

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910025577.7

C12N 15/40 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 7 月 22 日

[11] 公开号 CN 101487011A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/14 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

[22] 申请日 2009.2.10

[21] 申请号 200910025577.7

[71] 申请人 江苏省农业科学院

地址 210014 江苏省南京市钟灵街 50 号

共同申请人 中国人民解放军南京军区军事医学研究所

[72] 发明人 王永山 王忠灿 唐雨德 谭维国
潘英 施正良 欧阳伟 李银
王晓丽 潘群兴 夏兴霞 诸玉梅
张改平 王选年 陈光华

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 张素卿

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 2 页

[54] 发明名称

模拟 IBDV 多表位基因的分子设计及其应用

[57] 摘要

本发明涉及模拟 IBDV 多表位基因的分子设计及其应用,属于生物制药领域。根据对免疫保护有效的抗原表位基序设计合成具有免疫保护功能的模拟 IBDV 多表位基因 epis,运用基因工程技术构建重组表达质粒 pET-epis,使 epis 基因在大肠杆菌中表达,然后以大肠杆菌表达的重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 作为抗原,加上相应的佐剂制成 IBDV 表位基因工程疫苗,可用于预防控制传染性法氏囊病。在进行 epis 分子设计时,由于采用线性化序列模拟了 IBDV 空间构象依赖性表位基序,因此重组大肠杆菌表达的 rEPIS 制备工艺简单、成本低、生物安全性高。

```
ATG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT GGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT TCG AGC CTT
M P K T H N S G R S N V D G G G S T L
CAT CTG CCG CAT TTG TGG CCG CCT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT GCG AAG TAT
H L P H L W R P L S G G G S H N A K Y
GTG TCG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT CCG TTT CTG
V S A E S W G G G S H P D S I H P F L
GCG TCT CCT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT AAT TGG TTT
A S P G G G S D T L H G H G P T N W F
GGT GGA GGT TCG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT GGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT
G G G S P K T H N S G R S N V D G G G
TGG AGC CTT CAT CTG CCG CAT TTG TGG CCG CCT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT
S T L H L P H L W R P L S G G G S H N
GCG AAG TAT CTG TCG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT
A K Y V S A E S W G G G S H P D S I H
CCG TTT CTG CCG TCT CCT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT
P F L A S P G G G S D T L H G H G P F T
AAT TGG TTT TAA TAG
N W F * *
```

1、模拟 IBDV 多表位基因 epis, 其特征在于, 该基因的长度为 471bp, 编码 155aa, 命名为 epis, 其序列为 SEQ ID NO.1。

2、权利要求 1 所述模拟 IBDV 多表位基因 epis 的所编码的多表位蛋白 rEPIS, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO.2。

3、权利要求 1 所述模拟 IBDV 多表位基因 epis 的基因工程应用。

4、权利要求 1 所述模拟 IBDV 多表位基因 epis 的重组表达质粒 pET-epis。

5、根据权利要求 4 的所述模拟 IBDV 多表位基因 epis 的重组表达质粒 pET-epis, 其构建方法为:

化学合成权利要求 1 所述 IBDV 多表位基因 epis, 用 pMD18-T 载体克隆, 获得 epis 重组克隆质粒 pMD-epis, 根据 pET28b(+)启动子下游阅读框, 将 epis 基因的克隆质粒 pMD-epis 和 pET28b(+)质粒用限制性内切酶 SacI 和 HindIII 酶切, 经琼脂糖凝胶电泳后, 回收 pMD-epis 的 epis 基因片段和 pET28b 的载体片段, 用 T4 DNA 连接酶连接两片段, 转化大肠杆菌 JM109, 涂布于含终浓度为 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 14h, 挑取单菌落, 接种在 3mL 含 kan 的 LB 培养基中, 振荡培养 14h, 抽提质粒, 酶切鉴定, 获取阳性重组表达质粒 pET-epis。

6、权利要求 4 或 5 所述模拟 IBDV 多表位基因 epis 的重组表达质粒 pET-epis 转化大肠杆菌 BL21(DE3)而获得的重组菌 pET-epis/BL21。

7、权利要求 1 所述模拟 IBDV 多表位基因 epis 的 IBDV 表位基因工程疫苗。

8、根据权利要求 7 所述的 IBDV 表位基因工程疫苗, 其制备方法为:

培养诱导权利要求 5 所述的重组菌 pET-epis/BL21, 10000 r/min 高速离心 20 min 沉淀菌体, 弃上清液, 用 pH7.2 的 PBS 缓冲液悬浮菌体, 置于 0 $^{\circ}$ C 冰水浴, 超声功率 500~600W、每次超声时间 10min、重复 2~4 次超声波破碎菌体直至浑浊菌液变为透明菌液, 即为抗原重组模拟 IBDV 多表位蛋白 rEPIS, 用 PBS 调整抗原浓度至 1000 μ g/mL, 抗原与白油佐剂按 1:1 配比, 乳化, 即为 IBDV 表位基因工程疫苗。

9、权利要求 7 或 8 所述 IBDV 表位基因工程疫苗在制备传染性法氏囊病诊断抗原方面的应用。

模拟 IBDV 多表位基因的分子设计及其应用

一、技术领域

本发明涉及模拟传染性法氏囊病病毒（IBDV）多表位基因 epis 的分子设计、序列(包括 epis 部分以及 n 次重复序列)、表达质粒构建以及疫苗制备方法，属于生物制药领域。

二、背景技术

传染性法氏囊病（IBD）是由传染性法氏囊病病毒（IBDV）引起的以侵害幼鸡淋巴组织，特别是中枢免疫器官—法氏囊为主要特征的传染病。该病在国内外广泛流行，其危害主要包括两个方面：一是引起 3~8 周龄的鸡发病和死亡，尤其是近年来超强毒株（vvIBDV）的出现使雏鸡死亡率大大增加；二是雏鸡早期感染本病，则引起免疫抑制，导致鸡群对其它疫病的易感性增高和对疫苗的免疫应答能力降低或失败，造成巨大的间接经济损失。

IBDV 属双 RNA 病毒科，基因组包括大（A）小（B）两个片段，已确认有五种病毒蛋白：VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5。VP1 为病毒自身编码的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶，由 B 片段编码。其它四种病毒蛋白由 A 片段编码，VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白，构成病毒衣壳，VP2 相对含量较多，中和抗原表位主要存在于 VP2 上，且多为构象依赖性，用构象依赖性中和抗原表位诱导的中和抗体能被动地保护宿主不受 IBDV 感染，VP4 为病毒自身蛋白酶，VP5 的功能尚不明确。大肠杆菌表达的 VP2 免疫原性较差，表明 VP2 的后加工过程对 VP2 的结构形成至关重要。

目前，IBD 仍然是危害养鸡业的主要传染病之一，虽然研制了多种商品化的弱毒疫苗和灭活疫苗，但其安全性和制造工艺尚有不尽人意之处，如为抵抗超强毒的攻击，使用中强毒力的毒株研制活疫苗，给 IBD 的防制带来极大的隐患，灭活疫苗存在着抗原制备的困难。因此，国内外学者一直在探索免疫原性好且安全性高的新型疫苗，先后运用大肠杆菌、酵母、鸡痘病毒载体、杆状病毒以及核酸疫苗载体单独或者共同表达了 A 片段 cDNA、VP2、VP3 和 VP4 基因。分析这些研究成果，从重组亚单位疫苗到病毒载体疫苗以及核酸疫苗，有的不能产生中和抗体，有的则不能兼顾高保护力和囊损伤问题，有的还存在着表达量低、保护率低、免疫程序复杂以及难以工业化标准生产等缺点。

蛋白质分子上的抗原表位（亦称抗原决定簇）是蛋白质抗原性的物质基础。近年来研究发现的模拟抗原表位，本质上是构象依赖性表位，虽然模拟表位的氨基酸顺序与蛋白质分子一级结构的氨基酸顺序截然不同，却可以引起特异性的免疫反应，因此，在免疫应答中的地位极为重要。用常规基因克隆表达方法研制的重组亚单位疫苗，尽管人们采用多种方法进行复性，仍然难以完全恢复到天然的构象，导致部分构象依赖

性抗原表位丢失,其中可能是中和抗原表位,从而影响到机体产生完全有效的保护性免疫应答。IBDV 的中和抗原表位主要存在于结构蛋白 VP2 上,均为构象依赖性,因此,采用克隆表达 IBDV 病毒结构蛋白基因研制 IBD 基因工程疫苗的常规思路和方法,使重组蛋白难以完成天然的蛋白质构象,导致部分构象依赖性抗原表位缺失或改变,其中很多是重要的具有保护作用的中和抗原表位,从而影响到机体产生完全有效的保护性免疫应答。对此,人们采用了不同的研究策略,例如,改变表达方法和表达系统、对重组蛋白结构进行充分地复性等,这些措施采取后,蛋白质结构问题可能部分解决,但又会出现表达量低、制备工艺复杂或生产成本高等新的问题。这表明,采用新的研究思路和技术路线制备新型 IBD 基因工程疫苗的必要性与紧迫性。

三、发明内容

技术问题 本发明针对 IBD 基因工程疫苗研究难点,将抗原表位免疫应答的分子免疫学理论应用于基因工程疫苗研究,突破了以往采用克隆表达病毒结构蛋白基因方法进行基因工程疫苗研究的传统思路和方法。制备 IBDV 中和表位与优势抗原表位单克隆抗体,综合运用单克隆抗体与噬菌体展示随机肽库技术,分析 IBDV 保护性免疫应答相关的中和抗原表位和优势抗原表位,设计合成具有免疫保护功能的模拟 IBDV 多表位基因 epis,制备 IBDV 表位基因工程疫苗。在进行 epis 分子设计时,由于采用线性化序列模拟了 IBDV 空间构象依赖性表位基序,因此大肠杆菌表达的重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 制备工艺简单、成本低、生物安全性高。

技术方案

模拟 IBDV 多表位基因 epis,其特征在于,该基因的长度为 471bp,编码 155aa,命名为 epis,其序列为 SEQ ID NO.1。其所编码的多表位蛋白 rEPIS,其氨基酸序列为 SEQ ID NO.2。模拟 IBDV 多表位基因 epis 的重组表达质粒 pET-epis,其构建方法为:

化学合成上述 IBDV 多表位基因 epis,用 pMD18-T 载体克隆,获得 epis 重组克隆质粒 pMD-epis,根据 pET28b(+)启动子下游阅读框,将 epis 基因的克隆质粒 pMD-epis 和 pET28b(+)质粒用限制性内切酶 SacI 和 HindIII 酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,回收 pMD-epis 的 epis 基因片段和 pET28b 的载体片段,用 T4 DNA 连接酶连接两片段,转化大肠杆菌 JM109,涂布于含终浓度为 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 14h,挑取单菌落,接种在 3mL 含 kan 的 LB 培养基中,振荡培养 14h,抽提质粒,酶切鉴定,获取阳性重组表达质粒 pET-epis。

模拟 IBDV 多表位基因 epis 的重组表达质粒 pET-epis 转化大肠杆菌 BL21(DE3)获得重组菌 pET-epis/BL21。培养诱导重组菌 pET-epis/BL21,10000 r/min 高速离心 20 min 沉淀菌体,弃上清液,用 pH7.2 的 PBS 缓冲液悬浮菌体,置于 0 $^{\circ}$ C 冰水浴,超声波破碎菌体(超声功率 500~600W、每次超声时间 10min、重复 2~4 次)直至浑浊菌液变为透明菌液,即为抗原重组模拟 IBDV 多表位蛋白 rEPIS,用 PBS 调整抗原浓度至 1000 μ g/mL,抗原与白油佐剂按 1:1 配比,乳化,制备 IBDV 表位基因工程疫苗。IBDV 表位基因工程疫苗可在制备传染性法氏囊病诊断抗原方面的应用。

有益效果 本发明的特点和优点如下：

IBDV 基因组包括大（A）小（B）两个片段，编码 5 种病毒蛋白：VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5。VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白，也是病毒主要保护性抗原，目前已知的 IBDV 中和表位主要存在于 VP2 上，为构象依赖性。用常规的分子克隆技术直接克隆病毒结构蛋白，在原核或真核系统中表达，难以兼顾表达量、制备工艺和生产成本等方面的问题。因此，如何使重组蛋白保持 IBDV 保护性免疫所必须的构象，以形成有效的中和表位，成为 IBD 基因工程疫苗亟待解决的问题。

本发明针对 IBD 基因工程疫苗研究难点，将抗原表位免疫应答的分子免疫学理论应用于基因工程疫苗研究，突破了以往采用克隆表达病毒结构蛋白基因方法进行基因工程疫苗研究的传统思路和方法。运用 IBDV 单克隆抗体和噬菌体随机肽库获取 IBDV 抗原表位基序，设计合成具有免疫保护功能的模拟 IBDV 多表位基因，利用线性序列来模拟替代构象依赖性的中和表位序列，使基因工程方法表达的重组蛋白一级结构具有所需的中和表位序列，把中和表位的构象依赖性转变成线性而使问题得到解决。此外，由于单个抗原表位分子量小、结构简单，免疫原性弱，在体内易被降解，以往通常采用表位肽与载体蛋白进行偶联的方法来提高免疫原性，用这种偶联蛋白免疫动物产生的抗体绝大部分是针对载体蛋白的，本发明采用多个抗原表位模拟肽串联并重复两次，构建模拟 IBDV 多表位基因 epis，提高了重组蛋白的分子量、免疫原性和稳定性。将设计的 epis 利用表达量高且生产工艺简便的大肠杆菌表达系统制备 IBDV 表位基因工程疫苗。用 SPF 鸡进行免疫攻毒试验证明，重组多表位蛋白 rEPIS 可诱导机体产生抗 IBDV 感染的保护性免疫应答，可用于制备 IBDV 表位基因工程疫苗，同时具备良好的生物安全性。

在进行 epis 分子设计时，由于采用线性化序列模拟了 IBDV 空间构象依赖性表位基序，因此大肠杆菌表达的重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 制备工艺简单、成本低、生物安全性高。

本发明拓宽了 IBDV 基因工程疫苗的研究思路，不仅巨大的生产应用前景，而且具有重要的理论意义。

四、附图说明

图 1 模拟 IBDV 多表位基因 epis 序列

图 2 模拟 IBDV 多表位基因 epis 重组克隆质粒 pMD-epis 图谱

图 3 模拟 IBDV 多表位基因 epis 重组表达质粒 pET-epis 图谱

五、具体实施方式

本发明是制备 IBDV 中和表位与优势抗原表位单克隆抗体，综合运用单克隆抗体和噬菌体随机肽库技术，获取 IBDV 抗原表位基序，根据表位基序进行分子设计、化学合成模拟 IBDV 多表位基因 epis，运用基因工程技术构建重组表达质粒 pET-epis，使 epis 基因在大肠杆菌中获得高效表达，然后以大肠杆菌表达的重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 作为抗原，加上相应的佐剂制成 IBDV 表位基因工程疫苗。

本发明采用的具体技术路线包括以下三个方面：

1. 模拟 IBDV 多表位基因 epis 的分子设计、表达质粒构建以及在大肠杆菌中的表达

1) 抗 IBDV 单克隆抗体免疫活性分析

通过单克隆抗体对应抗原表位分析与单克隆抗体病毒中和能力的测定两个试验鉴定抗 IBDV 单克隆抗体的免疫活性,筛选 IBDV 中和表位单抗与优势抗原表位单抗。

(1) 单克隆抗体对应抗原表位分析

采用间接 ELISA 相加实验。将腹水单克隆抗体分别稀释至达饱和时的工作浓度,在此浓度下各取 50% 两两混匀。分别测定混合的单克隆抗体及饱和浓度下单一腹水单克隆抗体的 A_{450} 值。计算加成指数 $AI = [2A_{1+2} / (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$ (A_1 、 A_2 分别为两株不同单克隆抗体所测的 A_{450} 值, A_{1+2} 为两两混合抗体所测的 A_{450} 值), 每组重复试验 3 次, 计算其平均值。AI 值 $\geq 50\%$ 时, 认为两种单克隆抗体识别不同的抗原表位。相加间接 ELISA 结果表明, 单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1 和 2G8 与不同的 IBDV 抗原表位反应 (单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1 和 2G8 均为公知公用见参考文献: 1 王军, 李银, 范红结, 周宗安, 施正良, 王永山(通讯作者). 传染性法氏囊病病毒抗原表位分析——单克隆抗体的制备与鉴定. 中国预防兽医学报, 2005, 27(3): 171-174; 2 陈光华, 蒋桃珍, 董琳琳, 龚人雄. 鸡传染性法氏囊病病毒单克隆抗体的研究. 中国兽药杂志, 2000, 34(3): 9-13)。

(2) 单克隆抗体病毒中和能力的测定

采用固定病毒-稀释抗体的中和试验法分析单克隆抗体对 IBDV 的中和能力。用 MEM 营养液 (GIBCO 公司产品) 将 IBDV 病毒培养物 (购自中国兽医药品监察所兽医微生物菌种保藏管理中心, 毒种编号 cvcc AV8) 稀释成 200 TCID₅₀/0.1ml, 将无菌采取的各单克隆抗体腹水分别用 MEM 营养液从 1:100 起 10 倍比连续稀释, 取每个稀释度的单克隆抗体溶液 0.1 ml 加入 0.1 ml 病毒液 (200 TCID₅₀), 37 °C 感作 1 h, 然后加入到预先做好的鸡胚成纤维细胞 (CEF) (用中牧集团乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂 SPF 鸡胚制备, 制备方法文献: 殷震, 刘景华 主编. 动物病毒学 (第二版). 北京: 科学出版社, 1997, 223.) 单层培养孔中, 于 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度条件下继续培养接种后的 CEF, 观察 CEF 生长情况。试验同时设立 IBDV 病毒、IBDV 阳性血清 (购自中国兽医药品监察所)、SPF 鸡血清 (购自中牧集团乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂 SPF 鸡)、腹水和 MEM 营养液空白对照。在病毒中和试验中, 单克隆抗体 B34 和 2G8 对病毒有较强的中和能力, 腹水单抗的中和效价为 10⁵, 而单克隆抗体 HNF1、HNF7 和 2B1 则没有明显的中和能力, 是 IBDV 优势抗原表位, 腹水单抗的病毒中和效价小于 10²。

2) 传染性法氏囊病病毒抗原表位基序的获取

用纯化的抗 IBDV 中和表位与优势抗原表位单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1

和 2G8 分别包被 ELISA 微孔板, 浓度 100 μ g/ml, 150 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过液, 用 1%牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, PBST (含 0.1% Tween-20) 洗涤 6 遍, 加入含 2×10^{10} pfu 噬菌体展示随机 12 肽库原液 (Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit 试剂盒的组成部分, 该试剂盒购自 NEW ENGLAND BioLabs[®]公司), 室温置 1h; PBST 洗涤 10 遍; 用 100 μ L 0.2mol/L Gly-HCl (pH2.2) 洗脱 8min; 加入 15 μ L 1mol/L Tris-HCl (pH9.1) 中和洗脱液。用常规方法滴定洗脱液中的噬菌体, 计算噬菌体的产出率: 产出率 (%) = 洗脱噬菌体数 (Output) / 淘洗用噬菌体数 (Input) $\times 100\%$ 。将洗脱液接种到 20mL 新鲜培养的大肠杆菌 ER2738 (该菌株是 Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit 试剂盒的组成部分) 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4.5h, 4 $^{\circ}$ C、10000r/min 离心 10min, 收集上清液, 加入 1/6 体积的 PEG/NaCl 溶液 (含 20% PEG₈₀₀₀ 和 2.5mol/L NaCl), 4 $^{\circ}$ C 过液, 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 15 min, 用 1mL TBS 重悬沉淀, 按照上述方法用 PEG/NaCl 再次沉淀, 最终用 200 μ L TBS 重悬沉淀, 滴定后置 4 $^{\circ}$ C 保存。将单克隆抗体的包被浓度降低至 50 μ g/mL, 洗涤用的 PBST 中 Tween-20 的浓度提高到 0.5%, 按上述步骤再淘洗 2 次。经过 3 次淘洗后, 从每株单克隆抗体筛出的噬菌斑中随机挑取单克隆蓝色噬菌斑 12 个, 扩增。用夹心 ELISA、单克隆抗体竞争抑制 ELISA 和 IBDV 竞争抑制 ELISA 等免疫学方法分析筛选肽与 IBDV 抗原表位的相关性。根据 ELISA 和竞争抑制试验分析结果, 从每株单克隆抗体挑出的 12 个单克隆蓝色噬菌斑中选定 10 个, 制备单链 DNA 模板, 测序, 分析单克隆抗体对应的抗原表位 12 肽优势序列。

5 株 IBDV 单克隆抗体对应的抗原表位 12 肽优势序列为:

HNF1	CCT	AAG	ACT	CAT	AAT	TCT	GGT	CGT	TCT	AAT	GTG	GAT
	P	K	T	H	N	S	G	R	S	N	V	D
HNF7	ACG	CTT	CAT	CTG	CCG	CAT	TTG	TGG	CGG	CCT	CTT	TCT
	T	L	H	L	P	H	L	W	R	P	L	S
B34	CAT	AAT	GCG	AAG	TAT	GTG	TCG	GCT	GAG	TCT	TGG	GGG
	H	N	A	K	Y	V	S	A	E	S	W	G
2B1	CAT	CCG	GAT	AGT	ATT	CAT	CCG	TTT	CTG	GCG	TCT	CCT
	H	P	D	S	I	H	P	F	L	A	S	P
2G8	GAT	ACT	CTT	CAT	GGG	CAT	GGT	TTT	ACT	AAT	TGG	TTT
	D	T	L	H	G	H	G	F	T	N	W	F

(1) 噬菌体短肽的 ELISA 检测方法的操作步骤: 分别以 5 株单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1 和 2G8 包被 ELISA 板, 包被浓度 5 μ g/mL, 1%BSA 封闭, 加入对应单克隆抗体筛出的单克隆噬菌体扩增培养物, 室温放置 60min, 洗涤, 加入 HRP-羊抗 M13 单克隆抗体 (Amersham Pharmacia Biotech 公司产品), 进行间接 ELISA。检测在筛选 12 肽内是否存在 IBDV 单克隆抗体结合位点。以 A 值均大于 1.00 为阳性判定标准。

(2) 单克隆抗体竞争抑制 ELISA 方法的操作步骤: 为验证筛选肽的特异性, 分别以 5 株单克隆抗体包被 ELISA 板, 以对应游离的单克隆抗体作为竞争抑制物, 分别与对应单克隆抗体筛出的噬菌体培养物共同反应 60min, 洗涤, 加入 HRP-羊抗 M13 单克隆抗体, 进行竞争抑制 ELISA。计算抑制率, 分析筛选 12 肽与单克隆抗体结合的特异性。以抑制率大于 40%为阳性判定标准。

(3) IBDV 竞争抑制 ELISA 方法的操作步骤:与上述单克隆抗体竞争抑制 ELISA 相似,只是以游离的 IBDV 作为竞争抑制物,分别与对应单克隆抗体筛出的噬菌体培养物共同反应。计算抑制率,进一步验证筛选 12 肽内的 IBDV 抗原表位。以抑制率大于 40%为阳性判定标准。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{未掺入竞争抑制物的 } A \text{ 值} - \text{掺入竞争抑制物的 } A \text{ 值}}{\text{未掺入竞争抑制物的 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

将上述 5 个 12 肽的氨基酸序列分别与 GenBank 中 IBDV 基因组 A 片段(GenBank 登录: AF443294, AF362776, AF454945)和 B 片段(GenBank 登录: AF362774, AF455136)编码蛋白的氨基酸序列进行比较,发现 2B1 筛选肽有 4 个连续氨基酸残基 L-A-S-P 与 IBDV 基因组 A 片段编码多聚蛋白的第 536-599 氨基酸残基一致,推测 2B1 为线性表位;而 HNF1、HNF7、B34 和 2G8 筛选肽均没找到有 3 个以上连续氨基酸残基与 IBDV 基因组编码蛋白氨基酸残基相同之处,是构象依赖性表位。

3) 模拟 IBDV 多表位基因 epis 的分子设计

参照 5 株单克隆抗体对应的抗原表位优势序列设计模拟 IBDV 多表位基因 epis,方法是:将 5 个抗原表位用 GGGs 四肽串联(HNF1-HNF7-B34-2B1-2G8)并重复一次(HNF1-HNF7-B34-2B1-2G8-HNF1-HNF7-B34-2B1-2G8),该模拟 IBDV 多表位基因的长度为 471bp,编码 155aa,命名为 epis,其序列为:

```

ATG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT TCG ACG CTT
M   P   K   T   H   N   S   G   R   S   N   V   D   G   G   G   S   T   L
CAT CTG CCG CAT TTG TGG CGG CCT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT GCG AAG TAT
H   L   P   H   L   W   R   P   L   S   G   G   G   S   H   N   A   K   Y
GTG TCG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT CCG TTT CTG
V   S   A   E   S   W   G   G   G   S   H   P   D   S   I   H   P   F   L
GCG TCT CCT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT AAT TGG TTT
A   S   P   G   G   G   S   D   T   L   H   G   H   G   F   T   N   W   F
GGT GGA GGT TCG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT
G   G   G   S   P   K   T   H   N   S   G   R   S   N   V   D   G   G   G
TCG ACG CTT CAT CTG CCG CAT TTG TGG CGG CCT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT
S   T   L   H   L   P   H   L   W   R   P   L   S   G   G   G   S   H   N
GCG AAG TAT GTG TCG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT
A   K   Y   V   S   A   E   S   W   G   G   G   S   H   P   D   S   I   H
CCG TTT CTG GCG TCT CCT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT
P   F   L   A   S   P   G   G   G   S   D   T   L   H   G   H   G   F   T
AAT TGG TTT TAA TAG
N   W   F   *   *

```

4) 重组表达质粒 pET-epis 的构建及其在大肠杆菌中表达

化学合成 IBDV 多表位基因 epis,用 pMD18-T 载体(购自大连宝生物 TaKaRa 公司)克隆,获得 epis 重组克隆质粒 pMD-epis。根据 pET28b(+)(购自 Novagen 公司)启动子下游阅读框,将 epis 基因的克隆质粒 pMD-epis 和 pET28b(+)质粒用限制性内切酶 SacI 和 HindIII 酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,回收 pMD-epis 的 epis 基因片段(约 500bp)和 pET28b(+)的载体片段(约 5.3kb),用 T4 DNA 连接酶连接两片段,转化大肠杆菌 JM109(Novagen 公司),涂布于含终浓度为 30μg/mL 卡那霉素(kan)的 LB

琼脂平板上, 37℃培养 14h。挑取单菌落, 接种在 3mL 含 kan 的 LB 培养基中, 振荡培养 14h, 抽提质粒, 酶切鉴定, 获取阳性重组表达质粒 pET-epis。

用 pET-epis 转化大肠杆菌 BL21(DE3)(Novagen 公司), 获得重组菌 pET-epis/BL21, 挑取单菌落, 接种在 3mL 含 kan 的 LB 培养基中, 37℃振荡培养 14h。次日, 以 1% 接种在含 kan 的新鲜 LB 培养基中, 37℃振荡培养 2h 后, 向 LB 培养基中加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 37℃继续培养 4h, 诱导生产重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS。取 1.5mL 细菌培养液, 高速离心, SDS-PAGE 分析, 扫描分析 rEPIS 的表达量与分子量。rEPIS 的表达量约 30%, 分子量约 20kDa。

5) 重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 免疫反应性分析

以免疫印迹法 (Western-blotting) 用 IBDV 单克隆抗体和多克隆抗体进行平行试验, 分析 rEPIS 的特异性和免疫反应性。方法是: 将诱导前后的重组菌 pET-epis/BL21 进行 SDS-PAGE (分离胶浓度 15%), 然后电转移到硝酸纤维素膜 (Amersham Pharmacia Biotech 公司产品) 上, 将膜按泳道剪成条, 用抗 IBDV 单克隆抗体 HNF1、HNF7、B34、2B1、2G8 混合液和碱性磷酸酶 (AP) 标记的兔抗鼠 IgG (购自南京生兴生物技术公司) 先后与转移膜反应, 显色, 观察显色条带位置, 分析 rEPIS 的特异性和免疫反应性。在用 IBDV 多克隆抗体 (购自南京生兴生物技术公司) 进行的平行对照试验中, 只是用 IBDV 多克隆抗体和 AP 标记的羊抗兔 (购自南京生兴生物技术公司) IgG 替代对应抗体, 其它与单克隆抗体试验相同。试验同步设 BL21(DE3)和 pET28b 转化的 BL21(DE3)菌对照。在免疫印迹试验中, IBDV 单克隆抗体和多克隆抗体均可与 rEPIS 反应, 在约 20kDa 处出现一条蛋白印迹, 与 SDS-PAGE 的分析结果一致, 表明 rEPIS 具有 IBDV 特异性和免疫反应性。

2. 表达重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 的免疫攻毒实验

1) 免疫抗原的制备

用 PBS 调整重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 的蛋白抗原浓度至 1000μg/mL, 抗原与白油佐剂按 1:1 配比, 乳化。

2) 动物分组与免疫

14 日龄 SPF 来航鸡 (中牧集团乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂) 180 只, 随机分成 3 组: rEPIS 加佐剂免疫组、单用佐剂对照组和饲养对照组, 60 只/组, 隔离饲养。rEPIS 加佐剂免疫组, 胸部肌肉注射佐剂型 rEPIS 免疫物, rEPIS 的有效免疫剂量为 50μg/只/次, 单用佐剂对照组则只注射等体积的佐剂, 均免疫注射 2 次, 间隔 7d; 饲养对照组中的鸡不进行免疫, 只是与两个免疫组在相同条件下饲养。实验鸡每间隔 7d 经翅下静脉采血, 以常规间接 ELISA 测定血清中 IBDV 抗体的效价。

3) 攻毒

在第 2 次免疫 7d 后, 用 1:100 稀释的 IBDV 强毒株 GX8/99 (参考文献: 崔治中, 孙淑红, 单忠芳, 蒋玉雯, 金文杰. 鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株 GX8/99 株的致病性. 病毒学报, 2002, 18(2):162-166.) 感染鸡法氏囊组织悬液在实验鸡的眼和鼻内

各滴 0.1mL（病毒量约 200 个 ELD50），实验观察 7d，及时取出死亡鸡、剖解检查法氏囊变化，记录实验结果。

4) 免疫攻毒实验结果

用 IBDV 间接 ELISA 检测 rEPIS 免疫鸡血清抗体，第一次免疫 7d 后抗体效价为 1:1600；第二次免疫 7d 后抗体效价升高到 1:12800（表 1）。从攻毒后的第 3d，单用佐剂和饲养对照两个组的攻毒鸡开始死亡，在 7d 的实验观察期间，单用佐剂对照组的发病率为 83.3% (50/60)（发病率包括：IBD 临床症状阳性、法氏囊组织 IBD 病变阳性和 IBDV 检测阳性）、死亡率为 35.0% (21/60)，饲养对照组的发病率为 85.0% (51/60)、死亡率为 36.7% (22/60)；rEPIS 加佐剂组攻毒后的发病率为 0.0% (0/60)、死亡率为 1.7% (1/60)、免疫保护率为 98.3% (59/60)（表 2）。攻毒实验结果表明，注射免疫 100μg 重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 的 SPF 鸡（50μg/次×2 次）能够抵抗 IBDV 强毒的攻击。

表 1 重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 免疫 SPF 雏鸡后的血清抗体检测结果

分组	0	7	14	21	28
rEPIS+佐剂	100	3200	12800	256000	512000
佐剂对照	100	100	100	100	100
空白对照	100	100	100	100	100

表 2 重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS 免疫 SPF 雏鸡的攻毒试验结果

分组	抗攻毒时的抗体效价	发病率#	死亡率	免疫保护率
rEPIS+佐剂	12800	0.0%(0/60)	1.7% (1/60)	98.3% (59/60)
佐剂对照	100	83.3%(50/60)	35.0% (21/60)	—
空白对照	100	85.0% (51/60)	36.7% (22/60)	—

发病率包括：IBD 临床症状阳性、法氏囊组织 IBD 病变阳性和 IBDV 检测阳性。

3. IBDV 表位基因工程疫苗的制备与使用

疫苗制备方法：培养诱导重组菌 pET-epis/BL21，10000 r/min 高速离心 20 min 沉淀菌体，弃上清液，用 PBS 缓冲液（pH7.2）悬浮菌体，置于 0℃冰水浴，超声波破碎菌体（超声功率 500~600W、每次超声时间 10min、重复 2~4 次）直至浑浊菌液变为透明菌液，即抗原重组 IBDV 多表位蛋白 rEPIS。用 PBS 调整抗原浓度至 1000μg/mL，抗原与白油佐剂按 1:1 配比，乳化，即为 IBDV 表位基因工程疫苗。

疫苗使用方法：肌肉注射 0.2ml/只/次（rEPIS 的有效含量 50μg），两周后进行第 2 次免疫，可使免疫鸡产生有效的抗 IBDV 抗体。

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏省农业科学院

中国人民解放军南京军区军事医学研究所

<120> 模拟 IBDV 多表位基因的分子设计及其应用

<130> 说明书

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 471

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<221> 模拟 IBDV 多表位基因 epis 序列

<222> (1)..(471)

<223>

<400> 1

atgcctaaga ctcataattc tggctgttct aatgtggatg gtggagggtc gacgcttcat 60

ctgccgcatt tgtggcggcc tctttctggt ggagggtcgc ataatgcgaa gtatgtgtcg 120

gctgagtctt ggggtggagg ttcgcatccg gatagtattc atcggtttct ggcgtctcct 180

ggaggagggt cggatactct tcatgggcat ggttttacta attggtttgg tggagggtcg 240

cctaagactc ataattctgg tcgttctaata gtggatgggt gaggttcgac gcttcactcg 300

ccgcatttgt ggcggcctct ttctggtgga ggttcgcata atgcgaagta tgtgtcggct 360

gagtcttggg gtggagggtc gcattccgat agtattcatt cgtttctggc gtctcctggt 420

ggagggttcg atactcttca tgggcatggt ttactaatt ggttttaata g 471

<210> 2

<211> 155

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<221> 多表位蛋白 rEPIS

<222> (1)..(155)

<223>

<400> 2

Met Pro Lys Thr His Asn Ser Gly Arg Ser Asn Val Asp Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Thr Leu His Leu Pro His Leu Trp Arg Pro Leu Ser Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser His Asn Ala Lys Tyr Val Ser Ala Glu Ser Trp Gly Gly Gly Ser
 35 40 45
 His Pro Asp Ser Ile His Pro Phe Leu Ala Ser Pro Gly Gly Gly Ser
 50 55 60
 Asp Thr Leu His Gly His Gly Phe Thr Asn Trp Phe Gly Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 Pro Lys Thr His Asn Ser Gly Arg Ser Asn Val Asp Gly Gly Gly Ser
 85 90 95
 Thr Leu His Leu Pro His Leu Trp Arg Pro Leu Ser Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 His Asn Ala Lys Tyr Val Ser Ala Glu Ser Trp Gly Gly Gly Ser His
 115 120 125
 Pro Asp Ser Ile His Pro Phe Leu Ala Ser Pro Gly Gly Gly Ser Asp
 130 135 140
 Thr Leu His Gly His Gly Phe Thr Asn Trp Phe
 145 150 155

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> IBDV 单克隆抗体

<220>

<221> HNF1 基因

<222> (1)..(36)

<223>

<400> 3

cctaagactc ataattctgg tcgttctaata gtggat

36

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> IBDV 单克隆抗体

<220>

<221> HNF1 抗原表位 12 肽优势序列

<222> (1)..(12)

<223>

<400> 4

Pro Lys Thr His Asn Ser Gly Arg Ser Asn Val Asp

1 5 10

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> IBDV 单克隆抗体

<220>

<221> HNF7 基因
<222> (1)..(36)
<223>
<400> 5
acgcttcac tgccgcattt gtggcggcct ctttct 36
<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> IBDV 单克隆抗体
<220>
<221> HNF7 抗原表位 12 肽优势序列
<222> (1)..(12)
<223>
<400> 6
Thr Leu His Leu Pro His Leu Trp Arg Pro Leu Ser
1 5 10
<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> IBDV 单克隆抗体
<220>
<221> B34 基因
<222> (1)..(36)
<223>
<400> 7
cataatgcga agtatgtgtc ggctgagtct tggggg 36
<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> IBDV 单克隆抗体
<220>
<221> B34 抗原表位 12 肽优势序列
<222> (1)..(12)
<223>
<400> 8
His Asn Ala Lys Tyr Val Ser Ala Glu Ser Trp Gly
1 5 10
<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> IBDV 单克隆抗体
<220>
<221> 2B1 基因
<222> (1)..(36)

<223>
 <400> 9
 catccggata gtattcatcc gtttctggcg tctcct 36
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> IBDV 单克隆抗体
 <220>
 <221> 2B1 抗原表位 12 肽优势序列
 <222> (1)..(12)
 <223>
 <400> 10
 His Pro Asp Ser Ile His Pro Phe Leu Ala Ser Pro
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> IBDV 单克隆抗体
 <220>
 <221> 2G8 基因
 <222> (1)..(36)
 <223>
 <400> 11
 gatactcttc atgggcatgg ttttactaat tggttt 36
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> IBDV 单克隆抗体
 <220>
 <221> 2G8 抗原表位 12 肽优势序列
 <222> (1)..(12)
 <223>
 <400> 12
 Asp Thr Leu His Gly His Gly Phe Thr Asn Trp Phe
 1 5 10

```

ATG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT TCG ACG CTT
M   P   K   T   H   N   S   G   R   S   N   V   D   G   G   G   S   T   L

CAT CTG CCG CAT TTG TGG CGG CCT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT GCG AAG TAT
H   L   P   H   L   W   R   P   L   S   G   G   G   S   H   N   A   K   Y

GTG TCG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT CCG TTT CTG
V   S   A   E   S   W   G   G   G   S   H   P   D   S   I   H   P   F   L

GCG TCT CCT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT AAT TGG TTT
A   S   P   G   G   G   S   D   T   L   H   G   H   G   F   T   N   W   F

GGT GGA GGT TCG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT
G   G   G   S   P   K   T   H   N   S   G   R   S   N   V   D   G   G   G

TCG ACG CTT CAT CTG CCG CAT TTG TGG CGG CCT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT
S   T   L   H   L   P   H   L   W   R   P   L   S   G   G   G   S   H   N

GCG AAG TAT GTG TCG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT
A   K   Y   V   S   A   E   S   W   G   G   G   S   H   P   D   S   I   H

CCG TTT CTG GCG TCT CCT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT
P   F   L   A   S   P   G   G   G   S   D   T   L   H   G   H   G   F   T

AAT TGG TTT TAA TAG
N   W   F   *   *

```

图 1

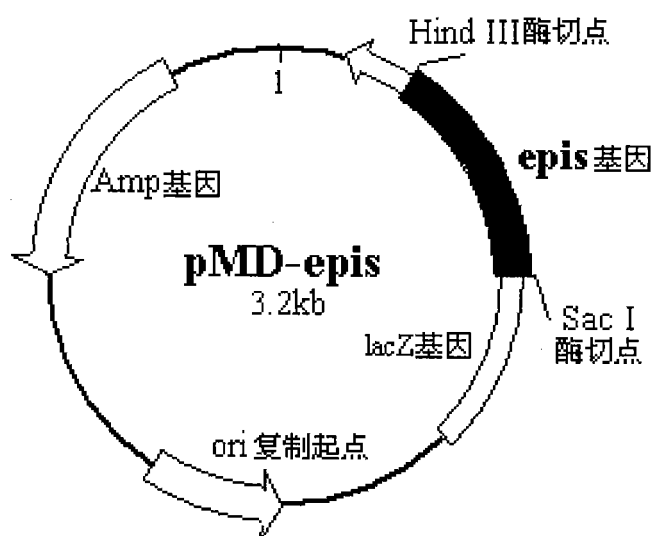


图 2

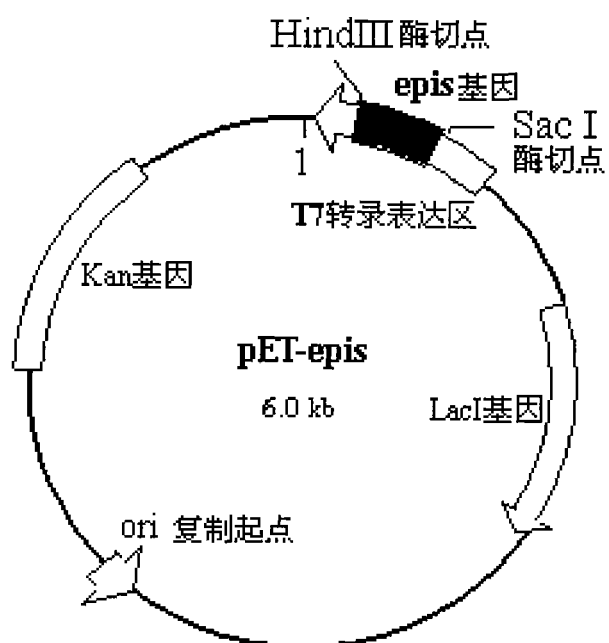


图 3

专利名称(译)	模拟IBDV多表位基因的分子设计及其应用		
公开(公告)号	CN101487011A	公开(公告)日	2009-07-22
申请号	CN200910025577.7	申请日	2009-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院 中国人民解放军南京军区军事医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院 中国人民解放军南京军区军事医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省农业科学院 中国人民解放军南京军区军事医学研究所		
[标]发明人	王永山 王忠灿 唐雨德 谭维国 潘英 施正良 欧阳伟 李银 王晓丽 潘群兴 夏兴霞 诸玉梅 张改平 王选年 陈光华		
发明人	王永山 王忠灿 唐雨德 谭维国 潘英 施正良 欧阳伟 李银 王晓丽 潘群兴 夏兴霞 诸玉梅 张改平 王选年 陈光华		
IPC分类号	C12N15/40 C07K14/08 C12N15/63 C12N15/66 C12N1/21 A61K39/12 A61P31/14 G01N33/531 C12R1/19		
代理人(译)	张素卿		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明涉及模拟IBDV多表位基因的分子设计及其应用，属于生物制药领域。根据对免疫保护有效的抗原表位基序设计合成具有免疫保护功能的模拟IBDV多表位基因epis，运用基因工程技术构建重组表达质粒pET - epis，使epis基因在大肠杆菌中表达，然后以大肠杆菌表达的重组IBDV多表位蛋白rEPIS作为抗原，加上相应的佐剂制成IBDV表位基因工程疫苗，可用于预防控制传染性法氏囊病。在进行epis分子设计时，由于采用线性化序列模拟了IBDV空间构象依赖性表位基序，因此重组大肠杆菌表达的rEPIS制备工艺简单、成本低、生物安全性高。

ATG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CGT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT TCG ACG CTT
M P K T H N S G R S N V D G G G S T L
CAT CTG CCG CAT TTG TGG GGG CTT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT GCG AAG TAT
H L P H L W R P L S G G G S H N A K Y
GTG TGG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT CCG TTT CTG
V S A E S W G G G S H P D S I H P F L
GGG TCT CTT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT AAT TGG TTT
A S P C G G S D T L H G H G F T N W F
GGT GGA GGT TCG CCT AAG ACT CAT AAT TCT GGT CTT TCT AAT GTG GAT GGT GGA GGT
G G G S P K T H N S G R S N V D G G G
TGG ACG CTT CAT CTG CCG CAT TTG TGG GGG CTT CTT TCT GGT GGA GGT TCG CAT AAT
S T L H L P H L W R P L S G G G S H N
GCG AAG TAT GTG TGG GCT GAG TCT TGG GGT GGA GGT TCG CAT CCG GAT AGT ATT CAT
A K Y V S A E S W G G G S H P D S I H
CGG TTT CTG CCG TCT CTT GGT GGA GGT TCG GAT ACT CTT CAT GGG CAT GGT TTT ACT
P F L A S P G G G S D T L H G H G F T
AAT TGG TTT TAA TAG
N W F * *