(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 104073473 A
(43)申请公布日 2014.10.01

(21)申请号 201410145870.8
(22)申请日 2014.04.11
(71)申请人 美国普赛生物高科技有限责任公司
地址 美国马里兰州罗克维尔市帕克路生物医学研究所普赛有限责任公司
申请人 湖南农业大学
(72)发明人 杨毅 雷昕诺 王乃东 邓治邦 湛阳 王爱兵 薛立群 张颜
(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所 43114
代理人 袁靖
(51)Int.Cl.
C12N 7/04(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 15/34(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

一种PCV2病毒样颗粒及其制备方法和裂解及VLP组装缓冲液

(57)摘要

本发明公开了一种PCV2病毒样颗粒及其制备方法和裂解及VLP组装缓冲液。基于自主优化设计，并人工合成适合在原核表达系统中高效表达的PCV2核衣壳蛋白基因，通过大肠杆菌原核表达系统表达PCV2核衣壳蛋白的全长基因序列，并利用其可溶性核衣壳蛋白在特定条件下高效自体组装成了病毒样颗粒。本发明创新点主要在于采用不同于常规的真核表达系统获取VLPs方法，而是利用原核表达系统获取PCV2VLPs，本方法成本低廉、简单高效，适合大规模产业化应用；其中还应用到独创的既可以促进菌体裂解又能适合VLPs自体组装的双功能于一体的缓冲液配方；另外发明所获得的PCV2病毒样颗粒与野生型病毒外形相似度高，并且免疫原性好，可以用于研发具有应用潜力的猪圆环病毒的亚单位疫苗及药物传递载体。

CN 104073473 A

1. 一种 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，依次包括以下步骤：

1）选取利用密码子的兼并性，人工合成的适合于原核表达的编码 PCV2 核衣壳蛋白全长基因；

2）将基因序列与表达质粒载体重组得到的重组质粒转化大肠杆菌，然后加入 IPTG，使得体系中其浓度为 0.1-1mM，并在 25-37℃进行诱导表达；

3）将诱导表达 PCV2 核衣壳蛋白时获取的细菌沉淀用以下配方的裂解及 VLP 组装缓冲液重悬，超声处理，离心收集上清，树脂吸附目的蛋白，然后从树脂上洗脱目的蛋白；所述的裂解及 VLP 组装缓冲液配方为：0.1M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、0.1M Na_2HPO_4、20mM Imidazole、10mM Tris-base、300mM NaCl、50mM KCl、2mM $MgCl_2$、0.1M Ammonium citrate、2%Glycerine、0.5%Triton X-100、5mMβ-Me、0.1mM PMSF、1U/mL Leupeptin Protease inhibitor；其中 Triton X-100、β-Me、PMSF、Leupeptin Protease inhibitor 现用现加，缓冲液 pH8.0，余量为纯水。

2. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，所述的利用密码子的兼并性，人工合成的适合于原核表达的编码 PCV2 核衣壳蛋白全长基因见 SEQ NO.1 所示。

3. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，步骤 2)所述的表达质粒载体为 pET100_D/TOPO。

4. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，步骤 2）中 IPTG 在体系中的浓度为 1mM。

5. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，步骤 2)的诱导表达温度为 30℃。

6. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，步骤 3)按照 1 升大肠杆菌培养物用 100mL 裂解及组装缓冲液的比例重悬，冰上静置至少 5 分钟；然后将重悬液样品在冰上进行超声裂解至少 10 分钟；将超声裂解所获得的裂解样品进行离心，大于 12000 转 / 分钟，4℃离心 10-30 分钟收集上清。

7. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，将离心所获得的上清液与 Ni-NTA His • Bind 树脂结合，上清和树脂填料的体积比为 20:1；4℃轻微震荡结合至少 60 分钟；以 10 倍柱体积洗涤液漂洗；最后用洗脱液洗脱目的蛋白。

8. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 病毒样颗粒的制备方法，其特征在于，将洗脱的目的蛋白放入裂解及组装缓冲液中进行隔夜透析。

9. 一种 PCV2 病毒样颗粒，其特征在于，是由权利要求 1-8 任一项所述的方法制备获得。

10. 一种 PCV2 病毒样颗粒所用的裂解及 VLP 组装缓冲液，其特征在于，配方为：0.1M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、0.1M Na_2HPO_4、20mM Imidazole、10mM Tris-base、300mM NaCl、50mM KCl、2mM $MgCl_2$、0.1M Ammonium citrate、2%Glycerine、0.5%Triton X-100、5mMβ-Me、0.1mM PMSF、1U/mL Leupeptin Protease inhibitor；其中 Triton X-100、β-Me、PMSF、Leupeptin Protease inhibitor 现用现加，缓冲液 pH8.0，余量为纯水。

一种PCV2病毒样颗粒及其制备方法和裂解及VLP组装缓冲液

技术领域

[0001] 本发明属于猪圆环病毒疫苗研究技术领域，具体涉及一种PCV2病毒样颗粒的制备方法、及该方法制备得到的病毒样颗粒，还有方法中用到的裂解及VLP组装缓冲液。

背景技术

[0002] 猪圆环病毒二型(porcine circovirus type2,PCV2)属于圆环病毒科，直径约为17nm,无囊膜,二十面体对称,共价闭合环状单股DNA病毒。PVC2是引起仔猪断奶后多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome,PMWS)的主要病原,还会导致育肥猪皮炎与肾病综合征(porcine dermatis and nephropathy syndrome,PDNS)、猪呼吸道综合征(porcine respiratory disease complex,PRDC)、新生仔猪的腹泻病等综合征以及猪体内免疫抑制,很难进行有效的药物治疗,此外，PVC2常与诸多病原并发或继发感染,无疑为PVC2感染的准确诊断及有效防控增加了难度。PVC2该病毒目前已经在世界主要养猪生产大国的猪群中广泛传播,并已造成巨大的经济损失,建立高效预防方法对病毒的综合防控具有重要意义。

[0003] 猪圆环病毒疫苗的研制成功于2006年并开始在北美应用,给全球养猪业带来了福音;2009年勃林格猪圆环病毒疫苗在中国首家注册成功和2010年第一个上市,2010年下半年国产疫苗的陆续上市。目前的亚单位疫苗就是将PCV2基因组中编码免疫原性蛋白的ORF2片段插入到昆虫杆状病毒中,通过培养昆虫杆状病毒而快速、大量获得具备免疫原性的PCV2核衣壳蛋白,再将其制备成疫苗。如勃林格殷格翰动物保健(美国)有限公司的FLEX系列茵格发猪圆环病毒疫苗和英特威/先灵葆雅动物保健公司的PCV2疫苗。还有一种是嵌合病毒灭活苗,原理是用PCV2的ORF2片段置换为不致病的PCV1中的ORF2片段,即获得了PCV1-PCV2嵌合病毒,具有与PCV2类似的免疫原性。辉瑞/富道动物保健公司研制的PCV2疫苗即是采用了这种技术。全病毒PCV2灭活疫苗,由于PCV2难培养、生长慢及难灭活,培养成本高,生产周期长,所以多数动物保健公司采用成熟的分子生物技术生产亚单位疫苗。目前在国外只有梅里亚动物保健公司生产全病毒灭活疫苗,适用于母猪免疫。已经注册的国产圆环病毒疫苗均为全病毒灭活疫苗。2010年分别由哈尔滨兽医研究所用LG株、南京农业大学用SH株研制而成的“圆克清”。由哈尔滨维科生物技术开发公司、上海海利生物药品有限公司生产出猪圆环病毒2型LG株全病毒灭活疫苗“圆毕净”;由洛阳普莱柯生物工程有限公司、江苏南农高科技股份有限公司生产出猪圆环病毒2型SH株全病毒灭活疫苗,2011北京大北农集团研发出“诸欢泰”。以上全病毒培养物在灭活前的病毒含量约$10^{5.5-6.0}TCID_{50}/mL$。应用的灭活剂为甲醛溶液(福尔马林)。在国际上应用PK-15传代细胞培养PCV2的最高含量很难超过$10^{3.5}TCID_{50}/mL$,而国内应用微载体细胞悬浮培养技术,使抗原效价提高了100多倍。抗原蛋白纯化是减少疫苗过敏反应的重要一环,国产疫苗亟待提高纯化工艺,以达到无超量杂质蛋白。

[0004] 中国猪圆环病毒疫苗市场情况汇总

[0005]

公司	疫苗名称	抗原成分	类型
梅里亚（法国）	Cirovac®	灭活的 PCV2a 全病毒	灭活疫苗
勃林格（美国）	Ingelvac®	PCV2a-Cap 蛋白	亚单位疫苗
英特威（荷兰）	Circumvent®	PCV2a-Cap 蛋白	亚单位疫苗
先灵葆雅（美国）	Porcilis®PCV	PCV2a-Cap 蛋白	亚单位疫苗
富道/辉瑞（中国）	Suvaxyn®PCV2	灭活的 PCV1-2 嵌合病毒	灭活疫苗
海利/维科（中国）	圆毕净	灭活的 PCV2a 全病毒	灭活疫苗
南农高科/普莱柯（中国）	圆克清/圆健	灭活的 PCV2b 全病毒	灭活疫苗
北京大北农（中国）	诸欢泰	灭活的 PCV2a 全病毒	灭活疫苗

[0006] 常规重组蛋白研制的亚单位疫苗的免疫原性比较差，主要是因为靶蛋白无法正确折叠或无法充分递呈给免疫系统。病毒样颗粒（virus-like particles,VLPs）是不含病毒核酸的空壳结构，许多病毒结构蛋白都具有自动组装成 VLPs 的能力，在形态结构上与天然的病毒颗粒相似，具有很强的免疫原性和生物学活性。由于 VLPs 作为免疫原没有感染性，稳定性好，不易失活，它可通过和病毒感染一样的途径呈递给免疫细胞，有效地诱导机体的免疫系统产生免疫保护反应，应用于新型疫苗研制具有广阔的发展前景。人和动物的多种病毒，如人乳头状瘤病毒、乙型肝炎病毒等的结构蛋白都能在各种不同的表达系统中自动组装成病毒样颗粒。Margaret 等（2006）研究人乳头瘤病毒（HPV）核衣壳蛋白在原核表达系统中表达时发现，HPV 核衣壳蛋白可以自我装配或形成病毒样颗粒（VLPs），其结构和抗原表位与天然的病毒颗粒十分相似。姜博等（2012）将编码 HPV16L2 的 65-71，112-120 表位片段偶联到 AP250 氮端，在原核细胞中实现表达，并自行组装形成 VLPs，为 HPV16L2-AP250VLPs 亚单位疫苗研究打下基础。谢明辉等（2009）采用大肠杆菌表达系统高效可溶性地表达 HPV18-L1 蛋白，利用离子交换、疏水相互作用层析充分去除核酸和细菌内毒素等杂质制备高纯度的蛋白，并且通过体外组装获得具有高度免疫原性的 HPV18-VLPs，为研制 HPV18 的预防性疫苗奠定了良好的基础。

[0007] 昆虫－杆状病毒（Sf9-Baculovirus）表达系统成功地表达 PCV2 的核衣壳蛋白（Capsid），通过密度梯度离心可以获得高纯度的 PCV2VLPs。在此基础上开发的 PCV2VLPs 亚单位疫苗，已经成为目前国际市场的主要疫苗种类。但是，利用昆虫－杆状病毒系统表达蛋白相对于原核表达系统产生的 VLPs，其生产工艺复杂，价格高。很多研究者利用大肠杆菌成功表达 PCV2Capsid 蛋白质，但不能将其在体外组装成 VLPs。2013 年，Yin 等将 Sumo- 标签融合到 PCV2Capsid 基因 5’ 端，能提高 PCV2Capsid 蛋白质在大肠杆菌中的表达和可溶性，且 PCV2Capsid 蛋白质能在体外成功组装成 VLPs，但是由于是通过与 Sumo- 标签融合后表达，表达纯化后的融合蛋白质需要使用蛋白酶切除其标签，目的蛋白质才能组装成 VLPs，从而提高了生产难度和成本，且其 VLPs 浓度偏低，组装效率不高。

[0008] 本发明通过基因优化，采用创新型 PCV2VLPs 获取方法，同时在本发明的独特缓冲液的作用下，显著提高了 PCV2Capsid 蛋白的表达量和可溶性，并且使得 PCV2 病毒样颗粒体外组装的效果得到了显著提升和完善，在同类研究结果中成效突出（Marcekova,Z.et

al.,2009Journal of Virological Methods;Yin et al.2010Virology Journal;Wu,PC.et al.,2012,Appl.Microbiol.Biotechnol, 等),为下游研究猪圆环病毒的亚单位疫苗及药物传递载体提供了坚实基础。

发明内容：

[0009] 本发明的目的是提供一种高效的PCV2衣壳蛋白质组装成PCV2病毒样颗粒的组装方法,及其组装成的颗粒和裂解及VLP组装用的缓冲液。该组装方法成本低、操作简易,显著提高PCV2衣壳蛋白质的表达量和可溶性;并且使得PCV2病毒样颗粒体外组装的效果得到了显著提升和完善。

[0010] 本发明的目的是通过以下方式实现的：

[0011] 一种PCV2病毒样颗粒的制备方法,依次包括以下步骤：

[0012] 1)选取利用密码子的兼并性,人工合成的适合于原核表达的编码PCV2核衣壳蛋白全长基因；

[0013] 2)将基因序列与表达质粒载体重组得到的重组质粒转化大肠杆菌,然后加入IPTG,使得体系中其浓度为0.1-1mM,并在25-37℃进行诱导表达；

[0014] 3)将诱导表达PCV2核衣壳蛋白时获取的细菌沉淀用以下配方的裂解及VLP组装缓冲液重悬,超声处理,离心收集上清,树脂吸附目的蛋白,然后从树脂上洗脱目的蛋白;所述的裂解及VLP组装缓冲液配方为:0.1M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、0.1M Na_2HPO_4、20mM Imidazole、10mM Tris-base、300mM NaCl、50mM KCl、2mM $MgCl_2$、0.1M Ammonium citrate、2%Glycerine、0.5%Triton X-100、5mMβ-Me、0.1mM PMSF、1U/mL Leupeptin Protease inhibitor;其中Triton X-100、β-Me、PMSF、Leupeptin Protease inhibitor现用现加,缓冲液pH8.0,余量为纯水。

[0015] 所述的利用密码子的兼并性,人工合成的适合于原核表达的编码PCV2核衣壳蛋白全长基因见SEQ NO.1所示。

[0016] 步骤2)所述的表达质粒载体为pET100_D/TOPO。

[0017] 步骤2)中IPTG在体系中的浓度优选为1mM。

[0018] 步骤2)的诱导表达温度优选为30℃。

[0019] 步骤3)按照1升大肠杆菌培养物用100mL裂解及组装缓冲液的比例重悬,冰上静置至少5分钟;然后将重悬液样品在冰上进行超声裂解至少10分钟;将超声裂解所获得的裂解样品进行离心,大于12000转/分钟,4℃离心10-30分钟收集上清。

[0020] 上述制备方法中将离心所获得的上清液与Ni-NTA His•Bind树脂结合,上清和树脂填料的体积比为20:1;4℃轻微震荡结合至少60分钟;以10倍柱体积洗涤液漂洗;最后用洗脱液洗脱目的蛋白。

[0021] 上述制备方法中,将洗脱的目的蛋白放入裂解及组装缓冲液中进行隔夜透析。

[0022] 一种PCV2病毒样颗粒,是由上述的方法制备获得。

[0023] 一种PCV2病毒样颗粒所用的裂解及VLP组装缓冲液,配方为:0.1M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、0.1M Na_2HPO_4、20mM Imidazole、10mM Tris-base、300mM NaCl、50mM KCl、2mM $MgCl_2$、0.1M Ammonium citrate、2%Glycerine、0.5%Triton X-100、5mMβ-Me、0.1mM PMSF、1U/mL Leupeptin Protease inhibitor;其中Triton X-100、β-Me、PMSF、Leupeptin Protease

inhibitor 现用现加，缓冲液 pH8.0，余量为纯水。

[0024] PCV2 野生型病毒的 Capsid 核衣壳蛋白全长基因很难可溶性表达，即使通过编码优化或附加可溶性标签也很难大量表达，纯化难度更大，国际同类研究性文献几乎不能给出令人满意的表达及纯化结果。本发明通过对所有的 PCV2 基因型序列比对，找到一株在我国猪场最流行，最具有代表性的 PCV2 核衣壳蛋白质的氨基酸序列 PCV2b-1B-cap，利用密码子的兼并性，人工合成多条适合于原核表达的，编码 PCV2 核衣壳蛋白全长基因。利用大肠杆菌原核表达系统筛选出高表达量的一条人工合成的 PCV2 核衣壳蛋白质的基因 PCV2b-1B-cap_RCFP(详见 SEQ NO.1 所示)；同时通过本发明在 IPTG 诱导体系中对表达条件进行系列优化，不仅使表达量大大提升，同时增加了该蛋白的可溶性，为后续病毒样颗粒的自组装过程提供的充分的可能性和高效性。表达 PCV2 核衣壳蛋白质的大肠杆菌经裂解后，在本发明独特的缓冲液中即能组装成 PCV2 病毒样颗粒，通过简单的亲和纯化的方式，就能快速获得大量的、高纯度 PCV2 病毒样颗粒。

[0025] 通常 VLPs 是利用杆状病毒真核表达系统产生，然后通过密度梯度离心来纯化，由于成本高、效率低限制其大规模应用与开发。我们首次通过基因比较、基因优化及人工合成、原核表达条件优化、裂解及组装缓冲液的研制，建立获得了大量、高纯度、优质的 PCV2VLPs，对于猪圆环二型病毒的病毒样颗粒亚单位疫苗大规模产业化谱写了序章。

附图说明

[0026] 图 1 中 A 为商业化工程质粒 pET100_D/TOPO 图谱，B 为本发明所使用的全长 Cap 重组质粒 pET-PCV2b-1B-Cap-RCFP 图谱；

[0027] 图 2 为图 1 的全长 Cap 重组质粒酶切验证图；1、2 号为全长重组质粒经过 Nde Ⅰ和 BamH Ⅰ双酶切，3 号为 PCR 扩出的全长 Cap 基因片段；

[0028] 图 3 为 IPTG 诱导 PCV2 核衣壳蛋白表达；1 为菌液 OD_{600}=1 时收获的样品即诱导前，其余均为 30℃，1mM IPTG 诱导后取样，2、3、4 分别为 3h 总蛋白(包括可溶性蛋白质和不可溶性蛋白质)、3h 上清(可溶性蛋白质)、3h 沉淀(不可溶性蛋白质)；5、6、7 分别为 6h 总蛋白、6h 上清、6h 沉淀；全长 Cap 蛋白分子量均为 32KD，红色箭头标示为目的 Cap 蛋白条带；

[0029] 图 4 为本发明表达蛋白的菌体裂解时得到的透射电镜图，表明可溶性上清(PCV2capsid 蛋白)在裂解和组装缓冲液中即可自体装成 VLPs 颗粒；

[0030] 图 5 为本发明 PCV2 核衣壳蛋白的镍柱纯化样品 SDS-PAGE 分析结果；T 为表达出的上清液总蛋白，F 为过镍柱后的流穿液，W 为一定咪唑浓度的洗涤液，1-6 为纯化后的蛋白，10μL 上样；

[0031] 图 6 中 A 为野生型 PCV2 病毒透射电镜图，B 为本发明获得的 PCV2VLPs 透射电镜图；

[0032] 图 7 中 A 为野生型 PCV2 病毒侵染猪肾上皮细胞，共聚焦显微镜成像图；B 为本发明制备的 PCV2VLPs 侵染猪肾上皮细胞，共聚焦显微镜成像图，实验抗体为小鼠注射 VLPs 后获得的血清。从图中可看出本发明获得的 PCV2VLPs 具有与野生型病毒同样的侵染性，抗体的有效性同时表明 VLP 具有很好的免疫原性。

具体实施方式

[0033] 以下结合具体例证实验旨在进一步说明本发明，而非限制本发明。

[0034] 实验步骤

[0035] 1.PCV2b-1B-cap 的合成和重组质粒构建

[0036] 因为野生型全长 Cap 蛋白很难表达，所以我们先通过对所有的 PCV2 基因型序列比对，找出最具代表型的全长 Cap 基因序列，然后根据大肠杆菌密码子的偏好性，优化并合成了一条 PCV2 核衣壳蛋白基因典型序列 PCV2b-1B-cap。将 PCV2b-1B-cap 与表达质粒 pET100_D/TOPO (美国 Invitrogen 公司)载体重组构成 pET-PCV2b-1B-cap_RCFP 重组质粒，插入位点在工程质粒的 TOPO 区，酶切位点 N 端为 Nde Ⅰ，C 端为 BamH Ⅰ。

[0037] 2.pET-PCV2b-1B-cap_RCFP 重组质粒转化大肠杆菌 BL21

[0038] 1）取 100μL BL21（DE3）感受态置于冰上解冻，加入 1μL（约 10ng）重组质粒，并用枪头轻轻搅拌混匀。混匀后的感受态置于冰上 30 分钟。

[0039] 2)静置于 42℃水浴锅中热激 60s。快速转到冰浴中，冷却 1-2 分钟。加入 900μL 的 SOC 培养基，混匀。37℃，230rpm 震荡培养 45 分钟。

[0040] 3）取 50μL 转化液涂于含有 100μg/mL Amp^+ 的 LB 培养板中，37℃倒置培养 12-16h。

[0041] 3.IPTG 诱导 PCV2 核衣壳蛋白表达的条件探索

[0042] 1)随机挑取单克隆接种于 10mL 含有 100μg/mL Amp^+ 的 LB 培养液中，37℃，230rpm 震荡过夜扩增培养。

[0043] 2)按 1:100 吸取 100μL 过夜培养的菌液至 10mL 含有 100μg/mL Amp^+ 的 LB 培养液中，37℃，250rpm 震荡培养至 OD_{600} 达到 1.0。

[0044] 3)吸取 1mL 菌液，10,000g 离心 1 分钟，去除上清，加入 200μL2xSDS-PAGE sample buffer 充分悬浮细胞沉淀，细菌沉淀立即 -20℃保存(为阴性对照样品)。

[0045] 4)温度调整为 30℃，加入 IPTG 使得体系中 IPTG 浓度为 1mM，诱导表达后在 3h、6h 分别吸取 2mL 菌液，分装至 4 个 1.5mL 离心管(3h-1，3h-2，6h-1，6h-2)，10,000r/ 分钟离心 2 分钟，去除上清，细菌沉淀(蛋白样品)-20℃保存。

[0046] 4.PCV2 核衣壳蛋白可溶性分析

[0047] 1)将上述第 3 点诱导表达 3h、6h 时获取的细菌沉淀(3h-1，6h-1)用 500μL 本发明的裂解及组装缓冲液中重悬，(3h-2，6h-2）用 400μL 本发明的裂解及组装缓冲液中重悬，冰上静置反应 10 分钟，然后样品进行超声裂解，超声 5s，停 5s，15% 振幅共超声 10 分钟(冰上操作)。

[0048] 2）将超声后的 3h-2，6h-2 裂解样品加 100μL5×SDS-PAGE sample buffer，将沉淀吹打数次以充分溶解。煮沸 5 分钟。此样品为表达的总蛋白样品，用于 SDS-PAGE 分析。

[0049] 3）样品 3h-1，6h-1，4℃离心 18,000g，10 分钟。将上清液 450μL 转移至新的无菌离心管，置于冰上保存。取 50μL 上清液样品进行电镜观察；400μL 样品加 100μL5×SDS-PAGE sample buffer 煮沸 5 分钟，此样品为可溶性上清样品，用作后续 SDS-PAGE 电泳分析。

[0050] 4）将步骤 3）中，样品 3h-1，6h-1 离心后的细胞沉淀部分用 1mL PBS 缓冲液重悬，18,000g4℃离心 5 分钟，去除上清液(目的：去掉沉淀中的可溶性蛋白质组分)。加 500μL1×SDS-PAGE sample buffer，将沉淀吹打数次以充分溶解。煮沸 5 分钟。沉淀重悬

液进行超声裂解，超声 5s，停 5s，15% 振幅共超声 10 分钟，确保样品不粘稠。此样品为不可溶性蛋白样品，用做后续 SDS-PAGE 电泳分析。

[0051] 6）将上述步骤中保存的样品进行 SDS-PAGE 电泳分析，检查目标蛋白的表达及可溶性情况。

[0052] 5. PCV2 核衣壳蛋白大规模诱导表达

[0053] 1）随机挑取单克隆接种于 10mL 含有 100μg/mL Amp^+ 的 LB 培养液中，37℃，230rpm 震荡过夜扩增培养。

[0054] 2）按 1:1000 吸取 1mL 过夜培养的菌液至 1L 含有 100μg/mL Amp^+ 的 LB 培养液中，37℃，250rpm 震荡培养至 OD_{600} 达到 1.0。

[0055] 3）加入 IPTG 使得体系中 IPTG 浓度为 1mM，30℃，250rpm 诱导表达 6h，8,000g 离心 10 分钟，去除上清，细菌沉淀 -20℃保存。

[0056] 6. PCV2 核衣壳蛋白的镍柱纯化

[0057] 1）取 20mL 本发明裂解及组装缓冲液重悬细菌沉淀（200mL 培养物）静置冰上反应 10 分钟。

[0058] 2）将样品进行超声裂解，30% 幅度，超声 5s，停 5s，共超声 10 分钟，确保样品不粘稠。18,000g、4℃离心 20 分钟，吸取上清液转移至新的无菌离心管，置于冰上保存。

[0059] 3）将上清液加入到 2mL Ni-NTA His·Bind 树脂中，4℃轻微震荡结合 60 分钟。

[0060] 4）将含有填料的上清转移至柱子中，将流穿液（flow though）再过柱子一次，收集流穿液保存用于 SDS-PAGE 电泳分析。

[0061] 5）以 5 倍柱体积洗涤液（wash buffer）漂洗。

[0062] 6）按填料体积的 10 倍加入洗脱液（elution buffer）洗脱目的蛋白，用 2mL 离心管进行收集每管收集 2mL，4℃或冰上保存。

[0063] 7）用大量 PBS 冲洗填料，最后等体积加入 20% 乙醇保存，保存树脂填料。

[0064] 8）将上述步骤收集的样品取少部分加入 SDS sample buffer，煮沸，进行蛋白变性处理然后 SDS-PAGE 分析蛋白纯化情况。

[0065] 7. PCV2 病毒样颗粒组装

[0066] 1）将步骤 6 纯化的蛋白进行蛋白浓度测定，BCA 法或紫外分光光度法。

[0067] 2）将浓度大于 0.5mg/mL 的蛋白样品转移至透析袋中，放入裂解及组装缓冲液中进行隔夜透析，第二天进行电镜观察。

[0068] 8. PCV2 病毒样颗粒免疫小鼠

[0069] 将收获的 VLP 颗粒免疫小鼠。

[0070] 9. VLP 侵染细胞免疫荧光实验

[0071] VLPs 侵染 PK15 猪肾上皮细胞，把从免疫的小鼠身上获得的血清作为抗体进行细胞免疫荧光实验。

[0072] 实验结果

[0073] 1. PCV2b-1B-cap-RCFP 基因的设计和合成

[0074] 本发明所涉及的猪圆环病毒Ⅱ型（PCV2）核衣壳蛋白全长基因 PCV2-1B-cap-RCFP 为本实验室经过优化产生，适合于在大肠杆菌原核细胞中高效可溶性表达。PCV2b-1B-cap-RCFP 全长 cap 基因核苷酸序列 SEQ NO.1 如下：

[0075] ATGACCTATCCGCGTCGTCGTTATCGCCGCCGCCGCCATCGCCCGCGTAGTCATCTGGGTCAGATCCTG CGTCGCCGTCCGTGGCTGGTTCATCCGCGCCACCGTTACCGTTGGCGCCGTAAAAACGGTATTTTTAATACGCGTCT GAGTCGCACGTTCGGCTATACCATCAAACGTACCACGGTGAAGACCCCGTCCTGGGCGGTTGATATGATGCGCTTTA ACATTAATGACTTCCTGCCGCCGGGCGGTGGCAGCAACCCGCGTTCTGTTCCGTTTGAATATTACCGTATTCGCAAA GTGAAGGTTGAATTCTGGCCGTGCTCTCCGATCACCCAAGGTGATCGCGGTGTTGGCAGCTCTGCAGTCATTCTGGA TGACAACTTTGTCACCAAAGCGACGGCCCTGACCTATGATCCGTACGTGAATTATAGTTCCCGTCATACCATCACGC AGCCGTTTTCATACCACTCGCGCTATTTCACGCCGAAACCGGTTCTGGATTCAACCATTGACTATTTTCAACCGAAC AATAAGCGTAACCAGCTGTGGCTGCGCCTGCAAACGGCAGGCAATGTCGATCACGTGGGTCTGGGCACCGCTTTCGA AAACTCGATTTACGACCAGGAATATAATATCCGTGTCACGATGTATGTCCAGTTCCGTGAATTTAACCTGAAAGACC CGCCGCTGAATCCGTAATAA

[0076] PCV2b-1B-Cap-RCFP 氨基酸序列 SEQ NO.2 如下：

[0077] MTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRKNGIFNTRLSRTFGYTIKRTTVKTPSWAV DMMRFNINDFLPPGGGSNPRSVPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSS RHTITQPFSYHSRYFTPKPVLDSTIDYFQPNNKRNQLWLRLQTAGNVDHVGLGTAFENSIYDQEYNIRVTMYVQFRE FNLKDPPLNPMTYPRRRYRRRRHRPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRRK

[0078] 233 个氨基酸；分子量大约 27.85KD；等电点 10.82。

[0079] 2. 重组质粒的构建

[0080] 将 PCV2b-1B-Cap-RCFP 通过酶切连接的方法克隆至 pET100_D/TOPO 载体(见图 1，a 为原始工程质粒 pET100_D/TOPO，b 为重组质粒 pET-PCV2b-1B-Cap-RCFP)。质粒经酶切鉴定，大小符合预期，测序的结果也 100% 匹配。如图 2 所示，PCV2 核衣壳蛋白 Cap 全长重组质粒双酶切后片段符合目的大小，表明质粒重组成功。

[0081] 3.PCV2 核衣壳蛋白的表达

[0082] 如图 3，PCV2 核衣壳蛋白全长基因序列的重组质粒可以在本发明的实验方法下成功的可溶性表达且具有较好的表达量。

[0083] 4. 可溶性上清电镜分析

[0084] 如图 4，通过电镜观察在裂解及组装缓冲液中可以自体组装成 VLPs。

[0085] 5. 全长 VLPs 镍柱纯化，结果详情见图 5。

[0086] 6.VLPs 的颗粒性电镜分析

[0087] PCV2 核衣壳蛋白 VLPs 在视野中呈现为均一的、直径 20nm 左右的正二十面体状空心颗粒，大小与形态天然病毒颗粒相近，详情见图 6。

[0088] 7.VLP 侵染细胞免疫荧光实验

[0089] 如图 7，通过免疫荧光实验，说明本发明制备的 VLPs 具有与野生型病毒同样的侵染性，抗体为小鼠注射 VLP 后获得的血清，证明 VLP 具有很好的免疫原性。

[0090] 本发明例证实验相关试剂配方

[0091] 裂解及组装缓冲液，MW 代表分子量：

[0092] pH8.0

[0093]

工作浓度 W.C.	组成成分 Components
0.1 M	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ （MW. 156）
0.1 M	Na_2HPO_4 （MW. 142）
20 mM	Imidazole （MW. 68.08）
10 mM	Tris-base （MW. 121.14）
300 mM	NaCl （MW.58.44）
50 mM	KCl （MW.74.55）
2mM	$MgCl_2$ （MW.95.21）
0.1M	Ammonium citrate （MW.243.22）
2 %	Glycerine
0.5 %	Triton X-100（现加）
5 mM	β-Me（现加）
0.1 mM	PMSF（现加） 母液 1M
1U/mL	Leupeptin Protease inhibitor （现加）

[0094] Wash Buffer:pH8.0

[0095]

WC	Items
50mM	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$（MW.156.01）
20mM	Imidazole（MW.68.08）
500mM	NaCl（MW.58.44）

[0096] Elution buffer:pH6.0

[0097]

WC	Items
300mM	Imidazole（MW.68.08）
300mM	NaCl（MW.58.44）

[0098] 5×SDS-PAGE sample buffer

[0099]

WC	Items
225mM	Tris-HCl（pH6.8）
50%	Glycerine
5%	SDS

0.05%	bromophenol blue
25%	β -Me

[0100] 实验相关结果对比

[0101] 同类型研究文献 PCV2 核衣壳蛋白获得实验所用裂解液配方

[0102]

Literatures	《 Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from Escherichia coli》	《 Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development》	《 The 2.3-Angstrom Structure of Porcine Circovirus 2》
Lysis buffer	50 mM Tris-HCl 1.0% Triton X-100 pH 8.0	50mM Tris 150mM NaCl 0.2% Triton-X100 1mM Protease inhibitor 5% Glycerol pH 7.2	20mM CAPS 0.5M NaCl 50 mM Imidazole 0.2 mM PMSF 4 mM β -Me 20units Benzonase EMD4 pH 10.5

[0103] 经过试验测试，应用上述几种配方的裂解液纯化 PCV2 全长 Cap 蛋白并不能达到本发明配方的同等效果，主要表现为蛋白可溶性不高，大部分为包涵体蛋白；另外 PCV2 全长 Cap 蛋白也不能够在上述几种裂解液配方中正确组装。

[0001]

序列表

<110> 美国 ProCell, LLC 生物高科技有限责任公司
湖南农业大学

<120> 一种 PCV2 病毒样颗粒及其制备方法和裂解及 VLP 组装缓冲液

<130> 无

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 705
<212> DNA
<213> PCV2b-1B-cap-RCFP 全长 cap 基因核苷酸序列

<400> 1
atgacctatc cgcgtcgtcg ttatcgccgc cgccgccatc gcccgcgtag tcatctgggt 60

cagatcctgc gtcgccgtcc gtggctggtt catccgcgcc accgttaccg ttggcgccgt 120

aaaaacggta tttttaatac gcgtctgagt cgcacgttcg gctataccat caaacgtacc 180

acggtgaaga ccccgtcctg ggcggttgat atgatgcgct ttaacattaa tgacttcctg 240

ccgccgggcg gtggcagcaa cccgcgttct gttccgtttg aatattaccg tattcgcaaa 300

gtgaaggttg aattctggcc gtgctctccg atcacccaag gtgatcgcgg tgttggcagc 360

tctgcagtca ttctggatga caactttgtc accaaagcga cggccctgac ctatgatccg 420

tacgtgaatt atagttcccg tcataccatc acgcagccgt tttcatacca ctcgcgctat 480

ttcacgccga aaccggttct ggattcaacc attgactatt ttcaaccgaa caataagcgt 540

aaccagctgt ggctgcgcct gcaaacggca ggcaatgtcg atcacgtggg tctgggcacc 600

gctttcgaaa actcgattta cgaccaggaa tataatatcc gtgtcacgat gtatgtccag 660

ttccgtgaat ttaacctgaa agacccgccg ctgaatccgt aataa 705

<210> 2

[0002]

<211> 274
<212> PRT
<213> PCV2b-1B-Cap-RCFP 氨基酸序列

<400> 2

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr
50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

[0003]

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg
225 230 235 240

Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu
245 250 255

Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg
260 265 270

Arg Lys

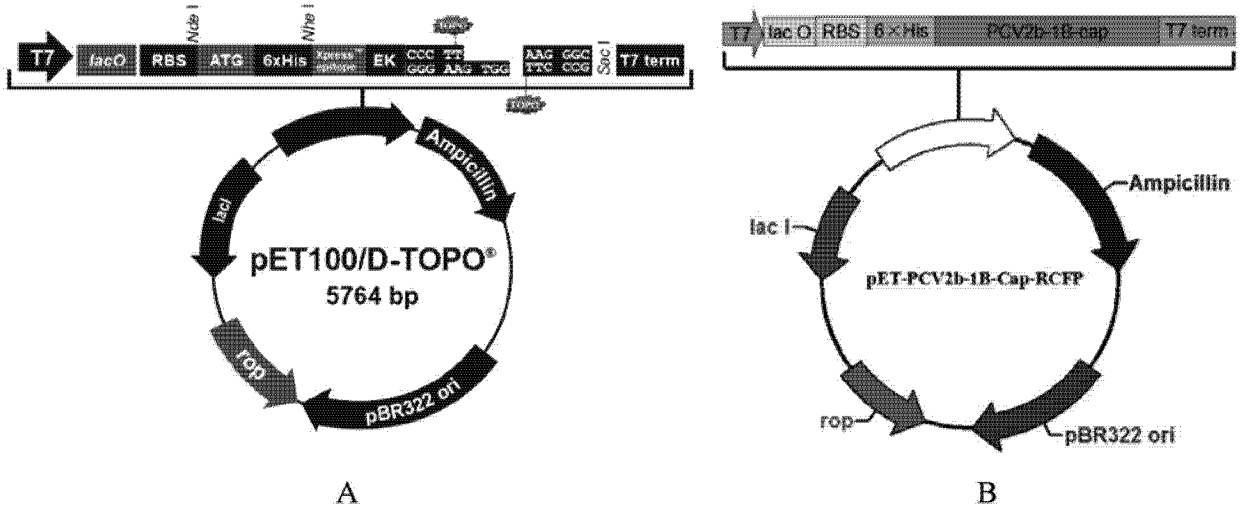

T7
lacO
RBS
ATG
6xHis
EK
T7 term
Nde I
Nhe I
Sac I
pET100/D-TOPO®
5764 bp
Ampicillin
lacI
rop
pBR322 ori
T7
lac O
RBS
6×His
PCV2b-1B-cap
T7 term
pET-PCV2b-1B-Cap-RCFP
Ampicillin
lac I
rop
pBR322 ori
A
B

图 1

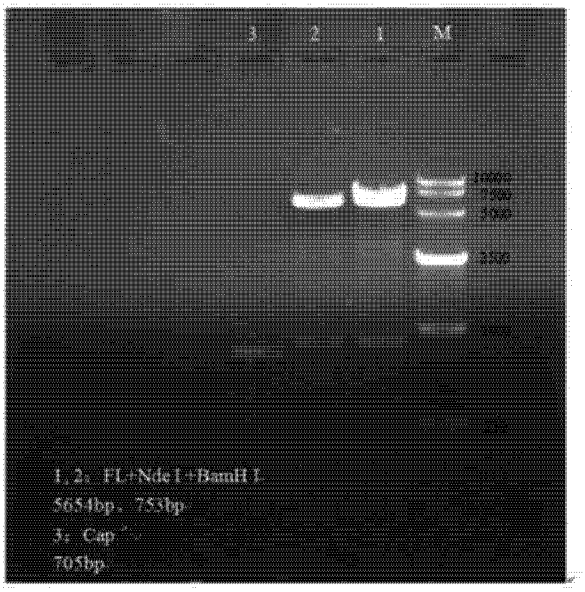

3
2
1
M
1, 2：FL+Nde I+BamH I
5654bp，753bp
3：Cap
705bp

图 2

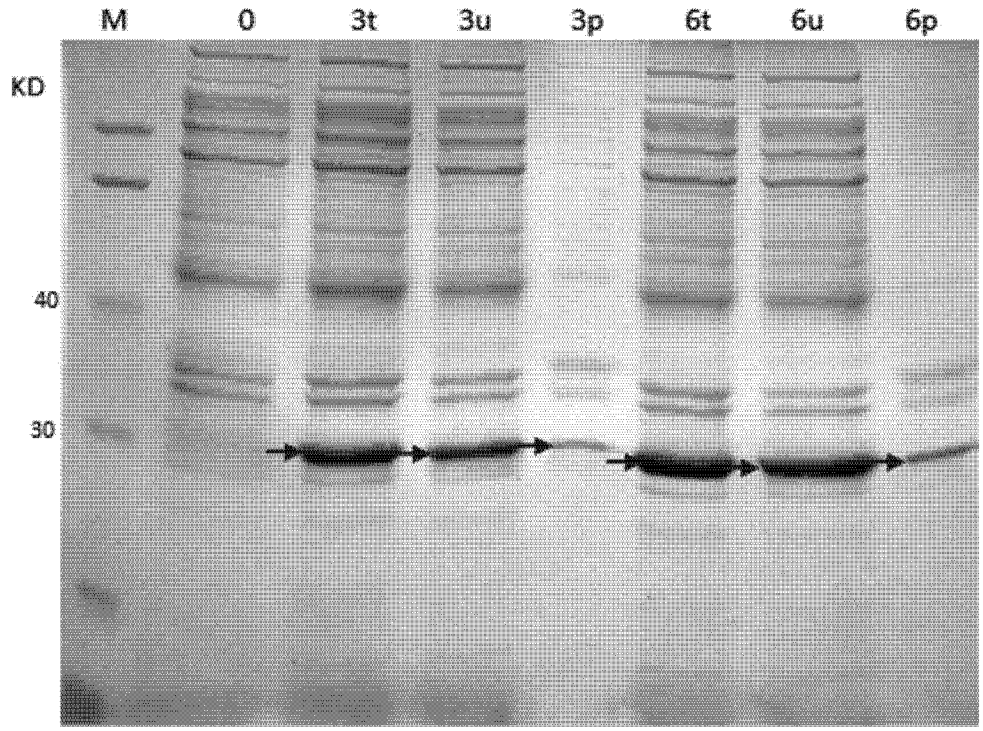


图 3

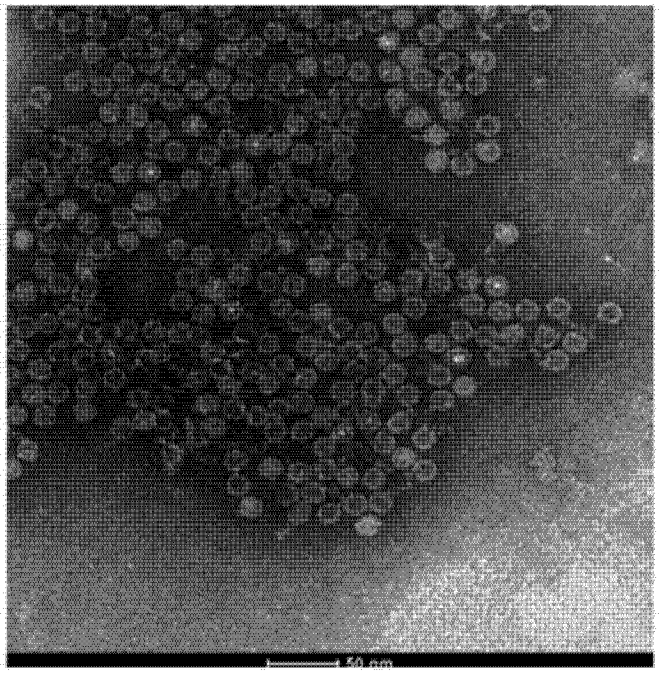


图 4

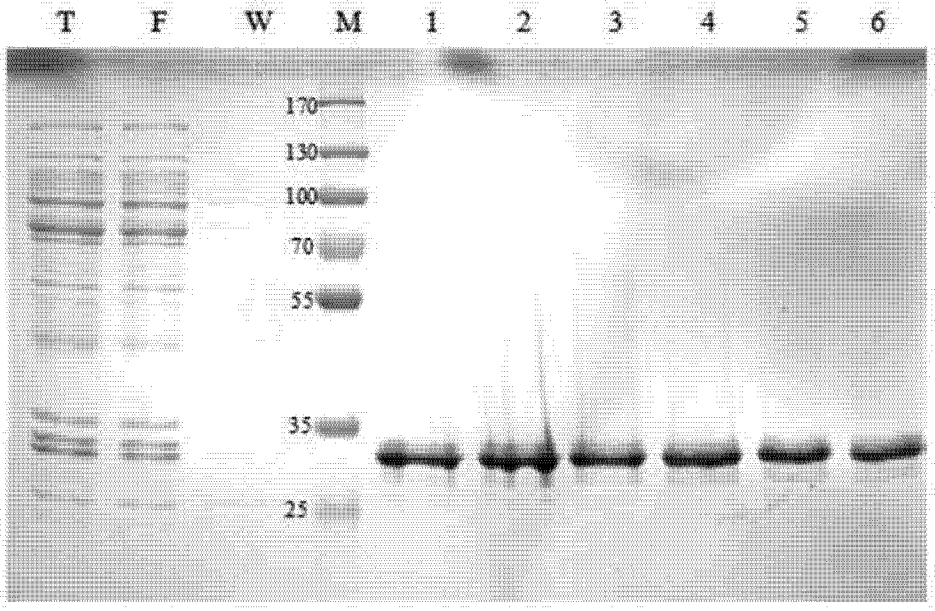
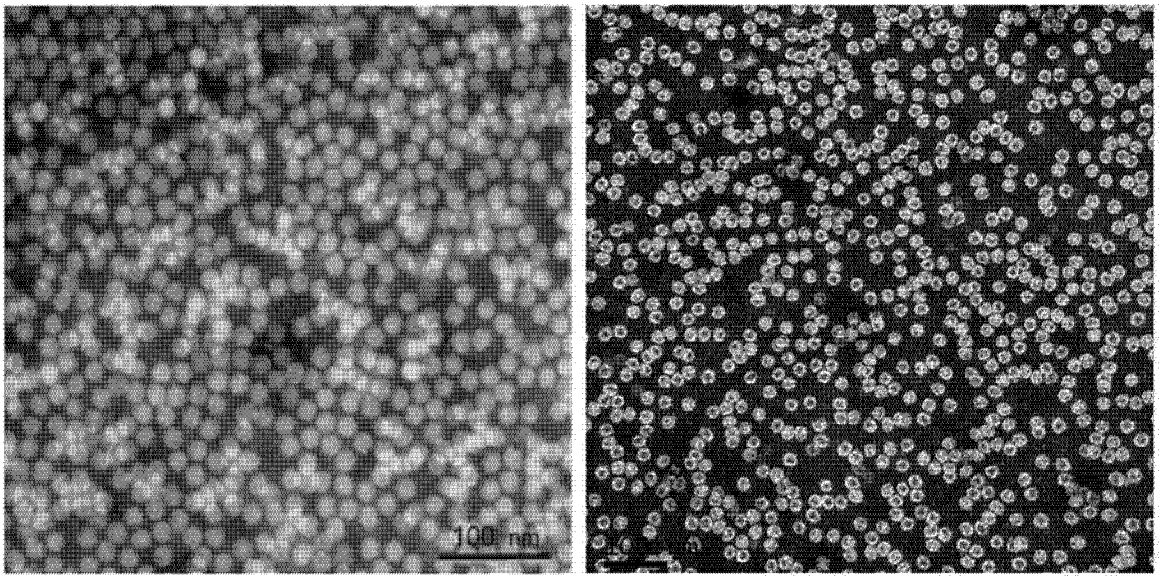


图 5



A B

图 6

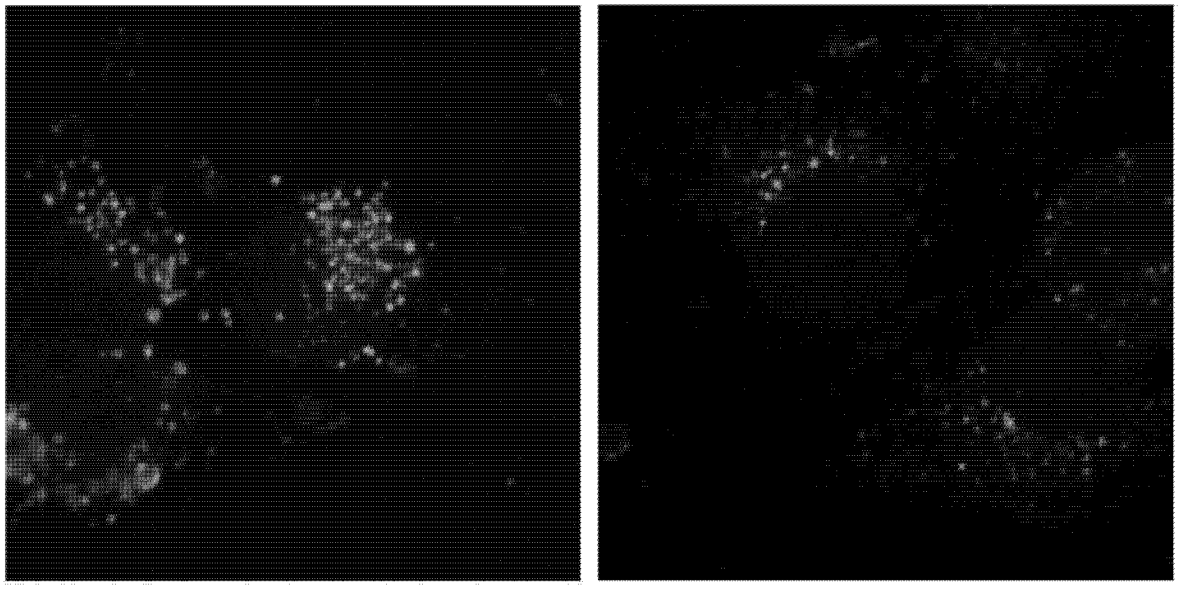


图 7