

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01819570.9

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1317034C

[22] 申请日 2001.11.26 [21] 申请号 01819570.9

[30] 优先权

[32] 2000.11.27 [33] US [31] 09/724,315

[86] 国际申请 PCT/US2001/043151 2001.11.26

[87] 国际公布 WO2003/004055 英 2003.1.16

[85] 进入国家阶段日期 2003.5.27

[73] 专利权人 宝德杰克特疫苗有限公司

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 约尔·R·海恩斯

约书亚·E·阿林顿

[56] 参考文献

US6056960A 2000.5.2

US5980898A 1999.11.9

Transcutaneous immunization with bacterial ADP – ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants GLENN G M, INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 67 No. 3 1999

Transcutaneous immunization with bacterial-ADP – ribosylating exotoxins, subunits, and unrelated adjuvants SCHARTON. KERSTEN T, INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 68 No. 9 2000

审查员 陆 纯

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

权利要求书 4 页 说明书 93 页 附图 26 页

[54] 发明名称

核酸佐剂

[57] 摘要

本发明描述了重组核酸分子。该分子有两个核酸序列，其中第一核酸序列是获自或来源于细菌 ADP – 核糖基化外毒素截短的 A 亚基编码区，第二核酸序列是截短的 B 亚基编码序列。也描述了含有这些分子的载体和组合物。也描述了利用这些重组核酸分子和组合物增加对目的抗原免疫应答的方法。

1. 一种用于提高对抗原的免疫应答的佐剂组合物，该佐剂组合物含有第一和第二核酸序列，其中所述第一核酸序列是获自或来源于细菌ADP-核糖基化外毒素截短的A亚基编码区，所述第二核酸序列是获自或来源于细菌ADP-核糖基化外毒素截短的B亚基编码区，其中所述第一和第二核酸序列与在哺乳动物细胞中具有活性的启动子可操作地连接或所述第一和第二核酸序列各自与在哺乳动物细胞中具有活性的启动子可操作地连接，条件是每个所述截短的亚基编码区具有5'缺失，并且编码不具氨基末端细菌信号肽的亚基肽。

2. 如权利要求1所述的组合物，其中截短的A亚基编码区已被进一步基因修饰以缺失其编码的亚基肽中C-末端KDEL或RDEL基序。

3. 一种用于提高对抗原的免疫应答的佐剂组合物，该佐剂组合物含有第一和第二核酸序列，其中所述第一核酸序列是获自或来源于细菌ADP-核糖基化外毒素的修饰的A亚基编码区，所述第二核酸序列是获自或来源于细菌ADP-核糖基化外毒素的B亚基编码区，条件是所述修饰的A亚基编码区和B亚基编码区分别编码成熟亚基肽，并且进一步条件是修饰的A亚基编码区已被基因修饰以缺失其编码的亚基肽中C-末端KDEL或RDEL基序，并且，其中所述第一和第二核酸序列与在哺乳动物细胞中具有活性的启动子可操作地连接或所述第一和第二核酸序列各自与在哺乳动物细胞中具有活性的启动子可操作地连接。

4. 如权利要求3所述的组合物，其中通过5'缺失已分别截短修饰的A亚基编码区和B亚基编码区，因此，所述每个截短的亚基编码区编码不具有氨基末端细菌信号肽的亚基肽。

5. 如权利要求1~4任一项所述的组合物，其中所编码的各亚基肽与分泌前导序列可操作地连接以从哺乳动物细胞进行分泌。

6. 如权利要求1~4任一项所述的组合物，其中所述第一和第二核酸序列存在于单一核酸构建体中。

7. 如权利要求1~4任一项所述的组合物，其中所述第一和第二

核酸序列存在于分离的核酸构建体中。

8. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中所述第一核酸和/或第二核酸序列存在于相同或不同的质粒中。

9. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中截短的亚基编码区是获自或来源于相同的细菌 ADP-核糖基化外毒素。

10. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中所述的一个细菌 ADP-核糖基化外毒素是霍乱毒素亚基和/或所述两个细菌 ADP-核糖基化外毒素均是霍乱毒素亚基。

11. 如权利要求 10 所述的组合物, 其中所述的两个细菌 ADP-核糖基化外毒素均是霍乱毒素亚基。

12. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中所述一个细菌 ADP-核糖基化外毒素是大肠杆菌热不稳定肠毒素亚基和/或两个细菌 ADP-核糖基化外毒素均是大肠杆菌热不稳定肠毒素亚基。

13. 如权利要求 12 所述的组合物, 其中所述两个细菌 ADP-核糖基化外毒素均是大肠杆菌热不稳定肠毒素亚基。

14. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中至少一个截短的亚基编码区已被基因修饰以除去其编码的亚基肽的毒性。

15. 如权利要求 14 所述的组合物, 其中截短的 A 亚基编码区已被基因修饰以破坏或失活其编码的亚基肽中 ADP-核糖基转移酶的活性。

16. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中至少一个截短的亚基编码区已被除去毒性。

17. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其进一步包含目的抗原。

18. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其进一步包含编码目的抗原的第三核酸序列。

19. 如权利要求 18 所述的组合物, 其中所述抗原来源于或是细菌病原体、病毒病原体、寄生病原体、过敏原或肿瘤特异性抗原。

20. 如权利要求 19 所述的组合物, 其中所述的抗原来自流感病毒、单纯疱疹病毒、肝炎病毒或乳头状瘤病毒。

21. 如权利要求 18 所述的组合物, 其中所述第三核酸序列存在于不含有所述第一或第二核酸序列的核酸构建体中。

22. 如权利要求 18 所述的组合物, 其中所述第三核酸序列存在于也含有至少一个所述第一或所述第二核酸序列的核酸构建体中。

23. 如权利要求 18 所述的组合物, 其中含有第三核酸序列的核酸构建体是质粒载体。

24. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其进一步包含药学可接受的载体或赋形剂。

25. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中所述组合物是粒子形式。

26. 如权利要求 25 所述的组合物, 其中所述粒子组合物适于通过粒子递送装置经皮递送。

27. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其中第一和第二核酸序列包被于核心载体粒子上。

28. 如权利要求 27 所述的组合物, 其中核心载体粒子具有 $0.1\ \mu\text{m}$ 到 $10\ \mu\text{m}$ 的平均直径。

29. 如权利要求 27 所述的组合物, 其中核心载体粒子包括金属。

30. 如权利要求 29 所述的组合物, 其中金属是金。

31. 如权利要求 1~4 任一项所述的组合物, 其进一步含有转染促进剂。

32. 如权利要求 31 所述的组合物, 其中转染促进剂是脂质体。

33. 一种粒子递送装置, 其中该装置装载有权利要求 26~30 任一项所定义的组合物。

34. 权利要求 1~16 任一项中所定义的佐剂组合物在药剂制造中的用途, 所述药剂用于提高脊椎动物个体对目的抗原的免疫应答。

35. 根据权利要求 34 所述的用途, 其中所述药剂还包含目的抗原。

36. 根据权利要求 34 所述的用途, 其中目的抗原来源于或是细菌病原体、病毒病原体或寄生病原体、过敏原或肿瘤特异性抗原。

37. 根据权利要求 34 所述的用途, 其中所述药剂还包含第三核酸

序列，该第三核酸序列编码所述目的抗原。

38. 根据权利要求 34 所述的用途，其中所述药剂为粒子形式。

39. 根据权利要求 34 所述的用途，其中所述佐剂组合物中所包含的第一和第二核酸序列包被于核心载体粒子上。

40. 根据权利要求 39 所述的用途，其中所述核心载体粒子具有 $0.1\ \mu\text{m}$ 到 $10\ \mu\text{m}$ 的平均直径。

41. 根据权利要求 39 所述的用途，其中核心载体粒子包括金属。

42. 根据权利要求 41 所述的用途，其中金属是金。

43. 根据权利要求 34 所述的用途，其中个体是人。

核酸佐剂

技术领域

本发明涉及分子生物学和免疫学领域，广泛涉及核酸免疫技术。更具体地说，本发明涉及编码佐剂的多核苷酸，和应用这些多核苷酸的免疫策略。

背景技术

本领域已描述为了抗表达产物的免疫目的，将 DNA 和 mRNA 注射入哺乳动物组织中的技术。该技术，本文命名为“核酸免疫”，已显示了诱导体液和细胞介导的免疫应答。例如，已显示用编码包膜糖蛋白，gp160 的 DNA 构建体免疫小鼠的血清在免疫测定中与重组 gp160 反应，并且，注射小鼠的淋巴细胞显示了增殖以应答重组 gp120。Wang 等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4156-4160。类似地，用人生长激素(hGH) 基因免疫的小鼠证实了基于抗体的免疫应答。Tang 等(1992) *Nature* 356:152-154。肌肉注射由哺乳动物启动子驱动的编码流感核蛋白的 DNA 已显示了诱导 CD8+CTL 应答，其可保护小鼠免受后续病毒致死性攻击。Ulmer 等(1993) *Science* 259:1745-1749。注射位点的免疫组织化学研究揭示成髓细胞吸收 DNA，并且病毒蛋白的胞质生产可以显示至少 6 个月。

发明概述

本发明的主要目的是提供一种含有第一和第二核酸序列的多核苷酸佐剂组合物，其中第一核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的截短的 A 亚基编码区，第二核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的截短的 B 亚基编码区。每个截短的亚基编码区具有 5' 缺失，并且编码不具氨基末端细菌信号肽的亚基肽。

第一和第二核酸序列可在相同或不同的核酸构建体中存在。截短的亚基编码区可获自或来源于相同的细菌 ADP-核糖基化外毒素，并且在一些优选实施方式中，细菌 ADP-核糖基化外毒素是霍乱毒素（CT）或大肠杆菌（*E. coli*）热不稳定肠毒素（LT）。此外，至少一个截短的亚基编码区可被基因修饰以除去由其编码的亚基肽的毒性，例如，其中截短的 A 亚基编码区已被基因修饰以破坏或失活亚基肽表达产物中的 ADP-核糖基转移酶的活性。

本发明的另一个主要目的是提供一种含有第一和第二核酸序列的多核苷酸佐剂组合物，其中第一核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的修饰的 A 亚基编码区，第二核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的 B 亚基编码区。所述修饰的 A 亚基编码区和 B 亚基编码区分别编码成熟亚基肽，并且修饰的 A 亚基编码区已被基因修饰以缺失由其编码的 C-末端 KDEL 或亚基肽的 RDEL 基序（motif）。

如上所述，第一和第二核酸序列可在相同或不同的核酸构建体中存在。截短的亚基编码区可获自或来源于相同的细菌 ADP-核糖基化外毒素，并且在一些优选实施方式中，细菌 ADP-核糖基化外毒素是霍乱毒素（CT）或大肠杆菌（*E. coli*）热不稳定肠毒素（LT）。此外，至少一个截短的亚基编码区可被基因修饰以除去由其编码的亚基肽的毒性，例如，其中截短的 A 亚基编码区已被基因修饰以破坏或失活亚基肽表达产物中的 ADP-核糖基转移酶的活性。

在本发明的某些方面，可以通过粒子形式提供上述组合物，例如，其中组合物是适合以粒子递送设备递送的粒子。在这方面，本组合物可包被至相同或不同的核心载体粒子上，从而适于使用粒子介导的转染技术来递送。优选核心载体粒子的平均直径约为 0.1—10 μm ，并且可以包含金属，例如金。因此，本发明的进一步的目的是提供负载有（例如，含有）如本文所述的粒子组合物的粒子递送设备。

本发明的另一个主要目的是提供组合物在制造药剂的应用，所述组合物含有第一和第二核酸序列，其中每个序列包含 ADP-核糖基化外毒素亚基的编码区，所述药剂用于提高脊椎动物个体抗所述个体中目的抗原

的免疫应答。通过给所述个体施用目的抗原和组合物，因此，表达由第一和第二核酸序列编码的毒素亚基，其量足以诱导对抗原的免疫应答。第一核酸序列含有获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的截短的 A 亚基编码区，第二核酸序列含有获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的截短的 B 亚基编码区，但条件是每个截短的亚基编码区具有 5' 缺失，并且编码不具氨基末端细菌信号肽的亚基肽。

本发明相关的主要目的是提供用于提高抗个体中目的抗原的免疫应答的方法。该方法通常需要：（a）给所述个体施用目的抗原；（b）提供含有第一和第二核酸序列的佐剂组合物，其中第一核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的截短的 A 亚基编码区，第二核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的截短的 B 亚基编码区；和（c）给所述个体施用佐剂组合物，藉此通过引入到所述个体，表达第一和第二核酸序列，以提供足够量的亚基肽来诱导提高的抗目的抗原的免疫应答。截短亚基编码区的原因在于每个亚基编码区具有 5' 缺失，并且编码不具氨基末端细菌信号肽的亚基肽。

本发明还有一个主要目的是提供组合物在制造药剂的应用，所述组合物含有第一和第二核酸序列，其中每个序列包含细菌 ADP-核糖基化外毒素亚基的编码区，所述药剂用于提高脊椎动物个体抗所述个体中目的抗原的免疫应答。通过给所述个体施用目的抗原和组合物，因此，表达由第一和第二核酸序列编码的毒素亚基，其量足以诱导提高的对抗原的免疫应答。第一核酸序列含有获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的修饰的 A 亚基编码区，第二核酸序列含有获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的 B 亚基编码区，但条件是修饰的 A 亚基和 B 亚基编码区分别编码成熟亚基肽，并且进一步条件是修饰的 A 亚基编码区已被基因修饰以缺失由其编码的亚基肽的 C-末端 KDEL 或 RDEL 基序。

本发明相关的主要目的是提供用于提高抗个体中目的抗原的免疫应答的方法。该方法通常需要：（a）给所述个体施用目的抗原；（b）提供含有第一和第二核酸序列的佐剂组合物，其中第一核酸序列是获自或来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的修饰的 A 亚基，第二核酸序列是获自或

来源于细菌 ADP-核糖基化外毒素的 B 亚基编码区；和 (c) 给所述个体施用佐剂组合物，藉此通过引入到所述个体，表达第一和第二核酸序列，以提供足够量的亚基肽来诱导提高的对抗原的免疫应答。修饰亚基编码区的原因在于它们分别编码成熟亚基肽，但是已基因修饰 A 亚基编码区以缺失由其编码的亚基肽的 C-末端 KDEL 或 RDEL 基序。

在本发明应用和方法中，施用佐剂组合物需要用本发明多核苷酸佐剂组合物转染个体细胞。含有本发明核酸分子的表达盒子和/或载体可以用于转染细胞，而且在允许个体中亚基肽表达的条件下进行转染。该方法可以进一步需要给个体施用至少一个第二组合物的步骤。

在免疫期间可以在体内或离体进行转染过程（例如，在进行次级免疫步骤前获得随后被引入个体的转染细胞）。当应用体内转染时，可以通过肌肉或真皮内注射质粒 DNA 的方法给个体施用核酸分子，优选地，利用粒子介导的递送技术给个体施用。可以以任何适合的疫苗组合物形式，例如肽亚基组合物的形式，核酸疫苗组合物的形式，或整体或分裂的病毒流感疫苗组合物的形式提供疫苗组合物（含有目的抗原）。

在一些方法中，给个体的相同位点施用目的抗原和佐剂组合物。例如，可以同时施用佐剂组合物和目的抗原（例如，在单一疫苗组合物中提供）。在一些优选实施方式中，以粒子形式施用佐剂和，可选地目的抗原，例如其中佐剂组合物包被在核心载体粒子上，而且用粒子介导的递送技术递送给个体。

在这些方法中，优选本发明多核苷酸佐剂组合物的施用引起增加的抗共施用目的抗原的细胞免疫应答。该提高的免疫应答通常可以以增加的产生干扰素的 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ T 淋巴细胞效价，增加的抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性，和抗目的抗原的 T 辅助性 1 一类似免疫应答 (Th1)（以增加的通常与细胞免疫（例如，IgG2a）有关的亚类的抗原特异性抗体的效价，常常伴随通常与体液免疫（例如，IgG1）有关的亚类的抗体效价的降低为特征）为特征，而不是 T 辅助性 2 一类似免疫应答 (Th2)。T 辅助性 2 一类似免疫应答 (Th2) 就像当用细菌 ADP-核糖基化外毒素佐剂，如 CT 或 LT 免疫个体时通常产生的那样。

本发明优点包括，但不限于本发明佐剂组合物提供显著佐剂效果和因此提高免疫个体中共施用抗原免疫原性的能力，还包括有助于抗共施用抗原的 Th1 样免疫应答的能力，共施用抗原在疫苗产品中是有益的。

鉴于本文的公开，本领域普通的技术人员将容易想到本发明的这些和其它目的，方面，实施方式和优点。

附图简述

图 1 是质粒 pPJV2002 的限制图谱和功能图谱，该质粒含有霍乱毒素 (CT) 亚基 A (CTA) 肽截短的编码序列，其中该质粒进一步含有人巨细胞病毒 (hCMV) 立即早期启动子和相关内含子 A 序列，及允许从哺乳动物细胞分泌截短的 CTA 表达产物的人组织血纤蛋白溶酶原激活体信号肽的编码序列。该图进一步包含 pPJV2002 质粒的完整核酸序列 (SEQ ID NO:1)。

图 2 是质粒 pPJV2003 的限制图谱和功能图谱，该质粒含有霍乱毒素 (CT) 亚基 B (CTB) 肽截短的编码序列，其中该质粒进一步含有 hCMV 立即早期启动子和相关内含子 A 序列，及允许从哺乳动物细胞分泌截短的 CTB 表达产物的人组织血纤蛋白溶酶原激活体信号肽的编码序列。该图进一步包含 pPJV2003 质粒的完整核酸序列 (SEQ ID NO:2)。

图 3 是质粒 pPJV2006 的限制图谱和功能图谱，该质粒含有 CTA 肽截短的编码序列，其中进一步修饰截短的 CTA 编码序列以缺失其编码的亚基肽中 C-末端 KDEL 基序。质粒进一步含有 hCMV 立即早期启动子和相关内含子 A 序列，及允许从哺乳动物细胞分泌截短的 CTA 表达产物的人组织血纤蛋白溶酶原激活体信号肽的编码序列。该图进一步包含 pPJV2006 质粒的完整核酸序列 (SEQ ID NO:3)。

图 4 是质粒 pPJV2004 的限制图谱和功能图谱，该质粒含有大肠杆菌 (*E. coli*) 热不稳定肠毒素 (LT) 亚基 A (LTA) 肽截短的编码序列，其中该质粒进一步含有 hCMV 立即早期启动子和相关内含子 A 序列，及允许从哺乳动物细胞分泌截短的 LTA 表达产物的人组织血纤蛋白溶酶原激活体信号肽的编码序列。该图进一步包含 pPJV2004 质粒的完整核酸序列

(SEQ ID NO:4)。

图 5 是质粒 pPJV2005 的限制图谱和功能图谱, 该质粒含有 LT 亚基 B (LTB) 肽截短的编码序列, 其中该质粒进一步含有 hCMV 立即早期启动子和相关内含子 A 序列, 及允许从哺乳动物细胞分泌截短的 LTB 表达产物的人组织血纤蛋白溶酶原激活体信号肽的编码序列。该图进一步包含 pPJV2005 质粒的完整核酸序列 (SEQ ID NO:5)。

图 6 是质粒 pPJV2007 的限制图谱和功能图谱, 该质粒含有 LTA 肽截短的编码序列, 其中截短的 LTA 编码区被进一步修饰以缺失其编码的亚基肽中 C-末端 RDEL 基序。该质粒进一步含有 hCMV 立即早期启动子和相关内含子 A 序列, 及允许从哺乳动物细胞分泌截短的 LTA 表达产物的人组织血纤蛋白溶酶原激活体信号肽的编码序列。该图进一步包含 pPJV2007 质粒的完整核酸序列 (SEQ ID NO:6)。

图 7 描述了实施例 5 中进行的 ELISA 结果。矩形图表示接受下述制剂的动物中出现的抗 gp120 抗体的对数倒数效价, 在图中从左到右, 含有空 pWRG7504 载体 (“EmpVec”) 的制剂 #1; 含有 EmpVec (pWRG7054) 和 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #2; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 EmpVec (pWRG7054) 的制剂 #3; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #4; 含有与 pPJV2006 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA-KDEL/B”) 联合的 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 制剂 #5; 或无疫苗和/或佐剂组合物 (首次用于试验的)。

图 8 描述了实施例 5 中进行的原位 ELISA 结果。矩形图表示接受下述制剂的动物脾细胞中 gp120 特异性 IFN- γ 产生的相对水平, 图中从左到右, 含有空 pWRG7504 载体 (“EmpVec”) 的制剂 #1; 含有 EmpVec (pWRG7054) 和 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #2; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 EmpVec (pWRG7054) 的制剂 #3; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #4; 或含有与 pPJV2006 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA-KDEL/B”) 联合的 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #5。

图 9 描述了实施例 5 中进行的 ELISPOT 测定法的结果。矩形图表示接受下述制剂的动物中产生 IFN- γ 的脾细胞的相对水平, 图中从左到右, 含有空 pWRG7504 载体 (“EmpVec”) 的制剂 #1; 含有 EmpVec (pWRG7054) 和 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #2; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 EmpVec (pWRG7054) 的制剂 #3; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #4; 或含有与 pPJV2006 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA-KDEL/B”) 联合的 pCIA-EnvT 质粒 (“gp120”) 的制剂 #5。

图 10 描述了实施例 6 中进行的 ELISA 结果。在图中, 几何平均吸光度值表示在血清样品 (以四个不同稀释度) 中出现的抗 HBcAg 抗体的效价, 所述的血清样品在加强免疫时 (本研究的第 6 周), 接受下述制剂的动物中采集的, 或是含有 HBcAg/HBsAg 载体质粒 (pWRG7193) 的制剂 #1; 或是含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 HBcAg/HBsAg 载体质粒 (pWRG7193) 的制剂 #2。

图 11 描述了实施例 6 中进行的 ELISA 结果。在图中, 几何平均吸光度值表示在血清样品 (以四个不同稀释度) 中出现的抗 HBcAg 抗体的效价, 所述的血清样品在加强免疫后 2 周 (本研究的第 8 周), 从接受下列制剂的动物中采集的, 或是含有 HBcAg/HBsAg 载体质粒 (pWRG7193) 的制剂 #1; 或是含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 佐剂载体 (“CTA/B”) 联合的 HBcAg/HBsAg 载体质粒 (pWRG7193) 的制剂 #2。

图 12 描述了实施例 7 中进行的 ELISA 结果。矩形图表示接受下列制剂的每个免疫组的 log IgG1:: IgG2a 比率, 在图中从左到右, 含有与空载体质粒对照 (pWRG7054) 联合的 pM2-FL 质粒 (“M2”) 的制剂 #1; 含有与 pPJV2002 和 pPJV2003 CTA/B 佐剂载体 (“M2+CT”) 联合的 pM2-FL 质粒的制剂 #2; 或含有与 pPJV2004 和 pPJV2005 LTA/B 佐剂载体 (“M2+LT”) 联合的 pM2-FL 质粒的制剂 #2。

图 13A-13D 描述了在实施例 8 的第一次研究中用于评估对肝炎 B 病毒表面和核心抗原免疫应答的 IFN- γ 和 IL4 ELISPOT 测定法的结果。矩形图表示各个实验组中每 1×10^5 脾脏细胞的斑点数。

图 14 描述了实施例 9 中进行的 HSV-2 病毒攻击研究的存活结果。

发明详述

详述本发明前，可以理解本发明不限于本身的特定示例性分子或过程参数，因为当然，所述分子或过程参数可以变化。用在本文的术语仅仅是为了描述本发明特定实施方式的目的，而不意味限制本发明，这也是可以理解的。此外，除非另外说明，本发明的实践将利用所有本领域技术人员范围内的病毒学，微生物学，分子生物学，重组 DNA 技术和免疫学的常规方法。文献中全面解释了这些技术。参见，例如 Sambrook, 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.) *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); 和 *Fundamental Virology*, 第二版, vol. I & II (B. N. Fields 和 D. M. Knipe, eds.)。

因此无论上文和下文，本文引用的所有出版物、专利和专利申请都整体并入参考文献。

必需注意，除了内容清楚规定外，在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一种”或“一个”和“所述”或“该”等冠词包括复数对象。

定义

除了另外定义，本文所用的所有技术和科学术语与本发明相关的本领域普通技术人员通常的理解具有相同的含意。尽管与本文所述类似或等同的大量方法和材料可以用于本发明实践中，但是本文描述了优选的材料和方法。

在描述本发明中，将用到下面的术语，而且按如下所述定义这些术语。

术语“佐剂”意指能特异或非特异改变，提高，定向，重新定向，加强或起始抗原特异性免疫应答的任何材料和组合物。因此，佐剂和抗原的共施用可以导致在施用抗原的个体中，达到期望免疫应答必需的较

低或较少剂量，或共施用在个体中可以引起定性和/或定量不同的免疫应答。通过给动物施用佐剂和疫苗组合物，同时单独施用疫苗组合物，并且用标准测定法，如放射免疫测定法，ELISAs，CTL 测定法等等本领域已知测定法比较两个组中的抗体和/或细胞介导的免疫，可以测定佐剂的有效性。通常，在疫苗组合物中，尽管单一分子可以有佐剂和抗原两种特性，但是佐剂是与抗原分离的单独部分。

“佐剂组合物”意指任何含有佐剂的药物组合物。可以通过任何适合的药物形式，例如作为液体，粉末，乳膏，洗液，乳剂，凝胶或类似形式递送佐剂组合物，通过本发明方法递送佐剂组合物。然而，优选的佐剂组合物将是粒子形式。尽管没有经常明确说明，但是倾向于与野生型或纯化肽或化学佐剂具有类似生物活性的分子。

术语“肽”所用的是其最广泛的意义，指两个或多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或其它肽聚模拟物 (peptidomimetics)。可以通过肽键或通过其它键，例如酯，醚等连接亚基。如本文所用，术语“氨基酸”指或天然和/或非天然或合成氨基酸，包括甘氨酸和 D 或 L 光学异构体，和氨基酸类似物和肽聚模拟物。如果肽链短，三个和多个氨基酸通常称为“寡肽”。如果肽链长，肽通常指“多肽”或“蛋白质”。

“抗原”指任何试剂，通常是能诱导个体免疫应答的大分子。术语可以用于指单独大分子或抗原大分子的同质或异质群。如本文所用，“抗原”通常用于指含有一个或多个抗原表位的肽或碳水化合物分子。对于本发明目的而言，可以从任何适合来源获得或得到抗原。而且，对于本发明目的而言，只要肽保持足够的免疫原性，“抗原”包含有修饰的肽，如对天然序列的缺失，添加和置换（通常在天然存在时是保守的）。这些修饰可以是有意的，例如通过定点诱变，或可以是偶然的，如通过产生抗原的宿主突变。

抗目的抗原的“免疫应答”是个体中对该抗原的体液和/或细胞免疫应答的发展。对于本发明目的而言，“体液免疫应答”指通过抗体分子介导的免疫应答，而“细胞免疫应答”是通过 T-淋巴细胞和/或其它白血细胞介导的免疫应答。

术语“核酸免疫”用在本文指引入宿主细胞编码一个或多个选定抗原的核酸分子进行一个抗原或许多抗原的体内表达。术语也包含引入宿主细胞编码一个或多个选定佐剂的核酸分子进行一个佐剂或许多佐剂的体内表达。如通过标准肌肉或真皮内注射；经皮的粒子递送；吸入；局部地，或通过口、鼻内或粘膜施用方式，可以直接引入核酸分子进入受体个体。可选的方案，在离体条件下，可以引入分子进入从个体分离的细胞。在后一种情况下，再引入含有目的核酸分子的细胞进入个体，因此可以增加抗核酸分子编码抗原的免疫应答，或因此核酸分子编码的佐剂可以发挥其佐剂作用。

术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文是互换使用的，指任何长度核苷酸（或脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或其类似物）的聚合形式。多核苷酸可以有任何三维结构，可以进行任何已知或未知的功能。多核苷酸非限制性的例子包括基因、基因片段、外显子、内含子、信使 RNA(mRNA)、转运 RNA、核糖体 RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸，分支多核苷酸，质粒，载体，任何序列的分离 DNA、任何序列的分离 RNA、核酸探针和引物。

多核苷酸通常由四个核苷酸碱基：腺嘌呤（A）；胞嘧啶（C）；鸟嘌呤（G）；和胸腺嘧啶（T）（当多核苷酸是 RNA 时，尿嘧啶（U）代替胸腺嘧啶（T））的特异序列组成。因此，术语核酸序列是多核苷酸分子的字母表示。可以在有中央处理单元计算机的数据库中输入该字母表示，并且用于生物信息学应用，如功能基因组学和同源性检索。

“载体”能转移核酸序列到靶细胞（例如，病毒载体、非病毒载体、粒子载体和脂质体）。通常，“载体构建体”、“表达载体”、和“基因转移载体”指能引导目的基因表达的任何核酸构建体，而且其能转移基因到靶细胞。因此，该术语包括克隆和表达载体及病毒载体。“质粒”是染色体外遗传成分形式的载体。

“编码”选定佐剂和/或抗原的核酸序列是核酸分子，当该核酸分子置于合适调节序列控制时，其在体内被转录（DNA 情况下）和翻译（RNA 情况下）成多肽。由 5' -（氨基）末端的起始密码子和 3' -（羧基）末

端的翻译终止密码子确定编码序列的范围。对于本发明目的而言，该核酸序列可以包括，但不限于病毒的 cDNA、原核或真核 mRNA、病毒或原核 DNA 或 RNA 的基因组序列、甚至是合成的 DNA 序列。转录终止序列可以位于编码序列的 3' 端。

“启动子”是起始和调节编码多肽的多核苷酸转录的核苷酸序列。启动子可以包括诱导型启动子（其中分析物、辅因子、调节蛋白等诱导可操作地与启动子连接的多核苷酸序列的表达），阻抑型启动子（其中分析物、辅因子、调节蛋白等阻抑可操作地与启动子连接的多核苷酸序列的表达），及组成型启动子。倾向术语“启动子”或“控制元件”包括全长启动子区域和这些区域的功能（例如，控制转录或翻译）片段。

“可操作地连接”指元件的排列，其中装配所述组分以进行其通常的功能。因此，当适合的酶存在时，可操作地与核酸序列连接的特定启动子能影响该序列的表达。只要启动子起到引导序列表达的功能，启动子不需要与序列邻接。因此，例如，可以在启动子序列和核酸序列间存在间插的非翻译但转录序列，仍然可以认为启动子序列“可操作地连接”编码序列。

“重组体”在本文用于描述基因组、cDNA、半合成或合成来源的核酸分子（多核苷酸），利用其来源或操作，其与其天然相关的全部或部分多核苷酸无关，和/或与其天然所连接的多核苷酸以外的多核苷酸连接。当单个重组核酸分子中含有的两个核酸序列在天然存在时，通常相互不相关时，这两个核酸序列相互是“异源的”。

“分离的多核苷酸”是来源于整个生物体的单独和分离的核酸分子，在天然存在时，该分子是在整个生物体中发现的；或是缺少与其天然存在时，通常相关序列的全部或部分的核酸分子；或是天然存在的序列，但该序列有与其相关的异源序列（如下所定义）。如果序列和来源分子区域、其 cDNA、其互补序列有相同或基本相同的碱基对序列，或如果如下所述其显示了序列同一性，那么序列是“来源于或获自”所述分子。

检测核酸和氨基酸“序列同一性”或“序列同源性”的技术也是本领域已知的。通常，该技术包括检测基因的 mRNA 核苷酸序列和/或检测

由其编码的氨基酸序列，和比较这些序列与第二核苷酸序列或氨基酸序列。通常，“同一性”分别指两个多核苷酸或多肽序列的精确的核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸对应。可以通过检测它们的“同一性百分比”比较两个或多个序列（多核苷酸或氨基酸）。无论核酸或氨基酸序列，两个序列的同一性百分比是两个比对序列间的精确匹配数除以较短序列的长度，乘以100。Smith 和 Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)的局部同源性算法提供了用于核酸序列的适合的比对。通过用 Dayhoff, (Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, 华盛顿, 美国) 开发及 Gribskov, (Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763 (1986)) 标准化的记分矩阵，该算法可以用于氨基酸序列。Genetics Computer Group (Madison, WI) 在“BestFit”实用申请中提供了该算法检测序列同一性百分比的示例性具体实施。在 Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, 第8版(1995) (可从 Genetics Computer Group, Madison, WI 得到) 中描述了这个方法的缺省参数。在本发明上下文确立同一性百分比的优选方法是利用 MPSRCH 程序包，其版权由 the University of Edinburgh 所有，由 John F. Collins 和 Shane S. Sturrok 开发, IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA) 发行。这套程序包可以利用 Smith-Waterman 算法，其中缺省参数用于记分表（例如，空位设置罚值12，空位扩展罚值1和空位6）。

“匹配”值产生的数据放映了“序列同一性”。用于估算序列间同一性或类似性百分比的其它适合程序通常是本领域已知的，例如，另一个具有缺省参数应用的比对程序是 BLAST。例如，利用下面缺省参数应用 BLASTN 和 BLASTP：遗传密码=标准；过滤=无；链=双链；截断值=60；E 值 (expect)=10；矩阵=BLOSUM62；描述=50 个序列；分类=HIGH SCORE；数据库=非冗余，GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 翻译+Swiss 蛋白质+Spupdate+PIR。可以在下面网址中发现这些程序的详细内容：
<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。

作为替代方案，在多核苷酸同源区形成稳定双螺旋的条件下，可以通过多核苷酸杂交检测同源性，随后用单链特异性核酸酶消化，及消化片段大小的检测。用上述方法测定，当序列与确定长度的分子显示至少约 80—85%，优选至少约 90%，和最优选地至少约 95%—98% 序列同一性时，两个 DNA 或两个多肽序列相互是“基本同源的”。如本文所用，基本同源也指显示与特定 DNA 或多肽序列有完整同一性的序列。可以在 Southern 杂交实验，在例如严格条件下，鉴定基本同源性的 DNA 序列，所述条件由该特定系统所限定。例如，严格杂交条件可以包括 50% 甲酰胺，5x Denhardt's 溶液，5x SSC，0.1% SDS 和 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA，并且冲洗条件可以包含在 37°C，2x SSC，0.1% SDS，接着 68°C，1x SSC，0.1% SDS。定义适合的杂交条件是本领域技术。参见，例如，Sambrook 等，上文；*DNA Cloning*，上文；*Nucleic Acid Hybridization*，上文。

术语“经皮的”递送指皮内（例如进入真皮或表皮），经皮（例如经皮肤的）和经粘膜施用，即，通过试剂的递送进入或穿过皮肤或粘膜组织。参见，例如 *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft 和 Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson 和 Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); 和 *Transdermal Delivery of Drugs*, 卷 1-3, Kydonieus 和 Berner (eds.), CRC 出版社, (1987)。因此，该术语包括利用如美国专利号：5,630,796 所述的粒子递送装置（例如，无针注射器）的试剂递送，及如美国专利号：5,865,796 所述的粒子介导递送装置的递送。

通过“核心载体”指为了给予确定的粒子大小和完成细胞膜穿透所需动量的足够高密度，载体上包被待处理核酸（例如，DNA、RNA），因此用粒子介导技术可以（参见，例如美国专利号：5,100,792）递送待处理分子。核心载体通常包括钨、金、铂、铁酸盐、聚苯乙烯和乳胶。参见，例如 *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, (1994) Yang, N. ed., Oxford University 出版社, New York, NY 10-11 页。

通过“粒子递送装置”指不需要常规针的辅助经皮递送粒子组合物

穿透皮肤。整个本文件讨论本发明所用的粒子递送装置。

本文所用的术语“治疗”包括下面任何一个：感染或再感染的预防；症状的减少和消除；病原体的减少或完全消除。治疗可以在预防（感染前）或治疗（感染后）阶段实现。

在本文可互换使用术语“个体”和“受处理者”，指脊索（cordata）亚门的任何成员，包括，非限于，人和任何其它灵长目动物，包括非人灵长目如黑猩猩和其它猿及猴种；农场动物如牛、绵羊、猪、山羊和马；家养的哺乳动物如狗和猫；实验动物包括啮齿动物如小鼠、大鼠和豚鼠；鸟类，包括家养、野生和猎鸟如鸡、火鸡和其它鸡形目的鸟、鸭子、鹅等等。术语不表示特定的年龄。因此，意指包括成年和新出生的个体。因为所有这些脊椎动物的免疫系统类似地起作用，所以本文所述方法意指在任何上述脊椎动物物种中应用。

概述

详述本发明前，可以理解本发明不限于特定的配方或过程参数，因为，当然，所述配方或过程参数可以变化。用在本文的术语只是为了描述本发明特定实施方式的目的，而不意味限制本发明，这也是可以理解的。

本发明提供了含有核酸序列的新组合物，其中组合物中第一序列是获自或来源于 ADP-核糖基化细菌毒素的 A 亚基编码序列，组合物中第二序列是获得或来源于 ADP-核糖基化细菌毒素的 B 亚基编码序列。第一和第二序列在免疫方法中是有用的，其中为了在免疫个体中提供佐剂效果（抗共施用的目的抗原），递送它们给个体。ADP-核糖基化细菌毒素是相关细菌外毒素家族，包括白喉毒素（DT），百日咳毒素（PT），霍乱毒素（CT），大肠杆菌（*E. coli*）热不稳定毒素（LT1 和 LT2），假单胞菌（*Pseudomonas*）内毒素 A，假单胞菌（*Pseudomonas*）外毒素 S，蜡样芽孢杆菌（*B. cereus*）胞外酶，球形芽孢杆菌毒素（*B. sphaericus*），肉毒梭菌（*C. botulinum*）C2 和 C3 毒素，泥渣梭菌（*C. limosum*）胞外酶，及产气荚膜梭菌（*C. perfringens*），*C. spiriforma* 和艰难梭菌（*C.*

difficile) 的毒素, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) EDIN, 和 ADP-核糖基化细菌毒素突变体, 如 CRM₁₉₇, 非毒性白喉毒素突变体 (参见, 例如 Bixler 等 (1989) *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:175; 和 Constantino 等 (1992) *Vaccine*)。大多数 ADP-核糖基化细菌毒素被组织为 A:B 多聚体, 其中 A 亚基含有 ADP-核糖基转移酶的活性, B 亚基作为结合部分。用于本发明组合物的优选 ADP-核糖基化细菌毒素包括霍乱毒素和大肠杆菌 (*E. coli*) 热不稳定毒素。

霍乱毒素 (CT) 和相关的大肠杆菌 (*E. coli*) 热不稳定肠毒素 (LT) 是其各自肠毒素细菌株系的分泌产物, 其是有效的免疫原, 并且当系统、口服或粘膜施用显示了强毒性。当通过肌肉或口服途径施用 CT 和 LT 时, 两者提供抗原佐剂效果是已知的。低于毒性所需剂量时就已观察到了这些佐剂效果。两种毒素是极其类似的分子, 在氨基酸水平上至少约 70—80% 是同源的。

CT 和 LT 毒素是六聚体, 由 5 个 B 亚基分子组成的环形环环绕单分子 A 亚基构成。A 亚基具有引起 G 蛋白修饰的 ADP 核糖基酶活性, 所述修饰引起 A 亚基在哺乳动物细胞内在化后的 cAMP 和蛋白激酶 A 正调节。可以通过外源蛋白酶切割 A 亚基产生由单二硫桥连接的 A1 和 A2 片段。CT 的 A 亚基含有与蛋白质跨越高尔基网进入 ER 挽回有关的 C-末端 KDEL 肽基序 (对于 LT 的 A 亚基是 RDEL)。对于内在化后为毒性 A 片段递送到正确细胞区室, 及该细胞区室内毒素的保留, 这可能是重要的。A1 亚基进入细胞胞质, 并且通过催化 G 蛋白质 ADP-核糖基化触发 C1 流出, 其激活引起提高 cAMP 水平的腺苷酸环化酶。提高的 cAMP 引起蛋白激酶 A 磷酸化和打开囊性纤维化跨膜传导调节蛋白氯离子通道。

片段 A2 的主要作用是与 B 亚基相互作用。通过 B 亚基的 5 个拷贝介导毒素内在化, B 亚基对 GM1 神经节苷脂, 普遍存在哺乳动物细胞表面的鞘糖脂具有结合活性。

A 和 B 亚基对于佐剂活性的相对重要性是有争议的。在本领域存在这样的推测, 即 A 亚基可以调节与 B 亚基相关的佐剂效果。一些研究证明 A 亚基的突变废除了佐剂活性, 而其它研究表明阻断 ADP-核糖基酶活

性的 A 亚基突变对佐剂活性没有影响。其它报告表明对于纯化的 B 亚基或重组 B 亚基制剂, 佐剂效果的变化水平。可能 A 和 B 亚基有独立产生佐剂活性的单独功能。这些功能分别是 ADP-核糖基转移酶的活性和受体触发活性。尤其是与 B 细胞上 GM1 受体结合的 LT 的 B 亚基引起多克隆活化, 其在缺乏显著增殖时出现, 而且包括许多重要分子, 如 MCH II 类、B7、CD40、ICAM-1 和 IL2-R α 的正调节。对于 T 细胞, 向伴刀豆球蛋白 A 刺激的 T 细胞添加 CT 或 LT 全毒素或重组 B 亚基引起胸腺嘧啶加入的减少。还没有报道这些分子对巨噬细胞和树突状细胞的作用。在 PBMC 培养中, EtxB 刺激高水平的 TNF- α 和 IL-10 而不是 IL-12 产生。这与利用 CT 和 LT 形式作为佐剂有关的主要 Th2 样应答的观察结果一致。

因此本发明的意外特征是本发明多核苷酸佐剂组合物的施用优先产生增强的抗共施用抗原的 Th1 样免疫应答, 而不是应用 ADP-核糖基化外毒素佐剂化合物预期的 Th2 样应答。

ADP-核糖基化外毒素亚基的编码序列

在一个实施方式中, 提供包含一个或多个重组核酸分子的组合物, 所述一个或多个分子含有第一和第二核酸序列, 其中 (a) 第一核酸序列是得自或来源于 ADP-核糖基化外毒素截短的 A 亚基肽编码区, 和 (b) 第二核酸序列是得自或来源于 ADP-核糖基化外毒素截短的 B 亚基肽编码区。因为已基因改变了每个所述编码区以产生 5' 缺失, 所以编码区提供“截短的”亚基肽, 因此编码的亚基肽没有氨基末端细菌信号肽。

在另一实施方式中, 提供包含一个或多个重组核酸分子的组合物, 所述一个或多个分子含有第一和第二核酸序列, 其中 (a) 第一核酸序列是得自或来源于 ADP-核糖基化外毒素的修饰的、成熟 A 亚基肽编码区, 和 (b) 第二核酸序列是得自或来源于 ADP-核糖基化外毒素的成熟 B 亚基肽编码区。因为已基因改变了所述编码区以缺失在编码亚基肽中正常发现的 4 个氨基酸残基 C-末端 KDEL 或 RDEL 基序, 所以第一核酸序列含有提供“修饰的”A 亚基肽的编码区。

在进一步的具体实施方式中, 提供包含一个或多个重组核酸分子的

组合物, 所述一个或多个分子含有第一和第二核酸序列, 其中 (a) 第一核酸序列是得自或来源于 ADP-核糖基化外毒素截短和修饰的 A 亚基肽编码区, 和 (b) 第二核酸序列是得自或来源于 ADP-核糖基化外毒素的截短的 B 亚基肽编码序列。

在特定优选的实施方式中, ADP-核糖基化外毒素肽亚基编码序列得自或来源于霍乱毒素 (CT)。在其它特定优选实施方式中, ADP-核糖基化外毒素肽亚基编码序列得自或来源于大肠杆菌 (*E. coli*) 热不稳定肠毒素 (LT), 例如 LT1 或 LT2。

通常, 各种肠毒素细菌种的基因组部分, 特别是含有 ADP-核糖基化外毒素编码序列的基因组部分是已知的, 其序列例如在互联网是公众可获得的, 例如在 World Wide Web, 和/或存储在储存库如 GenBank 数据库。例如, 在 Locus VIBCTXABB (登记号: D30053) 可以发现 CT 亚基 A 和 B 基因完整序列的 GenBank 入口, 而在 Locus AB0116677 (登记号: AB011677) 可以发现 LT 亚基 A 和 B 基因完整序列的 GenBank 入口。也可以在本发明组合物和方法中利用这些毒素序列的活性变异体或片断。对于 ADP-核糖基化外毒素的总的讨论, 参见例如: Krueger 等 (1995) *Clin. Microbiol. Rev.* 8:34-47。而且, 在本发明的一些方面, 可以进一步基因修饰一个或两个毒素亚基肽编码区以除去其编码的亚基肽的毒性。例如, 破坏 ADP-核糖基化活性、胰蛋白酶切割位点突变或破坏结合活性的基因改变的毒素突变体是本领域已知的。参见, 例如 Burnette 等 (1994) “Recombinant microbial ADP-ribosylating toxins of *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and enterotoxigenic *Escherichia coli*: structure, function and toxoid vaccine development,” 在 *Bioprocess Technology*, Burnette 等 eds., 185-203 页; Rappuoli 等 (1995) *Int. Archiv. Allergy Immunol.* 108:327-333; 和 Rappuoli 等 (1996) *Ad. Exp. Med. Biol.* 397:55-60。用已知技术, 通常在适合的载体 (例如质粒骨架) 中插入编码选定毒素亚基的序列, 如下面实施例所述。

可以用已知方法获得和/或制备编码目的 ADP-核糖基化外毒素亚基

肽的一个或多个序列。例如，用标准分子生物学工具，可以得到基本上纯的制剂。即，用重组方法，如通过从表达毒素亚基的细胞筛选 cDNA 文库，或通过从已知包含该多核苷酸序列的载体得到毒素亚基编码序列，可以获得编码上述毒素亚基的多核苷酸序列。各种细菌株系的毒素亚基编码序列保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)，而其它的毒素亚基编码序列可从国家和国际健康组织如疾病控制中心(the Centers of Disease Control)(Atlanta, GA)得到。参见，例如 Sambrook 等，上文，用于获得和分离核酸分子的技术说明。也可以合成，而不是克隆产生多核苷酸序列。

然而，分离特定核酸分子的另一个方便方法是通过聚合酶链式反应(PCR) Mullis 等(1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350。这个技术利用 DNA 聚合酶，通常是热稳定 DNA 聚合酶复制期望的 DNA 区域。通过特异序列的寡核苷酸识别将要复制的 DNA 区域，该寡核苷酸与期望 DNA 的相反末端和相反链互补以引发复制反应。第一轮复制产物是用于随后复制的模板本身，因此重复连续的复制循环引起了由所用引物对限定的 DNA 片断的几何扩增。

一旦获得目的 ADP-核糖基化外毒素亚基的相关序列，用标准克隆或分子生物学技术可以将其连接在一起以提供一个或多个邻接核酸分子。更具体地，获得选定毒素亚基联合的序列信息后，编码序列可以互相联合或与其它序列联合以形成杂交序列，或分别处理编码序列。在杂交序列中，亚基肽编码序列相互间可以通过任何方式定位，而且以任何排序方式包含在单分子中，例如，作为单拷贝，作为在分子中随机重复的多拷贝，或作为多串连重复包含在分子中，或另外的有序重复基序。

尽管可以用许多常规分子生物学技术构建该重组核酸分子，但是一个方便的方法需要利用穿梭或克隆载体中一个或多个单一限制性位点(或者插入在适合载体序列中插入一个或多个单一位点)和标准克隆技术定向亚基肽编码一个序列或多个序列到载体特定靶位点中。

作为替代方案，可以合成，而不是克隆产生杂交分子。设计具有期望特定氨基酸的合适密码子的核苷酸序列。一般地，人们选择表达序列

的期望宿主的优选密码子。然后，可以从标准方法制备的重叠寡核苷酸装配完整序列，并且装配为完整编码序列。参见，例如 Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair 等 (1984) *Science* (1984) 223:1299; Jay 等 (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311。

一旦获得或构建相关的 ADP-核糖基化外毒素肽编码序列，可以在含有控制序列的一个或多个适合载体内插入它们，该控制序列可操作地与插入的一个序列或多个序列连接，因此提供了允许毒素亚基肽在靶个体物种体内表达的表达盒子。

哺乳动物细胞表达的常用启动子包括 SV40 早期启动子，CMV 启动子如 CMV 立即早期启动子，小鼠乳腺肿瘤病毒 LTR 启动子，腺病毒主要晚期启动子 (Ad MLP)，和其它适合有效的启动子系统。非病毒启动子，如鼠金属硫蛋白基因启动子也可以用于哺乳动物表达。也可以利用诱导型、阻抑型或其它控制型启动子。通常，也将存在转录终止和聚腺苷酸化序列，其位于每个翻译终止子的 3'。优选地，也存在位于每个编码序列 5' 的翻译起始的最佳序列。转录终止子/聚腺苷酸化信号的例子包括来源于 SV40 的转录终止子/聚腺苷酸化信号，如 Sambrook et al 等，上文，及牛生长激素终止子序列。表达盒子内也可以设计含有剪接供体和受体位点的内含子。

此外，表达盒子中可以包含增强子元件以增加表达水平。适合的增强子例子包括 SV40 早期基因增强子 (Dijkema 等 (1985) *EMBO J.* 4:761)，来源于鲁斯氏肉瘤病毒长末端重复 (LTR) 的增强子/启动子 (Gorman 等 (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777)，和来源于人或鼠 CMV 的元件 (Boshart 等 (1985) *Cell* 41:521)，例如包含在 CMV 内含子 A 序列中的元件。

在一些特定的实施方式中，可以进一步包含辅助序列，该辅助序列提供了所连接的 ADP-核糖基化外毒素亚基肽从哺乳动物细胞的分泌。该分泌前导序列是本领域技术人员已知的，而且包括，例如组织血纤维蛋白溶酶原激活物 (tpa) 前导信号序列。

在产生含有目的 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列的一个或多

个适合的表达盒子（或核酸构建体，如质粒载体）后，在适合的转染载体，如 DNA 质粒载体或病毒载体中可以提供表达盒子用于随后施用于个体。在这方面，本发明的多核苷酸组合物可以用做独立的佐剂组合物，或与目的抗原共施用，例如作为多组分疫苗组合物的一部分。例如，在多组分疫苗组合物中，该核酸分子（含有目的 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列）可以与编码一个或多个抗原的其它核酸分子，例如含有编码流感 HA 或 NA 抗原序列的分子，或含有编码 HIV 抗原序列的分子联合，已知所述抗原对提供抗病原体的保护是重要的。作为替代方案，除了编码毒素亚基的多核苷酸外，多组分疫苗组合物还可以包含常规整体病毒的抗原、分裂的病毒、多糖、或纯化的亚基疫苗制剂，如本文下文所述。

抗原

本文所述的组合物和方法在辅助免疫系统抗广泛种类共施用抗原方面是有用的，所述抗原，例如得自或来源于患病细胞或组织、人或动物病原体的抗原。对于本发明目的而言，佐剂或用于增强对特异抗原的免疫应答，例如当佐剂与疫苗组合物共施用时，免疫应答比施用同样量没有佐剂的疫苗组合物诱导的免疫应答更强；佐剂或用于定向抗共施用抗原的特定型或类的免疫应答。本发明佐剂组合物“有效量”的共施用是增强对共施用抗原免疫学反应的量，因此，例如，需要较低或较少剂量的抗原产生有效的免疫应答。

例如，当本发明的编码佐剂组合物的 ADP-核糖基化外毒素亚基与目的抗原（例如，疫苗组合物）“共施用”时，本文所用术语“共施用”指佐剂组合物和抗原的同时或共同施用，例如，当两者出现在相同组合物中，或者在几乎相同时间但不同位点以单独组合物形式施用时，及佐剂组合物和抗原在不同时间以单独组合物形式递送，包括给不同位点递送。例如，在相同或不同位点递送抗原前或后可以递送佐剂组合物。佐剂和抗原递送的计时范围可以从约几分钟间隔到几小时间隔，到几天间隔。

对于本发明目的而言，术语“病原体”以广泛地意义应用，指疾病和病情的特定成因因子，并且包括提供诱导免疫应答的分子原的任何因

子。因此，病原体包括但不限于病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫、癌细胞等等。通常，病原体产生的一个或多个肽或碳水化合物抗原诱导免疫应答。鉴定适合抗原，获得和制备该分子，然后测定适合的剂量，测定适合的免疫原性及用该抗原治疗的方法是本领域已知的。参见，例如 Plotkin 等 (1994) *Vaccines*, 第二版, W.B. Saunders, Philadelphia, PA。因此，可以用于接种脊椎动物个体，特别是人和非人的哺乳动物的抗原源的非限制性例子包括病毒、细菌、真菌和其它的病原生物体。

适合的病毒抗原包括但不限于从肝炎家族病毒，包括肝炎 A 病毒 (HAV)，肝炎 B 病毒 (HBV)，肝炎 C 病毒 (HBC)， δ 肝炎病毒 (HDV)，肝炎 E 病毒 (HEV) 和肝炎 G 病毒 (HGV) 得到或来源的病毒抗原。参见，例如国际公布号：WO 89/04669；WO 90/11089；和 WO 90/14436。HCV 基因组编码多个病毒蛋白质，包括 E1 和 E2。参见，例如 Houghton 等 (1991) *Hepatology* 14:381-388。将发现含有编码这些蛋白质序列的基因组片段及其抗原片段在本发明的应用。类似地，HDV 的 δ -抗原的编码序列是已知的 (参见，例如美国专利号：5,378,814)。

以类似的方式，本发明可以利用疱疹病毒家族广泛种类的蛋白质作为抗原，包括来源于疱疹单纯病毒 (HSV) 类型 1 和类型 2，如 HSV-1 和 HSV-2 糖蛋白 gB、gD 和 gH；水痘带状疱疹病毒 (VZV)，EB 病毒 (EBV) 和巨细胞病毒 (CMV)，包括 CMV gB 和 CMV gH 的蛋白质；和其它的人疱疹病毒，如 HHV6 和 HHV7 的抗原。(参见，例如 Chee 等 (1990) *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag, 125-169 页；McGeoch 等 (1988) *J. Gen. Virol.* 69:1531-1574；美国专利号：5,171,568；Baer 等 (1984) *Nature* 310:207-211；和 Davison 等 (1986) *J. Gen. Virol.* 67:1759-1816)。

已知和报道了人免疫缺陷病毒 (HIV) 抗原，如许多 HIV-1 和 HIV-2 分离物，包括 HIV 各种遗传亚型成员的 gp120 分子 (参见，例如 Myers 等, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico (1992)；和 Modrow 等 (1987) *J. Virol.* 61:570-578)。

将发现从任何这些分离物来源或获得的含有抗原的基因组片段在本发明中的应用。而且，将发现来源于或获自各种 HIV 分离物中任何一种的其它免疫原蛋白质在本文的应用，所述免疫原蛋白质包括含有一个或多个各种衣壳蛋白质如 gp160 和 gp41 的片段，gag 抗原如 p24gag 和 p55gag，及来源于 HIV 的 pol、env、tat、vif、rev、nef、vpr、vpu 和 LTR 区域的蛋白质。

也将发现来源于或获自其它病毒的抗原在本文的应用，如非限制性的，小核糖核酸病毒科（例如脊髓灰质炎病毒、鼻病毒等）；杯状病毒科；披膜病毒科（例如风疹病毒、登革热病毒等）；黄病毒科；冠状病毒科；呼肠孤病毒科（例如，轮状病毒）；双节段 RNA 病毒科；弹状病毒科（例如，狂犬病病毒）；正粘病毒科（例如，甲、乙和丙型流感病毒等）；纤丝病毒科；副粘病毒科（例如，流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒、副流感病毒等）；布尼亚病毒科；沙粒病毒科；逆转录病毒科（例如，HTLV-I；HTLV-II；HIV-1（作为 HTLV-III，LAV，ARV，hTLR 等也是已知的）），包括但不限于来源于分离物 HIV_{IIIB}、HIV_{SF2}、HIV_{LAV}、HIV_{LA1}、HIV_{MN}；HIV-1_{CW235}，HIV-1_{US4}；HIV-2，其中的其它种类的抗原；猿免疫缺陷病毒（SIV）；乳头状瘤病毒、蜱传脑炎（the tick-bourne）病毒等等。关于这些和其它病毒的描述参见，例如 Virology，第三版（W.K. Joklik ed. 1988）；*Fundamental Virology*，第二版（B.N. Fields 和 D.M. Knipe, eds. 1991）。

在一些上下文中，获自或来源于病毒病原体的病毒抗原可以是优选的，这些病毒病原体通常通过粘膜表面进入身体，已知其引起或与人类疾病有关，所述病毒病原体例如，但不限于 HIV（AIDS）、流感病毒（Flu）、单纯疱疹病毒（生殖器感染、单纯性疱疹、STDs）、轮状病毒（腹泻）、副流感病毒（呼吸感染）、脊髓灰质炎病毒（脊髓灰质炎）、呼吸道合胞体病毒（呼吸感染）、麻疹和流行性腮腺炎病毒（麻疹、腮腺炎）、风疹病毒（风疹）和鼻病毒（普通感冒）。

可以从已知与疾病相关的成因因子获得或衍生含有细菌和寄生抗原的基因组片段，包括但不限于，白喉（Diphtheria）、百日咳、破伤风、

结核病、细菌或真菌肺炎、中耳炎、淋病 (Gonorrhea)、霍乱、伤寒、脑膜炎、单核细胞增多症、瘟疫、细菌性痢疾或沙门氏菌感染、军团病、莱姆病 (Lyme Disease)、麻风病、疟疾、钩虫病、盘尾丝虫病、血吸虫病、Trypanosomiasis, Leishmaniasis、贾第鞭毛虫病、阿米巴病 (Amoebiasis)、丝虫病、包柔螺旋体病 (Borelia) 和旋毛虫病。而且进一步抗原可以从非常规病毒, 如库鲁病、克-雅病 (Creutzfeldt-Jakob 病, CJD)、羊瘙痒病、可传递的水貂脑病和慢性消耗性疾病, 或蛋白质感染粒子如与疯牛病有关的朊病毒的成因因子得到或来源。

特定的病原体可以包括结核分支杆菌、衣原体、淋病奈瑟氏球菌、志贺菌属、沙门菌、霍乱弧菌、梅毒密螺旋体、假单胞菌、百日咳博德特氏菌、布鲁氏菌、土拉热弗朗西斯氏菌 (*Francisella tularensis*)、幽门螺杆菌、问号钩端螺旋、嗜肺军团菌、鼠疫杆菌、链球菌 (A 和 B 型)、肺炎球菌、脑膜炎球菌、血友病流感 (*Hemophilus influenza*) (B 型)、鼠弓形体、Complimbacteriosis、粘膜炎莫拉菌、腹股沟肉芽肿和放线菌病; 真菌病原体包括念珠菌病和曲霉病; 寄生病原体包括绦虫属、血吸虫、线虫、阿米巴病、贾第虫病、隐孢子虫属、血吸虫属、卡氏肺囊虫、毛滴虫病和旋毛虫病。因此, 本发明也可以用于提供抗许多兽医疾病的免疫应答, 如口蹄疫、冠状病毒、多杀巴斯德菌、螺杆菌属、寻常圆线虫、胸膜肺炎放线杆菌、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、肺炎克雷白菌、大肠杆菌、百日咳博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌和 *brochiseptica*。

在一些实施方式中, 目的抗原可以是过敏原。“过敏原”是能引起超敏感性状态的抗原, 或在已用过敏原致敏的个体中能激发立即超敏感性反应。过敏原通常是具有过敏属性的蛋白质或与蛋白质结合的化学试剂; 然而, 过敏原也包括从各种人造或天然来源, 如植物材料、金属、化妆品或去污剂中的组分、乳胶等等得到的有机或无机材料。用于本发明方法中的适合过敏原的分类包括, 但不限于花粉、动物毛屑、草、霉、尘埃、抗生素、螫刺昆虫毒液, 和各种环境的 (包括化学试剂和金属)、药物和食品过敏原。普通树过敏原包括三叶杨、普通岑树、桦树、槭树、

橡树、榆树、山胡桃木和美洲山核桃树的花粉；普通植物过敏原包括来自黑麦、豚草、英国车前草、酸模和藜的过敏原；植物接触过敏原包括来自毒栎、毒葛和荨麻的过敏原；普通草过敏原包括来自猫尾草、约翰逊、百慕大、牛毛草和莓系属的牧草过敏原；也可以从霉菌或真菌得到普通过敏原，例如链格孢属、镰刀菌属、单孢枝霉菌属、曲霉属、小多胞菌属、毛霉菌和嗜热放线菌纲；青霉素和四环素是普通的抗生素过敏原；从房屋或有机尘埃（来源通常是真菌）中，从昆虫如房屋螨类（*dermatophagoides pterosinensis*），或是动物来源的如羽毛，猫和狗的毛屑可以得到表皮过敏原；普通的食物过敏原包括牛奶和奶酪（奶制品）、蛋、小麦、坚果（例如花生）、海产食品（例如贝类）、豌豆、豆和谷蛋白过敏原；普通的环境过敏原包括金属（镍和金）、化学试剂（甲醛、三硝基苯酚和松脂）、乳剂、橡胶、纤维（棉花或羊毛）、粗帆布、染发剂、化妆品、去污剂和香味过敏原；普通的药物过敏原包括局部麻醉剂和水杨酸盐过敏原；抗生素过敏原包括青霉素和磺胺类药物过敏原；和普通的昆虫过敏原包括蜜蜂、胡蜂和蚂蚁毒液、及蟑螂等器过敏原。特定特征的过敏原包括，但不限于 Der p1 过敏原 (Hoyne 等 (1994) *Immunology* 83:190-195)，蜜蜂毒液磷脂酶 A2 (PLA) (Akdis 等 (1996) *J. Clin. Invest.* 98:1676-1683)，桦树花粉过敏原 Bet v 1 (Bauer 等 (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107:536-541) 和多抗原表位重组草过敏原 rKBG8.3 (Cao 等 (1997) *Immunology* 90:46-51) 的主要和隐含的抗原表位。可购买得到这些和其它适合的过敏原，和/或根据已知技术易制备作为提取物的这些和其它适合的过敏原。

在一些其它实施方式中，目的抗原可以是肿瘤特异性抗原。对于本发明目的而言，肿瘤特异性抗原包括，但不限于各种 MAGEs (黑色素瘤相关抗原 E)，包括 MAGE 1、MAGE 2、MAGE 3 (HLA-A1 肽)、MAGE 4 等的任何一种；各种酪氨酸酶 (HLA-A2 肽)；突变的 ras；突变的 p53；和 p97 黑色素瘤抗原中任何一种；其它肿瘤特异性抗原包括与晚期癌症相关 Ras 肽和 p53 肽、与宫颈癌相关的 HPV 16/18 和 E6/E7 抗原、与乳腺癌相关的 MUC1-KLH 抗原、与结肠直肠癌相关的 CEA (癌胚抗原)，与黑色素肿瘤

相关的 gp100 或 MART1 抗原、及与前列腺癌相关的 PSA 抗原。*p53* 基因序列是已知的（参见，例如，Harris 等（1986）*Mol. Cell. Biol.* 6:4650-4656），并且存储在 GenBank 中，登记号为：M14694。因此，可以用本发明佐剂组合物进行治疗宫颈、乳腺、结肠直肠、前列腺、肺癌和黑色素瘤的免疫治疗方法。

可以用本领域技术人员已知的各种方法获得或产生本发明所用抗原。具体地，用标准纯化技术，可以直接从天然来源分离抗原。作为替代方案，可以用已知技术重组产生抗原。参见，例如 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II 和 III, 第二版（1989）；DNA Cloning, Vols. I 和 II (D.N. Glover ed. 1985)。也可以根据所述的氨基酸序列，通过化学多聚体合成，如固相肽合成来合成本文所用抗原。这些方法对本领域技术人员是已知的。参见，对于固相肽合成技术，例如，J.M. Stewart 和 J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第二版, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) 和 G. Barany 和 R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, 编者 E. Gross 和 J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), 3-254 页；和对于经典溶液合成，M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin (1984) 及 E. Gross 和 J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, 上文, Vol. 1。

如果期望，可以用重组方法，例如通过从表达基因的细胞筛选 cDNA 和基因组文库，或通过从已知包含该多核苷酸序列的载体中取得基因，获得编码上述抗原的多核苷酸序列。而且，用标准技术，如苯酚提取和 cDNA 或基因组 DNA PCR，可以直接从含有该多核苷酸序列的细胞和组织中分离期望的基因。参见，例如 Sambrook 等, 上文，用于获得和分离 DNA 技术的描述。也可以合成，而不是克隆产生多核苷酸序列。

在这些组合物中，其中将通过编码目的抗原的核酸序列的方式提供抗原成分，选定抗原的编码序列可以与一个或两个 ADP-核糖基化外毒素亚基肽的编码序列连接以提供带有所有三个编码序列的单一构建体，可

以与毒素亚基的仅一个编码序列连接以提供，例如两个质粒组合物，或提供在来自于带有毒素亚基编码序列的单一构建体或多构建体的分离构建体中。在上述情况的每一种中，抗原可以可操作地被连接，并且在相同或不同控制元件，例如启动子和增强子的转录控制下。在这些构建体中，其中单一控制元件用于引导两个或多个编码序列的转录，可以利用内部核糖体进入序列（IRES）促进多序列的转录。

多核苷酸的施用

可以通过任何合适的方法施用本文所述的多核苷酸（含有选定 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列的核酸分子）。在优选的实施方式中，如下文所述，通过包被含有目的 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列（并且，在一些实施方式中，是在相同或不同构建体中的目的抗原的编码序列）的一个或多个适合构建体（例如，一个或多个 DNA 质粒构建体）到核心载体粒子上，然后给个体或细胞施用包被的粒子。然而，也可以用病毒载体或用非病毒系统，例如裸核酸递送，递送本发明多核苷酸。

病毒载体

大量基于病毒的系统已用于基因递送。例如，逆转录病毒是已知的，并且通常利用具有整合缺陷原病毒（辅助病毒）的包装系，该缺陷原病毒（辅助病毒）表达所有的病毒基因，但是由于包装信号，已知为 *pis* 序列的缺失，不能包装其自身基因组。因此，细胞系产生了空病毒外壳。可以由包装系得到生产系，生产系中除了辅助病毒外，还含有病毒载体，该病毒载体含有在病毒复制和包装中所需的顺式（*in cis*）序列，即已知的长末端重复（LTRs）。目的多核苷酸分子可以插入载体中，在逆转录病毒辅助病毒合成的病毒外壳中包装。然后可以分离重组病毒，及递送给个体重组病毒。（参见，例如，美国专利号：5,219,740）。代表性的逆转录病毒载体包括但不限于，载体例如，如美国专利号：5,219,740 所述 LHL, N2, LNSAL, LSHL 和 LHL2 载体，本文整体并入这篇文献为参考文献，及这些载体的衍生物，如本文所述的修饰的 N2 载体。可以用本领域熟知技术构建逆转录病毒载体。参见，例如美国专利号：5,219,740；Mann 等

(1983) *Cell* 33:153-159。

已研究开发了用于基因递送的基于腺病毒的系统，该系统适合递送本文所述的核酸分子。人腺病毒是通过受体介导的胞吞作用进入细胞的双链 DNA 病毒。这些病毒特别适于基因转移，因为它们容易生长和操作，而且它们显示了在体内和体外广泛的宿主范围。例如，腺病毒能感染造血的、淋巴样和骨髓来源的人细胞。而且，腺病毒感染静止和复制的靶细胞。不同于整合进宿主基因组的逆转录病毒，腺病毒持续存在于染色体外，因此使与插入诱变有关的风险最小化。病毒容易高效价产生，而且是稳定的，因此可以纯化和贮藏。即使是在有能力复制的形式中，腺病毒仅仅引起低水平的发病率，并且与人恶性肿瘤无关。因此，已开发研究出利用这些优点的腺病毒载体。腺病毒载体的描述和它们的应用参见，例如 Haj-Ahmad 和 Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett 等 (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder 等 (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth 等 (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr 等 (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K.L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; Rich 等 (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476。

腺相关病毒载体 (AAV) 也可用于施用本文所述的多核苷酸。在这方面，AAV 载体可以来源于任何 AAV 血清型，包括但不限于 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 等。AAV 载体可以有一个或多个整体或部分缺失的 AAV 野生型基因，优选 *rep* 和/或 *cap* 基因，但保留一个或多个功能的侧翼末端反向重复 (ITR) 序列。通常认为功能 ITR 序列对 AAV 病毒粒子的拯救、复制和包装是必需的。因此，AAV 载体包含至少在病毒复制和包装中所需的那些顺式 (*in cis*) 序列 (例如，功能 ITR)。只要 ITR 序列提供功能拯救、复制和包装，其不必是野生的核苷酸序列，而且可以通过核苷酸的插入，缺失和置换改变。

用已知技术构建 AAV 表达载体，其至少提供了在指导转录时可操作地连接的组分，控制元件包括转录起始区、目的 DNA 和转录终止区。选择在哺乳动物细胞中起作用的控制元件。由此产生的含有可操作地连接组分的构建体与功能 AAV ITR 序列连接 (5' 和 3')。可以用本领域熟知

技术设计适合的 AAV 构建体。参见，例如美国专利号：5,173,414 和 5,139,941；国际公布号：WO 92/01070 (1992 年 1 月 23 日公开)和 WO 93/03769 (1993 年 3 月 4 日公开)；Lebkowski 等 (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996；Vincent 等 (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory 出版社)；Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539；Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129；Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801；Shelling 和 Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169；和 Zhou 等 (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875。

常规药物制剂

可以用本领域技术人员易得的所有标准制药剂型化学和方法学完成包含本发明多核苷酸分子，有或无抗原组合物添加的制剂剂型。例如，含有一个或多个适合载体的组合物可以与一个或多个药学上可接受的赋形剂或载体联合以提供液体制剂。

可以在赋形剂或载体中存在辅助物质，如湿润或乳化剂、pH 缓冲物质等等。这些赋形剂、载体和辅助物质是普通的药学试剂，其本身在接受组合物的个体中不会诱导免疫应答，并且可以予以施用，而无过度的毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体，如水、盐水、聚乙烯二醇、透明质酸、甘油和乙醇。药学上可接受的盐也可以包含在其中，例如矿酸盐，如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等等；和有机酸盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等等。尽管不是必需，但也优选制剂含有起稳定剂作用的，特别是对如果将要包含在疫苗组合物中的肽、蛋白质或其它类似抗原分子起稳定剂作用的药学上可接受的赋形剂。作为适合载体对肽也起稳定剂作用的例子非限制性包括葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、肌醇、葡聚糖等的药学梯度。其它适合载体再一次非限制性包括淀粉、纤维素、磷酸钠或磷酸钙、柠檬酸、酒石酸、甘氨酸、高分子量的聚乙二醇(PEGs)，及其联合。在 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991)可得到药学可接受赋形剂、载体和辅助物质的详细讨论，本文并入其为参考文献。

组合物中也可以包含一些核酸摄取和/或表达的促进因子(“转染促进剂”),例如,促进因子如丁呱卡因(bupivacaine)、心脏毒素和蔗糖,和转染促进载体如常规用于递送核酸分子的脂质体或脂质制剂。阴离子和中性脂质体是广泛可得到的,用于递送核酸分子是熟知的(参见,例如 *Liposomes: A Practical Approach*, (1990) RPC New Ed., IRL Press)。阳离子脂质制剂也是熟知的用于核酸分子递送的载体。适合的脂质制剂包括可购得的商品名为 Lipofectin™ 的 DOTMA(N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-氯化三甲铵),和 DOTAP(1,2-二油酰氧-3-(三甲铵)丙烷),参见,例如 Felgner 等 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416; Malone 等 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081; 美国专利号: 5,283,185 和 5,527,928, 和国际公布号: WO 90/11092, WO 91/15501 和 WO 95/26356。这些阳离子脂质可以优选与中性脂质,例如 DOPE(二油酰磷脂酰乙醇胺)联合使用。可以添加到上述脂质或脂质体中的进一步的转染促进组合物包括精胺衍生物(参见,例如国际公布号: WO 93/18759)和细胞膜通透化合物如 GALA、短杆菌肽 S 和阳离子胆汁盐(参见,例如国际公布号: WO 93/19768)。

作为替代方案,本发明核酸分子可被包被、吸附或连接粒子载体。适合的粒子载体包括来源于聚甲基甲基丙烯酸酯多聚体的粒子载体,和来源于聚丙交酯和聚(丙交酯-co-聚乙交酯)的 PLG 微粒,参见,例如 Jeffery 等 (1993) *Pharm. Res.* 10:362-368。也可以利用其它的粒子系统和多聚体,例如,多聚体如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺及这些分子的共轭物。

因此,所形成的组合物通常将包含一个或多个多核苷酸分子(例如,质粒载体),该多核苷酸分子含有选定 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列,其量足以辅助抗共施用抗原的免疫学反应。本领域技术人员容易确定适合的有效量。该量将在通过常规试验测定的相对宽范围内。例如,用 0.1 μg 这样少量的 DNA 可以获得适合的佐剂效果,而在其它施用中,可以使用达 0.2mg 的 DNA。通常期望含有目的 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列的多核苷酸的有效剂量范围将在约 1 μg 到 1000 μg 内,但是,

发现这个剂量以上和以下也是有效的。因此，组合物可以包含从约 0.1 %到约 99.9%的多核苷酸分子。

常规药物制剂的施用

可以通过在整个疗程中连续或间断的一个剂量完成上述药物制剂的施用，即，一旦适合地制备了本发明的组合物，可以用各种已知的途径和技术给个体体内施用它。例如，液体制剂可以作为可注射的溶液、悬浮液或乳液提供，用常规注射针和注射器，通过不经肠道的、皮下、皮内、肌肉内、静脉内注射，或液体喷射注射系统施用。也可以给皮肤或粘膜组织局部施用液体制剂，或提供为适于呼吸器官或肺施用的极细分割的喷雾。其它施用方式包括口服施用、栓剂和主动或被动经皮递送技术。

作为替代方案，可以离体施用组合物，例如转化细胞递送和重新植入受体是已知的（例如，葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、电穿孔和直接微注射入核）。然而，通过常规注射针和注射器用于含有粒子组合物的液体组合物和液体悬浮液的递送是最经常的递送。测定最有效施用方法和剂量的方法是本领域技术人员已知的，而且将随着递送载体、治疗组合物、靶细胞和被治疗的个体而变化。由主治医师选的剂量水平和方式可以进行单一或多次施用。应该理解单多核苷酸载体构建体可以带有一个以上亚基编码区和/或抗原编码区。可选的方案，如本文所述，也可以递送给个体表达来源于任何病原体的一个或多个毒素亚基肽和/或抗原的每个单独载体（例如，病毒载体、质粒或其任何联合）。

而且，也希望本发明方法递送的多核苷酸可以与其它适合的组合物和治疗联合。例如，为了进一步增强个体的免疫应答，本文所述的组合物和方法可以与辅助物质（例如，其它佐剂），如药理学因子、细胞因子或类似物的递送联合。可以在本文所述多核苷酸分子施用同时，前或后施用辅助物质，例如蛋白质或其它大分子。用本领域技术人员已知的方法，核酸分子组合物也可以给个体直接施用，或可选方法，离体递送给来自个体的细胞。

包被的粒子

在一个实施方式中，用载体粒子递送含有选定 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列的多核苷酸构建体，和其它辅助成分（如一个或多个抗原编码序列）。用于施用该核酸制剂的粒子介导的递送方法是本领域已知的。因此，一旦制备和适合地纯化出上述质粒载体构建体，其就可以用各种已知技术包被到载体粒子（例如，核心载体）上。载体粒子选自在粒子大小范围内有适合密度的材料，该粒子大小通常来自于适合的粒子递送装置的细胞内递送。当然，最佳载体粒子大小将取决于靶细胞的直径。

对于本发明的目的，可以用钨、金、铂和铱核心载体粒子。优选钨和金粒子。容易得到平均直径大小为 0.5 到 2.0 μm 的钨粒子。尽管该粒子对粒子递送方法有用的最佳密度，而且允许 DNA 高效包被，但是钨对一些细胞型有潜在的毒性。因此，也将发现金粒子和微晶体金（例如，金粉 A1570, 可购自 Engelhard Corp., East Newark, NJ）在本发明中的应用。金粒子具有一致的大小（1-3 μm 大小的粒子可购自 Alpha Chemicals 或包括 0.95 μm 大小的粒子可购自 Degussa, South Plainfield, NJ）和减少的毒性。

用于在金或钨粒子上包被或沉淀 DNA 或 RNA 的许多方法是已知的，而且已描述了这些方法。大多数这样的方法通常混合预先测定量的金或钨与质粒 DNA、 CaCl_2 和亚精胺。在包被过程期间持续涡旋由此得到的溶液以确保反应混合物的均匀性。核酸沉淀后，包被的粒子可以转移到适合的膜上，使用前允许干燥，包被在样品组件或盒子表面，或装载到递送盒子中以用于适合粒子递送装置。

肽抗原也可以包被在相同或相似的核心载体粒子上。例如，通过以经验确定比率简单混合两组分，通过本领域技术人员熟悉的硫酸铵沉淀或其它溶剂沉淀方法，或通过肽与载体粒子的化学偶合，肽可以与载体粒子连接。以前描述过 L-半胱氨酸残基与金的偶合（Brown 等, *Chemical Society Reviews* 9:271-311 (1980)）。其它的方法将包括，例如，在纯乙醇、水、或醇/水混合物中溶解肽，该溶液加到一定量的载体粒子中，然后在空气或氮气流中干燥混合物，同时涡旋。可替代的方案，通过真

空离心，抗原可以干燥于载体粒子上。一旦包被的粒子被干燥，其就可以在适合的溶剂（例如乙酸乙酯或丙酮）中重悬浮、粉碎（例如，通过超声）以提供基本均匀的悬浮液。然后用抗原包被的核心载体粒子可以与带有 ADP-核糖基化外毒素亚基肽构建体的核心载体粒子结合，并且在单粒子注射步骤中施用，或与毒素亚基组合物分开施用。

包被粒子的施用

在包被的核心载体粒子形成后，用粒子介导递送技术，递送给个体单独或与，如抗原制剂联合的本发明核酸制剂包被的核心载体粒子。

适合于粒子介导递送技术的各种粒子递送装置是本领域已知的，而且它们都适于用在本发明的实践中。目前的装置设计利用爆发的、电或气发射以驱使包被的核心载体粒子朝向靶细胞。包被的粒子本身可释放地与可移动的载片连接，或可移去地与气流通过的表面连接，从表面抬高粒子，朝向靶细胞加速它们。在美国专利号：5,204,253 中描述了气发射装置的例子。在美国专利号：4,945,050 中描述了爆发型装置。在美国专利号：5,120,657 中描述了电发射型粒子加速装置的一个例子。在美国专利号：5,149,655 中描述了适于本文的另一个电发射装置。本文，整体并入所有这些专利的公开为参考文献。

以与剂量剂型一致的方式及将有效引起期望佐剂效果/免疫应答的量给待治疗个体施用包被的粒子。所递送组合物的量，在核酸分子的情况下，通常是每剂量 0.001 到 1000 μg ，更通常是 0.01 到 10.0 μg 的核酸分子，而且在肽或蛋白质分子的情况下是 1 μg 到 5 μg ，更通常是 1 到 50 μg 肽，取决于待治疗个体。根据免疫个体的年龄和总体情况，选择的特定核苷酸序列或肽，及其它因素，必需的精确的量将变化。依据阅读本发明的说明书，本领域技术人员可以容易地确定适合的有效量。

粒子组合物

作为替代方案，带有选定 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列的多核苷酸，和一个或多个选定抗原部分可以形成粒子组合物。更具体地，可以用本领域技术人员容易获得的所有标准制药剂型化学和方法学制备包含一个或多个多核苷酸分子的粒子制剂。例如，一个或多个载体构建

体和/或抗原成分可以与一个或多个药学可接受赋形剂或载体混合以提供疫苗组合物。辅助物质，如湿润或乳化剂、pH 缓冲物质等可以在赋形剂或载体中存在。这些赋形剂、载体和辅助物质是普通的药学试剂，其本身在接受组合物的个体中不会诱导免疫应答，并且可以予以施用，而无过度的毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体，如水、盐水、聚乙烯二醇、透明质酸、甘油和乙醇。药学上可接受的盐也可以包含在其中，例如矿酸盐，如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等等；和有机酸盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等等。尽管不是必需，但也优选核酸组合物含有起稳定剂作用的，特别是对肽、蛋白质或其它类似抗原或辅助物质起稳定剂作用的药学上可接受的载体。适合载体对肽也起稳定剂作用的例子非限制性包括葡萄糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、肌醇、葡聚糖等的药学梯度。其它适合载体再一次非限制性包括淀粉、纤维素、磷酸钠或磷酸钙、柠檬酸、酒石酸、甘氨酸、高分子量的聚乙二醇（PEGs）、及其联合。在 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)可得到药学可接受赋形剂、载体和其它辅助物质的详细讨论，本文并入其为参考文献。

所形成的组合物将包含编码毒素亚基肽的多核苷酸，其含量足以提供抗共施用抗原的期望佐剂效果，如上所述。本领域技术人员可以容易测定适合有效的含量。该含量将在相对宽的范围内，通常在约 0.001 μ g 到 25mg 或更多的目的核酸构建体范围内，而且可以通过常规试验测定特定合适的含量。组合物可以含有约 0.1%到约 99.9%的核酸分子。如果组合物中包含抗原成分，或方法用于提供粒子抗原组合物，那么抗原如上所述抗原将以适合的含量存在。然后用标准技术，如通过简单蒸发（空气干燥）、真空干燥、喷雾干燥、冷冻干燥（冻干法）、喷雾-冷冻干燥、喷雾包被、沉淀、超临界液体粒子形成等制备组合物成为粒子。如果期望，得到的粒子可以用在共有国际公布号：WO 97/48485 中所述技术浓缩。

单独的单位剂量或多剂量容器，其中在使用前可以包装粒子，可以包括装有适合量粒子的密封容器，所述粒子含有适合核酸构建体和/或选定抗原（例如，提供多成分疫苗组合物）。粒子组合物可以作为无菌制剂

包装，因此可以设计密封容器以保持制剂在本发明方法中使用前是无菌的。如果期望，可以改造容器以适于在粒子递送装置中直接应用。这样的容器可以为胶囊、箔袋、小袋、盒子等形式。本文描述了适合的粒子递送装置（例如，无针注射器）。

进一步，可以标记装有粒子的容器以识别组合物和提供相关的剂量信息。此外，可以用政府机构，例如食品和药品管理机构规定形式的公示标记容器，其中公示表明联邦法律机构许可包含在其中的人用佐剂、抗原（或疫苗组合物）的制造、使用或销售。

然后可以用经皮递送技术施用粒子组合物。优选地，通过粉末注射方法，例如，通过如在共有国际公布号：W0 94/24263, W0 96/04947, W0 96/12513, 和 W0 96/20022 所述无针注射器系统递送粒子组合物，在本文并入所有这些文献为参考文献。通常使用具有近似大小的粒子，通常范围是 0.1 到 250 μm ，优选范围是约 10-70 μm 的粒子进行该无针注射器系统的粒子递送。也可以从粒子递送装置递送大于约 250 μm 的粒子，作为粒子大小的上限点将引起皮肤细胞的不适当的损坏。递送粒子穿透靶表面的实际距离取决于粒子大小（例如，假设接近球形粒子几何学的标称粒子直径）、粒子密度、粒子撞击表面的起始速率、和靶细胞组织的密度和运动学的粘性。在这方面，用于无针注射的最佳粒子密度通常范围在约 0.1 到 25g/cm³ 之间，优选在约 0.9 到 1.5g/cm³ 之间，注射速率通常在约 100 和 3,000 m/sec 之间的范围，或更大。用合适的气压，可以通过喷嘴以接近驱动气体流动超声速度的速率加速有 10-70 μm 平均直径的粒子。

通过上述粒子递送装置，可以递送含有本文所述粉末分子治疗有效量的组合物给任何适合的靶组织。例如，可以递送组合物给肌肉、皮肤、脑、肺、肝、脾脏、骨髓、胸腺、心脏、淋巴、血液、骨骼软骨、胰腺、肾、胆囊、胃、肠、睾丸、卵巢、子宫、直肠、神经系统、眼睛、腺和结缔组织。对于核酸分子，优选递送给分子表达的末端分化细胞；然而，也可以递送分子给非分化或部分分化的细胞，如血液干细胞和皮肤成纤维细胞。

如果期望，可以提供预先加载状况的这些无针注射器系统，其含有适合剂量的粒子，该粒子含有目的 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列。可以在密封的容器中包装加载的注射器，可以如上所述进一步标记。

因此，本方法可以用于获得大小范围为约 $10\ \mu\text{m}$ 到 $250\ \mu\text{m}$ ，优选约 $10\ \mu\text{m}$ 到约 $150\ \mu\text{m}$ ，最优选约 $20\ \mu\text{m}$ 到 $60\ \mu\text{m}$ 的核酸粒子；而且粒子密度范围约从 0.1 到约 $25\text{g}/\text{cm}^3$ ，约 $0.5\text{g}/\text{cm}^3$ 到约 $3.0\text{g}/\text{cm}^3$ 或更大的体积密度。

类似地，可以获得大小范围为约 $0.1\ \mu\text{m}$ 到 $250\ \mu\text{m}$ ，优选约 $0.1\ \mu\text{m}$ 到约 $150\ \mu\text{m}$ ，最优选约 $20\ \mu\text{m}$ 到 $60\ \mu\text{m}$ ；粒子密度范围约从 $0.1\text{g}/\text{cm}^3$ 到约 $25\text{g}/\text{cm}^3$ ，优选约 0.5 到约 $3.0\text{g}/\text{cm}^3$ ，最优选约 $0.8\text{g}/\text{cm}^3$ 到约 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ 体积密度的选定抗原粒子。

增强免疫应答

在本发明另一个实施方式中，提供了用于增强抗目的共施用抗原免疫应答的方法。本质上，该方法需要：(a) 给个体施用目的抗原，(b) 提供本发明佐剂组合物，其中所述组合物包含一个或多个含有选定 ADP-核糖基化外毒素亚基肽编码序列的核酸分子，和 (c) 给个体共施用佐剂组合物，因此毒素亚基肽从它们各自编码序列表达，其量足以诱导增强的抗共施用抗原免疫应答。如上文所详述，编码序列可操作地与相同或不同调节序列连接以提供一个或多个表达盒子。然后在适合载体，例如质粒载体构建体或病毒载体中提供这些表达盒子。

在一方面，该方法需要用本领域已知的标准基因递送技术给个体施用多核苷酸组合物。参见，例如美国专利号：5,399,346，5,580,859，5,589,466。通常，多核苷酸疫苗组合物与药学可接受赋形剂或载体混合以提供液体制剂（如上文所述），然后作为可注射溶液、悬浮液或乳剂用于利用常规注射针和注射器，或液体喷射注射系统通过不经肠道的、皮下、皮内、肌肉内、静脉内注射施用。优选给个体的皮肤或粘膜组织施用组合物，也可以给皮肤或粘膜组织局部施用液体制剂，或提供为适于呼吸器官或肺施用的极细分割的喷雾。其它施用方式包括口服施用、栓剂和主动或被动经皮递送技术。作为替代方案，多核苷酸组合物可以离

体递送给来自个体的细胞，随后细胞重新植入个体。一旦引入个体，就表达核酸序列以在原位提供 ADP-核糖基化外毒素亚基肽，其量足以增强接种个体抗共施用抗原的免疫应答。这个增强的免疫应答以提高的体液（抗体）应答，提高的细胞（CTL）应答为特征，或以提高的抗共施用抗原的体液和细胞应答为特征。

在一些优选实施方式中，增强的免疫应答是以增加的抗共施用抗原的 Th1 样（细胞的）免疫应答，而不是 Th2 样应答为特征。在这方面，可以通过下面的一个或多个证明增加的 Th1 样免疫应答是符合要求的：增加的产生干扰素 γ 的 CD4⁺辅助细胞 T 淋巴细胞和/或 CD8⁺CTLs 效价；增加的抗原特异性 CTL 活性；增加的通常与细胞免疫有关（例如，IgG2a）亚类抗原特异性抗体效价。

优选以粒子形式递送本发明多核苷酸佐剂组合物。例如，用上文详细描述粒子递送装置可以施用组合物。在一些实施方式中，用本领域已知的各种技术可以在核心载体粒子上包被多核苷酸组合物并利用粒子介导方法递送。载体粒子选自在粒子大小范围内适合密度的材料，该粒子大小通常用来自于粒子递送装置的细胞内递送。当然，最佳载体粒子大小将取决于靶细胞的直径。

可选地，通过给个体共施用额外或辅助成分，可以修改这些方法。例如可以施用次级疫苗组合物，其中次级组合物可以包含核酸疫苗，或次级疫苗组合物可以包含常规疫苗，如整体病毒、分裂病毒或亚基疫苗。次级疫苗组合物可以与多核苷酸 ADP-核糖基外毒素亚基肽组合物混合以形成单独组合物，或次级疫苗组合物可以或共同、顺序地给相同或不同位点单独施用，或通过一段明显的时间分开次级疫苗组合物，如施用最初组合物后一些天的加强步骤中施用。

如上述，可以用常规注射器或用粒子介导递送系统，通过注射施用次级疫苗组合物和/或其它辅助成分，也是如上所述。通常是皮下、表皮、皮内、粘膜内（例如，鼻、直肠和/或阴道）、腹膜内、静脉内、口或肌肉内施用。其它施用方式包括局部、口和肺施用、栓剂和经皮应用。剂量治疗可以是单剂量程序表或多剂量程序表。

实施例

下面是实施本方面特定实施方式的实施例。提供实施例仅是为了示例目的，并不意味着以任何方式限定本发明的范围。

尽管已努力确保所用数字（例如，量、温度等）的精确性，但是一些实验误差和偏差当然应该是允许的。

实施例 1

编码 CT 的 A 和 B 亚基表达载体的研究

用霍乱弧菌基因组 DNA 作为聚合酶链式反应（PCR）模板以产生含有霍乱毒素（CT）A 和 B 亚基编码序列的 DNA 片段。为了产生 A 亚基编码片段（CTA）的 PCR，用下面两个寡脱氧核糖核苷酸引物：

引物 1：5' — GGA GCT AGC AAT GAT GAT AAG TTA TAT CGG —3' (SEQ ID NO:7)；和

引物 2：5' — CCT GGA TCC TCA TAA TTC ATC CTT AAT TCT —3' (SEQ ID NO:8)。

为了有利于插入表达载体，引物 1 和 2 的 5' -末端含有附加序列(CTA 编码序列同源区以外)，该序列分别包含 *NheI* 和 *BamHI* 的识别位点。设计引物 1 和 2 以引起起始于核苷酸位置 164，终止于核苷酸位置 886 的 A 亚基编码序列 PCR 片段（GenBank 登记号：#D30053）的产生。这个区域包含成熟亚基 A 肽完整编码序列，但不包含在前体亚基 A 肽氨基末端发现的编码细菌信号肽的序列。

为了产生 B 亚基编码片段（CTB）的 PCR，用下面两个寡脱氧核糖核苷酸引物：

引物 3：5' — GGA GCT AGC ACA CCT CAA AAT ATT ACT GAT —3' (SEQ ID NO:9)；和

引物 4：5' — CCT GGA TCC TTA ATT TGC CAT ACT AAT TGC —3' (SEQ ID NO:10)。

为了有利于插入表达载体,引物3和4的5'-末端含有附加序列(CTB编码序列同源区域以外),该序列分别包含 *NheI* 和 *BamHI* 的识别位点。设计引物3和4以引起起始于核苷酸位置946,终止于核苷酸位置1257的B亚基编码序列PCR片段(GenBank 登记号: #D30053)的产生。这个区域包含成熟亚基B肽完整编码序列,但不包含在前体亚基B肽氨基末端发现的编码细菌信号肽的序列。

除了上述两个PCR反应外,进行第三个PCR反应以产生修饰形式的CT亚基A编码序列,其中除去了其C-末端四个氨基酸KDEL基序。这个反应包括应用引物1(SEQ ID NO:7)和下面引物:

引物5: 5' — CCT GGA TCC TCA AAT TCT ATT ATG TGT ATC — 3' (SEQ ID NO:11)。

用Pfu Turbo DNA聚合酶(购自Stratagene, La Jolla, CA)和生产商提供的PCR反应缓冲液进行所有PCR反应。PCR条件如下: 95°C, 2分钟; 30个循环(95°C, 1分钟; 55°C, 2分钟15秒; 72°C, 1分钟。), 72°C, 5分钟, 和4°C放置。

PCR反应完成后,用*NheI*和*BamHI*酶消化新合成片段以产生粘性末端,在*NheI*和*BamHI*切割的pWRG7054表达载体中插入每个片段,产生下面的克隆:pPJV2002、pPJV2003和pPJV2006,它们分别编码CTA、CTB和修饰的CTA(减去KDEL)。亲本克隆载体pWRG7054含有人巨细胞病毒立即早期启动子和相关内含子A序列。此外,在pWRG7054中包含人组织纤蛋白溶酶原激活物信号肽的编码序列以允许从哺乳动物细胞分泌任何蛋白质,其编码序列插入适合可读框的*NheI*位点。(参见,例如,Chapman等(1991) *Nuc. Acids Res.* 19:3979-3986,和Burke等(1986) *J. Biol. Chem.* 261:12574-12578)。

在图1, 2, 和3中分别描述了质粒pPJV2002、pPJV2003和pPJV2006的限制图谱和全序列。

实施例2

编码大肠杆菌热不稳定肠毒素A和B亚基表达载体的研究

用大肠杆菌株系 E078:H11(美国典型培养物保藏中心, ATCC, #35401) 基因组 DNA 作为聚合酶链式反应 (PCR) 的模板以产生含有热不稳定肠毒素 (LT) A 和 B 亚基编码序列的 DNA 片段。为了产生 A 亚基编码片段的 PCR, 用下面两个寡脱氧核糖核苷酸引物:

引物 6: 5' — GGA GCT AGC AAT GGC GAC AAA TTA TAC CGT —3' (SEQ ID NO:12); 和

引物 7: 5' — CCT GGA TCC TCA TAA TTC ATC CCG AAT TCT —3' (SEQ ID NO:13)。

为了有利于插入表达载体, 引物 6 和 7 的 5' -末端含有额外序列(LTA 编码序列同源区域以外), 该序列分别包含 *NheI* 和 *BamHI* 的识别位点。设计引物 6 和 7 以引起起始于核苷酸位置 145, 终止于核苷酸位置 867 的 A 亚基编码序列 PCR 片段 (GenBank 登记号: #AB011677) 的产生。这个区域包含成熟亚基 A 肽完整编码序列, 但不包含在前体亚基 A 肽氨基末端发现的编码细菌信号肽的序列。

为了产生 B 亚基编码片段 (CTB) 的 PCR, 用下面两个寡脱氧核糖核苷酸引物:

引物 8: 5' — GGA GCT AGC GCT CCC CAG TCT ATT ACA GAA —3' (SEQ ID NO:14); 和

引物 9: 5' — CCT GGA TCC CTA GTT TTC CAT ACT GAT TGC —3' (SEQ ID NO:15)。

为了有利于插入表达载体, 引物 8 和 9 的 5' -末端含有额外序列(LTB 编码序列同源区域以外), 该序列分别包含 *NheI* 和 *BamHI* 的识别位点。设计引物 8 和 9 以引起起始于核苷酸位置 927, 终止于核苷酸位置 1238 的 B 亚基编码序列 PCR 片段的产生, 在 GenBank 数据库发现这个片段 (登记号: #AB011677)。这个区域包含成熟亚基 B 肽完整编码序列, 但不包含在前体亚基 B 肽氨基末端发现的编码细菌信号肽的序列。

除了上述两个 PCR 反应外, 进行第三个 PCR 反应以产生修饰形式的 LT 亚基 A 编码序列, 其中除去了其 C-末端四个氨基酸 RDEL 基序。这个反应包括应用引物 6 (SEQ ID NO:12) 和下面引物:

引物 10: 5' — CCT GGA TCC TCA AAT TCT GTT ATA TAT GTC —3' (SEQ ID NO:16)。

用 Pfu Turbo DNA 聚合酶(购自 Strategene, La Jolla, CA)和生产商提供的 PCR 反应缓冲液进行所有 PCR 反应。PCR 条件如下: 95℃, 2 分钟; 30 个循环 (95℃, 1 分钟; 55℃, 2 分钟 15 秒; 72℃, 1 分钟。), 72℃, 5 分钟, 和 4℃放置。

PCR 反应完成后, 用 *NheI* 和 *BamHI* 酶消化新合成片段以产生粘性末端, 在 *NheI* 和 *BamHI* 切割的 pWRG7054 表达载体中插入每个片段, 产生克隆: pPJV2004, pPJV2005 和 pPJV2007, 它们分别编码 LTA、LTB 和修饰的 LTA(减去 RDEL)。

在图 4、5 和 6 中分别显示了质粒 pPJV2004、pPJV2005 和 pPJV2007 的限制图谱和全序列。

实施例 3

对利用编码 CTA 和/或 CTB 质粒载体 DNA 疫苗的抗原特异性抗体应答的增加

利用编码甲型流感病毒 M2 蛋白质的 DNA 疫苗载体检测 pPJV2002, pPJV2003 和 pPJV2006 佐剂载体在上下文粒子介导的 DNA 接种中的佐剂效果。通过在显微可见金粒子上沉淀有/无各种 pPJV2002、pPJV2003 和 pPJV2006 佐剂载体混合的 M2 DNA 疫苗载体, 用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置(PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI)加速包被的金粒子进入小鼠表皮, 进行粒子介导的 DNA 接种。

更具体地, 用流感病毒株系 A/Kagoshima/10/95 (H3N2)的 RNA 片段 #7(其编码 M2 蛋白质)作为设计 PCR 引物的模型以有利于 A/Sydney/5/97 (H3N2)成熟 M2 编码序列的克隆。因为 A/Sydney 的 RNA 片段 #7 序列还没有确定, 所以用 A/Kagoshima 序列设计引物。预测 M2 序列中高度保守以有利于应用从不同病毒株系设计的引物。

因为 M2 是从剪接 RNA 翻译的, 所以认为剪除了片段 7 RNA 编码区的核苷酸位置 27 到 714 是必要的。因此, 产生和设计一套 PCR 引物以产生

完整 M2 编码序列，但是确保从由此得到的 M2 编码序列克隆中完全除去内含子序列。用于产生全长 M2 编码序列克隆的 PCR 引物如下：

引物 11：5'—CCC AAG CTT CCA CCA TGA GCC TTC TAA CCG AGG TCG AAA CAC CTA TCA GAA ACG AAT GGG AGT GC—3' (SEQ ID NO:17)；和

引物 12：5'—CCC GGA TCC TTA CTC CAG CTC TAT GCT G—3' (SEQ ID NO:18)。

引物 11 (SEQ ID NO:17) 5' -末端含有附加序列，其包含 *Hind*III 的识别位点和有助于 mRNA 翻译起始的 Kozak 共有序列。引物 12 (SEQ ID NO:18) 5' -末端也含有附加序列，其包含 *Bam*HI 的识别位点。

从在含胚鸡蛋中生长的 A/Sydney/5/97 (H3N2) 样品分离病毒 RNA。所用的病毒 RNA 分离方法标准技术是本领域技术人员已知的。用从 Stratagene (La Jolla, CA) 得到的 RT-PCR 试剂盒，在反转录酶/聚合酶链式反应 (RT-PCR) 中使用该病毒的 RNA。通过加 5.9 μ l 无 RNA 酶的水到反应试管中完成 RT 反应的步骤。向试管加入试剂盒中的 1.0 μ l 10X MMLV-RT 缓冲液和 1.0 μ l dNTP 混合物。还加入 1 μ l A/Sydney/5/97 RNA 和 0.6 μ l (0.6 μ g) 引物 11 (SEQ ID NO:17)。加热反应到 65°C，5 分钟以变性 RNA，随后加入 0.5 μ l 试剂盒中的反转录酶。在 37°C，温育反应 15 分钟以完成反转录步骤。

通过向新反应试管中添加下面成分完成 PCR 反应步骤：40 μ l 水；试剂盒中的 5 μ l 10X 超级 (ultra) HF 缓冲液；试剂盒中的 1.0 μ l dNTP 混合物；1.0 μ l 引物 11 (SEQ ID NO:17) (1.0 μ g)；1.0 μ l 引物 12 (SEQ ID NO:18) (1.0 μ g)；1 μ l 上述反转录酶反应混合物；和试剂盒中的 1 μ l Turbo PFU 聚合酶。用下面的温育方案进行 PCR 反应：95°C，1 分钟；接着 30 个循环 (95°C，30 秒；46°C，30 秒；68°C，3 分钟)，随后 68°C，10 分钟。在 2% 琼脂糖凝胶上电泳 PCR 产物，显示了约 300bp 预期大小的单 DNA 带。

从凝胶上分离约 300bp 带，用 *Hind*III 和 *Bam*HI 消化以产生必需的粘性末端用于插入 pWRG7077 疫苗表达载体 (Schmaljohn 等 (1997) *J. Virol.* 71:9563-9569)。用 *Hind*III 部分消化，用 *Bam*HI 进行完全消化

pWRG7077 DNA 以利于 M2 编码插入的插入。要求载体部分 *Hind*III 消化是因为在该质粒卡那霉素抗性标记中存在第二个 *Hind*III 位点。由此得到的 M2 DNA 疫苗载体称为 pM2-FL。pM2-FL 载体含有人巨细胞病毒(hCMV)的立即早期启动子及其相关的内含子 A 序列以驱动 M2 编码序列的转录。该载体也包含牛生长激素基因的聚腺苷酸化序列。

然后在 2 微米金粒子上沉淀 pM2-FL 质粒为单一载体,或加佐剂载体样品成为混合载体(即,M2 质粒载与 pPJV2002、pPJV2003,和/或 pPJV2006 佐剂载体混合)。具体地,在含有 400 μ l 50 mM 亚精胺小离心管中,质粒 DNA (单一 M2 载体或添加有一个或多个佐剂载体的 M2 载体)与 2 微米金粒子(Degussa, Lot 65-0)混合。DNA 和金的比率在 2.5 微克 DNA/每毫克金到 4.0 微克 DNA/每毫克金之间变化,而且一批含有 26mg 金。当旋转混合器上的离心管不断搅拌期间,通过加 1/10 体积 10% CaCl_2 ,DNA 在金粒子上沉淀。用纯乙醇洗 DNA-金复合物 3 次,然后将其注射到管式旋转器包被机器(tube turner coating machine)(PowderJect Vaccines, Inc., Madison WI)的 TEFZEL®管(McMaster-Carr)中,其用金/DNA 复合物包被管内部。美国专利号:: 5,733,600 描述了这种管式旋转器机器 (tube turner machine)。也参见 PCT 专利申请号: PCT/US95/00780 和美国专利号:: 5,780,100; 5,865,796 和 5,584,807。完成包被过程后,将离心管切成适于装载到粒子递送装置的 0.5 英寸“筒”。

产生下面 DNA-金制剂用于小鼠 DNA 疫苗佐剂试验。

制剂#1: 单独的 pM2-FL DNA 载体, 2.5 微克 DNA/每毫克金, 0.5 毫克金/每筒;

制剂#2: 在第一批金(2 微克 pM2-FL DNA/每毫克金)上沉淀的 pM2-FL DNA 载体, 在第二批金(1.75 微克每种 DNA 佐剂载体/每毫克金)上其沉淀的 pPJV2002 和 pPJV2003 DNA 载体, 相等地混合两批金, 0.5 毫克金/每筒;

制剂#3: 在第一批金 (2 微克 pM2-FL DNA/每毫克金, pPJV2002 和 pPJV2003 各 1 微克/每毫克金)上共沉淀所有 pM2-FL DNA 载体、pPJV2002 和 pPJV2003 DNA 载体, 0.5 毫克金/每筒;

制剂#4: 在单独一批金 (2 微克 pM2-FL DNA/每毫克金, pPJV2006 和 pPJV2003 各 1 微克/每毫克金) 上共沉淀所有 pM2-FL DNA 载体、pPJV2006 和 pPJV2003 DNA 载体, 0.5 毫克金/每筒;

制剂#5: 在单独一批金 (2 微克 pM2-FL DNA/每毫克金, pPJV2002 DNA 各 1 微克/每毫克金) 上共沉淀 pM2-FL DNA 载体和 pPJV2002, 0.5 毫克金/每筒; 和

制剂#6: 在单独一批金 (2 微克 pM2-FL DNA/每毫克金, pPJV2003 DNA\1 微克/每毫克金) 上共沉淀 pM2-FL DNA 载体和 pPJV2003, 0.5 毫克金/每筒。

然后, 给如下 6 组鼠施用这些 DNA 疫苗。每个实验组包含 7 只动物, 每只动物接受单独制剂的两次免疫, 两次免疫间有 4 周休息期。每次免疫由给腹部表皮一前一后两次递送组成 (每次递送一个筒)。用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI), 在 400p. s. i. 氮压力,。初次免疫后 4 周 (刚好在加强免疫前) 和二次或加强免疫后 2 周收集血清样品。

用 ELISA 测定法测定每个血清样品的 M2 特异性抗体应答, 其中用由下面序列组成的 M2 合成肽预先包被 96 孔板: SLLTEVETPIRNEWECR (SEQ ID NO: 19)。用 M2 肽包被 ELISA 板, 4°C 过夜, 在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中肽浓度 1 μ g/ml。第二天, 用 5% PBS 中脱脂奶粉, 室温封闭板 1 小时。然后用冲洗缓冲液 (10 mM Tris 缓冲盐溶液, 0.1% Brij-35) 洗板三次。然后向孔中加稀释的血清样品, 在室温下, 温育板 2 小时。然后用冲洗缓冲液洗板三次。加入 100 μ l 的第二抗体, 室温下, 温育板 1 小时。第二抗体由羊抗-鼠 IgG (H+L) 生物素标记的抗体 (Southern Biotechnology) 组成, 其在 1% BSA/PBS/0.1% Tween-20 中以 1:8000 比率稀释。然后洗板三次, 加入在 PBS/0.1% Tween-20 中以 1:8000 稀释的链霉抗生物素蛋白素-辣根过氧化物酶共轭物 (Southern Biotechnology), 室温下, 温育板 1 小时。另外洗 3 次后, 加入 100 μ l TMB 底物 (Bio Rad, Hercules, CA), 室温下, 进行显色 30 分钟。通过加入 1N H₂SO₄ 终止显色, 在 450nm 读板。

通过鉴定血清最高稀释度检测终点稀释效价，该最高稀释度仍旧产生吸光度值，其是用非免疫对照样品获得的背景吸光度值的两倍。

在下表 1 中所示是每组中个体动物的终点抗体效价和每个实验组的几何平均效价。

表 1

制剂 #	个体效价	几何平均效价
1	24,300 24,300 72,900 218,700 218,700 218,700 218,700	99,781
2	72,900 72,900 218,700 218,700 218,700 218,700 656,100	186,934
3	24,300 72,900 72,900 218,700 656,100 656,100 656,100	186,934
4	24,300 218,700 656,100 656,100 656,100 656,100 656,100 656,100	350,211
5	----* 72,900 218,700 218,700 218,700	262,645

制剂 #	个体效价	几何平均效价
	656, 100 656, 100	
6	24, 300 72, 900 218, 700 218, 700 1, 968, 300 1, 968, 300 5, 904, 900	409, 722

*(已死亡)

如所观察，与仅用 M2 载体（制剂#1）免疫的对照动物比较，用含有一个或多个 CT 编码佐剂载体（制剂#2-6）免疫的所有实验组在加强免疫后都显示了增加的几何平均效价。

实施例 4

用编码 CT-A 和 CT-B 亚基肽佐剂质粒载体，对编码乙型肝炎表面抗原（HBsAg）DNA 疫苗的抗原特异性细胞应答的增加

如下构建乙型肝炎表面抗原（HBsAg）载体质粒。为了产生 HbsAg 编码序列，用 *NcoI* 切割 pAM6 构建体（得自美国典型培养物保藏中心“ATCC”得到），用绿豆核酸酶处理以除去 X-抗原起始密码子。然后用 *BamHI* 切割由此产生的 DNA，用 T4 DNA 聚合酶处理成平末端 DNA，产生 HBsAg 表达盒子。HBsAg 表达盒子以 1.2kB 片段存在。用 *HindIII* 和 *BglIII* 切割含有全长人 CMV (Towne 株系) 立即早期启动子（带有增强子）的质粒构建体 pPJV7077 (Schmaljohn 等 (1997) *J. Virol.* 71:9563-9569)，然后用 T4 DNA 聚合酶和小牛碱性磷酸酶处理以产生平端 DNA，HBsAg 表达盒子连接到质粒中产生 pWRG7128 构建体。

在上面实施例 3 所述过程后，在金粒子上沉淀 pWRG7128 质粒，再一次用 2 微克 DNA/每毫克金。混合表达 CTA 和 CTB 亚基基因（分别是 pPJV2002 和 pPJV2003）的佐剂质粒载体在一起，在金粒子上沉淀，每个质粒以 1 微克 DNA/每毫克金存在，这样总量也是 2 微克 DNA/每毫克金。以 1:1 混合用 pWRG7128 包被的金粒子和用 pPJV2002 及 pPJV2003 包被的

金粒子,然后装载到如上提到的 TEFZEL®管中。对于免疫,用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置,用上述实施例 3 相同的递送条件递送表示 $1\mu\text{g}$ DNA ($0.5\mu\text{g}$ pWRG7128 质粒和 pPJV2002 及 pPJV2003 质粒各 $0.25\mu\text{g}$) 的 0.5 英寸长的管进入 Balb/c 小鼠表皮。对于对照,用仅由 pWRG7128 包被的金粒子(每次递送 1 微克 DNA/0.5 毫克金)免疫小鼠。在第 4 周,免疫和加强免疫小鼠(每个实验组 4 只),然后,在后加强免疫 2 周时处死小鼠。通过 ELISA 的血清抗体水平评估免疫应答。此外,用 ELISPOT 测定法定量 CD8-特异的 IFN- γ 分泌来检测细胞免疫应答。

用 ELISA 测定法检测每只鼠血清样品 HBsAg 特异的抗体。对于 ELISA,用纯化 HBsAg(BioDesign),以每孔 $0.1\mu\text{g}$,在 PBS (磷酸缓冲盐, BioWhittaker)中包被 Falcon Pro Bind 微量滴定板, 4°C 过夜。室温下 (RT),用 5%奶粉/PBS 封闭板 1 小时,然后用冲洗缓冲液(10 mM Tris 缓冲盐溶液, 0.1% Brij-35),洗 3 次,向板中加入在稀释缓冲液(2%奶粉/PBS/0.05 % Tween 20)中稀释的血清样品,在室温 (RT) 温育 2 小时。洗板 3 次,向板中加入在稀释缓冲液中以 1:8000 稀释的生物素酰化的羊抗鼠抗体(Southern Biotechnology),室温温育 1 小时。温育后,洗板 3 次,之后,加入 PBS 中 1:8000 稀释的链霉抗生物素蛋白素-辣根过氧化物酶共轭物(Southern Biotechnology),在室温下,进一步温育板 1 小时。另外洗 3 次后,洗板 3 次,然后加入 TMB 底物溶液(BioRad),30 分钟后,用 $1\text{N H}_2\text{SO}_4$ 停止反应。在 450nm 读光密度,通过样品和已知效价的标准比较计算终点效价。

对于细胞免疫测定法,在与已知 Balb/C 小鼠中 CD8 抗原表位对应的肽存在情况下,体外培养免疫动物脾脏脾细胞的单细胞悬浮液。在 DMSO (10 mg/ml) 中溶解肽,在培养中稀释到 $10\mu\text{g/ml}$ 。肽序列是 IPQSLDSWWTSL (SEQ ID NO: 20)。

对于 IFN- γ ELISPOT 测定法,用 $50\mu\text{l}$ 的 $15\mu\text{g/ml}$ 抗-IFN- γ 抗血清(Pharmingen)在无菌 0.1M 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中包被微孔多筛选膜过滤板, 4°C 过夜。用无菌 PBS 洗板 6 次,然后用含有 10%胎牛血清(FBS)的组织培养基在室温下封闭 1-2 小时。除去培养基,按照每孔 1×10^6 细胞

总数，向孔中分配脾脏细胞。对于少于 1×10^6 免疫动物细胞的孔，加入首次用于实验的(naïve)动物细胞达到 1×10^6 总数。在上述肽存在情况下，细胞在组织培养的培养箱中温育过夜。然后用 PBS 洗板 2 次，用蒸馏水洗 1 次。随后用 PBS 洗 3 次。向板中(PBS 中 $1 \mu\text{g/ml}$ 溶液 $50 \mu\text{l}$)加入生物素酰化的抗 IFN- γ 单克隆抗体(Pharmingen)，室温温育 2 小时。用 PBS 洗板 6 次，之后，加入 $50 \mu\text{l}$ 链霉抗生物素蛋白素碱性磷酸酶共轭物(PBS 中 1:1000, Pharmingen)，室温，温育 2 小时。用 PBS 洗板 6 次，加入碱性磷酸酶显色底物(BioRad)，进行这个反应直到暗斑出现。通过用水洗 3 次终止反应。空气干燥板，在显微镜下计数斑。

对于 IFN- γ ELISA 测定法，在肽存在的情况下，在圆底 96 孔组织培养板中过夜培养细胞。取上清液的样品用于 IFN- γ 水平测定。用 $100 \mu\text{l}$ $0.5 \mu\text{g/ml}$ 抗小鼠 IFN- γ 抗体(Pharmingen)在碳酸氢盐缓冲液中，pH 9.6 包被高结合的板(Costar)。用含有 10% FBS 的组织培养基，室温下封闭板 1 小时，然后用 TBS 冲洗缓冲液洗 3 次。在组织培养基中稀释获自培养细胞的上清液样品，加载到板上，室温温育 2 小时。用冲洗缓冲液洗板 3 次，向板中加第二抗体(PBS 中 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 生物素酰化的大鼠抗-小鼠 INF- γ , Pharmingen)，室温温育 1 小时。洗板 3 次，加入链霉抗生物素蛋白素-辣根过氧化物酶共轭物(PBS 中 1:2000, Southern Biotechnology)室温 1 小时。洗板 3 次，加入 TMB 底物溶液(BioRad)，用 $1\text{N H}_2\text{SO}_4$ 终止反应。在 450nm 读光密度。

在下表 2 中报告了 ELISA 结果。

表 2

制剂	个体效价	平均效价
pWRG7128	40,000	55,000
	84,000	
	41,000	
	54,000	
pWRG7128, pPJV2002 和 pPJV2003	28,000	23,000
	14,000	
	27,000	
	23,000	

如所观察到的,发现单独用 pWRG7128 免疫的对照小鼠的抗体水平比用 pWRG7128 和 CT 佐剂载体(pPJV2002 和 pPJV2003)免疫小鼠的抗体水平高。对照动物平均终点效价是 55,000,而用佐剂制剂免疫动物的平均效价是 23,000。然而,接受佐剂制剂的组实际接受了作为对照 pWRG7128 量的 1/2,这解释了抗体效价降低的原因。

在两组小鼠中测定的细胞免疫应答表明了通过 CT 佐剂载体,细胞应答显著增强。更具体地,在下面表 3 中描述了 CD8 特异性 IFN- γ ELISA 测定法的结果。

表 3

IFN- γ ELISA			
制剂	细胞数/孔		
	1.0 x 10 ⁶	0.5 x 10 ⁶	0.1 x 10 ⁶
pWRG7128	0.77	0.213	0.001
	0.828	0.121	0.027
	1.35	0.312	0.006
	1.25	0.323	0.007
(平均值)	1.05	0.242	0.01
pWRG7128, pPJV2002 和 pPJV2003	1.96	1.19	0.079
	2.30	1.70	0.263
	2.20	1.83	0.377
	2.44	2.33	0.898
(平均值)	2.23	1.76	0.404

在该 IFN- γ ELISA 测定中,每孔的细胞数表示从平板每孔的免疫动物恢复的细胞数。每孔总细胞数是常数(例如, 1 x 10⁶),而且用首次用于实验的动物细胞补充。数值是在 450 nm 测定的 OD 读数。发现用 CT 佐剂制剂处理的小鼠细胞在 ELISA 中有较高 OD 值,表明这些细胞分泌较大量的 IFN- γ 以对抗原应答。在 IFN- γ ELISA 中,首次用于实验的小鼠没有产生可测量的 OD 值。

下表 4 描述了 CD8 特异性 IFN- γ ELISPOT 测定法的结果。

表 4

IFN- γ ELISPOTs	
制剂	阳性细胞数/ 1×10^6 细胞
pWRG7128	510
	410
	530
	590
(平均值)	510
pWRG7128, pPJV2002 和 pPJV2003	1,480
	2,300
	2,500
	3,500
(平均值)	2,445

在该 IFN- γ ELISPOT 测定中, 数字是重复孔的平均值, 与每 1×10^6 细胞的阳性细胞数对应。在该 ELISPOT 测定中, 首次用于实验的小鼠细胞没有产生任何斑点。此外, 在用 CT 佐剂制剂处理的动物中发现了大量的 ELISPOTs, 表明比单独接受抗原 (pWRG7128) 的动物优越的应答。

上述数据表明本发明新的佐剂组合物具有增强对共施用抗原细胞免疫应答的有效能力, 在这种情况下, 从 DNA 疫苗表达 HbsAg。

实施例 5

用 gp120 抗原载体和 CTA/CTB 佐剂载体同时递送, 对 HIV-1 gp120 抗原体液和细胞免疫应答的增加

如下文构建编码 HIV-1 gp120 的质粒载体。用 Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA) 质粒骨架、人巨细胞病毒 (hCMV) 立即早期启动子 (Fuller 等 (1994) *Aids Res. Hum Retroviruses* 10:1433) 和 SV40 病毒晚期聚腺苷酸化位点开始构建载体。HCMV 启动子包含在 619 个碱基对 (bp) *AccII* 片段内, 从立即早期转录起始位点向上游延伸 522 个碱基对, 向下游延伸 96 个碱基对。SV40 病毒晚期聚腺苷酸化序列包含在来自于 pSV2dhfr (以前得自 Bethesda Research Laboratories, catalogue #5369 SS) 约 800 个碱基对的 *BamHI-BglIII* 内。最初, 构建编码 HIV-1 gp160, 称为 “pC-Env” 的质粒。该质粒含有来自于 LAV-1_{BRU} (ATCC 登记号: 53069, GenBank 登记号: K02013) 的 2565 碱基对的

KpnI-*XhoI* 片段, 其在编码成熟 gp160 氨基末端氨基酸位置 #4 的序列开始。紧邻下游放置 *env* 编码序列片段, 并在框架中与疱疹单纯病毒糖蛋白 D(gD) 信号肽的 160bp 合成片段融合, 没有成熟 gD 氨基末端氨基酸, 如先前所述(Fuller 等 (1994) *Aids Res. Hum Retroviruses* 10:1433)。

如下文, 然后构建编码 HIV-1 gp120, 这里称为 “pCIA-Env/T” 的质粒。pCIA-Env/T 质粒编码 HIV-1 gp160 截短的形式, 除了在核苷酸位置 8188 的 *HindIII* 位点截短 *env* 编码序列外, 其与 pC-Env 构建体相同。这就产生了截短 gp160 翻译产物, 具有位于 gp120/gp41 加工位点下游 128 个氨基酸残基的截短点。

如下文, 构建编码 HIV-1 rev, 这里称为 “pC-rev” 的第二个质粒载体。该载体含有 LAV-1_{BRU} 原病毒(核苷酸位置 678-1085、5821-6379 和 8188-8944)的三个不连续区, 直接置于如上所述 hCMV 启动子和 SV40 病毒晚期聚腺苷酸化序列间。这三个不连续区分别含有主要 5' 剪接供体, *rev* 基因的第一内含子, 和 *rev* 基因的第二内含子。

称为 “pWRG7054” 的第三个质粒载体构建体在研究中用做空载体对照。pWRG7054 构建体含有 SIV *nef* 编码区, hCMV 立即早期启动子和内含子 A 区, TPA 前导序列和牛生长激素聚腺苷酸化序列。在下文实施例 6 中描述了 pWRG7054 质粒的构建。

产生下面 DNA-金制剂用于小鼠 DNA 疫苗佐剂试验。

制剂#1: 空载体对照(pWRG7054, 无 gp120 插入), 2.5 微克 DNA/每毫克金, 0.5 毫克金/每筒;

制剂#2: 在单独一批金(pWRG7054 DNA 和 pCIA-EnvT DNA 各 1.25 微克/每毫克金, 0.12 微克 pC-rev/每毫克金)上共沉淀所有空载体对照(pWRG7054)、gp120 (pCIA-EnvT)DNA 载体, 和 rev (pC-rev)DNA 载体(允许 HIV-1 gp120 分子表达), 0.5 毫克金/每筒;

制剂#3: 在单独一批金(1.25 微克 pWRG7054/每毫克金、pPJ2002 和 pPJ2003 DNA 各 1 微克/每毫克金)上共沉淀所有空载体对照(pWRG7054)、CTA (pPJ2002)和 CTB (pPJ2003)DNA 载体, 0.5 毫克金/每筒;

制剂#4：在单独一批金(1.25 微克 pCIA-EnvT DNA/每毫克金、0.125 微克 pC-rev DNA/每毫克金、pPJV2002 和 pPJV2003 DNA 各 1 微克/每毫克金)上共沉淀所有 gp120 (pCIA-EnvT) DNA 载体、HIV-1 rev (pC-rev) DNA 载体、CTA (pPJV2002)和 CTB(pPJV2003) DNA 载体，0.5 毫克金/每筒；和

制剂#5：在单独一批金 gp120 (1.25 微克 pCIA-EnvT DNA/每毫克金、0.125 微克 pC-rev DNA/每毫克金，pPJV2006 和 pPJV2003 DNA 各 1 微克/每毫克金)上共沉淀所有(pCIA-EnvT) DNA 载体、HIV-1 rev (pC-rev) DNA 载体、CTA -KDEL (pPJV2006)和 CTB (pPJV2003) DNA 载体，0.5 毫克金/每筒。

在上文实施例 3 所述过程后，在金粒子上沉淀 pWRG7054、pCIA-EnvT、pC-rev、pPJV2002、pPJV2003 和 pPJV2006 质粒载体，也用 2 微克 DNA/每毫克金。再一次用上文实施例 3 所述的过程，装载包被的金粒子到 TEFZEL®管中。对于免疫，用粒子递送装置，在上述实施例 3 所述相同的递送条件(400 p. s. i. 氮)下，用两个 0.5 英寸长的管递送总载重 1.0mg 的金进入 5—6 周龄雌性 Balb/c 小鼠表皮。

5 个实验组(每种 DNA 疫苗制剂各是一个试验组)中每个实验组由 4 只动物组成，每个动物用它们各自制剂进行初次和加强免疫，时间在第 0 和 5 周。用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI)，每次免疫由两次一前一后给腹部表皮的递送构成(每次递送一个筒)。

用 ELISA 测定法，在第 5 周和 6.5 周(分别是初次免疫后和加强免疫后)收集的样品检测对 HIV gp120 抗原的血清抗体应答。对于 ELISA，在 50 μ l-PBS 中，用 0.3 μ g/孔的重组 HIV gp120(Intracel)包被 Costar 高结合 EIA 板，4℃过夜温育。洗板 3 次，室温下，用 2%PBS 中 BSA 封闭 2 小鼠。向包被板中加入系列血清稀释液，37℃温育 1 小时。板后，板与共轭结合羊抗-鼠 IgG (H+L) (BioRad)的 1:1500 稀释度的碱性磷酸酶温育，随后用对硝基苯磷酸(PNPP)显色，在 405nm 读 OD 值。

在图 7 中描述了 ELISA 结果, 如所观察到的, 接受佐剂载体(含有 pPJV2002 和 pPJV2003 载体的制剂#4, 或含有 pPJV2006 和 pPJV2003 载体的制剂#5)与 gp120 载体联合的组与接受 gp120 载体, 而无佐剂的组(制剂#2, pCIA-EnvT)比较, gp120 特异性免疫应答约增加 20 倍。

收集加强免疫后血清样品后, 处死动物, 收集每只鼠的脾脏。通过碾碎脾脏分离脾细胞, 将细胞通过 70 μ m 细胞过滤器, 用 ACK 裂解缓冲液(BioWhittaker)裂解红血细胞。用 RPMI-5% FCS 洗脾细胞 3 次, 在添加抗生素、丙酮酸钠和非必需氨基酸的 RPMI-10% FCS 中重悬浮到 1×10^7 细胞/ml 的浓度。

用原位 ELISA 测定脾细胞分泌的抗原特异 IFN- γ 的量。在 50 μ l 0.1M 碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)中, 用 10 μ g/ml 抗-小鼠 IFN- γ 捕获单克隆抗体 (mAb) (PharMingen, San Diego, CA)包被 Costar 高结合板。4 $^{\circ}$ C, 温育过夜后, 用 PBS-0.05% Tween-20 洗孔 5 次, 用 200 μ l 完全 R10 培养基, 室温封闭 2 小时。向每孔加入 1×10^6 脾细胞, 在仅有培养基(阴性对照), 或有 1 μ g/ml HIV gp120 肽的培养基中刺激, 该肽有下面的序列: RIQRGPGRAFVITGK (SEQ ID NO:21)。在 5% CO₂中, 在 37 $^{\circ}$ C 温育 24 小时后, 用去离子(DI)水洗板 2 次以裂解细胞, 然后用 PBS-0.05% Tween 20 洗 3 次, 室温下与每孔 50 μ l 的 1 μ g/ml 生物素酰化抗-小鼠 IFN- γ 检测 mAb (PharMingen)温育 1 小时。然后洗板 5 次, 与每孔 50 μ l 的 1:8000 稀释度的链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶 (HRP) 溶液 (Southern Biotechnology)温育 1 小时。再一次洗板 5 次, 通过加 TMB 底物(BioRad, Hercules, CA), 室温进行 30 分钟完成比色计显色。通过加 1N 硫酸终止反应。用光学板读数器读取 450nm 的吸光度。

在图 8 中描述了该研究的结果。该图表示在接受上述制剂(制剂#1-5)的 5 个不同疫苗实验组中, 抗原特异性 IFN- γ 生产的相对水平。重要地, 接受 gp120 载体(pCIA-EnvT)与 CT 佐剂载体(即含有 pPJV2002 和 pPJV2003 载体的制剂#4, 含有 pPJV2006 和 pPJV2003 载体的制剂#5)联合的两个免疫组显示了比接受 gp120, 而无佐剂的组(含有空载体对照和 pCIA-EnvT 的制剂#2)显著高的 IFN- γ 生产水平(分别是 $P < 0.000001$ 和 $P = 0.0068$)。

这些数据证明在动物模型中该 CT 载体佐剂联合具有显著增加对 HIV 抗原的抗原特异性细胞免疫的能力。

除了 IFN- γ 生产水平增加外,如用 ELISPOT 方法所测定,分泌 IFN- γ 的 HIV-gp120 肽-特异性脾细胞也显著增加。用 IFN- γ 捕获抗体包被用于 T 辅助细胞 IFN- γ 原位 ELISA 的硝酸纤维素板(微孔),如上所述,冲洗,封闭。以 1×10^6 细胞/孔的加载细胞数向预包被孔中加入脾细胞,在仅有培养基(阴性对照)或含有 $1 \mu\text{g/ml}$ 肽的培养基中刺激,该肽含有免疫优势 HIV-gp120 CTL 抗原表位,和具有下面的序列:RGPGRAFVTI (SEQ ID NO:22)。在 5% CO_2 中,在 37°C ,温育板 24 小时,用去离子水洗 2 次,用 PBS 洗 3 次,在室温下,与每孔 $50 \mu\text{l}$ 的 $1 \mu\text{g/ml}$ 生物素酰化抗-小鼠 IFN- γ 检测 mAb (PharMingen)温育 1 小时。然后洗板 5 次,与每孔 $50 \mu\text{l}$ 的 1:1000 稀释度的链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶(ALP)溶液(Mabtech)温育 1 小时。再一次洗板 5 次,通过添加 ALP 膜底物(BioRad, Hercules, CA),直到斑点形成(室温,2-30 分钟)完成比色计显色。通过用去离子水洗终止反应,空气干燥板,过夜。在 40X 显微镜下斑点。仅仅计数有模糊边界的大斑点计数为斑点形成细胞(SFC)。

在图 9 中描述了 ELISPOT 测定的结果,该图表示在 5 个不同疫苗实验组(分别接受制剂#1-5)中产生 IFN- γ 脾脏细胞的相对水平。重要地,接受 gp120 载体(pCIA-EnvT)与 CT 佐剂载体(即含有 pPJV2002 和 pPJV2003 载体的制剂#4,含有 pPJV2006 和 pPJV2003 载体的制剂#5)联合的两个免疫组显示了比接受 gp120,而无佐剂的组(含有空载体对照和 pCIA-EnvT 的制剂#2)显著高的生产 IFN- γ 的细胞数(分别是 $P < 0.000001$ 和 $P = 0.0032$)。这些数据证明在动物模型中该 CT 佐剂联合具有显著增加对共施用 HIV gp120 抗原的抗原特异性细胞免疫的能力。此外,在这些研究中所观察到增加的 IFN- γ 生产表明 CT 佐剂载体与本发明联合应用在免疫动物中提供了强 Th1 样免疫应答。

实施例 6

用编码 HBcAg 和 HBsAg 载体和 CTA/CTB 佐剂载体的同时递送, 对乙型肝炎核心和表面抗原的抗体应答的增强

如下文, 构建含有乙型肝炎核心抗原 (HBcAg) 和乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 编码序列的载体质粒。从 HBV 克隆 pAM6 (ATCC 登记号: 45020) 得到 HBsAg 和 HbsAg 编码序列。为了产生 HBsAg 编码序列, 用 *NcoI* 切割 pAM6 构建体, 用绿豆核酸酶处理以除去 X-抗原起始密码子。然后用 *BamHI* 切割由此产生的 DNA, 用 T4 DNA 聚合酶处理成平末端 DNA, 产生 HBsAg 表达盒子。HBsAg 表达盒子以 1.2kB 片段存在。用 *HindIII* 和 *BglIII* 切割含有全长人 CMV (Towne 株系) 立即早期启动子 (带有增强子) 的质粒构建体 pPJV7077 (Schmaljohn 等 (1997) *J. Virol.* 71:9563-9569), 然后用 T4 DNA 聚合酶和小牛碱性磷酸酶处理以产生平末端 DNA, HBsAg 表达盒子连接到质粒中产生 pWRG7128 构建体。

为了产生 HBcAg 编码序列, 切割 pAM6 构建体产生 HBcAg 表达盒子, 之后, 通过位点定向诱变截短 HBcAg 序列以除去核心抗原粒子的 C-末端精氨酸富集区 (其缺失不影响粒子形成)。然后克隆截短的 HBcAg 序列到含有人延长因子启动子 (“hELF”, Mizushima 等 (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:5322) 的质粒构建体中以提供 HBcAg 载体构建体。

分别从 JW4303 载体构建体 (Harriet Robinson 博士, University of Massachusetts 惠赠) 获得包含: (a) CMV 启动子/增强子, 内含子 A- 5' 非翻译区, 和人组织血纤蛋白溶酶原激活物 (hTPA) 信号肽 (“CMV-IA-TPA”); 或 (b) 牛生长激素 polyA 序列 (bGHpA) 的表达盒子, 并入插入到质粒骨架中。用 *NheI* 切割由此产生的构建体, 用聚合酶补平, 然后用 *BamHI* 切割以产生含有 pUC19 复制原点, 氨苄青霉素抗性基因和 bGHpA 序列的载体片段。用 *SaII* 第二次切割质粒骨架, 用聚合酶补平, 用 *BamHI* 切割以释放含有 CMV-IA-TPA 载体片段的载体片段。连接两个载体片段以产生命名为 pWRG7054 的构建体。

用 *NheI* 切割 pWRG7054 构建体, 用聚合酶补平, 用 *BamHI* 切割以产生载体片段。用 *NcoI* 切割 HBcAg 载体构建体, 用聚合酶补平, 用 *BamHI* 切割以产生插入片段。然后连接两个片段以产生命名为 pWRG7063 的构建体。

用 *EcoRI* 切割 PEL-Bos, 用牛小肠磷酸酶去磷酸化以产生载体片段用 *HindIII* 切割 pWRG7063 质粒, 用聚合酶补平, 用 *EcoRI* 切割以产生包含 hTPA 信号肽、HBcAg 抗原序列和 bGHpA 区的插入片段。连接两个片段以提供命名为 pWRG7145 的构建体。

用 *EcoRI* 切割 pWRG7128 构建体, 用牛小肠磷酸酶去磷酸化以产生含有 hCMV 启动子转录控制的 HbsAg 编码区的载体片段。用 *MfeI* 和 *EcoRI* 切割 pWRG7145 构建体以产生包含 hELF 启动子/内含子、hTPA 信号肽序列、HBcAg 抗原序列和 bGHpA 区域的插入片段。然后连接这些片段以提供含有 HBcAg 和 HBsAg 编码序列的 pPJV7193 质粒构建体。

然后产生下面的 DNA-金制剂用于猪 DNA 疫苗佐剂试验

制剂#1: 对照、单独的 HBcAg/HBsAg 载体 (pWRG7193)、2 微克 DNA/每毫克金、0.5 毫克金/每筒; 和

制剂#2: 在单独一批金 (1.0 微克 pWRG7193 DNA/每毫克金, pPJV2006 和 pPJV2003 DNA 各 0.5 微克/每毫克金) 上共沉淀所有 HBcAg/HBsAg 载体 (pWRG7193)、CTA-KDEL (pPJV2006) 和 CTB (pPJV2003) DNA 载体, 0.5 毫克金/每筒。

在上文实施例 3 所述过程后, 再一次, 在金粒子上以 2 微克 DNA/每毫克金的最终浓度沉淀单独或与 pPJV2006 和 pPJV2003 佐剂载体一起沉淀 pWRG7193 质粒。用上文实施例 3 所述方法, 加载包被的金粒子到 TEFZEL® 管中。两个试验组 (每个由 5 头家猪组成) 分别接受用制剂#1 和制剂#2 的两次免疫, 其中两次免疫的间隔是 6 周, 用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置, 每次免疫包括递送给腹股沟区的两个一前一后 500 p. s. i. 射击, 其中每次射击用一个筒。因此, 在对照组 (制剂#1) 中, 每次免疫由总共 1 毫克金和 2 微克 DNA 疫苗载体 pWRG7193 的递送构成。类似地, 在佐剂实验组 (制剂#2) 中, 每次免疫包括总共 1 毫克金, 2 微克 DNA 疫苗载体 pWRG7193, 和佐剂载体 pPJV2006 和 pPJV2003 各 1 微克的递送。在加强免疫 (第 6 周) 和加强免疫后 2 周 (第 8 周) 时, 收集血液样品。

如下文, 进行对核心抗原特异的抗体应答检测: 在 PBS 中, 以 100 ng/ml 乙型肝炎核心抗原 (Biodesign) 包被 ELISA 板。包被后, 在 4°C 过

夜。室温，在 PBS 中，用 5% 脱脂奶粉封闭板 1 小时。然后用含有 0.05% Tween-20 的 PBS 洗板 3 次。在 2% 脱脂奶粉/PBS/0.01% Tween-20 中连续稀释猪血清样品，加到 ELISA 板中。室温，温育 2 小时后，用 PBS/0.05% Tween-20 洗板 3 次。第二抗体由与辣根过氧化物酶共轭结合的羊抗猪 IgG 构成(Kirkegaard and Perry)，在 2% 脱脂奶粉/PBS/0.01% Tween-20 中以 1:2000 稀释，加入板中，室温温育 1 小时。然后用 PBS/0.05% Tween-20 洗板 5 次，加入 100 μ l-TMB 底物。进行显色 15 分钟，通过加入 100 μ l 1N H₂SO₄ 终止显色。在 450nm 读板。图 10 和 11 分别表示在第 6 和 8 周时，两组猪中每一组在 4 个不同血清稀释度时的几何平均吸光度值。这些数据证明在应用 CT 佐剂载体 pPJV2006 和 pPJV2003 后，对乙型肝炎核心抗原的抗体效价的显著增加。

除了对乙型肝炎核心抗原增加的体液应答外，在佐剂实验组中也观察到了对乙型肝炎表面抗原特异的抗体应答可检测的增加。在每个动物血清样品中，用商购测定试剂盒(AUSAB, Abbott Laboratories)定量表面抗原特异性抗体。该试剂盒允许用标准板以毫国际单位(mIU/ml)进行抗体应答定量。在对照组(制剂#1)和佐剂实验组(制剂#2)中，几何平均表面抗原抗体效价分别是 285 和 662mIU/ml，证明了该佐剂质粒(pPJV2006 和 pPJV2003)具有增加对分离载体编码抗原的免疫应答的能力。

实施例 7

对利用编码 CT 或 LT 亚基质粒载体的 DNA 疫苗的细胞 Th1 样免疫应答的增加

用编码甲型流感病毒 M2 蛋白质的 pM2-FL DNA 疫苗载体检测 pPJV2002、pPJV2003、pPJV2004、pPJV2005、pPJV2006 和 pPJV2007 佐剂载体在粒子介导的 DNA 接种上下文中的佐剂效果。通过在显微可见金粒子上沉淀有/无各种佐剂载体混合的 M2 DNA 疫苗载体，用 PowderJect®XR-1 粒子递送装置(PowderJect Vaccines, Inc. Madison,

WI)加速包被的金粒子进入小鼠表皮,进行粒子介导的DNA接种。在上述实施例3中描述了pM2-FL DNA质粒载体的构建。

如上述,在2微米金粒子上沉淀pM2-FL质粒为单一载体,或加佐剂载体样品成为混合载体。具体地,在含有亚精胺小离心管中,质粒DNA(单一pM2-FL载体或添加有一个或多个佐剂载体的pM2-FL载体)与2微米金粒子(Degussa)混合。在实施例3的方法后,进行沉淀,然后也如实施例3所述,包被的金粒子包被到TEFZEL®管内表面。然后将管切成适于装载到粒子递送装置的0.5英寸“筒”。

产生下面DNA-金制剂用于小鼠DNA疫苗佐剂试验。

制剂#1: pM2-FL DNA载体与pWRG7054空质粒载体在同一批金上沉淀前混合,2.1微克总DNA/每毫克金(0.1微克pM2-FL和2.0微克pWRG7054),0.5毫克金/每筒;

制剂#2: pM2-FL DNA载体与CTA和CTB(pPJV2002和pPJV2003)DNA载体在同一批金上沉淀前混合,2.1微克总DNA/每毫克金(每种DNA佐剂载体各1.0微克/每毫克金,0.1微克pM2-FL),0.5毫克金/每筒;

制剂#3: 在一批金上共沉淀所有混合有CTA-KDEL和CTB(pPJV2006和pPJV2003)DNA载体的pM2-FL DNA载体,2.1微克总DNA/每毫克金(每种DNA佐剂载体各1.0微克/每毫克金,0.1微克pM2-FL),0.5毫克金/每筒;

制剂#4: 在一批金上混合和共沉淀所有混合有CTA-KDEL(pPJV2006)DNA载体和添加有pWRG7054空质粒载体的pM2-FL DNA载体,2.1微克总DNA/每毫克金(1.0微克pPJV2006、1.0微克pWRG7054、0.1微克pM2-FL),0.5毫克金/每筒;

制剂#5: 混合有CTA(pPJV2002)DNA载体和添加有pWRG7054空质粒载体的pM2-FL DNA载体,在一批金上混合和共沉淀所有DNAs,2.1微克总DNA/每毫克金(1.0微克pPJV2002、1.0微克pWRG7054、0.1微克pM2-FL),0.5毫克金/每筒;

制剂#6: 混合有CTB(pPJV2003)DNA载体和添加有pWRG7054空质粒载体的pM2-FL DNA载体,在一批金上混合和共沉淀所有DNAs,2.1微

克总 DNA/每毫克金(1.0 微克 pPJV2003、1.0 微克 pWRG7054、0.1 微克 pM2-FL)，0.5 毫克金/每筒；

制剂#7：pM2-FL DNA 载体与 LTA 和 LTB (pPJV2004 和 pPJV2005) DNA 载体在一批金上共沉淀之前混合，2.1 微克总 DNA/每毫克金(每种 DNA 佐剂载体各 1.0 微克/每毫克金，0.1 微克 pM2-FL)，0.5 毫克金/每筒；

制剂#8：在一批金上共沉淀所有混合有 LTA - RDEL 和 LTB (pPJV2007 和 pPJV2005)DNA 载体的 pM2-FL DNA 载体，2.1 微克总 DNA/每毫克金(每种 DNA 佐剂载体各 1.0 微克/每毫克金，0.1 微克 pM2- FL)，0.5 毫克金/每筒；

制剂#9：在一批金上混合和共沉淀所有混合有 LTA-RDEL (pPJV2007)DNA 载体和添加有 pWRG7054 空质粒载体的 pM2-FL DNA 载体，2.1 微克总 DNA/每毫克金(1.0 微克 pPJV2007、1.0 微克 pWRG7054、0.1 微克 pM2-FL)，0.5 毫克金/每筒；

制剂#10：混合有 LTA (pPJV2004) DNA 载体和添加有 pWRG7054 空质粒载体的 pM2-FL DNA 载体，在一批金上混合和共沉淀所有 DNAs，2.1 微克总 DNA/每毫克金(1.0 微克 pPJV2004、1.0 微克 pWRG7054、0.1 微克 pM2-FL)，0.5 毫克金/每筒；和

制剂#11：混合有 LTB (pPJV2005) DNA 载体和添加有 pWRG7054 空质粒载体的 pM2-FL DNA 载体，在一批金上混合和共沉淀所有 DNAs，2.1 微克总 DNA/每毫克金(1.0 微克 pPJV2005、1.0 微克 pWRG7054、0.1 微克 pM2-FL)，0.5 毫克金/每筒。

然后，如下所述给 11 组小鼠施用这些 DNA 疫苗制剂。每个实验组包含 8 只动物，每只动物用其各自制剂进行两次免疫，两次免疫间有 4 周休息期。用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI)，在 400p. s. i. 氮压力，每次免疫由两次一前一后递送给腹部皮肤的递送构成（每次一筒）。在第二次或加强免疫后两周收集血清样品。

除了利用对 IgG1 或 IgG2a 特异性的第二抗体共轭物外，用上文实施例 3 用于总 IgG 效价检测的 ELISA 测定法检测个体血清样品对 IgG 和

IgG2a 亚类的 M2 特异性抗体应答。从 Southern Biotechnology Associates, Inc. (目录#1070-08, 浓度 0.5 mg/ml) 获得羊抗-鼠 IgG1-生物素共轭结合的抗体, 以 1/8000 稀释度使用。从相同的来源 (目录 #1080-08, 浓度 0.5 mg/ml) 获得羊抗-鼠 IgG2a-生物素共轭结合的抗体, 而且也是以 1/8000 稀释度使用。分段测定每个实验组的 M2 抗原特异性 IgG1 和 IgG2a 的几何平均抗体效价, 计算 IgG1 比 IgG2 的比率。在下面表 5 中报告了这些数据。

表 5

制剂#	IgG1-比-IgG2a 比率
1	160.99
2	3.44
3	13.59
4	63.20
5	2.63
6	30.97
7	0.02
8	0.50
9	9.00
10	4.53
11	27.00

如参考表 5 所观察的, 添加到 M2 DNA 疫苗制剂中 A 或 B 亚基, 或 A 和 B 亚基的各种联合引起 IgG1-比-IgG2a 比率的显著降低, 而该比率在缺乏佐剂 (制剂#1) 的情况下是 M2 DNA 疫苗(pM2-FL) 诱导的。LTA 加 LTB, 和 LTA - RDEL 加 LTB 载体联合 (分别是制剂#7 和#8) 应用产生了最大比率的降低。在两个制剂中, 本发明多核苷酸佐剂的应用引起了 M2 抗原特异性 IgG2a 效价高于 IgG1 许多, 该特征是小鼠中 Th1 样免疫应答的明显特点。

在图 12 中绘制接受制剂#1, #2 和#7 实验组结果为 IgG1-比-IgG2a 比率的对数。从该图可以看出, 用 CTA 加 CTB 佐剂载体辅助 pM2-FL DNA 疫苗组合物 (制剂#2) 与没有佐剂的 pM2-FL 疫苗组合物 (制剂#1) 比较, 引起了 2 个数量级 IgG1-比-IgG2a 比率的降低。此外, 当用 LTA 加 LTB 佐剂

载体辅助 pM2-FL DNA 疫苗(制剂#7)，观测到这个比率进一步降低了 2 个数量级。

实施例 8

向编码 CT 或 LT 的佐剂载体添加信号肽编码序列

修饰含有 CTA、CTB、LTA 和 LTB 毒素亚基的载体构建体(分别是 pPJV2002、pPJV2003、pPJV2004 和 pPJV2005)以除去 tpa 信号肽编码序列，构建用于下面实验的编码乙型肝炎表面和核心抗原的双 DNA 疫苗载体。

用于载体构建/修饰的标准 PCR 条件如下：1.5 mM MgCl₂ (Promega Corp., Madison, WI)的 1x PCR 核心缓冲液；每种引物各 0.400 μM；每种 dNTP (USB Inc., Cleveland, OH)各 200 μM；2.5 μg Taq 聚合酶 (Promega Corp., Madison, WI)；1.0ng 模板 DNA；加水到 100 μl；和矿物油(Aldrich Chemical Inc., Milwaukee WI)覆盖。编程 PTC-200 热循环仪(MJ Research Inc., Waltham, MA)以运行下面的程序：95℃，4 分钟；30 个循环（95℃，1 分钟；55℃，1 分钟 15 秒；72℃，1 分钟。），72℃，10 分钟；和 4℃放置。在用限制酶(New England Biolabs, Beverly, MA)切割前，用 QIAquick® PCR 纯化试剂盒(Qiagen Inc., Valencia CA)从 PCR 反应中移出扩增产物。克隆后测序所有 PCR 产物以确保扩增的忠实性。

更具体地，如下文，构建编码乙型肝炎表面和核心抗原的双 DNA 疫苗载体。用一系列标准分子生物学技术修饰含有表面抗原编码序列的 pWRG7128 构建体(实施例 4)以提供双（表面/核心抗原）构建体。开始，修饰 pWRG7128 构建体以除去牛生长激素腺苷酸化区域，并用兔 β-珠蛋白腺苷酸化区域置换该区域。含有 CMV 启动子的第一插入片段和含有第二个兔 β-珠蛋白腺苷酸化区域的第二插入片段连接入修饰的 pWRG7128 构建体中，其中 CMV 启动子带有外显子 1 和外显子 2 序列，在直接位于插入 CMV 启动子的上游的 *Sph*I 和 *Pst*I 位点间插入通过复性 systematic 寡核苷酸构建的衔接子。

用下面引物对质粒 mpSmpCC(GlaxoSmithKline, UK) 进行 PCR:
5'—GCC' GCT AGC ATG GAC ATT GAC CCT TAT AAA GA—3' (SEQ ID NO:23)
和 5'—CCA GGA TCC TTA ACA TTG AGA TTC C—3' (SEQ ID NO:24) 以产生
乙肝-adw2 核心抗原编码序列。用 *Nhe*I 和 *Bam*HI 切割这个 PCR 产物以产生
插入片段, 然后修饰该片段以包含下游 *Bgl*II 位点, 插入克隆载体。用
*Pst*I 和 *Eco*RI 切割克隆载体以产生核心抗原插入片段; 用 *Pst*I 和 *Mfe*I
切割修饰的 pWRG7128 质粒以产生载体片段, 连接核心抗原插入片段到载体
片段中, 产生双表面/核心抗原质粒构建体。

通过用限制性酶仅仅切除 tpa 信号肽编码序列修饰含有 CTA、CTB、
LTA 和 TB 毒素亚基的载体构建体(分别是 pPJV2002、pPJV2003、pPJV2004
和 pPJV2005) 以除去 tpa 信号肽编码序列以分别产生下面构建体:CTA w/o
TPA、CTB w/o TPA、LTA w/o TPA 和 LTB w/o TPA。

双表面/核心抗原质粒与不相关质粒 DNA(用于无佐剂的对照), 或与
毒素亚基载体构建体混合, 并在 2 微米金粒子上沉淀。更具体地, 含亚
精胺小离心管中混合外加两个佐剂载体(提供 CTA/CTB 或 LTA/LTB 联合)
的质粒 DNA(双表面/核心抗原质粒载体)与 2 微米金粒子(Degussa)。在
实施例 3 的方法后进行沉淀, 也如实施例 3 所述, 然后包被的金粒子包
被在 TEFZEL®管内表面上。然后将管切成适于装载到粒子递送装置的 0.5
英寸的筒。

因此, 产生下面 DNA-金制剂用于小鼠 DNA 疫苗佐剂试验:

制剂#1: (“无佐剂”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 1 μ g
不相关 DNA 质粒载体;

制剂#2: (“CT”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 0.5 μ g
pPJV2002 (CTA)DNA 质粒载体, 0.5 μ g pPJV2003 (CTB) DNA 质粒载体;

制剂#3: (“CT w/o TPA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体,
0.5 μ g CTA w/o TPA DNA 质粒载体, 0.5 μ g CTB w/o TPA DNA 质粒载体;

制剂#4: (“CTA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 1 μ g
pPJV2002 (CTA) DNA 质粒载体;

制剂#5: (“CTA w/o TPA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体,
1 μ g CTA w/o TPA DNA 质粒载体;

制剂#6: (“CTB”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 1 μ g
pPJV2003 (CTB) DNA 质粒载体;

制剂#7: (“CTB w/o TPA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体,
1 μ g CTB w/o TPA DNA 质粒载体;

制剂#8: (“LT”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 0.5 μ g
pPJV2004 (LTA) DNA 质粒载体, 0.5 μ g pPJV2005 (LTB) DNA 质粒载体;

制剂#9: (“LT w/o TPA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体,
0.5 μ g LTA w/o TPA DNA 质粒载体, 0.5 μ g LTB w/o TPA DNA 质粒载
体;

制剂 #10: (“LTA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 1 μ g
pPJV2004 (LTA) DNA 质粒载体;

制剂#11: (“LTA w/o TPA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体,
1 μ g LTA w/o TPA DNA 质粒载体;

制剂 #12: (“LTB”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体, 1 μ g
pPJV2005 (LTB) DNA 质粒载体; 和

制剂 #13: (“LTB w/o TPA”) 1 μ g 双表面/核心抗原 DNA 质粒载体,
1 μ g LTB w/o TPA DNA 质粒载体。

在第一个研究中, 用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置 (PowderJect
Vaccines Inc., Madison, WI), 给 5 组小鼠施用各种上述 DNA 疫苗制剂。
每个实验组包含 5 个动物, 每个动物用各自的制剂接受两次免疫, 在两
次免疫间有 4 周休息期。检测的制剂如下: 制剂#1 (无佐剂); 制剂#2 (CT);
制剂#3 (CT w/o TPA); 制剂#8 (LT); 和制剂#9 (LT w/o TPA)。第二次免
疫后 2 周处死所有动物, 收集脾脏用于 IFN- γ 和 IL-4 ELISPOT 测定
中。对于细胞免疫测定, 在与小鼠已知 T 细胞抗原表位 (来源于表面或
核心抗原) 对应的肽存在的情况下, 在体外培养免疫动物脾脏脾细胞的
单细胞悬浮液。在 DMSO (10 mg/ml) 中溶解肽和在培养中稀释到 10 μ g/ml。

对于 ELISPOT 测定法, 用 50 μ l 适合抗血清 (15 μ g/ml 抗 IFN- γ 或 IL-4 抗血清, Pharmingen) 在无菌 0.1M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 中包被微孔多筛选膜过滤板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用无菌 PBS 洗板 6 次, 然后用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的组织培养基在室温下封闭 1-2 小时。除去培养基, 按照每孔 1×10^6 细胞总数, 向孔中分配脾脏细胞。对于少于 1×10^6 免疫动物细胞的孔, 加入首次用于实验的动物细胞达到 1×10^6 总数。在上述肽存在情况下, 细胞在组织培养的培养箱中温育过夜。然后用 PBS 洗板 2 次, 用蒸馏水洗 1 次。随后用 PBS 洗 3 次。向板中 (PBS 中 1 μ g/ml 溶液 50 μ l) 加入生物素酰化的抗 IFN- γ 或抗 IL-4 单克隆抗体 (Pharmingen), 室温温育 2 小时。用 PBS 洗板 6 次, 之后, 加入 50 μ l 链霉抗生物素蛋白素碱性磷酸酶共轭物 (PBS 中 1:1000, Pharmingen), 室温温育 2 小时。用 PBS 洗板 6 次, 加入碱性磷酸酶显色底物 (BioRad), 进行这个反应直到暗斑出现。通过用水洗 3 次终止反应。空气干燥板, 在显微镜下计数斑。

通过测定对双表面/核心抗原构建体编码的乙肝表面和核心抗原 (“sAg” and “cAg”) 的 IFN- γ 和 IL-4 ELISPOT 应答评估分泌或非分泌毒素亚基编码序列的佐剂效果, 如图 13A-13D 所报告比较这些结果。如所观察到的, 在 IFN- γ 对表面和核心抗原的应答及 IL-4 对表面抗原的应答方面, 分泌的 (含有信号序列) CT 和 LT 佐剂载体 (分别是制剂#2 和 #8) 产生了显著的增加 ($P \leq 0.05$) (参见图 13A、13B 和 13C)。关于 IL-4 对核心抗原的应答, LT 载体 (制剂#8 和 #9) 佐剂效果的缺乏与 LT 毒素比 CT 毒素为更多 Th1 佐剂的观察结果是一致的。最重要地, 缺乏信号序列的 CT 和 LT 载体 (分别是制剂#3 和 #9) 显示了较弱的佐剂效果, 特别是在 IFN- γ ELISPOT 数据中所看到的对表面和核心抗原 (参见, 图 13A 和 13C), 其中由于缺失信号肽序列, 佐剂活性在统计学上显著降低。

最后, 在分泌的 (制剂#2 和 #8) 和非分泌的 (制剂#3 和 #9) 间佐剂效果的清楚可观测到的差异帮助证明了可观测到的佐剂效果不是因为佐剂载体内的 CpG 基序, 因为有信号和无信号的载体在细菌 DNA (CpG) 含量没有任何不同, 但是它们在增加表面抗原特异性 IFN- γ 应答的能力方面却显示了显著差异。

在第二个研究中,用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置(PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI)给 8 组小鼠施用上述 DNA 疫苗制剂。每个实验组包含 5 个动物,每个动物用各自的制剂接受两次免疫,在两次免疫间有 4 周休息期。检测的制剂如下:制剂#1 (无佐剂);制剂#2 (CT);制剂#4 (CTA);制剂#5 (CTA w/o TPA);制剂#6 (CTB);制剂#7 (CTB w/o TPA);制剂#8 (LT);制剂#10 (LTA);制剂#11 (LTA w/o TPA);制剂#12 (LTB) 和制剂#13 (LTB w/o TPA) 第二次免疫后 2 周处死所有动物,收集脾脏用于 IFN- γ 和 IL-4 ELISPOT 测定中,如上所述。

作为第二次研究的结果(数据未示),再一次观察到了在各种佐剂质粒中,没有可能由 CpG 含量引起的可辨别的佐剂效果。尽管对大部分各种毒素亚基佐剂载体没有观察到统计学相关的佐剂效果,但是 LT 亚基载体(制剂#10-13)确实显示了对表面抗原(sAg)的 IFN- γ 和 IL-4 应答的佐剂效果,而该应答受分泌信号序列存在/缺乏的影响。

实施例 9

在病毒攻击研究中,编码 CTA/CTB 或 LTA/LTB 亚基肽的佐剂质粒载体

为了评测本发明佐剂质粒载体在疱疹单纯病毒类型 2 (HSV-2) 病毒攻击模型中提供保护效果的能力,进行下面的研究。构建编码 HSV-2 抗原的 DNA 疫苗,然后将其与本发明佐剂质粒载体的各种联合进行混合以提供疫苗组合物。免疫后,用 HSV-2 病毒攻击免疫动物,并且测定各种疫苗组合物的保护效果。

在 DNA 抗原质粒构建方面,用标准 PCR 技术构建质粒。用于载体构建的标准 PCR 条件如下: 1.5 mM MgCl₂ (Promega Corp., Madison, WI) 的 1x PCR 核心缓冲液; 每种引物各 0.400 μ M; 每种 dNTP (USB Inc., Cleveland, OH) 各 200 μ M; 2.5 μ g Taq 聚合酶 (Promega Corp., Madison, WI); 1.0ng 模板 DNA; 加水到 100 μ l; 和矿物油 (Aldrich Chemical Inc., Milwaukee WI) 覆盖。编程 PTC-200 热循环仪 (MJ Research Inc., Waltham, MA) 以运行下面的程序: 95°C, 4 分钟; 30 个循环 (95°C, 1 分钟; 55°C,

1 分钟 15 秒; 72°C, 1 分钟。), 72°C, 10 分钟, 和 4°C 放置。在用限制酶(New England Biolabs, Beverly, MA)切割前, 用 QIAquick® PCR 纯化试剂盒(Qiagen Inc., Valencia CA)从 PCR 反应中移出扩增产物。克隆后测序所有 PCR 产物以确保扩增的忠实性。

更具体地, 如下所述, 构建编码 HSV-2 早期 ICP27 抗原的 DNA 疫苗质粒载体。HSV 是有约 150-160 kbp 基因组的双链 DNA 病毒。病毒基因组在 20 面体核衣壳内包装, 该核衣壳包被在膜中。膜 (或包膜) 包含至少 10 个病毒编码的糖蛋白, 最丰富的糖蛋白是 gB、gC、gD 和 gE。病毒基因组也编码 70 多个其它蛋白质, 包括一组约 5 个 ICP 抗原。与仅在病毒生命循环晚期产生的包膜糖蛋白相比, 这些早期蛋白质是在病毒复制循环的早期合成的。对于 HSV 的分子结构和组织的述评参见, 例如 Roizman 和 Sears (1996) “Herpes simplex viruses and their replication” in Fields Virology, 第三版 Fields 等 eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA。从 HSV-2 基因组, 例如 HSV-2 基因组的范围从约核苷酸 114589 到 134980 的基因组区, 或 HSV-2 基因组的核苷酸 110931 到 139697 范围的 *EcoRI* 片段, 容易得到 HSV-2 ICP27 抗原。从公开的来源可得到 HSV-2 基因组序列, 例如存储在 GenBank 中登记号: NC_001798 的序列

为了构建用在本研究中的 ICP27 载体, 用下面引物: 5' —GCC ACT CTC TTC CGA CAC—3' (SEQ ID NO:25) 和 5' —CAA GAA CAT CAC ACG GAA C—3' (SEQ ID NO:26) 从 HSV-2 基因组对 ICP27 编码区进行 PCR, 以获得与 ICP27 编码区对应的, 含有 HSV-2 核苷酸序列 114523-116179 (GenBank) 的核苷酸片段。然后克隆 ICP27 片段到 pTarget 载体 (Promega Corp., Madison, WI) 的多克隆区。

混合含有 CTA、CTB、LTA 和 LTB 毒素亚基 (分别是 pPJV2002、pPJV2003、pPJV2004 和 pPJV2005) 的佐剂质粒载体构建体以提供 CTA/CTB (pPJV2002 + pPJV2003) 和 LTA/LTB (pPJV2004 + pPJV2005) 佐剂。ICP27 抗原质粒与毒素亚基载体构建体对混合, 并且在 2 微米金粒子上沉淀。更具体地, 在含有亚精胺的小离心管中, 混合外加有两个佐剂载体 (提供 CTA/CTB 或

LTA/LTB 联合)的质粒 DNA (ICP27 抗原质粒载体)与 2 微米金粒子 (Degussa)。在实施例 3 的方法后,进行沉淀,然后也如实施例 3 所述,包被的金粒子包被在 TEFZEL®管内表面。然后将管切成适于装载到粒子递送装置的 0.5 英寸筒。

因此,产生下面 DNA-金制剂用于 HSV-2 攻击研究:

制剂#1: (无佐剂) 2 μ g ICP27 抗原 DNA 质粒载体;

制剂#2: (“高 CT”) 900ng ICP27 抗原 DNA 质粒载体, 50ngpPJV2002 (CTA), 50ngpPJV2003 (CTB);

制剂#3: (“低 CT”) 500ng ICP27 抗原 DNA 质粒载体, 250ng pPJV2002 (CTA), 250ng pPJV2003 (CTB);

制剂#4: (“高 LT”) 900ng ICP27 抗原 DNA 质粒载体, 50ng pPJV2004 (LTA), 50ng pPJV2005 (LTB); 和

制剂#5: (“低 LT”) 500ng ICP27 抗原 DNA 质粒载体, 250ng pPJV2004 (LTA), 250ng pPJV2005 (LTB)。

在该研究中,用 PowderJect® XR-1 粒子递送装置 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI), 给 5 个不同组小鼠施用上述 DNA 疫苗制剂。每个实验组包含 12 个动物,每个动物用各自的制剂接受两次免疫(应用于腹部的单射击),在两次免疫间有 4 周休息期。设置 6 组小鼠作为阴性(首次用于实验)对照,不接受任何接种。第二次免疫后 2 周,每组取出 4 只小鼠用于 IFN- γ ELISPOT 测定(数据未示出)。

第二次免疫后 2 周,用 1×10^6 PFU, MS 株系的 HSV-2 病毒通过鼻内滴注攻击所有剩下的小鼠(8 只/每组)。在图 14 中说明了描述攻击结果的存活图。如可观察到的,100%首次用于实验的动物在攻击后 4 天内死亡。在图上用(●)曲线描绘首次用于实验的动物。此外,100%单独接受 ICP27 抗原质粒载体(制剂#1)的动物在攻击后 7 天内死亡。在图上用(▼)曲线描绘接受制剂#1 的动物。明显的对比,25% (2/8)接受低剂量 CT 佐剂的 ICP27 质粒(制剂#3)的动物获得免受病毒攻击的保护,38% (3/8)接受高剂量 CT 佐剂的 ICP27 质粒(制剂#2)的动物获得免受病毒攻击的保护。在图上用(■)曲线描绘接受制剂#3 的动物。在图上用(◆)

曲线描绘接受制剂#2 的动物。最后，低剂量 LT 佐剂（制剂#5）和高剂量 LT-佐剂（制剂#4）的 ICP27 疫苗在免疫动物中提供了完全（100%）的保护。在图上用（▲）曲线描绘接受制剂#5 的动物。在图上用（○）曲线描绘接受制剂#4 的动物。

因此，已经说明了新的多核苷酸佐剂分子、包含这些佐剂分子的组合物、及常规核酸免疫技术。尽管已详细描述了本发明优选的实施方式，但是可以进行不偏离所附权利要求限定的本发明精神和范围的明显变化，这是可以理解的。

 序列表

<110> 宝德杰克特疫苗有限公司

<120> 核酸佐剂

<130> P03GB051797

<150> US 09/724, 315

<151> 2000-11-27

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5500

<212> DNA

<213> pPJV2002 质粒

<400> 1

```

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatitt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt      60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatitt      120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat      180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgccctt attccctttt      240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg      300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga      360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc      420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac      480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg      540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtataac actgcggcca      600
acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg      660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg      720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg      780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag      840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggttggtg gtttattgct gataaatctg      900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct      960

```

```

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat cgggtaagcg 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 1740
atagtccgtg cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgctg atttttgtga tgctcgtcag 1800
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cagcacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggcttttacac tttatgcttc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
accatgatta cgccaagcta gtcacataa atcaatatig gctattggcc attgcatacg 2280
ttgtatctat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt 2340
tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cgggggtcatt agttcatagc 2400
ccatataatg agttccgctg tacataactt acggtaaatg gcccgccctg tgaccgcca 2460
acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 2520

```

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	2580
aagtgtatca tatgccaaagt cgggccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc	2640
tggcattatg ccagttacat gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta	2700
ttagtcatcg ctattacat ggatgatgcg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag	2760
cggtttgact cacggggatt tccaagtcct caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt	2820
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgcgtaata accccgcccc gttgacgcaa	2880
atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt	2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgtt ttgacctcc atagaagaca ccgggaccga	3000
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc	3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgca tgctatactg	3120
tttttggctt ggggcctata ccccccgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag	3180
cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattgggtgac gatactttcc	3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcc caactatctc tattggctat atgccaatac	3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta	3360
tttacaatt cacatataca acaacgccgt ccccggtgcc cgcagttttt attaaacata	3420
gcgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttccgga catgggcctt tctccggtag	3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgtcgg	3540
cagctccttg ctcttaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac	3600
cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg	3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc	3720
tgagtgtgtg tattctgata agagtcagag gtaactccc ttgcggtgct gttaacggtg	3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcggt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc	3840
tgacagacta acagactggt cttttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg	3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggctct gctgtgtgtc gctgctgtgt ggagcagctt	3960
tcgtttcggc tagcaatgat gataagttat atcgggcaga ttctagacct cctgatgaaa	4020
taaagcagtc aggtggctct atgccaagag gacagagtga gtactttgac cgaggtactc	4080

aaatgaatat caacctttat gatcatgcaa gaggaactca gacgggattt gttaggcacg	4140
atgatggata tgtttccacc tcaattagtt tgagaagtgc ccacttagtg ggtcaaacta	4200
tattgtctgg tcattctact tattatatat atgttatagc cactgcaccc aacatgttta	4260
acgttaatga tgtattaggg gcatacagtc ctcatccaga tgaacaagaa gtttctgctt	4320
taggtgggat tccatactcc caaatatatg gatggtatcg agttcatttt ggggtgcttg	4380
atgaacaatt acatcgtaat aggggctaca gagatagata ttacagtaac ttagatattg	4440
ctccagcagc agatggttat ggattggcag gtttccctcc ggagcataga gcttggaggg	4500
aagagccgtg gattcatcat gcaccgccgg gttgtgggaa tgctccaaga tcatcgatga	4560
gtaatacttg cgatgaaaaa acccaaagtc taggtgtaaa attccttgac gaataccaat	4620
ctaaagttaa aagacaaata ttttcaggct atcaatctga tattgataca cataatagaa	4680
ttaaggatga attatgagga tcctcgcaat ccctaggagg attaggcaag ggcttgagct	4740
cacgctcttg tgagggacag aaatacaatc aggggcagta tatgaatact ccatggagaa	4800
accagatct acgtatgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttggt	4860
tgccccctcc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa	4920
taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg	4980
gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg	5040
gtgggctcta tggcttctga ggcggaaga accagctggg gctcgacagc tcgactctag	5100
aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt	5160
aatcgccctg cagcacatcc cctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc	5220
gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgctgat gcggtathtt	5280
ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc	5340
tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgctga cgcgccctga	5400
cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc	5460
atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg aaacgcgcga	5500

<210> 2

<211> 5089

<212> DNA

<213> pPJV2003 质粒

<400> 2

```

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatitt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt    60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatitt    120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat    180
aataattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctitt    240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg    300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga    360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctgc    420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac    480
actatttctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg    540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacat gagtgataac actgcggcca    600
acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg    660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg    720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg    780
gcgaactact tactctagct tcccggaac aattaataga ctggatggag gcggataaag    840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg    900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct    960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac   1020
agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta agcatttgga actgtcagac caagtttact   1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga   1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt   1200
cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct   1260
gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc   1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc   1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc thtagcaccg cctacatacc   1440

```

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggttg ctgccagtg cgataagtcg tgccttaccg	1500
ggttggactc aagacgatat ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg	1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt	1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
gggggaggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggcctttt	1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	1920
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	1980
cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca	2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc	2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	2220
accatgatta cgccaagcta gtcacataa atcaatatg gctattggcc attgcatacg	2280
ttgtatctat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt	2340
tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc	2400
ccatatatgg agttccgct tacataactt acggtaaatt gcccgctcg tgaccgcca	2460
acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga	2520
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	2580
aagtgtatca tatgccaagt ccggccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc	2640
tggcattatg ccagttacat gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta	2700
ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag	2760
cggtttgact cacggggatt tccaagtcic caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt	2820
tggcacaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtataa accccgcccc gttgacgcaa	2880
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt	2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga	3000

tccagcctcc ggggcggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgac	3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgca tgctatactg	3120
tttttggctt ggggcctata ccccccgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag	3180
cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattgggtgac gatactttcc	3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcc caactatctc tattggctat atgccaatac	3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta	3360
tttaciaaatt cacatataca acaacgccgt cccccgtgcc cgcagttttt attaaacata	3420
gcgtgggac tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcggga catgggctct tctccggtag	3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgctcgg	3540
cagctccttg ctccaaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac	3600
cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg	3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc	3720
tgagttgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct gttaacgggtg	3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc	3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg	3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggctct gctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagctt	3960
tcgtttcggc tagcacacct caaaatatta ctgatttggtg tgcagaatac cacaacacac	4020
aaatatatac gctaaatgat aagatatattt cgtatacaga atctctagct ggaaaaagag	4080
agatggctat cattactttt aagaatgggtg caatttttca agtagaagta ccaggtagtc	4140
aacatataga ttcacaaaaa aaagcgattg aaaggatgaa ggataccctg aggattgcat	4200
atcttactga agctaaagtc gaaaagtatt gtgtatggaa taataaacg cctcatgcga	4260
ttgccgcaat tagtatggca aattaaggat cctcgcaatc cctaggagga ttaggcaagg	4320
gcttgagctc acgctcttgt gagggacaga aatacaatca ggggcagtat atgaatactc	4380
catggagaaa ccagatcta cgtatgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca	4440
tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc	4500
ctttcctaatt aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg	4560

```

gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct 4620
ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg ctgcacagct 4680
cgactctaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccttggcggt 4740
acccaactta atcgcccttc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag 4800
gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcciga atggcgaatg gcgcctgatg 4860
cggtattttt tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcataatgggt cactctcagt 4920
acaatctgct ctgatccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac 4980
gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 5040
gggagctgca tgtgtcagag gttttaccg tcatcaccga aacgcgcga 5089

```

<210> 3

<211> 5488

<212> DNA

<213> pPJV2006 质粒

<400> 3

```

gacgaaagg cctcgtgata cgcctatitt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt 120
tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat ctacggatg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtgataac actgcggcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

```

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg	900
gagccgggtga gcgtgggtct cgcgggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	960
cccgatctgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020
agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact	1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	1140
tcctttttga taatctcatg accaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	1200
cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	1260
gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc	1320
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttaccg	1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt	1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat ccggtaaagc	1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt	1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
gggggaggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggcctttt	1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	1920
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	1980
cagtgagcga ggaagcgga gagcgccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca	2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcaccca ggctttacac tttatgcttc	2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	2220
accatgatta cgccaagcta gtcgacataa atcaatattg gctattggcc attgcatacg	2280
ttgtatctat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt	2340
tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc	2400

ccatataatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaattg gcccgcctcg tgaccgcccc	2460
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga	2520
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	2580
aagtgtatca tatgccaaagt ccggccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc	2640
tggcattatg cccagtacat gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta	2700
ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag	2760
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gaggttgttt	2820
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaata accccgcccc gttgacgcaa	2880
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt	2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt ttgacctcc atagaagaca ccgggaccga	3000
tccagcctcc gcggccggga acgggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc	3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgca tgctatactg	3120
tttttggtt ggggcctata ccccccgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag	3180
cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattggtgac gatactttcc	3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcc caactatctc tattggctat atgccaatac	3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta	3360
tttacaatt cacatataca acaacgccgt cccccgtgcc cgcagttttt attaaacata	3420
gcgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttccgga catgggctct tctccggtag	3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgctcgg	3540
cagtccttg ctccaaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac	3600
cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg	3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc	3720
tgagtgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct gttaacggtg	3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc	3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg	3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggcctt gctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagtct	3960

tcgtttcggc tagcaatgat gataagttat atcgggcaga ttctagacct cctgatgaaa	4020
taaagcagtc aggttggtctt atgccaagag gacagagtga gtactttgac cgaggtactc	4080
aaatgaatat caacctttat gatcatgcaa gaggaactca gacgggattt gttaggcacg	4140
atgatggata tgtttccacc tcaattagtt tgagaagtgc ccacttagtg ggtcaaacta	4200
tattgtctgg tcattctact tattatatat atgttatagc cactgcaccc aacatgttta	4260
acgttaatga tgtattaggg gcatacagtc ctcatccaga tgaacaagaa gtttctgctt	4320
taggtgggat tccatactcc caaatatatg gatggtatcg agttcatttt ggggtgcttg	4380
atgaacaatt acatcgtaat aggggctaca gagatagata ttacagtaac ttagatattg	4440
ctccagcagc agatggttat ggattggcag gtttcctcc ggagcataga gcttgagggg	4500
aagagccgtg gattcatcat gcaccgccgg gttgtgggaa tgctccaaga tcatcgatga	4560
gtaatacttg cgatgaaaaa acccaaagtc taggtgtaaa attccttgac gaataccaat	4620
ctaaagttaa aagacaaata ttttcaggct atcaatctga tattgataca cataatagaa	4680
tttgaggatc ctgcfaatcc ctaggaggat taggcaaggg cttgagctca cgctcttggtg	4740
agggacagaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac	4800
gtatgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc	4860
gtgccttctt' tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa	4920
attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac	4980
agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgtg gggatgcggt gggctctatg	5040
gcttctgagg cggaagaac cagctggggc tcgacagctc gactctagaa ttcactggcc	5100
gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacitaa tcgccttgca	5160
gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc	5220
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat	5280
ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca	5340
tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cggcctgacg ggcttgtctg	5400
ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg	5460
ttttaccgt catcaccgaa acgcgcga	5488

<210> 4
 <211> 5500
 <212> DNA
 <213> pPJV2004 质粒

<400> 4
 gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatittt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
 cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatittt 120
 tctaaataca ttcaaatacg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240
 ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
 ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
 tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctgc 420
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac 480
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg ccataacat gagtgataac actgcggccca 600
 acttacttct gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg 780
 gogaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
 ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
 gagccgggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960
 cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	1560
cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacagggtat ccggtaaagc	1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt	1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggcctttt	1860
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	1920
ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	1980
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	2040
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca	2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc	2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	2220
accatgatta cgccaagcta gtcgacataa atcaatatg gctattggcc attgcatacg	2280
ttgtatctat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt	2340
tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggctcatt agttcatagc	2400
ccatataatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatt gcccgctcgt tgaccgcccc	2460
acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga	2520
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc	2580
aagtgtatca tatgccaaat ccggccccct attgacgtca atgacggtaa atggccccgc	2640
tggcattatg ccagttacat gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta	2700
ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag	2760
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccocatg acgtcaatgg gagtttgttt	2820
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgctgtaata accccgcccc gttgacgcaa	2880

atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt	2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgtt ttgacctc atagaagaca ccgggaccga	3000
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc	3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgca tgctatactg	3120
tttttggctt ggggcctata ccccccgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag	3180
cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattgggtgc gatactttcc	3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcc caactatctc tattggctat atgccaatac	3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta	3360
tttacaatt cacatataca acaacgccgt cccccgtgc cgcagttttt attaaacata	3420
gcgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcgga catgggctct tctccggtag	3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgtcgg	3540
cagctccttg ctccaaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac	3600
cagtgtgcgc cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg	3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc	3720
tgagtgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcgggtgt gttaacgggtg	3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc	3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg	3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggtctt gctgtgtgtt gctgctgtgt ggagcagtct	3960
tcgtttcggc tagcaatggc gacaaattat accgtgtga ctctagacc ccagatgaaa	4020
taaaacgttc cggaggtctt atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc	4080
aatgaatat taatctttat gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg	4140
atgacggata tgtttccact tctcttagtt tgagaagtgc tacttagca ggacagtcta	4200
tattatcagg atattccact tactatata atgttatagc gacagacca aatatgttta	4260
atgttaatga tgtattaggc gtatacagcc ctcaccata tgaacaggag gtttctgcgt	4320
taggtggaat accatattct cagatatatg gatggatcg tgtaatttt ggtgtgattg	4380
atgaacgatt acatcgtaac agggaatata gagaccggtt ttacagaaat ctgaatatag	4440

```

ctccggcaga ggatggttac agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag 4500
aagaaccctg gattcatcat gcaccacaag gttgtggaaa ttcataaga acaattacag 4560
gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat 4620
caaaagttaa gaggcagata ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa 4680
ttcgggatga attatgagga tcctcgcaat ccctaggagg attaggcaag ggcttgagct 4740
cacgctcttg tgaggacag aaatacaatc aggggcagta tatgaatact ccatggagaa 4800
accagatct acgtatgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 4860
tgccccctcc cegtgccttc ctgaccctg gaagggtcca ctcccactgt cctttcctaa 4920
taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg 4980
gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg 5040
gtgggctcta tggcttctga ggcggaaga accagctggg gctcgacagc tcgactctag 5100
aattcactgg cgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt 5160
aatcgccttg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggccgcacc 5220
gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgccctgat gcggtatttt 5280
ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcaactctcag tacaatctgc 5340
tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgctga cgcgccctga 5400
cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 5460
atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcacg aaacgcgcga 5500

```

<210> 5

<211> 5089

<212> DNA

<213> pPJV2005 质粒

<400> 5

```

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt 120
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc accagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

```

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga	360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctgc	420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac	480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat ctacggatg	540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtgataac actgcggccca	600
acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg	660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg	780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag	840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gttattgtg gataaatctg	900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct	960
cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac	1020
agatcgtga gataggtgcc tctactgatta agcatggta actgtcagac caagtttact	1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga	1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc citaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	1200
cagaccccggt agaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct	1260
gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc	1320
taccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc	1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	1500
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt	1560
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	1620
agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggat ccggtaaagc	1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt	1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	1800
gggggcggag cctatggaac aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt	1860

gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagcta	gtcgacataa	atcaatatig	gctattggcc	attgcatacg	2280
ttgtatctat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaattia	cggggtcatt	agttcatagc	2400
ccatatatgg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaattg	gcccgcctcg	tgaccgcca	2460
acgacccccg	cccattgacg	tcaataatga	cgatatgttc	catagtaacg	ccaataggga	2520
ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
aagtgtatca	tatgccaagt	ccggccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggcccgcc	2640
tggcattatg	cccagtacat	gaccttacgg	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	2700
ttagtcatcg	ctattacat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccccatig	acgtcaatgg	gagtttgttt	2820
tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgtaata	accccgcccc	gttgacgcaa	2880
atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	agtgaaccgt	2940
cagatgcct	ggagacgcca	tccacgtgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccga	3000
tccagcctcc	gcggccggga	acgggtgcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	caagagtgc	3060
gtaagtaccg	cctatagact	ctataggcac	acccctttgg	ctcttatgca	tgctatactg	3120
tttttggctt	ggggcctata	cacccccgt	ccttatgcta	taggtgatgg	tatagcttag	3180
cctatagggtg	tgggttatig	accattattg	accactcccc	tattggtgac	gatactttcc	3240
attactaatc	cataacatgg	ctctttgcc	caactatctc	tattggctat	atgccaatc	3300
tctgtccttc	agagactgac	acggactctg	tatttttaca	ggatggggtc	ccatttatta	3360
tttaciaaatt	cacatataca	acaacgccgt	cccccggtgc	cgcagttttt	attaaacata	3420

gcgtgggatac tccacgcgaa tctcgggtac gtgttccgga catgggctct tctccggtag	3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgtctcg	3540
cagctccttg ctctaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac	3600
cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg	3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc	3720
tgagtgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct gttaacggtg	3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc	3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg	3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggctct gctgtgtgtct gctgctgtgt ggagcagtct	3960
tcgtttcggc tagcgtctcc cagtctatta cagaactatg ttcggaatat cgcaacacac	4020
aaatatatac gataaatgac aagatactat catatacgga atcgatggca ggcaaaagag	4080
aaatggttat cattacattt aagagcggcg caacatttca ggtcgaagtc ccgggcagtc	4140
aacatataga ctcccaaaaa aaagccattg aaaggatgaa ggacacatta agaatcacat	4200
atctgaccga gaccaaaatt gataaattat gtgtatggaa taataaaacc cccaattcaa	4260
ttgcggcaat cagtatggaa aactagggat cctcgcaatc cctaggagga ttaggcaagg	4320
gcttgagctc acgctcttgt gagggacaga aatacaatca ggggcagtat atgaatactc	4380
catggagaaa ccagatcta cgtatgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca	4440
tctgttgttt gcccccccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc	4500
ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg	4560
gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct	4620
ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcgaaagaa ccagctgggg ctgcacagct	4680
cgactctaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggt	4740
acccaactta atcgccctgc agcacatccc ctttcgccca gctggcgtaa tagcgaagag	4800
gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg	4860
cggatattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcataatgggt cactctcagt	4920
acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac	4980

ggcgcctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 5040

gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcga 5089

<210> 6

<211> 5488

<212> DNA

<213> pPJV2007 质粒

<400> 6

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatittt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatittt 120

tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 240

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctcgc 420

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac 480

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacatc gatgataac actgcggcca 600

acttacttct gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc 720

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020

agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta agcatiggta actgtcagac caagtttact 1080

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140

tcctttttga taatctcatg accaaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200

cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaatct	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgt	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacagggtat	ccggtaaagc	1680
gcagggctcg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740
atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	tgctcgtcag	1800
gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagcta	gtcgacataa	atcaatatgt	gctattggcc	attgcatacg	2280
ttgtatctat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	cgggggtcatt	agttcatagc	2400
ccatatatgg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaattg	gcccgcctcg	tgaccgcca	2460
acgacccccg	cccatggacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
aagtgtatca	tatgccaaagt	ccggccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggccccgc	2640
tggcattatg	cccagtacat	gaccttacgg	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	2700
ttagtcatcg	ctattacat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760

cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt	2820
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgttaata accccgcccc gttgacgcaa	2880
atgggcggta ggcggtgtacg gtgggagggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt	2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgtt ttgacctcc atagaagaca ccgggaccga	3000
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc	3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgca tgctatactg	3120
tttttggtt ggggcctata ccccccgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag	3180
cctataggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattggtgac gatactttcc	3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcc caactatctc tattggctat atgccaatac	3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta	3360
tttaciaaatt cacatataca acaacgccgt cccccgtgcc cgcagttttt attaaacata	3420
gcgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcgga catgggctct tctccggtag	3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgtcgg	3540
cagctccttg ctccaaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac	3600
cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg	3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc	3720
tgagttgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct gttacgggtg	3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc	3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg	3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggctct gctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagttt	3960
tcgtttcggc tagcaatggc gacaaattat accgtgctga ctctagacct ccagatgaaa	4020
taaaacgttc cggaggtctt atgccagat ggcataatga gtacttcgat agaggaactc	4080
aaatgaatat taatctttat gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg	4140
atgacggata tgtttccact tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta	4200
tattatcagg atattccact tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta	4260
atgttaatga tgtattaggc gtatacagcc ctacccata tgaacaggag gtttctgcgt	4320

taggtggaat accatattct cagatatatg gatggatatcg tgtaaatttt gggtgtgattg	4380
atgaacgatt acatcgtaac agggaaatata gagaccggta ttacagaaat ctgaatatag	4440
ctccggcaga ggatgggttac agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag	4500
aagaacctg gattcatcat gcaccacaag gtigtgaaa ttcatcaaga acaattacag	4560
gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat	4620
caaaagttaa gaggcagata ttttcagact atcagtcaga gggtgacata tataacagaa	4680
tttgaggatc ctgcgaatcc ctaggaggat taggcaaggg cttgagctca cgctcttgtg	4740
agggacagaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac	4800
gtatgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttggttg cccctcccc	4860
gtgccttctt tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa	4920
attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggtt ggggcaggac	4980
agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg gggaatgcgtt gggctctatg	5040
gcttctgagg cggaagaac cagctggggc tcgacagctc gactctagaa ttactggcc	5100
gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtt cccaacttaa tcgccttgca	5160
gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc	5220
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat	5280
ctgtgcggta tttcacaccg catatgggtc actctcagta caatctgctc tgatgccgca	5340
tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg	5400
ctcccgcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg	5460
ttttcacctg catcacgaa acgcgcga	5488

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 7

ggagctagca atgatgataa gttatatcgg

30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 8
cctggatcct cataattcat ccttaattct 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 9
ggagctagca cacctcaaaa tattactgat 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 10
cctggatcct taatttgcca tactaattgc 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 11
cctggatcct caaattctat tatgtgtatc 30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 12

ggagctagca atggcgacaa attataccgt

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 13

cctggatcct cataattcat cccgaattct

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 14

ggagctagcg ctccccagtc tattacagaa

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 15

cctggatccc tagttttcca tactgattgc

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 16

cctggatcct caaattctgt tatatatgtc

30

<210> 17

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 17

cccaagcttc caccatgagc cttctaaccg aggtcgaaac acctatcaga aacgaatggg 60

agtgc 65

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 18

cccggatcct tactccagct ctatgctg 28

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 19

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu Cys
1 5 10 15

Arg

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 20

Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 21

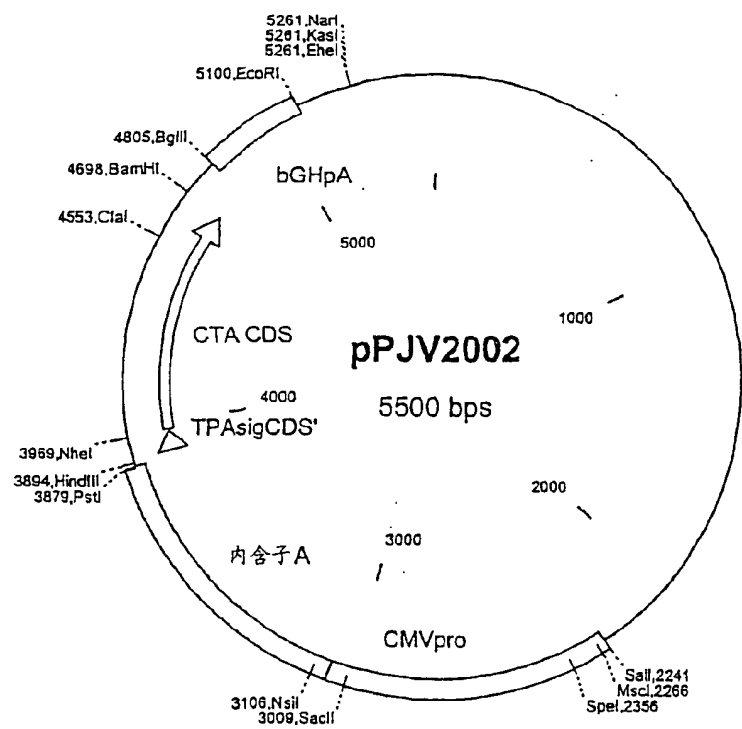
Arg	Ile	Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Val	Ile	Thr	Gly	Lys
1				5					10					15

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成构建体

<400> 22

Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Val	Thr	Ile
1				5					10



分子：pPJV2002, 5500 bps DNA 环形
文件名称：pPJV2002.cm5,
描述：Nhe Bam 切割 CTA PCR片段接入 7054 Nhe Bam 载体
注释：

分子特征：

类型	起始	终止	名称	描述
区域	2242	3060	CMVpro	
区域	3061	3884	内含子 A	
基因	3906	3969	TPAsigCDS'	
基因	3975	4697	CTA CDS	
区域	4805	5101	bGHpA	

酶 (15 个位点)							
SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356,	SacII	3009
NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894,	NheI	3969
ClaI	4553,	BamHI	4698,	BglII	4805,	EcoRI	5100

图 1-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTATTATTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTGCGCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCCCGT AGAAAAGATC CCGTAGCAA TGGCAACAAAC GTTGCGCAAA CTATTAACTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCCGTATCTA AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACCTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACCTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACC GCTCATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACCA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACC GTTCCCAGAG GGAGAAAGGC GGCAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCCTGT CGGGTTCGCG CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTT CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACCTATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCAATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAAATG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGA CTACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTT ACGTCAATGG GAGTTTGT TT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GGCGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGACCGGA
3001 TCAAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGATGAC
3061 TGACATTGAC CTTATAGACT CTATAGGCAC ACCCTTTTGG CTCTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCGGT CCCCCTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGTGAC GTGTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGCTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

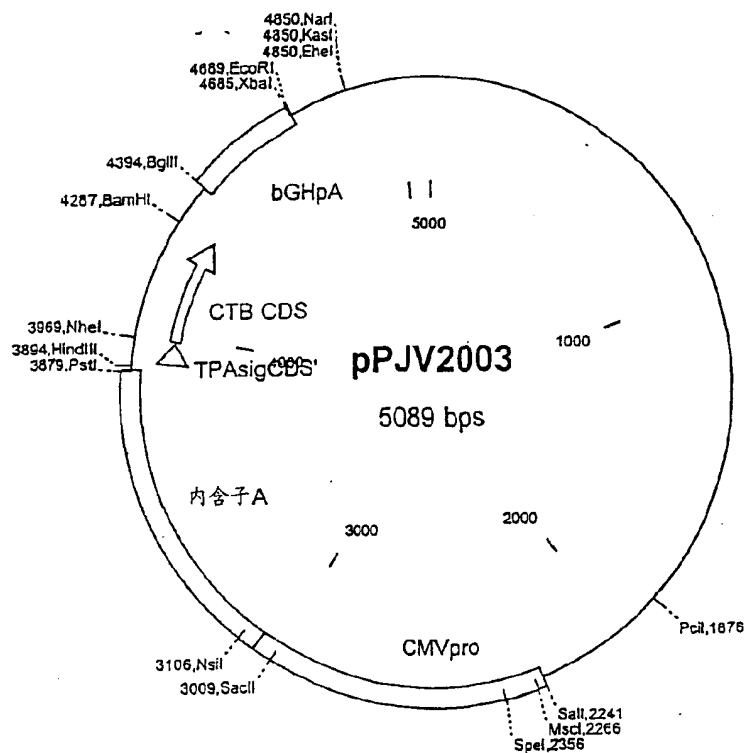
图 1-2

```

3661 GGCTCGCACC GTGACGCAGA TGGAAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAAGA TGCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA
4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC
4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG
4141 ATGATGGATA TGTTTCCACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACTTAGTG GGTCAAACCTA
4201 TATTGTCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA
4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCTGCTT
4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG
4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG
4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GCACCGCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4501 AAGAGCCGTG GATTTCATCAT GCACCGCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4561 GTAATACTTG CGATGAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAA ATTCTTGAC GAATACCAAT
4621 CTAAGTTTAA AAGACAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA
4681 TTAAGGATGA ATTATGAGGA TCCTCGCAAT CCCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT
4741 CACGCTCTTG TGAGGGACAG AAATACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA
4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT
4861 TGCCCCCTCC CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA
4921 TAAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG
4981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG
5041 GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG
5101 AATTCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACCT
5161 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCTTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC
5221 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT
5281 CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC
5341 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA
5401 CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC
5461 ATGTGTCAGA GGTTTTACAC GTCATCACCG AAACGCGCGA

```

图 1-3



分子：pPJV2003, 5089 bps DNA 环形
文件名称：pPJV2003.cm5,
描述：CTB nhe bam 切割片段连接入 7054 Nhe Bam 载体
注释：

分子特征：

类型	起始	终止	名称	描述			
区域	2242	3060	CMVpro				
区域	3061	3884	内含子A				
基因	3906	3969	TPAsigCDS'				
基因	3975	4286	CTB_CDS				
区域	4394	4690	bGHpA				
酶	(16 个位点)						
PciI	1876,	Sali	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894
NheI	3969,	BamHI	4287,	BglII	4394,	XbaI	4685

图 2-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTGCGCCTT ATTCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAAG
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCGTC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTGA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGTCGTG CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCAGCAA CTATTAACTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTATTGCTG GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCT
961 ACCGATCTGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAAGCAAC TATGGATGAA CGAAATGAGC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACCTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAGATCC GTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CCGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTCTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTGCGG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAAGTC TGTAGCACCG CTTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGAGCTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGCCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTCTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACCTATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTGACATAAA ATCAATATTG GCTATTGGCG ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCATAGC
2401 CCAATATATG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAAAG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATACA TATGCCAAGT CCGGCCCTCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTGT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCAGCTGTG TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC CGGGCCGGGA ACGGTGCTAT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGGATGAC
3061 GTAAGTACCG CTTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTTT GGGGCCCTATA CACCCCGCTC CTTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAT GATACTTTTC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACCCGT CCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGTCTCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

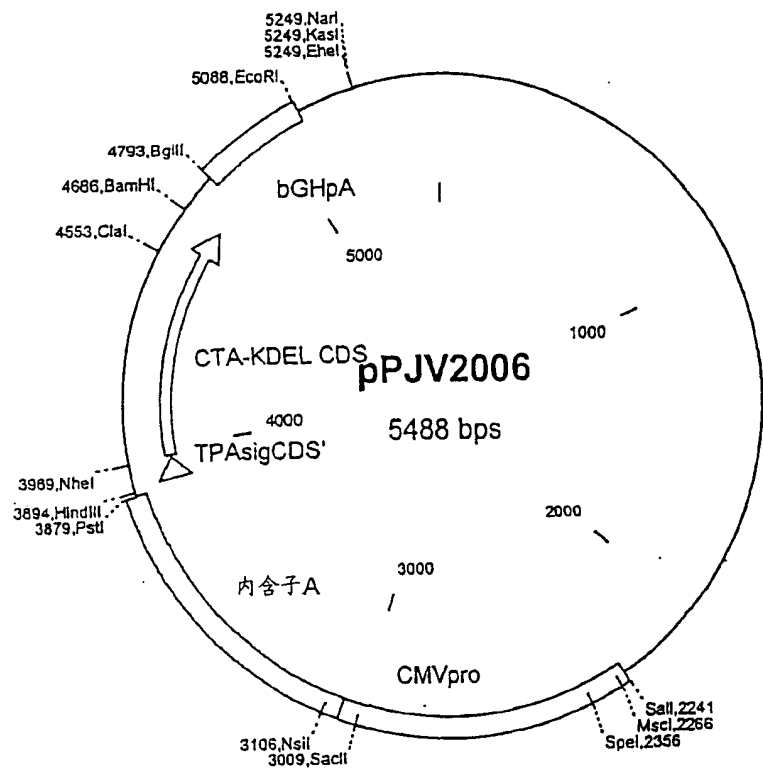
图 2-2

```

3661 GGCTCGCACC GTGAGCAGA TGGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAGAGAGG TGCAGGCAGG
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCACACCT CAAAATATTA CTGATTTGTG TGCAGAATAC CACAACACAC
4021 AAATATATAC GCTAAATGAT AAGATATTTT CGTATACAGA ATCTCTAGCT GGAAAAAGAG
4081 AGATGGCTAT CATTACTTTT AAGAATGGTG CAATTTTTC AAGTAGAAGTA CCAGGTAGTC
4141 AACATATAGA TTCACAAAAA AAAGCGATTG AAAGGATGAA GGATACCCTG AGGATTGCAT
4201 ATCTTACTGA AGCTAAAGTC GAAAAGTTAT GTGTATGGAA TAATAAAACG CCTCATGCGA
4261 TTGCCGCAAT TAGTATGGCA AATTAAGGAT CCTCGCAATC CCTAGGAGGA TTAGGCAAGG
4321 GCTTGAGCTC ACGCTCTTGT GAGGGACAGA AATACAATCA GGGGCAGTAT ATGAATACTC
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
4441 TCTGTGTGTTT GCCCCCTCCC CGTGCCCTCC TTGACCTTGG AAGGTGCCAC TCCCACTGTC
4501 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGACAGCT
4681 CGACTCTAGA ATTCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG
4801 GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG
4861 CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACC GCATATGGTG CACTCTCAGT
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
5041 GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGA

```

图 2-3



分子：pPJV2006, 5488 bps DNA 环形
文件名称：pPJV2006.cm5,
描述：以 Nhe Bam 切割 CTA-KDEL PCR 片段连接入 7054 Nhe Bam 载体
注释：

分子特征：

类型	起始	终止	名称	描述
区域	2242	3060	CMVpro	
区域	3061	3884	内含子A	
基因	3906	3969	TPAsigCDS'	
基因	3975	4685	CTA-KDEL CDS	
区域	4793	5089	bGHpA	

酶	(15 个位点)						
Sall	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356,	SacII	3009
NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894,	NheI	3969
ClaI	4553,	BamHI	4686,	BglII	4793,	EcoRI	5088

图 3-1

1	GACGAAAGGG	CCTCGTGATA	CGCCTATTTT	TATAGGTTAA	TGTCATGATA	ATAATGGTTT
61	CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	TTTCGGGGAA	ATGTGCGCGG	AACCCCTATT	TGTTTATTTT
121	TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCCGCTCA	TGAGACAATA	ACCTTGATAA	ATGCTTCAAT
181	AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	ATGAGTATTC	AACATTTCCG	TGTCGCCCTT	ATTCCCTTTT
241	TTGCGGCATT	TTGCCTTCCT	GTTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	GCTGGTGAAA	GTAAAAGATG
301	CTGAAGATCA	GTTGGGTGCA	CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	AGCGGTAAGA
361	TCCTTGAGAG	TTTTCGCCCC	GAAGAACGTT	TTCCAATGAT	GAGCACTTTT	AAAGTTCGTC
421	TAGCTGGCGC	GGTATTATCC	CGTATTGACG	CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC
481	ACTATTCTCA	GAATGACTTG	GTTGAGTACT	CACCAGTCAC	AGAAAAGCAT	CTTACGGATG
541	GCATGACAGT	AAGAGAATTA	TGCAGTGCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA
601	ACTTACTTCT	GACAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	CACAACATGG
661	GAGCCGATGT	AACCTCGCCTT	GATCGTTGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG
721	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA	CTATTAAC TG
781	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	TCCC GGCAAC	AAATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCCGATAAAG
841	TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG
901	TAGCTGGTGA	GCGTGGGTCT	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT
961	CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	TATGGATGAA	CGAAATAGAC
1021	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCAGTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT
1081	CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACCTT	ATTTTAAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA
1141	TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTCGTTC	CACTGAGCGT
1201	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT
1261	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC
1321	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAACCTGGT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC
1381	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC
1441	TCGCTCTGCT	AATCCTGTGA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGCTTACC CG
1501	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT
1561	CGTGACACCA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG
1621	AGCATTGAGA	AAGCGCCACG	CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG
1681	GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT
1741	ATAGTCTCTG	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTGTGTA	TGCTCGTCAG
1801	GGGGCGGGAG	CCTATGGAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	TTTACGGTTT	CTGGCCCTTT
1861	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCCTG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA
1921	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT
1981	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC
2041	CGATTCAATTA	ATGCACTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA
2101	ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC
2161	CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG
2221	ACCATGATTA	CGCCAAGCTA	GTCGACATAA	ATCAATATTG	GCTATTGGCC	ATTGCATACG
2281	TTGTATCTAT	ATCATAATAT	GTACATTTAT	ATTGGCTCAT	GTCCAATATG	ACCGCCATGT
2341	TGACATTGAT	TATTGACTAG	TTATTAATAG	TAATCAATTA	CGGGGTCATT	AGTTCATAGC
2401	CCATATATGG	AGTTCGCGT	TACATAAATT	ACGGTAAATG	GCCCCGCTCG	TGACCGCCCA
2461	ACGACCCCGG	CCCATTGACG	TCAATAATGA	CGTATGTTCC	CATAGTAACG	CCAATAGGGA
2521	CTTTCCATTG	ACGTCAATGG	GTGGAGTATT	TACGGTAAAC	TGCCCACTTG	GCAGTACATC
2581	AAGTGATATCA	TATGCCAAGT	CCGGCCCCCT	ATTGACGTCA	ATGACGGTAA	ATGGCCCGCC
2641	TGGCATPATG	CCCAGTACAT	GACCTTACGG	GACTTTCCCTA	CTTGGCAGTA	CATCTACGTA
2701	TTAGTCATCG	CTATTACCAT	GGTGATGCGG	TTTTGGCAGT	ACACCAATGG	GCGTGGATAG
2761	CGGTTTGACT	CACGGGGATT	TCCAAGTCTC	CACCCCATTG	ACGTCAATGG	GAGTTTGT TT
2821	TGGCACCAAA	ATCAACGGGA	CTTTCCAAAA	TGTCGTAATA	ACCCCGCCCC	GTTGACGCAA
2881	ATGGGCGGTA	GGCGGTGACG	GTGGGAGGTC	TATATAAGCA	GAGCTCGTTT	AGTGAACCGT
2941	CACATCGCCT	GGAGACGCCA	TCCACGCTGT	TTTGACCTCC	ATAGAAGACA	CCGGGACCGA
3001	TCCAGCCTCC	GCGGCCGGGA	ACGGTGCAAT	GGAACGCGGA	TTCCCCGTGC	CAAGAGTGAC
3061	GTAAGTACCG	CCTATAGACT	CTATAGGCAC	ACCCCTTTGG	CTCTTATGCA	TGCTATACTG
3121	TTTTTGCTT	GGGGCCTATA	CACCCCGCTG	CCTTATGCTA	TAGGTGATGG	TATAGCTTAG
3181	CCTATAGGTG	TGGGTTATTG	ACCATTATTG	ACCACCTCCC	TATTGGTGAC	GATACTTTCC
3241	ATTACTAATC	CATAACATGG	CTCTTTGCCA	CAACTATCTC	TATTGGCTAT	ATGCCAATAC
3301	TCTGTCCTTC	AGAGACTGAC	ACGGACTCTG	TATTTTITACA	GGATGGGGTC	CCATTTATTA
3361	TTTACAAATT	CACATATACA	ACAACGCCGT	CCCCCGTGCC	CGCAGTTTTT	ATTAAACATA
3421	GCGTGGGATC	TCCACGCGAA	TCTCGGTAC	GTGTTCCGGA	CATGGGCTCT	TCTCCGTAG
3481	CGGCGGAGCT	TCCACATCCG	AGCCCTGGTC	CCATGCCTCC	AGCGGCTCAT	GGTCGCTCGG
3541	CAGCTCCTTG	CTCCTAACAG	TGGAGGCCAG	ACTTAGGCAC	AGCACAATGC	CCACCACCAC
3601	CAGTGTGCCG	CACAAGGCCG	TGGCGGTAGG	GTATGTGTCT	GAAAATGAGC	TCGGAGATTG

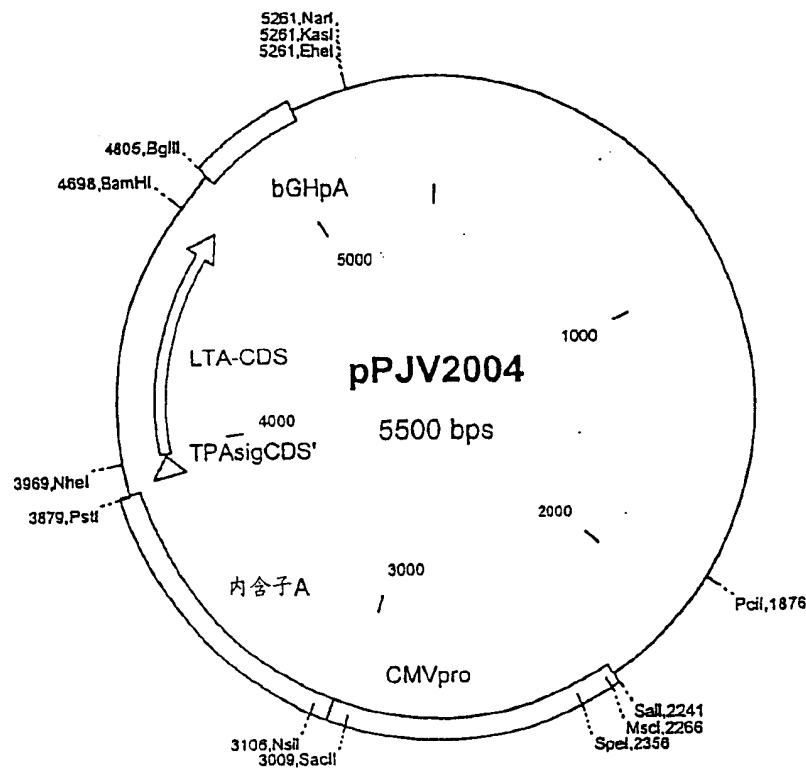
图 3-2

```

3661 GGCTCGCACC GTG AGA TGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGGAGG GCGGCGAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGC TTACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA
4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC
4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG
4141 ATGATGGATA TGTTTCCACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACTTAGTG GGTCAAACCTA
4201 TATTGTCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA
4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCTGCTT
4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG
4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG
4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GTTCCCTCC GGAGCATAGA GCTTGGAGGG
4501 AAGAGCCGTG GATTCAATCAT GCACCCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4561 GTAATACTTG CGATGAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAA ATTCCTTGAC GAATACCAAT
4621 CTAAAGTTAA AAGACAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA
4681 TTTGAGGATC CTCGCAATCC CTAGGAGGAT TAGGCAAGGG CTTGAGCTCA CGCTCTTGTG
4741 AGGGACAGAA ATACAAATCAG GGGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAAC CCAGATCTAC
4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC
4861 GTGCCTTCCT TGACCTTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCTAATA AAATGAGGAA
4921 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
5041 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCGACAGCTC GACTCTAGAA TTCACTGGCC
5101 GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
5161 GCACATCCCC CTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
5221 CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCCTGATGC GGTATTTTCT CCTTACGCAT
5281 CTGTGCGGTA TTTCACACCG CATATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA
5341 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTGTGCTG
5401 CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG
5461 TTTTCACCGT CATACCGAA ACGCGCGA

```

图 3-3



分子：pPJV2004, 5500 bps DNA 环形
文件名称：pPJV2004.cm5,
描述：LTA Nhe-Bam 插入体连接入 7054 Nhe Bam 载体
注释：

分子特征：

类型	起始	终止	名称	描述			
区域	2242	3060	CMVpro				
区域	3061	3884	内含子A				
基因	3906	3969	TPAsigCDS'				
基因	3975	4697	LTA-CDS				
区域	4805	5101	bGHpA				
酶 (13 个位点)							
PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	NheI	3969
BamHI	4698,	BglII	4805,	EheI	5261,	KasI	5261

图 4-1

1	GACGAAAGGG	CCTCGTGATA	CGCCTATTTT	TATAGGTTAA	TGTCATGATA	ATAATGGTTT
61	CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	TTTCGGGGAA	ATGTGCGCGG	AACCCCTATT	TGTTTTATTTT
121	TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCCGCTCA	TGAGACAATA	ACCCTGATAA	ATGCTTCAAT
181	AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	ATGAGTATTC	AACATTTCCG	TGTCGCCCTT	ATTCCTTTT
241	TTGCGGCATT	TTGCCTTCCT	GTTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	GCTGGTGAAA	GTAAAAGATG
301	CTGAAGATCA	GTTGGGTGCA	CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	AGCGGTAAGA
361	TCCTTGAGAG	TTTTCGCCCC	GAAGAACGTT	TTCCAATGAT	GAGCACTTTT	AAAGTTCTGC
421	TATGTGGCGC	GGTATTATCC	CGTATTGACG	CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC
481	ACTATTCTCA	GAATGACTTG	GTTGAGTACT	CACCAGTCAC	AGAAAAGCAT	CTTACGGATG
541	GCATGACAGT	AAGAGAATTA	TGCAGTGCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA
601	ACTTACTTCT	GACAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	CACAACATGG
661	GGGATCATGT	AACTCGCCTT	GATCGTTGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG
721	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA	CTATTAATCG
781	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG
841	TGTCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG
901	GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT
961	CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	TATGGATGAA	CGAAATAGAC
1021	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCACTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT
1081	CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACTTC	ATTTTTAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA
1141	TCCTTTTTGA	TAATCTCATG	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTTCGTT	CACTGAGCGT
1201	CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT
1261	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC
1321	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAAGTGGCT	TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC
1381	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	GGCCACCACT	TCAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC
1441	TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGCTTTACCG
1501	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT
1561	CGTGACACACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	ACTGAGATAC	CTACAGCGTG
1621	AGCATTGAGA	AAGCGCCACG	CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG
1681	GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT
1741	ATAGTCTCTG	CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTGTGTA	TGCTCGTACG
1801	GGGGGCGGAG	CCTATGGAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCCT	TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT
1861	GCTGGCCCTT	TGCTCACATG	TTCTTTCTCG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA
1921	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT
1981	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC
2041	CGATTCAATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA
2101	ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC
2161	CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG
2221	ACCATGATTA	CGCCAAGCTA	GTCGACATAA	ATCAATATG	GCTATTGGCC	ATTGCATACG
2281	TTGTATCTAT	ATCATAATAT	GTACATTTAT	ATTGGCTCAT	GTCCAATATG	ACCGCCATGT
2341	TGACATTGAT	TATTGACTAG	TTATTAATAG	TAATCAATTA	CGGGGTCAAT	AGTTCATAGC
2401	CCATATATGG	AGTTCCGCGT	TACATAACCT	ACGGTAAATG	GCCCCCCTCG	TGACCGCCCA
2461	ACGACCCCGG	CCCATTGACG	TCAATAATGA	CGTATGTICC	CATAGTAAAG	CCATAGGGA
2521	CTTTCCATTG	ACGTCAATGG	GTCGAGTATT	TACGGTAAAC	TGCCCACTTG	GCAGTACATC
2581	AAGTGTATCA	TATGCCAAGT	CCGGCCCCCT	ATTGACGTCA	ATGACGGTAA	ATGGCCCGCC
2641	TGGCATTATG	CCCAGTACAT	GACCTTACGG	GACTTTTCTA	CTTGGCAGTA	CATCTACGTA
2701	TTAGTCATCG	CTATTACCAT	GGTGATGCGG	TTTTGGCAGT	ACACCAATGG	GCGTGGATAG
2761	CGGTTTGACT	CACGGGGATT	TCCAAGTCTC	CACCCCATTG	ACGTCAATGG	GAGTTTGTGT
2821	TGGCACCAAA	ATCAACGGGA	CTTTCCAAAA	TGTCGTAATA	ACCCCGCCCC	GTTGACGCAA
2881	ATGGGCGGTA	GGCGTGTACG	GTGGGAGGTC	TATATAAGCA	GAGCTCGTTT	AGTGAACCGT
2941	CAGATCGCCT	GGAGACGCGA	TCCACGCTGT	TTTGACCTCC	ATAGAAGACA	CCGGGACCGA
3001	TCCAGCCTCC	GCGGCCGCGA	ACGGTGCATT	GGAACGCGGA	TTCCCGTGTC	CAAGAGTGAC
3061	GTAAGTACCG	CCTATAGACT	CTATAGGCAC	ACCCCTTTGG	CTCTTATGCA	TGCTATACCT
3121	TTTTTGGCTT	GGGGCCTATA	CACCCCGCTC	CCTTATGCTA	TAGGTATGAG	TATAGCTTAG
3181	CCTATAGGTG	TGGGTTATTG	ACCATATTG	ACCACTCCCC	TATTGGTGAC	GATACTTTCC
3241	ATTACTAATC	CATAACATGG	CTCTTTGCCA	CAACTATCTC	TATTGGCTAT	ATGCCAATAC
3301	TCTGTCCTTC	AGAGACTGAC	ACGGACTCTG	TATTTTACAA	GGATGGGGTC	CCATTTATTA
3361	TTTACAAATT	CACATATACA	ACAACGCCGT	CCCCCGTGCC	CGCAGTTTTT	ATTAAACATA
3421	GCGTGGGATC	TCCACGCGAA	TCTCGGGTAC	GTGTTCCGGA	CATGGGCTCT	TCTCCGGTAG
3481	CGGCGGAGCT	TCCACATCCG	AGCCCTGGTC	CCATGCCTCC	AGCGGCTCAT	GGTCGCTCGG
3541	CAGCTCCTTG	CTCCTAACAG	TGGAGGCCAG	ACTTAGGCAC	AGCACAATGC	CCACCACCAC
3601	CAGTGTGCCG	CACAAGGCCG	TGGCGGTAGG	GTATGTGTCT	GAAAATGAGC	TCCGAGATTG

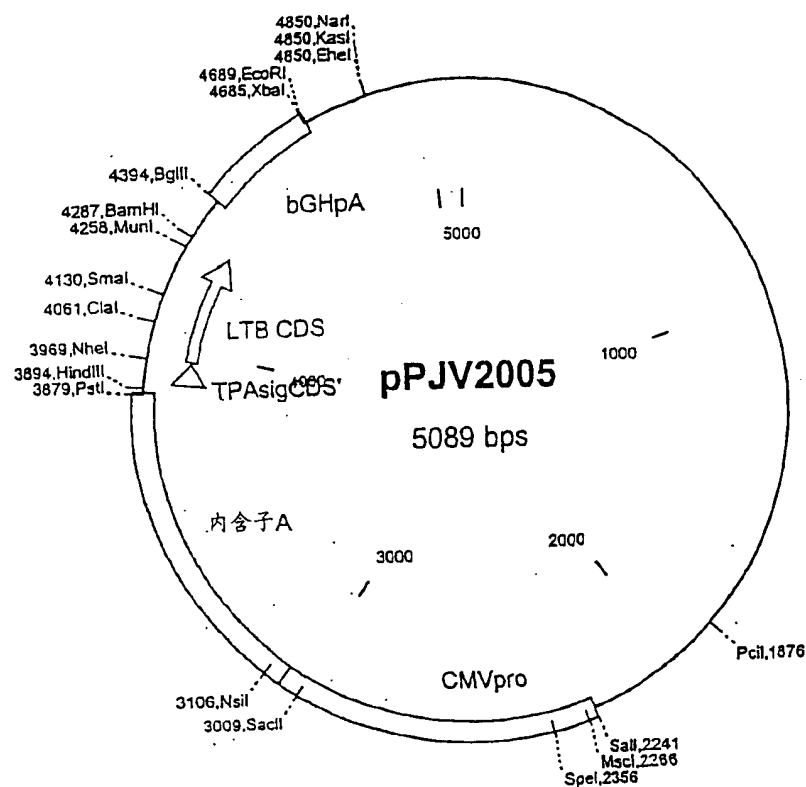
图 4-2

```

3661 GGCTCGDACC GTGACGCAGA TGGAAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAAGA TGCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCC TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCCGCG CGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGGC GACAAATTAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA
4021 TAAAACGTTT CGGAGGTCTT ATGCCAGAG GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACTC
4081 AAATGAATAT TAATCTTTAT GATCACGCGA GAGGAACACA AACCGGCTTT GTCAGATATG
4141 ATGACGGATA TGTTCCTACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA
4201 TATTATCAGG ATATTCCTACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGACCA AATATGTTTA
4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACAGGAG GTTTCTGCGT
4321 TAGGTGGAAT ACCATATTCT CAGATATATG GATGGTATCG TGTTAATTTT GGTGTGATTG
4381 ATGAACGATT ACATCGTAAC AGGGAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG
4441 CTCCGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTCCCACC GGATCACCAA GCTTGAGAG
4501 AAGAACCCTG GATTCACTAT GCACCACAAG GTTGTGGAAT TTCATCAAGA ACAATTACAG
4561 GTGATACTTG TAATCAGGAG ACCCAGAATC TGAGCACAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT
4621 CAAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GGTGACATA TATAACAGAA
4681 TTCGGGATGA ATTATGAGGA TCCTCGCAAT CCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT
4741 CACGCTCTTG TGAGGGACAG AAATACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA
4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT
4861 TGCCCCCTCC CCGTGCCCTT CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CCTTCTCTAA
4921 TAAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG
4981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG
5041 GTGGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG
5101 AATTCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACCT
5161 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCCGACC
5221 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT
5281 CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC
5341 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA
5401 CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC
5461 ATGTGTCAGA GGTTCACACC GTCATCACCG AAACGCGCGA

```

图 4-3



分子：pPJV2005, 5089 bps DNA 环形
文件名称：pPJV2005.cm5,
描述：LTB NheBam 片段连接入 7054 Nhe Bam 载体
注释：

分子特征：

类型	起始	终止	名称	描述			
区域	2242	3060	CMVpro				
区域	3061	3884	内含子A				
基因	3906	3969	TPAsigCDS'				
基因	3975	4286	LTB CDS				
区域	4394	4690	bGHpA				
酶	(19 个位点)						
PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894
NheI	3969,	ClaI	4061,	SmaI	4130,	MunI	4258

图 5-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGAGCCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCGTGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCAGGAGT GAATGAAGCC ATACCAACG
721 ACCAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCAGCAA CTATTAAGTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATGTCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAAGC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAATAATTC ATTTTAAAT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTCGTTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACC CGCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCTGTGTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGGACTC AAGACGATAG TTACCCGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCAATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTCTG CCGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACCCGACGA ACGCGGCCCT TTTACGGTTT CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCAGATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCAATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCGCGCT TACATAACTT ACGGTAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGA CTACGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTGT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAATA ACCCGCCCCG GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GGCCTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GAGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTIATTG ACCATTATG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTAATAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCTCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAATGAGC TCGGAGATTG

```

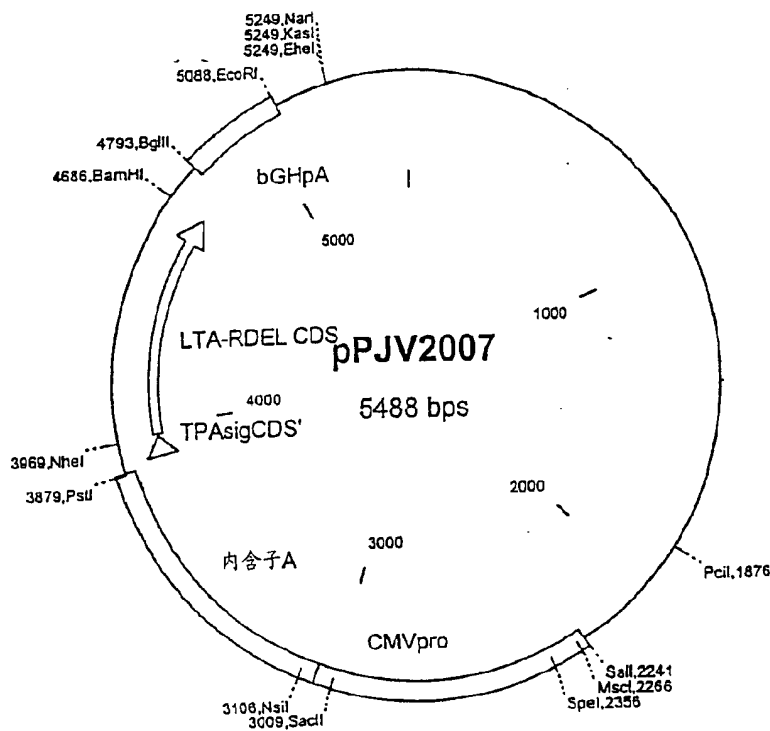
图 5-2


```

3661 GGCTCGCACC GTGACGCAGA TGGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGATAGAGA TGCAGGCAGC--
3721 TGAGTTGTGT TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAAC TCCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCGCTCCC CAGTCTATTA CAGAACTATG TTCGGAATAT CGCAACACAC
4021 AAATATATAC GATAAATGAC AAGATACTAT CATATACGGA ATCGATGGCA GGCAAAAGAG
4081 AAATGGTTAT CATTACATT AAGAGCGCGC CAACATTTC GGTCTGAAGTC CCGGGCAGTC
4141 AACATATAGA CTCCCAAAAA AAAGCCATTG AAAGGATGAA GGACACATTA AGAATCACAT
4201 ATCTGACCGA GACCAAAATT GATAAATTAT GTGTATGGAA TAATAAAACC CCCAATTCAA
4261 TTGCGGCAAT CAGTATGGAA AACTAGGGAT CCTCGCAATC CCTAGGAGGA TTAGGCAAGG
4321 GCTTGAGCTC ACGCTCTTGT GAGGGACAGA AATACAATCA GGGGCAGTAT ATGAATACTC
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
4441 TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTC
4501 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATGTCTGTA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGACAGCT
4681 CGACTCTAGA ATCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCAGATCCC CCTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG
4801 GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG
4861 CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACCC GCATATGGTG CACTCTCAGT
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
5041 GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACC GA AACGCGCGA

```

图 5-3



分子: pPJV2007, 5488 bps DNA 环形
文件名称: pPJV2007.cm5,
描述: LTA-RDEL Nhe Bam 插入体连接入 7054 Nhe Bam 载体
注释:

分子特征:

类型	起始	终止	名称	描述
区域	2242	3060	CMVpro	
区域	3061	3884	内含子A	
基因	3906	3969	TPAsigCDS'	
基因	3975	4685	LTA-RDEL CDS	
区域	4793	5089	bGHpA	

酶 (14 个位点)							
PciI	1876,	Sall	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	NheI	3969
BamHI	4686,	BglII	4793,	EcoRI	5088,	EheI	5249

图 6-1

```

1      GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61     CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121    TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181    AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241    TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301    CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361    TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCAGTTT AAAGTTCTGC
421    TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481    ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCACTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541    GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601    ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTGTG CACAACATGG
661    GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCAGGAGT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721    ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAACTG
781    GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841    TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901    GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT
961    CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021   AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081   CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141   TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTC CACTGAGCGT
1201   CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTCGTG CGCGTAATCT
1261   GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCAG GATCAAGAGC
1321   TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACCTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381   TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441   TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501   GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT
1561   CGTGCAACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621   AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681   GCAGGGTCCG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741   ATAGTCTGT CCGGTTTTCG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1801   GGGGGCGGAG GCTTACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1861   GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTTCTTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921   TTACCCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCTCTCCCG GCGCGTTGCG
1981   CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCG GCGCGTTGCG
2041   CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101   ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCAT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161   CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221   CCGCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281   TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341   TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CCGGGTCAIT AGTTTCATAGC
2401   CCATATATGG AGTTCGCGCT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCCGCCA
2461   ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521   CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581   AAGTGATATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCCGC
2641   TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701   TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761   CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATG ACGTCAATGG GAGTTTGTGT
2821   TGGCACAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTCGTAATA ACCCGCCCCG GTTGACGCAA
2881   ATGGGCGGTA GCGGTGTACC GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941   CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001   TCCAGCCTCC GCGGCCGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGTGC CAAGAGTGAC
3061   GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121   TTTTGGCTT GGGGCCATA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181   CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241   ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301   TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361   TTTACAAATT CACATATAA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421   GCGTGGGATC TCCACGCGA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481   CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541   CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601   CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

图 6-2

```

3661 GGCTCGCACC GTGACGCAGA TGGAAGACTT AAGGCAGCGG CRGAAGAAAG TGCGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAAC TCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGGC GACAAATAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA
4021 TAAAACGTTT CCGAGGTCTT ATGCCCAGAT GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACTC
4081 AAATGAATAT TAATCTTTAT GATCAGCGCA GAGGAACACA AACC GGCTTT GTCAGATATG
4141 ATGACGGATA TGTTTCCACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA
4201 TATTATCAGG ATATTCCACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGCACCA AATATGTTTA
4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACAGGAG GTTTC TCGGT
4321 TAGGTGGAAT ACCATATTCT CAGATATATG GATGGTATCG TGTTAATTTT GGTGTGATTG
4381 ATGAACGATT ACATCGTAAC AGGGAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG
4441 CTCCGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTCCCACC GGATCACCAA GCTTGGAGAG
4501 AAGAACCCTG GATTCAATCAT GCACCACAAG GTTGTGGAAT TTCATCAAGA ACAATTACAG
4561 GTGATACTTG TAATGAGGAG ACCCAGAAATC TGAGCACAAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT
4621 CAAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GGTTGACATA TATAACAGAA
4681 TTTGAGGATC CTCGCAATCC CTAGGAGGAT TAGGCAAGGG CTTGAGCTCA CGCTCTTGTG
4741 AGGGACAGAA ATACAATCAG GGGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAAC CCAGATCTAC
4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC
4861 GTGCCTTCCT TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCTTAATA AAATGAGGAA
4921 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
5041 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCGACAGCTC GACTCTAGAA TTCATGGGCC
5101 GTCGTTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
5161 GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
5221 CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCCTGATGC GGTATTTTCT CCTTACGCAT
5281 CTGTGCGGTA TTTCAACCG CATATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA
5341 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG
5401 CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTGAGAGG
5461 TTTTCACCGT CATACCAGAA ACGCGCGA

```

图 6-3

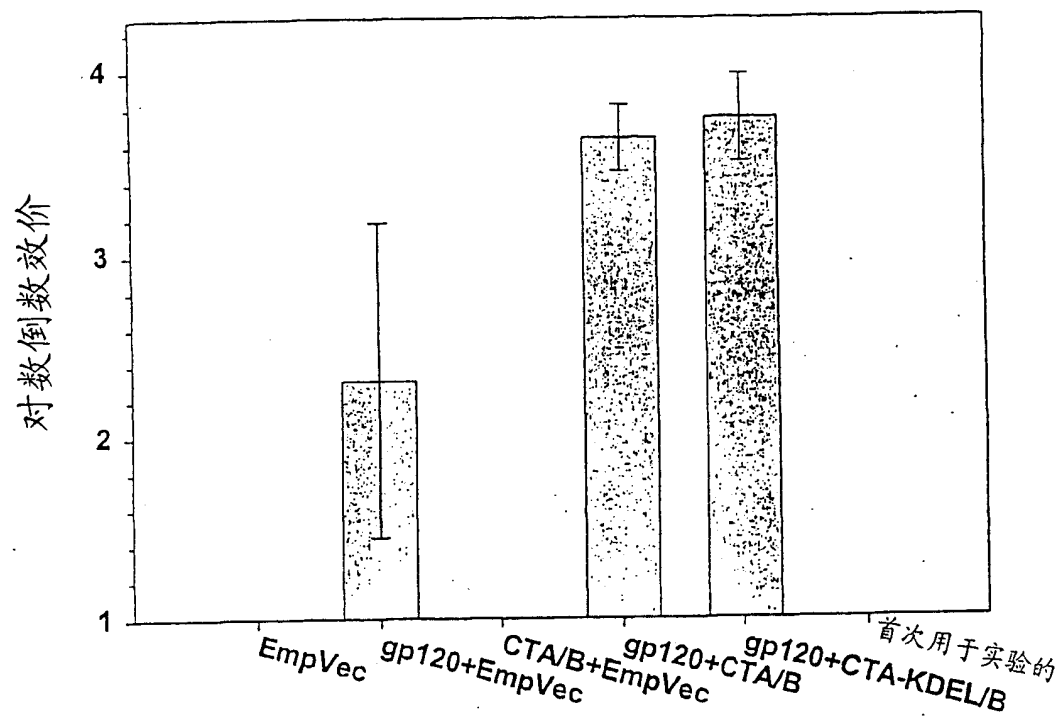


图 7

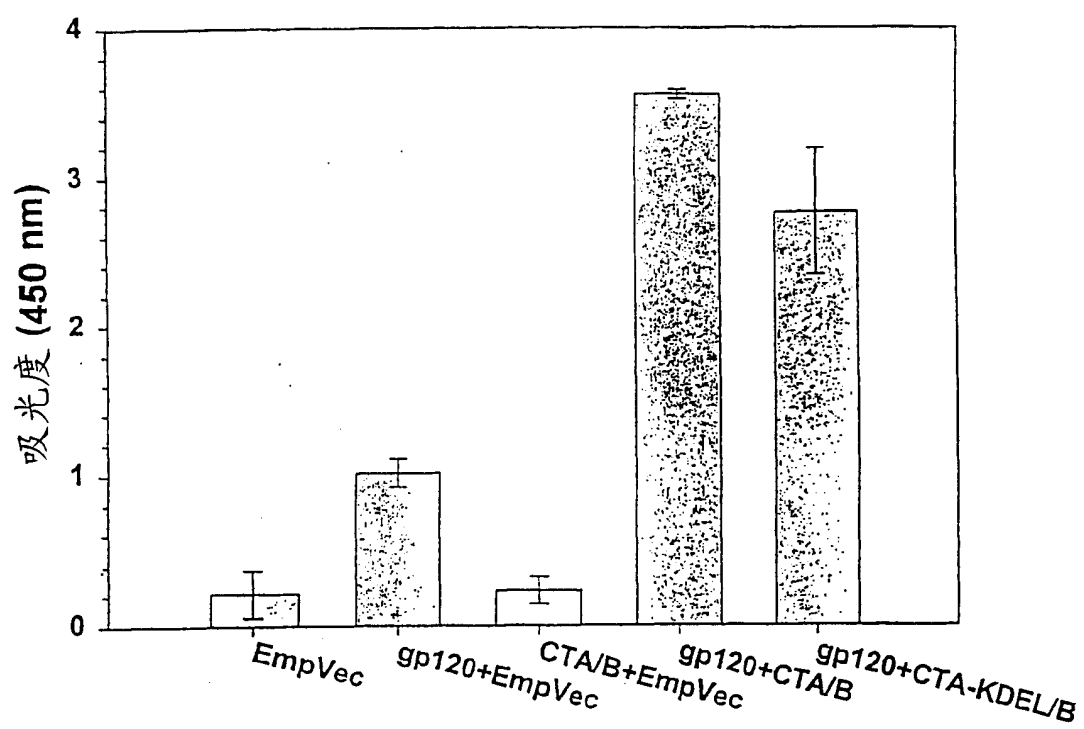


图 8

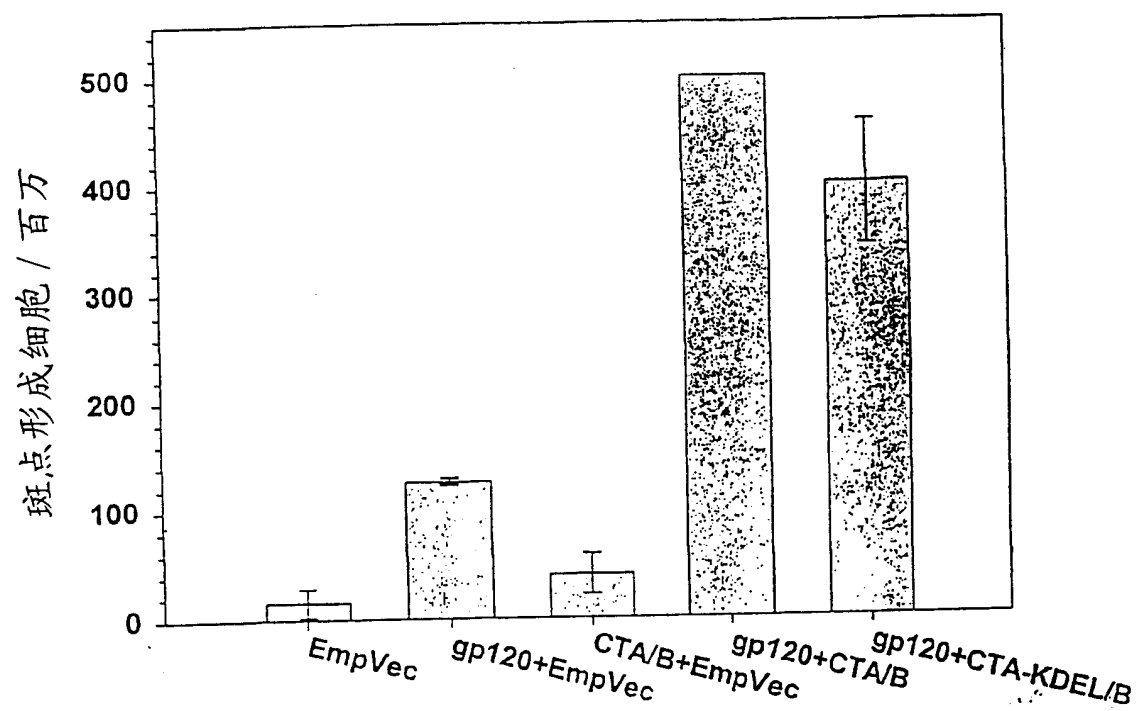


图 9

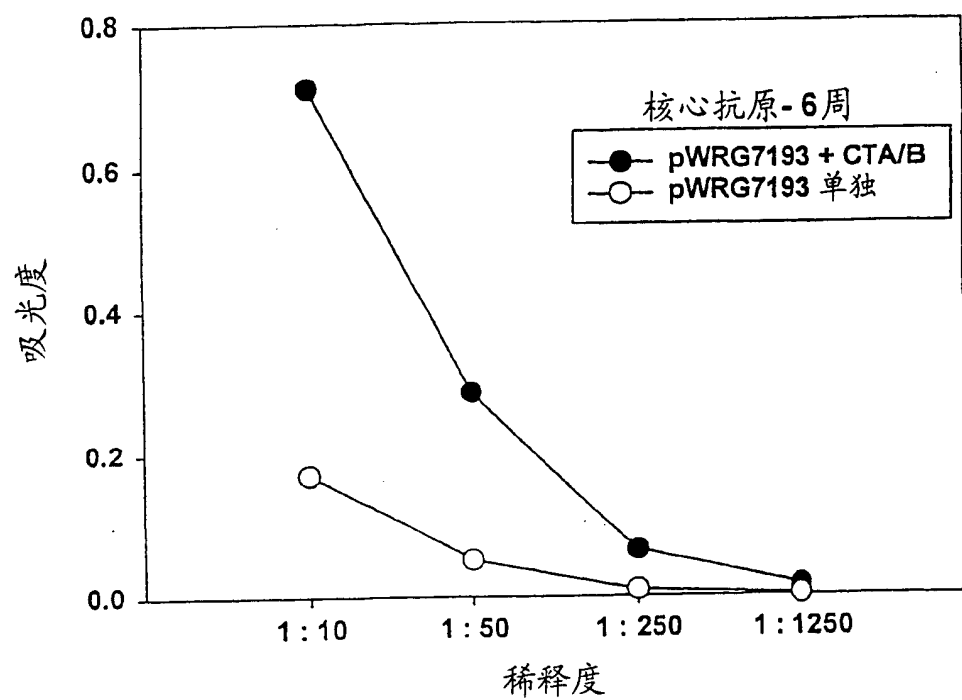


图 10

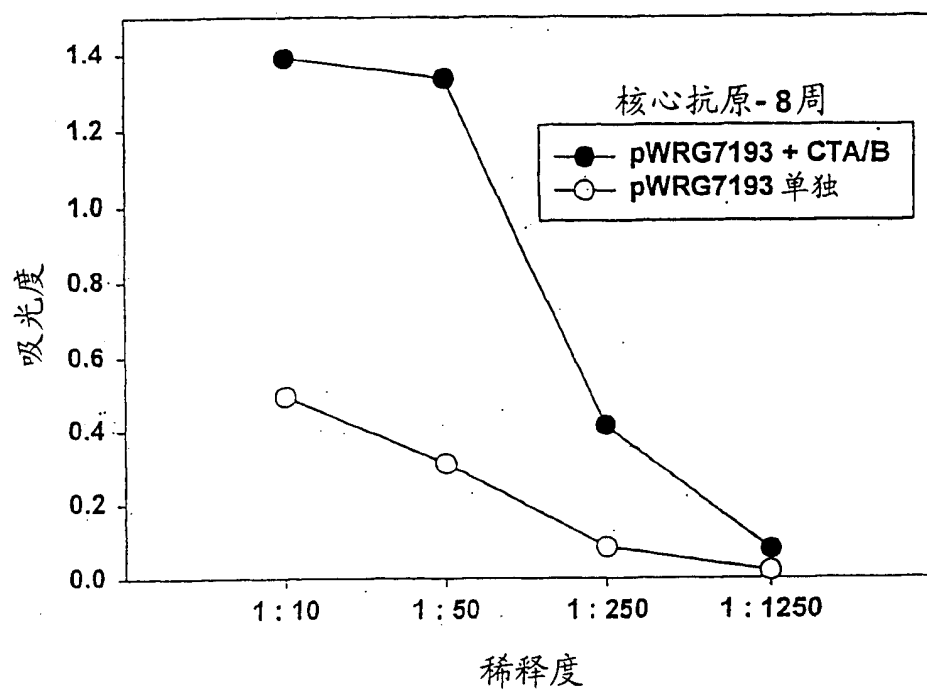


图 11

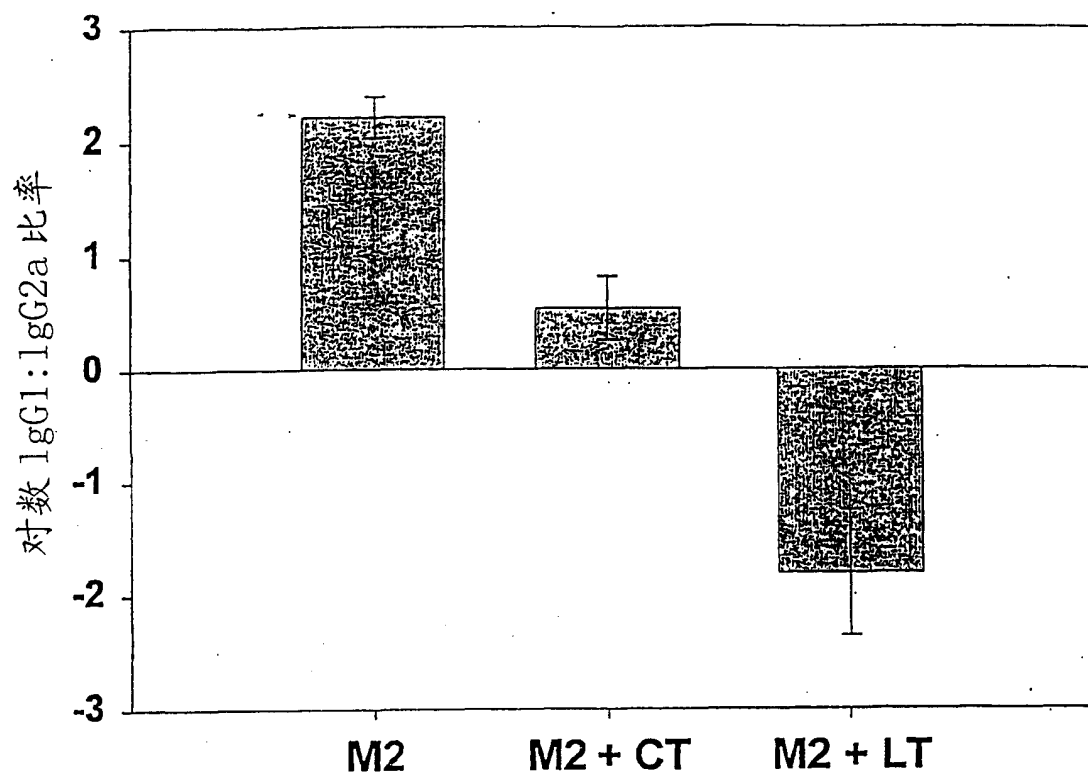


图 12

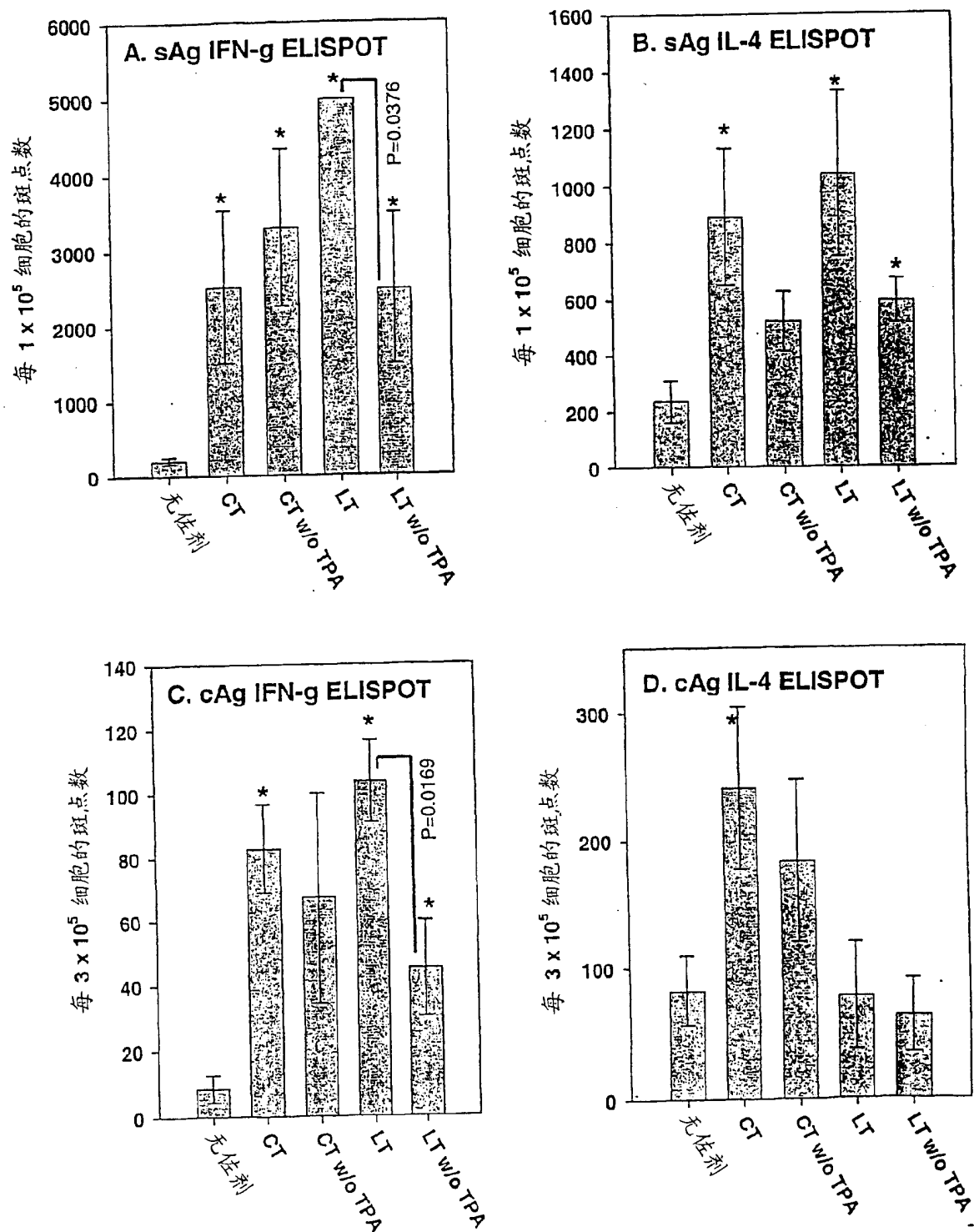


图 13A-13D

小鼠中对 HSV-2 攻击的保护

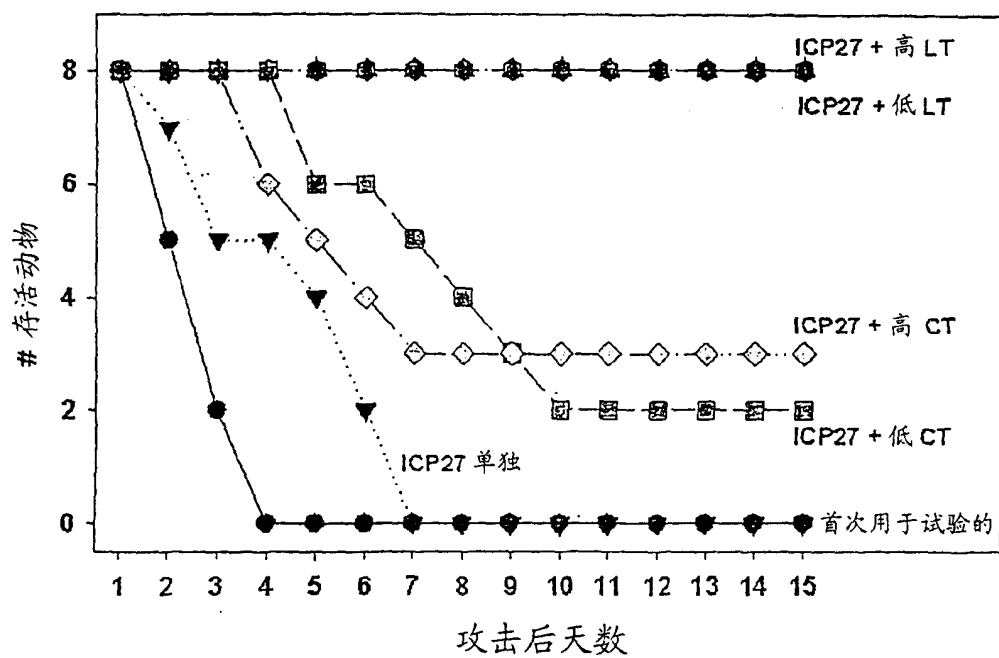


图 14