



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112439057 A

(43)申请公布日 2021.03.05

(21)申请号 201910803838.7

C12N 15/866(2006.01)

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 中国农业科学院生物技术研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号中国农业科学院生物技术研究所

(72)发明人 张志芳 李轶女 易咏竹 刘兴健
胡小元 魏珍珍 宋浩志

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务
所(普通合伙) 11598

代理人 余光军 曾晖

(51)Int.Cl.

A61K 39/187(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

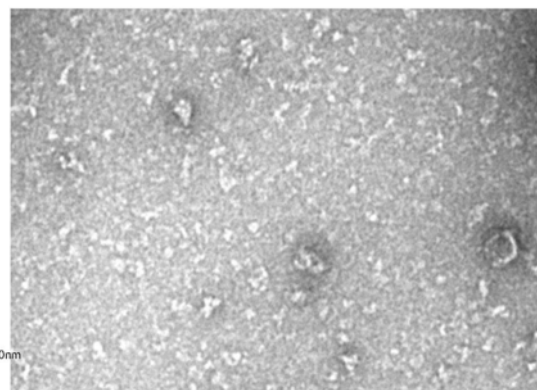
权利要求书2页 说明书21页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

基于自组装铁蛋白纳米抗原颗粒及由其制备的猪瘟疫苗和应用

(57)摘要

本发明公开了基于自组装铁蛋白纳米抗原颗粒及由其制备的猪瘟疫苗和应用。本发明将猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白与自组装铁蛋白纳米颗粒亚基融合得到融合蛋白。本发明将猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白进行单位点、双位点及多位点突变,所得到的突变体的可溶性表达量和表达效率提升显著。本发明利用原核表达系统、家蚕及AcMNPV-昆虫细胞真核表达系统表达重组蛋白或通过重组杆状病毒在脊椎动物体内进行基因呈递产生抗原诱导抗体产生。本发明所提供的疫苗通过在幽门螺杆菌铁蛋白笼形结构表面展示猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白,引起广泛中和性抗猪瘟疫病毒抗体,提高了免疫效力还扩大了免疫范围,有成为具有交叉免疫效力的通用疫苗的潜力。



1. 一种包含融合蛋白的纳米抗原颗粒,其特征在于,所述融合蛋白由猪瘟病毒囊膜E2蛋白和单体铁蛋白亚基连接得到;优选的,所述融合蛋白由猪瘟病毒囊膜E2蛋白的C端和单体铁蛋白亚基的N端通过连接肽SGG连接得到。

2. 按照权利要求1所述的包含融合蛋白的纳米抗原颗粒,其特征在于,所述单体铁蛋白亚基包括但不限于细菌铁蛋白、植物铁蛋白、藻铁蛋白、昆虫铁蛋白、真菌铁蛋白或哺乳动物铁蛋白中的任何一种;优选的,所述单体铁蛋白亚基是幽门螺杆菌铁蛋白单体,其氨基酸序列为NCBI上GenBank序列号为WP_000949190所示的氨基酸序列;

所述猪瘟病毒囊膜E2蛋白是猪瘟病毒完整E2蛋白序列;优选的,所述的猪瘟病毒囊膜E2蛋白的氨基酸序列为NCBI上Genbank序列号为ART84247.1所示的氨基酸序列。

3. 权利要求1所述融合蛋白的同感序列,其特征在于,其氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示,其编码基因的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示。

4. 权利要求3所述的同感序列的优化基因,其特征在于,其核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示。

5. 权利要求3所述融合蛋白的同感序列的突变体,其特征在于,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸按照I13H、G23M、N35A、S48K、L59N、Y66C、S78T、D86R、D97N、S109V、Y116W、A125V、E139F、V152H、D167G、N175P、V202I、P215Q、I227D或D238E中的任何一种氨基酸单位点突变方式获得的单位点突变体;优选的,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照N35A、D86R、Y116W、E139F、D167G或I227D中的任何一种氨基酸单位点突变方式获得的单位点突变体;最优选的,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照D86R氨基酸单位点获得的单位点突变体。

6. 权利要求3所述融合蛋白的同感序列的双位点突变体,其特征在于,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照N35A-D86R、N35A-Y116W、N35A-E139F、N35A-D167G、N35A-I227D、D86R-Y116W、D86R-E139F、D86R-D167G、D86R-I227D、Y116W-E139F、Y116W-D167G、Y116W-I227D、E139F-D167G、E139F-I227D或D167G-I227D中任何一种双位点突变方式获得的双位点突变体;优选的,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照D86R-Y116W、E139F-D167G或E139F-I227D中任何一种双位点突变方式获得的双位点突变体;最优选的,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照D86R-Y116W所述双位点突变方式获得的双位点突变体。

7. 权利要求3所述融合蛋白的同感序列的多位点突变体,其特征在于,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照N35A-D86R-Y116W-E139F-D167G-I227D进行多位点突变方式获得的多位点突变体。

8. 权利要求1-3任何一项所述的纳米抗原颗粒、权利要求4所述的优化基因、权利要求5-7任何一项所述的突变体在制备猪瘟疫苗中的用途。

9. 按照权利要求8所述的用途,其特征在于,包括:将权利要求1所述的融合蛋白编码基因、权利要求4所述的优化基因、权利要求5-7任何一项所述突变体的编码基因在大肠杆菌原核表达系统中进行表达,收集并纯化所表达的抗原;

或者,将权利要求1所述的融合蛋白编码基因、权利要求4所述的优化基因、权利要求5-7任何一项所述的突变体的编码基因在家蚕表达系统或AcMNPV-昆虫细胞真核表达系统中进行表达,收集并纯化所表达的抗原;优选的,将融合蛋白编码基因克隆到杆状病毒转移载体中构建得到重组转移载体;将重组转移载体与杆状病毒DNA共转染昆虫细胞,获得重组杆状病毒;将重组杆状病毒感染昆虫宿主或细胞,培养被感染的昆虫细胞或昆虫宿主表达

相应的抗原,纯化,即得;

或者,将权利要求1所述的融合蛋白编码基因、权利要求4所述的优化基因、权利要求5-7任何一项所述的突变体的编码基因克隆到杆状病毒哺乳动物的表达载体中得到重组杆状病毒;将重组杆状病毒在脊椎动物体内组织进行基因呈递产生抗原。

10. 一种猪瘟疫苗,其特征在于,包含有效量的权利要求1-2所述的纳米抗原颗粒、权利要求3所述的融合蛋白的同感序列、权利要求5-7任何一项所述的突变体和药学上可接受的佐剂或载体。

基于自组装铁蛋白纳米抗原颗粒及其制备的猪瘟疫苗和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基于自组装铁蛋白纳米抗原颗粒,尤其涉及由猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白和单体铁蛋白亚基融合在一起的纳米抗原颗粒以及由该纳米颗粒抗原制备的猪瘟疫苗,属于猪瘟疫苗的制备和应用领域。

背景技术

[0002] 猪瘟疫(Classical swine fever,CSF)又叫欧洲猪热病(European swine fever),猪霍乱(Hog cholera),中国民间也称“烂肠瘟”,是一种由猪瘟疫病毒(CSFV)引起的猪病毒性传染病,各年龄段的家猪和野猪均可感染发病。猪瘟疫最早可能发生于十九世纪三十年代的美 国中西部,直到二十世纪早期通过分析感染猪的体液猪瘟疫病原学才得以被揭示。猪瘟疫是一种伴随着出血损伤的全身性疾病,根据猪瘟疫病毒株的毒力、病毒感染剂量以及宿主条件的不同,临床表现可分为急性、亚急性、慢性和迟发型。急性感染最为严重致死率高,多见于幼畜,主要症状有发热、食欲不振、结膜炎、便秘并伴随着腹泻、神经症状、皮肤和其它器官出血等,继发性感染还会造成肠和呼吸系统损伤。研究发现猪瘟疫发病时还伴随着血细胞特别是白细胞减少症。迟发型猪瘟疫即先天感染猪瘟疫病毒,感染后的仔猪不产生特异性抗体但却终生带毒,是天生的感染源。

[0003] 猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus,CSFV)与牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和羊边界病病(BDV)共同组成了黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)。猪瘟疫病毒粒子是40~60nm的球形结构,其中含有单股正链极性RNA,病毒粒子外围包裹着脂蛋白囊膜,表面有6~8nm花穗样突起。猪瘟疫病毒的基因组大小约为12.3kb实验室已经分离出猪瘟疫病毒感染性的c DNA。病毒RNA编码4个结构基因和8个非结构基因。猪瘟疫病毒在潮湿环境以及新鲜的肉食产品中都是极其稳定的,但猪瘟疫病毒不耐热,56℃60min和60℃10min即可完全灭活病毒,猪瘟疫病毒在pH值为5~10范围内稳定,但在p H值低于3的环境下病毒毒力会下降,洗涤剂、脂溶剂、肽酶类以及常规的消毒剂的处理也可灭活病毒。中国是世界上的养猪大国,而猪瘟疫又是各年龄段的猪相对容易感染的疾病,所以猪瘟疫成为制约中国养猪业发展的重要因素之一。针对疾病最好的治疗方案莫过于防患未然,而针对各种疾病的疫苗正式发挥预防作用的主力军。传统的疫苗多为减毒活疫苗,包括天然减毒株和基因重组弱毒株等。应用减毒株疫苗的最大缺陷是减毒株在易感群体中有恢复毒力作用的风险。因此,生产安全、高效及廉价的基因工程疫苗成为新的需求。

[0004] 近年来,铁蛋白(Ferritin)作为一种纳米材料在多个领域得到应用。铁蛋白是一种广泛存在于生物体中的笼状蛋白,其蛋白外壳由24个铁蛋白亚基自组装而成,其中每三个亚基组成一个三聚体亚单位。铁蛋白的N末端伸向外表面,易于进行基因修饰,融合蛋白多肽。高度有序重复抗原在微生物体表面以5-10nm间隔分布时易于诱导产生强烈的T细胞依赖的抗体反应。铁蛋白非常稳定,能够耐受高温(70-80℃)和多种变性剂而不影响天然蛋白结构。铁蛋白对pH敏感,在pH2.0的酸性条件下蛋白壳发生解体,而当pH恢复到生理条件

(pH 7.0)时,解体的蛋白亚基又能重新组装成完整的铁蛋白。近年来对铁蛋白的研究主要集中在:(1)通过对铁蛋白内表面的修饰使铁蛋白壳内包裹上特定药物或者促进纳米材料的合成;(2)通过对铁蛋白外表面的修饰与PEG或抗体连接以扩展新的功能;(3)通过铁蛋白外表面或亚基间接触面的修饰控制铁蛋白的自组装。铁蛋白纳米颗粒展示抗原,能够显著地增强抗原的免疫原性,引起更强的体液、细胞免疫反应,因此铁蛋白是理想的纳米疫苗平台。

[0005] 利用24个亚基自组装而成的铁蛋白纳米粒子作为抗原呈递和疫苗开发平台,研制一种猪瘟疫苗,对于猪瘟的防治将具有重要的应用价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是提供一种包含猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白的融合蛋白的自组装铁蛋白纳米抗原颗粒;

[0007] 本发明的目的之二是将所述融合蛋白进行部位位点的突变进而提高融合蛋白的表达量或表达效率;

[0008] 本发明的目的之三是提供基于自组装铁蛋白纳米抗原颗粒得到的猪瘟疫疫苗;

[0009] 本发明目的之四提供高效表达所述融合蛋白的方法;

[0010] 本发明目的之五是提供一种将自组装铁蛋白纳米颗粒与猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白所构建的融合基因呈递给动物体内并在动物体内呈递抗原诱导产生抗猪瘟疫病毒抗体的方法。

[0011] 为了实现上述目的,本发明所采取的技术方案是:

[0012] 本发明首先提供了一种包含猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白的融合蛋白的纳米抗原颗粒,所述融合蛋白由猪瘟疫病毒囊膜E2的C端和单体铁蛋白亚基的N端连接得到;优选的,将猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白和单体铁蛋白亚基的N端通过连接肽SGG连接得到融合蛋白。

[0013] 所述单体铁蛋白亚基包括但不限于细菌铁蛋白、植物铁蛋白、藻铁蛋白、昆虫铁蛋白、真菌铁蛋白或哺乳动物铁蛋白中的任何一种;优选的,所述单体铁蛋白亚基是幽门螺杆菌铁蛋白单体,其氨基酸序列为NCBI上GenBank序列号为WP_000949190所示的序列。

[0014] 所述猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白所选区域包含选自以下区域:N端的信号肽、C端的跨膜区以及中间的氨基酸区域组成;优选的,所述猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白选取完整囊膜E2蛋白;最优选的,所述的猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白的氨基酸序列号为NCBI上GenBank序列号为ART84247.1所示的序列。

[0015] 本发明为了提高猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白与铁蛋白单体连接后得到的融合蛋白的表达量,本发明进一步将两者原始融合蛋白(CSFV E2-Ferritin)融合蛋白的同感序列进行突变优化,并在序列优化之后进行糖基化位点分析,以消除糖基化位点来增加可溶性表达,进一步在同感序列优化之后进行氨基酸单位点突变,双位点突变和多位点突变,以提高其可溶性表达量和表达效率:

[0016] 具体的,本发明人通过分析了20条最近年份,流行于不同地区的猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白氨基酸序列并进行比对分析,找出一条最为通用的同感序列,作为相应毒株的抗原基因,以期取得最佳的保护效果;在此基础上,本发明进一步利用OptimumGene™技术对猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白氨基酸序列进行优化,将优化后的E2蛋白氨基酸序列和铁蛋白单体亚基氨基酸序列根据大肠杆菌密码子偏好性对氨基酸序列进行改造,对影响基因转录效率、翻译效

率和蛋白折叠的GC含量、CpG二核苷酸含量、密码子偏好性、mRNA的二级结构、mRNA自由能稳定性、RNA不稳定性基因序列、重复序列等多种相关参数进行优化设计,并保持最终翻译成的蛋白序列不变。此外,为了提高铁蛋白的表达量,同时提高可溶表达,对铁蛋白单体亚基进行点突变N19Q。最终,本发明将原始融合蛋白的同感序列(SEQ ID NO.1)的核苷酸序列(SEQ ID NO.2)按照上述优化方式得到的核苷酸为SEQ ID NO.3所示的优化基因序列。

[0017] 本发明将优化后的同感序列在家蚕表达系统中进行表达,根据基因表达产物ELISA效价结果可见,密码子优化后的同感序列的表达量相比优化前有了显著提高。

[0018] 本发明获得了CSFV E2-Ferritin-C突变体以CSFV E2-Ferritin-C突变体密码子优化后的基因序列为模板,设计多对引物对保守序列进行定点突变:

[0019] 将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照I13H、G23M、N35A、S48K、L59N、Y66C、S78T、D86R、D97N、S109V、Y116W、A125V、E139F、V152H、D167G、N175P、V202I、P215Q、I227D或D238E的氨基酸单位点突变方式获得了多个单位点突变体;

[0020] 本发明所述氨基酸单位点突变“I13H”表示将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第13位氨基酸由I突变成H;其余的单位点突变的表述依此类推。

[0021] 本发明将突变后的这些单位点突变体在家蚕表达系统中进行表达,根据表达结果可见:将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列去掉跨膜区之后按照N35A、D86R、Y116W、E139F、D167G、I227D的氨基酸单位点突变方式获得的这6个突变体的表达产物的效价呈显著提升;其中,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照D86R氨基酸单位点突变获得的突变体的效价提升最为显著。

[0022] 基于所确定的部分单位点的突变是有效突变,可以达到提高CSFV E2-Ferritin-C-O-M突变体表达量的目的;考虑到氨基酸的排列顺序是蛋白质的一级结构并决定着蛋白质的高级结构,且上述进行的氨基酸单位点突变有部分突变位点的位置可能是相互关联的,本发明进一步进行氨基酸双位点突变。本发明将可以提高表达量的单突变位点两两组进行双位点突变,具体如下:

[0023] 在单位点突变的基础上,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照N35A-D86R、N35A-Y116W、N35A-E139F、N35A-D167G、N35A-I227D、D86R-Y116W、D86R-E139F、D86R-D167G、D86R-I227D、Y116W-E139F、Y116W-D167G、Y116W-I227D、E139F-D167G、E139F-I227D或D167G-I227D的氨基酸双位点突变方式获得15个双位点突变。

[0024] 本发明所述氨基酸双位点突变“N35A-D86R”表示将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第35位氨基酸由N突变成A以及将第86位氨基酸由D突变成R;其余的双位点突变的表述依此类推。

[0025] 本发明将获得的上述15个双位点突变体分别在家蚕表达系统中进行表达,根据表达结果可见:将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照D86R-Y116W、E139F-D167G、E139F-I227D的氨基酸双位点突变方式获得的这3个位点突变体的表达产物的效价呈显著提升,其中,将SEQ ID NO.1所示的氨基酸按照D86R-Y113W氨基酸双位点突变获得的突变体的效价提升最为显著。

[0026] 鉴于部分双位点突变能够有效提升表达量后效价,考虑到氨基酸的排列顺序是蛋白质的一级结构,并决定着蛋白质的高级结构,推测可能是由于进行的氨基酸单位点突变有部分突变点的位置相互靠近彼此关联的,本发明进一步尝试进行氨基酸多位点突变。本

发明通过分析糖基化位点,得出6个单突变位点能有效提高目的基因的表达量,因此多位点突变是基于上述获得有效的双位点突变序列的基础之上,通过融合PCR的方法进行多突变位点的定点突变,具体突变方式如下:将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列按照N35A-D86R-Y116W-E139F-D167G-I227D氨基酸多位点突变方式获得多位点突变体。

[0027] 本发明所述氨基酸多位点突变“N35A-D86R-Y116W-E139F-D167G-I227D”表示将SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列同时进行下述突变:将第35位的氨基酸由N突变为A,将第86位的氨基酸由D突变为R,将第116位的氨基酸由Y突变为W,将第139位的氨基酸由E突变为F,将第167位的氨基酸由D突变为G以及将第227位的氨基酸由I突变为D。

[0028] 本发明将获得的上述多位点突变体在家蚕表达系统中进行表达,根据表达结果可见:所得的两个多位点突变体的表达量相比上述单突变体、双突变体的表达量均有显著提升。本发明进一步将这两个多位点突变体在家蚕表达系统中的表达产物经过初步纯化后采用电镜进行观察,观察结果可见产物大小与预期符合的纳米颗粒,笼状体的直径为12纳米左右,仔细观察可见有天线状突出。

[0029] 本发明将获得的多位点突变体编码基因克隆到杆状病毒哺乳动物的表达载体中构建得到呈递基因的重组杆状病毒;将重组杆状病毒呈递给小鼠,结果发现小鼠所产生的抗体效价明显高于健康蚕蛹对照和传统疫苗。

[0030] 因此,本发明所提供的包含融合蛋白的自组装铁蛋白纳米抗原颗粒能应用于制备猪瘟疫苗,其应用方法包括:

[0031] (I) 将所述的融合蛋白编码基因采用原核表达系统在原核细胞中进行表达得到纳米抗原颗粒,将所表达的纳米抗原颗粒产物纯化后与医学上可接受的载体拼接在一起得到猪瘟疫苗;

[0032] 作为参考,采用原核表达系统在原核细胞中表达纳米抗原颗粒的步骤包括:

[0033] (1) 将融合蛋白原始序列或突变优化后的融合蛋白序列克隆到表达载体pET28a上,得到重组质粒pET28a-CSFV E2-Ferritin;

[0034] (2) 将重组质粒pET28a-CSFV E2-Ferritin转化到BL21 (DE3) 感受态细胞中表达,随后经过镍柱纯化,即得。

[0035] (II) 将所述的融合蛋白编码基因采用真核表达系统在真核细胞中进行表达,将所表达的抗原产物纯化后与医学上可接受的载体拼接在一起得到猪瘟疫苗。

[0036] 作为参考,所述的融合蛋白编码基因采用真核表达系统在真核细胞中进行表达的方法包括以下步骤:

[0037] 将所述的融合蛋白编码基因在家蚕表达系统中进行表达,收集并纯化所表达的抗原;优选的,将所述的融合蛋白编码基因构建到家蚕杆状表达载体中制备得到重组家蚕杆状病毒;将重组家蚕杆状病毒在家蚕细胞中扩增后在家蚕或蚕蛹中进行表达;

[0038] 或者将所述的融合蛋白编码基因在AcMNPV-昆虫细胞真核表达系统中进行表达,收集并纯化所表达的抗原;优选的,将融合蛋白编码基因克隆到杆状病毒转移载体中构建得到重组杆状病毒转移载体;将重组杆状病毒转移载体与杆状病毒DNA共转染昆虫细胞,获得重组杆状病毒;将重组杆状病毒感染昆虫宿主或昆虫细胞,培养被感染的昆虫细胞或昆虫宿主表达相应的抗原,纯化,即得;

[0039] (III) 还可将所述的融合蛋白编码基因克隆到基因呈递载体上构建得到向脊椎动

物细胞或个体中呈递外源基因的重组杆状病毒转移载体,将重组杆状病毒转移载体转染家蚕细胞得到重组病毒;所得到的重组病毒通过注射或口服的方式在动物体内呈递抗原并诱导动物产生抗体。

[0040] 本发明进一步提供了一种防治猪瘟的疫苗,包括:预防或治疗上有效量的包含融合蛋白的自组装铁蛋白纳米抗原颗粒以及药学上可接受的载体。

[0041] 本发明的疫苗可以以各种不同的药物赋载体配制。它们可以包括盐和缓冲剂以提供生理学的离子强度和pH,表面活性剂诸如聚山梨醇酯20和80以防止抗原聚集,用于抗原稳定的稳定剂,诸如PEG、海藻糖和明胶及用于缓释的聚合物诸如CMC、HEC和葡聚糖。疫苗还可以受控释放或增强的展示系统配制,诸如水凝胶、病毒体、纳米颗粒和乳液。疫苗还可以佐剂配制,以进一步增加交叉反应免疫应答和交叉保护,所述合适的佐剂可以选自多糖诸如脂多糖和皂苷、核酸诸如CpG和聚I:C、脂质诸如MPL(单磷酰脂质A)、蛋白质诸如细菌鞭毛蛋白、无机盐诸如铝盐和磷酸钙、乳剂诸如弗氏不完全佐剂、MF59和AS03和各种To11样受体配体。可以用处理的抗原测试不同的佐剂,以鉴定在合适的佐剂剂量产生较高水平的交叉反应免疫应答和交叉保护,包括完全的或100%的保护的合适的佐剂。

[0042] 本发明的猪瘟疫苗可通过各种途径使用,如肌内、皮下、鼻内、局部、舌下、或口服。

[0043] 本发明所提供的疫苗能通过幽门螺杆菌铁蛋白笼形结构表面展示猪瘟病毒囊膜E2蛋白三聚体结构,从而能够引起广泛中和性猪瘟抗体。此种疫苗诱导个体产生的中和性抗体不仅增加了免疫效力,还增加了免疫范围,能免疫不同年份同型以及异型猪瘟病毒。

[0044] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

[0045] 1、本发明利用原核表达系统大肠杆菌和家蚕杆状病毒和AcMNPV-昆虫细胞表达重组蛋白疫苗,疫苗制备过程不涉及到活的有害病毒,相比传统的制备猪瘟疫苗方法操作更加安全、简便,适合进行快速大规模生产;

[0046] 2、本发明提供的纳米猪瘟疫苗可以诱导具有广谱性质的猪瘟抗体,为制备一种通用猪瘟疫苗打下基础。

[0047] 3、本发明提供的纳米猪瘟疫苗,用这种纳米猪瘟疫苗免疫接种动物而诱导产生的抗猪瘟抗体水平明显比传统疫苗的高。

[0048] 本发明所涉及到的术语定义

[0049] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术及科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解相同的含义。

[0050] 词语“抗原”和“免疫原”可互换使用,且是指能够诱导特异性体液(抗体)和细胞免疫应答的分子、物质、蛋白质、糖蛋白、或活病毒。

[0051] 术语“抗原性”是指抗体与特异性抗原反应或结合的能力;术语“免疫原性”是指抗原或疫苗诱导特异性免疫应答的能力;术语“免疫应答”是指针对抗原、疫苗或感染因子的体液或抗体介导的和细胞介导的免疫应答;术语“疫苗”是指用于针对感染性或非感染性疾病的治疗性处理或预防性免疫的包括抗原的组合物;术语“免疫”是指通过接种疫苗或感染产生的免疫应答,其提供针对感染性或外来试剂的保护;术语“重组蛋白质或抗原”是指以重组DNA技术产生的蛋白质或抗原,其可用于在包括细菌、哺乳类细胞、昆虫细胞和植物的各种宿主中克隆和表达基因以产生蛋白质。术语“效力”是指如通过指定的效力测定测量的在抗原制剂或疫苗中抗原的量。

[0052] 术语“突变”和“突变体”在此具有它们的常用含义,指的是在核酸或多肽序列中的遗传的、天然存在的或引入的变化,它们的意义与本领域人员通常所知的意义相同。

[0053] 术语“宿主细胞”或“重组宿主细胞”意指包含本发明多核苷酸的细胞,而不管使用何种方法进行插入以产生重组宿主细胞,例如直接摄取、转导、f配对或所属领域中已知的其它方法。外源性多核苷酸可保持为例如质粒的非整合载体或者可整合入宿主基因组中。

[0054] 术语“转染”指真核细胞由于外源DNA掺入而获得新的遗传标志的过程。

附图说明

[0055] 图1 CSFV E2-Ferritin在原核表达系统中表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图;M为Marker;1-6为CSFV E2-Ferritin原核表达样品;空载为pET-28a载体的原核表达样品;未诱导为未诱导的原核表达样品。

[0056] 图2 CSFV E2-Ferritin-C-0-M₆在家蚕表达系统中表达产物Western blotting检测图;A为CSFV E2-Ferritin-C-0-M₆家蚕表达产物;B为阴性对照。

[0057] 图3 CSFV E2-Ferritin-C-0-M₆在家蚕表达系统中表达产物的电镜图。

具体实施方式

[0058] 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,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,但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0059] 1、试验材料与试剂

[0060] (1) 菌株、病毒株与载体:原核表达载体pET-28a(+)、大肠杆菌TOP10菌株、转移载体pVL1393、原核表达菌株BL21(DE3)、家蚕细胞BmN、家蚕核型多角体病毒亲本株BmBacmid、家蚕品种JY1均为中国农业科学院生物技术研究所分子微生物实验室保存;

[0061] (2) 铁蛋白序列和猪瘟疫病毒囊膜E2蛋白基因序列:通过分析得到的共有序列送至金斯瑞公司合成,并克隆到原核表达载体pUC57载体上。

[0062] (3) 酶与试剂:限制性内切酶、T4 DNA连接酶及所对应的缓冲液均购自Promega公司;LA Taq聚合酶及缓冲液购自TaKaRa公司;各种规格的DNA和蛋白质分子量标准为TranGen Biotech公司产品;2K Plus II DNA Marker购自北京全式金生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗购自MBL公司;DEPC、M-MLV-Rtase(逆转录酶)购自Promega公司;铁蛋白一抗为本实验室提供;

[0063] (4) 生化试剂:Tris、Ampicillin、Kanamycin、IPTG、SDS、尿素、咪唑、TritonX-100、TEMED(N,N,N',N'-Tetramethylethylene diamine)、过硫酸铵(Ammonium Persulfate)、卡那霉素(Kanamycin)购自Sigma公司;bisacrylamide、acrylamide、IPTG、X-Gal购自Promega公司;琼脂糖为Sunbiotech公司产品;酵母抽提物(Yeast Extract)、胰蛋白胨均购自英国OXOID公司;0.2um、0.45um滤器购自Gelman Sciences公司;溴化乙锭(EB)、考马斯亮兰R-250购自Fluka公司;Ni-NTA Agarose、Proteinase K、胎牛血清购自Invitrogen公司;牛血清白蛋白购自罗氏公司;其它均为国产或进口分析纯试剂。引物合成与基因测序均由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

[0064] (5) 培养基:大肠杆菌培养基为LB培养基;家蚕昆虫细胞培养基为TC-100购自AppliChem公司;

[0065] (6) 猪瘟病毒囊膜E2蛋白与铁蛋白融合构建的纳米疫苗的动物实验在隔离实验室进行。

[0066] 2、实验方法中用于定点突变的融合PCR方法

[0067] 参照邝翡婷等人(一种载体构建的新方法:重组融合PCR法,基因组学与应用生物学,2012年,第31卷,第6期,第634-639页)所描述的方法进行。

[0068] 实施例1 CSFV E2-Ferritin原始序列纳米颗粒疫苗的制备与效力检测

[0069] 1有关溶液和培养基的配置

[0070] 有关溶液和培养基的配置方法参照相关工具书(Joseph et al.,分子克隆实验指南第三版,2002;奥斯伯,等人,精编分子生物学指南,1998)。

[0071] 2猪瘟病毒囊膜E2蛋白基因序列和铁蛋白基因序列的合成。

[0072] 为了使猪瘟病毒囊膜E2蛋白与铁蛋白更好的融合表达,利用信号肽分析软件(SignalP)和跨膜结构域分析软件(TMhMM)对猪瘟病毒囊膜E2蛋白的氨基酸序列进行分析,我们使用的同感序列无信号肽区,其胞外结构域为前246个氨基酸。

[0073] 为了促进猪瘟病毒与铁蛋白融合纳米颗粒的表达效率,并提高可溶表达,将幽门螺杆菌铁蛋白氨基酸序列中第19位天冬酰胺(N)突变为谷氨酰胺(Q),以消除糖基化位点。其中猪瘟病毒囊膜E2蛋白序列与铁蛋白序列之间由一段连接肽连接(SGG),将铁蛋白氨基酸序列前4个氨基酸去掉,然后将连接肽连在铁蛋白N端第5个氨基酸上。

[0074] 为了提高目的基因在家蚕杆状病毒真核表达体系中的翻译起始效率,在基因前面加了Kozak序列AAC,为了提高翻译终止效率,终止密码子改为TAA。此外,还去除了基因序列内部的BamHI、EcoRI等限制性酶切位点,在基因上游加上了BamHI,在基因下游加上了EcoRI限制性酶切位点,以便后续克隆到真核转移载体pVL1393中。

[0075] 将目的基因序列去掉信号肽,利用pET-28a(+)载体上的ATG进行起始起始翻译。此外,还去除了基因序列内部的BamHI、EcoRI等限制性酶切位点,在基因上游加上了BamHI,在基因下游加上了EcoRI限制性酶切位点,以便后续克隆到原核载体pET-28a(+)上。

[0076] 将上述所设计的猪瘟病毒囊膜E2蛋白基因序列和铁蛋白序列人工合成。

[0077] 3猪瘟病毒和铁蛋白融合蛋白的质粒构建

[0078] 3.1猪瘟病毒和铁蛋白融合蛋白的PCR扩增

[0079] 用融合PCR技术将猪瘟病毒和铁蛋白融合在一起。具体实验方法见上述实验方法2.3.1.1大肠杆菌表达质粒的PCR扩增

[0080] PCR扩增CSFV E2胞外域序列:以质粒pUC57-CSFV E2为模板

[0081] F1	5' -CGGGATCCATGCGGCTAGCCTGTAAGGA-3'
R1	5' -GCCACCGGAGCCATCTCTGTTACAGTCCG-3'

[0082] PCR扩增CSFV E2胞外域序列:以质粒pUC57-CSFV E2-Ferritin为模板,

[0083] PCR扩增Ferritin序列:以pUC57-Ferritin为模板,

[0084] F2	5' -TTCAGCAGCTTGATGATGTCGCCACCGGA-3'
R2	5' -CGGAATTCTTAGCTCTTGCGGGACTTGG-3'

[0085] 以PCR产物CSFV E2和Ferritin为模板,Overlap-PCR扩增出CSFV E2-Ferritin

[0086]	F1	5' -CGGGATCCATGCGGCTAGCCTGTAAGGA-3'
	R2	5' -CGGAATTCTTAGCTCTTGCGGGACTTGG-3'

[0087] 3.1.2家蚕表达系统中表达质粒的PCR扩增

[0088] PCR扩增CSFV E2胞外域序列:以质粒pUC57-CSFV E2为模板

[0089]	F3	5' -CGGGATCCAATATGCGGCTAGCCTGTAAGGA-3'
	R3	5' -GCCACCGGAGCCATCTCTGTTACAGTCCG-3'

[0090] PCR扩增Ferritin序列:以pUC57-Ferritin为模板,

[0091]	F4	5' -TTCAGCAGCTTGATGATGTCGCCACCGGA-3'
	R4	5' -CGGAATTCTTAGCTCTTGCGGGACTTGG-3'

[0092] 以PCR产物CSFV E2和Ferritin为模板,Overlap-PCR扩增出CSFV E2-Ferritin

[0093]	F3	5' -CGGGATCCAATATGCGGCTAGCCTGTAAGGA-3'
	R4	5' -CGGAATTCTTAGCTCTTGCGGGACTTGG-3'

[0094] PCR反应体系为表1:

[0095] 表1 PCR反应体系

试剂	体积
dd H ₂ O	40μL
10×LA Buffer	5 μL
dNTP	1 μL
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
模板	1 μL
LA Taq 酶	1 μL
总体积	50μL

[0097] PCR参数设置:

95°C	5 min	
95°C	30 s	}
58°C	30 s	
		30 循环
72°C	3min	
72°C	10min	

[0099] 3.2玻璃奶纯化回收DNA片段

[0100] 配置1% (w/v) 琼脂糖凝胶,对PCR扩增的产物进行电泳;将琼脂糖凝胶置于紫外灯下,快速切下含有单一的目的核酸条带的凝胶,放入1.5mL的离心管中,称重,加三倍体积的6M NaI,放于37°C恒温培养箱中融化;向已经完全融化的溶液中加入8μL Glassmilk,混匀,冰浴5min,中间摇匀两次;8000rpm离心10s,弃掉上清;加800μL New Wash洗涤,轻轻弹起后离心,重复2次;弃去上清,将离心管放37°C恒温培养箱干燥2~3min;干燥后加20μL 0.1×TE溶解,混合充分溶解DNA,12000rpm离心5min,取上清立即用于连接,其余放-20°C保存。

[0101] 3.3目的基因PCR产物酶切处理

[0102] 将PCR产物跑胶,胶回收正确的产物用限制性内切酶BamH I和EcoR I进行双酶切反应获得目的片段CSFV E2-Ferritin。酶切体系如下表2所示:

[0103] 表2酶切体系

	酶切各组分	体积
	ddH ₂ O	33μL
	10×Buffer E	5 μL
[0104]	胶回收产物	10 μL
	<i>BamH I</i>	1 μL
	<i>EcoR I</i>	1 μL
	总体积	50 μL

[0105] 3.4感受态细胞的小量制备

[0106] 制备大肠杆菌Top10感受态细胞, -80℃保存。

[0107] 3.5目的基因与pET-28a (+) 载体和pVL1393载体的连接与转化

[0108] 3.5.1酶切处理pET-28a (+) 和pVL1393载体

[0109] 用限制性内切酶BamHI和EcoRI对转移载体pVL1393和pET-28a (+) 进行双酶切, 65℃灭活20min, 保存于-20℃备用。

[0110] 3.5.2连接

[0111] 酶切回收的目的片段与经BamHI/EcoRI双酶切处理后的转移载体pVL1393和pET-28a (+) 的连接。用T₄ DNA连接酶, 16℃, 连接过夜。连接体系如下表3所示:

[0112] 表3连接体系

	连接体系	体积
[0113]	回收目的片段	7μL
	10×Buffer	1μL
	载体	1 μL
[0114]	T ₄ DNA 连接酶	1 μL
	总体积	10μL

[0115] 3.5.3转化

[0116] 取-80℃保存的感受态细胞, 快速融化一半, 加入上述连接产物3μL, 冰上放置半小时; 42℃恒温水浴锅中放置90s, 迅速置于冰上3~5min; 向管中加入适量的1mL LB培养基, 37℃恒温培养箱中静置培养60min; 离心, 弃去大部分上清, 留200μL涂布于LB平板 (100μg/mL Amp) 上, 37℃恒温培养箱正置培养30min, 后倒置培养过夜。

[0117] 3.6核酸快速抽提法粗筛阳性克隆

[0118] 挑取LB平板上的单菌落, 接种于LB液体培养基 (100μg/mL Amp) 中, 置于37℃恒温振荡培养器中, 设置转速为220rpm, 过夜培养; 取500μL菌液于离心管内, 收集菌体; 加入30μL Loading Buffer和20μL酚/氯仿 (1:1), 用涡旋振荡器充分混匀, 使菌体重悬; 12000rpm离心3min, 取8μL上清进行琼脂糖凝胶电泳, 同时以同样方法处理的空载体作为对照。凝胶成像系统的紫外灯下观察条带, 选取质粒带明显退后的菌液提取质粒。

[0119] 3.7 SDS碱裂解法提取质粒DNA

[0120] 收集3mL菌液于离心管中,SDS碱裂解法提取质粒DNA,-20℃保存备用。

[0121] 3.8阳性克隆的酶切与测序鉴定

[0122] 酶切体系如表4所示:

[0123] 表4酶切体系

	酶切各组分	体积
	ddH ₂ O	14 μL
	10×Buffer E	2 μL
[0124]	重组质粒 DNA	3 μL
	<i>Bam</i> HI	0.5 μL
	<i>Eco</i> R I	0.5 μL
	总体积	20 μL

[0125] 37℃反应2h后,取7μL用1%的琼脂糖进行电泳检测。酶切检测正确的质粒DNA测序,结果和目的基因一致,得到的重组质粒命名为pET28a-CSFV E2-Ferritin、pVL1393-CSFV E2-Ferritin。

[0126] 4重组质粒的表达与纯化

[0127] 4.1重组质粒在大肠杆菌中诱导表达

[0128] 将鉴定正确的重组表达质粒pET28a-CSFV E2-Ferritin转化BL21感受态细胞,在37℃,IPTG终浓度为0.5mM的条件下,分别诱导1h、2h、3h、4h、5h后收集菌液,用SDS-PAGE电泳分析表达情况,pET28a-CSFV E2-Ferritin在约52kDa处出现了特异条带,这与预期的带His的重组蛋白大小相符,而未诱导的重组表达载体没有产生该特异条带,表明融合蛋白在大肠杆菌内成功表达,在添加IPTG后1~4h,表达量逐渐增加,而诱导6h和诱导8h的多积累的重组蛋白几乎一样多。用超声波将菌体细胞破碎,发现上清有少量目的蛋白,沉淀中有明显目的条带,说明重组蛋白His-CSFV E2-Ferritin主要以不可溶的包涵体形式存在。聚丙烯凝胶电泳图如图1所示。

[0129] 4.2重组蛋白的大量表达与包涵体蛋白样品的处理

[0130] 将保存于-80℃表达量高的菌种划线,37℃培养过夜,挑取单菌落接种于4mL LB液体培养基(50μg/mL Kan)中,37℃培养过夜;1%的菌液转接于200mL含的LB液体培养基(50μg/mL Kan)中,37℃震荡培养,使OD值达0.6左右,加入IPTG(终浓度为0.5mM),37℃继续培养4h;4℃,5000rpm离心10min收集菌体,用无菌ddH₂O洗2次,离心收集菌体。用裂解缓冲液重悬菌体,用量为100μL裂解液/mL菌液,冰浴30min,冰上超声波破碎裂解菌体;4℃,12000rpm离心10min,弃上清,沉淀即为重组蛋白包涵体;沉淀用适量包涵体洗涤液I和包涵体洗涤液II重悬并洗涤,弃上清;用适量脲NTA-0Buffer重悬沉淀,4℃,过夜溶解。

[0131] 4.3镍柱亲和层析纯化重组蛋白

[0132] 取上述溶解过夜的包涵体溶液,4℃,12000rpm离心15min,取上清,用0.45μm膜过滤;用Ni-NTA树脂层析柱纯化该表达蛋白,在脲NTA-25、脲NTA-50、脲NTA-100、脲NTA-250、脲NTA-500,5个梯度收集洗脱液,收集穿透液、洗脱液,每管收集一个NTA体积,SDS-PAGE分析确定蛋白质的结合情况、目标蛋白在洗脱液中的分布情况。蛋白电泳显示在25mM咪唑浓度洗脱下来的蛋白最多。纯化后的重组蛋白经SDS-PAGE电泳后,观察大小正确,条带单一的蛋白带,纯化后的蛋白含量为6mg/mL。

[0133] 4.4多克隆抗体的制备

[0134] 将纯化后的His-Ferritin蛋白定量后收集1.5mg蛋白,经SDS-PAGE电泳后切下含有目的蛋白的凝胶,尽量切碎,37℃烘干后研磨成粉末,用生理盐水将抗原蛋白稀释到2倍最终浓度,充分混合佐剂,无菌条件下取出所需用量与抗原蛋白按体积比1:1迅速混匀,通过后腿小腿肌肉注射免疫小鼠,两免之后收集全部血清,测定血清的抗体效价。

[0135] 5重组质粒在家蚕真核表达系统中表达与纯化

[0136] 5.1家蚕核型多角体病毒亲本株BmBacmid的繁殖及病毒DNA的制备

[0137] 按AppliChem公司产品说明配制1×TC-100培养基,用2M NaOH将pH调至6.22,过滤除菌后的培养基补加10%胎牛血清,27℃下培养家蚕细胞BmN。用家蚕核型多角体病毒亲本株感染对数生长期的细胞约50mL,3~4d后收集病毒感染液,10000rpm离心10min,除去沉淀,上清用25000rpm离心1小时,除上清,用1ml病毒DNA抽提液(1L中含Tris 12.1g,EDTA 33.6g,KCl 14.1g,pH 7.5)悬浮病毒粒子沉淀,转移至1.5ml离心管中,加入蛋白酶K至终浓度为50μg/ml,50℃保温2小时,再加入35%的Sarkosel至终浓度为1%,继续于50℃保温2小时,分别用等体积的饱和酚、苯酚:氯仿(1:1)、氯仿依次抽提,将上层水相转移到一个新管中,加入1/10体积的3M NaCl,再加入2倍体积的无水乙醇,-20℃放置2小时以上沉淀病毒DNA,5000rpm离心10分钟,沉淀用75%乙醇洗一次,冷冻干燥。溶解在100μl TE Buffer中,放4℃保存备用。

[0138] 5.2重组家蚕杆状病毒rBmBacmid (P_{PH}-CSFV E2-Ferritin) 的构建和获得

[0139] 接种大约1×10⁶细胞于15cm²培养瓶中,细胞贴壁后,除去含胎牛血清(FBS)培养基,用不含FBS的培养基洗三次,加1.5ml无FBS培养基。向一灭菌管中依次加入1μg家蚕杆状病毒亲本株BmBacmid DNA(专利号为:ZL201110142492.4),2μg重组转移质粒pVL1393-CSFV E2-Ferritin和5μl脂质体,用无菌双蒸水补足体积到60μl,轻轻混匀,静置15min后,逐滴加入到培养瓶中进行共转染。27℃培养4h后补加1.5ml无血清培养基和300μl FBS。27℃恒温培养4~5天,收集上清液用于重组病毒rBmBacmid (P_{PH}-CSFV E2-Ferritin) 的筛选。接种适量细胞(约70~80%)于35mm小平皿中,细胞贴壁后,吸去培养基,将共转染上清进行不同浓度稀释,取1ml共转染液加到贴壁细胞中,分布均匀。27℃感染1h后,吸去感染液,将2%低熔点琼脂糖凝胶于60℃水浴中融化,冷至40℃与40℃预热的2×TC-100培养基(含20%FBS)混合均匀,每平皿加4ml胶,待凝固后用Parafilm封口,27℃倒置培养3~5d,显微镜观察。将不含有多角体的空斑挑选出来,重复以上步骤,经过2~3轮的纯化获得纯的重组家蚕杆状病毒rBmBacmid (P_{PH}-CSFV E2-Ferritin)。

[0140] 5.3重组病毒rBmBacmid (P_{PH}-CSFV E2-Ferritin) 在家蚕细胞中的扩增

[0141] 将重组家蚕杆状病毒rBmBacmid (P_{PH}-CSFV E2-Ferritin) 感染正常生长的BmN细胞,培养3天后收集上清液,上清中即含有大量的重组病毒rBmBacmid (P_{PH}-CSFV E2-Ferritin)。

[0142] 5.4重组病毒的鉴定

[0143] 利用PCR方法分析外源基因整合。游离病毒基因组DNA的提取方法如下:取病毒上清150μl,加入150μl(0.5mol/L)的NaOH后混匀,再加入20μl(8mol/L)的醋酸铵,混匀后用等体积的酚和氯仿分别抽提一次,酒精沉淀后用20μl的TE溶解DNA。

[0144] 取上述病毒基因组DNA 1μl进行PCR扩增,反应条件为:94℃变性5min、94℃1min、

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/087056123145006106>