(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105886477 B
(45)授权公告日 2017.08.29

(21)申请号 201610339704.0

(22)申请日 2016.05.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105886477 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:V201548 2015.12.23
CCTCC NO:V201555 2015.12.23
CCTCC NO:V201556 2015.12.23

(73)专利权人 国年实业有限公司
地址 中国台湾台北市中正区忠孝东路2段112号8楼

(72)发明人 林建宏

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245
代理人 苏运贞 陈燕娴

(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
A61K 39/17(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)

(56)对比文件
CN 104988124 A,2015.10.21,全文.
CN 105543180 A,2016.05.04,说明书第5-9段.

审查员 李振鹏

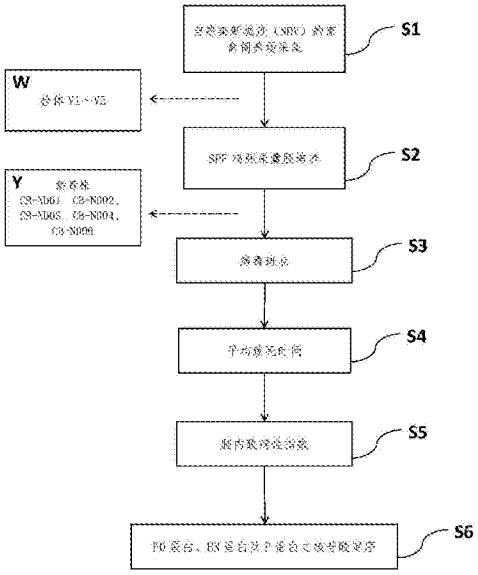
权利要求书1页 说明书11页
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

可用于制备VII型新城疫疫苗的病毒株及其编码基因

(57)摘要

本发明提供一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株及其编码基因。该病毒株位保藏号是CCTCC NO:V201548、名称为鸡七型新城疫病毒(Genotype VII Newcastle disease virus)VII NDV/CB-ND02的病毒株，保藏号是CCTCC NO:V201555、名称为鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND04的病毒株，或保藏号是CCTCC NO:V201556、名称为鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND06的病毒株。该病毒株能够有效提高宿主对新城疫病毒的免疫力、在禽类体内产生抗体免疫持续力，适于研发和制备新城疫疫苗，也可用于制造灭活或减毒型疫苗。



CN 105886477 B

1.一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其特征在于，所述的病毒株为保藏号是CCTCC NO: V201548、名称为鸡七型新城疫病毒(*Genotype VII Newcastle disease virus*)VII NDV/CB-ND02的病毒株，保藏号是CCTCC NO:V201555、名称为鸡七型新城疫病毒(*Genotype VII Newcastle disease virus*)VII NDV/CB-ND04的病毒株，或保藏号是CCTCC NO:V201556、名称为鸡七型新城疫病毒(*Genotype VII Newcastle disease virus*)VII NDV/CB-ND06的病毒株，这三株病毒株于2015年12月23日保藏于位于中国武汉武汉大学的中国典型培养物保藏中心。

可用于制备VII型新城疫疫苗的病毒株及其编码基因

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域，特别是免疫学领域，具体涉及一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株及其编码基因。

背景技术

[0002] 研究报告指出：新城疫(Newcastle disease，ND)是各型禽病中最常见的一种恶性传染病，自1926年新城疫被发现以来，已传播至世界上大部分国家，此新城疫在各地区的流行不大相同。

[0003] 鸡新城疫，1926年首先发现于印度尼西亚，不久又在英国新城发现，之后世界各国均有流行记载。新城疫(ND)是由新城疫病毒(NDV)引起的一种急性传染病，1926年首次爆发于印度尼西亚和英国的新城，故名新城疫病毒(Alexander DJ，1982)。它属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)，腮腺炎病毒属(Rubulavirus)家族的成员(Rima BK et al.，1995)，属于禽类第一型副黏液病毒。其新城疫病毒的基因组为一条单股负链RNA，包含约15kb碱基，六个主要结构蛋白：3’-NP-P-M-F-HN-L-5’。

[0004] 近年来，由于禽类副黏液病毒(Avian Paramyxovirus，APMV)时常被发现于许多种类的家禽、信鸽等禽类间；当感染此种病毒时，经常对于禽鸟造成各种不同的临床症状，例如，造成禽类呼吸、消化和神经系统的障碍等。由于各类型新城疫病毒的毒性强弱差异大，所以新城疫发生率、致病症状、病变征候、及致死率等亦都随着病毒类型不同而明显差异。虽然轻微时病征不显着，然而严重时则会导致死亡，因而晚近已引起世界各国特别地关注、重视并且不断进行此类病原群相关的研究及调查。

[0005] 根据感染能力和感染后所引起的临床症状的严重性差别，新城疫病毒可分为强毒(velogenic)、中毒(mesogenic)和弱毒(lentogenic)三类(AlexanderD J，1997)。NDV强毒株感染力很强，通常以引起强烈性感染为特征；而NDV弱毒株的感染力和致病力很弱，一般无急性感染病症，事实上，包括La Sota等在内的多株弱毒NDV通常在生产上被用做活毒疫苗。

[0006] 然而，因为新城疫的强毒力型病毒感染的死亡率高，对养鸡业危害严重。尚无有效治疗药物，只能依靠严格消毒、隔离，活毒疫苗和灭活疫苗的协同使用预防接种。目前防止新城疫的疫苗主要使用LaSota和Hitchner B1两种弱毒株疫苗或其灭活毒株疫苗，并且这两株病毒作为疫苗毒株已经应用了几十年。LaSota和Hitchner B1两病毒株都属于基因II型，而当前流行亚洲地区的病毒株主要是基因VII型NDV。因此，上述两种疫苗不能在临床应用上提供坚强的免疫保护，此状况也可以解释了新城疫依旧在一些地区爆发流行的原因。

[0007] 此外，基于现有疫苗质量问题、免疫接种方式方法、免疫程序、鸡场饲养管理水平、鸡群抗体水平良莠不齐的现状，使新城疫免疫失败屡见不鲜。可以当作一个好的疫苗候选的病毒株需同时具有毒力弱、和遗传稳定性好的特点，而目前国内外分离到的新城疫病毒普遍存在强毒株的裂解位点、效价低和容易发生变异等缺点。大部分新城疫病毒的F蛋白裂解位点序列为强毒特征，但对鸡的致病力较弱，推测这种毒力的差异可能由于病毒的复制

能力的差异而引起。为解决这一难题，有赖于对本地区流行的毒株的流行特点、变异特点进行研究以及筛选分离出合适的优势疫苗的病毒株，以使新城疫的防控进一步具有针对性和有效性。

[0008] 因此，各界莫不期待以及殷切期盼开发出一种能够解决免疫力反应低、感染力弱、防疫效果持续力弱等的传统技术的缺陷的Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株。

发明内容

[0009] 有鉴于此，本发明人等经由潜心研究及寻找用于解决传统技术缺陷的各种可能方案，进而筛选出一种不但能够克服上述现有技术的缺陷，而且不会危害饲养环境及禽类健康、且具有能够有效提高宿主对新城疫病毒的免疫力反应、对宿主的感染力在安全范围内、产生抗体免疫持续力长等功效、以及能够制成具有长效防治新城疫效能的疫苗的新颖的适用于Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，至此完成本发明。

[0010] 具体而言，本发明的目的在于提供一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，所述的病毒株为保藏号是CCTCC NO:V201548、名称为鸡七型新城疫病毒(Genotype VII Newcastle disease virus)VII NDV/CB-ND02的病毒株，保藏号是CCTCC NO:V201555、名称为鸡七型新城疫病毒(Genotype VII Newcastle disease virus)VII NDV/CB-ND04的病毒株，或保藏号是CCTCC NO:V201556、名称为鸡七型新城疫病毒(Genotype VII Newcastle disease virus)VII NDV/CB-ND06的病毒株，这三株病毒株于2015年12月23日保藏于位于中国武汉武汉大学的中国典型培养物保藏中心。

[0011] 在某些具体实施例中，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株具有F_0蛋白的编码核苷酸序列为SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:3，分别依次对应鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND02、鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND04、鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND06。

[0012] 在某些具体实施例中，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株具有HN蛋白的编码核苷酸序列为SEQ ID NO:4～SEQ ID NO:6，分别依次对应鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND02、鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND04、鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND06。

[0013] 具体而言，根据本发明，在某些具体实施例中，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株具有P蛋白的编码核苷酸序列为SEQ ID NO:7～SEQ ID NO:9，分别依次对应鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND02、鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND04、鸡七型新城疫病毒VII NDV/CB-ND06。

[0014] 另外，在某些具体实施例中，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株具有F_0蛋白的切割点氨基酸序列(112～117)为SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15中的任一种。

[0015] 再者，在某些具体实施例中，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株感染SPF鸡胚的平均致死时间在20～40小时；经过弱化后，所述病毒株的平均致死时间超过60小时。

[0016] 进一步，在某些具体实施例中，本发明提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株感染SPF鸡只的脑内致病性指数的平均数值在1.7～2；经过弱化

后，所述病毒株的脑内致病性指数的平均数值在0.4以下。

[0017] 其中，在某些具体实施例中，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株为感染鸡胚胎培养、动物接种、或组织培养中的至少一种。

[0018] 根据某些具体实施例，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株为感染Vero细胞、BHK-21细胞、或MDCK细胞中的至少一种。

[0019] 进而，根据某些具体实施例，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其中所述病毒株的核苷酸序列，而所述核苷酸序列中一个或多个核苷酸可进一步被其他的核苷酸所置换。

[0020] 此外，本发明的另一个目的在于提供一种免疫原性组合物。根据某些具体实施例，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，更进一步可以用于一种免疫原性组合物，其所述免疫原性组合物可以包含在药学上可接受的载体。

[0021] 再者，根据某些具体实施例，本发明进一步提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，更进一步可以用于制备一种疫苗组合物，其所述疫苗组合物可以包含在药学上可接受的载体。

[0022] 根据某些具体实施例，本发明提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，更进一步可以用于制备一种疫苗组合物，所述疫苗组合物为单价疫苗组合物。

[0023] 根据某些具体实施例，本发明提供了一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，更进一步可以用于制备一种疫苗组合物，其所述疫苗组合物为多价疫苗组合物。

[0024] 下文将对于本说明书中所使用的特定用语或名词进行描述性的说明；然而，下列说明仅为例示性说明，意图并非用于限制本发明说明书及申请专利范围。除非本说明书另有定义以外，在本文中所用的科学与技术词汇的含义与本发明所属技术领域中具有通常知识者所理解与惯用的意义相同。

[0025] 在本文中，所谓“适用于Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株”指的是病毒株能够用来引起宿主免疫反应的特异性抗原，其包括但不限于全病毒、表面血球凝集抗原(hemagglutinin surface antigen)、表面神经胺酸酶抗原(neuraminidase surface antigen)、及内部核白衣抗原(internal nucleocapsid antigen)、或衍生物等。

[0026] 本文术语中关于禽类VII基因型新城疫感染的"预防"指的是抑制禽类VII基因型新城疫病毒株复制、抑制禽类VII基因型新城疫病毒株传播、或预防禽类VII基因型新城疫病毒株在其宿主中生长、以及缓和禽类VII基因型新城疫病毒株感染引起的疾病或病症的症状。本发明方法具有多方面的技术效果，例如可有效的预防以及降低禽类呼吸道及神经系统的损害。

[0027] 本文术语的"禽类VII基因型新城疫灭活疫苗"意指用于预防因若感染禽类第VII基因型新城疫病毒株引起的病症或疾病的疫苗。禽类VII基因型新城疫灭活疫苗可包括任何有效治疗或预防禽类经禽类VII基因型新城疫感染的疫苗。优选地，本发明方法使用的病毒株疫苗为禽类VII基因型新城疫灭活疫苗。

[0028] 本文术语的"动物"意指所有非人类动物，包括哺乳动物。

[0029] 本文术语的"禽类"意指小鸡、鸡、火鸡、鸭、母鸡、雌鸡、阉鸡、土鸡、公鸡、山鸡及禽类属的成员。

[0030] 优选地，本发明方法施用于非人类的哺乳动物；最优选地为禽类。

[0031] 本文术语的"病毒株疫苗"意指适用于作为疫苗的灭活全部灭活或部分灭活的禽类VII基因型新城疫病毒株，可以为鸡胚尿囊及/或细胞制剂。

[0032] 本文术语的"有效量"意指于投用后可充分引起禽类免疫反应的禽类VII基因型新城疫灭活疫苗量。免疫反应包含(而未限制)先天诱发的、细胞的及/或体液免疫反应。

[0033] 在本文中，对于用以界定本发明范围的数值与参数，本质上不可避免地含有因个别测试方法所致的标准偏差，因而大多是以约略的数量值来表示，然而中具体实施例中则尽可能精确呈现的相关数值。在本文中，「约」通常视本领域技术人员的考虑而定，一般系指代表实际数值落在平均值的可接受标准误差之内，例如，所述实际数值为在一特定数值或范围的±10%、±5%、±1%、或±0.5%以内。

[0034] 本发明于自野外田间采样分离出一种适用于Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株。

[0035] 具体而言，本发明提供一种可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，所述病毒株的生物保藏号为V201548、V201555、V201556，命名为CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06。

[0036] 根据某些具体实施例，本发明的可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，所述病毒株可用于制备疫苗，编码F_0蛋白的核苷酸序列的长度并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明精神以及能够达到引起宿主免疫反应效果的范围内即可。举例来说，对于可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株而言，所述编码F_0蛋白的核苷酸序列可以是例如第1个核苷酸至约第900个核苷酸的范围；在某些具体实施例中，优选为约20个核苷酸至约第800个核苷酸的范围；更优选为在约50个核苷酸至约第700个核苷酸的范围；特别优选为在约60个核苷酸至约第600个核苷酸的范围；最优选为在约100个核苷酸至约第500个核苷酸的范围。

[0037] 根据某些具体实施例，本发明的可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，可用于制备疫苗，编码HN蛋白的核苷酸序列的长度并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明精神以及能够达到引起宿主免疫反应效果的范围内即可。举例来说，对于可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株而言，所述编码HN蛋白的核苷酸序列可以是例如第1个核苷酸至约第900个核苷酸的范围；在某些具体实施例中，优选为约20个核苷酸至约第800个核苷酸的范围；更优选为在约50个核苷酸至约第700个核苷酸的范围；特别优选为在约60个核苷酸至约第600个核苷酸的范围；最优选为在约100个核苷酸至约第500个核苷酸的范围。

[0038] 根据某些具体实施例，本发明的可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，用于制备疫苗，编码P蛋白的核苷酸序列的长度并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明精神以及能够达到引起宿主免疫反应效果的范围内即可。举例来说，对于用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株而言，所述P蛋白的核苷酸序列可以是例如第1个核苷酸至约第1188个核苷酸的范围；在某些具体实施例中，较优选为约20个核苷酸至约第1100个核苷酸的范围；更优选为在约50个核苷酸至约第900个核苷酸的范围；特别优选为在约60个核苷酸至约第850个核苷酸的范围；最优选为在约100个核苷酸至约第800个核苷酸的范围。

[0039] 根据某些具体实施例，本发明的用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，其具有F_0蛋白的切割点氨基酸序列并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明之精神，以及能够达到引起宿主致病力的F_0蛋白的切割点氨基酸序列即可。举例来说，对于可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株而言，所述病毒株具有F_0蛋白的切割点氨基酸序列，例如可以是^{112}RRQKRF^{117}、^{112}RRQRRF^{117}、^{112}KRQKRF^{117}、或^{112}KRQRRF^{117}至少其中一种；在某些具体实施

例中，较优选为^{112}RRQKRF^{117}、^{112}RRQRRF^{117}、^{112}KRQKRF^{117}、或^{112}KRQRRF^{117}至少其中一种；更优选为^{112}RRQKRF^{117}、^{112}RRQRRF^{117}、或^{112}KRQKRF^{117}至少其中一种；特别优选为^{112}RRQKRF^{117}、或^{112}RRQRRF^{117}。

[0040] 根据某些具体实施例，本发明的用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，其宿主平均死亡时间(MDT)的病原性鉴定的效果并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明精神以及能够达到引起宿主平均死亡时间的范围内即可。举例来说，对于可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株而言，所述病毒株使宿主平均死亡时间，例如可以是约1个小时至约120个小时的范围；在某些具体实施例中，较优选为约5个小时至约110个小时的范围；更优选为在约10个小时至约90个小时的范围；特别优选为在约20个小时至约80个小时的范围；最优选为在约30个小时至约60个小时的范围。

[0041] 具体而言，根据本发明提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，所述病毒株经过弱化后，其所述病毒株的平均致死时间超过60小时。

[0042] 根据某些具体实施例，本发明的用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，其宿主脑内致病性指数(ICPI)的病原性鉴定的效果并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明之精神以及能够达到引起宿主大脑内接种致病性指数的范围内即可。举例来说，对于可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株而言，所述病毒株使宿主大脑内接种致病性指数，例如可以是平均值约0至约2的范围；在某些具体实施例中，较优选为平均值约0.5至约1.99的范围；更优选为平均值约0.6至约1.95的范围；特别优选为平均值约0.7至约1.9的范围；最优选为平均值约0.9至约1.85的范围。

[0043] 具体而言，本发明提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株，所述病毒株经过弱化后，其所述病毒株的脑内致病性指数的平均数值在0.4以下。

[0044] 其中，在某些具体实施例中，本发明的用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，其中所述病毒株感染培养方式并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明之精神即可。举例来说，例如可以是鸡胚胎培养、动物接种、或组织培养。根据本发明的某些具体实施例，所述病毒株系用为感染培养方式例如可以是自鸡胚胎培养、动物接种、或组织培养中的至少一种；适用于本发明的可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的病毒株较优选的感染培养方式是使用鸡胚胎培养、动物接种、或组织培养；更优选的感染培养方式是鸡胚胎培养、或组织培养；特别优选为鸡胚胎培养。

[0045] 本发明的用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，其感染细胞种类并未特别加以限定，只要是在不违背或脱离本发明之精神即可。举例来说，例如可以是Vero细胞、BHK-21细胞、或MDCK细胞。根据本发明的某些具体实施例，所述感染细胞种类的细胞株来源例如可以是Vero细胞、BHK-21细胞、或MDCK细胞中的至少一种；本发明的可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株的感染细胞种类较优选使用来源为Vero细胞、BHK-21细胞、或MDCK细胞；更优选使用来源为Vero细胞、或BHK-21细胞；特别优选使用来源为Vero细胞。

[0046] 具体而言，本发明提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，其中所述新城疫病毒株的核苷酸序列，而所述核苷酸序列中一或多个核苷酸可进一步被其他的核苷酸所置换。

[0047] 此外，具体而言，根据本发明之一可以提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，更进一步提供了一种免疫原性组合物，其包含在药学上可接受的载体。

[0048] 另外，具体而言，本发明提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，更进一步提供了一种疫苗组合物，其包含在药学上可接受的载体。

[0049] 再者，具体而言，本发明提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，更进一步提供了一种疫苗组合物，其为单价疫苗组合物。

[0050] 另外，具体而言，本发明提供一种用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株，更进一步提供了一种疫苗组合物，其为多价疫苗组合物。

附图说明

[0051] 图1概略显示了在本发明的一具体实施例中之Ⅶ型新城病疫苗病毒株的采集步骤之流程图：

[0052] 在该图1中，步骤S1：表示自感染新城疫(NDV)的家禽饲养场采集病毒株之步骤；

[0053] 步骤S2：表示将在步骤1所采集到的病毒株于SPF鸡胚尿囊胚中培养之步骤；

[0054] 步骤S3：表示观测感染细胞有无出现病毒斑点之步骤；

[0055] 步骤S4：表示量测感染鸡胚之平均致死时间之步骤；

[0056] 步骤S5：表示量测感染鸡胚之脑内致病性指数之步骤；

[0057] 步骤S6：表示对于S1步骤采集到的Ⅶ型新城病疫苗病毒株进行其F_0蛋白、HN蛋白及P蛋白的核苷酸定序之步骤；

[0058] W：表示检体V1～V5；

[0059] Y：表示病毒株CB-ND01、CB-ND02、CB-ND03、CB-ND04、CB-ND06。

具体实施方式

[0060] 以下实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本发明的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。以下，进一步列举实施例来说明本发明之病毒株之分离与筛选方法。

[0061] 实施例1～5

[0062] 《野外田间病例采集病毒株》

[0063] 首先，依照如图1所示之Ⅶ型新城病疫苗之病毒株的采集步骤，自曾感染新城疫(NVD)的家禽类饲养场，从已感染鸡只的肺、气管、肠、及脑部采集组织病理样本，共采集5个样本，每个样本各10克重。于室温，将所述5个组织病理样本分别置放于含有2％胎牛血清的MEM培养基(modified minimal essential medium)中，以组织研磨机(homogenizer)充分磨碎；分别取其悬浮液，接着以1,500rpm离心15分钟后，再以0.2μm滤膜过滤；取其上清液做为待检样本V1-V5。《鸡胚尿囊腔培养病毒株》

[0064] 接着，取50ml所述待检样本V1-V5接种在9日龄无特定病源(specific pathogen free；SPF)的鸡胚尿囊腔中，然后放置于37℃的孵卵器中培养，继续培养7日并观察每日鸡胚死亡的情况。对于死亡的鸡胚进行病理解剖并收集尿囊腔中的液体做为病毒株样本，编码CB-ND01、CB-ND02、CB-ND03、CB-ND04、CB-ND06。

[0065] 《含有新城疫病毒的感染待检样本有产生病毒斑点》

[0066] 首先，用病毒株样本分别和Vero细胞株(绿猴肾细胞，ATCC：CCL81)在6孔培养盘中

一起培养，于含有10％胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的DMEM培养基(Dulbecco's modified Eagle medium)(5毫升/孔)、5％CO_2及37℃的培养环境下培养。

[0067] 使上述细胞，长到细胞密度(confluence)达到约80％左右，成单层Vero细胞后。将上述单层Vero细胞去除原先的培养基，以磷酸缓冲溶液(phosphate-buffered saline;PBS,pH＝7.2)清洗一次后，每孔加入0.5ml含病毒株样本的培养液，进行培养液稀释，倍数分别为10^1倍、10^2倍、10^3倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍，最后一孔为0.5ml细胞培养液对照组。

[0068] 把培养盘放置于5％CO_2及37℃的环境下培养，作用一个小时；在作用期间每15分钟轻摇培养盘，让含病毒株样本的培养液可以均匀覆盖细胞层。

[0069] 继而，移除含病毒株样本的培养液，每孔加入4ml含1％琼脂(agar)的维持培养液，放置于5％CO_2及37℃的培养环境下培养，培养后经过48小时，挑选培养细胞中有因病毒感染而产生明显CPE，且于每个孔加入0.5ml浓度为0.1％的中性红溶液，再以锡箔纸包住，置于5％CO_2及37℃的培养环境下培养，培养至隔夜后，进行观察病毒斑点产生的状况。

[0070] 根据本发明之实施例1～实施例5的NDV的病毒株样本在感染细胞后，有无产生CPE结果，统计如《表1》所示。

[0071] 表1

[0072]

	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5
病毒株样本	CB-ND01	CB-ND02	CB-ND03	CB-ND04	CB-ND06
感染宿主细胞	Vero	Vero	Vero	Vero	Vero
CPE	N	Y	N	Y	Y

[0073] 实施例6～10

[0074] 《新城疫疫病毒的鉴定》

[0075] 1.平均致死时间(Mean death time,MDT)

[0076] 在室温下，从以PBS稀释10^6倍、10^7倍、10^8倍、10^9倍的含有实施例1～实施例5的病毒株样本CB-ND01～CB-ND06的稀释液中，各取0.1ml，分别接种于5个9～10日龄SPF鸡胚，然后放置于37℃的孵卵器中培养，以每日2次的频率实施照蛋检查，记录鸡胚死亡时间，总计连续实施7日，并计算最小致死剂量(the minimum lethal dose,MDT)。

[0077] 实施例6～实施例10的NDV的MDT鉴定结果记载于表3。

[0078] 表3

[0079]

	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10

[0080]

病毒株样本	CB-ND01	CB-ND02	CB-ND03	CB-ND04	CB-ND06
感染宿主	SPF 鸡胚	SPF 鸡胚	SPF 鸡胚	SPF 鸡胚	SPF 鸡胚
MDT(hr)	120	40	125	44	48
病毒鉴定	Vw	Vs	Vw	Vs	Vs

[0081] 根据表3的实施例6至实施例10的CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06新城疫病毒株的MDT

试验结果，可以确认的MDT皆在44小时至48小时之间，因而CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06三株病毒株为强毒株，而且可以确认本发明的病毒株的病毒力价明显优于目前市售疫苗的病毒株，例如，BC病毒株(MDT:62小时)、LaSota病毒株(MDT:90小时)等。

[0082] 另一方面，实施例1的CB-ND01、实施例3的CB-ND03之MDT都超过120小时以上，因而CB-ND01、CB-ND03为弱病毒株。

[0083] 《脑内致病性指数》(Intracerebral pathogenicity index;ICPI)

[0084] 首先，要测量出1单位(1HAU)的抗原最高稀释倍数仍有血球凝集作用的为HA效价；先在U型平盘每孔加入50μL HI缓冲液(3.25g KH_2PO_4、10.8g Na_2HPO_4、170g NaCl、D_3W加至2,000mL)。

[0085] 第一孔加入待测血清病毒抗原50μl，与生理盐水充分混合后吸取25μl注入第二孔中，如此进行二倍连续稀释，最后一孔弃置25μl混合液。

[0086] 最后每孔加50μL 1％鸡红血球液(cRBC)，并于室温作用30分钟后判读；以抗原最高稀释倍数仍有血球凝集作用的为其HA效价，此即为1单位(1HAU)之抗原最高稀释倍数仍有血球凝集作用的为HA效价。

[0087] 抽取病毒株样本且HA效价高于16者，以生理盐水稀释10倍，在于每组10只，1日龄SPF鸡脑内接种，每只0.05ml，接种后每24小时观察一次，连续观察8日，正常鸡记录值为0，病鸡1，死亡鸡2，ICPI即为全部8日内每日每只鸡的平均数值。

[0088] 实施例11～15

[0089] 实施例6～实施例10NDV的ICPI鉴定结果记载于表4。

[0090] 表4

[0091]

	实施例11	实施例12	实施例13	实施例14	实施例15
病毒株样本	CB-ND01	CB-ND02	CB-ND03	CB-ND04	CB-ND06
感染宿主	SPF鸡只	SPF鸡只	SPF鸡只	SPF鸡只	SPF鸡只
ICPI	1.79	0.1	1.75	0.3	1.74
病毒鉴定	Vw	Vs	Vw	Vs	Vs

[0092] 根据表4的实施例11～实施例15之CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06新城疫病毒株的ICPI试验结果，可以确认ICPI的平均数值皆在1.7至1.8之间，因而CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06之三株病毒株为强毒株，而且可以确认本发明之病毒株的毒价明显优于目前市售疫苗的病毒株，例如，BC病毒株(ICPI:0.25)、LaSota病毒株(ICPI:0.5)等。

[0093] 另一方面，实施例11的CB-ND01、实施例13的CB-ND03的ICPI都在0.3以下，因而CB-ND01、CB-ND03为弱病毒株。

[0094] 实施例16～20

[0095] 《新城疫病毒之定序》

[0096] 首先，要对本发明的新城疫病毒株提取RNA，但为避免RNase污染实验器具及消化病毒RNA而影响结果，所有使用于接触RNA的溶液均以焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)处理过的蒸馏水配制。其他塑料性材料经高压灭菌后，也应置于操作RNA病毒专用的特定保存处，以避免与操作非RNA的材料混用。

[0097] 再来，把上述从尿囊腔中收集到的感染待检样品V1-V5，取250μL尿囊液与750μL

TriZole(Invitrogen)混合静置5分钟，加入200μL氯仿(chloroform)混合至乳糜状，于室温静置10分钟后再以13,000rpm，4℃离心10分钟，取上层水液约500μL至新的离心管，加入等量异丙醇(isopropanol)均匀混合，于4℃以13,000rpm离心10分钟后倒弃上层液，加入1mL 70％酒精洗去盐类，再以4℃13,000rpm离心10分钟，倒弃上层液，将沉淀物置50-60℃烘箱烘干，以DEPC处理过的水50μL悬浮沉淀物，感染样本(I1～I5)。

[0098] 再者，将感染样本(I1～I5)先和Vero细胞株在含有2％胎牛血清的DMEM培养基中一起培养，再利用市售购得的核醣核苷酸(RNA)提取试剂盒(QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen Inc.,Santa Clara,CA)，将感染样本(I1～I5)中的RNA，自感染细胞株中提取出来作为感染病毒的RNA样本(R1～R5)。

[0099] 以RNA样本(R1～R5)为模板，利用一般实验室已知常用的反转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription-PCR，简称RT-PCR)技术，将病毒全长基因复制成若干片段后，以进行第一股cDNA合成。

[0100] 随后进行聚合酶连锁反应(polymerase chain reaction;PCR)，利用表5中的引子序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11当作聚合酶连锁反应之引物，及配合反应条件为先加热94℃、5分钟，破坏反应混合液中所存在的蛋白酶，再进行35个循环反应。每个反应为94℃、1分钟的变性反应，55℃、1分钟的炼合反应(退火反应)，72℃、每1Kb使用1分钟的DNA合成反应。经35个循环反应后，再作用72℃、10分钟，将PCR合成产物的两端补齐，其反应结束后，其可以得到目标基因之F蛋白的产物。

[0101] PCR反应后。取5μL在1％琼脂糖(agarose)胶片中电泳，分析PCR产物中DNA片段大小见《表6》。

[0102] 《表5》

[0103]

引物	核苷酸序列(5’-3’)	目标核苷酸位置	目标基因
SEQ ID NO:10	ATGGGCTCCA GATCTTCTAC	47-66	F
SEQ ID NO:11	CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC	581-557	F

[0104] 《表6》

[0105]

	实施例16	实施例17	实施例18	实施例19	实施例20
病毒株样本	CB-ND01	CB-ND02	CB-ND03	CB-ND04	CB-ND06
感染细胞	Vero	Vero	Vero	Vero	Vero
感染样本	I1	I2	I3	I4	I5
RNA样本	R1	R2	R3	R4	R5
DNA片段大小(bp)	X	535	X	535	535

[0106] 实施例21～25

[0107] 接下来，将上面实施例16～实施例20后的产物放置在冰上，取45μL PCR产物于1％琼脂糖胶片中进行电泳。完成电泳后的胶体置于含5μg/mL EB(ethidium bromide)染色液内，浸泡5分钟，再以二次蒸馏水褪染10分钟。

[0108] 在波长320nm紫外灯下，以手术刀片切下所述特定DNA片段的胶片。放入已预先秤重的微量离心管，再秤其总重量，计算胶片重量。

[0109] 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(agarose gel extractionkit,VIOGENE Gel Extraction System),自琼脂糖凝胶体中回收DNA。首先于装有胶体的微量离心管中加入0.5mL buffer GEX。置于60℃水浴10分钟,每隔2分钟反转离心管,使GEX均匀悬浮于溶液中。将凝胶回收柱子(Gel extraction column)套入收集管,将溶解的胶及GEX混合液加入column 13000rpm离心30秒,去除滤液;加入0.5mL洗涤缓冲液(Washing Buffer)于13000rpm离心30秒,弃除滤过液体;再加入0.7mL洗涤缓冲液(Washing Buffer),于13000rpm离心30秒后弃除过滤液;将柱子(column)放入一新的收集管,加入30μL经DEPC处理过的二次蒸馏水,静置1分钟后13000rpm离心2分钟,收集滤过液达到本发明新城疫病毒株遗传物质的纯化,直接进行新城疫病毒株的F_0蛋白切割点氨基酸序列、及全基因核苷酸序列分析(用全自动分析仪),结果记载表7及表8。

[0110] 《表7》

[0111]

实施例	病毒株样本	F_0蛋白之切割点氨基酸序列	病毒鉴定
21	CB-ND01	^{112}GKQGRL^{117}	Vw
22	CB-ND02	^{112}RRQKRF^{117}	Vs
23	CB-ND03	^{112}ERQERL^{117}	Vw
24	CB-ND04	^{112}RRQRRF^{117}	Vs
25	CB-ND06	^{112}KRQKRF^{117}	Vs

[0112] 表7显示了实施例21～实施例25的NDV F_0蛋白的切割点氨基酸序列的分析结果。根据表7所述的F_0蛋白切割点氨基酸序列数据,可以确认实施例22的CB-ND02、实施例24的CB-ND04、实施例26的CB-ND06为强毒株;而且可以确认本发明的病毒株具有强病毒株F_0蛋白切割点氨基酸序列,明显不同于目前市售疫苗之病毒株,例如,BC病毒株(^{112}GRQGRL^{117})、LaSota病毒株(^{112}GRQGRL^{117})等。

[0113] 另外,可以确认实施例21的CB-ND01、实施例23的CB-ND03为弱毒株。

[0114] 因此,CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06的新城疫强毒株具有由Q隔开的两对碱性氨基酸,且容易被宿主的蛋白水解酶(furin)识别和裂解;而CB-ND01、CB-ND03的新城疫弱毒株不具有由Q隔开的两对碱性氨基酸,而以非活性前体F_0蛋白的形式传递到子代,不易被宿主的蛋白水解酶(furin)识别和裂解,感染活性降低或丧失。

[0115] 综上,实施例1～实施例25例示的本发明的可用于制备Ⅶ型新城疫疫苗的新城疫病毒株CB-ND01、CB-ND02、CB-ND03、CB-ND04、CB-ND06中,CB-ND02、CB-ND04、CB-ND06为强病毒株;CB-ND01、CB-ND03为弱病毒株。

[0116] 从而,可以确认本发明的新城疫病毒株与市售疫苗的病毒株相比,MDT的感染效果强50%,且ICPI的平均数值高出接近2倍效果。本发明的禽类VII基因型病毒株能够明显地引起鸡只的免疫反应,进而可以开发为具有对抗VII基因型新城疫感染的疫苗及其相关应用。

[0117] 【生物材料保藏】

[0118] 将本发明该病毒株保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center For Type Culture Collection,CCTCC),保藏日为2015年12月23日;CB-ND02病毒株的保藏号为CCTCC NO:V201548,CB-ND04病毒株的保藏号为V201555、CB-ND06病毒株的保藏号为CCTCCNo:

V201556。

[0119] 综上所述，本发明的内容已经以如上的实施例举例说明，然而本发明并非仅限定于此等实施方式而已。本发明所属技术领域中具有通常知识者，在不脱离本发明的精神和范围内，当可再进行各种的更动与修饰；例如，将前述实施例中所例示的各技术内容加以组合或变更而成为新的实施方式，此等实施方式也当然视为本发明所属内容。因此，本案所欲保护的范围也包括前述的申请专利范围及其所界定的范围。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 国牧实业有限公司
<120> 可用于制备VII型新城疫疫苗的病毒株及其编码基因
<130> 1
<160> 15
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 529
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 1
atgggctcca gatcttctac caggatccca gaacctctga tgctgatcac tcggattatg 60
ctgatattga gctgtatccg tctgacaagc tcccttcacg gcaggcctct tgcagctgca 120
ggaattgtag taacaggaga taaggcagtc agtgtataca cctcatctca gacagggtca 180
atcatagtca aattgctccc gaatatgccc aaggataagg aggcgtgtgc aaaagcccca 240
ttagaggcat ataacagaac actgactact ttgctcactc ctcttggcga ttccatccgc 300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtctgga ggaaggagac aaaaacgctt tataggtgcc 360
gttattggca gtgtagctct tggggttgca acagcggcac agataacagc agctgcggcc 420
ctaatacagg ccaaccagaa tgccgccaac atcctccggc ttaaggagag cattgctgca 480
accaatgaag ctgtgcatga agtcaccgac ggattatcac aactagcag 529

<210> 2
<211> 389
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 2
atgggctcca gatcttctac caggatccca gaacctctga tgctgatcac tcggattatg 60
ctgatattga gctgtatccg tctgacaagc tcccttgacg gcaggcctct tgcagctgca 120
gggattgtag taacaggaga taaggcagtc aatatataca cctcatctca gacagggtca 180
atcatagtca aattgctccc gaatatgccc aaggataagg aggcgtgtgc aaaagcccca 240
ttagaggcat ataacagaac actgactact ttgctcactc ctcttggcga ttccatccgc 300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtctgga ggaaggagac aaaaacgctt tataggtgcc 360
gttattggca gtgtagctct tggggttgc 389

<210> 3
<211> 374
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 3
atgggctcca gatcttctac caggatccca gcacctctga tgctgatcac tcggattatg 60
ctgatattta gctgcatccg tctgacaagc tcccttgacg gcaggcctct tgcagctgca 120
ggaattgtag taacaggaga taaggcagtc aatgtataca cctcatctca gacagggtca 180
atcatagtca aattgctccc gaatatgccc aaggataagg aggcgtgtgc aaaagcccca 240
ttagaggcat ataacagaac actgactgct ttgctcactc ctcttggcga ttccatccgc 300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtctgga ggaaggagac aaaaacgctt tataggtgcc 360
gttattggca gtgt 374

[0002]

<210> 4
<211> 426
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 4

tgcagtgtga gtgcaactcc tttaggttgt gatatgctgt gctctaaggt cacagagatt 60
gaggaggagg attacaagtc agttaccccc acatcgatgg tgcacgggag gctagggttt 120
gacggtcaat accatgagaa ggacttagat accacagtct tatttaagga ttgggtggca 180
aattacccag gagtgggggg agggtctttt atcgatgacc gtgtacggtt cccagtttac 240
ggagggctca aacccaattc acccagtgac gctgcacagg aagggaaata tgtaatatac 300
aagcgccata acaacacatg ccccgataga caagattacc aaattcggat ggctaagtct 360
tcatataaac ccaggcgatt tggtggaaag cgcgtacagc aagccatctt atctatcaaa 420
gtgtca 426

<210> 5
<211> 1716
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 5

atggaccgcg cggttaacag agtcgtgcta gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca 60
tggcgcctgg ttttccggat cgcagtctta cttttaatgg taatgactct agctatctct 120
tcagctgccc tggcatacag cacgggggcc agtacgcccc acgacctcgc aggcatatcg 180
actgtgatct ccaagacaga agataaggtt acgtctttac tcagttcaag tcaagacgtg 240
atggatagga tatataagca ggtggctctt gaatccccgc tagcgctact aaacactgaa 300
tctataatta tgaatgcaat aacctctctt tcttatcaaa tcaacggggc tgcgaacagc 360
agcgggtgtg gggcgcctgt tcatgaccca gactacatcg gggggatagg caaagaactc 420
atagtggacg acattagtga tgtcacatca ttttatcctt ctgcgtatca agaacactig 480
aatttcatcc cggcacctac tacaggatct ggttgcactc ggataccctc atttgacatg 540
agcaccactc actactgtta tactcacaat gtgatattat ctggttgcag agatcactca 600
cactcacatc aatacttagc acttggtgtg cttcggacat ctgcaacagg gagggtattc 660
ttttctactc tgcgctccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ctgcagtgtg 720
agtgcaaccc ctttaggttg tgatatgctg tgctctaagg tcacagagat tgaggaggag 780
gattacaagt cagttacccc cacatcgatg gtgcacggga ggctagggtt tgacggtcaa 840
taccatgaga aggacttaga taccacagtc ttatttaagg attgggtggc aaattaccca 900
ggagtgggag gagggtcttt tatcgatgac cgtgtatggt tcccagttta cggagggctc 960
aaacccaatt cacccagtga cgctgcacag gaagggaaat atgtaatata caagcgccat 1020
aacaacacat gccccgatgg acaagattac caaattcgga tggctaagtc ttcatataaa 1080
cccaggcgat ttggtggaaa gcgcgtacag caagccatct tatccatcaa agtgtcaaca 1140
tccttgggta aggacccggt gctgactatt ccgcctaata caattacact catgggagcc 1200
gaaggcagaa ttctcacagt ggggacatct cacttcttat atcaacgagg gtcttcatat 1260
ttctcccctg ccttattata tcccatgaca gtaaataaca aaacagctac actccatagt 1320
ccttatacgt ttaatgcttt tactcggcca ggtagtatcc cttgccaggc atcagcaaga 1380
tgccccaact catgcatcac tggggtctat acggatccat atcccttaat cttccatagg 1440
aatcataccc tacgaggggt cttcgggacg atgcttgatg atgaacaagc aagacttaac 1500
cccgtatctg cagtattcga cgacatatcc cgcagtcgtg taacccgggt gagttcaagc 1560
agcaccaagg cagcatncac gacatcgaca tgttttaaag ttgtccagac caataaagtt 1620
tattgtctta gtattgcaga aatatccaat accctattcg gggaatttag gattgttccc 1680
ttactagttg agatcctcaa ggatgatagg gtttaa 1716

<210> 6
<211> 1716
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒

[0003]

<400> 6

atggaccgcg cggttaacag agtcgtgcta gagaatgagg aaagagaagc aaagaacaca 60
tggcgcctag ttttccggat cgcagtctta cttttaatgg taatgactct agctatctct 120
tcagctgccc tggcatacag caccgggggcc agtacgcccc acgaccttgc aggcatatcg 180
actgtgatct ccaagacaga agataaggtt acgtctttac tcagttcaag tcaagacgtg 240
atggatagga tatataagca ggtggctctt gaatccccgc tagcgctact aaacactgaa 300
tctataatta tgaatgcaat aacctctctt ccttatcaaa tcaacggggc tgcgaacagc 360
agcgggtgtg gggcgcctgt tcatgaccca gactacatcg gggggatagg caaagaactc 420
atagtagacg acattagtga tgtcacatca ttttatcctt ctgcgtatca agaacacttg 480
aatttcatcc cggcacctac cacaggatct ggttgcactc ggataccctc atttgacatg 540
agcaccactc actactgtta tactcacaat gtgatattat ctggttgcaa agatcactta 600
cactcacatc aatacttagc acttggtgtg cttcggacat ctgcaacagg gagggtattc 660
ttttctactc tgcgctccat caatttagat gacacccaaa atcggaagtc ctgcagtgtg 720
agtgcaaccc ctttaggttg tgatatgctg tgctctaagg tcacagagat tgaggaggag 780
gattacaagt cagttacccc cacatcgatg gtgcacggga ggctagggtt tgacggtcaa 840
taccatgaga aggacttaga taccacagtc ttatttaagg attgggtggc aaattaccca 900
ggagtgggag gagggtcttt tatcgatgac cgtgtatggt tcccagttta cggagggctc 960
aaaacccaatt cacccagtga cgctgcacag gaagggaaat atgtaatata caagcgccat 1020
aacaacacat gccccgatgg acaagattac caaactcgga tggctaagtc ttcatataaa 1080
cccaggcgat ttggtggaaa gcgcgtacag caagccatct tatccatcaa agtgtcaaca 1140
tccttgggta aggacccggt gctgactatt ccgcctaata caattacact catgggagcc 1200
gaaggcagaa ttctcacagt ggggacatct cacttcttat atcaacgagg gtcttcatat 1260
ttctcccctg ccttattata tcccatgaca gtaaataaca aaacagctac actccatagt 1320
ccttatacgt ttaatgcttt tactcggcca ggtagtatcc cttgccaggc atcagcaaga 1380
tgccccaact catgcatcac tggggtctat acggatccat atcccttaat cttccatagg 1440
aatcataccc tacgaggggt cttcgggacg atgcttgatg atgaacaagc aagacttaac 1500
cccgtatctg cagtattcga cgacatatcc cgcagtcgtg taacccgggt gagttcaagc 1560
agcaccaagg cagcatacac gacatcgaca tgttttaaag ttgtcaagac caataaagtt 1620
tattgtctta gtattgcaga aatatccaat accctattcg gggaatttag gattgttccc 1680
ttactagttg agatcctcaa ggacgatagg gtttaa 1716

<210> 7
<211> 1188
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 7

atggccacct ttacagatgc ggagatagat gacatatttg agaccagtgg gactgtcatt 60
gacagcgtaa ttacggccca gggcaaatca gctgagaccg tcggaagaag cgcaatcccg 120
caaggaaaga ctaaagctct gatcgcatca tgggagaaac acgggggcgt caagcctcac 180
gccagccagg acgctcctga ccaacaagac agaacagaga aacagccatc catacctgag 240
caggcgactt tacacgacaa cccgccgatc acatccaccg aaccgcctcc cacccaggcc 300
gcaagcgaga ccagcgacac acagctcaag accggagcaa gcaactccct tctgtccatg 360
ctcgacaaac tgagcaataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc gggtccccag 420
gaagggcatc accaacctcc ggcccaacaa cacgggaacc agccgagcct tggaagcaac 480
caggggaaac cgcagcacca ggccaaggcc gtccctggaa gccggggcac agacgagaac 540
acngcatatc atggacaatg gnaggagtca caaccatcag ctggtgcaac ccctcatgtg 600
ctccagtcag ggcagagccg agacaatact cctgtacctg tggatcgtgt ccaactacct 660
gccgactttg tgcaagcgat gatgtctatg atggaggcat tatcacagaa ggtaagtaaa 720
gttgatcatc agctatacct agtcttaaaa cagacatcct ccattcctat gatgcgatct 780
gagatccaac agctcaaaac atctgttgcg atcatggaag ccaacttagg catgatgaaa 840
attgtggacc ctggttgtgc taacgtttca tccttaagtg atctccgggc ggtagcccga 900
tcccacccag tcctagttic agtccccgga gacccatctc cttacgtgac acaagggggt 960
gaaatgacgc tcaataaact ctcacaaccg gtacagcacc cctctgaatt aattaagtgt 1020

[0004]

gccactgcaa gcgggcctga tatgggagtg gagaaggaca ctgtccgcgc attaatcacc 1080
tcgcgtccga tgcacccaag ttcctcggct aggctcctga gcaagctaga tgcagccaag 1140
tcaattgaag agatcaggaa gatcaaacgc cttgctataa atgggtaa 1188

<210> 8
<211> 1188
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 8
atggccacct ttacagatgc ggagatagat gacatatttg agaccagtgg gactgtcatt 60
gacagcataa ttacggccca gggcaaatca gctgagaccg tcggaagaag cgcaatcccg 120
caaggcaaga ctaaagctct gagcgcagca tgggagaagc acgggggcgt ccaacctcac 180
gccagccagg acgctcctga ccaacaagac agaacagaga aacagccatc catacctgag 240
caggcgactt tacacaacaa cccgccgatc acatccaccg aaccgcctcc cacccaggcc 300
gcaagcgaga ccagcgacac acagctcaag acggagcaa gcaactccct tctgtccatg 360
ctcgacaaac tgagccataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc gggtccccag 420
gaagggcatc accaacctcc ggcccaacaa cacgggaacc agccgagcca tggaagcaac 480
caggggaaac cgcagcacca ggccaaggcc gtccctggaa gccggggcac agacgagaac 540
acagcatatc atggacaatg gaaggagtca caaccatcag ctggtgcaac ccctcatgtg 600
ctccagtcag ggcagagcca agacaatact cctgtacctg tggatcgtgt ccaactacct 660
gccgactttg tgcaagcgat gatgtctatg atggaggcat tatcacagaa ggtaagtaaa 720
gttgatcatc ggctagacct agtcttaaaa cagacatcct ccattcctat gatgcgatct 780
gagatccaac agctcaaaac atctgttgcg atcatggaag ccaacttagg catgatgaaa 840
attctggacc ctggttgtgc taacgtttca tccttaagtg atctccgggc agtagcccga 900
tcccacccag tcctagtttc aggccccgga gacccatctc cttacgtgac acaagggggt 960
gaaatgacgc tcaataaact ctcacaaccg gtacagcacc cctctgaatt aattaagtct 1020
gccactgcaa gcgggcctga tatgggagtg gagaaggaca ctgtccgcgc attaatcacc 1080
tcgcgtccga tgcacccaag ctcctcggct aggctcctga gcaagctaga tgcagccaag 1140
tcaattgaag agatcaggaa gatcaaacgc cttgctctaa atgggtaa 1188

<210> 9
<211> 1188
<212> DNA
<213> 鸡VII型新城疫病毒
<400> 9
atggccacct ttacagatgc ggagatagat gacatatttg agaccagtgg gaccgtcatt 60
gacagcataa ttacggccca gggcaaatca gctgagaccg tcggaagaag cgcaatcccg 120
caaggcaagg ctaaagctct gagcgcagca tgggagaagc acgggggcgt ccaacctcat 180
gccagccagg acgctcctga ccaacaagac agaacagaga aacagccatc catacctgag 240
caggcgactt tacacaacaa cccgccgatc acgtccaccg aaccgccccc cacccaggcc 300
gcaagcgaga ccagcgacac acagctcaag acggagcaa gcaactccct tctgtccatg 360
ctcgacaaac tgagccataa atcgtccaat gctaaaaagg gcccatggtc gggtccccag 420
gaagggcatc accaacctcc ggcccaacaa cacgggaacc agccgagcca tggaagcaac 480
caggggaaac agcagcacca ggccaaggtc gtccctggaa gccggggcac agacgagaac 540
acagcatatc atggacaatg gaaggagtca caaccatcag ctggtgcaac ccctcatgtg 600
ctccagtcag ggcagagcca agacaatact cctgcacctg cggatcgtgt ccaactacct 660
gccgactttg tgcaagcgat gatgtcaatg atggaggcat tatcacagaa ggtaagtaaa 720
gttgatcatc agctagacct agtcttaaaa cagacatcct ccattcctat gatgcgatct 780
gagatccaac agctcaaaac atctgttgcg atcatggaag ccaacttagg catgatgaaa 840
attctggacc ccggttgtgc taacgtttca tccttaagtg atctccgggc agtagcccgg 900
tcccacccag tcctagtttc aggccccgga gacccatctc cttacgtgac acaagggggt 960
gaaatgacac tcaataaact ctcacaaccg gtacagcacc cctctgaatt aattaagtct 1020
gccactgcaa gcgggcctga tatgggagtg gagaaggaca ctgtccgcgc attaatcacc 1080

[0005]

tcgcgcccga tgcacccaag ctcctcggct aggctcctga gcaagctaga tgcagctaag 1140
tcaattgaag agatcaggaa gatcaaacgc cttgctctaa atgggtaa 1188

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> 引物SEQ ID NO: 10
<400> 10
atgggctcca gatcttctac 20

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial sequence
<220>
<223> 引物 SEQ ID NO:11
<400> 11
ctgccactgc tagttgtgat aatcc 25

〈210〉 12
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 鸡VII型新城疫病毒
〈400〉 12
Arg Arg Gln Lys Arg Phe
1 5

〈210〉 13
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 鸡VII型新城疫病毒
〈400〉 13
Arg Arg Gln Arg Arg Phe
1 5

〈210〉 14
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 鸡VII型新城疫病毒
〈400〉 14
Lys Arg Gln Lys Arg Phe
1 5

〈210〉 15
〈211〉 6
〈212〉 PRT
〈213〉 鸡VII型新城疫病毒
〈400〉 15
Lys Arg Gln Arg Arg Phe
1 5

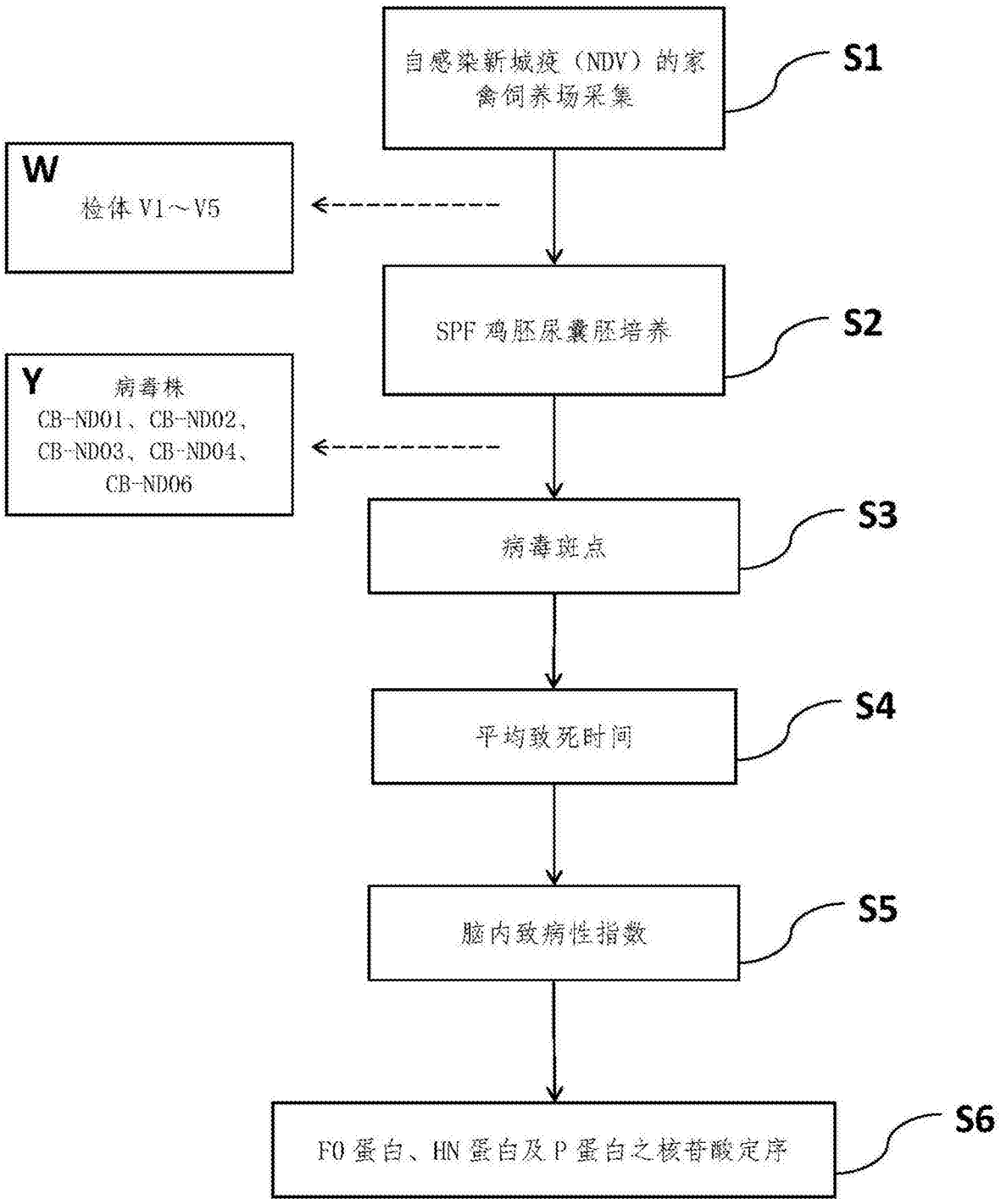

自感染新城疫（NDV）的家禽饲养场采集
S1
W
检体 V1～V5
SPF 鸡胚尿囊胚培养
S2
Y
病毒株
CB-ND01、CB-ND02、
CB-ND03、CB-ND04、
CB-ND06
病毒斑点
S3
平均致死时间
S4
脑内致病性指数
S5
F0 蛋白、HN 蛋白及 P 蛋白之核苷酸定序
S6

图1