



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111925452 B

(45) 授权公告日 2020.12.18

(21) 申请号 202011114349.X

A61P 11/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.19

A61P 31/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111925452 A

(56) 对比文件

CN 109678968 A, 2019.04.26

EP 3098301 A1, 2016.11.30

CN 104293816 A, 2015.01.21

EP 0359919 B1, 1996.02.28

CN 104277115 A, 2015.01.14

(43) 申请公布日 2020.11.13

(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

专利权人 苏州米迪生物技术有限公司

Fabricio Rochedo Conceicao~o, et al. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice.《Vaccine》.2006,第24卷第5734-5743页.

(72) 发明人 曹文龙 孔迪 滕小锺 张大鹤

施尧.猪支原体肺炎疫苗研究进展.《养猪》.2013,(第3期),第93-95页.

(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

审查员 柳洋洋

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

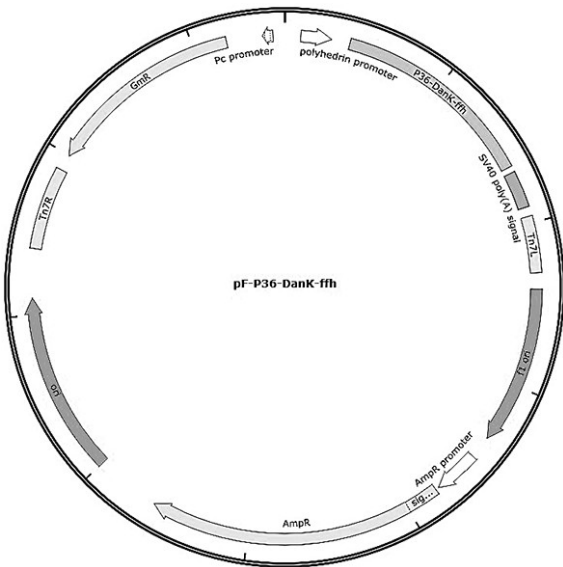
序列表9页 附图8页

(54) 发明名称

猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明揭示了一种猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用。所述疫苗包含蛋白组合物以及医药学上可接受的载剂,所述蛋白组合物包含分别具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6所示序列的两种融合蛋白。本发明提供的所述疫苗无任何毒性,安全性高,免疫原性好,能够在猪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,并获得全面保护,且所述疫苗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. 蛋白组合物, 包含:
序列如SEQ ID NO:2所示的第一融合蛋白, 以及
序列如SEQ ID NO:6所示的第二融合蛋白。
2. 基因组合物, 包含分别用于编码权利要求1所述蛋白组合物中第一融合蛋白、第二融合蛋白的基因。
3. 如权利要求2所述的基因组合物, 其特征在于包含:
序列如SEQ ID NO:1所示的第一核酸分子, 以及
序列如SEQ ID NO:5所示的第二核酸分子。
4. 重组载体组合物, 包括:
包含权利要求1所述蛋白组合物中第一融合蛋白的编码基因的第一重组载体, 以及
包含所述蛋白组合物中第二融合蛋白的编码基因的第二重组载体。
5. 如权利要求4所述的重组载体组合物, 其特征在于: 所述第一重组载体、第二重组载体包括pFastBac 1、pVL1393或pFastBac dual。
6. 宿主细胞组合物, 包括:
包含权利要求1所述蛋白组合物中第一融合蛋白的编码基因的第一宿主细胞, 以及
包含所述蛋白组合物中第二融合蛋白的编码基因的第二宿主细胞。
7. 如权利要求6所述的宿主细胞组合物, 其特征在于: 所述第一宿主细胞、第二宿主细胞选自昆虫细胞, 所述昆虫细胞包括Sf9、High Five或 Sf21细胞。
8. 一种免疫组合物, 其特征在于包括: 权利要求1所述的蛋白组合物; 以及, 医药学上可接受的载体。
9. 如权利要求8所述的免疫组合物, 其特征在于: 所述医药学上可接受的载体包括MONTANIDE ISA 206 VG、MONTANIDE ISA 201 VG、液体石蜡、樟脑油、植物细胞凝集素之中的任意一种或者两种以上的组合。
10. 一种蛋白组合物的制备方法, 其特征在于包括:
提供权利要求1所述蛋白组合物中第一融合蛋白、第二融合蛋白的编码基因;
分别将所述第一融合蛋白的编码基因、第二融合蛋白的编码基因克隆到穿梭载体中, 分别获得含有相应目的基因的第一重组穿梭载体、第二重组穿梭载体;
分别将所述第一重组穿梭载体、第二重组穿梭载体转化感受态细胞, 并分离获得分别含有相应目的基因表达框的第一重组杆状病毒基因组质粒、第二重组杆状病毒基因组质粒;
分别以所述第一重组杆状病毒基因组质粒、第二重组杆状病毒基因组质粒转染昆虫细胞, 并分别获得相应的第一重组杆状病毒、第二重组杆状病毒;
分别将所述第一重组杆状病毒、第二重组杆状病毒接种昆虫细胞并进行培养, 之后分离获得所述第一融合蛋白、第二融合蛋白。
11. 如权利要求10所述的制备方法, 其特征在于: 所述穿梭载体包括pFastBac 1、pVL1393或pFastBac dual; 和/或, 所述昆虫细胞包括Sf9、High Five或 Sf21细胞。
12. 一种猪肺炎支原体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10-11中任一项所述的方法制备第一融合蛋白、第二融合蛋白, 并将所述第一融合蛋白、第二融合蛋白与医药学上可接受的载体混合。

13. 如权利要求1所述蛋白组合物或权利要求8或9所述免疫组合物在生产用于在受试动物中诱导针对猪肺炎支原体抗原的免疫反应的药剂,或者,在生产用于预防动物受猪肺炎支原体感染的药剂中的用途。

14. 如权利要求1所述蛋白组合物或权利要求8或9所述免疫组合物在制备猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗中的用途。

猪肺炎支原体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,具体涉及一种猪肺炎支原体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] 猪支原体肺炎(Mycoplasmal pneumonia of swine,MPS)又称猪喘气病、猪地方流行性肺炎(Swine enzootic pneumoniae,SEP),是由猪肺炎支原体(Mycoplasma hyopneumoniae,Mhp)引起的一种接触性和慢性呼吸道传染病,其临床症状表现为咳嗽、气喘、发育迟缓以及料肉比低等。该病主要通过带菌猪和患病猪传染,不同品种、年龄、性别的猪均能感染,其传播途径为直接接触和空气传播,当患病猪和健康猪混合饲养时,常会引发大规模的感染传播。MPS属于免疫抑制性疾病,其感染后往往造成猪支气管纤毛、肺泡巨噬细胞的损伤,降低机体清除外来病原的能力,导致其他病原如猪圆环病毒(Porcine circovirus,PCV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)和胸膜肺炎放线杆菌(Actinobacillus pleuropneumoniae)等的继发感染,引起猪呼吸道疾病综合征(Porcine respiratory disease complex,PRDC)的发生,这不但增大了猪诊断和防控的难度,也造成了非常严重的经济损失。因此MPS成为当前最常发生、最广流行、最难净化的重要疫病之一,被喻为全球养猪业的“隐形杀手”。

[0003] Mhp是一种介于细菌和病毒之间的、最简单且能够自主复制的原核微生物,大小在200nm~400nm之间,没有细胞壁,仅有三层界限膜,呈点状、球状、两级状等多种形态。Mhp主要有以下几种免疫抗原:细胞质蛋白(胞内具乳酸脱氢酶活性的蛋白P36)、膜蛋白(P46、P65和P74)、黏附因子(主要为P97、P101、P216、P159、P116、Mhp107和Mhp271七种蛋白)以及核苷酸还原酶等。P97蛋白是Mhp发现较早且研究非常多的黏附蛋白,是一种重要的毒力因子,它含有R1和R2两个重复区域,在Mhp黏附宿主上皮细胞过程中起到了非常重要的作用。P97蛋白也是Mhp感染猪后最早产生抗体的抗原之一,其中R1区(P97R1)具有很强的免疫原性,在体内能刺激机体产生很强的抗体免疫应答反应,是目前发现的具有开发潜力的抗原区。P36蛋白是一种乳酸脱氢酶,也是Mhp的种特异性蛋白,带有种属特异性的抗原决定簇,主要在Mhp的感染后期发挥作用。研究发现,P36蛋白在自然和人工感染的猪体内均能诱导产生较好的天然免疫应答,是一种免疫优势性蛋白,与其它抗原相比其产生抗体的时间相对较晚,但产生的特异性抗体能维持较长时间。P46蛋白是一种表面脂蛋白,能引起宿主的早期免疫反应,具有高度的种内保守性和较好的特异性和免疫保护力,重组P46蛋白可以诱发机体产生强烈的体液免疫和细胞免疫反应,可成为新型Mhp疫苗的候选基因。热休克蛋白(Heat shock proteins,HSPs)是生物细胞在受到理化、生物等因素刺激后,发生热休克反应时所合成的一类最保守的伴侣细胞蛋白。经基因序列分析发现Mhp中的热休克蛋白有DnaK(Mhp072)、DnaJ(Mhp073)、ClpB(Mhp278)、GrpE(Mhp011)以及Lon(Mhp541)等。DnaK蛋白也被称为热休克蛋白70(HSP70),是HSPs家族中最重要的蛋白之一。DnaK蛋白的C-末端主要作用为免疫原和免疫佐剂,可诱导和增强机体的免疫反应;其N-末端则主要表现分子伴侣作用。

DnaJ蛋白是刺激DnaK蛋白的ATP酶和蛋白折叠活性的辅助分子伴侣,在整个活体细胞和组织中有活性,纠正或清除细胞内错误折叠并使蛋白失活,指导蛋白质的正确生物活性。信号识别颗粒(Signal Recognition Particle,SRP)途径是一个高度保守的蛋白靶向途径,先后在真核生物、原核生物和古细菌中被发现。原核生物中SRP途径主要由ffh、FtsY和scRNA组成,其中ffh蛋白具有在各个功能域的协调作用,能够识别结合新生蛋白。

[0004] 由于Mhp没有细胞壁,对常规抗生素不敏感,加之耐药性和免疫保护特殊性等问题,疫苗免疫成为主要预防和控制Mhp感染的手段。目前国内外用于防控Mhp的疫苗主要包括灭活疫苗、弱毒疫苗以及基因工程亚单位疫苗等。灭活疫苗能够降低肺部病理损伤,激发机体的体液免疫,但几乎不产生细胞免疫,也不能阻止猪群中Mhp的感染和传播;弱毒疫苗存在操作难度系数大,产量低,毒力返强等问题。Mhp对培养基的条件要求非常苛刻,是动物支原体中较难培养的一种,培养过程中极易被其他细菌和支原体污染,也使上述两种疫苗生产成本居高不下。因此,为了更有效地防治MPS,免疫原性强、安全性高的新型猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗的研制极为重要,但目前仍鲜见相关报道。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的在于提供一种猪肺炎支原体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蛋白组合物,包含:具有SEQ ID NO:2所示序列或者与SEQ ID NO:2的全长序列95%以上相同的序列的第一融合蛋白,具有SEQ ID NO:6所示序列或者与SEQ ID NO:6的全长序列95%以上相同的序列的第二融合蛋白。

[0008] 即,本发明实施例提供的各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一种基因组合物,包含分别用于编码所述蛋白组合物中第一融合蛋白、第二融合蛋白的编码基因。

[0010] 在一些实施方式中,所述的基因组合物包含:具有SEQ ID NO:1所示序列或者与SEQ ID NO:1的全长序列95%以上相同的序列的第一核酸分子,具有SEQ ID NO:5所示序列或者与SEQ ID NO:5的全长序列95%以上相同的序列的第二核酸分子。

[0011] 本发明实施例还提供了一种重组载体组合物,包括:

[0012] 包含所述蛋白组合物中第一融合蛋白的编码基因的第一重组载体,以及

[0013] 包含所述蛋白组合物中第二融合蛋白的编码基因的第二重组载体。

[0014] 在一些实施方式中,所述第一重组载体、第二重组载体包括但不限于pFastBac 1、pVL1393、pFastBac dual,并优选采用pFastBac 1。

[0015] 本发明实施例还提供了一种宿主细胞组合物,包括:

[0016] 包含所述蛋白组合物中第一融合蛋白的编码基因的第一宿主细胞,以及

[0017] 包含所述蛋白组合物中第二融合蛋白的编码基因的第二宿主细胞。

[0018] 在一些实施方式中,所述第一宿主细胞、第二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。

[0019] 本发明实施例还提供了一种免疫组合物,其包括:所述的蛋白组合物;以及,医药学上可接受的载剂。

[0020] 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MONTANIDE ISA 206 VG、MONTANIDE ISA 201 VG、MONTANIDE ISA 15 VG、液体石蜡、樟脑油、植物细胞凝集素之中的任意一种或者两种以上的组合,优选为MONTANIDE ISA 201 VG。

[0021] 本发明实施例还提供了一种蛋白组合物的制备方法,其包括:

[0022] 提供所述蛋白组合物中第一融合蛋白、第二融合蛋白的编码基因;

[0023] 分别将所述第一融合蛋白的编码基因、第二融合蛋白的编码基因克隆到穿梭载体中,分别获得含有相应目的基因的第一重组穿梭载体、第二重组穿梭载体;

[0024] 分别将所述第一重组穿梭载体、第二重组穿梭载体转化感受态细胞,并分离获得分别含有相应目的基因表达框的第一重组杆状病毒基因组质粒、第二重组杆状病毒基因组质粒;

[0025] 分别以所述第一重组杆状病毒基因组质粒、第二重组杆状病毒基因组质粒转染昆虫细胞,并分别获得相应的第一重组杆状病毒、第二重组杆状病毒;

[0026] 分别将所述第一重组杆状病毒、第二重组杆状病毒接种昆虫细胞并进行培养,之后分离获得所述第一融合蛋白、第二融合蛋白。

[0027] 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,优选为pFastBac1。

[0028] 在一些实施方式中,所述昆虫细胞选自Sf9细胞系等,例如可以包括但不限于Sf9、High Five或 Sf21细胞等,优选为Sf9细胞。

[0029] 本发明实施例还提供了一种猪肺炎支原体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第一融合蛋白、第二融合蛋白,并将所述第一融合蛋白、第二融合蛋白与医药学上可接受的载剂混合。

[0030] 本发明实施例还提供了所述蛋白组合物或所述免疫组合物在制备猪肺炎支原体检测试剂,在生产用于在受试动物中诱导针对猪肺炎支原体抗原的免疫反应的药剂,或者,在生产用于预防动物受猪肺炎支原体感染的药剂中的用途。

[0031] 本发明实施例还提供了所述蛋白组合物或所述免疫组合物在制备猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗中的用途。

[0032] 本发明实施例提供了一种猪肺炎支原体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。

[0033] 本发明实施例还提供了包含所述蛋白组合物中各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猪肺炎支原体感染的试剂的用途。

[0034] 本发明实施例还提供了包含所述蛋白组合物中各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猪肺炎支原体抗原的免疫反应的药剂的用途。

[0035] 本发明实施例还提供了包含所述蛋白组合物中各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猪肺炎支原体感染的药剂的用途。

[0036] 本发明实施例还提供了一种诱导针对猪肺炎支原体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猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗。

[0037] 本发明实施例还提供了一种保护受试动物免受猪肺炎支原体感染的方法,所述方法包括向受试动物施用所述猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗。

[0038] 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猪肺炎支原体感染的免疫反应的疫苗,所述疫苗包含:本发明的蛋白组合物以及佐剂分子。

[0039] 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。

[0040] 较之现有技术,本发明实施例通过选取猪肺炎支原体的P36、P46、P97、DnaK、ffh、DnaJ等蛋白中的抗原片段,并对其中来源于P97的抗原片段进行优化,再将这些抗原融合表达,获得了第一、第二融合蛋白(分别定义为P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ),该两种融合蛋白均可以利用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,包含该两种融合蛋白的Mhp疫苗只需要很少量就能提供很好的免疫效果和全面的保护,对猪没有致病性,具有很好的应用前景。

附图说明

[0041] 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地介绍,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。

[0042] 图1是实施例1中密码子优化后的P36-DnaK-ffh基因PCR扩增产物的凝胶电泳图,其中在1.6kbp位置出现目的条带。

[0043] 图2是实施例1中菌落PCR扩增产物的凝胶电泳图,其中在1.6kbp位置出现目的条带。

[0044] 图3是实施例1中转移载体pF-P36-DnaK-ffh的结构示意图。

[0045] 图4是实施例2中密码子优化后的P97-P46-DnaJ基因PCR扩增产物的凝胶电泳图,其中在1.6kbp位置出现目的条带。

[0046] 图5是实施例2中菌落PCR扩增产物的凝胶电泳图,其中在1.6kbp位置出现目的条带。

[0047] 图6是实施例2中转移载体pF-P97-P46-DnaJ的结构示意图。

[0048] 图7是实施例5所获细胞培养物的SDS-PAGE检测图谱。

[0049] 图8是实施例5所获各SDS-PAGE电泳后产物的Western Blot检测结果图。

[0050] 图9是实施例7中接种空杆状病毒、重组杆状病毒的Sf9细胞的荧光检测图。

[0051] 图10是实施例9所获的各纯化后融合蛋白的灰度扫描图。

具体实施方式

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 本发明实施例一方面提供的第一融合蛋白具有SEQ ID NO:2所示序列或者与SEQ ID NO:2的全长序列95%以上相同的序列的。

[0055] 该第一融合蛋白定义为P36-DnaK-ffh,其中P36、DnaK、ffh是精选的抗原片段,而不是全长蛋白,使该融合蛋白表达量高,免疫原性好。

[0056] 本发明实施例另一方面提供的第二融合蛋白具有SEQ ID NO:6所示序列或者与SEQ ID NO:6的全长序列95%以上相同的序列。

[0057] 该第二融合蛋白定义为P97-P46-DnaJ中,其中P97、P46以及DnaJ蛋白也是精选的抗原片段,而不是全长蛋白,且P97黏附蛋白抗原片段去掉了如下疏水片段:

[0058] VFLELVHQSEYEEQEIIKELDKTVLNLQYQFQEVK,使该融合蛋白表达量显著提高。

[0059] 本发明实施例主要通过精选猪肺炎支原体P36、P46、P97、DnaK、ffh、DnaJ蛋白中的抗原片段,并对其中来源于P97的抗原片段进行优化,再将这些抗原融合表达,获得了P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ这两种融合蛋白,其可以利用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,其不仅表达水平较高,而且蛋白免疫原性好。

[0060] 进一步的,前述P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ融合蛋白可以用于制备猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗,其只需要很少量就能提供很好的免疫效果和全面的保护,且非常安全。

[0061] 例如,在本发明实施例的一个具体实施方案中,一种猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗的制备方法具体可以包括:

[0062] (1) 分别制备用于编码P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ融合蛋白的核酸分子;

[0063] (2) 分别将步骤(1)中制备的各核酸分子克隆到穿梭载体中,得到相应的含有目的基因的重组穿梭载体;

[0064] (3) 将步骤(2)获得的各重组穿梭载体分别转化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;

[0065] (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P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ融合蛋白;

[0066] (5) 将所述P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ融合蛋白混合加入到佐剂中,得到所述疫苗。

[0067] 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P36-DnaK-ffh、P97-P46-DnaJ,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,对猪没有致病性,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。

[0068] 本发明实施例提供的猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗无任何毒性,安全性高,免疫原性好,能够在动物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。

[0069] 本发明实施例提供的猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗在应用时,只需将有效量接种于猪。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。

[0070] 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。

[0071] 实施例1 转移载体pF-P36-DnaK-ffh构建与鉴定

[0072] 1.P36-DnaK-ffh基因扩增与纯化

[0073] 在南京金斯瑞生物科技有限公司合成了密码子优化后的P36-DnaK-ffh基因(SEQ ID NO:1)并克隆到pUC17载体上,得到pUC-P36-DnaK-ffh质粒载体。以pUC-P36-DnaK-ffh质粒作为模板,P36-DnaK-ffh-F、P36-DnaK-ffh-R作为上下游引物进行PCR扩增(P36-DnaK-ffh-F、P36-DnaK-ffh-R的基因序列如SEQ ID NO:3、4所示),扩增体系见表1。

[0074] 表1 P36-DnaK-ffh基因扩增体系

[0075]	反应成分	单位 (μL)
	pUC-P36-DnaK-ffh 质粒	1
	P36-DnaK-ffh-F 引物	2
	P36-DnaK-ffh-R 引物	2
	2× PCR MasterMix	25
	ddH ₂ O	20

[0076] 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。

[0077] 将PCR产物进行凝胶电泳验证目的基因大小,如图1所示,在1.6kbp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。

[0078] 2. 酶切与纯化

[0079] 将pFastBac 1质粒和P36-DnaK-ffh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。

[0080] 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P36-DnaK-ffh基因片段。

[0081] 表2 P36-DnaK-ffh基因酶切反应体系

[0082]	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

[0083] 表3 pFastBac 1质粒酶切反应体系

[0084]	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

[0085] 3. 连接

[0086] 将酶切过的pFastBac 1质粒和P36-DnaK-ffh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。

[0087] 表4 P36-DnaK-ffh基因与pFastBac 1质粒连接体系

[0088]	反应成分	单位 (μL)
	P36-DnaK-ffh 基因酶切产物	6
	酶切质粒	2
	反应 Buffer	1
	T4 DNA 连接酶	1

[0089] 4. 转化

[0090] 取10μL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。

[0091] 5. 菌落PCR和测序鉴定

[0092] 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,P36-DnaK-ffh-F和P36-DnaK-ffh-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1.6kbp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-P36-DnaK-ffh其示意图如图3。

[0093] 实施例2 转移载体pF-P97-P46-DnaJ构建与鉴定

[0094] 1.P97-P46-DnaJ基因扩增与纯化

[0095] 在南京金斯瑞生物科技有限公司合成了密码子优化后的P97-P46-DnaJ基因 (SEQ ID NO:5) 并克隆到pUC17载体上,得到pUC-P97-P46-DnaJ质粒载体。以pUC-P97-P46-DnaJ质粒作为模板,P97-P46-DnaJ-F、P97-P46-DnaJ-R作为上下游引物进行PCR扩增 (P97-P46-DnaJ-F、P97-P46-DnaJ-R的基因序列如SEQ ID NO:7、8所示),扩增体系见表5。

[0096] 表5 P97-P46-DnaJ基因扩增体系

[0097]	反应成分	单位 (μL)
	pUC-P97-P46-DnaJ 质粒	1
	P97-P46-DnaJ-F 引物	2
	P97-P46-DnaJ-R 引物	2
	2× PCR MasterMix	25
	ddH ₂ O	20

[0098] 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。

[0099] 将PCR产物进行凝胶电泳验证目的基因大小,如图4所示,在1.6kbp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。

[0100] 2.酶切与纯化

[0101] 将pFastBac 1质粒和P97-P46-DnaJ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6、表7。

[0102] 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P97-P46-DnaJ基因片段。

[0103] 表6 P97-P46-DnaJ基因酶切反应体系

[0104]	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

[0105] 表7 pFastBac 1质粒酶切反应体系

[0106]	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

[0107] 3.连接

[0108] 将酶切过的pFastBac 1质粒和P97-P46-DnaJ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8。

[0109] 表8 P97-P46-DnaJ基因与pFastBac 1质粒连接体系

	反应成分	单位 (μL)
	P97-P46-DnaJ 基因酶切产物	6
[0110]	酶切质粒	2
	反应 Buffer	1
	T4 DNA 连接酶	1

[0111] 4. 转化

[0112] 取10μL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。

[0113] 5. 菌落PCR和测序鉴定

[0114] 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,P97-P46-DnaJ-F和P97-P46-DnaJ-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5所示,出现1.6kbp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-P97-P46-DnaJ其示意图如图6。

[0115] 实施例3 重组杆状病毒基因组Bac-P36-DnaK-ffh和Bac-P97-P46-DnaJ构建

[0116] 1. DH10Bac菌转化

[0117] 分别取实施例1和实施例2中pF-P36-DnaK-ffh质粒、pF-P97-P46-DnaJ质粒各1μL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。

[0118] 2. 挑选单克隆

[0119] 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。分别获得重组质粒Bacmid-P36-DnaK-ffh和Bacmid-P97-P46-DnaJ。

[0120] 实施例4重组杆状病毒转染

[0121] 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基分别稀释3μg实施例3中的重组Bacmid-P36-DnaK-ffh质粒和重组Bacmid-P97-P46-DnaJ质粒,分别将稀释的转染试剂和质粒混合,轻轻吹匀,制备转染混合物。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。分别获得重组杆状病毒rBac-P36-DnaK-ffh和rBac-P97-P46-DnaJ,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-P36-DnaK-ffh种毒病毒滴度为 $7.5 \times 10^{8.3}$ pfu/mL,rBac-P97-P46-DnaJ种毒病毒滴度为 $3.7 \times 10^{8.5}$ pfu/mL。扩增重组杆状病毒rBac-P36-DnaK-ffh和rBac-P97-P46-DnaJ作为种毒备用。

[0122] 另外按照上面的实施例方法构建表达如下(表9)对照组的重组杆状病毒:

[0123] 表9

组别	表达蛋白名称	蛋白修饰	序列信息
对照组 1	P97*-P46-DnaJ	P97 蛋白加上疏水片段	SEQ ID NO:9
对照组 2	P97*+P46+DnaJ+P36+DnaK+ffh (混合物)	P97 蛋白加上疏水片段	SEQ ID NO:10-15

[0125] 实施例5 SDS-PAGE检测

[0126] 将实施例4中收获的rBac-P36-DnaK-ffh、rBac-P97-P46-DnaJ和对照组1的细胞培养物进行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40 μ L收获的细胞培养物,加入10 μ L的5 $\times$ 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7所示,说明本实施例两组融合蛋白表达量较高。

[0127] 实施例6 Western Blot检测

[0128] 将实施例5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,猪源抗Mhp阳性血清孵育2小时,漂洗,HRP标记的羊抗猪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8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。

[0129] 实施例7 间接免疫荧光检测

[0130] 分别向96孔细胞培养板中加入转染过rBac-P36-DnaK-ffh和rBacP97-P46-DnaJ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。首先与猪源抗MPS多抗血清反应,然后与FITC标记的羊抗猪IgG反应,倒置荧光显微镜观察结果。如图9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。

[0131] 实施例8昆虫细胞的生物反应器无血清悬浮培养

[0132] 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-P36-DnaK-ffh,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100-180rpm。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48h后,加千分之二终浓度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P36-DnaK-ffh蛋白原液。同时以同样的方法制备表达P97-P46-DnaJ和各对照组的蛋白原液。

[0133] 实施例9蛋白纯化

[0134] 1. 将收获的原液使用阳离子交换层析法进行纯化

[0135] 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线性梯度进行洗脱, 从0% buffer B(此时buffer A为100%)到100% buffer B(0.05 M MOPS(钠盐), pH=7.0, 1.5M NaCl) (此时buffer A为0%), 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℃。然后将最后一个洗脱峰(A280)下收集的组份无菌过滤储存在4℃。

[0136] 2. 羟基磷灰石疏水层析

[0137] 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/h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。

[0138] 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10所示, P36-DnaK-ffh蛋白浓度为320 µg/mL, 纯度为92%; P97-P46-DnaJ蛋白浓度为312 µg/mL, 纯度为95%。

[0139] 实施例10琼扩检测

[0140] 使用琼扩方法检测表达的P36-DnaK-ffh蛋白和P97-P46-DnaJ蛋白效价。在琼脂糖凝胶板上打梅花孔, 在梅花孔中间加入Mhp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: P36-DnaK-ffh蛋白琼扩效价为1:256, P97-P46-DnaJ蛋白琼扩效价为1:128。

[0141] 实施例11 疫苗制备

[0142] 将实施例9中所收获的重组蛋白原液按表10分组所示制备成疫苗, 具体操作如下: 将每组适量重组蛋白原液等比例混合加入到MONTANIDE ISA 201 VG佐剂中(体积比为46:54), 使得最终乳化好的疫苗中蛋白浓度为100µg/mL, 乳化、质检合格后置于4℃保存。

[0143] 表10

分组	疫苗组分
免疫组	P36-DnaK-ffh+P97-P46-DnaJ
对照组 A	P36-DnaK-ffh+ P97*-P46-DnaJ
对照组 B	P97*+P46+DnaJ+P36+DnaK+ffh (混合物)

[0145] 实施例12 免疫实验

[0146] 试验一: 非靶动物安全性试验

[0147] 选用16~18g健康小鼠20只,随机分为4组,分别为实施例11中试验组3组,另设空白对照组,每组5只。试验组小鼠各颈部皮下注射对应组分疫苗1.0mL,空白注射同等剂量佐剂,连续观察14天,各组小鼠均不出现死亡及不良反应,无临床异常表现,证明本发明疫苗对非靶动物使用安全。

[0148] 试验二:效力检验

[0149] 1) 抗体水平检测:取14~21日龄仔猪70头,随机分为4组,前3组分别颈部肌肉注射本实施例免疫组、对照组A、对照组B疫苗2mL,第4组设为阴性对照组,颈部肌肉注射MONTANIDE ISA 201 VG佐剂2mL,同条件下隔离饲养,在首次免疫3周后同种剂量相同途径加强免疫一次。分别于首免前和首免后14、28、42日前腔静脉采血,分离血清,用ELISA方法检测各组的抗体水平,结果如表11所示。

[0150] 表11

分组	免疫前 S/P 值	首免后 14 日 S/P 值	首免后 28 日 S/P 值	首免后 42 日 S/P 值
免疫组	0.106	0.844	1.231	1.541
对照组 A	0.112	0.623	0.898	1.021
对照组 B	0.123	0.588	0.745	0.930
阴性对照	0.119	0.124	0.128	0.106

[0152] 判定:S/P<0.3,血清中Mhp抗体阴性;S/P>0.4,血清中Mhp抗体阳性。

[0153] 2) 免疫攻毒保护试验:采血完成后,对免疫组和对照组仔猪用CVCC354株(购自中国兽医药品检查所,该菌株为中国兽医药品监察所保藏的Mhp疫苗效力检验用毒株)气管注射5mL/头(100MID)进行攻毒,攻毒后30天,称取并记录各组猪免疫前后的体重,观察各组猪存活情况并剖杀各组试验猪,对各组试验猪进行肺病变分析,肺脏的尖叶、心叶、中间叶或膈叶前缘呈“胰样变”或“肉样变”,视为病变。按28分计分法记录猪肺炎病变分数,对每只猪的肺病变进行评分,按公式计算肺炎病变减少率。结果如表12所示。

[0154] 表12

分组	仔猪数量/头	平均日增重(kg)	平均肺炎病变得分	平均肺炎病变减少率(%)	攻毒保护率(保护数/总数)
免疫组	10	0.0687	0.51	97.1	10/10
对照组 A	10	0.0477	4.81	72.5	5/10
对照组 B	10	0.0449	4.69	73.2	2/10
阴性对照组	10	0.0154	17.52	/	0/10

[0156] 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作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、苏州米迪生物技术有限公司
- [0003] <120> 猪肺炎支原体基因工程亚单位疫苗、其制备方法及应用
- [0004] <160> 15
- [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 1608
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(人工序列)
- [0010] <400> 1
- [0011] atgagcggca ccgtgctgga taccgcgcgc ctgcagtttg cgattgcgaa acgcgcgaaa 60
- [0012] gtgagcccga acagcgtgca ggcgtatgtg atgggcgaac atggcgatag cagctttgtg 120
- [0013] gcgtatagca acattaaaat tgcgggcgaa tgctttttgc cgtatagcaa actgaccggc 180
- [0014] attgatagca gcaactatga aaaagaactg gaatatccgg tgagccgccg cgcgtatgaa 240
- [0015] attattaacc gcaaacgcgc gaccttttat ggcattggcg cggcgattgc gaaaattgtg 300
- [0016] agcaacatta ttaaagatac caaaaacatt atgattgcgg gcgcgaacct gcgcggcgaa 360
- [0017] tatggctttc atggcgtgaa cattggcgtg ccggtggtgc tgggcgcgaa cggcattgaa 420
- [0018] aaaattattg aaattagcct gaacgataaa gaaaaagaaa aattttgcgaa aagcgtggcg 480
- [0019] attattgata aaatttatca ggatgcgatt aaaaacatta ttattgaaaa ccagaaaccg 540
- [0020] gtggtgctgg aaaacccgaa cggcaaacgc accacccgga gcgtggtggc gtttaaaaac 600
- [0021] aacgaagaaa ttgtggcgca tgcggcgaaa cgccagctgg aaaccaaccc ggaagcgatt 660
- [0022] gcgagcatta aacgcctgat gggcacccgat aaaaccgtgc gcgcgaacga acgcgattat 720
- [0023] aaaccggaag aaattagcgc gaaaattctg gcgtatctga aagaatatgc ggaaaaaaaa 780
- [0024] attggccata aagtgaccaa agcggtgatt accgtgccgg cgtattttga taacgcgcag 840
- [0025] cgcaagcga ccaaaaacgc gggcaaaatt gcgggcctgc aggtggaacg cattattaac 900
- [0026] gaaccgaccg cggcggcgct ggcgtttggc ctggataaaa ccgaaaaaga aatgaaagtg 960
- [0027] ctggtgtatg atctgggcgg cggcaccttt gatgtgagcg tgctggaact gagcggcggc 1020
- [0028] acctttgaag tgctgagcac cagcggcgat aaccatctgg gcgcgatga ttgggataac 1080
- [0029] gaatatgtgg aaaaaagccc ggtgcagatt gcgaaagaag cgctgattta tagcaaaaac 1140
- [0030] aacgattttg atctggtgat ttttgatacc gcgggccgcc tgagcattaa cgaagaactg 1200
- [0031] atgaacgaac tgagcgaaat taaagaaaac attaaaccgg atcagattct gtttattctg 1260
- [0032] gatgcgctga gcggccagga tattattaac gtggcgcaga tttttaacca gaaaattaac 1320
- [0033] ctgaccggcg cgattattac caaactggat agcaacgcgc gcgcgggcgc ggcgctgagc 1380
- [0034] attacccatc tgctgaaaat tccggtgctg ctggtgggca ccggcgaaaa aattagcgcg 1440
- [0035] ctggaactgt ttcattccgaa ccgcatggcg gatcgcatc tgggcatggg cgatgtgcgc 1500
- [0036] agcctgctgg aacaggcgga agaaaacatt gataaaaaaa ccgtgaaaaa actgagccat 1560
- [0037] cgcattgtta gcggccagtt tgatctgaac gatctgctga acagctaa 1608
- [0038] <210> 2
- [0039] <211> 535
- [0040] <212> PRT
- [0041] <213> 人工序列(人工序列)

[0042]	<400> 2															
[0043]	Met	Ser	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Thr	Ala	Arg	Leu	Gln	Phe	Ala	Ile	Ala
[0044]	1				5					10					15	
[0045]	Lys	Arg	Ala	Lys	Val	Ser	Pro	Asn	Ser	Val	Gln	Ala	Tyr	Val	Met	Gly
[0046]				20					25					30		
[0047]	Glu	His	Gly	Asp	Ser	Ser	Phe	Val	Ala	Tyr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ile	Ala
[0048]			35					40					45			
[0049]	Gly	Glu	Cys	Phe	Cys	Ala	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser
[0050]		50					55					60				
[0051]	Asn	Tyr	Glu	Lys	Glu	Leu	Glu	Tyr	Pro	Val	Ser	Arg	Arg	Ala	Tyr	Glu
[0052]	65					70					75					80
[0053]	Ile	Ile	Asn	Arg	Lys	Arg	Ala	Thr	Phe	Tyr	Gly	Ile	Gly	Ala	Ala	Ile
[0054]					85					90					95	
[0055]	Ala	Lys	Ile	Val	Ser	Asn	Ile	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	Asn	Ile	Met	Ile
[0056]				100					105					110		
[0057]	Ala	Gly	Ala	Asn	Leu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Gly	Phe	His	Gly	Val	Asn	Ile
[0058]			115					120					125			
[0059]	Gly	Val	Pro	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Ile	Glu	Lys	Ile	Ile	Glu
[0060]		130					135					140				
[0061]	Ile	Ser	Leu	Asn	Asp	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Phe	Ala	Lys	Ser	Val	Ala
[0062]	145					150					155					160
[0063]	Ile	Ile	Asp	Lys	Ile	Tyr	Gln	Asp	Ala	Ile	Lys	Asn	Ile	Ile	Ile	Glu
[0064]				165						170					175	
[0065]	Asn	Gln	Lys	Pro	Val	Val	Leu	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Lys	Arg	Thr	Thr
[0066]				180					185					190		
[0067]	Pro	Ser	Val	Val	Ala	Phe	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ile	Val	Gly	Asp	Ala
[0068]			195					200					205			
[0069]	Ala	Lys	Arg	Gln	Leu	Glu	Thr	Asn	Pro	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	Ile	Lys
[0070]		210					215					220				
[0071]	Arg	Leu	Met	Gly	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Arg	Ala	Asn	Glu	Arg	Asp	Tyr
[0072]	225					230					235					240
[0073]	Lys	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ala	Lys	Ile	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Glu	Tyr
[0074]				245						250					255	
[0075]	Ala	Glu	Lys	Lys	Ile	Gly	His	Lys	Val	Thr	Lys	Ala	Val	Ile	Thr	Val
[0076]				260					265					270		
[0077]	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asp	Asn	Ala	Gln	Arg	Glu	Ala	Thr	Lys	Asn	Ala	Gly
[0078]			275					280					285			
[0079]	Lys	Ile	Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Glu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro	Thr	Ala
[0080]		290					295					300				
[0081]	Ala	Ala	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Asp	Lys	Thr	Glu	Lys	Glu	Met	Lys	Val
[0082]	305					310					315					320
[0083]	Leu	Val	Tyr	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Val	Leu	Glu

[0084]	325	330	335
[0085]	Leu Ser Gly Gly Thr Phe Glu Val Leu Ser Thr Ser Gly Asp Asn His		
[0086]	340	345	350
[0087]	Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp Asn Glu Tyr Val Glu Lys Ser Pro Val		
[0088]	355	360	365
[0089]	Gln Ile Ala Lys Glu Ala Leu Ile Tyr Ser Lys Asn Asn Asp Phe Asp		
[0090]	370	375	380
[0091]	Leu Val Ile Phe Asp Thr Ala Gly Arg Leu Ser Ile Asn Glu Glu Leu		
[0092]	385	390	395
[0093]	Met Asn Glu Leu Ser Glu Ile Lys Glu Asn Ile Lys Pro Asp Gln Ile		
[0094]	405	410	415
[0095]	Leu Phe Ile Leu Asp Ala Leu Ser Gly Gln Asp Ile Ile Asn Val Ala		
[0096]	420	425	430
[0097]	Gln Ile Phe Asn Gln Lys Ile Asn Leu Thr Gly Ala Ile Ile Thr Lys		
[0098]	435	440	445
[0099]	Leu Asp Ser Asn Ala Arg Ala Gly Ala Ala Leu Ser Ile Thr His Leu		
[0100]	450	455	460
[0101]	Leu Lys Ile Pro Val Leu Leu Val Gly Thr Gly Glu Lys Ile Ser Ala		
[0102]	465	470	475
[0103]	Leu Glu Leu Phe His Pro Asn Arg Met Ala Asp Arg Ile Leu Gly Met		
[0104]	485	490	495
[0105]	Gly Asp Val Arg Ser Leu Leu Glu Gln Ala Glu Glu Asn Ile Asp Lys		
[0106]	500	505	510
[0107]	Lys Thr Val Lys Lys Leu Ser His Arg Met Phe Ser Gly Gln Phe Asp		
[0108]	515	520	525
[0109]	Leu Asn Asp Leu Leu Asn Ser		
[0110]	530	535	
[0111]	<210> 3		
[0112]	<211> 33		
[0113]	<212> DNA		
[0114]	<213> 人工序列(人工序列)		
[0115]	<400> 3		
[0116]	ataggatcca tgagcggcac cgtgctggat acc 33		
[0117]	<210> 4		
[0118]	<211> 36		
[0119]	<212> DNA		
[0120]	<213> 人工序列(人工序列)		
[0121]	<400> 4		
[0122]	ataaagcttt tagctgttca gcagatcggt cagatc 36		
[0123]	<210> 5		
[0124]	<211> 1647		
[0125]	<212> DNA		

[0126]	<213> 人工序列(人工序列)
[0127]	<400> 5
[0128]	atggaaacca ccaaagaagg caaacgcgaa gaagtggata aaaaagtgaa agaactggat 60
[0129]	aacaaaatta aaggcattct gccgcagccg ccggcggcga aaccggaagc ggcgaaaccg 120
[0130]	gtggcggcga aaccggaaac caccaaaccg gtggcggcga aaccggaagc ggcgaaaccg 180
[0131]	gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaaccg gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaaccg 240
[0132]	gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaaccg gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaaccg 300
[0133]	gaagcggcga aaccggtggc gaccaacacc ggcttttagcc tgaccaacaa accgaaagaa 360
[0134]	gattattttc cgatggcggt tagctataaa ctggaatata ccgatgaaaa caaactgagc 420
[0135]	ctgaaaaccc cggaatttaa cgtgaccagc gatcagtatc agaaactgag ccatccgatg 480
[0136]	atgaccgaag gcagcagcaa ccagggcaaa aaaagcgaag gcaccccgaa ccagggcaaa 540
[0137]	aaagcgggaag gcgcgccgaa ccagggcaaa aaagcgggaag gcaccccgaa ccagggcaaa 600
[0138]	aaagcggaaa tgaaaaacag cgaaaaacaaa attattgatc tgagcccgga tggcgaaaac 660
[0139]	gcggtgtatg tgccgggctg gaactatggc accgcgggcc agcgcattca gagctttctg 720
[0140]	accattaaca aagatccggc gggcggcaac aaaattaaag cgggtgggcag caaacggcg 780
[0141]	agcattttta aaggctttct ggcccgcaac gatggcatgg cggaacaggc gattacaaaa 840
[0142]	ctgaaactgg aaggctttga taccagaaa atttttgtga ccggccagga ttataacgat 900
[0143]	aaagcgaaaa cttttattaa agatggcgat cagaacatga ccatttataa accggataaa 960
[0144]	gtgctgggca aagtggcggg ggaagtgtct gcggtgtga ttgcgaaaaa aaacaaagcg 1020
[0145]	agccgcagcg aagtggaaaa cgaactgaaa gcgaaactgc cgaacattag ctttaaatat 1080
[0146]	gataaccaga cctataaagt gcagggcaaa aacattaaca ccattctggt gagcccgggtg 1140
[0147]	attgtgacca aagcgaacgt ggataaccgc gatgcggtgg aaaccaaaga agaagtgacc 1200
[0148]	attaaaattc cggcgggcat tcaggatggc atgtttattc gcgtggcggg ctttggcggc 1260
[0149]	ccgggccata aaggcggccc gagcggcgat ctgcatctgg aaattaacgt gcgccagcat 1320
[0150]	aaacatttta cccgcagcgg caacgatatt catgtgaaca tgccggtgag cattattgat 1380
[0151]	attattaacc agaacaccgt ggaagtgccg agcccagccg gcctgaaaaa agtgcgcctg 1440
[0152]	tatgattatt ataaaagcgg ccagattgtg aacgtgctgc gcgcgggcgc gccgatccg 1500
[0153]	aaaaacccgc gcattattgg cgatctgaaa gtgcatctga ttttttatat tccggaattt 1560
[0154]	agcccgcgcc agaaagatga actgaaccag gtgtttgcgc agattaacga taaaacaaaa 1620
[0155]	gcgaaatggc tgaaagaatt tcagtaa 1647
[0156]	<210> 6
[0157]	<211> 548
[0158]	<212> PRT
[0159]	<213> 人工序列(人工序列)
[0160]	<400> 6
[0161]	Met Glu Thr Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val
[0162]	1 5 10 15
[0163]	Lys Glu Leu Asp Asn Lys Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Ala
[0164]	20 25 30
[0165]	Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Thr Thr
[0166]	35 40 45
[0167]	Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys

[0168]	50	55	60
[0169]	Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro		
[0170]	65	70	75
[0171]	Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val		
[0172]	85	90	95
[0173]	Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Asn Thr Gly Phe		
[0174]	100	105	110
[0175]	Ser Leu Thr Asn Lys Pro Lys Glu Asp Tyr Phe Pro Met Ala Phe Ser		
[0176]	115	120	125
[0177]	Tyr Lys Leu Glu Tyr Thr Asp Glu Asn Lys Leu Ser Leu Lys Thr Pro		
[0178]	130	135	140
[0179]	Glu Ile Asn Val Thr Ser Asp Gln Tyr Gln Lys Leu Ser His Pro Met		
[0180]	145	150	155
[0181]	Met Thr Glu Gly Ser Ser Asn Gln Gly Lys Lys Ser Glu Gly Thr Pro		
[0182]	165	170	175
[0183]	Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Gly Ala Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala		
[0184]	180	185	190
[0185]	Glu Gly Thr Pro Asn Gln Gly Lys Lys Ala Glu Met Lys Asn Ser Glu		
[0186]	195	200	205
[0187]	Asn Lys Ile Ile Asp Leu Ser Pro Asp Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val		
[0188]	210	215	220
[0189]	Pro Gly Trp Asn Tyr Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu		
[0190]	225	230	235
[0191]	Thr Ile Asn Lys Asp Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly		
[0192]	245	250	255
[0193]	Ser Lys Pro Ala Ser Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly		
[0194]	260	265	270
[0195]	Met Ala Glu Gln Ala Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr		
[0196]	275	280	285
[0197]	Gln Lys Ile Phe Val Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr		
[0198]	290	295	300
[0199]	Phe Ile Lys Asp Gly Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys		
[0200]	305	310	315
[0201]	Val Leu Gly Lys Val Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys		
[0202]	325	330	335
[0203]	Lys Asn Lys Ala Ser Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys		
[0204]	340	345	350
[0205]	Leu Pro Asn Ile Ser Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln		
[0206]	355	360	365
[0207]	Gly Lys Asn Ile Asn Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys		
[0208]	370	375	380
[0209]	Ala Asn Val Asp Asn Pro Asp Ala Val Glu Thr Lys Glu Glu Val Thr		

[0210]	385	390	395	400
[0211]	Ile Lys Ile Pro Ala Gly Ile Gln Asp Gly Met Phe Ile Arg Val Ala			
[0212]		405	410	415
[0213]	Gly Phe Gly Gly Pro Gly His Lys Gly Gly Pro Ser Gly Asp Leu His			
[0214]		420	425	430
[0215]	Leu Glu Ile Asn Val Arg Gln His Lys His Phe Thr Arg Ser Gly Asn			
[0216]		435	440	445
[0217]	Asp Ile His Val Asn Met Pro Val Ser Ile Ile Asp Ile Ile Asn Gln			
[0218]		450	455	460
[0219]	Asn Thr Val Glu Val Pro Ser Pro Thr Gly Leu Lys Lys Val Arg Leu			
[0220]	465	470	475	480
[0221]	Tyr Asp Tyr Tyr Lys Ser Gly Gln Ile Val Asn Val Leu Arg Ala Gly			
[0222]		485	490	495
[0223]	Ala Pro Asp Pro Lys Asn Pro Arg Ile Ile Gly Asp Leu Lys Val His			
[0224]		500	505	510
[0225]	Leu Ile Phe Tyr Ile Pro Glu Phe Ser Pro Arg Gln Lys Asp Glu Leu			
[0226]		515	520	525
[0227]	Asn Gln Val Phe Ala Gln Ile Asn Asp Lys Thr Lys Ala Lys Trp Leu			
[0228]		530	535	540
[0229]	Lys Glu Phe Gln			
[0230]	545			
[0231]	<210> 7			
[0232]	<211> 30			
[0233]	<212> DNA			
[0234]	<213> 人工序列(人工序列)			
[0235]	<400> 7			
[0236]	ataggatcca tggaaccac caaagaaggc 30			
[0237]	<210> 8			
[0238]	<211> 33			
[0239]	<212> DNA			
[0240]	<213> 人工序列(人工序列)			
[0241]	<400> 8			
[0242]	ataaagcttt tactgaaatt ctttcagcca ttt 33			
[0243]	<210> 9			
[0244]	<211> 1749			
[0245]	<212> DNA			
[0246]	<213> 人工序列(人工序列)			
[0247]	<400> 9			
[0248]	atggaacca ccaagaagg caaacgcgaa gaagtggata aaaaagtga agaactggat 60			
[0249]	aacaaaatta aaggcattct gccgcagccg ccggcggcga aaccggaagc ggcgaaaccg 120			
[0250]	gtggcggcga aaccggaac caccaaaccg gtggcggcga aaccggaagc ggcgaaaccg 180			
[0251]	gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaaccg gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaaccg 240			

[0252]	gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaccg gaagcggcga aaccggtggc ggcgaaccg	300
[0253]	gaagcggcga aaccggtggc gaccaacacc ggcttttagcc tgaccaacaa accgaaagaa	360
[0254]	gattattttc cgatggcggt tagctataaa ctggaatata ccgatgaaaa caaactgagc	420
[0255]	ctgaaaaccc cggaattaa cgtgtttctg gaactggtgc atcagagcga atatgaagaa	480
[0256]	caggaaatta ttaaagaact ggataaaacc gtgctgaacc tgcagtatca gtttcaggaa	540
[0257]	gtgaaagtga ccagcgatca gtatcagaaa ctgagccatc cgatgatgac cgaaggcagc	600
[0258]	agcaaccagg gcaaaaaaag cgaaggcacc ccgaaccagg gcaaaaaaagc ggaaggcgcg	660
[0259]	ccgaaccagg gcaaaaaaagc ggaaggcacc ccgaaccagg gcaaaaaaagc ggaatgaaa	720
[0260]	aacagcga aaacaaattat tgatctgagc ccgatggcg aaaacgcggt gtatgtgccg	780
[0261]	ggctggaact atggcaccgc gggccagcgc attcagagct ttctgacat taacaaagat	840
[0262]	ccggcggcg gcaacaaaat taaagcgtg ggcagcaaac cggcgagcat ttttaaaggc	900
[0263]	tttctggcg cgaacgatg catggcgga caggcgatta ccaaactgaa actggaaggc	960
[0264]	tttgataccc agaaaatttt tgtgaccgc caggattata acgataaagc gaaaaccttt	1020
[0265]	attaaagatg gcgatcagaa catgaccatt tataaacgg ataaagtgt gggcaaagt	1080
[0266]	gcggtggaag tgctgcgct gctgattgcg aaaaaaaca aagcgagccg cagcgaagt	1140
[0267]	gaaaacgaac tgaaagcga actgccgaac attagcttta aatatgataa ccagacctat	1200
[0268]	aaagtgcagg gcaaaaacat taacaccatt ctggtgagcc cgggtgattgt gaccaaagc	1260
[0269]	aactggata acccgatgc ggtggaacc aaagaagaag tgaccattaa aattccggcg	1320
[0270]	ggcattcagg atggcatgtt tattcgcgtg gcgggcttg gcggcccgg ccataaaggc	1380
[0271]	ggcccgagcg gcgatctgca tctggaatt aacgtgcgc agcataaaca ttttaccgc	1440
[0272]	agcggaacg atattcatgt gaacatgcc gtgagcatta ttgatattat taaccagaac	1500
[0273]	accgtggaag tgccgagccc gaccggcctg aaaaaagtgc gcctgtatga ttattataaa	1560
[0274]	agcgccaga ttgtgaacgt gctgcgcgc ggcgcgccg atccgaaaaa cccgcgcatt	1620
[0275]	attggcgatc tgaaagtgc tctgattttt tatattccgg aatttagccc gcgccagaaa	1680
[0276]	gatgaactga accagtggt tgccgagatt aacgataaaa ccaaagcga atggctgaaa	1740
[0277]	gaatttcag	1749
[0278]	<210>	10
[0279]	<211>	711
[0280]	<212>	DNA
[0281]	<213>	人工序列(人工序列)
[0282]	<400>	10
[0283]	gaaaccacca aagaaggcaa acggaagaa gtggataaaa aagtgaaga actggataac	60
[0284]	aaaattaaag gcattctgcc gcagccgcc ggcgcgaaac cggaagcggc gaaaccggtg	120
[0285]	gcggcgaaac cggaaccac caaacgggtg gcggcgaaac cggaagcggc gaaaccgga	180
[0286]	gcggcgaaac cgggtggcgc gaaaccgga gcggcgaaac cgggtggcgc gaaaccgga	240
[0287]	gcggcgaaac cgggtggcgc gaaaccgga gcggcgaaac cgggtggcgc gaaaccgga	300
[0288]	gcggcgaaac cgggtggcgc caacaccgc tttagcctga ccaacaaacc gaaagaagt	360
[0289]	tattttccga tggcgtttag ctataaactg gaataaccg atgaaaaca actgagcctg	420
[0290]	aaaaccccg aaattaacgt gtttctgga ctggtgcatc agagcgaata tgaagaacag	480
[0291]	gaaattatta aagaactgga taaaccggt ctgaacctgc agtatcagtt tcaggaagt	540
[0292]	aaagtacca gcgatcagta tcagaaactg agccatccga tgatgaccga aggcagcagc	600
[0293]	aaccagggca aaaaaagcga aggcacccg aaccagggca aaaaagcga aggcgcgccg	660

[0294] aaccagggca aaaaagcgga aggcaccccg aaccagggca aaaaagcgga a 711
 [0295] <210> 11
 [0296] <211> 567
 [0297] <212> DNA
 [0298] <213> 人工序列(人工序列)
 [0299] <400> 11
 [0300] atgaaaaaca gcgaaaacaa aattattgat ctgagcccg atggcgaaaa cgcggtgtat 60
 [0301] gtgccgggct ggaactatgg caccgcgggc cagcgcatte agagctttct gaccattaac 120
 [0302] aaagatccgg cgggcggcaa caaaattaaa gcggtgggca gcaaaccggc gagcattttt 180
 [0303] aaagcttttc tggcgccgaa cgatggcatg gcggaacagg cgattaccaa actgaaactg 240
 [0304] gaagcttttg ataccagaa aatttttgtg accggccagg attataacga taaagcgaaa 300
 [0305] acctttatta aagatggcga tcagaacatg accatttata aaccgataa agtgctgggc 360
 [0306] aaagtggcgg tggaagtgtc gcgcgtgtg attgcgaaaa aaaacaaagc gagccgcagc 420
 [0307] gaagtggaaa acgaactgaa agcgaaactg ccgaacatta gctttaaata tgataaccag 480
 [0308] acctataaag tgcagggcaa aaacattaac accattcttg tgagcccggt gattgtgacc 540
 [0309] aaagcgaacg tggataaccc ggatgcg 567
 [0310] <210> 12
 [0311] <211> 468
 [0312] <212> DNA
 [0313] <213> 人工序列(人工序列)
 [0314] <400> 12
 [0315] gtggaacca aagaagaagt gaccattaaa attccggcgg gcattcagga tggcatgttt 60
 [0316] attcgcgtgg cgggctttgg cggcccgggc cataaaggcg gcccgagcgg cgatctgcat 120
 [0317] ctggaaatta acgtgcgcca gcataaacat tttaccgca gcgcaacga tattcatgtg 180
 [0318] aacatgccgg tgagcattat tgatattatt aaccagaaca ccgtggaagt gccgagcccc 240
 [0319] accggcctga aaaaagtgcg cctgtatgat tattataaaa gcggccagat tgtgaacgtg 300
 [0320] ctgcgcgcgg gcgcgccgga tccgaaaaac ccgcgcatta ttggcgatct gaaagtgcac 360
 [0321] ctgatttttt atattccgga atttagcccg cgccagaaag atgaactgaa ccaggtgttt 420
 [0322] gcgcagatta acgataaaac caaagcgaaa tggctgaaag aatttcag 468
 [0323] <210> 13
 [0324] <211> 516
 [0325] <212> DNA
 [0326] <213> 人工序列(人工序列)
 [0327] <400> 13
 [0328] agcggcacccg tgctggatac cgcgcgccgt cagtttgca ttgcgaaacg cgcgaaagt 60
 [0329] agccgaaca gcgtgcaggc gtatgtgatg ggcaacatg gcgatagcag ctttgtggcg 120
 [0330] tatagcaaca ttaaaattgc gggcgaatgc ttttgcgct atagcaaact gaccggcatt 180
 [0331] gatagcagca actatgaaaa agaactggaa tatccggtga gccgccgcgc gtatgaaatt 240
 [0332] attaaccgca aacgcgcgac cttttatggc attggcgcg cgattgcgaa aattgtgagc 300
 [0333] aacattatta aagataccaa aaacattatg attgcgggcg cgaacctgcg cggcgaatat 360
 [0334] ggctttcatg gcgtgaacat tggcgtgccg gtggtgctgg gcgcgaacgg cattgaaaaa 420
 [0335] attattgaaa ttagcctgaa cgataaagaa aaagaaaaat ttgcgaaaag cgtggcgatt 480

[0336] attgataaaa tttatcagga tgcgattaaa aacatt 516
[0337] <210> 14
[0338] <211> 564
[0339] <212> DNA
[0340] <213> 人工序列(人工序列)
[0341] <400> 14
[0342] attattgaaa accagaaacc ggtggtgctg gaaaaccga acggcaaacg caccaccccg 60
[0343] agcgtggtgg cgtttaaaaa caacgaagaa attgtggcg atgcggcgaa acgccagctg 120
[0344] gaaaccaacc cggaagcgat tgcgagcatt aaacgcctga tgggcaccga taaaaccgtg 180
[0345] cgcgcgaacg aacgcgatta taaaccgaa gaaattagcg cgaaaattct ggcgtatctg 240
[0346] aaagaatatg cggaaaaaaa aattggccat aaagtacca aagcgggtgat taccgtgccg 300
[0347] gcgtattttg ataacgcga gcgcgaagcg accaaaaacg cgggcaaaat tgcgggcctg 360
[0348] caggtggaac gcattattaa cgaaccgacc gcggcggcg tggcgtttgg cctggataaa 420
[0349] accgaaaaag aaatgaaagt gctggtgtat gatctggcg gcggcacctt tgatgtgagc 480
[0350] gtgctggaac tgagcggcgg caccttgaa gtgctgagca ccagcggcga taaccatctg 540
[0351] ggcgcgatg attgggataa cgaa 564
[0352] <210> 15
[0353] <211> 522
[0354] <212> DNA
[0355] <213> 人工序列(人工序列)
[0356] <400> 15
[0357] tatgtgaaa aaagcccgt gcagattgcg aaagaagcg tgatttatag caaaaacaac 60
[0358] gattttgatc tggtgatttt tgataccgcg ggccgcctga gcattaacga agaactgatg 120
[0359] aacgaactga gcgaaattaa agaaaacatt aaaccggatc agattctgtt tattctggat 180
[0360] gcgctgagcg gccaggatat tattaacgtg gcgcagattt ttaaccagaa aattaacctg 240
[0361] accggcgcga ttattaccaa actggatagc aacgcgcgcg cgggcgcgcg gctgagcatt 300
[0362] acccatctgc tgaattcc ggtgctgctg gtgggcaccg gcgaaaaat tagcgcgctg 360
[0363] gaactgtttc atccgaaccg catggcgat cgcattctgg gcatgggcga tgtgcgagc 420
[0364] ctgctggaac aggcggaaga aaacattgat aaaaaaccg tgaaaaaact gagccatcgc 480
[0365] atgttttagcg gccagtttga tctgaacgat ctgctgaaca gc 522

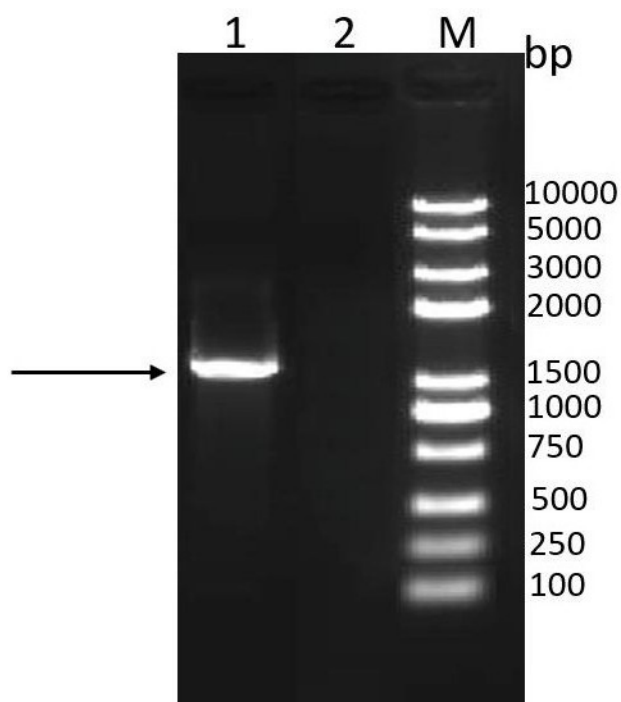


图1

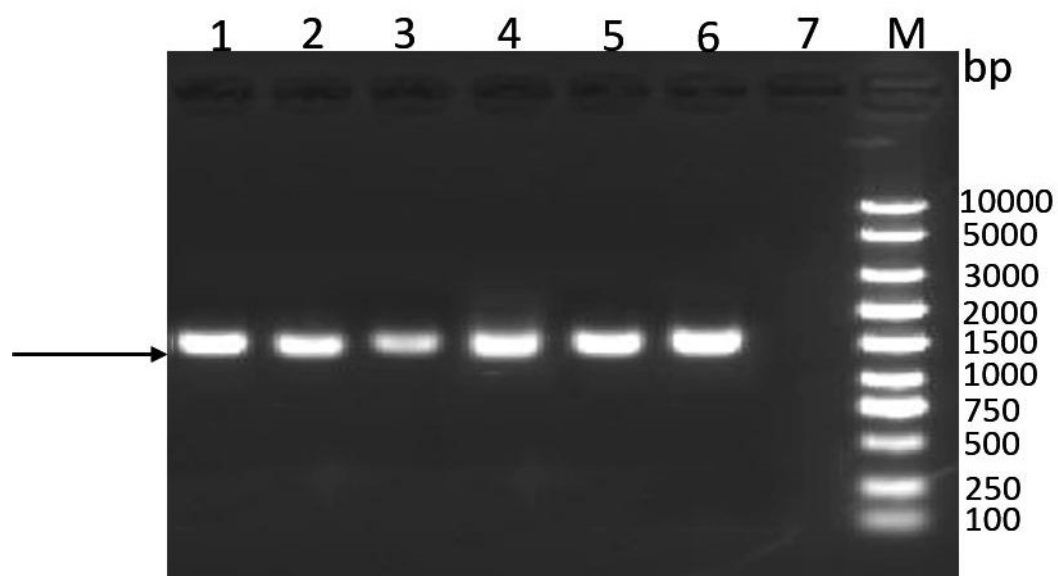


图2



图3

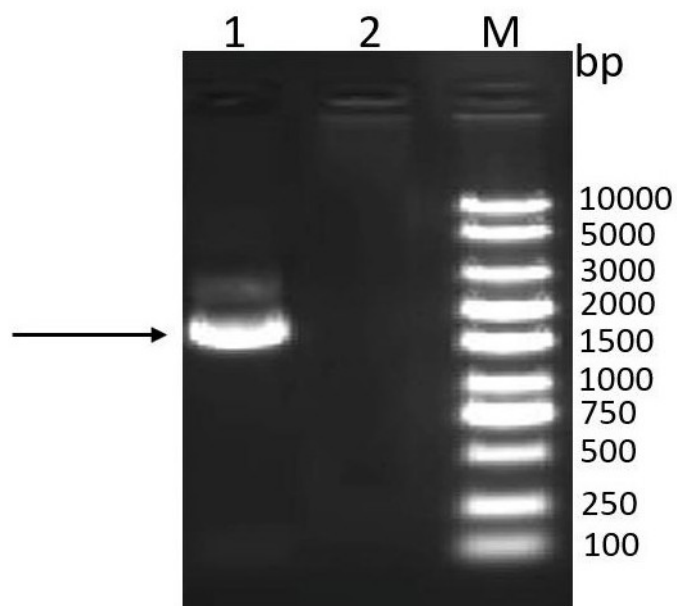


图4

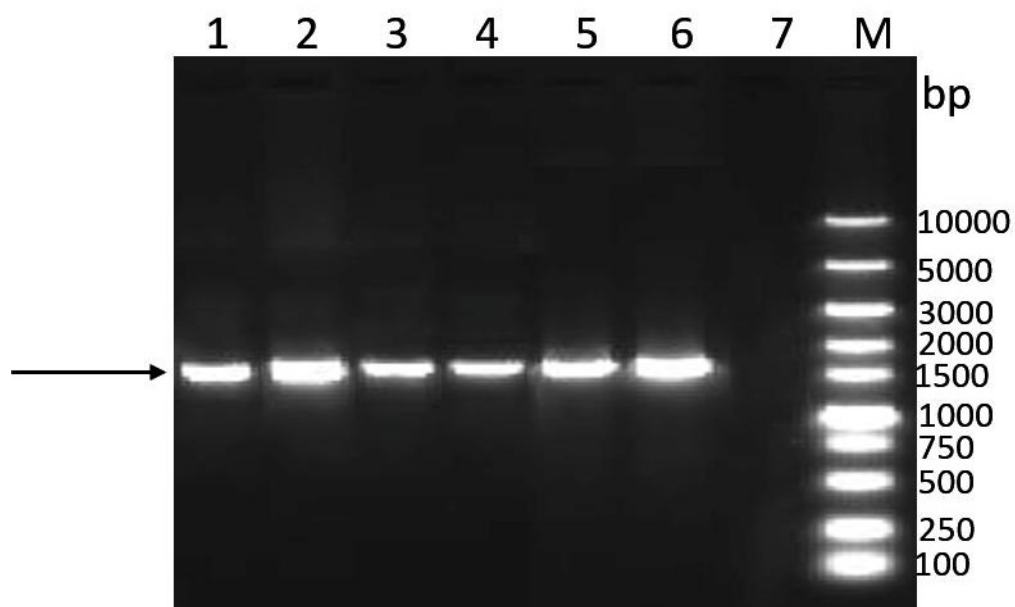


图5

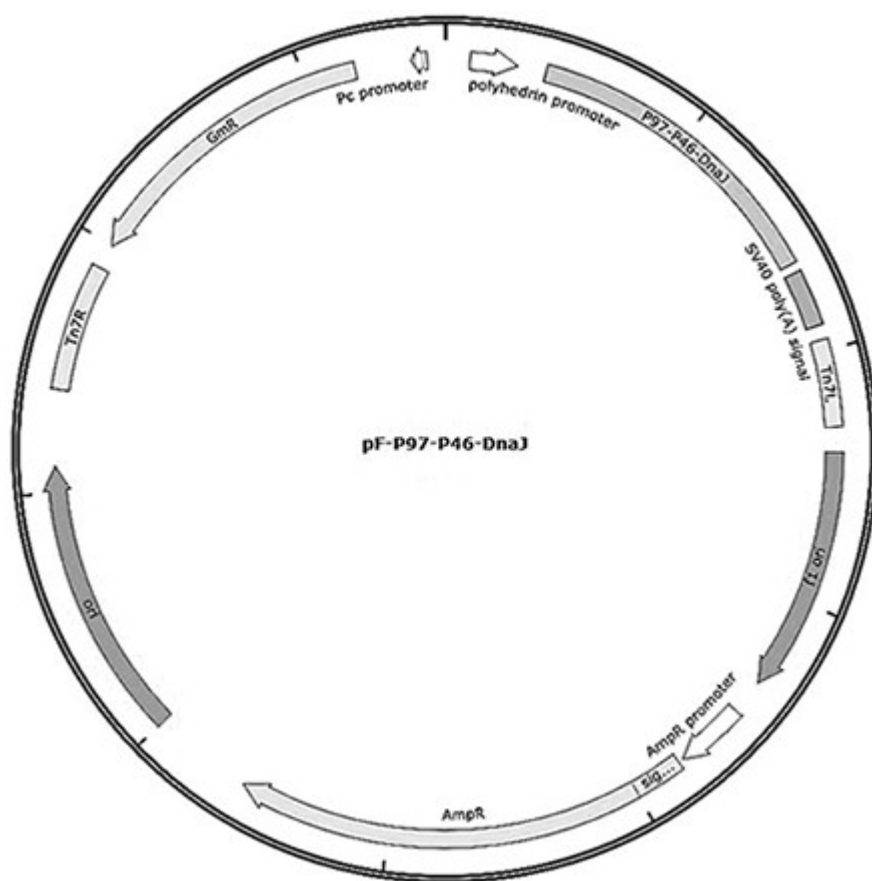


图6

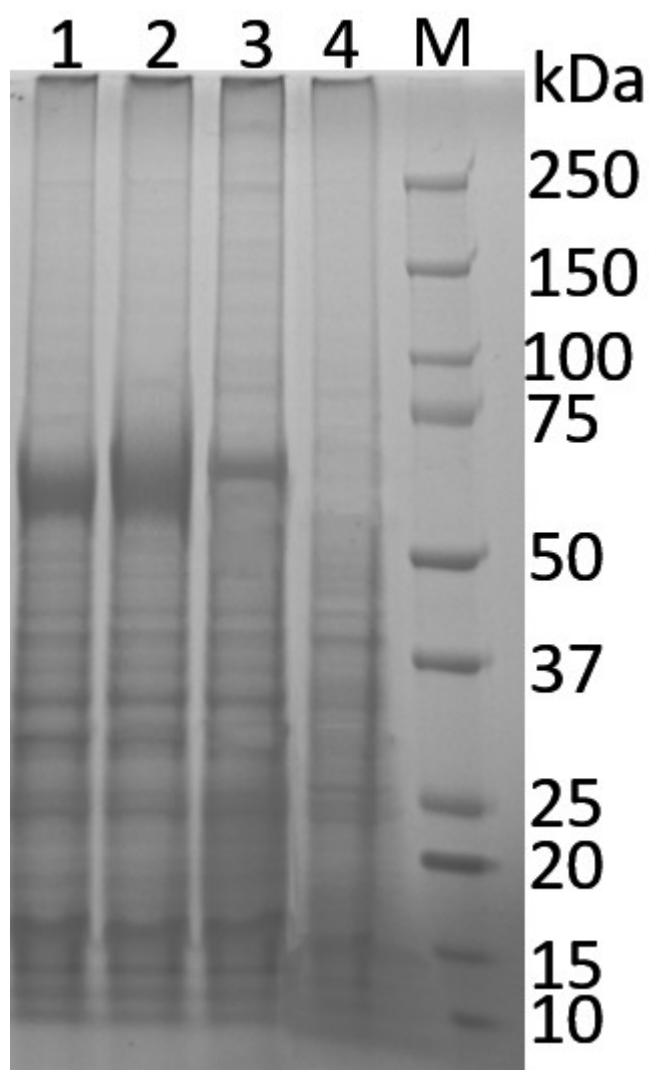


图7

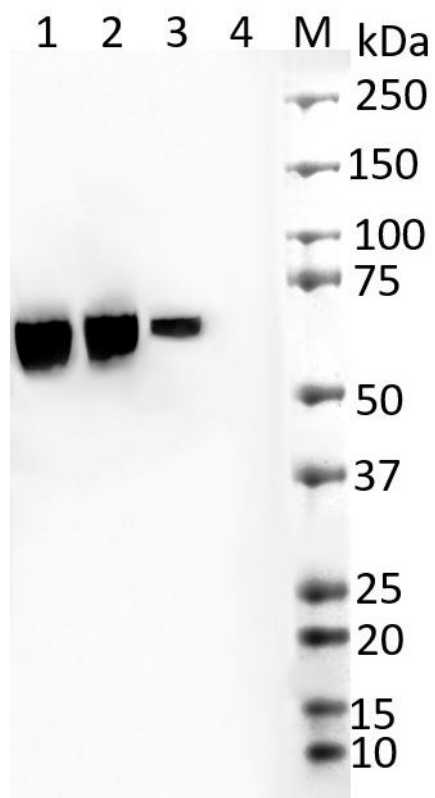


图8

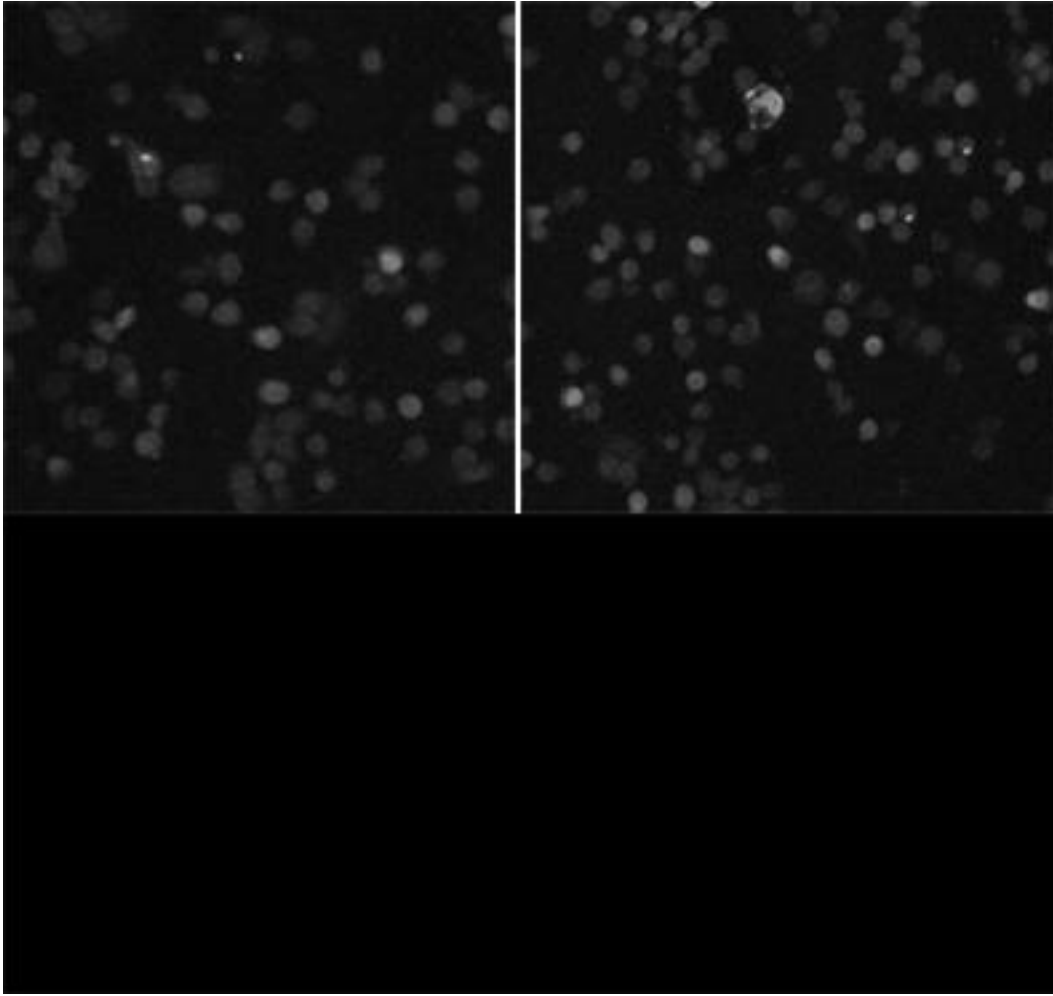


图9

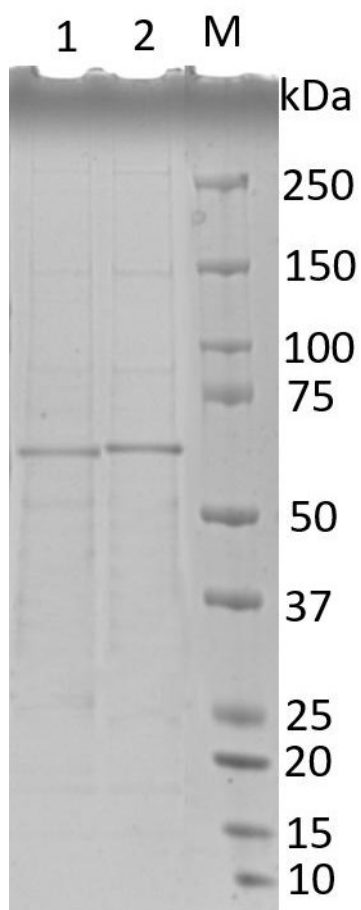


图10