

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03808000.1

**A61K 39/255**

A01N 65/00

C12P 19/34

C12N 7/00

C12N 15/00

C12N 15/66

C07H 21/04

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1646157A

[22] 申请日 2003.3.6 [21] 申请号 03808000.1

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 8 [33] US [31] 60/362,547

[32] 2003. 3. 4 [33] US [31] 10/377,718

[86] 国际申请 PCT/US2003/006811 2003.3.6

[87] 国际公布 WO2003/075843 英 2003.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.9

[71] 申请人 施怀哲股份有限公司

地址 美国加州工业市

[72] 发明人 郭村勇

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 鲁兵

权利要求书 3 页 说明书 12 页 序列表 18 页

[54] 发明名称 多重性和多价性蛋白内 DNA 疫苗

[57] 摘要

本发明提供一种用在禽类蛋内以获得胚胎免疫性的多重性 DNA 疫苗和/或多价性 DNA 疫苗。该多重性 DNA 疫苗包含二个或二个以上的 DNA 构建物，各构建物含有一个编码禽类病毒蛋白或其片段的 DNA 分子，该病毒蛋白或其片段能诱导出抗禽类体内的禽类病毒疾病的保护性免疫反应。该多价性 DNA 疫苗包含一个含有二个或二个以上 DNA 分子的 DNA 构建物，每个 DNA 分子代表一种禽类病毒基因或其片段。该多价性 DNA 疫苗能表达出二个或二个以上病毒抗原且在禽类体内诱导出抗禽类病毒疾病的保护性免疫反应。

ISSN 1008-4274

1、一种用于蛋内注射的多重性 DNA 疫苗，包括：

二个或二个以上的 DNA 构建物，每个 DNA 构建物表达出一个会在禽类内造成禽类病毒疾病的禽类病毒的抗原蛋白；其中，所述禽类病毒的所述抗原蛋白能在所述禽类诱导出抗所述禽类病毒疾病的保护性免疫反应；且

所述多重性 DNA 疫苗被注射到所述禽类的蛋内。

2、根据权利要求 1 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述禽类病毒选自马立克病病毒 (MDV)、传染性华氏囊病病毒 (IBDV)、新城鸡瘟病毒 (NDV)、传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、禽脑脊髓炎病毒 (AEV)、禽白血病病毒 (ALV)、禽痘病毒 (FPV)、禽副流感病毒 (APV)、鸭肝炎病毒 (DHV)、和出血性肠炎病毒 (HEV) 所构成的群组中的一种。

3、根据权利要求 1 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 构建物包括一个编码所述禽类病毒的所述抗原蛋白的 DNA 分子与一个载体。

4、根据权利要求 1 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述载体为一个质粒或一个病毒载体。

5、根据权利要求 4 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述质粒为选自 pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质粒与 pGEM 系统质粒所构成的群组中的一种。

6、根据权利要求 4 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述质粒包括一个启动子，所述启动子选自 CMV 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子和  $\beta$ -肌动蛋白启动子所构成的群组。

7、根据权利要求 4 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述病毒载体为选自杆状病毒、疱疹病毒和痘病毒所构成的群组中的一种。

8、根据权利要求 3 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的马立克病病毒 (MDV) gB 基因的全序列或其片段。

9、根据权利要求 3 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列的传染性华氏囊病病毒 (IBDV) VP2 基因的全序列或其片段。

10、根据权利要求 3 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:3 中自第 6321 至 8319 碱基对的 DNA 序列的新城鸡瘟病毒 (NDV) HN 基因的全序列或其片段。

11、根据权利要求 3 的多重性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 分子为具有 SEQ ID NO:4 的 DNA 序列的传染性支气管炎病毒 (IBV) S1 基因的全序列或其片段。

12、根据权利要求3的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA分子为具有SEQ ID NO:5的DNA序列的传染性喉气管炎病毒(ILTV)的糖蛋白G基因的全序列或其片段。

13、根据权利要求3的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA分子为禽类脑脊髓炎病毒(AEV)的VP1、VP0、或VP3基因的全序列或其片段；其中，所述VP1基因具有SEQ ID NO:6的DNA序列；所述VP0基因具有SEQ ID NO:7的DNA序列；所述VP3基因具有SEQ ID NO:8的DNA序列。

14、根据权利要求3的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA分子为具有SEQ ID NO:9的DNA序列的禽类副流感病毒(APV)的副糖蛋白G基因的全序列或其片段。

15、根据权利要求3的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA分子为具有SEQ ID NO:10的DNA序列的出血性肠炎病毒(HEV)的A型五角体基基因的全序列或其片段。

16、根据权利要求3的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA分子为具有SEQ ID NO:11的DNA序列的禽痘病毒(FPV)的鞘膜抗原基因的全序列或其片段。

17、根据权利要求1的多重性DNA疫苗，其中，所述多重性DNA疫苗是注射到所述蛋内的羊水内。

18、根据权利要求17的多重性DNA疫苗，其中，所述蛋受精约18天。

19、根据权利要求1的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA疫苗包括二个DNA构建物，每个DNA构建物包含一个DNA分子，所述DNA分子能够表达出选自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、禽白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽副流感病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)、和出血性肠炎病毒(HEV)所构成的群组中的基因或其片段。

20、根据权利要求1的多重性DNA疫苗，其中，所述DNA疫苗包括三个或三个以上的DNA构建物，每个DNA构建物包含一个DNA分子，所述DNA分子能够表达出选自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、禽白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽副流感病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)、和出血性肠炎病毒(HEV)所构成的群组中的基因或其片段。

21、根据权利要求1的多重性DNA疫苗，其中，所述禽类选自鸡、火鸡、鸭和鹅所构成的群组。

22、一种给禽蛋接种的方法，包括：

注射根据权利要求1所述的多重性DNA疫苗到所述禽蛋内。

23、一种制备根据权利要求1所述的多重性DNA疫苗的方法，包括：

将一个 DNA 分子黏接(ligating)到一个质粒或病毒载体以形成一个 DNA 构建物；  
将二个或二个以上的所述 DNA 构建物混合形成所述多重性 DNA 疫苗；

其中，所述 DNA 分子包括选自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽类脑脊髓炎病毒(AEV)、禽类白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽类副黏病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)和出血性肠炎病毒(HEV)所构成的群组之中的基因或其片段。

24、一种用于蛋内注射的多价性 DNA 疫苗，包括：

一个含有二个或二个以上 DNA 分子的 DNA 构建物，其中，每个所述 DNA 分子能表达出一个会在禽类内造成禽类病毒疾病的禽类病毒的抗原蛋白；其中，所述禽类病毒的所述抗原蛋白能在所述禽类诱导出抗所述禽类病毒疾病的保护性免疫反应；且

所述多价性 DNA 疫苗被注射到所述禽类的蛋内。

25、根据权利要求 22 的多价性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 分子包括选自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽类脑脊髓炎病毒(AEV)、禽类白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽类副黏病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)和出血性肠炎病毒(HEV)所构成的群组之中的一个基因或其片段。

26、根据权利要求 24 的多价性 DNA 疫苗，其中，所述 DNA 构建物进一步包括一个质粒或一个病毒载体。

27、根据权利要求 26 的多价性 DNA 疫苗，其中，所述质粒为选自 pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质粒与 pGEM 系统质粒所构成的群组中的一种。

28、根据权利要求 26 的多价性 DNA 疫苗，其中，所述质粒包括一个启动子，所述启动子选自 CMV 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子和  $\beta$ -肌动蛋白启动子所构成的群组。

29、根据权利要求 26 的多价性 DNA 疫苗，其中，所述病毒载体为选自杆状病毒、疱疹病毒和痘病毒所构成的群组中的一种。

30、一种给禽蛋接种的方法，包括：

注射根据权利要求 24 所述的多价性 DNA 疫苗到所述禽蛋内。

## 多重性和多价性蛋内 DNA 疫苗

### 相关申请

本申请案主张 2002 年 3 月 8 日提出的美国临时申请案 60/362, 547 的优先权, 在这里以引用方式并于本文。

### 技术领域

本发明是有关一种在禽卵内取得胚胎免疫性的多重性 DNA 疫苗及/或多价性 DNA 疫苗。该多重性 DNA 疫苗包含二个或二个以上的 DNA 构建物, 每个构建物含有一个编码禽类病毒蛋白或其片段的 DNA 分子, 该蛋白或其片段能在禽类体内诱导出抗禽类病毒疾病的保护性免疫反应。该多价性 DNA 疫苗包含一个 DNA 构建物, 该构建物含有二个或二个以上的 DNA 分子, 各 DNA 分子为一个禽类病毒基因或其片段。该多价性 DNA 疫苗能表达出二个或二个以上的病毒抗原且能在禽类体内诱导出抗禽类病毒疾病的保护性免疫反应。该多重性 DNA 疫苗和该多价性 DNA 疫苗两者优选在禽卵受精约 18 天后注射到禽卵的羊膜内。

### 背景技术

Sharma 等人已经全面地说明含病毒疫苗的蛋内疫苗接种 (in ovo vaccination) (美国专利第 4, 458, 630 号)。尤其是, 其讲授到可以将活的马立克病病毒 (Marek's disease virus) 注射到卵的羊膜的, 其后胚胎受到感染并且疫苗病毒复制到一高病毒效价 (titer), 从而在受处理的胚胎内诱导出保护性抗体的形成。(参阅, Sharma (1985), Avian Diseases 29, 1155, 1167-68)。

在全世界的家禽产业中众所周知, 某些病毒疾病, 例如马立克病病毒 (MDV)、传染性华氏囊病病毒 (IBDV)、新城鸡瘟病毒 (Newcastle disease virus) (NDV)、传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV)、禽脑脊髓炎病毒 (AEV)、鸡贫血病毒 (CAV)、鸡痘病毒 (FPV)、禽流感病毒 (AIV)、理奥病毒 (reovirus)、禽白血病病毒 (ALV)、网状内皮组织增生病毒 (REV)、禽腺病毒和出血性肠炎病毒 (HEV), 可能造成重大疫情爆发且导致养禽商业明显经济损失。其中, MDV、IBDV、NDV 和 IBV 由于其毒性本质而显得特别重要。

马立克病 (MD) 为一种会在鸡中自然发生的恶性淋巴增生失调疾病。该疾病是由一种疱疹病毒-马立克病病毒 (MDV) 所引起的。MD 普遍存在于全世界的禽类生产国家中, 在密集生产系统下饲养的鸡不可避免地会遭受来自马立克病所造成的损失。MD 病征广泛地出现于受到感染的鸡的神经、生殖器官、内部器官、眼睛和皮肤, 造成运动障碍

(由于神经受到感染时因麻痹所致)，内部器官的功能性障碍(因肿瘤所致)，与慢性营养不良(若内部器官有受到病毒侵袭时)。MD 会感染约 6 周龄以上的鸡，最常发生于 12 周至 24 周龄鸡中。

至目前为止，尚未有治疗 MD 的方法。该疾病的控制主要基于管理方法，例如将正在生长的鸡与感染源隔离，使用在遗传上具有抗性的品系，以及接种疫苗。不过，管理程序通常不具成本效益，且针对具有增加遗传上控制抵抗力的禽系的选择而言，其进展亦令人失望。现今，MD 的控制几乎完全根基于疫苗接种。

传染性华氏囊病病毒(IBDV)会造成幼鸡的高度接触感染免疫抑制性疾病，进而造成全世界禽业的明显损失(参阅 Kibenge (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:1757-1775)。感染了病毒性传染性华氏囊病病毒系的敏感性鸡，可能会产生被称为传染性华氏囊病(IBD)的高度接触感染免疫抑制性状况。对华氏囊(the bursa of Fabricius)的淋巴滤泡和脾所造成的伤害，可能会加重其它病原体所造成的感染，并且减低鸡对疫苗的反应能力(参阅 Cosgrove (1962), *Avian Dis.*, 6:385-3894)。

IBDV 为双 RNA 病毒科(Birnaviridae)的一员，其基因组由两个片段的双链 RNA 所构成(参阅 Dobos et al. (1979), *J. Virol.*, 32:593-605)。较小的片段 B(约 2800 bp)编码 VP1, 即 dsRNA 聚合酶。较大的基因片段 A(约 3000 bp)在单一开放读码区(ORF)内编码为一个 110kDa 多肽前体，经处理成为成熟的 VP2、VP3 和 VP4 (参阅 Azad et al. (1985), *Virology*, 143:35-44)。从与该多肽的 ORF 部分重叠的一个小 ORF，片段 A 也可编码出 VP5, 一具有未知功能的 17kDa 蛋白质(参阅 Kibenge et al (1991), *J. Gen. Virol.* 71:569-577)。

虽然 VP2 和 VP3 都是病毒粒子的主要结构蛋白，不过 VP2 才是主要的保护性免疫原且会引起宿主诱导出中和抗体(参阅 Becht et al. (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:631-640; Fahey et al. (1988), *J. Gen. Virol.*, 70:1473-1481)。VP3 被认为是一种组特异性抗原(group-specific antigen)，是因为其可被来源于血清型 1 和 2 中直接抗 VP3 的单克隆抗体(Mabs)所识别(参阅 Becht et al (1988), *J. Gen. Virol.*, 69:631-640)。VP4 为一种由病毒编码的蛋白酶且参与蛋白质前体的处理(参阅 Jagadish et al. (1988), *J. Virol.*, 62:1084-1087)。

在过去，幼鸡 IBDV 感染的控制是由使用无毒性品系进行活疫苗接种，或主要通过将活的或经杀死的 IBDV 疫苗饲养母鸡后所诱导出的母体抗体转移而达成。不幸的是，最近数年内，在美国从经疫苗接种过的鸡群中已分离出毒性 IBDV 变异株(参阅，例如，Snyder et al. (1988), *Avian Dis.*, 32:535-539; Van der Marel et al. (1990), *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 97:81-83)，此事实严重地破坏了对 IBDV 使用活疫苗接

种的效用性。

开发对 IBDV 的重组疫苗已有成效，并已将 IBDV 的基因组克隆出来(参阅 Azad et al (1985) "Virology", 143:35-44)。IBDV 的 VP2 基因也克隆出且在酵母菌内(参阅 Macreadie et al. (1990), Vaccine, 8:549-552)，以及重组禽痘病毒内表达出(参阅 Bayliss et al (1991), Arch. Virol., 120:193-205)。当鸡使用从酵母菌表达的 VP2 抗原予以免疫处理时，抗血清可提供鸡对抗传染性华氏囊病病毒感染的被动保护。在用于主动免疫研究时，以禽痘病毒为载体的(fowlpox virus-vectored) VP2 抗原可提供对抗死亡的保护，但是不能提供对抗华氏囊伤害的保护。

新城鸡瘟病毒(NDV)为一种有鞘膜的病毒，其包含一线形、单链、未分段、负义(negative sense)的 RNA 基因组。具有特色地，包含负义基因组的带有鞘膜的单链 RNA 的病毒族被分类为具有未分段的基因组(例如，副黏病毒科(Paramyxoviridae)和弹状病毒科(Rhabdoviridae))或具有分段的基因组(例如，正黏病毒科(Orthomyxoviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)和砂粒病毒科(Arenaviridae))。新城鸡瘟病毒，与副流感病毒、仙台病毒(Sendai virus)、猿猴病毒 5(simian virus 5)、和腮腺炎病毒(mumps virus)都属于副黏病毒科。

NDV 的构造成分包括一源于细胞膜的双层脂质的病毒鞘膜。从鞘膜突出的糖蛋白，血球凝集素-神经胺酸酶(HN)，可使病毒同时具有血球凝集和神经胺酸酶两种活性。而融合糖蛋白(F)也会与病毒鞘膜产生相互作用，它首先以无活性的前体形式产生，然后经转译后处理，被切断产生两条由双硫键联结的多肽链。活化的 F 蛋白经由帮助病毒鞘膜与宿主细胞膜的融合使新城鸡瘟病毒穿透到宿主细胞内。基质蛋白(M)则与病毒组装有关，且与病毒鞘膜和核壳体蛋白(nucleocapsid proteins)两者相互作用。

NDV 核壳体的主要蛋白亚单位为核壳体蛋白(NP)，其赋予核壳螺旋对称性。与核壳体结合的为 P 和 L 蛋白。磷酸化的磷蛋白(P)被认为在转录作用中具有调节的作用，并可能与甲基化、磷酸化和聚腺苷酸化作用有关。编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的 L 基因系与 P 蛋白一起为合成病毒 RNA 所需。占有病毒基因组的编码容量几乎一半的 L 蛋白是各种病毒蛋白中最大的，且在转录和复制上均扮有重要角色。

所有负链 RNA 病毒，包括 NDV，其复制皆因不含有复制 RNA 所需的细胞机构而变得复杂。此外，负链基因组不能直接转译成为蛋白质，而必须先转录到正链(mRNA)拷贝的中。所以，在进入宿主细胞内的后，病毒不能马上合成 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。L、P 和 NP 蛋白必须在感染时一起与基因组进入细胞的内。NDV 的负链基因组(vRNAs)和反基因组(antigenome)两者均由核壳体蛋白所封装(encapsidated)；唯一未被封装的 RNA 种类为病毒 mRNAs。细胞质为 NDV 的病毒 RNA 复制的场所，也是其转录的场所。

各病毒成分的组装在宿主细胞膜进行，且成熟病毒通过出芽而释放出来。

在美国专利 5,427,791 中，Ahmad 等人述及针对 NDV 的胚胎疫苗接种，其中需要通过使用乙基甲基磺酸酯(EMS)将病毒修饰。然而，EMS 为一种突变剂，使得经由使用 EMS 制备成的疫苗也被怀疑具有突变剂的作用，对于正常疫苗的施用并不适宜。不过，在没有使用 EMS 的改变的下，新城鸡瘟病毒疫苗就不能用于卵内疫苗接种，因为在使用未修饰的病毒注射到卵内的后，几乎所有的胚胎都会死掉。

传染性支气管炎病毒(IBV)，为冠状病毒科(Coronaviridae)的原型，是为传染性支气管炎(IB)的病原。该病毒具有一有正极性的单链 RNA 基因组，长度约 20kb，且其尺寸常约 80-100nm，为有突出 20 纳米刺突(spike)的圆形。传染性支气管炎病毒为所有年龄鸡的急性高度接触传染性疾病的肇因剂，会感染呼吸、生殖和肾等系统。

IBV 含有三个结构蛋白：刺突糖蛋白(S)、膜糖蛋白和核壳体蛋白。该刺突糖蛋白因其存在于病毒脂质膜突出的刺突或泪滴状表面突起而得此名称。该刺突蛋白被认为与病毒的致免疫性有关，部分是因为其类似于其它冠状病毒的刺突蛋白，且另一部分则由于体外(in vitro)中和实验(参阅，例如，D. Cavanagh et al. (1984), Avian Pathology, 13, 573-583)。该病毒含有两种刺突糖蛋白，为 S1 (90kDa)和 S2 (84kDa)。糖多肽链 S1 和 S2 的多肽成分经酶法移除寡糖的后估计具有约 125kDa 的合并分子量。刺突糖蛋白显然是通过 S2 多肽链接着到病毒鞘膜的。

IBV 已广泛分布于已经发展出密集养鸡工业的国家中。生长到 4 周年龄的幼鸡最容易受到传染性支气管炎病毒所感染，其感染会导致高度发病率及因二次细菌感染所致死亡率。感染也会导致蛋产量下降，或完全不能下蛋，加上产生具有薄壳、畸形、粗糙和软壳的低级蛋，而对经济造成严重的影响。

给予蛋中(卵内)正发育的小鸡活的疫苗，已被证明为一种免疫婴儿鸡使其在其孵出前抗某些疾病的快速(40,000 颗蛋每小时)，有效(100%蛋接受疫苗)，且省劳力(100,000 美金每年每孵化场)的方法。

第一个用于鸡孵化蛋的具卵内疫苗接种机器是由 Raleigh, N.C. 的 Embrex, Inc. 于 80 年代晚期发展出来的。(参阅，美国专利第 5,056,464 号和 5,699,751 号)。此种卵内机器目前用于约 80%的美国肉鸡孵化场中，主要是用来施打 MD 疫苗。该机器用于鸡抗 MD 的疫苗接种中被证明为安全有效的机器，也逐渐被用来施打 IBD 和 ND 疫苗。

下面文段内所呈现的本发明中，要介绍的是一种以 DNA 为媒介的免疫作用(总称为"DNA 疫苗")。有两类型的 DNA 疫苗，亦即，一种多重性 DNA 疫苗和一种多价性 DNA 疫苗。本发明的多重性 DNA 疫苗含有两种或更多种 DNA 构建物的组合，各构建物含有为一病毒基因或其片段的单一 DNA 分子。本发明的多价性 DNA 疫苗包含在一个 DNA



构建物中联结在一起的二个或更多个病毒基因或其片段。制备该多重性 DNA 疫苗或该多价性 DNA 疫苗任一中所使用的病毒基因或其片段可编码出病毒的肽链, 该肽链为宿主体液和细胞免疫系统的抗原且可诱导该体液和细胞免疫系统。该 DNA 疫苗首选用针施打到卵内。蛋内 DNA 疫苗注射会导致令人惊讶地强烈的免疫反应, 其中不仅包括抗体诱导和有细胞介质分泌的 T-细胞活化, 而且包括细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的产生。

### 发明内容

本发明提供一种用于蛋内注射的多重性 DNA 疫苗。该多重性 DNA 疫苗包含二个或二个以上 DNA 构建物, 各 DNA 构建物可表达出会在禽类内造成禽类病毒疾病的禽类病毒的抗原蛋白。该禽类病毒的抗原蛋白能诱导出抗禽类病毒疾病的保护性免疫反应。该多重性 DNA 疫苗优选地是注射到禽蛋内, 特别是禽卵的羊水内。该卵优选地是经受精约 18 天。优选的禽类包括鸡、火鸡、鸭和鹅。

该 DNA 构建物包含一个 DNA 分子和一个载体(vector)。该载体可为一质粒(plasmid)或一病毒载体, 优选载体为质粒, 质粒的例子包括, 但是不限于, pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质粒(例如 pUC7、pUC8、pUC18)、与 pGEM 系统质粒。或者, 也可以使用含有一个启动子(promoter)例如 CMV 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子、和  $\beta$ -肌动蛋白启动子等的任何质粒来制备 DNA 构建物。最适合的质粒为 pcDNA3。优选病毒载体为选自杆状病毒、疱疹病毒、和痘病毒所构成的群组中的一种。

禽类病毒的例子包括, 但不限于, 马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽类脑脊髓炎病毒(AEV)、禽类白血病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽类副黏病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)、和出血性肠炎病毒(HEV)。

特别适合用来诱导保护性免疫反应以对抗上面所述禽类病毒疾病的 DNA 分子包括, 但不限于, 具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的马立克病病毒(MDV) gB 基因的全序列或其片段; 具有 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列的传染性华氏囊病病毒(IBDV) VP2 基因的全序列或其片段; 具有 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列的新城鸡瘟病毒(NDV) HN 基因(自第 6321 至第 8319 碱基对)的全序列或其片段(亦即 SEQ ID NO:3 为新城鸡瘟病毒的整个基因组); 具有 SEQ ID NO:4 的 DNA 序列的传染性支气管炎病毒(IBV) S1 基因的全序列或其片段; 具有 SEQ ID NO:5 的 DNA 序列的传染性喉气管炎病毒(ILTV)的糖蛋白 G 基因的全序列或其片段; 禽类脑脊髓炎病毒(AEV) 的 VP1、VP0、或 VP3 基因的全序列或其片段(VP1 基因具有 SEQ ID NO:6 的 DNA 序列; VP0 基因具有 SEQ ID NO:7 的 DNA 序列; 且 VP3 基因具有 SEQ ID NO:8 的 DNA 序列); 具有 SEQ ID NO:9 的 DNA 序列的禽类副

流感病毒(APV)的副糖蛋白 G 基因的全序列或其片段; 具有 SEQ ID NO:10 的 DNA 序列的出血性肠炎病毒(HEV)的 A 型五角体基(penton base)基因的全序列或其片段; 与具有 SEQ ID NO:11 的 DNA 序列的禽痘病毒(FPV)的鞘膜抗原基因的全序列或其片段。

一个优选的 DNA 疫苗例子包含两个 DNA 构建物, 每个含有一个能够表达来自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、或传染性支气管炎病毒(IBV)的基因或其片段的 DNA 分子。

多重性 DNA 疫苗的另一优选例子含有 3 或 3 个以上的 DNA 构建物, 每个含有一个能够表达来自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、或传染性支气管炎病毒(IBV)的基因或其片段的 DNA 分子。

本发明也提供一种给禽卵接种的方法与一种制备该多重性 DNA 疫苗的方法。该给禽卵接种的方法包括向禽蛋内注射上述多重性 DNA 疫苗。该制备该多重性 DNA 疫苗的方法包括将一个 DNA 分子黏接(ligating)到质粒或病毒载体以形成 DNA 构建物; 然后将该二个或更多个该 DNA 构建物混合以形成多重性 DNA 疫苗。将 DNA 分子插入于载体内的步骤可以用常规方法来达成, 亦即, 基因和适合的载体都用相同的限制酶予以酶切以藉此产生互补的 DNA 末端, 使用如 T4 DNA 黏接酶(ligase)的酶黏接 DNA 分子。

对于 pcDNA3, 优选的限制酶为 BamH1 和 EcoR1。

在另一具体实例中, 提供了一种蛋内注射用的多价性 DNA 疫苗。该多价性 DNA 疫苗包含一个 DNA 构建物, 各构建物含有用一个载体联结的二个或二个以上的 DNA 分子。每个 DNA 分子可表达出一种禽类病毒的抗原蛋白, 该抗原蛋白能在禽类体内诱导出抗该禽类病毒疾病的保护性免疫反应。该多价性 DNA 疫苗优选注射到禽蛋内。该多价性 DNA 疫苗的每一个 DNA 分子为来自马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽类脑脊髓炎病毒(AEV)、禽类白血病病毒(ALV)、禽痘病毒(FPV)、禽类副流感病毒(APV)、鸭肝炎病毒(DHV)、和出血性肠炎病毒(HEV)的一个基因或其片段。

### 具体实施方式

传统禽类疫苗包括经化学灭活的病毒疫苗或经修饰的活病毒疫苗。灭活疫苗需要额外的免疫化处理, 如此不仅制造起来昂贵且执行起来繁琐。再者, 某些传染性病毒颗粒可能在灭活程序中存活, 并可能在施打到动物后引发疾病。

整体而言, 经减毒的活病毒疫苗比经灭活疫苗较适当, 因为其可诱发通常同时基于体液和细胞反应的免疫反应。这种疫苗通常是以在组织培养中的毒性病毒株连续传代为基础。然而, 减毒程序会诱导病毒基因组的突变, 产生有关毒性和免疫性质互相异质的一族群病毒粒子。此外, 众所周知, 传统经减毒的活病毒疫苗可能回复毒性,

而导致在所接种的动物上爆发疾病并可能将病原散布到其它动物上。

因此，以重组 DNA 技术为基础的疫苗对产业界来说是具有其优点的。所得 DNA 疫苗只含有且只表达出所必需的和相关的免疫原物质，此免疫原物质能够诱发抗病原的保护性免疫反应，且不会显现出上述活疫苗或经灭活的疫苗的缺点。

为了制备多重性 DNA 疫苗及/或多价性重组 DNA 疫苗的目的，基因的 DNA 序列(也可以与“DNA 分子”互换地使用)不需要含有编码该多肽链的 DNA 的全部长度。在大部分情况中，编码一个抗原决定部位区的基因片段应该就足够供免疫反应所用。抗原决定部位区的 DNA 序列可以通过将其它病毒株的对应部份予以定序且互相比较而找出。主要的抗原决定子(antigenic determinant)可能为显示出最大异质性(heterology)者。此外，这些抗原决定部位区也可能位于蛋白质的构象结构之内。一个或更多个该编码抗原决定子的基因片段可以通过化学合成或重组 DNA 技术予以制备。如果需要，这些基因片段可以键联在一起或联结到其它 DNA 分子。

同时，病毒基因也不需要 DNA 内。事实上，某些常见的禽类病毒疾病是由双链或单链 RNA 病毒所引起的。例如，马立克病病毒(MDV)为一种双链 RNA 病毒，而传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)和传染性支气管炎病毒(IBV)都是单链 RNA 病毒。不过，RNA 病毒序列可以使用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术反转录到 DNA 内，接着以常用的重组 DNA 技术将之加到载体内。

此外，因为遗传密码的简并性，可能会有许多 RNA 和 DNA 序列编码着一个特定的氨基酸序列。因此，可表达出具有抗体结合特性的多肽链的所有 RNA 和 DNA 序列都为本发明所涵盖。

要构建重组 DNA 疫苗时，不论单价或多价，均可将病毒基因的 DNA 序列黏接到于自然界中不相关或联结的其它 DNA 分子。任意地，可将一个病毒基因的 DNA 序列黏接另一个 DNA 分子中，即载体，该载体含有其编码融合蛋白质序列例如  $\beta$ -半乳糖苷酶的 DNA，产生所谓的重组核酸分子或 DNA 构建物，其可用来转殖到适当的宿主。此种载体优选是衍生自，如质粒或存在于噬菌体、黏接质粒或病毒中的核酸序列。

可以用来克隆根据本发明的核酸序列的特定载体都是本领域所知的，且包括质粒或病毒载体。质粒的例子包括，但不限于，pBR322、pcDNA3、pVAX1、pSectag、pTracer、pDisplay、pUC 系统质粒(例如 pUC7、pUC8、pUC18)、pGEM 系统质粒、Bluescript 质粒或有包括 CMV 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子、和  $\beta$ -肌动蛋白启动子等的任何其它质粒。优选质粒为 pcDNA3。病毒载体的例子包括，但不限于，噬菌体(例如， $\lambda$  和 M13-衍生的噬菌体)、SV40、腺病毒、多瘤病毒(polyoma)、杆状病毒、疱疹病毒(HVT)或痘病毒(例如禽痘病毒)。

构建重组核酸分子所用的方法都是本领域所知悉的技术。例如，当基因和适合的克隆载体都用相同的限制酶酶切以产生互补的 DNA 末端后，核酸序列在一克隆载体中的插入可以很容易地通过如 T4 DNA 连接酶的酶连接得到。

或者，通过消化单链 DNA 或使用恰当的 DNA 聚合酶来填充隐性末端来修饰限制酶切部位以产生钝端(blunt end)可能也是需要的。随后，可以使用如 T4 DNA 黏接酶的酶进行钝端黏接。如果需要，可以通过将黏接臂黏接到 DNA 末端上来产生任何限制酶切部位。这类黏接臂可包括编码限制酶切部位序列的特定寡核苷酸序列。经限制酶酶切过的载体和核酸序列也可通过均聚物加尾(homopolymeric tailing)来进行修饰。

本发明提供两种 DNA 疫苗。第一种多重性 DNA 疫苗，其包含二个或二个以上的单价 DNA 疫苗，各含有一条 DNA 序列，该 DNA 序列编码着至少一种多肽链，该多肽链能提供保护作用以对抗一种禽类病毒疾病例如马立克病病毒(MDV)、传染性华氏囊病病毒(IBDV)、新城鸡瘟病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、禽脑脊髓炎病毒(AEV)、禽痘病毒(FPV)、禽流感病毒(AIV)、禽白血病病毒(ALV)、鸭肝炎病毒 B 基因和出血性肠炎病毒(HEV)，并插入到商业上可用的质粒中。

第二种为多价性重组 DNA 疫苗，其包含来自不同病毒的二种或二种以上的基因或基因片段。这些基因或基因片段通过一个有用的载体所携带，该载体可为质粒或病毒载体。该多价性重组 DNA 疫苗编码着二个或二个以上的抗原多肽链，该抗原多肽链可提供保护作用以对抗至少两种病毒疾病包括，但不限于，马立克病、传染性华氏囊病、新城鸡瘟病或传染性支气管炎之保护。该病毒基因或基因片段可被有效地连接到载体的读码区内以使其可在宿主体内表达出来。由该载体所携带的不同结构 DNA 序列可用终止序列和起始序列分隔使得该蛋白质可以分开表达，或成为一个单一读码区的一部分，因而可用本领域中已知的方法以融合蛋白质的形式产生。

优选的 DNA 序列包括，但不限于，具有 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的马立克病病毒(MDV) gB 基因的全序列或其片段；具有 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列的传染性华氏囊病病毒(IBDV) VP2 基因的全序列或其片段；具有 SEQ ID NO:3 中自第 6321 至 8319 碱基对的 DNA 序列的新城鸡瘟病毒(NDV) HN 基因的全序列或其片段；具有 SEQ ID NO:4 的 DNA 序列的传染性支气管炎病毒(IBV) S1 基因的全序列或其片段。

编码马立克病病毒的 gB 多肽链的 DNA 序列具有 SEQ ID NO:1 的核酸序列。该 DNA 序列包含线型 DNA 的 3650 个碱基对。

编码传染性华氏囊病病毒的 VP2 多肽链的 DNA 序列具有 SEQ ID NO:2 的核酸序列。该 DNA 序列包含线型 DNA 分子的 3004 碱基对，可由传染性华氏囊病病毒的 RNA 模板反转录而来。

整个新城鸡瘟病毒基因组的 DNA 序列包含 15186 碱基对的 DNA，其中(1)第 56 至 1792 碱基对编码 NP 多肽链，为一核壳体蛋白；(2)第 1804-3244 碱基对编码 P 多肽链，为一磷蛋白；(3)第 3256-4487 碱基对编码 M 多肽链，为一基质蛋白；(4)第 4498-6279 碱基对编码 F 多肽链，为一融合蛋白质；(5)第 6321-8319 碱基对编码 HN 多肽链，为血球凝集素神经胺酸酶；(6)第 8370-15073 碱基对编码 L 多肽链，为一大的聚合酶蛋白质。新城鸡瘟病毒基因组具有 SEQ ID NO:3 的 DNA 序列。

S1 多肽链的 DNA 序列含有如 SEQ ID NO:4 所示 1611 个碱基对线型 DNA 序列，是从传染性支气管炎病毒的 RNA 模板反转录而得。

下面的实验设计为示范说明，而不用来限制本发明的范围。其中可做出合理的变化，例如合理技术操作所发生者，不脱离本发明的范围。

### I. 材料与amp;方法

#### (A) 病毒与疫苗

禽类传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性华氏囊病 (IBD) 和新城鸡瘟病 (ND) 疫苗都购自 Intervet Inc.。

#### (B) 病毒 RNA 分离与反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

将 200 微升回收的减毒疫苗 (Intervet Inc.) 溶解于冰冷的 GTC 缓冲液 (4 M 异硫氰酸胍, 25 mM 柠檬酸钠, pH 7.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M 氢硫基乙醇) 和醋酸钠 (pH 4) 中。加入等体积的苯酚-氯仿 (1:1) 震荡后静置于冰上 15 分钟。离心后收集水层且使用等体积的异丙醇沉淀出 RNA。在 4°C 下以 12,000 rpm 离心 20 分钟将沉淀的 RNA 分离出，然后悬浮在经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的去离子水中且贮存在 -70°C。

#### (C) 寡核苷酸

反转录聚合酶连锁反应所用的寡核苷酸引物 (primer) 都是购自 Promega，且都是分别针对禽类传染性支气管炎病毒 (Beaudette CK 株)、新城鸡瘟病毒 (Lasota 株) 和禽类传染性华氏囊病病毒的基因组来设计。PCR 所用各引物的序列为：

IBS1F' 5' CGGGATCCGCCCGCCATGTTGGTAACACCTCTT 3'; (SEQ ID NO:12)

IBS1R' 5' CGGAATTCTTAACGTCTAAAACGACGTGT 3'; (SEQ ID NO:13)

NDF F' 5' CGGGATCCGCCCGCCATGGGCTCCAGACCTTCTACC 3'; (SEQ ID NO:14)

NDF R' 5' CCGCTCGAGTTACATTTTTGTAGTGGCTCTCATT 3'; (SEQ ID NO:15)

NDHN F' 5' CGGGATCCGCCCGCCATGGACCGCGCGTTAGGCAAG 3'; (SEQ ID NO:16)

NDHN R' 5' GCTCTAGATTACTCAACTAGCCAGACCTG 3'; (SEQ ID NO:17)

IBDVP2F' 5' CGGGATCCGCCCGCCATGACAAACCTGCAAGAT 3'; (SEQ ID NO:18)

IBDVP2R' 5' CGGAATTCTTACCTTATGGCCCGGATTAT 3'; (SEQ ID NO:19)

#### (D) 反转录聚合酶连锁反应(RT-PCR)

传染性支气管炎病毒、新城鸡瘟病和传染性华氏囊病病毒的 RNA 反转录是在 42 °C 于 2.5 倍 Taq 缓冲液(200 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM β-巯基乙醇, 和各 0.25 mM 的 dATP、dCTP、dGTP, 和 dTTP)中进行 30 分钟。除了 Taq 缓冲液之外, 反应混合物(40 微升)也含有病毒 RNA, 2.4 U 的禽类骨髓母细胞瘤病毒(AMV)反转录酶(Promega), 16 U 的 RNasin (Promega), 和 0.01nmol 的反向引物(IBDVP2R、NDF F、NDHN F 或 IBS1R)。反应混合物的最后体积为 40 微升。反转录之后, 在反转录混合物中加入下列药剂: 0.02 nmol 的各核苷三磷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP), 0.01 nmol 的前向引物(IBDVP2F、NDF R、NDHN R 或 IBS1F)和 1.5 U 的 Taq DNA 聚合酶(Stratagene)。然后加水到终体积 100 微升。反应在 ThermalCycler(Perkin Elmer-Cetus)内进行 32 个循环。每一 PCR 循环包括在 94°C 下变性(denaturation) 1 分钟, 在 57°C 下退火(annealing) 1 分钟, 与在 72°C 下延长(elongation)2 分钟。

#### (E) DNA 构建物的制备

使用分别来源于传染性华氏囊病毒疫苗、传染性支气管炎病毒疫苗和新城鸡瘟病毒疫苗的 VP2、S1、NDF 和 NDHN 等基因放置于市售质粒 pcDNA3(Invitrogen, U.S.A.) 的下游处, 构成质粒 pCMV-VP2、pCMV-S1、pCMV-NDF 和 pCMV-NDHN。使用限制酶 *Bam*H1、*Eco*R1、*Xba*I 和 *Xho*I 将所有的基因插入到 pcDNA3 载体之内(引物序列中带下划线的字母)。在 pcDNA3 载体内的所有基因的序列都经过两方向测序予以验证。

#### (F) DNA 和 DNA 传递的制备

经亲和层析法(Qiagen. Inc.)纯化的质粒 DNA 的定量用波长为 260 和 280nm 的分光光度计测量。将各 100 微克分量的 DNA 悬浮在 100 微升 PBS 中(0.14 M 氯化钠, 10 mM 磷酸钠, pH 7.4)。对于 DNA 传递, 使用含有 20 号 1 又 1/2 吋针头的 1 cc 注射筒。对于蛋内注射组, 是从每一个蛋的大头端用针头穿透气室将 0.1 毫升的 DNA 疫苗(100 微克)注射到胚胎内(取自鸡窝盘中 18 天的已受精且正发育的卵)。然后将该卵转移到孵化场, 且放在该处直到在约 21 天时孵化为止。对于 IM (肌肉内)组, 所有疫苗(1/5 剂量的活疫苗)注射到孵化后 10 天鸡的胸肉内。

## II. 实验设计

将无特定病原(SPF)受精蛋(n = 60)随机分成 12 组。所有组的所有蛋(一组 5 颗蛋)都分别给予 100 微升的试剂。A 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN 混合物, B 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-S1, C 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-VP2, D 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN + 100 微克 pCMV-S1 (ND + IB), E 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN

+ 100 微克 pCMV-VP2 (ND + IBD), F 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-VP2 + 100 微克 pCMV-VP2 混合物 (IB + IBD), G 组的每一颗蛋注射 100 微克 pCMV-NDF + 100 微克 pCMV-NDHN + 100 微克 pCMV-S1 + 100 微克 pCMV-VP2 (ND + IB + IBD), 作为阳性对照组的 H 组的每一颗蛋注射 1 剂量的市售蛋内 IBD 疫苗 (Embrex, Inc), I、J、K 和 L 组的每一颗蛋注射 100 微升的 PBS。在此实验中的所有鸡都是在孵化后 10 天鸡的胸肉内注射 100 微升的疫苗 (1/5 剂量的活疫苗)。A 和 I 组中的鸡注射 NDV 疫苗, B 和 J 组注射 IBV 疫苗, C 和 K 组注射 IBDV 疫苗, D 组注射 NDV + IB 疫苗混合物, E 组注射 NDV + IBD 疫苗混合物, F 组注射 IB + IBD 疫苗混合物, 且 G 和 L 组注射 NDV、IB 和 IBD 疫苗混合物。

### III. 血清检测

在孵化后 10 天 (同时注射低剂量活疫苗)、17 天、24 天和 31 天收集所有血清样品。抗体效价的检测使用购自 IDEXX Laboratories, Inc. 的 IB、IBD 和 NDV 抗体检测试剂盒用 ELISA 检测。所有样品都进行重复检测。在检定之前使用样品稀释剂将检验样品稀释 500 倍 (1: 500)。检测程序按照试剂盒手册进行。为了使检测正确, 测量且记录在波长 650nm 的吸光值, A(650)。未知样中的相对抗体含量通过计算样品对阳性样 (S/P) 比例来确定。终点效价使用公式计算:  $\text{Log}_{10} \text{效价} = 1.09 (\text{Log}_{10} \text{S/P}) + 3.36$ 。

### 结果

如表 1 中所示, 结果证实, 对于抗-IBD 抗体的检测, IBDV 重组抗原 VP2 可以被表达并能起到原发刺激作用。在一低剂量疫苗强化后效价迅速增加。在孵化 17 天之后 (亦即, IM 注射后 7 天), C、E、F 和 G 等组的效价明显地高于 K 和 L 组的效价。最重要的, IBDV 抗原的表达不会受其它单价 DNA 疫苗 (新城鸡瘟病毒和传染性支气管炎病毒) 所干扰。对于 IB 和 NDV DNA 疫苗也有相同的结果。孵化后 17 天, B、D、F 和 G 等组的效价都高于 J 和 L 组的效价 (表 2) 且孵化后 17 天, A、D、E 和 G 等组的效价都高于 I 和 L 组的效价 (表 3)。唯一未预料到的结果是抗-NDV 效价不能用三价 DNA 疫苗高度诱导出来 (表 3, G 组), 不过抗-IBD 和抗-IB 则都可以 (表 1 和 2, G 组)。

表 1 用 IDEXX IBD 抗体检测试剂盒检测的血清样品  
(抗体效价对应于平均效价 ± SD)

动物组别	免疫化和样品采集时间表(天)			
	10 天 PH*	17 天 PH	24 天 PH	31 天 PH
C(IBD)	---**	4535 ± 1267	16623 ± 3105	21254 ± 3852
E(IBD+ND)	---	1685 ± 655	17339 ± 2185	19041 ± 2967
F(IBD+IB)	---	8252 ± 2205	10057 ± 1295	17561 ± 2006
G(IBD+IB+ND)	---	9111 ± 1701	13127 ± 1763	16694 ± 2134

H(IBD 阳性)	6635 ± 851	13025 ± 2131	18015 ± 1592	18853 ± 2614
K(PBS/IBD)	---	---	1853 ± 302	17002 ± 2965
L(PBS/IBD+IB+ND)	---	---	6923 ± 1168	18063 ± 2531

\*PH: 孵化后

\*\*---: 平均效价低于 396 (被 IDEXX 试剂盒作为阴性)

表 2 用 IDEXX IB 抗体检测试剂盒检测的血清样品  
(抗体效价对应于平均效价 ± SD)

免疫化和样品采集时间表(天)				
动物组别	10 天 PH*	17 天 PH	24 天 PH	31 天 PH
B(IB)	---**	441 ± 117	2426 ± 264	3214 ± 877
D(IB+ND)	---	586 ± 182	805 ± 221	1988 ± 501
F(IB+IBD)	---	509 ± 89	685 ± 186	1192 ± 237
G(IBD+IB+ND)	---	499 ± 81	688 ± 78	2551 ± 531
J(PBS/IB)	---	---	485 ± 76	1662 ± 441
L(PBS/IBD+IB+ND)	---	---	819 ± 202	1332 ± 488

\*PH: 孵化后

\*\*---: 平均效价低于 396 (被 IDEXX 试剂盒作为阴性)

表 3 用 IDEXX ND 抗体检测试剂盒检测的血清样品  
(抗体效价对应于平均效价 ± SD)

免疫化和样品采集时间表(天)				
动物组别	10 天 PH*	17 天 PH	24 天 PH	31 天 PH
A(ND)	---**	466 ± 101	2394 ± 456	8103 ± 2198
D(ND + IB)	---	706 ± 140	1778 ± 378	6811 ± 2206
E(ND+IBD)	---	517 ± 104	3021 ± 411	5991 ± 1695
G(IBD+IB+ND)	---	---	---	783 ± 201
I(PBS/ND)	---	---	1853 ± 324	3912 ± 304
L(PBS/IBD+IB+ND)	---	---	4027 ± 662	5807 ± 1996

\*PH: 孵化后

\*\*---: 平均效价低于 396 (被 IDEXX 试剂盒作为阴性)



<110>郭村勇

<120>多重性和多价性蛋白 DNA 疫苗

<130>39734-186920

<160>19

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>3650

<212>DNA

<213>马立克病病毒

<400>1

tcgagctcgc	cggggatggt	tagtcacgat	agacatcggg	tcgcccagcc	gtcgaataca	60
gcattatatt	ttagtggtga	aatgttaggg	ctgcttctc	acttaaagga	ggaaatggct	120
cgattcatgt	tcatagcag	tagaaaaaca	gattggaccg	tcagtaagtt	tagagggttt	180
tatgacttta	gcactataga	taatgtaact	gcggcccatc	gcatggcttg	gaaatatac	240
aaagaactga	tttttgcaac	agctttattt	tcttctgtat	ttaaattgtg	cgaattgcac	300
atctgtcgtg	ccgacagttt	gcagatcaac	agcaatggag	actatgtatg	gaaaaatgga	360
atatatataa	catatgaaac	cgaatatcca	cttataatga	ttctggggtc	agaatcaagc	420
acttcagaaa	cgaaaatat	gactgcaatt	attgatacag	atgttttttc	gttgctttat	480
tctattttgc	agtatatggc	ccccgttacg	gcagatcagg	tgcgagtaga	acagattacc	540
aacagccacg	ccccatctg	accgtccaa	tattcttgtg	tccctgcatt	ttatctcaca	600
caatttatga	acagcatcat	taagatcatc	tcactatgca	ctattttagg	cggaattgca	660
ttttttcct	tatagttatt	ctatatggta	cgaactcatc	tccgagtacc	caaaatgtga	720
catcaagaga	agttgtttcg	agcgtccagt	tgtctgagga	agagtctacg	ttttatcttt	780
gtccccacc	agtgggttca	accgtgatcc	gtctagaacc	gccgcgaaaa	tgtcccgaac	840
ctagaaaagc	caccgagtgg	ggtgaaggaa	tcgcatatatt	atttaaagag	aatatcagtc	900
catataaatt	taaagtgcag	ctttattata	aaaatatcat	tcagacgacg	acatggacgg	960
ggacgacata	tagacagatc	actaatcgat	atacagatag	gacgccggtt	tccattgaag	1020
agatcacgga	tctaactgac	ggcaaaggaa	gatgctcatc	taaagcaaga	taccttagaa	1080
acaatgtata	tgttgaagcg	tttgacaggg	atgcgggaga	aaaacaagta	cttctaaaac	1140
catcaaaaatt	caacacgccc	gaatctaggg	catggcacac	gactaatgag	acgtataccg	1200
tgtggggatc	accatggata	tatcgaacgg	gaacctccgt	caattgtata	gtagaggaaa	1260
tggatgcccg	ctctgtgttt	ccgtattcat	attttgcaat	ggccaatggc	gacatcgca	1320
acatatctcc	attttatggt	ctatccccac	cagaggctgc	cgcagaacc	atgggatatc	1380
cccaggataa	tttcaaaaa	ctagatagct	attttcaat	ggatttggac	aagcgtcgaa	1440
aagcaagcct	tccagtcaag	cgtaactttc	tcatcacatc	acacttcaca	gttgggtggg	1500

actgggctcc	aaaaactact	cgtgtatgtt	caatgactaa	gtggaaagag	gtgactgaaa	1560
tgttgcgtgc	aacagttaat	gggagataca	gatttatggc	ccgtgaactt	tcggcaacgt	1620
ttatcagtaa	tacgactgag	tttgatccaa	atcgcacat	attaggacaa	tgtattaaac	1680
gcgaggcaga	agcagcaatc	gagcagatat	ttaggacaaa	atataatgac	agtcacgtca	1740
aggttggaca	tgtacaatat	ttcttggctc	tcgggggatt	tattgtagca	tatcagcctg	1800
ttctatccaa	atccctggct	catatgtacc	tcagagaatt	gatgagagac	aacaggaccg	1860
atgagatgct	cgacctggta	aacaataagc	atgcaattta	taagaaaaat	gctacctcat	1920
tgtcacgatt	gcggcgagat	attcgaaatg	caccaaatag	aaaaataaca	ttagacgaca	1980
ccacagctat	taaatcgaca	tcgtctgttc	aattcgccat	gctccaattt	ctttatgatc	2040
atatacaaac	ccatattaat	gatatgttta	gtaggattgc	cacagcttgg	tgcgaattgc	2100
agaatagaga	acttgtttta	tggcacgaag	ggataaagat	taatcctagc	gctacagcga	2160
gtgcaacatt	aggaaggaga	gtggctgcaa	agatgttggg	ggatgtcgct	gctgtatcga	2220
gctgcactgc	tatagatgcg	gaatccgtca	ctttgcaaaa	ttctatgcga	gttatcacat	2280
ccactaatac	atgttatagc	cgaccattgg	ttctattttc	atatggagaa	aaccaaggaa	2340
acatacaggg	acaactcggg	gaaaacaacg	agttgcttcc	aacgctagag	gctgtagagc	2400
catgctcggc	taatcatcgt	agatattttc	tgtttggatc	cggttatgct	ttatttgaaa	2460
actataatth	tgtaagatg	gtagacgctg	ccgatataca	gattgctagc	acatttgtcg	2520
agcttaatct	aaccctgcta	gaagatcggg	aaatthtggc	tttatccggt	tacacaaaag	2580
aagagttcgc	tgatgttggg	gtattggatt	atgcagaagt	agctcgccgc	aatcaactac	2640
atgaacttaa	atthtatgac	ataaacaag	taatagaagt	ggatacaaat	tacgcgttta	2700
tgaacggtth	ggccgaattg	tttaacggta	tgggtcaggt	agggcaagct	ataggcaaag	2760
ttgtagtagg	ggctgccggg	gcaatcgtat	ctaccatata	tggtgtctct	gctttcatgt	2820
caatccctth	ggggctthtcg	gcaatcgggt	taatcattat	agcaggactc	gtggctgcat	2880
thttagcata	tcgttatgta	aacaagctta	aaagcaatcc	aatgaaagcc	ctttatccta	2940
tgacaacaga	agtgcttaag	gcacaggcaa	cgctgaggt	gcatggcgag	gaatcagatg	3000
atthtgaacg	aacatctatt	gatgaaagaa	aattagaaga	agctagagaa	atgataaaat	3060
atatggcgth	agtctccgcg	gaagaacgcc	acgagaaaaa	actgcbggaga	aagaggcgag	3120
gcactaccgc	cgthctatcg	gaccacctgg	caaaaatgag	gattaaaaat	agtaacccta	3180
aatatgataa	gttacctact	acatattcag	actcagaaga	tgatgctgtg	taagtgggca	3240
ctatttatatt	tgaactgaat	aaaacgcata	gagcatgata	tggtttactc	atthattgcg	3300
agatataaag	catattcaat	acgatataat	gcgaacgtga	tgctaaaaac	atagctccct	3360
gtattattga	tgcgccatca	thtgattaat	aaatacatcg	acgccggcat	cactgggtgcg	3420
gtgtatacca	gctacggcgc	tagcattcat	ggtatcccg	gattgctcga	tgctthcctt	3480
ctgaattccg	tcggaacgct	cctgagagat	ggtcgcagtt	atthgtacat	thcgaccagc	3540
ctccgatct	gaaactggca	caggaatgca	ccgtggaatt	ggtagaagtt	thtccttccg	3600
tggaaggcat	agggcgttcg	actcccatgg	gccatgaaac	tgtgggatgt		3650

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;3004

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;传染性华氏囊病病毒 (IBDV)

&lt;400&gt;2

tgatgccaac	aaccggaccg	gcgtccattc	cggacgacac	cctggagaag	cacactctca	60
ggtcagagac	ctcgacctac	aatttgactg	tgggggacac	agggtcaggg	ctaattgtct	120
ttttccctgg	attccctggc	tcaattgtgg	gtgctcacta	cacactgcag	agcaatggga	180
actacaagtt	cgatcagatg	ctcctgactg	cccagaacct	accggccagt	tacaactact	240
gcaggctagt	gagtcggagt	ctcacagtga	ggtcaagcac	acttcttggt	ggcgtttatg	300
cactaaacgg	caccataaac	gccgtgacct	tccaaggaag	cctgagtgaa	ctgacagatg	360
ttagctacaa	tgggttgatg	tctgcaacag	ccaacatcaa	cgacaaaatt	gggaacgtcc	420
tagtagggga	aggggtcacc	gtcctcagct	taccacatc	atatgatctt	gggtatgtga	480
ggcttggtga	ccccattccc	gcaatagggc	ttgacccaaa	aatggtagcc	acatgtgaca	540
gcagtgacag	gcccagagtc	tacaccataa	ctgcagccga	tgattaccaa	ttctcatcac	600
agtaccaacc	aggtggggta	acaatcacac	tgttctcagc	caacattgat	gccatcacia	660
gcctcagcgt	tggggggagag	ctcgtgtttc	gaacaagcgt	ccacggcctt	gtactgggcg	720
ccaccateta	cctcataggc	ttgatggga	caacggtaat	caccagggt	gtggccgcaa	780
acactgggct	gacgaccggc	accgacaacc	ttatgccatt	caatcttggt	attccaacia	840
acgagataac	ccagccaatc	acatccatca	aactggagat	agtgacctcc	aaaagtgggt	900
gtcaggcagg	ggatcagatg	ttatggctgg	caagagggag	cctagcagtg	acgatccatg	960
gtggcaacta	tccaggggcc	ctccgtcccg	tcacgctagt	ggcctacgaa	agagtggcaa	1020
caggatccgt	cgttacggtc	gctgggggtga	gcaacttcga	gctgatccca	aatcctgaac	1080
tagcaaagaa	cctgggttaca	gaatacggcc	gatttgacc	aggagccatg	aactacacia	1140
aattgatact	gagtgagagg	gaccgtcttg	gcatcaagac	cgtctggcca	acaagggagt	1200
acactgactt	tcgtgaatac	ttcatggagg	tggccgacct	caactctccc	ctgaagattg	1260
caggagcatt	cggcttcaaa	gacataatcc	gggcataaag	gaggatagct	gtgccggtgg	1320
tctccacatt	gttcccacct	gocgtcccc	tagcccatgc	aattggggaa	ggtgtagact	1380
acctgctggg	cgatgaggca	caggctgctt	caggaactgc	tcgagccgcg	tcaggaanaag	1440
caagagctgc	ctcaggccgc	ataaggcagc	tgactctcgc	cgccgacaag	gggtacgagg	1500
tagtcgcaaa	tctattccag	gtgccccaga	atcccgtagt	cgacgggatt	cttgcttcac	1560
ctggggact	ccgcggtgca	cacaacctcg	actgcgtggt	aagagagggt	gccacgctat	1620
tccctgtggt	tattacgaca	gtggaagacg	ccatgacacc	caaagcattg	aacagcaaaa	1680
tgtttgctgt	cattgaaggc	gtgcgagaag	acctccaacc	tccatctcaa	agaggatcct	1740
tcatacgaac	tctctctgga	cacagagtct	atggatatgc	tccagatggg	gtacttccac	1800
tggagactgg	gagagactac	accgttgctc	caatagatga	tgtctgggac	gacagcatta	1860
tgtgtccaa	agatcccata	cctctattg	tgggaaacag	tggaaatcta	gccatagctt	1920
acatggatgt	gtttcgacc	aaagtcccaa	tccatgtggc	tatgacggga	gccctcaatg	1980
cttgtggcga	gattgagaaa	gtaagcttta	gaagcaccaa	gctcgccact	gcacaccgac	2040
ttggccttaa	gttggtggt	ccggagcat	tcgatgtaaa	caccgggccc	aactgggcaa	2100
cgttcatcaa	acgtttccct	cacaatccac	gcgactggga	caggctcccc	tacctcaacc	2160
taccatacct	tccaccaat	gcaggacgcc	agtaccacct	tgccatggct	gcatcagagt	2220
tcaaagagac	ccccgaactc	gagagtgccg	tcagagcaat	ggaagcagca	gccaacgtgg	2280
accactatt	ccaatctgca	ctcagtgtgt	tcatgtggct	ggaagagaat	gggattgtga	2340
ctgacatggc	caacttcgca	ctcagcgacc	cgaacgcccc	tcggatgcga	aattttcttg	2400

caaacgcacc	acaagcaggc	agcaagtcgc	aaagggccaa	gtacgggaca	gcaggctacg	2460
gagtggaggc	tcggggcccc	acaccagagg	aagcacagag	ggaaaaagac	acacggatct	2520
caaagaagat	ggagaccatg	ggcatctact	ttgcaacacc	agaatgggta	gcactcaatg	2580
ggcaccgagg	gccaaagccc	ggccagctaa	agtactggca	gaacacacga	gaaataccgg	2640
acccaaacga	ggactatcta	gactacgtgc	atgcagagaa	gagccggttg	gcatcagaag	2700
aacaaatcct	aagggcagct	acgtcgatct	acggggctcc	aggacaggca	gagccacccc	2760
aagctttcat	agacgaagtt	gccaaagtct	atgaaatcaa	ccatggacgt	ggcccaaacc	2820
aagaacagat	gaaagatctg	ctcttgactg	cgatggagat	gaagcatcgc	aatcccaggc	2880
gggctctacc	aaagcccaag	ccaaaacca	atgctccaac	acagagaccc	cctggctcggc	2940
tgggccgctg	gatcaggacc	gtctctgatg	aggaccttga	gtgaggctcc	tggaagtctc	3000
ccga						3004

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;15186

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;新城疫病毒(NDV)

&lt;400&gt;3

accaaacaga	gaatccgtga	gttacgataa	aaggcgaagg	agcaattgaa	gtcgcacggg	60
tagaaggtgt	gaatctcgag	tgcgagcccg	aagcacaac	tcgagaaagc	cttctgccaa	120
catgtcttcc	gtatttgatg	agtacgaaca	gctcctcgcg	gctcagactc	gccccaatgg	180
agctcatgga	gggggagaaa	aagggagtac	cttaaaagta	gacgtcccgg	tattcactct	240
taacagtgat	gaccagaag	atagatggag	ctttgtggta	ttctgcctcc	ggattgctgt	300
tagcgaagat	gccaaacaac	cactcaggca	aggtgctctc	atatctcttt	tatgctccca	360
ctcacaggta	atgaggaacc	atgttgccat	tgcagggaaa	cagaatgaag	ccacattggc	420
cgtgcttgag	attgatggct	ttgccaacgg	cacgccccag	ttcaacaata	ggagtggagt	480
gtctgaagag	agagcacaga	gatttgcatg	gatagcagga	tctctcctc	gggcatgcag	540
caacggaacc	ccgttcgtca	cagccggggc	agaagatgat	gcaccagaag	acatcaccga	600
taccctggag	aggatcctct	ctatccaggc	tcaagtatgg	gtcacagtag	caaaagccat	660
gactgcgtat	gagactgcag	atgagtcgga	aacaaggcga	atcaataagt	atatgcagca	720
aggcagggtc	caaaagaaat	acatccteta	ccccgtatgc	aggagcacia	tccaactcac	780
gatcagacag	tctcttgag	tccgcatctt	tttggttagc	gagctcaaga	gaggccgcaa	840
cacggcaggt	ggtacctcta	cttattataa	cctggtaggg	gacgtagact	catacatcag	900
gaataccggg	cttactgcat	tcttcttgac	actcaagtac	ggaatcaaca	ccaagacatc	960
agcccttgca	cttagtagcc	tctcaggcga	catccagaag	atgaagcagc	tcatgcgttt	1020
gtatcggatg	aaaggagata	atgcgccgta	catgacatta	cttggtgata	gtgaccagat	1080
gagctttgcg	cctgccgagt	atgcacaact	ttactccttt	gccatgggta	tggcatcagt	1140
cctagataaa	ggtactggga	aataccaatt	tgccagggac	tttatgagca	catcattctg	1200
gagacttgga	gtagagtacg	ctcaggctca	gggaagtagc	attaacgagg	atatggctgc	1260
cgagctaaag	ctaaccacag	cagcaatgaa	gggcctggca	gctgctgccc	aacgggtctc	1320
cgacgatacc	agcagcatat	acatgcctac	tcaacaagtc	ggagtcctca	ctgggcttag	1380

cgaggggggg	tccaagctc	tacaaggcgg	atcgaataga	tcgcaagggc	aaccagaagc	1440
cggggatggg	gagacccaat	tcctggatct	gatgagagcg	gtagcaaata	gcatgaggga	1500
ggcgccaaac	tctgcacagg	gactcctcca	atcggggcct	cccccaactc	ctgggccatc	1560
ccaagataac	gacaccgact	gggggtattg	atggacaaaa	cccagcctgc	ttccacaaaa	1620
acatcccaat	gccctcacc	gtagtcgacc	cctcgatttg	cggtctata	tgaccacacc	1680
ctaaacaaa	catccccctc	tttctcct	ccccctgctg	tacaactccg	cacgccctag	1740
ataccacagg	cacaatgcgg	ctactaaca	atcaaaacag	agccgaggga	attagaaaaa	1800
agtacgggta	gaagagggat	attcagagat	cagggcaagt	ctcccagtc	tctgctctct	1860
cctctacctg	atagaccagg	acaacatgg	ccacctttac	agatgcagag	atcgacgagc	1920
tatttgagac	aagtggaact	gtcattgaca	acataattac	agcccagggt	aaaccagcag	1980
agactgttgg	aaggagtgc	atcccacaag	gcaagaccaa	ggtgctgagc	gcagcatggg	2040
agaagcatgg	gagcatccag	ccaccggcca	gtcaagacaa	ccccgatcga	caggacagat	2100
ctgacaaaca	accatccaca	cccagacaaa	cgaccccgca	tgacagcccg	ccggccacat	2160
ccgccgacca	gccccccacc	caggccacag	acgaagccgt	cgacacacag	ttcaggaccg	2220
gagcaagcaa	ctctctgctg	ttgatgcttg	acaagctcag	caataaatcg	tccaatgcta	2280
aaaaggggccc	atggtcgagc	ccccaaagagg	ggaatcacca	acgtccgact	caacagcagg	2340
ggagtcaacc	cagtcgcgga	aacagtcagg	aaagaccgca	gaaccaagtc	aaggccgccc	2400
ctggaacca	gggcacagac	gtgaacacag	catatcatgg	acaatgggag	gagtcacaac	2460
tatcagctgg	tgcaaccct	catgctctcc	gatcaaggca	gagccaagac	aatacccttg	2520
tatctcggga	tcatgtccag	ccacctgtag	actttgtgca	agcgatgatg	tctatgatgg	2580
aggcgatatac	acagagagta	agtaaggttg	actatcagct	agatcttgtc	ttgaaacaga	2640
catcctccat	ccctatgatg	cggtccgaaa	tccaacagct	gaaaacatct	gttgacgtca	2700
tggaagccaa	cttgggaatg	atgaagattc	tggatcccgg	ttgtgccaac	atttcatctc	2760
tgagtgatct	acgggcagtt	gcccgatctc	acccggtttt	agtttcaggc	cctggagacc	2820
cctctccta	tgtgacacaa	ggaggcgaaa	tggcacttaa	taaactttcg	caaccagtgc	2880
cacatccate	tgaattgatt	aaacccgcca	ctgcatgcgg	gcctgatata	ggagtggaaa	2940
aggacactgt	ccgtgcattg	atcatgtcac	gccaatgca	cccagttct	tcagccaagc	3000
tcctaagcaa	gttagatgca	gccgggtcga	tcgaggaaat	caggaaaatc	aagcgccttg	3060
ctctaaatgg	ctaattacta	ctgccacacg	tagcgggtcc	ctgtccactc	ggcatcacac	3120
ggaatctgca	ccgagttccc	ccccgcagac	ccaaggtcca	actctccaag	cggcaatcct	3180
ctctcgcttc	ctcagcccca	ctgaatggtc	gcgtaaccgt	aattaatcta	gctacattta	3240
agattaagaa	aaaatacggg	tagaattgga	gtgccccaat	tgtgccaaga	tggactcate	3300
taggacaatt	gggctgtact	ttgattctgc	ccattcttct	agcaacctgt	tagcatttcc	3360
gatcgtccta	caaggcacag	gagatgggaa	gaagcaaadc	gccccgcaat	ataggatcca	3420
gcgccttgac	ttgtggactg	atagtaagga	ggactcagta	ttcatcacca	cctatggatt	3480
catctttcaa	gttggaatg	aagaagccac	tgctggcatg	atcgatgata	aaccaagcg	3540
cgagttactt	tccgctgcga	tgctctgcct	aggaagcgtc	ccaataaccg	gagaccttat	3600
tgagctggca	aggccctgtc	tcactatgat	agtcacatgc	aagaagagtg	caactaatac	3660
tgagagaatg	gtttctcag	tagtgcaggc	acccaagtg	ctgcaaagct	gtagggttgt	3720
ggcaacaaa	tactcatcag	tgaatgcagt	caagcacgtg	aaagcggcag	agaagattcc	3780
cgggagtgga	accctagaat	acaaggtgaa	ctttgtctcc	ttgactgtgg	taccgaagaa	3840
ggatgtctac	aagatcccag	ctgcagtatt	gaaggtttct	ggctcgagtc	tgtacaatct	3900

tgcgctcaat	gtcactatta	atgtggaggt	agacccgagg	agtccttttg	ttaaactctt	3960
gtctaagtct	gacagcggat	actatgctaa	cctcttcttg	catattggac	ttatgaccac	4020
cgtagatagg	aaggggaaga	aagtgacatt	tgacaagctg	gaaaagaaaa	taaggagcct	4080
tgatctatct	gtcgggctca	gtgatgtgct	cgggccttcc	gtgttggtaa	aagcaagagg	4140
tgcacggact	aagcttttgg	cacctttctt	ctctagcagt	gggacagcct	gctatcccat	4200
agcaaatgct	tctcctcagg	tggccaagat	actctggagt	caaaccgcgt	gectgcggag	4260
cgttaaaatc	attatccaag	caggtacca	acgcgctgtc	gcagtgaccg	ccgaccacga	4320
ggttacctct	actaagctgg	agaaggggca	cacccttgcc	aaatacaatc	cttttaagaa	4380
ataagctgcg	tctctgagat	tgcgctccgc	ccactcacc	agatcatcat	gacacaaaa	4440
actaatctgt	cttgattatt	tacagttagt	ttacctgtct	atcaagttag	aaaaaacacg	4500
ggtagaagat	tctggatccc	ggttggcgcc	ctccagggtc	aagatgggct	ccagaccttc	4560
taccaagaac	ccagcaccta	tgatgctgac	tatccgggtt	gcgctggtac	tgagttgcat	4620
ctgtccggca	aactccattg	atggcaggcc	tcttgcaagt	gcaggaattg	tggttacagg	4680
agacaaagcc	gtcaacatat	acacctcctc	ccagacagga	tcaatcatag	ttaagctcct	4740
cccgaatctg	ccaaggata	aggaggcatg	tgcgaaagcc	cccttggatg	catacaacag	4800
gacattgacc	actttgctca	cccccttgg	tgactctatc	cgtaggatag	aagagtctgt	4860
gactacatct	ggagggggga	gacaggggcg	ccttataggc	gccattattg	gcggtgtggc	4920
tcttgggggt	gcaactgccg	cacaaataac	agcggccgca	gctctgatac	aagccaaaca	4980
aatgctgcc	aacatcctcc	gacttaaaga	gagcattgcc	gcaaccaatg	aggctgtgca	5040
tgaggteact	gacggattat	cgcaactagc	agtggcagtt	gggaagatgc	agcagtttgt	5100
taatgaccaa	tttaataaaa	cagctcagga	attagactgc	atcaaaattg	cacagcaagt	5160
tggtgtagag	ctcaacctgt	acctaaccga	attgactaca	gtattcggac	cacaaatcac	5220
ttcacctgct	ttaaacaagc	tgactattca	ggcactttac	aatctagctg	gtggaaatat	5280
ggattactta	ttgactaagt	taggtgtagg	gaacaatcaa	ctcagctcat	taatcggtag	5340
cggcttaate	accggttaacc	ctattctata	cgactcacag	actcaactct	tggttataca	5400
ggtaactcta	ccttcagctg	ggaacctaaa	taatatgcgt	gccacctact	tggaacctt	5460
atccgtaagc	acaaccaggg	gatttgctc	ggcacttgct	cccaaagtgg	tgacacaggt	5520
cggttctgtg	atagaagaac	ttgacacctc	atactgtata	gaaactgact	tagatttata	5580
ttgtacaaga	atagtaacgt	tccctatgtc	ccctggatt	tattcctgct	tgagcggcaa	5640
tacgtcggcc	tgtatgtact	caaagaccga	aggcgcactt	actacacat	acatgactat	5700
caaaggttca	gtcatcgcca	actgcaagat	gacaacatgt	agatgtgtaa	acccccggg	5760
tatcatatcg	caaaactatg	gagaagccgt	gtctctaata	gataaacaat	catgcaatgt	5820
tttatcctta	ggcgggataa	ctttaaggct	cagtggggaa	ttcgatgtaa	cttatcagaa	5880
gaatatctca	atacaagatt	ctcaagtaat	aataacaggc	aatcttgata	tctcaactga	5940
gcttgggaat	gtcaacaact	cgatcagtaa	tgctttgaat	aagttagagg	aaagcaacag	6000
aaaactagac	aaagtcaatg	tcaaactgac	tagcacatct	gctctcatta	cctatatcgt	6060
tttgactatc	atatctcttg	tttttggtat	acttagcctg	attctagcat	gctacctaat	6120
gtacaagcaa	aaggcgcaac	aaaagacctt	attatggctt	gggaataata	ctctagatca	6180
gatgagagcc	actacaaaa	tgtgaacaca	gatgaggaac	gaaggtttcc	ctaatagtaa	6240
tttgtgtgaa	agttctggta	gtctgtcagt	tcagagagtt	aagaaaaaac	taccggttgt	6300
agatgaccaa	aggacgatat	acgggtagaa	cggtaaagaa	ggccgccctt	caattgcgag	6360
ccaggettca	caacctccgt	tctaccgctt	caccgacaac	agtcctcaat	catggaccgc	6420

gccgtagcc	aagttgcgtt	agagaatgat	gaaagagagg	caaaaaatac	atggcgcttg	6480
atattccgga	ttgcaatctt	attcttaaca	gtagtgacct	tggctatatac	tgtagcctcc	6540
cttttatata	gcatgggggc	tagcacacct	agcgatcttg	taggcatacc	gactaggatt	6600
tccagggcag	aagaaaagat	tacatctaca	cttggttcca	atcaagatgt	agtagatagg	6660
atatataagc	aagtggccct	tgagtctccg	ttggcattgt	taaatactga	gaccacaatt	6720
atgaacgcaa	taacatctct	ctcttatcag	attaatggag	ctgcaacaa	cagtgggtgg	6780
ggggcaccta	tccatgacct	agattatata	gggggatag	gcaaagaact	cattgtagat	6840
gatgctagtg	atgtcacatc	attctatccc	tctgcatttc	agaacatct	gaattttatc	6900
ccggcgcta	ctacaggatc	aggttgcact	cgaataccct	catttgacat	gagtgtacc	6960
cattactgct	acaccataa	tgtaatattg	tctggatgca	gagatcactc	acattcatat	7020
cagtatttag	cacttgggtg	gctccggaca	tctgcaacag	ggagggtatt	cttttctact	7080
ctgcgtcca	tcaacctgga	cgacacccaa	aatcggaagt	cttgcaagtgt	gagtgcaact	7140
cccctgggtt	gtgatatgct	gtgctcgaaa	gtcacggaga	cagaggaaga	agattataac	7200
tcagctgtcc	ctacgcgat	ggtacatggg	aggtagggt	tcgacggcca	gtaccacgaa	7260
aaggacctag	atgtcacaac	attattcggg	gactgggtgg	ccaactacc	aggagtaggg	7320
ggtggatctt	ttattgacag	ccgcgatgg	ttctcagtct	acggagggtt	aaaacccaat	7380
tcaccagtg	acactgtaca	ggaagggaaa	tatgtgatat	acaagcgata	caatgacaca	7440
tgcccagatg	agcaagacta	ccagattcga	atggccaagt	cttcgtataa	gcctggacgg	7500
tttgggtgga	aacgcataca	gcaggctatc	ttatctatca	aggtgtcaac	atccttaggc	7560
gaagaccgg	tactgactgt	accgccaac	acagtcacac	tcatgggggc	cgaaggcaga	7620
attctcacag	tagggacatc	tcatttcttg	tatcaacgag	ggtcatcata	cttctctccc	7680
gcgttattat	atcctatgac	agtcagcaac	aaaacagcca	ctcttcatag	tccttataca	7740
ttcaatgcct	tactcggcc	aggtagtatac	ccttgccagg	cttcagcaag	atgccccaac	7800
tcgtgtgta	ctggagtcta	tacagatcca	tatcccctaa	tcttctatag	aaaccacacc	7860
ttgcgagggg	tattcgggac	aatgcttgat	ggtgtacaag	caagacttaa	ccctgcgtct	7920
gcagtattcg	atagcacatc	ccgcagtcgc	attactcgag	tgagttcaag	cagtaccaa	7980
gcagcataca	caacatcaac	ttgttttaaa	gtggcaaga	ctaataagac	ctattgtctc	8040
agcattgctg	aaatatctaa	tactctcttc	ggagaattca	gaatcgtccc	gttactagtt	8100
gagatcctca	aagatgacgg	ggttagagaa	gccaggctctg	gctagttgag	tcaattataa	8160
aggagttgga	aagatggcat	tgtatcacct	atcttctgcg	acatcaagaa	tcaaaccgaa	8220
tgccggcgcg	tgctcgaatt	ccatgttgcc	agttgaccac	aatcagccag	tgctcatgcg	8280
atcagattaa	gccttgatcat	taatctcttg	attaagaaaa	aatgtaagt	gcaatgagat	8340
acaaggcaaa	acagctcatg	gtaaataata	cgggtaggac	atggcgagct	ccggtcctga	8400
aagggcagag	catcagatta	tcctaccaga	gccacacctg	tcttcacat	tggtcaagca	8460
caaactactc	tattactgga	aattaactgg	gctaccgctt	cctgatgaat	gtgacttcga	8520
ccacctcatt	ctcagccgac	aatggaaaa	aatacttgaa	tcggcctctc	ctgatactga	8580
gagaatgata	aaactcggaa	gggcagtaca	ccaaactctt	aaccacaatt	ccagaataac	8640
cggagtgtctc	caccccaggt	gtttagaaca	actggctaata	attgaggtcc	cagattcaac	8700
caacaaattt	cggaagattg	agaagaagat	ccaaattcac	aacacgagat	atggagaact	8760
gttcacaagg	ctgtgtacgc	atatagagaa	gaaactgctg	gggtcatctt	ggtctaacaa	8820
tgtcccccg	tcagaggagt	tcagcagcat	tcgtacggat	ccggcattct	ggtttcactc	8880
aaaatggtcc	acagccaagt	ttgcatggct	ccatataaaa	cagatccaga	ggcatctgat	8940

ggtggcagct	aagacaaggt	ctgcggccaa	caaattggtg	atgctaacc	ataaggtagg	9000
ccaagtcttt	gtcactcctg	aacttgtcgt	tgtgacgcat	acgaatgaga	acaagttcac	9060
atgtcttacc	caggaacttg	tattgatgta	tgcagatatg	atggagggca	gagatatggt	9120
caacataata	tcaaccacgg	cggtgcatct	cagaagctta	tcagagaaaa	ttgatgacat	9180
tttgcggtta	atagacgctc	tggcaaaaga	cttgggtaat	caagtctacg	atgttgatc	9240
actaatggag	ggatttgcac	acggagctgt	ccagctactc	gagccgtcag	gtacatttgc	9300
aggagatttc	ttcgattcca	acctgcagga	gcttaaagac	attctaattg	gcctcctccc	9360
caatgatata	gcagaatccg	tgactcatgc	aatcgctact	gtattctctg	gtttagaaca	9420
gaatcaagca	gctgagatgt	tgtgtctggt	gcgtctgtgg	ggcaccacac	tgcttgagtc	9480
ccgtattgca	gcaaaggcag	tcaggagcca	aatgtgcgca	ccgaaaatgg	tagactttga	9540
tatgatcctt	caggtactgt	ctttcttcaa	gggaacaatc	atcaacgggt	acagaaagaa	9600
gaatgcaggt	gtgtggccgc	gagtcaaagt	ggatacaata	tatgggaagg	tcattgggca	9660
actacatgca	gattcagcag	agatttcaca	cgatatcatg	ttgagagagt	ataagagttt	9720
atctgcactt	gaatttgagc	catgtataga	atatgaccct	gtcaccaacc	tgagcatggt	9780
cctaaaagac	aaggcaatcg	cacaccccaa	cgataattgg	cttgccctcgt	ttaggcggaa	9840
ccttctctcc	gaagaccaga	agaaacatgt	aaaagaagca	acttcgacta	atcgctctct	9900
gatagagttt	ttagagtcaa	atgattttga	tccatataaa	gagatggaat	atctgacgac	9960
ccttgagtac	cttagagatg	acaatgtggc	agtatcatac	tcgctcaagg	agaaggaagt	10020
gaaagttaat	ggacggatct	tcgctaagct	gacaaagaag	ttaaggaact	gtcaggtgat	10080
ggcggaaagg	atcctagccg	atcagattgc	acctttcttt	cagggaaatg	gagtcattca	10140
ggatagcata	tccttgacca	agagtatgct	agcgatgagt	caactgtctt	ttaacagcaa	10200
taagaaacgt	atcactgact	gtaaagaaa	agtatcttca	aaccgcaatc	atgatccgaa	10260
aagcaagaac	cgctggagag	ttgcaacctt	cataacaact	gacctgcaa	agtactgtct	10320
taattggaga	tatcagacaa	tcaaattggt	cgctcatgcc	atcaatcagt	tgatgggctt	10380
acctcacttc	ttcgaatgga	ttcacctaag	actgatggac	actacgatgt	tcgtaggaga	10440
ccctttcaat	cctccaagtg	accctactga	ctgtgacctc	tcaagagtcc	ctaatgatga	10500
catatatatt	gtcagtgcca	gagggggtat	cgaaggatta	tgccagaagc	tatggacaat	10560
gatctcaatt	gctgcaatcc	aacttgtctg	agctagatcg	cattgtcgtg	ttgcctgtat	10620
ggtacagggt	gataatcaag	taatagcagt	aacgagagag	gtaagatcag	acgactctcc	10680
ggagatgggt	ttgacacagt	tgcatcaagc	cagtgataat	ttcttcaagg	aattaattca	10740
tgtcaatcat	ttgattggcc	ataatttgaa	ggatcgtgaa	accatcaggt	cagacacatt	10800
cttcatatac	agcaaacgaa	tcttcaaaga	tggagcaatc	ctcagtcaag	tctcaaaaa	10860
ttcatctaaa	ttagtgtctag	tgtcaggtga	tctcagtgaa	aacaccgtaa	tgctctgtgc	10920
caacattgcc	tctactgtag	cacggctatg	cgagaacggg	cttcccaaag	acttctgtta	10980
ctattttaa	ctatataatga	gttgtgtgca	gacatacttt	gactctgagt	tctccatcac	11040
caacaattcg	caccccgatc	ttaatcagtc	gtggattgag	gacatctctt	ttgtgcactc	11100
atatgttctg	actcctgccc	aattaggggg	actgagtaac	cttcaatact	caaggctcta	11160
cactagaaat	atcggtgacc	cggggactac	tgcttttgca	gagatcaagc	gactagaagc	11220
agtgggatta	ctgagtccta	acattatgac	taatatctta	actaggccgc	ctgggaatgg	11280
agattgggcc	agtctgtgca	acgaccata	ctctttcaat	tttgagactg	ttgcaagccc	11340
aaatattggt	cttaagaaac	atacgcaaag	agtcctatit	gaaacttggt	caaatccctt	11400
attgtctgga	gtgcacacag	aggataatga	ggcagaagag	aaggcattgg	ctgaattctt	11460



gcttaatcaa	gaggtgattc	atccccgcgt	tgcgcatgcc	atcatggagg	caagetctgt	11520
aggtaggaga	aagcaaattc	aagggcttgt	tgacacaaca	aacaccgtaa	ttaagattgc	11580
gcttactagg	aggccattag	gcatcaagag	gctgatgcgg	atagtcaatt	attctagcat	11640
gcatgcaatg	ctgttttagag	acgatgtttt	ttcctccagt	agatccaacc	acccttagt	11700
ctcttcta	atgtgttctc	tgacactggc	agactatgca	cggaaataga	gctggtcacc	11760
tttgacggga	ggcaggaaaa	tactgggtgt	atctaactct	gatacgatag	aactcgtaga	11820
gggtgagatt	cttagtgtaa	gcggagggtg	tacaagatgt	gacagcggag	atgaacaatt	11880
tacttggttc	catcttccaa	gcaatataga	attgaccgat	gacaccagca	agaatcctcc	11940
gatgagggtg	ccatatctcg	ggcaaaagac	acaggagagg	agagctgcct	cacttgcaaa	12000
aatagctcat	atgtcgccac	atgtaaaggc	tgccctaagg	gcatcatccg	tgttgatctg	12060
ggcttatggg	gataatgaag	taaattggac	tgctgctctt	acgattgcaa	aatctcgggtg	12120
taatgtaa	cttagagtac	ttcgggtact	gtccccctta	cccacggctg	ggaatcttca	12180
acatagacta	gatgatggta	taactcagat	gacattcacc	cctgcatctc	tctacaggtg	12240
tcacettaca	ttcacatata	caatgattct	caaaggctgt	tactgaaga	aggagtcaaa	12300
gaggggaatg	tggtttacca	acagagtcac	gctcttgggt	ttatctctaa	tcgaatcgat	12360
cttccaatg	acaacaacca	ggacatatga	tgagatcaca	ctgcacctac	atagtaaatt	12420
tagttgctgt	atcagagaag	cacctgttgc	ggttcctttc	gagctacttg	gggtggtacc	12480
ggaactgagg	acagtgcact	caaataagtt	tatgtatgat	cctagccctg	tatcggaggg	12540
agactttgcg	agacttgact	tagctatctt	caagagttat	gagcttaatc	tggagtcata	12600
tcccacgata	gagctaatga	acattctttc	aatatccagc	gggaagttga	ttggccagtc	12660
tgtggtttct	tatgatgaag	atacctccat	aaagaatgac	gccataatag	tgtatgacaa	12720
taccgaaat	tggatcagtg	aagctcagaa	ttcagatgtg	gtccgcctat	ttgaatatgc	12780
agcacttgaa	gtgctcctcg	actgttctta	ccaactctat	tacctgagag	taagaggcct	12840
agacaatatt	gtcttatata	tgggtgattt	atacaagaat	atgccaggaa	ttctactttc	12900
caacattgca	gctacaatat	ctcateccgt	cattcattca	aggttacatg	cagtgggcct	12960
ggtcaaccat	gacggatcac	accaacttgc	agatacggat	ttatcgaaa	tgtctgcaaa	13020
actattagta	tcttgcacc	gacgtgtgat	ctccggctta	tattcaggaa	ataagtatga	13080
tctgctgttc	ccatctgtct	tagatgataa	cctgaatgag	aagatgcttc	agctgatata	13140
ccggttatgc	tgtctgtaca	cggactctt	tgctacaaca	agagaaatcc	cgaaaataag	13200
aggcttaact	gcagaagaga	aatgttcaat	actcactgag	tatttactgt	cggatgctgt	13260
gaaaccatta	cttagccccg	atcaagtgag	ctctatcatg	tctcctaaca	taattacatt	13320
cccagctaat	ctgtactaca	tgtctcggaa	gagcctcaat	ttgatcaggg	aaagggagga	13380
cagggatact	atcctggcgt	tgttgttccc	ccaagagcca	ttattagagt	tccttctgt	13440
gcaagatatt	ggtgctcgag	tgaaagatcc	attcaccoga	caacctgcgg	catttttgca	13500
agagttagat	ttgagtgtc	cagcaaggta	tgacgcattc	acacttagtc	agattcatcc	13560
tgaactcaca	tctccaaatc	cggaggaaga	ctacttagta	cgatacttgt	tcagagggat	13620
agggactgca	tcttctctt	ggtataaggc	atctcatctc	ctttctgtac	ccgaggtaag	13680
atgtgcaaga	cacgggaact	ccttatactt	agctgaaggg	agcggagcca	tcatgagtct	13740
tctcgaactg	catgtaccac	atgaaactat	ctattacaat	acgctctttt	caaatgagat	13800
gaacccccg	caacgacatt	tcgggcccac	cccaactcag	tttttgaatt	cggttgttta	13860
taggaatcta	caggcggagg	taacatgcaa	agatggattt	gtccaagagt	tcctccatt	13920
atggagagaa	aatacagagg	aaagtgcact	gacctcagat	aaagcagtgg	ggtatattac	13980

atctgcagtg	ccctacagat	ctgtatcatt	gctgcattgt	gacattgaaa	ttcctccagg	14040
gtccaatcaa	agcttactag	atcaactagc	tatcaattta	tctctgattg	ccatgcattc	14100
tgtaagggag	ggcgggtag	taatcatcaa	agtgtttgat	gcaatgggat	actactttca	14160
tctactcatg	aacttgtttg	ctccgtgttc	cacaaaagga	tatattctct	ctaattggta	14220
tgcattgtcga	ggagatatgg	agtgtttacct	ggtattttgtc	atgggttacc	tgggcggggcc	14280
tacatttgta	catgagggtg	tgaggatggc	aaaaactctg	gtgcagcggc	acggtagcgt	14340
cttgtctaaa	tcagatgaga	tcacactgac	caggttattc	acctcacagc	ggcagcgtgt	14400
gacagacatc	ctatccagtc	ctttaccaag	attaataaag	tacttgagga	agaatattga	14460
cactgcgctg	attgaagccg	ggggacagcc	cgctccgtcca	ttctgtgcgg	agagtctggt	14520
gagcagccta	gcgaacataa	ctcagataac	ccagattatc	gctagtcaca	ttgacacagt	14580
tatccggctct	gtgatataata	tggaagctga	gggtgatctc	gctgacacag	tatttctatt	14640
tacccttac	aatctctcta	ctgacgggaa	aaagaggaca	tcacttatac	agtgcacgag	14700
acagatccta	gaggttacia	tactaggctc	tagagtcgaa	aatctcaata	aaataggcga	14760
tataatcagc	ctagtgttta	aaggcatgat	ctccatggag	gaccttatcc	cactaaggac	14820
atacttgaag	catagtacct	gccctaaata	tttgaaggct	gtcctaggta	ttaccaaact	14880
caaagaaatg	tttacagaca	cttctgtatt	gtacttgact	cgctgctcaac	aaaaattcta	14940
catgaaaact	ataggcaatg	cagtcaaagg	atattacagt	aactgtgact	cttaacgaaa	15000
atcacatatt	aataggctcc	ttttttggcc	aattgtattc	ttgttgattt	aatcatatta	15060
tgtagaaaa	aagttgaacc	ctgactcctt	aggactcgaa	ttcgaactca	aataaatgtc	15120
ttaaaaaaag	gttgcgcaca	attattcttg	agtgtagtct	cgctattcac	caaatctttg	15180
tttgggt						15186

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;1611

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;传染性支气管炎病毒 (IBV)

&lt;400&gt;4

atgtttggtaa	cacctctttt	actagtgact	cttttgtgtg	cactatgtag	tgctgctttg	60
tatgacagta	gttcttacgt	gtactactac	caaagtgcct	tcagaccacc	tgatggttgg	120
catttacatg	ggggtgcgta	tgcggttggt	aatatttcta	gtgaatctaa	taatgcaggc	180
tcttcatctg	ggtgtactgt	tggtattatt	catggtggtc	gtgttgttaa	tgcttcttct	240
atagctatga	cggcaccgtc	atcaggtatg	gcttgggtcta	gcagtcagtt	ttgtactgca	300
tactgtaact	tttcagatac	tacagtgttt	gttacacatt	gttacaaaca	tgttgggtgt	360
cctataactg	gcattgcttca	acagcattct	atacgtgttt	ctgctatgaa	aaatggccag	420
cttttttata	atttaacagt	tagtgtagct	aagtacccta	cttttaaatc	atttcagtgt	480
gtaataaatt	taacatccgt	atatttaaat	ggtgatcttg	tttacacctc	taatgagacc	540
acagatgtta	catctgcagg	tgtttatttt	aaagctgggtg	gacctataac	ttataaagtt	600
atgagagaag	ttagagccct	ggcttatttt	gttaatggta	ctgcacaaga	tgttattttg	660
tgtgatgggt	cacctagagg	cttgtagca	tgccagtata	atactggcaa	tttttcagat	720
ggcttttatac	cttttactaa	tagtagttta	gttaagcaga	agttttattgt	ctatcgtgaa	780

aatagtgtta	atactacttt	tacgttacac	aatttcactt	ttcataatga	gactggcgcc	840
aacccaaatc	ctagtgggtg	ccagaatatt	caaacttacc	aaacacaaac	agctcagagt	900
ggttattata	atttttaattt	ttcctttctg	agtagttttg	tttataagga	gtctaatttt	960
atgtatggat	cttatcacc	aagttgta	tttagactag	aaactattaa	taatggtttg	1020
tggtttaatt	cactttcagt	ttcaattgct	tacggctctc	ttcaagggtg	ttgcaagcaa	1080
tctgtcttta	gtggtagagc	aacctgttgt	tatgcttact	catatggagg	tcctttgctg	1140
tgtaaagggtg	tttattcagg	tgagttagat	cataattttg	aatgtggact	gttagtttat	1200
gttactaaga	gcggtggctc	tcgtatacaa	acagccactg	aaccgccagt	tataactcaa	1260
cacaattata	ataatattac	tttaaatact	tgtgttgatt	ataatatata	tggcagaact	1320
ggccaagggtt	ttattactaa	tgtaaccgac	tcagctgtta	gttataatta	tctagcagac	1380
gcaggtttgg	ctattttaga	tacatctggt	tccatagaca	tctttgtcgt	acaaagtga	1440
tatggtctta	attattataa	ggttaaccct	tgcaagatg	tcaaccagca	gtttgtagtt	1500
tctggtggta	aattagtagg	tattcttact	tcacgtaatg	agactggttc	ccagettctt	1560
gagaatcagt	tttacaatcaa	aatcactaat	ggaacacgctc	gttttagacg	t	1611

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;960

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;传染性喉气管炎病毒(ILTV)

&lt;400&gt;5

ggaggggaga	gagacaactt	cagctcgaag	tctgaagaga	catcatgagc	ggcttcagta	60
acataggatc	gattgccacc	gtttccctag	tatgctcgct	tttgtgcgca	tctgtattag	120
gggcgccggt	actggacggg	ctcgagtcga	gccctttccc	gttcgggggc	aaaattatag	180
cccaggcgtg	caaccgcacc	acgattgagg	tgacgggtccc	gtggagcgac	tactctggtc	240
gcaccgaagg	agtgtcagtc	gaggtgaaat	ggttctacgg	gaatagtaat	ccgaaagct	300
tcgtgttcgg	ggtggatagc	gaaacgggca	gtggacacga	ggacctgtct	acgtgctggg	360
ctctaatacca	taatctgaac	gcgtctgtgt	gcagggcgctc	tgacgccggg	atacctgatt	420
tcgacaagca	gtgcgaaaaa	gtgcagagaa	gactgcgctc	cggggtggaa	cttggtagtt	480
acgtgtctgg	caatggatcc	ctggtgctgt	accagggat	gtacgatgcc	ggcatctacg	540
cctaccagct	ctcagtgggt	gggaaggat	ataccgggtc	tgtttatcta	gacgtcggac	600
caaaccgccg	atgccacgac	cagtatgggt	acacctatta	cagcctggcc	gacgaggcgt	660
cagacttatac	atcttatgac	gtagcctcgc	ccgaactcga	cggtcctatg	gaggaagatt	720
attccaattg	tctagacatg	ccccgctac	gcccattggac	aaccgtttgt	tcgcatgacg	780
tcgaggagca	gaaaacgcc	acggacgagc	tttacctatg	ggacgaggaa	tgcccggtc	840
cgctggacga	gtacgtcgac	gaaaggtcag	agacgatgcc	caggatggtt	gtcttttcac	900
cgccctctac	gctccagcag	tagccaccg	agagtgtttt	ttgtgagcgc	ccacgcaaca	960

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;810

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;禽脑脊髓炎病毒(AEV)

&lt;400&gt;6

```

gggaaagagg atgaaggagg atttttcagt gtgcctgaag tggagcaaca tgttgttgag      60
gataaggaac cacagggacc tttgcacgtg acaccttttg gcgctgttaa agctatggag      120
gacccccaat tggccaggaa aacacctggc acattccctg aattagctcc tggtaaacct      180
cgacatacag tggaccacat ggatctgtat aagttcatgg ggcgtgccca ttacttgtgg      240
ggacatgaat tcaccaaaac tgacatgcag tacacattcc agataccatt aagtcccatt      300
aaagagggtt ttgtgacggg tacacttagg tggtttttaa gtcttttcca actgtatcgt      360
ggttctctcg acattacat gacatttgca ggaaaaacta atgtggatgg cattgtgtac      420
tttgtgcctg aggggtgttg gatagagact gagaggagg agcagacccc tttgctcaca      480
ttgaactata aaacatcggg aggtgccatt aggtttaata ctggacaaac tacgaatgtc      540
cagtttagga tccctttcta cacgccactg gaacacatcg caaccattc taaaaatgcg      600
atggattcag tcttgggggc aatcacaacc cagatcacta actatagtgc tcaggatgag      660
tatttgcagg ttacctacta catcagtttc aatgaagatt cacagttttc tgttcccaga      720
gcggtgccag tggtcagctc attcactgac acatctagca aaacagtgat gaatacatat      780
tggcttgatg atgacgagtt ggtagaagag                                     810

```

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;726

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;禽脑脊髓炎病毒(AEV)

&lt;400&gt;7

```

atgagcaaac tattttctac tgtaggcagg actgttgatg aggttttgtc tgtgctcaat      60
gatgaggata ctgaatccta tgctggccct gatcgcactg cagtagttgg cggaggattt      120
ctgacaacgg tagaccagag ttcagttagc acggctacaa tgggaagttt acaagatgta      180
cagtacagga ctgcagtcga tattcctggg tctagagtga cacaaggtga gaggttcttc      240
cttatcgatc agcgtgagtg gaactcaaca cagagtgaat ggtagttatt gggcaagatt      300
gacatagtaa aagagctgct tgatcagtcg tatgctgttg atggcctttt gaagtacat      360
tcttatgcaa ggtttggctt ggatgtcatt gttcagatta atccaacatc attccaggca      420
gggggcctca tagcagctct cgtacctat gaccaggttg acattgaatc aattgttgcc      480
atgaccactt attgccatgg caaggttaat tgcaacataa actacgttgt aaggatgaag      540
gtgcatata tatacagtcg aggttgttac aaccttagga actcagcata ctccatttgg      600
atgcttgtga taagagtgtg gtcacggctg cagttgggat ctggcacttc aacacagatt      660
actatcacca ccttggttag gtttgtggat ttggaactgc atggacttag ccctttggtc      720
gcacag                                     726

```

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;735

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;禽脑脊髓炎病毒(AEV)

&lt;400&gt;8

atgatgcgca	acgaatttcg	actgtcgtca	tctagcaaca	ttgtcaattt	ggctaattat	60
gacgatgcaa	gagccaaagt	gtctctagcg	ctgggacaag	aagagttttc	cagagactcg	120
tcaagtaccg	ggggggaatt	ggtgcatcat	ttttcacagt	ggacgtccat	tccgtgcctt	180
gccttcactt	ttacattccc	cggcacggta	gggccaggca	ctcacatctg	gtcaaccacg	240
gtggaccctt	tttccgtgaa	cttgagggcg	tctagcactg	tgcacccac	taacttgagc	300
tcgattgcbg	gtatgttctg	tttttggaga	ggtgacattg	tatttgagtt	tcaagtcttt	360
tgcaccaagt	atcattccgg	caggttgatg	tttgtgtatg	tgcttggcga	tgaaaacaca	420
aaaatcagca	ccttaactgc	aaaacaagca	tctactggtc	ttactgctgt	ttttgatatc	480
aatgggtgaa	attcaacact	ggtgtttaga	tgccctttca	tctctgacac	accttacagg	540
gtgaatccaa	cgactcataa	gtccctctgg	ccttatgcaa	ctggcaagct	tgtgtgctat	600
gtctacaata	tactgaacgc	acctgccagt	gtatcaccaa	ccctgcccat	taatgtgtac	660
aaaagtgctg	cggatctgga	gttgtatgca	cctgtttatg	gggtttctcc	caccaacacc	720
tcaatTTTTG	ttcaa					735

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;1500

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;禽副流感病毒(APV)

&lt;400&gt;9

ggggggtgtg	catggtaggg	tggggaaggt	agccaattcc	tgcccattgg	gccgaccgta	60
ccaagagaag	tcaacagaag	tatagatgca	gggcgacatg	gagggtagcc	gtgataacct	120
cacagtagat	gatgaattaa	agacaacatg	gaggttagct	tatagagttg	tatccctcct	180
attgatggtg	agtgccttga	taatctctat	agtaatcctg	acgagagata	acagccaaag	240
cataatcacg	gcgatcaacc	agtcgtatga	cgcagactca	aagtggcaaa	cagggataga	300
agggaaaatc	acctcaatca	tgactgatac	gctcgatacc	aggaatgcag	ctcttctcca	360
cattccactc	cagctcaata	cacttgaggc	aaacctgttg	tccgccctcg	gaggttacac	420
gggaattggc	cccggagatc	tagagcactg	tcgttatccg	gttcatgact	ccgcttacct	480
gcatggagtc	aatcgattac	tcatcaatca	aacagctgac	tacacagcag	aaggccccct	540
ggatcatgtg	aacttcattc	cggcaccagt	tacgactact	ggatgcacaa	ggatcccac	600
cttttctgta	tcatcatcca	tttgggtgta	tacacacaat	gtgattgaaa	caggttgcaa	660
tgaccactca	ggtagtaatc	aatatatcag	tatgggggtg	attaagaggg	ctggcaacgg	720
cttaccttac	ttctcaacag	tcgtgagtaa	gtatctgacc	gatgggttga	atagaaaaag	780
ctgttccgta	gctgcgggat	ccgggcattg	ttacctcctt	tgtagcctag	tgctcagagcc	840
cgaacctgat	gactatgtgt	caccagatcc	cacaccgatg	aggttagggg	tgctaacaag	900
ggatgggtct	tacactgaac	aggtggtacc	cgaagaata	ttaagaaca	tatggagcgc	960

aaactaccct	ggggtagggt	caggtgctat	agcaggaaat	aaggtgttat	tcccatttta	1020
cggcggagtg	aagaatggat	caaccctga	ggtgatgaat	agggaagat	attactacat	1080
ccaggatcca	aatgactatt	gccctgacc	gctgcaagat	cagatcttaa	gggcagaaca	1140
atcgtattat	cctactcgat	ttggtaggag	gatggtaatg	cagggagtcc	taacatgtcc	1200
agtatccaac	aattcaaca	tagccagcca	atgccaatct	tactatttca	acaactcatt	1260
aggattcatc	ggggcggaat	ctaggatcta	ttacctcaat	ggtaacattt	acctttatca	1320
aagaagctcg	agctgggtgc	ctcaccceca	aatttaccta	cttgattcca	ggattgcaag	1380
tccgggtacg	cagaacattg	actcaggcgt	taacctcaag	atgttaaagt	ttactgtcat	1440
tacacgacca	tcactggct	tttgtaatag	tcagtcgaaga	tgccctaagt	actgcttatt	1500

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt;1440

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;出血性肠炎病毒(HEV)

&lt;400&gt;10

gaaatgttaa	tgtagacca	tactgacca	ttcctggttc	atthtagatg	gaatcttcca	60
acactgccac	tagaattttt	gctccaacgg	aaggagaaa	cagtataatt	tacagcaact	120
tgcctcctgt	tcaagataca	acaaaatat	tttatataga	taacaaggcc	attgatatag	180
agtcatataa	tcaagagaaa	gatcattcta	attattatac	taatataatt	caaacacaga	240
acatttcaac	tattgattca	agtatacagc	aaattcagtt	agatgaaagg	tctagatggg	300
gaggagaact	acatacaagc	ttagtaacat	ctgttatgaa	ttgtactaaa	cattttaatt	360
cagataggtg	tttagtgaaa	attcagacta	ttaagagtcc	acctacattt	gaatggaaag	420
aattgaaaat	acctgaggga	aactatgttt	taaagagtt	tattgattta	ttaaataag	480
gtattacttc	tttatacctt	cagtatggca	ggcaacaggg	tgtacttgaa	gaagacatag	540
gaataaaatt	tgatactcgc	aattttgaaa	ttggtaaaga	tccaactact	aatcttgta	600
ctcctggtaa	atacttgttt	aagggttatc	atgctgatat	aatacttctt	cctggttggg	660
ctattgattt	ttctttttct	agattgggta	acattttagg	tattagaaaa	cgtgagactt	720
ataaagctgg	ctttttgatt	gaatatgatg	acttgacaaa	tggtaatatt	ccaccactgt	780
tggatgttgc	taactataag	tctacaagtc	aagctaaacc	attattacag	gatccatctg	840
gcagatctta	ccacgttatg	gatagtgatt	ctaacagacc	tgtgactgca	tataggtctt	900
ttgttttgtc	atataacaat	gaagggtctg	caaaattaa	gtttttgatg	tgtatgagtg	960
atataacggg	gggtctcaat	cagctgtatt	gggtttgcc	tgattcttat	aaaccgccag	1020
tatcttttaa	gcaagaaacg	caagtagata	aactgcctgt	tgttggtatg	caactttttt	1080
tcctttttgt	ttgtaaactc	gtgtattctg	gtgctgctgt	ttacacacag	ttaattgaac	1140
agcagactaa	tttgacacaa	atthttaaca	gatttcatga	taatgaaatt	ttaaaacaag	1200
ctccatattg	gaatcaagtt	ttattggctg	aaaatgtgcc	cataaatggt	aatcagggaa	1260
caataccaat	atthtcaact	cttcaggag	tacagagagt	ggttgtggaa	gacgatagga	1320
gaagaactgt	accctacgtt	accaagtcac	ttgctacagt	atatccgaag	gttttgtcta	1380
gcaaaacttt	gcaataatgc	attctgttgt	ttattctcca	ggggacagta	gaggatgggg	1440

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt;2995

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;禽痘病毒(FPV)

&lt;400&gt;11

ctcttaattc gtttcaaaaa tgggaaatat ttttaagcct attccaaagg cggattatca	60
gattgtggaa acagtaccac aaagcttaac agctattaat tctactaatc tttctactta	120
tgaatgtttt aaacgtttta tagatctagc aaaaaagag atctacatag ctacgttttg	180
ttgtaacctt agtactaatc ctgagggtac tgacatacta aacagattaa tcgatgtttc	240
gagtaaagtt tctgtatata ttttagtaga tgagagcagt cctcataaag attatgaaaa	300
gattaagtct tcccatatta gttatattaa agtagatata ggtgtgctta ataataatc	360
agtaggaaac ttgttaggta atttctgggt agtgataag cttcactttt atataggtag	420
tgcgtctctt atgggaaatg cgctaacaac tattaanaat atgggcatat attccgaaaa	480
taattcttta gcaatggatt tatatttcag atcgttggac tataanaata taagcaagaa	540
aaaatgttta ttctttacca gaatggccac aaagtaccat ttcttcaaaa accataacgg	600
tatattcttt tcagattctc cagaacatat ggtagtaga aaaagaactt ttgacttggg	660
ttgtgttatt cattatatag acgcggcgaa gtctactata gatctagcga tagtatctct	720
tcttcctaca aagagaacaa aagattctat cgtctattgg cctataataa aagatgcatt	780
aatacgggcc gtattagaac gaggtgtcaa actacgagtg ctattaggat ttggaaaaa	840
aacggatggt atatcaaaag catctataaa aagccttaac gaactaggag ttgaccatat	900
agatatctct actaaagtat ttaggtttcc cgtaattctt aaagtagatg atattaataa	960
ttctaaaatg atgattatag atggaaggta tgctcatggt atgactgcta acctagacgg	1020
gtctcatttt aatcacctag cttttgtag ctttaactgt atggatcaac aatttcaaaa	1080
gaaaatagct gaagtgtttg aaaggactg gatatctctt tacgcaaaag aaatagatat	1140
gtctcaaata tagtatatat gataaaaaga tctaataaa taaatatagc atggcactaa	1200
tagaacagtt acaatcttct gaacaatcaa tactttcacc gtttagatat tatggtttta	1260
aagattttca taatgtaatt tttaccacaa tagatgacga aacattaata gtaattacag	1320
tcaacaatgt accattagta actagggtta taacgtttga aaaaataaca ttttttagat	1380
cgtttaatag tacttgtatt ataacttcca acaataattc ggatattgat acagatactt	1440
attttatacc aaattcggtt tcaactactag atattttgaa gaaaagagca tatgatgtag	1500
aactaagaga tctatcattt gctataatgt cggaaatgaa taacgatgaa ttgagaaata	1560
gtgatattgt atctctaaac aaatggctac ataagcataa ttactagac tacaatttag	1620
tactaataag tgatatcgat agaagatata aattatacaa taaaaaaaaat acaataattg	1680
atgttatatc cgtaaattgg agaaattata atatattgggt taaagatggt atagaatatt	1740
attcaccgga aacttaaga tggctatag atattaaaag agccacagaa agtaataact	1800
ggttaccgta tagccagtct ataaaccctt tgaatgaaaa tatatacgct tttgaattta	1860
tagctacttt agaaagatcc aatgagcgct taaatatcgg agcgatattc ctgtatccgg	1920
atataataat tacaggtaga aacaacgaag atataataga aaagttttta gatcagttag	1980
aagaagtaat atataaaaa aattctgata gtattgtttt aacaggttat catctaacat	2040
ttttagagaa tactatttta gagagatata tcagtaagta taaagactgg atttttacat	2100

gtaatcgtct	agtacattgt	aaaaccggca	ctgaagtatt	cttattttgat	gccgctatat	2160
tttttccatc	ctctaataag	aaaggatag	taaaacattg	gacaggtaaa	aaattaaatt	2220
ttaaaaactt	tttccaaaa	gatagtcagc	tagaaaaata	cataaataat	aacagtgtag	2280
cagaacgtat	atattattta	cagtcttctt	tacacaagca	tatatcctgt	ctaatagaaa	2340
ttttcgagtt	aaatggattt	gattttaatt	tttctgggtt	gtagatata	cttattttca	2400
gtattcgtgt	taagaataat	aatggtaatt	actattacc	tAACattct	tcagctgtga	2460
atttgatggt	gtcatctatt	tacacggact	attatgctat	tgatgatata	gataaagata	2520
gtaagaaact	tgtttttaac	tctatttttc	ctttaataat	ggaaggatat	taccctgaag	2580
gaaaacctta	ttatacga	acacccaaag	aagggtattt	gtcaatatgt	ttatgtgatg	2640
tagaaatata	taatgatata	aagaatccta	tattgtattg	tAAgaaaac	aagtcagcta	2700
ggaagtttac	aggagtattc	acatctgtag	atatagatac	cgctgtaaaa	ctaagaggat	2760
ataaaattaa	aatattagaa	tgtattgaat	ggcctaataa	aataaaatta	ttcgacaata	2820
tatgttatct	gaataaatta	tttatagaac	atcaggatta	cacacacgat	gaaaaatctt	2880
tacaaggcta	tcttttttct	tatttactta	aaggcaacgt	taccgaagat	gttttagcta	2940
tgaaaagttg	tagaaataat	ctttctataa	tatcatttat	aataagttac	tgacg	2995

<210>12

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>PCR 引物, IBS1F'

<400>12

cgggatccgc cgccgcatg ttggtaacac ctctt

35

<210>13

<211>29

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>PCR 引物, IBS1R'

<400>13

cggaattctt aacgtctaaa acgacgtgt

29

<210>14



<211>38	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物, NDF F'	
<400>14	
cgggatccgc cgccgcatg ggctccagac cttctacc	38
<210>15	
<211>34	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物, NDF R'	
<400>15	
ccgctcagat tacatTTTTg tagtggctct catt	34
<210>16	
<211>39	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物, NDHN F'	
<400>16	
cgggatccgc cgccgcatg gaccgcccg ttaggcaag	39
<210>17	
<211>29	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>PCR 引物, NDHN R'	

---

<400>17  
gctctagatt actcaactag ccagacctg 29

<210>18  
<211>35  
<212>DNA  
<213>人工序列

<220>  
<223>PCR 引物, IBDVP2 F'

<400>18  
cgggatccgc cgccgcatg acaaacctgc aagat 35

<210>19  
<211>29  
<212>DNA  
<213>人工序列

<220>  
<223>PCR 引物, IBDVP2 R'

<400>19  
cggaattctt accttatggc ccgattat 29