



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111018995 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911052111.6

A61P 31/20(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450018 河南省郑州市郑东新区商务  
外环路12号7层3号

申请人 郑州倍赛泰生物科技有限公司

(72)发明人 王云龙 毕胜利 李玉林 伊瑶

范雪亭 王继创 程蕾 张怡青

宋长绪 王国强

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

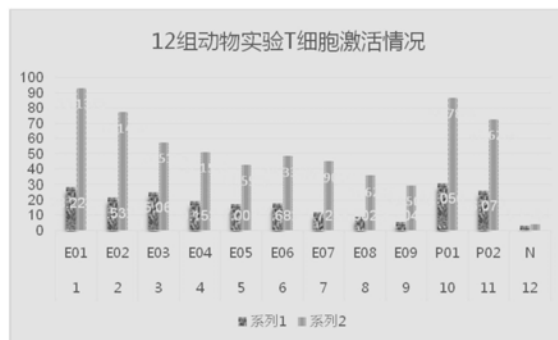
序列表6页 附图1页

(54)发明名称

一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗

(57)摘要

本发明属于疫苗技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟B、T细胞串联表位融合疫苗。非洲猪瘟B、T细胞串联表位融合疫苗的主要成分为非洲猪瘟串联表位融合蛋白,该非洲猪瘟串联表位融合蛋白包括B细胞中和表位肽片段和T细胞表位,B细胞中和表位肽包括下述片段:p72、p54、p30等3个蛋白中每个蛋白至少1个中和表位肽。该非洲猪瘟串联表位融合蛋白用作疫苗时,免疫效果好,一免后即可检测到显著高于对照组的抗体水平,且由于该融合蛋白中尽量减少了非中和抗原表位,可避免免疫后非中和抗体加速病毒感染(ADE效应,抗体依赖增强效应)的风险。



1. 一种非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白包括B细胞中和表位肽片段和T细胞表位肽片段,所述B细胞中和表位肽包括下述片段:p72蛋白的至少1个中和表位肽、p54蛋白的至少1个中和表位肽和p30蛋白的至少1个中和表位肽。

2. 根据权利要求1所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述T细胞表位肽包括p30蛋白T细胞表位肽和/或T淋巴细胞激活表位肽,所述T淋巴细胞激活表位肽包括但不限于选自流感病毒NP蛋白的片段。

3. 根据权利要求1或2所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白还包括下述片段:CD2v蛋白的至少一种中和表位肽、C-type lectin蛋白的至少一种中和表位肽、PP62蛋白的至少一种中和表位肽、p17蛋白的至少一种中和表位肽或p12蛋白的至少一种中和表位肽或上述任意几种蛋白的中和表位肽的组合。

4. 根据权利要求3所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白还包括免疫活性肽tuftsin片段,所述选自流感病毒NP蛋白的片段为NP<sub>147-155</sub>。

5. 根据权利要求3所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述p72蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1-5所示;所述p30蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.6-11所示;所述p54蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.12-16所示;所述CD2v蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.17-19所示;所述C-type lectin蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.20所示;所述PP62蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.21-25所示;所述p17蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.26所示;所述p12蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28所示。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白的不同组成片段之间通过连接臂连接,所述连接臂的氨基酸序列选自KK、KKK、GGGSGGG或GPGPG中的任意一种或几种的组合。

7. 根据权利要求6所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,相邻的所述B细胞中和表位肽之间通过KK和/或GPGPG连接,所述T细胞表位肽与相邻的所述B细胞中和表位肽之间通过KK或KKK连接。

8. 根据权利要求4所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白,其特征在于,所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白包括p72蛋白的至少3个中和表位肽、p30蛋白的至少5个中和表位肽和p54蛋白的至少3个中和表位肽。

9. 根据权利要求1-8中任意一项所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的制备方法,其特征在于,采用化学合成法合成或采用基因工程的方法通过原核或真核表达系统制备、纯化得到。

10. 一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗,其特征在于,所述非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗的原料包括如权利要求1-8中任意一项所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白。

## 一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗

### 技术领域

[0001] 本发明属于疫苗技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗。

### 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)引起的一种猪烈性传染病,是全球养猪业的“头号杀手”,强毒株引发的超急性和急性感染死亡率高达100%。2018年8月ASF首次传入我国,截止2019年6月6日,已有32个省份累计暴发137起疫情,给我国社会、经济构成巨大威胁。

[0003] ASFV为有囊膜的双链DNA病毒,是非洲猪瘟相关病毒科(Asfarviridae)非洲猪瘟病毒属(Asfivirus)的唯一成员,也是迄今发现的唯一DNA虫媒病毒。胞外病毒粒子直径约为200nm。ASFV基因组全长170~190kb,具有151个开放阅读框ORFs,共编码大约150~200种蛋白,该病毒成熟的粒子中含有50种以上的主要蛋白,在感染过程中起着重要作用。

[0004] 依据p72基因(B646L)末端核苷酸的差异,可将ASFV分为24个基因型,基于病毒是否会引起红细胞吸附的特性,已鉴定出至少有8个血清群。此外,在不同流行地区已鉴定出有不同来源(非洲源、欧洲源)、毒力(高毒力、中毒力、低毒力)、宿主传代变异等多种毒株,这些毒株对宿主的致病性和免疫应答存在一定差异。

[0005] 因此,ASFV在流行地区容易发生适应性变异,不断进化,致使开发的各类疫苗不能完全提供交叉免疫保护。ASF疫苗的研制始于上世纪60年代,但均以失败而告终,其主要原因是对ASFV生物学特性缺乏深入的研究。早期研究采用细胞传代、天然致弱、灭活等传统手段,研制的减毒活疫苗能抵抗同源毒株的攻击,但不能提供异源毒株的交叉保护,且存在安全隐患,迫使此类疫苗研发受阻。灭活疫苗因自身固有的缺陷,难以刺激先天免疫系统诱导产生高水平的细胞免疫,虽部分能刺激猪产生抗体,但很难检测到中和抗体的存在。

[0006] 随后的研究热点转向ASF亚单位疫苗,在原核或真核细胞中将具有中和表位的非洲猪瘟病毒的保护性抗原进行表达,然后将得到的蛋白质或多肽与抗原呈递细胞结合以诱导产生更高的抗ASFV中和抗体。ASFV编码的结构蛋白种类很多,经研究发现具有保护作用的有p72、CD2v、p12、p54、D117L和p30,其中最重要抗原蛋白有p72、p54、p30三种。产生p72和p54的抗体可以防止病毒吸附,p30的抗体可阻止病毒内吞作用。在p30、p72和p54中表达的重组蛋白只能延缓临床症状并降低病毒血症水平,仅能提供50%的保护而不能达到有效保护。ASFV具有复杂的结构蛋白和免疫逃避机制,紧靠上述3者抗原刺激产生的中和抗体很难获得良好的免疫保护效果。

[0007] 大量研究证实细胞免疫在抗ASFV感染中发挥重要作用。如特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞能清除ASFV,参与机体的免疫保护。ASFV 3种基因(CD2v/EP402R、p54/E183L、p30/CP204L)与细胞中的泛素基因共表达后,能诱导机体产生细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的免疫应答,在无特异性抗体的情况下能提供部分免疫保护。另外, $\gamma$ 干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )应答、自然杀伤细胞(NK细胞)等也在细胞免疫中发挥重要作用。

[0008] 目前,关于病毒活载体疫苗主要表现在诱导免疫应答上。有相关研究以狂犬病病

毒、痘病毒或腺病毒等作为载体表达ASFV保护性抗原基因,以期获得更好的细胞免疫和细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic lymphocyte CTL)反应。为获得理想的诱导免疫应答反应,使用“鸡尾酒”式混合免疫,但这些研究未进行攻毒保护试验,需进一步验证保护效果。

[0009] 中国专利文献CN 103172749A公开了一种非洲猪瘟蛋白工程疫苗的制备,该非洲猪瘟蛋白工程疫苗通过利用基因重组技术,将非洲猪瘟重要结构蛋白p72、p54以及红细胞凝集素HA多个T细胞表位和纯化标签串联,并克隆入载体,转化宿主菌,经过发酵,纯化、乳化工艺制备得到具有细胞免疫和体液免疫效果的非洲猪瘟蛋白工程疫苗,用于非洲猪瘟疫情的防控。该非洲猪瘟蛋白工程疫苗由于缺少了现已公认有效的p30蛋白特定表位,在理论上存在保护位点不足的问题,同时,用于免疫猪时,一免后免疫组相对于对照组抗体水平升高不明显,不能快速产生相应抗体。

### 发明内容

[0010] 本发明的第一目的在于提供一种非洲猪瘟串联表位融合蛋白,该非洲猪瘟串联表位融合蛋白一免后即可检测到较高水平的抗体,以解决上述技术问题。

[0011] 本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白采用如下技术方案:一种非洲猪瘟串联表位融合蛋白,所述融合蛋白包括B细胞中和表位肽片段和T细胞表位肽片段,所述B细胞中和表位肽包括下述片段:p72蛋白的至少1个中和表位肽、p54蛋白的至少1个中和表位肽和p30蛋白的至少1个中和表位肽。本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白除包括上述片段外,还包括用于将所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白的各个氨基酸片段连接起来的柔性连接臂、纯化标签等非抗原性片段(必要时还可包括接头肽、化学修饰部分、N端信号肽和C端多聚腺苷酸等)。

[0012] 优选的,所述T细胞表位肽包括p30蛋白T细胞表位肽和/或T淋巴细胞激活表位肽,所述T淋巴细胞激活表位肽包括但不限于选自流感病毒NP蛋白的片段。

[0013] 优选的,所述融合蛋白还包括下述片段:CD2v蛋白的至少一种中和表位肽、C-type lectin蛋白的至少一种中和表位肽、PP62蛋白的至少一种中和表位肽、p17蛋白的至少一种中和表位肽或p12蛋白的至少一种中和表位肽或上述任意几种蛋白的中和表位肽的组合。

[0014] 优选的,所述融合蛋白还包括免疫活性肽tuftsin片段,所述选自流感病毒NP蛋白的片段为NP<sub>147-155</sub>。该融合蛋白中的免疫活性肽tuftsin(氨基酸序列为Thr-Lys-Pro-Arg)和NP<sub>147-155</sub>(氨基酸序列为TYQRTRALV),有助于增强其吞噬作用激发抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)提高细胞的活性,增强T淋巴细胞的细胞毒(CTL)作用。实验证实成功激活以CD8+T细胞为主的细胞免疫应答,实现了高效的体液免疫和细胞免疫应答;所述T淋巴细胞激活表位肽包括但不限于NP<sub>147-155</sub>(氨基酸序列为TYQRTRALV)。NP<sub>147-155</sub>是我国上海兽医研究所学者王军等(2012)发现的一个在禽、猪、人流感病毒中的一个T淋巴细胞激活保守序列,该序列作为一个淋巴细胞激活表位,被用于广谱基因工程流感疫苗的构建,取得了良好的实验结果[Protective efficacy of a broadly cross-reactive swine influenza DNA vaccine encoding M2e, cytotoxic T lymphocyte epitope and consensus H3 hemagglutinin. Wang B et al. Virol J. (2012)]。本发明的融合蛋白中的NP<sub>147-155</sub>片段可有效提高体液免疫和细胞免疫应答的水平。

[0015] 优选的,所述p72蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1-5所示;所述p30蛋

白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.6-11所示;所述p54蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.12-16所示;所述CD2v蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.17-19所示;所述C-type lectin蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.20所示;所述PP62蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.21-25所示;所述p17蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.26所示;所述p12蛋白的中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28所示。

[0016] 优选的,所述融合蛋白的不同组成片段之间通过连接臂连接,所述连接臂的氨基酸序列选自KK、KKK、GGGSGGG或GPGPG中的任意一种或几种的组合。

[0017] 优选的,相邻的所述B细胞中和表位肽之间通过KK和/或GPGPG连接,所述T细胞表位肽与相邻的所述B细胞中和表位肽之间通过KK或KKK连接。依据已有研究成果,采用两个或三个赖氨酸(KK或KKK)将tuftsin和np147-155(TYQRTRALV)与非洲猪瘟病毒主要中和抗体表位连接,使其在溶酶体中能被溶酶体蛋白水解酶靶定切割,既充分发挥两者的作用又避免连接区产生新的表位,有利于产生高水平的细胞和体液免疫;此外,在表位串联时,容易出现两个表位连接处形成新的表位,从而掩盖了原有表位的免疫应答的情况,本发明通过在中和表位间添加GPGPG可有效避免上述情况。因此,根据HLA-DR分子识别多肽序列特点,我们设计加入GPGPG。

[0018] 优选的,所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白包括p72蛋白的至少3个中和表位肽、p30蛋白的至少5个中和表位肽和p54蛋白的至少3个中和表位肽。例如,所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.34或SEQ ID NO.35所示。

[0019] 本发明的第二目的在于提供所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的制备方法,具体技术方案为:采用化学合成法合成或采用基因工程的方法通过原核或真核表达系统制备、纯化得到。

[0020] 本发明的第三目的在于提供一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗,具体技术方案为:一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗,所述非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗的原料包括如上述任意一项所述的非洲猪瘟串联表位融合蛋白。应当说明的是,除所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白外,所述疫苗还可包括赋形剂,载体或稀释剂等成分。进一步的,任选地包含一种或多种合适的佐剂,例如:201佐剂(法国赛比克公司)、化学类免疫佐剂如氢氧化铝、弗氏佐剂、矿物油、司盘等;微生物类免疫佐剂如分枝杆菌、BCC、脂多糖、胞壁酰二肽、胞肽、脂溶性蜡质D、短小棒状杆菌;植物类免疫佐剂多为从植物或大真菌中提取的多糖类,如茯苓多糖、红花多糖、中草药类等。

[0021] 本领域技术人员可知,根据本发明的所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白的氨基酸序列和本领域常识,可得到编码所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白的核酸分子,进而将核酸分子转入合适的载体中,用于构建可表达所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白的重组工程菌。例如,本领域常见的融合蛋白表达系统有大肠杆菌表达系统和酵母菌表达系统,根据需要可将如上所述的载体导入大肠杆菌或酵母菌中,得到用于表达融合蛋白的重组工程菌。

[0022] 本发明的有益效果是:本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白免疫效果好,一免后即可检测到显著高于对照组的抗体水平,且由于该融合蛋白中尽量减少了非中和抗原表位,安全性更好,可避免免疫后非中和抗体加速病毒感染的风险。

[0023] 本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白还可包括选自CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的任意中和表位肽片段或免疫活性肽tuftsin片段和选自CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的任意中和表位肽片段的组合,以一定程度上达到更好的免疫效果。

[0024] 本发明还对所述非洲猪瘟串联表位融合蛋白中用到的连接臂进行了优化,优先选用氨基酸序列为KK、KKK、GGGSGGG或GPGPG的片段作为连接臂。上述连接臂有助于产生高水平的细胞和体液免疫。

[0025] 本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白除可用于制备疫苗外,还可用于制备非洲猪瘟单克隆抗体、非洲猪瘟检测试纸条/检测卡或试剂盒等。

## 附图说明

[0026] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0027] 图1为本发明实施例5检测到的抗体检测结果图;

[0028] 图2为本发明实施例5检测到的细胞免疫结果图;

[0029] 图中:系列1、系列2分别指第一次免疫后和第二次免疫后检测到的结果。

## 具体实施方式

[0030] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0031] 在没有其他明确说明的情况下,本发明中所用的氨基酸序列均按照N端-C端的顺序排列。

[0032] 实施例1.获取p72蛋白、p54蛋白、p30蛋白、CD2v蛋白、C-type lectin蛋白、PP62蛋白、p17蛋白或p12蛋白的中和抗原表位肽:

[0033] 利用<http://tools.iedb.org/bcell/>、[http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html)、SYFPEITHI和BIMAS等,结合已有文献分析设计,得到的非洲猪瘟病毒中和抗体潜在表位如下:

[0034] 1.1p72蛋白中和表位肽:

[0035] SEQ ID NO.1:MASGGAFCLIANDGKADKI;

[0036] SEQ ID NO.2:NVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFDH;

[0037] SEQ ID NO.3:HSSWQDAPIQGTSQMGAGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERL;

[0038] SEQ ID NO.4:VSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA;

- [0039] SEQ ID NO.5:RRNIRFKPWFIPGVINEISLTNNELYINNLFVTPEIHNLFVKRVRFSLIRVHKTQ1  
.2p30蛋白中和表位肽:
- [0040] SEQ ID NO.6:MEVIFKTDLRSSSQVVFHAG;
- [0041] SEQ ID NO.7:KSARIYAGQGYTEHQAEQEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDNETNECTS;
- [0042] SEQ ID NO.8:EQEPSSEVPKDS;
- [0043] SEQ ID NO.9:QYGKAPDF;SEQ ID NO.10:TIYGTPLKEEKEV;
- [0044] SEQ ID NO.11:NETNECTSSFETLFEQEPSSE
- [0045] 1.3p54蛋白中和表位肽:
- [0046] SEQ ID NO.12:MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTSPFFSTHMY;
- [0047] SEQ ID NO.13:
- [0048] FSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPAT;
- [0049] SEQ ID NO.14:NKPVTDNVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQT;
- [0050] SEQ ID NO.15:LRQRNTYTHKDLNSL;
- [0051] SEQ ID NO.16:MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTSPFFSTHMYTIL
- [0052] 1.4CD2v蛋白中和表位肽:
- [0053] SEQ ID NO.17:DSNITNDNNDINGVSWN;
- [0054] SEQ ID NO.18:LTPATPPNITYNCTNFLITCKKNGTNT;
- [0055] SEQ ID NO.19:
- [0056] KHVEEIESPPPESENEEQCQHDDTTSIHEPSPRELLPKPYSRYQYNTPIIYMRPSTQPLNPFPLPKP  
CPPPKPCPPPKPCPPPKPCPSAESYSPKPLPSIPLLPNIPPLST;
- [0057] 1.5C-type lectin蛋白中和表位肽:
- [0058] SEQ ID NO.20:YNNVCYYFGNEEKNYNNASNYCKQLNS
- [0059] 1.6PP62蛋白中和表位肽:
- [0060] SEQ ID NO.21:EIKKHAYSNDPSQAIKTLESILPFYIPTPAEFTGEIGSYTGVKLEVEKTEA;
- [0061] SEQ ID NO.22:DFKPFDPDRRLAVWIMESGSMPLGPPYKRKKEGGNDPPVPKHI SPYTPRTR;
- [0062] SEQ ID NO.23:EPYKTHGDDFLIPETILFGPTGWNGTDLYQ;
- [0063] SEQ ID NO.24:DSATKEVDVPICYSDPETVHSYANHVRTEILHNAVNKVTTPNLVVQAYNELEQT  
NTIRHYGPIFPES;
- [0064] SEQ ID NO.25:SRPGNNYINELNITSPAMYGDKHTTGDIAPNDRFAMLVAFINSTDFLYTAIPEEK  
VGGNETQTSSLTDLVPTRLH;
- [0065] 1.7p17蛋白中和表位肽:
- [0066] SEQ ID NO.26:KSSIPKPPPSYYVQQPEPHHHFPVFFRKRKNSTSLQSHIPSDEQLAELAHS。
- [0067] 1.8p12蛋白中和表位肽:
- [0068] SEQ ID NO.27:LDGSSGGGSN;
- [0069] SEQ ID NO.28:MPRQQKKCSKAEECTCNGSCSLKTS。
- [0070] 实施例2.本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的具体氨基酸序列(仅列举部分作为示例,
- [0071] 并非本发明的全部可能的氨基酸序列):
- [0072] 2.1下述在说明非洲猪瘟串联表位融合蛋白时,用代表中和表位肽的氨基酸序列

的序列号进行表征,连接臂用粗体表示,NP<sub>147-155</sub>的氨基酸序列用*TYQRTRALV* (斜体表示) 和免疫活性肽tuftsin用TKPR (下划线) 表示,不同的组成部分之间通过连接臂和“-”连接。

[0073] 2.2本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白包括p30、p54、p72中和表位肽和NP<sub>147-155</sub>,其氨基酸序列可表示为:

[0074] (1) 包括p30蛋白的1个中和抗原表位、p54蛋白的1个中和抗原表位、p72蛋白蛋白的1个中和抗原表位:

[0075] 按照2.1部分的规则可表示为: SEQ ID NO.1-**KK**-SEQ ID NO.5-**KK**-SEQ ID NO.10-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG (其所代表的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的氨基酸序列 MASGGAFCLIAN~~DK~~ADKIK**KK**MEVIFKTDLRSSSQVVFHAG**KK**MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTSPSFSTHMY**KKTYQRTRALV**GGGSGGG);或SEQ ID NO.6-**KK**-SEQ ID NO.4-**KK**-SEQ ID NO.13-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG ;或SEQ ID NO.12-**KK**-SEQ ID NO.2-**KK**-SEQ ID NO.18-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG等 (SEQ ID NO.1-4中的任意一个、SEQ ID NO.5-9中的任意一个、SEQ ID NO.10-13中的任意一个和TYQRTRALV,可按照任意顺序排列,此处不再赘述)。

[0076] (2) 包括p30蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p54蛋白的1个中和抗原表位、p72蛋白蛋白的1个中和抗原表位和TYQRTRALV;包括p30蛋白的1个中和抗原表位、p54蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p72蛋白蛋白的1个中和抗原表位和TYQRTRALV;包括p30蛋白的1个中和抗原表位、p54蛋白的1个中和抗原表位、p72蛋白蛋白的2个或2个以上中和抗原表位和TYQRTRALV;包括p30蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p54蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p72蛋白蛋白的1个中和抗原表位和TYQRTRALV;包括p30蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p54蛋白的1个中和抗原表位、p72蛋白蛋白的2个或2个以上中和抗原表位和TYQRTRALV;包括p30蛋白的1个中和抗原表位、p54蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p72蛋白蛋白的2个或2个以上中和抗原表位和TYQRTRALV;包括p30蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p54蛋白的2个或2个以上中和抗原表位、p72蛋白蛋白的2个或2个以上中和抗原表位和TYQRTRALV (对上述任意序号的氨基酸序列没有限定,可按任意顺序排列):

[0077] 按照2.1部分的规则举例如下: SEQ ID NO.9-**KKK**-SEQ ID NO.5-**KKK**-SEQ ID NO.10-**KKK**-SEQ ID NO.3-**KKK-TYQRTRALV**-GGGSGGG; 或 SEQ ID NO.12-**KK**-SEQ ID NO.3-**KK**-SEQ ID NO.4-**KK**-SEQ ID NO.6-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG; 或 SEQ ID NO.1-**KK**-SEQ ID NO.2-**KK**-SEQ ID NO.4-**KK**-SEQ ID NO.12-**KK**-SEQ ID NO.9-**KK**-SEQ ID NO.11-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG等。

[0078] (3) 在上述第(2)部分所包含的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的氨基酸序列的基础上,还包括选自CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的任意中和表位肽片段,例如p72-p54-p30-CD2v-NP、p72-p54-p30-CD2v-D117L-NP、CD2v-D117L-p72-p54-p30-p12-NP等:

[0079] 按照2.1部分的规则举例如下: SEQ ID NO.15-**KK**-SEQ ID NO.2-**KK**-SEQ ID NO.5-**KK**-SEQ ID NO.6-**KK**-SEQ ID NO.11-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG; 或 SEQ ID NO.3-**KK**-SEQ ID NO.6-**KK**-SEQ ID NO.9-**KK**-SEQ ID NO.17-**KK**-SEQ ID NO.12-**KK-TYQRTRALV**-GGGSGGG; 或 SEQ ID NO.10-**KK**-SEQ ID NO.9-**KK**-SEQ ID NO.8-**KK**-SEQ ID NO.6-**KK**-SEQ ID NO.1-**KKK**-SEQ ID NO.5-**KKK**-SEQ ID



NO.20-**KK-TYQRTRALV-GGGS**GGGG; 或 SEQ ID NO.10-**KK**-SEQ ID NO.13-**KK**-SEQ ID NO.16-**KK**-SEQ ID NO.4-**KK**-SEQ ID NO.12-**KK**-SEQ ID NO.23-**KK**-SEQ ID NO.8-**KK-TYQRTRALV-GGGS**GGGG 等。

[0080] (4) 在上述第(3)部分所包含的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的氨基酸序列的基础上,还包括免疫活性肽tuftsin片段:

**TKPR-KK**-SEQ ID NO.19-**KK**-SEQ ID NO.6-**KK**-SEQ ID NO.4-**KK**-SEQ ID NO.9-**KK**-SEQ ID NO.12-**KK-TYQRTRALV-GGGS**GGGG; 或 SEQ ID NO.7-**KK**-SEQ ID NO.1-**KK-TKPR-KK**-SEQ ID NO.10-**KKK**-SEQ ID NO.22-**KKK**-SEQ ID NO.13-**KK-TYQRTRALV-GGGS**GGGG; 或 **TYQRTRALV-KK**-SEQ ID NO.12-**KK**-SEQ ID NO.1-**KK**-SEQ ID NO.7-**KK**-SEQ ID NO.8-**KK**-SEQ ID NO.3-**KK**-SEQ ID NO.14-**KK**-SEQ ID NO.20-**KK-TKPR-GGGS**GGGG ;或 **TKPR-KK**-SEQ ID NO.9-**KK**-SEQ ID NO.2-**KK**-SEQ ID NO.16-**KK**-SEQ ID NO.5-**KK**-SEQ ID NO.12-**KK**-SEQ ID NO.23-**KK**-SEQ ID NO.16-**KK-TYQRTRALV-GGGS**GGGG等。

[0081] 实施例3按照本发明的非洲猪瘟串联表位融合蛋白的氨基酸序列利用基因工程的方法表达、纯化融合蛋白

[0082] 3.1通过原核表达系统表达、纯化融合蛋白

[0083] 3.1.1按照设计的融合蛋白的氨基酸序列(必要时还包括纯化标签His等其他无抗原活性的必要片段),交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行编码融合蛋白的核酸分子的合成和载体的构建(根据融合蛋白的氨基酸序列和编码该融合蛋白的核酸分子应用的表达系统进行密码子优化,合成该核酸分子),原核表达载体选用pET28a,在NocI和XhoI之间插入合成的核酸分子,宿主菌选用B121(DE)3。

[0084] 3.1.2表达:将上述3.1.1得到的pET28a重组载体转入BL21(DE3),构建表达工程菌,以1%的接种量接种至含100 $\mu$ g/mL Kan(卡那霉素)的100mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200r/min培养至A600为0.6时,加入0.05mmol/L IPTG,15 $^{\circ}$ C,120r/min的条件下初步表达24h。表达结束后,4 $^{\circ}$ C,6800 $\times$ g离心10min,收集菌体,经10mL 10mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)洗涤2次,重悬菌体,0 $^{\circ}$ C进行超声破碎。破碎液于4 $^{\circ}$ C,10600 $\times$ g离心30min,得到含有融合蛋白的上清。

[0085] 3.1.3融合蛋白的分离纯化:将工程菌于最适条件下进行表达,收集菌体进行超声破碎,破碎液于4 $^{\circ}$ C,10600 $\times$ g离心30min,上清液经0.45 $\mu$ m的滤膜过滤后,负载上Ni-NTA柱,用10倍柱体积的结合缓冲液(20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl,5mmol/L咪唑,pH 8.0)冲洗柱子,收集流出液;用6倍柱体积的洗涤缓冲液(20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl,20mmol/L咪唑,pH8.0)冲洗柱子,收集流出液;最后用10倍柱体积的洗脱缓冲液(20mmol/L Tris-HCl,0.5mol/L NaCl,500mmol/L咪唑,pH8.0)对目的蛋白进行洗脱,收集洗脱液,洗脱至无蛋白检出。

[0086] 按照该方法分别得到下述氨基酸序列的融合蛋白:

[0087] SEQ ID NO.29:ASFV.E01:(551aa, **TKPR+p30+p54+p72+Np<sub>147-155</sub>**)

TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYG  
ECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGK  
 [0088] PVTGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQ  
RNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPV  
GFEYNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLOTFPRNGYDWDNQTPL  
EGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRT  
CSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGGSGGGHHHHHH

[0089] SEQ ID NO.30:ASFV.E02:(584aa, **TKPR+p30+p54+p72+Np<sub>147-155</sub>**)  
TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGGPGPGKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSE

[0090] NIHEKNDNETNECTSGPGPGEQEPSSEVPKDSGPGPGY GKAPDFGPGPGTIYGTPLKEEEKEVGP  
MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTSPFFSTHMYGPGPGFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEV  
TPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEP  
YTTVTTQNTASQTGPGPLRQRNTYTHKDLENSLGP  
GPGMASGGAFCLIANDGKADKIGPGPGNVNKS  
GKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGF  
FEYNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDGPGPGHSSWQ

[0091] DAPIQGTSQMGAHGQLOTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERL  
GPGPGVSV  
EGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTY  
QRTRALVGGGSGGGHHHHHH

[0092] SEQ ID NO.31:ASFV.E03:(567aa, **TKPR+p30+p54+p72+Np<sub>147-155</sub>**)  
TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVGS  
SSSGSSSGMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAG  
ATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTAS

[0093] QTKKLRQRNTYTHKDLENSLGS  
SSSGSSSGMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGF  
FEYNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLOTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERLKKVSV  
EGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGGSGGGHHHHHH  
 H

[0094] SEQ ID NO.32:ASFV.E04:(550aa, **TKPR+p30+p54+p72+CDv2+Np<sub>147-155</sub>**)

- [0095] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGGKAPDFKKTIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYG  
ECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGK  
PVTGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQ  
RNTYTHKDLLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNSYGGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYV  
PVGFYENKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKKKHVEEIESPPESNEEEOCOHDDTTSIHESPREPL  
LPKYSRYQYNTPIIYMRPSTQPLNPFPLPKCKKHSSWQDAPIQGTSQMGAGHQLQTFPRNGYDWDNQTPLE  
GAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERLKKTYQRTRALVGGSGGGGHHHHHH
- [0096] SEQ ID NO.33:ASFV.E05: (559aa, **TKPR+p30+p54+** C-type lectin +**p72**+Np<sub>147-155</sub>)  
TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGGKAPDFKKTIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYG  
ECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGK  
PVTGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQ  
RNTYTHKDLLENSLKKYNNVCYFNGNEEKNYNNASNYCKQLNSKKNVNSYGGKPDPEPTLSQIEETHLVHF  
NAHFKPYVVPVGFYENKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAGHQLQTFPRN  
GYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPI  
LTDENDTQRTCSTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGSGGGGHHHHHH
- [0097] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGGKAPDFKKTIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYG  
ECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGK  
PVTGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQ  
RNTYTHKDLLENSLKKYNNVCYFNGNEEKNYNNASNYCKQLNSKKNVNSYGGKPDPEPTLSQIEETHLVHF  
NAHFKPYVVPVGFYENKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAGHQLQTFPRN  
GYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPI  
LTDENDTQRTCSTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGSGGGGHHHHHH
- [0098] SEQ ID NO.34:ASFV.E06: (632aa, **TKPR+p30+p54+PP62+p72**+Np<sub>147-155</sub>)  
TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAEQEEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGGKAPDFKKTIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYG  
ECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGK  
PVTGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQ  
RNTYTHKDLLENSLKKKPYKTHGDDFLIPETILFGPTGWNGTDLYQKKDSATKEVDVPICYSDETVHSYA  
NHVRTEILHHAHVAVNKVTTPNLVVQAYNELEQTNTIRHYGPIFPESKKNVNSYGGKPDPEPTLSQIEETHLVHF  
NAHFKPYVVPVGFYENKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAGHQLQTFPRN  
GYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYCEYPGERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPI  
LTDENDTQRTCSTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGSGGGGHHHHHH
- [0099] SEQ ID NO.35:ASFV.E07: (545aa, **p30+p54+p72**+Np<sub>147-155</sub>)

[0102] MEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAEQEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDNET  
NECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPV TGRPA  
 TNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTH  
KDLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYENKV  
RPHTGTPLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTL  
VDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPK  
FLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGGSGGGHHHHHH

[0103] SEQ ID NO.36:ASFV.E08:(527aa, **TKPR+p30+p54+p72**)  
TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAEQEWNMILHVLFEETESSASSENIH  
EKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYG  
 ECLSPVTTPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGK

[0104] PVTGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQ  
RNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPV  
GFYENKVRPHTGTPLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTP  
LEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRT  
CSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA

[0105] MEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAEQEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDNET  
NECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPV TGRPA  
 TNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTH  
KDLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYENKV  
RPHTGTPLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTP  
LEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRT  
CSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA

[0106] SEQ ID NO.37:ASFV.E09:(521aa, **p30+p54+p72**)  
MEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAEQEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDNET  
NECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPV TGRPA  
 TNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTH  
KDLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYENKV  
RPHTGTPLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTP  
LEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRT  
CSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA

[0107] MEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAEQEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDNET  
NECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQY GKAPDFKKTIIYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPV TGRPA  
 TNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTH  
KDLENSLKKMASGGAFCLIANDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYENKV  
RPHTGTPLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTP  
LEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRT  
CSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA

[0108] SEQ ID NO.38:ASFV.E10:(149aa, **p30+p54+p72+N<sub>p147-155</sub>**)  
MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFSTHMYTILGGGSGGGRRNIRFKPWFIPGVINEISLTNNEL

[0109] YINNLFVTPEIHNLFVKRVRFLIRVHKTQGGGSGGGNETNECTSSFETLFEQEPSSEKKTYYQRTRALV  
GGGSGGGHHHHHH

[0110] 3.2通过真核表达系统表达、纯化融合蛋白  
 [0111] 采用酵母表达系统,表达菌由生工生物工程(上海)股份有限公司按照设计的融合蛋白的氨基酸序列构建得到。  
 [0112] 3.2.1酵母菌菌株摇瓶发酵:相应菌株由甘油管接种至装有YPD培养基的血清瓶中培养至对数期,12000g离心2min收集菌体,无菌水清洗两次后,以OD600=1的终浓度接种至装有50ml YNM或YND的500ml挡板瓶中进行发酵。每隔24h补加相应碳源至初始浓度,同时取

样1ml,12 000g离心5min。毕赤酵母菌株摇床培养条件均为30℃、200r/min。

[0113] 3.2.2菌株5L反应器发酵种子培养:接种到发酵罐的种子分别在摇瓶中培养,进行甘油分批培养时种子培养基使用MGY培养基,进行葡萄糖分批培养及补料时种子培养基用YND培养基。培养时先由甘油管接种至装有YPD培养基的血清瓶中培养至对数期作为一级种子。将一级种子按照1:40比例再接到300ml MGY培养基或者YND培养基中,培养至对数生长期作为二级种子。二级种子全部接入装有3L基础盐培养基BSM(按4.5ml/L添加PTM1)的5L反应器中。

[0114] 3.2.3采用葡萄糖发酵工艺:起始发酵阶段向培养基中加入40g/L葡萄糖,待葡萄糖耗尽分批阶段结束后,即以相应的恒定速率限制性流加50% (m/V) 葡萄糖溶液,直至发酵结束。发酵过程溶解氧、pH和温度控制与甲醇发酵工艺相同。发酵过程溶解氧控制在30%~50%,可以通过在200~10 00r/min范围内控制转速及2~6L /min调节通气量来调节溶解氧,当转速和通气均达到最大值时可通入纯氧来满足要求。通过发酵罐联动的pH调节蠕动泵控制补入氨水的量来调控pH,批培养阶段pH5.0,诱导阶段pH3.5。整个发酵过程温度均控制在30℃。

[0115] 3.2.4融合蛋白的分离纯化:具体纯化工艺参见3.1.3。

[0116] 3.2.5按照上述酵母表达系统的方法,得到具有下述氨基酸序列的非洲猪瘟串联表位融合蛋白:

[0117] ASFV.P01(氨基酸序列如SEQ ID NO.29所示,共551aa, **TKPR+p30+p54+p72+Np<sub>147-155</sub>**);

[0118] ASFV.P02(氨基酸序列如SEQ ID NO.30所示,共584aa, **TKPR+p30+p54+p72+Np<sub>147-155</sub>**);

[0119] ASFV.P03(氨基酸序列如SEQ ID NO.31所示,567aa, **TKPR+p30+p54+p72+Np<sub>147-155</sub>**);

[0120] ASFV.P04(氨基酸序列如SEQ ID NO.32所示,550aa, **TKPR+p30+p54+p72+CDv2+Np<sub>147-155</sub>**);

[0121] ASFV.P05:(氨基酸序列如SEQ ID NO.33所示,559aa, **TKPR+p30+p54+ C-type lectin +p72+Np<sub>147-155</sub>**);

[0122] ASFV.P06:(氨基酸序列如SEQ ID NO.34所示,632aa, **TKPR+p30+p54+ PP62+p72+Np<sub>147-155</sub>**)。

[0123] 实施例4制作本发明的非洲猪瘟疫苗:

[0124] 取7号白油1128毫升,再加入司盘-80 720毫升,混匀;再称取硬脂酸铝24克并加入7号白油和司盘-80的混合样品中;将上述3试剂的混合样品用胶体磨充分溶解、混匀、并高压灭菌,即为油相。将纯化的融合蛋白(实施例3制备得到)无菌过滤后用无菌水稀释为1mg/ml,得到水相;取油相1000mL和水相500mL混合,10000r/min搅拌2-5min即得非洲猪瘟疫苗。

[0125] 实施例5将实施例4制备得到的疫苗用于免疫动物

[0126] 免疫方法:取36只猪分为12组进行免疫,采用耳后颈部肌肉注射,在左右双耳分别注射0.5mL实施例4制备得到的非洲猪瘟疫苗;共免疫两次,每次间隔14天(第1天和第15天分别进行第一次免疫和第二次免疫),第14、28天分别前腔静脉采血,用于后续检测。

[0127] 分组情况:试验组共11组,每组3只;空白对照组(3只):在左、右两耳分别注射0.5mL生理盐水;具体情况详见下表1

[0128] 表1

[0129]

组别	1	2	3	4	5	6	7
所用抗原	ASFV.E01	ASFV.E02	ASFV.E03	ASFV.E04	ASFV.E05	ASFV.E06	ASFV.E07
组别	8	9	10	11	12	13	
所用抗原	ASFV.E08	ASFV.E09	ASFV.E10	ASFV.P01	ASFV.P02	空白对照	

## [0130] 5.1 抗体检测

[0131] 将各试验组所用的抗原分别(不能混合)用pH9.5 0.05mol/L CB稀释至0.1 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ l/孔加入酶板反应板,4 $^{\circ}$ C包被过夜,第二天,洗涤液(pH7.0 0.01mol/LPB 0.1mol/L NaCl 0.1% tween-20)洗板一次,按115 $\mu$ l/孔加入含5%小牛血清的pH7.0 0.01mol/L PB封板,4 $^{\circ}$ C封闭过夜,第二天吸净封板液,37 $^{\circ}$ C干燥1小时,加干燥剂封装于铝箔袋中,包被完毕。检测时在酶标反应孔中先加入50 $\mu$ l pH7.0的终浓度为0.01mol/L PB和0.1mol/L NaCl 配制成的PBS,然后加入50 $\mu$ l待检血清,阴性、阳性对照,37 $^{\circ}$ C温育20分钟,用洗涤液洗板五次,拍干,用pH7.0 PBS 1:500稀释羊抗猪酶标抗体,100 $\mu$ l/孔加入反应板,37 $^{\circ}$ C温育20分钟,洗板同前,加入显色剂A、B液各1滴,37 $^{\circ}$ C显色10分钟,显色剂A含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,显色剂B含TMB,显色完成后,每孔加入1滴2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,用酶标仪在450nm波长读取结果:OD<sub>450nm</sub>> 2.1 $\times$ 阴性对照OD平均值者为阳性,OD<sub>450nm</sub><2.1 $\times$ 阴性对照平均值为阴性。

[0132] 检测结果参见说明书附图图1和表2,图1和表2中系列1是第一次免疫14天后(第14天)取样的血清样品的OD值;系列2是第二次免疫14天后(第28天)取样的血清样品的OD值。

[0133] 表2

[0134]

组别	抗原	1	2
1	ASFV.E01	0.4704 $\pm$ 0.071	1.008 $\pm$ 0.108
2	ASFV.E02	0.3507 $\pm$ 0.035	0.769 $\pm$ 0.095
3	ASFV.E03	0.2597 $\pm$ 0.052	0.895 $\pm$ 0.116
4	ASFV.E04	0.2947 $\pm$ 0.021	0.632 $\pm$ 0.084
5	ASFV.E05	0.2268 $\pm$ 0.053	0.512 $\pm$ 0.100
6	ASFV.E06	0.1799 $\pm$ 0.047	0.482 $\pm$ 0.097
7	ASFV.E07	0.2709 $\pm$ 0.085	0.358 $\pm$ 0.056
8	ASFV.E08	0.1344 $\pm$ 0.029	0.197 $\pm$ 0.098
9	ASFV.E09	0.0735 $\pm$ 0.028	0.168 $\pm$ 0.157
10	ASFV.E10	0.216 $\pm$ 0.021	1.075 $\pm$ 0.068
11	ASFV.P01	0.5292 $\pm$ 0.102	1.252 $\pm$ 0.124
12	ASFV.P02	0.3668 $\pm$ 0.085	0.824 $\pm$ 0.135
13	N(生理盐水)	0.012 $\pm$ 0.015	0.010 $\pm$ 0.013

[0135] 由上表2可知:(1)在p72蛋白、p54蛋白和p30蛋白的中和表位肽的基础上,增加N<sub>p147-155</sub>片段,可有效提高免疫血清中的抗体效价(第7组检测到的OD值显著高于第9组检测到的OD值,约为第9组的2倍);

[0136] (2)在p72蛋白、p54蛋白和p30蛋白的中和表位肽的基础上,增加N<sub>p147-155</sub>片段相对于在在p72蛋白、p54蛋白和p30蛋白的中和表位肽的基础上,增加免疫活性肽tuftsin的免疫效果也更好(第7组检测到的OD值高于第8组检测到的OD值);

[0137] (3)在p72蛋白、p54蛋白、p30蛋白的中和表位肽和N<sub>p147-155</sub>片段的基础上,增加免疫活性肽tuftsin和选自CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的任意中和表位肽片段的组合后,可进一步增强免疫效果(第4、5、6组检测到的OD值均高于第7组检测到的OD值)。

## [0138] 5.2 细胞免疫检测

[0139] 分别于第一次免疫后的第14天和第二次免疫后的第14天采集外周血淋巴细胞,采

用Biosource Europe的Swine IFN(干扰素)Cytoset ELISPOT检测试剂盒、按照试剂盒的说明书进行检测。具体步骤如下：

[0140] A.准备工作和封闭预包被孔板

[0141] (1) 在支架上安装需要数量的孔条,用无菌PBS (200 $\mu$ l/孔) 洗4次。剩余的孔条放在封闭袋中室温保存。

[0142] (2) 用包含10%血清(血清与悬浮细胞的血清相同)的培养基(200 $\mu$ l/孔)封闭。在室温下孵育至少30分钟。

[0143] B.在孔板中孵育细胞

[0144] (1) 移去封闭培养基,加入包含有抗原等可能的刺激因素的细胞悬液(终体积100~150 $\mu$ l/孔)。推荐使用试剂盒中的阳性对照,使用终浓度为100ng/ml。

[0145] (2) 孔板放在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的增湿培养箱中赋予12~48h。孵育的时候不要移动孔板,使用铝箔纸包裹孔板以避免水分蒸发。

[0146] C、检测斑点

[0147] (1) 排空孔板移除细胞,用无菌PBS清洗5次,200 $\mu$ l/孔。

[0148] (2) 用包含0.5%胎牛血清的无菌PBS按照1:200稀释一步反应检测试剂。每孔加100 $\mu$ l。室温孵育2h。

[0149] (3) 200 $\mu$ l/孔PBS清洗孔板5次。

[0150] (4) 用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤准备使用的底物裂解液(BCIP/NBT-plus),每孔加100 $\mu$ l。显像直到斑点出现;超过15min的显影能引起背景染色。用自来水冲洗使染色反应终止。移去板缝里面的水(孔板下面的软塑料)并且清洗薄膜的背面。

[0151] (5) 晾干孔板。在显微镜(X40) 或者在ELISpot计数器上检查并计数斑点。

[0152] 检测结果见下表3

[0153] 表3

组别	抗原	1	2
1	ASFVE01	28.2	93.1

[0155]

2	ASFV.E02	21.5	77.1
3	ASFV.E03	25.1	57.5
4	ASFV.E04	19.2	51.2
5	ASFV.E05	17.0	42.6
6	ASFV.E06	17.7	48.3
7	ASFV.E07	11.7	44.9
8	ASFV.E08	8.8	35.6
9	ASFV.E09	5.7	29.5
10	ASFV.E10	31.8	84.1
11	ASFV.P01	31.1	86.8
12	ASFV.P02	26.1	72.6
13	N (生理盐水)	3.1	3.8

[0156] 注：检测细胞数为 $10^6$ 细胞。

[0157] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。



## 序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心

郑州倍赛泰生物科技有限公司

<120> 一种非洲猪瘟B、T细胞表位串联融合疫苗

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 287

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

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

```

210	215	220
Asp Ile Thr Pro Ile Thr Asp Ala Arg Arg Asn Ile Arg Phe Lys Pro		
225	230	235
Trp Phe Ile Pro Gly Val Ile Asn Glu Ile Ser Leu Thr Asn Asn Glu		240
	245	250
Leu Tyr Ile Asn Asn Leu Phe Val Thr Pro Glu Ile His Asn Leu Phe		255
	260	265
Val Lys Arg Val Arg Phe Ser Leu Ile Arg Val His Lys Thr Gln		270
	275	280
		285

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 2

Met Glu Val Ile Phe Lys Thr Asp Leu Arg Ser Ser Ser Gln Val Val		
1	5	10
Phe His Ala Gly Lys Ser Ala Arg Ile Tyr Ala Gly Gln Gly Tyr Thr		
	20	25
Glu His Gln Ala Gln Glu Glu Trp Asn Met Ile Leu His Val Leu Phe		
	35	40
Glu Glu Glu Thr Glu Ser Ser Ala Ser Ser Glu Asn Ile His Glu Lys		
	50	55
Asn Asp Asn Glu Thr Asn Glu Cys Thr Ser Glu Gln Glu Pro Ser Ser		
65	70	75
Glu Val Pro Lys Asp Ser Gln Tyr Gly Lys Ala Pro Asp Phe Thr Ile		
	85	90
Tyr Gly Thr Pro Leu Lys Glu Glu Glu Lys Glu Val Asn Glu Thr Asn		
	100	105
Glu Cys Thr Ser Ser Phe Glu Thr Leu Phe Glu Gln Glu Pro Ser Ser		
	115	120
		125

Glu

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 194

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 3

Met Asp Ser Glu Phe Phe Gln Pro Val Tyr Pro Arg His Tyr Gly Glu		
1	5	10
Cys Leu Ser Pro Val Thr Thr Pro Ser Phe Phe Ser Thr His Met Tyr		

	20	25	30
Phe Ser Ser Arg Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ile Glu Glu Glu Asp Ile			
	35	40	45
Gln Phe Ile Asn Pro Tyr Gln Asp Gln Gln Trp Val Glu Val Thr Pro			
	50	55	60
Gln Pro Gly Thr Ser Lys Pro Ala Gly Ala Thr Thr Ala Ser Val Gly			
65	70	75	80
Lys Pro Val Thr Gly Arg Pro Ala Thr Asn Arg Pro Ala Thr Asn Lys			
	85	90	95
Pro Val Thr Asp Asn Pro Val Thr Asp Arg Leu Val Met Ala Thr Gly			
	100	105	110
Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Pro Ala His Pro Ala			
	115	120	125
Glu Pro Tyr Thr Thr Val Thr Thr Gln Asn Thr Ala Ser Gln Thr Leu			
	130	135	140
Arg Gln Arg Asn Thr Tyr Thr His Lys Asp Leu Glu Asn Ser Leu Met			
145	150	155	160
Asp Ser Glu Phe Phe Gln Pro Val Tyr Pro Arg His Tyr Gly Glu Cys			
	165	170	175
Leu Ser Pro Val Thr Thr Pro Ser Phe Phe Ser Thr His Met Tyr Thr			
	180	185	190
Ile Leu			
<210> 4			
<211> 158			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 4			
Asp Ser Asn Ile Thr Asn Asp Asn Asn Asp Ile Asn Gly Val Ser Trp			
1	5	10	15
Asn Leu Thr Pro Ala Thr Pro Pro Asn Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn			
	20	25	30
Phe Leu Ile Thr Cys Lys Lys Asn Asn Gly Thr Asn Thr Lys His Val			
	35	40	45
Glu Glu Ile Glu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Asn Glu Glu Glu Gln Cys			
	50	55	60
Gln His Asp Asp Thr Thr Ser Ile His Glu Pro Ser Pro Arg Glu Pro			
65	70	75	80
Leu Leu Pro Lys Pro Tyr Ser Arg Tyr Gln Tyr Asn Thr Pro Ile Tyr			
	85	90	95

Tyr Met Arg Pro Ser Thr Gln Pro Leu Asn Pro Phe Pro Leu Pro Lys  
 100 105 110  
 Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro  
 115 120 125  
 Pro Lys Pro Cys Pro Ser Ala Glu Ser Tyr Ser Pro Pro Lys Pro Leu  
 130 135 140  
 Pro Ser Ile Pro Leu Leu Pro Asn Ile Pro Pro Leu Ser Thr  
 145 150 155  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 5  
 Tyr Asn Asn Val Cys Tyr Tyr Phe Gly Asn Glu Glu Lys Asn Tyr Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Ser Asn Tyr Cys Lys Gln Leu Asn Ser  
 20 25  
 <210> 6  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <400> 6  
 Glu Ile Lys Lys His Ala Tyr Ser Asn Asp Pro Ser Gln Ala Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Glu Ser Leu Ile Leu Pro Phe Tyr Ile Pro Thr Pro Ala Glu  
 20 25 30  
 Phe Thr Gly Glu Ile Gly Ser Tyr Thr Gly Val Lys Leu Glu Val Glu  
 35 40 45  
 Lys Thr Glu Ala Asp Phe Lys Pro Phe Pro Asp Arg Arg Leu Ala Val  
 50 55 60  
 Trp Ile Met Glu Ser Gly Ser Met Pro Leu Glu Gly Pro Pro Tyr Lys  
 65 70 75 80  
 Arg Lys Lys Glu Gly Gly Gly Asn Asp Pro Pro Val Pro Lys His Ile  
 85 90 95  
 Ser Pro Tyr Thr Pro Arg Thr Arg Glu Pro Tyr Lys Thr His Gly Asp  
 100 105 110  
 Asp Phe Leu Ile Pro Glu Thr Ile Leu Phe Gly Pro Thr Gly Trp Asn  
 115 120 125  
 Gly Thr Asp Leu Tyr Gln Asp Ser Ala Thr Lys Glu Val Asp Val Pro



---

Lys Cys Ser Lys Ala Glu Glu Cys Thr Cys Asn Asn Gly Ser Cys Ser  
20 25 30  
Leu Lys Thr Ser  
35

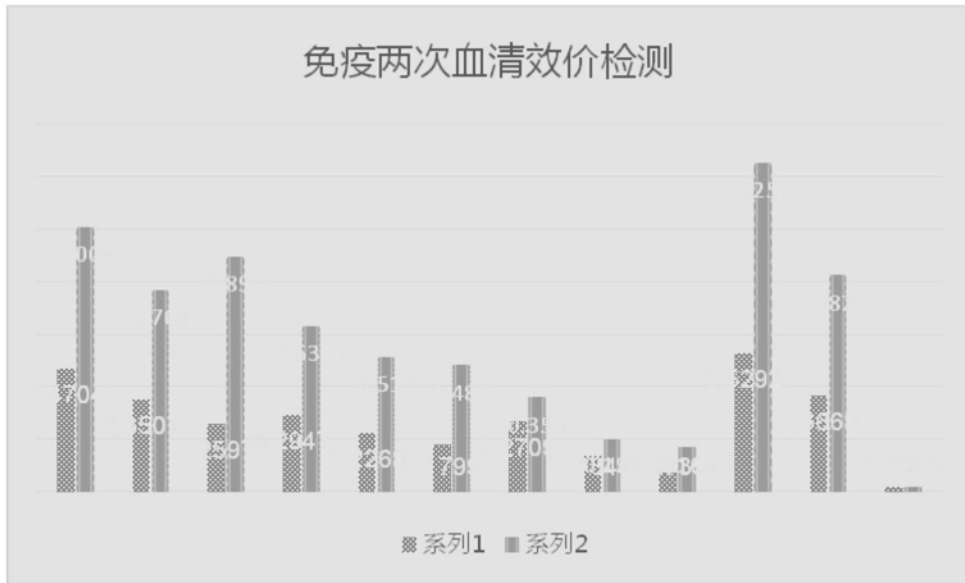


图1

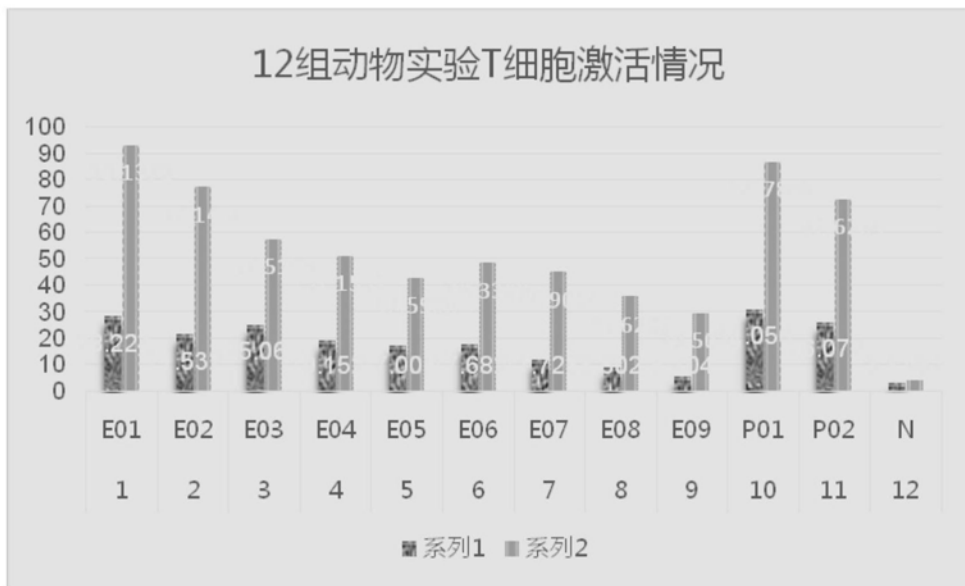


图2