



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104531687 A

(43) 申请公布日 2015.04.22

(21) 申请号 201410742117.7

(22) 申请日 2014.12.07

(71) 申请人 青岛易邦生物工程有限公司

地址 266114 山东省青岛市红岛经济区红岛  
街道泉大路东大洋社区岙东南路 21 号

(72) 发明人 张恒 范根成 杜元钊

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C07K 14/01(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表1页

(54) 发明名称

猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗中 Cap 蛋白解  
离的方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种猪圆环病毒 2 型铝  
胶佐剂疫苗,所使用的解离剂的核苷酸序列为 SEQ  
ID NO:1。本发明提供的解离剂能够有效的将猪圆  
环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗中的 Cap 蛋白抗原解离  
出来,从而能更准确有效价评价疫苗的效果,为铝  
胶佐剂疫苗的效检提供了一种很好的方法。采用  
本发明的工艺操作简单,对设备要求低,而且样品  
处理量大。

1. 一种解离剂,其特征在于,所述的解离剂为寡聚核苷酸,其序列为 SEQ ID NO:1。
2. 如权利要求 1 的解离剂,其特征在于,所述的寡聚核苷酸中的核苷酸碱基进行硫代化修饰。
3. 权利要求 1 的解离剂在将 Cap 蛋白从铝胶佐剂疫苗中解离出来的应用。
4. 一种将 Cap 蛋白从铝胶佐剂疫苗中解离出来的方法,其特征在于,所述的方法是在疫苗中加入权利要求 1 的解离剂,在震荡条件下 37℃处理 1 小时或以上。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的疫苗为猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗。
6. 一种检测猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗效力的方法,其特征在于,所述的方法是先权利要求 4 所述的方法将 Cap 蛋白从铝胶佐剂疫苗中解离出来,再进行蛋白的琼扩效价检测。

## 猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗中 Cap 蛋白解离的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品技术领域,具体涉及一种猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗中 Cap 蛋白解离的方法。

### 背景技术

[0002] 猪圆环病毒病 2 型可引起免疫抑制性疾病。该病毒可诱发多种病毒、细菌的混合感染和继发感染,给养猪业造成巨大的经济损失,对此病的研究特别是对其疫苗的研究正日益受到关注。疫苗作为防控 PCV2 的主要手段,国内外研究者正在研究和开发各种疫苗,到目前为止,部分疫苗已在临床试验中取得成功,有的已投入应用,其他候选疫苗也正在积极研究中。

[0003] 但猪圆环病毒 2 型亚单位疫苗中的 Cap 蛋白抗原含量决定了疫苗的品质,因此直接检测疫苗中 Cap 抗原含量是疫苗效力检验最常用、最直接的方法之一,但由于猪圆环病毒 2 型亚单位疫苗中加入了铝胶佐剂,琼扩试验中直接影响抗原检测的结果。因此,有必要提供一种铝胶佐剂疫苗中 Cap 蛋白解离的方法,从而更好的评价疫苗效果。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种简便、高效的可用于铝胶疫苗中 Cap 蛋白解离的方法,从而为猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗的成品疫苗效力检验(蛋白的琼扩效价检测)奠定了坚实的基础。

[0005] 本发明首先提供一种解离剂,该解离剂为寡聚核苷酸,其核苷酸序列如下:

[0006] 5' -TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' (SEQ ID NO:1),每个核苷酸碱基进行硫代修饰;

[0007] 上述的解离剂用于将 Cap 蛋白从铝胶佐剂疫苗中解离出来;

[0008] 本发明还提供一种将 Cap 蛋白从铝胶佐剂疫苗中解离出来的方法,是在疫苗中加入解离剂,在震荡条件下 37℃ 处理 1 小时或以上。

[0009] 本发明采用琼扩试验来评价上述方法的解离效果。

[0010] 本发明提供的解离剂能够有效的将猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗中的 Cap 蛋白抗原解离出来,从而能更准确有效评价疫苗的效果,为铝胶佐剂疫苗的效检提供了一种很好的方法。采用本发明的工艺操作简单,对设备要求低,而且样品处理量大。

### 具体实施方式

[0011] 将不同琼扩效价的抗原制备的铝胶佐剂疫苗,通过加入解离剂,摇匀后放入摇床 37℃,200 转/分钟,作用 1 小时,取解离前和解离后的上清进行琼扩试验,通过研究发现,解离前琼扩效价均为阴性,解离后琼扩效价与配苗前的琼扩效价有很好的相关性,解离后抗原琼扩效价比配苗前效价低 0~1 个滴度。本发明能更好的评价疫苗中的有效的蛋白含量,能更准确的评价疫苗的效果。

[0012] 本发明所使用的解离剂,是寡聚核苷酸,其序列:5'-T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T-T-3'(\*表示对每个碱基进行硫化),分子量为7696.8,退火温度为57.3℃。该解离剂可以人工合成,本发明实施例中的解离剂由大连宝生物工程有限公司合成。

[0013] 下面结合实施例对本发明进行具体说明。

[0014] 实施例1

[0015] 1 不同抗原效价疫苗的制备 取灭活的猪圆环病毒2型 Cap 蛋白液(AGP 效价为1:64)做为制苗抗原,用灭菌生理盐水分别将其稀释成 AGP 效价为 1:16、1:8、1:4、1:2 和 1:1 后,按 4 份抗原液加 1 份铝胶佐剂的比例制成 PCV2 灭活疫苗。

[0016] 2 疫苗解离 将上述制备的 5 种疫苗,分别取摇匀的疫苗 5ml,加入 0.25g 解离剂后,放入设定 200r/min 的摇床,37℃解离 1 小时,以 5000r/min 离心 10 分钟取上清准备进行琼扩试验和免疫组化试验。

[0017] 3 Cap 蛋白琼扩效价测定

[0018] 3.1 pH 值 7.2,0.01mol/L PBS 溶液的配制精密称取 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.56g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.58g, NaCl 9.0g,加蒸馏水 400ml 充分溶解后,然后加蒸馏水至 1000ml,调 pH 值至 7.2。

[0019] 3.2 琼脂平板的制备 pH 值 7.2,0.01mol/L PBS 100ml,加 1.0g 琼脂糖,用微波炉加热至琼脂糖完全溶解。取无菌直径 90mm 平皿,加入溶解后的琼脂 20ml,制成约 3mm 厚的琼脂平板,待琼脂完全凝固后,平皿加盖并倒置,2~8℃冷藏备用。

[0020] 3.3 测样 用直径 4mm,中央孔与外周孔距为 4mm 的梅花形打孔器打孔,封底。中央孔加入标准阳性血清,外围孔依次加入倍比稀释的待检 Cap 蛋白抗原,加液量以不溢出加样孔为宜,加样完毕后,静置 5~10 分钟,将平皿轻轻倒置,放入湿盒内置 37℃温箱中作用 24~48 小时,观察结果。以出现 Cap 蛋白抗原最高稀释倍数为待检样品的琼扩效价。

[0021] 4 疫苗免疫组化试验 将这 5 组疫苗分别免疫 14~28 日龄健康易感仔猪 5 头,各颈部肌肉注射疫苗,2.0ml/头;对照猪 5 头,各颈部肌肉注射灭菌生理盐水,2.0ml/头,隔离饲养。免后 35 日,用猪圆环病毒 2 型 FJ 株(病毒含量为 10<sup>6.25</sup>TCID<sub>50</sub>/ml) 检验用毒攻击,每头滴鼻 1.0ml、肌肉注射 2.0ml,隔离饲养。攻毒后 28 日,剖杀取腹股沟淋巴结,进行免疫组化检测。免疫猪应至少 4 头为阴性,对照猪应至少 4 头为阳性。

[0022] 5 解离标准判定 解离后的琼扩效价不低于 1:2,比解离前的琼扩效价低 1 个滴度或滴度未降低判为解离合格。

[0023] 6 试验结果

[0024] 6.1 用确立的解离方法对制备的不同抗原效价的 PCV 疫苗进行解离,并对其解离前疫苗上清中的 Cap 抗原琼扩效价和蛋白含量及解离后疫苗上清的 Cap 抗原琼扩效价和蛋白含量进行检测,结果为未解离的疫苗上清琼扩效价均为阴性, Cap 抗原蛋白含量均为 0ug/ml,解离后抗原琼扩效价为 1:2~1:16 个滴度, Cap 抗原蛋白含量为 44.1ug/ml~331.2ug/ml,解离后琼扩效价比配苗前低 0~1 个滴度,与蛋白含量检测结果有很好的相关性,说明此方法可以用于定量检测成品疫苗中抗原量。结果见表 1。

[0025] 6.2 当解离的抗原琼扩效价不低于 1:2 时,免疫组化试验结果均 4/5 及以上阴性(疫苗的保护率不低于 4/5),说明解离后的抗原琼扩效价与免疫组化试验有很好的相关

性,可以用于疫苗的效力检验。当成品疫苗解离后,上清中 Cap 抗原蛋白琼扩效价不低于 1:2 时判为疫苗合格。结果见表 1。

[0026] 表 1: 解离效果验证试验结果

[0027]

配苗前抗	配苗前 Cap 抗原	未解离疫苗	未解离疫苗上清	解离后抗	解离疫苗上清 Cap	免疫组化	疫苗	疫苗判定
------	------------	-------	---------	------	------------	------	----	------

[0028]

原琼扩价	蛋白含量 (ug/ml)	苗中抗原的琼扩价	Cap 抗原蛋白含量 (ug/ml)	原琼扩价	抗原蛋白含量 (ug/ml)	试验结果	的保护率	
1:16	335.7	阴性	0	1:8	171.2	5/5 阴性	5/5	合格
1:8	169.5	阴性	0	1:4	88.6	5/5 阴性	5/5	合格
1:4	86.3	阴性	0	1:2	44.1	4/5 阴性	4/5	合格
1:2	42.8	阴性	0	1:1	24.3	2/5 阴性	2/5	不合格
1:1	21.5	阴性	0	阴性	8.5	1/5 阴性	1/5	不合格
生理盐水	/	/	/	/	/	0/5 阴性	0/5	试验成立

[0029] 实施例 2

[0030] 1 猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗 2012001、2012002、2012003、2012004、2012005、2012006 批由青岛易邦公司中试生产。

[0031] 2 疫苗解离将上述 6 批疫苗,分别取摇匀的疫苗 5ml,加入 0.25g 解离剂后,放入设定 200r/min 的摇床,37℃解离 1 小时,以 5000r/min 离心 10 分钟取上清准备进行琼扩试验。

[0032] 3 Cap 蛋白琼扩效价测定

[0033] 3.1 pH 值 7.2,0.01mol/L PBS 溶液的配制精密称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.56g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.58g,NaCl 9.0g,加蒸馏水 400ml 充分溶解后,然后加蒸馏水至 1000ml,调

pH 值至 7.2。

[0034] 3.2 琼脂平板的制备 pH 值 7.2, 0.01mol/L PBS 100ml, 加 1.0g 琼脂糖, 用微波炉加热至琼脂糖完全溶解。取无菌直径 90mm 平皿, 加入溶解后的琼脂 20ml, 制成约 3mm 厚的琼脂平板, 待琼脂完全凝固后, 平皿加盖并倒置, 2 ~ 8℃ 冷藏备用。

[0035] 3.3 测样 用直径 4mm, 中央孔与外周孔距为 4mm 的梅花形打孔器打孔, 封底。中央孔加入标准阳性血清, 外围孔依次加入倍比稀释的待检 Cap 蛋白抗原, 加液量以不溢出加样孔为宜, 加样完毕后, 静置 5 ~ 10 分钟, 将平皿轻轻倒置, 放入湿盒内置 37℃ 温箱中作用 24 ~ 48 小时, 观察结果。以出现 Cap 蛋白抗原最高稀释倍数为待检样品的琼扩效价。

[0036] 4 免疫组化试验 将这 6 批疫苗分别免疫 14 ~ 28 日龄健康易感仔猪 5 头, 各颈部肌肉注射疫苗, 2.0ml/ 头; 对照猪 5 头, 各颈部肌肉注射灭菌生理盐水, 2.0ml/ 头, 隔离饲养。免后 35 日, 用猪圆环病毒 2 型 FJ 株 (病毒含量为  $10^{6.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml) 检验用毒攻击, 每头滴鼻 1.0ml、肌肉注射 2.0ml, 隔离饲养。攻毒后 28 日, 剖杀取腹股沟淋巴结, 进行免疫组化检测。免疫猪应至少 4 头为阴性, 对照猪应至少 4 头为阳性。

[0037] 5 解离标准判定 解离后的琼扩效价不低于 1:2, 比解离前的琼扩效价低 1 个滴度或滴度未降低判为解离合格。

[0038] 6 试验结果

[0039] 6.1 琼脂扩散试验结果 用确立的方法对中试生产的 2012001、2012002、2012003、2012004、2012005、2012006 批 PCV 疫苗进行解离, 并且对解离前和解离后的疫苗上清进行琼扩效价检测, 结果为解离前疫苗的琼扩效价为阴性, 解离后抗原琼扩效价在 1:2 ~ 1:4 之间, 比配苗前抗原琼扩效价下降了 0 ~ 1 个滴度, 与配苗前琼扩效价有很好的相关性, 免疫组化试验结果进一步说明本发明的方法是可靠、有效的。结果见表 2。

[0040] 6.2 免疫组化试验结果 6 批疫苗免疫组化试验均 5/5 阴性, 并且对照组结果成立, 解离后抗原琼扩效价均不低于 1:2, 充分的验证了当解离后 Cap 抗原琼扩效价不低于 1:2 时疫苗判定合格是准确有效的。

[0041] 表 2 6 批 PCV 疫苗中抗原琼扩效价及免疫组化试验结果

[0042]

疫苗批号	配苗前抗原琼扩效价	未解离疫苗中抗原琼扩效价	解离后抗原琼扩效价	免疫组化试验结果	疫苗判定结果
2012001	1:8	阴性	1:4	5/5 阴性	合格

[0043]

2012002	1:4	阴性	1:2	5/5 阴性	合格
2012003	1:4	阴性	1:2	5/5 阴性	合格
2012004	1:4	阴性	1:2	5/5 阴性	合格
2012005	1:4	阴性	1:4	5/5 阴性	合格
2012006	1:8	阴性	1:4	5/5 阴性	合格
对照组	/	/	/	0/5 阴性	试验成立

[0001]

序 列 表

---

SEQUENCE LISTING

<110> 青岛易邦生物工程有限公司

<120> 猪圆环病毒 2 型铝胶佐剂疫苗中 Cap 蛋白解离的方法

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 1

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24