

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 7/04
C07K 14/08 C12N 15/40
A61K 39/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01804245.7

[43] 公开日 2003 年 3 月 26 日 [11] 公开号 CN 1406277A

[22] 申请日 2001.1.26 [21] 申请号 01804245.7
[30] 优先权
[32] 2000.1.26 [33] DE [31] 10003371.7
[32] 2000.1.26 [33] DE [31] 10003373.3
[32] 2000.1.26 [33] DE [31] 10003372.5
[86] 国际申请 PCT/EP01/00865 2001.1.26
[87] 国际公布 WO01/55353 英 2001.8.2
[85] 进入国家阶段日期 2002.7.26
[71] 申请人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司
地址 德国英格海姆
[72] 发明人 克努特·埃尔伯斯 斯蒂芬·佩施
海克·伦格伯斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 19 页

[54] 发明名称 PRRSV 的重组减毒
[57] 摘要

本发明涉及通过在病毒蛋白特异性位点发生氨基酸突变而减毒的活 PRRS 病毒，其中所述病毒蛋白由选自 ORF1a、ORF1b 和/或 ORF2 的开放式阅读框编码。本发明还涉及编码所述病毒的核苷酸序列，产生所述病毒的方法和它们在制备用于预防和治疗 PRRS 感染的药物组合物中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种活的减毒 PRRS 病毒，该病毒包含基本上如 VR-2332 中的 ORF1a、ORF1b 和 ORF2 但并非 RespPRRS，其特征在于 ORF1a 的 321 - 341 位的至少一个氨基酸不等同于 VR-2332 在所述相应位置上的氨基酸，和/或 ORF1b 的 936 - 956 位的至少一个氨基酸不等同于 VR-2332 在所述相应位置上的氨基酸，和/或 ORF2 的 1-20 位的至少一个氨基酸不等同于 VR-2332 在所述相应位置上的氨基酸。
2. 一种如权利要求 1 所述的活的减毒 PRRS 病毒，其特征在于 ORF1a 的 321 - 341 位的至少一个氨基酸被缺失、和/或 ORF1b 的 936 - 956 位的至少一个氨基酸被缺失、和/或 1-20 位的至少一个氨基酸被缺失。
3. 一种如权利要求 1 或 2 所述的活的减毒 PRRS 病毒，其特征在于 ORF1a 第 331 位的氨基酸和/或 ORF1b 第 946 位的氨基酸和/或 ORF2 第 10 位的氨基酸不等同于 ACTT VR-2332 病毒株在相应位点上的氨基酸。
4. 一种如权利要求 1 到 3 任一项所述的活的减毒 PRRS 病毒，其特征在于 ORF1a 第 331 位的氨基酸和/或 ORF1b 第 946 位的氨基酸和/或 ORF2 第 10 位的氨基酸被缺失。
5. 一种编码如权利要求 1 到 4 任一项所述病毒的核苷酸序列。
6. 一种如权利要求 5 所述的核苷酸序列，其中该核苷酸序列被修饰成编码一种毒力标记和/或血清学标记。
7. 一种如权利要求 6 所述的核苷酸序列，其中编码所述标记的核苷酸序列位于任何编码结构性病毒蛋白的开放式阅读框中。
8. 一种产生感染性减毒 PRRS 活病毒的方法，所述方法包括产生一种包含至少一个全长 DNA 拷贝或体外转录的 RNA 拷贝或任一种的衍生物的重组核酸序列，其特征在于所述核苷酸序列是如权利要求 5-7 任一项所述的核苷酸序列。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其中通过分子生物学的方法插入特异性突变，其特征在于相应于 ORF1a 的 321 - 341 位的氨基酸位点和/或 ORF1b 的 936 - 956 位的氨基酸位点和/或 1-20 位的氨基酸位点的核酸发生突变，使得所述位点上的至少一个核苷酸被取代或缺失。
10. 一种含有如权利要求 1-4 任一项所述 PRRS 病毒和药学上可接受的

载体的药物组合物。

11. 如权利要求 1-4 任一项所述的 PRRS 病毒在制备用于预防和治疗 PRRS 感染的疫苗中的应用。

PRRSV 的重组减毒

5 发明领域

本发明涉及通过在病毒蛋白特异性位点发生氨基酸突变而减毒的活 PRRS 病毒，其中所述病毒蛋白由选自 ORF1a、ORF1b 和/或 ORF2 的开放式阅读框编码。本发明还涉及编码所述病毒的核苷酸序列，产生所述病毒的方法和它们在制备用于预防和治疗 PRRS 感染的药物组合物中的用途。

10

发明背景

一种神秘猪疾病，后来被重新命名为猪生殖和呼吸综合征(PRRS)，是由 Arteriviridae 病毒科的正链 RNA 包膜病毒引起的(E.J.Snijdet, 1998)。约 10-15 年前，在美国和欧洲分别出现两种不同的 PRRS 病毒株。此病现已在北美、
15 欧洲和亚洲的许多产猪国家局部流行。它一直是导致猪生殖力丧失和呼吸疾病的主要原因，据估计该病在美国的流行率高达 70%。

该病毒通过吸入、摄食、交配、叮咬伤口或针刺的途径传播，并在粘膜、肺部或局部区域的巨噬细胞里复制。

这种疾病导致并临床隐性感染(resolution)或持续性感染。被持续感染的
20 动物将病毒释放至口/咽的流体、血液、粪、尿和精液中。

母猪的临床症状涉及流产或存活力低的未成熟小仔猪、死产的猪和自溶胎儿。被感染的初生仔猪存在较高的死亡率或染上肺炎，肺炎及并发的细菌感染使得随后对猪的护理和饲养很困难，死亡率增加。公猪易于发烧和发生精子形态学的变化。

25 和所有 arterivirus 一样，PRRS 病毒基因组是长约 15kb 的单链正链 RNA 分子。ORF(开放式阅读框)1a 和 1b 编码复制酶，ORF2 到 5 编码假定糖蛋白(gp1-4)，ORF6 编码膜蛋白(M)和 ORF7 编码核壳体蛋白(N)。

对美国(分离物 ATCC VR-2332, 1991 年 7 月 18 日保藏于美国典型培养物保藏中心，其在 rockville, 马里兰, 美国, Genbank U87392 U00153)和欧
30 洲(WO9221375, isolate Lelystad Agent(CDI-NL-2.91), 于 1991 年 6 月 5 日保藏于巴斯德研究所, 巴黎, 保藏号 I-1102)的 PRRS 感染的最初描述鉴别了存

在基因组和血清学差异的病毒。比较表明它们都有一个共同的祖先,该祖先
在 20 世纪 80 年代后期临床症状被描述前已经分化。现已经报道了多种 PRRS
病毒的全长基因组序列及其蛋白编码区的完整结构(Snijder 等, 1998;
Meulenberg 等, 1993b; Conzelmann 等, 1993; Murtaugh 等, 1995; Kapur
5 等, 1996)。PRRS 病毒可以在体外的猪肺巨噬细胞、单核细胞、神经胶质细
胞和两种 MA-104 细胞亚群(猴胚肾细胞)即所谓的 CL-2621 和
MARC-145(K.D.Rossow, 猪的生殖和呼吸综合征, Vet Pathol 35:1-20, 1998)
中进行复制。目前已有产生有传染力的 PRRS 克隆的重组方法
(EP0839912A1)。

- 10 现已有市售 PRRS 减毒活疫苗 (RespPRRS/Ingelvac[®]PRS MLV,
Boehringer Ingelheim)用于保护猪。

在产生全面保护性免疫反应的功效上,即使是存在佐剂的情况下,死疫
苗(灭活的全病毒)或亚单位疫苗(常规纯化或异源表达并纯化的病毒蛋白)通
常不如活疫苗。对于 PRRS 来说已证实,相对于目前可得到的灭活疫苗,弱
15 毒疫苗引起对疾病的免疫力更持久和有效(Snijder 等, 参考文献同上)。目前
的活 PRRS 疫苗是根据常规的方法进行减毒,即连续地将病毒在适合的宿主
细胞中传代直到致病性丧失(EP0529584B1)。目前的活 PRRS 疫苗仍然需要
改进。第一,它们不能防止再感染,第二,它们不能使免疫接种的动物和感
染野生病毒的动物在血清学上相区别。但最重要的一点是来自完整微生物的
20 活疫苗虽然毒性减弱了,但可能伴随着严重的安全问题,特别是对于 RNA
病毒如 PRRS 病毒来说更是如此,这是因为认为 RNA 病毒由于缺乏 RNA 复
制酶的校对导致对 RNA 基因组的不精确复制引起了高的突变率。

减毒活病毒潜在的回复可能造成对免疫动物的严重威胁。由常规多次传
代方法得到的减毒病毒的分子来源和遗传稳定性仍然未知,而且回复体的形
25 成是不可预知的。

因此,本发明要解决的技术问题是提供一种极少有可能回复成野生型病
毒的 PRRS 病毒。

发明概述

- 30 本发明涉及活的 PRRS 病毒,该病毒是通过对由选自 ORF1a、ORF1b
和/或 ORF2 的开放式阅读框(ORF)编码的病毒蛋白上的特异性位点进行氨

基酸突变而减毒获得。本发明还涉及编码所述病毒的核苷酸序列，产生这种病毒的方法和它们在制备预防和治疗 PRRS 感染的药物组合物中的应用。

附图说明

5 图 1ATTC VR-2332 的 ORF1a 的氨基酸序列，其中已标出了本发明优选的减毒位点。

图 2ATTC VR-2332 的 ORF1b 的氨基酸序列，其中已标出了本发明优选的减毒位点。

10 图 3ATTC VR-2332 的 ORF2 的氨基酸序列，其中已标出了本发明优选的减毒位点。

图 4ATTC VR-2332 的 ORF1a 的核苷酸序列，其中粗体表示本发明优选的减毒位点，下划线为最优选位点。

图 5ATTC VR-2332 的 ORF1b 的核苷酸序列，其中粗体表示本发明优选的减毒位点，下划线为最优选位点。

15 图 6ATTC VR-2332 的 ORF2 的核苷酸序列，其中粗体表示本发明优选的减毒位点，下划线为最优选位点。

发明详述

20 由权利要求书限定了特征的本说明书和技术方案提供了解决上述技术问题的方法。

在描述本发明的技术方案之前，必需清楚的是本文和附的权利要求中使用的单词“a”、“an”和“the”包含了复数的意思，除非在文中清楚指明了其含义。因此，例如，“a PRRS virus”包括多种所述 PRRS 病毒，“cell”指一个或多个细胞及本领域的技术人员已知的等同物，等等。除非另外定义了，
25 本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同含义。虽然在实践或检测本发明时可以使用与文中描述的相似或等同的方法和材料，但是在本发明中仍然描述了优选的方法、设备和材料。文中提及的所有出版物均引入本文作为参考，用来描述和公开这些出版物上报导的可用于本发明的细胞系、载体和方法。本发明公开的内容不会由于在
30 前发明的这种公开导致丧失居前的权力。

发明人惊奇地发现 PRRS 病毒在某些开放式阅读框上含有特异性基因

组位点，它们会顽固地回复成起始野毒株 VR-2332 在这些位点上的氨基酸。现在称为“毒力特异性位点”或简称为“本发明位点”或仅称为“位点”的这种位置上的进化压力是巨大的。有可能利用 RespPRRS 的两种回复株首次证实起始野毒株的这种毒力特异性位点上的氨基酸突变在美国和欧洲有地理性差异。具有作为本发明减毒基础的特定突变的活疫苗可以避免目前制备减毒疫苗的缺陷，所述减毒突变的另一优点在于它们的已知分子唯一性上，这种唯一性使得它们可以作为减毒病毒的显著标记并使得它们能与野生型病毒区别开来。

将常规减毒病毒 RespPRRS 的氨基酸和核苷酸序列与起始野毒株 VR-2332 的进行比较，为了鉴别出毒力特异性位点，对两种提及的毒力回复体之间及与 VR-2332 和 RespPRRS 之间分别进行了比较。

这样使得可以鉴别与 PRRS 病毒的毒力相关的每种病毒蛋白上的毒力特异性位点。

结果，本发明一方面涉及活的 PRRS 病毒，该病毒不是 RespPRRS，并且要比 PRRS 病毒 ATCC VR-2332 毒性弱，其特征在於它含有一种由开放式阅读框(ORF)编码的蛋白，该开放式阅读框选自以下的组：图 1 描述的所述 VR-2332 毒株的 ORF1a，图 2 中描述的所述 VR-2332 株的 ORF1b，和/或图 3 描述的所述 VR-2332 株的 ORF2，其中在确定的毒力特异性位点的至少一个氨基酸不等同于 VR-2332 毒株在所述相应位置上的至少一个氨基酸。

氨基酸和核苷酸的编号方式依据 VR-2332 的数据记载。图 1、2 和 3 提供了代表所有 PRRS 毒株的信息，从而使得发明形象化，还可以鉴别进行不同编号的所有 PRRS 病毒中优选的氨基酸和优选的位点。鉴别这些位点可以通过以下方法进行：鉴别目标 PRRS 病毒株和列出的参照病毒株中保守的特征相同的氨基酸，接着确定目标病毒上分别相应于图 1、2 和/或 3 中位点的位置。

已经鉴别出了图 1、2 和/或 3 所示 VR-2332 的 ORF1a、ORF1b 和/或 ORF2 编码的蛋白中的三个上述位点。

本发明的另一方面涉及活的减毒 PRRS 病毒，该病毒包含基本上如 VR-2332 而非 RespPRRS 中的 ORF1a、ORF1b 和 ORF2，其特征在於 ORF1a 的 321 - 341 位的至少一个氨基酸不等同于图 1 中描述的 VR-2332 在所述相应位置上的氨基酸，和/或 ORF1b 的 936 - 956 位的至少一个氨基酸不等同于

图2中描述的VR-2332在所述相应位置上的氨基酸,和/或ORF2的1-20位的至少一个氨基酸不等同于图3中描述的VR-2332在所述相应位置上的氨基酸。因此,在ORF1a的321-341位、ORF1b的936-956位和/或ORF2的1-20位(分别参见图4、5或6)的位置上,编码一个或多个氨基酸的核苷酸三联体发生变异,其导致所述位点的序列发生核苷酸水平或者另外还有并另外优选氨基酸水平的一或多种变化,以至于所述位点的所有核苷酸或氨基酸位置可以发生突变。本发明包括所述位点的一个或者两个或所有三个发生了突变的病毒。“突变”指一个氨基酸替换成另一个氨基酸或由另一个核苷酸替换编码核苷酸(如C替代为T),即所谓的替代,优选其使编码的氨基酸被改变,或任何其它突变如“缺失”或“插入”。突变总是在编码核苷酸序列中进行。所述突变可以通过使用本领域标准方法进行,如Meulenberg等(Adv. Exp. Med. Biol, 1998, 440: 199-206)描述的对一个感染拷贝的定点诱变(参见如萨姆布鲁克等,1989,分子克隆:试验指南,第二版,冷泉港实验室出版社,冷泉港实验室,纽约)。“基本上”指至少75%的序列,优选85%,更优选除了本发明所述“位点”外的所有序列等同于VR-2332,但也可以对本发明所述位点外的其它编码氨基酸的核苷酸进行突变。这类依据本发明所述的病毒仍符合本发明的标准,即不太可能回复成野生型且比VR-2332毒力弱。

根据本发明的活的PRRS病毒指如E.J.Snijder等(参考同上)定义的PRRS病毒,即能传染猪并能在猪中复制的病毒。常规减毒的RespPRRS病毒是特别要放弃的,它不属于本发明且不在本发明的保护范围内。RespPRRS病毒可以通过商业途径获得,如从Boehringer Ingelheim Vetmedica公司购得(Ingelvac® PRS MLV),它的大部分序列也是公众可得到的(Genebank AJ 223082)。

对于本发明来说特别重要的位点和氨基酸决不局限于在VR-2332毒株中具体描述的位置,而是用于以一种可仿效的方式来指出在该位点或其它PRRS毒株中相应位点上的优选氨基酸。对于不同的PRRS病毒来说,优选氨基酸的位置编号方式可以不同,但作为Arteriviridae病毒科病毒的分子生物学领域的专家来说很容易通过这些优选氨基酸与所述蛋白的其它保守氨基酸的相关性来鉴别它们。

术语“比PRRS病毒VR-2332毒力弱”可以理解为是比较感兴趣病毒

与 VR-2332 的临床症状。确定一种 PRRS 病毒是否比 PRRS 病毒 VR-2332 毒力弱的优选过程由实施例 1 阐述。并不是在毒力特异性位点的所有可能的优选氨基酸突变均可以导致毒力降低。实施例 1 的方法提供了精确和直接确定含有本发明所述蛋白的 PRRS 活病毒是否比野毒株 VR-2332 毒力弱的实验策略。

毒力特异性位点可以通过减毒病毒的至少一个氨基酸向 VR-2332 的氨基酸的回复来鉴别。该特异性氨基酸是更大的二级肽结构如 α 螺旋、 β 折叠或发夹 β 基序或其它结构的一部分。因此极有可能是相邻氨基酸也参与调节该蛋白的毒性，蛋白质化学领域的专家因此预计很可能在最初鉴定的氨基酸位点左右两侧的 10 个邻接氨基酸中鉴定出与毒力相关的其它氨基酸。10 到 20 个氨基酸是蛋白中肽基序的典型范围。因此，本发明优选的病毒含有如图 1 例示的蛋白或其在其它病毒株中的相应蛋白，这些蛋白中的毒力特异性位点包括在最初鉴定的氨基酸位点上游的 10 个氨基酸和下游的 10 个氨基酸。更优选的如上所述的病毒，其中的毒力特异性位点包括在最初鉴定的氨基酸位点上游的 5 个氨基酸和下游的 5 个氨基酸。最优选的如上所述的病毒，其中的毒力特异性位点包括在最初鉴定的氨基酸位点上游的 3 个氨基酸和下游的 3 个氨基酸。

根据本发明的教导，通过对毒力特异性位点上的氨基酸进行突变有可能从野毒株产生减毒的 PRRS 毒株。然而，RNA 病毒的高频突变所致的问题仍然存在。该问题可以通过缺失病毒蛋白的毒力特异性位点上的特异性氨基酸得到极大的缓解。因此本发明涉及上述的 PRRS 病毒，其特征在于该病毒蛋白的毒力特异性位点上至少一个氨基酸被缺失。术语“缺失”可以理解成图中所示一或多个位点上的相应氨基酸缺失。因此，根据本发明，“缺失”指移走一个或几个核苷酸或氨基酸。

在一个更优选的方案中，本发明涉及活的减毒 PRRS 病毒，其特征在于 ORF1a 的 321 - 341 位的至少一个氨基酸被缺失和/或 ORF1b 的 936 - 956 位的至少一个氨基酸被缺失和/或 ORF2 的 1-20 位的至少一个氨基酸被缺失。因此，不管在 ORF1a 的 321 - 341 位、ORF1b 的 936 - 956 位或 ORF2 的 1-20 位，或编码一或多个氨基酸的核苷酸三联体的所有三个位点缺失导致了在所述位点的一个或多个缺失。仅缺失一个核苷酸或一个氨基酸的病毒和所述位点之一或全部缺失的病毒都包括在本发明中(分别参见图 4、5 或 6)。

为了鉴定特定 PRRS 病毒蛋白上的毒力特异性位点,在优选实施例中已证实至少一个氨基酸是处于突变的高压力下并与野毒株 VR-2332 的回复体的毒力特性相关。这种个别氨基酸位点是本发明最优选的方案。

因此,在最优选的方案中,本发明涉及一种根据本发明的活的减毒病毒,
5 该病毒不是 RespPRRS 并且毒力比 ACTT VR-2332 弱,其特征在于 ORF1a 第 331 位的氨基酸和/或 ORF1b 第 946 位的氨基酸和/或 ORF2 第 10 位氨基酸不等同于 ACTT VR-2332 毒株在相应位点上的氨基酸。因此,在 ORF1a 第 321 位、ORF1b 第 946 位或 ORF2 第 10 位、或编码一个氨基酸的核苷酸三联体的所有三个位点、或在该氨基酸发生突变导致在所述位点的一至三种
10 突变(分别参见图 4、5 或 6)。

由于上述的理由,仅通过缺失易于回复的氨基酸就可以更安全和更好地避免改变的氨基酸回复成有毒力的类型。

因此,本发明在此最优选方案中涉及本发明的减毒 PRRS 活病毒,其特征
15 在于 ORF1a 第 331 位的氨基酸和/或 ORF1b 第 946 位的氨基酸和/或 ORF2 第 10 位的氨基酸被缺失,即,与 VR-2332 的位点相比较时不存在。

另一最优选的方案是根据本发明的活的减毒 PRRS 病毒,其特征
20 在于 ORF1a 第 321 位的氨基酸即其编码三联体缺失。另一最优选的方案是根据本发明的活的减毒 PRRS 病毒,其特征
在于 ORF1b 第 946 位的氨基酸即其编码三联体缺失。另一最优选的方案是根据本发明的活的减毒 PRRS 病毒,其
特征在于 ORF2 第 10 位的氨基酸即其编码三联体缺失(分别参见图 4、5 或
6)。所述最优选的病毒在所有其它位点上等同于 VR-2332。

本发明的教导使得专家可以重组产生 PRRS 病毒的感染性克隆,该克隆
比 VR-2332 毒力弱并可用于制备一种活的药物组合物。所有产生正链 RNA
病毒的重组感染性克隆所需的所有信息可以从文献中轻易获得,尤其对于
25 PRRSV 更是如此。例如,Meulenberg 等的欧洲专利申请 EP0839912,该发
明全文引入本文中作为参考,它提供了制备重组活 PRRS 病毒的清楚的教导。
因此,在另一方面,本发明涉及编码依据本发明的病毒的核苷酸序列。由于
遗传密码的简并性,多核苷酸变异体将导致等同氨基酸的翻译。本发明同样
包括那些简并的变异体。

30 如介绍页中提及的一样,对猪的健康管理很重要,这样可以区别药物组
合物中的弱毒力活疫苗株和野毒株病毒的感染。这常常是困难的,尤其是在

野生型感染的临床症状不是那种特异性的或是与其它感染形成重叠感染或是观察和评估的时间太短的时候。目标病毒的重组产生使得在能建立血清学标记或毒力标记的遗传密码中导入修饰。血清学标记指抗原性可检测到的分子如肽、蛋白、糖蛋白等，这些可以从被感染的细胞或体液如但不局限于咽、鼻液或尿中分离出。毒力标记可以理解为在能被重组分析方法如但不局限于PCR和常规测序鉴别的遗传密码中的标记。因此，在一个优选方案中，本发明涉及根据本发明的核苷酸序列，其中该核苷酸序列被修饰成编码一种毒力标记和/或血清学标记。特别地，为了使毒力减弱而导入的突变或缺失可用于作为毒力和血清学标记。通过在已公开的毒力特异性位点上中监控这些突变，有可能在早期预测的可能的毒力回复体的出现。

更优选本发明的核苷酸序列中编码所述标记的核苷酸序列位于编码结构性病毒蛋白的任一开放式阅读框中。

本发明的另一方面涉及产生根据本发明的传染性减毒 PRRS 活病毒的方法，所述方法包括产生一种如上描述的包含至少一个全长 DNA 拷贝或体外转录的 RNA 拷贝或任一种的衍生物的重组核酸。

本发明另一个优选的方案涉及依据本发明的方法，其中用分子生物学方法引入特异性突变，其特征在于相应于 ORF1a 的氨基酸位点 321-341 位、相应于 ORF1b 的氨基酸位点 936-956 位和/或相应于 ORF2 的氨基酸位点 1-20 位的核酸发生突变，该突变是在所述位点的至少一个核苷酸发生取代或缺失。

本发明另一个重要的方面是含有根据发明的 PRRS 病毒和药学上可以接受载体的药物组合物。

“药物组合物”基本上由以下组成组成一种或多种改变接受了其给药的生物或生长于其中或其表面的生物的生理功能如免疫功能但不局限于抗生素或抗寄生虫剂的成分，和其它为了获得某些其它目标而加入的组分，它们不局限于加工特性、无菌性、稳定性、经过肠道或非肠道途径如口服、鼻内、静脉内、肌内、皮下、皮内或其它适合途径给药的可行性，及给药后的耐受力，和控制释放特性。

药学上可接受的载体可含有生理学上可接受的化合物，该化合物用于如稳定或增加吸收或成为根据本发明的 PRRS 病毒的缓慢释放制剂的一部分。这种生理学上可接受的化合物包括，例如碳水化合物，如葡萄糖、蔗糖或右

旋糖苷, 抗氧化剂如抗坏血酸或谷胱甘肽、螯合剂、低分子量蛋白或其它稳定剂或赋形剂(参见如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990, 18th ed. Mack Publ., Easton)。本领域的技术人员知道如何选择一种药学上可接受的载体, 包括如根据所述组合物的给药途径选择生理学可接受的化合物。

5 本发明的另一个方面涉及本发明病毒的应用。通过提供本发明的活的减毒 PRRS 病毒, 现在有可能用它们制备用于预防和治疗 PRRS 感染的疫苗。它们在减毒作用方面特定的分子基础使得它们优于目前常规的减毒病毒。尤其优选使用根据本发明的在毒力特异性位点有缺失的病毒, 因为缺失不易回复。

10 下列实施例用于进一步解释本发明, 但不应理解为限制本文公开的本发明的保护范围。

参考文献

1. Snijder E.J., Meulenber J.J.M., 1998. The molecular biology of arteriviruses, Journal
15 of General Virology May 79(5):961-971.
2. Meulenber J.J.M., Hulst, M.M. et al., 1993b. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome, Virology 192, 62-72.
- 20 3. Conzelmann K.K., Visser N., Van Woensel P., Thiel H.J., 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group, Virology 103, 329-339.
4. Murtaugh M.P., Elam M.R., Kakach L.T., 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus, Archives of
25 Virology 140, 1451-1460.
5. Kapur V., Elam M.R., Pawtovich T.M. Murtaugh M.P., 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States, Journal of General Virology 77, 1271-1276.
- 30 6. Rossow K.D., 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome, Vet Pathol 35:1-20.

实施例 1 减毒的确立

该实施例明确指示如何比较两种不同 PRRS 病毒株的毒力特性。

每一项实验中每组至少 10 只没有感染 PRRS 病毒的小母猪。

动物经检验不含 PRRS 病毒特异性血清抗体并对 PRRSV 呈阴性。

- 5 实验中的所有动物具有相同的来源和品种。动物分组是随机的。

怀孕 90 天时，在每个鼻孔内施用 1ml 10^5 TDCID₅₀(第三代)的 PRRSV，每套检测中至少三个组。

一 VR-2332 攻击组，一个用可能的减毒病毒进行攻击的组，一个严格对照组。

- 10 如果实验全程中严格对照组保持 PRRS 阴性，并且 VR-2332 攻击组中出生的生命健康的小母猪比严格对照组至少少 25%，则实验是有效的。

减毒，或者说毒力低，被定义为一个或多个确定生殖性能的参数在统计学上的显著变化。

优选实验组有至少一个下列参数显著减少：

- 15
- 死胎频率
 - 在怀孕 112 天之时或之前的流产率
 - 木乃伊化(mumified)小母猪的数量
 - 存活和体弱小母猪的数量
 - 断奶前死亡率

- 20 或还优选实验组有至少一个下列参数显著增加：

- 每只大母猪的断奶小母猪的数量
 - 每只大母猪生出健康小母猪的数量
- 与 VR2332 感染组相比较

开放式阅读框1a，对PRRS病毒株ATCC VR-2332的氨基酸序列的对比排列

1 MSGILDRCTC TPNARVEMAE GQVYCTRCLS ARSLLPLNLQ VSELGVLGLF YRPEEPLRWT

61 LPRAFFTVEC SPAGACWLSA IFPIARMTSG NLNFQORMVR VAAELYRAGQ LTPAVLKALQ

121 VYERGCRWYP IVGPVPGVAV FANSLHVSDK PFPGATHVLT NLPLQRPKP EDFCFECAM

181 ATVYDIGHDA VMYAERKVS WAPRGDEVK FEAVPGELKL IANRLTSFP PHHTVDMSKF

241 AFTAPGCGVS MRVERQHGCL PADTVPEGNC WWSLFDLLPL EVQNKIRHA NQFGYQTKHG

301 VSGKYLQRRL QVNGLRAVTD LNGPIVVQYF SVKESWIRHL KLAGEPSYSG FEDLLRIRVE

361 PNTSPLADKE EKIFREGSHK WYGAGKRARK ARSCATATVA GRALSVRETR QAKEHEVAGA

421 NKAHLKHYS PPAEGNCGWH CISAIANRMV NSKFETTLPE RVRPPDDWAT DEDLVNAIQI

481 LRLPAALDRN GACTSAKYVL KLEGEHWTVT VTPGMSPSLL PLECVQGCGG HKGGLGSPDA

541 VEVSGFDPAC LDRLAEMVHL PSSAIPAALA EMSGSDSDRSA SPVTTVWTVS QFFARHSGGN

601 HPDQVRLGKI ISLCQVIEDC CCSQNKTNRV TPEEVAAKID LYLRGATNLE ECLARLEKAR

图 1

661 PPRVIDTSFD WDVVLPGVEA ATQTIKLPQV NQCRAVPVW TQKSLDNNV PLTAFSLANY
721 YYRAQGDEV HRERLTAVLS KLEKVVREY GLMTEPGPR PTLPRGLDEL KQOMEEDLLK
781 LANAQTTSDM MAWAVEQVDL KTWKYNPRW TPPPPPKVQ PRKTKPVKSL PERKVPVAPR
841 RKGSDCGSP VSLGGDVPNS WEDLAVSSPF DLPTPEPAT PSSELVIVSS PQCIFRPATP
901 LSEPAPIPAP RGTVSRPVTP LSEPIVPAP RRKFQQVKRL SSAAAIPPYQ DEPLDLSASS
961 QTEYEASPPA PPQSGGVLGV EGHEAEETLS EISDMSGNIK PASVSSSSSL SSVRITRPKY
1021 SAQAIIIDSGG PCSGHLQEVK ETCLSVAREA CDATKLDPA TQEWLSRMWD RVDMLTWRNT
1081 SVYQAICTLD GRLKFLPKMI LETPPYPCE FVMPHPTAP SVGAESDLTI GSVATEDVPR
1141 ILEKIENVGE MANQPLAFS EDKPVDDQLV NDPRISSRRP DESTSAPSAG TGGAGSFTDL
1201 PPSDGADADG GGFERTVKKR AERLFDQLSR QVFDLVSHLP VFFSRFLYPG GGYSPGDWGF
1261 AAFTLLCLFL CYSYPAFGIA PLLGVFSGSS RVRMGVFGC WLAFVGLFK PVSDPVGAAAC

图 1a

1321 EFDSPECRNI LHSFELLKPW DPVRSLVVGP VGLGLAILGR LLGGARCIWH FLRLGLIVAD
1381 CILAGAYVLS QGRCKKCWGS CIRTPA NEVA FNVFPFTRAT RSSLIDLCDR FCAPKGM DPI
1441 FLATGWRGCW AGRSPIEQPS EKPIAFAQLD EKKITARTVV AQPYDPNOAV KCLRVLQSGG
1501 RWLSG-PKS GQGERCSIPS PFFPTGVKVD PDCRVVVDPD TFTAALRSY STTNVLGVG
1561 DFAQLNGLKI RQISKPSGGG PHLMAALHVA CSMALHMLAG IYVTAVGSCG TGTNDPWCAN
1621 PFAVPGYGP G SLCTSRLCIS QHGLTLPLTA LVAGFGIOEI ALVVLIFVSI GGMAHRLSCK
1681 ADMLCVLLAI ASYVWVPLTW LLCVFPCWLR CFSLHPLTIL WLVEFFLISVN MP SGILAMVL
1741 LVSLWLLGRY TNVAGLVTPY DIHHYTS GPR GVAALATAPD GTYLAAVRRA ALTGR TMLFT
1801 PSQLGSLL EG AFRTRKPSLN TVNVIGSSMG SGGVFTIDGK VKCVTAAHVL TGN SARVSGV
1861 GFNQMLDFDV KGDFAIADCP NWQGAAPKTQ FCTDGTGRA YWLTSSGVEP GVIGKGFAFC
1921 FTACGDSGSP VITEAGELVG VHTGSNKQGG GIVTRPSGQF CNVAPIKLSE LSEFFAGPKV
1981 PLGDVKVGSH IIKDISEVPS DLCALLAAKP ELEGGLSTVQ LLCVFFLLWR MMGHAWTPLV

 1b

2041 AVSFFILNEV LPAVLVRSVF SFGMFVLSWL TPWSAQVLM I RLLTAALNRN RWSLAFFSLG
2101 AVTGFVADLA ATQGHPLQAV MNLSTYAFLP RMMVVTSPV VITCGVVHLL AIILYLFKYR
2161 GPHHILVGDG VFSAAFFLRY FAEGKLREGV SQSCGMNHES LTGALAMRLN DEDLDLFLMKW
2221 TDEKCFVSAS NMRNAAGQFI EAAAYAKALRV ELAQLVQVDK VRGTLAKLEA FADTVAPQLS
2281 PGDIVVALGH TPVGSIFDLK VGSTKHTLQA IETRVLAGSK MTVARVVDPT PTPPPAPVPI
2341 PLPPKVLENG PNAWGDEDRL NKKKRRRMEA LGIYVMGGKK YQKFWDKNSG DVFYEEVHNN
2401 TDEWECLRVG DPADEFDEKG TLCGHVTIEN KAYHVTYSPS GKKFLVPVNP ENGRVQWEAA
2461 KLSVEQALGM MNVDGELTAK ELEKLKRIID KLQGLTKEQC LNC*

图 1c

开放式阅读框1b，对PRRS病毒株ATCC VR-2332的氨基酸序列的对比排列

1 LAASDLTRCG RGLVVTETA VKIVKFNRT FTLGPVNLKV ASEVELKDAV EHNQHPVARP

61 IDGGVLLRS AVPSLIDVLI SGADASPKLL AHHPGNTGI DGLWDFESE ATKEEVALSA

121 QIIQACDIRR GDAPEIGLPY KLYPVRGNPE RVKGVLQNT R FGDIPYKTPS DTGSPVHAAA

181 CLTPNATPVT DGRSVLATM PPGFELYVPT IPASVLDYLD SRPDCPKQLT EHGCEDAALK

241 DLSKYDLSTQ GFVLPGLRL VRKYLFAHVG KCPPVHRPST YPAKNMAGI NGNRFPTKDI

301 QSVPEIDVLC AQAVRENWQT VTPCTLKKQY CGKKKTRTIL GTNFIALAH RAVLSGVTQG

361 FMKKAENSPI ALGKNKFKEL QTPVLGRCL E ADLASC DRST PAIVRWFAAN LLYELACAE E

421 HLP SYVLNCC HDLLVTQSGA VTKRGG LSSG DPITSVSNTI YSLVIYAQHM VLSYFKSGHP

481 HGLLFLQDQL KFEDMLKVQP LIVYSDDLVL YAESPTMPNY HWWVEHLNLM LGFQTDPKKT

541 AITDSPSFLG CRIINGRQLV PNRDRILAAL AYHMKASNV S EYYASAAAIL MDSCACLEYD

601 PEWFEEELVVG IAQCARKDGY SFPGTFFMS MWEKLRN S Y E GKSRVCGYC GAPAPYATAC

图 2

661 GLDVCYIYH TH FHQHCPTIW CGHPAGSGSC SECKSPVGKG TSPLEVELEQ VPKPPRTVI
721 MHVEQGLTPL DPGRYQTRRG LVSRRGIRG NEVGLPDGDY ASTALLPTCK EINMVAVASN
781 VLRSRFIIGP PGAGKTYWLL QQVQDGDVIY TPHTQTM LDM IRALGTCRFN VPAGTTLQFP
841 VPSRTGPWVR ILAGSWCPGK NSFLDEAAYC NHLDVLRLLS KTTLTCLGDF KQLHPVGFDS
901 HCYVEDIMPQ TQLKTIWRFQ QNICDAIQPD YRDKIMSMVN TTRVTYVEKP VRYGOVLTPY
961 HRDREDDAIT IDSSQGATFD VVTLHLPTKD SLNRQALVA ITRARHAIFV YDPHRQLQGL
1021 FDLPAKGTPV NLAHVHCDGQL IVIDRNNKEC TVAQALGNGD KFRATDKRVV DSLRAICADL
1081 EGSSSPLPKV AHNLGIFYFSP DLTQFAKLPV ELAPHWPVVS TONNEKWPDR LVASLRPIHK
1141 YSRACIGAGY MVGPSVFLGT PGVVSYYLTK FVKGGAQVLP ETVFSTGRIE VDCREYLDDR
1201 EREVAASLPH GFIGDVKGTT VGGCHHVTSR YLPRVLPKES VAVGVSSPG KAAKALCTLT
1261 DVYLPDLEAY LHPETQSKCW KMLDFKEVR LMVWKDKTAY FQLEGRYFTW YQLASYASYI

图 2a

1321 RVPVNSTVYL DPCMGPALCN RRVVGSTHWG ADLAVTPYDY GAKIILSSAY HGEMPPGYKI
1381 LACAEFSLDD PVKYKHTWGF ESDTAYLYEF TNGEDWEDY NDAFRARQEG KIYKATATSL
1441 KEYFPPGPVI EPTLGLN*

图 2b

开放式阅读框2，对PRRS病毒株ATCC VR-2332的氨基酸序列的对比排列

```
1  MKWGPCKAFL TKLANFLWMI SRSSWCPLLI SLYFWPFCIA SPSVGVWSF ASDWEAPRYS
61  VRALPFTLSN YRRSYEAFLS QCQVDIPTWG TKHPLGMLWH HKVSTLIDEM VSRMYRIME
121 KAGQAAWKQV VSEATLSRIS SLDVVAHFQH LAAIEAETCK YLASRLPMLH NLRMTGSNVT
181 IVYNSTLNQV FAIFPTPGSR PKLHDFQOWL IAVHSSIFSS VAASCTLFVV LWLRVPILRT
241 VFGFRWLGA I FLSNSQ*
```

图 3

VR 2332	10	20	30	40	50	60
	ATGTCCTGGGA	TACTTGATCG	GTGCACGTGT	ACCCCCAATG	CCAGGGTGTT	TATGGCGGAG
VR 2332	70	80	90	100	110	120
	GGCCAAGTCT	ACTGCACACG	ATGCCTCAGT	GCACGGTCTC	TCCTTCCCCT	GAACCTCCAA
VR 2332	130	140	150	160	170	180
	GTTTCTGAGC	TCGGGGTGCT	AGGCCTATTC	TACAGGCCCG	AAGAGCCACT	CCGGTGAGCG
VR 2332	190	200	210	220	230	240
	TTGCCACGTG	CATTCCCCAC	TGTTGAGTGC	TCCCCGCGCG	GGGCCTGCTG	GCTTTCTGCA
VR 2332	250	260	270	280	290	300
	ATCTTTCCAA	TCGCACGAAT	GACCAGTGGA	AACCTGAACT	TCCAACAAAG	AATGGTACGG
VR 2332	310	320	330	340	350	360
	GTCGCAGCTG	AGCTTTACAG	AGCCGCGCCAG	CTCACCCCTG	CAGTCTTGAA	GGCTCTACAA
VR 2332	370	380	390	400	410	420
	GTTTATGAAC	GGGGTTGCCG	CTGGTACCCC	ATTGTTGGAC	CTGTCCCTGG	AGTGGCCGTT
VR 2332	430	440	450	460	470	480
	TTCGCCAATT	CCCTACATGT	GAGTGATAAA	CCTTTCCCGG	GAGCAACTCA	CGTGTTGACC
VR 2332	490	500	510	520	530	540
	AACCTGCCGC	TCCCGCAGAG	ACCCAAGCCT	GAAGACTTTT	GCCCCTTTGA	GTGTGCTATG
VR 2332	550	560	570	580	590	600
	GCTACTGTCT	ATGACATTGG	TCATGACGCC	GTCATGTATG	TGGCCGAAAG	GAAAGTCTCC
VR 2332	610	620	630	640	650	660
	TGGGCCCTC	GTGGCGGGGA	TGAAGTAAA	TTTGAAGCTG	TCCCCGGGGA	GTGAAGTTG
VR 2332	670	680	690	700	710	720
	ATTGCGAACC	GGCTCCGCAC	CTCCTTCCCG	CCCCACCACA	CAGTGACAT	GTCTAAGTTC
VR 2332	730	740	750	760	770	780
	GCCTTCACAG	CCCCTGGGTG	TGGTGTCTCT	ATGCGGGTCG	AACGCCAACA	CGGCTGCCTT
VR 2332	790	800	810	820	830	840
	CCCGCTGACA	CTGTCCCTGA	AGGCAACTGC	TGGTGGAGCT	TGTTTGACTT	GCTTCCACTG
VR 2332	850	860	870	880	890	900
	GAAGTTCAGA	ACAAAGAAAT	TCGCCATGCT	AACCAATTG	GCTACCAGAC	CAAGCATGGT
VR 2332	910	920	930	940	950	960
	GTCTCTGGCA	AGTACCTACA	GCGGAGGCTG	CAAGTTAATG	GTCTCCGAGC	AGTAACTGAC
VR 2332	970	980	990	1000	1010	1020
	CTAAACGGAC	CTATCGTCGT	ACAGTACTTC	<u>TCCGTTAAGG</u>	AGAGTTGGAT	CCGCCATTTG
VR 2332	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	AAACTGGCGG	GAGAACCCAG	CTACTCTGGG	TTTGAGGACC	TCCTCAGAAT	AAGGGTTGAG
VR 2332	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CCTAACACGT	CGCCATTGGC	TGACAAGGAA	GAAAAAATTT	TCCGGTTTGG	CAGTCACAAG
VR 2332	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	TGGTACGGCG	CTGGAAAGAG	AGCAAGAAAA	GCACGCTCTT	GTGCGACTGC	TACAGTCGCT
VR 2332	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	GGCCGCGCTT	TGTCCGTTCTG	TGAAACCCGG	CAGGCCAAGG	AGCACGAGGT	TGCCGGCGCC

图 4

VR 2332	1270 AACAAAGGCTG	1280 AGCACCTCAA	1290 ACACTACTCC	1300 CCGCCTGCCG	1310 AAGGGAATTG	1320 TGGTTGGCAC
VR 2332	1330 TGCATTTCCG	1340 CCATCGCCAA	1350 CCGGATGGTG	1360 AATTCCAAAT	1370 TTGAAACCAC	1380 CCTTCCCGAA
VR 2332	1390 AGAGTGAGAC	1400 CTCCAGATGA	1410 CTGGGCTACT	1420 GACGAGGATC	1430 TTGTGAATGC	1440 CATCCAAATC
VR 2332	1450 CTCAGACTCC	1460 CTGCGGCCTT	1470 AGACAGGAAC	1480 GGTGCTTGTA	1490 CTAGCGCCAA	1500 GTACGTACTT
VR 2332	1510 AAGCTGGAAG	1520 GTGAGCATTG	1530 GACTGTCACT	1540 GTGACCCCTG	1550 GGATGTCCCC	1560 TTCTTTGCTC
VR 2332	1570 CCTCTTGAAT	1580 GTGTTTCAGGG	1590 CTGTTGTGGG	1600 CACAAGGGCG	1610 GTCTTG GTTC	1620 CCCAGATGCA
VR 2332	1630 GTCGAGGTCT	1640 CCGGATTTGA	1650 CCCTGCCTGC	1660 CTTGACCGGC	1670 TGGCTGAGGT	1680 GATGCACCTG
VR 2332	1690 CCTAGCAGTG	1700 CTATCCCAGC	1710 CGCTCTGGCC	1720 GAAATGTCTG	1730 GCGATTCCGA	1740 TCGTTCCGGCT
VR 2332	1750 TCTCCGGTCA	1760 CCACCGTGTG	1770 GACTGTTTCG	1780 CAGTTCTTTG	1790 CCCGTCACAG	1800 CGGAGGGAAT
VR 2332	1810 CACCTTGACC	1820 AAGTGCGCTT	1830 AGGGAAAAAT	1840 ATCAGCCTTT	1850 GTCAGGTGAT	1860 TGAGGACTGC
VR 2332	1870 TGCTGTTCCC	1880 AGAACAAAAC	1890 CAACCGGGTC	1900 ACCCCGGAGG	1910 AGGTCGCAGC	1920 AAAGATTGAC
VR 2332	1930 CTGTACCTCC	1940 GTGGTGCAAC	1950 AAATCTTGAA	1960 GAATGCTTGG	1970 CCAGGCTTGA	1980 GAAAGCGCGC
VR 2332	1990 CCGCCACGCG	2000 TAATCGACAC	2010 CTCCTTTGAT	2020 TGGGATGTTG	2030 TGCTCCCTGG	2040 GGTTGAGGCG
VR 2332	2050 GCAACCCAGA	2060 CGATCAAGCT	2070 GCCCCAGGTC	2080 AACCAGTGTC	2090 GTGCTCTGGT	2100 CCCTGTTGTG
VR 2332	2110 ACTCAAAAGT	2120 CCTTGACAA	2130 CAACTCGGTC	2140 CCCCTGACCG	2150 CCTTTTCACT	2160 GGCTAACTAC
VR 2332	2170 TACTACCGTG	2180 CGCAAGGTGA	2190 CGAAGTTCGT	2200 CACCGTGAAA	2210 GACTAACCGC	2220 CGTGCTCTCC
VR 2332	2230 AAGTTGGAAG	2240 AGGTTGTTCG	2250 AGAAGAATAT	2260 GGGCTCATGC	2270 CAACCGAGCC	2280 TGGTCCACGG
VR 2332	2290 CCCACACTGC	2300 CACGCGGGCT	2310 CGACGAACTC	2320 AAAGACCAGA	2330 TGGAGGAGGA	2340 CTTGCTGAAA
VR 2332	2350 CTGGCTAACG	2360 CCCAGACGAC	2370 TTCGGACATG	2380 ATGGCCTGGG	2390 CAGTCGAGCA	2400 GGTTGACCTA
VR 2332	2410 AAA ACTTGGG	2420 TCAAGAACTA	2430 CCCGCGGTGG	2440 ACACCACCAC	2450 CCCCTCCGCC	2460 AAAAGTTCAG
VR 2332	2470 CCTCGAAAAA	2480 CGAAGCCTGT	2490 CAAGAGCTTG	2500 CCGGAGAGAA	2510 AGCCTGTCCC	2520 CGCCCCGCGC

图 4a

VR 2332	2530 AGGAAGGTTG	2540 GGTCCGATTG	2550 TGGCAGCCCG	2560 GTTTCATTAG	2570 GCGGCGATGT	2580 CCCTAACAGT
VR 2332	2590 TGGGAAGATT	2600 TGGCTGTTAG	2610 TAGCCCCTTT	2620 GATCTCCCGA	2630 CCCCACCTGA	2640 GCCGGCAACA
VR 2332	2650 CCTTCAAGTG	2660 AGCTGGTGAT	2670 TGTGTCCTCA	2680 CCGCAATGCA	2690 TCTTCAGGCC	2700 GGCGACACCC
VR 2332	2710 TTGAGTGAGC	2720 CGGCTCCAAT	2730 TCCCGCACCT	2740 CGCGGAAC TG	2750 TGTCTCGACC	2760 GGTGACACCC
VR 2332	2770 TTGAGTGAGC	2780 CGATCCCTGT	2790 GCCCCGACCG	2800 CGGCGTAAGT	2810 TTCAGCAGGT	2820 GAAAAGATTG
VR 2332	2830 AGTTCGGCGG	2840 CGGCAATCCC	2850 ACCGTACCAG	2860 GACGAGCCCC	2870 TGGATTTGTC	2880 TGCTTCTCTCA
VR 2332	2890 CAGACTGAAT	2900 ATGAGGCCTC	2910 TCCCCAGCA	2920 CCGCCGCAGA	2930 GCGGGGGCGT	2940 TCTGGGAGTA
VR 2332	2950 GAGGGGCATG	2960 AAGCTGAGGA	2970 AACCCTGAGT	2980 GAAATCTCGG	2990 ACATGTCGGG	3000 TAACATTAAA
VR 2332	3010 CCTGCGTCCG	3020 TGTCATCAAG	3030 CAGCTCCTTG	3040 TCCAGCGTGA	3050 GAATCACACG	3060 CCCCAAATAC
VR 2332	3070 TCAGCTCAAG	3080 CCATCATCGA	3090 CTCGGGCGGG	3100 CCCTGCAGTG	3110 GGCATCTCCA	3120 AGAGGTAAAG
VR 2332	3130 GAAACATGCC	3140 TTAGTGTTCAT	3150 GCGCGAGGCA	3160 TGTGATGCGA	3170 CTAAGCTTGA	3180 TGACCCTGCT
VR 2332	3190 ACGCAGGAAT	3200 GGCTTTCTCG	3210 CATGTGGGAT	3220 CGGGTGGACA	3230 TGCTGACTTG	3240 GCGCAACACG
VR 2332	3250 TCTGTTTACC	3260 AGGCGATTTG	3270 CACCTTAGAT	3280 GGCAGGTTAA	3290 AGTTCCTCCC	3300 AAAAATGATA
VR 2332	3310 CTCGAGACAC	3320 CGCCGCCCTA	3330 TCCGTGTGAG	3340 TTTGTGATGA	3350 TGCCTCACAC	3360 GCCTGCACCT
VR 2332	3370 TCCGTAGGTG	3380 CGGAGAGCGA	3390 CCTTACCATT	3400 GGCTCAGTTG	3410 CTACTGAAGA	3420 TGTTCCACGC
VR 2332	3430 ATCCTCGAGA	3440 AAATAGAAAA	3450 TGTCGGCGAG	3460 ATGGCCAACC	3470 AGGGACCCTT	3480 GGCCTTCTCC
VR 2332	3490 GAGGATAAAC	3500 CGGTAGATGA	3510 CCAACTTGTC	3520 AACGACCCCC	3530 GGATATCGTC	3540 GCGGAGGCCT
VR 2332	3550 GACGAGAGCA	3560 CATCAGCTCC	3570 GTCCGCAGGC	3580 ACAGGTGGCG	3590 CCGGCTCTTT	3600 TACCGATTTG
VR 2332	3610 CCGCCTTTCA	3620 ATGGCGCGGA	3630 TGCGGACGGG	3640 GGGGGGCCGT	3650 TTCGGACGGT	3660 AAAAAGAAAA
VR 2332	3670 GCTGAAAGGC	3680 TCTTTGACCA	3690 ACTGAGCCGT	3700 CAGGTTTTTG	3710 ACCTCGTCTC	3720 CCATCTCCCT
VR 2332	3730 GTTTTCTTCT	3740 CACGCCTTTT	3750 CTACCCTGGC	3760 GGTGTTATT	3770 CTCCGGGTGA	3780 TTGGGGTTTT

图 4b

VR 2332	6310 GTGACCGGTT	6320 TTGTCGCAGA	6330 TCTTGCGGCC	6340 ACTCAGGGGC	6350 ATCCGTTGCA	6360 GGCAGTGATG
VR 2332	6370 AAATTTGAGCA	6380 CCTATGCATT	6390 CCTGCCTCGG	6400 ATGATGGTTG	6410 TGACCTCACC	6420 AGTCCCAGTG
VR 2332	6430 ATCACGTGTG	6440 GTGTCGTGCA	6450 CCTACTTGCC	6460 ATCATTTTGT	6470 ACTTGTTTAA	6480 GTACCGTGCC
VR 2332	6490 CCGCACCATA	6500 TCCTTGTTGG	6510 CGATGGAGTG	6520 TTCTCTGCGG	6530 CTTTCTTCTT	6540 GAGATACTTT
VR 2332	6550 GCCGAGGGAA	6560 AGTTGAGGGA	6570 AGGGGTGTCTG	6580 CAATCCTGCG	6590 GAATGAATCA	6600 TGAGTCTCTG
VR 2332	6610 ACTGGTGCCC	6620 TCGCTATGAG	6630 ACTCAATGAC	6640 GAGGACTTGG	6650 ATTTCTTAT	6660 GAAATGGACT
VR 2332	6670 GATTTTAAGT	6680 GCTTTGTTTC	6690 TGCCTCCAAC	6700 ATGAGGAATG	6710 CAGCGGTCA	6720 ATTTATCGAG
VR 2332	6730 GCTGCCTATG	6740 CTAAAGCACT	6750 TAGAGTAGAA	6760 CTGGCCCAGT	6770 TGGTGCAGGT	6780 TGATAAAGTT
VR 2332	6790 CGAGGTACTT	6800 TGGCCAACT	6810 TGAAGCTTTT	6820 GCTGATACCG	6830 TGGCACCTCA	6840 ACTCTCGCCC
VR 2332	6850 GGTGACATTG	6860 TTGTCGCTCT	6870 CGGCCACACG	6880 CCTGTTGGCA	6890 GTATCTTCGA	6900 CCTAAAGGTT
VR 2332	6910 GGTAGCACCA	6920 AGCATACCCT	6930 CCAAGCCATT	6940 GAGACCAGAG	6950 TCCTTGCTGG	6960 GTCCAAAATG
VR 2332	6970 ACCGTGCGC	6980 GCGTCGTGCA	6990 CCCGACCCCC	7000 ACGCCCCCAC	7010 CCGCACCCGT	7020 GCCCATCCCC
VR 2332	7030 CTCCCACCGA	7040 AAGTTCTGGA	7050 GAATGGCCCC	7060 AACGCTTGGG	7070 GGGATGAGGA	7080 CCGTTTGAAT
VR 2332	7090 AAGAAGAAGA	7100 GGCGCAGGAT	7110 GGAAGCCCTC	7120 GGCATCTATG	7130 TTATGGGCGG	7140 GAAAAAGTAC
VR 2332	7150 CAGAAATTTT	7160 GGGACAAGAA	7170 TTCCGGTGAT	7180 GTGTTTATG	7190 AGGAGGTCCA	7200 TAATAACACA
VR 2332	7210 GATGAGTGGG	7220 AGTGTCTCAG	7230 AGTTGGCGAC	7240 CCTGCCGACT	7250 TTGACCCTGA	7260 GAAGGGAACT
VR 2332	7270 CTGTGTGGAC	7280 ATGTCACCAT	7290 TGAAAACAAG	7300 GCTTACCATG	7310 TTTACACCTC	7320 CCCATCTGGT
VR 2332	7330 AAGAAGTTCT	7340 TGGTCCCCGT	7350 CAACCCAGAG	7360 AATGGAAGAG	7370 TTCAATGGGA	7380 AGCTGCAAAG
VR 2332	7390 CTTTCCGTGG	7400 AGCAGGCCCT	7410 AGGTATGATG	7420 AATGTCGACG	7430 GCGAACTGAC	7440 TGCCAAAGAA
VR 2332	7450 CTGGAGAAAC	7460 TGAAAAGAAT	7470 AATTGACAAA	7480 CTCCAGGGCC	7490 TGACTAAGGA	7500 GCAGTGTTTA
VR 2332	7509 AACTGCTAG					

图 4e

VR 2332	5050 GACATGCTGT	5060 GTGTTTTGCT	5070 TGCAATTGCC	5080 AGCTATGTTT	5090 GGGTACCTCT	5100 TACCTGGTTG
VR 2332	5110 CTTTGTGTGT	5120 TTCCTTGCTG	5130 GTTGCGCTGT	5140 TTTTCTTTGC	5150 ACCCCTCAC	5160 CATCCTATGG
VR 2332	5170 TTGGTGTTTT	5180 TCTTGATTTC	5190 TGTGAATATG	5200 CCTTCAGGAA	5210 TCTTGCCCAT	5220 GGTGTGTGTG
VR 2332	5230 GTTTCTCTTT	5240 GGCTTCTTGG	5250 TCGTTATACT	5260 AATGTTGCTG	5270 GCCTTGTCAC	5280 CCCTACGAC
VR 2332	5290 ATTTCATCATT	5300 ACACCAGTGG	5310 CCCCCGCGGT	5320 GTTGCCGCCT	5330 TGGCTACCGC	5340 ACCAGATGGG
VR 2332	5350 ACCTACTTGG	5360 CCGCTGTCCG	5370 CCGCGCTGCG	5380 TTGACTGGCC	5390 GCACCATGCT	5400 GTTTACCCCG
VR 2332	5410 TCCCAGCTTG	5420 GGTCTCTTCT	5430 TGAGGGTGCT	5440 TTCAGAACTC	5450 GAAAGCCCTC	5460 ACTGAACACC
VR 2332	5470 GTCAATGTGA	5480 TCGGGTCTCT	5490 CATGGGCTCT	5500 GGCGGGGTGT	5510 TTACCATCGA	5520 CGGGAAAGTC
VR 2332	5530 AAGTGCGTAA	5540 CTGCCGCACA	5550 TGTCCTTACG	5560 GGCAATTACG	5570 CTCGGGTTTC	5580 CGGGGTCGGC
VR 2332	5590 TTCAATCAAA	5600 TGCTTGACTT	5610 TGACGTAAAG	5620 GGAGATTTTC	5630 CTATAGCTGA	5640 TTGCCCGAAT
VR 2332	5650 TGGCAAGGGG	5660 CTGCCCCCAA	5670 GACCCAATTC	5680 TGCACGGATG	5690 GATGGACTGG	5700 CCGTGCCTAT
VR 2332	5710 TGGCTAACAT	5720 CCTCTGGCGT	5730 CGAACCCGGC	5740 GTCATTGGAA	5750 AAGGATTTCG	5760 CTTCTGCTTC
VR 2332	5770 ACCGCATGTG	5780 GCGATTCCGG	5790 GTCCCCAGTG	5800 ATCACCGAGG	5810 CCGGTGAGCT	5820 TGTCGGCGTT
VR 2332	5830 CACACGGGAT	5840 CGAATAAACA	5850 AGGGGGGGGC	5860 ATTGTTACGC	5870 GCCCCTCAGG	5880 CCAGTTTGTG
VR 2332	5890 AATGTGGCAC	5900 CCATCAAGCT	5910 AAGCGAATTA	5920 AGTGAATTCT	5930 TTGCTGGGCC	5940 TAAGGTCCCC
VR 2332	5950 CTCGGTGATG	5960 TGAAGGTCGG	5970 CAGCCACATA	5980 ATTAAAGACA	5990 TAAGCGAGGT	6000 GCCTTCAGAT
VR 2332	6010 CTTTGTGCCT	6020 TGCTTGCTGC	6030 CAAACCTGAA	6040 CTGGAAGGAG	6050 GCCTCTCCAC	6060 CGTCCAACCT
VR 2332	6070 CTTTGTGTGT	6080 TTTTTCTCCT	6090 GTGGAGAATG	6100 ATGGGACATG	6110 CCTGGACGCC	6120 CTTGGTTGCT
VR 2332	6130 GTGAGTTTCT	6140 TTATTTTGAA	6150 TGAGGTCTCT	6160 CCAGCCGTCC	6170 TGGTCCGGAG	6180 TGTTTTCTCC
VR 2332	6190 TTTGGAATGT	6200 TTGTGCTATC	6210 CTGGCTCACG	6220 CCATGGTCTG	6230 CGCAAGTTCT	6240 GATGATCAGG
VR 2332	6250 CTTCTGACAG	6260 CAGCTCTTAA	6270 CAGGAACAGA	6280 TGGTCACTTG	6290 CCTTTTTTCAG	6300 CCTCGGTGCA

图 4d

VR 2332	3790	3800	3810	3820	3830	3840
	GCAGCTTTTA	CTCTATTGTG	CCTCTTTTTA	TGTTACAGTT	ACCCAGCCTT	TGGTATTGCT
VR 2332	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	CCCCTCTTGG	GTGTGTTTTC	TGGGTCTTCT	CGGCGCGTTC	GAATGGGGGT	TTTGGGCTGC
VR 2332	3910	3920	3930	3940	3950	3960
	TGGTTGGCTT	TTGCTGTTGG	TCTGTTCAAG	CCTGTGTCCG	ACCCAGTCGG	CGCTGCTTGT
VR 2332	3970	3980	3990	4000	4010	4020
	GAGTTTGACT	CGCCAGAGTG	TAGAAACATC	CTTCATTCTT	TTGAGCTTCT	CAAACCTTGG
VR 2332	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	GACCTTGTTT	GCAGCCTTGT	TGTGGGGCCC	GTCGGTCTCG	GTCTTGCCAT	TCTTGGCAGG
VR 2332	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	TTACTGGGCG	GGGCACGCTG	CATCTGGCAC	TTTTTGCTTA	GGCTTGGCAT	TGTTGCAGAC
VR 2332	4150	4160	4170	4180	4190	4200
	TGTATCTTGG	CTGGAGCTTA	CGTGCTTTCT	CAAGGTAGGT	GTAAAAAGTG	CTGGGGATCT
VR 2332	4210	4220	4230	4240	4250	4260
	TGTATAAGAA	CTGCTCCTAA	TGAGGTCGCT	TTTAACGTGT	TTCTTTTCAC	ACGTGCGACC
VR 2332	4270	4280	4290	4300	4310	4320
	AGGTCGTCAC	TTATCGACCT	GTGCGATCGG	TTTTGTGCGC	CAAAAGGAAT	GGACCCCAT
VR 2332	4330	4340	4350	4360	4370	4380
	TTTCTCGCCA	CTGGGTGGCG	CGGGTGCTGG	GCCGGCCGAA	GCCCCATTGA	GCAACCCTCT
VR 2332	4390	4400	4410	4420	4430	4440
	GAAAAACCCA	TCGCGTTTGC	CCAATTGGAT	GAAAAGAAGA	TTACGCTAG	GACTGTGGTC
VR 2332	4450	4460	4470	4480	4490	4500
	GCCCAGCCTT	ATGACCCCAA	CCAAGCCGTA	AAGTGCTTGC	GGGTATTGCA	GTCGGGTGGG
VR 2332	4510	4520	4530	4540	4550	4560
	CGATGCTGGC	TAAGCGTCC	CAAAAGTGGT	CAAGGTTTCC	GCTGTTCAT	TCCGAGCCCC
VR 2332	4570	4580	4590	4600	4610	4620
	TTCTTTCCCA	CTGGAGTGAA	AGTTGACCCT	GATTGCAGGG	TCGTGGTTGA	CCCTGACACT
VR 2332	4630	4640	4650	4660	4670	4680
	TTCACCTGCAG	CTCTCCGGTC	TGGCTACTCC	ACCACAAACC	TCGTCTTGG	TGTAGGGGAC
VR 2332	4690	4700	4710	4720	4760	4740
	TTTGCCCAGC	TGAATGGATT	AAAAATCAGG	CAAATTTCCA	AGCCTTCAGG	GGGAGGCCCA
VR 2332	4750	4760	4770	4780	4790	4800
	CATCTCATGG	CTGCCCTGCA	TGTTGCCTGC	TCGATGGCTC	TGCACATGCT	TGCTGGGATT
VR 2332	4810	4820	4830	4840	4850	4860
	TATGTGACTG	CGGTGGGTTC	TTGCGGCACC	GGCACCAACG	ACCCGTGGTG	CGCTAACCCG
VR 2332	4870	4880	4890	4900	4910	4920
	TTTGCCGTCC	CTGGCTACGG	ACCTGGCTCT	CTCTGCACGT	CCAGGTTGTG	CATTTCCCAA
VR 2332	4930	4940	4950	4960	4970	4980
	CACGGCCTTA	CCCTGCCCTT	GACAGCACTT	GTGGCGGGAT	TCGGTATTCA	AGAAATTGCC
VR 2332	4990	5000	5010	5020	5030	5040
	TTGGTCGTTT	TGATTTTGT	TTCCATCGGA	GGCATGGCTC	ATAGGTTGAG	CTGTAAGGCT

图 4C

VR 2332	10	20	30	40	50	60
	CTAGCCGCCA	GCGACTTGAC	CCGCTGTGGT	CGCGGCGGCT	TGGTTGTGTAC	TGAAACAGCG
VR 2332	70	80	90	100	110	120
	GTAAAAATAG	TCAAATTTCA	CAACCGGACC	TTCACCCTGG	GACCTGTGAA	TTTAAAAGTG
VR 2332	130	140	150	160	170	180
	GCCAGTGAGG	TTGAGCTAAA	AGACGCGGTT	GAGCACAAACC	AACACCCGGT	TGCGAGACCG
VR 2332	190	200	210	220	230	240
	ATCGATGGTG	GAGTTGTGCT	CCTGCGTTCC	GCGGTTCCCT	CGCTTATAGA	CGTCTTGATC
VR 2332	250	260	270	280	290	300
	TCCGGTGCTG	ATGCATCTCC	CAAGTTACTT	GCCCATCACG	GGCCGGGAAA	CACTGGGATC
VR 2332	310	320	330	340	350	360
	GATGGCACGC	TCTGGGATTT	TGAGTCCGAA	GCCACTAAAG	AGGAAGTCGC	ACTCAGTGCG
VR 2332	370	380	390	400	410	420
	CAAATAATAC	AGGCTTGTGA	CATTAGGCGC	GGCGACGCTC	CTGAAATTGG	TCTCCCTTAC
VR 2332	430	440	450	460	470	480
	AAGCTGTACC	CTGTTAGGGG	TAACCCCTGAG	CGGGTGAAAG	GAGTTCTGCA	GAATACAAGG
VR 2332	490	500	510	520	530	540
	TTTGGAGACA	TACCTTACAA	AACCCCCAGT	GACACTGGAA	GCCCAGTGCA	CGCGGCTGCC
VR 2332	550	560	570	580	590	600
	TGCCCTTACGC	CCAACGCCAC	TCCGGTGACT	GATGGGCGCT	CCGTCTTGGC	CACGACCATG
VR 2332	610	620	630	640	650	660
	CCCCCGGGT	TTGAGTTATA	TGTACCGACC	ATACCAGCGT	CTGTCCTTGA	TTACCTTGAC
VR 2332	670	680	690	700	710	720
	TCTAGGCCTG	ACTGCCCTAA	ACAGCTGACA	GAGCACGGCT	GCGAAGATGC	CGCACTGAAA
VR 2332	730	740	750	760	770	780
	GACCTCTCTA	AATATGACTT	GTCCACCCAA	GGCTTTGTTT	TACCTGGAGT	TCTTCGCCTT
VR 2332	790	800	810	820	830	840
	GTGCGGAAAT	ACCTGTTTGC	CCATGTAGGT	AAGTGCCAC	CCGTTTCATG	GCCTTCTACT
VR 2332	850	860	870	880	890	900
	TACCCTGCTA	AGAATTCTAT	GGCTGGAATA	AATGGGAACA	GGTTCCCAAC	CAAGGACATT
VR 2332	910	920	930	940	950	960
	CAGAGCGTCC	CTGAAATCGA	CGTTCTGTGC	GCACAGGCTG	TGCGAGAAAA	CTGGCAAAC
VR 2332	970	980	990	1000	1010	1020
	GTCACCCCTT	GTACTCTTAA	GAAACAGTAT	TGCGGGAAGA	AGAAGACTAG	GACCATACTC
VR 2332	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	GGCACCAATA	ACTTCATCGC	ACTAGCCAC	CGAGCAGTGT	TGAGTGGTGT	TACCCAGGGC
VR 2332	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	TTCATGAAAA	AGGCGTTTAA	CTCGCCCATC	GCCCTCGGAA	AGAACAAGTT	TAAGGAGCTA
VR 2332	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	CAGACTCCGG	TCCTGGGCAG	GTGCCTTGAA	GCTGATCTCG	CATCCTGCGA	TCGATCCACG
VR 2332	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	CCTGCAATTG	TCCGCTGGTT	TGCCGCCAAC	CTTCTTTATG	AACTTGCCTG	TGCTGAAGAG

图 5

VR 2332	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	CATCTACCGT	CGTACGTGCT	GAAGTCTGCTGC	CACGACTTAC	TGGTCACGCA	GTCCGGCGCA
VR 2332	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	GTGACTAAGA	GAGGTGGCCT	GTCGTCTGGC	GACCCGATCA	CCTCTGTGTC	TAACACCATT
VR 2332	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	TATAGTTTGG	TGATCTATGC	ACAGCATATG	GTGCTTAGTT	ACTTCAAAAG	TGGTCACCCC
VR 2332	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	CATGGCCCTTC	TGTTCTTACA	AGACCAGCTA	AAGTTTGAGG	ACATGCTCAA	GGTTCAACCC
VR 2332	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	CTGATCGTCT	ATTCGGACGA	CCTCGTGCTG	TATGCCGAGT	CTCCCACCAT	GCCAAACTAT
VR 2332	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CACTGGTGGG	TTGAACATCT	GAATTTGATG	CTGGGGTTTC	AGACGGACCC	AAAGAAGACA
VR 2332	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	GCAATAACAG	ACTCGCCATC	ATTTCTAGGC	TGTAGAATAA	TAAATGGGCG	CCAGCTAGTC
VR 2332	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	CCCAACCGTG	ACAGGATCCT	CGCGGCCCTC	GCCTATCACA	TGAAGGCGAG	TAATGTTTCT
VR 2332	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	GAATACTATG	CCTCAGCGGC	TGCAATACTC	ATGGACAGCT	GTGCTTGTTT	GGAGTATGAT
VR 2332	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	CCTGAATGGT	TTGAAGAACT	TGTAGTTGGA	ATAGCGCAGT	GCGCCCGCAA	GGACGGCTAC
VR 2332	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	AGCTTTCCCG	GCACGCCGTT	CTTCATGTCC	ATGTGGGAAA	AACTCAGGTC	CAATTATGAG
VR 2332	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	GGGAAGAAGT	CGAGAGTGTG	CGGGTACTGC	GGGGCCCCGG	CCCCGTACGC	TACTGCCTGT
VR 2332	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	GGCCTCGACG	TCTGCATTTA	CCACACCCAC	TTCCACCAGC	ATTGTCCAGT	CACAATCTGG
VR 2332	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	TGTGGCCATC	CAGCGGGTTC	TGGTTCTTGT	AGTGAGTGCA	AATCCCCTGT	AGGGAAAGGC
VR 2332	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	ACAAGCCCTT	TAGACGAGGT	GCTGGAACAA	GTCCCGTATA	AGCCCCACG	GACCGTTATC
VR 2332	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	ATGCATGTGG	AGCAGGGTCT	CACCCCCCTT	GATCCAGGTA	GATACCAAAC	TCGCCGCGGA
VR 2332	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	TTAGTCTCTG	TCAGGCGTGG	AATTAGGGGA	AATGAAGTTG	GACTACCAGA	CGGTGATTAT
VR 2332	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	GCTAGCACCG	CCTTGCTCCC	TACCTGCAAA	GAGATCAACA	TGGTCGCTGT	CGCTTCCAAT
VR 2332	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	GTATTGCGCA	GCAGGTTTCAT	CATCGGCCCA	CCCGGTGCTG	GGAAACATA	CTGGCTCCTT
VR 2332	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	CAACAGGTCC	AGGATGGTGA	TGTTATTTAC	ACACCAACTC	ACCAGACCAT	GCTTGACATG
VR 2332	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	ATTAGGGCTT	TGGGGACGTG	CCGGTTCAAC	GTCCCGGCAG	GCACAACGCT	GCAATTCCCC

图 5a

VR 2332	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	GTCCCCCTCCC	GCACCCGGTCC	GTGGGTTCGC	ATCCTAGCCG	GCGGTGGTG	TCCTGGCAAG
VR 2332	2590	2600	2610	2620	2630	2640
	AATTCCTTCC	TAGATGAAGC	AGCGTATTGC	AATCACCTTG	ATGTTTGGAG	GCTTCTTAGT
VR 2332	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	AAAACTACCC	TCACCTGTCT	AGGAGACTTC	AAGCAACTCC	ACCCAGTGGG	TTTTGATTCT
VR 2332	2710	2720	2730	2740	2750	2760
	CATTGCTATG	TTTTTGACAT	CATGCCTCAA	ACTCAACTGA	AGACCATCTG	GAGGTTTGA
VR 2332	2770	2780	2790	2800	2810	2820
	CAGAATATCT	GTGATGCCAT	TCAGCCAGAT	TACAGGGACA	AACTCATGTC	CATGGTCAAC
VR 2332	2830	2840	2850	2860	2870	2880
	ACAACCCGTG	TGACCTACGT	GGAAAAACCT	GTCAGGTATG	GGCAGGTCTT	CACCCCTAC
VR 2332	2890	2900	2910	2920	2930	2940
	CACAGGGACC	GAGAGGACGA	CGCCATCACT	ATTGACTCCA	GTCAAGGCGC	CACATTGCGAT
VR 2332	2950	2960	2970	2980	2990	3000
	GTGGTTACAT	TGCATTTGCC	CACTAAAGAT	TCACTCAACA	GGCAAAGAGC	CCTTGTTGCT
VR 2332	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	ATCACCAGGG	CAAGACACGC	TATCTTTGTG	TATGACCCAC	ACAGGCAGCT	GCAGGGCTTG
VR 2332	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	TTTGATCTTC	CTGCAAAAGG	CACGCCCGTC	AACCTCGCAG	TGCACTGCGA	CGGGCAGCTG
VR 2332	3130	3140	3150	3160	3170	3180
	ATCGTGCTGG	ATAGAAATAA	CAAAGAATGC	ACGGTTGCTC	AGGCTCTAGG	CAACGGGGAT
VR 2332	3190	3200	3210	3220	3230	3240
	AAATTTAGGG	CCACAGACAA	GCGTGTTGTA	GATTCTCTCC	GCGCCATTTC	TGCTGATCTA
VR 2332	3250	3260	3270	3280	3290	3300
	GAAGGGTCGA	GCTCTCCGCT	CCCCAAGGTC	GCACACAAC	TGGGATTTTA	TTTCTCACCT
VR 2332	3310	3320	3330	3340	3350	3360
	GATTTAACAC	AGTTTGCTAA	ACTCCAGTA	GAACCTGCAC	CTCACTGGCC	CGTGGTGTCA
VR 2332	3370	3380	3390	3400	3410	3420
	ACCCAGAACA	ATGAAAAGTG	GCCGGATCGG	CTGGTTGCCA	GCCTTCGCCC	TATCCATAAA
VR 2332	3430	3440	3450	3460	3470	3480
	TACAGCCGCG	CGTGATCCGG	TGCCGGCTAT	ATGGTGGGCC	CTTCGGTGTT	TCTAGGCACT
VR 2332	3490	3500	3510	3520	3530	3540
	CCTGGGGTCG	TGTCATACTA	TCTCACAATA	TTTGTTAAGG	GCGGGGCTCA	AGTGCTTCCG
VR 2332	3550	3560	3570	3580	3590	3600
	GAGACGGTTT	TCAGCACCGG	CCGAATTGAG	GTAGACTGCC	GGGAATATCT	TGATGATCGG
VR 2332	3610	3620	3630	3640	3650	3660
	GAGCGAGAAG	TTGCTGCGTC	CCTCCACAC	GGTTTCATTG	GCGACGTCAA	AGGCACTACC
VR 2332	3670	3680	3690	3700	3710	3720
	GTTGGAGGAT	GTCATCATGT	CACCTCCAGA	TACCTCCCGC	GCGTCCTTCC	CAAGGAATCA
VR 2332	3730	3740	3750	3760	3770	3780
	GTTGCGGTAG	TCGGGGTTTC	AAGCCCCGGA	AAAGCCGCGA	AAGCATTGTG	CACACTGACA

图 5b

VR 2332	3790	3800	3810	3820	3830	3840
	GATGTGTACC	TCCCAGATCT	TGAAGCCTAT	CTCCACCCGG	AGACCCAGTC	CAAGTGCTGG
VR 2332	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	AAAATGATGT	TGGACTTCAA	AGAAGTTCGA	CTAATGGTCT	GGAAAGACAA	AACAGCCTAT
VR 2332	3910	3920	3930	3940	3950	3960
	TTCCAACCTG	AAGGTCGCTA	TTTCACCTGG	TATCAGCTTG	CCAGCTATGC	CTCGTACATC
VR 2332	3970	3980	3990	4000	4010	4020
	CGTGTTCCTG	TCAACTCTAC	GGTGTACTTG	GACCCCTGCA	TGGGCCCCGC	CCTTTGCAAC
VR 2332	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	AGGAGAGTCG	TCGGGTCCAC	CCACTGGGGG	GCTGACCTCG	CGGTCACCCC	TTATGATTAC
VR 2332	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	GGCGCTAAAA	TTATCCTGTC	TAGCGCGTAC	CATGGTGAAA	TGCCCCCGG	ATACAAAATT
VR 2332	4150	4160	4170	4180	4190	4200
	CTGGCGTGCG	CGGAGTTCTC	GTTGGATGAC	CCAGTTAAGT	ACAAACATAC	CTGGGGGTTT
VR 2332	4210	4220	4230	4240	4250	4260
	GAATCGGATA	CAGCGTATCT	GTATGAGTTC	ACCGGAAACG	GTGAGGACTG	GGAGGATTAC
VR 2332	4270	4280	4290	4300	4310	4320
	AATGATGCGT	TTCGTGCGCG	CCAGGAAGGG	AAAATTTATA	AGGCCACTGC	CACCAGCTTG
VR 2332	4330	4340	4350	4360	4374	
	AAGTTTATT	TTCCCCCGG	CCCTGTCATT	GAACCAACTT	TAGGCCTGAA	TTGA

图 5c

```

VR 2332      10      20      30      40      50      60
              ATGAAATGGG GTCCATGCAA AGCCTTTTTTG AAAAAATTGG CCAACTTTTT GTGGATGCTT

VR 2332      70      80      90      100     110     120
              TCACGGAGTT CTTGGTGTCC ATTGTTGATA TCATTATATT TTTGGCCATT TTGTTTGGCT

VR 2332     130     140     150     160     170     180
              TCACCATCGC CGGTTGGCTG GTGGTCTTTT GCATCAGATT GGTTCGCTCC GCGATACTCC

VR 2332     190     200     210     220     230     240
              GTACGCGCCC TGCCATTAC TCTGAGCAAT TACAGAAGAT CTTATGAGGC CTTTCTTTCC

VR 2332     250     260     270     280     290     300
              CAGTGCCAAG TGGACATTCC CACCTGGGGA ACTAAACATC CTTTGGGGAT GCTTTGGCAC

VR 2332     310     320     330     340     350     360
              CATAAGGTGT CAACCCTGAT TGATGAAATG GTGTCGCGTC GAATGTACCG CATCATGGAA

VR 2332     370     380     390     400     410     420
              AAAGCAGGGC AGGCTGCCTG GAAACAGGTG GTGAGCGAGG CTACGCTGTC TCGCATTAGT

VR 2332     430     440     450     460     470     480
              AGTTTGATG TGGTGGCTCA TTTTCAGCAT CTAGCCGCCA TTGAAGCCGA GACCTGTAA

VR 2332     490     500     510     520     530     540
              TATTTGGCCT CCCGGCTGCC CATGCTACAC AACCTGCGCA TGACAGGGTC AAATGTAACC

VR 2332     550     560     570     580     590     600
              ATAGTGATA ATAGCACTTT GAATCAGGTG TTTGCTATTT TTCCAACCCC TGGTTCCCGG

VR 2332     610     620     630     640     650     660
              CCAAAGCTTC ATGATTTTCA GCAATGGTTA ATAGCTGTAC ATTCCTCCAT ATTTTCCTCT

VR 2332     670     680     690     700     710     720
              GTTGCAGCTT CTTGTACTCT TTTTGTTGTG CTGTGGTTGC GGGTTCCAAT ACTACGTACT

VR 2332     730     740     750     760     770
              GTTTTTGGTT TCCGCTGGTT AGGGGCAATT TTTCTTTTGA ACTCACAGTG A

```

图 6