



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112094354 B

(45) 授权公告日 2021.02.02

(21) 申请号 202011219753.3

(22) 申请日 2020.11.05

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112094354 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(73) 专利权人 苏州世诺生物技术有限公司

地址 215000 江苏省苏州市吴中区苏州工业园区若水路388号D座506室

(72) 发明人 曹文龙 孔迪 滕小铭 张大鹤

(74) 专利代理机构 南京利丰知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 32256

代理人 王锋

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 0824358 B1, 2002.04.12

CN 108290961 A, 2018.07.17

US 9375467 B2, 2016.06.28

EP 1923399 A1, 2008.05.21

CN 1597693 A, 2005.03.23

Yi-Ping Wang等. The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities.《Veterinary Microbiology》.2014,

审查员 苏存生

权利要求书1页 说明书11页

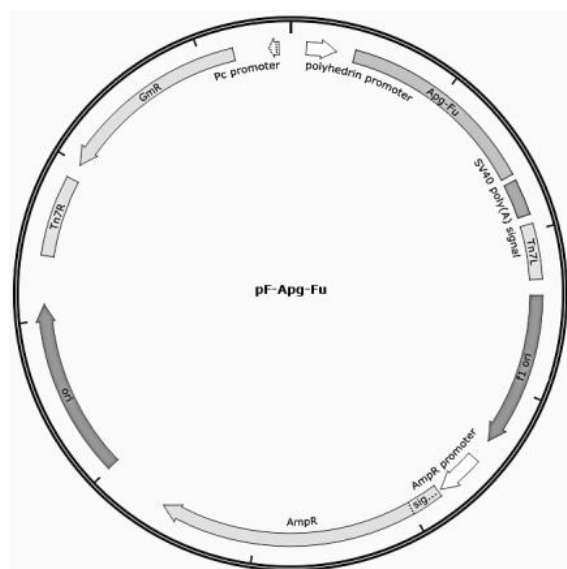
序列表6页 附图4页

(54) 发明名称

副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用。所述疫苗包含融合蛋白以及医药学上可接受的载剂,所述融合蛋白具有SEQ ID NO:2所示序列。本发明提供的所述疫苗无任何毒性,安全性高,免疫原性好,能够在鸡体内产生较强的体液免疫,免疫后的鸡能够抵御强毒攻毒,并且还可以使用生物反应器大规模无血清悬浮培养制备,具有质控容易、批次间稳定、生产成本低等优点。



1. 一种融合蛋白,其序列如SEQIDNO:2所示。
2. 用于编码权利要求1所述融合蛋白的基因。
3. 如权利要求2所述的基因,其特征在于:所述基因的序列如SEQIDNO:1所示。
4. 包含权利要求1所述融合蛋白的编码基因的重组载体或宿主细胞。
5. 一种免疫组合物,其特征在于包括:权利要求1所述的融合蛋白;以及,医药学上可接受的载剂。
6. 如权利要求5所述的免疫组合物,其特征在于:所述医药学上可接受的载剂包括白油、硬脂酸铝、司本、吐温之中的任意一种或者两种以上的组合。
7. 一种融合蛋白的制备方法,其特征在于包括:
提供权利要求1所述融合蛋白的编码基因;
将所述融合蛋白的编码基因克隆到穿梭载体中,获得含有目的基因的重组穿梭载体;
将所述重组穿梭载体转化感受态细胞,并分离获得含有目的基因表达框的重组杆状病毒基因组质粒;
以所述重组杆状病毒基因组质粒转染昆虫细胞,并获得重组杆状病毒;
将所述重组杆状病毒接种昆虫细胞并进行培养,之后分离获得所述融合蛋白。
8. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于:所述穿梭载体包括pFastBac1、pVL1393或pFastBacDual。
9. 如权利要求7所述的制备方法,其特征在于:所述昆虫细胞选自Sf9、HighFive或Sf21细胞。
10. 一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗的制备方法,其特征在于包括:采用权利要求7-9中任一项所述的方法制备融合蛋白,并将所述融合蛋白与医药学上可接受的载剂混合。
11. 如权利要求1所述融合蛋白或权利要求5或6所述免疫组合物在生产用于在受试动物中诱导针对副鸡禽杆菌抗原的免疫反应的药剂,或者,在生产用于预防动物受副鸡禽杆菌感染的药剂中的用途。
12. 如权利要求1所述融合蛋白或权利要求5或6所述免疫组合物在制备副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗中的用途。

副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基因工程疫苗,具体涉及一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用,属于动物免疫药物技术领域。

背景技术

[0002] 鸡传染性鼻炎(Infectious Coryza, IC)是由副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*, Apg)引起的一种急性鸡上呼吸道感染病。该病发生后可引起蛋鸡产蛋量下降、育成鸡生长发育受阻和淘汰率增加、肉鸡肉质下降等问题;剖检后以鼻腔和窦粘膜呈现急性卡他性炎症,呼吸道粘膜充血、发红和肿胀为主要特征。Apg可感染任何年龄段鸡群,4周龄以上的育成鸡和产蛋鸡的敏感性较高。病鸡与隐形带菌鸡是主要的传染源,Apg通过消化道排泄物、呼吸道、大气、尘埃和饲料等传播,后期容易和其他病原体混合感染,造成鸡群死亡率很高。目前IC在世界许多地方发生和流行,给养鸡业造成巨大经济损失。

[0003] Apg原名副鸡嗜血杆菌(*Haemophilus paragallinarum*, Hpg),属于巴氏杆菌科禽杆菌属,是一种革兰氏阴性的细小杆菌,长1-3 μ m,宽0.4-0.8 μ m,两极浓染、没有运动性、不形成芽孢,毒力菌株往往具有荚膜,但这种能力在体外传代时容易丧失。根据血凝抑制试验的分型方法,Apg分为A型、B型和C型三个血清型,目前的研究结果表明A、C两型Apg均具有不同程度的致病力,而B型致病力因菌株而异。人工感染任一型的Apg后可对其它两型感染产生一定程度的抵抗力,但三者的灭活菌体不存在型间交叉免疫,A型存在型内的交叉免疫,B型存在株间抗原多样性和部分交叉免疫。血凝素(Haemagglutinin, HA)是Apg的主要抗原成分之一,也是Apg分型的基础,在细菌定植过程中起关键作用。HA作为Apg的一种保护性抗原,不同血清型的Apg菌株的HA基因的同源性在95%以上,可与Apg的阳性血清发生反应,因此HA也是研究Apg基因工程亚单位疫苗的最适合抗原成分。菌毛是革兰阴性菌菌体表面密布的细而短的丝状物,由结构蛋白亚单位菌毛蛋白(pilin)组成,具有抗原性。在巴氏杆菌科的其他菌属中,菌毛作为细菌表面的一种常在结构,在细菌与细胞作用、DNA的摄取和转移以及生物被膜的形成中都发挥了重要的作用。

[0004] 定期进行免疫接种是我国和世界许多国家预防IC的重要手段,目前国际上普遍使用的多为灭活疫苗,大多只包含A型和C型血清型,但Apg的三个血清型之间不具有交叉保护力,导致灭活疫苗不能起到全面地保护作用,而且Apg还含有LPS等毒素物质,大量接种会带毒副作用,从而影响鸡的产蛋和生长。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的在于提供一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用,以克服现有技术中的不足。

[0006] 为实现前述发明目的,本发明采用的技术方案包括:

[0007] 本发明实施例提供了一种融合蛋白,其具有SEQ ID NO:2所示序列或者与SEQ ID NO:2的全长序列95%以上相同的序列。

[0008] 即,本发明实施例提供的所述融合蛋白的氨基酸序列可以是原始序列,增加或截短的序列。

[0009] 本发明实施例还提供了用于编码所述融合蛋白的基因。

[0010] 在一些实施方式中,所述的基因具有SEQ ID NO:1所示序列或者与SEQ ID NO:1的全长序列95%以上相同的序列。

[0011] 本发明实施例还提供了包含所述融合蛋白的编码基因的重组载体。

[0012] 在一些实施方式中,所述重组载体包括但不限于pFastBac 1、pVL1393、pFastBac Dual等,例如可以优选采用pFastBac 1。

[0013] 本发明实施例还提供了包含所述融合蛋白的编码基因的宿主细胞。

[0014] 在一些实施方式中,所述宿主细胞选自昆虫细胞,例如Sf9细胞系,优选的,所述Sf9细胞系包括但不限于Sf9、High Five或 Sf21细胞,更优选为Sf9细胞。

[0015] 本发明实施例还提供了一种免疫组合物,其特征在于包括:所述的融合蛋白;以及,医药学上可接受的载剂。

[0016] 在一些实施方式中,所述医药学上可接受的载剂包括但不限于白油、硬脂酸铝、司本、吐温中的任意一种或者两种以上的组合。

[0017] 本发明实施例还提供了一种融合蛋白的制备方法,其包括:

[0018] 提供所述融合蛋白的编码基因;

[0019] 将所述融合蛋白的编码基因克隆到穿梭载体中,获得含有目的基因的重组穿梭载体;

[0020] 将所述重组穿梭载体转化感受态细胞,并分离获得含有目的基因表达框的重组杆状病毒基因组质粒;

[0021] 以所述重组杆状病毒基因组质粒转染昆虫细胞,并获得重组杆状病毒;

[0022] 将所述重组杆状病毒接种昆虫细胞并进行培养,之后分离获得所述融合蛋白。

[0023] 在一些实施方式中,所述穿梭载体包括但不限于pFastBac 1、pVL1393、pFastBac Dual等,例如可以优选采用pFastBac 1。

[0024] 在一些实施方式中,所述昆虫细胞可以包括但不限于Sf9、High Five或 Sf21细胞等,优选为Sf9细胞。

[0025] 本发明实施例还提供了一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗的制备方法,其包括:采用前述的任一种方法制备融合蛋白,并将所述融合蛋白与医药学上可接受的载剂混合。

[0026] 本发明实施例还提供了所述融合蛋白或所述免疫组合物在制备副鸡禽杆菌检测试剂,在生产用于在受试动物中诱导针对副鸡禽杆菌抗原的免疫反应的药剂,或者,在生产用于预防动物受副鸡禽杆菌感染的药剂中的用途。

[0027] 本发明实施例还提供了所述融合蛋白或所述免疫组合物在制备副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗中的用途。

[0028] 本发明实施例提供了一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗,其包含前述的任一种免疫组合物。进一步的,所述疫苗还可包含医药学上可接受的载剂。

[0029] 本发明实施例还提供了包含所述融合蛋白的编码基因的重组载体或宿主细胞在生产用于检测动物受副鸡禽杆菌感染的试剂的用途。

[0030] 本发明实施例还提供了包含所述融合蛋白的编码基因的重组载体或宿主细胞在生产用于在受试动物中诱导针对副鸡禽杆菌抗原的免疫反应的药剂的用途。

[0031] 本发明实施例还提供了包含所述融合蛋白的编码基因的重组载体或宿主细胞在生产用于预防动物受副鸡禽杆菌感染的药剂的用途。

[0032] 本发明实施例还提供了一种诱导针对副鸡禽杆菌抗原的免疫反应的方法,所述方法包括向受试动物施用所述副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗。

[0033] 本发明实施例还提供了一种保护受试动物免受副鸡禽杆菌感染的方法,所述方法包括向受试动物施用所述副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗。

[0034] 本发明实施例还提供了一种适用于在受试动物中产生针对副鸡禽杆菌感染的免疫反应的疫苗,所述疫苗包含:本发明的融合蛋白以及佐剂分子。

[0035] 如本说明书所述的“佐剂”意指被添加到本说明书所述的疫苗中来增强由下文所述编码核酸序列的所编码的抗原的免疫原性的任何分子。例如,所述佐剂可为IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、血小板源性生长因子(PDGF)、TNF α 、TNF β 、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、IL-21、IL-31、IL-33或其组合;并且在一些实施方式中,可为IL-12、IL-15、IL-28或RANTES。进一步的,所述佐剂可以优选采用苏州世诺生物技术有限公司生产的相关佐剂,以提高疫苗效果。

[0036] 较之现有技术,本发明实施例设计了一种新的副鸡禽杆菌融合蛋白,该融合蛋白(可以命名为Apg-Fu)包含A、B、C三型鼻炎菌血凝素抗原的主要抗原片段以及保守菌毛蛋白抗原片段。单独的保守菌毛蛋白尽管在A、B、C三型鼻炎菌中保守,交叉保护好,但是免疫原性差,保护能力弱,但本发明实施例中将保守菌毛蛋白与血凝素蛋白抗原片段融合后,保护率显著提高。本发明实施例设计的融合蛋白表达量高,免疫原性好,并且能够抵御A、B、C三种不同血清型副鸡禽杆菌的攻击,保护率显著提高,且所述融合蛋白可以通过杆状病毒昆虫细胞表达系统,使用悬浮培养Sf9细胞等进行表达和大规模无血清悬浮培养制备,大大降低了疫苗生产成本,同时所获产品的抗原性、免疫原性和功能与天然蛋白质相似,表达水平较高,免疫原性强,只需要很少量就能提供很好的免疫效果,对鸡没有致病性,适于作为副鸡禽杆菌重组基因工程亚单位疫苗广泛应用。

附图说明

[0037] 为了更清楚地说明本发明实施方式的技术方案,下面将对实施方式中所需要使用的附图作简单的介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0038] 图1是实施例1中密码子优化的Apg-Fu基因PCR扩增产物的凝胶电泳图,其中在1.4kbp位置出现目的条带。

[0039] 图2是实施例1中菌落PCR扩增产物的凝胶电泳图,其中在1.4kbp位置出现目的条带。

[0040] 图3是实施例1中转移载体pF-Apg-Fu的结构示意图。

[0041] 图4是实施例3所获rBac-Apg-Fu细胞培养物的SDS-PAGE检测图谱。

[0042] 图5是实施例4所获SDS-PAGE电泳后产物的化学发光成像图。

[0043] 图6是实施例6中接种重组杆状病毒、空杆状病毒的Sf9细胞的荧光检测图谱。

[0044] 图7是实施例9所获的纯化后融合蛋白的灰度扫描图。

具体实施方式

[0045] 应该指出,以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本说明书使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0046] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0047] 本发明实施例主要通过在一个包含A、B、C三种血清型副鸡禽杆菌血凝素抗原主要抗原片段的融合蛋白上添加保守的菌毛蛋白抗原片段,形成一个新型的副鸡禽杆菌融合蛋白,该融合蛋白(可以命名为Apg-Fu)表达量高,免疫原性好,并且能够抵御A、B、C三种不同血清型副鸡禽杆菌的攻击,保护率显著提高,此外还安全无毒。

[0048] 进一步的,前述融合蛋白可以基于杆状病毒昆虫细胞表达系统,使用悬浮培养Sf9细胞进行表达,其不仅表达水平较高,而且蛋白免疫原性好。

[0049] 进一步的,前述融合蛋白可以用于制备副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗。

[0050] 例如,在本发明实施例的一个具体实施方案中,一种副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗的制备方法具体可以包括:

[0051] (1)制备用于编码所述融合蛋白的核酸分子;

[0052] (2)将步骤(1)中制备的编码所述融合蛋白的核酸分子克隆到穿梭载体中,得到含有目的基因的重组穿梭载体;

[0053] (3)将步骤(2)获得的重组穿梭载体转化DH10Bac菌,挑选重组菌,抽提基因组转染Sf9细胞(或前述的其它昆虫细胞),获得重组杆状病毒;

[0054] (4)培育所述Sf9细胞(或前述的其它昆虫细胞)进而重组表达产生融合蛋白;

[0055] (5)将所述融合蛋白混合加入到佐剂中,得到所述疫苗。

[0056] 本发明实施例的该具体实施方案中,使用Sf9细胞表达融合蛋白Apg-Fu,产品的抗原性、免疫原性和功能与天然蛋白质相似,表达水平较高,免疫原性强,对鸡没有致病性,并且疫苗可以使用生物反应器大规模无血清悬浮培养制备,也大大降低了疫苗生产成本。

[0057] 本发明实施例提供的副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗无任何毒性,安全性高,免疫原性好,能够在鸡体内产生较强的体液免疫,免疫后的动物能够抵御强毒攻毒,且还具有可以大规模批量生产、质控容易、批次间稳定、生产成本低等一系列优点。

[0058] 本发明实施例提供的副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗在应用时,只需将有效量接种于鸡。如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。

[0059] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实

施例范围之中。下列实施例中所用试剂和原料均市售可得,而其中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。又及,除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley& Sons,New York,1987 and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin (P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols (P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0060] 实施例1 转移载体pF-Apg-Fu构建与鉴定

[0061] 1.Apg-Fu基因扩增与纯化

[0062] 在南京金斯瑞生物科技有限公司合成了密码子优化的Apg-Fu基因(SEQ ID NO:1)并克隆到pUC17载体上,得到pUC-Apg-Fu质粒载体。以pUC-Apg-Fu质粒作为模板,Apg-Fu-F、Apg-Fu-R作为上下游引物进行PCR扩增(Apg-Fu-F、Apg-Fu-R的基因序列如SEQ ID NO:3、4所示),扩增体系见表1。

[0063] 表1 Apg-Fu基因扩增体系

[0064]	反应成分	单位 (μL)
	pUC-Apg-Fu 质粒	1
	Apg-Fu-F 引物	2
	Apg-Fu-R 引物	2
	2× PCR MasterMix	25
	ddH ₂ O	20

[0065] 反应条件为:95℃预变性5分钟;94℃变性45秒,54℃退火45秒,72℃延伸1分钟,35个循环;72℃延伸10分钟。

[0066] 将PCR产物进行凝胶电泳验证目的基因大小,如图1所示,在1.4 kbp的位置出现目的条带,目的基因扩增成功,用凝胶回收纯化试剂盒进行回收纯化。

[0067] 2.酶切与纯化

[0068] 将pFastBac 1质粒和Apg-Fu基因PCR扩增产物使用BamH I、Hind III 37℃双酶切3小时,具体酶切反应体系见表2、表3。

[0069] 将酶切产物进行凝胶电泳,分别使用凝胶回收纯化试剂盒纯化酶切的pFastBac 1质粒以及Apg-Fu基因片段。

[0070] 表2 Apg-Fu基因酶切反应体系

[0071]

反应成分	单位 (μL)
PCR 产物	20
反应 Buffer	5
BamH I酶	2
Hind III酶	2
ddH ₂ O	21

[0072] 表3 pFastBac 1质粒酶切反应体系

[0073]

反应成分	单位 (μL)
pFastBac 1 质粒	10
反应 Buffer	5
BamH I酶	2
Hind III酶	2
ddH ₂ O	31

[0074] 3.连接

[0075] 将酶切过的pFastBac 1质粒和Apg-Fu基因酶切产物使用T4 DNA连接酶16℃水浴连接过夜,连接体系见表4。

[0076] 表4 Apg-Fu基因与pFastBac 1质粒连接体系

[0077]

反应成分	单位 (μL)
Apg-Fu 基因酶切产物	6
酶切质粒	2
反应 Buffer	1
T4 DNA 连接酶	1

[0078] 4.转化

[0079] 取10μL步骤(3)所获连接产物加入100μL的DH5α感受态细胞,混匀,42℃热休克90秒,冰浴2分钟,加入900μL不含Amp的LB培养基,37℃培养1小时。取1.0 mL菌液离心浓缩成100 μL涂布于含有Amp的LB固体培养基上,37℃培养16小时。

[0080] 5.菌落PCR和测序鉴定

[0081] 挑取平板上的单菌落分别接种LB液体培养基,37℃培养2小时,以菌液作为模板,Apg-Fu-F和Apg-Fu-R作为引物进行菌落PCR。将PCR产物进行凝胶电泳验证目的基因大小,如图2所示,出现1.4kbp附近条带的样品为阳性样品。将菌落PCR鉴定阳性的菌液送测序公司测序,选择测序正确的菌液进行保存。构建的含有目的基因的转移载体pF-Apg-Fu,其示意图如图3。

[0082] 实施例2 重组杆状病毒基因组Bac-Apg-Fu构建

[0083] 1.DH10Bac菌转化

[0084] 取1μL 实施例1所获pF-Apg-Fu质粒加入100μL的DH10Bac感受态细胞中混匀,冰浴30分钟,42℃水浴热休克90秒,再冰浴2分钟,加入900μL不含Amp的LB液体培养基,37℃培养5小时。取100μL菌液稀释81倍后,取100μL稀释的菌液涂布到含有庆大霉素、卡那霉素、四环

素、X-gal以及IPTG的LB固体培养基上,37℃培养48小时。

[0085] 2.挑选单克隆

[0086] 使用接种针挑取大的白色菌落,然后在含有庆大霉素、卡那霉素、四环素、X-gal以及IPTG的LB固体培养基上划线,37℃培养48小时,然后挑取单菌落接种含有庆大霉素、卡那霉素、四环素的LB液体培养基培养,保存菌种,抽提质粒。获得重组质粒Bacmid-Apg-Fu。

[0087] 实施例3重组杆状病毒转染

[0088] 六孔板中每个孔接种 0.8×10^6 个Sf9细胞,细胞汇合度为50~70%。对于每一个孔制备以下的复合物:用100μL转染培养基T1稀释4μL的Cellfectin转染试剂,短暂的漩涡震荡;用100μL转染培养基T1基稀释3μg实施例2中的重组Bacmid-Apg-Fu质粒,分别将稀释的转染试剂和质粒混合,轻轻吹匀,制备转染复合物。待细胞贴壁后加入上述的转染复合物,27℃孵育5小时,移除上清,添加2mLSF-SFM新鲜培养基,27℃培养4~5日收获上清。获得重组杆状病毒rBac-Apg-Fu,对收获的P1代重组杆状病毒使用MTT相对效力法检测病毒滴度,rBac-Apg-Fu种毒病毒滴度为 7.5×10^7 pfu/mL。扩增重组杆状病毒rBac-Apg-Fu作为种毒备用。

[0089] 另外按照上面的实施例方法构建表达如下对照组的重组杆状病毒(表5):

[0090] 表5

[0091]

组别	表达蛋白名称	是否添加保守的菌毛蛋白抗原片段	序列信息
对照组 1	A-B-C	否	SEQ ID NO:5
对照组 2	A+B+C+P(混合物)	是	SEQ ID NO: 6-9
对照组 3	A-P	是	SEQ ID NO: 10
对照组 4	B-P	是	SEQ ID NO:11
对照组 5	C-P	是	SEQ ID NO:12

[0092] 注:A为A型Apg HA抗原片段;B为B型Apg HA抗原片段;C为C型Apg HA抗原片段;P为菌毛蛋白抗原片段。

[0093] 实施例4 SDS-PAGE检测

[0094] 将实施例3中收获的rBac-Apg-Fu和对照组1细胞培养物进行SDS-PAGE检测,同时使用感染空杆状病毒的Sf9细胞作为阴性对照。具体操作如下:取40μL收获的细胞培养物,加入10μL的5×loading buffer,沸水浴5分钟,12000r/min离心1分钟,取上清进行SDS-PAGE凝胶(12%浓度凝胶)电泳,电泳后取凝胶经染色、脱色后观察目的条带。结果如图4所示,rBac-Apg-Fu细胞培养物在分子量约52kDa处出现目的条带,对照组1细胞培养物在分子量约41kDa处出现目的条带,阴性对照在对应位置没有条带。

[0095] 实施例5 Western Blot检测

[0096] 将实施例4中SDS-PAGE电泳后的产物转印到NC(硝酸纤维素)膜上,用5%脱脂牛奶封闭2小时,鸡源抗Apg阳性血清孵育2小时,漂洗,HRP标记的羊抗鸡多克隆抗体二抗孵育2小时,漂洗,然后滴加增强型化学发光荧光底物,使用化学发光成像仪拍照。结果如图5所

示,重组杆状病毒表达样品有目的条带,阴性对照没有目的条带,说明目的蛋白在Sf9细胞中得到正确表达。

[0097] 实施例6 间接免疫荧光检测

[0098] 向96孔细胞培养板中加入转染过rBac-Apg-Fu的Sf9细胞悬液,100 μ L/孔(细胞浓度为 $2.5 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^5$ 个/ml),接种4孔,27 $^{\circ}$ C静置15分钟,使Sf9细胞贴于培养板底壁,然后每孔加入10 μ L稀释10倍的毒种。同时设空白细胞对照。接种后细胞置27 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养72~96小时,弃培养液,冷甲醇/丙酮(1:1)固定。首先与鸡源抗Apg多抗血清反应,然后与FITC标记的羊抗鸡IgG反应,倒置荧光显微镜观察结果。如图6所示,接种空杆状病毒Sf9细胞不能观察到荧光,而接种了重组杆状病毒Sf9细胞能够观察到荧光,说明目的抗原蛋白在Sf9细胞中得到正确表达,重组杆状病毒构建正确。

[0099] 实施例7 抗原蛋白血凝检测

[0100] 使用鸡红血球检测Apg-Fu蛋白血凝效价。收获表达Apg-Fu蛋白细胞悬液样品,将样品在-80 $^{\circ}$ C反复冻融三次后离心取得上清用于检测。在微量板上,从第1孔至12孔,用移液器每孔加入PBS 0.025 mL,用移液器吸取被检样品0.025 mL,从第一孔起,依次作2倍系列稀释,至最后1个孔,弃去移液器内0.025 mL液体(稀释倍数依次为2,4,8,16,32……)。每孔加入1%鸡红细胞悬液0.025 mL,并设不加样品的红细胞对照孔,立即在微量板振摇器上摇匀,置于20~40 $^{\circ}$ C或置于2~8 $^{\circ}$ C 40~60分钟,当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。使100%红细胞完全凝集的抗原最高稀释度作为判定重点。检测显示Apg-Fu蛋白的血凝效价为1:128。

[0101] 实施例8 昆虫细胞的生物反应器无血清悬浮培养

[0102] 在1000mL摇瓶中无菌培养Sf9昆虫细胞3-4天,待浓度长到 $3-5 \times 10^6$ cell/mL,活力大于95%时,将细胞接种到5L的生物反应器中,接种浓度为 $3-8 \times 10^5$ cell/mL。当细胞浓度达到 $3-55 \times 10^6$ cell/mL时,将细胞接种到50L生物反应器中,待细胞长至浓度为 $3-55 \times 10^6$ cell/mL,接种到500L生物反应器中,待细胞浓度达到 $2-85 \times 10^6$ cell/mL时,接种rBac-Apg-Fu,反应器培养条件为pH值6.0-6.5、温度25-27 $^{\circ}$ C、溶氧30-80%、搅拌速度100-180rpm。考虑到细胞培养的最适条件,优选的pH6.2、细胞培养阶段温度设定27 $^{\circ}$ C、溶氧50%、搅拌速度100-180 rpm。在感染之后继续培养5-9天后,加入千分之一终浓度BEI,37 $^{\circ}$ C作用48 h后,加千之二终浓度Na₂S₂O₃终止灭活。通过离心或中空纤维过滤的方法收获细胞培养上清,置2-8 $^{\circ}$ C保存Apg-Fu蛋白原液。同时以同样的方法制备表达各对照组的蛋白原液。

[0103] 实施例9 蛋白纯化

[0104] 1.将收获的原液使用阳离子交换层析法进行纯化

[0105] 使用强阳离子层析填料POROS 50HS进行离子交换层析,填料使用前使用0.5M NaOH进行消毒。然后用微滤缓冲液在室温平衡,然后将疫苗原液以125 mL/min的速率上柱,然后用漂洗buffer A(0.05 M MOPS(钠盐),pH=7.0,0.5M NaCl)洗脱8个柱体积。然后以buffer A和buffer B(0.05 M MOPS(钠盐),pH=7.0,1.5M NaCl)线性梯度进行洗脱,从0% buffer B(即100% buffer A)到100% buffer B(即0% buffer A),其中线性洗脱一共洗脱了10个柱体积,然后平均分别收获这10个柱体积的洗脱物。线性洗脱完后,再用buffer B洗脱2个柱体积,并分别收集。将收集的样品放在2 L的无菌的塑料瓶中放置在4 $^{\circ}$ C。然后将最后一个洗脱峰(A280)下收集的组分无菌过滤储存在4 $^{\circ}$ C。

[0106] 2.羟基磷灰石疏水层析

[0107] 使用预装羟基磷灰石柱(CHT[™] Ceramic Hydroxyapatite Type II Media),首先使用50 mM MOPS(钠盐),pH=7.0,1.25M NaCl进行平衡,然后将上面初步纯化的样品以90 cm/hour进行上样,上完样后使用8体积的平衡液进行洗脱直至UV值为零。然后使用洗脱液(0.2 M 磷酸盐,pH=7.0,1.25 M NaCl)进行梯度洗脱,洗脱液浓度从0%到100%,速度仍然是90 cm/h,洗脱体积是4个柱体积。纯化得到目的蛋白。

[0108] 将纯化的目的蛋白使用BCA总蛋白定量,然后结合灰度扫描确定目的蛋白纯度,纯化后的蛋白如图7所示,Apg-Fu蛋白浓度为3.2g/L,纯度为96%。

[0109] 实施例10琼扩检测

[0110] 使用琼扩方法检测表达的Apg-Fu蛋白效价。在琼脂糖凝胶板上打梅花孔,在梅花孔中间加入Apg琼扩检测标准血清,周围分别加入稀释了2的0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10次方的表达抗原。倒置孵育72 h后观察沉淀线。出现沉淀线的最大稀释比例为其琼扩效价。琼扩效价检测结果如下:Apg-Fu蛋白琼扩效价为1:256。

[0111] 实施例11 疫苗制备

[0112] 取实施例9中表达的重组Apg-Fu蛋白原液,使用生理盐水进行稀释,使得Apg-Fu的浓度达到20 μ g/mL,然后将稀释好的疫苗原液与油佐剂按照2:3的比例配制成油乳剂疫苗。具体的,每1L的混合疫苗原液加入白油1429g、司本70.2g、硬脂酸铝8.43g以及吐温53.3g。然后用乳化破碎机破碎乳化制备成油乳佐剂灭活苗,质检合格后置于4℃保存。以相同的方法将对照组制备成疫苗并保存。

[0113] 实施例12 免疫实验

[0114] 试验一:安全检验

[0115] 选取42日龄SPF鸡10只,其中免疫组8只,空白组2只。免疫组各鸡颈背部皮下注射1.0ml本发明疫苗,空白组各颈部皮下注射1.0ml生理盐水。观察临床表现,共观察2周。观察期间,试验组鸡在整个观察期间呼吸、食欲、精神状态都正常,平均体温升高不超过1℃,未见精神不振、采食减少、流涕、呼吸困难、眼睑肿胀等不良反应,与空白组一致。说明本发明实施例的疫苗安全。

[0116] 试验二:效力检验

[0117] 1) 血清抗体检测:选取42日龄的SPF鸡35只,随机分成7组,每组5只,前6组每组分别颈背部皮下注射免疫组和各对照组疫苗0.2ml,第7组设为阴性对照组,经颈背部皮下注射生理盐水0.2ml。分别在免疫后不同时间段采血分离血清,分别检测血清中A、B、C型HI抗体效价,以完全抑制4HA单位抗原的血清最大稀释倍数为血清的抗体效价。记录疫苗免疫后不同时间每组每只鸡A、B、C型抗体检测结果,计算各组平均值,结果如表6所示。

[0118] 表6

[0119]

组别	血清型	免疫后每组平均抗体效价（以血清稀释倍数标示抗体效价）									
		7d	21d	28d	42d	56d	84d	112d	140d	168d	196d
免疫组	A型	11.2	32	57.6	102.4	153.6	115.2	89.6	64	38.4	22.4
	B型	14.4	38.4	44.8	115.2	128	115.2	76.8	57.6	44.8	25.6
	C型	11.2	32	51.2	89.6	179.2	128	102.4	64	32	22.4
对照组 1	A型	7.2	19.2	25.6	38.4	64	57.6	51.2	44.8	22.4	9.6
	B型	8	11.2	22.4	32	57.6	51.2	44.8	38.4	25.6	11.2
	C型	9.6	9.6	32	44.8	76.8	57.6	51.2	32	28.8	8
对照组 2	A型	5.6	8	11.2	32	44.8	25.6	38.4	28.8	9.6	8
	B型	4	9.6	12.8	25.6	51.2	44.8	38.4	32	11.2	6.4
	C型	4.8	9.6	14.4	28.8	57.6	51.2	44.8	38.4	9.6	7.2
对照组 3	A型	9.6	16	22.4	51.2	76.8	57.6	51.2	38.4	28.8	16
	B型	0	0.4	0.4	0.4	0.8	0.4	0.4	0	0	0
	C型	0	0	0.4	0.8	0.8	0.4	0	0	0	0
对照组 4	A型	0	0	0	0.4	0.4	0	0	0	0	0
	B型	8	14.4	28.8	38.4	89.6	64	51.2	28.8	22.4	14.4
	C型	0	0	0.4	0.8	0.4	0.4	0	0	0	0
对照组 5	A型	0	0	0.4	0.8	1.2	0.4	0	0	0	0
	B型	0	0	0	0.8	0.4	0.4	0	0	0	0
	C型	9.6	16	25.6	44.8	89.6	57.6	44.8	32	19.2	14.4
阴性对照	A型	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B型	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C型	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0120] 从免疫组鸡免疫后抗体消长规律来看,免疫组疫苗免疫后7d即能产生保护性抗体,在42~56d期间抗体效价达到顶峰,后抗体开始逐步下降,直到196d抗体效价仍高于4。

[0121] 2) 免疫攻毒保护试验:选取42日龄的SPF鸡90只,随机分成6组,每组15只,每组分别颈背部皮下注射免疫组和各对照组疫苗0.2ml。免疫后56日,每组鸡随机平均分为3小组,每小组5只。每小组鸡分别眶下窦内注射副鸡禽杆菌A型Hp8株 1×10^6 CFU、B型BJ株 5×10^5 CFU、C型668株 1×10^6 CFU。攻毒后连续观察14日,记录试验鸡发病情况。具体结果见表7。

[0122] 表7

[0123]

分组	攻毒菌株	试验鸡数量/只	临床症状	保护数/总数	保护率/%
免疫组	A型	5	5只鸡均正常	5/5	100
	B型	5	5只鸡均正常	5/5	100
	C型	5	5只鸡均正常	5/5	100
对照组 1	A型	5	4只鸡正常, 1只鸡发病	4/5	80
	B型	5	3只鸡正常, 2只鸡发病	3/5	60
	C型	5	4只鸡正常, 1只鸡发病	4/5	80
对照组 2	A型	5	3只鸡正常, 2只鸡发病	3/5	60
	B型	5	3只鸡正常, 2只鸡发病	3/5	60
	C型	5	4只鸡正常, 1只鸡发病	4/5	80
对照组 3	A型	5	3只鸡正常, 2只鸡发病	3/5	60
	B型	5	5只鸡均发病	0/5	0
	C型	5	1只鸡一直正常, 4只鸡发病	1/5	20
对照组 4	A型	5	5只鸡均发病	0/5	0
	B型	5	4只鸡正常, 1只鸡发病	4/5	80
	C型	5	1只鸡一直正常, 4只鸡发病	1/5	20
对照组 5	A型	5	1只鸡一直正常, 4只鸡发病	1/5	20
	B型	5	5只鸡均发病	0/5	0
	C型	5	5只鸡均正常	5/5	100

[0124] 应当理解,以上所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。本发明的实施例的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 苏州世诺生物技术有限公司
[0003]	<120> 副鸡禽杆菌基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用
[0004]	<160> 12
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 1413
[0008]	<212> DNA
[0009]	<213> 人工序列(人工序列)
[0010]	<400> 1
[0011]	atgtatgatg attttggccg cgcgaaactg cgccaggatg gcgaaaccgt gggcaaacat 60
[0012]	accaaccatg gcgcgcatct gaggctgaaa gcgagctatc cggtgctgga aggcctggat 120
[0013]	gtgtatgcgc gcgtgggcgc ggcgctgatt cgcagcgatt ataaaccgac caaacgcgcg 180
[0014]	gcgccgaacg aaacccatga acatagcctg aaagtgcgac cggtgtttgc gggcggcctg 240
[0015]	gaatataacc tgccgagcct gccggaactg gcgctgcgcg tggaatatca gtgggtgaac 300
[0016]	aaagtgggcc gctgggaaaa agatggcagc gcgctggatt ataccgcgag cattggcagc 360
[0017]	gtgaccggcg gcggcagcta tgatgatttt ggccgcgcga aactgcgcaa aggcggcgaa 420
[0018]	accgtgatta aacataccaa ccatggcgcg catctgagcc tgaaagcgag ctatccgggt 480
[0019]	ctggaaggcc tggatgtgta tgcgcgcgtg ggccgcggcg tgattcgcag cgattataaa 540
[0020]	agcaccaaac gcgcgaaaag cgattatgtg atgcatgaac atagcctgaa agtgagcccc 600
[0021]	gtgtttgcgg gcggcctgga atataacctg ccgagcctgc cggaactggc gctgcgcgtg 660
[0022]	gaatatcagt gggatgaacaa agtgggcccgc ggcgaaaaag atggcagccg cgtggattat 720
[0023]	accccgagca ttggcagcgt gaccggcggc ggcagctatg atgattttgg ccgcgcgaaa 780
[0024]	tttcgccagg atggcgaaac cgtgattaaa cataccaacc atggcgcgca tctgagcctg 840
[0025]	aaagcgagct atccggtgct ggaaggcctg gatgtgtatg cgcgcgtggg cgcggcgctg 900
[0026]	attcgcagcg attataaacc gaccaaaccg gcggcgccga acgaaaccca tgaacatagc 960
[0027]	ctgaaagtga gcccggtgtt tgcgggcggc ctggaatata acctgccgag cctgccggaa 1020
[0028]	ctggcgctgc gcgtggaata tcagtgggtg aacaaagtgg gccgcgatgg cagccgcgtg 1080
[0029]	gattataccc cgagcattgg cagcgtgacc ggcgcgcgca gcgcgggcac caccctgttt 1140
[0030]	accattgatc tgagcgaatg cagcagcgcg agcagcaaac tggcgagcaa agcggcggtg 1200
[0031]	tatttttagca acgatgcgga taaagtgacc gcgatggca aactgctgaa caaacgggc 1260
[0032]	ggcagcccgc gcgatgcggc gcagaactg gtggtgcagc tgctgcataa agatgatacc 1320
[0033]	gtgattgata ttaccaggc gtatgatcag tataccagg ataaagataa agtggcgatt 1380
[0034]	accggcaaca gcccgaaacg caaagcgaaa taa 1413
[0035]	<210> 2
[0036]	<211> 470
[0037]	<212> PRT
[0038]	<213> 人工序列(人工序列)
[0039]	<400> 2
[0040]	Met Tyr Asp Asp Phe Gly Arg Ala Lys Leu Arg Gln Asp Gly Glu Thr
[0041]	1 5 10 15

[0042]	Val Gly Lys His Thr Asn His Gly Ala His Leu Ser Leu Lys Ala Ser		
[0043]		20	25 30
[0044]	Tyr Pro Val Leu Glu Gly Leu Asp Val Tyr Ala Arg Val Gly Ala Ala		
[0045]		35	40 45
[0046]	Leu Ile Arg Ser Asp Tyr Lys Pro Thr Lys Arg Ala Ala Pro Asn Glu		
[0047]		50	55 60
[0048]	Thr His Glu His Ser Leu Lys Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Leu		
[0049]		65	70 75 80
[0050]	Glu Tyr Asn Leu Pro Ser Leu Pro Glu Leu Ala Leu Arg Val Glu Tyr		
[0051]		85	90 95
[0052]	Gln Trp Val Asn Lys Val Gly Arg Trp Glu Lys Asp Gly Ser Arg Val		
[0053]		100	105 110
[0054]	Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Gly Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Asp		
[0055]		115	120 125
[0056]	Asp Phe Gly Arg Ala Lys Leu Arg Lys Gly Gly Glu Thr Val Ile Lys		
[0057]		130	135 140
[0058]	His Thr Asn His Gly Ala His Leu Ser Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Val		
[0059]		145	150 155 160
[0060]	Leu Glu Gly Leu Asp Val Tyr Ala Arg Val Gly Ala Ala Leu Ile Arg		
[0061]		165	170 175
[0062]	Ser Asp Tyr Lys Ser Thr Lys Arg Ala Glu Ser Asp Tyr Val Met His		
[0063]		180	185 190
[0064]	Glu His Ser Leu Lys Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Leu Glu Tyr		
[0065]		195	200 205
[0066]	Asn Leu Pro Ser Leu Pro Glu Leu Ala Leu Arg Val Glu Tyr Gln Trp		
[0067]		210	215 220
[0068]	Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Lys Asp Gly Ser Arg Val Asp Tyr		
[0069]		225	230 235 240
[0070]	Thr Pro Ser Ile Gly Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Asp Asp Phe		
[0071]		245	250 255
[0072]	Gly Arg Ala Lys Phe Arg Gln Asp Gly Glu Thr Val Ile Lys His Thr		
[0073]		260	265 270
[0074]	Asn His Gly Ala His Leu Ser Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Val Leu Glu		
[0075]		275	280 285
[0076]	Gly Leu Asp Val Tyr Ala Arg Val Gly Ala Ala Leu Ile Arg Ser Asp		
[0077]		290	295 300
[0078]	Tyr Lys Pro Thr Lys Arg Ala Ala Pro Asn Glu Thr His Glu His Ser		
[0079]		305	310 315 320
[0080]	Leu Lys Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Leu Glu Tyr Asn Leu Pro		
[0081]		325	330 335
[0082]	Ser Leu Pro Glu Leu Ala Leu Arg Val Glu Tyr Gln Trp Val Asn Lys		
[0083]		340	345 350

[0084]	Val Gly Arg Asp Gly Ser Arg Val Asp Tyr Thr Pro Ser Ile Gly Ser	
[0085]	355	360 365
[0086]	Val Thr Gly Gly Gly Ser Ala Gly Thr Thr Leu Phe Thr Ile Asp Leu	
[0087]	370	375 380
[0088]	Ser Glu Cys Ser Ser Ala Ser Ser Lys Leu Ala Ser Lys Ala Ala Val	
[0089]	385	390 395 400
[0090]	Tyr Phe Ser Asn Asp Ala Asp Lys Val Thr Ala Asp Gly Lys Leu Leu	
[0091]	405	410 415
[0092]	Asn Lys Pro Gly Gly Ser Pro Gly Asp Ala Ala Gln Asn Val Val Val	
[0093]	420	425 430
[0094]	Gln Leu Leu His Lys Asp Asp Thr Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Tyr	
[0095]	435	440 445
[0096]	Asp Gln Tyr Thr Gln Asp Lys Asp Lys Val Ala Ile Thr Gly Asn Ser	
[0097]	450	455 460
[0098]	Pro Asn Gly Lys Ala Lys	
[0099]	465	470
[0100]	<210> 3	
[0101]	<211> 36	
[0102]	<212> DNA	
[0103]	<213> 人工序列(人工序列)	
[0104]	<400> 3	
[0105]	ataggatcca tgtatgatga ttttgccgc gcgaaa 36	
[0106]	<210> 4	
[0107]	<211> 36	
[0108]	<212> DNA	
[0109]	<213> 人工序列(人工序列)	
[0110]	<400> 4	
[0111]	ataaagcttt tatttcgctt tgccgttcgg gctgtt 36	
[0112]	<210> 5	
[0113]	<211> 1110	
[0114]	<212> DNA	
[0115]	<213> 人工序列(人工序列)	
[0116]	<400> 5	
[0117]	atgtatgatg attttgccg cgcgaaactg cgccaggatg gcgaaaccgt gggcaaacat 60	
[0118]	accaaccatg gcgcgcatct gagcctgaaa gcgagctatc cggtgctgga aggcctggat 120	
[0119]	gtgtatgcgc gcgtgggcgc ggcgctgatt cgcagcgatt ataaaccgac caaacgcgcg 180	
[0120]	gcgccgaacg aaaccatga acatagcctg aaagttagcc cggtgtttgc gggcggcctg 240	
[0121]	gaatataacc tgccgagcct gccggaactg gcgctgcgcg tggaatatca gtgggtgaac 300	
[0122]	aaagtgggcc gctgggaaa agatggcagc cgcgtggatt ataccccgag cattggcagc 360	
[0123]	gtgaccggcg gcggcagcta tgatgatttt ggccgcgcga aactgcgcaa aggcggcgaa 420	
[0124]	accgtgatta aacataccaa ccatggcgcg catctgagcc tgaaagcgag ctatccggtg 480	
[0125]	ctggaaggcc tggatgtgta tgcgcgcgtg ggccggcgcg tgattcgag cgattataaa 540	

[0126]	agcaccaaac gcgcggaaag cgattatgtg atgcatgaac atagcctgaa agtgagcccg	600
[0127]	gtgtttgcgg gcggcctgga atataacctg ccgagcctgc cggaactggc gctgcgcgtg	660
[0128]	gaatatcagt ggggtgaacaa agtgggccgc ggcgaaaaag atggcagccg cgtggattat	720
[0129]	accccgagca ttggcagcgt gaccggcggc ggcagctatg atgatttttg ccgcgcgaaa	780
[0130]	tttcgccagg atggcgaaac cgtgattaaa cataccaacc atggcgcgca tctgagcctg	840
[0131]	aaagcgagct atccggtgct ggaaggcctg gatgtgtatg cgcgctggg cgcggcgctg	900
[0132]	attcgacgg attataaacc gaccaaaccg gcggcgccga acgaaacca tgaacatagc	960
[0133]	ctgaaagtga gcccggtgtt tgcgggccgc ctggaatata acctgccgag cctgccgga	1020
[0134]	ctggcgcctgc gcgtggaata tcagtgggtg aacaaagtgg gccgcgatgg cagccgcgtg	1080
[0135]	gattataccc cgagcattgg cagcgtgacc	1110
[0136]	<210> 6	
[0137]	<211> 363	
[0138]	<212> DNA	
[0139]	<213> 人工序列(人工序列)	
[0140]	<400> 6	
[0141]	tatgatgatt ttggccgcgc gaaactgcgc caggatggcg aaaccgtggg caaacatacc	60
[0142]	aaccatggcg cgcattctgag cctgaaagcg agctatccgg tgctggaagg cctggatgtg	120
[0143]	tatgcgcgcg tgggcgcggc gctgattcgc agcgattata aaccgaccaa acgcgcggcg	180
[0144]	ccgaacgaaa cccatgaaca tagcctgaaa gtgagcccg tgtttgcggg cggcctggaa	240
[0145]	tataacctgc cgagcctgcc ggaactggcg ctgcgcgtgg aatatcagtg ggtgaacaaa	300
[0146]	gtgggccgct gggaaaaaga tggcagccgc gtggattata ccccgagcat tggcagcgtg	360
[0147]	acc	363
[0148]	<210> 7	
[0149]	<211> 366	
[0150]	<212> DNA	
[0151]	<213> 人工序列(人工序列)	
[0152]	<400> 7	
[0153]	tatgatgatt ttggccgcgc gaaactgcgc aaaggcggcg aaaccgtgat taaacatacc	60
[0154]	aaccatggcg cgcattctgag cctgaaagcg agctatccgg tgctggaagg cctggatgtg	120
[0155]	tatgcgcgcg tgggcgcggc gctgattcgc agcgattata aaagcaccaa acgcgcggaa	180
[0156]	agcgattatg tgatgcatga acatagcctg aaagttagcc cgggtgtttgc gggcggcctg	240
[0157]	gaatataacc tgccgagcct gccggaactg gcgctgcgcg tggaatatca gtgggtgaac	300
[0158]	aaagtgggcc gcggcgaaaa agatggcagc cgcggtggatt ataccccgag cattggcagc	360
[0159]	gtgacc	366
[0160]	<210> 8	
[0161]	<211> 354	
[0162]	<212> DNA	
[0163]	<213> 人工序列(人工序列)	
[0164]	<400> 8	
[0165]	tatgatgatt ttggccgcgc gaaatttcgc caggatggcg aaaccgtgat taaacatacc	60
[0166]	aaccatggcg cgcattctgag cctgaaagcg agctatccgg tgctggaagg cctggatgtg	120
[0167]	tatgcgcgcg tgggcgcggc gctgattcgc agcgattata aaccgaccaa acgcgcggcg	180

[0168] ccgaacgaaa cccatgaaca tagcctgaaa gtgagcccgg tgtttgcggg cggcctggaa 240
 [0169] tataacctgc cgagcctgcc ggaactggcg ctgcgcgtgg aatatcagtg ggtgaacaaa 300
 [0170] gtgggccgag atggcagccg cgtggattat accccgagca ttggcagcgt gacc 354
 [0171] <210> 9
 [0172] <211> 288
 [0173] <212> DNA
 [0174] <213> 人工序列(人工序列)
 [0175] <400> 9
 [0176] gcgggcacca ccctgtttac cattgatctg agcgaatgca gcagcgcgag cagcaaaactg 60
 [0177] gcgagcaaaag cggcgggtgta ttttagcaac gatgcggata aagtgaccgc ggatggcaaa 120
 [0178] ctgctgaaca aaccgggcgg cagcccgggc gatgcggcgc agaactgtgt ggtgcagctg 180
 [0179] ctgcataaag atgataccgt gattgatatt acccaggcgt atgatcagta taccaggat 240
 [0180] aaagataaag tggcgattac cggcaacagc ccgaacggca aagcga 288
 [0181] <210> 10
 [0182] <211> 666
 [0183] <212> DNA
 [0184] <213> 人工序列(人工序列)
 [0185] <400> 10
 [0186] atgtatgatg attttgccg cgcgaaactg cgccaggatg gcgaaaccgt gggcaaacat 60
 [0187] accaaccatg gcgcgcatct gagcctgaaa gcgagctatc cggctgctgga aggcctggat 120
 [0188] gtgtatgcgc gcgtgggcgc ggcgctgatt cgcagcgatt ataaaccgac caaacgcgcg 180
 [0189] gcgccgaacg aaacccatga acatagcctg aaagttagcc cgggtgttgc gggcggcctg 240
 [0190] gaatataacc tgccgagcct gccggaactg gcgctgcgcg tggaatatca gtgggtgaac 300
 [0191] aaagtgggcc gctgggaaaa agatggcagc gcgctggatt ataccccgag cattggcagc 360
 [0192] gtgaccggcg gcggcagcgc gggcaccacc ctgtttacca ttgatctgag cgaatgcagc 420
 [0193] agcgcgagca gcaaaactggc gagcaaagcg gcggtgtatt ttagcaacga tgcggataaa 480
 [0194] gtgaccgcgg atggcaaaact gctgaacaaa ccgggcggca gcccgggcga tgcggcgag 540
 [0195] aacgtggtgg tgcagctgct gcataaagat gataccgtga ttgatattac ccaggcgtat 600
 [0196] gatcagtata ccaggataa agataaagtg gcgattaccg gcaacagccc gaacggcaaa 660
 [0197] gcgaaa 666
 [0198] <210> 11
 [0199] <211> 669
 [0200] <212> DNA
 [0201] <213> 人工序列(人工序列)
 [0202] <400> 11
 [0203] atgtatgatg attttgccg cgcgaaactg cgcaaaggcg gcgaaaccgt gattaacat 60
 [0204] accaaccatg gcgcgcatct gagcctgaaa gcgagctatc cggctgctgga aggcctggat 120
 [0205] gtgtatgcgc gcgtgggcgc ggcgctgatt cgcagcgatt ataaaagcac caaacgcgcg 180
 [0206] gaaagcgatt atgtgatgca tgaacatagc ctgaaagtga gcccggtgtt tgcgggcggc 240
 [0207] ctggaatata acctgccgag cctgccgga ctggcgctgc gcgtggaata tcagtgggtg 300
 [0208] aacaaagtgg gccgcggcga aaaagatggc agccgcgtgg attatacccc gagcattggc 360
 [0209] agcgtgaccg gcggcggcag cgcgggcacc accctgttta ccattgatct gagcgaatgc 420

[0210] agcagcgcga gcagcaaact ggcgagcaaa gcggcggtgt attttagcaa cgatgcggat 480
[0211] aaagtgaccg cggatggcaa actgctgaac aaaccgggcg gcagcccggg cgatgcggcg 540
[0212] cagaacgtgg tggcgcagct gctgcataaa gatgataccg tgattgatat taccaggcg 600
[0213] tatgatcagt atacccagga taaagataaa gtggcgatta ccggcaacag cccgaacggc 660
[0214] aaagcgaaa 669
[0215] <210> 12
[0216] <211> 657
[0217] <212> DNA
[0218] <213> 人工序列(人工序列)
[0219] <400> 12
[0220] atgtatgatg attttgccg gcgaaattht cggcaggatg gcgaaaccgt gattaaacat 60
[0221] accaaccatg gcgcgcatct gaggctgaaa gcgagctatc cggctgctgga aggcctggat 120
[0222] gtgtatgcgc gcgtgggcgc ggcgctgatt cgcagcgatt ataaaccgac caaacgcgcg 180
[0223] gcgccgaacg aaacccatga acatagcctg aaagtgagcc cgggtgtttgc gggcggcctg 240
[0224] gaatataacc tgccgagcct gccggaactg gcgctgcgcg tggaatatca gtgggtgaac 300
[0225] aaagtgggcc gcgatggcag ccgcgtggat tataccccga gcattggcag cgtgaccggc 360
[0226] ggcggcagcg cgggcaccac cctgtttacc attgatctga gcgaatgcag cagcgcgagc 420
[0227] agcaaactgg cgagcaaagc ggcggtgtat tttagcaacg atgcggataa agtgaccgcg 480
[0228] gatggcaaac tgctgaacaa accgggcggc agcccgggcg atgcggcgca gaacgtggtg 540
[0229] gtgcagctgc tgcataaaga tgataccgtg attgatatta cccaggcgta tgatcagtat 600
[0230] acccaggata aagataaagt ggcgattacc ggcaacagcc cgaacggcaa agcgaaa 657

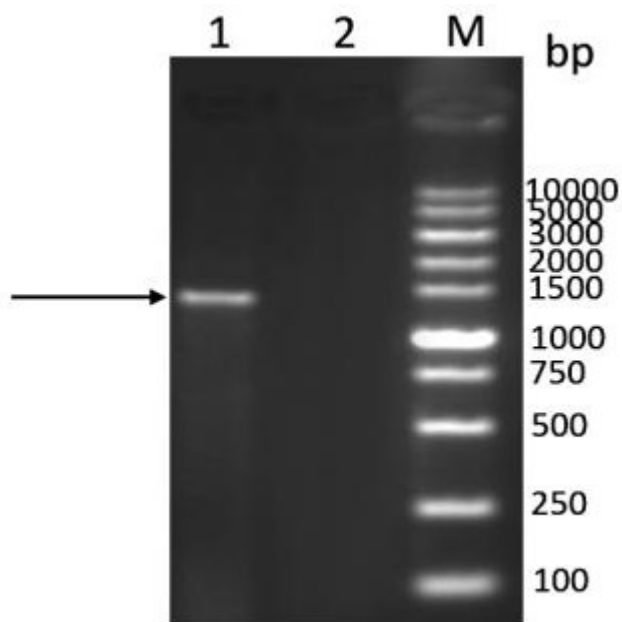


图1

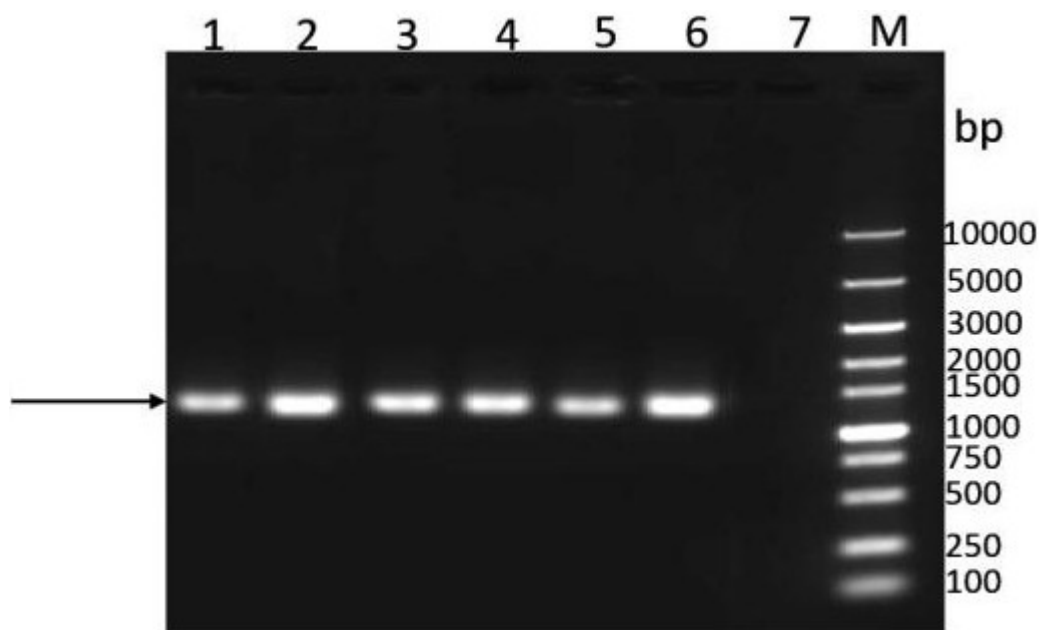


图2

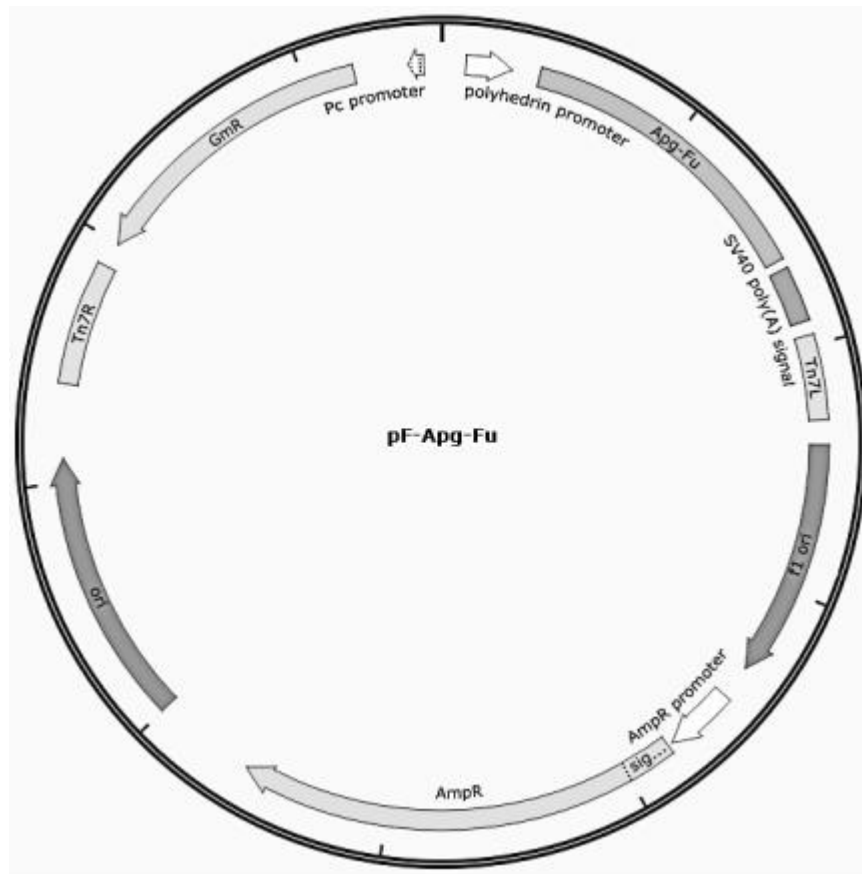


图3

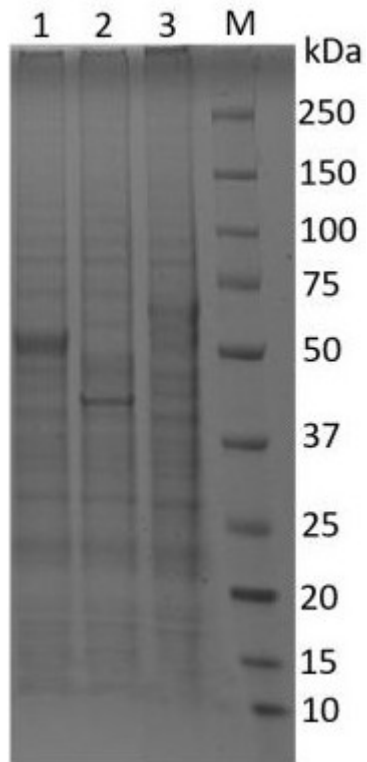


图4

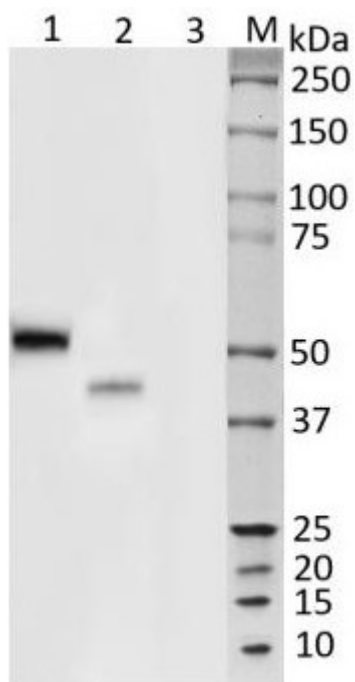


图5

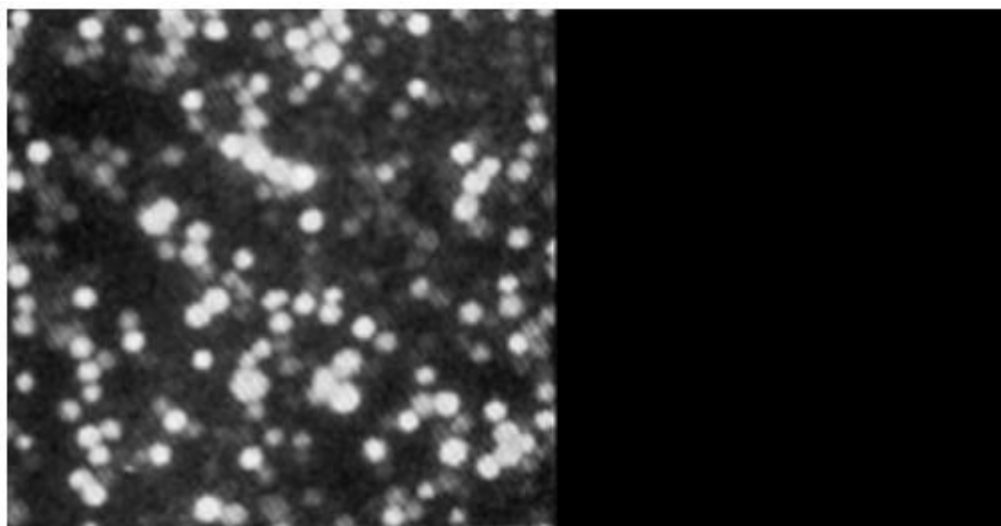


图6

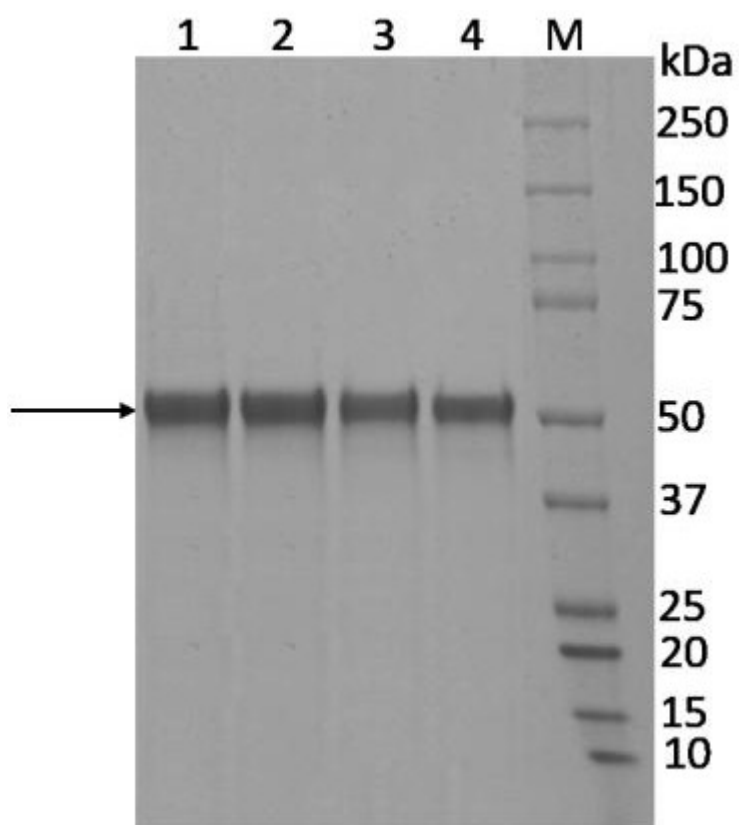


图7