



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120249337 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 04

(21) 申请号 202510130019.6

A61P 31/14 (2006.01)

(22) 申请日 2014.04.25

(30) 优先权数据

1307528.8 2013.04.26 GB

(62) 分案原申请数据

201480023688.3 2014.04.25

(71) 申请人 鲁汶天主教大学

地址 比利时勒芬

(72) 发明人 K·达尔梅尔 J·内茨

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 葛臻翼

(51) Int. Cl.

C12N 15/69 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

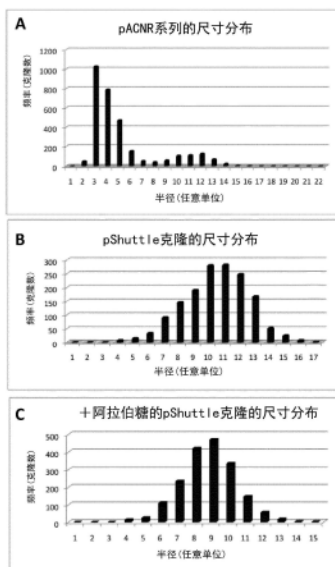
权利要求书2页 说明书29页
序列表(电子公布) 附图37页

(54) 发明名称

细菌人工染色体

(57) 摘要

本发明涉及细菌人工染色体(BAC)用于制备疫苗的应用,其中所述BAC包含:-诱导型细菌ori序列,其用于扩增所述BAC至每个细菌细胞多于10个拷贝,和-病毒表达盒,其包含减毒RNA病毒基因组的cDNA,并且包含用于在哺乳动物细胞中转录所述病毒cDNA和用于将转录的RNA加工成感染性病毒RNA的顺式-调节元件。



1. 细菌人工染色体 (BAC) 用于制备包含BAC的DNA疫苗的应用,其中所述BAC包含:
 - 诱导型细菌ori序列,其用于扩增所述BAC至每细菌细胞多于10个拷贝,和
 - 病毒表达盒,其包含减毒RNA病毒基因组的cDNA,并包含用于在哺乳动物细胞中转录所述病毒cDNA和用于在所述哺乳动物细胞中将转录的RNA加工成感染性RNA病毒的顺式-调节元件。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,用于制备用于预防RNA病毒感染的DNA疫苗。
3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,
 - 所述DNA疫苗用于人和/或脊椎动物的免疫接种,并且
 - 所述BAC包含用于在人或脊椎动物中转录所述病毒cDNA和用于在所述人或脊椎动物中将转录的RNA加工成感染性RNA病毒的顺式-调节元件。
4. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述减毒RNA病毒基因组的cDNA是RNA病毒基因组的嵌合病毒cDNA构建体,其中异源性DNA序列已被插入或其中天然病毒序列已缺失、被截短或突变。
5. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含
 - 正链RNA病毒基因组的cDNA,
 - RNA聚合酶驱动的启动子,其位于所述cDNA的5'端之前,用于起始所述cDNA的转录,和
 - 供于RNA自切割的元件,其位于所述cDNA的3'端之后,用于在设定位置切割所述病毒cDNA的RNA转录本。
6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,RNA聚合酶驱动的启动子是选自RNA聚合酶I、RNA聚合酶II和RNA聚合酶III启动子的真核RNA聚合酶驱动的启动子。
7. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述正链RNA病毒选自下组:黄病毒、丙型肝炎病毒、痘病毒、囊膜病毒、小核糖核酸病毒、冠状病毒、戊型肝炎病毒和萆状病毒。
8. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含黄热病病毒的cDNA。
9. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含减毒活YFV-17D黄热病病毒疫苗的cDNA。
10. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含属于下组的病毒的cDNA:负链RNA病毒、双链RNA病毒或双义RNA病毒。
11. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述细菌人工染色体还包含酵母自主复制序列,所述酵母自主复制序列用于穿梭至酵母,并将所述细菌人工染色体保留在酵母中。
12. 如权利要求11所述的应用,其特征在于,所述酵母ori序列是2 μ 质粒起始或ARS1(自主复制序列1)或其功能同源衍生物。
13. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒即刻早期(CMV-IE)启动子、猴病毒40启动子或其功能同源衍生物。
14. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述用于RNA自切割的元件是丁型肝炎病毒的基因组核酶的cDNA或功能同源RNA元件。
15. 如权利要求9所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含减毒活YFV-17D疫苗的cDNA,其中编码病毒颗粒表面蛋白的一种或多种cDNA序列缺失、被截短或突变,从而YFV-17D的该功能性病毒颗粒表面蛋白不表达,并且编码异源性蛋白质的cDNA序列插入所述YFV-17D cDNA。

16. 如权利要求15所述的应用,其特征在于,所述异源性蛋白质是黄病毒的病毒颗粒表面蛋白。

17. 如权利要求15或16所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含减毒活YFV-17D疫苗的cDNA,其中,插入一种或多种无关的cDNA序列,其表达为所述病毒多聚蛋白中的一种或多种异源性蛋白质。

18. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述病毒表达盒包含病毒cDNA,其中插入由所述重组病毒异源表达的外源cDNA序列。

19. 一种制备抵抗RNA病毒的包含BAC的DNA疫苗的方法,所述方法包括如下步骤:

a) 提供用BAC转染的细菌宿主,其包含:

- 诱导型细菌ori序列,其用于扩增所述BAC至每细菌细胞多于10个拷贝,和
- 病毒表达盒,其包含减毒RNA病毒基因组的cDNA,并且包含用于在哺乳动物细胞中转录所述病毒cDNA和用于在所述哺乳动物细胞中将转录的RNA加工成感染性病毒RNA的顺式-调节元件,

b) 通过添加激活所述诱导型ori的化合物来扩增所述BAC

c) 分离该扩增的BAC,

d) 将所述BAC配制成疫苗。

20. BAC在制备疫苗中的应用,所述BAC包含:

- 诱导型细菌ori序列,其用于扩增所述BAC至每细菌细胞多于10个拷贝,和
- 病毒表达盒,其包含减毒RNA病毒基因组的cDNA,并且包含用于在哺乳动物细胞中转录所述病毒cDNA和用于在所述哺乳动物细胞中将转录的RNA加工成感染性病毒RNA的顺式-调节元件。

21. 如权利要求20所述的应用,用于制备预防RNA病毒感染的疫苗。

22. 如权利要求1所述的细菌人工染色体用于保持天然或重组RNA病毒基因组的cDNA和用于从所述cDNA增殖天然或重组病毒的应用。

23. 一种包含细菌人工染色体(BAC)的DNA疫苗,其中所述BAC包含:

- 诱导型细菌ori序列,其用于扩增所述BAC至每细菌细胞多于10个拷贝,和
- 病毒表达盒,其包含减毒RNA病毒基因组的cDNA,并包含用于在哺乳动物细胞中转录所述病毒cDNA和用于在所述哺乳动物细胞中将转录的RNA加工成感染性RNA病毒的顺式-调节元件。

24. 如权利要求23所述的DNA疫苗,其中所述DNA疫苗能够预防人或脊椎动物的RNA病毒感染,其中所述BAC包含用于在所述人或脊椎动物中转录所述病毒cDNA和用于在所述人或脊椎动物中将转录的RNA加工成感染性RNA病毒的顺式-调节元件。

细菌人工染色体

发明领域

[0001] 本发明涉及适于操作、维持并增殖RNA病毒基因组的感染性cDNA的质粒载体系统,以及所述载体系统的应用。

背景技术

[0002] 先前,已将数种黄病毒和其它RNA病毒的拷贝DNA(cDNA)克隆进入不同低拷贝细菌载体,以克服其固有的毒性(归因于病毒序列的大尺寸和隐蔽表达)(Bredenbeek等.(2003) J.Gen.Virol.84,1261-1268;Durbin,等.(2006) Hum Vaccin.2,255-260;Fan和Bird(2008) J.Virol.Methods.149,309-315;Li等.(2011) PLoS One 6,e18197;Pu等.(2011) J.Virol.85,2927-2941;Rice等.(1989) New Biol.1,285-296)Almazán等.(2008) Methods Mol Biol.454,275-91)。已将克隆的cDNA作为模板使用,以产生感染性重组病毒,通过体外合成或RNA基因组的转染(Bredenbeek等,2003,如上所引),或通过将该病毒cDNA纳入表达盒,该表达盒包含启动子,例如允许从转染的质粒DNA转录病毒RNA的CMV-IE(巨细胞病毒即刻早期(immediate early))启动子(Enjuanes等.(2001) J.Biotechnol.88,183-204;Hall等.(2003) Proc.Natl.Acad.Sci.USA.100,10460-10464)。引导减毒的手足口病(Ward等.(1997) J.Virol.71,7442-7447)和库宁病毒(Hall等.(2003) Proc Natl Acad Sci USA.100,10460-10464)的表达的所述病毒表达盒已被用作实验DNA疫苗。尽管包含病毒表达盒的低拷贝数载体系统能以稳定的方式保持在细菌宿主细胞中,它们存在重要缺陷:其仅允许以仅仅足够于小规模实验应用的量纯化感染性病毒cDNA。因此,其作为感染性病毒cDNA的常规来源的应用(例如在活cDNA疫苗生产中的应用)是不可能的。

[0003] 病毒DNA疫苗的生产需要大量扩增克隆载体,以获得足够的DNA,但这些扩增方法受到严重的约束。为了避免突变,包含病毒DNA的载体在防止诱变事件(重组、突变、增加错配修复等)的条件下增殖。细菌人工染色体(BAC)的稳定性是已知的,并且其可包含多达500kb或更多的插入。

[0004] 然而,带有外源DNA的这种载体的大小对于细菌而言是个沉重负担,并且其复制需要大量代谢努力。此外,核苷酸的耗尽可导致突变增加。最终,会出现外源DNA的不希望的表达(所谓隐蔽表达),这可造成毒性重组蛋白质。隐蔽转录本的毒性蛋白质的产生是黄病毒DNA所固有的,并且仅能通过降低质粒的拷贝数来解决。事实上,载体的拷贝数越高,毒性蛋白质的浓度越高。结果是,细菌宿主可能会相反选择(counterselect)突变,其中这些蛋白质不表达。

[0005] Pu等.(2011) J.Virol.85,2927-2941,详细描述了解决细菌中的黄病毒cDNA的固有毒性的各种尝试。这些包括包含病毒基因组的部分的质粒的体内连接、特定宿主、避免隐蔽表达的突变体,以及低拷贝数质粒。

[0006] 因此,在细菌中以单一拷贝出现的BAC的应用为这些问题提供了解决方案。

[0007] 低拷贝数不是这些应用的缺点,其中BAC DNA随后被亚克隆或扩增以提高浓度,并且其中通过这些技术引入的一些突变对于设想的实验并不是至关重要的。然而,所述扩增

方法无法应用于DNA疫苗的制造中,这使得BAC在DNA疫苗的大规模质粒制备中并不是优选的载体。需要超大规模培养来获得大量的BAC。

[0008] 从Wild等.(2002)基因组Res.12,1434-1444已知诱导型BAC载体的应用,由此,BAC的拷贝数从每细胞1个拷贝增加至多达每细胞100个拷贝或甚至更多。尽管该系统提供了增加BAC DNA产量的方法,还是存在合理的担心,即,诱导后复制系统的活性的强力增加会增加突变频率。因此,DNA疫苗的制造需要这样一种系统,其中所述系统能够获得载体的高拷贝数,但其中所述载体发生复制却不引入无法耐受的突变。

发明内容

[0009] 本发明通过提供一种载体,所述载体能以低拷贝数在宿主细胞中稳定保持,但能通过调节其宿主的培养条件来大量扩增,而不发生不希望的诱变事件,从而解决了本领域就载体系统中制备疫苗而言的病毒cDNA的扩增问题。本发明的另一个目的在于,提供这样一种载体,所述载体能够在酵母和细菌宿主之间穿梭,从而提供非常通用的系统,所述系统可按控制来操作酵母和细菌遗传系统中的载体。

[0010] 本发明出乎预料地证明,BAC载体的拷贝数的可诱导增加提供了具有低得惊人的突变速率的DNA。甚至更令人吃惊的是,发生的少数突变大部分是移码突变或终止密码子,导致表达后的截短形式。点突变(其没有作用或导致修饰的氨基酸)则代表性不足。

[0011] 该预料之外的效果导致有利作用,即,能获得高量载体,并且有限量的错误导致非功能性病毒基因组,而不导致相较于原始克隆的构建体而言毒力会增加的突变病毒基因组。

[0012] 本发明提供一种细菌人工染色体,其包含诱导型细菌ori序列,该序列允许诱导所述细菌人工染色体扩增至高拷贝数,例如,通过调节细菌宿主的培养条件来进行。本文所用的细菌人工染色体还包含病毒表达盒,所述病毒表达盒包含侧接有顺式-调节元件的RNA病毒基因组的cDNA,其在将所述细菌人工染色体导入哺乳动物细胞之后促进所述病毒cDNA的转录,并且允许将转录的RNA加工成感染性病毒RNA。所述病毒表达盒中所含的病毒cDNA可以对应于野生型RNA病毒基因组的那些或是嵌合病毒cDNA构建体,其中,异源性DNA序列已被插入,和/或,天然病毒序列已删除、截短或突变。通常而言,异源性DNA序列编码一种或多种肽/蛋白质,其在本发明的细菌人工染色体被引入哺乳动物细胞之后,由重组病毒异源表达,本发明的细菌人工染色体包含有所述嵌合病毒cDNA的病毒表达盒。所述细菌人工染色体还可包含用于穿梭至酵母或在酵母中保持所述细菌人工染色体的酵母自主复制序列。穿梭至酵母细胞或在酵母细胞中保持本发明的细菌人工染色体的可能性提供了可按控制在酵母和细菌遗传系统中进行遗传操作的优势。同样地,本发明提供一种单一载体系统,其适合于RNA病毒基因组的感染性cDNA的操作、维持和增殖。

[0013] 在不存在所述诱导型ori的刺激时,本发明的细菌人工染色体可用于实现细菌宿主中感染性病毒cDNA的稳定克隆,而所述刺激存在时,所述cDNA能被容易地扩增,随后分离并使用。本发明的细菌人工染色体在待作为抵抗RNA病毒病原体的活疫苗(live vaccine)使用的病毒cDNA的开发、稳定性保持和生产中尤为有用。或者,所述细菌人工染色体用于保持并从cDNA增殖天然或重组病毒(例如,出于研究目的)。

[0014] 本发明中,采用具有诱导型细菌ori的BAC来制备病毒表达盒的疫苗,所述病毒表

达盒包含用于在哺乳动物细胞中转录病毒cDNA和用于将转录的RNA加工成感染性病毒RNA的顺式调节元件和RNA病毒的cDNA。

[0015] 令人吃惊的是,包含所述病毒DNA的BAC的多个拷贝的产生并不会导致已知采用高拷贝数系统会出现的缺陷。

[0016] 一般而言,在细菌系统中会产生毒性蛋白质,这归因于病毒序列的隐蔽表达。事实上,黄病毒感染性克隆的生产传统上受到细菌中其全长cDNA的毒性的干扰。已采用多种方法来克服该问题,包括极低拷贝数质粒和细菌人工染色体的应用(在Edmonds (2013) J.Virol.87,2367-2372中讨论)。这是涉及插入的现象,所述插入被克隆进入BAC,从而阻碍细菌生长和代谢。其中没有发生隐蔽表达的带有突变的细菌具有生长优势,并且会使原始群落过度生长。现有技术中,这由细菌集落的大小反映。非突变构建体产生毒性蛋白质,并且通常获得小集落。突变构建体产生较少或不产生毒性蛋白质,这导致出现较大集落。

[0017] 基于该现有技术知识,从而预计质粒复制的诱导将导致毒性转录本的增加,以及伴随的不发生隐蔽表达的突变体的增加。

[0018] 令人吃惊的是,诱导型复制系统似乎对隐蔽蛋白质的毒性不敏感。事实上,相比现有技术的高拷贝数系统,细菌集落在某种程度上更大,这指示细菌宿主对最后的毒性蛋白质较不敏感。更重要的是,非常大的集落,代表没有出现突变质粒。

[0019] 该发现,即诱导型系统对毒性蛋白质不敏感,是预料之外的。现有技术中并没有教导表示该系统会对毒性蛋白质不敏感(或该毒性蛋白质并没有产生)。

[0020] 诱导型系统的另一个缺点是固有地产生BAC的多拷贝。事实上,诱导型系统的作者解释,BAC克隆的最重要的特点是因其极低拷贝数所致的其稳定性。如上所引的Wild等.(2002)显示,拷贝数甚至可通过添加葡萄糖而被进一步降低。该单一拷贝状态通过减少克隆之间的胞内重组的机会而改善了BAC文库的保留稳定性。这证明,Wild等公布的诱导型系统并没有减低只要BAC的多个拷贝存在于宿主细胞中就会很快发生的不希望的重组事件的变化。本领域技术人员应理解,诱导和随后的高拷贝数会重新引入重组事件。因此,技术人员会避免采用所述系统来制备待用于疫苗接种目的的DNA。

[0021] 本发明中,已在诱导型ori系统中扩增BAC,并且已测试所述扩增的BAC的重组事件。预料之外地,重组事件十分罕见。

[0022] 此外,除了测试重组事件以外,还测试了扩增的BAC是否存在其它突变。发生突变的频率非常低,此外,错义部分令人吃惊地低于理论预期情况。如果发生突变,则主要是无义突变或导致无功能病毒RNA的移码突变。

[0023] 本发明允许显著扩大DNA疫苗生产的规模。例如,目前的减毒活(life-attenuated)黄热病疫苗的主要生产商尚无法满足存在的需求。采用本发明技术,将能够以相较于目前的减毒活疫苗而言显著降低的成本和更高的质量生产DNA疫苗,由此满足长期以来的需求。

[0024] 同样地,对于其它病毒性疾病,例如JEV、WNV、麻疹、风疹和HIV疫苗,需要一种能够提供足量DNA的疫苗制备平台。

[0025] 本发明的第一方面涉及细菌人工染色体(BAC)用于制备疫苗的应用,其中所述BAC包含:

[0026] -诱导型细菌ori序列,其用于扩增所述BAC至每个细菌细胞多于10个拷贝,和-病

毒表达盒,其包含减毒RNA病毒基因组的cDNA,并且包含用于在哺乳动物细胞中转录所述病毒cDNA和用于将转录的RNA加工成感染性RNA病毒的顺式-调节元件。

[0027] 减毒RNA病毒基因组的cDNA的实施方式是RNA病毒基因组的嵌合病毒cDNA构建体,其中,异源性DNA序列已被插入,或其中,天然病毒序列已缺失、被截短或突变。

[0028] 所述病毒表达盒的实施方式包括:

[0029] -正链RNA病毒基因组的cDNA,

[0030] -RNA聚合酶驱动的启动子,其位于所述cDNA的5'端之前,用于起始所述cDNA的转录,和

[0031] -供于RNA自切割的元件,其位于所述cDNA的3'端之后,用于在设定位置切割所述病毒cDNA的RNA转录本。

[0032] 正链RNA病毒的实施方式有:黄病毒、丙型肝炎病毒、痘病毒、囊膜病毒、小核糖核酸病毒、冠状病毒、戊型肝炎病毒,和萼状病毒。

[0033] 在一个典型实施方式中,所述病毒表达盒包含黄热病病毒的cDNA,例如减毒活YFV-17D黄热病病毒疫苗的cDNA。

[0034] 在其它实施方式中,所述病毒表达盒包含属于下组的病毒的cDNA:负链RNA病毒、双链RNA病毒或双义RNA病毒。

[0035] 在特定实施方式中,所述细菌人工染色体还包含酵母自主复制序列,所述酵母自主复制序列用于穿梭至酵母,并将所述细菌人工染色体保留在酵母中。

[0036] 酵母ori序列的一个示例是2 μ 质粒起点或ARS1(自主复制序列1)或其功能同源衍生物。

[0037] 在某些实施方式中,所述RNA聚合酶驱动的启动子是RNA聚合酶II启动子,例如巨细胞病毒即刻早期(CMV-IE)启动子、猴病毒40启动子或其功能同源衍生物。

[0038] 在其它实施方式中,所述RNA聚合酶驱动的启动子是RNA聚合酶I或III启动子。

[0039] 用于RNA自切割的元件的示例是:丁型肝炎病毒的基因组核酶或功能同源RNA元件的cDNA。

[0040] 在具体实施方式中,所述病毒表达盒包含减毒活YFV-17D疫苗的cDNA,其中,编码病毒颗粒表面蛋白的一种或多种cDNA序列缺失、被截短或突变,从而YFV-17D的所述功能性病毒颗粒表面蛋白不表达,并且编码异源性蛋白质的cDNA序列插入所述YFV-17D cDNA。所述异源性蛋白质的一个示例是黄病毒的病毒颗粒表面蛋白。

[0041] 病毒表达盒的实施方式包含减毒活YFV-17D疫苗的cDNA,其中,插入一种或多种无关的cDNA序列,其表达为所述病毒多聚蛋白中的一种或多种异源性蛋白质。

[0042] 在其它实施方式中,所述病毒表达盒包含病毒cDNA,其中,插入外源cDNA序列,其由所述重组病毒异源表达。

[0043] 另一个方面涉及制备针对RNA病毒的疫苗的方法,所述方法包括如下步骤:a)提供用第一方面及其多种实施方式中所述的用BAC转染的细菌宿主

[0044] b)通过添加能够激活所述诱导型ori的化合物来扩增所述BAC

[0045] c)分离该扩增的BAC,

[0046] d)将所述BAC配制成疫苗。

[0047] 另一个方面涉及:第一方面及其多种实施方式中所述的BAC,所述BAC被用作疫苗。

[0048] 本发明的另一个方面涉及:第一方面及其多种实施方式中所述的BAC,所述BAC用于预防RNA病毒感染。

[0049] 另一个方面涉及:第一方面及其多种实施方式中所述的BAC作为活DNA疫苗的应用。

[0050] 另一个方面涉及:第一方面及其多种实施方式中所述的BAC用于从所述cDNA增殖天然或重组病毒的应用。

[0051] 另一个方面涉及:第一方面及其多种实施方式中所述的细菌人工染色体(BAC)作为BAC用于制备疫苗的应用。

发明详述

附图说明

[0053] 图1.RNA病毒表达质粒的pShuttleBAC系列的生成。(A)图显示:作为起始载体构建体的pShuttleBAC/Pme的构建。(B)图显示pShuttleBAC/Pme衍生的黄病毒表达载体的构建,通过插入病毒cDNA,通过SV40启动子(SV40p)和HDV核酶(HDrz)之间的同源重组来进行上述构建。

[0054] 图2.增强大肠杆菌中pShuttleBAC构建体的质粒稳定性。通用质粒图谱显示现有技术黄病毒cDNA质粒(A)和新型pShuttleBAC载体系列(B,DNA-YFVax)的设计原理。其中转化(A)和(B)各自的单一集落之后的大肠杆菌在37°C生长过夜,并铺板在选择培养基上。总体而言,A型构建体长成的集落尺寸比B型的那些小得多(分别示于图2C和D)。此外,A型构建体产生具有宽范围集落尺寸的后代(图2C的右侧图显示标准化的集落直径),指示有时候使这些cDNA对于大肠杆菌的毒性较低的突变质粒克隆的选择和分离。克隆分析鉴定了多种可能的潜在突变,包括病毒E/NS1区域中的转座子插入。相反,pShuttleBAC系列的B型构建体的质粒克隆没有分离,并且,显示更为均一的集落尺寸,甚至在大肠杆菌中重复传代之后也是如此,这指示其高遗传稳定性。

[0055] 图3A.在Vero-B细胞用pShuttle/YF17D(野生型,WT)及其复制缺陷型衍生物pShuttle/YF17D ΔGDD(ΔGDD)转染之后,通过Northern印迹检测YFV-17DRNA复制的复制中间体。反义取向的反基因组(-)-RNA(A上图,11kb)和正义取向的病毒基因组(+)-RNA(A下图,11kb)仅在WT转染细胞中于转染后5天检测到。在放线菌素D(ACD)(一种DNA导向的RNA合成的抑制剂)存在下的进行中的复制证实,从pShuttle/YF17D初始起始YFV-17D基因组转录之后,病毒复制以独立于质粒的方式自主继续。

[0056] 图3B.通过5'-和3'-RACE(cDNA末端的快速扩增)来检测正确的YFV-17DRNA转录本加工。pShuttle/YF17D启动新生YFV-17D RNA(图3B中粗体表示)的转录,经快速扩增cDNA末端(RACE)确认,其以正确5'和3'端开始和结束(分别示于上图和下图)。

[0057] 图4A-C.由不同起点的YFV-17D诱导的类似的CPE。源自采用pACNR-FLYF17DII作为模板的体外转录并加帽的RNA的YFV-17D病毒(A),或在pShuttle/YF17D质粒DNA转染后收获的YFV-17D病毒(B)在转染后(p.i.)5天(d)使BHK-21细胞产生相同的病毒诱导的细胞病变作用(CPE);C,用于比较的未转染的细胞。

[0058] 图4D-E.不同起点的YFV-17D的相似的空斑表型。源自采用pACNR-FLYF17DII作为

模板的体外转录和加帽的RNA的YFV-17D病毒(D),或在pShuttle/YF17D的质粒DNA转染之后收获的YFV-17D病毒(E)在BHK-21细胞上产生相当数量(转染后5天 3×10^5 个空斑形成单位(pfu) mL^{-1} 对比 2×10^5 个pfu mL^{-1})和相同形貌的空斑(直径 $6.4 \pm 0.7\text{mM}$ 对比 $6.1 \pm 1.1\text{mM}$; t检验 $n=8$, p值=0.6)。

[0059] 图5.通过免疫荧光试验(IFA)检测感染性重组DENV2。用pShuttle/DV2转染的BHK-21细胞产生的重组DENV2 NGC显示Vero-B细胞的剂量依赖性感染,显示为:转染后5天对于病毒E蛋白质免疫荧光染色的病毒聚焦(A,未稀释的上清液,B,100倍稀释的上清液,C,未感染的细胞对照)。

[0060] 图6.用Stamaril(空心方形)感染的AG129小鼠或用pShuttle/YF17D转染的(十字形)AG129小鼠的存活率.在i.p.挑战之后10-12天,干扰素I型和II型受体缺陷型(AG129)小鼠开始减轻体重,并且发展出统一的症状发作,即皮毛起皱、震颤和迟缓性后肢瘫痪。用复制缺陷型NS5 Δ GDD质粒变体转染的对照动物(Δ GDD,空心圆)显示没有发病。然而,在初始转染20天后,它们仍易受第二次Stamaril®挑战(实心三角形)的影响,然后,在相当的时间范围内死亡并显示相似的症状。质粒DNA采用33%丙二醇(作为运载体)中的碳酸钙微米花(microflower)i.p.转染。

[0061] 图7.感染的AG129小鼠的YFV-17D RNA(B)检测和发病率(A)。(A)如果用Stamaril®感染或用pShuttle/YF17D(pYF17D)转染,AG129小鼠损失约20%的体重,然后在平均12-13天(MDD,平均至死亡(day to death)天数)之后,必须对它们进行安乐死。不同的是,pShuttle/YF17D Δ GDD(Δ GDD)转染的小鼠增重,之后采用Stamaril®(Δ GDD+2°Stamaril)对它们进行挑战,其自YFV-17D感染约两周内死亡。(B)可通过qRT-PCR在从(A)收集的死亡时AG129小鼠的脑部样品中检测到相当的量的YFV-17D RNA。

[0062] 图8.pShuttle/YF17D(合成的构建体#1)的图谱。注释:SV40p:猴病毒40启动子/起点,YFV-17D:黄热病病毒疫苗株17D cDNA,HDVrz:丁型肝炎病毒核酶cDNA;2 μ :酿酒酵母(S.cerevisiae)2-微米起点;TRP1:提供朝向色氨酸的原养型生长的TRP1基因;parABC:F-质粒的区分基因(partitioning gene);repE:F-质粒的repE基因;oriS:F-质粒的起点;oriV:质粒RK2的起点;CmR:氯霉素抗性基因。

[0063] 图9.用不同YFV-17D cDNA载体转染后的大肠杆菌集落生长。(A)用pACNR-FLYF17DII转化并在37°C生长16小时之后的大肠杆菌EPI-300T集落。可以观察到具有较大尺寸差异的两个亚群的集落尺寸分布,小集落(直径小于0.2mm)和大集落(直径约0.4mm)。大多数是小集落。(B+C)用pShuttle/YFV17D转化后的大肠杆菌EPI-300T集落。在不含诱导剂(B)或含有0.01% L-阿拉伯糖(C)(用于诱导通过诱导型高拷贝起点介导的高拷贝复制)的平板上铺板。大的黑色圆形是包埋在琼脂中的直径2.5mm的Zirkonia珠,以作为校准物。插图是示意线图,其表示各组中观察到的集落的轮廓。

[0064] 图10.用不同YFV-17D cDNA载体转化后的大肠杆菌集落的尺寸分布。(A)用pACNR-FLYF17DII转化后的大肠杆菌EPI-300T集落。(B+C)用pShuttle/YFV17D转化后的大肠杆菌EPI-300T集落。在不含诱导剂(B)或含有0.01% L-阿拉伯糖(C)(用于诱导通过诱导型高拷贝起点介导的高拷贝复制)的平板上铺板。

[0065] 图11a.pShuttle/ChimeriVax-JE的图谱。pShuttle/ChimeriVax-JE包含如下组成:SV40启动子/起点(核苷酸1-481)和YFV-17D(核苷酸2452-10862),其中插入477-2477神

经减毒JEV疫苗株JE SA14-14-2。JEV E-ORF的最后两个氨基酸倒数第二是来自组氨酸到甘氨酸密码子的突变,以产生KasI位点,NS2A和NS4B-ORF包含见于Imojev®的两个相配的G4055a和G7349a突变,分别将YFV-17D NS2A中的甲硫氨酸变为缬氨酸,且将NS4B ORF中的赖氨酸变为谷氨酰胺。其它沉默突变在第406位(XhoI)、第4009位(BstEII)和第7315位(NheI)产生限制标志物。

[0066] 图11b.pShuttle/ChimeriVax-WN的图谱。pShuttle/ChimeriVax-WN包含如下组成:SV40启动子/起点(核苷酸1-481)和YFV-17D(核苷酸2452-10862),其中插入477-2477的WNV株NY-99的神经减毒衍生物。WN E-ORF的最后两个氨基酸倒数第二是来自组氨酸到甘氨酸密码子的突变,以产生KasI位点,NS2A和NS4B-ORF包含见于Imojev®的两个相配的G4055a和G7349a突变,分别将YFV-17D NS2A中的甲硫氨酸变为缬氨酸,且将NS4B ORF中的赖氨酸变为谷氨酰胺。其它沉默突变在第406位(XhoI)、第4009位(BstEII)和第7315位(NheI)产生限制标志物。

[0067] 图12.pShuttle/EV71的图谱。pShuttle/EV71包含在SV40启动子/起点的5'末端和30个核苷酸长的多聚A重复加上丁型肝炎病毒核酶的3'端之间插入的EV71株BrCr-TR的cDNA(Genbank AB204852.1)。

[0068] 图13描述具有SEQ ID NO 1-7的序列。

[0069] 定义

[0070] 术语“细菌人工染色体(BAC)”指的是用于在细菌细胞(例如大肠杆菌)中克隆DNA序列的质粒DNA构建体。一般而言,30,000-约300,000个碱基对范围内的DNA序列均能被插入BAC。带有插入的DNA的BAC能被细菌细胞摄取。随着细菌细胞生长和分裂,BAC DNA以每细菌细胞极低的拷贝数稳定地保留在细菌细胞中,优选地不超过每细胞3个拷贝,例如每细胞一个拷贝。BAC的复制在复制(ori)序列(通常是oriS序列)的起点起始。该复制由BAC编码的基因产物(一般是repE和/或repF)严格调控。BAC还编码在分列过程中指导将BAC拷贝划分至子细胞的蛋白质(例如parA,B和C)。通常,BAC载体还包含可选择的标志物,例如抗生素抗性受体酶标志物,例如lacZ,其允许进行蓝白筛选。通常采用的BAC的示例是pBeloBac11(Shizuya等.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89,8794-8797)。该载体的序列以GenBank登录号U51113报告。pBeloBac11是环状质粒,其包含oriS,产生起始和调控oriS处的复制的蛋白质的repE基因,和区分基因par A,B和C。供于选择,pBeloBac11包含氯霉素-抗性-编码基因。所述载体还包含lacZ α 基因,当所述BAC中被克隆进入插入物时,其可被干扰或从所述载体消除。

[0071] 术语“诱导型细菌ori序列”指的是在细菌宿主细胞中具有功能并响应扩增-介导的蛋白质的质粒ori序列。优选地,在所述扩增-介导的蛋白质不存在时,所述诱导型ori的复制功能被严格抑制或不存在。还优选:在所述扩增-介导的蛋白质存在时,诱导型ori扩增所述质粒至高拷贝数,优选地,扩增至每细胞多于20个拷贝,更优选地,扩增至每细胞多于100,例如,多于500或1000个拷贝。对于本发明的应用,还优选(但不必需)所述诱导型ori响应单一扩增-介导的蛋白质。

[0072] 在本发明中,oriV尤其有用于作为诱导型细菌ori,因为其宽宿主范围,其已知的复制100-kb或更大的DNA片段的能力,其高拷贝数,以及其仅需要一种诱导蛋白。包含诱导型oriV的细菌人工染色体的示例有:pBeloBAC/oriV(Wild等.(2002)Genome Res.12,1434-

1444) 和pBAC-LacZ (Addgene质粒13422:pBAC-lacZ, Addgene, 美国马萨诸塞州坎布里奇)。pBAC-lacZ质粒是一种迷你-F', 其可在标准大肠杆菌菌株中复制, 但因为其以单拷贝游离基因的形式保持, 其DNA产量低。pBAC-lacZ还包含第二种较高拷贝数复制起点(oriV), 其仅在trfA基因编码的反式作用因子的存在下有活性。该质粒在表达trfA的大肠杆菌细胞中自诱导型启动子的转录通过诱导trfA的表达而允许pBAC-lacZ质粒的拷贝数增加。TransforMax™ EPI300™大肠杆菌细胞(美国威斯康星州麦迪逊的艾比森德公司(Epicentre))包含诱导型突变trfA基因, 其基因产物是从oriV复制起点处起始复制所必需的。trfA的表达可通过向培养基添加L-阿拉伯糖来诱导, 导致oriV的活化。

[0073] “酵母复制起点”指的是质粒中的一段序列, 例如细菌人工染色体, 其允许在酵母细胞中复制并维持该质粒。已显示2 μ 质粒中存在的复制起点(Huberman等.(1987)Cell 51, 473-481; Brewer和Fangman(1987)Cell 51, 463-471; Hartley和Donelson(1980)Nature 286, 860-865.)是合适用于将本发明的细菌人工染色体穿梭至酵母的ori。已经描述其它合适的酵母ORI(Liachko等.(2013)Genome Res. 23, 698-704, 例如ARS1(自主复制序列1)及其功能同源衍生物, 如酵母着丝粒质粒(YCp)中所用, 或合成的CEN6/ARSH4起点(Frazer和O'Keefe(2007)Yeast. 24, 777-789)。

[0074] 本发明内容中的“病毒表达盒”指的是侧接有顺式-调节元件的RNA病毒基因组的cDNA, 其在将所述细菌人工染色体导入哺乳动物细胞之后促进所述病毒cDNA的转录, 并且允许将转录的RNA加工成感染性病毒RNA, 如下文详述。

[0075] “感染性病毒RNA”指的是病毒RNA, 其在导入其哺乳动物宿主之后, 足以提供病毒复制和产生感染性病毒后代所需的所有病毒功能。这包括: (i) 作为供于病毒RNA合成和基因组扩增的转录模板, 和(ii) 作为供于合成病毒复制所需的病毒蛋白质的翻译模板。其它附加功能, 例如引诱先天抗病毒应答中涉及的宿主细胞因子(Moon等.(2012)RNA. 18, 2029-40), 可能也需要由感染性病毒RNA提供。

[0076] 本发明内容中, “减毒”涉及病原体毒力的变化, 通过减毒, 致病生物体的有害性质被削弱(或削减); 减毒病原体可用作活疫苗。减毒疫苗能以不同方式源自已被弱化的活生物体, 通常来自次优条件(也称作减毒)下的培养, 或来自具有使其致病能力下降的作用的遗传修饰。

[0077] 在本发明的第一方面, 提供一种细菌人工染色体, 所述细菌人工染色体包含诱导型细菌ori序列, 其在刺激存在下诱导所述细菌人工染色体在细菌细胞中扩增至高拷贝数, 优选地, 扩增至每细胞多于10个拷贝, 更优选地, 扩增至每细胞多于100, 例如多于500或1000个拷贝。一般而言, 所述刺激所致的所述细菌人工染色体的扩增不超过每细胞多于10, 000个拷贝, 例如不多于5000个拷贝。本发明的细菌人工染色体还包含病毒表达盒, 所述病毒表达盒包含侧接有顺式-调节元件的RNA病毒基因组的cDNA, 其在将所述细菌人工染色体导入哺乳动物细胞之后促进所述病毒cDNA的转录, 并且允许将转录的RNA加工成感染性病毒RNA。本发明的细菌人工染色体的病毒表达盒中包含的病毒cDNA可源自属于下组的病毒: 正链病毒、负链病毒、双链RNA病毒或利用双义RNA策略来复制的病毒。所述病毒表达盒中包含的病毒cDNA能够对应于野生型RNA病毒基因组, 或者是嵌合病毒cDNA构建体, 其中异源性DNA序列已被插入和/或天然病毒序列已缺失。优选地, 所述异源性DNA序列编码一种或多种蛋白质, 所述蛋白质在将包含所述嵌合病毒cDNA的病毒表达盒的本发明的细菌人工染色体

引入哺乳动物细胞之后由该重组病毒异源表达。任选地,本发明的细菌人工染色体还包含用于穿梭至酵母或在酵母中保持所述细菌人工染色体的酵母自主复制序列。穿梭至酵母细胞或在酵母细胞中保持本发明的细菌人工染色体的可能性提供了可按控制在酵母和细菌遗传系统中进行遗传操作的优势。

[0078] 在对于所述诱导型ori的刺激不存在时,本发明的细菌人工染色体可用于感染性病毒cDNA在细菌宿主中的留存和稳定克隆,而当所述刺激存在时,所述cDNA可被扩增,随后分离以供使用。本发明的细菌人工染色体在待作为针对RNA病毒病原体的活疫苗使用的病毒cDNA的开发、稳定保持和生产中特别有用。或者,所述细菌人工染色体用于从cDNA维持并增殖天然或重组病毒,例如,用于研究目的。本发明的细菌人工染色体,特别是包含酵母复制起点的那些,还具有其它优势:它们提供供于遗传工程改造病毒cDNA的通用系统。该通用性在所述细菌人工染色体的研究和开发应用中(例如,在针对RNA病毒病原体的cDNA活疫苗的设计中,或在采用反向遗传学方法以阐明某些病毒基因产物的作用和功能为目的的研究中)特别重要。

[0079] 如果本发明的细菌人工染色体包含含有正链RNA病毒基因组的cDNA的病毒表达盒,优选在所述病毒cDNA的5'端之前存在RNA聚合酶驱动的启动子,其在引入哺乳动物细胞之后起始所述病毒cDNA的转录,而优选在其3'端之后存在供于RNA自切割的元件,以用于在设定位置切割所述病毒cDNA的RNA转录本。在将所述细菌人工染色体引入哺乳动物细胞时,这些顺式-调节元件一起允许所述转录,并将所述病毒cDNA加工成感染性病毒RNA。优选地,所述RNA聚合酶驱动的启动子是RNA聚合酶II操作的启动子,例如巨细胞病毒即刻早期(CMV-IE)启动子(Thomsen等.(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,659-663),猴病毒40启动子(Deboist和Chambon(1981) Nature 290,304-310)或其功能同源衍生物,例如CMV-IE鸡 β -肌动蛋白嵌合(CAG)启动子(Niwa等.(1991) 基因108,193-199)或所述RNA聚合酶II操作启动子的诱导型形式,例如四环素-操作子最小CMV-IE启动子(Gossen等.(1995) Science. 268,1766-1769; Baron和Bujard(2000) Methods Enzymol. 327,401-421)。或者,所述RNA聚合酶驱动的启动子是RNA聚合酶I(Russel和Zomerdi jk(2006) Biochem. Soc. Symp. 73,203-216)或RNA聚合酶III启动子,例如U6或H1启动子。还优选所述用于RNA自切割的元件是丁型肝炎病毒的染色体组核酶的cDNA(Chadalavada等,(2007) RNA 13,2189-2201)或功能同源丁型肝炎病毒样自切割核酶RNA元件的cDNA,例如Webb和Luptak(2011) RNA Biol. 8,719-727中所述。优选地,所述病毒表达盒中包含的正链RNA病毒的病毒cDNA源自属于以下病毒家族之一的病毒:黄病毒科(Flaviviridae),包括黄热病病毒和其它黄病毒;丙型肝炎病毒(hepacivirus),包括丙型肝炎病毒(hepatitis C virus);痘病毒,包括牛病毒性腹泻病毒,和典型的猪瘟疫病毒;披膜病毒科(Togaviridae),包括 α 病毒、基孔肯雅病和风疹病毒属、风疹病毒;小核糖核酸病毒科(Picornaviridae),包括肠道病毒,例如脊髓灰质炎病毒和鼻病毒,以及口蹄疫病毒,冠状病毒科(Coronaviridae),包括HCoV-229E、SARS-CoV、MERS-CoV(最初被描述为新型冠状病毒2012/伦敦1_新型CoV 2012)和猫冠状病毒,以及戊型肝炎病毒(hepevirus),包括戊型肝炎(hepatitis E)病毒,和杯状病毒科(Caliciviridae),包括诺沃克病毒和诺如病毒。所述病毒表达盒中所含的病毒cDNA可以对应于野生型RNA病毒基因组的那些或是嵌合病毒cDNA构建体,其中,异源性DNA序列已被插入,和/或,天然病毒序列已删除、截短或突变。优选地,所述异源性DNA序列编码一种

或多种肽/蛋白质,所述肽/蛋白质在将包含所述嵌合病毒cDNA的病毒表达盒的本发明的细菌人工染色体引入哺乳动物之后由该重组病毒异源表达。

[0080] 在本发明的具体实施方式中,本发明的细菌人工染色体包含含有正链减毒活黄热病病毒(YFV)-17D疫苗的cDNA的病毒表达盒(图6)。根据该具体实施方式的细菌人工染色体可用于YFV-17D cDNA的稳定克隆和增殖。此外,所述细菌人工染色体可作为活YFV-17D的DNA疫苗,作为目前使用的减毒活YFV-17D病毒疫苗(**Stamaril®**和相似制备物,例如**YF-Vax®**等)的替代物。关于现有的YFV-17D病毒疫苗,本发明的YFV-17DNA疫苗具有优势:其能以较低成本生成,而无需真核细胞培养物或鸡胚蛋。此外,其分布不需要冷链(cold-chain)并且其可以无针给予。

[0081] 在更具体的实施方式中,本发明的细菌人工染色体包含含有所述减毒活YFV-17D疫苗的cDNA的病毒表达盒,其中异源性DNA序列已被插入和/或天然病毒序列已缺失。例如,参考US6962708,YFV-17D的cDNA中的编码prM-E蛋白质的核苷酸序列可缺失、被截短或突变,从而YFV-17D的功能性prM-E蛋白质不被表达,而编码第二种不同的病毒的病毒包膜蛋白质的核苷酸序列,从而所述第二病毒的病毒包膜蛋白质由YFV-17D疫苗的改变的基因组表达。优选地,所述第二病毒也是黄病毒,例如日本脑炎(JE,例如,JE SA14-14-2)、登革热(DEN,例如,登革热1-4型的任何类型;例如,登革热-2毒株PU0-218)(Gruenberg等.(1988) *J. Gen. Virol.* 67,1391-1398.)、墨莱河谷脑炎(MVE)、圣路易脑炎(SLE)、西尼罗河病毒(WN)、蜱传脑炎(TBE)(即,中欧脑炎(CEE)和俄罗斯春夏脑炎(RSSE)病毒),以及丙型肝炎(HCV)病毒。用作所述第二黄病毒的其他黄病毒包括:库宁病毒、波瓦生病毒、夸塞纳森林病毒、济卡病毒、乌苏图病毒和鄂木斯克出血热病毒。包含嵌合YFV-17D cDNA的细菌人工染色体向哺乳动物细胞中的导入导致生成嵌合病毒,所述嵌合病毒由属于YFV-17D的负责胞内复制的基因和基因产物以及第二病毒的包膜的基因和基因产物组成。因为所述病毒包膜包含负责诱导中和抗体的抗原决定簇,被该嵌合病毒感染的结果是,产生针对该第二病毒的抗体。或者,YFV-17D的cDNA中的编码prM-E和/或NS1蛋白质的核苷酸序列可缺失、被截短或突变,从而YFV-17D的功能性prM-E和/或NS1蛋白质同样不被表达,而编码包含特定表位/抗原的肽/蛋白质的核苷酸序列,从而所述蛋白质由YFV-17D疫苗的变化基因组表达。或者,编码异源性蛋白质的cDNA可被插入本发明的细菌人工染色体中的YFV-17D cDNA中的其它位置,例如,在E和NS1基因之间插入(Bonaldo等.(2007) *Virology* 331,247-259;Schoggings等.(2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109,14610-14615)或在YFV-17D cDNA的未翻译的区域中插入(Jones等.(2005),如上所引)。优选地,包含所述表位/抗原的蛋白质是肿瘤抗原或寄生病原体的病毒抗原、细菌抗原。所述包含嵌合YFV-17D cDNA的细菌人工染色体在向哺乳动物细胞中的引入导致生成嵌合病毒,所述嵌合病毒由属于YFV-17D的负责胞内复制的基因和基因产物以及包含所述表位/抗原的蛋白质的基因和基因产物组成。因为所述病毒包膜包含负责诱导中和抗体的抗原决定簇,被该嵌合病毒感染的结果是,产生针对包含所述表位/抗原的蛋白质的抗体。

[0082] 如果本发明的细菌人工染色体包含含有负链RNA病毒基因组的cDNA的病毒表达盒,则必须以如下方式修饰如前文关于正链RNA病毒所述的构建体:所述病毒基因组cDNA,关于驱动其表达的顺式元件而言,以其正义(反基因组)方向存在,(Radecke等.(1995) *EMBO J.* 14,5773-5784),并且其还以正义方向包含正义方向的编码病毒基因产物的cDNA,与上述

病毒RNA一起,形成拯救病毒RNA复制所需的病毒复制酶复合物的部分。这些cDNA侧接有调节顺式元件,所述调节顺式元件是从质粒构建病毒复制酶复合物的这些病毒基因产物的表达所需的。在未分段的负链RNA病毒的情况下,(Conzelmann (1998) *Annu. Rev. Genet.* 32, 123-162) 这些病毒基因产物是N(NP)、P和L蛋白质。负链RNA基因组的反基因组cDNA的表达可由RNA聚合酶I或II启动子驱动(Martin等,(2006) *J Virol.* 80, 5708-5715;而构建病毒复制酶复合物的病毒蛋白质的表达盒可以是多顺反子性的(如病毒本身中自然出现的那样),或单顺反子性的(采用不同RNA聚合酶启动子(Morita等.(2012) *Biotechniques* 0,1-5))以供各复制酶组分的平衡表达。用来自本发明的人工细菌染色体的分段RNA基因组进行的负链RNA病毒的拯救需要关于所述系统的修饰(如关于带有未分段的RNA基因组的负链RNA病毒所述的那样);更具体地,需要纳入由合适的RNA聚合酶I和II启动子(Fodor等.(1999) *J. Virol.* 73, 9679-9682) 驱动的用于各基因组片段(Neumann和Kawaoka (2004) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 283, 43-60) 的表达盒。因为现有技术中用于该目的的质粒载体系统的载体容量有限,现有技术中,拯救所述病毒所需的全部功能都必须通过若干质粒的共转染来提供,例如采用多达8或12种质粒来拯救流行性感冒病毒,分别见述于先前文献:Hoffmann等.(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11411-11416和Fodor等.1999(如上所引)。本发明的细菌人工染色体具有高载体容量以包含大量插入,这允许表达负链RNA病毒基因组或基因组区段,加上以与正链RNA病毒基因组相似的方式表达来自单一细菌人工染色体的其它病毒蛋白质编码序列。

[0083] 优选地,所述病毒表达盒中包含的负链RNA病毒的所述病毒cDNA和拯救病毒复制所需的其它表达盒源自属于以下病毒家族之一的病毒:正粘病毒科(Orthomyxoviridae),包括甲型、乙型和丙型流感病毒,和副粘病毒,包括麻疹病毒、腮腺炎病毒和呼吸道合胞体病毒。所述病毒表达盒中所含的病毒cDNA可以对应于野生型RNA病毒基因组的那些或是嵌合病毒cDNA构建体,其中,异源性DNA序列已被插入,和/或,天然病毒序列已删除、截短或突变。优选地,所述异源性DNA序列编码一种或多种肽/蛋白质,所述肽/蛋白质在将包含所述嵌合病毒cDNA的病毒表达盒的本发明的细菌人工染色体引入哺乳动物之后由该重组病毒异源表达。

[0084] 如果本发明的细菌人工染色体包含含有双链RNA病毒基因组的cDNA的病毒表达盒,则所述构建体必须被修饰,从而,Boyce等.(2008) *J. Virol.* 82, 8339-8348中所述的拯救病毒RNA复制所需的全部病毒RNA基因组区段,即,蓝舌病病毒情况中的10种RNA,可由RNA聚合酶II启动子表达,这允许对新生转录本进行正确的加工(主要是加帽)。或者,RNA聚合酶I和III启动子也可用于该目的。优选地,所述病毒表达盒中所含的双链RNA病毒的所述病毒cDNA源自属于以下病毒家族之一的病毒:呼肠孤病毒科(Reoviridae),包括呼肠孤病毒、轮状病毒和蓝舌病病毒。所述病毒表达盒中所含的病毒cDNA可以对应于野生型RNA病毒基因组的那些或是嵌合病毒cDNA构建体,其中,异源性DNA序列已被插入,和/或,天然病毒序列已删除、截短或突变。优选地,所述异源性DNA序列编码一种或多种肽/蛋白质,所述肽/蛋白质在将包含所述嵌合病毒cDNA的病毒表达盒的本发明的细菌人工染色体引入哺乳动物之后由该重组病毒异源表达。

[0085] 如果,本发明的细菌人工染色体包含含有使用双义RNA策略供于复制的病毒的cDNA的病毒表达盒,则该构建体必须以如下方式被修饰:如(Lowen等.(2004) *Virology*

330,493-500)所述,拯救病毒RNA复制所需的全部病毒RNA基因组区段由RNA聚合酶I或II启动子表达。优选地,所述病毒表达盒中包含的采用双义RNA复制策略的病毒的所述病毒cDNA源自属于以下病毒家族之一的病毒:布尼亚病毒科(Bunyaviridae),包括里夫特裂谷热病毒、汉坦病毒和施马伦贝格病毒,以及沙粒病毒科(Arenaviridae),包括拉沙病毒。所述病毒表达盒中所含的病毒cDNA可以对应于野生型RNA病毒基因组的那些或是嵌合病毒cDNA构建体,其中,异源性DNA序列已被插入,和/或,天然病毒序列已删除、截短或突变。优选地,所述异源性DNA序列编码一种或多种肽/蛋白质,所述肽/蛋白质在将包含所述嵌合病毒cDNA的病毒表达盒的本发明的细菌人工染色体引入哺乳动物之后由该重组病毒异源表达。

[0086] 如上所述并如示例说明,本发明允许产生高量的病毒cDNA,其具有足够高的质量以在DNA疫苗中使用。

[0087] 将DNA配制成疫苗制备物是本领域已知的,并且在如下文献中有详细描述,例如,《分子药物方法》(Methods in Molecular Medicine)第6-10章“DNA疫苗”,第127卷,(2006) Springer Saltzman, Shen和Brandsma(编).胡玛纳出版社(Humana Press).新泽西州托托马.和疫苗(Vaccines)(第6版)的第61章,可选性疫苗递送方法(Alternative vaccine delivery methods),第1200-1231页,(2013)(Plotkin等编)。关于合适用于DNA疫苗制备物中的可接受的运载体、稀释剂、赋形剂和佐剂的详细描述可见于W02005042014,如下所示。

[0088] “可接受的运载体、稀释剂或赋形剂”,指的是人类和/或兽医药物,尤其是关于免疫治疗的药物的应用中可接受的其它物质。

[0089] 例如,可接受的运载体、稀释剂或赋形剂可以是固体或液体填料、稀释剂或包封物质,其能够安全地用于全身性或局部给予。根据具体给予途径,可采用本领域中熟知的多种运载体。这些运载体可选自下组:糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、胶质、滑石、硫酸钙、植物油、合成的油、多元醇、褐藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳液、等渗盐水和盐例如无机酸盐,包括盐酸盐、溴化物和硫酸盐,有机酸盐例如乙酸盐、丙酸盐和丙二酸盐,以及无热原的水。

[0090] 描述药学上可接受的运载体、稀释剂和赋形剂的有用的参考文献是:《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(马克出版公司(Mack Publishing Co.),美国新泽西州,1991),其通过引用纳入本文。

[0091] 可采用任何安全给予途径来向患者提供所述DNA疫苗。例如,可采用经口、直肠、肠胃外、舌下、口腔、静脉内、关节内、肌内、皮肤内、皮下、吸入、眼内、腹膜内、脑室内、经皮等。肌内和皮下注射可能是合适的,例如,用于给予免疫治疗性组合物、蛋白质疫苗和核酸疫苗。还设想,微粒轰击法或电穿孔法也可具体用于递送核酸疫苗。

[0092] 剂型包括片剂、分散剂、悬液、注射剂、溶液、糖浆、药片、尿囊、栓剂、气溶胶、透皮贴片等。这些剂型还可包括注射或植入控释装置,所述控释装置经特殊设计以用于该目的,或其它形式的植入物,所述植入物经修饰以该形式另发挥作用。这些治疗剂的控释可通过对其进行被覆来起效,例如,采用疏水聚合物,包括丙烯酸树脂、蜡、高级脂肪醇、聚乳酸和聚乙醇酸,以及某些纤维素衍生物,例如羟丙基甲基纤维素。此外,所述控释可通过采用其它聚合物基质、脂质体和/或微球来起效。

[0093] 适合于经口或肠胃外给予的DNA疫苗可以如下形式存在:离散单元例如各自包含预定量的质粒DNA的胶囊、小袋或片剂,粉末或颗粒,或水性液体、非水性液体、水包油乳液或油包水液体乳液形式的溶液或悬液。所述组合物可通过任何药学方法制备,但所有方法

均包括如下步骤:将如上所述的一种或多种试剂与由一种或多种必需组分组成的运载体相联合。一般而言,组合物通过如下方式制备:将DNA质粒和液体运载体或精细研磨的固体运载体或两者混合,然后,必要时,使产物成型为所需形式。

[0094] 上述组合物可以能够与剂量配方相容的方式和有效的量给予。给予患者的剂量应足以有效于在合适时间段于患者中产生有益反应。待给予的试剂的量可取决于待治疗的对象,包括其年龄、性别、体重和总体健康状况,因素将取决于从业医师的判断。

[0095] 所述DNA疫苗通常用于对人类进行预防性或治疗性免疫接种,但对于某些病毒,也可施用于脊椎动物(通常是哺乳动物、鸟类和鱼类),包括家畜,例如牲畜和伴侣动物。设想所述疫苗接种对作为活病毒蓄积体的动物(人畜共患病)进行,例如猴、小鼠、大鼠、鸟类和蝙蝠。

[0096] 在某些实施方式中,疫苗可包含佐剂,即增强疫苗组合物的免疫原性和/或功效的一种或多种物质,然而,活疫苗可能最终会被佐剂(可刺激独立于病毒复制的先天免疫应答的)破坏。合适的佐剂的非限制性示例包括:角鲨烷和鲨烯(或其它动物油);嵌段共聚物;去污剂例如吐温80;卷片A、矿物油例如Drakeol或Marcol、植物油例如花生油;白喉棒状杆菌(*Corynebacterium*)源性佐剂,例如短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*);丙酸菌属(*Propionibacterium*)源性佐剂,例如痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acne*);牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*) (卡介苗或BCG);白介素例如白介素2和白介素12;单核因子例如白介素1;肿瘤坏死因子;干扰素,例如 γ 干扰素;组合,例如皂苷-氢氧化铝或卷片-A氢氧化铝;脂质体;ISCOMt)和ISCOMATRIX (B) 佐剂;分枝杆菌细胞壁提取物;合成的糖肽,例如胞壁二肽,或其它衍生物;阿夫立定;脂质A衍生物;硫酸葡聚糖;DEAE-右旋糖或带有磷酸铝;羟聚甲烯,例如Carbopol'EMA;丙烯酸共聚物乳液,例如Neocryl A640;牛痘或动物痘病毒蛋白质;亚病毒颗粒佐剂,例如霍乱毒素或其混合物。

[0097] 本发明还通过以下实施例的方式说明:

实施例

[0098] 实施例1:实施例2和3中的实验工作中所用的动物、病毒、细胞、细菌和酵母

[0099] 动物.

[0100] 室内饲养敲除了干扰素I型和II型受体 (AG129小鼠;B&K通用有限公司/英国) 的129/Sv小鼠。

[0101] 病毒和细胞.

[0102] Vero-B细胞(非洲绿猴肾细胞;美国典型培养物保藏中心(ATCC) CCL-81) 和BHK-21细胞(婴幼仓鼠肾细胞;ATCC CCL-10) 获自ATCC。所有细胞基本按照如下文献所述进行培养(De Burghgraeve等.(2012) PLoS ONE 7, e37244)。黄热病病毒疫苗株17D(**Stamaril®**)购自赛诺菲巴斯德MSD公司,比利时布鲁塞尔。

[0103] 细菌和酵母.

[0104] 用于pShuttle-BAC扩增的常规克隆和增殖的细菌株分别是大肠杆菌Top10(英杰公司(Invitrogen)) 和Epi300-T(艾比森塔公司(Epicenter))。用全长黄病毒cDNA质粒pACNR-FL17DII、pACNR-DENV2和p4(参见下文)转化的细菌在28°C下生长,并且通过氯霉素扩增来增加质粒DNA产量。包含穿梭质粒的Epi-300T细胞在在37°C下生长,并如下所述扩

增。酵母株酵母菌属 (*Saccharomyces*) 啤酒酵母 YPH500 (基因型: MAT α ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1- Δ 63his3- Δ 200leu2- Δ 1) 在选择培养基上生长, 该选择培养基来自 Difco-BD 生物科学公司和西格玛-奥德里奇公司。感受态酵母细胞的转化采用乙酸钠方法进行, 且酵母在 28°C 下生长。

[0105] 实验部分中所用的引物如下所示:

[0106] 表1: 引物列表

#	引物名称	5'-3'序列	SEQ ID NO:
16	mRFP(+)_Age/Bst X/Nco_Kozak	ATCCACCGGTCCACAACCatggcc tcctccgaggac	8
17	mRFP(-)_非/Xba (mRFP(-)_Not/Xba)	TGATCTAGAGTCGCGGCCGCTT TAggcgccggtggagtg	9
55	YF17D(-)10862	AGTGGTTTTGTGTTTGTTCATCC	10
109	YF3'-HDrz5'(+))	GGATGACAAACACAAAACCACT GGCCGGCATGGTCCCAGCCTCC TCGCTGG	11
[0107] 110	HDrz中(+) (HDrzMiddle(+))	GGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCG CCGGCTGGGCAACATTCCGAG GGG	12
111	HDrz3'(-)	GTCCCATTCGCCATTACCGAGG GGACGGTCCCCTCGGAATGTTG CCC	13
173	YF17D(+)_1_SP6_ Xma/非 ((YF17D(+)_1_SP6 _Xma/Not))	CCCGGGCGGCCGCgcatacgatttagg tgacactatagAGTAAATCCTGTGTG CTAATTG	14
194	Trp1(+)_Nsi/ 非 /Sal	atgcatgcccgcgctcgacGGTCGAAA AAAGAAAAGGAG	15

[0108]

	((Trp1(+)_Nsi/Not/Sal))		
195	2 微米 (+)_Nsi/NgoM4/R 1	Atgcatgccggcgaattctgaaccagtcctaaaa cgag	16
231	DENV2(+)_1_T7_X ma/ 非 _tataGGGAGTT ((DENV2(+)_1_T7_ Xma/Not_tataGGG AGTT))	cccgggcccggcctaatacgaactactataGG GAGTTGTTAGTCTACGTGG	17
334	pBABE正向	Accccgcctcaatcctc	18
391	YF17D(+)_10627	GGTTTCTGGGACCTCCCACCCC AGAGT	19
393	miRNA克隆接头1	/5rApp/CTGTAGGCACCATCAAT/ 3ddC/	20
394	接头 1_ 反向 /Nhe/Sal	gtcgacgctagcGATTGATGGTGCCT ACAG	21
425	HDrz_BstE_Hygro (-)	GGAGGCTGGGACCATGCCGGC CaGGTcACCggtagctcttgatccggca	22
426	Hygro_BstE_HDrz	tgccggatcaagagctaccGGTgACcTGG CCGGCATGGTCCCAGCCTCC	23
453	SV40(+)-76	Ctccgcccagttccgcccattctccgcccattgg ctgactaattttttatttatgcag	24
454	SV40/YF17D(+)_1	gactaattttttatttatgcagaggccgagggccg cctcAGTAAATCCTGTGTGCTAA T	25
455	SV40/DV2(+)_1	gactaattttttatttatgcagaggccgagggccg cctcAGTTGTTAGTCTACGTGGA C	26
456	HDrz(-)_5'	CCCTCGGAATGTTGCCAGCCG	27

[0109]

		GCGCCAGCGAGGAGGCTGGGA CCATGCCGGCCa	
457	YF17D(-)10862_H Drz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCa GTGGTTTTGTGTTTGTTCATCC	28
458	DV2(-)10724_HDr z	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCa GAACCTGTTGATTCAACAGCAC C	29
474	SV40(-)_HDrz/Pm e	CGAGGAGGCTGGGACCATGCC GGCCaGGTCACCgtttaaacGGCCga ggcggcctcgcc	30
475	HDrz(+)_Sfi/Pme/ BstE	tttatgcagaggccgaggccgcctcGGCCggt taaacGGTGACctGGCCGGCATGG TCCC	31
552	SV40(-)-1	Gagcggcctcgccctctgca	32
553	HDrz(+)'5'	tGGCCGGCATGGTCCCAGCCT	33
856	SV40/DV4(+)'1	gactaattttttatttatgcagaggccgaggccg cctcAGTTGTTAGTCTGTGTGGA C	34
857	DV4(-)10649_HDr z	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCa GAACCTGTTGGATCAACAACA CC	35
946	HA-标签_H1(-)	ttaTGCATAGTCAGGCACGTCAT ATGGATAggatcc	36
947	YF17D(+)7637_T7 p	TCGACTAATACGACTCACTATA GGGggagcgcgaatggaaaaac	37
948	YF17D(-)8136_Sp 6p	CGCGCATAACGATTTAGGTGACA CTATAGgtatcaagaactctcacgg	38
208		AGTAAATCCTGTGTGCTAATT	39
94		GGCAATCACGACTCGTTGCG	40
953		AGATGGTATCTTCATATTTAGA G	41

	954		ACATTTGCTTTGGTCCCTGTCT	42
	453	SV40(+)-76	ctcgcgccagttccgcccattctccgccccatggc tgactaattttttttatttatgcag	43
	988	SV40/hRV14(+) ¹	gactaattttttttatttatgcagaggccgaggccg cctcTTAAAACAGCGGATGGGT	44
[0110]	989	hRV14pA(-) 7214_30xA_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCt ttttttttttttttttttttttttttttttATAAACTCC	45
	991	SV40/EV71(+) ¹	gactaattttttttatttatgcagaggccgaggccg cctcTTAAAACAGCCTGTGGGT	46
	992	EV71pA(-) 7408_30xA_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCt ttttttttttttttttttttttttttttttGCTATTCTG	47
	990	HDrz(-)5'#2	CCCTCGGAATGTTGCCAGCCG GCGCCAGCGAGGAGGCTGGGA CCATGCCGGCC	48

[0111] 实施例2:分别包含登革热2型(DENV2)、登革热4型(Denv4)和YFV-17D的病毒cDNA的本发明细菌人工染色体的制备

[0112] 如下所述制备分别包含登革热2型(DENV2)、登革热4型(Denv4)和YFV-17D的病毒cDNA的细菌人工染色体。

[0113] 材料和方法

[0114] 质粒构建体(细菌人工染色体)。

[0115] 所有质粒构建体通过标准技术产生,并通过桑格测序确认。诱导型穿梭载体pShuttleBAC/Pme如下以多个步骤产生(图1)。首先,将pBAC/LacZ(Addgene质粒#13422)(一种阿拉伯糖-诱导型pBeloBAC/oriV的衍生物)(Wild等.(2002)基因组Res.12,1434-1444)中的lacZ基因用合成的DNA盒替代,所述合成的DNA盒包含:(i)驱动hph基因的猴病毒40(SV40)启动子/起点(SEQ ID 1),以提供潮霉素B抗性,(ii)丁型肝炎病毒(HDrz)的基因组核酶的合成的cDNA(Chadalavada等.(2007)RNA 13,2189-2201)(SEQ ID NO 2),和(iii)酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)附加体2 μ 质粒起点,以及(iv)TRP1基因,以提供对于色氨酸的原养型生长。结构模块(i)是采用引物#334和#425从pBABE-hygro PCR扩增的(Morgenstern等.(1990)Nucleic Acids Res.18,3587-3996;Addgene质粒#1765)。结构模块(ii-iv)采用引物#426和#231从pJet(-)/Trp1_2微米-YF3'_HDrz_BstE PCR扩增。质粒

pJet(-)/Trp1_2微米-YF3'_HDRz_BstE是pJet1.2/钝(CloneJET PCR克隆试剂盒, Fermentas公司)的衍生物,其包含YFV-17DcDNA的3'末端(包含病毒核苷酸9466至10862)至(ii)HDRz(组装自DNA核苷酸#109、110和111)的融合体,和(iii+iv)2 μ -TRP1序列,其初始源自pRE637(Esteban和Fujimura, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 2568-2573)(采用PCR引物#194和#195)。结构模块(i)被融合至(ii-iv),所述融合通过重叠延伸PCR,然后克隆进入pBAC/LacZ的SalI位点进行,以产生pShuttleBAC/SV40_Hygro_HDRz中间构建体。随后,将pShuttleBAC/SV40_Hygro_HDRz中的hph基因填充元件替换成最终pShuttleBAC/Pme穿梭载体中的多克隆位点(SfiI-PmeI-BstEII)(图1A),所述替换通过跨越整个质粒的反向PCR(采用引物#474和#475),并采用T4 DNA连接酶再环化,然后转化并在大肠杆菌中克隆来进行。

[0116] 病毒表达构建体pShuttle/YF17D、pShuttle/DV2和pShuttle/DV4通过如下方式生成:通过在酿酒酵母中进行同源重组,分别将YFV-17D(SEQ ID NO 3)、DENV2株新几内亚-C(NGC)和DENV4株多米尼加的cDNA传入pShuttleBAC/Pme(图1B)。为此,将所述病毒cDNA扩增三轮PCR引入终末延伸,所述终末延伸在其5'端包含-76bp的SV40启动子/起始(Ghosh等.(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 100-104),且在其3'端包含86个核苷酸的HDRz序列(Chadalavada等., (2007) RNA 13, 2189-2201)。首个PCR(10个循环)分别采用病毒特异性引物组合#454加#457、#455加#458和#856加#857,然后10个循环各采用SV40和HDRz特异性#453加#456,和最终的#453加#111引物。对应的病毒cDNA模板是pACNR-FLYF1DII(Bredenbeek等., (2003), 如上所引), pACNR-DENV2和p4(Durbin等.(2001) Am J Trop Med Hyg. 65, 405-413)。质粒pACNR-DENV2是pACNR-FLYF17D的衍生物,其中YFV-17D序列被替换成DENV2 NGC cDNA源性的pDVWS601(Gualano等.(1998) Gen. Virol. 79, 437-446),还分别在所述病毒基因组的7537和10232核苷酸位置处包含额外翻译沉默AgeI和BstEII位点。重组所需的线性化的载体部分通过反向PCR在pShuttleBAC/Pme上制备,该pShuttleBAC/Pme采用引物#552加#553,用PmeI预先线性化。载体扩增子用DpnI处理,然后进行凝胶纯化并转化进入酵母YPH500,以降低可能未切割的质粒模板遗留形成的背景。酵母克隆在不存在色氨酸的情况下生长,以选择重组穿梭质粒。将从酵母小量制备物回收的质粒DNA转化进入大肠杆菌Epi300-T细胞(爱彼森特公司),并如文献所述(Wild等.(2000), 如上所引),通过添加0.1% (w/v)的L-阿拉伯糖至在新鲜LB培养基(补充有20mM氯化镁)中稀释6倍的过夜培养物,并在剧烈振荡下于37°C生长6小时来进行扩增。

[0117] 通过如下方式生成在其NS5 ORF包含非转化致命突变(RdRp Δ GDD)的YFV-17D变体:将源自酵母附加体质粒(YEp) p404Gal1/HA-NS5 Δ GDD_ura3的3,6kb长的BglIII-PstI限制性片段,其包含核苷酸9294下游的合适突变YFV-17DcDNA同源重组进入pShuttle/YF17D(该pShuttle/YF17D通过C1aI(YFV-17D核苷酸9656下游)和KasI(HDRz核苷酸位置+27上游)线性化),以产生pShuttle/YF17D Δ GDD。

[0118] 结果

[0119] 已由数个DNA组成模块组装一系列合成的DNA构建体(pShuttleBAC系列),作为RNA病毒表达质粒(图1)。常用载体构建体pShuttleBAC/Pme是一种细菌人工染色体,其包含供于大肠杆菌中的条件扩增的第二起点(oriV),和供于酿酒酵母中的附加体复制的酵母2 μ 起点和TRP1营养缺陷标志物(图1A)。已插入YFV-17D疫苗的cDNA,以通过pShuttleBAC/Pme中

存在的HDV核酶和SV40启动子之间的同源性产生pShuttle/YF17D(图1B)。pShuttle/YF17D图谱示于图8(SEQ ID NO 4)。也已插入其它黄病毒的cDNA。与现有技术黄病毒cDNA克隆(例如pACNR-FLYF17DII)不同,pShuttle/YF17D在大肠杆菌中显示优越的遗传稳定性(图2),还可以被诱导来获得高质粒DNA产量。

[0120] 实施例3:包含YFV-17D疫苗cDNA的本发明的细菌人工染色体的体外和体内表征

[0121] 发现本发明的细菌人工染色体表达的YFV-17D的特点与原始疫苗病毒(例如复制功效、病毒产量和空斑表型)一致。此外,当该裸YFV-17D质粒DNA i.p.注射进入AG129小鼠,其导致与母病毒相同的病理学、发病率和死亡率。该方便、强健且可重复的系统以低成本提供了针对YFV的DNA疫苗,而无需真核细胞培养物或鸡胚蛋。不再需要冷链,并且可通过无针方式给予。

[0122] 材料和方法

[0123] 体外转录、体外加帽和电穿孔。

[0124] 包含全长YFV-17D cDNA的质粒pACNR-FLYF17DII(Bredenbeek等.(2003) J.Gen.Virol.84,1261-1268)用AflIII线性化,并通过蛋白酶K消化、苯酚-氯仿提取和乙醇沉淀来纯化。或者,采用引物#173和#55和KAPA高保真DNA聚合酶,通过对pACNR-FLYF17DII进行PCR来制备用于用于体外转录(IVT)的全长cDNA模板,以克服受限的质粒产量。通过采用Sp6 RNA聚合酶(Ribomax大规模RNA生产试剂盒,普洛麦格(Promega)),体外生成失控(run-off)RNA转录本。转录本采用纯化的牛痘病毒7-甲基鸟苷转移酶(Scriptcap 7mG加帽系统,爱彼森特公司)加帽,并用于BHK-21细胞的电穿孔(采用从BHK-21细胞提取的过量的总RNA作为运载体RNA)。在转染的细胞显示近乎完全细胞病变时,收获细胞培养基。通过离心从细胞碎片清出培养基,然后用于在BHK-21细胞上制备病毒储液。

[0125] 质粒转染

[0126] Vero-B细胞于在包含10%胎牛血清的培养基中接种至6孔板至70%融合度,并在第二天用2.5 μ g的质粒DNA,采用Transit-LT1试剂(Mirus)以1:3的DNA-载体比例转染。质粒pmRFP1以1:10的比例共转染,以作为视觉对照,以确保相同的转染功效。对于病毒储液的长期保持和生产,在孵育过夜后更换培养基,以仅包含2%的血清。

[0127] 病毒RNA末端的图谱分析。

[0128] 通过cDNA末端的快速扩增(RACE)来分析从pShuttleBAC载体源性的病毒RNA的合适加工。在新反向延长/扩增方案之后进行的5' RACE已在如下文献中详细描述(Dallmeier和Neyts(2013) Anal.Biochem.434,1-3)。非聚腺苷酸化的YFV-17D基因组RNA的3' RACE基本按照先前所述进行。简言之,利用T4 RNA连接酶2(新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs))在15%聚乙二醇(PEG)-8000存在下的活性,在10 μ L的总反应体积中,在16 $^{\circ}$ C过夜,将5 μ L的DNA酶I处理的pShuttle/YF17D转染Vero细胞的总RNA(约1 μ g的RNA)连接至5'-腺苷酸化和3'-双脱氧胞嘧啶(ddC)修饰的接头#393(miRNA克隆接头1, IDT DNA技术公司)。连接产物通过一步RT-PCR(凯杰)扩增,分别使用YFV-17D和接头特异性引物#391和#394进行。在磨平由Taq DNA聚合酶产生的3'腺嘌呤突出物之后,265bp的扩增子经凝胶纯化并克隆进入pJet1.2/钝(CloneJet PCR克隆试剂盒,Fermentas公司),并通过桑格测序法分析。

[0129] 胞内病毒复制性RNA形式的检测。

[0130] 变性琼脂糖凝胶电泳之后,基本按照如下文献描述进行Northern印迹并检测病毒

复制中间体 (Dallmeier等. (2008) PLoS Pathog. 4, e1000230), 其中对所用的凝胶系统和探针设计稍作了修改。简言之, 3 μ g总RNA经加热变性, 并通过包含1%甲酰胺和0.01 μ g溴化乙锭 mL^{-1} 的2mM乙二胺四乙酸 (EDTA) 和5mM乙酸钠以及20mM 3- (N-吗啉代) 丙磺酸 (MOPS) 中的1%琼脂糖凝胶 (pH 7.0), 随后通过20x SSC (3M氯化钠, 300mM柠檬酸钠, pH 7.0) 中的正电尼龙膜 (罗氏诊断公司) 上的毛细管转移, 来进行分离。根据Knuchel等. (2000) J. Histochem. Cytochem. 48, 285-294, 采用引物#947和#948, 生成与YFV-17D的NS5区域的5'端互补 (核苷酸7637-8136) 的链-特异性DIG标记的单链DNA探针。杂交化和免疫检测根据DIG应用手册关于滤膜杂交的部分 (罗氏诊断公司) 进行。

[0131] 通过空斑试验和RT-qPCR进行病毒定量。

[0132] 释放自转染的细胞的感染性病毒通过对转染后7天的BHK-21细胞的融合单层进行病毒空斑试验来定量, 试验采用1%微晶纤维素 (Avicell), 其在0.5x的维持基质中按先前所述重叠 (Kaptein等. (2010) Antimicrob Agents Chemother. 54, 5269-8520)。为了定量感染的小鼠组织中的病毒RNA荷载, 速冻尸检在Precellys珠研钵中于RLT缓冲液 (RNeasy, 凯杰) 中破坏, 然后根据生产商说明提取总RNA。完全按照 (Kaptein等. (2010), 如上所引) 的描述, 采用靶向NS3基因的约150核苷酸伸展部分的引物和探针, 和相同克隆的YFV-17D cDNA片段的系列稀释物作为标准物, 对YFV-17D RNA进行定量反转录酶PCR (RT-qPCR)。

[0133] 免疫荧光试验。

[0134] 采用pShuttle/DV2转染的BHK-21细胞的转染后 (p. t.) 7天的经清除处理的上清液来繁育亚融合Vero-B培养物, 其在4%的多聚甲醛中固定5天后, 并基本按照先前所述进行免疫染色 (De Burghgraeve等. (2012) PLoS ONE 7, e37244)。通过DENV2血清型特异性单克隆抗体 (mAb) 3H5.1 (密理博) 和Alexa Fluor-488标记的二抗 (密理博) 来检测胞内E蛋白表达。DAPI染色后, 细胞采用FLoid细胞成像工作台 (生命技术公司) 观察。

[0135] 小鼠的体内转染。

[0136] 将10-20 μ g的质粒DNA与作为运载体的33%丙二醇中的20 μ g碳酸钙微米花混合 (Fumoto等. (2012) Mol. Pharm. 9, 1962-1970), 并腹膜内注射进入成年 (约20g) AG129小鼠。或者, 腹膜注射半剂量的减毒活YFV-17D疫苗 (Stamaril[®], 赛诺菲巴斯德MSD公司, 布鲁塞尔)。每天监测体重和行为。

[0137] 结果

[0138] 如果转染进入哺乳动物细胞, 则正确加工的YFV-17D RNA的转录由pShuttle/YF17D启动 (图3B), 其起始胞内自我维持的病毒复制 (图3A)。用pShuttle/YF17D转染的细胞最终分泌感染性病毒颗粒, 其在表型上, 关于其在组织培养物中诱导细胞病变作用的能力 (图4A-C)、病毒产量和空斑表型 (图4D+E), 无法与亲本YFV-17D病毒区分。因此, 产生的重组病毒能够被认为是在生物学上相同的 (数量和质量上)。同样地, 用pShuttle/DV2转染的细胞产生重组感染性DENV2新几内亚株C (图5)。

[0139] pShuttle/YF17D在AG129小鼠 (建立的一种YFV-17D感染的致死体内小鼠模型) 中的腹膜内转染, (Meier等. (2009) PLoS Pathog. 5, e1000614; Thibodeaux等. (2012) 疫苗30, 3180-3187), 导致与真实YFV疫苗Stamaril[®]相似的病毒诱导的死亡率 (图6) 和发病率 (图7)。因此, 该方便、强健且可重复的系统能够允许以低成本开发出针对YFV的DNA疫苗, 而无需真核细胞培养物或鸡胚蛋。不再需要冷链, 并且可通过无针方式给予。

[0140] 实施例4:pShuttle/YF17D (DNA-YFVax) 在通过皮下途径和通过无针喷射注射裸质粒DNA所感染的AG129小鼠中诱导的发病率和死亡率。

[0141] 为了评估除了腹膜内途径以外的,用于施予pShuttle/YF17D (DNA-YFVax) 的其它途径的可行性,数组 (n=3) 9周龄雄性AG129小鼠 (雄性,重22-25g) 用100 μ L磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的25 μ g的DNA-YFVax注射,通过 (i) 采用注射器和G27针头经皮下 (s.c.) 或 (ii) 通过经批准用于人类临床用于经皮施用 (例如,胰岛素或麻醉剂) 的应用的无针喷射注射器 (Injex-30,德国柏林的Injex制药股份有限公司) 经皮 (t.d.) 给予。AG129用与200 μ L 33% 丙二醇中的碳酸钙微晶配制的25 μ gDNA-YFVax (如之前作为对照组) i.p. 注射。发病率和死亡率向先前那样评分,实验在30天之后终止 (参见表2)。

[0142] 表2:用DNA-YFVax通过不同途径注射的雄性AG129小鼠的死亡率。

[0143]	组	死亡率	至死亡天数	MDD
[0144]	腹膜内 (采用 CaCO ₃)	0/3	n.a.	n.a.
	皮下	1/3	13, n.a., n.a.	n.a.
	喷射注射	3/3	16, 16, 19	17 \pm 2

[0145] MDD-平均至死亡天数;n.a.-不适用

[0146] 通过s.c.和t.d.途径注射DNA-YFVax的AG129小鼠中的至少一些发展出YFV-17D诱导的疾病的迹象 (体重损失、皮毛起皱、背佝、迟缓性后肢瘫痪) 而必须被安乐死。最重要的是,通过无针喷射注射的全部小鼠在自YFV-17D诱导的脑炎17 \pm 2天内统一死亡,而全部 i.p. 注射的对照小鼠在实验时程中存活 (30天)。观察过程中,对照组中缺乏死亡率的现象 (相比实施例3中出现的13 \pm 2的MDD) 能够容易地通过所用雄性动物体重较重来解释。

[0147] 注,采用碳酸钙作为运载体用于DNA-YFVax对于疫苗递送而言并不必然是最理想的;即,有时候甚至在仓鼠中观察到一些抑制作用 (参见实施例5),这取决于注射途径和不同批次的碳酸钙微米花之间的差异性。总之,DNA-YFVax能够以不同的制剂通过不同的注射途径 (包括通过无针喷射注射) 被成功递送。

[0148] 实施例5:叙利亚金仓鼠在用pShuttle/YF17D (DNA-YFVax) 免疫之后的血清转化

[0149] 为了评估通过DNA-YFVax的针对YFV的保护性免疫的诱导,采用临床前叙利亚金仓鼠 (*Mesocricetus auratus*) 模型 (Tesh等. (2001) *J Infect Dis.* 183, 1431-1436)。为此,数组磁性仓鼠 (8-10周龄,90-100g) 通过腹膜内 (i.p.) 注射1/5剂量的Stamaril® (100 μ L), 或,如前所述用200 μ L的33% 丙二醇中的碳酸钙微晶配制的20 μ g pShuttle/YF17D (DNA-YFVax) 来免疫。以重复形式,替代性施用10 μ g DNA-YFVax。每周在完全外科麻醉的情况下,通过心脏穿刺取血,通过离心收获血清,并冻存在-80 $^{\circ}$ C。两只未经处理的仓鼠作为正常血清的供者。为了对保护相关的免疫评分, (i) 通过间接免疫荧光试验 (IIFA), 和 (ii) 通过空斑-减少中和试验 (PRNT) 来分析血清。

[0150] 间接免疫荧光试验 (IIFA) .通过经批准用于人临床应用的市售的YFV IIFA试剂盒 (EUROIMMUN医学实验诊断股份公司,德国吕贝克,目录号FI-2665-1005G和FI-2665-1010G)

(Niedrig等.(2008)Clin Vaccine Immunol.15,177-81),按照生产商的说明稍加改变,测定免疫的仓鼠血清中的YFV-17D(**Stamaril®**和DNA-YFVax)特异性IgG抗体。仓鼠血清在样品缓冲液中稀释20-、66-、200-、660-和2000倍,并且在YFV-IIFA载玻片上施加30 μ L血清稀释物。载玻片在室温孵育30分钟,然后在包含0.2%吐温-20的PBS中清洗5分钟。为了检测金仓鼠中诱导的抗体,FITC-标记的抗仓鼠IgG二抗(杰克森免疫研究实验室公司,目录号307-095-003)在包含2% BSA的PBS中以1:50稀释,并替代试剂盒中提供的抗人二抗而使用。载玻片用DAPI复染,并通过荧光显微镜测定端点效价。

[0151] 空斑减少中和试验(PRNT)。黄热病免疫的仓鼠血清中的中和抗体效价采用PRNT测定。简言之,0.5x 10⁶BHK细胞/孔铺板于12孔板,在生长培养基(MEM培养基,补充有10% FCS,1%碳酸氢钠和1%谷氨酰胺)中过夜。全部血清一式三份以1:20、1:66、1:200、1:660、1:2000和1:6600的系列稀释度测定。将30 μ L血清稀释物混合在30 μ L试验培养基(与生长培养基相同,但仅包含2%的FCS),其包含YFV-17D病毒形成的40个空斑(**Stamaril®**,批次G5400P1,在Vero-B细胞上传代一次)。在37 $^{\circ}$ C这样预吸附1小时之后,添加440 μ L试验培养基,并将500 μ L各混合物添加至BHK细胞。室温孵育1小时之后,细胞经清洗并用试验培养基(补充LMP琼脂糖(英杰公司)至终浓度0.5%)覆盖。随后,在37 $^{\circ}$ C培养5天,用8%的甲醛混合2小时,并用吉姆萨(Giemsa)染剂染色。对空斑计数,并根据Reed和Munch所述计算50%中和效价(Reed和Muench(1938)Am. J. Hyg. 27, 493-497)。

[0152] 总体而言,通过IIFA进行的交叉反应抗体的检测(表3)和通过PRNT进行的中和抗体的检测(表4)一致。关于疫苗功效,DNA-YFVax显示不劣于**Stamaril®**;在两个试验组中,3个个体中有2个(1/5 **Stamaril®**对比20 μ g DNA-YFVax),和5个个体中有4个对比4个个体中有2个(1/5 **Stamaril®**对比10 μ g DNA-YFVax)血清转化至高效价的YFV交叉反应和中和抗体(参见表3和4)。可认为这些值代表了完全保护性免疫(与保护相关的免疫),其中PRNT效价>40的在致死YFV挑战仓鼠模型中具有保护性(Julander等.(2011)疫苗29,6008-6016)。最重要地,WHO表示,已经>0.7的对数中和指数(LNI)与灵长类动物中的疫苗接种后免疫保护相关,而这对人类也是如此(WHO意见书(2013)Wkly.Epidemiol.Rec.88,269-283.)。该PRNT Log₁₀效价>0.7的基准被仓鼠中的DNA-YFVax超出数个数量级,超出多于150倍(参见表4)。

[0153] 此外,相比于**Stamaril®**,免疫应答在DNA-YFVax疫苗接种的个体中更具同源性,在3周内一致检测到血清转化至高PRNT效价,而不是仅在4周后,即比来自**Stamaril®**组的其它血清转化物晚3周。

[0154] 表3: **Stamaril®**和DNA-YFVax免疫的叙利亚金仓鼠中的YFV交叉反应抗体应答

组	Log10几何平均IIFA效价*				
	第28天	第21天	第14天	第7天	第3天/D0
8-10周龄♀♀ 仓鼠	ND				
8-10周龄♀♀ 仓鼠+ Stamaril® (1/5)	2.3 (2/3)	2.3 (2/3)	2.3 (1/3)	1.3 (1/3)	ND
8-10周龄♀♀ 仓鼠+ Stamaril® (1/5)	1.9 (4/5)				
8-10周龄♀♀ 仓鼠+ DNA-YFVax (20ug)	2.3 (2/3)	2.3 (2/3)	2.3 (1/3)	ND	ND
8-10周龄♀♀ 仓鼠+ DNA-YFVax (10ug)	2.3 (2/4)	2.3 (2/3)	2.8 (2/4)	ND	ND

[0156] ND=未检测;*(x/x) =血清转化的个体数/测试个体数

[0157] 表4. Stamaril®和DNA-YFVax免疫的叙利亚金仓鼠中的中和抗体应答

	动物	感染后28天的几何平均PRNT效价
非免疫	H001	ND
	H002	ND

8-10周龄♀♀ 仓鼠+ Stamaril® (1/5)	H012	405 ± 57	
	H013	ND	
	H014	947 ± 98	
	8-10周龄♀♀ 仓鼠+ DNA-YFVax (20µg)	H015	ND
		H016	928 ± 45
		H017	822 ± 151

[0160] ND=未检测

[0161] 实施例6:评估克隆的YFV-17D cDNA的遗传不稳定性.

[0162] (a) 起始材料:采用标准技术进行上述pACNR-FLYF17DII的 (Bredenbeek等. (2003)) 和pShuttle/YFV-17D的大规模质粒制备.为此,将pACNR-FLYF17DII转化进入标准大肠杆菌K12衍生株,铺板于含有100µg/mL氨苄青霉素的LB-琼脂,并在28°C (替代37°C) 生长过夜,以利于质粒稳定性.将小集落扩大规模并在两个连续过夜培养物中于28°C剧烈振荡下生长在包含100µg/mL的LB中,以最终达到1L的批次培养物.该批次在28°C过夜生长,并最终通过添加氯霉素至终浓度20µg/mL另在28°C持续8小时来扩增.类似地,将pShuttle/

YFV-17D转化到大肠杆菌株EPI300-T细胞(爱彼森特)中,铺板于包含20 μ g/mL氯霉素的LB-琼脂,并在37 $^{\circ}$ C生长过夜。相应地将后者质粒扩大规模,而所有生长在20 μ g/mL氯霉素的存在下于37 $^{\circ}$ C进行。最终过夜批次培养物以1:6稀释进入包含20 μ g/mL氯霉素和0.01% L-阿拉伯糖的新鲜LB培养基,并生长不超过6小时。质粒采用标准柱亲和纯化法(凯杰)纯化,溶解于TE(10mM Tris-HCl,1mM EDTA)至终浓度1 μ g/mL,并冻存于-20 $^{\circ}$ C。

[0163] (b) 集落生长和尺寸.将两种质粒转化进入大肠杆菌EPI300-T并在包含合适抗生素作为选择培养基的MacConkey琼脂(2%蛋白胨、0.5% NaCl、1%乳糖、0.15%胆汁盐、0.003%中性红、0.0001%结晶紫、1.35%琼脂)上划线。将无菌Zirkonia珠(直径2.5mm)包埋进入琼脂,以作为绝对尺寸测量的校准器。对于用pShuttle/YFV-17D转染的1等份细菌,所述琼脂另包含0.01% L-阿拉伯糖。在37 $^{\circ}$ C孵育16小时之后,采用常规数码相机(佳能 Powershot SX10IS)拍照,并保存成JPEG文件(参见图9)。将图片导入OpenCFU 3.8.11版,用于关于集落计数和大小的图像分析Geissman(2013)PLoS One.8,e54072。

[0164] 携带pShuttle/YFV-17D的大肠杆菌克隆(图9B)生长出的尺寸远大于含pACNR-FLYF17DII的克隆(图9A),其群落也比含pACNR-FLYF17DII的克隆(图9A)更为均一。预料之外的是,pShuttle/YFV-17D的这一表面上较低的毒性甚至保持在阿拉伯糖诱导的状态中(图9C)。pACNR-FLYF17DII转化株群落(图9A)中存在的较大集落更可能包含带有突变的质粒,所述突变消除毒性病毒蛋白质的隐蔽表达(参见实施例6)。

[0165] 图像分析显示包含pShuttle/YFV-17D的克隆对比包含pACNR-FLYF17DII的克隆具有显著较高的均一性(表5)。事实上,pACNR-FLYF17D转化株能够明显分成至少两个不同尺寸的亚群,表示导致(i) 偏离平均值的大标准偏差(表5),非高斯尺寸分布(图10A),和(iii) 在例如计算的算术平均和中值集落尺寸之间存在较大差异(表5)。相反,带有pShuttle/YFV-17D的转化体显示更加均一的集落尺寸(表5)和钟形的高斯尺寸分布(图10B)。预料之外地,后者也完全适于pShuttle/YFV-17D的阿拉伯糖诱导的状态(表5,图10C)。

[0166] 表5.对转化株集落尺寸(以mm计)的描述统计学评分

描述统计学	pACNR-FLYF1 7DII	pShuttle/YFV-17 D	pShuttle/YFV-17D + 阿拉伯糖
平均值	0,265832815	0,583330396	0,462981572
标准误差	0,002723111	0,003093512	0,002016904
中值	0,2	0,616	0,477
模式	0,15	0,616	0,477
[0167] 标准偏差	0,154475074	0,123314407	0,086633004
样品方差	0,023862548	0,015206443	0,007505277
峰度	1,265566671	0,005301521	0,450188526
偏度	1,50038333	-0,216414415	0,070062482
范围	1	0,728	0,583
最小值	0,1	0,224	0,212
最大值	1,1	0,952	0,795

描述统计学	pACNR-FLYF1 7DII	pShuttle/YFV-17 D	pShuttle/YFV-17D + 阿拉伯糖
[0168] 加和	855,45	926,912	854,201
计数	3218	1589	1845

[0169] 实施例7克隆的YFV-17D cDNA在大肠杆菌中的增殖过程中的突变模式和频率。

[0170] 为了落实包含YFV-17D cDNA的质粒的克隆遗传稳定性,将实施例6中所述的两种质粒转化进入大肠杆菌EPI300-T,并在上文所述那样包含合适抗生素作为选择培养基的MacConkey琼脂上划线(参见实施例6b)。pACNR-FLYF17DII克隆在28℃孵育24小时,而pShuttle/YF17D克隆在37℃孵育16小时。

[0171] 从各质粒挑取两个系列的各24-48个集落,供于质粒在200μL液体培养基(包含合适抗生素的补充有20mM MgCl₂的LB)中的生长。分别选择一个pACNR-FLYF17DII系列从小集落开始(pAS系列),并选择一个从大集落(pAL系列)开始。对于没有观察到主要尺寸差异的pShuttle/Y17D(参见实施例6b),选择具有合理尺寸差异的集落作为两个培养系列,分别从较小(pSS系列)和较大集落(pSL系列)开始。

[0172] 包含pACNR质粒的细菌在28℃孵育24小时,而pShuttle集落在37℃孵育过夜,随后在包含氯霉素和0.01%阿拉伯糖的600μL LB中孵育6小时。分别采用引物#208和#94(对应YFV-17D核苷酸1-940,以及#953和#954(对应YFV-17D核苷酸2500-3600),对这些培养物[视作第0代(P₀)的质粒]的部分直接进行PCR扩增(GoTaq Green主混物,普洛麦格)。

[0173] 扩增子亲和纯化(凯杰)并且分别采用引物#208和#953直接测序(Bigdye,应用生物系统公司(Applied Biosystems))。经分析,预计cDNA区域分别包含先前已知的毒性决定簇的cDNA,即供于大肠杆菌中病毒5'未翻译区域中的不正常转录和翻译的隐蔽启动子(Li等.(2011),如上所引;Pu等.(2011),如上所引),以及尤其是病毒E-NS1区域中的疏水蛋白

质延伸(Yamshchikov等.(2001)Virology281,272-280)。

[0174] 各培养的克隆的另一部分以1/100在新鲜培养基中稀释并如前所述生长,以获得下一传代(P1)。后者重复达10代(P10)。如前所述通过PCR和测序分析P1、P3和P3的质粒。对于P10,质粒在较大体积的5mL培养基中生长,并且通过标准碱性质粒小抽法分离质粒。对这些质粒小抽物进行(i)PCR分析(靶向核苷酸1-940和2500-3600区域),然后进行琼脂糖电泳检测,(ii)直接测序(如果能够检测PCR扩增子),和(iii)采用PstI进行限制性酶切分析。P0、P1、P3和P10的测序结果总结于表6和7。P10的PCR和限制性分析的结果总结于表8。

[0175] 早期传代发现的突变。

[0176] pAS和pAL系列的早期传代(低传代数P0-P3)的质粒的直接测序(表6)显示相当高的突变频率,在初始克隆质粒制备物中高达13%(参见实施例6a)。几乎全部发现的突变都是无义或移码突变(FS),这分别归因于过早终止密码子(PMSt)和单核苷酸删除/插入。这些突变明显完全消除了全长YFV-17D开放阅读框(ORF)的表达。在pSL系列中,在P1中发现相似的突变,不过频率较低。在P0的pSS系列中发现不取消病毒ORF的表达的错义突变。

[0177] 总之,携带YFV-17D的cDNA的初始克隆质粒的大规模制备(参见实施例6a)包含了可容易地检测的量的突变质粒变体。在pACNR-FLYF17DII的情况中,大多数突变明显地消除了全长病毒多聚蛋白的表达,使得从相应的不能胜任复制的突变cDNA中产生病毒RNA。这就是超过所有质粒克隆的10%的情况。在pShuttle/YFV-17D的情况中,突变频率较低(少于10%),且最重要的是,较小部分的突变体会因此组成先验复制失能病毒。

[0178] p10代发现的突变。

[0179] 当分析P10代的来自pAL和pAS系列的质粒时,大多数质粒包含较大结构重排,其中分别是48例中有10例(21%)且48中有44例(92%)质粒克隆完全无法扩增核苷酸2500-3600区域(表8)。这伴随着后者突变质粒的异常限制图谱,其中多达数千碱基的DNA从质粒中丢失。应注意,测试的全部突变克隆仍然包含核苷酸1-940区域(表6),因此其更可能是原始pACNR-FLYF17DII(表8)的后代,而不是无关的污染物。已预期所述毒性cDNA片段的删除且被现有技术报道(Yamshchikov等.(2001),如上所引)。

[0180] 相反,在pShuttle-YFV17D系列中从未发现相似的重排和删除。本文中,48例中仅有2例(4%)显示错义突变,其明显改变了E-NS1编码区域中框ATG起始密码子(核苷酸2957-2959)的可能性。这并不会取消病毒ORF的表达。

[0181] 总之,初始克隆pACNR-FLYF17DII的重复传代(参见实施例6a)导致病毒cDNA中的大量删除,并因此导致功能性cDNA损失多达90%,并且更多的全部质粒克隆最明显地使由相应突变cDNA产生的病毒RNA完全失能。在pShuttle/YFV-17D的情况中,突变频率低得多(低于5%),并且最重要地,没有观察到组成先验复制失能病毒的突变(这将使其无法用作,例如,减毒活DNA疫苗)。

[0182] 表6:大肠杆菌传代(早期传代)过程中在克隆的YFV-17D cDNA中发生的突变。

[0183]

克隆系列	传代	区域	突变频率 分析的全部 克隆中的突 变克隆(%)	引入的突变 类型
pAL	P1	1-940	0/38 (0)	n.a.
	P0	2500-3600	3/24 (13)	1x PMSt 2x FS
pAS	P1	1-940	0/48 (0)	n.a.
	P3	1-940	2/91 (2)	2x FS *
	P0	2500-3600	1/23 (4)	1x S **
pSL	P1	1-940	0/34 (0)	n.a.
	P3	1-940	0/34 (0)	n.a.
	P0	2500-3600	2/24 (8)	2x FS
pSS	P0	2500-3600	1/23 (4)	1x MS

[0184] n.a.-不适用;PMSt-产生早熟的STOP密码子(无义突变);FS-归因于单核苷酸插入或删除的移码;MS-改变密码子的错义突变;S-沉默的同义密码子交换

[0185] *起始密码子上游紧邻非编码区域中观察到的一个FS

[0186] **全部三种可变密码子的混合群,但并不是同义野生型密码子

[0187] 表7:大肠杆菌传代(后期P10代)过程中在克隆YFV-17D cDNA中出现的突变

[0188]

克隆系列	代	区域	突变频率 分析的全部 克隆中的突 变克隆(%)	引入的突变 类型
pAL	P10	1-940	0/48 (0)	n.a.
	P10	2500-3600	10/48 (21)	DEL
pAS	P10	1-940	0/47 (0)	n.a.
	P10	2500-3600	44/48 (92)	DEL
pSL*	P10	2500-3600	2/48 (4)	2x MSi

[0189] n.a.-不适用;DEL-大量(千碱基范围)删除,更多具体内容参见表8;MSi-框ATG起始密码子中的可能的错义突变变化

[0190] *当铺板源自P0代的过夜培养物时,pSS和pSL克隆生长至相同集落尺寸,并且因此

在P10时不再被分开考虑。

[0191] 表8:在大肠杆菌中传代 (P10代) 过程中,携带克隆的YFV-17D cDNA的质粒中的较大结构变化

克隆系列	代	通过PCR无法扩增 1-940区域 分析的全部 克隆中的突 变克隆(%)	通过PCR无法扩增 1-940区域 分析的全部 克隆中的突 变克隆(%)	异常限制图谱 分析的全部克隆 中的突变克隆 (%)
pAL	P10	0/48 (0%)	10/48 (21%)	n.d.
pAS	P10	0/48 (0%)	44/48 (94%)	46/48 (96%)
pSL*	P10	n.d.	0/48 (0%)	n.d.

[0192] n.d. - 未测定

[0193] *当铺板源自P0代的过夜培养物时,pSS和pSL克隆生长至相同集落尺寸,并且因此在P10时不再被分开考虑。

[0194] 实施例8:构建pShuttle/YFV-JE、pShuttle/YFV-WN和pShuttle/YFV-USU作为用作嵌合黄病毒疫苗的表达式载体

[0195] YFV-17D重组嵌合衍生物经开发并用作疫苗,其中YFV-17D作为异源性抗原的载体 (Guy等.(2010)疫苗28,632-49;美国专利申请20100278773),例如,其它病原性黄病毒抗原的表面糖蛋白的载体,例如日本脑炎病毒(JEV)和西尼罗病毒(WNV)的prM和E蛋白质,分别开发成ChimeriVax-JE (**Imojev®**赛诺菲巴斯德-MSD)和ChimeriVax-WN20。本发明的pShuttle/YFV-17D(DNA-YFVax)可被修饰,从而其能够直接从转染的质粒DNA起始这些前述的ChimeriVax疫苗病毒,并且能因此完全取代包含活病毒的所述减毒活ChimeriVax-JE (**Imojev®**)和ChimeriVax-WN20疫苗。

[0196] 表达ChimeriVax-JE、pShuttle/ChimeriVax-JE(图11a)的BAC通过如下方式产生:用pShuttle/YFV17D中YFV-17D的核苷酸482-2451来取代神经减毒JEV疫苗株JE SA14-14-2的核苷酸477-2477 (Chambers (1999) J. Virol. 73 (4), 3095-3101; Arroyo等.(2001) J. Virol. 75, 934-942.) 加上在YFV-17D主链上的NS2A和NS4B基因中的两个适应性突变 (Pugachev等.(2004) J. Virol. 78, 1032-1038)。这通过同源重组和纳入三个质粒片段来实现;通过惯用DNA合成法制成pShuttle/YFV17D的两个PCR扩增子(核苷酸7228-481,和核苷酸3966-7342)和嵌合YFV-JEV cDNA片段(IDT整合DNA技术公司,比利时哈斯罗德)。后者包含ChimeriVax-JE的核苷酸359-4105(图11a)。最终构建体具有SEQ ID NO:5所示序列。

[0197] 表达BAC的ChimeriVax-WN02,pShuttle/ChimeriVax-WN02(图11b),通过如下方式产生:用pShuttle/ChimeriVax-JE的prM-E基因区域取代相应的区域WNV(NY99株),其在E蛋白中包含三个神经减毒突变如Monath等所述.(2006) (Proc Natl Acad Sci USA. 103, 6694-6699),即L107F、A316V和K440R。为此,通过如下方式制备嵌合YFV-WNV cDNA片段:惯

用DNA合成 (IDT整合DNA技术公司,比利时哈罗德),并重组进入pShuttle/ChimeriVax-JE的XhoI (核苷酸406)和KasI (核苷酸2477)位点。最终构建体具有SEQ ID NO:6所示序列。

[0199] 实施例9:构建pShuttle/EV71作为用于不同小核糖核酸病毒的表达载体

[0200] 肠道病毒是(+)-RNA病毒,其属于具有正义取向的RNA基因组的小非包膜病毒的小核糖核酸病毒家族。通常,小核糖核酸病毒的基因组不加帽,而是携带5'末端共价连接的VPg蛋白。缺少帽结构,内部核糖体进入位点(IRES)招募细胞翻译机器至病毒RNA,供于病毒蛋白质表达。原则上,小核糖核酸病毒复制和感染性病毒的后代的产生能在病毒基因组的异源性转录之后于胞内启动。现有技术中,所述病毒基因组在噬菌体启动子的控制下从cDNA转录,并且只有共转染了同源噬菌体RNA聚合酶才转录,并且在生产者细胞(双质粒系统)中表达。同样地,所述噬菌体聚合酶可在采用辅助病毒(例如,重组杆状病毒)转导了相应cDNA之后于胞内表达(Yap等.(1997)Virology.231,192-200)。

[0201] 作为现有技术中更为复杂的方法的替代,所述细小核糖核酸病毒cDNA可由pShuttle-BAC的衍生物胞内表达(单质粒系统),供于直接起始病毒复制,如下文中关于人肠道病毒71(EV71)所示例。为此,将EV71基因组作为表达盒克隆进入pShuttle-BAC,其带有5' SV40启动子和3'末端多聚A尾,之后是丁型肝炎病毒核酶。这通过如下方式完成:采用引物#991和#992通过PCR扩增EV71的cDNA,和采用引物#453和#990再扩增,以产生相应的表达盒。不同的核酸来源可用作该PCR的模板以合适扩增约7.4kb长的EV71 cDNA;(i)已克隆的EV71的cDNA,例如Chua等.(2008)J.Gen.Virol.89,1622-1632)和Zhang等.(2013)Virus Genes.47,235-243)或(ii)任何组织培养物或人或动物组织源性的EV71的全长基因组RNA的逆转录产物;或者,(iii)EV71 cDNA可通过惯用基因合成法制备。与cDNA的来源无关,由此产生的表达盒将被插入pShuttle/BAC-Pme,所述pShuttle/BAC-Pme已通过采用PmeI的限制性核酸内切酶消化(优选通过酵母中重组)被线性化。所述构建体具有如SEQ ID NO:7中所示序列,关于EV71株BrCr-TR(Arita等.(2005)J.Gen.Virol.86,1391-401)。

[0202] 可遵循相似的策略用于其它肠道病毒例如人鼻病毒14(hRV14)的克隆,仅改变用于病毒cDNA的初始扩增的第一组引物。用于hRV14的合适的引物是#988和#989。

[0203] 感染性EV71和hRV14病毒将分别通过培养的哺乳动物细胞(例如人宫颈癌(HeLa)细胞)中转染pShuttle/EV71和pShuttle/hRV14质粒或通过体内转染生成。其减毒变体可通过相似方式生成并用作减毒活疫苗。

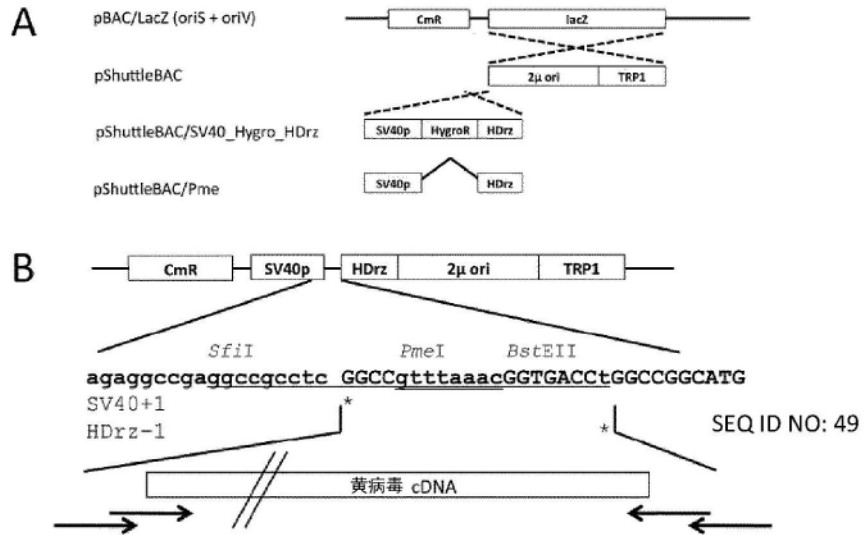


图1

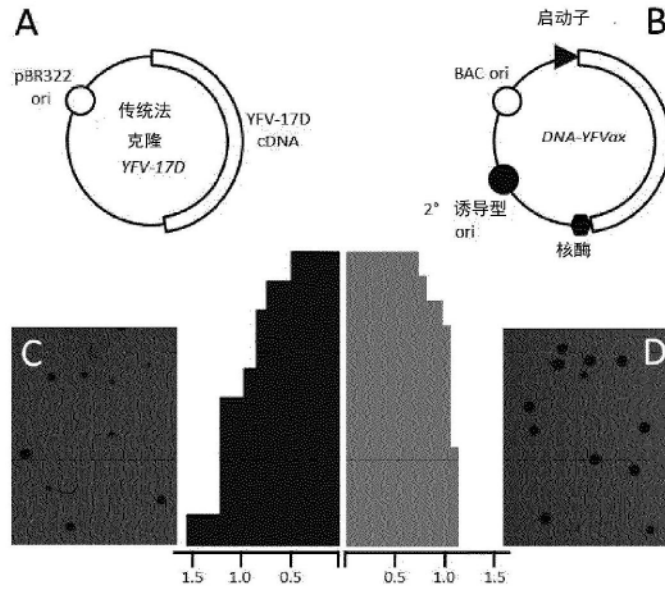


图2

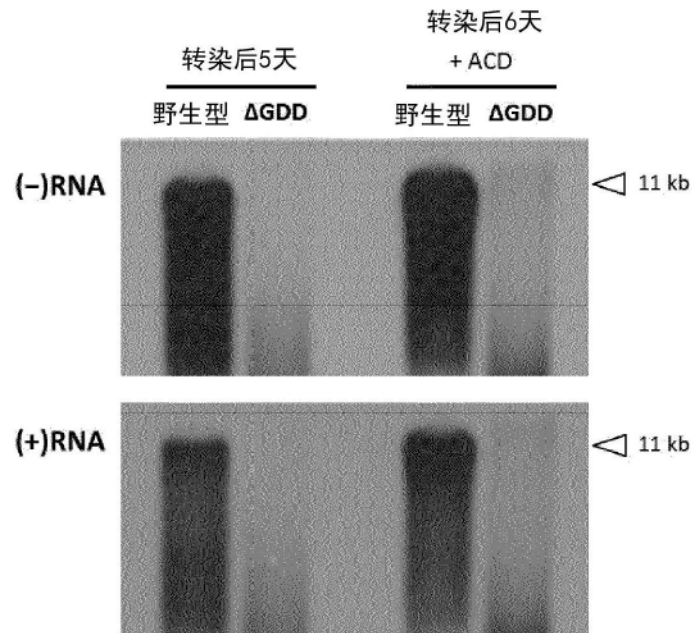


图3A

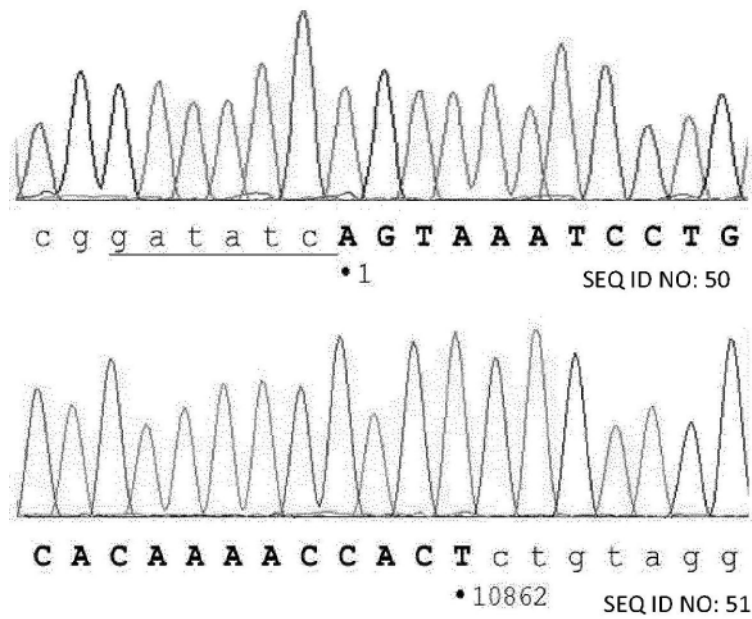


图3B

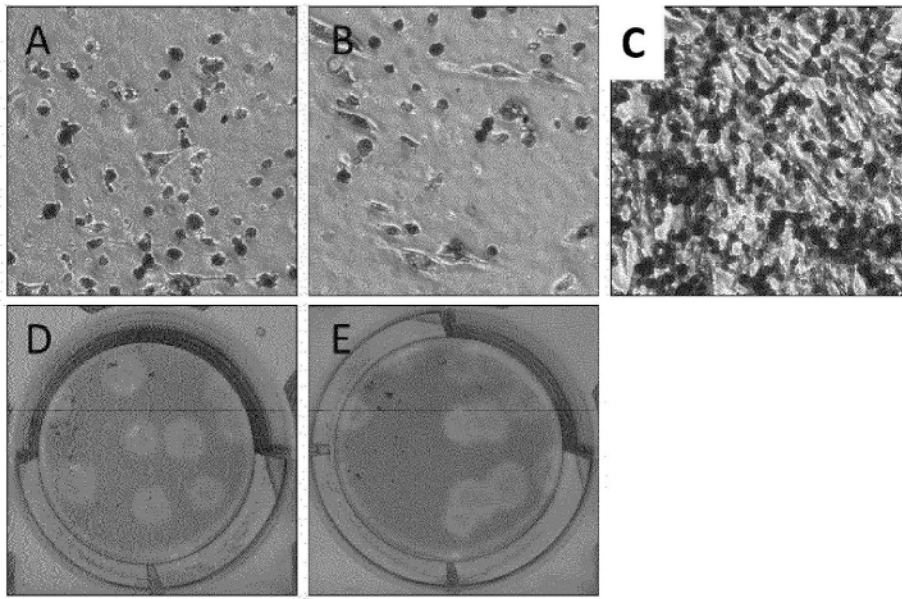


图4

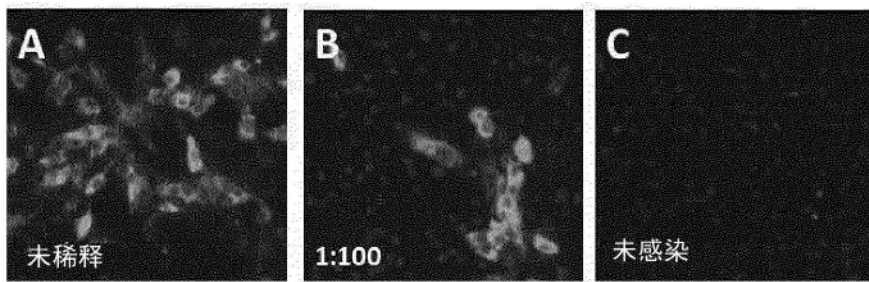


图5

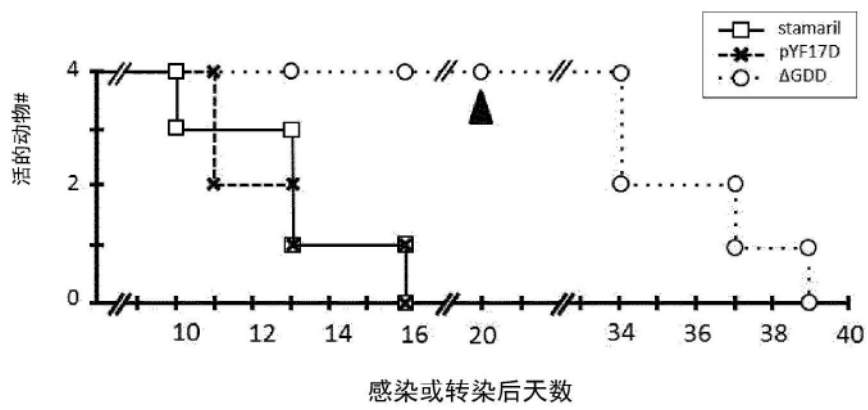


图6

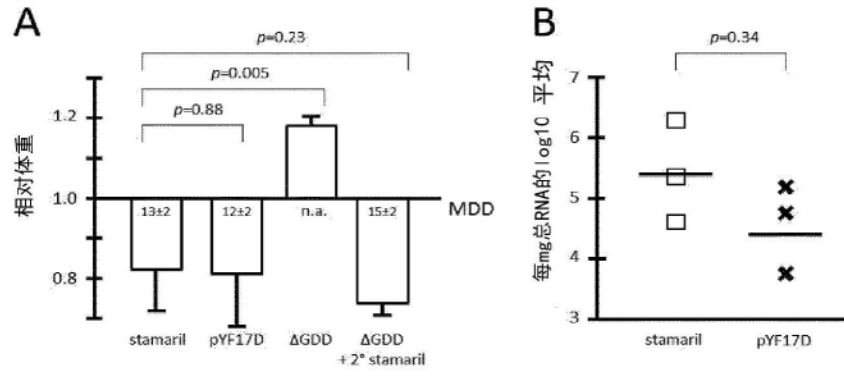


图7

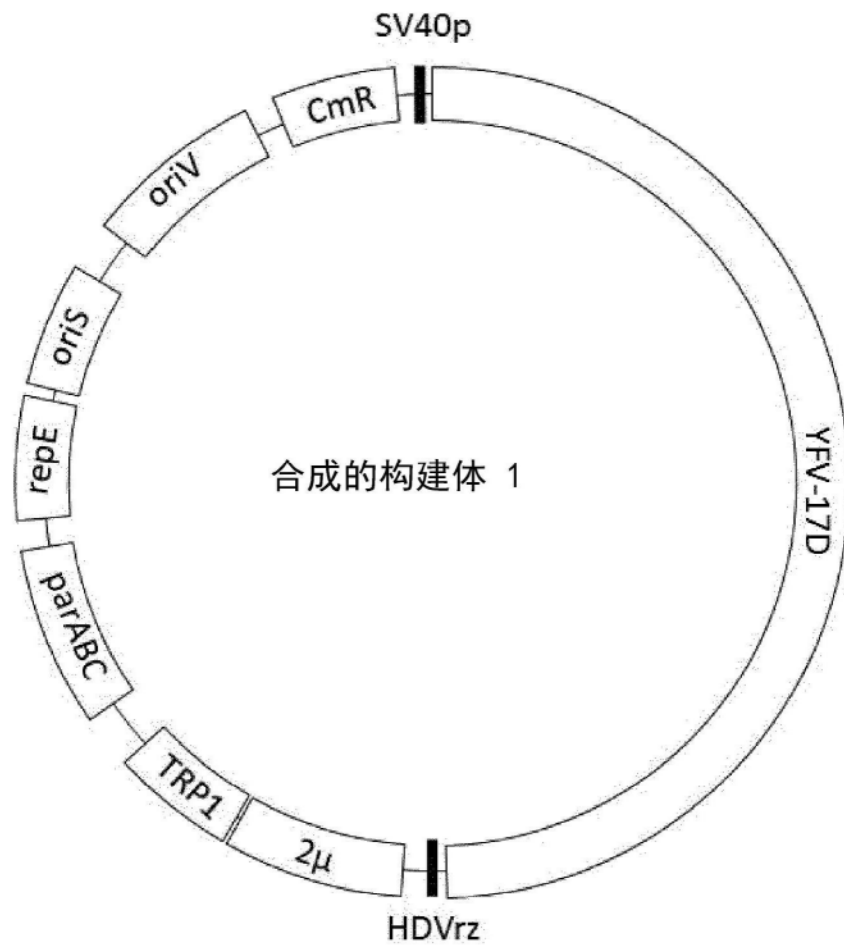


图8

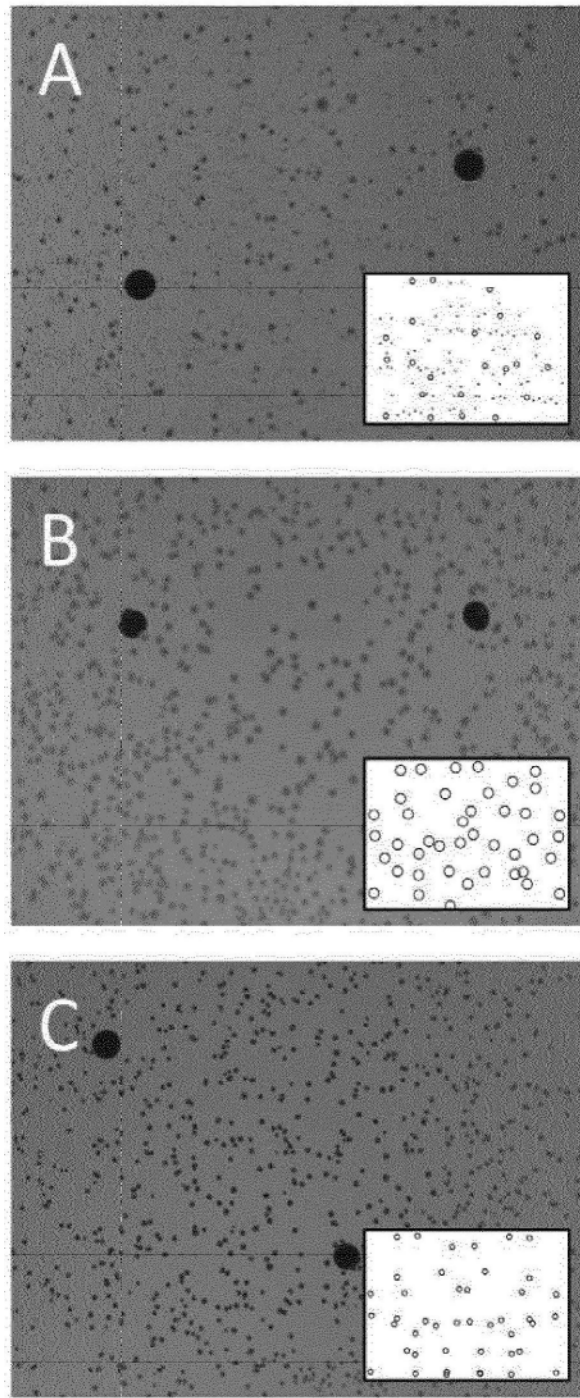


图9

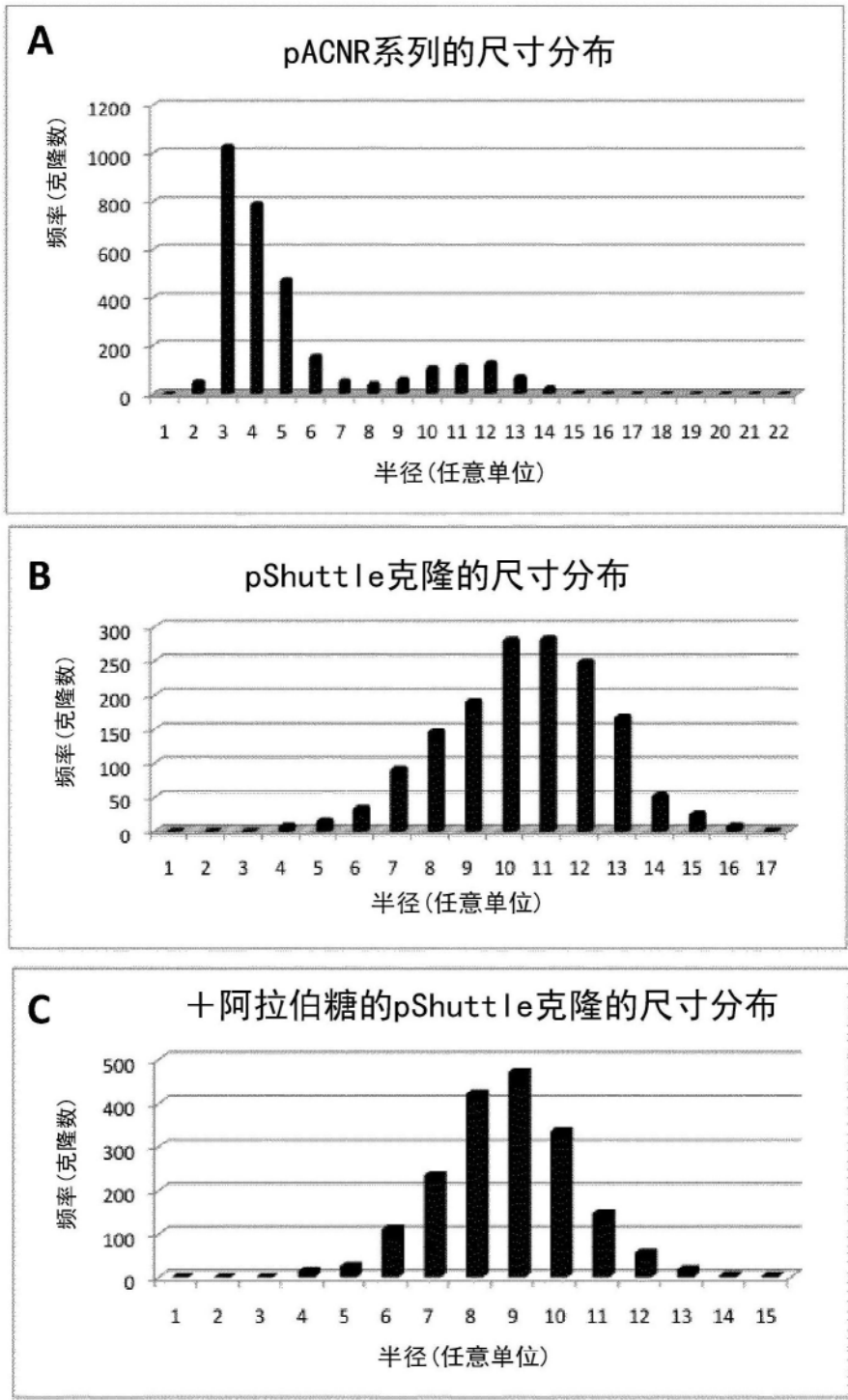


图10

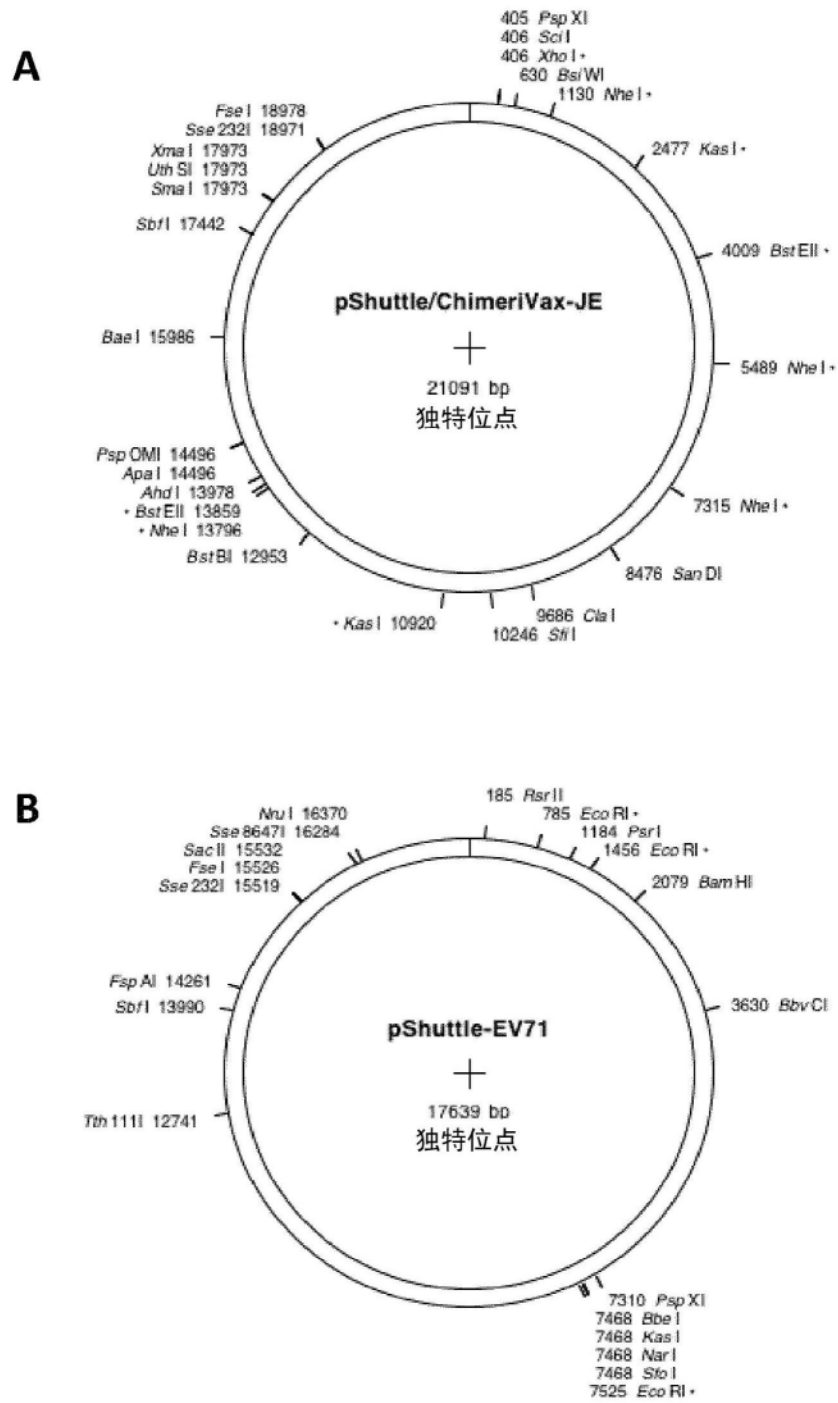


图11

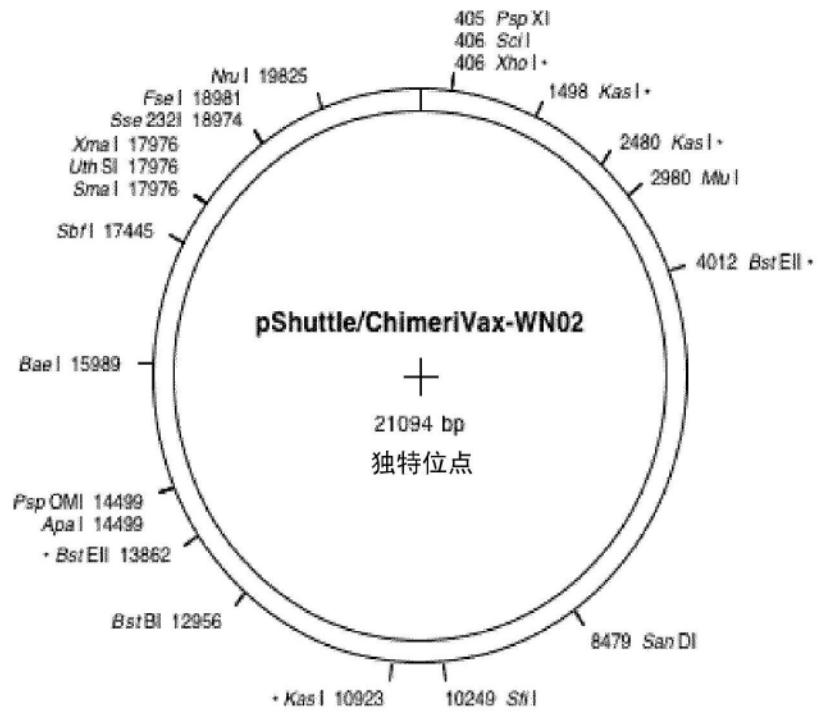


图12

SEQ ID NO: 1-7的序列

SEQ ID NO 1: SV40 启动子 (Ghosh 等 (1981) 如上所引)

CCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGC
 ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAAGTCCC GCCCTAACTCCGCCATCCCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGC
 CCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCC

SEQ ID NO 2: 85nt HDV (+) 核酶 (Chaladavada 2007 如上所引)

TGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCCTCGGTAAT
 GGCGAATGGGAC

SEQ ID NO 3: YFV-17D (Bredenbeek 等 (2003) 如上所引)

AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGTCTGCAAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTTGGATT
 AATTTTAATCGTTCGTTGAGCGATTAGCAGAGAATGACCAGAACATGTCTGGTCGTAAAGCTCAGGGAAAAA
 CCCTGGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTTCGCTCCTTGTCAAACAAAATAAAAAACAAAAACAAAT
 TGGAAACAGACCTGGACCTTCAAGAGGTGTTCAAGGATTTATCTTTTTCTTTTTGTTCAACATTTTGACTGGA
 AAAAAATCACAGCCACCTAAAGAGGTTGTGGAAAATGCTGGACCCAAGACAAGGCTTGGCTGTTCTAAGGA
 AAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTTGATGAGAGGATTGTCTCAAGGAAACGCCGTCCCATGATGTTCTGAC
 TGTGCAATTCTAATTTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTGACCTTGGTGGGAAAAACAGATGGTTG
 CTCTAAATGTGACATCTGAGGACCTCGGAAAAACATTCTGTGGGCACAGGCAACTGCACAACAAACATTT
 TGGAAAGCAAGTACTGGTGGCCAGACTCAATGGAATACAACGTCCCAATCTCAGTCCAAGAGAGGAGCCAGA
 TGACATTGATTGCTGGTGTATGGGGTGGAAAACGTTAGAGTGCATATGGTAAGTGTGACTCAGCAGGCAGG
 TCTAGGAGGTCAAGAAGGGCCATTGACTTGCCTACGCATGAAAACCATGGTTTGAAGACCCGGCAAGAAAAAT
 GGATGACTGGAAGAATGGGTGAAAAGCAACTCCAAAAGATTGAGAGATGGTTCGTGAGGAACCCCTTTTTTGC
 AGTGACGGCTCTGACCATTGCCTACCTTGTGGGAAGCAACATGACGCAACGAGTCGTGATTGCCCTACTGGTC
 TTGGCTGTTGGTCCGGCCTACTCAGCTCACTGCATTGGAATTA CTGACAGGGATTTCAATTGAGGGGGTGCATG
 GAGGAACTTGGGTTTCAGCTACCCTGGAGCAAGACAAGTGTGTCACTGTTATGGCCCTGACAAGCCTTCATT
 GGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCATTGATAGACCTGCTGAGGTGAGGAAAGTGTGTTACAATGCAGTTCTC
 ACTCATGTGAAGATTAATGACAAGTGCCCCAGCACTGGAGAGGCCACCTAGCTGAAGAGAACGAAGGGGACA
 ATGCGTGCAAGCGCACTTATTCTGATAGAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGCCTATTTGGGAAAGGGAGCATTGT
 GGCAITGCCCAAATTCACTTGTGCCAAATCCATGAGTTTGTITGAGGTTGATCAGACCAAAAATTCAGTATGTC
 ATCAGAGCACAATTGCATGTAGGGGCCAAGCAGGAAAATGGAATACCGACATTAAGACTCTCAAGTTTGATG
 CCTGTGACGGCTCCCAGGAAGTCGAGTTCATTGGGTATGGAAAAGCTACACTGGAATGCCAGGTGCAAACCTGC
 GGTGGACTTTGGTAACAGTTACATCGCTGAGATGGAAACAGAGAGCTGGATAGTGACAGACAGTGGGCCAG
 GACTTGACCCTGCCATGGCAGAGTGGAAAGTGGCGGGTGTGGAGAGAGATGCATCATCTTGTGCAATTTGAAC
 CTCCGCATGCCGCCACTATCAGAGTACTGGCCCTGGGAAACCAGGAAGGCTCCTTGAAAACAGCTCTTACTGG
 CGCAATGAGGGTTACAAAGGACACAAATGACAACAACCTTTACAAACTACATGGTGGACATGTTTCTTGCAGA
 GTGAAATTGTCAGCTTTGACACTCAAGGGGACATCCTACAAAATATGCACTGACAAAATGTTTTTTGTCAAGA
 ACCCAACTGACACTGGCCATGGCACTGTTGTGATGCAGGTGAAAGTGTCAAAGGAGCCCCCTGCAGGATTC
 AGTGATAGTAGCTGATGATCTTACAGCGGCAATCAATAAAGGCATTTTGGTTACAGTTAACCCCATCGCCTCA
 ACCAATGATGATGAAGTGTGATTGAGGTGAACCCACCTTTTGGAGACAGCTACATTATCGTTGGGAGAGGAG
 ATTCACGTCTCACTTACCAGTGGCACAAGAGGGGAAGCTCAATAGGAAAGTTGTTCACTCAGACCATGAAAGG

- SEQ ID NO 3 (续)

图13

CGTGGAAACGCCTGGCCGTCATGGGAGACACCGCCTGGGATTTTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTT
GGGAAAGGAATTCATACGGTGTGGCTCTGCCTTTCAGGGGCTATTTGGCGGCTTGAAGTGGATAACAAAGG
TCATCATGGGGCGGTACTTATATGGGTTGGCATCAACACAAGAAACATGACAATGTCCATGAGCATGATCTT
GGTAGGAGTGATCATGATGTTTTTGTCTCTAGGAGTTGGGGCGGATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGGCAAG
AGAGAGCTCAAGTGCGGAGATGGTATCTTCATATTTAGAGACTCTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACT
ATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTTGCATCAATAGTGAAAGCCTCTTTTGAAGAAGGGAAGTGTGGCCTAAATTC
AGTTGACTCCCTTGAGCATGAGATGTGGAGAAGCAGGCAGATGAGATCAATGCCATTTTGGAGAAAACGAG
GTGGACATTTCTGTTGTCGTGCAGGATCCAAAGAATGTTTACCAGAGAGGAACTCATCCATTTTCCAGAATTC
GGGATGGTCTGCAGTATGGTTGGAAGACTTGGGGTAAAGAACCTTGTGTTCTCCCGAGGGAGGAAGAATGGAAG
CTTCATCATAGATGGAAAGTCCAGGAAAGAATGCCGTTTTTCAAACCGGGTCTGGAATTTCTTCCAGATAGAG
GAGTTTGGGACGGGAGTGTTCACCACACGCGTGTACATGGACGCAGTCTTTGAATACACCATAGACTGCGATG
GATCTATCTTGGGTGCAGCGGTGAACGGAAAAAGAGTGCCCATGGCTCTCCAACATTTGGATGGGAAGTCA
TGAAGTAAATGGGACATGGATGATCCACACCTTGGAGGCATTAGATTACAAGGAGTGTGAGTGGCCACTGACA
CATACGATTGGAACATCAGTGAAGAGAGTGAAATGTTTCATGCCGAGATCAATCGGAGGCCAGTTAGCTCTC
ACAATCATATCCCTGGATACAAGGTTTCAGACGAACGGACCTTGGATGCAGGTACCACTAGAAGTGAAGAGAGA
AGCTTGCCAGGGACTAGCGTATCATTGATGGCAACTGTGATGGACGGGGAAAAATCAACCAGATCCACCAG
GATAGCGGGAAAGTTATTCCTGAATGGTGTGGCCGCTCTGCACAATGCCGCTGTGAGCTTCCATGGTAGTG
ATGGGTGTTGGTATCCCATGGAAATTAGGCCAAGGAAAACGCATGAAAGCCATCTGGTGCCTCCTGGGTTAC
AGCTGGAGAAATACATGCTGCCCTTTGGTTTTGGTGAGCATGATGATAGCAATGGAAGTGGTCTTAAGGAAA
AGACAGGGACCAAAGCAAATGTTGGTTGGAGGAGTAGTGCTCTTGGGAGCAATGCTGGTGGGCAAGTAACTC
TCCTTGATTTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGGATTGCATTTCCATGAGATGAAACAATGGAGGAGACGCCAT
GTATATGGCGTTGATTGCTGCCTTTTCAATCAGACCAGGGCTGCTCATCGGCTTTGGGCTCAGGACCCATGG
AGCCCTCGGGAACGCCTTGTGCTGACCCTAGGAGCAGCCATGGTGGAGATTGCCTTGGGTGGCGTGATGGCG
GCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTTCTCTCTGCATCCTGACAATAAATGCTGTGTGCTTCTAGGAAAGCATC
AAATACCATCTTGGCCCTCATGGCTCTGTTGACACCTGTCACTATGGCTGAGGTGAGACTTGGCCCAATGTTT
TTTTGTGCCGTGGTTATCATAGGGGTCCTTACCAGAATTTCAAGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACTC
TGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGGCTTGACACAACCTTTTTTGGGCTGTGTGCATTTCTGGCAAC
CCGCATATTTGGGCGAAGGAGTATCCAGTGAATGAGGCACTCGCAGCAGCTGGTCTAGTGGGAGTGCCTGGCA
GGACTGGCTTTTTCAGGAGATGGAGAACTTCCCTGGTCCGATTGCAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGTTA
GCGTGGCTGGGAGGGTGGATGGGCTAGAGCTCAAGAAGCTTGGTGAAGTTTCATGGGAAGAGGAGCCGGAGAT
CAGCGGGAGTTCGGCCCGCTATGATGTGGCACTCAGTGAACAAGGGGAGTTCAAGCTGCTTTCTGAAGAGAAA
GTGCCATGGGACCAGGTTGTGATGACCTCGCTGGCCTTGGTTGGGGCTGCCCTCCATCCATTTGCTCTTCTGC
TGGTCTTGTCTGGGTGGCTGTTTCATGTGAGGGGAGCTAGGAGAAGTGGGGATGTCTTGTGGGATATTTCCAC
TCCTAAGATCATCGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGGATTTATGGCATAATCCAGTCAACCTTCTTGGGG
GCCTCCAGCGAGGAGTGGGAGTGGCACAGGGAGGGGTGTTCCACACAATGTGGCATGTCACAAGAGGAGCTT
TCCTTGTGAGGAATGGCAAGAAGTTGATTCCATCTTGGGCTTCAGTAAAGGAAGACCTTGTGCGCTATGGTGG
CTCATGGAAGTTGGAAGGCAGATGGGATGGAGAGGAAGAGGTCCAGTTGATCGCGGCTGTTCCAGGAAAGAAC
GTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTTGTTCAAAGTGAGGAATGGGGGAGAAATCGGGGCTGTGCTCTTG
ACTATCCGAGTGGCACTTTCAGGATCTCCTATTGTTAACAGGAACGGAGAGGTGATTTGGGCTGTACGGCAATGG
CATCTTGTGCGGTGACAACCTCTTCGTGTCCGCCATATCCAGACTGAGGTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAG
CTCCAAGAGATCCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAACCTGTCTTGAATTTTCATCCTGGAGCTGGGAAGA
CAAGACGTTTCTCCACAGATCTTGGCCGAGTGGCACGGAGACGCTTGGCCTCTTGTGTTGGCCCCAC
CAGGGTGTCTTTCTGAAATGAAGGAGGCTTTTTCACGGCTGGACGTGAAATTCACACACAGGCTTTTTC
GCTCACGGCAGCGGGAGAGAAGTCATTGATGCCATGTGCCATGCCACCCTAACTTACAGGATGTTGGAACCAA
CTAGGGTGTGTTAACTGGGAAGTATCATTATGGATGAAGCCATTTTTTGGATCCAGCTAGCATAGCCGCTAG
AGGTTGGGCAGCGCACAGAGCTAGGGCAAATGAAAGTGAACAATCTTGTGACAGCCACACCGCCTGGGACT

- SEQ ID NO 3 (续)

图13(续)

AGTGATGAATTTCCACATTCAAATGGTGAAATAGAAGATGTTCAAACGGACATACCCAGTGAGCCCTGGAACA
CAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGCATGGTTCCTTCCATCCATCAGAGCTGCAAATGT
CATGGCTGCCTCTTTGCGTAAGGCTGGAAAGAGTGTGGTGGTCTGAACAGGAAAACCTTTGAGAGAGAATAC
CCCACGATAAAGCAGAAGAAACCTGACTTTATATTGGCCACTGACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTTGCG
TGGAGCGAGTGCTGGATTGCAGGACGGCTTTTAAGCCTGTGCTTGTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATAAA
AGGGCCACTTCGTATCTCCGCATCCTCTGCTGCTCAAAGGAGGGGGCGCATTGGGAGAAAATCCCAACAGAGAT
GGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTAAAAATAATGCCACCACGCTGCTGGTTGGAGGCCTCAA
TGCTCTTGGACAACATGGAGGTGAGGGGTGGAATGGTCGCCCCACTCTATGGCGTTGAAGGAACTAAAACACC
AGTTTCCCTGGTGAATGAGACTGAGGGATGACCAGAGGAAAGTCTTCAGAGAACTAGTGAGGAATTGTGAC
CTGCCCGTTTGGCTTTTCGTGGCAAGTGGCCAAGGCTGGTTTGAAGACGAATGATCGTAAGTGGTGTTTTGAAG
GCCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAACAGTGAAGTGCAGGGCTCCTGGAGGAGCAAAGAA
GCCCTGCGCCCAAGGTGGTGTGATGAAAGGGTGTCTCTGACCAGAGTGGCTGTCTGAATTTATTAAGTTT
GCTGAAGGTAGGAGGGGAGCTGCTGAAGTGTAGTTGTGCTGAGTGAACCTCCTGATTTCTGGCTAAAAAG
GTGGAGAGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCCCTCCACTCTGAGGAAGGCTCTAGGGCTTACCGCAATGCACT
ATCAATGATGCCTGAGGCAATGACAATAGTCATGCTGTTTATACTGGCTGGACTACTGACATCGGGAATGGTC
ATCTTTTTCATGTCTCCCAAAGGCATCAGTAGAATGTCTATGGCGATGGGCACAATGGCCGGCTGTGGATATC
TCATGTTCCCTTGGAGGGCTCAAACCCACTCACATCTCCTATGTCTGCTCATATCTTTGTCTGATGGTGGT
TGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCCATCCAAGACAACCAAGTGGCATACTCATTATTGGCATCCTG
ACGCTGGTTTTCAGCGGTGGCAGCCAACGAGCTAGGCATGCTGGAGAAAACCAAAGAGGACCTCTTTGGGAAGA
AGAACTTAATTCATCTAGTGTCTCACCTGGAGTTGGCCGGATCTTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCTGGAC
AGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTCTCCAATGTTGCACCCTGGATCAAAGTCAATATGGCAACCTG
TCTCTGTCTGGAATAGCCAGTCAGCCTCAGTCTTTCTTTTCATGGACAAGGGGATACCATTTCATGAAGATGA
ATATCTCGGTCATAATGCTGCTGGTCAAGTGGCTGGAATCAATAACAGTGAAGTCTGCTCTGTGGCATAGG
GTGCGCCATGCTCCACTGGTCTCTCATTTTACCTGGAATCAAAGCGCAGCAGTCAAAGCTTGCACAGAGAAGG
GTGTTCCATGGCGTTGCCGAGAACCCTGTGGTTGATGGGAATCCAACAGTTGACATGAGGAAGCTCCTGAAA
TGCTTGCCTTTTATGAGAAGAACTGGCTCTATACTCTCTTCTTGTCTCTCAGCCTAGCTTCTGTTGCCATGTG
CAGAACGCCCTTTTTCATGGCTGAAGGCATTGTCTAGCATCAGCTGCCTTAGGGCCGCTCATAGAGGGAAAC
ACCAGCCTTCTTTGGAATGGACCCATGGCTGTCTCCATGACAGGAGTCATGAGGGGGAATCACTATGCTTTTG
TGGGAGTCATGTACAATCTATGGAAGATGAAAACGGACGCCGGGGGAGCGGAATGGAAAACTTTGGGTGA
AGTCTGGAAGAGGGAACTGAATCTGTTGGACAAGCGACAGTTTGAAGTGTATAAAAAGGACCGACATTGTGGAG
GTGGATCGTGATACGGCACGCAGGCATTTGGCCGAAGGGAAAGGTGGACACCGGGGTGGCGGTCTCCAGGGGA
CCGCAAAGTTAAGGTGGTTCATGAGCGTGGCTATGTCGAAGCTGGAAGGTAGGGTGATTGACCTGGGGTGTGG
CCGCGGAGGCTGGTGTACTACGCTGCTGCGCAAAAGGAAGTGAGTGGGGTCAAAGGATTTACTCTTGGAGA
GACGGCCATGAGAAACCCATGAATGTGCAAAGTCTGGGATGGAACATCATCACCTTCAAGGACAAAACCTGATA
TCCACCGCCTAGAACCAGTGAAATGTGACACCCTTTTGTGTGACATTGGAGAGTCATCATCGTCATCGGTCAC
AGAGGGGGAAAGGACCGTGAGAGTTCTTGATACTGTAGAAAAATGGCTGGCTTGTGGGGTTGACAACCTCTGT
GTGAAGGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTTGAGAACTGGAATTGCTCCAAAGGAGGTTTGGCGGAA
CAGTGATCAGGAACCTCTCTCCAGGAATCCACTCATGAAATGTACTACGTGCTGGAGCCCGCAGCAATGT
CACATTTACTGTGAACCAAACATCCCGCCTCCTGATGAGGAGAATGAGGCGTCCAACCTGGAAAAGTGACCTG
GAGGCTGACGTCATCCTCCCAATTTGGACACGCAGTGTGAGACAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCA
TAGAAGAAAGGGTTGAGAGGATAAAATCTGAGTACATGACCTCTTGGTTTATGACAATGACAACCCCTACAG
GACCTGGCACTACTGTGGCTCCTATGTACAAAAACCTCAGGAAGTGCAGGAGCATGGTAAATGGTGTATT
AAAATTTGACATATCCATGGGACAGGATAGAGGAGTCAAGAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTTTG
GACAGCAAAGAGTGTAAAGAAAAAGTTGACACCAGAGCAAAGGATCCACCAGCGGGAAGTGGAAAGATCAT
GAAAGTTGTCAACAGGTGGCTGTTCCGCCACCTGGCCAGAGAAAAGAACCCAGACTGTGCACAAAGGAAGAA
TTTATTGCAAAGTCCGAAGTCATGCAGCCATTGGAGCTTACCTGGAAGAACAAGAACAGTGGAAAGACTGCCA

- SEQ ID NO 3 (续)

图13(续)

ATGAGGCTGTCCAAGACCCAAAAGTTCTGGGAACTGGTGGATGAAGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTG
 TCGGACTTGTGTGTACACATGATGGGGAAAAGAGAGAAGAAGCTGTCAGAGTTTGGGAAAAGCAAAGGGAAAGC
 CGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGCGCGGTATCTTGTAGTTTGTAGGCCCTGGGATTCTGAATGAGGACC
 ATTGGGCTTCCAGGGAAAAGCTCAGGAGGAGGAGTGAAGGCATTGGCTTACAATACCTAGGATATGTGATCAG
 AGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACGCGGATGACACCGCTGGATGGGACACGCGCATCACAGAG
 GCAGACCTTGTATGATGAACAGGAGATCTTGAACACATGAGCCACATCACAAAAAAGCTGGCACAAGCAGTGA
 TGGAAATGACATACAAGAACAAGTGGTGAAGTGTGAGACCAGCCCCAGGAGGGAAAGCCTACATGGATGT
 CATAAGTCGACGAGACCAGAGAGGATCCGGGCAGGTAGTGACTTATGCTCTGAACACCATACCAACTTGAAA
 GTCCAATTGATCAGAATGGCAGAAGCAGAGATGGTGATACATCACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAATCAG
 TTCTGACCAGGCTGGAGGCATGGCTCACTGAGCACGGATGTGACAGACTGAAGAGGATGGCGGTGAGTGGAGA
 CGACTGTGTGGTCCGGCCATCGATGACAGGTTCCGCCTGGCCCTGTCCCATCTCAACGCCATGTCCAAGGTT
 AGAAAGGACATATCTGAATGGCAGCCATCAAAGGGTGAATGATTGGGAGAATGTGCCCTTCTGTTCCACC
 ACTTCCATGAACTACAGTGAAGGATGGCAGGAGGATTGTGGTGCCTTGCCGAGAACAGGACGAGCTATTGG
 GAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAGGAAACAGCTTGCCCTCAGCAAAGCCTATGCCAAC
 ATGTGGTCACTGATGTATTTTACAAAAGGGACATGAGGCTACTGTCATTGGCTGTTTCTCAGCTGTTCCCA
 CCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACAACATGGTCGATTCATGGGAAAGGGGAGTGGATGACCACGGAAGACAT
 GCTTGAGGTGTGGAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCACACATGCAGGACAAGACAATGGTGAATAATGG
 AGAGATGTCCCTTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGTGCGGATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCCA
 CCTGGGCTCCACATCCATTTAGTCATCCATCGTATCCGAACGCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTA
 CCTAACAGTCATGGACAGTATTCTGTGGATGTGACCTGCAACTGGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAA
 CAGGAATAACCGGGATACAAACCACGGGTGGAGAACCGGACTCCCCACAACCTGAAACCGGGATATAACCAC
 GGCTGGAGAACCGGGCTCCGCACTTAAAATGAAACAGAAACCGGGATAAAAACTACGGATGGAGAACCGGACT
 CCACACATTGAGACAGAAGAAGTTGTGACCCAGAACCCACACAGATTTTGCCACTGCTAAGCTGTGAGGCA
 GTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAAAAACCTGGTTTCTGGGACCTCCCACCCAGAGTAAAAA
 GAACGGAGCCTCCGCTACCACCTCCACGTTGGTGTAGAAAGACGGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCTCC
 AGGGAACAAATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGAAAGACCGGAGTGGTTCTCTGCTTTTCTCCAGAGGTC
 TGTGAGCACAGTTTGTCAAGAATAAGCAGACCTTTGGATGACAAACACAAAACCACT

SEQ ID NO. 4 : pShuttle/YF17D (构建体 #1)

AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGTCTGCAAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTTGGATT
 AATTTTAATCGTTCGTTGAGCGATTAGCAGAGAAGTACCAGAACATGTCTGGTCGTAAGCTCAGGGAAAAA
 CCCTGGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTTCGCTCCTTGTCAAACAAAATAAAAACAAAAACAAAACAAAT
 TGGAAACAGACCTGGACCTTCAAGAGGTGTTCAAGGATTTATCTTTTTCTTTTTGTTCAACATTTTACTGGA
 AAAAAGATCACAGCCACCTAAAGAGGTGTGGAAAATGCTGGACCAAGACAAGGCTTGGCTGTTCTAAGGA
 AAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTTGTGATGAGAGGATTGTCCTCAAGGAAACGCCGTCCCATGATGTTCTGAC
 TGTGCAATTCCTAATTTTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTGACCTTGGTGGGAAAAACAGATGGTTG
 CTCCTAAATGTGACATCTGAGGACCTCGGGAAAACATTCTCTGTGGGCACAGGCAACTGCACAACAAACATTT
 TGGAAAGCAAGTACTGGTGGCCAGACTCAATGGAATACAACCTGTCCCAATCTCAGTCCAAGAGAGGAGCCAGA
 TGACATTGATTGCTGGTGTATGGGGTGGAAAACGTTAGAGTCGCATATGGTAAGTGTGACTCAGCAGGCAGG
 TCTAGGAGGTCAAGAAGGGCCATTGACTTGCCCTACGCATGAAAACCATGGTTTGAAGACCCGGCAAGAAAAAT
 GGATGACTGGAAGAATGGGTGAAAGGCAACTCCAAAAGATTGAGAGATGGTTCTGTGAGGAACCCCTTTTTTGC
 AGTGACGGCTCTGACCATTGCCACCTTGTGGGAAGCAACATGACGCAACGAGTCGTGATTGCCCTACTGGTC
 TTGGCTGTTGGTCCGGCCTACTCAGCTCACTGCATTGGAATTAAGTACAGGGATTTCAATTGAGGGGGTGCATG
 GAGGAACTTGGGTTTTCAGCTACCCCTGGAGCAAGACAAGTGTGTCAGTGTATGGCCCTGACAAGCCTTCATT
 GGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCATTGATAGACCTGCTGAGGTGAGGAAAGTGTGTTACAATGCAGTTCTC

图13(续)

ACTCATGTGAAGATTAATGACAAGTGCCCCAGCACTGGAGAGGCCACCTAGCTGAAGAGAACGAAGGGGACA
 ATGCGTGCAAGCGCACTTATTCTGATAGAGGCTGGGGCAATGGCTGTGGCCTATTTGGGAAAGGGAGCATTGT
 GGCATGCGCCAAATTCACCTTGTGCCAAATCCATGAGTTTGTGTTGAGGTTGATCAGACCAAAATTCAGTATGTC
 ATCAGAGCACAATTGCATGTAGGGGCCAAGCAGGAAAATTTGGAATACCGACATTAAGACTCTCAAGTTTGTATG
 CCTGTGTCAGGCTCCCAGGAAGTCGAGTTCATTGGGTATGGAAAAGCTACACTGGAATGCCAGGTGCAAACGTC
 GGTGGACTTTGGTAACAGTTACATCGCTGAGATGGAAACAGAGAGCTGGATAGTGACAGACAGTGGGCCAG
 GACTTGACCCTGCCATGGCAGAGTGGAAAGTGGCGGGTGTGGAGAGAGATGCATCATCTTGTGCAATTTGAAC
 CTCGCGATGCCGCCACTATCAGAGTACTGGCCCTGGGAAACCAGGAAGGCTCCTTGAAAACAGCTCTTACTGG
 CGCAATGAGGGTTACAAAGGACACAAATGACAACAACCTTTACAAACTACATGGTGACATGTTTCTTGCAGA
 GTGAAATTTGCAGCTTTGACACTCAAGGGGACATCCTACAAAATATGCACACTGACAAAATGTTTTTGTCAAGA
 ACCCAACTGACACTGGCCATGGCACTGTTGTGATGCAGGTGAAAGTGTCAAAAGGAGCCCCCTGCAGGATTC
 AGTGATAGTAGCTGATGATCTTACAGCGGCAATCAATAAAGGCATTTTGGTTACAGTTAACCCCATCGCCTCA
 ACCAATGATGATGAAGTGTGATTGAGGTGAACCCACCTTTTGGAGACAGCTACATTATCGTTGGGAGAGGAG
 ATTCACGTCTCACTTACCAGTGGCACAAGAGGGAAGCTCAATAGGAAAGTTGTCACTCAGACCATGAAAGG
 CGTGGAAACGCTGGCCGTATGGGAGACACCGCTGGGATTTAGCTCCGCTGGAGGGTTCTTCACTTCGGTT
 GGGAAAGGAATTCATACGGTGTGTTGGCTCTGCCTTTACGGGCTATTTGGCGGCTTGAAGTGGATAACAAAG
 TCATCATGGGGGCGGTACTTATATGGGTTGGCATCAACACAAGAAACATGCAATGTCCATGAGCATGATCTT
 GGTAGGAGTGATCATGATGTTTTGTCTCTAGGAGTTGGGGCGGATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGGCAAG
 AGAGAGCTCAAGTGGGAGATGGTATCTTCATATTTAGAGACTCTGATGACTGGCTGGAACAAGTACTCATACT
 ATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTTGCATCAATAGTGAAGCCTCTTTTGAAGAAGGGAAGTGTGGCCTAAATTC
 AGTTGACTCCCTTGAGCATGAGATGTGGAGAAGCAGGGCAGATGAGATCAATGCCATTTTGGAGAAAACGAG
 GTGGACATTTCTGTTGTCGTGACAGGATCCAAAGAAATGTTTACCAGAGAGGAACTCATCCATTTTCCAGAATTC
 GGGATGGTCTGCAGTATGGTTGGAAGACTTGGGGTAAAGAACCTTGTGTTCTCCCAGGGAGGAAGAATGGAAAG
 CTTTCATCATAGATGGAAGTCCAGGAAAGAATGCCGTTTTCAAACCGGGTCTGGAATTTTCCAGATAGAG
 GAGTTTGGGACGGGAGTGTCCACACACGCGTGTACATGGACGCAGTCTTGAATACCCATAGACTGCGATG
 GATCTATCTTGGGTGCAGCGGTGAACGGAAAAAAGAGTGCCCATGGCTCTCCAACATTTTGGATGGGAAGTCA
 TGAAGTAAATGGGACATGGATGATCCACACCTTGGAGGCATTAGATTACAAGGAGTGTGAGTGGCCACTGACA
 CATAAGATTGGAACATCAGTTGAAGAGAGTGAATGTTTCATGCCGAGATCAATCGGAGGCCAGTTAGCTCTC
 ACAATCATATCCCTGGATACAAGGTTTACAGACGAACGGACCTTGGATGCAGGTACCACTAGAAGTGAAGAGAGA
 AGCTTGGCCAGGGACTAGCGTGATCATTGATGGCAACTGTGATGGACGGGGAAAATCAACCAGATCCACCAG
 GATAGCGGGAAAGTTATTCCTGAATGGTGTGCGGCTCCTGCACAATGCCGCTGTGAGCTTCCATGGTAGTG
 ATGGGTGTTGGTATCCCATGGAAATTAGGCCAAGGAAAACGCATGAAAGCCAATCGGTGCGCTCCTGGGTTAC
 AGCTGGAGAAATACATGCTGTCCCTTTTGGTTTGGTGAGCATGATGATAGCAATGGAAGTGGTCTTAAGGAAA
 AGACAGGGACCAAAGCAAATGTTGGTTGGAGGAGTAGTGCTCTTGGGAGCAATGCTGGTGGGCAAGTAACTC
 TCCTTGATTTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGGATTGCATTTCCATGAGATGAACAATGGAGGAGACGCCAT
 GTATATGGCGTTGATTGCTGCCTTTTCAATCAGACCAGGGCTGCTCATCGGCTTTGGGCTCAGGACCCTATGG
 AGCCCTCGGGAACGCCTTGTGCTGACCCTAGGAGCAGCCATGGTGGAGATTGCCCTGGGTGGCGTGATGGGCG
 GCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTTCTCTCTGCATCCTGACAATAAATGCTGTTGCTTCTAGGAAAGCATC
 AAATACCATCTTGGCCCTCATGGCTCTGTTGACACCTGTCACTATGGCTGAGGTGAGACTTGCCGCAATGTTT
 TTTTGTGCCGTGGTTATCATAGGGTCCCTTACCAGAATTTCAAGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACTC
 TGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGGCTTGACACAACCTTTTTTGGGCTGTGTGCATTTCTGGCAAC
 CCGCATATTTGGGCGAAGGAGTATCCCAGTGAATGAGGCACTCGCAGCAGCTGGTCTAGTGGGAGTGTGGCA
 GGACTGGCTTTTTCAGGAGATGGAGAACTTCTTGGTCCGATTGCAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGTTA
 GCGTGGCTGGGAGGGTGGATGGGCTAGAGCTCAAGAAGCTTGGTGAAGTTTCATGGGAAGAGGAGGCCGAGAT
 CAGCGGGAGTTCGCCCGCTATGATGTGGCACTCAGTGAACAAGGGGAGTTCAAGCTGCTTTCTGAAGAGAAA

- SEQ ID NO 4 (续)

图13(续)

GTGCCATGGGACCAGGTTGTGATGACCTCGCTGGCCTTGGTTGGGGCTGCCCTCCATCCATTTGCTCTTCTGC
TGGTCCCTTGCTGGGTGGCTGTTTCATGTGAGGGGAGCTAGGAGAAGTGGGGATGTCTTGTGGGATATCCAC
TCCTAAGATCATCGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGGATTTATGGCATATTCCAGTCAACCTTCTTGGGG
GCCTCCCAGCGAGGAGTGGGAGTGGCACAGGGAGGGTGTTCACACAATGTGGCATGTGACAAGAGGAGCTT
TCCTTGTGAGGAATGGCAAGAAGTTGATTCCATCTTGGGCTTCAGTAAAGGAAGACCTTGTGCGCTATGGTGG
CTCATGGAAGTTGGAAGGCAGATGGGATGGAGAGGAAGAGGTCCAGTTGATCGCGGCTGTTCCAGGAAAGAAC
GTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTTGTTCAAAGTGAGGAATGGGGGAGAAATCGGGGCTGTGCTCTTG
ACTATCCGAGTGGCAGTTCAGGATCTCCTATTGTTAACAGGAACGGAGAGGTGATTGGGCTGTACGGCAATGG
CATCCTTGTGCGGTGACAACCTCCTTCGTGTCCGCCATATCCCAGACTGAGGTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAG
CTCCAAGAGATCCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAACGTCTTGTATTTCATCCTGGAGCTGGGAAGA
CAAGACGTTTCCTCCCACAGATCTTGGCCGAGTGGCACGGAGACGCTTGGCCTACTTGTGTTGGCCCCAC
CAGGTTGTTCCTTCTGAAAAGAAGGAGGCTTTTTCACGGCCTGGACGTGAAATTCACACACAGGCTTTTTC
GCTCACGGCAGCGGGAGAGAAGTCATTGATGCCATGTGCCATGCCACCCTAACTTACAGGATGTTGGAACCAA
CTAGGTTGTTAACTGGGAAGTGATCATTATGGATGAAGCCATTTTTTGGATCCAGCTAGCATAGCCGCTAG
AGGTTGGGCAGCGCACAGAGCTAGGGCAAATGAAAGTCAACAATCTTGATGACAGCCACACCGCCTGGGACT
AGTGATGAATTTCCACATTCAAATGGTGAAATAGAAGATGTTCAAACGGACATACCCAGTGAAGCCCTGGAACA
CAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGCATGGTTTCTTCCATCCATCAGAGCTGCAAATGT
CATGGCTGCCTCTTTGCGTAAGGCTGGAAAGAGTGTGGTGGTCTGAACAGGAAAACCTTTGAGAGAGAATAC
CCCACGATAAAGCAGAAGAAACCTGACTTTATATTGGCCACTGACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTTGCG
TGGAGCGAGTGGATTGCAGGACGGCTTTTAAAGCCTGTGCTTGTGGATGAAGGAGGAAGGTGGCAATAAA
AGGGCCACTTCGTATCTCCGCATCCTCTGCTGCTCAAAGGAGGGGGCGCATTGGGAGAAAATCCCAACAGAGAT
GGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTAAAATAATGCCACCACGCTCTGCTGGTTGGAGGCTCAA
TGCTCTTGGACAACATGGAGGTGAGGGGTGGAATGGTGGCCCACTCTATGGCGTTGAAGGAATAAAACACC
AGTTTCCCCTGGTGAATGAGACTGAGGGATGACCAGAGGAAAGTCTTCAGAGAACTAGTGAGGAATTTGAC
CTGCCCGTTTGGCTTTTCGTGGCAAGTGGCCAAGGCTGGTTTGAAGACGAATGATCGTAAGTGGTGTTTTGAAG
GCCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAACAGTGAAGTGCAGGGCTCCTGGAGGAGCAAAGAA
GCCTCTGCGCCCAAGTGGTGTGATGAAAGGTTGATCTGACCAGAGTGGCTGTCTGAATTTATTAAGTTT
GCTGAAGGTAGGAGGGGAGCTGCTGAAGTGTAGTTGTGCTGAGTGAACCTCCTGATTTCTTGGCTAAAAAAG
GTGGAGAGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCCCTCACTCTGAGGAAGGCTCTAGGGCTTACCAGCAATGCACT
ATCAATGATGCCTGAGGCAATGACAATAGTCATGCTGTTTATACTGGCTGGACTACTGACATCGGGAATGGTC
ATCTTTTTTCATGTCTCCCAAAGGCATCAGTAGAATGTCTATGGCGATGGGCACAATGGCCGGCTGTGGATATC
TCATGTTCCCTTGGAGGCGTCAAACCCACTCACATCTCCTATGTGATGCTCATAATCTTTGTCTGATGGTGGT
TGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCCATCCAAGACAACCAAGTGGCATACTCATTATTGGCATCCTG
ACGCTGGTTTCAGCGGTGGCAGCCAACGAGCTAGGCATGCTGGAGAAAACCAAAGAGGACCTCTTTGGGAAGA
AGAACTTAATTCATCTAGTGCTTCACCCCTGGAGTTGGCCGGATCTTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCTGGAC
AGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTCTCCAATGTTGCACCACTGGATCAAAGTGAATATGGCAACCTG
TCTCTGTCTGGAATAGCCAGTCAGCCTCAGTCTTTCTTTTCATGGACAAGGGGATACCATTTCATGAAGATGA
ATATCTCGGTGATAATGTGCTGGTCAAGTGGCTGGAAATCAATAACAGTGTGCTCTGCTCTGTGGCATAGG
GTGCGCCATGCTCCACTGGTCTCTCATTTTACCTGGAATCAAAGCGCAGCAGTCAAAGCTTGCACAGAGAAGG
GTGTTCCATGGCGTTGCCGAGAACCCTGTGGTTGATGGGAATCCAACAGTTGACATGAGGAAGCTCCTGAAA
TGCCCTGCCCTTTATGAGAAGAACTGGCTCTATATCTCCTTCTTGTCTCAGCCTAGCTTCTGTTGCCATGTG
CAGAACGCCCTTTTCATTGGCTGAAGGCATTGTCTAGCATCAGCTGCCTTAGGGCCGCTCATAGAGGGAAAC
ACCAGCCTTCTTTGGAATGGACCCATGGCTGTCTCCATGACAGGAGTCATGAGGGGGAATCACTATGCTTTTG
TGGGAGTCATGTACAATCTATGGAAGATGAAAACCTGGACGCCGGGGAGCGGAATGGAAAACTTTGGGTGA
AGTCTGGAAGAGGGAACTGAATCTGTTGGACAAGCGACAGTTTGTGATTGTATAAAAAGGACCGACATTGTGGAG
GTGGATCGTGATACGGCACGCAGGCATTTGGCCGAAGGGAAGGTGGACACCGGGGTGGCGGTCTCCAGGGGGA

- SEQ ID NO 4 (续)

图13(续)

CCGCAAAGTTAAGGTGGTTCCATGAGCGTGGCTATGTCAAAGCTGGAAGGTAGGGTGATTGACCTGGGGTGTGG
 CCGCGGAGGCTGGTGTACTACGCTGCTGCGCAAAGGAAGTGAGTGGGGTCAAAGGATTTACTCTTGGAAGA
 GACGGCCATGAGAAACCCATGAATGTGCAAAGTCTGGGATGGAACATCATCACCTTCAAGGACAAAACCTGATA
 TCCACCGCCTAGAACCAGTGAAATGTGACACCCTTTTGTGTGACATTGGAGAGTCATCATCGTCATCGGTCAC
 AGAGGGGGAAAGGACCGTGAGAGTTCTTGATACTGTAGAAAAATGGCTGGCTTGTGGGGTTGACAACCTTCTGT
 GTGAAGGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTTGAGAAAAGTGAATTGCTCCAAAAGGAGGTTTGGCGGAA
 CAGTGATCAGGAACCCCTCTCTCCAGGAATTCACCTCATGAAATGTACTACGTGTCTGGAGCCCGCAGCAATGT
 CACATTTACTGTGAACCAAACATCCCCTCTCTGATGAGGAGAATGAGGCGTCCAAGTGGAAAAGTGACCCCTG
 GAGGCTGACGTATCCTCCCAATTGGGACACGCAGTGTGAGACAGACAAGGGACCCCTGGACAAAAGAGGCCA
 TAGAAGAAAAGGTTGAGAGGATAAAAATCTGAGTACATGACCTCTTGGTTTTATGACAATGACAACCCCTACAG
 GACCTGGCACTACTGTGGCTCCTATGTCAAAAAACCTCAGGAAGTGCAGGAGCATGGTAAATGGTGTATT
 AAAATTCTGACATATCCATGGGACAGGATAGAGGAGTCAACAAGAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTTT
 GACAGCAAAGAGTGTAAAGAAAAAGTTGACACCAGAGCAAAGGATCCACCAGCGGGAAGTGGAAAGTCAAT
 GAAAGTTGTCAACAGGTGGCTGTTCCGCCACCTGGCCAGAGAAAAGAACCCAGACTGTGCACAAAAGGAAGAA
 TTTATTGCAAAAAGTCCGAAGTCATGCAGCCATTGGAGCTTACCTGGAAGAACAAGAACAGTGGAAAGTGGCA
 ATGAGGCTGTCCAAGACCCAAAGTTCTGGGAACTGGTGGATGAAGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTG
 TCGGACTTGTGTGTACAACATGATGGGGAAAAGAGAGAAGAAGCTGTGAGAGTTGGGAAAGCAAAGGGAAAGC
 CGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGCGCGGTATCTTGAGTTTGGAGCCCTGGGATTCTGAATGAGGACC
 ATGGGCTTCCAGGGAAAACCTCAGGAGGAGGAGTGGAAAGCATTGGCTTACAATACCTAGGATATGTGATCAG
 AGACCTGGCTGCAATGGTGGTGGATTCTACGCGGATGACACCGCTGGATGGGACACGCGCATCACAGAG
 GCAGACCTTGATGATGAACAGGAGATCTTGAACATGAGCCACATCACAACAAAACCTGGCACAAGCAGTGA
 TGGAAATGACATAACAAGAACAAGTGGTGAAGTGTGAGACCAGCCCCAGGAGGGAAAAGCCTACATGGATGT
 CATAAGTCGACGAGACCAGAGAGGATCCGGGCAGGTAGTGACTTATGCTCTGAACACCATCACCAACTTGA
 GTCCAATTGATCAGAATGGCAGAAGCAGAGATGGTGATACATCACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAATCAG
 TTCTGACCAGGCTGGAGGCATGGCTCACTGAGCACGGATGTGACAGACTGAAGAGGATGGCGGTGAGTGGAGA
 CGACTGTGTGGTCCGGCCATCGATGACAGGTTCCGGCTGGCCCTGTCCCATCTCAACGCCATGTCCAAGGTT
 AGAAAAGACATATCTGAATGGCAGCCATCAAAAAGGTTGGAATGATTGGGAGAATGTGCCCTTCTGTTCCACC
 ACTTCCATGAACTACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATGTGGTGCCTTGGCGAGAACAGGACGAGCTCATTGG
 GAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAGGAAACAGCTTGCCCTCAGCAAAGCCTATGCCAAC
 ATGTGGTCACTGATGTATTTTCAAAAAGGGACATGAGGCTACTGTGATTGGCTGTTTCTCAGCTGTTCCCA
 CCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACAACATGGTCGATTCATGGGAAAGGGGAGTGGATGACCACGGAAGACAT
 GCTTGAGGTGTGGAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCACACATGCAGGACAAGACAATGGTGAATAAATGG
 AGAGATGTCCCTTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGTGCGGATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCCA
 CCTGGGCCTCCCACATCCATTTAGTCATCCATCGTATCCGAACGCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTA
 CCTAACAGTCATGGACAGGTATTCTGTGGATGCTGACCTGCAACTGGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAA
 CAGGAATAACCGGGATACAAACCACGGGTGGAGAACCGGACTCCCCACAACCTGAAACCGGGATATAAACCAC
 GGCTGGAGAACCGGGCTCCGCACTTAAAATGAAACAGAAAACCGGGATAAAAACCTACGGATGGAGAACCGGACT
 CCACACATTGAGACAGAAGAAGTGTGACGCCAGAACCCACACGAGTTTGGCACTGCTAAGCTGTGAGGCA
 GTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAAAAACCTGGTTTTCTGGGACCTCCCACCCAGAGTAAAAA
 GAACGGAGCCTCCGCTACCACCCTCCCACGTGGTGGTAGAAAGACGGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCTCC
 AGGGAACAAATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGGAAAGACCGGAGTGGTCTCTGCTTTTCTCCAGAGGTC
 TGTGAGCACAGTTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTTGGATGACAAACACAAAACCACTGGCCGGCATGGTCCC
 AGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATCCGAGGGGACCGTCCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACGAAT
 TCTGAACCAGTCTAAAACGAGTAAATAGGACCGGCAATTTTCAAGCAATAAACAGGAATACCAATTTATTA
 AAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAAGCTTTGAAGAAAAATGCGCCTTATTCAATCTTTGCTATAAAAAA
 TGGCCAAAATCTCACATTGGAAGACATTTGATGACCTCATTTCTTTCAATGAAGGGCCTAACGGAGTTGACT

- SEQ ID NO 4 (续)

图13(续)

AATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCTTCTGCCGTGGCCAGGACAACGTATACTCATCAGATAACAG
 CAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTTTCTCGGTACTATGCATATGATCCAATATCAAAGGAAATGATAGC
 ATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGCTGAAGGAAGC
 ATACGATAACCCGCATGGAAATGGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTTCATCCTACATAAATAGAC
 GCATATAAGTACGCATTTAAGCATAAACACGCCTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATATACAGGCAACA
 CGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAAGCGCTCGTT
 TTCGGAACGCTTTGAAGTCTTATTCCGAAGTCTTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCAGAGCGCTTTT
 GAAAACCAAAGCGCTCTGAAGACGCCTTTCAAAAAACCAAAACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAA
 TATTGCGAATACCGCTTCCACAAAATTGCTCAAAAGTATCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCCCTA
 TATAACCTIACCCATCCACCTTCGCTCCTTGAAC TTGCATCTAAACTCGACCTCTACATTTTTTATGTTTATC
 TCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAATTGTAGTAAGAACTATTTCATAGAGTGAATCGAAAAAATACGAAAA
 TGTAAACATTTCCATACGTAGTATATAGAGACAAAAATAGAAGAAACCGTTCATAATTTTCTGACCAATGAAG
 AATCATCAACGCTATCATTCTGTTCACAAAGTATGCCAATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATG
 CCTTTATCTTGAAAAATGCACCCGCAGCTTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGGAAGTGGAGTCAAGCTTTTT
 TTATGGAAGAGAAAAATAGACACCAAGTAGCCTTCTCTAACCTTAACGGACCTACAGTGCAAAAAGTTATCA
 AGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAGTAATCTAAGATGCTTTGTAGAAAAATAGCGCTCT
 CGGGATGCATTTTTGTAGAACAAAAAAGAAGTATAGATTCTTTGTTGGTAAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATT
 TCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTAAAAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTTGTTTTAC
 AAAAAATGAAGCACAGATTCTCGTTGGTAAAAATAGCGCTTTTCGCGTTGCATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGC
 TCAGATTCTTTGTTTAAAAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTGTTCACAAAAATGAAGCACAGATGCTTC
 GTTAACAAAGATATGCTATTGAAGTGCAAGATGGAAACGCAGAAAAATGAACCGGGGATGCGACGTGCAAGATT
 ACCTATGCAATAGATGCAATAGTTTCTCCAGGAACCGAAATACATACATTGCTCTCCGTAAGCGCTAGACTA
 TATATTATTATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTTCAGGGAAAACTCCAGGTTCCGATGTTCAAATTCAA
 TGATGGGTAACAAGTACGATCGTAAATCTGTAAAAACGTTTGTCCGATATTAGGCTGTATCTCCTCAAAGCGT
 ATTCGAATATCATTGAGAAGCTGCAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAAATACTACTCAGTAATAACCT
 ATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTAGAGTCTTTTACACCATTGTCTCCACACCTCCGCT
 TACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATACCAACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAAC
 ATAAAAATGTAAGCTTTCCGGGCTCTCTTGCCTTCCAACCCAGTCAGAAATCGAGTCCAATCCAAAAGTTTAC
 CTGTCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGAATGAGGTTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTAT
 GTTGCACTTTTTGGAATACGAGTCTTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACCTTGGTATTCTTGCCACGAC
 TCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGACCAGAGCCAAAACATCCTCCTTAGGTTGAT
 TACGAAACACGCCAACCAAGTATTTCCGGAGTGCCTGAATATTTTTATATGCTTTTACAAGACTTGAATTTT
 CCTTGCAATAACCGGGTCAATGTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACCCAGCAAGTCAGCATCGGAA
 TCTAGAGCACATTTCTGCGCCTCTGTGCTCTGCAAGCCGAAACTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGA
 AATTAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTTAATCACGTATACTCACGTGCTCAATAGTCACCA
 ATGCCCTCCCTCTTGGCCCTCCTCCTTTTCTTTTTTCGACCGCTAGCGTCGACAGCGACACACTTGCATCGGA
 TGCAGCCCGGTTAACGTGCCGGCACGGCCTGGGTAACCAGGTATTTTGTCCACATAACCGTGCGCAAAATGTT
 GTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATACAACCGCACACCGAGGTTACTCCGTTCTACAGG
 TTACGACGACATGTCAATACTTGCCTTGACAGGCATTGATGGAATCGTAGTCTCACGCTGATAGTCTGATCG
 ACAATACAAGTGGGACCGTGGTCCAGACCGATAATCAGACCGACAACACGAGTGGGATCGTGGTCCCAGACT
 AATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACC
 GTGGTTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGA
 TACGAGTGGGACCATGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATT
 ATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGG
 TCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACA
 AGTGGAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTAGGCCAGTTATGCTTTCTGGCTGTAAACAAAGGACATTAAGTA

- SEQ ID NO 4 (续)

图13(续)

AAGACAGATAAACGTAGACTAAAACGTGGTCGCATCAGGGTGCTGGCTTTTCAAGTTCCCTTAAGAATGGCCTC
AATTTTCTCTATACACTCAGTTGGAACACGGGACCTGTCCAGGTTAAGCACCATTTTATCGCCCTTATACAAT
ACTGTCGCTCCAGGAGCAAACCTGATGTCGTGAGCTTAAACTAGTTCTTGATGCAGATGACGTTTTAAGCACAG
AAGTTAAAAGAGTGATAACTTCTTCAGCTTCAAATATCACCCCAGCTTTTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGC
CTGCTGCTTAAAGTAATTCCTCTTTATCTGTAAAGGCTTTTTGAAGTGCATCACCTGACCGGGCAGATAGTTCA
CCGGGGTGAGAAAAAGAGCAACAACCTGATTTAGGCAATTTGGCGGTGTTGATACAGCGGGTAATAATCTTAC
GTGAAATATTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAATATTTCCAGCAAATTCATTCTGCAATCGGCTTGATAACG
CTGACCACGTTTATAAGCACTTGTGGGGGATAATCGTTACCCAATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCA
TCCAGCTCGCCAACCAGAACACGATAATCACTTTTCGGTAAGTGCAGCAGCTTTACGACGGCGACTCCCATCGG
CAATTTCTATGACACCAGATACTCTTCGACCGAACCGCGGTGTCTGTTGACCAGTCAGTAGAAAAGAAGGGAT
GAGATCATCCAGTGCCTCCTCAGTAAGCAGCTCCTGGTCACGTTTATTACCTGACCATAACCCGAGAGGTTCTC
TCAACACTATCACCCCGGAGCACTTCAAGAGTAAACTTCACATCCCGACCACATACAGGCAAAGTAATGGCAT
TACCGCGAGCCATTACTCCTACGCGCGCAATTAACGAATCCACCATCGGGGCAGCTGGTGTGATAACGAAGT
ATCTTCAACCGGTTGAGTATGAGCGTATGTTTTGGAATAACAGGGCGCAGCTTCATTATCTAATCTCCCAGC
GTGGTTTAAATCAGACGATCGAAAATTTTATTGACAGCAGGTTCCCAAATAGAAAAGAGCATTCTCCAGGCACC
AGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTCAAAAACAGTTCTCATCCGGATCTGACCTTTACCAACTTCATCC
GTTTACAGTACAACATTTTTTGAACCATGCTTCCCAGGCATCCCGAATTTGCTCCTCCATCCAGGGGACT
GAGAGCCATTACTATTGCTGATTTGGTAAGCAAAAACGTACATCAGGCTCGAACCCCTTAAAGATCAACGTT
CTTGAGCAGATCACGAAGCATATCGAAAACTGCAGTGGGAGGTGTAGTCAAACAACCTCAGCAGGCGTGGGA
ACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGACATTAATCGTGGCGATACCCAGGTTAGGCGCGCTGTCAATAACTA
TGACATCATAGTCATGAGCAACAGTTTCAATGGCCAGTCCGAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGGCAGTTTACC
TTCATCAAATTTGCCCATTAACCTCAGTTTCAATACGGTGCAGAGCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCC
GGCCAGCAAAGTGGGCTTTATGATAAGTGACATCGTCTTTTCCCAAGATAGAAAAGGCAGGAGAGTGTCTT
CTGCATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCCGTGATACATTGAGGCTGTTCCCTGGGGGCTGTTACCTTCCAC
GAGCAAAACACGTAGCCCTTCAGAGCCAGATCCTGAGCAAGATGAACAGAACTGAGGTTTTGTAAACGCCA
CCTTTATGGGCAGCAACCCCGATCACCAGGTGGAATACGTCTTCAGCACGTGCAATCGCGTACCAACACAT
CACGCATATGATTAATTTGTTCAATTGTATAACCAACACGTTGCTCAACCCGTCTCGAATTTCCATATCCGG
GTGCGGTAGTCGCCCTGCTTTCTCGGCATCTCTGATAGCCTGAGAAGAAACCCCACTAAATCCGCTGCTTCA
CCTATTCTCCAGCGCCGGGTTATTTCTCGCTTCCGGGCTGTCTCATTTAAACTGTGCAATGGCGATAGCCT
TCGTCAATTCATGACCAGCGTTTATGCACTGGTTAAGTGTTCATGAGTTTCATCTGAACATCCTTTAATC
ATTGCTTTGCGTTTTTTTTATTAATCTTGCAATTTACTGCAAAGCAACAACAAAATCGCAAAGTCATCAAAAA
ACCGCAAAGTTGTTTTAAATAAGAGCAACACTACAAAAGGAGATAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACTTAT
ATCACTAGCGCTCGCCGAGCCGTGTAACCGAGCATAGCGAGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGAAGAACTGTT
CTGTCAGATAGCTCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATCCACCGTGGGAAAACTCCAGGTAGAGGTACACA
CGCGGATAGCCAATTCAGAGTAATAAACTGTGATAATCAACCCTCATCAATGATGACGAACTAACCCCGATA
TCAGGTACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTGTGACAACTGCCCTCAAATTTGGCTTCCTTAAA
AATTACAGTTCAAAAAGTATGAGAAAATCCATGCAGGCTGAAGGAAACAGCAAACTGTGACAAATTACCCCTC
AGTAGGTGAGAACAATGTGACGAACCACCTCAAATCTGTGACAGATAACCCCTCAGACTATCCTGTGTCAT
GGAAGTGATATCGCGGAAGGAAAATACGATATGAGTCGTCTGGCGGCCTTTCTTTTCTCAATGTATGAGAGG
CGCATTGGAGTTCTGCTGTTGATCTCATTAAACACAGACCTGCAGGAAGCGGCGGGAAGTCAGGCATACGCT
GGTAACTTTGAGGCAGCTGGTAACGCTCTATGATCCAGTCGATTTTTCAGAGAGACGATGCCTGAGCCATCCGG
CTTACGATACTGACACAGGGATTTCGTATAAACGCATGGCATAACGGATTGGTGATTTCTTTTGTTCCTAAGC
CGAAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAACCCGATAAAGAAGGGAATGAGATATGGGTGATATGTACTGTAAA
GCCCTCTGGATGGACTGTGCGCACGTTTGATAAACCAAGGAAAAGATTTCATAGCCTTTTTCATCGCCGGCATC
CTCTTCAGGGCGATAAAAAACCACTTCTTCCCGCGAACTCTTCAATGCCTGCCGTATATCCTTACTGGCT

- SEQ ID NO 4 (续)

图13(续)

TCCGCAGAGGTCAATCCGAATATTTAGCATATTTAGCAACATGGATCTCGCAGATACCGTCATGTTCCCTGTA
GGGTGCCATCAGATTTTCTGATCTGGTCAACGAACAGATACAGCATACGTTTTTGTATCCCGGGAGAGACTATA
TGCCGCCCTCAGTGAGGTCGTTTACTGGACGATTCCGGGGCTATTTTTACGTTTCTTGTGATTGATAACCGCT
GTTTCCGCCATGACAGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTTTTAGATTGTCACACTAAATAAAAAAGAGTCAAT
AAGCAGGGATAACTTTGTGAAAAACAGCTTCTTCTGAGGGCAATTTGTCACAGGGTTAAGGGCAATTTGTCA
CAGACAGGACTGTCAATTTGAGGGTGATTTGTCACACTGAAAGGGCAATTTGTCACAACACCTTCTCTAGAACC
AGCATGGATAAAGGCCTACAAGGCCTCTAAAAAGAAGATCTAAAAACTATAAAAAAATAATTATAAAAAAT
ATCCCGTGGATAAAGTGGATAACCCCAAGGGAAGTTTTTTCAGGCATCGTGTGTAAGCAGAATATATAAGTGC
TGTCCCTGGTGCTTCCCTCGCTCACTCGACCGGGAGGTTTCGAGAAGGGGGGCACCCCTTCGGCGTGCGC
GGTCACGCGCACAGGGCGCAGCCCTGGTTAAAAACAAGTTTATAAATATTGGTTTAAAAGCAGGTTAAAAGA
CAGGTTAGCGGTGGCCGAAAAACGGGCGAAACCTTGCAAATGCTGGATTTTCTGCCTGTGGACAGCCCTC
AAATGTCAATAGGTGCGCCCTCATCTGTGACACTCTGCCCTCAAGTGTCAAGGATCGCGCCCTCATCTG
TCAGTAGTCGCGCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGCACTTATCCCAGGCTGTCCACATCATCTGTGGGA
AACTCGCGTAAATCAGGCGTTTTGCGCGATTTGCGAGGCTGGCCAGCTCCACGTGCGCGGCCGAAATCGAGC
CTGCCCTCATCTGTCAACGCGCGCGGGTGAGTCGCCCTCAAGTGTCAACGTCCGCCCTCATCTGTCA
GTAGGGCCAAGTTTTCCGCGAGGTATCCACAACGCGCGCGGCCGCGCGGTGTCTCGCACAGGCTTCGAC
GGCGTTTCTGGCGCGTTTGCAGGGCCATAGACGGCCCGAGCCAGCGGGCAGGGCAACCAGCCGAGGGCTTC
GCCCTGTGCTCGACTGCGCGGAGCACTACTGGCTGTAAAAGGACAGACCACATCATGTTTCTGTGTTCAATA
GGTTGTTCTGTCCATTGCTGACATAATCCGCTCCACTTCAACGTAACACCGCACGAAGATTTCTATTGTTCCCT
GAAGGCATATTTCAATCGTTTTTCGTTACCGCTTGCAGGCATCATGACAGAACACTACTTCTATAAACGCTAC
ACAGGCTCCTGAGATTAATAATGCGGATCTCTACGATAATGGGAGATTTCCCGACTGTTTCGTTCCGTTCTC
AGTGATAACAGCCAGCTTCTCTGTTAACAGACAAAAACAGCATATCCACTCAGTCCACATTTCCATATAA
AGGCCAAGGCATTTATTTCTCAGGATAATTGTTTCAGCATCGCAACCGCATCAGACTCCGGCATCGCAAACCTGC
ACCCGGTGCCGGGCAGCCACATCCAGCGCAAAAACCTTCGTGTAGACTCCGTTGAACTGATGGACTTATGTC
CCATCAGGCTTTGCAGAACTTTCAGCGGTATACCGGCATACAGCATGTGCATCGCATAGGAATGGCGGAACGT
ATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTACACCGTCAGCAGCAGCGGGCGCAACCGCTCCCAATCCAGGTC
CTGACCGTTCTGTCCGTCACCTCCAGATCCGCGCTTCTCTGTCTTCTGTGCGACGGTTACGCCGCTCCA
TGAGCTTATCGCGAATAAATACCTGTGACGGAAGTCACTTCGCGAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTG
ATACCGGGAAGCCCTGGGCCAATTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTCA
CCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAA
ATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCAT
TTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCTTTTTAAAGACCGTAAA
GAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTTTGGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTT
CGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCTTGTACACCGTTTTCCATGAGC
AACTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCA
AGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTCTGCTCA
GCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTT
TCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTTCATCATGCCGT
TTGTGATGGCTTCCATGTCCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCG
TAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGA
TGAATGGCAGAAATTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTGGTGCACCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAG
GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAG
GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATA
GTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGAC
TAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCCGAGGCCGCTC

- SEQ ID NO 4 (续)

图13(续)

序列 SEQ ID NO:5

合成构建体 : PSHUTTLE/CHIMERIVAX-JE (21091 BP)

```

AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGTCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTTGGATT
AATTTAATCGTTCGTTGAGCGATTAGCAGAGAATGACCAGAACATGTCTGGTCGTAAGCTCAGGGAAAAA
CCCTGGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTTCGCTCCTGTCAAACAAAATAAAACAAAAACAAAACAAAT
TGGAAACAGACCTGGACCTCAAGAGGTGTTCAAGGATTTATCTTTTTCTTTTTGTCAACATTTTGACTGGA
AAAAAGATCACAGCCACCTAAAGAGGTGTGGAAAAATGCTGGACCCAAGACAAGGCTTGGCTGTTCTAAGGA
AAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTGATGAGAGGATTGTCTCGAGGAAACGCCGTCCCATGATGTTCTGAC
TGTGCAATTCTAATTTTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAATGAAGTTGTCGAATTTCCAGGGGAAGCTT
TTGATGACCATCAACAACACGGACATTGCAGACGTTATCGTGATTCCCACCTCAAAGGAGAGAACAGATGCT
GGTCCGGGCAATCGACGTCGGCTACATGTGTGAGGACACTATCACGTACGAATGTCTAAGCTTACCATGGG
CAATGATCCAGAGGATGTGGATTGCTGGTGTGACAACCAAGAAGTCTACGTCCAATATGGACGGTGCACGCGG
ACCAGGCATTCCAAGCGAAGCAGGAGATCCGTGTCGGTCCAAACACATGGGGAGAGTTCCTAGTGAATAAAA
AAGAGGCTTGGCTGGATTCAACGAAAGCCACACGATATCTCATGAAAAC TGAGAACTGGATCATAAGGAATCC
TGGCTATGCTTTCTGGCGGCGGTACTTGGCTGGATGCTTGGCAGTAACAACGGTCAACGCGTGGTATTTACC
ATCCTCCTGCTGTTGGTCGCTCCGGCTTACAGTTTTAATTTGCTGTTGGGAATGGGCAATCGTGACTTCATAGAAG
GAGCCAGTGGAGCCACTTGGGTGGACTTGGTGTGATAAGGAGACAGCTGCTTGACAATCATGGCAAACGACAA
ACCAACATTGGACGTCGCGCATGATTAACATCGAAGCTAGCCAACCTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCAT
GCTTCAGTCACTGACATCTCGACGGTGGCTCGGTGCCACGACTGGAGAAGCCCAACGAGAAGCGAGCTG
ATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGGCTTCACTGACCGTGGGTGGGGCAACGGATGTGGATTTTTCGGGAAGGG
AAGCATTGACACATGTGCAAAAATCTCCTGCACCAGTAAAGCGATTGGGAGAACAAATCCAGCCAGAAAACATC
AAATACAAAAGTTGGCATTTTTGTGCATGGAACCACCACTTCGGAAAACCATGGGAATTATTCAGCGCAAGTTG
GGGCGTCCCAGGCGGCAAAGTTTACAGTAACACCCAAATGCTCCTTCGGTAGCCCTCAAACCTTGGTGACTACGG
AGAAGTCACACTGGACTGTGAGCCAAGGAGTGGACTGAACACTGAAGCGTTTTTACGTCATGACCGTGGGGTCA
AAGTCATTTCTGGTCCATAGGGAGTGGTTTTCATGACCTCGCTCTCCCCTGGACGTCCTTTCGAGCACAGCGT
GGAGAAAACAGAGAATCCTCATGGAATTTGAAGGGGCGCACGCCACAAAACAGTCCGTTGTTGCTCTGGGTC
ACAGGAAGGAGGCCTCCATCATGCGTTGGCAGGAGCCATCGTGGTGGAGTACTCAAGCTCAGTGATGTTAACA
TCAGGCCACCTGAAATGTAGGCTGAAAATGGACAACTGGCTCTGAAAGGCACAACCTATGGCATGTGTACAG
AAAAATCTCGTTCGCGAAAAATCCGGTGGACACTGGTCCAGGAACAGTTGTCAATTGAACTCTCCTACTCTGG
GAGTGATGGCCCTGCAAAAATCCGATTGTTTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACCCCCGTTGGGCGGCTG
GTGACAGTGAACCCCTTCGTTCGCGACTTCCAGTGCCAACCTCAAAGGTGCTGGTTCGAGATGGAACCCCTTCG
GAGACTCCTACATCGTAGTTGGAAGGGGAGACAAGCAGATCAACCACCATTGGCACAAGCTGGAAGCACGCT
GGGCAAGGCCTTTTCAACAACCTTTGAAGGGAGCTCAAAGACTGGCAGCGTTGGGCGACACAGCCTGGGACTTT
GGCTCTATTGGAGGGGTCTTCAACTCCATAGGAAGAGCCGTTACCAAGTGTGTTGGTGGTGCCTTCAGAACAC
TCTTTGGGGGAATGTCTTGGATCACACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGGATGGGCGTCAACGCACG
AGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTCTTAGCGACCAATGTGGGCGCC
GATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGGCAAGAGAGCTCAAGTGCAGGATGGTATCTTCATATTTAGAGACT
CTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACTATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTTGCATCAATAGTGAAGCCTC
TTTTGAAGAAGGGAAGTGTGGCCTAAATTCAGTTGACTCCCTTGGAGCATGAGATGTGGAGAAGCAGGGCAGAT
GAGATCAATGCCATTTTTGAGGAAAACGAGGTGGACATTTCTGTTGTCGTGCAGGATCCAAAGAATGTTTACC
AGAGAGGAACTCATCCATTTCCAGAATTCGGGATGGTCTGCAGTATGGTTGGAAGACTTGGGGTAAGAACCT
TGTGTTCTCCCAGGGAGGAAGAATGGAAGCTTCATCATAGATGGAAGTCCAGGAAAAGAATGCCGTTTTTCA
AACGGGTCTGGAATTTTCCAGATAGAGGAGTTTGGGACGGGAGTGTTCACCACACGCGTGTACATGGACG
CAGTCTTTGAATACCCATAGACTGCGATGGATCTATCTTGGGTGCAGCGGTGAACGGAAAAAAGAGTGCCCA

```

- SEQ ID NO 5

图13(续)

TGGCTCTCCAACATTTTGGATGGGAAGTCATGAAGTAAATGGGACATGGATGATCCACACCTTGGAGGCATTA
GATTACAAGGAGTGTGAGTGGCCACTGACACATACGATTGGAACATCAGTTGAAGAGAGTGAAATGTTTCATGC
CGAGATCAATCGGAGGCCAGTTAGCTCTCACAATCATATCCCTGGATACAAGGTTGAGACGAACGGACCTTG
GATGCAGGTACCCTAGAAAGTGAAGAGAGAAGCTTGCCAGGGACTAGCGTGATCATTGATGGCAACTGTGAT
GGACGGGGAAAATCAACCAGATCCACCACGGATAGCGGGAAAAGTTATTCCCTGAATGGTGTGGCCCTCCTGCA
CAATGCCGCTGTGAGCTTCCATGGTAGTGATGGGTGTGGTATCCCATGGAAATAGGCCAAGGAAAACGCA
TGAAAGCCATCTGGTGGCTCCTGGGTTACAGCTGGAGAAAATACATGCTGTCCCTTTTGGTTTGGTGGAGCATG
ATGATAGCAATGGAAGTGGTCTAAGGAAAAGACAGGGACCAAAGCAAATGTTGGTTGGAGGAGTAGTGCTCT
TGGGAGCAATGCTGGTGGGCAAGTAACTCTCCTTGATTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGGATTGCATTT
CCATGAGATGAACAATGGAGGAGACGCCATGTATATGGCGTTGATTGCTGCCTTTTCAATCAGACCAGGGCTG
CTCATCGGCTTTGGGCTCAGGACCCTATGGAGCCCTCGGGAACGCCTTGTGCTGACCCTAGGAGCAGCCATGG
TGGAGATTGCCCTTGGGTGGCGTGATGGGCGCCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTTCTCTCTGCATCCTGAC
AATAAATGCTGTTGCTTCTAGGAAAGCATCAAATACCATCTTGGCCCTCATGGCTCTGTTGACACCGGTCACC
ATGGCTGAGGTGAGACTTGGCCCAATGTTCTTTTGTGCCATGGTTATCATAGGGGTCTTACCAGAATTTCA
AGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACCTCTGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGGCTTGCACAACC
TTTTTTGGGCTGTGTGCATTTCTGGCAACCCGCATATTTGGGCGAAGGAGTATCCAGTGAATGAGGCATC
GCAGCAGCTGGTCTAGTGGGAGTGCTGGCAGGACTGGCTTTTCAGGAGATGGAGAACTTCTTGGTCCGATTG
CAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGTTAGCGTGGCTGGGAGGGTGGATGGGCTAGAGCTCAAGAAGCTTGG
TGAAGTTTCATGGGAAGAGGAGCGGAGATCAGCGGGAGTTCCGCCCGCTATGATGTGGCACTCAGTGAACAA
GGGAGTTCAAGCTGCTTTCTGAAGAGAAAAGTCCATGGGACCAGGTTGTGATGACCTCGCTGGCCTTGGTTG
GGGCTGCCCTCCATCCATTTGCTCTTCTGCTGGTCTTCTGCTGGTGGCTGTTTCATGTGAGGGGAGCTAGGAG
AAGTGGGGATGTCTTGTGGGATATTTCCACTCCTAAGATCATCGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGGATT
TATGGCATATTCAGTCAACCTTCTTGGGGCCCTCCAGCGAGGAGTGGGAGTGGCACAGGGAGGGGTGTTC
ACACAATGTGGCATGTCAAGAGGAGCTTTCTTGTGCAAGTGGCAAGAAGTTGATTCCATCTTGGGCTTC
AGTAAAGGAAGACCTTGTGCGCTATGGTGGCTCATGGAAGTTGGAAGGCAGATGGGATGGAGAGGAAGAGGTC
CAGTTGATCGCGGCTGTTCAGGAAAGAAGCTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTTGTTCAAAGTGAAGGA
ATGGGGGAGAAAATCGGGGCTGTGCTCTTACTACTCCGAGTGGCACTTCCAGGATCTCCTATTGTTAACAGGAA
CGGAGAGGTGATTGGGCTGTACGGCAATGGCATCTTGTGCGGTGACAACCTCCTCGTGTCCGCCATATCCAG
ACTGAGGTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAGCTCCAAGAGATCCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAACATG
TCCTTGATTTTCATCTGGAGCTGGGAAGACAAGACGTTTCTCCACAGATCTTGGCCGAGTGGCAGCGGAG
ACGCTTGGCACTCTTGTGTTGGCCCCACCAGGGTGTCTTTCTGAAATGAAGGAGGCTTTTTCACGGCCTG
GACGTGAAATTCACACACAGGCTTTTTCCGCTCACGGCAGCGGGAGAGAAGTCATGATGCCATGTGCCATG
CCACCCTAACTTACAGGATGTTGGAACCAACTAGGGTGTAACTGGGAAGTGATCATTATGGATGAAGCCCA
TTTTTTGGATCCAGCTAGCATAGCCGCTAGAGGTTGGGCAGCGCACAGAGCTAGGGCAAATGAAAGTGAACA
ATCTTGATGACAGCCACACCGCCTGGGACTAGTGATGAAATTTCCACATTCAAATGGTGAATAGAAGATGTTT
AAACGGACATACCCAGTGAGCCCTGGAACACAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGCATG
GTTCTTCCATCCATCAGAGCTGCAAATGTGATGGCTGCCTCTTTGCGTAAGGCTGGAAAGAGTGTGGTGGTC
CTGAACAGGAAAACCTTTGAGAGAGAATACCCACGATAAAGCAGAAGAAACCTGACTTTATATTGGCCACTG
ACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTTGCGTGGAGCGAGTGCTGGATTGCAGGACGGCTTTTAAGCCTGTGCT
TGTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATAAAGGGCCACTTCGTATCTCCGCATCCTCTGCTGCTCAAAGGAGG
GGGCGCATTGGGAGAAAATCCCAACAGAGATGGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTGAATAATG
CCCACCACGCTGTGCTGGTTGGAGGCCTCAATGCTCTTGGACAACATGGAGGTGAGGGGTGGAATGGTCCGCCC
ACTCTATGGCGTTGAAGGAACTAAAACACCAGTTTCCCTGGTGAATGAGACTGAGGGATGACCAGAGGAAA
GTCTTCAGAGAACTAGTGAGGAATGTGACCTGCCGCTTTGGCTTTCTGTTGGCAAGTGGCAAGGCTGGTTTGA
AGACGAATGATCGTAAGTGGTGTTTTGAAGGCCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAACAGT
GAAGTGCAGGGCTCCTGGAGGAGCAAAGAAGCCTCTGCGCCCAAGGTGGTGTGATGAAAGGGTGTATCTGAC

- SEQ ID NO 5 (续)

图13(续)

CAGAGTGCCTGTCTGAATTTATTAAGTTTGGCTGAAGGTAGGAGGGGAGCTGCTGAAGTGTAGTTGTGCTGA
 GTGAACTCCCTGATTTTCCTGGCTAAAAAAGGTGGAGAGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCCCTCCACTCTGA
 GGAAGGCTCTAGGGCTTACC GCAATGCACTATCAATGATGCCTGAGGCAATGACAAATAGTCATGCTGTTTTATA
 CTGGCTGGACTACTGACATCGGGAATGGTCATCTTTTTCATGTCTCCCAAAGGCATCAGTAGAATGTCTATGG
 CGATGGGCACAATGGCCGGCTGTGGATATCTCATGTTCCCTTGGAGGCGTCAAACCCACTCACATCTCCTATGT
 CATGCTCATATTCTTTGTCTGATGGTGGTTGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCCATCCAAGACAAC
 CAAGTGGCATACTCATTATTGGCATCTGACGCTGGTTTTCAGCGGTGGCAGCCAACGAGCTAGGCATGCTGG
 AGAAAAACCAAGAGGACCTCTTTGGGAAGAAGAACCTAATTCCATCTAGTGCCTCACCCCTGGAGTTGGCCGGA
 TCTTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCTGGACAGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTCTCCAATGTTGCAC
 CACTGGATCAAAGTGAATAAGCAACCTGTCTCTGTCTGGAATAGCCAGTCAGCCTCAGTCTTTCTTTTCA
 TGGACAAGGGGATAACCATTCATGAAGATGAATATCTCGGTCATAATGCTGCTGGTCAGTGGCTGGAATTCAT
 AACAGTGTGCTCTGTCTGTGGCATAGGGTGCGCCATGCTCCACTGGTCTCTCATTTTTACCTGGAATCAA
 GCGCAGCAGTCAAAGCTAGCACAGAGAAGGGTGTTCATGGCGTTGCCGAGAACCCTGTGGTTGATGGGAATC
 CAACAGTTGACATTGAGGAAGCTCCTGAAATGCC TGCCCTTTATGAGAAGAACTGGCTCTATATCTCCTTCT
 TGCTCTCAGCCTAGCTTCTGTGTGCCATGTGCAGAACGCCCTTTTTCATTGGCTGAAGGCATTGTCTTAGCATCA
 GCTGCCCTTAGGGCCGCTCATAGAGGGAAACACCAGCCTTCTTTTGAATGGACCCATGGCTGTCTCCATGACAG
 GAGTCATGAGGGGGAATCATAATGCTTTTGTGGGAGTCATGTACAATCTATGGAAGATGAAAACCTGGACGCCG
 GGGGAGCGCAATGGA AAAACTTTGGGTGAAGTCTGGAAGAGGGAACTGAATCTGTTGGACAAGCGACAGTTT
 GAGTTGTATAAAAGGACCGACATTGTGGAGGTGGATCGTGATACGGCAGCAGGCATTTGGCCGAAGGGAAAG
 TGGACACCGGGGTGGCGGCTCCAGAGGGACCGCAAAGTTAAGGTGGTTCCATGAGCGTGGCTATGTCAAGCT
 GGAAGGTAGGGTGATTGACCTGGGGTGTGGCCGGGAGGCTGGTGTACTACGCTGCTGCGCAAAAGGAAGTG
 AGTGGGGTCAAAGGATTTACTCTTGGAAAGAGACGGCCATGAGAAAACCCATGAATGTGCAAAGTCTGGGATGGA
 ACATCATCACCTTCAAGGACAAAACCTGATATCCACCGCTAGAACCAGTGAAATGTGACACCCTTTTGTGTGA
 CATTGGAGAGTCATCATCGTCATCGGTCACAGAGGGGAAAGGACCGTGAGAGTCTTTGATACTGTAGAAAA
 TGGCTGGCTTGTGGGGTTGACAACCTTCTGTGTGAAGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTTGAGAAAC
 TGGAAATGCTCCAAAGGAGTGTGGCGGAACAGTGATCAGGAACCCCTCTCCAGGAATCCACTCATGAAAT
 GTACTACGTGTCTGGAGCCCGCAGCAATGTACATTTACTGTGAACCAAACATCCC GCCTCCTGATGAGGAGA
 ATGAGGCGTCCAAC TGGAAAAGTGACCCTGGAGGCTGACGTCATCCTCCAAATGGGACACGCAGTGTGAGA
 CAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCATAGAAGAAAGGGTTGAGAGGATAAAA TCTGAGTACATGACCTC
 TTGGTTTTATGACAATGACAACCCCTACAGGACCTGGCACTACTGTGGCTCCTATGTACAAAAACCTCAGGA
 AGTGGCGGAGCATGGTAAATGGTGTATTAAAAATCTGACATATCCATGGGACAGGATAGAGGAGGTCACAA
 GAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTTTGGACAGCAAAGAGTGTTTAAAGAAAAAGTTGACACCAGAGCAA
 GGATCCACCAGCGGAAC TAGGAAGATCATGAAAGTTGTCAACAGGTGGCTGTTCCGCCACCTGGCCAGAGAA
 AAGAACCCAGACTGTGCACAAAGGAAGAATTTATTGCAAAAGTCCGAAGTCATGCAGCCATTGGAGCTTACC
 TGGAAGAACAAGAACAGTGGAAAGACTGCCAATGAGGCTGTCCAAGACCCAAAGTCTGGGAACTGGTGGATGA
 AGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTGTGGACTTGTGTGTACAACATGATGGGGAAAAGAGAGAAGAAG
 CTGTGACAGTGTGGGAAAGCAAAGGGAAGCCGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGCGCGGTATCTTGAGT
 TTGAGGCCCTGGGATTC TGAATGAGGACCATTTGGGCTTCCAGGGAAAAC TCAAGGAGGAGTGGAAAGGCAT
 TGGCTTACAATACCTAGGATATGTGATCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACGCGGATGAC
 ACCGCTGGATGGGACACGCGCATCACAGAGGCAGACCTTGATGATGAACAGGAGATCTTGA ACTACATGAGCC
 CACATCAAAAAAC TGGCAACAGCAGTGTGAAATGACATACAAGAACAAGTGGTGAAGTGTGAGACC
 AGCCCCAGGAGGGAAGCCTACATGGATGTCATAAGTCGACGAGACCAGAGAGGATCCGGGCAGGTAGTACT
 TATGCTCTGAACACCATCACC AACTTGAAAGTCCAATGATCAGAATGGCAGAAGCAGAGATGGTGATACATC
 ACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAATCAGTTCTGACCAGGCTGGAGGCATGGCTCACTGAGCACGGATGTGA
 CAGACTGAAGAGGATGGCGGTGAGTGGAGACGACTGTGTGGTCCGGCCCATCGATGACAGGTTCCGGCTGGCC

- SEQ ID NO 5 (续)

图13(续)

CTGTCCCATCTCAACGCCATGTCCAAGGTTAGAAAGGACATATCTGAATGGCAGCCATCAAAAGGGTGGAAATG
ATTGGGAGAATGTGCCCTTCTGTTCACCACCTTCCATGAACTACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATTGTGGT
GCCTTGCCGAGAACAGGACGAGCTCATTGGGAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAGGAA
ACAGCTTGCCTCAGCAAAGCCTATGCCAACATGTGGTCACTGATGTATTTTACAAAAGGGACATGAGGCTAC
TGTCAATTGGCTGTTTTCTCAGCTGTTCCACCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACAACATGGTTCGATTTCATGG
GAAAGGGGAGTGGATGACCACGGAAGACATGCTTGAGGTGTGGAAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCACAC
ATGCAGGACAAGACAATGGTAAAAAATGGAGAGATGCCCTTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGTGCG
GATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCCACCTGGGCTCCACATCCATTTAGTCATCCATCGTATCCGAAC
GCTGATTGGACAGGAGAAAATACACTGACTACCTAACAGTTCATGGACAGGTATTTCTGTGGATGCTGACCTGCAA
CTGGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAACAGGAATAACCGGGATACAAACCAGGGTGGAGAACCGGACTC
CCCACAACCTGAAACCGGATATAAAACCACGGCTGGAGAACCGGGCTCCGCACCTTAAAATGAAACAGAAACCG
GGATAAAAACCTACGGATGGAGAACCGGACTCCACACATTTGAGACAGAAGAAGTTGTTCAGCCCAGAACCCACA
CGAGTTTGGCCACTGCTAAGCTGTGAGGCAGTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAAAAACCTGG
TTTCTGGGACCTCCCACCCAGAGTAAAAAGAACGGAGCCTCCGCTACCACCTCCCACGTTGGTGGTAGAAAG
ACGGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCTCCAGGGAACAAATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGGAAAGACCG
GAGTGGTTCTCTGCTTTTCTCCAGAGGTCTGTGAGCACAGTTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTTGGATGAC
AAACAAAAACCACTGGCCGGCATGGTCCCAGCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGCAACATTCGAGGGGACC
GTCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACGAATTCGAACAGTCTAAAACGAGTAAATAGGACCGCAATTCCTT
CAAGCAATAAACAGGAATACCAATTATTAAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAAGCTTTGAAGAAAA
TGCGCCTTATTCAATCTTTGCTATAAAAAATGGCCAAAATCTCACATTGGAAGACATTTGATGACCTCATT
CTTCAATGAAGGGCCTAACGGAGTTGACTAATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGTCTTCTGCCGTGG
CCAGGACAACGTATACATCAGATAACAGCAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTTCTCGGTACTATGC
ATATGATCCAATATCAAAGGAAATGATAGCATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATA
GAACAGCTAAAGGGTAGTGTGAAGGAAGCATAACGATACCCCGCATGGAATGGGATAATATCACAGGAGGTAC
TAGACTACCTTTTACCTACATAAATAGACGCATATAAGTACGCATTTAAGCATAAACACGCACACTATGCCGTT
CTTCTCATGTATATATATACAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAAGTGTATGTGCGCA
GCTCGGTTGCATTTTCGGAAGCGCTCGTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCCTATTCGGAAGTTCCTATTCTC
TAGAAAATAGGAACCTCAGAGCGCTTTTGAACCACAAAGCGCTCTGAAGACGCACTTTCAAAAAACCAAA
AACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATGCGAATACCGCTTCCACAACATTTGCTCAAAAGTATCTC
TTTGTATATATCTCTGTGCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTTCGCTCCTTGAACCTGCACTA
AACTCGACCTCTACATTTTTTATGTTTATCTCTAGTATFACTCTTTAGACAAAAAATTTAGTAAGAATAT
TCATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAACATTTCTTATACGTAGTATATAGAGACAAAAATAGAAG
AAACCGTTCATAATTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCACTTCTGTTCAAAAAGTATGCGCAAT
CCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATGCCTTTATCTTGAAAAAATGCACCCGACGCTTCGCTAGTAATCA
GTAAACCGGGGAAAGTGGAGTCAGGCTTTTTTTATGGAAGAGAAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTCAACC
TTAACGGACCTACAGTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAAGGAGAAAAAAGTAATC
TAAGATGCTTTGTTAGAAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTGTAGAACAAAAAAGAAGTATAGATTCTTT
GTTGGTAAAAATAGCGCTCTCGGTTGCATTTCTGTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGA AAAAT
TAGCGCTCTCGGTTGCATTTTGTGTTTACAAAAATGAAGCACAGATTCTTCGTTGGTAAAAATAGCGCTTTCG
CGTTGCATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGA AAAATTAGCGCTCTCGGTTGCATTT
TTGTTCTACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTAACAAAAGATATGCTATTGAAGTGCAAGATGGAACGCAGA
AAATGAACCGGGGATGCGACGTGCAAGATTACCTATGCAATAGATGCAATAGTTTCTCCAGGAACCGAAATAC
ATACATTGTCTCCGTAAGCGCTAGACTATATATATATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTTCAGGGAA
AACTCCCAGGTTCCGATGTTCAAAAATCAATGATGGGTAACAAGTACGATCGTAAATCTGTAAAACAGTTTGT
CGGATATTAGGCTGTATCTCCTCAAAGCGTATTGCAATATCATTGAGAAGCTGCAGGCAAGTGCACAACAAT

- SEQ ID NO 5 (续)

图13(续)

ACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTAGAGTC
 TTTTACACCATTTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCACC
 ACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAATGTAAGCTTTTCGGGGCTCTCTTGCCTTCCAACCCAGT
 CAGAAATCGAGTTCCAATCCAAAAGTTACCTGTCCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGAATG
 AGGTTTCTGTGAAGCTGCAC TGAGTAGTATGTTGCAGTCTTTTGGAAATACGAGTCTTTTAATAACTGGCAA
 CCGAGGAACTCTTGGTATTCCTTGCACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGA
 CCAGAGCCAAAACATCCTCCTTAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTTCCGGAGTGCCTGAACTATT
 TTTATATGCTTTTACAAGACTTGAAATTTTCCCTTGCAATAAACCGGGTCAATTGTTCTCTTTCTATTGGGCACA
 CATATAATACCCAGCAAGTCAGCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCCCTGTGTCTGTGCAAGCCGCAAA
 CTTTACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTTAAT
 CACGTATACTCACGTGCTCAATAGTCACCAATGCCCTCCCTCTTGGCCCTCCTCCTTTTCTTTTTTCGACCGC
 TAGCGTCGACAGCGACACACTTGCATCGGATGCAGCCGGTTAACGTGCCGGCACGGCCTGGGTAACCAGGTA
 TTTTGTCCACATAACCGTGCACAAAATGTTGTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATACAA
 CCGCACACCGAGGTTACTCCGTCTACAGGTTACGACGACATGTCAATAC TTGCCCTTGACAGGCATTGATGG
 AATCGTAGTCTCACGCTGATAGTCTGATCGACAATAACAAGTGGGACCGTGGTCCCAGACCGATAATCAGACCG
 ACAACACGAGTGGGATCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACT
 AATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACC
 GTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCATGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGA
 TACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATA
 ATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGG
 TCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACAAGTGGAACAGTGGGCCAGAGAGAATATT CAGGCCAGTTATGC
 TTTCTGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAAACGTAGACTAAAACGTGGTGCATCAGGGTGC
 TGGCTTTTCAAGTTCCCTTAAGAATGGCCTCAATTTTCTTATACACTCAGTTGGAACACGGGACCTGTCCAGG
 TTAAGCACCATTTTATCGCCCTTATACAATACTGTGCTCCAGGAGCAAAC TGATGTCGTGAGCTTAAACTAG
 TTCTTGATCGAGATGACGTTTAAAGCACAGAAGTTAAAGAGTGAATAACTTCTTCAGCTTCAAATATCACCCC
 AGCTTTTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGCCTGCTGCTTAAGTAATCCTCTTTATCTGTAAAGGCTTTTTGA
 AGTGATCACCTGACCGGGCAGATAGTTACCAGGGGTGAGAAAAAAGAGCAACAACCTGATTTAGGCAATTTGG
 CGGTGTTGATACAGCGGGTAATAATCTTACGTGAAATATTTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAATATTTCCAGC
 AAATTCATTCTGCAATCGGCTTGCAATAACGCTGACCAGTTTATAAGCACTTGTGGGCGATAATCGTTACCC
 AATCTGATAATGCAGCCATCTGCTCATCATCCAGCTGCCAACAGAACACGATAATCACTTTCGGTAAGTG
 CAGCAGCTTTACGACGGCGACTCCCATCGGCAATTTCTATGACACCAGATACTCTTCGACCGAACCGCGGTGT
 CTGTTGACCACTCAGTAGAAAAGAAGGATGAGATCATCCAGTGCCTCCTCAGTAAGCAGCTCCTGGTCACGT
 TCATTACCTGACCATAACCGAGAGGTCTTCTCAACACTATCACCCGGAGCACTTCAAGAGTAAACTTCACAT
 CCCGACCACATACAGGCAAAGTAATGGCATTACCGGAGCCATTACTCCTACGCGCGCAATTAACGAATCCAC
 CATCGGGCAGCTGGTGTGATAACGAAGTATCTTCAACCGGTTGAGTATTGAGCGTATGTTTTGGAATAACA
 GGCGCAGCTTCATTATCTAATCTCCCAGCGTGGTTAATCAGACGATCGAAAAATTCATTGCAGACAGGTTTC
 CAAAATAGAAAGAGCATTTCTCCAGGCACAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTCAAAAACAGTTCTC
 ATCCGGATCTGACCTTTACCAACTTCATCCGTTTACGTTACAACATTTTTTAGAACCATGCTTCCCAGGCAT
 CCCGAATTTGCTCCTCCATCCACGGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGTATTTGGTAAGCAAAAATACGTAC
 ATCAGGCTCGAACCCTTTAAGATCAACGTTCTTGAGCAGATCACGAAGCATA TCGAAAAACTGCAGTGGGAG
 GTGTAGTCAAACAACCTCAGCAGGCGTGGGAACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGACATTAATCGTGCCGA
 TACCCAGGTTAGGCGCGCTGTCAATAACTATGACATCATAGT CATGAGCAACAGTTTCAATGGCCAGTCCGAG
 CATCAGGTGTGGATCGGTGGGCAGTTTACCTTCATCAAAATTTGCCATTAAC TCAAGTTTCAATACGGTGCAGA
 GCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCGGCCAGCAAGTGGGCTTTATTGCATAAGTGACATCGTCTTTT
 CCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTTCTGCATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCCGTGATACATTGA
 GGCTGTTCCCTGGGGTCTTACCTTCCACGAGCAAAAACAGTAGCCCTTCAGAGCCAGATCCTGAGCAAGA

- SEQ ID NO 5 (续)

图13(续)

TGAACAGAAACTGAGGTTTTGTAAACGCCACCTTTATGGGCAGCAACCCCGATCACCGGTGAAATACGTCTT
CAGCACGTGCGAATCGCGTACCAAACACATCACGCATATGATTAATTTGTTCAATTGTATAACCAACACGTTG
CTCAACCCGTCCTCGAATTTCCATATCCGGGTGCGGTAGTCGCCCTGCTTTTCGGCATCTCTGATAGCCTGA
GAAGAAACCCCAACTAAATCCGCTGCTTACCTATTCTCCAGCGCCGGGTTATTTTCCTCGCTTCCGGGCTGT
CATCATTAAACTGTGCAATGGCGATAGCCTTCGTCAATTCATGACCAGCGTTTATGCACTGGTTAAGTGTTC
CATGAGTTTTATTCTGAACATCCTTTAATCATTGCTTTGCGTTTTTTTTATTAAATCTTGCAATTTACTGCAAA
GCAACAACAAAATCGCAAAGTCATCAAAAAACCGCAAAGTTGTTTTAAAAAAGAGCAACACTACAAAAGGAGA
TAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACTTATTATCAGTACGCTCGCCGAGCCGTGTAACCGAGCATAGCGAGC
GAACTGGCGAGGAAGCAAAGAAGAACTGTTCTGTGATAGCTCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATCCAC
CGTGGGAAAAACTCCAGGTAGAGGTACACACGCGGATAGCCAATTAGAGTAATAAACTGTGATAATCAACCC
TCATCAATGATGACGAACTAACCCCGATATCAGGTACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTGTGA
CAAACAGCAAACTGTGACAAATTACCCTCAGTAGGTCAGAACAAATGTGACGAACCACCCTCAAATCTGTGA
CAGATAACCCCTCAGACTATCTGTGCTCATGGAAGTGATATCGCGGAAGGAAAATACGATATGAGTCGTCTG
CGGCTTTCTTTTTCTCAATGTATGAGAGGCGCATTGGAGTTCTGCTGTTGATCTCATTAAACACAGACCTGCA
GGAAGCGGCGGCGGAAGTCAGGCATACGCTGGTAACTTTGAGGCAGCTGGTAACTCTATGATCCAGTCGAT
TTTCAGAGAGACGATGCCCTGAGCCATCCGGCTTACGATACTGACACAGGGATTCTGATAAACGCATGGCATA
GGATTGGTGATTTCTTTTGTTCATAAGCCGAAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAACCCGATAAAGAAGGGAA
TGAGATATGGGTTGATATGTACACTGTAAAGCCCTCTGGATGGACTGTGCGCACGTTTGATAAACCAGGAAA
AGATTCATAGCCTTTTTTCATCGCCGGCATCCTCTCAGGGCGATAAAAAACCACTTCTTCCCGCGAAACTC
TTCAATGCCCTGCCGTATATCCTTACTGGCTTCCGAGAGGTCAATCCGAATATTCAGCATATTTAGCAACAT
GGATCTCGCAGATAACCGTCAATGTTCTGTAGGGTGCCATCAGATTTTCTGATCTGGTCAACGAACAGATACAG
CATACGTTTTTGATCCCGGAGAGACTATATGCCCTCAGTGAGGTCGTTGACTGGACGATTCCGCGGCTA
TTTTTACGTTTCTGTGATTGATAACCGCTGTTTCCGCCATGACAGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTTTTA
GATTGTACACTAAATAAAAAAGAGTCAATAAGCAGGGATAACTTTGTGAAAAACAGCTTCTTCTGAGGGCA
ATTTGTACAGGGTTAAGGGCAATTTGTACAGACAGGACTGTCAATTTGAGGGTGATTTGTACACTGAAAGG
GCAATTTGTACAAACACCTTCTCTAGAACAGCATGATAAAGGCCTACAAGGCCTCTAAAAAAGAAGATCT
AAAACTATAAAAAAAATAATATAAAAAATATCCCCGTGGATAAGTGGATAACCCCAAGGGAAAGTTTTTCAG
GCATCGTGTGTAAGCAGAAATATAAGTGTGTTCCCTGGTGTCTCTCGCTCACTCGACCGGGAGGGTTTCA
GAAGGGGGGGCACCCTTTCGGCGTGCAGGTCACGCGCACAGGGCGCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGTTTA
TAAATATTGGTTTTAAAGCAGGTTAAAGACAGGTTAGCGGTGGCCGAAAAACGGGCGGAAACCTTGCAAT
GCTGGATTTTCTGCCTGTGGACAGCCCTCAAATGTCAATAGGTGCGCCCTCATCTGTGACACTCTGCCCC
TCAAGTGTCAAGGATCGCGCCCTCATCTGTGAGTAGTGCAGCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGCACTTA
TCCCAGGCTTGTCCACATCATCTGTGGGAACTCGCGTAAATCAGGCGTTTCGCGGATTTGCGAGGCTGG
CCAGCTCCACGTGCGCGGCCGAAATCGAGCTGCCCTCATCTGTCAACGCCGCGCGGGTGAGTCGGCCCT
CAAGTGTCAACGTCCGCCCTCATCTGTGAGTGGGGCAAGTTTTCCGCGAGGATCCACAACGCCGGCGGC
CGGCCGCGGTGTCTCGCACAGGCTTCGACGGCGTTTCTGGCGGTTTGCAGGGCCATAGACGGCCGCCAGCC
CAGCGCGAGGGCAACCAGCGAGGGCTTCGCCCTGTGCTCGACTGCGCGGAGCACTACTGGCTGTAAAAGG
ACAGACCACATCATGGTTCTGTGTTTATTAGGTTGTTCTGTCCATTGCTGACATAATCCGCTCCACTTCAACG
TAACACCGCACGAAGATTTCTATGTTTCTGAAGGCATATCAAAATCGTTTTTCGTTACCGCTTGCAGGCATCA
TGACAGAACTACTTCTATAAAACGCTACACAGGCTCCTGAGATTAATAATGCGGATCTCTACGATAATGGG
AGATTTTCCCGACTGTTTCGTTTCGCTTCTCAGTGGATAACAGCCAGCTTCTCTGTTTAAACAGACAAAAACAGC
ATATCCACTCAGTTCACATTTCCATATAAAGGCCAAGGCATTTATTCTCAGGATAATTGTTTTCAGCATCGCA
ACCGCATCAGACTCCGGCATCGAACTGCACCCGGTGCAGGGCAGCCACATCCAGCGCAAAAACCTTCGTGT
AGACTTCCGTTGAACTGATGGACTTATGTCCATCAGGCTTTGCAGAACTTTCAGCGGTATACCGGCATACAG
CATGTGCATCGCATAGGAATGGCGGAACGTATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTACACCCGTCAGCAGCA

- SEQ ID NO 5 (续)

图13(续)

GCGGCGGCAACCGCCTCCCAATCCAGGTCCTGACCGTCTGTCCGTCACCTCCAGATCCGCGCTTTCTCTG
 TCCTTCTGTGCGACGGTTACGCCCTCCATGAGCTTATCGGAATAAATACCTGTGACGGAAGTCACTTCG
 CAGAATAAATAAATCCGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGT
 TGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTCCACATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGGAGTTA
 TCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCC
 AATGGCATCGTAAAGAACATTTTGGGCACTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCT
 GGATATTACGGCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTTCTT
 GCCCGCCTGATGAATGTCATCCGGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTG
 TTCACCCCTTGTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGA
 TTTCCGGCAGTTTTCTACACATATATTGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACTGGCCTATTTCCCTAAA
 GGGTTTATTGAGAATATGTTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGG
 CCAATATGGACAACCTTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGAT
 GCCGCTGGCGATTTCAGTTTCATCATGCCGTTTTGTGATGGCTTCCATGTCCGCGAAGTCTTAATGAATTACAA
 CAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTTTTAAAGGCAGTTATGGTGCCCTTAAACGCCCTGGTT
 GCTACGCCTGAATAAGTGATAAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATT
 GGTGACCCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCA
 AAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA
 AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCA
 GTTCCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTC

SEQ ID NO 5 (续)

序列 ID NO:6

合成构建体 : PSHUTTLE/CHIMERIVAX-WN (21094 BP)

AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGTCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTTGGATT
 AATTTTAATCGTTCGTTGAGCGATTAGCAGAGAACGACCAGAACATGTCTGGTCGTAAAGCTCAGGGAAAA
 CCCGGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTTCGCTCCTTGTCAAACAAAATAAAAACAAAAACAAAACAAAT
 TGGAAACAGACCTGGACCTTCAAGAGGTGTTCAAGGATTTATCTTTTTCTTTTTGTTCAACATTTTACTGGA
 AAAAAGATCACAGCCACCTAAAGAGGTTGTGGAAAATGCTGGACCCAAGACAAGGCTTGGCTGTTCTAAGGA
 AAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTTGTGATGAGAGGATTGTCTCGAGGAAACGCCGTTCCCATGATGTTCTGAC
 TGTGCAATTCCTAATTTTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGAAGGTG
 ATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTATCACGATTCCAACAGCTGCTGGAAAAGAACCTATGCA
 TTGTGAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATGATACTATCACTTATGAATGCCAGTGTGTCGGCTGG
 TAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCACAAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAG
 ACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTCAGTGCAGTGCAGACACACGGAGAAAGCACTCTAGCGAACAAAG
 AGGGGGCTTGGATGGACAGCACCAGGCCACAAGGATTTTGGTAAAAACAGAATCATGGATCTTGGAGAACCC
 TGGATATGCCCTGGTGGCAGCCGTCATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACACCATGCAGAGAGTTGTGTTTGTCT
 GTGCTATTGCTTTTTGGTGGCCCCAGCTTACAGCTTCACTGCCTTGGAAATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAA
 GAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTGGTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAA
 GCCTACCATCGATGTGAAGATGATGAATATGGAGGCGGCCAACCTGGCAGAGGTCGCGAGTTATTGCTATTTG
 GCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTG
 ACCCAGCTTTTGTGTGACAGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGATTCTTTGGAAAAG
 ATCCATTGACACATGCGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACCACTTGAAGAGAATATC
 AAGTACGAAGTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAACCTACTCCACACAGGTTG
 GAGCCACTCAGGCAGGGAGATTACAGCATCACTCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGG

- SEQ ID NO 6

图13(续)

AGAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGAACA
AAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGTACTGTGT
GGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGAGAACACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATAGCATTGGGCTC
ACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTGTGGAATTTTCAAGCAACACTGTCAAGTTG
ACGTCGGGTCAATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAACAACCTATGGCGTCTGTT
CAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGTCGACACAGGTCACGGCAGTGTGGTGTGGAATTGCAGTACAC
TGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTTCTATCTCGTCAGTGGCTTCATTGAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGA
TTGGTCACTGTCAACCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGCTAAGGTCCTGATTGAATTGGAACCACCT
TTGGAGACTCATACTAGTGGTGGGCAGAGGAGAACAACAGATCAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAG
CATTGGCAAAGCCTTTTACAACCACCTCAAAGGAGCGCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGAC
TTTGGATCAGTTGGAGGGTGTTCACCTCAGTTGGGCGCGCTGTCCATCAAGTGTTCGGAGGAGCATTCCGCT
CACTGTTTCGGAGGCATGTCTGGATAACGCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCTGTTGTGGATGGGCATCAATGC
TCGTGATAGGTCCATAGCTTCACGTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCTCTCCGTGAACGTGGGC
GCCGATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGGCAAGAGAGAGCTCAAGTGCAGGAGATGGTATCTTCATATTTAGAG
ACTCTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACTATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTTGCATCAATAGTGAAAGC
CTCTTTTGAAGAAGGGAAAGTGTGGCCTAAATTCAGTTGACTCCCTTGAGCATGAGATGTGGAGAAGCAGGGCA
GATGAGATCAATGCCATTTTGGAGAAAACGAGGTGGACATTTCTGTTGTCGTGCAGGATCCAAAGAATGTTT
ACCAGAGAGGAACCTCATCCATTTTCCAGAATTCGGGATGGTCTGCAGTATGGTTGGAAGACTTGGGGTAAGAA
CCTTGTGTTCTCCCAGGGAGGAAGAATGGAAGCTTCATCATAGATGGAAAGTCCAGGAAAGAATGCCCGTTT
TCAAACCGGGTCTGGAATTCCTTCCAGATAGAGGAGTTTGGGACGGGAGTGTTCACCACACGCGTGTACATGG
ACGCAGTCTTTGAATACACCATAGACTGCGATGGATCTATCTTGGGTGCAGCGGTGAACGGAAAAAAGAGTGC
CCATGGCTCTCCAACATTTTGGATGGGAAGTCAAGTAAATGGGACATGGATGATCCACACCTTGGAGGCA
TTAGATTACAAGGAGTGTGAGTGGCCACTGACACATACGATTGGAACATCAGTTGAAGAGAGTGAATGTTCA
TGCCGAGATCAATCGGAGGCCAGTTAGCTCTCACAATCATATCCCTGGATACAAGGTTTCCAGACGAACGGAC
TTGGATGCAGGTACCAC TAGAAGTGAAGAGAGAAGCTTGGCCAGGACTAGCGTGATCATTGATGGCAACTGT
GATGGACGGGGAAAATCAACCAGATCCACCACGGATAGCGGGAAAAGTTATTCCTGAATGGTGTGGCCGCTCT
GCACAATGCCGCTGTGAGCTTCCATGGTAGTGTGGGTGTTGGTATCCCATGGAAATTAGGCCAAGGAAAAC
GCATGAAAGCCATCTGGTGCCTCTGGGTTACAGCTGGAGAAAATACATGCTGTCCCTTTTGGTTTGGTGTAGC
ATGATGATAGCAATGGAAGTGGTCTTAAGGAAAAGACAGGGACCAAAGCAAATGTTGGTTGGAGGAGTAGTGC
TCTTGGGAGCAATGCTGGTGGGCAAGTAACTCTCCTTGATTTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGGATTGCA
TTTCCATGAGATGAACAATGGAGGAGACGCCATGTATATGGCGTTGATTGCTGCCTTTTCAATCAGACCAGGG
CTGCTCATCGGCTTTGGGCTCAGGACCCTATGGAGCCCTCGGGAACGCCTTGTGCTGACCCTAGGAGCAGCCA
TGGTGGAGATTGCCTTGGGTGGCGTGATGGGCGCCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTTCTCTCTGCATCCT
GACAATAAATGCTGTTGCTTCTAGGAAAGCATCAAATACCATCTTGCCCCCATGGCTCTGTTGACACCGGTC
ACCATGGCTGAGGTGAGACTTGCCGCAATGTTCTTTTGTGCCATGGTTATCATAGGGGTCTTACCAGAAAT
TCAAGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACCTCTGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGGCTTGACACA
ACCTTTTTTGGGCTGTGTGCATTTCTGGCAACCCGCATATTTGGGCGAAGGAGTATCCCAGTGAATGAGGCA
CTCGCAGCAGCTGGTCTAGTGGGAGTGTGGCAGGACTGGCTTTTTCAGGAGATGGAGAACTTCTTGGTCCGA
TTGCAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGTTAGCGTGGCTGGGAGGGTGGATGGGCTAGAGCTCAAGAAGCT
TGGTGAAGTTTTCATGGGAAGAGGAGGCGGAGATCAGCGGGAGTTCCGCCCCGTATGATGTGGCACTCAGTGAA
CAAGGGGAGTTCAAGCTGCTTTCTGAAGAGAAAAGTGCATGGGACCAGGTTGTGATGACCTCGCTGGCCTTGG
TTGGGGCTGCCCTCCATCCATTTGCTCTTCTGCTGGTCCCTGCTGGGTGGCTGTTTCATGTGAGGGGAGCTAG
GAGAAGTGGGGATGCTTGTGGGATATTTCCACTCCTAAGATCATCGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGG
ATTTATGGCATATTCAGTCAACCTTCTTGGGGGCTCCAGCGAGGAGTGGGAGTGGCACAGGGAGGGGTGT
TCCACACAATGTGGCATGTCACAAGAGGAGCTTCTTGTGTCAGGAATGGCAAGAAGTTGATTCCATCTTGGGC
TTCAGTAAAGGAAGACCTTGTGCCTATGGTGGCTCATGGAAGTTGGAAGGCAGATGGGATGGAGAGGAAGAG

- SEQ ID NO 6 (续)

图13(续)

GTCCAGTTGATCGCGGCTGTTCCAGGAAAGAACGTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTTGTTCAAAGTGA
 GGAATGGGGGAGAAATCGGGGCTGTGCTCTTGACTATCCGAGTGGCAGTTCAGGATCTCCTATTGTTAACAG
 GAACGGAGAGGTGATTGGGCTGTACGGCAATGGCATCCTTGTGCGGTGACAACCTCTTCGTGTCCGCCATATCC
 CAGACTGAGGTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAGCTCCAAGAGATCCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAA
 CTGTCTTGTGATTTTTCATCCTGGAGCTGGGAAGACAAGACGTTTCTCCACAGATCTTGGCCGAGTGGCGCAG
 GAGACGCTTGGCGACTCTTGTGTTGGCCCCACCAGGTTGTTCTTTCTGAAATGAAGGAGGCTTTTACGGC
 CTGGACGTGAAATTCCACACACAGGCTTTTTCCGCTCACGGCAGCGGGAGAGAAGTCAATTGATGCCATGTGCC
 ATGCCACCCTAACTTACAGGATGTTGGAACCAACTAGGGTTGTTAACTGGGAAGTGATCATTATGGATGAAGC
 CCATTTTTTGGATCCAGCTAGCATAGCCGCTAGAGGTTGGGCAGCGCACAGAGCTAGGGCAAATGAAAGTGCA
 ACAATCTTGTGATGACAGCCACACCGCCTGGGACTAGTGATGAATTTCCACATTCAAATGGTGAATAGAAGATG
 TTCAAACGGACATACCCAGTGAGCCCTGGAACACAGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGC
 ATGGTTCCCTTCCATCCATCAGAGCTGCAAATGTCATGGCTGCCTCTTTGCGTAAGGCTGGAAAGAGTGTGGTG
 GTCCTGAACAGGAAAACCTTTGAGAGAGAATACCCACGATAAAGCAGAAGAAACCTGACTTTATATTGGCCA
 CTGACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTTGCGTGGAGCGAGTGTGGATTGCAGGACGGCTTTTAAGCCTGT
 GCTTGTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATAAAAGGGCCACTTCGTATCTCCGCATCCTCTGCTGCTCAAAGG
 AGGGGGCGCATTGGGAGAAAATCCCAACAGAGATGGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTGAATA
 ATGCCACCACGTCTGCTGGTTGGAGGCCTCAATGCTCTTGGACAACATGGAGGTGAGGGGTGGAATGGTCGC
 CCCACTCTATGGCGTTGAAGGAATAAAACACCAGTTTCCCCTGGTGAATGAGACTGAGGGATGACCAGAGG
 AAAGTCTTCAGAGAAC TAGTGAGGAATTGTGACCTGCCCGTTTGGCTTTCTGTTGCAAGTGGCCAAGGCTGGTT
 TGAAGACGAATGATCGTAAGTGGTGTGTTTGAAGGCCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAC
 AGTGAAGTGCAGGGCTCCTGGAGGAGCAAAGAAGCCTCTGCCCCCAAGGTGGTGTGATGAAAGGGTGTGATCT
 GACCAGAGTGCCTGTCTGAAATTTATTAAGTTTGTGTAAGGTAGGAGGGGAGCTGCTGAAGTGTGATGTTGTC
 TGAGTGAACCTCCTGATTTCTGGCTAAAAAAGGTGGAGAGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCTCCACTC
 TGAGGAAGGCTCTAGGGCTTACCGCAATGCACTATCAATGATGCCTGAGGCAATGACAATAGTCATGCTGTTT
 ATACTGGCTGGACTACTGACATCGGGAATGGTCATCTTTTTCATGTCTCCCAAAGGCATCAGTAGAATGTCTA
 TGGCGATGGGCACAATGGCCGGCTGTGGATATCTCATGTTCCCTGGAGGCGTCAAACCCACTCACATCTCCTA
 TGTGATGCTCATATTTCTTGTCTGATGGTGGTGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCCATCCAAGC
 AACCAAGTGGCATACTCATTATTGGCATCCTGACGCTGGTTTTAGCGGTGGCAGCCAAACGAGCTAGGCATGC
 TGGAGAAAACCAAAGAGGACCTCTTTGGGAAGAAGAACTTAATTCATCTAGTGCTCACCCCTGGAGTTGGCC
 GGATCTTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCTGGACAGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTCTCCAATGTTG
 CACCCTGGATCAAAGTCGAATATGGCAACCTGTCTCTGTCTGGAATAGCCAGTCAGCCTCAGTCTTTCTT
 TCATGGACAAGGGGATACCATTGATGAAGATGAATATCTCGGTGATAATGCTGCTGGTCAAGTGGCTGGAATC
 AATAACAGTGATGCCTCTGCTCTGTGGCATAGGGTGGCCATGCTCCACTGGTCTCTCATTTTACCTGGAATC
 AAAGCGCAGCAGTCAAAGCTAGCACAGAGAAGGGTGTTCATGGCGTTGCCGAGAACCCCTGTGGTTGATGGGA
 ATCCAACAGTTGACATTGAGGAAGCTCCTGAAATGCCCTGCCCCCTTATGAGAAGAACTGGCTCTATATCTCCT
 TCTTGCTCTCAGCCTAGCTTCTGTTGCCATGTGCAGAACGCCCTTTTTCATTGGCTGAAGGCATTGTCTTAGCA
 TCAGTGCCTTAGGGCCGCTCATAGAGGGAAACACCAGCCTTCTTTGGAATGGACCCATGGCTGTCTCCATGA
 CAGGAGTCATGAGGGGAAATCACTATGCTTTTGTGGAGTCATGTACAATCTATGGAAGATGAAAACCTGGACG
 CCGGGGAGCGCAATGGAAAACTTTGGGTGAAGTCTGGAAGAGGGAACGAACTGTTGGACAAGCGACAG
 TTTGAGTTGTATAAAAGGACCGACATTGTGGAGGTGGATCGTGATACGGCACGCAGGCATTTGGCCGAAGGGA
 AGGTGGACACCGGGGTGGCGGCTCCAGGGGACCGCAAAGTTAAGGTGGTTCCATGAGCGTGGCTATGTCAA
 GCTGGAAGGTAGGGTGAATTGACCTGGGGTGTGGCCGGGAGGCTGGTGTACTACGCTGCTGCGCAAAGGAA
 GTGAGTGGGGTCAAAGGATTTACTCTTGGAAAGAGACGGCCATGAGAAACCCATGAAATGTGCAAAGTCTGGGAT
 GGAACATCATCACCTTCAAGGACAAAACCTGATATCCACCGCCTAGAACCAGTGAATGTGACACCCTTTTGTG
 TGACATTTGGAGAGTCATCATCGTCATCGGTCACAGAGGGGAAAGGACCGTGAGAGTCTTGTACTGTAGAA
 AAATGGCTGGCTTGTGGGGTTGACAACTTCTGTGTGAAGGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTTGAGA

- SEQ ID NO 6 (续)

图13(续)

AACTGGAATTGCTCCAAAGGAGGTTTGGCGGAACAGTGATCAGGAACCCCTCTCTCCAGGAATTCCACTCATGA
 AATGTACTACGTGTCTGGAGCCCGCAGCAATGTCACATTTACTGTGAACCAAACATCCCGCCTCCTGATGAGG
 AGAATGAGGCGTCCAAC TGAAAAAGTGACCCCTGGAGGCTGACGTCATCCTCCCAATTGGGACACGCAGTGTG
 AGACAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCATAGAAGAAAGGGTTGAGAGGATAAAAATCTGAGTACATGAC
 CTCTTGGTTTTATGACAATGACAACCCCTACAGGACCTGGCACTACTGTGGCTCCTATGTCACAAAAACCTCA
 GGAAGTGC GGCGAGCATGGTAAATGGTGTATTAAAAATCTGACATATCCATGGGACAGGATAGAGGAGGTCA
 CAAGAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTTTGGACAGCAAAGAGTGTTTAAAGAAAAAGTTGACACCAGAGC
 AAAGGATCCACCAGCGGGAAGCTAGGAAGATCATGAAAGTTGTCAACAGGTGGCTGTTCCGCCACCTGGCCAGA
 GAAAAAGAACCCAGACTGTGCACAAAGGAAGAATTTATTGCAAAAAGTCCGAAGTCATGCAGCCATTGGAGCTT
 ACCTGGAAGAACAAGAACAGTGGAAGACTGCCAATGAGGCTGTCCAAGACCCAAAGTTCTGGGAACGGTGGGA
 TGAAGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTGTCCGACTTGTGTGTACAACATGATGGGGAAAAGAGAGAAG
 AAGCTGTCAGAGTTTGGGAAAGCAAAGGGAAGCCGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGCGCGGTATCTTG
 AGTTTGAGGCCCTGGGATTCTGAATGAGGACCATTGGGCTTCCAGGGAAAACCTCAGGAGGAGGAGTGGAAAG
 CATTGGCTTACAATACC TAGGATATGTGATCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACGCGGAT
 GACACCGCTGGATGGGACACGCGCATCACAGAGGCAGACCTTGATGATGAACAGGAGATCTTGAAC TACATGA
 GCCACATCACAAAAAC TGGCACAAGCAGTGATGGAATGACATACAAGAACAAGTGGTGAAAGTGTGAG
 ACCAGCCCCAGGAGGGAAAGCCTACATGGATGTCATAAGTCGACGAGACCAGAGAGGATCCGGGCAGGTAGTG
 ACTTATGCTCTGAACACCATACCAACTTGAAAGTCCAATTGATCAGAATGGCAGAAGCAGAGATGGTGATAC
 ATCACAACATGTTCAAGATTGTGATGAATCAGTTCTGACCAGGCTGGAGGCATGGCTCACTGAGCACGGATG
 TGACAGACTGAAGAGGATGGCGGTGAGTGGAGACGACTGTGTGGTCCGGCCATCGATGACAGGTTCCGGCCTG
 GCCCTGTCCCATCTCAACGCCATGTCCAAGGTTAGAAAGGACATATCTGAATGGCAGCCATCAAAGGGTGGGA
 ATGATTGGGAGAATGTGCCCTTCTGTTCCACCACCTTCATGAACTACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATTGT
 GGTGCCCTTGCCGAGAACAGGACGAGCTCATTGGGAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAG
 GAAACAGCTTGCCCTCAGCAAAGCCTATGCCAACATGTGGTCACTGATGTATTTTCAAAAAGGGACATGAGGC
 TACTGT CATTGGCTGTTTCTCAGCTGTTCCACCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACAACATGGTCGATTCA
 TGGGAAAGGGGAGTGGATGACCACGGAAGACATGCTTGAGGTGTGGAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCA
 CACATGCAGGACAAGACAATGGTGAAAAAATGGAGAGATGTCCCTTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGT
 GCGGATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCCACCTGGGCTCCACATCCATTTAGTCATCCATCGTATCCG
 AACGCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTACCTAACAGTCACTGGACAGGTATTTCTGTGGATGCTGACCTG
 CAACTGGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAACAGGAATAACCGGGATACAACCACGGGTGGAGAACC GGA
 CTCCCCACAACCTGAAACCGGATATAAACCACGGCTGGAGAACC GGGCTCCGCACTTAAATGAAACAGAAA
 CCGGATAAAAACTACGGATGGAGAACC GACTCCACACATTGAGACAGAAGAAGTTGTCAGCCCAGAACCC
 ACACGAGTTTTGCCACTGCTAAGCTGTGAGGCAGTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAAAAACC
 TGGTTTCTGGGACCTCCCACCCAGAGTAAAAAGAACGGAGCCTCCGCTACCACCTCCCACGTGGTGGTAGA
 AAGACGGGCTTAGAGGTTAGAGGAGACCCTCCAGGGAACAAATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGGAAGA
 CCGGAGTGGTTCTCTGCTTTTCTCCAGAGGCTGTGAGCACAGTTTGTCTAAGAA TAAGCAGACCTTTGGAT
 GACAAAACAAAAACCTGCGCCGATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGG
 ACCGTCCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACGAATTCGAAACAGTCTAAAACGAGTAAATAGGACC GGCATTT
 CTTCAAGCAATAAACAGGAATACCAATTATTAAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAAGCTTTGAAGAA
 AAAATGCGCTTATTCAATCTTTGCTATAAAAAATGGCCAAAATCTCACATTGGAGACATTTGATGACCTCA
 TTTCTTTCAATGAAGGGCTAACGGAGTTGACTAATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCTTCTGCCG
 TGGCCAGGACAACGTATACTCATCAGATAACAGCAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTTCTCGGTACTA
 TGCATATGATCCAATATCAAAGGAAATGATAGCATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCAT
 ATAGAACAGCTAAAGGTTAGTGCTGAAGGAAGCATACGATACCCCGCATGGAATGGGATAATATCACAGGAGG
 TACTAGACTACCTTTCATCTACATAAATAGACGCATATAAGTACGCATTTAAGCATAAACACGCCTATGCC
 GTTCTTCTCATGTATATATATATACAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAAGCTGTATGTGC

- SEQ ID NO 6 (续)

图13(续)

GCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAAAGCGCTCGTTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATT
CTCTAGAAAAGTATAGGAAC TTCAGAGCGCTTTTAAAAACCAAAGCGCTCTGAAGACGCACCTTTCAAAAAACC
AAAAACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATTGCGAATACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAAAGTAT
CTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTTTCGCTCCTTGAAC TTGCAT
CTAAACTCGACCTCTACATTTTTTATGTTTATCTCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAAATTGTAGTAAGAAC
TATTCATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAACATTTTCTATACGTAGTATATAGAGACAAAATAG
AAGAAAACCGTTTATAATTTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCCTTTCTGTTTCAAAAAGTATGCGC
AATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATGCCTTTATCTTGAAAAATGCACCCGCGAGCTTCGCTAGTAA
TCAGTAAACGCGGGAAGTGGAGTCAGGCTTTTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTCTA
ACCTTAACGGACCTACAGTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAGTA
ATCTAAGATGCTTTGTTAGAAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTTTGTAGAACAAAAAAGAAGTATAGATTC
TTTGTGGTAAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGA
AATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTTGTTTTACAAAAATGAAGCACAGATTTCTCGTTGGTAAAAATAGCGCTT
TCGCGTTGCATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATTTCTTTGTTTGAAAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCA
TTTTGTTCTACAAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTAACAAAGATATGCTATTGAAGTGAAGATGGAAACGC
AGAAAAATGAACCGGGGATGCGACGTGCAAGATTACCTATGCAATAGATGCAATAGTTTCTCCAGGAACCGAAA
TACATACATTGTCTTCCGTAAGCGCTAGACTATATATTATTATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTTCAGG
GAAAACTCCAGGTTTCGATGTTCAAAATTC AATGATGGGTAACAAGTACGATCGTAAATCTGTAAACAGTT
TGTCGGATATTAGGCTGTATCTCTCAAAGCGTATTCGAATATCATTGAGAAGTGCAGGCAAGTGCACAAC
AATACTTAAATAAATAC TACTCAGTAATAACCTATTTCTTAGCATTTTTTGACGAAAATTTGCTATTTTTGTTAGA
GTCTTTTACACCATTTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCA
CCAACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACATAAAAATGTAAGCTTTTCGGGGCTCTCTGCTTCCAACCC
AGTCAGAAATCGAGTTCCAATCCAAAAGTTCACTGTCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAATAAACGA
ATGAGGTTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTATGTTGCACTTTTTGGAATACGAGTCTTTTAATAACTGGC
AAACCGAGGAACTCTTGGTATTTCTTGCCACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCAT
TGACCAGAGCCAAAACATCCCTCCTTAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTTCCGGAGTGCCTGAACT
ATTTTTATATGCTTTTACAAGACTTGAAATTTTCTTGCAATAACCGGGTCAATTTGTTCTCTTTCTATTGGGC
ACACATATAATACCCAGCAAGTACGATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCTCTGTGCTCTGCAAGCCGC
AACTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTT
AATCAGTATACTCACGTGCTCAATAGTCACCAATGCCCTCCCTCTTGGCCCTCCTCCTTTTCTTTTTTCGAC
CGCTAGCGTCGACAGCGACACACTTGCATCGGATGCAGCCCGTTAACGTGCCGGCACGGCCCTGGGTAACCAG
GTATTTGTCCACATAACCGTGCACAAAATGTTGTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATA
CAACCGCACACCGAGGTTACTCCGTTCTACAGGTTACGACGACATGTCAATACTTGCCTTGACAGGCATTGA
TGGAATCGTAGTCTCACGCTGATAGTCTGATCGACAATAACAAGTGGGACCGTGGTCCCAGACCGATAATCAGA
CCGACAACACGAGTGGGATCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAG
ACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTTCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGG
ACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGA
CGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTA
ATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCG
TGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACAAGTGGAAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTCAGGCCAGTTA
TGCTTTCTGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAAACCGTAGACTAAAACGTGGTTCGCATCAGGG
TGCTGGCTTTTCAAGTTCCTTAAGAATGGCCTCAATTTCTCTATACACTCAGTTGGAAACACGGGACCTGTCC
AGGTTAAGCACCATTTTATCGCCCTTATACAATACTGTGCTCCAGGAGCAAAC TGATGTCGTGAGCTTAAAC
TAGTCTTGATGCAGATGACGTTTTAAGCACAGAAGTTAAAAGAGTGATAACTTCTTCAGCTTCAAATATCAC
CCCAGCTTTTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGCCTGCTGCTTAAGTAATTCCTCTTTATCTGTAAAGGCTTTT
TGAAGTGCATCACCTGACCGGGCAGATAGTTACCGGGGTGAGAAAAAAGAGCAACAACCTGATTTAGGCAATT

- SEQ ID NO 6 (续)

图13(续)

TGGCGGTGTTGATACAGCGGGTAATAATCTTACGTGAAATATTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAATATTTCC
AGCAAATTCATTCTGCAATCGGCTTGATAACGCTGACCACGTTTATAAGCACTTGTTGGGCGATAATCGTTA
CCCAATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCATCCAGCTCGCCAACCAGAACACGATAATCACTTTTCGGTAA
GTGCAGCAGCTTTACGACGGCGACTCCCATCGGCAATTTCTATGACACCAGATACTCTTCGACCGAACGCCGG
TGTTCTGTTGACCAGTCAGTAGAAAAGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCCTCAGTAAGCAGCTCCTGGTCA
CGTTTCATTACCTGACCATACCCGAGAGGTCTTCTCAACACTATCACCCCGGAGCACTTCAAGAGTAAACTTCA
CATCCCGACCACATACAGGCAAAGTAATGGCATTACCGCGAGCCATTACTCCTACGCGCGCAATTAACGAATC
CACCATCGGGGCGAGCTGGTGTGATAACGAAGTATCTTCAACCGGTTGAGTATTGAGCGTATGTTTTGGAATA
ACAGGCGCACGCTTCAATTCTAATCTCCAGCGTGGTTAATCAGACGATCGAAAATTTTATTGCAGACAGG
TTCCCAAATAGAAAGAGCATTTCTCCAGGCACCAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTCAAAAACAGTT
CTCATCCGGATCTGACCTTTACCAACTTCATCCGTTTACAGTACAACATTTTTTTAGAACCATGCTTCCCCAGG
CATCCCGAATTTGCTCCTCCATCCACGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGTATTTGGTAAGCAAAAATACG
TACATCAGGCTCGAACCTTTAAGATCAACGTTCTTACGAGATCACGAAGCATATCGAAAAACTGCAGTGGC
GAGGTGTAGTCAAACAACCTACGAGGCGTGGGAACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGACATTAATCGTGC
CGATACCCAGGTTAGGCGCGCTGTCAATAACTATGACATCATAGTCATGAGCAACAGTTTCAATGGCCAGTGC
GAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGGCGAGTTTACCTTCATCAAATTTGCCATTAACCTCAGTTTCAATACGGTGC
AGAGCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCCGCCAGCAAGTGGGCTTTATTGCATAAGTGACATCGTCTT
TTTCCCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTTTCGATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCCGTTGATACAT
TGAGGCTGTTCCCTGGGGTCTGTTACCTTCCAGGACAAAACACGTAGCCCCCTCAGAGCCAGATCCTGAGCA
AGATGAACAGAAAACCTGAGGTTTGTAAACGCCACCTTATGGGCGCAACCCCGATCACCGGTGGAAATACGT
CTTCAGCACGTCGCAATCGCGTACCAACACATCAGCATATGATTAATTTGTTCAATTGTATAACCAACAGC
TTGCTCAACCCGCTCCTCGAATTTCCATATCCGGGTGCGGTAGTCGCCCTGCTTTCTCGGCATCTCTGATAGCC
TGAGAAGAAAACCCCAACTAAATCCGCTGCTTACCATTCTCCAGCGCCGGTTATTTTCTCGCTTCCGGGC
TGTCATCATTAACCTGTGCAATGGCGATAGCCTTCGTCAATTTATGACCAGCGTTTATGCACTGGTTAAGTGT
TTCCATGAGTTTCATTCTGAACATCCTTTAATCATTTGCTTTTTCGTTTTTTTTTATTAATCTTGCAATTTACTGC
AAAGCAACAACAAAATCGCAAAGTCATCAAAAACCGCAAAGTTGTTTAAAAAAGAGCAACACTACAAAAGG
AGATAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACTTATTACTACTAGCGCTCGCCGAGCCGTTGTAACCGAGCATAGCG
AGCGAACTGGGCGAGGAAGCAAAGAAGAACTGTTCTGTGATAGCTCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATC
CACCGTGGGAAAAACTCCAGGTAGAGGTACACACGCGGATAGCCAATTCAGAGTAAATAACTGTGATAATCAA
CCCTCATCAATGATGACGAACTAACCCCGATATCAGGTCACATGACGAAGGAAAGAGAAGGAAATCAACTG
TGACAAACTGCCCTCAAATTTGGCTTCCCTTAAAAATTACAGTTCAAAAAGTATGAGAAAATCCATGCAGGCTG
AAGGAAACAGCAAAACTGTGACAAATTACCTCAGTAGGTCAGAACAATGTGACGAACCACCCTCAAATCTG
TGACAGATAACCCTCAGACTATCCTGTGTCATGGAAGTATATCGCGGAAGGAAAATACGATATGAGTCGTC
TGGCGGCTTTCTTTTTCTCAATGTATGAGAGGCGCATTTGGAGTTCTGCTGTTGATCTCATTAAACACAGACCT
GCAGGAAGCGGCGGCGGAAGTCAGGCATACGCTGGTAACTTTGAGGCAGCTGGTAAACGCTCTATGATCCAGTC
GATTTTCAGAGAGACGATGCCTGAGCCATCCGGCTTACGATACTGACACAGGGATTCGTATAAACGCATGGCA
TACGGATTGGTGATTTCTTTTGTTCCTAAGCCGAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAAACCGGATAAAGAAGG
GAATGAGATATGGGTTGATATGTACACTGTAAAGCCCTCTGGATGGACTGTGCGCACGTTTGATAAACCAGG
AAAAGATTCATAGCCTTTTTCTATCGCCGGCATCCTCTCAGGGCGATAAAAAACCACTTCCCTCCCCGCGAAA
CTCTTCAATGCCTGCCGTATATCCTTACTGGCTTCCGAGAGGTCAATCCGAATATTTAGCATATTTAGCAA
CATGGATCTCGCAGATACCGTCATGTTTCTGTAGGGTGCATCAGATTTTCTGATCTGGTCAACGAACAGATA
CAGCATACGTTTTTGTATCCCGGGAGAGACTATATGCCGCTCAGTGAGGTCGTTTACTGGACGATTCGCGGG
CTATTTTTACGTTTTCTGTGATGATAACCGCTGTTTCCGCCATGACAGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTT
TTAGATTTGTACACTAAATAAAAAAGAGTCAATAAGCAGGGATAAATTTGTGAAAAACAGCTTCTTCTGAGG
GCAATTTGTACAGGTTAAGGGCAATTTGTACAGACAGGACTGTCAATTTGAGGGTGATTTGTACACTGAA
AGGGCAATTTGTACAAACACCTTCTCTAGAACCAGCATGGATAAAGGCCTACAAGGCGCTTAAAAAAGAAGA

- SEQ ID NO 6 (续)

图13(续)

TCTAAAAACTATAAAAAATAATTATAAAAATATCCCCGTGGATAAGTGGATAACCCCAAGGGAAGTTTTTT
 CAGGCATCGTGTGTAAGCAGAAATATAAAGTGCTGTTCCCTGGTGCTTCCCTCGCTCACTCGACCGGGAGGGTT
 CGAGAAGGGGGGGCACCCCCCTTCGGCGTGCGCGGTACGCGCACAGGGCGCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGT
 TTATAAATATTGGTTTAAAAGCAGGTTAAAAGACAGGTTAGCGGTGGCCGAAAAACGGGCGGAAACCCTTGCA
 AATGCTGGATTTTCTGCCTGTGGACAGCCCCCTCAAATGTCAATAGGTGCGCCCCCTCATCTGTGAGCACTCTGC
 CCCTCAAGTGTCAAGGATCGCGCCCCCTCATCTGTGAGTAGTTCGCGCCCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGCAC
 TTATCCCCAGGCTTGTCCACATCATCTGTGGGAAACTCGCGTAAAATCAGGCGTTTTTCGCCGATTTGCGAGGC
 TGGCCAGCTCCACGTGCGCGCCGAAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCAACGCGCGCGCGGGTGTGAGTCCGCC
 CCTCAAGTGTCAACGTCCGCCCTCATCTGTGAGTGGGGCAAGTTTTCCGCGAGGTATCCACAACGCCGGC
 GCGCGCGCGGGTGTCTCGCACACGGCTTCGACGGCGTTTCTGGCGCGTTTTGCAGGGCCATAGACGGCCGCCA
 GCCAGCGCGGAGGGCAACCAGCCGAGGGCTTCGCCCTGTGCTCGACTGCGCGGAGCACTACTGGCTGTAAA
 AGGACAGACCACATCATGGTTCTGTGTTTATTAGGTTGTTCTGTCCATTGCTGACATAATCCGCTCCACTTCA
 ACGTAACACCGCACGAAGATTTCTATTGTTCTGAAGGCATATTCAAATCGTTTTTCGTTACCGCTTGCAGGCA
 TCATGACAGAACACTACTTCTATAAACGCTACACAGGCTCCTGAGATTAATAATGCGGATCTCTACGATAAT
 GGGAGATTTTCCCGACTGTTTCGTTTCGTTCTCAGTGGATAACAGCCAGCTTCTCTGTTTAAACAGACAAAAAC
 AGCATATCCACTCAGTTCACATTTCCATATAAAGGCCAAGGCATTTATTCTCAGGATAAATTGTTTCAGCATC
 GCAACCGCATCAGACTCCGGCATCGCAAACGACCCGGTGCCGGCAGCCACATCCAGCGCAAAAACCTTCG
 TGTAGACTTCCGTTGAACTGATGGACTTATGTCCCATCAGGCTTTGCAGAACTTTCAGCGGTATACCGGCATA
 CAGCATGTGCATCGCATAGGAATGGCGGAACGTATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTACACCGTCAGCA
 GCAGCGCGGCAACCGCCTCCCAATCCAGGCTCCGACCGTTCTGTCCGTCACCTCCAGATCCGCGCTTTCT
 CTGTCTTCCCTGTGCGACGGTTACGCCGCTCCATGAGCTTATCGCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACT
 TCGCAGAATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGA
 GTTATCGAGATTTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATAT
 CCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAAGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCA
 GCTGGATATTACGGCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACAT
 CTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTGCTATGGCAATGAAAGACGGTGTGAGCTGGTGTATGGGATA
 GTGTTACCCCTTGTACACCGTTTCCATGAGCAAACGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGA
 CGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACCTGGCCTATTTCCCT
 AAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACG
 TGGCAATATGGACAACCTTTCGCCCCGTTTTCCCATGGGCAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCT
 GATGCCGCTGGCGATTAGGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTA
 CAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTTGGTGCCCTTAAACGCCCTG
 GTTGTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGA
 ATTGGTGCACCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTAT
 GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATG
 CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCCTAACTCCGC
 CCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTC

SEQ ID NO 6 (续)

图13(续)

序列 ID NO:7

合成构建体: PSHUTTLE/EV71 (17638 BP)

```

TTAAAACAGCCTGTGGGTTGCACCCACTCACAGGGCCACTGGGCGCTAGTACACTGGTATCTCGGTACCTTT
GTACGCCTGTTTTATACCCCTCCCTGATTTGCAACTTAGAAGCAACGCAAACCAGATCAATAGTAGGTGTA
CATACCAGTCGCATCTTGATCAAGCACTTCTGTATCCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGTGCACACGGTTGA
AGGAGAAAACGTCCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAAACCTAGTAACGCCATGAAGTTGCAGAGTGTTC
GCTCAGCACTCCCCCGTGTAGATCAGGTGCATGAGTACC GCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTG
CGTTGGCGGCCTGCCATGTTGGGTAACCCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGCGTGAAGAGTCTATTGAGCT
AGTTAGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGTTAATCTAAGTGCAGGACACATACCCTTAATCCAAAGGGCAG
TGTGTCGTAAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTCTTTTTATTCTTGTATTG
GCTGCTTATGGTGACAATTAAGAATTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCAGTGTCAAACAGAGCT
ATTGTATATCTCTTTGTTGGATTACACCTCTCACTCTTGAACGTTACACACCCCTCAATTACATTATACTGC
TGAAACGAAGCGATGGGCTCCAGGTCTCCACACAGCGATCCGGCTCGCATGAGAATCCAACCTCAGCCAG
GAAGCTCCACTATAAATTACACAACCATTAATTACTACAAAGACTCGTATGCTGCCACTGCTGGAAAGCAA
GTCTCAAACAAGATCCTGCACAAGTTTGCGAACCCGTGAAGGACATCTTTACTGAAATGGCAGCGCCCTTAAA
GTCTCCCTCTGCTGAAGCATGTGGCTATAGCGACCGAGTGGCAGAGCTTACCATTGGAAATTCACCATTACT
ACACAAGAAGCAGCAAACATAATAGTTGGGTATGGTGGCCTTCATACTGCTCTGATAATGATGCAACAG
CGGTAGACAAAACCTACACGGCTGATGTCTCAGTAAATAGATTTTACACGCTAGACACTAAGCTATGGGAGAA
ATCATCCAAGGGGTGGTACTGGAAGTTCCAGATGTAAGTACTGACTGAAACCGGAGTTTGGTCAAATGCACAA
TTTCACTACTTATACCGTTCAGGGTCTGCATCCAGTCAATGTAACGCTAGCAAATTCACCAAGGGGCGC
TACTCGTTGCGGTATTGCCCCGAGTATGTCAATGGAAACAGTGGCAGGCGGCACAGGCACAGAGAACAGTCACCC
TCCTTATATACAAACCAACCCGGCGCTGATGGATTTGAATTACAACATCCATATGTTCTTGATGCTGGAAAT
CCAATATCTCAGTTGACAGTGTGCCCTCACCAGTGGATCAATTTACGAACCAACAATTTGTGCCACCATAATAG
TGCCATACATGAACACACTACCTTTTGATTCCGCATTGAACCACTGTAATTTCCGACTATTGGTGGTGCCTAT
CAGCCCGCTGGATTTGACCAAGGGGGGACACCCGTAATTCCTATCACTATCACGTGGCTCCGATGTGTTCT
GAGTTTGGGGTCTCAGGCAGGAGTTGCGCAGGGTTCCCCACTGAATTGAAACCTGGCACTAATCAGTTCT
TAACCACGGATGATGGTGTGTCAGCACCTATATTGCCAAATTTCCACCCACCCCGTGCATTACATACCTGG
CGAGGTTAGAACTTACTAGAACTGTGCCAGGTAGAAACCATTTTAGAAGTCAACAATGTGCCACCAACGCA
ACCAGTTTATGGAAGGCTACGGTTTCCAGTGTGAGCCAAAGCAGGGAAAGGTGAGTTGTGTGCAGTGTCA
GGGCCGACCCCTGGGAGGGATGGTCTTGGCAATCCACCATGCTAGGCCAGTTGTGTGGATATTACACCCAAATG
GTCAGGGTCTTTGGAAGTCACTTTTATGTTACCCGATCCTTTATGGCAACTGGTAAAATGCTTATAGCTTAC
ACACCCCGAGGGGGCCCTTTGCCTAAAGATAGAGCCACAGCTATGCTGGGGACGCACGTATCTGGGACTTTG
GCTTGCAATCGTCCGTCACCCCTCGTCATACCATGGATCAGTAACTCACTATAGGGCGCATGCTCGAGATGG
GGTGTGTTGATTACTACACCACAGGTTTGGTTAGTATATGGTACCAAACAATTTATGTAGTCCCTATTGGAGCA
CCTAATACTGCCTATATAATAGCGTTGGCAGCAGCCAAAAGAATTTCACTATGAAATTTGTGCAAGGACACCA
GTGACATTTTGAAACGGCCACTATTCAAGGGGACAGAGTGGCAGATGTGATTGAGAGCTCTATAGGAGATAG
TGTGAGTAAGGCCCTCACCAAGCTTTACCTGCACCCACAGGCCAAAACACCAAGTGAGCAGTCATCGCTTA
GACACTGAAAAGTACCAGCACTTCAAGCCGCCGAAATCGGAGCTTCGTGCAATGCTAGTGTGAGAGTATGA
TTGAGACTCGGTGTGTTCTTAACTCACATAGCACAGCTGAAACCAACCTTGATAGTTTCTTCACTAGAGCAGG
CTTAGTTGGGGAGATAGATCTTCTCTAAAGGGCACCAACATCCGAACGGGTATGCCAACTGGGACATAGAC
ATAACCGGTTATGCGCAGATGCGCAGAAAAGTGGAACTATTCACTATATGCGCTTTGACGCAGAGTTCACTT
TTGTCGCGTGCACACCTACCGGAGAGGTCGTTCCACAGCTGCTTCAATACATGTTTGTTCACCCGGGGCCCC
CAAACCAGACTCCAGAGACTCTTTGGCTTGGCAAACGGCCACGAACCCCTCAGTTTTTGTCAAATTATCCGAC
CCACCAGCACAAGTCTCAGTGCCATTTATGTCACCTGCAAGCGCATACCAATGGTTTTATGACGGATACCCCTA
CATTTGGAGAGCACAAGCAAGAGAAGGATCTCGAGTATGGGGCATGCCGAATAACATGATGGGCACATTTCTC

```

- SEQ ID NO 7

图13(续)

AGTGCGGACTGTGGGATCGTCACAGTCAAAATATCCCTTAGTCATCAGAATATACATGAGAATGAAGCACGTC
 AGAGCGTGGATACCTCGGCCGATGCGCAATCAGAACTATTTGTTCAAATCCAACCCAAACTATGCTGGTAATT
 CCATTAACCAACTGGTACCAGCCGAACGGCAATCACTACGCTCGGGAAATTCGGTCAGCAGTCTGGGGCTAT
 TTATGTGGGCAACCTTAGGGTAGTAAACAGACACCTAGCCACCCATACTGACTGGGCCAACTTGGTGTGGGAA
 GACAGCTCTAGAGACCTCCTAGTTTCTTCAACTACCGCTCAAGGGTGTGACACCATTGCTCGATGTAACCTGCC
 AAACCGGAGTGTATTACTGTAACCTCTCGCAGAAAACACTATCCAGTCAGTTTTTCGAAACCTAGTTTGGTGT
 TGTAGAAGCTAGTGAGTATTATCCAGCTAGATATCAGTCCCATCTTATGCTTGTGAGGGCCATTGAGAACC
 GGTGATTGTGGCGGTATTCTTAGATGCCAACACGGTGTGGTGGGAATTGTCTCCACTGGCGGAAGTGGCCTG
 TGGGATTTGCTGACGTTAGAGATCTTCTGTGGCTAGATGAGGAAGCGATGGAGCAGGGGGTATCTGATTACAT
 CAAAGGTCTCGGTGATGCCCTTCGGCACAGGTTTCACTGACGCGAGTGTCTAGGGAAGTGGGAAGCGTTGAAGAAC
 CACTTAATCGGCTCCGAAGGGGCTGTTGAGAAGATCTTGAAGAAGTGGTGAAGCTAATTTAGCCTTAGTTA
 TAGTCATCAGAAGTGATTATGATATGGTACCCCTCACAGCCACACTAGCTCTGATCGGGTGCACGGGAGTCC
 TTGGCGTGGATCAAATCAAAGACAGCTTCCATACCTGGGCATTCCATGGCACAAAAACAGAGTGCCTCATGG
 CTAAGAAGTTCATGACATGGCAAATGCTGCAAAAGGGCTTGGTGGATTTCACAAAGATCAGTAAGTTCA
 TTGACTGGCTTAAAGAGAAGATCATTCCAGCTGCCAAGAGAAAGTTGAGTTTTTGAACAACCTAAAACAGCT
 CCCCTTGTGGAGAACCAGGCTCCAATCTTGAACAGTCTGCTGCCTCACAAGAAGACTTAGAAGCTATGTTT
 GGTAAATGTGTATATCTGGCTCACTTTTGGCGCAAATCCAACCACTCTACGCACTGAGGCCAAGAGAGTCT
 ACGCTTTAGAGAAAAGGATGAATAACTACATGCAGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCTGTATGCTTGT
 CATCAGAGGTTCCCAGGAACGGGCAAATCGCTCGCCACAGGCATTATAGCTAGAGCCATTGCTGACAAGTAT
 CGCTCTAGTGTATACTCACTCCCCCAGACCCAGATCACTTTGATGGGTATAAGCAACAGGTGGTCACGGTCA
 TGGATGATCTCTGCCAGAACCAGGACGGAAAAGACATGTCCCTATTTTGTCAAATGGTTTCTACAGTAGATTT
 TATACCACCCATGGCATCACTAGAGGAGAAAGGAGTGTCCCTCACCTCTAAGTTTGTCAATTCAGTACGACCAAT
 GCTAGTAACATCATAGTCCCACAGTTTCAGATTGCAATTCGAGGCGATTCTATATGACTGCGATA
 TAGAAGTGACAGATTCCTACAAGACAGACCTCGGTCGGCTGGACGCGAGGTAGAGCTGCCAAGCTTTGTACAGA
 AAAAACACTGCTAATTTCAAGAGATGCAGCCCACTGGTGTGTGGTAAGGCTATTCAGCTGAGAGACAGGAAG
 TCCAAAGTGAGATATAGCGTCGACACCGTGGTATCGGAACTGATCAGAGAGTACAACAATAGATCTGCTATTG
 GGAATACTATAGAAGCACTCTTCAAGGACCCCTAAAATTCAGGCCTATAAGAATTAGTCTCGAAGAAAAGCC
 AGCCCCAGATGCCATTGGTGATTTGCTCGCTAGTGTGATAGCGAGGAGGTCCGACAGTACTGCAGGGAACAA
 GGGTGGATAATCCCGAAACACCAACTAATGTGGAACGTCACCTCAATAGAGCAGTATTGGTAATGCAGTCCA
 TCGCCACTGTGGTTGCAGTTGTGTCTCTTGTATTATGTCATTTATAAGCTGTTTGGCCGGTTCCAGGGTGCFTA
 CTCTGGAGCGCCCAAGCAAATCTCAAGAAGCCCGTGTAAAGAACAGCCACGGTCCAAGGGCCAGCTTAGAC
 TTCGCCTTGTCTCTTTGAGGCGCAACATTAGACAAGCGCAAACCTGACCAAGGACACTTCACCATGCTAGGAG
 TGCGAGATCGCCTAGCCATCCTGCCGCGCCACTCGCAACCAGGGAAGACCATCTGGGTAGAGCATAAAATTAAT
 CAATGTACTAGATGCAGTTGAGTTGGTGGATGAGCAAGGTGTAACCTTGGAACTCACACTGGTAACTTTGGAC
 ACCAATGAAAAATTTAGGGATATACCAAGTTTATCCCAGAAGTGATCACCGGGCGAGTGACGCAACTCTAG
 TCATCAACACTGAGCACATGCCCTCAATGTTTGTGCCGGTGGGTGACGTTGTGCAGTACGGGTTTCTGAACCT
 TAGTGGTAAACCCACACAGAACCATGATGTATAACTTCCCCACGAAGGCAGGACAGTGTGGGGGGTGGTT
 ACCTCAGTTGGTAAGATCATTGAATCCACATTGGCGGGAATGGACGCCAGGGCTTTTGGCTGGCCTAAAGA
 GGAGTTATTTTGGCAGCGAGCAAGGAGAGATCCAGTGGATGAAGCCTAACAGAGAAACCGGGAGGTTGAATAT
 TAAATGGTCCAACCCGAACCTAAGCTGGAACCCAGTGTATTCATGATGTGTTCGAGGGCAACAAGGAACCAGCG
 GTCCCTGACTAGTAAGGACCCAGACTTGAGGTTGATTTTGGCAAGCTTTGTCTCCAAGTATGTGGGTAACA
 CCTGATGAACCTGATGAGTACGTGACACAGGCTGCTCTCCACTACGCAATCAGCTGAAGCAACTGGACAT
 CAACACCAGCAAGATGAGCATGGAAGAAGCGTGTATGGCACAGAATATTTAGAAGCTATAGACTTGCACACC
 AGTGCTGGATACCCTTATAGTGCTTTGGGCATCAAGAAAAGAGACATCCTCGACCCAGTTACCAGAGACACCT
 CCAGGATGAAGTTATATATGGATAAGTATGGGTGGACTTGCCCTTATTCCACTTATGTAAGGATGAGCTTAG
 ATCTCTAGATAAGATCAGAAAAGGGAAGTCTCGCCTGATTGAGGCTAGCAGCTTAAATGATTCTGTCTACCTT

- SEQ ID NO 7 (续)

图13(续)

AGAATGACTTTTGGACACCTTTATGAAGTGTTCACGCCAACCCAGGGACTGTAACAGGATCTGCAGTTGGGT
 GCAACCCTGATGTATTTTGGAGCAAGTTACCAATTTTGTACC GGTTCACTCTTTGCATTTGACTACTCAGG
 ATATGATGCAAGCCTTAGTCCTGTGTGGTTCAGAGCTCTAGAGTTGGTTCAGAGAGATCGGTTACTCGGAG
 GAGGCTGTGTCACTCATAGAAGGGATCAATCACACCCACCACGTGTACCGAAACAAGACATATTGTGTACTTG
 GTGGAATGCCCTCAGGCTGCTCCGGTACTTCCATTTTCAATTCATGATTAACAACATAATCATCAGAACCCT
 CCTGATTA AAAACATTCAAAGGTATAGACTTAGATGAGCTGAAAATGGTAGCTTATGGAGATGACGTGTTGGCC
 AGCTACCCGTTTCTATTGATTGCTTGGAAATTGGCTAAAAACAGGCAAAGAATATGGGCTGACTATGACTCCTG
 CTGATAAATCACCTTGTTCATGAGGTTACCTGGGAGAATGCAACCTTCTTAAAACGCGGTTTTCTACCGGA
 CCATCAGTTCCCTTTTCTGATCCATCCCCTATGCCCATGAGGGAAATCCATGAGTCCATCCGCTGGACCAAG
 GACGCGCGCAATACTCAAGATCATGTGCGCTCCCTTTGTCTCCTGGCATGGCATAATGGAAAAGAGGAGTATG
 AGAAATTTGTGAGTACAATTAGATCAGTCCCCATTGGAAGGGCTTTAGCAATACCAAATTTTGAAGCTTGTAG
 AAGAAATTGGCTCGAGTTATTTTAAACTTACAGCTCAATGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTCTGTCAATG
 ACTGGTGGGGTAAATTTGTTATAACAGAATAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCCG
 CATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCTCGGTAATGGCGAAT
 GGGACGAATTCTGAACCAGTCTTAAAACGAGTAAATAGGACCGGCAATTC'TTCAAGCAATAAACAGGAATACC
 AATTTATAAAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAAGCTTTGAAGAAAAATGCGCCTTATTCAATCTTTGC
 TATAAAAAATGGCCCAAATCTCACATTGGAAGACATTTGATGACCTCATTTCTTCAATGAAGGGCTAACG
 GAGTTGACTAATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCTTCTGCCGTGGCCAGGACAACGTATACTCATC
 AGATAACAGCAATACCTGATCACTACTTCGCAC'TAGTTTCTCGGTACTATGCATATGATCCAATATCAAAGGA
 AATGATAGCATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGCT
 GAAGGAAGCATAACGATACCCCGCATGGAATGGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTTCATCCTACA
 TAAATAGACGCATATAAGTACGCATTTAAGCATAAACACGCACTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATA
 CAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGCAGTGAACAGTGAAGTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAA
 GCGCTCGTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCTTATCCGAAGTTCTTATCTCTAGAAAGTATAGGAAC'TTCAG
 AGCGCTTTTGA AAAACCAAAGCGCTCTGAAGACGCACTTTCAAAAAACCAAACGACCCGGACTGTAACGAG
 CTACTAAAATATTGCGAATACCGCTTCCACAACATTGCTCAAAAAGTATCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCT
 ATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTTGCTCCTTGAAC'TTGCATCTAAACTCGACCTCTACATTTT
 ATGTTTATCTCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAATGTAGTAAGAAC'TATCATAGAGTGAATCGAAAACA
 ATACGAAAATGTAAACATTTCTTATACGTAGTATATAGAGACAAAATAGAAGAACCGTTCATAATTTTCTGA
 CCAATGAAGAATCATCAACGCTATCACTTTCTGTTTCAAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAATATA
 TCGGGGATGCCTTTATCTTGAAAAAATGCACCCGCGAGCTTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGGAAGTGGAGTC
 AGGCTTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTCTAACCTTAACGGACCTACAGTGCAAA
 AAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAGTAATCTAAGATGCTTTGTTAGAAAA
 TAGCGCTCTCGGGATGCATTTTGTAGAACAAAAAGAGTATAGATTCTTTGTTGGTAAAATAGCGCTCTCG
 CGTTGCATTTCTGTTCTGTAAAAATGCAGCTCAGATCTTTGTTTGA AAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTT
 TTGTTTACAAAAATGAAGCACAGATTTCTCGTTGGTAAAATAGCGCTTTTCGCGTTGCATTTCTGTTCTGTAA
 AAATGCAGCTCAGATCTTTGTTTGA AAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTGTCTACAAAATGAAGCAC
 AGATGCTTCGTTAACAAAGATATGCTATTGAAGTGCAAGATGGAAACGCAGAAAATGAACCGGGGATGCGACG
 TGCAAGATTACCTATGCAATAGATGCAATAGTTTCTCCAGGAACCGAAATACATACATTGTCTTCCGTAAGC
 GCTAGACTATATATTATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTTCAGGGAAAAC'TCCAGGTTCCGGATGTTT
 AAAATCAATGATGGGTAACAAGTACGATCGTAAATCTGTAAAACAGTTTGTGCGGATATTAGGCTGTATCTCC
 TCAAAGCGTATTGCAATATCATTTGAGAAGCTGCAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAG
 TAATAACCTATTTCTTAGCATTTTGTGACGAAATTTGCTATTTTGTAGAGTCTTTTACACCATTTGTCTCCAC
 ACC'TCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTTAATCTAAGCGCATCACCAACATTTTCTGGCGTCAGTCCA
 CCAGCTAACATAAAAATGTAAGCTTTCCGGGCTCTCTTGCTTCCAACCCAGTCAGAAAATCGAGTTCCAATCCA
 AAAGTTCACCTGTCCCACCTGCTTCTGAATCAACAAGGGAATAAACGAATGAGGTTTCTGTGAAGCTGCACT

- SEQ ID NO 7 (续)

图13(续)

GAGTAGTATGTTGCAGTCTTTTGGAAATACGAGTCTTTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACTCTTGGTATTCT
 TGCCACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGACCAGAGCCAAAACATCCTCCT
 TAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTTTCGGAGTGCCTGAACTATTTTATATGCTTTTACAAGACT
 TGAAATTTTCTTGCATAAACCGGGTCAATTGTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACCCAGCAAGTCA
 GCATCGGAATCTAGAGCACATTTCTGCGGCTCTGTGCTCTGCAAGCCGCAAACTTTACCAATGGACCAGAAC
 TACCTGTGAAATTAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTTAATCACGTATACTCACGTGCTCAA
 TAGTCACCAATGCCCTCCCTCTTGGCCCTCCTCCTTTTCTTTTTTCGACCGCTAGCGTGCACAGCGACACT
 TGCATCGGATGCAGCCCGTTAACGTGCCGGCACGGCTGGGTAACCAGGTATTTTGTCCACATAACCGTGGC
 CAAAATGTTGTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATACAACCGCACACCGAGGTTACTCCG
 TTCTACAGGTTACGACGACATGTCAATACTTGCCTTGCAGGCAATTGATGGAATCGTAGTCTCACGCTGATA
 GTCTGATCGACAATAACAAGTGGGACCGTGGTCCCAGACCGATAATCAGACCGACAACACGAGTGGGATCGTGG
 TCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACG
 AGTGGGACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCA
 GACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCC
 AGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGT
 GGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACC
 GACGATACAAGTGAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTCAGGCCAGTTATGCTTCTGGCCTGTAACAAAGGA
 CATTAAAGTAAAGACAGATAAACGTAGACTAAAACGTGGTCGCATCAGGGTGTGGCTTTTCAAGTCTTTAAG
 AATGGCCTCAATTTTCTCTATACACTCAGTTGGAACACGGGACCTGTCCAGGTTAAGCACCATTTTATCGCCC
 TTATACAATACTGTGCTCCAGGAGCAAACCTGATGTCGTGAGCTTAAACTAGTTCTTGATGCAGATGACGTTT
 TAAGCACAGAAGTTAAAAGAGTGATAACTTCTTCAGTTCAAAATATCACCCAGCTTTTTTCTGCTCATGAAG
 GTTAGATGCCTGCTGCTTAAGTAATTCCTCTTTATCTGTAAAGGCTTTTTTGAAGTGCATCACCTGACGGGCA
 GATAGTTACCGGGGTGAGAAAAAGAGCAACAACCTGATTTAGGCAATTTGGCGGTGTTGATACAGCGGTTAA
 TAACTTACGTGAAATATTTTCCGCATCAGCCAGCCAGAAATATTTCCAGCAAATTCATTCTGCAATCGGCT
 TGCATAACGCTGACCAGTTCATAAGCACTTGTGGGCGATAATCGTTACCCAATCTGGATAATGCAGCCATC
 TGCTCATCAGCTCGCCAACAGAACACGATAATCACTTTCGGTAAGTGCAGCAGCTTTACGACGGCGAC
 TCCCATCGGCAATTTCTATGACACCAGATACTCTCGACCGAACCGGTGTCTGTGACCACTCAGTAGAAA
 AGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCCTCCTCAGTAAGCAGCTCCTGGTACGTTTACCTGACCATAACCCGA
 GAGGCTTCTCAACACTATCACCCGGAGCACTTCAAGAGTAAACTTCACATCCGACCACATACAGGCAAAG
 TAAAGGATACCGCGAGCCATTACTCCTACGCGCGCAATTAACGAATCCACCATCGGGGACGCTGGTGTGCA
 TAACGAAGTATCTTCAACCGGTTGAGTATTGAGCGTATGTTTTGGAATAACAGGCGCACGCTTATTATCTAA
 TCTCCAGCGTGGTTTTAATCAGACGATCGAAAATTTCAATGACAGAGTTCCCAAATAGAAAGAGCATTTCT
 CCAGGCACAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTCAAAAACAGTTCATCCGGATCTGACCTTTACCA
 ACTTCATCCGTTTACGTACAACATTTTTTAGAACCATGCTTCCCAGGCATCCCGAATTTGCTCCTCCATCC
 ACGGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGTATTGGTAAGCAAAATACGTACATCAGGCTCGAACCCTTAAG
 ATCAACGTTCTTGAGCAGATCAGGAAGCATATCGAAAACTGCAGTGGGAGGTGTAGTCAAACAACCTCAGCA
 GCGTGGGAACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGACATTAATCGTGCCGATACCCAGGTTAGGCGCGCTGT
 CAATAACTATGACATCATAGTCATGAGCAACAGTTCAATGGCCAGTCGGAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGG
 CAGTTTACCTTCATCAAATTTGCCATTAATCAGTTTCAATACGGTGCAGAGCCAGACAGGAAGGAATAATG
 TCAAGCCCCGGCCAGCAAGTGGGCTTTATTGCATAAGTGACATCGTCTTTTTCCCAAGATAGAAAGGCAGGA
 GAGTGTCTTCTGCATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCCGTGATACATTGAGGCTGTTCCCTGGGGTCTGTT
 ACCTTCCAGGCAAAACACGTAGCCCCTCAGAGCCAGATCCTGAGCAAGATGAACAGAAACTGAGGTTTTG
 TAAACGCCACCTTTATGGGCAGCAACCCGATCACCGGTGGAATAACGTCCTTTCAGCAGCTCGCAATCGCGTAC
 CAAACACATCAGCATATGATTAATTTGTTCAATTGTATAACCAACACGTTGCTCAACCCGCTCCTCGAATTC
 CATATCCGGGTGCGGTAGTCGCCCTGCTTCTCGGCATCTCTGATAGCCTGAGAAGAAACCCCAACTAAATCC
 GCTGCTTACCTATTCTCCAGCGCCGGGTTATTTCTCGCTTCCGGGCTGTATCATTAACCTGTGCAATGG

- SEQ ID NO 7 (续)

图13(续)

CGATAGCCTTCGTCATTTTCATGACCAGCGTTTTATGCACTGGTTAAGTGTTTTCCATGAGTTTCATTCTGAACAT
CCTTTAATCATTGCTTTGCGTTTTTTTTATTAAATCTTGCAATTTACTGCAAAGCAACAACAAAATCGCAAAGT
CATCAAAAAACCGCAAAGTTGTTTAAAAATAAGAGCAACACTACAAAAGGAGATAAGAAGAGCACATACCTCAG
TCACTTATTATCACTAGCGCTCGCCGCGAGCCGTGTAACCGAGCATAGCGAGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGA
AGAACTGTTCTGTGATAGCTCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATCCACCGTGGGAAAAACTCCAGGTAG
AGGTACACACGCGGATAGCCAATTCAGAGTAATAAACTGTGATAATCAACCCTCATCAATGATGACGAACATA
CCCCGATATCAGGTCACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTGTGACAAACTGCCCTCAAATTTGGC
TTCCTTAAAAATTACAGTTCAAAAAGTATGAGAAAATCCATGCAGGCTGAAGGAAAACAGCAAAAATGTGACAA
ATTACCCCTCAGTAGGTCAGAACAAATGTGACGAACCACCCTCAAATCTGTGACAGATAACCCCTCAGACTATCC
TGTCGTCATGGAAGTGATATCGCGGAAGGAAAATACGATATGAGTCGCTCGCGGCCCTTTCTTTTTCTCAATG
TATGAGAGGCGCATTGGAGTTCTGCTGTTGATCTCATTAACACAGACCTGCAGGAAGCGGCGCGGAAGTCAG
GCATACGCTGGTAACTTTGAGGCGAGCTGGTAACGCTCTATGATCCAGTCGATTTTCAGAGAGACGATGCCGTA
GCCATCCGGCTTACGATACTGACACAGGGATTCTGATAAAACGCATGGCATACGGATTGGTGATTTCTTTTTGTT
TCACTAAGCCGAAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAACCCGATAAAGAAGGGAATGAGATATGGGTTGATATGTA
CACTGTAAAGCCCTCTGGATGGACTGTGCGCACGTTTGATAAACCAAGGAAAAGATTCATAGCCTTTTTTCATC
GCCGCATCCTCTTCAGGGCGATAAAAAACCACCTTCTTCCCGCGAAACTCTTCAATGCCTGCCGTATATCC
TTACTGGCTTCCGAGAGGTCATCCGAATATTTTCCAGCATATTTAGCAACATGGATCTCGCAGATACCGTCAT
GTTCTGTAGGGTGCCATCAGATTTTTCTGATCTGGTCAACGAACAGATACAGCATACGTTTTTTGATCCCGGA
GAGACTATATGCCGCTCAGTGAGGTCGTTTACTGGACGATTTCGCGGCTATTTTTACGTTTTCTGTGATTG
ATAACCGCTGTTTTCCGCCATGACAGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTTTTAGATTGTACACTAAATAAAAA
AGAGTCAATAAGCAGGGATAACTTTGTGAAAAACAGCTTCTTCTGAGGGCAATTTGTCACAGGGTTAAGGGC
AATTTGTCACAGACAGGACTGTCATTTGAGGGTGATTTGTCACACTGAAAGGGCAATTTGTCACAACACCTTC
TCTAGAACCAGCATGGATAAAGGCCCTACAAGGCGCTCTAAAAAAGAAGATCTAAAAACTATAAAAAAATAAT
TATAAAAAATATCCCCGTGGATAAGTGGATAACCCCAAGGGAAGTTTTTTTTCAGGCATCGTGTGTAAGCAGAATA
TATAAGTGCTGTTCCCTGGTGCTTCTCGCTCACTCGACCGGGAGGGTTCGAGAAGGGGGGACCCCCCTTC
GGCGTGCGGGTACGCGCACAGGGGCGCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGTTTATAAAATATTGGTTTAAAAAGCAG
GTTAAAAGACAGGTTAGCGGTGGCCGAAAAACGGCGGAAACCCCTTGCAAATGCTGGATTTTCTGCCTGTGGA
CAGCCCCCAAATGTCAATAGGTGCGCCCCCTCATCTGTGACACTCTGCCCTCAAGTGTCAAGGATCGCGCC
CCTCATCTGTGAGTAGTCGCGCCCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGCACTTATCCCCAGGCTTGTCCACATCA
TCTGTGGGAAACTCGCGTAAAAATCAGGCGTTTTTCGCCGATTTGCGAGGCTGGCCAGCTCCACGTGCGCGGCCG
AAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCAACGCCGCGCCGGGTGAGTCGGCCCCCTCAAGTGTCAACGTGCGCCCCCT
CATCTGTGAGTGAAGGCCAAGTTTTCCGCGAGGTATCCACAACGCCGGCGGCCGCGCGGTGTCTCGCACAC
GGCTTCGACGGCGTTTTGCGCGGTTTGCAGGGCCATAGACGGCCGCCAGCCAGCGGGCGAGGGCAACCAGCC
GAGGGCTTCGCCCTGTGCTCGACTGCGGCGAGCACTACTGGCTGTAAAAGGACAGACCACATCATGGTTCTG
TGTTCAATTAGGTTGTTCTGTCCATTGCTGACATAATCCGCTCCACTTCAACGTAACACCGCACGAAGATTTCT
ATTGTTCTGAAGGCATATTCAAATCGTTTTCTGTTACCCTTGCAGGCATCATGACAGAACAATACTTCTTAT
AAACGCTACACAGGCTCCTGAGATTAATAATGCGGATCTCTACGATAATGGGAGATTTTCCCGACTGTTTCGT
TCGCTTCTCAGTGGATAACAGCCAGCTTCTCTGTTTAAACAGACAAAACAGCATATCCACTCAGTTCACAT
TCCATATAAAGGCCAAGGCATTTATTCTCAGGATAATGTTTTCAGCATCGCAACCGCATCAGACTCCGGCATC
GCAAACTGCACCCGGTGCAGGGCAGCCACATCCAGCGCAAAAACCTTCGTGTAGACTTCCGTTGAACTGATGG
ACTTATGTCCCATCAGGCTTTCAGAACTTTTCAGCGGTATACCGGCATACAGCATGTGCATCGCATAGGAATG
GCGGAACGTATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTCACACCGTCAGCAGCAGCGGGCGGAACCGCCTCCCA
ATCCAGGTCTGACCGTTCTGTCCGTCACCTCCAGATCCGCGCTTTCTCTGTCTTCTGTGCGACGGTTAC
GCCGCTCCATGAGCTTATCGCGAATAAATACCTGTGACGGAAAGATCACTTCGCGAATAAATAAATCCTGGTG
TCCCTGTTGATACCGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTT
CAACTTTCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAG

- SEQ ID NO 7 (续)

图13(续)

GAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATT
TTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAA
GACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCAT
CCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTTGTTACACCGTTT
TCCATGAGCAAACGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACAT
ATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTT
TTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTGTATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTCTTCG
CCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTCA
TCATGCCGTTTTGTGATGGCTTCCATGTCCGCAGAAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAG
GGCGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTGAATAAGTGATA
ATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTGGTCGACCCTGTGGAATGTGT
GTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC
AGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCA
GCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCC
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGCCGCCTC

SEQ ID NO 7 (续)

图13(续)