



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105263515 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201480006177. 0

(22) 申请日 2014. 01. 23

(30) 优先权数据

102013001893-7 2013. 01. 25 BR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/BR2014/000019 2014. 01. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/113855 PT 2014. 07. 31

(71) 申请人 米纳斯吉拉斯州研究基金

会 -FAPEMIG

地址 巴西米纳斯吉拉斯州

申请人 维索萨联邦大学

(72) 发明人 M·R·德·阿尔梅达 A·S·朱尼尔

J·L·R·菲尔托 G·C·布雷森

R·L·萨尔加杜 T·S·奥诺弗雷

M·C·福斯托 P·M·P·维迪加尔

S·P·卡尔科斯 J·S·克瑞斯皮姆

R·阿姆泽尔斯·席尔瓦·莱特

J·D·安德雷德·特谢拉

N·菲尔荷·贡扎加

T·拉奎尔·兹驰

L·F·利诺·德·索萨

A·M·达·克鲁兹·索萨

A·德·莫雷斯·蒙蒂罗

(74) 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有

限公司 11275

代理人 王维绮

(51) Int. Cl.

A61K 39/12(2006. 01)

C07K 14/01(2006. 01)

C12N 15/34(2006. 01)

A61P 31/20(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表2页 附图8页

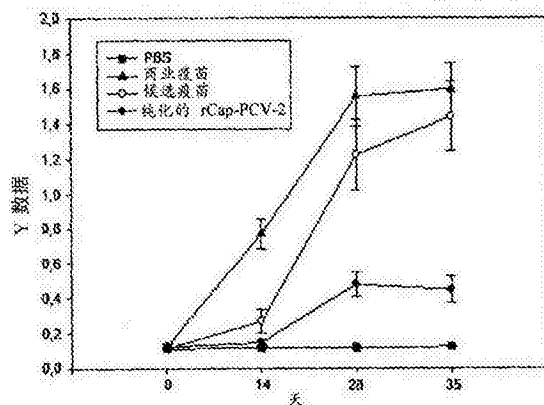
(54) 发明名称

用于疫苗制剂、诊断试剂盒的重组猪圆环病毒 2(PCV-2) 的抗原及其使用

(57) 摘要

本发明涉及制备猪圆环病毒 2(PCV-2) 病毒衣壳的重组抗原及其修饰形式,在原核系统中表达,以单体形式纯化,回收病毒样颗粒 (VLP),以及它们使用在疫苗制剂、诊断试剂盒及借助于捕获 ELISA 测定法在疫苗批次中定量 PCV-2 抗原的系统中。抗原和疫苗制剂可在常规猪育种体系中用于防治 PCV-2 相关疾病的规划中的动物的免疫,并且代表了对商用疫苗的替代。ELISA 试剂盒可用于测试针对 PCV-2 的商业疫苗和 / 或实验疫苗的质量。

CN 105263515 A



1. 一种猪圆环病毒 2 的重组抗原,其中,它是 SEQ ID NO:02。
2. 根据权利要求 1 所述的重组抗原,其中,它包含位于 PCV-2 重组衣壳蛋白的氨基末端区的 10 个组氨酸残基。
3. 根据权利要求 1 和 2 中任一权利要求所述的重组抗原作为 PCV-2 的病毒样颗粒 (VLP),其中,它包含 SEQ ID NO:02 的寡聚化产物。
4. 一种疫苗制剂,其中,它包括如权利要求 1 和 2 中限定的纯化抗原,或如权利要求 3 中限定的 VLP,与可药用佐剂结合,尤其是与氢氧化铝结合。
5. 一种 ELISA 捕获型诊断试剂盒,其中,它包含如权利要求 1 和 2 中限定的 SEQ ID NO:02,和抗 SEQ ID NO:02 抗体。
6. 权利要求 1、2 和 3 所限定的抗原的应用,其中,它应用于生产诊断试剂盒和生产疫苗化合物,并且不限于这些用途。
7. 权利要求 4 所限定的疫苗制剂的应用,其中,它用于控制与 PCV-2 相关的疾病。
8. 权利要求 5 所限定的诊断试剂盒的应用,其中,它用于 PCV-2 的衣壳蛋白量化,尤其在疫苗制剂中。

用于疫苗制剂、诊断试剂盒的重组猪圆环病毒 2 (PCV-2) 的 抗原及其使用

技术领域

[0001] 本专利申请的第一目的涉及在大肠杆菌 (*E. coli*) 中产生的纯化 PCV-2 重组衣壳蛋白作为疫苗抗原和诊断抗原。本专利申请的第二目的涉及由大肠杆菌产生的 PCV2 病毒样颗粒 (VLP) 作为疫苗抗原或诊断抗原。本专利申请的第三目的涉及抗 PCV-2 的重组疫苗, 它含有大肠杆菌中产生的 PCV2 的纯化抗原或重组 VLP 抗原, 添加至氢氧化铝作为佐剂。本专利申请的第四目的涉及用于量化 PCV-2 的疫苗抗原的捕获 ELISA 试剂盒。本文所述的疫苗抗原 (目的 1 和 2) 和疫苗 (目的 3) 可用于动物免疫, 用在常规猪养殖体系的 PCV-2 相关疾病的防治规划中, 并且代表市场上可获得的疫苗的替代物。ELISA 试剂盒 (目的 4) 可用于抗 PCV-2 的商业疫苗和 / 或实验疫苗的质量检验。上文提到的这些产品可用于制药或动物卫生领域。

背景技术

[0002] 在 1974 年, 猪圆环病毒 (PCV) 被首次识别 / 确定为存在于猪源性肾细胞培养中的持久污染物。不过, 该病毒在二十世纪 90 年代后期仅与猪的致病性相关。它是首次披露于加拿大的断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS)。由于在具有 PMWS 症状的动物中隔离出的该新型 PCV 和来自实验室细胞的那些污染物之间的遗传差异和免疫差异, 这两种病毒分别被命名为猪圆环病毒 -2 (PCV-2) 和猪圆环病毒 -1 (PCV-1) (Silva Junior, A., Carvalho, O. V., Bulos, L. H. S., Fietto, J. L. R., Moraes, M. P., Almeida, M. R. Porcine circovirus 2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines; World journal vaccine, v. 2, p. 96-104, 2012)。

[0003] 由于 PCV-2 与猪中除 PMWS 之外的不同的症状群相关, 术语猪圆环病毒相关疾病 (PCVAD) 在 2006 年由美国猪兽医协会 (AASV) 引入, 来分类所有的这些综合症。其中包括侵袭猪的肠炎、繁殖失败、皮炎和肾病, 主要在生长期和肥育期。最近, 在 2011 年, 披露了以急性肺水肿为特征的新综合症, 影响幼龄动物并且针对 PCV-2 接种疫苗, 导致约 20% 的死亡率 (Cino-Ozuna A. G., Henry S., Hesse, R., Nietfeld, J. C., Bai, J., Scott, H. M., Rowland, R. R. R. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. Journal of Clinical Microbiology, V49, p. 2012-2016, 2011)。目前, PCV-2 呈全球分布并且 PCVAD 在大多数养殖国家呈地方性流行。

[0004] 并非所有受 PCV-2 感染的动物都表现这些疾病的明显临床症状。因此, 为了进行准确的诊断, 除了通过实验室技术如聚合酶链反应 (PCR)、免疫组织化学 (IHC) 以及其它技术检测动物中的病毒外, 还需要观察相容性临床症状的存在和特征性显微病变的存在 (Silva Junior, A., Carvalho, O. V., Bulos, L. H. S., Fietto, J. L. R., Moraes, M. P., Almeida, M. R. Porcine circovirus 2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines; World journal vaccine, v. 2, p. 96-104, 2012)。

[0005] 由于患病的动物通常出现淋巴细胞减少,通过条件性病原体所致的继发性感染是时常发生的,这增加了 PCVAD 控制的重要性。从这个意义上说,研究提出 PCVAD 的形成与病毒相互作用以及其它条件性传染因子直接相关,其中动物的免疫系统证实了这些疾病的多因素性质 (Silva Junior, A., Carvalho, O. V., Bulos, L. H. S., Fietto, J. L. R., Moraes, M. P., Almeida, M. R. Porcine circovirus2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines; World journal vaccine, v. 2, p. 96-104, 2012)。

[0006] PCV-2 可以通过口腔和鼻腔分泌物、排泄物和血液在环境中传播。病毒传播借助鼻、口、排泄物途径和尿路发生。感染性病毒颗粒对物理和化学因素有抵抗力,并且能够经受酸性环境 (pH3)、热灭活 (120℃达 30 分钟)、冷冻和暴露于紫外光。基于过硫酸氢钾的消毒剂、过乙酸与过氧化氢、含有季铵盐的化合物、次氯酸钠或氢氧化钠可有效降低感染性颗粒的数量。在另一方面,含有碘或酚类化合物的产品不能降低在体外的病毒的传染性。由于 PCVAD 的多因素性质,应当通过多种因素 / 因子的组合来进行控制,例如由众所周知的“Madec’ s20points”推荐的良好管理实践,减少动物应激,减少混批、采用健康差距以及兽群的接种和血液学监测已证明是有效的 (Madec, F., Rose, N., Grasland, B., Cariot, R., Jestin, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. Transboundary and Emerging Diseases, v. 55, p. 273-283, 2008)。

[0007] 自从涌现 PMWS 并确认 PCV-2 及其致病因子以来,全世界的研究人员已经致力于开发控制该疾病特别是通过疫苗控制该疾病的多种方式。已经采用了几种策略,以便开发免疫原。其中,细胞培养中生长的灭活病毒疫苗、DNA 疫苗和含有在改性的昆虫细胞中产生的病毒衣壳蛋白的亚单位疫苗引人注目 (Silva Junior, A., Carvalho, O. V., Bulos, L. H. S., Fietto, J. L. R., Moraes, M. P., Almeida, M. R. Porcine circovirus2: immunopathogenesis and recent developments in vaccines; World journal vaccine, v. 2, p. 96-104, 2012)。

[0008] 圆环病毒衣壳的结构蛋白 SEQIDNO:04 由 ORF2, SEQIDNO:03 编码,并且近似分子量为 28kDa 和理论等电点 (PI) 为约 10.7。通过与细胞表面上的受体的特异性相互作用,它是参与宿主免疫反应的最相关蛋白。它在其氨基末端部分 (前 41 个氨基酸残基) 具有核定位信号,具有大量的带正电荷的氨基酸残基,其中约 40% 是精氨酸残基。研究显示 PCV-2 的衣壳蛋白上存在的三个免疫原性表位能够产生中和抗体。这些包括第 47 至 57 位氨基酸序列、第 165 至 200 位氨基酸序列和从 C 末端数最后 4 个氨基酸残基 (Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Marsh, P. S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X. J. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. Journal of Virology, V. 78, p. 8135-8145, 2004)。

[0009] 2001 年由 Liu 和同事首次在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中生成 PCV-2 的病毒衣壳蛋白作为多肽链,与麦芽糖结合蛋白 (MBP) 和组氨酸尾 -(MBP)-His8 融合 (Liu, Q., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2, Virology, v. 285, p. 91-99, 2001)。通过亲和色谱法纯化的这种重组蛋白与在先用 PCV-2 免疫的兔多克隆血清和来自被病毒感染的猪的血清特异性反应。

[0010] 难以在大肠杆菌细胞中表达大量的 PCV-2 衣壳蛋白,这是由于核定位信号中的大量的精氨酸残基和存在从该有机体的稀有密码子合成的其它氨基酸残基。另一种规避 PCV-2 衣壳蛋白的低表达问题的方式是使用过量表达稀有密码子的 t-RNA 的细菌菌株,如 BL21 密码子 ρ -plus-DE3-RIL。优点是维持蛋白质的全部氨基酸残基(一级结构保守),这确保了由核定位信号区中存在的表位产生抗体生成的可能性。不过,由多家企业销售或开发的其它细菌系统可用于表达。

[0011] 目前,主要在两种系统中进行重组 Cap-PCV-2 表达:第一种使用重组杆状病毒感染的昆虫细胞,而另一种由转化的细菌系统中重组蛋白诱导组成。在后一种系统中,表达系统通常受到 lac 操纵基因的控制,从而其诱导通常通过添加异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)至培养基进行。不过,存在几种由不同的企业销售的用于在细菌系统中表达的载体。因此,其它同源或异源启动子也可用作受阿拉伯糖调制的启动子。病毒样颗粒(VLP)是病毒衣壳的结构蛋白,以类似于野生型病毒颗粒的结构排列,形成其中缺少遗传物质的衣壳。这些非传染性颗粒由于存在病毒颗粒(病毒感染颗粒)的结构形式而具有高度免疫原性。因此,通过以类似于野生型病毒颗粒的方式刺激免疫系统,VLP在重组疫苗中的使用提高了所述疫苗的功效。已经在真核表达系统中(Bucarey S. A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Saenz, L. Zuniga, A. Tobar, J. A. The optimized capsid gene of porcine circovirus type2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts, *Vaccine*, v. 27, p. 5781-5790, 2009)和在原核系统中(Lou, Z. Z., Li, Z. Y., Wang, G., Li, J. Q., Lan, X., Li, X. R., Yin, X. P., Liu, J. X., Liu S. D. Prokaryotic expression and potential application of the truncated PCV-2 capsid protein. *Virological Sinica*, v. 25, p. 86-97, 2010)展示了 PCV-2 衣壳蛋白的形成 VLP 的能力。

[0012] 本发明所使用的方法使用细菌系统。这能够在几小时的诱导中诱导的培养基产生每升数十毫克至数百毫克范围内的抗原量。不过,昆虫细胞中的表达系统需要数日以产生相同的量。另一个优点是与其生产相关的成本。细菌系统使用比昆虫细胞更廉价的诱导手段。然而,采用昆虫细胞的系统不需要表达浓缩和纯化抗原的后续步骤。不过,在本发明中,借助比较便宜的技术回收重组抗原供以后使用。

[0013] 细菌系统的另一个可能的缺点是一旦采用原核系统,则衣壳蛋白中缺少转译后修饰/改性。然而,本发明显示当在细菌系统中表达时,病毒衣壳蛋白能够自我装配并促进生成形状和尺寸类似于野生型病毒颗粒的非传染性 VLP,类似于对于真核系统中表达所观察到的情况。

[0014] 另一个在产生含有 PCV-2 病毒衣壳蛋白的接种化合物中遭遇的难点是其在疫苗制剂中的量化。市场上的重组疫苗通常使用通过聚丙烯酰胺凝胶中密度测定法的量化技术,将标准蛋白例如牛血清白蛋白(BSA)用作参照。在本申请中,利用抗 PCV-2 抗体对免疫原性蛋白进行量化。所述抗体与特定样品中存在的 PCV-2 衣壳蛋白特异性相互作用,并且由于抗体上的特定标记,出现与样品中存在的抗原的量成比例的信号生成(颜色、放射性活度等)。因此,在读取该产生的信号并通过与含有纯化重组蛋白的样品进行比较后进行量化。

[0015] 在文献中描述了几种免疫反应的增强剂,并且根据本发明,可与本文所述的配方

结合使用。优选水性佐剂如氢氧化铝或碳聚合物,如羧甲基纤维素,原因在于产生比油性佐剂更少的炎症和疼痛。

[0016] 本发明开发的疫苗化合物可以按文献中描述的任何途径施用,优选地肌内给药施用。

[0017] 在多个专利库内进行的检索中,找到了用于猪的免疫原产生过程领域的专利文献,不过这些专利均不使用与本专利的目的相关的产品或方法。在这项检索中,找到了2004年7月26日的发明名称为“VACCINE FORMULATIONS”的专利文献PI0412855-9,其涉及“在存在细菌悬液或病毒悬液的情况下(尤其对于浓缩及非纯化或弱纯化)具有增大的稳定性的新型油水乳剂”,其中描述了含有灭活PCV-2的溶液。本专利申请的目的不同于所述的专利,因为它聚焦于使用在细菌系统中产生的重组蛋白,此外还提出用于回收和量化该抗原的特别的新方法。

[0018] 找到的另一篇申请是2006年9月8日的BRPI 0615862-5,发明名称为“VACCINE PCV-2, AND, METHOD FOR MANUFACTURING A VACCINE”,该申请是“一种抗猪圆环病毒(PCV-2)的疫苗和一种用于制造所述疫苗以使猪免遭PCV感染的方法”,其中发明人已开发了一种用于产生重组抗原的方法,优选在真核系统(昆虫细胞)中,以便规避病毒颗粒在培养的细胞中低回收的问题。与该专利相似,2005年12月29日的美国专利770028,发明名称为“PCV2immunogenic compositions and methods of producing such compositions”,描述了一种用于在诱导的细胞的上清液中改进的回收PCV-2重组衣壳蛋白的方法,在感染后约5天开始。相比之下,本发明提供了在几小时的诱导中产生数十毫克至数百毫克的蛋白质,在溶解并回收重组蛋白后。

[0019] 在美国专利数据库中找到另一文献是2009年12月11日的US 8008001,发明名称为“PCV-2VACCINE”,其涉及一种通过施用含有至少20微克/剂量的PCV-2衣壳蛋白的疫苗使猪崽免受PCV-2感染的疫苗和方法。所述专利披露了真核表达系统(重组杆状病毒接种的昆虫细胞)的优选使用。该系统不同于本发明中提出的系统,如本文所述是使用细菌系统,用抗原回收和量化的新方法。

[0020] 还在美国专利数据库中找到1999年3月12日的专利US 6287856,发明名称为“Vaccines against circovirus infections”,涉及保护免遭PCV感染的疫苗组合物。这些组合物是基于含有PCV多肽的编码序列的核酸载体,其中核酸缺少病毒复制起点,因此关于DNA疫苗,除本申请之外,其在大肠杆菌中产生抗原。

[0021] 本专利申请的第一目的是在转基因的大肠杆菌中产生的纯化PCV-2重组衣壳蛋白作为疫苗抗原和诊断抗原。本专利申请的第二目的是由转基因的大肠杆菌产生的PCV2病毒样颗粒(VLP)作为疫苗抗原。两个目的均可用于由PCV-2所致感染的控制和预防规划。本申请的第三目的涉及抗PCV-2的重组疫苗,含有在转基因的大肠杆菌中产生的PCV2纯化的抗原或重组VLP或其变体,添加氢氧化铝作为佐剂。同样可用于由PCV-2所致感染的控制和预防规划。

[0022] 本发明的另一目的是借助于产生的重组蛋白提供一种捕获ELISA试剂盒,用于在疫苗制剂中进一步量化。该技术的主要优点是易于执行和自动化、精确性、适应性和低成本。另外,所提出的捕获ELISA的主要优点是:样品不需要纯化,也不需要高浓度化验/测定,因为抗原由特异性抗体固定,使得该连接与这些蛋白质的浓度成正比,导致在需要量化

的结果中更大的再现性。当用 1 升的溶液稀释时,可以检出非常低量(如 50 微克)的蛋白质。因此,由于其益处和便利性,该测定法成为在安全性测试和剂量-反应测定中用作参照的有力候选方法,以便验证根据需要调整,放行不同商业疫苗所要求的疫苗效能。

[0023] 开发能够针对 PCV-2 感染产生保护作用的免疫原性化合物已经是控制 PCVAD 研究的总体框架内的定向搜索。在细菌系统中产生并以上文所述方式回收的 PCV-2 重组衣壳蛋白表明为潜在的免疫原。此外,替换作为诊断方法的检测和量化 PCV-2 的繁琐技术对于兽医诊断业而言是感兴趣的。因此,投资于生产和回收本文所述的重组抗原以便生产用于诊断和疫苗目的以及用于其它应用的目标化合物是非常有前景的。

附图说明

[0024] 图 1 示出了 1%琼脂糖凝胶的 PCR 产物的分析。M:100bpLadder DNA marker ;1、2、3 和 4 :对应于扩增 PCV-2 的 ORF2 的 DNA ;C- :阴性对照(从不含 PCV-2 的 SK6 细胞提取的 DNA)。

[0025] 图 2 示出了 1%琼脂糖凝胶的用 EcoRI 的质粒切割反应的分析,示出来自切割 ORF2 的 400bp 和 316bp 的条带。M:100bp Ladder DNA marker ;1.1、1.2、1.4、1.6、和 1.8 :随机选择的白色菌落 ;1.9、1.10 和 1.11 :阴性对照(蓝色菌落)。

[0026] 图 3 示出了 1%琼脂糖凝胶的采用 EcoRI(泳道 1)和采用 XbaI(泳道 2)的 pCap-PCV2 重组质粒切割反应的分析。M:100bp Ladder DNA marker。

[0027] 图 4 示出了 rCap-PCV-2 表达的确证。15% SDS-PAGE 凝胶(左)和通过蛋白质印迹法获得的硝酸纤维素膜(右)。M:分子量标记 ;C- :阴性对照(用空细菌表达质粒转化并用 IPTG 诱导的大肠杆菌提取物的可溶性部分);和 2 :样品(用 pCap-rPCV2 转化并用 IPTG 诱导的大肠杆菌提取物的可溶性部分)。箭头指示与 rCap-PCV-2 相对应的约 30kDa 的条带。

[0028] 图 5 示出了在纯化过程期间从可溶性部分获得的蛋白质(表达)谱。M:分子量标记 ;1 :诱导的大肠杆菌提取物的可溶性部分 ;2 :非相互作用性体积 ;3 :用 10%洗脱缓冲液洗涤 ;4 :用 20%洗脱缓冲液洗涤 ;5 :用 100%洗脱缓冲液洗脱。箭头指示纯化的 rCap-PCV-2。

[0029] 图 6 示出了由用不同硫酸铵饱和水平沉淀可溶性部分的过程所得级分的蛋白质谱。M:分子量标记 ;1 :可溶性部分,2 :级分 0-20%,3 :级分 20%-40%,4 :级分 40%-60%,5 :级分 60%-80%,6 :纯化的 rCap。箭头指示 rCap-PCV-2。

[0030] 图 7A、B 和 C 示出了电子显微照片:通过 rCap-PCV-2 形成病毒样颗粒(VLP)。放大 140000X(A 和 B)。放大 250000X(C)。通过透射电子显微镜分析样品,使用 formvar/碳覆盖的 200 目载网。VLP 可以由箭头可见。

[0031] 图 8 示出了样品稀释物:rCap-PCV-2 :10mg/L 至 0.004883mg/L 稀释物。候选疫苗:1:50 至 1:103,200 稀释。来自阴性大肠杆菌的裂解物:1:50 至 1:103,200 稀释。获得的等式是 $y = 0.875x + 0.196$ ($R^2 = 0.996$),其中 y 是 OD_{492nm} 并且 x 是待检测蛋白质的浓度。

[0032] 图 9 示出了通过间接 ELISA 测得的在接种之前和之后小鼠中 rCap-PCV-2 诱导的特异性体液反应。动物在第 0 天和第 14 天接种并且在第 35 天激发。候选疫苗接种的动物显示明显量的抗体,特别在第二次接种后。

[0033] 图 10 示出在采样时间用商业疫苗 1 接种的动物的病毒血症的评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 5E+10e^{0.1847x}$ 表示。在接种后的一段时间期间不存在病毒载量的显著降低 ($R^2 = 0.1195$)。

[0034] 图 11 示出了在两个采样时间用商业疫苗接种的动物的病毒血症评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 2E+13e^{1.323x}$ 表示。在接种后的一段时间期间不存在病毒载量的显著降低 ($R^2 = 0.5703$)。

[0035] 图 12 示出了在采集时间用候选疫苗以 50pg 浓度的剂量接种的动物的病毒血症评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 2E+12e^{0.766x}$ 表示。在接种后的一段时间存在病毒载量的显著减少 ($R^2 = 0.9696$)。

[0036] 图 13 示出了在采集时间用候选疫苗以 50 μ g 浓度的两个剂量接种的动物的病毒血症评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 1E+12e^{0.79x}$ 表示。在接种后的一段时间存在病毒载量的显著减少 ($R^2 = 0.9418$)。

[0037] 图 14 示出了在采集时间用候选疫苗以 150 μ g 剂量浓度接种的动物的病毒血症评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 2E+17e^{4.106x}$ 表示。在接种后的一段时间不存在病毒载量的显著减少 ($R^2 = 0.7912$)。

[0038] 图 15 示出了在采集时间用候选疫苗以 150 μ g 浓度的两个剂量接种的动物的病毒血症评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 4E+13e^{1.594x}$ 表示。在接种后的一段时间不存在病毒载量的显著减少 ($R^2 = 0.6673$)。

[0039] 图 16 示出了在采集时间未接种动物(阴性对照)的病毒血症评估。在垂直轴上显示病毒载量,在水平轴上显示 4 个采集阶段:21、63、105 和 154 日猪龄。线性回归由式 $y = 2E+13e^{1.304x}$ 表示。在接种后的一段时间不存在病毒载量的显著减少 ($R^2 = 0.7425$)。

具体实施方式

分离和克隆猪圆环病毒衣壳蛋白的编码区

[0040] 从 MG, Ponte Nova 地区受 PCV-2 折磨的猪组织样品分离出用于扩增衣壳蛋白编码区(ORF2)SEQ ID NO:03 的猪圆环病毒 2(PCV-2)DNA。利用在 5' 末端插入 NdeI 酶限制性位点的正向寡核苷酸 5'-CGCCATATGACGTATCCAAGGAGG-3' (正向)和在编码区的末端形成 Xho I 位点的反向寡核苷酸 5'-CCCTCGAGTTAGGGTTAAGTGGG-3' (反向),通过聚合酶链反应(PCR)技术扩增 ORF2。这些寡核苷酸由保藏在 GenBank 的巴西分离株 PCV-2(DQ364650)的基因组序列构建。利用 TaqDNA 聚合酶 5U/ μ L 在热循环仪中进行 DNA 片段的扩增。扩增的样品贮存在 -4°C 并且通过水平电泳在 1% 琼脂糖凝胶上分析。在紫外光下在凝胶上用溴化乙锭 0.4g/mL 显示 716bp 的 DNA 片段,如图 1 中所示。

[0041] 从琼脂糖凝胶纯化 PCR 产物。随后,将纯化的 PCV-2ORF2 克隆至扩增载体(pGEM®-TEasy 载体系统 -PROMEGA)中。将如试剂盒制造商所指示获得的结合混合物添加至大约 100 μ L 的含有细菌大肠杆菌 DH5 α 的溶液,其中事先使得所述细菌具有感受

态 (Sambrook J., Russell, D. W., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), 并且在冰中实施培育达 30 分钟。随后, 细胞和质粒 DNA 的混合物受到在水浴中在 42°C 的热休克达 1 分钟, 并再次在冰上达 2 分钟。随后, 添加 900 μ L 的无抗生素的 LB-Net (1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl; pH7.5) 并将细胞在 37°C 以 250rpm 在轨道摇床中培育达 2 小时。将该混合物铺在含有氨苄青霉素 (5 至 10mg/mL) 的固态 LB-琼脂培养基 (1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 1% NaCl, 1.5% 选择琼脂; pH7.5) 上并且在 37°C 培育达 12 至 14 小时。

[0042] 回收氨苄青霉素抗性克隆并用于通过 PCR 和酶测定从借助微型质粒制备法提取的质粒来确认含有感兴趣的基因的质粒的存在 (Sambrook J., Russell, D. W., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)。用限制性酶 EcoRI 进行酶测定, 并且通过电泳法在 1% 琼脂糖凝胶中分析后续切割反应 (图 2)。按照与上述 PCR 相同的方式进行菌落的 PCR, 不过, 借助无菌牙签添加转化子菌落的等分试样, 替代来自感染组织的基因组 DNA。还通过电泳法在 1% 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物。

[0043] 利用 PCR 产物纯化试剂盒纯化获得的通过酶测定和菌落 PCR 确定含有病毒 DNA 的质粒样品, 并且随后送至 Genomics Laboratory, BIOAGRO/UFV 以便后续测序以确定载体的正确装配。测序反应基于双脱氧核苷酸 (ddNTP) 链终止技术 (Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 74, p. 5463-5467, 1977)。利用生物信息学软件将生成的序列编辑并装配成“重叠群”, 随后相互比较, 并且利用 BLAST 软件将序列保藏于 theGenBank。ORF2 的翻译序列在 SEQ ID NO:04 描述。将含有该构建体的克隆在含有 20% 甘油的微量离心管中的 LB-Net 培养基内贮存并储存在 -80°C。

转移猪圆环病毒 2 衣壳蛋白的编码区至细菌系统中的表达载体

[0044] 在检验了载体中插入物的正确序列后, 对 pCapPCV-2 质粒 DNA 样品 SEQ ID NO:03 (扩增载体) 进行酶测定, 在酶测定中, 特异性限制性位点用于将 ORF2 基因插入细菌表达载体 (pET-16b-Novagen), 所述细菌表达载体受 lacT7 启动子控制并且具有在 N 末端编码 10 组氨酸尾的序列 (用于通过与含镍树脂的亲合力进行纯化)。pCapPCV-2 中的 ORF2 序列以及细菌表达载体用 NdeI 和 XhoI 消化。在切割后, 利用 T4DNA 连接酶结合产物 (消化的细菌表达载体和 ORF2 插入物 (从扩增载体取出))。结合反应随后用来转化大肠杆菌 DH5 α ; 如上文所述。随机从菌落选出转化体克隆以识别具有插入物的质粒。为了克隆确认, 进行菌落 PCR, 显示对于两组随机选择的菌落, 位点定向克隆如预期那样进行, 产生 716bp 的片段。选择阳性菌落并且每个菌落分别进行 PCR。对于向重组质粒呈现近似大小为 716bp 的菌落, 对 PCAP-RPCV-2 质粒 SEQ ID NO:01 实施切割反应, 以确认它们的方向。因此, 分别从 EcoRI 消化和 XbaI 消化观察到 718bp 和 472bp 预期大小的条带, 以及对应于质粒的剩余片段的高分子量 (条带) (图 3)。所获得的重组质粒被命名为 PCAP-rPCV2 并贮藏在含有 15% -30% 甘油的微量离心管中, 并储存在 -70°C。

表达猪圆环病毒 2 衣壳重组蛋白和对 SDS-PAGE 凝胶的分析

[0045] 在 TB1000mL (胰蛋白胨 12g/L, 酵母提取物 24g/L, 甘油 4mL, 磷酸二氢钾 2.31g/L, 和磷酸氢二钾 12.54g/L) 中以中等规模进行重组蛋白的完整表达。对此, 将大肠杆菌菌株

BL21-DE3-RIL 密码子 plus 的感受态细菌用 PCAP-rPCV2 构建体以类似于用扩增载体所实施的方式转化。因此,大约 20 纳克的 PCAP-rPCV2 重组质粒被添加至 100L 的感受态细胞,并且混合物在冰上被培育达 30 分钟。随后,细胞混合物和质粒 DNA 在水浴中在 42℃ 受到热休克达 1 分钟,并再次在冰上达 2 分钟。随后,添加 900 μ L 无抗生素的 LB 培养基(细菌胰蛋白胨 10g/L,酵母提取物 5g/L 和氯化钠 10g/L)并将细胞在 37℃ 以 250rpm 培育达 2 小时。细胞被百倍稀释(1:100)到含有氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 培养基并且在 37℃ 和 200rpm 培育达 12 小时(预接种)。还在 LB-Net, pH7.0, 氯霉素 17 μ g/mL 中进行阴性对照(非转化的 BL21 细菌)的培养。细胞随后在含氨苄青霉素 100 μ g/mL 的 TB 液体培养基, pH7.0 中 1:100 稀释,并且将培养物在 30℃ /250rpm 培育大约 3 小时直至光密度(OD₆₀₀)达到 0.6-0.8。利用氯霉素 17 μ g/mL 对阴性对照进行相同的程序。在达到 OD 后,将培养物等分试样转移至新管,在新管中进行 1、2、3、4 和 5 小时诱导以便了解最佳诱导时间。测试的 IPTG 浓度是 0.1、0.5 和 1mM,并且所用的温度是 30℃ 和 37℃,总是在剧烈搅拌和充分通气下进行。对于阴性对照,实施相同的程序。在每种条件下采集 1mL 样品,以 10000xg 离心达 1 分钟,弃去上清液,并且将细胞沉淀物贮存在 -20℃ 以便通过 SDS-PAGE 进行分析。

[0046] 为了纯化,在诱导期间观察到最佳产生时间(4 小时)、温度(30℃)和 IPTG 浓度(0.25mM),因此,诱导 1 升含有重组质粒 pCap-rPCV2 的正在生长的菌落。以最佳条件诱导后,将样品在 4℃ 以 10,000g 离心达 20 分钟。弃去上清液并将细胞沉淀物贮存在 -20℃。

[0047] 融化从 100mL 体积的诱导的培养基得到的沉淀物并用裂解缓冲液(Na₂HPO₄20mM; NaCl300mM,咪唑 5mM, pH8.0)再悬浮到最终体积为大约 2.5mL。向该缓冲液添加 1mg/mL 的溶菌酶,并且随后将样品在 0℃ 培育达 30 分钟。用 6 个超声处理循环进行细胞裂解过程,每次 200-300 瓦特 10 秒,间隔 10 秒,并将管放在冰上以防止样品升温。通过在 4℃ 以 15000xg 离心达 30 分钟,沉淀细胞残片和包涵体。将上清液(可溶性部分)被收集在新管中并用于纯化 PCV-2 重组衣壳蛋白,命名为 rCap-PCV-2(SEQ ID NO:02)。

[0048] 在 15% 聚丙烯酰胺凝胶中分析样品(包括阴性对照)(Sambrook J., Russell, D. W., Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)。在跑胶后,通过染色溶液(Coomassie Brilliant Blue R-2500. 1%、乙酸 9%、乙醇 45%)显示凝胶。电泳运行确认了诱导的样品中存在大约 30kDa 的条带。该质量对应于由添加至组氨酸尾的 PCV-2 ORF2 编码的蛋白质。通过蛋白质印迹技术实施表达确认(图 4)。

纯化猪圆环病毒 2 重组衣壳蛋白和对 SDS-PAGE 凝胶的分析

[0049] 在琼脂糖固定化镍树脂中借助亲和色谱法从可溶性部分纯化 PCV-2 病毒重组衣壳蛋白。所用的技术是“快速性能液相色谱”(FPLC),通过载有镍的色谱柱用于纯化与组氨酸尾融合的重组蛋白。纯化借助于几个分析参数如线性流速、洗涤体积及洗脱体积、和咪唑浓度及脲浓度被标准化。在纯化后,将含有蛋白质的溶液在 50 个体积的含有 300mM NaCl 的 50mM pH7.2 的碳酸盐缓冲液中透析 3 次总计 9 小时(三小时透析)。在 15% 聚丙烯酰胺凝胶上如前文所述分析全部纯化步骤的样品。蛋白质被成功纯化并且可以在图 5 中见到。

rCap-PCV-2 浓度估计

[0050] 可以利用 Bradford 描述的方法确定纯化和透析的 PCV-2 病毒衣壳重组蛋白的量(Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein- dyebinding. Analytical Biochemistry, V. 72, p. 248-254, 1976)。通过线性回归进行计算,其中从测试的 BSA 稀释物的光密度值的最佳拟合获得等式 $y = 0.3267 + 0.0108x$ 。

通过用硫酸铵沉淀回收猪圆环病毒 2 衣壳重组蛋白以及制备疫苗化合物和病毒样颗粒 (VLP) 的形成验证

[0051] 对此,向含有 rCap-PCV-2 的可溶性部分添加量足以形成 20% 饱和度 (至 0°) 的 Na_2SO_4 , 并且随后,将样品在冰上以 100rpm 培育达 30 分钟。接着,将蛋白质提取物在 0°C 以 15,000x g 离心达 20 分钟。在离心结束时,收集上清液并将沉淀物重悬于相同体积的含有 300mM NaCl 的 pH7.0 碳酸盐缓冲液中 (硫酸铵 0-20% 的蛋白质级分)。向上清液添加量足以形成 40% 饱和度的 Na_2SO_4 , 从该盐溶液的初始 20% 饱和度开始。随后,重复在冰上培育和搅拌和离心步骤以获得饱和度 20% -40%、40% -60% 和 60% -80% 的硫酸铵级分。这些级分在含有 300mM NaCl 的 pH7.0 碳酸盐缓冲液中透析并且随后贮存在 4°C 达最长两天,以便通过 SDS-PAGE (图 6)、蛋白质印迹法和捕获 ELISA 分析。每种疫苗使用 1mL 剂量的佐剂氢氧化铝凝胶 (OMEGA-Chemicals Inc.)。

[0052] 为了 VLP 验证,对蛋白质印迹法呈阳性结果的来自 CsCl 梯度的 (多个) 级分分别对 500mL 碳酸盐缓冲液 (300mM NaCl, 50mM 碳酸盐, pH7.0) 透析 2 次,每次达 4 小时。将大约 10 μL 的各级分添加至 formvar/ 碳覆盖的 200 目载网并且允许在室温放置 1 分钟。随后,用滤纸移除过多的样品,并且将一滴 2% 乙酸双氧铀添加在每个载网中并且允许作用 1 分钟。用滤纸移除过多的该造影剂,并将载网留在干燥器中达 2 日。在透射电子显微镜上进行分析并且拍摄影像 (图 7A、B 和 C)。

通过捕获 ELISA 量化 PCV2 疫苗抗原

[0053] 在这个 ELISA 测定中,将兔中产生的抗 rcap-PCV-2 抗体沉淀并用作捕获和检测抗体,后者与过氧化物酶缀合。在标准化中,最佳抗原浓度是 0.625g/mL,捕捉抗体的最佳稀释度是 15 $\mu\text{g/mL}$, 并且过氧化物酶缀合的检测抗体为 1:800。全部过程均按照 Checkerboard 法进行 (Crowther J. R. ELISA. Theory and Practice. Methods in Molecular Biology, V. 42, p. 1-223, 1995)。在优化了捕获 ELISA 工作条件后, rCap-PCV-2 的浓度用于通过线性回归构建标准曲线 ($y = 0.196 + 0.875x$) (图 8)。通过计算吸光度值的均值进行标准曲线的构建,其中在覆有捕获抗体 (0.625g/mL 浓度) 的 96 孔微板中,以 2 为基数从蛋白质的连续稀释 (从 5mg/L 开始至 0.0048mg/L) 获得所述吸光度值。测定法的工作范围定义为曲线的线性区域,其中相关系数 $R^2 = 0.996$ 。因此,7 点校正自 rCap-PCV-2 0.625-0.0391mg/L, 对应于线性回归分析的结果。

[0054] 为了量化疫苗化合物中的蛋白质,使用 0.6g 的沉淀物,等同于 100mL 的用 pCap-2-RPCV 重组质粒转化的大肠杆菌的细胞诱导培养基,其中所述重组质粒含有与 PCV-2 的 ORF2 相对应的基因,并用 IPTG 诱导以便产生重组蛋白。作为阴性样品,使用相同量的用空细菌表达载体转化的细胞的提取物。将这些细胞的沉淀物融化并重悬于 2mL 裂解缓冲液 (NaH_2PO_4 20mM ; NaCl 300mM, 咪唑 5mM, pH8.0) 中。向裂解缓冲液添加溶菌酶 1mg/mL、1mM PMSF 并且随后在冰上培育达 30 分钟。用 6 个超声处理循环进行细胞裂解的过程,每次 200-300W 10 秒,间隔 10 秒,并且将管放在冰上以防止样品升温。通过 Holden 和同事 (公开的方法) 确定候选疫苗中 rCap-PCV-2 的未知浓度 (Holden, L., Faeste, C. K., Egaas, E.

Quantitative Sandwich ELISA for the determination of lupine-lupinus spp. in foods, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, V. 53, p. 5866-5871, 2005), 其中进行疫苗连续稀释并且将 OD492nm 值与标准曲线的线性部分的中点最接近的稀释度用来计算疫苗中蛋白质的浓度。因此, 在计算样品稀释因子后, 候选疫苗中 rCap-PCV-2 (SEQ ID NO:02) 的浓度是 0.73mg/mL。

展示性实验

小鼠中的实验

[0055] 将多只五周龄雌性小鼠如下分成 4 个组, 每组 5 只动物: 一组用开发的候选疫苗 (硫酸铵 0-40% 透析的蛋白质沉淀); 一组用纯化的 rCap-PCV-2; 一组用磷酸盐缓冲液 PBS (阴性对照) 接种; 和, 一组用抗猪圆环病毒的商业疫苗 (阳性对照) 接种。在用候选疫苗接种的组、用纯化蛋白质接种的组和用 PBS 接种的组中, 添加氢氧化铝用作佐剂, 例外的是用商业疫苗接种的动物。动物通过腹腔内注射被接种 2 次 (两个剂量), 其中剂量之间间隔是 14 天。在候选疫苗接种的组中和在纯化蛋白质接种的组中接种的 rCap-PCV-2 的量对于第一次剂量是 30 μ g, 而第二次是 15 μ g。在接种后 0、14、28 和 35 天时间通过眼窝穿刺法采集血液样品以进行血清分析。在激发后 14 天使动物安乐死。遵循巴西动物实验学会 (COBEA) 所采用的动物实验的所有伦理原则 (Certificate of Ethics for Animal Use (CEUA)/UFV, Case No 054/2011)。

[0056] 通过间接 ELISA 技术进行体液免疫反应的评价。通过 Checker board 滴定法评价 rCap-PCV-2 抗原的最佳工作浓度和血清 (第一抗体) 的最佳稀释度 (Crowther J. R. ELISA. Theory and Practice, *Methods in Molecular Biology*, V. 42, p. 1-223, 1995)。确定最佳抗原 (rcap-PCV-2) 浓度分别为 0.156 μ g/孔和 1:4,000, 用于该 PCV-2 阳性小鼠血清。

[0057] 用候选疫苗接种的小鼠显示与对用商业疫苗接种的小鼠所获得的相似水平, 尤其在第二次疫苗剂量后 (图 9), 可能是由于 VLP 的存在 (图 7) 和所用的佐剂浓度。

猪中的实验

[0058] 来自标准商业农场的 21 日龄猪用候选疫苗接种并与商业疫苗比较。评价在猪中含有 PCV-2 (rCap-PCV-2) 病毒衣壳重组蛋白的疫苗化合物的抗原潜力。对此, 使用来自 Ponte Nova 地区, MG 的商业农场的 140 头大约 21 日龄的猪。尊重农场采用的管理实施实验。遵循 Department of Veterinary Medicine DVT/UFV 的 Standards of Conduct for the use of Animals in Teaching, Research, and Extension, 注册号 37/2012 进行这项现场研究。

[0059] 将这些动物分成 7 组, 每组 20 只动物。组 1 和组 2 用商业疫苗根据制造商的推荐接种。将组 3 和组 4 用含有 50 μ g 的重组蛋白的商用候选者接种, 其中组 3 的动物在 21 日龄接受一次剂量, 而组 4 的动物在 21 日龄和 35 日龄接受两次剂量。相比之下, 组 5 和组 6 用含有 150 μ g 的重组蛋白的候选疫苗接种, 分别使用一次和两次剂量, 按照与组 3 和组 4 相同的接种方案。组 7 (对照组) 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 接种。所有免疫接种均通过肌肉注射途径进行。从最初适应期至屠宰日采集血样, 用于病毒载量量化。在动物的第 21、63、105 和 154 生活日采集血样。利用商用提取试剂盒进行总 DNA 提取。通过 PCR 实时按照 Silva 等人所述的方案进行所采集的血清中的 PCV-2 病毒载量的量化 (Silva, F. M. F., Silva Jr., A., Vidigal P. M., Oliveira C. R., Viana, V. W., Silva, C. H. O., Vargas, I., Fietto, J. L. R., Almeida, M.

R. Porcine Circovirus-2 Viral Load versus Lesions in Pigs: Perspectives for Post-weaning multisystemic Wasting Syndrome, *Journal of Comparative Pathology*, v. 144, p. 296-302, 2011)。反应按一式三份进行并且所有分析的 Ct (阈值循环) 代表来自每个样品的 Ct 平均数, 因此, 由每个样品的 Ct 平均数, 可计算每个组和每次采集的平均和标准偏差。通过指数回归分析, 求得的均值用于病毒载量的递降趋势评估。统计上, 在商业疫苗 1 和 2 中未观察到病毒载量降低趋势 / 递降趋势 (图 10 和图 11)。在组 3 和组 4 中分别在统计上证实了病毒载量的降低 (rCap-PCV2 50 μ g, 一次和两次剂量), $R^2 = 0.96$ 和 $R^2 = 0.94$ (图 12 和图 13), 其中从第三周的分析存在向下趋势。组 5 和组 6 (rCap-PCV2, 150 μ g- 一次和两次剂量) 没有显示在统计上病毒载量的可容许的递降趋势 (分别为 $R^2 = 0.7184$ 和 $R^2 = 0.638$ - 图 14 和图 15)。阴性对照组显示没有病毒载量在统计上的递降趋势 (图 16)。

结论

[0060] 目前, 在兽医市场, 真对 PCV-2 的商业疫苗由外国企业销售, 并且它们在巴西以外生产, 因此疫苗批次具有进口成本。本发明的疫苗抗原可用于在常规猪养殖体系中 PCV-2 相关疾病防治规划的动物的接种, 并且代表了商用疫苗的替代品。ELISA 试剂盒可用于 PCV-2 疫苗抗原的量化, 可用于对商业疫苗和 / 或实验疫苗的质量保证测试。

[0001]

序列表

<110> 维索萨联邦大学
米纳斯吉拉斯州研究基金会-FAPEMIG
<120> 用于疫苗制剂、诊断试剂盒的重组猪圆环病毒2 (PCV-2) 的抗原及其使用
<130> 02 - 2013
<160> 4

<210> SEQ ID N 01
<211> 764
<212> DNA
<213> 重组猪圆环病毒2 (PCV-2)

<400> 1
atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca ggggccatat cgaaggtcgt 60
catatgacgt atccaaggag gcgttaccgg agaagaagac accgcccacg cagccatctt 120
ggccagatcc tcgcgcgcgc cccctggctc atccaccccc gccaccgta cgcctggaga 180
aggaaaaatg gcattctcaa cacccgcctc tcccgcacct tccgatatac tatcaaacga 240
accacagtaa aaacgcctc ctggggggtg gacatgatga gattcaatat taatgacttt 300
cttcccaccg gagggggctc aaacccccgc tctgtgcctt ttgaatacta cagaataaga 360
aaggttaagg ttgaattctg gccctgctcc ccgafcaccc agggtagacg gggagtgggc 420
tccagtgctg ttattctaga tgataacttt gtaacaaagg ccacagcctc cacctatgac 480
ccctatgtaa actactecte ccgccatacc ataaccacgc ccttctecta ccactcccgc 540
tactttaccg ccaaacctgt cctagatfcc actatigatt acttccaacc aaacaacaaa 600
agaaatcagc tgtggctgag actacaaact gctggaaatg tagaccacgt aggcctcggc 660
actgcgttcg aaaacagtat atacgaccag gaatacaata tccgtgtaac catgtatgta 720
caattcagng aatttaatct taaagacccc ccacttaaca ctaa 764

<210> SEQ ID N 02
<211> 254
<212> 蛋白质
<213> 重组猪圆环病毒2 (PCV-2)

<400> 2
Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly
01 05 10 15
His Ile Glu Gly Arg His Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg
20 25 30
Arg Arg Arg His Arg Pro Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg
35 40 45
Arg Arg Pro Trp Leu Ile His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg
50 55 60
Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly
65 70 75
Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val Lys Thr Pro Ser Trp Ala Val
80 85 90
Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly Gly
95 100 105
Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Gln Tyr Tyr Arg Ile Arg
110 115 120
Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly
125 130 135
Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe
140 145 150
Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
155 160 165
Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg
170 175 180
Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
185 190 195
Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr
200 205 210
Ala Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn
215 220 225
Ser Ile Tyr Asp Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val
230 235 240
Gln Phe Arg Glu Phe Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Thr
245 250 254

<210> SEQ ID N 03
<211> 702
<212> DNA

[0002]

<213> 猪圆环病毒2 (PCV-2)

<400> 3

```

atgacgtate caaggaggcg ttaccggaga agaagacacc gcccaacgag ceatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggtccttc caccceccc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaaac acgctctctc cgcaccttcg gatataetat caaacgaacc 180
acagtcacaaa cgccctctcg gccgggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccccctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaaggttg aattctggcc ctgctcccc atcaaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgtgttta tcttagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaact actctctccg ceataccata acccagcctt tctctacca etcccgtacc 480
tttaccceca aacctgtcct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540
aatcagctgt gcctgagact ncaaaactgt gaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaacct gtagtataaa 660
ttcagagaat ttaattctaa agacccecca cttaacactt aa 702
    
```

<210> SEQ ID N 04

<211> 233

<212> 蛋白质

<213> 猪圆环病毒2 (PCV-2)

<400> 4

```

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro
01 05 10 15
Arg Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Ile
20 25 30
His Pro Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe
35 40 45
Asn Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr
50 55 60
Thr Val Lys Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn
65 70 75
Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser
80 85 90
Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe
95 100 105
Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser
110 115 120
Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala
125 130 135
Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile
140 145 150
Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro
155 160 165
Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg
170 175 180
Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val Asp His
185 190 195
Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp Gln Glu
200 205 210
Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe Asn
215 220 225
Leu Lys Asp Pro Pro Leu Asn Thr
230 233
    
```

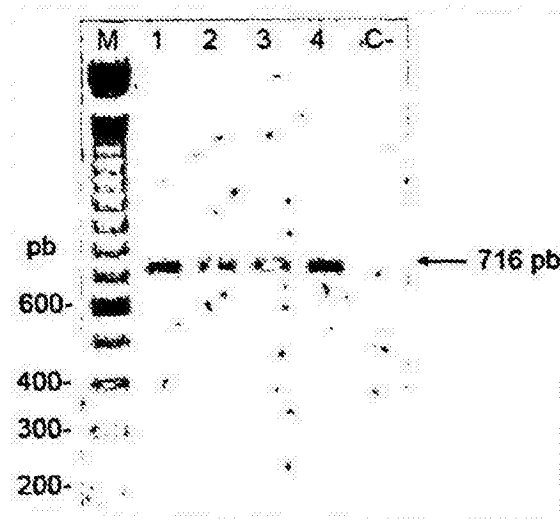


图 1

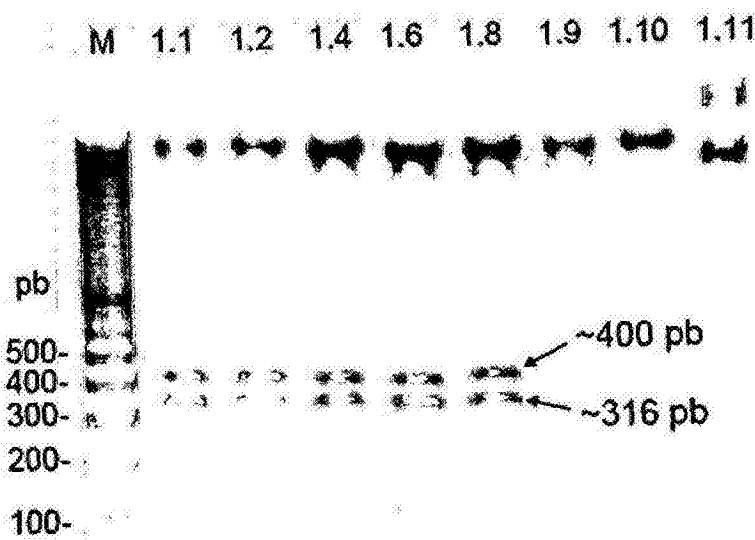


图 2

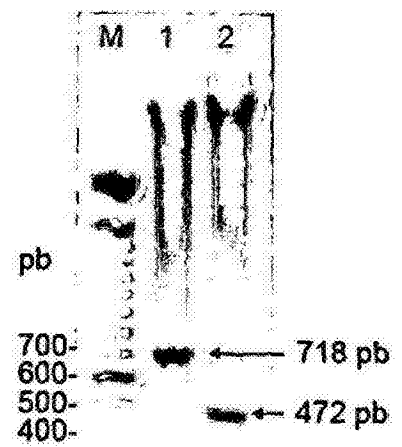


图 3

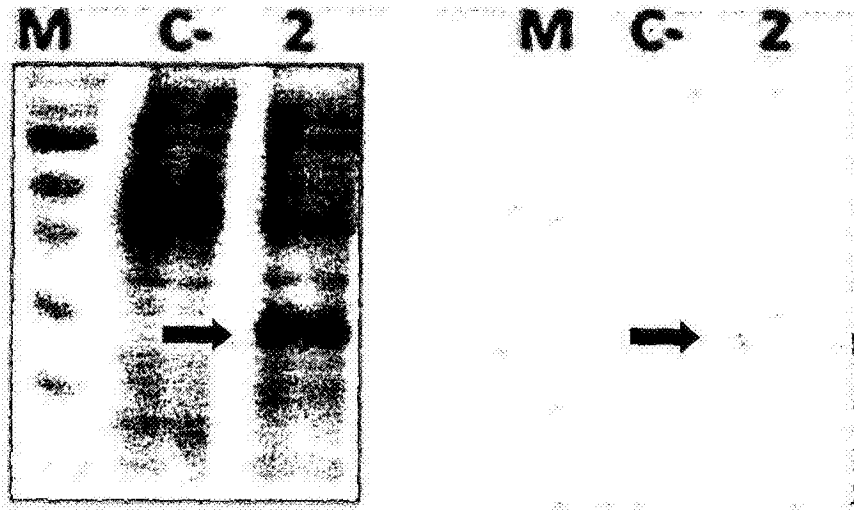


图 4

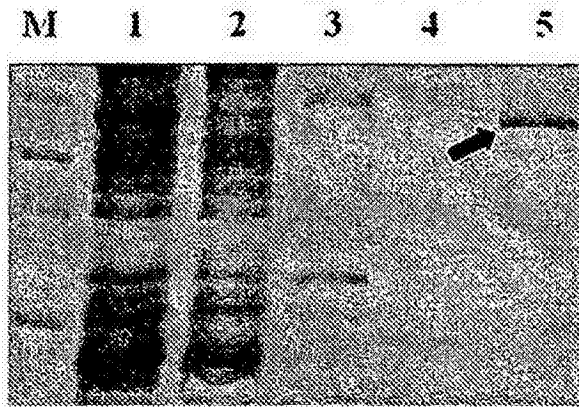


图 5

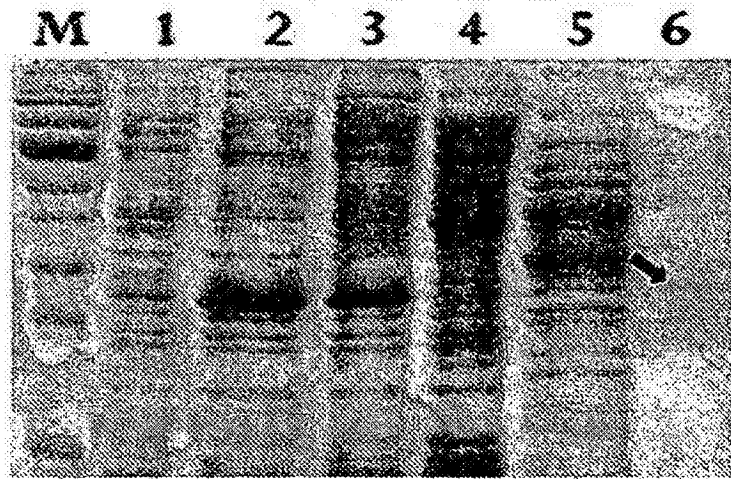


图 6

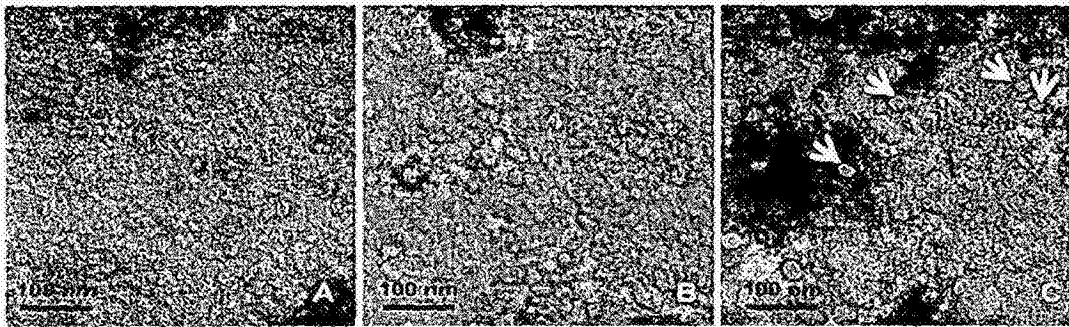


图 7

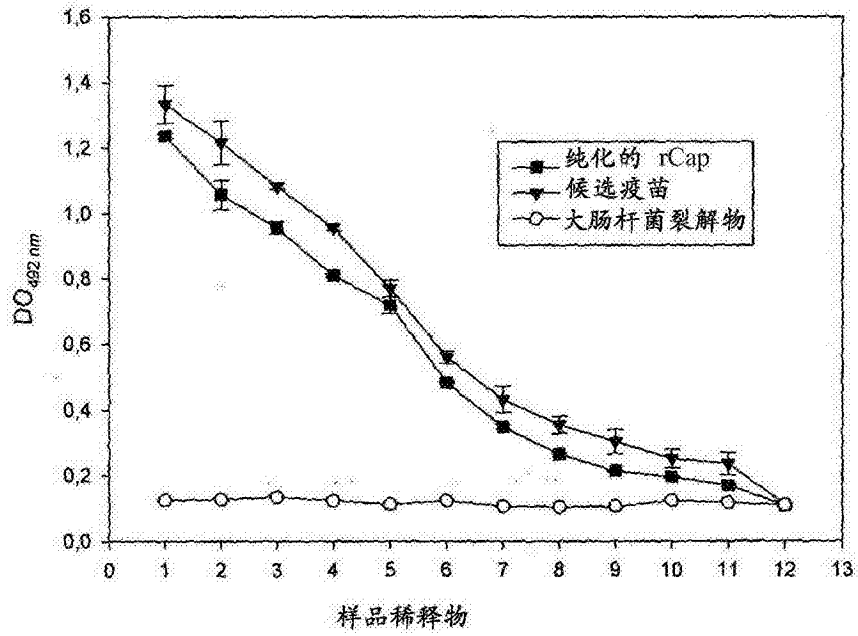


图 8

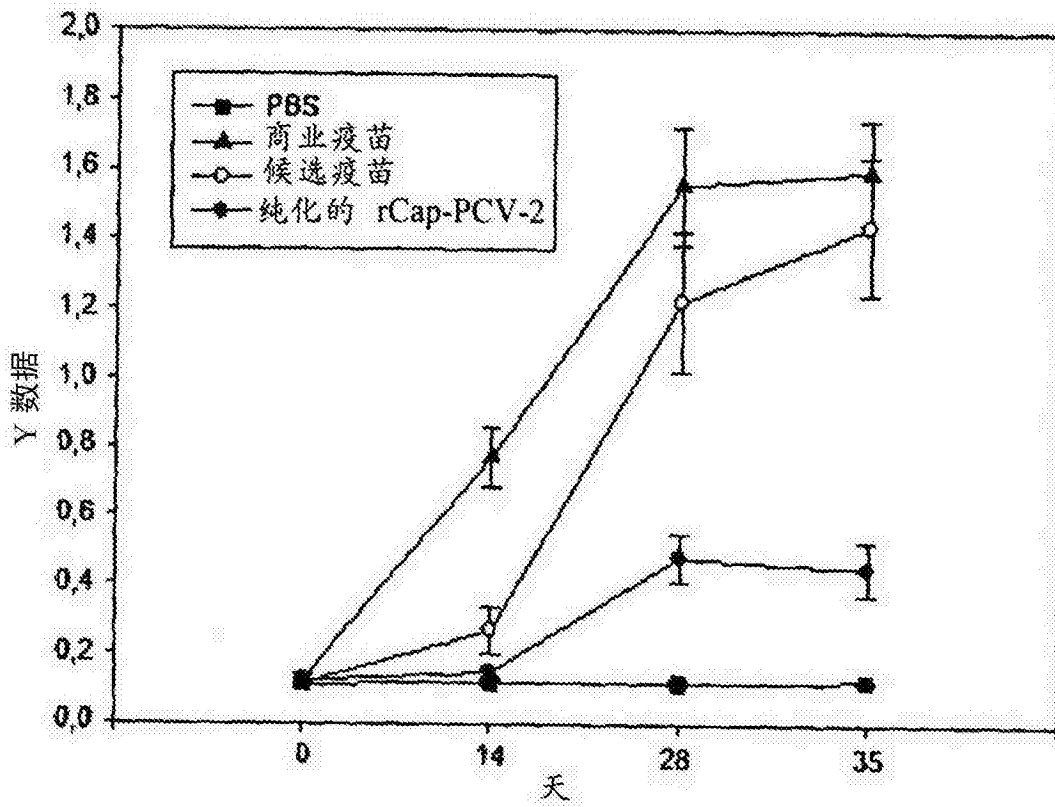


图 9

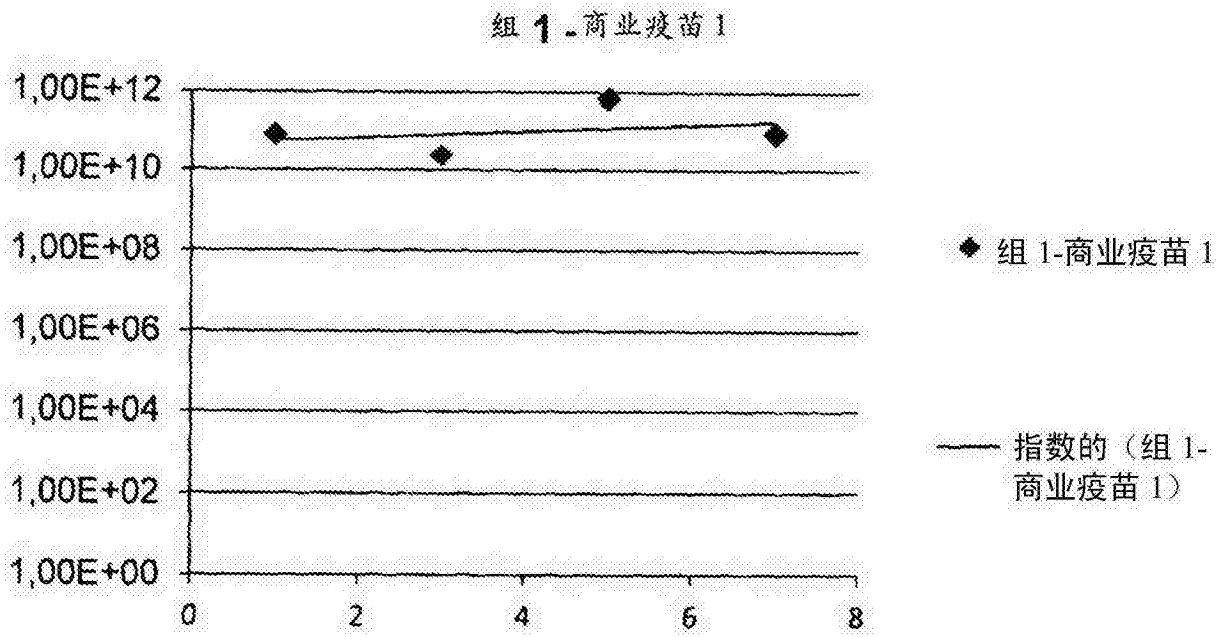


图 10

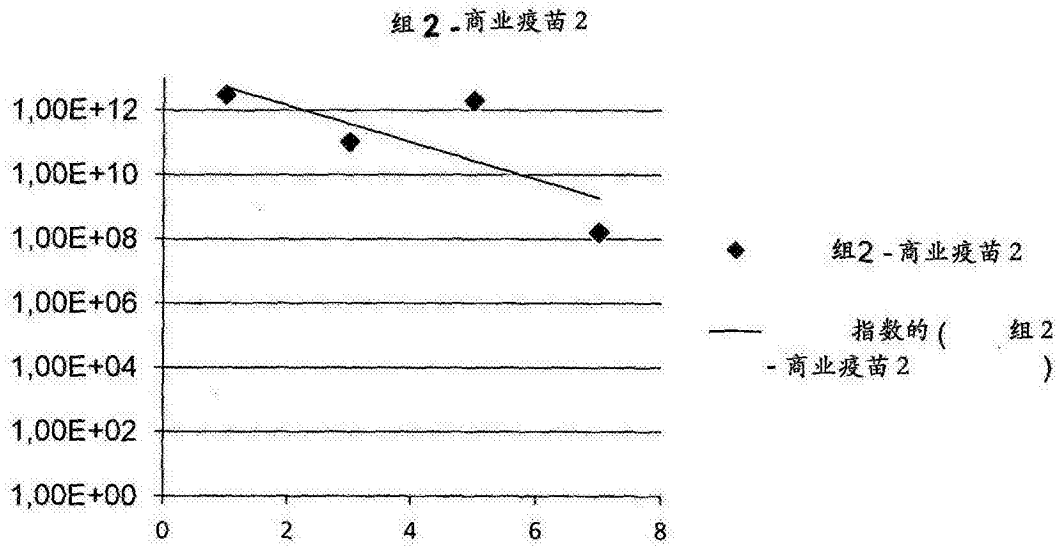


图 11

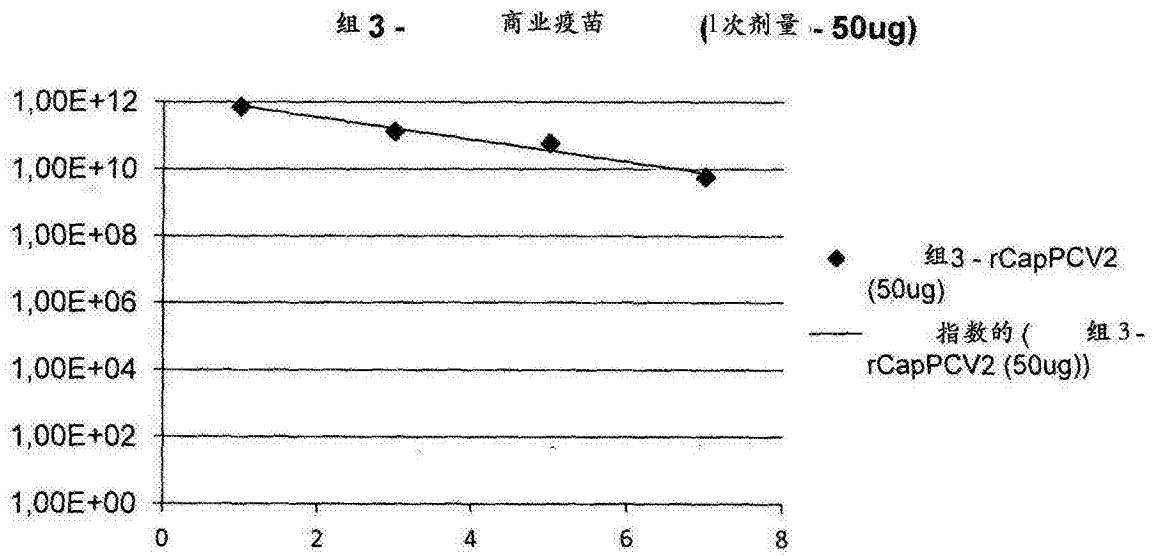


图 12

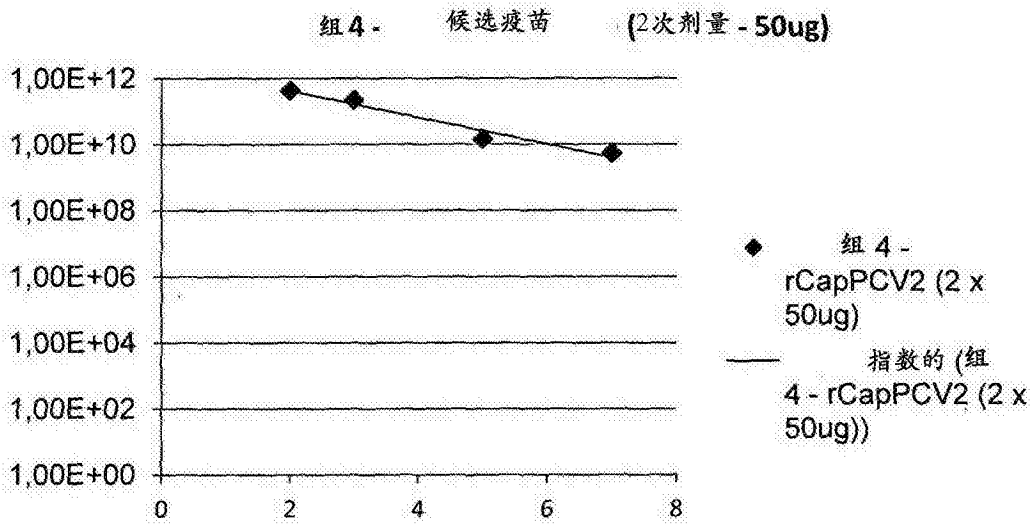


图 13

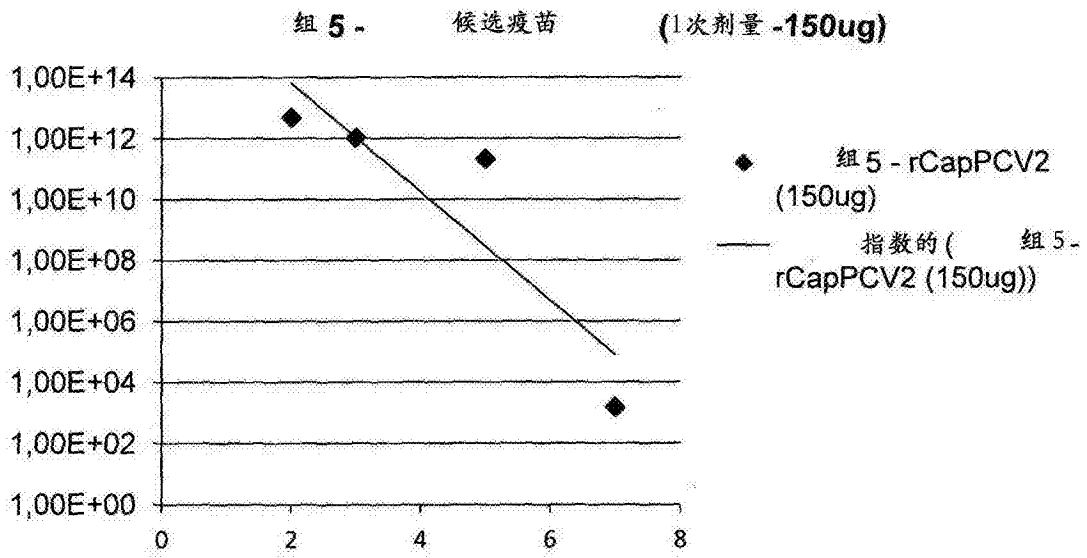


图 14

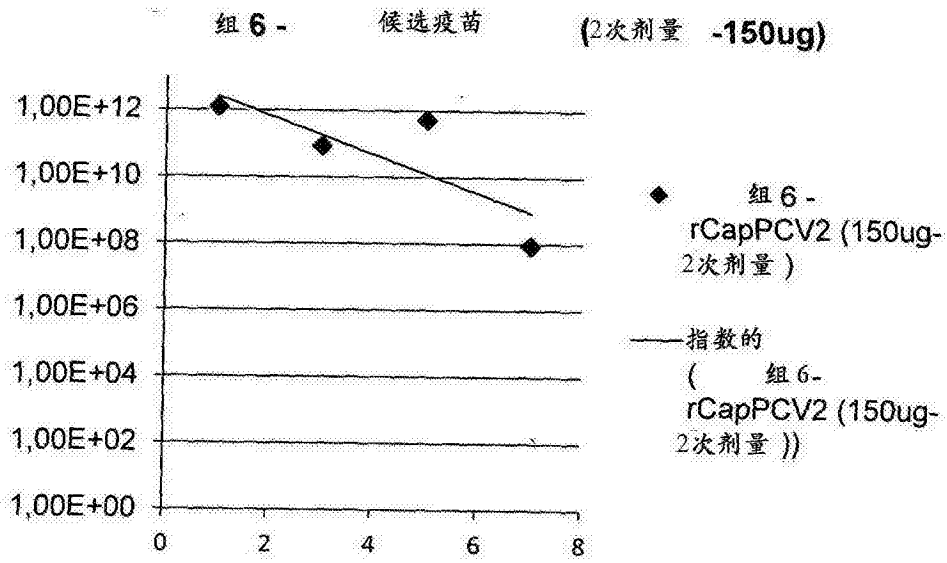


图 15

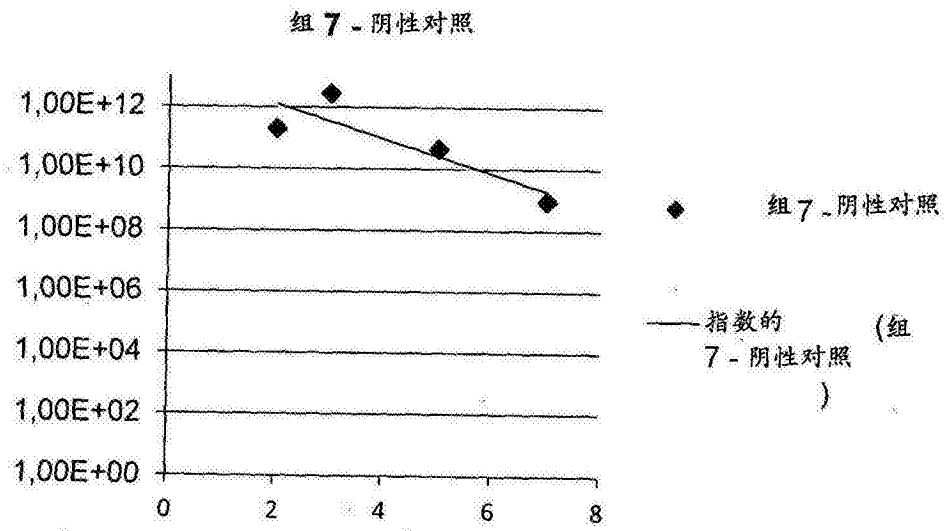


图 16

专利名称(译)	用于疫苗制剂、诊断试剂盒的重组猪圆环病毒2(PCV-2)的抗原及其使用		
公开(公告)号	CN105263515A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201480006177.0	申请日	2014-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	米纳斯吉拉斯州研究基金会-FAPEMIG 维索萨联邦大学		
申请(专利权)人(译)	米纳斯吉拉斯州研究基金会-FAPEMIG 维索萨联邦大学		
当前申请(专利权)人(译)	米纳斯吉拉斯州研究基金会-FAPEMIG 维索萨联邦大学		
[标]发明人	MR德阿尔梅达 AS朱尼尔 JLR菲尔托 GC布雷森 RL萨尔加杜 TS奥诺弗雷 MC福斯托 PMP维迪加尔 SP卡尔科斯 JS克瑞斯皮姆 R阿姆泽尔斯席尔瓦莱特 JD安德雷德特谢拉 N菲尔荷贡扎加 T拉奎尔兹驰 LF利诺德索萨 AM达克鲁兹索萨 A德莫雷斯蒙蒂罗		
发明人	M·R·德·阿尔梅达 A·S·朱尼尔 J·L·R·菲尔托 G·C·布雷森 R·L·萨尔加杜 T·S·奥诺弗雷 M·C·福斯托 P·M·P·维迪加尔 S·P·卡尔科斯 J·S·克瑞斯皮姆 R·阿姆泽尔斯·席尔瓦·莱特 J·D·安德雷德·特谢拉 N·菲尔荷·贡扎加 T·拉奎尔·兹驰 L·F·利诺·德·索萨 A·M·达·克鲁兹·索萨 A·德·莫雷斯·蒙蒂罗		
IPC分类号	A61K39/12 C07K14/01 C12N15/34 A61P31/20 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/5258 A61K2039/55505 C12N7/00 C12N2750/10023 C12N2750/10034 G01N33/56983 G01N2333/015 C07K14/005 G01N2333/01 G01N2469/20		

摘要(译)

本发明涉及制备猪圆环病毒2(PCV-2)病毒衣壳的重组抗原及其修饰形式，在原核系统中表达，以单体形式纯化，回收病毒样颗粒(VLP)，以及它们使用在疫苗制剂、诊断试剂盒及借助于捕获ELISA测定法在疫苗批次中定量PCV-2抗原的系统中。抗原和疫苗制剂可在常规猪育种体系中用于防治PCV-2相关疾病的规划中的动物的免疫，并且代表了对商用疫苗的替代。ELISA试剂盒可用于测试针对PCV-2的商业疫苗和/或实验疫苗的质量。

