

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 39/135

C12P 21/02

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93112596.0

[45]授权公告日 2000 年 7 月 19 日

[11]授权公告号 CN 1054544C

[22]申请日 1993.10.21 [24]颁证日 2000.6.30
[21]申请号 93112596.0
[73]专利权人 复旦大学
地址 200433 上海市邯郸路 220 号
共同专利权人 上海畜牧兽医研究所
严维耀 盛祖恬
[72]发明人 郑兆鑫 徐泉兴 毛昌群 尤永进
金建平 周智爱 郭杰炎 赵洪兴
严维耀 盛祖恬
[56]参考文献
CN86103718A 1987. 2. 4
WO83/03547 1983.10.27
WO91/03255 1991. 3.21
审查员 黄 赤

[74]专利代理机构 复旦大学专利事务所
代理人 姚静芳

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 家畜口蹄疫病毒多肽疫苗及其制备方法

[57]摘要

本发明是一种家畜口蹄疫病毒多肽疫苗及其制备方法。传统口蹄疫病毒疫苗制备方法生产过程中安全性差,目前虽然有基因重组 VP1 蛋白方法制备较为安全的抗原,但是抗原免疫原性不强。本发明制备出一种口蹄疫病毒疫苗,包含有 20 个氨基酸和 14 个氨基酸的 DNA 序列,有三个免疫原性的肽段基因,它有一定的核苷酸排列序列,分子量为 30—140KDa。用化学方法合成编码 141—160 位氨基酸和 200—213 位氨基酸的小肽基团,将其串联,再插入质粒载体大分子上转入细菌表达,经过发酵即得抗口蹄疫病毒疫苗,该疫苗安全性好,对家畜保护力强。

ISSN 1000-8424

权 利 要 求 书

1. 一种家畜口蹄疫病毒多肽疫苗，是口蹄疫病毒毒株编码 VPI 蛋白中有免疫原性的包含有 20 个氨基酸和 14 个氨基酸的 DNA 序列，其特征在于该多肽疫苗是由 DNA 编码，由 20 个氨基酸和 14 个氨基酸的 DNA 序列串联成的编码 20 肽-14 肽-20 肽基因，其间的 DNA 连接序列共编码 13 个氨基酸，它的核苷酸排列是：

AATTCATGGTACCAAACCTGCGTGGTGACCTGCAGGTACTTGCTCAGAAAGTTGC
GTACCATGGT TTGGACGCACCACTGGACGTCCATGAACGAGTCTTTCAACG

TCGTACTCTGCCACCCGGGCGTCACAAACAGAAAATCGTAGCTCCAGTAAAACAGACT
AGCATGAGACGGTGGGCCCCGAGTGTTTGTCTTTTA GCATCGAGGTCATT TTGT CTGA

CTGCAATTCGACCTCGAATTCATGGTACCCTCGAGGGTACCAAACCTGCGTGGTGACC
GACGTTAAGCTGGAGCTTAAGTACCATGGGAGCTCCCATGGTTTGGACGCACCACTGG

TGCAGGTACTTGCTCAGAAAGTTGCTCGTACTCTGCCATGAG
ACGTCCATGAACGAGTCTTTCAACGAGCATGAGACGGTACTCCTAG

该种具有免疫原性多肽氨基酸序列是：

	Val	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln	Val	Leu	Ala	Gln
Lys	Val	Ala	Arg	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Arg	His	Lys	Gln	Lys
Ile	Val	Ala	Pro	Val	Lys	Gln	Thr	Leu	Gln	Phe	Glu	Leu	Glu
Met	Val	Pro	Ser	Arg	Val	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln
Val	Ala	Arg	Thr	Leu	Pro								

2. 根据权利要求 1 所述的家畜口蹄疫病毒多肽苗，其特征在于疫苗蛋白的分子量是 30—140KDa。

3. 一种家畜口蹄疫病毒多肽疫苗的制备方法，包括基因重组，重组融合蛋白的制备，其特征在于：

- (1) 用化学合成的方法合成编码 141-160 位氨基酸和 200-213 位氨基酸的小肽基因，在 DNA 水平上以串联方式连接，同时将编码上述小肽的 DNA 片段与半乳糖苷酶基因或乙肝病毒核心抗原基因串联在一起；
- (2) 将上述基因插入质粒载体；
- (3) 将上述重组质粒转入细菌表达，得到菌株；
- (4) 将菌株置于营养丰富的培养基中发酵，发酵温度 30-37℃，发酵时间 9-24 小时，发酵液中加入浓度为 50-100ug/ml 的氨苄青霉素，发酵完毕，经离心，粉碎细胞，再离心即可。

说明书

家畜口蹄疫病毒多肽疫苗及其制备方法

本发明属遗传工程领域。

家畜口蹄疫病毒是世界烈性家畜传染病，可感染多种偶蹄类家畜，尤其对猪和牛的感染严重。家畜一旦染上此病，很快蔓延传染，病势发展甚快。目前抗口蹄疫病毒疫苗的传统制备方法是采用组织培养法繁殖口蹄疫病毒，然后将病毒灭活成为死疫苗。另一种方法是通过各种减毒方法制得弱毒疫苗。这两种疫苗虽然都有较好的免疫能力，但是制备的安全性很差，因为在它们的生产过程中需培养大量病毒，而该种病毒是空气传染，生产过程中与病毒接触过的任何工具或器皿都有散毒的危险。而且传统的灭活疫苗与病毒弱毒疫苗一旦灭活或减毒不完全，甚至自然突变都可能有极少量病毒颗粒，它们仍然有感染致病的能力。在大规模对动物的免疫过程中，可能会导致极少量被免疫动物发病而成为疾病大规模流行的病原中心与媒介。虽然目前采用基因重组方法，制备大量使用安全的抗原，但是如克隆 VP1蛋白的基因制备的抗原免疫原性不强，对动物的保护效果尚不理想。

本发明的目的是发明一种能有效预防家畜口蹄疫病毒的、安全可靠的疫苗及其制备方法。

本发明是一种家畜口蹄疫病毒多肽疫苗，是编码口蹄疫病毒毒株VP1蛋白中有免疫原性的包含有20个氨基酸和14个氨基酸的DNA序列，该多肽疫苗是20个氨基酸和14个氨基酸的DNA序列串联成的编码20肽-14肽-20肽的基因，是三个免疫原性的肽段基因，介于其间的DNA连接序列共编码13个氨基酸，它的核苷酸序列是：

AATTCATGGTACCAAACCTGCGTGGTGACCTGCAGGTA CTGCTCAGAAAGTTGCTCGTA
GTACCATGGTTTGGACGCACCACTGGACGTCCATGAACGAGTCTTTCAACGAGCAT

CTCTGCCACCCGGGCGTCACAAACAGAAAATCGTAGCTCCAGTAAAACAGACTCTACAAT
GAGACGGTGGGCCCCGAGTGTTTGTCTTTTAGCATCGAGGTCATTTTGTCTGAGATGTTA

TCGAGCTCGAATTCATGGTACCCTCGAGGGTACCAAACCTGCGTGGTGACCTGCAGGTAC
AGCTCGAGCTTAAGTACCATGGGAGCTCCCATGGTTTGGACGCACCACTGGACGTCCATG

TTGCTCAGAAAGTTGCTCGTACTCTGCCATGAG
AACGAGTCTTTCAACGAGCATGAGACGGTACTCCTAG

该基因从5'端到3'端之间有多个限制酶切点，如EcoRI, KpnI, PstI, SmaI, SacI, EcoRI, KpnI, XhoI, KpnI, PstI, BamHI。该基因插入质粒载体的β-半乳糖苷酶基因末端的EcoRI和BamHI两个切点之间，如果插入质粒载体pWR590，则在EcoRI的5'端有来自pWR590的SacI切点，在BamHI的3'端还有来自pWR590的XbaI, SalI, PstI, HindIII切点。

根据基因插入质粒载体的大小，得到疫苗蛋白的分子量为30-140KDa。

这种家畜口蹄疫病毒多肽疫苗的制备方法包括基因重组，重组融合蛋白的制备。先用常规化学合成方法合成编码141-160位氨基酸和200-213位氨基酸的小肽基因，将其串联，加入13个氨基酸连接核苷酸序列，再与质粒载体的大分子β-半乳糖苷酶基因末端连接，或者与乙肝病毒核心抗原基因连接，将此重组质粒转入细菌表达，将细菌表达的菌株置于营养丰富的培养基中发酵，发酵温度30-37℃，发酵时间9-24小时，发酵液中加入浓度为50-100ug/ml的氨苄青霉素和IPTG，发酵完毕经过离心，粉碎细胞，再离心即可。用常规的化学合成方法合成编码为141-160位氨基酸和200-213位氨基酸的小肽基因。将这两个DNA片段串联成为编码20肽-14肽-20肽的基因，然后插入质粒载体的β-半乳糖苷酶基因。插入的质粒载体可以是pWR590，也可以是pUC系列质粒。具体操作同实施例。将重组融合蛋白转入细菌表达，转入的细菌可以是大肠杆菌，或枯草杆菌，经过发酵，得到的白色沉淀即为重组融合蛋白。将该融合蛋白悬浮于尿素溶液中，经SDS-PAGE电泳检测，证明融合蛋白占50%。具体实验条件同实施例。

用化学合成的基因片段为探针与转化子原位杂交后选出的克隆子培养在含有50-100ug/ml氨苄青霉素的LB培养基中，30-37℃温度下振荡培养过夜。

培养液中加入IPTG进行诱导，以增加融合蛋白的表达量，离心收集菌体，再悬浮在0.1毫升点样液中煮沸5分钟，离心后取上层清液点样。用12%SDS-PAGE电泳检查融合蛋白，电泳时电压为150V，时间4小时，将凝胶取出置于考马斯蓝溶液中振荡染色6小时。用甲醇溶液退色20小时后，有明显的重组融合蛋白条带，分子量在30-140KDa范围之内。

菌株培养在含有50-100ug/ml氨苄青霉素的LB培养基中，培养基中可含有蛋白胨、酵母膏等一些营养丰富的物质。

本发明方法制备的疫苗，由于其融合蛋白中含有免疫原性蛋白，因此作为疫苗注射家畜，能有效地抵抗口蹄疫病毒的感染，对家畜保护力强。表1列出了免疫豚鼠后的保护效果的检测，表2说明免疫猪的保护效果检测。

表1.

一次免疫量 (ug)	二次免疫量 (ug)	中和抗体效价		病毒攻击后 存活数 3000ID ₅₀
		24天	40天	
400	400	ND	2.34	4/4
80	80	1.67	1.90	4/1
40	40	1.09	1.00	4/1
400		ND	2.04	4/3
800		0.97	2.67	4/3
对照				4/0

对猪的保护性免疫试验，用40千克中国健康猪，每只注射融合

蛋白5mg。第一次注射后20天，再注射5mg进行第二次免疫。第一次免疫注射后45天，用口蹄疫病毒3000ID₅₀攻击，保护率为100%。结果如表2：

表2.

一次免疫量 (ug)	二次免疫量 (ug)	病毒攻击后存活数 3000ID ₅₀
5000	5000	6/6
5000		6/1
对照		4/0

实施例:

用化学方法合成编码口蹄疫病毒的VP1蛋白中编码141-160位氨基酸的DNA片段和编码200-213位氨基酸的DNA片段，将上述两个DNA片段串联成为编码20肽-14肽-20肽的基因，将其插入质粒载体pWR590。先取0.5微克pWR590悬浮于TE缓冲液、用EcoRI和BamHI限制酶切点酶切，在37℃下反应1小时，经酚处理和等体积酒精沉淀后，离心得到沉淀，然后悬浮于10微升水溶液中，同时加入10微升串联基因，其DNA含量为0.2微克。两者混合后，加入1单位T4连接酶，在15℃下保温一夜，取200微升保存于-20℃的感受态大肠杆菌细胞，加入已进行连接的DNA，在4℃冰浴中保持1小时，然后再加入0.5毫升LB培养基，在37℃中孵育，倒入带有氨苄青霉素的LB培养基，培养在37℃下一夜后长出转化子，再用化学合成的基因片段为探针进行原位杂交后，选出克隆子。通过DNA序列分析，该克隆子中含有编码20肽-14肽-20肽的基因，序列与设计相符。

重组融合蛋白制备时，用50毫升三角烧瓶将克隆子培养在含有50ug/ml氨苄青霉素的LB培养基中，37℃温度下振荡培养过夜作为种子液，次日将种

子液吸入16立升的发酵罐中，在发酵罐中仍以LB培养基为培养液，并加入50 μ g/ml氨苄青霉素。发酵条件：30-37℃下通气培养，搅拌速度6000转/分，培养时间5小时，加入IPTG诱导10小时，总共发酵培养15小时后收集发酵液，以5000转/分离心20分钟收集菌体，弃去发酵液。菌体再悬浮在二倍体积的pH7.2、浓度为2-3毫升/克的湿菌体的磷酸缓冲液中，振荡使细胞充分悬浮。用5000转/分离心20分钟收集菌体，弃去上层清液。再将菌体悬浮在破壁缓冲液中，用95瓦功率5分钟超声打碎细胞。超声时注意用冰浴保持样品在10℃以下。超声打碎后在5000转/分速度下离心20分钟，去除上层清液，即得到白色沉淀的重组融合蛋白。将该融合蛋白悬浮于2M尿素溶液中，经SDS-PAGE电泳检测，其融合蛋白含量占50%。