307685

（由本局填寫）

承辦人代碼：	A6 B6
大　　類：	
ＩＰＣ分類：	

本案已向：

美　國（地區）　申請專利，申請日期：1991.6.6　案號：711,429　，□有　□無主張優先權

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

相關申請案之交叉參考

本案為1991年6月13日提出申請之第07／714，687申請案之部份連續案，後者為1991年6月6日提出申請之第07／711，429號申請案之部分連續案，而後者又為1990年8月15日提出申請之第07／567，960號申請案之連續案。

發明之領域

本發明係有關一種經修飾的痘病毒及其製法及用法。特別，本發明係有關重組型痘病毒，該病毒可表現黃病毒基因之基因產物，及有關可提供對抗黃病毒感染的保護性免疫力的疫苗。

本案中參考若干公開文獻。於說明書末了，申請專利範圍之前，完整地引述出此等參考文獻。此等參考文獻說明本發明相關的技術現況。

發明之背景

牛痘病毒及更為晚近的其他痘病毒曾經用來插入及表現外來基因。將外來基因插入傳染性活痘病毒的基本技術涉及在介於給予者質體內二側有外來基因元體之痘DNA序列與救援作用痘病毒內存在之同源序列之間的重組(Piccinietal., 1987)。

特定言之，重組型痘病毒係以業界已知，且類似於美國第4，603，112號專利案中所述牛痘病毒合成重組的生成方法（該案之揭示內容併述於此，以供參考）的二步驟來建構。

首先，有待插入病毒的DNA基因序列，特別得自非痘

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

來源的開放讀碼架構，放置於一其中已經插入一與一段痘病毒DNA同源的DNA之大腸桿菌質體建構體內。另外，有待插入的DNA基因序列與起動子接合。起動子-基因鍵聯放置於質體建構體內，致使，起動子-基因鍵聯之兩端的DNA，係為一與DNA序列同源，該DBA序列二側含有非必要位址的DNA序列同源。然後，所得質體構成體經由於大腸桿菌生長使其擴增(Clewell, 1972)並予分離(Clewell etal., 1969; Maniatiset al., 1986)。

其次，含有待插入的DNA基因序列之經分離的質體連同痘病毒性狀感染於細胞培養中，如雞胚纖維母細胞。在質體內之同源痘DNA與病毒基因組間之重組作用，可獲得一經由在其基因組非必要區內存在有外來DNA序列予以修飾之痘病毒。術語“外來”DNA代表外源DNA，特別得自非痘來源之DNA，其編碼的產物通常不是放置該外源DNA之基因組一般會產生的產物。

概略而言，基因重組作用為兩股DNA間之同源DNA段間的交換。某病毒些中RNA可取代DNA。核酸之同源段為具有相同核苷酸鹼基序列的核酸(DNA或RNA)段。

新穎病毒基因組於受感染的寄主細胞內複製或製造期間可能自然出現基因重組。因此，一個同時感染有兩種或兩種以上不同的病毒或其他基因建構體之宿主細胞，於病毒複製週期中，可能出現病毒基因間之基因重組。得自第一重組組之一段DNA可互換用來構成第二共同感染的病毒的該段基因組，其中該DNA係與第一病毒基因組同源者。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

然而，重組作用也可能出現於並非完美的同源之不同基因組的DNA段間。如果此段係得自與另一基因組之一段同源的第一基因組，但於第一段內存在有諸如基因標記或編碼抗原決定基之基因插入部分同源DNA中，則仍可能出現重組作用，隨後，該重組產物可經由重組型病毒基因組內存在有該基因標記或基因而檢測。

藉經修飾的傳染性病毒而成功地表現出所插入的DNA基因序列要求兩種條件。第一，必須插入病毒之非必要區，俾便使經修飾的病毒保持活存。表現插入DNA的第二條件為相對於插入的DNA有適當關係之起動子的存在。起動子之安置必須位在有待表現的DNA序列上游。

黃病毒科約包括60種寄生於節肢動物的病毒，該等病毒於溫帶及熱帶地區引起嚴重公共衛生問題(Shope, 1980；Monath, 1986)。雖然已經開發數種高度成功的失活疫苗及減毒活疫苗來對抗此種病毒，但近來仍迫切需要研究黃病毒的分子生物學，俾便生產對其餘病毒，最值得注意者為登革熱，之重組型疫苗(Brandt, 1988)。

黃熱病毒蛋白質係由正股基因組RNA內所存在的單一長轉譯開放讀碼架構(ORF)所編碼。結構蛋白質之編碼基因出現於基因組5´端，接著為非結構糖蛋白NS1及其餘非結構蛋白質(Rice et al., 1985)。黃病毒粒子含有一被膜糖蛋白E，一膜蛋白M，及一鞘蛋白C。以日本腦炎病毒(JEV)為例，病毒粒子製劑通常含少量為膜蛋白的糖蛋白先質，prM(Mason et al., 1987a)。另一方面，於JEV-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

感染之細胞內，M蛋白幾乎絕對地以高分子量prM蛋白質形式存在(Mason et al., 1987a；Shapiro et al., 1972)。

研究對此三種黃病毒糖蛋白(prM, E, NS1)具專一性的單株抗體(MAbs)被動投藥後的保護功效，顯示對此等抗原之免疫力導致對致命的病毒挑釁具有部分或完整的保護作用。對E之單株抗體也可提供保護以避免為下列各者所感染：日本腦炎病毒(JEV)(Kimura-Kuroda et al., 1988；Masonet al., 1989)，登革熱2型病毒(Kaufman et al., 1987)及黃熱病毒(YF)(Gould et al., 1986)。大多數情況下，被動保護作用係與此等E MAbs於活體外的中和病毒的能力有關。近來，Kaufman et al., (1989)驗證使用於活體外顯示，微弱或無法檢測之中和活性的prM MAbs也可產生被動保護作用。對結構蛋白質具專一性的MAb，可保護動物不受感染之能力，係與下述習知假說符合一致；結構蛋白質抗體可經由封阻病毒與標的細胞結合的作用而使病毒感染力減毒。使用對黃熱病毒(Schlesinger et al., 1985；Gouldet al., 1986)及登革熱2型病毒(Henchal et al., 1988)之NS1蛋白質之MAbs進行被動保護實驗，驗證對此等非結構糖蛋白之抗體可保護動物不受致命病毒的感染。由於此等MAbs不具有病毒結合性質，故推定其保護作用係由若干較非習知的病毒感染減毒機轉所調節(Gibson etal., 1988)。

NS1免疫力可保護寄主不受感染的額外證據來自於直

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

接免疫接種實驗，實驗中自黃熱病毒感染細胞(Schlesinger et al., 1985, 1986)或登革熱2型病毒感染細胞(Schlesinger et al., 1987)純化而得之NS1誘生對同源病毒感染之保護免疫力。

雖然於推衍出此三種黃病毒糖蛋白抗原的初級構造上已有顯著進展，但對其三維結構所知較少。產生此等抗原經適當摺疊且可能經正確組配形式之能力對有效重組型疫苗之生產上相當重要。以NS1為基礎的疫苗為例，NS1可能需要二聚合化(Winkler et al., 1988)，來誘導出最高保護反應。至於E蛋白質，正確的摺疊可能為誘導出保護免疫反應所必須，歸因於大腸桿菌產生的E蛋白質抗原(Mason et al., 1989)及於變性條件下製備的真正E蛋白質(Wengler etal., 1989b)皆無法誘生中和抗體。E蛋白質正確摺疊可能需要prM蛋白質的對應合成，因為此等蛋白質於West Nile病毒之細胞結合形式中(Wengleret al., 1989a)為異二聚體。E之正確摺疊及E與prM組配入病毒粒子內可能需要NS1蛋白質的配位合成，在JEV感染細胞中，該NS1蛋白質與未熟型E共同保有該JEV-感染細胞的分泌器的早期隔間內(Mason, 1989)。

基於黃病毒糖蛋白而試圖生產重組型黃病毒疫苗，已有若干成功，但於動物模式系統中的保護作用，並不是無法經常與所預測生產中和性抗體關聯一致(Bray et al., 1989；Deubelet al., 1988；Matsuura et al., 1989；Yasuda et al., 1990；Zhang et al., 1988；Zhao et

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.7.05 修正補充
A7
B7

五、發明說明（　）

al., 1987)。

Yasuda et al.(1990)報告一種牛痘重組體，其含編碼著下列各者之JEV區：127胺基酸C中之65個，全部prM，全部E，及352胺基酸NS1中之59個。Haishi et al.(1989)報告一種牛痘重組體，其包含一編碼著167胺基酸prM之17個，全部E及352胺基酸NS1中之57個的日本腦炎序列。

Deubel et al.(1988)報告一種牛痘重組體，其含有編碼序列編碼著全部C，全部prM，全部E及352胺基酸NS1中之16個之登革熱-2。

Zhao et al.(1987)報告一種牛痘重組體，其包含編碼全部C，全部prM，全部E，全部NS1，及全部NS2A之登革熱-4序列。Bray et al.(1989)報告一系列牛痘重組體，其包含下列各者之登革熱-4編碼序列：(i)全部C，全部prM及454胺基酸的E中之416個，(ii)167胺基酸之prM中的15及454胺基酸之E中的416個，(iii)流行性感冒A病毒血液集素之18個胺基酸及454胺基酸之E的416個，及(iv)呼吸融合病毒G糖蛋白之71個胺基酸及454胺基酸之E中的416個。

雖然曾經如此嘗試生產重組型黃病毒疫苗，但仍無法滿意地獲得藉牛痘重組體適當表現JEV E蛋白質。雖然Haishi et al.(1989)驗證經由其牛痘重組體進行JEV E蛋白質之胞質表現，但分布不同於於JEV感染細胞內所觀察到者。Yasuda et al.(1990)檢測藉其牛痘重組體於細胞表

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

面表現JEV蛋白質。可表現prM及E蛋白質之重組型病毒可保護小鼠對抗約10 LD_{50}的挑戰病毒。Yasuda etal., (1990)誘發出抗JEV免疫反應及保護作用，但其對一組對E有專一性的單株抗體具反應性，卻顯現出其與於JEV感染細胞內觀得之反應性不同。

曾經藉重組型牛痘病毒表現登革熱2型結構蛋白質(Deubel et al., 1988)。雖然此等病毒於感染細胞內誘生合成結構糖蛋白，但其無法誘發出可檢測的抗登革熱免疫反應，也無法保護猴不受登革熱感染。也曾對於牛痘病毒表現部分登革熱4型結構及非結構蛋白質完成若干研究(Bray et al., 1989；Falgout et al., 1989；Zhaoet al., 1987)。有趣地，含有從C延伸至NS2A之病毒ORF完整5′端且為P7.5早期-晚期起動子的控制之下的重組體，可產生胞內型prM, E及NS1，但無法誘使其合成任一種胞外型結構蛋白質，即使一型NS1係從此種重組型病毒感染細胞中釋出(Bray et al., 1989；Zhao et al., 1987)。也曾經研究含有若干型登革熱4型E基因且含或不含其他結構性蛋白質基因的其它重組型病毒(Bray et al., 1989)。雖然若干重組型病毒可誘生保護作用，但皆無法產生胞外型E，也無法誘發免疫抗體。可表現C端截頭E蛋白質基因的登革熱-牛痘重組體，可誘使合成胞外型E並於接種小鼠中提供對登革熱病毒腦炎的抗性增高(Men et al.,1991)。

如此，可瞭解提供一產生適當處理型黃病毒蛋白質的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

黃病毒重組型瘟病毒，及提供一對黃病毒感染產生保護免疫力之疫苗，乃對技術現況之一高度期望的進展。

發明之目的

因此，本發明的目的提供一種可表現經適當加工過的黃病毒之基因產物的重組型瘟病毒，以及提供此種重組型瘟病毒之製法。

本發明的另一目的係提供一在瘟病毒載體內表瘟病毒編碼序列之選殖與表現。

本發明的另一目的係提供一種疫苗，其可誘導出瘟病毒中和抗體，血液凝集作用抑制抗體，並可對抗黃病毒感染及致命黃病毒挑釁之保護免疫力。

本發明之此等及其他目的及優點於研讀下文之後將更顯然易明。

發明之說明

就一特點而言，本發明係有關一種重組型瘟病毒，其可產生一種可誘生對抗黃病毒感染之保護免疫力的胞外黃病毒結構蛋白質。特別是，重組型瘟病毒可產生一種含有黃病毒E及M蛋白質之胞外粒子，而該二蛋白質可誘導出中和抗體及血液凝集抑制抗體。瘟病毒較佳為牛瘟病毒或鳥瘟病毒，例如禽瘟病毒或金絲雀瘟病毒。黃病毒較佳為日本腦炎病毒，黃熱病毒及登革熱病毒。

依據本發明，重組型瘟病毒中，其在瘟病毒基因組的非必要區上，含有得自黃病毒之DNA，以供在一宿主中表現一可釋至胞外培養基的黃病毒結構蛋白質。特別是，該

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

DNA含有編碼一為結構蛋白質M，結構蛋白質E及非結構蛋白質NS1及NS2A之先質的日本腦炎病毒編碼序列。更特別是，該重組型痘病毒中，在痘病毒基因組的非必要區上，含有得自黃病毒之DNA，以供表現一含有黃病毒結構蛋白質E與結構蛋白質M的粒子。

另一方面，本發明係有關一種於經接種寄主動物體內而誘生免疫反應的一種疫苗，該疫苗包含一載劑及一在其中非必要區域上含有得自黃病毒之DNA的重組型痘病毒。

更特別，重組型病毒可表現從prM延伸至NS2B之黃病毒ORF的部份。對以重組型病毒感染之細胞進行生物學分析，顯示重組型病毒明顯生產三種黃病毒糖蛋白-prM、E及NS1之適當加工過的形式。重組型病毒可誘發胞外粒子的合成，該粒子含有經完整加工過的M及E蛋白質形式。此外，小鼠免疫研究結果驗證，中和抗體的誘生與高度保護作用係與免疫重組型病毒產生含有該兩種結構膜蛋白質之胞外粒子的能力相關。

圖式之簡單說明

參照附圖將可更瞭解本發明，附圖為：

第1圖示意顯示建構給予質體pSPJEVSH11VC及pSPJEVL10VC之方法，該二質體含有JEV結構蛋白質編碼區的編碼序列，NS1及NS2A；

第2圖示意顯示建構給予質體pSPJEVSH12VC及pSPJEVL14VC之方法，該二質體含有JEV結構蛋白質編碼區的編碼序列，NS1、NS2A與NS2B；

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

第３圖顯示用來建構給予者質體之寡核苷酸的DNA序列（轉譯開始子及中止子以斜體字顯示，而早期轉錄中止子以下方畫線顯示）；

第４圖為插入四個重組型牛痘病毒vP650，vP555，vP658及vP583之JEV編碼區之圖譜；

第５圖為藉由SDS-PAGE分析，而顯示由JEV感染及重組型牛痘病毒vP650，vP555，vP658及vP583感染所產生的細胞溶解產物NS1蛋白質之比較結果；

第６圖為藉由SDS-PAGE分析，而顯示由JEV感染及重組型牛痘病毒vP650，vP555，vP658及vP583感染之培養液NS1的比較結果；

第７圖為藉由SDS-PAGE分析，而顯示由JEV感染及重組型牛痘病毒vP650，vP555，vP658及vP583感染所產生的細胞溶解產物E蛋白質之比較結果；

第８圖為藉由SDS-PAGE分析，而顯示由JEV感染及重組型牛痘病毒vP650，vP555，vP658及vP583感染之培養液E蛋白質的比較結果；

第９圖為藉蔗糖梯度分析，由JEV感染細胞及牛痘重組體vP555，vP650感染的培養流體所回收之培養液中E蛋白質形式之比較結果；

第10圖為以JEV及以牛痘重組型vP555，vP658免疫接種動物所得之挑釁前血清對JEV專一性反應之免疫沈澱分析比較結果；

第11圖顯示建構一刪失胸腺核苷激酶基因並產生重組

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

型牛痘病毒vP410之質體pSD460的方法；

第12圖顯示建構一刪失出血區並產生重組型牛痘病毒vP553之質體pSD486的方法；

第13圖顯示建構一刪失ATI區並產生重組型牛痘病毒vP618之質體pMP494△的方法；

第14圖顯示建構一刪失血液凝集素基因及產生重組型牛痘病毒vP723之質體pSD467的方法；

第15圖顯示建構一刪失基因簇〔C7L-K1L〕及產生重組型牛痘病毒vP804之質體pMPCSK1△的方法；

第16圖顯示建構一刪失大次單位，核糖核苷酸還原酶，並產生重組型牛痘病毒vP866(NYVAC)之質體pSD548的方法；

第17圖顯示JEV Nakayama種株於編碼C至NS2B之區的NA序列；

第18圖顯示插入牛痘病毒vP555，vP825，vP908，vP923，vP857，vP864及金絲雀痘病毒vCP107之JEV編碼區之圖譜；

第19圖顯為插入牛痘病毒vP766，vP764，vP869，vP729，vP725，vP984，vP997，vP1002，vP1003及金絲雀痘病毒vCP127之YF編碼區之圖譜；

第20圖顯示DEN 1型西太平洋種株之部分DNA序列；

第21圖為插入牛痘病毒vP867，vP962及vP955之DEN編碼區之圖譜；

第22圖顯示含C5 ORF之金絲雀痘PvuII段之DNA序列

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

；

第23圖示意顯示一建構刪失C5之質體pRW848之方法；

第24圖顯示含C3 ORF之金絲雀痘之7351鹼基對片段之DNA序列。

發明之詳細說明

藉由下說明用之實施例，可更瞭解本發明及其多種優點。

實施例1 -JEV基因嵌殖入牛痘病毒給予者質體

牛痘病毒哥本哈根種株之胸腺核苷激酶突變種vP410 (Guo et al., 1989)用來產生重組體vP658(參見下文)。含有位在HA區並處於11-KDa晚近牛痘病毒起動子控制之下的β-半乳糖苷酶基因的重組型牛痘病毒(vP425)(Guo et al., 1989)係用來產生重組體vP555, vP583及vP650。全部牛痘病毒儲液在添加10%熱失活胎牛血清(FBS)的鷹氏最低必須培養基(MEM)內為VERO(ATCC CCL 81)或MRC-5(ATCC CCL 171)細胞所生產。生物合成的研究，係使用於37℃下在補充有7.5%FBS及抗生素之MEM內生產的嬰倉鼠腎細胞(BHK 21-15純株)，或於相同條件下（除使用5%FBS）生長的VERO細胞進行。在活體外試驗所用JEV病毒為澄清的培養液，其係由以JEVNakayama種株之乳鼠腦懸浮液經55繼代培養所得之感染C6／36細胞(Mason, 1989)製得。

限制酶係得自GIBCO／BRL公司(馬利蘭州，蓋茲堡市)，新英格蘭生物實驗室公司(麻州，貝弗利市)，或百靈佳曼漢生物化學公司(印地安納州，印地安那波里市)。T4

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

DNA接合酶得自新英格蘭生物實驗室公司。使用標準DNA重組技術(Maniatis et al., 1986)，但在選殖、篩選、及質體純化上有稍微的修改。核酸序列係使用標準二去氧鏈終結反應(Sanger et al., 1977)，於鹼變性雙股質體模版上確認之。序列分析之引子，及其他寡核苷酸係使用標準化學方式合成之(Biosearch 8700, San Rafael, CA；Applied Biosystems 380B, Foster City, CA)。用來構建JEV-牛痘重組型病毒之JEV cDNA，係衍生自JEV Nakayama種株(McAda etal., 1987)；所有核苷酸配位子係衍生自第17A及17B圖所示之序列資料(序列辨識編號：52)，其中含C編碼區序列與prM, E, NS1, NS2A及NS2B編碼區之最新序列相組合。

質體pJEV 3／4係藉下述方式衍生而得：將JEV cDNA之Bgl II-Apa I段(核苷酸2554-3558)、Apa I-Bal I段(核苷酸3559-4125)及退火(anneal)的寡J3(序列辨識編號：44)及J4(序列辨識編號：45)〔第３圖；含一轉譯中止子，而後為牛痘早期轉錄終止信號(TTTTTAT；Yuen et al., 1987)，EagI 址，及Hin dIII粘接端〕選殖入經Bam HI-HindIII分解過之pUC 18。pJEV 3／4以Eco RV(核苷酸2672)而於JEV序列內分解，而以Sac I而在pUC 18內分解，且含質體起點及由核苷酸2692延伸至4125的JEV cDNA序列的片段接合至JEV cDNA Sac I-EcoRV段(核苷酸2125-2671)上。所得質體pJEV 1，含有病毒ORF，該ORF係由從E之倒數第三個之Sac I址(核苷酸2125)經由為Bal I址

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

(核苷酸4125)的二胺基酸殘基(aa)延伸入NS2B預測的N端(第1圖)。

合成寡J1B(序列辨識編號：46)及J2B(序列辨識編號：47)(第3圖；含有Xho I粘著端，Sma I址，C之最末15aa，及帶有一Hind III粘端之JEV prM的首9aa)連接至JEV cDNA之Hin dIII-Sac I段(核苷酸407-2124)，及經Xho I-Sac I分解之載體pIBI24(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)接合。所得質體pJEV2含有介於出現在prM預測N端前方15aa的蛋胺酸(Met)字碼子(核苷酸337-339)與出現於E最末第三Sac I址(核苷酸2124)(第1圖)間延伸的病毒ORF。

使用合成寡J7(序列辨識編號：48)及J8(序列辨識編號：49)
(第3圖；含有Bam HI及Nco I粘著端)，以將JEV cDNA之NcoI-Sac I段(核苷酸1336-2124)選殖入經Bam HI-Sac I分解過之pIBI24，進而獲得pSPN78。寡核苷酸J9(序列辨識編號：50)及J10(序列辨識編號：51)(第3圖；含HindIII粘端，Sma I址，及JEV cDNA之核苷酸811-832)用來將JEVcDNA之Hinc II-Nco I段(核苷酸833-1335)選殖入經HindIII-NcoI分解的pSPNC78內。所得質體，pJEV5，含有病毒ORF延伸在位置E之N端前方25aa的Met字碼子(核苷酸811-813)與位置於E倒數第三(第1圖)Sac I址(核苷酸2124)間。

pTP15含有早期／晚期牛痘病毒H6起動子，該起動子

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

插入聚聯結子區內，此區係已經刪失血液凝集素(HA)基因之牛痘病毒之HindIIIA段序列的側邊。(Guo et al., 1989)。經Sac I-Eag-I分解的pTP15，經純化及並連接至經自pJEV2之經純化Sma I-Sac I插子，並加上 pJEV1之SacI-EagI插子的連接，而獲得pSPJEVL(第1圖)。對應於用來生產pSPJEVL的獨特SmaI址之6bp，隨後使用寡核苷酸-指導雙股斷裂突變作用(Mandecki, 1986)去除，產生pSPJEVL14VC，於其中H6起動子係位於ATG開始字碼子前方(第1圖)。

Sma I-Eag I pTP15段連接至得自pJEV5之經純化的Sma I-Sac I插子，並加上pJEV1之Sac I-Eag I插子的接合，而獲得pSPJEVSH(第1圖)。對應於用來生產pSPJEVSH之獨特Sma I址的6bp如前述去除，產生pSPJEVSH12VC，於其中H6起動子恰位在ATG開始字碼子前方(第1圖)。

寡核苷酸指導突變(Kunkel, 1985)用來將於pJEV2 E基因(TTTTTGT；核苷酸1304-1310)內之可能的牛痘病毒早期轉錄終結信號(Yune et al., 1987)轉成TCTTTGT，生成質體pJEV22(第2圖)。對pJEV5進行相同轉變，而產生pJEV6(第2圖)。

合成寡J37及J38〔第3圖；含JEV核苷酸4497-4512，轉譯中止子，早期轉錄終結信號(TTTTTAT；Yuen et al., 1987)，Eag I址，及Hin dIII粘端〕用來將JEV cDNA之Sac I-Dra I段(核苷酸2125-4496)選殖入經Sac I-HindIII分解的pIBI24內。所得質體pJEV7含有病毒ORF，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

該ORF於在於E最末第三個所見之Sac I址（核苷酸2125）與NS2B最末字碼子（核苷酸4512）間（第２圖）間延伸。經SmaI-EagI分解的pTP15經純化且接合至得自pJEV22 經純化的Sma I-Sac I 插子，並加上pJEV7之Sac I-Eag I插子接合，而獲得pSPJEV10（第２圖）。對應於用來產生pSPJEV10之SmaI址的6bp，如前述去除，生成pSPJEV10VC（第２圖）。將經Sma I-Eag I分解之pTP15，以pJEV6之SmaI-SacI插子及pJEV7之Sac I-Eag I插子接合，而生成pSPJEV11（第２圖）。對應於用來產生pSPJEV11之SmaI址的6bp，如前述去除，以獲得pSPJEV11VC（第２圖）。

實施例２-牛痘病毒重組體之建構

將重組體給予者質體性狀感染入一已感染救援牛痘病毒的組織培養細胞及及藉由於硝基纖維素濾片上進行原地雜交而鑑別重組體之步驟已被揭露（Guoet al., 1989；Panicali et al., 1982）。pSPJEVL14VC、pSPJEVSH12VC及pSPJEV10VC分別性狀感染進入vP425感染細胞，以分別產生牛痘重組體vP555，vP583及vP650（第４圖）。pSPJEV11VC性狀感染進入vP410感染細胞，以產生牛痘重組體vP658（第４圖）。

實施例３-活體外的病毒感染及放射性標幟

於35mm直徑皿上，製備BHK及VERO細胞單層，並以牛痘病毒（m.o.i為２）或JEV（m.o.i為５）感染，在放射性標幟前，分別培育11小時（牛痘）或16小時（JEV）。感染後11小時或16小時，去除培養基，並更換以含２％FBS及250

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

μCi／ml^{35}S-Met之溫熱且不含Met的培養基。細胞於37℃培育1小時，使用含10倍正常數量之未經標記Met的溫熱維持培養基清洗，且在如下所述收之穫前，於相同高Met之培養基內培育6小時。某些情況下，澄清的培養液樣品利用製備10至35%連續蔗糖梯度離心並如已知方式加以分析(Mason, 1989)而進行蔗糖梯度離心方式分析

實施例4-放射性免疫沈澱，聚丙烯醯胺膠電泳，及內糖苷酶處理

收穫加放射線標幟的細胞溶解產物及培養流體，將病毒蛋白質免疫沈澱，且以內糖苷酶分解，並利用如前述之含SDS之聚丙烯醯胺膠(SDS-PAGE)分離(Mason, 1989)。除非有其他陳述，否則所有SDS-PAGE樣品，於電泳前，係在50mM二硫赤絲醇(DTT)存在之下加熱所製得的。

實施例5-重組型牛痘病毒之結構

建構可表現由prM延伸至NS2B之JEV編碼區部分之四種不同牛痘病毒重組體。此等重組型病毒所含JEV cDNA序列示於第4圖。全部四重組型病毒中，JEV cDNA有意義股位在牛痘病毒早期／晚期H6起動子後方，且預期其轉譯係始於位在病毒cDNA序列5′端之天然出現的JEV Met編碼子(第4圖)。

重組體vP555編碼著位在結構蛋白質先質prM N端前方推定之15aa的信號序列、結構糖蛋白E、非結構糖蛋白NS1及非結構蛋白質NS2A(McAda et al., 1987)。重組體vP583編碼著E之N端前方推定的信號序列、E、NS1及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

NS2A(McAda et al., 1987)。重組體vP650含一cDNA，此cDNA編碼著如同vP555之蛋白質，但增加NS2B編碼區。重組體vP658含有如同vP583之相同蛋白質之編碼cDNA，但添加NS2B。重組體vP650及vP658中，E內潛在之牛痘病毒早期轉錄終結信號（TTTTTGT；核苷酸1087-1094)在未改變其aa序列下而修飾成TCTTTGT。此種改變試圖提高E及NS1之表現水平，因為此種序列會活體外之轉錄分析中增加轉錄終結之情況(Yuen et al., 1987)。

重組型牛痘基因組內JEV基因之位置及方向可藉限制酶分解重組型牛痘病毒DNA獲得證實。分析中，注意到重組體vP555，vP583及vP650具有一從HindIII C片段內延伸過HindIII N及M直至HindIII K之刪除。於vP425親代病毒也觀察到同樣的刪除。有趣地的是，此等病毒在VERO細胞中有比vP410及其衍生物vP658更低有細胞致病性。

NS1藉重組型牛痘病毒表現時可經適當處理及分泌

第5及6圖顯示經由JEV感染或重組型牛痘病毒感染而產生NS1蛋白質之比較。BHK細胞以JEV或重組型牛痘病毒感染，然後以^{35}S-Met標幟1小時，並追蹤6小時。由各細胞層製得之溶解產物(第5圖)或培養流體(第6圖)的同等餾分進行免疫沈澱，而後在SDS-PAGE分析前，作mock分解(M)，以endo H分解(H)，或者以PNGase F分解(F)。

由第5及6圖所得自脈衝-追蹤實驗資料，證實用4種重組型牛痘病毒感染細胞內，可合成並分泌出與真實

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

NS1及NS1´大小完全相等的蛋白質。此外，此等蛋白質對endoH及PNGase F之敏感度指示NS1重組型式係經糖基化。詳言之，，NS1之細胞結合型全部都含有二不成熟(endo H敏感性)N-聯結葡萄聚糖，而其胞外型則含有一個不成熟及一個複合型或雜交型(endo H抗性)之葡萄聚糖(參見Mason, 1989)。有趣地，此種脈衝-追蹤研究顯示全部4種重組體產生相似之NS1量，此教示在位置接近vP555及vP583之E編碼區末端潛在的牛痘早期轉錄終結信號，相對於經TTTTTGT修飾過的vP650或vP658，並未顯著減少NS1生產量。雖然第5及6圖所示實驗，係於感染後11小時的BHK細胞上進行，但於感染後4或8小時之脈衝標記的感染VERO細胞，進行類似實驗，此TTTTTGT序列的存不存在，在S1的表現上，並未顯示出任何差異。比較由含有NS2A(vP555及vP583)編碼區或含有NS2A與NS2B二者(vP650及vP658)編碼區之牛痘病毒所合成之NS1，其顯示NS2B編碼區之存在與否對NS1之表現並無影響。此等結果與Falgout et al.(1989)之結果一致，皆顯示NS2A基因需要NS1的適當加工。

<u>以重組型牛痘病毒表現時E及prM係經過適當的加工</u>

第7及8圖顯示以JEV感染或重組型牛痘病毒感染所產生之E蛋白質的比較結果。以JEV或重組型牛痘病毒感染，然後以^{35}S-Met標幟1小時，並追蹤6小時。由各細胞層製得之溶解產物(第7圖)或培養流體(第8圖)的同等餾分進行免疫沈澱，而後在SDS-PAGE分析前，作mock分解

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

(M)，以endo H分解(H)，或者以PNGase F分解(F)。

由第７及８圖所示脈衝-追蹤實驗資料證實：在以含E基因的重組型牛痘病毒感染之細胞內合成大小等於E之蛋白質。然而，E蛋白質僅由含有編碼prM、E、NS1及NS2A之病毒ORF區的牛痘病毒所感染之細胞內放出(vP555及vP650；參見第４，７及８圖)。內糖苷酶敏感度(第７及８圖)顯示以牛痘重組體感染細胞所合成之E蛋白質胞的細胞外型與細胞內型皆經糖基化；E之細胞結合型為endo H敏感性，而胞外型對endo H消化具有抗性。

使用M專一性MAb(及prM)而由放射線標幟之牛痘感染細胞製得的免疫沈澱物顯示，於感染有vP555及vP650之細胞內可合成prM。以該二重組型痘病毒任一者所感染的細胞，可產生與JEV感染細胞所產生的prM蛋白質尺寸相同之細胞型prM，且在以此二病毒感染的二蛋白質細胞培養液內，可測得具有正確尺寸的M蛋白質。

由感染著vP555及vP650的細胞收穫得之胞外流體含有多型E，該E於蔗糖密度梯度為具有血液凝集活性峰之移動。有趣地的是，此種血液凝集素的移動類似於JEV感染細胞培養液(第９圖)所見的非傳染性血液凝集素(SHA)的緩慢沈澱峰(Russell et al., 1980)。此外，此等含有M完整加工過形式的相同餾分，證實vP555及vP650感染細胞可產生一含有JEV之兩種結構膜蛋白質的粒子。此等粒子可能代表空的JEV被膜，此類似於為感染Ｂ型肝炎病毒感染之人血液內，出現的22nm Ｂ型肝炎病毒粒子(Tiollais

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

et al., 1985)，該粒子係由可表現B型肝炎表面抗原基因的細胞中釋出(Dubois et al., 1980；Moriarty et al., 1981)。檢查感染重組型病毒之細胞上清液之血液凝集性質，由於血液凝集活性需要JEV蛋白質之微粒化（此對清潔劑的崩解敏感）。(Eckels et al., 1975)。血液凝集分析顯示，為vP555及vP650感染之細胞所收穫的上清液中含有為抗-JEV抗體所抑制之血液凝集活性，且具有一與JEV血液凝集素完全相同的最適當pH。於以vP410，vP583，或vP658感染之細胞培養液內，未測得任何血液凝集活性。

重組型牛痘病毒產生胞外粒子

重組型牛痘病毒vP555產生表現類似空病毒被膜之含E及M的細胞外粒子。此重組型病毒誘導使含JEV結構蛋白質之胞外粒子的合成能力可提供一可產生經適當加工並摺疊過之抗原的系統。

本文所述重組型病毒含編碼為結構蛋白質M前驅物、結構蛋白質E及非結構蛋白質NS1，NS2A，及NS2B之JEV ORF部份。由此等重組型病毒感染細胞所產生的E及NS1蛋白質進行蛋白質分解割裂及N-聯結碳水化合物添加係與JEV感染細胞所產生的相同蛋白質無法區分。此等資料進一步證實，E及NS1蛋白質之分解割裂與N-聯結碳水化合物添加無需位在病毒基因組內位置NS2A之3´的黃病毒非結構蛋白質(Bray et al., 1989；Deubel al., 1988；Falgoutet al., 1989；Fan et al., 1990；Matsuura et

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

al., 1989；Ruiz-Linares et al., 1989；Yasuda et al., 1990；Zhang et al., 1988；Zhao al., 1987)。

有趣地，插入重組型牛痘病毒之ORF部份對prM及E之晚期加工具有顯著影響，但對NS1之命運並無影響。所有編碼NS1之重組型病毒可產生此蛋白質之成熟胞外型，此與先前的研究顯示在NS2A及NS2B存在下生產的NS1可被適當加工並由被性狀感染之細胞中分泌出（Fanet al., 1990）是完全相符。另一方面，含E蛋白質編碼區之4個重組體中僅有二者可產生胞外型E。此二重組體vP555及vP650不同於其餘重組體係在其於除含有E，NS1及NS2a外含有prM編碼區。胞外型E僅由含E及prM編碼區之病毒所生，以及胞外型E係與M結合等事實教示，prM及E的同時合成係為胞外流體生成標的粒子之要件。

實施例6-動物保護研究

多組每組包含3週齡育成瑞士小鼠腹內注射稀釋於0.1ml PBS的10^7pfu牛痘病毒進行免疫接種。接種後3週，由選定的小鼠之眶後竇採血，血清儲存於-70℃。採血後2至3日，小鼠或再度以重組病毒接種或藉由腹內注射已感染JEV之乳鼠腦稀釋液加以挑釁之(北京種株；多小鼠繼代培養)(Huang, 1982)。由於在各組小鼠與挑釁病毒繼代培養間觀察到致命劑量上的改變，於在每一挑釁試驗中皆進行致命-劑量的滴定。挑釁後，日間觀察小鼠，合計3週。

對重組型牛痘病毒之免疫反應之評估

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

等量混合各組代表性小鼠採血所得血清以製得小鼠血清匯集物。三微升血清匯集樣品與得自經^{35}S-Met標幟之JEV感染細胞並經清潔劑處理過的細胞培養液混合，然後，抗原抗體混合物與固定的金黃葡萄球菌(酶中心，馬利蘭州，馬蘭市)〔其塗覆以兔抗小鼠免疫球蛋白Dakopatts，Gostrup，丹麥)〕一起培育，以確保各類鼠抗體皆會沈澱。由此等沈澱物所得樣品，於電泳前，並未使用二硫赤絲醇處理，俾便避免由於兔免疫球蛋白重鏈與經放射線標幟病毒抗原共同移動所造成之人為的電泳誤差，並令E及NS1´蛋白質澄清分離。對熱失活血清(56℃，20分鐘)進行中和試驗，係如已揭露者(Teshet al.，1987)，但有如下修飾：(1)新鮮解凍人血清加入全部病毒／抗體稀釋液內，至終濃度為2.5%，(2)病毒吸附後，細胞單層上方覆蓋以含0.5%羧甲基纖維素之培養基(Sigma，蒙大拿州，聖路易市)，及(3)感染後6日，使用溶解於20%乙醇之0.1%結晶紫觀察溶菌斑。血液凝集性試驗及血液凝集抑制性(HAI)試驗皆係藉由Clarkeet al.，(1958)之方法加以進行。

以vP555免疫接種可提供對抗大於JEV之10000 LD_{50}的保護作用

使用JEV北京種株〔其對小鼠具有高度周邊致病性(Huang，1982)〕試驗重組型牛痘病毒對保護育成小鼠不受致命JEV感染的能力。基於初步實驗顯示全部4種重組型牛痘病毒皆可對此種病毒之致命挑釁提供若干保護，選

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

出二病毒(vP555及vP658)進行深部挑釁研究。vP555誘導胞外型E的合成，而vP658雖未產生任何胞外型E，但含額外編碼NS2B蛋白質之cDNA序列。挑釁實驗中，試驗挑釁病毒之若干稀釋液，且檢查以牛痘重組型之追加免疫對保護情況上的影響，並評估於免疫接種動物之小組中，血清學上的反應。使用此等重組型病毒作單一接種結果顯示，於所有挑釁劑量上，重組型病毒vP555可產生比vP658更佳的保護情況(表1)。二重組型病毒於低度挑釁病毒量下，可提供較佳保護作用，此乃與使用高劑量JEV而可壓倒保護之能力是一致的。表1顯示高於JEV 10000 LD_{50}之完全保護可藉由vP555的兩次接種達成之，但於測試的挑釁劑量內，vP658並非如此。第10圖顯示得自重組型牛痘病毒免疫接種動物，在挑釁前血清的JEV專一性反應性分析。由用於保護實驗的動物小組收集得之血清(參見表1及2)經匯集，並取樣進行其對回收自JEV感對感染細胞之培養液的放射性標幟蛋白質的免疫沈澱能力。第10圖之自動放射線攝影圖右側二行係為樣品與從已得自未接種小鼠的血清(一)，或得自對正常致命劑量JEV倖存的小鼠之血清，進行免疫沈澱所製得的。分析證實：(1)只有以vP555免疫的動物，顯示對E有強力免疫反應，及(2)第二次接種使得對E蛋白質之反應活性顯著增高(第10圖)。

分析此等動物收集得之血清的中和及HAI資料，證實免疫沈澱分析結果，顯示100%保護之以vP555追加接種的動物，具有極高量的中和及血液凝集抑制抗體(表2)。此

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

等中和及血液凝集抑制抗體量，類似對以正常致命劑量JEV北京種株加以挑釁所倖存的天然小鼠中達成的力價。

vP555誘發中和抗體的能力可能與vP555可產生結構蛋白質E及M之胞外微粒型的事實有關。此種仿-SHA粒子可能代表一空JEV被膜，其含有摺疊且組配成一種構型極其類似傳染性JEV粒子所見之E與M。重組體vP555及vP650由於含有全部3種JEV糖蛋白的編碼區，故可產生結構蛋白質之胞外型，藉此可提供組配病毒被膜所需全部JEV基因產物。其他研究（參見上文）尚未能檢測於有或無NS1及NS2A共存之下可表現全部3種結構蛋白質（C，prM，及E）之細胞對E胞外型的產生。重組型病毒之無法產生由vP555及vP650所產生的類似粒子，可能歸咎於重組體基因組內存在有C蛋白質基因之故。特別是，在無基因組RNA存在之下生產的C蛋白質會干擾病毒膜蛋白質之適當組配。另外，類似Nowak et al.，(1989)於活體外轉譯試驗測得之不完全處理型C，可防止由可表現C基因的細胞中釋出結構膜蛋白質。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表 1　重組型牛痘病毒vP555或vP658保護小鼠不感染致命性JEV腦炎的能力評估

免疫接種病毒[1]	挑釁劑量(LOG)[2]	一次接種後存活[3]	兩次接種後存活[4]
vP410	-1	0／20	0／10
vP410	-2	0／20	1／10
vP410	-3	0／18	
vP555	-1	12／20	10／10
vP555	-2	15／20	10／10
vP555	-3	18／19	
vP658	-1	0／20	3／9
vP658	-2	4／22	3／10
vP658	-3	12／18	
—	-2	0／5	1／5
—	-3	1／10	3／5
—	-4	2／10	4／10
—	-5	3／10	6／10
—	-6	4／10	3／10
—	-7	3／5	7／10
—	-8		5／6

1 以牛痘重組體免疫接種，或未經免疫的致命劑量滴定組（一）。
2 挑釁所用乳鼠腦儲液之稀釋液。基於此表所示同時滴定資料，-1 log病毒挑釁劑量等於6週齡動物於一次接種後$4.7\times10^{4}LD_{50}$的挑釁劑量及10週齡動物於兩次接種後之$3.0\times10^{4}LD_{50}$的挑釁劑量。
3 每組之活動物／總數；對6週齡小鼠挑釁，單一次接種後3週。
4 每組活動物／總數；對10週齡小鼠挑釁，係在第一次牛痘接種後6週，第二次同樣牛痘重組體接種後3週。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表２　於挑釁前血清中之溶菌斑降低的中和力價與HAI抗體力價

	第一次接種		第二次接種	
組[1]	中和力價[2]	HAI價[3]	中和力價[2]	HAI力價[3]
vP410組１	<1：10	<1：10		
vP555組１	1：40	1：40		
vP555組２	1：80	1：160	1：160	1：160
vP658組１	<1：10	<1：10		
vP658組２	<1：10	<1：10	<1：10	<1：10

1 以牛痘重組體免疫接種。組１代表動物於以單一次牛痘接種３週後挑釁，而組２代表動物於兩次接種後挑釁
2 血清稀釋在溶菌斑數目上造成90%的降低。
3 血清稀釋度。

實施例７-減毒牛痘疫苗種株NYNAC

欲求發展出新牛痘疫苗種株NYVAC(vP866)，牛痘病毒哥本哈根疫苗種株藉由刪除基因組上已知或可能編碼具毒力因子的６非必要區，予以修飾。一系列刪除詳述如下。所有牛痘限制酶片斷、開放讀碼架構及核苷酸位置之命名係基於Goebel et al., 1990a, b所報告的命名學。

刪失位置也作可插入外來基因的接受位置的基因工程皮處理。

於NYVAC一系列刪失之區列舉如下。也列出縮寫及刪除區之開放讀碼架構命名(Goebel et al., 1990a, b)號以及有載明其刪除區之含有所有刪除的牛痘重組體(vP)之命名：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

(1)胸腺核苷激酶基因(TK；J2R)vP410；

(2)出血區(ATI；A26L)vP618；

(3)A型包涵體區(ATI；A26L)vP618；

(4)血液凝集素基因(HA；A56R)vP723；

(5)寄主範圍基因區(C7L-K1L)vP804；及

(6)大次單位，核糖核苷酸還原酶(I4L)vP866(NYVAC)。

DNA繁殖及合成

藉標準程序建構，篩選質體與使其生長(Maniatis et al.1986；Perkus et al., 1985；Piccini et al., 1987)。核酸內切酶係得自GIBCO／BRL，馬利蘭州，蓋色堡市，新英格蘭生物實驗室，麻省，貝佛利市；及百靈佳曼漢生物化學公司，印地安那州，印地安拿坡里市。大腸桿菌聚合酶Klenow段，係得自百靈佳曼漢生物化學公司。BAL-31核酸外切酶及噬菌體T4 DNA接合酶係得自新英格蘭生物實驗室。試劑係遵照供應商所規定者使用。

於如前述，合成的寡去氧核糖核苷酸係在Biosearch 8750或應用生物系統380B DNA合成儀上製備之(Perkus et al., 1989)。決定DNA序列，係如已揭露者使用Seguenase(Tabor et al., 1987)(Guo et al., 1989)藉二去氧-鏈終結法(Sanger etal., 1977)加以決定。為確認序列而以聚合酶鏈反應(PCR)擴增DNA(Engelke et al., 1988)，該擴增係使用一般合成寡核苷酸引子及GeneAmp DNA擴增試劑套組(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)，而於自動化Perkin Elmer Cetus DNA熱循環機內進行。藉

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

限制內切酶分解，而後以BAL-31外切酶分解以及利用合成寡核苷酸所進行突變(Mandecki, 1986)，而從質體上刪除過多的DNA序列。

細胞，病毒，及性狀感染

牛痘病毒哥本哈根種株之來源及培養條件係如習知巷所揭露的(Guo et al., 1989)。藉重組技術產生重組型病毒，即硝基纖維素濾片的原地雜交與β-半乳糖苷酶活性的篩選係如習知所述(Panicali et al., 1982；Perkus et al., 1989)。

刪失胸腺核苷激酶基因(J2R)之質體pSD460的建構

現在參照第11圖，質體pSD406含有選殖入pUC8之牛痘Hind III J(pos.83359-88377)。pSD406以Hind III及Pvu II切斷，而得自Hind III J左側的1.7kb段選殖入以Hind III／Sma I切斷的pUC8內，以生成pSD447。pSD447含J2R完整基因(pos. 83855-84385)。起始碼含於Nla III址內，而終止碼含於Ssp I址內。轉錄方向以第11圖箭頭指示。

欲獲得向左側伸出之臂，由pSD447分離0.8kb HindIII／Eco RI段，然後以Nla III分解，再分離0.5kbHind III／Nla III段。經退火配對的合成寡核苷酸MPSYN43／MPSYN44(序列辨識編號：1／序列辨識編號：2)

```
                                    SmaI
MPSYN43   5'      TAATTAACTAGCTACCCGGG          3'
MPSYN44   3' GTACATTAATTGATCGATGGGCCCTTAA       5'
          NlaIII                          EcoRI
```

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　　）

與0.5kb Hind III／Nla III段接合至以Hind III／Eco RI切斷的PUC18載體質體內，產生質體pSD449。

欲獲得含牛痘向右伸出臂及pUC載體序列之限制酶片段，pSD447於牛痘序列內，以Ssp I(部分)切斷，而於pUC／牛痘接頭處，使用Hind III切斷，而分離2.9kb載體段。此載體段與經退火配對的合成寡核苷酸MPSYN45／MPSYN46(序列辨識編號：3／序列辨識編號：4)

```
            HindIII SmaI
MPSYN45   5'  AGCTTCCCGGGTAAGTAATACGTCAAGGAGAAAACGAA
MPSYN46   3'      AGGGCCCATTCATTATGCAGTTCCTCTTTTGCTT

                          NotI              SspI
                ACGATCTGTAGTTAGCGGCCGCCTAATTAACTAAT  3' MPSYN45
                TGCTAGACATCAATCGCCGGCGGATTAATTGATTA  5' MPSYN46
```

接合而產生pSD459。

欲將向左及右伸出的臂組合入質體內，由pSD449分離出0.5kb Hind III／Sma I段，與使用Hind III／Sma I切斷的pSD459載體質體接合，產生質體pSD460。pSD460用作給予質體，以與野生型親代牛痘病毒哥本哈根種株VC-2重組。^{32}P標幟探針係使用作為模版的MPSYN45(序列辨識編號：3)及互補的20元體寡核苷酸MPSYN47(序列辨識編號0：5)(5'TTAGTTAATTAGGCGGCCGC 3')作引子，而切用引子延伸方式加以合成。重組型病毒vP410藉溶菌斑雜交加以鑑別。

建構刪失出血區(B13R＋B14R)之質體pSD486

現在參照第12圖，質體pSD419含有選殖入pUC8牛痘之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

Sal I G (pos.160, 744-173351)。pSD422含接合至右方的牛痘Sal I段，選殖入pUC8之Sal J(pos.173, 351-182746)。欲建構刪除出血區u 313R-B14R(pos.172549-173553)之質體，pSD419用作向左伸出臂之來源，而pSD422用作向右伸出臂的來源。u 區之轉錄方向以第12圖箭頭指示。

欲從pSD419去除不期望的序列，至Nco I址左側之序列(pos.172253)經由以Nco I／Sma I分解pSD419，予以去除，接著與大腸桿菌聚合酶Klenow段生成鈍端，並接合產生質體pSD476。向右伸出臂之病毒的獲得方式，係藉由以Hpa I在B14R之終止碼上分解pSD422，以及藉由距離右端0.3kb的Nru I予以分解。分離出0.3kb段，並將其與分離自pSD476的3.4kb Hinc II載體段接合，產生質體pSD477。於pSD477部分刪失牛痘u區之位置以三角形指示。pSD477其餘B13R編碼序列係以Cla I／Hpa I分解去除，所得載體段與經退火配對的合成寡核苷酸SD22元體／SD20元體(序列辨識編號：6／序列辨識編號：7)

```
                ClaI          BamHI HpaI
SD22mer  5'  CGATTACTATGAAGGATCCGTT   3'
SD20mer  3'    TAATGATACTTCCTAGGCAA   5'
```

接合而產生pSD479。pSD479含起始碼(下方畫線)，其接著為Bam HI址。欲將大腸桿菌β-半乳糖苷酶置於u起動子控制之下的B13-B14(u)刪除位址，將含β-半乳糖苷酶基因的3.2kb Bam HI段(Shapira et al., 1983)插入pSD479之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

Bam HI址，產生pSD479BG。pSD479BG用作給予者質體，以供與牛痘病毒vP410重組。重組型牛痘病毒vP533以係呈色基質X-gal存在下呈藍斑者加以分離。於vP533中，B13R-B14R區被刪除並為β-半乳糖苷酶所置換。

欲從vP533中去除β-半乳糖苷酶，質體pSD486(pSD477之衍生物，其中含聚聯結子區，但u刪除接頭上不含起始碼)經被使用。首先，如上所述，得自pSD477的ClaI／Hpa I載體段與經退火配對的合成寡核苷酸SD42元體／SD40元體(序列辨識編號：8／序列辨識編號：9)

```
                ClaI              SacI          XhoI          HpaI
SD42mer   5'  CGATTACTAGATCTGAGCTCCCCGGGCTCGAGGGATCCGTT    3'
SD40mer   3'    TAATGATCTAGACTCGAGGGGCCCGAGCTCCCTAGGCAA    5'
                      BglII          SmaI          BamHI
```

接合而產生質體pSD478。其次，於pUC／牛痘接頭的Eco RI址利用Eco RI分解pSD478而被破壞，接著使用大腸桿菌聚合酶Klenow段產生鈍端-及接合，而產生質體pSD478E⁻。pSD478E⁻以Bam HI及Hpa I分解及與經退火配對的合成寡核苷酸HEM5／HEM6(序列辨識編號：10／序列辨識編號：11)

```
                BamHI EcoRI    HpaI
HEM5   5'   GATCCGAATTCTAGCT   3'
HEM6   3'       GCTTAAGATCGA   5'
```

接合，而產生質體pSD486。pSD486用作給予者質體，以供與重組體牛痘病毒vP533重組，產生vP553，該vP553於X-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

gal存在下，為呈透明斑予以分離。

建構刪失ATI區(A26L)之質體pMP494△

現在參照第13圖，pSD414含有選殖入pUC8之Sal B。欲求去除A26L區左方不期望的DNA序列，pSD414在牛痘序列(pos. 137079)內，以Xba I切斷，並在pUC／牛痘接頭處以HindIII切斷之，然後以大腸桿菌聚合酶Klenow段加鈍端並接合，而獲得質體pSD483。欲求去除A26L區右方不期望的牛痘DNA序列，pSD483以Eco RI切斷(pos. 140665及於pUC／牛痘接頭)並接合而生成質體pSD484。欲去除A26L編碼區，pSD484以在A26L ORF略微上游的Nde I(部分)切斷(pos.139004)及於A26L ORF略為下游以Hpa I切斷(pos. 137889)。分離5.2kb載體段且與退火配對的合成寡核苷酸ATI3／ATI4(序列辨識編號：12／序列辨識編號：13)

```
          NdeI
ATI3   5' TATGAGTAACTTAACTCTTTTGTTAATTAAAAGTATATTCAAAAAATAAGT
ATI4   3'   ACTCATTGAATTGAGAAAACAATTAATTTTCATATAAGTTTTTTATTCA

                    BglII EcoRI HpaI
              TATATAAATAGATCTGAATTCGTT  3' ATI3
              ATATATTTATCTAGACTTAAGCAA  5' ATI4
```

接合，重新建構A26L上游區，並以如前述之含限制址Bgl II，Eco RI及Hpa I之短聚聯結子區置換A26L ORF。所得質體定名為pSD485。由於pSD485之聚聯結子區內的Bgl II及Eco RI址皆非獨特，故使用Bgl II(pos. 140136)及於pUC／牛痘接頭使用Eco R分解，接著以大腸桿菌聚

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

合酶Klenow段加鈍端及接合，而由質體pSD483(前述)去除不期望的Bgl II及Eco RI址。所得的質體命名為pSD489。得自含有A26L ORF之pSD489的1.8kbCla I(pos.137198)／EcoRV(pos. 139048)段以得自pSD485的對應的0.7kb含聚聯結子之Cla I／Eco RV段置換，產生pSD492。pSD492之聚聯結子區內之Bgl II及Eco RI址為獨特。

含有處於牛痘11KDa起動子控制之下(Bertholet et al., 1985；Perkus et al., 1990)之含有大腸桿菌β-半乳糖苷酶基因(Shapira et al., 1983)的3.3kb Bgl II卡匣插入pSD492之Bgl II址，生成pSD493KBG。質體pSD493KBG與救援病毒vP553重組。重組型牛痘病毒vP581，其於A26L刪除區含β-半乳糖苷酶，可在X-gal存在下呈藍斑，予以分離。

欲產生一用於自牛痘重組型病毒vP581去除β-半乳糖苷酶序列用之質體，使用合成寡核苷酸MPSYN177(序列辨識編號：14)

(5' AAAATGGGCGTGGATTGTTAACTTTATATAACTTATTTTTTGAATATAC 3')

藉突變作用(Mandecki, 1986)刪除質體pSD492之聚聯結子區。所得質體pMP494△中，包含位置(137889-138637)（該位置包含全體A26L ORF）之牛痘DNA被刪除。pMP494△與含β-半乳糖苷酶牛痘重組體vP581間的重組，獲得一牛痘刪除變異體vP618，該變異種於X-gal存在之下係呈透明斑，而予以分離。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

建構刪失血液凝集素基因(A56R)之質體pSD467

現在參照第14圖，牛痘SalⅠG限制段(pos.160744-173351)橫跨Hind III A／B接頭(pos.162539)。pSD419含有選殖入pUC8的牛痘SalⅠG。血液凝集素(HA)基因之轉錄方向係以第14圖的箭頭指示。由Hind III B衍生而得之牛痘序列，藉由Hind III在牛痘序列內在之UC／牛痘接頭分解pSD419，而後再予接合，而被去除。所得質體pSD456含有HA基因A56R，此基因向左側伸出0.4kb牛痘序列及向右側旁出0.4kb牛痘序列。A56R編碼序列，係以距離A56R編碼序列上游且接近基因的EagⅠ(pos. 162054)之RsaI(部分；pos. 161090)切斷pSD456，予以去除。得自pSD456之3.6kb RsaⅠ／EagI載體段分離出，並與經退火配對的合成寡核苷酸MPSYN59(序列辨識編號：15)，MPSY62(序列辨識編號：16)，MPSYN60(序列辨識編號：17)，及MPSYN61(序列辨識編號：18)

```
          RsaI
MPSYN59 5' ACACGAATGATTTTCTAAAGTATTTGGAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGA-
MPSYN62 3' TGTGCTTACTAAAAGATTTCATAAACCTTTCAAAATATCCATCAACTATCT  5'

MPSYN59    -ACAAAATACATAATTT 3'

                                                      BglII
MPSYN60 5'                    TGTAAAAATAAATCACTTTTTATACTAAGATCT-
MPSYN61 3' TGTTTTATGTATTAAAACATTTTTATTTAGTGAAAAATATGATTCTAGA-
```

```
                    SmaI  PstI  EagI
MPSYN60    -CCCGGGCTGCAGC        3'
MPSYN61    -GGGCCCGACGTCGCCGG    5'
```

接合而重新構成在A56R ORF上游的DNA序列，並如前所述

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

，以聚聯結子區置換A56R ORF。所得質體為pSD466。於pSD466之牛痘刪除區包括位置〔161185-162053〕。pSD466中此刪除的刪除於第14圖以三角形表示。

於牛痘11 KDa起動子控制之下(Bertholet et al., 1985；Guo et al., 1989)之含大腸桿菌β-半乳糖苷酶基因(Shapira et al., 1983)的3.2kb Bgl II／Bam HI(部分)卡匣插入pSD466之Bgl II址，生成pSD466KBG質體。質體pSD466KBG用來與救援病毒vP618重組。含在A56R刪失區含β-半乳糖苷酶之重組型牛痘病毒vP708係以在X-gal存在下呈藍斑加以分離。

使用給予者質體pSD467，從vP708刪除β-半乳糖苷酶基因。pSD467與pSD466相同，但其藉由使用Eco RI／BamHI分解pSD466，而後使用大腸桿菌聚合酶Klenow加鈍端並接合，而由pUC／牛痘接頭中去除Eco RI，Sma I，及BamHI址。vP708與pSD467間之重組生成重組型牛痘刪除變異體vP723，該變異體於X-gal存在下呈透有斑，予以分離。

建構刪失開放讀碼架構〔C7L-K1L〕之質體pMPCSK1△

現在參照第15圖，使用如下牛痘殖株用來建構pMPCSK1△。pSD420為選殖入pUC8的Sal IH。pSD435為選殖入pUC18之Kpn I F。pSD435以Sph I切斷及再度接合而生成pSD451。於pSD451中，於Hind III中位在Sph I址(pos.27416)左側的DNA序列被去除(Prekus et al., 1990)。pSD409為M選殖入pUC8之HindIII。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

欲提供從牛痘刪除〔C7L-KIL〕基因簇用之基質，首先，如下所述，將大腸桿菌β-半乳糖甘酶述插入牛痘M2L刪除位址(Guoet al., 1990)。欲求消除pSD409之Bgl II址，質體係在牛痘序列(pos. 28212)內以Bgl II切斷並於pUC／牛痘接頭處以Bam HI切斷，然後接合生成pMP409B。pMP409B於獨特Sph I址(pos.27416)切斷。使用合成寡核苷酸MPSYN82(序列辨識編號：19)

BglII
5' TTTCTGTATATTTGCACCAATTTAGATCTTACTCAAAA
TATGTAACAATA 3'

，藉由突變，去除M2L編碼序列(Guo et al., 1990；Mandecki, 1986)。所得質體pMP409D含有插入如前述之M2L刪除區的獨特Bgl II址。含有於11KDa起動子控制之下(Bertholet etal., 1985)之大腸桿菌β-半乳糖甘酶基因(Shapiraet al., 1983)的3.2Bam HI(部分)／Bgl II卡匣插入以BglII切斷的pMP409D內。所得質體pMP409DBG(Guo et al., 1990)用作給予者質體，以供與救援牛痘病毒vP723重組。含有插入M2L刪失址之β-半乳糖甘酶的重組型牛痘病毒vP784於X-gal存在下呈藍斑，予以分離。刪除牛痘基因〔C7L-KIL〕的質體組配入以Sma I，Hind III切斷且以大腸桿菌聚合酶Klenow段加鈍端的pUC8內。由牛痘HindIIIC序列組成之左側延伸臂之製得如下所示：以XbaI分解pSD420(pos. 18628)，接著以大腸桿菌聚合酶Klenow段加鈍端，再以Bgl II消化(pos. 19706)。由牛痘HindIII K序列之右側伸出臂，係以Bgl II(pos. 29, 062)及EcoRV

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

(pos. 29, 778)分解pSD451而得。所得質體pMP581CK刪除了介於Hind IIIC內之Bgl II址(pos. 19706)與HindIII K內之Bgl II址(pos. 29062)間之牛痘序列。質體pMP581ck中牛痘序列之刪除址於第15圖中以三角形指示。

欲去除於牛痘刪除接頭之過多DNA，質體pMP581ck於位在牛痘序列內之Nco I址(pos. 18811；19655)切斷，以Bal-31外切酶處理，並使用合成寡核苷酸MPSYN233(序列辨識編號：20)5' TGTCATTTAACACTATACTCATATTAATAAAAATAATATTTATT3' 進行突變(Mandecki, 1986)。所得質體pMPCSK1△係在牛痘序列位置18805-29108（含括12牛痘開放讀碼架構〔C7L-KIL〕）上刪除。pMPCSK1△與含β-半乳糖苷酶之牛痘重組體vP784間之重組，導致生成牛痘刪除變異體vP804，該變異體於X-gal存在之下係呈透明斑，而予以分離。

建構刪失大次單位，核糖核苷酸還原酶(I4L)的質體pSD548

現在參照第16圖，質體pSD405含有選殖入pUC8的牛痘Hind III I(pos63, 875-70, 367)。pSD405於牛痘序列(pos.67933)內以Eco RV分解，且於pUC／牛痘接頭處以SmaI分解，再予接合，以生成質體pSD518。pSD518用作建構pSD548中用的全部牛痘限限片段的來源。

牛痘I4L基因由位置67371延伸至65059。I4L之轉錄方向以箭頭示於第16圖。欲獲得一刪除部分I4L編碼序列之載體質體段，pSD518以Bam HI(pos. 65, 381)及Hpa I

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

(pos.67, 001)分解，並使用大腸桿菌聚合酶kLENOW段加鈍端。此4.8kb載體段與含有於牛痘11KDa起動子控制之下(Bertholet et al., 1985；Perkus et al., 1990)之大腸桿菌β-半乳糖苷酶基因(Shapiraet al., 1983)的3.2kbSmaI卡匣接合，生成質體pSD524KBG。pSD524KBG用作給予者質體，以供與牛痘病毒vP804重組。於I4L基因上部分刪除之含有β-半乳糖苷酶的重組牛痘病毒vP855，於X-gal存在下呈藍斑，而予以分離。

欲從vP855刪除β-半乳糖苷酶及其餘I4L ORF，建構刪除質體pSD548。向左及向右伸出牛痘臂分別於pUC8內組配，其詳述內容如下所述，且示意說明於第16圖。

欲建構載體質體來接受向左申出的牛痘臂，pUC8以BamHI／Eco RI切斷，並與退火配對的合成寡核苷酸518A1／518A2(序列辨識編號：21／序列辨識編號：22)

```
          BamHI    RsaI
518A1   5' GATCCTGAGTACTTTGTAATATAATGATATATATTTTCACTTTATCTCAT
518A2   3'      GACTCATGAAACATTATATTACTATATATAAAAGTGAAATAGAGTA

                     BglII     EcoRI
TTGAGAATAAAAAGATCTTAGG       3'    518A1
AACTCTTATTTTTCTAGAATCCTTAA   5'    518A2
```

接合，生成質體pSD531。pSD531以Rsa I(部分)及Bam HI切斷，而分離出2.7kb載體段。pSD518以Bgl II(pos. 64, 459)／Rsa I(pos. 64, 994)切斷，並分離出0.5kb段。將此二段接合在一起，生成含有對I4L編碼序列之向左伸出的完整牛痘臂之pSD537。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

欲建構載體質體來接受向右伸出的牛痘臂，pUC8以BamHI／Eco RI切斷，並經退火配對的合成寡核苷酸518B1／518B2(序列辨識編號：23／序列辨識編號：24)

```
          BamHI BglII SmaI
518B1   5'  GATCCAGATCTCCCGGGAAAAAAATTATTTAACTTTTCATTAATAGGGATTT
518B2   3'      GTCTAGAGGGCCCTTTTTTTAATAAATTGAAAAGTAATTATCCCTAAA

                  RsaI   EcoRI
GACGTATGTAGCGTACTAGG       3'   518B1
CTGCATACTACGCATGATCCTTAA    5'   518B2
```

接合，生成質體pSD532。pSD532以Rsa I(部分)及Eco RI切斷，分離出2.7kb載體段。pSD518於牛痘序列(pos. 67436)內以Rsa I切斷，且於牛痘／pUC接頭，以Eco RI切斷，以分離出0.6kb段。將此二段接合在一起，生成含有對I4L編碼序列向右伸出完整牛痘臂之pSD538。

向右伸出的牛痘臂呈0.6kb Eco RI／Bgl II段，而由pSD538中分離出，並接合入以Eco RI／Bgl II切斷的pSD537載體質體內。所得質體pSD539中，I4L ORF(pos. 65047-67386)為聚聯結子區所置換，該聚聯結子區向左側伸出0.6kb牛痘DNA及向右側伸出0.6kb牛痘DNA，全體皆於pUC背景內。在牛痘序列中之刪除址於第16圖以三角形指示。欲避免於pSD539之pUC衍生部分內之β-半乳糖苷酶序列與重組型牛痘病毒vP855內之β-半乳糖苷酶序列間可能的重組，將牛痘I4L刪除卡匣從pSD539移入pRC11，pRC11為一種，其中所有β-半乳糖苷酶序列皆已去除且置換以聚聯結子區之pUC衍生物(Colinas etal., 1990)。pSD539

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

以EcoRI／Pst I切斷並分離出1.2kb段。將此段接合入以Eco RI／Pst I(2.35kb)切斷的pRC11，以生成pSD548。pSD548與含β-半乳糖苷酶牛痘重組體vP855間重組生成牛痘刪除變異體vP866，該變異體於X-gal存在下以呈透明斑者加以分離。

得自重組型牛痘病毒vP866之DNA藉限制分解，接著於瓊脂凝膠上藉由電泳進行分析。限制圖譜係如所預期者。使用vP866作模版及如前詳伸出的6刪除位址的引子進行聚合酶連鎖反應(pCR)(Engelke et al., 1988)生成具有期望尺寸之DNA段。對刪除接頭區附近產生PCR之段進行序列分析證實，接頭係如所預期者。如前述含6經基因工程處理之刪除的重組型牛痘病毒vP866定名為牛痘疫苗種株“NYVAC”。

實施例8-建構可表現麻疹融合及血液凝集素糖蛋白之NYVAC-MV重組體

編碼麻疹病毒MV(Edmonston種株)之HA及F序列的cDNA複製本插入NYVAC，而產生定名為NYVAC-MV之雙重重組體。重組體於感染細胞表面確實可表現二麻疹糖蛋白。免疫沈澱分析證實F及HA糖蛋白二者係經正確的加工。重組體也顯示可誘發合胞體的形成。

細胞及病毒

使用於產生NYVAC-MV的救援病毒為定名為NYVAC之經修飾的牛痘病毒哥本哈哏種株。所有病毒皆於Vero細胞單層上生長及測定力價。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

質體之建構

質體pSPM2LHA(Taylor et al., 1991)含完整麻疹HA基因，此基因在如前已述的牛痘病毒H6起動子上以正確的ATG至ATG構型聯結(Taylor et al., 1988, b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989)。由pSPM2LHA分離出1.8Kpb Eco V／Sma I段，其包含以正確ATG：ATG構型與缺少最3' 端26bp的HA基因相融合的H6起動子3' 端之24bp。此段用來置換pSPMHHA11之1.8kbp Eco RV／Sma I段(Taylor et al., 1991)，以生成pRW803。質體pRW803含與完整麻疹HA基因正確聯結的完整H6起動子。

在證實帶有麻疹HA基因之前述建構體中，發現與已公開的序列(Alkhatib et al., 1986)相比，編碼子18序列(ccc)係已被刪失。CCC序列經由Kunkel方法(Kunkel, 1985)，利用寡核苷酸RW117(序列辨識編號：39)

(5'GACTATCCTACTTCCCTTGGGATGGGGGTTATCTTTGTA-3').

PRO 18

而以寡核苷酸突變方式加以置換。單股的模版係衍生自質體pRW819，該質體含有在pIBI25中得自pRW803之H6／HA卡匣(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)。含有一在編碼18上編碼脯胺酸殘基之插入物(CCC)的突變質體被定名為pRW820。介於pRW820之Hind III與Xba I址間之序列，由核苷酸序列分析獲得證實。Hind III址位在H6起始碼之5' 緣，而Xba I址位在HA基因起始碼下游之230bp。得

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

自pRW803之1.6Kbp Xba I／Eco RI段（其含有Xba I下游之HA編碼序列(如上述)且含括終止碼）用來置換pRW820之對等段，以生成pRW837。含於pRW837內的突變表現卡匣係如下所衍生出的：經由以Hind III及Eco RI分解，於2mM dNTPs存在下，使用大腸桿菌DNA聚合酶Klenow段加鈍端，及插入pSD513之Sma I址，生成pRW843。質體pSD513係經由加入聚聯結子序列而從質體pSD460衍生而得。質體pSD460從牛痘病毒所衍生成之可刪除胸腺核苷激酶(第11圖)者。

欲將麻疹病毒F基因插入HA插入質體，須於pSPHMF7進行操作。質體pSPHMF7(Taylor et al., 1991)含有恰位在前述牛痘病毒H6起動子之3'緊鄰之麻疹F基因。欲對ATG構型達成一完整的ATG並去除介於起動子3'端與麻疹F基因ATG間之介入序列，利用寡核苷酸SPMAD(序列辨識編號：40)

SPMAD: 5'- TATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGGGTCTCAAGGTGAACGTCT-3'

進行寡核苷酸指導突變。所得質體定名為pSPMF75M20。

含有以正確的ATG構型與H6起動子聯結之麻疹F基因的質體pSPMF75M20以Nru I及Eag I分解。分離出含有H6起動子最3'端27bp及完整融合基因的1.7Kbp鈍端段，及插入已經使用Nru I及Xba I分解並加鈍端的中間質體pRW823內。所得質體pRW841含有在pIBI25質體載體內中與麻疹F基因聯結(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)之H6

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

起動子。H6／麻疹F卡匣經由以Sma I分解而從pRW841切除，所得1.8kb段插入pRW843(含麻疹HA基因)內。質體pRW843首先以Not I分解及，再以大腸桿菌DNA聚合酶Klenow段於2mM dNTPs存在下加鈍端。因而，所得之質體pRW857含有以尾對尾構型聯結之麻疹病毒F及HA基因。二基因皆與牛痘病毒H6起動子聯結。

NYVAC-MV之發展

使用已揭露之磷酸鈣沈澱法，將質體pRW857性狀感染已為NYVAC所感染的Vero細胞(Panicali et al., 1982；Piccini etal., 1987)。基於與對MV F及HA專一性的放射性標幟探針進行原地溶菌斑雜交，選出陽性斑，再經由連續進行6回合溶菌斑純化，直到獲得純株群為止。然後擴增一代表性的溶菌斑，所得重組體定名為NYVAC-MV(vP913)。

實施例9-JEV基因選殖入牛痘病毒給予者質體

牛痘病毒vP410哥本哈根種株之胸腺核苷激酶變異體(Guo et al., 1989)用來產生重組體vP825, vP829, vP857及vP864(參見下文)。vP555之生成已如前述(Mason et al., 1991)。所有牛痘病毒儲液皆以VERO(ATCC CCL81)細胞內在添加10%熱失活胎牛血清(FBS)的鷹氏最低必要培養基內所生成。生物合成研究係使用VERO細胞於37℃於補充5%FBS及抗生素的MEM中生長進行，或於相同條件下但使用10%FBS及非必要胺基酸生長的HeLa(ATCC CCL2)細胞內進行。全活體外實驗中所用JEV病毒為澄清的培養液

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

，此培養液係自感染有JEV Nakayama種株55繼培養代乳鼠腦懸浮液之C6／36細胞(Mason, 1989)中製得 。使用高度致病性JEVP3種株，進行動物挑釁實驗(多重鼠繼培養代；Huang, 1982)。

經由使用Moloney鼠白血病病毒反錄酶(GIBCO／BRL，馬利蘭州，蓋茲堡市)(D' Alessio and Gerrard, 1988)藉Okayama及Berg(1982)之修飾方法，獲得編碼JEV C蛋白質之cDNA。藉Repik et al., (1983)之方法，從感染有JEVNakayama種株55繼代培養乳鼠腦儲液之C6／36細胞懸浮培養製得的病毒粒子中，分離出基因組RNA。第一股cDNA合成係從與JEV E編碼區鹼基986至1005互補的合成寡核苷酸為引子延伸(第17A及B圖)(序列辨識編號：52)。雙股cDNA與含Eco RI址之合成寡核苷酸接合(新英格蘭生物實驗室，麻省，貝佛利市)，插入經磷酸酶處理經Eco RI割裂的pBR322內(新英格蘭生物實驗室)，所得DNA性狀轉變大腸桿菌株DH5細胞GIBCO／BRL)。質體係經限制酶分析，並鑑別出含對應於非編碼RNA及C及prM編碼區的81核苷酸之cDNA的質體(pC20)。pC20於聯結子址以Eco RI分解，且於位在ATG起始碼5' 28bp的內部Dra I址與所得含C及prM編碼區之段插入經Sma I-Eco RI分解的PUC18內，生成質體pDr20。pC20之C編碼區序列，與JEV Nakayama種株之現令的prM, E, NS1, NS2A及NS2B編碼區之序列組合，顯示於第17A及B(序列辨識編號：52)。全體核苷酸配位皆基於此最新序列，而編號始於C蛋白質Met起始碼。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂　線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

於pUC18(參見上文)之Sma I及Eco RI址上含有JEV cDNA(核苷酸-28至1000)的質體pDr20，以Bam HI及Eco RI分解，且將該JEV cDNA插入子選殖入pIBI25(國際生物技術公司，康州，新港市)中，產生質體JEV18。JEV18於JE序列(核苷酸24)內以Apa I分解，及於pIBI25內以Xho I分解，再與經退火配對的寡核苷酸J90(序列辨識編號：54)及J91(序列辨識編號：55)(含Xho I黏端，Sma I址，及JE核苷酸1至23)接合，產生殖體JEV19。JEV19於pIBI25內以Xho I分解，及JE序列(核苷酸602)內以AccI分解，所得613bP段選殖入JEV2之Xho I及Acc I段(第1圖)〔其含質體起點及編碼prM羧端40%及E之胺基端2／3之JEV cDNA(核苷酸603至2124)〕，產生質體JEV20，此質體含有於E之最後1／3所見之由C之ATG延伸過SacI址(核苷酸2124)之JE序列。

得自JEV8(類似JEVL質體(第1圖)，其中TTTTTGT核苷酸1304至1310轉成TCTTTGT)之Sma I-Sac I段，其含有E之最後1／3延伸經NS2B之首二胺基酸(核苷酸2124至4126)、質體起點及牛痘病毒的JE序列，係與得自JEV20經純化的Sma I-Sac I插廿子接合，而得JEV22-1。對應於用來構成JEV22-1之獨特Sma I址的6bp，則使用寡核苷酸指導雙股斷裂突變方式(Mandecki，1986)去除，生成JEV24，其中H6起動子恰位在ATG起動字碼子前。

質體JEV7(第2圖)於JE序列內以Sph I消化(核苷酸2381)及於IBI24內以Hind III消化。與經退火配對的J94及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

J95〔含Sph I黏端，轉譯中止，牛痘早期轉錄終結信號(TTTTTAT；Yuen et al., 1987)，轉譯中止，Eag I址及HindIII黏端〕接合而生成質體JEV25，該質體包含自位於E之末1／3之Sac I址(核苷酸2124)延伸至E之羧基端的JEcDNA。得自JEV25之Sac I-Eag I段與JEV8之Sac I-Eag I段(含編碼著15aa C，prM及E核苷酸337至2124之胺基端2／3的之JE cDNA，質體起點及牛痘序列)之Sac I-EagI段接合，獲得質體JEV26。如前述，去除ATG起始碼前方的特獨Sma I址，生成H6起動子恰位在ATG起始碼前方之JEV27。

將寡核苷酸J96，J97，J98及J99(含JE核苷酸2293至2380帶有Sph I黏端)經激酶化，退火配對並接合至經SmaI-SphI分解之經鹼性磷酸酶處理的pIBI25，生成質體JEV28。JEV28於JE序列(核苷酸2301)內以Hpa I分解，且於pIBI25序列內以Hind III分解，並以鹼性磷酸酶處理之。與得自JEV1之Hpa I-Hind III段或與得自JEV7之Hpa I-Hind III段(第2圖)接合，獲得JEV29〔含Sma I址，接著為編碼30aaE，NS1，NS2A之JE cDNA(核苷酸2293至4125)〕及JEV30〔含Sma I址，接著為編碼30aa E，NS1，NS2A，NS2B之JEcDNA(核苷酸2293至4512)〕。

得自JEV29之Sma I-Eag I段與經Sma I-Eag I分解之pTP15接合(Mason et al., 1991)，獲得JEV31。對應於用來生成JEV31的獨特Sma I址之6bp，如前述加以去除，以生成H6起動子恰位在ATG起始字碼子前方之JEV33。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

得自JEV30之Sma I-Eag I段與經Sma I-Eag I分解的pTP15接合，得到JEV32。對應於用來生成JEV32之獨特SmaI址之6bp，如前述加以去除，以生成H6起動子恰位在ATG開始字碼子前方之JEV34。寡核苷酸J90(序列辨識編號：25)，J91(序列辨識編號：26)，(序列辨識編號：28)，J96及J97(序列辨識編號：29)，及J99及J98，J94(序列辨識編號：27)，J95(序列辨識編號：30)如下：

```
J90   5'-TCGAG CCCGGG atg ACTAAAAAACCAGGA GGGCC-3'
J91   3'-    C GGGCCC TAC TGATTTTTTGGTCCT C    -5'
        XhoI    SmaI                        ApaI

J94   5'-    C T tga tttttat tga CGGCCG A    -3'
J95   3'-GTACG A ACT AAAAATA ACT GCCGGC TTCGA-5'
        SphI                      EagI   HindIII

J96+J97    5'-GGG atg GGCGTTAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTTAGCC
J99+J98    3'-CCC TAC CCGCAATTGCGTGCTCTGGCTAGTTAACGAAACCGGAAGAATCGG

             ACAGGAGGTGTGCTCGTGTTCTTAGCGACCAATGT GCATG-3'
             TGTCCTCCACACGAGCACAAGAATCGCTGGTTACA C    -5'
                                                 SphI
```

牛痘病毒重組體之建構

曾經敘述將重組體給予者質體性狀感染入已為救援牛痘病毒感染的組織培養細胞內，以及經由於硝基纖維素濾片上進行原地雜交鑑別重組體之步驟（Panicali et al., 1982；Guo et al., 1989）。JEV24，JEV27，JEV33及JEV34性狀感染入經vP410感染細胞，以分別生成牛痘重組體vP825，vP829，vP857及vP864(第18圖)。

活體外病毒感染及放射性標幟

HeLa細胞單層於直徑35mm皿中製備，並在放射性標記

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

前，以牛痘病毒(m.o.i.為2)或JEV(m.o.i.為5)感染之。感染後16小時，細胞以含^{35}S-Met之培養基加上脈衝標幟，且恰如Mason et al., (1991)所述，且過量未標幟Met存在下追蹤6小時。JEV感染細胞，如前述，加放射性標幟，以供利用放射性免疫沈澱法檢測挑釁前及挑釁後鼠血清之具放射活性蛋白質的準備。

放射性免疫沈澱，聚丙烯醯胺膠電泳，及內糖苷酶處理

收穫加放射性標幟之細胞產物及培養液，病毒蛋白質經免疫沈澱，以內核苷酸酶分解，並如Mason(1989)所述，於含SDS之聚丙烯醯胺膠(SDS-PAGE)上分離。

動物保護實驗

小鼠保護實驗係恰如Mason et al., (1991)所述進行。簡言之，多組3周齡小鼠藉腹內(ip)注射10^7pfu牛痘病毒作免疫接種，3週後從特選的小鼠中收集血清。然後小鼠或再度接種重組型病毒或藉ip注射已感染JEV P3種株的乳鼠腦懸浮液加以挑釁。3週後，將追加接種的動物再度採血並以JEV之P3種株加以挑釁。挑釁後，每日觀察小鼠，經歷3週，同時使用實驗動物之同一窩動物於，各挑釁試驗中進行致命劑量滴定反應。此外，挑釁後4週由所有存活動物收集血清。

評估對重組型牛痘病毒之免疫反應

恰如Mason et al., (1991)所述，係測試血清自經清潔劑處理的細胞產物或得自經^{35}S-Met-標幟 JEV-感染細胞之培養液中沈澱JEV蛋白質的能力。血液凝集抑制(HAI)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

及中和(NEUT)試驗係如Mason et al., (1991)所述進行，但於上方鋪設的培養基使用1%羧甲基纖維素，且培育5日來觀察NEUT試驗之溶菌斑。

重組型牛痘病毒之構造

建構4種不同由C延伸至NS2B之JEV編碼區之表現部份的牛痘重組體(於HA位址)。此等重組型病毒所含之JEV cDNA序列示於第18圖。全部4種重組型病毒中，JEV cDNA之有意義股位在牛痘病毒早期／晚期H6起動子之後方，且其轉譯由位在病毒cDNA序列5'端之天然JEV Met碼開始。

重組體vP825編碼著膜鞘蛋白質C，結構蛋白前驅物prM，結構糖蛋白E，非結構糖蛋白NS1，及非結構蛋白NS2A(McAda et al., 1987)。重組體vP829編碼著prM胺基端前方推定的15aa信號序列以及prM及E(McAda et al., 1987)。重組體vP857含編碼E之30aa疏水羧基端，接著為NS1及NS2A之cDNA。重組體vP864含如同編碼vP857之蛋白質但添加NS2B之cDNA。於重組體vP825及vP829內E中，可能的牛痘病毒早期轉錄終結信號(TTTTTGT；核苷酸1399-1405)被修飾成TCTTTGT，但未改變aa序列。此種改變嘗試提高E之表現水平，因為於此種序列於活體外轉錄分析中顯示可提高轉錄終結(Yuer et al., 1987)。

當經由重組型牛痘病毒表現時E及prM可經適當加工

脈衝-追蹤實驗驗證：大小與E相同之蛋白質係在以所有含E基因的重組體牛痘病毒所感染細胞內合成(表3)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

。以JEV，vP555及vP829感染細胞為例，於感染細胞收穫的培養液中也測得於SDS-PAGE中遷移較緩慢的E蛋白質（表３）。經由JEV-及vP555感染細胞所生成的胞外形式之E含成熟N-聯結葡萄聚糖（Mason，1989；Mason etal.，1991），可由vP829感染細胞所生成的胞外形式E證實者一般。有趣地，含有除了prM及E還有C編碼區之vP8明顯合成不會釋放入胞外液體的E形式（表３）。使用對M（及prM）專一性之Mab，而由放射性標幟牛痘感染細胞製得之免疫沈澱物，顯示prM係於vP555，vP825，及vP829感染細胞內合成，而M係於vP555或vP829感染細胞之培養鄉液內檢測出（表３）。

從vP555及vP829感染細胞收穫而得之胞外液體中含有HA活性，但於vP410，vP825，vP857或vP864感染細胞之培養液體內，則未檢測得此種活性。於vP829感染細胞之培養液中觀察得之HA活度為vP555感染細胞所得者之８倍高。基於HA活性受抗-JEV抗體及其最適當pH（Mason et al.，1991）的感染，此種HA顯然類似JEV感染細胞所產生的HA。使用得自感染細胞的培養流體作蔗糖密度梯度分析，於vP829樣品內鑑定出HA的活性峰，此峰與JEV培養液內所見緩慢沈澱的血液凝集素（SHA）之峰共同移動（表３）。此結果指示vP829感染細胞所產生的胞外粒子，類似於vP555感染細胞收穫的培養液內觀察到的含E及M之空病毒被膜（第９圖）。

當經由重組牛痘病毒表現時NS1經適當加工並分泌出

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

脈衝-追蹤實驗結果驗證：於vP555，vP825，vP857，及vP864感染細胞內合成的蛋白質大小與真正NS1及NS1'相同（表３）。vP555感染細胞所產生的NS1以高分子量形戈釋放於感染細胞之培養液內。NS1也釋入vP857及vP864感染細胞培養流體內（表３）。比較由含編碼NS2A(vP857)或NS2A及NS2B(vP864)之編碼區的牛痘病毒所合成NS1，顯示是否存在有NS2B編碼區對NS1表現並無影響，此乃與先前適當NS2A基因是需要ND1A的資料符合一致(Ealgout et al., 1989；Mason et al., 1991)。vP825感染細胞釋放NS1之效率為vP555，vP857或vP864感染細胞內合成之NS1的效率高不到10倍。

重組型牛痘病毒誘生對JEV抗原之免疫反應

各組由特選動物匯集的挑釁前血清，試驗其免疫沈澱放射性標幟E及NS1的能力。研究結果(表３)驗證；(1)對E之免疫反應順序如下vP829>vP555>vP825，(2)所有NS1及NS2A編碼病毒皆可誘生抗NS1抗體，及(3)全部免疫反應皆因第二次接種重組病毒而提高。分析由此等動物收集得之血清的中和作用及HAI資料(表４)，證實免疫分析沈澱結果，此顯示以RIP驗證的抗E免疫反應與其他血清學試驗有密切關係(表４)。

以重組型病毒免疫接種可提供對抗致命JEV感染之保護作用

全體重組型牛痘病毒皆可對小鼠提供受周邊致病JEVP3種株之致命性感染提供若干保護(Huang，1982)(表４)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

研究驗證vP555之保護之潛力(Mason et al., 1991)並驗證對vP825及vP829接種動物，具有相同保護作用。對NS1誘發強力免疫反應的重組型病毒vP857及vP864顯示十分低的保護水平，但若與接種對照病毒vP410之小鼠（表４）比較時，接種重組體之小鼠顯然仍受保護。

挑釁後免疫反應驗證JEV複製水平

欲求對接種重組型病毒的動物保護不受致命感染之機轉有更多了解，係評估挑釁後血清內的抗體辨認JEV抗原之能力估。此等研究使用得自加放射性標幟之JEV感染細胞溶解產物的抗原，及檢視NS3蛋白質，此種蛋白質於高度免疫小鼠可誘生高水高水平抗體(Mason et al., 1987a)。研究結果（表５）顯示與其存活資料有密切關係：以可誘發高度保護水平的重組體病毒(vP829, vP555及vP825)免疫接種動物組，顯示對NS3之挑釁後反應低，而以僅表現NS1之重組體(vP857及vP864)免疫接種組之倖存者的血清，則顯示對NS3有十分高的挑釁後反應。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表３　由牛痘重組體表現之病毒的特徵化及其免疫反應

	vP555	vP829	vP825	vP857	vP864
表現胞內蛋白質	prM, E NS1	prM, E NS1	prM, E	NS1	NS1
分泌	M, E, NS1	M, E	NS1	NS1	NS1
粒子生成	＋	＋	－	－	－
免疫反應					
單	E	E	NS1	NS1	NS1
雙	E, NS1	E	E, NS1	NS1	NS1

單＝以10^7pfu牛痘重組體(ip)單次接種

雙＝以10^7pfu牛痘重組體(ip)種種兩次，間隔３週

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表４　小鼠之保護作用及免疫反應

保護	vP555	vP829	vP825	vP857	vP864
單	7／10	10／10	8／10	0／10	1／10
雙	10／10	9／10	9／10	5／10	6／10
中和力價					
單	1：20	1：160	1：10	<1：10	<1：10
雙	1：320	1：2560	1：320	<1：10	<1：10
HAI力價					
單	1：20	1：40	1：10	<1：10	<1：10
雙	1：80	1：160	1：40	<1：10	<1：10

單＝以10^7pfu牛痘重組體(ip)單一次接種及３週後以4.9×10^5 LD_{50}P3種株JEV(ip)挑釁

雙＝以10^7pfu牛痘重組體(ip)兩次接種，間隔３週，及３ 週後以1.3×10^3 LD_{50}P3種株JEV(ip)挑釁

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表5　挑釁後免疫反應

接種物	vP555	vP829	vP825	vP857	vP864
單	+	+	++	−[a]	++++
雙	+/−[b]	−	−	++	+++

\+　挑釁後血清內存在的NS3抗體

a　無存活小鼠

b　挑釁後血清內存在的NS3抗體量極低

實施例10-JEV基因嵌殖入牛痘(NYVAC)給予者質體

質體pMP2VCL(於KIL寄主範圍基因上游的牛痘序列內含聚聯結子區)於聚聯結子內以Hind III及Xho I分解；及與經退火配對的寡核苷酸SPHPRHA A至D接合，而生成

SPHPRHA A (SEQ ID NO:31) 5'-
AGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGT - 3'
SPHPRHA B (SEQ ID NO:32) 5'-
TGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTG
TATCGTAC - 3'
SPHPRHA C (SEQ ID NO:33) 3'-
TTATTAGTATTTAATAAAGTAATAGCGCTATAGGCAATTCAAACATAGCATGAGCT - 5'
SPHPRHA D (SEQ ID NO:34) 3' -
AGAAATAAGATATGAATTTTTCACTTTTATTTATGTTTCCAAGAACTCCCAACACAATTTAACTT
TCGCTCT - 5'

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

Sp126，其含Hind III址，H6起動子 -124至-1 (Perkus et al., 1989)及 Xho I，Kpn I，Sma I，Sac I及Eco RI址。

質體pSD544VC(含有環繞以聚聯結子區置換的HA基因址之牛痘序列及於6讀碼架構之轉譯終止碼)於聚聯結子內，以Xho I分解，以DNA聚合酶I Klenow段填入並以鹼性磷酸酶處理。SP126以Hind III分解，以Klenow處理並以Sma I分解而分離出H6起動子。H6起動子段接合至pSD544VC，生成SPHAH6，其於聚聯結子區，含有H6起動子(為順HA轉錄方向)。

質體JEV L16VC(第1圖)於H6起動上以Eco RV分解及於JEV序列(核苷酸2124)，在JEV序列上，以Sac I分解，而可分離出1789bp段。JEV L 14VC於T5NT後方之Eag I址以Ecl XI分解，以DNA聚合酶I之Klenow 段填充，並於JEV序列(核苷酸2124)以Sac I分解，而生成2005bp段。1789 bp Eco RV-Sac I及2005bp(Sac I-填入 Ecl XI)段接合至經Eco RV(H6內)與Sma I分解(聚聯結子內)且經鹼性磷酸酶處理的SP126，而生成JEV35。JEV35性狀感染入經vP866(NYVAC)感染細胞的內，以產生牛痘重組體vP908(第18圖)。

JEV35以Sac I(JE序列核苷酸2124內)及Ecl XI(T5NT後)分解，分離5497bp段，將其接合至JEV25之Sac I(JEV核苷酸2125)至Eag I段上(其含E之其餘2／3，轉譯中止子及T5NT)，生成JEV36。JEV36性狀感染入經vP866(NYVAC)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

感染細胞，而生成牛痘重組體vP923(第18圖)。

寡核苷酸SPHPRHA A至D(序列辨識編號：30)、(序列辨識編號：32)、(序列辨識編號：33)及(序列辨識編號：34)接合，而生成如下序列(序列辨識編號：56／序列辨識編號：57)

HindIII
A+B 5'- AGCTTCTTTATTCTATACTTAAAAAGTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTG
D+C 3'-　　AGAAATAAGATATGAATTTTTCACTTTTATTTATGTTTCCAAGAACTCCCAACAC

EcoRV
TTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTT A+B
AATTTAACTTTCGCTCTTTATTAGTATTTAATAAAGTAATAGCGCTATAGGCAATTCAA D+C

TGTATCGTAC -3'　　A+B
ACATAGCATGAGCT -5' D+C
XhoI

動物保護實驗

依Mason et al., (1991)所述的，進行小鼠保護實驗。多組3週齡小鼠，藉腹內(ip)注射10^7pfu牛痘病毒，免疫接種，3週後由選定的小鼠收集血清。然後，小鼠經由腹空注射經JEV P3種株(多代小鼠繼代培養；Huang, 1982)感染的乳鼠腦懸浮液，而加以挑釁。挑釁後，每日觀察小鼠，連續3週。

對JEV NYVAC重組體之免疫反應的評估

血液凝集素抑制(HAI)試驗係如Mason et al.,(1991)所述者進行。

以JEV NYVAC重組體免疫接種可提供保護而免於JEV的感染作用

NYVAC重組體vP908及vP923可誘生高水平之血液凝集

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

抗體，並保護小鼠對抗100,000LD$_{50}$以上的JEV(表６)。

表６　JEV NYVAC重組體保護小鼠免於致命性JEV腦炎之能力

免疫用病毒	挑釁前	存活／合計
NYVAC(vP866)	<1：10	0／12
vP908	1：80	11／12
vP923	1：80	10／10

免疫接種--一次接種10^7pfu，途徑：腹腔注射。

挑釁-免疫接種後３週，3.8×10^5LD$_{50}$ P3 JEV種株，途徑：腹腔注射。

實施例11-YF基因嵌殖入牛痘病毒給予者質體

使用牛痘病毒(WR 種株)VP293之寄主範圍之突變體(Perkus et al., 1989)，產生全部重組體(參見下文)。全部之牛痘病毒儲液，皆在培養於補充有5-10%胎牛血清(流動實驗室，維吉尼亞州，麥克林)之應氏MEM內的VERO(ATCC CCL81)或MRC-5(ATCCCCL171)中產生。

用來構成YF牛痘重組型病毒(純株10 III及純株28 III)的YF 17D cDNA純株係得自恆河(華盛頓大學醫學院，蒙大拿州，聖路易市)。所有核苷酸配位基皆衍生自Rice et al., 1985所述之序列資料。

含編碼著prM羧基端80%，E與NS1胺基端80%(核苷

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

酸537-3266)之YF cDNA的質體YFO，係經由將YF cDNA之AvaI至 Nsi I段 (核苷酸537-1658) 及 YF cDNA之)Nsi I至 Kpn I段 (核苷酸1659-3266) 選殖入經AvaI及Kpn I分解的IBI 25(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)所衍生而得。含編碼著C及prM胺基端20%(核苷酸119-536)之YE cDNA的質體YF1，係經由將YF cDNA之RsaI至AvaI段(核苷酸166-536)及經退火配對之寡SP46及SP47(含不可用的HindIII黏端，Xho I及Cla I址及YF核苷酸119-165)選殖入經Ava I及Hind III分解之IBI 25，衍生而得的。含編碼著E羧基端60%及NS1胺基端25%之YFcDNA的質體YF3，係經由將YFcDNA之Apa I至Bam HI段(核苷酸1604-2725)選殖入經ApaI及Bam HI分解的IBI 25，所生成的。含編碼著NS1羧基端20%、NS2A、NS2B及NS3胺基端20%之YFcDNA的質體YF8，係經由將YF cDNA之Kpn I至Xba I段(核苷酸3267-4940)選殖入經Kpn I及Xba I分解的IBI25內，所生成的。含編碼著NS2B羧基端60%與NS3胺基端20%之YFcDNA的質體YF9，係經由將YFcDNA之Sac I至XbaI段(核苷酸4339-4940)選殖入經Sac I及Xba I分解之IBI25內而生成的。含編碼著C羧基端25%，prM及E胺基端40%之YFcDNA的質體YF13，係經由將YF cDNA之Bal I至ApaI段(核苷酸384-1603)選殖入經Apa I及SmaI分解的IBI 25衍生而得。

寡核苷酸指導突變作用(Kunkel，1985)用來將於YF1中距離C基因胺基端49aa之能的牛痘病毒早期轉錄終結信

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

號（TTTTTCT核苷酸263-269及TTTTTGT核苷酸269-275）（Yuen et al., 1987）轉成（序列辨識編號：35）TTCTTCTTCTTGT，以生成質體YF1B，轉變YF3之E基因（距羧基端189aa之核苷酸1886-1893 TTTTTTGT轉變成TTCTTTGT及距離羧端8胺基酸之核苷酸2429-2435TTTTTGT至TTCTTGT），生成質體YF3B及YF3C。將得自YF3C之Pst I至Bam HI段（核苷酸1965-2725）交換成YF3B之對應段，以生成YF4，該YF4含E羧基端60%及NS1胺基端25%（核苷酸1604-2725）之編碼YF cDNA，且帶有二突變化的轉錄終結止信號。以得自YF4之ApaI至Bam HI段（核苷酸1604-2725）取代YF0中之對等區，生成質體含有編碼著prM羧基端80%，E及NS1胺基端80%（核苷酸537-3266）之YF cDNA且帶有二突變化的轉錄終結信號之質體YF6。質體YF6於IBI25序列以Eco RV分解及於核苷酸537以Ava I分解，且與得自YF1B之Eco RV至Ava I段（IBI 25內之Eco RV至核苷酸536之Ava I）接合，生成YF2，該YF2含有編碼C至NS1胺基端80%（核苷酸119-3266）之YFcDNA，於119帶有Xho I及Cla I址與4個突變化的轉錄終止信號。

前述寡核苷酸指導突變是用來，在質體YF3C中，將距離E之羧基端（核苷酸2402-2404）在前17aa且在ATG前插入Xho I址及ClaI址，生成YF5，且在質體YF13中，將距prM之羧基端19aa且在TAG前方之XhoI及Cla I址（核苷酸917-919）插入其中，生成FY14，將距離E之羧基端（核苷酸2384-2386）23aa的ATG前方之Xho I址插入質體YF3C，生成質

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

體YF25，及將Xho I址及ATG(核苷酸419)插入質體YF1內，C之羧基端21aa而生成YF45。

以得自YF5之Apa I至Bam HI段(核苷酸1640-2725)交換YF0之對應區，生成YF7，其包含編碼prM羧基端80%，E及NS1胺基端80%之YF cDNA(核苷酸537-3266)，於2402(距E之羧基端17aa)帶有Xho I及Cla I址及於2429-2435之經突變過的轉錄終結信號(距E之羧基端8aa)。以得自YF25之Apa I段至Bam HI段(核苷酸1604、2725)交換YF0之對應區，生成YF26，其含有編碼prM羧基端80%，E及NS1胺基端80%之YF cDNA(核苷酸537-3266)，且於核苷酸2384上，帶有XhoI址(距E之羧基端23aa)，並於2428-2435帶有突變化之轉錄終止信號(距E之羧基端8aa)。

以得自YF14之Ava I及Apa I段(核苷酸537-1603)取代YF6之對應區，而生成YF15，其含有編碼prM羧基端80%，E及NS1胺基端80%之YF cDNA(核苷酸537-3266)，且於核苷酸917上，帶有Xho I及Cla I址(距prM之羧基端19aa)，並帶有二經突變過之轉錄終止信號。YF6於IBI25內以Eco RV分解，而於YF內，則於核苷酸537位置上，以Ava I分解，再將其與YF45之Eco RV(IBI25內)至AvaI段接合，生成YF46，其含有編碼C至NS1胺基端80%(核苷酸119-3266)之YF cDNA，且於419位置上，帶有Xho I址(距C之羧基端21aa)，且帶有二個被除去的轉錄終結止信號。

前述寡核苷酸指導突變，是用來將於將質體YF9的NS2B之羧基端上插入Sma I址(核苷酸4569)，生成YF11，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

及將於質體YF8之NS2A之羧基端處插入Sma I址（核苷酸4180），而生成YF10。得自YF11之Sac I至Xba I段（核苷酸4339-4940），與得自YF8之Asp 718至Sac I段（核苷酸3262-4338），與經Asp718及Xba I分解的IBI25接合，而生成YF12，其含有編碼ns1羧基端20%、NS2A、NS2B及NS3胺基端20%之YFcDNA(核苷酸3262-4940)，且在NS2B之羧基端後方帶有一Sma I址（核苷酸4569)。

質體PHES4含有牛痘KIL寄主範圍基因，早期／晚期牛痘病毒H6起動子，獨有的多選殖限制址，轉譯中止碼與早期轉錄終止信號(Perkus et al., 1989)。將得自YF12編碼著NS1羧基端20%、NS2A及NS2B之Kpn I至Sma I段（核苷酸3267-4569)、得自YF15之編碼著19aa prM, E及NS1胺基端80%之Xho I至Kpn I段（核苷酸917-3266)與經Xho I-Sma I分解之pHES4接合，而生成YF23。得自YF26編碼著23aaE、NS1胺基端25%之Xho I至Bam HI段（核苷酸2384-2725)接合至得自YF23之Xho I至Bam I段（含NS1羧基端75%，NS2A及NS2B，複製起點及牛痘序列），而生成YF28。

經Xho I-Sma I分解之pHES4接合至得自YF7編碼著17aaE及NS1胺基端80%之經純化的Xho I至Kpn段（核苷酸2402-3266)，並加上得自YF10編碼著NS1羧基端20%及NS2A之Kpn I至Sma I段（核苷酸3267-4180)，而生成YF18。得自YF2之編碼著C，prM, E及NS1胺基端25%（核苷酸119-2725)的Xho I至Bam HI段，與YF18之Xho I至Bam HI段（含

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

有NS1羧基端75%及NS2A，複製起點及牛痘序列)接合，而生成YF19。將得自YF2之相同Xho I至Bam HI段，與得自YF28之Xho I至Bam HI段(含NS1羧基端75%及NS2A，複製起點及牛痘序列)接合，而生成YF20。將得自YF46編碼著21aaC，prM，E及NS1胺基端25%之Xho I至Bam HI段(核甘酸419-2725)，與得自YF18之Xho I至Bam HI段接合，而生成YF47。寡核甘酸SP46(序列辨識編號：36)及SP47(序列辨識編號：37)如下：

```
          HindIII
SP46  5'-  AGCTT CTCGAGCATCGATTACT atg TCTGGTCGTAAAGCTCAGGGAAAAACC
SP47  3'-      A GAGCTCGTAGCTAATGA TAC AGACCAGCATTTCGAGTCCCTTTTTGG

           CTGGGCGTCAATATGGT -3'
           GACCCGCAGTTATACCA -5'
```

牛痘重組體之構成

業已說明重組體給予者質體性狀感染入已經救援牛痘病毒感染之組織培養細胞之程序及經由寄主範圍選擇與在硝基纖維素濾片上之原地雜交鑑別程序 (Perkus et al., 1989)。YF18、YF23、YF20、YF19及YF47性狀感染入寄主範圍突變體vP293(Perkus et al.感染細胞內，而生成牛痘重組體vP725、vP729、vP764、vP766及vP869。含有在vP293背景中之已恢復寄主範圍基因的vP457(Perkus et al., 1989)亦已說明。

活體外感染及放射性標幟

在放射性標幟前，Vero細胞單層以牛痘病毒感染1小

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

時(m.o.i.＝10)。在吸附期間後，移開接種物，該感染細胞上方舖上含20uCi／ml ^{35}S-Met及２％經滲析FBS之不含Met的培養基(MEM)。所有樣品皆於感染後８小時收穫。

於放射性標幟前，HeLa細胞單層以牛痘病毒(m.o.i＝2)或YF17D(m.o.i.＝4)感染。經YF17D感染後38小時或經牛痘感染後16小時，細胞以含^{35}S-Met之培養基，作行脈衝標幟，並在於過量未標幟Met存在之下，追蹤６小時。

放射性免疫沈澱及聚丙烯醯胺膠電泳

如Mason(1989)所述，收穫放射性溶胞產物及培養液，使用抗YF E及NS1之單株抗體對病毒蛋白進行免疫沈澱，並令其於SDS含之聚丙烯醯胺膠上分離。

動物保護實驗

多組３週齡小鼠，藉腹內注射，以10^7pfu牛痘病毒或100μl10%含YF17D之乳鼠腦懸浮液加以免疫接種。３週後由選的小鼠收集血清。然後小鼠再度接種重組體病毒或YF17D，或藉顱內注射YFV法國親神經種株，而加以挑釁。３週後經追加接種的動物再度放血，並以YFV法國親神經種株挑釁。挑釁後，每日間隔觀察小鼠，經歷３週，每一實驗皆使用實驗動物之同一窩小鼠，進行致命劑量的滴定，此外，挑釁後４週由存活動物體中收集血清。

對重組型牛痘病毒之免疫反應之評估

如Mason et al., (1991)所述，血清試驗係測試其由經清潔劑處理的溶胞產物中沈澱放射性標幟YFV蛋白質之能力。中和試驗係如Mason et al., (1991)所述者進行，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

但人血清未加入病毒／抗體稀釋液內。血液凝集試驗及血液凝集抑制(HAI)試驗係如Mason et al., (1991)所述進行。

重組型牛痘病毒之構造

使用寄主範圍選擇系統(Perkus et al., 1989)，建構出5種不同牛痘病毒重組體，其可表現由C延伸至NS2B之部分的YF編碼區。含於此等重組體中之YF cDNA序列示於第19圖。全部5重組型病毒中，YF cDNA之有意義股置於牛痘病毒早期／晚期H6起動子後方，預期轉譯始於位在病毒cDNA序列5´端Met之字碼(第19圖)。

重組體vP725編碼著位在非結構蛋白質NS1前之推定的17aa信號序列與非結構蛋白質NS1及NS2A(Riceet al., 1985)。重組體vP729編碼著位在E之N端前方推定為19-aa的信號列、E、NS1、NS2A及NS2B(Rice etal., 1985)。重組體vP764編碼著C、prM、E、NS1及NS2A(Riceet al., 1985)。重組體vP766編碼著C、prM、E、NS1及NS2A(Rice et al., 1985)。重組體vP869編碼著位在結構蛋白質母質prM之N端的前方推定的21-aa信號序列、prM、E、NS1及NS2A之(Rice etal., 1985)。

經由重組型牛痘病毒表現E蛋白質

HeLa細胞之脈衝-追蹤實驗驗證：尺寸與YF17D E相等的蛋白質，可於經vP869感染之細胞內合成，並分泌入培養液內(表7)。於相同標幟條件下，於vP766, vP729或對照牛痘病毒vP457之感染培養基內，未檢測得胞內或胞外

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

E（表７）。

於Vero細胞之連續標幟試驗，驗證大小與vP869表現的E蛋白質相同的蛋白質，係於vP766及vP729感染培養基內表現（表７）。結果教示由vP869感染細胞所產生的E蛋白質，是以比vP766或vP729表現的E蛋白質更安定的形式存在的。先前已顯示YF17D可產生比其他YF分離株更安定的E蛋白質（Cane et al., 1989）。

由vP869感染細胞收穫的胞外流體中含有之HA活度係在vP766、vP729、vP725或vP457感染細胞之培養液未曾檢測到（表７）。此種HA，基於其於最適當之pH值，而可顯然出為類似YF17D感染細胞內所生成的HA。

由重組型牛痘病毒表現NS1蛋白質

於HeLa細胞進行脈衝-追蹤實驗結果驗證，於vP725、vP766及vP729感染細胞內合成大小類似真正YF17D NS1之蛋白質（表７），但合成數量大有變化。vP725及vP729感染細胞所生成的NS1，以類似YF17D感染細胞所分泌的NS1的高分子量形式，釋放入感染細胞培養液內。然而，vP766細胞並未分泌出NS1，且胞內NS1水平，以此種重組體為最低（表７）。vP869無法合成NS1，係咎於用來產生此種重組體的給予者質體（YF47）刪除一鹼基（核苷酸2962）之故。

保護不受致命YF挑戰

於初步實驗中，以vP457、vP764及vP869與YF17D作比較，而比較保護小鼠不受YFV法國親神經種株之致命挑戰的能力（表８，實驗Ⅰ）。vP869提供顯著保護作用，而

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

vP764提供的保護不比對照牛痘病毒vP457更佳的保護作用。

進行第二保護實驗，比較vP869、vP766、vP725、vP729及vP457與YF17D對保護小鼠不受法國親神經YFV種株之致命挑釁之能力(表８，實驗II)。接受一次或二次接種或vP869之小鼠可被保護不受挑釁，其它重組體之一次或二次接種後，皆未具保護作用。此外於vP869接種小鼠所達成的水平，等於以YF17D免疫接種所達成的。各組中由選定的動物匯集在挑釁前血清，試驗其免疫沈澱放射性標幟之E及蛋白質之能力，並試驗中和抗體及HAI抗體存在之能力。如表９所示，以vP869及YF17D免疫小鼠對E蛋白質反應，此反應經由第二次接種而提高。以vP729，vP725或vP766免疫兩次的小鼠可產生抗NS1抗體。於vP869接種小鼠體內出現高度量的中和抗體(表10) 與HAI抗體(表1)，但接種任何其他重組體，小鼠則無有此現象。此證實了免疫沈澱分析結果，並教示此等高水平抗體是保護作用所需的。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表7　由牛痘重組體及YF17D表現之蛋白質之特徵化

	17D	vP869	vP729	vP725	vP766	vP457
所表現的YF蛋白質						
胞內	E,NS1	E	E,NS1	NS1	E,NS1	無
分泌	E,NS1	E	NS1	NS1	無	無
胞外HA活度	是	是	否	否	否	否

表8　保護小鼠不受YF致命挑釁

實驗I

重　組　體	存　活　總　數
vP457	2／10
vP764	2／10
vP869	9／10
YF17D	5／10

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

實驗 II

重　組　體	存活／總數 單一接種[a]	二次接種[b]
vP457	0／16	1／14
vP725	0／14	2／16
vP729	0／16	2／13
vP766	0／14	0／14
vP869	8／15	15／16
YF17D	10／13	16／16

a 小鼠ip接種10^7pfu牛痘重組體或100μl 10%含YF17D之乳鼠腦懸浮液及3週後以220LD_{50}法國親神經種株YFV ic注射。

b 小鼠ip接種10^7pfu牛痘重組體或100μl10% YF17D乳鼠腦懸浮液，接種兩次間隔3週，3週後以36LD_{50}法國親神經種株YFV ic注射。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表９ 挑釁前放射性免疫沈澱

免疫用病毒	一次接種		二次接種	
	抗-E	抗-NS1	抗-E	抗-NS1
vP457	−	−	−	−
vP725				+
vP729				+
vP766				+
vP869	+	−	+ +	−
17D	+	−	+ +	−

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
衣
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

表10　挑釁前血清中之減少溶菌斑的中和力價

免疫接種病毒[a]	一次接種[b]	二次接種[b]
vP457組 I	<1：10	
vP457組 II	<1：10	<1：10
vP725組 I	<1：10	
vP725組 II	<1：10	<1：10
vP729組 I	<1：10	
vP729組 II	<1：10	<1：10
vP766組 I	<1：10	
vP766組 II	<1：10	<1：10
vP869組 I	1：40	
vP869組 II	1：80	1：160
17D 組 I	1：80	
17D 組 II	1：160	1：640

a 免疫接種用病毒。組I代表單一次接種後3週接受挑釁的動物。組II代表兩次接種後接受挑釁的動物。
b 血清稀釋得溶菌斑數目減少90%。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表11　挑釁前血清中的HAI抗體力價

免疫接種病毒[a]	一次接種[b]	二次接種[b]
vP457組 I	<1：10	
vP457組 II	<1：10	<1：10
vP725組 I	<1：10	
vP725組 II	<1：10	<1：10
vP729組 I	<1：10	
vP729組 II	<1：10	<1：10
vP766組 I	<1：10	
vP766組 II	<1：10	<1：10
vP869組 I	1：80	
vP869組 II	1：80	1：320
17D 組 I	1：80	
17D 組 II	1：40	1：1280

a 免疫接種用病毒。組I代表單一次接種後3週接受挑釁的動物。組II代表兩次接種後接受挑釁的動物。
b 血清稀釋。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（　）

實施例12-YF基因選殖入NYVAC給予者質體

含有編碼21胺基酸C，prM，E，NS1，NS2A編碼之YF cDNA(於NS1核苷酸2962有一鹼基缺失)且得自YF47之Xho I至Sma I段(核苷酸419-4180)接合至經Xho I-Sma I分解的SPHA-H6(HA區給予者質體)，而產生YF48。YF48以Sac I(核苷酸2490)分解，並以Asp718(核苷酸3262)部分解，而分離出一6700bp段(含質體複製起點，牛痘序列，21胺基酸C，prM，E，NS1胺基端3.5%，NS1羧基端23%，NS2A)，將其與得自YF18之Sac I-Asp 718段(含帶有於2962之鹼基的其餘的NS1)接合，而產生YF51。使用寡核苷酸指導雙股斷裂突變(Mandecki，1986)，去除對應於YF51之獨特Xho I址的6bp，產生在HA位址給予者質體上可編碼YF 21胺基酸C、prM、E、NS1、NS2A之YF50。YF50性狀感染入經vP866(NYVAC)感染的細胞，產生重組體vP984(第19圖)。YF50性狀感染經vP913 感染的細胞(NYVAC-MV)，產生重組體vP1002(第19圖)。

YF48內對應於獨特Xho I址之6bp，使用寡核苷酸指導雙股斷裂突變去除，以產生YF49。寡核苷酸指導突變(Kunkel，1985)用來將Sma I址插入YF4內之E的羧基端(核苷酸2452)，以產生YF16。YF49之Apa I-Sma I段(含有質體複製起點，牛痘序列及編碼21胺基酸C、prM及E胺基端43%之YF cDNA)，接合至得自YF16之Apa I-Sma I段(含有E羧基端57%之核苷酸1604-2452)，而產生於HA位址給予者質體內含有21胺基酸C、prM、E之YF53。YF53性狀感

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

染入經vP866(NYVAC)感染的細胞，而產生重組體vP1003（第19圖）。YF53性狀感染經vP913感染的細胞(NYVAC-MV)，而產生重組體vP997(第19圖)。

實施例13-登革熱1型嵌殖入牛痘病毒給予者質體

用來建構DEN牛痘重組體之DEN cDNA係衍生自DEN-1之西太平洋種系(Mason et al., 1987b)。該公開文獻中提出核苷酸位址1-3745。第20圖(序列辨識編號：53)為其核苷酸3392至6117之序列。

含有編碼NS1羧基端84%及NS2A胺基端45% NS2A之DEN cDNA的質體DEN1(核苷酸2559-3745, Mason et al., 1987B)，係經由將DEN cDNA之Eco RI-Xba I段(核苷酸2579-3740)與經退火配對的寡核苷酸DEN1(序列辨識編號：38)及DEN2(SEQID NO：39)(含Xba I 黏端，轉譯終止碼，T5AT牛痘病毒早期轉錄端結信號，Yuen et al., (1987)，Eag I址及Hin dIII黏端)嵌殖入經HindIII-Eco RI分解的pUC8，而衍生出的。得自DEN1之EcoRI-HindIII段(核苷酸2559-3745)與編碼E的羧基端36%及NS1胺基端16%之DEN cDNA的SacI-EcoR I段(核苷酸1447-2559, Mason et al., 1987B)接合至經Hind III-Sac I分解的IBI24(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)，而產生編碼由E羧基端64%延伸經NS2A胺基端45% NS2A且於NS1有一鹼基缺失(核苷酸2467)之DEN3。

經Hind III-Xba I分解的IBI24與經退火配對的寡核苷酸DEN9(序列辨識編號：40)及DEN 10(序列辨識編號：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

41)〔含HindIII黏端，Sma I址，DEN核苷酸377-428(Mason et al., 1987B)及Xba I黏端〕接合，而產生SPD 910。SPD 910以SacI(IBI24內)及Ava I(DEN內於核苷酸423)分解，並接合至DENcDNA之Ava I-Sac I段(核苷酸424-1447 Mason et al., 1987B)，而產生編碼C羧基端11aa，prM與E胺基端36%之DEN4。

含有編碼E羧基端64%及NS1胺基端18%之DEN cDNA的質體DEN6(核苷酸1447-2579帶有核苷酸2467，見Mason et al., 1987B)，係經由將DEN cDNA之Sac I-XhoI段選殖入IBI 25而衍生的(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)。含有編碼DEN 5´未轉譯區之51個鹼基、C、prM及E的胺基端36%之DEN cDNA的質體DEN15，係經由將DEN cDNA之Hind III-Sac I段(核苷酸20-1447，Mason et al., 1987B)選殖入經HindIII-Sac I分解的IBI 25而衍生得的。含有編碼NS2A羧基端55%及NS2B胺基端28%之DEN cDNA的質體DEN23(核苷酸3745-4213，第20圖)(SEQIDNO：53)，係經由將DENcDNA之Xba I-Sph I段選殖入Xba I-SphI分解的IBI25所衍生得的。含有編碼NS2A羧基端55%，NS2B及NS3胺基端24胺基酸之DEN cDNA的質體DEN20(核苷酸3745-4563，第20圖)(序列辨識編號：53)，係經由將DENcDNA之Xba I至EcoR I段選殖入Xba I-EcoR I分解的IBI25所衍生出的。

寡核苷酸指導的突變(Kunkel, 1985)用來改變潛在的牛痘病毒早期轉錄終結信號(Yuen et al., 1987)，該信

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

號位於離DEN4之prM基因的羧基端29aa處（核苷酸822-828 TTTTTCT至TATTTCT）及距該羧基端13aa處（核苷酸870-875 TTTTTAT至TATTTAT），以產生質體DEN47，及位在DEN17中之離NS1基因胺基端17aa（核苷酸2448-2454TTTTTGT至TATTTGT）處，以產生質體DEN7。

前述寡核苷酸指導突變用來將Eag I及Eco RI址插入質體DEN23之NS2A之羧基端（核苷酸4102），以產生DEN24，將Sma I址及ATG15插入距離於DEN7之E羧基端15aa（核苷酸2348）處，而產生DEN10，將Eag I及Hind III址插入質體DEN20之NS2B之羧基端（核苷酸4492），而產生質體DEN 21，以及以部分牛痘病毒早期／晚期H6起動子（位置-1至-21，Perkus et al., 1989）置換質體DEN15之核苷酸60-67，而產生DEN16（含有DEN核苷酸20-59，Eco RV址至H6起動子之-1，與DEN核苷酸68-1447）。

得自DEN7之Sac I-Xho I段（核苷酸1447-2579）取代DEN3之對應區，而產生含有編碼E羧基端64%及NS2A胺基端45%之DEN cDNA（核苷酸1447-3745）且帶有核苷酸2467與經修飾的轉錄結終信號（核苷酸2448-2454）之DEN19。將得自DEN19之Xho I-Xba I段（核苷酸2579-3745）與得自DEN 24之Xba I-Hind III段（Xba I核苷酸3745DEN延伸至IBI25之Hind III）接合至經Xho I-HindIII分解之IBI25接合，而產生含有編碼NS1羧基端82%、NS2A及NS2B胺基端28%之DEN cDNA（核苷酸2579-4213）且於4102帶有Ega I址並存在有核苷酸2467以及經突變的轉錄終結信號（核苷酸

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

2448-2454)的DEN25。經得自DEN19之Xho I-Xba I段(核苷酸2579-3745)接合至經Xho I(IBI25內)及Xba I(DEN核苷酸3745)分解的DEN21，而產生編碼NS1羧基端82%、NS2A、NS2B及NS3胺基端24aa(核苷酸2579-4564)並帶有核苷酸2467、經修飾的轉錄終結信號(核苷酸2448-2454)以及位於4492之EagI址的DNE22。

DEN16之HindIII-Pst I段(核苷酸20-59，Eco RV址至H6起動子之-1，及DEN核苷酸68-494)接合至得自DEN47之HindIII-Pst I段(編碼著prM羧基端83%及E胺基端36%核苷酸494-1447與質體之複製起點)，而產生DEN17，該該DEN可編碼的C、prM及E胺基端36%並帶有部分H6起動子以及C之胺基端前方的EcoR V址。將得自DEN17之編碼著C羧基端13aa、prM及E胺基端36%(核苷酸370-1447)之Hind III-Bgl II段接合至經退火配對的寡核苷酸SP111及SP112(其中含有不可使用的HindIII黏端，EcoR V至H6起動子之址-1，及DEN核苷酸350-369帶有Bgl-II黏端)，而產生DEN33，DEN33編碼著EcoR V址至H6起動子-1，C羧基端20aa、prM及E胺基端36%。

經Sma I-Eag I分解之pTP15(Mason et al., 1991)接合至下列各者：編碼著C羧基端11aa、prM及E胺基端36%E(核苷酸377-1447)之得自DEN4的Sma I-Sac I段與編碼著E羧基端64%、NS1及NS2A胺基端45%之得自DEN3之SacI-EagI段，而產生DENL。編碼著E羧基端64%及NS1胺基端18%(核苷酸1447-2579)之得自DEN7之SacI-XhoI段接

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

合至編碼著prM羧基端55%prM及胺基端36%E之得自DEN47的BstEII-SacI段（核苷酸631-1447），以及接合至含有C羧基端11aa、prM胺基端45%、NS1羧基端82%、NS2A羧基端45%並具有複製起點及牛痘序列之得自DEN的之BstEII-XhoI段，而產生DEN8。使用寡核苷酸指導之雙股斷裂突變(Mandecki，1986)去除獨特SmaI址（位在H6起動子與ATG間），而產生DEN8VC，其中H6起動子恰位在ATG起始碼前方。

編碼C、prM及E胺基端36%之得自DEN17之EcoR V-SacI段（位置-21至-1之H6起動子DEN核苷酸68-1447)接合至DEN8VC之Eco RV-Sac I段（含有牛痘序列，由-21至-124之H6起動子、複製起點及E胺基端64%、NS1、NS2A胺基端45%之核苷酸1447-3745），而產生DEN18。編碼著NS1羧基端82%及NS2A(核苷酸2579-4102)之得自DEN25之Xho I-EagI段接合至DEN18之Xho I-Eag I段（含複製起點，牛痘序列及DEN C、prM、E及NS1胺基端18%之核苷酸68-2579），而產生DEN26。得自DEN8VC之Eco RV-Sac I段（位置-21至-1之H6起動子DEN核苷酸377-1447，其編碼著C 11aa，prM及E胺基端36%）接合至DEN26之Eco RV-Sac I段（含複製起點、牛痘序列及DEN區編碼著E羧基端64%，NS1及NS2A，同時於NS1之核苷酸2894有鹼基缺失），而產生DEN32。DEN32性狀感染入經vP410感染的細胞，而產生重組體vP867(第21圖）。

將得自DEN10之Sac I-Xho I段（核苷酸1447-2579)取

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

代DEN3之對應區，產生DEN11，該DEN11含有DEN cDNA編碼著E羧基端64%，NS1及NS2A胺基端45%NS2A並帶有Sma I址及距E之羧基端15aa ATG。將得自DEN11之Sma I-Eag I段(編碼著R羧基端15aa、NS1及NS2A胺基端45%核苷酸2348-3745)接合至經SmaI-Eag I分解的pTP15接合，而產生DEN12。

將得自DEN22之Xho I-Eag I段(核苷酸2579-4492)接合至前述得自DEN18之Xho I-Eag I段，而產生DEN27。將得自DEN12之EcoR V-Pst I段(位置-21至-1 H6起動子DEN核苷酸2348-3447，其編碼著E 15aa 與NS1)接合至得自DEN27之EcoR V-Pst I段 (含複製起點，牛痘序列，H6起動子-21至-124及編碼著NS2A及NS2B之DEN cDNA)，而產生DEN31。

將得自DEN8VC之EcoR V-Xho I段(位置-21至-1 H6起動子DEN核苷酸377-2579，其編碼著C羧基端11aa、prM、E、NS1胺基端18%)接合至得自DEN31之Eco RI-Xho I段(含複製起點、牛痘序列及編碼著NS1羧基端82%、NS2A、NS2B之DEN cDNA並帶有在NS1位之第2894鹼基)，而產生DEN35。將DEN35性狀感染入經vP410感染的細胞，而產生重組體vP955(第21圖)。將得自DEN33之Eco RV-Sac I段(位置-21至-1 H6起動子DEN核苷酸350-1447編碼著羧基端20aa C，prM及胺基端36%E)及得自DEN32之Sac I-Xho I段(編碼著E羧基端64%及NS1胺基端18%核苷酸1447-2579)接合至前述得自DEN31之Eco RV-SacI段，而產生DEN34。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

DEN34性狀感染入經vP410感染的細胞，而產生重組體vP962(第21圖)。寡核苷酸DEN-(序列辨識編號：38)，DEN2(序列辨識編號：39)，DEN9(序列辨識編號：40)，DEN10(序列辨識編號：41)，SP11(序列辨識編號：42)，及SP12(序列辨識編號：43)如下所示：

```
DEN1  5'-  CTAGA tga TTTTTAT CGGCCG A      -3'
DEN2  3'-      T ACT AAAAATA GCCGGC TTCGA -5'
            XbaI                EagI     HindIII

DEN9  5'   AGCTT CCCGGG atg CTCCTCATGCTGCTGCCC
DEN10 3'       A GGGCCC TAC GAGGAGTACGACGACGGG
         HindIII  SmaI

           ACAGCCCTGGCGTTCCATCTGACCACCCGAG T      -3'
           TGTCGGGACCGCAAGGTAGACTGGTGGGCTC AGATC  -5'
                                    AvaI    XbaI

              -24        H6          -1
SP111 5' AGCT GATATCCGTTAAGTTTGTATCGTA atg AACAGGAGGAAA A    -3'
SP112 3'    A CTATAGGCAATTCAAACATAGCAT TAC TTGTCCTCCTTT TCTAG-5'
      HindIII EcoRV                                    BglII
```

對重組型牛痘病毒之免疫反應

多組3週齡小鼠，腹內接種10^7Pfu牛痘病毒重組體vP962、vP955、vP867、vP452(牛痘對照組)或100μl 10%含登革熱型夏威夷株之乳鼠腦懸浮液。3週後收集血清。其中1組小鼠再度接種並於4週後收集血清。如Mason等人(1991)所述分析血清的HAI抗體。

表12顯示以vP962免疫兩次的小鼠，可發展出高量HAI抗體，該量相當於以登革熱型夏威夷種株免疫兩次的動物所得者。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
衣
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

表12　HAI抗體力價

病　毒	一次免疫	兩次免疫
vP452	<1：10	<1：10
vP962	1：10	1：80
vP955	<1：10	<1：10
vP867	<1：10	1：10
DEN-1	1：40	1：80

含DEN1型20aa C、prM、E之牛痘插入載體之建構

編碼著E羧基端23%（核苷酸2055-2392，Mason etal.，1987b）、TGA 中止碼T5NT牛痘早期轉錄終結信號（Yuen et al.，1987）及Ecl XI及Bam HI址之338bp段係使用質體DEN7作模版，利用寡核苷酸（序列辨識編號：58／序列辨識編號：59）藉PCR（Engelka et al.，1988）方式衍生而得。

SP122 5'-GTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTC-3'
Hind III

及 SP130 5'-TCGGGATCCCGGCCGATAAAAATCACGCCTGAACCATGACTCCTAGGTAC-3'
BamHI　EclXI

PCR段以Hind III（DEN核苷酸2062，Mason et al.，1987b）及Bam HI（於TGA，及T5NT，及Ecl XI址後方）分解，並選殖入經HindIII／Bam HI分解之IBI25，而產生DEN36。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

DEN 34以EcoR V(於H6起動子內)分解，並以之Hind III而E內分解(DEN核苷酸2061；Mason et al., 1987b)，而分離出1733bp段(含EcoR V至-1 H6起動子，C 20aa、prM及E胺基端77%)。DEN36以Hind III及Ecl XI分解，而分離331bp段（含DEN核苷酸2062-2392 TGA T5NT Ecl XI黏端）。該1733bp段及該331bp段接合至經Eco RV／Ecl XI分解之PT15(Guo et al., 1989)，而生成質體DEN38。質體DEN 38性狀感染入經牛痘感染的細胞，而產生編碼著DEN 20aaC、prM及E之重組體。

實施例14—表現JEV蛋白質之ALVAC重組體的建構

本例說明編碼著JEV 15aa C、prM、E，NS1、NS2A之金絲雀痘重組體vcp107及編碼著15aa C、prM、E之金絲雀痘給予者質體(JEVCPC5)之發展。

細胞及病毒

親代金絲雀痘病毒(Rentschler種系)為金絲雀的牛痘種株。疫苗種株係得自野生型分離株且且經由於雞胚纖維母細胞上進行超過200系列的繼代培養而減毒的。主病毒種子於瓊脂下接受四次溶菌斑純化處理，且一溶菌斑純株又經5次繼代培養而擴增，隨後，病毒儲液用作活體外重組試驗之親代病毒。經溶菌斑純化的金絲雀痘單離株定名為ALVAC。

金絲雀痘插入載體之構造

880bp金絲雀痘Pvu II段選殖於pUC9之Pvu II址間，而生成pRW7645。此段係示於第22圖(序列辨識編號：90)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

，其介於位置1372與2251間。定義出稱為C5之開放讀碼架構的上下限。決定出該開放讀碼架構係起始於該段內之位置1537，而終止於位置1857。進行C5刪除，但並未打斷該開放讀碼架構。由位置1538至位置1836之鹼基以序列GCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTT置換之。此置換序列含Hin dIII，Sma I及Eco RI插入址，其後接著為轉譯中止子，與為由牛痘病毒RNA聚合酶所辨認的轉錄終止信號 Yune et al., 1987)。如下述進行C5 ORF之刪除(第23圖)。質體pRW764.5以Rsa I進行部份切割，而分離為直線的產物。RsaI直線段再度以Bgl II切割，而分離出由位置1527至位置1832之Rsa I至Bgl II刪除的pRW764.5段，將此段用作如下合成寡核苷酸載體：

RW145 (序列辨識編號:60)

ACTCTCAAAAGCTTCCCGGGAATTCTAGCTAGCTAGTTTTTATAAA

RW146 (序列辨識編號:61)

GATCTTTATAAAAACTAGCTAGCTAGAATTCCCGGGAAGCTTTTGAGAGT

寡核苷酸RW145(序列辨識編號：60)及RW146(序列辨識編號：61)退火配對及插入前述pRW764.5 Rsa I及Bgl II載體中。所得質體定名為pRW831。

含JEV 15aaC、prM、E、NS1、NS2A之插入載體的建構

以下將列示說明pRW838之構成(第23圖)。寡核苷酸A至E（其H6起動子之轉譯起始子與狂犬病G之ATG重疊）選殖入pUC9，而作為pRW737。寡核苷酸A至E為含有H6起

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

動子、始於Nru I，經由狂犬病G之HindIII址，而後接著為BglII。寡核苷酸A至E之序列為：

A （序列辨識編號:62）：CTGAAATTATTTCATTATCGCGATATCCGTTAAGTTT GTATCGTAATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGT

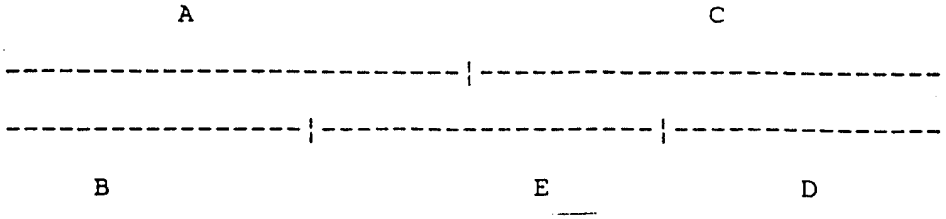
B （序列辨識編號:63）：CATTACGATACAAACTTAACGGATATCGCGATAATGAAAT AATTTCAG

C （序列辨識編號:64）：ACCCCTTCTGGTTTTTCCGTTGTGTTTTGGGAAATT CCCTATTTACACGATCCCAGACAAGCTTAGATCTCAG

D （序列辨識編號:65）：CTGAGATCTAAGCTTGTCTGGGATCGTGTAAATAGGGAAT TTCCCAAAACA

E （序列辨識編號:66）：CAACGGAAAAACCAGAAGGGGTACAAACAGGAGAGCCTGA GGAAC

寡核苷酸的A 至E的退火配對圖形係如下所示：



寡核苷酸A至E經激酶化，退火配對（95℃經歷5分鐘，然後冷卻至室溫），而後插入PUC9之Pvu II址間。所得質體pRW737以Hin dIII及Bgl II切割，以用作ptg155PRO之1.6kbp的HindIII-Bgl II段之載體（Kieny et al., 1984），進而產生pRW739。ptg155 PRO Hind III址為位在狂犬病G轉譯起始子下游86bp。Bgl II為在ptg155 PRO中狂犬病G轉譯中止子的下游。pRW739以Nru I部分切斷，以BglII完全切斷，再將該1.7Kbp Nru I-Bgl II段〔含前

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

述H6起動子之3' 端(Taylor et al., 1988a, b; Guo et al., 1989; Perkuset al., 1989)延伸至完整的狂犬病G基因〕插入pRW824之NruI與Bam HI址間。所生成之質體定名為pRW832。pRW824的插入係添加Nru I之H6起動子5'。Bam HI繼以為SmaI之pRW824序列為：GGATCCCCGGG。pRW824為一含有一與牛痘病毒H6起動子正確連結之無關基因的質體。以Nru I及Bam HI分解可完全去除此無關基因。一含H6起動之狂犬病G之1.8Kbp pRW832 Sma I段插入pRW831之Sma I，而生成質體pRW838。

pRW838於狂犬病糖蛋白質基因之3' 端以EcoR 分解，以DNA聚合酶I之Klenow段填入、在H6起動子內以EcoRV分解，並以鹼性磷酸酶處理，而分離出一含H6起動子之5' 103bp，質體複製起點與C5側出臂之3202bp段。於牛痘病毒給予者質體(第1圖)中，含編碼15胺基酸C、prM、E、NS1、NS2A之JEV cDNA的質體JEVL14VC(第1圖)(核苷酸337-4125，第17A圖及B圖)(序列辨識編號：52)於H6起動子上以EcoR V分解，且於JEV序列內以 Sac I分解(核苷酸2124)，而分離出1809bp 段。JEVL14VC於T5AT後方之Eag I址以EclXI分解，填入DNA聚合酶I之Klenow，再於JEV序列內以Sac I分解(核苷酸2124)，而產生2011bp段。將1809bp EcoRV-Sac I、2011bp SacI-填入的Ecl XI段及3202bpEcpRV填入的Eco RI段相接合，而產生JEVCP1。JEVCP1性狀感染入經ALVAC感染之一次CEF細胞，而生產金絲雀痘重組vCP107，其編碼著15胺基酸C、prM、E、NS1、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

NS2A(第18圖)。

含JEV 15aa C、prM、E之C5插入載體之建構

含C5下游1535bp、帶有Kpn I／Sma I／Xba I及NotI址之聚聯結子與404bp金絲雀痘DNA(31bp C5編碼序列及473bp 下游序列)之C5插入載體，以如下方式衍生金絲雀痘DNA基因庫建構於cosmid載體pyK102(Knauf et al., 1982)以pRW764.5作為探針，而鑑別出一含29kb插子之純株(pHCOSI)。鑑別出含得自pHCOSI之含有C5區的3.3kb Cla I段。Cla I段之序列分析用來將第22圖(序列辨識編號：90)之序列由核苷酸1延長至1372。

以2步驟建構新的C5插入載體。使用寡核苷酸C5A(序列辨識編號：67)(5'-ATCATCGAATTCTGAATGTTAAATGTTATACTTTG-3' 及C5B(序列辨識編號：68)(5'-GGGGGTACCTTTGAGAGTACCACTTCAG-3')並使用經純化的基因組金絲雀痘DNA作模版，藉PCR 擴增(Engelke et al., 1988)，而產生1535bp下游序列。此段以EcoR I(寡C5A內)分解及選殖入經EcoRI／Sma I分解的pUC8內，而產生C5LAB。使用寡核苷酸C5C(序列辨識編號：69)(5'-GGGTCTAGAGCGGCCGCTTATAAAGATCTAAAATGCATAATTTC-3')及C5DA(序列辨識編號：70)(5'-ATCATCCTGCAGGTATTCTAAACTAGGAATAGATG-3')，藉PCR擴增，而產生404bp臂。此段以Pst I(寡C5DA內)分解及選殖入經Sma I／Pst I分解的C5LAB，而產生PC5L。

PC5L於聚聯結子內以Asp718及Not I分解，並以鹼性

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

磷酸鹽處理，並接合至經激酶化及退火配對的寡核苷酸CP26（序列辨識編號：71)及CP27(序列辨識編號：72)(含廢用的Asp718址，於6讀碼架構的轉譯，中止，字碼子，牛痘早期轉錄終止信號(Tuen及Moss，1987)Bam HI，、pn I、XhoI、XbaI、Cla I及Sma I限制址，牛痘早期轉錄終結止號，於6讀碼架構轉譯中止碼，及廢用的Not I址)，而產生質體C5LSP。早期／晚期H6牛痘病毒起動子(Guo et al.，1989；Perkus et al.，1989)係使用pRW824作模版，並使用寡核苷酸CP30(序列辨識編號：73)(5'-TCGGGATCCGGGTTAATTAATTAGTCATCAGGCAGGGCG-3')及CP31(序列辨識編號：72)(5'-TAGCTCGAGGGTACCTACGATACAAACTTAACGGATATCG-3' 藉PCR方法所衍生的(Engelke et al.，1988)。PCR產物以BamHI及Xho I(分別位在CP30(序列辨識編號：75)及CP31(序列辨識編號：74)之5' 端之位址)分解，並接合至經Bam HI-Xho I分解的C5LSP，而產生VQH6CLSP。CP26(序列辨識編號：71)及CP27(序列辨識編號：72)如下：

```
CP26 5'-GTACGTGACTAATTAGCTATAAAAAGGATCCGGTACCCTCGAG
CP27 3'-    CACTGATTAATCGATATTTTTCCTAGGCCATGGGAGCTC
                                  BamHI  KpnI XhoI

      TCTAGAATCGATCCCGGGTTTTTATGACTAGTTAATCAC    -3'
      AGATCTTAGCTAGGGCCCAAAAATACTGATCAATTAGTGCCGG-5'
      XbaI  ClaI  SmaI
```

質體於H6起動子內以EcoR V分解，及於JEV序列內以Sph I(核苷酸2380)分解，而分離出2065bp段。質體

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

VQH6C5LSP於H6起動子內以Eco RV分解，於聚聯結子內以Xba I分解，而接合至2065bp段，並加上經退火配對的寡核苷酸SP131(序列辨識編號：75)及SP132(序列辨識編號：76)(含Sph I黏端，T核苷酸完整E編碼區，轉譯中止子，牛痘早期轉錄終止信號(AT5AT；Yuen及Moss，1987)，第二轉譯中止，及Xba I黏端)，而產生質體JEVCP5，該質體在介於C5側臂上且為H6起動子的控制之下編碼著15胺基酸C、prM及E。JEVCP5可性狀感染入經ALVAC或ALVAC重組體感染細胞，而產生編碼著JEV 15aaC、prM及E的重組體。

SP131 (序列辨識編號:75) 5'- C T tga ttttttat tga T -3'
SP132 (序列辨識編號:76) 3'-GTACG A ACT AAAAATA ACT AGATC-5'
SphI XbaI

實施例15-可表現YFV蛋白質之AUVAC重組體之建構

金絲雀痘插入載體之構成

8.5kb金絲雀痘Bgl II選殖入pBS-SK質體載體之BamHI址，而生成pWW5。核苷酸序列分析顯示，定名為C3之讀碼架構始於第24A-C圖序列(序列辨識編號：83)內之位置1458而止於位置2897。欲建構給予者質體，以供將外來基因插入C3位置，並可將C3開放讀碼架構完全切除，使用PCR引子來擴增相對於C3之5'及3'序列。5'序列引子為RG277(序列辨識編號：77)(5'-CAGTTGGTACCACTGGTATTTTATTTCAG-3'及RG278(序列辨識編號：78)(5'-TATCTGAATTCCCTGCAGCCCGGGTTTTTATAGCTAATTAGTCAAATGTGAGTTAATATTAG

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
長
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

-3'）。

3' 序列之引子為RG279(序列辨識編號：79)(5' TCGC TGAATTCGATATCAAGCTTATCGATTTTTATGACTAGTTAATCAAATAAA AAGCATACAAGC-3')和RG280(序列辨識編號：80)(5'-TTA TCGAGCTCTGTAACATCAGTATCTAAC-3')。引子的設計含有由牛痘轉錄及轉譯終結信號所側伸出之多選殖址 。於左臂及右臂之5'-端及3' 端也含有適當限制址(左臂之Asp 718及EcoR I，及右臂之Eco RI及Sac I)，因而使得該二臂可接合至經Asp 718／Sac I分解之PBS-SK質體載體。所得質體定名為PC3I。

恰位在C3位址上游(核苷酸537-1444，第24A-C圖(序列辨識編號：837) 之金絲雀痘DNA之908bp段，係經由以Nsi I及Ssp I分解質體pWW5而得。金絲雀痘DNA之604bp段(核苷酸1-604第24A-C圖(序列辨識編號：83))，係使用pWW5作模版並使用寡核苷酸CP16(序列辨識編號：81)(5' -TCCGGTACCGCGGCCGCAGCTATTTGTTAGCTTCTGC-3')及CP17(序列辨識編號：82)(5' -TCGCTCGAGTAGGATACCTACCTACTAC CTACG-3')，藉PCR所衍生而得(Engelke et al., 1988)。該604bp段以Asp718及Xho I分解(分別存在於寡核苷酸CP16及CP17之5' 端之址)並選殖入經Asp 718-Xho I分解與鹼性磷酸酶處理的IBI25(國際生物技術公司，康乃狄格州，新港市)，而產生質體SPC3LA。SPC3LA於IBI25內以EcoRV分解，而於金絲雀痘DNA內以NsiI分解，(核苷酸536，第24A-C圖(序列辨識編號：38))，再將其與908bp Nsi

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

I-SspI段接合，而產生SPCPLAX，該SPCPLAX中含有C_3位址上游之金絲雀痘DNA1444bp。

金絲雀痘之2178bp DNA的Bgl II-Sty I段（核苷酸3035-5212，第24A-C圖（序列辨識編號：83)），係由質體pXX4(其中含一6.5kb金絲雀痘DNA Nsi I段選殖入PBS-SK之PstI址)單獨而得。金絲雀痘DNA 279bp段（核苷酸5194-5472，第24A-C圖（序列辨識編號：83)），係使用質體pXX4作模版並使用寡核苷酸CP19(序列辨識編號：84)(5' -TCGCTCGAGCTTTCTTGACAATAACATAG-3')及CP20(序列辨識編號：85)(5' -TAGGAGCTCTTTATACTACTGGGTTACTTC-3')，藉PCR分離而得者(Engelke et al., 1988)。279bp段以XhoI及Sac I分解(分別位於寡核苷酸CP19及CP20之5' 端之址)並選殖入經Sac I-Xho I分解與鹼性磷酸酶處理的IBI25內，而產生質體SPC3RA。

欲將額外獨特址加入聯結子中，PC3I於聚聯結子區內以Eco RI及Cla I消化，並鹼性磷酸酶處理，接合至激酶化以並經退火配對的寡核苷酸CP12(序列辨識編號：86)及CP13(序列辨識編號：87)(含Eco RI黏端，Xho I址，Bma HI址，及與Cla I相容的黏端)，而產生質體SPC3S。SPCP3S於C3位址下游的金絲雀痘序列內，以Sty I(核苷酸3035)及Sac I(pBS-SK)分解，再將其與得自SPC3RA之261bpBgl II-Sac I段（核苷酸5212-5472，第24A-C圖（序列辨識編號NO：83))與得自pXX4之2178bp Bgl II-Sty I段（核苷酸3035-5212，第24A-C圖（序列辨識編號：83)），產生一含

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

有於C3位址下游的2572bp金絲雀痘DNA的質體CPRAL。SPCP3S於C3位址下游之金絲雀痘序列內以Asp 718(於pBS-SK)及Acc I(核苷酸1435)分解，而後接合至得自SPCPLAX之1436bp Asp 718-Acc I段，而產生含有C3位址上游的1457bp金絲雀痘DNA的質體CPLAL。CPLAL於C3位址下游之金絲雀痘序列內以Sty I(核苷酸 3035) 及Sac I(於pBS-SK內)粉解，並接合至得自CPRAL之2438bp Sty I-Sac I段，而產生含有C3位址上游之1457bp之金絲雀痘DNA、於6個讀碼架構內之中止碼、早期轉錄終止信號、聚聯結子區、早期轉錄終止信號、在６讀碼架構內之中止碼及C3位址下游之2572bp金絲雀痘DNA的質體CP3L。

早期／晚期H6牛痘病毒起動子(Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989)係使用PRW838作模版，並使用寡核苷酸CP21(序列辨識編號：88)(5' TCGGGATCCGGGTTCCTTAATTAGTTCTTAGACAAGGTG-3')及CP22(序列辨識編號：89)(5'-TAGGAATTCCTCGAGTACGATACAAACTTAAGCGGATATCG-3' 藉PCR所衍生而得(Engelke et al., 1988)。PCR產物以BamHI及EcoR I(二址分別位於寡核苷酸CP21及CP22之5' 端)分解並接合至於聚聯結子內經Bam HI及Eco RI分解的CP3L，而生質體VQH6CP3L。

CP12　(序列辨識編號:85)　5'-AATTCCTCGAGGGATCC -3'
CP13　(序列辨識編號:86)　3'- GGAGCTCCCTAGGGC-5'
EcoRI XhoI BamHI

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝　訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明（　）

ALVAC給予者質體VQH6CP3L於聚聯結子內以Xho I及Sma I分解並接合至得自YF51之3772bp Xho I-Sma I段（核苷酸419-4180編碼著YF21胺基酸 C、prM、E、NS1、NS2A），產生 YF 52。使用寡核苷酸指導雙股斷裂突變作用（Mandecki，1986）去除在UP52內對應於獨特Xho I址之6bp，而產生YFCP3。YFCP3性狀感染入經ALVAC感染的初級CEF細胞內，以產生一編碼著21aa C、prM、E、NS1、NS2A之金絲雀痘重組體VAP127（第19圖）。

含YFV 21aa C, prM, E之C3插入載體之建構

YP52以Sma I於YF cDNA的3'端分解，並以Apa I（YF核苷酸1604）'分解，而分離出8344bp段（含有質體複製起點，金絲雀痘DNA及編碼著21胺基酸C、prM及E胺基端57%的YF cDNA），再接合至得自YF16之Apa I至Sma I段（核苷酸1604-2452含有E羧基端43%），而產生YF54 。如前述去除在YF54內對應於獨特Xho I址之6bp，而產生含有編碼21胺基酸C、prM及E之YF cDNA的YFCP4。YFCP4可性狀感染入經ALVAL或ALVAC重組體感染細胞，而產生編碼YFV 21 aa C、prM、E之重組體。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

公告本

84. 4. 29 修正補充
年 月 日

申請日期	90. 8. 29
案號	80106870
類別	A61K39/275, 39/285, C12N 15/86, 15/39

Int.·Cl[6]

A4
C4

307685

（以上各欄由本局填註）

307685

第80106870號申請案 發明 ~~新型~~ 專利說明書 修正本 修正日期：84年4月

一、發明 ~~新型~~ 名稱	中文	其包含有黃病毒重組型痘病毒且在其被接種至一宿主動物體內後能誘發一免疫反應的一種疫苗之製備方法
	英文	METHOD FOR PREPARING A VACCINE CONTAINING FLAVIVIRUS RECOMBINATION POXVIRUS FOR INDUCING AN IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN A HOST ANIMAL INOCULATED WITH SAID VACCINE
二、發明 ~~創作~~ 人	姓名	(1)安諾・帕歐勒提 (2)史蒂芬 E. 畢卡士
	國籍	美國
	住、居所	(1)美國紐約州德馬・繆勒大道297號 (2)美國紐約州東綠林・特洛伊路78號
三、申請人	姓名（名稱）	美商・維洛喬尼提斯股份有限公司
	國籍	美國
	住、居所（事務所）	美國紐約州特洛伊・瑞塞爾技術公園・約旦路465號
	代表人姓名	肯特 V. 堪本

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社

紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

307685

86.7.05 修正補充
年 月 日

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：其包含有黃病毒重組型痘病毒且在其被接種至一宿主動物體內後能誘發一免疫反應的一種疫苗之製備方法）

本文所敘述者為一種重組型痘病毒，例如牛痘病毒，禽痘病毒及金絲雀痘病毒，其含有得自黃病毒，例如日本腦炎病毒、黃熱病毒及登革熱病毒，之外來DNA者。於較佳實施例中，重組型痘病毒產生一種胞外粒子，該粒子含有可誘生中和抗體、抑制血液凝集抗體及對抗黃病毒感染之保護性免疫力的黃病毒E及M蛋白質。本案也敘述含有重組型痘病毒之疫苗，其供用誘導一經該疫苗接種的宿主動物的免疫反應。

英文發明摘要（發明之名稱：METHOD FOR PREPARING A VACCINE CONTAINING FLAVIVIRUS RECOMBINANT POXVIRUS FOR INDUCING AN IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN A HOST ANIMAL INOCULATED WITH SAID VACCINE）

What is described is a recombinant poxvirus, such as vaccinia virus, fowlpox virus and canarypox virus, containing foreign DNA from flavivirus, such as Japanese encephalitis virus, yellow fever virus and Dengue virus. In a preferred embodiment, the recombinant poxvirus generates an extracellular particle containing flavivirus E and M proteins capable of inducing neutralizing antibodies, hemagglutination-inhibiting antibodies and protective immunity against flavivirus infection. What is also described is a vaccine containing the recombinant poxvirus for inducing an immunological response in a host animal inoculated with the vaccine.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

30[illegible]85 公告本

85. 7. 05 修正 補充

A8
B8
C8
D8

六、申請專利範圍

第80106870號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：85年 7月

1.一種會於經其接種的宿主動物體內誘發一免疫反應之疫苗的製備方法，該疫苗包括一載劑及一重組型痘病毒，該重組型痘病毒包含一位在該病毒基因組之非必要區域且為一合適的起動子控制下的外源DNA插入子，該插入子編碼一在一宿主體內可誘發對抗黃病毒感染之保護性免疫作用的黃病毒胞外結構蛋白質，該方法包括：

藉由獲得一編碼該胞外蛋白質且其側邊為痘病毒DNA序列之基因，並利用位在該基因之側邊的痘病毒DNA序列與存在一救援痘病毒內之同源序列的基因重組，而將該基因插入該救援痘病毒內之一位在該病毒基因組之非必要區域且為一合適的起動子控制下之位置，而製備出該重組型痘病毒；以及

將該重組型痘病毒與該載劑混合，

其中該外源DNA插入子為：

i)一編碼下述4種日本腦炎病毒(JEV)胞外蛋白質之插入子：結構蛋白質M（即為蛋白質M或為其蛋白質先質prM結構蛋白質）與E以及JEV之非結構蛋白質NS1與NS2A，且該重組體能表現該4種蛋白質並誘發該保護性免疫作用；或

ii)一編碼一在宿主體內可誘發對黃熱病病毒的保護性免疫作用之黃熱病病毒胞外結構蛋白質之插入子；或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

iii）一編碼一在宿主體內可誘發對登革病毒的保護性免疫作用之登革病毒胞外結構蛋白質之插入子；且

其中該痘病毒係為一牛痘病毒或鳥痘病毒，且其中當該插入子分別編碼一在宿主體內可誘發對登革病毒或JEV的保護性免疫作用之登革病毒胞外結構蛋白質或JEV結構蛋白質，且該重組痘病毒係牛痘病毒時，下述開放閱讀架構是全部係失去活性的：J2R、B13R+B14R、A26R、A56R、C7L-K1L以及I4L。

2.如申請專利範圍第1項之方法，其中該外源DNA插入子係如申請專利範圍第1項之第（i）次項中所界定者，該痘病毒為牛痘病毒。

3.如申請專利範圍第2項之方法，其中該牛痘病毒為vP908。

4.如申請專利範圍第1項之方法，其中該插入子係編碼一胞外黃病病毒，且該痘病毒係為牛痘病毒，在該痘病毒其內具有實質上由下列所構成之失去活性的開放閱讀架構：J2R、B13R+B14R、A26R、A56R、C7L-K1L以及I4L；或該痘病毒係為NYVAC重組型牛痘病毒。

5.如申請專利範圍第1項之方法，其中該外源DNA插入子係如申請專利範圍第1項之第（i）次項中所界定者，且該痘病毒為鳥痘病毒。

6.如申請專利範圍第5項之方法，其中該鳥痘病毒為金絲雀痘病毒。

7.如申請專利範圍第6項之方法，其中該重組型痘病毒為

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

vCP107。

8.如申請專利範圍第1項之方法，其中該外源DNA插入子係如申請專利範圍第1項之第(ii)次項中所界定者，且該重組型痘病毒為vP725、vP729、vP764、vP766、vP869、vP984、vP997、vP1002或vP1003。

9.如申請專利範圍第8項之方法，其中該痘病毒為金絲雀痘病毒。

10.如申請專利範圍第9項之方法，其中該金絲雀痘病毒為vCP127。

11.如申請專利範圍第1項之方法，其中該外源DNA插入子係如申請專利範圍第1項之第(iii)項中所界定者，且該重組型痘病毒為vP867、vP955或vP962。

12.如申請專利範圍第1項之方法，其中該外源DNA插入子編碼，且該重組體表現，一包含有黃熱病病毒之結構蛋白質E與M的顆粒體，該顆粒體可有效地誘發該保護性免疫作用。

13.如申請專利範圍第1項之方法，其中該外源DNA插入子編碼，且該重組體表現，一包含有登革病毒之結構蛋白質E與M的顆粒體，該顆粒體可有效地誘發該保護性免疫作用。

14.如申請專利範圍第1項之方法，其中該結構蛋白質係能於一宿主體內被釋出至一胞外基質中。

15.如申請專利範圍第1項之方法，其中該重組型病毒能誘發出對抗黃病毒感染的中和抗體、血液凝集-抑制抗體

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

以及對抗黃病毒感染之保護性免疫作用。

16.如申請專利範圍第1項之方法，其中該重組型痘病毒包含編碼日本腦炎病毒E、M、NS1與NS2A等蛋白質之DNA，其中一包含有日本腦炎病毒E與M蛋白質的胞外顆粒體被產生之，該顆粒體會誘發出對抗日本腦炎病毒感染的中和抗體、血液凝集-抑制抗體以及對抗日本腦炎感染之保護性免疫作用。

17.如申請專利範圍第1項之方法，其中該重組型痘病毒包含一源自日本腦炎病毒之編碼結構蛋白質M先質、結構蛋白質E以及非結構蛋白質NS1與NS2A的DNA，該DNA係供表現一包含有結構蛋白質E與結構蛋白質M之顆粒體。

18.如申請專利範圍第1項之方法，其中該痘病毒係為一金絲雀痘病毒之鳥痘病毒，該病毒係經在雞胚纖維母細胞經過高於於200次的繼代培養，並經過連續四次溶菌斑純化，以及由五次額外的繼代培養而予以減毒，或該牛痘病毒具有全部失活的下述開放閱讀架構：J2R、B13R+B14R、A26R、A56R、C7L-K1L以及I4L；或是該痘病毒係為ALVAC病毒或是NYVAC病毒。

19.如申請專利範圍第18項之方法，其中該插入子係編碼一登格熱病毒胞外結構蛋白，且該痘病毒係為金絲雀痘病毒，該金絲雀病毒係經在雞胚纖維母細胞經過高於於200次的繼代培養，並經過連續四次溶菌斑純化，以及由五次額外的繼代培養而予以減毒；；或是為病毒係為ALVAC病毒。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

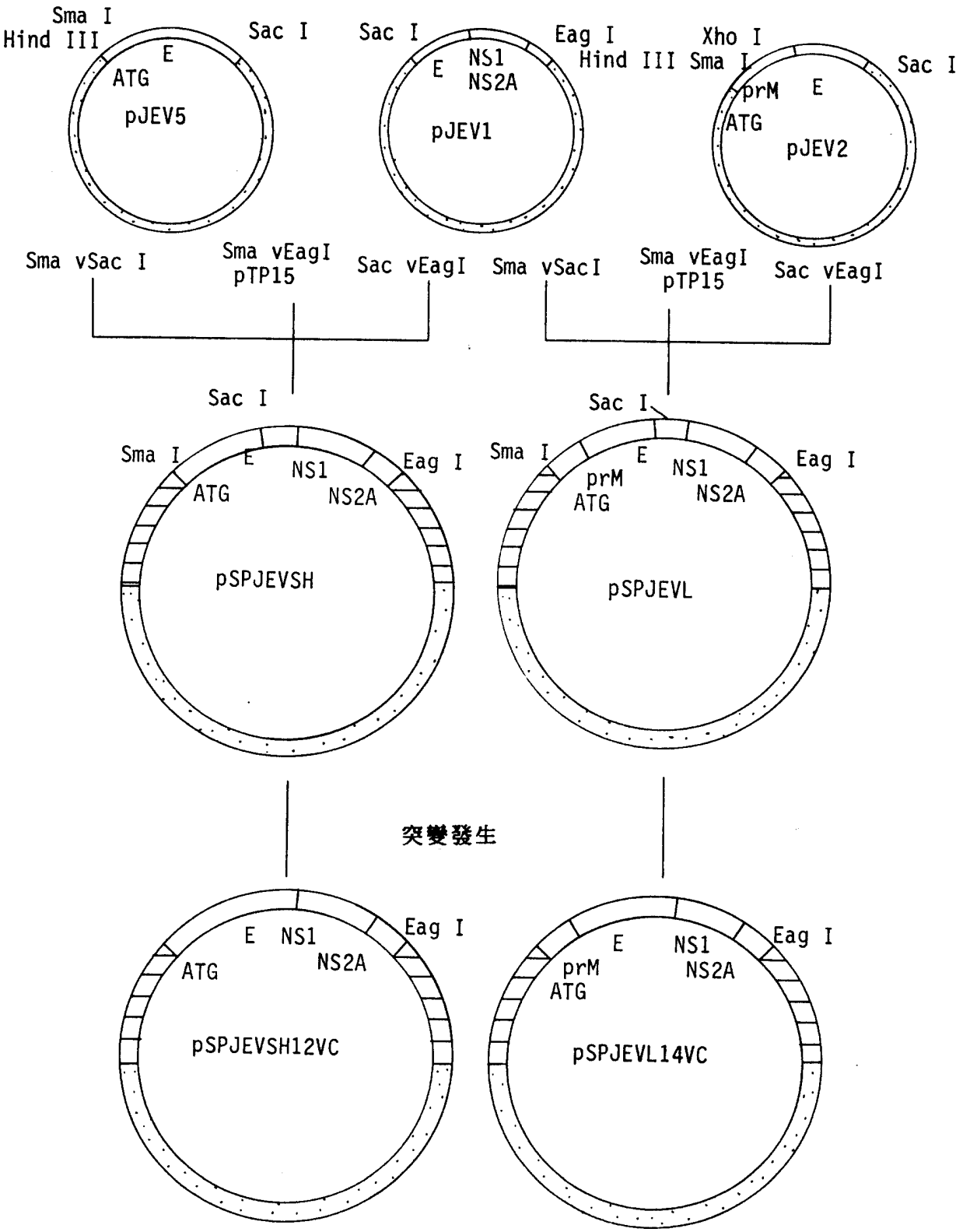
線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

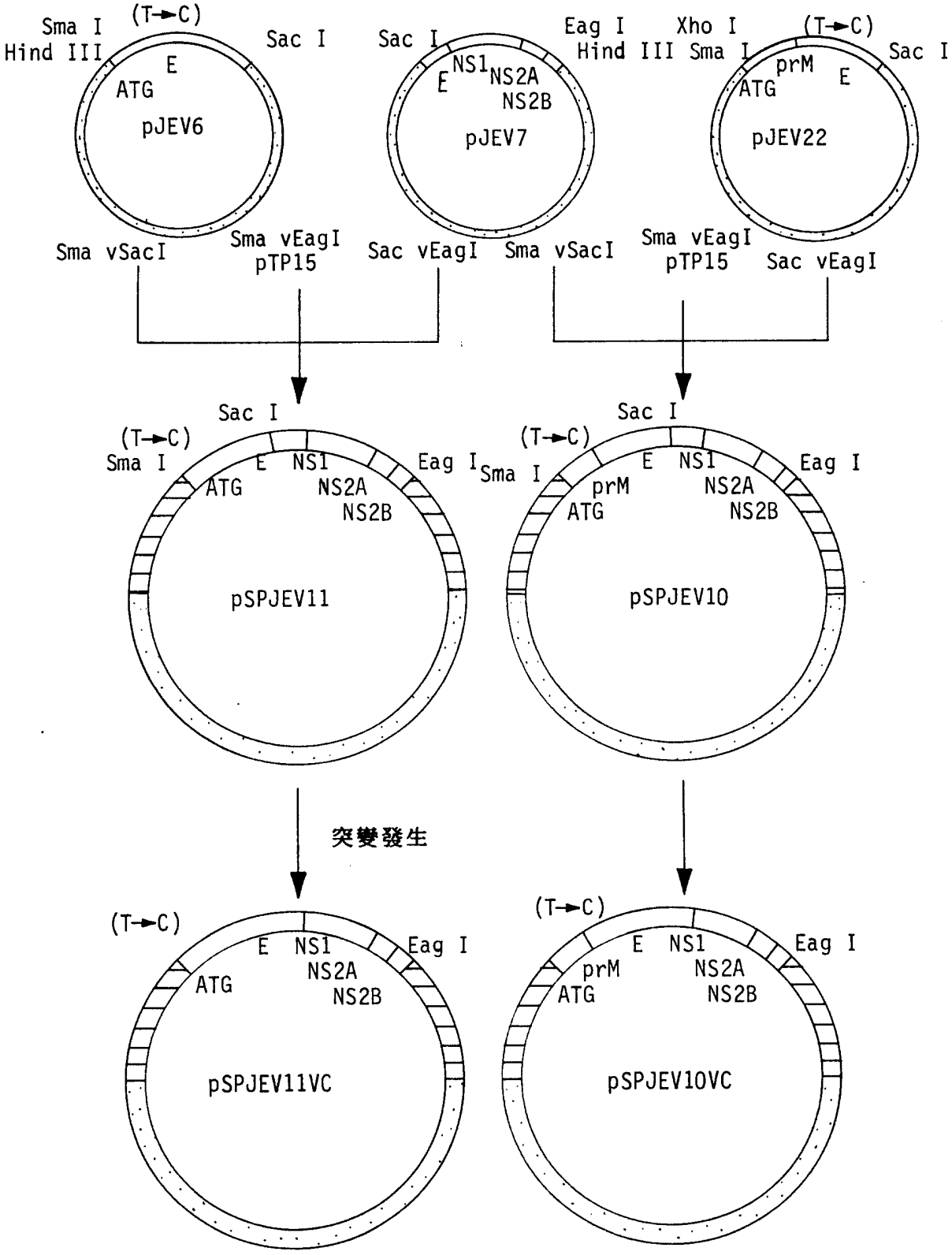
公告本

85. 7. 05

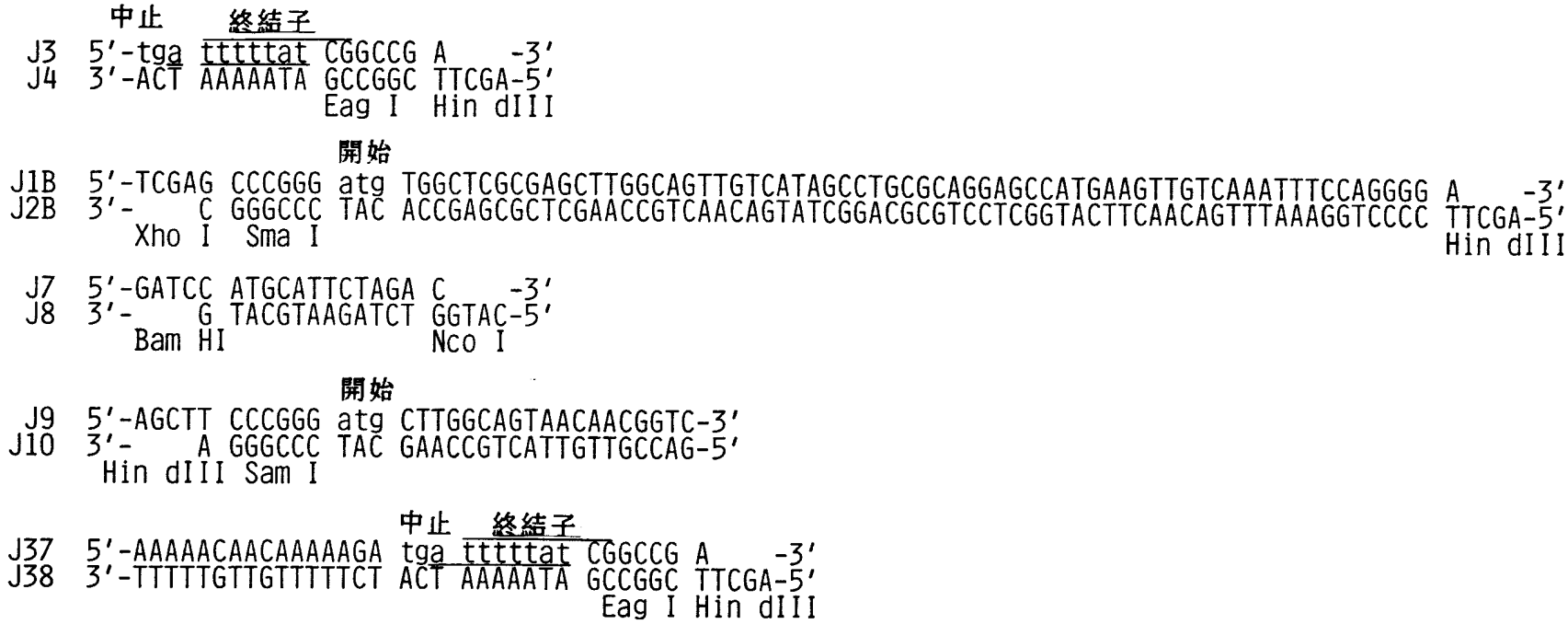
中譯圖



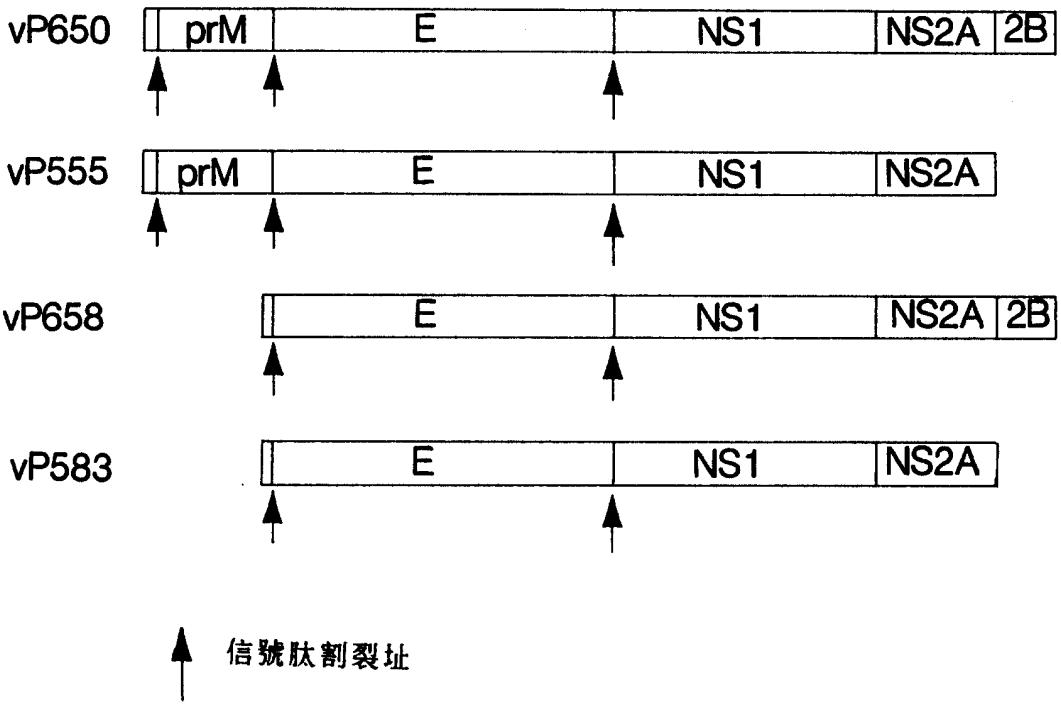
第 1 圖


Sma I
(T→C)
Hind III
Sac I
E
ATG
pJEV6
Sac I
E
NS1
NS2A
NS2B
pJEV7
Eag I
Xho I
(T→C)
Hind III
Sma I
Sac I
prM
E
ATG
pJEV22
Sma vSacI
Sma vEagI
pTP15
Sac vEagI
Sma vSacI
Sma vEagI
pTP15
Sac vEagI
Sac I
(T→C)
Sma I
E
NS1
Eag I
ATG
NS2A
NS2B
pSPJEV11
Sac I
(T→C)
Sma I
E
NS1
Eag I
prM
ATG
NS2A
NS2B
pSPJEV10
突變發生
(T→C)
E
NS1
Eag I
ATG
NS2A
NS2B
pSPJEV11VC
(T→C)
E
NS1
Eag I
prM
ATG
NS2A
NS2B
pSPJEV10VC

第 2 圖


中止 終結子
J3 5′-tga ttttat CGGCCG A -3′
J4 3′-ACT AAAAATA GCCGGC TTCGA-5′
Eag I Hin dIII
開始
J1B 5′-TCGAG CCCGGG atg TGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGTCATAGCCTGCGCAGGAGCCATGAAGTTGTCAAATTTCCAGGGG A -3′
J2B 3′- C GGGCCC TAC ACCGAGCGCTCGAACCGTCAACAGTATCGGACGCGTCCTCGGTACTTCAACAGTTTAAAGGTCCCC TTCGA-5′
Xho I Sma I
Hin dIII
J7 5′-GATCC ATGCATTCTAGA C -3′
J8 3′- G TACGTAAGATCT GGTAC-5′
Bam HI Nco I
開始
J9 5′-AGCTT CCCGGG atg CTTGGCAGTAACAACGGTC-3′
J10 3′- A GGGCCC TAC GAACCGTCATTGTTGCCAG-5′
Hin dIII Sam I
中止 終結子
J37 5′-AAAAACAACAAAAAGA tga ttttat CGGCCG A -3′
J38 3′-TTTTTGTTGTTTTTCT ACT AAAAATA GCCGGC TTCGA-5′
Eag I Hin dIII

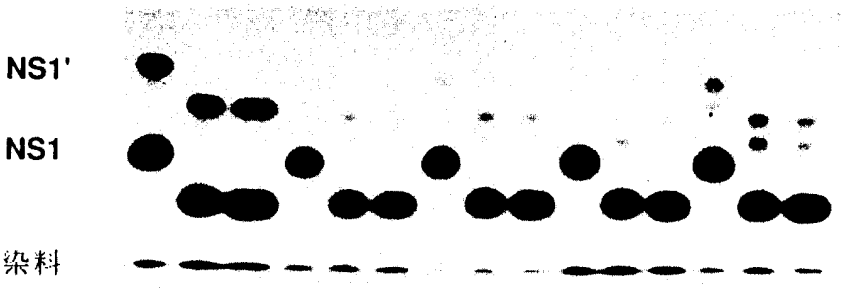
第 3 圖


vP650
prM
E
NS1
NS2A
2B
vP555
prM
E
NS1
NS2A
vP658
E
NS1
NS2A
2B
vP583
E
NS1
NS2A
信號肽割裂址

第 4 圖

細胞結合的 NS1

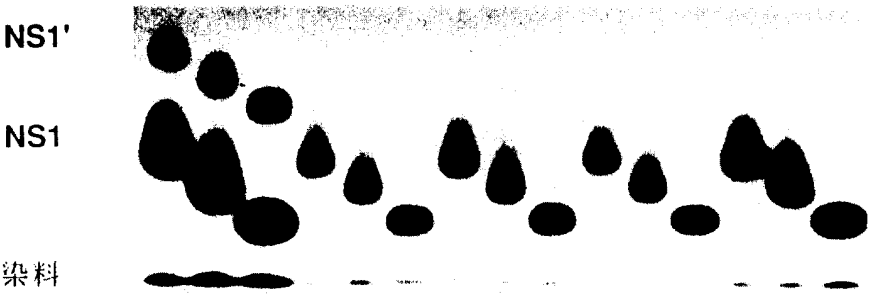
病毒：	JEV			vP650			vP555			vP658			vP583		
糖苷酶：	M	H	F	M	H	F	M	H	F	M	H	F	M	H	F



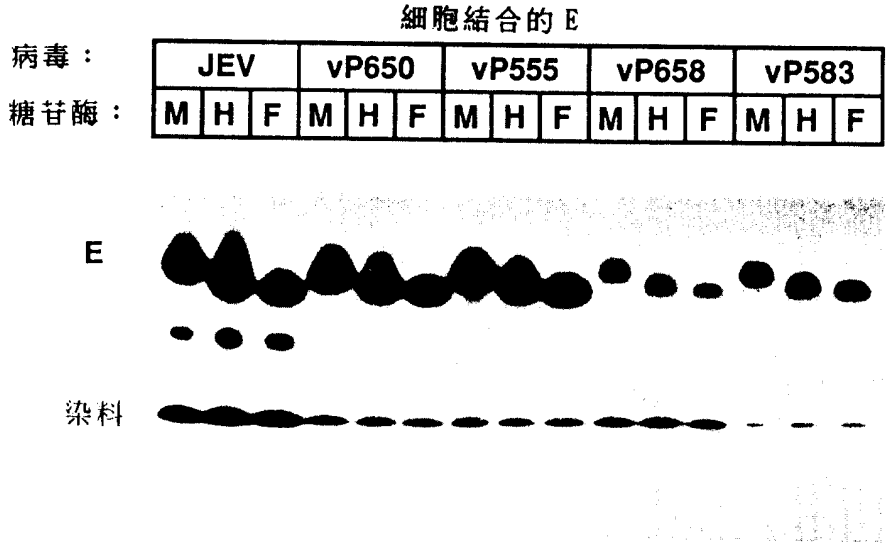
第 5 圖

胞外 NS1

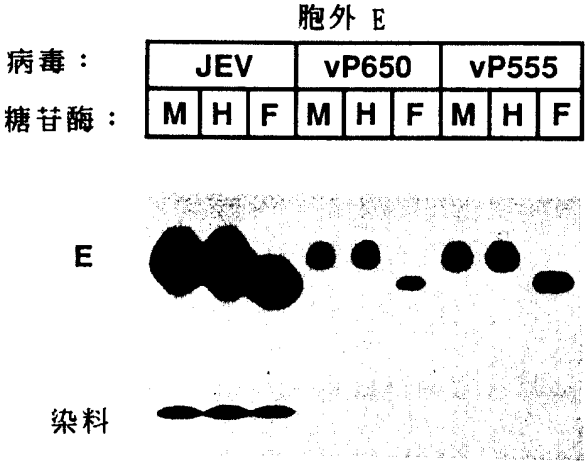
病毒：	JEV			vP650			vP555			vP658			vP583		
糖苷酶：	M	H	F	M	H	F	M	H	F	M	H	F	M	H	F



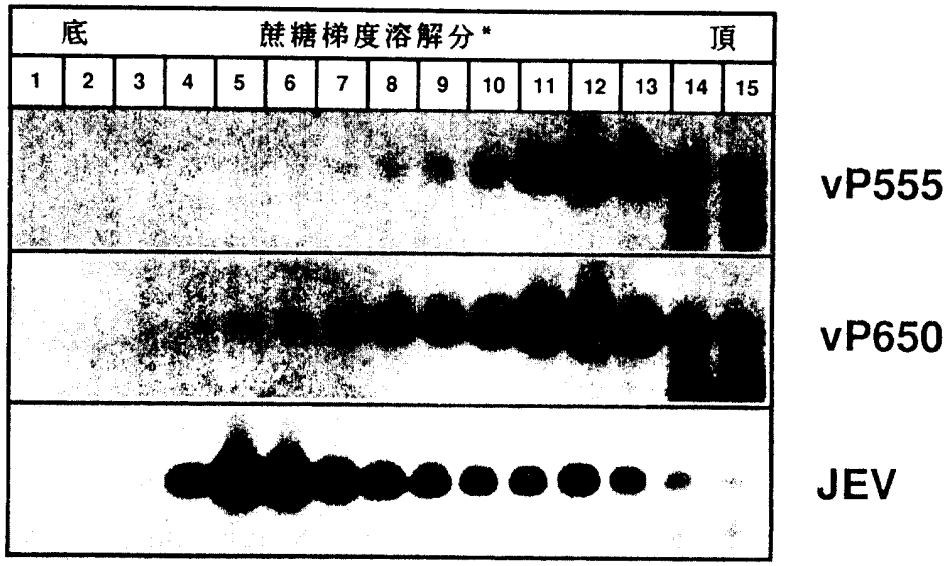
第 6 圖


細胞結合的 E
病毒：
JEV
vP650
vP555
vP658
vP583
糖苷酶：
M H F M H F M H F M H F M H F
E
染料

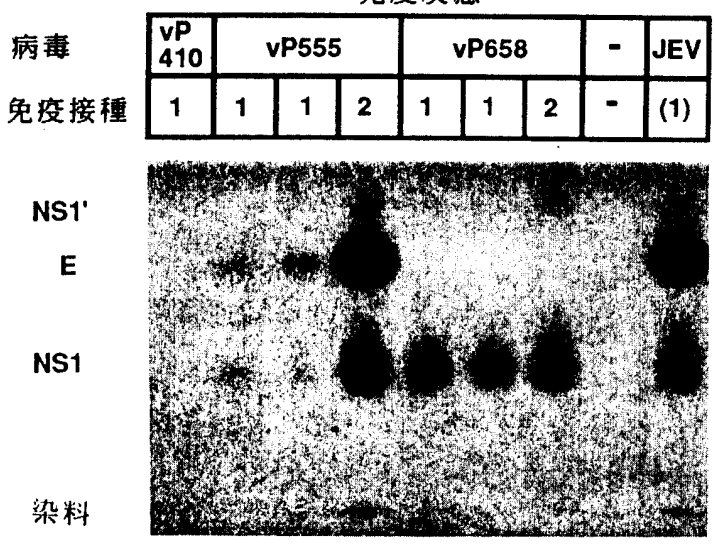
第 7 圖


胞外 E
病毒：
JEV
vP650
vP555
糖苷酶：
M H F M H F M H F
E
染料

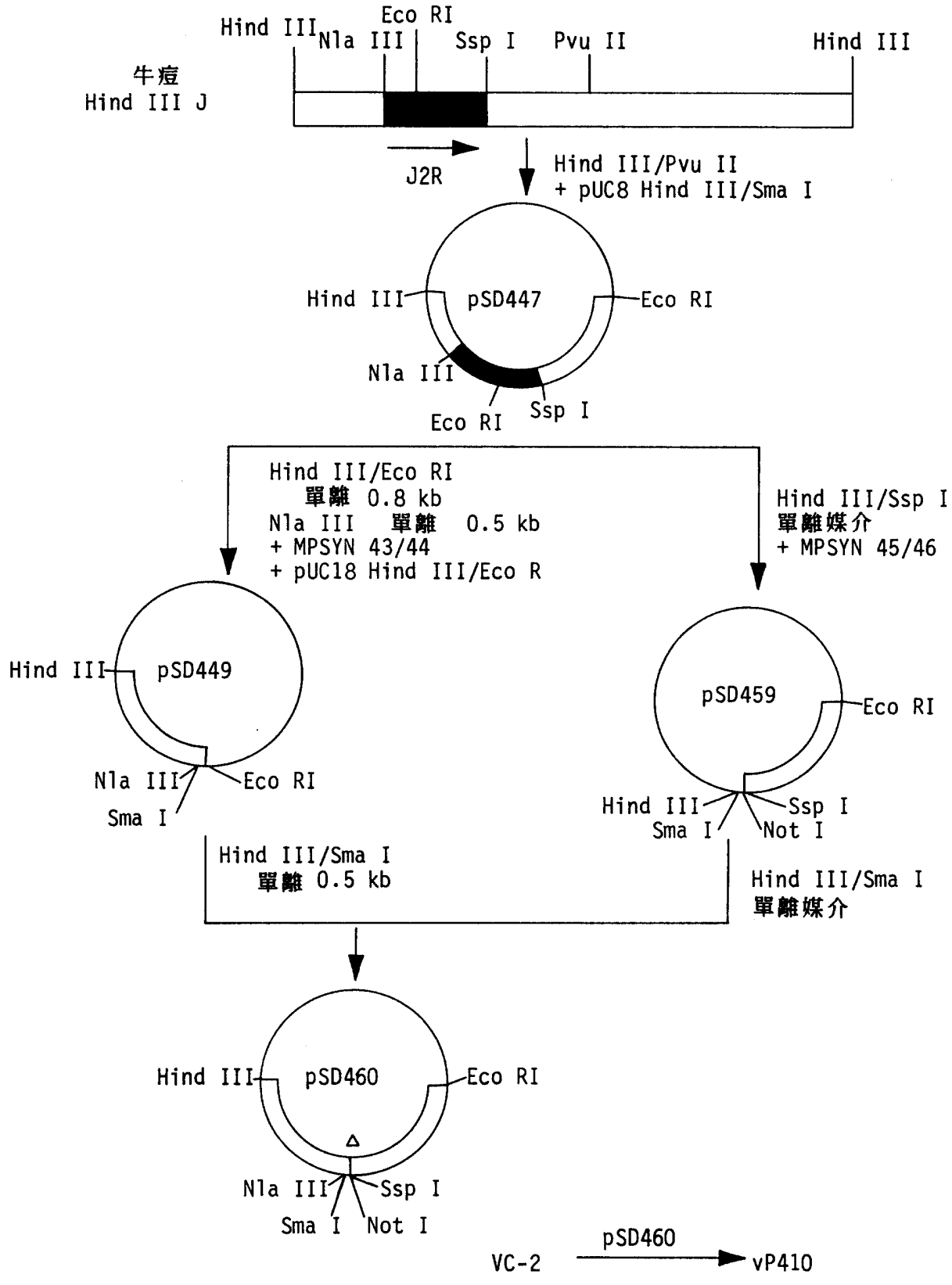
第 8 圖


底
蔗糖梯度溶解分*
頂
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
vP555
vP650
JEV
病毒粒子
SHA

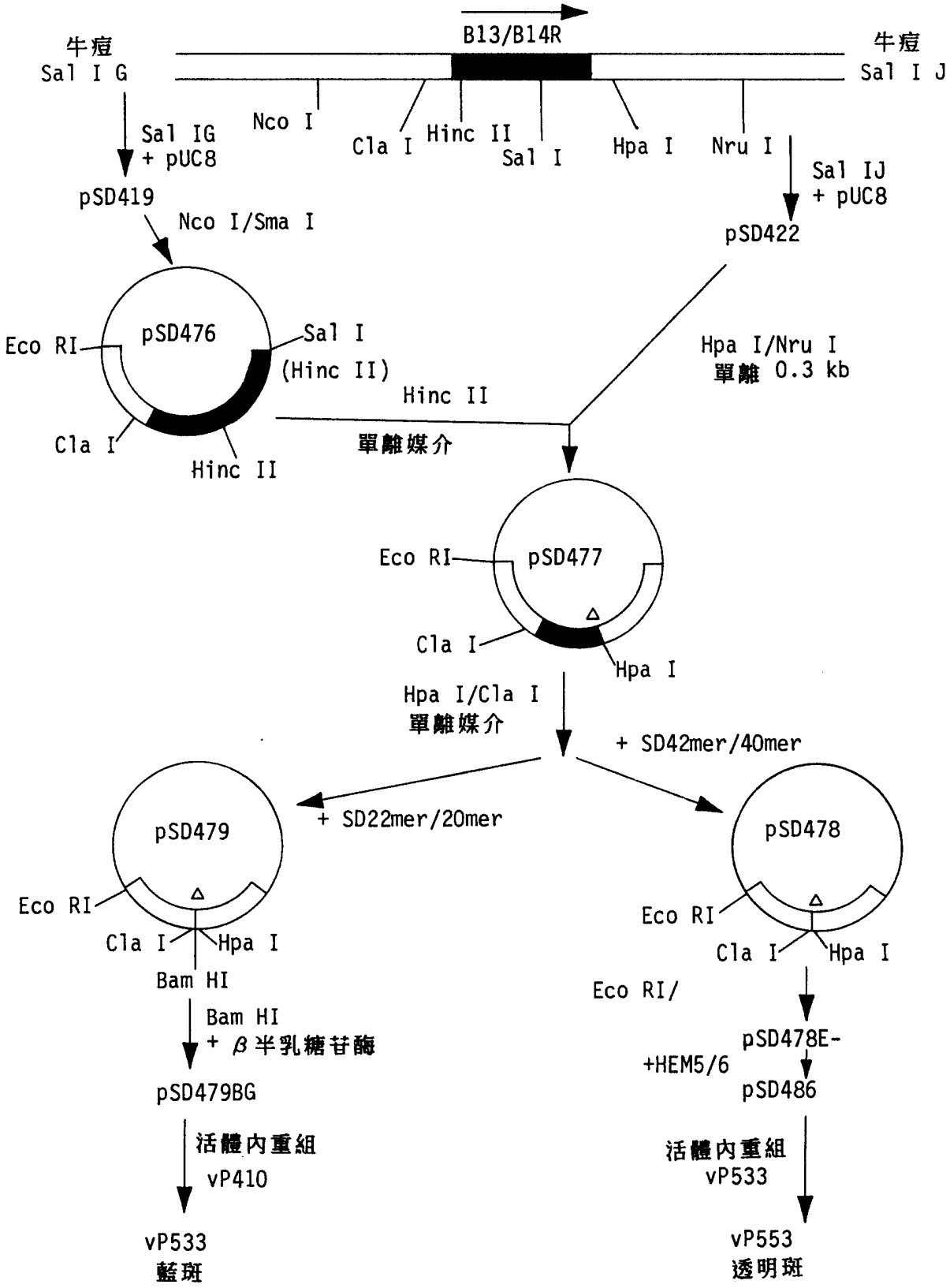
第 9 圖


免疫反應
病毒
vP 410
vP555
vP658
-
JEV
免疫接種
1
1
1
2
1
1
2
-
(1)
NS1'
E
NS1
染料

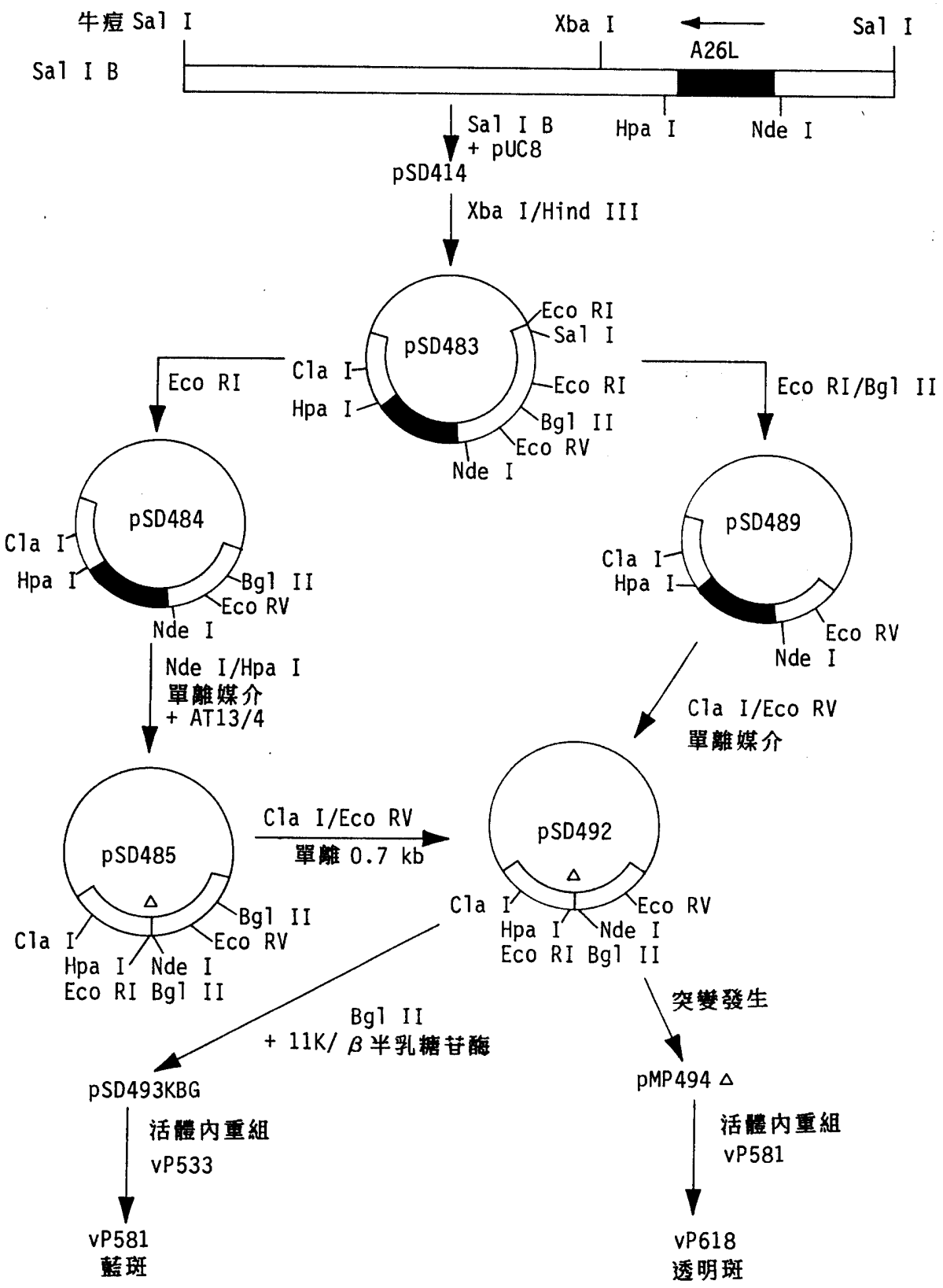
第 10 圖


Hind III
Nla III
Eco RI
Ssp I
Pvu II
Hind III
牛痘
Hind III J
J2R
Hind III/Pvu II
+ pUC8 Hind III/Sma I
pSD447
Hind III
Eco RI
Nla III
Eco RI
Ssp I
Hind III/Eco RI
單離 0.8 kb
Nla III 單離 0.5 kb
+ MPSYN 43/44
+ pUC18 Hind III/Eco R
Hind III/Ssp I
單離媒介
+ MPSYN 45/46
pSD449
Hind III
Nla III
Eco RI
Sma I
pSD459
Eco RI
Hind III
Sma I
Ssp I
Not I
Hind III/Sma I
單離 0.5 kb
Hind III/Sma I
單離媒介
pSD460
Hind III
Eco RI
Nla III
Ssp I
Sma I
Not I
VC-2
pSD460
vP410

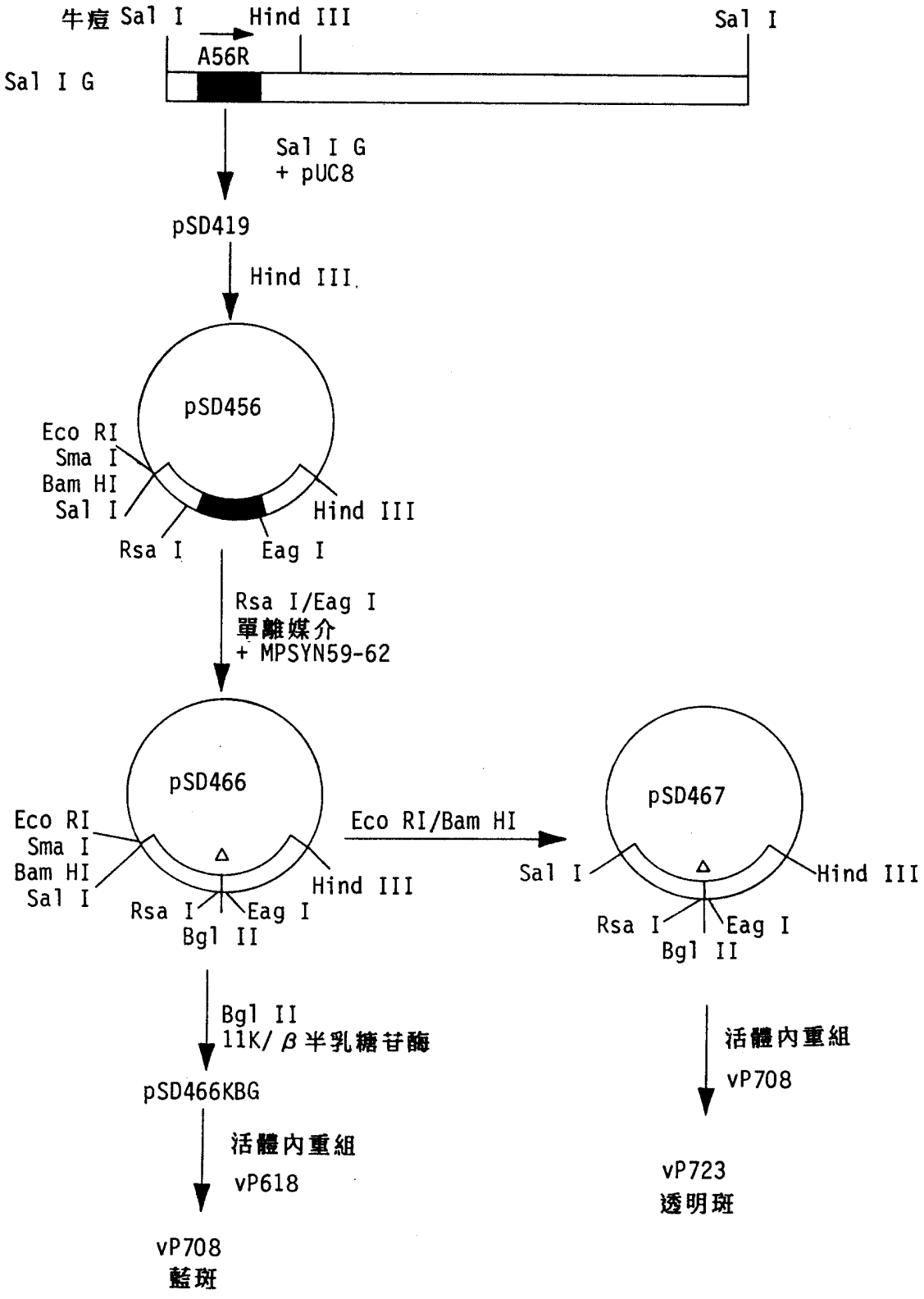
第 11 圖


B13/B14R
牛痘
Sal I G
牛痘
Sal I J
Nco I
Cla I
Hinc II
Sal I
Hpa I
Nru I
Sal IG
+ pUC8
pSD419
Nco I/Sma I
Sal IJ
+ pUC8
pSD422
pSD476
Eco RI
Sal I
(Hinc II)
Cla I
Hinc II
Hinc II
單離媒介
Hpa I/Nru I
單離 0.3 kb
pSD477
Eco RI
Cla I
Hpa I
Hpa I/Cla I
單離媒介
+ SD42mer/40mer
+ SD22mer/20mer
pSD479
Eco RI
Cla I
Hpa I
Bam HI
Bam HI
+ β半乳糖苷酶
pSD479BG
活體內重組
vP410
vP533
藍斑
pSD478
Eco RI
Cla I
Hpa I
Eco RI/
pSD478E-
+HEM5/6
pSD486
活體內重組
vP533
vP553
透明斑

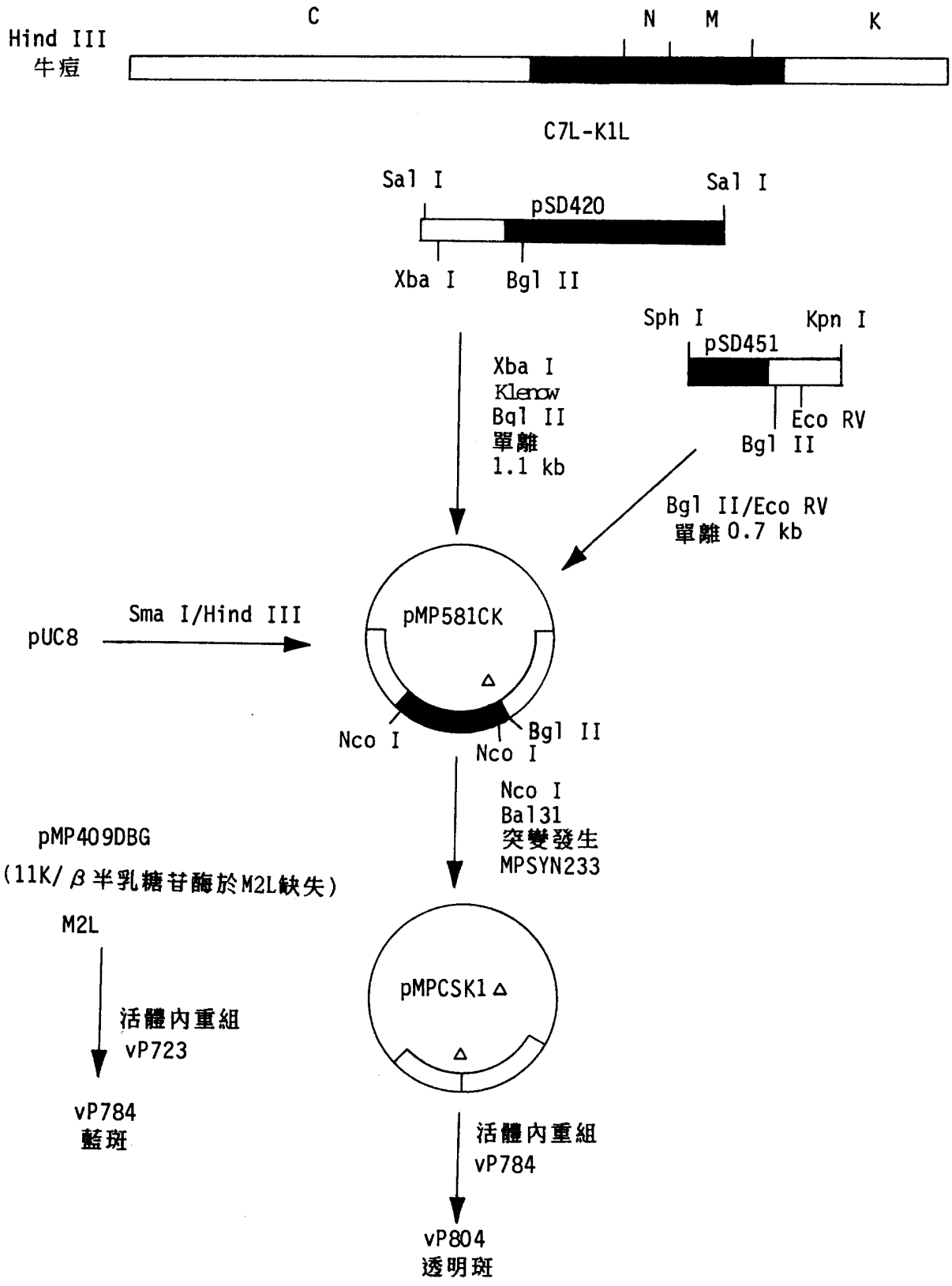
第 12 圖


牛痘 Sal I
Xba I
Sal I
A26L
Sal I B
Sal I B
+ pUC8
Hpa I
Nde I
pSD414
Xba I/Hind III
pSD483
Eco RI
Sal I
Cla I
Eco RI
Hpa I
Bgl II
Eco RV
Nde I
Eco RI
Eco RI/Bgl II
pSD484
Cla I
Hpa I
Bgl II
Eco RV
Nde I
pSD489
Cla I
Hpa I
Eco RV
Nde I
Nde I/Hpa I
單離媒介
+ AT13/4
Cla I/Eco RV
單離媒介
pSD485
Cla I/Eco RV
單離 0.7 kb
pSD492
Bgl II
Cla I
Hpa I
Nde I
Eco RI
Eco RV
Cla I
Hpa I
Nde I
Eco RI Bgl II
Eco RI Bgl II
突變發生
Bgl II
+ 11K/ β半乳糖苷酶
pSD493KBG
pMP494 △
活體內重組
vP533
活體內重組
vP581
vP581
藍斑
vP618
透明斑

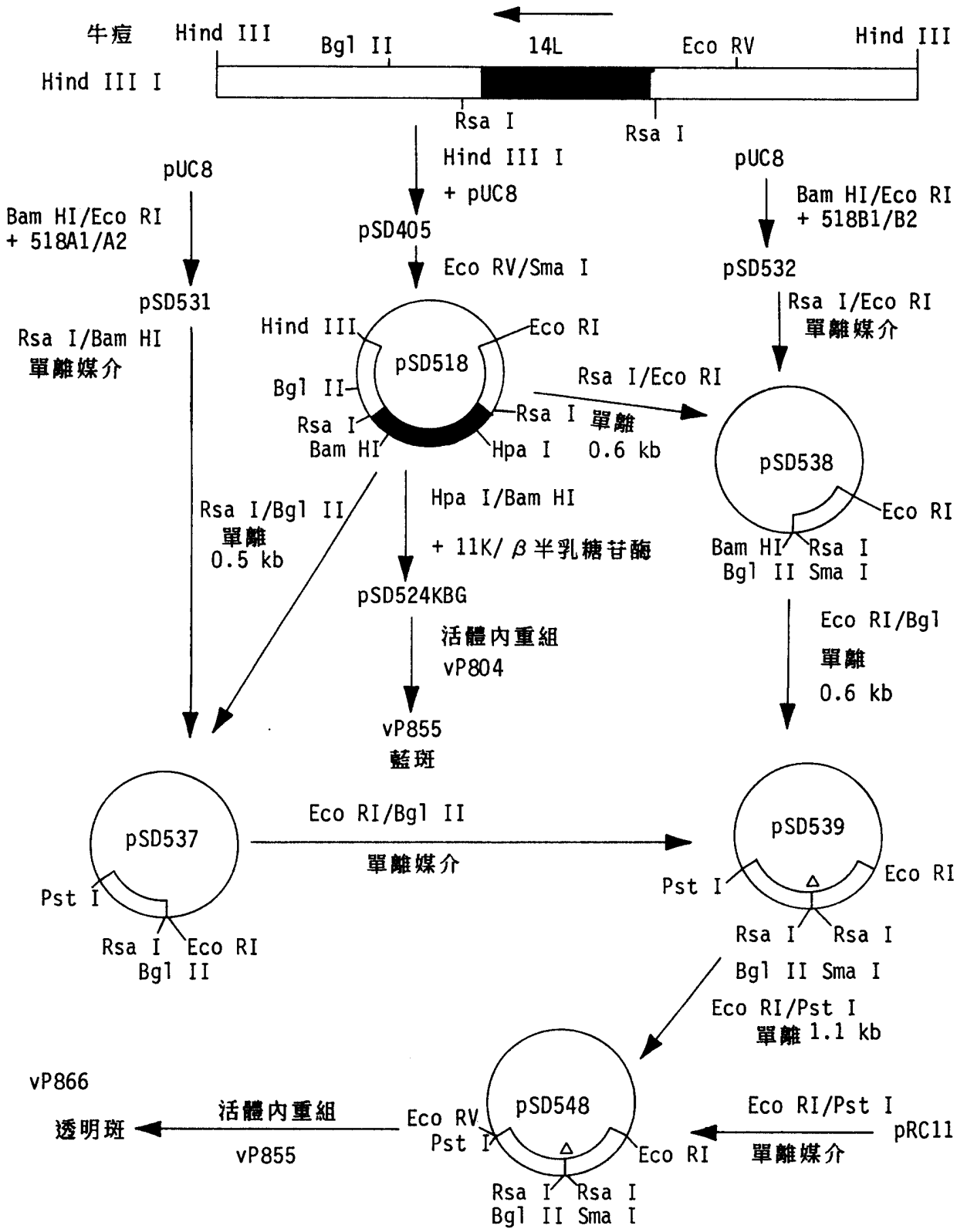
第 13 圖


牛痘 Sal I
Hind III
Sal I
A56R
Sal I G
Sal I G
+ pUC8
pSD419
Hind III
pSD456
Eco RI
Sma I
Bam HI
Sal I
Hind III
Rsa I
Eag I
Rsa I/Eag I
單離媒介
+ MPSYN59-62
pSD466
Eco RI
Sma I
Bam HI
Sal I
Hind III
Rsa I
Eag I
Bgl II
Eco RI/Bam HI
pSD467
Sal I
Hind III
Rsa I
Eag I
Bgl II
Bgl II
11K/β半乳糖苷酶
pSD466KBG
活體內重組
vP618
vP708
藍斑
活體內重組
vP708
vP723
透明斑

第 14 圖


Hind III
牛痘
C
N
M
K
C7L-K1L
Sal I
Sal I
pSD420
Xba I
Bgl II
Sph I
Kpn I
pSD451
Eco RV
Bgl II
Xba I
Klenow
Bgl II
單離
1.1 kb
Bgl II/Eco RV
單離 0.7 kb
pUC8
Sma I/Hind III
pMP581CK
Nco I
Nco I
Bgl II
Nco I
Bal31
突變發生
MPSYN233
pMP409DBG
(11K/β半乳糖苷酶於M2L缺失)
M2L
活體內重組
vP723
vP784
藍斑
pMPCSK1△
活體內重組
vP784
vP804
透明斑

第 15 圖


牛痘
Hind III
Bgl II
14L
Eco RV
Hind III
Hind III I
Rsa I
Rsa I
Hind III I
+ pUC8
pSD405
Eco RV/Sma I
pUC8
Bam HI/Eco RI
+ 518A1/A2
pSD531
Rsa I/Bam HI
單離媒介
pUC8
Bam HI/Eco RI
+ 518B1/B2
pSD532
Rsa I/Eco RI
單離媒介
Hind III
Eco RI
pSD518
Bgl II
Rsa I
Bam HI
Hpa I
Rsa I 單離
0.6 kb
Rsa I/Eco RI
pSD538
Eco RI
Bam HI
Rsa I
Bgl II Sma I
Rsa I/Bgl II
單離
0.5 kb
Hpa I/Bam HI
+ 11K/β半乳糖苷酶
pSD524KBG
活體內重組
vP804
vP855
藍斑
Eco RI/Bgl II
單離
0.6 kb
pSD537
Eco RI/Bgl II
單離媒介
pSD539
Pst I
Rsa I
Eco RI
Bgl II
Pst I
Eco RI
Rsa I
Rsa I
Bgl II Sma I
Eco RI/Pst I
單離 1.1 kb
vP866
透明斑
活體內重組
vP855
pSD548
Eco RV
Pst I
Eco RI
Eco RI/Pst I
單離媒介
pRC11
Rsa I
Rsa I
Bgl II Sma I

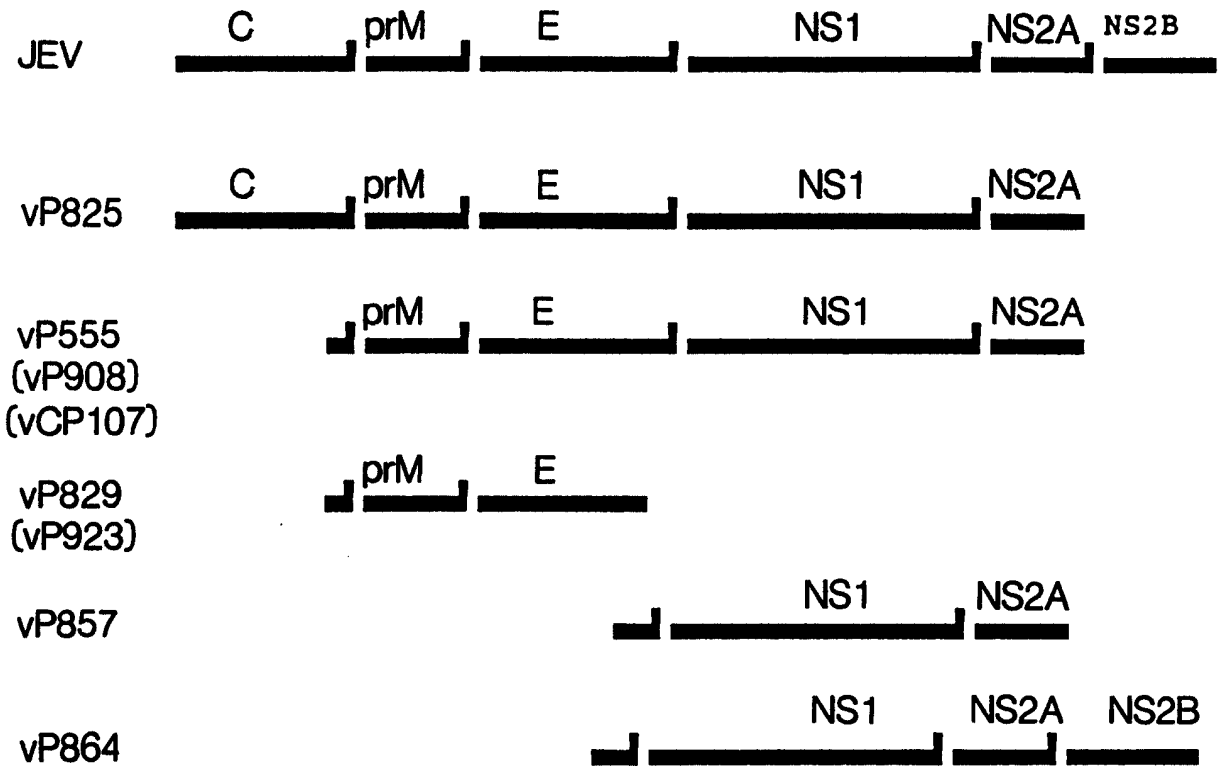
第 16 圖

```
   1 ATGACTAAAA AACCAGGAGG GCCCGGTAAA AACCGGGCTA TCAATATGCT GAAACGCGGC
  61 TTACCCCGCG TATTCCCACT AGTGGGAGTG AAGAGGGTAG TGATGAGCTT GTTGGACGGC
 121 AGAGGGCCAG TACGTTTCGT GCTGGCTCTT ATCACGTTCT TCAAGTTTAC AGCATTAGCC
 181 CCGACCAAGG CGCTTTTAGG CCGATGGAAA GCAGTGGAAA AGAGTGTGGC AATGAAACAT
 241 CTTACTAGTT TCAAACGAGA ACTCGGAACA CTCATTGACG CCGTGAACAA GCGGGGCAGA
 301 AAGCAAAACA AAAGAGGAGG AAATGAAGGC TCAATCATGT GGCTCGCGAG CTTGGCAGTT
 361 GTCATAGCCT GCGCAGGAGC CATGAAGTTG TCAAATTTCC AGGGGAAGCT TTTGATGACC
 421 GTCAACAACA CGGACATTGC AGACGTTATC GTGATTCCCA CCTCAAAAGG AGAGAACAGA
 481 TGTTGGGTCC GGGCAATCGA CGTCGGCTAC ATGTGTGAGG ACACTATCAC GTACGAATGT
 541 CCTAAGCTCA CCATGGGCAA TGATCCAGAG GACGTGGACT GTTGGTGTGA CAACCAAGAA
 601 GTCTACGTCC AATATGGACG GTGCACGCGG ACCAGGCATT CCAAGCGAAG CAGGAGATCC
 661 GTGTCGGTCC AAACACATGG GGAGAGTTCA CTAGTGAATA AAAAAGAGGC TTGGCTGGAT
 721 TCAACGAAAG CCACACGATA CCTCATGAAA ACTGAGAACT GGATCGTAAG GAATCCTGGC
 781 TATGCTTTCC TGGCGGCGAT ACTTGGCTGG ATGCTTGGCA GTAACAACGG TCAACGCGTG
 841 GTATTCACCA TCCTCCTGCT GTTGGTCGCT CCGGCTTACA GTTTCAACTG TCTGGGAATG
 901 GGCAATCGTG ACTTCATAGA AGGAGCCAGT GGAGCCACTT GGGTGGACTT GGTGCTAGAA
 961 GGAGACAGCT GCTTGACAAT TATGGCAAAC GACAAACCAA CATTGGACGT CCGCATGATC
1021 AACATCGAAG CTGTCCAACT TGCTGAGGTC AGAAGTTACT GCTATCATGC TTCAGTCACT
1081 GACATTTCGA CGGTGGCTCG GTGCCCCACG ACTGGAGAAG CTCACAACGA GAAGCGAGCT
1141 GATAGTAGCT ATGTGTGCAA ACAAGGCTTC ACTGATCGTG GGTGGGGCAA CGGATGTGGA
1201 CTTTTCGGGA AGGGAAGCAT TGACACATGT GCAAAATTCT CCTGCACCAG TAAGGCGATT
1261 GGGAGAACAA TCCAGCCAGA AAACATCAAA TACGAAGTTG GCATTTTTGT GCATGGAACC
1321 ACCACTTCGG AAAACCATGG GAATTATTCA GCGCAAGTTG GGGCGTCCCA GGCGGCAAAG
1381 TTTACAGTAA CACCCAATGC TCCTTCGATA ACCCTTAAAC TTGGTGACTA CGGAGAAGTC
1441 ACACTGGACT GTGAGCCAAG GAGTGGACTA AACACTGAAG CGTTTTACGT CATGACCGTG
1501 GGGTCAAAGT CATTTTTGGT CCACAGGGAA TGGTTTCATG ATCTCGCTCT CCCTTGGACG
1561 CCCCCTTCGA GCACAGCGTG GAGAAACAGA GAACTCCTCA TGGAATTTGA AGAGGCGCAC
1621 GCCACAAAAC AGTCCGTTGT TGCTCTTGGG TCACAGGAAG GAGGCCTCCA TCAGGCGTTG
1681 GCAGGAGCCA TCGTGGTGGA GTACTCAAGC TCAGTGAAGT TAACATCAGG CCACCTAAAA
1741 TGCAGGCTGA AAATGGACAA ACTGGCTCTG AAAGGCACAA CCTATGGCAT GTGCACAGAA
1801 AAATTCTCGT TCGCGAAAAA TCCGGCGGAC ACTGGTCACG GAACAGTTGT CATTGAACTT
1861 TCCTACTCTG GGAGTGATGG CCCTTGCAAA ATTCCGATTG TCTCCGTTGC GAGCCTCAAT
1921 GACATGACCC CCGTCGGGCG GCTGGTGACA GTGAACCCCT TCGTCGCGAC TTCCAGCGCC
1981 AACTCAAAGG TGCTAGTCGA GATGGAACCC CCCTTCGGAG ACTCCTACAT CGTAGTTGGA
2041 AGGGGAGACA AGCAGATTAA CCACCATTGG CACAAGGCTG GAAGCACGCT GGGCAAAGCC
2101 TTTTCAACGA CTTTGAAGGG AGCTCAAAGA CTGGCAGCGT TGGGCGACAC AGCCTGGGAC
2161 TTTGGCTCTA TTGGAGGGGT TTTCAACTCC ATAGGGAAAG CCGTTCACCA AGTGTTTGGT
2221 GGTGCCTTCA GAACACTCTT CGGGGGAATG TCTTGGATCA CACAAGGGCT AATGGGGGCC
2281 CTACTACTCT GGATGGGCGT TAACGCACGA GACCGATCAA TTGCTTTGGC CTTCTTAGCC
2341 ACAGGAGGTG TGCTCGTGTT CTTAGCGACC AATGTGCATG CTGACACTGG ATGTGCCATT
2401 GACATCACAA GAAAAGAGAT GAGGTGTGGA AGTGGCATCT TCGTGCACAA CGACGTGGAA
2461 GCCTGGGTGG ATAGGTATAA ATATTTGCCA GAAACGCCCA GATCCCTGGC GAAGATCGTC
2521 CACAAAGCGC ACAAGGAAGG CGTGTGCGGA GTCAGATCTG TCACCAGACT GGAGCACCAA
2581 ATGTGGGAAG CCGTACGGGA CGAATTGAAC GTCCTACTCA AAGAGAACGC AGTGGACCTC
2641 AGCGTGGTGG TGAACAAGCC CGTGGGGAGA TATCGCTCAG CCCCTAAACG CCTATCCATG
2701 ACGCAAGAGA AGTTTGAAAT GGGCTGGAAA GCATGGGGAA AAAGCATTCT CTATGCCCCG
2761 GAATTGGCTA ACTCCACATT TGTCGTAGAT GGACCTGAGA CAAAGGAATG CCCTGATGAG
2821 CACAGAGCTT GGAACAGCAT GCAAATCGAA GACTTCGGCT TTGGCATCAC ATCAACCCGT
2881 GTGTGGCTGA AGATCAGAGA GGAGAGCACT GACGAGTGTG ATGGAGCGAT CATAGGCACG
2941 GCTGTCAAAG GACATGTGGC AGTCCATAGT GACTTGTCGT ACTGGATTGA GAGTCGCTAC
3001 AACGACACAT GGAAACTTGA GAGGGCAGTC TTTGGAGAGG TCAAATCTTG CACTTGGCCA
```

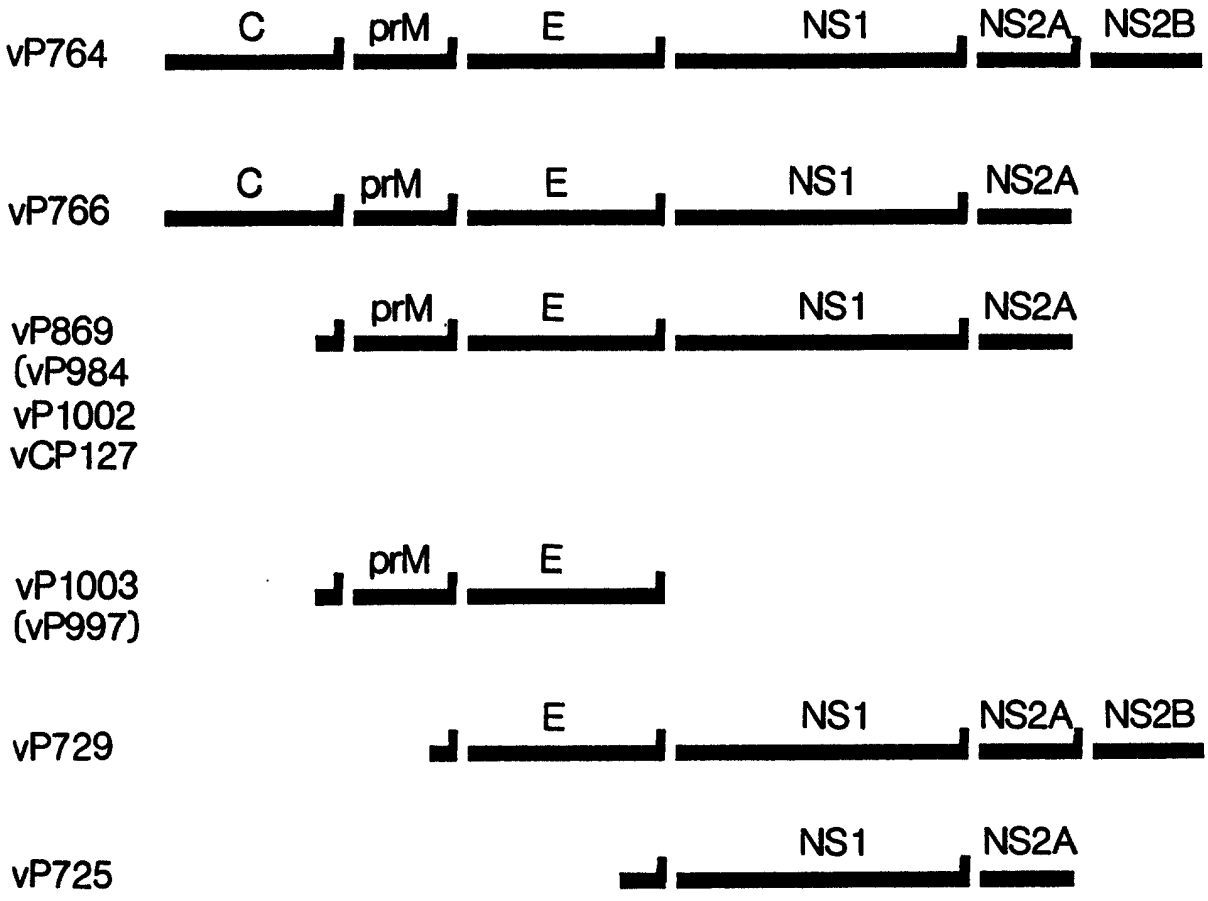
第 17A 圖

```
3061 GAGACACACA CCCTTTGGGG AGATGGTGTT GAGGAAAGTG AACTCATCAT TCCGCATACC
3121 ATAGCCGGAC CAAAAAGCAA GCACAATCGG AGGGAAGGGT ATAAGACACA AAACCAGGGA
3181 CCCTGGGACG AGAATGGTAT AGTCTTGGAC TTTGATTATT GCCCAGGGAC AAAAGTCACC
3241 ATTACAGAGG ATTGTGGCAA GAGAGGCCCT TCGGTCAGAA CCACTACTGA CAGTGGAAAG
3301 TTGATCACTG ACTGGGTCTG TCGCAGTTGC TCCCTTCCGC CCCTACGATT CCGGACAGAA
3361 AATGGCTGCT GGTACGGAAT GGAAATCAGA CCTGTCAGGC ATGATGAAAC AACACTCGTC
3421 AGATCACAGG TTGATGCTTT TAATGGTGAA ATGGTTGACC CTTTTCAGCT GGGCCTTCTG
3481 GTGATGTTTC TGGCCACCCA GGAGGTCCTT CGCAAGAGGT GGACGGCCAG ATTGACTATT
3541 CCCGCGGTTT TGGGGGCCCT ACTTGTGCTG ATGCTTGGGG GCATCACTTA CACTGATTTG
3601 GCGAGGTATG TGGTGCTAGT CGCTGCTGCT TTCGCAGAAG CCAACAGTGG AGGAGACGTG
3661 CTGCACCTTG CTTTGATTGC CGTTTTTAAG ATCCAACCAG CATTTCTAGT GATGAACATG
3721 CTTAGCACGA GATGGACGAA CCAAGAAAAC GTGGTTCTGG TCCTAGGGGC TGCCTTTTTT
3781 CAATTAGCCT CAGTAGATCT GCAAATAGGA GTCCACGGAA TCCTGAATGC CGCCGCTATA
3841 GCATGGATGA TTGTCCGAGC GATCACTTTC CCCACAACCT CCTCCGTCAC CATGCCAGTC
3901 TTAGCGCTTC TAACTCCGGG AATGAGGGCT CTATACCTAG ACACTTACAG AATCATCCTC
3961 CTCGTCATAG GGATTTGCTC CCTGCTGCAA GAGAGGAAAA AGACCATGGC AAAAAAGAAA
4021 GGAGCTGTAC TCTTGGGCTT AGCGCTCACA TCCACTGGAT GGTTCTCGCC CACCACTATA
4081 GCTGCCGGAC TAATGGTCTG CAACCCAAAC AAGAAGAGAG GGTGGCCAGC TACTGAGTTT
4141 TTGTCGGCAG TTGGATTGAT GTTTGCCATC GTAGGTGGTT TGGCCGAGTT GGATATTGAA
4201 TCCATGTCAA TACCCTTCAT GCTGGCAGGT CTTATGGCAG TGTCCTACGT GGTGTCAGGA
4261 AAAGCAACAG ATATGTGGCT TGAACGGGCC GCCGACATCA GCTGGGAGAT GGATGCTGCA
4321 ATCACAGGAA GCAGTCGGAG GCTGGATGTG AAGCTGGATG ATGACGGAGA TTTTCACTTG
4381 ATTGATGATC CCGGTGTTCC ATGGAAGGTC TGGGTCTTGC GCATGTCTTG CATTGGCTTA
4441 GCCGCCCTCA CGCCTTGGGC CATTGTTCCC GCCGCTTTTG GTTATTGGCT CACTTTAAAA
4501 ACAACAAAAA GA
```

第 17B 圖


JEV
C
prM
E
NS1
NS2A
NS2B
vP825
C
prM
E
NS1
NS2A
vP555
(vP908)
(vCP107)
prM
E
NS1
NS2A
vP829
(vP923)
prM
E
vP857
NS1
NS2A
vP864
NS1
NS2A
NS2B

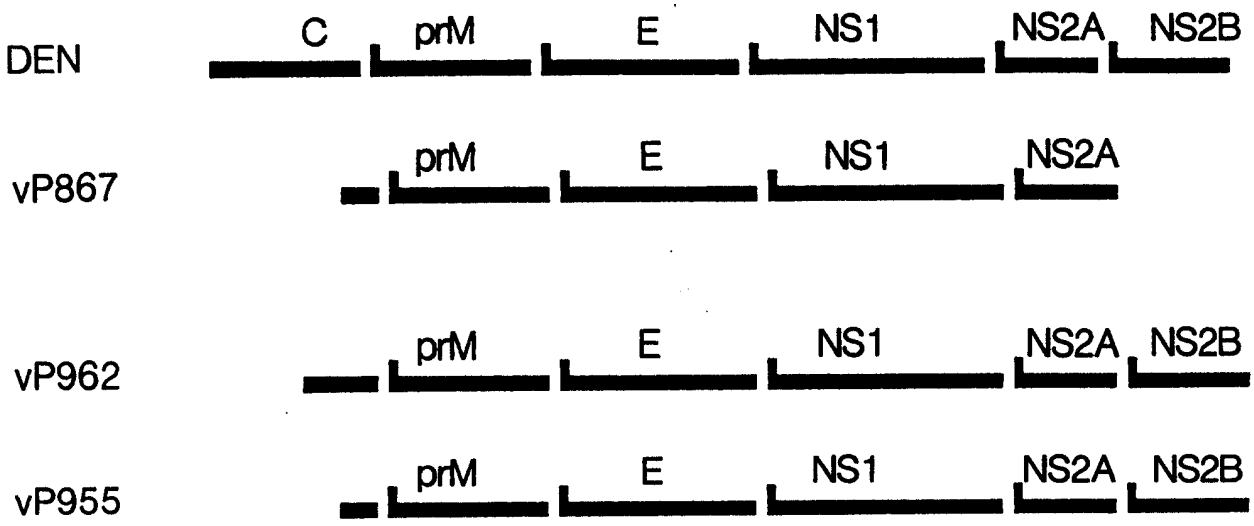
第 18 圖


vP764
C
prM
E
NS1
NS2A
NS2B
vP766
C
prM
E
NS1
NS2A
vP869
(vP984
vP1002
vCP127
prM
E
NS1
NS2A
vP1003
(vP997)
prM
E
vP729
E
NS1
NS2A
NS2B
vP725
NS1
NS2A

第 19 圖

```
3332 AGATCTTGCA CGTTACCCCC CCTACGTTTC AAAGGAGAAG ACGGGTGCTG GTACGGCATG
3392 GAAATCAGAC CAGTCAAGGA GAAGGAAGAG AACCTAGTTA AGTCAATGGT CTCTGCAGGG
3452 TCAGGAGAAG TGGACAGTTT TTCACTAGGA CTGCTATGCA TATCAATAAT GATCGAAGAG
3512 GTAATGAGAT CCAGATGGAG CAGAAAAATG CTGATGACTG GAACATTGGC TGTGTTCCTC
3572 CTTCTCACAA TGGGACAATT GACATGGAAT GATCTGATCA GGCTATGTAT CATGGTTGGA
3632 GCCAACGCTT CAGACAAGAT GGGGATGGGA ACAACGTACC TAGCTTTGAT GGCCACTTTC
3692 AGAATGAGAC CAATGTTCGC AGTCGGGCTA CTGTTTCGCA GATTAACATC TAGAGAAGTT
3752 CTTCTTCTTA CAGTTGGATT GAGTCTGGTG GCATCTGTAG AACTACCAAA TTCCTTAGAG
3812 GAGCTAGGGG ATGGACTTGC AATGGGCATC ATGATGTTGA AATTACTGAC TGATTTTCAG
3872 TCACATCAGC TATGGGCTAC CTTGCTGTCT TTAACATTTG TCAAAACAAC TTTTTCATTG
3932 CACTATGCAT GGAAGACAAT GGCTATGATA CTGTCAATTG TATCTCTCTT CCCTTTATGC
3992 CTGTCCACGA CTTCTCAAAA AACAACATGG CTTCCGGTGT TGCTGGGATC TCTTGGATGC
4052 AAACCACTAA CCATGTTTCT TATAACAGAA AACAAAATCT GGGGAAGGAA AAGCTGGCCT
4112 CTCAATGAAG GAATTATGGC TGTTGGAATA GTTAGCATTC TTCTAAGTTC ACTTCTCAAG
4172 AATGATGTGC CACTAGCTGG CCCACTAATA GCTGGAGGCA TGCTAATAGC ATGTTATGTC
4232 ATACCTGGAA GCTCGGCCGA TTTATCACTG GAGAAAGCGG CTGAGGTCTC CTGGGAAGAA
4292 GAAGCAGAAC ACTCTGGTGC CTCACACAAC ATACTAGTGG AGGTCCAAGA TGATGGAACC
4352 ATGAAGATAA AGGATGAAGA GAGAGATGAC ACACTCACCA TTCTCCTCAA AGCAACTCTG
4412 CTAGCAATCT CAGGGGTATA CCCAATGTCA ATACCGGCGA CCCTCTTTGT GTGGTATTTT
4472 TGGCAGAAAA AAAAACAGAG ATCAGGAGTG CTATGGGACA CACCCAGCCC TCCAGAAGTG
4532 GAAAGAGCAG TCCTTGATGA TGGCATTTAT AGAATTCTCC AAAGAGGATT GTTGGGCAGG
4592 TCTCAAGTAG GAGTAGGAGT TTTTCAAGAA GGCGTGTTCC ACACAATGTG GCACGTCACC
4652 AGGGGAGCTG TCCTCATGTA CCAAGGGAAG AGACTGGAAC CAAGTTGGGC CAGTGTTAAA
4712 AAAGACTTGA TCTCATATGG AGGAGGTTGG AGGTTTCAAG GATCCTGGAA CGCGGGAGAA
4772 GAAGTGCAGG TGATTGCTGT TGAACCGGGG AAGAACCCCA AAAATGTACA GACAGCGCCG
4832 GGTACCTTCA AGACCCCTGA AGGCGAAGTT GGAGCCATAG CTCTAGACTT TAAACCCGGC
4892 ACATCTGGAT CTCCTATCGT GAACAGAGAG GGAAAAATAG TAGGTCTTTA TGGAAATGGA
4952 GTGGTGACAA CAAGTGGTAC CTACGTCAGT GCCATAGCTC AAGCTAAAGC ATCACAAGAA
5012 GGGCCTCTAC CAGAGATTGA GGACGAGGTG TTTAGGAAAA GAAACTTAAC AATAATGGAC
5072 CTACATCCAG GATCGGGAAA AACAAGAAGA TACCTTCCAG CCATAGTCCG TGAGGCCATA
5132 AAAAGAAAGC TGCGCACGCT AGTCTTAGCT CCCACAAGAG TTGTCGCTTC TGAAATGGCA
5192 GAGGCGCTCA AGGGAATGCC AATAAGGTAT CAGACAACAG CAGTGAAGAG TGAACACACG
5252 GGAAAGGAGA TAGTTGACCT TATGTGTCAC GCCACTTTCA CTATGCGTCT CCTGTCTCCT
5312 GTGAGAGTTC CCAAGGATAA TATGATTATC ATGGATGAAG CACATTTCAC CGATCCAGCC
5372 AGCATAGCAG CCAGAGGGTA TATCTCAACC CGAGTGGGTA TGGGTGAAGC AGCTGCGATT
5432 TTCATGACAG CCACTCCCCC CGGATCGGTG GAGGCCTTTC CACAGAGCAA TGCAGTTATC
5492 CAAGATGAGG AAAGAGACAT TCCTGAAAGA TCATGGAACT CAGGCTATGA CTGGATCACT
5552 GATTTCCCAG GTAAAACAGT CTGGTTTGTT CCAAGCATCA AATCAGGAAA TGACATTGCC
5612 AACTGTTTAA GAAAGAATGG GAAACGGGTG GTCCAATTGA GCAGAAAAAC TTTTGACACT
5672 GAGTACCAGA AAACAAAAAA TAACGACTGG GACTATGTTG TCACAACAGA CATATCCGAA
5732 ATGGGAGCAA ACTTCCGAGC CGACAGGGTA ATAGACCCGA GGCGGTGCCT GAAACCGGTA
5792 ATACTAAAAG ATGGCCCAGA GCGTGTCATT CTAGCCGGAC CGATGCCAGT GACTGTGTAC
5852 GCCGCCCAGA GGAGAGGAAG AATTGGAAGG AACCAAAATA AGGAAGGCGA TCAGTATATT
5912 TACATGGGAC AGCCTCTAAA CAATGATGAG GACCACGCCC ATTGGACAGA AGCAAAAATG
5972 CTCCTTGACA ACATAAACAC ACCAGAAGGG ATTATCCCAG CCCTCTTTGA GCCGGAGAGA
6032 GAAAAGAGTG CAGCAATAGA CGGGGAATAC AGACTACGGG GTGAAGCGAG GAAAACGTTC
6092 GTGGAGCTCA TGAGAAGAGG AGATCT
```

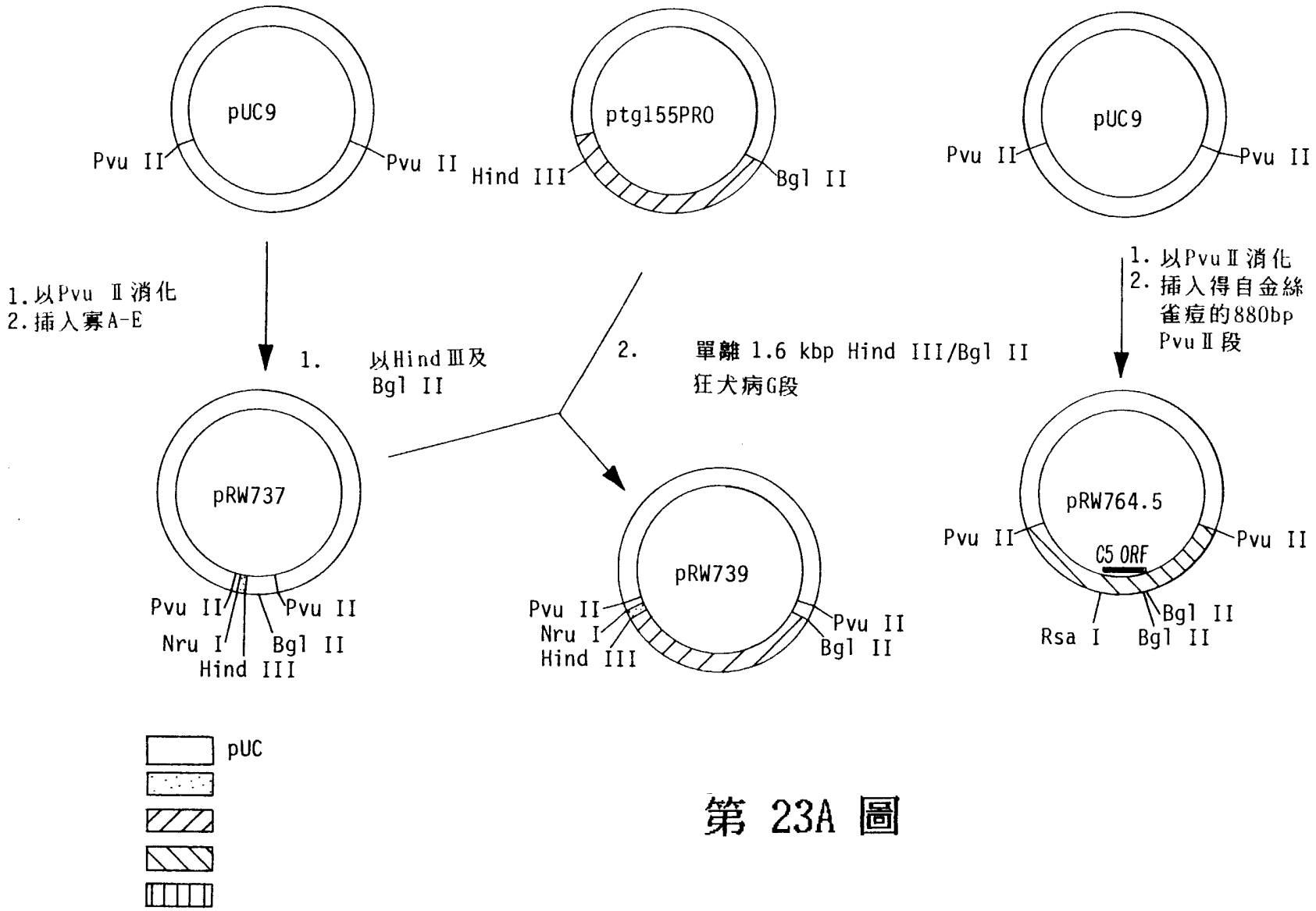
第 20 圖


DEN
C
prM
E
NS1
NS2A
NS2B
vP867
prM
E
NS1
NS2A
vP962
prM
E
NS1
NS2A
NS2B
vP955
prM
E
NS1
NS2A
NS2B

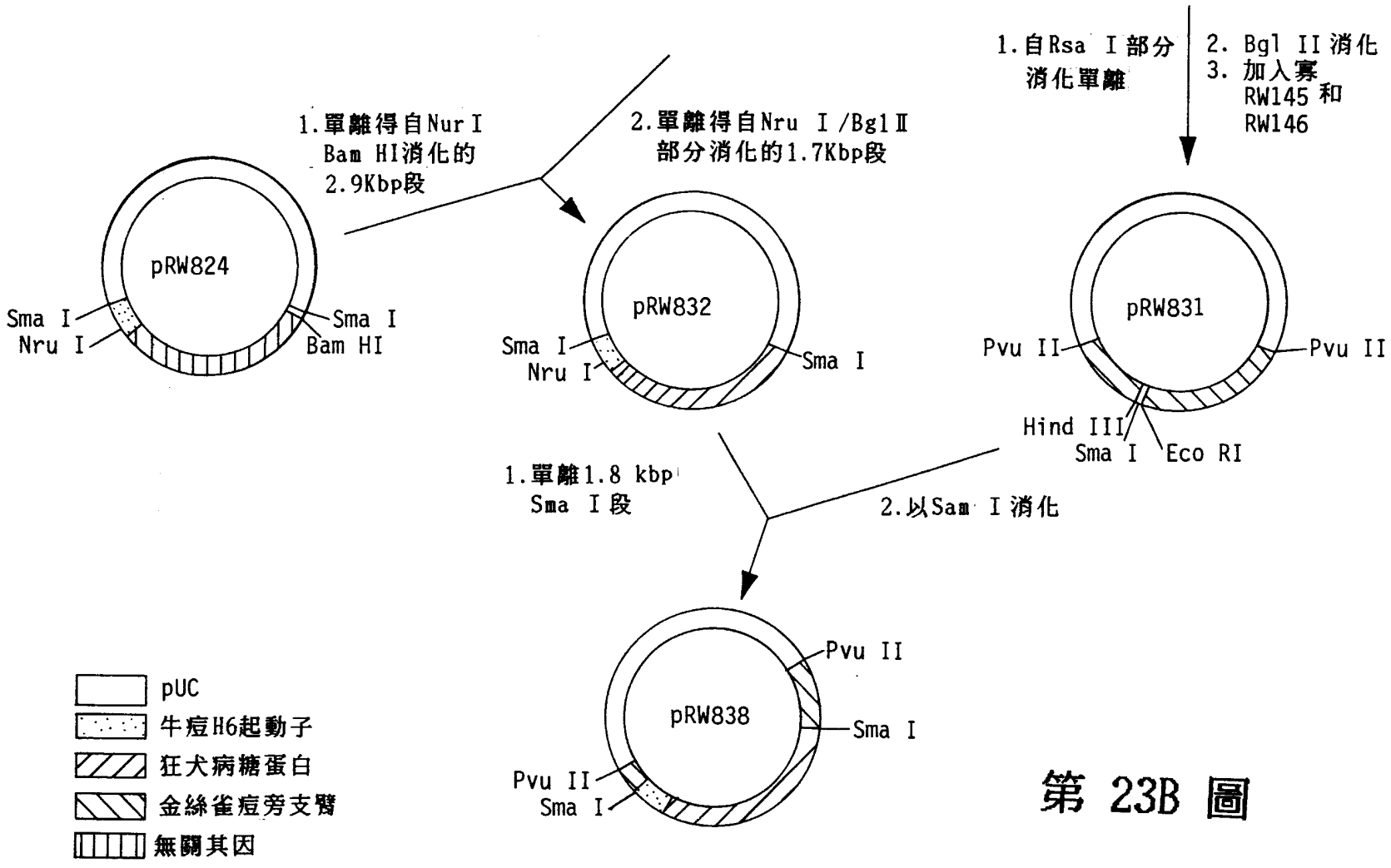
第 21 圖

```
   1 TGAATGTTAA ATGTTATACT TTGGATGAAG CTATAAATAT GCATTGGAAA AATAATCCAT
  61 TTAAAGAAAG GATTCAAATA CTACAAAACC TAAGCGATAA TATGTTAACT AAGCTTATTC
 121 TTAACGACGC TTTAAATATA CACAAATAAA CATAATTTTT GTATAACCTA ACAAATAACT
 181 AAAACATAAA AATAATAAAA GGAAATGTAA TATCGTAATT ATTTTACTCA GGAATGGGGT
 241 TAAATATTTA TATCACGTGT ATATCTATAC TGTTATCGTA TACTCTTTAC AATTACTATT
 301 ACGAATATGC AAGAGATAAT AAGATTACGT ATTTAAGAGA ATCTTGTCAT GATAATTGGG
 361 TACGACATAG TGATAAATGC TATTTCGCAT CGTTACATAA AGTCAGTTGG AAAGATGGAT
 421 TTGACAGATG TAACTTAATA GGTGCAAAAA TGTTAAATAA CAGCATTCTA TCGGAAGATA
 481 GGATACCAGT TATATTATAC AAAAATCACT GGTTGGATAA AACAGATTCT GCAATATTCG
 541 TAAAAGATGA AGATTACTGC GAATTTGTAA ACTATGACAA TAAAAAGCCA TTTATCTCAA
 601 CGACATCGTG TAATTCTTCC ATGTTTTATG TATGTGTTTC AGATATTATG AGATTACTAT
 661 AAACTTTTTG TATACTTATA TTCCGTAAAC TATATTAATC ATGAAGAAAA TGAAAAAGTA
 721 TAGAAGCTGT TCACGAGCGG TTGTTGAAAA CAACAAAATT ATACATTCAA GATGGCTTAC
 781 ATATACGTCT GTGAGGCTAT CATGGATAAT CAGAATGCAT CTCTAAATAG GTTTTTGGAC
 841 AATGGATTCG ACCCTAACAC GGAATATGGT ACTCTACAAT CTCCTCTTGA AATGGCTGTA
 901 ATGTTCAAGA ATACCGAGGC TATAAAAATC TTGATGAGGT ATGGAGCTAA ACCTGTAGTT
 961 ACTGAATGCA CAACTTCTTG TCTGCATGAT GCGGTGTTGA GAGACGACTA CAAAATAGTG
1021 AAAGATCTGT TGAAGAATAA CTATGTAAAC AATGTTCTTT ACAGCGGAGG CTTTACTCCT
1081 TTGTGTTTGG CAGCTTACCT TAACAAAGTT AATTTGGTTA AACTTCTATT GGCTCATTCG
1141 GCGGATGTAG ATATTTCAAA CACGGATCGG TTAACTCCTC TACATATAGC CGTATCAAAT
1201 AAAAATTTAA CAATGGTTAA ACTTCTATTG AACAAAGGTG CTGATACTGA CTTGCTGGAT
1261 AACATGGGAC GTACTCCTTT AATGATCGCT GTACAATCTG GAAATATTGA AATATGTAGC
1321 ACACTACTTA AAAAAAATAA AATGTCCAGA ACTGGGAAAA ATTGATCTTG CCAGCTGTAA
1381 TTCATGGTAG AAAAGAAGTG CTCAGGCTAC TTTTCAACAA AGGAGCAGAT GTAAACTACA
1441 TCTTTGAAAG AAATGGAAAA TCATATACTG TTTTGGAATT GATTAAAGAA AGTTACTCTG
1501 AGACACAAAA GAGGTAGCTG AAGTGGTACT CTCAAAATGC AGAACGATGA CTGCGAAGCA
1561 AGAAGTAGAG AAATAACACT TTATGACTTT CTTAGTTGTA GAAAAGATAG AGATATAATG
1621 ATGGTCATAA ATAACTCTGA TATTGCAAGT AAATGCAATA ATAAGTTAGA TTTATTTAAA
1681 AGGATAGTTA AAAATAGAAA AAAAGAGTTA ATTTGTAGGG TTAAAATAAT ACATAAGATC
1741 TTAAAATTTA TAAATACGCA TAATAATAAA AATAGATTAT ACTTATTACC TTCAGAGATA
1801 AAATTTAAGA TATTTACTTA TTTAACTTAT AAAGATCTAA AATGCATAAT TTCTAAATAA
1861 TGAAAAAAAA GTACATCATG AGCAACGCGT TAGTATATTT TACAATGGAG ATTAACGCTC
1921 TATACCGTTC TATGTTTATT GATTCAGATG ATGTTTTAGA AAAGAAAGTT ATTGAATATG
1981 AAAACTTTAA TGAAGATGAA GATGACGACG ATGATTATTG TTGTAAATCT GTTTTAGATG
2041 AAGAAGATGA CGCGCTAAAG TATACTATGG TTACAAAGTA TAAGTCTATA CTACTAATGG
2101 CGACTTGTGC AAGAAGGTAT AGTATAGTGA AAATGTTGTT AGATTATGAT TATGAAAAAC
2161 CAAATAAATC AGATCCATAT CTAAAGGTAT CTCCTTTGCA CATAATTTCA TCTATTCCTA
2221 GTTTAGAATA CTTTTCATTA TATTTGTTTA CAGCTGAAGA CGAAAAAAAT ATATCGATAA
2281 TAGAAGATTA TGTTAACTCT GCTAATAAGA TGAAATTGAA TGAGTCTGTG ATAATAGCTA
2341 TAATCAGAGA AGTTCTAAAA GGAAATAAAA ATCTAACTGA TCAGGATATA AAAACATTGG
2401 CTGATGAAAT CAACAAGGAG GAACTGAATA TAGCTAAACT ATTGTTAGAT AGAGGGGCCA
2461 AAGTAAATTA CAAGGATGTT TACGGTTCTT CAGCTCTCCA TAGAGCTGCT ATTGGTAGGA
2521 AACAGGATAT GATAAAGCTG TTAATCGATC ATGGAGCTGA TGTAAACTCT TTAACTATTG
2581 CTAAAGATAA TCTTATTAAA AAAAAATAAT ATCACGTTTA GTAATATTAA AATATATTAA
2641 TAACTCTATT ACTAATAACT CCAGTGGATA TGAACATAAT ACGAAGTTTA TACATTCTCA
2701 TCAAAATCTT ATTGACATCA AGTTAGATTG TGAAAATGAG ATTATGAAAT TAAGGAATAC
2761 AAAAATAGGA TGTAAGAACT TACTAGAATG TTTTATCAAT AATGATATGA ATACAGTATC
2821 TAGGGCTATA AACAATGAAA CGATTAAAAA TTATAAAAAT CATTTCCCTA TATATAATAC
2881 GCTCATAGAA AAATTCATTT CTGAAAGTAT ACTAAGACAC GAATTATTGG ATGGAGTTAT
2941 AAATTCTTTT CAAGGATTCA ATAATAAATT GCCTTACGAG ATTCAGTACA TTATACTGGA
3001 GAATCTTAAT AACCATGAAC TAAAAAAAAT TTTAGATAAT ATACATTAAA AAGGTAAATA
3061 GATCATCTGT TATTATAAGC AAAGATGCTT GTTGCCAATA ATATACAACA GGTATTTGTT
3121 TTTATTTTTA ACTACATATT TGATGTTCAT TCTCTTTATA TAGTATACAC AGAAAATTCA
3181 TAATCCACTT AGAATTTCTA GTTATCTAG
```

第 22 圖


pUC9
Pvu II
Pvu II
ptg155PRO
Hind III
Bgl II
pUC9
Pvu II
Pvu II
1. 以Pvu Ⅱ消化
2. 插入寡A-E
1. 以Hind Ⅲ及 Bgl II
2. 單離 1.6 kbp Hind III/Bgl II 狂犬病G段
1. 以Pvu Ⅱ消化
2. 插入得自金絲雀痘的880bp Pvu Ⅱ段
pRW737
Pvu II
Pvu II
Nru I
Bgl II
Hind III
pRW739
Pvu II
Nru I
Hind III
Pvu II
Bgl II
pRW764.5
Pvu II
C5 ORF
Pvu II
Rsa I
Bgl II
Bgl II
pUC

第 23A 圖


1.自Rsa I部分
消化單離
2. Bgl II 消化
3. 加入寡
RW145 和
RW146
1.單離得自Nur I
Bam HI消化的
2.9Kbp段
2.單離得自Nru I /Bgl II
部分消化的1.7Kbp段
pRW824
Sma I
Nru I
Sma I
Bam HI
pRW832
Sma I
Nru I
Sma I
pRW831
Pvu II
Pvu II
Hind III
Sma I
Eco RI
1.單離1.8 kbp
Sma I 段
2.以Sam I 消化
pRW838
Pvu II
Sma I
Pvu II
Sma I
pUC
牛痘H6起動子
狂犬病糖蛋白
金絲雀痘旁支臂
無關其因

第 23B 圖

```
   1 AGATATTTGT TAGCTTCTGC CGGAGATACC GTGAAAATCT ATTTTCTGGA AGGAAAGGGA
  61 GGTCTTATCT ATTCTGTCAG CAGAGTAGGT TCCTCTAATG ACGAAGACAA TAGTGAATAC
 121 TTGCATGAAG GTCACTGTGT AGAGTTCAAA ACTGATCATC AGTGTTTGAT AACTCTAGCG
 181 TGTACGAGTC CTTCTAACAC TGTGGTTTAT TGGCTGGAAT AAAAGGATAA AGACACCTAT
 241 ACTGATTCAT TTTCATCTGT CAACGTTTCT CTAAGAGATT CATAGGTATT ATTATTACAT
 301 CGATCTAGAA GTCTAATAAC TGCTAAGTAT ATTATTGGAT TTAACGCGCT ATAAACGCAT
 361 CCAAAACCTA CAAATATAGG AGAAGCTTCT CTTATGAAAC TTCTTAAAGC TTTACTCTTA
 421 CTATTACTAC TCAAAAGAGA TATTACATTA ATTATGTGAT GAGGCATCCA ACATATAAAG
 481 AAGACTAAAG CTGTAGAAGC TGTTATGAAG AATATCTTAT CAGATATATT AGATGCATTG
 541 TTAGTTCTGT AGATCAGTAA CGTATAGCAT ACGAGTATAA TTATCGTAGG TAGTAGGTAT
 601 CCTAAAATAA ATCTGATACA GATAATAACT TTGTAAATCA ATTCAGCAAT TTCTCTATTA
 661 TCATGATAAT GATTAATACA CAGCGTGTCG TTATTTTTTG TTACGATAGT ATTTCTAAAG
 721 TAAAGAGCAG GAATCCCTAG TATAATAGAA ATAATCCATA TGAAAAATAT AGTAATGTAC
 781 ATATTTCTAA TGTTAACATA TTTATAGGTA AATCCAGGAA GGGTAATTTT TACATATCTA
 841 TATACGCTTA TTACAGTTAT TAAAAATATA CTTGCAAACA TGTTAGAAGT AAAAAAGAAA
 901 GAACTAATTT TACAAAGTGC TTTACCAAAA TGCCAATGGA AATTACTTAG TATGTATATA
 961 ATGTATAAAG GTATGAATAT CACAAACAGC AAATCGGCTA TTCCCAAGTT GAGAAACGGT
1021 ATAATAGATA TATTTCTAGA TACCATTAAT AACCTTATAA GCTTGACGTT TCCTATAATG
1081 CCTACTAAGA AAACTAGAAG ATACATACAT ACTAACGCCA TACGAGAGTA ACTACTCATC
1141 GTATAACTAC TGTTGCTAAC AGTGACACTG ATGTTATAAC TCATCTTTGA TGTGGTATAA
1201 ATGTATAATA ACTATATTAC ACTGGTATTT TATTTCAGTT ATATACTATA TAGTATTAAA
1261 AATTATATTT GTATAATTAT ATTATTATAT TCAGTGTAGA AAGTAAAATA CTATAAATAT
1321 GTATCTCTTA TTTATAACTT ATTAGTAAAG TATGTACTAT TCAGTTATAT TGTTTTATAA
1381 AAGCTAAATG CTACTAGATT GATATAAATG AATATGTAAT AAATTAGTAA TGTAGTATAC
1441 TAATATTAAC TCACATTATG AATACTACTA ATCACGAAGA ATGCAGTAAA ACATATGATA
1501 CAAACATGTT AACAGTTTTA AAAGCCATTA GTAATAAACA GTACAATATA ATTAAGTCTT
1561 TACTTAAAAA AGATATTAAT GTTAATAGAT TATTAACTAG TTATTCTAAC GAAATATATA
1621 AACATTTAGA CATTACATTA TGTAATATAC TTATAGAACG TGCAGCAGAC ATAAACATTA
1681 TAGATAAGAA CAATCGTACA CCGTTGTTTT ATGCGGTAAA GAATAATGAT TATGATATGG
1741 TTAAACTCCT ATTAAAAAAT GGCGCGAATG TAAATTTACA AGATAGTATA GGATATTCAT
1801 GTCTTCACAT CGCAGGTATA CATAATAGTA ACATAGAAAT AGTAGATGCA TTGATATCAT
1861 ACAAACCAGA TTTAAACTCC CGCGATTGGG TAGGTAGAAC ACCGCTACAT ATCTTCGTGA
1921 TAGAATCTAA CTTTGAAGCT GTGAAATTAT TATTAAAGTC AGGTGCATAT GTAGGTTTGA
1981 AAGACAAATG TAAGCATTTT CCTATACACC ATTCTGTAAT GAAATTAGAT CACTTAATAT
2041 CAGGATTGTT ATTAAAATAT GGAGCAAATC CAAATACAAT TAACGGCAAT GGAAAAACAT
2101 TATTAAGCAT TGCTGTAACA TCTAATAATA CACTACTGGT AGAACAGCTG CTGTTATATG
2161 GAGCAGAAGT TAATAATGGT GGTTATGATG TTCCAGCTCC TATTATATCC GCTGTCAGTG
2221 TTAACAATTA TGATATTGTT AAGATACTGA TACATAATGG TGCGAATATA AATGTATCCA
2281 CGGAAGATGG TAGAACGTCT TTACATACAG CTATGTTTTG GAATAACGCT AAAATAATAG
2341 ATGAGTTGCT TAACTATGGA AGTGACATAA ACAGCGTAGA TACTTATGGT AGAACTCCGT
2401 TATCTTGTTA TCGTAGCTTA AGTTATGATA TCGCTACTAA ACTAATATCA CGTATCATTA
2461 TAACAGATGT CTATCGTGAA GCACCAGTAA ATATCAGCGG ATTTATAATT AATTTAAAAA
2521 CTATAGAAAA TAATGATATA TTCAAATTAA TTAAAGATGA TTGTATTAAA GAGATAAACA
2581 TACTTAAAAG TATAACCCTT AATAAATTTC ATTCATCTGA CATATTTATA CGATATAATA
2641 CTGATATATG TTTATTAACG AGATTTATTC AACATCCAAA GATAATAGAA CTAGACAAAA
2701 AACTCTACGC TTATAAATCT ATAGTCAACG AGAGAAAAAT CAAAGCTACT TACAGGTATT
2761 ATCAAATAAA AAAAGTATTA ACTGTACTAC CTTTTTCAGG ATATTTCTCT ATATTGCCGT
2821 TTGATGTGTT AGTATATATA CTTGAATTCA TCTATGATAA TAATATGTTG GTACTTATGA
2881 GAGCGTTATC ATTAAAATGA AATAAAAAGC ATACAAGCTA TTGCTTCGCT ATCGTTACAA
2941 AATGGCAGGA ATTTTGTGTA AACTAAGCCA CATACTTGCC AATGAAAAAA ATAGTAGAAA
3001 GGATACTATT TTAATGGGAT TAGATGTTAA GGTTCCTTGG GATTATAGTA ACTGGGCATC
```

第 24A 圖

```
3061 TGTTAACTTT TACGACGTTA GGTTAGATAC TGATGTTACA GATTATAATA ATGTTACAAT
3121 AAAATACATG ACAGGATGTG ATATTTTTCC TCATATAACT CTTGGAATAG CAAATATGGA
3181 TCAATGTGAT AGATTTGAAA ATTTCAAAAA GCAAATAACT GATCAAGATT TACAGACTAT
3241 TTCTATAGTC TGTAAAGAAG AGATGTGTTT TCCTCAGAGT AACGCCTCTA AACAGTTGGG
3301 AGCGAAAGGA TGCGCTGTAG TTATGAAACT GGAGGTATCT GATGAACTTA GAGCCCTAAG
3361 AAATGTTCTG CTGAATGCGG TACCCTGTTC GAAGGACGTG TTTGGTGATA TCACAGTAGA
3421 TAATCCGTGG AATCCTCACA TAACAGTAGG ATATGTTAAG GAGGACGATG TCGAAAACAA
3481 GAAACGCCTA ATGGAGTGCA TGTCCAAGTT TAGGGGGCAA GAAATACAAG TTCTAGGATG
3541 GTATTAATAA GTATCTAAGT ATTTGGTATA ATTTATTAAA TAGTATAATT ATAACAAATA
3601 ATAAATAACA TGATAACGGT TTTTATTAGA ATAAAATAGA GATAATATCA TAATGATATA
3661 TAATACTTCA TTACCAGAAA TGAGTAATGG AAGACTTATA AATGAACTGC ATAAAGCTAT
3721 AAGGTATAGA GATATAAATT TAGTAAGGTA TATACTTAAA AAATGCAAAT ACAATAACGT
3781 AAATATACTA TCAACGTCTT TGTATTTAGC CGTAAGTATT TCTGATATAG AAATGGTAAA
3841 ATTATTACTA GAACACGGTG CCGATATTTT AAAATGTAAA AATCCTCCTC TTCATAAAGC
3901 TGCTAGTTTA GATAATACAG AAATTGCTAA ACTACTAATA GATTCTGGCG CTGACATAGA
3961 ACAGATACAT TCTGGAAATA GTCCGTTATA TATTTCTGTA TATAGAAACA ATAAGTCATT
4021 AACTAGATAT TTATTAAAAA AAGGTGTTAA TTGTAATAGA TTCTTTCTAA ATTATTACGA
4081 TGTACTGTAT GATAAGATAT CTGATGATAT GTATAAAATA TTTATAGATT TTAATATTGA
4141 TCTTAATATA CAAACTAGAA ATTTTGAAAC TCCGTTACAT TACGCTATAA AGTATAAGAA
4201 TATAGATTTA ATTAGGATAT TGTTAGATAA TAGTATTAAA ATAGATAAAA GTTTATTTTT
4261 GCATAAACAG TATCTCATAA AGGCACTTAA AAATAATTGT AGTTACGATA TAATAGCGTT
4321 ACTTATAAAT CACGGAGTGC CTATAAACGA ACAAGATGAT TTAGGTAAAA CCCCATTACA
4381 TCATTCGGTA ATTAATAGAA GAAAAGATGT AACAGCACTT CTGTTAAATC TAGGAGCTGA
4441 TATAAACGTA ATAGATGACT GTATGGGCAG TCCCTTACAT TACGTCGTTT CACGTAACGA
4501 TATCGAAACA ACAAAGACAC TTTTAGAAAG AGGATCTAAT GTTAATGTGG TTAATAATCA
4561 TATAGATACC GTTCTAAATA TAGCTGTTGC ATCTAAAAAC AAAACTATAG TAAACTTATT
4621 ACTGAAGTAC GGTACTGATA CAAAGTTGGT AGGATTAGAT AAACATGTTA TTCACATAGC
4681 TATAGAAATG AAAGATATTA ATATACTGAA TGCGATCTTA TTATATGGTT GCTATGTAAA
4741 CGTCTATAAT CATAAAGGTT TCACTCCTCT ATACATGGCA GTTAGTTCTA TGAAAACAGA
4801 ATTTGTTAAA CTCTTACTTG ACCACGGTGC TTACGTAAAT GCTAAAGCTA AGTTATCTGG
4861 AAATACTCCT TTACATAAAG CTATGTTATC TAATAGTTTT AATAATATAA AATTACTTTT
4921 ATCTTATAAC GCCGACTATA ATTCTCTAAA TAATCACGGT AATACGCCTC TAACTTGTGT
4981 TAGCTTTTTA GATGACAAGA TAGCTATTAT GATAATATCT AAAATGATGT TAGAAATATC
5041 TAAAAATCCT GAAATAGCTA ATTCAGAAGG TTTTATAGTA AACATGGAAC ATATAAACAG
5101 TAATAAAAGA CTACTATCTA TAAAAGAATC ATGCGAAAAA GAACTAGATG TTATAACACA
5161 TATAAAGTTA AATTCTATAT ATTCTTTTAA TATCTTTCTT GACAATAACA TAGATCTTAT
5221 GGTAAAGTTC GTAACTAATC CTAGAGTTAA TAAGATACCT GCATGTATAC GTATATATAG
5281 GGAATTAATA CGGAAAAATA AATCATTAGC TTTTCATAGA CATCAGCTAA TAGTTAAAGC
5341 TGTAAAAGAG AGTAAGAATC TAGGAATAAT AGGTAGGTTA CCTATAGATA TCAAACATAT
5401 AATAATGGAA CTATTAAGTA ATAATGATTT ACATTCTGTT ATCACCAGCT GTTGTAACCC
5461 AGTAGTATAA AGTGATTTTA TTCAATTACG AAGATAAACA TTAAATTTGT TAACAGATAT
5521 GAGTTATGAG TATTTAACTA AAGTTACTTT AGGTACAAAT AAAATATTAT GTAATATAAT
5581 AGAAAATTAT CTTGAGTCTT CATTTCCATC ACCGTCTAAA TTTATTATTA AAACCTTATT
5641 ATATAAGGCT GTTGAGTTTA GAAATGTAAA TGCTGTAAAA AAAATATTAC AGAATGATAT
5701 TGAATATGTT AAAGTAGATA GTCATGGTGT CTCGCCTTTA CATATTATAG CTATGCCTTC
5761 AAATTTTTCT CTCATAGACG CTGACATGTA TTCAGAATTT AATGAAATTA GTAATAGACT
5821 TCAAAAATCT AAAGATAGTA ACGAATTTCA ACGAGTTAGT CTACTAAGGA CAATTATAGA
5881 ATATGGTAAT GATAGTGATA TTAATAAGTG TCTAACATTA GTAAAAACGG ATATACAGAG
5941 TAACGAAGAG ATAGATATTA TAGATCTTTT GATAAATAAA GGAATAGATA TAAATATTAA
6001 AGACGATTTA GGAAACACAG CTTTGCATTA CTCGTGTGAT TATGCTAAGG GATCAAAGAT
6061 AGCTAAAAAG TTACTAGATT GTGGAGCAGA TCCTAACATA GTTAATGATT TAGGTGTTAC
```

第 24B 圖

```
6121 ACCACTAGCG TGTGCCGTTA ATACTTGCAA CGAGATACTA GTAGATATTC TGTTAAATAA
6181 TGATGCGAAT CCTGATTCAT CTTCCTCATA TTTTTTAGGT ACTAATGTGT TACATACAGC
6241 CGTAGGTACC GGTAATATAG ATATTGTAAG ATCTTTACTT ACGGCTGGTG CCAATCCTAA
6301 TGTAGGAGAT AAATCTGGAG TTACTCCTTT GCACGTTGCT GCAGCTGATA AAGACAGTTA
6361 TCTGTTAATG GAGATGCTAC TAGATAGCGG GGCAGATCCA AATATAAAAT GCGCAAACGG
6421 TTTTACTCCT TTGTTTAATG CAGTATATGA TCATAACCGT ATAAAGTTAT TATTTCTTTA
6481 CGGGGCTGAT ATCAATATTA CTGACTCTTA CGGAAATACT CCTCTTACTT ATATGACTAA
6541 TTTTGATAAT AAATATGTAA ATTCAATAAT TATCTTACAA ATATATCTAC TTAAAAAAGA
6601 ATATAACGAT GAAAGATTGT TTCCACCTGG TATGATAAAA AATTTAAACT TTATAGAATC
6661 AAACGATAGT CTTAAAGTTA TAGCTAAAAA GTGTAATTCG TTAATACGCT ATAAGAAAAA
6721 TAAAGACATA GATGCAGATA ACGTATTATT GGAGCTTTTA GAGGAAGAGG AAGAAGATGA
6781 AATAGACAGA TGGCATACTA CATGTAAAAT ATCTTAAATA GTAATTAAAT CATTGAAATA
6841 TTAACTTACA AGATGATCGA GGTCACTTAT TATACTCTTT AATAATGGGT ACAAAGAGTA
6901 TTCATACGTT AGTTAAATCT AACGATGTAA TACGTGTTCG TGAATTAATA AAGGATGATA
6961 GATGTTTGAT AAATAAAAGA AATAGAAGAA ATCAGTCACC TGTATATATA GCTATATACA
7021 AAGGACTTTA TGAAATGACT GAAATGTTAT TGCTAAATAA TGCAAGTCTA GATACTAAAA
7081 TACCTTCTTT AATTATAGCA GCTAAAAATA ATGACTTACC TATGATAAAA TTATTGATAC
7141 AATACGGGGC AAAATTAAAT GATATTTATT TAAGGGACAC AGCATTAATG ATAGCTCTCA
7201 GAAATGGTTA CCTAGATATA GCTGAATATT TACTTTCATT AGGAGCAGAA TTTGTTAAAT
7261 ACAGACATAA GGTAATATAT AAATATCTAT CAAAAGATGC GTATGAATTA CTTTTTAGAT
7321 TTAATTATGA CGTTAATATA ATAGATTGAG A
```

第 24C 圖