

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



## [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97196558.7

C12N 15/38 (2006.01)

C12N 15/44 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1329513C

[22] 申请日 1997.7.15 [21] 申请号 97196558.7

[30] 优先权

[32] 1996.7.19 [33] FR [31] 96/09338

[86] 国际申请 PCT/FR1997/001313 1997.7.15

[87] 国际公布 WO1998/003658 法 1998.1.29

[85] 进入国家阶段日期 1999.1.19

[73] 专利权人 梅瑞尔公司

地址 法国里昂

[72] 发明人 J-C·奥都尼特 A·布萨都恩

P·保杜 M·里威尔

[56] 参考文献

WO9520660A 1995.1.1

WO9606619A 1996.1.1

审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 陈文平

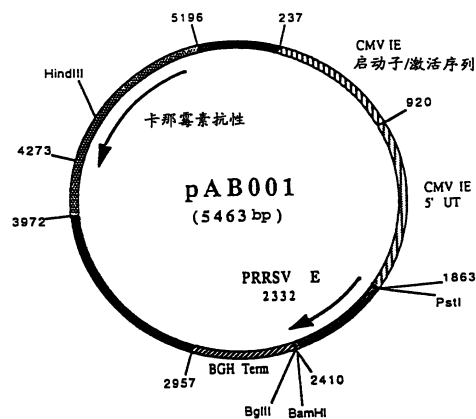
权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 31 页

[54] 发明名称

抗猪生殖和呼吸疾病的多核苷酸疫苗制剂

[57] 摘要

抗猪生殖和/或呼吸疾病的猪疫苗制剂，所述制剂含有至少 3 种效价的多核苷酸疫苗，含有一个整合质粒，其可在宿主细胞中体内表达一种猪病原体效价的基因。这些效价选自两组，即 Aujeszkey 病病毒、猪流感病毒、猪神秘病病毒、细小病毒病病毒、典型猪瘟病毒和引起放线杆菌病的细菌。对于每种效价而言，质粒含有一种或多种基因，该基因对于 Aujeszkey 病病毒选自 gB 和 gD，对于猪流感病毒选自 HA，NP 和 N，对于神秘病病毒选自 E、ORF3、M，对于细小病毒病病毒选自 VP2，对于瘟病毒病病毒选自 E1、E2，对放线杆菌病选自 apx I、apx II 和 apx III。



1. 一种猪疫苗，其中包含含有 Aujeszky 病病毒基因的质粒，所述基因选自 gB 和 gD。
2. 根据权利要求 1 的疫苗，其中所述质粒包含 gB 和 gD 基因二者。
3. 根据权利要求 1 的疫苗，其中所述质粒包含 gB 基因。
4. 根据权利要求 1 的疫苗，其中所述质粒包含 gD 基因。
5. 根据权利要求 1 的疫苗，其中包含含有 gB 基因的质粒和含有 gD 基因的质粒。
6. 根据权利要求 1-5 任一项的疫苗，其中所述质粒包含巨细胞病毒 CMV - IE 启动子。
7. 根据权利要求 1-5 任一项的疫苗，其中所述质粒包含选自 SV40 病毒早期启动子、SV40 病毒晚期启动子、劳氏肉瘤病毒 LTR 启动子和细胞骨架基因启动子的启动子。

## 抗猪生殖和呼吸疾病的多核苷酸疫苗制剂

本发明涉及可特别地接种猪以抗生殖和呼吸疾病的疫苗制剂，还涉及相应的接种方法。

在过去几十年里，生产猪的方法发生了根本性的变化。在被包围的空间内集中繁殖已被推广，但其必然后果是呼吸疾病也随之迅速发展。

猪呼吸病理学的症状范围一般被归纳为复杂的猪呼吸疾病名称，并涉及多种致病因子，其中包括病毒以及细菌和支原体。

参与呼吸疾病的主要因子是大叶性肺炎放线杆菌(*Actino-bacillus pleuropneumoniae*)，不育和呼吸综合征病毒(PRRS)，也被称为神秘病病毒，Aujeszkey 病病毒(PRV)和猪流感病毒。

其它病毒导致生殖疾病，所述疾病导致流产，胎儿干瘪和不育。主要病毒是 PRRS，细小病毒和典型猪瘟病毒(HCV)。其次，猪流感病毒 PRV 和大叶性肺炎放线杆菌也可导致这种疾病。大叶性肺炎放线杆菌、HCV 和 PRV 可导致死亡。

另外，微生物之间的相互关系在猪呼吸综合征中非常重要。实际上，大多数细菌病原体是鼻咽区和幼小动物扁桃体的习惯性宿主。来自大母猪的这些病原体经常被出生仅几个小时、初乳免疫力尚未起效之前的小猪吸入。当宿主的呼吸防御机制被诸如大叶性肺炎放线杆菌的前体因子或病毒损坏时，在上呼吸道中生存的生物体可入侵下呼吸道。对肺的入侵非常快，尤其是在诸如大叶性肺炎放线杆菌的前体病原体的情况下更是如此，所述病原体可产生强有力的细胞毒素，该毒素能损害呼吸道上皮细胞的纤毛和肺泡巨噬细胞。

除了具有呼吸道趋向性的细菌和支原体外，主要的病毒感染，如流感病毒，呼吸道冠状病毒和 Aujeszkey 病病毒的感染对呼吸道综合征的致病性可能也起到了一定的作用。

最后，一些因子既有呼吸效应也有生殖效应。从生殖病理学的角度

看, 也会出现相互作用。

因此, 似乎需要试着开展针对猪生殖和呼吸疾病的主要致病因子的有效防治作用。

迄今为止发展起来的方法是用灭活疫苗或活疫苗, 及可能为这种疫苗的混合物。它们的发展提出了效价和稳定性之间相容性的问题。实际上不论是从所用的不同抗原的角度, 还是从制剂本身的角度, 尤其是在联合使用灭活疫苗和活疫苗的情况下, 都必需确保不同疫苗效价之间的相容性。另外还存在的问题是: 这种联合疫苗的保存及其安全性, 尤其是存在佐剂时的安全性。这些疫苗一般十分昂贵。

专利申请 WO-A-90 11092, WO-A-92 19183, WO-A-94 21797 和 WO-A-95 20660 利用了最近兴起的多核苷酸疫苗技术。已知这些疫苗使用了质粒, 所述质粒能在宿主细胞中表达插入其中的抗原。已提出所有的施用途径(腹膜内, 静脉内, 肌内, 经皮, 皮内, 粘膜等等)。也可以使用不同的接种方式, 如将 DNA 沉积在金粒表面并投射之以穿入动物皮肤(Tang 等, 自然 ( Nature ), 356, 152-154, 1992), 可以同时转染皮肤, 肌肉, 脂肪组织和乳房组织的液体喷射注射器(Furth 等, 分析生物化学 ( Analytical Biochemistry ), 205, 365-368, 1992)。

多核苷酸疫苗也可以使用裸 DNA 和经配制的 DNA, 如阳离子脂质脂质体内的 DNA。

M-F Le Potier 等人(第二届消灭 Aujeszkey 病(假狂犬病)病毒国际研讨会论文集, 1995 年 8 月 6 日至 8 日, 哥本哈根, 丹麦)和 M. Monteil 等人(Les Journees d'Animation Scientifique du Departement de Pathologie Animale[动物病理学部门组织的科学会议], INRA-ENV, Ecole Nationale Veterinaire de LYON(里昂国家畜医学校), 13-14, 1994 年 12 月 13 - 14 日)借助于可在强启动子, 即 2 型腺病毒主要晚期启动子的控制下表达 gD 基因的质粒, 试着接种了猪以抗 Aujeszkey 病病毒。尽管抗体反应水平良好, 但未显示保护作用。不过, 用其中插入了 gD 基因和相同启动子的重组腺病毒接种猪之后, 记录了有关保护作

用的令人满意的结果，证明 gD 糖蛋白应足以在猪中诱导保护作用。

现有技术中通过多核苷酸接种方法在猪中未获得保护性结果。

因此，本发明打算提供多价的疫苗制剂，所述制剂可以确保接种猪能抵抗特别是涉及呼吸疾病和/或生殖疾病的多种致病因子。

本发明的另一目的是提供包含有不同效价并满足彼此相容性和效价稳定性所需的所有标准的疫苗制剂。

本发明的另一目的是提供可以在相同载体中含有不同效价的疫苗制剂。

本发明的另一目的是提供使用简单且便宜的疫苗制剂。

本发明的另一目的是提供这样一种疫苗制剂和接种猪的方法，所述疫苗和接种可以得到高效、长期以及安全性良好又不留后患的保护作用，包括多价保护作用。

因此，本发明的目的是特别地针对猪生殖和/或呼吸疾病的疫苗制剂，所述制剂含有至少 3 种效价的多核苷酸疫苗，每种含有一个整合质粒，其可在宿主细胞中体内表达一种猪病原体效价的基因，这些效价选自 Aujeszkey 病病毒(PRV 或假狂犬病病毒)，猪流感病毒(SIV)，猪神秘病病毒(PRRS 病毒)，细小病毒病病毒(PPV 病毒)，典型猪瘟病毒(HCV 病毒)和引起放线杆菌病的细菌(大叶性肺炎放线杆菌)，对于每种效价而言，质粒含有一种或多种基因，该基因对于 Aujeszkey 病病毒选自 gB 和 gD，对于猪流感病毒选自 HA、NP 和 N，对于 PRRS 病毒选自 ORF5(E)，ORF3，ORF6(M)，对于细小病毒病病毒选自 VP2，对于典型猪瘟病毒选自 E1、E2，对于大叶性肺炎放线杆菌选自 apxI、apxII 和 apxIII。

本发明中的效价应理解成至少一种可提供抗所研究病原体病毒的保护作用的抗原，效价可含有得自一株或多株所研究病原体的一个或多个经修饰的天然基因作为亚效价。

病原性因子的基因应理解成不仅指完整的基因，也指不同的多种核苷酸序列，包括保持了诱导保护性反应之能力的片段。基因的概念覆盖了等价于实施例中详细描述의 序列的核苷酸序列，也就是说，有所不同

但编码相同蛋白质的序列。此概念也覆盖了被研究的其它株病原体的核苷酸序列，它可以提供交叉保护作用或特异地保护作用。此概念也覆盖了已被修饰以便于由宿主动物在体内表达，但编码相同蛋白质的核苷酸序列。

优选本发明的疫苗制剂含有 Aujeszkey 和猪流感效价，在其中可加入优选选自 PRRS 和大叶性肺炎放线杆菌(放线杆菌病)效价的其它效价，任选在其中进入选自细小病毒病和典型猪瘟效价的其它效价。

当然，效价的所有联合都是可以的，然而，在本发明的范围内，Aujeszkey 和猪流感，接下来是 PRRS 和大叶性肺炎放线杆菌的效价被认为是优选的。

从更特异地针对猪呼吸疾病的接种角度看，优选效价选自 Aujeszkey、猪流感、PRRS 和放线杆菌病。

从特异地针对猪生殖疾病的接种角度看，优选效价选自 PRRS、细小病毒病、典型猪瘟和 Aujeszkey 病。

至于 Aujeszkey 效价，可使用 gB 或 gD 基因，优选使用这两种基因，此时所述基因位于不同质粒或一个相同质粒上。

至于猪流感效价，优选使用 HA 和 NP 基因，可以使用这两个基因中的一个，也可以同时使用这两个基因，此时所述基因位于不同质粒或一个相同质粒上。优选在同一疫苗中联合得自一种以上流感病毒株，尤其是得自在自然界发现的不同株的 HA 序列。另一方面，NP 提供了交叉保护作用，因此得自单个病毒株的序列能令人满意。

至于 PRSS 效价，优选使用 E 和 ORF3 或 M 基因，可以单独或联合使用这些基因；联合使用时，基因可位于分离的质粒上，或位于联合有 2 或 3 个这种基因的质粒中。得自至少两株，尤其是得自欧洲株和美洲株的基因利于在同一疫苗中联合。

至于典型猪瘟效价，可使用 E1 和 E2 基因中的任一种或 E1 和 E2 基因，后情形下它们可在两个不同质粒或任选在一个相同质粒中联合。

至于放线杆菌病效价，可使用上述 3 种基因中的一个或位于不同质粒或混合质粒上的这些基因中 2 个或 3 个基因的联合以提供针对不同血

清型大叶性肺炎放线杆菌的保护作用。对于 apxI, II 和 III 而言, 可以设想修饰编码序列以得到解毒的抗原, 具体方法见实施例。

特别对于经肌肉途径接种而言, 本发明疫苗制剂一般以 0.1-10ml, 特别是 1-5ml 的剂量体积形式提供。

剂量一般为每种质粒类型 10ng-1mg, 优选为 100ng-50 $\mu$ g, 优选为 1 $\mu$ g-250 $\mu$ g。

优选使用简单地置于接种载体, 一般为生理盐水(0.9 % NaCl), 超纯水, TE 缓冲液等中的裸质粒。当然也可以使用现有技术中已描述的任何多核苷酸疫苗形式。

每个质粒都含有启动子, 在其控制下可确保插入基因在宿主细胞中的表达。所述启动子一般是强的真核生物启动子, 尤其是来源于人或鼠, 或任选来源于其它动物如大鼠、猪和豚鼠的巨细胞病毒早期 CMV-IE 启动子。

启动子更一般地讲是来源于病毒或细胞。至于病毒启动子, 可提到 SV40 病毒早期或晚期启动子或 Rous 肉瘤病毒 LTR 启动子。也可以是基因来源病毒的启动子, 例如基因自身的启动子。

至于细胞启动子, 可提到细胞骨架基因的启动子, 例如结蛋白启动子(Bolmont 等, 亚显微镜细胞学和病理学 ( Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology ), 1990, 22, 117-122; 和 Zhenlin 等, 基因 ( Gene ), 1989, 78, 243-254)或者肌动蛋白启动子。

当相同质粒中存在几个基因时, 它们会存在于相同的转录单位或两个不同的单位中。

优选通过混合表达各种效价之抗原的多核苷酸质粒来达到本发明不同疫苗效价的联合, 但也可以设想使几种效价的抗原由相同质粒表达。

本发明的目的还在于单价疫苗制剂, 所述制剂含有一个或多个编码得自选自 PRV, PRRS, PPV, HCV 的病毒之一和大叶性肺炎放线杆菌的一个或多个基因的质粒, 所述基因为上述的那些。除了它们的单价特征外, 这些制剂可具有上述有关基因选择, 基因联合, 质粒组成,

剂量体积, 剂量等方面的特征。

单价疫苗制剂也可用于(i)制备上述的多价疫苗制剂, (ii)各对抗自己的疾病, (iii)与针对另一种疾病的另一类型(活的或灭活的完整的, 重组的, 亚单位)的疫苗联合, 或(iv)按下述作为疫苗的加强剂。

实际上本发明另一个目的是使用一种或多种本发明的质粒以制备用于接种猪的疫苗, 该猪首先已用第一种已知类型的常规疫苗接种, 所述第一种疫苗特别选自活的完整疫苗, 灭活的完整疫苗, 亚单位疫苗和重组疫苗, 所述第一种疫苗(单价或多价)具有(也就是说含有或能表达)由所述质粒编码的抗原或提供交叉保护作用的抗原。值得注意的是, 该多核苷酸疫苗具有强有力的加强效果, 可导致免疫应答的增强并可获得长期的免疫力。

一般讲, 第一接种疫苗可选自可从不同的兽用疫苗生产商处购得的疫苗。

本发明的另一目的是接种试剂盒, 所述试剂盒将上述第一接种疫苗和用于加强免疫的本发明的疫苗制剂组配在一起。本发明还涉及附带有说明书的本发明疫苗制剂, 所述说明书指明该制剂可作为上述第一次接种的加强剂来使用。

本发明的另一目的是接种猪以抵抗猪生殖疾病和/或呼吸疾病的方法, 所述方法包括施用有效量的上述疫苗制剂。此接种方法包括施用一剂或更多剂疫苗制剂, 这些剂量可以在短时间内连续施用和/或以较长的间隔期连续施用。

在这种接种方法中, 通过现有技术中建议的用于多核苷酸接种的不同施用途径并利用已知的施用技术施用本发明的疫苗制剂。特别可借助于液体注射器经液体喷射优选多个液体喷射经由皮内途径进行接种, 尤其是使用具有几个孔或喷嘴, 特别是具有5或6个孔或喷嘴的注射头的注射器, 如法国里昂 Endoscopic 公司制造并销售的 Pigjet 装置。

对于这种装置而言, 优选剂量体积降低为 0.1-0.9ml, 特别是 0.2-0.6ml, 更优选为 0.4-0.5ml, 可以 1 次或几次, 优选为 2 次施用该剂量体积。

本发明的另一目的是一种接种方法,所述方法包括按上述进行第一次接种,并用本发明的疫苗制剂加强接种。在本发明方法的优选实施方案中,首先给动物施用有效剂量的常规疫苗,尤其是灭活的、活的、减毒的或重组的、或亚单位的疫苗以提供第一次接种,一段时间后,优选为2至6周后,施用本发明的多价或单价疫苗。

本发明也涉及一种制备疫苗制剂的方法,即制备不同效价及其混合物的方法,如从此说明书中看到的方法。

下面参照附图,借助于本发明的实施方案更详细地描述本发明。

#### 附图说明

图1: 质粒 pVR1012

图2: PRV gB 基因的序列(NIA3 株)

图3: 质粒 pAB090 的构建

图4: PRV gD 基因的序列(NIA3 株)

图5: 质粒 pPB098 的构建

图6: 猪流感 HA 基因的序列(H1N1 株)

图7: 质粒 pPB143 的构建

图8: 猪流感 NP 基因的序列(H1N1 株)

图9: 质粒 pPB42 的构建

图10: 猪流感 HA 基因的序列(H3N2 株)

图11: 质粒 pPB144 的构建

图12: 猪流感 NP 基因的序列(H3N2 株)

图13: 质粒 pPB132 的构建

图14: 质粒 pAB025

图15: 质粒 pAB001

图16: 质粒 pAB091

图17: 质粒 pAB092

图18: 质粒 pAB004

图19: 质粒 pAB069

图 20：质粒 pAB061

图 21：质粒 pPB162

图 22：质粒 pPB163

图 23：质粒 pPB174'

图 24：质粒 pPB189

图 25：质粒 pPB190

序列表 SEQ ID NO:

SEQ ID NO:1：PRV gB 基因的序列(NIA3 株)

SEQ ID NO:2：寡核苷酸 AB166

SEQ ID NO:3：寡核苷酸 AB167

SEQ ID NO:4：寡核苷酸 AB168

SEQ ID NO:5：寡核苷酸 AB169

SEQ ID NO:6：PRV gD 基因的序列(NIA3 株)

SEQ ID NO:7：寡核苷酸 PB101

SEQ ID NO:8：寡核苷酸 PB102

SEQ ID NO:9：寡核苷酸 PB107

SEQ ID NO:10：寡核苷酸 PB108

SEQ ID NO:11：猪流感 HA 基因的序列(H1N1 株)

SEQ ID NO:12：寡核苷酸 PB097

SEQ ID NO:13：寡核苷酸 PB098

SEQ ID NO:14：猪流感 NP 基因的序列(H1N1 株)

SEQ ID NO:15：寡核苷酸 PB095

SEQ ID NO:16：寡核苷酸 PB096

SEQ ID NO:17：猪流感 HA 基因的序列(H3N2 株)

SEQ ID NO:18：猪流感 NP 基因的序列(H3N2 株)

SEQ ID NO:19：寡核苷酸 AB055

SEQ ID NO:20：寡核苷酸 AB056

SEQ ID NO:21：寡核苷酸 AB001

SEQ ID NO:22: 寡核苷酸 AB002  
SEQ ID NO:23: 寡核苷酸 AB170  
SEQ ID NO:24: 寡核苷酸 AB171  
SEQ ID NO:25: 寡核苷酸 AB172  
SEQ ID NO:26: 寡核苷酸 AB173  
SEQ ID NO:27: 寡核苷酸 AB007  
SEQ ID NO:28: 寡核苷酸 AB010  
SEQ ID NO:29: 寡核苷酸 AB126  
SEQ ID NO:30: 寡核苷酸 AB127  
SEQ ID NO:31: 寡核苷酸 AB118  
SEQ ID NO:32: 寡核苷酸 AB119  
SEQ ID NO:33: 寡核苷酸 PB174  
SEQ ID NO:34: 寡核苷酸 PB189  
SEQ ID NO:35: 寡核苷酸 PB190  
SEQ ID NO:36: 寡核苷酸 PB175  
SEQ ID NO:37: 寡核苷酸 PB176  
SEQ ID NO:38: 寡核苷酸 PB191  
SEQ ID NO:39: 寡核苷酸 PB192  
SEQ ID NO:40: 寡核苷酸 PB177  
SEQ ID NO:41: 寡核苷酸 PB278  
SEQ ID NO:42: 寡核苷酸 PB279  
SEQ ID NO:43: 寡核苷酸 PB280  
SEQ ID NO:44: 寡核苷酸 PB307  
SEQ ID NO:45: 寡核苷酸 PB303  
SEQ ID NO:46: 寡核苷酸 PB306  
SEQ ID NO:47: 寡核苷酸 PB304  
SEQ ID NO:48: 寡核苷酸 PB305

实施例

### 实施例 1：病毒的培养

在适当的细胞系统中培养病毒直至得到细胞病变效应。本领域技术人员熟知每种病毒所用的细胞系统。简单地说，用感染复数为 1 的被研究的病毒株接种对所用病毒敏感的细胞，所述细胞在 Eagle 最低基本培养基(MEM 培养基)或另一种适当的培养基中培养。然后于 37 °C 保温被感染的细胞直至出现完全的细胞病变效应(平均为 36 小时)。

### 实施例 2：细菌的培养和细菌 DNA 的提取

按 A. Rycroft 等人(普通微生物学杂志 ( J.Gen.Microbiol. ), 1991, 137, 561-568)所述培养大叶性肺炎放线杆菌菌株。根据 J. Sambrook 等人(分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室，冷泉港，纽约，1989)所述的标准技术制备高分子量的 DNA(染色体 DNA)。

### 实施例 3：提取病毒基因组 DNA

培养后，收获上清液和被裂解的细胞，于 4 °C，1000g 将全部的病毒悬浮液离心 10 分钟以除去细胞碎片，然后通过于 4 °C，400,000g 超速离心 1 小时以收获病毒颗粒。将沉淀物溶解于最少量的缓冲液(10mM Tris, 1mM EDTA; pH8.0)中，于 37 °C，在十二烷基硫酸钠(SDS)的存在下(终浓度为 0.5 %)，用蛋白酶 K(终浓度为 100µg/ml)将上述浓缩的病毒悬浮液处理 2 小时。然后用苯酚/氯仿混合物提取病毒 DNA，再用 2 倍体积的无水乙醇沉淀之。于 -20 °C 放置过夜后，于 4 °C，10,000g 将 DNA 离心 15 分钟，干燥 DNA 沉淀物，然后将它溶于最少量的无菌超纯水中，接着可以用限制性酶消化所述 DNA。

### 实施例 4：分离病毒基因组 RNA

根据本领域技术人员熟知的技术纯化 RNA 病毒，然后使用 P. Chromczynski 和 N. Sacchi 所述的“硫氰酸胍/苯酚-氯仿”提取技术(分析生物化学，1987, 162, 156-159)分离各个病毒的基因组病毒 RNA。

### 实施例 5：分子生物学技术

使用 J. Sambrook 等人(分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室，冷泉港，纽约，1989)所述的标准分子生物学技术进行所有的质粒构建。使用“GeneClean”试剂盒(BIO 101 Inc. La Jolla, CA)分离用于本发明的所有限制性片段。

### 实施例 6：RT-PCR 技术

合成多个特异性的寡核苷酸(在其 5' 末端含有限制性位点以便于克隆经扩增的片段)以使其完全覆盖欲被扩增的基因的编码区(见具体的实施例)。根据标准技术(J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室，冷泉港，纽约，1989)进行逆转录(RT)反应和聚合酶链反应(PCR)。用一对特异性的扩增引物进行一种 RT-PCR 反应，所述反应的模板是提取出的病毒基因组 RNA。用苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)提取经扩增的互补 DNA，然后用限制性酶消化。

### 实施例 7：质粒 pVR1012

质粒 pVR1012(图 1)得自 Vical Inc., San Diego, CA, USA。其构建描述于 J. Hartikka 等人(人类基因疗法 (Human Gene Therapy), 1996, 7, 1205-1217)。

### 实施例 8：构建质粒 pAB090(PRV gB 基因)

用 ApaI 和 NaeI 消化质粒 pPR2.15(M. Riviere 等，病毒学杂志 (J. Virol), 1992, 66, 3424-3434)，以释放出含有编码 Aujeszky 病病毒(NIA3 株)gB 糖蛋白之基因(图 2 和 SEQ ID NO:1)的 2665 bp 的 ApaI-NaeI 片段(片段 A)。

通过下列 2 个寡核苷酸的杂交：

AB166(33 聚体)(SEQ ID NO:2)

5' GATGCCCCGCTGGTGGCGGTCTTTGGCGCGGGCC 3'

**AB167(33 聚体)(SEQ ID NO:3)**

**5' ACGTCTACGGGCGACCAACCGCCAGAAACCGCGC 3'**

重新构建含有 gD 基因序列, 始于起始的 ATG 密码子直至 ApaI 位点的 33 bp 的片段(片段 B), 该片段在 5'端产生了 PstI 位点。

通过下列 2 个寡核苷酸的杂交:

**AB168(45 聚体)(SEQ ID NO:4)**

**5'**

**GGCACTACCAGCGCCTCGAGAGCGAGGACCCCGACGCCCTG  
TAGG 3'**

**AB169(49 聚体)(SEQ ID NO:5)**

**5'**

**GATCCCTACAGGGCGTCGGGGTCCTCGCTCTCGAGGCGCTG  
GTAGTGCC 3'**

重新构建含有 gD 基因序列, 始于 NaeI 位点直至 TAG 终止密码子的 45 bp 的片段(片段 C), 该片段在 3'端产生了 BamHI 位点。

将片断 A, B 和 C 一起连接到预先经 PstI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012(实施例 7)中, 得到质粒 pAB090(7603 bp)(图 3)。

**实施例 9: 构建质粒 pPB098(PRV gD 基因)**

用 SalI 和 BglII 消化质粒 pPR29(M. Riviere 等, 病毒学杂志, 1992, 66, 3424-3434), 以释放出含有编码 Aujeszky 病病毒(NIA3 株)gD 糖蛋白之基因的 3'部分(图 4 和 SEQ ID NO:6)的 711 bp 的 SalI-BglII 片段(片段 A)。

用 Eco47III 和 SalI 消化质粒 pPR29 以释放出含有编码 Aujeszky 病病毒(NIA3 株)gD 糖蛋白之基因的 5'部分的 498 bp 的 Eco47III-SalI 片段(片段 B)。

通过下列 2 个寡核苷酸的杂交:

**PB101(15 聚体)(SEQ ID NO:7)**

**5' GATGCTGCTCGCAGC 3'**

**PB102(19 聚体)(SEQ ID NO:8)**

**5' GCTGCGAGCAGCATCTGCA 3'**

重新构建含有 gD 基因 5' 序列，始于起始的 ATG 密码子直至 Eco47III 位点的 15 bp 的片段(片段 C)，该片段在 5' 端产生了 PstI 位点。

纯化之后，将片段 A，B 和 C 一起连接到预先经 PstI 和 BglII 消化的载体 pVR1012(实施例 7)中，得到质粒 pPB098(6076 bp)(图 5)。

**实施例 10：构建质粒 pPB143(猪流感 HA 基因，H1N1 株)**

用根据实施例 4 所述技术制备的猪流感病毒(SIV H1N1 “SW” 株)基因组 RNA，和下列寡核苷酸：

**PB107(32 聚体)(SEQ ID NO:9)**

**5' GTTCTGCAGCACCCGGGAGCAAAAGCAGGGGA 3'**

**PB108(33 聚体)(SEQ ID NO:10)**

**5' ATTGCGGCCGCTAGTAGAAACAAGGGTGTTTTT 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 SIV H1N1 中精确地分离 1803 bp PCR 片段形式的编码 HA 蛋白的基因(图 6 和 SEQ ID NO:11)。纯化之后，将此片段与载体 PCRII-direct(Invitrogen Reference K2000-01)连接，得到载体 pPB137(5755 bp)。用 EcoRV 和 NotI 消化载体 pPB137 以释放 1820 bp 的含有 HA 基因的 EcoRV-NotI 片段。将此片段与预先经 EcoRV 和 NotI 消化的载体 pVR1012(实施例 7)连接，得到质粒 pPB143(6726 bp)(图 7)。

**实施例 11：构建质粒 pPB142(猪流感 NP 基因，H1N1 株)**

用根据实施例 4 所述技术制备的猪流感病毒(SIV H1N1 “SW” 株)基因组 RNA，和下列寡核苷酸：

**PB097(36 聚体)(SEQ ID NO:12)**

**5' CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGACATC 3'**

**PB098(33 聚体)(SEQ ID NO:13)**

**5' TTGCGGCCGCTGTAGAAACAAGGGTATTTTTCT 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 SIV H1N1 中精确地分离 SalI-NotI 片段形式的编码 NP 蛋白的基因(图 8 和 SEQ ID NO:14)。纯化之后, 将 1566 bp 的 RT-PCR 产物与载体 PCRII-direct(Invitrogen Reference K2000-01)连接, 得到载体 pPB127(5519 bp)。

用 SalI 和 NotI 消化载体 pPB127 以释放 1560 bp 的含有 NP 基因的 SalI-NotI 片段。将此片段与预先经 SalI 和 NotI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接, 得到质粒 pPB142(6451 bp)(图 9)。

#### 实施例 12: 构建质粒 pPB144(猪流感 HA 基因, H3N2 株)

用根据实施例 4 所述技术制备的猪流感病毒(SIV H3N2 株, Cotes du Nord 1987)基因组 RNA, 和下列寡核苷酸:

PB095(31 聚体)(SEQ ID NO:15)

5' GTTCTGCAGGCAGGGGATAATTCTATCAACC 3'

PB096(36 聚体)(SEQ ID NO:16)

5' TTGCGGCCGCAAGGGTGTTTTTAATTACTAATATAC 3'

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 SIV H3N2 中精确地分离 PstI-NotI 片断形式的编码 HA 蛋白的基因(图 10 和 SEQ ID NO:17)。纯化之后, 将 1765 bp 的 RT-PCR 产物与载体 PCRII-direct(Invitrogen Reference K2000-01)连接, 得到载体 pPB120(5716 bp)。

用 NotI 消化载体 pPB120 以释放 1797 bp 的含有 HA 基因的 NotI-NotI 片段。将此片段与预先经 NotI 消化的载体 pVR1012(实施例 7)连接, 得到质粒 pPB144(6712 bp), 该质粒在相对于启动子正确的方向上含有 H3N2 HA 基因(图 11)。

#### 实施例 13: 构建质粒 pPB132(猪流感 NP 基因, H3N2 株)

用根据实施例 4 所述技术制备的猪流感病毒(SIV H3N2 株, Cotes du Nord 1987)基因组 RNA, 和下列寡核苷酸:

PB097(36 聚体)(SEQ ID NO:12)

**5' CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGACATC 3'**

**PB098(33 聚体)(SEQ ID NO:13)**

**5' TTGCGGCCCGCTGTAGAAACAAGGGTATTTTTTCT 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 SIV H3N2 中精确地分离 Sall-NotI 片段形式的编码 NP 蛋白的基因(图 12 和 SEQ ID NO:18)。纯化之后,将 1564 bp 的 RT-PCR 产物与载体 PCRII-direct(Invitrogen Reference K2000-01)连接,得到载体 pPB123(5485 bp)。

用 Sall 和 NotI 消化载体 pPB123 以释放 1558 bp 的含有 NP 基因的 Sall -NotI 片段。将此片段与预先经 Sall 和 NotI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接,得到质粒 pPB132(6449 bp)(图 13)。

**实施例 14: 构建质粒 pAB025(PRRSV ORF5 基因, Lelystad 株)**

用根据实施例 4 所述技术制备的 PRRSV 病毒(Lelystad 株)基因组 RNA(J. Meulenber 等, 病毒学 ( Virology ), 1993, 19, 62-72), 和下列寡核苷酸:

**AB055(34 聚体)(SEQ ID NO:19)**

**5' ACGCGTCGACAATATGAGATGTTCTCACAAATTG 3'**

**AB056(33 聚体)(SEQ ID NO:20)**

**5' CGCGGATCCCGTCTAGGCCTCCCATTGCTCAGC 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 PRRS 病毒 Lelystad 株中精确地分离编码包膜糖蛋白 E(gp25)的“ORF5”基因。纯化之后,用 Sall 和 BamHI 消化 630 bp 的 RT-PCR 产物以分离 617 bp 的 Sall-BamHI 片段。将此片段与预先经 Sall 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接,得到质粒 pAB025(5486 bp)(图 14)。

**实施例 15: 构建质粒 pAB001(PRRSV ORF5 基因, USA 株)**

用根据实施例 4 所述技术制备的 PRRSV 病毒(ATCC VR2332 株)基因组 RNA(M. Murtaugh 等, Arch Virol, 1995, 140, 1451-1460), 和下列寡核苷酸:

**AB001(30 聚体)(SEQ ID NO:21)**

**5' AACTGCAGATGTTGGAGAAATGCTTGACCG 3'**

**AB002(30 聚体)(SEQ ID NO:22)**

**5' CGGGATCCCTAAGGACGACCCCATTTGTTCC 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 PRRS 病毒 ATCC-VR2332 株中精确地分离编码包膜糖蛋白 E(gp25)的基因。纯化之后,用 PstI 和 BamHI 消化 620 bp 的 RT-PCR 产物以分离 606 bp 的 PstI-BamHI 片断。将此片段与预先经 PstI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接,得到质粒 pAB001(5463 bp)(图 15)。

**实施例 16: 构建质粒 pAB091(PRRSV ORF3 基因, Lelystad 株)**

用根据实施例 4 所述技术制备的 PRRSV 病毒(Lelystad 株)基因组 RNA(J. Meulenberg 等, 病毒学, 1993, 19, 62-72), 和下列寡核苷酸:

**AB170(32 聚体)(SEQ ID NO:23)**

**5' AAAGTGCAGCAATGGCTCATCAGTGTGCACGC 3'**

**AB171(30 聚体)(SEQ ID NO:24)**

**5' CGCGGATCCTTATCGTGATGTACTGGGGAG 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 PRRS 病毒 Lelystad 株中精确地分离编码包膜糖蛋白“gp45”的“ORF3”基因。纯化之后,用 PstI 和 BamHI 消化 818 bp 的 RT-PCR 产物以分离 802 bp 的 PstI-BamHI 片断。将此片段与预先经 PstI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接,得到质粒 pAB091(5660 bp)(图 16)。

**实施例 17: 构建质粒 pAB092(PRRSV ORF3 基因, USA 株)**

用根据实施例 4 所述技术制备的 PRRSV 病毒(ATCC VR2332 株)基因组 RNA(M. Murtaugh 等, Arch Virol, 1995, 140, 1451-1460), 和下列寡核苷酸:

**AN172(32 聚体)(SEQ ID NO:25)**

5' AAAGTGCAGCAATGGTTAATAGCTGTACATTC 3'

AB173(32 聚体)(SEQ ID NO:26)

5' CGCGGATCCCTATCGCCGTACGGCACTGAGGG 3'

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 PRRS 病毒 ATCC-VR2332 株中精确地分离编码包膜糖蛋白“gp45”的“ORF3”基因。纯化之后,用 PstI 和 BamHI 消化 785 bp 的 RT-PCR 产物以分离 769 bp 的 PstI-BamHI 片段。将此片段与预先经 PstI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接,得到质粒 pAB092(5627 bp)(图 17)。

实施例 18: 构建质粒 pAB004(猪细小病毒 VP2 基因)

用根据实施例 4 所述技术制备的猪细小病毒(NADL2 株)基因组 RNA(J. Vasudevacharya 等, 病毒学, 1990, 178, 611-616), 和下列寡核苷酸:

AB007(33 聚体)(SEQ ID NO:27)

5' AAAAGTGCAGCAATGAGTGAAAATGTGGAACAAC 3'

AB010(33 聚体)(SEQ ID NO:28)

5' CGCGGATCCCTAGTATAATTTTCTTGGTATAAG 3'

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以扩增含有编码猪细小病毒 VP2 蛋白之基因的 1757 bp 的片段。纯化之后,用 PstI 和 BamHI 消化 RT-PCR 产物,得到 1740 bp 的 PstI-BamHI 片段。将此片段与预先经 PstI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接,得到质粒 pAB004 (6601bp)(图 18)。

实施例 19: 构建质粒 pAB069(猪瘟 HCV E1 基因)

用根据实施例 4 所述技术制备的猪瘟病毒(HCV)(Alfort 株)基因组 RNA(G. Meyers 等, 病毒学, 1989, 171, 18-27), 和下列寡核苷酸:

AB126(36 聚体)(SEQ ID NO:29)

5' ACGCGTCGACATGAAACTAGAAAAAGCCCTGTTGGC 3'

AB127(34 聚体)(SEQ ID NO:30)

**5' CGCGGATCCTCATAGCCGCCCTTGTGCCCCGGTC 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 HCV 病毒中分离 1363 bp 的 RT-PCR 片段形式的编码 E1 蛋白的序列。纯化之后，用 SalI 和 BamHI 消化此片段，得到 1349 bp 的 SalI-BamHI 片段。将此片段与预先经 SalI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7) 连接，得到质粒 pAB069(6218 bp)(图 19)。

**实施例 20：构建质粒 pAB061(猪瘟 HCV E2 基因)**

用根据实施例 4 所述技术制备的猪瘟病毒(HCV)(Alfort 株)基因组 RNA(G. Meyers 等，病毒学，1989，171，18-27)，和下列寡核苷酸：AB118(36 聚体)(SEQ ID NO:31)

**5' ACGCGTCGACATGTCAACTACTGCGTTTCTCATTG 3'**

AB119(33 聚体)(SEQ ID NO:32)

**5' CGCGGATCCTCACTGTAGACCAGCAGCGAGCTG 3'**

根据实施例 6 所述技术进行 RT-PCR 反应以从 HCV 病毒中分离 1246bp 的 RT-PCR 片段形式的编码 E2 蛋白的序列。纯化之后，用 SalI 和 BamHI 消化此片段，得到 1232 bp 的 SalI-BamHI 片段。将此片段与预先经 SalI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7) 连接，得到质粒 pAB061 (6101bp)(图 20)。

**实施例 21：构建质粒 pPB162(缺失的大叶性肺炎放线杆菌 apxI 基因)**

克隆大叶性肺炎放线杆菌 apxI 基因以缺失氨基酸 719-846 之间富含甘氨酸的氨基酸区域(涉及钙离子的结合)。

用根据实施例 2 和 3 所述技术制备的大叶性肺炎放线杆菌(血清型 1)的基因组 DNA(J. Frey 等，感染和免疫(Infect. Immun.)，1991，59，3026-3032)，和下列寡核苷酸：

PB174(32 聚体)(SEQ ID NO:33)

**5' TTGTCGACGTAAATAGCTAAGGAGACAACATG 3'**

PB189(29 聚体)(SEQ ID NO:34)

**5' TTGAATTCTTCTTCAACAGAATGTAATTC 3'**

进行 PCR 反应以扩增 SalI-EcoRI 片段形式的编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 I 蛋白之 apxI 基因的 5' 部分。纯化之后, 用 SalI 和 EcoRI 消化 2193 bp 的 PCR 产物以分离 2183 bp 的 SalI-EcoRI 片段(片段 A)。

用大叶性肺炎放线杆菌(血清型 1)的基因组 DNA(J. Frey 等, Infect. Immun., 1991, 59, 3026-3032), 和下列寡核苷酸:

PB190(32 聚体)(SEQ ID NO:35)

**5' TTGAATTCTATCGCTACAGTAAGGAGTACGG 3'**

PB175(31 聚体)(SEQ ID NO:36)

**5' TTGGATCCGCTATTTATCATCTAAAAATAAC 3'**

进行 PCR 反应以扩增 EcoRI-BamHI 片段形式的编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 I 蛋白之 apxI 基因的 3' 部分。纯化之后, 用 EcoRI 和 BamHI 消化 576 bp 的 PCR 产物以分离 566 bp 的 EcoRI-BamHI 片段(片段 B)。将片段 A 和 B 与预先经 SalI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接, 得到质粒 pPB162(7619 bp)(图 21)。

**实施例 22: 构建质粒 pPB163(缺失的大叶性肺炎放线杆菌 apxII 基因)**

克隆大叶性肺炎放线杆菌 apxII 基因以缺失氨基酸 716-813 之间富含甘氨酸的氨基酸区域(涉及钙离子的结合)。

用根据实施例 2 和 3 所述技术制备的大叶性肺炎放线杆菌(血清型 9)的基因组 DNA(M. Smits 等, 感染和免疫 (Infection and Immunity), 1991, 59, 4497-4504), 和下列寡核苷酸:

PB176(31 聚体)(SEQ ID NO:37)

**5' TTGTCGACGATCAATTATATAAAGGAGACTC 3'**

PB191(30 聚体)(SEQ ID NO:38)

**5' TTGAATTCCTCTTCAACTGATTTGAGTGAG 3'**

进行 PCR 反应以扩增 SalI-EcoRI 片段形式的编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 II 蛋白之 apxII 基因的 5' 部分。纯化之后, 用 SalI 和 EcoRI 消化 2190 bp 的 PCR 产物以分离 2180 bp 的 SalI-EcoRI 片段(片段 A)。

用大叶性肺炎放线杆菌(血清型 9)的基因组 DNA(M. Smits 等, 感染和免疫, 1991, 59, 4497-4504), 和下列寡核苷酸:

PB192(29 聚体)(SEQ ID NO:39)

5' TTGAATTCGTAATCTTAAAGACCTCACC 3'

PB177(30 聚体)(SEQ ID NO:40)

5' TTGGATCCACCATAGGATTGCTATGATTTG 3'

进行 PCR 反应以扩增 EcoRI-BamHI 片段形式的编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 II 蛋白之 apxII 基因的 3' 部分。纯化之后, 用 EcoRI 和 BamHI 消化 473 bp 的 PCR 产物以分离 463 bp 的 EcoRI-BamHI 片段(片段 B)。

将片段 A 和 B 与预先经 Sall 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接, 得到质粒 pPB163(7513 bp)(图 22)。

实施例 23: 构建质粒 pPB174', pPB189 和 pPB190(缺失的大叶性肺炎放线杆菌 apxIII 基因)

apxIII 缺失的第一个实施例(质粒 pPB174')

克隆大叶性肺炎放线杆菌 apxIII 基因以缺失氨基酸 733-860 之间富含甘氨酸的氨基酸区域(涉及钙离子的结合)。

用根据实施例 2 和 3 所述技术制备的大叶性肺炎放线杆菌(血清型 8)的基因组 DNA(M. Smits, 1992, Genbank 序列登记号为 X68815), 和下列寡核苷酸:

PB278(30 聚体)(SEQ ID NO:41)

5' TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB279(28 聚体)(SEQ ID NO:42)

5' TTTATCGATTCTTCTACTGAATGTAATTC 3'

进行 PCR 反应以扩增 Sall-ClaI 片段形式的 apxIII 基因(编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 III 蛋白)的 5' 部分。纯化之后, 用 Sall 和 ClaI 消化 2216 bp 的 PCR 产物以分离 2205 bp 的 Sall-ClaI 片段(片段 A)。

用大叶性肺炎放线杆菌(血清型 8)的基因组 DNA(M. Smits,

1992, Genbank 序列登记号为 X68815), 和下列寡核苷酸:

PB280(33 聚体)(SEQ ID NO:43)

5' TTTATCGATTTATGTTTATCGTTCCACTTCAGG 3'

PB307(32 聚体)(SEQ ID NO:44)

5' TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

进行 PCR 反应以扩增 ClaI-BamHI 片段形式的 apxIII 基因(编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 III 蛋白)的 3' 部分。纯化之后, 用 ClaI 和 BamHI 消化 596 bp 的 PCR 产物以分离 583 bp 的 ClaI-BamHI 片段(片段 B)。将片段 A 和 B 与预先经 SalI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接, 得到质粒 pPB174'(7658 bp)(图 23)。

#### apxIII 缺失的第二个实施例(质粒 pPB189)

克隆大叶性肺炎放线杆菌 apxIII 基因以缺失氨基酸 705-886 之间富含甘氨酸的氨基酸区域(涉及钙离子的结合)。

用根据实施例 2 和 3 所述技术制备的大叶性肺炎放线杆菌(血清型 8)的基因组 DNA(M. Smits, 1992, Genbank 序列登记号为 X68815), 和下列寡核苷酸:

PB278(30 聚体)(SEQ ID NO:41)

5' TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB303(32 聚体)(SEQ ID NO:45)

5' TTTATCGATTTCTTCACGTTTACCAACAGCAG 3'

进行 PCR 反应以扩增 SalI-ClaI 片段形式的 apxIII 基因(编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 III 蛋白)的 5' 部分。纯化之后, 用 SalI 和 ClaI 消化 2133 bp 的 PCR 产物以分离 2122 bp 的 SalI-ClaI 片段(片段 A)。

用大叶性肺炎放线杆菌(血清型 8)的基因组 DNA(M. Smits, 1992, Genbank 序列登记号为 X68815), 和下列寡核苷酸:

PB306(31 聚体)(SEQ ID NO:46)

5' TTTATCGATTCTGATTTTTCCTTCGATCGTC 3'

PB307(32 聚体)(SEQ ID NO:44)

**5' TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'**

进行PCR反应以扩增 ClaI-BamHI 片段形式的 apxIII 基因(编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 III 蛋白)的 3' 部分。纯化之后, 用 ClaI 和 BamHI 消化 518 bp 的 PCR 产物以分离 506 bp 的 ClaI-BamHI 片段(片段 B)。将片段 A 和 B 与预先经 SalI 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接, 得到质粒 pPB189(7496 bp)(图 24)。

**apxIII 缺失的第三个实施例(质粒 pPB190)**

克隆大叶性肺炎放线杆菌 apxIII 基因以缺失氨基酸 718-876 之间富含甘氨酸的氨基酸区域(涉及钙离子的结合)。

用根据实施例 2 和 3 所述技术制备的大叶性肺炎放线杆菌(血清型 8)的基因组 DNA(M. Smits, 1992, Genbank 序列登记号为 X68815), 和下列寡核苷酸:

**PB278(30 聚体)(SEQ ID NO:41)**

**5' TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'**

**PB304(33 聚体)(SEQ ID NO:47)**

**5' TTTATCGATACCTGATTGCGTTAATTCATAATC 3'**

进行 PCR 反应以扩增 SalI-ClaI 片段形式的 apxIII 基因(编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 III 蛋白)的 5' 部分。纯化之后, 用 SalI 和 ClaI 消化 2172 bp 的 PCR 产物以分离 2161 bp 的 SalI-ClaI 片段(片段 A)。

用大叶性肺炎放线杆菌(血清型 8)的基因组 DNA(M. Smits, 1992, Genbank 序列登记号为 X68815), 和下列寡核苷酸:

**PB305(31 聚体)(SEQ ID NO:48)**

**5' TTTATCGATAAATCTAGTGATTAGATAAAC 3'**

**PB307(32 聚体)(SEQ ID NO:44)**

**5' TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'**

进行PCR反应以扩增 ClaI-BamHI 片段形式的 apxIII 基因(编码大叶性肺炎放线杆菌溶血素 III 蛋白)的 3' 部分。纯化之后, 用 ClaI 和 BamHI 消化 548 bp 的 PCR 产物以分离 536 bp 的 ClaI-BamHI 片段(片段 B)。

将片段 A 和 B 与预先经 Sall 和 BamHI 消化的载体 pVR1012 (实施例 7)连接, 得到质粒 pPB190(7565 bp)(图 25)。

#### 实施例 24: 制备和纯化质粒

为了制备欲接种动物的质粒, 可使用能得到超螺旋形式占优势的纯化质粒悬浮液的任何技术, 这些技术是本领域技术人员所熟知的。这里可特别提到 J. Sambrook 等人(分子克隆: 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约, 1989)所述的碱裂解技术, 接着再在溴化乙锭的存在下, 在氯化铯梯度中进行 2 次连续的超速离心。也可参照专利申请 PCT WO 95/21250 和 PCT WO 96/02658, 它们描述了工业化规模生产可用于接种之质粒的方法。为了制备疫苗(见实施例 17), 可重新悬浮纯化的质粒以得到适于储存的高浓度溶液(>2mg/ml)。为此, 将质粒重新悬浮于超纯水或 TE 缓冲液(10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH8.0)中。

#### 实施例 25: 制备联合疫苗

从其浓缩溶液(实施例 16)开始混合制备联合疫苗所需的多种质粒。制备混合物以使各个质粒的终浓度相当于各个质粒的有效剂量。可被用于调节疫苗终浓度的溶液可以是 0.9 % 的 NaCl 溶液, 也可以是 PBS 缓冲液。

也可以将特殊的制剂, 如脂质体, 阳离子脂质用于制备疫苗。

#### 实施例 26: 对猪的接种

以每种质粒 100, 250 或 500 $\mu$ g 的剂量接种猪。

通过肌肉途径用针头进行注射。此时, 以 2ml 的体积施用疫苗剂量。

也可使用在 5 个点分送 0.2ml 剂量(每个注射点 0.04ml)的液体喷射注射器装置(不带针头)(如“PIGJET”装置), 经由皮内途径进行注射。此时, 施用的疫苗剂量体积为 0.2 或 0.4ml, 这分别相应于注射 1 次或

---

2 次。当利用 PIGJET 装置进行 2 次连续的注射时，应将注射区间隔开以使 2 个注射区彼此间隔约 1-2cm 的距离。

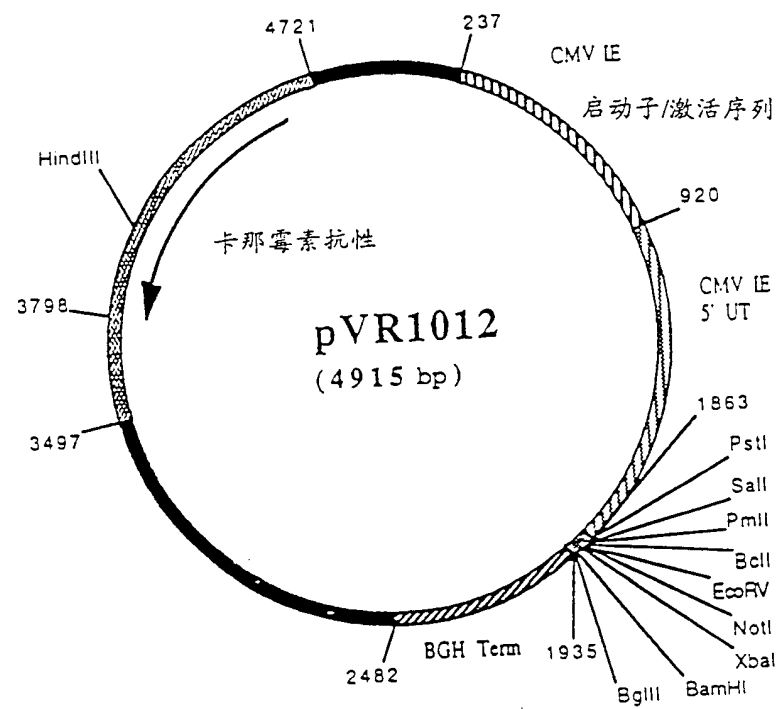


图 1

```

1  ATCCCCCTGGTGGCGCTCTTTGGCGCGGGCCCCCGGGGCATCGGCCCGGGCACCACGGCGGT
1▶MetProAlaGlyGlyGlyLeuTrpArgGlyProArgGlyHisArgProGlyHisHisGlyGly
PstI
64  GCTGGCCTCGGACGTCTTTGGCCTGCTCCACACCACGCTGCAGCTGCGCGGGGCGCGCTCGCG
22▶AlaGlyLeuGlyArgLeuTrpProAlaProHisHisAlaAlaAlaAlaArgGlyAlaValAla
127 CTAGCGCTGCTGCTGCTGGCGCTCGCCCGCGGCCCGCGCTGCGCGCGCGCGCGCTGACGCGG
43▶LeuAlaLeuLeuLeuLeuAlaLeuAlaAlaAlaProProCysGlyAlaAlaAlaValThrArg
190 GCGCGCTCGGCCTCGCGGACGCGCGGGACGGCGGCCACCCCAACGACGTCTCGCGCGAGCGG
64▶AlaAlaSerAlaSerProThrProGlyThrGlyAlaThrProAsnAspValSerAlaGluAla
XhoI
253 TCCCTCGAGGAGATCGAGCGTTCTCCCCCGGCCCTCGGAGGCCCGGACGGCGAGTACGGC
85▶SerLeuGluGluIleGluAlaPheSerProGlyProSerGluAlaProAspGlyGluTyrGly
316 GACCTGGACGCGCGGACGCGCGCTGCGCGCGCGCGGACCGAGCGGGACCGCTTCTACGCTCGC
106▶AspLeuAspAlaArgThrAlaValArgAlaAlaAlaThrGluArgAspArgPheTyrValCys
379 CCGCGCGCGTCCGCGTCCACGGTGGTGGCGCTGGAGCCCGAGCAGGCTCGCCCGAGTACTCG
127▶ProProProSerGlySerThrValValArgLeuGluProGluGlnAlaCysProGluTyrSer
442 CAGGGCGCAACTTCACGGAGGGATCGCCCTGCTCTTCAAGGAGAACATCGCCCGCACAAG
148▶GlnGlyArgAsnPheThrGluGlyIleAlaLeuLeuPheLysGluAsnIleAlaProHisLys
505 TTCAAGGCCACATCTACTACAAGAACGTCATCGTCACGACCGTGTGCTCGCGGAGCACGTAC
169▶PheLysAlaHisIleTyrTyrLysAsnValIleValThrThrValTrpSerGlySerThrTyr
568 GCGGCCATCACGAACCGCTTCACAGACCGCGTCCCGTCCCGTGCAGGAGATCAGGACGTG
190▶AlaAlaIleThrAsnArgPheThrAspArgValProValProValGlnGluIleThrAspVal
631 ATCGACCGCGCGCGCAAGTGGCTCTCCAAGCGCGAGTACGTGCGCAACAACCAAGGTGACC
211▶IleAspArgArgGlyLysCysValSerLysAlaGluTyrValArgAsnAsnHisLysValThr
694 GCCTTCGACCGCGACGAGAACCCCGTCGAGGTGGACCTGCGCCCCCTCGCGCTGAACGCGCTC
232▶AlaPheAspArgAspGluAsnProValGluValAspLeuArgProSerArgLeuAsnAlaLeu
757 GGCACCGCGCGCTGGCACACCACCAACGACACCTACACCAAGATCGCGCGCGCGGGTTCTAC
253▶GlyThrArgAlaTrpHisThrThrAsnAspThrTyrThrLysIleGlyAlaAlaGlyPheTyr
820 CAGACGGGCACCTCCGTCAACTGCATCGTCGAGGAGGTGGAGCGCGCTCCGTGTACCCCTAC
274▶GlnThrGlyThrSerValAsnCysIleValGluGluValGluAlaArgSerValTyrProTyr
883 GACTCCTTCGCCCTGTCCACGGGGGACATTGTGTACATGTCCCCCTTCTACGGCCTGCGCGAG
295▶AspSerPheAlaLeuSerThrGlyAspIleValTyrMetSerProPheTyrGlyLeuArgGlu
946 GGGGCCACCGGGAGCAGATCGGCTACGCGCGCGCGCTTCCAGCAGGTGGAGCACTACTAC
316▶GlyAlaHisGlyGluGlnIleGlyTyrAlaProGlyArgPheGlnGlnValGluHisTyrTyr
1009 CCCATCGACCTGGAATCGCGCTCCGCGCTCCGAGAGCGTGACGCGCAACTTCTACGCAAG
337▶ProIleAspLeuAspSerArgLeuArgAlaSerGluSerValThrArgAsnPheLeuArgThr
1072 CCGCACTTCACGGTGGCTGGGACTGGGCCCCCAAGACGCGCGCGCTGTGCAGCCTGGCCAAG
358▶ProHisPheThrValAlaTrpAspTrpAlaProLysThrArgArgValCysSerLeuAlaLys
1135 TGGCGGAGGCGGAGGAGATGACCCGCGACGAGACGCGGACGGCTCCTTCCGCTTCACGTCG
379▶TrpArgGluAlaGluGluMetThrArgAspGluThrArgAspGlySerPheArgPheThrSer
PstI
1198 CGGCCCCCTGGCGCCTCCTTCGTCAGCGACGTACGACAGCTGGACCTGCAGCGCGTGCACCTG
400▶ArgAlaLeuGlyAlaSerPheValSerAspValThrGlnLeuAspLeuGlnArgValHisLeu
1261 GCGCACTCGCTCCTCCGCGAGGCCTCGGAGGCCATCGACGCCATCTACCGCGCGCGCTACAAC
421▶GlyAspCysValLeuArgGluAlaSerGluAlaIleAspAlaIleTyrArgArgArgTyrAsn
1324 AGCAGCGACGTGCTGGCGCGGACAGCGCCGAGGTGTACCTCGCCCGCGGGGCTTCGTGGTG
442▶SerThrHisValLeuAlaGlyAspArgProGluValTyrLeuAlaArgGlyGlyPheValVal

```

图 2

XhoI

1387 GCCTTCGGCCCCGCTGATCTCGAAGGAGCTGGCGCAGCTGTACCGCCCCAGCTCGAGCCGCTC  
 463▶AlaPheArgProLeuIleSerAsnGluLeuAlaGlnLeuTyrAlaArgGluLeuGluArgLeu  
 1450 GCGCTCGCGCGCGCTGCTGGGCCCCGGGCCCCGGCGCGCCCCCTCGCGCCCCGGCTCCCCC  
 484▶GlyLeuAlaGlyValValGlyProAlaAlaProAlaAlaAlaArgArgAlaArgArgSerPro  
 1513 GCGCCGCGCGGACGCCCCAGCCCGCGGCGCTCAACGGCAGCGGGCACCTGGCGATCACCCAG  
 505▶GlyProAlaGlyThrProGluProProAlaValAsnGlyThrGlyHisLeuArgIleThrThr  

PstI

1576 GGCTCGGCGGAGTTTTCGGCGCCTGCAGTTCACCTACGACCACATCCAGGCGCACGTGAACGAC  
 526▶GlySerAlaGluPheAlaArgLeuGlnPheThrTyrAspHisIleGlnAlaHisValAsnAsp  

PstI

1639 ATGCTGGGCGGCATCGCGCGCGCCTGGTGGAGCTGCAGAACAGGACCGCACCCCTGTGGAGC  
 547▶MetLeuGlyArgIleAlaAlaAlaTrpCysGluLeuGlnAsnLysAspArgThrLeuTrpSer  
 1702 GAGATGTTCGGCCTGAACCCAGCGCCGTGGCCACGCGCGCGCTCGGCCAGCGCGTCTGCGCG  
 568▶GluMetSerArgLeuAsnProSerAlaValAlaThrAlaAlaLeuGlyGlnArgValCysAla  
 1765 CGCATGCTCGGCGACGTGATGGCCATCTCGCGGTGCGTGGAGTGGCGCGCGCGGTGTACGTG  
 589▶ArgMetLeuGlyAspValMetAlaIleSerArgCysValGluValArgGlyGlyValTyrVal  
 1828 CAGAACTCCATGCGCGTGGCCGGGAGCGCGGCACGTGCTACAGCCGCGCGCTGGTCACCTTC  
 610▶GlnAsnSerMetArgValProGlyGluArgGlyThrCysTyrSerArgProLeuValThrPhe  
 1891 GAGCACAACGGCACGGCGGTGATCGAGGGCCAGCTCGGCGACGACAACGAGCTCCTCATCTCG  
 631▶GluHisAsnGlyThrGlyValIleGluGlyGlnLeuGlyAspAspAsnGluLeuLeuIleSer  
 1954 CGCGACCTCATCGAGCCCTGCACCGGCAACCAACCGGCGCTACTTTAAGCTGGGGAGCGGGTAC  
 652▶ArgAspLeuIleGluProCysThrGlyAsnHisArgArgTyrPheLysLeuGlySerGlyTyr  
 2017 GTGTACTACGAGGACTACAATACGTGCGCATGGTGGAGGTGCCCCGAGACGATCAGCACGCGG  
 673▶ValTyrTyrGluAspTyrAsnTyrValArgMetValGluValProGluThrIleSerThrArg  

XhoI

2080 GTTACCCGTGAACCTGACGCTGCTGGAGGACCGGAGTTCCCTGCCCCCTCGAGGTGTACACGGC  
 594▶ValThrLeuAsnLeuThrLeuLeuGluAspArgGluPheLeuProLeuGluValTyrThrArg  
 2143 GAGGAGCTCGCCGACACGGGCTCCTGGACTACAGCGAGATCCAGCGCCGCAACAGCTGCAC  
 715▶GluGluLeuAlaAspThrGlyLeuLeuAspTyrSerGluIleGlnArgArgAsnGlnLeuHis  
 2206 GCGCTCAAGTTCTACGACATCGACCGCGTGGTCAAGGTGGACCACAACGCTGGTGTCTGCGC  
 736▶AlaLeuLysPheTyrAspIleAspArgValValLysValAspHisAsnValValLeuLeuArg  
 2269 GGCATCGCCAACTTCTTCCAGGGCTCGGCGACGTGGGCGCCCGCGTGGCAAGGTGGTCTCTG  
 757▶GlyIleAlaAsnPhePheGlnGlyLeuGlyAspValGlyAlaAlaValGlyLysValValLeu  
 2332 GGTGCCACGGGGCGCGTATCTCGCCCGTGGCGGCATGGTGTCTTCTCTGTCCAACCCCTTC  
 778▶GlyAlaThrGlyAlaValIleSerAlaValGlyGlyMetValSerPheLeuSerAsnProPhe  
 2395 GGGGCGCTCGCCATCGGCTGCTGGTGGTGGCGCGCTGGTGGCGGCTTCTGGGCTACCGG  
 799▶GlyAlaLeuAlaIleGlyLeuLeuValLeuAlaGlyLeuValAlaAlaPheLeuAlaTyrArg  
 2458 CACATCTCGCGCTCGCGCGCAACCCATGAAGGCCCTGTACCCCGTCACGACCAAGACGCTC  
 820▶HisIleSerArgLeuArgArgAsnProMetLysAlaLeuTyrProValThrThrLysThrLeu  

SalI

2521 AAGGAGGACGGCGTTCACGAAGGCGACGTGGACGAGGCCAAGCTGGACGAGGCCCGGACATG  
 841▶LysGluAspGlyValAspGluGlyAspValAspGluAlaLysLeuAspGlnAlaArgAspMet  

XhoI

2584 ATCCGGTACATGTCATCTGTCTCGGCCCTCGAGCAGCAGGAGCACAAGGCCCGCAAGAAGAAC  
 862▶IleArgTyrMetSerIleValSerAlaLeuGluGlnGlnGluHisLysAlaArgLysLysAsn  
 2647 AGCGGCGCGCGCTGCTGGCCAGCGCGCTCGGGCGCATGGCCACCGCGCGCGCGGACTACCG  
 883▶SerGlyProAlaLeuLeuAlaSerArgValGlyAlaMetAlaThrArgArgArgHisTyrGln  

XhoI

2710 CCGCTCGAGACGAGGACCCCGACGCCCTGTAG  
 904▶ArgLeuGluSerGluAspProAspAlaLeu...

图 2 (续完)

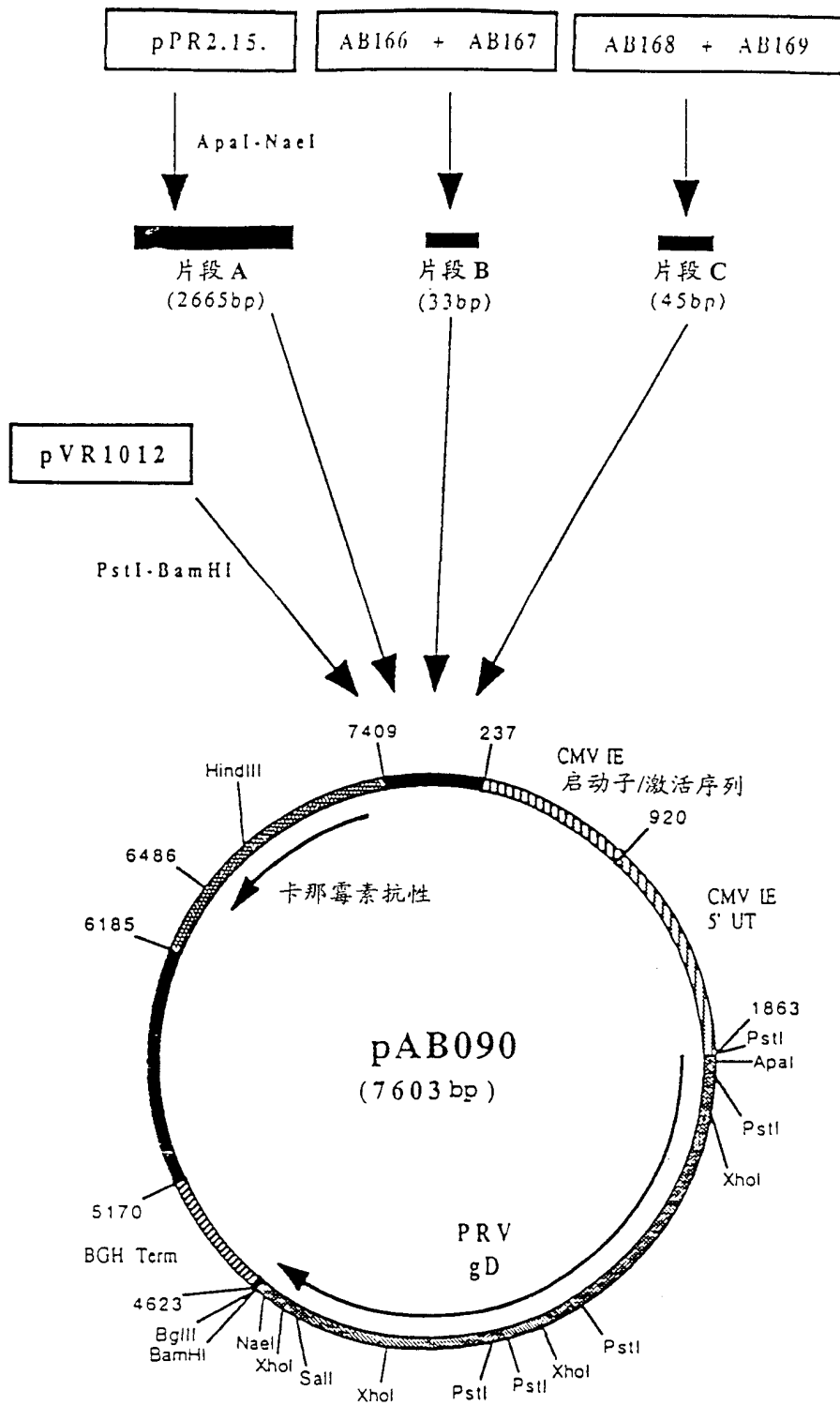


图 3

```

1  ATGCTGCTGCGACGCGCTATTGGCGGGCGGTGGTCGCCCCGACGACGCTCGGTGCGGACGTGGAC
1▶ MetLeuLeuAlaAlaLeuLeuAlaAlaLeuValAlaArgThrThrLeuGlyAlaAspValAsp
54  GCGGTGCCCCGCGCGACCTTCCCCCGCCCCCGGTACCGGTACACCGAGTCGTGGCAGCTGACG
22▶ AlaValProAlaProThrPheProProProAlaTyrProTyrThrGluSerTrpGlnLeuThr
127  CTGACGACGGTCCCCCTCGCCCTTCGTGCGCCCCGCGGACGTCTACCACACGCGCCCCGCTGGAG
43▶ LeuThrThrValProSerProPheValGlyProAlaAspValTyrHisThrArgProLeuGlu
190  GACCCGTCGCGGGTGGTGGCGCTGATCTCCGACCCGACGGTGGACCGGCTGCTGAACGAGGCG
64▶ AspProCysGlyValValAlaLeuIleSerAspProGlnValAspArgLeuLeuAsnGluAla
253  GTGCCCCACCGCGCGCCACGTACCGCGCCACGTGGCCTGGTACCGCATCGCGGACGCGGTGC
85▶ ValAlaHisArgArgProThrTyrArgAlaHisValAlaTrpTyrArgIleAlaAspGlyCys
316  GCACACCTGCTGTACTTTATCGAGTACGCGGACTGCGACCCGAGGCAGGCAGATCTTTGGGCG
106▶ AlaHisLeuLeuTyrPheIleGluTyrAlaAspCysAspProArgGlnAlaAspLeuTrpAla
379  CTGCGCGCGCGCGACCCACGCGGATGTGGTGGACCCCGTCCGCGGACTACATGTTCCCCACGGA
127▶ LeuProAlaProHisHisAlaAspValValAspProValArgGlyLeuHisValProHisGly
442  GGACGAGCTGGGGCTGCTCATGGTGGCCCCCGGGCGGTTCAACGAGGGCCAGTACCGCGCCT
148▶ GlyArgAlaGlyAlaAlaHisGlyGlyProArgAlaValGlnArgGlyProValProAlaPro
505  GGTGTCCGTCGACGGCGTGAACATCCTCACCGACTTCATGGTGGCGCTCCCCGAGGGGCAAGA
169▶ GlyValArgArgArgArgGluHisProHisArgLeuHisGlyGlyAlaProArgGlyAlaArg
568  GTGCGCGTTCGCCCCGCTGGACACGACCGCAGCTACAAGTTCCGCGCGTCTGAGCGGACGA
190▶ ValProValArgProArgGlyProAlaProHisValGlnValArgArgValLeuGluArgArg
631  CAGCTTCAAGCGGGCGGTGGACGTGATGCGATTCTTGACGCGGTTCTACCAGCAGCCCCCGCA
211▶ GlnLeuGlnAlaGlyArgGlyArgAspAlaIleProAspAlaValLeuProAlaAlaProAla
694  CCGGGAGGTGGTGAACACTACTGGTACCGCAAGAACGCGCGGACGCTCCCCGCGGGCCACGCGC
232▶ ProGlyGlyGlyGluLeuLeuValProGlnGluArgProAspAlaProAlaGlyProArgArg
757  CGCCACGCGGTACGCCATCGACCCCGCGCGGCTCGGCGGGCTCGCCGAGGCCCCCGGCCCCG
253▶ ArgHisAlaValArgHisArgProArgAlaAlaLeuGlyGlyLeuAlaGluAlaProAlaPro
820  GCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCGAAGCCCCGAGCCCCCGCGGACGCCCCGCCCCCGGACCG
274▶ AlaProAlaProAlaProAlaGluAlaArgAlaArgProGlyAspAlaArgAlaProArgPro
883  CCTGCCCCGACCGCGGACCGCGGACCGCCCGCGGGCGCGCCCCACGCGCGACCCCCGAG
295▶ ProAlaArgAlaGlyAspAlaGlyProArgArgArgGlyProProHisAlaAlaThrProGlu
946  GCCCCGAGACGCGCCACCGCCCCCTTCGCCCCCGCGGCGCTGCTGCCCAGCGGTGGCCGACGCC
316▶ AlaArgAspAlaAlaProProLeuArgProAlaGlyArgArgAlaGlnArgValAlaAlaAla
1009  CCGCGAGCCGTTCCAGCCGCGGACCCCGCGCGCGGGCGTCTCGCGCCACCGCTCGGTGAT
337▶ ArgGlyAlaValProAlaAlaAspProArgArgAlaGlyArgLeuAlaProProLeuGlyAsp

```

图 4

```
1072 CGTCGGCACGGGCACCGCGATGGGCGCGCTCCTGSGGGCGTGTGGCTCTACATCTTCTCCG
358▶ ArgArgHisGlyHisArgAspGlyArgAlaProGlyGlyArgValArgLeuHisLeuLeuPro
1135 CCTGAGGGGGCGAAGGGGTATCGCCTCCTGGGCGGTCCCGCGGACGCCGACGAGCTAAAAGC
379▶ ProGluGlyGlyGluGlyValSerProProGlyArgSerArgGlyArgArgAlaLysSer
1198 GCAGCCCGGTCCGTAG
400▶ AlaAlaArgSerVal
```

图 4(续完)

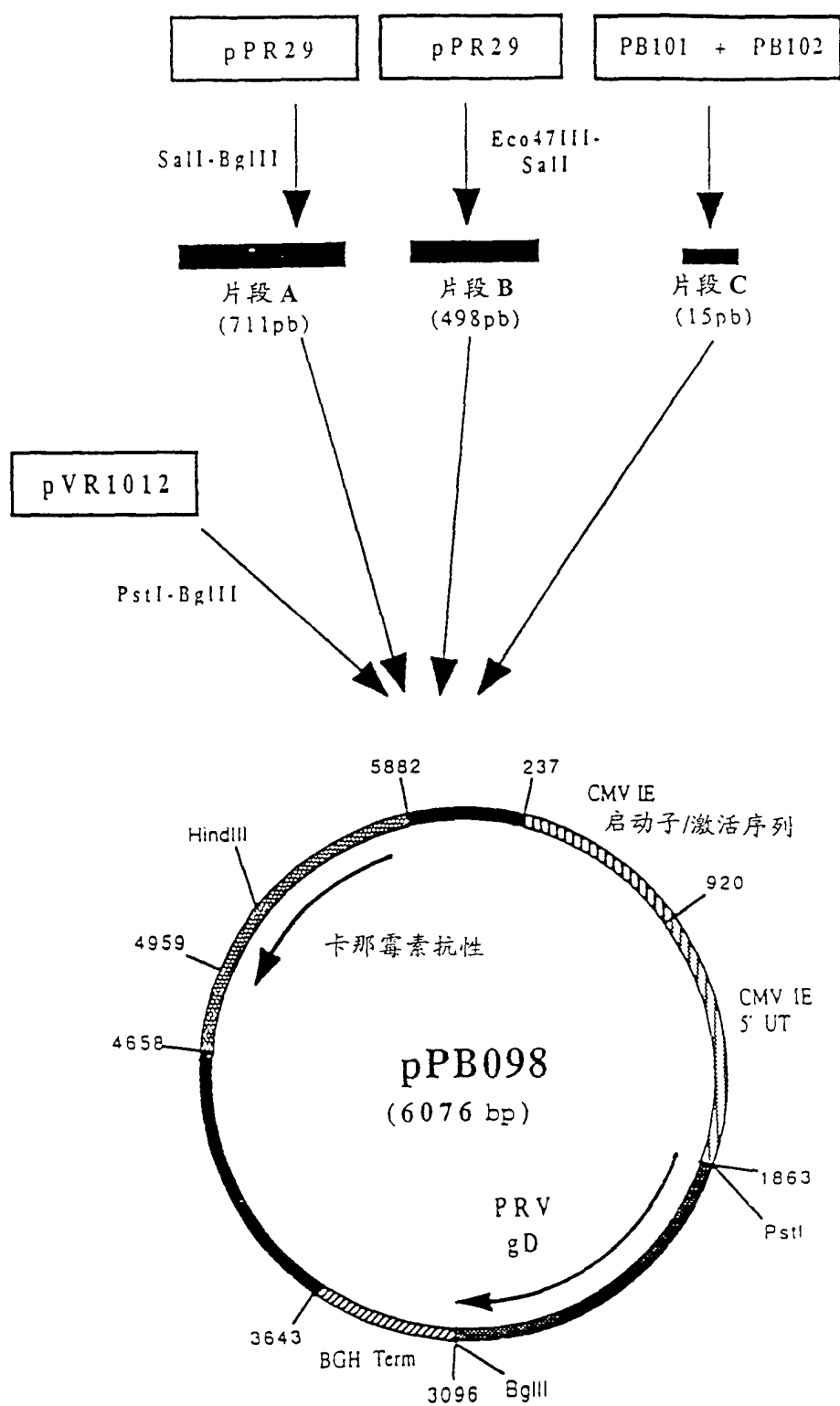


图 5

1 ATGGAAGCAAACTATTTCGTATTATTCTGTACATTCAGTGGCTGAAAGCTGACACCATCTGT  
1▶ MetGluAlaLysLeuPheValLeuPheCysThrPheThrAlaLeuLysAlaAspThrIleCys  
64 GTAGGATACCATGCTAACAATTCCACAGATACTGTGACACAATACTGGAGAAGAATGTGACT  
22▶ ValGlyTyrHisAlaAsnAsnSerThrAspThrValAspThrIleLeuGluLysAsnValThr  
127 GTGACTCATTCAGTTAATTTACTAGAAAACAGTCATAATGGAAAACCTCTGCAGCCTGAATGGA  
43▶ ValThrHisSerValAsnLeuLeuGluAsnSerHisAsnGlyLysLeuCysSerLeuAsnGly  
190 GTAGCCCCCTTGCAACTAGGGAAGTGCAACGTAGCAGGGTGGATCCTTGGCAACCCAGAATGT  
64▶ ValAlaProLeuGlnLeuGlyLysCysAsnValAlaGlyTrpIleLeuGlyAsnProGluCys  
253 GACCTGTTGCTCACAGCGAATTCATGGTCTTACATAATAGAGACTTCAAATTCAGAAAAATGGA  
85▶ AspLeuLeuLeuThrAlaAsnSerTrpSerTyrIleIleGluThrSerAsnSerGluAsnGly  
316 ACATGCTACCCCGGAGAATTCATTGATTATGAGGAATTAAGGGAGCAGCTGAGTTCAGTGTCT  
106▶ ThrCysTyrProGlyGluPheIleAspTyrGluGluLeuArgGluGlnLeuSerSerValSer  
379 TCATTTGAAAGGTTTGAAATTTTCCAAAAGCAAACCTCATGGCCAAATCATGAGACAACCAAA  
127▶ SerPheGluArgPheGluIlePheProLysAlaAsnSerTrpProAsnHisGluThrThrLys  
442 GGTATTACAGCTGCATGCTCTTACTCTGGAACCCCCAGTTTTTATCGGAATTTGCTATGGATA  
148▶ GlyIleThrAlaAlaCysSerTyrSerGlyThrProSerPheTyrArgAsnLeuLeuTrpIle  
505 GTAGAGAGGGAAAATTCCTATCCTAAACTCAGCAAATCATACACAAACAAGGGGAAAGAA  
169▶ ValGluArgGluAsnSerTyrProLysLeuSerLysSerTyrThrAsnAsnLysGlyLysGlu  
568 GTGCTTATAATCTGGGGAGTGCACCACCCTCCAACTACCAATGACCAACAAAGCCTCTATCAG  
190▶ ValLeuIleIleTrpGlyValHisHisProProThrThrAsnAspGlnGlnSerLeuTyrGln  
631 AATGCTGATGCATATGTTTCAGTTGGGTCATCAAAATACAACCGAAGGTTACACCAGAAATA  
211▶ AsnAlaAspAlaTyrValSerValGlySerSerLysTyrAsnArgArgPheThrProGluIle  
694 GCAGCTAGACCTAAAGTCAAAGGACAAGCAGGCAGAATGAATTATTATTGGACATTGTTAGAT  
232▶ AlaAlaArgProLysValLysGlyGlnAlaGlyArgMetAsnTyrTyrTrpThrLeuLeuAsp  
757 CAAGGAGACACCATAACGTTTGAAGCCACTGGGAACTTAATAGCACCATGGTACGCCTTCGCA  
253▶ GlnGlyAspThrIleThrPheGluAlaThrGlyAsnLeuIleAlaProTrpTyrAlaPheAla  
820 TTGAATAAGGGCTCTCGTTCTGGAATTATAACGTGGGATACTCCGGTTCACAATTGTGATACA  
274▶ LeuAsnLysGlySerGlySerGlyIleIleThrSerAspThrProValHisAsnCysAspThr  
883 AAGTGCCAAACCCCTCATGGGGCCTTGAACAGTAGTCTTCCTTTTCAGAACGTACATCCCATC  
295▶ LysCysGlnThrProHisGlyAlaLeuAsnSerSerLeuProPheGlnAsnValHisProIle  
946 ACTATTGGAGAATGCCCCAAATATGTTAAAAGCACCAAACTGAGAATGGCAACAGGACTAAGG  
316▶ ThrIleGlyGluCysProLysTyrValLysSerThrLysLeuArgMetAlaThrGlyLeuArg  
1009 AACGTCCCCTCTATTCAATCCAGAGGACTTTTCGGAGCAATTCGCTGGATTTCATTGAAGGAGGA  
337▶ AsnValProSerIleGlnSerArgGlyLeuPheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluGlyGly

图 6

1072 TGGACAGGAATGATAGATGGGTGGTATGGGTATCACCATCAGAATGAGCAGGGATCTGGTTAC  
358 ▶ TrpThrGlyMetIleAspGlyTrpTyrGlyTyrHisHisGlnAsnGluGlnGlySerGlyTyr  
1135 GCAGCTGATCAGAAAAGCACACAAATTGCAATTGACGGGATCAGCAACAAAGTGAACCTAGTA  
379 ▶ AlaAlaAspGlnLysSerThrGlnIleAlaIleAspGlyIleSerAsnLysValAsnSerVal  
1198 ATTGAGAAAATGAACACTCAATTCAGTGCAGTGGGCAAGGAATTCAATGATCTAGAAAAAAGG  
400 ▶ IleGluLysMetAsnThrGlnPheThrAlaValGlyLysGluPheAsnAspLeuGluLysArg  
1261 ATTGAGAATTTGAATAAGAAAGTCGATGATGGGTTTTTGGATGTTTGGACATATAATGCTGAG  
421 ▶ IleGluAsnLeuAsnLysLysValAspAspGlyPheLeuAspValTrpThrTyrAsnAlaGlu  
1324 TTGCTCGTTTTGCTCGAGAACGAAAGGACTCTAGATTTCCATGACTTTAACGTAAGAAATTTA  
442 ▶ LeuLeuValLeuLeuGluAsnGluArgThrLeuAspPheHisAspPheAsnValArgAsnLeu  
1387 TATGAAAAGGTCAAGTCACAATTGAGAAACAATGCCAAAGAAATCGGGAAATGGTTGTTTTGAG  
463 ▶ TyrGluLysValLysSerGlnLeuArgAsnAsnAlaLysGluIleGlyAsnGlyCysPheGlu  
1450 TTCTATCACAAATGTGATGACGAATGCATGAAGAGCGTAAAGAATGGCACATATAACTACCCC  
484 ▶ PheTyrHisLysCysAspAspGluCysMetLysSerValLysAsnGlyThrTyrAsnTyrPro  
1513 AAATATTCAGAAGAATCCAAATTGAATAGAGAGGAAATAGACGGTGTGAACTAGAATCAATG  
505 ▶ LysTyrSerGluGluSerLysLeuAsnArgGluGluIleAspGlyValLysLeuGluSerMet  
1576 GGAGTTTACCAGATTTTGGCGATCTACTCCACAGTCCGCAGTTCCCTGGTCTTGTTAGTCTCC  
526 ▶ GlyValTyrGlnIleLeuAlaIleTyrSerThrValAlaSerSerLeuValLeuLeuValSer  
1639 CTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCTAATGGGTCATTGCAATGCAGAATATGCATTTAA  
547 ▶ LeuGlyAlaIleSerPheTrpMetCysSerAsnGlySerLeuGlnCysArgIleCysIle...

图 6 (续完)

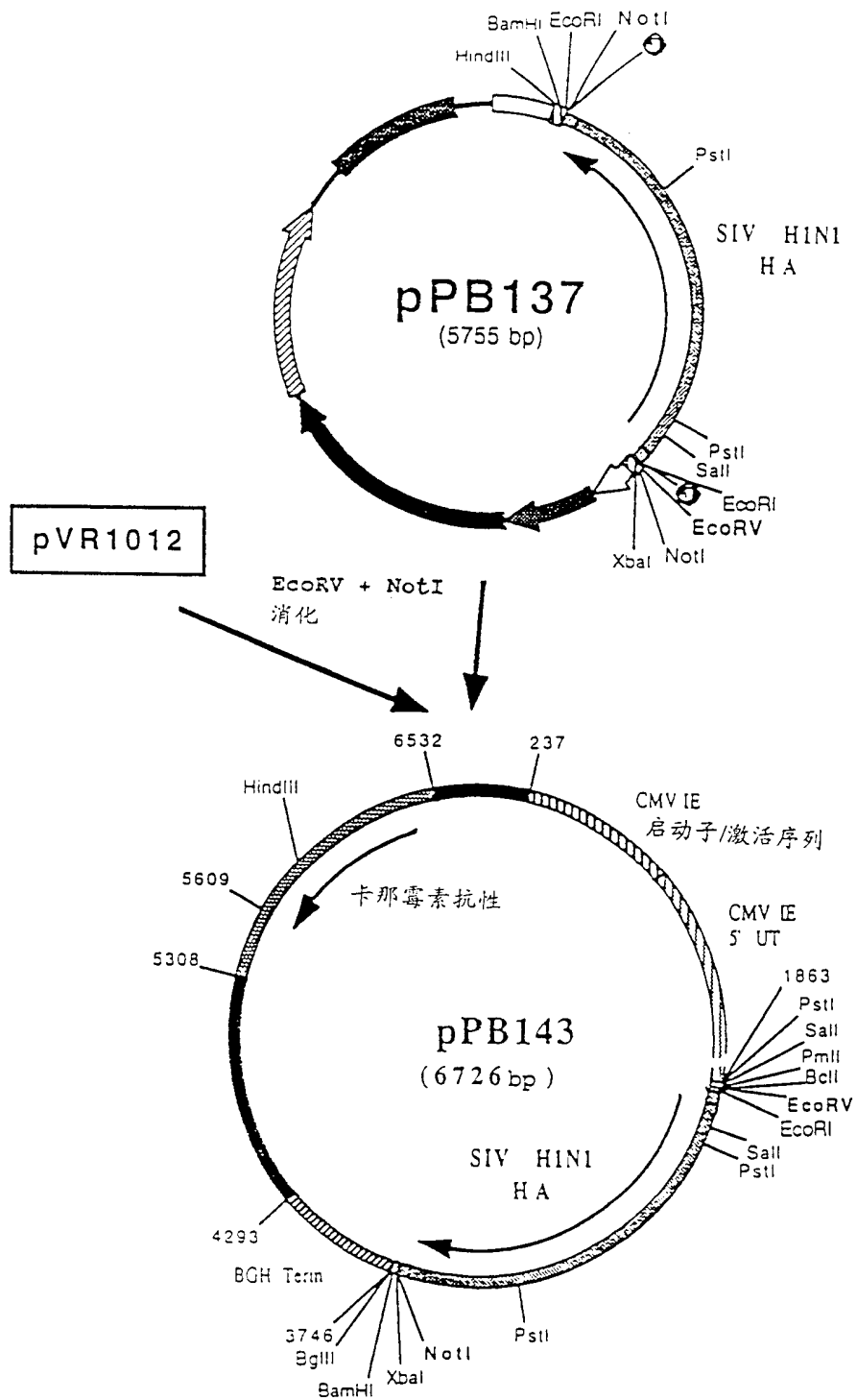


图 7

1 ATGGCGTCTCAAGGCCACCAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGGAGAAGCCGAGAAT  
1 ▶ MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgGlnAsn  
64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGGAATGGTTGGTGGAAATTGGAAGATTCTACATACAG  
22 ▶ AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln  
127 ATGTGCACTGAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA  
43 ▶ MetCysThrGluLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle  
190 GAGAGAATGGTTCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAACATCCCAGT  
64 ▶ GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer  
253 GCGGGGAAGGACCCAAAGAAAACCTGGAGGTCCAATCTACAGAAAGAGAGACGGAATGGATG  
85 ▶ AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet  
316 ACAGAGCTGATTCTATATGACAAAGAGGAGATCAGGAGGATTTGGCGTCAAGCAAACAATGGT  
106 ▶ ArgGluLeuIleLeuTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly  
379 GAAGATGCTACTGCTGCTCCTCACTCATCTGATGATTTGGCATTCACCTGAATGATGCCACA  
127 ▶ GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr  
442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACTGGGATGGACCCGAGAATGTGCTCTCTGATGCCAA  
148 ▶ TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln  
505 GGATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGTGGCGCAGTAAAGGGAGTTGGGACGATG  
169 ▶ GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet  
568 GTAATGGAAGTATTCCGGATGATAAAGCGGGGATCAATGATCGGAACCTCTGGAGAGGCGAA  
190 ▶ ValMetGluLeuIleArgMetIleLysAlaGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu  
631 AATGGACGAAGAACAAGAATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGAAAATTTTCAG  
211 ▶ AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln  
694 ACAGCAGCGCAACAAGCAATGATGGACCAGGTGCGAGAAATGACAAATCCTGGGAATGCTGAG  
232 ▶ ThrAlaAlaGlnGlnAlaMetMetAspGlnValArgGluMetThrAsnProGlyAsnAlaGlu  
757 ACTGAAGACCTTATCTTTCTGGCAGCATCTGCACTCATTTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA  
253 ▶ ThrGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys  
820 TCCTGCCTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGTGTGGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA  
274 ▶ SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu  
883 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGTCTGCTCCAAAACAGCCAGGTGTTACAGCCTC  
295 ▶ GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu  
946 ATTAGACCAAATGACAATCCAGCACATAAGAGTCAGCTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA  
316 ▶ IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla  
1009 GCATTTGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAA  
337 ▶ AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrArgValValProArgGlyGln

图 8

1072 CTGTCCACCAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAAAACATGGAAACAATGGAGTCCAGTACT  
358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetGluSerSerThr  
1135 CTTGAACTGAGAAGCAAATACTGGGCTATAAGAACCAGGAGCGGAGGAAACACCAACCAACAG  
379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln  
1198 AGAGCATCTGCAGGGCAAATCAGTGTACAACCTTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTC  
400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnLeuThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe  
1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGG  
421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg  
1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCCTTCCAGGGCGGGGA  
442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly  
1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAAT  
463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspMetSerAsn  
1450 GAGGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAA  
484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAspAsn...

图 8 (续完)

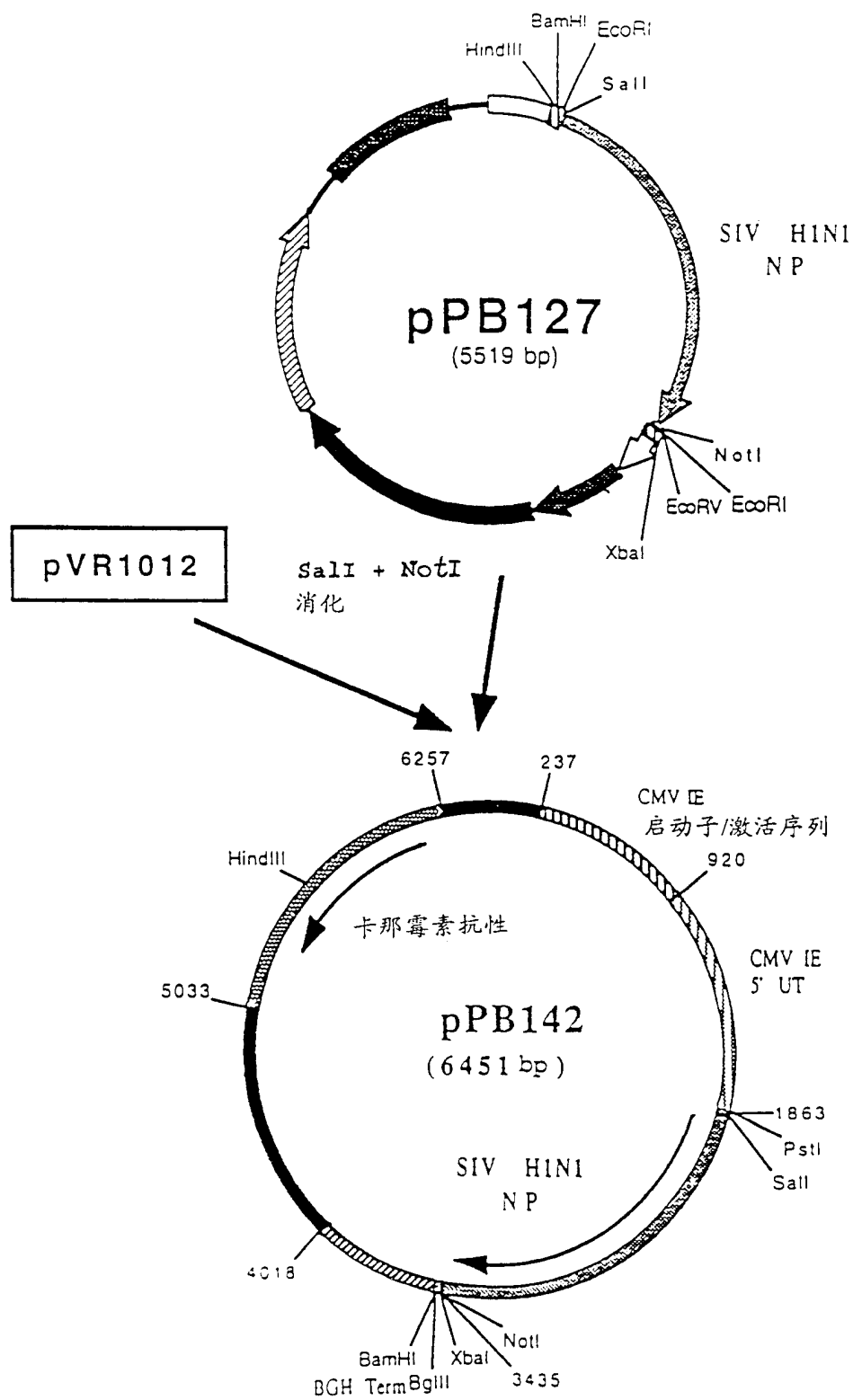


图 9

1 ATGAAGACTGTCATTGGCCTTGAGCTACATTTTCTGCTGGTTCTTGGCCAAGACCTTCCAGAA  
1▶ MetLysThrValIleAlaLeuSerTyrIlePheCysLeuValLeuGlyGlnAspLeuProGlu  
64 AATGGCAGCAGCACAGCAAAGCCTGGTCTGGGACATCATGCGGTGCCAAACGGAACGTTAGTG  
22▶ AsnGlySerSerThrAlaLysProGlyLeuGlyHisHisAlaValProAsnGlyThrLeuVal  
127 AAAACAATCACGAATGATCAGATCGAAGTGACTAATGCTACTGAGCTGGTCCAGAGTTTCTCA  
43▶ LysThrIleThrAsnAspGlnIleGluValThrAsnAlaThrGluLeuValGlnSerPheSer  
190 ATGGGTAAAATATGCAACAATCCTCATCGAGTTCTTGATGGAGCAAACGTACACTGATAGAT  
64▶ MetGlyLysIleCysAsnAsnProHisArgValLeuAspGlyAlaAsnCysThrLeuIleAsp  
253 GCTCTATTGGGGGACCCTCATTGTGATGGCTTTCAAATGAGAAATGGGACCTTTTCGTTGAA  
85▶ AlaLeuLeuGlyAspProHisCysAspGlyPheGlnAsnGluLysTrpAspLeuPheValGlu  
316 CGCAGCAAATGCTTCAGCAACTGTTACCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCTCCCTTAGGTCA  
106▶ ArgSerLysCysPheSerAsnCysTyrProTyrAspValProAspTyrAlaSerLeuArgSer  
379 CTAATTGCCTCTTCGGGCACCTTTGGAGTTTATCAATGAAGGTTTCAATTGGACTGGGGTCACT  
127▶ LeuIleAlaSerSerGlyThrLeuGluPheIleAsnGluGlyPheAsnTrpThrGlyValThr  
442 CAGAACGGAGGAAGCAATGCTTGCAAGAGGGGGCCTGATAGCGGTTTCTTCAGTAGGCTGAAC  
148▶ GlnAsnGlyGlySerAsnAlaCysLysArgGlyProAspSerGlyPhePheSerArgLeuAsn  
505 TGGTTGTACAAATCAGGAAACACATACCCGATGCTGAACGTGACTATGCCAAACAGTGATAAT  
169▶ TrpLeuTyrLysSerGlyAsnThrTyrProMetLeuAsnValThrMetProAsnSerAspAsn  
568 TTTGACAAATTATACATTTGGGGGGTTCCACCATCCGAGCACAGACAGGGAACAAACCAACCTA  
190▶ PheAspLysLeuTyrIleTrpGlyValHisHisProSerThrAspArgGluGlnThrAsnLeu  
631 TATGTTCAAGTATCAGGGAAAGCAACGGTTTTTCACCAAGAGAAGCCAGCAGACCATAATCCCG  
211▶ TyrValGlnValSerGlyLysAlaThrValPheThrLysArgSerGlnGlnThrIleIlePro  
694 AACAGTCGGTCTAGACCCTGGGTAAGGGGTCTGTCTAGTAGAATAAGCATCCATTGGACAATA  
232▶ AsnSerArgSerArgProTrpValArgGlyLeuSerSerArgIleSerIleHisTrpThrIle  
757 GTTAAACCGGGGACATTCTGATAATTAATAGTAATGGAACCTAATTGCTCCTCGGGGTAC  
253▶ ValLysProGlyAspIleLeuIleIleAsnSerAsnGlyAsnLeuIleAlaProArgGlyTyr  
820 TTCAAAATGCACAATGGGAGAAGCTCAATAATGAGGTGAGTGCACCTATTGGCACCTGCAGT  
274▶ PheLysMetHisAsnGlyArgSerSerIleMetArgSerAspAlaProIleGlyThrCysSer  
883 TCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATCCCAAATGACAAAACCTTTCAAACGTAACAAG  
295▶ SerGluCysIleThrProAsnGlySerIleProAsnAspLysProPheGlnAsnValAsnLys  
946 ATCACATATGGGGCATGCTCCTAAGTATGTTAAACAAACACTCTGAAGTTGGCAACAGGGATG  
316▶ IleThrTyrGlyAlaCysProLysTyrValLysGlnAsnThrLeuLysLeuAlaThrGlyMet  
1009 CGGAATATACCGGAAAAACAACTAGAGGCATATTCGCGCAATAGCAGGTTTCATAGAGAAT  
337▶ ArgAsnIleProGluLysGlnThrArgGlyIlePheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluAsn

图 10

1072 GGTGGGAAGGAATGGTAGACGGCTGGTACGGTTTCAGACATCAAAATTCTGAGGGCACAGGA  
358 ▶ GlyTrpGluGlyMetValAspGlyTrpTyrGlyPheArgHisGlnAsnSerGluGlyThrGly  
1135 CAAGCAGCAGACCTTAAAAGCACCCAAACAGCCATCGACCAATCAACGGGAAACTGAATAGA  
379 ▶ GlnAlaAlaAspLeuLysSerThrGlnAlaAlaIleAspGlnIleAsnGlyLysLeuAsnArg  
1198 CTAATCGAGAAGACGAACGGGAAATTCCATCAAATCGAAAAGGAATTCTCAATAGTAGAAGGG  
400 ▶ LeuIleGluLysThrAsnGlyLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerIleValGluGly  
1261 AGAATTGAGGACCTCGAGAAATACGTTGAAGACACTAAATAGATCTCTGGTCTTACAATGCG  
421 ▶ ArgIleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAla  
1324 GAACTTCTTGCTGCTCTGGAGAACCACATACAATTGATCTGACTGACTCGGAAATGAGCAAA  
442 ▶ GluLeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspSerGluMetSerLys  
1387 CTGTTTGAAAAACAAGGAGGCAACTGAGGGAAATGCTGAGGACATGGGAAACGGTTGCCTT  
463 ▶ LeuPheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyAsnGlyCysLeu  
1450 CAAATATACCACAAATGTGACAATGCTTGCATAGAGTCAATCAGAAATGGGACTTATGACCAT  
484 ▶ GlnIleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGluSerIleArgAsnGlyThrTyrAspHis  
1513 AATGAATACAGAGACGAAGCATTAAACAACCGATTTTCAGATCAAAGGTGTTGAGCTGAAGTCG  
505 ▶ AsnGluTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSer  
1576 GGATACAAAGACTGGATCCTGTGGATTTCCTCTGCCATATCATGCTTTTTGCTTTGTGTGTT  
526 ▶ GlyTyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerSerAlaIleSerCysPheLeuLeuCysValVal  
1639 TTGCTAGGATTTATCATGTGGGCCTGCCAGAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATCTGA  
547 ▶ LeuLeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

图 10(续完)

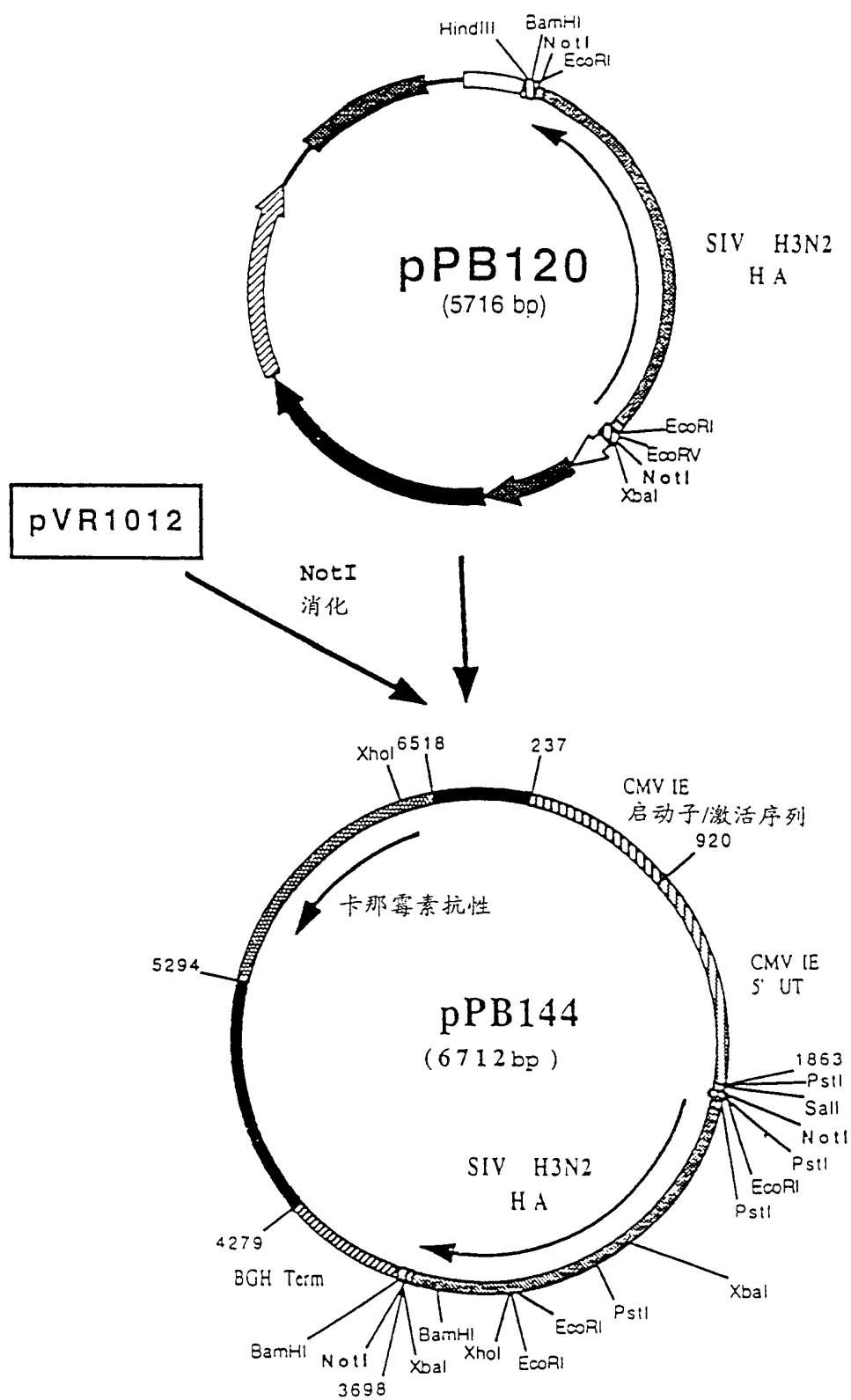


图 11

1 ATGGCGTCTCAAGGCACTAAACGATCTTATGAGCAGATGGAACCGGTGAGAACCCCGGAAT  
1▶MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgArgAsn  
64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGGAATGGTTGGTGAATTGGAAGATTCTACATACAG  
22▶AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln  
127 ATGTGCACTAAACTCAAACCTCAGTGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA  
43▶MetCysThrLysLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle  
190 GAGAGAAATGGTTCTCTCTGCAATTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAACATCCCGAT  
64▶GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer  
253 GCGGGGAAGGACCCAAAGAAAACCTGGAGGTCCAATATACAGAAAGAGAGACGGAAAATGGATG  
85▶AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet  
316 AGAGAGCTGATTATGTATGACAAAGAGGAGATCAGGAGGATTTGGCGTCAAGCAAACAATGGT  
106▶ArgGluLeuIleMetTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly  
379 GAAGATGCTACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACA  
127▶GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr  
442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACTGGGATGGACCCAGAAATGTGCTCTCTGATGCAA  
148▶TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln  
505 GGATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGTGCAGCAGTAAAGGGAGTTGGGACGATG  
169▶GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet  
568 GTAATGGAAGTATTCCGATGATAAAGCGGGGATCAATGATCGGAACCTCTGGAGAGGCGAA  
190▶ValMetGluLeuIleArgMetIleLysArgGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu  
631 AATGGACGAACAACAAGAATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTTTCAG  
211▶AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln  
694 ACAGCAGCGCAACGAGCAACGATGGACCAGGTGCGAGAAAGCAGAAATCCTGGGAATGCTGAG  
232▶ThrAlaAlaGlnArgAlaThrMetAspGlnValArgGluSerArgAsnProGlyAsnAlaGlu  
757 ATTGAAGACCTTATCTTTCTAGCACGATCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA  
253▶IleGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys  
820 TCCTGTCTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGTGTGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA  
274▶SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu  
883 GGGTACTCTCTASTCGGAATAGATCCTTTCCGTCTGCTCCAGAACAGCCAGGTGTTCAAGCCTC  
295▶GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu  
946 ATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAGAGTCAGTTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA  
316▶IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla  
1009 GCATTTGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGGACAAAAGTGGTCCCAAGAGGACAA  
337▶AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrLysValValProArgGlyGln

图 12

1072 CTGTCCACTAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAAAACATGGAAACAATGGACTCCATTACT  
358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetAspSerIleThr

1135 CTTGAACTGAGAAGCAAATACTGGGCTATAAGAACCAGGAGCGGAGGAAAACACCAACCAACAG  
379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln

1198 AGGGCATCTGCAGGGCAAATCAGTGTACACCTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTC  
400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnProThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe

1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTTCACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGCATGAGG  
421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg

1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCTTCCAGGGCGGGGA  
442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly

1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAAGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACGTGAGTAAT  
463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspValSerAsn

1450 GAGGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATAACAATTAA  
484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAsnAsn...

图 12(续完)

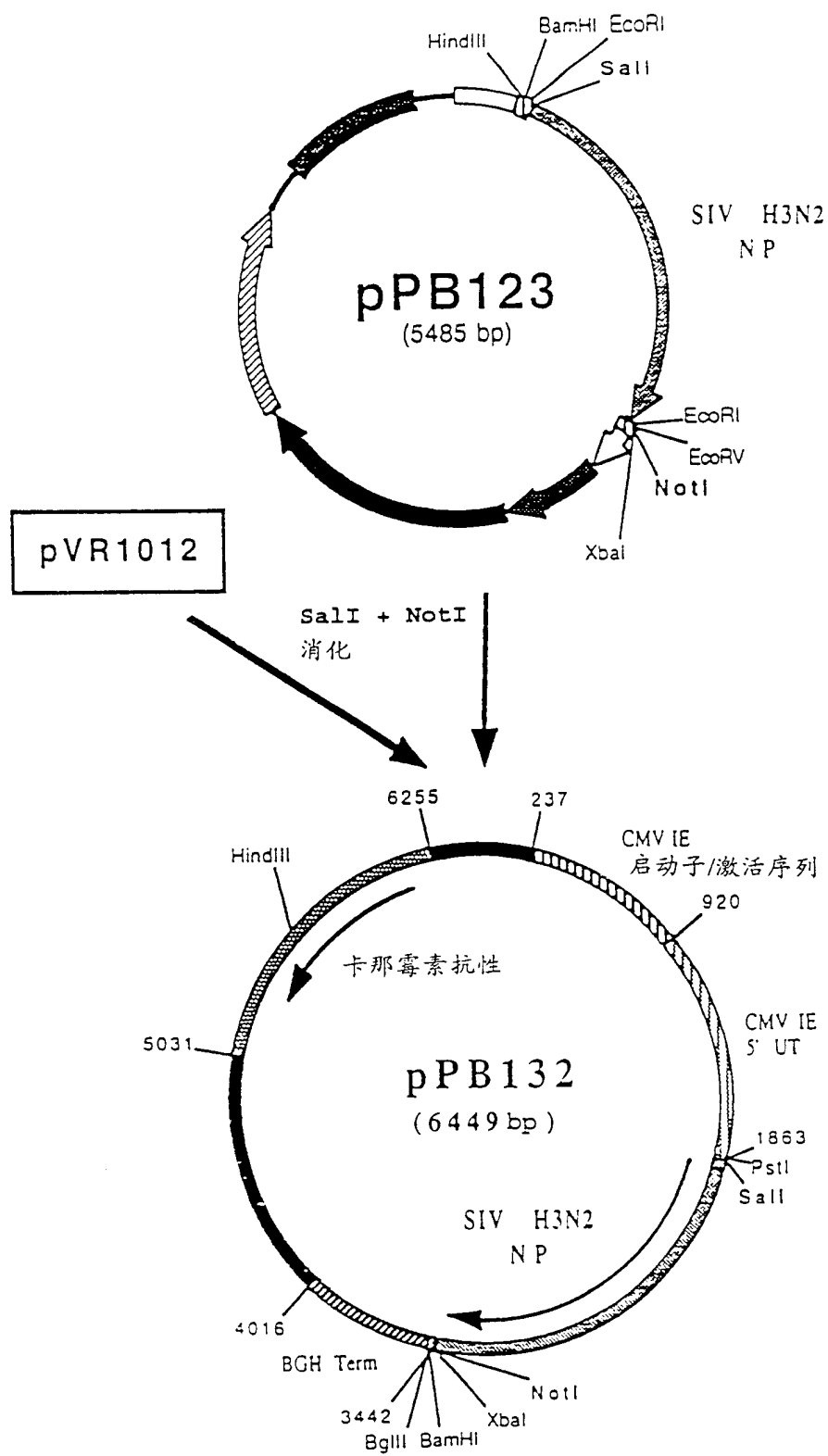


图 13

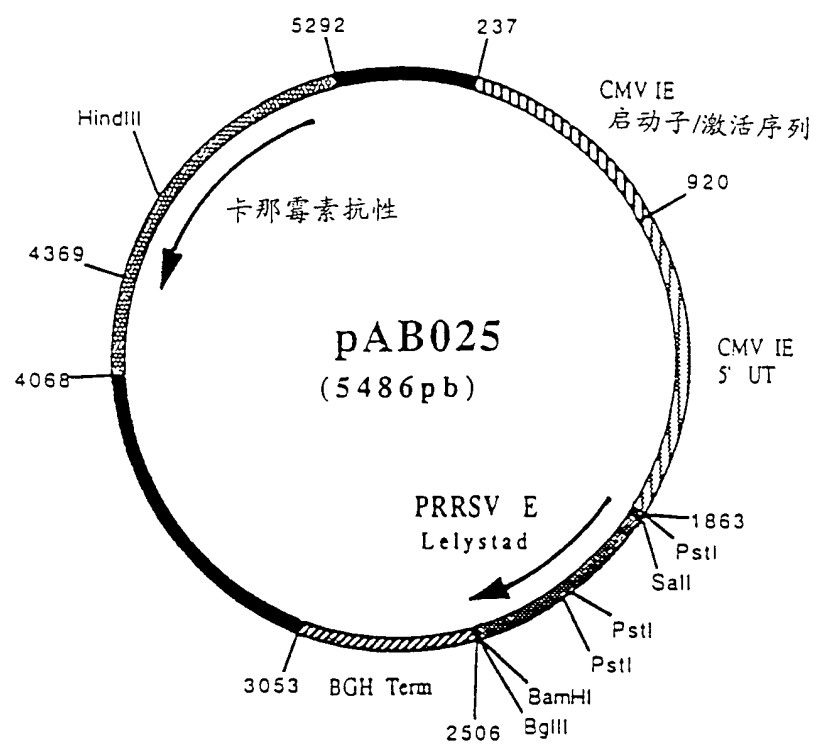


图 14

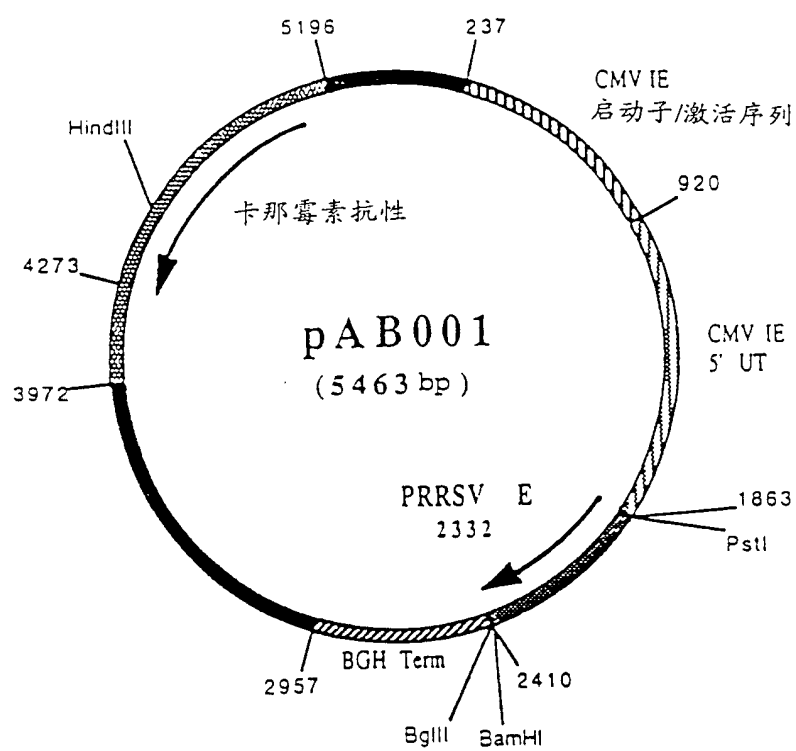


图 15

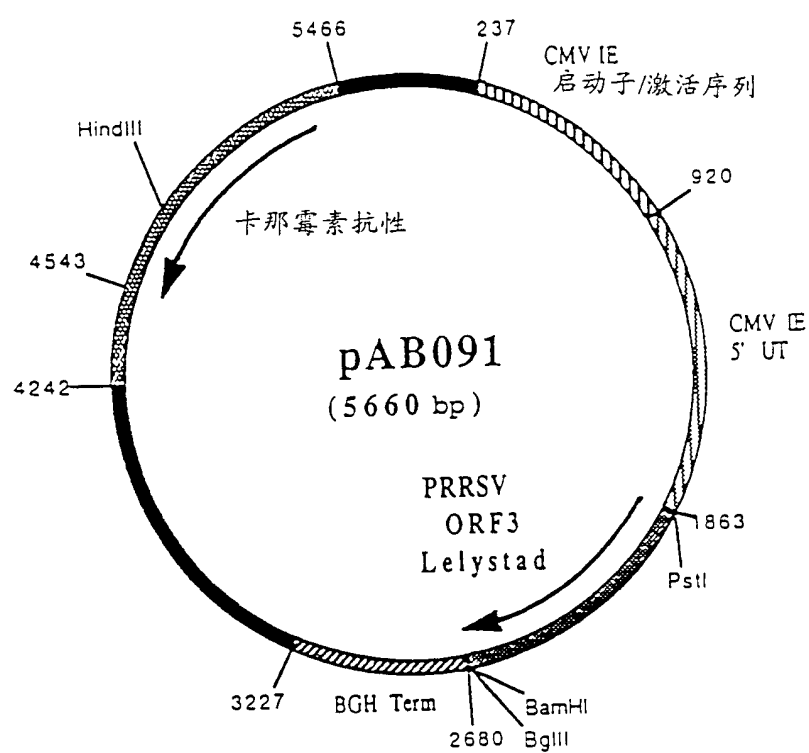


图 16

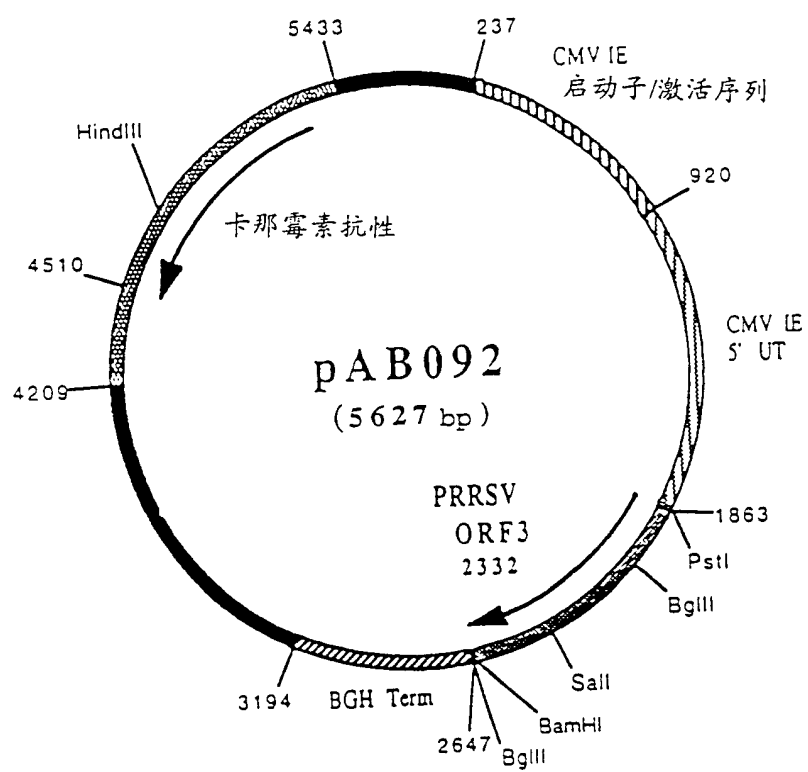


图 17

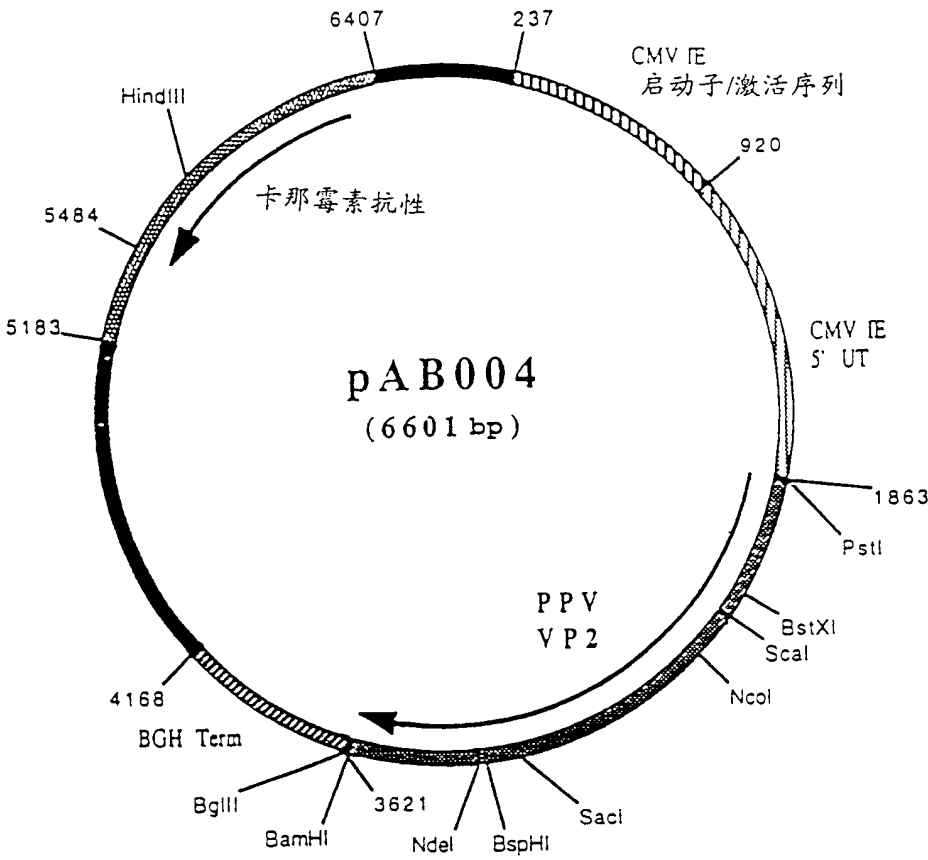


图 18

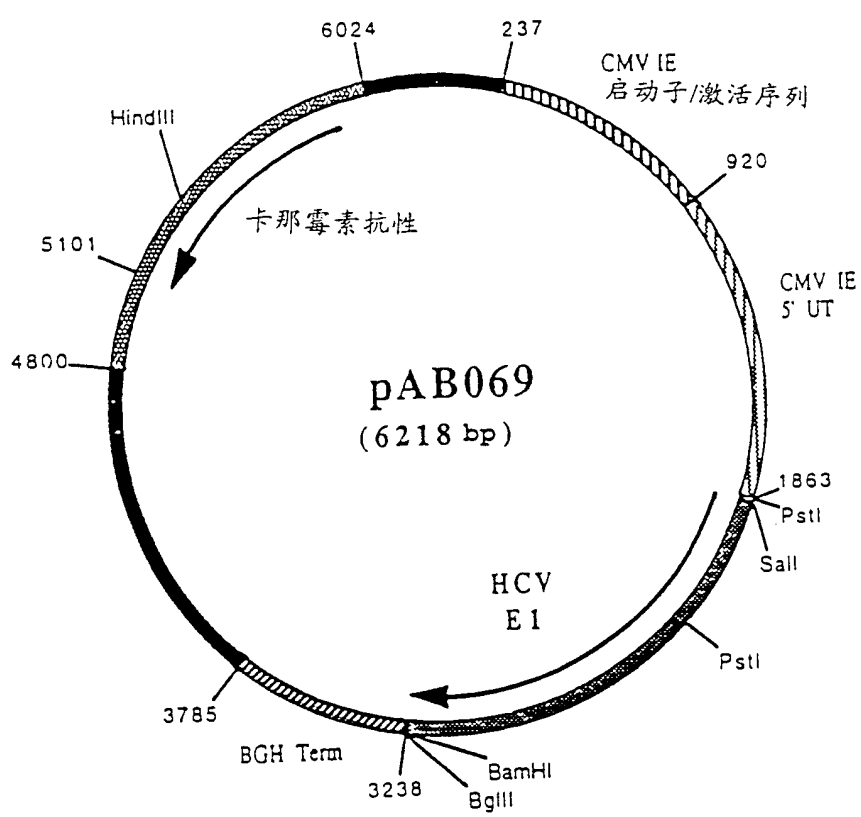


图 19

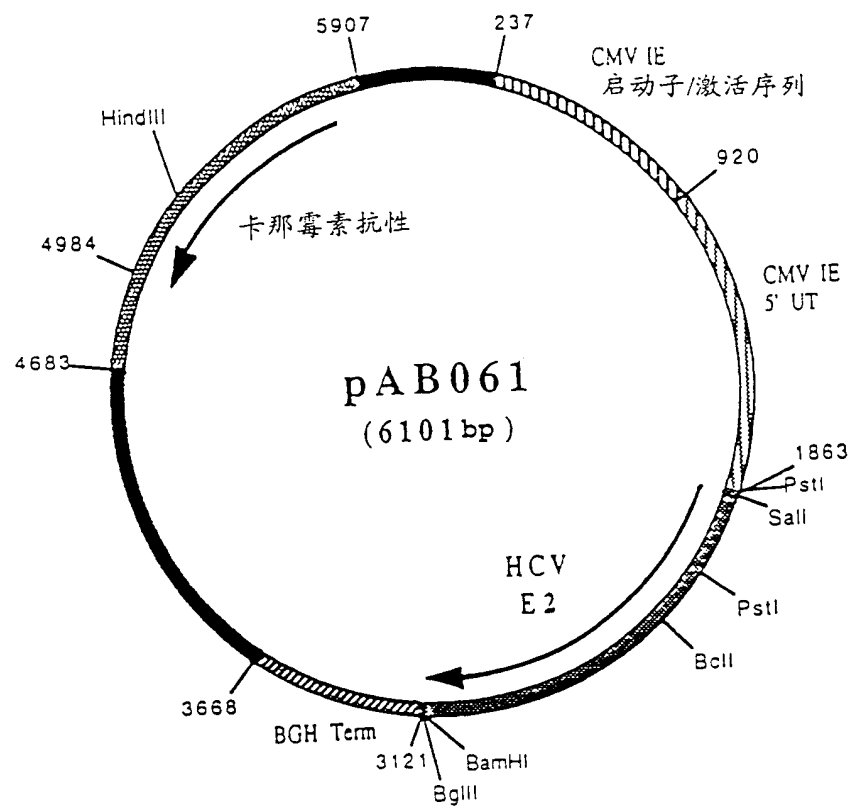


图 20

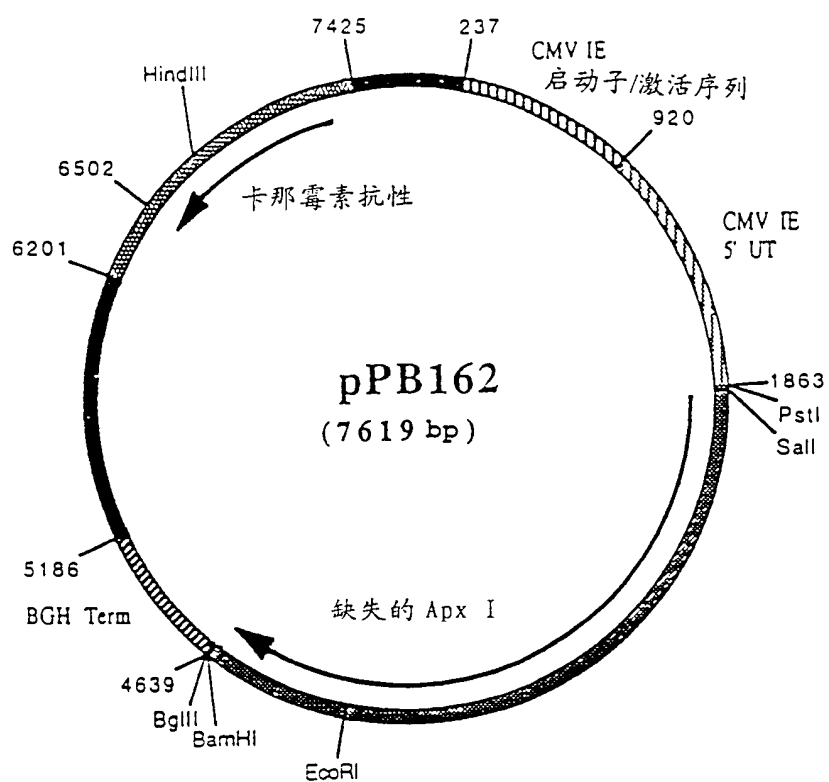


图 21

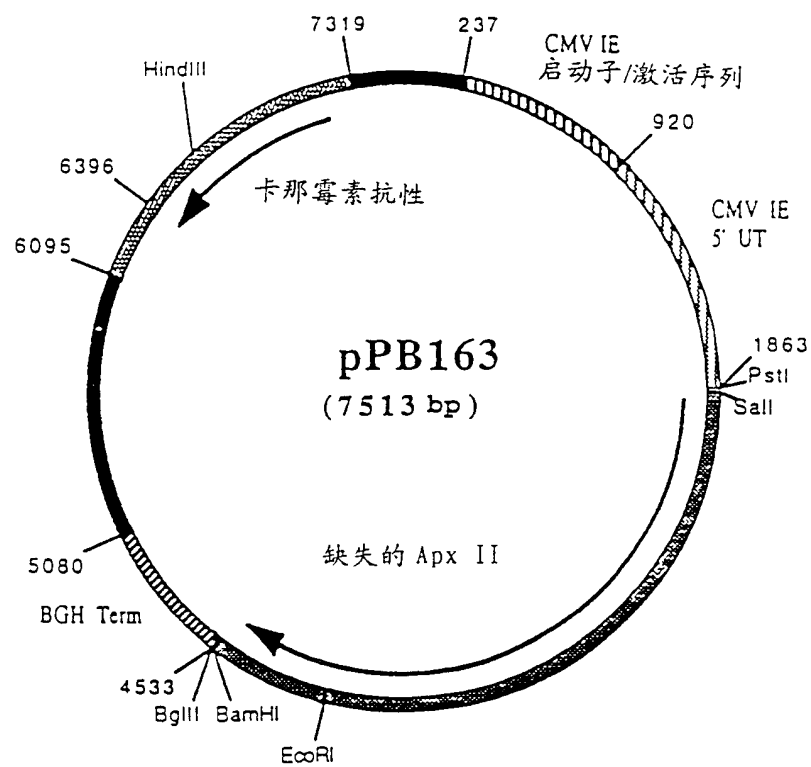


图 22

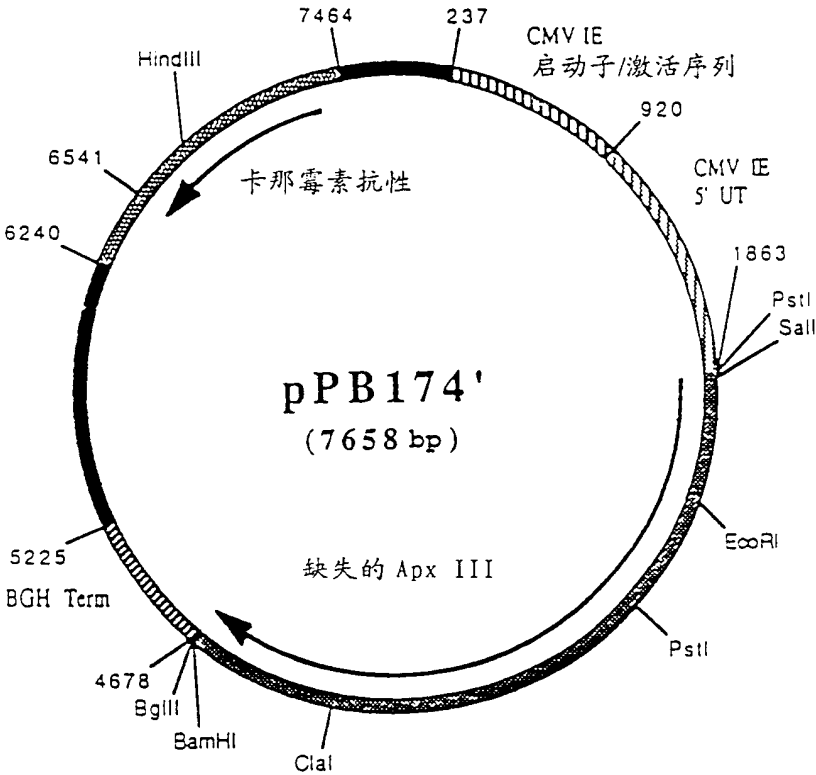


图 23

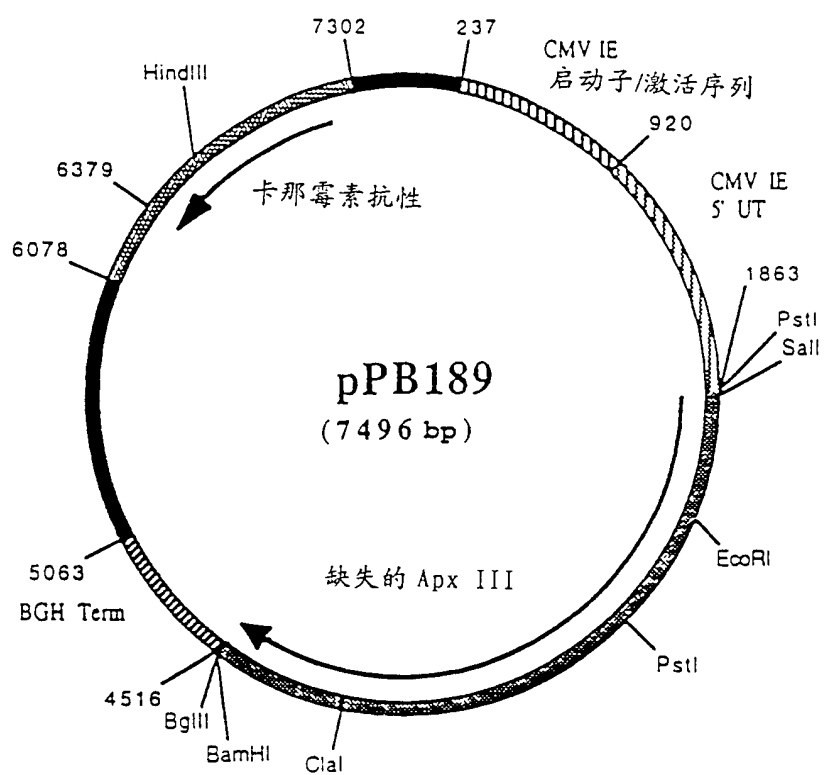


图 24

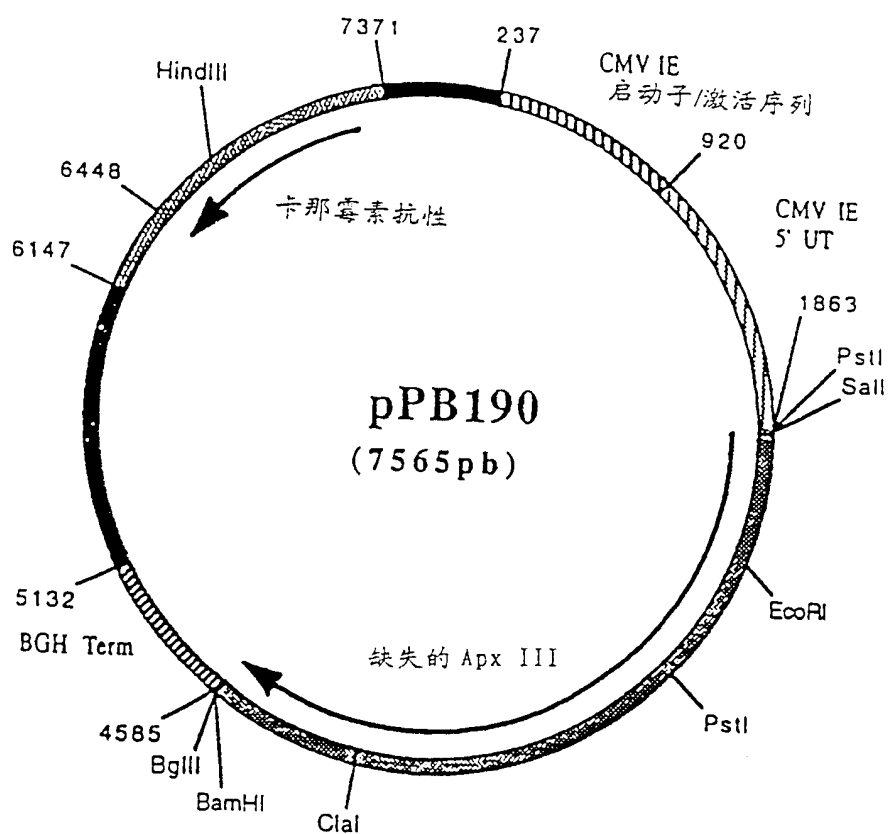


图 25