

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/09

C12N 15/33

C12P 21/02 C12P 19/34

A61K 39/12

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 91105196.1

[45]授权公告日 2000 年 9 月 27 日

[11]授权公告号 CN 1056879C

[22]申请日 1991.7.29 [24]颁证日 2000.7.14

[21]申请号 91105196.1

[30]优先权

[32]1990.7.30 [33]US [31]599.735

[73]专利权人 阿克佐公司

地址 荷兰阿纳姆

[72]发明人 罗宾·威尔逊·摩根

[56]参考文献

EP334530A 1989. 9.27 C12N15/00

审查员 潘爱群

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

权利要求书 1 页 说明书 27 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 重组马立克氏病病毒

[57]摘要

本发明涉及使用马立克氏病 I 型病毒作为能在某些家禽中表达外来基因的病毒载体。要求专利保护的是该病毒之 DNA 基因组上的非必需插入区域、含有该区域的质粒、包含该质粒的宿主细胞,以及含有重组病毒的疫苗。

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

权 利 要 求 书

1. 一种制备重组载体的方法，该方法包括将 DNA 片段插入到载体中，所说的 DNA 片段包含 MDV-1 基因组的独特短区域内 BamHI-A 的末端 4.3kb EcoRI-BamHI 亚片段的开放读码，具有基本上如图 1 所示的限制性酶切位点图。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中 DNA 片段包含如图 2 中所示从核苷酸位置 238 至 1050 的 DNA 序列。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中 DNA 片段包含一个含 Bgl II 限制性酶的识别序列的插入位点。

4. 根据权利要求 1-3 任一项的方法，其中载体是质粒。

5. 根据权利要求 1-3 任一项的方法，该方法还包括将衍生于家禽疾病致病因子的外来基因插入到 DNA 片段中。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中外来基因处于能够驱使所说基因表达的启动子控制下。

7. 一种制备重组 MDV-1 的方法，该重组 MDV-1 包含 MDV-1 的基因组 DNA 和至少一个衍生于家禽疾病致病因子的外来基因，其中将所说的外来基因在如权利要求 1-3 任一项中所定义的位置插入到所说 MDV-1 基因组的基因组 DNA 中。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中外来基因处于能够驱使所说基因表达的启动子控制下。

重组马立克氏病病毒

本发明涉及能够表达外来基因，特别是鸡的外来基因的病毒载体。具体地说，本发明涉及马立克氏病病毒（MDV）血清型1 DNA基因组的插入区域的发现。该区域内可插入一个包括侧翼接有来自该插入区域DNA序列之外来基因的异源核酸序列；含有所说核苷酸序列的质粒；含有重组MDV的疫苗；以及含有抗重组MDV抗体的抗血清。

马立克氏病是一种由疱疹病毒即马立克氏病病毒引起的鸡的恶性淋巴组织瘤性疾病。该病毒感染鸡并在感染后几周内发展成各组织的T细胞淋巴瘤，最终导致被感染的鸡死亡或成为进行性恶化的不治之症。这种疾病在疱疹病毒诱发的疾病中是独特的，在于近20年来，在美国和世界上许多其他地区，已因疫苗接种所有商品肉鸡和肉鸡饲养员而在家禽工业中得到了控制。

MDV是一种有包膜的DNA病毒并在分类学上分在疱疹病毒科（Herpesviridae）。进一步可分为下列三个血清型：

I型：对鸡有致病性和致肿瘤性的MDV强毒力株，以及由之衍生的减毒非病原性病毒株；

II型：天然存在的MDV非致病性病毒株；以及

III型：对鸡无致病性的火鸡疱疹病毒株（HV T）。

二十世纪中，一直在研究MDV感染的致病机理和MDV的传统

病毒学问题。近十年来,对MDV的分子分析已取得进展。主要进展包括克隆病毒DNA分子 (Fukuchi et al., J. Virol. 51: 102-109, 1984)、产生抗MDV单克隆抗体、鉴定病毒多肽、得到转录图谱 (Schat et al., Int. J. Cancer 44: 101-109, 1989), 以及鉴定MDV基因组上的基因 (Buckmaster et al., J. Gen. Virol. 69: 2033-2042, 1988)。虽然已报导了一个HVT的乙酸磷酯抗性突变株, 但迄今为止还没有真正对该病毒进行过基因分析。

马立克氏病是有极大经济重要性的疾病, 而且有效的马立克氏病疫苗对于家禽养殖业的发展是十分关键的。最广泛使用的疫苗是HVT疫苗, 不过近年许多地区也联合使用MDV疫苗。已有的马立克氏病疫苗已不可能满足未来家禽养殖工业的需求, 发展重组马立克氏病疫苗仍是对该领域内研究人员的一个严重挑战。因为已有马立克氏病疫苗作为活的疱疹病毒疫苗已在家禽养殖业中使用了二十年, 所以目前可将其作为适用于家禽的潜在疱疹病毒载体来研究。

已报导的病毒载体中, 如可使用牛痘病毒、乳头状瘤病毒、杆状病毒、细小病毒和烟草花叶病毒。所有已报导的这些病毒均可作为外来基因的克隆载体或表达载体。也已报导可用MDV作为外来基因的表达载体 (见T. Isikawa et al., 欧洲专利申请 0 334 530号)。其中述及可将外来基因, 如编码血细胞凝集素和新城疫病毒 (NDV) 之神经氨酸苷酶的基因插入编码HVT之A抗原位点的基因 (gp 57-65基因) 中。重组HVT被用于产生抗NDV和MDV的疫苗。

在国际专利申请W O 8 8 / 0 7 0 8 8号中, S. Martin等人描述了将外来基因插入H V T的非必需区域并用该病毒载体感染鸡, 以使之最终产生针对外来基因产物和H V T的免疫原性反应。特别是其中述及H V T是作为病毒载体的仅有的鸟类疱疹病毒, 并且使用了编码胸苷激酶和1- β -D-阿胸苷抗性的非必需区域。

Cochran等人在国际专利申请W O 8 9 / 0 1 4 0号中述及, 可将外来基因插入病毒的疱疹病毒载体中。他们描述了包含与假狂犬病病毒gp X糖蛋白部分相融合之抗原性氨基酸序列的重组融合蛋白质。其中将编码VP 2、VP 4和PV 3三个多肽之感染性腔上囊病毒(I B D V) RNA大片段的c D N A拷贝和大肠杆菌 β 半乳糖苷酶基因插入H V T基因组之特有长区域内的非必需位点中。这种重组病毒被用作抗I B D V的疫苗。将MDVA抗原基因(gp 5 7-6 5)插入H V T的同一位点, 以产生改良的抗M D V疫苗。

虽然已对某些疱疹病毒如单纯疱疹病毒和假狂犬病病毒作了基因分析, 但还不了解M D V血清型1 (M D V-1)之D N A基因组的遗传结构。

目前使用的抗各种家禽疾病的疫苗多是使用活的、减毒的病原体生产的, 因此存在用不足以减毒的病原性微生物接种动物的危险。

失活的疫苗一般只诱导仍须追加免疫的低水平免疫力。此外, 经灭活处理可使诱导中和作用病毒的抗原决定基发生改变, 以致降低了疫苗的保护能力。

如果在疫苗中合用一种以上减毒的活病原体, 又可引起其他问题。抗原成分的相互影响可导致一种或多种组成抗原之免疫原性的降低。

为了产生强有力的抗马立克氏病和至少一种其他鸟类疾病的疫苗。通过使用其中MDV的DNA基因组含有编码来自其他鸟类疾病致病因子之抗原的外来基因的MDV载体。就必须找到一个MDV基因组的非必需区域并用作插入区。一旦外来基因被插入到该插入区域内，便必定能表达相应的基因产物。一旦将MDV载体注入鸡体内，即可引发最好比联合疫苗表现出更大能力的抗MDV和外来基因产物（如一种蛋白质）的免疫反应。

图1显示见于马立克氏病病毒血清型1（MDV-1）DNA基因组特有短区域内BamHI-A之末端4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段中开放读码的限制性酶切图。

编号指示相当于图2中所示序列的核苷酸位置。

所用缩写符号：ORF—开放读码；B—BamHI；E—EcoRI；TR-1—独特的末端长重复区；IR-1—特有的长反向重复区；TR-s—特有的末端短重复区；IR-s—特有的长反向重复区。

图2显示MDV-1插入区的DNA序列。

图3显示含有克隆到质粒载体pUC19中的BamHI-A之末端BamHI-A中的4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段的质粒pMD100，该BamHI-A的4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段含有一个独特的Bgl II位点。

图4显示含有由SV40早期启动子开始表达之lacZ基因（其可表达β半乳糖苷酶）的暗盒。

图5显示含有从SV40早期启动子开始表达之lacZ基因的质粒pMT1A和pMT1B，前者被插入到位于BamHI-A之4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段内的Bgl II位点中。

图6显示对得自GA亲代和GAlac重组MDV-1分离物之DNA所作Southern吸印分析的结果,表明重组是位点特异性的。

图7显示亲代(GA亲代)和重组(GAlac 1)MDV-1分离物于37°C下的生长曲线。

图8显示亲代(GA亲代)和重组(GAlac 1)MDV-1分离物在41°C下的生长曲线。

本发明的主题是发现了此前未知的、MDV-1之DNA基因组上的非必需插入区域。该区域包含基因组特有短区域内的BamHI-A之末端4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段中的开放读码。BamHI-A是用BamHI完全消化MDV-1基因组后所得29个BamHI片段中最大的一个,且BamHI-A在酶切图上位于基因组的独有短区域内。该区域是由图1所示限制性酶切图限定的。该区域基本上包括了图2所示从核苷酸位置238到1050的DNA序列。另外,本发明包括了含有该插入区域的质粒。

本发明还包括了含有外来基因,较好是编码另一个家禽疾病致病因子之免疫原的基因的重组MDV-1。因该重组病毒基因组中还插入了编码所说致病因子的外来基因,故可引发抗MDV和所述致病因子的免疫反应,从而可保护健康动物免受相应致病因子的感染。

众所周知,可用抗特异性病原体的抗血清治疗已受该病原体感染的动物。本发明中,抗体是由重组MDV-1诱导产生的,所说的重组体包含编码衍生于特异性病原体之抗原性多肽的异源基因。可用有效量根据本发明的重组MDV-1免疫动物如家禽,来制备抗所说之重组MDV-1的抗血清,以引发适当的免疫反应。然后采集动物血液,按常规方法制得抗血清。

作为有用的重组MDV-1的前提条件是，可将异源核酸序列掺入到MDV-1基因组的非必需位置或区域中，即能够用来进行这种掺入而又不会破坏病毒之基本功能，如病毒进行感染或复制所必需的位置或区域。这样一个区域被称为插入区域。以前并没有将本发明的插入区域描述为适于外源DNA插入的区域。再者，就如本文所述用于掺入外源DNA序列之MDV-1基因组区域的限制性酶切图来说，以前也未曾有过有关资料。

优选的插入区域位于基因组的特有短区域中并限定为2中从核苷酸位置238至1050的DNA序列，其被用于掺入异源DNA序列以制备本发明重组MDV。如图1中含开放读码之基因组区域的限制性酶切图所示，该插入区域位于BamHI-A的4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段之内。特别是如图1中含开放读码之基因组区域的限制性酶切图所示，该插入区域含有一个位于BamHI-A之4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段内的Bgl II位点。

可使用与上述非必需插入区域相对应的DNA序列，将基因插入MDV-1基因组中。

应明确的是，对于MDV-1基因组的DNA序列来说，各病毒株之间可以存在自然变异。这些变异可导致一个或多个核苷酸的缺失、取代插入、颠换或加入，其可能影响一个或多个限制性位点的位置，从而产生与图1所示酶切图相关的限制性酶切图。

此外，也可能使用基因工程技术引起上述变异，产生具有与图1所示酶切图相关之限制性酶切图谱的DNA序列。这就意味着，如果一个重组MDV-1含有掺入插入区域内的异源基因，而且所说的插入区域位于由任何上述相关之限制性酶切图谱限定的MDV-1基因

组区域内，则所说的重组MDV-1也将包括在本发明的范围之内。再者，因为按照本发明鉴定的插入区域并不发挥基本功能，故可将所说的区域部分或全部删除，然后即可将外源基因掺入所说的区域中。应明确的是，如果外源基因插入到相当于本发明插入区域，或该插入区域之一部分的并由本文鉴定的MDV-1基因组某区域中，则含有这样一个外源基因的重组MDV-1也构成本发明的一部分。

总的说来，插入区域基本上限定了某区域在MDV基因组内的定位特征，其可用来掺入异源核酸序列。

图2中显示了作为含有从核苷酸238至1050DNA序列插入区域的DNA序列。在限定本发明插入区域的特征时，应特别注意的是MDV-1病毒间可能存在产生一个或多个核苷酸缺失、取代、颠换、插入等自然变异。也可用基因工程手段造成这些变异。含有掺入这样一个相关但不相同之MDV-1基因组区域中之异源基因的重组MDV-1也包括在本发明的范围内。例如，某异源基因可掺入含有图2所示MDV-1基因组的核苷酸序列有缺失的MDV-1病毒株中。由图2所示DNA序列限定的MDV-1插入区域使某区域在MDV-1基因组内的定位特征化，其可用来掺入异源核酸序列。

可由病毒、原核、真核或合成来源得到欲掺入本发明MDV-1基因组内的异源核酸序列。所说的核酸序列可来自于病原体，更好是鸟类病原体，在将其插入MDV-1基因组中之后即可诱导抗疾病免疫力。可将得自感染性支气管炎病毒(IBV)、MDV、NDV、IBDV、鸡贫血因子(CAA)、呼肠孤病毒、鸡反录病毒、鸡腺病毒、火鸡鼻气管炎病毒、感染性喉气管炎病毒、艾美球虫、沙门氏菌、大肠杆菌和鸡败血病支原菌(*Mycoplasma gallisepti-*

cum) 的核酸序列掺入 MDV-1 基因组的插入区域。此外, 还可以将编码适合药物或诊断剂应用之多肽, 特别是编码淋巴激活素、干扰素或细胞素等免疫调节剂的核酸序列掺入所说的插入区域中。

为表达这些异源核酸序列, 须将序列连接到有足够长度和功能活性的启动子上。这样的启动子可以是任何原核、真核、病毒或合成启动子, 用以指导基因在 MDV-1 感染之细胞内的表达。

可按包括下述步骤的方法制备重组 MDV-1:

得到含有克隆到适当载体内之 MDV-1 基因组 BamHI-A 限制性片段中 4.3 kb BamHI-EcoRI 亚片段的第一载体;

在第一载体的 MDV-1 DNA 片段中插入至少一个外来基因序列, 以形成第二载体;

用第二载体的 DNA 和 MDV-1 的 DNA 共转染细胞;

将共转染的细胞保温足够长时间, 以便使含有被外来基因隔断之 MDV-1 DNA 的第二载体之 DNA 片段和具有与第二载体之 MDV-1 DNA 片段同源或相似核苷酸序列之减毒 MDV-1 的基因组 DNA 间发生同源重组; 以及

从被转染的细胞中分离含有减毒 MDV-1 和插入其中之外来基因的重组体病毒。

在第一个步骤中, 将 MDV-1 基因组之 BamHI-A 限制性片段的 4.3 kb BamHI-EcoRI 亚片段连接到适当载体上, 以形成第一载体。载体可由任何质粒、柯氏质粒或噬菌体衍生得到, 但较好是得自质粒。更优选的质粒是 pMD100 质粒。按照常规方法用 BamHI 和 EcoRI 消化含有 MDV-1 之 23 kb BamHI-A 片段的克隆, 然后分离 BamHI-A 限制性片段中的 4.3 kb BamHI-EcoRI 亚片

段。

必要时，可从MDV-1的基因组文库中分离含有MDV-1之23 kb BamHI-A片段的克隆。可按照常规方法在宿主细胞培养物如鸡细胞培养物中培养MDV-1以制备病毒的基因组文库，并按常规方法从MDV-1感染的宿主细胞培养物中分离病毒DNA。例如，可在鸡胚成纤维细胞上接种MDV-1并培养之，以得到病毒感染的细胞。收获此病毒感染的细胞，用缓冲液洗涤、离心后重新悬浮于Tris-盐酸和EDTA中，其密度为 $1-5 \times 10^8$ 个细胞/ml。加入十二烷基硫酸钠(SDS)至浓度为0.5%，并加入蛋白酶K至终浓度为200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。保温后再加入蛋白酶K并继续保温1小时。按常规方法用苯酚-氯仿(1:1)混合物提取该溶液两次并用乙醇沉淀核酸。离心回收被感染细胞的总DNA并溶解于10 mM Tris-盐酸(pH 7.5)和1 mM EDTA (TE)中。按照酶制造商推荐的条件用限制性酶如Sau 3A处理DNA。在琼脂糖凝胶上分离反应产物并分离出大小在16至20 kb间的部分。按常规方法将其中100 ng DNA片段与已用适当限制性酶消化的适当载体DNA相连接。适用的载体例如可以是BamHI-EcoRI消化的 λ EMBL3 DNA。连接后使用商品提取物体外包装上述反应混合物。以大约100 PFU/平皿的密度重组噬菌体铺敷在适当的大肠杆菌宿主菌株如LE392或K802上。按常规方法使用硝酸纤维素滤膜以两份重复制备同样的圆盘。第一组滤膜按常规方法与放射活性标记的未感染细胞的DNA杂交，第二组滤膜与放射活性标记的MDV-1感染之细胞的DNA杂交。洗涤后，对X线胶片曝光，显现呈正确方向放置之重复滤膜的影象，并分离几个与从

M D V - 1 感染之细胞制得的探针产生单一特异性杂交的噬菌斑，然后由之扩增噬菌体。根据插入段的限制性酶切图详细分析这些噬菌体克隆，找出有限制性酶识别型式的克隆，表明其含有 M D V - 1 基因组的 BamHI-A 片段。

如上所述，按常规方法用 BamHI 和 EcoRI 限制性酶消化含 BamHI-A 的基因组克隆，以分离 M D V - 1 基因组中 BamHI-A 限制性片段的 4.3 kb BamHI-EcoRI 亚片段。在低熔点琼脂糖凝胶上电泳分离所得的消化片段，并以苯酚提取和乙醇沉淀等标准方法纯化之。按常规方法使用 DNA 连接酶将纯化的 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段连接到适当载体上，得到第一载体。优选的载体是由 Life Technologies 有限公司 (P. O. BOX 6009, Gaithersburg, MD 20877) 得到的质粒 pUC18 或 pUC19。用连接产物转化适当的宿主细胞。用常规方法纯化并分析转化体的 DNA，以确保得到正确的第一载体。第一载体在其 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段内含有一个 Bgl II 限制性酶识别位点。优选的第一载体是如图 3 中所示的质粒 pMD100。

下一步是将至少一个外来基因序列插入第一载体的 M D V - 1 DNA 片段中，以形成第二载体。

可将任何一个外来基因插入第一载体的 Bgl II 位点中，可从异源于 M D V - 1 的生物体中制备用以插入第一载体内的外来基因。如果外来基因是由 RNA 组成的，则须以常规方法使用市售反转录酶制备与基因组互补的 DNA。为了在第一载体中适当地插入外来基因，最好制备外来基因的限制性酶切图谱并测定外来基因的核苷酸序列。限制性酶切图谱的制备和核苷酸序列的测定均可按常规方法进行。

为了表达外来基因，须将有足够长度和功能活性的启动子连接到外来基因上。启动子可以是任何能够在重组MDV-1感染的细胞中指导基因转录的真核、原核或病毒启动子。所用启动子的例子包括得自反录病毒之长末端重复区的启动子、SV40启动子或存在于MDV或HVT基因组中的启动子。

可按常规方法将外来基因插入第一载体中。在位于MDV-1之BamHI-A限制性片段的4.3 kb BamHI-EcoRI亚片段内的Bgl II位点处切断第一载体。使用DNA连接酶按常规方法将外来基因连接到Bgl II位点上，形成第二载体。再将此连接产物转化到适当的宿主细胞中。按常规方法纯化并分析重组体，以确保得到正确的第二载体。用常规方法制备第二载体的质粒DNA并以氯化铯平衡离心法分离纯化两次。

在第二个步骤中，用如上制得之第二载体的DNA和MDV-1病毒株的DNA共转染细胞。也可以用第二载体的DNA转染MDV-1感染的细胞。

按常规方法用适当的减毒MDV-1感染次级鸡胚成纤维细胞培养物以得到MDV-1的DNA，保温该培养物直到出现广泛的细胞病理效应。在含有0.2 mg/ml蛋白酶K、0.5% SDS、100 mM氯化钠、10 mM Tris-盐酸(pH 8)和1 mM EDTA的消化溶液中将MDV-1感染的细胞保温4小时，以纯化总细胞DNA。所得溶液用苯酚提取一次并用氯仿-异戊醇(24:1)提取两次。加入2倍体积的无水乙醇沉淀DNA，离心回收后溶解于TE缓冲液中，并根据260 nm处的消光率定量分析之。下文中将以此方式制得的DNA称为“MDV DNA”。可由被任何适当

MDV-1 感染的培养物中制备 MDV DNA。

按照如下改动的常规磷酸钙介导的转染法 (F. L. Graham et al., Virology 52: 456-467, 1977; N. D. Stow et al., J. Gen. Virol. 33: 447-458, 1976) 用第二载体的 DNA 和 MDV DNA 进行共转染。从得自无特异性病原体鸡卵的十天龄鸡胚中制备初级鸡胚成纤维细胞。十天后, 由初级培养物中制备次级鸡胚成纤维细胞。当制备次级鸡胚成纤维细胞时, 同时制取磷酸钙/DNA 沉淀物, 即静止试管直到出现可见的细微沉淀物, 然后将内容物平均分配在两个有新铺敷之细胞的平皿间。保温后, 在缺少血清的维持培养基中冲洗培养物, 用加在 $1 \times \text{HBSP}$ ($0.75 \text{ mM NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 5 mM KCl 、 140 mM NaCl 、 6 mM 葡萄糖、 25 mM HEPES , $\text{pH } 7$) 中的 15% 甘油处理 3 分钟、冲洗, 然后加入完全的维持培养基。

在第四个步骤中, 将共转染的细胞保温足够长时间, 以使含有 MDV-1 基因组 DNA 片段连同外来基因的第二载体 DNA 片段与一部分具有同源或相似于第二载体中 MDV-1 DNA 片段之核苷酸序列的减毒 MDV-1 的 DNA 间发生同源重组。

最后, 从培养的被转染细胞中分离其中含有已插入了减毒 MDV-1 和外来基因的重组病毒, 并可用包括与适当探针杂交、与特异性抗体之反应性以丢失或获得相关酶活性在内的几种方法鉴定含有其他外来基因的重组体。

例如, 为了用杂交法鉴定重组病毒, 从培养物中除去维持培养基并在细胞上铺敷含琼脂糖的新鲜维持培养基。将培养物保温 1-3 天直到形成噬斑。连同琼脂糖凝胶各收集一部分噬斑, 并转移到市售的

滤膜上。按常规方法对滤膜作变性和中和处理，并使各噬斑的 DNA 固定在滤膜上。使用放射活性标记的、由外来基因组成的探针，按常规方法对所得滤膜进行噬斑杂交。与探针杂交的噬斑即被看作是阳性噬斑。由铺敷在组织培养皿上的琼脂糖中分离相当于阳性杂交信号的重组噬斑，并按常规方法增殖 MDV-1。

也可用其他方法检测重组体中外来基因的存在。例如，可使用对外来基因产物特异的抗体着染含有重组 MDV-1 噬斑的组织培养皿。该抗体将特异地识别含产生外来基因产物之重组 MDV-1 的噬斑。

按上述方法在培养的细胞中增殖重组 MDV-1。从重组 MDV-1 感染的细胞中分离总 DNA，并用常规方法进行 Southern 印迹分析，以确证外来基因插入到了靶位点，即 BamHI-A 的 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段中。

可用表达一种或多种不同的鸟纲动物病原体之异源性多肽的活的重组 MDV-1 接种动物，特别是对这些病原体敏感的鸡和火鸡等鸟纲动物。在接种从本文所述重组 MDV-1 制备的活载体疫苗后，最好能在被接种宿主体内复制表达异源性多肽和 MDV-1 多肽的重组 MDV-1。如果引发了保护性免疫反应，如此接种的动物继后即可免于遭受这些病原体的感染。

可用含有并表达一种或多种不同之异源性多肽的本发明重组 MDV-1 作为单价或多价疫苗。也可用这样的 MDV-1 来制备失活疫苗。可按疫苗制备领域中熟练技术人员已知的方法制备这些疫苗。

给出下列实施例旨在进一步解释而不是限制本发明。

实施例1—材料

由M. Nonoyama (Showa Research Institute for Biomedicine, St. Petersburg, Florida) 处得到MDV-1的GA株。用该病毒株制取MDV-1的BamHI质粒文库 (Fukuchi et al., 1984)。病毒株在次级鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中传代, 约达到75代为止。

实施例2—质粒构建

使用标准方法进行克隆。按照酶的制造商所推荐的方法进行限制性酶消化。如图3所示, 质粒pMD100含有克隆到质粒载体pUC19中之BamHI-A的末端4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段。该4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段整个地位于基因组的独有缺区域内。从Intervet International (Boxmeer, The Newtherland) 得到lacZ暗盒。从真核试验载体pCH110 (Pharmacia公司, Piscataway, NJ) 中除去lacZ基因并按下述方法修饰之, 以构建上述暗盒: 用具有下文结构的双股合成寡核苷酸置换接近SV40复制原点的72碱基对Sph1片段:

5' — GGATCCGTCGACCATG — 3'

3' — GTACCCTAGGCAGCTG — 5'

在pCH110的两个Sph1识别位点间插入该接头并不能恢复各位点的Sph1的识别序列, 并产生了SV40早期启动子的BamHI和SalI位点上游区。继后用BamHI消化该构建物, 产生—4.0

kb 表达暗盒。如图 4 所示, *lacZ* 基因长 4056 bp, 且处于 SV40 早期启动子控制下。

为将 *lacZ* 暗盒插入 pMD100 中, 用 Bgl II (Bethesda Research Laboratories [BRL], Gaithersburg, MD) 消化 1 μ g pMD100。加入约 1 单位牛小肠碱性磷酸酶 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 并保温 30 分钟。反应条件调整为 20 mM Tris-盐酸 (pH 7.4)、5 mM EDTA、0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 100 μ g/ml 蛋白酶 K (BRL), 并继续保温 1 小时。反应混合物用苯酚提取一次, 加入乙酸钠终浓度为 0.1 M, 并加入 2 倍体积的无水乙醇。在微量离心机中以高速离心 15 分钟收集 DNA。将 DNA 沉淀物溶于 20 μ l 含 10 mM Tris-盐酸 (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的 TE 缓冲液中。

经下述连接反应将修饰的 *lacZ* 基因插入 pMD100 的 Bgl II 位点中。在总体积 10 μ l 的含 66 mM Tris-盐酸 (pH 7.6)、6 mM $MgCl_2$ 和 1 mM ATP 的连接缓冲液中, 将 50 ng Bgl II 消化的 pMD100 和 10 ng *lacZ* 暗盒与 2 单位 T4 DNA 连接酶 (BRL) 于 4 $^{\circ}$ C 下保温过夜。用 TE 稀释连接反应混合物至浓度为每微升含 1 ng 载体。取其中 2 μ l 转化 DH5 α 感受态细胞。由个别菌落中纯化质粒 DNA 并分析 *lacZ* 序列的存在。图 5 中显示了定名为 pMT1A 的含 *lacZ* 之 pMD100。所构建的第二个质粒 pMT1B 也示于图 5 中, 该质粒不同于 pMT1A 在于其中 *lacZ* 暗盒的方向不同。按标准方法制备质粒 DNA 并用氯化铯平衡离心法分离两次。

实施例 3—MDV DNA 制备

按上述方法制备 MDV 感染之 CEF 的总 DNA。简单地说, 用细胞相关病毒感染 (10^5 PFU/培养瓶) 生长于 75 cm^2 培养瓶内的次级 CEF (1.6×10^7 细胞/培养瓶) 并保温 6 天。将细胞加在含有 0.2 mg/ml 蛋白酶 K (BRL)、 0.5% SDS、 100 mM NaCl、 10 mM Tris—盐酸 (pH 8) 和 1 mM EDTA 的消化溶液中保温 4 小时, 以纯化 DNA。所得溶液用苯酚提取一次, 再用氯仿—异戊醇 (24:1) 提取两次。加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 离心回收后溶解于 TE 中, 测 260 nm 消光率以进行定量分析。将如此制得的 DNA 称为 MDV DNA。

实施例 4—转染

根据 MDV DNA 引起的噬斑形成来检测各 MDV DNA 制剂的剂量反应, 并用给出最大噬斑形成数量的 MDV DNA 进行共转染。转染前, 用乙醇沉淀 4 至 $8\text{ }\mu\text{g}$ MDV DNA 和 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ 质粒 DNA, 经离心回收后溶解于 $50\text{ }\mu\text{l}$ TE 中。

从得自无特异性病原体鸡卵的 10 天龄鸡胚中制备初级鸡成纤维细胞。以 8×10^5 个细胞/ml 的浓度制成细胞悬浮液并以 1.6×10^7 个细胞/瓶加于 75 cm^2 培养瓶中 (20 ml /瓶)。一天后, 将初级培养物用缺少血清的维持培养基洗一次, 在与 0.05% 胰蛋白酶接触后从培养瓶中除去细胞培养物。经加入约 0.5 ml 牛血清失活胰蛋白酶, 以 2500 rpm 离心 10 分钟分离细胞后, 于 1.5 倍原

体积重新悬浮之，作为浓度约 8×10^5 个细胞/ml 的初级培养物铺敷并通过粗滤布过滤两次。将细胞以 4×10^6 个细胞/平皿的密度铺敷在 60 mm 有座标方格的组织培养皿中，然后直接加入磷酸钙/DNA 沉淀物。

在制备次级鸡胚成纤维细胞时，经连续向 15 ml 聚苯乙烯管内加入下列试剂制成磷酸钙/DNA 沉淀物：388 μ l 水、50 μ l 溶于 TE 中的 DNA、和 62 μ l 2 M 氯化钙。缓慢加入准确总体积为 500 μ l 的 $2 \times$ HBSP ($2 \times$ HBSP = 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 mM KCl、280 mM NaCl、12 mM 葡萄糖、50 mM HEPES, pH 7), 并经小管尖端向溶液内轻轻吹入 5—6 个气泡以混合试管内容物。试管于室温下放置 30 分钟直到显现可见的细微沉淀物，轻轻混合后平均分配到两个含新铺敷之细胞的平皿内。37 °C 保温 4 小时后，在无血清的维持培养基中小心冲洗培养物，用加在 $1 \times$ HBSP 中的 15 % 甘油 (1.5 ml / 平皿) 处理 3 分钟、冲洗后加入完全维持培养基。

6 天后计数噬斑数。如表 1 所示，共转染实验中噬斑形成的频率依据所使用的 MDV DNA 制剂而异。

表 1

为产生G A l a c重组体所进行的共转染尝试一览表

M D V D N A ^a (μ g)	质粒 ^b	噬斑/沉 淀物 ^c	所获得 的总噬 斑数	β -半乳糖 苷酶阳性噬 斑	β -半乳糖 苷酶阳性出 现率 (%)	稳定的 β - 半乳糖苷酶 阳性(名 称)	稳定的 β - 半乳糖苷酶 阳性出 现率(%)
4.5	PMT1B	323	721	7	1	1 (G...)	0.1
4.5	"	389					
6	"	159	498	3	0.6	1 (GALac2)	0.2
6	"	116					
6	"	223					
8	"	306	1450	9	0.6	1 (GALac3)	0.07
8	"	411					
8	"	360					
8	"	373					
8	PMT1A	600	915	3	0.3	1 (GALac4)	0.1
8	"	315					

a 如在材料和方法中所述制得来自G A 感染的C E F的总D N A。

b 500ng质粒D N A与M D V D N A共沉淀。

c 在标有坐标方格的平皿之间平分各磷酸钙沉淀物。数字为每一沉淀物中出现的噬斑数之和。

d 呈100% β -半乳糖苷酶阳性的噬斑纯化分离物的数目。

三次转染实验后所得噬斑的平均数目为 296 ± 96 ，且变化范围为每份沉淀物 116 至 411 个噬斑。因此，为得到最佳共转染，应根据其转染效率来确定各 MDV DNA 制剂的特征。

实施例 5 — 检测并分离稳定的 GALac 重组体

按下述方法鉴定含大肠杆菌之 lacZ 基因的转化体。转染后七天组织培养基减少至 2 ml，向平皿内加入 20 μ l BluO-gal(BRL) 溶液 (20 mg/ml，在二甲基亚砷中新制备的)，使 BluO-gal 终浓度达到 0.2 mg/ml。将平皿置于组织培养物保温箱内保温 1—2 小时。采集已显现的蓝色噬斑并悬浮于 0.05% 胰蛋白酶中使细胞解聚。5 分钟后，加入 1—2 滴牛血清以失活胰蛋白酶，并在新铺敷的次级 CEF 上滴定分离的噬斑。七天后，对平皿染色，采集蓝色噬斑并重新铺板。

如上面表 1 中所示，染色后计数的噬斑中有 0.3—1.0% 呈阳性 β -半乳糖苷酶活性。对各阳性噬斑均进行四次采集和染色处理，以得到稳定的、噬斑纯化的分离物。所得到的稳定的、噬斑纯化的分离物占最初采集之蓝色噬斑的 18%，据此可知，稳定的重组体分离物衍生于原来存在于转染平皿上之约占 0.1% 的噬斑。一旦分离出稳定的重组体，使病毒在细胞培养物中传代或将病毒 DNA 再次转染到次级 CEF 中之后，由其衍生的噬斑保留了 100% β -半乳糖苷酶阳性。共分离出四个表达 lacZ 的重组体病毒。这些分离物分别定名为 GALac1、GALac2、GALac3 和 GALac4。其中 3 个 (GALac1, GALac2 和 GALac3) 是使用 p_{MT1B} 制得的，1 个

(GALac 4) 是使用 pMT1A 制得的。

实施例 6 — 分析 3A1ac 重组 DNA

用纯化的 GALac 重组体转染生长于 75 cm^2 培养瓶中的次级 CEF, 每培养瓶约产生 10,000 个噬斑。按上述方法纯化重组体病毒感染之培养物的总 DNA。使用标准方法制备 Southern 印迹, 并用 pMD100 中的 4.3 kb 插入段、含 lac Z 基因 5' 末端之 pCH110 的 2.5 kb Pvu II 片段, 或 pBR322 探查之 (如图 6 所示)。使用随机引导的 DNA 合成试剂盒 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 用 ^{32}P -脱氧核苷酸放射标记探针。DNA-DNA 杂交在 50% 甲酰胺、10 mM Tris-盐酸 (pH 7.5)、0.1% SDS、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性的鲑鱼精子 DNA、含 0.1% Ficoll 400 5× Denhardt 氏溶液 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO USA) 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮和 6× SSC (1× SSC 含有 0.15 M 氯化钠和 0.015 M 柠檬酸钠 [pH 7]) 中, 于 42°C 进行 16 小时。杂交的硝酸纤维素滤膜在含有 0.1× SSC 和 0.1% SDS 的洗涤溶液中, 65°C 下洗 4 次, 每次 30 分钟。

使用二脱氧序列测定法和序列酶 1 (Sequenase I, United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) 测定无 RNA 质粒的 DNA 序列。使用商品配套软件 “Microgenie” (Beckman Instruments 有限公司, Palo Alto, CA) 分析这些序列。

实施例7—对GAlac重组体的Southern分析

为了检查是否在BamHI-A的4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段内以一种位点特异的方式发生了重组,对重组体病毒的DNA进行Southern印迹分析(见图6)。A部分中显示用得自pMD100的BamHI-A之4.3 kb EcoRI-BamHI亚片段探查印迹。B部分中,所使用的探针是位于lacZ基因内的2.5 kb PvuII片段。各DNA样品均取10 µg用BamHI或合用BamHI和EcoRI消化。泳道1、6、13为用BamHI切割的CEF DNA;泳道2、7、14为用BamHI切割之亲代GA病毒株感染的CEF的DNA;泳道3、8、15为用BamHI和EcoRI切割之亲代GA病毒株感染的CEF的DNA;泳道4、9、11、16为分别用BamHI切割之GAlac1、2、3或4感染的CEF的DNA;泳道5、10、12、17为分别用BamHI或EcoRI切割之GAlac1、2、3或4感染的CEF的DNA。在所有这些例子中,均在靶位点处发生了重组。pMD100的4.3 kb插入段与GAlac1、GAlac2和GAlac3的4.6和3.8 kb EcoRI-BamHI杂交,表明亲代4.3 kb段是经加入含有一个EcoRI位点的4 kb DNA后被修饰了的。lacZ探针与三个重组体中的4.6 kb带杂交,表明4.6 kb带含有lacZ序列。因为所用的2.5 kb PvuII探针与lacZ基因的5'端同源,且没有延伸到lacZ基因内的EcoRI位点之后,所以用lacZ探针检测不到3.8 kb带。同一探针与GAlac4杂交,表明发生了相似的重组,但lacZ基因在病毒中是呈相反方向定位的(图6)。

lacZ 基因可以两种方式重组到 MDV 基因组中。一个是有 pMD 100 中 lacZ 基因之两侧翼参予的双股交叉过程，将导致以含 lacZ 的衍生物取代 BamHI-A 的 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段。另一个是 lacZ 基因之某一侧翼区中的单股交叉过程，将产生包含所有亲代序列加上作为整体包括 pUC 19 序列的 PMT1A 或 PMT1B 的衍生病毒。

Southern 印迹分析结果表明，重组是因双股交叉过程发生的。首先，如果 pUC 19 序列已经通过单股交叉过程插入 MDV 中，则可望使 pMD 100 的 4.3 kb 插入段与在 GALac 1, 2 和 3 情况下的大小为 4.6、4.3 和 3.8 kb 的三个片段杂交，或在 GALac 4 情况下与大小为 6.9、4.3 和 1.5 kb 的三个片段杂交。pMD 100 衍生的探针不能检出 4.3 kb 带这一事实表明，pUC 19 序列没有重组到 MDV 重组体内。其次，与 pUC 19 共有相同 DNA 序列的 pBR 322 没有与重组体中任何部分的 DNA 杂交，此表明 pUC 19 序列没有重组到病毒中。

实施例 8—插入位点的序列

lacZ 插入 BamHI 之 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段的 Bgl II 位点，表明该位点对于病毒在细胞培养物内的复制是非必要的。如图 2 所示，从相关 Bgl II 位点周围的两个方向测得序列资料，以鉴定可能已被切断的基因。插入 Bgl II 位点中可能已切断了左侧长 810 碱基对的开放读码和右侧长 462 碱基对的开放读码。

实施例 9 — 亲代和重组 MDV 分离物的生长曲线

制备初级 CEF 并铺敷在 7.5 cm^2 培养瓶中。收获初级培养物，并根据需要于第 0、1、2、4 和 6 天作为次级培养物重新铺敷。在第 0 天，对十二个 60 mm 平皿的次级 CEF 接种大约 300 PFU 的亲代 MDV 病毒株。另十二个平皿则接种约 300 PFU 的 GALac 1 重组体。接种后 6 天计数存在于含各不同病毒株之两组平皿上的噬斑数，以确定实际已接种的 PFU 数目。于第 0、1、2、4 和 6 天，收获两个重复的接种平皿并在新鲜制备的次级 CEF 上滴定所存在的病毒。滴定后 6 天，计数噬斑并检测存在于原接种平皿上的 PFU 数目。

如图 7 和 8 所示。经过 6 天时间，两病毒株在次级 CEF 中，于 37°C 或 41°C 条件下的生长特性没有明显差异。两病毒株在 41°C 比在 37°C 下生长快；但在两个温度下每个平皿中所得病毒的终收率是相同的。

实施例 10 — 对亲代和重组 MDV 分离物的体内分析

将一天龄无特异性病原体的单冠白色来抗鸡的翅膀绑住。经腹腔内分别接种亲代 MDV 病毒株感染的细胞、GALac 1 重组体病毒感染的细胞，或未感染的细胞。接种 (PI) 后一周，制备各组鸡的血清样品。由各组鸡体内分离脾细胞、计数、并将相当数目的存活细胞 (5×10^7 和 5×10^6 个) 共培养于新制备的 CEF 上。通过 “Histopaque 1077” (Sigma Chemical CO.,

St. Louis, MO) 离心纯化淋巴细胞、计数、并将相当数目的存活细胞 (1×10^7 和 1×10^6 个) 共培养于新制备的 CEF 上。6 天后, 计数共培养皿上的噬斑。对于脾细胞的滴定结果示于表 2 中, 对于淋巴细胞的滴定结果示于表 3 中。

表2 由脾细胞再分离病毒

病毒株	剂 量 (PFU)	所 得 噬 斑 (铺敷的细胞数) 5×10^7 5×10^6	所得噬斑平均数 (铺敷的细胞数) 5×10^7 5×10^6
亲 代	216	54, 60 12, 19	57 16
	390	17, 18 2, 5	18 4
	682	4, 3 1, 0	4 1
GALAC	526	30, 20 1, 6	25 4
	914	32, 47 6, 2	40 4
	1554	62, 68 4, 7	65 5
	—	0, 0 0, 0	0 0

表 3 由淋巴细胞再分离病毒

病毒株	剂 量 (PFU)	所 得 噬 斑 (铺敷细胞的数目) 1×10^7 1×10^6	所得噬斑平均数 (铺敷细胞的数目) 1×10^7 1×10^6
亲 代	216	9, 9 1, 1	9 1
	390	9, 4 0, 0	7 0
	682	1, 4 1, 0	3 1
GALac	526	19, 35 2, 7	27 5
	914	79, 93 9, 16	86 13
	1554	128, 142 11, 18	135 15
	—	0, 0 0, 0	0 0

这些结果显示, 可由脾细胞中重新分离出含有已插入 BamHI-A 之 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段的 Bgl II 位点中之 β -半乳糖苷酶基因的重组 MDV, 并可以一种相似于亲代 MDV 病毒株的方式在鸡体内诱发病毒血症。使用 Blue-gal 作底物显现某些滴定皿中的 β -半乳糖苷酶活性, 以估测在 GALac 重组体已通过鸡传代后的稳定性。由 GALac 滴定试验所显色的 473 个噬斑, 均呈现 β -半乳糖苷酶活性阳性反应。于接种后 3 和 6 周, 两次制取血浆样品并纯化淋巴细胞, 然后检测 MDV 的存在, 以估计各病毒株之病毒血症的持续时间。接种后两病毒株均在淋巴细胞中至少持续存在 6 周, 但观察到接种后 3 周时病毒血症明显减轻。用间接免疫荧光检测法就所有接种后 1、3 和 6 周的各个血浆样品检测对 MDV 的抗体反应。在注射亲代病毒或 GALac 重组体各组中均观察到了抗 MDV 抗体反应。在第 3 周时采集的样品即显现出抗体反应, 且在第 6 周时反应强度增加。

根据这些实验结果可以认为, 可使用位于 BamHI-A 之 4.3 kb EcoRI-BamHI 亚片段内 Bgl II 位点稳定地整合外来基因, 而不会对 MDV 感染和复制所必需的基本功能造成明显影响。此外, 还可得出这样的结论, 即病毒引发抗 MDV 免疫反应的能力不会因为外来基因整合到插入位点内而受到损害。

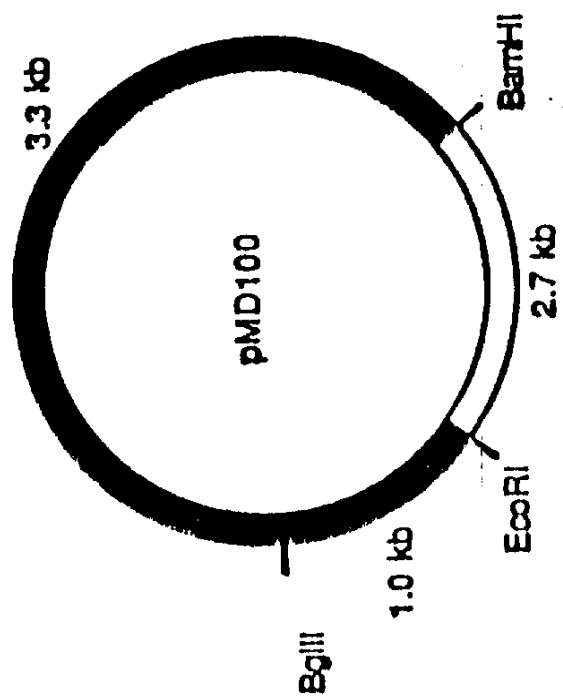
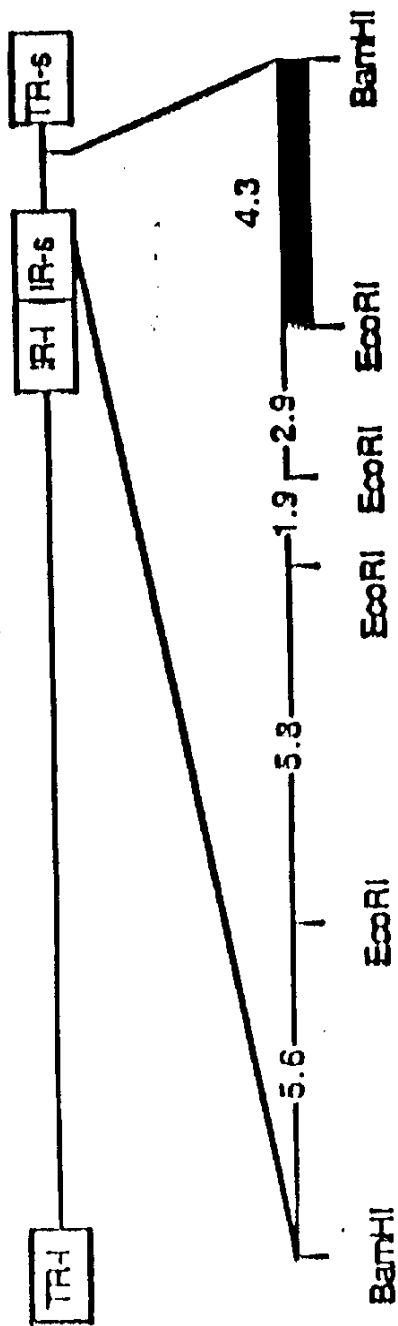


CAA CGT CGT ATC CGT ACC ATT GAT GCT GTT ATG TAT AAT TCC GTA GGT AGT ATT AGT TTT	30	60
AGA GTC GTG TAC TTT CGA CGA AGA AAT GCC ACA TTC CAT CGT TTC TGC CTC CGG AGT CGA	90	120
AGA CAT CCA GTC TAT TAC CTA GTT TTA ACC CTG TTT CAT ATT CTA CCA GAG TAT AAG ATT	150	180
TGG AGA TCA GAC CGG CCC AGT TAT TAA CAA TAA AAA AGA TTA TTG GTG GAG GTG AAG ATG	210	240
		M
GGT GTG TCC ATG ATA ACT ATA GTC ACA CTT CTA GAT GAA TGC GAT CGA TTG CCA GGA AGA	270	300
G V S M I T I V T L L D E C D R L P G R		
TCT AGA GAT GCT GCA TCT ACT TTA TGG ATA TTC CTT ATA AAG CAA TGT ATG GAA CAA ATA	330	360
S R D A A S T L W I F L I K Q C M E Q I		
CAG GAT GAT GTG GGT GTG CCC ATA ATC GCC AGA GCT GCA GAC CTA TTC CGT TTT GCC AAA	390	420
Q D D V G V P I I A R A A D L F R F A K		
CCC ATG TTA ATT CTT CCT CGG CAA CAT CGA CCG ATA GTA AGG ACA AAG CCA CCA GAT GGA	450	480
P M L I L P R Q H R P I V R T K P P D G		
ACT GGA GTT CGT GGT ACC GGA TTG GCC GGA ACT AGG GAT TCG TTT ATA GTG CGG CTA TTT	510	540
T G V R G T G L A G T R D S F I V R L F		
GAA GAT GTT GCA GGA TGT TCC ACA GAA TGG CAG GAT GTT CTA TCT GGA TAT TTG ATG TTG	570	600
E D V A G C S T E W Q D V L S G Y L M L		
GAA TCT GAA GTT TCT GGT AAT GCT CCA CAT AGC TTG TGG ATA GTT GGG GCG GCA GAT ATA	630	660
E S E V S G N A P H S L W I V G A A D I		
TGT CGC ATT GCG CTC GAA TGT ATT CCT TTG CCA AAA AGG TTA CTT GCA ATC AAA GTG TCT	690	720
C R I A L E C I P L P K R L L A I K V S		
GGG ACC TGG TCC GGT ATG CCG TGG GCC ATT CCC GAC AAT ATT CAA ACT CTC TTG ACA TCT	750	780
G T W S G M P W A I P D N I Q T L L T S		
ACA TGG GAA CCG AAG TTC GAC ACC CCA GAA GAT AGA GCG CAT TTT TGC GAC AGT GAT ATG	810	840
T W E P K F D T P E D R A M F C D S D M		

图. 2

																		870																			900
GTA	TGT	GTA	TAC	AAA	ATC	CTC	GGG	TCC	CCA	CCC	AAT	CCT	CTA	AAA	CCT	CCG	GAA	ATC	GAA																		
V	C	V	Y	K	I	L	G	S	P	P	M	P	L	K	P	P	E	I	E																		
																		930																			960
CCA	CCT	CAA	ATG	AGT	AGT	ACA	CCC	GGC	AGA	TTA	TTC	TGT	TGT	GGA	AAA	TGT	TGC	AAG	AAA																		
P	P	Q	M	S	S	T	P	G	R	L	F	C	C	G	K	C	C	K	K																		
																		990																			1020
GAA	GAT	AGA	GAT	GCG	ATT	GCA	ATT	CCG	GTT	CGT	TAC	ACT	GCG	ACA	GGA	AAG	TCA	CGA	ATA																		
E	D	R	D	A	I	A	I	P	V	R	Y	T	A	T	G	K	S	R	I																		
																		1050																			1080
CAG	AAA	AAA	TGT	AGA	GCC	GGT	AGT	CAT	TAG	CTG	TTA	TTC	GAC	AGA	CCT	ACT	TGC	TAC	CAA																		
Q	K	K	C	R	A	G	S	M	U																												
																		1110																			1140
TTA	GAT	ATA	ATT	ACA	TGA	TGG	GGC	GTA	TAC	ACA	TTA	CGA	TTA	GGT	GCA	TCG	CTA	CAA	CCG																		
																		1170																			1200
TCG	CTA	TAG	TGT	CAC	GTA	TAA	TTT	GTA	TAT	TAG	TGC	AAT	AAC	AAA	CCC	TTC	TAG	ATC	ACT																		
																		1230																			1260
TAT	GTA	TCC	AGG	CTA	TCT	ICC	ATA	TAC	TTC	TAA	CAT	CAG	GAG	AGA	TTC	AAC	AAT	CGA	GCG																		
																		1290																			
CAT	TTG	AAA	GAC	AAC	GAT	GAG	CAG	AGT	CAA	TGC	TAC	AAT	GTT	CGA	TGA	TAT	GGA	TAT	AC																		

图. 2 (续)



3

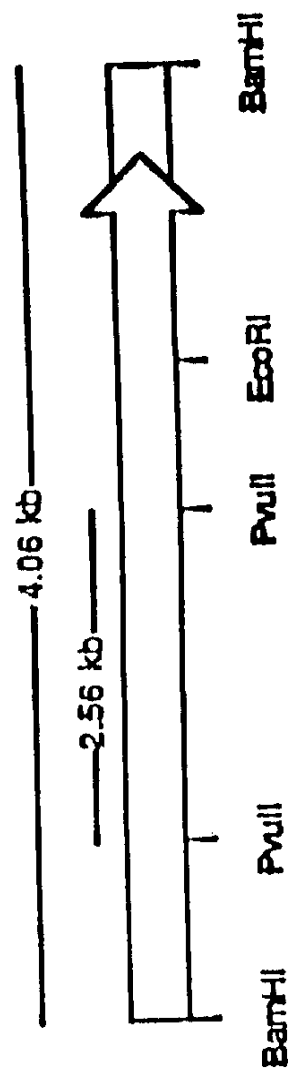


图. 4

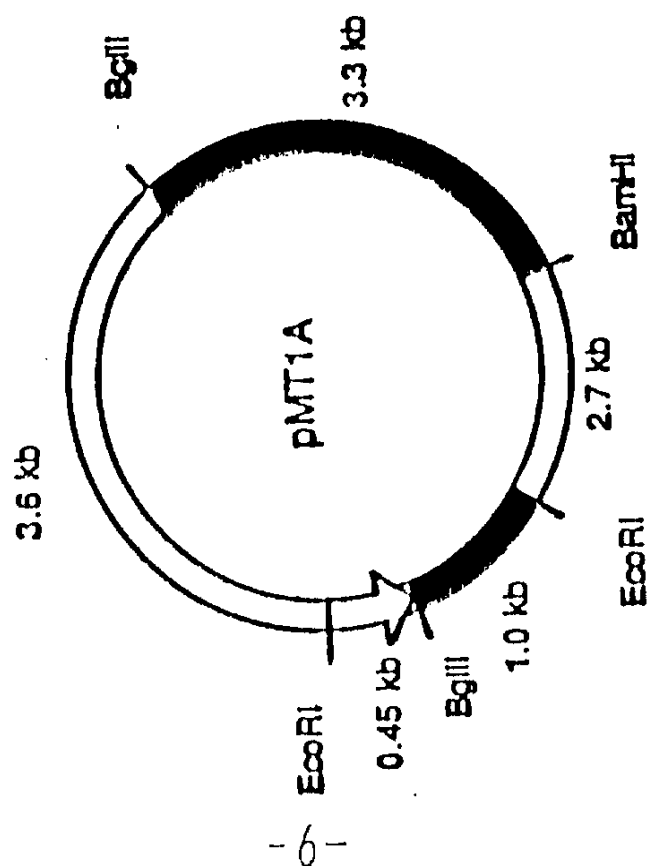
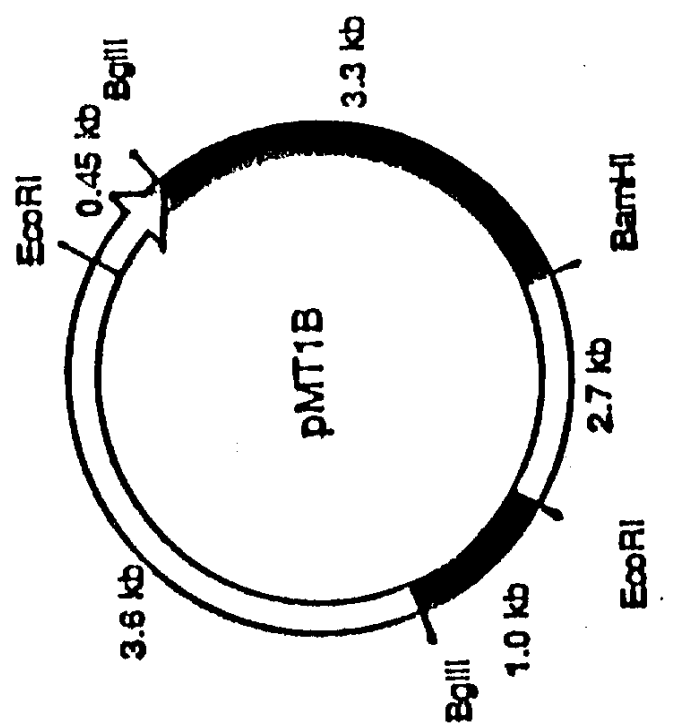
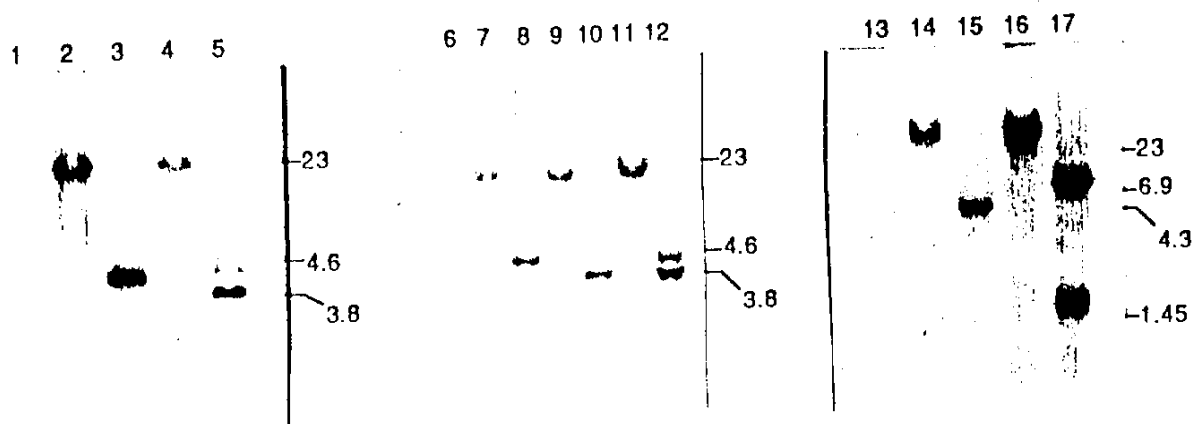


Fig. 5

A. pMD100 探针



B. lacZ 探针

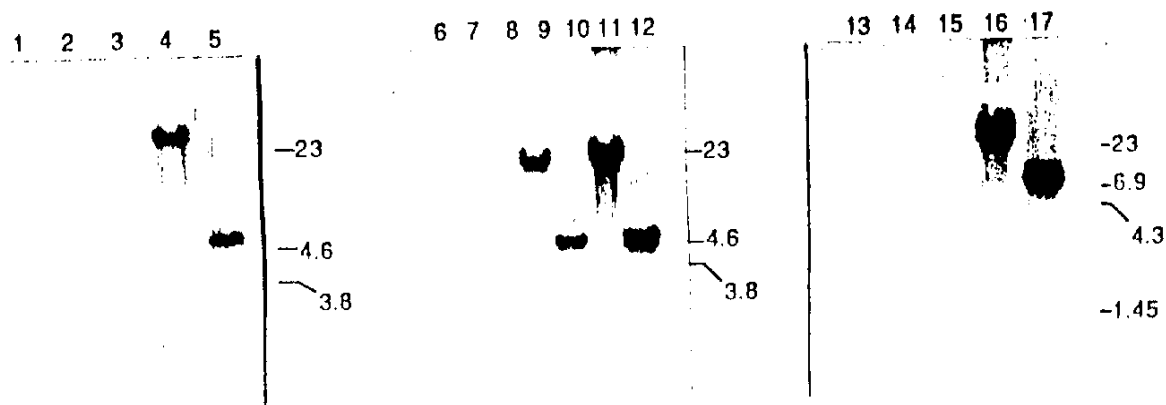


图. 6

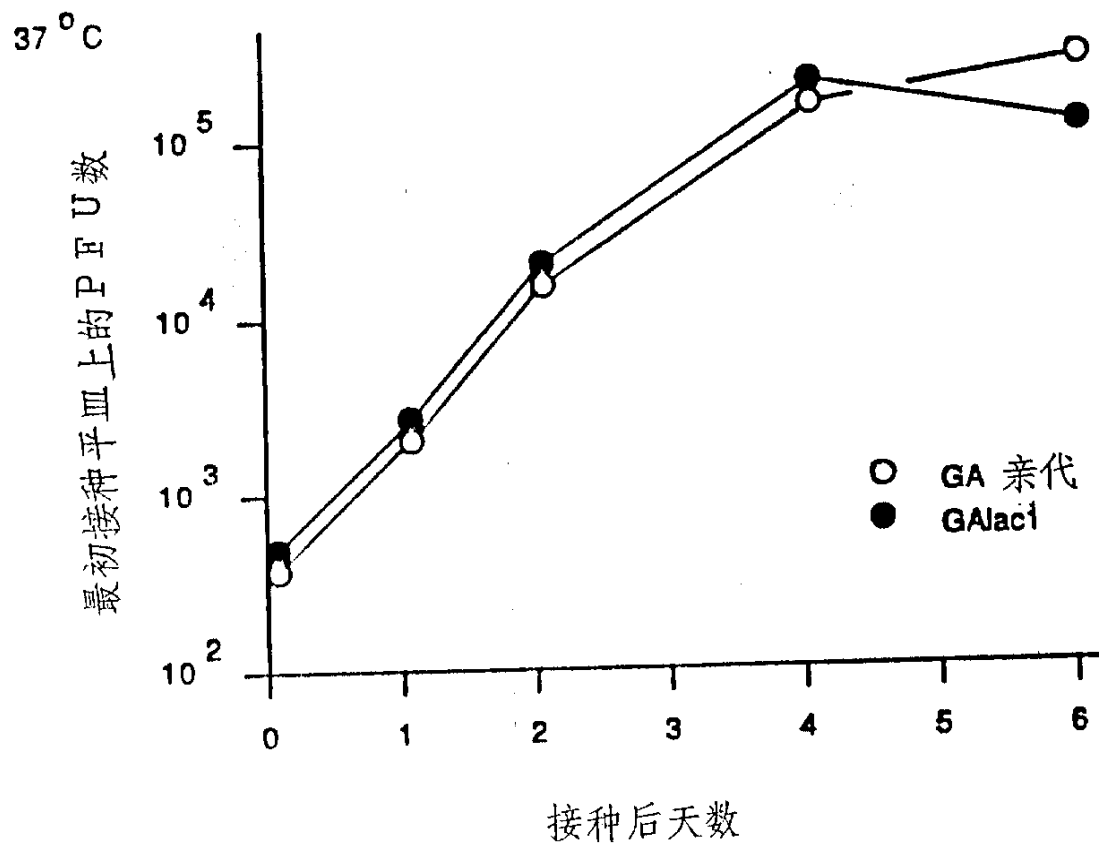


图. 7

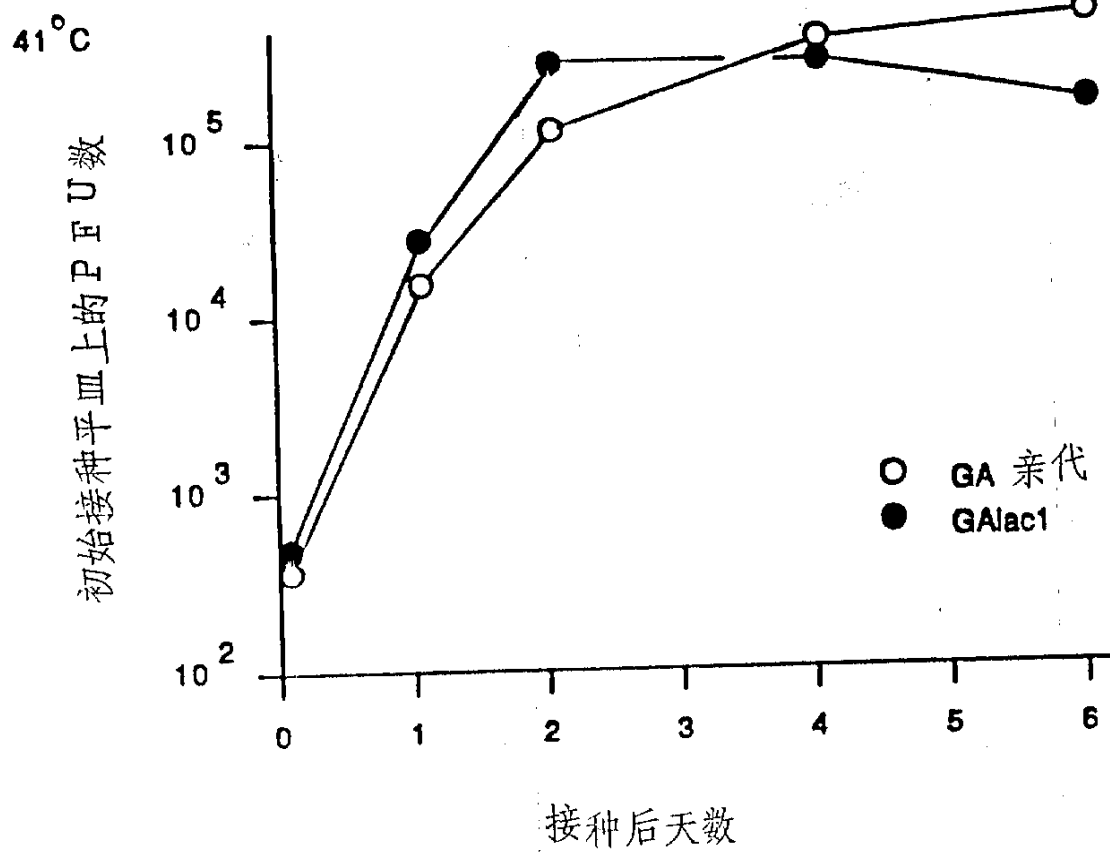


图. 8