



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101903040 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 01

(21) 申请号 200880016674. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 03. 28

A61K 39/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 43/00 (2006. 01)

11/729, 978 2007. 03. 30 US

C12N 1/21 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 11. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/004070 2008. 03. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02008/121329 EN 2008. 10. 09

(71) 申请人 法国诗华动物保健公司

地址 法国利布尔讷

(72) 发明人 克里斯蒂·M·多尔西

劳伦·E·詹森 江崎素之

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

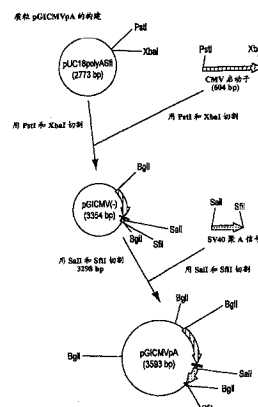
权利要求书 1 页 说明书 26 页 序列表 13 页
附图 10 页

(54) 发明名称

含有禽流感基因的火鸡疱疹病毒载体重组体

(57) 摘要

本发明提供了一种重组火鸡疱疹病毒,其通过存在在启动子下的编码禽流感病毒的血凝素蛋白的 cDNA 而被修饰。本发明中所描述的包含重组火鸡疱疹病毒的家禽疫苗可以诱导血清学应答,所述血清学应答可以容易地通过血凝抑制测定法检出,而非通过商品化诊断 ELISA 试剂盒检出;如此使得能够容易地区别接种和场地感染。



1. 一种重组火鸡疱疹病毒,其包含禽流感病毒的血凝素基因和巨细胞病毒立即早期启动子,其中所述血凝素基因在所述启动子的控制下。
2. 权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒,其中所述血凝素基因和所述启动子存在于火鸡疱疹病毒基因组的非必需区中。
3. 权利要求 2 的重组火鸡疱疹病毒,其中所述非必需区在火鸡疱疹病毒基因组的 UL45 和 UL46 之间。
4. 权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒,其中所述禽流感病毒是 H5 亚型。
5. 权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒,其中所述禽流感病毒是甲型 / 火鸡 / 威斯康星 /68 (H5N9) 毒株。
6. 权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒,其中所述血凝素基因的核苷酸序列在 SEQ ID NO : 1 中显示。
7. 一种家禽疫苗,其包含权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒。
8. 一种家禽疫苗,其包含权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒,其中所述疫苗最迟在接种疫苗后 5 周在所接种的鸡中赋予大于 50 的血凝抑制滴度(几何平均滴度),其中所述血凝抑制滴度定义为当使用 4 个血凝单位的灭活禽流感病毒同源抗原时展现出血凝抑制的血清的最高稀释度。
9. 一种通过用权利要求 1 的重组火鸡疱疹病毒接种鸡来赋予高血凝抑制滴度的方法。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述所接种的鸡最迟在接种后 5 周形成大于 50 的血凝抑制滴度(几何平均滴度),其中所述血凝抑制滴度定义为当使用 4 个血凝单位的灭活禽流感病毒同源抗原时展现出血凝抑制的血清的最高稀释度。

含有禽流感基因的火鸡疱疹病毒载体重组体

[0001] 发明背景

[0002] 1. 发明领域

[0003] 本发明一般地涉及针对禽流感 (AI) 的禽疫苗。更具体地, 本发明提供了一种重组火鸡疱疹病毒, 其通过存在在启动子下的编码禽流感病毒的血凝素 (HA) 蛋白的 cDNA 而被修饰。

[0004] 2. 相关技术的说明

[0005] 禽流感由归类于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 甲型流感病毒 (Influenzavirus A) 属的禽流感病毒引起。禽流感病毒的基因组由 8 段单链的反义 RNA 构成。该病毒基因组编码 10 种蛋白质, 其中 8 种蛋白质是结构蛋白, 包括 HA 和神经氨酸酶 (NA), 而 2 种蛋白质是非结构的。基于 HA 和 NA 蛋白的抗原性, 将甲型流感分成多种亚型。存在公认的 16 种 HA 抗原和 9 种 NA 抗原。认为 HA 是主要的抗原, 其可以在禽类 (birds) 中引发保护性抗体。

[0006] 基于其致病性, 来自家禽的甲型流感病毒分成两种致病型: 高致病性禽流感 (HPAI) 病毒和低致病性禽流感 (LPAI) 病毒。大多数禽流感病毒是低毒力的, 但是少数 H5 和 H7 亚型病毒可引起导致高死亡率的严重系统性疾病。虽然仅少数 H5 和 H7 禽流感病毒是高毒力的, 但是因为低毒力病毒通过突变而增加毒力的风险, 所有的 H5 和 H7 病毒都被世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, OIE) 定为须报告的 (notifiable) 禽流感病毒。

[0007] 自 1990 年代后期以来, AI 爆发的数目及那些爆发中所牵涉的禽类数目有显著的增加 (I. Capua 等, 2004, Avian Pathology, 33 :393-404)。最值得注意的例子是在中国和东南亚的一系列 H5N1 HPAI 爆发, 现在其已经蔓延至世界的其它部分, 如欧洲、中东和非洲。自 2003 年以来, 这些爆发已经在超过 10 个国家使多至 160 人失去生命, 虽然仍待证实明显的人与人之间的传播。这些最近的爆发已经对家禽工业造成了巨大的经济损失, 而且由于害怕有可能的人大流行病而引起了公众的担忧。

[0008] 因为所谓的“扑灭 (stamping out)”规程已经是首要的选项, 所以针对 AI 的接种直至最近尚未广泛地进行。在“扑灭”规程中, 汰除鸡群中所有感染 AI 的鸡。过去大多数 AI 爆发通过“扑灭”根除或控制。但是, 在最近的 AI 爆发中, 尤其在 H5N1 爆发中, 已经有大规模汰除 (culling) 不实用或不可行的情况, 这是由于与汰除有关的难以忍受的经济成本和损失、所谓的后院鸡 (backyard chicken) 的普遍存在等。在那些情况中, 已经认为接种是支持 AI 根除或 AI 控制程序的合适而有力的工具, 因为已经显示了接种保护家禽免于临床征候 (clinical sign) 和死亡, 并在所接种的禽类中降低病毒脱落, 由此降低病毒传播 (D. E. Swayne., 2003, Developments in Biologicals, 114 :201-212)。为了在 AI 根除程序或 AI 控制程序中利用疫苗, 对贸易和监视目的至关重要, 所接种的禽类可以与那些感染野病毒 (field virus) 的禽类区别开来。实际上, 必须在简单的血清学测定法中检测出所接种鸡群中的场地暴露 (field exposure)。否则, 野病毒可以在未检出的已接种禽类中传播。可以通过简单的测定法检测出接种的凭据也是重要的, 以便证实所接种的群体中的大

部分或所有的禽类是正确接种的。

[0009] 目前商品化的疫苗是具有油佐剂的灭活的完全 AI 抗原和鸟痘病毒载体重组疫苗。虽然已经显示了两种疫苗均是有效的,但是它们要求牵涉手工处理每只禽的劳动密集型且昂贵的胃肠外接种。虽然灭活的 AI 疫苗已经在称为 DIVA (“区别感染动物与接种动物”,“Differentiation of infected from vaccinated animals”)的程序中使用,但是还没有针对大规模施用而开发的商业上可用的测试。已经显示了,通过场地暴露或通过用常规的鸟痘疫苗进行接种得到的用鸟痘病毒预免疫的鸡在用鸟痘病毒载体重组 AI 疫苗接种后不会形成针对 AI 的一致性的保护性免疫 (D. E. Swayne 等,2000, Avian Diseases, 44 : 132-137)。鸟痘病毒载体重组 AI 疫苗不能引发可通过血凝抑制 (HI) 测试一致检出的血清学应答 (D. E. Swayne 等,1997, Avian Diseases, 41 : 910-922)。因此,开发更易于施用并且可容易地与野病毒感染区别的疫苗对于家禽工业是想要的。

[0010] 商品化鸟痘病毒载体重组 AI 疫苗含有甲型 AI 病毒 / 火鸡 / 爱尔兰 / 1378/83 (H5N8) 的 HA 基因 (J. R. Taylor 等,1988, Vaccine, 6 : 504-508)。已经开发了数种其它的实验用鸟痘载体重组疫苗,并且显示了针对实验条件中用 AI 病毒的攻击是有效的。鸟痘载体重组疫苗中所含有的禽流感病毒基因包括来自甲型 / 鸡 / 苏格兰 / 59 (H5N1) 的 HA 基因 (C. W. Beard 等,1991, Avian Diseases, 35 : 356-359) 和来自甲型 / 鹅 / 广东 / 3/96 (H5N1) 的 HA 和 NA 基因 (C. Qiao 等,2003, Avian Pathol., 32 : 25-31)。M. Mingxiao 等融合来自 H5N1 亚型和 H7N1 亚型的 HA 基因以形成单一开放框,并与鸡白介素 -18 一起插入重组鸟痘病毒中 (M. Mingxiao 等,2006, Vaccine, 24 : 4304-4311)。已经观察到 AI 病毒 H5 亚型之中的广泛交叉保护。已经证明了,针对禽流感 H5 亚型的鸟痘病毒载体重组 AI 疫苗和灭活的完全 AI 疫苗保护鸡抵御用不同 H5 亚型 AI 病毒进行的攻击,所述不同 H5 亚型 AI 病毒的推导出的 HA 氨基酸序列与疫苗的相似性低至 87% (D. E. Swayne 等,2000, Veterinary Microbiol., 74 : 165-172)。

[0011] 开发中的下一代疫苗包括重组新城疫病毒疫苗 (D. E. Swayne 等,2003, Avian Diseases, 47 : 1047-1050 ; J. Veits 等,2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103 : 8197-8202 ; M. Park 等,2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103 : 8203-8208 ; 及 J. Ge 等,2007, J. Virol. 81 : 150-158)、重组感染性喉气管炎病毒疫苗 (D. Luschow 等,2001, Vaccine 19 : 4249-4259 和 J. Veits 等,2003, J. Gen. Virol. 84 : 3343-3352)、重组腺病毒疫苗 (W. Gao 等,2006, J. Virol. 80 : 1959-1964)、杆状病毒 - 表达的亚基疫苗 (J. Crawford 等,1999, Vaccine, 17 : 2265-2274 和 D. E. Swayne 等,2001, Avian Diseases, 45 : 355-365) 和 DNA 疫苗 (美国专利号 5,916,879 和 M. Cherbonnel 等,2003, Avian Diseases, 47 : 1181-1186)。虽然重组新城疫病毒疫苗、重组感染性喉气管炎病毒疫苗、和重组腺病毒疫苗能够在无特异性病原体的鸡中赋予针对 AI 攻击的部分至半完全的保护,但是它们在具有针对该载体病毒或 AI 的母体抗体的鸡中,或者在先前感染或接种该载体病毒的鸡中的功效仍有待证明。也已经显示 DNA 疫苗在鸡体内提供保护性免疫,但是它们需要至少两次接种及给每只鸡的单独施用。杆状病毒 - 表达的亚基疫苗也需要给每只鸡的单独施用。

[0012] 火鸡疱疹病毒 (HVT),即马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 血清型 -3 已经被作为载体使用以表达来自禽病原体的抗原。野生型 HVT 或重组 HVT 可以经由卵内 (in ovo) 路径向发育后期的胚胎施用,或者在孵化场经由皮下路径向一日龄雏鸡施用。

证明了重组的、细胞相关的 HVT 疫苗在接种入具有针对插入抗原的母体抗体的胚胎或一日龄雏鸡后能够克服母体抗体的影响,并随着母体抗体减少而将保护性免疫赋予鸡(美国专利号 6,764,684 和美国专利号 6,866,852)。卓越的免疫持续时间也通过重组 HVT 实现(美国专利号 6,866,852),这可能是因为 HVT 变为潜伏性的,并保持在所接种禽类体内,持续其一生。如此,可以认为 HVT 是卓越的禽病原体载体。尚未有构建具有禽流感抗原的重组 HVT 或 MDV 的报道。虽然美国专利号 5,853,733 的权利要求 15 记载了包含插入与 HVT 基因组的 EcoRI#9 片段对应的区域内的 AI 病毒的多肽基因的重组 HVT,但是没有构建具有禽流感抗原的重组 HVT 的实际例子。在哺乳动物物种中,美国专利号 6,225,111 记载了包含马流感病毒 HA 基因的重组马疱疹病毒的构建,但是没有关于这些重组体的疫苗功效的数据。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了一种重组 HVT,其通过存在在启动子下的编码禽流感病毒 HA 蛋白的 cDNA 而被修饰。该重组 HVT 能够引发血清学应答,所述血清学应答容易通过 HI 测定法检出,而非通过商业上可得到的诊断 ELISA 试剂盒检出。该重组病毒的这种特征使得能够容易地区别接种和场地感染(fieldinfection)。还提供了一种包含重组 HVT 的家禽疫苗。

[0015] 下文更详细地描述了本发明。

[0016] (禽流感病毒血凝素基因)

[0017] 该血凝素基因可以自禽流感病毒的任何亚型或任何毒株获得。优选地,所述 HA 基因自 H5 亚型禽流感病毒获得。更优选地,所述 HA 基因自 H5N9 亚型禽流感病毒获得。最优选地,所述 HA 基因自甲型禽流感病毒/火鸡/威斯康星/68(H5N9)毒株获得。来自该甲型/火鸡/威斯康星/68(H5N9)毒株的 HA 基因的核苷酸序列在 SEQ ID NO:1 中显示。SEQ ID NO:1 中的序列与甲型/火鸡/威斯康星/68(H5N9)毒株 HA 基因的公开核苷酸序列(M. Garcia 等,1997, VirusRes. 51:115-124, GenBank 登录号 U79456)有数个碱基的差异。这些差异可能归因于具有 RNA 基因组的禽流感病毒的遗传不稳定性。因此,SEQ ID NO:1 中所显示的序列仅仅是一个例子,并且本发明不应当限于该序列。

[0018] (启动子)

[0019] 包括接近 HVT 基因组中 HA 基因的、通常在 HA 基因的 5'区处的调控 DNA 序列(其在这里称为启动子)以控制 HA 基因的转录,由此控制 HA 基因的表达(HA 蛋白的生成)。当基因的转录和由此的表达受启动子控制时,认为该基因在该启动子的控制下。在本发明中,HA 的基因在巨细胞病毒立即早期启动子(CMV 启动子)的控制下。我们发现,具有与 CMV 启动子组合的 HA 基因的重组 HVT 能够通过 HI 在鸡中赋予比具有其它启动子诸如鸡 β -肌动蛋白启动子(T. A. Kost 等,1983, Nucleic Acids Res. 11:8287-8301)和经修饰的鸡 β -肌动蛋白启动子(美国专利号 6,866,852)的重组 HVT 更高且更一致的血清学滴度。CMV 启动子的核苷酸序列记载于文献中(M. Boshart 等,1985, Cell 41:521-530, GenBank 登录号 K03104)。然而,只要启动子在禽物种的细胞中或体内是功能性的,启动子的核苷酸序列便不必与文献中的序列相同。发明人自最初序列对 CMV 启动子(其序列显示于 SEQ ID NO:3 中)加以略微修饰,但是证明其仍有效表达 HA 基因。

[0020] (火鸡疱疹病毒)

[0021] 火鸡疱疹病毒是疱疹病毒科(Herpesviridae family)和 α -疱疹病毒亚科(Alphaherpesvirinae subfamily)中的双链线性 DNA 病毒。HVT 在家养火鸡中是普遍存在

的且是非治癌的,并且它被分类为马立克氏病病毒血清型 3。已经广泛地用 HVT 对鸡进行接种以在鸡中预防马立克氏病。只要它对鸡是非致病的,本发明中便可以使用任何 HVT。例如,下列 HVT 毒株,FC126、PB-THV1、H-2、YT-7、WTHV-1、和 HPRS-26 适用于主链病毒。这些之中,将 FC126 毒株有利地用于本发明中。

[0022] (供基因插入的区域)

[0023] 在本发明中,将 HA 基因和 CMV 启动子插入 HVT DNA 基因组中。优选地,将 HA 基因和 CMV 启动子插入 HVT 基因组中病毒生长非必需的区域,其在这里称为非必需区。换言之,非必需区可定义为这样的区域,其中外来基因的修饰或插入不会阻止病毒在体外或在体内成功复制。HVT 基因组中的数个非必需区已经有报道。例如,可以将 HA 基因和 CMV 启动子插入,但不限于 UL43(WO 89/01040)、US2(WO 93/25665) 或 UL44 和 UL46 之间的 ORF- 间区域(WO99/18215)。最优选地,将 HA 基因和 CMV 启动子插入 UL45 和 UL46 之间的 ORF- 间区域中。

[0024] 对于本发明,非必需区可以通过下列概括规程新鉴定的。首先,将合适长度的 HVT DNA 片段克隆入大肠杆菌质粒中,并通过限制酶分析进行物理作图。然后,将由启动子和标志基因构成的基因盒插入所克隆 DNA 片段的合适限制位点中,产生同源性质粒。若所获得的同源性质粒的同源重组产生表达所插入标志基因的重组病毒且若该病毒在体外和在体内是稳定的,则最初选定的 DNA 片段应当是适于 HA 基因和 CMV 启动子插入的非必需区。

[0025] (rHVT 的构建)

[0026] 对于本发明,任何已知的生成重组 HVT 方法均是可应用的。一个典型的例子如下。(1) 首先,如上文所述,构建含有 HVT 基因组非必需区的重组质粒。然后,优选地,与 5' 端的启动子和 3' 端的多腺苷酸化信号一起,将 HA 基因插入该非必需区中以生成同源性质粒。(2) 将同源性质粒转染入用亲本 HVT 感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)中,或者与感染性 HVT 基因组 DNA 共转染入 CEF 细胞中。可以通过任何已知的方法来进行转染。(3) 将经转染的 CEF 细胞植于组织培养板上,并进行温育,直至病毒噬斑变得可见。(4) 可鉴定的噬斑包括重组病毒以及亲本野生型病毒。可以通过任何已知方法来从野生型病毒纯化重组病毒以检测所插入外来基因的表达。

[0027] (禽流感-马立克氏病二价疫苗)

[0028] 因为 HA 蛋白是禽流感病毒的保护性抗原,而主链 HVT 是马立克氏病活体疫苗,所以本发明中含有 HA 基因的重组 HVT 可以用作针对 AI 和马立克氏病的二价疫苗,或者用作针对 AI 的单价疫苗。

[0029] 该疫苗(其主要由本发明中的重组 HVT 组成)还可以包括禽细胞、培养基成分、缓冲液如磷酸盐缓冲液和 HEPES 缓冲液、和 / 或佐剂诸如细胞因子和 CpG 寡脱氧核苷酸。只要不是药理学有害的,该疫苗还可含有任何成分诸如防腐剂。另外,本发明的疫苗可以与任何重组的或非重组的病毒(诸如 MDV 血清型 1 或血清型 2 疫苗毒株)在混合物中使用。

[0030] 任何已知方法可适用于制备本发明中的重组二价疫苗。例如,可以将重组 HVT 接种入允许培养细胞(诸如 CEF 细胞)中,并培养至合适的滴度。然后,用细胞刮棒(cell scraper)或者通过胰蛋白酶处理从组织培养板或滚瓶中取出细胞,并通过离心来收集。然后将所沉淀的细胞在含有二甲基亚砜的培养基中悬浮,缓慢地冷冻,然后贮存在液氮中。或

者,可以通过在含有稳定剂(诸如蔗糖和牛清蛋白)的稀释剂中破坏细胞来从经感染的细胞中释放重组 HVT。这些所释放的 HVT 称为无细胞的 HVT。可以冻干无细胞的 HVT,并于 4℃ 贮存。

[0031] 可以通过接种马立克氏病疫苗的任何已知方法来给鸡施用二价重组 HVT 疫苗。例如,用含有缓冲组分、糖类、和染料的稀释剂将本发明的疫苗稀释成给出每剂 10^1 - 10^5 个,或者更有利地, 10^2 - 10^4 个噬斑形成单位(pfu)。可以将经稀释的疫苗在一日龄雏鸡的颈后进行皮下接种或者用注射器或用任何注射装置经由卵内路径接种入含胚卵(embryonating egg)中。

[0032] 在对 HI 测试使用 4 个血凝单位的灭活禽流感病毒同源 H5 亚型抗原时,本禽类二价疫苗能够最迟在(不迟于)接种后 5 周在所接种的鸡群中赋予大于 50 的血清学滴度(几何平均滴度)的 HI。本发明中的二价疫苗还提供了针对用高致病性禽流感病毒(H5N1)进行的致死攻击的卓越保护。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 质粒 pGICMVpA 的构建

[0035] 图 2 同源性质粒 p45CMVH5Wis68 的构建

[0036] 图 3 质粒 pGIBacpA2nd 的构建

[0037] 图 4 同源性质粒 p45BacH5Wis68 的构建

[0038] 图 5 同源性质粒 p45PecH5Wis68 的构建

[0039] 图 6 检测由重组火鸡疱疹病毒进行的血凝素蛋白表达的 Western 印迹测定法。

[0040] 图 7 用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的血凝抑制滴度

[0041] 图 8 用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的 ELISA 滴度,其使用商品化 ELISA 试剂盒(IDEXX LABORATORIES, FLOCKCHEK AIV) 进行。

[0042] 图 9 用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的 ELISA 滴度,其使用商品化 ELISA 试剂盒(SYNBIOTICS, PROFLOK AIV 抗体测试试剂盒) 进行。

[0043] 图 10 用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的血凝抑制滴度(第二次试验)。

[0044] 发明详述

[0045] 基本上通过标准分子生物学技术(Molecular Cloning:A Laboratory Manual. 第 3 版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, N. Y. 2001) 来实施基因克隆和质粒构建。使用火鸡疱疹病毒 FC126 株(R. L. Witter 等, 1970, Am. J. Vet. Res. 31, 525-538) 作为主链病毒来生成重组火鸡疱疹病毒。

[0046] 实施例 1

[0047] 从禽流感病毒 H5 亚型分离血凝素基因

[0048] 将甲型禽流感病毒/火鸡/威斯康星/68(H5N9) 毒株在无特异性病原体的含胚鸡卵的尿膜囊(allantoic sac) 中增殖。使用 RNEASY MINI KIT(QIAGEN, 目录号 74104) 来提取来自甲型/火鸡/威斯康星/68 病毒的总基因组 RNA。用供 RT-PCR 用的 SUPERScript FIRST-STRAND 系统(Invitrogen, 目录号 11904-018) 合成第一链 cDNA。使用所得的 cDNA 作为模板,通过用 PFUULTRA HIGH FIDELITY DNA 聚合酶(STRATAGENE, 目录号 600380) 和 PCR 引物进行的聚合酶链式反应(PCR) 来扩增 HA 基因。这些 PCR 引物,即 BamHA-F 引物(SEQ ID NO:4) 和 SalHA-R

引物 (SEQ ID NO :5) 分别退火至 HA 基因的起始和终止序列,并且每个引物分别在 5' 末端含有供限制酶 BamHI 或 SalI 用的序列。PCR 反应后,将 Taq 聚合酶 (PROMEGA, 目录号 M2665) 添加至 PCR 混合物,以将 3' A- 悬突物 (overhang) 添加至 PCR 产物。

[0049] BamHA-F 引物 (SEQ ID NO :4) 5' -TGACGGATCCATGGAAAGAATAGTGATTG-3'

[0050] SalHA-R 引物 (SEQ ID NO :5) 5' -CTGACAGTCGACCTAGATGCAAATTCTGC-3'

[0051] 将所扩增 1800 个碱基 (kb) HA cDNA 插入 PCR2.1-TOPO 载体中 (INVITROGEN, 目录号 K4500-01) 中,得到 pCR2.1-H5Wis68。用 6 种引物 (BamHA-F 引物 (SEQ ID NO :4)、SalHA-R 引物 (SEQ ID NO :5)、M13 正向引物 (SEQ ID NO :6)、M13 反向引物 (SEQ ID NO :7)、HA-F 引物 (SEQ ID NO :8)、和 HA-R 引物 (SEQ ID NO :9)) 使用 ABI PRISM 3730XL DNA 分析仪 (APPLIEDBIOSYSTEMS) 测定质粒 pCR2.1-H5Wis68 的少数克隆中的 HA 基因和 PCR 产物的核苷酸序列。

[0052] M13 正向引物 (SEQ ID NO :6) 5' -GTAAACGACGGCCAGT-3'

[0053] M13 反向引物 (SEQ ID NO :7) 5' -GGAAACAGCTATGACCATG-3'

[0054] HA-F 引物 (SEQ ID NO :8) 5' -CTGGACAATACTAAGGCCGAACGAT-3'

[0055] HA-R 引物 (SEQ ID NO :9) 5' -CACTGGGGTCTGACATTTGGTA-3'

[0056] 质粒 pCR2.1-H5Wis68 的克隆中的序列彼此之间及与 PCR 产物序列是相同的。虽然推导的氨基酸序列与甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 的报道序列 (M. Garcia 等, 1997, Virus Res. 51 :115-124, GenBank 登录号 U79456) 有 4 个氨基酸的差异,我们所获得的氨基酸与大多数 H5 亚型 HA 蛋白的氨基酸相同。自甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 获得的 HA 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列在 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 中显示。

[0057] 实施例 2 构建同源性质粒

[0058] 2-1. 同源性质粒和重组火鸡疱疹病毒的总结

[0059] 在本发明中,使用 3 种启动子 (CMV 启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子 (Bac 启动子)、和修饰的鸡 β -肌动蛋白启动子 (Pec 启动子)) 来控制甲型 AI 病毒 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 株 HA 基因的表达。首先,构建具有 HA 基因和所述启动子之一的同源性质粒,然后使用该同源性质粒来生成重组火鸡疱疹病毒。比较具有不同启动子的重组火鸡疱疹病毒在鸡中赋予针对 AI 的血清学滴度的能力,如实施例 6 中所示。具有 CMV 启动子的重组 HVT 在这里作为实施例呈现,而具有 Bac 启动子或 Pec 启动子的重组病毒在这里作为比较例呈现。表 1 中显示了本发明中所构建的同源性质粒和重组火鸡疱疹病毒的列表。

[0060] 表 1. 同源性质粒和重组火鸡疱疹病毒的列表

[0061]

项 #	同源性质粒的名称	重组病毒的名称	启动子	实施例对比较例
1	p45CMVH5Wis68	rHVT/CMVH5Wis68	CMV 启动子	实施例
2	p45BacH5Wis68	rHVT/BacH5Wis68	Bac 启动子	比较例
3	p45PecH5Wis68	rHVT/PecH5Wis68	Pec 启动子	比较例

[0062] 2-2. 质粒 pGICMVpA 的构建

[0063] 自 pBK-CMV (STRATAGENE, 目录号 212209) 获得 CMV 启动子。为了使通过使用 4 对引物的 PCR 体外诱变进行的质粒构建过程变得容易, 破坏了 CMV 启动子中的 3 处 BglI 限制酶位点。引物对是 PrCMV1 (SEQ ID NO:10) 和 PrCMV3 (SEQ ID NO:12)、PrCMV4 (SEQ ID NO:13) 和 PrCMV5 (SEQ ID NO:14)、PrCMV6 (SEQ ID NO:15) 和 PrCMV2' (SEQ ID NO:11)、及 PrCMVo1 (SEQ ID NO:16) 和 PrCMVR1 (SEQ ID NO:17)。分开使用每对引物和作为模板的 pBK-CMV 来进行 4 次 PCR 反应。然后将 4 种 PCR 产物合并, 并作为模板用于以引物 PrCMV1 和 PrCMVR1 进行的再次 PCR, 产生具有经修饰的 CMV 启动子序列的 604bp 片段。在 SEQ ID. NO. 3 中提供了用于表达 HA 基因的 CMV 启动子的核苷酸序列。用 PstI 和 XbaI 消化 CMV 启动子片段, 并插入经 PstI 和 XbaI 消化的 pUC18polyASfi (美国专利号 6, 866, 852) 中, 产生 pGICMV(-)。通过使用引物 PolyA-SalKpn (SEQ ID NO:18) 和 PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO:19) 进行的 PCR, 自 pBK-CMV 获得 SV40 聚 A 信号。用 SalI 和 SfiI 消化含有 SV40 聚 A 信号的 PCR 片段, 并连接至用 SalI 和 SfiI 消化的 pGICMV(-), 产生 pGICMVpA (图 1)。

[0064] PrCMV1 (SEQ ID NO:10) 5' -GGGCTGCAGAGTTATTAATAGTAATCAATT-3'

[0065] PrCMV2' (SEQ ID NO:11) 5' -CGCGCCATTTACCGTCATTGACGTC-3'

[0066] PrCMV3 (SEQ ID NO:12) 5' -GGGTCGTTGGGCGGTGACCGGCGG-3'

[0067] PrCMV4 (SEQ ID NO:13) 5' -CTTACGGTAAATGGCCCCGCGGCTG-3'

[0068] PrCMV5 (SEQ ID NO:14) 5' -TACACTTGATGTACTGCCAATGGGC-3'

[0069] PrCMV6 (SEQ ID NO:15) 5' -TATTTACGGTAAACTGCCCATTGGC-3'

[0070] PrCMVo1 (SEQ ID NO:16) 5' -ACGTCAATGACGGTAAATGGCGCGCCTGGC-3'

[0071] PrCMVR1 (SEQ ID NO:17) 5' -CGTCTAGAGGATCTGACGGTTCACTAAACC-3'

[0072] PolyA-SalKpn (SEQ ID NO:18) 5' -TGTGGTACCGTCGACGATTCACAGTCCCAAGGC-3'

[0073] PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO:19) 5' -CTTGGCCTTATTGGCCTAAGATACATTGATGAG-3'

[0074] 2-3. 同源性质粒 p45CMVH5Wis68 的构建

[0075] 通过 BglI 自 pGICMVpA 切割出 CMV 启动子和 SV40 聚 A 信号 (940bp), 并连接入经 SfiI 消化的 p45/46Sfi (US 6, 866, 852) 中, 产生 p45/46CMVpA。然后, 使用 SalI 和 BamHI 自 pCR2.1-H5Wis68 切割出来自甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 的 HA 基因。将该 1701bp HA 基因插入用 SalI 和 BamHI 消化的 p45/46CMVpA 中, 产生 p45CMVH5Wis68 (图 2)。将质粒 p45CMVH5Wis68 作为同源性质粒使用以生成重组火鸡疱疹病毒。

[0076] 2-4. 质粒 pGIBacpA2nd 的构建

[0077] 通过使用 CEF 细胞的细胞 DNA 作为模板进行的 PCR 来获得 Bac 启动子。PrBac1 (SEQ ID NO:18) 和 PrBac2' (SEQ ID NO:19) 是用于 PCR 的引物组。用 PstI 和 XbaI 消化所获得的 1500 个碱基的 DNA 片段, 并插入经 PstI 和 XbaI 消化的 pUC18polyASfi 中, 产生 pGIBac2。然后, 用 SalI 和 SfiI 消化通过使用引物 PolyA-SalKpn (SEQ ID NO:18) 和 PolyA-SfiF2 (SEQ ID NO:19) 进行的 PCR 所获得的 SV40 聚 A 信号, 并连接至用 SalI 和 SfiI 消化的 pGIBac2, 产生 pGIBacpA2nd (图 3)。

[0078] PrBac1 (SEQ ID NO:20) 5' -CAGTGTGCTGCAGCTCAGTGCATGCACGCTCATTGCCC-3'

[0079] PrBac2' (SEQ ID NO :21)

[0080] 5' -GCTCTAGAGGCGTGGAGCTTGGGGGCTGCGGAGGAACAGAGAAGGGAAG-3'

[0081] 2-5. 同源性质粒 p45BachH5Wis68 的构建

[0082] 通过 BglI 自 pGIBacpA2nd 切割出 Bac 启动子和 SV40 聚 A 信号 (1866bp), 并接入经 SfiI 消化的 p45/46Sfi 中, 产生 p45/46BacpA2nd。然后, 将使用 SalI 和 BamHI 自 pCR2.1-H5Wis68 切割出的甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 的 HA 基因插入用 SalI 和 BamHI 消化的 p45/46BacpA2nd 中, 产生 p45BachH5Wis68 (图 4)。

[0083] 2-6. 同源性质粒 p45PecH5Wis68 的构建

[0084] Pec 启动子的构建记载于美国专利号 6,866,852。通过将鸡 β -肌动蛋白启动子的部分与 CMV 启动子的增强子区融合来合成 Pec 启动子。用 PstI 和 BamHI 自 pGIPec (美国专利号 6,866,852) 切割出 Pec 启动子, 并插入经 PstI 和 BamHI 消化的实施例 2-4 中所述的 p45/46BacpA2nd 中, 产生 p45/46PecpA2nd。然后将使用 SalI 和 BamHI 自 pCR2.1-H5Wis68 切割出的甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 的 HA 基因插入用 SalI 和 BamHI 消化的 p45/46PecpA2nd 中, 产生 p45PecH5Wis68 (图 5)。

[0085] 实施例 3 重组火鸡疱疹病毒的生成和分离

[0086] 制备 HVT FC 126 毒株的病毒 DNA, 如 Morgan 等 (Avian Diseases, 1990, 34 : 345-351) 所述。

[0087] 将 10^7 个次级鸡胚成纤维 (CEF) 细胞在盐水 G (0.14M NaCl、0.5mM KCl、1.1mM Na_2HPO_4 、1.5mM NaH_2PO_4 、0.5mM MgCl_2 和 0.011% 葡萄糖) 中悬浮, 并通过电穿孔用 HVT 病毒 DNA 和 5 至 25 μg 同源性质粒 p45CMVH5Wis68、p45BachH5Wis68、或 p45PecH5Wis68 共转染。使用 BIO-RAD GENE PULSER 来实施电穿孔。将经转染的细胞于室温温育 10 分钟, 并转移至 96 孔板的各孔。于 37°C 在 4-5% CO_2 中温育 7 天后, 或者直至噬斑变得可见, 通过胰蛋白酶处理 (trypsinization) 将细胞与平板分离, 相等地转移至两块具有次级 CEF 的 96 孔板, 并温育 3 至 4 天, 直至观察到噬斑。通过仅对表达 HA 蛋白的噬斑染色的黑色噬斑测定法 (black plaque assay) 来进行筛选。简言之, 用甲醇 : 丙酮混合物 (1 : 2) 固定两块平板之一, 并与鸡抗 HA 抗血清一起温育。接着, 与生物素化的抗鸡 IgG 抗体 (VECTOR LABORATORIES, 目录号 BA-9010) 然后与 VECTASTAIN ABC-AP 试剂盒 (Vector Laboratories, 目录号 AK-5000) 一起温育, 通过添加 BCIP/NBT 溶液 (BIO-RAD LABORATORIES, 目录号 170-6539 和 170-6532) 来对表达 HA 蛋白的噬斑染色。鉴定含有经染色的重组噬斑的孔, 并对来自另一块 96 孔板上的相应孔的细胞进行胰蛋白酶处理。然后将细胞在新鲜的次级 CEF 细胞中稀释, 并转移至 96 孔板以完成第一轮纯化。

[0088] 重复纯化步骤, 直至所有噬斑在黑色噬斑测定法中均被染成阳性。具有在 CMV 启动子下的 HA 基因的纯化重组病毒称为 rHVT/CMVH5Wis68 (本发明)。具有 Bac 启动子或 Pec 启动子的重组病毒分别称为 rHVT/BachH5Wis68 和 rHVT/PecH5Wis68 (比较例)。

[0089] 实施例 4 重组 HVT 的基因组结构和稳定性的验证

[0090] 4-1. Southern 印迹分析

[0091] 在 Southern 印迹分析中使用 100-mm 皿中用重组病毒 rHVT/CMVH5Wis68 或 HVT FC126 亲本株感染的鸡胚成纤维细胞以证实 HA 基因在想要的插入位点中的插入。通过细胞刮棒并通过以 913xg 离心 5 分钟来收集细胞。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 清洗所收获的细胞,

并在 1.0 毫升 (ml) 溶解缓冲液 (PBS 中的 0.5% TRITON X-100、100mM 2-巯基乙醇、和 20mM EDTA) 中重悬。将细胞悬浮液涡旋振荡共 30 秒,并于室温温育 15 分钟。通过以 2,060xg 离心 5 分钟来除去细胞核和细胞碎片,并将上清液转移至 1.5-ml 管。通过于 4℃ 以 20,800xg 离心 20 分钟来收集病毒。将沉淀物在 0.33ml 核酸酶溶液 (12.5mM Tris-Cl (pH7.5)、1 μg/ml DNA 酶 I 和 1 μg/ml RNA 酶 A) 中悬浮,并于 37℃ 温育 30 分钟。然后,将 83 μl SDS-蛋白酶溶液 (50mM EDTA、5% SDS、0.5mg/ml 蛋白酶 K、和 25mM 2-巯基乙醇) 添加至病毒悬浮液,并于 55℃ 温育 30 分钟以破坏病毒包膜。进行两次酚氯仿提取,并通过添加 2.5 体积冷的 100% 乙醇和终浓度 0.16M 的 NaCl 来沉淀 DNA。于 4℃ 以 20,800xg 离心 30 分钟后,用 70% 乙醇清洗沉淀物并风干。将沉淀物在 TE 缓冲液 (10mM Tris-Cl (pH8.0) 和 1mM EDTA) 中溶解。

[0092] 用 XhoI、BamHI 和 SpeI 消化 TE 缓冲液中的病毒 DNA 和同源性质粒 (阳性对照),并通过使用 0.6% 琼脂糖凝胶的琼脂糖凝胶电泳来分开。将该凝胶上的 DNA 片段转移至 BIODYNE A 尼龙膜 (PALL, 目录号 BNXF3R)。将该膜与洋地黄毒苷 (Digoxigenin, DIG) 标记的 HA 探针或 DIG 标记的 IS45/46 探针杂交。分别使用引物 HA1-P-F (SEQ ID NO:22) 和 HA1-P-R (SEQ ID NO:23) 及引物 45/46-F (SEQ ID NO:24) 和 45/46-R (SEQ ID NO:25),用 PCR DIG 探针合成试剂盒 (ROCHE APPLIED SCIENCE, 目录号 11636090910) 制备经 DIG 标记的 HA 探针和 IS45/46 探针。

[0093] HA1-P-F (SEQ ID NO:22) 5' -GGGGGTGGCAAGGAATG-3'

[0094] HA1-P-R (SEQ ID NO:23) 5' -GCTAGGGAACTCGCCACTGT-3'

[0095] 45/46-F-B (SEQ ID NO:24) 5' -TAGCGGCACGGAAACAGATAGAGA-3'

[0096] 45/46-R-B (SEQ ID NO:25) 5' -TGGCGATACGGTTCCTGGTTTGAC-3'

[0097] 于室温用 2X SSC 溶液清洗该膜,然后于 68℃ 用 0.5X SSC 溶液清洗。封闭该膜,并与抗洋地黄毒苷-AP, Fab 片段 (ROCHE APPLIED SCIENCE, 目录号 11093274910) 于室温一起温育 30 分钟。用马来酸清洗缓冲液 (0.1M 马来酸、0.15M NaCl、和 0.3% Tween20, pH7.5) 清洗 2 次后,通过将该膜与 BCIP/NBT 溶液一起温育来显现与探针杂交的 DNA 条带。HA 探针与重组病毒 DNA 和同源性质粒中的 3.6kb 条带杂交,而与 HVT 亲本没有检测出条带。IS45/46 探针与重组 DNA 和同源性质粒中的 3.6kb 和 1.2kb 条带杂交,并与 HVT 亲本中的 2.3kb 条带杂交。这些结果证明了,实施例 3 中所获得的 rHVT/CMVH5Wis68 具有预期的基因组结构。

[0098] 以对 rHVT/CMVH5Wis68 的 Southern 印迹分析类似的方式进行对 rHVT/Bach5Wis68 和 rHVT/Pech5Wis68 的 Southern 印迹分析,只是对 rHVT/Bach5Wis68 使用 XhoI 和 SpeI 限制酶。对于 rHVT/Bach5Wis68, HA 探针与重组病毒 DNA 和同源性质粒中的 4.9kb 条带杂交,而与 HVT 亲本没有检测出条带。IS45/46 探针与重组 DNA 和同源性质粒中的 4.9kb 和 0.8kb 条带杂交,并与 HVT 亲本中的 2.3kb 条带杂交。对于 rHVT/Pech5Wis68, HA 探针与重组病毒 DNA 和同源性质粒中的 3.6kb 条带杂交,而与 HVT 亲本没有检测出条带。IS45/46 探针与重组 DNA 和同源性质粒中的 3.6kb 和 1.2kb 条带杂交,并与 HVT 亲本中的 2.3kb 条带杂交。也证明了,这些重组病毒具有预期的基因组结构。

[0099] 4.2. 重组 HVT 的稳定性

[0100] 将重组病毒 rHVT/CMVH5Wis68、rHVT/Bach5Wis68 和 rHVT/Pech5Wis68 在 CEF 细胞中盲 (blindly) 传代 20 次。20 次传代后,通过 Southern 印迹分析来分析所述病毒,如实施

例 4.1 中所述。20 次传代后自病毒分离的 DNA 中所检测出的条带与实施例 4.1 中所描述的条带相同,证明重组病毒即使在 20 次传代后也是稳定的。

[0101] 实施例 5 由重组 HVT 进行的 HA 蛋白表达

[0102] 通过黑色噬斑测定法和 Western 印迹测定法证实了由重组病毒 rHVT/CMVH5Wis68、rHVT/BachH5Wis68、和 rHVT/PechH5Wis68 进行的 HA 蛋白表达。用于黑色噬斑测定法的规程记载于实施例 3 中。使用用重组病毒感染的 CEF 细胞和鸡抗 HA 抗血清来进行 Western 印迹。简言之,以约 0.01 的感染复数 (multiplicity of infection) 用重组病毒之一或亲本 HVT FC126 株感染 100-mm 皿中的 CEF 细胞。接种后 2 至 3 天,用细胞刮棒收获细胞,并以 913xg 离心 5 分钟。用 PBS 清洗沉淀物两次,并用 50 至 100 μ l PBS 重悬。添加相同体积的 2x SDS 样品缓冲液 (130mM Tris-Cl (pH6.8)、6% SDS、20% 甘油、10% 2-巯基乙醇和 0.01% 溴酚蓝) 后,将细胞悬浮液煮沸 5 分钟。通过使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行的 SDS-PAGE 来将样品分开,并转移至 PVDF 膜 (IMMOBILON-P, MILLIPORE)。将该膜完全干燥,然后与鸡抗 HA 抗血清一起温育。洗掉抗 HA 抗血清后,将该膜与碱性磷酸酶偶联的抗鸡 IgG Fc 抗体 (BETHYL, 目录号 A30-104AP) 一起温育。通过添加 BCIP/NBT 溶液来显现与鸡抗 HA 抗血清结合的蛋白质。如图 3 中所示,仅在具有经重组病毒感染的细胞的泳道中观察到 74 千道尔顿 (kDa) 的蛋白质条带,其是未加工的 HA 蛋白的预期大小。

[0103] 实施例 6 对用重组 HVT 接种的鸡的血清学评估

[0104] 对用重组病毒 rHVT/CMVH5Wis68、rHVT/PechH5Wis68 和 rHVT/BachH5Wis68 接种的鸡中针对 AI 的血清学应答进行评估。用重组病毒之一皮下接种一日龄的无特异性病原体的雏鸡 (SPAFAS, 群 T-10)。分别用每剂 1638pfu (0.2ml) 和每剂 375pfu 的 rHVT/CMVH5Wis68 接种组 1 和组 2 (表 2)。组 3 和组 4 包含用 2800pfu (组 3) 或 550pfu (组 4) 的 rHVT/PechH5Wis68 接种的鸡。分别用每剂 4350pfu 和 720pfu 的 rHVT/BachH5Wis68 接种组 5 和组 6。一组鸡 (组 8) 作为未接种的阴性对照保持。另一组鸡 (组 7) 在 3 周龄时用灭活的甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 疫苗皮下接种,作为灭活疫苗对照。在 3 至 7 周龄之间对鸡进行放血,并通过 AI HI 测试和 AIV ELISA 测试来评估所获得的血清。使用 4 个血凝单位的甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 株 (其 HA 基因在重组病毒中使用) 的灭活禽流感病毒同源抗原来进行 AI HI 测试,如 D. E. Swayne 等所述 (D. E. Swayne 等, 1998, Avian Influenza. 于: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155)。简言之,在 HI 测定法前,确定灭活的甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 抗原中血凝单位的数目作为给出完全血凝的最高抗原稀释度,并将抗原稀释成在 25 μ l 中含有 4 个血凝单位。在 U-底 96 孔板中,最初以 1 : 5 稀释血清,然后在平板间用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 以 2 倍连续稀释成每孔含有 25 μ l。将 25 μ l 中的 4 个血凝单位的抗原添加至每孔,并于室温温育 30 分钟。最后,将 50 μ l 在 PBS 中的 0.5% 鸡红细胞添加至每孔,并于室温温育约 40 分钟。HI 滴度是展现出血凝抑制的最高血清稀释度。认为等于或者大于 10 的 HI 滴度为阳性。使用在美国可用的两种商品化 AIV ELISA 试剂盒 (IDEXX Laboratories, FLOCKCHEK AIV 和 SYNBIOTICS, PROFLOKAIV 抗体测试试剂盒) 来进行 ELISA 测试。

[0105] 如表 3 和图 7 中所示,来自用 rHVT/CMVH5Wis68 接种的鸡 (组 1 和组 2) 的血清早在接种后 3 周便开始显示 HI 滴度,并且 HI 滴度在不迟于 (最迟) 接种后 6 周连续增加多至 100 的 HI 滴度 (几何平均滴度)。还有,接种后 3 周多于 80% 的已接种鸡和接种后 5 周所

有的已接种鸡具有等于或大于 10 的 HI 滴度（表 3）。用商品化的禽痘载体 AIV 疫苗尚未一致地观察到高水平的 HI 滴度，而且这并不容易实现。两个疫苗组（1638pfu 和 375pfu）之间的剂量差异对血清学应答没有显著影响。令人惊讶地，在用商品化 AIV ELISA 试剂盒测试时，来自经 rHVT/CMVH5Wis68 接种的鸡的、通过 HI 测试为高度阳性的这些血清在接种后 3 周 -7 周（through 3 and 7 weeks）中没有给出阳性 ELISA 滴度，而自灭活疫苗对照（组 7）收集的血清用两种商品化 ELISA 试剂盒均显示高度阳性 ELISA 滴度（图 8 和图 9）。rHVT/CMVH5Wis68 疫苗的这种特征会使其极易于区别疫苗反应与场地病毒暴露，而且使其极易于追踪已接种的鸡。来自用 rHVT/PecH5Wis68（组 3 和组 4）或 rHVT/BacH5wis68（组 5 和组 6）接种的鸡的血清的几何平均 HI 滴度不如那些由 rHVT/CMVH5Wis68 所赋予的几何平均 HI 滴度那样高。还有，rHVT/PecH5Wis68 和 rHVT/BacH5wis68 未能通过 HI 将血清学滴度一致地赋予已接种的鸡，如表 3 中所示。未接种的阴性对照（组 8）在 HI 测试或 ELISA 测试中在整个观察期间没有显示阳性血清学结果。

[0106] 总之，具有与 CMV 启动子组合的 HA 基因的重组 HVT (rHVT/CMVH5wis68) 通过 HI 给已接种的鸡提供比具有 Bac 启动子的重组 HVT (rHVT/BacH5Wis68) 和具有 Pec 启动子的重组 HVT (rHVT/PecH5Wis68)（它们在这里作为比较例呈现）更高且更一致的血清学滴度。从由 rHVT/CMVH5Wis68 接种的鸡中收集的血清通过商品化 AIV ELISA 试剂盒（测试）为阴性，虽然该血清通过 AI HI 测试为高度阳性，如此使得能够容易地区别来自接种的反应与来自场地感染的反应。

[0107] 实施例 7

[0108] 对用重组 HVT 接种的鸡的第二次血清学评估

[0109] 为了进一步调查具有 HA 基因的重组 HVT 的效力，进行另一次血清学评估测试。在此研究中将无特异性病原体的鸡（SPAFAS，群 R105）分成 4 组（表 4）。经由卵内路径用每剂 980pfu (0.1ml) 的 rHVT/CMVH5Wis68 接种组 1 中温育 18 天时的胚。一日龄时分别用每剂 695pfu (0.2ml) 的 rHVT/CMVH5Wis68 或每剂 1155pfu 的 rHVT/BacH5Wis68 皮下接种组 2 和组 3。一组鸡（组 4）作为未接种的阴性对照保持。在 2 至 7 周龄之间对鸡进行放血，并通过 AI HI 测试和 AIV ELISA 测试来评估所获得的血清。使用 4 个 HA 单位的灭活甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 抗原来进行 AI HI 测试，如 D. E. Swayne 等所述 (D. E. Swayne 等, 1998, Avian Influenza. 于 :A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155)。

[0110] 如表 5 和图 10 中所示，通过再次皮下施用的 rHVT/CMVH5Wis68（组 2）显示了如在第一次试验中的卓越效力。这组中的 HI 滴度不迟于（最迟在）接种后 3 周达到 100（几何平均滴度），并且在接种后的 7 周中维持高水平的 HI 滴度。还有，在此研究中，我们发现 rHVT/CMVH5Wis68 的卵内施用（组 1）与皮下施用一样有力。组 1 中的 HI 滴度与组 2 中的那些非常类似。来自用 rHVT/BacH5Wis68 接种的鸡（组 3）的滴度比那些来自用 rHVT/CMVH5Wis68 再次接种的鸡（组 1 和组 2）的滴度稍低，只是接种后 5 周时，组 3 具有比其它组高的 HI 滴度，但是 HI 滴度在随后几周下降。在整个观察期间没有从未接种的阴性对照中观察到可检测的 HI 滴度。

[0111] 实施例 8

[0112] 重组 HVT 针对高致病性禽流感病毒 (H5N1) 攻击的功效

[0113] 在第三次试验中,检查具有 HA 基因的重组 HVT 针对高致病性禽流感病毒 (H5N1 亚型) 的功效。在此研究中将无特异性病原体的鸡分成 4 组 (表 6)。分别用每剂 1075pfu (0.2ml) 的 rHVT/CMVH5Wis68 和每剂 1080pfu 的 rHVT/BacH5Wis68 接种组 1 和组 2 中的 1 日龄雏鸡。用疫苗稀释剂接种组 3 中的雏鸡 (未接种的、经攻击的阳性对照),并在 4 周龄时进行攻击。组 4 作为未接种的、未攻击的阴性对照保持。

[0114] 在 4 周龄时,用 $10^{5.0} \text{EID}_{50}$ (200LD₅₀) 高致病性甲型禽流感病毒 / 越南 / 1203/04 (H5N1) 株对组 1、组 2 和组 3 中的鸡进行鼻内攻击。通过禽流感的死亡率和临床征候来评估保护。组 3 中所有的鸡 (未接种的、经攻击的阳性对照) 在攻击后的两天内死亡,证实攻击的严重性 (表 7)。rHVT/CMVH5Wis68 显示针对致死的高致病性禽流感攻击的卓越保护,因为在用 rHVT/CMVH5Wis68 接种的组 1 中,95% (20 只鸡中的 19 只) 受到保护。另一方面,组 2 中仅 65% (20 只中的 13 只) 的鸡 (rHVT/BacH5Wis68) 幸免于该攻击而存活。组 4 中所有的鸡 (未接种的、未攻击的阴性对照) 均没有禽流感的死亡率和临床征候。与实施例 6 和 7 中所述的两项血清学评估研究一致的是,具有与 CMV 启动子组合的 HA 基因的重组 HVT (rHVT/CMVH5wis68) 提供了比具有 Bac 启动子的重组 HVT (rHVT/BacH5Wis68) (其在这里作为比较例呈现) 好得多的针对用高致病性禽流感病毒 (H5N1) 的攻击的保护。

[0115] 表 2. 处理组

[0116]

组号	处理组	启动子	接种龄	疫苗剂量 (pfu ¹)	疫苗路径	鸡数目
1	rHVT/CMVH5Wis68	CMV (Ex ²)	1 日龄	1638	SQ ³	17
2	rHVT/CMVH5Wis68	CMV (Ex)	1 日龄	375	SQ	17
3	rHVT/PecH5Wis68	Pec (CE ⁴)	1 日龄	2800	SQ	17
4	rHVT/PecH5Wis68	Pec (CE)	1 日龄	550	SQ	17
5	rHVT/BacH5Wis68	Bac (CE)	1 日龄	4350	SQ	17
6	rHVT/BacH5Wis68	Bac (CE)	1 日龄	720	SQ	17
7	灭活的 H5N9 疫苗	N/A ⁵	3 周龄	0.5ml ⁶	SQ	17
8	阴性对照	N/A	N/A	无	N/A	10

[0117] pfu¹ = 噬斑形成单位

[0118] Ex² = 实施例

[0119] SQ³ = 皮下的

[0120] CE⁴ = 比较例

[0121] N/A⁵ = 不适用

[0122] ml⁶ = 毫升

[0123] 表 3. HI 滴度

[0124]

组	3周		4周		5周		6周		7周	
号	阳 性 / 总数	GMT 滴度 ²	阳 性 / 总数	GMT 滴度	阳 性 / 总数	GMT 滴度	阳 性 / 总数	GMT 滴度	阳 性 / 总数	GMT 滴度
1	16/17 (94%)	23.5	15/17 (88%)	47.1	17/17 (100%)	62.6	17/17 (100%)	94.2	17/17 (100%)	70.8
2	14/17 (82%)	18.4	17/17 (100%)	47.1	17/17 (100%)	53.2	16/16 (100%)	113.1	16/16 (100%)	118.1
3	15/17 (88%)	17.7	16/17 (94%)	24.5	16/17 (94%)	28.9	17/17 (100%)	38.4	16/17 (94%)	47.1
4	14/17 (82%)	23.5	16/17 (94%)	28.9	15/17 (88%)	23.5	13/17 (76%)	23.2	14/17 (82%)	28.9
5	16/17 (94%)	35.4	16/17 (94%)	32.6	15/17 (88%)	25.5	14/17 (82%)	21.4	13/17 (76%)	28.5
6	11/17 (65%)	11.0	11/17 (65%)	11.6	12/17 (71%)	9.5	10/17 (59%)	13.9	10/16 (63%)	10.9
7	N/A ³	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	17/17 (100%)	294.9	17/17 (100%)	461.9
8	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A

[0125] 阳性¹ = 认为等于或大于 10 的 HI 滴度为阳性。[0126] GMT 滴度² = 几何平均滴度[0127] N/A³ = 不适用

[0128] 表 4. 用于第二次血清学评估的处理组

[0129]

组 号	处理组	启动子	接种龄	疫苗剂 量(pfu ¹)	疫苗 路径	鸡数目
1	rHVT/CMVH5Wis68	CMV (Ex ²)	18天龄的胚	980	卵内	18
2	rHVT/CMVH5Wis68	CMV (Ex)	1天龄	695	SQ ³	10
3	rHVT/BacH5Wis68	Bac (CE ⁴)	1天龄	1155	SQ	10
4	阴性对照	N/A ⁵	N/A	无	N/A	10

[0130] pfu¹ = 噬斑形成单位[0131] Ex² = 实施例[0132] SQ³ = 皮下的

[0133] CE⁴ = 比较例

[0134] N/A⁵ = 不适用

[0135] 表 5. 第二次血清学评估的 HI 滴度

[0136]

组号	2周		3周		4周		5周		6周		7周	
	阳性 ¹ /总数	GMT 滴度 ²	阳性 /总数	GMT 滴度	阳性 /总数	GMT 滴度	阳性 /总数	GMT 滴度	阳性 /总数	GMT 滴度	阳性 /总数	GMT 滴度
1	12/18 (67%)	8.3	18/18 (100%)	66.0	18/18 (100%)	83.1	18/18 (100%)	148.1	18/18 (100%)	201.6	18/18 (100%)	179.6
2	9/10 (90%)	17.0	10/10 (100%)	105.6	10/10 (100%)	171.5	10/10 (100%)	91.9	10/10 (100%)	105.6	10/10 (100%)	80.0
3	7/10 (70%)	7.1	10/10 (100%)	45.9	10/10 (100%)	65.0	10/10 (100%)	211.1	10/10 (100%)	60.6	10/10 (100%)	49.2
4	0/10 (0%)	N/A ³	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A

[0137] 阳性¹ = 认为等于或大于 10 的 HI 滴度为阳性。

[0138] GMT 滴度² = 几何平均滴度

[0139] N/A³ = 不适用

[0140] 表 6. 用于针对高致病性禽流感病毒的功效试验的处理组

[0141]

组号	处理组	启动子	接种龄	疫苗剂量 (pfu ¹)	疫苗路径	鸡数 目
1	rHVT/CMVH5Wis68	CMV (Ex ²)	1日龄	1075	SQ ³	20
2	rHVT/BacH5Wis68	Bac (CE ⁴)	1日龄	1080	SQ	20
3	攻击对照	N/A ⁵	N/A	无	N/A	20
4	阴性对照	N/A	N/A	无	N/A	5

[0142] pfu¹ = 噬斑形成单位

[0143] Ex² = 实施例

[0144] SQ³ = 皮下的

[0145] CE⁴ = 比较例

[0146] N/A⁵ = 不适用

[0147] 表 7. 重组 HVT 针对高致病性禽流感病毒的保护

组号	处理组	受保护数目/总数	%保护
1	rHVT/CMVH5Wis68	19/20	95%
2	rHVT/BacH5Wis68	13/20	65%
3	攻击对照	0/10	0%
4	阴性对照	5/5	100%

[0149] 序列表

[0150] <110> 日本瑞翁株式会社 (Zeon Corporation)

[0151] Esaki, Motoyuki

[0152] Jensen, Lauren Elizabeth

[0153] Dorsey, Kristi M.

[0154] <120> 含有禽流感基因的火鸡疱疹病毒载体重组体

[0155] <130> rHVT-AI 专利

[0156] <160> 25

[0157] <170> PatentIn version 3.1

[0158] <210> 1

[0159] <211> 1695

[0160] <212> DNA

[0161] <213> 甲型流感病毒

[0162] <220>

[0163] <221> CDS

[0164] <222> (1).. (1695)

[0165] <223> 甲型 / 火鸡 / 威斯康星 / 68 (H5N9) 的血凝基因

[0166] <400> 1

[0167] atg gaa aga ata gtg att gcc ctt gca ata atc agc gtt gtc aaa ggt 48

[0168] Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly

[0169] 1 5 10 15

[0170] gac caa atc tgc atc ggt tat cat gca aac aat tca aca aaa caa gtt 96

[0171] Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val

[0172] 20 25 30

[0173] gac aca atc atg gag aag aat gtg acg gtc aca cat gct caa gat ata 144

[0174] Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile

[0175] 35 40 45

[0176] ctg gaa aaa gag cac aac ggg aaa ctc tgc agt ctc aaa gga gtg agg 192

[0177] Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg

[0178] 50 55 60

[0179] ccc ctc att ctg aag gat tgc agt gtg gct gga tgg ctt ctt ggg aac 240

[0180] Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn

[0181] 65 70 75 80

[0182]	cca atg tgt gat gag ttc cta aat gta ccg gaa tgg tca tat att gta	288
[0183]	Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val	
[0184]	85 90 95	
[0185]	gag aag gac aat cca acc aat ggc tta tgt tat ccg gga gac ttc aat	336
[0186]	Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn	
[0187]	100 105 110	
[0188]	gat tat gaa gaa ctg aag tat tta atg agc aac aca aac cat ttt gag	384
[0189]	Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu	
[0190]	115 120 125	
[0191]	aaa att caa ata atc cct agg aac tct tgg tcc aat cat gat gcc tca	432
[0192]	Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser	
[0193]	130 135 140	
[0194]	tca gga gtg agc tca gca tgc cca tac aat ggt aga tct tcc ttt ttc	480
[0195]	Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe	
[0196]	145 150 155 160	
[0197]	agg aat gtg gtg tgg ttg atc aag aag agt aat gca tac cca aca ata	528
[0198]	Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile	
[0199]	165 170 175	
[0200]	aag agg acc tac aat aac acc aat gta gag gac ctt ctg ata ttg tgg	576
[0201]	Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp	
[0202]	180 185 190	
[0203]	gga atc cat cac cct aat gat gca gcg gaa caa acg gaa ctc tat cag	624
[0204]	Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln	
[0205]	195 200 205	
[0206]	aac tcg aac act tat gtg tct gta gga aca tca aca cta aat cag agg	672
[0207]	Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg	
[0208]	210 215 220	
[0209]	tca att cca gaa ata gct acc agg ccc aaa gtg aat gga caa agt gga	720
[0210]	Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly	
[0211]	225 230 235 240	
[0212]	aga ata gaa ttt ttc tgg aca ata cta agg ccg aac gat gca atc agc	768
[0213]	Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser	
[0214]	245 250 255	
[0215]	ttt gaa agt aat ggg aac ttt ata gct cct gaa tat gca tac aag ata	816
[0216]	Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile	
[0217]	260 265 270	
[0218]	gtt aaa aag gga gat tca gca atc atg aga agc gaa ctg gag tat ggc	864
[0219]	Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly	
[0220]	275 280 285	

[0221]	aac tgt gat acc aaa tgt cag acc cca gtg ggt gct ata aat tcc agt	912
[0222]	Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser	
[0223]	290 295 300	
[0224]	atg cct ttt cac aat gtt cat ccc ctt acc att gga gag tgt ccc aaa	960
[0225]	Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys	
[0226]	305 310 315 320	
[0227]	tat gtc aaa tca gat aaa ctg gtc ctt gca aca gga ctg agg aac gtg	1008
[0228]	Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val	
[0229]	325 330 335	
[0230]	cct cag aga gaa aca aga ggt ctg ttt gga gca ata gca gga ttc ata	1056
[0231]	Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile	
[0232]	340 345 350	
[0233]	gaa ggg ggg tgg caa gga atg gta gat gga tgg tat ggt tac cat cat	1104
[0234]	Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His	
[0235]	355 360 365	
[0236]	agc aac gag cag gga agt gga tat gct gca gac aaa gag tcc act cag	1152
[0237]	Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln	
[0238]	370 375 380	
[0239]	aaa gca atc gac ggg atc acc aat aaa gtc aac tca atc att gac aaa	1200
[0240]	Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys	
[0241]	385 390 395 400	
[0242]	atg aac act caa ttc gaa gcc gtt ggg aaa gaa ttc aac aac tta gaa	1248
[0243]	Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu	
[0244]	405 410 415	
[0245]	agg aga ata gaa aat ttg aat aag aaa atg gaa gat gga ttt cta gat	1296
[0246]	Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp	
[0247]	420 425 430	
[0248]	gta tgg act tac aat gca gaa ctt ctg gtg ctc atg gaa aat gaa aga	1344
[0249]	Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg	
[0250]	435 440 445	
[0251]	act ctg gat ttc cat gat tca tat gtc aag aac cta tac gat aag gtc	1392
[0252]	Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val	
[0253]	450 455 460	
[0254]	cga ctc cag ctg aga gat aat gca aaa gaa ttg ggc aat ggg tgt ttt	1440
[0255]	Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe	
[0256]	465 470 475 480	
[0257]	gag ttc tac cac aaa tgt gac aat gaa tgc atg gaa agt gtg aga aac	1488
[0258]	Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn	
[0259]	485 490 495	

[0260] gga acg tat gac tat cca caa tac tca gaa gaa tca agg ctg aac aga 1536
 [0261] Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg
 [0262] 500 505 510
 [0263] gag gaa ata gat gga gtc aaa ttg gag tca atg ggc acc tat cag ata 1584
 [0264] Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile
 [0265] 515 520 525
 [0266] cta tca atc tac tca aca gtg gcg agt tcc cta gca ctg gca atc atg 1632
 [0267] Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met
 [0268] 530 535 540
 [0269] gta gct ggt ctg tct ttt tgg atg tgc tcc aat gga tca ttg cag tgc 1680
 [0270] Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys
 [0271] 545 550 555 560
 [0272] aga att tgc atc tag 1695
 [0273] Arg Ile Cys Ile
 [0274] <210>2
 [0275] <211>564
 [0276] <212>PRT
 [0277] <213> 甲型流感病毒
 [0278] <400>2
 [0279] Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly
 [0280] 1 5 10 15
 [0281] Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val
 [0282] 20 25 30
 [0283] Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 [0284] 35 40 45
 [0285] Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg
 [0286] 50 55 60
 [0287] Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 [0288] 65 70 75 80
 [0289] Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 [0290] 85 90 95
 [0291] Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 [0292] 100 105 110
 [0293] Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu
 [0294] 115 120 125
 [0295] Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser
 [0296] 130 135 140
 [0297] Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe
 [0298] 145 150 155 160

[0299]	Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile
[0300]	165 170 175
[0301]	Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
[0302]	180 185 190
[0303]	Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln
[0304]	195 200 205
[0305]	Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
[0306]	210 215 220
[0307]	Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
[0308]	225 230 235 240
[0309]	Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser
[0310]	245 250 255
[0311]	Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
[0312]	260 265 270
[0313]	Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
[0314]	275 280 285
[0315]	Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser
[0316]	290 295 300
[0317]	Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
[0318]	305 310 315 320
[0319]	Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val
[0320]	325 330 335
[0321]	Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
[0322]	340 345 350
[0323]	Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
[0324]	355 360 365
[0325]	Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
[0326]	370 375 380
[0327]	Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
[0328]	385 390 395 400
[0329]	Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu
[0330]	405 410 415
[0331]	Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
[0332]	420 425 430
[0333]	Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
[0334]	435 440 445
[0335]	Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
[0336]	450 455 460
[0337]	Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe

[0338]	465	470	475	480
[0339]	Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn			
[0340]		485	490	495
[0341]	Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg			
[0342]		500	505	510
[0343]	Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile			
[0344]		515	520	525
[0345]	Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met			
[0346]		530	535	540
[0347]	Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys			
[0348]	545	550	555	560
[0349]	Arg Ile Cys Ile			
[0350]	<210>3			
[0351]	<211>587			
[0352]	<212>DNA			
[0353]	<213> 巨细胞病毒			
[0354]	<220>			
[0355]	<221> 启动子			
[0356]	<222>(1).. (587)			
[0357]	<223> 巨细胞病毒立即早期启动子			
[0358]	<400>3			
[0359]	agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc			60
[0360]	gttacataac ttacggtaaa tgccccgccg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga			120
[0361]	cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat			180
[0362]	gggtggagta ttacggtaa actgccatt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag			240
[0363]	tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcgcgcc tggcattatg ccagttacat			300
[0364]	gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcacg ctattaccat			360
[0365]	ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt			420
[0366]	tccaagtctc caccatttg acgtcaatgg gagtttggtt tggcaccaaa atcaacggga			480
[0367]	ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg			540
[0368]	gtgggaggtc tatataagca gagctgggtt agtgaaccgt cagatcc			587
[0369]	<210>4			
[0370]	<211>29			
[0371]	<212>DNA			
[0372]	<220>			
[0373]	<223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物			
[0374]	<400>4			
[0375]	tgacggatcc atggaaagaa tagtgattg		29	
[0376]	<210>5			

[0377]	<211>29	
[0378]	<212>DNA	
[0379]	<213> 人工的	
[0380]	<220>	
[0381]	<223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物	
[0382]	<400>5	
[0383]	ctgacagtcg acctagatgc aaat tctgc	29
[0384]	<210>6	
[0385]	<211>17	
[0386]	<212>DNA	
[0387]	<213> 人工的	
[0388]	<220>	
[0389]	<223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物	
[0390]	<400>6	
[0391]	gtaaaacgac ggccagt	17
[0392]	<210>7	
[0393]	<211>19	
[0394]	<212>DNA	
[0395]	<213> 人工的	
[0396]	<220>	
[0397]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0398]	<400>7	
[0399]	ggaaacagct atgaccatg	19
[0400]	<210>8	
[0401]	<211>25	
[0402]	<212>DNA	
[0403]	<213> 人工的	
[0404]	<220>	
[0405]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0406]	<400>8	
[0407]	ctggacaata ctaaggccga acgat	25
[0408]	<210>9	
[0409]	<211>22	
[0410]	<212>DNA	
[0411]	<213> 人工的	
[0412]	<220>	
[0413]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0414]	<400>9	
[0415]	cactgggggtc tgacatttgg ta	22

[0416]	<210>10	
[0417]	<211>30	
[0418]	<212>DNA	
[0419]	<213> 人工的	
[0420]	<220>	
[0421]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0422]	<400>10	
[0423]	gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt	30
[0424]	<210>11	
[0425]	<211>25	
[0426]	<212>DNA	
[0427]	<213> 人工的	
[0428]	<220>	
[0429]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0430]	<400>11	
[0431]	cgcgccattt accgtcattg acgtc	25
[0432]	<210>12	
[0433]	<211>25	
[0434]	<212>DNA	
[0435]	<213> 人工的	
[0436]	<220>	
[0437]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0438]	<400>12	
[0439]	gggtcgt tgg gcggtcagcc ggcgg	25
[0440]	<210>13	
[0441]	<211>25	
[0442]	<212>DNA	
[0443]	<213> 人工的	
[0444]	<220>	
[0445]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0446]	<400>13	
[0447]	cttacggtaa atggcccgcc ggctg	25
[0448]	<210>14	
[0449]	<211>25	
[0450]	<212>DNA	
[0451]	<213> 人工的	
[0452]	<220>	
[0453]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0454]	<400>14	

[0455]	tacacttgat gtactgccaa tgggc	25
[0456]	<210>15	
[0457]	<211>25	
[0458]	<212>DNA	
[0459]	<213> 人工的	
[0460]	<220>	
[0461]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0462]	<400>15	
[0463]	tatttacggt aaactgccca ttggc	25
[0464]	<210>16	
[0465]	<211>30	
[0466]	<212>DNA	
[0467]	<213> 人工的	
[0468]	<220>	
[0469]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0470]	<400>16	
[0471]	acgtcaatga cggtaaattg gcgcctggc	30
[0472]	<210>17	
[0473]	<211>30	
[0474]	<212>DNA	
[0475]	<213> 人工的	
[0476]	<220>	
[0477]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0478]	<400>17	
[0479]	cgtctagagg atctgacggt tcactaaacc	30
[0480]	<210>18	
[0481]	<211>33	
[0482]	<212>DNA	
[0483]	<213> 人工的	
[0484]	<220>	
[0485]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0486]	<400>18	
[0487]	tgtggtaccg tcgacgattc acagtcccaa ggc	33
[0488]	<210>19	
[0489]	<211>33	
[0490]	<212>DNA	
[0491]	<213> 人工的	
[0492]	<220>	
[0493]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	

[0494]	<400>19	
[0495]	cttggcctta ttggcctaag atacattgat gag	33
[0496]	<210>20	
[0497]	<211>39	
[0498]	<212>DNA	
[0499]	<213> 人工的	
[0500]	<220>	
[0501]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0502]	<400>20	
[0503]	cagtgtcgct gcagctcagt gcatgcacgc tcattgccc	39
[0504]	<210>21	
[0505]	<211>49	
[0506]	<212>DNA	
[0507]	<213> 人工的	
[0508]	<220>	
[0509]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0510]	<400>21	
[0511]	gctctagagg cgtggagctt gggggctgcg gaggaacaga gaagggaag	49
[0512]	<210>22	
[0513]	<211>17	
[0514]	<212>DNA	
[0515]	<213> 人工的	
[0516]	<220>	
[0517]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0518]	<400>22	
[0519]	gggggtggca aggaatg	17
[0520]	<210>23	
[0521]	<211>20	
[0522]	<212>DNA	
[0523]	<213> 人工的	
[0524]	<220>	
[0525]	<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA	
[0526]	<400>23	
[0527]	gctagggaac tcgccactgt	20
[0528]	<210>24	
[0529]	<211>24	
[0530]	<212>DNA	
[0531]	<213> 人工的	
[0532]	<220>	

- [0533] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0534] <400>24
- [0535] tagcggcacg gaaacagata gaga 24
- [0536] <210>25
- [0537] <211>24
- [0538] <212>DNA
- [0539] <213> 人工的
- [0540] <220>
- [0541] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0542] <400>25
- [0543] tggcgatacg gttcctgggtt tgac 24
- [0544] 分开的序列表中的文字
- [0545] <210>1
- [0546] <223> 甲型 / 火鸡 / 威斯康星 /68 (H5N9) 的血凝基因
- [0547] <210>3
- [0548] <223> 巨细胞病毒立即早期启动子
- [0549] <210>4
- [0550] <223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物
- [0551] <210>5
- [0552] <223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物
- [0553] <210>6
- [0554] <223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物
- [0555] <210>7
- [0556] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0557] <210>8
- [0558] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0559] <210>9
- [0560] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0561] <210>10
- [0562] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0563] <210>11
- [0564] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0565] <210>12
- [0566] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0567] <210>13
- [0568] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0569] <210>14
- [0570] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0571] <210>15

- [0572] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0573] <210>16
- [0574] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0575] <210>17
- [0576] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0577] <210>18
- [0578] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0579] <210>19
- [0580] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0581] <210>20
- [0582] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0583] <210>21
- [0584] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0585] <210>22
- [0586] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0587] <210>23
- [0588] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0589] <210>24
- [0590] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA
- [0591] <210>25
- [0592] <223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

序列表

<110> 日本瑞翁株式会社 (Zeon Corporation)

<120> 含有禽流感基因的火鸡疱疹病毒载体重组体

<130>rHVT-AI patent

<160>25

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>1695

<212>DNA

<213> 甲型流感病毒 (Influenza A virus)

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(1695)

<223> 甲型 / 火鸡 / 威斯康星 /68(A/Turkey/Wisconsin/68) (H5N9) 的血凝素基因

<400>1

atg gaa aga ata gtg att gcc ctt gca ata atc agc gtt gtc aaa ggt	48
Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly	
1 5 10 15	
gac caa atc tgc ate ggt tat cat gca aac aat tca aca aaa caa gtt	96
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val	
20 25 30	
gac aca atc atg gag aag aat gtg acg gtc aca cat gct caa gat ata	144
Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile	
35 40 45	
ctg gaa aaa gag cac aac ggg aaa ctc tgc agt ctc aaa gga gtg agg	192
Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg	
50 55 60	
ccc ctc att ctg aag gat tgc agt gtg gct gga tgg ctt ctt ggg aac	240
Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn	
65 70 75 80	

cca atg tgt gat gag ttc cta aat gta ccg gaa tgg tea tat att gta	288
Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val	
85 90 95	
gag aag gac aat cca acc aat ggc tta tgt tat ccg gga gac ttc aat	336
Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn	
100 105 110	
gat tat gaa gaa ctg aag tat tta atg agc aac aca aac cat ttt gag	384
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu	
115 120 125	
aaa att caa ata atc cct agg aac tct tgg tcc aat cat gat gcc tca	432
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser	
130 135 140	
tca gga gtg agc tca gca tgc cca tac aat ggt aga tct tcc ttt ttc	480
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe	
145 150 155 160	
agg aat gtg gtg tgg ttg atc aag aag agt aat gca tac cca aca ata	528
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile	
165 170 175	
aag agg acc tac aat aac acc aat gta gag gac ctt ctg ata ttg tgg	576
Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp	
180 185 190	
gga atc cat cac cct aat gat gca gcg gaa caa acg gaa ctc tat cag	624
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln	
195 200 205	
aac tcg aac act tat gtg tct gta gga aca tca aca cta aat cag agg	672
Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg	
210 215 220	
tca att cca gaa ata gct acc agg ccc aaa gtg aat gga caa agt gga	720
Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly	
225 230 235 240	
aga ata gaa ttt ttc tgg aca ata cta agg ccg aac gat gca atc agc	768
Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser	
245 250 255	
ttt gaa agt aat ggg aac ttt ata gct cct gaa tat gca tac aag ata	816
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile	
260 265 270	
gtt aaa aag gga gat tca gca atc atg aga agc gaa ctg gag tat ggc	864
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly	
275 280 285	

aac tgt gat acc aaa tgt cag acc cca gtg ggt gct ata aat tcc agt	912
Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser	
290 295 300	
atg cct ttt cac aat gtt cat ccc ctt acc att gga gag tgt ccc aaa	960
Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys	
305 310 315 320	
tat gtc aaa tca gat aaa ctg gtc ctt gca aca gga ctg agg aac gtg	1008
Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val	
325 330 335	
cct cag aga gaa aca aga ggt ctg ttt gga gca ata gca gga ttc ata	1056
Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile	
340 345 350	
gaa ggg ggg tgg caa gga atg gta gat gga tgg tat ggt tac cat cat	1104
Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His	
355 360 365	
agc aac gag cag gga agt gga tat gct gca gac aaa gag tcc act cag	1152
Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln	
370 375 380	
aaa gca atc gac ggg atc acc aat aaa gtc aac tca atc att gac aaa	1200
Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys	
385 390 395 400	
atg aac act caa ttc gaa gcc gtt ggg aaa gaa ttc aac aac tta gaa	1248
Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu	
405 410 415	
agg aga ata gaa aat ttg aat aag aaa atg gaa gat gga ttt cta gat	1296
Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp	
420 425 430	
gta tgg act tac aat gca gaa ctt ctg gtg ctc atg gaa aat gaa aga	1344
Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg	
435 440 445	
act ctg gat ttc cat gat tca tat gtc aag aac cta tac gat aag gtc	1392
Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val	
450 455 460	
cga ctc cag ctg aga gat aat gca aaa gaa ttg ggc aat ggg tgt ttt	1440
Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe	
465 470 475 480	
gag ttc tac cac aaa tgt gac aat gaa tgc atg gaa agt gtg aga aac	1488
Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn	
485 490 495	

gga acg tat gac tat cca caa tac tca gaa gaa tca agg ctg aac aga	1536
Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg	
500 505 510	
gag gaa ata gat gga gtc aaa ttg gag tca atg ggc acc tat cag ata	1584
Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile	
515 520 525	
cta tca atc tac tca aca gtg gcg agt tcc cta gca ctg gca atc atg	1632
Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met	
530 535 540	
gta gct ggt ctg tct ttt tgg atg tgc tcc aat gga tca ttg cag tgc	1680
Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys	
545 550 555 560	
aga att tgc atc tag	1695
Arg Ile Cys Ile	

<210>2

<211>564

<212>PRT

<213> 甲型流感病毒

<400>2

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val Lys Gly	
1 5 10 15	
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys Gln Val	
20 25 30	
Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile	
35 40 45	
Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly Val Arg	
50 55 60	
Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn	
65 70 75 80	
Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val	
85 90 95	
Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn	
100 105 110	
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His Phe Glu	
115 120 125	
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp Ala Ser	
130 135 140	

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser Phe Phe			
145	150	155	160
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro Thr Ile			
	165	170	175
Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp			
	180	185	190
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu Tyr Gln			
	195	200	205
Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg			
	210	215	220
Scr Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly			
225	230	235	240
Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala Ile Ser			
	245	250	255
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile			
	260	265	270
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu Tyr Gly			
	275	280	285
Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn Ser Ser			
	290	295	300
Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys			
305	310	315	320
Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Val			
	325	330	335
Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile			
	340	345	350
Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His			
	355	360	365
Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln			
	370	375	380
Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys			
385	390	395	400
Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu			
	405	410	415
Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp			
	420	425	430
Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg			
	435	440	445
Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val			

450	455	460
Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe		
465	470	475
Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn		480
	485	490
Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg		495
	500	505
Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr Gln Ile		510
	515	520
Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met		525
	530	535
Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys		540
545	550	555
Arg Ile Cys Ile		560

<210>3

<211>587

<212>DNA

<213> 巨细胞病毒 (Cytomegalovirus)

<220>

<221> 启动子

<222>(1).. (587)

<223> 巨细胞病毒立即早期启动子

<400>3

agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc	60
gttacataac ttacggtaaa tggeccgccc gctgaccgcc caacgacccc cgccattga	120
cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat	180
gggtggagta ttacggtaa actgcccatt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag	240
tacgcccct attgacgtca atgacggtaa atggcgcgcc tggcattatg ccagtacat	300
gaccttatgg gactttccta ctggcgagta catctacgta ttagtcacgc ctattaccat	360
ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt	420
tccaagtctc caccatttg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga	480
ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg	540
gtgggaggtc tatataagca gagctggttt agtgaaccgt cagatcc	587

<210>4

<211>29

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物

<400>4

tgacggatcc atggaaagaa tagtgattg 29

<210>5

<211>29

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物

<400>5

ctgacagtcg acctagatgc aaattctgc 29

<210>6

<211>17

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的 DNA 的合成引物

<400>6

gtaaaacgac ggccagt 17

<210>7

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>7

ggaaacagct atgaccatg

19

<210>8

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>8

ctggacaata ctaaggccga acgat

25

<210>9

<211>22

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>9

cactgggggtc tgacatttgg ta

22

<210>10

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>10

gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt

30

<210>11

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>11

cgcgccattt accgtcattg acgtc 25

<210>12

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>12

gggtcgttgg gcggtcagcc ggcgg 25

<210>13

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>13

cttacggtaa atggcccgcc ggctg 25

<210>14

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>14

tacacttgat gtactgccaa tgggc 25

<210>15

<211>25

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>15

tattttacggt aaactgccca ttggc 25

<210>16

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>16

acgtcaatga cggtaaattgg cgcgcctggc 30

<210>17

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>17

cgtctagagg atctgacggt tcactaaacc 30

<210>18

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>18

tgtggtaccg tcgacgattc acagtcceaa ggc 33

<210>19

<211>33

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>19

cttggcctta ttggcctaag atacattgat gag 33

<210>20

<211>39

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>20

cagtgtcgct gcagctcagt gcatgcacgc tcattgccc 39

<210>21

<211>49

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>21

gctctagagg cgtggagctt gggggctgcg gaggaacaga gaagggaag 49

<210>22

<211>17

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>22

gggggtggca aggaatg

17

<210>23

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>23

gctaggggaac tcgccactgt

20

<210>24

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>24

tagcggcacg gaaacagata gaga

24

<210>25

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的合成引物 DNA

<400>25

tggcgatacg gttcctgggtt tgac

24

质粒 pGICMVpA 的构建

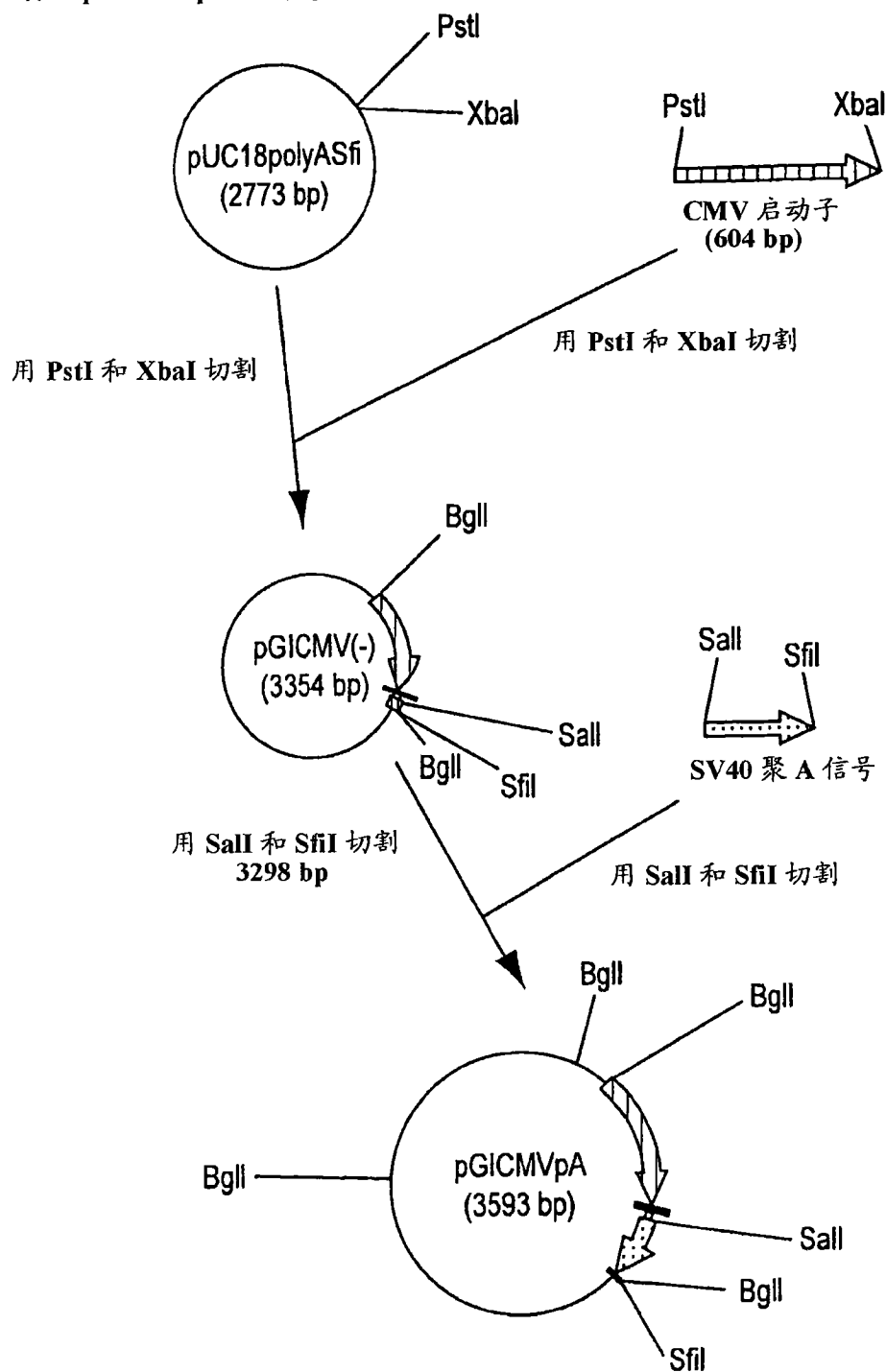


图 1

质粒 p45CMVH5Wis68 的构建

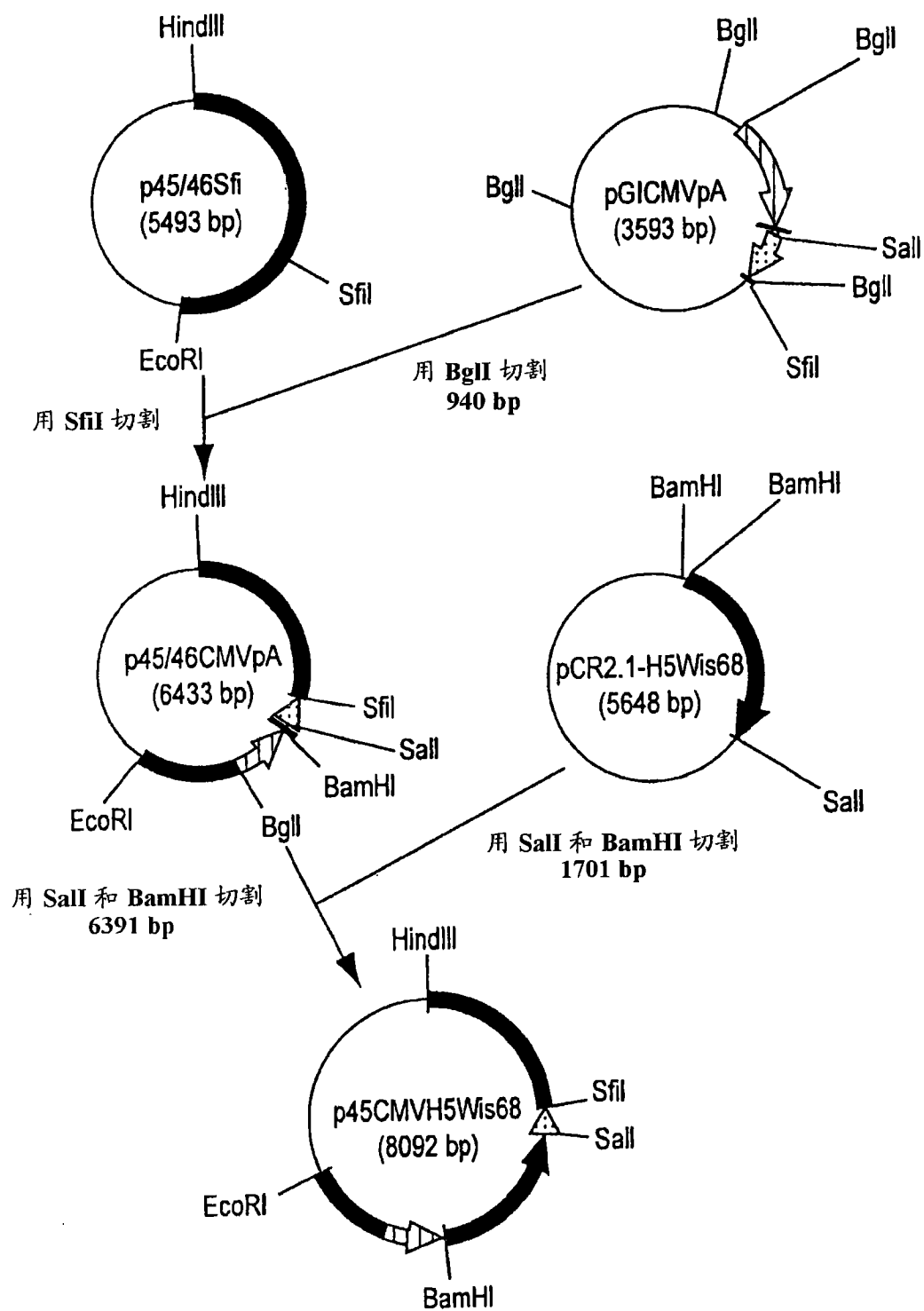


图 2

质粒 pGIBacpA2nd 的构建

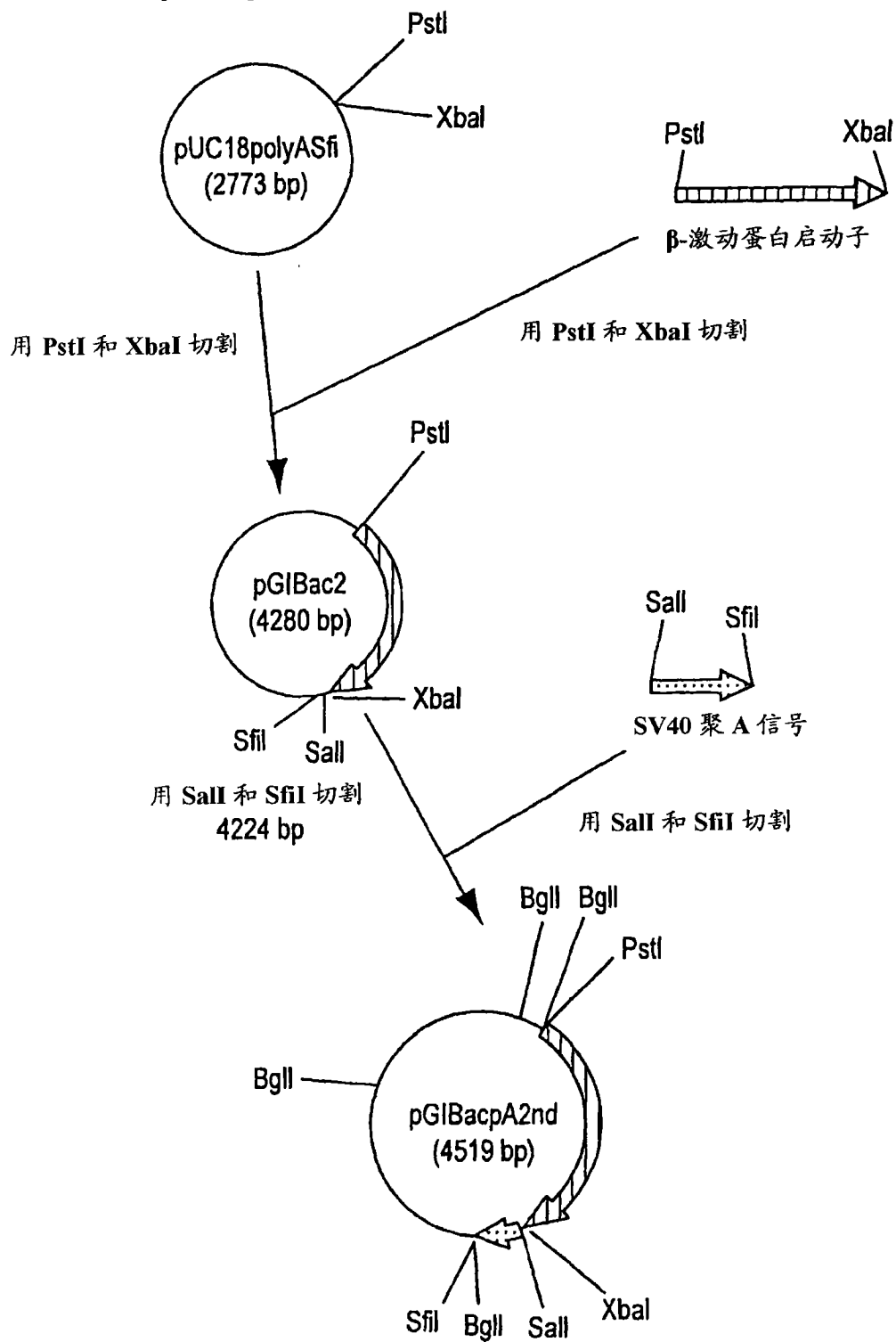


图 3

质粒 p45BacH5Wis68 的构建

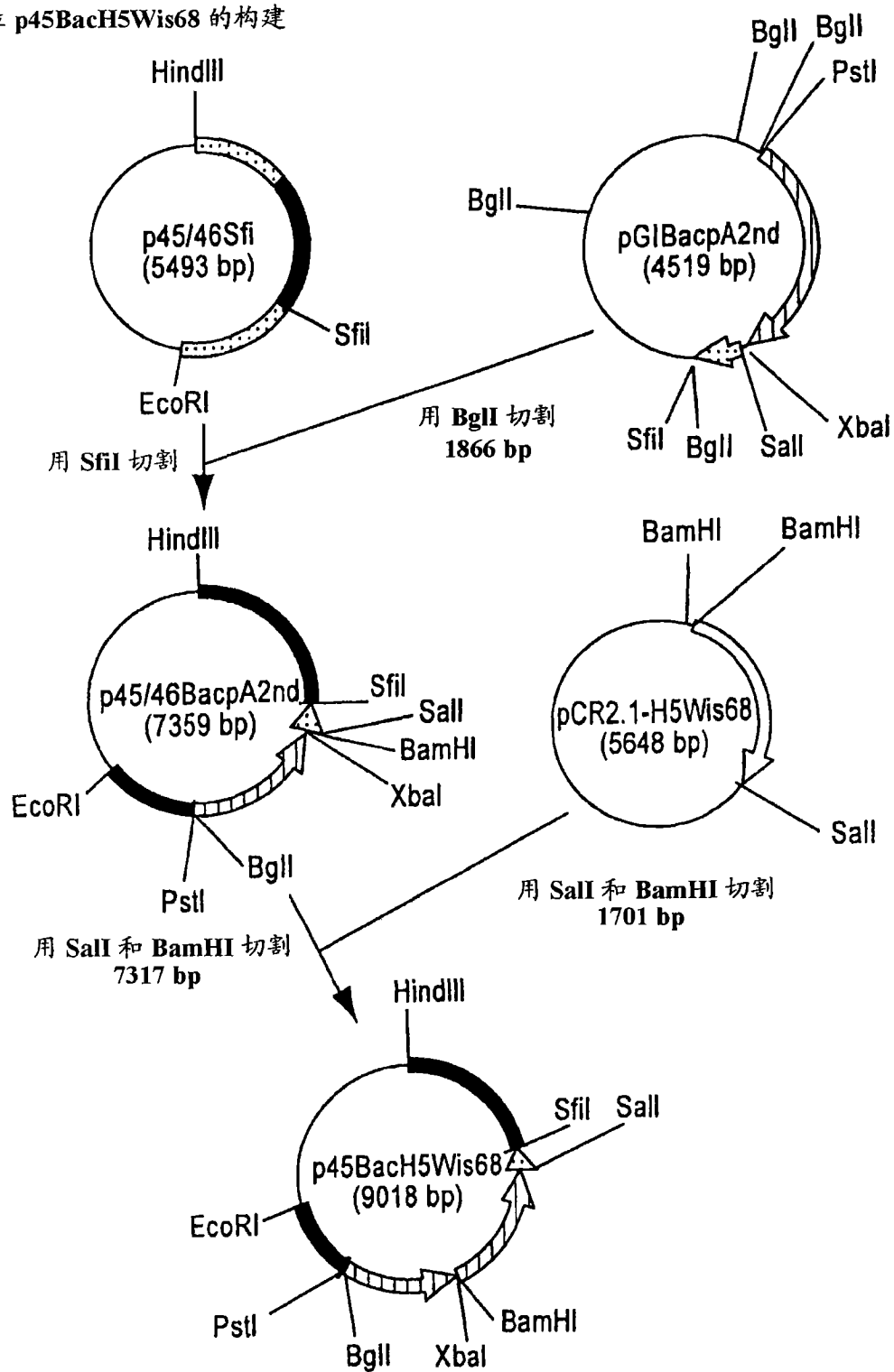


图 4

质粒 p45PecH5Wis68 的构建

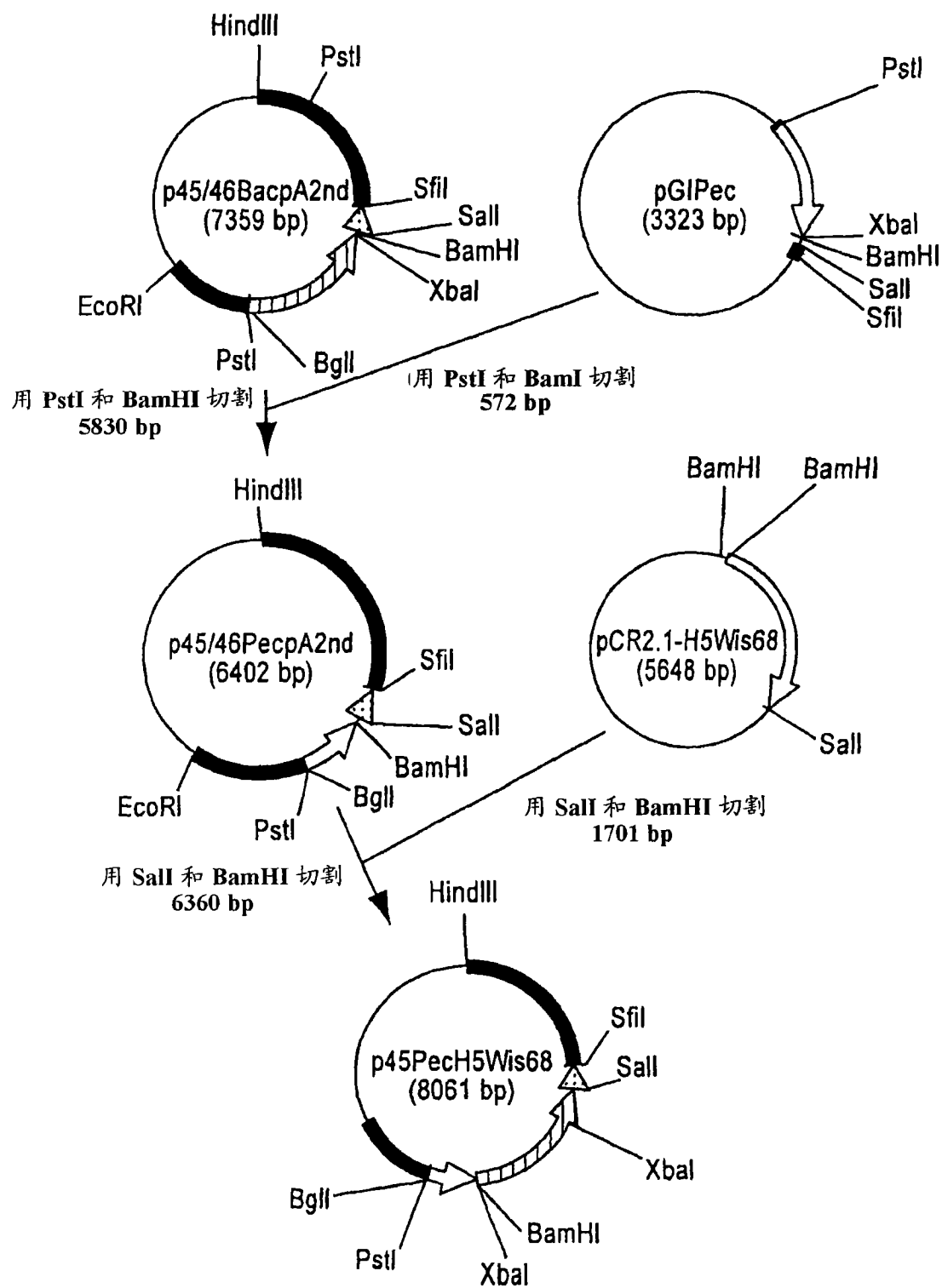


图 5

检测由重组火鸡疱疹病毒进行的血凝素蛋白表达的 Western 印迹测定法。第 1 道 = 精确的 Plus 蛋白全蓝标准品 (Bio-Rad Laboratories, 目录号 161-0373) ; 第 2 道 = CEF 对照 ; 第 3 道 = HVT FC126 亲本株 ; 第 4 道 = 具有血凝素基因的重组 HVT, 箭头指示具有 74KDa 分子量的血凝素蛋白。

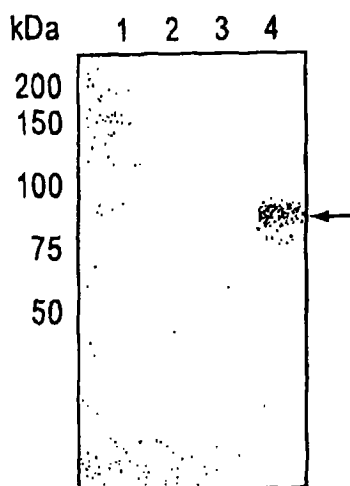
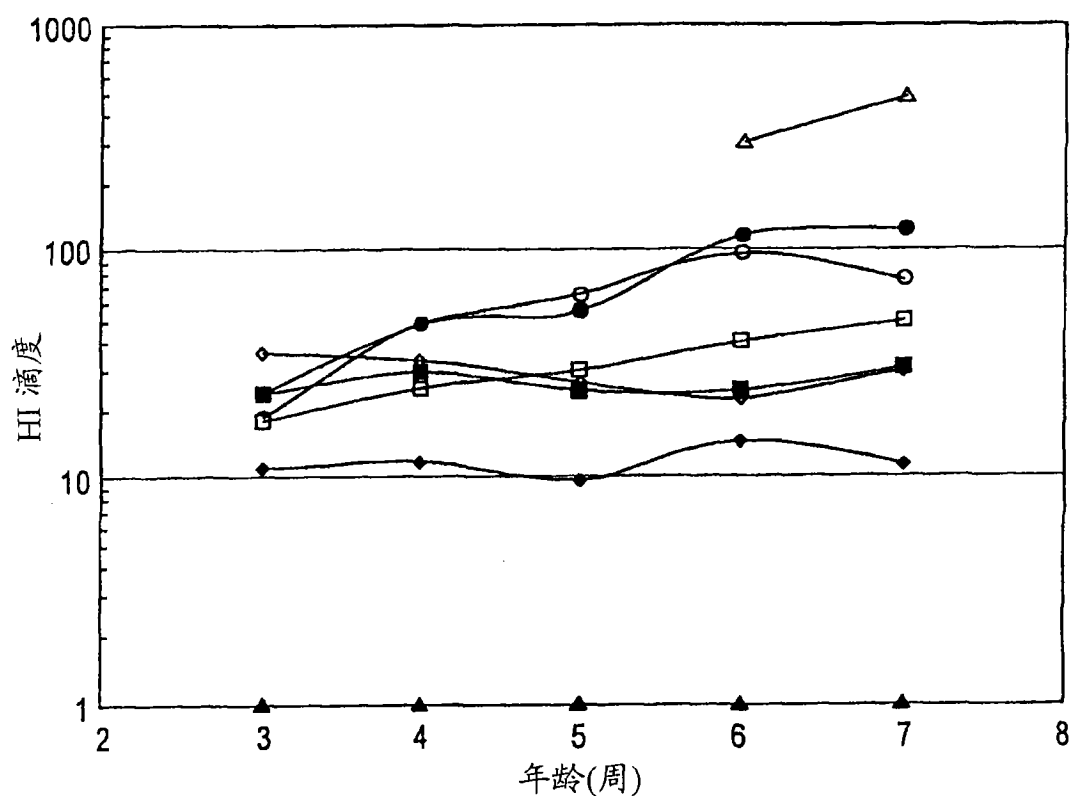


图 6

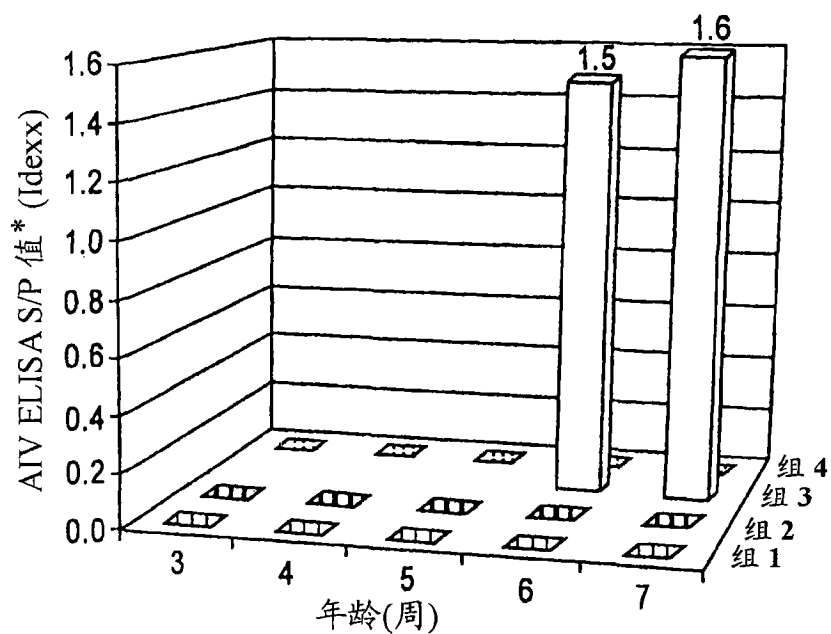
用具有凝血素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的血凝抑制滴度



- 组 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 pfu
- 组 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 pfu
- 组 3 rHVT/PecH5Wis68 2800 pfu
- 组 4 rHVT/PecH5Wis68 550 pfu
- ◇—组 5 rHVT/BacH5Wis68 4350 pfu
- ◆—组 6 rHVT/BacH5Wis68 750 pfu
- △—组 7 AI H5N9 灭活病毒(3 周龄)
- ▲—组 8 未接种疫苗的对照

图 7

使用商品化 ELISA 试剂盒 (Idexx Laboratories, FlockCheck AIV) 用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的 ELISA 滴度

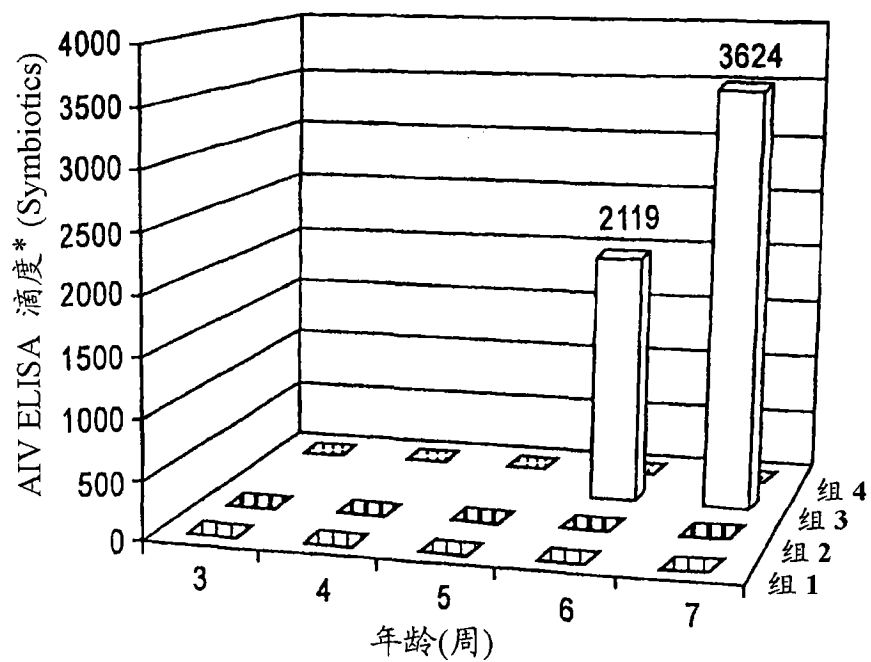


S/P 值*=认为等于或大于 0.5 的 S/P 值为阳性.

- 组 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 pfu
- 组 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 pfu
- 组 3 AI H5N9 灭活病毒(3 周龄)
- 组 4 未接种的对照

图 8

使用商品化 ELISA 试剂盒 (Synbiotics, proFLOK AIV 抗体测试试剂盒) 用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的 ELISA 滴度

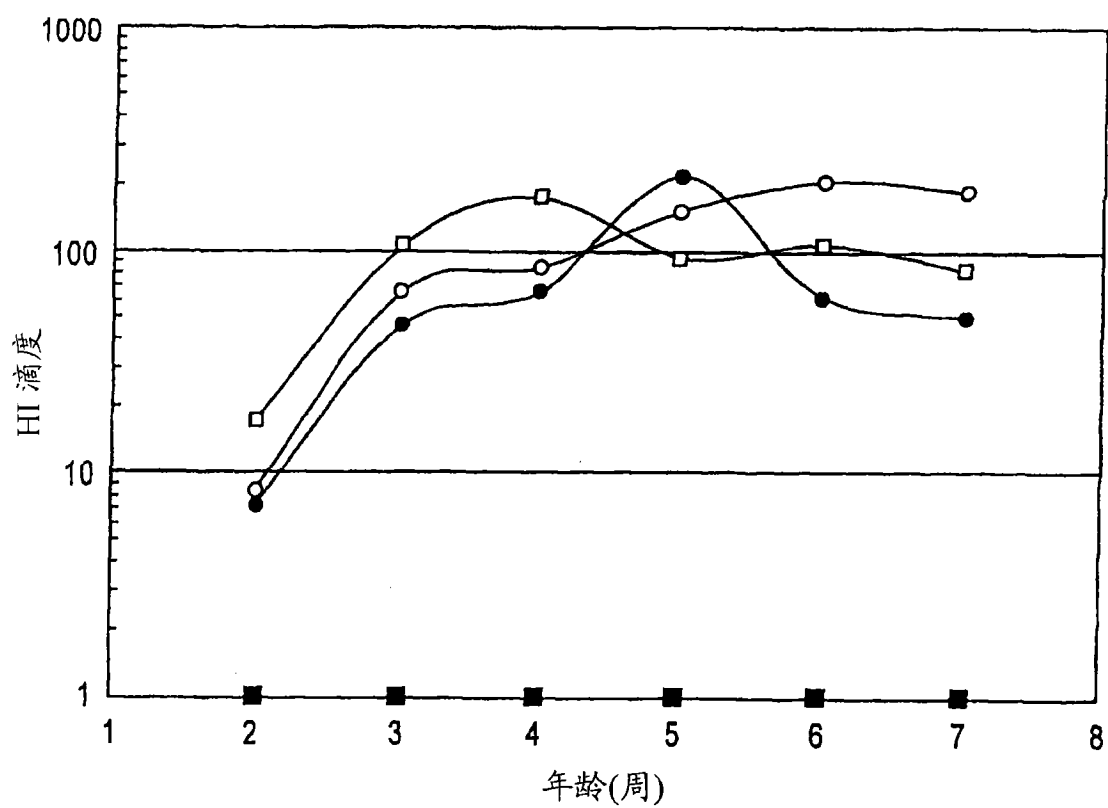


ELISA 滴度*=认为等于或大于 570 的 ELISA 滴度为阳性.

- 组 1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 pfu
- 组 2 rHVT/CMVH5Wis68 375 pfu
- 组 3 AI H5N9 灭活病毒(3 周龄)
- 组 4 未接种的对照

图 9

用具有血凝素基因的重组火鸡疱疹病毒接种的鸡中的血凝抑制滴度（第二次试验）



- 组 1 rHVT/CMVH5Wis68 卵内
- 组 2 rHVT/CMVH5Wis68 皮下
- 组 3 rHVT/BacH5Wis68 皮下
- 组 4 未接种的对照

图 10