



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104610456 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201510040766. 7

A61K 39/39(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 01. 27

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 31/16(2006. 01)

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

(72) 发明人 焦新安 潘志明 宋丽 熊丹

康喜龙 孙林 陈祥 耿士忠

黄金林 殷月兰

(74) 专利代理机构 南京钟山专利代理有限公司

32252

代理人 戴朝荣

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/62(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

A61K 39/145(2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页

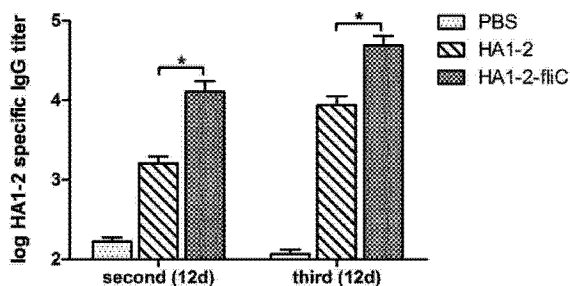
序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

一种 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法及应用;本发明的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗,其为融合蛋白,所述融合蛋白包括 H7N9 亚型禽流感病毒抗原 HA1-2 蛋白和具有佐剂效应的鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC。所述融合蛋白具有如下氨基酸序列:(1) 由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;或(2) 与序列 SEQ ID No. 2 限定的氨基酸序列同源性在 80%至 100%编码相同功能蛋白质的氨基酸序列;或(3)SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列经增加、缺失或替换一个或多个氨基酸具有同等活性的由(1) 衍生的蛋白。本发明表达融合蛋白的周期短且具有良好的免疫原性。



1. 一种 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗,其特征在于:其为融合蛋白,所述融合蛋白包括 H7N9 亚型禽流感病毒抗原 HA1-2 蛋白和具有佐剂效应的鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC。

2. 根据权利要求 1 所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗,其特征在于:所述融合蛋白具有如下氨基酸序列:

(1) 由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;或

(2) 与序列 SEQ ID No. 2 限定的氨基酸序列同源性在 80%至 100%编码相同功能蛋白质的氨基酸序列;或

(3) SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列经增加、缺失或替换一个或多个氨基酸具有同等活性的由 (1) 衍生的蛋白。

3. 一种核酸分子,其编码权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白。

4. 根据权利要求 3 所述的核酸分子,其核苷酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。

5. 制备权利要求 1 所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) overlap PCR 扩增权利要求 1 所述蛋白的基因,

(2) 连接到 pCold 载体,得到重组质粒 pCold-HA1-2-fliC,

(3) 将其转化宿主菌 E. coli BL21 (DE3),获得阳性重组菌 DE3 (pCold-HA1-2-fliC),

(4) H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 在大肠杆菌表达系统中的融合表达;通过 IPTG 诱导表达目的蛋白 HA1-2-fliC,采用 Ni-NAT 亲和层析法纯化带有 His 标签的目的融合蛋白。

6. 根据权利要求 5 所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法,其特征在于:在步骤 (1) 中, H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的获得:a. H7N9 亚型禽流感病毒基因组 RNA 的提取;

b. RNA 反转录合成 cDNA;

c. H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的克隆; fliC 基因的 PCR 扩增; HA1-2-fliC 基因的 overlap PCR 扩增; PCR 产物的回收与纯化。

7. 根据权利要求 6 所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法,其特征在于:在步骤 (2) 中,将经 1%琼脂糖凝胶电泳回收的 PCR 产物 HA1-2-fliC,与原核表达载体 pCold 连接,得到重组质粒 pCold-HA1-2-fliC;

在步骤 (3) 中,连接产物的转化:将重组质粒 pCold-HA1-2-fliC,其转化宿主菌 E. coli DH5a,获得阳性重组菌 DH5a (pCold-HA1-2-fliC);重组质粒的双酶切和测序鉴定;

连接产物的转化:将重组质粒 pCold-HA1-2-fliC,其转化表达宿主菌 E. coli BL21 (DE3),获得阳性重组菌 DE3 (pCold-HA1-2-fliC);

在步骤 (4) 中,融合蛋白 HA1-2-fliC 的表达;融合蛋白 HA1-2-fliC 的纯化。

8. 根据权利要求 7 所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法,其特征在于:在步骤 (1) 中, H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的克隆:

根据 GenBank 中 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素 HA 的核酸序列,设计两对引物, HA1-2-F' /HA1-2-R' 和 HA1-2-F/HA1-2-R;

其中 HA1-2-F' 的 5' 端和 HA1-2-R' 的 3' 端分别引入限制性酶切位点 Sac I、

Hind III, 是用于扩增单独 HA1-2 基因的引物 ; 而引物 HA1-2-F 和 HA1-2-R 的 5' 端分别引入限制性酶切位点 EcoR I 与柔性肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因 ; 是用于扩增融合片段中 HA1-2 基因的引物 ;

引物 HA1-2-F' 具有 SEQID NO. 3 的核苷酸序列 ;

引物 HA1-2-R' 具有 SEQID NO. 4 的核苷酸序列 ;

引物 HA1-2-F 具有 SEQID NO. 5 的核苷酸序列 ;

引物 HA1-2-R 具有 SEQID NO. 6 的核苷酸序列。

9. 根据权利要求 8 所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法, 其特征在于 : 在步骤 (1) 中, fliC 基因的 PCR 扩增 : 根据鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 基因序列设计引物 fliC-F 和 fliC-R, 其中引物 fliC-F 和 fliC-R 的 5' 端分别引入柔性肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因和限制性酶切位点 Xba I ;

引物 fliC-F 具有 SEQID NO. 7 的核苷酸序列 ;

引物 fliC-R 具有 SEQID NO. 8 的核苷酸序列。

10. 权利要求 1 或 2 任一项所述的亚单位疫苗在 H7N9 亚型禽流感免疫预防中的应用。

一种 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域,具体涉及一种 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 流感病毒 (Influenza Virus) 是流感的病原体,分类上属于正黏病毒科 (Orthomyxoviridae),A 型流感病毒属。病毒基因组由 8 个单股负链的 RNA 片段组成,各自编码功能性蛋白,分别为 PB1、PB2、PA、HA、NP、NA、M 和 NS 基因。一般呈球形,直径 80nm ~ 120nm,有囊膜,囊膜表面主要有 2 种糖蛋白,即血凝素 (Hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA),迄今已发现 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型。流感病毒对宿主的致病性是由多个基因决定的,其中 HA 基因及其编码的蛋白尤为重要,在病毒吸附及穿膜过程中起着关键作用,是重要的表面抗原,它刺激机体产生中和抗体,可中和病毒的感染。

[0003] 血凝素是含有 562-566 个氨基酸 (Amino acid, aa) 的糖蛋白,其前体分子 HA0 被宿主蛋白酶裂解为 HA1 和 HA2 两部分。其中 HA1 含有 319-326 个 aa, HA2 含有 221-222 个 aa。HA 单体的球状区由 HA1 的大部分组成,茎状区主要由 HA2 组成,还含有一小部分 HA1。虽然 HA1 比 HA2 保守性差,但自然感染或接种疫苗后,大部分保护性中和抗体是针对 HA1 构成的球状区,另外,X 射线晶体衍射结果表明,HA (57-264aa 和 63-286aa) 能够形成接近天然状态的高级结构。

[0004] 2013 年 2 月底, H7N9 亚型禽流感病毒在中国首次被发现,随后疫情发展较快,至 2014 年 10 月共有 453 例人感染 H7N9 亚型禽流感病毒的实验室确诊病例,其中包括死亡 175 例 (<http://www.who.int/>)。Gao 等率先报道该病毒所有基因片段均来源于禽流感病毒,不含任何人流感病毒的基因片段, H7N9 亚型禽流感病毒是一种新型重配流感病毒,在家禽中具有低致病性的流感病毒 (LPAI),但对人的致病性高于 H5N1,很难检测与预防,因此引起了广泛关注。

[0005] 疫苗是控制病毒感染的最有效方式之一,但 H7N9 亚型禽流感病毒的抗原性与以往流行的禽流感病毒不同,因此,原有的季节性流感疫苗和禽流感疫苗对其缺乏免疫保护作用,目前我国已获准上市的流感疫苗均采用传统的灭活或裂解工艺,存在生产周期长和产量低等缺点。重组亚单位疫苗,特别是大肠杆菌中表达的亚单位疫苗,具有保护性抗原表位多、表达效率高、发酵工艺成熟、生成成本低及易于大规模生产的特点。并且亚单位疫苗具有较高的安全性,易于被人们接受。但亚单位疫苗的主要缺点是免疫原性弱,往往需要有效的佐剂辅助才能引起理想的免疫应答。

[0006] 鞭毛蛋白是细菌鞭毛的主要结构成分,是一种高度保守的蛋白。它作为一种特殊的炎性分子,既有抗原性又有佐剂效应,其佐剂效应主要通过 TLR5 信号传导通路实现。大量研究表明鞭毛蛋白是一种很有潜力的佐剂,不仅是产生天然免疫应答的诱导剂,而且有助于诱导获得性免疫应答。

[0007] 目前,缺乏一种具有良好的免疫原性的 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法

及应用。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是提供了一种具有良好的免疫原性的 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法及应用。

[0009] 为了实现上述目的,本发明通过如下技术方案实现:本发明提供了一种 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗,其为融合蛋白,所述融合蛋白包括 H7N9 亚型禽流感病毒抗原 HA1-2 蛋白和具有佐剂效应的鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC。

[0010] 进一步地,所述融合蛋白具有如下氨基酸序列:

[0011] (1) 由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;或

[0012] (2) 与序列 SEQ ID No. 2 限定的氨基酸序列同源性在 80% 至 100% 编码相同功能蛋白质的氨基酸序列;或

[0013] (3) SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列经增加、缺失或替换一个或多个氨基酸具有同等活性的由 (1) 衍生的蛋白。

[0014] 本发明的一种核酸分子,其编码所述的融合蛋白。

[0015] 进一步地,所述的核酸分子,其核苷酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。

[0016] 本发明制备所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法,包括以下步骤:

[0017] (1) overlap PCR 扩增权利要求 1 所述蛋白的基因,

[0018] (2) 连接到 pCold 载体,得到重组质粒 pCold-HA1-2-fliC,

[0019] (3) 将其转化宿主菌 E. coli BL21(DE3), 获得阳性重组菌 DE3(pCold-HA1-2-fliC),

[0020] (4) H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 在大肠杆菌表达系统中的融合表达;通过 IPTG 诱导表达目的蛋白 HA1-2-fliC,采用 Ni-NAT 亲和层析法纯化带有 His 标签的目的融合蛋白。

[0021] 进一步地,在步骤 (1) 中,H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的获得:a. H7N9 亚型禽流感病毒基因组 RNA 的提取;

[0022] b. RNA 反转录合成 cDNA;

[0023] c. H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的克隆;fliC 基因的 PCR 扩增;HA1-2-fliC 基因的 overlap PCR 扩增;PCR 产物的回收与纯化。

[0024] 进一步地,在步骤 (2) 中,将经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收的 PCR 产物 HA1-2-fliC,与原核表达载体 pCold 连接,得到重组质粒 pCold-HA1-2-fliC;

[0025] 在步骤 (3) 中,连接产物的转化:将重组质粒 pCold-HA1-2-fliC,其转化宿主菌 E. coli DH5a,获得阳性重组菌 DH5a(pCold-HA1-2-fliC);重组质粒的双酶切和测序鉴定;

[0026] 连接产物的转化:将重组质粒 pCold-HA1-2-fliC,其转化表达宿主菌 E. coli BL21(DE3),获得阳性重组菌 DE3(pCold-HA1-2-fliC);

[0027] 在步骤 (4) 中,融合蛋白 HA1-2-fliC 的表达;融合蛋白 HA1-2-fliC 的纯化。

[0028] 更进一步地,在步骤 (1) 中,H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的克隆:

[0029] 根据 GenBank 中 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素 HA 的核酸序列,设计两对引物,HA1-2-F' /HA1-2-R' 和 HA1-2-F/HA1-2-R;

[0030] 其中 HA1-2-F' 的 5' 端和 HA1-2-R' 的 3' 端分别引入限制性酶切位点 Sac I、Hind III, 是用于扩增单独 HA1-2 基因的引物; 而引物 HA1-2-F 和 HA1-2-R 的 5' 端分别引入限制性酶切位点 EcoR I 与柔性肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因; 是用于扩增融合片段中 HA1-2 基因的引物;

[0031] 引物 HA1-2-F' 具有 SEQID NO. 3 的核苷酸序列;

[0032] 引物 HA1-2-R' 具有 SEQID NO. 4 的核苷酸序列;

[0033] 引物 HA1-2-F 具有 SEQID NO. 5 的核苷酸序列;

[0034] 引物 HA1-2-R 具有 SEQID NO. 6 的核苷酸序列。

[0035] 进一步地, 在步骤 (1) 中, fliC 基因的 PCR 扩增: 根据鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 基因序列设计引物 fliC-F 和 fliC-R, 其中引物 fliC-F 和 fliC-R 的 5' 端分别引入柔性肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因和限制性酶切位点 Xba I;

[0036] 引物 fliC-F 具有 SEQID NO. 7 的核苷酸序列;

[0037] 引物 fliC-R 具有 SEQID NO. 8 的核苷酸序列。

[0038] 本发明所述的亚单位疫苗在 H7N9 亚型禽流感免疫预防中的应用。

[0039] 有益效果: 本发明制得的高免疫原性的亚单位疫苗的保护性抗原是 HA1-2-fliC 融合蛋白, 其表达融合蛋白的周期短, 表达产物具有与天然产物相似的生物学特性和良好的免疫原性。本发明将 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 基因通过柔性肽连接到鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白基因的 N 端, 通过大肠杆菌原核表达系统将鞭毛蛋白与 HA1-2 蛋白进行融合表达, 克服了传统的灭活或裂解工艺, 生产周期长、产量低, 亚单位疫苗免疫原性不够充分的缺点, 因此对 H7N9 亚型禽流感新型疫苗的开发具有重要的意义。

附图说明

[0040] 图 1 为目的基因 PCR 扩增产物的电泳图;

[0041] 图 2 为重组质粒 pCold-HA1-2 酶切鉴定图;

[0042] 图 3 为重组质粒 pCold-HA1-2-fliC 酶切鉴定图;

[0043] 图 4 为重组菌 DE3(pCold-HA1-2) 表达产物的 SDS-PAGE 结果图;

[0044] 图 5 为重组菌 DE3(pCold-HA1-2-fliC) 表达产物的 SDS-PAGE 结果图;

[0045] 图 6 为纯化后蛋白的 SDS-PAGE 结果图;

[0046] 图 7 为蛋白 HA1-2、HA1-2-fliC 的 Western blot 检测图;

[0047] 图 8 为融合蛋白 HA1-2-fliC 的 TLR5 生物活性检测图;

[0048] 图 9 为二免、三免 12 天后小鼠血清中 HA1-2 特异的 IgG 抗体检测图;

[0049] 图 10 为 H7N9 亚型禽流感病毒血凝试验检测图;

[0050] 图 11 为三免 12 天后小鼠血清中血凝抑制抗体滴度检测图;

[0051] 图 12 为三免后小鼠血清中抗体水平动态变化图。

具体实施方式

[0052] 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。

[0053] 按照本发明的技术方案,发明人给出以下具体的应用实施例,需要说明的是,以下实施例仅是说明性的,本发明并不限于这些实施例。

[0054] 图 1 为目的基因 PCR 扩增产物的电泳图;其中, M1 :DL2000DNA marker, M2 : λ -EcoT14digest DNA marker, 1 :HA1-2 扩增产物, 2 :fliC 扩增产物, 3 :HA1-2-fliC 扩增产物。

[0055] 图 2 为重组质粒 pCold-HA1-2 酶切鉴定图;其中, M1 : λ -EcoT14digest DNA marker, M2 :DL 2000DNA marker, 1 :pCold-HA1-2 酶切产物。

[0056] 图 3 为重组质粒 pCold-HA1-2-fliC 酶切鉴定图;其中, M : λ -EcoT14digest DNA marker, 1 :pCold-HA1-2-fliC 酶切产物。

[0057] 图 4 为重组菌 DE3(pCold-HA1-2) 表达产物的 SDS-PAGE 结果图;其中, M :protein marker, 1 :空载体, 2 :未诱导, 3 :诱导沉淀, 4 :诱导上清。

[0058] 图 5 为重组菌 DE3(pCold-HA1-2-fliC) 表达产物的 SDS-PAGE 结果图;其中, M :protein marker, 1 :空载体, 2 :未诱导, 3 :诱导沉淀, 4 :诱导上清。

[0059] 图 6 为纯化后蛋白的 SDS-PAGE 结果图;其中, M :protein marker, 1 :HA1-2 蛋白, 2 :HA1-2-fliC 融合蛋白。

[0060] 图 7 为蛋白 HA1-2、HA1-2-fliC 的 Western blot 检测图;

[0061] 图 8 为融合蛋白 HA1-2-fliC 的 TLR5 生物活性检测图;

[0062] 图 9 为二免、三免 12 天后小鼠血清中 HA1-2 特异的 IgG 抗体检测图;

[0063] 图 10 为 H7N9 亚型禽流感病毒血凝试验检测图;

[0064] 图 11 为三免 12 天后小鼠血清中血凝抑制抗体滴度检测图;

[0065] 图 12 为三免后小鼠血清中抗体水平动态变化图。

[0066] 本发明提供了一种 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗,其为融合蛋白,所述融合蛋白包括 H7N9 亚型禽流感病毒抗原 HA1-2 蛋白和具有佐剂效应的鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC。该融合蛋白中的 HA1-2 蛋白是由 H7N9 亚型禽流感病毒的主要保护性抗原血凝素的第 62-284 位氨基酸组成,鞭毛蛋白作为佐剂增强了 HA1-2 蛋白的免疫应答,具有更强的免疫原性。

[0067] 所述融合蛋白具有如下氨基酸序列:

[0068] (1) 由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;或

[0069] (2) 与序列 SEQ ID No. 2 限定的氨基酸序列同源性在 80%至 100%编码相同功能蛋白质的氨基酸序列;或

[0070] (3) SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列经增加、缺失或替换一个或多个氨基酸具有同等活性的由 (1) 衍生的蛋白。

[0071] 本发明的一种核酸分子,其编码权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白。所述的核酸分子,其核苷酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。

[0072] 本发明制备所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法,包括以下步骤:

[0073] 一、构建含有 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 基因和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 基因的重组质粒,具体步骤如下:

[0074] 1. H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的获得:(1)H7N9 亚型禽流感病毒基因组 RNA

的提取, (2)RNA 反转录合成 cDNA, (3)H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的克隆;

[0075] 2. fliC 基因的 PCR 扩增;

[0076] 3. HA1-2-fliC 基因的 overlap PCR 扩增;

[0077] 4. PCR 产物的回收与纯化;

[0078] 5. 连接反应:将经 1%琼脂糖凝胶电泳回收的 PCR 产物 HA1-2 和 HA1-2-fliC, 分别与原核表达载体 pCold 连接, 得到重组质粒 pCold-HA1-2 和 pCold-HA1-2-fliC;

[0079] 6. 连接产物的转化:将重组质粒 pCold-HA1-2 和 pCold-HA1-2-fliC, 分别转化宿主菌 E. coli DH5a, 获得阳性重组菌 DH5a(pCold-HA1-2) 和 DH5a(pCold-HA1-2-fliC)。

[0080] 7. 重组质粒的双酶切和测序鉴定

[0081] 8. 连接产物的转化:将重组质粒 pCold-HA1-2 和 pCold-HA1-2-fliC, 分别转化表达宿主菌 E. coli BL21(DE3), 获得阳性重组菌 DE3(pCold-HA1-2) 和 DE3(pCold-HA1-2-fliC)。

[0082] 二、H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 在大肠杆菌表达系统中的融合表达:

[0083] 1. 蛋白 HA1-2 与融合蛋白 HA1-2-FliC 的表达;

[0084] 2. 蛋白 HA1-2 与融合蛋白 HA1-2-FliC 的纯化;

[0085] 3. Western blotting 鉴定;

[0086] 4. TLR5 生物活性检测。

[0087] 三、H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 融合表达产物的免疫原性:

[0088] 6-8 周龄 C3H/HeJ 雌性小鼠 18 只, 将小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 免疫途径为腹腔注射, 免疫分三次进行, 检测免疫后各免疫组小鼠血清中抗体水平及抗体在体内随时间的动态变化, 也对血清中抗体的血凝抑制效价进行检测。

[0089] 实施例 1

[0090] 本发明制备所述的 H7N9 亚型禽流感的亚单位疫苗的方法, 包括以下步骤:

[0091] 一、构建含有 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 基因和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 基因的重组质粒, 具体步骤如下:

[0092] 1. H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的获得

[0093] (1)H7N9 亚型禽流感病毒基因组 RNA 的提取:

[0094] 扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室赠送含有灭活 H7N9 亚型禽流感病毒的鸡胚尿囊液, 取 500 μ L 提取 RNA。

[0095] ①向加了 Trizol® Reagent 的尿囊液加入 200 μ L 氯仿 (Trizol® Reagent 的 1/5 体积量), 充分振荡, 待乳化溶液呈乳白状后, 室温静置 5min;

[0096] ②离心 (12000g, 15min, 4°C);

[0097] ③小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层 (无色的上清液、中间的白色蛋白层、有颜色的下层有机相), 吸取上清液转移至另一新的离心管中 (切忌吸出白色中间层);

[0098] ④向上清中加入等体积的异丙醇, 上下颠倒离心管充分混匀后, 15 ~ 30°C 下静置 10min; 离心 (12000g, 10min, 4°C);

[0099] ⑤ RNA 沉淀的清洗:小心弃去上清, 沿离心管壁缓慢加入 1mL 75%的乙醇, 轻轻洗

涤管壁,离心 (12000g,5min,4℃),弃去乙醇;

[0100] ⑥ RNA 的溶解:室温干燥沉淀至透明,加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀,完全溶解,-70℃保存;

[0101] ⑦取少量 RNA 溶液检测浓度。

[0102] (2) RNA 反转录合成 cDNA

[0103] 按 PrimeScript™ RT reagent kit 的要求配制 RT 反应体系 (10 μL) 如下:

[0104]

| | |
|------------------------------|--------|
| 5×PrimeScript® buffer | 2 μL |
| PrimeScript® RT enzyme Mix I | 0.5 μL |
| Oligo dT primer (50 μM) | 0.5 μL |
| Random 6 mers (100 μM) | 6.5 μL |
| RNA | 6.5 μL |

[0105] 注:10 μL 体系 RNA 不能超过 1 μg。

[0106] 37℃水浴 15min,85℃水浴 5s 灭活反转录酶。

[0107] (3) H7N9 亚型禽流感病毒 HA1-2 基因的克隆:

[0108] 根据 GenBank 中流感病毒 (A/Hangzhou/1/2013 (H7N9)) 血凝素 HA 核酸序列,设计两对引物,HA1-2-F' /HA1-2-R' 和 HA1-2-F/HA1-2-R。其中 HA1-2-F' 的 5' 端和 HA1-2-R' 的 3' 端分别引入限制性酶切位点 Sac I、Hind III (下划线处),是用于扩增单独 HA1-2 基因。

[0109] HA1-2-F' :5' -CCCGAGCTCAAAGGGAAAAGGACAGTTGACC-3' SEQID NO. 3

[0110] HA1-2-R' :5' -CCCAAGCTTGGCATCAACCTGTACT-3' SEQID NO. 4

[0111] 而引物 HA1-2-F、HA1-2-R 的 5' 端分别引入限制性酶切位点 EcoR I 与柔性肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因 (下划线处) 用于扩增融合片段中的 HA1-2 基因。

[0112] HA1-2-F :5' -CCGGAATTCAAAGGGAAAAGGACAGTTGACC-3' SEQID NO. 5

[0113] HA1-2-R :5' -CACCTCCGCTTCCACCTCCACCGGCATCAACCTGTACT-3' SEQID NO. 6

[0114] 扩增 HA1-2 基因 PCR 反应体系 (20 μL) 如下:

[0115]

| | |
|---------------|------|
| 10×PCR Buffer | 2 μL |
| dNTP Mixture | 2 μL |
| HA1-2-F | 1 μL |

[0116]

| | |
|--------------------|---------|
| HA1-2-R | 1 μL |
| 高保真酶 | 0.2 μL |
| H7N9 亚型禽流感病毒 cDNA | 0.2 μL |
| ddH ₂ O | 13.6 μL |

[0117] 将反应体系混匀瞬时离心,置于 PCR 仪上扩增。HA1-2 基因反应条件:94℃预变性

5min、94℃变性 50s、59℃退火 50s、72℃延伸 50s, 30 个循环, 72℃终延伸 10min。

[0118] 2. *fliC* 基因的 PCR 扩增:

[0119] 根据鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 *fliC* 基因序列设计引物 *fliC*-F、*fliC*-R, 其中引物 *fliC*-F、*fliC*-R 的 5' 端分别引入柔性肽 (Gly₄Ser)₃ 编码基因和限制性酶切位点 Xba I (下划线处)。

[0120] *fliC*-F : 5' -AGGTGGAAGCGGAGGTGGTGGGAAGCATGGCACAAAGTCATTAATA-3'

[0121] SEQID NO. 7

[0122] *fliC*-R : 5' -CCGTCTAGATTAACGCAGTAAAGAGAGGACG-3' SEQID NO. 8

[0123] 扩增 *fliC* 基因 PCR 反应体系 (20 μL) 如下:

[0124]

| | |
|----------------------------|---------|
| 10×PCR Buffer | 2 μL |
| dNTP Mixture | 2 μL |
| <i>fliC</i> -F | 1 μL |
| <i>fliC</i> -R | 1 μL |
| 高保真酶 | 0.2 μL |
| 质粒 pET30a- <i>fliC</i> -WT | 0.2 μL |
| ddH ₂ O | 13.6 μL |

[0125] 将反应体系混匀瞬时离心, 置于 PCR 仪上扩增。 *fliC* 基因反应条件: 94℃预变性 5min、94℃变性 50s、56℃退火 50s、72℃延伸 2min、30 个循环, 72℃终延伸 10min。

[0126] 3. HA1-2-*fliC* 基因的 overlap PCR 扩增

[0127] 以上述 PCR 产物 (HA1-2 基因和 *fliC* 基因) 为模板, HA1-2-F 和 *fliC*-R 为引物, 通过 overlap PCR 法扩增出目的基因 HA1-2-*fliC*。

[0128] 扩增 HA1-2-*fliC* 基因 PCR 反应体系 (20 μL) 如下:

[0129]

| | |
|----------------|--------|
| 10×PCR Buffer | 2 μL |
| dNTP Mixture | 2 μL |
| HA1-2-F | 1 μL |
| <i>fliC</i> -R | 1 μL |
| 高保真酶 | 0.2 μL |

[0130]

| | |
|--------------------|---------|
| HA1-2 扩增产物 | 0.2 μL |
| <i>fliC</i> 扩增产物 | 0.2 μL |
| ddH ₂ O | 13.4 μL |

[0131] 将反应体系混匀瞬时离心, 置于 PCR 仪上扩增。 HA1-2-*fliC* 基因反应条件: 94℃预变性 5min、94℃变性 50s、56℃退火 50s、72℃延伸 2min 30s、共 30 个循环, 72℃终延伸

10min。

[0132] 以上步骤中 PCR 产物各取 2 μ L 加入适量 Loading Buffer 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳。结果显示, PCR 扩增的 HA1-2、*fliC* 和 HA1-2-*fliC* 基因产物电泳后分别在约 669bp、1488bp 和 2187bp 处出现特异性条带, 与预期结果相符, 结果如图 1 所示。

[0133] 4. PCR 产物的回收与纯化

[0134] 核酸电泳结束后, 用洁净刀片在紫外灯下切出含目的片段 DNA 的凝胶。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因, 操作参考 DNA 回收试剂盒。

[0135] 5. 连接反应

[0136] 将经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收的 PCR 产物 HA1-2 和 HA1-2-*fliC*, 与原核表达载体 pCold 分别进行双酶切; 将回收的目的片段与载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。

[0137] 连接反应体系 (10 μ L) 如下:

[0138]

| | |
|------------------|-----------|
| T4 ligase Buffer | 1 μ L |
| T4 DNA 连接酶 | 1 μ L |
| pCold 载体 | 2 μ L |
| 目的基因的 PCR 回收产物 | 6 μ L |

[0139] 6. 连接产物的转化

[0140] ①从 -70 $^{\circ}$ C 取一支含有 100 μ L 感受态细胞 *E. coli* DH5a 的 1.5mL 指形管, 冰浴融化。

[0141] ②无菌条件下加入 10 μ L 连接液, 冰浴 30min, 期间切忌振动。

[0142] ③ 42 $^{\circ}$ C 热激 90s, 不要振动。

[0143] ④冰浴 10min。

[0144] ⑤加无抗 LB 培养基 890 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 培养 1-2h。

[0145] ⑥离心 (4000rpm, 5min)。

[0146] ⑦留 200 μ L 上清, 弃多余部分, 混匀, 涂布到含氨苄抗生素 LB 琼脂平板。

[0147] ⑧ 37 $^{\circ}$ C 培养箱正置至平板上无明显液体流动, 倒置培养过夜, 约 16-20h,

[0148] 7. 重组质粒的双酶切和测序鉴定

[0149] (1) 重组菌经提取质粒, 双酶切鉴定

[0150] 反应体系 (20 μ L) 如下:

[0151]

| | | | |
|----------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| 10 \times M Buffer | 2 μ L | 10 \times H Buffer | 2 μ L |
| <i>Sac</i> I | 0.5 μ L | <i>EcoR</i> I | 0.5 μ L |
| <i>Hind</i> III | 0.5 μ L | <i>Xba</i> I | 0.5 μ L |
| pCold-HA1-2 | 5 μ L | pCold-HA1-2- <i>fliC</i> | 5 μ L |
| ddH ₂ O | 12 μ L | ddH ₂ O | 12 μ L |

[0152] 37 $^{\circ}$ C 水浴 3h 后, 进行琼脂糖电泳观察。

[0153] 结果显示, 重组质粒 pCold-HA1-2 经酶切后出现约 669bp 的目的片段和 4407bp 的

载体片段,与预期结果相符,结果见图 2。同样,重组质粒 pCold-HA1-2-fliC 经酶切后,出现约 2187bp 的目的片段和 4407bp 的载体片段,结果见图 3。

[0154] (2) 重组质粒测序及序列分析

[0155] 将双酶切鉴定为阳性的克隆 DH5a(pCold-HA1-2) 和 DH5a(pCold-HA1-2-fliC),过夜培养,提取重组质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

[0156] 8. 将双酶切测序正确的重组质粒导入 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞,将鉴定正确的重组菌命名为 DE3(pCold-HA1-2) 和 DE3(pCold-HA1-2-fliC)。

[0157] 二、H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 在大肠杆菌表达系统中的融合表达

[0158] 1. 蛋白 HA1-2 与融合蛋白 HA1-2-FliC 的表达

[0159] 挑取重组菌 DE3(pCold-HA1-2) 和 DE3(pCold-HA1-2-fliC) 种于氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8,15℃ 静置 30min 后加入 IPTG 至终浓度为 0.5mM,15℃ 振荡培养 24h 诱导蛋白表达。诱导产物超声波裂解后离心,分别将诱导产物裂解上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分析,判断蛋白的可溶性。结果显示分别在约 26kDa 和 82kDa 左右处出现明显的目的蛋白条带,与预期蛋白大小一致,表明成功表达出 HA1-2 蛋白及 HA1-2-fliC 融合蛋白,结果如图 4 和图 5 所示。

[0160] 2. 蛋白 HA1-2 与融合蛋白 HA1-2-FliC 的纯化

[0161] 继续按照 1 中方法诱导大量重组菌 (800mL) 的表达,按照 Novagen 公司的 His•Bind[®] Purification Kit 的说明对蛋白进行纯化,取部分纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。结果显示分别在约 26kDa 和 82kDa 左右处出现单一的目的蛋白条带,与预期蛋白大小一致且纯度较高,结果如图 6 所示。

[0162] 3. Western blotting 鉴定

[0163] 将纯化的融合蛋白 HA1-2-fliC 和蛋白 HA1-2 经 SDS-PAGE 电泳后,转印到硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,分别以小鼠抗 H7N9 亚型禽流感病毒多抗血清和抗鞭毛蛋白多抗血清作为一抗,以 1:500 稀释,4℃ 孵育过夜;次日以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,1:5000 稀释,室温孵育 2h 后 ECL/DAB 显色。结果表明,蛋白 HA1-2 和 HA1-2-fliC 均能与小鼠抗 H7N9 亚型禽流感病毒多抗血清反应,融合蛋白 HA1-2-fliC 也能与小鼠抗鞭毛蛋白多抗血清发生特异性反应,说明蛋白均具有良好的免疫反应性,结果如图 7 所示,图 7 为蛋白 HA1-2、HA1-2-fliC 的 Western blot 检测图。

[0164] 4. TLR5 生物活性检测

[0165] 每孔 5×10^4 个 HEK293-mTLR5 细胞 (100 μ L) 置于 96 孔板中培养过夜。次日,将商品化的鞭毛蛋白、HA1-2 蛋白、HA1-2-fliC 融合蛋白以 100ng/mL 的浓度刺激 HEK293-mTLR5 细胞,5h 后收集上清,用 Human IL-8ELISA kit 检测 IL-8 分泌水平,评价目的蛋白的 TLR5 活性。结果显示,融合蛋白 HA1-2-fliC 能诱导细胞分泌高水平的 IL-8 (2200pg/mL),而 HA1-2 蛋白刺激组仅分泌极低水平的 IL-8 (100pg/mL),利用 GraphPad Prism 5.0 软件对结果进行分析,融合蛋白 HA1-2-fliC 诱导细胞分泌 IL-8 的水平极显著地高于 HA1-2 ($P < 0.001$)。结果如图 8 所示,图 8 为融合蛋白 HA1-2-fliC TLR5 生物活性检测图。

[0166] 三、H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 和鼠伤寒沙门菌 I 型鞭毛蛋白 fliC 融合表达产物的免疫原性

[0167] 1. 材料

[0168] 实验动物 :6-8 周龄 C3H/HeJ 雌性小鼠 18 只,购自南京大学南京生物医药研究院。

[0169] 免疫蛋白 :前期实验中利用 His 标签纯化的重组目的蛋白 HA1-2 和 HA1-2-fliC。

[0170] 2. 小鼠免疫方案

[0171] 将 18 只小鼠随机分为 3 组,每组 6 只,免疫途径为腹腔注射,200 μ L/ 只免疫分三次进行,首免不进行抗体检测,二免后根据抗体检测结果,进行三免,免疫方法及剂量同首免,如表 1 所示 :

[0172] 表 1

[0173]

| 组别 | 剂量 | 途径 |
|------------|-------------|----|
| HA1-2-fliC | 50 μ g | |
| HA1-2 | 15 μ g | 腹腔 |
| PBS | 200 μ L | |

[0174] 3. 实验小鼠采血及血清分离

[0175] 第二、三次免疫后 12 天对各免疫组进行眼眶静脉采血,血液置 4 $^{\circ}$ C 放置过夜,4 $^{\circ}$ C,4000rpm/min 离心 15min,再小心吸出上层透明血清,将吸出的血清置 -20 $^{\circ}$ C 冻存,分离血清用于抗体检测和血凝抑制试验。

[0176] 4. 二免、三免后 12 天小鼠血清中 HA1-2 特异性 IgG 抗体检测

[0177] 间接 ELISA 检测步骤如下 :

[0178] ①包被 :于试验前一天用碳酸盐缓冲液稀释 GST-HA1-2 蛋白至 1.5 μ g/mL,以微量加样器每孔加样 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜 ;

[0179] ②洗涤 :次日以含 0.05% Tween-20 的 PBST 冲洗酶标板,共洗涤 4 次,每次 5min ;

[0180] ③封闭 :以微量加样器在每孔内加入含封闭液 (1% BSA 的 PBST) 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴封闭 2h ;

[0181] ④洗涤 :PBST 冲洗酶标板,共洗涤 4 次,每次 5min ;

[0182] ⑤一抗孵育 :以封闭液稀释待检血清至工作浓度 (1:100 稀释),每孔加入 100 μ L 待检血清稀释液,依次按 2 倍稀释法稀释至适宜浓度,37 $^{\circ}$ C 水浴作用 2h ;

[0183] ⑥洗涤 :PBST 冲洗酶标板,共洗涤 5 次,每次 5min ;

[0184] ⑦二抗孵育 :以封闭液将 HRP 标记的羊抗鼠抗体稀释至工作浓度,IgG (1:10000 稀释),以微量加样器每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1h ;

[0185] ⑧洗涤 :PBST 冲洗酶标板,共洗涤 6 次,每次 5min ;

[0186] ⑨显色 :加入 TMB 底物缓冲液显色,100 μ L/ 孔,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10min ;2M H_2SO_4 溶液终止反应,50 μ L/ 孔 ;

[0187] ⑩读数 :酶联免疫阅读仪读取 OD₄₅₀ 值

[0188] 结果显示,二免 12 后 HA1-2-fliC 免疫组小鼠血清中的 HA1-2 特异性 IgG 抗体的平均水平达到 12800,三免 12 天后达到 48640,经 GraphPad Prism 5.0 软件分析,HA1-2-fliC 免疫组均显著高于 HA1-2 免疫组 (P<0.05),结果如图 9 所示,图 9 为二免、三免 12 天后小鼠

血清中 HA1-2 特异的 IgG 抗体检测图。

[0189] 5. 三免后 12 天小鼠血清的血凝抑制试验

[0190] (1) 血凝试验

[0191] ①在血凝板中每孔加入 25 μ L PBS；

[0192] ②第一孔加入灭活 H7N9 亚型禽流感病毒，依次作 2 倍系列稀释，同时设立阳性对照孔和阴性对照孔；

[0193] ③每孔加入 25 μ L 1% 鸡红细胞悬浮液，水平振荡器上振荡 1 ~ 2min 混匀，37 $^{\circ}$ C 静置 30min 后判定结果。

[0194] 血凝试验结果：灭活 H7N9 亚型禽流感病毒血凝价为 2⁸，结果如图 10 所示。图 10 为 H7N9 亚型禽流感病毒血凝试验检测图；

[0195] (2) 血凝抑制试验

[0196] ①根据 (1) 中结果制备 4 个单位病毒液：将灭活 H7N9 亚型禽流感病毒的血凝价除以 4 作为 4 个单位病毒液的稀释度，以 PBS 稀释；

[0197] ②在血凝板中每孔加入 25 μ L PBS，第一孔加入 25 μ L 待检血清，依次作 2 倍系列稀释，同时设立阳性对照孔和阴性对照孔；

[0198] ③除阴性对照孔之外，每孔加入 25 μ L 4 个单位病毒液；置水平振荡器上振荡 1 ~ 2min 后，37 $^{\circ}$ C 静置 15min；

[0199] ④每孔加入 25 μ L 1% 鸡红细胞悬浮液，水平振荡器上振荡 1 ~ 2min 混匀，37 $^{\circ}$ C 静置 30min 后判定结果。

[0200] 结果显示，三免后 12 天 HA1-2-fl1c 免疫组小鼠血清中的血凝抑制抗体平均滴度达到 2⁵，经 GraphPad Prism 5.0 软件分析，显著高于 HA1-2 免疫组 (P<0.01)，结果如图 11 所示，图 11 为三免 12 天后小鼠血清中血凝抑制抗体滴度检测图。

[0201] 6. 三免后小鼠血清中抗体动态变化

[0202] 三免 0 天（即二免后 12 天）检测小鼠血清中抗体效价，三免后每隔 12 天对各免疫组进行眼眶静脉采血，监测三免后小鼠血清中抗体动态变化，结果显示，在三免后 12 天，HA1-2-fl1c 免疫组小鼠血清中 HA1-2 特异性抗体水平达到最高（平均为 48640），随后抗体水平都呈下降趋势，直至三免后 84 天 HA1-2-fl1c 免疫组小鼠血清中 HA1-2 特异性抗体水平仍在 10⁴左右，均显著高于 HA1-2 免疫组 (P<0.05)，结果如图 12 所示，图 12 为三免后小鼠血清中抗体水平动态变化图。

[0203] 本发明制得的高免疫原性的亚单位疫苗的保护性抗原是 HA1-2-fl1c 融合蛋白，其表达融合蛋白的周期短，表达产物具有与天然产物相似的生物学特性和良好的免疫原性。本发明将 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素片段 HA1-2 基因通过柔性肽连接到鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白基因的 N 端，通过大肠杆菌原核表达系统将鞭毛蛋白与 HA1-2 蛋白进行融合表达，克服了传统的灭活或裂解工艺，生产周期长、产量低，亚单位疫苗免疫原性不够充分的缺点，因此对 H7N9 亚型禽流感新型疫苗的开发具有重要的意义。

[0204] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解，本发明不受上述实施例的限制，上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理，在不脱离本发明精神和范围的前提下，本发明还会有各种变化和改进，本发明要求保护范围由所附的权利要求书、说明书及其等效物界定。

[0001]

序列表

<110> 扬州大学

<120> 一种 H7N9 亚型禽流感亚单位疫苗的制备方法及应用

<130>

<140>

<141>

<150>

<151>

<160> 8

<170>

<210> 1

<211> 2187

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列的描述：编码融合蛋白的核苷酸序列

<400> 1

```

aaagggaaaaggacagttgacctcggtcaatgtggactcctggggacaatcactggacca 60
cctcaatgtgaccaattcctagaattttcagccgatttaattattgagaggcgagaagga 120
agtgatgtctgttatcctgggaaattcgtgaatgaagaagctctgaggcaaattctcaga 180
gaatcaggcggaattgacaaggaagcaatgggattcacatacagtggaaataagaactaat 240
ggagcaaccagtgcatgtaggagatcaggatcttctattctatgcagaaatgaaatggctc 300
ctgtcaaacacagataaatgctgcattcccgcagatgactaagtcatataaaaaatacaaga 360
aaaagcccagctctaatagtatgggggatccatcattccgtatcaactgcagagcaaac 420
aagctatatgggagtggaacaaaactggtgacagttgggagttctaattatcaacaatct 480
tttgtaccgagtcaccaggagcgagaccacaagttaatggtatatctggaagaattgacttt 540
cattggctaataatgctaaaatcccaatgatacagtcactttcagtttcaatggggctttcata 600
gctccagaccgtgcaagcttctgagaggaaaatctatgggaatccagagtggagtacag 660
gttgatgcoggtggaggtggaagcggaggtggtggaagcatggcacaagtcattaataca 720
aacagcctgtgctgttgaaccagaataaactgaacaaatcccagtcctgctctgggcaacc 780
gctatogagcgtctgttctccggtctgctatcaacagcgcgaaagacgatgcggcaggt 840
caggcgattgctaaccgttttaccgcgaacatcaaaggctctgactcaggcttcccgtaac 900

```

[0002]

gctaacgaoggtatctccattgocgcagaccactgaaggcogogctgaacgaaatcaacaac 960
aacctgcagcgtgtgcgtgaactggcggttcagttctgctaacagcaccaactcccagttc 1020
gacctogactccatccaggctgaaatcaccagcgcctgaacgaaatogaccgtgtatcc 1080
ggccagactcagttcaacggcgtgaaagtctctggcgcaggacaacacctgaccatccag 1140
gttgggtgccaacgacgggtgaaactatcgatatcgatctgaagcagatcaactctcagacc 1200
ctgggtctggatacgtggaatgtgcaacaaaaatataagggtcagegatacgggtgcaact 1260
gttacaggatatgccgatactacgattgcttttagacaatagtaacttttaagcctcggct 1320
actggctcttgggtggtactgaccagaaaattgatggcgattttaaattttgatgatacgaact 1380
ggaaaatatttacgccaaaagttaccgttacggggggaactggtaagatggctattatgaa 1440
gtttccggttgataagacgaacgggtgaggtgactcttctgctggcggtgcgacttccccgctt 1500
acaggtggaactacctgcgacagcaactgaggatgtgaaaaatgtacaagttgcaaatgct 1560
gatttgacagaggctaaagccgcattgacagcagcaggtgttaccggcacagcatctgtt 1620
gttaagatgtcttatactgataataacgggtaaaaactattgatgggtgggttagcagttaag 1680
gtaggcgtatgattactattctgcaactcaaaaataaagatggttccataagtattaact 1740
acgaaatacactgcagatgacgggtacatccaaaactgcactaaacaaaactgggtggcgca 1800
gacggcaaaaaccgaagttgtttctattgggtggtaaaaacttacgctgcaagtaaagccgaa 1860
ggtcacaaactttaagcacagcctgatctggcggaagcggctgctacaaccaccgaaaaac 1920
ccgctgcagaaaaattgatgctgctttggcacaggttgacacggttacgcttctgacctgggt 1980
gcggtacagaaccggtttcaactccgctattaccaacctgggcaacaccgtaaacacctg 2040
acttctgcccgtagccgtatcgaagattccgactacgcgaccgaagtttccaacatgtct 2100
cgcgcgcagattctgcagcaggccgggtacctccgttctggcgcaggcgaaccagggttccg 2160
caaaacgctcctctcttttactgctgtaa 2187

<210> 2

<211> 728

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列的描述: 融合蛋白的氨基酸序列

<400> 2

Lys Gly Lys Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile
1 5 10 15
Thr Gly Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile
20 25 30
Ile Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
35 40 45 50
Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys Glu
55 60 65
Ala Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr Ser Ala
70 75 80 85
Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp Leu Leu Ser

[0003]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | | | | 90 | | | | | | 95 | | | | | 100 | | | | |
| Asn | Thr | Asp | Asn | Ala | Ala | Phe | Pro | Gln | Met | Thr | Lys | Ser | Tyr | Lys | Asn | Thr | | | |
| | | 105 | | | | | | 110 | | | | | 115 | | | | | | |
| Arg | Lys | Ser | Pro | Ala | Leu | Ile | Val | Trp | Gly | Ile | His | His | Ser | Val | Ser | Thr | | | |
| 120 | | | | | 125 | | | | | 130 | | | | | 135 | | | | |
| Ala | Glu | Gln | Thr | Lys | Leu | Tyr | Gly | Ser | Gly | Asn | Lys | Leu | Val | Thr | Val | Gly | | | |
| | | | 140 | | | | | 145 | | | | | 150 | | | | | | |
| Ser | Ser | Asn | Tyr | Gln | Gln | Ser | Phe | Val | Pro | Ser | Pro | Gly | Ala | Arg | Pro | Gln | | | |
| | | 155 | | | | 160 | | | | | 165 | | | | 170 | | | | |
| Val | Asn | Gly | Ile | Ser | Gly | Arg | Ile | Asp | Phe | His | Trp | Leu | Met | Leu | Asn | Pro | | | |
| | | | 175 | | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | |
| Asn | Asp | Thr | Val | Thr | Phe | Ser | Phe | Asn | Gly | Ala | Phe | Ile | Ala | Pro | Asp | Arg | | | |
| | | 190 | | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | | | |
| Ala | Ser | Phe | Leu | Arg | Gly | Lys | Ser | Met | Gly | Ile | Gln | Ser | Gly | Val | Gln | Val | | | |
| 205 | | | | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Asp | Ala | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Met | Ala | Gln | Val | Ile | | | |
| | | | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | | |
| Asn | Thr | Asn | Ser | Leu | Ser | Leu | Leu | Thr | Gln | Asn | Asn | Leu | Asn | Lys | Ser | Gln | | | |
| | 240 | | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | 255 | | | |
| Ser | Ala | Leu | Gly | Thr | Ala | Ile | Glu | Arg | Leu | Ser | Ser | Gly | Leu | Arg | Ile | Asn | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | | |
| Ser | Ala | Lys | Asp | Asp | Ala | Ala | Gly | Gln | Ala | Ile | Ala | Asn | Arg | Phe | Thr | Ala | | | |
| | | 275 | | | | 280 | | | | | | 285 | | | | | | | |
| Asn | Ile | Lys | Gly | Leu | Thr | Gln | Ala | Ser | Arg | Asn | Ala | Asn | Asp | Gly | Ile | Ser | | | |
| 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | 305 | | | | |
| Ile | Ala | Gln | Thr | Thr | Glu | Gly | Ala | Leu | Asn | Glu | Ile | Asn | Asn | Asn | Leu | Gln | | | |
| | | | 310 | | | | | 315 | | | | | | 320 | | | | | |
| Arg | Val | Arg | Glu | Leu | Ala | Val | Gln | Ser | Ala | Asn | Ser | Thr | Asn | Ser | Gln | Ser | | | |
| | 325 | | | | | 330 | | | | | | 335 | | | 340 | | | | |
| Asp | Leu | Asp | Ser | Ile | Gln | Ala | Glu | Ile | Thr | Gln | Arg | Leu | Asn | Glu | Ile | Asp | | | |
| | | | 345 | | | | | | 350 | | | | | 355 | | | | | |
| Arg | Val | Ser | Gly | Gln | Thr | Gln | Phe | Asn | Gly | Val | Lys | Val | Leu | Ala | Gln | Asp | | | |
| | | 360 | | | | 365 | | | | | | 370 | | | | | | | |
| Asn | Thr | Leu | Thr | Ile | Gln | Val | Gly | Ala | Asn | Asp | Gly | Glu | Thr | Ile | Asp | Ile | | | |
| 375 | | | | | 380 | | | | | | 385 | | | | 390 | | | | |
| Asp | Leu | Lys | Gln | Ile | Asn | Ser | Gln | Thr | Leu | Gly | Leu | Asp | Thr | Leu | Asn | Val | | | |
| | | | 395 | | | | | 400 | | | | | 405 | | | | | | |
| Gln | Gln | Lys | Tyr | Lys | Val | Ser | Asp | Thr | Ala | Ala | Thr | Val | Thr | Gly | Tyr | Ala | | | |
| | 410 | | | | | 415 | | | | | | 420 | | | | 425 | | | |
| Asp | Thr | Thr | Ile | Ala | Leu | Asp | Asn | Ser | Thr | Phe | Lys | Ala | Ser | Ala | Thr | Gly | | | |
| | | | 430 | | | | | | 435 | | | | 440 | | | | | | |
| Leu | Gly | Gly | Thr | Asp | Gln | Lys | Ile | Asp | Gly | Asp | Leu | Lys | Phe | Asp | Asp | Thr | | | |
| | 445 | | | | | 450 | | | | | | 455 | | | | | | | |
| Thr | Gly | Lys | Tyr | Tyr | Ala | Lys | Val | Thr | Val | Thr | Gly | Gly | Thr | Gly | Lys | Asp | | | |

[0004]

460 465 470 475
 Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val Thr Leu Ala
 480 485 490
 Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro Ala Thr Ala Thr Glu
 495 500 505 510
 Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp Leu Thr Glu Ala Lys Ala
 515 520 525
 Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr Ala Ser Val Val Lys Met Ser
 530 535 540
 Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val
 545 550 555 560
 Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile
 565 570 575
 Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn
 580 585 590 595
 Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys
 600 605 610
 Thr Tyr Ala Ala Ser Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp
 615 620 625
 Leu Ala Glu Ala Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp
 630 635 640 645
 Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln
 650 655 660
 Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu
 665 670 675 680
 Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
 685 690 695
 Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala
 700 705 710
 Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
 715 720 725

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列的描述: 引物 HA1-2-F' 的核苷酸序列

<400> 3

Cccgagctcaaagggaaaaggacagttgacc 31

[0005]

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列的描述: 引物 HA1-2-R' 的核苷酸序列

<400> 4
cccaagcttggcatcaacctgtact 25

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列的描述: 引物 HA1-2-F 的核苷酸序列

<400> 5
ccggaattcaaagggaaaaggacagttgacc 31

<210> 6
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> 人工序列的描述: 引物 HA1-2-R 的核苷酸序列

<400> 6
cacctccgcttccacctccaccggcatcaacctgtact 38

<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0006]

<221> 来源

<223> 人工序列的描述: 引物 *fliC-F* 的核苷酸序列

<400> 7

aggtggaagcggaggtggtggaagcatggcacaagtcattaata 44

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> 人工序列的描述: 引物 *fliC-R* 的核苷酸序列

<400> 8

ccgtctagattaacgcagtaaagagaggacg 31

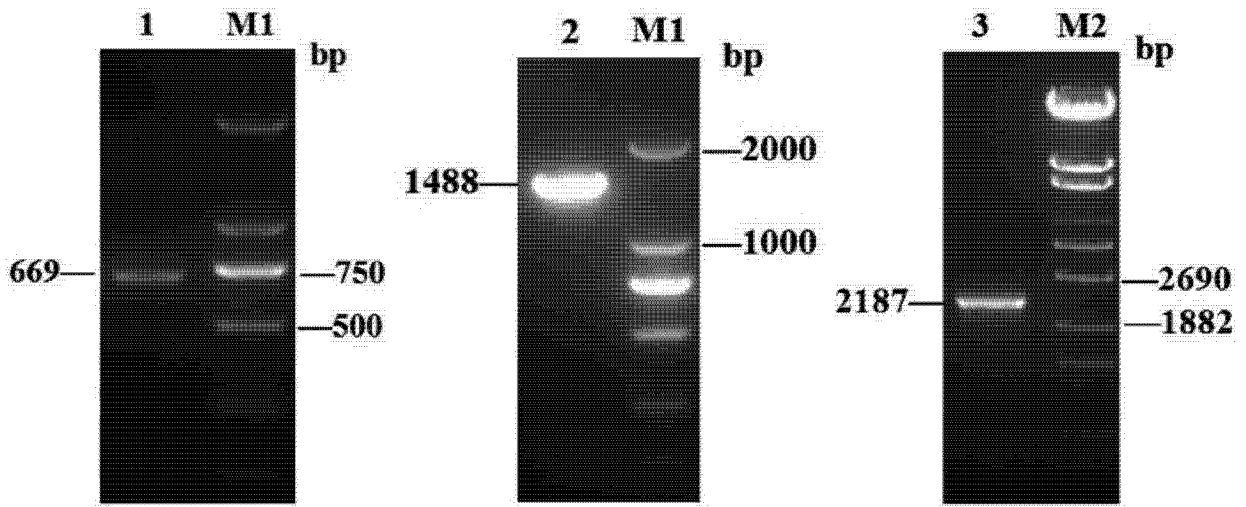


图 1

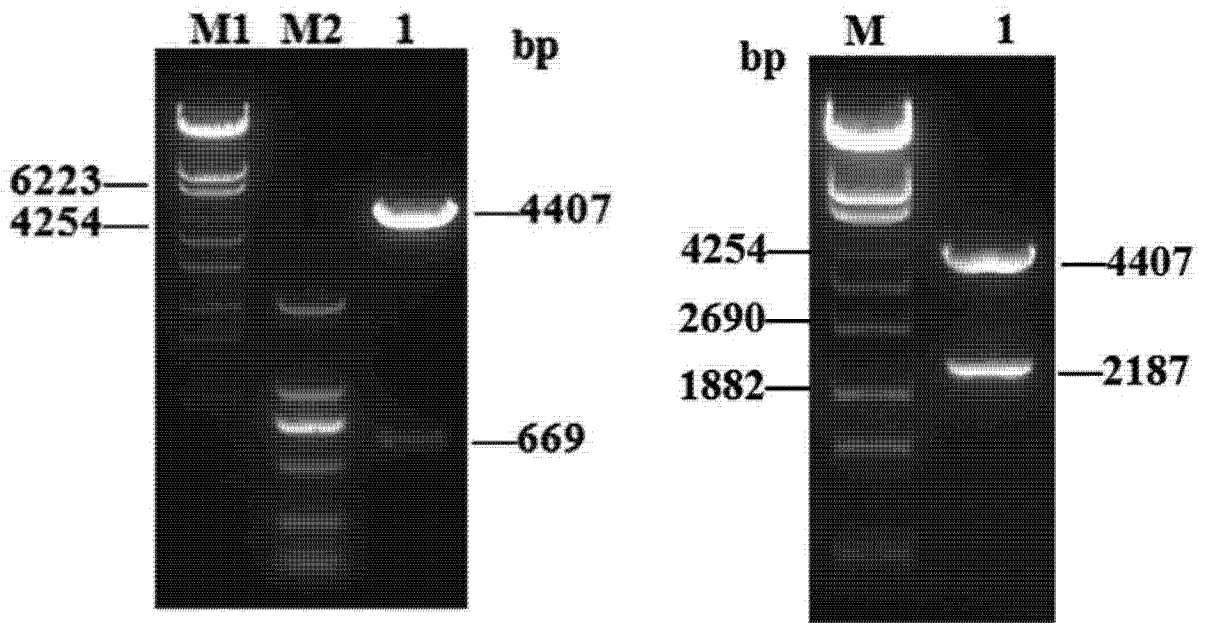


图 2

图 3

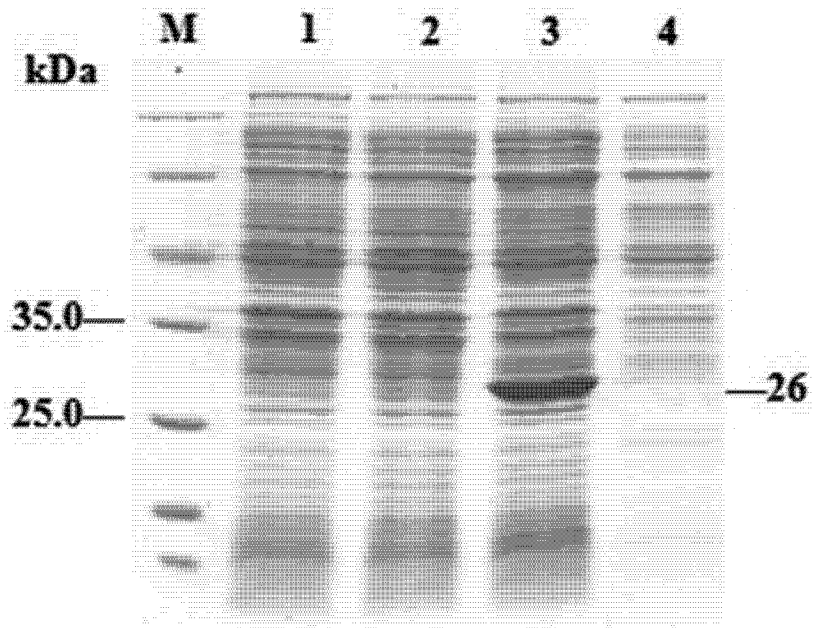


图 4

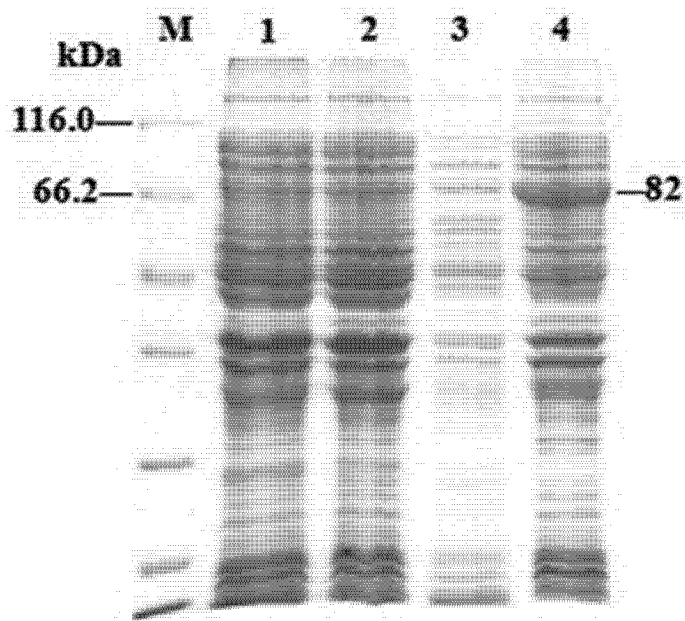


图 5

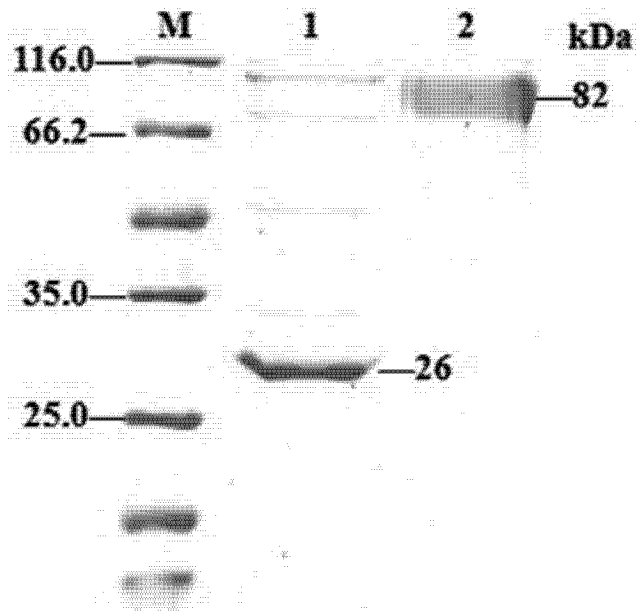


图 6

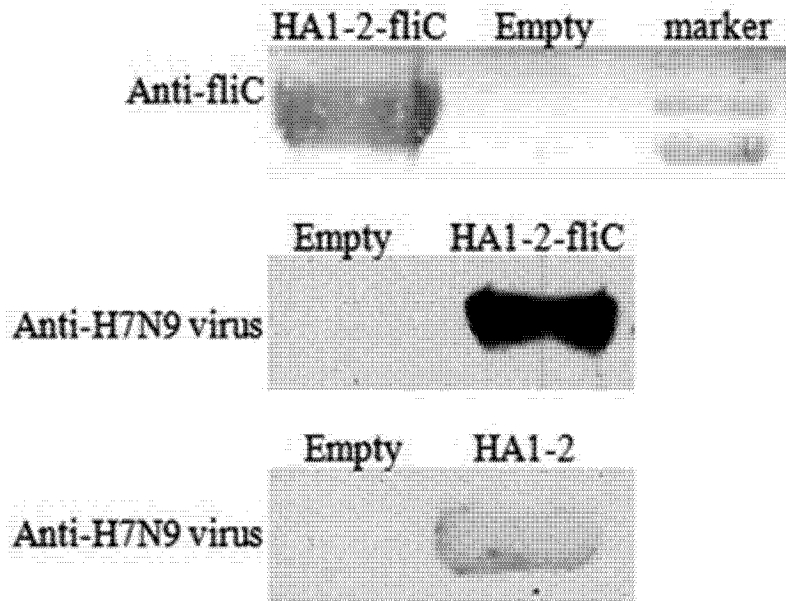


图 7

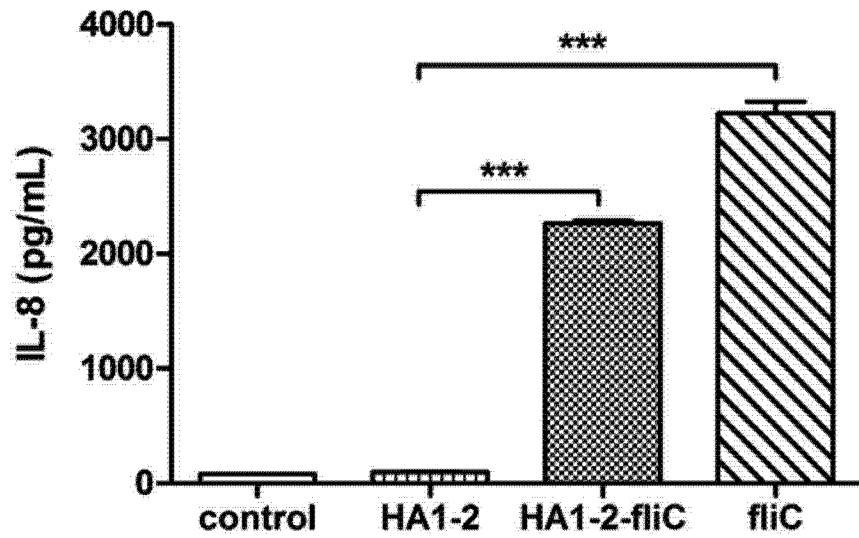


图 8

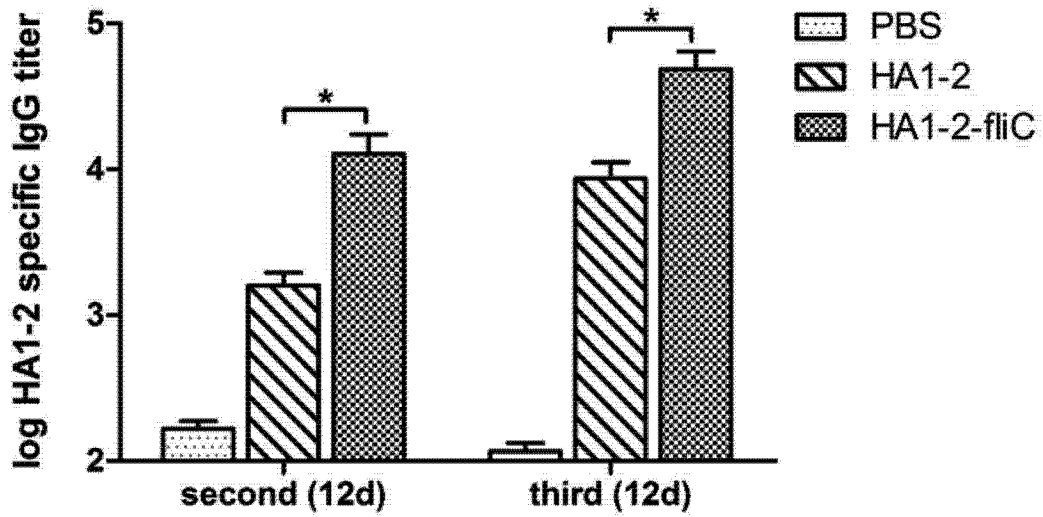


图 9

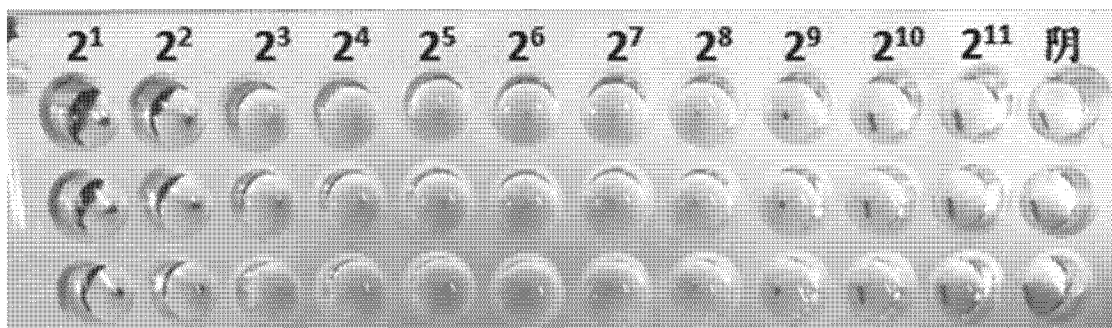


图 10

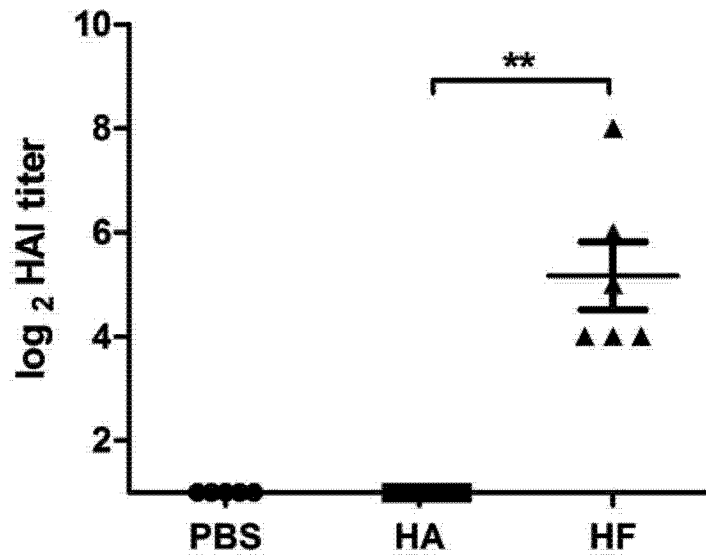


图 11

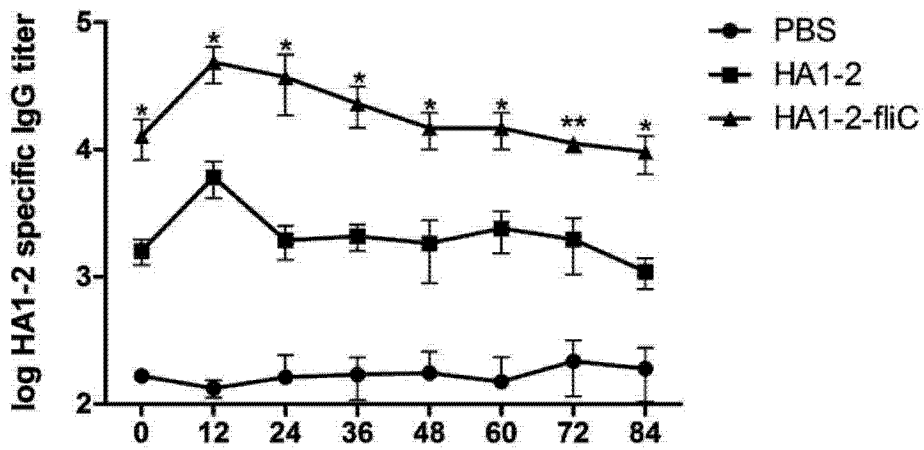


图 12