



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111018996 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911052128.1

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 李玉林 毕胜利 王云龙 伊瑶

范雪亭 张怡青 程蕾 王继创

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

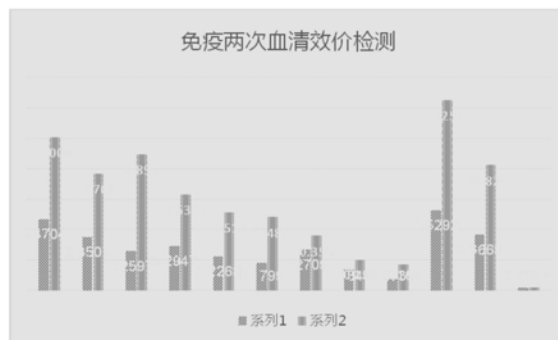
序列表6页 附图1页

(54)发明名称

一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗

(57)摘要

本发明属于疫苗技术领域,具体涉及一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗。该非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗主要由非洲猪瘟中和表位融合蛋白组成,非洲猪瘟中和表位融合蛋白主要由B细胞中和表位肽片段组成,所述B细胞中和表位肽片段包括: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。该非洲猪瘟中和表位融合蛋白可有效避免因包括非中和抗体可能造成的加速病毒感染的风险,可有效提高融合蛋白免疫的安全性。此外,本发明的非洲猪瘟中和表位融合蛋白用于免疫猪时,在一免后即可产生显著高于对照组的抗体水平。



1. 一种非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述融合蛋白主要由B细胞中和表位肽片段组成,所述B细胞中和表位肽片段包括: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所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述融合蛋白还包括免疫活性肽tuftsin。

3. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述免疫活性肽tuftsin位于所述融合蛋白的N端。

4. 根据权利要求2所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述融合蛋白还包括T细胞激活表位肽。

5. 根据权利要求4所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述T细胞激活表位肽包括但不限于NP<sub>147-155</sub>。

6. 根据权利要求5所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述NP<sub>147-155</sub>和免疫活性肽tuftsin分别位于所述融合蛋白的两端。

7. 根据权利要求1或2所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述融合蛋白还包括下述选自B细胞中和表位肽的片段: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。

8. 根据权利要求1或7所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白,其特征在於,所述P72蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.5所示;所述P30蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10或SEQ ID NO.11所示;所述P54蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15或SEQ ID NO.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、SEQ ID NO.18、或SEQ ID NO.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、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.24或SEQ ID NO.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或SEQ ID NO.28所示。

9. 根据权利要求1-8中任意一项所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白的制备方法,其特征在於,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. 一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗,其特征在於,所述非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗包括如权利要求1-8中任意一项所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白。

## 一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗

### 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中和表位亚单位疫苗。

### 背景技术

[0002] 非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒ASFV引起的猪的一种急性、热性传染性疫病。国际兽医局将其列为A类动物疫病,我国已将此病规定为一类动物传染病。ASFV是一个复杂的二十面体病毒,其特征与虹彩病毒科和痘病毒科的成员相似。ASFV双股线性DNA基因组,根据病毒株的不同其大小为170~190kb。ASFV是一种非常复杂的病毒,基因组共有150多个开放阅读框,共编码100多种多肽,在不同的实验室所得到的结果有一定差异。ASFV病毒可以编码34种以上的结构蛋白,虽然病毒的结构蛋白很多,但是证实具有抗原性的蛋白仅有几种,Tabares (1980)等发现6种,VP72,VP162,VP146,VP54,VP34,VP23.5,其中p72、p54、p30和p12,具有良好的抗原性。P72是一个主要的衣壳蛋白,占整个病毒粒子总蛋白的32%,国外研究表明,不同区域的ASFV病毒诱导产生的P72抗体的相应抗原表位都相当保守,而且抗原性很稳定,常被用来作为血清学检测和免疫制剂。膜结构蛋白P54由D183L基因编码,含有一段跨膜区域,主要集中在衍生的内质网膜处,其与轻链细胞质动力蛋白DLC8存在特殊的交叉反应,并在细胞内摄作用及病毒加工过程中其重要作用。感染病毒后复制早期,病毒可激活细胞凋亡蛋白酶,诱发细胞脱噬作用。

[0003] ASFV很好的抗原性,在感染期间能诱导产生高水平的特异性抗体。在感染后4d能检测到IgM,感染后6~8d能检测到IgG。并且初次感染后血清中的抗体能维持很长一段时间。抗ASFV的抗体能延迟临床症状的出现,减轻病毒血症,并能保护感染猪不会死亡。早期的实验表明实验感染和自然感染ASFV的猪血清中没有中和抗体。然而,康复猪用口蹄疫疫苗免疫时能产生正常水平的中和抗体,该实验证明了ASFV对体液免疫反应不存在负面影响。其他学者(Ruiz Gonzalo等,1986)也证明不同的ASFV分离株大部分能被恢复期血清中和,但总有10%的ASFV不能被中和。另外,Gomez—Puertas等(1996)报道,恢复期猪血清中的ASFV抗体能有效地中和感染易感细胞之前或之后的ASFV。然而,现在还不能证明ASFV的特异性抗体完全符合经典的病毒中和试验;另一方面,来自康复猪的细胞毒性T淋巴细胞能杀死感染ASFV的巨噬细胞(Martins和Leitao,1994),这表明细胞介导的免疫反应可能是保护性免疫反应的重要组成部分。

[0004] 尽管研究人员已经对ASFV的生物学知识已经有了深入的了解,但目前还无法治疗ASF,也没有有效的疫苗来预防ASF。自从1963年第一个ASF弱毒疫苗在葡萄牙应用以来(Manso Ribeiro等,1963),人们做了许多努力以期制备满意的疫苗。灭活疫苗不能产生任何保护作用。弱毒活疫苗能使一些猪免受同源ASFV毒株的感染,但是这些猪部分会成为病毒携带者或出现慢性病变,当大规模使用弱毒活疫苗时,这种可能性会增加。其他研究表明,抗同源或一些异源ASFV毒株的猪血清能抑制(体外)与异源毒株相关但与异源毒株不同的毒株对细胞的感染。近年来的发现表明,针对ASFV蛋白p30、p54和p72的中和抗体不足以产生抗体介导的免疫保护(《Neutralizing antibodies to African swine fever virus

proteins p30,p54,and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection》J.G.Neilan等,《Virology》319(2004),P337-342)。

[0005] 以往的疫苗均是以灭活疫苗和弱毒疫苗为基础进行尝试,但效果均不理想。未来进一步开发以特异性靶向基因剔除(如编码入侵宿主防御系统的基因)为目标的安全性好和效力高的重组弱毒疫苗可能会产生较好的效果。尽管分子生物学技术已经成功应用于界定体内ASFV相关毒力因子,但时至今日,由于其残余的毒力,仍没有证据表明合格的重组弱毒疫苗开发成功。研究人员(JordiM.Argilaguuet等,2012)基于成功诱导免疫反应抗原特性,开发了DNA疫苗,但是免疫后仅能诱导部分保护。

[0006] ASF抗体调节要求多个针对许多不同病毒蛋白的反应,有些可能涉及病毒中和反应。也可能是一些尚未发现的中和表位在保护中发挥了重要作用。

[0007] 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。其中,该融合蛋白包括p72蛋白和p54蛋白的部分片段,所采用的片段中含有中和表位片段和非中和表位片段,非中和表位片段在免疫过程中可能会出现ADE(抗体依赖的感染增强)效应。此外,该融合蛋白用于免疫猪时,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

[0008] 本发明提供一种非洲猪瘟中和表位融合蛋白,以改善非洲猪瘟疫苗的免疫效果。

[0009] 本发明的非洲猪瘟中和表位融合蛋白采用如下技术方案:一种非洲猪瘟中和表位融合蛋白,所述融合蛋白主要由B细胞中和表位肽片段组成,所述B细胞中和表位肽片段包括: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)。

[0010] 优选的,所述融合蛋白还包括免疫活性肽tuftsin。tuftsin能使淋巴细胞对其偶联的表位肽抗原产生有效的抗体免疫反应。tuftsin是一种由脾脏合成的免疫活性肽,它是IgG分子Fc(289-292)片段中的一个四肽(Thr-Lys-Pro-Arg),自身免疫原性弱,但能调节机体免疫系统。(张玉新,tuftsin的研究进展,国外医学外科学分册,1995)虽然是个小分子的四肽,但能与粒细胞、单核巨噬细胞系结合,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。(Victor A.Tuftsin,A Natural Activator of Phagocyte Cells:An Overview[J].Annals New York Academy of Sciences,1983,)之后,中国疾病预防控制中心将该分子结构应用于基因工程流感疫苗的研究,发现该淋巴细胞靶向结构显著提高了机体免疫系统对外来病毒抗原的摄取,大大提高病毒基因工程疫苗诱导抗体产生的活性。众多学者的研究证明tuftsin能使脾内脾小体增多,增强粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞的趋化、游离、吞噬、产生细胞毒作用,提高淋巴系统的细胞免疫功能。tuftsin不仅可以促进单核吞噬细胞系统

的MHC非限制性功能,还可以促进它们的MHC限制性的抗原递呈功能,增强细胞毒作用。

[0011] 优选的,所述免疫活性肽tuftsin位于所述融合蛋白的N端。研究表明,tuftsin位于融合蛋白的N端时(例如p72-p54-p30-tuftsin、p72-p30-p54-tuftsin、p54-p72-p30-tuftsin、p30-p54-p72-tuftsin等,上述融合蛋白的氨基酸序列无特别说明的情况下均按照C端-N端的顺序排列,上述p72、p54、p30指各自的中和表位肽),免疫效果较好;当tuftsin位于融合蛋白的C端(例如tuftsin-p72-p54-p30、tuftsin-p72-p30-p54、tuftsin-p30-p54-p72等,上述p72、p54、p30指各自的中和表位肽)时,免疫效果相对较差。

[0012] 优选的,所述融合蛋白还包括T细胞激活表位肽。T细胞激活表位肽可起到激活T淋巴细胞的作用,进而可有效激活或增强细胞免疫。

[0013] 优选的,所述T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 H3hemagglutinin. Wang B et al. Virol J. (2012)]。在所述融合蛋白同时包括NP<sub>147-155</sub>和免疫活性肽tuftsin片段的情况下,可有效增强吞噬作用,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<sup>+</sup>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。

[0014] 优选的,所述NP<sub>147-155</sub>和免疫活性肽tuftsin分别位于所述融合蛋白的两端。当NP<sub>147-155</sub>和免疫活性肽tuftsin分别位于融合蛋白的两端时,免疫效果最好。例如,当NP<sub>147-155</sub>位于融合蛋白的C端时,tuftsin位于融合蛋白的N端;当NP<sub>147-155</sub>位于融合蛋白的N端时,tuftsin位于融合蛋白的C端。

[0015] 优选的,所述融合蛋白还包括下述选自B细胞中和表位肽的片段: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。

[0016] 优选的,所述P72蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、

[0017] SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.5所示;所述P30蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10或SEQ ID NO.11所示;所述P54蛋白中和表位肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15或SEQ ID NO.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、SEQ ID NO.18、或SEQ ID NO.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、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.24或SEQ ID NO.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或SEQ ID NO.28所示。上述中和表位肽是利用自建的生物信息学分析体系对NCBI已公布的非洲猪瘟病毒p72、p52、p30、CDv2、PP62、C-type lectin、p17蛋白、p12蛋白进行分析,结合已确认的抗体中和表位设计出了多种候选中和抗体表位组合,尽可能多的

保留了中和表位,减少非中和表位,避免免疫后非中和抗体加速病毒的感染进程的风险。

[0018] 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。

[0019] 优选的,所述tuftsin(T细胞表位肽)与所述p72蛋白的中和表位肽、p54蛋白的中和表位肽、p30蛋白的中和表位肽、CD2v蛋白的中和表位肽、C-type lectin蛋白的中和表位肽、PP62蛋白的中和表位肽、p17蛋白的中和表位肽或p12蛋白的中和表位肽之间通过KK或KKK连接;所述NP<sub>147-155</sub>(T细胞表位肽)与所述p72蛋白的中和表位肽、p54蛋白的中和表位肽、p30蛋白的中和表位肽、CD2v蛋白的中和表位肽、C-type lectin蛋白的中和表位肽、PP62蛋白的中和表位肽、p17蛋白的中和表位肽或p12蛋白的中和表位肽之间通过KK或KKK连接。即T细胞表位肽与B细胞中和表位肽(p72、p54、p30、CD2v、C-type lectin、PP62、p17或p12)之间通过KK(两个赖氨酸)或KKK(三个赖氨酸)连接。这种连接方式可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。

[0020] 优选的,所述融合蛋白的B细胞中和表位肽之间通过GPGPG连接。其中,B细胞中和表位肽是指p72、p54、p30、CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的中和表位肽,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,根据HLA-DR分子识别多肽序列特点,我们设计加入GPGPG以有效避免上述情况。

[0021] 本发明的第二目的在于提供上述任意一项所述的非洲猪瘟中和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。

[0022] 本发明的第三目的在于提供一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗,具体技术方案为:一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗,所述非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗的原料包括如上述任意一项所述的非洲猪瘟中和表位融合蛋白。应当说明的是,除所述非洲猪瘟中和表位融合蛋白外,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。

[0023] 本领域技术人员可知,根据本发明的所述非洲猪瘟中和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中和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中和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,得到用于表达所述非洲猪瘟中和表位融合蛋白的重组工程菌。本发明在制备所述非洲猪瘟中和表位融合蛋白的过程中,即通过将所述非洲猪瘟中和表位融合蛋白的氨基酸序列提供给生工生物工程(上海)股份有限公司由上海生工根据所采用的不同表达系统,对密码子进行优化,并合成了相应的核苷酸序列和重组质粒(载体)。

[0024] 本发明的有益效果是:本发明的融合蛋白包括p72蛋白、p54蛋白和p30蛋白的中和表位,可有效避免因包括非中和抗体可能造成的加速病毒感染的风险,提高融合蛋白免疫

的安全性。此外,本发明的非洲猪瘟中和表位融合蛋白用于免疫猪时,在一免后即可产生显著高于对照组的抗体水平。

[0025] 通过在本发明的非洲猪瘟中和表位融合蛋白上增加免疫活性肽tuftsin片段,可使融合蛋白用作疫苗时,免疫效果更好。

[0026] 本发明还对免疫活性肽tuftsin片段在融合蛋白的不同位置处对免疫效果的影响进行了考察,当免疫活性肽tuftsin片段位于融合蛋白的N端时,免疫效果更好。

[0027] 本发明通过在融合蛋白上增加T细胞激活表位肽片段,可使融合蛋白产生更高的抗体水平,细胞免疫的效果也更好。

[0028] 作为更优的技术方案,当T细胞激活表位肽片段和免疫活性肽tuftsin片段分别位于融合蛋白的两端时,免疫效果更好。

[0029] 本发明的融合蛋白除具有p30、p54、p72蛋白的中和表位肽片段外,还可增加选自CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的任意中和表位肽片段。

[0030] 本发明的融合蛋白除具有p30、p54、p72蛋白的中和表位肽和免疫活性肽tuftsin片段外,还可增加选自CD2v、C-type lectin、PP62、p17和p12蛋白的任意中和表位肽片段。

[0031] 本发明还对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、GGSGGG或GPGPG的片段作为连接臂。有助于产生高水平的细胞和体液免疫。

[0032] 本发明的非洲猪瘟中和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

[0033] 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。

[0034] 图1为本发明实施例5检测到的抗体检测结果图;

[0035] 图2为本发明实施例5检测到的细胞免疫结果图;

[0036] 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

[0037] 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。在没有其他明确说明的情况下,本发明中所列出的氨基酸序列均按照N端-C端的顺序排列。

[0038] 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:

[0039] 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:

- [0040] 1.1 p72蛋白中和表位肽：  
[0041] SEQ ID NO.1:MASGGAFCLIANDGKADKI；  
[0042] SEQ ID NO.2:NVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYENKVRPHTGTPTLGKLT  
TFGIPQYGDFFHD；  
[0043] SEQ ID NO.3:HSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGT  
KNAYRNLVYYCEYPGERL；  
[0044] SEQ ID NO.4:VSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSTNPKFLSQHFPENSHNI  
QTAGKQDITPITDA；  
[0045] SEQ ID NO.5:RRNIRFKPWFIPGVINEISLTNNELYINNLFVTPEIHNLFVKRVRFSLIRVHKTQ；  
[0046] 1.2 p30蛋白中和表位肽：  
[0047] SEQ ID NO.6:MEVIFKTDLRSSSQVVFHAG；  
[0048] SEQ ID NO.7:KSARIYAGQGYTEHQAEWNNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDNETNECTS；  
[0049] SEQ ID NO.8:EQEPSSEVPKDS；  
[0050] SEQ ID NO.9:QYGKAPDF；  
SEQ ID NO.10:TIYGTPLKEEEKEV；  
[0051] SEQ ID NO.11:NETNECTSSFETLFEQEPSSE  
[0052] 1.3 p54蛋白中和表位肽：  
[0053] SEQ ID NO.12:MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFSTHMY；  
[0054] SEQ ID NO.13：  
[0055] FSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPAT；  
[0056] SEQ ID NO.14:NKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPTYTTVTQTASQT；  
[0057] SEQ ID NO.15:LRQRNTYTHKDLENSL；  
[0058] SEQ ID NO.16:MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFSTHMYTIL；  
[0059] 1.4 CD2v蛋白中和表位肽：  
[0060] SEQ ID NO.17:DSNITNDNNDINGVSWN；  
[0061] SEQ ID NO.18:LTPATPPNITYNCTNFLITCKKNGTNT；  
[0062] SEQ ID NO.19：  
[0063] KHVEEIESPPPESENEEQCQHDDTTSIHEPSPRELLPKPYSRYQYNTPIIYMRPSTQPLNPFPLPKP  
CPPPKPCPPPKPCPPPKPCPSAESYSPKPLPSIPLLNPPLST；  
[0064] 1.5 C-type lectin蛋白中和表位肽：  
[0065] SEQ ID NO.20:YNNVCYYFGNEEKNYNNASNYCKQLNS  
[0066] 1.6 PP62蛋白中和表位肽：  
[0067] SEQ ID NO.21:EIKKHAYSNDPSQAIKTLESLLPFYIPTPAEFTGEIGSYTGKLEVEKTEA；  
[0068] SEQ ID NO.22:DFKFPDRRLAVWIMESGSMPLGPPYKRKKEGGNDPPVPKHISPYTPRTR；  
[0069] SEQ ID NO.23:EPYKTHGDDFLIPETILFGPTGWNGTDLYQ；  
[0070] SEQ ID NO.24:DSATKEVDVPICYSDPETVHSYANHVRTEILHNAVNKVTTPNLVVQAYNELEQT  
NTIRHYGPIFPES；  
[0071] SEQ ID NO.25:SRPGNNYINELNITSPAMYGDKHTTGDIAPNDRFAMLVAFINSTDFLYTAIPEEK  
VG GNETQTSSLTDLVPTLH；



[0072] 1.7 p17蛋白中和表位肽：

[0073] SEQ ID NO.26:KSSIPKPPSYVYVQQPEPHHFPVFFRKRKNSTSLQSHIPSDEQLAELAHS。

[0074] 1.8 p12蛋白中和表位肽

[0075] SEQ ID NO.27:LDGSSGGGSN

[0076] SEQ ID NO.28:MPRQQKKCSKAEECTCNGSCSLKTS

[0077] 实施例2.本发明的非洲猪瘟中和表位融合蛋白的具体氨基酸序列举例：

[0078] 2.1下述在说明非洲猪瘟中和表位融合蛋白时,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。

[0079] 例如:(1)SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-GSSSSGSSSG代表的非洲猪瘟中和表位融合蛋白的氨基酸序列为:MASGGAFCLIAN<sup>D</sup>GKADKI-KK-MEVIFKTDLRSSSQVVFHAG-KK-MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFSTHMY-GGGSGGG;

[0080] (2)TKPR-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.3-KK-SEQ ID NO.13-KK-TYQRTRALV-GGGSGGG表示的氨基酸序列为:TKPR KK-KSARIYAGQGYTEHQAEWNMILHVLFEETESSASSEN<sup>I</sup>HEKNDNETNECTS-KK-HSSWQDAPIQGTSQMG<sup>A</sup>HGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERL-KK-LRQRNTYTHKDLENSL-KK-TYQRTRALVGGGSGGG;

[0081] 2.2下面对本发明的非洲猪瘟中和表位融合蛋白可能的氨基酸序列做进一步举例(在无其他明确说明的情况下下述示例中任意蛋白的中和表位肽、tuftsin和NP<sub>147-155</sub>之间的位置可任意转换)：

[0082] 2.2.1融合蛋白包括p72蛋白的1个中和表位肽、p30蛋白的1个中和表位肽和p54蛋白的1个中和表位肽,其氨基酸序列包括但不限于下述示例：

[0083] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0084] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.7-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0085] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.8-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0086] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.9-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0087] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0088] SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0089] SEQ ID NO.3-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0090] SEQ ID NO.4-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0091] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.11-GGGSGGG;

[0092] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.12-GGGSGGG;

[0093] SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.13-GGGSGGG;

[0094] 2.2.2融合蛋白包括p72蛋白的至少1个中和表位肽、p30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tuftsin,其氨基酸序列包括但不限于下述示例：

[0095] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0096] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.7-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0097] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.8-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0098] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.9-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;

[0099] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.11-GGGSGGG;

[0100] TKPR-KKK-SEQ ID NO.1-KKK-SEQ ID NO.5-KKK-SEQ ID NO.12-GGGSGGG;  
[0101] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.13-GGGSGGG;  
[0102] SEQ ID NO.1-KK-TKPR-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;  
[0103] SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-TKPR-KK-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;  
[0104] SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-KK-TKPR-GGGSGGG;  
[0105] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-GPGPG-SEQ ID NO.5-GPGPG-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;  
[0106] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-GPGPG-SEQ ID NO.5-GPGPG-SEQ ID NO.10-KK;  
[0107] TKPR-KKK-SEQ ID NO.1-GPGPG-SEQ ID NO.5-GPGPG-SEQ ID NO.10-GGGSGGG;  
[0108] 2.2.3融合蛋白包括p72蛋白的至少1个中和表位肽、p30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、tuftsin和NP<sub>147-155</sub>,其氨基酸序列包括但不限于下述示例:

[0109] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-KK-TYQRTRALV-GGGSGGG;(其中SEQ ID NO.1可被SEQ ID NO.2-5中的任意序列取代;SEQ ID NO.6可被SEQ ID NO.7-11中的任意序列取代;SEQ ID NO.12可被SEQ ID NO.13-16中的任意序列取代;上述序列中的任意中和表位肽以及tuftsin和NP<sub>147-155</sub>片段之间的顺序可任意变换)

[0110] 2.2.4融合蛋白包括p72蛋白的至少1个中和表位肽、p30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、tuftsin、NP<sub>147-155</sub>和CD2v、C-type lectin、PP62、p17或p12蛋白中的任意中和表位肽的组合,其氨基酸序列包括但不限于下述示例:

[0111] TKPR-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.10-KK-SEQ ID NO.14-KK-TYQRTRALV-GGGSGGG(SEQ ID NO.17可被SEQ ID NO.18-SEQ ID NO.28中的任意一个或几个序列取代)

[0112] 2.2.5融合蛋白包括p72蛋白的至少1个中和表位肽、p30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、tuftsin和NP<sub>147-155</sub>(即融合蛋白包括4个或4个以上的B细胞中和表位肽片段),其氨基酸序列包括但不限于下述示例:

[0113] TKPR-KK-SEQ ID NO.5-KK-SEQ ID NO.6-KK-SEQ ID NO.7-KK-SEQ ID NO.8-KK-SEQ ID NO.9-KK-SEQ ID NO.10-KK-SEQ ID NO.11-KK-SEQ ID NO.13-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.2-KK-SEQ ID NO.3-KK-SEQ ID NO.1-KK-SEQ ID NO.4-KK-TYQRTRALV-GGGSGGG;

[0114] 实施例3按照非洲猪瘟中和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

[0115] 3.1通过原核表达系统表达、纯化融合蛋白

[0116] 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),交由上海生工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。

[0117] 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A<sub>600</sub>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℃进行超声破碎。破碎液于4℃,10600×g离心30min,得到含有融合蛋白的上清。

[0118] 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℃,10600×g离心30min,上清液经0.45μm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。

[0119] 按照该方法分别得到下述氨基酸序列的融合蛋白:

[0120] SEQ ID NO.29:ASFV.E01:(548aa,TKPR+P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>)

[0121] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENI  
HEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKP  
 VTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIA  
 NDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDF  
 HDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGER  
 LKKVSVEGTSGPLL CNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTY  
 QRTRALVGGGSGGG

[0122] SEQ ID NO.30:ASFV.E02:(581aa,TKPR+P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>)

[0123] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGGPGPKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASS  
ENIHEKNDNETNECTSGPGPEQEPSSEVPKDSGPGPGQYGKAPDFGPGGT IYGTPLKEEEKEVGPMPGMDSEFFQ  
 PVYPRHYGECLSPVTTSPFFSTHMYGPGPGFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASV  
 GKPVTPGRPATNRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTGPGPGLRQRNTYT  
 HKDLENSLGPMPGPGMASGGAFCLIAN DGKADKIGPGPGNVNKS YGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFY  
 NKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFDGPGPGHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYT  
 LVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERLGPMPGVSVEGTSGPLL CNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTN  
 PKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGGSGGG

[0124] SEQ ID NO.31:ASFV.E03:(564aa,TKPR+P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>)

[0125] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENI  
HEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEKEVGSSSSGSSSGMDSEFFQPVYPRHY  
 GECLSPVTTSPFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPAT  
 NRPATNKPVTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLGS  
 SSSGSGMASGGAFCLIAN DGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYKVRPHTGTPT  
 LGNKLTFGIPQYGDFFDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTK  
 NAYRNLVYYCEYPGERLKKVSVEGTSGPLL CNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQT  
 AGKQDITPITDAKKTYQRTRALVGGGSGGG

[0126] SEQ ID NO.32:ASFV.E04:(547aa,TKPR+P30+P54+P72+CDv2+Np<sub>147-155</sub>)

[0127] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENI

HEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKP  
 VTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIA  
 NDGKADKIKKNVNSYKGPDPPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFF  
 HDKHHVVEEIESPPPESENEEEQCQHDDTTSIHEPSPRELLPKPYSRYQYNTPIIYMRPSTQPLNPFPLPKPCKKHS  
 SWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERLKKTYQ  
 RTRALVGGGSGGG

[0128] SEQ ID NO. 33:ASFV.E05: (556aa,TKPR+P30+P54+C-type lectin+P72+Np<sub>147-155</sub>)

[0129] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENI  
HEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKP  
 VTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKYNNVCYYFGNE  
 EKNNYNASNYCKQLNSKKNVNSYKGPDPPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFG  
 IPQYGDFFHDKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVY  
 YCEYPGERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITP  
 ITDAKKTYQRTRALVGGGSGGG

[0130] SEQ ID NO. 34:ASFV.E06: (626aa,TKPR+P30+P54+PP62+P72+Np<sub>147-155</sub>)

[0131] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENI  
HEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKP  
 VTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKKPYKTHGDDFL  
 IPETILFGPTGWNGTDLYQKKDSATKEVDVVICYSDPETVHSYANHV RTEILHNAVNVKVTTPNLVVQAYNELEQTN  
 TIRHYGPIFPESKKNVNSYKGPDPPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQY  
 GDFFHDKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEY  
 PGERLKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA  
 KKTYQRTRALVGGGSGGG

[0132] SEQ ID NO. 35:ASFV.E07: (542aa,P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>)

[0133] MEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDN  
ETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFS  
 THMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKPVTDNPV  
 TDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIANNDGKAD  
 KIKKNVNSYKGPDPPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKHHS  
 SWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERLKKVSV  
 EGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDAKKTYQRTRAL  
 VGGGSGGG

[0134] SEQ ID NO. 36:ASFV.E08: (527aa,TKPR+P30+P54+P72)

[0135] TKPRKKMEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENI  
HEKNDNETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYGKAPDFKKT IYGTPLKEEEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVT  
 TPSFFSTHMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKP

VTDNPVTDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIA  
NDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFF  
HDKKHSSWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGER  
LKKVSVEGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA

[0136] SEQ ID NO.37:ASFV.E09:(521aa,P30+P54+P72)

[0137] MEVIFKTDLRSSSQVVFHAGKKSARIYAGQGYTEHQAQEEWNMILHVLFEETESSASSENIHEKNDN  
ETNECTSKKEQEPSSEVPKDSKKQYKAPDFKKT IYGTPLKEEKEVKKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFS  
THMYKKFSSRKKKAAAIEEEDIQFINPYQDQWVEVTPQPGTSKPAGATTASVGKPVTPGRPATNRPATNKPVTDNPV  
TDRLVMATGGPAAAPAAASAPAHPAEPYTTVTTQNTASQTKKLRQRNTYTHKDLENSLKKMASGGAFCLIAN  
NDGKADKIKKNVNKSYGKPDPEPTLSQIEETHLVHFNAHFKPYVPVGFYFNKVRPHTGTPTLGNKLTFGIPQYGDFFHDKKHS  
SWQDAPIQGTSQMGAHGQLQTFPRNGYDWDNQTPLEGAVYTLVDPFGRPIVPGTKNAYRNLVYYCEYPGERLKKVSV  
EGTSGPLLCNIHDLHKPHQSKPILTDENDTQRTCSHTNPKFLSQHFPENSHNIQTAGKQDITPITDA

[0138] SEQ ID NO.38:ASFV.E10:(138aa,P30+P54+P72)

[0139] MDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFSTHMYTILGGGSGGRRNIRFKPWFIPGVINEISL

[0140] TNNELYINNLVFTPEIHNLFVKRVRFSLIRVHKTQGGGSGGNETNECTSSFETLFEQEPSSEGGGSGG  
GHHHHHH

[0141] SEQ ID NO.39:ASFV.E11:(155aa,TKPR+P30+P54+P72+N<sub>p147-155</sub>)

[0142] TKPRKMDSEFFQPVYPRHYGECLSPVTTPSFFSTHMYTILGGGSGGRRNIRFKPWFIPGVINEISL  
NNELYINNLVFTPEIHNLFVKRVRFSLIRVHKTQGGGSGGNETNECTSSFETLFEQEPSSEKKTQTRALVGGGS  
GGHHHHHH

[0143] 3.2通过真核表达系统表达、纯化融合蛋白

[0144] 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。

[0145] 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OD<sub>600</sub>=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,12000g离心5min。毕赤酵母菌株摇床培养条件均为30℃、200r/min。

[0146] 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比例再接种到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。

[0147] 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200~1000r/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℃。

[0148] 3.2.4融合蛋白的分离纯化:具体纯化工艺参见3.1.3。

[0149] 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融合蛋白:

[0150] ASFV.P01(氨基酸序列如SEQ ID NO.29所示,548aa,TKPR+P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>);

[0151] ASFV.P02(氨基酸序列如SEQ ID NO.30所示,581aa,TKPR+P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>);

[0152] ASFV.P03(氨基酸序列如SEQ ID NO.31所示,564aa,TKPR+P30+P54+P72+Np<sub>147-155</sub>);

[0153] ASFV.P04(氨基酸序列如SEQ ID NO.32所示,547aa,TKPR+P30+P54+P72+CDv2+Np<sub>147-155</sub>);

[0154] ASFV.P05(氨基酸序列如SEQ ID NO.33所示,556aa,TKPR+P30+P54+C-type lectin+P72+Np<sub>147-155</sub>);

[0155] ASFV.P06(氨基酸序列如SEQ ID NO.34所示,626aa,TKPR+P30+P54+PP62+P72+Np<sub>147-155</sub>)。

[0156] 实施例4制作本发明的非洲猪瘟疫苗:

[0157] 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种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。

[0158] 实施例5将实施例4制备得到的疫苗用于免疫动物

[0159] 免疫方法:取42头猪分为14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。

[0160] 分组情况:试验组共13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

[0161] 不同组免疫情况如下表1所示:

[0162] 表1

[0163]

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	14
所用抗原	ASFV.E08	ASFV.E09	ASFV.E10	ASFV.E11	ASFV.P01	ASFV.P02	空白对照

[0164] 5.1抗体检测

[0165] 将表1中各组所用抗原分别(不能混合)用pH9.5 0.05mol/L CB稀释至0.1ug/ml,100ul/孔加入酶板反应板,4℃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115ul/孔加入含5%小牛血清的pH7.0 0.01mol/L PB封板,4℃封闭过夜,第二天吸净封板液,37℃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50ul 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℃温育20分钟,用洗涤液洗板五次,拍干,用pH7.0PBS 1:500稀释羊抗猪酶标抗体,100 $\mu$ l/孔加入反应板,37℃温育20分钟,洗板同前,加入显色剂A、B液各1滴,37℃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×阴性对照OD平均值者为阳性,OD<sub>450nm</sub><2.1×阴性对照平均值为阴性。

[0166] 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)取样测得的血清样品的OD值。

[0167] 表2

[0168]

组别	抗原	1	2
1	ASFV.E01	0.4704±0.071	1.008±0.108
2	ASFV.E02	0.3507±0.035	0.769±0.095
3	ASFV.E03	0.2597±0.052	0.895±0.116
4	ASFV.E04	0.2947±0.021	0.632±0.084
5	ASFV.E05	0.2268±0.053	0.512±0.100
6	ASFV.E06	0.1799±0.047	0.482±0.097
7	ASFV.E07	0.2709±0.085	0.358±0.056
8	ASFV.E08	0.1344±0.029	0.197±0.098
9	ASFV.E09	0.0735±0.028	0.168±0.157
10	ASFV.E10	0.095±0.021	0.427±0.038
11	ASFV.E11	0.216±0.032	1.075±0.073
12	ASFV.P01	0.5292±0.102	1.252±0.124
13	ASFV.P02	0.3668±0.085	0.824±0.135
14	N(生理盐水)	0.012±0.015	0.010±0.013

[0169] 由上表2可知:(1)抗原标号为ASFV.09的疫苗(融合蛋白仅含p72、p54、p30蛋白的中和表位肽片段)在第一次免疫后,血清样品的OD值即显著高于抗原标号为N(生理盐水)的OD值,本发明的疫苗免疫动物后,动物体内可以在更短时间内产生抗体,起效快。

[0170] (2)抗原标号为ASFV.E08的疫苗免疫后血清样品测得的OD值均大于抗原标号为ASFV.E09的疫苗免疫后的血清样品的OD值,即具有TKPR片段的融合蛋白作为疫苗的免疫效果优于仅含有p30、p54和p72中和抗原表位片段的融合蛋白。

[0171] (3)抗原标号为ASFV.E01、ASFV.E02、ASFV.P01、ASFV.P02的疫苗的免疫效果优于其他组,即当融合蛋白包括p72蛋白、p54蛋白和p30蛋白的中和表位肽以及Np<sub>147-155</sub>、免疫活性肽tuftsin时,免疫效果更好。

[0172] 5.2细胞免疫检测

[0173] 分别于第14天和第28天采集猪的外周血,分离外周血淋巴细胞,采用Biosource Europe的Swine IFN(干扰素)Cytoset ELISPOT检测试剂盒进行检测。具体步骤如下

[0174] A.准备工作和封闭预包被孔板

[0175] (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。

[0176] (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。

[0177] B. 在孔板中孵育细胞

[0178] (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。

[0179] (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。

[0180] C、检测斑点

[0181] (1) 排空孔板移除细胞,用无菌PBS清洗5次,200 $\mu$ l/孔。

[0182] (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。

[0183] (3) 200 $\mu$ l/孔PBS清洗孔板5次。

[0184] (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。

[0185] (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。

[0186] 检测结果见下表3

[0187] 表3

[0188]

组别	抗原	1	2
1	ASFV.E01	28.2	93.1
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	11.2	19.7
11	ASFV.E11	31.8	84.1
12	ASFV.P01	31.1	86.8
13	ASFV.P02	26.1	72.6
14	N(生理盐水)	3.1	3.8

[0189] 注:检测细胞数为10<sup>6</sup>细胞。

[0190] 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> 一种非洲猪瘟中和表位亚单位疫苗

<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

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 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

<210> 3

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 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

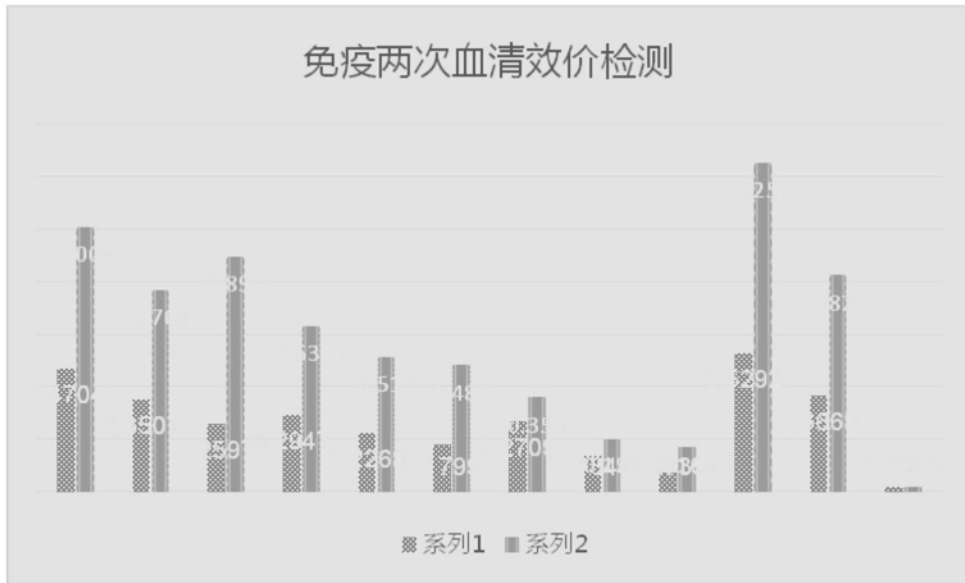


图1

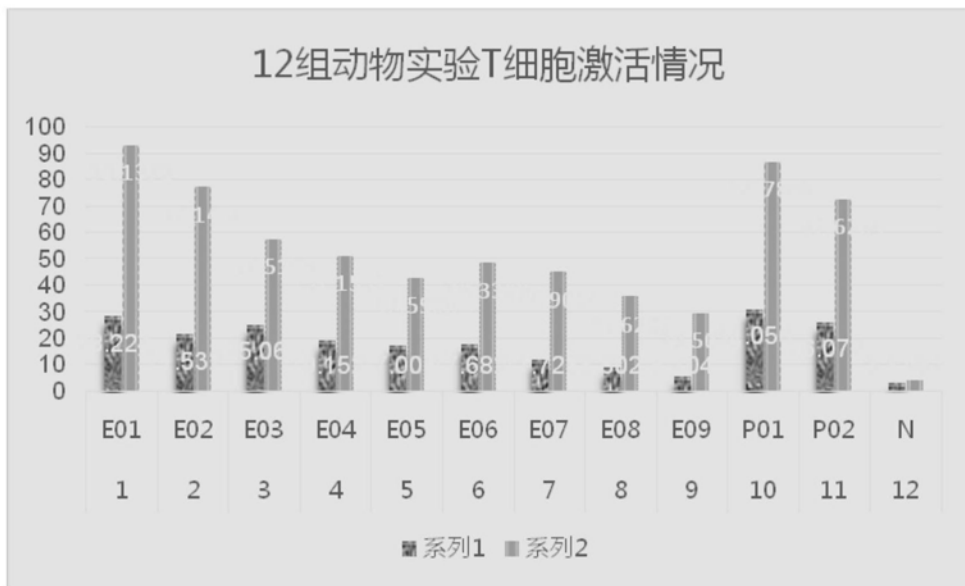


图2