



**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

## 一种猪伪狂犬病病毒、疫苗组合物及其制备方法和应用

### 技术领域

本发明涉及一种疫苗组合物，属于动物病毒学领域。

### 背景技术

伪狂犬病，又称 Aujeszky 氏病，是由疱疹病毒科 (Herpesviridae)  $\alpha$  亚科中的猪疱疹病毒 I 型 (Suid herpesvirus 1 strain) 所引起的猪、牛、羊等多种家畜、家禽和野生动物的一种以发热、奇痒(除猪外)及脑脊髓炎为主症的急性传染病。猪的伪狂犬病在我国广泛存在，危害严重，是制约规模化猪场生产的主要疫病之一。它能引起妊娠母猪流产、死胎或木乃伊胎和仔猪出现神经症状、麻痹，死亡率高。PRV 具有较强的泛嗜性、神经嗜性及潜伏感染特性，在外周神经系统可以长期潜伏感染，当潜伏病毒被激活变成有感染力的病毒，被潜伏感染的宿主就会发病。

研究表明亚单位疫苗能够给免疫动物提供相应的保护，亚单位疫苗是利用基因工程方法将病原保护性抗原基因克隆到原核或真核表达系统中，使其高效表达而制成的疫苗。目前发现伪狂犬病毒糖蛋白中的 gB、gC、gD 均能使机体产生中和抗体，这些抗体无论是在体内、体外，还是在有无补体存在的情况下都有中和 PRV 的能力。“伪狂犬病亚单位疫苗研究进展”(杨承槐，娄高明，谌南辉《江西畜牧兽医杂志》2004 年第 3 期)公开了在伪狂犬病病毒目前已发现的 11 种糖蛋白中，gB、gC、gD 均能诱导机体产生中和抗体。在没有补体的参与下，gB、gC、gD 的单克隆抗体能中和 PRV。猪和小鼠注射抗 gB、gC、gD 的单克隆抗体均能抵抗 PRV 强毒的攻击。因此，gB、gC、gD 是研制 PRV 亚单位疫苗的首选蛋白。糖蛋白 gD 是一种重要的中和抗原，也是保护性抗体的主要目标，能诱导较好的保护反应。US6858385 和 US6521231 公开了利用猪伪狂犬病病毒 gD 蛋白可以制备疫苗用于猪伪狂犬病的预防。

猪 PRV 只有一个血清型，通常认为毒株的交叉保护力很强，但目前仍存在仔猪注射商品化疫苗后发生典型猪伪狂犬病，例如长时间体温升高，精神沉郁，食欲减退，出现呼吸道和/或神经症状。突出表现为任何年龄的猪都会感染，可在猪群水平传播，潜伏期短（1~2 天），发病率在 10%~100%之间，发病猪死亡率在 10%~100%之间（仔猪死亡率可高达 100%），感染后可引起猪只高热（40~42℃，持续 3 日以上），呼吸困难，腹泻，喘，咳嗽，打喷嚏，后肢麻痹，犬坐，突然倒地，抽搐，侧卧不起，角弓反张，泳状划水，最后衰竭而死，并可引起种公猪精液质量下降，怀孕母猪流产（高达 35%），早产，死胎，弱仔（弱仔 14 日龄前全部死亡）等繁殖障碍症状。现有技术的疫苗免疫猪只后不能完全抵抗野毒攻击，依然会出现高热，精神沉郁，食欲下降或废绝等症状，感染率超过 80%，发病率超过 30%，死亡率在 10%~20%之间。现有技术还没有疫苗能够解决针对猪伪狂犬变异株引起的伪狂犬病。

## 发明内容

为解决现有技术的不足，本发明旨在提供一种猪伪狂犬病病毒株，该猪伪狂犬病病毒株可用于制备疫苗，通过动物实验证明该疫苗对于猪伪狂犬病具有良好的免疫作用。

本发明提供了一种核苷酸序列，所述核苷酸序列实质上编码序列表 SEQ ID NO.1 所示的蛋白。

本发明提供了一种核苷酸序列，所述核苷酸序列实质上编码序列表 SEQ ID NO.2 所示的蛋白。

本发明提供了一种核苷酸序列，所述核苷酸序列实质上编码序列表 SEQ ID NO.3 所示的蛋白。

“编码序列”在本申请中是指一种 DNA 序列，其能够被转录得到相应的 RNA 序列。

为解决现有技术的不足，本发明的主要目的是提供一种猪伪狂犬病病毒株，其中，所述猪伪狂犬病病毒株具有序列表 SEQ ID NO.4 所示的核苷酸序列编码的 gD 糖蛋白。

本发明术语“gD糖蛋白”，是猪伪狂犬病病毒进行感染必需的结构蛋白，是成熟的病毒粒子囊膜表面的主要糖蛋白之一，也称为gp50蛋白。

本发明术语“同源性”在本申请中是指两条氨基酸序列或两条核苷酸序列的相似程度。氨基酸序列或核苷酸序列的同源性可以通过本领域公知的任何适当的方法计算得到，例如，可以将目标氨基酸(或核苷酸)序列与参比氨基酸(或核苷酸)序列进行序列比对，必要时可以引入空缺，使得两条比对的序列间相同的氨基酸(或核苷酸)数目达到最优化，并在此基础上计算两条氨基酸(或核苷酸)序列之间相同氨基酸(或核苷酸)的百分比。氨基酸(或核苷酸)序列的比对和同源性的计算可以通过本领域公知的软件实现，例如，但不限于，BLAST 软件(在美国国立生物技术信息中心(NCBI)的网址上可获得：<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>，或者见，例如，Altschul S.F. et al, *J.Mol.Biol.*, 215 : 403-410(1990) ; Stephen F. et al, *Nucleic Acids Res.*, 25 : 3389-3402(1997)), ClustalW2 软件(在欧洲生物信息研究所网址上可获得：<http://www.eji.ac.uk/Toolsa/clustalw2/>，另见，例如，Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266 : 383-402(1996) ; Larkin M.A. et al, *Bioinformatics(Oxford, England)*, 23(21) : 2947-8(2007)) ; 和TCoffee 软件等(在瑞典生物信息学研究所的网站上可以获得：[http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee\\_cgi/index.cgi](http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi)，另见，例如，Poirot O. et al, *Nucleic Acids Res.*, 31(13) : 3503-6(2003) ; Notredame C. et al, *J.Mol.Boil.*, 302(1) : 205-17(2000))。使用软件进行序列比对时，可以使用软件提供的默认参数，或者也可以根据实际情况对软件提供的参数进行调整，这些都在本领域技术人员知识范围内。

优选地，所述猪伪狂犬病病毒株具有序列表 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列编码的 gB 糖蛋白。

优选地，所述的猪伪狂犬病病毒，它具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列的 gB 糖蛋白。

优选地，根据本发明的所述猪伪狂犬病病毒，它具有 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列的 gC 糖蛋白。

优选地，所述猪伪狂犬病病毒株为HN1201株（Pseudorabies virus, strain HN1201）或其培养物，保藏号为CCTCC NO. V 201311；保藏于中国典型培养物保藏中心；保藏地址为湖北省武汉市·武汉大学，保藏日期为2013年5月20日。

所述术语“培养物”是病毒的不同代次传代培养物，本领域技术人员知晓不同代次之间其基因序列仅可能会发生微小的变异，优选地，所述培养物是5-35代以内的培养物。

本发明的另一个目的是提供一种猪伪狂犬病病毒疫苗组合物，其中，所述疫苗组合物包括免疫量的猪伪狂犬病病毒株的减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、合成疫苗或基因工程疫苗。

优选地，所述疫苗组合物包括免疫量的所述猪伪狂犬病病毒株HN1201株或其培养物的减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、合成肽疫苗或基因工程疫苗。

优选地，本发明的疫苗组合物包含所述猪伪狂犬病病毒或其抗原作为活性成分。用于疫苗的组合物中的猪伪狂犬病病毒具有 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列或与其共有 98%以上同源性的氨基酸序列表示的 gD 糖蛋白。

优选地，所述疫苗组合物中的猪伪狂犬病病毒为 HN1201 株或其培养物。

用于本发明的抗原是指病毒组分的抗原部分，它引起免疫应答，并可包含具有与 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列。

可选择地，抗原可包含具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列或其片段共有 95%以上核苷酸同源性的 gB 蛋白。

可选择地，抗原可包含具有 SEQ ID NO.3 的氨基酸序列或其片段共有 95%以上核苷酸同源性的 gC 蛋白。

本发明所用的术语“活疫苗”指的是以毒力已经减弱但仍可在宿主体内或细胞上复制的病毒制备的疫苗。本发明所用的术语“减毒”用于指以使病原丧失致病性、但保持免疫原性的方式对基因进行突变来人工降低病原体毒性。通常，通过 UV 辐射、化学处理或体外连续高阶继代培养

实现减毒。人工的基因改变，例如将已知序列中的特定核苷酸缺失以使毒力减弱。

所用的术语“灭活疫苗”，也称作失活疫苗，指的是用作抗原以产生免疫力的灭活病毒的混悬液。灭活疫苗的例子包括全病毒疫苗和裂解型疫苗。使用已知方法可以很容易地产生灭活疫苗。例如，通过用甲醛溶液处理病毒可获得全病毒灭活疫苗。裂解型疫苗可在用醚处理后由病毒包膜制备得到。

术语“亚单位疫苗”指的是利用基因工程方法将病原体的保护性抗原基因克隆到原核或真核表达系统中，使其高效表达而制成的疫苗。它比全病毒疫苗引起副反应的可能性小。例如，表达的猪伪狂犬病病毒的 gD 或 gC 蛋白可用于制备亚单位疫苗。

术语“合成肽疫苗”指的是一种仅含免疫决定簇组分的小肽，即用人工作按天然蛋白质的氨基酸顺序合成保护性短肽，与载体连接后加佐剂所制成的疫苗。

优选地，所述疫苗组合物包括  $\geq 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 的猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物灭活疫苗。

优选地，本发明的疫苗组合物可包含每头份  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 量的猪伪狂犬病病毒。当猪伪狂犬病病毒以少于  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 的量使用时，疫苗不能有效刺激抗体产生。另一方面，超过的量可能是不经济的。

优选地，所述疫苗组合物包括猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物的 25~100 $\mu$ g/剂量 gD 蛋白抗原。

此外，本发明的猪伪狂犬疫苗可与其他失活病原体或抗原组合使用以制备抵抗包括猪伪狂犬病的各种疾病的联合疫苗或复合疫苗。本发明所用的术语“联合疫苗”用于指从本发明的猪伪狂犬病病毒与至少一种不同病毒的病毒混合物制备的疫苗。术语“复合疫苗”指的是从病毒和细菌制备的疫苗。例如，本发明的猪伪狂犬病毒可与猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒和/或副猪嗜血杆菌、支原体混合或组合。

优选地，所述疫苗组合物进一步包括介质、佐剂、赋形剂。

本发明的疫苗组合物还可包含介质、佐剂和/或赋形剂。生理盐水或

蒸馏水可用作介质。用于疫苗组合物的佐剂的例子包括弗氏的不完全佐剂或完全佐剂、氢氧化铝凝胶、植物油或矿物油等。赋形剂的例子包括磷酸铝、氢氧化铝和硫酸铝钾，但不限于此。在实践中，本领域技术人员已知的用于疫苗制备的所有物质均可适用于本发明的疫苗组合物。

本发明的再一目的是提供一种制备所述疫苗组合物的方法，所述制备方法包括增殖培养所述猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株，灭活，加入佐剂，搅拌均匀。

具体地，所述方法为：(1) 将猪伪狂犬病病毒疫苗株接种于各自的易感细胞，并培养所述接种后的易感细胞；收获细胞培养物；

(2) 用甲醛溶液、BPL( $\beta$ -丙内酯)或BEI(二乙烯亚胺)处理来自步骤(1)的病毒；

所述易感细胞可以是传代细胞系，也可以是原代细胞。适合于猪伪狂犬病病毒的易感细胞包括但不限于，ST细胞系(ATCC 编号：CRL-1746)、PK-15细胞系(ATCC 编号：CCL-33)、非洲绿猴肾细胞 Marc-145细胞系(ATCC 编号：CRL-12219)、牛肾细胞MDBK细胞系(ATCC 编号：CCL-22)、牛睾丸传代细胞BT细胞系(ATCC 编号：CRL-1390)、Vero 细胞系(ATCC 编号：CCL-81)、BHK-21 细胞系(ATCC 编号：CCL-10)、猪肾传代细胞系(如：IBRS-2，见例如，DECASTRO, M.P.1964.Behavior offoot and mouth disease virus in cell culture : susceptibility of the IB-RS-2swine cell line.Arquivos Instituto Biologica 31 : 63-78)、兔肾传代细胞系(RK，如：ATCC 编号：CCL-106) 等传代细胞系，或者鸡胚成纤维细胞和猪肾细胞等原代细胞。原代细胞可以通过本领域公知的方法，用动物体内的组织进行分离和制备。

可根据本发明的疫苗组合物制备成口服剂型或非口服剂型。优选的是可通过皮内、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内或硬脑膜外途径给予的非口服剂型。

本发明的又一目的在于提供一种制备所述疫苗组合物的方法，所述方法包括：(1) 克隆所述猪伪狂犬病病毒 gD 蛋白重组基因；(2) 表达所述猪伪狂犬病病毒 gD 重组蛋白；(3) 将所述猪伪狂犬病病毒 gD

蛋白抗原与佐剂按比例混合，乳化。

本发明的又一目的在于提供所述的疫苗组合物在制备预防和治疗猪伪狂犬病病毒相关疾病的药物中的应用。

本文所用的术语“猪伪狂犬病病毒相关疾病”用于指由猪伪狂犬病毒感染引起的疾病。它的例子包括发病仔猪表现出明显的神经症状、昏睡、鸣叫、呕吐、拉稀、体温升高，一旦发病，怀孕母猪可发生流产、产木乃伊胎儿或死胎或繁殖障碍，但不限于此。

本文所用的术语“猪伪狂犬病病毒相关疾病”可以进一步用于指表现为任何年龄的猪都会感染，可在猪群水平传播，潜伏期短（1~2天），发病率在10%~100%之间，发病猪死亡率在10%~100%之间（仔猪死亡率可高达100%），感染后可引起猪只高热（40~42℃，持续3日以上），呼吸困难，腹泻，喘，咳嗽，打喷嚏，后肢麻痹，犬坐，突然倒地，抽搐，侧卧不起，角弓反张，泳状划水，最后衰竭而死，并可引起种公猪精液质量下降，怀孕母猪流产（高达35%），早产，死胎，弱仔（弱仔14日龄前全部死亡）等繁殖障碍症状，但不限于此。上述症状与现有技术中感染了普通猪伪狂犬病病毒后产生的症状差异在于：感染了后会造造成感染后成年猪（体重在50kg以上猪）可引起猪只高热（40~42℃，持续3日以上），呼吸困难，腹泻，喘，咳嗽，打喷嚏，后肢麻痹，犬坐，突然倒地，抽搐，侧卧不起，角弓反张，泳状划水，最后衰竭而死；新生及4周龄以内的仔猪突然发病，发生大批死亡，死亡率达90%以上；发病仔猪主要表现为体温上升达41℃以上，食欲废绝，伴有明显的神经症状和腹泻；断奶前后仔猪主要为呼吸系统症状，表现呼吸困难、咳嗽、流鼻涕等。

本文所用的术语“预防”指通过给予根据本发明的疫苗组合物抑制猪伪狂犬感染或推迟疾病发作的所有行为。术语“治疗”指通过给予根据本发明的疫苗组合物使猪伪狂犬病病毒感染引起的症状减轻或转好的所有行为。

## 附图说明

图 1 为 HN1201 株 gC 氨基酸序列与 SA215 株 gC 氨基酸序列同源分析结果;

图 2 为 HN1201 株 gD 氨基酸序列与 SA215 株 gD 氨基酸序列同源分析结果。

序列表中:

序列 1 为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 gD 氨基酸序列;

序列 2 为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 gB 氨基酸序列;

序列 3 为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 gC 氨基酸序列;

序列 4 为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 gD 核苷酸序列;

序列 5 为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 gB 核苷酸序列;

序列 6 为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 gC 核苷酸序列。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

本发明中的术语“头份”是指每头猪注射的疫苗量。

本发明中所述的“TCID<sub>50</sub>”(50% tissue culture infective dose)是指半数细胞培养物感染量,是表示病毒感染力的一种表示方式。

MEM液体培养基(液)用购自美国Life Technologies公司的MEM干粉培养基按照其说明书配制。

本发明的DMEM培养基参照GB/T18641-2002附录A配制方法配制。

本发明中所述的“PBS”是指磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)的英文缩写,本发明中使用的是0.01mM的pH7.4的PBS,按《分子克隆》第三版所述配制。

### **实施例 1、病毒的采集分离**

从来自河南的疑似猪伪狂犬感染的样本中分离样本无菌采集猪脑组织，以 1:10 (体积比) 加入 MEM 培养液，研磨，制备组织悬液，经反复 3 次冻融后，2000r/min 离心 15min，收集上清液，再经 0.2 $\mu$ m 滤膜滤器过滤，在 PK-15 细胞上传代 37 $^{\circ}$ C 培养 1h，换加含 2% 犊牛血清的 MEM 培养液，37 $^{\circ}$ C 培养 5 日。收获含毒培养液，经 2 次冻融后，收毒，换加含 2% 犊牛血清的 MEM 培养液。采用猪伪狂犬病病毒 PCR 检测试剂盒(北京世纪元亨动物防疫技术有限公司)检测猪伪狂犬病病毒，结果为阳性；对分离的病毒利用 PCR 试剂盒进行外源病毒的检测(猪蓝耳病病毒 RT-PCR 检测试剂盒、猪细小病毒 PCR 检测试剂盒猪瘟病毒 RT-PCR 检测试剂盒均为北京世纪元亨动物防疫技术有限公司产品)，PCR 检测结果均为阴性，表明毒种纯净。

将分离到的伪狂犬病毒提交保藏，所述猪伪狂犬病病毒株为 HN1201 株 (Pseudorabies virus, strain HN1201)，保藏号为 CCTCC NO. V 201311；保藏于中国典型培养物保藏中心；保藏地址为湖北省武汉武汉大学，保藏日期为 2013 年 5 月 20 日。

## 实施例 2、分离病毒的遗传特性

通过基因分析来确定实施例 1 中分离的病毒的遗传特性。利用在 PK15 细胞上分离的猪伪狂犬病病毒基因组 DNA 做模板，使用表 1 所示的引物进行 PCR。分别使用 Primer Premier 5.0 来设计用于扩增 gB、gC、gD 基因的引物序列。

以提取的基因组 DNA 为模板，制备 PCR 扩增体系如下：模板 DNA 100 $\mu$ g，PrimerSTAR HS DNA Polymerase (2.5U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l，2 $\times$ PrimerSTAR GC Buffer 25 $\mu$ l，上下游引物各 1 $\mu$ l (10pmol/ $\mu$ l)，dNTP Mix (2.5mM each) 4 $\mu$ l，并用蒸馏水将体积补足 50 $\mu$ l。进行两步 PCR 反应：在 98 $^{\circ}$ C 变性 10 sec，然后在 68 $^{\circ}$ C 退火和延伸（按照 1kb/min 计算所需时间），共 30 个循环。在 4 $^{\circ}$ C 终止 PCR 反应。通过在含有溴化乙锭的 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析所得的 PCR 产物。PCR 产物进行序列测定。用 Lasergene 软件分析所得到的序列数据。

表1 PCR引物序列

靶基因	引物序列 (5' → 3' )	PCR产物大小
gB	aagcgcacatctttattgtttcccg	2957 bp
	ggcttctaccgcttccagacgg	
gC	accgtcgccatgtgcgccacta	1603 bp
	cgggtcggactcgctgtcgtttatt	
gD	ttccatacactcacctgccagc	1250 bp
	tcgacgccggtactgcggag	

**实施例 3、病毒的致病性试验**

3.1 不同日龄仔猪的致病性

将 34~35 日龄猪伪狂犬病抗体阴性仔猪 6 头随机分成 2 组，4 头/组（试验组）和 2 头/组（对照组），滴鼻接种猪伪狂犬病病毒 HN1201 株（攻毒剂量为  $2 \times 10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/头），对照组接种 DMEM 培养基；同时将 4 头 49 日龄仔猪接种保藏后培养 3 代的强毒 HN1201 株（攻毒剂量为  $2 \times 10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/头），仍以 35 日龄仔猪作为对照。病毒接种后，每日测定仔猪体温，观察临床症状和死亡情况，具体结果见表 2。

表 2 猪伪狂犬强毒 HN1201 株对不同日龄仔猪的致病性

组别	编号	日龄	接种剂量	临床症状	死亡情况
1	A1	35 日龄	$2 \times 10^{8.0}$ TCID <sub>50</sub> /头	体温升高，精神沉郁，食量降低，出现呼吸道和/或神经系统症状	攻毒后 4 天死亡
	A2				攻毒后 5 天死亡
	A3				攻毒后 5 天死亡
	A4				攻毒后 6 天死亡
2	B1	49 日龄	$2 \times 10^{8.0}$ TCID <sub>50</sub> /头	体温升高，精神沉郁，	攻毒后 7 天死亡
	B2	龄			攻毒后 7 天死亡

	B3			食量降低， 出现呼吸道 和/或神经系 统症状	攻毒后 5 天死亡
	B4				耐过存活
3	C1	35 日	DMEM 对	正常	存活
	C2	龄	照		存活

结果显示，猪伪狂犬病病毒 HN1201 株接种不同日龄的仔猪均可导致仔猪发病，且可导致 3/4 以上的仔猪死亡。

3.2 不同剂量对仔猪的致病性

将 49 日龄猪伪狂犬抗体阴性仔猪 8 头随机分成 2 组，每组 4 头，另取 2 头仔猪作为对照。实验组分别滴鼻接种  $2 \times 10^{7.0} \text{TCID}_{50}$ /头和  $2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}$ /头猪伪狂犬病病毒 HN1201 株，对照组接种 DMEM 培养基。病毒接种后，每日测定仔猪体温，观察临床症状和死亡情况，具体结果见表 3。

表 3 不同剂量猪伪狂犬病病毒 HN1201 株对仔猪的致病性

组别	编号	接种剂量	临床症状	死亡情况
1	A1	$2 \times 10^{7.0} \text{TCID}_{50}$ /头	明显的临床症状：体温 升高，精神沉郁，食量 降低	攻毒后 5 天死亡
	A2			攻毒后 6 天死亡
	A3			攻毒后 6 天死亡
	A4			攻毒后 6 天死亡
2	B1	$2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}$ /头	明显的临床症状：体温 升高，精神沉郁，食量 降低	攻毒后 2 天死亡
	B2			攻毒后 3 天死亡
	B3			攻毒后 4 天死亡
	B4			攻毒后 4 天死亡
3	C1	DMEM 对照	正常	存活
	C2			存活

结果显示，猪伪狂犬病病毒临床分离 HN1201 以不同剂量接种 49

日龄的仔猪，均可导致仔猪发病，且 4/4 的仔猪死亡。

#### 实施例 4、猪伪狂犬病病毒灭活苗的制备

将按照表 4 将所分离的毒株的不同代次的培养物接种于 PK-15 细胞培养物先形成种子批，然后按病毒培养液量的 1% (V/V) 接入形成单层的 PK 细胞培养物中，置 37℃ 旋转培养，当病变达到 80% 时，收获含毒细胞培养液，经 2 次冻融后，收毒，测定毒价。分别向不同代次病毒液中加入 10% (v/v) 甲醛溶液使甲醛的终浓度为 0.2% (V/V)，37℃ 灭活 18 小时，每 4 小时搅拌 1 次，每次搅拌 10min，灭活后病毒液用 PH7.4 的 PBS 液稀释至表 4 所示的病毒含量然后与 206 佐剂（法国 SEPPIC 公司产品）按照体积比 54:46 混合，在 30℃ 条件下 120 转/分钟搅拌 15 分钟。

表 4 各组别猪伪狂犬疫苗的制备

组别	HN1201 培养物代次	灭活前病毒含量	疫苗配比（灭活病毒液：206 佐剂）
A	HN1201 培养 5 代	$10^{8.43}$ TCID <sub>50</sub> /ml	54:46
B	HN1201 培养 35 代	$10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /ml	54:46

#### 实施例 5、灭活疫苗免疫原性实验

将 21 日龄 PRV 抗体阴性仔猪 16 头随机分成 4 组，4 头/组，按照表 4 注射疫苗灭活苗组注射实施例 4 制备的疫苗免疫猪伪狂犬灭活疫苗 2ml/头，对照疫苗采用 CN101186902 方法制备的猪伪狂犬活疫苗 SA215 株，按照其专利说明书免疫原性测定方法的使用，对照组接种 DMEM 培养基 2ml/头。免疫后 28 日后攻毒，攻毒剂量为 HN1201 株猪伪狂犬病病毒  $2 \times 10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/头，攻毒后每日测定仔猪体温，观察临床症状和死亡情况（结果见表 5）

表 5 免疫原性试验动物分组

组别	注射疫苗	免疫剂量
----	------	------

灭活苗 A	实施例 4 制备的疫苗组别 A	2ml/头
灭活苗 B	实施例 4 制备的疫苗组别 B	2ml/头
活疫苗 SA215	猪伪狂犬病病毒活疫苗	$10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> /头
对照组	DMEM 培养基	2ml/头

疫苗免疫后，每周参照 GB/T18641-2002 方法血清中和试验的方法测定灭活疫苗组的中和抗体效价，结果见表 6。

表 6 猪伪狂犬灭活疫苗免疫仔猪后不同时间的抗体情况

组别	不同时间（周）中和抗体效价的平均值			
	1	2	3	4
灭活苗 A	1:4.8	1:11.2	1:16.0	1:37.7
灭活苗 B	1:4.0	1:6.3	1:13.5	1:22.4
活疫苗	1:3.7	1:4.0	1:10.0	1:16.0
对照组	阴性	阴性	阴性	阴性

表 6 的结果显示，猪伪狂犬灭活疫苗免疫仔猪后，能产生较高的中和抗体，且随免疫时间逐渐升高。

免疫后 28 日后攻毒，攻毒剂量为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株猪伪狂犬病病毒  $2 \times 10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/头，观察临床症状和死亡情况见表 7，攻毒后每日测定仔猪体温见表 8。

表 7 猪伪狂犬灭活疫苗免疫仔猪后的攻毒情况

组别	临床症状及死亡情况	保护率
灭活苗 A	体温升高 2-3 天，食欲正常，基本没有精神症状，存活	100% (4/4)
灭活苗 B	体温升高 2-3 天，食欲正常，基本没有精神症状，存活	100% (4/4)
活疫苗	体温升高 7-10 天，食欲降低，有明显的精神症状，存活	100% (4/4)

对照组	有明显的症状，攻毒后 2 天死 2 头，3 天全部死亡	100% (0/4)
-----	-----------------------------	------------

表 8 猪伪狂犬疫苗免疫的仔猪攻毒后仔猪体温变化

天数	灭活苗 A 组	灭活苗 B 组	活疫苗组
攻毒后 1 天	39.5	39.6	39.4
攻毒后 2 天	41.2	41.6	41.8
攻毒后 3 天	40.5	40.3	41.2
攻毒后 4 天	40.2	39.7	41.6
攻毒后 5 天	39.7	39.5	41.4
攻毒后 6 天	39.6	39.4	41.3
攻毒后 7 天	39.7	39.5	41.4
攻毒后 8 天	39.5	39.7	41.2
攻毒后 9 天	39.6	39.4	41.5
攻毒后 10 天	39.2	39.5	40.6
攻毒后 11 天	39.5	39.7	39.7
攻毒后 12 天	39.4	39.5	39.8
攻毒后 13 天	39.3	39.4	39.7
攻毒后 14 天	39.2	39.1	39.4

表 7 和表 8 的结果显示，猪伪狂犬灭活疫苗免疫仔猪后，虽然不能阻断病毒感染（出现临床症状），但能为仔猪提供 100% (4/4) 保护，而对照仔猪攻毒后 4 日后全部死亡，因此，猪伪狂犬灭活疫苗具有很好的保护力。另外相对于对照组活疫苗，灭活疫苗免疫组的仔猪体温升高时间更短，食欲基本正常，并且基本没有临床症状，显示出很好的免疫保护。

## 实施例 6、猪伪狂犬 gD 蛋白的制备

### 1. PRV gD 基因的扩增

在生长良好的 PK15 细胞上接种 PRV HN1201 病毒或其不同代次的培养物（猪伪狂犬病病毒株为 HN1201 株（Pseudorabies virus, strain HN1201），保藏号为 CCTCC NO. V 201311；保藏于中国典型培养物保藏中心；保藏地址为中国武汉·武汉大学，保藏日期为 2013 年 5 月 20 日），该不同代次的培养物为 5-35 代以内的培养物，收获病毒后用 TAKARA 公司 MiniBEST Viral RNA/ DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒提取 PRV 基因组 DNA。取 1 $\mu$ l 基因组 DNA 作为模板，利用 gD 特异性引物：

gDSF: 5' ATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGC 3'和

gDSR: 5' CTACGGACCGGGCTGCGCTTTTAG3'

进行 PCR 扩增，利用 TAKARA 的高保真酶 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase with GC Buffer，扩增条件为：94°C 3min；94°C 30 s，68°C 90 s，30 cycles；72°C 5min。PCR 产物命名为 gD。其核苷酸序列见 SEQNO.4，推导其氨基酸序列为 SEQNO.1。

## 2. 重组 Bacmid 的获取及鉴定

将高保真酶扩增获得的 PCR 产物 gD 克隆至 pFastBac/HBM-TOPO 载体（购自 Invitrogen 公司，货号 A11339），克隆体系如下：PCR 产物 gD 4 $\mu$ l，Salt solution（盐溶液）1 $\mu$ l，TOPO vector 1 $\mu$ l，共 6 $\mu$ l。混合均匀，室温孵育 5min，转化 One ShotR Mach1™T1R 感受态细胞，涂布氨苄青霉素抗性平板，挑取单克隆鉴定 gD 基因的插入方向，插入方向正确的质粒送 Invitrogen 公司测序，鉴定 gD 序列的正确性。测序正确的质粒命名为 pFastBac/HBM-TOPO-gD。

pFastBac/HBM-TOPO-gD 质粒转化 DH10Bac 感受态细胞（来源），pFastBac/HBM-TOPO-gD 和感受态细胞中的穿梭质粒 Bacmid 进行转座，用 Invitrogen 的 PureLink HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit 提取获得的重组质粒，并用 pUCM13 Forward/pUCM13 Reverse 引物鉴定 gD 的插入，阳性 Bacmid 命名为 Bacmid-gD。

## 3. 转染获得重组杆状病毒

按照 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac HBM TOPO Secreted Expression System 的说明书提供的方法进行。6 孔板每孔铺  $8 \times 10^5$  个 sf9 细胞，待

细胞贴壁后按照 Cellfectin II 转染试剂的说明书进行转染：分别稀释 8 $\mu$ l Cellfectin II 和 1 $\mu$ g Bacmid-gD DNA 到 100  $\mu$ l SF-900 II 培养基中，Vortex 混匀，混合稀释后的 DNA 与稀释后的 Cellfectin II (总体积~210 $\mu$ l)，混合均匀室温孵育 15~30min，一滴滴加到细胞中。转染后 72h 待出现细胞病变后，收集细胞培养上清，记为 P0 代重组病毒 vBac-gD。P0 代重组病毒 vBac-gD 感染 sf9 细胞，经 3 代扩大培养后，获得的 P3 代 vBac-gD 用于重组蛋白表达。

#### 4. 重组杆状病毒感染 High-five 细胞获得重组蛋白

将 P3 代重组杆状病毒 vBac-gD 接种 High-five 细胞(购自 Invitrogen, 货号 B85502)。在 500ml 三角瓶中悬浮培养 High-five 细胞，至细胞密度达到  $7.0 \times 10^5$  cell/ml 后，按照 1 MOI 的量接种病毒，感染后 72h 收取细胞培养上清。利用 Millipore 的切向流过滤系统将体积浓缩为原来体积的 1/10。用 1% (体积比) 的 Triton X-100 (购自 sigma) 灭活杆状病毒，SDS-PAGE 光密度法测定蛋白含量为 200 $\mu$ g/ml。

### 实施例 7、猪伪狂犬给 gD 亚单位疫苗的制备

将实施例 6 制备的亚单位抗原，用 PBS 液 (pH 7.4) 稀释至表 9 的体积与 206 佐剂 (法国 SEPPIC 公司产品) 按照体积比 54:46 混合，在 30 $^{\circ}$ C 条件下 120 转/分钟搅拌 15 分钟。

表 9 各组别猪伪狂亚单位疫苗的制备

组别	蛋白含量	疫苗配比 (灭活病毒液: 206 佐剂)
A	25 $\mu$ g/ml	54:46
B	100 $\mu$ g/ml	54:46

### 实施例 8、疫苗对猪的免疫原性实验

将 21 日龄 PRV 抗体阴性仔猪 12 头随机分成 3 组，4 头/组，按照表 2 注射实施例 2 制备的疫苗，免疫猪伪狂犬病病毒亚单位疫苗 2ml/头。对照组接种 DMEM 培养基 2ml/头。免疫后 28 日后攻毒，攻毒剂量为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株  $2 \times 10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/头，攻毒后每日测定仔猪体温，观察临床

症状和死亡情况（结果见表10）。

表 10 免疫原性试验动物分组

组别	注射疫苗	免疫剂量
亚单位疫苗 A	实施例 2 制备的疫苗组别 A	2ml/头
亚单位疫苗 B	实施例 2 制备的疫苗组别 B	2ml/头
对照组	DMEM 培养基	2ml/头

免疫后 28 日后攻毒，攻毒剂量为猪伪狂犬病病毒 HN1201 株  $2 \times 10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/头，观察临床症状和死亡情况见表 11，攻毒后每日测定仔猪体温见表 12。

表 11 猪伪狂犬病病毒亚单位疫苗免疫仔猪后的攻毒情况

组别	临床症状及死亡情况	保护率
亚单位苗 A	体温升高 2-3 天，食欲正常，基本没有精神症状，存活	100%( 4/4 )
亚单位苗 B	体温升高 2-3 天，食欲正常，基本没有精神症状，存活	100%( 4/4 )
对照组	有明显的症状，攻毒后 2 天死 2 头，3 天全部死亡	0% ( 0/4 )

表 12 猪伪狂犬病病毒亚单位疫苗免疫的仔猪攻毒后仔猪体温变化

天数	灭活苗 A 组	灭活苗 B 组
攻毒后 1 天	39.5	39.5
攻毒后 2 天	41.2	41.6
攻毒后 3 天	40.3	40.2
攻毒后 4 天	40.1	39.7
攻毒后 5 天	39.6	39.5
攻毒后 6 天	39.6	39.3
攻毒后 7 天	39.6	39.5

攻毒后 8 天	39.5	39.4
攻毒后 9 天	39.5	39.6
攻毒后 10 天	39.2	39.3
攻毒后 11 天	39.3	39.4
攻毒后 12 天	39.4	39.4
攻毒后 13 天	39.2	39.4
攻毒后 14 天	39.2	39.1

表 11 和表 12 的结果显示,猪伪狂犬病病毒亚单位疫苗免疫仔猪后,虽然不能阻断病毒感染(出现临床症状),但能为仔猪提供 100%(4/4)保护,而对照仔猪攻毒后 4 日后全部死亡,显示出很好的免疫保护。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

## 权 利 要 求 书

1、一种核苷酸序列，所述核苷酸序列实质上编码序列表 SEQ ID NO.1 所示的蛋白。

2、一种核苷酸序列，所述核苷酸序列实质上编码序列表 SEQ ID NO.2 所示的蛋白。

3、一种核苷酸序列，所述核苷酸序列实质上编码序列表 SEQ ID NO.3 所示的蛋白。

4、一种猪伪狂犬病病毒株，其中，所述猪伪狂犬病病毒株具有序列表 SEQ ID NO.4 所示的核苷酸序列编码的 gD 糖蛋白。

5、根据权利要求 4 所述的猪伪狂犬病病毒株，其中，所述猪伪狂犬病病毒株具有序列表 SEQ ID NO.5 所示的核苷酸序列编码的 gB 糖蛋白。

6、根据权利要求 5 所述的猪伪狂犬病病毒株，其中，所述猪伪狂犬病病毒株为 HN1201 株或其培养物，保藏号为 CCTCC NO. V 201311；保藏于中国典型培养物保藏中心；保藏地址为湖北省武汉·武汉大学，保藏日期为 2013 年 5 月 20 日。

7、一种疫苗组合物，所述疫苗组合物包括免疫量的权利要求 4~6 任一项所述的猪伪狂犬病病毒株的减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、合成疫苗或基因工程疫苗；优选地，所述疫苗组合物包括免疫量的所述猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物的减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、合成疫苗或基因工程疫苗。

8、一种疫苗组合物，所述疫苗组合物包括免疫量的权利要求 5 所述的猪伪狂犬病病毒株的减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、合成疫苗或基因工程疫苗；优选地，所述疫苗组合物包括免疫量的所述猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物的减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗、合成疫苗或基因工程疫苗。

9、根据权利要求 8 所述的疫苗组合物，其中，所述疫苗组合物包括  $\geq 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 的猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物灭活疫苗。

10、根据权利要求 8 所述的疫苗组合物，其中，所述疫苗组合物包括猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物的 25~100 $\mu$ g/剂量 gD 蛋白抗原。

11、根据权利要求 7~10 任一项所述的疫苗组合物，其中，所述疫苗组合物进一步包括介质、佐剂、赋形剂。

12、一种制备权利要求 8 所述疫苗组合物的方法，所述制备方法包括增殖培养所述猪伪狂犬病病毒株 HN1201 株或其培养物，灭活，加入佐剂，搅拌均匀。

13、一种制备权利要求 8 所述疫苗组合物的方法，所述方法包括：

- (1) 克隆所述猪伪狂犬病病毒 gD 蛋白重组基因；
- (2) 表达所述猪伪狂犬病病毒 gD 重组蛋白；
- (3) 将所述猪伪狂犬病病毒 gD 蛋白抗原与佐剂按比例混合，乳化。

14、根据权利要求 7~10 任一项所述的疫苗组合物在制备预防和治疗猪伪狂犬病病毒相关疾病的药物中的应用。

Majority	MASLARAMLALLALYTAIAIAAAPSSTTALGTTPNGGGGGSSAGELSPSPSTPEPVSGTTGAAASTPAAVSTPRVPPPSVSRKPKQRMGRTRVHGDKA	
	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100	
HN1201 gC pro.pro	MASLARAMLALLALYTAIAIAAAPSSTTALGTTPNGGGGGSSAGELSPSPSTPEPVSGTTGAAASTPAAVSTPRVPPPSVSRKPKQRMGRTRVHGDKA	100
gC SA215 pro.pro	.....	100
Majority	TSHGRKRIVCRERLFSARVGDVAVFGCAVVPRACTEFVRFYRGRFRSPDADPEYFDEPPRPPELPRERLLFSSANASLAHADALASAVVVEGERATVAN	
	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200	
HN1201 gC pro.pro	TSHGRKRIVCRERLFSARVGDVAVFGCAVVPRACTEFVRFYRGRFRSPDADPEYFDEPPRPPELPRERLLFSSANASLAHADALASAVVVEGERATVAN	200
gC SA215 pro.pro	.....	200
Majority	VSGEYSVRVAAAADAETEGVYTWVLSANGTEVRSANVSLVLYSQPEFGLSAPPVLFGEPPFAVVCVVRDYYPRRSVRLRWFADEHPVDAAFVITNSTVADEL	
	210 220 230 240 250 260 270 280 290 300	
HN1201 gC pro.pro	VSGEYSVRVAAAADAETEGVYTWVLSANGTEVRSANVSLVLYSQPEFGLSAPPVLFGEPPFAVVCVVRDYYPRRSVRLRWFADEHPVDAAFVITNSTVADEL	300
gC SA215 pro.pro	.....	300
Majority	GRRTVSVVMVTRADVPLAAADDADALAPSLRCEAVWYRDSVASQRFSEALRPHVYHPAAVSVRFVGEFVAVCDGLCVPEARLAWSDHAADTVYHLGAC	
	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400	
HN1201 gC pro.pro	GRRTVSVVMVTRADVPLAAADDADALAPSLRCEAVWYRDSVASQRFSEALRPHVYHPAAVSVRFVGEFVAVCDGLCVPEARLAWSDHAADTVYHLGAC	400
gC SA215 pro.pro	.....	400
Majority	AEHPGLLNVR SARPLSDLDGPDVYTCRLEGMPSQLPIFEDTQRYDASPTSVSVPVVTSMITVIAGIAIALAIVLVMATCYYYRAGL-	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
HN1201 gC pro.pro	AEHPGLLNVR SARPLSDLDGPDVYTCRLEGMPSQLPIFEDTQRYDASPTSVSVPVVTSMITVIAGIAIALAIVLVMATCYYYRAGL	488
gC SA215 pro.pro	.....	488

图 1

Majority	MLLAALLAALVARITTLGADVAVPAFTFPFPAYPYTESWQLTLTTVSPFVGPADVYHTRPLEDPCEVVALISDQVDRLLNEAVAHRRPTTYRAHVAWYRIADGC	
	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100	
HN1201 gD pro.pro	MLLAALLAALVARITTLGADVAVPAFTFPFPAYPYTESWQLTLTTVSPFVGPADVYHTRPLEDPCEVVALISDQVDRLLNEAVAHRRPTTYRAHVAWYRIADGC	105
gD SA215 pro.pro	.....	105
Majority	AHLLYFIEYADCDPRQIFGRCCRRTTPMWTSPADYMFTEDELGLLMVAPGRFNEGQYRRLVSVDGVMILTFMVALPEGQECPFARVVDQHRTYKFGACWSDDS	
	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210	
HN1201 gD pro.pro	AHLLYFIEYADCDPRQIFGRCCRRTTPMWTSPADYMFTEDELGLLMVAPGRFNEGQYRRLVSVDGVMILTFMVALPEGQECPFARVVDQHRTYKFGACWSDDS	210
gD SA215 pro.pro	.....	210
Majority	FKRGVDVMRFLTFFYQPPHREVVNWYRKNGRTRLPRAYAAATPYAIDPARPSAGSPRPRPRPRPRPKPEPAPATPAPPGRLEPATRDHAAGCRPTPRPRP	
	220 230 240 250 260 270 280 290 300 310	
HN1201 gD pro.pro	FKRGVDVMRFLTFFYQPPHREVVNWYRKNGRTRLPRAYAAATPYAIDPARPSAGSPRPRPRPRPRPKPEPAPATPAPPGRLEPATRDHAAGCRPTPRPRP	315
gD SA215 pro.pro	.....	315
Majority	ETPHRPFAPPAVVP SGWPQPAEFPFRTTAAAPGVSRRHSVIVGTGTAMGALLVGVCVYIFFRLRGAKGYRLLGGPADADELKAQPGP-	
	320 330 340 350 360 370 380 390 400	
HN1201 gD pro.pro	ETPHRPFAPPAVVP SGWPQPAEFPFRTTAAAPGVSRRHSVIVGTGTAMGALLVGVCVYIFFRLRGAKGYRLLGGPADADELKAQPGP	403
gD SA215 pro.pro	.....	403

图 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2014/076691**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 21/04 (2006.01) i; C07K 14/03 (2006.01) i; C12N 7/00 (2006.01) i; C12N 7/04 (2006.01) i; A61K 39/245 (2006.01) i  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H; C07K; C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNKI, CNABS, CPRSABS, NCBI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT: pseudorabies, PRV, porcine pseudorabies, virus, herpesviridae, suid herpesvirus, vaccine, glycoprotein, antigen, antibody, irnrnune response, gD, gB, gC Genbank, EMBL: sequence search on SEQ ID NOs: 1-6

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN, Zhenhai et al., "Cloning and sequence analysis of gB, gC, gD genes of pseudorabies virus strain Fa", FUJIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, vol. 22, no. 2, 31 December 2007 (31.12.2007), pages 120-125, see page 121, left column, lines 7-9, and right column, section 1.6	1-14
A	CN 102994458 A (HARBIN VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 27 March 2013 (27.03.2013), see description, and claims	1-14
A	CN 102399755 A (SHANGHAI CHUANGHONG BIO-TECH CO., LTD.), 04 April 2012 (04.04.2012), see description, and claims	1-14
A	US 6255078 B1 (PHARMACIA & UPJOHN CO.), 03 July 2001 (03.07.2001), see description, and claims	1-14
A	US 5352596 A (US SEC OF AGRIC), 04 October 1994 (04.10.1994), see description, and claims	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
16 July 2014 (16.07.2014)

Date of mailing of the international search report  
**29 July 2014 (29.07.2014)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**YANG, Yingyue**  
Telephone No.: (86-10) **62412184**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2014/076691**

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102952785 A (JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 06 March 2013 (06.03.2013), see description, and claims	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2014/076691**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102994458 A	27.03.2013	CN 102994458 B	02.04.2014
CN 102399755 A	04.04.2012	CN 102399755 B	20.03.2013
US 6255078 B1	03.07.2001	US 6261563 B1	17.07.2001
US 5352596 A	04.10.1994	None	
CN 102952785 A	06.03.2013	CN 102952785 B	11.12.2013

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07H 21/04(2006.01)i; C07K 14/03(2006.01)i; C12N 7/00(2006.01)i; C12N 7/04(2006.01)i; A61K 39/245(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07H; C07K; C12N; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>DWPI, SIPOABS, CNKI, CNABS, CPRSABS, NCBI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT: 猪伪狂犬病, 伪狂犬病, 病毒, 疱疹病毒, 疫苗, 糖蛋白, 抗原, 抗体, 免疫响应, PRV, porcine pseudorabies, virus, herpesviridae, suid herpesvirus, vaccine, glycoprotein, antigen, antibody, immune response, gD, gB, gC Genbank, EMBL: 针对SEQ ID NO: 1-6进行的序列检索</p>																														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>陈振海等. "伪狂犬病毒Fa株gB、gC、gD基因的克隆与序列分析" 福建农业学报, 第22卷, 卷, 第2期, 期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第120-125页, 参见第121页左栏7-9行, 右栏1.6节</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102994458A (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见说明书及权利要求书全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102399755A (上海创宏生物科技有限公司) 2012年 4月 04日 (2012 - 04 - 04) 参见说明书及权利要求书全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6255078B1 (PHARMACIA &amp; UPJOHN CO) 2001年 7月 03日 (2001 - 07 - 03) 参见说明书及权利要求书全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5352596A (US SEC OF AGRIC) 1994年 10月 04日 (1994 - 10 - 04) 参见说明书及权利要求书全文</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&amp;” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	陈振海等. "伪狂犬病毒Fa株gB、gC、gD基因的克隆与序列分析" 福建农业学报, 第22卷, 卷, 第2期, 期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第120-125页, 参见第121页左栏7-9行, 右栏1.6节	1-14	A	CN 102994458A (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见说明书及权利要求书全文	1-14	A	CN 102399755A (上海创宏生物科技有限公司) 2012年 4月 04日 (2012 - 04 - 04) 参见说明书及权利要求书全文	1-14	A	US 6255078B1 (PHARMACIA & UPJOHN CO) 2001年 7月 03日 (2001 - 07 - 03) 参见说明书及权利要求书全文	1-14	A	US 5352596A (US SEC OF AGRIC) 1994年 10月 04日 (1994 - 10 - 04) 参见说明书及权利要求书全文	1-14	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																												
X	陈振海等. "伪狂犬病毒Fa株gB、gC、gD基因的克隆与序列分析" 福建农业学报, 第22卷, 卷, 第2期, 期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第120-125页, 参见第121页左栏7-9行, 右栏1.6节	1-14																												
A	CN 102994458A (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见说明书及权利要求书全文	1-14																												
A	CN 102399755A (上海创宏生物科技有限公司) 2012年 4月 04日 (2012 - 04 - 04) 参见说明书及权利要求书全文	1-14																												
A	US 6255078B1 (PHARMACIA & UPJOHN CO) 2001年 7月 03日 (2001 - 07 - 03) 参见说明书及权利要求书全文	1-14																												
A	US 5352596A (US SEC OF AGRIC) 1994年 10月 04日 (1994 - 10 - 04) 参见说明书及权利要求书全文	1-14																												
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																													
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																													
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																													
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件																													
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2014年 7月 16日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2014年 7月 29日</p>																													
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>杨莹跃</p> <p>电话号码 (86-10)62412184</p>																													

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102952785A (江苏省农业科学院) 2013年 3月 06日 (2013 - 03 - 06) 参见说明书及权利要求书全文	1-14

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2014/076691

检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
CN	102994458A	2013年 3月 27日	CN	102994458B	2014年 4月 02日
CN	102399755A	2012年 4月 04日	CN	102399755B	2013年 3月 20日
US	6255078B1	2001年 7月 03日	US	6261563B1	2001年 7月 17日
US	5352596A	1994年 10月 04日	无		
CN	102952785A	2013年 3月 06日	CN	102952785B	2013年 12月 11日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)