因，IBV S1上游:5'-AAGACTGAACAAAAGACCGACT-3';下游:5'-CAAAACCTGCCATAACTAACATA-3';产物长度1700bp左右。PCR产物经1. 5%琼脂糖凝胶电泳，目的条带清晰无杂带，直接送至华大基因公司测序。S1基因序列拼接整理后全长1620bp。

[0026] YX10株S1基因序列提交Gene bank，Accession No:JX840411。与H120(EU822341)、H52(AF352315)、W93(AY842862)、M41(DQ664534)、4/91(JN192154)、LDT3-A(AY702975)疫苗株的S1基因进行多重比对，同源性较低(均低于85%)，分别为77. 9%、78. 3%、77. 5%、77. 8%、78. 6%、84.8%。S1基因编码的纤突蛋白位于病毒的表面，诱导机体产生中和抗体，与机体的保护反应密切相关，S1基因是病毒演化过程中最易发生变异的基因，其序列相差大于5%可能就不能产生或不能完全产生交叉保护作用。

[0027] 4、形态学观察

YX10 D90株病毒尿囊液经离心、磷钨酸负染后在电镜下可见到直径约为80～120nm的冠状毒，病毒粒子呈多形性，多数为圆形，有囊膜，表面有呈松散、均匀排列的冠状突起。具有冠状病毒典型形态。

[0028] 5、动物回归试验

7日龄SPF鸡20只，滴鼻点眼途径接种第五代病毒，100μl每只，鸡群在攻毒后2天开始出现临诊症状，3天开始有鸡只死亡，发病率为100%(10/10)，死亡率为50%(5/10)。发病鸡表现出轻度呼吸道症状，部分鸡精神不振，拉稀，饮水增多，采食量下降。病死鸡极度消瘦，病死鸡只均有轻微气管粘液、出血，有气囊炎，肾脏明显肿大，呈花斑，有大量白色尿酸盐沉积。

从第14天以后临床症状逐渐出现好转，攻毒后20天，基本上恢复正常。用分离到的传支病毒感染易感雏鸡可复制出临床病例。

[0029] 6、血清中和试验

YX10株阳性血清制备：14日龄SPF鸡20只饲养于负压隔离器中，滴鼻点眼途径接种YX10株第五代病毒，剂量0.1ml/只，10天后将没有死亡的小鸡颈部皮下注射YX10株油乳剂灭活苗0.3ml，14天后再次颈部皮下注射YX10株油乳剂灭活苗0.5ml，10天后心脏采血，无菌分离血清，按每毫升2000单位加入青链霉素，分装备用。

[0030] 与类症疾病阳性血清的交叉中和试验：将YX10株第五代毒稀释1000倍，分别与等量的ND、IBD、ITL、IB(M41)阳性血清(购自中国兽医药品监察所)及YX10阳性血清混合后，在37℃感作60min，各接种10日龄SPF鸡胚5枚，每胚尿囊腔内0.2mL。病毒对照组为YX10株10^{-4}稀释毒与等量盐水混合。37℃孵化，观察6d，结果见表1。

表1 与类症疾病阳性血清中和试验结果

组别	鸡胚病变（平均胚重）	判定
YX10+ND 血清	1/5 死，4/5 发育受阻（9.2g）	不被中和
YX10+IBD 血清	5/5 发育受阻（10g）	不被中和
YX10+ILT 血清	5/5 发育受阻（9.5g）	不被中和
YX10+IB（M）血清	1/5 正常（18.5g），4/5 发育受阻（8.5g）	不完全中和
YX10 病毒对照	5/5 发育受阻（9.1g）	全部感染
空白组	5/5 正常（19.5g）	发育正常

[0031] 与IB阳性血清的中和试验：用生理盐水将YX10株稀释至每0.1ml含100个EID_{50}；IBV M41株、4/91株、LDT3-A株及YX10株阳性血清，分别作16倍稀释，稀释的病毒和血清等量混合，37℃感作60min，分别经尿囊腔接种SPF鸡胚，每份血清5枚，每胚0.2mL，37℃孵化168h，以在24～168h内死亡的鸡胚及144小时的活胚中，其胎儿具有失水、蜷缩、发育小等特异性病变，作为是否具有IB特异性病变的感染指标。结果见表2。

表 2 与 IB 阳性血清的中和试验结果

组别	鸡胚病变（平均胚重）	判定
YX10+YX10 阳性血清	5 只鸡胚全部存活（20.5g）	完全中和
YX10+M41 血清	5 只鸡胚 1 死 4 只发育受阻（12.5g）	不被中和
YX10+4.91 血清	5 只鸡胚 1 死 4 只发育受阻(8.5g)	不被中和
YX10+LDT3-A 血清	5 只鸡胚发育受阻（10.2g）	不被中和
YX10 病毒对照	5 只鸡胚发育受阻（8.3g）	全部感染

[0032] 结果表明，ND、IBD、ILT的阳性血清不能中和IBV YX10株病毒。IBV，YX10株能被YX10株阳性血清完全中和，所有鸡胚发育正常，IBV M41株、4/91株、LDT3-A株阳性血清不能中和YX10株病毒。

[0033] 至此通过病毒的分离鉴定、PCR鉴定、形态学观察、血清鸡胚中和试验、动物回归实验等病原生物学特性研究，得到一株类QX型禽传染性支气管炎病毒，命名为YX10株。YX10全基因序列已测序完成并上传GenBank，Accession No:JX840411。

[0034] 实施例2 YX10D90弱毒株的培育

1、毒株鸡胚连续传代致弱

使用9～11日龄SPF鸡胚对YX10株进行连续传代致弱，每代次通过尿囊腔接种10枚鸡胚，0.1ml/枚，37℃孵育，弃去24小时内死亡鸡胚，36小时左右收获5枚活胚，无菌收集胚液进行下一次传代，其余留至144小时观察鸡胚有无传支病变。如此连续传代至第120代。期间间隔一定代次进行病毒含量、无菌和支原体检测、外源病毒检测、和对易感雏鸡的安全性试验以确定毒力是否致弱。

[0035] 2、病毒含量测定

传代过程中分别测定D5、D25、D40、D58、D75、D90、D120代病毒的EID_{50}。病毒用灭菌生理盐水10倍倍比稀释，选取5个稀释度(10^{-4}～10^{-8})分别接种5枚10日龄SPF鸡胚，每胚0.2ml，37℃孵育至144小时，24小时内死亡鸡胚不计，记录感染鸡胚数，按Reed-Muench法计算EID_{50}。测定结果见表3。

表 3 YX10 传代毒不同代次滴度值

代次（常温）	YX10 D5	YX10D 25	YX10D 40	YX10D 58	YX10D 75	YX10D 90	YX10D 120
EID50/0.2ml	$10^{6.3}$	$10^{6.8}$	$10^{7.2}$	$10^{7.12}$	$10^{7.8}$	$10^{7.23}$	10^{7}

[0036] 毒株YX10传代毒可以很快适应鸡胚，YX10 D5代毒价高达$10^{6.3}$ EID_{50}/0.2ml，传代

后病毒滴度持续升高，但幅度不大，最高为YX10 D75代达到$10^{7.8}$ EID_{50}/0.2ml，大部分都维持在$10^{6.5}EID_{50}$/0.2ml左右。

[0037] 3、无菌和支原体检测

分别将D5、D25、D58、D75、D90、D120代病毒按照现行《中华人民共和国兽药典》附录进行无菌和支原体检验。各代次检测结果均为阴性。

[0038] 4、外源病毒检测

分别将D5、D25、D58、D75、D90、D120代病毒按照现行《中华人民共和国兽药典》附录进行外源病毒检测。各代次检测结果均为阴性。

[0039] 5、对易感雏鸡的安全性试验

连续传代过程中分别进行D5、D25、D58、D75、D90、D120代病毒的安全性试验，1日龄SPF雏鸡30只随机分为两组，试验组滴鼻点眼途径接种各代次病毒，每只滴鼻$10^{5.5}EID_{50}$/200μl，另一组作为对照不做处理。负压隔离器中饲养，自由饮水采食。接种后每日观察，记录鸡群的发病、死亡情况，及时剖检死亡鸡。2周后，剖检存活鸡，记录肾脏气管等器官的病变情况，结果见表4。

表4 YX10不同代次毒病毒对1日龄SPF鸡的致病力评估

分组	代次	剂量（EID50）	发病率	死亡率
1	YX10 D5	$10^{5.5}$	12/12	6/12
2	YX10 D25	$10^{5.5}$	12/12	3/12
3	YX10 D58	$10^{5.5}$	9/12	2/12
4	YX10 D75	$10^{5.5}$	2/12	0/12
5	YX10 D90	$10^{5.5}$	0/12	0/12
6	YX10 D120	$10^{5.5}$	0/12	0/12
7	空白对照	生理盐水	0/6	0/6

[0040] 随着病毒逐步适应鸡胚，其对鸡的致病力在逐步下降，D5、D25、D58接种后雏鸡发病率100%、100%，75%(9/12)，死亡率分别为50%(6/12)、25%(3/12)、16.7%(2/12)，D75致病力已有下降，仅有16.7%(2/12)表现一过性呼吸道症状，无死亡。D90、D120代鸡群在接种后精神采食完全正常，无呼吸道症状，无死亡，剖检气管和肾脏无病变，传代至D90代病毒已没有致病性。

[0041] 6、YX10 D90的免疫原性试验

对已致弱的YX10 D90病毒进行免疫原性测定。1日龄SPF雏鸡30只随机分为4组，试验组以$10^{6.0}EID_{50}$/只、$10^{5.0}EID_{50}$/只、$10^{4.0}EID_{50}$/只三个不同剂量滴鼻点眼途径免疫YX10 D90病毒，200μl/只，第4组作为对照不做处理。负压隔离器中饲养，自由饮水采食。接种后每日观察记录鸡群的情况，2周后用同源强毒YX10 D5进行攻毒，滴鼻点眼途径，每只$10^{5.5}$ EID_{50}/200μl，攻毒后每日观察记录鸡群的发病、死亡情况，及时剖检死亡鸡。观察2周，剖检存活鸡，记录肾脏、气管等器官的病变情况。免疫后实验组和对照组鸡群均正常，攻毒后对照组

第3天鸡只表现呼吸道症状，部分鸡精神不振，排水便，发病率100%，共5只死亡，存活鸡有不同程度的气管出血、气管有粘液，肾脏肿大苍白等病变。而免疫组均无发病，无死亡；结果见表5。

表5 YX10 D90 不同免疫剂量免疫保护率

分组	接种剂量（EID_{50}）	鸡只数量（只）	攻毒剂量（EID50）	保护数	保护率
1	$10^{6.0}$	10	$10^{5.5}$	10/10	100%
2	$10^{5.0}$	10	$10^{5.5}$	10/10	100%
3	$10^{4.0}$	10	$10^{5.5}$	10/10	100%
攻毒对照		10	$10^{5.5}$	0	0

[0042] 结论：YX10 D90的免疫剂量≥$10^{4.0}EID_{50}$/只时可达到满意的保护效果，保护率100%。

[0043] 7、弱毒疫苗株YX10 D90全基因测序

YX10 D90已完成全基因测序，YX10 D90 S1序列如SEQ ID NO:1所示，YX10 D90 3'-UTR如SEQ ID NO:3所示。

[0044] YX10经过SPF鸡胚连续传代120次，病毒在SPF鸡胚上适应良好，D40以后毒价稳定在$10^{7.0}EID_{50}$/0.2ml以上，至第90代病毒已完全致弱且保留有良好的免疫原性，且细菌、支原体、其他外源病毒检测结果均为阴性，YX10 D90可以作为传支弱毒疫苗原始种毒。

[0045] 将所得毒株提交保藏，所述毒株的保藏名称为鸡传染性支气管炎病毒YX10D90株，保藏时间为2016年3月14日，保藏编号为CCTCC NO:V201610，保藏单位是中国典型培养物保藏中心，保藏地址为：中国，武汉，武汉大学。

[0046] 所述毒株的S1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示，其编码的多肽序列如SEQ ID NO:2所示。

[0047] 实施例3 YX10 D90弱毒疫苗制备

1、IBV病毒液的制备

将实施例2获得的YX10 D90种毒用灭菌生理盐水稀释1000倍，尿囊腔接种100枚10日龄SPF鸡胚，每胚0.2ml，密封针孔，置37℃继续孵育，不必翻蛋，接种后24小时内照蛋1次，弃去死胚，以后每隔4小时照蛋1次，将死亡的鸡胚随时取出，至36小时，不论死亡与否，将全部鸡胚取出，气室向上直立，置于4℃冷却12小时。将冷却的鸡胚取出，消毒气室部位，然后以无菌手术剥除气室部卵壳，揭去卵壳膜，剪破绒毛尿囊膜及羊膜(勿使卵黄破裂)，吸取鸡胚液，分别取样进行检验，置于-20℃保存备用。

[0048] 2、IBV毒液的检验

收获的病毒液按现行《中国兽药典》附录方法逐瓶作无菌检验及红细胞凝集试验，并抽样一份测定病毒含量(EID_{50})。结果收获的病毒液无菌生长，对1%鸡红细胞悬液凝集试验应为阴性，每0. 1ml病毒含量为$10^{7.0}EID_{50}$以上。

[0049] 3、配苗与分装

将检验合格的病毒液用4层灭菌纱布滤过，混合于同一容器内，加入等量的5%蔗糖脱脂奶作稳定剂，同时按每毫升1000单位加入青链霉素，充分摇匀，定量分装，使每羽份病毒含量$10^{4.0}EID_{50}$，每瓶1000羽份。

[0050] 4、冷冻干燥，压盖贴签，-15℃以下保存。

[0051] 5、疫苗的安全性试验

以10倍免疫剂量免疫1日龄SPF鸡，检验疫苗的安全性。疫苗用灭菌生理盐水适当稀释免疫1日龄SPF鸡10只，每只滴鼻200μl（含10羽份疫苗），同时设10只不免疫对照，负压隔离器饲养，自由饮水采食，每日观察记录鸡只的健康情况，观察21天。结果免疫组与对照组鸡只无发病，增重无差异，表明疫苗是安全的。

[0052] 6、疫苗的效力试验

1日龄SPF鸡20只分为2组，一组免疫一羽份上述制备得到的YX10 D90活疫苗，另一组不处理作为对照，负压隔离器中饲养，自由饮水采食。接种后每日观察记录鸡群的情况，2周后用强毒YX10 D5进行攻毒，滴鼻点眼途径每只$10^{5.5}EID_{50}$/0.2ml，攻毒后每日观察记录鸡群的发病、死亡情况，及时剖检死亡鸡。观察2周，剖检存活鸡，记录肾脏、气管等器官的病变情况。

[0053] 免疫后实验组和对照组鸡群均正常，攻毒后对照组第二天既有鸡只表现呼吸道症状，部分鸡精神不振，排水便，共5只死亡，存活鸡有不同程度的气管出血、气管有粘液，肾脏肿大苍白等病变，发病率100%（10/10），死亡率50%（5/10）。而免疫组无发病死亡，鸡只健康无异常（图1），表明用致弱的D90病毒制备的活疫苗安全有效，可以保护同源强毒的攻毒。

SEQUENCE LISTING

<110> 华南农业大学

<120> 一种鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗YX10 D90株

<130>

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1620

<212> DNA

<213> YX10 D90的S1基因的核苷酸序列

<400> 1

atgttgggga agtcactgtt tttagtgacc attttgtgtg cactatgtag tgcaaatttg 60

tttgattctg ccaataatta tgtgtactac taccaaagtg cctttaggcc tccaaatgga 120

tggcatctgc aaggggggtgc ttatgcagta gtgaattcta ctaattatac taataatgcc 180

ggttctgcaa gtgggtgcac tgttggtgtt attaaggacg tctataatca aagtgcggct 240

tccatagcta tgacagcacc tcctcagggt atggcttggt ctaagtcaca attttgtagt 300

gcacactgta acttttctga aattacagtt tttgtcacac attgttatag tagtggtgca 360

ggttcttgtc ctataacagg catgattgca cgtgatcata ttcgtatttc tgcaatgaaa 420

aatggttctt tattttataa tttaacagtt agcgtatcta aataccctac gtttaaatct 480

tttcaatgtg ttaacaattc cacatctgtt tatctaaatg gtgatcttgt ttttacttct 540

aacaaaactg ctgatgttac gtcagcaggt gtgtattata aagcaggtgg acccgtaaat 600

tatagtgtta tgaaagaatt taaggttctt gcttactttg ttaatggtac agcacaagat 660

gtaattttgt gcgacaattc ccccaagggt ttgctggctt gtcaatataa tactggcaat 720

ttttcagatg gcttttatcc ttttactaat agtactttag ttagggacaa gttcattgtc 780

tatcgtgaaa gtagtgtcaa tactactttg acgttaacta atttcacttt tactaatgta 840

agtactgcac agcctaatag tggtggtgtt agtacttttc atttatatca aacacaaaca 900

gctcagagtg gttattataa ttttaatttg tcatttctga gtcagtttgt gtataaggca 960

agtgatttta tgtatgggtc ttaccaccct aggtgttctt ttagaccaga aaccattaat 1020

agtggtttat ggtttaattc cttgtcagtt tctcttactt atggacccct acagggaggg 1080

tgtaagcaat ctgtttttaa tggtaaggca acgtgttgtt atgcctactc ttataatggc 1140

ccaagggcat gtaaaggtgt ttattcaggt gaattaagca agacttttga atgtggattg 1200

ctggtttatg ttactaagag tgatggctct cgtatacaga ctagaacgga gcccttagta 1260

ttaatgcaac acaattataa taatattact ttagataagt gtgttgacta taatatatat 1320

ggcagagtag gccaaggttt tattactaat gtgactgatt ctgctgctaa ttttagttat 1380

ttagcagatg gtgggttagc tattttagat acttcgggtg ccatagatgt ctttgttgta 1440

cagggcagct atggtcttaa ttattacaag gtcaatcctt gtgaagatgt taaccaacag 1500

tttgtagtgt ctggtggcaa tatagttggc attcttactt ctagaaatga aacaggttct 1560

gaacaggttg agaaccagtt ttatgttaag ttaaccaata gctcacatcg tcgcaggcgt 1620

<210> 2
<211> 540
<212> PRT
<213> YX10 D90的S1基因编码的氨基酸序列
<400> 2

Met Leu Gly Lys Ser Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Cys Ala Leu Cys
1 5 10 15

Ser Ala Asn Leu Phe Asp Ser Ala Asn Asn Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln

20 25 30

Ser Ala Phe Arg Pro Pro Asn Gly Trp His Leu Gln Gly Gly Ala Tyr
35 40 45

Ala Val Val Asn Ser Thr Asn Tyr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala Ser
50 55 60

Gly Cys Thr Val Gly Val Ile Lys Asp Val Tyr Asn Gln Ser Ala Ala
65 70 75 80

Ser Ile Ala Met Thr Ala Pro Pro Gln Gly Met Ala Trp Ser Lys Ser
85 90 95

Gln Phe Cys Ser Ala His Cys Asn Phe Ser Glu Ile Thr Val Phe Val
100 105 110

Thr His Cys Tyr Ser Ser Gly Ala Gly Ser Cys Pro Ile Thr Gly Met
115 120 125

Ile Ala Arg Asp His Ile Arg Ile Ser Ala Met Lys Asn Gly Ser Leu
130 135 140

Phe Tyr Asn Leu Thr Val Ser Val Ser Lys Tyr Pro Thr Phe Lys Ser
145 150 155 160

Phe Gln Cys Val Asn Asn Ser Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu
165 170 175

Val Phe Thr Ser Asn Lys Thr Ala Asp Val Thr Ser Ala Gly Val Tyr
180 185 190

Tyr Lys Ala Gly Gly Pro Val Asn Tyr Ser Val Met Lys Glu Phe Lys
195 200 205

Val Leu Ala Tyr Phe Val Asn Gly Thr Ala Gln Asp Val Ile Leu Cys
210 215 220

Asp Asn Ser Pro Lys Gly Leu Leu Ala Cys Gln Tyr Asn Thr Gly Asn
225 230 235 240

Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Pro Phe Thr Asn Ser Thr Leu Val Arg Asp
245 250 255

Lys Phe Ile Val Tyr Arg Glu Ser Ser Val Asn Thr Thr Leu Thr Leu
260 265 270

Thr Asn Phe Thr Phe Thr Asn Val Ser Thr Ala Gln Pro Asn Ser Gly
275 280 285

Gly Val Ser Thr Phe His Leu Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly
290 295 300

Tyr Tyr Asn Phe Asn Leu Ser Phe Leu Ser Gln Phe Val Tyr Lys Ala
305 310 315 320

Ser Asp Phe Met Tyr Gly Ser Tyr His Pro Arg Cys Ser Phe Arg Pro
325 330 335

Glu Thr Ile Asn Ser Gly Leu Trp Phe Asn Ser Leu Ser Val Ser Leu
340 345 350

Thr Tyr Gly Pro Leu Gln Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val Phe Asn Gly
355 360 365

Lys Ala Thr Cys Cys Tyr Ala Tyr Ser Tyr Asn Gly Pro Arg Ala Cys
370 375 380

Lys Gly Val Tyr Ser Gly Glu Leu Ser Lys Thr Phe Glu Cys Gly Leu
385 390 395 400

Leu Val Tyr Val Thr Lys Ser Asp Gly Ser Arg Ile Gln Thr Arg Thr
405 410 415

Glu Pro Leu Val Leu Met Gln His Asn Tyr Asn Asn Ile Thr Leu Asp
420 425 430

Lys Cys Val Asp Tyr Asn Ile Tyr Gly Arg Val Gly Gln Gly Phe Ile
435 440 445

Thr Asn Val Thr Asp Ser Ala Ala Asn Phe Ser Tyr Leu Ala Asp Gly
450 455 460

Gly Leu Ala Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ala Ile Asp Val Phe Val Val
465 470 475 480

Gln Gly Ser Tyr Gly Leu Asn Tyr Tyr Lys Val Asn Pro Cys Glu Asp
485 490 495

Val Asn Gln Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Asn Ile Val Gly Ile Leu
500 505 510

Thr Ser Arg Asn Glu Thr Gly Ser Glu Gln Val Glu Asn Gln Phe Tyr
515 520 525

Val Lys Leu Thr Asn Ser Ser His Arg Arg Arg Arg
530 535 540

<210> 3
<211> 391
<212> DNA
<213> YX10 D90 3'-UTR序列
<400> 3
cataattgtt gattgcagtt tgctttcttt ctgtgcttat tgtttttatt ctgctttatt 60

ctttgttata tcgtagaagt ttattaaagg ttaaggaaga taggcatgta gcttgattac 120

ctacatgtct atcgccaggg aaatgtctaa tctgtctact tagtagcctg gaaacgaacg 180

gtagaccctt agattttaat ttagtttaat ttttagttta gtttaagtta gtttagagta 240

ggtataaaga tgccagtgcc ggggccacgc ggagtacgat cgagggtaca gcactaggac 300

gcccactagg ggaagagcta aattttagtt taagttaagt ttaattgtct aagtatagtt 360

aaaatttata ggctagtata gagttagagc a 391

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> N基因上游引物
<400> 4
cggagcaata gcaagaaaag c 21

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> N基因下游引物

<400> 5
gcagcaaccc acactatacc atc 23

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 扩增传支S1基因的上游引物
<400> 6
aagactgaac aaaagaccga ct 22

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 扩增传支S1基因的下游引物
<400> 7
caaaacctgc cataactaac ata 23



1日龄SPF鸡接种YX10原代后5天，病鸡肾脏肿大，花斑肾



1日龄SPF鸡接种YX10 D90后5天，鸡只健康无异常，肾脏大小、结构正常

图1