



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111393531 B

(45) 授权公告日 2023.01.17

(21) 申请号 201910268140.X

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2019.04.03

C12N 5/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/187 (2006.01)

申请公布号 CN 111393531 A

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.07.10

(56) 对比文件

(66) 本国优先权数据

CN 108504687 A, 2018.09.07

201910004596.5 2019.01.03 CN

CN 104262484 A, 2015.01.07

(73) 专利权人 浙江海隆生物科技有限公司

C L Martins et al. Modulation of

地址 312366 浙江省绍兴市滨海新区百川路1号

porcine peripheral blood-derived

macrophage functions by in vitro

(72) 发明人 钱泓 吴有强 张强 徐玉兰

infection with African swine fever virus

吴素芳 车影

(ASFV) isolates of different virulence.

《Viral Immunol》.1987,

(74) 专利代理机构 北京乾诚五洲知识产权代理

审查员 李煦颖

有限责任公司 11042

专利代理师 付晓青 李广文

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书16页

C07K 19/00 (2006.01)

序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

一种亚单位融合蛋白CD2V-Fc及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种亚单位融合蛋白CD2V-Fc及其制备方法和应用,所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc含有非洲猪瘟病毒表面囊膜蛋白CD2V的胞外区和猪的抗体Fc蛋白,所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明能够在大量可溶性表达CD2V-Fc,蛋白稳定,克服了现有技术中的诸多问题,且制备方法简单、成本低。

1. 一种亚单位融合蛋白CD2V-Fc, 其特征在于, 所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc含有非洲猪瘟病毒表面囊膜蛋白CD2V的胞外区和猪的抗体Fc蛋白; 其中, 所述非洲猪瘟病毒表面囊膜蛋白CD2V的胞外区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示, 其中所述猪的抗体Fc蛋白为猪的IgG的重链恒定区, 其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示, 所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc, 其特征在于, 所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc还包括如SEQ ID NO1所示的氨基酸序列包括经过颠倒CD2V和Fc的顺序并且将Fc放置在氨基端的衍生的蛋白质。

3. 根据权利要求2所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc, 其特征在于, 其中亚单位融合蛋白CD2V-Fc还包括在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端上连接的poly-Arg、poly-His、flag、c-myc和HA中的一种或多种标签氨基酸。

4. 根据权利要求1所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc, 其特征在于, 所述非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc编码的基因序列如SEQ ID NO.4所示。

5. 一种如权利要求1~4任一所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括如下步骤:

1) 将如SEQ ID NO.4所示的非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc编码的基因克隆到真核表达载体中, 以得到含有非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc编码的基因的重组质粒; 所述真核表达载体为pEE6.4、pEE12.4、pGL4.13、pcDNA3.1、pcDNA3.3;

2) 再将含有非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白编码的基因的重组质粒转染至CHO细胞中, 以得到CHO细胞株;

3) 通过培养、筛选、驯化步骤2) 中所述CHO细胞株以得到高度表达的细胞株;

4) 发酵培养步骤3) 中所述高度表达的细胞株, 纯化后得到重组非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 所述非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的表达系统为哺乳动物细胞, 所述哺乳动物细胞为CHO细胞、293T细胞, 所述CHO细胞为DG44、DXB11、CHO-K1、CHO-S细胞。

7. 一种根据权利要求1-4任一所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc在制备用于诊断、预防和治疗非洲猪瘟的疫苗中的应用。

## 一种亚单位融合蛋白CD2V-Fc及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品技术领域。涉及一种亚单位融合蛋白CD2V-Fc及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)引起的猪的急性、热性、高度接触性传染病。猪是ASFV自然感染的唯一哺乳动物宿主,包括家猪和野猪,尤其是家猪,易感性极高。猪感染非洲猪瘟病毒后临床上以皮肤充血,内脏器官出血,高热为特征,发病率及死亡率高达100%。世界动物卫生组织将其列为A类疫病,我国也将其列为一类动物传染病。

[0003] 非洲猪瘟自1927年在非洲大陆发现以来,对非洲和欧洲的养猪业造成极大打击。2018年8月份以来,在我国多个省份爆发,给我国养猪业带来了严重的经济损失。虽然,国内外学者对非洲猪瘟做了大量的研究工作,但研究发现:常规制备的非洲猪瘟灭活苗效果不明显,而弱毒苗保护效果也不好,且安全性差,易造成散毒。目前,世界上尚未有有效预防非洲猪瘟的疫苗和治疗该病的药物发现,迫切需要新型疫苗的研发和生产来预防非洲猪瘟。

[0004] ASFV病毒是具有囊膜的虫媒DNA病毒。病毒颗粒呈二十面体对称结构,平均直径200nm,表面有含糖脂类的囊膜覆盖。其病毒基因组为双股线性DNA,大小为170-190kb,整个基因组大约有150个ORF,编码150-200中蛋白质。CD2V蛋白由EP402R基因编码,有一段信号肽和跨膜区域。胞外区的氨基酸残基与宿主的CD2V蛋白相似,包含2个免疫球蛋白样结构域,能吸附红细胞在病毒扩散及损伤淋巴细胞的过程中起着重要的作用。研究发现,CD2V是病毒囊膜表面蛋白,针对CD2V的抗体可以很好的阻止病毒的吸附。因此,CD2V是一个很好的保护性抗原。在Ruiz-Gonzalvo,F.,Rodriguez,F.and Escribano,J.M.,Virology 218, 285-289 (1996),报道用杆状病毒系统表达CD2V胞外区,并且只有western的结果,没有SDS-PAGE,表达量很低。但未见其大量表达,说明CD2V胞外区的稳定性较差,因此,很难在实际生产中应用。抗体类蛋白在血液中含丰富,半衰期长达21天,其Fc片段是抗体的恒定区,具有同源二聚体结构,该片段具有稳定蛋白的作用。因此,本发明将非洲猪瘟病毒CD2V蛋白胞外区和猪的抗体Fc片段创造性地融合表达,发现不但能保持CD2V的同源二聚体结构,且又能有效的保持CD2V的稳定,还可可大规模生产应用。在当前没有可能大规模制备灭活疫苗或弱毒疫苗的情况下,确定一种制备该病毒的免疫原性蛋白的方法,以便研究一种能够预防该疾病的疫苗或具有能够预防该疾病的亚单位蛋白具有重大的意义。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种可大规模工业化生产的含有非洲猪瘟表面CD2V亚单位蛋白的融合蛋白,及其制备方法和应用;

[0006] 为了解决该问题,本发明人在充分分析、研究目前所能得到的非洲猪瘟病毒的资料的基础上,并通过结构分析CD2V蛋白的整体结构,提出了一种能稳定高效表达非洲猪瘟

CD2V抗原和猪免疫球蛋白Fc的亚单位融合蛋白CD2V-Fc及其在CHO或293T细胞系统中构建和表达方法。本发明获得的可以分泌表达亚单位融合蛋白CD2V-Fc的单克隆细胞株,表达产量高,经一步亲和层析即可获得大量的融合蛋白。所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc含有非洲猪瘟病毒表面囊膜蛋白CD2V的胞外区和猪的抗体Fc蛋白,所述亚单位融合蛋白CD2V-Fc的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 根据本发明所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的技术方案,优选地,如SEQ ID N01所示的氨基酸序列包括经过取代、缺失或添加一个氨基酸或几个氨基酸且具有免疫原性的衍生的蛋白质。

[0008] 根据本发明所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的技术方案,优选地,如SEQ ID N01所示的氨基酸序列包括经过颠倒CD2V和Fc的顺序并且将Fc放置在氨基端的衍生的蛋白质。

[0009] 根据本发明所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的技术方案,优选地,所述非洲猪瘟病毒表面囊膜蛋白CD2V的胞外区的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 根据本发明所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的技术方案,优选地,所述猪的抗体Fc蛋白为猪的IgG的重链恒定区,所述猪的抗体Fc蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0011] 根据本发明所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的技术方案,优选地,在SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端上连接poly-Arg、poly-His、flag、c-myc和HA中的一种或多种标签氨基酸。

[0012] 根据本发明所述的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的技术方案,优选地,所述非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的表达系统包括但不限于哺乳动物细胞以及昆虫细胞。优选地,所述哺乳动物细胞为CHO细胞、293T细胞。所述哺乳动物细胞为CHO细胞、293T细胞。更优选地,所述哺乳动物细胞为CHO细胞。

[0013] 根据本发明的另一方面,本发明提供了一种制备亚单位融合蛋白CD2V-Fc的方法,所述制备方法包括如下步骤:1)将如SEQ ID NO.4所示的非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc编码的基因克隆到真核表达载体中,以得到含有非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc编码的基因的重组质粒;2)再将含有非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白编码的基因的重组质粒转染至CHO细胞中,以得到CHO细胞株;3)通过培养、筛选、驯化步骤2)中所述CHO细胞株以得到高度表达的细胞株;4)发酵培养步骤3)中所述高度表达的细胞株,纯化后得到重组非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc。

[0014] 根据本发明所述的制备方法的技术方案,优选地,步骤1)中,所述真核表达载体为pEE6.4、pEE12.4、pGL4.13、pcDNA3.1、pcDNA3.3。优选地,所述真核表达载体为pEE12.4。

[0015] 根据本发明所述的制备方法的技术方案,优选地,所述CHO细胞为DG44、DXB11、CHO-K1、CHO-S细胞。优选地,所述CHO细胞为CHO-K1细胞。

[0016] 根据本发明所述的制备方法的技术方案,优选地,所述非洲猪瘟CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的表达系统为哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞为CHO细胞、293T细胞。

[0017] 本发明构建并筛选了悬浮稳定高效分泌表达非洲猪瘟病毒CD2V的亚单位融合蛋白CD2V-Fc的CHO细胞株,该细胞株表达亚单位融合蛋白CD2V-Fc产量高(产量高达1-2g/L)、易于纯化(如图4所示,细胞培养上清中的目的蛋白纯度都能达到70%以上,只需一步亲和层析就能使目的蛋白纯度达到90%以上,远远满足亚单位疫苗和诊断试剂的需求)、易于大规模生产。因此,解决了CD2V不能稳定表达并且降低了生产成本。另外,由于生产用的CHO

细胞株在培养时可控制性高、质控容易、生产蛋白批次间稳定,生物安全高(没有病毒,不存在散毒的风险)。

### 附图说明

[0018] 图1表示pEE12.4-OPTI-CD2V-Fc质粒图谱。

[0019] 图2表示pEE12.4-OPTI-CD2V-Fc双酶切鉴定结果:M是DNA Marker:DL10000Marker;1是pEE12.4-OPTI-CD2V-Fc双酶切电泳结果。

[0020] 图3表示亚单位融合蛋白CD2V-Fc纯化后SDS-PAGE检测结果:1是亚单位融合蛋白CD2V-Fc,2是Marker。

[0021] 图4A,B表示纯化后的亚单位融合蛋白CD2V-Fc在4℃和-20℃分别放置10周后SDS-PAGE检测结果:M是Marker,1是4℃和放置10周后的亚单位融合蛋白CD2V-Fc;2是-20℃和放置10周后的亚单位融合蛋白CD2V-Fc。

[0022] 图5表示亚单位融合蛋白CD2V-Fc在纯化后Westernblot检测结果:1是Marker,2是亚单位融合蛋白CD2V-Fc

### 具体实施方式

[0023] 以下将结合附图和实施例对本发明做进一步说明,本发明的实施例仅用于说明本发明的技术方案,并非限定本发明。

[0024] 本发明实施例中所使用的菌株、质粒和试剂均为市售产品。

[0025] 本发明试剂及药品的来源列单如下:

[0026] CHO-K1细胞来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库中国科学院上海生命科学研究所细胞库;

[0027] 细胞培养基和血清均购自美国gibco公司;

[0028] 真核表达载体pEE12.4购自上海林渊生物科技有限公司;

[0029] Lipofectamine LTX购自美国Thermo Fisher公司;

[0030] 甲硫氨酸亚砷亚铵(L-methioninesulfoximine,MSX)购于Sigma公司;

[0031] BCA蛋白质定量试剂盒购自美国Thermo Fisher公司。

[0032] 实施例1 CD2V-Fc蛋白表达及制备

[0033] 1.1非洲猪瘟CD2V-Fc蛋白的选择

[0034] 非洲猪瘟结构蛋白CD2V是由EP402R基因编码的一段多肽,预测分析在207-229aa处有一个跨膜区,已有研究表明,CD2V蛋白能够与红细胞相互作用,在病毒的扩散和淋巴细胞损伤的过程中有很重要的作用。因此,利用CD2V蛋白作为抗原具有很好的防控非洲猪瘟的感染,目前还没有报道在真核表达系统中能大规模表达及纯化得到该蛋白,这或许是CD2V蛋白不稳定造成,本发明为了解决这个重要的技术问题,在CD2V的羧基端引入了猪的抗体Fc片段,以保证CD2V的结构和蛋白稳定。

[0035] 1.2非洲猪瘟CD2V-Fc蛋白密码子优化

[0036] 本实验室以2018年在中国报道流行的非洲猪瘟毒株亚型,参考Georgia 2007/1全基因序列(GenBank:FR682468.1)为模板,发现基因组序列73369-74451编码非洲猪瘟CD2V蛋白序列。进一步分析1M-15S可能为CD2V蛋白的分泌信号肽,16Q-206Y可能为CD2V蛋白的

胞外区。该段氨基酸序列预测的三维结构与人的CD2蛋白类似,其三维结构模式图如图1所示。从结构上看是一个同源二聚体结构,进一步为了使CD2V稳定表达,我们在CD2V胞外区羧基端添加了猪Fc序列 (GenBank:AK405774.1) 即CD2V-Fc作为我们的免疫原性蛋白。氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0037] 为了使所述亚单位CD2V-Fc蛋白便于纯化,可在如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端连接如表一所示的标签,本实施例中具体以Poly-His为例,将其连接于如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的羧基末端处。

[0038] 表一标签及其氨基酸序列

	标签	序列	残基
	Poly-Arg	RRRRRR	5-6 个 (通常是 6 个)
[0039]	Poly-His	HHHHHH	6-10 个 (通常是 6 个)
	FLAG	DYKDDDDK	8
	c-myc	EQKLISEEDL	10
	HA	YPYDVPDYA	9

[0040] 编码该段氨基酸优化后序列的基因序列如SEQ ID NO.6所示,该序列合成工作委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

[0041] 实施例2:pEE12.4-OPTI-CD2V-Fc重组质粒构建

[0042] 2.1 PCR扩增目的片段OPTI-CD2V-Fc

[0043] 2.1.1 PCR反应

[0044] (1) 引物设计及合成

[0045] 上游引物:5' -acgaAGCTTGCCGCCACCATGATCAT-3'

[0046] 下游引物:5' -GCGGAATTGAATTCTTAATGGTGATG-3'

[0047] (2) 加样体系50 $\mu$ L,如下表所示:

	加样成分	体积 ( $\mu$ L)
	Q5 Mix	25
	上游引物(10 $\mu$ M)	2.5
[0048]	下游引物(10 $\mu$ M)	2.5
	OPTI-CD2V-Fc	1
	dd H <sub>2</sub> O	19
	总体积	50

[0049] PCR扩增程序:

	95°C	2 min	} 30 循环
	95°C	30 s	
[0050]	55°C	45 s	
	72°C	1 min	
	72°C	10 min	
	8°C	Forever	

[0051] 2.1.2 PCR产物进行胶回收

[0052] (1) 标记好样品收集EP管、吸附柱以及收集管；

[0053] (2) 称取标记好的空的EP管重量，并记录数值；

[0054] (3) 将单一的目的DNA条带在切胶仪上从琼脂糖凝胶中用手术刀小心切下放入干净的1.5mL离心管中；

[0055] (4) 向步骤(3)中的1.5mL离心管中加入600μL PC buffer, 50°C水浴放置5min左右，其间不断温和上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解；

[0056] (5) 柱平衡：向吸附柱CB2中(吸附柱预先放入收集管中)加入500μL平衡液BL，离心12,000rpm/min, 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中；

[0057] (6) 将步骤(5)所得溶液加至吸附柱CB2中，静置2min, 10,000rpm/min，离心30s，倒掉收集管中的废液，再将吸附柱CB2放入收集管中；

[0058] (7) 向吸附柱中加入600μL漂洗液PW buffer，静置3min，离心10,000rpm/min, 30s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CB2放入收集管中；

[0059] (8) 重复步骤(7)；

[0060] (9) 空吸附柱离心，12,000rpm/min, 2min，尽量除去漂洗液，将吸附柱置于室温放置10min，彻底晾干；

[0061] (10) 将吸附柱CB2放入收集管中，向吸附膜中间位置悬空滴加50μL Elutionbuffer (65°C预热)，静置3min，离心12,000rpm/min, 2min；

[0062] (11) 从离心机中取出步骤(10)中离心管，丢弃中间的吸附柱CB2，盖上离心管盖子，保留离心管中的DNA样品；

[0063] (12) 将步骤11中的DNA样品置于4°C保存，准备琼脂糖凝胶电泳鉴定胶回收DNA片段。

[0064] 2.2 PCR产物及载体双酶切反应

[0065] (1) 标记好需要用到的1.5mL EP管，在1.5mL EP管中按照下表进行加样、混匀：50μL反应体系

	加样成分名称	体积 ( $\mu\text{L}$ )
	dd H <sub>2</sub> O	补充至 50
[0066]	10×buffer	5
	DNA 样品	2 $\mu\text{g}$ 时体积
	HindIII	2.5
	EcoR I	2.5

[0067] (2) 将步骤(1)中的1.5mL EP管置于相应酶最适温度恒温水浴锅中,水浴2-3h。

[0068] 双酶切产物胶回收:取出上述双酶切体系,进行琼脂糖凝胶电泳以回收其中的DNA片段,方法同1.2.1中PCR产物胶回收。

[0069] 2.3连接反应

[0070] (1) 准备洁净的1.5mL EP管若干,做好标记,置于EP管架上待用。

[0071] (2) 在1.5mL EP管按照下表进行加样、混匀。

	加样成分名称	实验组 ( $\mu\text{L}$ )	空白组 ( $\mu\text{L}$ )
[0072]	dd H <sub>2</sub> O	/	6
	10× T4 连接 buffer	1	1
[0073]	目的片段	6	-
	载体	2	2
	T4 连接酶	1	1

[0074] (3) 按照步骤(2)中表格完成加样后,将每个10 $\mu\text{l}$ 反应体系置于16℃低温冷却液循环机中,水浴10-16h;

[0075] (4) 取出步骤(3)中EP管,将其置于65℃水浴锅中,水浴15min;

[0076] (5) 取出步骤(4)中的EP管,置于4℃保存。

[0077] 2.4转化反应

[0078] (1) 将10 $\mu\text{L}$ 连接反应液快速加入100 $\mu\text{L}$ 感受态细胞中,并吹打混匀,冰浴30min;

[0079] (2) 取出样品管,置于42℃水浴100s,然后立即冰浴2min;

[0080] (3) 取出样品管,在超净工作台中,向样品管中加入600 $\mu\text{L}$ 液体LB培养基,然后将样品管置于37℃恒温摇床,220rpm/min,培养1h;

[0081] (4) 涂板:取出步骤(3)中样品管,室温离心8,000rpm/min,2min,去掉600 $\mu\text{L}$ 上清液体,剩余上清液重悬管底部的菌体,将重悬的菌液放入相应的转化平板中心,用涂菌棒将转化平板中心的菌液均匀铺开。

[0082] (5) 将转化步骤(4)平板正置于生化恒温培养箱中,37℃培养1h后,将转化平板倒置进行培养15h;

[0083] (6) 观察转化结果。

[0084] 2.5质粒抽提与双酶切鉴定

[0085] 2.5.1质粒抽提

[0086] (1) 用10 $\mu$ L移液枪头从转化平板中挑取单克隆至5mL含氨苄抗性的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,220rpm/min摇菌过夜;

[0087] (2) 将菌液移至1.5mL EP管中,室温离心,12,000rpm/min,2min,弃上清;

[0088] (3) 向步骤(2)的EP管中加入250 $\mu$ L质粒提取试剂P1buffer,彻底悬浮菌体;

[0089] (4) 向步骤(3)溶液中加入250 $\mu$ L P2 buffer,立即温和颠倒离心管5-10次混匀,室温静置2-4min;

[0090] (5) 向步骤(4)溶液中加入350 $\mu$ L P3 buffer,立即温和颠倒离心管5-10次混匀;室温静置2-4min;

[0091] (6) 将步骤(5)溶液,室温离心,14,000rpm/min,10min;

[0092] (7) 将步骤(6)中上清溶液移至吸附柱中心,室温离心,12,000rpm/min,30s,倒掉收集管中液体;

[0093] (8) 向吸附柱中心加入500 $\mu$ L buffer DW1,室温离心,12,000rpm/min,30s,倒掉收集管中液体;

[0094] (9) 向吸附柱中心加入500 $\mu$ L wash solution,室温离心,12,000rpm/min,30s,倒掉收集管中液体,重复一次;

[0095] (10) 空吸附柱,室温离心,12,000rpm,2min。

[0096] (11) 将吸附柱放入一个干净的1.5mL离心管中,向吸附膜中心加入30 $\mu$ L Elution buffer,室温静置5min,室温离心,12,000rpm,2min。保存管中DNA溶液。

[0097] 2.5.2双酶切鉴定

[0098] (1) 标记好需要用到的1.5mL EP管,按照下表进行加样:20 $\mu$ L反应体系

	加样成分名称	体积 ( $\mu$ L)
	dd H <sub>2</sub> O	补充至 20 $\mu$ L
[0099]	10 $\times$ buffer	2
	DNA 样品	质量为 1 $\mu$ g 时体积
	HindIII	1
	EcoR I	1

[0100] (2) 将步骤(1)中的EP管20 $\mu$ L反应体系置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中,水浴2h。

[0101] (3) 将步骤(2)中的双酶切体系样品进行琼脂糖凝胶电泳,检查插入片段大小是否正确;实验结果见图2:酶切鉴定构建正确。

[0102] (4) 选择插入片段正确的克隆送测序公司测序。

[0103] 2.6无内毒素质粒大提

[0104] 2.6.1无内毒素质粒提取

[0105] (1) 测序正确的克隆接种至100mL含氨苄抗性的培养基中,于37 $^{\circ}$ C恒温摇床,220rpm/min,培养15h;

- [0106] (2) 将步骤(1)中培养的菌液转移至50mL离心管中,室温8,000rpm/min、离心5min,收集菌体,弃掉上清培养基;
- [0107] (3) 向步骤(2)的离心管中加入8mL溶液P1,用移液器充分重悬菌体;
- [0108] (4) 向步骤(3)的离心管中加入8mL溶液P2,立即温和颠倒离心管6-8次,室温静置5min;
- [0109] (5) 向步骤(4)的离心管中加入8mL溶液P4,立即上下颠倒6-8次,充分混匀至溶液出现白色絮状沉淀,室温放置10min左右。8,000rpm/min室温离心5-10min,使白色沉淀离至管底;
- [0110] (6) 将步骤(5)中上清液全部小心移入过滤器CS1中,慢慢推柄过滤器,滤液收集在干净的50mL离心管中;
- [0111] (7) 柱平衡:向吸附柱CP6中(吸附柱放入50mL收集管中)加入2.5mL的平衡液BL,室温8,000rpm/min离心2min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中;
- [0112] (8) 向步骤(6)滤液中加入0.3倍滤液体积的异丙醇,上下颠倒混匀后转移到吸附柱CP6中。室温8,000rpm/min离心2min,倒掉收集管中液体,将吸附柱CP6重新放入同一个收集管中;
- [0113] (9) 向步骤(8)吸附柱CP6中加入10mL漂洗液PW,室温8,000rpm/min离心2min,弃收集管中废液,将吸附柱重新放回收集管中;
- [0114] (10) 重复操作步骤(9)一次;
- [0115] (11) 向步骤(10)吸附柱CP6中加入3mL无水乙醇,室温8,000rpm/min离心2min,倒掉废液;
- [0116] (12) 将步骤(11)吸附柱CP6重新放回收集管中,室温8,000rpm/min离心5min。将吸附柱CP6开盖,置于室温放置数分钟晾干;
- [0117] (13) 将步骤(12)中吸附柱放入干净的50mL离心管中,在吸附膜中央加入1-2mL缓冲液TB,室温静置5min,室温8,000rpm/min离心2min,将50mL离心管中的洗脱液全部移入一个干净的1.5mL离心管,测浓度,-20℃保存。
- [0118] (14) 取1-2μL所得到的质粒DNA溶液进行琼脂糖凝胶电泳并保存电泳结果数据。
- [0119] 实施例3:pEE12.4-OPTI-CD2V-Fc重组质粒转染CHO-K1细胞与单克隆筛选的建立
- [0120] 3.1 CHO-K1细胞转染
- [0121] (1) 准备:生物安全柜紫外灭菌30min;DMEM/F12(含10%血清,1%双抗)、DMEM/F12与PBS置于37℃水浴锅预热至37℃。
- [0122] (2) 从37℃培养箱中取出细胞(10cm细胞培养皿),弃去上清培养基,用预温的8mL PBS洗细胞一次,并弃去PBS。
- [0123] (3) 每个10cm细胞培养皿加入1-2mL 0.25% trypsin-EDTA,室温消化2min左右,显微镜下观察细胞皱缩变圆,并呈单个细胞。
- [0124] (4) 加入4mL DMEM/F12(含10%血清,1%双抗)终止消化反应,并用移液器将细胞吹散。
- [0125] (5) 将消化好的细胞转移至15mL离心管中,常温离心,200g,5min。
- [0126] (6) 用DMEM/F12(含10%血清,1%双抗)重新悬浮细胞,计数。
- [0127] (7) 稀释细胞至 $2 \times 10^5$ 个/mL,取2mL混匀的细胞加入到六孔板,六孔板放置到37

℃,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育过夜。

[0128] (8) 取出步骤(7)细胞培养皿,观察细胞状态:当细胞交汇度达到80%-90%时即可开始转染,转染前将培养基换成无抗生素无血清的DMEM/F12,2mL/孔。

[0129] (9) 稀释质粒:用OPTI-MEM稀释质粒,125μL OPTI-MEM中加入2.5μg质粒,然后加入2.5μL plus,混匀,室温静置5min。

[0130] (10) 稀释Lipofectamine LTX:125μL OPTI-MEM中加入9μL Lipofectamine LTX,然后加入2.5μL plus,轻轻混匀,室温静置5min。

[0131] (11) 将步骤(10)和步骤(11)混合物轻轻混匀。室温放置5min,然后逐滴加入六孔板中均匀分布。

[0132] (12) 将六孔板置于37℃,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养4-6h。

[0133] (13) 换液:弃掉上清培养基,加入2mL DMEM/F12(含10%血清1%双抗),将六孔板置于37℃,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。

[0134] 3.2加压筛选

[0135] 转染后24h开始加压:从37℃培养箱中取出六孔板细胞,弃去上清培养基,加入2mL DMEM/F12(含10%血清+25μM MSX),加压7d,中间观察细胞,死细胞多换液。

[0136] 3.3单克隆筛选

[0137] (1) 加压筛选至阴性对照细胞存货约10-20%左右时,约7days,开始单克隆筛选。

[0138] (2) 取出六孔板,弃掉培养基,PBS洗一次,然后加入300μL 0.25% trypsin-EDTA,室温消化2min左右,加入2mL DMEM/F12(含10%血清+25μM MSX)终止消化反应,并用移液器将细胞吹散。

[0139] (3) 将消化好的细胞转移至15mL离心管中,常温离心,200g,5min。

[0140] (4) 用DMEM/F12(含10%血清+25μM MSX)重新悬浮细胞,计数。

[0141] (5) 铺板:稀释细胞至5个/mL,取200μL混匀的细胞加入到96孔板中,放置到37℃,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中孵育4-6h。

[0142] (6) 记录单个细胞的孔。

[0143] (7) 待96孔板中单个细胞的孔长起来时,弃掉培养基,PBS洗一次,加入100μL 0.25% trypsin-EDTA,室温消化2min左右,加入2mL DMEM/F12(含10%血清+25μM MSX)终止消化反应,并用移液器将细胞吹散。将细胞液转移至12孔板,待12孔板长满时,取上清,ELISA检测克隆是否为阳性,高效表达的阳性克隆继续扩大培养、冻存。

[0144] 实施例4:CHO-K1细胞株驯化成悬浮培养

[0145] (1) 准备:生物安全柜紫外灭菌30min;DMEM/F12(含10%血清,25μM MSX)置于37℃水浴锅中预热至37℃。

[0146] (2) 从37℃培养箱中取出细胞(10cm细胞培养皿),弃去上清培养基,用预温的8mL PBS洗细胞一次,并弃去PBS。

[0147] (3) 每个10cm细胞培养皿加入1-2mL 0.25% trypsin-EDTA,室温消化2min左右,显微镜下观察细胞皱缩变圆,并呈单个细胞。

[0148] (4) 加入4mL DMEM/F12(含10%血清,25μM MSX)终止消化反应,并用移液枪将细胞吹散。

[0149] (5) 将消化好的细胞转移至15mL离心管中,常温离心,200g,5min。

- [0150] (6) 用100%DMEM/F12(含10%血清,25 $\mu$ M MSX)悬浮细胞,计数。
- [0151] (7) 稀释细胞至 $5 \times 10^5$ 个细胞/mL接种30mL培养基于一个125mL摇瓶中。细胞培养瓶放置到37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中的轨道式振荡器上120rpm/min孵育过夜。
- [0152] (8) 生物安全柜台面用75%酒精擦拭消毒,紫外照射30min。
- [0153] (9) 每隔24h计数细胞密度及活力。
- [0154] (10) 待第一代细胞培养一次后细胞存活率达到94-97%时进行第二代培养。
- [0155] (11) 准备:生物安全柜紫外灭菌30min;100%DMEM/F12(含10%血清,25 $\mu$ M MSX),EX-CELL 302置于CO<sub>2</sub>细胞培养箱中预热至37 $^{\circ}$ C。
- [0156] (12) 从37 $^{\circ}$ C培养箱中取出细胞转移至50mL离心管中,常温200g离心5min。
- [0157] (13) 将DMEM/F12(含10%血清,25 $\mu$ M MSX)和EX-CELL 302按1:1混合,重新悬浮细胞,计数。
- [0158] (14) 稀释细胞至 $5 \times 10^5$ 个细胞/mL接种30mL培养基于一个125mL摇瓶中。细胞培养瓶放置到37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中的轨道式振荡器上120rpm/min孵育过夜。
- [0159] (15) 生物安全柜台面用75%酒精擦拭消毒,紫外照射30min。
- [0160] (16) 每隔24h计数细胞密度及活力。
- [0161] (17) 第二代培养两次后得到的细胞存活率大于95%;第三至六代培养三次后得到的细胞存活率大于95%。7周后,细胞接种3天后繁殖三代,密度达到 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL,同时细胞存活率达到95%,该细胞被认为已经适应悬浮培养。接种密度降低到 $3 \times 10^5$ 个/mL。
- [0162] (18) 经驯化,1D11株、20A5株都满足要求,这表明,1D11株、20A5株都驯化成功。
- [0163] 实施例5:细胞摇瓶发酵
- [0164] (1) 传代培养基的配制:60%的CD-CHO+40%的Ex-cell 302置于37 $^{\circ}$ C水浴锅中预热至37 $^{\circ}$ C。
- [0165] (2) 从CO<sub>2</sub>恒温摇床取出摇瓶细胞,进行计数。
- [0166] (3) 稀释实施例4得到的,1D11株、20A5株细胞至 $2.5-3.5 \times 10^5$ 个细胞/mL接种30mL培养基于一个125mL摇瓶中。细胞培养瓶放置到37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>恒温摇床中100rpm/min孵育过夜。
- [0167] (4) 每隔24h计数细胞密度及活力,测葡萄糖,当血糖低于2g/L的时候,添加葡萄糖到4g/L;每天取1mL样品,上清用于检测蛋白表达情况。
- [0168] (5) 补料(约第四天):补充70g/L CB5,添加基础培养基的10%。
- [0169] (6) 第5天开始,将CO<sub>2</sub>培养箱温度调整至32 $^{\circ}$ C。
- [0170] (7) 第九天,补充70g/L CB5,添加基础培养基的10%。
- [0171] (8) 第十二天,收获细胞。
- [0172] 实施例6:稳定表达CD2V-Fc蛋白重组293T细胞系构建及驯化
- [0173] 按照实施例1-5的操作方法,本发明人也很容易的构建了表达CD2V-Fc蛋白的稳定细胞系,因此,可以预见常见的工程化的哺乳动物细胞系。很容易采用该方法构建重组表达CD2V-Fc的稳定细胞株,从而大规模生产该蛋白。因此,也在本发明保护范围内。
- [0174] 实施例7:蛋白纯化
- [0175] 收集实施例5的细胞培养液(每批均约100ml),4 $^{\circ}$ C,8,000g离心30min,取上清,过0.8 $\mu$ m滤膜,上样,预留80 $\mu$ L样品加入20 $\mu$ L的5 $\times$ SDS-样品缓冲液,用于SDS-PAGE检测。

[0176] 柱平衡:用超纯水平衡2~3CV(column volume柱体积),排出乙醇保存液;然后用1XPBS平衡5~10CV。

[0177] 上样:取5mL平衡后的ProteinA填料与细胞培养液上清滚瓶结合1h,收集Flow through (FT),取80 $\mu$ L样品加入20 $\mu$ L的5 $\times$ SDS-样品缓冲液,用于SDS-PAGE检测。

[0178] 洗涤:用1XPBS把未结合上柱的蛋白和结合能力较弱的杂蛋白冲洗干净。

[0179] 洗脱:用0.1M甘氨酸,pH 3.0buffer洗脱目的蛋白(在收集管中加入适量1M Tris-HCl,使最终洗脱液PH中和至7.4),收集:5mL/管;收集样品混合后(Elutethrough-ET)取80 $\mu$ L样品加入20 $\mu$ L的5 $\times$ SDS-样品缓冲液,用于SDS-PAGE检测。

[0180] 透析换液:将含有目的蛋白的洗脱液倒入透析袋内,用1 $\times$ PBS透析至少1,000倍,取80 $\mu$ L留样检测。

[0181] 除菌过滤:在生物安全柜中,过0.22 $\mu$ m低蛋白结合针头滤器,或大量蛋白溶液过灭菌的0.22 $\mu$ m滤膜的Nalgene的滤器,过滤好的蛋白溶液样品存放于-80 $^{\circ}$ C冰箱。蛋白浓度测定:采用BCA法测定蛋白浓度,该批蛋白浓度分别为2.5mg/ml、2.8mg/ml,体积均约为40ml;经过计算(蛋白得率=蛋白浓度\*蛋白体积/所取发酵上清体积),1D11株、20A5株蛋白得率均约为1-1.12g/L。

[0182] 实施例8:镍柱蛋白纯化

[0183] 按照实施1-5用方法制备CD2V-Fc,其中用SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列替换SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列,得到编码该段氨基酸优化后序列的基因序列如SEQ ID NO.4所示。

[0184] 纯化方法是按照下述方法。

[0185] 收集如实施例5的细胞培养液(每批均约100ml),4 $^{\circ}$ C,8,000g离心30min,取上清,过0.8 $\mu$ m滤膜,上样,预留80 $\mu$ L样品加入20 $\mu$ L的5 $\times$ SDS-样品缓冲液,用于SDS-PAGE检测。

[0186] 柱平衡:用超纯水平衡2~3CV(column volume柱体积),排出乙醇保存液;然后用BufferA(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4),500mM NaCl)平衡2~3CV,4~7mL/min。

[0187] 上样:若5mL预装镍柱一个,1mL/min进行上样(根据预装柱体积调节上样流速,保留时间5min),收集Flow through (FT),取80 $\mu$ L样品加入20 $\mu$ L的5 $\times$ SDS-样品缓冲液,用于SDS-PAGE检测。

[0188] 洗涤:用4%bufferB(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4),500mM NaCl,20mM imidazole)洗柱,流速为4mL/min,把未结合上柱的蛋白和结合能力较弱的杂蛋白冲洗干净,至OD280nm基线平稳为止。

[0189] 洗脱:50%bufferB(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4),500mM NaCl,250mM imidazole)洗脱目的蛋白,至基线洗平,2mL/min,收集:10mL/管;收集样品混合后(Elutethrough-ET)取80 $\mu$ L样品加入20 $\mu$ L的5 $\times$ SDS-样品缓冲液,用于SDS-PAGE检测。

[0190] 洗涤:100%bufferB(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4),500mM NaCl,500mM imidazole),4mL/min,不收集,冲洗2-3个柱体积,至UV基线洗平。超纯水平衡2~3CV。保存HisTrap excel柱可用20%乙醇保存液平衡2~3CV。

[0191] 透析换液:将含有目的蛋白的咪唑洗脱液倒入透析袋内,用1 $\times$ PBS透析至少1,000倍,取80 $\mu$ L留样检测。

[0192] 除菌过滤:在生物安全柜中,过0.22 $\mu$ m低蛋白结合针头滤器,或大量蛋白溶液过灭

菌的0.22 $\mu$ m滤膜的Nalgene的滤器,过滤好的蛋白溶液样品存放于-80℃冰箱。

[0193] 蛋白浓度测定:采用BCA法测定蛋白浓度,该批蛋白浓度分别为2.0mg/ml、2.3mg/ml,体积均约为40ml;经过计算(蛋白得率=蛋白浓度\*蛋白体积/所取发酵上清体积),1D11株、20A5株蛋白得率均约为0.8-0.92g/L。

[0194] 实施例9:CD2V-Fc蛋白检测及稳定性验证

[0195] 9.1 SDS-PAGE检测

[0196] 将实施例6纯化后的蛋白进行SDS-PAGE检测,所用样品中CD2V-Fc蛋白浓度为2 $\mu$ g/孔,结果如图3所示:从图中可以计算出,纯化后的CD2V-Fc蛋白SDS-PAGE纯度为95%。

[0197] 9.2稳定性验证

[0198] 将实施例6纯化后的蛋白用PBS稀释到0.8mg/ml,分成20份,每份0.5ml;十份置于4℃冰箱中,每周取样一份,连续取样10次;十份置于-20℃冰箱中,每周取样一份,连续取样10次;每次取样后用BCA检测蛋白浓度,结果如下表所示:

样品	4℃处理后样品浓度 (mg/ml)	-20℃处理后样品浓度 (mg/ml)
第一次取样	0.83	0.79
第二次取样	0.81	0.81
第三次取样	0.81	0.78
[0199] 第四次取样	0.82	0.79
第五次取样	0.79	0.78
第六次取样	0.78	0.80
第七次取样	0.77	0.79
第八次取样	0.76	0.77
第九次取样	0.77	0.78
第十次取样	0.76	0.77

[0200] 从蛋白浓度的变化来看,两组实验过程中蛋白基本保持稳定。为了进一步验证处理后的蛋白的是否降解,我们用第十次的样品进行SDS-PAGE检测,具体结果如图4所示:M表示Marker;1是4℃处理后的CD2V-Fc蛋白,上样量为2 $\mu$ g;2是-20℃处理后的CD2V-Fc蛋白,上样量为2 $\mu$ g;从图中可以看出,处理后的样品(第十次取样)仍然稳定。

[0201] 实施例10:疫苗制备

[0202] 10.1疫苗制备

[0203] 水相准备:根据疫苗中CD2V-Fc蛋白含量,使用PBS(或生理盐水)将CD2V-Fc蛋白稀释适当浓度,即为水相;

[0204] 油相准备:根据制备疫苗总量,按照抗原相和佐剂重量比为1:1,体积比为46:54,量取适量ISA 201 VG佐剂;

[0205] 乳化:将水相和油相都预热到33℃,将水相缓缓加到油相中,200-500rpm搅拌20-30min,于20℃静置1h置于4℃过夜;

- [0206] 分装、贮存:根据需要进行分装,检合格后于4℃保存备用。
- [0207] 10.2疫苗质检
- [0208] 物理性状采用眼观的方法观察外观(是否是乳白色乳剂);
- [0209] 采用清洁吸管吸取少量疫苗滴于冷水中,观察(除第1滴外),疫苗应为云雾状扩散,判定为水包油包水剂型;
- [0210] 将疫苗5ml加入离心管中,以3000r/min离心15min,管底析出的水相应 $\leq 0.25\text{mL}$ ,判为稳定;
- [0211] 使用粘度仪对疫苗进行粘度检测,应在20-50cp,判为合格。
- [0212] 实施例11:重组CD2V-Fc融合蛋白安全性实验及免疫原性实验
- [0213] 11.1安全性实验
- [0214] 取健康35日龄(购置自绍兴某猪场)20头(雌雄各半),分别随机分4个组,每组5头,按照如下方法进行安全性实验。
- [0215] 单剂量一次免疫组:每组5头按颈部肌肉注射接种1ml(50ug/头),连续观察2周。
- [0216] 单剂量二次免疫组:每组5头按颈部肌肉注射接种1ml(50ug/头),连续观察2周。2周后以相同方法剂量再接种一次,继续观察2周。
- [0217] 超剂量一次免疫组:每组5头按颈部肌肉注射接种1ml(500ug/头),连续观察2周。对照组:每组5头按颈部肌肉注射接种1ml(PBS配制的疫苗),连续观察2周。
- [0218] 实验期间,每天观察动物的精神,采食、活动、饮水、注射部位炎症变化和排泄情况等临床变化,记录动物的异常情况。
- [0219] 经过连续观察,对注射CD2V-Fc融合蛋白的猪的临床症状进行比较,单剂量,二次免疫剂量,超剂量免疫组和对照组,均饮食正常,精神无不良变化,排泄正常,注射部位未发现发炎现象,无死亡猪出现,接种动物没有遇到任何不良反应。说明,本发明制备的疫苗蛋白即使是以高剂量注射免疫(500ug/ml),也无明显副作用,是一种安全的免疫蛋白。
- [0220] 10.2免疫原性实验
- [0221] 将实施例6纯化后的蛋白进行Western Blot检测,所用样品中CD2V-Fc蛋白(图中标记为1)浓度为2 $\mu\text{g}$ /孔;所用一抗来源于CD2V-Fc免疫后的猪的血清,稀释比例为1:100;二抗为HRP标记的羊抗猪IgG二抗,稀释比为1:5000。结果如图5所示:该血清能与CD2V-Fc蛋白特异性结合。
- [0222] 本发明通过上面的实施例进行举例说明,但是,应当理解,本发明并不限于这里所描述的特殊实例和实施方案。在这里包含这些特殊实例和实施方案的目的在于帮助本领域中的技术人员实践本发明。任何本领域中的技术人员很容易在不脱离本发明精神和范围的情况下进行进一步的改进和完善,因此本发明只受到本发明权利要求的内容和范围的限制,其意图涵盖所有包括在由附录权利要求所限定的本发明精神和范围内的备选方案和等同方案。

## 氨基酸、核苷酸序列表

- <110> 浙江海隆生物科技有限公司
- <120> 一种非洲猪瘟病毒 CD2V 和猪 Fc 融合蛋白制备方法和应用
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 442
- <212> PRT
- <213> CD2V-Fc 蛋白氨基酸序列
- <400> 1
- MIILIFLIFSNIIVLSIDYWVSFNKTIILDSNITNDNNDINGVSWNFFNNSFNLTATCGKAGNFC  
 ECSNYSTSIYNITNNCSLTIFPHNDVFDTTYQVVWNQIINYTIKLLTPATPPNITYNCTNFLITC  
 KKNNGTNTNIYLNINDTFVKYTNESILEYNWNNNSINNNFTATCIINNTISTSNETTLINCTYLT  
 LSSNYFYTFFKLYGGGGSGGGGSGGGGSICPACESPGPSVFIFPPKPKDLMISRTPQVTCVV  
 VDVSQENPEVQFSWYVDGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCK  
 VNNKDLPAPITRIISKAKGPSREPQVYTLSPSAEELSRKVSITCLVTGFYPPDIDVEWKSNGQ  
 PEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLYSKLAVDKASWQRGDPFQCAVMHEALHNHYTQKSISKT  
 PGK
- <210> 2
- <211> 206
- <212> PRT
- [0223] <213> CD2V 胞外区蛋白氨基酸序列
- <400> 2
- MIILIFLIFSNIIVLSIDYWVSFNKTIILDSNITNDNNDINGVSWNFFNNSFNLTATCGKAGNFC  
 ECSNYSTSIYNITNNCSLTIFPHNDVFDTTYQVVWNQIINYTIKLLTPATPPNITYNCTNFLITC  
 KKNNGTNTNIYLNINDTFVKYTNESILEYNWNNNSINNNFTATCIINNTISTSNETTLINCTYLT  
 LSSNYFYTFFKLY
- <210> 3
- <211> 221
- <212> PRT
- <213> 猪 Fc 蛋白的氨基酸序列
- <400> 3
- ICPACESPGPSVFIFPPKPKDLMISRTPQVTCVVVDVSQENPEVQFSWYVDGVEVHTAQTR  
 PKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPITRIISKAKGPSREPQVYTL  
 PSAEELSRKVSITCLVTGFYPPDIDVEWKSNGQPEPEGNYRTTPPQQDVDGTYFLYSKLAV  
 DKASWQRGDPFQCAVMHEALHNHYTQKSISKT
- <210> 4
- <211> 1347
- <212> DNA
- <213> 编码 CD2V-Fc 的核苷酸序列
- <400> 4
- ATGATCATCCTGATCTTCCTGATCTTTTCTAACATCGTGCTGTCCATCGACTACTGGGTGT  
 CTTTCAATAAGACAATCATCCTGGATTCCAACATCACCAATGACAACAATGATATCAACG  
 GCGTGTCTGGAATTTCTTTAAACAATAGCTTCAACACCCTGGCCACATGCGGCAAGGCT  
 GGCAACTTTTGCAGTGTCTAATTACTCTACCTCCATCTATAACATCACAAACAATTGTT

## 氨基酸、核苷酸序列表

CCCTGACCATCTTCCCACACAATGACGTGTTTGATAACCACATAACCAGGTGGTGTGGAACC  
 AGATCATCAATTATACAATCAAGCTGCTGACCCCTGCCACACCCCCTAACATCACCTACA  
 ACTGCACAAATTTTCTGATCACCTGTAAGAAGAACAATGGCACCAACACAAATATCTATC  
 TGAACATCAATGACACCTTCGTGAAGTACACAAATGAGAGCATCCTGGAGTACAACCTGG  
 AACAACTCTAACATCAACAACCTTCACCGCTACATGCATCATCAACAATACCATCAGCACA  
 TCTAACGAGACCACACTGATCAATTGTACCTACCTGACACTGTCCAGCAACTACTTCTAT  
 ACCTTCTTTAAGCTGTACGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAG  
 GAAGCATCTGCCAGCTTGTGAGTCCCCAGGACCAAGCGTGTTCATCTTTCCCCCTAAG  
 CCTAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCACAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGT  
 GAGCCAGGAGAACCCCGAGGTGCAGTTTTCTTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT  
 ACCGCCAGACAAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAATTCTACCTACCGGGTGGTGTCCG  
 TGCTGCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTTAAGTGCAAGGTGAA  
 CAATAAGGATCTGCCTGCCCAATCACCAGGATCATCAGCAAGGCTAAGGGCCCTTCTC  
 GGGAGCCACAGGTGTACACACTGTCCCTTCCGCCGAGGAGCTGTCTAGATCCAAGGTG  
 TCTATCCTGTCTGGTGACAGGCTTCTATCCACCCGACATCGATGTGGAGTGGGAAGTCC  
 AATGGCCAGCCCGAGCCTGAGGGCAACTACAGGACCACACCTCCACAGCAGGACGTGG  
 ATGGCACCTACTTTCTGTATTCTAAGCTGGCTGTGGACAAGGCTTCTGGCAGAGGGGC  
 GATCCTTTCCAGTGTGCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCATTACCCAGAAGAG  
 CATCTTAAGACACCAGGCAAGTAA

- [0224] <210> 5  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> CD2V-Fc 蛋白氨基酸序列带 HIS 标签  
 <400> 5

MIILIFLIFSNIIVLSIDYWVSFNKTIILDSNITNDNNDINGVSWNFFNNSFNLTATCGKAGNFC  
 ECSNYSTSIYNITNNSLTIFPHNDVFDTTYQVWVWVWQIINYTIKLLTPATPPNITYNCTNFLITC  
 KKNNGTNTNIYLNINDTFVKYTNESILEYNWNNNSINNFATCIINNTISTSNETTLINCTYLT  
 LSSNYFYTFKLYGGGGSGGGGSGGGGSIKPACESPGPSVFIFPPKPKDTLMISRTQPQVTCVV  
 VDVSQENPEVQFSWYVDGVEVHTAQRTRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCK  
 VNNKDLPAITRIISKAKGPSREPQVYTLSPSAEELSRKVSITCLVTGFYPPDIDVEWKSNGQ  
 PEPEGNYRTPPPQQDVDGTYFLYSKLAVDKASWQRGDPFQCAVMHEALHNHYTQKSISKT  
 PGKHHHHHH

- <210> 6  
 <211> 1365  
 <212> DNA  
 <213> 编码 CD2V-Fc 的核苷酸序列带 HIS 标签  
 <400> 6

ATGATCATCCTGATCTTCTGATCTTTTCTAACATCGTGCTGTCCATCGACTACTGGGTGT  
 CTTTCAATAAGACAATCATCCTGGATTCCAACATCACCAATGACAACAATGATATCAACG  
 GCGTGTCTGGAATTTCTTTAACAATAGCTTCAACACCCTGGCCACATGCGGCAAGGCT  
 GGCAACTTTTGCAGTGTCTAATTACTCTACCTCCATCTATAACATCACAAACAATTGTT  
 CCCTGACCATCTTCCCACACAATGACGTGTTTGATAACCACATAACCAGGTGGTGTGGAACC  
 AGATCATCAATTATACAATCAAGCTGCTGACCCCTGCCACACCCCCTAACATCACCTACA

## 氨基酸、核苷酸序列表

[0225]

ACTGCACAAATTTTCTGATCACCTGTAAGAAGAACAATGGCACCAACACAAATATCTATC  
TGAACATCAATGACACCTTCGTGAAGTACACAAATGAGAGCATCCTGGAGTACAACCTGG  
AACAACTCTAACATCAACAACCTTCACCGCTACATGCATCATCAACAATACCATCAGCACA  
TCTAACGAGACCACACTGATCAATTGTACCTACCTGACACTGTCCAGCAACTACTTCTAT  
ACTTCTTTAAGCTGTACGGCGGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAG  
GAAGCATCTGCCAGCTTGTGAGTCCCCAGGACCAAGCGTGTCATCTTTCCCCCTAAG  
CCTAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCACAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGT  
GAGCCAGGAGAACCCCGAGGTGCAGTTTTTCTTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT  
ACCGCCAGACAAGGCCAAAGGAGGAGCAGTTCAATTCTACCTACCGGGTGGTGTCCG  
TGCTGCCCATCCAGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTTTAAGTGCAAGGTGAA  
CAATAAGGATCTGCCTGCCCAATCACCAGGATCATCAGCAAGGCTAAGGGCCCTTCTC  
GGGAGCCACAGGTGTACACACTGTCCCTTCCGCCGAGGAGCTGTCTAGATCCAAGGTG  
TCTATCACCTGTCTGGTGACAGGCTTCTATCCACCCGACATCGATGTGGAGTGGAAGTCC  
AATGGCCAGCCGAGCCTGAGGGCAACTACAGGACCACACCTCCACAGCAGGACGTGG  
ATGGCACCTACTTTCTGTATTCTAAGCTGGCTGTGGACAAGGCTTCCTGGCAGAGGGGC  
GATCCTTTCCAGTGTGCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCATTACACCCAGAAGAG  
CATCTCTAAGACACCAGGCAAGCACCATCACCATCACCATTAA



[0039]	Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
[0040]	225 230 235 240
[0041]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val
[0042]	245 250 255
[0043]	Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val
[0044]	260 265 270
[0045]	Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln
[0046]	275 280 285
[0047]	Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln
[0048]	290 295 300
[0049]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
[0050]	305 310 315 320
[0051]	Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Pro Ser
[0052]	325 330 335
[0053]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ser Pro Ser Ala Glu Glu Leu Ser
[0054]	340 345 350
[0055]	Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr Pro Pro
[0056]	355 360 365
[0057]	Asp Ile Asp Val Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly
[0058]	370 375 380
[0059]	Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe
[0060]	385 390 395 400
[0061]	Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Arg Gly Asp
[0062]	405 410 415
[0063]	Pro Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0064]	420 425 430
[0065]	Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys
[0066]	435 440
[0067]	<210> 2
[0068]	<211> 206
[0069]	<212> PRT
[0070]	<213> CD2V胞外区蛋白氨基酸序列 (PRT)
[0071]	<400> 2
[0072]	Met Ile Ile Leu Ile Phe Leu Ile Phe Ser Asn Ile Val Leu Ser Ile
[0073]	1 5 10 15
[0074]	Asp Tyr Trp Val Ser Phe Asn Lys Thr Ile Ile Leu Asp Ser Asn Ile
[0075]	20 25 30
[0076]	Thr Asn Asp Asn Asn Asp Ile Asn Gly Val Ser Trp Asn Phe Phe Asn
[0077]	35 40 45

[0078]	Asn Ser Phe Asn Thr Leu Ala Thr Cys Gly Lys Ala Gly Asn Phe Cys
[0079]	50 55 60
[0080]	Glu Cys Ser Asn Tyr Ser Thr Ser Ile Tyr Asn Ile Thr Asn Asn Cys
[0081]	65 70 75 80
[0082]	Ser Leu Thr Ile Phe Pro His Asn Asp Val Phe Asp Thr Thr Tyr Gln
[0083]	85 90 95
[0084]	Val Val Trp Asn Gln Ile Ile Asn Tyr Thr Ile Lys Leu Leu Thr Pro
[0085]	100 105 110
[0086]	Ala Thr Pro Pro Asn Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn Phe Leu Ile Thr
[0087]	115 120 125
[0088]	Cys Lys Lys Asn Asn Gly Thr Asn Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ile Asn
[0089]	130 135 140
[0090]	Asp Thr Phe Val Lys Tyr Thr Asn Glu Ser Ile Leu Glu Tyr Asn Trp
[0091]	145 150 155 160
[0092]	Asn Asn Ser Asn Ile Asn Asn Phe Thr Ala Thr Cys Ile Ile Asn Asn
[0093]	165 170 175
[0094]	Thr Ile Ser Thr Ser Asn Glu Thr Thr Leu Ile Asn Cys Thr Tyr Leu
[0095]	180 185 190
[0096]	Thr Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Tyr Thr Phe Phe Lys Leu Tyr
[0097]	195 200 205
[0098]	<210> 3
[0099]	<211> 221
[0100]	<212> PRT
[0101]	<213> 猪Fc蛋白的氨基酸序列 (PRT)
[0102]	<400> 3
[0103]	Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[0104]	1 5 10 15
[0105]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr
[0106]	20 25 30
[0107]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser
[0108]	35 40 45
[0109]	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys
[0110]	50 55 60
[0111]	Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile
[0112]	65 70 75 80
[0113]	Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
[0114]	85 90 95
[0115]	Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys
[0116]	100 105 110

[0117]	Gly Pro Ser Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ser Pro Ser Ala Glu
[0118]	115 120 125
[0119]	Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe
[0120]	130 135 140
[0121]	Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu
[0122]	145 150 155 160
[0123]	Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly
[0124]	165 170 175
[0125]	Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln
[0126]	180 185 190
[0127]	Arg Gly Asp Pro Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn
[0128]	195 200 205
[0129]	His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys
[0130]	210 215 220
[0131]	<210> 4
[0132]	<211> 1347
[0133]	<212> DNA
[0134]	<213> 编码CD2V-Fc的核苷酸序列 (DNA)
[0135]	<400> 4
[0136]	<210> 5
[0137]	<211> 448
[0138]	<212> PRT
[0139]	<213> CD2V-Fc蛋白氨基酸序列带HIS标签 (PRT)
[0140]	<400> 5
[0141]	Met Ile Ile Leu Ile Phe Leu Ile Phe Ser Asn Ile Val Leu Ser Ile
[0142]	1 5 10 15
[0143]	Asp Tyr Trp Val Ser Phe Asn Lys Thr Ile Ile Leu Asp Ser Asn Ile
[0144]	20 25 30
[0145]	Thr Asn Asp Asn Asn Asp Ile Asn Gly Val Ser Trp Asn Phe Phe Asn
[0146]	35 40 45
[0147]	Asn Ser Phe Asn Thr Leu Ala Thr Cys Gly Lys Ala Gly Asn Phe Cys
[0148]	50 55 60
[0149]	Glu Cys Ser Asn Tyr Ser Thr Ser Ile Tyr Asn Ile Thr Asn Asn Cys
[0150]	65 70 75 80
[0151]	Ser Leu Thr Ile Phe Pro His Asn Asp Val Phe Asp Thr Thr Tyr Gln
[0152]	85 90 95
[0153]	Val Val Trp Asn Gln Ile Ile Asn Tyr Thr Ile Lys Leu Leu Thr Pro
[0154]	100 105 110
[0155]	Ala Thr Pro Pro Asn Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn Phe Leu Ile Thr

[0156]	115	120	125
[0157]	Cys Lys Lys Asn Asn Gly Thr Asn Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ile Asn		
[0158]	130	135	140
[0159]	Asp Thr Phe Val Lys Tyr Thr Asn Glu Ser Ile Leu Glu Tyr Asn Trp		
[0160]	145	150	155
[0161]	Asn Asn Ser Asn Ile Asn Asn Phe Thr Ala Thr Cys Ile Ile Asn Asn		
[0162]	165	170	175
[0163]	Thr Ile Ser Thr Ser Asn Glu Thr Thr Leu Ile Asn Cys Thr Tyr Leu		
[0164]	180	185	190
[0165]	Thr Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Tyr Thr Phe Phe Lys Leu Tyr Gly Gly		
[0166]	195	200	205
[0167]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Cys Pro		
[0168]	210	215	220
[0169]	Ala Cys Glu Ser Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro		
[0170]	225	230	235
[0171]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val		
[0172]	245	250	255
[0173]	Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val		
[0174]	260	265	270
[0175]	Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln		
[0176]	275	280	285
[0177]	Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln		
[0178]	290	295	300
[0179]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp		
[0180]	305	310	315
[0181]	Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Pro Ser		
[0182]	325	330	335
[0183]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ser Pro Ser Ala Glu Glu Leu Ser		
[0184]	340	345	350
[0185]	Arg Ser Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr Pro Pro		
[0186]	355	360	365
[0187]	Asp Ile Asp Val Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly		
[0188]	370	375	380
[0189]	Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe		
[0190]	385	390	395
[0191]	Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Arg Gly Asp		
[0192]	405	410	415
[0193]	Pro Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0194]	420	425	430

- 
- [0195] Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys His His His His His His  
[0196] 435 440 445  
[0197] <210> 6  
[0198] <211> 1365  
[0199] <212> DNA  
[0200] <213> 编码CD2V-Fc的核苷酸序列带HIS标签 (DNA)  
[0201] <400> 6

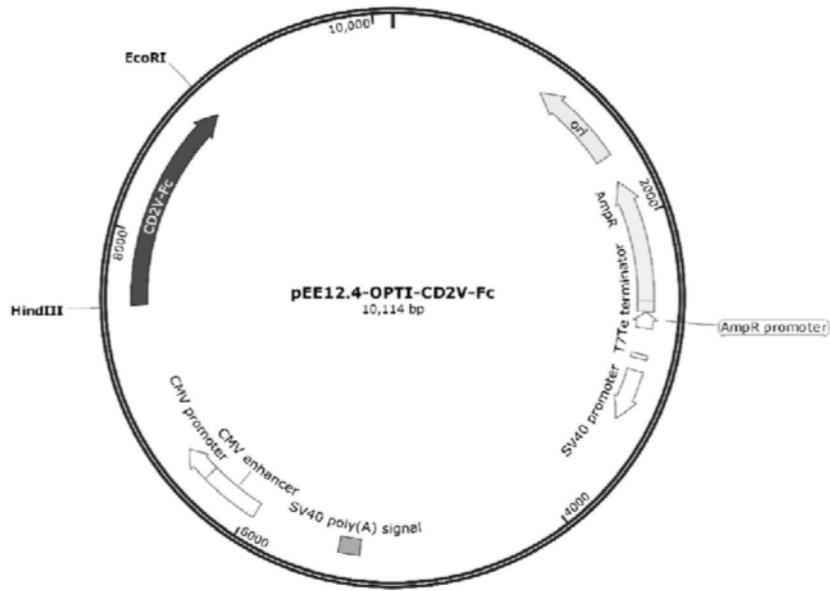


图1

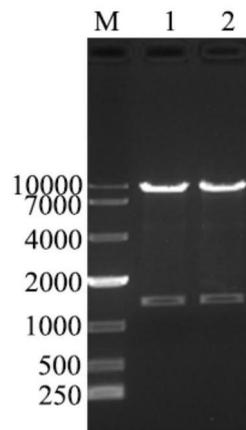


图2

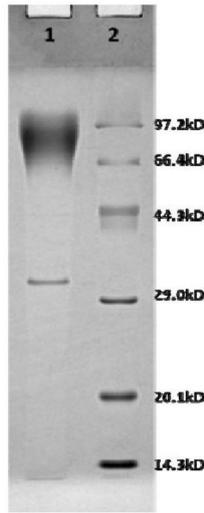


图3

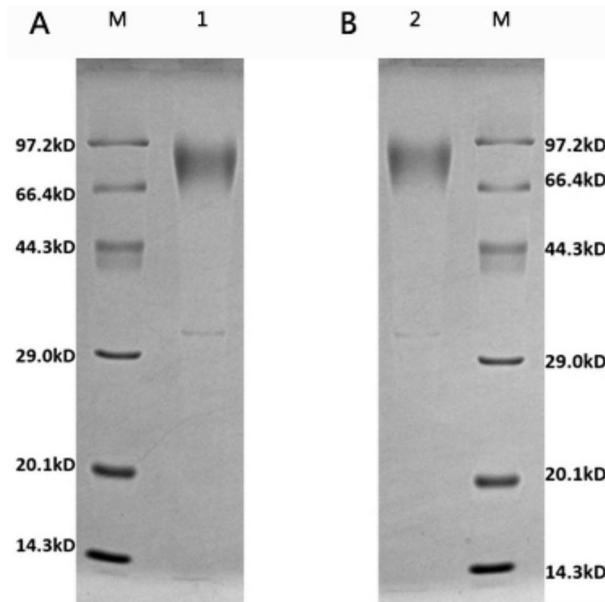


图4

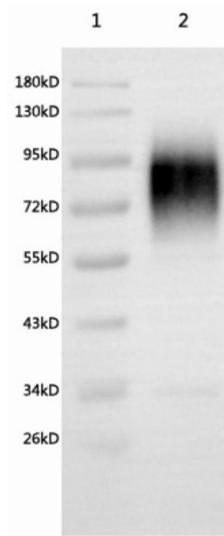


图5