



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102335424 B

(45) 授权公告日 2013.12.04

(21) 申请号 201110273911.8

(22) 申请日 2007.08.22

(62) 分案原申请数据

200710055986.2 2007.08.22

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院  
军事兽医研究所

地址 130000 吉林省长春市净月经济开发区  
柳莺西路 666 号

(72) 发明人 扈荣良 张守峰 刘晔 李忠

(74) 专利代理机构 长春众益专利商标事务所  
(普通合伙) 22211

代理人 赵正

(51) Int. Cl.

A61K 39/205(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1718242 A, 2006.01.11,

CN 1827172 A, 2006.09.06,

CN 1147837 A, 1997.04.16,

赵忠鹏等. 表达狂犬病毒糖蛋白抗原的  
重组犬 2 型腺病毒的构建及鉴定. 《微生物学

报》. 2007, 第 47 卷 (第 2 期), 335-339.

王永志. 表达狂犬病病毒糖蛋白膜外区重组  
犬 2 型腺病毒的构建及其免疫原性研究. 《微  
生物学报》. 2005, 第 45 卷 (第 2 期), 213-217.

Robert A. Meulenbroek 等. Use of  
adenovirus protein IX (pIX) to display  
large polypeptides on the virion—  
generation of fluorescent virus through  
the incorporation of pIX-GFP. 《Molecular  
Therapy》. 2004, 第 9 卷 (第 4 期), 617-624.

S Kurashi 等. Characterization of  
capsid-modified adenovirus vectors  
containing heterologous peptides in the  
fiber knob, protein IX, or hexon. 《Gene  
Therapy》. 2006, 第 14 卷 (第 3 期), 266-274.

审查员 高巍

权利要求书1页 说明书15页

序列表8页

(54) 发明名称

利用 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗原的  
犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗

(57) 摘要

一种利用 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗  
原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗, 涉及利用犬  
II 型腺病毒不同结构蛋白的特性, 分别展示狂犬  
病病毒保护性抗原或抗原表位的重组疫苗, 在其  
结构蛋白基因的疏水性位点利用 IX 蛋白插入狂  
犬病病毒保护性抗原基因或表达抗原表位的核苷  
酸序列, 使外源抗原或表位在腺病毒表面与其结  
构蛋白融合表达。本发明重组疫苗攻毒后对试验  
动物进行封闭隔离饲养, 观察并记录试验动物的  
采食和发病情况, 结果显示, 口服和肌肉注射任何  
CN 一种重组疫苗的犬均可抵抗强毒的攻击, 存活率  
在 90% 以上。

1. 一种利用 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗, 其特征在于: 以犬 II 型腺病毒为载体, 在其 IX 蛋白基因内的限制性内切酶 Ase I 位点插入狂犬病病毒糖蛋白膜外区的基因和 SV40 病毒多聚 A 转录终止信号, 使 IX 蛋白与糖蛋白膜外区利用同一转录阅读框在腺病毒颗粒外表面融合表达。

2. 根据权利要求 1 所述的重组疫苗, 其特征在于: 利用 pPOLYII-CAV2 中两个单一酶切位点 EcoR I 和 Cla I 得到含 IX 蛋白基因的大片段, 将其克隆入 pBluescriptII KS (+/-) 载体, 获得重组质粒 pBS-LIX, 再利用 pBS-LIX 中大片段的两个单一酶切位点 Mlu I 与 EcoR I 得到含 IX 蛋白基因的小片段, 将其克隆入 pEGFP-C1 载体, 获得重组质粒 pEGFP-SIX, 然后, 在 IX 蛋白终止密码子处, 利用其自身的酶切位点 Ase I 插入狂犬病病毒糖蛋白膜外区基因与 SV40 多聚 A 转录终止序列, 实现 IX 蛋白与糖蛋白膜外区融合表达, 最后, 按照上述路线, 反向克隆获得重组犬 II 型腺病毒全基因组。

3. 根据权利要求 1 所述的重组疫苗, 其特征在于: 所述的狂犬病病毒糖蛋白膜外区基因序列为:

GGCCCAAATTCCCTATTACACGATACCGACACACTGGTCCCTGGAGACCGATCGATATACATCATCTCA  
GTTGCCAAACAATTGGTTGTGGAGGATGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTCTCCTACATGGAACCTAAAGTT  
GGACACATCTCAGCCATAAAGGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGCGTTGTGACAGAGGCAGAACCGTACACTAACTT  
TGTGGTTATGTCACCACCGTCAAAAGAAAGCATTCCGCCAACACCAGATGCATGTAGAGCCCGTACA  
GGAAGATGGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAGTCCGTACCCCTGACTACCATTGGCTTCGAACCGTA  
AAAACCACAAAGGAGTCTACGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAAATTGGACCCATATGATAACTCCCTCACTT  
GAGGGTCTCCCTAGCGGAAAGTGTCAAGGATAACGGTGCCTCTGTCACTGCTCAACTAACCGATTACACCG  
TTGGATGCCTGAAATCCTGAGACTAGGGACATCTTGTGATATTTACTAATAGTAGAGGGAAGAGAGCATCCAAG  
GGGAGCAAGACCTGTGGCTTGATGAAAGGGCCTATATAAGTCTCTAAAGGCGATGCAAACACTCAAGTTATG  
TGGAGTTCCTGGACTTAGACTTATGGACGGAACATGGGTCTCGATGCAGACATCAAATGAGACCAAATGGTGCCTC  
CCGGTCAGTTGGTTAATCTGCACGACCTCACTCAGACGAAATTGAGCATCTTGTGAGGGAGTTGGTCAAGAAA  
AGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATAACCACCAAGTCAGTGAGTTCAAGACGTCTCAGTCATTAAAG  
AAAACCTGTCCCCGGGTTGGAAAGGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGGCTGAAGCTCACTACAAGT  
CAGTCAGGACTTGGAAATGAGATCATCCCCTCAAAAGGGTGGAGAGTTGGAGGGCATGTTTAATCCCAGAGATG  
CAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATAGAGTTATTGGAATCCTCAGTTATTCCCTGATGCACCCCTGAGACCC  
GTTCACAGTTCAAGGACGGCGATGAGATTGAGGAGTTGTGGAAGTTCACCTCCCGATGTGACGAACAGGTCT  
CAGGGGTTGACCTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAG 。

## 利用 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒 活载体重组疫苗

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及利用犬 II 型腺病毒不同结构蛋白的特性，分别展示狂犬病病毒保护性抗原或抗原表位的重组疫苗，可用于新型动物狂犬病疫苗的研制和应用。

### 背景技术：

[0002] 狂犬病是由狂犬病病毒引起的以非化脓性脑脊髓炎为主要特征的一种重要人畜共患传染病，感染人和动物后，一旦发病，死亡率几乎是 100%。我国是狂犬病的多发地，每年有上千人死于狂犬病，主要是由带病毒的犬咬伤引起。尽管目前人用商品疫苗安全有效，但大量带毒动物的存在仍然对人类生命安全构成了直接威胁。特别是近年来，死于狂犬病的人数呈逐年上升的趋势。因此，减少或控制狂犬病病毒在家养动物中的贮集是有效控制人狂犬病发生的重要途径。

[0003] 目前用于动物狂犬病预防的疫苗主要是灭活疫苗和弱毒疫苗，二者对预防狂犬病的发生起到了积极重要的作用。但是灭活疫苗免疫周期短，接种方式单一，不适于动物的田间免疫，而且在我国还没有实现国产化，进口灭活疫苗制备工艺复杂，成本昂贵，比较适用于发达国家。弱毒疫苗在敏感动物体内有毒力返祖的危险，不能从根本上消除狂犬病，因此，难以在我国得到推广。

[0004] 随着对狂犬病病毒分子生物学特性的不断研究，已证明糖蛋白是唯一可以诱导机体产生中和抗体的狂犬病病毒结构蛋白。国际上许多实验室都开展了以糖蛋白为保护性抗原的亚单位疫苗、基因工程亚单位疫苗、DNA 疫苗等新型狂犬病疫苗的研究。虽然这些疫苗可以诱导特异性中和抗体的产生，并具有一定的免疫保护力，但由于免疫原性较弱，未得到实际应用。以痘病毒和人 5 型腺病毒为载体表达狂犬病病毒糖蛋白的活载体重组疫苗研究取得了一定进展，在欧洲和北美洲的免疫试验证明，具有良好的免疫原性。但由于存在再次免疫排斥或安全性问题，而未得到正式批准使用。为提高重组腺病毒疫苗的实际应用价值，目前，以人 5 型腺病毒为载体的展示疫苗已有研究，而以犬 II 型腺病毒为载体的展示疫苗技术在国内外尚未见报道。

[0005] 以犬 II 型腺病毒为载体的重组疫苗对犬科动物易感，也可在猫、牛和猪等家畜动物体内有效复制，而且遗传特性稳定，安全性好，在新型狂犬病疫苗的研究中具有较大的开发潜力。本实验室构建的表达狂犬病病毒糖蛋白的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗，已获得国家发明专利，并完成了在生产性试验阶段的生物安全评价，证明具有良好的免疫效果和安全性。在此基础上，为进一步提高犬 II 型腺病毒重组疫苗的免疫效力和实际应用价值，本发明提供了一系列以犬 II 型腺病毒结构蛋白展示表达狂犬病病毒保护性抗原或抗原表位的重组疫苗。

### 发明内容：

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供利用 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II

型腺病毒活载体重组疫苗。

[0007] 本发明的技术方案是以犬 II 型腺病毒为载体,在其结构蛋白基因的疏水性位点插入狂犬病病毒保护性抗原基因或表达抗原表位的核苷酸序列,使外源抗原或表位在腺病毒表面与其结构蛋白融合表达。

[0008] 进一步讲,以犬 II 型腺病毒疫苗株为载体,在其结构蛋白六邻粒、纤突或 IX 蛋白上,利用这些结构蛋白基因自身的转录原件,融合表达狂犬病病毒保护性抗原或抗原表位,使其在犬 II 型腺病毒颗粒表面得以展示,从而达到增强重组疫苗免疫效力的目的。免疫试验证明,该系列重组疫苗均可诱导产生高滴度的针对狂犬病病毒和犬腺病毒的中和抗体,并能抵抗狂犬病病毒标准强毒株和犬腺病毒强毒株的攻击。

[0009] 首先,在不发生碱基缺失和不影响结构蛋白转录的前提下,对犬 II 型腺病毒全基因组中六邻粒、纤突或 IX 蛋白基因进行改造:

[0010] 1、过重叠 PCR 分别在犬 II 型腺病毒全基因组六邻粒基因超变区的 4 个位点,按六邻粒的转录阅读框分别插入狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位,使其与六邻粒在腺病毒颗粒外表面融合表达;

[0011] 2、在犬 II 型腺病毒全基因组 28106bp 处引入一段人工合成的核酸序列(含 Xma I 酶切位点),在 Xma I 酶切位点处,按纤突的转录阅读框插入狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位,使其与纤突在腺病毒颗粒外表面融合表达;

[0012] 3、利用犬 II 型腺病毒 IX 蛋白基因内的限制性内切酶 Ase I 位点,在 IX 蛋白转录终止密码子处插入狂犬病病毒糖蛋白膜外区基因和 SV40 病毒多聚 A 转录终止信号,使 IX 蛋白与外源抗原表位利用同一转录阅读框在腺病毒颗粒外表面融合表达。

[0013] 其次,狂犬病病毒保护性抗原或抗原表位能随重组犬 II 型腺病毒结构蛋白一起转录,在病毒颗粒表面产生多个拷贝,其免疫效力好于单一拷贝的重组疫苗;第三,重组疫苗的增殖、扩大培养以及免疫接种的方式均与载体病毒疫苗株犬 II 型腺病毒一致;第四,动物接种重组疫苗后,将同时获得针对犬腺病毒感染和狂犬病病毒感染的免疫力,并能抵抗正常致死剂量强毒株的攻击。

[0014] 展示狂犬病病毒保护性抗原的重组犬 II 型腺病毒的构建过程:

[0015] 1、利用实验室前期构建的含犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPOLYII-CAV2 中两个单一酶切位点得到含六邻粒基因的大片段,将其克隆入 pET-28a 载体,获得重组质粒 pET-LH。再利用 pET-LH 中大片段的两个单一酶切位点得到含六邻粒基因的小片段,将其克隆入 pET-28a 载体,获得重组质粒 pET-SH。通过重叠 PCR 将狂犬病病毒中和抗原表位分别插入六邻体超变区内的 4 个不同位点(分别在犬 II 型腺病毒全基因组的 17378bp、17450bp、17623bp 和 18084bp 处),并将 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体,进行序列测定。测序正确后,利用六邻粒中两个单一酶切位点将改造后的六邻粒基因克隆入 pET-SH。最后,按照上述路线返向克隆,获得重组犬 II 型腺病毒全基因组。

[0016] 2、利用 pBluescriptII KS (+/-) 中的酶切位点 Sac I 和 Kpn I,插入人工合成序列 Linker SK(依次含 Sal I、Xma I、Spe I 和 Pac I 多个酶切位点),获得重组质粒 pBS-SKI。按纤突基因序列,人工合成犬 II 型腺病毒全基因组序列 28050bp ~ 28106bp 区段,并插入 Linker SK 中 Sal I ~ Xma I 之间,利用 PCR 获得犬 II 型腺病毒全基因组中 30182bp ~ 29358bp 序列,将两片段插入 Linker SK 中 Spe I ~ Pac I 之间,获得重组质粒 pBS-SKII。

再将狂犬病病毒中和抗原表位按纤突基因的转录阅读框插入 pBS-SKII 的 Linker SK 中 Xma I 和 Spe I 位点之间, 获得改造后的纤突基因。最后, 通过 Linker SK 中两端的酶切位点 Sal I 和 Pac I, 将改造的纤突基因插入 pPOLYII-CAV2 中, 得到重组犬 II 型腺病毒全基因组。

[0017] 3、利用 pPOLYII-CAV2 中两个单一酶切位点得到含 IX 蛋白基因的大片段, 将其克隆入 pBluescriptII KS (+/-) 载体, 获得重组质粒 pBS-LIX。再利用 pBS-LIX 中大片段的两个单一酶切位点得到含 IX 蛋白基因的小片段, 将其克隆入 pEGFP-C1 载体, 获得重组质粒 pEGFP-SIX。然后, 在 IX 蛋白终止密码子处, 利用其自身的酶切位点插入狂犬病病毒糖蛋白膜外区基因与 SV40 多聚 A 转录终止序列, 实现 IX 蛋白与糖蛋白膜外区融合表达。最后, 按照上述路线, 反向克隆获得重组犬 II 型腺病毒全基因组。

[0018] 4、碱裂解法大量制备各种重组犬 II 型腺病毒基因组质粒, 分别经 Asc I 和 Pme I 双酶切游离全基因组后, 通过脂质体转染 5 μg 基因组 DNA 于犬肾传代细胞系 MDCK, 隔天传代 1 次, 直至出现典型的犬腺病毒病变 (葡萄串状)。

[0019] 展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗免疫原性

[0020] 1、利用 MDCK 细胞大量制备重组疫苗, 并测定疫苗的 TCID<sub>50</sub> (均不低于 10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>/0.1ml)。取无狂犬病免疫史的家犬为试验动物, 分别两侧股内侧肌肉注射和口服接种。

[0021] 2、免疫时每条犬肌肉注射 1ml 或口服 2ml 一种重组疫苗, 免疫一次, 免疫前及免疫后每周采血并分离血清。

[0022] 3、采用荧光抗体狂犬病病毒中和试验 (FAVN) 法, 检测免疫犬血清中和抗体效价, 结果显示, 重组疫苗诱导的平均中和抗体水平在免疫后第 3 周时, 均能达到国际最低保护水平 (0.5IU/ml) 以上, 第 4 ~ 5 周达到最高 (4.62 ~ 6.43IU/ml)。通过血凝抑制试验, 检测试验犬体内腺病毒抗体效价, 结果显示, 重组疫苗诱导的腺病毒抗体水平在免疫后第 4 周时最高, 均为 1 : 2<sup>10</sup>。

[0023] 展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗的免疫保护作用

[0024] 免疫 6 周后, 对各试验组动物进行攻毒, 每组分别用 100LD<sub>50</sub> 的狂犬病病毒标准强毒 CVS-24 和犬腺病毒强毒进行攻毒。攻毒后对试验动物进行封闭隔离饲养, 相互之间不接触, 每天观察并记录试验动物的采食和发病情况, 观察 40 天。结果显示, 口服和肌肉注射任何一种重组疫苗的犬均可抵抗强毒的攻击, 存活率在 90% 以上。

### 具体实施方案 :

[0025] 下面结合实施例, 对本发明做进一步描述:

[0026] 实施例 1: 以六邻粒展示狂犬病病毒保护性抗原的重组疫苗全基因组的克隆

[0027] Eco52I 和 SnaB I 双酶切 pPOLYII-CAV2, 经琼脂糖凝胶电泳回收 12516bp 片段, 克隆入 pET-28a 载体, 获得重组质粒 pET-LH。再用 Nde I 和 Mlu I 双酶切 pET-LH, 经琼脂糖凝胶电泳回收 4325bp 片段, 克隆至 pET-28a 载体, 获得重组质粒 pET-SH。通过重叠 PCR 将狂犬病病毒中和抗原表位分别插入六邻体内 4 个不同位点, 并将 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体, 进行序列测定。测序正确后, 利用六邻粒 Kpn I 和 Dra I 两个自然酶切位点将改造后的六邻粒基因克隆入 pET-SH。最后, 按照上述路线, 反向克隆获得 4 种重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPolyII-CAV2/HVR1-GAP、pPolyII-CAV2/HVR2-GAP、pPolyII-CAV2/HVR3-GAP

和 pPolyII-CAV2/HVR4-GAP。

[0028] 重叠 PCR 引物序列

[0029] HV (forward) :

[0030] 5' -ATATCAGGGTACCCCTAGACAGAG-3' ;

[0031] HV (reverse) :

[0032] 5' -GGTGTGTATTAAAGGCATCAGGC-3' ;

[0033] HVR 1-GAP (forward) :

[0034] 5' -CTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATACTAGGTCAGCTGCACAAACAATACCTACCA-3' ;

[0035] HVR1-GAP (reverse) :

[0036] 5' -TGAACCTAGTATGTCATAAGGGCTCCAGGATCCGAGCACAGTTATGGCACCTGCAGAGG-3' ;

[0037] HVR2-GAP (forward) :

[0038] 5' -CTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATACTAGGTCAGAGCTGGGGATGCGTCTGCCG-3' ;

[0039] HVR2-GAP (reverse) :

[0040] 5' -TGAACCTAGTATGTCATAAGGGCTCCAGGATCCGAGATCGACCCAGCTTCAGGGCCA-3' ;

[0041] HVR3-GAP (forward) :

[0042] 5' -CTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATACTAGGTCAGCCATGCTATAACTGAAGATGT-3' ;

[0043] HVR3-GAP (reverse) :

[0044] 5' -TGAACCTAGTATGTCATAAGGGCTCCAGGATCCGAGGGTGGTCACCTATAAAATCTGG-3' ;

[0045] HVR4-GAP (forward) :

[0046] 5' -CTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATACTAGGTCATTCAAGGAGAAAATACCAATGT-3' ;

[0047] HVR4-GAP (reverse) :

[0048] 5' -TGAACCTAGTATGTCATAAGGGCTCCAGGATCCGAGAACCTCATGGGGTCATGTTG-3' 。

[0049] 其中,在犬 II 型腺病毒全基因组 17378bp 处插入外源基因时,用引物 HV 和 HVR1-GAP,最终得到重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPolyII-CAV2/HVR1-GAP;在 17450bp 处插入时,用引物 HV 和 HVR2-GAP,最终得到重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPolyII-CAV2/HVR2-GAP;在 17623bp 处插入时,用引物 HV 和 HVR3-GAP,最终得到重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPolyII-CAV2/HVR3-GAP;在 18084bp 处插入时,用引物 HV 和 HVR4-GAP,最终得到重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPolyII-CAV2/HVR4-GAP。

[0050] 狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位 DNA 序列

[0051] 5' -TGAACCTAGTATGTCATAAGGGCTCCAGGATCCGAG-3' 。

[0052] PCR 反应条件

[0053] 以在犬 II 型腺病毒全基因组 17378bp 处插入外源基因为例,质粒 pET-SH 为模板,HVR(reverse) 和 HVR1-GAP(forward) 为引物,在 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶作用下,95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 45s,59℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环,得到突变位点左侧片段(2L)。以 pET-SH 为模板, HVR1-GAP(reverse) 和 HV(forward) 为引物,在 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶作用下,95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 45s,56℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10min 扩增突变位点右侧片段(2R)。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化。然后,进行第二步 PCR,分别取 25-50ng 2L 和 2R 片段充分混匀作为模板,以 HV(forward) 和 HV(reverse) 为引物,在 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶作用下,95℃ 预变性

5min, 94℃变性 45s, 56℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 共 30 个循环, 扩增得到 HVR1-GAP 突变片段。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 连接到 pMD18-T Vector, 进行测序。在其他位置插入时以相同方法, 利用各自引物进行重叠 PCR 扩增。

[0054] 实施例 2 : 以纤突展示狂犬病病毒保护性抗原的重组疫苗全基因组的克隆

[0055] 利用 pBluescriptII KS(+-) 中的酶切位点 Sac I 和 Kpn I, 插入人工合成序列 Linker SK (依次含 Sal I、Xma I、Spe I 和 Pac I 多个酶切位点), 获得重组质粒 pBS-SKI。按纤突基因序列, 人工合成犬 II 型腺病毒全基因组序列 28050bp ~ 28106bp 区段, 并插入 Linker SK 中 Sal I ~ Xma I 之间, 利用 PCR 获得犬 II 型腺病毒全基因组中 30182bp ~ 29358bp 序列, 将两片段插入 Linker SK 中 Spe I ~ Pac I 之间, 获得重组质粒 pBS-SKII。再将狂犬病病毒中和抗原表位按纤突基因的转录阅读框插入 pBS-SKII 的 Linker SK 中 Xma I 和 Spe I 位点之间, 获得改造后的纤突基因。最后, 通过 Linker SK 中两端的酶切位点 Sal I 和 Pac I, 将改造的纤突基因插入 pPOLYII-CAV2 中, 得到重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPOLYII-CAV2/Fiber-GAP。

[0056] Linker SK 序列

[0057] Sense sequence :

[0058] 5' -CGTCGACAGTCCCCGGAGTGGGCCAGTGGGCCAGTACTAGTGCCTTAATTAAAGGTAC-3' ;

[0059] Antisense sequence :

[0060] 5' -CTTAATTAAGGCAGTAGTACTGGGCCACTGGGCCACTCCGGGACTGTCGACGAGCT-3' 。

[0061] 人工合成犬 II 型腺病毒全基因组 28050bp ~ 28106bp 区段序列

[0062] Sense sequence :

[0063] 5' -TCGACGGTGCCCCCAGCAGAAGTATCGACTGCATGCTAATTATTAACAAACCAAAAC-3' ;

[0064] Antisense sequence :

[0065] 5' -CCGGGTTTGGTTGTTAATAATTAGCATGCGACTCGATACTTCTGCTGGGGCACCG-3' 。

[0066] PCR 引物序列

[0067] Forward : 5' -TGATCACCGCAACGGTGAATG-3'

[0068] Reverse : 5' -TGAGTATGATGATGCTTGCAC-3'

[0069] PCR 反应条件

[0070] 在 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶作用下, 95℃预变性 5min, 94℃变性 45s, 55℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 共 30 个循环, 72℃延伸 10min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 连接到 pMD18-T Vector, 进行测序。

[0071] 实施例 3 : 以 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗原的重组疫苗全基因组的克隆

[0072] EcoR I 和 Cla I 双酶切 pPOLYII-CAV2, 琼脂糖凝胶电泳回收 3610bp 片段, 克隆入 pBluescriptII KS(+-), 获得重组质粒 pBS-LIX。Mlu I 与 EcoR I 双酶切 pBS-LIX, 琼脂糖凝胶电泳回收 340bp 片段, 克隆入 pEGFP-C1, 获得重组质粒 pEGFP-SIX。在 IX 蛋白终止密码子处, 利用单一酶切位点 Ase I 插入狂犬病病毒糖蛋白膜外区基因 (G') 与 SV40 多聚 A 转录终止信号序列, 实现 IX 蛋白与糖蛋白膜外区融合表达。最后, 按照上述路线, 反向克隆获得重组犬 II 型腺病毒全基因组质粒 pPOLYII-CAV2/IX-G'。

[0073] 实施例 4 : 重组疫苗的包装与鉴定

[0074] 1、重组疫苗的包装

[0075] 取改造的犬二型腺病毒质粒 pPolyII-CAV2/HVR1-GAP、pPolyII-CAV2/HVR2-GAP、pPolyII-CAV2/HVR3-GAP、pPolyII-CAV2/HVR4-GAP, pPOLYII-CAV2/Fiber-GAP 和 pPOLYII-CAV2/IX-G' 各 5 μg, 分别以 Asc I 和 Pme I 双酶切释放重组的全基因组, 利用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染至 MDCK 细胞系, 直到细胞出现病变。

[0076] 酶切条件

[0077] 限制性内切酶 Asc I 和 Pme I 各 10U, 10×Buffer 5 μl, 质粒 5 μg, 加水补至 50 μl。37℃水浴反应 1h 后, 氯仿 : 异戊醇 (24 : 1) 抽提 1 次, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 灭菌四馏水溶解沉淀, -20℃保存备用。

[0078] 2、重组疫苗的鉴定

[0079] 重组疫苗基因组鉴定

[0080] 取 50ml 培养瓶内已呈葡萄串状病变的单层 MDCK 细胞, 倾弃培养基, 以 PBS 洗涤 2 次, 加入 800 μl 新鲜配制的细胞裂解液 (0.6% SDS, 10mM EDTA, 100 μg/ml 蛋白酶 K), 37℃ 温育 1h, 加入 200 μl 5M NaCl, 轻轻混匀后, 冰水浴 1h。将全部混合物移入离心管, 于 4℃, 12000rpm 离心 40min, 上清移入加一离心管, 以等体积酚 : 氯仿抽提 2 次, 加入终浓度 0.25M 醋酸钠和 2 倍体积无水乙醇, 12000rpm 离心 10min, DNA 沉淀以 70% 乙醇洗涤 1 次, 无菌风干后, 溶于 50 μl 去离子水。以基因组为模板, PCR 扩增外源基因, 测序鉴定。

[0081] 鉴定用 PCR 引物序列

[0082] ① CAV2/HVR 1-GAP、CAV2/HVR2-GAP、CAV2/HVR3-GAP 和 CAV2/HVR4-GAP 鉴定用引物序列

[0083] Forward : 5' -GGTGTTATTAAAGGCATCAGGC-3' ;

[0084] Reverse : 5' -ATATCAGGGGTACCCCTAGACAGAG-3'。

[0085] ② CAV2/Fiber-GAP 鉴定用引物序列

[0086] Forward : 5' -AGCAGAAGTATCGACTGCAT-3' ;

[0087] Reverse : 5' -TGAGTATGATGATGCTTGCAC-3'。

[0088] ③ CAV2/IX-G' 鉴定用引物序列

[0089] Forward : 5' -AGCTGAAGATCCAGGTGGCT-3' ;

[0090] Reverse : 5' -ACGCTGGACACGGTATTATC-3'。

[0091] PCR 反应条件

[0092] 同上。

[0093] TCID<sub>50</sub> 的测定

[0094] 将 1 × 10<sup>7</sup> MDCK 细胞传入 96 孔细胞培养板, 每孔内细胞约 1 × 10<sup>6</sup>, 补加培养基至 100 μl。次日, 接入待测病毒样品。在 1 ~ 11 孔内, 进行 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-11</sup> 稀释, A ~ H 列为同浓度重复。7 天后, 以 Karber 法计算待测重组疫苗的 TCID<sub>50</sub>。

[0095] 免疫原性鉴定 (Western blotting)

[0096] 取含狂犬病病毒 SRV<sub>9</sub> 株的细胞裂解液 50 μl, 加等量 2×SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 10min, 冷却至室温, 短暂离心后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕, 将胶上蛋白样品电转移到硝酸纤维素膜上, 分别与犬抗重组疫苗的多抗及阳性和阴性对照多抗、HR 标记兔抗犬二抗反应, 最后以 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色, 根据显色带出现与否及其位置判定重组疫苗是否表达狂犬病病毒抗原。

[0097] 毒力鉴定

[0098] 取 4 ~ 5 月龄犬腺病毒和狂犬病病毒抗体阴性犬 60 条,按接种重组疫苗不同分为 6 组,每组 10 条,分别用含  $10^8\text{TCID}_{50}$  和  $10^7\text{TCID}_{50}$  的重组疫苗细胞培养液各肌肉注射 5 条犬。注射后,观察注射犬的饮食、精神状态等表现,测量体温、计数白细胞数量和其它临床表现等,并在 4 周后解剖注射犬,观察犬体病理变化,并进行肝等主要脏器的组织切片观察。

[0099] 稳定性鉴定

[0100]  $1 \times 10^6\text{MDCK}$  细胞传入  $25\text{cm}^2$  细胞培养瓶内,细胞长成单层后,按培养瓶内培养基体积的 0.5% 接入重组疫苗,接种后 3 ~ 4 天收毒,对各种重组疫苗分别连续传代 40 次,标记并保存每次的培养液,同时每隔 5 代,提取感染细胞中的腺病毒基因组,通过 PCR 和 DNA 测序鉴定外源基因的大小、方向和位置。

[0101] 结果

[0102] 1. 各重组疫苗基因组内均正确插入了狂犬病病毒保护性抗原,转录方向与病毒基因组转录方向一致;

[0103] 2. 0.1ml 各重组疫苗的  $\text{TCID}_{50}$  无明显差别,为  $10^{6.5} \sim 10^7$ ;

[0104] 3. 各重组疫苗均表达了狂犬病病毒糖蛋白中和表位,抗体可以与狂犬病病毒糖蛋白特异性结合;

[0105] 4. 毒力检测结果显示,注射犬未出现饮食和精神表现等异常,体温在正常范围内 ( $37.5 \sim 38.5^\circ\text{C}$ )。体内白细胞计数显示,白细胞总数 ( $7.5 \sim 16.0 \times 10^9/\text{L}$ ) 分类计数均在正常范围内,注射犬未出现蓝眼或厌食等临床表现。解剖未见主要组织器官出现异常变化,重组疫苗注射犬肺、肝和肾等组织切片与健康犬的组织切片无明显区别。

[0106] 5. 稳定性鉴定结果表明,各重组疫苗经过 40 代传代,其基因组(包括外源基因的大小、方向和位置)均保持不变,外源基因序列均未发生改变。

[0107] 实施例 5:以六邻粒展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗的免疫效果

[0108] 实验动物

[0109] 狂犬病病毒和腺病毒抗体阴性的 4 ~ 5 月龄犬 80 条,随机分为 8 组,每组 10 条。

[0110] 动物免疫

[0111] 分别以  $\text{TCID}_{50}$  为  $10^{6.5}$  的重组疫苗 CAV2/HVR1-GAP、CAV2/HVR2-GAP、CAV2/HVR3-GAP 和 CAV2/HVR4-GAP 对 8 组犬进行免疫。每种重组疫苗各免疫 20 条犬,其中肌肉注射 10 条,1ml/条;口服 10 条,2ml/条。

[0112] 免疫检测

[0113] 免疫前及免疫后每周分别采集少量静脉血,分离血清,以 FAVN 检测受试犬狂犬病病毒中和抗体水平。

[0114] 攻毒试验

[0115] 免疫 6 周后,每组随机抽取 5 条犬,以  $100\text{LD}_{50}$  狂犬病标准强毒株 CVS-24 接种;其余犬以  $100\text{LD}_{50}$  犬 I 型和 II 型腺病毒强毒混合物接种。隔离观察各犬至接种后 40 天,详细记录各组犬的发病及死亡情况。

[0116] 结果

[0117] 1. 所有受试犬的免疫前血清内检不出抗犬腺病毒及狂犬病病毒的特异性抗体;

[0118] 2. 所有犬免疫后 2 ~ 3 周, 其血清中均可检出抗腺病毒抗体, 至 6 周时, 抗体仍维持在较高水平;

[0119] 3. 所有受试犬免疫后 3 ~ 4 周时, 其血清中均可检出狂犬病中和抗体, 抗体消长规律与腺病毒抗体一致;

[0120] 4. 受试犬能抵抗犬 I 型与 II 型腺病毒强毒的攻击, 存活率为 95%;

[0121] 5. 受试犬能抵抗狂犬病强毒的攻击, 存活率为 90%;

[0122] 结论

[0123] 4 株不同重组疫苗均可诱导机体产生针对犬腺病毒和狂犬病病毒的特异性中和抗体, 对犬腺病毒和狂犬病病毒感染具有保护作用。

[0124] 实施例 6: 以纤突展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗的免疫效果

[0125] 实验动物

[0126] 狂犬病病毒和腺病毒抗体阴性的 4 ~ 5 月龄犬 20 条, 随机分为 2 组, 每组 10 条。

[0127] 动物免疫

[0128] 分别以 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>6.5</sup> 的重组疫苗 CAV2/Fiber-GAP 对 2 组犬进行免疫。其中肌肉注射 10 条, 1ml/ 条; 口服 10 条, 2ml/ 条。

[0129] 免疫检测

[0130] 免疫前及免疫后每周分别采集少量静脉血, 分离血清, 以 FAVN 检测受试犬狂犬病病毒中和抗体水平。

[0131] 攻毒试验

[0132] 免疫 6 周后, 每组随机抽取 5 条犬, 以 100LD<sub>50</sub> 狂犬病标准强毒株 CVS-24 接种; 其余犬以 100LD<sub>50</sub> 犬 I 型和 II 型腺病毒强毒混合物接种。隔离观察各犬至接种后 40 天, 详细记录各组犬的发病及死亡情况。

[0133] 结果

[0134] 1. 所有受试犬的免疫前血清内检不出抗犬腺病毒及狂犬病病毒的特异性抗体;

[0135] 2. 所有犬免疫后 2 ~ 3 周, 其血清中均可检出抗腺病毒抗体, 至 6 周时, 抗体仍维持在较高水平;

[0136] 3. 所有受试犬免疫后 3 ~ 4 周时, 其血清中均可检出狂犬病中和抗体, 抗体消长规律与腺病毒抗体一致;

[0137] 4. 受试犬能抵抗犬 I 型与 II 型腺病毒强毒的攻击, 存活率为 95%;

[0138] 5. 受试犬能抵抗狂犬病强毒的攻击, 存活率为 90%;

[0139] 结论

[0140] 重组疫苗 CAV2/Fiber-GAP 可诱导机体产生针对犬腺病毒和狂犬病病毒的特异性中和抗体, 对犬腺病毒和狂犬病病毒感染有保护作用。

[0141] 实施例 7: 以 IX 蛋白展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗的免疫效果

[0142] 实验动物

[0143] 狂犬病病毒和腺病毒抗体阴性的 4 ~ 5 月龄犬 20 条, 随机分为 2 组, 每组 10 条。

[0144] 动物免疫

[0145] 分别以 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>6.5</sup> 的重组疫苗 CAV2/IX-G' 对 2 组犬进行免疫。其中肌肉注射 10 条, 1ml/ 条; 口服 10 条, 2ml/ 条。

[0146] 免疫检测

[0147] 免疫前及免疫后每周分别采集少量静脉血, 分离血清, 以 FAVN 检测受试犬狂犬病病毒中和抗体水平。

[0148] 攻毒试验

[0149] 免疫 6 周后, 每组随机抽取 5 条犬, 以 100LD<sub>50</sub> 狂犬病标准强毒株 CVS-24 接种; 其余犬以 100LD<sub>50</sub> 犬 I 型和 II 型腺病毒强毒混合物接种。隔离观察各犬至接种后 40 天, 详细记录各组犬的发病及死亡情况。

[0150] 结果

[0151] 1. 所有受试犬的免疫前血清内检不出抗犬腺病毒及狂犬病病毒的特异性抗体;

[0152] 2. 所有犬免疫后 2 ~ 3 周, 其血清中均可检出抗腺病毒抗体, 至 6 周时, 抗体仍维持在较高水平;

[0153] 3. 所有受试犬免疫后 3 ~ 4 周时, 其血清中均可检出狂犬病中和抗体, 抗体消长规律与腺病毒抗体一致;

[0154] 4. 受试犬能抵抗犬 I 型与 II 型腺病毒强毒的攻击, 存活率为 95%;

[0155] 5. 受试犬能抵抗狂犬病强毒的攻击, 存活率为 90%;

[0156] 结论

[0157] 重组疫苗 CAV2/IX-G' 可诱导机体产生针对犬腺病毒和狂犬病病毒的特异性中和抗体, 对犬腺病毒和狂犬病病毒感染有保护作用。

[0158] 附: 改造后犬 II 型腺病毒结构蛋白基因序列

[0159] 1. 改造后犬 II 型腺病毒结构蛋白六邻粒基因序列

[0160] 重组疫苗 CAV2/HVR1-GAP 中六邻粒基因序列:

[0161] ATGGCAACCCCGTCGATGCTGCCACAATGGTCTTACATGCACATTGCTGCCAGGACGCCGCCAATA  
CTTGTCTCCGCCCTGGTTAGTTGCCAACGCAACCAGTTCTACTTTAACGGTGGACAACAAGTTAGAAACCCCC  
ACTGTGGCCCCCACCGATGTGACCACTGAGAGGTCGCAGCGCTTGAGCTGCGCTTGTGCCAGTCATGCAA  
GAGGATGGCCAGTACACTTACAAAACCCGCTTCCAGCTTGCAGGGAGACAACAGGGTGTGGACATGGCCAGT  
ACTTACTTCGATATCAGGGGTACCCCTAGACAGAGGCCCTCCTCAAGCCTTACAGCGGCACCGCCTACAATGCC  
CTCGCCCCAAGGCCGGGCTAACAACTGTCTTTAATGGACAGGGTCCAATATTAACACTTAGGCCAGGTG  
CCCTCTGCAGGT [CTCGGATCCGCCCTATTGACATACTAGGTTCA] ACTGTGGCTGTCAC  
AAACAATACCTACCAGCCAGAGCCCCAGCTGGGCCCTGAAAGCTGGTCGATGGCAGCCTAGCAGAGCTGGGGATG  
CGTCTGCCGTGCCCTTAAGGCTCAACCCCGCATGCCCTGCTATGGTCTCATGCTCCCCCACCACGAAACGAAAT  
GGAGGTACTGGTCCAGTGGATCCAGATTATAAGGTGACCACCAACAATAACAATGAAGCAGATGCCATGCTATA  
CACTGAAGATGTAAACCTGCAGGCCAGACACCCACCTGGTGCACCAAGTGCAGAGGGTCAGGTTACAGGGTGC  
AAGGGCTGGGCCAGCAGGCTGCGCCAACAGGCCGAACACTACATAGGCTTCAGGGACAACCTCATAGGCCTCATGTAC  
TACAATAGTAATGGAAACCTAGGGTGCTGGCGGGTCAGTCATCTCAGCTCAATGCCGTGGACTTGCAAGACAG  
AAACACAGAGCTCTCTTACCGAGCTGCTGGATGCCCTCACAGACAGGTCCGCTACTTTCCATGTGGAACCAGG  
CTGTAGATAGCTATGACCAGGATGTTAGGATTATTGACAACCATGGCGTGGAAAGATGATATGCCAACTATTGCTAC  
CCACTGAGCGGCATGGGGCCCTAACAAACATGACCACCATGAAGGTTTCAGGCAGAAAATACCAATGTGGGCC

CATTCAAAAGATTGGTTGGAAATGTTGAGGCCATGGAAATCAACCTCAATGCCAACCTCTCAAAAGCTTCCTT  
 ACTCCAATGTGGCCTTATACTTGCTGATGCCCTAAATACACACCTGAAAACATTGTCGCCCTGCCAATGTGAAT  
 ACCTATGCTTACATGAATGTTAGATTACCCGCCAACCTTATAGATACCTTGTAAATATTGGCGCCAGATGGTC  
 ACCAGATGTAATGGACACTGTTAACCTTCAACCACACAGAAAATGCAGGACTCCGCTACCGTTACAACGTCTG  
 GCAATGGCCGCTATTGCTCGTCCATATTCAAGGTCCTCAAAAATTTTGCAATCAAAATCTCCTCCTACTGCCT  
 GGAACGTACACGTACGAGTGGTCTTCAGAAAGGATGTAACATGATCCTCAAAGCAGCTGGCAATGACCTCCG  
 AGTGGATGGGCCACCATCACACATTAGAGCATCACCTATATGCAAGCTTTCCCAATGGCACACAACACTGCCT  
 CCACTCTGGAAGCCATGCTGCGAACGATGTAATGACCAGTCCTTGAGACTACCTGTCTCTGCCAACATGCTT  
 TATCCCATCCCTGCCAACACTACTAACCTGCCATCTCCATTCCGCCAGAAACTGGCCGGATTAGAGGGTGGAG  
 CTTTACCAAGAATTAAGCAACGAGAAACTCCTGCCCTGGCTGCCATTGATCCCTACTTCACTTATCGGGCAGTA  
 TTCCATATCTGGATGCAACTTTTACCTCAGCCACACCTTAGAAGAGTTCCATCATGTTGACTCTCCGTGTCT  
 TGGCCTGGCAATGACAGGCTGCTACCCCCAATGAGTTGAGATTAAGGATGCTAGACGGTGAAGGTTACAATGT  
 GGCCCAGTCCAACATGACAAAAGACTGGTCATGGTCAAATGCTAGCCCACAAACATCGGCTACCAAGGCTACC  
 ACCTGCCAGAAAGCTACAAGGACAGAATGTAACCTCCTAAGAAACTTGAGCCATGTCAGACAGTTGGTGGAC  
 GTGGCCAACATGCTGCCCTACCAGCCGGTTACCGTGGCCACCAGCATAACAATTCTGGTTATGCTAGGCCCTTC  
 GCCCTTAACCCGCGTGAGGGGCCACCCATACCCAGCAAACCTGGCCTTACCCACTCATTGGAGCCAATGCAGTACCC  
 CTGTCACCCAGAAAAGTCCCTGCGACAGGTCCCTGCGCATCCATTCTCCTCCAACTTATGCTATGG  
 ACCCTCACTGACCTGGCCAAAACCTGCTGACTCTAACCTCCGCCACGCCCTGACATGACTTTGAGGTTGATGC  
 CATGAATGAGCCCACCTGTTGACGTTGAAGTGGTCACTGGCACGCGTCCATAGCCCCACCGGGGG  
 TGATTGAGGTAGTGTACCTCAGAACCTCCCTCTCCGCCGGCAACGCCACCACTAA

[0162] **加框**序列为狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位基因序列

[0163] 重组疫苗 CAV2/HVR2-GAP 中六邻粒基因序列：

[0164] ATGGCAACCCCGTCATGCTGCCACAATGGCTTACATGCACATTGCTGCCAGGACGCCGCCAATA  
 CTTGCTCCGCCCTGGTCAGTTGCCAAGCAACCAGTTCTACTTTAAGTTGACAACAAGTTGAGAAACCCC  
 ACTGTGGCCCCCACCACGATGTAACACTGAGAGGTGGCAGCGCTTGCAGCTGCCCTTGCCAGTCATGCAA  
 GAGGATGGCCAGTACACTTACAAAACCCGCTCCAGCTGCCGTGGAGACAACAGGGTGCTGGACATGGCCAGT  
 ACTTACTTCGATATCAGGGTACCCTAGACAGAGGCCCTCTCAAGCCTTACAGCGGCACCGCCTACAATGCC  
 CTCGCCCTAACAGGCCGGGCTAACAACTGTCCTTAATGGACAGGGTCCAATATTACACTTAGCCCAGGTG  
 CCCTCTGCAGGTACTGTG [CTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATACTAGGTCA] G  
 CTGTCACAAACAATACCTACCAGCCAGAGCCCCAGCTGGGCCCTGAAAGCTGGTCGATGGCAGCTAGCAGAGCTG  
 GGGGATGCGTCTGGCGTGCCCTAACGGCTCAACCCCGCGATGCCCTGCTATGGTCCTATGCTCCCCCACC  
 CGAAAATGGAGGTACTGGTCCAGTGGAAATCCAGATTATAAGGTGACCACCAACAATAACAATGAAGCAGATGCC  
 TGCTATACACTGAAGATGTAACCTGCAGGCCAGACACCCACCTGGTGACCAAGTGCAGAGGGTCAGGTACA  
 GGGGTGCAAGGGCTGGCCAGCAGGCTGCCAACAGGGCAACTACATAGGCTCAGGGACAACCTCATAGGCCT  
 CATGTAACATAGTAATGGAAACCTAGGGTGCTGGCGGGTCAGTCATCTCAGCTCAATGCCGTGGACTTGC  
 AAGACAGAAACACAGAGCTCTTACCGAGCTGCTGGATGCCCTCACAGACAGGTCCCGCTACTTTCCATGTGG  
 AACCAAGGCTGTAGATAGCTATGACCAAGGATGTTAGGATTATTGACAACCAGCGTGGAAAGATGATATGCCAACTA  
 TTGCTACCCACTGAGCGGCATGGGCCCTAACAAACATGACCAACATGAAGGTTTCAGGCAGAAAATACCAATG

TGGGGCCCATTCAAAAGATTGGTTGGAAATGTTGAGGCCATGGAAATCAACCTCAATGCCAACCTCTTCAAAAGC  
 TTCCCTTACTCCAATGTGGCCTTATACTTGCGCTGATGCCCTTAAACACACACCTGAAAACATTGTGGCCCTGCCAA  
 TGTGAATACCTATGCTTACATGAATGTTAGATTACCCGCCAACCTTATAGATACCTTGTAATATTGGCGCCA  
 GATGGTCACCAGATGTAATGGACACTGTTAACCTTCAACCACCCAGAAAATGCAGGACTCCGCTACCGTTACAA  
 CTGCTGGCAATGGCCGCTATTGCTCGTCCATATTCAAGGTCCCTCAAAAATTTTGCAATCAAAAATCTCCTCCT  
 ACTGCCTGGAACGTACACGTACGAGTGGCTTCAAGAAAGGATGTAACATGATCCTCAAAGCAGCTGGCAATG  
 ACCTCCGAGTGGATGGGCCACCATCACACATTCAAGAGCATCAACCTATATGCAAGCTTTCCCAATGGCACACA  
 ACTGCCTCCACTCTGGAAGCCATGCTGCGCAACGATGTAATGACCAGTCCTTGAGACTACCTGTCTCTGCCAA  
 CATGCTTATCCCATCCCTGCCAACACTAACTGCAATCTCCATTCCGCCAGAAACTGGGGGGATTAGAG  
 GGTGGAGCTTACCAAGAATTAAGCAACGAGAAACTCCTGCCCTGGCTGCCATTGATCCCTACTTCACTTAC  
 GGCAGTATTCCATATCTGGATGCAACTTTACCTCAGCCACACCTTAGAAGAGTTCCATCATGTTGACTCTC  
 CGTGTCTTGGCCTGGCAATGACAGGCTGCTTACCCCCAATGAGTTGAGATTAAGGTATGTAGACGGTGAAGGTT  
 ACAATGTGGCCAGTCAAACATGACAAAAGACTGGTCAATGCTAGCCCACAAACATCGGCTACCAA  
 GGCTTACCACTGCCAGAAAGCTACAAGGACAGAAATGTAATGCCCTAAGAAACTTGAGCCATGTCAGACAGTT  
 GGTGGACGTGCCAACTATGCTGCCCTACCAGCCGGTTACCGTGGGCCACCAGCATAACAATTCTGGTTATGCTAGCG  
 CCCTTCCGGCTTTAACCGCGTGAGGGGACCCATAACCCAGCAAACCTGCCCTACCCACTCATGGAGCCAATGCA  
 GTACCCACTGTCACCCAGAAAAGTTCCCTGCGACAGGTCCCTGTGGCGCATCCATTCTCCCTCAAACTTATGTC  
 TATGGAACCCCTCACTGACCTGGCCAAAACCTGCTGTACTCTAACCTCCGCCACGCCCTGACATGACTTTGAGG  
 TTGATGCCATGAATGAGCCCACCTGTTGACGTTGAAGTGGTACGTGGCACGCGTCCATGCCAAC  
 CGGGGGGTGATTGAGGTAGTGTACCTCAGAACTCCCTCTCCGCCGGCAACGCCACCACCTAA

[0165] **加框**序列为狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位基因序列

[0166] 重组疫苗 CAV2/HVR3-GAP 中六邻粒基因序列：

[0167] ATGGCAACCCCGTCATGCTGCCACAATGGCTTACATGCACATTGCTGCCAGGACGCCGCCAATA  
 CTTGTCTCCGCCCTGGTCAAGTTGCCAACGCAACCAGTTCTTACTTTAAGTTGACAACAAGTTCAGAAACCC  
 ACTGTGGCCCCCACCACGATGTGACCACTGAGAGGTCGCAGCGCTTGCAGCTGCGCTTGTGCCAGTCATGCAAG  
 AGGATGGCCAGTACACTTACAAACCCGCTTCAAGCAGGGCCCTCCAGCTGCCCTGAGACACAGGGTGCTGGACATGCCAGTAC  
 TTACTTCGATATCAGGGTACCCCTAGACAGAGGGCCCTTCAAGCCTTACAGCGGCACCGCCTACAATGCCCTC  
 GCCCCCAAGGCCGGGCTAACAACTGTCTTTAATGGACAGGGTGCCAATATTAACACTTAGCCAGGTGCCCT  
 CTGCAGGTACTGTGGCTGTCACAAACAATACCTACAGCCAGAGGCCAGCTGGCCCTGAAAGCTGGTCATGGTTC  
 CTATGCTCCCCCACCACGAAAATGGAGGT **CTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATAC**

**TAGGTTCA** ACTGGTCCAGTGGATCCAGATTATAAGGTGACCACCAACAATAACATGAAGCAGATGCC  
 ATGCTATAACTGAAGATGTAACCTGCAGGCCAGACACCCACCTGGTCACCAAGTGCAGAGGGTCAGGTTAC  
 AGGGGTGCAAGGGCTGGCCAGCAGGCTGCGCCAACAGGCCGAACATAGGCTTCAGGGACAACCTCATAGGCC  
 TCATGTACTACAATAGTAATGGAAACCTAGGGGTGCTGGCGGTCAAGTCATCTCAGCTCAATGCCGTGGACTTG  
 CAAGACAGAAACACAGAGCTCTTACCAAGCTGCTGGATGCCCTCACAGACAGGTCCCGCTACTTTCCATGTG  
 GAACCAGGCTGTAGATAGCTATGACCAAGGATGTTAGGATTATTGACAACCATGGCGTGGAAAGATGATATGCCCAACT  
 ATTGCTACCCACTGAGCGGCATGGGCCCTAACAAACATGACCAACATGAAGGTTTCAGGCAGAAAATACCAAT

GTGGGGCCCATTCAAAAGATTGGTTTGAAATGTTGAGGCCATGGAAATCACCTCAATGCCAACCTCTTCAAAAG  
 CTTCCCTTACTCCAATGTGGCCTTATACTTGCCTGATGCCCTAAATACACACCTGAAAACATTGTGGCCCTGCCA  
 ATGTGAATACCTATGCTTACATGAATGTTAGATTACCCGCCAACCTTATAGATACCTTGTAAATATTGGCGCC  
 AGATGGTCACCAGATGTAATGGACACTGTTAACCTCAACCACAGAAATGCAGGACTCCGCTACCGTCACA  
 ACTGCTGGCAATGGCGCTATTGCTCGTCCATTTCAGGTCCCTCAAAATTTTGCAATCAAAATCTCCTCC  
 TACTGCCTGGAACGTACACGTACAGTGGCTTCAGAAAGGATGTAACATGATCCTCAAAGCAGCTGGCAAT  
 GACCTCCGAGTGGATGGGCCACCATCAACATTCAAGAGCATCACCTATATGCAAGCTTTCCCAATGGCACACAA  
 CACTGCCTCCACTCTGGAGCCATGCTGCGCAACGATGTAATGACCAGTCCTTGAGACTACCTGTCTTGCA  
 ACATGCTTATCCCATCCCTGCCAACACTACTAACCTGCCAATCTCATTCCGCCAGAAACTGGCGGGATTAGA  
 GGGTGGAGCTTACCAAGAATTAAAGCAACGAGAAACTCCTGCCCTGGCTGCCATTGATCCCTACTCACTATT  
 GGGCAGTATTCATATCTGGATGCAACTTTTACCTCAGCCACACCTTAGAAGAGTTCCATATGTTGACTCTT  
 CCGTGTCTGGCCTGGCAATGACAGGCTGTTACCCCCAATGAGTTGAGATTAAGGTATGTAGACGGTGAAGGT  
 TACAATGTGGCCAGTCAAACATGACAAAAGACTGGTCATGGTCAAATGCTAGCCCACAAACATCGGCTACCA  
 AGGCTACCACCTGCCAGAAAGCTACAAGGACAGAAATGTAACCTCCCTAAGAAACTTTGAGCCATGTGCAGACAGT  
 TGGTGGACGTGGCCAATGCTGCCCTACAGCCGGTACCGTGGCCACCAGCATAACAATTCTGGTTATGCTAGC  
 GCCCTTCGGCCTTAACCCCGTGAGGGCACCCATACCCAGCAAATGCCCTTACCCACTCATGGAGCCAATGC  
 AGTACCCACTGTCACCCAGAAAAAGTCCCTGCGACAGGTCCCTGTGGCGCATCCATTCTCCTCAAATTG  
 CTATGGGAACCTCACTGACCTGGCCAAACCTGCTGACTCTAACCTCCGCCACGCCCTGACATGACTTTGAG  
 GTTGTGCCATGAATGAGCCCACCTGTTGACGTTGTTGAAGTGTGACGTGGCACCGTCCATCAGCCCCA  
 CGGGGGGTGATTGAGGTAGTGTACCTCAGAACCTCCCTCTCGCCGGCAACGCCACACCTAA

[0168] **加框**序列为狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位基因序列

[0169] 重组疫苗 CAV2/HVR4-GAP 中六邻粒基因序列：

[0170] ATGGCAACCCCGTCATGCTGCCACAATGGCTTACATGCACATTGCTGCCAGGACGCCGCCAATA  
 CTTGTCTCCGCCCTGGTCAGTTGCCAACGCAACCAGTTCTACTTTAAGTTGACAACAAGTTCAGAAACCC  
 ACTGTGGCCCCCACCACGATGTGACCACTGAGAGGTCGCAGCGCTTGAGCTGCGCTTGTGCCAGTCATGCAAG  
 AGGATGGCCAGTACACTTACAAACCCGCTTCCAGCTGCGGTGGAGACAACAGGGTGCTGGACATGCCAGTAC  
 TTACTTCGATATCAGGGTACCCCTAGACAGAGGCCCTCTCAAGCCTAACGGCCACGCCCTACAATGCCCTC  
 GCCCCCAAGGCCGGGCTAACAACTGTCTTTAATGGACAGGGTCCAATATTAACACTTAGCCAGGTGCCCT  
 CTGCAGGTACTGTGGCTGTCACAAACAATACCTACAGCCAGAGCCCCAGCTGGCCCTGAAAGCTGGTCATGG  
 CAGCCTAGCAGAGCTGGGGATGCGTCTGCCGTGCCCTAACGGCTCAACCCCGCGCATGCCCTGCTATGGTCC  
 TATGCTCCCCCACCAACGAAAATGGAGGTACTGGTCCAGTGGAAATCCAGATTATAAGGTGACCACCAACAA  
 ACAATGAAGCAGATGCCATGCTATACACTGAAGATGTAACCTGCAGGGCCCCAGACACCCACCTGGTCACCAAGT  
 GCCAGAGGGTCAGGTTACAGGGTGCAAGGGCTGGCCAGCAGGCTGCCAACAGGCCAACTACATAGGCTTC  
 AGGGACAACCTCATAGGCCCTCATGTAACATAGTAATGGAAACCTAGGGTGCTGGCGGGTCAGTCATCTCAGC  
 TCAATGCCGTGGACTTGCAAGACAGAAACACAGAGCTCTTACAGCTGCTGCTGGATGCCCTCACAGACAG  
 GTCCCGCTACTTTCCATGTGAAACCAGGCTGTAGATAGCTATGACCAGGATGTTAGGATTATTGACAACCATGGC  
 GTGGAAGATGATATGCCCAACTATTGCTACCCACTGAGCGGCATGGGCCCTAACAAACATGACCACCATGAAGGT  
 TCTCGGATCCTGGAGCCCTATTGACATACTAGGTCA' TTTCAGGCAGAAAATACCA

ATGTGGGCCATTCAAAAGATTGGTTGGAAATGTTGAGGCCATGGAAATCAACCTCAATGCCAACCTCTCAAA  
 AGCTTCCTTACTCCAATGTGGCCTTATACTTGCCTGATGCCTTAAATACACACCTGAAAACATTGTGGCCCTGC  
 CAATGTGAATACCTATGCTTACATGAATGTTAGATTACCCGCCAACCTTATAGATACTTGTAAATATTGGCG  
 CCAGATGGTCACCAGATGTAATGGACACTGTTAACCTCAACCACAGAAATGCAGGACTCCGCTACCGTTCA  
 CAACTGCTTGGCAATGGCGTATTGCTCGTCCATATTCAAGGTCCTCAAAAATTGGCAATCAAAATCTCCT  
 CCTACTGCCTGGAACGTACACGTACAGTGCTTCAAGAAAGGATGTAACATGATCCTCAAAGCAGCTGGCA  
 ATGACCTCCGAGTGGATGGGCCACCATCAACATTCAAGAGCATCAACCTATGCAAGCTTTCCAATGGCACAC  
 AACACTGCCTCCACTCTGGAAAGCCATGCTGCGCAACGATGTAATGACCAGTCCTTGCAAGACTACCTGTCTCTGC  
 CAACATGCTTATCCCCTGCCAACACTACTAACCTGCCAATCTCCATTCCGCCAGAAACTGGCGGGATTAA  
 GAGGGTGGAGCTTACCAAGAATTAAGCAACGAGAAACTCCTGCCCTGGCTGCCATTGATCCCTACTTCACTTAT  
 TCGGGCAGTATTCCATATCTGGATGCAACTTTACCTCAGCCACACCTTAGAAGAGTTCCATCATGTTGACTC  
 TTCCGTGTCTGGCCTGGCAATGACAGGCTGCTACCCCCAATGAGTTGAGATTAAAGGTATGTAGACGGTGAAG  
 GTTACAATGTGGCCCAGTCCAACATGACAAAAGACTGGTCATGGTCAAATGCTAGCCCACAAACATCGGCTAC  
 CAAGGCTACCACCTGCCAGAAAGCTACAAGGACAGAATGTAACCTCTTAAGAAACTTGGCTAGCCATGTGCAAGACA  
 GTTGGTGGACGTGGCCAATATGCTGCCTACCAGCCGGTACCGTGGCCACCAGCATAACAATTCTGGTTATGCTA  
 GCGCCCTTCGGCCTTAACCCGCGTGAGGGCACCCATACCCAGCAAACCTGCCCTACCCACTATTGGAGCCAAT  
 GCAGTACCCACTGTCACCCAGAAAAAGTCCTCTGCGACAGGTCCCTGTGGCGCATCCATTCTCCTCAACTTAT  
 GTCTATGGGAACCTCACTGACCTGGCCAAAACCTGCTGTACTCTAACCTCCGCCACGCCCTGACATGACTTTG  
 AGGTTGATGCCATGAATGAGCCACTCTGTTGACGTTGAAGTGTGACGTGGCACGCGTCCATCAGCCC  
 CACCGGGGGGTGATTGAGGTAGTGTACCTCAGAACTCCCTCTCCGCCGGCAACGCCACCACTAA

[0171] **加框**序列为狂犬病病毒糖蛋白中和抗原表位基因序列

[0172] 2. 重组疫苗 CAV2/Fiber-GAP 中纤突基因序列

[0173] **GTCGAC** GGTCCCCCAGCAGAAGTATCGACTGCATGCTAATTATTAACAAACCAAA

A**CCCGGG**TGGAGCCGATCGATAGGCGCCTCTAAAGGCGCATGCAAACCAAGTTATGTGGAGTTCTT  
GGACTTAGACTTATGGACGGAACATGGGGCCAGTAATGAGACCAAATGGTGTCTCCGATCAGTTGGTTAATCT  
GCACGACTTCGCTCAGACGAAATTGAGCATCTGTTAGAGGAGGCTAGTGGCGTTGCCACTTACACCCTACCT  
TTAGGTTTAAACTTAACAGACTAACGGGAGGTACCCCTGTTAAACTGATGTCCTAACCTTACCTATGTAGGC  
GAAAATCAATAAAACAGAAAAATAAGTTAAAGCTTATTTCATACACGCGAGCGGTAAAGGCTGCCCT  
CAGGAAAAGTTACTCTGAAACAGTTCTTACAACAGCACAAACATAGGTATTAGTTAACAGTCATTGGCTA  
TAATAATATACATTCTGGTGGCAAAGCAAGGGTCGTAATCTCAACAAACCATCAACTGGAAATGCAAGAATA  
GTCCAGCACGGTGGTCAATCTAAACAGTAAAGAAACCGCGTTGAGGTTACTAACAGCACAGGTTGAATCTGCGGC  
AGCGTCCATGCATCATAGCTGTCTCAAAGCAGATTGTCCTTCCCTGCCCTGGAAAGTGGTTGGTGAAGCACT  
ACAGGTGTCTTCAACCTCTTCAGCACCCGCACTATTACAGATCTCACCCACACAGCACAGTTTAAGAGAACAA  
ATAGTTGAAGGCTACAAGATTACCTAACGACCCAGTAATTATAAGTGTCTTAAAGAAACTACCCCTAGCT  
CAGGGTTAATGCACCTTAATGGCCTCATGCAGGCTTATGGACAGTTCTAAAGACAGTCTAAATAAG  
TAGTGAGTGTCTAAATATAACTCCCCACATAGTTAATTGATCAGGCCCTGCTAGAATTACAAACTCTCGGTA  
CCACATATACTTTATTGATGCCACCCCTAATAAGTCCTCAATCACTTCTGAACCACATGCTGCTAGCCA  
TGCATTGTAAGACAAGCTGTTAGAGCAGTGAACAGTGTACTGCCACGTTGAGCCTCTGCCAGGAGCAGTGCTTA

GTTACTATCAACTCAATAACCGCATTGCATGTAAACCCCCAAAGAGCAGTTTCATGCCTGTAGCACATCATC  
CCACAAAATAGGAATTTCATAGCATAAAGCAAAGCAATTACAATATTAGGAACACTCTCACCACAGCAGTCACGTGAC  
ATGTTGTCTCAGCAGTGCAGTTGCCCTCATCCTACAATTATGAACAAAAACTAAACACTTCTAACAAAGATAAGT  
GACAATCTCCCTCCTCTAAAAGCATTGTTACATTAGGGTATTATTAAACAACGTAGAAATTCTTA  
**[TAATTA]**  
AAGTGCCTTAAAATGTGCAAGAGCATCATCATACTCA

[0174] **加框**序列分别为 Sa1 I、Xma I 和 Pac I 位点, 下划线部分是狂犬病病毒中和抗原表位序列。

[0175] 3. 重组疫苗 CAV2/IX-G' 中 IX 蛋白序列

[0176]

ATGGACCCTCAACAGAAGGGGCTTGTGAACACACGTGTTGTGACTACCGCG  
TATTCCGTCTTGGGCAGGAGCAAGACAGAACAGAATGTCACCGGGT~~CAGATTAG~~  
AAGGAAAGCCC~~GTGCC~~CTCAGATGTGCTGGAAAGTGGACGCCGCTTGC  
AGCCCCGCGCATCAGAAC~~TTGTATGAGGAGCAGCAG~~CTGAACATGCTTG  
CGGTGAATGTTCTTGGATGAGCTGAAGATCCAGGTGGCTGCCATGCAA  
AACTCTGTGACTGCTATT~~CAGCGAGAAGTAAATGATCTAAAGCAACGAAT~~  
**CGCCCGAGAT** GGCCCAAATTCCCTATTACACGATACCAGACACACTTGGTCCCTGGAGACCGATCGATA  
TACATCATCTCAGTTGCCAAACAATTGGTTGGAGGATGAAGGATGCACCAAC~~CTGTCAGGGT~~TCCTACATG  
GAAC~~TTAAAGTGGACACATCTCAGCCATAAAGGTGAACGGGTT~~CACTTG~~CACAGGC~~TTGTGACAGAGG~~CAGAAAC~~  
GTACACTAACTTGTGTTATGTCACCACCGTCAAAAGAAAGCATTCCGCCAAACACCAGATGCATGTAGAG  
CCCGTACA~~ACTGGAAGATGGCCGGT~~GACCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAGTCCG~~TACCC~~TGACTACCATTGG  
CTTCGAACCGTAAAAACCACAAAGGAGTCTATCGTTATCATATCTCAAGTGTGG~~CAAATTGGACCC~~ATATGATAA  
CTCCCTTCACTTGAGGGTCTCCCTAGCGGAAAGT~~GCTCAGGAATAACGGT~~GCCTCTGTCTACTGCTCAACTAAC  
CACGATTACACCGTTGGATGCCTGAAATCCTGAGACTAGGGACATCTGTGATATTTACTAATAGTAGAGGGAA  
GAGAGCATCCAAGGGGAGCAAGACCTGTGGCTTGTAGATGAAAGGGCCTATATAAGTCTCTAAAGGCGCATGCA  
AACTCAAGTTATGTGGAGTTCTGGACTTAGACTTATGGACGGAACATGG~~GTCATCTGTT~~GTAGAGACC  
AAATGGTGTCTCCGGTCAGTTGTTAATCTGCACGACCTCACTCAGACGAAATTGAGCATCTGTTAGAGGA  
GTTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATAACCACCAAGTCAGTGAGTT~~CAGACGTC~~  
TCAGTCATTAAAGAAA~~ACTTGTCCCCGGT~~CGGAAAGGCATATACCATATTCAACAAAGACCTTGATGGAGGCTGAA  
GCTCACTACAAGTCAGTCAGGACTTGGAAATGAGATCATCCCCTCAAAAGGGT~~TTGAGAGT~~GGAGGGCATGTTT  
AATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCAGAACATATAGAGTTATTGGAATCCTCAGTTATTCCCTGATGCACC  
CCCTG~~CAGACCCGTT~~ACAGTTCAAGGACGGCGATGAGATTGAGGATTGTGGAAGTTCACCTCCC~~GATGTG~~  
CACGAACAGGTCTCAGGGGTTGACCTGGTCTCCGA~~ACTGGGG~~AAAG

GTAACTTGT~~TTATTG~~CAGCTATAATGGTACAAATAAGCAATAGCAT  
CACAAATTCACAAATAAGCATT~~TTT~~CACTGCATTCTAGTTGTGGTTG  
TCCAAACTCATCAATGTATCTAACGCG**TAAT**

[0177] **加框**部分是犬 II 型腺病毒 IX 蛋白序列, 下划线部分是狂犬病病毒糖蛋白膜外区

序列, 阴影部分是 SV40poly(A) 序列。

<110> 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所

<120> 展示狂犬病病毒保护性抗原的犬 II 型腺病毒活载体重组疫苗

<160> 5

<170> PatentIn Version 2.1

<210> 1

<211> 2718

<212> DNA

<213> 犬 II 型腺病毒 (canine adenovirus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (2718)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (2718)

<400> 1

ATGGCAACCC CGTCGATGCT GCCACAATGG TCTTACATGC ACATTGCTGG CCAGGACGCC 60  
GCCGAATACT TGTCTCCCGC CCTGGTTCAAG TTTGCCAAG CAACCAGTTC TTACTTTAAG 120  
TTGGACAACA AGTCAGAAA CCCCACTGTG GCCCCCACCC ACGATGTGAC CACTGAGAGG 180  
TCGCAGCGCT TGCAGCTGCG CTTTGTCGA GTCATGCAAG AGGATGGCCA GTACACTTAC 240  
AAACCCGCT TCCAGCTTGC GGTGGGAGAC AACAGGGTGC TGGACATGGC CAGTACTTAC 300  
TTCGATATCA GGGGTACCCCT AGACAGAGGC CCCTCCTTCA AGCCTTACAG CGGCACCGCC 360  
TACAATGCC CCGCCCCCAA GGCGGGGCT AACAACTGTC TTTTTAATGG ACAGGGTGCC 420  
AATATTAACA CTTTAGCCCA GGTGCCCTCT GCAGGTCTCG GATCCTGGAG CCCTATTGAC 480  
ATACTAGGTT CAACTGTGGC TGTCACAAAC AATACCTACC AGCCAGAGGC CCAGCTGGC 520  
CCTGAAAGCT GGGTCGATGG CAGCCTAGCA GAGCTGGGG ATGCGTCTGG CCGTGCCCTT 600  
AAGGCTTCAA CCCCAGCAT GCCTGCTAT GGTTCTATG CTCCCCCAC CAACGAAAAT 660  
GGAGGTACTG GTCCAGTGGA ATCCAGATT TATAAGGTGA CCACCAACAA TAACAATGAA 720  
GCAGATGCCA TGCTATACAC TGAAGATGTA AACCTGCAGG CCCCAGACAC CCACCTGGTG 780  
CACCAAGTGC CAGAGGGTCA GGTTACAGGG GTGCAAGGGC TGGGCCAGCA GGCTGCGCCC 840  
AACAGGCCGA ACTACATAGG CTTCAAGGAC AACTCATAG GCCTCATGTA CTACAATAGT 900  
AATGGAAACC TAGGGGTGCT GGCGGGTCAG TCATCTCAGC TCAATGCCGT GGTGGACTTG 960  
CAAGACAGAA ACACAGAGCT CTCTTACCAAG CTGCTGCTGG ATGCCCTCAC AGACAGGTCC 1020  
CGCTACTTT CCATGTGGAA CCAGGCTGTA GATAGCTATG ACCAGGATGT TAGGATTATT 1080  
GACAACCATG GCGTGGAAAGA TGATATGCC AACTATTGCT ACCCACTGAG CGGCATGGGG 1140  
CCCCTAACAA ACATGACCAC CATGAAGGTT TTTCAGGCAG AAAATACCAA TGTGGGGCCC 1200  
ATTCAAAAGA TTGGTTTGAG AAATGTTGAG GCCATGGAAA TCAACCTCAA TGCCAACCTC 1260

TTCAAAAGCT TCCTTTACTC CAATGTGGCC TTATACTTGC CTGATGCCTT TAAATACACA 1320  
 CCTGAAAACA TTGTGGCCCC TGCCAATGTG AATACCTATG CTTACATGAA TGTTAGATTA 1380  
 CCCGCCGCCA ACCTTATAGA TACCTTGTA AATATTGGCG CCAGATGGTC ACCAGATGTA 1440  
 ATGGACACTG TTAATCCTTT CAACCACAC AGAAATGCAG GACTCCGCTA CCGTCACAA 1500  
 CTGCTTGGCA ATGGCCGCTA TTGCTCGTTC CATATTCAAGG TCCCTAAAA ATTGTTTGCA 1560  
 ATCAAAAATC TCCTCCTACT GCCTGGAACG TACACGTACG AGTGGTCTT CAGAAAGGAT 1620  
 GTAAACATGA TCCTTCAAAG CAGCTGGGC AATGACCTCC GAGTGGATGG GGCCACCATC 1680  
 AACATTCAAGA GCATCAACCT ATATGCAAGC TTTTCCCAA TGGCACACAA CACTGCCTCC 1740  
 ACTCTGGAAG CCATGCTGCG CAACGATGTA AATGACCAGT CCTTGCGAGA CTACCTGTCT 1800  
 TCTGCCAAC A TGCTTATCC CATCCCTGCC AACACTACTA ACCTGCCAAT CTCCATTCCC 1860  
 GCCAGAAAAGT GGGCGGGATT TAGAGGGTGG AGCTTTACCA GAATTAAGCA ACGAGAAACT 1920  
 CCTGCCCTGG GCTCGCCTTA TGATCCCTAC TTCACTTATT CGGGCAGTAT TCCATATCTG 1980  
 GATGCAACTT TTTACCTCAG CCACACCTT AGAAGAGTTT CCATCATGTT TGACTCTTCC 2040  
 GTGTCTGGC CTGGCAATGA CAGGCTGCTT ACCCCCAATG AGTTGAGAT TAAAAGGTAT 2100  
 GTAGACGGTG AAGGTTACAA TGTGGCCAG TCCAACATGA CAAAAGACTG GTTCATGGTT 2160  
 CAAATGCTAG CCCACTACAA CATCGGCTAC CAAGGCTACC ACCTGCCAGA AAGCTACAAG 2220  
 GACAGAATGT ACTCCTTCCT AAGAAACTTT GAGCCCATGT GCAGACAGTT GGTGGACGTG 2280  
 GCCAACTATG CTGCCTACCA GCCGGTTACC GTGGGCCACC AGCATAACAA TTCTGGTTAT 2340  
 GCTAGCGCCC TTTCGGCCTT TAACCCCGGT GAGGGGCACC CATAACCCAGC AACTGGCCT 2400  
 TACCCACTCA TTGGAGCCAA TGCACTACCC ACTGTCACCC AGAAAAAGTT CCTCTGCGAC 2460  
 AGGTCCCTGT GGCGCATCCC ATTCTCCTCC AACTTTATGT CTATGGGAAC CCTCACTGAC 2520  
 CTGGGCCAAA ACCTGCTGTA CTCTAACTCC GCCCACGCC TTGACATGAC TTTTGAGGTT 2580  
 GATGCCATGA ATGAGCCCAC TCTGTTGTAC GTTTGTTTG AAGTGTTCGA CGTGGCACCG 2640  
 GTCCATCAGC CCCACCGGGG GGTGATTGAG GTAGTGTACC TCAGAACTCC CTTCTCCGCC 2700  
 GGCAACGCCA CCACCTAA 2718

<210> 2  
 <211> 2718  
 <212> DNA  
 <213> 犬 II 型腺病毒 (canine adenovirus)  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (2718)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (2718)  
 <400> 2

ATGGCAACCC CGTCGATGCT GCCACAATGG TCTTACATGC ACATTGCTGG CCAGGACGCC 60

GCCGAATACT TGTCTCCCGC CCTGGTTCAG TTTGCCAAG CAACCAGTTC TTACTTTAAG 120  
 TTGGACAACA AGTCAGAAA CCCCACGTG GCCCCCACCC ACGATGTGAC CACTGAGAGG 180  
 TCGCAGCGCT TGCAGCTGCG CTTGTGCCA GTCATGCAAG AGGATGGCCA GTACACTTAC 240  
 AAAACCCGCT TCCAGCTTGC GGTGGGAGAC AACAGGGTGC TGGACATGGC CAGTACTTAC 300  
 TTCGATATCA GGGGTACCCCT AGACAGAGGC CCCTCCTCA AGCCTTACAG CGGCACCGCC 360  
 TACAATGCC CCGCCCCAA GGCGGGGCT AACAACTGTC TTTTAATGG ACAGGGTGCC 420  
 AATATTAACA CTTTAGCCCCA GGTGCCCTCT GCAGGTACTG TGCTCGGATC CTGGAGCCCT 480  
 ATTGACATAC TAGGTTCAGC TGTACAAAC AATACCTACC AGCCAGAGGC CCAGCTGGC 540  
 CCTGAAAGCT GGGTCGATGG CAGCCTAGCA GAGCTGGGG ATGCGTCTGG CCGTGCCCTT 600  
 AAGGCTCAA CCCCAGCGAT GCCTGCTAT GGTTCTATG CTCCCCCAC CAACGAAAAT 660  
 GGAGGTACTG GTCCAGTGGA ATCCAGATT TATAAGGTGA CCACCAACAA TAACAATGAA 720  
 GCAGATGCCA TGCTATACAC TGAAGATGTA AACCTGCAGG CCCCAGACAC CCACCTGGTG 780  
 CACCAAGTGC CAGAGGGTCA GGTTACAGGG GTGCAAGGGC TGGGCCAGCA GGCTGCGCCC 840  
 AACAGGCCGA ACTACATAGG CTTCAAGGAC AACTTCATAG GCCTCATGTA CTACAATAGT 900  
 AATGGAAACC TAGGGGTGCT GGCGGGTCAG TCATCTCAGC TCAATGCCGT GGTGGACTTG 960  
 CAAGACAGAA ACACAGAGCT CTCTTACCAAG CTGCTGCTGG ATGCCCTCAC AGACAGGTCC 1020  
 CGCTACTTTT CCATGTGGAA CCAGGCTGTA GATAGCTATG ACCAGGATGT TAGGATTATT 1080  
 GACAACCATG GCGTGGAAAGA TGATATGCCA AACTATTGCT ACCCACTGAG CGGCATGGGG 1140  
 CCCCTAACAA ACATGACCAC CATGAAGGTT TTTCAGGCAG AAAATACCAA TGTGGGCC 1200  
 ATTCAAAAGA TTGGTTTGAG AAATGTTGAG GCCATGGAAA TCAACCTCAA TGCCAACCTC 1260  
 TTCAAAAGCT TCCTTTACTC CAATGTGGCC TTATACTTGC CTGATGCCCT TAAATACACA 1320  
 CCTGAAACAA TTGTGGCCCC TGCCAATGTG AATACCTATG CTTACATGAA TGTTAGATTA 1380  
 CCCGCCCA ACCTTATAGA TACCTTGTA AATATTGGCG CCAGATGGTC ACCAGATGTA 1440  
 ATGGACACTG TTAATCCTT CAACCACCA AGAAATGCAG GACTCCGCTA CCGTTCACAA 1500  
 CTGCTGGCA ATGGCCGCTA TTGCTCGTTC CATATTCAAG TCCCTCAAA ATTTTTGCA 1560  
 ATCAAAAATC TCCTCCTACT GCCTGGAACG TACACGTACG AGTGGTCTT CAGAAAGGAT 1620  
 GTAAACATGA TCCTCAAAG CAGCTGGGC AATGACCTCC GAGTGGATGG GGCCACCATC 1680  
 AACATTCAAGA GCATCAACCT ATATGCAAGC TTTTCCCAA TGGCACACAA CACTGCCTCC 1740  
 ACTCTGGAAG CCATGCTGCG CAACGATGTA AATGACCAAGT CCTTGAGA CTACCTGTCT 1800  
 TCTGCCAAC A TGCTTATCC CATCCCTGCC AACACTACTA ACCTGCCAAT CTCCATTCCC 1860  
 GCCAGAAACT GGGCGGGATT TAGAGGGTGG AGCTTACCA GAATTAAGCA ACGAGAAACT 1920  
 CCTGCCCTGG GCTCGCCTTA TGATCCCTAC TTCACTTATT CGGGCAGTAT TCCATATCTG 1980  
 GATGCAACTT TTTACCTCAG CCACACCTTT AGAAGAGTTT CCATCATGTT TGACTCTTCC 2040  
 GTGTCTGGC CTGGCAATGA CAGGCTGCTT ACCCCCAATG AGTTGAGAT TAAAAGGTAT 2100  
 GTAGACGGTG AAGGTTACAA TGTGGCCCCAG TCCAACATGA CAAAAGACTG GTTCATGGTT 2160  
 CAAATGCTAG CCCACTACAA CATCGGCTAC CAAGGCTACC ACCTGCCAGA AAGCTACAAG 2220  
 GACAGAATGT ACTCCCTCCT AAGAAACTTT GAGCCCATGT GCAGACAGTT GGTGGACGTG 2280  
 GCCAACTATG CTGCCTACCA GCGGGTTACC GTGGGCCACC AGCATAACAA TTCTGGTTAT 2340  
 GCTAGCGCCC TTTCGGCCTT TAACCCCGT GAGGGGCACC CATAACCCAGC AACTGGCCT 2400

TACCCACTCA TTGGAGCCAA TGCAGTACCC ACTGTCACCC AGAAAAAGTT CCTCTGCGAC 2460  
 AGGTCCCTGT GGCGCATCCC ATTCTCCTCC AACTTTATGT CTATGGGAAC CCTCACTGAC 2520  
 CTGGGCCAAA ACCTGCTGTA CTCTAATCCT GCCCACGCC CCC 2580  
 GATGCCATGA ATGAGCCCAC TCTGTTGTAC GTTTGTTG AAGTGTTCGA CGTGGCACGC 2640  
 GTCCATCAGC CCCACCAGGGG GGTGATTGAG GTAGTGTACC TCAGAACTCC CTTCTCCGCC 2700  
 GGCAACGCCA CCACCTAA 2718

<210> 3  
 <211> 2718  
 <212> DNA  
 <213> 犬 II 型腺病毒 (canine adenovirus)  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (2718)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (2718)  
 <400> 3

ATGGCAACCC CGTCGATGCT GCCACAATGG TCTTACATGC ACATTGCTGG CCAGGACGCC 60  
 GCCGAATACT TGTCTCCCGC CCTGGTTCAG TTTGCCAAG CAACCAAGTTC TTACTTTAAC 120  
 TTGGACAACA AGTCAGAAA CCCCCACTGTG GCCCCCACCC ACGATGTGAC CACTGAGAGG 180  
 TCGCAGCGCT TGCAGCTGCG CTTTGCCCA GTCATGCAAG AGGATGGCCA GTACACTTAC 240  
 AAAACCCGCT TCCAGCTTGC GGTGGGAGAC AACAGGGTGC TGGACATGGC CAGTACTTAC 300  
 TTCGATATCA GGGGTACCCCT AGACAGAGGC CCCTCCTTCA AGCCTTACAG CGGCACCGCC 360  
 TACAATGCC 420  
 TCGCCCCCAA GGCGGGGCT AACAACTGTC TTTTTAATGG ACAGGGTGCC 420  
 AATATTAACA CTTTAGGCCA GGTGCCCTCT GCAGGTACTG TGCTCGGATC CTGGAGCCCT 480  
 ATTGACATAC TAGGTTCAAC TGGTCCAGTG GAATCCAGAT TTTATAAGGT GACCACCAAC 540  
 AATAACAATG AAGCAGATGC CATGCTATAC ACTGAAGATG TAAACCTGCA GGCCCCAGAC 600  
 TATGCTCCCC CCACCAACGA AAATGGAGGT CTCGGATCCT GGAGCCCTAT TGACATACTA 660  
 GGTTCAACTG GTCCAGTGGA ATCCAGATT TATAAGGTGA CCACCAACAA TAACAATGAA 720  
 GCAGATGCCA TGCTATACAC TGAAGATGTA AACCTGCAGG CCCCCAGACAC CCACCTGGTG 780  
 CACCAAGTGC CAGAGGGTCA GGTTACAGGG GTGCAAGGGC TGGGCCAGCA GGCTGCGCCC 840  
 AACAGGCCGA ACTACATAGG CTTCAAGGAC AACTTCATAG GCCTCATGTA CTACAATAGT 900  
 AATGGAAACC TAGGGGTGCT GGCGGGTCAG TCATCTCAGC TCAATGCCGT GGTGGACTTG 960  
 CAAGACAGAA ACACAGAGCT CTCTTACCAAG CTGCTGCTGG ATGCCCTCAC AGACAGGTCC 1020  
 CGCTACTTTT CCATGTGGAA CCAGGCTGTA GATAGCTATG ACCAGGATGT TAGGATTATT 1080  
 GACAACCATG GCGTGGAAAGA TGATATGCCA AACTATTGCT ACCCACTGAG CGGCATGGGG 1140  
 CCCCTAACAA ACATGACCAC CATGAAGGTT TTTCAAGGAG AAAATACCAA TGTGGGCC 1200

ATTCAAAAGA TTGGTTTGAG AAATGTTGAG GCCATGGAAA TCAACCTCAA TGCCAACCTC	1260
TTCAAAAGCT TCCTTTACTC CAATGTGGCC TTATACTTGC CTGATGCCTT TAAATACACA	1320
CCTGAAAACA TTGTGGCCCC TGCCAATGTG AATACCTATG CTTACATGAA TGTTAGATTA	1380
CCCGCCGCCA ACCTTATAGA TACCTTGTA AATATTGGCG CCAGATGGTC ACCAGATGTA	1440
ATGGACACTG TTAATCCTTT CAACCACAC AGAAATGCAG GACTCCGCTA CCGTTCACAA	1500
CTGCTTGGCA ATGGCCGCTA TTGCTCGTTC CATATTCAAGG TCCCTCAAAA ATTTTTGCA	1560
ATCAAAAATC TCCTCCTACT GCCTGGAACG TACACGTACG AGTGGTCTTT CAGAAAGGAT	1620
GTAAACATGA TCCTTCAAAG CAGCTGGGC AATGACCTCC GAGTGGATGG GGCCACCATC	1680
AACATTCAAGA GCATCAACCT ATATGCAAGC TTTTCCCCTA TGGCACACAA CACTGCCTCC	1740
ACTCTGGAAG CCATGCTGCG CAACGATGTA AATGACCAGT CCTTGCGAGA CTACCTGTCT	1800
TCTGCCAACA TGCTTTATCC CATCCCTGCC AACACTACTA ACCTGCCAAT CTCCATTCCC	1860
GCCAGAAACT GGGCGGGATT TAGAGGGTGG AGCTTTACCA GAATTAAGCA ACGAGAAACT	1920
CCTGCCCTGG GCTCGCCTTA TGATCCCTAC TTCACTTATT CGGGCAGTAT TCCATATCTG	1980
GATGCAACTT TTTACCTCAG CCACACCTTT AGAAGAGTTT CCATCATGTT TGACTCTTCC	2040
GTGTCTTGGC CTGGCAATGA CAGGCTGCTT ACCCCCAATG AGTTGAGAT TAAAAGGTAT	2100
GTAGACGGTG AAGGTTACAA TGTGGCCAG TCCAACATGA CAAAGACTG GTTCATGGTT	2160
CAAATGCTAG CCCACTACAA CATCGGCTAC CAAGGCTACC ACCTGCCAGA AAGCTACAAG	2220
GACAGAATGT ACTCCTTCCT AAGAAACTTT GAGCCCATGT GCAGACAGTT GGTGGACGTG	2280
GCCAACATATG CTGCCTACCA GCCGGTTACC GTGGGCCACC AGCATAACAA TTCTGGTTAT	2340
GCTAGCGCCC TTTCGGCCTT TAACCCCGGT GAGGGGCACC CATAACCCAGC AACTGGCCT	2400
TACCCACTCA TTGGAGCCAA TGCAGTACCC ACTGTCACCC AGAAAAAGTT CCTCTGCGAC	2460
AGGTCCCTGT GGGCATCCC ATTCTCCTCC AACTTTATGT CTATGGGAAC CCTCACTGAC	2520
CTGGGCCAAA ACCTGCTGTA CTCTAACTCC GCCCACGCC TTGACATGAC TTTTGAGGTT	2580
GATGCCATGA ATGAGCCCAC TCTGTTGTAC GTTTGTTTG AAGTGTTCGA CGTGGCACGC	2640
GTCCATCAGC CCCACCGGGG GGTGATTGAG GTAGTGTACC TCAGAACTCC CTTCTCCGCC	2700
GGCAACGCCA CCACCTAA	2718

- 〈210〉 4
- 〈211〉 2718
- 〈212〉 DNA
- 〈213〉 犬 II 型腺病毒 (canine adenovirus)
- 〈220〉
- 〈221〉 CDS
- 〈222〉 (1)... (2718)
- 〈223〉
- 〈220〉
- 〈221〉 CDS
- 〈222〉 (1)... (2718)
- 〈400〉 4

ATGGCAACCC CGTCGATGCT GCCACAATGG TCTTACATGC ACATTGCTGG CCAGGACGCC 60  
 GCCGAATACT TGTCTCCCGC CCTGGTTCAAG TTTGCCAAG CAACCAGTTC TTACTTTAAG 120  
 TTGGACAACA AGTCAGAAA CCCCACTGTG GCCCCCACCC ACGATGTGAC CACTGAGAGG 180  
 TCGCAGCGCT TGCAGCTGCG CTTTGCCCA GTCATGCAAG AGGATGGCCA GTACACTTAC 240  
 AAAACCCGCT TCCAGCTTGC GGTGGGAGAC AACAGGGTGC TGGACATGGC CAGTACTTAC 300  
 TTCGATATCA GGGGTACCCCT AGACAGAGGC CCCTCCTTCA AGCCTTACAG CGGCACCGCC 360  
 TACAATGCC TCGCCCCCAA GGCGGGGCT AACAACTGTC TTTTTAATGG ACAGGGTGCC 420  
 AATATTAACA CTTAGCCCA GGTGCCCTCT GCAGGTACTG TGCTCGGATC CTGGAGCCCT 480  
 ATTGACATAC TAGGTTCAAC TGGTCCAGTG GAATCCAGAT TTTATAAGGT GACCACCAAC 540  
 AATAACAATG AAGCAGATGC CATGCTATAC ACTGAAGATG TAAACCTGCA GGCCCCAGAC 600  
 TATGCTCCCC CCACCAACGA AAATGGAGGT ACTGGTCCAG TGGAATCCAG ATTTTATAAG 660  
 GTGACCACCA ACAATAACAA TGAAGCAGAT GCCATGCTAT ACACTGAAGA TGTAAACCTG 720  
 CAGGCCAG ACACCCACCT GGTGCACCAA GTGCCAGAGG GTCAGGTTAC AGGGGTGCAA 780  
 GGGCTGGGCC AGCAGGCTGC GCCAACACAGG CCGAACTACA TAGGCTTCAG GGACAACCTC 840  
 ATAGGCCTCA TGTACTACAA TAGTAATGGA AACCTAGGGG TGCTGGCGGG TCAGTCATCT 900  
 CAGCTCAATG CCGTGGTGGA CTTGCAAGAC AGAAACACAG AGCTCTCTTA CCAGCTGCTG 960  
 CTGGATGCC TCACAGACAG GTCCCGCTAC TTTTCCATGT GGAACCAGGC TGTAGATAGC 1020  
 TATGACCAGG ATGTTAGGAT TATTGACAAC CATGGCGTGG AAGATGATAT GCCCAACTAT 1080  
 TGCTACCCAC TGAGCGGCAT GGGGCCCCTA ACAAACATGA CCACCATGAA GGTTCTCGGA 1140  
 TCCTGGAGCC CTATTGACAT ACTAGGTTCA TTTCAGGCAG AAAATACCAA TGTGGGCC 1200  
 ATTCAAAAGA TTGGTTTTGG AAATGTTGAG GCCATGGAAA TCAACCTCAA TGCCAACCTC 1260  
 TTCAAAAGCT TCCTTACTC CAATGTGGCC TTATACTTGC CTGATGCCTT TAAATACACA 1320  
 CCTGAAAACA TTGTGGCCCC TGCCAATGTG AATACCTATG CTTACATGAA TGTAGATTTA 1380  
 CCCGCCGCCA ACCTTATAGA TACCTTGTA AATATTGGCG CCAGATGGTC ACCAGATGTA 1440  
 ATGGACACTG TTAATCCTT CAACCAACAC AGAAATGCAG GACTCCGCTA CCGTCACAA 1500  
 CTGCTTGGCA ATGGCCGCTA TTGCTCGTTC CATATTCAAGG TCCCTCAAAA ATTTTTGCA 1560  
 ATCAAAATC TCCTCCTACT GCCTGGAACG TACACGTACG AGTGGTCTTT CAGAAAGGAT 1620  
 GTAAACATGA TCCTTCAAAG CAGCTGGGC AATGACCTCC GAGTGGATGG GGCCACCATC 1680  
 AACATTCAAGA GCATCAACCT ATATGCAAGC TTTTCCCAA TGGCACACAA CACTGCCTCC 1740  
 ACTCTGGAAG CCATGCTGCG CAACGATGTA AATGACCAGT CCTTGCGAGA CTACCTGTCT 1800  
 TCTGCCAAC A TGCTTTATCC CATCCCTGCC AACACTACTA ACCTGCCAAT CTCCATTCCC 1860  
 GCCAGAAACT GGGCGGGATT TAGAGGGTGG AGCTTTACCA GAATTAAGCA ACGAGAAACT 1920  
 CCTGCCCTGG GCTCGCCTTA TGATCCCTAC TTCACTTATT CGGGCAGTAT TCCATATCTG 1980  
 GATGCAACTT TTTACCTCAG CCACACCTTT AGAAGAGTTT CCATCATGTT TGACTCTTCC 2040  
 GTGTCTGGC CTGGCAATGA CAGGCTGCTT ACCCCCAATG AGTTGAGAT TAAAAGGTAT 2100  
 GTAGACGGTG AAGGTTACAA TGTGGCCCAG TCCAACATGA CAAAGACTG GTTCATGGTT 2160  
 CAAATGCTAG CCCACTACAA CATCGGCTAC CAAGGCTACC ACCTGCCAGA AAGCTACAAG 2220  
 GACAGAATGT ACTCCTTCCT AAGAAACTTT GAGCCCAGTGCAGACAGTT GGTGGACGTG 2280  
 GCCAACTATG CTGCCTACCA GCCGGTTACC GTGGGCCACC AGCATAACAA TTCTGGTTAT 2340

GCTAGCGCCC	TTTCGGCCTT	TAACCCGCGT	GAGGGGCACC	CATAACCAGC	AAACTGGCCT	2400
TACCCACTCA	TTGGAGCCAA	TGCAGTACCC	ACTGTCACCC	AGAAAAAGTT	CCTCTGCGAC	2460
AGGTCCCTGT	GGCGCATCCC	ATTCTCCTCC	AACTTTATGT	CTATGGGAAC	CCTCACTGAC	2520
CTGGGCCAAA	ACCTGCTGTA	CTCTAACTCC	GCCCACGCC	TTGACATGAC	TTTGAGGTT	2580
GATGCCATGA	ATGAGCCCAC	TCTGTTGTAC	GTTCGGTTTG	AAGTGTTCGA	CGTGGCACGC	2640
GTCCATCAGC	CCCACCGGGG	GGTGATTGAG	GTAGTGTACC	TCAGAACTCC	CTTCTCCGCC	2700
GGCAACGCCA	CCACCTAA					2718

<210> 5

<211> 1550

<212> DNA

<213> 犬 II 型腺病毒 (canine adenovirus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1550)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1550)

<400> 5

GTCGACGGTG	CCCCCAGCAG	AAGTATCGAC	TGCATGCTAA	TTATTAACAA	ACCAAAACCC	60
GGGTGGAGCC	CGATCGATAT	AGGCGCCTCT	CTAAAAGGCG	CATGCAAAC	CAAGTTATGT	120
GGAGTTCTTG	GACTTAGACT	TATGGACGGA	ACATGGGGC	CCAGTAATGA	GACCAAATGG	180
TGTCCTCCCG	ATCAGTTGGT	TAATCTGCAC	GACTTCGCT	CAGACGAAAT	TGAGCATCTT	240
GTTGTAGAGG	AGGCTAGTGG	CGTTGCCACT	TACACCCTA	CCTTTAGGTT	TTTAAACTTT	300
AACAGACTAA	GCGGAGGTAC	CCTGTTAAA	ACTGATGTCT	TAACCTTAC	CTATGTAGGC	360
GAAAATCAAT	AAAACCAGAA	AAAAATAAGT	TTAAAAGCTT	TATTTTCAT	ACACGCGAGC	420
GGTAAGGCTG	CCGCCTTCAG	GAAAAGTTAC	TCTGTAAACA	GTTCTTCAC	AACAGCACAA	480
AACATAGGTA	TTAGTTAAC	GTTCATTTGG	GCTATAATAA	TATACATT	CTTGGGTGGC	540
AAAGCAAGGG	TCGGTAATCT	CAACAAAACC	ATCAACTGGA	ATGCAAGAAT	AGTCCAGCAC	600
GGTGGGTTCA	ATCTAAAAAT	GAAGAACGC	GTTGAGGTT	ACTAAGCACA	GGTTTTGAAT	660
CTGTCGGCAG	CGTCCATGCA	TCATAGCTG	TCTCAAAGCA	GATTGTCTC	TTTCCTCTGC	720
CTTGGAAAGTG	GTTTGGTGAA	GCACTACAGG	TGTCTTTCA	ACCTCTTCA	GCACCCGCAC	780
TATTACAGAT	CTCACCCACA	CAGCACAGTT	TTTAAGAGAA	CAATAGTTT	GAAGGCTACA	840
AGATTACAC	TTAAGCACCA	GCCAGTAATT	ATAAGTGCTT	TTAAGAACTA	CCCCTAGCTC	900
AGGGTTAATG	CACCTTTAA	TGGCCTCCAT	GCAGGCTTA	TGGACAGTTC	AAAAAAAAGA	960
CAGTCTAAAA	TAAATGTAGT	GAGTGTTC	AAATATAATA	CTCCCCACAT	AGTTAATTTC	1020
ATCAGGCCCTG	CTAGAATT	CAAACCTCG	GTACCACATA	TACTTTTAT	TCATAGCCCC	1080
ACCCTTAATA	AAGTCCTCAA	TCACCTTCTG	AACCACATGC	TTGCTAGCCA	TGCATTGTAA	1140

AGACAAGCTG TTAGAGCAGT GACAGTGTAC TCGCCACGTT TGAGCCTCTG CCAGGCAGCA 1200  
GTGCTTAGTT ACTATCAACT CAATAACCCGC ATTGCATGTA AACCCCCCAA AGAGCAGTTT 1260  
TTCATGCCCTG TGTAGCACAT CATCCCACAA AATAGGAATT TCATAGCATA AAGCAAAGCA 1320  
ATTACAATAT TTAGGAACCTC TCACCACAGC AGTCACGTGA CATGTTGTCT CAGCAGTGCA 1380  
GTTGCCTTCC ATCCTACAAT TATGAACAAA AACTAAACAC TTCTAACAAA GATACAGTGA 1440  
CAATCTCCCT TCCTCTAAAAA GCATTGTTA CATTAGGGTG ATTATTAACA ACGTCAGAAA 1500  
TTTCTTAAT TAAAGTGCCT TTAAAATGTG CAAGAGCATC ATCATACTCA 1550