



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106554944 B

(45)授权公告日 2020.04.14

(21)申请号 201510632108.7

(22)申请日 2015.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106554944 A

(43)申请公布日 2017.04.05

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:V201341 2013.09.16
CCTCC NO:V201514 2015.03.04

(73)专利权人 普莱柯生物工程股份有限公司
地址 471000 河南省洛阳市高新区凌波路5号

(72)发明人 田克恭 吕超超 孙进忠 张许科

(74)专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11017
代理人 韩登营

(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
A61K 39/215(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
C12R 1/93(2006.01)

(56)对比文件

CN 104513827 A,2015.04.15,
CN 103756974 A,2014.04.30,
CN 103194472 A,2013.07.10,
CN 104248762 A,2014.12.31,
CN 104357461 A,2015.02.18,
CN 104645326 A,2015.05.27,
KR 100773241 B1,2007.11.05,
陈弟诗等.猪流行性腹泻病毒S基因研究进展.《动物医学进展》.2014,第35卷(第7期),第77-81页.

Seong-Jun Park等.Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13.《Virus Genes》.2007,第35卷(第1期),第55-64页.

Bi.J.等.spike protein [Porcine epidemic diarrhea virus].《GenBank Database》.2012,Accession No. AFQ37598.

审查员 马家兴

权利要求书1页 说明书19页
序列表6页 附图1页

(54)发明名称

猪流行性腹泻病毒弱毒株及其制备的疫苗组合物和应用

(57)摘要

本发明涉及一种猪流行性腹泻病毒弱毒株,该猪流行性腹泻病毒弱毒疫苗株为猪流行性腹泻病毒S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段的核苷酸片段缺失或终止翻译。本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株为猪流行性腹泻病毒流行毒株的弱毒株,对猪体致病力显著降低,免疫猪体后不返强,免疫原性良好,免疫后能使猪有效抵抗强毒攻击。本发明还涉及该猪流行性腹泻病毒弱毒株作为活病毒抗原得到疫苗组合物,以及该猪流行性腹泻病毒弱毒株突变的S蛋白、以及猪流行性腹泻病毒弱毒株的制备方法。

Majority	GACFSGCCRGFRLLQPEAFEKVHVQ	
	1370	1380
S-HN1301-F4.seq	GACFSGCCRGFRLLQPEAFEKVHVQ.	4156
S-HN1301-F35.seq	GACFSGCCRGFRLLQPEAFEKVHVQ.	4156
S-HN1301-F64.seq	GACFSGCCRGFRLLQPEAFEKVHVQ.	4156
S-HN1301-F96.seq	GACFSGCCRGFRLLQPEAFEKVHVQ.	4156

CN 106554944 B

1. 一种猪流行性腹泻病毒弱毒株,其中,所述猪流行性腹泻病毒弱毒株是将猪流行性腹泻病毒的S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVVHVQ或其同源片段缺失或终止翻译,所述S基因编码序列中编码最后9个氨基酸同源片段为EVFEKVVHVQ,所述猪流行性腹泻病毒为HN1301株或HN1303株;所述HN1301株保藏号为CCTCC NO.V 201341,所述HN1303株保藏号为CCTCC NO.V 201514。

2. 一种疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物包括致免疫量的权利要求1所述的猪流行性腹泻病毒弱毒株。

3. 根据权利要求2所述的疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物还包括冻干保护剂。

4. 根据权利要求2所述的疫苗组合物,其中,所述猪流行性腹泻病毒弱毒株含量为 $\geq 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml。

5. 根据权利要求4所述的疫苗组合物,其中,所述猪流行性腹泻病毒弱毒株含量为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml $\sim 10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

6. 一种猪流行性腹泻病毒S蛋白的突变蛋白,其中,所述S蛋白的突变蛋白为S蛋白中最后9个氨基酸EAFEKVVHVQ或其同源片段缺失或终止表达,其中,所述S蛋白中最后9个氨基酸同源片段为EVFEKVVHVQ,所述S蛋白来源于猪流行性腹泻病毒为HN1301株或HN1303株的S蛋白;所述HN1301株保藏号为CCTCC NO.V 201341,所述HN1303株保藏号为CCTCC NO.V 201514。

7. 一种疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物包括致免疫量的权利要求6所述的S蛋白的突变蛋白和佐剂。

8. 根据权利要求7所述的疫苗组合物,其中,所述的S蛋白的突变蛋白序列如SEQ ID No.2所示。

9. 根据权利要求7所述的疫苗组合物,其中,所述的S蛋白的突变蛋白含量为50 \sim 100 μ g/ml。

猪流行性腹泻病毒弱毒株及其制备的疫苗组合物和应用

技术领域

[0001] 本发明属于兽用疫苗领域,具体涉及猪流行性腹泻病毒弱毒株、及其制备的疫苗组合物和应用。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea,PED)是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起的一种以腹泻、呕吐和脱水为主要特征的猪肠道传染病。各种年龄的猪均易感,尤其以哺乳仔猪影响最严重。该病已经成为猪养殖产业发展中的一个严重问题,2012年至今该病在全球范围内迅速爆发,造成了严重的经济损失。

[0003] 感染后发病仔猪常表现呕吐,迅速腹泻脱水,腹泻粪便呈黄色或灰黄色水样,体温基本正常,仔猪濒死前体温下降。而保育猪和生长猪常精神委顿、厌食和持续3-7天的腹泻,恢复后易造成生长不良。该病病变主要在小肠,小肠肠壁变薄,其内充满黄色液体。

[0004] 免疫接种是预防该病最有效的手段。国内外已有商品化的猪流行性腹泻疫苗,既有灭活疫苗,也有用弱毒株制备的活疫苗。目前活疫苗均采用经典毒株如国内CV777株、韩国DR13、日本83P-5株等,与流行毒株有较大差异,对于目前田间的流行毒株,其免疫保护效果有限,无法很好的抵抗流行毒株的攻击。对于灭活疫苗,虽有采用流行毒株如AJ1102株制备的疫苗,但其刺激机体产生细胞免疫和粘膜免疫反应的能力比活病毒差,免疫效力有待提高;此外用强毒株生产疫苗,需要大量培养强毒,需要严格控制生产环境、防止强毒扩散;配制灭活疫苗的成本远高于弱毒活疫苗。因此,筛选培育出以当前流行毒株为母本的弱毒疫苗株对PED的防治具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明提供一种新的猪流行性腹泻病毒弱毒株,用该弱毒疫苗株所制备的疫苗对于猪流行性腹泻病毒流行株具有良好的保护效力。

[0006] 本发明第一方面涉及一种猪流行性腹泻病毒弱毒株,其中,所述猪流行性腹泻病毒弱毒疫苗株为猪流行性腹泻病毒S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段的核苷酸片段缺失或终止翻译。

[0007] 本发明的另一方面涉及一种疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物包括致免疫量的本发明所述的猪流行性腹泻病毒弱毒株;优选地,所述疫苗组合物还包括冻干保护剂。

[0008] 本发明的另一方面涉及一种所述的猪流行性腹泻病毒S蛋白的突变蛋白,其中,所述S蛋白的突变蛋白为S蛋白中最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段缺失或终止表达。

[0009] 本发明的另一方面涉及一种疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物包括致免疫量的最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段缺失或终止表达的S蛋白的突变蛋白和佐剂。

[0010] 本发明的另一方面涉及一种制备本发明所述猪流行性腹泻病毒弱毒株的方法,其中,所述方法包括:(1)所述猪流行性腹泻病毒接种传代细胞,在所述传代细胞上培养,当所述传代细胞病变时,收获所述培养的病毒;以及(2)将所述步骤(1)中收获的病毒接种所述

传代细胞,继续培养,连续培养至35代以上,得到所述猪流行性腹泻病毒弱毒株。

附图说明:

- [0011] 图1为HN1301株培养不同代次后S基因C末端序列比对结果;
- [0012] 图2为HN1301株培养不同代次后S蛋白C末端序列比对结果。
- [0013] 序列表中:
- [0014] 序列1为猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株S基因至原S基因终止密码子全长核苷酸序列;
- [0015] 序列2为猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株S蛋白氨基酸序列。

具体实施方式

- [0016] 以下,对本发明的实施方式进行说明。
- [0017] 本发明的一个方面涉及一种猪流行性腹泻病毒弱毒株,其中,所述猪流行性腹泻病毒弱毒疫苗株为猪流行性腹泻病毒S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段的核苷酸片段缺失或终止翻译。本发明的一个方面在于提供一种猪流行性腹泻病毒弱毒株,其中所述的猪流行性腹泻病毒弱毒株基因S基因最末9aa缺失或终止表达。具备上述特征的S基因的猪流行性腹泻病毒株,致病力显著降低,是致弱的病毒株,并且对猪体安全。
- [0018] 本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株其S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段的核苷酸片段缺失或终止翻译;其同源片段指与EAFEKVHVQ同源75%以上、或与其同源80%以上、或与其同源85%以上、或与其同源90%以上、或与其同源95%以上、或与其同源98%以上的氨基酸片段。
- [0019] 作为本发明的一种实施方式,本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株其S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVHVQ的核苷酸片段缺失或终止翻译。
- [0020] 作为本发明的一种实施方式,本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株其S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EVFEKVHVQ的核苷酸片段缺失或终止翻译。
- [0021] 本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株可以传代致弱,通过在传代细胞上连续传代使S基因编码最后9个氨基酸的核苷酸片段缺失或终止翻译,也可以通过基因工程的方法,突变或重组使S基因编码最后9个氨基酸的核苷酸片段缺失或终止翻译。
- [0022] 作为本发明的一种实施方式,本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株中,所述猪流行性腹泻病毒为HN1301株、HN1303株、Iowa18984株、AJ1102株。
- [0023] 猪流行性腹泻病毒HN1301株(Porcine epidemic diarrhea virus, strain HN1301),保藏号为CCTCC NO.V 201341;保藏于中国典型培养物保藏中心;保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2013年9月16日。
- [0024] 猪流行性腹泻病毒HN1303株(Porcine epidemic diarrhea virus, strain HN1303),保藏号为CCTCC NO.V 201514;保藏于中国典型培养物保藏中心;保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2015年3月4日。
- [0025] Iowa18984株公开信息:Hoang,H.,Killian,M.L.,Madson,D.M.,Arruda,P.H.,Sun,D.,Schwartz,K.J.,Yoon,K.J.,2013.Full-Length Genome Sequence of a Plaque-

Cloned Virulent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Isolate (USA/Iowa/18984/2013) from a Midwestern U.S. Swine Herd. Genome Announc 1.

[0026] AJ1102株公开信息: Bi, J., Zeng, S., Xiao, S., Chen, H., Fang, L., 2012. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain AJ1102 isolated from a suckling piglet with acute diarrhea in China. J Virol 86, 10910-10911.

[0027] 作为本发明的一种优选实施方式, 猪流行性腹泻病毒HN1301株通过细胞连续传代方式得到的猪流行性腹泻病毒弱毒株, 与猪流行性腹泻病毒HN1301株相比, 病毒S基因第4129位核苷酸发生突变, 导致27nt编码的最末9aa的终止表达。

[0028] 致病性试验表明, 猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株连续培养1代至65代之间, 对猪致病力显著降低。3日龄仔猪接种后, 不出现临床症状。因此, 该病毒与亲本强毒株猪流行性腹泻病毒HN1301株相比, 致病力显著降低, 是人工致弱的病毒株。

[0029] 免疫原性试验表明, 猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株培养1代至第65代, 仍具有良好的免疫原性。3日龄仔猪接种后, 于21日龄可抵御强毒猪流行性腹泻病毒HN1301株的攻击, 同时, 未接种猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株培养物的猪, 则不能抵抗强毒猪流行性腹泻病毒HN1301株的攻击, 至少4/5发病。

[0030] 病毒返强试验表明, 猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株培养1代至65代的病毒, 接种后在猪群中连续体内传代多次, 不发生返强。因此, 病毒接种猪群后, 不会重新演变为强毒而引发病, 安全性有保证。

[0031] 对该猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株的免疫原性和保护效力测定结果表明: 该毒株具有良好的免疫原性, 能够刺激机体快速产生免疫力, 且抗体持续维持在一个较高水平, 对流行野毒株提供有效的保护, 显示出显著的免疫特性。

[0032] 为了验证猪流行性腹泻HN1301弱毒株与亲本强毒株存在差异的S基因最末9aa的终止表达从而导致亲本强毒株致弱是否能使其他猪流行性腹泻病毒株同样致弱, 发明人将猪流行性腹泻病毒HN1303株通过基因工程手段对其S基因4132位进行点突变即G4132T, 使对应的1378位氨基酸由“E”突变为终止密码子, 使原有最末端9个aa“EVFEKVHVQ”终止表达。将突变后的毒株命名为HN1303_{mut}株。

[0033] 同时, 发明人将猪流行性腹泻病毒Iowa18984株通过基因工程手段对其S基因4132位进行点突变即G4132T, 使对应的1378位氨基酸由“E”突变为终止密码子, 使原有最末端9个aa“EVFEKVHVQ”终止表达。将突变后的毒株命名为Iowa18984_{mut}株。

[0034] 对猪流行性腹泻病毒HN1303_{mut}株和猪流行性腹泻病毒Iowa18984_{mut}株的稳定性和安全性进行试验, 结果表明, 两个毒株是稳定的, 与亲本强毒株相比, 致病力显著降低, 无返强现象, 安全性好, 对怀孕母猪、仔猪均安全, 无副作用, 不会对机体造成危害。

[0035] 对猪流行性腹泻病毒HN1303_{mut}株和猪流行性腹泻病毒Iowa18984_{mut}株的免疫原性和保护效力进行试验, 结果表明, 两株病毒株均具有良好的免疫原性, 能够刺激机体快速产生免疫力, 且抗体持续维持在一个较高水平, 对流行野毒株感染提供良好的保护, 显示出良好的免疫特性。

[0036] 本发明另一方面涉及一种疫苗组合物, 其中, 所述疫苗组合物包括致免疫量的本发明所述的猪流行性腹泻病毒弱毒株。

[0037] 作为本发明的一种实施方式, 所述疫苗组合物包括致免疫量的本发明的所述猪流

行性腹泻病毒株的抗原和药学上可接受的载体；所述猪流行性腹泻病毒株抗原包括减毒全病毒抗原、亚单位抗原或合成肽抗原。

[0038] “疫苗组合物”系指含有猪流行性腹泻病毒免疫原性的药物组合物。该药物组合物可诱发、刺激或增强猪只针对猪流行性腹泻病毒的免疫反应。疫苗组合物包括致免疫量的猪流行性腹泻病毒株的减毒活疫苗、亚单位疫苗、合成肽疫苗。

[0039] “活疫苗”指的是以毒力已经减弱但仍可在宿主体内或细胞上复制的病毒制备的疫苗。本发明所用的术语“减毒”用于指以使病原丧失致病性、但保持免疫原性的方式对基因进行突变来人工降低病原体毒性。通常，通过UV辐射、化学处理或体外连续高阶继代培养实现减毒，或通过人工的基因改变，例如将已知序列中的特定核苷酸缺失以使毒力减弱。

[0040] “亚单位疫苗”指的是利用基因工程方法将病原体的保护性抗原基因克隆到原核或真核表达系统中，使其高效表达而制成的疫苗。它比全病毒疫苗引起副反应的可能性小。例如，表达的猪流行性腹泻病毒株的S蛋白可用于制备亚单位疫苗。

[0041] “合成肽疫苗”指的是一种仅含免疫决定簇组分的小肽，即用人工方法按天然蛋白质的氨基酸顺序合成保护性短肽，与载体连接后加佐剂所制成的疫苗。

[0042] 本发明的组合物的成分或组分的量优选地是致免疫量。所述致免疫量是指在组合物施用的宿主中发挥它们的免疫学作用而不导致过度副作用所必需量。所用的成分和待施用的组合物的精确的量将根据因素如治疗的疾病的类型，待预防或治疗的动物的类型和年龄，施用的方式，以及组合物中的其它成分而变化。

[0043] 作为本发明的一种实施方式，本发明的所述疫苗组合物还包括冻干保护剂。

[0044] 冻干保护剂可以保护生物制品在冻干过程中的稳定性，减少冻干过程对疫苗的生物活性的破坏。冻干保护剂可以为蔗糖、L-谷氨酸钠或水解乳蛋白。

[0045] 作为本发明的一种实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述猪流行性腹泻病毒弱毒株含量为 $\geq 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0046] 作为本发明的一种优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述猪流行性腹泻病毒弱毒株含量为 $10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml} \sim 10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0047] 作为本发明的一种优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述猪流行性腹泻病毒株的抗原为所述猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株的全病毒抗原；所述HN1301弱毒株全病毒抗原含量为 $\geq 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0048] 作为本发明的一种更优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述疫苗组合物中所述HN1301弱毒株全病毒抗原含量为 $10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml} \sim 10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0049] 作为本发明的一种优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述猪流行性腹泻病毒株的抗原为所述猪流行性腹泻病毒HN1303_{mut}株的全病毒抗原；所述HN1303_{mut}株全病毒抗原含量为 $\geq 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0050] 作为本发明的一种更优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述疫苗组合物中所述HN1303_{mut}株全病毒抗原含量为 $10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml} \sim 10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0051] 作为本发明的一种优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述猪流行性腹泻病毒株的抗原为所述猪流行性腹泻病毒Iowa18984_{mut}株的全病毒抗原；所述Iowa18984_{mut}株全病毒抗原含量为 $\geq 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0052] 作为本发明的一种更优选实施方式，本发明的所述疫苗组合物中，所述疫苗组合

物中所述Iowa18984_{mut}株全病毒抗原含量为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml \sim $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

[0053] 作为本发明的一种优选实施方式,本发明的所述疫苗组合中,所述猪流行性腹泻病毒株的抗原为所述猪流行性腹泻病毒AJ1102_{mut}株的全病毒抗原;所述AJ1102_{mut}株全病毒抗原含量为 $\geq 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml。

[0054] 作为本发明的一种更优选实施方式,本发明的所述疫苗组合中,所述疫苗组合中所述AJ1102_{mut}株全病毒抗原含量为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml \sim $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。

[0055] 本发明的另一方面涉及一种制备本发明所述的疫苗组合物的方法,其中,所述方法包括:(1)培养增殖所述的猪流行性腹泻病毒弱毒株;(2)在所述步骤(1)所述增殖猪流行性腹泻病毒弱毒株加入冻干保护剂,冻干保存。

[0056] 本发明的另一个方面涉及一种猪流行性腹泻病毒株S基因的突变子,所述S基因的突变子为S基因编码序列中编码最后9个氨基酸EAFEKVVHVQ或其同源片段的核苷酸片段缺失或终止翻译。

[0057] 作为本发明的一种实施方式,本发明提供的S基因的突变子实质上编码的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,或其简并性序列组成的核苷酸序列。

[0058] 作为本发明的一种实施方式,本发明提供的S基因的突变子实质上编码序列表中SEQ.NO.1所述的核苷酸序列,其中最末9aa终止表达。

[0059] “实质上编码”指其编码的蛋白可以通过添加、删除、替换一个或多个氨基酸残基同时保持其功能和免疫原性。

[0060] 本发明的猪流行性腹泻病毒株的S基因可以应用于表达载体、活载体、核酸疫苗、诊断试剂开发以及其他预防和/或治疗猪流行性腹泻相关药物开发。

[0061] 本发明的另一个方面涉及一种所述的猪流行性腹泻病毒S蛋白的突变蛋白,其中,所述S蛋白的突变蛋白为S蛋白中最后9个氨基酸EAFEKVVHVQ或其同源片段缺失或终止表达。

[0062] 作为本发明的一种实施方式,本发明的猪流行性腹泻病毒S蛋白的突变蛋白最后9个氨基酸EVFEKVVHVQ缺失或终止表达。

[0063] 本发明的猪流行性腹泻病毒S蛋白,其有利地激发动物中的保护性反应。具体地,本发明实施方式的蛋白序列包含与其功能衍生物基本相同的氨基酸序列。

[0064] “基本上相同”可以理解为本发明的蛋白优选地具有这样的氨基酸序列,其与SEQ ID NO.2中所示的序列的具有至少70%同源性或甚至优选地80%同源性,或甚至更优选地90%同源性,或最优选地95%同源性。

[0065] “同源性”还包括与参比序列相同或类似,同时提供任何氨基酸的简单替换/修饰。可以用BLAST-P(基本局部排比检索工具),本领域技术人员公知的程序进行该方面的同源性检索。对于相应的核酸序列,同源性涉及在本领域中已知的BLASTX和BLASTN程序。

[0066] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的猪流行性腹泻病毒S蛋白的突变蛋白,其中,所述S蛋白来源于猪流行性腹泻病毒为HN1301株、HN1303株、Iowa18984株、AJ1102株的S蛋白。

[0067] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的猪流行性腹泻病毒S蛋白的突变蛋白序列为SEQ.NO.2所述的氨基酸序列。本发明的另一个方面涉及一种疫苗组合,其中,所述疫苗组合包括致免疫量的本发明所述的S蛋白的突变蛋白和佐剂。

[0068] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述的疫苗组合,其中,所述的S蛋白的突

变蛋白含量为50~100 μ g/ml。

[0069] 本发明的另一个方面涉及一种制备本发明所述猪流行性腹泻病毒弱毒株的方法,其中,所述方法包括:(1)所述猪流行性腹泻病毒接种传代细胞,在所述传代细胞上培养,当所述传代细胞病变时,收获所述培养的病毒;以及(2)将所述步骤(1)中收获的病毒接种所述传代细胞,继续培养,连续培养至35代以上,得到所述猪流行性腹泻病毒弱毒株。

[0070] 本发明通过在Vero细胞上经人工连续传代培养,再通过有限稀释法分离纯化病毒,然后进行本动物接种试验,评价病毒的致病性和免疫原性,从而获得人工致弱的病毒株。

[0071] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述制备方法中:所述步骤(1)中传代培养步骤包括:选用生长良好的单层Vero细胞,弃细胞生长液,PBS洗2次,每瓶按培养液量5%加入病毒液,37 $^{\circ}$ C吸附1h,加入不含血清的维持液,继续培养,每天更换80%的维持液。当细胞病变(CPE)达到80%以上时收获培养物。

[0072] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述制备方法中,所述步骤(1)中传代细胞为Vero细胞,所述传代细胞病变为80%时收获病毒;所述步骤(2)中传代次数为35-100代。

[0073] 本发明制备的所述猪流行性腹泻病毒弱毒株经病毒纯化、致病性试验、免疫原性鉴定以确定可否作为疫苗株制备疫苗。

[0074] 1、病毒纯化:将收获的病毒液进行有限稀释,接种已经长至单层的24孔细胞培养板,每天观察细胞病变,选取单细胞病变孔进行扩大培养,获得纯化的病毒克隆;

[0075] 2、致病性试验:将各个代次的病毒分别接种试验猪,观察14天,记录猪的发病和死亡情况,以此评价病毒对猪的致病性;

[0076] 3、在给猪接种各个代次的病毒后第14天,用高致病的HN1301株P5代攻毒,观察猪发病情况,判定各个代次毒株的免疫原性。

[0077] 致病性试验表明,HN1301株培养35代至100代之间,对仔猪致病力显著降低。猪在接种后观察14天,不出现或出现轻微临床症状,剖检组织器官无变化。因此,该病毒与亲本强毒株相比,致病力显著降低,是人工致弱的病毒株。

[0078] 免疫原性试验表明,HN1301株在Vero细胞上培养至100代,仍具有良好的免疫原性。猪在接种后14天,可抵御强毒的攻击。同时,对照组仔猪则不能抵御强毒株的攻击,4/5以上发病。

[0079] 病毒返强试验表明,HN1301株在Vero细胞上培养35代至100代之间的病毒,接种后在仔猪中连续传代多次,不发生返强。因此病毒散播到仔猪后,不会重新演变为强毒而引起发病,安全性有保证。

[0080] 通过对在Vero细胞上培养35-100代HN1301株病毒的基因序列进行分析,发现了本疫苗毒株的特有基因序列特征,其S基因C端胞浆区核苷酸突变提前出现终止密码子,导致最末9aa的终止表达。

[0081] 本发明的另一个方面涉及一种制备本发明所述猪流行性腹泻病毒弱毒株的方法,所述方法包括:通过基因工程的方法将猪流行性腹泻病毒S基因的最后9个氨基酸EAFEKVHVQ或其同源片段缺失或终止表达,得到所述猪流行性腹泻病毒弱毒株。

[0082] 作为本发明的一种实施方式,本发明的猪流行性腹泻病毒弱毒株的制备方法,通过基因工程的方法将猪流行性腹泻病毒S基因的最后9个氨基酸EVFEKVHVQ缺失或终止表

达,得到所述猪流行性腹泻病毒弱毒株。

[0083] 作为本发明的一种优选实施方式,猪流行性腹泻病毒HN1303株通过基因工程手段对其S基因4132位进行点突变即G4132T,使对应的1378位氨基酸由“E”突变为终止翻译,使原有最末端9个aa“EVFEKVHVQ”终止表达。将突变后的毒株命名为HN1303_{mut}株,与猪流行性腹泻病毒HN1303株相比,病毒基因从S基因第4132位核苷酸起连续27nt编码的9aa的终止表达。

[0084] 作为本发明的一种优选实施方式,猪流行性腹泻病毒Iowa18984株通过基因工程手段对其S基因4132位进行点突变即G4132T,使对应的1378位氨基酸由“E”突变为终止翻译,使原有最末端9个aa“EVFEKVHVQ”终止表达。将突变后的毒株命名为Iowa18984_{mut}株,与猪流行性腹泻病毒Iowa18984株相比,病毒基因从S基因第4132位核苷酸起连续27nt失活,导致S基因最末9aa的终止表达。

[0085] 当以根据本发明所述的猪流行性腹泻病毒株调配于疫苗组合物中时,所述猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株、HN1303_{mut}株以及Iowa18984_{mut}株均显示出显著免疫特性。因此,对于所述疫苗组合物而言,所述猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株、HN1303_{mut}株、Iowa18984_{mut}株,以及其他本质上具有相同本质识别特征的分离株极为优选。

[0086] 本发明的另一方面涉及所述的疫苗组合物在制备预防和/或治疗猪流行性腹泻的药物中的应用。

[0087] 本发明的另一方面涉及所述的S蛋白的突变蛋白在制备预防和/或治疗猪流行性腹泻的药物中的应用。

[0088] “保护性反应”意为在动物中预防猪流行性腹泻病毒相关疾病或由猪流行性腹泻病毒导致的感染的发作或减轻存在的这样的疾病的严重程度。

[0089] “预防”指通过给予根据本发明的疫苗组合物抑制猪流行性腹泻或推迟疾病发作的所有行为。

[0090] “治疗”指通过给予根据本发明的疫苗组合物使猪流行性腹泻病毒感染引起的症状减轻或好转的所有行为。

[0091] 本发明的另一方面涉及本发明所述疫苗组合物的制备方法,所述方法包括:将PEDV HN1301株弱毒株接种到单层Vero细胞,接种后培养20-24h,期间观察细胞病变,80% CPE时收获病毒培养物,经离心或过滤除去细胞碎片,测定病毒液的TCID₅₀效价。将病毒液与保护剂及赋形剂混合均匀,分装在疫苗瓶中,冷冻干燥,封盖。

[0092] 本发明的另一方面涉及所述疫苗组合物的使用方法,所述使用方法包括:所述疫苗组合物通过口服、后海穴位注射(即尾根与肛门之间的凹陷处)、肌肉注射途径接种;所述疫苗组合物接种剂量为: $\geq 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml (2ml/1头份)。

[0093] 作为本发明的一种实施方式,本发明所述疫苗组合物当应用于妊娠母猪时,于分娩前免疫接种2次,当应用于仔猪时,免疫接种1-2次。

[0094] 作为本发明的一种实施方式,本发明的所述疫苗组合物与其他抗原制备成联苗使用。

[0095] 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。

[0096] 实施例1:猪流行性腹泻病毒株HN1301株的分离、检测与繁殖

[0097] 1.猪流行性腹泻病毒HN1301株的分离

[0098] 将从河南临床采集的猪流行性腹泻典型发病的小肠连同肠内容物,用无菌的剪刀剪碎,按质量体积比1:3加入无菌的PBS (pH 7.4),用无菌研磨器在冰上小心研磨完全。收集研磨后的液体,按照下面的步骤逐步进行梯度离心:3000rpm、4℃离心15min,然后在5000rpm、4℃离心15min,随后在7000rpm、4℃离心15min,最后在10000rpm、4℃离心15min。取离心后的上清,接种Vero细胞,接种的Vero细胞置于37℃、5%CO₂培养,3天后收毒冻于-20℃,收获的病毒液为分离的猪流行性腹泻病毒,命名为HN1301株。

[0099] 2.猪流行性腹泻病毒HN1301株的检测

[0100] 根据NCBI中公开的PEDV核酸序列分别设计引物,用PCR方法进行对猪流行性腹泻病毒HN1301株进行定性检测和外源微生物检测,所用引物序列如下:

[0101] 上游:5'-GAAATAACCAGGTCGTGGA-3'

[0102] 下游:5'-GCTCACGAACAGCCACATTA-3'

[0103] 结果显示:猪流行性腹泻病毒HN1301株为PEDV阳性,证实了该分离株确实为猪流行性腹泻毒株;同时,使用猪蓝耳病病毒RT-PCR检测试剂盒、猪瘟病毒RT-PCR检测试剂盒、猪细小病毒PCR检测试剂盒、猪圆环PCR检测试剂盒和猪伪狂犬病毒PCR检测试剂盒(均为北京世纪元亨动物防疫技术有限公司产品)进行PRRSV、CSFV、PPV、PCV2、PRV病毒检测;同时使用申请人实验室自建方法进行BVDV、TGEV和轮状病毒检测,结果表明:该分离株的PRRSV、CSFV、PPV、PCV2、PRV、BVDV、TGEV、轮状病毒和支原体均为阴性,表明该采集、收获的毒种纯净。

[0104] 3.猪流行性腹泻病毒HN1301株的繁殖

[0105] 将分离株HN1301的病毒液按照维持液体积的1%接种Vero细胞,吸附1h后,补加维持液至适当体积后静置于37℃、5%CO₂培养,盲传10代后,出现PEDV典型的细胞病变:细胞颗粒增多,出现含7-8个以上多核的融合细胞,并可见有空斑样小区,后期细胞逐渐脱落。细胞病变达到80%以上时收获。

[0106] 4.猪流行性腹泻病毒HN1301株病毒TCID₅₀测定

[0107] Vero细胞传代后,按照2万细胞/孔的细胞个数铺96孔细胞板,每孔100μl。将该96孔细胞板置于37℃、5%CO₂培养箱培养3天,细胞长成单层。将收获的病毒液用维持液进行10倍系列稀释,稀释度分别为10⁻¹、10⁻²...10⁻⁷,取10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷五个稀释度,分别加入到长成单层细胞的96孔细胞板中,每个稀释度做8个重复,每孔100μl,置于37℃、5%CO₂培养箱培养5天,每天观察细胞病变。根据细胞病变孔数,按照Reed-Muench方法计算病毒毒价,经计算PEDV TCID₅₀达10^{7.5}/ml以上。

[0108] 实施例2:猪流行性腹泻病毒HN1301株的毒力测定试验

[0109] 1.试验动物

[0110] 怀孕母猪采血进行PEDV抗原和中和抗体以及TGEV检测,选取PEDV抗原、抗体以及TGEV阴性的母猪所产仔猪用于本试验,仔猪不吃初乳。

[0111] 2.攻毒试验

[0112] 选用上述3日龄未吃初乳的仔猪20只,分为4组,每组5只。第1组口服接种实施例1

培养的HN1301病毒液4ml；第2组口服接种HN1301病毒液2ml；第3组口服接种HN1301病毒液1ml；第4组为空白对照组，口服接种DMEM培养液2ml。

[0113] 3. 临床观察与病理分析

[0114] 每天观察攻毒后仔猪临床症状。若被攻毒猪只发生死亡，则在其刚刚死亡时进行剖检以观察其脏器组织的病理变化；若被攻毒猪只未死亡，则在攻毒后7天时处死，取其小肠及其内容物，按照实施例1中的方法分离病毒，提取病毒RNA，进行PCR检测。同时将分离的病毒按照实施例1中相同的方法接种Vero细胞，观察细胞病变。

[0115] 4. 试验结果

[0116] 表1 HN1301株攻毒试验结果

分组	攻毒数量	攻毒剂量 (ml)	结果
第1组	5	4	5/5典型发病,5/5死亡
第2组	5	2	5/5典型发病,4/5死亡
第3组	5	1	3/5典型发病,1/5死亡
第4组	5	2	0/5典型发病,0/5死亡

[0118] 对从被剖检猪只中分离的病毒进行PCR分析，结果显示为PEDV阳性；TGEV、轮状病毒和猪细小病毒阴性。同时上述分离的病毒液接种Vero细胞后，出现与实施例1中相同的细胞病变。这表明本试验中引起仔猪腹泻的确实为猪流行性腹泻病毒。攻毒试验结果见表1，可见，实施例1分离到的HN1301株为猪流行性腹泻强毒株。

[0119] 实施例3：猪流行性腹泻病毒HN1301株的传代致弱

[0120] 1. 猪流行性腹泻病毒HN1301株连续传代培养

[0121] 选用生长良好的单层Vero细胞，弃细胞生长液，用PBS清洗2次后，每瓶按培养液量5%加入病毒液，37℃吸附1h，吸附期间轻摇细胞培养瓶5次，加入终浓度为10μg/ml胰蛋白酶的无血清细胞维持液，于37℃培养。当细胞病变(CPE)达到80%以上时收获培养物，按相同方法连续传代培养至100代。

[0122] 2. 病毒不同代次的致病性试验

[0123] 选取HN1301株培养至第5、20、35、65、80和100代的病毒液，分别测定其对3日龄仔猪的致病性。仔猪均未吃初乳，以奶粉人工饲养。每个代次的病毒液攻击5头仔猪，攻毒途径为口服，攻毒剂量为每头猪2ml ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)，另外设置阴性对照组(口服安慰剂)。攻毒后观察各组仔猪的精神状态、食欲，以及有无呕吐、水样腹泻典型症状。

[0124] 3. 试验结果

[0125] HN1301株第5代致病力较强，仔猪发病率和死亡率分别为100% (5/5) 和40% (2/5)；第20代导致80% (4/5) 仔猪发病，20% (1/5) 死亡；培养第35代致病力明显减弱，仔猪发病率为20% (1/5)，且病程较短，仅1天即恢复正常；第65、80和100代对3日龄仔猪均无致病性。详细结果见表2。

[0126] 根据试验结果，拟选取第60代病毒作为弱毒疫苗株。

[0127] 表2 HN1301株不同代次的致病性试验结果

	HN1301 株代次	仔猪 日龄	仔猪 数量	接种量	发病率(水 样腹泻)	死亡率
[0128]	5	3	5	$2 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$	100% (5/5)	40% (2/5)
	20	3	5	$2 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$	80% (4/5)	20% (1/5)
	35	3	5	$2 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$	20% (1/5)	0% (0/5)
	65	3	5	$2 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$	0% (0/5)	0% (0/5)
	80	3	5	$2 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$	0% (0/5)	0% (0/5)
[0129]	100	3	5	$2 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$	0% (0/5)	0% (0/5)
	对照	3	5	2ml 安慰剂	0% (0/5)	0% (0/5)

[0130] 实施例4:弱毒株的基因序列特征分析

[0131] 参照Park, et al 2007 (Park, S. J., Song, D. S., Ha, G. W., Park, B. K., 2007. Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13. Virus Genes 35, 55-64.) 设计的引物, 引物序列见表3, 分3段扩增PEDV的S基因。

[0132] 表3 HN1301弱毒株的S基因扩增引物

基因	引物序列 (5'-3')	目标片段大小 (bp)
[0133] S	SF1: TCATCCATTAGTGATGTGTGTTA	1654
	SR1: GCC(A)GCAGAGACAGTAATA TAACA	
	SF2: GTGTTCTCAGGTTGCTTTTGACCT	1593
	SR2: AAAGACTCAGCAAGCAATTGCTGG	
	SF3: GTACAGTGCGTCTCTCATCGGTGG	1422
	SR3: TCTAATTGGA ACTACATTGAGCTC	

[0134] 将获得的基因扩增产物回收、纯化, 连接载体, 转化后提取质粒送公司测序。用Clustal、DNASTAR等分子生物学软件进行核苷酸和氨基酸序列比对。

[0135] 结果显示: PEDV HN1301株病毒培养至35代后, 其与亲本毒株及国内外其它流行毒株相比, S基因的C末端出现特征性变化。即:

[0136] HN1301株: 第35、64、96代均在4129nt处GAA突变为TAA; 相应地, 在1377aa处氨基酸“E”突变为终止密码子, 使原有最末端9个aa“EAFKVVHVQ”终止表达, 而在培养传代35代以前则无此变化。具体的比对结果见图1、图2, 图中选则了培养传代35代以前的代表菌株, 即第4代培养菌株, 以及第35、64、96代培养菌株之间的S基因和S蛋白之间的比对。

[0137] 实施例5: 弱毒株的安全性试验

[0138] 1毒力返强试验:

[0139] 1.1 试验方法: 将实施例3制备的PEDV HN1301株第60代培养物 ($10^{6.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) 口

服接种未吃初乳的3日龄人工饲养仔猪,第1组5头仔猪分别口服2ml,接种后72h迫杀,观察胃肠道组织有无眼观异常,并制备小肠组织滤液(各个体混合液),取小肠组织滤液2ml口服接种第2组3日龄仔猪,待72h后迫杀,以上述同样的方法观察并接种第3组仔猪,依次类推,共连续接种5代(共5组)。

[0140] 1.2试验结果:在3日龄仔猪连续传代5代,试验仔猪临床观察和胃肠道大体剖检均未见明显异常,表明该疫苗株无毒力返强。

[0141] 2安全性试验

[0142] 2.1试验动物:妊娠70-80天的健康怀孕母猪、未吃初乳的3日龄仔猪,PEDV抗原抗体检测均为阴性。

[0143] 2.2试验方法:将制备的PEDV HN1301株第60代培养物($10^{6.5}$ TCID₅₀/ml)分别肌肉注射接种妊娠70-80天的怀孕母猪和3日龄仔猪,作一次超剂量接种安全性试验:每组各10头猪,各接种10头份,同时设阴性对照猪各5头(接种10头份等量的无病毒培养液)。接种后观察动物精神状态、采食、体温、接种部位的局部反应及其它临床表现(呕吐、腹泻等)。对于仔猪连续观察21天,对于母猪除上述指标外,另外观察其产仔情况,有无流产死胎等异常。

[0144] 2.3试验结果见表4、表5。

[0145] 表4 仔猪安全性试验结果

病毒代次	仔猪数	接种剂量	体温反应数	局部炎症	采食	临床反应		病理变化
						腹泻	呕吐	
[0146] 60	10	10头份	2/10	无	正常	无	无	无
阴性对照	5	10头份 无病毒	1/10	无	正常	无	无	无

[0147]		培养液						
--------	--	-----	--	--	--	--	--	--

[0148] 表5 母猪安全性试验结果

病毒代次	母猪数	接种剂量	体反 应数	局部 炎症	采 食	临床反应	
						腹泻	流产
[0149] 60	10	10头份	0/10	无	正常	无	无
阴性对照	5	10头份 无病毒 培养液	0/10	无	正常	无	无

[0150] 对仔猪安全性:均未见明显异常,安全。对妊娠母猪安全性:未见临床异常反应,产仔正常,未见流产,安全。

[0151] 试验结果证明,HN1301株弱毒株对妊娠母猪和仔猪均安全。

[0152] 实施例6:弱毒株的免疫效力试验

[0153] 试验动物:PEDV抗体阴性的怀孕母猪及仔猪。

[0154] 检验用强毒:HN1301株第5代($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)。

[0155] 试验方法:

[0156] 主动免疫试验:取实施例3制备的HN1301株第60代弱毒株以肌肉注射方式接种3日龄仔猪,作1次接种,剂量2ml/头,于仔猪21日龄时以HN1301株第5代病毒液口服攻毒。同时设立攻毒对照组,不接种仅攻毒。

[0157] 被动免疫试验:对产前42天的怀孕母猪以肌肉注射接种HN1301株第60代弱毒株,剂量2ml/头,间隔21天再次肌注2ml HN1301株第60代弱毒株。待母猪所产仔猪3日龄时口服第5代病毒液作攻击。同时设立攻毒对照组,不免疫仅攻毒。

[0158] 试验结果见表6、表7:

[0159] 表6 HN1301弱毒株主动免疫效力试验结果

代次	仔猪	接种	攻毒	攻毒	发病	保护率
	数量	途径	途径	剂量	率	
60	10	肌注	口服	2ml	1/10	9/10 (90%)
攻毒对照组	10	/	口服	2ml	8/10	/

[0162] 表7 HN1301弱毒株被动免疫效力试验结果

代次	母猪 编号	接种 途径	产仔 数量	攻毒 剂量	发病 率	保护率
60	1	肌注	13	2ml	1/13	12/13 (92%)
60	2	肌注	9	2ml	0/9	9/9 (100%)
60	3	肌注	10	2ml	2/10	8/10 (80%)
攻毒对照组	4	/	11	2ml	10/11	/

[0164] 结果表明,本发明HN1301株60代弱毒株对PEDV强毒的攻击具有良好的免疫保护力。

[0165] 实施例7:HN1303人工致弱毒株的构建及其致病性、安全性和效力

[0166] 1.HN1303人工致弱毒株的构建

[0167] 采用陈建飞2012年的《猪流行性腹泻病毒全基因组序列分析及感染性cDNA克隆的构建》论文(陈建飞.2012.猪流行性腹泻病毒全基因组序列分析及感染性cDNA克隆的构建.博士学位论文)中描述的方法,以HN1303株作为亲本,构建包含其全基因组的感染性克隆,命名为HN1303-C。以商品化试剂盒Fast Mutagenesis System对其S基因4132位进行点突变即G4132T,使对应的1378位氨基酸由“E”突变为终止翻译,使原有最末端9个aa“EVFEKVHVQ”终止表达。将突变后的毒株命名为HN1303_{mut}株,培养HN1303_{mut}株1代至65代之间,取其培养物,通过动物试验验证其致病性、安全性和效力。

[0168] 2.HN1303_{mut}株的致病性:

[0169] 选取以上步骤制备的HN1303_{mut}株病毒液1代、30代、45代、65代培养物,测定其对3日龄仔猪的致病性。分别口服接种10头仔猪,剂量为每头猪2ml ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)。另外设置强毒对照组(接种HN1301P5代)和阴性对照组5头(口服安慰剂),接种后观察仔猪的精神状态、食欲,有无呕吐、水样腹泻症状。

[0170] 试验结果:强毒对照组和阴性对照组成立。而HN1303_{mut}各接种组连续观察21天,均未见明显的临床症状。结果见表8。表明该突变株对3日龄仔猪丧失致病性。

[0171] 表8 HN1303_{mut}株的致病性试验结果

组别	仔猪 日龄	仔猪 数量	接种量	发病率(水 样腹泻)	死亡率
HN1303 _{mut} 1 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
HN1303 _{mut} 30 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
HN1303 _{mut} 45 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
HN1303 _{mut} 65 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
强毒对照	3	5	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	5/5	1/5
阴性对照	3	5	2ml 安慰剂	0/5	0/5

[0172] 致病性试验表明,猪流行性腹泻病毒HN1303_{mut}株连续培养1代至65代之间,对猪致病力显著降低。3日龄仔猪接种后,不出现临床症状。因此,该病毒与亲本强毒株猪流行性腹泻病毒HN1303株相比,致病力显著降低,是人工致弱的病毒株。

[0173] 3. HN1303_{mut}株的安全性

[0174] 毒力返强试验:

[0175] 试验方法:以实验室制备的HN1303_{mut}株病毒液 ($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml) 口服接种未吃初乳的3日龄人工饲养仔猪,第一组5头仔猪分别口服2ml,接种后72h处死,观察胃肠道组织有无肉眼异常,并制备小肠组织滤液(各个体混合液),取小肠组织滤液2ml口服接种第二组3日龄仔猪,待72h后处死,以上述同样的方法观察并接种第三组仔猪,依次类推,共连续接种5代(共5组)。

[0176] 试验结果:在3日龄仔猪连续传代5代,试验仔猪临床观察和胃肠道大体剖检均未见明显异常,表明HN1303_{mut}株无毒力返强。

[0177] 采用上述方法检测HN1303_{mut}株30代、45代、65代培养物,试验结果表明,培养1代至65代的HN1303_{mut}株病毒,接种后在猪群中连续体内传代多次,不发生返强。因此,病毒接种猪群后,不会重新演变为强毒而引发病,安全性有保证。

[0178] 安全性试验

[0179] 试验动物:妊娠70-80天的健康怀孕母猪、未吃初乳的3日龄仔猪, PEDV抗原抗体检

测均为阴性。

[0181] 试验方法:以上述步骤制备的HN1303_{mut}株病毒液 ($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml) 分别肌肉注射接种妊娠70-80天的怀孕母猪和3日龄仔猪,作一次超剂量接种的安全性试验,每组各10头猪,各接种10头份,同时设阴性对照猪各5头(接种10头份无病毒培养液)。接种后观察动物精神状态、采食、体温、接种部位的局部反应及其它临床表现(呕吐、腹泻等)。对于仔猪连续观察21天,对于母猪除上述指标外,另观察其产仔情况,有无流产死胎等异常。

[0182] 试验结果见表9、表10。

[0183] 表9 HN1303_{mut}株仔猪安全性试验结果

组别	仔猪数	接种剂量	体温反应数	局部炎症	采食	临床反应		病理变化
						腹泻	呕吐	
[0184] HN1303 _{mut} 株	10	10 头份	1/10	无	正常	无	无	无
阴性对照	5	10 头份 无病毒培养液	0/10	无	正常	无	无	无

[0185] 表10 HN1303_{mut}株母猪安全性试验结果

组别	母猪数	接种剂量	体温反应数	局部炎症	采食	临床反应	
						腹泻	流产
[0186] HN1303 _{mut} 株	10	10 头份	0/10	无	正常	无	无
阴性对照	5	10 头份 无病毒培养液	0/10	无	正常	无	无

[0187] 对仔猪安全性:均未见明显异常,安全。对妊娠母猪安全性:未见临床异常反应,产仔正常,未见流产,安全。试验结果表明,妊娠母猪和仔猪接种HN1303_{mut}株均安全。

[0188] 4. HN1303_{mut}株的免疫效力

[0189] 试验动物:PEDV抗体阴性的怀孕母猪及仔猪。

[0190] 检验用强毒:HN1301株第5代 ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)。

[0191] 试验方法:

[0192] 主动免疫试验:取HN1303_{mut}株病毒1代、30代、45代、65代培养物以肌肉注射方式接种3日龄仔猪,作1次接种,剂量为2ml/头,于仔猪21日龄时以HN1301株第5代病毒液口服攻毒。同时设立攻毒对照组,不接种仅攻毒。

[0193] 被动免疫试验:对产前42天的怀孕母猪以肌肉注射接种HN1303_{mut}株病毒,剂量为2ml/头,间隔21天再次肌注2ml。待母猪所产仔猪3日龄时口服HN1301株第5代病毒液作攻击。同时设立攻毒对照组,不免疫仅攻毒。

[0194] 试验结果见表11、表12:

[0195] 表11 HN1303_{mut}株的主动免疫效力试验结果

组别	仔猪	接种	攻毒	攻毒	发病	保护率
	数量	途径	途径	剂量	率	

HN1303 _{mut} 株	10	肌注	口服	2ml	2/10	8/10 (80%)
攻毒对照组	10	/	口服	2ml	9/10	/

[0198] 表12 HN1303_{mut}株的被动免疫效力试验结果

组别	母猪	接种	产仔	攻毒	发病	保护率
	编号	途径	数量	剂量	率	
HN1303 _{mut} 株	1	肌注	10	2ml	2/10	8/10(80%)
HN1303 _{mut} 株	2	肌注	9	2ml	1/9	8/9 (88%)
攻毒对照组	3	/	8	2ml	8/8	/

[0200] 结果表明:HN1303_{mut}株对PEDV强毒的攻击具有良好的效力。

[0201] 采用上述方法检测HN1303_{mut}株30代、45代、65代培养物免疫效力,免疫原性试验表明,猪流行性腹泻病毒HN1303_{mut}株培养至第65代,仍具有良好的免疫原性。3日龄仔猪接种后,于21日龄可抵御强毒猪流行性腹泻病毒HN1301株的攻击,同时,未接种猪流行性腹泻病毒HN1303_{mut}株培养物的猪,则不能抵抗强毒猪流行性腹泻病毒HN1301株的攻击,至少4/5发病。

[0202] 实施例8 Iowa18984人工致弱毒株的构建及其安全性和效力

[0203] 1. Iowa18984人工致弱毒株的构建

[0204] 参照实施例7描述的方法,构建美国流行强毒株Iowa18984 (GenBank accession No. KF804028) 的人工突变株Iowa18984_{mut}。使其S基因4132位点突变即G4132T,使对应的1378位氨基酸由“E”突变为终止翻译,使原有最末端9个aa“EVFEKVHVQ”终止。培养Iowa18984_{mut}株1代至65代之间,取其培养物,通过动物试验验证其致病性、安全性和效力。

[0205] 2. Iowa18984_{mut}株的致病性:

[0206] 选取以上步骤制备的Iowa18984_{mut}株病毒液1代、30代、45代、65代培养物,测定其对3日龄仔猪的致病性。各口服接种10头仔猪,剂量为每头猪2ml ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)。另外设置强毒对照组(接种HN1301株5代)和阴性对照组5头(口服安慰剂),接种后观察仔猪的精神状态、食欲,有无呕吐、水样腹泻症状。

[0207] 试验结果:强毒对照组和阴性对照组成立。而Iowa18984_{mut}各代次接种组连续观察21天,均未见明显的临床症状。详细结果见表13。表明该突变株对3日龄仔猪丧失致病性。

[0208] 表13 Iowa18984_{mut}株致病性试验结果

组别	仔猪 日龄	仔猪 数量	接种量	发病率(水 样腹泻)	死亡率
Iowa18984 _{mut} 1 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
Iowa18984 _{mut} 30 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
Iowa18984 _{mut} 45 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
Iowa18984 _{mut} 65 代组	3	10	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	0/10	0/10
强毒对照	3	5	$2 \times 10^{5.0}$ TCID ₅₀	5/5	2/5
阴性对照	3	5	2ml 安慰剂	0/5	0/5

[0210] 致病性试验表明,猪流行性腹泻病毒Iowa18984_{mut}株连续培养1代至65代之间,对猪致病力显著降低。3日龄仔猪接种后,不出现临床症状。因此,该病毒与亲本强毒株猪流行性腹泻病毒Iowa18984株相比,致病力显著降低,是人工致弱的病毒株。

[0211] 3. Iowa18984_{mut}株的安全性

[0212] 毒力返强试验:

[0213] 试验方法:以实验室制备的Iowa18984_{mut}株病毒液($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml)口服接种未吃初乳的3日龄人工饲养仔猪,第一组5头仔猪分别口服2ml,接种后72h处死,观察胃肠道组织有无肉眼异常,并制备小肠组织滤液(各个体混合液),取小肠组织滤液2ml口服接种第二组3日龄仔猪,待72h后处死,以上述同样的方法观察并接种第三组仔猪,依次类推,共连续接种5代(共5组)。

[0214] 试验结果:在3日龄仔猪连续传代5代,试验仔猪临床观察和胃肠道大体剖检均未见明显异常,表明Iowa18984_{mut}株无毒力返强。

[0215] 采用上述方法检测Iowa18984_{mut}株30代、45代、65代培养物,病毒返强试验表明,培养1代至65代的病毒,接种后在猪群中连续体内传代多次,不发生返强。因此,病毒接种猪群后,不会重新演变为强毒而引发病,安全性有保证。

[0216] 安全性试验

[0217] 试验动物:妊娠70-80天的健康怀孕母猪、未吃初乳的3日龄仔猪, PEDV抗原抗体检测均为阴性。

[0218] 试验方法:以实验室制备的Iowa18984_{mut}株病毒液($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml)分别肌肉注射接种妊娠70-80天的怀孕母猪和3日龄仔猪,作一次超剂量接种的安全性试验,每组各10头猪,各接种10头份,同时设阴性对照猪各5头(接种10头份无病毒培养液)。接种后观察动物精神状态、采食、体温、接种部位的局部反应及其它临床表现(呕吐、腹泻等)。对于仔猪连续观察21天,对于母猪除上述指标外,另观察其产仔情况,有无流产死胎等异常。

[0219] 试验结果见表14、表15。

[0220] 表14 Iowa18984_{mut}株仔猪安全性试验结果

组别	仔猪数	接种剂量	体温反应数	局部炎症	采食	临床反应		病理变化
						腹泻	呕吐	
[0221] Iowa18984 _{mut} 株	10	10头份	1/10	无	正常	无	无	无
阴性对照	5	10头份 无病毒 培养液	1/10	无	正常	无	无	无

[0222] 表15 Iowa18984_{mut}株母猪安全性试验结果

组别	母猪数	接种剂量	体温反应数	局部炎症	采食	临床反应	
						腹泻	流产
[0224] Iowa18984 _{mut}	10	10头份	0/10	无	正常	无	无
对照	5	10头份 无病毒 培养液	0/10	无	正常	无	无

[0225] 对仔猪安全性:均未见明显异常,安全。对妊娠母猪安全性:未见临床异常反应,产仔正常,未见流产,安全。试验结果表明,妊娠母猪和仔猪接种Iowa18984_{mut}株均安全。

[0226] 4. Iowa18984_{mut}株的免疫效力

[0227] 试验动物:PEDV抗体阴性的怀孕母猪及仔猪。

[0228] 检验用强毒:HN1301株第5代($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)。

[0229] 试验方法:

[0230] 主动免疫试验:取Iowa18984_{mut}株病毒1代、30代、45代、65代培养物以肌肉注射方式接种3日龄仔猪,作1次接种,剂量为2ml/头,于仔猪21日龄时以HN1301株第5代病毒液口服攻毒。同时设立攻毒对照组,不接种仅攻毒。

[0231] 被动免疫试验:对产前42天的怀孕母猪以肌肉注射接种Iowa18984_{mut}株病毒,剂量为2ml/头,间隔21天再次肌注2ml。待母猪所产仔猪3日龄时口服HN1301株第5代病毒液作攻击。同时设立攻毒对照组,不免疫仅攻毒。

[0232] 试验结果见表16、表17:

[0233] 表16 Iowa18984_{mut}株的主动免疫效力试验结果

组别	仔猪数量	接种途径	攻毒途径	攻毒剂量	发病率	保护率
[0234] Iowa18984 _{mut} 株	10	肌注	口服	2ml	2/10	8/10 (80%)
攻毒对照	5	/	口服	2ml	4/5	/

[0235] 表17 Iowa18984_{mut}株的被动免疫效力试验结果

组别	母猪	接种	产仔	攻毒剂	发病	保护率
[0236]	编号	途径	数量	量	率	
[0237] Iowa18984 _{mut} 株	1	肌注	9	2ml	2/9	7/9 (77%)
Iowa18984 _{mut} 株	2	肌注	7	2ml	1/7	6/7 (86%)
攻毒对照	3	/	11	2ml	11/11	/

[0238] 结果表明:Iowa18984_{mut}株对PEDV强毒的攻击具有良好的效力。

[0239] 采用上述方法检测Iowa18984_{mut}株30代、45代、65代培养物免疫效力,免疫原性试验表明,猪流行性腹泻病毒Iowa18984_{mut}株培养至第65代,仍具有良好的免疫原性。3日龄仔猪接种后,于21日龄可抵御强毒猪流行性腹泻病毒HN1301株的攻击,同时,未接种猪流行性腹泻病毒Iowa18984_{mut}株培养物的猪,则不能抵抗强毒猪流行性腹泻病毒HN1301株的攻击,至少4/5发病。

[0240] 实施例9 猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株S蛋白的制备

[0241] 1. 实施例3制备的毒株PEDV分离株HN1301弱毒株。

[0242] 2. 特异性引物

[0243] F: ATGAAGTCTTTAACCTACTTCTG

[0244] R: TCACTGCACGTGGACCTTTTCA

[0245] 3. S蛋白制备

[0246] 取PEDV HN1301弱毒株病毒液,提取病毒RNA,以随机引物反转录,用上述特异性引物进行扩增。取目的产物连接pMD18-T克隆载体,制备阳性重组质粒pMD18-T-S,挑选阳性重组质粒pMD18-T-S使用特异性引物进行扩增,将扩增产物连接表达载体pGEX-6P-1,并转化大肠杆菌JM109,筛选阳性克隆。将构建的阳性表达质粒转入表达宿主菌BL21中,挑选单克隆,接种到含有氨苄青霉素的LB培养基中,用IPTG进行诱导表达,即得到PEDV S蛋白。

[0247] 实施例10 猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株S蛋白的免疫原性试验

[0248] 选择2头预产期相同的待产健康母猪,PEDV抗体抗原阴性。其中1头母猪接种猪流行性腹泻病毒HN1301弱毒株,1头母猪接种实施例9制备的75 μ g/ml S蛋白,共2ml。2头母猪均于产前7周进行首免,颈部肌肉接种1头份,产前4周以相同方法和剂量进行二免。HN1301弱毒疫苗和S蛋白免疫的母猪,各选10头状态良好的仔猪用于攻毒试验。其中各有5头母乳喂养;5头不吃母乳,人工饲养。仔猪3日龄时,用HN1301毒株(P5代,10^{5.0}TCID₅₀/ml,2ml/头)进行口服攻毒,仔猪分组及攻毒情况见表18。

[0249] 表18 PEDV S蛋白攻毒保护比较结果

组别	仔猪数	母猪接种疫苗	饲养方式	攻毒毒株	攻毒方式	保护率
[0250] 1	5	弱毒疫苗	母乳	HN1301	口服	5/5
2	5	S 蛋白	母乳	HN1301	口服	4/5
3	5	弱毒疫苗	人工	HN1301	口服	0/5
4	5	S 蛋白	人工	HN1301	口服	0/5

[0251] 结果显示,HN1301弱毒疫苗免疫组未见异常临床症状,5/5保护;PEDV S蛋白免疫仔猪4/5保护,有1头仔猪出现轻微腹泻;对照组则5/5发病,出现典型的腹泻症状。该结果说明本研究中表达的S蛋白有较好的免疫原性,能够产生较好的保护力。

[0252] 以上所述仅是本发明的优选实施例而已,并非对本发明做任何形式上的限制,虽然本发明已以优选实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案的范围内,当可利用上述揭示的技术内容作出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

SEQUENCE LISTING

- <110> 普莱柯生物工程股份有限公司
 <120> 猪流行性腹泻病毒弱毒株及其制备的疫苗组合物和应用
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 4158
 <212> DNA
 <213> 猪流行性腹泻病毒 HN1301 弱毒株

<400> 1
 atgaagcttt taacctactt ctggttggtc ttaccagtac tttcaacact tagcctacca 60
 caagatgtca ccaggtgctc agctaacact aattttaggc ggttcttttc aaaatttaat 120
 gttcaggcgc ctgcagttgt tgtactgggc ggttatctac ctattggtga aaaccagggt 180
 gtcaattcaa cttggtactg tgctggccaa catccaactg ctagtggcgt tcatggtatc 240
 tttcttagcc atattagagg tggtcatggc tttgagattg gcatttcgca agagcctttt 300
 gaccctagtg gttaccagct ttatttacct aaggctacta acggtaacac taatgctact 360
 gcgcgactgc gcatttgcca gtttcccagc attaaaacat tgggccccac tgctaataat 420
 gatgttacia caggtcgtaa ctgcctattt aacaaagcca tcccagctca tatgagtga 480
 [0001] catagtgttg tcggcataac atgggataat gatcgtgtca ctgtcttttc tgacaagate 540
 tattattttt attttaaaaa tgatttggtc cgtgttgca caaagtgtta caacagtgga 600
 ggttggtgcta tgcaatatgt ttacgaacct acttactaca tgcttaatgt tactagtgt 660
 ggtgaggatg gtatttctta tcaacctgt acagctaatt gcattggtta tgctgccaat 720
 gtatttgcta ctgagcccaa tggccacata ccagaagggt ttagttttaa taattggttt 780
 cttttgtcca atggttccac tttggtgcat ggtaagggtg tttccaacca accattggtg 840
 gtcaattgtc ttttgccat tcctaagatt tatggactag gccaattttt ctctttaat 900
 caaacgatcg atggtgtttg taatggagct gctgtgcagc gtgcaccaga ggctctgagg 960
 tttaatatta atgacacttc tgtcattctt gctgaaggct caattgtact tcatactgct 1020
 ttaggaacaa attttcttt tgtttgcagt aatctctcaa atcctcactt agccaccttt 1080
 gccatacttc tgggtgctat ccaagtacc tattattggt ttcttaaagt ggatacttac 1140
 aactccactg tttataaatt cttggtgtt ttacctccta ccgtcagga aattgtcatc 1200
 accaagtatg gtgatgttca tgtcaatggg tttggctact tgcactctgg tttgttgat 1260
 gctgtcacia ttaatttcac tggtcatggc actgacgatg acgtttctgg tttttggacc 1320
 atagcatcga ctaattttgt tgatgcactt atcgaagtte aaggaactgc cattcagcgt 1380
 attctttatt gtgatgatcc tgttagccaa ctcaagtgt ctcaggttgc ttttgacctt 1440
 gacgatggtt tttaccctat ttctctaca aaccttctga gtcataaaca gccacttct 1500
 tttgttactt tgccatcatt taatgatcat tcttttgta atattactgt ctctgctgct 1560
 tttggtggtc atagtgggtc caaccttatt gcacttgaca ctactatcaa tggttttagt 1620
 tctttctgtg ttgacactag acaatttacc atttactgt tttataacgt tacaacagct 1680
 tatggttacg tgtctaaatc acaggacagt aattgccctt ttacctgca atctgttaat 1740
 gattacctgt cttttagcaa attttggtt tctaccagcc ttttggttag tgctgttacc 1800
 atagatcttt ttggttacc tgagtttgg agtgggtgta agttcacgct cctttacttt 1860
 caattcacia aggttgagtt gattactggc acgcctaac catttgaagg tgttacggac 1920
 gtttctttta tgactctgga tgtgtgtacc aagtatacta tctatggctt taagggtgag 1980

```

ggatcatta cccttaca aa ttctagcttt ttggcaggtg tttattatac atctgattct 2040
ggacagttgt tagcttttaa gaatgtcact agtgggtgctg tttattctgt tacgccatgt 2100
tctttttcag agcaggctgc atagtgtgat gatgatatag tgggtgttat ttctagtttg 2160
tctaactcca cttttaacag tactagggag ttgacctggtt tcttctacca ttctaagatg 2220
ggctctaatt gtacagagcc tgtgttggtg tatagtaaca taggtgtttg taaatctggc 2280
agtattggct atgtcccac tcagctcggc caagtcaaga ttgcacccac ggttactggg 2340
aatattagta ttcccaccaa ctttagtatg agtattagga cagaatattt acagctttac 2400
aacacgcctt ttagtgttga ttgtgctaca tatgtttgta atggtaactc tcgttgtaaa 2460
catttactca cccagtacac tgcagcatgt aagactatag agtcagcatt acaactcagc 2520
gctaggcttg agtctgctga agtcaactct atgcttacta tttctgaaga ggctctacag 2580
ttagctacca tcagtctggt taatgggtgat ggaataaatt ttactaatgt gctgggtgtt 2640
tccgtgtatg accctgcaag tggcaggggtg gtacaaaaaa ggtctttcat tgaagacctg 2700
cttttaata aagtgtttac taatggcctt ggtactgttg atgaagacta taagcgtgt 2760
tctaattggc gctctgtggc agatttagtc tgtgcgcagt attactctgg tgtcatggta 2820
ctacctggtg ttgttgacgc tgagaagctt catatgtata gtgcgtctct catcgggtgt 2880
atgggtctag gaggttttac tgcagcagcg gcattgcctt ttagctatgc tgttcaagcg 2940
agactgaatt atcttgcct acagacggat gttctacagc ggaaccagca attgcttget 3000
gagtctttta attctgctat tggtagtata acttcagccg ttgagagtgt taaagagtct 3060
attagtcaaa cttctaaggg tttgaacact gtggctcatg cgcttacc aa ggtccaagag 3120
gttgtaatt cgcaggggtg agctttgacc caacttaccg tacagctgca acacaacttc 3180
caagccattt ctagtctctat tgatgacatt tactcccagc ttgacattct ttcagccgat 3240
gttcaggtag accgtctcat caccggcaga ttatcagcac ttaatgcttt tgttgcctaa 3300
acccttacta agtatactga ggttcaggct agcaggaaac tagcacagca aaaggttaat 3360
gagtgcgtta aatcgcaatc tcagcgttat ggtttttgtg gtggtgatgg cgagcacatt 3420
ttctctctgg tacaggccgc acctcaaggc ctgctgtttt tacacacagt acttgtaccg 3480
ggtgactttg taaatgttat tgccatcget ggcttatgtg ttaacgatga aattgccttg 3540
actctacgtg agcctggttt agtcttgttt acgcatgaac ttcaagatac tgcgacggaa 3600
tattttgttt catcgcggcg tatgtatgaa cctagaaaac ctaccgttgg tgattttgtt 3660
caaattgaga gttgtgtggt cacctatgtc aatttgacta gagaccaact accacaagta 3720
atccagatt acatcgatgt taacaaaaca cttgatgaga ttttagcctc tctgcccaat 3780
agaactggtc caagtctttc tctagatgtt tttaatgcca cttatcttaa tctcactggt 3840
gaaattgcag atttagagca gcgttcagag tctctccgta atactacaga agagctccaa 3900
agtcttatat ataatatcaa caacacacta gttgacctg agtggctcaa ccgagttgag 3960
acatatatca agtggccgtg gtgggtttgg ttgattattt ttattgttct catctttgtt 4020
gtgtcattac tagtgttctg ctgcatttcc acgggttgtt gtggatgctg cggctgctgt 4080
ggtgcttggt tttcaggttg ttgtaggggt cctagacttc aaccttacta agcttttgaa 4140
aaggtccacg tgcagtga
    
```

[0002]

- <210> 2
- <211> 1376
- <212> PRT
- <213> 猪流行性腹泻病毒 HN1301 弱毒株
- <400> 2

```

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

Trp Tyr Cys Ala Gly Gln His Pro Thr Ala Ser Gly Val His Gly Ile
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser His Ile Arg Gly Gly His Gly Phe Glu Ile Gly Ile Ser
 85 90 95
 Gln Glu Pro Phe Asp Pro Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Leu His Lys Ala
 100 105 110
 Thr Asn Gly Asn Thr Asn Ala Thr Ala Arg Leu Arg Ile Cys Gln Phe
 115 120 125
 Pro Ser Ile Lys Thr Leu Gly Pro Thr Ala Asn Asn Asp Val Thr Thr
 130 135 140
 Gly Arg Asn Cys Leu Phe Asn Lys Ala Ile Pro Ala His Met Ser Glu
 145 150 155 160
 His Ser Val Val Gly Ile Thr Trp Asp Asn Asp Arg Val Thr Val Phe
 165 170 175
 Ser Asp Lys Ile Tyr Tyr Phe Tyr Phe Lys Asn Asp Trp Ser Arg Val
 180 185 190
 Ala Thr Lys Cys Tyr Asn Ser Gly Gly Cys Ala Met Gln Tyr Val Tyr
 195 200 205
 Glu Pro Thr Tyr Tyr Met Leu Asn Val Thr Ser Ala Gly Glu Asp Gly
 210 215 220
 Ile Ser Tyr Gln Pro Cys Thr Ala Asn Cys Ile Gly Tyr Ala Ala Asn
 225 230 235 240
 Val Phe Ala Thr Glu Pro Asn Gly His Ile Pro Glu Gly Phe Ser Phe
 245 250 255
 Asn Asn Trp Phe Leu Leu Ser Asn Gly Ser Thr Leu Val His Gly Lys
 260 265 270
 Val Val Ser Asn Gln Pro Leu Leu Val Asn Cys Leu Leu Ala Ile Pro
 275 280 285
 Lys Ile Tyr Gly Leu Gly Gln Phe Phe Ser Phe Asn Gln Thr Ile Asp
 290 295 300
 Gly Val Cys Asn Gly Ala Ala Val Gln Arg Ala Pro Glu Ala Leu Arg
 305 310 315 320
 Phe Asn Ile Asn Asp Thr Ser Val Ile Leu Ala Glu Gly Ser Ile Val
 325 330 335
 Leu His Thr Ala Leu Gly Thr Asn Phe Ser Phe Val Cys Ser Asn Ser
 340 345 350
 Ser Asn Pro His Leu Ala Thr Phe Ala Ile Pro Leu Gly Ala Ile Gln
 355 360 365
 Val Pro Tyr Tyr Cys Phe Leu Lys Val Asp Thr Tyr Asn Ser Thr Val
 370 375 380
 Tyr Lys Phe Leu Ala Val Leu Pro Pro Thr Val Arg Glu Ile Val Ile
 385 390 395 400
 Thr Lys Tyr Gly Asp Val His Val Asn Gly Phe Gly Tyr Leu His Leu
 405 410 415
 Gly Leu Leu Asp Ala Val Thr Ile Asn Phe Thr Gly His Gly Thr Asp
 420 425 430
 Asp Asp Val Ser Gly Phe Trp Thr Ile Ala Ser Thr Asn Phe Val Asp
 435 440 445
 Ala Leu Ile Glu Val Gln Gly Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Tyr Cys
 450 455 460
 Asp Asp Pro Val Ser Gln Leu Lys Cys Thr Gln Val Ala Phe Asp Leu
 465 470 475 480

[0003]

Asp Asp Gly Phe Tyr Pro Ile Ser Ser Thr Asn Leu Leu Ser His Glu
 485 490 495
 Gln Pro Thr Ser Phe Val Thr Leu Pro Ser Phe Asn Asp His Ser Phe
 500 505 510
 Val Asn Ile Thr Val Ser Ala Ala Phe Gly Gly His Ser Gly Ala Asn
 515 520 525
 Leu Ile Ala Ser Asp Thr Thr Ile Asn Gly Phe Ser Ser Phe Cys Val
 530 535 540
 Asp Thr Arg Gln Phe Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Asn Val Thr Asn Ser
 545 550 555 560
 Tyr Gly Tyr Val Ser Lys Ser Gln Asp Ser Asn Cys Pro Phe Thr Leu
 565 570 575
 Gln Ser Val Asn Asp Tyr Leu Ser Phe Ser Lys Phe Cys Val Ser Thr
 580 585 590
 Ser Leu Leu Ala Ser Ala Cys Thr Ile Asp Leu Phe Gly Tyr Pro Glu
 595 600 605
 Phe Gly Ser Gly Val Lys Phe Thr Ser Leu Tyr Phe Gln Phe Thr Lys
 610 615 620
 Gly Glu Leu Ile Thr Gly Thr Pro Lys Pro Phe Glu Gly Val Thr Asp
 625 630 635 640
 Val Ser Phe Met Thr Leu Asp Val Cys Thr Lys Tyr Thr Ile Tyr Gly
 645 650 655
 Phe Lys Gly Glu Gly Ile Ile Thr Leu Thr Asn Ser Ser Phe Leu Ala
 660 665 670
 Gly Val Tyr Tyr Thr Ser Asp Ser Gly Gln Leu Leu Ala Phe Lys Asn
 675 680 685
 Val Thr Ser Gly Ala Val Tyr Ser Val Thr Pro Cys Ser Phe Ser Glu
 690 695 700
 Gln Ala Ala Tyr Val Asp Asp Asp Ile Val Gly Val Ile Ser Ser Leu
 705 710 715 720
 Ser Asn Ser Thr Phe Asn Ser Thr Arg Glu Leu Pro Gly Phe Phe Tyr
 725 730 735
 His Ser Asn Asp Gly Ser Asn Cys Thr Glu Pro Val Leu Val Tyr Ser
 740 745 750
 Asn Ile Gly Val Cys Lys Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Val Pro Ser Gln
 755 760 765
 Ser Gly Gln Val Lys Ile Ala Pro Thr Val Thr Gly Asn Ile Ser Ile
 770 775 780
 Pro Thr Asn Phe Ser Met Ser Ile Arg Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Tyr
 785 790 795 800
 Asn Thr Pro Phe Ser Val Asp Cys Ala Thr Tyr Val Cys Asn Gly Asn
 805 810 815
 Ser Arg Cys Lys His Leu Leu Thr Gln Tyr Thr Ala Ala Cys Lys Thr
 820 825 830
 Ile Glu Ser Ala Leu Gln Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ser Ala Glu Val
 835 840 845
 Asn Ser Met Leu Thr Ile Ser Glu Glu Ala Leu Gln Leu Ala Thr Ile
 850 855 860
 Ser Ser Phe Asn Gly Asp Gly Tyr Asn Phe Thr Asn Val Leu Gly Val
 865 870 875 880
 Ser Val Tyr Asp Pro Ala Ser Gly Arg Val Val Gln Lys Arg Ser Phe
 885 890 895

[0004]

Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Val Thr Asn Gly Leu Gly Thr
 900 905 910
 Val Asp Glu Asp Tyr Lys Arg Cys Ser Asn Gly Arg Ser Val Ala Asp
 915 920 925
 Leu Val Cys Ala Gln Tyr Tyr Ser Gly Val Met Val Leu Pro Gly Val
 930 935 940
 Val Asp Ala Glu Lys Leu His Met Tyr Ser Ala Ser Leu Ile Gly Gly
 945 950 955 960
 Met Val Leu Gly Gly Phe Thr Ala Ala Ala Ala Leu Pro Phe Ser Tyr
 965 970 975
 Ala Val Gln Ala Arg Leu Asn Tyr Leu Ala Leu Gln Thr Asp Val Leu
 980 985 990
 Gln Arg Asn Gln Gln Leu Leu Ala Glu Ser Phe Asn Ser Ala Ile Gly
 995 1000 1005
 Ser Ile Thr Ser Ala Val Glu Ser Val Lys Glu Ser Ile Ser Gln
 1010 1015 1020
 Thr Ser Lys Gly Leu Asn Thr Val Ala His Ala Leu Thr Lys Val
 1025 1030 1035
 Gln Glu Val Val Asn Ser Gln Gly Ala Ala Leu Thr Gln Leu Thr
 1040 1045 1050
 Val Gln Leu Gln His Asn Phe Gln Ala Ile Ser Ser Ser Ile Asp
 1055 1060 1065
 Asp Ile Tyr Ser Arg Leu Asp Ile Leu Ser Ala Asp Val Gln Val
 1070 1075 1080
 Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Ser Ala Leu Asn Ala Phe Val
 1085 1090 1095
 Ala Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Thr Glu Val Gln Ala Ser Arg Lys
 1100 1105 1110
 Leu Ala Gln Gln Lys Val Asn Glu Cys Val Lys Ser Gln Ser Gln
 1115 1120 1125
 Arg Tyr Gly Phe Cys Gly Gly Asp Gly Glu His Ile Phe Ser Leu
 1130 1135 1140
 Val Gln Ala Ala Pro Gln Gly Leu Leu Phe Leu His Thr Val Leu
 1145 1150 1155
 Val Pro Gly Asp Phe Val Asn Val Ile Ala Ile Ala Gly Leu Cys
 1160 1165 1170
 Val Asn Asp Glu Ile Ala Leu Thr Leu Arg Glu Pro Gly Leu Val
 1175 1180 1185
 Leu Phe Thr His Glu Leu Gln Asp Thr Ala Thr Glu Tyr Phe Val
 1190 1195 1200
 Ser Ser Arg Arg Met Tyr Glu Pro Arg Lys Pro Thr Val Gly Asp
 1205 1210 1215
 Phe Val Gln Ile Glu Ser Cys Val Val Thr Tyr Val Asn Leu Thr
 1220 1225 1230
 Arg Asp Gln Leu Pro Gln Val Ile Pro Asp Tyr Ile Asp Val Asn
 1235 1240 1245
 Lys Thr Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ser Leu Pro Asn Arg Thr Gly
 1250 1255 1260
 Pro Ser Leu Ser Leu Asp Val Phe Asn Ala Thr Tyr Leu Asn Leu
 1265 1270 1275
 Thr Gly Glu Ile Ala Asp Leu Glu Gln Arg Ser Glu Ser Leu Arg
 1280 1285 1290

[0005]

	Asn Thr Thr Glu Glu Leu Gln Ser Leu Ile Tyr Asn Ile Asn Asn	
	1295	1300 1305
	Thr Leu Val Asp Leu Glu Trp Leu Asn Arg Val Glu Thr Tyr Ile	
	1310	1315 1320
	Lys Trp Pro Trp Trp Val Trp Leu Ile Ile Phe Ile Val Leu Ile	
	1325	1330 1335
[0006]	Phe Val Val Ser Leu Leu Val Phe Cys Cys Ile Ser Thr Gly Cys	
	1340	1345 1350
	Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Phe Ser Gly Cys Cys	
	1355	1360 1365
	Arg Gly Pro Arg Leu Gln Pro Tyr	
	1370	1375

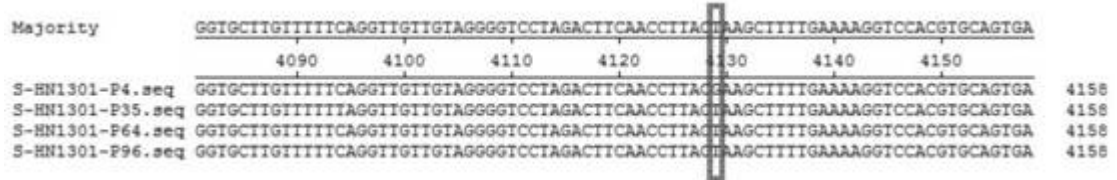


图1

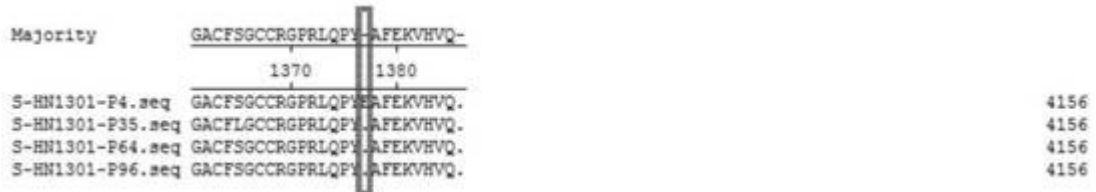


图2