

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910160070.2

[51] Int. Cl.

- G12N 15/31 (2006.01)*
- G12N 15/63 (2006.01)*
- G12N 7/01 (2006.01)*
- C07K 14/30 (2006.01)*
- G12N 15/70 (2006.01)*
- G12Q 1/68 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年3月3日

[11] 公开号 CN 101659954A

[51] Int. Cl. (续)

- G01N 33/53 (2006.01)*
- A61K 48/00 (2006.01)*
- A61K 39/02 (2006.01)*
- A61P 11/00 (2006.01)*
- A61P 31/04 (2006.01)*
- C12Q 1/70 (2006.01)*
- C12R 1/35 (2006.01)*
- C12R 1/19 (2006.01)*
- C12R 1/93 (2006.01)*

[22] 申请日 2009.7.22

[21] 申请号 200910160070.2

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
 地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

[72] 发明人 辛九庆 李媛 郭丹 郭军
 陈超 曹培丽 张美晶 董惠
 姜海芳

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司
 代理人 孙皓晨 费碧华

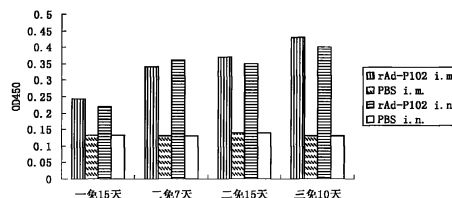
权利要求书1页 说明书20页 附图4页

[54] 发明名称

表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用

[57] 摘要

本发明公开了表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用。本发明首先将猪肺炎支原体 P102 蛋白的基因进行突变，将突变后的全基因 (SEQ ID NO: 1) 克隆到穿梭载体 pShuttle - CMV 上，得到重组穿梭载体；经线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的感受态细胞中，通过细菌内同源重组获得重组腺病毒。重组腺病毒经间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定证明该重组腺病毒成功表达了 P102 蛋白。将本发明重组腺病毒以肌注和滴鼻两种途径免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠，重组病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和胞免疫应答，表明本发明重组腺病毒可应用于猪支原体肺炎的诊断、预防或治疗。



- 1、编码猪肺炎支原体 P102 蛋白的 cDNA 序列，其特征在于：其是 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。
- 2、含有权利要求 1 所述 cDNA 序列的表达载体。
- 3、按照权利要求 2 所述的表达载体，其特征在于：所述的表达载体是重组腺病毒表达载体。
- 4、含有权利要求 2 或 3 所述表达载体的宿主细胞。
- 5、权利要求 1 所述 cDNA 序列编码的蛋白质，其特征在于：其是序列表 SEQ ID NO: 2 所述的氨基酸序列。
- 6、一种重组腺病毒，其特征在于：含有权利要求 1 所述的 cDNA 序列。
- 7、按照权利要求 6 所述的重组腺病毒，其特征在于：其微生物保藏号是 CGMCC No. 2987。
- 8、一种制备权利要求 6 或 7 所述重组腺病毒的方法，包括：将 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列克隆到穿梭载体 pShuttle-CMV 上，得到重组穿梭载体；重组穿梭载体经线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的感受态细胞中，通过细菌内同源重组获得重组腺病毒。
- 9、权利要求 1 所述的 cDNA 序列或权利要求 5 所述的蛋白质在制备诊断、预防或治疗猪支原体肺炎药物中的用途。
- 10、权利要求 6 或 7 所述的重组腺病毒在制备诊断、预防或治疗猪支原体肺炎药物中的用途。

表达猪肺炎支原体 P102 蛋白的重组腺病毒及其应用

技术领域

本发明涉及一种重排后的 cDNA 序列以及含有该 cDNA 序列的重组腺病毒，尤其涉及将编码猪肺炎支原体 P102 蛋白基因进行重排和优化后所得到的 cDNA 序列，本发明还涉及含有该 cDNA 序列的重组腺病毒以及它们在猪支原体肺炎的诊断、预防或治疗中的应用，属于猪支原体肺炎的防治领域。

背景技术

猪肺炎支原体 (*Mycoplasma, hyopneumoniae*, Mhp) 是猪支原体肺炎 (MPS) 的主要病原体，该病又称猪地方流行性肺炎 (EPP)，本病在我国流行范围广，对猪业造成了严重的危害。MPS 以接触性、高度传染性、慢性、高发病率和低死亡率为特点，主要表现为咳嗽、呼吸困难，解剖可见肺组织肉变或大理石样病变。其主要危害是引起猪的生长受阻和饲料转化率大幅下降。

国内外多年的研究成果表明，Mhp 与猪呼吸道纤毛的特异性黏附是引起猪支原体肺炎发生的先决条件，而 Mhp 表面的黏着素（黏附因子）在 Mhp 致病中起关键作用。目前，已阐明的 Mhp 粘附因子共有 3 种，即 P97 (232 株)、Mhp1 (P5722 株) 和 J 株的一个分子量为 94kDa 的蛋白，其中研究最为深入的是 P97 蛋白。1995 年张启敬利用单克

隆抗体 F2 G5 抑制 Mhp 对猪呼吸道纤毛细胞的粘附作用，免疫印迹结果显示 F2G5 主要识别一个约 97kDa 的蛋白 (P97)。电子显微镜观察发现 F2G5 识别的蛋白质随机分布于 Mhp 的表面。这些结果显示 P97 的功能是作为 Mhp 的粘附因子。在 P97 下游有一段与之相邻的基因 P102。由于它与 P97 相邻，预测它也有细胞黏附或辅助 P97 的细胞黏附作用。

在防治猪支原体肺炎中，发达国家试图通过建立无特定病原体猪群的猪场来预防猪支原体肺炎，但因耗资较大、管理困难等多方面的因素，未能取得良好的效果，特别是在发展中国家更显得不切合实际。在使用药物治疗该病时，存在治疗时间长、经济耗费大、效果不佳、药物残留以及食品安全等多种不利因素，即使临床治愈也可能长期带菌，给养猪业带来潜在的隐患。所以多数国家都倾向于使用疫苗来防治此病。70 年代以来，国外相继报道了使用灭活疫苗来预防本病，也取得了较好的效果。我国从 60 年代开始研制弱毒疫苗，目前已经有相应的产品问世，但国内生产的弱毒疫苗通过对仔猪进行肺脏接种来进行免疫，在实际应用过程中由于操作困难等原因很容易造成接种失败或异物性肺炎，限制了疫苗的应用。进口的灭活疫苗由于价格较贵、免疫效果不十分理想等原因应用并不太广泛。因此近年各国学者都在努力尝试研制包括猪肺炎支原体基因工程活载体疫苗和亚单位疫苗等新型疫苗用于猪肺炎支原体免疫。

目前，Mhp 的防控主要采用药物治疗、免疫接种和种群净化，疫苗免疫主要应用灭活疫苗和弱毒疫苗，但由于各种因素使得灭活疫苗和弱毒疫苗的推广应用受到影响。因此，近年各国学者都在努力研制

亚单位疫苗和活载体疫苗。以活病毒为载体的疫苗，可诱导机体产生针对目的抗原的免疫应答，是一种极具前景的新型疫苗形式。腺病毒具有粘膜感染的特点，用于制备重组病毒疫苗时，有利于刺激机体产生粘膜反应，从而保护机体免受通过呼吸道粘膜途径入侵病原体的危害。研究表明，腺病毒作为疫苗载体在诱导粘膜免疫方面具有明显的优势，可模仿病毒天然的感染方式，并直接在体内表达天然的、保持完整生物活性的抗原蛋白，因此常常能诱导有效的特异性粘膜和体液免疫应答。

发明内容

本发明的目的之一是将编码猪肺炎支原体 P102 蛋白基因进行重排和优化，得到一种重排后的编码猪肺炎支原体 P102 蛋白的 cDNA 序列；

本发明目的之二是提供一种含有上述 cDNA 序列的表达载体；

本发明目的之三是提供一种含有上述表达载体的宿主细胞；

本发明的目的之四是提供一种含有上述 cDNA 序列的重组腺病毒；

本发明的目的之五是提供一种由上述 cDNA 序列所编码的蛋白；

本发明的目的之六是将所编码或表达的蛋白应用于猪支原体肺炎的诊断和防治；

本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的：

本发明首先利用体外诱变技术将猪肺炎支原体 P102 蛋白的阅读

框架中的共 2700bp 个核苷酸中的 7 个 UGA 密码子诱变为 UGG，诱变后的核苷酸序列见序列表 SEQ ID NO: 1 所示。

含有 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列的表达载体以及含有该表达载体的宿主细胞也包括在本发明的保护范围之内；其中，所述的表达载体可以是穿梭载体或者是腺病毒表达载体等；

本发明还提供了一种含有上述 SEQ ID NO: 1 核苷酸序列的重组腺病毒，其微生物保藏号是 CGMCC No. 2987；保藏日期是：2009 年 3 月 26 日；分类命名是：腺病毒；保藏单位：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；保藏地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所。

本发明还提供了一种制备上述重组腺病毒的方法，包括：将 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列克隆到穿梭载体 pShuttle-CMV 上，得到重组穿梭载体；重组穿梭质粒经 Pme I 线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的 BJ5183 感受态细胞中，通过细菌内同源重组获得重组腺病毒；

重组腺病毒经间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定，证明了该重组腺病毒成功的表达了 P102 蛋白，所表达的氨基酸序列为序列表 SEQ ID NO: 2 所示。将该重组病毒进行纯化并进行滴度测定，获得了高纯度、高滴度的表达 P102 基因的重组腺病毒。

通过 RT-PCR、免疫荧光和 Western blot 检测证明 SEQ ID NO: 1 序列在 293 细胞内获得表达。利用 TCID₅₀ 方法测得腺病毒滴度为 5×10^6 TCID₅₀/ml。利用重组腺病毒以肌注和滴鼻两种途径免疫 6~8

周龄雌性 Balb/c 小鼠，重组病毒可诱导小鼠产生血清与肺匀浆液特异性 IgG，该重组腺病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和胞免疫应答，说明本发明重组腺病毒可制备成疫苗用于猪支原体肺炎的预防或治疗。

本发明的详细描述：

目的基因的突变：将猪肺炎支原体 P102 蛋白的阅读框架中 7 个 UGA 密码子进行突变。首先以支原体的基因组 DNA 为模板，设计三对特异性引物将全长 2700bp 的 P102 基因分成三部分进行克隆(A1、A2、B1、B2、C1、C2，其中 A1、B1 位于突变位点处，A2 和 B1，B2 和 C1 存在互补序列)，回收扩增的三段特异性片段(A、B、C)酶切后连接到 pMD-18T 载体上。以该载体作为模板，进一步通过 PCR 方法对 UGA 密码子进行替代，最后利用互补序列使用多次 PCR 方法，将三段 DNA 重新连接成一调完整序列。经序列测定后证实所扩增的特异性片段为所需的突变片段 (SEQ ID NO: 1)。

重组病毒的构建：将该突变目的片断 (SEQ ID NO: 1) 定向克隆到载体 pShuttle-CMV 载体中，将鉴定正确的重组穿梭质粒经 Pme I 线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的 BJ5183 感受态细胞中，通过细菌内同源重组获得重组腺病毒 DNA。纯化后的重组腺病毒质粒经 Pac I 酶切线性化后转染 AD293 细胞获得重组腺病毒。重组腺病毒经间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定，证明了该重组腺病毒成功的表达了 P102 蛋白。重组腺病毒经肌注、滴鼻两种途径免疫小鼠均可以刺激小鼠产生 P102 的特异性血清 IgG 抗体。首免两周后即可检出，

三免十天抗体值达到高峰，并且在三免后 18 天制备的肺匀浆液中，也都可以检出特异性的 IgG 抗体。

本发明利用腺病毒粘膜感染的特点，采用非复制型腺病毒为载体，构建了表达猪肺炎支原体P102基因的非复制型重组腺病毒。将突变成功的含有5个终止密码子猪肺炎支原体P102基克隆至腺病毒穿梭载体pShuttle-CMV中，pShuttle-CMV-P102用内切酶*Pme I*线性化后电转化内含pAdeasy-1骨架载体的BJ5183感受态细胞，通过细菌内的重组获得重组腺病毒DNA，将*Pac I*线性化的重组腺病毒DNA转染AD293细胞得到重组腺病毒。经过RT-PCR、Western blot及IFA检测证明Mhp P102基因在AD293细胞内成功获得表达。

为了研究重组腺病毒的免疫效果，通过滴鼻和肌注两种不同的途径免疫小鼠。动物试验结果表明本发明重组病毒能够刺激小鼠产生针对P102蛋白的体液免疫反应，从总体上看肌注与滴鼻产生的体液免疫反应水平较高，肌注血清IgG抗体水平略高于滴鼻。并于三免后18天制备的肺匀浆液中，也都可以检出特异性的IgG抗体。

本发明采用的非复制型腺病毒AdEasy系统缺失了腺病毒基因组的E1和E3区，这些片段的缺失可增强机体对外源抗原的免疫反应，更好地刺激机体产生免疫保护作用。因此与复制型腺病毒相比，非复制型腺病毒不仅更安全有效，而且以低剂量的方式产生抗原蛋白而不裂解细胞，故表达抗原的时间更持久，有利于激发长期的免疫反应。重组腺病毒载体的稳定性好，安全性高，整合入染色体的概率小，不存在演变为有害微生物的可能性。对动物无致癌性，对人类致病性极低，

长期的应用实践表明,该载体在用于人类的基因治疗方面和生态环境未造成不利影响,所以本发明所构建的重组腺病毒具有广阔的应用前景。

附图说明

图1 第1轮片段PCR扩增结果; M: DNA分子标准2000; 1: 上游引物A1, 下游突变引物a2 PCR扩增产物;

图2 第1轮片段PCR扩增结果; M: DNA分子标准2000; 2: 下游引物A2, 上游突变引物a1PCR扩增产物;

图3 M: DNA分子标准2000; 1: 上游引物A1, 下游引物A2PCR扩增产物;

图4 M: DNA分子标准2000; 1: A1、B2为引物PCR扩增产物;

图5 M: DNA分子标准15000; 1: A1、C3为引物PCR扩增产物;

图6 P102基因的PCR扩增; 1: P102C基因PCR扩增产物; 2 阴性对照;

图7 pshuttle-CMV-P102的酶切鉴定; M: DL15000 DNA Marker; 1: pShuttle-CMV 被 Not I+HindIII 酶切后的产物; 2: pShuttle-CMV-P102 被 Not I+HindIII酶切后的产物;

图8 pShuttle-CMV-P102的酶切鉴定; M: λ -Hind III DNA Marker; 1-2: pAd-P102被 *Pac I*酶切后的产物;

图9 rAd-P102的RT-PCR鉴定; M: DL2000 DNA Marker; 1: AD293 cells; 2: RT-PCR产物;

图10 重组腺病毒P102蛋白表达的Western Blot分析; M: 预先染色蛋白Marker ; 1: rAd-P102; 2: AD293 细胞;

图11 重组腺病毒P102蛋白表达的间接免疫荧光鉴定; A: AD293 cells infected by rAd-P102; B: AD293 cells ;

图12 rAd-P102免疫小鼠后的血清IgG的测定;

图13 小鼠肺匀浆液IgG的测定;

具体实施方式

以下通过实施来进一步描述本发明, 应该理解的是, 这些实施例仅用于例证的目的, 决不限本发明的范围。

实施例1 P102基因的突变

1.1 引物设计与 PCR 扩增

引物 A1 5' 端引物设有 CCACC 序列, ATG 启动子, Hind III 位点, 3' 端引物设有 TAA 终止密码和 Xho I 位点。

A1:	ATGGATCCAAACCTTTTTGGTTAATAA	扩增A段基因引物
A2:	CAGGTCGACATAATCAGAGAGGCTAAT	
a1:	AAAAAATGGTCGGCAAAAACAGT	位点241-243突变引物
a2:	CCGACCATTTTTTAAAATTATCTTTAATT	
a3:	GCTCTTTCAAGTCGTGAAAACCAATTAC	位点610-612突变引物
a4:	TTCACGACTTGAAAGAGCTTTGGTTG	
a5:	TCTAAAATTCTAAAATCCTGGCTTGAAA	位点877-879突变引物
a6:	ATTTTAGAATTTTAGAAATTTCTGATTTG	
B1:	CAGGAATTCTGGTATGGATCTCCGAATTCA	扩增B段基因引物
B2:	CAGGTCGACAAAAGTGCTTACCTCTGTT	
C1:	CAGGGATCCGCAGAAGAAGCTAAG	扩增C段基因引物
C2:	CCGGGTCGACTTACTTTTTAACATAGTTTC	
c1:	ACAAGCATTTGGACAGCTTTTAATTTT	位点1810-1812突变引物
c2:	GTCCAAATGCTTGTCCCAAATTTTTC	
	P42A5e: gct aaa gaa acc ttt gaa att aca gtc aaa atc gt	位点2161

	P42A6e: ttt caa agg ttt ctt tag cfc taa acc ttg atc ag	
c3:	GAATGGTTTCATCTTGATTGGTATCA	位点2521-2523突 变引物
c4:	AGATGAAACCATTCTAAAGTAAAGAAAT	

注：小写字母代表突变引物；大写字母代表扩增引物（A1在引物设计时已将位点33-36突变成TAA）

1.2 两轮PCR均得到了预期大小的扩增片断（以A段第76个氨基酸为例将TGA突变成TGG）

第1轮PCR扩增出了1条约720bp和1条约220bp的条带，第2轮PCR扩增出了1条约936bp的条带，符合预期结果。（见图1、图2、图3）

1.3 A+B拼接后PCR扩增片断

以突变成功的基因片断A和基因片断B为模板，A1、B2为引物，扩增出1条约1600bp左右的条带，符合预期结果（图4）。

1.4 A+B+C拼接后PCR扩增完整P102基因片断

以突变成功的基因片断A+B和C为模板，A1、C3为引物，扩增出1条约2670bp左右的条带，符合预期结果，并送测序，证明7个TGA已全部突变成TGG，突变成功（图5），测序后的序列为SEQ ID NO: 1所示。

实施例2 猪肺炎支原体 P102 基因重组腺病毒的构建及表达

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、细胞、基因片断

猪肺炎支原体 Yin-1 株是本实验室于 2005 年由现地分离并鉴定的；P102 基因（实施例 1 所得到的突变序列 SEQ ID NO: 1）；E. coli DH5 α 为 Novagen 公司产品；腺病毒表达载体系统 (AdEasy™ XL

Adenoviral Vector System) 包括穿梭载体 pShuttle-CMV、电转化感受态细胞 BJ5183-AD-1、包装细胞 AD-293 和超级感受态细胞 XL-10 购自 Stratagene 公司。

1.2 主要试剂

组织/细胞DNA提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均为上海华舜公司产品；蛋白质分子质量标准、限制性内切酶NotI、HindIII和Pyrobest™ DNA聚合酶为Fermentas MBI公司产品；限制性内切酶Pme I、Pac I为NEB公司产品；大量质粒提取试剂盒购自Promega公司；羊抗兔IgG酶标二抗为Sigma公司产品；FITC标记山羊抗兔IgG为中山金桥公司产品；转染试剂lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司；DNA分子质量标准为宝生物工程（大连）有限公司产品；针对P102蛋白的多克隆抗体P102C由本实验室研制。

1.3 引物设计与PCR扩增

参照Mhp国际标准株232株的全基因序列，用Primer 5.0软件设计扩增P102基因的引物：预计扩增2670bp的片段。P1：
5' -CAGGCGGCCGCATGTTACTTAAAAACCTTTT-3'；P2：
5' -CGCGGAAGCTTTTAAACATAGTTTCTAATCAACC-3'；P1下划线字母构成Not I酶切位点，P2下划线构成HindIII酶切位点。以突变成功的MhpP102基因（SEQ ID NO: 1）为模板，利用Pyrobest™ DNA聚合酶、P1和P2扩增P102基因。PCR反应条件为：95℃预变性5min，94℃变性45s，52℃退火45s，72℃延伸3min，35个循环后，72℃延伸10min。产物于10 g/L琼脂糖凝胶电泳上电泳30 min（100V），回收目的片段。

1.4 构建含 P102 基因的重组穿梭载体

将上述PCR产物用胶回收试剂盒回收。回收产物用Not I 和HindIII 酶切与同样酶切的穿梭质粒pShuttle-CMV连接后，转化到DH5 α 感受态细胞中。利用Kan抗性筛选重组质粒，并经PCR、酶切鉴定重组质粒，获得阳性重组子pShuttle-CMV-P102并送上海生工公司测序。用MegAlign软件对测序结果与国际已知菌株的序列进行分析。

1.5 重组腺病毒质粒pAdCMV-P102的构建

将穿梭质粒pShuttle-CMV-P102用*Pme I*限制性内切酶完全酶切线性化，经胶回收试剂盒回收，无菌双蒸水溶解，使质粒浓度为200ng/ μ L左右。取5 μ l的线性化的pShuttle-CMV-P102电转化到含有腺病毒骨架载体pAdEasy-1的大肠杆菌BJ5183感受态细胞中，于含50 μ g/mL Kan抗性LB平板上培养16-18个小时。挑取单菌落，提质粒，分别用PCR和*Pac I*酶切鉴定。

1.6 重组腺病毒pAdCMV-P102在AD293细胞中的包装

将鉴定正确的重组腺病毒DNA转入DH5 α 感受态细胞中，挑取单克隆扩大培养，提取质粒，经*Pac I*酶切后酚氯仿抽提并用乙醇沉淀，用lipofectamine™2000将*Pac I*线性化的重组腺病毒DNA转染AD293细胞，待出现明显病变后收集细胞，在-80 $^{\circ}$ C/37 $^{\circ}$ C反复冻融裂解细胞3次后，收取上清即为病毒原液，用病毒原液可再次感染细胞用于病毒传代。

1.7 重组腺病毒pAdCMV-P102的鉴定

1.7.1 RT-PCR鉴定

1.7.1.1 RT-PCR引物设计

参照Mhp国际标准株232株的全基因序列，用Primer 5.0软件设计扩增包含部分P102基因的RT-PCR引物。P3:

5' -CAGGAATTCTGGTATGGATCTCCGAATTCA-3' ; P4:

5' -CAGGTCGACAAAAGTGCTTACCTTGACTGTT-3' , 预计扩增片断699bp。

1.7.1.2 RT-PCR

用总RNA提取试剂盒分别提取病变细胞和正常293细胞的总RNA。

反转录: 取上述RNA模板13.5 μ L, 加入1 μ L随机引物, 70 $^{\circ}$ C作用10min后, 立即冰浴3min, 然后加入Rnasin(40U/ μ L) 0.5 μ L, M-MLV Reaction Buffer 5 μ L, dNTPs (2.5mM) 4 μ L, 灭菌超纯水1 μ L, M-MLV RT (200U/ μ L) 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C水浴1h。以P3、P4为引物进行PCR扩增: 上下游引物(5pM)各1.2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTP1.6 μ L, MgCl₂1.2 μ L, rTaq酶1 μ L, 灭菌超纯水10.8 μ L, cDNA模板1 μ L。扩增结束后用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.2 重组腺病毒pAdCMV-P102的Western blot鉴定

用Western及IP细胞裂解液裂解重组型病毒pAdCMV-P102感染产生病变的AD293细胞, 提取细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳分离, 转NC膜。加入1:50倍稀释的一抗Ag_{P102c}37 $^{\circ}$ C反应1h。羊抗兔IgG酶标二抗(1:3000稀释) 37 $^{\circ}$ C反应1h。用DAB化学发光法显色。

1.7.3 重组腺病毒pAdCMV-P102的免疫荧光鉴定

在96孔板中铺AD293, 长满后接重组腺病毒pAdCMV-P102。待出现明显病变弃培养液后用预冷的甲醇/丙酮(1:1)室温固定15min, 吸

弃固定液，PBS洗三次，每次10min，干燥。在孔中加入1:50稀释的一抗Ag_{P102C}温盒内37℃作用1h。PBS洗三次后加入1:100稀释的FITC标记山羊抗兔IgG为二抗37℃避光作用1h。在荧光倒置显微镜下观察。

1.8 重组腺病毒的滴度测定

将浓缩的病毒进行倍比稀释，用TCID₅₀的方法测定其滴度。将重组病毒作10⁻²~10⁻¹¹系列稀释，分别接种于已单层的AD293细胞96孔板，每个稀释度4个孔，100μL/孔，同时设不加病毒的正常细胞对照，置37℃，5% CO₂培养箱培养，连续观察记录病变细胞7d。按照Reed-Muench法计算TCID₅₀。

1.9 动物实验

以肌注和滴鼻两种途径免疫6~8周龄雌性Balb/c小鼠，每组5只，剂量均为5×10⁶ TCID₅₀/只，以接种PBS组为对照，每隔15d免疫1次，共免疫3次。分别在首免前和每次免疫前采血，分离血清。八周后小鼠处死后取肺制匀浆液，以pET-28a为载体表达的P102C末端蛋白(P102 C-28a)为抗原，以鼠血清和肺匀浆液为一抗，以羊抗小鼠IgG为二抗进行间接ELISA。

2 实验结果

2.1 P102基因的扩增

以突变完成的P102基因为模板，用P1，P2扩增P102基因，10g/L琼脂糖凝胶电泳结果得到2670bp左右的条带，与预期的目的片段大小相符（图6）。

2.2 穿梭载体pShuttle-CMV-102的鉴定

将扩增片段插入到 pShuttle-CMV 穿梭载体中, 经 Not I +HindIII 酶切, 从候选重组穿梭质粒中切出一个 2670bp 大小的 DNA 片段。序列测定结果表明 P102 基因插入的位置、大小和读码框架均正确, 获得重组穿梭载体。(图 7)

2.3 重组腺病毒 pAdCMV-P102 的获得与酶切鉴定

将 pShuttle-CMV-P102 用内切酶 *Pme I* 线性化后电转化内含 pAeasy-1 骨架载体的 BJ5183 感受态细胞, pShuttle-CMV-P102 与 pAeasy-1 在 BJ5183 内发生同源重组, 用 *Pac I* 酶切鉴定后在电泳图上显示为一条大小为 4.5kb 的小片段和 1 条大小约 30kb 的大片段 (图 8)。鉴定为阳性的腺病毒基因组质粒, *Pac I* 线性化后, 通过脂质体转染 AD293 细胞, 7-10 天后细胞出现肿胀、圆缩等典型的细胞病变, 待 14 天后细胞完全病变脱壁。收获所有细胞反复冻融后取上清得到重组腺病毒原液, 将原液感染 293 细胞产生病变。

2.4 pAdCMV-P102 表达 MhpP102 的 RT-PCR 鉴定

提取重组腺病毒总 RNA, 用包含部分 P102 基因的上下游引物 P3, P4 进行 PCR, 扩增出与预期相符的 699bp 特异性片段 (图 9)。

2.5 pAdCMV-P102 表达 MhpP102 的 Western blot 鉴定

将重组病毒接种 AD293 细胞, 收取病变后的细胞进行 SDS-PAGE、转膜, 并进行 Western blot 分析, 该重组病毒能在 AD293 细胞中表达大小约为 102kDa 的 P102 蛋白 (图 10)。

2.6 pAdCMV-P102 表达 MhpP102 的免疫荧光鉴定

将重组病毒接种长满 AD293 细胞的 96 孔板进行间接免疫荧光试验, 可以发现该重组病毒可以在细胞中表达 P102 蛋白 (图 11)。

2.7 重组腺病毒的纯化及滴度测定

将腺病毒第5代细胞培养物进行系列稀释，接种AD293细胞，连续观察7d，通过Reed-Muench法计算TCID₅₀，可以得到滴度为10⁶TCID₅₀/ml的腺病毒。

2.8 重组腺病毒免疫小鼠可产生特异性的IgG抗体

重组腺病毒经肌注、滴鼻两种途径免疫小鼠均可以刺激小鼠产生P102的特异性血清IgG抗体。首免两周后即可检出，三免十天抗体值达到高峰（图12），并且在三免后18天制备的肺匀浆液中，也都可以检出特异性的IgG抗体（图13）。

序列表.txt

序列表

<110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

<120> 表达猪肺炎支原体P102蛋白的重组腺病毒及其应用

<130> KLPI090287

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2697

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 1

```

atgttactta aaaaaccttt ttggttaata acaacaattg ccggaattag tcttagttta    60
tcagccgctg ttggtacagt tgcggaatt aattcttata ataaatcata ttattcttat    120
ctaatgaaa atccaagtca gctaaaagta gcaaaaaatg ctaaattag tcaggaaaaa    180
tttgattcaa ttgttttaaa tcttaagatt aaagataatt ttaaaaaatg gtcggcaaaa    240
acagttttaa ctgctgccaa aagcgatctt tatcgttata atcttgtttc tgcttttgat    300
ctaagccaac taataacaa tgattattca gttagttttg atcttgaaaa tgcagtagtt    360
gatcaaaatt cgattaaana tgttattatt tatgcaaat ctgataagga tcaataact    420
tattcaaac aaattgtact taaaggcttt ggaaatacag aacaagctag aactaat    480
gattttagcc aaattgattc gagcaagtct tttgttgatc ttcaagggc aaatctaact    540
ttgatggaat tccaaat    acttgcccaa aattttgaaa atgaaagagg aagtaattgg    600
ttttcacgac ttgaaagagc tttggttga tcaaaagcga gtctttcact ttataattcc    660
ttaggagaac ccgatttttt aggccagat tatcaattag acccagtttt ggatcgaaaa    720
aaattattaa ctttgctaaa taaagatgga aaattagctc ttggacttaa tttagtcaa    780
atttcaacta aaaaaactat gaatttaaat cttgaagttc gcggcgcat ttcaaatcag    840
gaaatttcta aaattctaaa atcctggctt gaaacaaatc ttcaaggcaa attaaaaacc    900
aaagatgatt tgcaaatggc actagtaaaa gataaaatta gcctctctga ttattggtat    960
ggatctccga attcaaaagt aaatacatcc caaattttta caaaaagtaa aggattttaa    1020
gatctttttg atttaaggga gtcaaat    tttcttaata ccaaactcgg aactgtctat    1080
ttaagtatta ttcccact tttagatcca agtcagatt ctggttga taagaaaaa    1140
ctagttgaaa atcaaaaaat tcgctttgaa attacagctt ctttaaacg aaaagctatt    1200
gataaaaaat tcatcatcca ggatcttcca gttttgttg atctaaaagt tgattt    1260

```

序列表.txt

```

aaataccaag ccgctgttgc ccaaatgttt ggaacgataa aatcagttaa agaattttca 1320
atgcctgaag atcaagatgc aaaacttta tctcaaatg aaataaaaca gcgagttgat 1380
cgtctttttg aactagcaaa aacagtgact aatttgaaa atccaagtga agaagttctt 1440
aaaagcattt atttattaaa tacgggaaaa tatttagttg accaagacca ggaaaaagta 1500
aaacaagagc taaaactgt tattgagggc ttaaatcaa aggcaaatac tcaaaaaaca 1560
gaaaaaata gccccacaca accgaaaaaa ccagaggttt cactagctaa aacaacagaa 1620
aattcagcaa aacagtcaa gggaagcact ttgcagaag aagctaaggg tcaaagtcaa 1680
agtcagcaaa cacgggcagt ttccacttca tcgcctcaaa ctagtcaaaa tttgaattct 1740
aattccacaa ccagtacgaa tttagcctta gaaaatgaaa aatttgaac aagcatttgg 1800
acagctttta attttgctaa tatttataat cttgaaaata caaaaagcga atatgagatc 1860
tcaactttag gaataagct attttttgat tttaaattag ttgataaac taatcaaaat 1920
ctaattttgg ctcagtccaa aattagtctt aataatatta ttaattctaa taaatctgcc 1980
tatgatataa ttaagaatt caatcccgat gtatttttag atggaacaat taattatcaa 2040
gaccaaggaa gagataaaaa agaatttata ctaaagatt taagtataa taaattaata 2100
ttaaatcag aagatgcaat tcaaactgat caaggtttag agctaaagaa acctttgaaa 2160
ttacagtcaa aatcgtctaa tccagaaaa gagatatcaa ctctttata taccggagca 2220
atttatttag tttttgatgc aaaaaact tctgatggta attgattaa tcttttagcc 2280
gatagaaaag gaaaaggact tgtaattaaa gttaaaagt cagataataa catacctata 2340
accaaagaaa ttgttgaaaa tggtacttat ttatatgaaa ttcttctggtg taaggattca 2400
attaaggtaa attcttattt tttccaacg aagtacccaa aacgtgtaaa acgtcttaat 2460
ttcaagatta accctaaaga caccttgcca aatttcttta ctttagaatg gtttcatctt 2520
gattggtatc aaatcgccc aggccaacaa aataaaaaac cacaacaaaa cgctaagaaa 2580
gaacctacaa ttatattaaa aacgctggca atatttaatg ataatcatt tgcagagaaa 2640
ggaagtttaa caaaaagaag tgaattaatt aacgggttga ttagaaacta tgtttaa 2697

```

<210> 2

<211> 898

<212> PRT

<213> Mycoplasma, hyopneumoniae

<400> 2

Met Leu Leu Lys Lys Pro Phe Trp Leu Ile Thr Thr Ile Ala Gly Ile
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Ala Ala Val Gly Thr Val Val Gly Ile Asn Ser
20 25 30

Tyr Asn Lys Ser Tyr Tyr Ser Tyr Leu Asn Glu Asn Pro Ser Gln Leu
35 40 45

Lys Val Ala Lys Asn Ala Lys Ile Ser Gln Glu Lys Phe Asp Ser Ile
50 55 60

序列表.txt

Val Leu Asn Leu Lys Ile Lys Asp Asn Phe Lys Lys Trp Ser Ala Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Leu Thr Ala Ala Lys Ser Asp Leu Tyr Arg Tyr Asn Leu Val
 85 90 95
 Ser Ala Phe Asp Leu Ser Gln Leu Ile Asn Asn Asp Tyr Ser Val Ser
 100 105 110
 Phe Asp Leu Glu Asn Ala Val Val Asp Gln Asn Ser Ile Lys Asn Val
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Ala Lys Ser Asp Lys Asp Gln Ile Thr Tyr Ser Lys Gln
 130 135 140
 Ile Val Leu Lys Gly Phe Gly Asn Thr Glu Gln Ala Arg Thr Asn Phe
 145 150 155 160
 Asp Phe Ser Gln Ile Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Asp Leu Ser Arg
 165 170 175
 Ala Asn Leu Thr Leu Met Glu Phe Gln Ile Leu Leu Ala Gln Asn Phe
 180 185 190
 Glu Asn Glu Arg Gly Ser Asn Trp Phe Ser Arg Leu Glu Arg Ala Leu
 195 200 205
 Val Ala Ser Lys Ala Ser Leu Ser Leu Tyr Asn Ser Leu Gly Glu Pro
 210 215 220
 Val Phe Leu Gly Pro Asp Tyr Gln Leu Asp Pro Val Leu Asp Arg Lys
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Thr Leu Leu Asn Lys Asp Gly Lys Leu Ala Leu Gly Leu
 245 250 255
 Asn Leu Val Gln Ile Ser Thr Lys Lys Thr Met Asn Leu Asn Leu Glu
 260 265 270
 Val Arg Gly Ala Ile Ser Asn Gln Glu Ile Ser Lys Ile Leu Lys Ser
 275 280 285
 Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gln Gly Lys Leu Lys Thr Lys Asp Asp Leu
 290 295 300
 Gln Met Ala Leu Val Lys Asp Lys Ile Ser Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr
 305 310 315 320
 Gly Ser Pro Asn Ser Lys Val Asn Thr Ser Gln Ile Leu Thr Lys Ser
 325 330 335
 Lys Gly Phe Lys Asp Leu Phe Asp Leu Arg Glu Ser Asn Phe Phe Leu
 340 345 350
 Asn Thr Lys Ile Gly Thr Val Tyr Leu Ser Ile Ile Pro Lys Leu Leu
 355 360 365

序列表.txt

Asp Pro Ser Gln Ile Ser Val Val Asp Lys Lys Lys Leu Val Glu Asn
 370 375 380

Gln Lys Ile Arg Phe Glu Ile Thr Ala Ser Leu Lys Arg Lys Ala Ile
 385 390 395 400

Asp Lys Lys Phe Ile Ile Gln Asp Leu Pro Val Phe Val Asp Leu Lys
 405 410 415

Val Asp Phe Asn Lys Tyr Gln Ala Ala Val Ala Gln Met Phe Gly Thr
 420 425 430

Ile Lys Ser Val Lys Glu Phe Ser Met Pro Glu Asp Gln Asp Ala Lys
 435 440 445

Thr Leu Ser Ser Asn Glu Ile Lys Gln Arg Val Asp Arg Leu Phe Glu
 450 455 460

Leu Ala Lys Thr Val Thr Asn Leu Glu Asn Pro Ser Glu Glu Val Leu
 465 470 475 480

Lys Ser Ile Tyr Leu Leu Asn Thr Gly Lys Tyr Leu Val Asp Gln Asp
 485 490 495

Gln Glu Lys Val Lys Gln Glu Leu Lys Thr Val Ile Glu Gly Leu Lys
 500 505 510

Ser Lys Ala Asn Thr Gln Lys Thr Glu Lys Asn Ser Pro Thr Gln Pro
 515 520 525

Lys Lys Pro Glu Val Ser Leu Ala Lys Thr Thr Glu Asn Ser Ala Lys
 530 535 540

Thr Val Lys Gly Ser Thr Phe Ala Glu Glu Ala Lys Gly Gln Ser Gln
 545 550 555 560

Ser Gln Gln Thr Arg Ala Val Ser Thr Ser Ser Pro Gln Thr Ser Gln
 565 570 575

Asn Leu Asn Ser Asn Ser Thr Thr Ser Thr Asn Leu Ala Leu Glu Asn
 580 585 590

Glu Lys Phe Gly Thr Ser Ile Trp Thr Ala Phe Asn Phe Ala Asn Ile
 595 600 605

Tyr Asn Leu Glu Asn Thr Lys Ser Glu Tyr Glu Ile Ser Thr Leu Gly
 610 615 620

Asn Lys Leu Phe Phe Asp Phe Lys Leu Val Asp Lys Thr Asn Gln Asn
 625 630 635 640

Leu Ile Leu Ala Gln Ser Lys Ile Ser Leu Asn Asn Ile Ile Asn Ser
 645 650 655

Asn Lys Ser Ala Tyr Asp Ile Ile Lys Lys Phe Asn Pro Asp Val Phe
 660 665 670

序列表.txt

Leu Asp Gly Thr Ile Asn Tyr Gln Asp Gln Gly Arg Asp Lys Lys Glu
 675 680 685
 Phe Ile Leu Lys Asp Leu Ser Asp Asn Lys Leu Ile Phe Lys Ser Glu
 690 695 700
 Asp Ala Ile Gln Thr Asp Gln Gly Leu Glu Leu Lys Lys Pro Leu Lys
 705 710 715 720
 Leu Gln Ser Lys Ser Ser Asn Pro Glu Lys Glu Ile Ser Thr Ser Leu
 725 730 735
 Tyr Thr Gly Ala Ile Tyr Leu Val Phe Asp Ala Lys Asn Thr Ser Asp
 740 745 750
 Gly Asn Trp Ile Asn Leu Leu Ala Asp Arg Lys Gly Lys Gly Leu Val
 755 760 765
 Ile Lys Val Lys Ser Ser Asp Asn Asn Ile Pro Ile Thr Lys Glu Ile
 770 775 780
 Val Glu Asn Gly Thr Tyr Leu Tyr Glu Ile Leu Ala Gly Lys Asp Ser
 785 790 795 800
 Ile Lys Val Asn Ser Tyr Phe Phe Pro Thr Lys Tyr Pro Lys Arg Val
 805 810 815
 Lys Arg Leu Asn Phe Lys Ile Asn Pro Lys Asp Thr Leu Pro Asn Phe
 820 825 830
 Phe Thr Leu Glu Trp Phe His Leu Asp Trp Tyr Gln Ile Gly Pro Gly
 835 840 845
 Glu Gln Asn Lys Lys Pro Gln Gln Asn Ala Lys Lys Glu Pro Thr Ile
 850 855 860
 Ile Leu Lys Thr Leu Ala Ile Phe Asn Asp Lys Ser Phe Ala Glu Lys
 865 870 875 880
 Gly Ser Leu Thr Lys Arg Ser Glu Leu Ile Asn Gly Leu Ile Arg Asn
 885 890 895
 Tyr Val

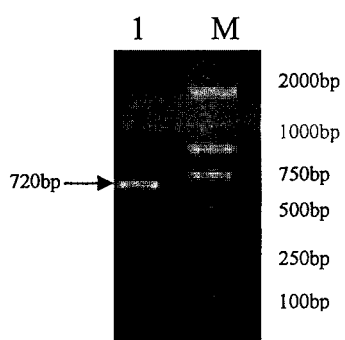


图1

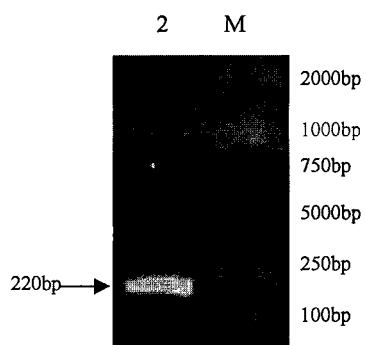


图2

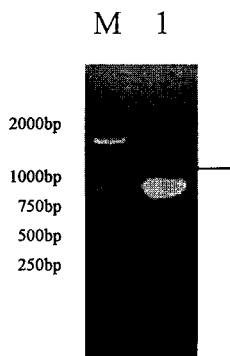


图3

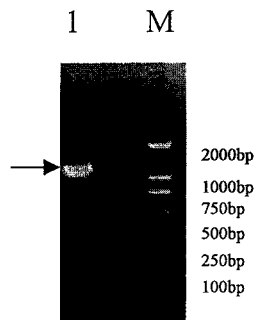


图4

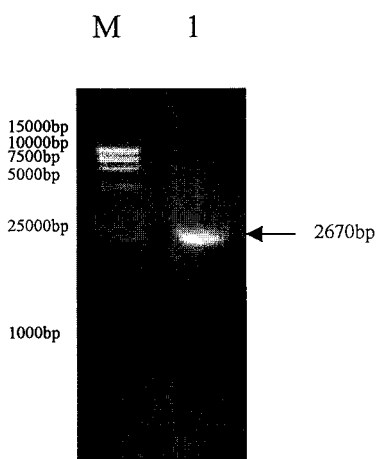


图5.

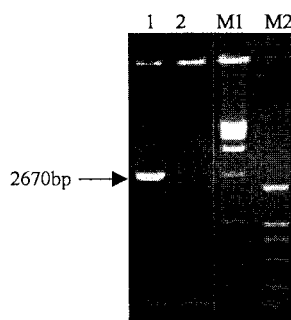


图6

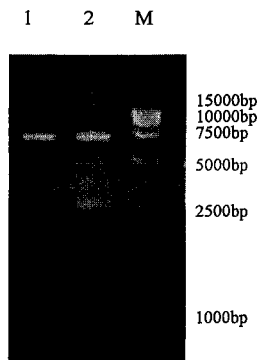


图7

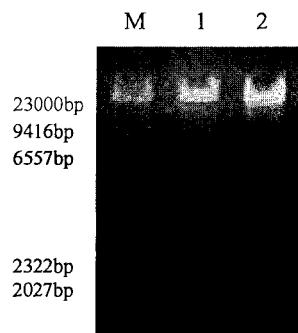


图8

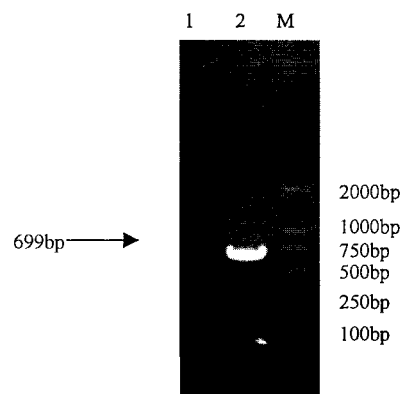


图9

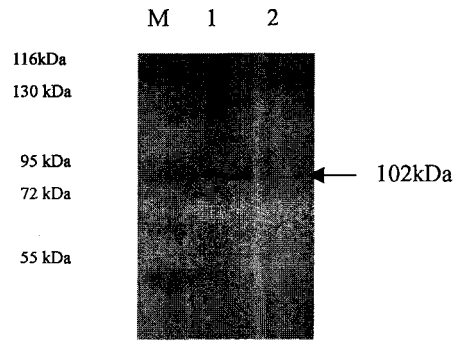


图 10

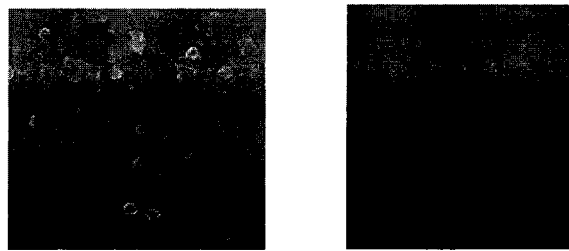


图 11

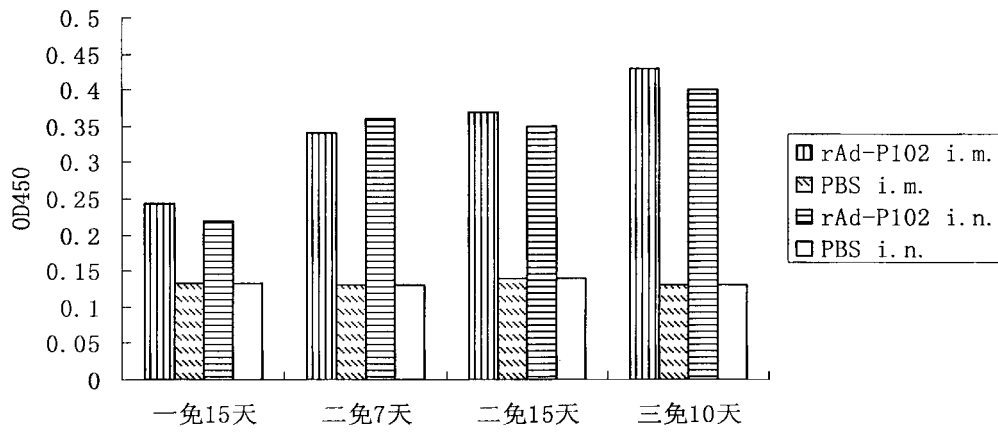


图 12

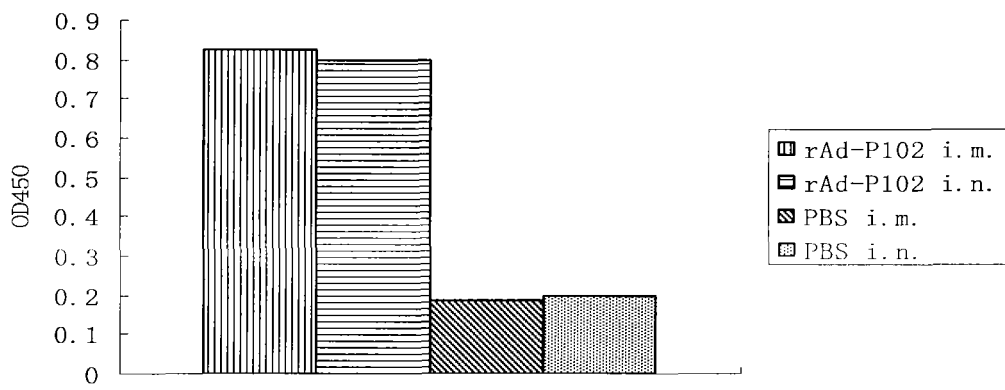


图 13

专利名称(译)	表达猪肺炎支原体P102蛋白的重组腺病毒及其应用		
公开(公告)号	CN101659954A	公开(公告)日	2010-03-03
申请号	CN200910160070.2	申请日	2009-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	辛九庆 李媛 郭丹 郭军 陈超 曹培丽 张美晶 董惠 姜海芳		
发明人	辛九庆 李媛 郭丹 郭军 陈超 曹培丽 张美晶 董惠 姜海芳		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/63 C12N7/01 C07K14/30 C12N15/70 C12Q1/68 G01N33/53 A61K48/00 A61K39/02 A61P11/00 A61P31/04 C12Q1/70 C12R1/35 C12R1/19 C12R1/93		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN101659954B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了表达猪肺炎支原体P102蛋白的重组腺病毒及其应用。本发明首先将猪肺炎支原体P102蛋白的基因进行突变，将突变后的全基因(SEQ ID NO: 1)克隆到穿梭载体pShuttle - CMV上，得到重组穿梭载体；经线性化后电转化入内含腺病毒骨架载体的感受态细胞中，通过细菌内同源重组获得重组腺病毒。重组腺病毒经间接免疫荧光和Western Blot鉴定证明该重组腺病毒成功表达了P102蛋白。将本发明重组腺病毒以肌注和滴鼻两种途径免疫6~8周龄雌性Balb/c小鼠，重组病毒可诱发小鼠产生特异的体液免疫和胞免疫应答，表明本发明重组腺病毒可应用于猪支原体肺炎的诊断、预防或治疗。

