



(10) 授权公告号 CN 114040979 B

(45) 授权公告日 2024.06.28

(21) 申请号 202080045560.2

(22) 申请日 2020.06.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114040979 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(30) 优先权数据
2019-115532 2019.06.21 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/024131 2020.06.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/256099 JA 2020.12.24

(73) 专利权人 国立大学法人大阪大学
地址 日本大阪府

(72) 发明人 小林刚 金井祐太

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
专利代理师 张晶 谢顺星

(51) Int.Cl.
C12N 15/86 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102666860 A, 2012.09.12

审查员 韩福平

权利要求书1页 说明书18页
序列表14页 附图14页

(54) 发明名称

稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法

(57) 摘要

本发明提供一种稳定地表达外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法,其特征在于,包括:
(1) 获取外源基因的工序,所述外源基因具有以近似于RNA病毒基因的密码子组成的方式发生了改变的密码子组成;(2) 将在(1)中获取的外源基因插入到RNA病毒的基因组中的工序;及(3)使用反向遗传学方法人工合成人工重组RNA。

1. 一种稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法,其特征在于,包括:

(1) 获取外源基因的工序,所述外源基因具有以近似于RNA病毒基因的密码子组成的方式发生了改变的密码子组成;

(2) 将在(1)中获取的外源基因插入到RNA病毒的基因组中的工序;及,

(3) 使用反向遗传学方法人工合成人工重组RNA病毒的工序,

其中,RNA病毒为属于轮状病毒属(Genus Rotavirus)或正呼肠孤病毒属(Genus Orthoreovirus)的病毒,

其中,在工序(1)中,获取具有改变至RNA病毒基因的密码子组成 $\pm 30\%$ 的范围内的密码子组成的外源基因。

2. 一种稳定地保持导入到使用反向遗传学方法人工合成的人工重组RNA病毒中的外源基因的方法,其特征在于,

使外源基因的密码子组成近似于RNA病毒基因的密码子组成,

其中,RNA病毒为属于轮状病毒属或正呼肠孤病毒属的病毒,

其中,使外源基因的密码子组成在RNA病毒基因的密码子组成 $\pm 30\%$ 的范围内与RNA病毒基因的密码子组成近似。

稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法。

背景技术

[0002] 属于呼肠孤病毒科的轮状病毒可引发婴幼儿的急性胃肠炎,每年约有20万人因感染轮状病毒而死亡。在轮状病毒方面,人工制作任意病毒的技术开发落后,然而最近本申请的发明人成功开发出了实用的轮状病毒的人工合成方法(专利文献1、非专利文献1)。通过该技术,能够自由制作具有任意突变的人工重组轮状病毒、或带有外源基因的人工重组轮状病毒。然后,本申请的发明人发现,在导入了外源基因的人工重组轮状病毒中,全长的外源基因会在短期内消失,即难以长期稳定地保持或表达外源基因,在经过反复研究后发表了用于稳定地保持或表达外源基因的一些改良方法的报告(非专利文献2)。

[0003] 在异源宿主中表达外源基因时,出于提高外源基因的表达的的目的,从很久以前开始就一直采用使外源基因的密码子组成接近于宿主基因的密码子组成的密码子优化技术(非专利文献3),并提供了大量的密码子优化软件。然而,密码子优化技术能否应用于稳定地保持导入于人工重组RNA病毒中的外源基因是未知的。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:国际公开W02018/062199

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Kanai et al.,Proc Natl Acad Sci USA.2017Feb 28;114(9):2349-2354

[0009] 非专利文献2:Kanai et al.,Journal of Virology,2019Feb 5;93(4).pii:e01774-18

[0010] 非专利文献3:Gustafsson et al.,Trends Biotechnol.2004Jul;22(7):346-353

发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题

[0012] 本发明的技术问题在于提供一种稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法以及稳定地保持导入于人工重组RNA病毒的外源基因的方法。

[0013] 解决技术问题的技术手段

[0014] 为了解决上述技术问题,本发明包括以下各个发明。

[0015] [1]一种稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法,其特征在于,包括:

[0016] (1)获取外源基因的工序,所述外源基因具有以近似于RNA病毒基因的密码子组成的方式发生了改变的密码子组成;

[0017] (2)将在(1)中获取的外源基因插入到RNA病毒的基因组中的工序;及,

[0018] (3)使用反向遗传学方法人工合成人工重组RNA病毒的工序。

- [0019] [2]根据所述[1]所述的方法,其中,RNA病毒为属于呼肠孤病毒科的病毒。
- [0020] [3]根据所述[2]所述的方法,其中,属于呼肠孤病毒科的病毒为属于轮状病毒属或正呼肠孤病毒属的病毒。
- [0021] [4]根据所述[1]~[3]中任一项所述的方法,其中,在工序(1)中,获取具有改变至RNA病毒基因的密码子组成 $\pm 30\%$ 的范围内的密码子组成的外源基因。
- [0022] [5]一种稳定地保持导入到使用反向遗传学方法人工合成的人工重组RNA病毒中的外源基因的方法,其特征在于,使外源基因的密码子组成近似于RNA病毒基因的密码子组成。
- [0023] [6]根据所述[5]所述的方法,其中,RNA病毒为属于呼肠孤病毒科的病毒。
- [0024] [7]根据所述[6]所述的方法,其中,属于呼肠孤病毒科的病毒为属于轮状病毒属或正呼肠孤病毒属的病毒。
- [0025] [8]根据所述[5]~[7]中任一项所述的方法,其中,使外源基因的密码子组成在RNA病毒基因的密码子组成 $\pm 30\%$ 的范围内与RNA病毒基因的密码子组成近似。
- [0026] 发明效果
- [0027] 根据本发明,能够提供一种长期稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒。

附图说明

- [0028] 图1为示出猴轮状病毒SA11株的NSP1基因(RV NSP1基因)、荧光素酶基因(NLuc基因)及密码子改变荧光素酶基因(Rv-NLuc基因)的各氨基酸密码子的组成的图。
- [0029] 图2为示出荧光素酶基因(NLuc基因)的碱基序列(SEQ ID NO:12)及密码子改变荧光素酶基因(Rv-NLuc基因)的碱基序列(SEQ ID NO:13)的图。
- [0030] 图3为示出插入了荧光素酶基因(NLuc基因)的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因及插入了密码子改变荧光素酶基因(Rv-NLuc基因)的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因的结构图。
- [0031] 图4为示出对具有荧光素酶基因(NLuc基因)的人工重组轮状病毒及具有密码子改变荧光素酶基因(Rv-NLuc基因)的人工重组轮状病毒进行10次传代培养并研究外源基因的稳定性的图。
- [0032] 图5为示出猴轮状病毒SA11株的NSP1基因(RV NSP1基因)、绿色荧光蛋白基因(ZsG基因)及密码子改变绿色荧光蛋白基因(Rv-ZsG基因)的各氨基酸密码子的组成的图。
- [0033] 图6为示出绿色荧光蛋白基因(ZsG基因)的碱基序列(SEQ ID NO:14)及密码子改变绿色荧光蛋白基因(Rv-ZsG基因)的碱基序列(SEQ ID NO:15)的图。
- [0034] 图7为示出插入了绿色荧光蛋白基因(ZsG基因)的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因及插入了密码子改变绿色荧光蛋白基因(Rv-ZsG基因)的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因的结构图。
- [0035] 图8为对具有绿色荧光蛋白基因(ZsG基因)的人工重组轮状病毒及具有密码子改变绿色荧光蛋白基因(Rv-ZsG基因)的人工重组轮状病毒进行10次传代培养并研究外源基因的稳定性的图。
- [0036] 图9为示出猴轮状病毒SA11株的NSP1基因(RV NSP1基因)、红色荧光蛋白基因(AsR基因)及密码子改变红色荧光蛋白基因(Rv-AsR基因)的各氨基酸密码子的组成的图。

[0037] 图10为示出红色荧光蛋白基因 (AsR基因) 的碱基序列 (SEQ ID NO:16) 及密码子改变红色荧光蛋白基因 (Rv-AsR基因) 的碱基序列 (SEQ ID NO:17) 的图。

[0038] 图11为示出插入了红色荧光蛋白基因 (AsR基因) 的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因及插入了密码子改变红色荧光蛋白基因 (Rv-AsR基因) 的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因的结构图。

[0039] 图12为示出对具有红色荧光蛋白基因 (AsR基因) 的人工重组轮状病毒及具有密码子改变红色荧光蛋白基因 (Rv-AsR基因) 的人工重组轮状病毒进行10次传代培养并研究外源基因的稳定性而得到的结果的图。

[0040] 图13为示出在荧光显微镜下观察具有绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 的人工重组轮状病毒及具有密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Rv-ZsG基因) 的人工重组轮状病毒的绿色荧光蛋白表达量而得到的结果的图。

[0041] 图14为示出以蛋白质印迹法 (western blotting) 对具有绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 的人工重组轮状病毒及具有密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Rv-ZsG基因) 的人工重组轮状病毒的绿色荧光蛋白表达量进行定量而得到的结果的图。

[0042] 图15为示出对具有绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 的人工重组轮状病毒及具有密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Rv-ZsG基因) 的人工重组轮状病毒的增殖能力进行比较而得到的结果的图。

[0043] 图16为示出在荧光显微镜下观察具有红色荧光蛋白基因 (AsR基因) 的人工重组轮状病毒及具有密码子改变红色荧光蛋白基因 (Rv-AsR基因) 的人工重组轮状病毒的红色荧光蛋白表达量而得到的结果的图。

[0044] 图17为示出对具有荧光素酶基因 (NLuc基因) 的人工重组轮状病毒及具有密码子改变荧光素酶基因 (Rv-NLuc基因) 的人工重组轮状病毒的荧光素酶活性进行测定而得到的结果的图。

[0045] 图18为示出猴轮状病毒SA11株的野生型NSP1基因、插入了密码子改变萤火虫荧光素酶基因 (Rv-AkaLuc基因) 的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因及插入了密码子改变诺如病毒VP1基因 (Rv-NoV VP1基因) 的猴轮状病毒SA11株的NSP1基因的结构图。

[0046] 图19为示出对具有密码子改变萤火虫荧光素酶基因 (Rv-AkaLuc基因) 的人工重组轮状病毒进行10次传代培养并研究外源基因的稳定性而得到的结果的图。

[0047] 图20为示出对具有密码子改变诺如病毒VP1基因 (Rv-NoV VP1基因) 的人工重组轮状病毒进行10次传代培养并研究外源基因的稳定性而得到的结果的图。

[0048] 图21为示出插入了绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 的蝙蝠呼肠孤病毒的S1基因及插入了密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Rv-ZsG基因) 的蝙蝠呼肠孤病毒的S1基因的结构图。

[0049] 图22为示出具有密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Rv-ZsG基因) 的人工重组蝙蝠呼肠孤病毒感染细胞的相差显微镜观察结果 (左) 及荧光显微镜观察结果 (右) 的图。

[0050] 图23为示出哺乳类呼肠孤病毒T1L型的L1基因 (MRV L1基因)、绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 及密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Mrv-ZsG基因) 的各氨基酸密码子的组成的图。

[0051] 图24为示出插入了绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 或密码子改变绿色荧光蛋白基因 (Mrv-ZsG基因) 的哺乳类呼肠孤病毒的L1基因的结构图。

[0052] 图25为示出对具有绿色荧光蛋白基因 (ZsG基因) 或密码子改变绿色荧光蛋白基因

(Mrv-ZsG基因)的人工重组哺乳类呼肠孤病毒感染细胞进行使用了MRV特异性抗体的免疫染色并在荧光显微镜下观察病毒感染细胞中的绿色荧光蛋白(ZsG)的表达而得到的结果的图,其中,上段为具有ZsG基因的哺乳类呼肠孤病毒感染细胞、下段为具有Mrv-ZsG基因的哺乳类呼肠孤病毒感染细胞,左侧为使用了MRV特异性抗体的免疫染色的观察图像、中间为绿色荧光蛋白表达细胞的观察图像、右侧为二者的合成图像。

[0053] 图26为示出对具有绿色荧光蛋白基因(ZsG基因)的人工重组哺乳类呼肠孤病毒及具有密码子改变绿色荧光蛋白基因(Mrv-ZsG基因)的人工重组哺乳类呼肠孤病毒进行1~3次传代培养并研究外源基因的稳定性的而得到的结果的图。

具体实施方式

[0054] 本发明提供一种稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法(以下记作“本发明的制作方法”)。本发明的制作方法包括以下的工序(1)、(2)及(3)即可:

[0055] (1)获取外源基因的工序,所述外源基因具有以近似于RNA病毒基因的密码子组成的方式发生了改变的密码子组成;

[0056] (2)将在(1)中获取的外源基因插入到RNA病毒的基因组中的工序;

[0057] (3)使用反向遗传学方法获取人工重组RNA病毒的工序。

[0058] RNA病毒可以为双链RNA病毒,也可以为正链单链RNA病毒,还可以为负链单链RNA病毒。作为双链RNA病毒,可列举出属于呼肠孤病毒科、双核糖核酸病毒科(Birnaviridae)的病毒。作为正链单链RNA病毒,可列举出属于冠状病毒科、小核糖核酸病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、杯状病毒科、星状病毒科等的病毒。作为负链单链RNA病毒,可列举出属于副粘液病毒科、弹状病毒科、纤丝病毒科、正粘病毒科、砂粒病毒科、布尼亚病毒科等的病毒。

[0059] RNA病毒可以为属于呼肠孤病毒科的病毒。属于呼肠孤病毒科的病毒为基因组中具有分为10~12个节段的直链双链RNA的病毒,其病毒粒子显示直径为60~80nm的正二十面体结构。属于呼肠孤病毒科的病毒中包括:哺乳类正呼肠孤病毒(也称为哺乳类呼肠孤病毒)、纳尔逊海湾正呼肠孤病毒(也称为纳尔逊海湾呼肠孤病毒或蝙蝠呼肠孤病毒)、禽呼肠孤病毒等正呼肠孤病毒属(Genus Orthoreovirus);非洲马瘟病毒、蓝舌病毒等环状病毒属(Genus Orbivirus);轮状病毒等轮状病毒属(Genus Rotavirus);科罗拉多蜱热病毒等COLTI病毒属(Genus Coltivirus);水生呼肠孤病毒A等水生呼肠孤病毒属(Genus Aquareovirus);质型多角体病毒等质型多角体病毒属(Genus Cypovirus);南方水稻黑条矮缩病毒等斐济病毒属(Genus Fijivirus);水稻矮缩病毒等植物呼肠孤病毒属(Genus Phytoreovirus)及水稻齿叶矮缩病毒(Rice ragged stunt virus)等水稻病毒属(Genus Oryzavirus)。属于呼肠孤病毒科的病毒可以是属于轮状病毒属的病毒,也可以是属于正呼肠孤病毒属的病毒。

[0060] 外源基因没有特别限定。外源基因可以为动物的基因,可以为植物的基因,可以为菌类的基因,可以为细菌的基因,也可以为病毒的基因。外源基因的碱基长度没有特别限定,可以为10bp以上,可以为100bp以上,可以为500bp以上,可以为1000bp以上,可以为1500bp以上,可以为2000bp以上,可以为3000bp以上,可以为4000bp以上,也可以为5000bp以上。外源基因的碱基长度可以为500bp以下,可以为1000bp以下,可以为1500bp以下,可以为2000bp以下,可以为3000bp以下,可以为4000bp以下,也可以为5000bp以下。

[0061] 由外源基因编码的蛋白质没有特别限定。由外源基因编码的蛋白质可以为疫苗抗原。作为疫苗抗原,例如可列举出诺如病毒抗原、腺病毒抗原、A型肝炎抗原、札幌病毒抗原、手足口病病毒抗原、肠病毒抗原、HIV抗原、沙门氏菌抗原、弯曲杆菌抗原、副溶血性弧菌抗原、大肠杆菌0157抗原、霍乱弧菌抗原、肠伤寒杆菌抗原、痢疾杆菌抗原等。这些疫苗抗原也可以为表位肽。

[0062] 在工序(1)中,获取具有以近似于RNA病毒基因的密码子组成的方式而发生了改变的密码子组成的外源基因。作为标准的RNA病毒基因的密码子组成,可以为通过嵌合改变了密码子的外源基因而人工合成的RNA病毒的基因的密码子组成,也可以为与通过嵌合改变了密码子的外源基因而人工合成的RNA病毒不同的RNA病毒的基因的密码子组成。在以不同的RNA病毒的基因的密码子组成作为标准时,不同的RNA病毒优选为与通过嵌合改变了密码子的外源基因而人工合成的RNA病毒在系统上近似的RNA病毒(例如,属于同科的病毒、属于同属的病毒、不同种的病毒等)。

[0063] 此外,作为标准的RNA病毒基因的密码子组成,可以为作为标准的RNA病毒的全基因的密码子组成,也可以为作为标准的RNA病毒的部分基因的密码子组成。在以RNA病毒的部分基因的密码子组成作为标准时,可以将一个基因的密码子组成作为标准,也可以将两个以上的基因的密码子组成作为标准。

[0064] 作为标准的RNA病毒基因的密码子组成能够根据登录在公知的基因数据库(例如GenBank等)中的RNA病毒的基因信息而制作。

[0065] 表1示出轮状病毒SA11株的全基因的基因组组成。表2示出轮状病毒SA11株的NSP1基因的基因组组成。表3示出蝙蝠呼肠孤病毒(Pteropine orthoreovirus)MB株的全基因的基因组组成。表4示出哺乳类呼肠孤病毒T1L型的全基因的基因组组成。能够将表1~4所示出的密码子组成用作本发明的制作方法中的标准密码子组成。其中能够使用属于呼肠孤病毒科的病毒、特别是属于轮状病毒属及正呼肠孤病毒属的人工重组病毒,并将其用作使外源基因表达时的标准密码子组成。

[0066] [表1]

[0067] 轮状病毒SA11株全基因的基因组组成(%)

[0068]

丙氨酸	GCA	42	甘氨酸	GGA	52	脯氨酸	CCA	65
	GCC	5		GGC	12		CCC	2
	GCG	11		GGG	8		CCG	12
	GCT	41		GGT	28		CCT	21
精氨酸	AGA	64	组氨酸	CAC	23	丝氨酸	AGC	2
	AGG	15		CAT	77		AGT	11
	CGA	8	异亮氨酸	ATA	47		TCA	49
	CGC	4		ATC	8		TCC	6
	CGG	2		ATT	45		TCG	9
	CGT	8		CTA	14		TCT	23
天冬酰胺	AAC	24	亮氨酸	CTC	4	苏氨酸	ACA	39
	AAT	76		CTG	8		ACC	7
天冬氨酸	GAC	26		CTT	12		ACG	15
	GAT	74		TTA	38		ACT	39
半胱氨酸	TGC	31		TTG	25	色氨酸	TGG	100
	TGT	69		赖氨酸	AAA	74	酪氨酸	TAC
终止	TAA	46	蛋氨酸	AAG	26	缬氨酸	TTA	77
	TAG	18	苯丙氨酸	ATG	100		GTA	33
	TGA	37	TTC	22	GTC		12	
谷氨酰胺	CAA	71	TTT	78	GTG		21	
	CAG	29			GTT	35		
谷氨酸	GAA	76						
	GAH	24						

[0069] [表2]

[0070] 轮状病毒SA11株NSP1基因的基因组组成

丙氨酸	GCA	38	甘氨酸	GGA	50	脯氨酸	CCA	71
	GCC	0		GGC	8		CCC	0
	GCG	6		GGG	17		CCG	6
	GCT	56		GGT	25		CCT	24
精氨酸	AGA	67	组氨酸	CAC	20	丝氨酸	AGC	6
	AGG	8		CAT	80		AGT	30
	CGA	0	异亮氨酸	ATA	35		TCA	30
	CGC	4		ATC	9		TCC	9
	CGG	13		ATT	56		TCG	3
	CGT	8		CTA	6		TCT	15
天冬酰胺	AAC	20	亮氨酸	CTC	2	苏氨酸	ACA	22
	AAT	80		CTG	8		ACC	9
天冬氨酸	GAC	15		CTT	18		ACG	17
	GAT	85		TTA	33		ACT	52
半胱氨酸	TGC	29		TTG	33	色氨酸	TGG	100
	TGT	71		赖氨酸	AAA	71	酪氨酸	TAC
终止	TAA	0	蛋氨酸	AAG	29	缬氨酸	TTA	73
	TAG	0	苯丙氨酸	ATG	100		GTA	18
	TGA	100	TTC	16	GTC		9	
谷氨酰胺	CAA	60	TTT	84	GTG		23	
	CAG	40			GTT	50		
谷氨酸	GAA	77						
	GAH	23						

[0071] [表3]

[0072] 蝙蝠呼肠孤病毒MB株全基因的基因组组成

丙氨酸	GCA	12	甘氨酸	GGA	16	脯氨酸	CCA	28	
	GCC	26		GGC	19		CCC	23	
	GCG	12		GGG	10		CCG	12	
	GCT	49		GGT	55		CCT	36	
精氨酸	AGA	10	组氨酸	CAC	39	丝氨酸	AGC	4	
	AGG	9		CAT	61		AGT	13	
	CGA	13	异亮氨酸	ATA	16		TCA	21	
	CGC	22		ATC	36		TCC	23	
	CGG	6		ATT	49		TCG	12	
	CGT	40		CTA	12		TCT	26	
天冬酰胺	AAC	40	亮氨酸	CTC	15	苏氨酸	ACA	17	
	AAT	60		CTG	22		ACC	24	
天冬氨酸	GAC	39		CTT	16		ACG	14	
	GAT	61		TTA	13		ACT	46	
半胱氨酸	TGC	41		赖氨酸	TTG	22	色氨酸	TGG	100
	TGT	59			AAA	46	酪氨酸	TAC	46
终止	TAA	25	蛋氨酸	AAG	54	TTA		54	
	TAG	42	苯丙氨酸	ATG	100	缬氨酸	GTA	7	
	TGA	33		TTC	56		GTC	29	
谷氨酰胺	CAA	43	TTT	44	GTG		25		
	CAG	57			GTT		38		
谷氨酸	GAA	45							
	GAH	55							

[0073] [表4]

[0074] 哺乳类呼肠孤病毒T1L型全基因的基因组组成

[0075]

丙氨酸	GCA	25	甘氨酸	GGA	32	脯氨酸	CCA	39	
	GCC	16		GGC	18		CCC	13	
	GCG	23		GGG	19		CCG	17	
	GCT	37		GGT	31		CCT	31	
精氨酸	AGA	25	组氨酸	CAC	35	丝氨酸	AGC	9	
	AGG	14		CAT	65		AGT	13	
	CGA	18	异亮氨酸	ATA	24		TCA	30	
	CGC	14		ATC	31		TCC	12	
	CGG	9		ATT	45		TCG	13	
	CGT	21		CTA	15		TCT	23	
天冬酰胺	AAC	35	亮氨酸	CTC	6	苏氨酸	ACA	25	
	AAT	65		CTG	20		ACC	12	
天冬氨酸	GAC	36		TTC	CTT		15	ACG	23
	GAT	64			TTA		19	ACT	40
半胱氨酸	TGC	42		赖氨酸	TTG	26	色氨酸	TGG	100
	TGT	58			AAA	45	酪氨酸	TAC	38
终止	TAA	64	蛋氨酸	AAG	55	TTA		62	
	TAG	0	苯丙氨酸	ATG	100	缬氨酸	GTA	18	
	TGA	36		TTC	49		GTC	17	
谷氨酰胺	CAA	43	TTT	51	GTG		37		
	CAG	57			GTT		27		
谷氨酸	GAA	41							
	GAH	59							

[0076] 使外源基因的密码子组成与作为标准的RNA病毒基因的密码子组成近似是指,在不使外源基因的氨基酸发生突变的前提下,将对应于相同氨基酸的密码子变更为作为标准的RNA病毒基因中出现频率高的密码子。与作为标准的RNA病毒基因的密码子组成的近似程度,只要为能够实现稳定地保持外源基因这一目的的程度即可,没有特别限定。例如,可以将外源基因的密码子组成改变至作为标准的RNA病毒基因的密码子组成±35%的范围内,可以将外源基因的密码子组成改变至作为标准的RNA病毒基因的密码子组成±30%的范围内,可以将外源基因的密码子组成改变至作为标准的RNA病毒基因的密码子组成±25%的范围内,可以将外源基因的密码子组成改变至作为标准的RNA病毒基因的密码子组成±20%的范围内,可以将外源基因的密码子组成改变至作为标准的RNA病毒基因的密码子组成±15%的范围内,也可以将外源基因的密码子组成改变至作为标准的RNA病毒基因的密码子组成±10%的范围内。

[0077] 对于改变了密码子组成的外源基因,能够根据改变后的碱基序列通过DNA合成而获取。此外,还能够使用以PCR为基础的定点突变法在现有的外源基因DNA中导入突变而获取。

[0078] 在工序(2)中,将在(1)中获取的外源基因插入到RNA病毒的基因组中。关于外源基因的插入位置,只要不妨碍使用反向遗传学方法而人工合成人工重组RNA病毒,则没有特别限定。例如,将外源基因导入人工重组轮状病毒中时,可以插入到NSP1基因中,也可以插入到NSP3基因中,还可以插入到NSP5基因中。例如,将外源基因导入人工重组哺乳类呼肠孤病毒中时,可以插入到L1基因中,也可以插入到S1、S2、S4基因中。例如,将外源基因导入人工重组流感病毒中时,可以插入到NS1基因中,也可以插入到NA基因中,还可以插入到PA基因中。例如,将外源基因导入阿尔法病毒属(辛德毕斯病毒、基孔肯雅病毒等)的人工重组病毒

中时,可以插入到NSP3基因中,也可以插入到衣壳蛋白基因中。例如,将外源基因导入人工重组诺如病毒中时,可以插入到ORF1基因中。例如,将外源基因导入黄病毒属(登革热病毒、C型肝炎病毒等)的人工重组病毒中时,可以插入到NS5A基因中,也可以插入到衣壳蛋白基因中。例如,将外源基因导入弹状病毒(狂犬病病毒、水泡性口炎病毒)的人工重组病毒中时,可以插入到G蛋白基因中。例如,将外源基因导入小核糖核酸病毒属(脊髓灰质炎病毒、口蹄疫病毒等)的人工重组病毒中时,可以插入到P1基因中。例如,将外源基因导入人工重组仙台病毒中时,可以插入到NP基因中。能够采用公知的基因重组技术将外源基因插入病毒基因组中。

[0079] 在工序(3)中,使用反向遗传学方法而人工合成人工重组RNA病毒。对于使用反向遗传学方法而人工合成人工重组RNA病毒的方法,根据RNA病毒的种类从公知的方法中适当选择即可。使用反向遗传学方法合成人工重组轮状病毒的方法,例如记载于上述专利文献1、非专利文献1、非专利文献2等。使用反向遗传学方法合成人工重组脊髓灰质炎病毒的方法,例如记载于下述参考文献1等。使用反向遗传学方法合成人工重组狂犬病病毒的方法,例如记载于下述参考文献2等。使用反向遗传学方法合成人工重组麻疹病毒的方法,例如记载于下述参考文献3等。使用反向遗传学方法合成人工重组布尼亚病毒的方法,例如记载于下述参考文献4等。使用反向遗传学方法合成人工重组传染性法式囊病病毒的方法,例如记载于下述参考文献5等。使用反向遗传学方法合成人工重组C型肝炎病毒的方法,例如记载于下述参考文献6等。使用反向遗传学方法合成人工重组流感病毒的方法,例如记载于下述参考文献7等。使用反向遗传学方法合成人工重组冠状病毒的方法,例如记载于下述参考文献8等。使用反向遗传学方法合成人工重组埃博拉病毒的方法,例如记载于下述参考文献9等。使用反向遗传学方法合成人工重组博尔纳病毒的方法,例如记载于下述参考文献10等。使用反向遗传学方法合成人工重组砂粒病毒的方法,例如记载于下述参考文献11等。使用反向遗传学方法合成人工重组呼肠孤病毒的方法,例如记载于下述参考文献12等。使用反向遗传学方法合成人工重组登革热病毒的方法,例如记载于下述参考文献13等。使用反向遗传学方法合成人工重组诺如病毒的方法,参考例如下述参考文献14等。使用反向遗传学方法合成人工重组日本脑炎病毒的方法,参考例如下述参考文献15等。使用反向遗传学方法合成人工重组蓝舌病毒的方法,参考例如下述参考文献16等。使用反向遗传学方法合成人工重组人免疫缺陷病毒的方法,参考例如下述参考文献17等。

[0080] <参考文献列表>

[0081] 1.Racaniello VR&Baltimore D(1981)Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells.Science214(4523):916-919.

[0082] 2.Schnell MJ,Mebatsion T,&Conzelmann KK(1994)Infectious Rabies Viruses from Cloned Cdna.Embo J 13(18):4195-4203.

[0083] 3.Radecke F,et al.(1995)Rescue of measles viruses from cloned DNA.Embo J 14(23):5773-5784.

[0084] 4.Bridgen A &Elliott RM(1996)Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(26):15400-15404.

[0085] 5.Mundt E&Vakharia VN(1996)Synthetic transcripts of double-stranded

Birnavirus genome are infectious. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(20):11131-11136.

[0086] 6. Kolykhalov AA, et al. (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. Science 277(5325):570-574.

[0087] 7. Neumann G, et al. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(16):9345-9350.

[0088] 8. Yount B, Curtis KM, & Baric RS (2000) Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. Journal of virology 74(22):10600-10611.

[0089] 9. Olchikov VE, et al. (2001) Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. Science 291(5510):1965-1969.

[0090] 10. Schneider U, Schwemmler M, & Staeheli P (2005) Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(9):3441-3446.

[0091] 11. Sanchez AB & de la Torre JC (2006) Rescue of the prototypic Arenavirus LCMV entirely from plasmid. Virology 350(2):370-380.

[0092] 12. Kobayashi T, et al. (2007) A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. Cell host & microbe 1(2):147-157.

[0093] 13. Lai CJ, Zhao BT, Hori H, & Bray M (1991) Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(12):5139-5143.

[0094] 14. Chaudhry Y, Skinner MA, & Goodfellow IG (2007) Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. The Journal of general virology 88(Pt8):2091-2100.

[0095] 15. Yun SI, Kim SY, Rice CM, & Lee YM (2003) Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. Journal of virology 77(11):6450-6465.

[0096] 16. Boyce M, Celma CC, & Roy P (2008) Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. Journal of virology 82(17):8339-8348.

[0097] 17. Adachi A, et al. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. Journal of virology 59(2):284-291.

[0098] 根据本发明的制作方法而制作的人工重组RNA病毒能够长期稳定地保持外源基

因,并能够长期稳定地表达外源基因产物,因此若使用例如疫苗抗原作为外源基因,则能够适宜地用作病毒疫苗。此外,还能够通过以(被认为是)由基因异常导致的消化道的遗传病(大肠癌、溃疡性结肠炎、克罗恩病、乳糜泄、非特异性多发性小肠溃疡等)为对象、以正常基因为外源基因并直达异常细胞而应用于基因治疗。

[0099] 本发明提供一种稳定地保持导入到使用反向遗传学方法人工合成的人工重组RNA病毒中的外源基因的方法(以下,记作“本发明的稳定保持方法”)。本发明的稳定保持方法是特征为使外源基因的密码子组成近似于RNA病毒基因的密码子组成的方法。关于使外源基因的密码子组成近似于作为标准的RNA病毒基因的密码子组成的方法,能够通过与其在上述本发明的制作方法中进行了说明的方法相同的方法来实施。

[0100] 实施例

[0101] 以下,通过实施例对本发明进行更详细的说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0102] [实施例1:表达荧光素酶的人工重组轮状病毒]

[0103] 1-1材料及方法

[0104] (1) 病毒

[0105] 使用了猴轮状病毒SA11株。本申请的发明人确定了该病毒株的11个分节段RNA基因组各自的碱基序列,并对其进行了登录。将本实验中所使用的猴轮状病毒SA11株(以下称作“SA11株”)的11个分节段RNA基因组各自的名称及GenBank登录号示于表5。

[0106] [表5]

[0107] 猴轮状病毒SA11株的分节段基因组序列

基因组片段	编码蛋白	GenBank登录号	SEQ ID NO
片段1	VP1 (RNA依赖性RNA聚合酶)	LC178564	1
片段2	VP2 (RNA结合蛋白)	LC178565	2
片段3	VP3 (鸟苷酸转移酶)	LC178566	3
片段4	VP4 (血凝素、刺突蛋白)	LC178567	4
片段5	NSP1 (免疫抑制因子)	LC178570	5
片段6	VP6 (内衣壳)	LC178568	6
片段7	NSP3 (翻译促进因子)	LC178572	7
片段8	NSP2 (NTPase)	LC178571	8
片段9	VP7 (外衣壳)	LC178569	9
片段10	NSP4 (肠毒素)	LC178573	10
片段11	NSP5 (RNA合成辅助)	LC178574	11

[0109] (2) 包含SA11株的各分节段RNA基因组表达盒的质粒(分节段RNA基因组表达载体)

[0110] 为了制作人工重组轮状病毒而制作了包含SA11株的11个分节段RNA基因组的cDNA的质粒。将从病毒中提取的双链RNA作为模板,使用基于各分节段RNA基因组的碱基序列的特异性引物进行RT-PCR。将所得到的RT-PCR产物(各分节段RNA基因组的cDNA)插入到p3E5质粒的T7启动子序列与HDV核酶序列之间,从而得到包含各分节段RNA基因组的表达盒的质粒(参照专利文献1)。各分节段RNA基因组的表达盒具有在各分节段RNA基因组的cDNA的5'侧与T7启动子序列邻接、在3'侧与D型肝炎病毒(HDV)核酶序列邻接,且在其下游配置有T7终止序列的结构。将所制作的质粒(分节段RNA基因组表达载体)分别称为pT7-VP1SA11、

pT7-VP2SA11、pT7-VP3SA11、pT7-VP4SA11、pT7-VP6SA11、pT7-VP7SA11、pT7-NSP1SA11、pT7-NSP2SA11、pT7-NSP3SA11、pT7-NSP4SA11及pT7-NSP5SA11。

[0111] (3) 荧光素酶基因

[0112] 作为荧光素酶基因,使用了作为来自细角刺虾 (*Oplophorus gracilirostris*) 的荧光素酶基因的NLuc基因。pNL1.1.TK[NLuc/TK]载体 (Promega, GenBank登录号:KM359774, 3817bp) 的815位~1330位 (SEQ ID NO:12) 为NLuc编码区域。

[0113] (4) 改变了密码子组成的荧光素酶基因

[0114] 对NLuc基因的密码子组成及轮状病毒SA11株的NSP1基因 (以下称作“RV NSP1基因”) 的密码子组成进行考察,根据所得到的这两个基因的密码子组成,以接近于RV NSP1基因的密码子组成的方式改变NLuc基因的密码子组成。将所得到的改变NLuc基因称作“Rv-NLuc基因”。

[0115] 在图1的(A)~(U)中示出了RV NSP1基因、NLuc基因及Rv-NLuc基因中的各氨基酸的密码子组成。此外,在图2中分别示出了NLuc基因的碱基序列 (SEQ ID NO:12) 与Rv-NLuc基因的碱基序列 (SEQ ID NO:13)。对于Rv-NLuc基因,在NLuc基因的全长516个碱基中,70个碱基发生了改变。原始的NLuc基因的GC含量为53%,而Rv-NLuc基因的GC含量降低至40%,其接近于RV NSP1基因的GC含量 (31%) (参照表6)。

[0116] [表6]

	GC 含量 (%)
[0117] RV NSP1	31
NLuc	53
Rv-NLuc	40

[0118] (5) FAST蛋白表达载体

[0119] FAST蛋白表达载体通过将纳尔逊海湾呼肠孤病毒p10基因 (参照GenBank登录号:AB908284) 的蛋白质编码区域DNA插入到pCAGGS质粒 (5699bp, Matsuo et al., 2006, Biochem Biophys Res Commun 340(1):200-208) 的BglIII切割位点而制作 (参照专利文献1)。将所得到的纳尔逊海湾呼肠孤病毒p10表达载体称为pCAG-p10。

[0120] (6) 加帽酶表达载体

[0121] 加帽酶表达载体通过将牛痘病毒D1R基因的蛋白质编码区域DNA (GenBank登录号:NC006998的93948位~96482位) 及牛痘病毒D12L基因的蛋白质编码区域DNA (GenBank登录号:NC006998的107332位~108195位) 分别插入到上述pCAGGS质粒的BglIII切割位点而制作 (参照专利文献1)。将所得到的牛痘病毒mRNA加帽酶大亚基表达载体称为pCAG-D1R,将牛痘病毒mRNA加帽酶小亚基表达载体称为pCAG-D12L。

[0122] (7) SA11株的NSP2蛋白表达载体

[0123] NSP2蛋白表达载体通过将SA11株NSP2基因的蛋白质编码区域DNA (GenBank登录号:LC178571的47位~1000位) 插入到上述pCAGGS质粒的BglIII切割位点而制作 (参照专利文献1)。将所得到的SA11株NSP2蛋白表达载体称为pCAG-NSP2。

[0124] (8) SA11株的NSP5蛋白表达载体

[0125] NSP5蛋白表达载体通过将SA11株NSP5基因的蛋白质编码区域DNA (GenBank登录号:LC178574的22位~618位) 插入到上述pCAGGS质粒的BglIII切割位点而制作 (参照专利文

献1)。将所得到的SA11株NSP5蛋白表达载体称为pCAG-NSP5。

[0126] (9) 荧光素酶表达人工重组轮状病毒的制作

[0127] 利用PCR分别对NLuc基因及Rv-NLuc基因进行扩增,将扩增产物插入到pT7-NSP1SA11的NSP1基因(SEQ ID NO:5)的128位与129位之间,从而制作NLuc基因插入NSP1基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-NLuc)及Rv-NLuc基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-Rv-NLuc)(参照图3)。

[0128] 在荧光素酶表达人工重组轮状病毒的制作中,使用了下述11种质粒:自上述(2)中制作的11种包含分节段RNA基因组的cDNA的质粒中除去pT7-NSP1SA11的10种质粒、及上述pT7-NSP1SA11-Nluc或pT7-NSP1SA11-Rv-Nluc。

[0129] 在实施转染的前一天,将BHK-T7/P5细胞以 8×10^5 个/孔接种于6孔培养板。使用转染试剂(TransIT-LT1(商品名称)、Mirus),将各0.8 μ g的11种分节段RNA基因组表达载体、0.015 μ g的FAST蛋白表达载体(pCAG-p10)、各0.8 μ g的加帽酶表达载体(pCAG-D1R及pCAG-D12L)、NSP2蛋白表达载体(pCAG-NSP2)、NSP5蛋白表达载体(pCAG-NSP5)导入到BHK-T7/P5细胞中。对于每1 μ g的DNA使用了2 μ g的转染试剂。使用含有5%的FBS、100单位/ml的青霉素及100 μ g/ml的链霉素的DMEM培养基,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下,对BHK-T7/P5细胞进行培养。在进行转染的48小时后回收培养基及细胞。对回收的培养基及细胞进行3次冻融从而制备细胞裂解液,对猴MA104细胞(ATCC CRL-2378.1)进行传代培养。具体而言,在0.5 μ g/ml的胰蛋白酶的存在下,向12孔板中处于汇合(confluent)状态的MA104细胞中添加约0.5ml所述细胞裂解液。MA104细胞的培养中使用了不含FBS的DMEM培养基。传代后培养7天,在此期间内确认到细胞变性时判断为制成了人工重组病毒。将此时所得到的病毒称为P1(Passage 1(第1次传代))病毒。将使用包含pT7-NSP1SA11-Nluc的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-NLuc”,将使用包含pT7-NSP1SA11-Rv-Nluc的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-Rv-NLuc”。

[0130] (10) 通过电泳对荧光素酶基因进行确认

[0131] 为了考察rsSA11-NLuc及rsSA11-Rv-NLuc传代后的NLuc基因及Rv-NLuc基因的稳定性,在MA104细胞中将rsSA11-NLuc及rsSA11-Rv-NLuc反复传代至P10。在12孔板中准备呈汇合状态的MA104细胞,在病毒感染前去除培养基,并置换为1ml含有0.5 μ g/ml的胰蛋白酶的不含FBS的DMEM。分别向准备好的MA104细胞中添加1 μ L的rsSA11-NLuc及rsSA11-Rv-Nluc的P1病毒并在37 $^{\circ}$ C下培养5天。在培养5天后经2次冻融从而得到P2病毒。对于各转基因病毒,分别在5个孔中进行传代。

[0132] 反复进行传代至P10,从而得到rsSA11-Nluc的P10病毒克隆1~5及rsSA11-Rv-Nluc的P10病毒克隆1~5。从所得到的各P10病毒的各克隆中提取病毒基因组RNA,将其连同从P1病毒及野生型SA11病毒中得到的病毒基因组RNA一起供于SDS-PAGE。

[0133] 1-2结果

[0134] 将结果示于图4。在rsSA11-NLuc P1病毒的病毒基因组RNA中,确认到了NSP1-NLuc基因,但在rsSA11-NLuc P10病毒的克隆1~5的病毒基因组RNA中确认到了长的NSP1-NLuc基因消失、可观察到发生短小突变的NSP1-NLuc基因的克隆。另一方面,在rsSA11-Rv-Nluc中,P1病毒及P10病毒的克隆1~5均仅确认到了长的NSP1-Rv-NLuc基因。对在rsSA11-NLuc P10病毒中确认到的短的突变NSP1-NLuc基因进行测序分析时发现,NLuc基因的大部分发生

了缺失。该结果表明,与NLuc基因相比,Rv-NLuc基因在人工重组轮状病毒中得到更稳定的保持。

[0135] [实施例2:表达绿色荧光蛋白的人工重组轮状病毒]

[0136] 2-1材料及方法

[0137] 作为绿色荧光蛋白基因,使用了包含于pZsGreen1-N1载体 (CLONTECH) 中的ZsGreen基因(以下称为“ZsG基因”)。将ZsG基因的碱基序列示于SEQ ID NO:14。考察了ZsG基因的密码子组成及RV NSP1基因的密码子组成,根据所得到的这两个基因的密码子组成,以近似于RV NSP1基因的密码子组成的方式改变ZsG基因的密码子组成。将所得到的改变ZsG基因称为“Rv-ZsG基因”。

[0138] 在图5的(A)~(U)中示出了RV NSP1基因、ZsG基因及Rv-ZsG基因中的各氨基酸的密码子组成。此外,在图6中分别示出了ZsG基因的碱基序列(SEQ ID NO:14)与Rv-ZsG基因的碱基序列(SEQ ID NO:15)。对于Rv-ZsG基因,ZsG基因的全长696个碱基中203个碱基发生了改变。原始的ZsG基因的GC含量为63%,而Rv-ZsG基因的GC含量降低至38%,其接近于RV NSP1基因的GC含量(31%) (参照表7)。

[0139] [表7]

GC 含量 (%)	
[0140] RV NSP1	31
ZsG	63
Rv-ZsG	38

[0141] 除了使用ZsG基因及Rv-ZsG基因来代替NLuc基因及Rv-NLuc基因以外,以与实施例1相同的方法进行实验。即,将利用PCR而扩增的ZsG基因及Rv-ZsG基因分别插入到pT7-NSP1SA11的NSP1基因(SEQ ID NO:5)的128位与129位之间,从而制作ZsG基因插入NSP1基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-ZsG)及Rv-ZsG基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-Rv-ZsG) (参照图7),以与实施例1相同的方法制作了表达绿色荧光蛋白的人工重组轮状病毒。将使用包含pT7-NSP1SA11-ZsG的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-ZsG”,将使用包含pT7-NSP1SA11-Rv-ZsG的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-Rv-ZsG”。将所得到的rsSA11-ZsG及rsSA11-Rv-ZsG分别传代至P10后提取病毒基因组RNA,供于SDS-PAGE。

[0142] 2-2结果

[0143] 将结果示于图8。与实施例1的结果相同,在rsSA11-ZsG P10病毒的克隆1~5的病毒基因组RNA中,观察到了发生短小突变的NSP1-ZsG基因。另一方面,在rsSA11-Rv-ZsG中,即使经过10次传代后也未确认到发生短小突变的基因。另外,由于NSP1-ZsG基因及NSP1-Rv-ZsG基因(2306bp)的大小与VP4基因(2362bp)相近,因此无法通过电泳判别。

[0144] [实施例3:表达红色荧光蛋白的人工重组轮状病毒]

[0145] 3-1材料及方法

[0146] 作为红色荧光蛋白基因,使用了包含于pAsRed2-N1载体 (CLONTECH) 中的AsRed基因(以下称为“AsR基因”)。将AsR基因的碱基序列示于SEQ ID NO:16。考察了AsR基因的密码子组成及RV NSP1基因的密码子组成,根据所得到的这两个基因的密码子组成,以近似于RV NSP1基因的密码子组成的方式改变AsR基因的密码子组成。将所得到的改变AsR基因称为

“Rv-AsR基因”。

[0147] 在图9的(A)~(U)中示出了RV NSP1基因、AsR基因及Rv-AsR基因中的各氨基酸的密码子组成。此外,在图10中分别示出了AsR基因的碱基序列(SEQ ID NO:16)与Rv-AsR基因的碱基序列(SEQ ID NO:17)。对于Rv-AsR基因,在AsR基因的全长699个碱基中,198个碱基发生了改变。原始的AsR基因的GC含量为65%,而Rv-AsR基因的GC含量降低至40%,其接近于RV NSP1基因的GC含量(31%) (参列表8)。

[0148] [表8]

		GC 含量 (%)
[0149]	RV NSP1	31
	AsR	65
	Rv-AsR	40

[0150] 除了使用AsR基因及Rv-AsR基因来代替NLuc基因及Rv-NLuc基因以外,以与实施例1相同的方法进行实验。即,将利用PCR扩增的AsR基因及Rv-AsR基因分别插入到pT7-NSP1SA11的NSP1基因(SEQ ID NO:5)的128位与129位之间,从而制作了AsR基因插入NSP1基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-AsR)及Rv-AsR基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-Rv-AsR) (参列表11),以与实施例1相同的方法制作了表达红色荧光蛋白的人工重组轮状病毒。将使用包含pT7-NSP1SA11-AsR的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-AsR”,将使用包含pT7-NSP1SA11-Rv-AsR的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-Rv-AsR”。将所得到的rsSA11-AsR及rsSA11-Rv-AsR分别传代至P10后提取病毒基因组RNA,供于SDS-PAGE。

[0151] 3-2结果

[0152] 将结果示于图12。与实施例1及2的结果相同,在rsSA11-AsR P10病毒的克隆1~5的病毒基因组RNA中,观察到了发生了短小突变的NSP1-AsR基因。另一方面,在rsSA11-Rv-AsR中,即使经过10次传代后也未确认到发生短小突变的基因。另外,由于NSP1-AsR基因及NSP1-Rv-AsR基因(2309bp)的大小与VP4基因(2362bp)相近,因此无法通过电泳判别。

[0153] [实施例4:来自改变外源基因的蛋白质的表达量]

[0154] 4-1材料及方法

[0155] 使用在实施例2中制作的表达绿色荧光蛋白的rsSA11-ZsG与rsSA11-Rv-ZsG、以及野生型SA11。在12孔板中准备呈汇合状态的MA104细胞,以MOI (Multiplicity of Infection,感染复数)为0.5PFU/cells的方式感染各病毒,在荧光显微镜下观察感染后经过24小时的ZsG及Rv-ZsG的表达,并通过蛋白质印迹法进行定量。另行在12孔板中准备呈汇合状态的MA104细胞,以MOI:0.01PFU/cells的方式感染各病毒,并以含有0.5 μ g/ml的胰蛋白酶的DMEM进行培养。在感染24小时后,对细胞进行2次冻融,测定细胞破碎液中的病毒滴度。

[0156] 4-2结果

[0157] 将荧光显微镜的观察图像示于图13、将蛋白质印迹法的结果示于图14、将病毒滴度的测定结果示于图15。利用荧光显微镜,将曝光时间设为100ms及400ms而观察基于ZsG及Rv-ZsG的绿色荧光时发现,与ZsG相比,Rv-ZsG的发光更强(图13)。此外通过使用了ZsG蛋白特异性抗体的蛋白质印迹法,确认到了Rv-ZsG的强烈表达(图14)。另一方面,rsSA11-ZsG与

rsSA11-Rv-ZsG的增殖能力为相同程度(图15),因此表示ZsG与Rv-ZsG的表达量的差异与病毒的增殖能力无关。

[0158] [参考例1:来自改变外源基因的蛋白质的表达量]

[0159] 使用了在实施例3中制作的表达红色荧光蛋白的rsSA11-AsR及rsSA11-Rv-AsR。以与实施例4相同的方式,在12孔板中准备呈汇合状态的MA104细胞,以MOI (Multiplicity of Infection) 为0.5PFU/cells的方式感染各病毒,在荧光显微镜下观察感染后经过24小时的AsR及Rv-AsR的表达。

[0160] 将结果示于图16。利用荧光显微镜(Nikon),将曝光时间设为400ms、800ms及1.5秒而观察基于AsR及Rv-AsR的红色荧光时,未见差异。即,表示AsR与Rv-AsR的表达量没有差异。

[0161] [参考例2:来自改变外源基因的蛋白质的表达量]

[0162] 使用在实施例1中制作的表达荧光素酶的rsSA11-Nluc与rsSA11-Rv-Nluc、以及野生型SA11。在12孔板中准备呈汇合状态的MA104细胞,以MOI (Multiplicity of Infection) 为0.1PFU/cells的方式感染各病毒,将感染后经过24小时的NLuc及Rv-Nluc的表达作为荧光素酶活性(发光强度)进行定量。

[0163] 将结果示于图17。rsSA11-Nluc与rsSA11-Rv-Nluc的荧光素酶活性没有差异。即,表示Nluc与Rv-Nluc的表达量没有差异。

[0164] [实施例5:表达碱基长度为1.6kbp的外源基因的人工重组轮状病毒]

[0165] 尝试制作表达具有长为1kbp以上的碱基长度的外源基因的人工重组轮状病毒。

[0166] 5-1材料及方法

[0167] (1) 外源基因

[0168] 作为外源基因,使用以接近于RV NSP1基因的密码子组成的方式改变作为萤火虫荧光素酶(FLuc)基因的改变体的Akaluc基因(GenBank登录号:LC320664,1653bp)而成的改变Akaluc基因(以下称为“Rv-Akaluc基因”)、及以接近于RV NSP1基因的密码子组成的方式改变诺如病毒VP1基因(GenBank登录号:KM268107,1623bp)的密码子组成而成的改变诺如病毒VP1基因(以下称为“Rv-NoV VP1基因”)。将改变Akaluc基因的碱基序列示于SEQ ID NO:18,将改变诺如病毒VP1基因的碱基序列示于SEQ ID NO:19。

[0169] (2) 外源基因插入NSP1表达质粒的制作

[0170] 将利用PCR扩增的Rv-Akaluc基因及Rv-NoV VP1基因分别插入到pT7-NSP1SA11的NSP1基因(SEQ ID NO:5)的128位与129位之间。进一步,按照Kanai等人的方法(非专利文献2),在NSP1基因上增加722bp的缺失,制作Rv-Akaluc基因插入NSP1基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-Rv-Akaluc)及Rv-NoV VP1基因插入NSP1基因表达质粒(称为pT7-NSP1SA11-Rv-NoV VP1)(参照图18)。

[0171] (3) 人工重组病毒的制作及外源基因保持的确认

[0172] 以与实施例1相同的方法,制作表达Rv-Akaluc的人工重组轮状病毒及表达Rv-NoV VP1的人工重组轮状病毒。将使用包含pT7-NSP1SA11-Rv-Akaluc的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-Rv-Akaluc”,将使用包含pT7-NSP1SA11-Rv-NoV VP1的11种质粒而制作的人工重组轮状病毒称为“rsSA11-Rv-NoV VP1”。将所得到的rsSA11-Rv-Akaluc及rsSA11-Rv-NoV VP1分别传代至P10后提取病毒基因组RNA,供于SDS-PAGE。

[0173] 5-2结果

[0174] 将rsSA11-Rv-Akaluc的结果示于图19,将rsSA11-Rv-NoV VP1的结果示于图20。除了NSP1以外,均在与野生型SA11株相同的位置确认到了rsSA11-Rv-Akaluc及rsSA11-Rv-NoV VP1的各基因组RNA的条带。另一方面,还分别在高于野生型SA11株的NSP1的条带的位置确认到了rsSA11-Rv-Akaluc的NSP1-Rv-Akaluc基因的条带及rsSA11-Rv-NoV VP1的Rv-NoV VP1基因的条带。此结果表明,即使是对于具有长1kbp以上的碱基长度的外源基因,也能够通过使其密码子组成接近于轮状病毒的密码子组成而制作稳定地保持具有1kbp以上的碱基长度的外源基因的转基因轮状病毒。

[0175] [实施例6:表达绿色荧光蛋白的人工重组蝙蝠呼肠孤病毒]

[0176] 6-1材料及方法

[0177] (1) 病毒

[0178] 蝙蝠呼肠孤病毒(Pteropine orthoreovirus,以下称为“PRV”)与轮状病毒同属呼肠孤病毒科,其具有由L1、L2、L3、M1、M2、M3、S1、S2、S3及S4构成的10个节段的双链RNA。以与实施例1的包含轮状病毒的分节段RNA基因组表达盒的质粒(分节段RNA基因组表达载体)相同的制作方法,制作包含PRV的10个分节段RNA基因组的cDNA的质粒。

[0179] (2) 绿色荧光蛋白基因

[0180] 与实施例2相同,使用了ZsG基因及Rv-ZsG基因。将ZsG基因及Rv-ZsG基因插入到PRV S1基因中。PRV S1基因为编码FAST、p17及sigmaC的基因,但是制作了将PRV S1基因连续的FAST-p17-sigmaC替换为ZsG-2A-FAST或RvZsG-2A-FAST的S1-ZsG-2A-FAST基因及S1-RvZsG-2A-FAST(参照图21)。

[0181] (3) 表达绿色荧光蛋白的人工重组蝙蝠呼肠孤病毒的制作

[0182] 以与实施例1相同的方法,将包含除S1基因以外的野生型基因的9种质粒与包含S1-ZsG-2A-FAST基因的质粒转染于BHK-T7/P5细胞,并传代于猴MA104细胞从而得到人工重组蝙蝠呼肠孤病毒(称为“rsMB-ZsG-2A-FAST”)。同样地,将包含除S1基因以外的野生型基因的9种质粒与包含S1-Rv-ZsG-2A-FAST基因的质粒转染于BHK-T7/P5细胞,并传代于猴MA104细胞从而得到人工重组蝙蝠呼肠孤病毒(称为“rsMB-Rv-ZsG-2A-FAST”)。

[0183] 6-2结果

[0184] 利用蚀斑法在荧光显微镜下考察rsMB-ZsG-2A-FAST病毒的绿色荧光蛋白(ZsG)的表达,结果发现全部病毒颗粒中的1/50~1/100左右呈现绿色荧光。然而,进行2~3次病毒的传代时,呈现绿色荧光的病毒消失。另一方面,rsMB-Rv-ZsG-2A-FAST病毒中100%的病毒呈现绿色荧光,即使在进行2~3次病毒的传代后,病毒仍呈现绿色荧光(参照图22),表示Rv-ZsG基因被稳定地保持。

[0185] [实施例7:表达绿色荧光蛋白的人工重组哺乳类呼肠孤病毒]

[0186] 7-1材料及方法

[0187] (1) 病毒

[0188] 哺乳类呼肠孤病毒(Mammalian orthoreovirus,以下称为“MRV”)与轮状病毒同属呼肠孤病毒科,其具有由L1、L2、L3、M1、M2、M3、S1、S2、S3及S4构成的10个节段的双链RNA。以与实施例1的包含轮状病毒的分节段RNA基因组表达盒的质粒(分节段RNA基因组表达载体)相同的制作方法,制作包含MRV的10个分节段RNA基因组的cDNA的质粒。

[0189] (2) 绿色荧光蛋白基因

[0190] 作为绿色荧光蛋白,使用了ZsG基因、以及使ZsG基因的密码子组成近似于MRV L1基因的密码子组成而得到的Mrv-ZsG基因。在图23的(A)~(U)中示出了MRV L1基因、ZsG基因及Mrv-ZsG基因中的各氨基酸的密码子组成。原始的ZsG基因的GC含量为63%,而Mrv-ZsG基因的GC含量降低至43%,其接近MRV L1基因的GC含量(46%)(参照表9)。

[0191] [表9]

	GC含量(%)	
[0192]	MRV L1	46
	ZsG	63
	Mrv-ZsG	43

[0193] 将ZsG基因及Mrv-ZsG基因插入到MRV L1基因中。MRV L1基因为编码 λ 3蛋白的基因,在ZsG基因及MRV-ZsG基因的下游插入编码自剪切肽的2A基因,从而制作了L1-ZsG-2A- λ 3及L1-Mrv-ZsG-2A- λ 3(参照图24)。

[0194] (3) 表达绿色荧光蛋白的人工重组哺乳类呼肠孤病毒的制作

[0195] 以与实施例1相同的方法,将包含除L1基因以外的野生型基因的9种质粒与包含L1-ZsG-2A- λ 3基因的质粒转染于BHK-T7/P5细胞,并传代于小鼠L929细胞从而得到人工重组哺乳类呼肠孤病毒(称为“rsMRV-ZsG”)。同样地,将包含除L1基因以外的野生型基因的9种质粒与包含L1-Mrv-ZsG-2A- λ 3基因的质粒转染于BHK-T7/P5细胞,并传代于小鼠L929细胞,从而得到人工重组哺乳类呼肠孤病毒(称为“rsMRV-Mrv-ZsG”)。

[0196] 7-2结果

[0197] 利用使用了MRV特异性抗体的免疫染色法,在荧光显微镜下对rsMRV-ZsG病毒的绿色荧光蛋白(ZsG)的表达进行考察,结果所考察的所有rsMRV-ZsG病毒感染细胞均未呈现绿色荧光。另一方面,rsMRV-Mrv-ZsG病毒中100%的病毒感染细胞呈现绿色荧光,即使在进行了3次病毒的传代后病毒也呈现绿色荧光(参照图25),表示Mrv-ZsG基因被稳定地保持。此外,从进行1~3次传代后的rsMRV-ZsG及rsMRV-Mrv-ZsG中提取病毒基因组RNA,并进行电泳分析时确认到,rsMRV-ZsG病毒的所插入的ZsG基因在第一次传代时就发生缺失,而rsMRV-Mrv-ZsG病毒即使在进行了3次传代后也保持有Mrv-ZsG基因(参照图26)。

[0198] 另外,本发明不受上述的各实施方案及实施例限定,可在权利要求所示的范围内进行各种变更,适当组合不同的实施方案所公开的技术手段而得到的实施方案也涵盖于本发明的技术范围内。此外,本说明书中记载的所有学术文献及专利文献均作为参考而被引用至本说明书中。

[0001] <110> 国立大学法人大阪大学
 [0002] <120> 稳定地保持外源基因的人工重组RNA病毒的制作方法
 [0003] <130> 011F6838
 [0004] <150> JP 2019-115532
 [0005] <151> 2019-06-21
 [0006] <160> 19
 [0007] <170> PatentIn version 3.5
 [0008] <210> 1
 [0009] <211> 3302
 [0010] <212> DNA
 [0011] <213> 轮状病毒株SA11 (Rotavirus strain SA11)
 [0012] <400> 1
 [0013] ggctattaaa gctgtacaat ggggaagtac aatctaactct tgtcagaata tctatcattt 60
 [0014] atatataatt cacaatctgc agttcaaatt ccaatatatt actcttccaa cagtgaatta 120
 [0015] gaaaatagat gtattgaatt tcattccaag tgtttagaga actcaaagaa tgggttatcg 180
 [0016] ttaagaaagt tgtttggtga atataatgat gtcatagaaa atgccacatt actgtcaata 240
 [0017] ctatcatatt cttacgacaa gtataacgct gttgaaagaa aattggtgaa gtatgcaaaa 300
 [0018] ggcaaacat tggaggcaga cttacagtg aatgaattgg attatgagaa caataaaata 360
 [0019] acatctgaat tatttccaac agcggaggaa tatacggact cactaatgga tccagcaatt 420
 [0020] ttaacttgc tatcatcaaa tttaaatgca gtcattgtct ggttgaaaa acatgaaaat 480
 [0021] gatgtcgtg aaaaacttaa agtttataaa aggagattag acctattcac catagtagcc 540
 [0022] tcaacgataa ataaatatgg cgtaccaagg cataacgcaa agtacagata tgaatacgac 600
 [0023] gtaatgaaag ataaaccgta ctacttagtg acatgggcaa attcttcaat tgaatgta 660
 [0024] atgtcagttt tctctcatga cgactatttg atagcaaaag agttaatagt gttatcatat 720
 [0025] tctaatagat ctactctagc aaagttagtg tcatcaccia tgtcgatttt ggtagccttg 780
 [0026] gtgatatta atggaacatt tattacaaat gaagaattag aattggaatt ttcaaataaa 840
 [0027] tatgtacgag caatagttcc ggatcaaca tttgacgaat taaatcaaat gcttgacaat 900
 [0028] atgaggaaag ctggattagt tgacatacct aagatgatac aggactggtt agttgatcgt 960
 [0029] tctatcgaaa aatttccatt aatggetaag atatattcat ggtcgtttca tgttgattt 1020
 [0030] agaaagcaaa aatgctaga tgctgcgtg gatcaattga aaactgagta tacagaaaat 1080
 [0031] gtggacgatg aatgtatcg ggaatataca atgttaataa gagatgaagt agttaaagt 1140
 [0032] cttgaagaac cagttaaaca tgatgatcac ttgctacgag attctgagtt agctggttta 1200
 [0033] ctatcaatgt cgtcagcatc gaatggtgag tcaaggcagc taaagtttg taggaaaaca 1260
 [0034] atttttcaa ctaaaaagaa tatgcatgtc atggatgata tggctaacga aagatacacg 1320
 [0035] cctggtataa taccaccagt gaatgttgat aaaccaatac cattaggaag aagagatggt 1380
 [0036] ccaggaagaa ggactagaat aatattcatt ctgccatacg aatatttcat agcacagcac 1440
 [0037] gctgtagttg aaaaaatggt gatttacgca aaacatacga gagaatacgc tgaattttat 1500
 [0038] tcacaatcaa accaattatt gtcatacggc gatgtaacgc gttttttgtc taataacaca 1560
 [0039] atggtcttgt atacggatgt atctcagtg gatctgtctc agcataatac acagccattt 1620
 [0040] aggaaaggaa taataatggg actggacata ttagctaaca tgactaatga tgctaaagt 1680
 [0041] cttcagacat taaacttata caaacaaca caaatcaatc tcatggattc atacgttcaa 1740

[0042]	ataccagatg gcaacgtcat taagaaaata caatacgggg cagtagcatc aggagagaaa	1800
[0043]	caaacgaaag cagcaaattc aatagcaaat ttggcactga ttaaacgggt tttgtcacgt	1860
[0044]	atttctaaca aacattcatt cgcaacaaaa ataataagag ttgatggaga tgataactat	1920
[0045]	gcggtgctac aatttaatac agaggtgact aagcagatga tccaagacgt atcgaacgat	1980
[0046]	gtaagagaaa cttatgcacg catgaatgct aaagttaaag ctctgggtatc cacagtagga	2040
[0047]	atagaaattg ctaaaaaggta cattgcaggt ggaaaaatat tttttcgagc tggaataaat	2100
[0048]	ctacttaata atgaaaagag agggcagagt acgcagtggtg atcaagcagc aatttttatat	2160
[0049]	tcaaattata ttgtaaatac acttagagga tttgaaactg ataggagatt tatttttaact	2220
[0050]	aagataatgc agatgacgtc agtcgcaatt actggatcat taagactatt tccttctgaa	2280
[0051]	cgcgtattaa ctacgaattc aacatttaaa gtatttgact cggaggattt tattatagag	2340
[0052]	tacggaacga ctgatgacga agtatatata caaagagcgt tcatgtcttt atcaagtcag	2400
[0053]	aatcaggaa tagccgatga gatagcggca tcatcaacat ttaaaaatta cgtcacgaga	2460
[0054]	ctatctgaac agttattatt ttcaaagaat aatatagtgt ccagaggaat agctttgact	2520
[0055]	gaaaaagcga aattgaattc atacgctcca atatcgcttg agaaaagacg tgcacagata	2580
[0056]	tcagctttat tgactatggt gcagaaaccg gtcacctca aatcaagtaa aataacaata	2640
[0057]	aatgacatac tcagagatat aaaaccattt tttacagtaa gtgatgcaca cttacctata	2700
[0058]	caataccaaa aatttatgcc aactttgcca gataacgtac agtatataat tcaatgtata	2760
[0059]	ggatccagaa cttatcaaat tgaagatgac ggttcgaagt cagccatc tagactaata	2820
[0060]	tcaaagtatt cagtttataa gccatcaatt gaagaattgt ataaagtgat ttcattgcat	2880
[0061]	gaaaacgaaa tacaattata tctgatttca ttaggaatac cgaaaataga cgctgacacg	2940
[0062]	tatgttgat caaagattta ttctcaagat aagtatagaa tactagaatc atacgtgtac	3000
[0063]	aatttattgt ccattaatta tggatgctat caattattg atttcaattc accggacttg	3060
[0064]	gagaagctga taagaatacc atttaaggga aaaataccag ctgttacatt catattacac	3120
[0065]	ttatatgcaa agctagaagt tataaactac gctataaaaa atggttcatg gataagccta	3180
[0066]	ttttgcaatt accctaaatc agaaatgata aaattatgga agaagatgtg gaacatcacg	3240
[0067]	tcattacgtt cgccgtacac taacgcgaac ttctttcaag attagaacgc ttagatgtga	3300
[0068]	cc	3302
[0069]	<210>	2
[0070]	<211>	2693
[0071]	<212>	DNA
[0072]	<213>	轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)
[0073]	<400>	2
[0074]	ggctattaaa ggctcaatgg cgtatcgaac acgtggagcg cgtcgtgaga cgaatctaaa	60
[0075]	acaagatgaa cgaatgcaag aaaaagaaga tagcaagaac attaataatg acagtcctaa	120
[0076]	atcacaatta tcagaaaaag tattatctaa gaaagaagag ataattacag ataatcaaga	180
[0077]	agaagttaag atatctgatg aggtaaaaaa atctaataaa gaagaatcga aacagttggt	240
[0078]	agaagtactt aaaacaaaag aggaacatca aaaagaagtt cagtatgaaa tattacaaaa	300
[0079]	aactatccct acatttgaac caaaagagtc aatactcaaa aaattagaag acataaaacc	360
[0080]	agaacaagca aagaacaaa ctaaactggt tcgaatattt gaaccgaaac aattgcctat	420
[0081]	ttatagagct aatggagaaa gagagcttcg taatagatgg tattggaaat tgaacgaga	480
[0082]	tactcttccct gatggagatt atgatgtag agagtatttt ttaaatttat atgatcaagt	540
[0083]	attaatggaa atgccggatt atctattact taaagatatg gctgtagaga ataaaaattc	600

[0084]	aagggatgct ggcaaagtag ttgattctga aacagccgca atatgcatg ctatTTTTca	660
[0085]	agatgaagaa accgaagtg cagtaagaag attcatagct gagatgagac aacgagttca	720
[0086]	agctgatcga aatgtagtca attatccatc tatattgcat ccaattgacc atgCGTttaa	780
[0087]	cgaatacttc ttacaacatc agttggtaga accattaaat aatgatatca ttttcaatta	840
[0088]	cataccagag agaataagaa atgatgtcaa ctatatatta aatatggaca ggaatttacc	900
[0089]	gtctactgct agatataatca gaccaaactt gctacaagat aggttaaatt tacatgataa	960
[0090]	ttttgagtca ctctgggata ctataactac atctaattat attttagcaa gatctgtggt	1020
[0091]	gccagacctt aaagaattag tatctactga ggcacaaatc cagaaaatgt cacaagattt	1080
[0092]	gcaattggaa gctttgacaa tacaatcaga gactcagttt ttaacaggtt taaactcaca	1140
[0093]	agccgctaatt gattgtttta aaactttgat tgctgctatg ttgagtcaga gaaccatgct	1200
[0094]	attagatttc gtaacgacaa attacatgct acttatttca ggcatgtggt tactactgt	1260
[0095]	gattccaaat gatatgttta taagagaatc attagtagca tgtcaactag ccataataaa	1320
[0096]	taccattggt tatccggcat tcggaatgca aagaatgcat tataggaatg gtgatccaca	1380
[0097]	gactcccttt caaattgcag agcaacagat tcaaaatttt caggtagcta attggttaca	1440
[0098]	ttttgttaat tataatcagt ttagacaagt agtgattgat ggagtgttaa atcaagtctt	1500
[0099]	gaatgataat ataagaaatg gtcatgtagt caaccaatta atggaagctc tgatgcaatt	1560
[0100]	atctagacaa cagtttccca caatgccagt tgattataaa agatctatac agagaggaat	1620
[0101]	tttgctgctt tctaacagac ttggtcagct tgctgattta acaagattgt tatcatacaa	1680
[0102]	ttatgagaca ttaatggcat gcataacaat gaatatgcag catgttcaaa cattaacaac	1740
[0103]	tgaaaaattg caattaacat cagtaacatc attatgtatg ctaattggaa atgctacggt	1800
[0104]	tataccgagt ccgcaaacat tgttccatta ctataatgtg aatgtcaatt ttcatcaca	1860
[0105]	ttataatgaa agaattaatg acgcagttgc aattataact gcggcaaata gattaaattt	1920
[0106]	atatcaaaag aaaatgaaat caatagttga ggactttctg aaaagattac agatatttga	1980
[0107]	tgttgcgaga gtaccagatg accaaatgta tagattgaga gatagattaa gactattacc	2040
[0108]	agttgaaata agaagattag atatttttaa ttgatagca atgaatatgg aacagattga	2100
[0109]	acgtgcatca gataaaattg cacaaggagt tataatagca taccgagata tgcagttaga	2160
[0110]	acgagatgag atgtatggtt acgtcaatat tgccagaaac ttggacggat ttcaacaat	2220
[0111]	aaatctttaa gaattgatga gatcaggaga ttatgctcaa attactaaca tgctacttaa	2280
[0112]	taatcaacca gtagcttag ttggagcgt accatttata acggattcat cagtatttc	2340
[0113]	gttaatagct aaactagatg caaccgtttt tgcacagatt gtcaaaacta gaaaggtcga	2400
[0114]	caggttaaaa cccatcctat ataagataaa ttcagattct aatgactttt atttggtggc	2460
[0115]	taattatgat tggattccta catctactac aaaagtgtat aaacaagttc cacaacaatt	2520
[0116]	tgattttaga gcgtaaatgc atatgttaac gtctaacta acatttaccg tatattcaga	2580
[0117]	tttgcttgcg ttcgtttcag ctgatactgt tgaaccaatt aatgctgttg cttttgataa	2640
[0118]	tatgcatc atgaacgaat tgtaaaccg aacccattg tggagatag acc	2693
[0119]	<210>	3
[0120]	<211>	2591
[0121]	<212>	DNA
[0122]	<213>	轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)
[0123]	<400>	3
[0124]	ggctattaaa gcagtaccag tagtgtgttt tacctctgat ggtgtaaaca tgaaagtact	60
[0125]	agctttaaga cacagtgtgg ctcaagtgtg tgcagacaact caagtctacg ttcatgatga	120

[0126]	tacaaaagat agttatgaaa acgctttttt aatctctaataa cttacgacct ataataat	180
[0127]	atacttaaat tatagcatta aaacattaga aatattaaat aagtcaggaa tagctgcaat	240
[0128]	tgctttacaa tcacttgaag aattattcac attaataagg tgtaatttca cttatgatta	300
[0129]	tgaacttgat ataatatatt tacatgatta ttcatattat accaataatg aaattagaac	360
[0130]	agaccaacat tggataacaa aaacaaatat tgaagaatat ttactacctg gatggaaatt	420
[0131]	aacatatggt ggttataatg gaagtgaac tagaggacat tataactttt catttaaatg	480
[0132]	tcaaaacgct gcaacagatg atgatctaata aattgaatac atttattcag aagcgttggg	540
[0133]	cttccaaaat tttatgttaa aaaagataaa ggaaagaatg actacatcgt tgcctatagc	600
[0134]	tagattatct aacagagtat ttagggataa gttattccca tcattattga aagaacataa	660
[0135]	gaatgtagtg aacgttggtc cgcgtaatga atctatgttt acatttttaa attatccaac	720
[0136]	tataaaacaa ttttcaaatg gtgcgtatgt agtaaaagat actataaaat taaaacaaga	780
[0137]	acgatggtta ggtaaaagga tatctcagtt tgatattggt cagtataaaa atatgctgaa	840
[0138]	tgttcttaca gcaatttatt attactataa tttatataaa agtaaaccac ttatatatat	900
[0139]	gatcggatct gctccatctt attggatata tgacgttagg cattattccg attttttctt	960
[0140]	tgaacttgg gatccattgg acacaccata ttcatcaatc catcacaag aattatTTTT	1020
[0141]	tataaatgat gtgaagaaac tgaaggataa ctcaatattg tatattgata taagaaccga	1080
[0142]	taggggcaat gctgattgga aaaaatggag aaagacagta gaagaacaaa ctattaataa	1140
[0143]	tttgacata gcttatgaat atttacgaac gggtaaagcg aaggtgtggt gtgttaagat	1200
[0144]	gacagctatg gatttgaac tgccaattc agctaaatta ctgaccacc caactacgga	1260
[0145]	aataagatca gaattttatt tattactaga tacttgggat ttaactaaca ttaggaggtt	1320
[0146]	cattcctaaa ggcgtgttat attcatttat aaacaatata ataactgaaa atgtgtttat	1380
[0147]	tcaacaacca tttaaagtaa aagtactgaa tgatagtat attgtagcgt tatatgcatt	1440
[0148]	atcaaatgat ttttaataata gatcagaagt aattaaatta attaataatc agaaacaatc	1500
[0149]	tctaataact gttagaataa ataatacgtt taaggatgaa ccaaaagttg ggttcaaaaa	1560
[0150]	tatctatgat tggaccttc ttccaaccga ctttgatacc aaagaagct taattacttc	1620
[0151]	atacgacggt tgttttaggac tctttggtt gtctatatcg ttagcatcaa aaccaacagg	1680
[0152]	gaataatcat ttattcattt taagtgttac agataagtat tataaattgg atcaatttgc	1740
[0153]	taatcacacc agtatatcga gaagatcaca ccaaatagg ttttcggaat ctgctacttc	1800
[0154]	atattcaggt tatatattta gagatttgc caataataat tttaatctaa ttgggtactaa	1860
[0155]	tatagagaat tcagtatcag gtcatgtata taatgcttata atttattata gatataatta	1920
[0156]	ttcatttgat cttaaagct ggatttattt acattctata gataaagttg atatagaagg	1980
[0157]	aggaaagtat tatgaacacg caccaataga attaatttat gcatgtagat cagcaaaaga	2040
[0158]	atgtctaca ttgcaggatg acttaactgt attgagatat tcaaacgaaa tagagaatta	2100
[0159]	tattaataca gtatatagta taacatacgc tgatgatccg aattacttta tcggaataca	2160
[0160]	atthagaaat ataccatata aatatgatgt taaaataccg catttaacct tcggagtatt	2220
[0161]	acatatttct gataacatgg tgccagacgt gattgacata ctaaagataa tgaagaatga	2280
[0162]	attattttaa atggatatta cgaccagtta tacatatatg ttatcagatg gaatctacgt	2340
[0163]	agcaaatggt agtggagtat tatctacata ctttaaaatc tataacgtat tttataaaaa	2400
[0164]	tcaaaact tttggccaat ccagaatggt tattccgcac ataacattaa gcttcaataa	2460
[0165]	catgagaaca gtaaggatag agactactaa attacaaatt aaatccattt atttaagaaa	2520
[0166]	gattaagggt gatacagtggt ttgataggt tgagttagct aaaaacttaa cacactagtc	2580
[0167]	atgatgtgac c 2591	

[0168] <210> 4
 [0169] <211> 2362
 [0170] <212> DNA
 [0171] <213> 轮状病毒株SA11 (Rotavirus strain SA11)
 [0172] <400> 4
 [0173] ggctataaaa tggcttcgct catttataga caattgctca cgaattctta tacagtagat 60
 [0174] ttatccgatg agatacaaga gattggatca actaaatcac aaaatgtcac aattaatcct 120
 [0175] ggaccatttg cgcaaacagg ttatgctcca gttaactggg gacctggaga aattaatgat 180
 [0176] tctacgacag ttggaccatt gctggatggg ctttatcaac caacgacatt caatccacca 240
 [0177] gtcgattatt ggatgttact ggctccaacg acacctggcg taattgttga aggtacaaat 300
 [0178] aatacagata gatggtagc cacaatttta atcgagcaa atgttcagtc tgaaaataga 360
 [0179] acttacacta tatttggat tcaagaaca ttaacggtat ccaatacttc acaagaccag 420
 [0180] tggaaattta ttgatgtcgt aaaaacaact gcaaatggaa gtataggaca atatggacca 480
 [0181] ttactatcca gtccgaaatt atatgcagtt atgaagcata atgaaaaatt atatacatat 540
 [0182] gaaggacaga cacctaacgc taggacagca cattattcaa caacgaatta tgattctgtt 600
 [0183] aacatgactg ctttttgtga cttttatata attcctagat ctgaagagtc taaatgtacg 660
 [0184] gaatacatta ataatggatt accaccaata caaaatacta gaaatgttgt accattatcg 720
 [0185] ttgactgcta gagatgtaat acactataga gctcaagcta atgaagatat tgtgatatcc 780
 [0186] aagacatcat tatggaaaga aatgcaatat aatagagata taactattag atttaaat 840
 [0187] gcaaatataa ttataaaatc aggaggctg ggatataagt ggtcagaaat atcatttaag 900
 [0188] ccagcgaatt atcaatacac atatactcgt gatggtgaag aagttaccgc acatactact 960
 [0189] tgttcagtga atggcgtaa tgacttcagt tttaatggag gatatttacc aactgatttt 1020
 [0190] gttgtatcta aatttgaagt aattaaagag aattcatacg tctatatcga ttactgggat 1080
 [0191] gattcacaag catttcgtaa cgtgggtgat gtccgatcgt tagcagcaaa cttgaattca 1140
 [0192] gttatgtgta ctggaggcag ctataat ttt agtctaccag ttggacaatg gcctgtttta 1200
 [0193] actgggggag cagtttcttt acattcagct ggtgtaacac tatctactca atttacagat 1260
 [0194] ttcgtatcat taaattcatt aagatttaga tttagactag ctgtcgaaga accacacttt 1320
 [0195] aaactgacta gaactagatt agatagattg tatggtctgc ctgctgcaga tccaaataat 1380
 [0196] ggtaaagaat attatgaaat tgctggacga ttttcaacta tatcattagt gccatcaaat 1440
 [0197] gatgactatc agactcctat agcaaacctca gttactgtac gacaagattt agaaaggcag 1500
 [0198] ttaggagaac taagagaaga gtttaacgct ttgtctcaag aaattgcaat gtcgcagtta 1560
 [0199] atcgatttag cgcttctacc attagatag tttctcaatgt tttctggcat taaaagtact 1620
 [0200] attgatgctg caaatcaat ggctactaat gttatgaaaa aattcaaaaa gtcaggatta 1680
 [0201] gcgaattcag tttcaacact gacagattct ttatcagacg cagcatcctc aatatcaaga 1740
 [0202] gttcatcta tacgttcgat tggatcttca gcatcagcat ggacggatgt atcaacacaa 1800
 [0203] ataactgata tatcgtcctc agtaagtca gtttcgacac aaacgtcaac tatcagtaga 1860
 [0204] agattgagac taaaggaaat ggcaacacaa actgagggta tgaattttga tgatataatca 1920
 [0205] gcggctgttt tgaagactaa gatagataaa tcgactcaaa tatcaccaaa cacaatacct 1980
 [0206] gacattgtta ctgaagcctc ggaaaaatc ataccaataa gggcttaccg cgttataaac 2040
 [0207] aacgatgatg tgtttgaagc tggaattgat gggaaat ttt ttgcttataa agtggataca 2100
 [0208] tttgaggaaa taccatttga tgtacaaaaa ttcgctgact tagttacaga ttctccagta 2160
 [0209] atatccgcta taattgat taaacaactt aaaaatttga acgataatta cggcattact 2220

[0210]	aagcaacaag catttaatct ttttaagatct gaccaagag ttttacgtga attcattaat	2280
[0211]	caggacaatc ctataattag aatagaatt gaacaactga ttatgcaatg caggttgtga	2340
[0212]	gtaatttcta gaggatgtga cc	2362
[0213]	<210> 5	
[0214]	<211> 1610	
[0215]	<212> DNA	
[0216]	<213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)	
[0217]	<400> 5	
[0218]	ggcttttttt tgaaaagtct tgtgtagcc atggctactt ttaaagatgc atgctttcat	60
[0219]	tatcgtagat taactgcttt aaatcggaga ttatgcaaca ttggtgcaa ttctatgttg	120
[0220]	atgccagttc ctgatgcgaa aattaagggg tgggttttag aatgttgc aatagctgat	180
[0221]	ttaaccatt gttatggtg ctcatgccc catgtttgca aatggtgtg tcagaacaga	240
[0222]	agatgcttcc ttgacaatga acctcattg cttaagctta gaactgtgaa acatccaatt	300
[0223]	accaaagaca aattacagtg tatcatagac ttgtacaata taatatttcc aattaatgat	360
[0224]	aaagtaatta gaaaatttga aagaatgata aagcaaagag aatgtaggaa tcaatataa	420
[0225]	attgaatgg ataatacattt gctgctccc attacattaa atgctgctgc atttaagttt	480
[0226]	gatgaaaata atctttatta tgtttttgg ttatatgaga aatcagtcag tgatatatat	540
[0227]	gctccatata gaattgttaa ctttataaat gaatttgata aattattgct tgatcatatt	600
[0228]	aactttaca gaatgtcca tctaccaata gagttgagaa accattacgc aaagaaatac	660
[0229]	ttccaattat caagactgcc atcatcaaaa ctaaagcaaa tttactttc agattttact	720
[0230]	aaagaaactg tgatttttaa tacttataca aaaacgccag gaagatcaat atacagaaat	780
[0231]	gtaactgaat ttaattggag agatgaattg gagctttatt ctgatttaa aatgataag	840
[0232]	aataaattaa ttgctgcaat gatgacgagt aagtatactc ggttctatgc tcatgataat	900
[0233]	aattttgaa gttgaaaat gacaatattt gagttgggac atcattgtca gcctaactac	960
[0234]	gtggcatcta atcaccagg caatgcttcc gatatccagt actgtaaagtg gtgtaatata	1020
[0235]	aatattttc ttagtaaaat tgattggcgg attcgtgata tgtataattt attgatggaa	1080
[0236]	tttattaagg attgttataa aagtaatgtt aacgttggac attgtagttc tgttgaaac	1140
[0237]	atatacctt taattaaag attaatttgg agtttgttta ctaatcat ggatcaaca	1200
[0238]	attgaagaag tgtttaatca catgtcgcga gtgtcagttg aaggtacgaa tgtcatcatg	1260
[0239]	ttgattcttg gattgaatat tagtttgtat aatgaaatta agcgcacttt gaatgtagat	1320
[0240]	agcataccea tggacttaa tttaaatgaa ttcagtagta tagttaaatc aattagcagt	1380
[0241]	aatggtata atgttgatga attggataaa ttgccaatgt caataaaatc aacggaggaa	1440
[0242]	ctgattgaaa tgaagaatc tggaaactta actgaagaat ttgagctact gatctccaac	1500
[0243]	tcagaagatg acaatgagtg aaattatgct actatctaata tacaagatg ttagccatca	1560
[0244]	caagaccgtc cagactagag tagcgcctag ctggcaaaat actgtgaacc	1610
[0245]	<210> 6	
[0246]	<211> 1356	
[0247]	<212> DNA	
[0248]	<213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)	
[0249]	<400> 6	
[0250]	ggcttttaa cgaagtcttc aacatggatg tcctatactc tttgtcaaag actcttaaag	60
[0251]	acgtagaga caaattgtc gaaggacat tgtattctaa cgtgagtgat ctaattcaac	120

[0252]	aatttaatca aatgataatt actatgaatg gaaatgaatt tcaaactgga ggaatcggta	180
[0253]	atgtccaat tagaaactgg aattttaatt tcgggttact tggaacaact ttgctgaact	240
[0254]	tagacgctaa ttatgttga acggcaagaa atacaattga ttatttcgtg gattttgtag	300
[0255]	acaatgtatg catggatgag atggttagag aatcacaaaag gaacggaatt gcacctcaat	360
[0256]	cagactcgct aagaaactg tcagccatta aattcaaaag aataaatttt gataattcgt	420
[0257]	cggaatacat agaaaactgg aatttgcaaa atagaagaca gaggacaggt ttcacttttc	480
[0258]	ataaaccaaa catttttctt tattcagcat catttacct aaatagatca caaccgctc	540
[0259]	atgataattt gatgggcaca atgtggttaa acgcaggatc ggaaattcaa gtcgctggat	600
[0260]	ttgactactc atgtgctatt aacgcaccag ccaatataca acaatttgag catattgtgc	660
[0261]	cactccgaag agtgtaact acagctacga taactcttct accagacgcg gaaaggttta	720
[0262]	gtttccaag agtgatcaat tcagctgacg gggcaactac atggtttttc aaccagtgta	780
[0263]	ttctcaggcc gaataacgtt gaagtggagt ttctattgaa tggacagata ataaacactt	840
[0264]	atcaagcaag atttggaact atcgtagcta gaaattttga tactattaga ctatcattcc	900
[0265]	agttaatgag accaccaaac atgacaccag cagtagcagt actattccc aatgcacagc	960
[0266]	cattcgaaca tcatgcaaca gtgggattga cacttagaat tgagtctgca gtttgtgagt	1020
[0267]	ctgtactcgc cgatgcaagt gaaactctat tagcaaatgt aacatccgtt aggcaagagt	1080
[0268]	acgcaatacc agttggacca gtctttccac caggtatgaa ctggactgat ttaatcacca	1140
[0269]	attatcacc gtctagggag gacaatttgc aacgcgtatt tacagtggct tccattagaa	1200
[0270]	gcatgctcat taaatgagga ccaagctaac aacttggtat ccaactttgg tgagtatgta	1260
[0271]	gctatatcaa gctgtttgaa ctctgtaagt aaggatgcgt atacgcattc gctacacaga	1320
[0272]	gtaatcactc agatggtata gtgagaggat gtgacc	1356
[0273]	<210> 7	
[0274]	<211> 1105	
[0275]	<212> DNA	
[0276]	<213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)	
[0277]	<400> 7	
[0278]	ggcatttaat gcttttcagt gtttgatgct caagatggag tctacgcaac agatggccgt	60
[0279]	ctcaattatt aactcttctt ttgaagctgc agttgtagct gcaacctcag ctcttgagaa	120
[0280]	tatgggaata gaatatgatt atcaggatat atattctaga gtaaagaata aatttgatt	180
[0281]	tgtgatggac gattctggtg ttaaaaataa tctgattggt aaagcaataa ctattgatca	240
[0282]	agctttgaat aataaatttg gatctgctat aagaaataga aactggcttg ctgatacttc	300
[0283]	tagacgagct aaattagatg aggatgtaaa caaactaaga atgatgttat catcaaaagg	360
[0284]	aattgatcaa aaaatgagag ttttaaacgc atgcttcagt gtaaaaagaa tacctggaaa	420
[0285]	atcatcatct attattaaat gcacaaaatt gatgcgtgat aaattggaac gtggtgaagt	480
[0286]	tgaagtggat gattcatttg tggatgaaaa aatggaagtg gataccattg actggaatc	540
[0287]	gcgctatgag caattggagc aaaggtttga atcattgaaa tccagggtaa atgaaaaata	600
[0288]	taataatttg gtgttgaaag caagaaaaat gaatgaaat atgcattctc ttcaaatgt	660
[0289]	catctctcaa cagcaagcac atatagctga gcttcaagtg tacaataata aactagaacg	720
[0290]	tgatttcaa aataaattg gatcccttac ttcttcgatt gaatggtatt taagatcaat	780
[0291]	ggaattagac cctgaaataa aggcagacat tgaacagcaa attaactcaa ttgatgcgat	840
[0292]	aatccattg cacgcttttg atgacttaga atcagtaata cgtaatttga tatctgatta	900
[0293]	tgacaaatta ttcttatgt tcaaaggatt aatacagaga tgtaattatc aatattcatt	960

[0294] tggttgcgaa taaccattht gatacatggt gaacaatcaa atacagtgtt agtatgttgt 1020
 [0295] catctatgca taacctcta tgagcacaat agttaaagc taacctgtc aaaaacctaa 1080
 [0296] atggetatag gggcgttatg tggcc 1105
 [0297] <210> 8
 [0298] <211> 1059
 [0299] <212> DNA
 [0300] <213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)
 [0301] <400> 8
 [0302] ggcttttaaa gcgtctcagt cgccgttga gccttgcggt gtagccatgg ctgagctagc 60
 [0303] ttgcttttgc tatcctcatt tggagaatga tagctataaa tttattcctt ttaataattt 120
 [0304] agctattaaa gctatgctga cagctaaagt agacaaaaag gacatggata agttttatga 180
 [0305] ttcaattatt tatggaatag caccgcctcc tcaatttaag aaacggata atactaatga 240
 [0306] taattcaaga ggcataaatt ttgaaacaat tatgtttact aaggtggcta tgttgatag 300
 [0307] tgaagctcta aattcattga aagtgcgca agcaaacgc tctaattgat taccacgagt 360
 [0308] agtatcaata aggcatttag aaaatttgg gatacgtaaa gaaaatccac aggatattct 420
 [0309] atttcattca aaagatttac ttttgaatc aacctgatt gctattggac agtctaaaga 480
 [0310] aattgaaact acaataactg cagaaggagg agaaattgta tttcaaacg ctgccttcac 540
 [0311] catgtgaaa ctaacttatt tagaacatca attgatgcca attctggatc agaattttat 600
 [0312] tgaatataaa gttacattga acgaagataa accaattca gatgttcattg ttaagaatt 660
 [0313] agtcgctgaa ctctgatgac aatataaca gtttgcctga atcacacatg gtaagggtca 720
 [0314] ttatagaatt gtaaagtatt catcagttgc taatcacgct gacagagtat atgcaacttt 780
 [0315] caagagtaat gttaaaactg gagttaataa tgattttaac ctacttgatc aaagaattat 840
 [0316] ttggcaaac tggatgcat ttacatcatc aatgaaacag ggtaatacac ttgacgtgtg 900
 [0317] taaaaggttg cttttccaaa aatgaaacc agaaaaaat ccatttaag ggctgtcaac 960
 [0318] ggatagaaaa atggacgaag tttctcaagt tggcgtttaa ttcgctatca atttgaggat 1020
 [0319] gatgatggct tagcaagaat agaaagcgt tatgtgacc 1059
 [0320] <210> 9
 [0321] <211> 1063
 [0322] <212> DNA
 [0323] <213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)
 [0324] <400> 9
 [0325] ggcttttaaaa agagagaatt tccgtttgac tagcggtag ctccttttaa tgtatggtat 60
 [0326] tgaatatacc acagttctaa cttttctgat atcgattatt ctactaaatt acatacttaa 120
 [0327] atcattaact agaataatgg actttataat ttatagattt ctttttataa ttgtgatatt 180
 [0328] gtcaccattt ctgagagcac aaaattatgg tattaatctt ccaatcacag gctccatgga 240
 [0329] cattgcatac gctaattcaa cgcaagaaga accattctc acttctacac tttgcctata 300
 [0330] ttatccgact gaggtgcga ctgaaataaa cgataattca tggaaagaca cactgtcaca 360
 [0331] actatttctt acgaaagggt ggccaactgg atccgtatat tttaaagaat atactaacat 420
 [0332] tgcacgtttt tctgttgatc cgcagttgta ttgtgattat aacgtagtac taatgaaata 480
 [0333] tgacgcgacg ttgcaattgg atatgtcaga acttgcggat ctaatattaa acgaatggtt 540
 [0334] gtgtaatcca atggatatta ctctgtatta ttatcagcaa actgacgaag cgaataaatg 600
 [0335] gatataatg ggctcatcat gtacaattaa agtatgtcca cttataacac aaactcttgg 660

[0336] aattggatgc ttgacaactg atgctacaac ttttgaagaa gttgcgacag ctgaaaagtt 720
 [0337] ggtaattact gacgtggttg atggcgtaa tcataagctg gatgtcacia cagcaacgtg 780
 [0338] tactattaga aactgtaaga aattgggacc aagagaaaac gtagccgta tacaagttgg 840
 [0339] tggttctgac atcctcgata taactgctga tccaactact gcaccacaga cagaacggat 900
 [0340] gatgcgaatt aactggaaaa aatgggtgca agttttttat actgtagtag actatgtaga 960
 [0341] tcagataata caagttatgt ccaaaagatc aagatcacta aattcagcag cattttatta 1020
 [0342] cagagttag gtataactta ggtagaatt gtatgatgtg acc 1063
 [0343] <210> 10
 [0344] <211> 751
 [0345] <212> DNA
 [0346] <213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)
 [0347] <400> 10
 [0348] ggcttttaa agttctgttc cgagagagcg cgtgcgaaa gatgaaaag cttaccgacc 60
 [0349] tcaattatac attgagtga atcactctaa tgaacaatac attgcacaca atacttgagg 120
 [0350] atccaggaat ggcgtatfff cttatatag catctgtctt aacagtttg tttgcgctac 180
 [0351] ataaagcadc cattccaaca atgaaaattg cattgaaaac gtcaaatgt tcatataaag 240
 [0352] tggtgaaata ttgtattgta acaattttta atacgttgtt aaaattggca ggttataaag 300
 [0353] agcagataac tactaaagat gagatagaaa agcaaatgga cagagttagc aaagaaatga 360
 [0354] gacgccagct agaaatgatt gacaaattga ctacacgtga aattgaacia gtagagttgc 420
 [0355] ttaaacgcac ttacgataaa ttgacggtgc aaacgacagg tgaatagat atgacaaaag 480
 [0356] agatcaatca aaaaaacgtg agaacgctag aagaatggga aagtggaaaa aatccttatg 540
 [0357] aaccaagaga agtgactgca gcaatgtaag aggttagct gccgtcact gtcctcggaa 600
 [0358] gcgcgagagt tctttacagt aagcaccatc ggacctgatg gctgactgag aagccacagt 660
 [0359] cagccatadc gcgtgtggct caagcctaa tcccgttta ccaatccggt cagcaccgga 720
 [0360] cgttaatgga aggaacggtc ttaatgtgac c 751
 [0361] <210> 11
 [0362] <211> 667
 [0363] <212> DNA
 [0364] <213> 轮状病毒株SA11(Rotavirus strain SA11)
 [0365] <400> 11
 [0366] ggcttttaa gcgctacagt gatgtctctc agtattgacg tgacgagtct tcttctatt 60
 [0367] cttcaacta tatataagaa tgaatcgtct tcaacaacgt caactcttc tggaaaatct 120
 [0368] attggttaga gtgaacagta cattcacca gatgcagaag cattcaataa atacatgctg 180
 [0369] tcgaagtctc cagaggatat tggaccatct gattctgctt caaacgatcc actcaccagt 240
 [0370] ttttcgatta gatcgaatgc agttaagaca aacgcagacg ctggcgtgct tatggattca 300
 [0371] tcagcacaat cacgaccttc aagtaatgct ggatgcgac aagtggattt ctccttaaat 360
 [0372] aaagccttaa aagtaaaagc taatttgac tcatcaatat caatatctac ggatactaaa 420
 [0373] aaggagaaat caaaacaaaa ccataaaagt aggaagcaact acccaagaat tgaagcagag 480
 [0374] tctgattcag atgattatgt actggatgat tcagatagtg atgatgtaa atgtaagaac 540
 [0375] tgtaaatata agaagaaata cttcgatta agaatgagaa tgaacaagt cgcaatgcaa 600
 [0376] ttgattgaag atttgtaagt ctgacctggg aacacactag ggagctcccc actcccgttt 660
 [0377] tgtgacc 667

- [0378] <210> 12
- [0379] <211> 516
- [0380] <212> DNA
- [0381] <213> 细角刺虾(*Oplophorus gracilirostris*)
- [0382] <400> 12
- [0383] atggtcttca cactcgaaga tttcgttggg gactggcgac agacagccgg ctacaacctg 60
- [0384] gaccaagtcc ttgaacaggg aggtgtgtcc agtttgtttc agaatctcgg ggtgtccgta 120
- [0385] actccgatcc aaaggattgt cctgagcggg gaaaatgggc tgaagatcga catccatgtc 180
- [0386] atcatcccgt atgaaggtct gagcggcgac caaatgggcc agatcgaaaa aatttttaag 240
- [0387] gtggtgtacc ctgtggatga tcatcacttt aaggatgatcc tgcactatgg cacactggta 300
- [0388] atcgacgggg ttacgccgaa catgatcgac tatttcggac ggccgatga aggcatcgcc 360
- [0389] gtgttcgacg gcaaaaagat cactgtaaca gggaccctgt ggaacggcaa caaaattatc 420
- [0390] gacgagcgcc tgatcaaccc cgacggctcc ctgctgttcc gagtaacat caacggagtg 480
- [0391] accggctggc ggctgtgcga acgcattctg gcgtga 516
- [0392] <210> 13
- [0393] <211> 516
- [0394] <212> DNA
- [0395] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [0396] <220>
- [0397] <223> Rv-NLuc
- [0398] <400> 13
- [0399] atggtcttta cgctcgaaga ttttgttggg gattggagac agacagctgg atacaactta 60
- [0400] gatcaagttc ttgaacaggg aggtgtttca agtttgtttc agaatctcgg ggtgtcagta 120
- [0401] actccgatcc aaaggattgt ttttaagaggt gaaaatgggc ttaaaattga catccatgtc 180
- [0402] attataccat atgaaggttt gagcggagat caaatgggac aaatagaaaa aatttttaag 240
- [0403] gttgtttacc ctgtggatga tcatcatttt aaagtgatac tgcactatgg aacattggta 300
- [0404] attgatgggg ttacgcaaaa tatgatcgat tattttggaa gaccatata aggcatgca 360
- [0405] gtgttcgacg gaaaaaagat cactgtaact gggactttgt ggaatggcaa taaaattatc 420
- [0406] gacgagcgcc tgataaaccc agatggetct ttactgttca gagtaacaat taacggagtg 480
- [0407] accggctggc ggttatgtga aagaattctt gcttga 516
- [0408] <210> 14
- [0409] <211> 696
- [0410] <212> DNA
- [0411] <213> 纽扣珊瑚(*Zoanthus* sp.)
- [0412] <400> 14
- [0413] atggctcaga gcaagcacgg cctgaccaag gagatgacca tgaagtacag aatggagggc 60
- [0414] tgcgtggacg gccacaagtt cgtgatcacc ggcgagggca tcggctacc cttcaagggc 120
- [0415] aagcagggca tcaacctgtg cgtggtggag ggcgcccccc tgcccttcgc cgaggacatc 180
- [0416] ctgagcgccg cttcatgta cggcaacaga gtgttcaccg agtaccacca ggacatcgtg 240
- [0417] gactacttca agaacagctg ccccgccggc tacacctggg acagaagctt cctgttcgag 300
- [0418] gacggcgccg tgtgcactctg caacgccgac atcaccgtga gcgtggagga gaactgcatg 360
- [0419] taccacgaga gcaagttcta cggcgtgaac ttccccgccg acggccccct gatgaagaag 420

[0420]	atgaccgaca actgggagcc cagctgcgag aagatcatcc ccgtgcccaa gcagggcatc	480
[0421]	ctgaagggcg acgtgagcat gtacctgtg ctgaaggacg gcggcagact gagatgccag	540
[0422]	ttcgacaccg tgtacaagc caagagcgtg cccagaaaga tgccccactg gcacttcac	600
[0423]	cagcacaagc tgaccagaga ggacagaagc gacgccaaga accagaagtg gcacctgacc	660
[0424]	gagcagcca tcgccagcgg cagcgcctg ccctga	696
[0425]	<210> 15	
[0426]	<211> 696	
[0427]	<212> DNA	
[0428]	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
[0429]	<220>	
[0430]	<223> Rv-ZsGreen	
[0431]	<400> 15	
[0432]	atggctcagt caaaacatgg acttactaaa gaaatgacta tgaagtatag aatggagggg	60
[0433]	tgtgtgatg gtcataaatt tgtgattacg ggggaaggaa taggataccc atttaagggt	120
[0434]	aaacaagcta taaacttatg tgtggtttaa ggaggtccat tgccttttgc tgaagatata	180
[0435]	ttgtcagcag cttttatgta tgggaataga gtgttcaactg aataccaca agatattgtt	240
[0436]	gattatttca aaaatagttg tcctgcaggg tatacatggg atagatcgtt tttattttaa	300
[0437]	gatggtgctg tttgtatttg taatgcagat ataactgtat ccgtggaaga gaactgtatg	360
[0438]	taccatgagt caaaatttta cggagttaat tttcctgctg atggaccagt tatgaaaaag	420
[0439]	atgactgata attgggaacc ttcatgtgaa aaaattatcc cagttcctaa acaaggaata	480
[0440]	ttgaaagggg atgtatcaat gtatttactt ttaaaggatg ggggtagatt gcggtgccaa	540
[0441]	ttcgacactg tttataaagc aaagtctgtt ccaaggaaaa tgccagattg gcactttatc	600
[0442]	cagcataagc tgactcggga ggatcgcagt gacgctaaaa atcagaagtg gcatttaaca	660
[0443]	gagcatgcta ttgctagtgg atcagctttg ccatga	696
[0444]	<210> 16	
[0445]	<211> 699	
[0446]	<212> DNA	
[0447]	<213> 蛇卷海葵(<i>Anemonia sulcata</i>)	
[0448]	<400> 16	
[0449]	atggcctctt tgctgaagaa gaccatgcc ttcaggacca ccatcgaggg caccgtgaac	60
[0450]	ggccactact tcaagtgcac cggcaagggc gagggcaacc ccctggaggg caccaggag	120
[0451]	atgaagatcg aggtgatcga gggcggcccc ctgcccttcg cttccacat cctgtccacc	180
[0452]	tcctgcatgt acggctccaa ggcttcatc aagtacgtg ccggcatccc cgactacttc	240
[0453]	aagcagtcct tccccaggg cttcacctgg gacgcacca ccacctacga ggacggcggc	300
[0454]	ttctgaccg cccaccagga cacctccctg gacggcgact gcctggtgta caaggtgaag	360
[0455]	atctgggca acaacttccc cgccgacggc cccgtgatgc agaacaaggc cggccgctgg	420
[0456]	gagccctcca ccgagatcgt gtacgaggtg gacggcgtgc tgcgggcca gtccctgatg	480
[0457]	gcctggagt gccccggcgg tcgccacctg acctgccacc tgcacaccac ctaccgctcc	540
[0458]	aagaagccc cctccgcct gaagatgcc ggcttccact tcgaggacca ccgcatcgag	600
[0459]	atctggagg aggtggagaa gggcaagtgc tacaagcagt acgaggccgc cgtgggccc	660
[0460]	tactgcgacg ccgccccctc caagctgggc cacaactga	699
[0461]	<210> 17	

[0462] <211> 699
 [0463] <212> DNA
 [0464] <213> 人工序列(Artificial sequence)
 [0465] <220>
 [0466] <223> Rv-AsRed
 [0467] <400> 17
 [0468] atggettctt tgctaaagaa aacaatgcca tttagaacta cgatcgaagg aactgtaaat 60
 [0469] ggacattact ttaaatgtac gggcaaagc gaaggcaatc cattagaagg cacgcaagaa 120
 [0470] atgaagatag aagttattga aggaggacca ttacctttg cattccatat tttatcaact 180
 [0471] agttgcatgt atggatccaa agctttcata aaatatgtta gcggtattcc agattatttc 240
 [0472] aaacagtcac tcccagaagc atttaccatg gaaaggacta ccacttatga ggacgggggt 300
 [0473] tttcttacgg ctcatcaaga tacatcaact gatggagact gtttagttta caaagtaaaa 360
 [0474] attttgggta acaactttcc ggcagatggc cctgtgatgc agaataagc tgggcggtgg 420
 [0475] gaaccagta cagaaatagt gtatgaagtt gatggagtgt tgagaggaca atcgtgatg 480
 [0476] gcattagaat gtccaggagg tcgccatctt acttgtcact tgcatactac ttatagaagt 540
 [0477] aagaaaccag cttcagcttt gaagatgcct ggatttcatt ttgaagatca cagaattgag 600
 [0478] atattagaag aggttgaaaa aggaaaatgc tacaagcaat atgaagcagc ggttggtaga 660
 [0479] tattgtgacg cagctccatc taaattggga cataattga 699
 [0480] <210> 18
 [0481] <211> 1653
 [0482] <212> DNA
 [0483] <213> 人工序列(Artificial sequence)
 [0484] <220>
 [0485] <223> Rv-Akaluc
 [0486] <400> 18
 [0487] atggaagatg caaaaaatat taagaaagga ccagcgcctt tttatccact tgaagatggg 60
 [0488] actgcaggcg aacaactgca taaagctatg aaaagatatg cattgggtcc aggagcaata 120
 [0489] gcttttactg acgcacatat tcaggtgat gttacttatg ctgaatattt tgagatgtca 180
 [0490] gttcggttag cagaagctat gaggagatat gggttaaata caaatcatcg gatagttgtg 240
 [0491] tgtagtgaaa atagttcga gttctttatg ccagtgttg gtgcattatt tataggtgtt 300
 [0492] gctgtggcac cagctaatga tatatataac gaaagagaac tgctgaatag catgggcatt 360
 [0493] tcacagccta ctgtcgtatt tgtgagcaag aaagggttaa gaaaagtcct taacgtgcaa 420
 [0494] aagaaactac cgattataag aaaaattata attatggata gcaaaactga ttaccagggc 480
 [0495] tttcaatcaa tgtacacctt tgttacttcc catttgccac caagttttaa tgaatacgat 540
 [0496] tttgttcccg agtcattcga tcgggataaa actattgcac tgataatgaa tagtagtgg 600
 [0497] agtacaggat taccaaaggg agtagctcta ccgcatagaa ctgcttgtgt tagatttagt 660
 [0498] catgctagag atccaatatt tggctatcag aatatccag acactgctat actcagtggt 720
 [0499] gtgccatttc atcacgggtt tggaatgttt accacgttag gatatttgat atgcggattt 780
 [0500] cgggttgtgc ttatgatag atttgaagaa gagctatttt tgagaagttt gcaagattat 840
 [0501] aagattcaat ctgcattatt gttccaaca ctattttcat gtcttgctaa atcaactctc 900
 [0502] atagacaaat atgatctatc ttcatgaga gaaattgcaa gcggcggggc gccgctcagc 960
 [0503] aaggaggtag gtgaagcagt cgctaaaaga tttagactac caggcattag acaaggctat 1020

[0504]	ggcttaacag aaacaaccaa tgcagttatg ataactcctg aggggggatcg taagcctgga	1080
[0505]	tcagtaggca aagtcgtgcc attccttgaa gctaagggtg tagatttggc cactggtaag	1140
[0506]	acactgggtg ttaaccaaag aggtgagttg tgtgtccgtg gacctatgat tatgagtgga	1200
[0507]	tacgttaata atccagaggc tacgaatgct cttattgaca aagatggatg gttacattct	1260
[0508]	ggagatatag catattggga tgaagacgaa cacttcctta tagttgatcg gttaaagagt	1320
[0509]	ctgattaaat acaaaggata tcaggtagct ccagctgaat tggaaggaat tctgttaca	1380
[0510]	cacccatata ttttcgatgc tggagtcgct ggattacctg atgacgatgc tggagagtta	1440
[0511]	ccagcagcag ttgtttgttt ggaacatggt aaaaccatga ctgaaaaaga gatagtggat	1500
[0512]	tatgttgcac cacaagttac aacggctaag aaattgcgcg gtggtgtttg gtttgttgat	1560
[0513]	gaagtccta gaggatcgac tggaaaatta gatgctagaa agattagaga aattctcact	1620
[0514]	aaagctaaga aagatggaaa aattgcagtt tga	1653
[0515]	<210>	19
[0516]	<211>	1623
[0517]	<212>	DNA
[0518]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0519]	<220>	
[0520]	<223>	Rv-NoV VP1
[0521]	<400>	19
[0522]	atgaaaatgg catcgagtga tgctaatacca tctgatgggt cagcagctaa tcttgttcca	60
[0523]	gaggttaaca atgaagtat ggctctggag ccagttgttg gtgctgctat tgcggcacct	120
[0524]	gtagcgggac aacaaaatgt aattgatccg tggattagaa ataattttgt acaagctcct	180
[0525]	ggtggagaat ttacggtatc acctagaaat gctccaggag aaatattatg gactgctcct	240
[0526]	ttgggacctg atctaaatcc atacctatca catttggcaa gaatgtataa tggttatgca	300
[0527]	ggtggatttg aagtgcaggt aattttggct gggaacgcgt ttactgctgg gaaggtcata	360
[0528]	tttgcagcag ttccaccaa ttttccaact gaaggattga gtccaagcca gttaccatg	420
[0529]	ttcccacata tagtagtaga cgttagacag ttagaacctg tgttgattcc attaccagat	480
[0530]	gttcggaaca atttttatca ttataatcaa tcaaatgac caaccattaa attgatagca	540
[0531]	atgttgata cgccacttag agctaataat gctggggatg atgtttttac agtttcttgc	600
[0532]	cgggttttaa cgagaccatc acctgaactt gattttatat ttttagtgc accgactgtt	660
[0533]	gagtcaagaa ctaaaccatt ctctgtccca gttttaactg ttgaggaaat gactaattca	720
[0534]	agattcccaa ttcttttga aaagttgtc acgggtccaa gtagtgcat tgttgttcaa	780
[0535]	ccacaaaatg gaagatgtac gactgatggc gtgcttttag gcactacca attatctcct	840
[0536]	gttaatatct gtacttttag aggagatgtt actcatataa ctggtagtcg taactataca	900
[0537]	atgaatttgg cttctcaaaa ctggagtaat tatgatccaa cagaagatat tccagcacct	960
[0538]	ctaggaactc cagattttgt ggggaaaatt caaggagtgc tactcaaac tacacggaca	1020
[0539]	gatgatcaa cacgtggaca taaagcaact gtgtacactg ggctcagcaga ctttgcctca	1080
[0540]	aaactgggta gagttcagtt tgaactgat acagaccatg attttgaagc taatcaaaat	1140
[0541]	acaaaattta cccagttgg tgcatacaa gatggaggaa ctaccaccg caatgaacca	1200
[0542]	caacagtggg tactccaag ttattcagga agaaacactc ctaatgtgca tttagctccg	1260
[0543]	gctgtagctc caactttcc aggagaacaa cttcttttct tcagatccac tatgccagga	1320
[0544]	tgctcagggt atccaaacat ggatttgat tgtttacttc ctcaggaatg ggtgcagtac	1380
[0545]	ttttaccaag aggcagcacc agcacagtct gatgtgctc tgттаagatt tgtgaatcca	1440

[0546] gatacaggta gagttttggt tgaatgtaag cttcacaat caggatatgt tacagtggct 1500
[0547] catactggcc aacatgattt ggtcatcct ccgaatggat attttaggtt tgattcctgg 1560
[0548] gttaatcagt tttatacgt tgctccaatg ggaaatggaa cggggagaag acgtgcacta 1620
[0549] tga 1623

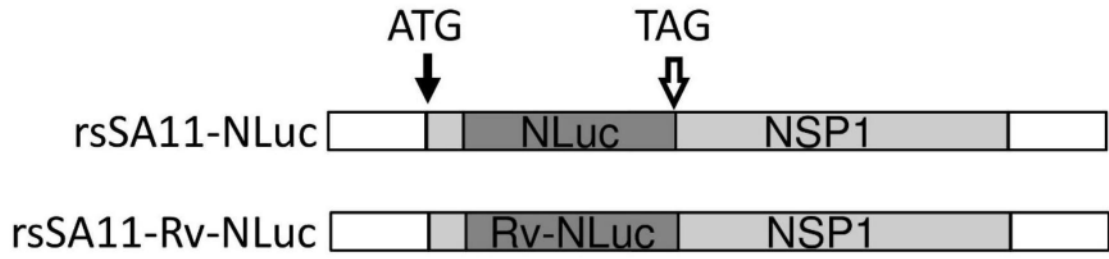


图3

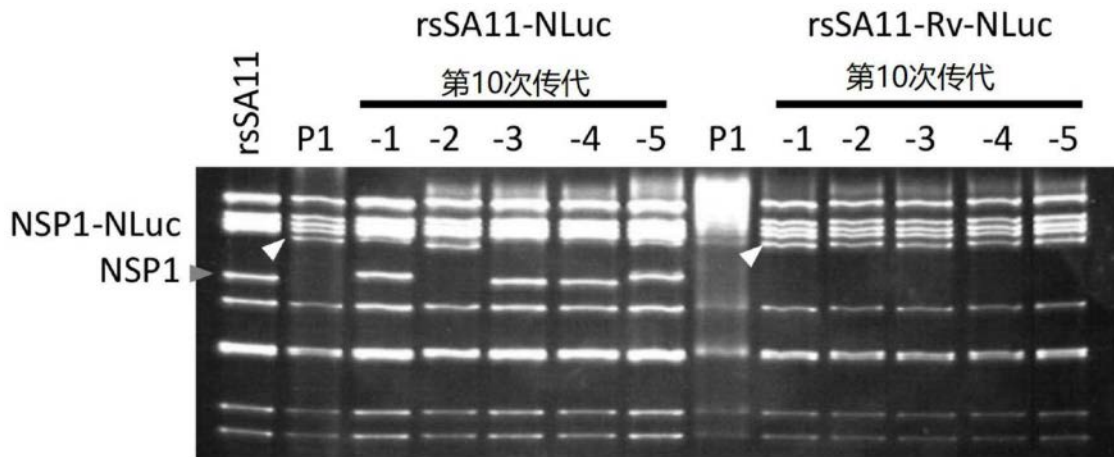


图4

<p>(A) 丙氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>GCA</td><td>38</td><td>0</td><td>29</td></tr> <tr><td>GCC</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>GCG</td><td>6</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>GCT</td><td>56</td><td>0</td><td>71</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	GCA	38	0	29	GCC	0	100	0	GCG	6	0	0	GCT	56	0	71	<p>(I) 甘氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>GGA</td><td>50</td><td>0</td><td>42</td></tr> <tr><td>GGC</td><td>8</td><td>95</td><td>0</td></tr> <tr><td>GGG</td><td>17</td><td>0</td><td>32</td></tr> <tr><td>GGT</td><td>25</td><td>5</td><td>26</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	GGA	50	0	42	GGC	8	95	0	GGG	17	0	32	GGT	25	5	26	<p>(P) 脯氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>CCA</td><td>71</td><td>0</td><td>62</td></tr> <tr><td>CCC</td><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>CCG</td><td>6</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>CCT</td><td>24</td><td>0</td><td>38</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	CCA	71	0	62	CCC	0	100	0	CCG	6	0	0	CCT	24	0	38								
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
GCA	38	0	29																																																																			
GCC	0	100	0																																																																			
GCG	6	0	0																																																																			
GCT	56	0	71																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
GGA	50	0	42																																																																			
GGC	8	95	0																																																																			
GGG	17	0	32																																																																			
GGT	25	5	26																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
CCA	71	0	62																																																																			
CCC	0	100	0																																																																			
CCG	6	0	0																																																																			
CCT	24	0	38																																																																			
<p>(B) 精氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>AGA</td><td>67</td><td>0</td><td>50</td></tr> <tr><td>AGG</td><td>8</td><td>0</td><td>13</td></tr> <tr><td>CGA</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>CGC</td><td>4</td><td>100</td><td>13</td></tr> <tr><td>CGG</td><td>13</td><td>0</td><td>25</td></tr> <tr><td>CGT</td><td>8</td><td>0</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	AGA	67	0	50	AGG	8	0	13	CGA	0	0	0	CGC	4	100	13	CGG	13	0	25	CGT	8	0	0	<p>(J) 组氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>CAC</td><td>20</td><td>100</td><td>14</td></tr> <tr><td>CAT</td><td>80</td><td>0</td><td>86</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	CAC	20	100	14	CAT	80	0	86	<p>(Q) 丝氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>AGC</td><td>6</td><td>25</td><td>0</td></tr> <tr><td>AGT</td><td>30</td><td>0</td><td>25</td></tr> <tr><td>TCA</td><td>36</td><td>0</td><td>50</td></tr> <tr><td>TCC</td><td>9</td><td>75</td><td>8</td></tr> <tr><td>TCG</td><td>3</td><td>0</td><td>8</td></tr> <tr><td>TCT</td><td>15</td><td>0</td><td>8</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	AGC	6	25	0	AGT	30	0	25	TCA	36	0	50	TCC	9	75	8	TCG	3	0	8	TCT	15	0	8
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
AGA	67	0	50																																																																			
AGG	8	0	13																																																																			
CGA	0	0	0																																																																			
CGC	4	100	13																																																																			
CGG	13	0	25																																																																			
CGT	8	0	0																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
CAC	20	100	14																																																																			
CAT	80	0	86																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
AGC	6	25	0																																																																			
AGT	30	0	25																																																																			
TCA	36	0	50																																																																			
TCC	9	75	8																																																																			
TCG	3	0	8																																																																			
TCT	15	0	8																																																																			
<p>(C) 天冬酰胺</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>AAC</td><td>20</td><td>100</td><td>25</td></tr> <tr><td>AAT</td><td>80</td><td>0</td><td>75</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	AAC	20	100	25	AAT	80	0	75	<p>(K) 异亮氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>ATA</td><td>35</td><td>0</td><td>42</td></tr> <tr><td>ATC</td><td>9</td><td>100</td><td>8</td></tr> <tr><td>ATT</td><td>56</td><td>0</td><td>50</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	ATA	35	0	42	ATC	9	100	8	ATT	56	0	50	<p>(R) 苏氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>ACA</td><td>22</td><td>0</td><td>20</td></tr> <tr><td>ACC</td><td>9</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>ACG</td><td>17</td><td>0</td><td>10</td></tr> <tr><td>ACT</td><td>52</td><td>0</td><td>70</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	ACA	22	0	20	ACC	9	100	0	ACG	17	0	10	ACT	52	0	70																				
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
AAC	20	100	25																																																																			
AAT	80	0	75																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
ATA	35	0	42																																																																			
ATC	9	100	8																																																																			
ATT	56	0	50																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
ACA	22	0	20																																																																			
ACC	9	100	0																																																																			
ACG	17	0	10																																																																			
ACT	52	0	70																																																																			
<p>(D) 天冬氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>GAC</td><td>15</td><td>100</td><td>13</td></tr> <tr><td>GAT</td><td>85</td><td>0</td><td>87</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	GAC	15	100	13	GAT	85	0	87	<p>(L) 亮氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>CTA</td><td>6</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>CTC</td><td>2</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>CTG</td><td>8</td><td>62</td><td>8</td></tr> <tr><td>CTT</td><td>18</td><td>0</td><td>15</td></tr> <tr><td>TTA</td><td>33</td><td>0</td><td>38</td></tr> <tr><td>TTG</td><td>33</td><td>38</td><td>38</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	CTA	6	0	0	CTC	2	0	0	CTG	8	62	8	CTT	18	0	15	TTA	33	0	38	TTG	33	38	38	<p>(S) 色氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>TGG</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	TGG	100	100	100																				
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
GAC	15	100	13																																																																			
GAT	85	0	87																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
CTA	6	0	0																																																																			
CTC	2	0	0																																																																			
CTG	8	62	8																																																																			
CTT	18	0	15																																																																			
TTA	33	0	38																																																																			
TTG	33	38	38																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
TGG	100	100	100																																																																			
<p>(E) 半胱氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>TGC</td><td>29</td><td>100</td><td>13</td></tr> <tr><td>TGT</td><td>71</td><td>0</td><td>88</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	TGC	29	100	13	TGT	71	0	88	<p>(M) 赖氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>AAA</td><td>71</td><td>0</td><td>65</td></tr> <tr><td>AAG</td><td>29</td><td>100</td><td>35</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	AAA	71	0	65	AAG	29	100	35	<p>(T) 酪氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>TAC</td><td>27</td><td>100</td><td>40</td></tr> <tr><td>TAT</td><td>73</td><td>0</td><td>60</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	TAC	27	100	40	TAT	73	0	60																																
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
TGC	29	100	13																																																																			
TGT	71	0	88																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
AAA	71	0	65																																																																			
AAG	29	100	35																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
TAC	27	100	40																																																																			
TAT	73	0	60																																																																			
<p>(F) 终止</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>TAA</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>TAG</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>TGA</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	TAA	0	0	0	TAG	0	0	0	TGA	100	100	100	<p>(N) 蛋氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>ATG</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	ATG	100	100	100	<p>(U) 缬氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>GTA</td><td>18</td><td>0</td><td>13</td></tr> <tr><td>GTC</td><td>9</td><td>7</td><td>0</td></tr> <tr><td>GTG</td><td>23</td><td>93</td><td>27</td></tr> <tr><td>GTT</td><td>50</td><td>0</td><td>60</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	GTA	18	0	13	GTC	9	7	0	GTG	23	93	27	GTT	50	0	60																								
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
TAA	0	0	0																																																																			
TAG	0	0	0																																																																			
TGA	100	100	100																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
ATG	100	100	100																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
GTA	18	0	13																																																																			
GTC	9	7	0																																																																			
GTG	23	93	27																																																																			
GTT	50	0	60																																																																			
<p>(G) 谷氨酰胺</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>CAA</td><td>60</td><td>0</td><td>57</td></tr> <tr><td>CAG</td><td>40</td><td>100</td><td>43</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	CAA	60	0	57	CAG	40	100	43	<p>(O) 苯丙氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>TTC</td><td>16</td><td>100</td><td>25</td></tr> <tr><td>TTT</td><td>84</td><td>0</td><td>75</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	TTC	16	100	25	TTT	84	0	75																																													
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
CAA	60	0	57																																																																			
CAG	40	100	43																																																																			
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
TTC	16	100	25																																																																			
TTT	84	0	75																																																																			
<p>(H) 谷氨酸</p> <table border="1"> <thead> <tr><th>密码子</th><th>RV NSP1</th><th>ZsG</th><th>Rv-ZsG</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>GAA</td><td>77</td><td>0</td><td>64</td></tr> <tr><td>GAG</td><td>23</td><td>100</td><td>36</td></tr> </tbody> </table>	密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG	GAA	77	0	64	GAG	23	100	36																																																										
密码子	RV NSP1	ZsG	Rv-ZsG																																																																			
GAA	77	0	64																																																																			
GAG	23	100	36																																																																			

图5

ZsG 1 ATGGCTCAGAGCAAGCAGCGCCTGACCAAGGAGATGACCATGAAGTACAGAATGGAGGGCTGCGTGGACGGCCACAAGTTCGTGATCACCGCGAGGGCA
Rv-ZsG 1 TCA . A . T . A . T . T . A . A T T G . T . T . T . T . A . T T . G . G . A . A .

TCGGCTACCCCTTCAAGGGCAAGCAGGCCATCAACCTGTGCGTGGTGGAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCGAGGACATCCTGAGCGCGCCTTCATGTACGGCAACAGA
. A . A A . T T . A . A . T . A . T T . A . A . T . AT T . T . T . A . T . AT . TCA . A . T . T T . G . T . . .

GTGTTACCGAGTACCCCGAGGACATCGTGGACTACTCAAGAACAGCTGCCCGCCGGCTACACCTGGGACAGAAGCTTCTGTTGAGGACGGCGCGTGTGCATCTG
. T . A A . A . T . T . T . T A . T . T . T . T . A . G . T . A T TCG . TT . A . T . A . T . T . T . T . T . . .

CAACGCCGACATCACCGTGAAGCGTGGAGGAGAACTGCATGTACCACGAGAGCAAGTTCACGGCGTGAACCTCCCGCCGACGGCCCGTATGAAGAAGATGACCGACA
T . T . A . T . A . T . ATC A T T TCA . A . T A . T . T . T . T . T . T . A . A . T A T . T .

ACTGGGAGCCAGCTGCGAGAAGATCATCCCGTGCCCAAGCAGGGCATCCTGAAGGGCGAGTGAAGCATGTACCTGCTGCTGAAGGACGGCGGACAGTGAAGTGCAG
. T A . TTCA . T . A . A . T A . T . T . A . A . A . AT A . G . T . ATCA TT . A . TT . A T . G . T . T . C . G A

TTCGACACCGTGTACAAGGCCAAGAGCGTGCAGGAAAGATGCCGACTGGCACTTATCCAGCACAAGCTGACCCAGAGAGGACAGAAGCGACGCCCAAGAACCAGAAGTG
. T . T . T . A . A . . TCT . T . A . G . A A . T T . T T TC . G TC . C . T T . A . T

GCACCTGACCGAGCAGCCATCGCCAGCGGCAGCCCTGCCCTGA 696
. TT . A . A T . T . T . T . T . ATCA . TT A 696

图6

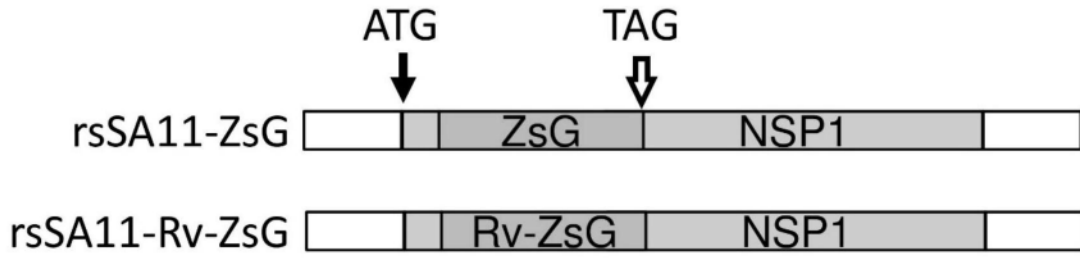


图7

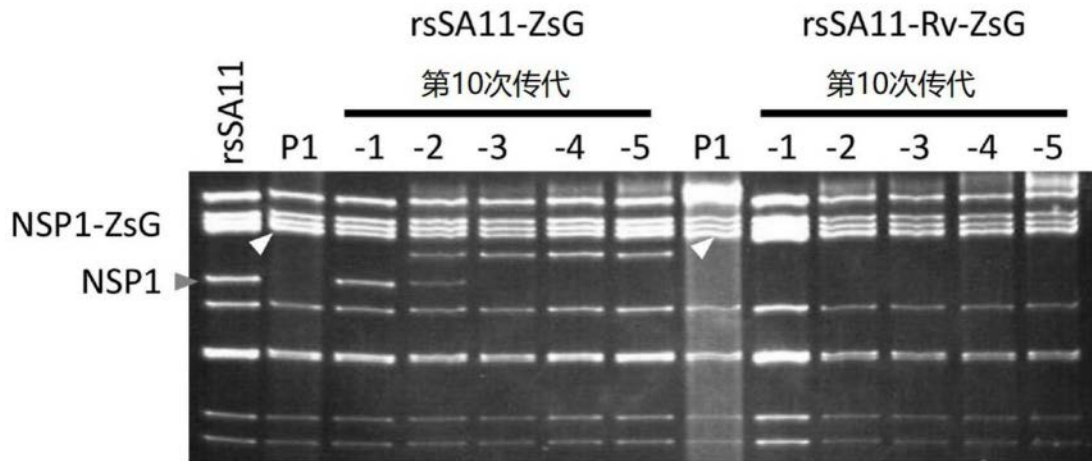


图8

(A) 丙氨酸				(I) 甘氨酸				(P) 脯氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
GCA	38	0	38	GGA	50	0	52	CCA	71	0	62
GCC	0	100	0	GGC	8	96	16	CCC	0	100	8
GCG	6	0	8	GGG	17	0	12	CCG	6	0	8
GCT	56	0	54	GGT	25	4	20	CCT	24	0	23
(B) 精氨酸				(J) 组氨酸				(Q) 丝氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
AGA	67	0	63	CAC	20	100	22	AGC	6	0	8
AGG	8	13	13	CAT	80	0	78	AGT	30	0	25
CGA	0	0	0	(K) 异亮氨酸				TCA	36	0	33
CGC	4	88	13	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	TCC	9	92	8
CGG	13	0	13	ATA	35	0	40	TCG	3	0	8
CGT	8	0	0	ATC	9	100	10	TCT	15	8	17
(C) 天冬酰胺				(L) 亮氨酸				(R) 苏氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
AAC	20	100	33	CTA	6	0	6	ACA	22	0	24
AAT	80	0	67	CTC	2	6	6	ACC	9	100	6
(D) 天冬氨酸				(M) 赖氨酸				(S) 色氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
GAC	15	100	33	CTG	8	89	6	ACG	17	0	24
GAT	85	0	67	CTT	18	0	17	ACT	52	0	47
(E) 半胱氨酸				(N) 蛋氨酸				(T) 酪氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
TGC	29	100	29	AAA	71	0	67	TAC	27	100	27
TGT	71	0	71	AAG	29	100	33	TAT	73	0	73
(F) 终止				(O) 苯丙氨酸				(U) 缬氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
TAA	0	0	0	ATG	100	100	100	GTA	18	0	18
TAG	0	0	0	(G) 谷氨酰胺				GTC	9	0	0
TGA	100	100	100	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	GTG	23	100	27
(G) 谷氨酰胺				(H) 谷氨酸				(O) 苯丙氨酸			
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR	密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR
CAA	60	0	67	TTC	16	100	27	GTT	50	0	55
CAG	40	100	33	TTT	84	0	73				
(H) 谷氨酸											
密码子	RV NSP1	AsR	Rv-AsR								
GAA	77	0	84								
GAG	23	100	16								

图9

```

AsR      1 ATGGCCTCTTTGCTGAAGAAGACCATGCCCTTCAGGACCACCATCGAGGGCACCGTGAACGGGCCACTCTCAAGTGACCGGCAAGGGCGAGGGCAACC
Rv-AsR   1 .....T.....A.....A.A.....A.T.A.T.G.....A.A.T.A.T.A.T.....T.A.T.G.....A.....A.....T.

CCCTGGAGGGGACCCAGGAGATGAAGATCGAGGTGATCGAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCATCCACATCCTGTCCACCTCCTGCATGTACGGCTCAA
.A.T.A.A.....G.A.A.....A.A.....T.T.A.A.A.A.A.A.T.A.A.....T.T.A.A.....TAGT.....T.A.....

GGCCTTCATCAAGTACGTGTCGGGCATCCCGACTACTTCAAGCAGTCCCTCCCGAGGGCTTCACCTGGGAGCGCACCCACCTACGAGGACGGCGGC
A.T.....A.A.T.TAG...T.T.A.T.T.....A.....A.....A.A.A.T.A.....AA.G.T.....T.T.....G.T

TTCTGACCGCCACCCAGGACACCTCCCTGGACGGCGACTGCCTGGTGTACAAGGTGAAGATCCTGGGCAACAACCTCCCGCGGACGGCCCGTGCATGC
.T.T.G.T.T.A.T.A.A.T.T.A.....TT.A.T.....A.A.A.TT...T.....T.G.A.T.G.T.....

AGAACAAGGGCGGCCGCTGGGAGCCCTCCACCGAGATCGTGTACGAGGTGGACGGCGTGTGCGCGGCCAGTCCCTGATGGCCCTGGAGTGCCTGGCGG
...T.....T.G.G.....A.AGT..A.A.A.....T.A.T.T.A.....T.A.A.A.A.G.....AT.A.A.T.A.A.

TCGCCACCTGACCTGCCACCTGCACACCACCTACCGTCCAAGAAGCCCGCTCCGCCCTGAAGATGCCCGGCTTCCACTTCGAGGACCACCGCATCGAG
.....T.T.T.T.T.....T.T.T.TA.AAGT.....A.A.T.A.TT.....T.A.T.T.T.A.T...A.A.T...

ATCCTGGAGGAGGTGGAGAAGGGCAAGTGTACAAGCAGTACGAGGGCGCGTGGGCCGCTACTGCGACGCGCCCTCCAAGTGGGCCACAACCTGA 699
..AT.A.A.....T.A.A.A.A.....A.T.A.A.G.T.TA.A.T.T.....A.T.A.T..AT...A.T.T... 699

```

图10

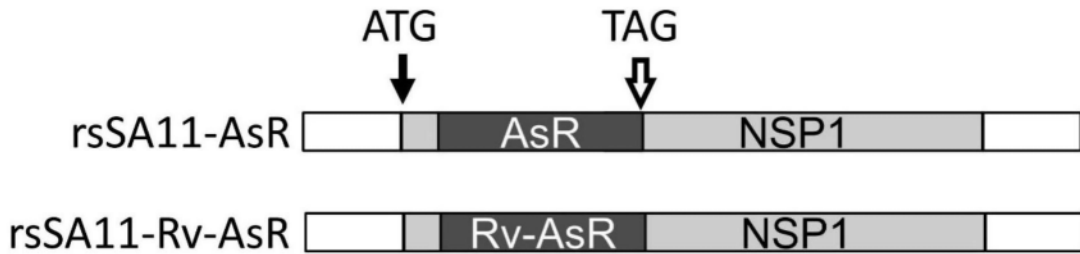


图11

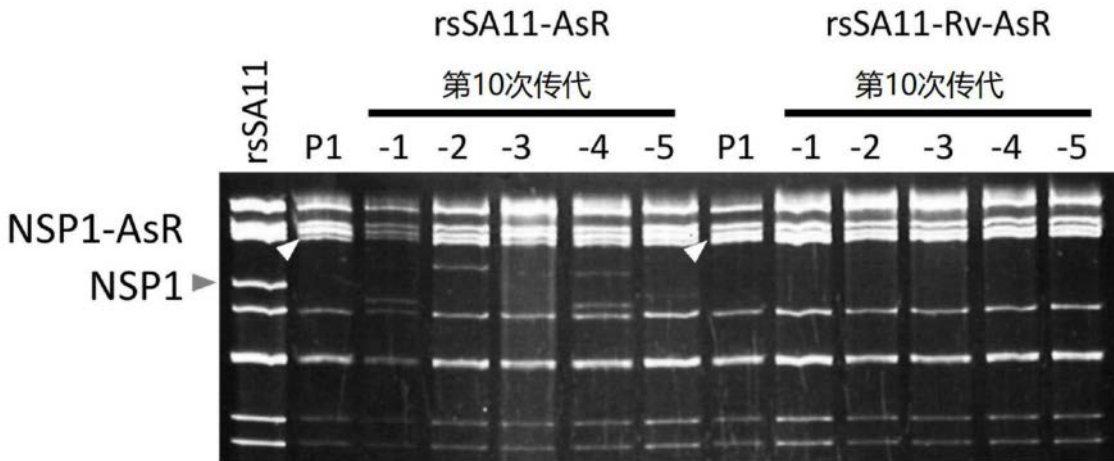


图12

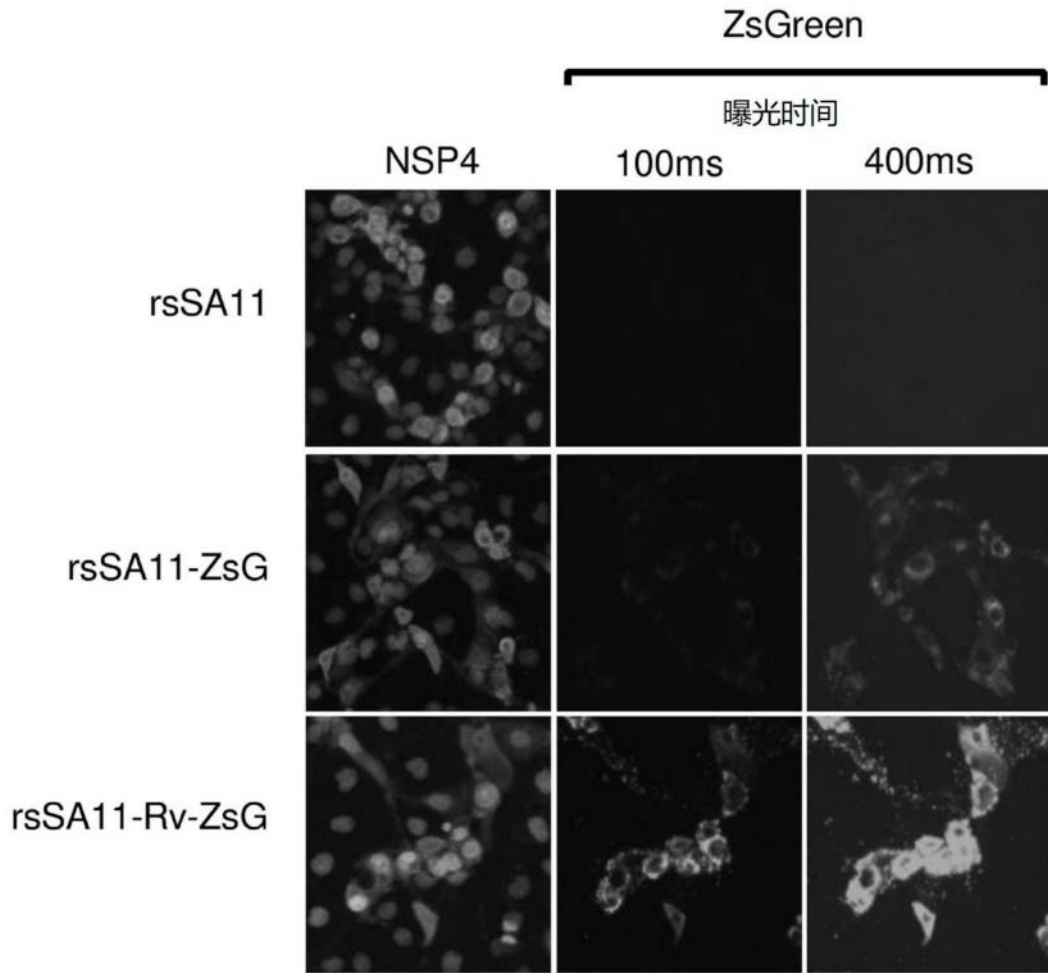


图13

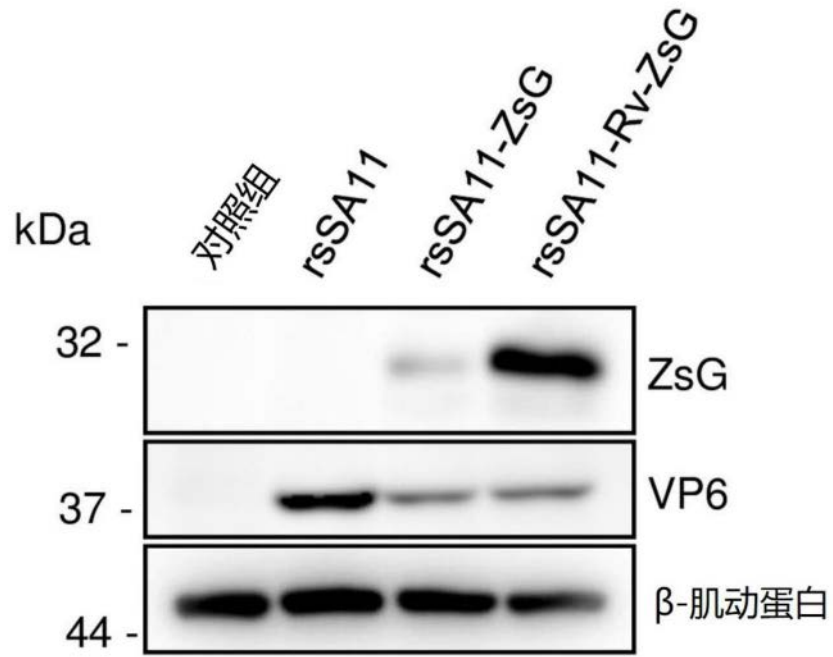


图14

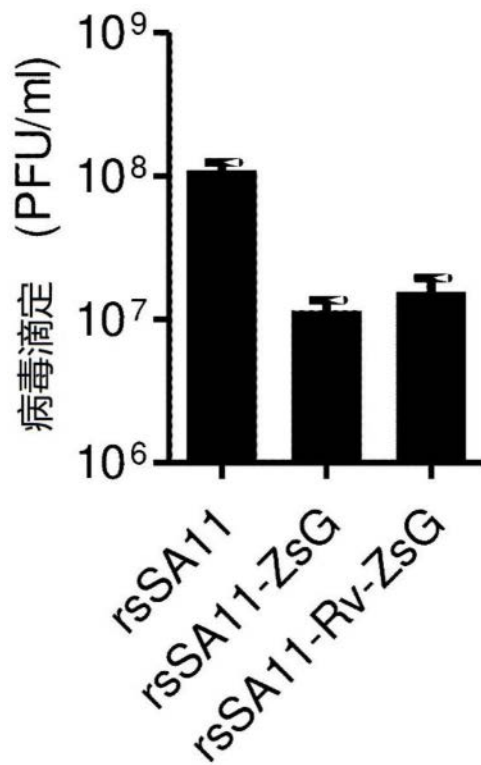


图15

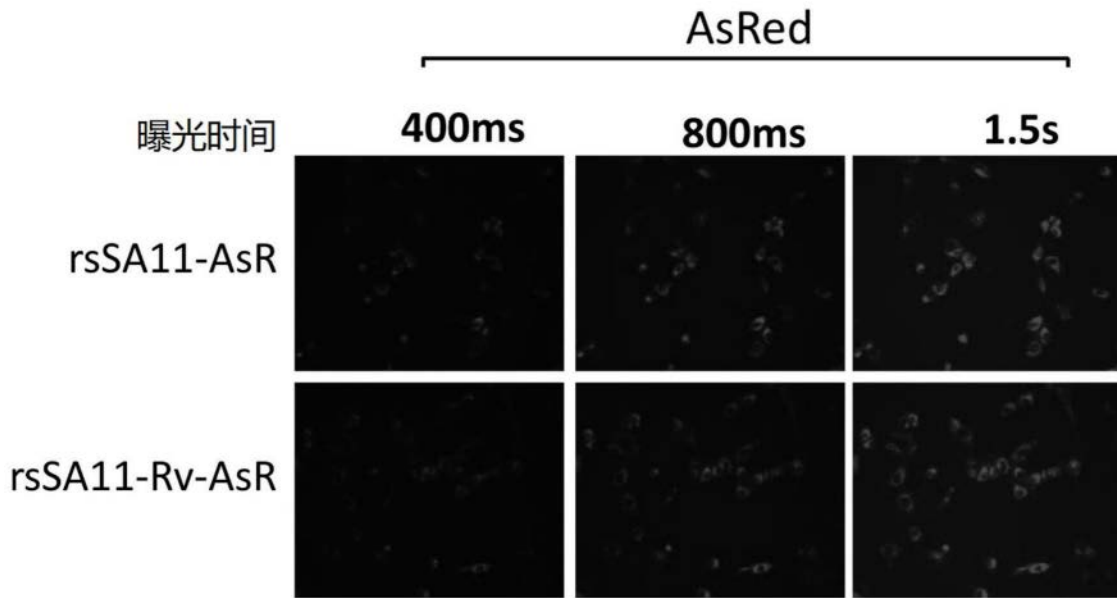


图16

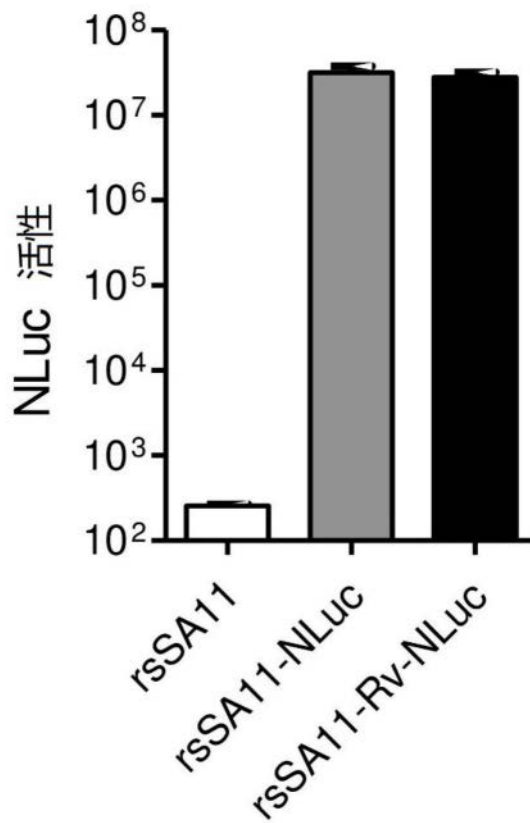


图17

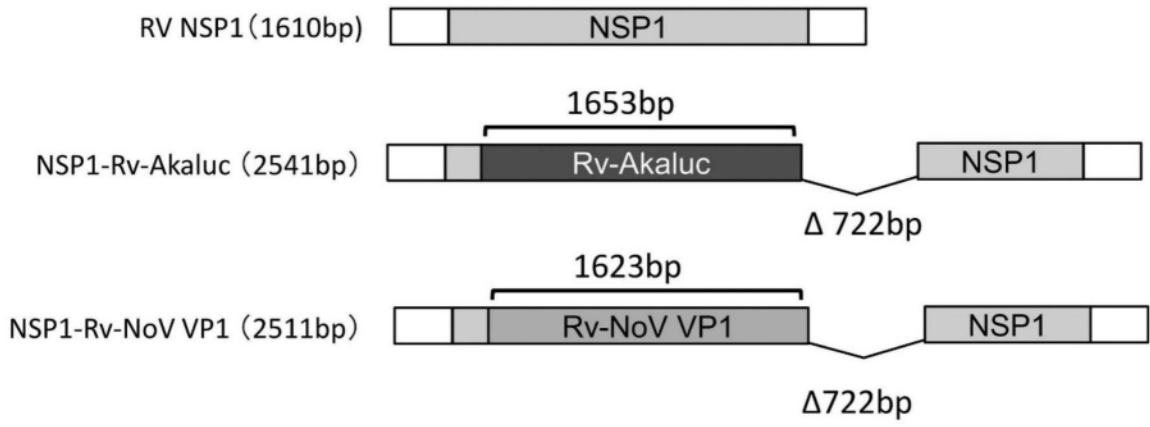


图18

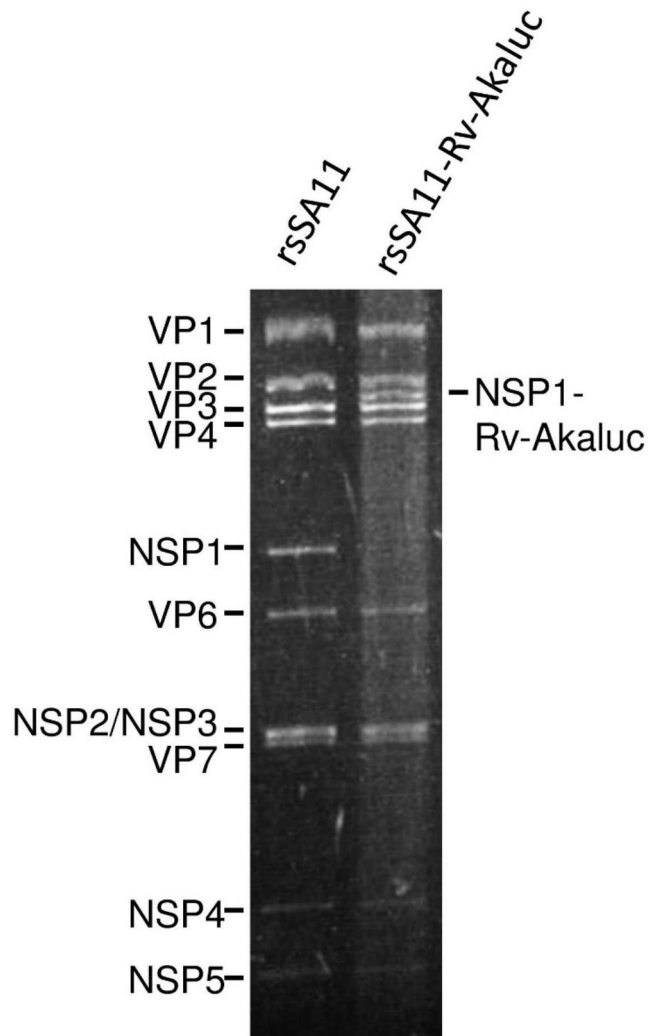


图19

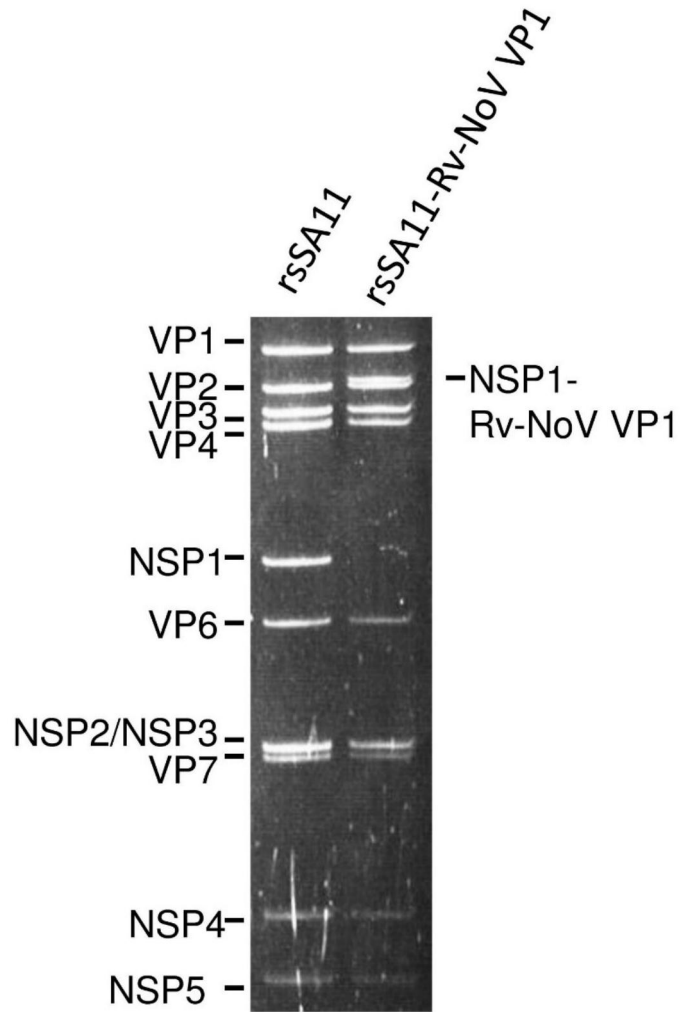


图20



图21

rsMB-Rv-ZsG-2A-FAST 感染细胞

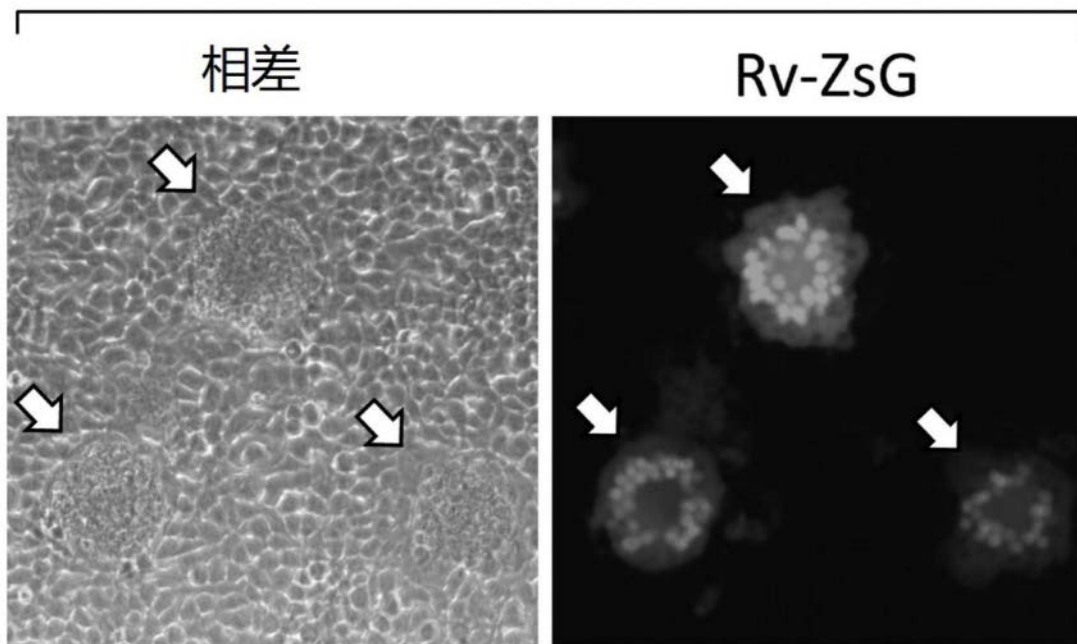


图22

(A) 丙氨酸				(I) 甘氨酸				(P) 脯氨酸			
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG
GCA	29	0	29	GGA	33	0	32	CCA	41	0	38
GCC	12	100	14	GGC	9	95	11	CCC	13	100	15
GCG	29	0	29	GGG	20	0	21	CCG	12	0	15
GCT	29	0	29	GGT	38	5	37	CCT	33	0	31
(B) 精氨酸				(J) 组氨酸				(Q) 丝氨酸			
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG
AGA	26	0	25	CAC	42	100	43	AGC	12	25	8
AGG	12	0	12	CAT	58	0	57	AGT	12	0	8
CGA	18	0	12	(K) 异亮氨酸				TCA	27	0	33
CGC	10	100	12	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	TCC	10	75	8
CGG	14	0	12	ATA	26	0	25	TCG	12	0	8
CGT	21	0	25	ATC	23	100	25	TCT	25	0	33
				ATT	51	0	50	(R) 苏氨酸			
(C) 天冬酰胺				(L) 亮氨酸				密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	ACA	29	0	30
AAC	36	100	37	CTA	17	0	15	ACC	6	100	0
AAT	64	0	62	CTC	3	0	0	ACG	20	0	20
(D) 天冬氨酸				CTG	15	62	15	ACT	46	0	50
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	CTT	11	0	8	(S) 色氨酸			
GAC	34	100	33	TTA	37	0	46	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG
GAT	66	0	67	TTG	17	38	15	TGG	100	100	100
(E) 半胱氨酸				(M) 赖氨酸				(T) 酪氨酸			
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG
TGC	31	100	25	AAA	44	0	45	TAC	39	100	40
TGT	69	0	75	AAG	56	100	55	TAT	61	0	60
(F) 终止				(N) 蛋氨酸				(U) 缬氨酸			
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG
TAA	0	0	0	ATG	100	100	100	GTA	20	0	20
TAG	0	0	0	(O) 苯丙氨酸				GTC	17	7	20
TGA	100	100	100	密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	GTG	42	93	40
(G) 谷氨酰胺				TTC	51	100	50	GTT	21	0	20
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG	TTT	49	0	50				
CAA	43	0	43								
CAG	57	100	57								
(H) 谷氨酸											
密码子	MRV L1	ZsG	Mrv-ZsG								
GAA	48	0	50								
GAG	52	100	50								

图23

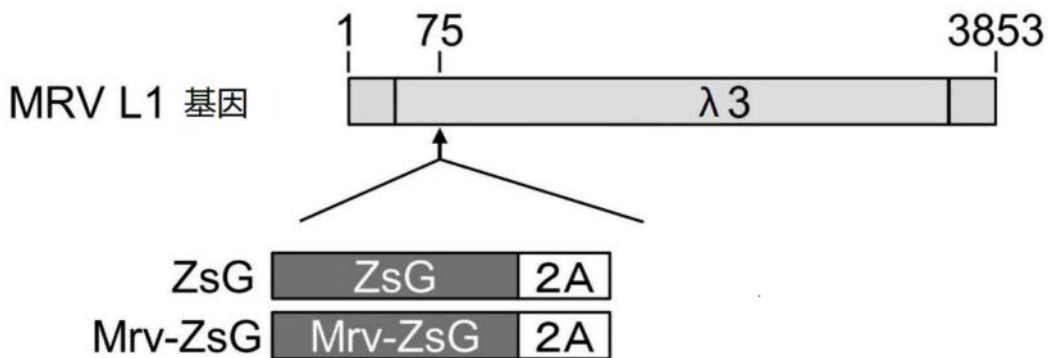


图24

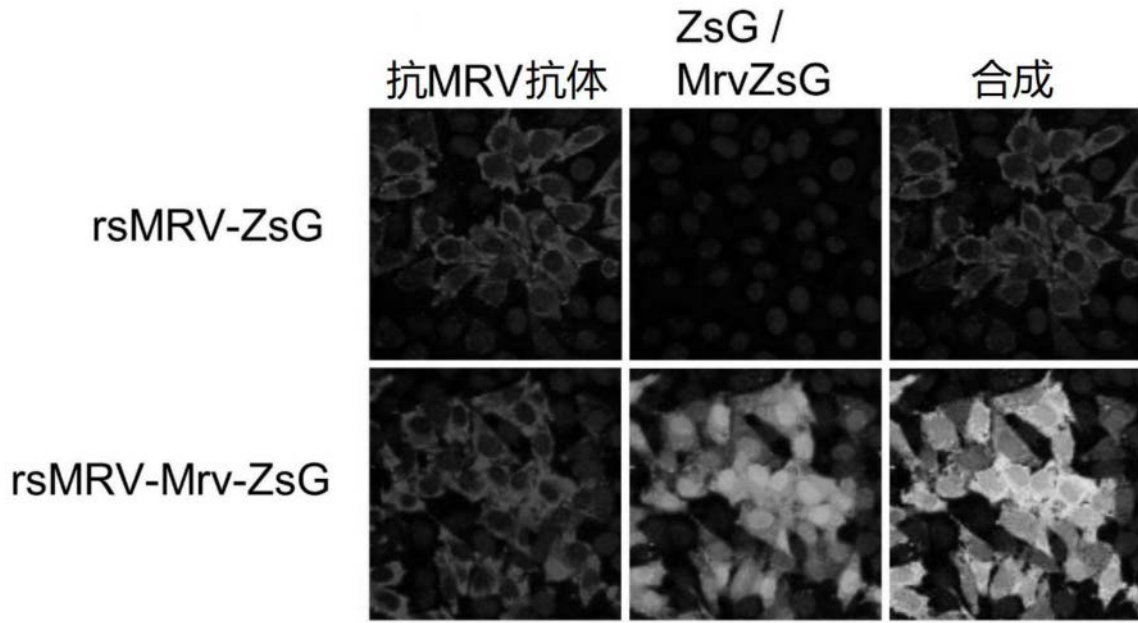


图25

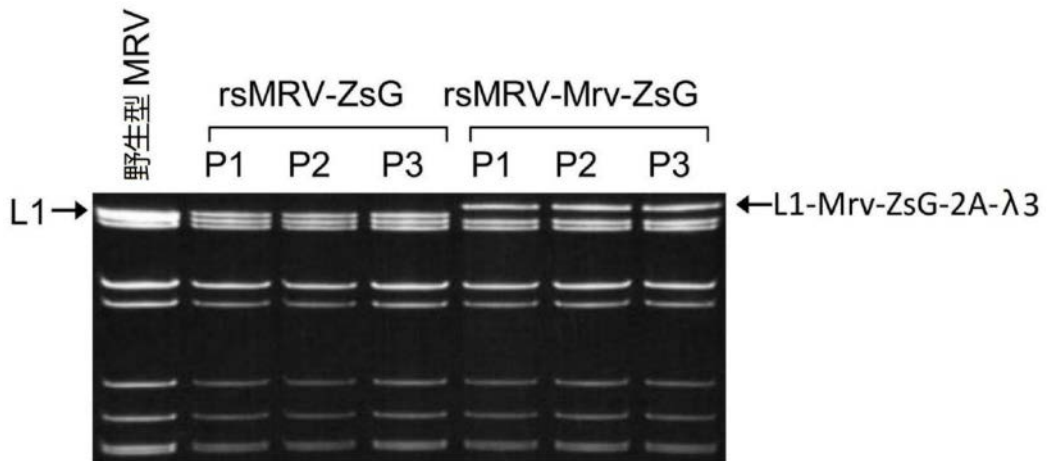


图26