



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113156135 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 202110085632.2

(22) 申请日 2016.03.04

(30) 优先权数据

62/128,744 2015.03.05 US

(62) 分案原申请数据

201680013955.8 2016.03.04

(71) 申请人 勃林格殷格翰动物保健美国有限公司

地址 美国佐治亚州

(72) 发明人 A·V·耶尔 J·R·赫尔曼

M·B·鲁夫 E·M·沃恩

M·L·舍费尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2018.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

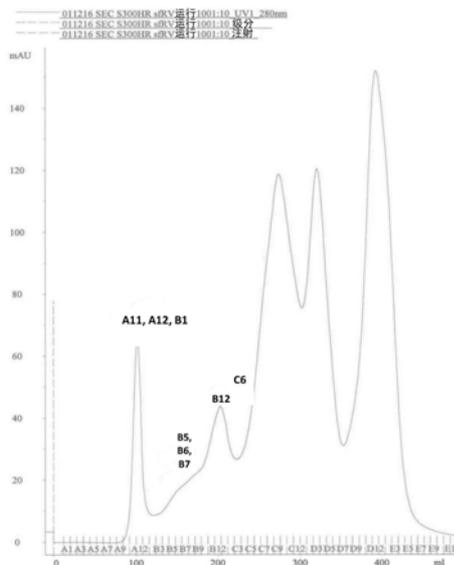
权利要求书2页 说明书22页
序列表72页 附图6页

(54) 发明名称

标记系统,特别是用于杆状病毒表达的亚单位抗原的标记系统

(57) 摘要

本发明属于允许区分感染的个体和疫苗接种的个体的依从性标记和标记疫苗的领域。具体而言,其涉及确定个体是否已经接受包含在培养的昆虫细胞中由杆状病毒表达系统产生的重组蛋白的免疫原性组合物的方法。



1. 用于确定个体是否已经接受免疫原性组合物的试剂盒,其中所述试剂盒包括固体支持物和固定至所述固体支持物的一种或多种捕获试剂,所述固定的一种或多种捕获试剂能够结合从已经接受所述免疫原性组合物的个体的生物样品中获得的抗体,

其中所述一种或多种捕获试剂选自:

a. 包含与选自SEQ ID NO:1至6的序列具有至少70%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;

b. 能够感染草地贪夜蛾细胞或来自衍生自草地贪夜蛾的细胞系的细胞的RNA病毒,其中所述RNA病毒是属于弹状病毒科的病毒,且其中所述病毒可选地已被灭活。

2. 如权利要求1的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用感染SF+或Sf9细胞的弹状病毒的G蛋白免疫的猪血清作为阳性对照。

3. 如权利要求1的试剂盒,其中所述RNA病毒选自:

a. 包含蛋白的能够感染昆虫细胞的RNA病毒,所述蛋白包含以下或由以下组成:

i. 与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%序列相同性的氨基酸序列;和/或

ii. 与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%序列相同性的氨基酸序列;和/或

b. 能够感染昆虫细胞的RNA病毒,其基因组包含编码蛋白的核酸分子,所述蛋白包含以下或由以下组成:

i. 与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%序列相同性的序列;和/或

ii. 与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%序列相同性的序列;和/或

c. 能够感染昆虫细胞的RNA病毒,其基因组包含具有以下序列的RNA分子:

i. 所述序列与核酸序列反向互补,所述核酸序列与SEQ ID NO:9的序列具有至少70%序列相同性;和/或

ii. 所述序列与核酸序列反向互补,所述核酸序列与SEQ ID NO:15的序列具有至少70%序列相同性。

4. 如权利要求1-3中任一项的试剂盒,其中来自能够感染昆虫细胞的RNA病毒的所述一种或多种抗原是包含以下或由以下组成的蛋白:

a. 与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%序列相同性的序列。

5. 如权利要求1-3中任一项的试剂盒,其中所述草地贪夜蛾细胞或所述来自衍生自草地贪夜蛾的细胞系的细胞选自:Sf9细胞和Sf+细胞。

6. 如权利要求1-3中任一项的试剂盒,

其中所述捕获试剂包含能够感染昆虫细胞的RNA病毒的病毒颗粒和/或病毒样颗粒或由其组成,且其中所述捕获试剂通过包括以下步骤的方法获得:

i) 从能够感染昆虫细胞的RNA病毒感染的昆虫细胞的培养物获得上清液,其中所述上清液包含RNA病毒的病毒颗粒和/或病毒样颗粒,

ii) 经由包括通过至少一个过滤器的微过滤的分离步骤从所述病毒颗粒和/或病毒样颗粒分离细胞碎片,其中至少一个过滤器具有比所述病毒颗粒和/或病毒样颗粒更大的孔径,和

iii) 任选地,使含有所述病毒颗粒和/或病毒样颗粒的ii)的滤液进行大小排阻色谱法,其中通过测量在260nm或280nm处的吸光度来测量洗脱液中的蛋白的存在。

7. 如权利要求6的试剂盒,在步骤i)中,所述能够感染昆虫细胞的RNA病毒感染的昆虫

细胞未感染杆状病毒,和/或未用质粒转染,

8.如权利要求6的试剂盒,在步骤ii)中,所述过滤器为两个。

9.如权利要求6的试剂盒,在步骤ii)中,所述至少一个过滤器具有0.1 μm 至4 μm 的孔径。

10.如权利要求6的试剂盒,在步骤ii)中,所述至少一个过滤器具有0.2 μm 至2 μm 的孔径。

11.如权利要求6的试剂盒,在步骤iii)中,通过收集表现出第一260nm处的吸光度或280nm处的吸光度的峰的洗脱液,通过测量在260nm或280nm处的吸光度,来测量洗脱液中的蛋白的存在。

标记系统,特别是用于杆状病毒表达的亚单位抗原的标记系统

[0001] 本申请是申请日为2016年3月4日的第201680013955.8号发明名称为“标记系统,特别是用于杆状病毒表达的亚单位抗原的标记系统”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请根据37C.F.R.1.821-1.825含有序列表。伴随本申请的序列表以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本发明属于允许区分感染的个体和疫苗接种的个体的依从性标记和标记疫苗的领域。具体而言,本发明涉及用于包括亚单位抗原的疫苗的依从性标记,和使得可能区分用病原体感染的动物和用衍生自所述病原体的亚单位抗原处理的动物的DIVA(区分感染的动物与疫苗接种的动物)系统,其中所述亚单位抗原已经在培养的昆虫细胞中(优选通过遗传工程改造的杆状病毒的方式)表达。

背景技术

[0005] 杆状病毒是感染无脊椎动物、特别是昆虫,但不在哺乳动物或其它脊椎动物细胞中复制的大的棒状双链DNA病毒。在1940年代开始,它们首先用作作物领域中的生物杀虫剂。另外,在出版描述人 β 干扰素在昆虫细胞中过表达的第一篇论文(Smith等人Mol Cell Biol.3:2156-2165(1983))之后,遗传工程改造的杆状病毒已被广泛用于在昆虫细胞培养物中生产复合重组蛋白,包括生产抗原用于许多批准的人和兽医亚单位疫苗(van Oers等人J Gen Virol.96:6-23(2015))。

[0006] 疫苗接种是管理畜群健康的重要工具,特别是在其中饲养许多食用动物的高密度限制环境中。当在据推测疫苗接种的动物中发生疾病爆发时,出现疫苗是否未能保护动物或疫苗是否被正确递送的问题,其中后一种关于疫苗的适当递送的可能性被称为疫苗依从性(vaccine compliance)。

[0007] 因此,生产者高度期望使用依从性标记用于确定动物是否已经被适当地疫苗接种。WO 2009/058835 A1描述了例如使用作为猪流感疫苗的依从性标记添加的纯化的木聚糖酶。关于包含杆状病毒表达的亚单位抗原的疫苗,可能使用杆状病毒抗原作为依从性标记,然而,目前使用的系统在测试阳性的动物中具有局限性,并且需要大量的抗原(Gerber等人Res Vet Sci.95:775-81(2013);Lehnert.Top Agrar 5:S11-S14(2011))。

[0008] 用于控制病毒爆发和感染的程序中使用的疫苗必须具有有效的系统以监测群体内病毒感染的持续存在。然而,疫苗接种使通过例如血清学方式针对感染的传播的大规模监视变得复杂化,因为疫苗接种的个体和暴露的个体两者均产生对病毒特异性的抗体。病毒的感染性强野毒株和病毒疫苗之间的抗原相似性经常妨碍感染的受试者和疫苗接种的受试者之间的区别,因为疫苗接种导致在感染的个体和疫苗接种的个体之间出现并留存无法区分的抗体。

[0009] 在DIVA (区分感染的动物和疫苗接种的动物) 疫苗接种策略中存在日益增加的全球兴趣。例如,关于禽流感毒株H5N1 HPAI的联合WHO/FAO/OIE会议已经推荐,使用DIVA实施所有疫苗接种,所以可以监测感染的传播。然而,目前的DIVA方法难以按比例扩大,并且在区分疫苗接种与用其它传播病毒毒株感染的方面经常具有问题。

[0010] 目前的监测方法包括疫苗接种的动物的物理标记、前哨动物的使用和病毒学测试。然而,由于后勤和经济原因,目前这些方法具有许多限制。

[0011] 疫苗接种的动物的物理标记涉及通过物理方式 (诸如耳标、腿带或耳旁标签) 对疫苗接种的个体进行耗时的个体鉴定。另外,未疫苗接种的前哨动物的使用在后勤和经济上是困难的,而且还存在以下风险:如果前哨动物变得被病毒感染,例如,被H5N1病毒感染的家禽,存在传播给人的增加风险。经由筛选和检测活病毒或RT-PCR监测测试来对个体进行病毒学检测是非常昂贵和基础繁重的过程,不适用于亚单位疫苗。并且仅提供关于个体的当前状态的信息,并且不允许分析该个体的感染和/或疫苗接种历史。

[0012] 鉴于所述限制,使用允许疫苗接种的动物和感染的动物的血清学鉴定的标记疫苗是高度优选的,其中此类标记疫苗可以制备为阴性或阳性标记疫苗。

[0013] 通过使用病原体的抗原部分或通过从病原体去除抗原 (其在感染的动物中引发特异性抗体) 来制备阴性标记疫苗。阴性标记疫苗通常是亚单位疫苗或减毒活疫苗,其含有缺乏免疫原性抗原的遗传工程改造的菌株。阴性标记疫苗的实例是例如使用杆状病毒表达的经典猪瘟病毒 (CSFV) E2蛋白作为用于针对经典猪瘟疫苗接种的亚单位抗原,其中在疫苗接种的猪的血清中对CSFV的其它抗原 (例如E^{RNS}蛋白或NS3蛋白) 特异性的抗体的检测显示CSFV感染。

[0014] 阳性标记疫苗含有额外的抗原,其在疫苗接种的个体中、但不在感染的个体中诱导特异性抗体。在WO 2007/053899 A1中描述了阳性标记疫苗方法的实例,其中两者分开产生的灭活的H6N2禽流感 (A1) 病毒和破伤风毒素在用于对禽类疫苗接种的一次注射中组合,随后对破伤风毒素特异性的抗体在获得自所述禽类的血清中检测为显示禽类被疫苗接种的标记。

[0015] 然而,疫苗抗原和标记抗原两者的分开生产是相对昂贵的,并且此外,需要混合步骤用于将两种组分组合在一种疫苗接种剂中,其中这额外还可以影响疫苗组分/抗原的稳定性。

[0016] 因此,需要简单的标记系统用于廉价地产生阳性标记疫苗,特别是包含杆状病毒表达的抗原的亚单位疫苗。

[0017] 此外,需要有效的依从性标记,其也使得能够灵敏地鉴定用少量的杆状病毒表达的亚单位抗原的疫苗接种。

附图说明

[0018] 图1:在凝胶上运行扩增的产物以验证大小。

[0019] 图2:在凝胶上运行切割的插入物和载体以检查载体的线性化。

[0020] 图3:将来自孔2、5、7、10、11和12的阳性克隆测序,并将重叠群与构建体参考序列比对以检查突变;所有克隆都是完美的匹配。

[0021] 图4:评估G基因构建体的表达的Western印迹。

[0022] 图5:针对蛋白探测上清液、可溶性和不溶性细胞级分;此时蛋白存在于不溶性部分中。

[0023] 图6:在AKTA上使用等度条件的大小排阻色谱运行的结果。在280nm处用UV吸收监测来自柱的蛋白的洗脱。

[0024] 图7:实时PCR结果:列1表示孔数。列2显示使用的与特异性探针连接的荧光团6-羧基荧光素(FAM)。列3表示衍生自大小排阻色谱的SfRV抗原的级分(级分A11、A12、B1、B5、B12和C6)或具有已知量的用于生成标准曲线的SfRV特异性核酸的标准品(孔7-14)。孔15是阴性对照(无模板),且孔16是含有通过大小分级分离(SEC)前的浓缩的SfRV抗原的阳性对照。

[0025] 图8:ELISA;用四种不同的抗原(包括半纯化的SfRV(小图A)、大小排阻级分A11(小图B)、A12(小图C)和B1(小图D))包被ELISA平板。用来自阴性对照动物的血清(倒三角形)或来自施用含有SfRV的实验疫苗的动物的第28天血清(圆形)探测平板。

发明内容

[0026] 上述技术问题的解决方案通过说明书和权利要求中表征的实施方案来实现。

[0027] 因此,本发明在其不同方面根据权利要求来实施。

[0028] 本发明基于以下令人惊讶的发现:使用被弹状病毒(rhabdovirus)感染的SF+细胞用于产生杆状病毒表达的抗原使得能够廉价且有效生产阳性标记疫苗和容易且生产固有依从性标记,这允许显示亚单位疫苗的适当递送的敏感方法。

[0029] 在第一方面,本发明因此提供了确定个体是否已经接受免疫原性组合物、特别是疫苗的方法,所述免疫原性组合物、特别是疫苗包含在培养的昆虫细胞中由表达系统、优选杆状病毒表达系统产生的重组蛋白,其中所述方法包括以下步骤:从个体获得生物样品;和在所述生物样品中确定存在或不存在显示所述个体已经接受来自病毒的一种或多种抗原的一种或多种标记物,所述病毒是能够感染昆虫细胞的RNA病毒,其中所述生物样品中存在所述一种或多种标记物表明所述个体已经接受所述免疫原性组合物,或其中所述生物样品中不存在所述一种或多种标记物表明所述个体没有接受所述免疫原性组合物。

[0030] 如本文所用的术语“重组蛋白”特别是指由重组DNA分子表达的蛋白分子,诸如通过重组DNA技术产生的多肽。此类技术的实例包括当编码表达的蛋白的DNA被插入合适的表达载体、优选杆状病毒表达载体(其进而用于转染)的情况,或者在杆状病毒表达载体感染宿主细胞以产生由DNA编码的蛋白或多肽的情况下。因此,如本文所用的术语“重组蛋白”特别是指由重组DNA分子表达的蛋白分子。

[0031] 根据具体实例,通过具有以下步骤的方法产生重组蛋白:将编码蛋白的基因克隆至杆状病毒转移载体中;转移载体用于通过昆虫细胞中的同源重组制备含有所述基因的重组杆状病毒;和然后在重组杆状病毒感染期间在昆虫细胞中表达蛋白。

[0032] 根据替代实例,在昆虫细胞中从重组表达质粒表达重组蛋白。在该替代实例的情况下,不需要杆状病毒。

[0033] 进一步理解,术语“由序列组成的重组蛋白”还特别涉及任何共翻译和/或翻译后修饰或由其中表达多肽的细胞实现的序列的修饰。因此,如本文所述的术语“由序列组成的重组蛋白”也涉及这样的序列,其具有由其中表达多肽的细胞实现的一种或多种修饰,特别是在蛋白生物合成和/或蛋白加工中实现的氨基酸残基的修饰,优选地选自糖基化、磷酸化

和乙酰化。

[0034] 优选地,本发明的重组蛋白通过杆状病毒表达系统产生或可获得,特别是在培养的昆虫细胞中。

[0035] 如本文所用的术语“表达系统”特别包括用于在宿主细胞中表达基因的媒介物或载体,以及导致基因稳定整合至宿主染色体中的媒介物或载体。

[0036] 如本文所用,“杆状病毒表达系统”特别意指用于使用设计用于表达所需蛋白的重组杆状病毒载体在昆虫细胞中产生所述蛋白的系统。杆状病毒表达系统通常包含在昆虫细胞中实现重组蛋白表达所必需的所有元件,并且通常涉及将杆状病毒载体工程改造以表达所需蛋白,将工程改造的杆状病毒载体引入昆虫细胞,在合适的生长培养基中培养含有工程改造的杆状病毒载体的昆虫细胞,使得表达所需蛋白,和回收蛋白。通常,工程改造杆状病毒载体涉及构建和分离重组杆状病毒,其中将所选基因的编码序列插入非必需病毒基因的启动子之后,其中大多数目前使用的杆状病毒表达系统基于苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcMNPV) 的序列 ((*Virology* 202 (2), 586-605 (1994), NCBI 登录号: NC_001623)。杆状病毒表达系统是本领域众所周知的,并且已经例如描述于“*Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*”, David R. O'Reilly, Lois Miller, Verne Luckow, 由Oxford Univ. Press出版(1994), “*The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*”, Linda A. King, R.D. Possee, 由Chapman&Hall出版(1992)。用于产生重组蛋白的杆状病毒系统的示例性非限制性实例例如描述于WO 2006/072065 A2中。

[0037] 根据所述第一方面,本发明因此提供了确定个体是否已经接受包含在培养的昆虫细胞中由表达系统产生的重组蛋白的免疫原性组合物的方法,所述方法在下文也被称为“本发明的方法”,其中所述方法特别包括在获得自所述个体的生物样品中确定存在或不存在显示所述个体已经接受来自病毒的一种或多种抗原的一种或多种标记物,所述病毒是能够感染昆虫细胞的RNA病毒,且其中所述生物样品中存在所述一种或多种标记物表明所述个体已经接受所述免疫原性组合物。

[0038] 如本文所用的“昆虫细胞”意指衍生自昆虫物种的细胞或细胞培养物。关于本发明特别感兴趣的是衍生自物种草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的昆虫细胞。

[0039] 如本文所用,“能够感染昆虫细胞的病毒”特别被理解为在病毒表面上携带结构的病毒,所述结构能够与昆虫细胞相互作用,其程度使得病毒或至少病毒基因组变得并入昆虫细胞。

[0040] 所述昆虫细胞的感染更具体地包括病毒附着至宿主细胞,病毒进入细胞,病毒粒子在细胞质中脱衣壳,病毒基因组的复制和转录,病毒蛋白的表达以及新的感染性病毒颗粒的组装和释放。

[0041] 优选地,本发明的免疫原性组合物是标记疫苗,特别是阳性标记疫苗。

[0042] 如本文所述的术语“标记疫苗”特别指定导致免疫的生物体中的免疫的疫苗,其不同于由真实病原体引起的生物体的免疫。

[0043] “阳性标记疫苗”特别涉及含有额外抗原的标记疫苗,其诱导产生在疫苗接种的个体中、但非感染个体中存在的特异性抗体。

[0044] 如本发明的上下文中使用的术语“标记物”优选等同于术语“生物标记物”，特别是指可测量的物质或化合物(其表明个体已经暴露于免疫原性组合物)，优选为阳性标记疫苗，或者更具体地，涉及诱导产生在疫苗接种的受试者中、但非感染的受试者中发现的特异性抗体的阳性标记疫苗的额外抗原。

[0045] 如本文所用，术语“免疫原性组合物”特别是指将在已经暴露于组合物的个体中引发免疫应答的组合物。免疫应答可以包括抗体的诱导和/或T-细胞应答的诱导。取决于组合物的预期功能，可以包括一种或多种抗原。优选地，如本文所述的免疫原性组合物是疫苗。

[0046] 如本文所用的术语“疫苗”根据相关领域定义，并且涉及诱导或增强个体对特定疾病的免疫力的组合物。为此，疫苗包含类似于病原体的化合物或引起所述疾病的所述病原体的化合物。与该化合物接触后，触发个体的免疫系统以将化合物识别为外来物质并将其破坏。免疫系统随后记忆与该化合物的接触，使得在随后与引起疾病的病原体的接触，确保了病原体的容易且有效的识别和破坏。根据本发明，所述疫苗可以在本领域已知的疫苗的任何制剂中，诸如例如用于肌肉注射的疫苗，粘膜疫苗或用于皮下或皮内注射的疫苗，以及用于吸入的疫苗，诸如例如作为气溶胶中。此类疫苗制剂是本领域众所周知的，并且已经例如描述于Neutra MR等人2006Mucosal vaccines:the promise and the challenge 6(2):148-58或F.P.Nijkamp,Michael J.Parnham 2011;Principles of Immunopharmacology ISBN-13:978-3034601351。

[0047] 因此，本发明的方法特别是确定个体是否已经接受包含在培养的昆虫细胞中由杆状病毒表达系统产生的重组蛋白的免疫原性组合物的方法，其中所述方法包括在获得自所述个体的生物样品中确定存在或不存在显示所述个体已经接受来自病毒的一种或多种抗原的一种或多种标记物，所述病毒是能够感染昆虫细胞的RNA病毒，且其中所述生物样品中存在所述一种或多种标记物表明所述个体已经接受所述免疫原性组合物。

[0048] 优选地，在个体已经疫苗接种或者分别已经据推测疫苗接种之日后至少14天且最优选14至35天，从所述个体获得生物样品。

[0049] 优选地，如本文所提及的昆虫细胞是草地贪夜蛾(Sf)细胞或来自衍生自草地贪夜蛾的细胞系的细胞，且更优选地选自Sf9细胞和Sf+细胞。分别地，如本文所提及的昆虫细胞是草地贪夜蛾(Sf)细胞或来自衍生自草地贪夜蛾的细胞系的细胞，且更优选地选自Sf9细胞和Sf+细胞。

[0050] 如本文所提及的显示个体已经接受来自能够感染昆虫细胞的RNA病毒的一种或多种抗原的一种或多种标记物(其在下文也被称为“本发明的一种或多种标记物”)优选为一种或多种选自以下的标记物：对于来自作为能够感染昆虫细胞的RNA病毒的病毒的一种或多种抗原特异性的抗体；来自作为能够感染昆虫细胞的RNA病毒的病毒的一种或多种抗原；和对于能够感染昆虫细胞的RNA病毒特异性的一种或多种核酸分子。

[0051] 最优选地，本发明的一种或多种标记物是对于来自作为能够感染昆虫细胞的RNA病毒的病毒的抗原特异性的抗体。

[0052] 优选地，如本文所述的抗体是多克隆抗体。

[0053] 如本文所用，术语“对于特定抗原特异性的抗体”特别是指以例如大于或等于约 10^5M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、 10^{12}M^{-1} 或 10^{13}M^{-1} 的亲合力或 K_a (即，单位为 $1/\text{M}$ 的特定结合相互作用的平衡缔合常数)结合抗原的抗体，优选多克隆抗体。或者，结合

亲和力可以被定义为单位为M(例如, 10^{-5} M至 10^{-13} M)的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)。可以使用本领域技术人员众所周知的技术容易地测定抗体的结合亲和力(参见例如, Scatchard等人.(1949) Ann.N.Y.Acad.Sci. 51:660; 美国专利号5,283,173; 5,468,614; **BIACORE®**分析; 或等效物)。

[0054] 如本文所提及的来自能够感染昆虫细胞的RNA病毒的一种或多种抗原(其也称为“本发明的一种或多种抗原”), 优选为包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白, 和/或包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白。

[0055] 关于如本发明的上下文中所提及的术语“至少90%”, 应当理解, 所述术语优选地涉及“至少91%”, 更优选“至少92%”, 还更优选“至少93%”, 或者特别是“至少94%”。

[0056] 关于如本发明的上下文中所提及的术语“至少95%”, 应当理解, 所述术语优选地涉及“至少96%”, 更优选“至少97%”, 还更优选“至少98%”, 或者特别是“至少99%”。

[0057] 如本文所用的术语“具有100%序列相同性”应当被理解为等同于术语“相同”。

[0058] 如本文所用, 术语“抗原”特别是指能够引发免疫应答的任何分子、部分或实体。这包括细胞和/或体液免疫应答。

[0059] 百分比序列相同性具有本领域公认的含义, 并且存在多种测量两个多肽或多核苷酸序列之间的相同性的方法。参见例如, Lesk, 编, Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, 编, Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin&Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); 和 Gribskov& Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991)。用于比对多核苷酸或多肽的方法编码在计算机程序中, 包括GCG程序包(Devereux等人, Nuc.Acids Res.12:387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul等人, J.Molec.Biol.215:403 (1990)) 和Bestfit程序(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis.53711), 其使用Smith和Waterman(Adv.App.Math., 2:482-489 (1981))的局部同源性算法)。例如, 可以使用采用FASTA算法的计算机程序ALIGN, 其具有仿射空位搜索, 空位开放罚分为-12且空位延伸罚分为-2。为了本发明的目的, 使用在DNASTAR Inc的MegAlign软件版本11.1.0 (59), 419中的Clustal W方法、使用程序中的默认多重比对参数集合(空位罚分=15.0, 空位长度罚分=6.66, 延迟发散序列(%)=30%, DNA转移权重=0.50和DNA权重矩阵=IUB) 比对核苷酸序列, 并且分别地, 使用在DNASTAR Inc的MegAlign软件版本11.1.0 (59), 419中的Clustal W方法、使用程序中的默认多重比对参数集合(具有空位罚分=10.0、空位长度罚分=0.2和延迟发散序列(%)=30%的Gonnet系列蛋白权重矩阵) 比对蛋白/氨基酸序列。

[0060] 如本文所用, 特别理解的是, 术语“与SEQ ID NO:X的序列的序列相同性”等同于术语“与SEQ ID NO:X的序列在SEQ ID NO:X的长度上的序列相同性”或术语“与SEQ ID NO:X的序列在SEQ ID NO:X的整个长度上的序列相同性”。在该上下文中, “X”是选自1至24的任

何整数,使得“SEQ ID NO:X”代表本文提及的任何SEQ ID NO。

[0061] 如本文所提及的对于能够感染昆虫细胞的RNA病毒特异性的一种或多种核酸分子(在下文也称为“根据本发明的一种或多种核酸分子”)优选为编码以下的核酸分子:包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白,和/或;包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白;和/或具有与核酸序列反向互补的序列的RNA,所述核酸序列与SEQ ID NO:9的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性;和/或,与核酸序列反向互补的序列,所述核酸序列与SEQ ID NO:15的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性。

[0062] 优选地,本发明的方法包括以下步骤:使生物样品与固定至固体支持物的捕获试剂接触,其中固定的捕获试剂能够结合本发明的一种或多种标记物;和确定所述一种或多种与捕获试剂结合的标记物的存在或不存在,其中所述一种或多种与捕获试剂结合的标记物的存在指示所述生物样品中所述一种或多种标记物的存在。

[0063] 如本文所用的术语“捕获试剂”特别是指可结合标记物的分子或多分子复合物。所述捕获试剂优选能够以基本上特异性的方式,优选以亲和力或 $K_a > 10^5 M^{-1}$ 或优选 $> 10^6 M^{-1}$ 结合标记物。所述捕获试剂可以任选地是天然存在的、重组的或合成的生物分子。蛋白和核酸配体(适体)非常适合作为捕获剂。整个病毒或病毒片段或合成肽也可充当优选的捕获试剂,因为它们能够结合抗体。

[0064] 如本文所用,术语“固定的”特别意味着捕获试剂可以以任何方式或任何方法连接至表面(例如,固体支持物);包括例如可逆或不可逆结合、共价或非共价附接等。

[0065] 本文所提及的被固定至固体支持物且能够结合本发明的一种或多种标记物的捕获试剂(其中所述捕获试剂在下文中也称为“根据本发明的捕获试剂”)优选地选自:包含与SEQ ID NO:1至6中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;能够感染昆虫细胞的RNA病毒,其中所述病毒任选地已被灭活;能够与SEQ ID NO:9的序列的特征性序列特异性杂交的寡核苷酸;和能够与SEQ ID NO:15的序列的特征性序列特异性杂交的寡核苷酸。

[0066] 如本文所述的术语“特异性杂交”特别涉及在严格条件下的杂交。所述杂交条件可以根据常规方案建立,所述常规方案例如描述于Sambrook,“Molecular Cloning, A Laboratory Handbook”,第2版(1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, “Current Protocols in Molecular Biology”, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989); 或Higgins和Hames(编)“Nucleic acid hybridization, a practical approach” IRL Press Oxford, Washington DC (1985)。特异性杂交条件的实例是在65°C下在4×SSC和0.1%SDS中杂交,随后在65°C下在0.1×SSC、0.1%SDS中洗涤。或者,严格杂交条件是例如在42°C下50%甲酰胺、4×SSC。

[0067] 如本文提及的术语“固体支持物”表示非流体物质,并且包括由材料诸如聚合物、

金属(顺磁性、铁磁性颗粒)、玻璃和陶瓷制成的芯片、容器和颗粒(包括微粒和珠粒);凝胶物质诸如二氧化硅、氧化铝和聚合物凝胶;毛细管,其可以由聚合物、金属、玻璃和/或陶瓷制成;沸石和其它多孔物质;电极;微量滴定板;固体条;和比色皿、管或其它光谱仪样品容器。测定的固体支持组分与测定可以与之接触的惰性固体表面的不同在于“固体支持物”在其表面上含有至少一个部分,其旨在与捕获试剂直接或间接相互作用。固体支持物可以是固定组分,诸如管、条、比色皿或微量滴定板,或者可以是非固定组分,诸如珠粒和微粒。微粒也可以用作固体支持物用于均相测定形式。可以使用允许蛋白和其它物质的非共价或共价附着的各种微粒。此类颗粒包括聚合物颗粒诸如聚苯乙烯和聚(甲基丙烯酸甲酯);金颗粒诸如金纳米颗粒和金胶体;和陶瓷颗粒诸如二氧化硅、玻璃和金属氧化物颗粒。参见例如,Martin,C.R.,等人,Analytical Chemistry-News&Features70(1998)322A-327A,其通过引用并入本文。

[0068] “芯片”是固体、无孔材料,诸如金属、玻璃或塑料。所述材料可以任选地整个或在某些区域中涂覆。在材料的表面上,存在任何点阵列,可见或在坐标中。在每个点上,可以将具有或不具有接头或间隔物的限定多肽固定至材料的表面。本文上下文中提及的所有文件都在此通过引用并入本文。

[0069] 如本文所提及的能够感染昆虫细胞的RNA病毒(下文中也称为“本发明的RNA病毒”)优选为:(-) ssRNA病毒,且任选为属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)的病毒;和/或包含蛋白的病毒,所述蛋白包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成,和/或;所述蛋白包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成;和/或,其基因组包含核酸分子的病毒,所述核酸分子编码包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白,和/或;包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白;和/或,其基因组包含RNA分子的病毒,所述RNA分子具有与核酸序列反向互补的序列,所述核酸序列与SEQ ID NO:9的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性;和/或,与核酸序列反向互补的序列,所述核酸序列与SEQ ID NO:15的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性。

[0070] 序列表的所有核苷酸序列都以5' - 3'方向输入。SEQ ID NO:9和15的序列编码具有正极性(+链)的cDNA。术语“反向互补”意味着序列与参考序列反向平行。

[0071] 根据本发明的RNA病毒优选能够在昆虫细胞系中复制至少两周或更优选至少三周。

[0072] 优选地,本发明的方法包括在生物样品中确定本发明的一种或多种标记物的存在或不存在,其中所述标记物是对于包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白特异性的抗体或;对于包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成的蛋白特异

性的抗体；且其中所述方法包括以下步骤：

[0073] a. 使生物样品与固定至固体支持物的捕获试剂接触，其中所述捕获试剂选自包含与SEQ ID NO:1至6中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列，任选地灭活的病毒，其含有包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白，和/或，包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白；其基因组包含核酸分子的病毒，所述核酸分子编码包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白，和/或，包含与SEQ ID NO:7的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白，其中所述病毒任选地已被灭活；其基因组包含RNA分子的病毒，所述RNA分子包含与核酸序列反向互补的序列，所述核酸序列与SEQ ID NO:9的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性，和/或，所述RNA分子包含与核酸序列反向互补的序列，所述核酸序列与SEQ ID NO:15的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性，其中所述病毒任选地已被灭活；

[0074] b. 将生物样品与固定的捕获试剂分离；

[0075] c. 使固定的捕获试剂-抗体复合物与结合试剂-抗体复合物的抗体的可检测试剂接触；和

[0076] d. 使用可检测试剂的检测方式测量与捕获试剂结合的抗体的水平，且其中测量步骤(d) 优选进一步包括与标准曲线比较，以测定与捕获试剂结合的抗体的水平。

[0077] 优选地，结合试剂-抗体复合物的抗体的所述可检测试剂是可检测的抗体，更优选标记的二抗。

[0078] 如本文所述的捕获试剂优选为杆状病毒表达的蛋白，且所述杆状病毒表达的蛋白优选由本文下文所述的本发明的杆状病毒表达。

[0079] 根据本发明的另一个优选方面，本发明的一种或多种标记物还可以是对于根据本发明的RNA病毒特异性的一种或多种T细胞和/或对于根据本发明的RNA病毒特异性的一种或多种B细胞和/或呈递根据本发明的一种或多种抗原的一种或多种抗原呈递细胞。所述一种或多种B细胞和/或所述一种或多种T细胞和/或所述一种或多种抗原呈递细胞的存在或不存在优选通过流式细胞术分析的方式来确定，且其中特别地，根据本发明的一种或多种荧光标记的抗原用于标记所述一种或多种B细胞和/或所述一种或多种T细胞和/或其中对于根据本发明的RNA病毒特异性的一种或多种荧光标记的抗体用于标记所述一种或多种抗原呈递细胞。

[0080] 如本文所提及的由培养的昆虫细胞中的表达系统产生的重组蛋白(在下文中也称为“本发明的重组蛋白”) 优选为PCV2 ORF2蛋白，且所述PCV2ORF2蛋白特别是与SEQ ID NO:23的序列具有至少90%、优选至少91%、更优选至少92%、还更优选至少93%、特别是至少

94%或至少95%序列相同性的蛋白。

[0081] 根据另一个优选方面,本发明的重组蛋白是流感血凝素,特别是禽流感血凝素,其中所述禽流感血凝素优选为H5N1病毒的H5蛋白,且其中所述H5N1病毒的H5蛋白更优选为包含与SEQ ID NO:24的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白。

[0082] 本发明的方法优选还包括在生物样品中确定一种或多种选自以下的分析物的存在的步骤:对于本发明的重组蛋白特异性的抗体,对于本发明的重组蛋白特异性的多肽,对于编码本发明的重组蛋白的DNA序列特异性的多肽。

[0083] 在本发明的方法的上下文中,免疫原性组合物优选为如下所述的免疫原性组合物。

[0084] 如本文所用的术语“生物样品”是指取自个体(例如取自猪或鸟)的任何样品,并且包括但不限于含细胞的体液、外周血液、血浆或血清、唾液、组织匀浆、肺和其它器官抽吸物,以及灌洗和灌肠溶液以及可获得自人或动物受试者的任何其它来源。对于动物,“生物样品”的实例包括血液、细胞、粪便、腹泻物、乳、粘液、痰、脓液、唾液、精液、汗液、泪液、尿液、眼泪、眼液、阴道分泌物和呕吐物,如果存在于该动物中。

[0085] 如本文所提及的生物样品优选分离自哺乳动物或鸟类,优选猪或鸡(家养原鸡(*Gallus gallus domesticus*)),和/或特别选自全血、血浆、血清、尿液和口腔液。本文中,术语“血清”意在等同于“血液血清”。

[0086] 如本文所用的术语“口腔液”特别是指单独或组合地在口腔中发现的一种或多种流体。这些包括但不限于唾液和粘膜渗出物。特别理解的是,口腔液可以包含来自多个来源(例如腮腺、下颌下、舌下、附属腺、牙龈粘膜和颊粘膜)的流体的组合,且术语“口腔液”包括单独或组合地来自这些来源中每一种的流体。术语“唾液”是指诸如通常在口中(特别是在咀嚼之后)发现的口腔液的组合。如本文所用的术语“粘膜渗出液”是指由血清组分从口腔粘膜间质被动扩散至口腔中而产生的流体。粘膜渗出液通常形成唾液的一种组分。

[0087] 如本文所述的固定的捕获试剂优选包被在微量滴定板上,特别是能够通过ELISA读数器读出的微量滴定板。

[0088] 根据另一个方面,本发明提供重组杆状病毒,其中所述杆状病毒包含DNA序列,所述DNA序列编码包含与SEQ ID NO:1至6中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白,和/或,包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;和/或,其中所述杆状病毒包含DNA序列,所述DNA序列包含与SEQ ID NO:9至14中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列,和/或,与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的序列或由其组成。

[0089] 本发明还提供载体,特别是转移载体,其含有DNA序列,所述DNA序列编码包含与SEQ ID NO:1至6中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白,和/或,包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至

少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;和/或,其含有与SEQ ID NO:9至14中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的DNA序列,和/或,与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的DNA序列。

[0090] 本发明的上下文中的转移载体优选为“杆状病毒转移载体”。

[0091] 术语“转移载体”是本领域公认的,并且是指已连接第二核酸的第一核酸分子,并且包括例如质粒、粘粒或噬菌体。

[0092] 在某些实施方案中,转移载体可以是“表达载体”,其是指用于表达编码所需蛋白的DNA的可复制DNA构建体,且其包括转录单位,其包含以下的组装体:(i)在基因表达中具有调节作用的遗传元件,例如启动子、操纵子或增强子,可操作连接至(ii)转录成mRNA并翻译成蛋白的编码所需蛋白的DNA序列,和(iii)适当的转录和翻译起始和终止序列。启动子和其它调控元件的选择通常根据预期的宿主细胞而变化。通常,用于重组DNA技术中的表达载体通常是“质粒”的形式,其是指环状双链DNA环,其以其载体形式不与染色体结合。本发明旨在包括此类其它形式的表达载体,其发挥等效的功能,并且在本领域中随后变得已知。

[0093] 某些转移载体可以含有用于控制转录或翻译的调节元件,其通常可衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因。也可以额外并入通常由复制起点赋予的宿主中复制的能力以及促进转化体识别的选择基因。

[0094] 可以在本发明的某些实施方案中采用衍生自病毒的转移载体,其可以称为“病毒载体”。一些实例包括杆状病毒、逆转录病毒、腺病毒等。病毒载体,特别是杆状病毒载体,例如杆状病毒转移载体,是根据本发明特别优选的。对于表达载体,病毒载体可以包括调节元件。

[0095] 任何转移载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择和/或期望表达的蛋白的类型等因素。此外,还可以考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由载体编码的任何其它蛋白、诸如抗生素标记物(例如氨苄青霉素)的表达。

[0096] 在另一个方面,本发明提供了免疫原性组合物,其在下文也称为“本发明的免疫原性组合物”,其中所述组合物包含由培养的昆虫细胞中的杆状病毒表达系统产生的重组蛋白;和来自根据本发明的RNA病毒的一种或多种抗原,其中所述病毒优选地已被灭活;且其中所述重组蛋白优选地选自PCV2 ORF2蛋白,其优选地包含与SEQ ID NO:23的序列具有至少90%、优选至少91%、更优选至少92%、还更优选至少93%或特别是至少94%或至少95%序列相同性的序列或由其组成;和流感血凝素,特别是禽流感血凝素,优选H5N1病毒的H5蛋白,更优选包含与SEQ ID NO:24的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;和包含与SEQ ID NO:1至8中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白。

[0097] 如本文所用的术语“灭活”意味着抗原当施用于哺乳动物宿主时不引起疾病或不在宿主细胞中复制。

[0098] 灭活的各种物理和化学方法是本领域已知的。术语“灭活”是指先前有毒或无毒的病毒已经被照射(紫外线(UV)、X-射线、电子束或 γ 辐射)、加热或化学处理以灭活、杀死,同

时保留其免疫原性。在一个实施方案中,本文公开的灭活病毒通过用灭活剂处理而灭活。合适的灭活剂包括 β -丙内酯、二元或 β -或乙酰乙亚胺、戊二醛、臭氧和福尔马林(甲醛)。

[0099] 对于用福尔马林或甲醛灭活,甲醛通常与水和甲醇混合以产生福尔马林。添加甲醇防止活化过程期间的降解或交叉反应。

[0100] 更具体地,术语“灭活”意味着病毒在体内或体外不能复制。例如,术语“灭活”可以是指体外已经繁殖的病毒,例如,然后使用化学或物理方式灭活,使得其不再能够复制的病毒。

[0101] 优选地,已经灭活的根据本发明的病毒是用二元乙亚胺(BEI)灭活的病毒。

[0102] 本发明还提供了产生本发明的免疫原性组合物的方法,其包括以下步骤:将编码所述重组蛋白的重组杆状病毒引入昆虫细胞中,其中所述昆虫细胞用能够感染昆虫细胞的所述RNA病毒感染,培养携带所述重组杆状病毒和所述RNA病毒的所述昆虫细胞;且回收所述重组蛋白和所述病毒,优选在上清液中回收;且优选还包括将编码所述重组蛋白的DNA序列插入能够将所述序列引入杆状病毒基因组的转移载体中、从而产生重组杆状病毒的初始步骤。

[0103] 根据另一个方面,本发明提供了用于确定个体是否已经接受包含在培养的昆虫细胞中由杆状病毒表达系统产生的重组蛋白的免疫原性组合物的试剂盒,特别是测试试剂盒,其中所述试剂盒含有固定至固体支持物的一种或多种捕获试剂,其中所述一种或多种固定的捕获试剂能够结合一种或多种标记物,其选自对于根据本发明的一种或多种抗原特异性的抗体;来自根据本发明的RNA病毒的一种或多种抗原;和根据本发明的一种或多种核酸分子;且其中所述一种或多种捕获试剂优选地选自包含与SEQ ID NO:1至6中任一者的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;包含与SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、还更优选至少95%或特别是100%序列相同性的氨基酸序列或由其组成的蛋白;能够感染昆虫细胞的RNA病毒,其中所述病毒已任选地被灭活,能够与SEQ ID NO:9的序列的特征性序列特异性杂交的寡核苷酸;和能够与SEQ ID NO:15的序列的特征性序列特异性杂交的寡核苷酸。

[0104] 此外,本发明提供了引物或引物对,其分别选自与SEQ ID NO:17至22中任一者的序列具有至少90%或优选至少95%序列相同性的序列。

[0105] 根据另一个方面,本发明的捕获试剂包含能够感染昆虫细胞的RNA病毒的病毒颗粒和/或病毒样颗粒或由其组成,其中所述能够感染昆虫细胞的RNA病毒优选为根据本发明的RNA病毒,其中所述捕获试剂可通过包括以下步骤的方法获得:

[0106] i) 从用RNA病毒、优选本发明的RNA病毒感染的昆虫细胞的培养物获得上清液,其中所述上清液包含RNA病毒的病毒颗粒和/或病毒样颗粒,且其中所述昆虫细胞优选未感染杆状病毒和/或优选未用质粒转染,

[0107] ii) 经由包括通过至少一个过滤器、优选两个过滤器的微过滤的分离步骤从所述病毒颗粒和/或病毒样颗粒分离细胞碎片,其中至少一个过滤器优选具有比所述病毒颗粒和/或病毒样颗粒更大的孔径,特别是具有约0.1 μ m至约4 μ m、优选约0.2 μ m至约2 μ m的孔径,和收集滤液,

[0108] iii) 和任选地使含有所述病毒颗粒和/或病毒样颗粒的ii)的滤液进行大小排阻

色谱法,其中优选地通过测量洗脱液在260nm或280nm处的吸光度(A260或A280)来测量洗脱液中的蛋白的存在,且其中收集表现出第一A260或A280峰的洗脱液。

[0109] 此外,本发明提供了包含所述捕获试剂的组合物,其中所述组合物可通过所述方法获得。

[0110] 在本文所述的大小排阻色谱(SEC)步骤中,在填充有惰性多孔介质、特别是惰性凝胶介质(其优选为球形珠粒形式的交联的多糖(例如,交联的琼脂糖和葡聚糖)的复合物)的床中根据大小分离分子。膨胀凝胶珠粒中大于最大孔的分子不进入凝胶珠粒,因此最快速地通过色谱床移动。根据其大小和形状在不同程度上进入凝胶珠粒的较小分子在其通过床中被延迟。因此,分子通常以分子大小渐降的顺序洗脱。包含适用于本文所述的大小排阻色谱的介质的SEC柱优选在HiPrep 26/60Sephacryl S300HR柱(GE Healthcare Bio-Sciences)中。

[0111] 特别理解的是,表现出第一A260或A280峰的洗脱物是包含ii)的滤液中包括的最大蛋白结构的ii)的滤液的级分。因此,表现出第一A260或A280峰的洗脱物是洗脱物或其部分,其含有ii)的滤液中包括的大部分病毒颗粒和/或病毒样颗粒。

实施例

[0112] 以下实施例仅意欲说明本发明。它们不应以任何方式限制权利要求的范围。

[0113] 实施例1:

[0114] 用弹状病毒感染Sf细胞、产生半纯化的弹状病毒以及克隆和表达弹状病毒抗原

[0115] 为了确认用弹状病毒(下文也称为SfRV或SFRV(Sf细胞弹状病毒))感染SF+和Sf9细胞,设计引物以扩增SFRV G和N基因,其目的是插入独特的5'和3'限制性位点。此外,设计3'末端引物以添加烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶切割位点,随后为6X组氨酸标签。这样做以使得能够使用His标签在镍柱上纯化表达的蛋白,然后使用TEV蛋白酶切割掉His标签以生成天然的G或N蛋白。

[0116] 用于G基因构建体(包含SEQ ID NO:1的序列)的引物的序列是SEQ ID NO:17和18中所示的序列,G基因构建体的核酸序列提供于SEQ ID NO:12中,且G基因构建体的氨基酸序列是SEQ ID NO:4的序列。

[0117] 用于N基因构建体(包含SEQ ID NO:7的序列)的引物的序列是SEQ ID NO:21和22中所示的序列,N基因构建体的核酸序列提供于SEQ ID NO:16中,且N基因构建体的氨基酸序列是SEQ ID NO:8的序列。

[0118] 此外,使用K.Hofmann&W.Stoffel(1993)TMbase-A database of membrane spanning proteins segments,Biol.Chem.Hoppe-Seyler 374,166中描述的TMpred(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)、使用Möller S1,Croning MD,Apweiler R.,Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions,Bioinformatics(2001)17(7):646-653中描述的隐马尔可夫模型的TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和SOSUI(<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>)预测SFRV G糖蛋白的跨膜和细胞内结构域。基于TMpred和TMHMM的结果,SFRV G序列在氨基酸550处终止,并添加TEV切割位点、6X His标签和Pst I位点。可用于此类G基因构建体(包含SEQ ID NO:2的序列)的引物的序列是SEQ ID NO:17和19中所示的

序列,G基因构建体的核酸序列提供于SEQ ID NO:13中,且G基因构建体的氨基酸序列是SEQ ID NO:5的序列。

[0119] 此外,将蜜蜂蜂毒肽分泌信号的序列与截短的SFRV G序列的序列融合(Chouljenko等人.J Virol,84:8596-8606 (2010);Tessier等人.Gene.98:177-83 (1991)),其中将蜂毒肽序列通过替换其N端而添加至具有TEV切割和6X his的全长SFRV G。可用于此类G基因构建体(包含SEQ ID NO:3的序列)的引物的序列是SEQ ID NO:20和18中所示的序列,G基因构建体的核酸序列提供于SEQ ID NO:14中,且G基因构建体的氨基酸序列是SEQ ID NO:6的序列。

[0120] 使用GenBank(登录号KF947078)中储存的根据MA等人(J Virol.88:6576-6585 (2014))的SFRV的全基因组序列作为引物设计的基础。类似地,对于TEV切割位点,基于可得的信息使用序列ENLYFQG。

[0121] 从Sf9(贴壁细胞)和Sf+(悬浮细胞)的生长中使用的已用的培养基纯化SFRV:从SFRV感染和常规繁殖的Sf9和Sf+细胞收集消耗培养基,并将其过滤通过0.2微米过滤器以消除细胞碎片。然后将滤液装载至NaCl-Tris HCl-EDTA(NTE)缓冲液(pH 7.4)中的30%蔗糖垫上,并在4°C下以32,000rpm超速离心3小时。小心吸出上清液,并将沉淀物在NTE缓冲液中再水合和重悬浮。在nanodrop机器上测量总蛋白含量,并将等分试样分配批号,并在≤-70°C下冷冻,直至进一步使用。该抗原制备物含有用于包被ELISA平板的半纯化病毒,如下所述。

[0122] 将消耗的SF9培养基用作SFRV病毒RNA提取的来源。根据制造商的说明使用QIAamp病毒RNA提取试剂盒(Qiagen)。

[0123] 为了扩增G和N基因,根据制造商的说明使用One-Step Superscript III试剂盒。用以下条件使用梯度RT-PCR:1个循环的在60°C下30分钟(RT步骤),随后1个循环的在94°C下2分钟。其随后为40个循环的在94°C下15秒,退火梯度75°C-50°C60秒,随后在68°C下延伸2分钟。最后,反应经受在68°C下5分钟的单个周期,并且在4°C下一直保持。

[0124] 在凝胶上运行扩增的产物以验证大小。将预期大小的凝胶条带从凝胶切出,并使用Qiaquick凝胶提取试剂盒使用制造商的说明纯化(图1)。

[0125] 在下文中,仅描述使用G基因(包含SEQ ID NO:1的序列)的进一步工作。

[0126] 如前所述切出具有~1.6Kb的预期大小的扩增的G基因(图1中的上部条带)并将其凝胶提取。这然后用Eco RI和Pst I限制性酶切割。切割的产物是插入物。类似地,用Eco RI和Pst I限制性酶切割杆状病毒转移载体质粒pVL1393(Pharmingen)以生成载体。在凝胶上运行切割的插入物和载体(参见图2)以检查载体的线性化。将条带切出并凝胶提取,并将载体去磷酸化。将插入物(Eco RI-PstI切割的SFRV-G构建体)克隆入载体(Eco RI-PstI切割的pVL1393,去磷酸化的)并使用标准程序连接。

[0127] 使用连接的产物转化大肠杆菌细胞(来自Invitrogen的One Shot Max效力DH5α化学感受态细胞),并将细胞铺板在具有氨苄青霉素的LB琼脂上。第二天挑取菌落,并使用菌落PCR筛选质粒的摄取并分配克隆数。

[0128] 菌落PCR的反应条件如下:一个循环的在98°C下3分钟,随后34个循环的在98°C下变性30秒,在58°C下退火30秒,和在72°C下延伸2分钟。该步骤随后为在72°C下10分钟的最终延伸步骤,且最终保持在4°C。

[0129] 在琼脂糖凝胶上运行PCR产物以鉴定含有质粒的克隆(参见图3)。

[0130] 然后使阳性克隆在LB-氨苄青霉素液体培养基上生长,并使用Qiaprep miniprep质粒纯化试剂盒(Qiagen)使用制造商的说明从培养物纯化质粒。因此生成的转移载体含有SFRV G基因构建体,并且等分,分配批号。

[0131] 为了生成表达SFRV G基因构建体的重组杆状病毒,使用ESCORT转染试剂(SAFC)将转移质粒与线性化的flashBAC ULTRAbaculovirus骨架DNA(Genway biotech)一起共转染至Sf9细胞中。一周后,将来自转染(p0)的上清液接种至新鲜的Sf9细胞上,以扩增可能已生成的任何重组杆状病毒。

[0132] 收集来自转染的细胞沉淀物,并在SDS凝胶上运行,并转移至硝酸纤维素膜上用于Western印迹。用抗His抗体(Invitrogen)探测蛋白。预测的蛋白大小为~71.5KDa。凝胶显示(图4)对于测试的所有五个克隆(2、5、7、10和11)的等于和高于62KDa标记物的两个接近条带,但在细胞对照泳道(cc)中没有条带。

[0133] 将重组病毒的克隆2和5进一步传代并在旋转烧瓶中生长以在Sf+悬浮培养物中大规模产生蛋白。针对该蛋白探测上清液、可溶性和不溶性细胞级分。此时,蛋白仅存在于不溶性部分中(图5)。作为结果,生成SFRV G糖蛋白的C-端截短,作为用于ELISA测定中的下一步骤。

[0134] 实施例2:

[0135] ELISA开发

[0136] 开发ELISA以评估在用SFVV感染的Sf细胞中表达的PCV2或其它亚单位疫苗杆状病毒疫苗接种的动物中存在针对SFRV的抗体应答。简言之,ELISA平板用250ng/孔的来自Sf9或Sf+细胞上清液的半纯化的SFRV抗原(如上所述)包被。

[0137] • 通过将抗原在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液pH 9.0中稀释以得到250ng/孔的最终浓度来进行包被。包被在4°C下进行过夜。

[0138] • 第二天用PBS-Tween (PBST) 洗涤平板,并在室温下用10%乳封闭1小时。

[0139] • 然后用1:100稀释的来自动物的血清(在封闭缓冲液中)探测平板,所述动物用PCV2亚单位抗原、SFRV感染的Sf细胞中表达的杆状病毒或未疫苗接种的对照接种(参见数据部分)。

[0140] • 将平板在37°C下孵育1小时,然后用PBST洗涤5次,以去除未结合的抗体。

[0141] • 然后将平板用1:10,000稀释的二抗(山羊抗猪IgG H+L-HRP缀合物-Bethyl laboratories)探测,在37°C下孵育1小时,然后用PBST洗涤5次以去除未结合的抗体。

[0142] • 最终,添加SureBlue TMB底物(KPL),并将平板在室温下孵育5分钟,然后用TMB终止溶液(KPL)终止。

[0143] • 然后在450nm读取平板。

[0144] ELISA平板设置为:

[0145] • 行a、孔1-10用Sf9衍生的SFRV包被

[0146] • 行b、孔1-10用Sf+衍生的SFRV包被

[0147] • 一式两份评估猪血清,并且用PCV2(A,B)亚单位抗原疫苗接种的动物以粗体显示。如果动物已经通过接种遇到SFRV且生成针对SFRV的抗体,则这些应当显示阳性读出值。

[0148] • 阴性对照以斜体显示(C和D)

[0149] • 列9和10是缓冲液对照(无一抗)

[0150] ELISA的结果显示于表1中。

[0151] 表1:

	A		B		C		D			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0152] 行 a	0,774	0,626	0,217	0,215	0,058	0,098	0,095	0,091	0,044	0,039
行 b	1,857	0,909	1,556	1,028	0,993	0,554	0,104	0,103	0,041	0,033

[0153] 表1显示评估衍生自Sf9细胞(行A)和Sf+细胞(行B)的SfRV抗原的数据。一式两份评估四份血清样品。列A和B含有来自用实验疫苗疫苗接种的动物的第28天血清,而列C和D含有来自阴性对照动物的血清。结果表明,Sf9和Sf+细胞两者均含有SfRV,并且可用作病毒抗原。此外,疫苗接种的动物、但非对照动物中的抗原的特异性识别指出SfRV作为固有依从性标记物的有用性。

[0154] 数据解释:

[0155] • 基于ELISA读出值,用PCV2亚单位抗原(组A和B)疫苗接种的动物显示针对半纯化的SFRV的良好反应。

[0156] • 阴性对照动物(组C和D)没有显示对半纯化的SFRV的反应。

[0157] • 结果表明SFRV用于固有依从性标记和DIVA方法的有用性。

[0158] 实施例3:

[0159] 使用上述SFRV抗原(其中抗原是包含SEQ ID NO:1至6中任一者的序列的蛋白,或其中抗原是根据本发明的纯化或半纯化病毒)的ELISA:

[0160] SCOPE:对于针对SFRV抗原的抗体的存在的测试血清(或口腔液)样品

[0161] 材料和方法

[0162] A. 设备

[0163] • ELISA洗板机

[0164] • ELISA阅读器

[0165] • 用于细胞培养的WFI,USP(Gibco,目录号A12873-02)

[0166] • 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH9.6)片剂(Sigma,目录号C3041-100CAP)

[0167] • 96孔免疫平板(圆底或平底平板,Nunc Maxisorb)

[0168] • 12通道移液器,范围为1 μ L至1mL的各种移液器

[0169] • 移液尖端

[0170] • 37 $^{\circ}$ C孵育箱

[0171] • 4 $^{\circ}$ C冰箱

[0172] • 旋涡仪

[0173] • 平板盖(Thermo,目录号AB-0752)

[0174] • S型块2mL稀释块(Phenix目录号M-1810S,或等效物)

[0175] • 试剂储库

[0176] • 计时器

[0177] B. 试剂

[0178] 1. 包被缓冲液:碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液

- [0179] ■ 100mL WFI
- [0180] ■ 1个胶囊的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液
- [0181] ■ 打开胶囊,将粉末分配至WFI中,混合直至溶解
- [0182] ■ 使用0.2 μ m过滤器过滤灭菌溶液
- [0183] ■ 储存在4 $^{\circ}$ C
- [0184] ■ 到期时间:1周
- [0185] ■ 每个测定需要(4个平板):50mL
- [0186] 2.10X PBS:
- [0187] ■ 包PBS浓缩物,Fisher BP665-1
- [0188] ■ 用GenPur H₂O(或等效物)调整至1L
- [0189] ■ 在室温下储存
- [0190] ■ 到期时间:1年
- [0191] 3.洗涤缓冲溶液:0.05%Tween 20/Dulbeccos PBS。
- [0192] ■ 0.5mL的Tween 20,Fisher BP337或等效物
- [0193] ■ 100mL 10X D-PBS,pH 7.2-7.4
- [0194] ■ 用GenPur H₂O(或等效物)调整至1L
- [0195] ■ pH至7.2 \pm 0.1
- [0196] ■ 在室温下储存
- [0197] ■ 到期时间:6个月
- [0198] ■ 每个测定需要(4个平板):2升
- [0199] 4.PBST:
- [0200] ■ 500mL 1X PBS pH 7.4(Gibco,目录号10010-023)
- [0201] ■ 0.3mL tween 20,Fisher BP337,或等效物
- [0202] ■ 在室温下储存
- [0203] ■ 到期时间:6个月
- [0204] ■ 每个测定需要(4个平板):100mL
- [0205] 5.封闭溶液:10%脱脂奶粉/PBST溶液。
- [0206] ■ 20g印迹级封闭物,Bio-Rad 170-6404,或等效物
- [0207] ■ 200mL PBST
- [0208] ■ 储存在4 $^{\circ}$ C
- [0209] ■ 到期时间:0天
- [0210] ■ 每个测定需要(4个平板):200mL
- [0211] 6.SFRV抗原:
- [0212] ■ 将未感染的SF或SF+细胞培养上清液过滤通过0.2微米过滤器
- [0213] (Thermo cat 456-0020)。在本上下文中,“未感染的SF或SF+细胞培养上清液”意指培养物中SF或SF+细胞的上清液,其中所述细胞未被杆状病毒感染,但被SFRV感染。
- [0214] 此外,在本公开中描述的细胞的上下文中,分别地,术语“SF”等同于术语“Sf”,术语“SF+”等同于术语“Sf+”,且术语“SF9”等同于术语“Sf9”。
- [0215] ■ 将滤液装载在30%蔗糖垫上,并以28,000-34,000rpm在4 $^{\circ}$ C下离心2-4小时

- [0216] ■离心后,小心吸出上清液,并将沉淀物悬浮于NaCl-Tris-EDTA缓冲液pH 7.4中
- [0217] ■这是半纯化的抗原
- [0218] ■通过分光光度法估计蛋白浓度,并将蛋白等分并冷冻在-70℃,直至使用。
- [0219] 7.2°抗体:山羊抗猪IgG h+1 HRP缀合的。Bethyl Labs目录号A100-105P,储存在4℃±3.0℃。
- [0220] 8.底物:SureBlue TMB 1-组分微孔过氧化物酶底物。
- [0221] Kirkgaard and Perry Laboratories目录号52-00-01或等效物。将底物储存在4℃±3.0℃,在25℃±2.0℃预孵育,并在25℃±3.0℃下使用。
- [0222] 9.终止溶液:TMB终止溶液。Kirkgaard and Perry Laboratories目录号50-85-04或等效物。储存在室温下。
- [0223] C.程序
- [0224] 1.使用上述B1中列出的配方制备包被缓冲液。
- [0225] 2.将SFRV抗原在包被缓冲液中稀释至250ng/孔。通过将抗原倒置10次来混合。用250ng/100μl(即2.5μg/ml=250ng/孔)包被。
- [0226] 3.将100μL稀释的SFRV抗原添加至所有孔,
- [0227] 4.用平板盖密封测试板,并在4℃下孵育过夜,置于冰箱的底部上,以使干扰最小化。
- [0228] 第二天
- [0229] 5.制备足够的封闭溶液仅用于当前测定。为4个平板推荐200mL块。储存在4℃温度,直至需要。
- [0230] 6.用洗涤缓冲液使用ultrawash加微量滴定板洗板机或等效物将测试板洗涤5次。
- [0231] 7.向测试板的所有孔中添加100μL封闭溶液。覆盖测试板,并在37℃±2.0℃下孵育1.0小时。
- [0232] 8.在封闭孵育期间,将s型块中的块中1:100稀释测试血清样品。对于口腔液,在块中1:2稀释样品。单独测试每个样品。以同样的方式稀释阳性和阴性对照。
- [0233] 9.将测试板洗涤1次。最后一次洗涤后,将平板轻拍至纸巾上。
- [0234] 10.将每孔100μL预稀释的测试样品添加至相应的平板。避免与移液管的尖端的充分接触。在每个测试样品之间改变尖端。
- [0235] 对于血清样品,覆盖测试板,并在37℃±2.0℃下孵育1.0小时。对于口腔液,将样品在4℃±2.0℃下孵育16.0小时。
- [0236] 11.临洗涤测试板之前,从冰箱取出二抗小瓶,并在块中稀释至1:10,000。推荐进行连续稀释以达到1:10,000稀释度(4次稀释)。通过倒置10次来混合稀释的抗体。
- [0237] 12.将测试板洗涤5次。
- [0238] 13.将100μL稀释的检测抗体添加至测试板的所有孔中。覆盖测试板,并在37℃±2.0℃下孵育1.0小时。
- [0239] 14.立即从冰箱(4℃±3℃)移取SureBlue TMB 1-组分微孔过氧化物酶底物,并将适当体积转移至棕色或不透明的高密度聚乙烯(HDPE)容器,并在25℃±2.0℃下孵育1小时±15分钟(台式)。
- [0240] 15.将测试板洗涤5次。最后一次洗涤后,将平板轻拍至纸巾上。推荐在洗板的同时

打开读板器。

[0241] 16. 将100 μ L底物添加至测试板的所有孔中。

[0242] 17. 在25 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C下孵育5分钟。

[0243] 18. 通过向所有孔中添加100 μ L终止溶液来终止反应

[0244] 19. 测量450nm处的吸光度。

[0245] D. 接受标准/结果

[0246] ■ 阳性对照: 来自用SFRV/SRFV G糖蛋白超免疫的猪的血清 (或分别为口腔液)

[0247] ■ 来自显示可忽略至没有对SFRV抗原的反应的未疫苗接种的猪的未处理猪血清 (或分别为口腔液) 或血清 (或分别为口腔液)

[0248] 实施例4:

[0249] 半纯化的弹状病毒的生产、大小排阻色谱 (SEC)、实时PCR、SEC级分的电子显微镜和ELISA

[0250] 半纯化的弹状病毒的生产:

[0251] 在装载至柱上前, 产生半纯化的弹状病毒, 其中将使用中空纤维过滤从5升浓缩至800mL的SfRV感染的Sf+昆虫细胞的细胞培养上清液 (40mL) 过滤通过1.2 μ m注射器过滤器。所得滤液是根据本实施例的“半纯化的弹状病毒”。

[0252] 大小排阻色谱法 (SEC):

[0253] 在具有HiPrep 26/60Sephacryl S300HR柱 (GE Healthcare Bio-Sciences) 的AKTA Explorer上使用等度条件以1mL/min的流速运行大小排阻色谱法。将柱用1.5个柱体积的缓冲液 (1X磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4, Gibco) 平衡, 随后注射根据 (i) 产生的半纯化的弹状病毒的澄清样品 (约5%柱体积)。经1.5个柱体积的缓冲液以1.0mL/min的流速进行分离, 并且通过整个分离步骤依注射时间收集级分 (8mL)。在280nm处用UV吸收监测来自柱的蛋白的洗脱 (图6)。

[0254] 使用TCA/丙酮沉淀浓缩峰级分后, 通过4-12% SDS-PAGE (Thermo Fisher) 分析级分。简言之, 将1mL各级分用TCA (200 μ L) 在冰上沉淀1小时。将样品以20,000xg离心2分钟, 并移取上清液。将级分用500 μ L冰冷的丙酮洗涤, 并通过涡旋混合, 随后以20,000xg离心2分钟。重复离心和丙酮步骤, 总共三次丙酮洗涤。将沉淀物干燥20分钟, 悬浮于20 μ L凝胶装载缓冲液中, 并装载至凝胶上。将凝胶用Imperial蛋白染料 (Thermo Fisher) 染色1小时, 并用去离子水脱色至少3小时。凝胶分析后, 使用牛血清白蛋白作为标准品, 通过BCA测定 (Thermo Fisher) 测定级分的蛋白浓度。

[0255] 实时PCR

[0256] (i) 的半纯化的弹状病毒 (滤液) 和 (ii) 的SEC收集的级分中的SfRV RNA的存在通过使用以下实时PCR的方法和序列进行检测/定量:

[0257] 引物/探针/G-块对照:

名称	序列	基因组位置*
Rhab_qPCR-F	SEQ ID NO:25	5584-5603

[0258]

[0259]	Rhab_qPCR-R	SEQ ID NO:26	5654-5672 (RC)
	Rhab_qPCR-PR (FAM)	SEQ ID NO:27	5624-5646 (RC)
	Rhab_gBlock	SEQ ID NO:28	5565-5690

[0260] *基于GenBank参照菌株的基因组位置:KF947078。所有序列都靶向编码SfRV糖蛋白的区域

[0261] 循环条件:

[0262] 1个循环,在50°C下10分钟

[0263] 1个循环,在95°C下3分钟

[0264] 40个循环,在95°C下15秒

[0265] 57°C下15秒,**Data collection (FAM)

[0266] 进行的步骤的简述:

[0267] 使用BioRad iTaq Universal Probes One-Step试剂盒(目录号172-5141)根据建议的制造商建议的方案进行扩增。在25 μ l反应中添加引物至0.4 μ M的最终浓度,同时添加探针至0.16 μ M的最终浓度。在每次运行中,标准曲线组成对应于预期扩增子的合成双链g-块(IDT)序列。反应使用CFX96实时PCR检测系统(BioRad)在以下条件下进行:在50°C下初始逆转录10分钟,随后在95°C下初始变性3分钟,随后40个循环的在95°C下变性15秒和在57°C下退火和延伸15秒,其中在FAM通道中收集数据。使用CFX Manager软件(版本2.1,BioRad)分析光学数据。运行基于以下被视为有效:标准曲线的一致性,r平方值超过0.99,且计算的效率在80-120%之间。对于每次确定,使用循环阈值(Ct)确定模式的回归设置自动计算阈值线。使用基线减去模式自动进行基线减去。

[0268] 实时PCR的结果显示于图7中。

[0269] 在图7中:

[0270] 列1表示孔数。列2显示该实时PCR中使用的与特异性探针连接的荧光团6-羧基荧光素(FAM)。列3表示衍生自大小排阻色谱的SfRV抗原的级分(级分A11、A12、B1、B5、B12和C6)或具有已知量的用于生成标准曲线的SfRV特异性核酸的标准品(孔7-14)。孔15充当阴性对照(无模板),且孔16充当含有通过大小分级分离(SEC)前的浓缩的SfRV抗原的阳性对照。

[0271] 定量循环(Cq)是检测荧光的循环。较低的Cq值表示样品中特定靶标的较高拷贝数。该数据显示于列4中。外推的基因组拷贝数作为序列定量(SQ)显示于列5中,并显示每mL的基因组拷贝数。

[0272] 数据显示起始材料具有6个对数的SfRV特异性基因组拷贝/mL(孔16),类似地,级分A11和A12具有6个对数的基因组拷贝/mL。这两个级分连同尾端级分B1应当含有大多数SfRV病毒颗粒/病毒粒子和病毒样颗粒(VLP)。其它级分B5、B12和C6应当含有SEC中的亚病毒颗粒,因此含有少量的病毒RNA(如果有的话)。

[0273] 电子显微镜:

[0274] (i)的SEC收集的级分用2.5%磷钨酸(PTA)染色3分钟(阴性染色)用于电子显微镜。在级分A11和A12(参考图6)中,观察到~30-35nm的颗粒,其被认为是SfRV的病毒颗粒。

[0275] ELISA:

[0276] 如实施例2中所述进行ELISA,其中使用实施例3下所述的材料和方法,差异在于,代替“SFRV抗原”(在实施例3的点B.6下),使用(i)的半纯化的弹状病毒(滤液)和(ii)的SEC收集的级分A11、A12和B1,各自在包被缓冲液中稀释至100 μ l中的250ng的浓度,然后将100 μ l的所述抗原各自包被在孔上。

[0277] 作为测试血清样品,使用来自用实验疫苗免疫的动物的血清,所述疫苗包含由培养的SfRV感染的昆虫细胞中的杆状病毒表达系统产生的重组蛋白。血清获得自血液,所述血液在施用实验疫苗后28天取自动物。

[0278] 作为阴性对照,分别使用相应的未免疫动物的血液血清。

[0279] ELISA的结果显示于图8中。

[0280] 用四种不同的抗原(包括半纯化的SfRV(小图A)、大小排阻级分A11(小图B)、A12(小图C)和B1(小图D))包被ELISA平板。用来自阴性对照动物的血清(倒三角形)或来自施用含有SfRV的实验疫苗的第28天血清(圆形)探测平板。

[0281] 结果显示来自疫苗接种的动物的血清与包被的抗原反应,而阴性对照血清具有最小反应。此外,疫苗接种的动物与包被有级分A11、A12和B1的孔强烈反应(小图B、C和D),如通过增加的OD值所证明,并且与半纯化的SfRV相比,反应与这些级分更紧密地成簇(小图A)。这表明对包被的抗原(级分A11、A12和B1)的更强烈的识别和更特异性的响应。

[0282] 在序列表中:

[0283] SEQ ID NO:1对应于SFRV G蛋白的序列,

[0284] SEQ ID NO:2对应于截短的SFRV G蛋白的序列,

[0285] SEQ ID NO:3对应于具有N-端蜂毒肽序列的截短的SFRV G蛋白的序列,

[0286] SEQ ID NO:4对应于具有修饰(包括6x His标签)的SEQ ID NO:1,

[0287] SEQ ID NO:5对应于具有修饰(包括6x His标签)的SEQ ID NO:2,

[0288] SEQ ID NO:6对应于具有修饰(包括6x His标签)的SEQ ID NO:3,

[0289] SEQ ID NO:7对应于SFRV N蛋白的序列,

[0290] SEQ ID NO:8对应于具有修饰(包括6x His标签)的SEQ ID NO:7,

[0291] SEQ ID NO:9对应于编码SEQ ID NO:1的序列,

[0292] SEQ ID NO:10对应于编码SEQ ID NO:2的序列,

[0293] SEQ ID NO:11对应于编码SEQ ID NO:3的序列,

[0294] SEQ ID NO:12对应于编码SEQ ID NO:4的序列,

[0295] SEQ ID NO:13对应于编码SEQ ID NO:5的序列,

[0296] SEQ ID NO:14对应于编码SEQ ID NO:6的序列,

[0297] SEQ ID NO:15对应于编码SEQ ID NO:7的序列,

[0298] SEQ ID NO:16对应于编码SEQ ID NO:8的序列,

[0299] SEQ ID NO:17对应于构建体SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的正向引物,

[0300] SEQ ID NO:18对应于构建体SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的反向引物,

[0301] SEQ ID NO:19对应于构建体SEQ ID NO:13的反向引物,

[0302] SEQ ID NO:20对应于构建体SEQ ID NO:14的正向引物,

[0303] SEQ ID NO:21对应于构建体SEQ ID NO:16的正向引物,

[0304] SEQ ID NO:22对应于构建体SEQ ID NO:16的反向引物,

- [0305] SEQ ID NO:23对应于PCV2 ORF2蛋白的序列，
- [0306] SEQ ID NO:24对应于血凝素H5蛋白(流感病毒)的序列。

序列表

<110> 勃林格殷格翰动物保健美国有限公司

<120> 标记系统，特别是用于杆状病毒表达的亚单位抗原的标记系统

<130> P10-0168

<160> 28

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 610

[0001] <212> PRT

<213> SFRV

<400> 1

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr

 20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr

 35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys

50

55

60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr

65

70

75

80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu

85

90

95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn

100

105

110

[0002]

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile

115

120

125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu

130

135

140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr

145

150

155

160

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys

165

170

175

Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg

180

185

190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg

195

200

205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys

210

215

220

[0003]

Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe

225

230

235

240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu

245

250

255

Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile

260

265

270

Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala

275

280

285

Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu

290

295

300

Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn

305

310

315

320

Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln

325

330

335

Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln

340

345

350

[0004]

Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe

355

360

365

Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln

370

375

380

Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr

385

390

395

400

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile

405

410

415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile

420

425

430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu

435

440

445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile

450

455

460

[0005]

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly

465

470

475

480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr

485

490

495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys

500

505

510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln

515

520

525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val

530

535

540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr

545

550

555

560

Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg

565

570

575

His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu

580

585

590

[0006]

Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp

595

600

605

Gly Val

610

<210> 2

<211> 550

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短的SFRV G蛋白的序列

<400> 2

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr

20 25 30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr

35 40 45

[0007]

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys

50 55 60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr

65 70 75 80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu

85 90 95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn

	100	105	110
Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile			
	115	120	125
Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu			
	130	135	140
Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr			
	145	150	155
			160
[0008]			
Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys			
	165	170	175
Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg			
	180	185	190
Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg			
	195	200	205
Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys			
	210	215	220

	340	345	350
Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe			
	355	360	365
Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln			
	370	375	380
Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr			
	385	390	395
			400
[0010]			
Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile			
	405	410	415
Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile			
	420	425	430
Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu			
	435	440	445
Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile			
	450	455	460

<220>

<223> 截短的 SFRV G 蛋白的序列, 具有 N 末端的 melittin 序列

<400> 3

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile

1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Asn Pro Leu

 20 25 30

Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro

 35 40 45

[0012]

Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr

 50 55 60

Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp

65 70 75 80

Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser

 85 90 95

Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr

	100	105	110
Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys			
	115	120	125
Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly			
	130	135	140
Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro			
	145	150	155
			160
[0013]			
Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly			
	165	170	175
Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro			
	180	185	190
Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp			
	195	200	205
Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly			
	210	215	220

	340	345	350
Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile			
	355	360	365
Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys			
	370	375	380
Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala			
	385	390	395
			400
[0015]			
Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly			
	405	410	415
Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr			
	420	425	430
Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys			
	435	440	445
Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr			
	450	455	460

580

585

590

Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe

595

600

605

Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp Gly Val

610

615

<210> 4

<211> 623

<212> PRT

<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> SEQ ID NO:1, 具有修饰(包括 6x His 标签)

<400> 4

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

1

5

10

15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr

20

25

30

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr

35

40

45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys

50

55

60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr

65

70

75

80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu

85

90

95

[0018]

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn

100

105

110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile

115

120

125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu

130

135

140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr

145

150

155

160

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys
 165 170 175

Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg
 180 185 190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg
 195 200 205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys
 210 215 220

[0019]

Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe
 225 230 235 240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu
 245 250 255

Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile
 260 265 270

Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala

275 280 285

Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu

290 295 300

Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn

305 310 315 320

Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln

325 330 335

[0020]

Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln

340 345 350

Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe

355 360 365

Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln

370 375 380

Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr

385 390 395 400

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile
 405 410 415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile
 420 425 430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu
 435 440 445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile
 450 455 460

[0021]

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly
 465 470 475 480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr
 485 490 495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys
 500 505 510

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln

515

520

525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val

530

535

540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr

545

550

555

560

Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg

565

570

575

[0022]

His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu

580

585

590

Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp

595

600

605

Gly Val Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His His His His

610

615

620

<210> 5

<211> 563

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO:2, 具有修饰(包括 6x His 标签)

<400> 5

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

1 5 10 15

Ala Val Thr Cys Ser Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr

 20 25 30

[0023]

Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr

 35 40 45

Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys

50 55 60

Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr

65 70 75 80

Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu

 85 90 95

Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn

100

105

110

Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile

115

120

125

Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu

130

135

140

Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr

145

150

155

160

[0024]

Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys

165

170

175

Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg

180

185

190

Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg

195

200

205

Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys

210

215

220

Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe

225

230

235

240

Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu

245

250

255

Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile

260

265

270

[0025]

Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala

275

280

285

Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu

290

295

300

Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn

305

310

315

320

Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln

325

330

335

Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln

340

345

350

Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe

355

360

365

Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln

370

375

380

Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr

385

390

395

400

[0026]

Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile

405

410

415

Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile

420

425

430

Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu

435

440

445

Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile

450

455

460

Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly

465

470

475

480

Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr

485

490

495

Met Asp His Leu Glu Val Val Gln Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys

500

505

510

[0027]

Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln

515

520

525

Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val

530

535

540

Asn Pro Trp Ile Gly Leu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly His His His

545

550

555

560

His His His

<210> 6

<211> 631

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO:3, 具有修饰(包括 6x His 标签)

<400> 6

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

[0028]

Ser Tyr Ile Tyr Ala Asn Pro Leu Ser Tyr Pro Asn Gly Asn Pro Leu
 20 25 30

Ser Tyr Pro Asn Gly Ile Leu Thr Asn Asn Ser Thr His Asn His Pro
 35 40 45

Leu Ser Asp Phe Tyr Ile Phe Tyr Glu Asn Ser Ser Leu Thr Tyr Thr
 50 55 60

Gln Phe Pro Val Ala Pro Asp Cys Ser Ser Ile Leu Asp Thr Arg Asp
65 70 75 80

Glu Gln Tyr Pro Thr Thr Val Thr Leu Trp Lys Val Asp Gln Glu Ser

85

90

95

Gln Ala Glu Trp Gly Leu Leu Leu Trp Gln Glu Arg Ile Asp Thr Thr

100

105

110

Cys Ser Trp Asn Phe Trp Gly Asn Tyr Lys Gly Ser Ile Val Ser Lys

115

120

125

Ser Ser Val Pro Leu Lys Asp Ile Pro Ser Gly Ser Ala Arg Asn Gly

130

135

140

[0029]

Tyr Trp Ala Leu Ser Asn Asp Glu Val Gln Glu Ile Asp His Val Pro

145

150

155

160

Tyr Asn Leu Arg Tyr Tyr Cys Tyr Trp Cys Arg Asn Glu Tyr Pro Gly

165

170

175

Ser Phe Tyr Met Arg Tyr Val Lys Lys Val Arg Ile Ile Arg Asn Pro

180

185

190

Asp Gly Ser Ile Lys Thr Pro Arg Gly Ser Trp Val His Glu Leu Asp

195 200 205

Asn Leu Trp Gly Asp Gln Met Arg Tyr Leu Val Ile Arg Arg Phe Gly

210 215 220

Gly Glu Ser Ser Cys Pro Leu Lys Ile Tyr Asp Val Arg Ala Gly Val

225 230 235 240

Leu Ser Lys Ser Arg Ser Asn Phe Ile Leu Val Ser Leu Pro Ser Leu

245 250 255

[0030]

Asn Leu Gln Phe Ser Val Ser Leu Glu Ser Thr Glu Thr Lys Cys Ser

260 265 270

Phe Gly Asp Lys Thr Tyr Asp Ile Val Gln Ser Met Gly Gly Tyr Leu

275 280 285

Leu Ser Ile Asp Ile Gly Asn Ala Asn Trp Arg Gly Pro Trp Asp Pro

290 295 300

Thr Pro Gln His Pro Gly Arg Glu Arg Arg Ser Ile Met Glu Phe Pro

305 310 315 320

Asp Gln Thr Ser Phe Arg Tyr Asn Gln Phe Ile Asn Tyr His Ser Ser
 325 330 335

Pro Arg His Lys Arg His Asp Gln Glu Phe Glu Phe Pro Leu Ser Leu
 340 345 350

Lys Ser Ser Tyr Asp Tyr Ala Gln Phe Arg Tyr Glu Gln Asn Phe Ile
 355 360 365

Ile Arg Gln Ile Asn Lys Asn Phe Gly Leu Leu Gln Lys Ser Ile Cys
 370 375 380

[0031]

Asp Ile Gln Phe Ser Lys Trp Gln Asn Leu Ser Pro Pro Asn Leu Ala
 385 390 395 400

Met Lys Ile Ala His Tyr Val Thr Gly Ser Ile His Ser Ile Gly Gly
 405 410 415

Val His His Gly Ser Tyr Ser Ile Gln Arg Thr Glu Lys Ser Ile Thr
 420 425 430

Lys Val Asn Leu Val Phe Pro Ile Val Ile Val His Gly Met Tyr Lys

435 440 445

Cys Gln Arg Glu Pro Ser Lys Glu Val Val Trp Ala Glu Pro Val Thr

450 455 460

Gly Ile Leu Phe Lys Ser Pro Ile Pro Thr His Phe Ser Leu Ser Ser

465 470 475 480

Ser Trp Leu Pro Gly Val Asn Gly Ser Ser Ile Val Pro Leu Thr Gly

485 490 495

[0032]

Gln Ile Leu Leu Pro Glu Ile Thr Met Asp His Leu Glu Val Val Gln

500 505 510

Gln Val Glu Ala Lys Met Val Lys Ser Met Tyr Thr Asn Val Glu Leu

515 520 525

Phe Gly Ser Thr Glu Glu Phe Gln Arg Tyr Gln Thr Gln Gly Ile Thr

530 535 540

Ser Asp Glu Gln Ser Asn Thr Val Asn Pro Trp Ile Gly Leu Leu Ile

545 550 555 560

His Gly Gly Val Ser Ile Ala Thr Gly Ile Leu Val Ala Leu Leu Ile
 565 570 575

Pro Ser Ile Leu Lys Leu Phe Arg His Ile Ile Glu Lys Gly Glu Ala
 580 585 590

Ser Leu Glu Glu Arg Leu His Leu Arg Glu Thr Ser Arg Lys Glu Phe
 595 600 605

Val Lys Val Arg Gly Lys Pro Trp Gly Val Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 610 615 620

[0033]

Gly His His His His His His
 625 630

<210> 7

<211> 521

<212> PRT

<213> SFRV

<400> 7

Met Thr Gln Gly Thr Met Lys Pro Val Trp Glu Glu Leu Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Phe Gln Gly Thr Val Asp Ile Pro Gly Arg Ser Leu Lys

20

25

30

Pro Glu Lys Thr Asp Trp Ser Val Asp Thr Cys Arg Glu Ile Ser Leu

35

40

45

Asn Leu Lys Leu Pro Gly Glu Ile Trp Gln Leu Ala His Gln Glu Thr

50

55

60

[0034]

Ile Phe Asn Arg Phe Leu Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Val Pro Asn

65

70

75

80

Thr His Thr Ala Thr Glu Ile Val Leu Ser Met Ala Ser Leu Ile Phe

85

90

95

Lys Asp Lys Ala Lys Ala Pro Ile Asp Leu Ile Trp Asp Asp Ser Phe

100

105

110

Gln Ala Ser Pro Ser Glu Glu Cys Gly Phe Ser Val Val Gly Glu Thr

115

120

125

Pro Leu Val Ile Gly Gln His Pro Asp Asp Asp Asp Tyr Thr Leu Arg

130

135

140

Glu Asp Glu Glu Ser Ala Ala Met Asn Glu Glu Glu Lys Ile Gln Ala

145

150

155

160

Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Asp Thr Pro Val Asp Leu Lys Asp

165

170

175

Ala Ser Gly Ile Val Phe Glu Thr Lys Glu Asp Arg Glu Gln Arg Ile

180

185

190

[0035]

Lys Asn Glu Lys Ala Leu His Val Glu Asp Asp Ile Asn Ala Leu Thr

195

200

205

Gln Ile Thr Lys Gln Phe Leu Phe Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Leu Gln

210

215

220

Lys Phe Val Ala Lys Ala Thr Thr Ile Phe Ile Asp Asn Asn Ala Thr

225

230

235

240

Asn Gly Phe Thr Arg Leu His Leu His Ala Ile Arg Val Met Asn Phe

245

250

255

Ile Ala Leu Thr Met Leu Arg Lys Val Thr Lys Ser Asn Ala Gln Met
 260 265 270

Ile Asn Ala Phe Leu Lys Glu Gln Tyr Lys Arg Asn Ile Ala Ser Leu
 275 280 285

Ile Pro Gly Ala Leu Ser Ser Asp Phe Ala Pro Pro Ser Lys Ser Cys
 290 295 300

[0036] Ile Asp Lys Leu Thr Ala Ile Ser Lys Asn Asp Pro Ala Val Ser Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Ala Lys Val Val Met Leu Asn Met Glu Glu Glu Arg Arg Asn
 325 330 335

Pro Ser Leu Val Ala Cys Leu Gly Ala Ser Leu Leu Thr His Thr Thr
 340 345 350

Trp Asn Gly Met Gly Ile Leu His Val Ile Phe Glu Val Cys Leu Phe
 355 360 365

His Gln Ile Ser Trp Lys Arg Leu Val Thr Glu Ser Leu Thr Ser Leu
 370 375 380

Thr Lys Met Ser Trp Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Ile Lys Tyr Gln
 385 390 395 400

Ala Lys Gly Asn Pro Asp Pro Thr Val Ala Trp Ala Arg Ile Ile Asp
 405 410 415

Asp Ser Tyr Phe Met Arg Leu Thr Ile Val Asn His Pro Thr Leu Ala
 420 425 430

[0037]

Ala Leu Leu Val Glu Ser Leu Ile Arg Ser Gln Lys Asp Asp Gly Ile
 435 440 445

Leu Asn Ala Asn Trp Ala Ile Gln His Arg Asp Thr Ile Asn Tyr Tyr
 450 455 460

Arg Asp Ala Ala Lys Leu Leu Thr Asp Lys Leu Thr Gly Gln Thr Ala
 465 470 475 480

Thr Val Gln Ala Leu Thr Asn Glu Ala Ala Asp Leu Val Arg Thr Met
 485 490 495

Asn Ala Gly Pro Ser Arg Tyr His Pro Arg Pro Ser Thr Leu Ile Pro
 500 505 510

Met Val Asp Leu Asn Pro Glu Asp Leu
 515 520

<210> 8

<211> 534

<212> PRT

<213> 人工序列

[0038]

<220>

<223> SEQ ID NO:7, 具有修饰(包括 6x His 标签)

<400> 8

Met Thr Gln Gly Thr Met Lys Pro Val Trp Glu Glu Leu Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Glu Phe Gln Gly Thr Val Asp Ile Pro Gly Arg Ser Leu Lys
 20 25 30

Pro Glu Lys Thr Asp Trp Ser Val Asp Thr Cys Arg Glu Ile Ser Leu
 35 40 45

Asn Leu Lys Leu Pro Gly Glu Ile Trp Gln Leu Ala His Gln Glu Thr

50

55

60

Ile Phe Asn Arg Phe Leu Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Val Pro Asn

65

70

75

80

Thr His Thr Ala Thr Glu Ile Val Leu Ser Met Ala Ser Leu Ile Phe

85

90

95

[0039]

Lys Asp Lys Ala Lys Ala Pro Ile Asp Leu Ile Trp Asp Asp Ser Phe

100

105

110

Gln Ala Ser Pro Ser Glu Glu Cys Gly Phe Ser Val Val Gly Glu Thr

115

120

125

Pro Leu Val Ile Gly Gln His Pro Asp Asp Asp Asp Tyr Thr Leu Arg

130

135

140

Glu Asp Glu Glu Ser Ala Ala Met Asn Glu Glu Glu Lys Ile Gln Ala

145

150

155

160

Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Asp Thr Pro Val Asp Leu Lys Asp

165

170

175

Ala Ser Gly Ile Val Phe Glu Thr Lys Glu Asp Arg Glu Gln Arg Ile

180

185

190

Lys Asn Glu Lys Ala Leu His Val Glu Asp Asp Ile Asn Ala Leu Thr

195

200

205

Gln Ile Thr Lys Gln Phe Leu Phe Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Leu Gln

210

215

220

[0040]

Lys Phe Val Ala Lys Ala Thr Thr Ile Phe Ile Asp Asn Asn Ala Thr

225

230

235

240

Asn Gly Phe Thr Arg Leu His Leu His Ala Ile Arg Val Met Asn Phe

245

250

255

Ile Ala Leu Thr Met Leu Arg Lys Val Thr Lys Ser Asn Ala Gln Met

260

265

270

Ile Asn Ala Phe Leu Lys Glu Gln Tyr Lys Arg Asn Ile Ala Ser Leu

275

280

285

Ile Pro Gly Ala Leu Ser Ser Asp Phe Ala Pro Pro Ser Lys Ser Cys

290

295

300

Ile Asp Lys Leu Thr Ala Ile Ser Lys Asn Asp Pro Ala Val Ser Ser

305

310

315

320

Phe Phe Ala Lys Val Val Met Leu Asn Met Glu Glu Glu Arg Arg Asn

325

330

335

[0041]

Pro Ser Leu Val Ala Cys Leu Gly Ala Ser Leu Leu Thr His Thr Thr

340

345

350

Trp Asn Gly Met Gly Ile Leu His Val Ile Phe Glu Val Cys Leu Phe

355

360

365

His Gln Ile Ser Trp Lys Arg Leu Val Thr Glu Ser Leu Thr Ser Leu

370

375

380

Thr Lys Met Ser Trp Gly Glu Val Ser Gln Phe Leu Ile Lys Tyr Gln

385

390

395

400

Ala Lys Gly Asn Pro Asp Pro Thr Val Ala Trp Ala Arg Ile Ile Asp

405

410

415

Asp Ser Tyr Phe Met Arg Leu Thr Ile Val Asn His Pro Thr Leu Ala

420

425

430

Ala Leu Leu Val Glu Ser Leu Ile Arg Ser Gln Lys Asp Asp Gly Ile

435

440

445

Leu Asn Ala Asn Trp Ala Ile Gln His Arg Asp Thr Ile Asn Tyr Tyr

450

455

460

[0042]

Arg Asp Ala Ala Lys Leu Leu Thr Asp Lys Leu Thr Gly Gln Thr Ala

465

470

475

480

Thr Val Gln Ala Leu Thr Asn Glu Ala Ala Asp Leu Val Arg Thr Met

485

490

495

Asn Ala Gly Pro Ser Arg Tyr His Pro Arg Pro Ser Thr Leu Ile Pro

500

505

510

Met Val Asp Leu Asn Pro Glu Asp Leu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

515

520

525

His His His His His His

530

<210> 9

<211> 1830

<212> DNA

<213> SFRV

<400> 9

atggttttct taagtttata aacgatcata tttatcctaa gcctccgggc tgtaacctgc 60

tccaatcctc tctcctatcc taatggcatt ttgactaaca actctactca caatcatecc 120

[0043]

ctatcggact tttatatttt ttatgagaac agttccctta cctatactca attccctgtg 180

gccccagact gctctagtat tctagatact agagatgagc agtatccac cactgttact 240

ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct gagtggggac tccttttatg gcaagagaga 300

attgacacca cttgctcctg gaacttctgg ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa 360

tctcagtac ctctaaagga tatcccatcg ggtagtgccc ggaatggata ttgggctttg 420

agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat gtccttaca acttgagata ttattgttac 480

tgggtcagaa atgaatatcc tgggagcttt tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc 540

	ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact cctagaggat cctgggttca tgagttggac	600
	aacttggtgg gagatcagat gaggtatcta gttattcgaa gatttggggg agaatctagc	660
	tgccctctta agatatatga tgtgagagca ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc	720
	atcttagtgt ccttccctc cttgaatttg cagttctctg taccacttga atccactgag	780
	acgaaatgct catttggaga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc	840
	ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat	900
	ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac	960
[0044]	caattataa attatcactc atccccaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagttc	1020
	cctctcagtc taaaatccag ttatgattat gctcaattta gatatgagca gaatttcac	1080
	atccgacaga tcaataagaa ttttggatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt	1140
	tctaagtggc agaatctcag tccaccaat ctgctatga aaattgceca ttatgtcacc	1200
	ggctctatcc actctatagg tgggtttcat catggatctt attcaattca aagaacggaa	1260
	aatccatta ctaaggtcaa tctggtgttt cccattgtta ttgttcatgg aatgtataag	1320
	tgccaaaggg aaccatcaa ggaggtggtt tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc	1380
	aagtctccta ttccgactca tttctcacta agttctcttt ggctacctgg ggtaaattgt	1440

tcttctattg tccctctgac aggtcaaatt cttctccctg aaatcacaat ggatcacttg	1500
gaggttgtac aacaggttga agcaaagatg gtcaaaagta tgtacacgaa tntagagttg	1560
tttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa	1620
tcaaatacag taaatccttg gattgggctt ttgatacatg gtggagtgtc catagctact	1680
ggaatattag tagcactttt gatcccctca atcttaaaat tgttcagaca tataattgag	1740
aaaggggagg catcgttaga ggagaggttg catctgaggg aaacctcaag aaaagaattt	1800
gtcaaggtta gggggaacc atggggtgtc	1830

[0045]

<210> 10

<211> 1650

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:2 的序列

<400> 10

atggttttct taagtttata aacgatcata ttatactaa gcctccgggc tgtaacctgc 60

tccaatctc tctctatcc taatggcatt ttgactaaca acttactca caatcatccc 120

ctatcgact tttatatttt ttatgagaac agttccctta cctatactca attccctgtg 180

	gccccagact gctctagtat tctagatact agagatgagc agtatccac cactgttact	240
	ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct gagtggggac tccttttatg gcaagagaga	300
	attgacacca ctgctcctg gaacttctgg ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa	360
	tcctcagtac ctctaaagga tatcccatcg ggtagtgccc ggaatggata ttgggctttg	420
	agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat gtcccttaca acttgagata ttattgttac	480
	tgggtcagaa atgaatatcc tgggagcttt tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc	540
	ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact cctagaggat cctgggttca tgagttggac	600
[0046]	aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta gtatttcgaa gatttggggg agaatctagc	660
	tgccctctta agatatatga tgtgagagca ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc	720
	atcttagtgt ccttccctc cttgaatttg cagtctcttg tatcaattga atccactgag	780
	acgaaatgct catttggaga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc	840
	ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgagccctt gggatcctac ccctcagcat	900
	ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac	960
	caattataa attatcactc atcccaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagttc	1020
	cctctcagtc taaaatccag ttatgattat getcaattta gatatgagca gaatttcac	1080

	atccgacaga tcaataagaa ttttggatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt	1140
	tctaagtggc agaatctcag tccaccaat cttgctatga aaattgccca ttatgtcacc	1200
	ggctctatcc actctatagg tgggtttcat catggatctt attcaattca aagaacggaa	1260
	aatccatta ctaaggtaa tctgggtgtt cccattgta ttgttcattg aatgtataag	1320
	tgccaaaggg aaccatccaa ggaggtgggt tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc	1380
	aagtctccta ttccgactca tttctcacta agttctctt ggctacctgg ggtaaattgt	1440
	tcttctattg tccctctgac aggtcaaatt ctctctcctg aaatcacaat ggatcacttg	1500
[0047]	gaggtgttac aacaggttga agcaaagatg gtcaaaagta tgtacacgaa tgtagagttg	1560
	tttgatcaa cagaggaatt tcaaagatac caaactcagg gaattacctc tgatgaacaa	1620
	tcaaatacag taaatccttg gattgggctt	1650

<210> 11

<211> 1854

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:3 的序列

<400> 11

	atgaaattct tagtcaacgt tgccttgtt tttatggtcg tatacatttc ttacatctat	60
	gccaatcctc tctcctatcc taatggcaat cctctctcct atcctaattg cattttgact	120
	aacaactcta ctcaaatca tcccctatcg gacttttata tttttatga gaacagttcc	180
	cttacctata ctcaattccc tgtggcccca gactgctcta gtattctaga tactagagat	240
	gagcagtatc ccaccactgt tactttgtgg aaggttgatc aagaatctca agctgagtgg	300
	ggactccttt tatggcaaga gagaattgac accacttgct cctggaactt ctggggcaat	360
	tacaaagat ccattgtatc taaatcctca gtacctctaa aggatatccc atcgggtagt	420
[0048]	gcccggaatg gatattgggc tttgagcaat gatgaagttc aagagattga tcatgtcct	480
	tacaacttga gatattattg ttactgggtc agaaatgaat atcctgggag cttttatag	540
	agatatgtaa agaaagttcg gatcataaga aatcctgatg ggtctataaa gactcctaga	600
	ggatcctggg ttcattgagt ggacaacttg tggggagatc agatgaggta tctagttatt	660
	cgaagatttg ggggagaatc tagctgccct ctttaagatat atgatgtgag agcaggggtt	720
	ctgtcaaaat ctcggtaaaa ctccatctta gtgtcccttc cctcctttaa ttgcagttc	780
	tctgtatcac ttgaatccac tgagacgaaa tgctcatttg gagataagac atatgatatt	840
	gtgcagagca tgggaggcta tctcctctcc atcgacatag gtaatgcaa ctggcgaggc	900

	ccttgggatac ctaccctca gcatccgggt cgtgaaagaa gatcaattat ggagtttccg	960
	gatcaaacat ctttcagata taaccaattt ataaattatc actcatcccc aagacacaag	1020
	agacatgatac aagaatttga gttccctctc agtctaaaat ccagttatga ttatgctcaa	1080
	tttagatatg agcagaattt catcatccga cagatcaata agaattttgg attattacag	1140
	aagagcattt gtgatattca gttttctaag tggcagaatc tcagtccacc caatcttget	1200
	atgaaaattg cccattatgt caccggctct atccactcta tagtggtgt tcacatgga	1260
	tcttattcaa ttcaaagaac ggaaaaatcc attactaagg tcaatctggt gtttcccatt	1320
[0049]	gttattgttc atggaatgta taagtgccaa agggaaccat ccaaggaggt ggtttggca	1380
	gaaccgctca cagggatctt attcaagtct cctattccga ctcatctctc actaagttcc	1440
	tcttggctac ctggggtaaa tggttcttct attgtccctc tgacaggtca aattcttctc	1500
	cctgaaatca caatgatca cttggaggtt gtacaacagg ttgaagcaaa gatggtcaaa	1560
	agtatgtaca cgaatgtaga gttgtttgga tcaacagagg aatttcaaag ataccaaact	1620
	cagggaatta cctctgatga acaatcaaat acagtaaate cttggattgg gcttttgata	1680
	catggtggag tgtccatagc tacttgaata ttagtagcac ttttgatccc ctcaatctta	1740
	aaattgttca gacatataat tgagaaagg gaggcacgt tagaggagag gttgcatctg	1800

	agggaaacct caagaaaaga atttgtcaag gttaggggga aacctgggg tgtc	1854
<210>	12	
<211>	1884	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	编码 SEQ ID NO:4 的序列	
<400>	12	
	gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tectaagcct ccgggctgta	60
[0050]	acctgetcca atcctctctc ctatccta atggcattttga ctaacaactc tactcacaat	120
	catcccctat cggactttta tattttttat gagaacagtt cccttaccta tactcaattc	180
	cctgtggccc cagactgetc tagtattcta gatactagag atgagcagta tcccaccaet	240
	gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa	300
	gagagaattg acaccacttg ctcttggaac ttctggggca attacaaaagg atccattgta	360
	tctaaatcct cagtacctct aaaggatata ccatcgggta gtgcccggaa tggatattgg	420
	gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat	480
	tgttactggt gcagaaatga atatcctggg agcttttata tgagatatgt aaagaaagtt	540

	cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag	600
	ttggacaact tgtggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa	660
	tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaaa atctcggtea	720
	aacttcatct tagtgtccct tccctccttg aatttgcagt tctctgtatc acttgaatcc	780
	actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catgggagcc	840
	tatctcctct ccatcgacat aggtaatgcg aactggcgag gcccttggga tcctaccct	900
	cagcatccgg gtcgtgaaag aagatcaatt atggagtttc cggatcaaac atctttcaga	960
[0051]	tataaccaat ttataaatta tcactcatcc ccaagacaca agagacatga tcaagaattt	1020
	gagttccctc tcagtctaaa atccagttat gattatgctc aatttagata tgagcagaat	1080
	ttcatcatcc gacagatcaa taagaatttt ggattattac agaagagcat ttgtgatatt	1140
	cagttttcta agtggcagaa tctcagtcca ccaatcttg ctatgaaaat tgcccattat	1200
	gtcaccggt ctatccactc tataggtggt gttcatcatg gatcttattc aattcaaaga	1260
	acggaaaaat ccattactaa ggtcaatctg gtgtttccca ttgttattgt tcatggaatg	1320
	tataagtgcc aaaggaacc atccaaggag gtggtttggg cagaaccctg cacagggatc	1380
	ttattcaagt ctctattcc gactcatttc tcaactaagt cctcttggt accctgggta	1440

	aatggttctt ctattgtccc tctgacaggt caaattcttc tcctgaaat cacaatggat	1500
	cacttgagg ttgtacaaca gttgaagca aagatggtca aaagtatgta cacgaatgta	1560
	gagttgttg gatcaacaga ggaatttcaa agatacaaaa ctgaggaat tacctctgat	1620
	gaacaatcaa atacagtaaa tccttggatt gggcttttga tacatggtgg agtgtccata	1680
	gctactggaa tattagtagc acttttgatc cctcaatct taaaattggt cagacatata	1740
	attgagaaag gggaggcatc gttagaggag aggttgcac tgagggaaac ctcaagaaaa	1800
	gaatttgta aggttagggg gaaaccatgg ggtgtcgaac acctgtattt tcagggccac	1860
[0052]	catcaccatc accattaact gcag	1884

<210> 13

<211> 1704

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 SEQ ID NO:5 的序列

<400> 13

gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tcctaagcct cgggctgta 60

acctgctcca atcctctctc ctatcctaag ggcattttga ctacaactc tactcacaat 120

	catccctat cggactttta tattttttat gagaacagt cccttaccta tactcaattc	180
	cctgtggccc cagactgctc tagtattcta gatactagag atgagcagta tcccaccact	240
	gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa	300
	gagagaattg acaccacttg ctctggaac ttctggggca attacaaagg atccattgta	360
	tctaaatcct cagtacctct aaaggatata ccatcgggta gtgcccggaa tggatattgg	420
	gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat	480
	tgttactggg gcagaaatga atatcctggg agcttttata tgagatatgt aaagaaagtt	540
[0053]	cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag	600
	ttggacaact tgtggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa	660
	tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaaa atctcgtca	720
	aacttcatct tagtgtccct tcctccttg aatttgcagt tctctgtatc acttgaatcc	780
	actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catgggaggc	840
	tatctcctct ccatcgacat aggtaatgcg aactggcgag gcccttggga tcctaccct	900
	cagcatccgg gtcgtgaaag aagatcaatt atggagtttc cggatcaaac atctttcaga	960
	tataaccaat ttataaatta tcaactcatcc ccaagacaca agagacatga tcaagaattt	1020

	gagttccctc tcagtctaaa atccagttat gattatgctc aatttagata tgagcagaat	1080
	ttcatcatcc gacagatcaa taagaatfff ggattattac agaagagcat ttgtgatatt	1140
	cagttttcta agtggcagaa tctcagtcca cccaatcttg ctatgaaaat tgcccattat	1200
	gtcaccgct ctatccactc tataggtggt gttcatcatg gatcttattc aattcaaaga	1260
	acggaaaaat ccattactaa ggtcaatctg gtgtttccca ttgttattgt tcatggaatg	1320
	tataagtgcc aaaggaacc atccaaggag gtggtttggg cagaaccctg cacagggatc	1380
	ttattcaagt ctctattcc gactcatttc tactaagtt cctcttgct acctggggta	1440
[0054]	aatggttctt ctattgtccc tctgacaggt caaattcttc tcctgaaat cacaatggat	1500
	cacttggagg ttgtacaaca ggttgaagca aagatggtca aaagtatgta cacgaatgta	1560
	gagttgtttg gatcaacaga ggaatttcaa agataccaaa ctgaggaat tacctctgat	1620
	gaacaatcaa atacagtaaa tccttggatt gggttgaaa acctgtattt tcaggccac	1680
	catcaccatc accattaact gcag	1704
	<210> 14	
	<211> 1908	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223>	编码 SEQ ID NO:6 的序列
	<400>	14
	gaattcatga aattcttagt caacgttgcc ctgttttta tggctgtata catttcttac	60
	atctatgcca atcctctctc ctatcetaat ggcaatcctc tctcctatcc taatggcatt	120
	ttgactaaca actctactca caatcatccc ctatcggact tttatatttt ttagagaac	180
	agttccctta cctatactca attccctgtg gccccagact gctctagtat tctagatact	240
	agagatgagc agtateccac cactgttact ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct	300
[0055]	gagtggggac tccttttatg gcaagagaga attgacacca cttgctcctg gaacttctgg	360
	ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa tcctcagtac ctctaaagga tatcccatcg	420
	ggtagtgccc ggaatggata ttggcctttg agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat	480
	gtcccttaca acttgagata ttattgttac tggcgcagaa atgaatatcc tgggagcttt	540
	tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact	600
	cctagaggat cctgggttca tgagttggac aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta	660
	gttattcgaa gatttggggg agaatctagc tgccctctta agatatatga tgtgagagca	720
	ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc atcttagtgt cccttcctc cttgaatttg	780

	cagttctctg taccacttga atccactgag acgaaatgct catttggaga taagacatat	840
	gatattgtgc agagcatggg aggctatctc ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg	900
	cgaggccctt gggatcctac cctcagcat ccgggtctgt aaagaagatc aattatggag	960
	tttccggatc aaacatcttt cagatataac caatttataa attatcactc atccccaaga	1020
	cacaagagac atgatcaaga atttgagttc cctctcagtc taaaatccag ttatgattat	1080
	gctcaattta gatatgagca gaatttcac cccgacaga tcaataagaa ttttggatta	1140
	ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt tctaagtggc agaatctcag tccaccaat	1200
[0056]	cttgctatga aaattgceca ttatgtcacc ggctctatcc actctatagg tgggtttcat	1260
	catggatctt attcaattca aagaacggaa aaatccatta ctaaggtcaa tctgggtgtt	1320
	cccattgtta ttgttcatgg aatgtataag tgccaaaggg aaccatccaa ggaggtggtt	1380
	tgggcagaac ccgtcacagg gatcttattc aagtctctca ttccgactca tttctcacta	1440
	agttcctctt ggctacctgg ggtaaattgt tcttctattg tccctctgac aggtcaaatt	1500
	cttctccctg aaatcacaat ggatcacttg gaggttgtag aacaggttga agcaaagatg	1560
	gtcaaaagta tgtacacgaa tgtagagttg tttggatcaa cagaggaatt tcaaagatac	1620
	caactcagg gaattacctc tgatgaacaa tcaaatacag taaatccttg gattgggctt	1680

	ttgatacatg gtggagtgtc catagctact ggaatattag tagcactttt gatcccctca	1740
	atcttaaaat tgttcagaca tataattgag aaaggggagg catcgttaga ggagaggttg	1800
	catctgaggg aaacctcaag aaaagaatth gtaaggta ggggaaacc atggggtgtc	1860
	gaaaacctgt attttcaggg ccaccatcac catcaccatt aactgcag	1908
	<210> 15	
	<211> 1563	
	<212> DNA	
	<213> SFRV	
	<400> 15	
[0057]	atgacacagg gaacctgaa gccagtatgg gaagaattgg ggacaggaga aacagagttc	60
	caagggaccg tggacattcc agggagatct ctcaagccag aaaaaacaga ttggagtgtt	120
	gatacatgtc gggagatcag tttaaatctg aagttacctg gtgaaatag gcaactggcc	180
	catcaagaaa ccactttcaa cagatttctt acattttacg ctactgggta tgttccaaat	240
	acacacacag ccacagaaat tgtactctcc atggcatcac taatcttcaa ggacaaggcc	300
	aaagcaccta ttgatttgat ttgggatgac tcatttcaag ctagtccctc tgaggagtgt	360
	gggttctccg ttgttgaga aactccattg gttatcggac aacaccgga tgatgatgac	420
	tacacattga gagaagatga agaatcagcc gctatgaatg aggaagaaaa aatacaagca	480

	gctctaaaaa ctttggaat tcaagatact ccagtagacc tgaaggatgc atctggaatt	540
	gtctttgaga caaaggagga cagagaacaa aggatcaaga atgagaaagc tetacatgta	600
	gaggatgata tcaacgctct aactcagatt acaaaacaat tcttgtttga gtattccaca	660
	ggctccctac agaaatttgt tgcaaaggct actactattt tcatagataa taatgctact	720
	aacggcttca cccgtttgca tctccatgcc atcagagtca tgaacttcat tgetctaaca	780
	atgcttagaa aggtaaccaa gtcaaatgcc cagatgatca atgcctttct gaaggagcaa	840
	tacaagagaa atattgectc cctaateccc ggcgcctct cctctgattt tgctcctccc	900
[0058]	agtaagagct gcattgataa actgacagct atttctaaga atgaccggc agtcagttca	960
	ttctttgcaa aggttgtgat gctcaacatg gaggaggaac ggagaaacce ttctctggtt	1020
	gcttgtcttg gggcttccet tctcaccac accacttga atggaatgg gattttacat	1080
	gttatttttg aagtttctt attccatcag attagctgga agaggttgg cacagagtcc	1140
	ctgacctcac taacaaagat gtcatggggt gaagtcatc aattcctcat caagtatcaa	1200
	gcaaagggaa atcctgacce aacggttgc tgggccagaa tcattgatga ttcttacttt	1260
	atgagattaa ccatagtaaa tcatcccaca ctgctgcat tattagtga atccctcata	1320
	agatctcaga aagatgatgg aatcctgaat gccactggg ccatccaaca caggacacc	1380

	atcaattatt atagggacgc tgccaagctt ctactgata agctcacagg acagactgct	1440
	acagtccaag cccttaccaa tgaagccgct gatctagtta gaacaatgaa tgcaggaccc	1500
	tctagatacc acccaaggcc tagtaccctt atcccctatgg tagatctaaa cccggaagac	1560
	tta	1563
	<210> 16	
	<211> 1617	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0059]	<220>	
	<223> 编码 SEQ ID NO:8 的序列	
	<400> 16	
	ggatccatga cacaggaac catgaagcca gtatgggaag aattggggac aggagaaaca	60
	gagttccaag ggaccgtgga cattccaggg agatctctca agccagaaaa aacagattgg	120
	agtgttgata catgtcggga gatcagttta aatctgaagt tacctgggta aatatggcaa	180
	ctgcccacac aagaaacat cttcaacaga tttcttacct tttacgctac tgggtatggt	240
	ccaaatacac acacagccac agaaattgta ctctccatgg catcactaat cttcaaggac	300
	aaggccaaag cacctattga tttgatttgg gatgactcat ttcaagctag tccctctgag	360

	gagtgtgggt tctccgttgt tggagaaact ccattggtta tcggacaaca cccgatgat	420
	gatgactaca cattgagaga agatgaagaa tcagccgcta tgaatgagga agaaaaaata	480
	caagcagctc taaaaacttt gggaattcaa gatactccag tagacctgaa ggatgcatct	540
	ggaattgtct ttgagacaaa ggaggacaga gaacaaagga tcaagaatga gaaagctcta	600
	catgtagagg atgatatcaa cgctctaact cagattacaa aacaattctt gtttgagtat	660
	tccacaggct ccctacagaa atttgttgca aaggctacta ctattttcat agataataat	720
	gctactaacg gcttcacceg tttgcatctc catgcatca gagtcatgaa cttcattget	780
[0060]	ctaacaatgc ttagaaaggt aaccaagtca aatgcccaga tgatcaatgc ctttctgaag	840
	gagcaataca agagaaatat tgcctcccta atccccggcg ccctctctc tgattttget	900
	cctcccagta agagctgcat tgataaactg acagctattt ctaagaatga cccggcagtc	960
	agttcattct ttgcaaaggt tgtgatgctc aacatggagg aggaacggag aaacccttct	1020
	ctggttgctt gtcttggggc ttccttctc acccacacca cttggaatgg aatggggatt	1080
	ttacatgtta tttttgaagt ttgtctattc catcagatta gctggaagag gttggtcaca	1140
	gagtcctga cctcactaac aaagatgtca tggggtgaag tcagtcaatt cctcatcaag	1200
	tatcaagcaa agggaaatcc tgaccaacg gttgcctggg ccagaatcat tgatgattct	1260

tactttatga gattaacat agtaaactat cccacacttg ctgcattatt agtggatcc 1320

ctcataagat ctcagaaaga tgatggaatc ctgaatgcca actgggcat ccaacacagg 1380

gacacatca attattatag ggacgtgcc aagcttctca ctgataagct cacaggacag 1440

actgctacag tccaagcct taccaatgaa gccgctgac tagttagaac aatgaatgca 1500

ggaccctcta gataaccacc aaggcctagt acccttatcc ccatggtaga tctaaaccg 1560

gaagacttag aaaacctgta ttttcagggc caccatcacc atcaccatta actgcag 1617

[0061] <210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13 的正向引物

<400> 17

aaaaaagaat tcatggtttt ctttag 26

<210> 18

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

	<220>		
	<223>	构建 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:14 的反向引物	
	<400>	18	
		tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttcgacaccc	60
		catggt	66
	<210>	19	
	<211>	68	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0062]	<220>		
	<223>	构建 SEQ ID NO:13 的反向引物	
	<400>	19	
		tttttctgc agttaatggt gatggtgatg gtggccctga aaatacagggt tttcaagccc	60
		aatccaag	68
	<210>	20	
	<211>	99	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 构建 SEQ ID NO:14 的正向引物	
	<400> 20	
	tatatagaat tcatgaaatt cttagtcaac gttgcccttg tttttatggt cgtatacatt	60
	tcttacatct atgccaatcc tctctcctat cctaattggc	99
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0063]	<223> 构建 SEQ ID NO:16 的正向引物	
	<400> 21	
	aaaaaaggat ccatgacaca gg	22
	<210> 22	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 构建 SEQ ID NO:16 的反向引物	
	<400> 22	
	tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttctaagtct	60

tccggg

66

<210> 23

<211> 233

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<400> 23

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg

1

5

10

15

[0064]

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20

25

30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg

35

40

45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr

50

55

60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val

65

70

75

80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr

85

90

95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr

100

105

110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

115

120

125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr

130

135

140

[0065]

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr

145

150

155

160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro

165

170

175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn

180

185

190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp

195

200

205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe

210

215

220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro

225

230

[0066]

<210> 24

<211> 552

<212> PRT

<213> 禽流感病毒

<400> 24

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val

1

5

10

15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile

20

25

30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys

35

40

45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
 85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 100 105 110

[0067]

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Asn Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
 115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Ser Ser Ser Phe Phe
 130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
 145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln

180

185

190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg

195

200

205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Asn Gly

210

215

220

[0068]

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn

225

230

235

240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile

245

250

255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly

260

265

270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser

275

280

285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys

290

295

300

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser

305

310

315

320

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile

325

330

335

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr

340

345

350

[0069]

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys

355

360

365

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser

370

375

380

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe

385

390

395

400

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp

405

410

415

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met

420

425

430

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu

435

440

445

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly

450

455

460

[0070]

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu

465

470

475

480

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala

485

490

495

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly

500

505

510

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala

515

520

525

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly

530

535

540

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile

545

550

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

[0071]

<400> 25

ctattgtccc tctgacag

18

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 26

gaccatcttt gcttcaacc

19

	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 27	
	caacctccaa gtgatccatt gtg	23
[0072]	<210> 28	
	<211> 126	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 28	
	cctggggtaa atggttcttc tattgtccct ctgacaggtc aaattcttct cctgaaatc	60
	acaatggatc acttgaggt tgtacaacag gttgaagcaa agatggtaa aagtatgtac	120
	acgaat	126

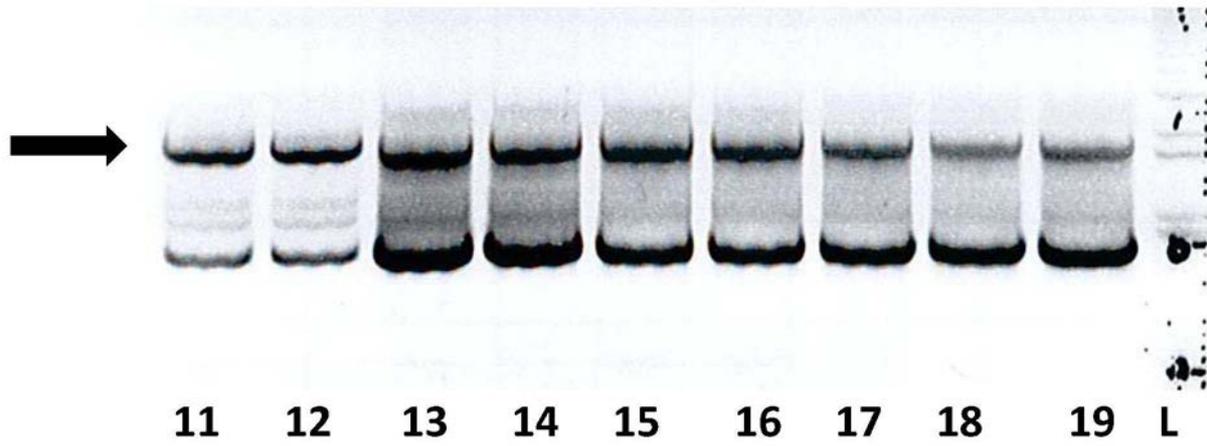
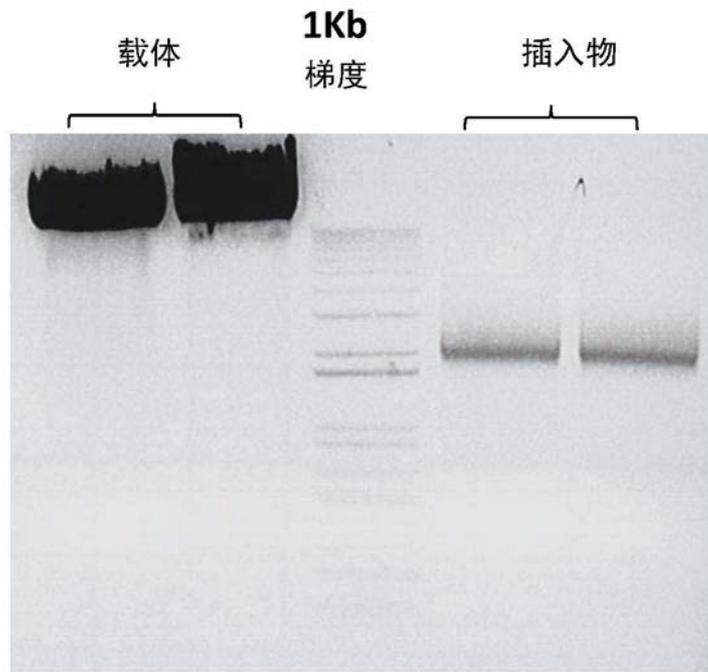


图1



N1322-100B

图2

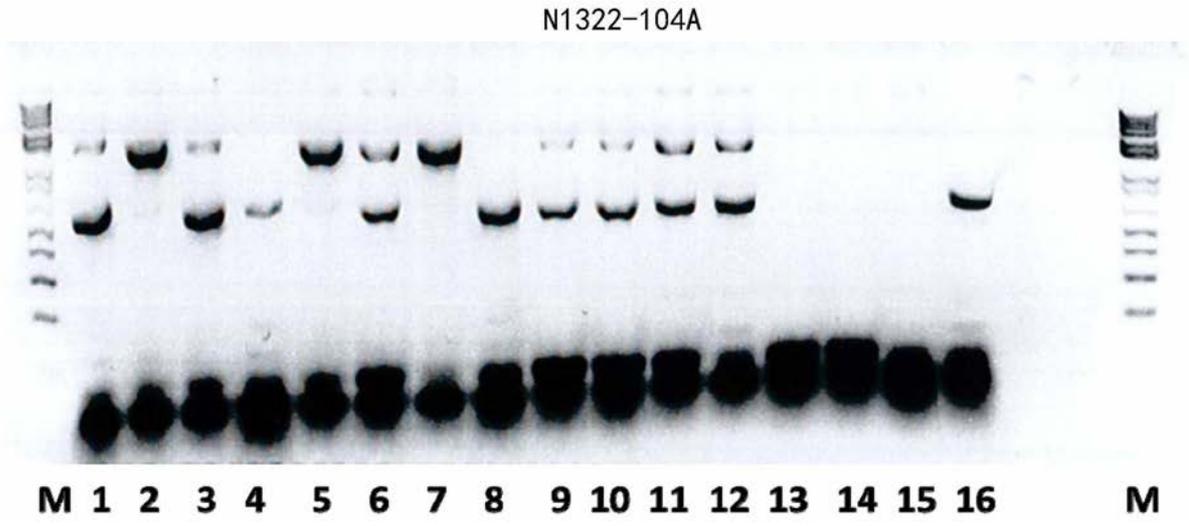
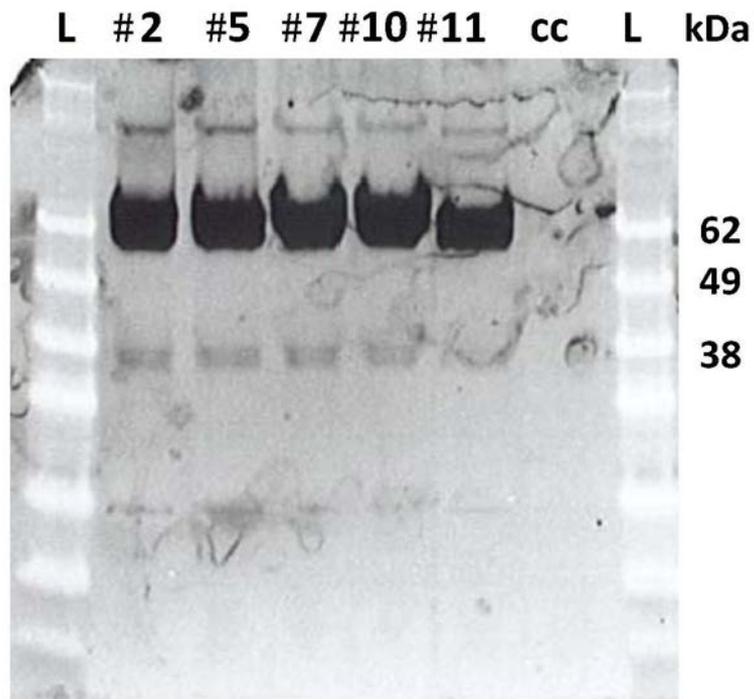


图3



N1322-112B

图4

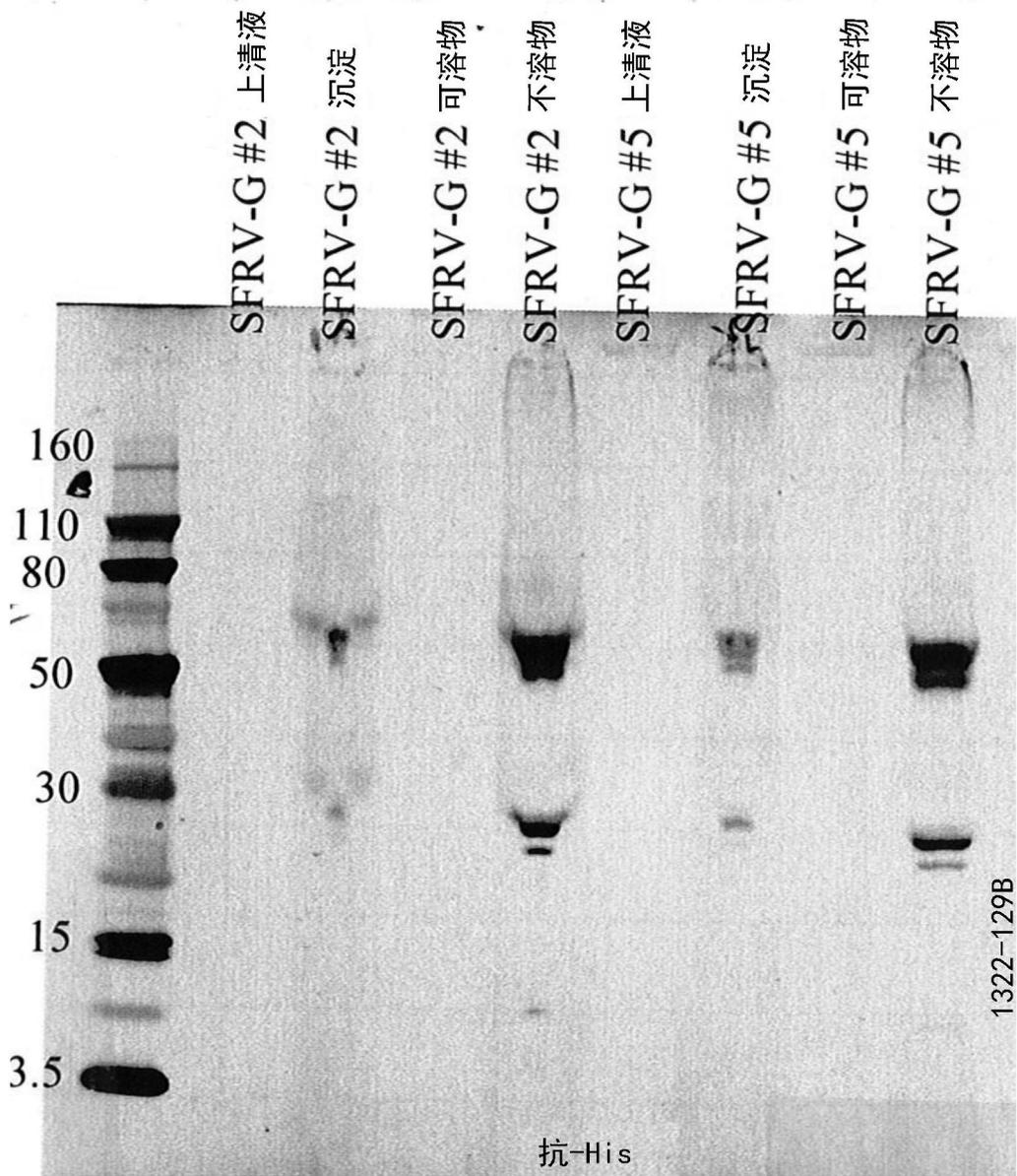


图5

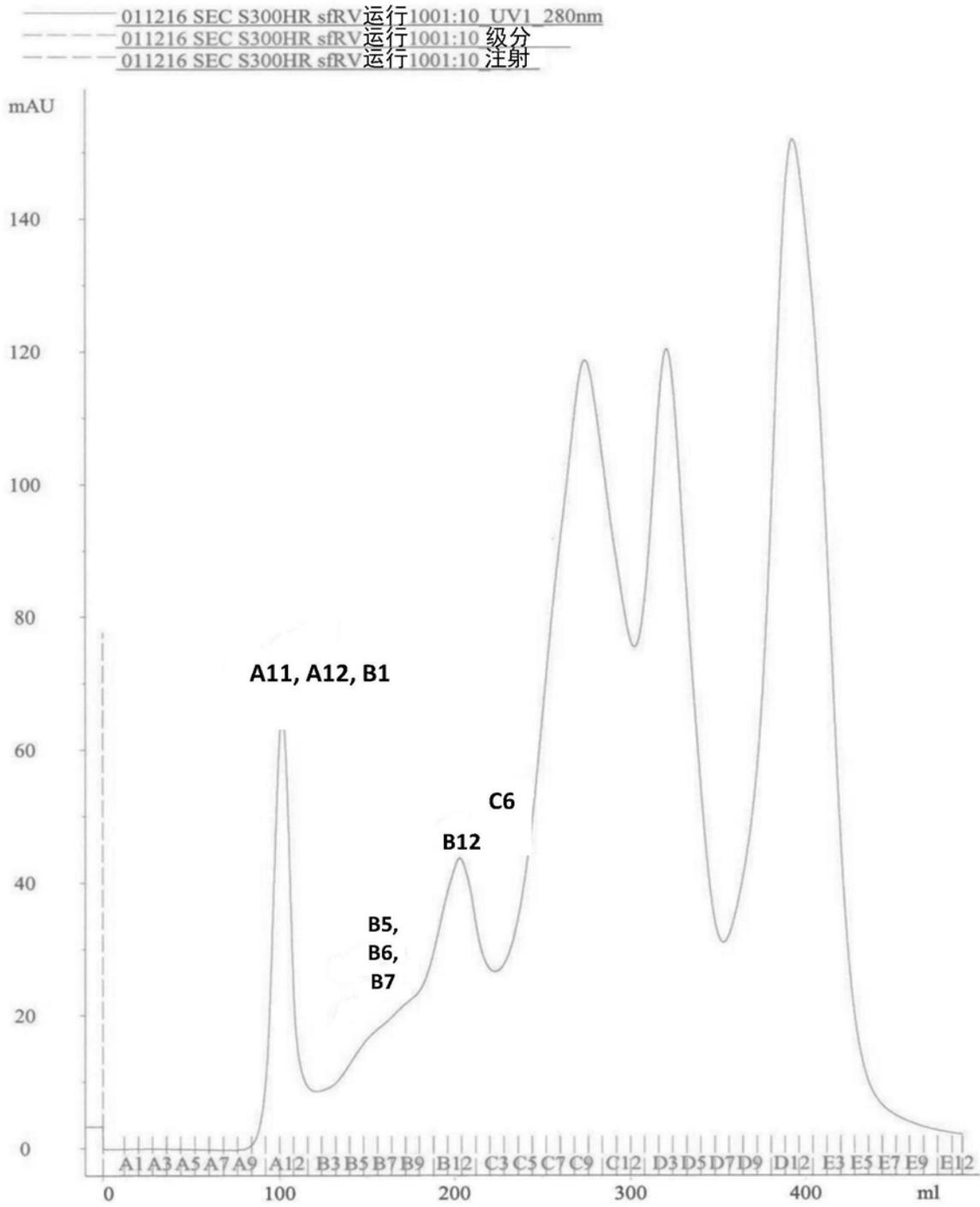


图6

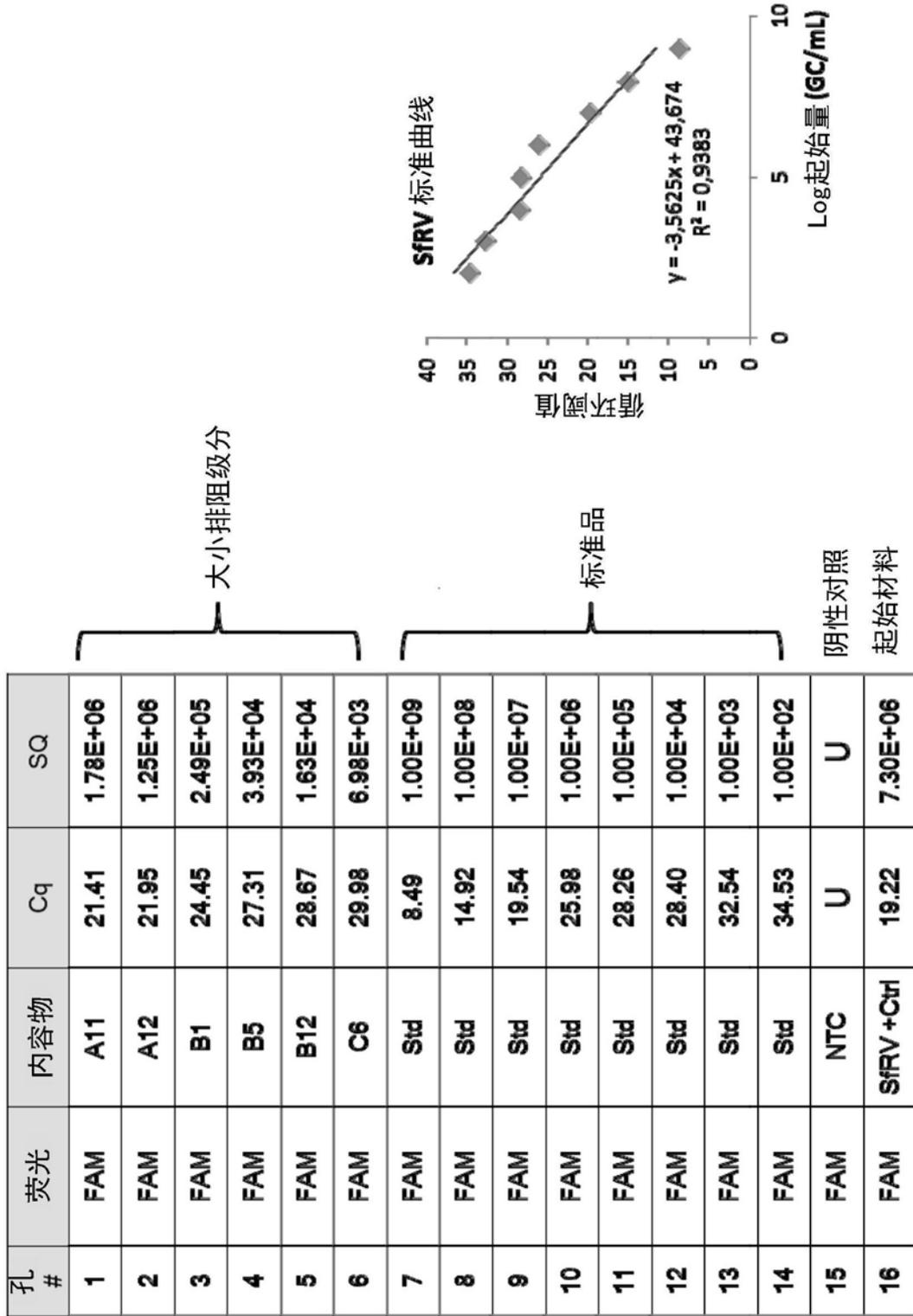


图7

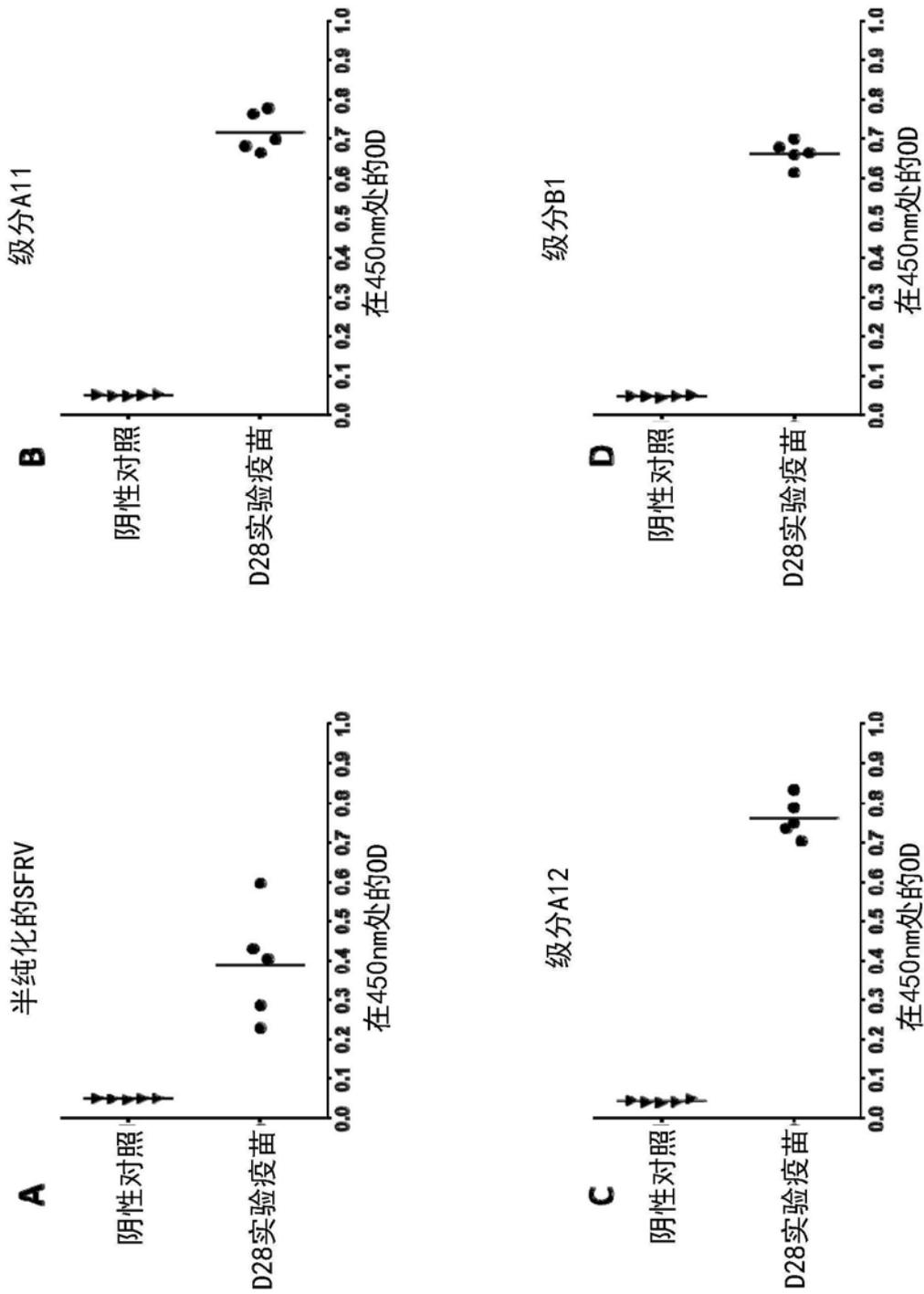


图8