



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102884193 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201080064234. 2

A61K 39/155 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 21

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/288, 401 2009. 12. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/061510 2010. 12. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/084783 EN 2011. 07. 14

(71) 申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 E·杜博维 R·W·瑞沙

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

C12N 15/45 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页

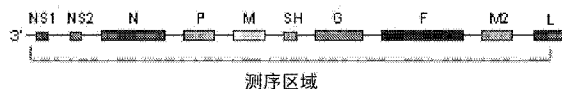
序列表 37 页 附图 3 页

(54) 发明名称

新肺炎病毒组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供新鉴定的能感染哺乳动物的肺炎病毒,所述哺乳动物包括狗、猫和可能的人。提供分离的病毒多核苷酸和蛋白,和分离的病毒本身。发明包括检测病毒的组合物和方法,和预防和/或治疗与病毒出现正相关的疾病征兆的方法和组合物,和包括病毒的分离细胞。也提供完整病毒颗粒,病毒蛋白和其片段。



1. 一种包括与 SEQ ID NO:1,2 或 3 序列至少 96% 相同的分离多核苷酸的组合物。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述多核苷酸是与 SEQ IDNO:1 序列至少 96% 相同的多核苷酸。
3. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述多核苷酸是与 SEQ IDNO:2 序列至少 96% 相同的多核苷酸。
4. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述多核苷酸是与 SEQ IDNO:3 序列至少 96% 相同的多核苷酸。
5. 一种包括与 SEQ ID NO:1,2 或 3 序列至少 96% 相同的多核苷酸的分离病毒。
6. 如权利要求 5 所述的分离病毒,其特征在于,所述分离病毒已经减毒。
7. 如权利要求 5 所述的分离病毒,其特征在于,所述分离病毒包括与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同的多核苷酸。
8. 如权利要求 6 所述的分离病毒,其特征在于,所述分离病毒包括与 SEQ ID NO:2 序列至少 96% 相同的多核苷酸。
9. 如权利要求 7 所述的分离病毒,其特征在于,所述分离病毒包括与 SEQ ID NO:3 序列至少 96% 相同的多核苷酸。
10. 一种含有病毒的分离细胞或体外细胞培养物,所述病毒包括与 SEQ ID NO:1,2 或 3 序列至少 96% 相同的多核苷酸的。
11. 一种在哺乳动物中刺激免疫反应的方法,所述方法包括给予哺乳动物含有权利要求 5 所述分离病毒、或所述分离病毒所含蛋白的片段的组合物,其中免疫反应在给药后于动物中被刺激。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,权利要求 5 所述的分离病毒包括与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同的多核苷酸,并且其中将所述组合物给予犬。
13. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,权利要求 5 所述的分离病毒包括与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 序列至少 96% 相同的多核苷酸,并且其中将所述组合物给予猫。
14. 一种检测哺乳动物是否被肺炎病毒感染的方法,所述方法包括从哺乳动物中获得生物样品和检测与 SEQ ID NO:1,2 或 3 序列至少 96% 相同的多核苷酸,或通过检测由 SEQ ID NO:1,2 或 3 反向互补物所编码蛋白的存在来检测与 SEQ ID NO:1,2 或 3 序列至少 96% 相同的多核苷酸,其中,多核苷酸或蛋白的存在指示哺乳动物被肺炎病毒感染。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物是犬或猫。

新肺炎病毒组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 21 日提交的美国申请号 61/288,401 的优先权,其公开内容通过引用纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及病毒学领域,并且更特定是在包括犬和猫在内的哺乳动物中发现的副粘病毒(Paramyxoviridae)科,肺炎病毒(Pneumovirinae)亚科的新发现病毒。

[0004] 发明背景

[0005] 关在一起的家犬,如在收容所、犬舍或繁育基地中,经常受到急性呼吸道感染(犬窝咳)影响。该疾病快速传播并难于消除,因为新动物会不断引入。一系列试剂会产生多个和顺序重叠感染的复杂综合征,使诊断和治疗困难。受影响犬的临床征兆从轻度干咳和流鼻涕液到严重病例的肺炎和死亡。猫也被多种试剂感染,产生不同严重程度的呼吸窘迫。相同或相似病毒也能感染人。因此,当前且仍需要确定感染多种哺乳动物的试剂和发展用于诊断、预防和 / 或治疗这种感染的组合物和方法。本发明满足了这些需要。

发明内容

[0006] 本发明基于新肺炎病毒的发现。所述病毒能感染不同类型的哺乳动物,包括但不限于限于犬、猫和可能的人。病毒的出现可与犬的急性呼吸疾病(ARDC)或猫呼吸疾病,或人或其他哺乳动物的呼吸或其他疾病正关联。

[0007] 发明提供病毒的分离多核苷酸和蛋白以及分离病毒本身。发明包括检测病毒的组合物和方法,以及预防和 / 或治疗与病毒出现正相关的疾病征兆的方法和组合物。也提供包括病毒的分离细胞。

[0008] 发明的病毒是负链 RNA 病毒。发明包括分离负链,与负链反向互补的正链, RNA 多核苷酸的 DNA 等价物,正链编码的蛋白,以及多核苷酸和蛋白的片段。

[0009] 某些实施方式中,经分离病毒包含的负链多核苷酸含有序列 SEQ ID NO:1 或与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同的序列。也提供包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 序列的分离多核苷酸,或具有与 SEQ ID NO:2 或 3 序列至少 96% 相同的序列的多核苷酸。

[0010] 发明提供刺激哺乳动物免疫反应的方法。刺激免疫反应可以是细胞介导,体液或其结合,并能对动物提供预防和 / 或治疗益处。刺激免疫反应的方法包括给予哺乳动物包括本文所述多核苷酸和 / 或病毒,本文所公开病毒多核苷酸编码的病毒蛋白,所述蛋白的片段或其组合的组合物。多核苷酸,病毒和 / 或蛋白和 / 或其片段能从任何合适来源分离,或能用熟知技术重组生成。

[0011] 发明提供检测哺乳动物所得生物样品中病毒出现的方法。所述方法包括从哺乳动物获得生物样品并从生物样品中检测病毒包括的多核苷酸序列,或病毒蛋白或其片段。多核苷酸、蛋白、蛋白片段或其组合的出现指示哺乳动物被病毒感染。

[0012] 附图简要说明

[0013] 图 1. 使用人类呼吸道合胞病毒特异性单克隆抗体(Mab)的 A72 细胞免疫荧光分析。A) 感染细胞上的 Mab 2G122。B) 未感染细胞上的 Mab2G122。C) 感染细胞上的 Mab 5H5N。D) 未感染细胞上的 Mab 5H5N。从生产商获得的初级 Mab 储液以 1:100 稀释使用。红色背景通过用伊文思蓝复染产生。

[0014] 图 2. 免疫荧光分析显示定向用于感染和未感染犬 A72 细胞的非呼吸相关测试的随机选定犬血清的反应性。A) 1:320 稀释的感染细胞血清。B) 1:320 稀释的未感染细胞血清。红色背景由用伊文思蓝复染生成。

[0015] 图 3. 包括 SEQ ID NO:1 序列的病毒基因组构成的图示。

[0016] 发明描述

[0017] 本发明提供新型分离病毒, 分离的病毒多核苷酸和蛋白, 检测病毒的组合物和方法, 和预防 and / 或治疗哺乳动物中与病毒出现正相关的疾病征兆的组合物和方法。

[0018] 发明的病毒是负链 RNA 病毒。因此, 病毒颗粒中包装的遗传材料是与正链反向互补的单链 RNA。由 RNA 依赖的 RNA 聚合酶从负链转录生成正链。正链至少有部分 mRNA 功能, 因为由正链编码的病毒蛋白在感染细胞的细胞质中翻译, 并且之后参与新病毒颗粒的组装和负链基因组的包装。

[0019] 在某些实施方式中, 发明提供分离的病毒包括含有序列 SEQ ID NO:1 或与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同序列的负链多核苷酸。发明也提供与负链互补的多核苷酸。在某些实施方式中, 所述多核苷酸包括 SEQ ID NO:4 所示序列, 或与 SEQ ID NO:4 至少 96% 相同的序列。也提供分离多核苷酸, 所述多核苷酸包括 SEQ ID NO:1 序列或与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同的序列, 或包括 SEQ ID NO:4 序列或与 SEQ ID NO:4 序列至少 96% 相同的序列。也提供包括 SEQ ID NO:2 和 / 或 SEQ ID NO:3 序列的多核苷酸, 或具有与 SEQ ID NO:2 或 3 序列至少 96% 相同序列的多核苷酸。也提供与所述序列和与反向互补物至少 96% 相同序列的反向互补序列。本文公开的所有这些多核苷酸和蛋白和其片段的结合也包括在发明中。能鉴定发明提供的病毒多核苷酸, 其功能在于支持活病毒复制(包括减毒病毒)。

[0020] 也提供包括病毒的细胞。在多个实施方式中, 包括病毒的细胞是分离细胞, 或体外增殖以使病毒减毒的细胞, 和 / 或用于疫苗或其他目的的病毒来源。因此, 包括病毒的分离细胞, 包括病毒的细胞培养物和 / 或细胞系, 细胞培养基中出现的病毒和 / 或病毒产物, 和包括病毒的分离组织都是发明的各个方面。

[0021] 在特定实施方式中, 提供本发明所述各 RNA 序列的 DNA 等价物。因此, 发明包括本文所述各 RNA 序列, 其中 RNA 中的每个 U (尿嘧啶) 被 T (胸腺嘧啶) 取代。本发明所述的每个病毒多核苷酸包括与各多核苷酸指定 SEQ ID NO 中所存在序列相同的多核苷酸, 并且还包含与病毒 SEQ IDNO 中所存在序列至少 96% 相同的所有多核苷酸。在特定实施方式中, 与序列表所示多核苷酸序列至少 96% 相同的多核苷酸与那些跨其全长的序列至少 96% 相同。不希望受任何特定理论的束缚, 认为本文出现和包括那些与序列表所列病毒多核苷酸序列有至少 96% 相同的多核苷酸序列与相关病毒例如已知感染鼠哺乳动物的病毒所含多核苷酸不同。不希望受任何特异理论的束缚, 还认为病毒的减毒, 例如连续传代, 能产生包括和 / 或转录与序列表所示序列至少 96% 相同的多核苷酸的病毒。与序列表中特定引用序列不同的序列可与所示序列有 96.0%–99.9% 相同, 包括其间到第一小数点的所有整数。96.0%–100% 序列相同性的所有范围(含端值)也是发明的实施方式。

[0022] 多核苷酸的片段也包括在本发明中。因此,在多个实施方式中,每个病毒多核苷酸(包括反向互补物和其 DNA 等价物)包括多核苷酸片段,长度从 10 个核苷酸到多核苷酸的全长,并包括其间所有整数。例如,本发明包含多核苷酸,所述多核苷酸含有 SEQ ID NO:1 序列且包含其序列所有片段,包含 10 个核苷酸长度到多至 8,598 个核苷酸长度,并且包含其间所有整数。本发明提供的多核苷酸,无论是否在病毒颗粒中出现,可以比本文所述那些更长,因为所示序列可能不包含完整病毒基因组序列和 / 或反向互补物和 / 或其 DNA 等价物。

[0023] 发明也提供刺激哺乳动物免疫反应的方法。经刺激免疫反应是能提供动物预防和 / 或治疗益处的免疫反应。经刺激免疫反应可以是体液和 / 或细胞介导的免疫反应。经刺激免疫反应能针对病毒编码的任何抗原和 / 或免疫原。因此,完整病毒颗粒,每个病毒蛋白,和病毒蛋白片段是能用于在哺乳动物中刺激免疫反应的本发明实施方式。在多种实施方式中,刺激免疫反应的动物是家犬(*Canis familiaris*)或家猫(*Felis catus*),即分别是驯养的犬或猫。

[0024] 在特定实施方式中,用于刺激犬免疫反应的多核苷酸包含 SEQ IDNO:1 序列或与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同的序列,或其编码蛋白或蛋白片段,或 SEQ ID NO:1 反向互补序列编码的病毒颗粒。包含 SEQ ID NO:2 和 / 或 SEQ ID NO:3 的序列的多核苷酸,或具有与 SEQ ID NO:2 或 3 序列至少 96% 相同序列的多核苷酸,或由 SEQ ID NO:2 或 3 反向互补序列编码的蛋白或蛋白片段或病毒蛋白,或具有与 SEQ ID NO:2 或 3 反向互补序列至少 96% 相同序列的多核苷酸,优选用于刺激猫的免疫反应。所述序列、蛋白、蛋白片段、和病毒颗粒与犬和猫的关系用于使用诊断目的的组合,但是这并不以任何方式消除将本发明实施到其他哺乳动物上的适用性,包括人。

[0025] 刺激免疫反应的方法包括将含有本文所述病毒、本文所公开病毒多核苷酸编码的病毒蛋白、所述蛋白片段或其组合的组合物给予哺乳动物。病毒和 / 或蛋白和 / 或其片段能从任何合适来源分离,或能用熟知技术重组生成。在多种实施方式中,发明提供的用于疫苗的病毒蛋白包括但不必要限于 NS-1、NS-2、N、P、M、SH、G、F、M2-1、M2-2、L 蛋白和其组合。编码这些蛋白的所有核苷序列包括在发明中,并且能由本领域技术人员用常规技术测定。

[0026] 给予发明合成物的哺乳动物能是任何有风险、怀疑有、或已经诊断出病症的哺乳动物,所述病症与一个或多个肺炎病毒的出现正相关,包括但不必需限于本文公开的病毒。在一个实施方式中,动物是有风险、怀疑患有、或者已诊断有 ARDC 的犬。在另一个实施方式中,哺乳动物是有风险、怀疑患有或诊断有呼吸疾病或任何其他与本文所述病毒正相关的疾病的人。这方面,本领域已知涉及本文所述新发现病毒的病毒,例如鼠肺炎病毒,能造成人的广泛感染(例如,参见 Pringle CR, Eglin RP., Murine pneumonia virus: seroepidemiological evidence of widespread human infection (《鼠肺炎病毒:广泛人际感染的血清流行病学证据》). *J Gen Virol.* 1986 年 6 月 ;67(Pt 6):975-82)。因此,有理由认为当前提供的组合物和方法有刺激人免疫反应的实用性和诊断人中病毒感染的应用。

[0027] 将发明组合物即疫苗给予动物能产生预防效果,意味着接受疫苗的动物中感染的可能性低于没有疫苗的动物更低,或动物中与病毒出现正相关的疾病征兆比没有接受疫苗动物更轻。给予本发明疫苗也能有治疗效果,意味着感染程度(如病毒负荷或效价和 / 或其他本领域技术人员已知的感染程度标记)在感染并接受疫苗后的动物中相对于感染但没有

接受疫苗的动物更低。类似地,感染并接受疫苗的动物中与动物病毒出现正相关的疾病征兆比没有接受疫苗的动物更轻。

[0028] 本文所述病毒和 / 或蛋白和多核苷酸能分离,意味着其从自然环境中去除,例如从动物和 / 或获自动物的生物样品中分离病毒。在一个实施方式中,包括本文所述病毒的分离细胞视作包括分离病毒。此外,本发明的分离病毒和 / 或蛋白和 / 或其片段和 / 或分离和 / 或重组多核苷酸能纯化任何所需纯化程度。发明提供的组合物可以包含病毒、病毒蛋白、其片段和 / 或多核苷酸、多核苷酸片段和 / 或其组合,由其组成或主要由其组成。

[0029] 在一个实施方式中,方法包括将包括含 SEQ ID NO:1 序列的多核苷酸或具有与 SEQ ID NO:1 序列至少 96% 相同序列的多核苷酸的组合物给予犬,从而在犬中刺激针对病毒的免疫反应。在一个实施方式中,多核苷酸作为 DNA 疫苗给予。制作、配制含 DNA 疫苗的药物组合物和给予含 DNA 疫苗的组合物的方法为本领域已知。在一个实施方式中,给予犬的多核苷酸在病毒颗粒中出现。病毒颗粒能分离和 / 或重组。在多个实施方式中,给予犬的病毒包括含某一氨基酸序列的蛋白,所述氨基酸序列是病毒颗粒所包括的部分蛋白。由病毒基因组编码的病毒颗粒所含病毒蛋白的预测氨基酸序列包括犬病毒蛋白 NS 1,非结构蛋白 1 (SEQ ID NO:7),NS2,非结构蛋白 2 (SEQ ID NO:8),N,核蛋白 (SEQ ID NO:9),P,磷蛋白 (SEQ ID NO:10),M,基质蛋白 (SEQ ID NO:11),SH,小疏水蛋白 (SEQ ID NO:12),G,附着蛋白 (SEQ ID NO:13),F,融合蛋白 (SEQ ID NO:14),M2,基质蛋白 M2-1 (SEQ ID NO:15)和 M2-2 (SEQ ID NO:16),L,RNA 依赖性 RNA 聚合酶,其中部分序列已提供 (SEQ ID NO:17)。发明也提供这些蛋白的猫病毒形式。

[0030] 在另一个实施方式中,所述方法包括给予猫组合物,所述组合物包括含 SEQ ID NO:2 和 / 或 SEQ ID NO:3 序列的多核苷酸、或具有与 SEQ IDNO:2 或 3 序列至少 96% 相同序列的多核苷酸,从而在猫中刺激针对病毒的免疫反应。在一个实施方式中,给予猫的多核苷酸在病毒颗粒中出现。所述颗粒能分离和 / 或重组。

[0031] 在多个实施方式中,给予猫的病毒包括含选自 SEQ ID NO:5 或 SEQ IDNO:6 的氨基酸序列的蛋白。

[0032] 在某些实施方式中,本发明包括能针对本文所公开病毒感染提供预防和 / 或治疗效果的疫苗。所述疫苗能包括活或死(失活)病毒或其片段。死病毒是不能复制的病毒。死疫苗能用任何本领域技术人员熟知的多种技术制备,包括但不限于热灭活和病毒蛋白和 / 或核酸的修饰,方法包括但不必需限于接触多聚甲醛,福尔马林和紫外光。例如,病毒蛋白能共价修饰,如通过能修饰病毒蛋白的交联剂以防止病毒细胞进入和 / 或复制所需的一个或多个步骤。认为活病毒包括减毒病毒。减毒病毒是相对于未减毒形式毒力降低的病毒。因此,减毒病毒能复制,但仅相对于同一类型的未减毒病毒变慢,并且因此一般不致病。本领域的技术人员应识别未减毒,减毒和死病毒之间的这些和其他区别,从而能互相区分。

[0033] 减毒病毒能用任何标准技术得到。在一个实施方式中,病毒通过连续传代哺乳动物细胞培养物来减毒。连续传代能通过许多机理引起减毒。支持病毒复制的任何细胞包括但不限于人细胞,能用于以病毒增殖和 / 或减毒为目的的传代。在多个非限定实施例中,传代的细胞培养物能获自或衍生自犬或猫,例如分别来自家犬或家猫。在一个实施方式中,细胞是初级细胞培养物。在一个实施方式中,细胞包括犬衍生的 A-72 细胞系,其美国典型培养物保藏中心(ATCC)的产品号是 CRL-1542。适合病毒减毒的任何传代数目都能使用。根

据本公开的优势,本领域技术人员能决定病毒减毒的传代参数。一般说,可以使用5-150,包括其间所有整数,并优选20-50传代。

[0034] 包括病毒的组合物能作为疫苗用途的药物制品提供。包括病毒的组合物能制备成悬浮液或冻干形式,并能另外包括所述组合物通常使用的药学上可接受载体和/或稀释剂。适用于发明的载体和稀释剂的一些示例参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (《雷明登:药物的科学和实践》)(2005)第21版,宾西法尼亚州费拉德尔菲亚, Lippincott Williams 和 Wilkins。载体的特定非限制性示例包括稳定剂,防腐剂和缓冲液。稳定剂的特定非限制性示例包括糖(如山梨糖醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、右旋糖苷、谷氨酸或葡萄糖),蛋白(如奶粉血清、清蛋白或酪蛋白)或其降解产物。合适缓冲液的特定非限制性示例包括碱金属磷酸盐。合适防腐剂的特定非限制性示例是硫柳汞、硫柳汞和庆大霉素。合适稀释剂的特定非限制性示例包括水,水性缓冲液(如缓冲盐水),乙醇和多元醇(如甘油)。

[0035] 本领域技术人员会认识到本文提供疫苗制品能包括有佐剂活性的一种或多种化合物。合适佐剂包括但不必需限于弗氏不完全佐剂,苏氨酸胞壁酰二肽,氢氧化铝,-磷酸盐或-氧化物,水包油或油包水乳液,基于例如矿物油或植物油如维生素E醋酸酯和皂苷。

[0036] 本发明提供的疫苗能通过任何合适途径给予。在多种实施方式中,疫苗能通过胃肠外、肌肉内或皮下、静脉内或口服给予,包括但不必需限于经鼻给予。本领域技术人员会认识到疫苗的有效剂量能用正常考虑因素确定,例如需要刺激免疫反应的动物类型,大小,年龄,环境,感染风险或阶段。一般说,根据发明的活疫苗能以每只动物 10^1 - 10^6 噬斑形成单位(pfu)的剂量给药,例如1ml剂量。灭活疫苗可以包括每个动物 10^6 - 10^{10} pfu的抗原等价物。

[0037] 发明的多核苷酸可以修饰成携带一个或多个异源基因,例如不仅针对本文所公开病毒,也对其他相关或不相关病毒和/或其他感染原提供免疫。同样,本文提供的免疫制剂也能包括旨在针对与本文公开病毒不同的感染原刺激免疫反应的免疫原性试剂。因此,发明包括用于不同哺乳动物和针对不同感染原的疫苗组合。疫苗组合能包括含所有或部分本文公开病毒蛋白的融合蛋白,和能含有来自其他蛋白多肽序列的融合蛋白以提供对不同感染原有有效的多价疫苗。发明还包括给予其他能提供动物有益效果的组合物,其能在所述感染的传统治疗之前、同时或之后给药。

[0038] 发明也提供检测本文公开病毒的方法。所述方法包括从动物获得生物样品和检测样品中和样品来源的病毒蛋白和/或病毒多核苷酸的存在。任何病毒多核苷酸和蛋白能用于检测有或没有病毒的方法。认为检测 SEQ ID NO:1、2或3的反向互补物或DNA等价物与检测多核苷酸相同,所述多核苷酸包括 SEQ ID NO:1、2或3序列或与任何这些序列至少96%相同的序列。

[0039] 检测能用获自需要诊断的哺乳动物的任何合适生物样品进行。生物样品的合适来源包括但不限于血液、粘膜刮片、组织活检或唾液。在一个实施方式中,生物样品包括鼻和/或咽部拭子或气管灌洗液。

[0040] 可以使用本领域熟知的多种技术测试DNA、RNA或蛋白来检测有或没有病毒。在某些实施方式中,通过检测包括全部或部分病毒基因组的多核苷酸,或从全部或部分病毒基因组扩增的多核苷酸来测定病毒的存在。这方面,通过鉴定来自病毒负链、病毒正链或其组

合的多核苷酸序列,发明包括测定病毒存在(或缺失)。发明还包括检测病毒负链,病毒正链或其组合的 DNA 形式。例如,在一个实施方式中,逆转录酶聚合酶链反应能用于生成病毒负链或其部分的 DNA 拷贝,并且 DNA 拷贝能用作病毒基因组扩增的模板以获得在杂交双链体中包括正链和负链或其部分的 DNA 形式的多个双链 DNA 分子。本领域技术人员应理解有多种扩增技术能增加遗传物质的数量以用于确定病毒是否或曾经在感兴趣生物样品中,并且扩增(没有扩增)的遗传物质能用很多检测多核苷酸序列的熟知技术和试剂分析。因此,发明包括任何和所有从生物样品中获得和分析核酸的方法,从而能确定有或没有病毒多核苷酸,包括但不限于那些涉及通过核酸和 / 或其他类型探针的杂交,和通过使用任何已知测序技术测定病毒多核苷酸序列来检测多核苷酸的方法。可测定所有或部分序列并用于鉴定病毒多核苷酸。

[0041] 在某些实施方式中,发明提供包括用于核酸杂交和 / 或扩增的分离病毒多核苷酸和成分的组合物。因此,所述组成物可额外包括 DNA 聚合酶、逆转录酶、游离核苷三磷酸、盐、缓冲液和其他通常用于杂交和 / 或扩增核酸的试剂。在一个实施方式中,发明提供分离病毒多核苷酸和 / 或从病毒多核苷酸扩增的多核苷酸,其中所述病毒多核苷酸和 / 或从病毒多核苷酸扩增的多核苷酸与一个或多个用于实时核酸扩增技术的扩增引物和检测探针杂交。

[0042] 发明还提供分离病毒多核苷酸和 / 或从病毒多核苷酸扩增的多核苷酸,其中所述多核苷酸与阵列中存在的至少一个探针杂交。例如,阵列可以存在于用以检测多种不同多核苷酸存在与缺失的芯片上。所述芯片市售可得并且能定制检测基本上任何多核苷酸的存在与缺失。

[0043] 在多种实施方式中,发明还包括有形介质中固定检测哺乳动物是否已经被本文公开的病毒感染。有形介质能是任何类型的有形介质,例如任何类型数字媒介,包括但不限于能存储于计算机、DVD、CD-ROM 或电子邮件的数字化文件。有形介质能提供给医疗服务人员以发展用于已感染哺乳动物的治疗方案。

[0044] 本领域技术人员会认识到根据本发明的优势,能生成多种试剂并用于检测本文公开病毒的诊断方法。例如,多克隆或单克隆抗体能用病毒颗粒或病毒颗粒部分、或分离或重组病毒蛋白或其片段生成。因此,抗体可制备成特异性识别任何病毒蛋白中存在的任何抗原决定簇。在多种实施方式中,抗体识别 NS-1、NS-2、N、P、M、SH、G、F、M2-1、M2-2 和 L 病毒蛋白或部分或其组合。期望生成的抗体能区分本发明病毒和其他相关病毒,例如 MPV。

[0045] 抗体能用于任何技术,因此能测定生物样品中或来自生物样品的病毒抗原的存在与缺失。所述技术包括但不限于 Western 印迹、免疫荧光、免疫组织化学和基于珠的 ELISA 分析或传统蛋白阵列。

[0046] 在一个实施方式中,发明提供在抗体复合物中出现的分离和 / 或重组病毒或病毒蛋白。

[0047] 以下实施例旨在说明本发明特定实施方式,但不应以任何方式对本发明构成限制。

[0048] 实施例 1

[0049] 从混种犬的鼻和咽部拭子获得样品并且用于接种犬 A72 细胞(美国典型培养物保藏中心, CRL-1542) 培养物以分离呼吸道病毒。在对应于接种后约 21 天的传代培养后期,

一些培养物显示细微细胞病性改变。持续传代后,培养物显示细胞变圆的小灶点,随后整个培养物中细胞快速死亡。所述模式主观评定为非特性的 ARDC 常见相关病毒。获得十三例个体病毒分离物并且在本实施例中描述。用普通犬呼吸道病毒特异性诊断试剂组的检测未能鉴定出已知病毒。用针对其他病毒的附加试剂进一步测试使用人呼吸道合胞病毒的单克隆抗体(Mab)库(抗 HRSV,编号 VP-R151,美国加利福尼亚州伯林格姆的载体实验室(Vector Laboratories))通过免疫荧光分析(IFA)最终揭示正识别。所述抗体制品通常用于我们实验室中以检测牛 RSV (BRSV)。染色模式包括丝状膜结合和自由漂浮病毒颗粒和胞质包含体,这是通常在 RSV 感染细胞中观察到的模式。

[0050] 根据初始 IFA 结果,我们试图使用基于人、牛和绵羊 RSV 序列比对设计的 PCR 引物从病毒中扩增核衣壳基因(N)片段。这未成功。抗 RSV 库中单独 Mab 的存储和其特异性从生产商获得并用于 IFA (图 1)。用 Mab5H5N (M2 蛋白特异)染色显示病毒颗粒和包含体。Mab 2G122 (P 蛋白特异)主要染色包含体并给出相对一致的膜相关信号。没有获得 Mabs 1C3 (N 蛋白特异)或 5A6 (F 蛋白特异)染色。所有四个单独 Mab 通过 IFA 识别 BRSV。4 个 Mab 中只有 2 个识别犬病毒不能扩增 RSV 基因组保守区域这与 RSV 有关,但不是典型形式。

[0051] 通过使用 CODEHOP 算法基于高度保守氨基酸(aa)序列简并 PCR 引物。定位 L (聚合酶)和 N 基因中的特异性区域。反应产物测序和 BLAST 分析揭示该病毒与传统称为小鼠肺炎病毒(或肺炎病毒)的鼠肺炎病毒(MPV)密切相关。发现两个 L 基因 PCR 产物与 MPV 有 95%-97% 相同并且 N 基因片段有约 96% 相同。

[0052] 为解决是否新鉴定肺炎病毒限于所测试收容所犬的问题,我们随机筛选犬血清样品并发现 27 例动物中的 6 例有特异性识别感染培养物中病毒的抗体。染色模式与 Mab 观察到的类似(图 2)。包含变量的 BRSV 中和抗体的牛血清没有染色受犬病毒感染的细胞。

[0053] 本实施例显示从 13 例有 ARDC 的狗分离的病毒似乎与 MPV 密切相关,并且因此我们认为其为犬肺炎病毒(CnPnV)。鼠肺炎病毒是分类在副粘病毒科肺炎病毒亚科肺炎病毒属的仅有三个病毒种之一。人 RSV 是模式种并与 BRSV 密切相关,而 MPV 相关性更远。例如,人和牛 RSV 的 N 蛋白核苷序列互相有约 94% 相同,但对 MPV 只有 60% 相同。只有两个完全测序的 MPV 菌株“株 15”和 J3666,并且在核苷水平有 99.7% 相同。

[0054] CnPnV 与 ARDC 的关联在一些病例中有致病性,特别当涉及复杂病因时。通过类比,MPV 通常已知感染啮齿动物群落并且血清学证据指出感染几个野生啮齿动物种但对自然生态知之甚少。事实上,不清楚啮齿动物是否是唯一 MPV 宿主或如果密切相关,病毒可以在其他物种循环。已经报道了与呼吸道症状相关的人感染证据(Pringle CR 等, J Gen Virol. 1986 ;67:975-82)。本质上,啮齿动物感染可以是亚临床或潜伏。实验室小鼠临床征兆可从无症状变化到发展为有高发病率和死亡率的肺水肿。包括 J3666 和株 15 在内的致病株,能产生严重肺炎并在低剂量接种后 6-10 天死亡。致病性或其缺失可依赖于病毒和小鼠品系。

[0055] 多个细菌和病毒剂能涉及犬呼吸道疾病。因此认为 CnPnV 是另一个能引起上呼吸道防护机理受损的事件顺序,造成更严重疾病的试剂。

[0056] 实施例 2

[0057] 本实施例所述的材料和方法用于获得其他实施例所述结果。

[0058] 病毒分离

[0059] 使用湿拭子从有呼吸道疾病征兆的混种狗收集鼻和咽样品,并且在康奈尔大学动物健康诊断中心收到 24 小时内进行处理。接种前,拭子浸入 3ml 有厄尔(Earle)盐的极限必需培养基(吉布可(Gibco) 10370,美国加州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen)),0.5% 牛血清白蛋白,青霉素(200U/ml),链霉素(200 μ g/ml)和两性霉素 B(Fungizone)(2.5 μ g/ml)中 30 分钟并且然后机械搅拌 10 秒。合并各 0.5ml 的等分鼻和咽部拭子提取物的,并用于接种没有其他培养基的半融合 A72 细胞的单独 T25 烧瓶(Binn 等,1980)(CRL-1542,美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心)。使提取物保持单层 1-3 小时然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗。细胞于 37°C 维持在 6ml 培养基(Leibovitz L15 培养基,10% 热灭活胎牛血清(FBS),200U/ml 青霉素,200 μ g/ml 链霉素,50 μ g/ml 庆大霉素)中,并且每 6-8 天进行继代培养。未接种对照 A72 培养物在分离过程中平行进行。

[0060] 免疫荧光分析

[0061] 细胞附于载玻片,然后用 PBS 冲洗并在冷丙酮中固定 10 分钟。载玻片在空气中干燥并在染色前于 -20°C 保存。在 PBS 中稀释的初级和二级抗体用于载玻片并且 37°C 孵育 30 分钟。每个孵育中,载玻片用 PBS 冲洗 15 分钟。染色用荧光显微镜观察。针对 HRSV 的 Mab 库在 1:400 稀释下用于初始鉴定(VP-R151,美国加利福尼亚州伯林格姆的载体实验室)。以 1 \times 浓度提供的小鼠抗 PVM (CL-603IFA,马萨诸塞州威尔明顿的查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))在 1:20 稀释下使用。二抗 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (02-18-06, KPL,美国马里兰州盖瑟斯堡)在 1:40 (12.5 μ g/ml) 稀释下使用。

[0062] RNA 纯化

[0063] 总细胞 RNA 从 A72 细胞(74106,美国加州瓦伦西亚的凯杰公司(Qiagen))中纯化。从一个显示约 50-75% 细胞病变效应(CPE)的感染 25cm² 烧瓶收集细胞并经各柱纯化。包括拭子洗脱液的无细胞上清液和培养基用 140 μ l 样品纯化(52906,凯杰公司)。纯化的 RNA 重悬于 40 μ l 无 RNase 的水中。

[0064] PCR

[0065] 起始用于获得基因组片段的简并引物序列是基于肺炎病毒亚科病毒的比对,并用 CODEHOP 算法设计(blocks.fhrc.org/codehop.html)(Rose 等,1998)。逆转录 PCR (RT-PCR) 根据生产商说明以 25 μ l 体积用一步反应(210212,凯杰公司)完成。每一个反应使用 1:5-1:10 稀释的 1 μ l 总 RNA 和 10 皮摩尔的各引物。RT 步骤的反应条件是在 50°C 30 分钟,然后 95°C 15 分钟。循环条件是 95°C 60 秒,54-56°C 30 秒,和 72°C 60-90 秒,共 35 个循环。N 基因的引物组 :N276F, tccgtgcaggccgaratggarcarg/P1R, (SEQ ID NO:35) ggaactcgggggcaaytтыtccat ;SEQ ID NO:36);L 基因号 1 :L428F, ccgatcttcggccayccnatggg/SEQ ID NO:37) L538R, ttcttaggaggggagatggcyttrtrctt ;SEQ ID NO:38) L 基因号 2 :L698F, catcaccgacctgtccaagttyaaycargc/SEQ ID NO:39) L894R, ttgaagtcgtccaggatggtrttdateca SEQ ID NO:40。两个用于来自多个地理位置的拭子样品的 PCR 引物组基于 CnPnV, MPV J3666 和菌株 15 序列比对而设计。G 蛋白 :G715F, ggettctgtttcttctttctgg/SEQ ID NO:41) G1062R, ccgtggtggtgctgtg SEQ ID NO:42);SH1 蛋白 :SH1F, atggatcctaacaatgacctayacSEQ ID NO:43)/SH187R, gattgggatgaacygtgcattg SEQ ID NO:44)。用于扩增低传代 Brne 分离物的引物 :G84F, tgtaaaagtgaaccaaattgtgta SEQ ID NO:45)/G404R, aaatcttcaggtaaatacaggte SEQ ID

N0:46);G849F, ttttaacaacaagaatcagtc SEQ ID N0:47)/G1048R, ctcctaggtgcgggggttgg SEQ IDN0:48)。用于 G 和 SH 扩增子的反应条件是 RT 在 50° C 30 分钟, 灭活/变性在 95° C 15 分钟, 和 PCR 在 95° C 60 秒, 54° C 30 秒和 72° C 90 秒, 共 35 个循环。

[0066] 基因组分析

[0067] PCR 产物用康奈尔大学测序和基因型核心实验室的应用生物系统自动 3730DNA 分析仪测序。用于检测完全序列的引物是基于 MPV 序列或前面测定的 CnPnV 序列。生成重叠 PCR 产物以覆盖间隙和引物结合区域。所有区域在 2 条链上测序。CnPnV 分离物与 MPV 株 15 (GenBank AY729016) 和 J3666 (GenBank NC006579) 的序列使用 Lasergene (DNASTAR, 美国威斯康星州麦迪逊) 作比较。

[0068] 实施例 3

[0069] 分离和鉴定

[0070] 采用鼻和咽部拭子洗脱液接种 A72 细胞。相对长时间培养后, 通常在第三或第四传代后观察到有限 CPE。起始 CPE 通常包括细胞变圆的散布小灶点, 有时有小合胞体和形成空泡。静置培养的所述 CPE 在几天内进展缓慢。继代培养常导致维持此低级 CPE 的单层, 但是一些培养物在 24-48 小时内有快速进展和单层的分解。尽管与一些疱疹病毒感染相似, 所述模式不测试犬疱疹病毒阳性, 并不显示通常使用相似过程分离的任何犬呼吸道病毒典型特征。一些早期传代分离物在培养中复制较差, 显示新鲜细胞上清液转移后 CPE 很少或没有。然而, 一些持续传代的培养物发展出更一致的转移 CPE, 并且选择它们用于进一步分析。起始测试显示来自几只不相关狗的血清似乎在 CPE 培养中识别病毒抗原(数据未显示), 但是普通犬呼吸道病毒测试为阴性。如实施例 1 所报道, 对 HRSV 特异的 Mab 有效识别病毒抗原。有抗 PVM 多克隆血清的正 IFA 染色用于确证。抗 PVM 小鼠血清通过 IFA 中仅微弱结合 BRSV。

[0071] 实施例 1 所述 CnPnV 的最初 13 种分离物源自相同组织管理的 2 个动物收容所。为检测是否病毒限于所述两个地点, 来自其他地理位置的病狗的鼻或咽部拭子样品用 PCR 测试。美国 8 个州 (CO、GA、FL、IN、MO、NV、SC、VA) 的 19 只狗用 G 和 SH 基因的引物组测试。19 例样品中, 一例来自内华达州, 和 5 例来自南卡罗来纳州的 9 只狗的组, 对 G 和 SH PCR 都是阳性并且通过测序证实。没有从其他 13 例狗中获得 PCR 阳性结果。对其他 6 例进行犬呼吸道诊断的来自纽约州和宾夕法尼亚州的鼻拭子样品尝试 A72 细胞的病毒分离。其中, 两例额外分离物来自纽约市兽医院且另一个来自宾西法尼亚州费城收容所。用抗 RSV 和抗 PVM 抗体通过 IFA 和随后 RT-PCR 证实所述分离物为 CnPnV。尽管所述 RT-PCR 和病毒分离结果不提供流行性的精确评价, 它们确实表明 CnPnV 感染广泛。

[0072] 序列分析

[0073] 前面研究已经注意到病毒分离物间的差异可归因于存在自然准种, 传代培养中的突变或 PCR 人造产物。为测定 CnPnV 分离物的最精确共有序列, 使用将总细胞 RNA 用作模板的多个重叠 RT-PCR 反应。测序两只狗的病毒分离物, 一个在组织传代 4 (Ane4) 且一个在组织传代 17 (Brne17), 并且与序列 J3666 (Thorpe 和 Easton, 2005) 和株 15 (Krempl 等, 2005) 作比较。8598nt 序列 (SEQ ID N0:1) 从 CnPnV-Ane4 获得, 从毗邻 NS1 的 3' 前导区开始并延伸到 L 编码区域的短距离, 完全覆盖 10 个基因组预测基因中的九个。证实基因顺序 NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L。此 CnPnV-Ane4 区域相较 MPV 株的全部 nt 序列相同性是

(SEQ ID NO:28);P (SEQ ID NO:28);M aggacaaaua (SEQ ID NO:29);SH aggauaagua (SEQ IDNO:30);G (SEQ ID NO::30);M2 aggauaagug (SEQ ID NO:31);F (SEQID NO:29)和L aggaucaaua SEQ ID NO:32)。

[0080] 在CnPnV-Ane4NTR中鉴定了一些长度变化和nt差异,主要在IGR中发现。IGR内的两个MPV株没有不同。Chambers等(Chambers,P.,Matthews,D.A.,Pringle,C.R.,Easton,A.J.,1991.Virus Res.18,263-270)从cDNA克隆中测定M2的GS,也注意到56nt IGR中存在2个额外潜在GS序列(GS1和GS2)。稍后的突变分析测定由于位点6的G取代A,推定的GS序列没有功能。随后,他们测定GS1和GS2序列能在最重要的第一序列(GS1)中指导转录起始。他们的结论是最初鉴定的GS序列可能由于cDNA克隆中的自发缺失而错鉴定。CnPnV中,立即跟随F GE序列的M2GS 1序列与SH和G基因起始序列相同,除了第10nt。认为主要使用GS1并示于表1。M2的GS2,AGGACAGGG,与(Dibben,O.,Easton,A.J.,2007.Virus Res.130,303-309)报道的共有序列仅差异2个位置,但可有有限活性,因为其在位点7没有保守性A。这不同于J3666和株15,其中A是保守的。CnPnV-Ane4中的第三潜在M2GS(GS3)与J3666和株15相同,并且因此假定由于位点6的G而功能较差。

[0081] 非结构蛋白的分析

[0082] 非结构小疏水蛋白看来耐受显著变化,因为其是两个MPV株之间分歧最大的蛋白,其中它们共有的92aa中只有92.4%aa相同。CnPnV-Ane4中,相较MPV株15,SH蛋白在所有检测蛋白中分歧最大。CnPnV-Ane4SH与J3666差异4aa(95.7%),和与株15差异9aa(90.2%),并且因此与J3666比MPV株之间更相似(表2)。另一显著差异是不同分离物的SH ORF长度。CnPnV-Ane4和株15二者都有279nt(92aa)的SH ORF,而发表的J3666SH序列是345nt(114aa)。然而,已经报道了J3666的单独扩增序列不同地编码92、96或114aa并且表明这些所示抗体逃避突变。表2提供对肺炎病毒亚科病毒的CnPnV-Ane4基因和蛋白的相同性百分比的总结。

[0083] 表2

[0084]

基因	MPV-J3666 nt/aa (Δ nt/ Δ aa) ^a	MPV-株 15 nt/aa (Δ nt/ Δ aa)	HRSV nt/aa	BRSV nt/aa	HMPV nt/aa	AMPV nt/aa
NS1	94.4 / 93.8 (18/7)	94.4 / 93.8 (18/7)	44.1 / 15.0	43.4 / 15.9	NA	NA
NS2	95.1 / 94.2 (23/9)	95.1 / 94.2 (23/9)	42.6 / 22.6	42.6 / 22.6	NA	NA
N	95.9 / 97.7 (48/9)	96.0 / 98.0 (42/8)	61.1 / 59.6	61.4 / 60.4	51.7 / 45.2	50.3 / 42.6
P	95.0 / 96.6 (44/10)	94.3 / 94.4 (1/15)	49.9 / 41.9	48.8 / 44.4	40.8 / 29.1	40.4 / 29.1
M	96.6 / 98.1 (27/5)	96.5 / 98.1 (28/5)	54.6 / 41.6	54.4 / 42.0	51.4 / 39.1	50.5 / 39.1
SH	93.2 / 95.7 (19/4)	91.0 / 90.2 (25/9)	44.7 / 18.5	39.7 / 16.0	31.5 / 6.6	29.3 / 12.0
G	94.5 / 91.9 (66/32)	94.5 / 91.7 (65/33)	33.4 / 19.4	37.1 / 14.4	36.7 / 10.5	33.2 / 10.7
F	97.1 / 97.4 (47/14)	97.0 / 97.0 (49/16)	54.6 / 43.6	55.0 / 45.3	50.9 / 40.8	49.8 / 41.0
M2-1	95.5 / 96.6 (24/6)	95.5 / 96.6 (24/6)	53.5 / 42.6	52.4 / 42.0	47.0 / 36.0	48.7 / 36.0
M2-2	96.3 / 95.9 (11/4)	96.3 / 95.9 (11/4)	37.3 / 11.1	39.9 / 12.2	34.0 / 5.6	34.9 / 9.9

[0085] 表2中,序列GenBank号:HRSV,NC_001781;BRSV,NC_001989;HMPV,NC_004148.2;AMPV,NC_007652,对应于人RSV、牛RSV、人偏肺病毒和禽偏肺病毒的全长序列。nt:核苷;

aa :氨基酸 ;NA :不可用。^a 每个基因中 nt 和 aa 不同的数量。发现 CnPnV-Ane4P 蛋白与 J3666 差异 10aa 和与株 15 差异 15aa。MPV 和 RSV P 比对显示 aa 22-124 的氨基近侧区侧翼的 2 个高同源区域没有明显相似性并包括对比中的 6-7 个间隙。当 CnPnV-Ane4 与两个 MPV 株作比较时,中等多样性的两个区域在 P 的低同源性所述区域内鉴定。七个 aa 差异在 aa 58-74 区域内聚集并且另外 4 个改变在 aa 93-102 发现。概率图预测 aa 58-74 的第一多样性区域具有相对高表面可及性和抗原性指数。在 aa 93-102 的第二多样性区域疏水并且有低预测的表面可及性(数据未显示)。在 MPV 中鉴定了 P 内第二个重叠的内部起始 ORF, 其能编码 137aa 的蛋白。合成的小基因组构建体用于研究从第二 ORF 生成的蛋白并且发现作为其起转录抑制剂功能。由于在 nt 285 的 T 向 A 颠换产生 TAG 密码子,CnPnV-Ane4 有第二重叠 P ORF,在相同位点起始但是更早终止和产生在 54aa 小于一半尺寸的蛋白(Dibben, O. 等,(2008)Virus Res. 131,47-53)。这遗留一个问题,如果生成,更短 P-2 蛋白是否有相同的功能。

[0086] 剩余的非结构蛋白包括 NS1 和 NS2,以及 M1-1 和 M1-2,其在 M2 基因中从交替阅读框翻译。这些蛋白在株 15 和 J3666 蛋白之间没有区别。然而,在每一个所述蛋白中,CnPnV 与 MPV 分离物都不同。与两个 MPV 株相比,CnPnV-Ane4NS1 有 7aa 差异,4 个位于 C 末端附近。NS2 中有 9aa 差异,相对平均分布在整个序列中。CnPnV-Ane4 与 M2-1 有 96.6% 相同,差异 6aa,与 M2-2 有 95.9% 相同,差异 4aa。

[0087] 结构蛋白的分析

[0088] 对肺炎病毒的 G 附着蛋白非常感兴趣,因为其通常分歧最大且是中和抗体反应的主要目标。G 蛋白在两个 MPV 分离物之间相对高保守,396aa 中只有 3 个不同(99.2%)。CnPnV 中,G 蛋白与 J3666 相比是最不保守蛋白且在株 15 中是 SH 后的第二不保守蛋白。与 J3666 和株 15G 分别有 32aa 和 33aa 差异。通常 aa 差异随机分布,除了 113-124 区域集中的几个区别和 aa 331-367 的 11aa 差异(基于 Ane4 ORF 编号)。一个明显的观察结果是 CnPnV-Ane4 的 G ORF 比 J3666 和株 15 的对应物长 54nt。GS 的位点 +29 的 ACG 到 AUG 的改变,产生 J3666 中存在而株 15 中没有的替代起始密码子。第二个在 +65 的 UAG 到 AAG 改变消除框内终止密码子。G ORF 编码有 53aa 胞质尾的蛋白,比发表的 J3666 和株 15 序列长 18aa。J3666 序列有在此位点的终止密码子,而株 15 没有。因此,在 J3666 和株 15 中,单一点突变能产生更长 G 变体。这在此前未见,因为从 J3666 感染小鼠肺扩增的未克隆 RT-PCR 产物序列在 +65 也有 U-A 改变。因此,显示 G 的更长变体不是 CnPnV 唯一的特性。根据本公开的优势,确定自然感染中哪些变化占优势的犬和鼠 RT-PCR 产物的其他序列数据能用本领域普通技术测定。看来 G 胞质尾长度有一些自然可塑性,并且所述尾本身是毒力决定簇。缺少 G 胞质尾的重组 MPV 突变在 BalbC 小鼠中减弱,但是复制水平与野生型病毒不同(Krempl, C. D. 等,2007. J. Virol. 81,9490-9501)。RSV 中胞质尾的第一 6aa 对与 M 蛋白的相互作用重要。还不知道 G 的 N 近端 aa 对是否对 MPV 中的 M 结合重要,但是如果证明为所述情况,那么胞质尾的两个变化的差异可能在于其与 M 相互作用的能力不同。

[0089] CnPnV-Ane4 的 F 蛋白没有相似高水平多样性,如在 G 中发现并且事实上与 MPV 相比是更保守蛋白之一。与 J3666 差异 14aa,和与株 15 差异 16aa,有 97% 或更高保守性。约一半 aa 差异在 COOH 末端的最终 55aa 内,在跨膜结构域内或附近,并且大部分 aa 取代具有类似功能组类型。总体上,N 是相对其他肺炎病毒的保守性最高蛋白。来自 CnPnV-Ane4

中 aa 245-333 的所述蛋白中间区域与 HRSV 和 BRSV 达到 92-93% 相同性。CnPnV-Ane4N 与 J3666 差异 9aa, 和与株 15 差异 8aa, 相对平均分布。没有一个 aa 差异对应于肺炎病毒中鉴定的不变位点或与 RNA 基因组相互作用的残基。看来任何这些差异不太可能会对蛋白结构或功能有明显影响。M 蛋白与 MPV 分离物有 98.1% 的最高水平保守性。5aa 差异在序列中平均分布并且每个示例中功能组保守。仅一个差异, aa 18 的 V-I 改变, 涉及通常发现在肺炎病毒和偏肺病毒的 M 蛋白中不变的残基。

[0090] 高和低传代培养的分析

[0091] 用于感染原初培养物时, 鉴定出一个分离物对培养适应良好并且持续复制和生成 CPE。尽管所述分离物在传代 17(Brne17), 对其测序和随后与较低传代 Ane4 分离物作比较。对于测序的 8423nt, 在 Brne17 中鉴定 7nt 差异(表 3, 在传代和离体两个阶段的 CnPnV-Ane4 和 Brne 之间提供核苷和氨基酸区别。)对于表 3, ^a 从每个基因起点开始的核苷位置。 ^b 每个 ORF 中基于位点的氨基酸编号。ND= 未检测到 ;nt :核苷酸 ;aa :氨基酸。

[0092] 表 3

基因	位置	Ane4	Brne17	Brne3	BrneSw
N	nt 1081 ^a	T	C	ND	ND
	-	-	-		
M	nt 543	A	G	ND	ND
	aa 178 ^b	Q	R		
SH -G NTR	nt 397	-	+A	ND	ND
	-	-			
[0093] G	nt 392	A	T	T	A
	aa 122	K	终止	终止	K
G	nt 1053	T	C	T	ND
	aa 342	L	P	L	
F	nt 1098	A	T	ND	ND
	-	-	-		
F	nt 1140	G	A	ND	ND
	-	-	-		

[0094] N 中的一个 nt 差异和 F 中的 2 个差异是同义替换。在 Brne17 的 SH GE 序列中添

加 A 残基也是非编码性。两个 nt 差异是非同义替换,造成 M 中 aa 178 的 Q 到 R 改变和 G 中 aa 342 的 L 到 P 改变。Brne17 发现的最显著差异是 G ORF 中 nt 364 的 A 到 U 替换,造成 aa 位点 122 的 K 残基替换为终止密码子。所述位点对应 MPV 株的 nt 310 (aa 104)。所述位点的终止子会产生 Brne17, 一个有 53aa 胞质尾、24aa 跨膜结构域和只有 44aa 胞外域的截短型 G。在 Brne17 中发现截短型 G 提示对传代 3 储液和最初拭子洗脱液 (Brne3 和 BrneSw) 的扩增产物的额外测序。有趣的是,这显示截短型变体早在传代 3 就已建立。然而,BrneSw 中,nt 364 上存在 A 表明狗中占优的病毒种没有截短型 G。RNA 提取物和扩增物的第二个独立组包括来自传代 1 和 2 的样品,并且仅在传代 1 中电泳图有基础峰,指示 nt 364 有 A 的小亚群。因此,看来迅速选定培养的截短形式。在培养传代株 15 (Warwick) 中确定相似突变,其中单个 nt 插入产生移框,造成肽的提前终止。在另一个下游位点起始的翻译能生成 33aa 更短并缺乏胞质尾的 G 蛋白。已表明截短的 G 至少部分解释了株 15 (Warwick) 的毒力降低。

[0095] RSV 中,发现低温传代 cp-52 突变体具有在培养中消除 G 和 SH 产物但是不阻止复制的大片缺失。此情况与 MPV 类似,因为缺乏整个 G 基因的重组病毒和完全重组病毒在 BHK-21 细胞培养中复制,但是在小鼠中未复制成可检测水平。这表明 G 在体外总是重要,因此预期只能检测 BrneSw 中的非截短变体。尚不清楚为什么在传代 2 结束时显示完全选择截短变体。如果选择仅是因为复制的效率增加,则预期 G 的缺失增加复制速率和效价,但是没有支持的证据表明所述情况 (Krempf 等,2007,同上)。影响 G 缺失突变体选择的因子可以对 A72 细胞特异。

[0096] 图 3 提供 SEQ ID NO:1 的基因组构成的图示。本领域技术人员应理解图 3 中图片以 3' -5' 方向显示,因为其是负链病毒,而 SEQ ID NO:1 显示 5' -3' 的负链,每个常规方向从左向右读取。因此,图 3 中,L ORF 在正链 3' 末端。表 4 提供 SEQ ID NO:1 所示序列的注释;缩写为:GS,基因起始信号序列;ORF,开放阅读框;GE,基因末端信号序列;IGR,非转录基因间区域。未列出的核苷酸认为没有翻译。

[0097] 表 4

[0098]

[0099]

3' 前导序列	1-25
NS1-GS	26-35
NS1-ORF	64-405
NS1-GE	423-435
IGR	436-443
NS2-GS	444-453
NS2-ORF	457-927

NS2-GE	1001-1014
IGR	1015-1018
N-GS	1019-1028
N-ORF	1050-2231
N-GE	2225-2238
IGR	2239-2249
P-GS	2250-2259
P-ORF	2259-3146
P-GE	3144-3156
IGR	3157-3160
M-GS	3161-3170
M-ORF	3171-3944
M-GE	4080-4092
IGR	4093
SH-GS	4094-4103
SH-ORF	4104-4382
SH-GE	4476-4489
IGR	4490-4491
G-GS	4492-4501
G-ORF	4520-5764
G-GE	5812-5825
IGR	5826-5841
F-GS	5842-5851
F-ORF	5851-7464

[0100]

F-GE	7490-7504
IGR	7505-7507
M2-GS	7508-7517
M2-1-ORF	7564-8094
M2-2-ORF	8028-8324
M2-GE	8420-8433
IGR	8434-8442
L-GS	8443-8452
L-ORF	8452-8598

[0101] 实施例 4

[0102] 也分析从猫获得的生物样品中病毒的存在,可以与本文确定的犬病毒相关。获得两个名为 29 肯塔基州(29KY)和 77 肯塔基州(77KY)分离物的序列。从 29KY 和 77KY 得到的部分 G 基因序列提供 353nt,对应上述犬肺炎病毒(CnPnV)Ane4 分离物的 nt 726-1078 和部分 SH 基因:29KY 有 207nt,对应 CnPnV-Ane4 的 nt 2-208。

[0103] 两个分离物的部分 G 核苷酸序列与鼠肺炎病毒(MPV)分离物 J3666 有 94.7% 相同,和与 Ane4 有 98.0% 相同。所述 117 氨基酸(aa)序列与 J3666 有 90.6% 相同且与 Ane4 有 97.4% 相同。因此,猫 29KY/77 KY G 序列与 Ane4 的关联性高于 J3666。

[0104] 29KY 的部分 SH nt 序列与 J3666 有 94.7% 相同且与 Ane4 有 97.1% 相同。所述 69aa 序列与 J3666 有 98.5% 一致和对 Ane4 有 97.1% 一致。因此,猫 29KY 序列与 J3666 的关联性略高于 Ane4。然而,认为所述序列代表新发现猫肺炎病毒。因此,上面所列用于犬肺炎病毒的组合物和方法 and 所有本发明实施方式的描述也应用于猫病毒,并且因此这些描述对猫病毒重复。

[0105] 本领域技术人员会从上面描述中认识到我们已经证明了 CnPnV 感染不限于其最初分离的收容所中的狗。其易在有急性呼吸道疾病的狗中鉴定。尽管疾病的致病作用还没有明确证明,本发明已提供鉴定病毒出现和针对其提供保护的组合物和方法,预期其在控制哺乳动物呼吸道疾病中至关重要,包括但不必需限于猫和犬中与病毒出现正相关的这类疾病。

[0001]

序列表

<110> 康奈尔大学 (Cornell University)

<120> 新肺炎病毒组合物及其使用方法

<130> 018617.00191_PCT

<150> US 61/288,401

<151> 2009-12-21

<160> 48

<170> PatentIn 3.5 版本

<210> 1

<211> 8598

<212> RNA

<213> 犬肺炎病毒

<400> 1

```

ggagguggug gcgguagaagu cgucuuucaa gaaaggucua ccaaugauac agcugccaag      60
agcauuaguu ucacuaaaaag auauaacacc cuuuuaguag cuaucuggua aguacacauu      120
uacuucuugu ucaucaauag gauecauauu gauccuaauu gauuuuuuuu auauaacuau      180
ugaauuaaca ugaaguuggu ugacuuggaa ucuacacgau ugacaauuug agguuaauga      240
cugauagcug acagaugaag gaauacaguc cacaucaucu ggccugacua uaucaaaugu      300
cuangaucac uugauuacuc cagcugaguu cuaugcagca caaggccucu uucacacagg      360
cuaucaauc gacacgguc cacaccacag acuucccugc aucuauuuu guggaugguc      420
uagacccauc gaaagugagg uuucuuuuu cuccaauuu auacauuuu ugcaguaugg      480
cuggauagua uuugaggcgc cuuaucauuc uguuuucaua gaagaauuuu ucuucuccuc      540
gauggagaug acagauugga ucagacugca uauuacuccu acuggcaguu ucuugagaau      600
gugaauaacu ugucucuucu uguguauuuu gucuauuuu gauaguauag uguugcaacu      660
ucucaaaaua uugacguccu cugcguugcu aucucuugcu uguuuuacca gaccaaacuc      720
caaguucugu aacacaguaa ucaaacugcc acaageuauc gacuuaguga uguuguuagu      780
uuuuuccagg uaacuuuuca gcacaccuau gguucccaaa gcuaucucag caguccuuug      840

```

[0002]

uggugcauca aauccacuga caueggucan ugcaucugug uugguaucga ggaaccuaua	900
aaucceuaug agcauauagu ucugccugag cauaagaguu uucaaaggcc auucccaua	960
uuuaugacia uacuugcaau uecuccecu ggaacaaaac ccuugaaccu caaauuugca	1020
aggucacaca cucaucacuac ccugucuuug agagucgagg gaaguguugg gucuggauug	1080
ucacuaaucc uaaguuuuuu aauuaacuaa cucauuuauug auuugguaca auugucauga	1140
uaaaacugug aggccaggug uacuuuugga uuucaaccug uuguccuga uauuuuugca	1200
uaccuuauac agaauaacc cuaugacaac cauuuuuaua auuagcaua caacgaugag	1260
cagaguuguu aguauauaug acuugguuaa acuuuuuuu acucuguuuu cacuuuaguc	1320
caauaacuga ucagaggccu ucaagaauu gegugucuga uugaugcuau gcuccacauc	1380
ucuuuauagca acacuaauu uauegucagg gaaauucaa gggucuuuu ucaagacca	1440
egguuucccu cugacuaca uugacuugcc aacuueuuug cuaagauagu agacaguguu	1500
uccuacuuga accuugucca cccuuuuguu ggagauguag ugacaaccau cuggcagagu	1560
ccuuuuuaua ccuuugucan uauugaugac ugugcaacug uuauggccau agcaagacac	1620
caagcaacc auuguaguca guacugcugu acucacauau guuuuacuug uggaaucuu	1680
acaueguag uuagugguau acauuuuga guugeauucu cgugauguua cagguacagu	1740
uagacuuuuc agagugucac agaaaacuaa cccauugugg aucucacaau cuguugguga	1800
ugggaaguau gauaauagc cugcauugug acaauaccag ccuuuauag cuuagccaa	1860
acaagcauau uugucugcua uguuauagca gucuauggaa cuuuuuuua cccaacauc	1920
uguguccaua acaccaaua acgggaguug uuuuuuuua accagugugu cagcauugac	1980
ugaacuuuau auugcuuacc cguuuuuuu cauuuauagcu cuacuagaua gcauuuuc	2040
uuuuuggccu gcugaaacag ccaugccgcc uacuauggag gugaguuccc ggucuguuaa	2100
cauaaaagau gaaacagugu guguuuaucc ugcauuagau gaaaauucac gagacacuu	2160
caaaagucuu uuuuugagcu guuggaauu auugacggca gugaugucgu gcacacaca	2220
agagacucgg uuuuuuuuug ggaguaauuc uuuaagauug aaguuuuuca auuacucac	2280
cacuuuagcu aacacugaca ugccguuggu uaggcuuaca acagccuau uuguuuuuu	2340

[0003]

cacugcuucu	cuaaucaaug	caaucucacu	uucaaguugc	acugucuugg	cuaaagccac	2400
cccggcagug	acugcagecc	cgagaccaag	aaucaaaccg	aggaaccucu	ucuuccuuuu	2460
ggacuucaaa	gcauuggaug	auaacguucu	caauucaucc	acugcauuac	uauagauugc	2520
aagcucauga	gccauaaacg	aguugcugcu	cuugcaugac	ucaauuuuuu	uuugagacaa	2580
cuuaauugac	auaacuguca	ugugccaacc	aguuctaagg	gcacucuuaa	aaccugcagu	2640
cucaacacua	cauguggacu	cauagaauuu	uucuguuuuu	guuuuugggu	gaaugguuuu	2700
gguguugaag	aucaacagaa	gaacuagaaa	gauccugcca	ggaaucauuu	uuguccuuuu	2760
auaucuagc	uuuuuuuca	uuuacuacug	auaagguugg	uacuuuuucu	gaaguugauu	2820
cggguauagg	ucacucaaga	auuagaccuc	cuuggaaaau	auuggagcau	aggacaccaa	2880
uagggcauug	uugguuuggg	uucucugcuu	gagccuacuc	cacauaaage	ucuuuuucuc	2940
cgacugagag	guuuggaccu	ccuaggugcg	ggguuugggu	uccuugucuc	cgguguuggu	3000
gccguggugg	ugccugugga	uuuuuugagu	gcagcuuuuu	ggguuuggag	acuuaggcug	3060
gguaguccaa	cuagaggaag	guuuuugaa	agcccaucac	augugagaua	aaauuuguuu	3120
ucuaggccag	cugagucugc	acagguggua	cacugagacu	gauucuuguu	guuaaaacua	3180
ggaaacaaaa	ucacaguuuu	gucugucagg	uugcaguuuu	uucugggaac	aacacauuuu	3240
gaguuaucuc	aaauuguuuu	ccaauaggaa	ucauaaugca	auuccaugau	aacuuguuga	3300
ccuccaagcu	cuagcacggc	ucucuucuga	ucagucuuu	aaccagaaag	gaagaacag	3360
aagcccugau	cacaccuauu	guggacacac	auugccuuuu	uguuggagua	cguagaaagg	3420
gugauaacuu	cuauuuuagg	ugcagcuucu	ucuccaccac	cauuuuuuuu	gcccauuuuu	3480
gccuucauug	uuacaagauc	agggcaaaac	cuuccuaagu	ugaucucacg	uuucucauuu	3540
caguuggugc	ugugauguuc	aggaccugga	ggcuugcaua	gaacaucuaa	uacgagcuug	3600
aaaucuucag	guaaaucagg	ucggucuaaa	uaaccuuugc	uggagcauug	guagggauc	3660
ucugagggug	ucaccuuuuu	gacaggcucu	gugaucucuu	gguggguggu	gguuuuggug	3720
ggggguuugg	ugaguuuugg	ggugguuccu	ugcucugugg	ugggcaggcc	ggcgguuugg	3780

[0004]

uggggagggg cggaugugcu guuccggauu guggcguucu gcguggaguu ggccuuguga	3840
uuugauguga auacagaaua cauuugacc cccacacaaa cugccacagc agcacuugug	3900
agcacaccug caauaagcuu acacaauugg uuacauuuua caacaguccu aaauguguca	3960
ggauacugag uuucucuaaa guucaaaaaa guaaugcuge caccacuuuc aaaguiccuu	4020
cccuaacuaa gugaagucua cuuguaguuc ucuuguaua gcugcucua acguucuauc	4080
agauuccaau aagauaguac uuauccuaau uuuuuuuuaa cuagacgaca uacuacaagg	4140
gcugauugaa ucaccuagca gaguggggcu gucuggcucg ggguuuauug aaggauguu	4200
uuugcuguuu auaacauuu guaguguucc uuaguuacag guugcccgge agacuaguuu	4260
cauugauucc auaacuuggu ggaggugau ugggaugaac cgugcauugg cugcuagcga	4320
ugccugaugu agcaaugcuc cuacugcuge aggccauuuu cagcgcacac acuguguuu	4380
uaacagcgc a ucaaggaga agagcuguca gggcuagugu auuuuuuuu ccauacggc	4440
ugcugucua guugaucuca aaagugaucu gguaugaggu cauuuuagga uccauuacuu	4500
auccuguuuu auuuuacuaa gauaugugug uggauuuuug uaggugugua uaugugguug	4560
ucauauugau guugguggca auaguuuug ugcuaagguga agucgugggg uuguaguuu	4620
ggauugagcu gaucaauggu gacuuucua uuuuuuaucc acuuuuugag gaacucuuu	4680
guauuagga agucgucua uuuuuuaggu ucauuuacac aucauuuag cuacacugag	4740
ucagauagg acccaguuc gcaagaauuu gacaaccuge cuuuuagcag uuuuuuagc	4800
cuuuggugga ugugaauug aucacaagug ugaguccuge auaggagcc acccuagcug	4860
uuuuuuuagc auuuuacua uccgagcuua uagccugcuc cacacuauc agguccugcu	4920
gucugauaga cagugcucug augaagacag guuuuuuag uacuuuuuu guaacccug	4980
uauggaaaga gcagacagcu aucagcucua gaguaggucg auuuuuuag guaaugcug	5040
gcacagugua aagcauuuu uuaggcuuaa gaauugucac acagaagcuc uuuuuuacaa	5100
aagcaacagg uacuuuugau uccauuuugc cccagucuc caagcuuug auagcauuu	5160
ucaagaaug ccuuggcaug guggcuagge cugcauuuga agagcucaga ucuaccuuga	5220
ucaugggacc auguacaguu gauuuuuug uacagaugac uguuacua uuuuuuaggu	5280

[0005]

ccaugacaga guuccuuggu agagauguuu gaaacauugg uauccacaca guuagugaua	5340
uguuggcuga auguuuuuca accaaguuaa gcuguauugc agcuguauau gggacgccau	5400
gguacaucuc uaccaaguag gccuccauua uuuguccugu uauuuuaauu aacuaaaaau	5460
uaaugeccau gaugucauca acatccaagu cuuccuuage cuccucagca uuugcggaca	5520
cuauuuuauc uaguauccuu gcucugucug uuaaaauaaca ggcugaucca ucaucaguuu	5580
cagcucuaga gcauuccuca ucucugagcu ucuccauggc cggcacucug ucauugacag	5640
ucaagauguc agacuugauc aucucaauaa guucuuucuu agugccuaua agggcaucuc	5700
uaauucuauc ucuagcagug guugguccag caguugcuac cauaauggug uuuaaaagge	5760
cuauuaugua ggacaauuuu uccucuaauc uaueuagucu uuuguucuaa gaugaagage	5820
ccggcucuuu guuagucucc ucaaaugaua gauugeuuuc uucaucauaa ccaucagegg	5880
caaaaguuuu cauggucucc uuuguacaggc uggeucccaa uccgacaaac uucucuucgg	5940
guuccacaaa ggugaccauc ggcuuccuag uuuuuuuagu aucgguauc ucugagcagc	6000
auggcuucuu acuguguucc ggauugucag gaaccucaua gacauguauu gucucuauuu	6060
cagcaucaga uuuuuugggc ugucuuuccu uguuuuugggg aggugugggu gguggagugg	6120
aggggggagu ggaggguuaa gugaguuuug cggcggcucu ugggggggag aguuugaauu	6180
agcugcgcaa uaugggggc auguuauuu uuugugacau aguggcagug uucgguauc	6240
cagcuagugg uuuuuccgaa gggaaggauc uauguuuag aaacuccuu gccuucuuu	6300
uggcauccuc accgacaaau ucaggggcaa auuucuccau auuuauccua uuuuuuccag	6360
uuuuuaauua aauaucauca ucaggagugu caucaacaau gcucagcugu uggcugauca	6420
gcucucuuc uucuguaguc aaguucaaug cacuguaguu aauuacauug uuguccuuua	6480
aucuuucgc auaaucuuua gcagcauca agaguucucu auucuuagga gcaccuuuu	6540
aagaccuuu gaugccuaaa ccugcagcau ugccaagcac gacacuggug aaauuaggac	6600
aauggucaa agagaggagu gaagcuuuug gauuuuuuu aauaugauag aauccugccu	6660
ccccuccuug cuucugggca uauucguaaa ccucaaccac cuguuuccau ucageuuua	6720

[0006]

cacuagcaug gccuagcaug auuuuuuuga caguuuuugc caguuaaacc caccucagca	6780
uaacuuguce ugccccguau gcauucauga agagaccaga aaacageccc ucaaccuuge	6840
ugccacccuu gacacuuagac ugggccagge caaaagugaü gaagacauca auguaauaag	6900
gcuuccuuuc aaacagguaa uaaaagcuuu cagcuauucg cuugaccuce agguugggau	6960
aucuggcuuu cucggcuuuc agcacuuuaa aagcccuücu uuccacagca ucaaguccuc	7020
cucugucucc ugcagcuauu uuggaaacaa cuauugcugc aacacagaga acuuuuacac	7080
cacaauucgg ugcaucaugc cuccgauuau cagguaaccc ggcuccuguu uugaguucuu	7140
uugcuaccac uccucuggeu uguaucuca gaucagcuua auuggecgea ucuuuuicca	7200
cuauaucuag gacuuguaau uuauagucuu uuuccuuguaa uuugauugua aaguccuuga	7260
gcuguguguc cacacuuuuu acuuuuuagc eggcuuücuü caguuuuuug augcugucuu	7320
cucugccuaa caaggacaug gcauuuugga gccuauucuc ugccacuucü ucgcagcggü	7380
ugaaagcagu aaguaggaac augccaagug uccuugcaag ggccuucugc auagcaugac	7440
cagauacacu gguuacaucg ccuguggauc ugguaacacu guuuuugcag uuggacagca	7500
ggcuauccuu guuuagaca ucauuagcu ucaacuuguc uagagacuuu uuggcccggc	7560
uuaggauug uuuuuuuccu auuuuuuuuc uuuuuuuuuu cuuagacuaa auacuguauc	7620
acuugcuuaa ggugguggga uuucucugc guuggagcga ucugaaucag cucagucauc	7680
aucauccuca uuacagauca agucauggcc uggguacaga augcauccug ugcacucaau	7740
ccagucuuuc uugugcugua caaagaagaa cuuuugguau uuucucccag uuacuuucuu	7800
cugccuccuu augcacuucc acucaaugcu gucugecuca gaugccauua ccauccaagc	7860
caugucuucc acuuuuugcu uggecucaau guaccccauu uuuuuccuuuu uuagucuauc	7920
auugcagauc cugaugaagu uccgguugau guaucuagug auguuuuuga agcucggcug	7980
gauuuuuua augagcaagu caagccaccu cucugagcuc ugugugguac gggacaccuu	8040
geccaucuccu gcuucaucac uegacuuüc acugucugaa auguucaaga uaguageagg	8100
uuuagaaaug gucugaguga acuuuuuücu agcugüggac auuaggauuu guccuaccuü	8160
uuuuuuuuuu uuacuacuaa augugcuguc auuuuuacca cugaucagcu cugccauuag	8220

[0007]

cucacaugug gggucaaugg gaggcucuau cucuugcccu guaggacuaa acacgauauc	8280
uuuugugaac caauguguua auguuuggcc ucuucuagua uuauuggaaga auuugcage	8340
uugcacaaa uggucucaaca aguugcaguc ccuicccacg agguacacgg agagucucug	8400
aucuugccau guacugcaca ccuugcacc ucuaaagauc guuuccaaa uugaccuauu	8460
gaaguugguu auguggaau ccaaccaugc agcucuucca ccuaaacca gcuccaucau	8520
cacauuacag cccaugauuc uggucuuuaa gacuaguugu cuccacuugu ccuaacuuu	8580
ucggaguggu ggguuugg	8598

- <210> 2
- <211> 354
- <212> RNA
- <213> 猫肺炎病毒

<400> 2	
ccgugguggu gccuguggau uguuugaguu cagcuuugug ggcuugagga cuuagcugg	60
guaguccaac uagagggagg uuucuugaaa gcccaucaca ugugagguaa aauuuguuau	120
cuaggccage ugagucugca caggugguac acugagacug auucuuguug uuaaaacuag	180
gaaacaaaau cacaguuugg ucugucaggu ugcaguuuugu ucugggaaca acacaauuaa	240
aguugucca auaguguuuc caauaggaau cauaaugcaa uucaugaua gcuuguugac	300
cuccaagcuc uagcacagcu cucuucugau cagugcuuaa accagaaagg aaga	354

- <210> 3
- <211> 207
- <212> RNA
- <213> 猫肺炎病毒

<400> 3	
gauuggaug aacugugcau uggcugcuua cgaugccuga uguagcaaug cuccuacugc	60
ugcaggccau uaucagcgca cacacugugu ugauaacagc gcaugcaagg aggagagcug	120
ucaggguag uguaauguau gugccaauc ggucugcuggu cauguugauc ucaaaaguga	180
ucugguguga ggucauguua ggaucca	207

[0008]

<210> 4	
<211> 8598	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 4	
ccaaacccac cacucegaaa aaguuaggac aaguggagac aacuagucuu aaagaccaga	60
aucaugggcu guaaugugau gauggagcuu gguuauggug gaagagcugc augguuggca	120
uuccacauaa ccaacucaa uaggucagau uuggaaacga ucuuaagagg ugcuaaggug	180
ugcaguacau ggcaagauca gagacucucc guguaccucg ugggaaggga cugcaacuug	240
uugagaccou uugugcaagc ugccaaaauic auccauaaua cuagaagagg ccaaacaaua	300
acacauuggu ucacaaaaga uaucguguuu aguccuacag ggcaagagau agagccuccc	360
auugacccca caugugagcu auuggcagag cugaucagug guuaaaauga cagcacauua	420
uguaguuaau uaaaacaag gguaggacaa auccuaaugu ccacagcuau gaacaaguuc	480
acucagacca uuucuaaacc ugcuaaiauc uugaacauuu cagacaguga agagucgagu	540
gaugaagcag ggaugggcaa ggugucccg accacacaga gcucagagag guggcuugac	600
uugcucauug aaaaauucca gccgagcuua caaaacauc cuagauacau caaccggaac	660
uucaucagga ucugcaauga uagacuuaaa aaggaaaaaa uggguuacau ugaggccaag	720
caauaugugg aagacauggc uuggauggua auggcaucug aggcagacag cauugagugg	780
aagugcauaa ggaggcagaa gaaaguaacu ggggagaaa acccaaguu cuucuuugua	840
cagcacaag aagacuggau ugagugcaca ggaucauuc uguaccagc ccaugacuug	900
aucuguaaug aggaugauga ugacugagcu gauucagauc gcuccacca gcagagauc	960
ccaccaccua uagcaaguga uacaguauuu agucuaugau uaguuauga aaaauuuag	1020
gauaaaauaca cauccuaage cgggccaaaa uguucuaaga caaguugaag cucaaugaug	1080
ucucaaaaca ggauagccug cuguccaacu gcaaauacag uguuaccaga uccacaggcg	1140
auguaaccag uguaucuggu caugcuauge agaaggccu ugcaaggaca cuuggcaugu	1200
uccuacuuaac ugcuuucaac cgcugcgaag aaguggcaga gauagggcuc caauaugcca	1260

[0009]

uguccuuguu aggcagagau gacagcauca aaauacugag agaagccggc uacaauguaa	1320
aaugugugga cacacagcuc aaggacuuua caaucauuu acaaggaaaa gacuauaaaa	1380
uacaaguccu agauauagug ggaauagaug eggccauuu agcugaucug gagauacaag	1440
ccagaggagu gguagcaaaa gaacucaaaa caggagccgg guuaccugau aaucggaggc	1500
augaucacc agauuguggu guauuaguuc ucuguguugc agcauuaguu guuucaaaa	1560
uagcugcagg agacagagga ggacuugaug cugugaaag aagggcuuua aaugucuga	1620
aagccagaa agccagauau cccaaccugg aggucaagca gauagcugaa agcuuuuug	1680
accuuuuuga aaggaagccu uuuuacauug augucuucac cacuuuugge cuggcccagu	1740
cuagugucua ggguggcagc aagguugagg ggcuguuuu ucgucucuc augaaugcau	1800
acggggcagg acaaguuuug cugagguggg guuuacuggc aaaucucugc aagaauaica	1860
ugcuaggcca ugcuauguuu caagcugaga uggaacaggu gguugagguu uacgaauug	1920
cccagaagca aggaggggag gcaggauuc aucauuuug aaauaauca aaagcuucac	1980
uccucucuuu gaccaauugu ccuaauuua ccagugucgu gcuuggcau gcugcagguu	2040
uaggcaucau agggucuuu aagggucuc cuaagaauag agaacucuuu gaugcugcua	2100
aagauuugc agaaagauua aaggacaaca auguaauuaa cuacagugca uugaacuuga	2160
cuacagaaga aagagagcug aucagccaac agcugagcau uguugaugac acuccugaug	2220
augauuuuu auuuuuuuu gaaaauuua ggauuuuuu ggaguuuuu gcccugauu	2280
uugucgguga ggauccaac aagaaggcag aggaguuuu caaacauaga uccuuccuu	2340
cggaauuacc acuagcuggu auaccgaaca cugccacuca ugucaccaa uauaacaugc	2400
ccccauuuu gcgcagucua uucaaacucu ccccccaag agccgccgca aaacucacua	2460
aaaccuccac uccccuucc acuccaccac ccacaccucc ceaaaacaag gaagagcagc	2520
ccaaagauc ugaugcugac auagagacca uacaugucua ugagguuccu gacaauccgg	2580
aacacaguaa gaagccaugc ugcucagaug auaccgauac uaagaaacu aggaagccga	2640
uggucaccuu uguggaaccc gaagagaagu uugucggauu gggagccagc cuguacaagg	2700
agaccaugca aacuuuugcc gcugaugguu augaugaaga aagcaucua ucauuugagg	2760

[0010]

agacuaacca	agagccgggc	ucuucaucug	uagaacaaag	acuagauaga	auagaggaga	2820
aauuguccua	cauaauagge	cuuuuaaaca	ccauuauugu	agcaacugcu	ggaccaacca	2880
cugcuagaga	ugagauuaga	gaugcccuua	uaggcacuag	agaagaacuu	auugagauga	2940
ucaagucuga	caucuugacu	gucaaugaca	gaguggcggc	cauggagaag	cucagagatg	3000
aggaaugcuc	uagagcugaa	acugaugaug	gaucagccug	uuuuuaaaca	gacagagcaa	3060
ggauacuaga	uaagauagug	uccagcaaug	cugaggagge	uaaggaagac	uuggauguug	3120
augacaucuu	ggcuaauuu	uuuuaguuaa	uuuuuuuac	aggacaaaua	auggaggccu	3180
acuugguaga	gauguaccuu	ggcgucuccu	auacagcugc	aaucagcua	aacuugguug	3240
aaaaacauuc	agccaacaua	ucacuaacug	uguggauacc	aauguuucaa	acaucucuaa	3300
caaggaacuc	ugucauggac	cugcuacaug	auguuacagu	caucuguaca	caaaauaaca	3360
cuguacaugg	ucccaugauc	aagguagauc	ugagcucuu	caaugcagge	cuagccacca	3420
ugccaaggca	auucuugaua	aaugcuauca	uagccuugga	ugacuggggc	aacauggaau	3480
acgaaguacc	uguugcuuuu	gauaaaaaga	gcuucugugu	gacaauucuu	aagccuaaaa	3540
acaugcuuuu	cacugugccc	agcauuacuc	cuacuaaucg	accuacucuu	gagcugauag	3600
cugucugcuc	uuuccauaac	aggguuacuu	uaaagucuuu	cacuauaccu	gucuucauca	3660
gagcacuguc	uauagacag	caggaccuug	auagugugga	gcaggcuuaa	agcuc.cgaug	3720
uggaccaugc	uauaacaaca	gcuagggugg	cucccuaugc	aggacucaca	cuugugauca	3780
acaucacauc	caccaaaggu	gcuucaaac	ugcuuaagge	agguugucua	auucuugcag	3840
aacugggucc	cuauucugcu	caggugagcc	uacauauguu	gauuuugaac	uggaaacaua	3900
caggcacuuc	cuacauacuc	aagaguuccu	caacaagugg	augaaaaauu	agaaagucac	3960
cauugaucag	cucauuccuu	aacuacaacc	ccacgacuuc	accuagecaca	acaacuauug	4020
ccaccaacuu	ccauaugaca	accacauuaa	cacaccuaca	uauauccaca	cacauaucuu	4080
aguuaaaaua	aacaggauaa	guaauggauc	cuaacaugac	cucauaccag	aucacuuuug	4140
agaucacaau	gaccagcagc	cguauuggua	cauauuuuac	acuagccug	acagcucuu	4200

[0011]

uccuugcaug cgcuguuau c aacacagugu gugcgcugau aauggccugc agcaguagga	4260
gcuuugcuac aucaggcauc gcuagcagcc aaugcacggu ucauiccaau caccucuccac	4320
caaguuuauagg aaUCAaugua acuagucugc eggccaaccu guacucaagg aacacUacau	4380
aauguuauaa acagcaaaaa ccaticcuca auaaaaccccg agccagacag ccccacucig	4440
cuaggugauu caaucagccc uuuguauaug ucgucuaguu aacaaaaau uaggauaagu	4500
acuauuuuu uggaauauga ugagaacugu agagcagcuc auacaagaga acuacaaguu	4560
gacuucacuu aguauaggaa ggaacuuuga aguggguggc agcauuacia auuugaacuu	4620
ugagagaacu caguaucug acacauuuag gacuguugua aaagugaace aaauguguaa	4680
gcuuauugca ggugugcuca caagugcugc uguggcaguu uguguggggg ucauaaugua	4740
uuucuguauuc acaucaaauc acaaggccaa cuccacgcag aacgccacia uccggaacag	4800
cacauccgcc ccucccaac caaccgccg ccugcccacc acagagcaag ggaccacccc	4860
caaacucacc aaacccccca ccaaaaccac caccaccau gagaucacag agccuguaa	4920
aauggugaca ccucagagg aucccuacca augeuccage aaugguuuu uagaccgacc	4980
ugauuuaccu gaagauuua agcucguuu ggauuuucua ugcaagccuc caggucuga	5040
acaucaagc accaacuguu augagaaacg ugagaucac uuaggaagug uuugcccuga	5100
ucuuguaaca augaaggca acauggcuu aaacaaugu gguggagaag aagcugcacc	5160
uuauauagag guuauaccc uuucuaagua cuccaacaaa agggcaaugu guguccaaa	5220
ugggugugau caggguucu guuuuuuu uucuguuuu agcacugauc agaagagagc	5280
cgugcuagag cuuggagguc aacaaguuu cauggaaug cauuuuguu ccuauuggaa	5340
acacuauugg aguaacucua auuguuuu ucccagaaca aacugcaacc ugacagacca	5400
aacugugauu uuguuuucca guuuuaaca caagaucag ucucagugua ccaccuguc	5460
agacucagcu ggccuagaua acauuuuuu ucucacaugu gaugggcuuu caagaaccu	5520
uccucuaugu ggacuaccca gccuaagucc ucaagccac aaagcugc acuaaacauc	5580
cacaggcacc accacggcac caacaccgga gacaaggaac ccaacccccg caccuaggag	5640
guccaaaccu cucagucgga agaaaagagc uuuauguga guaggcuca gcagagaacc	5700

[0012]

caaaccaaca	augcccuauu	gguguccuau	gucceaaaua	uuuccaagga	ggucuaaauc	5760
uugagugacc	uauaccegae	ucaacuucag	aaauaguacc	aaccuuauca	guaguuaug	5820
aaaaauaage	uauauauaa	uaggacaaa	augauuccug	gcaggauuu	ucuaguucuu	5880
cuguugaucu	ucaacaccaa	accaauucac	ccaaauacau	uaacagaaaa	auucuaugag	5940
uccacaugua	guguugagac	ugcagguuu	aagagugccc	uuagaacugg	uuggcacaug	6000
acaguuaugu	cauuuaguu	gucucaaaua	aaauuugagu	caugcaagag	cagcaacucg	6060
uuauuggcuc	augagcuugc	aaucuauagu	aaugcagugg	augaauugag	aacguuauca	6120
uccaaugcuu	ugaaguccaa	aaggaagaag	agguuccucg	guuugauucu	uggucucggg	6180
geugcaguca	cugccggggg	ggcuuuagcc	aagacagugc	aacuugaaag	ugagauugca	6240
uugauuagag	aagcagugag	aaauacaaa	gaggcuguug	uuagccuaac	caacggcaug	6300
ucaguguuag	cuaaaguggu	agauuauug	aaaaacuuca	uaucaaaaga	auuacuccea	6360
aaaauaaacc	gagucucuug	ugaugugcac	gacaucacug	ccgucuuuag	auuccaacag	6420
cucaacaaaa	gacuuuugga	agugucucgu	gaauuuuau	cuaaugcagg	auuaacacac	6480
acuguuuau	cuuuuauuu	aacagaccgg	gaacucaccu	ccauaguagg	cggauggcu	6540
guuucagcag	gccaaaaaga	gauaaugcua	ucuaguagag	cuauaaugag	aagaaacggg	6600
uuagcaauau	uaaguucagu	caaugcugac	acacugguuu	auauaaauca	acuccgguua	6660
uuugguguaa	uggacacaga	uuuuugggua	auaagaaguu	ccauagacug	ucauaacaua	6720
gcagacaaa	augcuuuuu	ggcuagagcu	gauaauggcu	ggauuuugca	caaugcaggc	6780
ucauuaucau	acuucccauc	accaacagau	ugugagauc	acaauuggua	uguuuuucgu	6840
gacacucuga	aaagucuaac	uguaccugua	acaucacgag	aaugcaacuc	aaacauguau	6900
accacuaacu	acgauuguaa	gauuuccaca	aguaaaacau	augugaguac	agcaguacug	6960
acuacaauug	guugcuuggu	gucuugcuau	ggccauaaca	guugcacagu	caucauuau	7020
gacaaaggua	uaauaaggac	ucugccagau	gguuugcacu	acaucuccaa	caaaggggug	7080
gacaagguuc	aaguaggaaa	cacugucua	uaucuuagca	aagaaguugg	caagucauu	7140

[0013]

guagucagag gggaaaccguu ggucuuugaaa uaugacceuu ugaauuuccc ugacgauaaa	7200
uuugauguug cuauaagaga uguggagcau agcaucaauc agacacgcac auucuuugaag	7260
gccucugauc aguuuuugga cuuaagugaa aacagaguga auaaaaguuu aaccaaguca	7320
uuuuuacuaa caacucugcu caucguugua augcuuuuaa uauuaauggu ugucuuaggg	7380
uucauucugu auuagguuuc gaaaauuauc agggacaaca gguugaaauc caaaaguaca	7440
ccuggccuca caguuuuauc augacaauug uaccaaauc uauuugaguu aguuaauuaa	7500
aaaacuagg auuagugaca auccagacc aacacuucc ucgacucua aggacaggu	7560
aggaugagug ugagaccuug caaaauugag guucaaggu uuuguuccag agggaggaau	7620
ugcaaguua gucauaaaua uuuggaauug ccuuugaaaa cucuuugcu caggcagaac	7680
uuuuugcuca auaggauua uuagguuccuc gauaccaaca cagaugcau gaccgaugc	7740
aguggauuug augcaccaca aaggacugcu gaguugcuu uggaaccu aggugucug	7800
aaaaguacc uggaaaaaac uaacaauc acuaagucg uagcuuugg caguuuugau	7860
acuguguuac agaacuuga uguugucug guuuuacaag caagagauag caacgcagag	7920
gacgucauu auuugagaag uucaacacu auacuauuu auuuagaca gauacacaag	7980
aagagacaag uuuuuacau ucuaagaaa cugccaguag gaguuuuug cagucugauc	8040
caucuguca ucuccaucg ggagaagaa auuuuucua ugaacacaga augauagge	8100
ugccuuuuu cuuaccgccc auacugcau agauguuuu uuuuaggua auuagaacc	8160
ucacuucga uggguuuga ccauccaca uauuagauc aggaagucu gugguguga	8220
accgugcga ugugauagcc ugugugaaag aggccuugug cugcauaga cucagcuga	8280
guuuuacuu gaucauagac uuuguuuuu gucaggccag augauguga cuguuuuccu	8340
ucaucuguca gcuaucagc auuaaccuca auuugcauu cguguaguu ccaagucaac	8400
caacuucag uuuuuucau aguuuuuuu auuuuuuuu uuaggaucuu uauugauccu	8460
uuuugauc aagaaguuu uguguuuuu ccagauagcu auuuuuagg uuuuuuuuu	8520
uuuuguuuu cuuauugcu uggcagcugu auuuuuuuu gaccuuuuu gaaagacgac	8580
uuuaccgcca ccaccucc	8598

[0014]

<210> 5
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 猫肺炎病毒

 <400> 5

 Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asp Gln Lys Arg Ala Val Leu Glu Leu Gly
 1 5 10 15

 Gly Gln Gln Ala Ile Met Glu Leu His Tyr Asp Ser Tyr Trp Lys His
 20 25 30

 Tyr Trp Ser Asn Phe Asn Cys Val Val Pro Arg Thr Asn Cys Asn Leu
 35 40 45

 Thr Asp Gln Thr Val Ile Leu Phe Pro Ser Phe Asn Asn Lys Asn Gln
 50 55 60

 Ser Gln Cys Thr Thr Cys Ala Asp Ser Ala Gly Leu Asp Asn Lys Phe
 65 70 75 80

 Tyr Leu Thr Cys Asp Gly Leu Ser Arg Asn Leu Pro Leu Val Gly Leu
 85 90 95

 Pro Ser Leu Ser Pro Gln Ala His Lys Ala Glu Leu Lys Gln Ser Thr
 100 105 110

 Gly Thr Thr Thr
 115

 <210> 6
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> 猫肺炎病毒 (Feline pnueovirus)

 <400> 6

 Asp Pro Asn Met Thr Ser His Gln Ile Thr Phe Glu Ile Asn Met Thr

[0015]

1 5 10 15
 Ser Ser Arg Ile Gly Thr Tyr Ile Thr Leu Ala Leu Thr Ala Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Cys Ala Val Ile Asn Thr Val Cys Ala Leu Ile Met Ala Cys
 35 40 45
 Ser Ser Arg Ser Ile Ala Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Gln Cys Thr
 50 55 60

 Val His Pro Asn
 65

 <210> 7
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 犬肺炎病毒

 <400> 7

 Met Gly Cys Asn Val Met Met Glu Leu Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ala
 1 5 10 15

 Trp Leu Ala Phe His Ile Thr Asn Phe Asn Arg Ser Asp Leu Glu Thr
 20 25 30

 Ile Leu Arg Gly Ala Arg Val Cys Ser Thr Trp Gln Asp Gln Arg Leu
 35 40 45

 Ser Val Tyr Leu Val Gly Arg Asp Cys Asn Leu Leu Arg Pro Phe Val
 50 55 60

 Gln Ala Ala Lys Phe Ile His Asn Thr Arg Arg Gly Gln Thr Leu Thr
 65 70 75 80

 His Trp Phe Thr Lys Asp Ile Val Phe Ser Pro Thr Gly Gln Glu Ile
 85 90 95

[0016]

Glu Pro Pro Ile Asp Pro Thr Cys Glu Leu Leu Ala Glu Leu Ile Ser
 100 105 110

Gly

- <210> 8
- <211> 156
- <212> PRT
- <213> 犬肺炎病毒
- <400> 8

Met Ser Thr Ala Met Asn Lys Phe Thr Gln Thr Ile Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15

Thr Ile Leu Asn Ile Ser Asp Ser Glu Glu Ser Ser Asp Glu Ala Gly
 20 25 30

Met Gly Lys Val Ser Arg Thr Thr Gln Ser Ser Glu Arg Trp Leu Asp
 35 40 45

Leu Leu Ile Glu Lys Phe Gln Pro Ser Leu Gln Asn Ile Thr Arg Tyr
 50 55 60

Ile Asn Arg Asn Phe Ile Arg Ile Cys Asn Asp Arg Leu Lys Lys Glu
 65 70 75 80

Lys Met Gly Tyr Ile Glu Ala Lys Gln Tyr Val Glu Asp Met Ala Trp
 85 90 95

Met Val Met Ala Ser Glu Ala Asp Ser Ile Glu Trp Lys Cys Ile Arg
 100 105 110

Arg Gln Lys Lys Val Thr Gly Glu Lys Tyr Pro Lys Phe Phe Phe Val
 115 120 125

Gln His Lys Glu Asp Trp Ile Glu Cys Thr Gly Cys Ile Leu Tyr Pro

[0017]

130	135	140
Gly His Asp Leu Ile Cys Asn Glu Asp Asp Asp Asp		
145	150	155
<210> 9		
<211> 393		
<212> PRT		
<213> 犬肺炎病毒		
<400> 9		
Met Ser Leu Asp Lys Leu Lys Leu Asn Asp Val Ser Asn Lys Asp Ser		
1	5	10
Leu Leu Ser Asn Cys Lys Tyr Ser Val Thr Arg Ser Thr Gly Asp Val		
	20	25
		30
Thr Ser Val Ser Gly His Ala Met Gln Lys Ala Leu Ala Arg Thr Leu		
	35	40
		45
Gly Met Phe Leu Leu Thr Ala Phe Asn Arg Cys Glu Glu Val Ala Glu		
	50	55
		60
Ile Gly Leu Gln Tyr Ala Met Ser Leu Leu Gly Arg Asp Asp Ser Ile		
	65	70
		75
		80
Lys Ile Leu Arg Glu Ala Gly Tyr Asn Val Lys Cys Val Asp Thr Gln		
	85	90
		95
Leu Lys Asp Phe Thr Ile Lys Leu Gln Gly Lys Asp Tyr Lys Ile Gln		
	100	105
		110
Val Leu Asp Ile Val Gly Ile Asp Ala Ala Asn Leu Ala Asp Leu Glu		
	115	120
		125
Ile Gln Ala Arg Gly Val Val Ala Lys Glu Leu Lys Thr Gly Ala Gly		
	130	135
		140

[0018]

Leu Pro Asp Asn Arg Arg His Asp Ala Pro Asp Cys Gly Val Ile Val
145 150 155 160

Leu Cys Val Ala Ala Leu Val Val Ser Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
165 170 175

Gly Gly Leu Asp Ala Val Glu Arg Arg Ala Leu Asn Val Leu Lys Ala
180 185 190

Glu Lys Ala Arg Tyr Pro Asn Leu Glu Val Lys Gln Ile Ala Glu Ser
195 200 205

Phe Tyr Asp Leu Phe Glu Arg Lys Pro Tyr Tyr Ile Asp Val Phe Ile
210 215 220

Thr Phe Gly Leu Ala Gln Ser Ser Val Lys Gly Gly Ser Lys Val Glu
225 230 235 240

Gly Leu Phe Ser Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Leu Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Gln Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Arg
290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Asn Cys Pro Asn Phe
305 310 315 320

Thr Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Ile Gly Ser
325 330 335

[0019]

Tyr Lys Gly Ala Pro Lys Asn Arg Glu Leu Phe Asp Ala Ala Lys Asp
 340 345 350

Tyr Ala Glu Arg Leu Lys Asp Asn Asn Val Ile Asn Tyr Ser Ala Leu
 355 360 365

Asn Leu Thr Thr Glu Glu Arg Glu Leu Ile Ser Gln Gln Leu Ser Ile
 370 375 380

Val Asp Asp Thr Pro Asp Asp Ile
 385 390

<210> 10

<211> 295

<212> PRT

<213> 犬肺炎病毒

<400> 10

Met Glu Lys Phe Ala Pro Glu Phe Val Gly Glu Asp Ala Asn Lys Lys
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Phe Leu Lys His Arg Ser Phe Pro Ser Glu Lys Pro Leu
 20 25 30

Ala Gly Ile Pro Asn Thr Ala Thr His Val Thr Lys Tyr Asn Met Pro
 35 40 45

Pro Ile Leu Arg Ser Ser Phe Lys Leu Ser Pro Pro Arg Ala Ala Ala
 50 55 60

Lys Leu Thr Lys Pro Ser Thr Pro Pro Ser Thr Pro Pro Pro Thr Pro
 65 70 75 80

Pro Gln Asn Lys Glu Glu Gln Pro Lys Glu Ser Asp Ala Asp Ile Glu
 85 90 95

Thr Ile His Val Tyr Glu Val Pro Asp Asn Pro Glu His Ser Lys Lys
 100 105 110

[0020]

Pro Cys Cys Ser Asp Asp Thr Asp Thr Lys Lys Thr Arg Lys Pro Met
 115 120 125

Val Thr Phe Val Glu Pro Glu Glu Lys Phe Val Gly Leu Gly Ala Ser
 130 135 140

Leu Tyr Lys Glu Thr Met Gln Thr Phe Ala Ala Asp Gly Tyr Asp Glu
 145 150 155 160

Glu Ser Asn Leu Ser Phe Glu Glu Thr Asn Gln Glu Pro Gly Ser Ser
 165 170 175

Ser Val Glu Gln Arg Leu Asp Arg Ile Glu Glu Lys Leu Ser Tyr Ile
 180 185 190

Ile Gly Leu Leu Asn Thr Ile Met Val Ala Thr Ala Gly Pro Thr Thr
 195 200 205

Ala Arg Asp Glu Ile Arg Asp Ala Leu Ile Gly Thr Arg Glu Glu Leu
 210 215 220

Ile Glu Met Ile Lys Ser Asp Ile Leu Thr Val Asn Asp Arg Val Ala
 225 230 235 240

Ala Met Glu Lys Leu Arg Asp Glu Glu Cys Ser Arg Ala Glu Thr Asp
 245 250 255

Asp Gly Ser Ala Cys Tyr Leu Thr Asp Arg Ala Arg Ile Leu Asp Lys
 260 265 270

Ile Val Ser Ser Asn Ala Glu Glu Ala Lys Glu Asp Leu Asp Val Asp
 275 280 285

Asp Ile Met Gly Ile Asn Phe
 290 295

[0021]

<210> 11
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> 犬肺炎病毒

 <400> 11

 Met Glu Ala Tyr Leu Val Glu Met Tyr His Gly Val Pro Tyr Thr Ala
 1 5 10 15

 Ala Ile Gln Leu Asn Leu Val Glu Lys His Ser Ala Asn Ile Ser Leu
 20 25 30

 Thr Val Trp Ile Pro Met Phe Gln Thr Ser Leu Pro Arg Asn Ser Val
 35 40 45

 Met Asp Leu Leu His Asp Val Thr Val Ile Cys Thr Gln Ile Ser Thr
 50 55 60

 Val His Gly Pro Met Ile Lys Val Asp Leu Ser Ser Ser Asn Ala Gly
 65 70 75 80

 Leu Ala Thr Met Pro Arg Gln Phe Leu Ile Asn Ala Ile Ile Ala Leu
 85 90 95

 Asp Asp Trp Gly Asn Met Glu Tyr Glu Val Pro Val Ala Phe Asp Lys
 100 105 110

 Lys Ser Phe Cys Val Thr Ile Leu Lys Pro Lys Asn Met Leu Tyr Thr
 115 120 125

 Val Pro Ser Ile Thr Pro Thr Asn Arg Pro Thr His Glu Leu Ile Ala
 130 135 140

 Val Cys Ser Phe His Asn Arg Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Ile Pro
 145 150 155 160

 Val Phe Ile Arg Ala Leu Ser Ile Arg Gln Gln Asp Leu Asp Ser Val

[0022]

	165	170	175
Glu Gln Ala Ile Ser Ser Asp Val Asp His Ala Ile Thr Thr Ala Arg			
	180	185	190
Val Ala Pro Tyr Ala Gly Leu Thr Leu Val Ile Asn Ile Thr Ser Thr			
	195	200	205
Lys Gly Ala Phe Lys Leu Leu Lys Ala Gly Cys Gln Ile Leu Ala Glu			
	210	215	220
Leu Gly Pro Tyr Leu Thr Gln Val Ser Leu His Asp Val Ile Met Asn			
	225	230	240
Trp Lys His Thr Gly Thr Ser Tyr Ile Leu Lys Ser Ser Ser Thr Ser			
	245	250	255
Gly			
<210> 12			
<211> 92			
<212> PRT			
<213> 犬肺炎病毒			
<400> 12			
Met Asp Pro Asn Met Thr Ser Tyr Gln Ile Thr Phe Glu Ile Asn Met			
1	5	10	15
Thr Ser Ser Arg Ile Gly Thr Tyr Ile Thr Leu Ala Leu Thr Ala Leu			
	20	25	30
Leu Leu Ala Cys Ala Val Ile Asn Thr Val Cys Ala Leu Ile Met Ala			
	35	40	45
Cys Ser Ser Arg Ser Ile Ala Thr Ser Gly Ile Ala Ser Ser Gln Cys			
	50	55	60

[0023]

Thr Val His Pro Asn His Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ile Asn Val Thr
65 70 75 80

Ser Leu Pro Gly Asn Leu Tyr Ser Arg Asn Thr Thr
85 90

<210> 13
<211> 414
<212> PRT
<213> 犬肺炎病毒

<400> 13

Met Arg Thr Val Glu Gln Leu Ile Gln Glu Asn Tyr Lys Leu Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ser Met Gly Arg Asn Phe Glu Val Gly Gly Ser Ile Thr Asn Leu
20 25 30

Asn Phe Glu Arg Thr Gln Tyr Pro Asp Thr Phe Arg Thr Val Val Lys
35 40 45

Val Asn Gln Met Cys Lys Leu Ile Ala Gly Val Leu Thr Ser Ala Ala
50 55 60

Val Ala Val Cys Val Gly Val Ile Met Tyr Ser Val Phe Thr Ser Asn
65 70 75 80

His Lys Ala Asn Ser Thr Gln Asn Ala Thr Ile Arg Asn Ser Thr Ser
85 90 95

Ala Pro Pro Gln Pro Thr Ala Gly Leu Pro Thr Thr Glu Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Pro Lys Leu Thr Lys Pro Pro Thr Lys Thr Thr Thr His His Glu
115 120 125

Ile Thr Glu Pro Val Lys Met Val Thr Pro Ser Glu Asp Pro Tyr Gln

[0024]

Val Gly Leu Pro Ser Leu Ser Pro Gln Ala His Lys Ala Ala Leu Lys
340 345 350

Gln Ser Thr Gly Thr Thr Thr Ala Pro Thr Pro Glu Thr Arg Asn Pro
355 360 365

Thr Pro Ala Pro Arg Arg Ser Lys Pro Leu Ser Arg Lys Lys Arg Ala
370 375 380

Leu Cys Gly Val Gly Ser Ser Arg Glu Pro Lys Pro Thr Met Pro Tyr
385 390 395 400

Trp Cys Pro Met Leu Gln Leu Phe Pro Arg Arg Ser Asn Ser
405 410

<210> 14

<211> 537

<212> PRT

<213> 犬肺炎病毒

<400> 14

Met Ile Pro Gly Arg Ile Phe Leu Val Leu Leu Leu Ile Phe Asn Thr
1 5 10 15

Lys Pro Ile His Pro Asn Thr Leu Thr Glu Lys Phe Tyr Glu Ser Thr
20 25 30

Cys Ser Val Glu Thr Ala Gly Tyr Lys Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp
35 40 45

His Met Thr Val Met Ser Ile Lys Leu Ser Gln Ile Asn Ile Glu Ser
50 55 60

Cys Lys Ser Ser Asn Ser Leu Leu Ala His Glu Leu Ala Ile Tyr Ser
65 70 75 80

[0026]

Asn Ala Val Asp Glu Leu Arg Thr Leu Ser Ser Asn Ala Leu Lys Ser
 85 90 95

Lys Arg Lys Lys Arg Phe Leu Gly Leu Ile Leu Gly Leu Gly Ala Ala
 100 105 110

Val Thr Ala Gly Val Ala Leu Ala Lys Thr Val Gln Leu Glu Ser Glu
 115 120 125

Ile Ala Leu Ile Arg Glu Ala Val Arg Asn Thr Asn Glu Ala Val Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Asn Gly Met Ser Val Leu Ala Lys Val Val Asp Asp Leu
 145 150 155 160

Lys Asn Phe Ile Ser Lys Glu Leu Leu Pro Lys Ile Asn Arg Val Ser
 165 170 175

Cys Asp Val His Asp Ile Thr Ala Val Ile Arg Phe Gln Gln Leu Asn
 180 185 190

Lys Arg Leu Leu Glu Val Ser Arg Glu Phe Ser Ser Asn Ala Gly Leu
 195 200 205

Thr His Thr Val Ser Ser Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Leu Thr Ser
 210 215 220

Ile Val Gly Gly Met Ala Val Ser Ala Gly Gln Lys Glu Ile Met Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Arg Ala Ile Met Arg Arg Asn Gly Leu Ala Ile Leu Ser Ser
 245 250 255

Val Asn Ala Asp Thr Leu Val Tyr Ile Ile Gln Leu Pro Leu Phe Gly
 260 265 270

Val Met Asp Thr Asp Cys Trp Val Ile Arg Ser Ser Ile Asp Cys His

[0027]

275	280	285
Asn Ile Ala Asp Lys Tyr	Ala Cys Leu Ala Arg Ala Asp Asn Gly Trp	
290	295	300
Tyr Cys His Asn Ala Gly Ser Leu Ser Tyr Phe Pro Ser Pro Thr Asp		
305	310	315
Cys Glu Ile His Asn Gly Tyr Val Phe Cys Asp Thr Leu Lys Ser Leu		
325	330	335
Thr Val Pro Val Thr Ser Arg Glu Cys Asn Ser Asn Met Tyr Thr Thr		
340	345	350
Asn Tyr Asp Cys Lys Ile Ser Thr Ser Lys Thr Tyr Val Ser Thr Ala		
355	360	365
Val Leu Thr Thr Met Gly Cys Leu Val Ser Cys Tyr Gly His Asn Ser		
370	375	380
Cys Thr Val Ile Asn Asn Asp Lys Gly Ile Ile Arg Thr Leu Pro Asp		
385	390	395
Gly Cys His Tyr Ile Ser Asn Lys Gly Val Asp Lys Val Gln Val Gly		
405	410	415
Asn Thr Val Tyr Tyr Leu Ser Lys Glu Val Gly Lys Ser Ile Val Val		
420	425	430
Arg Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Tyr Asp Pro Leu Asn Phe Pro Asp		
435	440	445
Asp Lys Phe Asp Val Ala Ile Arg Asp Val Glu His Ser Ile Asn Gln		
450	455	460
Thr Arg Thr Phe Leu Lys Ala Ser Asp Gln Leu Leu Asp Leu Ser Glu		
465	470	475
		480

[0028]

Asn Arg Val Asn Lys Ser Leu Thr Lys Ser Tyr Ile Leu Thr Thr Leu
485 490 495

Leu Ile Val Val Met Leu Ile Ile Ile Met Val Val Ile Gly Phe Ile
500 505 510

Leu Tyr Lys Val Ser Lys Ile Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Ser Lys
515 520 525

Ser Thr Pro Gly Leu Thr Val Leu Ser
530 535

<210> 15

<211> 176

<212> PRT

<213> 犬肺炎病毒

<400> 15

Met Ser Val Arg Pro Cys Lys Phe Glu Val Gln Gly Phe Cys Ser Arg
1 5 10 15

Gly Arg Asn Cys Lys Tyr Ser His Lys Tyr Trp Glu Trp Pro Leu Lys
20 25 30

Thr Leu Met Leu Arg Gln Asn Tyr Met Leu Asn Arg Ile Tyr Arg Phe
35 40 45

Leu Asp Thr Asn Thr Asp Ala Met Thr Asp Val Ser Gly Phe Asp Ala
50 55 60

Pro Gln Arg Thr Ala Glu Tyr Ala Leu Gly Thr Ile Gly Val Leu Lys
65 70 75 80

Ser Tyr Leu Glu Lys Thr Asn Asn Ile Thr Lys Ser Ile Ala Cys Gly
85 90 95

[0029]

Ser Leu Ile Thr Val Leu Gln Asn Leu Asp Val Gly Leu Val Ile Gln
 100 105 110

Ala Arg Asp Ser Asn Ala Glu Asp Val Asn Tyr Leu Arg Ser Cys Asn
 115 120 125

Thr Ile Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Ile His Lys Lys Arg Gln Val Ile
 130 135 140

His Ile Leu Lys Lys Leu Pro Val Gly Val Leu Cys Ser Leu Ile Gln
 145 150 155 160

Ser Val Ile Ser Ile Glu Glu Lys Ile Asn Ser Ser Met Lys Thr Glu
 165 170 175

<210> 16

<211> 98

<212> PRT

<213> 犬肺炎病毒

<400> 16

Met Gln Ser Asp Pro Ile Cys His Leu His Arg Gly Glu Asp Lys Phe
 1 5 10 15

Phe Tyr Glu Asn Arg Met Ile Arg Leu Pro Lys Tyr Tyr Pro Ala Ile
 20 25 30

Leu His Lys Met Tyr Ile Ile Gly Val Asn Arg Asn Leu Thr Tyr Asp
 35 40 45

Gly Ser Arg Pro Ser Thr Ile Ile Asp Ala Gly Lys Ser Val Val Trp
 50 55 60

Asn Arg Val Asp Val Ile Ala Cys Val Lys Glu Ala Leu Cys Cys Ile
 65 70 75 80

Glu Leu Ser Trp Ser Asn Gln Val Ile Ile Asp Phe Asp Tyr Ser Gln
 85 90 95

[0030]

Ala Arg

- <210> 17
- <211> 49
- <212> PRT
- <213> 犬肺炎病毒

<400> 17

Met Asp Pro Ile Asp Glu Gln Glu Val Asn Val Tyr Leu Pro Asp Ser
 1 5 10 15

Tyr Leu Lys Gly Val Ile Ser Phe Ser Glu Thr Asn Ala Leu Gly Ser
 20 25 30

Cys Ile Ile Gly Arg Pro Phe Leu Lys Asp Asp Phe Thr Ala Thr Thr
 35 40 45

Ser

- <210> 18
- <211> 13
- <212> RNA
- <213> 犬肺炎病毒

<400> 18

uaguuaauua aaa 13

- <210> 19
- <211> 14
- <212> RNA
- <213> 犬肺炎病毒

<400> 19

uaguuaauaga aaaa 14

- <210> 20
- <211> 14

[0031]

<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 20	
uauuuuauua aaaa	14
<210> 21	
<211> 13	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 21	
uaguuaaaua aaa	13
<210> 22	
<211> 14	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 22	
uaguuaaaca aaaa	14
<210> 23	
<211> 14	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 23	
uaguuaauga aaaa	14
<210> 24	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 24	
cuggaaaaua u	11
<210> 25	
<211> 16	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 25	

[0032]

uaagcuauga uauaau	16
<210> 26	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 26	
aggacaagug	10
<210> 27	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 27	
aggacaaauc	10
<210> 28	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 28	
aggauaaaua	10
<210> 29	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 29	
aggacaaaua	10
<210> 30	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 30	
aggauaagua	10
<210> 31	

[0033]

<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 31	
aggauaaagug	10
<210> 32	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 32	
aggaucaaua	10
<210> 33	
<211> 15	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 33	
uaguuuuuuu aaaaa	15
<210> 34	
<211> 14	
<212> RNA	
<213> 犬肺炎病毒	
<400> 34	
uaguuuuuuu aaaa	14
<210> 35	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物序列 (degenerate primer sequence)	
<400> 35	
tccgtgcagg ccgaratgga rcarg	25
<210> 36	

[0034]

<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物	
<400> 36	
ggaactcggg ggcgaaytty tccat	25
<210> 37	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (19).. (19)	
<223> n 是 a, c, g, 或 t	
<400> 37	
ccggatcttc ggccayecna tggt	24
<210> 38	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物	
<400> 38	
ttcttaggag gggagatggc ytrtrertt	29
<210> 39	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物	

[0035]

<400> 39	
catcacgcgac ctgtccaagt tyaaycargc	30
<210> 40	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物	
<400> 40	
ttgaagtcgt ccaggatggt rttatcca	29
<210> 41	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 41	
ggcttctggt tcttcttttc tgg	23
<210> 42	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 42	
ccgtggtggt gcctgtg	17
<210> 43	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物	
<400> 43	

[0036]

atggatccta acatgacctc ayac	24
<210> 44	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 简并引物	
<400> 44	
gattgggatg aacygtgcat tg	22
<210> 45	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 45	
tgtaaaagtg aaccaaagt gta	23
<210> 46	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 46	
aaatcttcag gtaaatacagg tc	22
<210> 47	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 47	
ttttaacaac aagaatcagt c	21

[0037]

<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 48
ctcctaggtg cgggggttgg

20

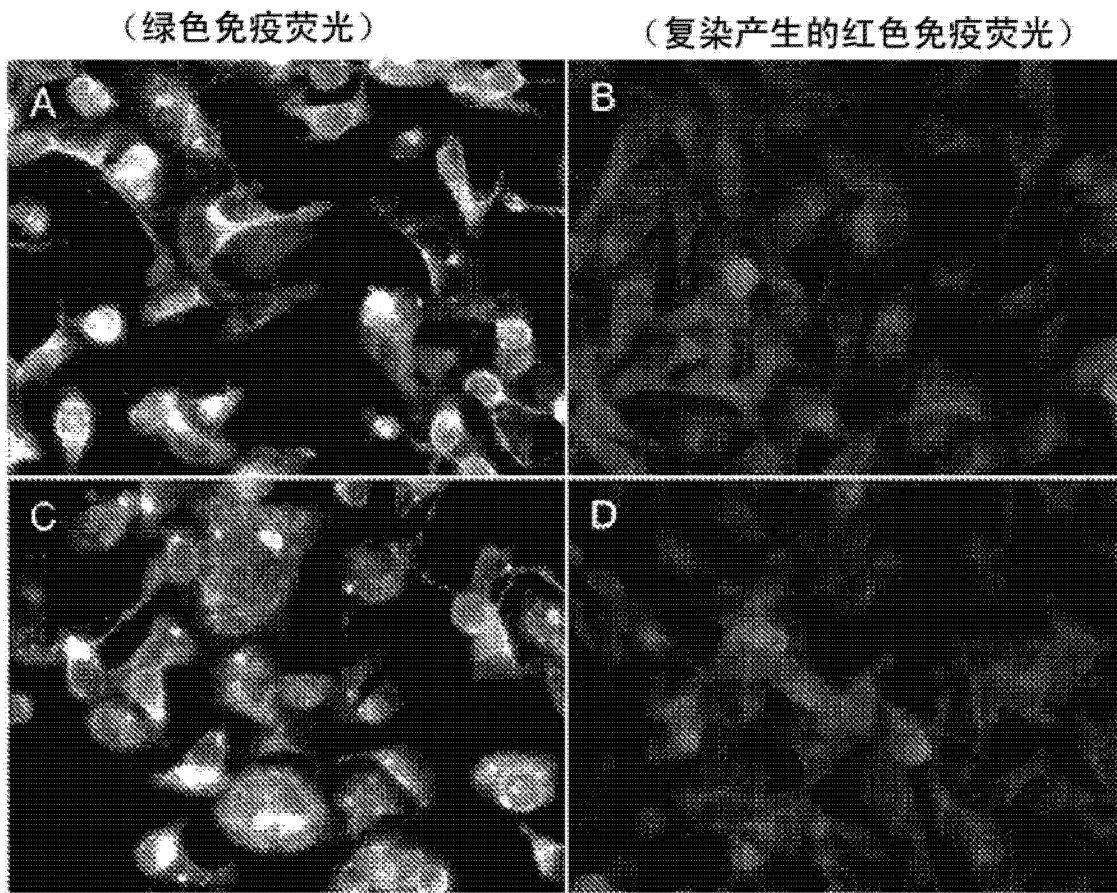
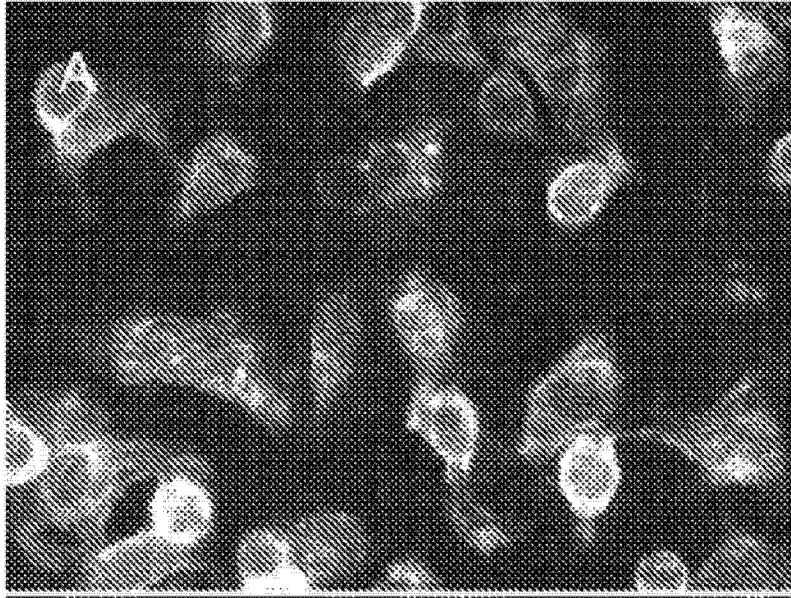


图 1

(绿色免疫荧光)



(复染产生的红色免疫荧光)

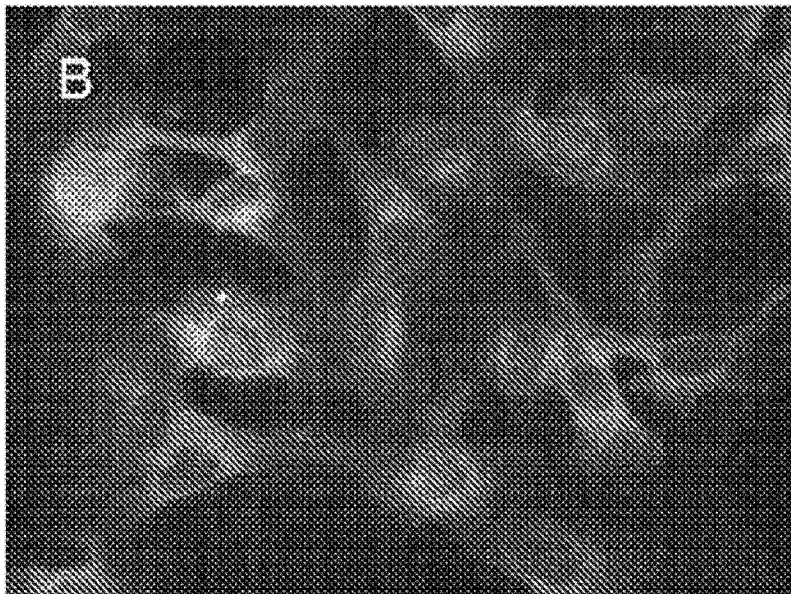
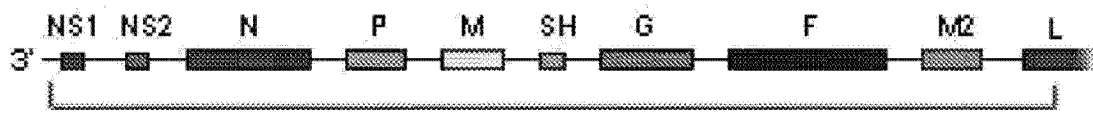


图 2



测序区域

图 3