



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109266666 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201810997202.6

A61K 39/12(2006.01)

(22)申请日 2018.08.29

A61P 31/14(2006.01)

(71)申请人 广东省农业科学院动物卫生研究所
地址 510640 广东省广州市天河区五山路
白石岗

(72)发明人 李林林 孙敏华 董嘉文 张俊勤
张春红

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 任重

(51)Int.Cl.

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/866(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

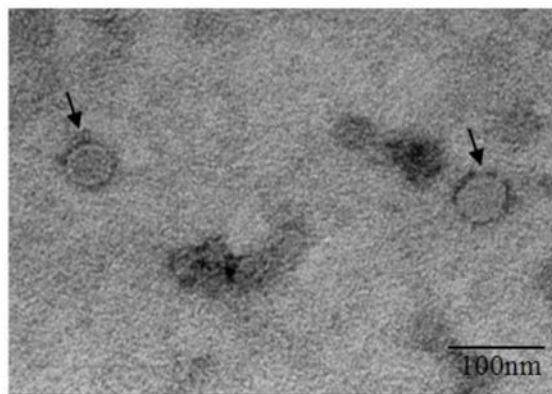
权利要求书1页 说明书14页 附图6页

(54)发明名称

一种鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒
及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒及其应用。所述病毒样颗粒由SEQ ID NO.15所示的融合基因和禽流感病毒H3N2 M1基因共表达得到。本发明利用杆状病毒/昆虫细胞表达系统研制得到表达鸭坦布苏病毒(DTMUV)E蛋白的嵌合病毒样颗粒,具有显著的免疫效果,为开发鸭坦布苏病毒新型疫苗和多价疫苗奠定了理论和实践基础。同时,本发明制备得到的病毒样颗粒不含有病毒核酸,因而不具有复制能力,也不会引起鸭坦布苏病毒感染,可以最大程度地降低疫苗使用的风险,具有很好的应用前景。



1. 一种融合基因,其特征在于,所述融合基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示。
2. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合基因的氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示。
3. 一种重组载体,其特征在于,所述载体含有权利要求1所述融合基因和禽流感病毒H3N2的M1基因,并分别位于载体的两个开放阅读框。
4. 一种重组载体组合,其特征在于,包括重组载体1和重组载体2,重组载体1含有权利要求1所述融合基因,重组载体2含有禽流感病毒H3N2的M1基因。
5. 一种重组的杆状病毒,其特征在于,所述杆状病毒含有权利要求1所述融合基因和禽流感病毒H3N2的M1基因。
6. 权利要求1所述融合基因、权利要求2所述融合蛋白、权利要求3所述载体、权利要求4所述载体组合或权利要求5所述杆状病毒在制备鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒中的应用。
7. 一种表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒,其特征在于,所述病毒样颗粒是通过使用权利要求1所述融合基因、权利要求2所述融合蛋白、权利要求3所述载体、权利要求4所述载体组合或权利要求5所述杆状病毒制备得到。
8. 权利要求1所述融合基因、权利要求2所述融合蛋白、权利要求3所述载体、权利要求4所述载体组合、权利要求5所述杆状病毒或权利要求7所述嵌合病毒样颗粒在制备鸭坦布苏病毒疫苗中的应用。
9. 一种鸭坦布苏病毒疫苗,其特征在于,包括权利要求7所述表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒。

一种鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及鸭坦布苏病毒技术领域,更具体地,涉及一种鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒及其应用。

背景技术

[0002] 鸭坦布苏病毒病是近年来在我国新爆发并广泛流行的传染性疾病,可造成感染鸭群采食量和产蛋量急速下降,并可感染其它家禽,给养禽业造成巨大经济损失。目前,该病的防控有商品化灭活疫苗,但生产中仍时常有鸭坦布苏病毒病暴发,还处于研发阶段的疫苗有存在病毒滴度不高,抗原含量不足等问题。因此,该病的有效防控亟待新型疫苗的研发。

[0003] 病毒样颗粒(VLPs)是指含有病毒的一个或者几个结构蛋白的空心颗粒。目前,一些病毒的VLPs已作为疫苗成功应用于临床,如:人乳头瘤病毒(HPV)四价VLPs疫苗、乙型肝炎病毒(HBV)等。随着对VLPs越来越深入的研究,含有来自两种病毒的结构蛋白的嵌合VLPs成为了VLPs在应用上一个非常重要且有发展前途的方向。目前尚无鸭坦布苏病毒病嵌合VLPs疫苗的研究报道。

[0004] 多种亚型的流感病毒,包括H5N1,H3N2,H1N1,H9N2等已被用于VLPs的包装,并取得成功。最新研究表明单HA蛋白和M1蛋白就能够成功包装出流感VLPs。与同属于A型流感病毒的其它所有17种亚型流感病毒HA蛋白的跨膜区(TM)相比较,H3亚型流感病毒HA蛋白的跨膜区具有独特的结构,有助于HA蛋白形成分子间二硫键,提高HA蛋白的稳定性和蛋白的免疫原性。本研究包装出以流感病毒H3N2VLPs为骨架的,表面展示鸭坦布苏病毒主要免疫保护蛋白E的嵌合VLPs,并将经过纯化的嵌合VLPs进行动物免疫以评价其免疫保护效果。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术的不足,提供一种鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒的制备及应用。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种融合基因。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种融合蛋白。

[0008] 本发明的第三个目的是提供一种载体。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种载体组合。

[0010] 本发明的第五个目的是提供一种杆状病毒。

[0011] 本发明的第六个目的是提供一种表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒。

[0012] 本发明的第七个目的是提供以上所述融合基因、以上所述融合蛋白、以上所述载体、以上所述载体组合或以上所述杆状病毒在制备鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒中的应用。

[0013] 本发明的第八个目的是提供以上所述融合基因、以上所述融合蛋白、以上所述载体、以上所述载体组合、以上所述杆状病毒或以上所述嵌合病毒样颗粒在制备鸭坦布苏病

毒疫苗中的应用。

[0014] 本发明的第九个目的是提供一种鸭坦布苏病毒疫苗。

[0015] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的:

[0016] 本发明制备了一种表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒,以其制备的鸭坦布苏病毒疫苗有很好的免疫保护效果,因此本发明要求保护以下内容:

[0017] 一种融合基因,所述融合基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示。

[0018] 一种融合蛋白,所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示。

[0019] 一种重组载体,所述载体含有以上所述融合基因和禽流感病毒H3N2的M1基因,并分别位于载体的两个开放阅读框。

[0020] 一个重组载体组合,包括重组载体1和重组载体2,重组载体1含有以上所述融合基因,重组载体2含有禽流感病毒H3N2的M1基因。

[0021] 优选的,所述载体为pFastBacDual。

[0022] 禽流感病毒H3N2的M1基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.17所示;编码的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.18所示。

[0023] 一个重组的杆状病毒,所述杆状病毒含有以上所述融合基因和禽流感病毒H3N2的M1基因。

[0024] 一种表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒,所述病毒是通过使用以上所述融合基因、以上所述融合蛋白、以上所述载体、以上所述载体组合、或以上所述杆状病毒制备的。

[0025] 优选地,所述嵌合病毒样颗粒是从上述细胞的培养液中分离纯化得到的。

[0026] 一种表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0027] S1.得到核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示的融合基因和流感病毒H3N2M1基因;

[0028] S2.将上述两个基因分别连接入病毒表达转移载体的两个开放阅读框,转化大肠杆菌感受态细胞,筛选得到重组转移载体,转化DH10Bac感受态细胞,筛选得到重组穿梭质粒,并转染细胞;

[0029] S3.培养被转染的细胞,收集细胞上清,获得重组病毒并进行传代;

[0030] S4.获得重组病毒感染细胞,获得并纯化病毒样颗粒。

[0031] 优选地,步骤S2中,病毒表达转移载体为杆状病毒表达转移载体。

[0032] 更优选地,步骤S2中,病毒表达转移载体为pFastBacDual杆状病毒表达转移载体。

[0033] 优选地,步骤S2中,转染昆虫细胞。

[0034] 更优选地,步骤S2中,转染昆虫细胞Sf9。

[0035] 优选地,步骤S3中,培养被转染的细胞的时间为:当细胞出现典型细胞病变时或25~30℃,培养70~75h。

[0036] 细胞出现典型细胞病变时的表现为:细胞变大,变圆,细胞核增大,胞内折光性强的物质明显增大,细胞生长缓慢甚至停止,培养基中出现较多悬浮细胞。

[0037] 优选地,步骤S3中,培养被转染的细胞的时间为27℃,培养72h。

[0038] 优选地,步骤S4中,纯化病毒样颗粒的具体方法为:取细胞上清液,8,000~12,000rpm离心8~12min,取上清;35,000~45,000rpm离心100~140min,取沉淀用PBS(pH7.4)缓冲液重悬;将重悬液利用已形成梯度的20%~60%的蔗糖梯度液进行离心,25,000~30,

000rpm水平转头离心100~140min;分离病毒样颗粒条带,PBS缓冲液重悬后,35,000~45,000rpm超速离心100~140min,弃上清;适量PBS重悬沉淀保存。

[0039] 最优选地,表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒的制备方法,包括以下步骤:

[0040] S1.得到核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示的融合基因和流感病毒H3N2M1基因;

[0041] S2.将上述两个基因分别连接入pFastBacDual杆状病毒表达转移载体,转化DH10Bac感受态细胞,经筛选得到重组杆状病毒穿梭载体,重组杆状病毒穿梭载体转染昆虫细胞Sf9;

[0042] S3.27℃培养被转染的细胞72h,收集细胞上清,获得重组病毒并进行传代;

[0043] S4.获得重组病毒,以MOI等于5感染细胞,取细胞上清液,10,000rpm离心10min,取上清;40,000rpm离心2h,取沉淀用PBS缓冲液重悬;将重悬液利用已形成梯度的20%~60%的蔗糖梯度液,27,000rpm水平转头离心2h;分离病毒样颗粒条带,PBS缓冲液重悬后,40,000rpm超速离心2h,弃上清;适量PBS重悬沉淀保存。

[0044] 以上所述融合基因、以上所述融合蛋白、以上所述载体、以上所述载体组合或以上所述杆状病毒在制备鸭坦布苏病毒E基因的嵌合病毒样颗粒中的应用。

[0045] 以上所述融合基因、以上所述融合蛋白、以上所述载体、以上所述载体组合、以上所述杆状病毒或以上所述嵌合病毒样颗粒在制备鸭坦布苏病毒疫苗中的应用。

[0046] 一种鸭坦布苏病毒疫苗,包括以上所述表达鸭坦布苏病毒E基因的嵌合病毒样颗粒。

[0047] 一种上述鸭坦布苏病毒疫苗的制备方法,包括以下步骤:

[0048] S1.用以上所述表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒与土温-80配置水相;

[0049] S2.矿物油、司本-80和硬脂酸铝配置油相,灭菌;

[0050] S2.水相和油相按照1:1.5~1:2的比例配制并充分乳化。

[0051] 优选地,E蛋白的嵌合病毒样颗粒与土温-80的体积比为90~95:5~10。

[0052] 更优选地,E蛋白的嵌合病毒样颗粒与土温-80的体积比为93:7。

[0053] 优选地,矿物油、司本-80和硬脂酸铝的体积比为91~95:4~6:1~3。

[0054] 更优选地,矿物油、司本-80和硬脂酸铝的体积比为93:5:2。

[0055] 优选地,所述矿物油为白油。

[0056] 由上述方法制备得到的鸭坦布苏病毒疫苗,也应在本发明的保护范围之内。

[0057] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0058] 本发明利用杆状病毒/昆虫细胞表达系统研制表达鸭坦布苏病毒E蛋白的嵌合病毒样颗粒,并发现其具有很好的免疫效果。为下一步开发鸭坦布苏病毒新型疫苗和多价疫苗奠定理论和实践基础。同时,本发明的制备得到的病毒样颗粒不含有病毒的核酸,因而不具有复制能力,也不会引起鸭坦布苏病毒感染,可以最大程度地降低疫苗使用的风险。

附图说明

[0059] 图1为融合蛋白sp/E/HA2的构建。

[0060] 图2为E片段的PCR扩增。

[0061] 图3为H3N2 HA基因HA2片段的PCR扩增。

- [0062] 图4为H3N2 HA基因信号肽片段的PCR扩增。
- [0063] 图5为融合片段sp/E/HA2的PCR扩增。
- [0064] 图6为H3N2 M1基因的PCR扩增。
- [0065] 图7为pFastBacDual-sp/E/HA2-M1质粒的酶切鉴定结果;M:DNA Marker DL5,000;1:质粒单酶切;2:针对sp/E/HA2片段双酶切;3:针对M1片段双酶切。
- [0066] 图8为重组杆粒rBacmid-sp/E/HA2-M1菌液PCR鉴定;M:DNA Marker DL5,000;1,2:重组质粒rBacmid-sp/E/HA2-M1菌液。
- [0067] 图9为重组杆状病毒表达蛋白western-blot检测(H3N2一抗);1:r-sp/E/HA2-M1感染Sf9细胞裂解产物;2:r-sp/E/HA2-M1感染Sf9上清;3:感染野生型杆状病毒的Sf9细胞对照。
- [0068] 图10为重组杆状病毒表达蛋白western-blot检测(DTMUV一抗)。
- [0069] 图11为r-sp/E/HA2-M1噬斑纯化图。
- [0070] 图12为间接免疫荧光检测重组蛋白sp/E/HA2和M1的表达和定位。
- [0071] 图13为SDS-PAGE电泳估算E蛋白含量。
- [0072] 图14为sp/E/HA2-M1VLP的电镜观察结果。
- [0073] 图15为不同免疫组小鼠血清中抗体水平变化。
- [0074] 图16为不同免疫组雏鸭血清中抗体水平变化。

具体实施方式

[0075] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0076] 实施例1构建融合蛋白sp/E/HA2基因及pFastBacDual-sp/E/HA2-M1重组质粒

[0077] 一、融合蛋白sp/E/HA2构建及PCR扩增

[0078] 融合蛋白依次包括流感病毒H3N2-HA的信号肽(H3N2HA-sp)、DTMUV E基因和H3N2-HA基因的整个HA2片段(含有流感病毒H3N2HA基因的跨膜区和胞内区(TM+CT),H3N2HA-HA2),融合蛋白基因构建结构如图1所示。

[0079] 1、实验操作

[0080] 设计合成4对引物,以本实验构建和保存的质粒pFastBacDual-E(含有DTMUV E基因)进行目的基因片段DTMUV E基因的PCR扩增;以质粒H3N2HA-T vector(含有流感病毒H3N2HA基因,由中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室惠赠)为模版,进行目的基因片段H3N2HA-sp和H3N2HA-HA2的PCR扩增。以扩增获得的H3N2HA-sp、E、H3N2-HA-HA2为模板进行overlapping PCR扩增获得融合基因片段H3N2HA-sp-E-H3N2-HA-HA2用于扩增H3N2HA-sp的引物序的核苷酸序列如SEQ ID NO.7~8所示;

[0081] 用于扩增DTMUV E(除信号肽序列)的引物序的核苷酸序列如SEQ ID NO.9~10所示;

[0082] 用于扩增H3N2HA-HA2的引物序的核苷酸序列如SEQ ID NO.11~12所示。

[0083] 用以上扩增产物混合在一起作为模板进行overlapping PCR扩增,获得融合蛋白

基因片段,引物序的核苷酸序列如SEQ ID NO.13~14所示。

[0084] 2、实验结果

[0085] PCR扩增得到的片段大小与预期一致(图2到图4)。

[0086] 扩增得到的H3N2HA-sp,180bp核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;编码60个氨基酸,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。扩增得到的DTMUV E(去信号肽和跨膜区),1047bp核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;编码349个氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0087] 扩增得到的H3N2HA-HA2,666bp核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示;编码221个氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示。

[0088] overlapping PCR得到目的片段sp/E/HA2(图5):1893bp核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示;编码631个氨基酸,氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示。

[0089] 二、目的片段连入pFastBacDual载体后阳性质粒的酶切鉴定结果

[0090] 1、实验操作

[0091] 获得的sp/E/HA2片段插入到含H3N2M1基因的杆状病毒表达转移载体pFastBacDual-M1(由中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室惠赠)的另外一个表达框内。构建pFastBacDual-sp/E/HA2-M1重组质粒并进行菌液PCR验证和酶切鉴定。其中,H3N2M1基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.17所示;编码的蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.18所示。

[0092] 2、实验结果

[0093] pFastBacDual-M1中H3N2M1基因片段如图6所示。

[0094] 经过鉴定为阳性的克隆,扩大培养后抽提质粒,用双酶切鉴定为阳性的,送英骏公司测序,经测序完全正确的,保存于-80℃,命名为pFastBacDual-sp/E/HA2-M1。酶切鉴定结果如图7。

[0095] 实施例2重组杆状病毒穿梭质粒rBacmid-sp/E/HA2-M1转染昆虫细胞Sf9

[0096] 1、实验操作

[0097] 将经鉴定正确的重组质粒pFastBacDual-sp/E/HA2-M1转化DH10Bac™感受态细胞,经蓝白斑筛选及三重抗生素(庆大霉素、卡那霉素和四环素)耐药性选择,37℃培养箱中培养48h后,挑取白斑并以划线方式接种到新的含有三种抗生素的LB平板中,培养48h再挑取白色单菌落,接种入含有三种抗生素的新鲜液体LB培养基中,6h后,取出1μl菌液作为模版进行菌液PCR鉴定,筛选得到含有重组质粒pFastBacDual-sp/E/HA2-M1的阳性重组DH10Bac,并提取重组质粒。选取鉴定正确的重组rBacmid-sp/E/HA2-M1杆粒转染Sf9细胞。当细胞出现典型细胞病变时(或感染72h后),收集病毒液和细胞。细胞病变的具体表现为:细胞变大,变圆,细胞核增大,胞内折光性强的物质明显增大,细胞生长缓慢甚至停止,培养基中出现较多悬浮细胞。所得上清液含重组病毒,作为P1代病毒原液,-80℃保存备用。检测所得沉淀有无目的蛋白表达。

[0098] 2、实验结果

[0099] 重组杆粒rBacmid-sp/E/HA2-M1的菌液PCR鉴定结果如图8所示,得到了含有目的基因的阳性菌落。阳性重组杆粒转染Sf9细胞后检测到目的蛋白的表达。

[0100] 实施例3重组杆状病毒感染Sf9细胞后蛋白的检测

[0101] 1、实验操作

[0102] (1) 重组杆粒转染细胞后72h收集细胞上清,即为第一代重组杆状病毒病毒(标记为P1),命名为r-sp/E/HA2-M1。用P1代毒继续感染对数生长期的Sf9细胞,72h后收集细胞上清,标记为P2。收集被感染的细胞,PBS洗涤三次,加入蛋白酶抑制剂,放于-80℃反复冻融三次,用超声波破碎仪进行破碎,12,000×g,4℃离心1min。

[0103] (2) 取上清加入上样缓冲液煮样后进行SDS-PAGE电泳,电泳后,部分聚丙烯酰胺凝胶用考马斯亮蓝R-250染色法进行常规染色。

[0104] (3) 其余部分的聚丙烯酰胺凝胶进行电转,将凝胶中的蛋白质转移至PVDF膜上进行Westernblot检测。

[0105] 2、实验结果

[0106] Western-blot检测结果如图9、10,融合蛋白sp/E/HA2大小约为70KD,M1大小约28KD,与预期表达蛋白大小相符。

[0107] 实施例4重组杆状病毒噬斑纯化和病毒滴度计算

[0108] 选择已通过Western blot检测证明可表达目的蛋白的P1代病毒原液感染Sf9细胞,27℃孵育72h后,收集含有病毒的上清液,记为P2代病毒。重复上述方法在Sf9细胞上传代至P3、P4及P5代。参照Invitrogen公司使用说明书的方法,应用空斑形成技术测定重组病毒的滴度(PFU/mL)

[0109] 1、实验操作

[0110] (1) 将浓度为 1×10^6 个/ml的Sf9细胞悬液接种于12孔板中,放入28℃细胞培养箱中过夜培养使细胞贴壁。

[0111] (2) 将第三代重组杆状病毒液(P3)用不完全培养基做梯度稀释, 10^{-1} - 10^{-8} 。

[0112] 杆状病毒的第一、二代毒一般作为种毒保存,常选用稳定的第三代病毒进行后续实验。

[0113] (3) 弃掉12孔板中的培养基,用PBS洗3次细胞,按顺序加入已经稀释好的病毒液,每孔400μl,每个稀释度设三个复孔,以正常细胞作为对照,12孔板放入培养箱,静置1小时使病毒吸附细胞。

[0114] (4) 配置2%的琼脂糖并高压灭菌备用。

[0115] (5) 病毒吸附1小时后,弃掉孔中的病毒液,用PBS清洗细胞3次。缓慢铺上琼脂糖(配置方法:14ml 2×Grace's培养基+300μl的双抗(青霉素+链霉素)+14ml 2%的琼脂糖+3ml FBS,使用前配置)。

[0116] (6) 4℃静置10min,待琼脂糖完全凝固以后将12孔板放入28℃培养箱中培养7-10d。

[0117] (7) 待肉眼于光下可观察到空斑形成。每孔加入1ml 0.03%的中性红溶液,放回28℃培养箱培养2小时,吸出染色液,观察噬斑。

[0118] (8) 将单个空斑用10μl枪头挑到用新鲜培养基培养的处于对数生长期的Sf9细胞中培养。72小时后,收集细胞上清液。加入1ml PBS吹散板上细胞,并用PBS洗三次,超声波破碎仪破碎细胞,检测蛋白表达情况。

[0119] (9) 计算病毒噬斑形成情况(PFU)

[0120] 病毒滴度 = (噬斑数 × 病毒稀释倍数) / 每孔接种病毒量

[0121] 2、实验结果

- [0122] 图11为r-sp/E/HA2-M1噬斑纯化图。经过计算得到病毒滴度 $=5.2 \times 10^6$ 。
- [0123] 实施例5间接免疫荧光 (IFA) 检测嵌合VLPs中sp/E/HA2和M1蛋白的表达
- [0124] Sf9细胞接种重组杆状病毒上清,感染72h后,采用间接免疫荧光观察重组蛋白的表达。
- [0125] 1、实验操作
- [0126] 将浓度为 1×10^6 个/ml的Sf9细胞悬液接种于6孔板中,放入28℃细胞培养箱中过夜培养使细胞贴壁。用重组杆状病毒r-sp/E/HA2-M1侵染Sf9细胞 (MOI=5),在28℃细胞培养箱中培养48小时。用3%BSA 4℃封闭过夜。加入用1%BSA稀释TMUV多抗鼠血清 (1:200稀释),室温静置2小时。PBS清洗3次后加入用1%BSA稀释流感病毒H3N2多抗兔血清 (1:50-1:200稀释),室温静置2小时。PBS清洗3次后加入荧光标记FITC标记抗鼠二抗 (1:1000稀释),室温避光静置1小时。清洗后加入荧光标记CY3标记抗兔二抗 (1:1000稀释),室温避光静置1小时。用PH7.4PBST洗细胞3次,每次5min,加入DAPI染核,避光15min,用PH7.4PBST洗细胞3次,每次5min。用甘油封片,4℃避光保存或直接用激光共聚焦进行观察。
- [0127] 2、实验结果
- [0128] 将重组昆虫杆状病毒r-sp/E/HA2-M1感染Sf9细胞,图12为重组蛋白sp/E/HA2和M1的表达情况。如图可见,绿色荧光显示重组蛋白sp/E/HA2的表达,且主要定位于感染细胞的表面。红色荧光显示了M1蛋白的表达,M1蛋白在整个细胞均有分布,主要定位于胞质。
- [0129] 实施例6透射电镜观察嵌合VLPs (v-sp/E/HA2) 的形态
- [0130] 1、实验操作
- [0131] (1) VLPs的制备和纯化
- [0132] 将转染昆虫细胞获得的经纯化后的重组杆状病毒r-sp/E/HA2-M1以MOI等于5感染昆虫细胞,27℃,培养72h后,收获上清,-80℃保存。将收获的上清液,10,000rpm离心10min去除细胞碎片;上清40000rpm超速离心2h进行浓缩,沉淀用2~4ml PBS (PH7.4) 缓冲液重悬;将浓缩液小心缓慢地上样于已形成梯度的20%-60%的蔗糖梯度液面上,27000rpm水平转头离心2h;将病毒条带缓慢吸取至浓缩管,加满PBS缓冲液后40000rpm超速离心2h脱糖。最后用适量PBS重悬沉淀,-80℃保存或进行下一步鉴定。
- [0133] (2) VLPs中蛋白的定量
- [0134] 采用SDS-PAGE凝胶电泳灰度扫描法对病毒样颗粒中E蛋白含量进行测定:将牛血清白蛋白 (BSA) 标准品 (1mg/ml) 和VLPs用PBS分别作梯度稀释;取20μL BSA或病毒样颗粒稀释液与5×电泳上样缓冲液煮沸后,取10μL混合液进行10%的SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色后,根据条带粗细、深浅,利用凝胶成像系统进行灰度扫描分析,估算VLPs的大约浓度范围 (以sp/E/HA2蛋白的含量进行计算)。
- [0135] (3) 透射电镜观察VLPs的形态
- [0136] 经过蔗糖密度梯度纯化嵌合VLPs,用磷钨酸进行负染后用透射电镜观察。将纯化的VLPs放在铜网上2min,然后用pH 6.5的磷钨酸染色1min,于透射电镜下观察DTMUV病毒样颗粒的形态。
- [0137] 2、实验结果
- [0138] 用软件根据SDS-PAGE胶上条带的粗细和灰度计算各目的蛋白的相对含量 (图13),sp/E/HA2蛋白的浓度约为0.052mg/mL。

[0139] 如图14电镜照片可以看出,嵌合VLPs形态与原始病毒相似,直径约为50nm。说明sp/E/HA2蛋白在Sf9细胞中表达且包装出VLPs颗粒,释放到细胞培养上清中。

[0140] 实施例7VLPs的免疫原性测定

[0141] 1、实验操作

[0142] (1) VLPs油苗的制备

[0143] 用实施例6纯化的VLPs和土温-80配置水相,其中VLPs和土温-80的体积比为93:7,用矿物油(白油)93份、司本-805份和硬脂酸铝2份,配置油相。将水相和油相按照1:1.5~1:2的体积比配制并充分乳化。油苗制备完成后,分装储存于4℃,并进行外观、稳定性和无菌检测。

[0144] (2) VLPs疫苗的免疫检测

[0145] 各取40只健康Balb/c小鼠和健康易感雏鸭,各分成4组,每组10只。4组分别颈部皮下注射v-sp/E/HA2油苗(油苗组)、v-sp/E/HA2蛋白(蛋白组)、灭活疫苗(商品灭活疫苗)和PBS。其中,v-sp/E/HA2油苗和v-sp/E/HA2蛋白的注射剂量为sp/E/HA2蛋白含量2μg/只。

[0146] 其中,对小鼠免疫时添加的佐剂为弗氏佐剂,对雏鸭免疫添加的佐剂为白油佐剂。共进行二次免疫,雏鸭7日龄首免,首免后14d进行二免。

[0147] 分别于免疫前,首免后7d、14d,二免后7d、14d、21d、28d采血,用ELISA测定DTMUV抗体;同时,于二免后14d用DTMUV强毒进行攻毒保护试验,观察雏鸭的临床症状和鸭只死亡情况,至少观察15天。

[0148] 实验中所有数据均用SPSS软件进行统计学分析以及显著性检验(paired-samples Ttest),实验结果用平均值±标准误(mean±SE)表示。

[0149] 2、实验结果

[0150] 结果显示:免疫小鼠后,油苗组和蛋白组血清抗体水平增长与灭活疫苗组接近,都在二免后21天,抗体水平达到高峰,而蛋白组抗体水平显著低于油苗组和灭活疫苗组(图15)。

[0151] 免疫雏鸭后,各免疫组也在二免后21天血清抗体水平达到高峰,但灭活疫苗组和油苗组明显高于蛋白组(图16)。

[0152] 免疫后雏鸭的攻毒保护结果表明(表1),灭活疫苗和油苗组的保护效果均达90%,蛋白组的保护效果为70%。说明sp/E/HA2病毒样颗粒制作油苗后免疫雏鸭能获得良好的免疫保护效果。

[0153] 表1免疫雏鸭后攻毒实验结果:

组别	数量(只)	剂量	发病数(只)	保护率(%)
油苗组	10	4μg/只	1	90
[0154] 蛋白组	10	4μg/只	3	70
灭活疫苗组	10	1羽份/只	1	90
PBS组	10	0.2ml	6	40

[0155] 对比例1

[0156] 1、实验操作

[0157] 同实施例1到实施例7,仅将H3N2-HA的信号肽的长度改为30aa,则其核苷酸序列如SEQ ID NO.19所示;氨基酸序列如SEQ ID NO.20所示,其扩增引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.21~22所示。

[0158] 2、实验结果

[0159] 得到目的片段30sp/E/HA2:其核苷酸序列如SEQ ID NO.23所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.24所示。

[0160] 对比例2

[0161] 1、实验操作

[0162] 同实施例1到实施例7,仅将H3N2-HA的信号肽的长度改为45aa,则其核苷酸序列如SEQ ID NO.25所示;氨基酸序列如SEQ ID NO.26所示,其扩增引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.27~28所示。

[0163] 2、实验结果

[0164] 得到目的片段45sp/E/HA2:其核苷酸序列如SEQ ID NO.29所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.30所示。

[0165] 根据实验结果显示,本发明的方案中重组嵌合病毒样颗粒在细胞上清中的分泌量明显高于对比例1和2。

[0166] SEQ ID NO.1:H3N2-HA的信号肽的核苷酸序列

[0167] atgaagactatcattgctttgagctacatTTTTCTGTCTGGTTTTGCCCCAAGACCTTCAGGAAATGA
CAACAGCACAGCAACTCTTTGCTGGGACATCATGCGGTGCCAACGGAACGCTAGTGAAAACAATCACGAATGAT
CAGATTGAAGTGACTAATGCTACTGAACTGGTTCAG

[0168] SEQ ID NO.2:H3N2-HA的信号肽的氨基酸序列

[0169] MKTIIALSYIFCLVFAQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKITINDQIEVTNATELVQ

[0170] SEQ ID NO.3:DTMUV E基因的核苷酸序列

[0171] gaattagcgggtgtgagatcttactgctatgagccgaaagtgtcggacgtgacgacagaatccagatg
cccaacctatgggagaggctcataatcccaaggcaacttatgctgaatacatatgcaaaaaagatTTTGTGGACAGG
GGTTGGGGCAATGGCTGTGGCTTGTGGAAAGGGGAGCATA CAGACATGTCCAAGTTTGACTGCACAAAGAAA
GCAGAAGGCAGGATCGTGCAGAAGGAGAAGTCCAGTTTGAAGTTGCAGTTTTCATACATGGTTCACGGAAGCGA
GCACCTACCACAATTATTCAGCCAGCAGTCGCTGAAACATGCCGCCAGATTCGTTATAACGCCAAAAGTCCCGT
CTACACCGCTGAGATGGAGGATTATGGTACCATCACACTCGAATGTGAACCCCGATCTGGGGTTGACATGGGGCAA
TTCTATGTCTTTACCATGAACACAAAAGCTGGCTTGTAAACAGAGACTGGTTTCATGATCTCAACTTACCATGGA
CAGGGTCATCAGCGGGGACGTGGCAAACAAAGAGTCATTGATAGAATTTGAGGAGGCCACGCCACCAACAATC
AGTGGTGGCTTTGGCATCACAAGAAGGAGCCCTCCATGCAGCATTGGCGGGAGCTATTCAGTGAAGTACTCTGGA
AGCAAATTGGAAATGACCTCAGGTCACTTAAATGTAGGGTTAAAATGCAGGGTTGAAGCTGAAAGGAATGACCT
ACCCGATGTGTAGCAATACTTTCCCTAGTGAAGAATCCTACCGACACTGGGCATGGCACTGTCTGTGGTGAATT
GTCTTATGCAGGTACCGATGGGCCCTGTAGAGTTCCCATATCCATGTCCGCAGATCTGAATGACATGACACCAGTT
GGACGCTTGATAACAGTCAACCCATACGTGTGCACCTCCTCCACGGGTGCCAAGATAATGGTGAAGTGAACCTC
CATTGGGGATTCACTCATCTTAGTAGGAAGTGGAAAAGGACAGATCAGGTACCGTGGCATAGAAGT

[0172] SEQ ID NO.4:DTMUV E基因的氨基酸序列

[0173] ELAVVRSYCYEPKVSVDVTESRCPTMGEAHPKATYAEYICKKDFVDRGWNGCGLFGKGSIQTCAKFD

CTKKAEGRIVQKENVQFEVAVFIHGSTEASTYHNYSAQQSLKHAARFVITPKSPVYTAEMEDYGTITLECEPRSGVD
MGQFYVFTMNTKSWLVNRDWFHDLNLPWTGSSAGTWQNKESLIEFEEAHATKQSVVALASQEGALHAALAGAI PVKY
SGSKLEMTSGHLKCRVKMQGLKLGMTYPMCSNTFSLVKNPTDTGHGTVVVELSYAGTDGPCRVPISMSADLNDMTP
VGRLITVNPYVSTSSTGAKIMVEVEPPFGDSFILVSGGKQIRYQWHRS

[0174] SEQ ID NO.5:H3HA2的核苷酸序列

[0175] ggcataattcggcgcaatagcaggtttcatagaaaatggttgggagggaatgataggcggttggtacgg
tttcaggcatcaaaaattctgagggcacaggacaagcagcagatcttaaaagcactcaagcagccatcgaccaaatc
aatgggaaactgaatagggtaatcgagaagacgaacgagaaaattccatcaaatcgaaaaggaattctcagaagtag
aagggagaattcaggacctcgagaaatacgttgaagacactaaaatagatctctggtcttacaatgaggagcttct
tgctgctctggagaaccaacatacaattgatctgactgactcggaaatgaacaaactgtttggaaaaacaaggagg
caactgaggggaaaatgctgaggacatgggcaatggttgcttcaaaaatataccacaaatgtgacaatgcttgcatag
ggtcaatcgaaaatgggacttatgaccatgatgtatacagagacgaagcattaacaaccggtttcagatcaaagg
tgttgaactgaagtcaggatacaagactggatcctgtggatttccctttgccatatcatgctttttgctttgtgtt
gttttgcctggggttcatcatgtgggcctgccagaaaggcaacattaggtgcaacatttgcactctga

[0176] SEQ ID NO.6:H3HA2的氨基酸序列

[0177] GIFGAIAGFIENGWEGMIGGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLN RVIEKTNEKFHQIEKE
FSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDN
ACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0178] SEQ ID NO.7

[0179] atgaagactatcattgctttg

[0180] SEQ ID NO.8

[0181] ctgaaccagttcagtagcat

[0182] SEQ ID NO.9

[0183] gaattagcggttgtgagatct

[0184] SEQ ID NO.10

[0185] acttctatgccactggtacct

[0186] SEQ ID NO.11

[0187] ggcataattcggcgcaa

[0188] SEQ ID NO.12

[0189] tcagatgcaaatgttgcacc

[0190] SEQ ID NO.13

[0191] ggactagtatgaagactatcattgcttt

[0192] SEQ ID NO.14

[0193] Ccaagctttcagatgcaaatgttgcacc

[0194] SEQ ID NO.15:sp/E/HA2的核苷酸序列

[0195] atgaagactatcattgctttgagctacattttctgtctggttttcgccaagaccttcaggaaatga
caacagcacagcaactctttgctgggacatcatgcggtgccaaacggaacgctagtgaaaacaatcacgaatgat
cagattgaagtgactaatgctactgaactggttcaggaattagcggttgtgagatcttactgctatgagccgaaag
tgctggacgtgacgacagaatccagatgcccaacctgggagaggctcataatccaaggcaacttatgctgaata

catatgcaaaaaagattttgtggacaggggttggggcaatggctgtggcttgtttggaaaggggagcatacagaca
tgtgccaaagtttgactgcacaaagaaagcagaaggcaggatcgtgcagaaggagaacgtccagtttgaagttgcag
ttttcatacatggttccacggaagcagcacctaccacaattattcagcccagcagtcgctgaaacatgccgccag
attcgttataacgccccaaaagtcccgtctacaccgctgagatggaggattatggtaccatcacactcgaatgtgaa
ccccgatctggggttgacatggggcaattctatgtctttaccatgaacacaaaaagctggcttgttaacagagact
ggtttcatgatctcaactaccatggacagggatcatcagcggggacgtggcaaaaacaagagtcattgatagaatt
tgaggaggcccacgccaccaacaatcagtggtggctttggcatcacaagaaggagccctccatgcagcattggcg
ggagctattccagtgaaagtactctggaagcaaattggaaatgacctcaggtcatcttaaagttagggtaaaatgc
agggtttgaagctgaaaggaatgacctaccgatgtgtagcaatacattttccctagtgagaatcctaccgacac
tgggcatggcactgtcgtggtggaattgtcttatgcaggtaccgatgggccctgtagagttcccatatccatgtcg
gcagatctgaatgacatgacaccagttggacgcttgataacagtcacccatacgtgtcgacctctccacgggtg
ccaagataatggtggaagtggaacctcattcggggattcattcatcttagtaggaagtggaaaaggacagatcag
gtaccagtggcataagaaggcatattcggcgcaatagcaggtttcatagaaaaagggtgggagggaatgatagggc
ggttggtacggtttcaggcatcaaaattctgagggcacaggacaagcagcagatctaaaagcactcaagcagcca
tcgaccaaatacaatgggaaactgaatagggtaatcgagaagacgaacgagaaaatccatcaaatcgaaaaggaatt
ctcagaagtagaagggagaattcaggacctcgagaaatacgttgaagacactaaaaatagatctctggtcttacaat
gcggagcttcttctgctctgagagaaccaacatacaattgatctgactgactcgaaaatgaacaaactgtttgaaa
aaacaaggaggcaactgagggaaaatgctgaggacatgggcaatggttgcttcaaaaataaccacaaatgtgacaa
tgcttgcatagggatcaatcagaaatgggacttatgaccatgatgtatacagagacgaagcattaaacaaccggttt
cagatcaaaggtggtgaactgaagtcaagatacaagactggatcctgtggatttcccttgccatatcatgctttt
tgctttgtgttgttttctgctgggggttcatcatgtgggcctgccagaaaggcaacattaggtgcaacatttgcatctga

[0196] SEQ ID NO.16:sp/E/HA2的蛋白质序列

[0197] MKTIIALSYIFCLVFAQDLPGNDNSTALCLGHHAVPNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQELAVVRSY
CYEPKVS DVTTESRCPTMGEAHNPKATYAEYICKKDFVD RGWNGCGLFGKGSIQTCAKFDCTKKAEGRIVQKEN
VQFEVAVFIHGSTEASTYHNYSAQQSLKHAARFVITPKSPVYTAEMEDYGTITLECEPRSGVDMGQFYVFTMNTKSW
LVNRDWFHDLNLPWTGSSAGTWQNKESLIEFEEAHATKQSVVALASQEGALHAALAGAI PVKYSKSKLEMTSGHLKC
RVKMQGLKLGMTYPMCSNTFSLVKNPTDTGHGTVVVELSYAGTDGPCRVPISMSADLNDMPVGRLLITVNPYVSTS
STGAKIMVEVEPPFGDSFILVSGSGKQIRYQWHRSGIFGAIAGFIENGWEGMIGGWYFRHQNSEGTGQAADLKSTQ
AAIDQINGKLN RVIEKTNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLF
EKTRRQLRENAEDMNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCF
LLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0198] SEQ ID NO.17:H3N2M1基因的核苷酸序列

[0199] atgagccttctaaccgaggtcgaaacgtatgttctctctatcgttccgtcaggeccccctcaaagccga
aatcgcgagagacttgaagatgtctttgctggaaagaacacagatcttgaggctctcatggaatggctaaagaca
agaccaatcctgtcaccctgactaaggggattttgggatttgtattcacgctcaccgtgccagtgagcgaggac
tgcagcgtagacgctttgtccaaaatgccctcaatggggaatggggatccaaaatacatggacaaagcagttaaact
gtacagaaaacttaagaggagataacattccatggggccaaagaaatagcactcagttattctgctggtgcactt
gccagttgcatgggcctcatatacaacaggatgggggctgtgaccactgaagtggcctttggcctggtatgtgcaa
cctgtgaacagattgctgactcccagcacaggtctcataggcaaatggtggcaacaaccaatccactaataagaca

tgagaacagaatggttctggccagcactacagctaaggctatggagcaaatggctggatcaagtgagcaggcagca
gaggccatggagggttgctagtcaggccaggcaaatggtacaggcaatgagagccattgggactcatcctagctcca
gtgctggtctaaaagatgatcttcttgaatttgcaggcctatcagaagcgaatgggggtgcagatgcaacgatt
caagtga

[0200] SEQ ID NO.18:H3N2M1氨基酸序列

[0201] MSLLETEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPV
SERGLQRRRFVQNALNGNDPNMMDKAVKLYRKLKREITFHGAKEIALSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTTEVAFGL
VCATCEQIADSQHRSHRQMVATTNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRAIGTHP
SSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK

[0202] SEQ ID NO.19:H3N2-HA的信号肽的核苷酸序列

[0203] atgaagactatcattgctttgagctacattttctgtctggttttcgccaagaccttcaggaaatga
caacagcacagcaactctttgc

[0204] SEQ ID NO.20:H3N2-HA的信号肽的氨基酸序列

[0205] MKTIIALSYIFCLVFAQDLPGNDNSTATLC

[0206] SEQ ID NO.21

[0207] atgaagactatcattgctttg

[0208] SEQ ID NO.22

[0209] gcaaagagttgctgtgct

[0210] SEQ ID NO.23 30sp/E/HA2核苷酸序列

[0211] atgaagactatcattgctttgagctacattttctgtctggttttcgccaagaccttcaggaaatga
caacagcacagcaactctttgcaatttagcggttgtagatcttactgctatgagccgaaagtgtcggacgtgacg
acagaatccagatgccaacatgggagaggctcataatccaaggcaacttatgctgaatacatatgcaaaaaag
atthttgtggacaggggttggggcaatggctgtggcttgtttggaaaggggagcatacagacatgtgccaagtthga
ctgcacaaagaaagcagaaggcaggatcgtgcagaaggagaacgtccagtttgaagttgcagttttcatacatggt
tccacggaagcgcagcactaccacaattattcagcccagcagtcgctgaaacatgccgccagattcgttataacgc
ccaaaagtcccgtctacaccgctgagatggaggattatggtaccatcacactcgaaatgtgaaccccgatctggggt
tgacatggggcaattctatgtctttaccatgaacacaaaaagctggcttgttaacagagactggtttcatgatctc
aacttaccatggacaggtcatcagcggggacgtggcaaaacaaagagtcattgatagaatttgaggaggcccacg
ccaccaaaccaatcagtggtggctttggcatcacaagaaggagccctccatgcagcattggcgggagctattccagt
gaagtactctggaagcaaatggaaatgacctcaggtcatcttaaatgtagggttaaaatgcagggtttgaagctg
aaaggaatgacctaccgatgtgtagcaatacattttccctagtgagaatcctaccgacactgggcatggcactg
tcgtgggtggaattgtcttatgcaggtaccgatgggcccctgtagagttcccatatccatgtcggcagatctgaatga
catgacaccagttggacgcttgataacagtcaaccatacgtgtcgacctcctccacgggtgccaagataatggtg
gaagtggaacctccattcggggattcattcatcttagtaggaagtggaaaaggacagatcaggtaccagtggcata
gaagtggcatattcggcgcaatagcaggtttcatagaaaatggttgggagggaaatgataggcggttggtacggttt
caggcatcaaaattctgagggcacaggacaagcagcagatcttaaaagcactcaagcagccatcgaccaaataat
gggaaactgaatagggtaatcga gaagacgaacgagaaattccatcaaatcgaaggaattctcagaagtagaa
gggagaattcaggacctcgagaaatacgttgaagacactaaaatagatctctggtcttacaatgcggagcttcttg
tcgctctggagaaccaacatacaattgatctgactgactcggaaatgaacaaactgthtggaaaaacaaggaggca

actgagggaaaatgctgaggacatgggcaatggttgcttcaaaatataaccacaaatgtgacaatgcttgcataggg
tcaatcagaaatgggacttatgaccatgatgtatacagagacgaagcattaacaaccggttcagatcaaaggtg
ttgaactgaagtcaggatacaagactggatcctgtggatttcctttgccatatcatgctttttgctttgtgtgt
tttgctggggttcatcatgtgggctgccagaaaggcaacattaggtgcaacatttgcatctga

[0212] SEQ ID NO.24 30sp/E/HA2氨基酸序列

[0213] MKTIIALSYIFCLVFAQDLPGNDNSTATLCELAVVRSYCYEPKVS DVTTESRCPTMGEAHNPKATYAEY
ICKKDFVDRGWNGCGLFGKGSIQTCAKFDCTKKAEGRIVQKENVQFEVAVFIHGSTEASTYHNYSAAQQLKHAARF
VITPKSPVYTAEMEDYGTITLECEPRSGVDMGQFYVFTMNTKSWLVNRDWFHDLNLPWTGSSAGTWQNKESLIEFEE
AHATKQSVVALASQEGALHAALAGAIPVKYSGSKLEMTSGHLKCRVKMQGLKLGMTYPMCSNTFSLVKNPTDTGHG
TVVVELSYAGTDGPCRVPISMSADLNDMTPVGR LITVNPYVSTSSTGAKIMVEVEPPFGDSFILVSGGKQIRYQWH
RSGIFGAIAGFIENGWEGMIGGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLN RVIEKTNEKFHQIEKEFSEVEG
RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSI
RNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGNIRCNICI

[0214] SEQ ID NO.25

[0215] atgaagactatcattgctttgagctacattttctgtctggttttcgccaagaccttcaggaaatga
caacagcacagcaactctttgcctgggacatcatgcggtgccaaacggaacgctagtgaaaacaatc

[0216] SEQ ID NO.26

[0217] MKTIIALSYIFCLVFAQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTI

[0218] SEQ ID NO.27

[0219] atgaagactatcattgctttg

[0220] SEQ ID NO.28

[0221] gattgttttcactagcgttc

[0222] SEQ ID NO.29 45sp/E/HA2核苷酸序列

[0223] atgaagactatcattgctttgagctacattttctgtctggttttcgccaagaccttcaggaaatga
caacagcacagcaactctttgcctgggacatcatgcggtgccaaacggaacgctagtgaaaacaatcgaattagcg
gttgtgagatcttactgctatgagccgaaagtgtcggacgtgacgacagaatccagatgcccaacctgggagagg
ctcataatcccaaggcaacttatgctgaatacatatgcaaaaaagattttgtggacaggggttggggcaatggctg
tggcttgtttgaaaggggagcatacagacatgtgccaaagtttgactgcacaaagaaagcagaaggcaggatcgtg
cagaaggagaacgtccagtttgaagttgcagttttcatacatggttccacggaagcagcaccctaccacaattatt
cagcccagcagtcgctgaaacatgccgccagattcggttataacgcccaaaaagtcctgcttacaccgctgagatgga
ggattatggtaccatcacactcgaatgtgaacccgatctggggttgacatggggcaattctatgtctttaccatg
aacacaaaaagctggcttgtaacagagactggtttcatgatctcaacttaccatggacagggatcatcagcgggga
cgtggcaaaaacaaagagtcattgatagaatttgaggaggcccacgccaccaacaacatcagtggtggctttggcatc
acaagaaggagccctccatgcagcattggcgggagctattccagtgaaagtactctggaagcaaattggaaatgacc
tcaggtcatcttaaatgtagggttaaaatgcagggtttgaagctgaaaggaatgacctaccgatgtgtagcaata
cattttccctagtgaaagaatcctaccgacactgggcatggcactgtctggtggaattgtcttatgcaggtaccga
tgggccctgtagagttcccatatccatgtcggcagatctgaatgacatgacaccagttggacgcttgataacagtc
aaccatacgtgtcgacctcctccaggggtccaagataatggtggaagtggaacctcattcggggattcattca
tcttagtaggaagtggaaaaggacagatcaggtaccagtggtcatagaagtggcatattcggcgcaatagcaggttt

catagaaaatggttgggaggggaatgataggcggttggtacggtttcaggcatcaaaattctgagggcacaggacaa
gcagcagatcttaaaagcactcaagcagccatcgaccaaataatgggaaactgaatagggtaatcgagaagacga
acgagaaaattccatcaaatcgaaaaggaattctcagaagtagaaggagaattcaggacctcgagaaatacgttga
agacactaaaatagatctctggtcttacaatgCGGagcttcttgtcgtctggagaaccaacatacaattgatctg
actgactcggaaatgaacaaactgtttgaaaaacaaggaggcaactgagggaaaaatgctgaggacatgggcaatg
gttgcttcaaaatataccacaaaatgtgacaatgcttgcatagggtcaatcagaaatgggacttatgacatgatgt
atacagagacgaagcattaaacaaccggtttcagatcaaagggttgaactgaagttaggatacaaagactggatc
ctgtggatttcctttgccatatacatgctttttgctttgtgtttttgctggggttcacatgtgggcctgccaga
aaggcaacattaggtgcaacatttgcattctga

[0224] SEQ ID NO.30 45sp/E/HA2氨基酸序列

[0225] MKTIIALSYIFCLVFAQDLPGNDNSTATLCLGHHAVPNGTLVKTIELAVVRSYCYEPKVSDVTTESRCP
TMGEAHNPKATYAEYICKKDFVDRGWNGCGLFGKGSIQTCAKFDCTKKAEGRIVQKENVQFEVAVFIHGSTEASTY
HNYSAAQQLKHAARFVITPKSPVYTAEMEDYGTITLECEPRSGVDMGQFYVFTMNTKSWLVNRDWFHDLNLPWTGSS
AGTWQNKESLIEFEEAHATKQSVVALASQEGALHAALAGAI PVKYSKLEMTSGHLKCRVKMQGLKLGMTYPMCS
NTFSLVKNPTDTGHGTVVVELSYAGTDGPCRVPISMSADLNDMTPVGRLITVNPYVSTSSTGAKIMVEVEPPFGDSF
ILVSGKQIRYQWHRSGIFGAIAGFIENGWEGMIGGWYFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLN RVIEKTN
EKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENAEDMGNGC
FKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILWISFAISCFLLCVLLGFIMWACQKGN
IRCNICI

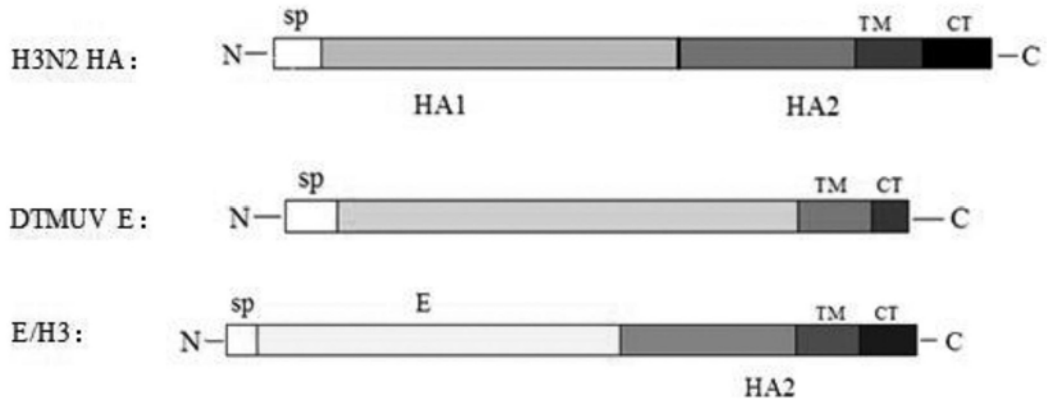


图1

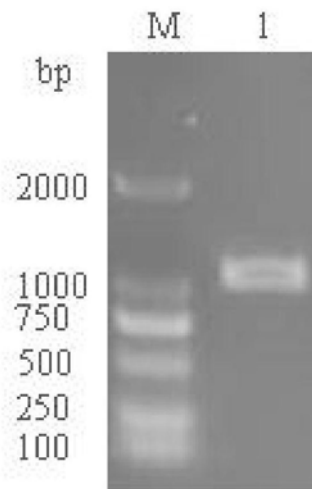


图2

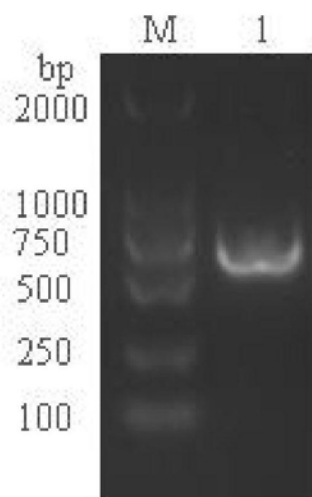


图3

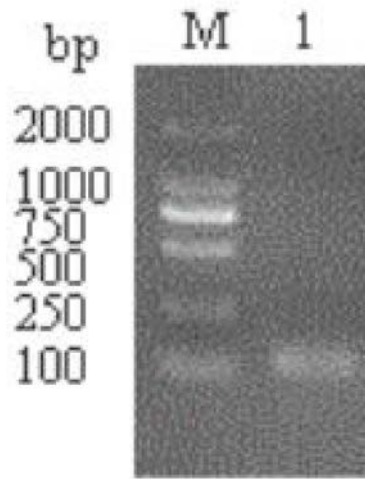


图4



图5

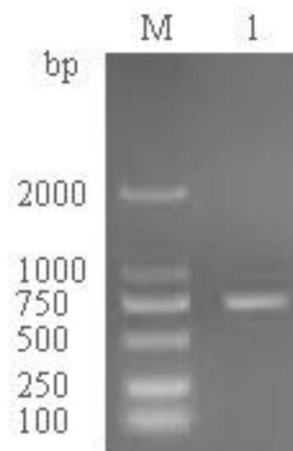


图6

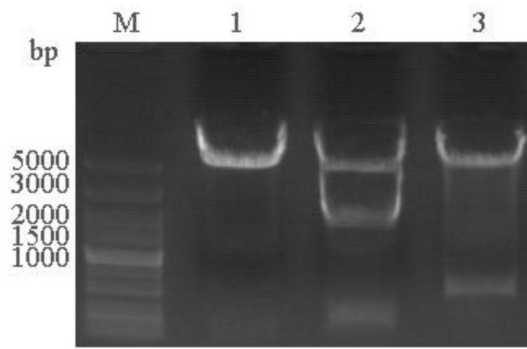


图7

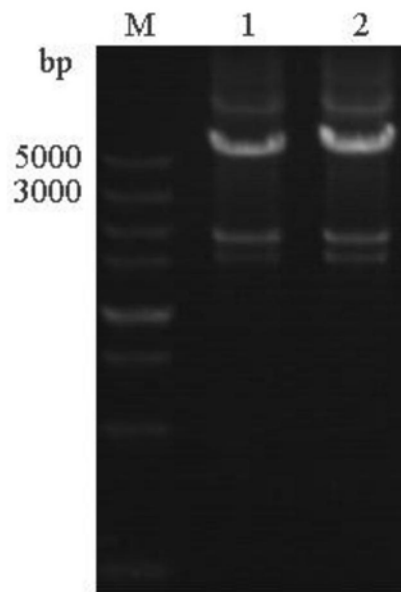


图8

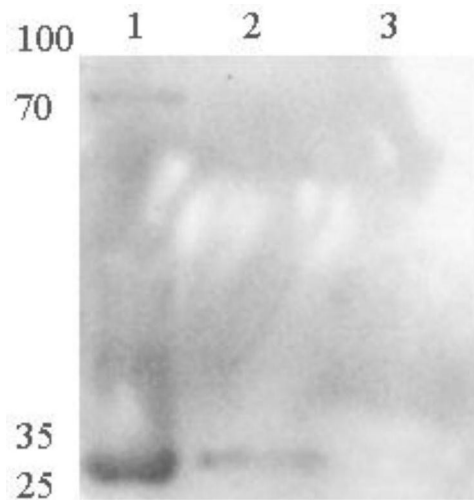


图9

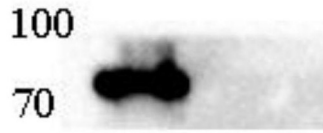


图10

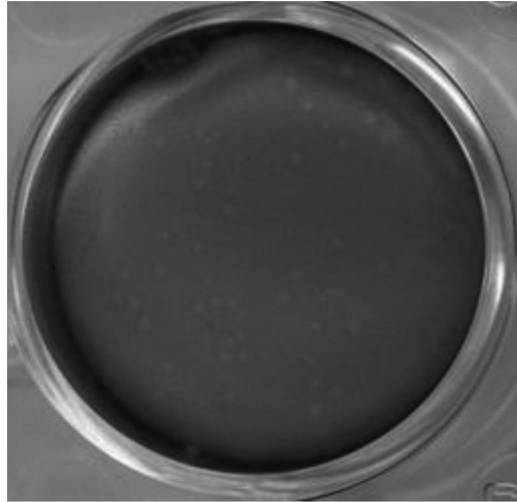


图11

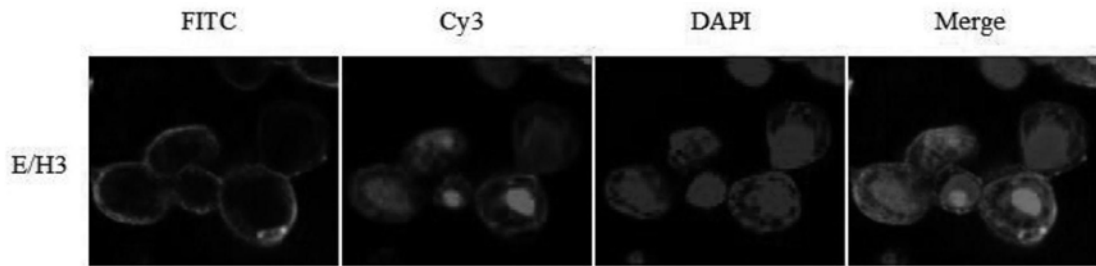


图12

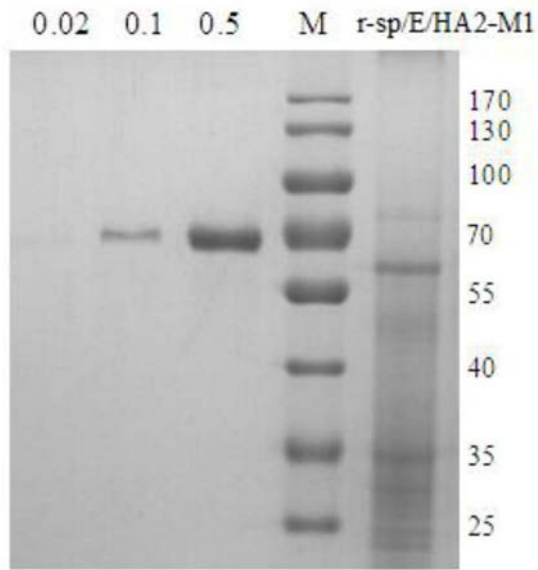


图13

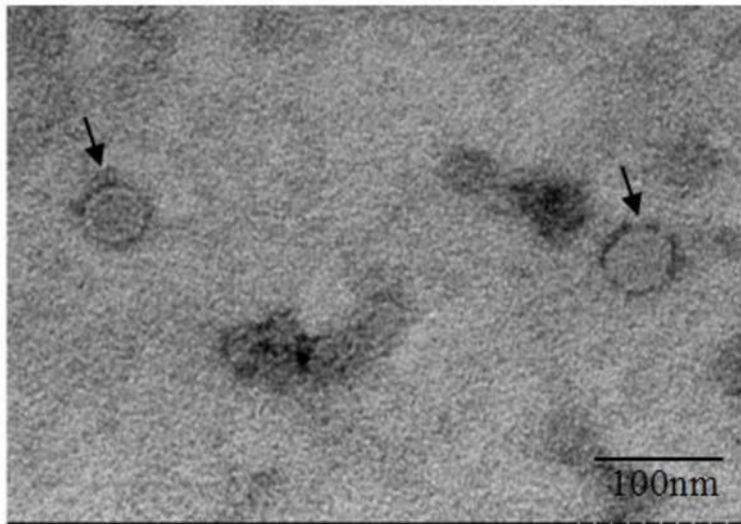


图14

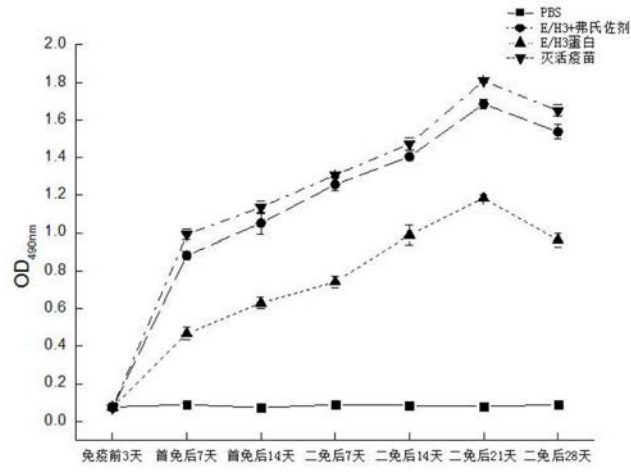


图15

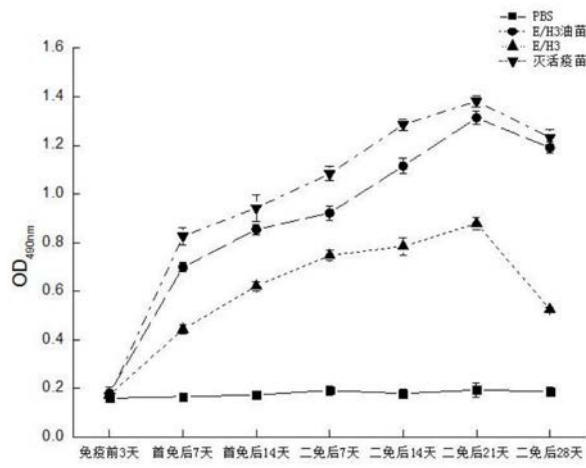


图16