



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111285924 A

(43)申请公布日 2020.06.16

(21)申请号 202010092764.3

A61K 39/39(2006.01)

(22)申请日 2020.02.14

A61K 39/145(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

(72)发明人 樊惠英 王亚贞 孔德鑫 胡朝升  
何恒昌

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有  
限公司 44245

代理人 苏运贞

(51)Int.Cl.

C07K 14/255(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

C12N 15/866(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页  
序列表5页 附图8页

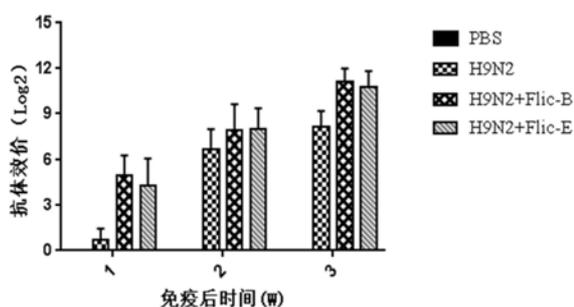
(54)发明名称

基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂及  
制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂及制备方法和应用。本发明是将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列通过Bac-to-Bac杆状病毒表达系统进行表达,纯化,得到的可溶性Flic蛋白即为Flic免疫佐剂。本发明提供的方法得到的可溶性Flic蛋白产量高,而且有极高的理化特性、生物学活性、免疫原性和安全性。用该Flic免疫佐剂制备得到的灭活禽流感疫苗,免疫后可快速产生高滴度的HI抗体效价,同时可以诱导产生细胞免疫反应,具有良好的免疫原性和反应性。

SPF鸡免疫后HI抗体效价



1. 一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,其特征在于包括如下步骤:是将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列通过Bac-to-Bac杆状病毒表达系统进行表达,纯化,得到的可溶性Flic蛋白。

2. 根据权利要求1所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列克隆入转递质粒,得到重组转递质粒;

(2) 将步骤(1)得到的重组转递质粒通过Tn7转座重组,将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列转座重组到杆状病毒穿梭载体Bacmid,得到重组杆状病毒质粒;

(3) 将步骤(2)得到的重组杆状病毒质粒转染昆虫宿主细胞,收集上清液,得到第一代杆状病毒;

(4) 将第一代杆状病毒扩大培养;

(5) 将第一代杆状病毒或是扩大培养得到的杆状病毒感染昆虫宿主细胞;

(6) 收集细胞,纯化,得到可溶性Flic蛋白,为基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂。

3. 根据权利要求1或2所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,其特征在于:所述的鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的氨基酸序列包含如SEQ ID NO.1所示的序列。

4. 根据权利要求1或2所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,其特征在于:所述的编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列包含如SEQ ID NO.3所示的序列。

5. 根据权利要求2所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,其特征在于:

所述的转递质粒为pFastBac™ 1;

步骤(2)中所述的Tn7转座重组通过如下步骤实现:将所述的重组转递质粒转化DH10Bac大肠杆菌感受态细胞,通过Tn7转座重组,将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列转座重组到杆状病毒穿梭载体Bacmid,得到重组杆状病毒质粒;

步骤(3)中所述的转染为脂质体转染法;

步骤(3)中所述的昆虫宿主细胞为Sf9细胞;

步骤(4)中所述的扩大培养指的是将第一代杆状病毒感染昆虫宿主细胞,上清液即为杆状病毒,依据实际需求重复将得到的病毒继续感染昆虫宿主细胞的步骤,获得更大量的杆状病毒;

步骤(5)如下:将第二代重组杆状病毒以MOI=1~5感染细胞密度为 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/ml的sf9细胞,27~28℃悬浮培养72h后收集细胞;

步骤(6)中所述的纯化的具体步骤如下:将收集得到的细胞进行超声波处理,处理液进行固液分离,将得到的上清液采用Ni-NAT亲和层析法纯化带有His标签的目的蛋白,得到可溶性Flic蛋白。

6. 根据权利要求5所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,其特征在于:

步骤(4)中所述的扩大培养包括如下具体步骤:将第一代重组杆状病毒以MOI=0.1感染细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的sf9细胞,27~28℃悬浮培养72h后收取细胞培养上清即

为第二代重组杆状病毒；

所述的超声波处理的条件如下：工作时间3s，间歇时间5s，工作功率100~200w，破碎时间10~15min；

所述的固液分离的方法为离心；

所述的Ni-NAT亲和层析法的步骤具体如下：将上清液上Ni-NAT柱，将上清液和Ni充分混匀后静置，待未结合的蛋白液通过重力作用流出Ni-NAT柱后，先用100mM咪唑洗脱杂蛋白，再用200~500mM咪唑直接洗脱带有His的目的蛋白，得到可溶性Flic蛋白。

7. 一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂，其特征在于：通过权利要求1~6任一项所述的制备方法得到。

8. 权利要求7所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂在制备疫苗中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用，其特征在于包括如下步骤：将所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂与灭活病毒混合，作为疫苗水相；再将该疫苗水相与水包油包水型佐剂混合，得到疫苗。

10. 根据权利要求9所述的应用，其特征在于：

所述的病毒为禽流感病毒；进一步为H9N2禽流感病毒；

所述的水包油包水型佐剂为MONTANIDETM ISA系列佐剂；进一步为MONTANIDETM ISA 201VG佐剂；

所述的疫苗的成分组成如下：水包油包水型佐剂50%体积、基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂20 $\mu$ g/0.3ml、灭活病毒每0.1ml病毒灭活前含量 $\geq 5 \times 10^7$ EID 50。

## 基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂及制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物制品领域,特别涉及一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂及制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 佐剂是一类先于抗原或与抗原同时注入到家禽体内,可以加速、延长或增强机体对该抗原的特异性免疫应答或改变免疫应答类型,但自身并无免疫原性且不能引起机体免疫应答的物质。作为一类独特的细菌病原相关分子模式(病原体相关分子模式,PAMPs),鞭毛蛋白具有激活Toll样受体5(TLR5)和NLR家族(NLRC4)两条信号通路的免疫活性,可以产生广泛的天然免疫应答以及对特定抗原的获得性免疫应答,从而有效激活机体的细胞和体液免疫反应。

[0003] 目前大肠杆菌表达载体,因其具有易培养,表达量高的特点,常作为表达目的蛋白的常用载体,但其表达系统不具有完备的翻译后加工修饰功能,使得表达产物的生物活性较低,且其表达产物常以包涵体形式存在,使得产物纯化困难。

[0004] 因此,需要研发一种活性更高的免疫佐剂。

### 发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法。

[0006] 本发明的另一目的在于提供通过上述制备方法得到的Flic免疫佐剂。

[0007] 本发明的再一目的在于提供上述Flic免疫佐剂的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂的制备方法,包括如下步骤:是将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列通过Bac-to-Bac杆状病毒表达系统进行表达,纯化,得到的可溶性Flic蛋白;优选包括如下步骤:

[0009] (1) 将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列克隆入转递质粒,得到重组转递质粒;

[0010] (2) 将步骤(1)得到的重组转递质粒通过Tn7转座重组,将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列转座重组到杆状病毒穿梭载体Bacmid,得到重组杆状病毒质粒;

[0011] (3) 将步骤(2)得到的重组杆状病毒质粒转染昆虫宿主细胞,收集上清液,得到第一代杆状病毒;

[0012] (4) 将第一代杆状病毒扩大培养;

[0013] (5) 将第一代杆状病毒或是扩大培养得到的杆状病毒感染昆虫宿主细胞;

[0014] (6) 收集细胞,纯化,得到可溶性Flic蛋白,为基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂。

[0015] 所述的鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的氨基酸序列包含如SEQ ID NO.1所示的序列;优选在如SEQ ID NO.1所示的序列的N端和/C端添加6×HIS标签,以有利于后期纯化。

[0016] 所述的编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列包含如SEQ ID NO.3所示的序列;优选如SEQ ID NO.4所示。

[0017] 所述的转递质粒优选为pFastBac™ 1,是将所述的编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列构建于该转递质粒的P<sub>H</sub>启动子下游。从而,Flic基因的表达由苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒(AcMNPV)多角体(P<sub>H</sub>)启动子控制,有利于Flic基因在昆虫细胞中的高水平表达。

[0018] 步骤(2)中所述的Tn7转座重组通过如下步骤实现:将所述的重组转递质粒转化DH10Bac大肠杆菌感受态细胞,通过Tn7转座重组,将编码鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白的核苷酸序列转座重组到杆状病毒穿梭载体Bacmid,得到重组杆状病毒质粒。

[0019] 步骤(3)中所述的转染优选为脂质体转染法。

[0020] 步骤(3)中所述的昆虫宿主细胞优选为Sf9细胞。

[0021] 步骤(4)中所述的扩大培养指的是将第一代杆状病毒感染昆虫宿主细胞,上清液即为杆状病毒,可依据实际需求重复将得到的病毒继续感染昆虫宿主细胞的步骤,获得更大量的杆状病毒;优选包括如下具体步骤:将第一代重组杆状病毒以MOI=0.1感染细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的sf9细胞,27~28℃悬浮培养72h后收取细胞培养上清即为第二代重组杆状病毒。

[0022] 所述的悬浮培养的温度优选为27℃。

[0023] 步骤(5)优选如下:将第二代重组杆状病毒以MOI=1~5感染细胞密度为 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/ml的sf9细胞,27-28℃悬浮培养72h后收集细胞。

[0024] 所述的悬浮培养的温度优选为27℃。

[0025] 步骤(6)中所述的纯化的具体步骤如下:将收集得到的细胞进行超声波处理,处理液进行固液分离,将得到的上清液采用Ni-NAT亲和层析法纯化带有His标签的目的蛋白,得到可溶性Flic蛋白。

[0026] 所述的超声波处理的条件优选如下:工作时间3s,间歇时间5s,工作功率100~200w,破碎时间10~15min。

[0027] 所述的固液分离的方法优选为离心。

[0028] 所述的离心的条件优选为于4℃,10000rpm离心8~10min。

[0029] 所述的Ni-NAT亲和层析法的步骤优选具体如下:将上清液上Ni-NAT柱,将上清液和Ni充分混匀后静置,待未结合的蛋白液通过重力作用流出Ni-NAT柱后,先用100mM咪唑洗脱杂蛋白,再用200~500mM咪唑直接洗脱带有His的目的蛋白,得到可溶性Flic蛋白。

[0030] 所述的可溶性Flic蛋白的分子量约为53.6KDa。

[0031] 一种基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂,通过上述制备方法得到,其具有与天然蛋白近似的理化和生物学特性。

[0032] 上述基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂在制备疫苗中的应用,优选包括如下步骤:将所述的基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂与灭活病毒混合,作为疫苗水相;再将该疫苗水相与水包油包水型佐剂混合,得到疫苗。

[0033] 所述的病毒优选为禽流感病毒;更优选为H9N2禽流感病毒。

[0034] 所述的水包油包水型佐剂优选为MONTANIDETM ISA系列佐剂;更优选为MONTANIDETM ISA 201VG佐剂。

[0035] 所述的疫苗的成分组成优选如下:水包油包水型佐剂50%体积、基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂20 $\mu$ g/0.3ml、灭活病毒每0.1ml病毒灭活前含量 $\geq 5 \times 10^7$ EID 50。

[0036] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0037] 1、本发明根据表达该目的基因的物种-草地贪夜蛾进行核苷酸序列的优化,实现了目的蛋白的稳定和大量表达。

[0038] 2、本发明是通过Bac-to-Bac杆状病毒表达系统表达的鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic-B,由于利用的表达系统属于真核表达系统,因此表达产物与天然外源产物有极高的理化特性和生物学活性及免疫原性,同时由于其对脊椎动物无感染性,因此其表达产物具有较高的生物安全性。

[0039] 3、本发明通过设计引物,在引物上游和下游分别插入6\*His标签,通过PCR扩增在目的基因N端和C端成功插入His标签,便于目的蛋白的表达鉴定和纯化。

[0040] 4、本发明实施例中利用摇瓶悬浮培养昆虫细胞的方式表达Flic-B蛋白,摇瓶培养20ml细胞量即能纯化大量单一的目的蛋白,日后可利用发酵罐等方式大量表达Flic-B蛋白,能极大地降低佐剂生产成本。

[0041] 5、本发明利用摇瓶悬浮培养昆虫细胞的方式表达Flic-B蛋白与经大肠杆菌诱导表达的Flic-E蛋白相比不仅生物活性更高,且表达量更优。

[0042] 5、本发明提供的含有所述免疫佐剂Flic的灭活禽流感疫苗,免疫后可快速产生高滴度的HI抗体效价,同时可以诱导产生细胞免疫反应,具有良好的免疫原性和反应性。

## 附图说明

[0043] 图1为目的基因的扩增结果图;其中,泳道1-4为Flic扩增条带,泳道5为阴性对照,泳道M为DL2000 Maker。

[0044] 图2为重组质粒pFastBacTM 1-Flic的酶切鉴定结果图;其中,泳道1为BamH I和Hind III双酶切质粒pFastBacTM 1-Flic获得的DNA片段,泳道M为DL5000 Maker。

[0045] 图3为重组杆状病毒质粒Bacmid-Flic的鉴定结果图;其中,泳道1为M13引物扩增的PCR结果,泳道2为Flic引物扩增结果,泳道M1为DL2000 Maker,泳道M2为DL5000 Maker。

[0046] 图4为IFA鉴定Flic-B蛋白表达结果图;其中,a为正常细胞对照图,b为BV-Flic感染Sf9细胞结果图。

[0047] 图5为SDS-PAGE分析Flic-B蛋白在不同MOI下的表达结果图;其中,泳道1、2、3分别为MOI为1、3、5时表达的Flic-B蛋白经超声处理后的上清液,泳道4、5、6为MOI为1、3、5时表达的Flic-B蛋白经超声处理后的沉淀,泳道7为野毒对照,泳道M是蛋白maker(大小180KDa)。

[0048] 图6为Western-Blot分析Flic-B蛋白在不同MOI下的表达结果图;其中,泳道1、2、3分别为MOI为1、3、5时表达的Flic-B蛋白经超声处理后的上清液,泳道4、5、6为MOI为1、3、5时表达的Flic-B蛋白经超声处理后的沉淀,泳道7为野毒对照,泳道M是蛋白maker(大小180KDa)。

[0049] 图7为SDS-PAGE分析Flic-B蛋白纯化结果图;其中,泳道1为原蛋白液,泳道2为未与镍柱结合的蛋白,泳道3-9分别是20mM、50mM、100mM、200mM、300mM、400mM、500mM咪唑洗脱的纯化蛋白,泳道M是蛋白maker(大小170KDa)。

[0050] 图8为用于佐剂制备的Flic-B蛋白纯化结果图;其中,泳道1为表达原蛋白液,泳道2为未与镍柱结合的蛋白,泳道3为100mM咪唑洗脱的杂蛋白,泳道4-5为200mM咪唑洗脱的具有单一条带的目的蛋白Flic-B,泳道6为500mM咪唑洗脱的具有单一条带的目的蛋白Flic-B,泳道M是蛋白maker(大小170KDa)。

[0051] 图9为重组质粒pET-32a-Flic的酶切鉴定结果图;其中,泳道1为BamH I和Hind III双酶切质粒pET-32a-Flic获得的DNA片段,泳道M为DL5000 Maker。

[0052] 图10为SDS-PAGE分析Flic-E蛋白的表达鉴定结果图;其中,泳道1为阴性对照,泳道2、3、4为表达的Flic-E蛋白经超声处理后的上清液,泳道M是蛋白maker(大小180KDa)。

[0053] 图11为Western-Blot分析Flic-E蛋白的表达鉴定结果图;其中,泳道1为阴性对照,泳道2、3、4为表达的Flic-E蛋白经超声处理后的上清液,泳道M是蛋白maker(大小180KDa)。

[0054] 图12为SDS-PAGE分析Flic-E蛋白在不同温度下诱导表达结果图;其中,泳道1、2、3分别为27℃、30℃、37℃条件下诱导的Flic-E蛋白,泳道M是蛋白maker(大小180KDa)。

[0055] 图13为SDS-PAGE分析用于佐剂制备的Flic-E蛋白纯化结果图;其中,泳道1为原蛋白液,泳道2为未与镍柱结合的蛋白,泳道3为100mM咪唑洗脱的杂蛋白,泳道4-5为200mM咪唑洗脱的目的蛋白Flic-E,泳道6为500mM咪唑洗脱的蛋白,泳道M是蛋白maker(大小170KDa)。

[0056] 图14为各免疫组不同时间点HI抗体效价结果分析图。

[0057] 图15为免疫后各免疫组细胞免疫反应结果分析图。

## 具体实施方式

[0058] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0059] 下述实施例中的试验材料,若无特别说明,均是来源于商业途径。所述的试验方法,若无特别说明,均为常规试验方法。

[0060] 实施例1基于杆状病毒表达系统的鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic-B的重组质粒的构建与表达

[0061] 1.1鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic基因的合成及扩增

[0062] 根据GenBank上登陆的参考菌株肠道血清型鼠伤寒沙门氏菌基因组序列(CP001363)Flic基因进行核苷酸优化,并合成Flic基因,参考基因核酸序列如SEQ ID NO.2所示,优化后Flic基因核酸序列如SEQ ID NO.3所示,根据优化后Flic基因核酸序列设计引物,其中在P1、P2上下游分别引入BamH I和Hind III酶切位点以及6×HIS标签,下划线部分为酶切位点。所涉及的序列如下:

[0063] 蛋白序列(亦为SEQ ID NO.1):

[0064] A Q V I N T N S L S L L T Q N N L N K S Q S A L G T A I E R L S S G L R I N S A K D D A A G Q A I A N R F T A N I K G L T Q A S R N A N  
D G I S I A Q T T E G A L N E I N N N L Q R V R E L A V Q S A N S T N S Q S D L D S I Q A E I T Q R L N E I D R V S G Q T Q F N G V K V L A Q D N T L T  
I Q V G A N D G E T I D I D L K Q I N S Q T L G L D T L N V Q Q K Y K V S D T A A T V T G Y A D T T I A L D N S T F K A S A T G L G G T D Q K I D G D L  
K F D D T T G K Y Y A K V T V T G G T G K D G Y Y E V S V D K T N G E V T L A G G A T S P L T G G L P A T A T E D V K N V Q V A N A D L T E A K A A L T  
A A G V T G T A S V V K M S Y T D N N G K T I D G G L A V K V G D D Y S A T Q N K D G S I S I N T T K Y T A D D G T S K T A L N K L G G A D G K T E V

VSIGGKTYAASKAEGHNFKAQPDLEAAATTTENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTS  
ARSRIEDSDYATEVSNSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR;

[0065] 原有的核苷酸序列(亦为SEQ ID NO.2):

[0066] ATGGCACAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTGCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCCCAGTC  
CGCTCTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTGTCTTCCGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGTGAG  
GCGATTGCTAACCGTTTTACCGCGAACATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCA  
TTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAACCTGGCGGTTGAGTC  
TGCTAACAGCACCAACTCCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGAC  
CGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAACGGCGTAAAGTCTGGCGCAGGACAACACCCTGACCATCCAGGTTGGTG  
CCAACGACGGTGAAACTATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCTGGGTCTGGATACGCTGAATGT  
GCAACAAAAATATAAGGTCAGCGATACGGCTGCAACTGTTACAGGATATGCCGATACTACGATTGCTTTAGACAAT  
AGTACTTTTTAAAGCCTCGGCTACTGGTCTTGGTGGTACTGACCAGAAAATTGATGGCGATTTAAAATTTGATGATA  
CGACTGGAAAATATTACGCCAAAGTTACCGTTACGGGGGAACTGGTAAAGATGGCTATTATGAAGTTTCCGTTGA  
TAAGACGAACGGTGAGGTGACTCTTGCTGGCGGTGCGACTTCCCCGCTTACAGGTGGACTACCTGCGACAGCAACT  
GAGGATGTGAAAAATGTACAAGTTGCAAATGCTGATTTGACAGAGGCTAAAGCCGCATTGACAGCAGCAGGTGTTA  
CCGGCACAGCATCTGTTGTTAAGATGTCTTATACTGATAATAACGGTAAAACTATTGATGGTGGTTTAGCAGTTAA  
GGTAGGCGATGATTACTATTCTGCAACTCAAATAAAGATGGTTCCATAAGTATTAATACTACGAAATACACTGCA  
GATGACGGTACATCCAAAACCTGCACTAAACAACCTGGGTGGCGCAGACGGCAAAACCGAAGTTGTTTCTATTGGTG  
GTAACACTTACGCTGCAAGTAAAGCCGAAGGTACAACCTTAAAGCACAGCCTGATCTGGCGGAAGCGGCTGCTAC  
AACCACCGAAAACCCGCTGCAGAAAATTGATGCTGCTTTGGCACAGGTTGACACGTTACGTTCTGACCTGGGTGCG  
GTACAGAACCGTTTCAACTCCGCTATTACCAACCTGGGCAACACCGTAAACAACCTGACTTCTGCCCGTAGCCGTA  
TCGAAGATTCCGACTACGCGACCGAAGTTTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGT  
TCTGGCGCAGGCGAACAGGTTCCGCAAAACGTCTCTCTTTACTGCGTTAA;

[0067] 优化后的序列(亦为SEQ ID NO.3):

[0068] GCTCAGGTCATTAACACTAACTCCCTGAGCCTGCTGACTCAGAACAACCTGAACAAGTCCCAGAGCGC  
TCTGGGTACCGCTATCGAACGCTGTGCCAGCGCCTGCGCATCAACTCCGCTAAGGACGACGCTGCTGGCCAGGCC  
ATCGCCAACCGCTTACCGCTAACATCAAGGGTCTGACCCAGGCCTCCCGCAACGCCAACGACGGTATCTCCATCG  
CTCAGACCACCGAAGGCGCCCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGCGTGCAGGAGCTGGCCGTTCAATCCGC  
TAACTCCACTAACAGCCAGAGCGACCTGGACAGCATCCAGGCTGAGATCACCCAGCGCCTGAACGAGATCGACCGC  
GTGTCCGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTCAAGGTGCTGGCTCAGGACAACACTCTGACTATCCAGGTGCGCGCTA  
ACGACGGCGAGACCATCGACATCGACCTGAAGCAGATCAACAGCCAGACCCTGGGTCTGGACACTCTGAACGTGCA  
GCAGAAGTACAAGGTGAGCGACTGCCGCCACCGTCACTGGCTACGCTGACACCACCATCGCCCTGGACAACCTCC  
ACTTTCAAGGCTTCCGCCACTGGCCTGGGTGGTACTGACCAGAAGATCGACGGTGACCTGAAGTTCGACGACACCA  
CCGGCAAGTACTACGCCAAGGTCACTGTGACCGGCGGCACTGGCAAGGACGGTACTACGAGGTCTCCGTGGACAA  
GACTAACGGTGAAGTGACCCTGGCTGGTGGCGCTACCAGCCCCCTGACTGGTGGCCTGCCTGCCACCGCTACTGAA  
GACGTGAAGAACGTCCAGGTGGCTAACGCCGACCTGACCGAAGCCAAGGCTGCTCTGACTGCCGCTGGTGTGACTG  
GTACTGCTTCCGTGGTCAAGATGTCCTACACCGACAACAACGGCAAGACCATCGACGGTGGCCTGGCTGTGAAGGT  
GGGTGACGACTACTACTCCGCCACCCAGAACAAGGACGGTAGCATCTCCATCAACACTACCAAGTACACCGCCGAC  
GACGGCACCAAGACCGCTCTGAACAAGCTGGGTGGCGCTGACGGCAAGACCGAAGTGGTCTCCATCGGTGGTA



[0077] PCR反应程序:98℃10s、60℃5s、72℃1min40s,30个循环;72℃终延伸2min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,确定产物大小,结果如图1所示,泳道1-4为扩增目的基因大小,泳道5为阴性,所扩增的Flic片段大小为1524bp,与预期结果相符。

[0078] 1.2重组质粒pFastBac™ 1-Flic的构建与鉴定

[0079] 将PCR产物回收并用BamHI和HindIII双酶切后,插入到转移质粒pFastBac™ 1(购自Invitrogen公司)的BamH I和Hind III位点,转化大肠杆菌DH5a感受态细胞,获得载体pFastBac™ 1-Flic。通过双酶切方式对重组质粒进行鉴定,并对该质粒进行测序,结果正确,如图2所示,泳道M是大小为5000的DNA Maker,泳道1为酶切鉴定结果。

[0080] 1.3重组杆状病毒质粒Bacmid-Flic的获得与鉴定

[0081] 将供体质粒pFastBac™ 1-Flic转化DH10Bac大肠杆菌感受态细胞,通过转座重组,获得重组杆状病毒质粒Bacmid-Flic,按照Invitrogen公司昆虫杆状病毒操作手册,用M13引物扩增片段对其鉴定,结果正确,如图3所示。

[0082] 1.4重组杆状病毒BV-Flic的获得与表达鉴定

[0083] (1) 重组杆状病毒BV-Flic的获得

[0084] 利用Cellfectin® II Regent(购自Thermo Fisher Scientific公司)脂质体介导转染法,将重组杆状病毒质粒Bacmid-Flic转染sf9昆虫细胞(购自GIBCO BRL公司),于27℃培养,未转染质粒的细胞作为阴性对照;培养至72h时,细胞出现病变,收集细胞培养上清,即获得第一代重组杆状病毒(P1)BV-Flic。

[0085] 具体步骤如下:

[0086] 确认Sf9处于对数期( $1.0\sim 2.5\times 10^6$ 个细胞/mL),且存活率高于95%;使用前混匀Cellfectin® II Regent脂质体,吸取6~8μL至Grace's Insect Medium(购自Thermo Fisher Scientific公司)溶液中,短暂涡旋混匀;取1μL需要转染的重组杆状病毒质粒(浓度在1000ng/μL以上)稀释于100μL Grace's溶液中,轻轻混匀;将稀释后的DNA与稀释的Cellfectin® II混合(总体积约210μL),轻轻混匀并在室温下孵育15~30min;弃去六孔板中的混合物,使用Grace's Insect Medium溶液清洗一次,并且吸取800μL Grace's Insect Medium溶液至脂质体混合物中补足1mL;逐滴加入大约1mL的DNA-脂质体混合物或转染混合物至清洗完毕的细胞中,27℃下孵育细胞3~5h;吸出混合物,使用Grace's Insect Medium溶液清洗一次,加入2mL完全培养基;将六孔板放于27℃培养箱中培养,观察到细胞病变后收取细胞培养上清,即可获得第一代重组杆状病毒(P1)BV-Flic。

[0087] (2) IFA法鉴定Flic-B蛋白的表达

[0088] 将sf9细胞按 $2\times 10^6$ 个细胞/ml铺于6孔板,按照Bac-to-Bac®杆状病毒表达系统手册说明,通常假设P1代重组病毒的滴度为 $5\times 10^6$ pfu/ml,以MOI为0.1,用P1代重组杆状病毒感染sf9细胞48h后,进行间接免疫荧光实验。具体如下:首先吸弃上清液,加入PBS(0.01M、pH7.4)清洗细胞3次,然后在每孔加入600μl体积分数为4%的预冷的多聚甲醛,常温下固定细胞30min;固定结束后吸弃多聚甲醛,用PBS清洗细胞3次,清洗后孵育,即加入600μl用PBS按照体积比为1:5000稀释好的His-tag(4C2) monoclonal antibody(购自Bioword TECHNOLOGY公司),并放置4℃冰箱过夜;一抗孵育完毕后,用PBS清洗细胞3次,再加入600μl用PBS按照体积比为1:100稀释好的FITC标记羊抗鼠二抗(购自鼎国生物有限公司)进行孵育。

育,37℃下避光反应1h;二抗孵育完毕后,用PBS清洗细胞3次,1mL PBS封底,在倒置荧光显微镜下观察,结果如图4所示:图4a为阴性对照组结果,图4b为(P1)BV-Flic感染Sf9细胞结果。结果显示:阴性对照组无荧光,BV-Flic感染的Sf9细胞出现明显的特异性绿色荧光。表明BV-Flic感染Sf9细胞后可以成功表达Flic-B蛋白。

#### [0089] 1.5Flic-B蛋白的纯化与鉴定

##### [0090] (1)Flic-B蛋白的获得与条件优化

[0091] 将P2代重组杆状病毒分别以MOI=1、3、5感染细胞密度为 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/ml的sf9细胞,摇床温度27℃,转速为100~120rpm悬浮培养72h后收集细胞,经超声波处理,处理条件为:工作时间3s,间歇时间5s,工作功率200w,破碎时间10min。经超声波处理后细胞悬液会变得澄清透亮,将处理后的细胞悬液以4℃,10000rpm离心8~10min取上清液,处理后的Flic-B蛋白以可溶性蛋白形式存在于上清液中,取适量蛋白样品制样,进行SDS-PAGE及Western-Blot鉴定,结果如图5及图6所示,在53.6kDa显示有明显的蛋白条带,与预期相符,且发现当以MOI为5时蛋白表达量最优,保存此蛋白用于后续纯化。

##### [0092] SDS-PAGE具体操作如下:

[0093] 首先按照SDS-PAGE凝胶试剂盒(购自鼎国生物有限公司)配制12%的蛋白胶;将蛋白样品按比例加入6×蛋白上样缓冲液,沸水煮10min,瞬时离心后备用;将蛋白胶置于电泳槽中,并按顺序加蛋白样品和蛋白Marker,插好电极,通电后先80V等压电泳约30min,再将电压调至120V等压电泳约90min,待SDS上样缓冲液中的溴酚蓝跑至凝胶的最低处为止;染色与脱色:电泳结束后,将蛋白胶放入到考马斯亮蓝溶液中染色30min,染色结束后加入脱色液处理;观察:将脱色完全的蛋白胶放置于双色激光成像分体系统进行扫描。

##### [0094] Western-Blot具体操作如下:

[0095] 首先按照上述方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,在电泳结束后,按照以下步骤进行Western-Blot:切胶:参照蛋白Marker,按照目的蛋白大小切下相应胶体,随后准备一大一小相近的NC膜,放入转模液中,浸泡10min;转膜准备:准备好转膜仪,按照黑面-海绵垫-三层滤纸-凝胶-NC膜-三层滤纸-海绵垫-白面的顺序依次放好,夹紧后放入电转仪中,插入电极,周围放置冰块降温使用;转膜:电泳仪设置为200mA恒流,电转70min;封闭:待电转结束后,取出NC膜放置于5%脱脂奶粉溶液中,摇床上室温封闭2h;洗膜:封闭结束后,弃去封闭液,加入PBST清洗10min,弃PBST溶液,此操作重复三次;孵育一抗:上步操作完成后,加入用PBS按照体积比为1:5000稀释好的His-tag(4C2) monoclonal antibody(购自Bioword TECHNOLOGY公司),充分浸泡膜后置于4℃冰箱孵育过夜,洗膜;孵育二抗:上步操作完成后,避光加入用TBS按照体积比为1:10000稀释好的IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG(H+L) Secondary Antibody(购自LI-COR Biosciences公司),室温摇床孵育1h,洗膜;观察结果:将处理好的NC膜放入双色激光成像分体系统进行扫描拍照,保存图片并分析结果。

##### [0096] (2)Flic-B蛋白的纯化与鉴定

[0097] 将上述制备的蛋白液采用Ni-NAT亲和层析法进行纯化,具体操作如下:

[0098] 首先将盛Ni-NTA的空柱用ddH<sub>2</sub>O进行润洗,润洗后向柱子内添加1ml Ni-NTA,并用ddH<sub>2</sub>O进行清洗,依靠重力作用滴下;

[0099] 将柱子下端密封,将上述制备的Flic-B蛋白液加入柱子中,上下颠倒使镍与蛋白液充分结合,置于4℃30min,期间每间隔5-6min混匀一次,取100μl原液制备样品进行SDS-

PAGE鉴定,结果如图7泳道1所示;

[0100] 蛋白液与镍充分结合后,依靠重力作用滴下的溶液为未结合部分蛋白液,取100 $\mu$ l液体制备样品进行SDS-PAGE鉴定,如图7泳道2所示;

[0101] 分别用20mM、50mM、100mM、200mM、300mM、400mM、500mM咪唑进行洗脱目的蛋白,并分别取各洗脱液100 $\mu$ l制备样品进行SDS-PAGE鉴定,结果如图7泳道3-9所示,其中泳道M是大小为170KDa的蛋白Maker。

[0102] 结果显示:经SDS-PAGE鉴定,在53.6KDa显示有明显的蛋白条带,且与预期一致。同时结果显示,用100mM咪唑仍能洗脱大量杂蛋白及少量目的蛋白,用500mM咪唑可洗脱大量单一的目的蛋白。因此制备佐剂时用100mM咪唑洗脱杂蛋白,用500mM咪唑直接洗脱带有His的目的蛋白Flic-B,用于佐剂制备的纯化结果如图8所示,泳道M是大小为170KDa的蛋白Maker,泳道1为原蛋白液Flic-B,泳道2为未挂柱蛋白样,泳道3为100mM咪唑洗脱的杂蛋白,泳道4-5为200mM咪唑洗脱的具有单一条带的目的蛋白Flic-B,泳道6为500mM咪唑洗脱的具有单一条带的目的蛋白Flic-B,结果显示在100mM咪唑洗脱杂蛋白后,200mM咪唑和500mM咪唑均可洗脱出单一条带的目的蛋白。

[0103] 实例2基于大肠杆菌表达系统的鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic-E的重组质粒的构建与表达

[0104] 2.1鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic基因的合成及扩增

[0105] 此步骤与实例1.1相同。

[0106] 2.2pET-32a-Flic重组表达载体的构建与鉴定

[0107] 将PCR产物回收,用BamH I和Hind III对胶回收目的产物和pET-32a空载体37 $^{\circ}$ C双酶切5h,胶回收后将目的基因与载体于16 $^{\circ}$ C连接过夜,并将连接产物转化大肠杆菌DH5a感受态细胞,获得载体pET-32a-Flic。通过双酶切方式对重组质粒进行鉴定,并对该质粒进行测序,结果正确,即得到重组表达载体pET-32a-Flic,如图9所示,泳道M是大小为5000的DNA Maker,泳道1为酶切鉴定结果。

[0108] 2.3重组表达菌pET-32a-Flic/BL21的构建

[0109] 将重组质粒pET-32a-Flic转化BL21 (DE3) pLysS感受态细胞中,获得阳性克隆菌株即为重组表达菌命名为pET-32a-Flic/BL21。

[0110] 2.4重组蛋白Flic-E的获得与鉴定

[0111] 将重组表达菌pET-32a-Flic/BL21按体积比1:1 000比例接种到含100 $\mu$ g/mL Amp<sup>+</sup>(氨苄)的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、220rpm振荡培养过夜,将其作为种子液。诱导表达时先扩大,将培养好的种子液按体积比1:100的比例转接到Amp<sup>+</sup>的新鲜LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、220rpm摇床上培养3~4h左右,使菌液OD<sub>600 nm</sub>值约为0.6可加入诱导剂异丙基硫代半乳糖苷IPTG进行诱导,诱导条件为: IPTG浓度为0.1mM,温度为30 $^{\circ}$ C,转速为150rpm,诱导时间为12h。如图10及图11所示,将诱导表达的菌液进行超声处理,处理条件为:工作时间3s,间歇时间5s,工作功率200w,破碎时间10min。经超声波处理后菌液会变得澄清透亮,将处理后的菌液以4 $^{\circ}$ C,10000rpm离心8~10min取上清液,处理后的Flic-E蛋白以可溶性蛋白形式存在以上清液中,取适量蛋白Flic-E制备样品,进行SDS及Western-Blot鉴定。将诱导温度设置为27 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C及37 $^{\circ}$ C进行诱导表达,结果如图12所示,发现由于表达系统不一样,目的蛋白在60-75KDa处出现目的条带,且温度设定为30 $^{\circ}$ C时表达量最高。

## [0112] 2.5Flic-E蛋白的纯化与鉴定

[0113] 纯化步骤与实例1.5(2)相同,经SDS鉴定结果如图13所示,可以看出泳道3为100mM咪唑洗脱的杂蛋白,在此条件下可以洗脱掉大量杂蛋白,泳道4和5为200mM咪唑洗脱的目的蛋白Flic-E,尽管可以洗脱大量的目的蛋白,但仍含有部分杂蛋白,纯化效果不如杆状病毒表达系统表达的Flic-B,泳道6为500mM咪唑洗脱的样品条带,结果发现无目的条带,说明大肠杆菌表达系统表达的Flic-E蛋白在200mM咪唑浓度下即可洗脱完全。

## [0114] 实例3BCA法测定Flic-B与Flic-E蛋白浓度

[0115] 使用BCA试剂盒(Thermo Scientific)测定Flic-B与Flic-E的蛋白浓度,步骤如下:

[0116] (1) 配制工作液:根据标准品和样品数量,按试剂A:试剂B=体积比50:1配制适量BCA工作液,充分混匀,并且工作液为现配现用,每个孔所需200 $\mu$ L工作液;

[0117] (2) 稀释标准品:以原液为2mg/mL(A)的牛血清白蛋白(BSA)标准品按下表使用与洗脱蛋白液相同浓度的咪唑溶液进行稀释:

管号	稀释液体积	标准品体积	终浓度
A	0 $\mu$ L	200 $\mu$ L (标准品原液中取)	2 000 $\mu$ g/mL
B	30 $\mu$ L	90 $\mu$ L (从A管取)	1 500 $\mu$ g/mL
C	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L (从A管取)	1000 $\mu$ g/mL
[0118] D	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L (从B管取)	750 $\mu$ g/mL
E	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L (从C管取)	500 $\mu$ g/mL
F	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L (从E管取)	250 $\mu$ g/mL
G	60 $\mu$ L	60 $\mu$ L (从F管取)	125 $\mu$ g/mL
H	100 $\mu$ L	25 $\mu$ L (从G管取)	25 $\mu$ g/mL
I	60 $\mu$ L	0	0 (空白)

[0119] (3) 分别取25 $\mu$ L的标准品和纯化后的Flic-B与Flic-E蛋白样品于对应加入96孔板中,每个样品做3个重复;

[0120] (4) 各孔加入已配制好的200 $\mu$ L BCA工作液,充分混匀;

[0121] (5) 盖上96孔板盖,37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0122] (6) 冷却至室温状态后用酶标仪测定562nm波长,根据标准曲线计算出纯化后的Flic-B与Flic-E蛋白浓度。

[0123] 结果分析:根据标准曲线计算,20ml细胞经表达纯化后可得到约11.28mg的Flic-B蛋白;20ml菌液经诱导表达纯化后可得到约3mgFlic-E蛋白;结果发现:经杆状病毒表达系统表达的Flic-B蛋白表达量远高于经大肠杆菌表达系统表达的Flic-E蛋白。

## [0124] 实例4免疫原性分析

[0125] 4.1含有鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic-B及Flic-E佐剂的H9N2灭活禽流感疫苗的制备

[0126] 将实例1和2中纯化的具有单一目的蛋白液的Flic分别与经终浓度为0.2%的福尔

马林完全灭活的H9N2病毒(A/chicken/Guangdong/V/2008(V<sub>K627</sub>),该病毒株已在文献“Meng Yu等.Expression pattern of NLRP3 and its related cytokines in the lung and brain of avian influenza virus H9N2 infected BALB/c mice,Virology Journal (2014) 11:229”中公开)按体积比1:8进行混合作为水相,将疫苗水相与SEPPIC MONTANIDETM ISA 201VG佐剂按照体积比1:1进行乳化,得到H9N2灭活禽流感疫苗,其Flic佐剂含量为20 $\mu$ g/0.3ml。其中用于配制灭活苗的H9N2病毒灭活前保证其每0.1ml病毒含量 $\geq 5 \times 10^7$ EID<sub>50</sub>,此含量与商品化H9N2灭活苗的病毒含量保持一致,H9N2商品化灭活苗为白色乳剂型疫苗。

#### [0127] 4.2免疫程序

[0128] 将52只SPF鸡(购自广东省新兴大华农禽蛋有限公司)随机分为4组,每组14只,分别为PBS组、H9N2商品化灭活苗组、H9N2灭活苗+Flic-B组、H9N2灭活苗+Flic-E组。免疫方式为颈部皮下免疫,免疫剂量为300 $\mu$ l/只。每组SPF鸡于2周龄进行免疫,分别于免疫后7d、14d、21d颈静脉采血,检测血清中HI抗体效价,从而评价免疫后机体的体液免疫应答水平;免疫后3周分离外周血淋巴细胞,检测淋巴细胞增殖用于评价佐剂刺激的细胞免疫应答水平。

#### [0129] (1) 体液免疫应答水平检测

[0130] 血清HI抗体效价检测:取96孔V型板,第1~11孔加入25 $\mu$ L PBS,第12孔加入50 $\mu$ L PBS。取25 $\mu$ L血清连续倍比稀释至第10孔,弃去25 $\mu$ L,加入25 $\mu$ L含有4个HA单位的H9N2禽流感抗原(第11孔作为抗原对照),混匀室温静置30分钟,所有孔加入等量1%鸡红细胞(第12孔作为红细胞对照),室温放置30分钟后观察结果,能完全抑制红细胞凝集的血清最高稀释度为被检血清的HI效价。上述各免疫组不同时间点HI抗体效价水平见图14所示。图中显示PBS组免疫后三周均无HI抗体效价产生,H9N2商品化灭活苗组于第1周开始产生抗体,平均HI抗体效价约为 $2^{0.67}$ ,第2周抗体效价达到 $2^{6.83}$ ,第三周抗体效价达到最高,约为 $2^{8.08}$ 。而H9N2灭活苗+Flic-B组和H9N2灭活苗+Flic-E组在免疫后1周即迅速产生抗体,HI抗体效价分别约为 $2^{4.91}$ 和 $2^{4.17}$ ,与商品化灭活苗组差异显著,免疫后第三周产生抗体效价最高,约为 $2^{11.25}$ 和 $2^{10.83}$ ,结果说明含有鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic佐剂的H9N2灭活禽流感疫苗免疫后可迅速产生抗体,且与商品化疫苗相比产生更早、更高的HI抗体效价。说明Flic佐剂的使用可以明显增强抗原的免疫原性。但H9N2灭活苗+Flic-B组在免疫后不同时间点HI抗体效价均高于H9N2灭活苗+Flic-E组,说明经杆状病毒表达系统表达的Flic-B蛋白佐剂效应更优,其生物活性更高。

#### [0131] (2) 细胞免疫应答水平检测

[0132] MTT法检测外周血淋巴细胞增殖:免疫后3周每组取3只鸡,从免疫鸡的颈静脉采集2mL血至抗凝管,根据说明书进行外周血淋巴细胞的分离。并根据MTT细胞活性检测使用说明书测定淋巴细胞增殖水平。其中每个样品做3个重复。上述各免疫组免疫后3周外周血淋巴细胞增殖结果如图15所示,结果显示与商品化疫苗组相比,H9N2灭活苗+Flic-B组PBMC的增殖水平最高,其次为H9N2灭活苗+Flic-E组,表明在Flic的作用下能明显增强机体的细胞免疫反应,且在Flic-B佐剂效应下刺激机体产生的细胞免疫更为明显。

[0133] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,

均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

## 序列表

- <110> 华南农业大学  
 <120> 基于杆状病毒表达系统的Flic免疫佐剂及制备方法和应用  
 <160> 6  
 <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 <210> 1  
 <211> 494  
 <212> PRT  
 <213> 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)  
 <220>  
 <223> 鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic的氨基酸序列  
 <400> 1

```

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
1           5           10           15
Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
           20           25           30
Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
           35           40           45
Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
           50           55           60
Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65           70           75           80
Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
           85           90           95
Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
           100          105          110
Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
           115          120          125
Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
           130          135          140
Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
145          150          155          160
Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln
           165          170          175
Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp
           180          185          190
Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly
           195          200          205

```

Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp  
 210 215 220  
 Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val  
 245 250 255  
 Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro Ala  
 260 265 270  
 Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp Leu  
 275 280 285  
 Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr Ala  
 290 295 300  
 Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile Asp  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln  
 325 330 335  
 Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp  
 340 345 350  
 Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly  
 355 360 365  
 Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser Lys  
 370 375 380  
 Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala  
 405 410 415  
 Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe  
 420 425 430  
 Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser  
 435 440 445  
 Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn  
 450 455 460  
 Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala  
 465 470 475 480  
 Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg  
 485 490

<210> 2

<211> 1488

<212> DNA

<213> 鼠伤寒沙门氏菌 ( <i>Salmonella typhimurium</i> )	
<220>	
<223> 鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic的编码核苷酸序列	
<400> 2	
atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa	60
tcccagtcgc ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc	120
gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcgaa catcaaaggt	180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgvcgagac cactgaaggc	240
gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct	300
aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg	360
aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag	420
gacaacaccc tgaccatcca ggttggtgcc aacgacggcg aaactatcga tatcgatctg	480
aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgtga atgtgcaaca aaaatataag	540
gtcagcgata cggctgcaac tgttacagga tatgccgata ctacgattgc tttagacaat	600
agtactttta aagcctcggc tactggtctt ggtggtactg accagaaaat tgatggcgat	660
ttaaaatttg atgatacgac tggaaaatat tacgccaag ttaccgttac ggggggaact	720
ggtaaagatg gctattatga agtttccgtt gataagacga acggtgaggt gactcttctg	780
ggcgggtgca cttccccgct tacaggtgga ctacctgca cagcaactga ggatgtgaaa	840
aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt	900
gttaccggca cagcatctgt tgtaagatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt	960
gatggtgggt tagcagttaa ggtagcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat	1020
ggttccataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca	1080
ctaaacaaac tgggtggcgc agacggcaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact	1140
tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg	1200
gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac	1260
acgttacggt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg	1320
ggcaacaccg taaacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg	1380
accgaagttt ccaacatgtc tcgvcgvcag attctgcagc aggccgttac ctccgttctg	1440
gcgcagggca accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgttaa	1488
<210> 3	
<211> 1482	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic的优化编码核苷酸序列	
<400> 3	
gctcaggtea ttaacactaa ctccctgagc ctgctgactc agaacaacct gaacaagtcc	60
cagagcgcctc tgggtaccgc tatcgaacgt ctgtccagcg gcctgcgcat caactccgct	120
aaggacgacg ctgctggcca ggccatcgcc aaccgcttca ccgctaakat caagggtctg	180

accaggcct cccgcaacgc caacgacggt atctccatcg ctgagaccac cgaaggcgcc	240
ctgaacgaaa tcaacaacaa cctgcagcgc gtgcgcgagc tggccgtcca atccgctaac	300
tccactaaca gccagagcga cctggacagc atccaggctg agatcaccca gcgcctgaac	360
gagatcgacc gcgtgtccgg tcagaccag ttcaacggcg tcaaggtgct ggctcaggac	420
aacactctga ctatccaggt cggcgctaac gacggcgaga ccatcgacat cgacctgaag	480
cagatcaaca gccagaccct gggctctggac actctgaacg tgcagcagaa gtacaaggtg	540
agcgacactg ccgccaccgt cactggctac gctgacacca ccatcgccct ggacaactcc	600
actttcaagg cttccgccac tggctgggt ggtactgacc agaagatcga cggtgacctg	660
aagttcgacg acaccaccgg caagtaactac gccaaagtca ctgtgaccgg cggcactggc	720
aaggacggtt actacgaggt ctccgtggac aagactaacg gtgaagtgac cctggctggt	780
ggcgctacca gccccctgac tgggtggctg cctgccaccg ctactgaaga cgtgaagaac	840
gtccagggtg ctaacgccga cctgaccgaa gccaaagtct ctctgactgc cgctggtgtg	900
actggtactg cttccgtggt caagatgtcc tacaccgaca acaacggcaa gaccatcgac	960
ggtggcctgg ctgtgaaggt gggtgacgac tactactccg ccaccagaa caaggacggt	1020
agcatctcca tcaaacactac caagtacacc gccgacgacg gcaccagcaa gaccgctctg	1080
aacaagctgg gtggcgctga cggcaagacc gaagtgtct ccatcggtgg taaaacctac	1140
gctgctagca aggccgaggg tcacaacttc aaggctcagc ctgacctggc cgaagctgcc	1200
gccaccacca ccgagaacct tctgcagaag atcgatgctg ctctggccca ggtggacact	1260
ctgcgcagcg acctgggtgc tgtccagaac cgtttcaaca gcgccatcac taacctgggt	1320
aacaccgtga acaacctgac tagcgtcgc agccgtatcg aggactccga ctacgccact	1380
gaggtgtcca acatgagccg cgctcagatc ctgcagcagg ccggtactag cgtgctggcc	1440
caggccaacc aggtcccca gaacgtcctg agcctgctcc gt	1482

<210> 4

<211> 1524

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白Flic的优化应用的编码核苷酸序列

<400> 4

atgcatcacc atcaccatca cgctcaggtc attaacacta actccctgag cctgctgact	60
cagaacaacc tgaacaagtc ccagagcgtc ctgggtaccg ctatcgaacg tctgtccagc	120
ggcctgcgca tcaactccgc taaggacgac gctgctggcc aggccatcgc caaccgcttc	180
accgctaaca tcaaggtct gaccagggc tcccgcaacg ccaacgacgg tatctccatc	240
gctcagacca ccgaaggcgc cctgaacgaa atcaacaaca acctgcagcg cgtgcgcgag	300
ctggccgtcc aatccgctaa ctccaactaac agccagagcg acctggacag catccaggct	360
gagatcacc agcgctgaa cgagatcgac cgcgtgtccg gtcagacca gttcaacggc	420
gtcaaggtgc tggctcagga caaactctg actatccagg tcggcgctaa cgacggcgag	480
accatcgaca tcgacctgaa gcagatcaac agccagacc tgggtctgga cactctgaac	540
gtgcagcaga agtacaaggt gagcgacact gccgccaccg tcactggcta cgctgacacc	600

accatcgccc tggacaactc cactttcaag gcttccgcca ctggcctggg tggactgac	660
cagaagatcg acggtgacct gaagttcgac gacaccaccg gcaagtacta cgccaaggct	720
actgtgaccg gcggcactgg caaggacggt tactacgagg tctccgtgga caagactaac	780
ggtgaagtga ccctggctgg tggcgctacc agccccctga ctggtggcct gcctgccacc	840
gctactgaag acgtgaagaa cgtccagggt gctaacgccg acctgaccga agccaaggct	900
gctctgactg ccgctggtgt gactgggtact gcttccgtgg tcaagatgtc ctacaccgac	960
aacaacggca agaccatcga cgggtggcctg gctgtgaagg tgggtgacga ctactactcc	1020
gccacccaga acaaggacgg tagcatctcc atcaacacta ccaagtacac cgccgacgac	1080
ggcaccagca agaccgctct gaacaagctg ggtggcgctg acggcaagac cgaagtggctc	1140
tccatcggtg gtaaaacctc cgctgctagc aaggccgagg gtcacaactt caaggctcag	1200
cctgacctgg ccgaagetgc cgccaccacc accgagaacc ctctgcagaa gatcgatgct	1260
gctctggccc aggtggacac tctgcgcagc gacctgggtg ctgtccagaa ccgtttcaac	1320
agcgccatca ctaacctggg taacaccgtg aacaacctga ctagcgctcg cagccgtatc	1380
gaggactccg actacgccac tgaggtgtcc aacatgagcc gcgctcagat cctgcagcag	1440
gccgtaacta gcgtgctggc ccaggccaac caggtccccc agaacgtcct gagcctgctc	1500
cgatcatcacc atcaccatca ctaa	1524
<210> 5	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 上游引物P1	
<400> 5	
cgggatccat gcatcacat caccatcacg ctgaggtcat taacactaac tccc	54
<210> 6	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 下游引物P2	
<400> 6	
cccaagcttt tagtgatggt gatggtgatg acggagcagg ctgaggacgt tc	52

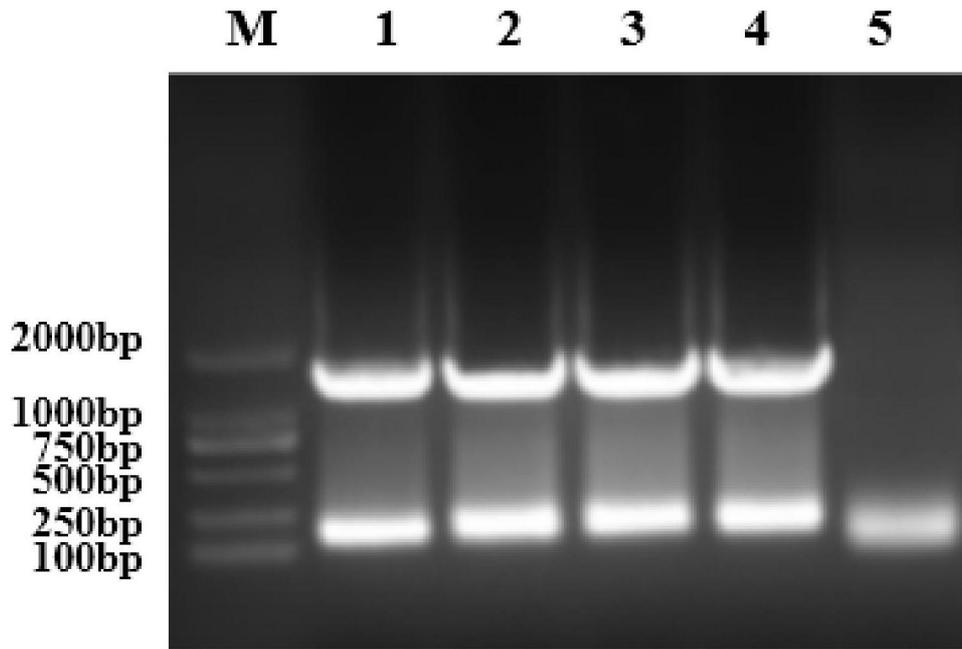


图1

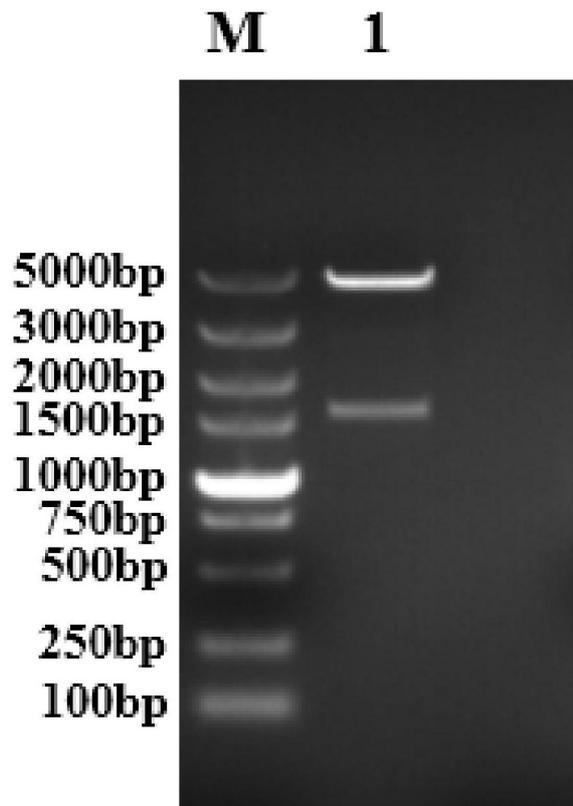


图2

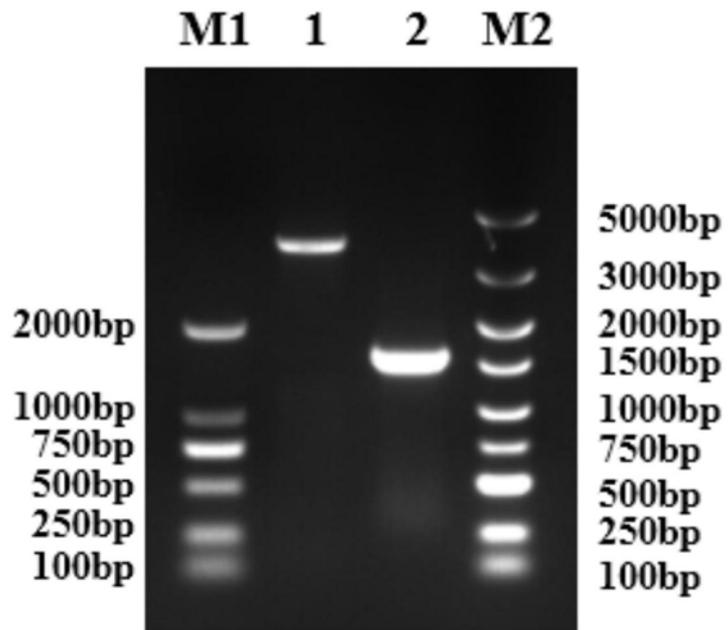


图3

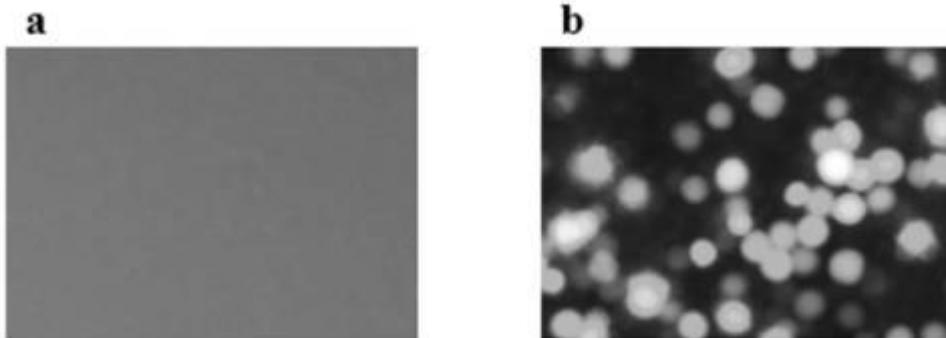


图4

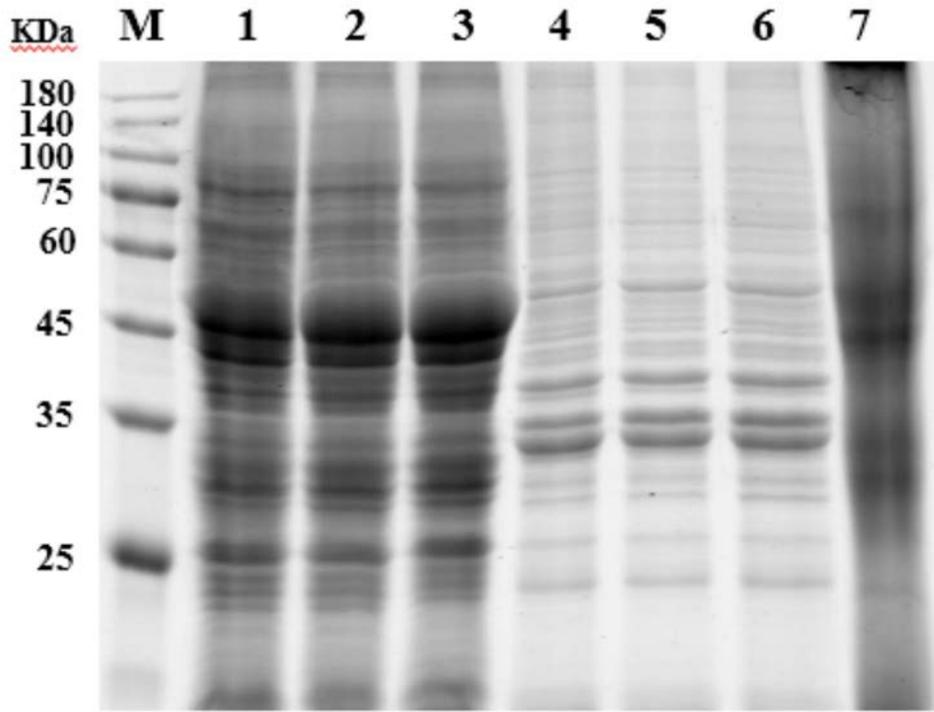


图5

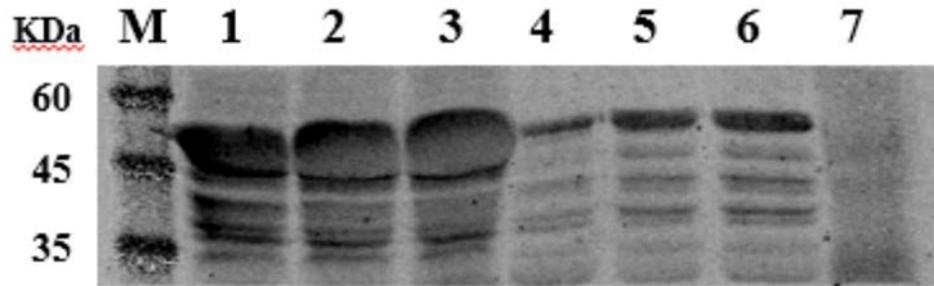


图6

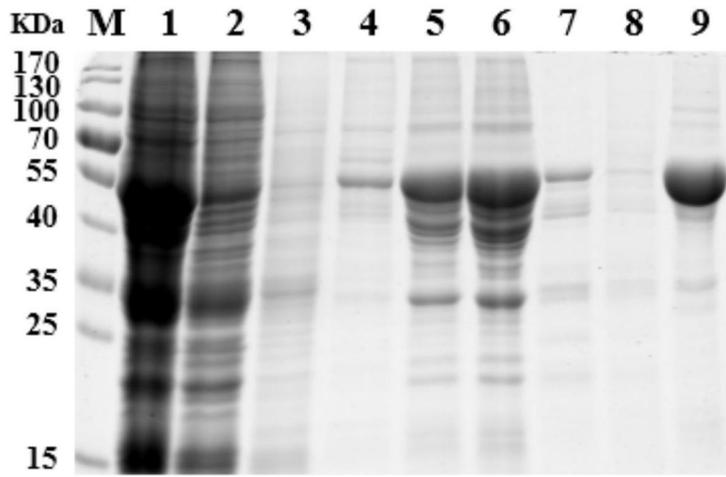


图7

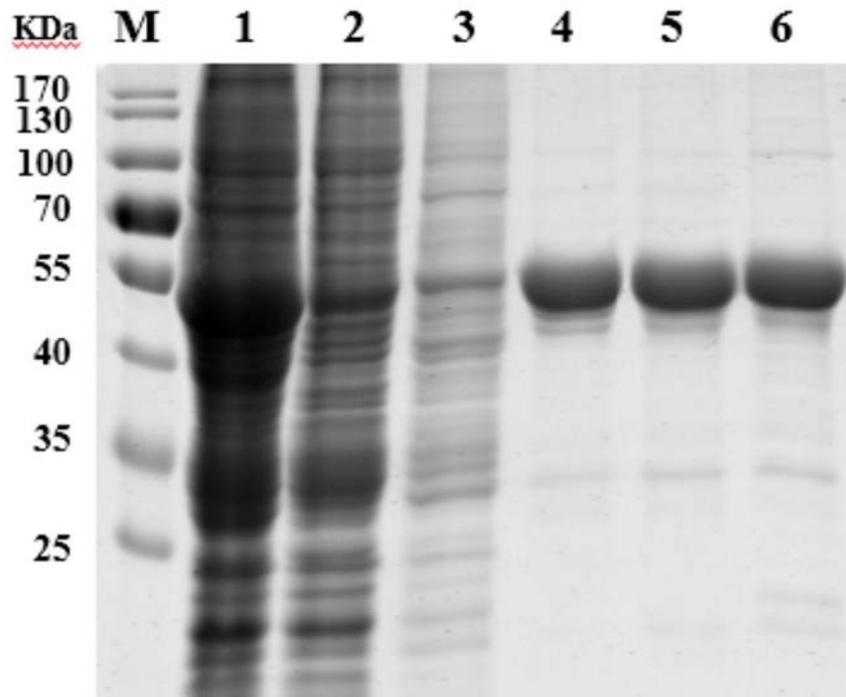


图8

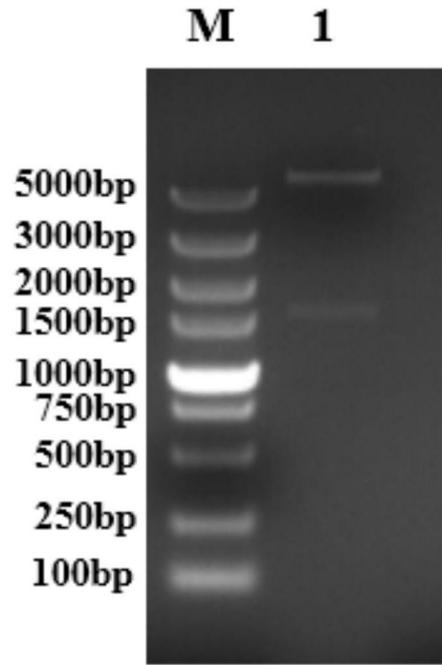


图9

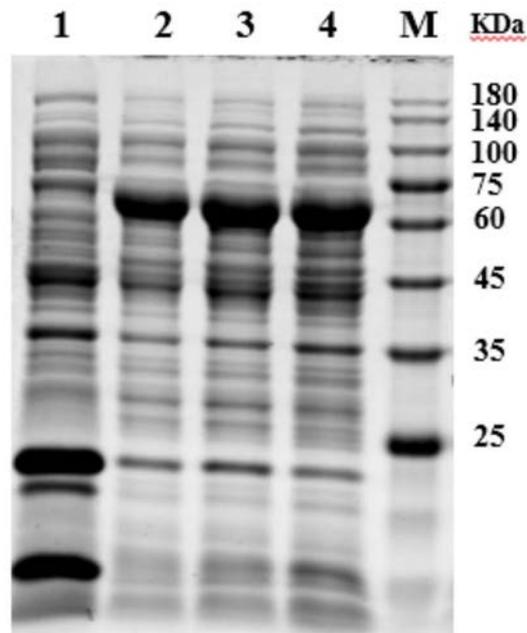


图10

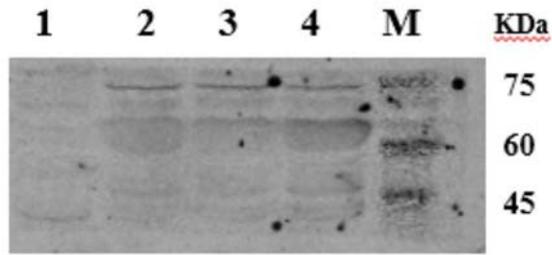


图11

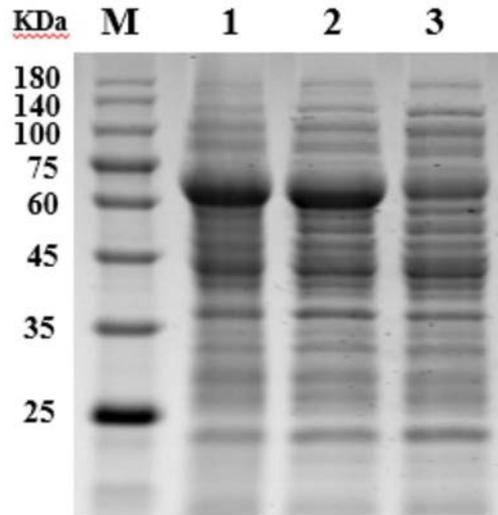


图12

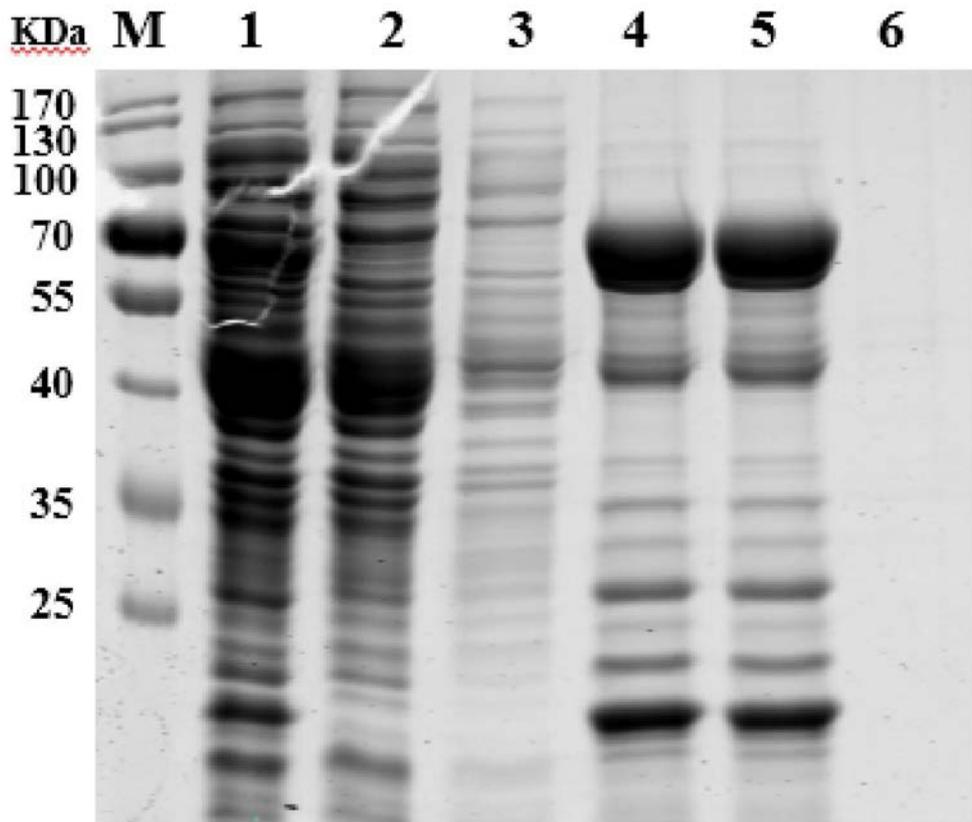


图13

SPF鸡免疫后HI抗体效价

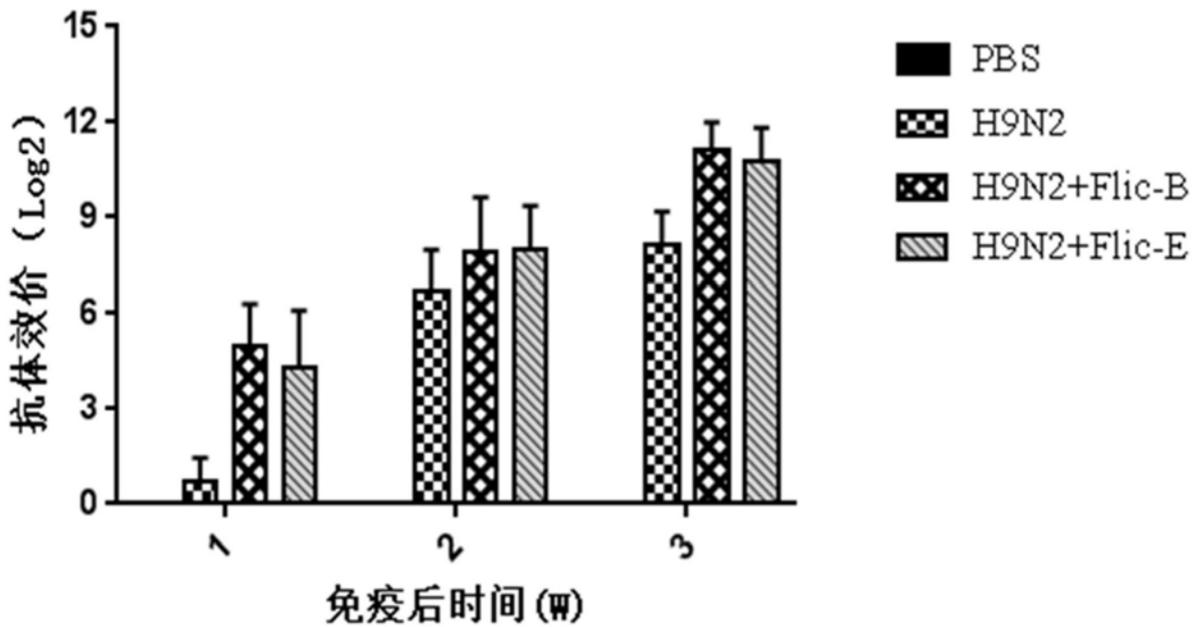


图14

### 淋巴细胞增殖

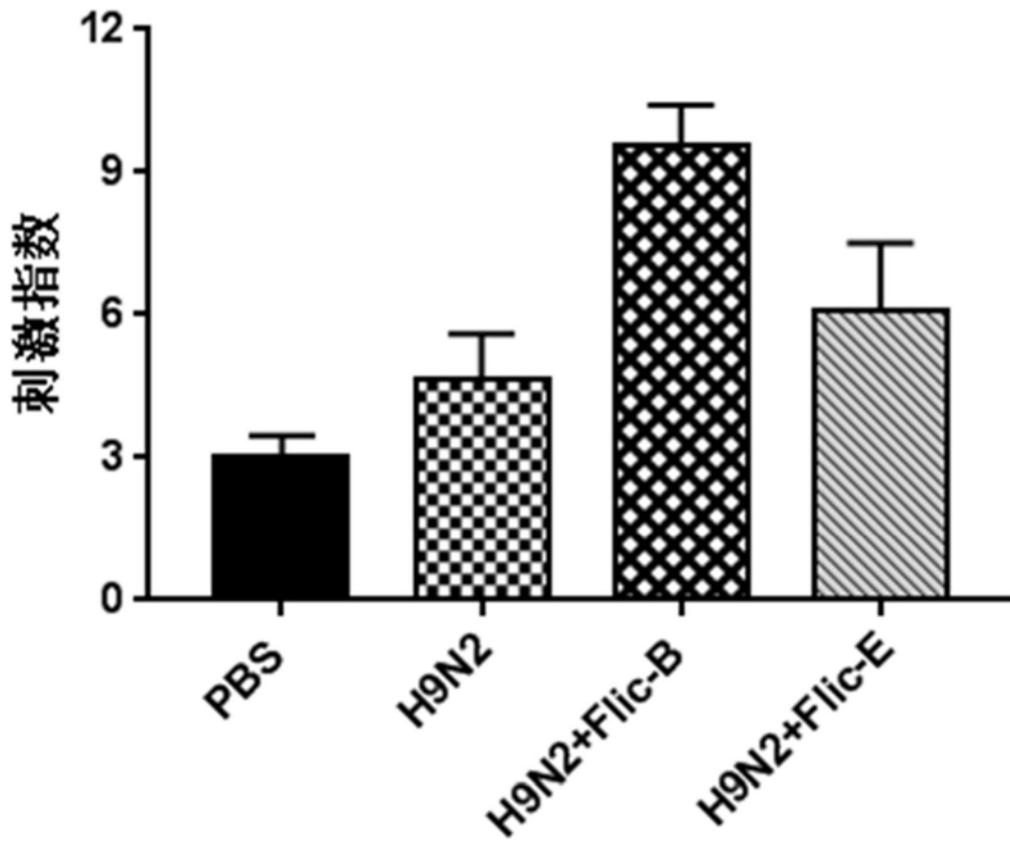


图15