



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106928326 A

(43)申请公布日 2017.07.07

---

(21)申请号	201511021535.8	<i>C12N 7/01</i> (2006.01)
(22)申请日	2015.12.31	<i>C12N 1/21</i> (2006.01)
(71)申请人	中国科学院动物研究所	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
地址	100101 北京市朝阳区北辰西路1号院5号	<i>C07K 1/36</i> (2006.01)
申请人	中国科学院微生物研究所	<i>C07K 1/34</i> (2006.01)
(72)发明人	高福 戴连攀 严景华 李世华 袁园	<i>C07K 1/20</i> (2006.01)
(74)专利代理机构	哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211	<i>C07K 1/18</i> (2006.01)
代理人	耿晓岳	<i>C07K 1/16</i> (2006.01)
(51)Int.Cl.		<i>A61K 39/215</i> (2006.01)
	<i>C07K 14/165</i> (2006.01)	<i>A61P 31/14</i> (2006.01)
	<i>C12N 15/50</i> (2006.01)	
	<i>C12N 15/866</i> (2006.01)	

权利要求书1页 说明书6页  
序列表4页 附图2页

---

(54)发明名称

一种基于二聚化的受体结合区亚单位的冠状病毒疫苗

(57)摘要

本发明公开了一种基于二聚化的受体结合区亚单位的冠状病毒疫苗,属于医药技术领域。本发明通过杆状病毒体在昆虫细胞里表达MERS-CoV蛋白的RBD(E367-Y606)区域和ARS-CoV的RBD(R294-F515),使得RBD可通过S蛋白自身603位的半胱氨酸残基形成二聚体或者通过S蛋白自身512位的半胱氨酸残基形成二聚体,分别使用纯化的RBD蛋白二聚体和单体对Balb/c小鼠进行免疫。本发明的二聚化的RBD克服了RBD单体免疫原性不足的缺点,大大提高了小鼠针对MERS-CoV的中和抗体产生。

1. 一种提高抗原免疫原性的方法,所述方法是表达二聚化的MERS-CoV蛋白或者SARS-CoV蛋白的RBD作为抗原;所述RBD的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:2所示。

2. 一种免疫原性提高的冠状病毒抗原,所述抗原是二聚化的MERS-CoV蛋白或者SARS-CoV蛋白的RBD;所述RBD的氨基酸序列如(1)或(2)所示:

(1)如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;

(2)在(1)中的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个氨基酸或几个氨基酸且具有相同抗原性的由(1)衍生的多肽或其类似物,且其编码的蛋白自身能够形成二聚体。

3. 根据权利要求2所述的冠状病毒抗原,其特征在于,所述RBD的核苷酸序列如SEQ ID NO:3或者SEQ ID NO:4所示。

4. 表达权利要求2-3任一所述冠状病毒抗原的重组载体或者表达盒或者转基因细胞系或者重组菌。

5. 一种冠状病毒抗原的制备方法,其特征在于,所述方法是在SEQ ID NO:3或者SEQ ID NO:4所示核苷酸序列的3'端加上翻译终止密码子,进行克隆表达,筛选正确的重组子,然后转染昆虫细胞进行表达,表达后收集细胞上清,纯化即得到冠状病毒抗原。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述昆虫细胞为昆虫细胞Sf9或者昆虫细胞系Hi5。

7. 一种纯化权利要求2-3任一所述冠状病毒抗原的方法,其特征在于,所述方法是将表达所述抗原的细胞上清液过滤除去细胞碎片,并通过HiTrap QHP阴离子交换柱进行目的蛋白的捕获,随即通过含有1M NaCl的缓冲液洗脱进行粗纯,之后含有目的蛋白的组分上样疏水柱HiTrap Phenyl HP,进行梯度洗脱,将得到的含有目标蛋白的洗脱峰合并,再10K截留浓缩,然后使用Superdex200Hi load 16/60柱子(GE)进行分子筛层析进行纯化。

8. 权利要求2-3任一所述冠状病毒抗原在制备抗冠状病毒药物方面的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述应用是将所述冠状病毒抗原与MF59或者铝佐剂合用。

10. 根据权利要求8或9所述的应用,其特征在于,所述应用是用于制备试剂盒;所述试剂盒中含有所述抗原,或者编码所述抗原的DNA分子,或者表达所述抗原的重组载体/表达盒/转基因细胞系/重组菌。

## 一种基于二聚化的受体结合区亚单位的冠状病毒疫苗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于二聚化的受体结合区亚单位的冠状病毒疫苗,属于医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 冠状病毒属于冠状病毒科冠状病毒属,是有囊膜的正链RNA病毒,在所有RNA病毒中其基因组最大。动物和人类都是冠状病毒的宿主。冠状病毒主要感染哺乳动物和鸟类的呼吸道和消化道。其中有6种冠状病毒感染人。其中对全球公共卫生威胁最大的是2002-2003年在中国爆发的严重呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和2012年爆发并持续至今的中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。冠状病毒也引发许多严重的动物疾病,尤其对农业牲畜和宠物带来严重威胁。比如,猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)可以引发猪的严重腹泻,死亡率极高;其缺失病毒猪呼吸道冠状病毒(PRCV)可以引起猪严重的呼吸道疾病;猫腹膜炎病毒(FIPV)可引起猫腹膜炎和腹水聚集,致死率很高;犬冠状病毒(CCoV)则可使犬发生不同程度的肠胃炎症状,传播快,难控制;猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起猪流行性腹泻等肠道疾病,容易在猪群里传播致死率很高。此外还有鼠、牛等冠状病毒。这些冠状病毒对人和动物的健康造成了严重的威胁。因此,开发一种安全、有效的针对冠状病毒SARS-CoV和MERS-CoV的疫苗十分紧迫、有着重要的意义。

[0003] 表面刺突蛋白(S蛋白)是冠状病毒的主要中和抗原。MERS-CoV、SARS-CoV S蛋白的受体结合区(Receptor Binding Domain, RBD)被认为是诱导机体产生中和抗体的最主要的抗原靶区域。RBD作为疫苗能够将机体刺激产生的中和抗体更加聚焦在针对病毒的受体结合,可以提高疫苗的免疫原性和免疫效率。MERS-CoV通过RBD与宿主细胞的受体(CD26,又名DPP4)结合而侵入细胞。此外,SARS-CoV通过其RBD与宿主细胞受体ACE2结合而进入细胞。

[0004] 目前已有报道的通过使用冠状病毒RBD制备针对MERS-CoV和SARS-CoV的疫苗,使用的是单体的RBD蛋白或者融合单体RBD与Fc区的蛋白。在MERS-CoV里面,之前报道的RBD单体仅能在小鼠体内激起较低的假病毒中和抗体水平。这提示使用MERS-CoV的RBD单体作为疫苗的免疫原性有限。因此有必要对基于MERS-CoV RBD的疫苗进行改进。之前又有报道通过在RBD的C末端融合IgG的Fc区域,表达制备RBD-Fc用于针对MERS-CoV的疫苗。RBD-Fc能够诱导产生较高的假病毒中和活性。但蛋白融合表达Fc作为疫苗其安全性还需要许多深入的研究评价,限制了其临床使用的进度。

[0005] 此外,之前SARS-CoV疫苗的研究也使用的是RBD单体,具有一定的中和免疫原性。

[0006] 总之,目前基于冠状病毒S蛋白的RBD单体研制的疫苗,免疫原性有限。而基于RBD的融合蛋白(比如IgG的Fc段)则存在安全评价不足的缺陷。因此,开发一种免疫原性高、安全性更被认可的SARS-CoV或MERS-CoV疫苗,是目前亟需解决的问题。

### 发明内容

[0007] 为了解决上述问题,本发明开发了一种基于冠状病毒RBD设计疫苗的新方法,利用

MERS-CoV、SARS-CoV自身的半胱氨酸残基形成同源二聚体来制备疫苗,本发明的疫苗能显著的提高宿主中和抗体的水平,制备方法简单、蛋白无标签且易于纯化,能较快的应用于临床的使用。

[0008] 本发明的第一个目的是提供一种免疫原性提高的冠状病毒抗原,所述抗原是二聚化的MERS-CoV蛋白或者SARS-CoV蛋白的RBD。

[0009] 所述RBD的氨基酸序列如(1)或(2)所示:

[0010] (1)如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;

[0011] (2)在(1)中的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个氨基酸或几个氨基酸且具有相抗原性的由(1)衍生的多肽或其类似物,且其编码的蛋白自身能够形成二聚体。

[0012] 所述SEQ ID NO:1的序列,来源于MERS-CoV EMC/2012株的S蛋白(NCBI上的GenBank:AFS88936.1)的一部分,是MERS-CoV蛋白的RBD的E367-Y606区域。

[0013] 所述SEQ ID NO:2的序列,来源于SARS-CoV BJ01株的S蛋白(spike glycoprotein S,NCBI为GenBank:AAP30030.1)的一部分,是SARS-CoV的RBD的R294-F515区域。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述二聚化的RBD的核苷酸序列如SEQ ID NO:3或者SEQ ID NO:4所示。

[0015] 本发明的第二个目的是提供所述冠状病毒抗原的制备方法,是在SEQ ID NO:3或者SEQ ID NO:4所示核苷酸序列的3'端加上翻译终止密码子,进行克隆表达,筛选正确的重组子,然后转染昆虫细胞进行表达,表达后收集细胞上清,纯化即得到冠状病毒抗原。

[0016] 在本发明的一种实施方式中,所述昆虫细胞为昆虫细胞Sf9或者昆虫细胞系Hi5。

[0017] 在本发明的一种实施方式中,所述冠状病毒抗原的纯化方法,是将表达所述抗原的细胞上清液过滤除去细胞碎片,并通过HiTrap QHP阴离子交换柱进行目的蛋白的捕获,随即通过含有1M NaCl的缓冲液洗脱进行粗纯,之后含有目的蛋白的组分上样疏水柱HiTrap Phenyl HP,然后进行梯度洗脱,将得到的含有目标蛋白的洗脱峰合并,再10K截留浓缩,然后使用Superdex200 HiLoad 16/60柱子(GE)进行分子筛层析进行纯化。

[0018] 在本发明的一种实施方式中,所述梯度洗脱是用20mM Tris-HCl,pH 8.0。

[0019] 在本发明的一种实施方式中,所述分子筛层析缓冲液为20mM Tris,150mM NaCl,PH8.0。

[0020] 在本发明的一种实施方式中,所述目的蛋白是二聚化的MERS-RBD蛋白或者SARS-RBD蛋白;所述二聚化的MERS-RBD蛋白在非还原条件下(不加DTT)的情况下大小约为60Kd,在还原条件下(加入DTT)大小约为30Kd;所述二聚化的SARS-RBD蛋白在非还原条件下大小约55kd,还原条件下大小约28Kd。

[0021] 本发明的第三个目的是提供编码所述抗原的DNA,表达所述抗原的载体、转基因细胞系或者重组菌、携带所述抗原的表达盒。

[0022] 本发明还提供所述抗原的应用,是用于制备抗冠状病毒的药物。

[0023] 在本发明的一种实施方式中,所述应用是将氨基酸序列如SEQ ID NO:1的抗原与MF59或者铝佐剂合用。

[0024] 在本发明的一种实施方式中,所述应用是将氨基酸序列如SEQ ID NO:2的抗原与MF59或者铝佐剂合用。

[0025] 在本发明的一种实施方式中,所述应用,是用于制备试剂盒;所述试剂盒中含有所

述抗原,或者编码所述抗原的DNA分子,或者表达所述抗原的重组载体/表达盒/转基因细胞系/重组菌。

[0026] 本发明的第四个目的是提供一种提高抗原免疫原性的方法,所述方法是表达二聚化的MERS-CoV蛋白或者SARS-CoV蛋白的RBD;所述二聚化的RBD的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或者SEQ ID NO:2所示。

[0027] 本发明的有益效果:

[0028] 本发明通过杆状病毒体在昆虫细胞里表达MERS-CoV蛋白的RBD(E367-Y606)区域,使得RBD可通过S蛋白自身603位的半胱氨酸残基形成二聚体。而当去掉这一半胱氨酸后,RBD则只形成单体(E379-E589)。进而,分别使用纯化的RBD蛋白二聚体和单体对Ba1b/c小鼠进行免疫。本发明的二聚化的RBD克服了RBD单体免疫原性不足的缺点,大大提高了小鼠针对MERS-CoV的中和抗体产生。按照同样的思路推广到SARS-CoV,本发明表达SARS-CoV的RBD(R294-F515),通过S蛋白自身512位的半胱氨酸残基形成二聚体。纯化后的SARS-CoV RBD二聚体较之其单体(512位的半胱氨酸残基突变成丝氨酸)免疫原性显著的提高。

#### 附图说明

[0029] 图1:MERS RBD蛋白纯化分子筛和SDS-PAGE图;M表示低分子量蛋白Marker,Dimer表示二聚体,Monomer表示单体;

[0030] 图2:SARS RBD蛋白纯化分子筛和SDS-PAGE图;M表示低分子量蛋白Marker,Dimer表示二聚体,Monomer表示单体;

[0031] 图3:小鼠免疫策略。

#### 具体实施方式

[0032] 实施例1:表达MERS和SARS抗原的重组杆状病毒制备

[0033] 将MERS-CoV RBD核苷酸序列(如SEQ ID NO:3所示)和SARS-CoV RBD(如SEQ ID NO:4所示)核苷酸序列3'端加上翻译终止密码子后克隆到包含gp67信号肽的pFastBac载体(pFastBac-SP)的EcoR I和Xho I酶切位点之间,使得蛋白编码区在信号肽gp67序列的后面融合表达,用于目的蛋白的分泌。分别得到载体pFastBac-SP-MERS-RBD以及pFastBac-SP-SARS-RBD。

[0034] 而用于表达MERS单体RBD的载体则由S蛋白序列(NCBI上GenBank:AFS88936.1)中氨基酸379位到589位蛋白的核酸片段插入pFastBac-SP的EcoRI和XhoI酶切位点,并在3'端带上6个组氨酸而构成。用于表达SARS单体RBD的载体则由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的第219位的半胱氨酸突变成丝氨酸而来(对于NCBI上GenBank:AAP30030.1的S蛋白的第512位),并在3'端带上6个组氨酸而构成。

[0035] 重组质粒转化DH10Bac感受态细胞,37°C过夜培养,通过蓝白斑筛选和PCR鉴定出阳性克隆。提取重组的杆状病毒DNA(Bacmid),通过测序鉴定正确的重组子。将Bacmid转染昆虫细胞Sf9,转染3天后收取培养上清,得到第1代重组杆状病毒。连续扩毒3代,所获第4代杆状病毒进行病毒滴度测定。根据滴定结果选取合适的病毒MOI感染Sf9或者昆虫细胞系Hi5做表达,48小时后离心收集细胞上清,进行细胞纯化。

[0036] 实施例2:MERS-RBD和SARS-RBD的纯化

[0037] 将表达MERS-RBD和SARS-RBD的细胞上清通过0.22 $\mu$ m的滤膜过滤,除去细胞碎片。并通过HiTrap QHP阴离子交换柱进行目的蛋白的捕获,随即通过含有1M NaCl的缓冲液洗脱进行粗纯。经过SDS-PAGE鉴定后收集合并含有目的蛋白的组分。作为A液上样疏水柱HiTrap Phenyl HP进行结合。配制低盐洗脱液B液(20mM Tris-HCl PH 8.0)进行梯度洗脱。将洗脱下来的RBD进行SDS凝胶电泳检测目的蛋白。通过疏水层析粗纯得到含目的蛋白的洗脱峰合并,通过10K截留浓缩管(Millipore)进行浓缩至5mL,再通过Superdex200 Hi-load 16/60柱子(GE)进行分子筛层析进行进一步的目的蛋白纯化。分子筛层析缓冲液为20mM Tris,150mM NaCl,PH8.0。

[0038] 取MERS-RBD蛋白在洗脱体积78mL附近的洗脱峰进行SDS-PAGE分析。目的蛋白在非还原条件下(不加DTT)的情况下大小约为60Kd;而在还原条件下(加入DTT),大小约为30Kd,证明该峰主要是二聚体。取洗脱体积90mL附近的洗脱峰进行SDS-PAGE分析,目的蛋白在非还原条件下(不加DTT)的情况下大小约为30Kd,证明该峰主要是RBD单体。同样的SARS-RBD蛋白在洗脱体积82mL附近的洗脱峰主要是二聚体(非还原条件下大小约55kd,还原条件下大小约28Kd),而在洗脱体积92mL附近的洗脱峰主要是RBD单体(非还原条件下大小约28kd)。

[0039] 典型的MERS-RBD和SARS-RBD蛋白分子筛图谱和SDS-PAGE分析图分别如图1,2所示。收集合并RBD二聚体的洗脱峰,重新通过Superdex200 Hi-load 16/60柱子(GE)进行进一步纯化,获得纯度大于99%的二聚体RBD蛋白。目的蛋白浓缩后,分装成小份,用液氮迅速冷冻后于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0040] 带His标签的MERS-RBD和SARS-RBD通过镍柱进行粗纯。将过滤后的细胞上清液与HiTrap HP于4 $^{\circ}$ C结合过夜。之后,首先使用缓冲液(20mM Tris,150mM NaCl,pH8.0)进行洗涤,去除流穿的杂蛋白。其后,通过含咪唑缓冲液(20mM Tris,150mM NaCl,pH 8.0,300mM imidazole)进行目的蛋白洗脱。使用10K截留浓缩管(Millipore)进行浓缩至体积5mL,再通过Superdex200Hi-load 16/60柱子(GE)进行分子筛层析进行进一步的目的蛋白纯化。分子筛层析缓冲液为20mM Tris-HCl,150mM NaCl,PH8.0的溶液。MERS-RBD在洗脱体积90mL附近的洗脱峰为RBD单体,大小约为28Kd。没有二聚体峰。SARS-RBD在洗脱体积92mL附近的洗脱峰为RBD单体,大小约为28Kd。没有二聚体峰。收集合并目的蛋白,通过浓缩管(Milipore)浓缩后,分装成小份,用液氮迅速冷冻后于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0041] 实施例3:小鼠免疫实验

[0042] 将实施例2得到的MERS和SARS抗原按照表1的方法于生理盐水中稀释,并与佐剂进行分组乳化。然后对4-6周龄的Ba1b/C小鼠进行分组免疫。免疫策略如图3,即通过大腿肌肉注射的方式,每只小鼠分别在第0天,第21天,第42天接受3次疫苗免疫,每次100u1的接种体积。第54天(即3免后的第12天),对小鼠进行尾部取血。小鼠血清在静置一段时间待血清析出后,通过3000rpm离心10分钟获得,并于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存,用于假病毒中和检测。

[0043] 表1:动物免疫分组情况

[0044]

抗原或对照	抗原含量	佐剂	动物数量
PBS	-	MF59	4
PBS	-	铝佐剂	4

RBD二聚体	3 $\mu$ g, 10 $\mu$ g	MF59	3 $\mu$ g, 10 $\mu$ g各4只
RBD单体	3 $\mu$ g, 10 $\mu$ g	MF59	3 $\mu$ g, 10 $\mu$ g各4只
RBD二聚体	10 $\mu$ g*, 30 $\mu$ g	铝佐剂	10 $\mu$ g, 30 $\mu$ g各4只
RBD单体	10 $\mu$ g*, 30 $\mu$ g	铝佐剂	10 $\mu$ g, 30 $\mu$ g各4只

[0045] \*用于SARS-RBD的免疫不含10 $\mu$ g抗原组。

[0046] 实施例4:假病毒中和试验

[0047] i)假病毒的制备:通过转染试剂PEI将质粒pCAGGS-MERS S(是指表达MERS S的哺乳动物载体pCAGGS,其中SARS假病毒制备使用pCAGGS-SARS S)与HIV pNL4-3.luc.RE (Invitrogen)共转染293T细胞。转染5小时后,PBS洗涤细胞2次,换为无血清DMEM培养基继续培养。48小时后收取上清,离心去除细胞碎片。假病毒通过上清超速离心机30000rpm离心3小时进行沉淀,后用小体积无血清DMEM溶解获得浓缩的MERS和SARS假病毒。分装保存于-80 $^{\circ}$ C条件。

[0048] ii)假病毒TCID<sub>50</sub>测定

[0049] 将上一步收取的病毒液按5倍比稀释,加入到96孔板中的人肝癌Huh7细胞中。感染4小时后,弃掉病毒液,PBS洗涤细胞2次,换为含10%血清的DMEM完全培养基。48小时,弃掉培养基,PBS洗涤2次,加入细胞裂解液。-80 $^{\circ}$ C冻融一次后,每孔取20 $\mu$ l利用GloMax 96 Microplate Luminometer(Promega)检测荧光素酶活性值。通过Reed-Muech法计算TCID<sub>50</sub>。

[0050] iii)中和试验

[0051] 将纯化的抗体2倍比稀释,与100TCID<sub>50</sub>假病毒混合,37 $^{\circ}$ C共孵育30分钟。将混合液加入到已铺满Huh7细胞的96孔板中。37 $^{\circ}$ C孵育4小时后,弃掉病毒液,PBS洗涤细胞2次,换为含10%血清的完全培养基DMEM。48小时后,弃掉培养液,PBS洗涤细胞2次,加入细胞裂解液,检测荧光素酶活性值。

[0052] iv)结果分析

[0053] 阳性标准:荧光素酶活性值<(阳性对照-阴性对照)/2的血清,即为有中和活性的阳性血清。血清稀释度最高的阳性孔的稀释倍数计为NT50(抑制50%病毒的血清中和滴度)。将二聚体和单体RBD免疫后动物的血清的假病毒中和抗体水平进行比较,利用t检验对组间进行差异显著性分析。最后通过双尾概率P值判断显著性水平。在显著性水平为0.05的情况下,双尾概率水平小于0.05时表示两组样本的均值存在显著差异;当概率P值大于0.05时可以认为两组样本的方差无显著差异,即通过了Levene方差齐检验。

[0054] 本发明发现对于MERS疫苗而言,无论与MF59还是铝佐剂合用,RBD二聚体免疫都能激发小鼠产生很高效价的中和抗体,其中最高效价可达3000以上,组内差异小。而RBD单体仅有3 $\mu$ g剂量与MF59合用时产生效价260的中和抗体,远小于平行对照的二聚体组所激发的中和抗体效价,且差异显著。而RBD单体的其他几个剂量组分与佐剂合用都不产生可检测到的中和抗体(小于20),与平行的二聚体组比较差异显著(表2)。这提示MERS RBD二聚体作为疫苗的免疫原性显著的大于RBD单体。同样的对于SARS疫苗而言,所有使用二聚体的免疫组都产生了很高的中和抗体水平,都在1900到3900之间,组内差异小。尽管RBD单体能激发小鼠产生一定水平的中和抗体,但仍然显著的小于平行的RBD二聚体(表2)。这提示SARS RBD二聚体作为疫苗能够显著的提高SARS-RBD疫苗的免疫原性。

[0055] 表2 MERS-CoV和SARS-CoV RBD疫苗激发小鼠中和抗体水平的检测

[0056]

	疫苗组分	中和效价 (NT50) : Mean±SE	
MERS 假病毒	MF59	<20	
	铝佐剂	<20	
		RBD 二聚体	RBD 单体
	3 μg + MF59	*2880±805	260±60
	10 μg + MF59	*3200±640	<20
	10 μg + 铝佐剂	*190±75	<20
	30 μg + 铝佐剂	*1600±320	<20
SARS 假病毒	MF59	<20	
	铝佐剂	<20	
		RBD 二聚体	RBD 单体
	3 μg + MF59	*3840±739	880±240
	10 μg + MF59	*3520±960	720±201
	10 μg + 铝佐剂	UD	UD
	30 μg + 铝佐剂	*1920±370	560±80

[0057] \*表示二聚体免疫组与平行的单体免疫组的中和抗体水平通过t-检验进行统计学分析,差异显著P<0.05

[0058] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。



## 序列表

<110> 中国科学院微生物研究所  
中国科学院动物研究所

<120> 一种基于二聚化的受体结合区亚单位的冠状病毒疫苗

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001] <400> 1

Glu Ala Lys Pro Ser Gly Ser Val Val Glu Gln Ala Glu Gly Val Glu  
1                    5                    10                    15  
Cys Asp Phe Ser Pro Leu Leu Ser Gly Thr Pro Pro Gln Val Tyr Asn  
                  20                    25                    30  
Phe Lys Arg Leu Val Phe Thr Asn Cys Asn Tyr Asn Leu Thr Lys Leu  
                  35                    40                    45  
Leu Ser Leu Phe Ser Val Asn Asp Phe Thr Cys Ser Gln Ile Ser Pro  
                  50                    55                    60  
Ala Ala Ile Ala Ser Asn Cys Tyr Ser Ser Leu Ile Leu Asp Tyr Phe  
65                    70                    75                    80  
Ser Tyr Pro Leu Ser Met Lys Ser Asp Leu Ser Val Ser Ser Ala Gly  
                  85                    90                    95  
Pro Ile Ser Gln Phe Asn Tyr Lys Gln Ser Phe Ser Asn Pro Thr Cys  
                  100                    105                    110  
Leu Ile Leu Ala Thr Val Pro His Asn Leu Thr Thr Ile Thr Lys Pro





caaatactc cagcagcaat tgetageaac tgttattctt caetgatttt ggattacttt	240
tcataceccae ttagtatgaa atccgatctc agtgtagtt ctgetggtec aatateccag	300
ttfaattata aacagtcctt ttctaatecc acatgittga tttfagegac tgttcctcat	360
aaccttacta ctattactaa gcctcttaag tacagctata ttaacaagtg ctctegtctt	420
ctttctgatg atcgtactga agtacctcag ttagtgaacg ctaatcaata ctacacctgt	480
glatccattg tcccatccac tgtgtgggaa gacgggtgatt attataggaa acaactatct	540
ccaactgaag gtgggtggetg gcttgttget agtggctcaa ctgttgcctat gactgagcaa	600
ttacagatgg gctttggtat tacagttcaa tatggctacag acaccaatag tgtttgcccc	660
aagcttgaat ttgctaata caaaaaatt gcctctcaat taggcaattg cgtggaatat	720

<210> 4

<211> 666

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

agggtggtgc ccagcggcga cgtggtgagg tcccccaaca tcaccaacct gtgcccttc	60
ggcgagggtg tcaacgccac caagttcccc agcgtatacg cctgggagag gaagaagatc	120
agcaactgcg tggccgacta cagcgtgctg tacaacagca cttcttcag cacctcaag	180
tgtacggcg tgagcggcac caagetgaac gacctgtgct tcagcaactg gtaecggac	240
agcttcgtgg tgaagggcga cgacgtgagg cagatcgctc ctggacagac cggcgtgatc	300
gccgactaca actacaaget gcccgacgac ttcatgggct gctgtctgge ctggaacacc	360
aggaacatcg acgcaaccag caccggcaac tacaactaca agtacaggta cctgaggcac	420
ggcaagetga ggcccttga gagggacatc agcaactgc cattcagccc tgaeggcaag	480
ccctgcacac cacctgcctt gaactgetac tggccactga acgactacgg ctcttaeacc	540
accaccgga tcggctacca gccctacagg gtggtggtgc tgagcttca gctgctgaac	600
gtctctgcca ccgtgtcggg ccctaagctg agcaccgacc tgatcaagaa ccagtgcgtg	660
aacttc	666

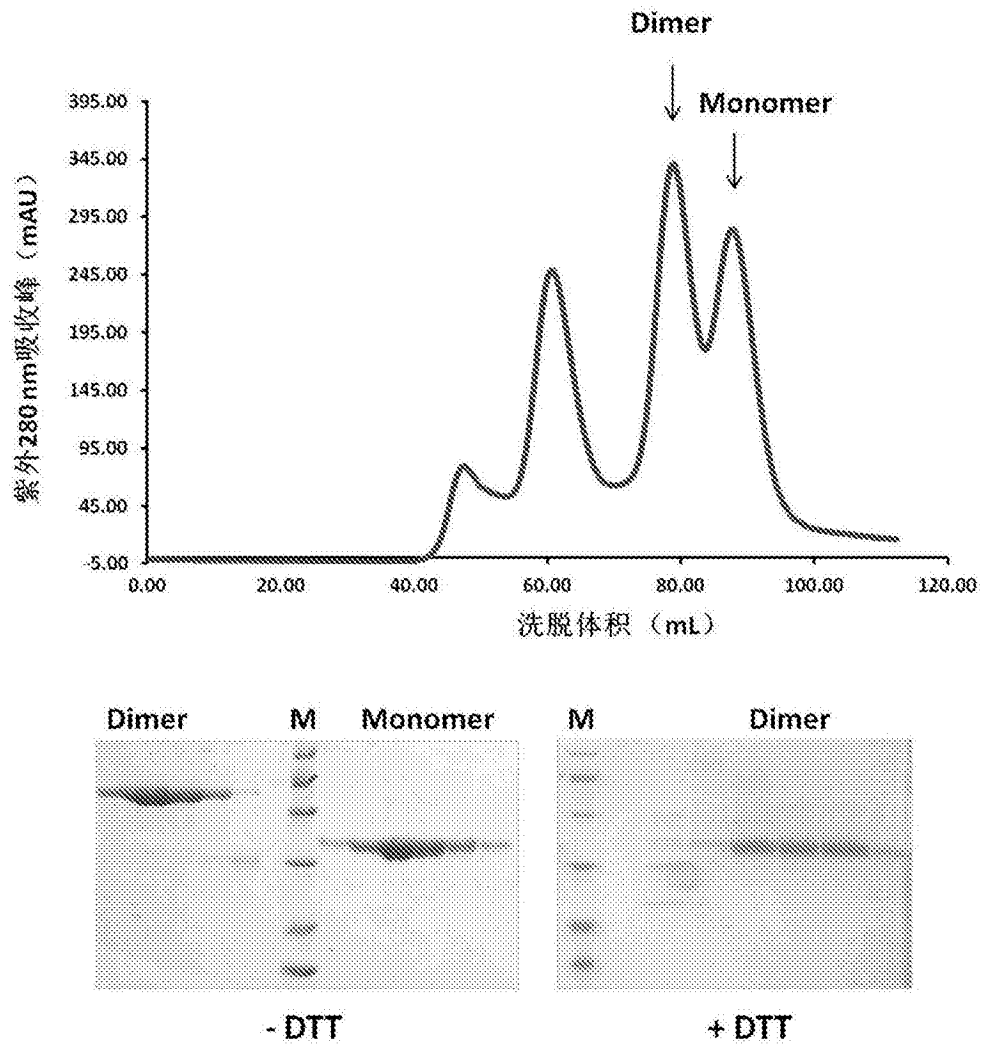


图1

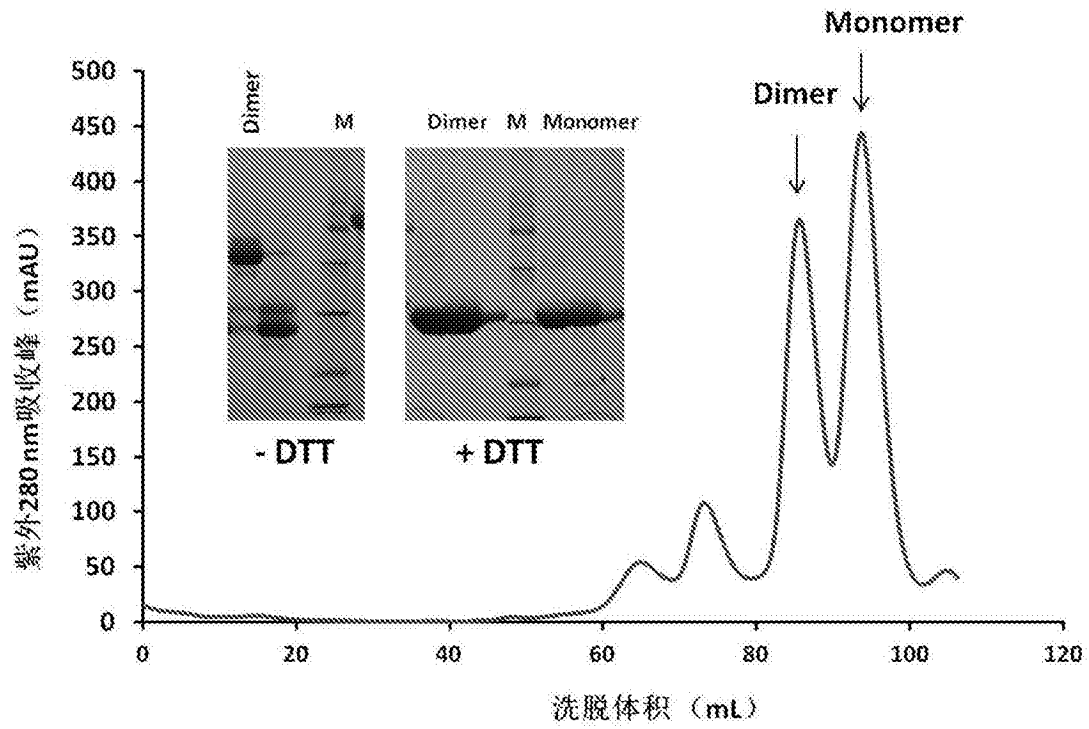


图2

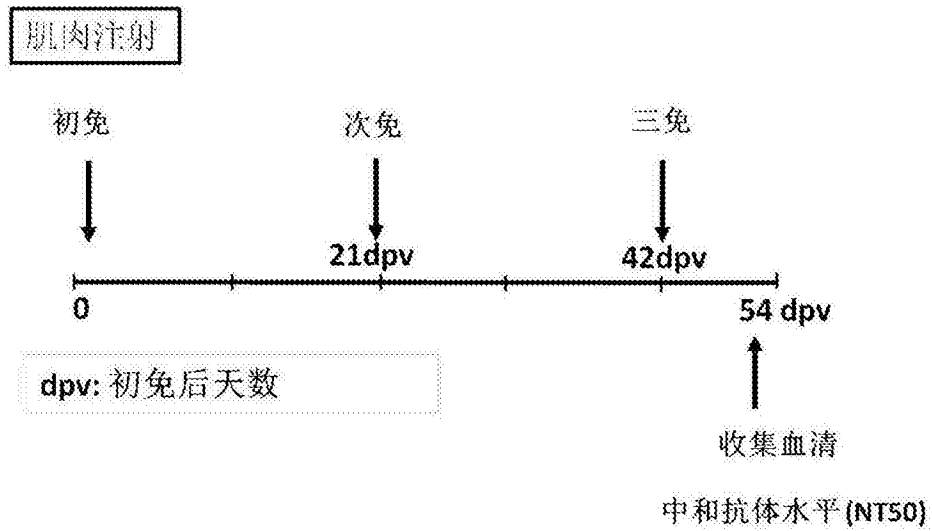


图3