

[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 200710143417.3

*C12N 7/01 (2006.01)*  
*C12N 15/866 (2006.01)*  
*A61K 39/12 (2006.01)*  
*A61P 31/12 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2009 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 101358182A

[22] 申请日 2007.7.31

[21] 申请号 200710143417.3

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

[72] 发明人 刘长明 陆月华 张超范 危艳武  
张朝霞 袁 婧 童光志

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有  
限责任公司  
代理人 孙皓晨

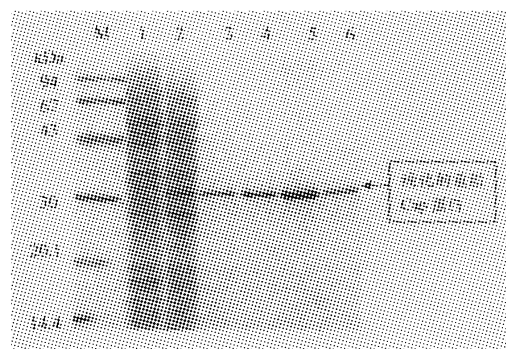
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

## [54] 发明名称

表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组杆状病毒毒株、其构建方法及应用

## [57] 摘要

本发明公开了一种高效表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap (微生物保藏号是: CGMCC NO.2083) 及其用途。本发明构建的重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap 可在昆虫细胞中高效表达重组 PCV2 - Cap 蛋白, 所表达的重组 Cap 蛋白具有良好的免疫活性和抗原性, 可作为预防猪圆环病毒 2 型感染引起的相关疫病用亚单位疫苗, 也可作为猪圆环病毒 2 型血清抗体检测诊断抗原。



- 1、重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap，其微生物保藏号是：CGMCC NO.2083。
- 2、权利要求 1 的重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap 在制备预防猪圆环病毒 2 型疫苗中的用途。
- 3、按照权利要求 2 的用途，其特征在于：所述的疫苗是亚单位疫苗。
- 4、权利要求 1 的重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap 在制备诊断猪圆环病毒 2 型血清抗体检测诊断抗原的用途。
- 5、权利要求 1 的重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap 所表达的重组猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白。
- 6、权利要求 5 的重组猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在制备诊断猪圆环病毒 2 型血清抗体检测诊断抗原的用途。
- 7、一种检测猪圆环病毒 2 型的 ELISA 诊断试剂盒，其特征在于：含有权利要求 5 所述的重组猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白。

## 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组杆状病毒毒株、其构建方法及应用

### 技术领域

本发明涉及一种重组杆状病毒毒株构建方法，尤其涉及一种猪圆环病毒 2 型重组 Cap 蛋白表达及应用；本发明还涉及用于构建该猪圆环病毒 2 型重组毒株的重组表达载体以及该重组毒株在猪圆环病毒诊断、预防中的应用，属于兽医生物技术领域。

### 背景技术

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的病原，引起断奶仔猪发生进行性消瘦、咳嗽、呼吸困难、腹泻、皮肤苍白或黄染、淋巴结肿大、肾脏灰白水肿等症状 (Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: A review[J]. J Vet Diagn Invest, 2000, 12: 3-14)。本病于 1991 年在加拿大首次被发现，现已证实呈世界性流行，我国的一些猪场也普遍存在本病。PCV2 基因组含有 2 个主要阅读框架，即 ORF1 和 ORF2。PCV2-ORF1 由 945 个碱基组成，编码 314 个氨基酸，基因产物与病毒复制酶相关 (Rep)；PCV2-ORF2 由 702 个碱基组成，编码 233 个氨基酸，是构成病毒衣壳蛋白 (Cap) 成分 (Cheung A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2[J]. Virology, 2003, 305: 168-180; Hamel A L, Lin L L, Nayar G P S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. J Virol, 1998, 72: 5262-5267.)。Nawagitgul 等 (Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 2281-2287; Nawagitgul P, Harms P A, Morozov I, *et al.* Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9: 33-40.)。用杆状病毒表达了 PCV2-ORF2 基因获得 30kDa 蛋白产物，电镜下观察这种

产物具有自我装配假病毒颗粒的能力。由于该病毒感染细胞不呈现细胞病变，病毒培养物毒价低、不易纯化，给研究工作带来一定困难。昆虫杆状病毒表达系统以其表达外源蛋白产量高、抗原性好、产物易纯化等特点，在多种疫病的研究中得到广泛利用。

## 发明内容

本发明目的是提供一种重组杆状病毒毒株，该重组毒株可以表达PCV2-ORF2编码的Cap蛋白，所表达的重组蛋白具有良好的免疫活性，可作为猪圆环病毒2型亚单位疫苗，也可作为猪圆环病毒2型特异性抗体诊断抗原。

本发明目的是通过以下技术方案来实现的：

一种重组杆状病毒毒株(rBac/PCV2Cap)，其微生物保藏号是：CGMCC NO. 2083；分类命名是：表达猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2) Cap蛋白的重组杆状病毒；保藏时间是：2007年6月13日；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：北京市海淀区中关村北一条13号，中国科学院微生物研究所。

本发明首先扩增PCV2-ORF2基因，获得699bp目的基因片断，将其与昆虫杆状病毒表达载体质粒(优选为pBlueBac4.5/V5-His-TOPO)连接，通过酶切反应鉴定及序列分析得到重组表达质粒；测序表明，扩增得到699bp的PCV2-ORF2基因，与已发表的PCV2序列同源性达到96.7%以上，表明该基因具有很高的保守性。将所得到的重组表达质粒与线性化杆状病毒DNA共浴，加入细胞转染试剂，取转感细胞培养上清做蚀斑克隆与筛选试验，采用病毒培养物上清，接种昆虫细胞，筛选获得一株稳定、高效表达PCV2-Cap蛋白的重组杆状病毒毒株(rBac/PCV2Cap)，病毒滴度达到 $1.28 \times 10^8$  pfu/ml。该重组毒株可以在昆虫细胞高效表达重组PCV2-Cap蛋白，所表达的重组PCV2-Cap蛋白具有良好的免疫反应活性，可作为猪圆环病毒2型亚单位疫苗，也可作为猪圆环病毒2型特异性抗体诊断抗原。

本发明重组毒株所表达的重组蛋白除去融合部分，其分子量与文献

(Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 2281-2287)报道的30kDa基本一致，而产物表达产量，高于文献报道的表达水平。

由于本发明在重组蛋白的C末端设计了His-tag序列，为下一步重组蛋白的纯化奠定

了基础。

据文献报道 (Mahé D, Blanchard P, Truong C, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1815-1824.) , PCV1与PCV2在基因组序列上存在较高同源性, 但分布不同, 两病毒在ORF1与ORF2编码区的氨基酸序列同源率分别为86%和56%。Mahé等 (Mahé D, Blanchard P, Truong C, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1815-1824.) 分别表达了两种病毒的ORF1, 证明它们的基因产物存在显著的抗原交叉反应; 但表达的ORF2基因产物间无显著抗原交叉反应。据此推断, 本发明重组杆状病毒所表达的PCV2-ORF2表达产物, 可作为猪圆环病毒2型特异性抗体检测靶抗原, 为进一步血清学鉴别诊断提供了基础。此外, PCV2-ORF2基因编码的蛋白是组成病毒结构蛋白的重要成分, 其在致病性和诱导机体保护性免疫应答起重要作用。利用所表达的重组蛋白可作为亚单位疫苗免疫动物, 刺激机体产生保护性免疫应答, 达到抗病毒感染的目的。

本发明为进一步进行猪圆环病毒亚单位疫苗、诊断抗原及分子生物学研究奠定基础。

#### 附图说明

图1 蓝白斑筛选重组杆状病毒的结果; A: 野生型杆状病毒 (白斑); B: 重组型杆状病毒 (蓝斑)。

图2 重组毒株感染 Sf-21 细胞后形成的病毒包涵体; A: 野生型杆状病毒包涵体; B: 重组杆状病毒包涵体。

图3 重组PCV2-Cap蛋白在昆虫Sf-21细胞中的表达; A: SDS-PAGE分析结果, 第1-6泳道分别是0, 24, 48, 72, 96h时间点的表达产物, 第7泳道为野生型杆状病毒对照, M泳道为标样蛋白; B: 免疫印迹分析结果, 加样顺序同图A; 图中箭头所指处为重组蛋白。

图4 重组 PCV2-Cap 蛋白用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱纯化结果; 泳道 1: Sf-21 细胞对照; 泳道 2: 粗制表达产物; 泳道 3-6: 纯化的重组蛋白部分收集样品。

## 具体实施方式

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而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并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,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

### 实施例1:本发明重组杆状病毒株(rBac/PCV2Cap)的构建和重组蛋白的表达

#### 1 材料与方法

##### 1.1 病毒、细胞及抗血清

猪圆环病毒2型毒株(PCV2/LG株):系从现地某猪场临床表现PMWS症状的病猪脏器,经不含PCV1的猪肾传代细胞系分离获得,并连续传29代。细胞培养采用RPMI1640培养液(Gibco),添加10%胎牛血清和100U/ml青霉素及100 $\mu$ g/ml链霉素。按常规方法进行细胞培养,采用同步法接种病毒,达到80%单层时,按文献(Tischer I, Miels W, Wolff D, *et al.* Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. Arch Virol, 1986, 91: 271-276.)方法做D-氨基葡萄糖处理。抗血清的制备:采用30日龄病毒抗体阴性猪,经气管内及腹股沟淋巴结接种病毒细胞培养物,于接种42天后采血,制备PCV2阳性血清。昆虫细胞株(Sf-21)培养于Grace氏培养液,添加0.26%磷酸胰蛋白肉汤,10%胎牛血清和50 $\mu$ g/ml卡那霉素,用于DNA转染、蚀斑克隆及重组蛋白表达。

##### 1.2 重组质粒的构建

PCV2-ORF2 基因序列扩增:取100 $\mu$ l病毒培养物,加2 $\mu$ l蛋白酶K(20mg/ml)于37 $^{\circ}$ C消化2h,经水浴煮沸5min,15000r/min离心10min,取上清用于DNA扩增。引物设计参考,GenBank 登录的PCV2序列(AF16652、AF027217、AF118097、AF264043和AF201897)。上游引物:5'-ATGACGTATCCAGGAGGCG-3';下游引物:5'-GGGTTTAAGTGGGGGTCT-3')。采用大连宝生物工程公司试剂盒进行PCR扩增反应,按说明书操作。DNA变性温度为94 $^{\circ}$ C 2min;扩增反应共进行35个循环:94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min;延伸反应为72 $^{\circ}$ C 7min。PCR产物经鉴定后克隆到昆虫杆状病毒转移质粒载体pBlueBac4.5/V5-His-TOPO上(Invitrogen),基因克隆及分析方法参考文献(萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著(黄培堂等译).分子克隆实验指南[M].第3板,科学出版社,2002.)。Qiagen柱纯化的重组质粒DNA,373A型序列仪进行

DNA 序列分析 (Perkin- Elmer 试剂盒), DNASIS 软件进行数据处理。

### 1. 3 DNA转染与蚀斑试验

纯化的质粒DNA与适宜比例的线性化杆状病毒DNA共浴, 加入适量细胞转染试剂 (Cellfectin, Invitrogen), 按说明书操作。取转感细胞培养上清做蚀斑克隆与筛选试验。蚀斑试验: 采用10倍系列稀释的病毒培养物上清, 接种昆虫细胞, 于28℃感作1h, 吸出接种液后用终浓度为1%琼脂糖—Grace氏完全培养液覆盖 (内含150 μg/ml X-gal), 凝固后倒置于28℃培养箱培养4日, 逐天观察深蓝色蚀斑的出现, 用毛吸玻璃管挑取蓝斑, 置0.5ml无血清Grace氏培养液中吹打, 以此接种新培养的Sf-21细胞, 反复进行3次重组杆状病毒的蚀斑克隆筛选, 获得的重组病毒滴度按蚀斑形成单位 (pfu/ml) 计算。

### 1. 4 重组蛋白质表达分析

重组杆状病毒基础种子毒的制备: 取新培养的 Sf-21 细胞, 接种剂量为 0.1 个感染单位, 接种 5~7 日后收获病毒细胞培养物。重组蛋白表达时, 接种剂量为 5 个感染单位, 按不同时间点 (0、24、48、72、96 和 120h) 收取细胞培养物。收取的细胞用 PBS 离心洗涤 3 次, 加入 SDS—PAGE 样品缓冲液, 经沸煮 5min 处理后, 12.5%的分离胶电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色, 薄层扫描仪测定蛋白含量。免疫印迹试验用于检测重组蛋白的免疫活性反应, 方法见文献 (萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著 (黄培堂等译). 分子克隆实验指南[M]. 第3板, 科学出版社, 2002.))。

## 2 实验结果

2.1 PCV2-ORF2基因扩增与克隆 PCR扩增获得的DNA产物, 大小与预期设计一致 (699bp), 删除病毒蛋白终止密码子。用限制性内切酶对重组质粒分析结果表明, 构建的重组质粒含有PCV2-ORF2基因, 连接方向正确。

2.2 DNA序列分析结果 对3个重组质粒进行的DNA测序分析结果一致, 表明克隆的PCR产物未发生错配现象。序列数据与GenBank登录的5个PCV2毒株基因序列同源性达到96.7%以上。PCV2-ORF2基因全长为702bp (含3个终止密码子), 编码233aa, 预测有一个潜在的糖基化位点。

2.3 重组杆状病毒的克隆筛选结果 经3个循环蚀斑克隆, 获得一株稳定、高效表达PCV2-Cap蛋白的重组杆状病毒 (rBac/PCV2Cap), 病毒滴度达到 $1.28 \times 10^8$  pfu/ml。重组病毒产生的蚀斑呈深蓝色反应 (图1B), 野性型杆状病毒产生的蚀斑

呈乳白色反应(图1A)。

从图2可以看出,重组杆状病毒接种Sf-21细胞后,可导致细胞内出现独特的大型包涵体(图2B);而野生型杆状病毒感染细胞时产生数十个小型包涵体(图2A);正常对照细胞无此现象。

2.4 重组蛋白的表达结果 重组杆状病毒接种 Sf-21 细胞,按不同时间收取样品进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。见图 3(A) 结果显示,在分子量 32.8kDa 处出现目的基因表达蛋白,随取样时间的推移,蛋白表达量逐渐增加。接种后 48h,重组蛋白开始表达,96h 达到峰值。经测定重组蛋白占蛋白含量的 17.2%。健康细胞和野生型病毒接种组在相同位置无此蛋白条带出现。

2.5 重组蛋白的免疫活性鉴定结果 采用免疫印迹试验对重组蛋白的免疫活性进行了鉴定,如图3(B)所示,在SDS-PAGE电泳图中(图3A)表现的32.8kDa蛋白条,48h~120h之间收获的样品均能与PCV2抗血清产生特异性免疫染色反应,健康细胞和野生型病毒接种组无染色。结果证实,获得的重组蛋白属于PCV2-Cap蛋白。

试验例 1 用本发明构建的重组杆状病毒株(rBac/PCV2Cap)表达的 PCV2-Cap 蛋白制备亚单位疫苗

以本发明构建的重组杆状病毒株(rBac/PCV2Cap),接种昆虫细胞表达的 PCV2-Cap 蛋白产物为抗原,制备亚单位疫苗。研究试验对制备重组蛋白在昆虫细胞的表达参数进行了优化,用 5 感染单位种毒接种昆虫细胞,用表达的 5 批次重组蛋白作为抗原进行了亚单位疫苗的研制。将重组蛋白培养物与免疫佐剂乳化制备亚单位疫苗。按兽用生物制品规程要求进行了半成品与成品疫苗的检验,用检验合格制品进行临床试验。

试验结果: 用试制的 PCV2-Cap 亚单位疫苗 2 倍剂量(4ml/头)肌肉接种 25 日龄仔猪 5 头,临床观察 28 天未见无异常反应,证明疫苗制品对本动物是安全的。疫苗免疫效力试验是采用 0.5ml、1ml、2ml 三种剂量免疫 25 日龄仔猪,每组 5 头,设未接种疫苗对照猪 3 头。所有疫苗免疫后 28 天抗体检测全部转阳;强毒攻击试验结果表明,1ml 和 2ml 免疫组均获得 100%保护,0.5ml 组获得 80%(4/5)保护率。

试验例 2 用本发明构建的重组杆状病毒株(rBac/PCV2Cap)表达的 PCV2-Cap 蛋白

## 抗原建立 ELISA 诊断试剂盒

用本发明构建的重组杆状病毒株 (rBac/PCV2Cap), 接种昆虫细胞制备重组表达的 PCV2-Cap 蛋白, 利用重组蛋白 C 末端插入的 6 个 His-Tag 标签序列, 采用商品化  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱一步法进行蛋白纯化 (图 4)。用纯化的重组蛋白抗原包被 ELISA 反应板, 建立检测 PCV2 特异性抗体诊断试剂盒。

ELISA 诊断试剂盒操作程序: 取上述方法制备的检测反应板置室温预热, 用 PBS 浸洗 1 次, 待检血清样品用 PBS-T 液 (含 0.05% Tween20 + 1% BSA) 按 1: 100 稀释, 以 PCV2 阳性和阴性血清作参照, 每份稀释的血清分别加入到 2 个抗原反应孔 (100 $\mu\text{L}$ /孔), 置 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 加入 1: 3000 倍稀释的 SPA-HRP 液 (Zymed 产品), 每孔 100 $\mu\text{L}$ , 置 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育 1h; PBS-T 洗涤 3 次, 加 50 $\mu\text{L}$ /孔底物反应液 (ABTS, Sigma 产品), 置室温显色 30min, 加入 1% NaF 溶液终止反应, 用酶标测定仪测定 405nm 波长的光密度值 ( $\text{OD}_{405}$ )。结果判定标准,  $\text{P/N} = [\text{待检血清 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}] / [\text{阴性对照血清 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}] \geq 2.1$  作为阳性反应临界值; 阳、阴性对照血清均成立时判定结果有效。

试验结果: 用重组蛋白包被 ELISA 板的最适浓度为 1.46~2.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 待检血清稀释倍数为 1: 100, 感作时间为 1h; 二抗酶标抗体稀释倍数为 1: 3000, 感作时间为 1h。组装的 ELISA 诊断试剂盒对已知 PCV2 阳性血清检测敏感性为 98%; 对 PCV2 阴性血清检测特异性为 100%。对猪瘟病毒 (CSFV)、猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪圆环病毒 1 型 (PCV1) 等参考阳性血清无交叉反应。诊断试剂批间与批内重复性良好, 变异系数小于 15%。与常规过氧化物酶单层细胞染色试验 (IPMA) 检测血清样本的符合率达 89%。诊断试剂盒可置 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存 1 年有效。

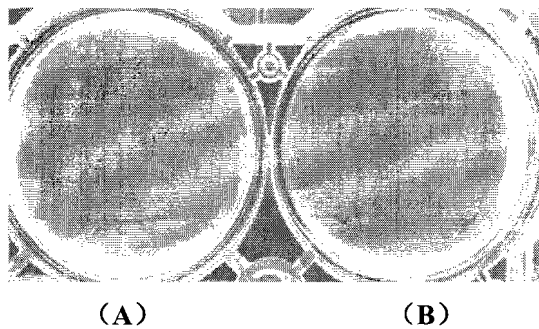


图 1

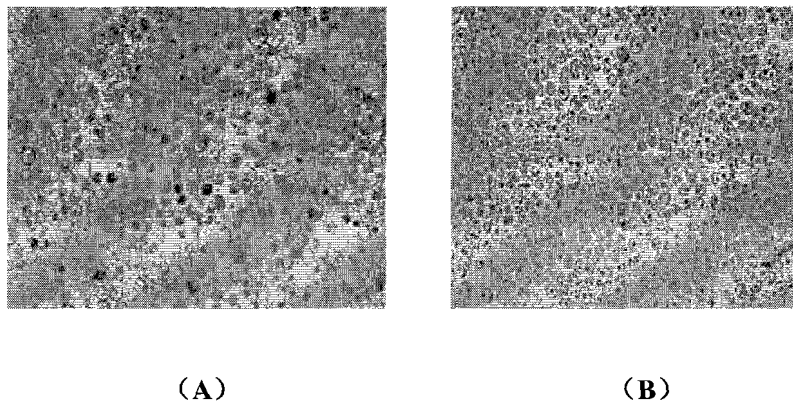


图 2

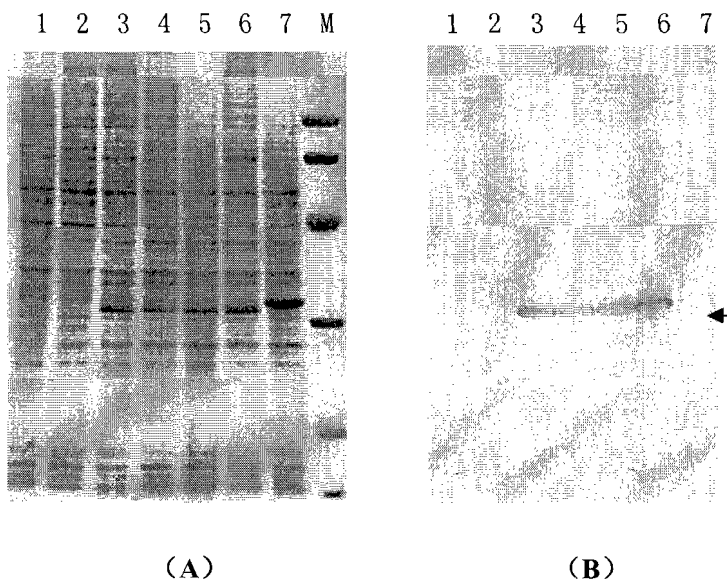


图 3

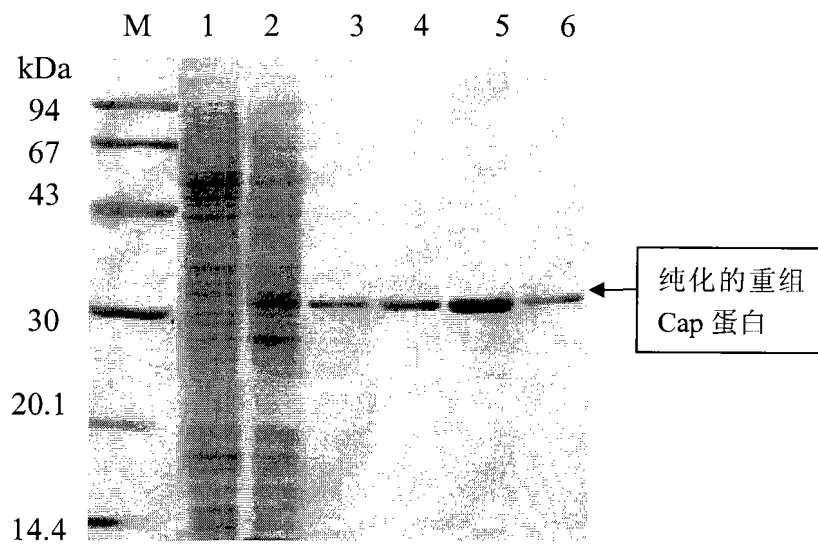


图 4

专利名称(译)	表达猪圆环病毒2型Cap蛋白的重组杆状病毒毒株、其构建方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101358182A</a>	公开(公告)日	2009-02-04
申请号	CN200710143417.3	申请日	2007-07-31
[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	刘长明 陆月华 张超范 危艳武 张朝霞 袁婧 董光志		
发明人	刘长明 陆月华 张超范 危艳武 张朝霞 袁婧 董光志		
IPC分类号	C12N7/01 C12N15/866 A61K39/12 A61P31/12 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/407		
代理人(译)	孙皓晨		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种高效表达猪圆环病毒2型Cap蛋白的重组杆状病毒毒株 rBac/PCV2Cap(微生物保藏号是:CGMCC NO.2083)及其用途。本发明构建的重组杆状病毒毒株rBac/PCV2Cap可在昆虫细胞中高效表达重组PCV2 - Cap蛋白,所表达的重组Cap蛋白具有良好的免疫活性和抗原性,可作为预防猪圆环病毒2型感染引起的相关疫病用亚单位疫苗,也可作为猪圆环病毒2型血清抗体检测诊断抗原。

