



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106916832 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 201710256371.X

(22) 申请日 2017.04.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106916832 A

(43) 申请公布日 2017.07.04

(73) 专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730046 甘肃省兰州市城关区盐场堡
徐家坪1号

(72) 发明人 郑海学 杨帆 朱紫祥 曹伟军
张克山 李丹 田宏 靳野
郭建宏 何继军 才学鹏 刘湘涛

(74) 专利代理机构 北京鸿德海业知识产权代理
事务所(普通合伙) 11412
代理人 袁媛

(51) Int.Cl.

C12N 15/42 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 39/135 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101838658 A, 2010.09.22

CN 103266091 A, 2013.08.18

CN 103266090 A, 2013.08.28

审查员 夏文静

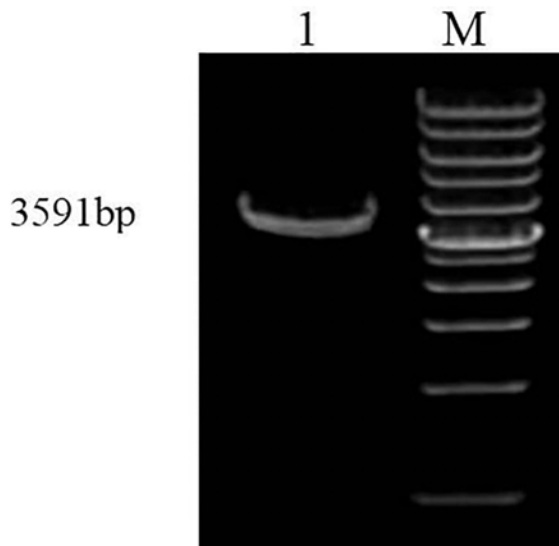
权利要求书2页 说明书10页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

O型口蹄疫病毒重组核酸、重组疫苗株及其
制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种分离的口蹄疫病毒核酸及其在制备口蹄疫病毒重组核酸和/或口蹄疫重组疫苗株中的用途、一种口蹄疫病毒重组核酸、包含所述重组核酸的口蹄疫重组病毒、由所述重组核酸编码的口蹄疫重组病毒、包含所述口蹄疫重组病毒的口蹄疫重组疫苗株、一种制备所述口蹄疫重组病毒的方法、由所述方法制备得到的口蹄疫重组疫苗以及所述口蹄疫重组疫苗在制备用于预防和/或控制动物口蹄疫疾病的药物中的用途。



1. 一种口蹄疫病毒重组核酸,其特征在于,所述重组核酸的序列包含O/CHA/99口蹄疫病毒株的核酸序列,但是其中所述O/CHA/99口蹄疫病毒株的L基因中与P1基因相连接的177个连续的核苷酸序列、全部P1基因、以及P2基因中与P1基因相连接的1206个连续的核苷酸序列被SEQ ID NO:1所示的核酸替换。

2. 一种包含如权利要求1所述的重组核酸的口蹄疫重组病毒。

3. 一种由如权利要求1所述的重组核酸编码的口蹄疫重组病毒。

4. 一种包含如权利要求2或3所述的口蹄疫重组病毒的口蹄疫重组疫苗株。

5. 如权利要求4所述的口蹄疫重组疫苗株,其特征在于,所述口蹄疫重组疫苗株能够激发对O型口蹄疫病毒株的免疫活性。

6. 如权利要求5所述的口蹄疫重组疫苗株,其特征在于,所述O型口蹄疫病毒株为Mya-98、PanAsia或Cathay谱系毒株。

7. 如权利要求6所述的口蹄疫重组疫苗株,其特征在于,所述O型口蹄疫病毒株为O/BY/CHA/2010、O/0834或O/0718,并且所述口蹄疫重组疫苗株对O/BY/CHA/2010、O/0834或O/0718的PD₅₀值均大于6。

8. 一种制备口蹄疫重组病毒的方法,其特征在于,包括如下步骤:

1)、用SEQ ID NO:1所示的核酸序列替换真核转录质粒prO/CHA/99的L基因中与P1基因相连接的177个连续的核苷酸序列、全部P1基因、以及P2基因中与P1基因相连接的1206个连续的核苷酸序列,得到prO-FMDV的重组质粒;

2)、用步骤1)得到的prO-FMDV的重组质粒转染口蹄疫病毒敏感细胞,获得口蹄疫重组病毒。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述口蹄疫病毒敏感细胞为BHK-21细胞或IBRS-2细胞。

10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,获得的所述口蹄疫重组病毒适于悬浮细胞培养。

11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,获得的所述口蹄疫重组病毒的146S抗原含量为4.0 μ g/mL以上。

12. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,对获得的所述口蹄疫重组病毒进行灭活。

13. 如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述灭活用二乙烯亚胺进行。

14. 如权利要求12所述的方法,其特征在于,在所述灭活之后对所述口蹄疫重组病毒进行乳化。

15. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述乳化是与ISA 206佐剂以体积比1:1进行。

16. 由权利要求8所述的方法制备得到的口蹄疫重组疫苗。

17. 如权利要求16所述的口蹄疫重组疫苗,其特征在于,所述口蹄疫重组疫苗能够激发对O型口蹄疫病毒株的免疫活性。

18. 如权利要求17所述的口蹄疫重组疫苗,其特征在于,所述O型口蹄疫病毒株为Mya-98、PanAsia或Cathay谱系的流行毒株。

19. 如权利要求18所述的口蹄疫重组疫苗,其特征在于,所述O型口蹄疫病毒株为O/BY/CHA/2010、O/0834或O/0718,并且所述口蹄疫重组疫苗株对O/BY/CHA/2010、O/0834或O/

0718的PD₅₀值均大于6。

20. 如权利要求4或16-19中任一项所述的口蹄疫重组疫苗在制备用于预防和/或控制动物口蹄疫疾病的药物中的用途。

21. 如权利要求20所述的用途,其特征在于,所述口蹄疫疾病为O型口蹄疫疾病。

22. 如权利要求20所述的用途,其特征在于,所述动物为猪、牛或羊。

O型口蹄疫病毒重组核酸、重组疫苗株及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用基因重组技术构建O型口蹄疫病毒重组核酸、重组疫苗株及其制备方法和应用,属于生物技术和生物制品领域。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot-and-mouth disease,FMD)是由FMD病毒(Foot-and-mouth disease virus,FMDV)引起的猪、牛和羊等偶蹄动物感染的一种急性、热性、高度接触性传染病。FMDV是一种单股正链RNA病毒,属小RNA病毒科(Picornaviridae),口蹄疫病毒属(Aphthovirus),具有A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2、和SAT3型7个不同的血清型,型间无交叉保护,我国主要流行O型,A型和Asia1型口蹄疫,其中O型流行情况复杂,危害最为严重,对畜产品经济造成了巨大的损失。

[0003] 流行于我国的O型口蹄疫毒株主要有Cathay、PanAsia和Mya-98三种拓扑型毒株,Cathay流行毒是猪适应毒株,临床上主要引起猪发病,在我国及周边国家流行和蔓延近40年;PanAsia毒株属于ME-SA遗传拓扑型,1999年在我国西藏、海南多个省份发生大流行,毒株宿主范围很广;Mya-98毒株属于SEA拓扑型,自从2010年广东白云区发生由该毒株引起的口蹄疫疫情后,我国大面积爆发由其引起的疫情。鉴于目前国内O型口蹄疫流行的现状,势必要求开发制备的疫苗能够同时预防多个毒株,疫苗种毒的抗原谱要足够宽,能对当前流行毒株都有效保护。

[0004] 病毒反向遗传操作技术能实现对病毒基因的改造和修饰,通过筛选将T细胞免疫应答较高的毒株构建反向遗传操作系统,作为构建重组疫苗株的框架,进而获得生产性能、抗原匹配性、免疫原性等特征改良的疫苗株,实现无需流行毒株构建疫苗株的方式,可以根据周边或其他国家流行毒株,建立有针对性的疫苗储备,实现更为主动的疫苗毒株构建和改良,改变了从流行毒株驯化疫苗株成功率低、费时费力、受病毒免疫抑制、抗原性差和抗体应答晚等自然属性制约,对整体提升疫苗品质和效力具有重大意义。

[0005] 传统的疫苗生产方法受多种因素的限制,为了适应工业生产的需要,悬浮细胞培养技术已广泛应用在多种疫苗的生产中,不仅缩短了疫苗生产周期,降低劳动强度、提高生产规模和降低生产成本,还因自动化程度高,工艺条件稳定、可控,能够减少批间差异,提高了疫苗质量,同时,自2012年2月1日起,各级兽医行政管理部门停止受理转瓶培养生产方式的兽用细胞苗生产线项目兽药GMP验收申请,这就要求疫苗种毒必须要适应悬浮细胞,具有良好的生产性能,不仅病变时间短、滴度高、病变稳定,同时要具备产量高的特点,方可用于工业化生产。

[0006] 因此,本研究利用已建立的具有较强细胞免疫应答毒株的反向遗传操作系统为框架,将筛选的Mya-98毒株作为抗原骨架进行重组病毒的构建与制备,从疫苗毒种源头技术入手,发明了适应悬浮培养的制苗种毒,提高抗原产能、抗原性、获得产量高、抗体应答强和交叉免疫保护率高等特征的疫苗种毒。

发明内容

[0007] 本发明涉及一种分离的口蹄疫病毒核酸及其在制备口蹄疫病毒重组核酸和/或口蹄疫病毒重组疫苗株中的用途、一种口蹄疫病毒重组核酸、包含所述重组核酸的口蹄疫重组病毒、由所述重组核酸编码的口蹄疫重组病毒、包含所述口蹄疫重组病毒的口蹄疫重组疫苗株、一种制备所述口蹄疫重组病毒的方法、由所述方法制备得到的口蹄疫重组疫苗、所述口蹄疫重组疫苗在制备用于预防和/或控制动物口蹄疫疾病的药物中的用途。

[0008] 一方面,本发明涉及一种分离的口蹄疫病毒核酸。

[0009] 在本申请中,“分离的”是指一种物质(例如多肽或者核酸)与它在自然界中正常存在的环境相分离或存在于与它在自然界中正常存在的环境不同的环境中。

[0010] 在某些实施方式中,所述分离的口蹄疫病毒核酸由口蹄疫病毒株0/JSCZ/2013株的基因组中相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因组成。在某些实施方式中,所述分离的口蹄疫病毒核酸的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0011] 另一方面,本发明涉及一种分离的口蹄疫病毒核酸在制备口蹄疫病毒重组核酸和/或口蹄疫病毒重组疫苗株中的用途。

[0012] 另一方面,本发明涉及一种口蹄疫病毒重组核酸。

[0013] 在某些实施方式中,所述重组核酸的序列包含非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的核酸序列,但是其中相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因被口蹄疫病毒株0/JSCZ/2013株的核酸序列中相对应的基因片段替换。在某些实施方式中,所述0/JSCZ/2013株的核酸序列中相对应的基因片段与所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因等长或者不等长。在某些实施方式中,所述0/JSCZ/2013株的核酸序列中相对应的基因片段与所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因片段等长。在某些实施方式中,所述0/JSCZ/2013株的核酸序列中相对应的基因片段为由0/JSCZ/2013株的基因组中相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因组成的基因片段。

[0014] 在某些实施方式中,所述0/JSCZ/2013株的核酸序列中相对应的基因片段如SEQ ID NO:1所示。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株中被替换的L基因的序列为所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的L基因中与P1基因相连接的至少100个连续的核苷酸序列,例如105个、110个、115个、120个、125个、130个、135个、140个、145个、150个、155个、160个、165个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个或者180个连续的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株中被替换的L基因的序列为所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的L基因中与P1基因相连接的177个连续的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株中被替换的P2基因的序列为所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的P2基因中与P1基因相连接的至少1000个连续的核苷酸序列,例如1050个、1100个、1150个、1200个、1201个、1202个、1203个、1204个、1205个、1206个、1207个、1208个、1209个或者1210个连续的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株中被替换的P2基因的序列为所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的P2基因中与P1基因相连接的1206个连续的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的L基因中与P1基因相连接的177个连续的核苷酸序列、全部P1基因、以及P2基因中与P1基因相连接的1206个连续的核苷酸序列被由0/JSCZ/2013株的基因组中相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因组成的基

因片段替换。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株的L基因中与P1基因相连接的177个连续的核苷酸序列、全部P1基因、以及P2基因中与P1基因相连接的1206个连续的核苷酸序列被如SEQ ID NO:1所示的序列替换。

[0015] 如本领域技术人员所知,在口蹄疫病毒的基因组中,L基因、P1基因和P2基因从5'端至3'端依次排列。在本申请中,“相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因”是指L基因的3'端与P1基因的5'端可操作地相互连接,P1基因的3'端与P2基因的5'端可操作地相互连接。

[0016] 在本申请中,“L基因”是指口蹄疫病毒的基因组中L基因的一部分或全部,例如,L基因中与P1基因相连接的至少100个连续的核苷酸序列,例如105个、110个、115个、120个、125个、130个、135个、140个、145个、150个、155个、160个、165个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个或者180个连续的核苷酸序列。

[0017] 在本申请中,“P2基因”是指口蹄疫病毒的基因组中P2基因的一部分或全部,例如,P2基因中与P1基因相连接的至少1000个连续的核苷酸序列,例如1050个、1100个、1150个、1200个、1201个、1202个、1203个、1204个、1205个、1206个、1207个、1208个、1209个或者1210个连续的核苷酸序列。

[0018] 在本申请中,“口蹄疫病毒株0/JSCZ/2013株的核酸序列中相对应的基因片段”是指口蹄疫病毒株0/JSCZ/2013株的基因组中相互毗邻的L基因、P1基因及P2基因,其中L基因可以是0/JSCZ/2013株L基因的全部或者一部分,P2基因可以是0/JSCZ/2013株P2基因的全部或者一部分。

[0019] 在本申请中,“非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株”是指口蹄疫病毒的核酸的部分或全部不是来源于0/JSCZ/2013株的毒株,例如,可以是来自于0/CHA/99株、0/GDBY/2010株、A/GD/2013株及OIE推荐的高效疫苗株等口蹄疫病毒株。在某些实施方式中,所述非0/JSCZ/2013株的口蹄疫病毒株为0/CHA/99株。

[0020] 另一方面,本发明涉及一种包含所述重组核酸的口蹄疫重组病毒。

[0021] 另一方面,本发明涉及一种由所述重组核酸编码的口蹄疫重组病毒。

[0022] 另一方面,本发明涉及一种包含所述口蹄疫重组病毒的口蹄疫重组疫苗株。

[0023] 在某些实施方式中,所述口蹄疫重组疫苗株为A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2、或者SAT3型口蹄疫重组疫苗株。在某些实施方式中,所述口蹄疫重组疫苗株为O型口蹄疫重组疫苗株。在某些实施方式中,所述口蹄疫重组疫苗株能够激发对O型口蹄疫病毒株的免疫活性。在某些实施方式中,所述O型口蹄疫病毒株为Mya-98、PanAsia或Cathay谱系毒株,在某些实施方式中,所述O型口蹄疫病毒株为0/BY/CHA/2010、0/0834或0/0718,并且所述口蹄疫重组疫苗株对0/BY/CHA/2010、0/0834或0/0718的PD₅₀值均大于6。

[0024] 另一方面,本发明涉及一种制备所述口蹄疫重组病毒的方法。

[0025] 在某些实施方式中,所述方法包括如下步骤:

[0026] 1)、用特异性引物OP12A-F和OP12A-R与0/JSCZ/2013毒株的cDNA核酸混合,以扩增得到0/JSCZ/2013毒株的L基因、P1基因及P2基因,将获得的基因片段替换插入真核转录质粒pr0/CHA/99中,得到pr0-FMDV的重组质粒,所述特异性引物分别是:

[0027] OP12A-F:5'-TTTTCCTTAAGGGACAGGAACACGCCGTGTTTGCCTGCGT-3'(SEQ ID NO:2)

[0028] OP12A-R:5'-ACTCACATCGATGTCAAAGTGAAACCTTC-3'(SEQ ID NO:3);

[0029] 2)、用步骤1)得到的真核转录质粒pr0-FMDV转染口蹄疫病毒敏感细胞,获得口蹄

疫重组病毒。

[0030] 在某些实施方式中,所述O/JSCZ/2013毒株的L基因、P1基因及P2基因包含如SEQ ID NO:1所示的核酸序列。在某些实施方式中,所述口蹄疫病毒敏感细胞为BHK-21细胞或IBRS-2细胞。在某些实施方式中,获得的所述口蹄疫重组病毒适于悬浮细胞培养,获得的所述口蹄疫重组病毒的146S抗原含量为4.0 μ g/mL以上(146S抗原含量的测定方法如中国发明专利ZL201310017378.8所述,其全文通过引用并入本申请)。在某些实施方式中,对获得的所述口蹄疫重组病毒进行灭活。在某些实施方式中,所述灭活用二乙烯亚胺进行。在某些实施方式中,在所述灭活之后对所述口蹄疫重组病毒进行乳化。在某些实施方式中,所述乳化是与ISA 206佐剂以体积比1:1进行。

[0031] 另一方面,本发明涉及由所述方法制备得到的口蹄疫重组疫苗。在某些实施方式中,所述口蹄疫重组疫苗能够激发对O型口蹄疫病毒株的免疫活性。在某些实施方式中,所述O型口蹄疫病毒株为Mya-98、PanAsia或Cathay谱系的流行毒株。在某些实施方式中,所述O型口蹄疫病毒株为O/BY/CHA/2010、O/0834或O/0718,并且所述口蹄疫重组疫苗株对O/BY/CHA/2010、O/0834或O/0718的PD₅₀值均大于6。

[0032] 另一方面,本发明涉及所述口蹄疫重组疫苗在制备用于预防和/或控制动物口蹄疫疾病的药物中的用途。在某些实施方式中,所述口蹄疫疾病为A、O、C、Asial、SAT1、SAT2、或者SAT3型口蹄疫疾病。在某些实施方式中,所述口蹄疫疾病为O型口蹄疫疾病。在某些实施方式中,所述动物为偶蹄类动物。在某些实施方式中,所述动物为猪、牛或羊。

[0033] 本发明具有如下积极效果:

[0034] 本发明依据口蹄疫分子流行病学,借助已经建立的高效反向遗传操作技术,通过相关基因的改造,进行口蹄疫疫苗株多种表型的改善和提高,构建了病变时间短、病毒滴度高、抗原匹配性高、病毒产量高的重组疫苗株,解决了筛选疫苗种毒的生产和驯化的问题,以此疫苗毒株框架为构建高效疫苗种毒奠定基础。

[0035] 1)、在病毒水平上提高了口蹄疫疫苗株的生产性能,病变时间降低,病毒滴度提高,重组毒株稳定传代后病变时间可缩短至11h左右,测定重组病毒rO-FMDV的毒价为8.33,而流行毒株为7.5,说明获得的重组毒株的滴度比流行毒提高约10倍,降低了抗原生产成本。

[0036] 2)、实现提高疫苗毒株抗原匹配性和免疫应答性,本发明构建的疫苗毒株的结构蛋白与流行毒株一致,抗原匹配性完全匹配,提高了疫苗株与流行毒株的针对性。

[0037] 3)、实现提高疫苗毒株抗原谱广的特点,以分子流行病学为基础,对Mya-98毒株进行大量筛选,选择抗原位点与本谱系流行毒株的匹配性好,且与其它谱系,Cathay和PanAsia流行毒株抗原交叉重叠,表现较高的抗原匹配性的O/JSCZ/2013毒株作为抗原骨架进行重组疫苗株的构建,通过交叉免疫中和试验及攻毒试验表明,重组疫苗株能够有效保护Mya-98、PanAsia和Cathay流行毒株,PD₅₀分别为13.59、7.05、9.0,实现了该重组疫苗株的抗原广谱性。

[0038] 4)、本发明的重组疫苗株rO-FMDV的骨架为高效疫苗株,在悬浮BHK-21细胞上培养生产获得的抗原,其抗原含量可达4.0 μ g/mL以上,比流行毒在悬浮细胞上的产量提高约2倍以上,节约了生产成本。

[0039] 5)、本发明的重组疫苗株rO-FMDV具有对宿主致病性降低的特性。

[0040] 6)、用含相同抗原含量的重组毒与野生毒分别制备灭活疫苗,免疫宿主动物猪,在第7天,5/7的r0-FMDV疫苗免疫组动物抗体效价 $\geq 1:45$,而野毒株疫苗免疫组仅3/7的动物抗体效价 $\geq 1:45$;在第14天,6/7的r0-FMDV疫苗免疫动物抗体效价 $\geq 1:90$,而仅3/7的野生毒疫苗免疫动物抗体效价 $\geq 1:90$ 。攻毒结果表明,r0-FMDV疫苗免疫动物攻毒100% (7/7) 免疫保护,而野生毒疫苗免疫动物攻毒71.5% (5/7) 免疫保护。说明重组疫苗株免疫动物后能够较早应答,且产生较高水平的抗体,攻毒保护率为100%。

[0041] 7)、本发明技术不仅改变了疫苗毒筛选驯化技术受病毒自然属性制约大、费时费力、成功率低的缺陷,可以实现更为主动有效的疫苗毒株构建,实现了口蹄疫灭活疫苗毒种制备工艺的革新,具有重大应用价值。

附图说明

[0042] 图1为实施例1中FMDV 0/JSCZ/2013株L基因、P1基因及P2基因片段的电泳图,其中1为扩增片段,M为DNA marker。

[0043] 图2为实施例1中0型口蹄疫病毒重组质粒pr0-FMDV的构建策略示意图。

[0044] 图3为实施例2中重组病毒r0-FMDV感染BHK-21细胞后引起的细胞病变效应(CPE),其中A表示正常BHK-21细胞;B表示出现CPE的BHK-21细胞。

具体实施方式

[0045] 本发明结合国家口蹄疫参考实验室近年来的毒株积累和对其全基因组序列的分析研究,将我国0型口蹄疫病毒0/JSCZ/2013株L基因、P1基因及P2基因片段,通过合适的限制性内切酶位点与已经建立的0型口蹄疫病毒0/CHA/99株的拯救系统中相应核苷酸序列进行替换,得到一种0型口蹄疫病毒感染性克隆pr0-FMDV,在BHK-21细胞或IBRS-2细胞上拯救后,得到重组0型口蹄疫病毒r0-FMDV,其与流行毒的抗原匹配性完全匹配,且与PanAsia和Cathay谱系的流行毒株抗原交叉重叠,抗原谱广。该重组疫苗株生产性能好,用悬浮BHK-21细胞生产,其抗原含量可达4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,制备的疫苗可有效刺激机体产生强的抗体应答,具有高滴度、高抗原产能、抗原谱广、致病性降低、抗体应答水平较高、免疫保护率高的特点。

[0046] 下面结合具体实施实例对本发明做进一步地描述,但具体实施实例并不对本发明做任何限定。

[0047] 下列实施实例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规条件,如《精编分子生物学实验指南》(F.M. 奥斯伯,R.E. 金斯顿,J.G. 赛德曼等主编,马学军,舒跃龙译,北京:科学出版社,2004)中所述的方法进行。

[0048] 实施例1.0型口蹄疫重组病毒感染性克隆的构建:

[0049] 发明人所用0/JSCZ/2013毒株由农业部兽医局指定国家口蹄疫参考实验室保藏,公众可通过农业部兽医局批示的委托函获得。根据0/JSCZ/2013株基因组序列,设计合成一对扩增引物,OP12A-F (5'-TTTTCCTTAAGGGACAGGAACACGCCGTGTTTGCTGCGT-3') 和OP12A-R (5'-ACTCACATCGATGTCAAAGTGAAACCTTC-3'),用RNAeasy Mini Kit (Qiagen) 提取0/JSCZ/2013毒株的总RNA,用引物oligNot I (5'-ttttctagagcggccgct₃₈-3') 反转录合成第一链cDNA,用具有极强延伸能力的PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa公司) 反转录

酶,按照产品说明书配制20 μ L反应体系,于42 $^{\circ}$ C反应1h备用,以反转录的第一链cDNA为模板,用引物OP12A-F和OP12A-R与O/JSCZ/2013毒株的cDNA核酸混合,以扩增获得O/JSCZ/2013毒株的L基因、P1基因及P2基因片段。扩增用适合长片段扩增、性能优良的LA Taq[®] (TaKaRa公司) DNA聚合酶,按照产品说明书配制50 μ L反应体系,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 30s,57 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 3min30s,35个循环后,72 $^{\circ}$ C 10min,纯化回收PCR扩增产物并送测序,扩增产物的电泳结果如图1所示,大小为3591bp,与预期大小相符,测序结果显示是SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0050] 将得到的含有O/JSCZ/2013毒株L基因、P1基因和P2基因以及O型口蹄疫病毒O/CHA/99株拯救系统的质粒prO/CHA/99(公开于授权专利“Asia1型口蹄疫重组病毒及其制备方法和应用”ZL201310175323.X和“A型口蹄疫重组疫苗株及其制备方法和应用”ZL201310175324.4中,其全文通过引用并入本申请中)分别用AflIII和ClaI双酶切后,纯化回收相应的目的片段,连接、转化至JM109感受态细胞中,测序鉴定阳性克隆,获得含O/JSCZ/2013毒株L基因P1基因及P2基因的重组质粒prO-FMDV,构建方法如图2所示。

[0051] 实施例2.0型口蹄疫重组病毒的拯救:

[0052] 用QIAGEN[®]Plasmid Plus Maxi Kit(QIAGEN公司)制备由实施例1得到的重组质粒prO-FMDV,当BHK-21细胞生长至80%时用于转染,在脂质体Lipofectamine[™]2000(Invitrogen)的介导下将4 μ g重组质粒转染BHK-21细胞,同时设立脂质体对照和正常细胞对照,放置于含5%CO₂的37 $^{\circ}$ C培养箱中,转染6h后弃去上清,加入MEM培养基,继续培养,观察细胞状态及细胞病变情况,待细胞出现90%左右病变时收获病毒,反复冻融3次后再次接种BHK-21细胞,直到病毒能稳定地产生细胞病变,出现细胞变圆,聚集成葡萄状分布,最终细胞崩解成碎片。将得到的O型口蹄疫重组病毒命名为rO-FMDV,在图3中,A:为正常对照BHK-21细胞图片;B:拯救的重组病毒rO-FMDV感染BHK-21细胞出现的CPE的图片。

[0053] 实施例3.0型口蹄疫重组病毒的鉴定:

[0054] 3.1 RT-PCR鉴定重组病毒

[0055] 将稳定传代的重组病毒rO-FMDV感染BHK-21细胞的上清用RNAeasy Mini Kit(Qiagen)提取总RNA,反转录后,扩增,纯化回收后送测序,结果显示获得的重组O型口蹄疫病毒的L基因、P1基因及P2基因与O/JSCZ/2013株的基因序列是一致的。

[0056] 3.2间接免疫荧光鉴定病毒抗原

[0057] 将转染后传至第2代的细胞上清,接种至底部放置了载玻片的生长有BHK-21细胞的六孔板里(单层细胞生长至60%~70%),置于含5%CO₂的37 $^{\circ}$ C培养箱中,12h后按常规方法做间接免疫荧光,一抗为O型FMDV兔阳性血清,二抗为标记FITC羊抗兔IgG(Sigma公司),同时设正常细胞对照。接种第2代细胞液的BHK-21细胞中可见绿色特异性荧光,而正常细胞对照无可见荧光产生,表明重组O型口蹄疫病毒感染的BHK-21细胞中有FMDV蛋白的表达。

[0058] 实施例4.0型口蹄疫重组病毒的致病力试验:

[0059] 4.1对BHK-21细胞的致病力试验

[0060] 按照常规方法对BHK-21细胞进行消化,加入含10%胎牛血清的MEM细胞培养基,将分散的细胞铺于12孔板中,于37 $^{\circ}$ C含有5%CO₂的培养箱中培养,待细胞单层长到90%时备用。用MEM以10倍倍比稀释病毒液,将各稀释度(10^{-4.0}~10^{-9.0})的病毒液分别加入细胞板中,

每个稀释度4孔,放入37℃含有5%CO₂的培养箱中进行培养,观察3天,用Reed-Muench氏法测定对BHK-21细胞的半数感染量(TCID₅₀)。按照该法测定拯救病毒rO-FMDV和流行毒的滴度,计算拯救病毒rO-FMDV的TCID₅₀为10^{-8.33}/mL,流行毒株O/BY/CHA/2010的TCID₅₀为10^{-7.5}/mL。

[0061] Reed-Muench计算方法是本领域的已有技术,现有文献“Reed,L.J.and Muench,H.(1938).“A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints”.The American Journal of Hygiene 27:493-497”中对此已经进行了详细地描述,该文献在此通过引用方式并入本申请用作参考。

[0062] 4.2对乳鼠致病力试验

[0063] 将重组病毒rO-FMDV和流行毒分别用PBS做10倍倍比稀释,各取10⁻⁴~10⁻⁹倍比稀释的病毒液经皮下接种3日龄乳鼠,每个稀释度各接种4只,接种剂量为200μL/只,连续观察7d。空白对照组乳鼠接种PBS缓冲液200μL/只,观察并记录乳鼠发病和死亡情况,用Reed-Muench法计算半数致死量(LD₅₀),拯救病毒rO-FMDV的LD₅₀为10^{-6.0}/0.2mL,流行毒株O/BY/CHA/2010的LD₅₀为10^{-6.5}/0.2mL。

[0064] 4.3对猪和牛的致病力试验

[0065] 从非疫区筛选试验用猪和牛,各6头,并经国家口蹄疫参考实验室生产的FMD液相阻断ELISA(LPB-ELISA)检测O型抗体均<1:4,FMD非结构蛋白3ABC-ELISA抗体检测为阴性。按常规培养法培养BHK-21细胞,制备重组病毒rO-FMDV,收获的病毒液置于-70℃保存,重组毒采用注射途径进行攻毒,攻毒剂量为10⁷TCID₅₀,猪肌肉注射2ml/头,牛舌部皮下注射1ml/头,同时设立流行毒株O/BY/CHA/2010对照组,连续观察10天,测量体温变化并观察记录发病情况。攻毒结果显示,流行毒经注射途径攻毒后,猪和牛从第2天开始出现临床症状,rO-FMDV攻毒后,猪未出现临床症状,并且对牛的致病性也降低,见表1。

[0066] 表1重组疫苗株和流行毒株致病力试验临床症状

组别	编号	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
rO-FMDV 注射	猪 1024	—	—	—	—	—	—	—	—
	猪 1027	—	—	—	—	—	—	—	—
	猪 1028	—	—	—	—	—	—	—	—
	牛 2012	—	—	鼻镜水泡	两蹄	两蹄	两蹄	两蹄	两蹄
	牛 2013	—	—	鼻镜水泡	一蹄	两蹄	三蹄	三蹄	三蹄
	牛 2015	—	舌面水泡	舌面水泡	两蹄	两蹄	四蹄	四蹄	四蹄
O/BY/CHA/2010 注射	猪 1029	—	—	—	一蹄	四蹄	四蹄	四蹄	四蹄
	猪 1035	—	—	—	两蹄	两蹄	四蹄	四蹄	四蹄
	猪 1036	—	—	一蹄	一蹄	三蹄	三蹄	三蹄	三蹄
	牛 2009	—	—	鼻镜水泡	两蹄	四蹄	四蹄	四蹄	四蹄
	牛 2010	—	舌面水泡	舌面水泡	两蹄	两蹄	四蹄	四蹄	四蹄
	牛 2017	—	—	鼻镜水泡	鼻镜水泡	一蹄	一蹄	三蹄	三蹄

[0068] 实施例5.悬浮BHK-21细胞培养O型口蹄疫重组病毒:

[0069] 按常规悬浮BHK-21细胞培养方法将悬浮细胞逐级扩大至10L机械搅拌式动物细胞培养反应器(默克密理博)中,细胞培养阶段,反应器PH值设定7.0,反应器溶氧受空气、氧气和CO₂气路的控制,搅拌转速40r/min,温度37℃,细胞培养至24、48小时进行台盼蓝染色细胞计数及活力检查。细胞接毒阶段,反应器PH值调至7.4-7.6,搅拌转速按照实际细胞数调整至50r/min左右,按细胞培养液体积的2.0%的比例,将已知抗原含量的O型口蹄疫重组病

毒或流行毒株的种毒液接种到反应器中,从接毒后定时在无菌条件下取样,进行台盼蓝色细胞计数及活力检查,于-40℃保存待用,当活细胞密度低于 1.0×10^6 /mL或细胞活力 $\leq 15\%$ 后一次性全部收样,统一测定口蹄疫病毒抗原含量,由结果可以看出,0型重组口蹄疫病毒的抗原含量可达4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上,而流行毒的却为2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。见表2。

[0070] 表2重组疫苗株和流行毒株悬浮BHK-21细胞培养后抗原含量测定

组别	第一批 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	第二批 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	第三批 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
[0071] rO-FMDV	4.23	4.82	4.52
O/BY/CHA/2010	1.6	2.68	2.29

[0072] 实施例6.0型口蹄疫重组疫苗的制备和免疫效果评价:

[0073] 6.1疫苗制备

[0074] 将由悬浮BHK-21细胞制备的重组病毒rO-FMDV及野毒培养物分别灭活,用3mmol/l二乙烯亚胺(Binary ethylenimine, BEI) (Sigma公司) 30℃灭活30h,加入阻断剂硫代硫酸钠溶液,4℃过夜,保存备用。灭活抗原经安检后与ISA206佐剂(法国SEPPIC)以1:1比例混合制备疫苗。具体按照《中华人民共和国药典》中兽用生物制品的口蹄疫灭活疫苗规程制备。安检牛舌部皮下注射灭活病毒2ml/头,连续逐日观察6日,观察期牛健康良好,蹄部和嘴鼻均无异常。实验用牛购自非疫区,并经国家口蹄疫参考实验室生产的FMD液相阻断ELISA (LPB-ELISA) 检测0型抗体均 $< 1:4$ 。FMD非结构蛋白3ABC-ELISA抗体检测为阴性。

[0075] 6.2疫苗免疫攻毒保护试验

[0076] 将得到的安检合格的0型口蹄疫重组病毒疫苗分别免疫10头牛,10头猪,同时各设2头非免疫对照,测定其免疫效力。攻毒方法及结果判定方法均按照《Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals》(2009年版,世界动物卫生组织(OIE))中所述。

[0077] 免疫猪28天后,用1000倍猪半数感染剂量(SID₅₀剂量)的流行毒进行攻毒实验,连续观察10天,结果表明,免疫的动物没有临床症状,100%保护,如表3所示。

[0078] 表3 0型口蹄疫重组疫苗免疫猪攻毒后临床症状和保护情况

编号	免疫剂量 (mL)	1dpc	2dpc	3dpc	4dpc	5dpc	6dpc	7dpc	8dpc	9dpc	10dpc	是否得到保护?
3476	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3483	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3488	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3492	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3493	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
[0079] 3494	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3495	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3496	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3542	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3543	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
3210	0	0	0	1	3	5	5	5	5	5	5	否
3211	0	0	1	1	3	3	4	4	4	4	4	否

[0080] 免疫牛28天后,用10000倍牛半数感染剂量(BID₅₀剂量)的流行毒进行攻毒实验,连续观察10天,结果表明:免疫的动物没有临床症状,100%保护,如表4所示。

[0081] 表4 0型口蹄疫重组疫苗免疫牛攻毒后临床症状和保护情况

编号	免疫剂量 (mL)	1dpc	2dpc	3dpc	4dpc	5dpc	6dpc	7dpc	8dpc	9dpc	10dpc	是否得到保护?
2020	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2021	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2022	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2023	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2024	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
[0082] 2025	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2051	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2052	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2053	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2054	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	是
2055	0	0	1	1	1	2	3	5	5	5	5	否
2056	0	0	0	1	1	3	3	5	5	5	5	否

[0083] 说明用该0型口蹄疫重组病毒作为疫苗株免疫猪和牛,能有效保护当前0型口蹄疫流行毒的攻击。

[0084] 6.3重组疫苗株与流行毒株制备疫苗免疫比较试验

[0085] 将0型口蹄疫重组病毒疫苗和流行毒株制备的疫苗分别免疫7头猪,免疫剂量相同,于免疫后第7d,14d,21d,28d用0型FMD液相阻断ELISA (LPB-ELISA) 检测血清中的抗体水平。28d后,用1000倍 $SI_{D_{50}}$ 剂量的流行毒进行攻毒实验,设3头对照,连续观察15日。结果表明,重组疫苗株诱导的抗口蹄疫抗体效价随着免疫期的延长不断上升,抗体应答比野毒株疫苗早,并且产生的抗体水平也比野毒株疫苗免疫组高。攻毒结果显示,重组疫苗株的保护率为100%,比野毒株疫苗的保护率(71.5%)高。说明与野毒株疫苗相比,该0型口蹄疫重组疫苗免疫动物后能够获得更好的免疫应答效果,如表5所示。

[0086] 表5 0型口蹄疫重组疫苗与流行毒株制备疫苗免疫猪后抗体应答与保护率比较

组别	编号	免疫剂量	7d	14d	21d	28d	保护情况
[0087] rO-FMDV 疫苗	0023	2mL	1:45	1:90	1:90	1:128	7/7
	0022	2mL	1:45	1:90	1:180	1:360	
	0014	2mL	1:22	1:45	1:90	1:180	
	0018	2mL	1:90	1:180	1:360	1:360	
	0011	2mL	1:180	1:360	1:512	1:720	
	0017	2mL	1:22	1:90	1:180	1:360	
	0024	2mL	1:45	1:360	1:512	1:512	
[0088] O/BY/CHA/2010 疫苗	0008	2mL	1:22	1:45	1:45	1:45	5/7
	0010	2mL	1:45	1:45	1:180	1:512	
	0016	2mL	1:45	1:90	1:90	1:360	
	0012	2mL	1:11	1:45	1:45	1:45	
	0020	2mL	1:22	1:90	1:90	1:180	
	0021	2mL	1:45	1:90	1:180	1:360	
	0025	2mL	1:11	1:45	1:180	1:360	
对照	0031	0	1:4	1:4	1:4	1:4	0/3
	0032	0	1:4	1:4	1:4	1:4	
	0033	0	1:4	1:4	1:4	1:4	

[0089] 6.4交叉免疫中和试验

[0090] 将上述0型口蹄疫重组疫苗免疫动物所得到的血清与O/BY/CHA/2010(属于Mya-98),O/0834(属于PanAsia),O/0718(属于Cathay)三株毒进行病毒交叉免疫中和实验,测定抗体匹配值 r ,其中 $1 \geq r \geq 0.3$ 表明毒株与疫苗的匹配性高,疫苗免疫动物后能抵抗此毒株的攻击,可作为潜在疫苗株; $r \leq 0.3$ 表明毒株与疫苗匹配性较差,疫苗免疫动物后不能抵抗

相应毒株的攻击。结果如表6。由表6可知,上述O型口蹄疫重组疫苗与O/BY/CHA/2010(属于Mya-98),O/0834(属于PanAsia),O/0718(属于Cathay)三种毒株的匹配性高,疫苗免疫动物后能抵抗这三种毒株的攻击,可作为潜在疫苗株。

[0091] 表6病毒交叉免疫中和试验抗体匹配值

血清编号	疫苗剂量 (mL)	病毒交叉免疫中和试验抗体匹配值		
		O/BY/CHA/2010	O/0834	O/0718
[0092] 2020	2	1.00	0.7	0.75
2051	2	1.00	0.75	0.8
2054	2	1.00	0.75	0.8

[0093] 6.5疫苗免疫效力与交叉攻毒试验

[0094] 按2015年版《中国兽药典》方法进行,口蹄疫参考实验室生产的FMD液相阻断ELISA(LPB-ELISA)检测O抗体均 $<1:4$ 。FMD非结构蛋白3ABC-ELISA抗体检测为阴性。本试验所用动物均严格在ABSL-3实验室圈养。按照2015年版《中国兽药典》记载的半数保护量(PD₅₀)测定方法来测定疫苗的半数保护量,具体方法如下。免疫组每组15头,免疫剂量分1头份、1/3头份、1/9头份,分别免疫,28d后,分别用Mya-98、PanAsia、Cathay的流行代表毒进行攻毒,攻毒剂量为1000倍SID₅₀,每组设3头对照,攻毒方式为肌肉注射。连续观察15日,根据舌面、齿龈、蹄出现水泡等口蹄疫症状判定病毒液致动物发病情况,动物发病即判为不保护。计算各组免疫动物的保护比例。最后再按照Reed-Muench法分别计算各组的PD₅₀。

[0095] 免疫效力及交叉攻毒试验测定结果表明,重组毒株对Mya-98、PanAsia和Cathay的PD₅₀分别为13.59、7.05、9.0,对O型不同拓扑型口蹄疫病毒的免疫保护效力大于OIE推荐的PD₅₀(即,6),是理想的抗O型口蹄疫重组疫苗,可用于我国及其周边国家O型口蹄疫病毒的预防和控制,参见表7。

[0096] 表7 O型口蹄疫重组疫苗株免疫效力及交叉攻毒保护结果

分组	免疫剂量	攻毒毒株	保护比例	PD ₅₀
组 1	1	O/BY/CHA/2010	5/5	13.59
	1/3	O/BY/CHA/2010	5/5	
	1/9	O/BY/CHA/2010	4/5	
对照组 1	0	O/BY/CHA/2010	0/3	
组 2	1	O/0834	5/5	7.05
	1/3	O/0834	3/5	
	1/9	O/0834	3/5	
对照组 2	0	O/0834	0/3	
组 3	1	O/0718	5/5	9.0
	1/3	O/0718	4/5	
	1/9	O/0718	3/5	
对照组 3	0	O/0718	0/3	

[0098] 以上所述的实施例仅表述了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可做出其它改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

[0001] 序列表

[0002] <110> 中国农业科学院兰州兽医研究所

[0003] <120> O型口蹄疫病毒重组核酸、重组疫苗株及其制备方法和应用

[0004] <130> PSF17140

[0005] <140> 201710256371.X

[0006] <141> 2017-04-19

[0007] <160> 3

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 3591

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 口蹄疫病毒核酸

[0015] <400> 1

[0016] cttaaggac agaacacgc cgtgtttgcc tgcgtcacct ccaacgggtg gtacgcgac 60

[0017] gacgacgaag aattctacc ctggacgcca gatccgtccg acgtgctggt ctttgtccc 120

[0018] tacgatcaag aaccacttaa tggagaatgg aaagcaaggg ttcagagacg gctcaaggga 180

[0019] gccggacaat ccagtccggc tactgggtca cagaaccaat caggcaacac cgggagtatc 240

[0020] atcaacaatt actacatgca gcaataccag aactccatgg acaccaact tggtgacaat 300

[0021] gctatcagcg gaggtccaa cgagggatcc acagacacaa cctccacca cacaaccaac 360

[0022] actcagaaca atgactggtt ttcaaagttg gccagctctg ctttcagcgg tcttttcggc 420

[0023] gccctcctcg ccgataagaa aaccgaggag accactcttc tcgaggaccg catcctcacc 480

[0024] acccgaaacg gacacaccac ctgacaacc cagtcgagtg ttggcataac gcacgggtac 540

[0025] gcaacagctg aggattttgt gaacgggcca aacacctctg gtcttgagac cagagttgtc 600

[0026] caggcgaac ggttctttaa aaccacactg ttcgactggg tcaccagtga tccgttcgga 660

[0027] cggtactact tgttgagct cccgactgac cacaaggtg tctacggcag cctgaccgac 720

[0028] tcatacgctt acatgagaaa cggttgggat gttgaggtca ccgctgtggg gaatcagttc 780

[0029] aacggagctt gcctactggt ggccatggtt cctgaacttt gttccatcga gcggagagag 840

[0030] ctgttccagc ttacgtctt cccccaccag ttcatacaacc cccggacgaa catgacagcc 900

[0031] cacatcaagg tgccctttgt tggcgtcaac cgttacgatc agtacaaggt acacaagccg 960

[0032] tggacccttg tggttatggt cgtagcccca ctgactgtca acaccgaagg cgctccgcag 1020

[0033] atcaaggtgt atgccaacat cgacccacc aacgtgcacg tcgcggtgga gttcccttcc 1080

[0034] aaagagggga ttttcctgt ggctgtagc gacggttatg gcggcttggg gacaactgac 1140

[0035] ccaaagacgg ctgaccccg t tacggcaaa gtgttcaacc cccccgcaa catgttgccg 1200

[0036] gggcggttca ccaacctcct gggcgtggct gaggttgc ccacgtttct gcacttcgat 1260

[0037] ggtgacgtac cgtatgtgac cactaagacg gattcggaca gggtgctcgc acaatttgac 1320

[0038] ttgtcttgg cagcaaaaca catgtcaaac accttcttg caggtcttgc ccagtactac 1380

[0039] acgcagtaca gcggcacctg taacctgac ttcatgttca caggtccac tgacgcgaaa 1440

[0040] gcgcgttaca tgattgcgta tgcccctccg ggcatggagc cgcccaaac acctgaggct 1500

[0041] gctgctcact gcattcacgc agagtgggac acgggtctga actcaaagtt taccttttcc 1560

[0042]	atcccctacc tctcggcggc tgattacgcg tacaccgcgt ctgacgctgc tgagaccaca	1620
[0043]	aatgttcagg gatgggtctg cttatttcaa ataacacacg ggaaagctga gggtgacgct	1680
[0044]	cttgtcgtgc tggccagtgc tggcaaagac tttgagctgc gcctgcctgt ggacgctcgg	1740
[0045]	caacagacca cttcgacggg cgagtcggct gaccccgctga ctgccaccgt tgagaattac	1800
[0046]	ggtggcgaga cacaggtcca gaggcgccac cacacagacg tctcattcat attggacaga	1860
[0047]	tttgtgaaag tcacacccaaa agactcaata aatgtattgg acctgatgca gacccctcc	1920
[0048]	cacaccctag taggggcgct cctccgcaact gccacttact atttcgctga tctagaggtg	1980
[0049]	gcagtgaaac acaaggggga ctttacctgg gtgccaaatg gagcacctga agcagccttg	2040
[0050]	gacaacacca ccaacccaac ggcgtactat aaggcgcgcg ttaccggct tgcattgcc	2100
[0051]	tacacggcac cacaccgtgt tttggccacc gtttacaacg ggaaatgcaa atacgccggg	2160
[0052]	ggctactgc ccaacgtgag aggcgatctc caagagctgg ctcagaaggc agcgaggccg	2220
[0053]	ctgcctactt ctttcaacta cggtgccatc aaagccactc gggtgacaga actgctgtac	2280
[0054]	cgatgaaga gggccgagac gtactgtcct cggccccitt tggctgttca cccgagtgcg	2340
[0055]	gccagacaca aacagaaaat agtggcgcct gtaaagcagt cttgaactt tgatctgctc	2400
[0056]	aagtggcag gggacgtgga gtccaaccct gggcccttct tcttctctga cgtcaggta	2460
[0057]	aacttccaca aactggtgga aaccatcaac cagatgcaag aggacatgtc aacaaaacac	2520
[0058]	ggaccgact ttaaccggtt ggtatcagcg tttgaggaat tggccgctgg ggtgaaagcc	2580
[0059]	atcaggaccg gcctcgacga ggccaaacc tggtacaagc tcatcaagct cctgagccgc	2640
[0060]	ttgtcatgca tggccgctgt agcagcacgg tccaaggacc cagtccttgt ggctatcatg	2700
[0061]	ctggtgaca ccggtcttga gattctggac agcacattg tcgtgcagaa aatctccgac	2760
[0062]	tcctctcca gtctcttca cgtgccggcc cccgtcttca gtttcggagc tccgattctg	2820
[0063]	ctagccgggt tggtaaggt cgcctcgacg ttcttccggt ccacaccga ggatctcgag	2880
[0064]	agagcagaga aacagtcaa agcacgtgac atcaatgaca tcttcgcat tctcaagaac	2940
[0065]	ggcagtggc tggtaaggt gatcctagcc atccgcgact ggattaaagc atggatgcc	3000
[0066]	tcagaagaga agtttgtcac catgacagac ttggtgctg gcatecttga aaagcagcgg	3060
[0067]	gacctaacg acccgccaa gtacaaggaa gccaaaggaat ggctcgacaa cgcgcgcaa	3120
[0068]	acgtgttga agagcgggaa cgtccacatt gccaacctgt gcaaagtgtg cggccagca	3180
[0069]	ccgagcaagt cgagacctga acccgtggtc gtgtgcctcc gcggcaaatc cggtcagggt	3240
[0070]	aagagttcc ttgcgaacgt gctggcacia gccatcteta cccactttac cggcaggact	3300
[0071]	gactcagttt ggtactgtcc gccagaccct gaccacttcg acggttacia ccagcagacc	3360
[0072]	gttgtgtgga tggatgattt gggccagaat cccgacggca aggacttcaa gtacttcgcc	3420
[0073]	cagatggtct cgaccacggg gttcatcccg cccatggctt cacttgagga caaaggcaag	3480
[0074]	cctttcaaca gcaaagtcatt cattgccacc accaacctgt actcgggctt caccgagga	3540
[0075]	accatggtgt gcccgatgc gctgaaccga aggtttcact ttgacatcga t	3591
[0076]	<210> 2	
[0077]	<211> 40	
[0078]	<212> DNA	
[0079]	<213> 人工序列	
[0080]	<220>	
[0081]	<223> 引物	
[0082]	<400> 2	
[0083]	ttttccttaa gggacaggaa cacgccgtgt ttgcctgcgt	40

-
- [0084] <210> 3
[0085] <211> 29
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列
[0088] <220>
[0089] <223> 引物
[0090] <400> 3
[0091] actcacatcg atgtcaaagt gaaaccttc 29

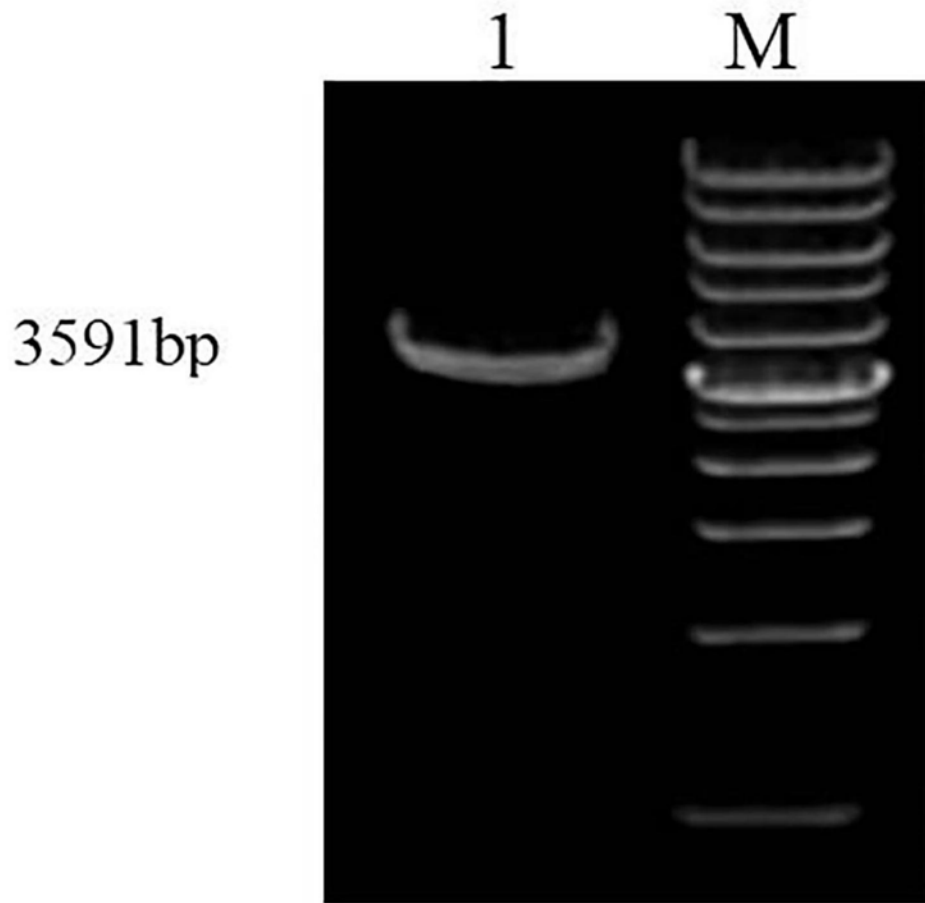


图1

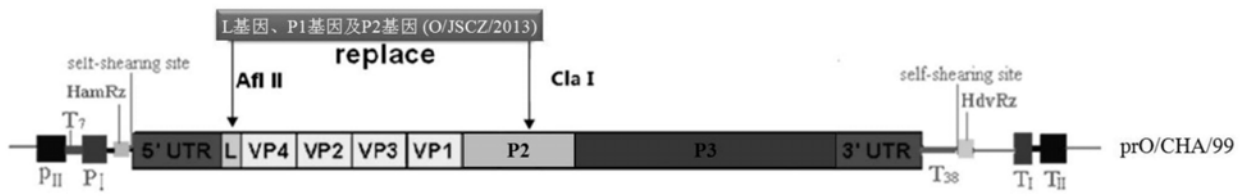


图2

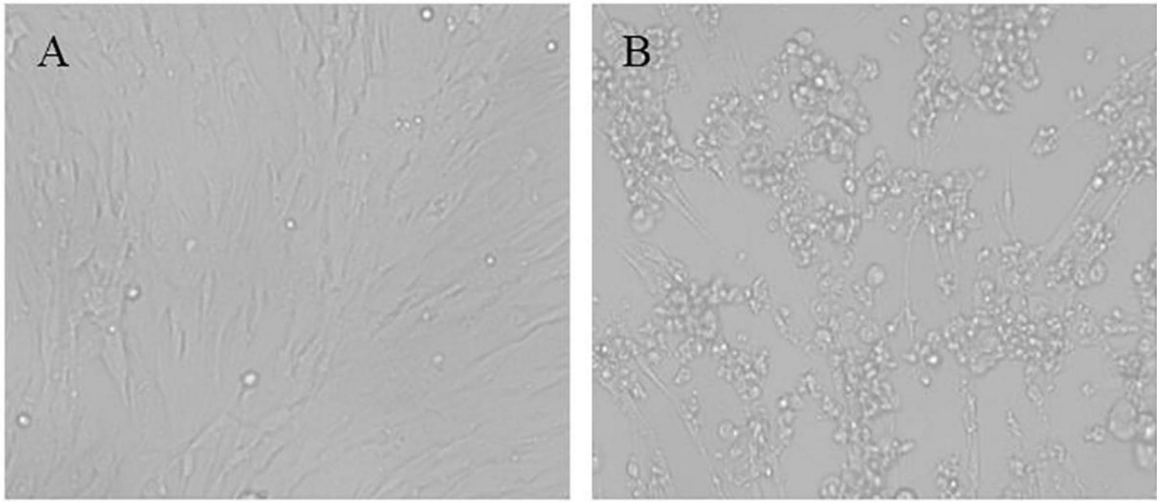


图3