



(21) 申请号 201710108921.3

(22) 申请日 2017.02.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108503697 A

(43) 申请公布日 2018.09.07

(73) 专利权人 中国科学院上海巴斯德研究所
地址 200025 上海市黄浦区合肥路411号

(72) 发明人 黄忠 屈攀科 张伟 刘庆伟

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 陈详 崔佳佳

(51) Int. Cl.

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106244726 A, 2016.12.21

CN 106279409 A, 2017.01.04

CN 104704117 A, 2015.06.10

WO 2017015463 A2, 2017.01.26

CN 105749268 A, 2016.07.13

Karin Stettler等. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection.

《Science》. 2016, 第353卷(第6301期),

Haiyan Zhao等. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. 《Cell》. 2016, 第166卷第1-12页.

Theodore C. Pierson等. Zika Virus: Immunity and Vaccine Development. 《Cell》. 2016, 第167卷

审查员 王鹏

权利要求书1页 说明书14页

序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

一种果蝇细胞表达的寨卡病毒亚单位疫苗

(57) 摘要

本发明提供了一种果蝇细胞表达的寨卡病毒亚单位疫苗,具体地本发明公开了利用果蝇S2细胞研发的亚单位寨卡病毒疫苗具有产量高、纯度高、稳定性好、易于纯化的优点,同时因为不含病毒核酸成分,所以不存在恢复突变的可能性,安全较高。

1. 一种抗原肽,其特征在于,所述抗原肽衍生自寨卡病毒包膜蛋白,并且所述抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2、3所示,并且所述抗原肽为果蝇S2细胞表达的重组蛋白。
2. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,所述的多核苷酸编码权利要求1所述的抗原肽。
3. 如权利要求2所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸选自下组:
 - (a) 编码如SEQ ID NO.2、3所示多肽的多核苷酸;
 - (b) 序列如SEQ ID NO.5、6所示的多核苷酸。
4. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有权利要求2所述的多核苷酸。
5. 一种宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞含有权利要求4所述的表达载体,或者在基因组中整合有权利要求2所述的多核苷酸,所述的宿主细胞为果蝇S2细胞。
6. 一种药物组合物,其特征在于,所述的组合物含有权利要求1所述的抗原肽、权利要求2所述的多核苷酸或者权利要求4所述的表达载体或者权利要求5所述的宿主细胞,以及药学上可接受的载体和/或辅料。
7. 如权利要求6所述的药物组合物,其特征在于,所述的组合物为疫苗。
8. 一种疫苗组合物,其特征在于,所述的组合物含有权利要求1所述的抗原肽、权利要求2所述的多核苷酸或者权利要求4所述的表达载体或者权利要求5所述的宿主细胞,以及免疫学上可接受的载体和/或辅料。
9. 如权利要求8所述的疫苗组合物,其特征在于,所述的疫苗组合物还含有佐剂。
10. 如权利要求1所述的抗原肽的用途,(a) 用于制备针对寨卡病毒的抗体;和/或(b) 用于制备治疗和/或预防与寨卡病毒相关的疾病的药物。
11. 如权利要求10所述的用途,其特征在于,所述的与寨卡病毒相关的疾病包括:寨卡病毒感染、格林巴列综合症、小头症。
12. 一种制备权利要求1所述的抗原肽的方法,包括步骤:
 - (i) 在适宜条件下培养权利要求5所述的宿主细胞,从而表达权利要求1所述的抗原肽;
 - (ii) 纯化所述抗原肽。
13. 如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述方法步骤(i)中待细胞密度达到 $2-4 \times 10^6$ 细胞/ml时,加入终浓度为5uM的氯化铬诱导表达。

一种果蝇细胞表达的寨卡病毒亚单位疫苗

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地说,本发明涉及果蝇细胞表达的寨卡病毒亚单位疫苗。

背景技术

[0002] 寨卡病毒在生物学分类上属黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus),该属病毒为单正链RNA病毒。寨卡病毒自从1947年首次在乌干达寨卡森林猕猴中分离,一直到2013年才被注意到,人们发现格林巴列综合症的爆发与法属玻利尼西亚寨卡病毒的流行相关。寨卡病毒主要通过伊蚊叮咬传播,尽管大多感染是没有症状的,但发现越来越多的小头症病例与母亲怀孕期间感染寨卡病毒相关,在小头症胎儿羊水和脑组织中分离出的寨卡病毒进一步确认了两者的关系。寨卡病毒的爆发对全球公共健康构成了严重威胁。

[0003] 因此,为了有效地、有针对性地预防和/或治疗寨卡病毒感染,本领域迫切需要开发寨卡病毒疫苗及其合适的制备方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种寨卡病毒亚单位疫苗,其制备方法及其应用。

[0005] 本发明的第一方面,提供了一种抗原肽,所述抗原肽衍生自寨卡病毒包膜蛋白,并且选自下组:

[0006] (1) SEQ ID NO.2、3所示的氨基酸序列;

[0007] (2) 将SEQ ID NO.2、3所示的氨基酸序列经过一个或多个(≤ 20 个,如2-10个,优选为2-5个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的衍生多肽,且所述衍生多肽具有抑制寨卡病毒感染细胞的功能和/或诱发针对寨卡病毒的免疫反应的功能。

[0008] 在另一优选例中,所述抗原肽为果蝇S2细胞表达的重组蛋白。

[0009] 本发明的第二方面,提供了一种分离的多核苷酸,所述的多核苷酸编码本发明第一方面的抗原肽。

[0010] 在另一优选例中,所述多核苷酸选自下组:

[0011] (a) 编码如SEQ ID NO.2、3所示多肽的多核苷酸;

[0012] (b) 序列如SEQ ID NO.5、6所示的多核苷酸;

[0013] (c) 核苷酸序列与SEQ ID NO.5、6所示序列的同源性 $\geq 95\%$ (较佳地 $\geq 98\%$)的多核苷酸;

[0014] (d) 如SEQ ID NO.5、6所示多核苷酸的5'端和/或3'端截短或添加1-60个(较佳地1-30,更佳地1-10个)核苷酸的多核苷酸;

[0015] (e) 与(a)-(d)任一所述的多核苷酸互补的多核苷酸。

[0016] 本发明的第三方面,提供了一种表达载体,所述表达载体含有本发明第二方面所述的多核苷酸。

[0017] 本发明的第四方面,提供了一种宿主细胞,所述的宿主细胞含有本发明第三方面

所述的表达载体,或者在基因组中整合有本发明第二方面所述的多核苷酸。

[0018] 在另一优选例中,所述的宿主细胞包括原核细胞和真核细胞。

[0019] 在另一优选例中,所述的宿主细胞包括果蝇S2细胞、酵母、大肠杆菌、CHO细胞、DC细胞等。

[0020] 本发明的第五方面,提供了一种药物组合物,所述的组合物含有本发明第一方面所述的抗原肽、本发明第二方面所述的多核苷酸或者本发明第三方面所述的表达载体或者本发明第四方面所述的宿主细胞,以及药学上可接受的载体和/或辅料。

[0021] 在另一优选例中,所述的组合物为疫苗。

[0022] 在另一优选例中,所述疫苗为治疗性疫苗和/或预防性疫苗。

[0023] 本发明的第六方面,提供了一种疫苗组合物,所述的组合物含有本发明第一方面所述的抗原肽、本发明第二方面所述的多核苷酸或者本发明三方面所述的表达载体或者本发明第四方面所述的宿主细胞,以及免疫学上可接受的载体和/或辅料。

[0024] 在另一优选例中,所述的疫苗组合物还含有佐剂。

[0025] 在另一优选例中,所述的佐剂包括氧化铝、皂苷、quil A、胞壁酰二肽、矿物油或植物油、基于囊泡的佐剂、非离子嵌段共聚物或DEAE葡聚糖、细胞因子(包括IL-1、IL-2、IFN- γ 、GM-CSF、IL-6、IL-12、和CpG)。

[0026] 本发明的第七方面,提供了如本发明第一方面所述的抗原肽的用途,(a)用于制备针对寨卡病毒的抗体;和/或(b)用于制备治疗和/或预防与寨卡病毒相关的疾病的药物。

[0027] 在另一优选例中,所述的与寨卡病毒相关的疾病包括:寨卡病毒感染、格林巴利综合征、小头症等。

[0028] 本发明的第八方面,提供了一种制备本发明第一方面所述的抗原肽的方法,包括步骤:

[0029] (i)在适宜条件下培养本发明第四方面所述的宿主细胞,从而表达本发明第一方面所述的抗原肽;

[0030] (ii)纯化所述抗原肽。

[0031] 在另一优选例中,所述方法步骤(i)中待细胞密度达到 $2-4 \times 10^6$ 细胞/ml时,加入终浓度为5 μ M的氯化铬诱导表达。

[0032] 本发明的第九方面,提供了一种治疗方法,给需要的对象施用本发明第一方面所述的抗原肽、第二方面所述的多核苷酸或者本发明第三方面所述的表达载体或者本发明第四方面所述的宿主细胞或本发明第五方面所述的药物组合物或本发明第六方面所述的疫苗组合物。

[0033] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0034] 图1显示了重组质粒pMT/Bip/V5-ZIKV E80和pMT/Bip/V5-ZIKV EDIII的构建。

[0035] 图2显示了目的蛋白质ZIKV E80和ZIKV EDIII的表达和纯化。(A)纯化的ZIKV E80经过15%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并用考马斯亮蓝R-250染色;(B)Western blot分析纯

化的ZIKV E80,用抗His-tag的单抗检测;(C)纯化的ZIKV EDIII经过15%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并用考马斯亮蓝R-250染色;(D)Western blot分析纯化的ZIKV EDIII,用抗His-tag的单抗检测。

[0036] 图3显示了ZIKV E80和ZIKV EDIII蛋白对寨卡病毒感染的抑制。梯度稀释的ZIKV E80、ZIKV EDIII或BSA与100PFU的寨卡病毒混合后加到预先铺好的Vero细胞,37℃孵育1小时后吸掉换为overlay培养基,BSA作为阴性对照。(A)对比对照组,ZIKV E80、ZIKVEDIII处理过的细胞空斑减少的情况;(B)计数空斑减少的数目,并用抑制率表示,抑制率(%)表示的是相对于未处理过的细胞的空斑数目,处理过细胞减少的空斑所占的百分比。

[0037] 图4显示了ZIKV E80、ZIKV EDIII免疫BALB/c小鼠后血清效价的测定。BALB/c小鼠用ZIKV E80、ZIKV EDIII或PBS加上铝佐剂免疫三次,每次免疫后两周采血,用ELISA测抗体效价。终点效价被定义为最高一个阳性结果的稀释度(OD450高于免疫前血清效价0.1)。(A)PBS、ZIKV E80组二免、三免后两周血清终点效价;(B)PBS、ZIKV EDIII组二免、三免后两周血清终点效价;水平短线表示每组血清终点效价的几何平均数。

[0038] 图5显示了ZIKV E80、ZIKV EDIII三免BALB/c小鼠后血清中和抗体的测定。三免后测ZIKV E80、ZIKV EDIII和PBS组抗血清的中和能力,用空斑减少中和分析法测定。几何平均数和P值展示出来。

[0039] 图6显示了ZIKV E80、ZIKV EDIII在小鼠体内诱导的细胞免疫反应。三免四周后,每一组的小鼠脾细胞被分离出来,用酶联免疫斑点法分析产生IFN- γ 和IL-4的细胞。(A和B)ZIKV E80组脾细胞被加刺激物,同时培养基作为对照;(C和D)ZIKV EDIII组脾细胞被加刺激物,同时培养基作为阴性对照。Mean \pm SEM如图所示。

[0040] 图7显示了被动保护实验。将PBS、ZIKV EDIII三免后两周的血清100u1与5PFU的寨卡病毒在37℃孵育1小时后经腹腔注射到5周大的AG6小鼠。然后观察2周,每天记录各组小鼠的存活状况(A)和体重变化(B)。

具体实施方式

[0041] 本发明人通过广泛而深入的研究,意外地发现利用果蝇S2细胞研发的亚单位寨卡病毒疫苗具有产量高、纯度高、稳定性好、易于纯化的优点,同时因为不含病毒核酸成分,所以不存在恢复突变的可能性,安全较高。而且,使用本发明的抗原肽E80和EDIII,结合铝佐剂,免疫小鼠后,免疫的小鼠均产生较强的免疫反应,诱导机体产生高效价的具有中和活性的抗体,用低剂量的免疫原ZIKV EDIII诱导的抗体就足以保护AG6小鼠免于致死剂量寨卡病毒的攻击。实验结果均表明本发明提供的寨卡病毒亚单位疫苗ZIKV EDIII和E80均对预防寨卡病毒感染具有显著的保护效果。

[0042] 在描述本发明之前,应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案,并且不意图是限制性的,本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

[0043] 除非另外定义,否则本文中使用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。如本文所用,在提到具体列举的数值中使用时,术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,如本文所用,表述“约100”包括99和101和之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0044] 虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料,本文在此处例举优选的方法和材料。

[0045] 寨卡病毒包膜蛋白

[0046] 寨卡病毒的包膜蛋白(E蛋白)是中和抗体的主要靶标,而E蛋白分为三个区域,EDI、EDII、EDIII,大多数特异性抗体或部分交叉反应的中和抗体,主要识别EDIII上的表位。本发明中E80蛋白是寨卡病毒包膜蛋白N端80%区域,是E蛋白胞外区段,负责与细胞受体的结合,是zika病毒的主要抗原表位。本发明主要目标是研发出一种能诱导机体产生靶向E蛋白(E80和EDIII)中和抗体的疫苗,用于预防寨卡病毒的感染。

[0047] 本发明提供了一种衍生自寨卡病毒包膜蛋白的抗原肽,优选地,用于本发明的寨卡病毒包膜蛋白源自寨卡病毒亚洲型2015年南美洲流行的Z1106033株(病毒氨基酸Genbank:ALX35659,毒株核苷酸GenBank:KU312312)。

[0048] 在本发明的一个优选地实施方式中,所述包膜蛋白(E蛋白)的氨基酸序列如下所示:

[0049] IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTT¹VSNMAEVR²SYCYEASISDM ASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD³RGWNGCGLFGK⁴GSLVTCAKFACSKKMTGKSIQ⁵PENLEYRIMLSVH GSQHSGMIVNDTG⁶HETDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYY⁷LTMNNKHWLVHKEWFHD IPLPWAGADTGT⁸PHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLSSGHLK⁹CRLKMD KLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGR¹⁰LITANPVITESTENS KMMELEDPFPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKRMAVLGDTAWDFGSVGGALNSLGKGIHQI FGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLMWLGLNAKNGSISLMCLALGGVLI¹¹FLSTAVSA,SEQ ID NO.1。

[0050] 在本发明的一个优选地实施方式中,所述抗原肽包括ZIKV E80蛋白,其氨基酸序列如下:

[0051] IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTT¹VSNMAEVR²SYCYEASISDM ASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD³RGWNGCGLFGK⁴GSLVTCAKFACSKKMTGKSIQ⁵PENLEYRIMLSVH GSQHSGMIVNDTG⁶HETDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYY⁷LTMNNKHWLVHKEWFHD IPLPWAGADTGT⁸PHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLSSGHLK⁹CRLKMD KLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGR¹⁰LITANPVITESTENS KMMELEDPFPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGK,SEQ ID NO.2。

[0052] 在本发明的另一个优选地实施方式中,所述抗原肽包括ZIKV EDIII蛋白,其氨基酸序列如下:

[0053] KLRLKGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGR¹LITANPV ITESTENSKMMELEDPFPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGST,SEQ ID NO.3。

[0054] 编码抗原肽基因序列的优化

[0055] 在本发明中,提供了优化的、特别适合在果蝇S2细胞中表达的本发明抗原肽的核酸编码序列。

[0056] 本发明人根据偏好密码子,在不改变其氨基酸序列的前提下对编码E蛋白的DNA序列进行了优化。然而,本发明人发现,仅依据密码子频率获得的优化序列并不完全适合在宿主细胞中表达。因此本发明人进行了二次优化,其中包括针对序列的GC含量进行了调整和优化,消除了原始序列中GC含量较高的区域;针对原始序列中的重复序列和顺式作用因子

等复杂结构 (GGGGG、GGTAAG) 进行优化;根据偏好性针对原核苷酸中存在的稀有密码子 (AGG、CGG、GGG、ACG) 进行了优化。

[0057] 经过大量测试和筛选,本发明人在众多优化序列中获得了一个特别优化的E蛋白编码序列,其多核苷酸序列如下所示:

[0058] atccgctgcatcggcgtgtcgaatcgcgatttcgtggagggaatgagcggaggaacctgggtggacgt
ggtgctggagcacggaggatgctgaccgtgatggcccaggataagccgaccgtggacatcgagctggtgaccacc
accgtgtcgaacatggccgaggtgctgagctactgctacgaggcctcgatcagcgatatggcctccgactcgcgct
gccaaccaggcggagcctacctggataagcagagcgacacccagtacgtgtgcaagcgcaccctgggtggatcg
cggatggggaaatggatgctgactgttcggcaaggatccctggtgacctgcccgaagttcgctgctccaagaag
atgaccggcaagtcgatccagccagagaacctggagtaccgcatcatgctgtcggtgcacggaagccagcactccg
gcatgatcgtgaacgataaccggccacgagaccgacgagaatcgcgccaaggtggagatcaccggaactccccacg
cgccgaggccaccctgggaggattcggatcgtggtgacctggattgcgagccacgcaccggcctggatttctccgac
ctgtactacctgaccatgaacaataagcactggctggtgcacaaggagtgggtccacgatatcccactgccctggc
acgccggagccgacaccggaacccacactggaacaataaggaggccctgggtggagttcaaggacgcccacgcca
gcgccagaccgtgggtggtgctgggaagccaggaggagccgtgcacaccgccctggccggagccctggaggccgag
atggatggagccaagggacgctgagctccggacacctgaagtgccgcctgaagatggacaagctgctcctgaagg
gcgtgagctactccctgtgaccgccccttcaccttcaccaagatcccagccgagaccctgcacggaaccgtgac
cgtggaggtgcagtacgccgaaccgatggaccatgcaaggtgccagcccagatggcctggacatgcagaccctg
acccagtgaggacgctgatcaccgccaatcccgtgatcaccgagtcaccgagaactcgaagatgatgctggagc
tggatcccccttcggcgacagctacatcgtgatcggcgtgggcgagaagaagatcaccaccactggcaccgctc
gggaagcaccatcggcaaggccttcgaggccaccgtgctgaggagccaagcgcagtgccctgctgggcgataccgcc
tgggacttcggaagcgtgggaggagccctgaacagcctgggcaaggcatccaccagatcttcggagccgcttca
agtccctgttcggaggcatgtcgtggttcagccagatcctgatcggcaccctgctgatgtggctgggctgaacgc
caagaatggctccatctcgtgatgtgctgacctggcctgggaggagtgctgatcttcttagcaccgcccgtgtccgc
taa,SEQ ID NO.4;该序列编码SEQ ID NO.1所示的E蛋白。

[0059] 根据上述经优化的DNA序列,编码E80的DNA序列如下:

[0060] atccgctgcatcggcgtgtcgaatcgcgatttcgtggagggaatgagcggaggaacctgggtggacgt
ggtgctggagcacggaggatgctgaccgtgatggcccaggataagccgaccgtggacatcgagctggtgaccacc
accgtgtcgaacatggccgaggtgctgagctactgctacgaggcctcgatcagcgatatggcctccgactcgcgct
gccaaccaggcggagcctacctggataagcagagcgacacccagtacgtgtgcaagcgcaccctgggtggatcg
cggatggggaaatggatgctgactgttcggcaaggatccctggtgacctgcccgaagttcgctgctccaagaag
atgaccggcaagtcgatccagccagagaacctggagtaccgcatcatgctgtcggtgcacggaagccagcactccg
gcatgatcgtgaacgataaccggccacgagaccgacgagaatcgcgccaaggtggagatcaccggaactccccacg
cgccgaggccaccctgggaggattcggatcgtggtgacctggattgcgagccacgcaccggcctggatttctccgac
ctgtactacctgaccatgaacaataagcactggctggtgcacaaggagtgggtccacgatatcccactgccctggc
acgccggagccgacaccggaacccacactggaacaataaggaggccctgggtggagttcaaggacgcccacgcca
gcgccagaccgtgggtggtgctgggaagccaggaggagccgtgcacaccgccctggccggagccctggaggccgag
atggatggagccaagggacgctgagctccggacacctgaagtgccgcctgaagatggacaagctgctcctgaagg
gcgtgagctactccctgtgaccgccccttcaccttcaccaagatcccagccgagaccctgcacggaaccgtgac

cgtggaggtgcagtagccggaaccgatggaccatgcaaggtgccagcccagatggccgtggacatgcagaccctg
acccagtgaggacgcctgatcaccgccaatcccgtgatcaccgagtcaccgagaactcgaagatgatgctggagc
tggatcccccggttcggcgacagctacatcgtgatcggcgtgggcgagaagaagatcaccaccactggcaccgctc
gggaagcaccatcggcaag,SEQ ID NO.5;

[0061] 编码EDIII蛋白的DNA序列如下:

[0062] aagctgcgcctgaagggcgtgagctactccctgtgcaccgccccttcaccttcaccaagatcccagc
cgagaccctgcacggaaccgtgaccgtggaggtgcagtagccggaaccgatggaccatgcaaggtgccagcccag
atggccgtggacatgcagaccctgacccagtgaggacgcctgatcaccgccaatcccgtgatcaccgagtcaccg
agaactcgaagatgatgctggagctggatcccccggttcggcgacagctacatcgtgatcggcgtgggcgagaaga
gatcaccaccactggcaccgctcgggaagcacc,SEQ ID NO.6。

[0063] 载体和宿主细胞

[0064] 本发明还提供了一种包含本发明的优化的抗原肽编码序列的载体,以及含所述载体的宿主细胞。

[0065] 在本发明的一个优选例中,所述载体具有表达所述抗原肽基因的表达盒,所述表达盒从5' -3' 依次具有下述元件:启动子,抗原肽基因,和终止子。

[0066] 本领域的普通技术人员可以使用的常规方法获得所述抗原肽的上述优化基因序列,例如全人工合成或PCR法合成。一种优选的合成法为不对称PCR法。用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

[0067] 本发明的多核苷酸序列可以通过常规的重组DNA技术,表达或生产目的蛋白(抗原肽),包括步骤:

[0068] (1) 用编码本发明蛋白的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞,较佳地为果蝇S2细胞;

[0069] (2) 在合适的培养基中培养宿主细胞;

[0070] (3) 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0071] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含本发明蛋白的编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体,优选市售的载体如pMT/BiP/V5-HisA。这些方法包括体外重组DNA技术、DNA合成技术、体内重组技术等。所述的DNA序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导mRNA合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。此外,表达载体优选包含一个或多个选择性标记基因,以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状。

[0072] 包含上述DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,表达目的蛋白。能够表达本发明抗原肽的宿主细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌;或是低等真核细胞,如酵母细胞(毕赤酵母、酿酒酵母);或是高等真核细胞,如昆虫细胞;优选为果蝇S2细胞。用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。工程细胞可以是快速利用甲醇型(Mut^r)或慢速利用甲醇型(Mut^s)。

[0073] 工程细胞的培养和目的蛋白发酵生产

[0074] 在获得工程细胞后,便可在适合条件下培养工程细胞,表达本发明的基因序列所编码的蛋白。根据宿主细胞的不同,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基,在适于

宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0075] 在本发明中,可采用常规的发酵条件。代表性的条件包括(但不限于):

[0076] (a) 就温度而言,本发明的抗原肽的发酵及诱导温度保持在28-30℃;

[0077] (b) 就诱导期的pH值而言,诱导期pH控制在3-9;

[0078] (c) 就溶氧(DO)而言,DO控制在20-90%,溶氧的维持可以用氧气/空气混合气体的通入来解决;

[0079] (d) 就补料而言,补料种类宜包括甘油、甲醇、葡萄糖等碳源,可单独补料或混合补料。

[0080] 工程细胞表达目的蛋白可以采用层析技术进行纯化。层析技术包括阳离子交换层析、阴离子交换层析、凝胶过滤层析、疏水层析、亲和层析等技术。常用的层析方法包括:

[0081] 1. 阴离子交换层析:

[0082] 阴离子交换层析介质包括(但不限于):Q-Sepharose、DEAE-Sepharose。如果发酵样品的盐浓度较高,影响与离子交换介质的结合,则在进行离子交换层析前需降低盐浓度。样品可以用稀释、超滤、透析、凝胶过滤层析等手段进行平衡缓冲液的更换,直至与对应的离子交换柱平衡液系统相似,然后上样,进行盐浓度或pH的梯度洗脱。

[0083] 2. 疏水层析:

[0084] 疏水层析介质包括(但不限于):Phenyl-Sepharose、Butyl-Sepharose、Octyl-Sepharose。样品通过添加NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等方式提高盐浓度,然后上样,通过降低盐浓度方法洗脱。通过疏水层析除去疏水性有较大差异的杂蛋白。

[0085] 3. 凝胶过滤层析

[0086] 疏水层析介质包括(但不限于):Sephacryl、Superdex、Sephadex类。通过凝胶过滤层析更换缓冲体系,或进一步精纯。

[0087] 4. 亲和层析

[0088] 亲和层析介质包括(但不限于):HiTrap™ Heparin HP Columns。

[0089] 制备疫苗组合物

[0090] 本发明还提供了一种制备疫苗组合物的方法,具体地,包括步骤:

[0091] 将本发明制备的抗原肽与药学上可接受的疫苗佐剂混合,从而形成疫苗组合物。

[0092] 在另一优选例中,所述的佐剂为铝佐剂、GLA佐剂,较佳的GLA佐剂。

[0093] 组合物和施用方法

[0094] 本发明还提供了一种组合物,所述组合物含有:(i)用本发明方法制备的重组抗原肽,以及(ii)药学上或免疫学上可接受的赋形剂或佐剂。本发明中,术语“含有”表示各种成分可一起应用于或存在于本发明的组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

[0095] 本发明的组合物包括药物组合物和疫苗组合物。本发明的组合物可以是单价的,也可以是多价的。

[0096] 本发明的药物组合物或疫苗组合物可制备成各种常规剂型,其中包括(但不限于):注射剂、粒剂、片剂、丸剂、栓剂、胶囊、悬浮液、喷雾剂等。

[0097] (i) 药物组合物

[0098] 本发明的药物组合物包括有效量的用本发明方法制备的抗原肽,所述抗原肽可以是单价的,也可以是多价的。

[0099] 本文所用的术语“有效量”指治疗剂治疗、缓解或预防目标疾病或状况的量,或是表现出可检测的治疗或预防效果的量。该效果可通过例如抗原水平来检测。治疗效果也包括生理性症状的减少。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。因此,预先指定准确的有效量是没用的。然而,对于某给定的状况而言,可以用常规实验来确定该有效量。

[0100] 为了本发明的目的,有效的剂量为给予个体约0.2微克/千克至2微克/千克。

[0101] 药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂(例如抗原肽或其它治疗剂)给药的载体。该术语指这样一些药剂载体:它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体,且给药后没有过分的毒性。合适的载体可以是大的、代谢缓慢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸(polylactic acid)、聚乙醇酸等。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co., N.J. 1991)中可找到关于药学上可接受的载体或赋形剂的充分讨论。

[0102] 组合物中药学上可接受的载体可包括液体,如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。通常,可将组合物制成可注射剂,例如液体溶液或悬液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液、液体赋形剂的的固体形式。脂质体也包括在药学上可接受的载体的定义中。

[0103] (ii) 疫苗组合物

[0104] 本发明的疫苗组合物可以是预防性的(即预防感染),也可以是治疗性的。所述的疫苗组合物包含免疫性抗原(包括本发明蛋白或自组装的病毒样颗粒),并且通常与“药学上可接受的载体”组合,这些载体包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体通常是大的、代谢缓慢的大分子,如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、氨基酸聚合物、氨基酸共聚物、脂质凝集物(如油滴或脂质体)等。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。另外,这些载体可起免疫刺激剂(“佐剂”)作用。另外,抗原也可以和细菌类毒素(如白喉、破伤风、霍乱、幽门螺杆菌等病原体的类毒素)偶联。

[0105] 增强免疫组合物效果的优选佐剂包括但不限于:(1) 铝盐(alum),如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等;(2) 水包油型乳剂配方,例如,(a) MF59(参见WO 90/14837), (b) SAF,和(c) RibTM佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem, Hamilton, MT), (3) 皂素佐剂;(4) Freund完全佐剂(CFA)和Freund不完全佐剂(IFA); (5) 细胞因子,如白介素(如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等)、干扰素(如 γ 干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等;(6) 细菌ADP-核糖基化毒素(如霍乱毒素CT,百日咳毒素PT或大肠杆菌热不稳定毒素LT)的脱毒变异体,参见例如W093/13302和W092/19265;以及(7) 作为免疫刺激剂来增强组合物效果的其它物质。

[0106] 包括免疫原性组合物在内的疫苗组合物(例如,可包括抗原、药学上可接受的载体以及佐剂),通常含有稀释剂,如水,盐水,甘油,乙醇等。另外,辅助性物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等可存在于这类运载体中。

[0107] 更具体地,包括免疫原性组合物在内的疫苗,包含免疫学有效量的免疫原性多肽,以及上述其它所需的组分。“免疫学有效量”指以单剂或连续剂一部分给予个体的量对治疗

或预防是有效的。该用量可根据所治疗个体的健康状况和生理状况、所治疗个体的类别(如人)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗的配制、治疗医师对医疗状况的评估、及其它的相关因素而定。预计该用量将在相对较宽的范围内,可通过常规实验来确定。

[0108] 通常,可将疫苗组合物或免疫原性组合物制成可注射剂,例如液体溶液或悬液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液、液体赋形剂的固体形式。该制剂还可乳化或包封在脂质体中,以增强佐剂效果。

[0109] (iii) 给药途径和剂量

[0110] 所述组合物可以直接给予对象。对象可以是人或非人哺乳动物,较佳地为人。当用作疫苗时,可用已知的方法将本发明的病毒样颗粒直接施用于个体。通常采用与常规疫苗相同的施用途径和/或模拟病原体感染路径施用这些疫苗。

[0111] 给予本发明药物组合物或疫苗组合物的途径包括(但并不限于):肌内、皮下、皮内、肺内、静脉内、经鼻、阴道内、经口服或其它肠胃外给药途径。如果需要,可以组合给药途径,或根据疾病情况进行调节。疫苗组合物可以单剂量或多剂量给予,且可以包括给予加强剂量以引发和/或维持免疫力。

[0112] 应以“有效量”给予病毒样颗粒疫苗,即病毒样颗粒的量在所选用的给药路径中足以引发免疫应答,能有效促使保护宿主抵抗寨卡病毒感染。

[0113] 在各疫苗剂份中所选用的病毒样颗粒的量,是按可引发免疫保护性应答而无明显的副作用的量而定。通常,在感染宿主细胞后,各剂的疫苗足以含有约 $1\mu\text{g}$ - $1000\mu\text{g}$,较佳地为 $1\mu\text{g}$ - $100\mu\text{g}$,更佳地 $10\mu\text{g}$ - $50\mu\text{g}$ 蛋白质或VLP。可用包括观察对象中的抗体滴定度和其它反应的标准研究方法来确定具体疫苗的最佳用量。可通过监控疫苗提供的免疫力水平来确定是否需要增强剂量。在评估了血清中的抗体滴定度后,可能需要选用增强剂量免疫接种。施用佐剂和/或免疫刺激剂就可提高对本发明的蛋白质的免疫应答。优选方法是从肠胃外(皮下或肌内)途径通过注射给予免疫原性组合物。

[0114] 本发明的主要优点在于:

[0115] (1) 本发明的抗原肽能够在果蝇S2细胞中大量表达,因此制备成本低,适合工业化应用;

[0116] (2) 本发明对寨卡病毒E蛋白的基因进行重新设计和序列优化,经优化的基因序列在宿主细胞内表达量高、稳定性好、适合高密度发酵;

[0117] (3) 使用本发明的抗原肽E80和EDIII,结合铝佐剂,免疫小鼠后,免疫的小鼠均产生较强的免疫反应,诱导机体产生高效价的具有中和活性的抗体,用低剂量的免疫原ZIKV EDIII诱导的抗体就足以保护AG6小鼠免于致死剂量寨卡病毒的攻击,寨卡病毒亚单位疫苗ZIKV EDIII和E80均是预防寨卡病毒感染的候选疫苗,具有显著的保护效果。

[0118] (3) 本发明与传统的减毒活疫苗、DNA疫苗以及灭活疫苗相比,该候选疫苗因不具有病毒核酸,所以非常安全。

[0119] 下面结合具体实施例,进一步详陈本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如美国Sambrook.J等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译,北京:科学出版社,2002年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计

算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0120] 材料和方法

[0121] 1. 细胞

[0122] 果蝇Schneider 2 (S2) 细胞购于Invitrogen公司, 培养于添加10%胎牛血清(Gibco), 1%双抗(Gibco)的Schneider's Drosophila Media (Gibco) 中或添加1%L-谷氨酰胺(Gibco), 1%双抗(Gibco)的ExpressFive® SFM培养基(Gibco) 中, 28℃培养箱培养。

[0123] 2. 病毒

[0124] 本研究中用到的寨卡病毒株为ZIKV/SZ-WIV01株(GenBank:KU963796), 来源于中国科学院武汉病毒研究所微生物菌毒种保藏中心(病毒保藏号:IVCAS6.6110)。

[0125] 3. 抗体

[0126] 鼠抗His-tag的单抗(10E2) 购买于Abmart(货号:264160), 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗鼠IgG购买于Sigma, 碱性磷酸酶(AP) 标记的山羊抗鼠IgG购买于Promega(货号:S3728)。

[0127] 4. 质粒构建

[0128] 果蝇细胞表达载体pMT/BiP/V5-HisA、筛选质粒pCoBlast和磷酸钙转染试剂盒都购自于Invitrogen公司。根据寨卡病毒亚洲型2015年南美洲流行的Z1106033株(病毒核苷酸GenBank:KU312312, 氨基酸Genbank:ALX35659)的E蛋白编码序列, 进行密码子优化及基因合成(GenScript公司), 并进一步克隆到载体pUC57(购自GenScript USA Inc.) 上, 获得质粒pZIKV-E。以pZIKV-E为模版, 经特异性引物PCR扩增后, 两端带有Bgl II和Xba I酶切位点, 连接到含有Bgl II和Xba I酶切位点的昆虫表达载体pMT/Bip/V5-His A(含有His标签, 有利于目的蛋白质的检测和纯化), 得到携带寨卡病毒包膜蛋白N端80%区域(ZIKV E80) 和包膜蛋白区域III(ZIKV EDIII) 目的基因片段的重组质粒pMT/Bip/V5-ZIKV E80和pMT/Bip/V5-ZIKV EDIII。

[0129] 基因扩增特异引物

[0130]

引物名称	引物序列	SEQ ID NO.
ZIKV E80-F	CCAAGATCTATCCGCTGCATCGGCGTGTCGAA	7
ZIKV E80-R	AAATCTAGACTTGCCGATGGTGCTTCCCGAGCG	8
ZIKV EDIII-F	AAAAGATCTAAGCTGCGCCTGAAGGGCGTGAGC	9
ZIKV EDIII-R	AAATCTAGAGGTGCTTCCCGAGCGGTGCCAGTG	10

[0131] 5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印记分析

[0132] 表达的蛋白溶液样品经过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 上样缓冲液作用, 并在100℃煮沸5分钟, 然后在15%的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 蛋白质经过考马斯亮蓝染色可见或转移到PVDF上用于蛋白质印记(Western Blotting) 分析, Western Blotting用抗His-tag的单抗检测, 接着用HRP偶联的羊抗鼠的二抗孵育, 最后显色来检测特异性条带的位置。

[0133] 6. 目的蛋白ZIKV E80和ZIKV EDIII在果蝇S2细胞中的表达

[0134] 1) 瞬时转染检测目的基因的表达

[0135] 采用钙转法将重组质粒转染到S2细胞中。首先铺野生型S2细胞于六孔板中, 3×10^6 细胞/孔, 28℃培养6~16个小时, 当细胞密度达到 $2-4 \times 10^6$ 细胞/ml时进行转染。将36ul 2M

CaCl₂、19ug重组质粒及无菌水加至300ul配置成A液,300ul 2xHEPES (50mM HEPES,1.5mM Na₂HP04,280mM NaCl,pH 7.1)配置成B液。将B液放置于震荡仪上,缓慢滴加A液于B液,并将此混合液于室温下静置30分钟,均匀滴加混合液于6孔板中的细胞上,在28℃培养16~24小时后,将细胞800rpm,离心5分钟,以含有10%血清的完全培养基洗三遍细胞,以除去钙颗粒,减轻对细胞的损害。将细胞放置于28℃培养72小时,加入5uM氯化铬诱导目的基因的表达,并以蛋白质印迹法检测目的蛋白的表达。

[0136] 2) 稳定系细胞的筛选及目的蛋白的大量表达

[0137] 如果瞬时转染能检测到目的蛋白质的表达,就采用杀稻瘟菌素筛选表达目的蛋白的稳转细胞系。将1ug pCoBlast筛选质粒与重组质粒按瞬时转染法(36ul 2M CaCl₂、19ug重组质粒及无菌水加至300ul配置成A液)共转于S2细胞中,当细胞密度至2-4x10⁶细胞/ml,以25ug/ml杀稻瘟菌素筛选压筛选出阳性细胞,并检测其目的基因表达。

[0138] 如果检测到目的蛋白,就不断扩大培养稳转系细胞,此时换用无血清培养基Express Five® SFM (Gibco) (添加10ug/ml的杀稻瘟菌素)。从一个T25flask扩大到一个T75flask,最后转接到转瓶中培养,等细胞密度达到2-4x10⁶细胞/ml时,加入终浓度为5uM的氯化铬诱导表达。

[0139] 诱导7天左右,离心收取上清,用0.45um的滤膜进行过滤。然后用以3kDa的超滤离心管(Millipore)进行浓缩,浓缩到原体积的1/20左右。后用镍柱(Novagen)纯化,上柱之前先binding buffer (0.5M NaCl,20mM Tris,10mM咪唑,pH7.9)结合特异性不强的位点,接着上样,随后用binding buffer和washing buffer (0.5M NaCl,20mM Tris,40mM咪唑,pH7.9)洗掉杂蛋白后,再用eluting buffer (0.5M NaCl,20mM Tris,250mM咪唑,pH7.9)洗脱目的蛋白。最后用SDS-PAGE和Brandford进行目的蛋白质的定量。

[0140] 7. 病毒空斑实验

[0141] 病毒的滴度用空斑法分析。简单地说,在24孔板上铺Vero-E6单层细胞,37℃培养过夜,10倍稀释的寨卡病毒在细胞上37℃孵育1小时,接着病毒样品被除去并加overlay培养基(含有1:1混合的0.2% agarose和2% FBS-DMEM)。细胞被转移到4℃,放置15分钟。接着37℃培养约80小时。最后用4%多聚甲醛固定并用0.1%的结晶紫染色。计数空斑并计算病毒的滴度。

[0142] 8. ZIKV E80和ZIKV EDIII蛋白对寨卡病毒感染的抑制

[0143] 提前一晚铺Vero-E6细胞于24孔板,10⁵细胞/孔,第二天,将ZIKV E80、ZIKV EDIII梯度稀释,分别与100PFU寨卡病毒在37℃孵育一小时,接着病毒样品被除去并加overlay培养基(含有1:1混合的0.2% agarose和2% FBS-DMEM)。细胞被转移到4℃,放置15分钟。接着37℃培养约80小时。最后用4%多聚甲醛固定并用0.1%的结晶紫染色。计数空斑并计算ZIKV E80和ZIKV EDIII蛋白对寨卡病毒感染的抑制率,未加目的蛋白的孔为参照(0%)。

[0144] 9. 动物免疫

[0145] 以ZIKV E80和ZIKV EDIII为免疫原,500ug氢氧化铝(Alhydrogel) (购自Invivogen)为佐剂,对6周大的BALB/c雌性小鼠(每组6只)分别腹腔注射10ug免疫原,另外以PBS组为对照组。在第0周、2周、4周的时候分别免疫一次,并且在第二周、第四周免疫前先眼眶后静脉采血。采完的血液先室温放置1-3小时,然后4度过夜,第二天4℃离心,3000rpm离心30分钟,分离出来的血清56℃处理30分钟。之后检测血清中抗体效价以及中和抗体效

价。

[0146] 10. 血清抗体效价的测定

[0147] 1) 测定ZIKV E80组血清抗体效价

[0148] 用纯化出来的ZIKV E80包被96孔板,50ng/孔,4℃过夜,5%脱脂牛奶37℃封闭1小时,将处理后的血清2倍梯度稀释,然后与包被的抗原37℃孵育2小时,用PBST洗5次,用辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠的二抗37℃孵育1小时,用TMB显色,室温避光作用,用1M磷酸终止反应后,Thermo Scientific Varioskan Flash多功能读数仪测定样品在A450的吸光值。

[0149] 2) 测定ZIKV EDIII组血清抗体效价

[0150] 同测定ZIKV E80组,但用ZIKV EDIII包板。

[0151] 11. 血清中和抗体效价的测定

[0152] 将Vero-E6细胞按 10^5 细胞/孔铺到24孔板中,培养过夜,等细胞覆盖90%左右,用无血清DMEM培养基将灭活的血清梯度稀释至100u1,与100PFU寨卡病毒37℃孵育1个小时,把200u1混合物加到Vero-E6细胞上,37℃培养1小时,弃去细胞上清,每孔加700u1 overlay培养基,37℃培养72小时左右。随后弃去培养基,用PBS洗两次,用4%多聚甲醛室温固定30分钟,紫外照射30分钟。弃去多聚甲醛,用0.1%结晶紫室温染色30分钟,用蒸馏水洗两次,晾干计数。经GraphPad Prism软件拟合曲线后,统计使空斑减少一半的滴度($PRNT_{50}$)。

[0153] 12. 酶联免疫斑点检测

[0154] 1) 提前用35%的乙醇将96孔板(Millipore MultiScreen 96-well ELISPOT plates)润湿,然后包被稀释的人源的IFN- γ 捕获抗体(10ug/ml)和IL-4捕获抗体(4ug/ml),50u1/孔,过夜4℃孵育;

[0155] 2) 弃去包被液,用PBS洗4次,用RPMI-1640的培养基封闭3小时;

[0156] 3) 将稀释的ZIKV E80、ZIKV EDIII和阳性对照(Concanavalin A)、阴性对照(RPMI-1640)加到相应的孔中;

[0157] 4) 分离脾细胞并计数,然后将其加到对应的孔中,37℃培养24-48小时;

[0158] 5) 弃去细胞,用冷的ddH₂O洗,再用PBST洗5次;

[0159] 6) 加稀释的鼠抗IFN- γ (2ug/ml)、IL-4 (4ug/ml)的检测抗体,室温孵育3小时;用PBST洗三次;加AP偶联的Streptavidin (1:1000),用PBST洗三次后,加BCIP/NBT进行显色,并加ddH₂O进行终止;

[0160] 7) 晾干以后用ELISPOT plate reader进行计数。

[0161] 13. 被动保护实验

[0162] 先将100u1三免小鼠血清(将每一组各个小鼠的血清混合在一块)和5PFU的寨卡病毒在37度孵育1小时,然后将其腹腔注射到5周龄的AG6小鼠(I型、II型干扰素受体敲除)体内;连续2周进行观察小鼠的状况,并进行称重;最后根据存活状况和体重变化情况判断疫苗的保护效果。

[0163] 14. 统计学分析

[0164] 所有的数据分析都用GraphPad Prism software v 5.0分析.Kaplan-Meier生存曲线比较用log-rank test.其它结果用Student's 2-tailed t检验分析.数据显著性差异表示为:ns(没有显著差异, $P \geq 0.05$);* $0.01 \leq P < 0.05$;** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$ 。

[0165] 本发明实施例中所用的实验材料如无特殊说明均可从市售渠道获得。

[0166] 实施例1目的蛋白ZIKV E80和ZIKV EDIII在果蝇S2细胞中的表达

[0167] 将构建好的重组质粒pMT/Bip/V5-ZIKV E80和pMT/Bip/V5-ZIKV EDIII(如图1),瞬时转染到果蝇细胞,经氯化铬诱导后进行western blot检测培养基上清,检测到目的蛋白。然后把重组质粒和pCoBlast筛选质粒共转,筛选稳定系细胞后,进行诱导表达,获得细胞上清后进行纯化,SDS-PAGE显示ZIKV E80蛋白大小为54KD(如图2A),用鼠抗His-tag抗体作为一抗,western blot检测到ZIKV E80(如图2B)大小与SDS-PAGE结果一致。同样地,ZIKV EDIII大小为15KD(如图2C),与western blot检测到的条带(图2D)大小一致。以上结果提示目标蛋白E80和EDIII获得表达,纯化后计算ZIKV E80和ZIKV EDIII抗原肽的表达产量分别达到10mg/l和2.6mg/l。

[0168] 酵母表达实验结果表明,目的蛋白ZIKV E80无法在酵母细胞中表达,却可以在果蝇S2细胞中高效表达,产量达到10mg/l。

[0169] 实施例2.ZIKV E80和ZIKV EDIII蛋白对寨卡病毒感染的抑制

[0170] 为了初步鉴定ZIKV E80和ZIKV EDIII的生物学功能,我们进行了ZIKV E80和ZIKV EDIII蛋白对寨卡病毒感染的抑制分析。结果如图3所示,寨卡病毒对Vero细胞的感染受到ZIKV E80($IC_{50}=54.63\mu\text{g/ml}$)、ZIKV EDIII($IC_{50}=71.85\mu\text{g/ml}$)的抑制,而且呈剂量依赖的方式,而对照蛋白BSA并不能抑制寨卡病毒对细胞的感染。而ZIKV E80抗原肽对寨卡病毒感染的抑制活性显著优于ZIKV EDIII蛋白,其 IC_{50} 值与ZIKV EDIII相比,降低了30%以上。

[0171] 本实施例的结果表明ZIKV E80、ZIKV EDIII可以和寨卡病毒竞争进入细胞,因此具有诱导动物产生中和抗体的潜力。

[0172] 实施例3.ZIKV E80和ZIKV EDIII在小鼠内体内诱导的特异抗体反应

[0173] 为了评价ZIKV E80、ZIKV EDIII的免疫原性,三组BALB/c分别被腹腔免疫三次,ZIKV E80+Alum、ZIKV EDIII+Alum、PBS+Alum。ZIKV E80、ZIKV EDIII诱导产生的小鼠抗血清用ELISA检测。如图4A所示,ZIKV E80诱导产生的特异性抗体效价二免和三免几何平均数分别为252.0、1007.9;如图4B所示,ZIKV EDIII诱导产生的特异性抗体效价二免和三免几何平均数分别为178.2、5701.8,而对照组血清没有显示结合能力。

[0174] 实施例4.ZIKV E80、ZIKV EDIII三免BALB/c小鼠后血清中和抗体的测定

[0175] 为了评价小鼠抗血清对寨卡病毒的中和能力,我们用空斑减少中和法分析(PRNT)。如图5所示,ZIKV E80组血清能中和寨卡病毒, $PRNT_{50}$ 为365.5,而ZIKV EDIII组血清中和能力更强, $PRNT_{50}$ 为1633.8,而对照组血清几乎没有中和能力, $PRNT_{50}$ 为49.1。

[0176] 实施例5.ZIKVE80和ZIKV EDIII在小鼠内体内诱导的细胞免疫反应

[0177] 为了探究免疫原能否诱导产生特异的T细胞反应,在三免四周后我们将小鼠脾细胞分离出来,用酶联免疫斑点分析产生IFN- γ 和IL-4的细胞。如图6所示,ZIKV E80组、ZIKV EDIII组都能诱导产生数目比较多的分泌IFN- γ 和IL-4的细胞,而PBS组不能诱导产生比较多分泌IFN- γ 和IL-4的细胞。因此,ZIKV E80、ZIKV EDIII能在小鼠内诱导产生抗原特异的IFN- γ 和IL-4记忆性T细胞。

[0178] 实施例6.被动保护实验

[0179] 根据血清中和试验结果,采用ZIKV EDIII三免后的血清做被动保护实验。血清和寨卡病毒孵育后,腹腔注射,观察两周小鼠的状况并每天称重。结果显示(图7),对照组AG6小鼠在攻毒后第5天开始体重下降,第9天完全死亡,而ZIKV EDIII组AG6小鼠除了一只

12天时死亡,其它4只第14天时仍然都幸存。这些结果表明,抗ZIKV EDIII的抗血清在与寨卡病毒孵育后能够保护致死剂量寨卡病毒的攻击。

[0180] 结论

[0181] 本发明人采用果蝇S2系统获得了稳转细胞系,并表达了寨卡病毒截断的包膜蛋白E80和EDIII。本发明获得的目的蛋白ZIKV E80和ZIKV EDIII在抑制寨卡病毒感染细胞实验中都展示出了比较好的抑制作用。在第三次免疫BALB/c小鼠后,无论是从血清抗体滴度还是特异的T细胞反应来看,两种抗原肽免疫的小鼠均产生较强的免疫反应。最重要的是,结合铝佐剂,用低剂量的免疫原ZIKV EDIII诱导的抗体就足以保护AG6小鼠免于致死剂量寨卡病毒的攻击。在目的蛋白的制备方面,本申请人在研究中发现,采用不同的宿主细胞进行表达,在基因序列完全一样的条件下,抗原肽的表达量差异巨大而且在蛋白活性方面也有很大的差异,比如采用酵母细胞无法成功制备本发明中具有活性的ZIKV E80抗原肽,而果蝇表达的ZIKA E80抗原肽不仅产量高,而且在对ZIKA病毒的抑制活性和诱导抗体的中和水平上均表现出较好的抗病毒效果,果蝇表达的ZIKA E80抗原肽是理想的ZIKA病毒候选疫苗。

[0182] 与传统的减毒活疫苗、DNA疫苗以及灭活疫苗相比,该候选疫苗因不具有病毒核酸,所以非常安全。另外纯化方便,不需要复杂的技术,操作简单,具有比较大的开发潜力。

[0183] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 中国科学院上海巴斯德研究所
 [0003] <120> 一种果蝇细胞表达的寨卡病毒亚单位疫苗
 [0004] <130> P2017-0051
 [0005] <160> 10
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 504
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 寨卡病毒
 [0011] <400> 1
 [0012] Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr
 [0015] 20 25 30
 [0016] Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr Val Asp Ile Glu Leu Val Thr Thr
 [0017] 35 40 45
 [0018] Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser
 [0019] 50 55 60
 [0020] Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr Leu
 [0023] 85 90 95
 [0024] Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 [0025] 100 105 110
 [0026] Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Lys Lys Met Thr Gly Lys
 [0027] 115 120 125
 [0028] Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met Leu Ser Val His
 [0029] 130 135 140
 [0030] Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Thr Gly His Glu Thr
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Ile Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala
 [0033] 165 170 175
 [0034] Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Asp Cys Glu Pro
 [0035] 180 185 190
 [0036] Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu Thr Met Asn Asn
 [0037] 195 200 205
 [0038] Lys His Trp Leu Val His Lys Glu Trp Phe His Asp Ile Pro Leu Pro
 [0039] 210 215 220
 [0040] Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly Thr Pro His Trp Asn Asn Lys Glu
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala His Ala Lys Arg Gln Thr Val Val
[0043]	245 250 255
[0044]	Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Val His Thr Ala Leu Ala Gly Ala
[0045]	260 265 270
[0046]	Leu Glu Ala Glu Met Asp Gly Ala Lys Gly Arg Leu Ser Ser Gly His
[0047]	275 280 285
[0048]	Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser
[0049]	290 295 300
[0050]	Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu
[0051]	305 310 315 320
[0052]	Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp
[0053]	325 330 335
[0054]	Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu
[0055]	340 345 350
[0056]	Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser
[0057]	355 360 365
[0058]	Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp
[0059]	370 375 380
[0060]	Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp
[0061]	385 390 395 400
[0062]	His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala Phe Glu Ala Thr Val Arg
[0063]	405 410 415
[0064]	Gly Ala Lys Arg Met Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly
[0065]	420 425 430
[0066]	Ser Val Gly Gly Ala Leu Asn Ser Leu Gly Lys Gly Ile His Gln Ile
[0067]	435 440 445
[0068]	Phe Gly Ala Ala Phe Lys Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Phe Ser
[0069]	450 455 460
[0070]	Gln Ile Leu Ile Gly Thr Leu Leu Met Trp Leu Gly Leu Asn Ala Lys
[0071]	465 470 475 480
[0072]	Asn Gly Ser Ile Ser Leu Met Cys Leu Ala Leu Gly Gly Val Leu Ile
[0073]	485 490 495
[0074]	Phe Leu Ser Thr Ala Val Ser Ala
[0075]	500
[0076]	<210> 2
[0077]	<211> 409
[0078]	<212> PRT
[0079]	<213> 寨卡病毒
[0080]	<400> 2
[0081]	Ile Arg Cys Ile Gly Val Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Met Ser
[0082]	1 5 10 15
[0083]	Gly Gly Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

[0084]	20	25	30
[0085]	Val Met Ala Gln Asp Lys Pro Thr Val Asp Ile Glu Leu Val Thr Thr		
[0086]	35	40	45
[0087]	Thr Val Ser Asn Met Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Glu Ala Ser		
[0088]	50	55	60
[0089]	Ile Ser Asp Met Ala Ser Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala		
[0090]	65	70	75
[0091]	Tyr Leu Asp Lys Gln Ser Asp Thr Gln Tyr Val Cys Lys Arg Thr Leu		
[0092]	85	90	95
[0093]	Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser		
[0094]	100	105	110
[0095]	Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Lys Lys Met Thr Gly Lys		
[0096]	115	120	125
[0097]	Ser Ile Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Arg Ile Met Leu Ser Val His		
[0098]	130	135	140
[0099]	Gly Ser Gln His Ser Gly Met Ile Val Asn Asp Thr Gly His Glu Thr		
[0100]	145	150	155
[0101]	Asp Glu Asn Arg Ala Lys Val Glu Ile Thr Pro Asn Ser Pro Arg Ala		
[0102]	165	170	175
[0103]	Glu Ala Thr Leu Gly Gly Phe Gly Ser Leu Gly Leu Asp Cys Glu Pro		
[0104]	180	185	190
[0105]	Arg Thr Gly Leu Asp Phe Ser Asp Leu Tyr Tyr Leu Thr Met Asn Asn		
[0106]	195	200	205
[0107]	Lys His Trp Leu Val His Lys Glu Trp Phe His Asp Ile Pro Leu Pro		
[0108]	210	215	220
[0109]	Trp His Ala Gly Ala Asp Thr Gly Thr Pro His Trp Asn Asn Lys Glu		
[0110]	225	230	235
[0111]	Ala Leu Val Glu Phe Lys Asp Ala His Ala Lys Arg Gln Thr Val Val		
[0112]	245	250	255
[0113]	Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Val His Thr Ala Leu Ala Gly Ala		
[0114]	260	265	270
[0115]	Leu Glu Ala Glu Met Asp Gly Ala Lys Gly Arg Leu Ser Ser Gly His		
[0116]	275	280	285
[0117]	Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser		
[0118]	290	295	300
[0119]	Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu		
[0120]	305	310	315
[0121]	Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp		
[0122]	325	330	335
[0123]	Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu		
[0124]	340	345	350
[0125]	Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser		

[0126]	355	360	365
[0127]	Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp		
[0128]	370	375	380
[0129]	Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp		
[0130]	385	390	395 400
[0131]	His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys		
[0132]	405		
[0133]	<210> 3		
[0134]	<211> 110		
[0135]	<212> PRT		
[0136]	<213> 寨卡病毒		
[0137]	<400> 3		
[0138]	Lys Leu Arg Leu Lys Gly Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe		
[0139]	1 5 10 15		
[0140]	Thr Phe Thr Lys Ile Pro Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val		
[0141]	20 25 30		
[0142]	Glu Val Gln Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln		
[0143]	35 40 45		
[0144]	Met Ala Val Asp Met Gln Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr		
[0145]	50 55 60		
[0146]	Ala Asn Pro Val Ile Thr Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu		
[0147]	65 70 75 80		
[0148]	Glu Leu Asp Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly		
[0149]	85 90 95		
[0150]	Glu Lys Lys Ile Thr His His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr		
[0151]	100 105 110		
[0152]	<210> 4		
[0153]	<211> 1515		
[0154]	<212> DNA		
[0155]	<213> 人工序列		
[0156]	<400> 4		
[0157]	atccgctgca tcggcgtgtc gaatcgcatg ttcgtggagg gaatgagcgg aggaacctgg 60		
[0158]	gtggacgtgg tgctggagca cggaggatgc gtgaccgtga tggcccagga taagccgacc 120		
[0159]	gtggacatcg agctggtgac caccaccgtg tcgaacatgg ccgaggtgcg cagctactgc 180		
[0160]	tacgaggcct cgatcagcga tatggcctcc gactcgcgct gcccaacca gggcgaggcc 240		
[0161]	tacctggata agcagagcga caccagctac gtgtgcaagc gcaccctggt ggatcgcgga 300		
[0162]	tgggaaaatg gatgcggact gttcggcaag ggatccttgg tgacctgcgc caagtctgcc 360		
[0163]	tgctccaaga agatgaccgg caagtcgac cagccagaga acctggagta ccgcatcatg 420		
[0164]	ctgtcgggtgc acggaagcca gactccggc atgatcgtga acgataaccg ccacgagacc 480		
[0165]	gacgagaatc gcgccaaggt ggagatcacc ccgaactccc cacgcgccga ggccaccctg 540		
[0166]	ggaggattcg gatcgtggg cctggattgc gagccacgca ccggcctgga tttctccgac 600		
[0167]	ctgtactacc tgacctgaa caataagcac tggctggtgc acaaggagtg gttccacgat 660		

[0168]	atcccactgc cctggcacgc cggagccgac accggaaccc cacactggaa caataaggag	720
[0169]	gccctggtgg agttcaagga cgcccacgcc aagcgccaga ccgtggtggt gctgggaagc	780
[0170]	caggaggag ccgtgcacac cgccctggcc ggagccctgg aggccgagat ggatggagcc	840
[0171]	aagggacgcc tgagctccg acacctgaag tgccgcctga agatggaaa gctgvcctg	900
[0172]	aaggcgtga gctactccct gtgaccgcc gccttcacct tcaccaagat cccagccgag	960
[0173]	acctgcacg gaaccgtgac cgtggaggtg cagtacgcc gaaccgatg accatgcaag	1020
[0174]	gtgccagccc agatggccgt ggacatgcag acctgacct cagtgggacg cctgateacc	1080
[0175]	gccaatcccg tgatcaccga gtccaccgag aactcgaaga tgatgctgga gctggatccc	1140
[0176]	ccgttcggcg acagctacat cgtgatcggc gtgggcgaga agaagatcac ccaccactg	1200
[0177]	caccgctcgg gaagcaccat cggcaaggcc ttcgaggcca ccgtgcgcgg agccaagcgc	1260
[0178]	atggccgtgc tggcgatac cgccctggac ttcggaagcg tgggaggagc cctgaacagc	1320
[0179]	ctggcaagg gcatcacca gatcttcgga gccgcctca agtcctgtt cggaggcatg	1380
[0180]	tcgtggttca gccagatcct gatcggcacc ctgctgatgt ggctgggct gaacgccaag	1440
[0181]	aatggctcca tctcgtgat gtgcctggcc ctgggaggag tgctgatctt cctgagcacc	1500
[0182]	gccgtgtccg cctaa	1515
[0183]	<210>	5
[0184]	<211>	1227
[0185]	<212>	DNA
[0186]	<213>	人工序列
[0187]	<400>	5
[0188]	atccgctgca tcggcgtgtc gaatcgcgat ttcgtggagg gaatgagcgg aggaacctgg	60
[0189]	gtggacgtgg tgctggagca cggaggatgc gtgaccgtga tggcccagga taagccgacc	120
[0190]	gtggacatcg agctggtgac caccaccgtg tcgaacatgg ccgagggtcg cagctactgc	180
[0191]	tacgaggcct cgatcagcga tatggcctcc gactcgcgct gcccaacca gggcgaggcc	240
[0192]	tacctggata agcagagcga caccagtac gtgtgcaagc gcacctggt ggatcgcgga	300
[0193]	tgggaaatg gatcggact gttcggcaag ggatccctgg tgacctgcgc caagtccgcc	360
[0194]	tgctccaaga agatgaccgg caagtcgatc cagccagaga acctggagta ccgcatcatg	420
[0195]	ctgtcgggtgc acggaagcca gactccggc atgatcgtga acgataccgg ccacgagacc	480
[0196]	gacgagaatc gcgccaaggt ggagatcacc ccgaactccc cagcgcccga ggccacctg	540
[0197]	ggaggattcg gatcgtggg cctggattgc gagccacgca ccggcctgga tttctccgac	600
[0198]	ctgtactacc tgaccatgaa caataagcac tggctggtgc acaaggagtg gttccacgat	660
[0199]	atcccactgc cctggcacgc cggagccgac accggaaccc cacactggaa caataaggag	720
[0200]	gccctggtgg agttcaagga cgcccacgcc aagcgccaga ccgtggtggt gctgggaagc	780
[0201]	caggaggag ccgtgcacac cgccctggcc ggagccctgg aggccgagat ggatggagcc	840
[0202]	aagggacgcc tgagctccg acacctgaag tgccgcctga agatggaaa gctgvcctg	900
[0203]	aaggcgtga gctactccct gtgaccgcc gccttcacct tcaccaagat cccagccgag	960
[0204]	acctgcacg gaaccgtgac cgtggaggtg cagtacgcc gaaccgatg accatgcaag	1020
[0205]	gtgccagccc agatggccgt ggacatgcag acctgacct cagtgggacg cctgateacc	1080
[0206]	gccaatcccg tgatcaccga gtccaccgag aactcgaaga tgatgctgga gctggatccc	1140
[0207]	ccgttcggcg acagctacat cgtgatcggc gtgggcgaga agaagatcac ccaccactg	1200
[0208]	caccgctcgg gaagcaccat cggcaag	1227
[0209]	<210>	6

- [0210] <211> 330
[0211] <212> DNA
[0212] <213> 人工序列
[0213] <400> 6
[0214] aagctgcgcc tgaagggcgt gagctactcc ctgtgcaccg ccgccttcac cttaccaag 60
[0215] atcccagcgc agaccctgca cggaaccgtg accgtggagg tgcagtacgc cggaaccgat 120
[0216] ggaccatgca aggtgccagc ccagatggcc gtggacatgc agaccctgac cccagtggga 180
[0217] cgctgatca ccgccaatcc cgtgatecacc gagtccaccg agaactcgaa gatgatgctg 240
[0218] gagctggatc ccccgttcgg cgacagctac atcgtgatcg gcgtgggcga gaagaagatc 300
[0219] acccaccact ggcaccgctc gggaagcacc 330
[0220] <210> 7
[0221] <211> 32
[0222] <212> DNA
[0223] <213> 人工序列
[0224] <400> 7
[0225] ccaagatcta tccgctgcat cggcgtgtcg aa 32
[0226] <210> 8
[0227] <211> 33
[0228] <212> DNA
[0229] <213> 人工序列
[0230] <400> 8
[0231] aaatctagac ttgccgatgg tgcttcccga gcg 33
[0232] <210> 9
[0233] <211> 33
[0234] <212> DNA
[0235] <213> 人工序列
[0236] <400> 9
[0237] aaaagatcta agctgcgctt gaagggcgtg agc 33
[0238] <210> 10
[0239] <211> 33
[0240] <212> DNA
[0241] <213> 人工序列
[0242] <400> 10
[0243] aaatctagag gtgcttcccg agcggtgcca gtg 33

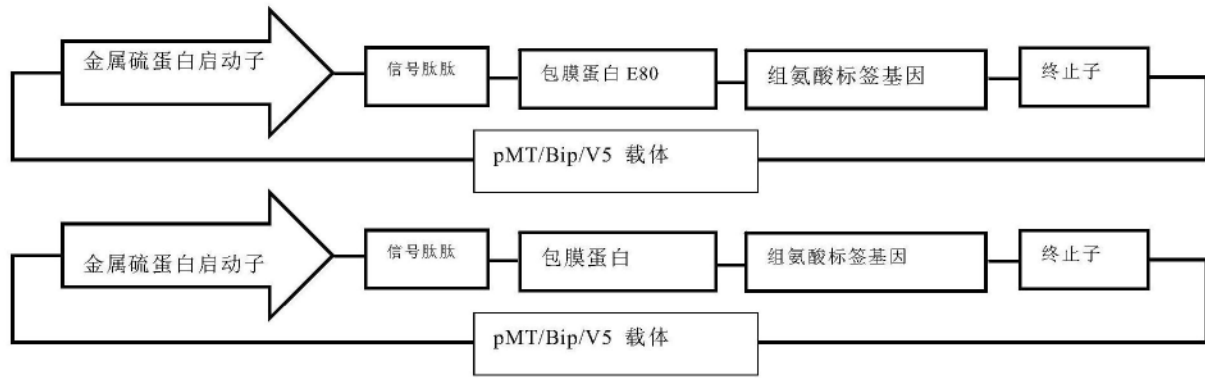


图1

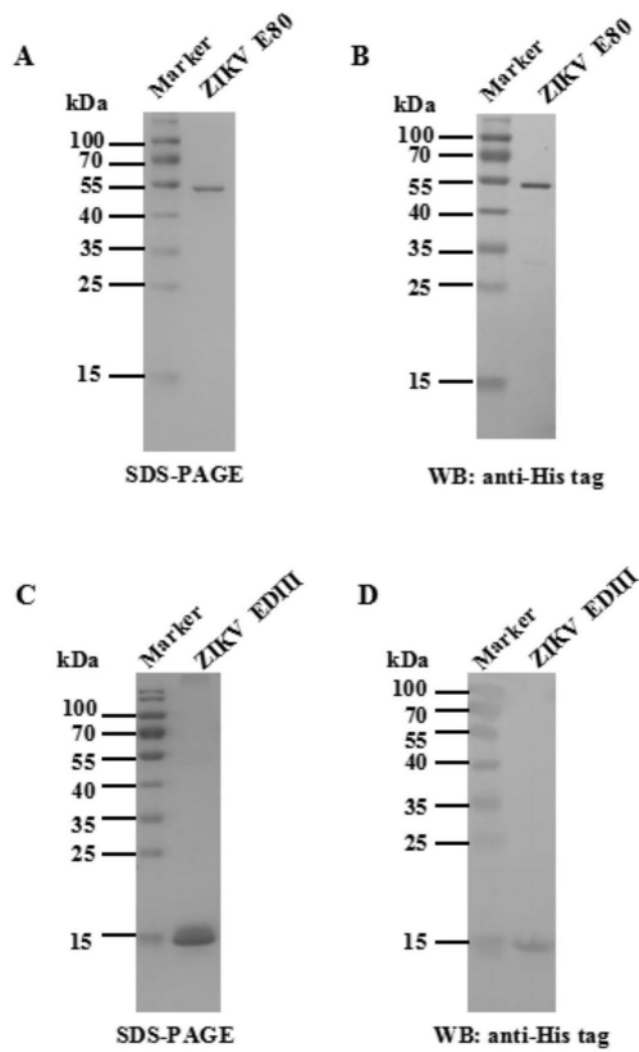


图2

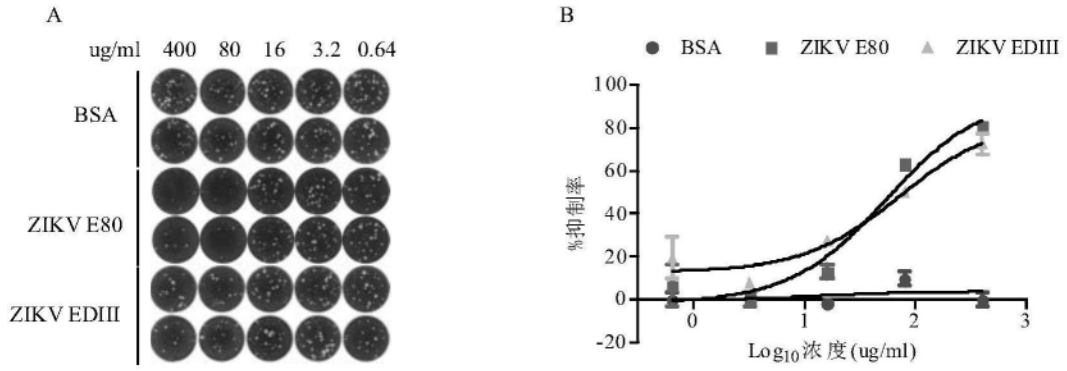


图3

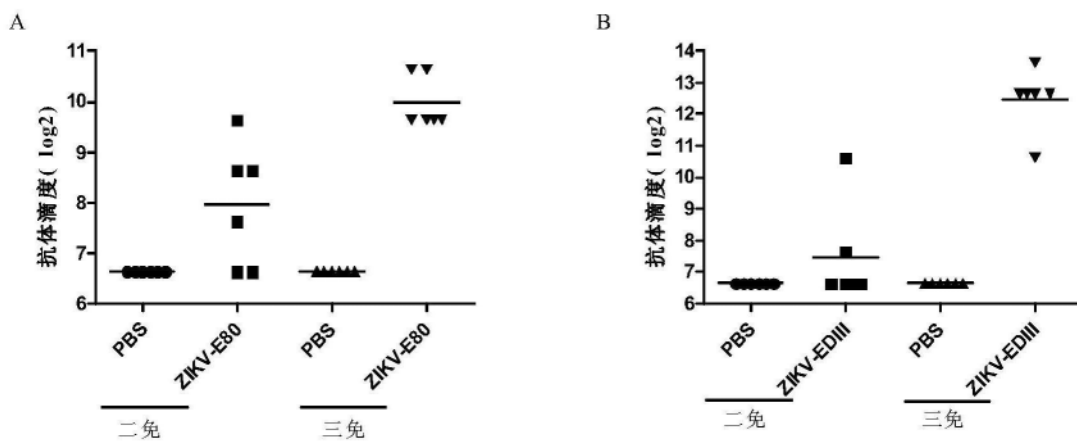


图4

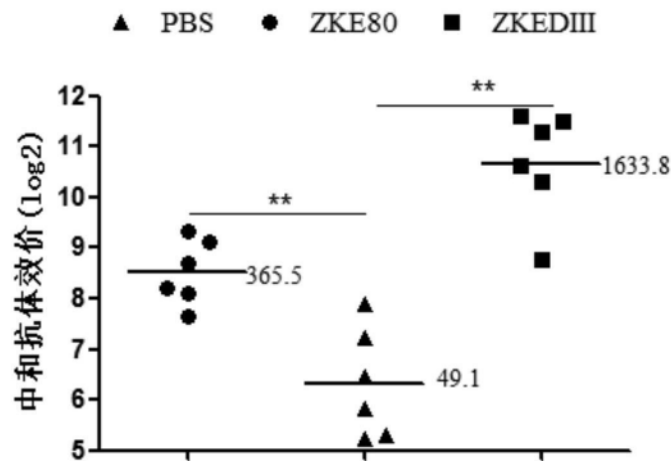


图5

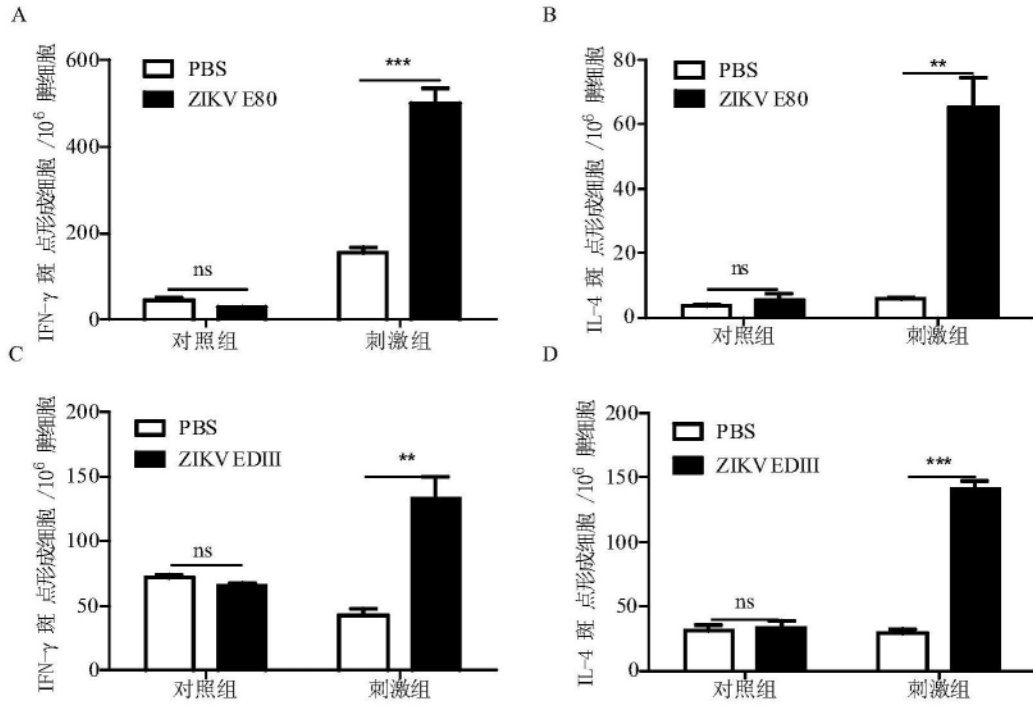


图6

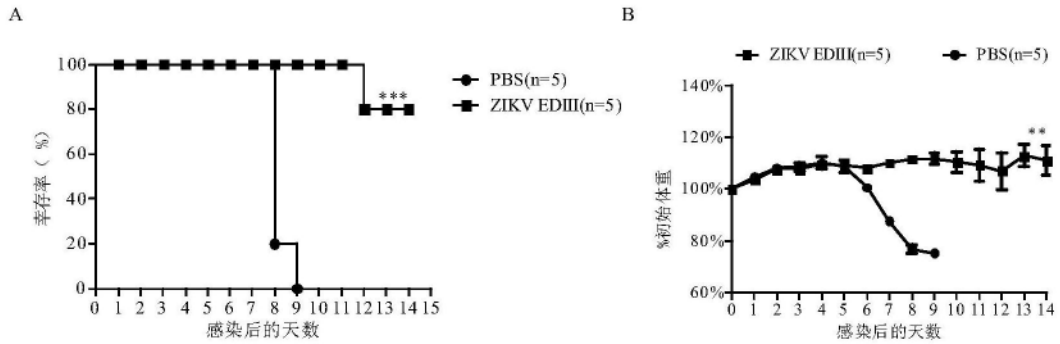


图7