

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：/ 00117552 (由92134999分割)

※申請日期：92.12.11

※IPC 分類：C12N15/82 (2006.01)

壹、發明名稱：(中文/英文)

用植物表現之重組蛋白質免疫魚類

Immunization of Fish With Plant-Expressed Recombinant Proteins

A23k1/8

(2006.01)

A61k39/12

(2006.01)

貳、申請人：(共 2 人)

申請人 1

姓名或名稱：(中文/英文)

諾華公司 / NOVARTIS AG

代表人：(中文/英文)

1. 亞瑟 卡儂尼卡 / CANONICA, ARTHUR

2. 佩斯寇 卓柏 / TRAUB, PASCAL

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士，4056 巴賽爾城，光明街 35 號

Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland

國 籍：(中文/英文)

瑞士 / SWITZERLAND

申請人 2

姓名或名稱：(中文/英文)

波第基因公司 / PRODIGENE, INC.

代表人：(中文/英文)

喬瑟夫 B. 沙陸里 / SALURI, JOSEPH B.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國愛阿華州 50003 拉瑞德催路 22555 號

22555 Laredo Trail, Adel, IA 50003, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.

201139672

參、發明人：(共 2 人)

發明人 1

姓 名：(中文/英文)

凱薩琳 貝費斯 / BEIFUSS, KATHERINE

住居所地址：(中文/英文)

美國 德州 77801 布萊恩市 森林路 2815 號

2815 Forestwood, Bryan, TX 77801, USA

國 籍：(中文/英文)

美國 / USA

發明人 2

姓 名：(中文/英文)

琳達 M. 波特蘭 / BOOTLAND, LINDA M.

住居所地址：(中文/英文)

加拿大 C0A 1J0 愛德華島 奎拋市 RR2 海灘之光路 125 號

PH. D., 125 Beach Light Rd, RR2 Crapaud, PE, Canada, C0A 1J0

國 籍：(中文/英文)

加拿大 / Canada

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國；2002.12.13；60/433,381

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於轉殖基因植物中表現魚類疾病抗原及其做為疫苗之用途。

【先前技術】

歷經過去十年間，已成功使用轉殖基因植物表現各種有用的蛋白質。例如，已達成於植物中製造蛋白酶（參見美國專利案 6,087,558 號）；以及於植物中製造抑蛋白酶肽（美國專利案 5,824,870 號）；與親和素（美國專利案 5,767,379 號）。已成功於植物中生產之蛋白質亦包括各種哺乳動物之細菌與病毒性致病抗原，例如病毒疫苗（美國專利案 6,136,320 號）；可傳染性胃腸炎與肝炎疫苗（美國專利案 5,914,123 與 6,034,298 號）。此等專利案及所有於本文所引述之文獻皆併入本文做為參考文獻。

許多所得到之肽類可於小鼠（馬森等人(1998)疫苗 16:1336-1343；韋格多維茲等人(1999)病毒學 155:347-353）及人類（卡普斯塔等人(1999) *FASEB J.* 13:1796-1799）體內誘發與原始病原菌相當的免疫反應。經口服遞送後，此等可食用疫苗具有成免疫性且能誘導保護作用。餵予基本飲食加上玉米表現之重組大腸桿菌熱-不穩定性內毒素 B-次單位(LtB)的小鼠呈現良好的劑量依賴型 IgG 與 IgA 反應（史崔費爾得等人“以植物為主之疫苗--獨特的進步”疫苗(2001)19:2742-2748）。某些首先研發之可食用疫苗技術包括表現肝炎、TGEV 與諾沃克病毒抗原以及各種其

他病毒抗原之轉殖基因馬鈴薯（參見例如，湯納拉等人（1995）*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:3358-3361；美國專利案 6,136,320；美國專利案 6,034,298 號；美國專利案 5,914,123 號；美國專利案 5,612,487 號及美國專利案 5,484,719 號；馬森等人（1996）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5335-5340；“用於口足病之 VP1 蛋白”（韋格多維茲等人（1999）*病毒學* 255:347-353）。

利用轉殖基因植物製造疫苗較傳統疫苗產製方法具有數種潛在的助益。第一，轉殖基因植物通常經架構而僅表現該病原菌或毒素之小的具抗原性部份，以排除受完整生物體感染或其天然毒性傷害的可能性，並減少可能發生有害反應。第二，因為尚未知有能夠感染植物之人類或動物病原菌存在，故可免除顧慮受病毒或感染性蛋白質污染。第三，於轉殖基因穀類製造免疫原係仰賴與習知用於食物穀類之播種、收割、儲放、運送及植物加工相同的已建立技術，故使轉殖基因植物成為供大規模製造疫苗之非常經濟的方式。第四，於植物之天然蛋白質-儲存區室中表現免疫原可使穩定性達最高，使對冷藏之需求減至最小並使運送及儲放花費保持低價。第五，可藉由將多種轉殖基因植物品系之種子摻合成單一疫苗而調製得多組成疫苗。第六，當免疫原係表現於一般攝取之食用植物（例如穀類）時可直接以口服投藥，促成製造可食用疫苗。

做為初次或追加免疫作用時之口服疫苗遞送方式為目前水產養殖業最欲尋求之方法，因為其適用於以各種大小

之團塊免疫魚類，其相對於注射遞送方式（其需要握住魚體且會誘發黏膜免疫性）對魚類較不具壓力。然而口服遞送之成本效益乃此方法商業化的最主要障礙，特別是對較大型魚類而言。據報導，口服遞送之功效會因抗原會被魚類消化系統破壞及吸收而受到限制。

本發明已發現轉殖基因植物可提供經濟產製用於魚類口服疫苗接種之抗原的理想系統。

【發明內容】

發明概述

根據本發明之一方面係提供使用由植物衍生之重組胺基酸序列製造用於預防或治療魚類疾病的醫藥品，其中該胺基酸序列（當投藥予魚類時）會在魚體內產生抗原性或免疫反應。較佳地該重組胺基酸序列為一種引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原。

於本發明之一方面，係以編碼胺其在投藥予魚類時會在魚體內產生抗原性或免疫反應的基酸序列之核苷酸序列轉形植物。

於本發明之另一方面，係使該胺基酸序列優先於該植物之種子中表現。

於另一方面，本發明係提供一種經由於植物細胞中表現而衍生得之胺基酸序列，其中該胺基酸序列為引起魚類疾病或病狀之生物體的內源性抗原。

於另一方面，本發明係提供一種適於口服遞送予魚類之組合物，其包含由植物衍生之重組胺基酸序列，尤其是

由植物所衍生得而其為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原之重組胺基酸序列。

於又一方面，本發明係提供一種免疫接種魚類對抗疾病之方法，其包含對魚類投藥一種包含由植物所衍生得而其為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原之重組胺基酸序列的組合物。

較佳具體實施態樣之詳述

本文所用術語“魚類”意指魚類、甲殼類及其他水生動物。魚類包括所有脊椎動物魚類，其可為硬骨魚類或軟骨魚類。用於接受本發明疫苗之主要候選魚類為鮭屬魚類，包括鮭魚及鱒魚品種，特別是銀鱒(*Oncorhynchus kisutch*)、河鱒(*Salvelinus fontinalis*)、褐斑鱒(*Salmo trutta*)、鮭魚(*Oncorhynchus tshawytscha*)、鱒魚(*Oncorhynchus masou*)、北鱒(*Oncorhynchus gorbuscha*)、彩虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)、北極嘉魚(*Salvelinus alpinus*)及大西洋鮭魚(*Salmo salar*)。

然而，亦有助於任何其他容易罹患感染性疾病之魚種，例如觀賞魚類、錦鯉、金魚、鯉魚、鯰魚、鰱魚、海鯛、鱸魚、梭子魚、大比目魚、鱈魚、尼羅紅魚、比目魚、狼魚等。

甲殼類之實例包括（但不限定於）蛤、龍蝦、小蝦、蟹及牡蠣。其他養殖水生動物包括（但不限定於）鰻魚、魷魚及章魚。

“由植物衍生得之”重組胺基酸序列為一種經加工操

作而於轉殖基因植物中表現且其序列對植物而言非內生性之胺基酸序列。

本發明之胺基酸序列為一種當投藥予魚類時，會在魚體內產生抗原性或免疫反應者。

引起魚類病狀之抗原及編碼此類抗原之核苷酸序列，業已經由注射、浸潤、噴灑、直接加入魚飼料中或基因轉移入魚細胞中等方式投藥予魚類。例如，美國專利案 6,462,027 號描述一種將經單離編碼免疫原之非感染性聚核苷酸與水生動物接觸的方法。美國專利案 6,180,614 號描述將編碼以抗原為主之疫苗的 DNA 質體藉由轉染作用導入魚類。啟動子為能夠於魚類主導表現者。該專利說明書指稱經細菌表現之重組蛋白質會形成包涵體以致蛋白質回收率低或不穩定。而且，其指出免疫反應之誘導可能需要該抗原蛋白被正確糖苷化及折疊，而其可能無法在動物細胞以外的細胞內完成。然而，本發明現已發現可在植物中製造經正確加工之抗原性胺基酸序列，其當投藥予魚類時會在魚體內引起抗原性或免疫反應。

已定序得許多在魚體內產生抗原性或免疫反應之胺基酸序列（亦稱之為“抗原”）的編碼序列，已有相當興趣投注於使用此等基因製造疫苗。雖於下文中引述或例舉說明本發明使用特定抗原之原理，本發明仍不受限於任何特定抗原。可使用任何在魚體內產生抗原性或免疫反應之胺基酸序列。於較佳具體實施態樣中，係使用引起魚類病症之生物體的抗原。此類抗原係用於誘發或增進免疫性，且

相對應編碼該抗原之核酸序列可用於本發明。此等已被單離之序列實例包括於美國專利案 6,471,964 號中所述編碼感染性鮭魚貧血病毒 (ISAV) 之結構蛋白-1 的 cDNA，以及於吐克等人 (2000) “經由粒子轟擊導入報導基因與組織病理學評估有效用於幼年日本比目魚 *Paralichthys olivaceus* 之 DNA 疫苗” 疫苗 19(7-8):801-809；柯拜爾等人 (1999) “感染性造血壞死病毒之 N、P、M、NV、G 蛋白質於使用 DNA 疫苗之彩虹鱒 *Oncorhynchus mykiss* 的保護性致免作用之評估” *Dis. Aquat. Organ* 39(1):29-26；紐斯邦等人 (2002) “河床鯰魚以河床鯰魚疱疹病毒 (IHV-1) 之早期與晚期轉錄產物施予 DNA 疫苗接種所誘發的保護免疫性” *Vet. Immunol. Immunopathol* 84(3-4):151-168；克拉克等人 (1992) “表面抗原基因於寄生性纖毛多子小瓜蟲 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 之發育表現” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(14):6363-6367；及佐藤等人 (2000) “YAV 蛋白質之表現與對抗養殖幼年鯽魚之病毒性腹水的疫苗接種” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(7):1494-1497。

各種本發明可供使用之病原實例包括 (但不限定於) 出血性敗血病毒 (VHSV)、感染性胰臟壞死病毒 (IPNV)、感染性造血壞死病毒 (IHNV)、鮭魚胰病病毒 (SPDV)、引起鯉魚春季病毒血症之病毒、草魚出血病毒、野田病毒科例如神經壞死病毒或條紋幼梭魚神經壞死病毒、感染性鮭魚貧血病毒 (ISAV)、殺鮭氣單胞菌、沙氏腎桿菌、耶爾森菌屬

、巴斯德菌屬（包括發光菌）、弧菌屬（包括鰻弧菌與病海魚弧菌）、愛得華氏菌屬（包括鮫魚愛得華氏菌與遲鈍愛得華氏菌）、鮭立克次體（引起鮭類魚類之立克次體敗血病）、虹色病毒、心肌病徵候群病毒、陶拉氏徵候群病毒、斑節蝦單節病毒、蝦黃頭病毒、蝦白點病毒及鏈球菌屬。

其他可用於本發明之造成魚類病狀的已知抗原實例包括：IPNV VP2 與 VP3 蛋白質、IHN V G 蛋白、VHSV G 蛋白、野田病毒外膜蛋白、ISAV 抗原揭示於 WO 01/10469、SPDV 抗原揭示於 WO 99/58639、鮭立克次體(*P. salmonis*) 抗原揭示於 WO 01/68865 及白點病毒抗原揭示於 WO 01/09340。已知許多魚類病原抗原之核酸及胺基酸序列且可經由 Genbank 資料庫及其他資源取得。

本發明其為“引起魚類疾病或病狀之生物體”之胺基酸序列或抗原係指，魚類病原菌之胺基酸序列或抗原（或其衍生物），其經由重組 DNA 技術（如下所述）於植物細胞內表現。“抗原”用於實施本發明可為得自引起魚類疾病之病毒、細菌、真菌、寄生蟲、原生動物等之全長抗原性蛋白質，或另供選擇地可構成其免疫生成部份、片段或衍生物者。胺基酸序列之“衍生物”係一段於胺基酸序列層次或於 3D 層面上與參考序列具關聯性之序列（亦即為具有大致與參考序列相同之形態及架構的分子）。衍生物包括同源序列、突變型、模擬物、最小抗原肽、類似物、單體形式及功能性相等物，而不論係直接得自該生物體或

經合成製得，其能夠在魚體內誘發抗原性或免疫反應者。特別可提及的是經由胺基酸取代（以天然或合成型胺基酸）、缺失、轉位、插入及加成作用得到之衍生物。

此抗原（不論其為胺基酸序列或蛋白質）係“感興趣之抗原”。“感興趣之基因”意指編碼其為所希望抗原或篩選標記之多肽或蛋白質的核苷酸序列。感興趣之基因可藉由使密碼子最適化用於植物（參見下文論述）而最佳適應於植物轉錄與轉譯作用。

一般，可用於構築上述重組基因之方法（視需要地包含各種用以增進表現之修飾）在細節上可能不盡相同。然而，習知所使用之方法包括 PCR 擴增，或設計並合成重疊、互補的合成型寡核苷酸，其經退火與連接在一起而產生具有供選殖用之方便限制酶切位的基因。該等所涉及之方法為分子生物學者已知之標準方法，山姆布克等人，分子選殖，實驗室手冊，冷泉港實驗室出版，第二版（1989）。

一旦該基因經遺傳工程操作而含有所希望性質（例如所希望之定位序列）後，便藉由標準方法將其置入表現載體中。適當表現載體之選擇將取決於該表現載體導入宿主細胞之方法。代表性之表現載體含有編碼細菌複製起點及供該表現載體於細菌宿主內生長與篩選之抗生素抗性基因的原核生物 DNA 元件；用於插入外源性 DNA 序列（於本文中係指編碼所興趣抗原者）之選殖位點；控制該外源性基因轉錄起始之真核生物 DNA 元件，例如啟動子；及轉錄物加工之 DNA 元件，例如轉錄終結/聚腺苷化序列。其亦可含

有諸等為使該載體最後整合入植物染色體中所需之序列。

於較佳具體實施態樣中，該表現載體亦含有編碼篩選標記之基因，其經功能性鍵聯至一種控制轉錄起始之啟動子。藉由“功能性鍵聯”，據了解該所興趣之基因（於此個案中該基因係編碼篩選標記）以使能正確進行 mRNA 轉錄及 mRNA 轉譯而產生所希望多肽或蛋白質之正確位向及正確框區排列接於該啟動子的下游處。關於植物表現載體及報告基因之一般敘述請參見格魯柏等人(1993)“供植物轉形作用之載體”於植物分子生物學與生物技術之方法 CRC 出版，第 89-119 頁。於一項具體實施態樣中，篩選基因為草氨磷-抗性編碼 DNA，而於另一項具體實施態樣中可為膦絲菌素乙醯轉移酶(“*pat*”)或受控於 CaMV 35S 啟動子之玉米最適化 *pat* 基因。該基因授與對雙丙氨磷之抗性（葛登-卡姆(1990)植物細胞 2:603；內宮等人(1993)生物/技術 11:835；及安采等人(1989) *Mol. Gen. Gen.* 219:492）。

“啟動子”意指足以主導轉錄作用之最小序列。本發明亦包括該等足以使啟動子-依賴性基因表現可受細胞類型特異性、組織特異性調控，或可被外在訊號或試劑誘發的啟動子元件；此類元件可位於該基因之 5' 或 3' 區域內。雖可使用所興趣結構基因之內源性啟動子進行該基因之轉錄調節，但該啟動子往往是一種外來的調節性序列。用於分別控制抗原性蛋白質與篩選基因表現之啟動子元件可為任一種植物-可相容啟動子。該等可為植物基因啟動子，例如泛素啟動子（歐洲專利申請案 0 342 926）；用於核

酮糖-1,5-雙-磷酸羧化酶小次單位(ssRUBISCO)之啟動子(克魯茲等人, *EMBO J.*, 3:1671, 1984; 布羅格利等人, *科學*, 224:838, 1984); 或得自根瘤農桿菌之根瘤-誘生質體的啟動子, 例如胭脂胺酸合成酶與章魚胺酸合成酶啟動子(其被攜帶於根瘤農桿菌之根瘤-誘生質體上且具有植物活性); 或病毒啟動子例如 CaMV 之花椰菜鑲嵌病毒(CaMV) 19S 與 35S 啟動子(布里森等人, *自然*, 310:511, 1984; 奧得爾等人, *自然*, 313:810, 1985)、玄蔘鑲嵌病毒 35S 啟動子(高達等人, *J. Cell Biochem.*, 13D:301, 1989) 或 TMV 之外套蛋白啟動子(高松等人, *EMBO J.* 6:307, 1987)。亦參見凱等人(1987)“CaMV 35S 啟動子之複製產生植物基因之強增效子” *科學*, 236:199-1302 及歐洲專利申請案 EP-A-342 926 號。另供選擇地, 可使用植物啟動子例如甘露胺酸合成酶啟動子(維特等人, *EMBO J.*, 3:2723, 1984); 熱休克啟動子例如大豆 hsp1 7.5-E 或 hsp1 7.3-B(格利等人, *Mol. Cell Biol.* 6:559, 1986; 塞弗林等人, *Plant Mol. Biol.* 15:827, 1990); 或乙醇-可誘導啟動子(卡迪克等人, *Nature Biotech.* 16:177, 1998)。關於例舉性適用於本發明之植物啟動子之回顧請參見國際專利申請案 WO 91/19806 號。於本發明之一項具體實施態樣中, 胺基酸-編碼 DNA 係於 PGNpr6 啟動子(WO 01/94394)之轉錄調控下。此為一種類-泛素啟動子。

於一項較佳具體實施態樣中, 係提供組織特異性啟動子主導該 DNA 優先於種子中進行轉錄。一種此類啟動子為

球蛋白啟動子。此為玉米球蛋白-1 基因之啟動子，經描述於貝朗格，F.C. 與克里茲，A.L. (1991) “玉米球蛋白-1 基因之等位基因多形性的分子基礎” *遺傳學* 129:863-972。其亦可見於 Genbank 資料庫寄存號碼為 L22344。其他實例為雲扁豆蛋白啟動子。參見，巴斯托等人(1989) “藉由經發現存在扁豆 B-雲扁豆蛋白基因上游之富含-A/T 順式作用序列調節 B-葡糖醛酸酶於轉殖基因煙草植株中的表現” *植物細胞* (1):839-853。

表現載體可視需要地亦含有座落於啟動子與該所興趣基因間之訊號序列。訊號序列為一種核苷酸序列（且可能為所對應之胺基酸序列），其由細胞利用以引導所興趣之蛋白質或多肽被轉譯並安置於真核細胞內或外的特定位置。一種植物訊號序列之實例為大麥 α -澱粉酶分泌訊號（羅杰斯(1985) *J. Biol Chem* 260, 3731-3738）。許多訊號序列為該項技藝中已知。參見，例如貝克等人(1992)，*Plant Mol. Biol.* 20:49；克洛斯，P.S. (1993)碩士論文，愛荷華州立大學；諾克斯，C. 等人(1987) “兩種得自大麥之趨異阿伐-澱粉酶基因的結構與組織”，*Plant Mol. Biol.* 9:3-17；里奈等人(1989)，*Plant Physiol.* 91:124-129；方特斯等人(1991)，*Plant Cell* 3:483-496；松岡等人(1991)，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:834；古爾得等人(1989)，*J. Cell Biol.* 108:1657；克來森等人(1991)，*Plant J.* 2:129；卡得隆等人(1984) “能夠特化核定位之短胺基酸序列” *Cell* 39:499-509；及史坦佛爾等

人(1990)“於早期葉與根部維管束分化中富含玉米細胞壁羥脯胺酸之糖蛋白基因的表現” *Plant Cell* 2:785-793。

於一項具體實施態樣中，植物篩選標記及所感興趣之基因二者可經功能性鍵聯至同一啟動子。於另一項具體實施態樣中，植物篩選標記及所感興趣之基因可經功能性鍵聯至不同啟動子。又於第三及第四項具體實施態樣中，表現載體可含有二或多種所感興趣之基因，彼等可經鍵聯至同一或不同啟動子。

顯然，有許多針對啟動子、可篩選標記、訊號序列及構築體其他組成之變異可供習於該項技藝人士利用。

根據本發明，係產製一種轉殖基因植物其含有由前述元件所組成而經整合入其基因組中之 DNA 分子，以使該植物能表現所興趣之基因並因而製造出所感興趣之抗原。轉殖基因植物可適宜地為一種習知栽培供動物餵食之物種，例如玉米 (*Zea mays*)、芥菜籽 (*Brassica napus*、蔓菁 *Brassica rapa* ssp.)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、稻米 (*Oryza sativa*)、裸麥 (*Secale cereale*)、高粱 (*Sorghum bicolor*、*Sorghum vulgare*)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、小麥 (*Triticum aestivum*)、大豆 (*Glycine max*)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 及豌豆 (*Lathyrus spp.*)。另供選擇地，轉殖基因植物可為一種非習知供食用之品種，例如煙草 (*Nicotiana tabacum*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、茶 (*Camellia sinensis*)、亞麻 (*Linum*)、瓊麻

(*Agave spp.*、*Furcraea spp.*)、松樹、樅樹及西洋杉。為產製此類轉殖基因植物，可將含有該基因之表現載體導入原生質體、完整組織（例如未成熟胚體與分生組織）、癒傷組織培養物、或經單離之細胞中。較佳地，係將表現載體導入完整組織中。植物組織培養之一般方法（例如）由三木等人(1993)記載於“用於將外來 DNA 導入植物之製程”，植物分子生物學及生物技術之方法，格利克等人（編著）CRC 出版第 67-68 頁，及由菲力普等人(1988)記載於“細胞/組織培養及活體外繁殖”，玉米及玉米改良第 3 版，斯普拉格等人（編著）美國農藝學協會第 345-387 頁。

習於該項技藝人士可利用以將表現載體導入植物組織之方法各有差異且將視所選擇的植物而定。供轉形許多不同類植物品種之方法為已熟知並且經記載於文獻中。參見（例如）三木等人，如前述；克來恩等人(1992)*生物/技術* 10:26；韋西格等人(1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477。例如，可使用諸如顯微注射-介導之遞送（克來恩等人(1987) *自然* 327:70-73）；電穿透（佛羅姆等人(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5824）；聚乙二醇(PEG)沈澱（帕柯夫斯基等人(1984) *Embo. J.* 3:2717-272）；直接基因轉移（WO 85/01856 與 EP-A-275 069）；活體外原生質體轉形（美國專利案 4,684,611）及植物細胞原生質體或胚源性癒傷組織（克羅斯威(1985) *Mol. Gen. Genetics* 202:179-185）等技術將 DNA 構築體導入植物細胞之基因組

DNA 中。另可選擇將植物組織與根瘤農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 共培養，其中係將 DNA 構築體置入雙向載體系統中 (石田等人 (1996) “由根瘤農桿菌介導玉米 (*Zea mays* L.) 之高效率轉形作用” 自然生物技術 14: 745-750)。根瘤農桿菌宿主之致病功能會在細胞受該細菌感染時，引導構築體插入植物細胞 DNA 中。參見 (例如) 霍許等人 (1984) 科學 233:496-498，及弗雷利等人 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:4803。

用於轉形芥菜籽之標準方法係由莫洛尼等人 (1989) “使用農桿菌載體高效率轉形芥菜籽 (*Brassica napus*)” 描述於植物細胞報導 8:238-242。玉米轉形作用係經描述於佛羅姆等人 (1990) 生物/技術 8:833 及戈登-卡姆等人，如前述。農桿菌主要用於雙子葉植物，但特定單子葉植物如玉米可由農桿菌進行轉形。參見例如，美國專利案 5,550,318。稻米轉形作用係由希海等人 (1994) 記載於 “由農桿菌介導稻米 (*Oryza sativa* L.) 之有效率轉形及 T-DNA 邊界之序列分析” *The Plant Journal* 6(2):271-282，克里斯托等人 (1992) 生物技術趨勢 10:239 及李等人 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6389。小麥可藉由與該等用於轉形玉米或水稻類似之技術進行轉形。高粱轉形作用係由凱薩斯等人 (1997) 描述於 “經顯微發射轟擊未成熟花序後獲得之轉殖基因高粱植物” 活體外細胞及發育生物學，植物 33:92-100 及描述於汪等人 (1994) 植物生理學 104:37。大豆轉形作用經描述於許多公開文獻中，包括美

國專利案 5,015,580 號。

於一項較佳方法中，發明人大致遵照如前述之石田及敘述於美國專利案 5,591,616 之農桿菌轉形方法且加以修飾而發現可改善所獲得轉形株之數量。石田方法係使用玉米之 A188 變種，其於培養物中產生第 I 型癒傷組織。於一項較佳具體實施態樣中，係使用於培養物中引發產生第 II 型胚源性癒傷組織之 Hi II 玉米品系。雖然石田建議當使用 *bar* 或 *pat* 基因做為篩選時係以 phosphinothricin 進行篩選，另一項較佳具體實施態樣係以雙丙氨酸取代。一般，如於該 '616 案中所述及下文之更詳細論述者，係藉由將植物之外植體培養於誘導去分化之培養基上至少七天而獲得去分化作用，並使組織於去分化期間或之後與具有所興趣基因之農桿菌接觸。經培養之組織可（例如）為癒傷組織、不定形類-胚組織及懸浮細胞。於此項較佳具體實施態樣中，農桿菌懸浮液具有細胞群落數為 10^6 至 10^{11} 個細胞/毫升且與該組織接觸三至十分鐘，或持續地與農桿菌培養至少七天。該農桿菌可含有質體 pTOK162，其中所感興趣之基因位於該質體之 T 區域邊界序列之間，或所感興趣之基因可存在另一株含有質體之農桿菌中。毒性區可起源於 Ti 質體或 Ri 質體之毒性區。用於石田製法中之菌株為 LBA4404 其具有 40kb 含有三株得自超毒性 A281 菌株之 *vir* 基因座的超雙向質體。該質體對四環霉素具有抗性。轉殖載體與該超雙向載體共合。因為轉殖載體具有大腸桿菌專一性複製起點，但不具有農桿菌複製起點，故其未與

該超雙向載體共合時並無法存活於農桿菌中。由於 LBA4404 菌株不具高毒性且若無超雙向質體時其應用便受到限制，本發明已於另一具體實施態樣中發現以 EHA101 菌株較佳。其為一種衍生自超毒性 A281 菌株之減毒輔助菌株。將該得自 LBA4404 親本之經共合超雙向/轉殖載體單離出並電穿透入 EHA101 中，篩選出具奇霉素抗性者。將質體分離以確定 EHA101 含有該質體。EHA101 含有攜帶對卡那霉素抗性之減毒 pTi。胡得 EE，赫耳默 GL，法拉利 RT，奇爾頓 MD (1986) “根瘤農桿菌 A281 之超毒性係經編碼於 pTiBo542 之 T-DNA 外部的區域中” *J Bacteriol* 168:1291-1301。

而且，前述之石田製法係提供將農桿菌之新鮮培養物生長於平板上，將細菌從平板上刮洗下來，並懸浮於如該 '616 案中所述用於與玉米胚培育之共培育培養基中。此培養基包括 4.3 克 MS 鹽類、0.5 毫克菸鹼酸 0.5 毫克吡哆辛鹽酸鹽、1.0 毫升硫胺素鹽酸鹽、酪蛋胺基酸、1.5 毫克 2,4-D、68.5 克蔗糖與 36 克葡萄糖，pH 值為 5.8。於另一較佳方法中，係將細菌於 1 毫升培養物中生長過夜，然後於次日進行轉形作用時再重新接種 10 毫升新鮮培養物。細菌成長進入對數期並於密度不超過 OD₆₀₀=0.5，較佳地介於 0.2 至 0.5 時採收。然後將細菌離心去除培養基並再懸浮於共培育培養基中。因為係使用 Hi II，故使用對 Hi II 較佳之培養基。此培養基經詳盡敘述於阿姆斯特壯，C.I. 與格林 C.E. (1985) “脆弱、胚源性玉米癒傷組織之建立

與維持以及 L-脯胺酸之參與” *Planta* 154:207-214。再懸浮培養基與前述者相同。所有其他 Hi II 培養基皆描述於阿姆斯特壯之文獻中。結果植物細胞再分化並再生成植株。再分化有時係指去分化作用，但前者術語較確切地描述出細胞開始成形及同一性、被置於其在該培養基中便喪失該同一性的培養基、以及經“重新編程”而轉變成具有新同一性的程序。因此盾片細胞轉變成為胚源性細胞。

較佳地選擇該胺基酸序列之最高表現量，且因此可用以於經轉形之細胞、轉殖基因植物及專一性表現組織中達確定表現程度。一種此類方法係以佔總體可溶性蛋白之百分比比例測量所興趣抗原的表現。一項標準分析為習於該項技藝人士已熟知之布拉福德分析法（布拉福德，M. (1976) *Anal. Biochem.* 72:284）。應亦測定重組胺基酸序列之生化活性並與野生型標準物進行比較。

所感興趣基因之表現量可藉由使所感興趣之基因穩定保持存在轉殖基因植物之染色體上而增強。使用鍵聯基因（除草劑抗性以物理鄰近方式與所感興趣之基因結合而得）將可使選擇壓力持續施於轉殖基因植物族群上，並確保篩選到其中所感興趣基因未喪失之植株。

以根據本發明之轉殖基因植物，該胺基酸序列可以商業製造量進行生產。因此，如上述之篩選與增殖技術生產大量可以習知方式收成之轉殖基因植物。表現該重組胺基酸序列之植物種子可用於產業加工上，或可將該胺基酸序列萃取出。當使用種子本身時，可（例如）將其製成粉末

然後再進行產業加工。可藉由已知方法從生物質進行萃取。用於任何生產系統之下游加工係指，所有於產物合成（此個案為於轉殖基因種子製造蛋白質）後所行之單元操作（庫斯納迪等人(1997)生物技術與生物工程 56:473-484）。種子係經加工成為以完整種子研磨之粉末（或經級分收集）以及與外殼及胚乳分離之胚芽。若使用胚芽，則可使用己烷萃取方式脫脂並將殘留之粉碎胚芽研磨成穀粉或粉末。於某些個案中，係直接使用胚芽或可萃取得該胺基酸序列（參見，例如 WO 98/39461）。一般係於特定 pH 值下進行萃取入水性緩衝液中，以增進重組胺基酸序列萃取作用並使天然種子蛋白質萃取量減至最低。接著可將胺基酸序列濃縮或純化。

於另一項具體實施態樣中，一旦發生轉形後可使用植物育種將該基因導入其他植物中。此可藉由該項技藝中任何已知用於育種植物之方法達成，例如將前文所述之轉殖基因植物與另一植物進行雜交授粉，並從後續子代篩選出表現該胺基酸序列之植物。本文所使用之植物育種方法為習於該項技藝人士所熟知者。關於植物育種方法之論述，請參見波爾曼(1987)育種田間作物，AVI 出版公司，西港康乃狄格州。許多可用於此方法之作物植物係經由利用該植物之授粉方法的技術進行育種。若得自一花之花粉傳送至同一植株之相同或另一朵花，則該植物係進行自花授粉。若花粉係來自不同植株上的花朵，則該植物係進行雜交-授粉。於授粉品種，例如稻米、燕麥、小麥、大麥、蠶

豆、豌豆、大豆、煙草及棉花，雄性與雌性植株在解剖學上為並列的。於天然授粉期間，給定花朵之雄性生殖器官對同一朵花之雌性生殖器官授粉。玉米植物(*Zea mays L.*)可藉由自花授粉及雜交授粉技術進行育種。玉米在同一株植物上具有雄花（位於雄花穗上）及雌花（位於玉米穗上）。其可行自花或雜交授粉。

可藉由任何方式進行授粉，包括（但不限定於）手傳、風媒或蟲媒授粉，或使雄性可孕植株與雄性不孕植株機械性接觸。為能使大部分植物品種以產業規模生產雜交種子，故以藉由風媒或蟲媒授粉為較佳。可藉由使用各種用以使一植物群成為雄性不孕而其他群為雄性可孕花粉供者的方法達到較精確控制授粉過程。此可藉由手動摘除穗鬚、細胞質雄性不孕、或經由各種習於育種人士所熟知之方法控制雄性不孕而完成。較複雜之雄性不孕系統實例包括該等敘述於布拉爾等人之美國專利案 4,654,465 與 4,727,219，及艾柏森等人之美國專利案 5,859,341 與 6,013,859 者。

可使用回交方法將基因導入植物。已使用此項技術將性狀導入植物中達數十年之久。一項描述此技術及其他已熟知之植物育種方法之實例可參見例如植物育種方法學，尼爾杰森，約翰威利父子股份有限公司(1988)。於代表性回交程序中，係將所興趣之原始變種（回歸親本）與攜帶單一欲轉移之所興趣基因的第二變種（非回歸親本）雜交。然後將經此雜交所得之子代再與回歸親本雜交，並重複

進行此程序直到獲得一種植物，其中實質上所有該回歸親本之所希望形態與生理特徵皆回復於轉變植物中，除了該單一從非回歸親本轉移得之基因。

將由植物衍生得重組胺基酸序列投藥予魚類之較佳方法為口服，視需要地藉由將該重組胺基酸序列予習知飼料混合。另供選擇之投藥方法包括浸潤、腹膜內注射及肌肉內注射。

可將轉殖基因植物組織餵予魚類，或與其他物料混合而餵予魚類，或經萃取後再投藥予魚類。

該疫苗之口服遞送形式包含該重組胺基酸序列與一或多種賦形劑及視需要地與一或多種營養劑之任意組合。賦形劑用於本文可包括矽石、黏合劑、乳劑、張力活性物質、脂肪酸、脂質、油類等及其他供製備該組合物所需之添加劑。

代表性之魚類飼料可包含各種營養源，例如可代謝能源（碳水化合物）、蛋白質來源、脂質來源、及視需要地纖維、維生素與礦物質。飼料之確切組合物取決於所欲照料之魚種，且尤其視該魚類是否為食肉性而定。於產業規模上，可方便地將飼料製成經壓縮或擠出之飼料丸粒形式。可將由植物衍生得之重組胺基酸序列藉由取代較平常之蛋白質來源（例如魚粉、血粉、玉米麩質、大豆粉等）而併入飼料中。另供選擇地，可將由植物衍生得之重組胺基酸序列附著於預先成形之於飼料表面上。

由植物衍生得之重組胺基酸序列可經腸衣包覆用於口

服遞送。腸衣塗層可保護疫苗不受蛋白酶及不受胃內相對較低之 pH 值破壞。此使疫苗能到達與淋巴組織相連之後腸，而令疫苗保護魚類之功效達到最大。腸衣塗層代表性地包含不受酸性 pH 值影響，但是當其通過至腸內之較高 pH 值環境時會被溶解的聚合物塗層。

於較佳具體實施態樣中，由植物衍生得之重組胺基酸序列係以轉殖基因植物材料（例如植物種子、葉片、果實、莖、塊根等）之形式投藥予魚類，較佳地該轉殖基因植物材料未與任何其他飼料混合。於另一具體實施態樣中，係將由植物衍生得之重組胺基酸序列在餵食魚類之前，先與預先成形之飼料以物理方式（可逆地）混合。

為免除不必要的萃取程序，較佳地將由植物衍生得之重組胺基酸序列以未經純化（粗製）形式餵予魚類。此類方法並未對來源植物之可食部位進行欲萃取或濃縮得該重組胺基酸序列的特別處理或加工。

疫苗之有效劑量可視標的對象之大小與品種，並根據投藥之型式而有所變化。可由獸醫師或水產養殖專員經過嘗試試驗而決定最適劑量。疫苗可於單一劑量中包含約 10 至 200 微克，較佳地約 50 至 100 微克，更佳地約 1 至 1000 微克之重組胺基酸序列。

可為預防或治療之目的將本發明之疫苗投藥予魚類。該疫苗能夠誘發長效性對抗目標感染病之保護作用。“長效性”保護作用於魚類係指，經免疫接種後長達多於 7 天（更佳地多於 20 天，且最佳地多於 70 天）之保護性免疫

反應。

【實施方式】

實施例 1

親和素轉形至植物及其表現程度之偵測

供親和素於植物中表現之質體的構築

用於將親和素轉形至玉米中之質體的構築係描述於美國專利案 5,767,379 號（併入本文做為參考文獻）。雞蛋白親和素 cDNA 係由戈培 ML.(1987)等人報導於 *Nuc. Acids Res.* 15:3595-3606。利用較佳之玉米密碼子使用表（GCG，由麥可伽里，史丹佛大學所組合）將胺基酸序列反轉譯成核酸序列。從此經電腦-產生之合成序列設計出具有可相容限制酶切位末端的重疊、互補寡核苷酸，然後經黏合與接合而得玉米最適化基因。所使用之序列係列示於專利案'379 中，其併入本文做為參考文獻。亦以玉米較佳密碼子（使用重疊、互補核苷酸）合成大麥阿伐澱粉酶訊號序列（羅杰斯(1985) *J. Biol Chem* 260, 3731-3738）。將介於此二基因片段間之可相容限制酶切位與之大麥阿伐澱粉酶訊號序列於親和素基因 5'端且以適當框區排列接合，以使於轉譯期間使用正確密碼子而產生所希望之抗原。將所得呈 BamHI/EcoRI 片段之大麥阿伐澱粉酶訊號序列/親和素區段（參見圖 1（SEQ ID NO:1））選殖入載體 pGEM3Zf+（為 Promega 公司(麥迪遜，WI)之產物）而製得質體 pHI5142。將一段含有大麥阿伐澱粉酶訊號序列/親和素區段之 BamHI/HpaI 片段分離並轉殖入衍生自

pBlueScript SK+ (史塔金(Stratagene), 拉尤拉, CA) 做為骨架之質體中。於此質體中, 係以正確位向將該訊號序列/親和素基因片段插入玉米遍在蛋白 5'區域(其包括玉米遍在蛋白啟動子(UBI1ZM)、第一外顯子及第一內含子)與馬鈴薯蛋白鹼抑制劑 II (PinII)轉錄終結子區域(安等人(1989 年一月)植物細胞 1:115-122)之間。所成之質體為 pHI5168 (圖 2)。與該質體進行共轉形者為含有得自吸水鏈霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)之 *bar* 基因(如前述及懷特 J. (1990)核酸研究 18:1062)鍵聯至雙重 35S 啟動子(例如佛列茲, S.E. *J. Cell Sci* 98:545-550)、得自玉米乙醇去氫酶基因之內含子(卡利斯 J. 等人, 基因與發育 1:1183-1200)及 PinII 終結子(安等人(1989)植物細胞 1:115-122)的質體(pHI610)。此等構築體及所使用之製程係詳盡描述於該'379 專利案中, 如前述。注意, 於該'379 專利案所描述之實驗中係使用 *bar* 基因, 而於本文所述其他實驗中係使用玉米最適化 *pat* 基因。圖 3 列示出此序列(SEQ ID NO:2)。

供產製親和素-表現植物之轉形作用及組織培養

將衍生自"Hi II"玉米植株之單一未成熟胚的已建立癒傷組織系(阿姆斯特壯 CL, 格林 CE, 菲力普 RL (1991) *Maiz Gen. Coop. 時事快報*, 65:92-93)使用粒子轟擊介導之轉形作用以氬-強化粒子加速裝置, PDS 1000 (Bio-Rad, 海克力斯, CA)進行轉形。Hi II 為一種常用於研究之玉米植物品系, 因為其容易進行轉形。將顯示脆弱第 II 型

胚源性形態之組織通過 710 μ 網目過篩，隨後與等莫耳量之親和素基因 (pPHI5168) 及 *bar* 可篩選標記基因 (PHP610)，根據湯姆斯等人之程序 (湯姆斯 DT, 羅斯 MC, 桑塔得 DD (1995) *植物細胞組織：基礎方法*。史林格出版社，柏林，海得堡，Pp.197-213) 進行共轉形。於雙丙氨磷 (3 mg l^{-1}) 存在下，根據雷吉斯特等人 (雷吉斯特 J.C.-III 等人 (1994) *Plant Mol. Biol.* 25:951-961) 之程序篩選出表現 *bar* 基因之轉形株。藉由 ELISA 篩檢所篩選出之選殖株鑑定亦表現親和素基因之共轉形株。從親和素-表現選殖株再生得多數植株 (T_0 代)，轉移至溫室培養並分析葉組織中之親和素表現。藉由異型雜交獲得 T_1 種子，其係以 T_0 植株為雌性親本及以未經轉形之近交系 (PHN46；參見美國專利案 5,567,861) 為雄性親本。

ELISA 偵測玉米中之親和素

以下程序係用於偵測親和素於種子中之表現。將種子磨成粉並於 10 mM 含有 0.05% 吐溫-20 之 PBS pH 7.0 (PBST) 中進行萃取。使用布拉福德微量滴定分析法 (布拉福德, M.M. 1976。一種利用蛋白質-染劑結合原理以定量微克量蛋白質之快速且靈敏的方法。 *Anal. Biochem.* 72:248-254) 定量總體蛋白質。ELISAs 為代表性之夾層形式其中係將微滴定平盤覆蓋以兔子抗-親和素抗體，於 4°C 下過夜捕捉親和素抗原，並將平盤與山羊抗-親和素抗體 (載體實驗室，柏林根漢，CA) 反應，隨後再與抗-山羊鹼性磷酸酶共軛物 (傑克森免疫研究，西格魯，PA) 反應。

以對-硝基酚磷酸酯偵測鹼性磷酸酶並於 405 nm 下置於 SpectroMax 平盤計讀機（分子裝置，桑尼谷，CA）上讀取數值。

實施例 2

LtB 轉形至植物中及其表現之偵測

LtB 序列及其導入植物中之程序經描述於美國專利案 6,194,560，本實驗係使用該序列及方法，且其併入本文做為參考文獻。本文所用之載體在某些層面上與該'560 專利案中所述者不同。其為 PGN7101，列示於圖 4。合成人類來源大腸桿菌株之 LtB 基因（利昂等人(1985)得自人類與豬來源大腸桿菌之介於熱不穩定性毒素 B-次單位順反子間的核苷酸序列組合物。 *Infect Immun.* Apr; 48(1):73-7）以最適化供玉米的密碼子使用，參見圖 5（SEQ ID NO:3）。將跨越該基因之寡核苷酸黏合及接合，且將產物使用聚合酶鏈反應(PCR)擴增。使用 PCR 將編碼大麥 α -澱粉酶分泌訊號(BAASS)之核苷酸序列加於 LtB 之 N-端，並將此完整之 BAASS:LtB 序列片段插入載體骨架中而得質體 PGN5431。該 BAASS:LtB 序列經列示於圖 5（SEQ ID NO:4）。使用限制酵素 NcoI 及 HpaI 將 BAASS:LtB 序列從 PGN5431 移出並接合入載體 PGN2774 之相對應限制酶切位中而得中間載體 PGN7020。於此中間載體中，該 BAASS:LtB 係置於相對來自玉米遍在蛋白調節系統之組成型啟動子與未轉譯領導序列（命名為 PGNpr1（野生型玉米聚泛素-1））的 3'，及相對馬鈴薯蛋白酶抑制劑 II 轉錄終結子(PinII)之 5'。使

用限制酵素 *NheI* 及 *NotI* 將 BAASSS:LtB 表現卡匣（啟動子、領導序列、BAASSS:LtB 與 *Pin II* 序列）從 PGN7020 移出並接合入植物轉形載體 PGN3770 之相對應限制酶切位中。最終之 BAASSS:LtB 轉形載體（命名為 PGN7101）含有根瘤農桿菌 *Ti* 質體複製起點之右與左邊界序列、及授與對草安磷胺抗性之綠色產色鏈霉素 *pat* 基因。

實施例 3

IPNV 轉形至植物中及其表現之偵測

感染性胰臟壞死病毒 (IPNV) 感染軟體動物、甲殼類及許多魚類，尤其是鮭類。IPNV 感染由於在魚苗及小鮭魚階段會造成魚類死亡並減低存活族群之生長而對鮭類生產具有毀壞性影響。已進行許多嘗試製造對抗此病毒之有效疫苗。目前之保護作用僅見於注射去活化病毒，然而此類疫苗已證實過於昂貴而不實用。使用前述方法將該病毒之主要結構與免疫生成性蛋白（VP2 及 VP3）表現於玉米中。

首先分別從質體 pUK-NVP2 及 pUK-NVP3 獲得編碼 VP2 及 VP3 之核苷酸序列。於此二質體中編碼該等蛋白質之序列係得自與 N1 品系親緣相近的 Norwegian IPNV 株。於該基因序列之 5' 及 3' 端進行核苷酸修飾以最適化供玉米的密碼子使用。

使用聚合酶鏈反應 (PCR) 將編碼 5' VP2 序列（其缺失自 pUK-NVP2 中之 VP2 基因，伴隨供密碼子最適化之核苷酸改變）的寡核苷酸序列黏合於得自 VP2 序列之 5' 端。將編碼位於 VP2 之 3' 端供密碼子最適化之核苷酸改變的寡核苷

酸序列以及得自馬鈴薯蛋白酶抑制劑 II 轉錄終結子 (PinII) (安等人, 植物細胞(1989) 1:115-122) 之序列使用 PCR 加於得自 pUK-NVP2 之 VP2 序列的 3'端。將此二 PCR 片段與中間 VP2 片段 (使用限制酵素 SacII 及 BbsI 從 pUK-NVP2 分離得) 接合在一起, 而得含有完整 VP2 核苷酸序列 (SEQ ID NO:5, 列示於圖 6) 之質體 PGNK5676。使用 PCR 將編碼大麥 -澱粉酶分泌訊號 (BAASS) 之寡核苷酸序列加於已回復 VP2 基因之 N-端。將從 PCR 產生之片段置入載體骨架中而得含有 BAASS:VP2 核苷酸序列 (SEQ ID NO:6, 列示於圖 7) 之質體 PGNK5443。

使用 PCR 將編碼供玉米密碼子最適化之核苷酸改變的寡核苷酸黏合至 VP3 序列 (得自 pUK-VP3) 之 5'及 3'兩端。將該 PCR 片段置入載體骨架中而得含有經部份最適化 VP3 序列 (SEQ ID NO:7, 列示於圖 8) 之質體 PGNK5581。使用 PCR 將編碼 BAASS 之寡核苷酸序列加至 VP3 之 N-端。將該 PCR 片段置入載體骨架中而得含有 BAASS:VP3 序列 (SEQ ID NO:8, 列示於圖 9) 之質體 PGNK5330。

構築得兩種分別之植物轉形載體, 各含有對應 VP2 及 VP3 之基因。第一種構築體含有對應 BAASS:VP2 及 BAASS:VP3, 各存在含有玉米種子較佳啟動子 (名為 PGNpr2) 與 PinII 終結子之分別表現卡匣中。BAASS:VP2 序列係以限制酵素 NcoI 與 PacI 切割自 PGN5443。將此片段與經限制酵素 HindIII 與 NcoI 切割之 PGNpr2 片段, 接合入含有 PinII 終結子、根瘤農桿菌 Ti 質體複製起點之右與

左邊界序列、及綠色產色鏈霉素 *pat* 基因（授與對草安磷胺抗性）之 PGN9004 植物轉形載體的 HindIII 與 PacI 限制酶切位中。此質體命名為 PGN5461。於類似方法中，係將 BAASS:VP2 序列使用限制酵素 NcoI 與 PacI 切割自 PGN5330。將此片段與 HindIII/NcoI PGNpr2 片段接合入 PGN9004 的 HindIII 與 PacI 限制酶切位中，而得質體 PGN5335。使用限制酵素 AscI 與 PacI 從 PGN5461 切割出 BAASS:VP2 表現卡匣（含有 PGNpr2 啟動子、BAASS、VP2 與 PinII 終結子）。使用限制酵素 HindIII 與 MluI 將 BAASS:VP3 表現卡匣（含有 PGNpr2 啟動子、BAASS、VP3 與 PinII 終結子）從 PGN5461 切割出。將此二片段接合入 PGN9004 的 HindIII 與 PacI 限制酶切位中而得含有 BAASS:VP2 及 BAASS:VP3 表現卡匣二者之最終植物轉形質體。此構築體（命名為 PGN9084，圖 10）係經設計以使該等蛋白質能送至細胞壁並主要累積於種子中。然後將植物根據經修飾之石田製程（如前述）進行轉形。由此以 PGN9084 轉形所獲得之植物命名為 NVA。

第二種植物轉形載體亦含有存在分別表現卡匣中受 PGNpr2 啟動子與 PinII 終結子調控之 VP2 及 VP3，然而其不含大麥 α -澱粉酶分泌訊號(BAASS)。將位於上游且包括 BstNI 限制酶切位之 VP2 序列的 5'部份使用限制酵素 BbsI 與 BstBI 從 PGNK5573 切出。將此片段與 HindIII/NcoI PGNpr2 片段接合入 PGNK5461 之 HindIII 與 BstBI 位置中，而形成含有 VP2 表現卡匣之質體 PGNK5676。使用限制酵

素 NcoI 與 PacI 將 VP3 片段從 PGNK5581 切出。將此片段與 HindIII/NcoI PGNpr2 片段接合入 PGNK9004 之 HindIII 與 PacI 位置中，而形成含有 VP3 表現卡匣之質體 PGNK5681。使用限制酵素 AscI 與 PacI 將 VP2 表現卡匣從 PGNK5676 切出。使用限制酵素 HindIII 與 MluI 將 VP3 表現卡匣從 PGNK5681 切出。將此二片段接合入 PGNK9004 之 HindIII 與 PacI 限制切位中，而形成含有 VP2 及 VP3 表現卡匣之最終植物轉形載體。此構築體命名為 PGNK9111（圖 11），其經設計以使該等蛋白質能送至細胞質並主要累積於種子中。由 PGN9111 轉形所生成之植物命名為 NVB。

使用多株抗-IPNV 全病毒抗體進行之西方轉漬分析顯示蛋白質 VP2 與 VP3 皆於 NVA 及 NVB 中表現。於西方轉漬結果（圖 12）上，經表現於 NVA 種子中之 VP2 與 VP3 蛋白質量較由 IPNV 全病毒標準物所觀察得之相對應天然蛋白質稍大。列 1 表示蛋白標準參照物，列 2-4 為 IPNV 全病毒之經純化製備物、列 5 為對照組玉米種子萃取物（陰性對照組），列 6-11 為得自不同 NVA 種子之萃取物而列 12 為 IPNV 全病毒之未經純化製備物。（注意，IPNV 全病毒之純化處理在該等槽之頂端產生成片條帶）。

因為 VP2 與 VP3 蛋白質受 BAASS 靶定送至 NVA 種子之細胞壁，故預期該等蛋白質將被糖苷化。無意受限於理論，可能此二蛋白之大小增加暗示著該等蛋白質於植物中進行糖苷化。於西方轉漬結果（圖 13）上，經表現於 NVB 種子中之 VP2 與 VP3 蛋白具有與 IPNV 全病毒標準物相當之所

預期大小。列 1 表示蛋白標準參照物，列 2 為得自 NVA 種子之萃取物，列 3-9 為得自不同 NVB 種子之萃取物，而列 10-12 為漸增量之未經純化 IPNV 全病毒。

因為此等蛋白質係經表現於植物細胞之細胞質中，故預期無蛋白質修飾。

VP2 與 VP3 於 NVA 種子中之表現程度係藉由西方轉漬法進行測量。使用點滴光密度測定法測量得自種子萃取物之 VP2 與 VP3 蛋白條帶強度，然後與已知量全病毒之條帶進行比較。使用此方法計算得 VP2 於 NVA T2 種子之表現為 0.1% TSP (總體可溶性蛋白)，而 VP3 於 NVA T2 種子之表現經計算得為 0.3% TSP。以 ELISA 測量 VP2 於 NVB 種子中之表現量。該 ELISA 為代表性之夾層形式其中係將微滴定平盤覆蓋以綿羊抗-IPNV 全病毒抗血清，於 4℃ 下過夜捕捉存在植物萃取物中之 IPNV 蛋白質，並將平盤與 AS1 小鼠單株抗-VP2 抗體反應，隨後再與經鹼性磷酸酶共軛之綿羊抗-小鼠 IgG 反應。以對-硝基酚磷酸酯，二鈉(pNpp)偵測鹼性磷酸酶並於 405 nm 下於吸光值平盤計讀機上讀取數值。使用此方法測量得 VP2 於 NVB T1 種子之表現為 0.17% TSP，於最高單一類種子中。

實施例 4

以親和素及 LtB 進行之餵食研究

為於魚類評估此項新技術，遂設計此實驗以測定口服投藥含有由玉米-表現之重組標記蛋白的飲食是否會於鮭類體內誘導體液免疫反應。以量為大約 2%體重每天，含有

兩劑量表現 LtB 之未純化玉米（食物之 5%或 10%）或表現雞蛋白親和素之未純化玉米（食物之 10%或 20%）的飲食餵食大西洋鮭魚 5 天，以正常食物餵食 12 天再以已處理飲食餵食 5 天。以腹膜內注射經純化 LtB 及親和素蛋白之魚組群做為陽性對照組。

檢測魚類生長、重組蛋白於糞便中之存在量及體液免疫反應。比較不同劑量 LtB（其先前已顯示能夠在小鼠體內產生強抗體反應）與親和素（其先前已顯示在小鼠體內為較弱的抗原）之魚抗體反應。

大西洋鮭魚每隻重約 20 克。共有十一個處理組包含數個陰性與陽性對照組（表 1）。A 與 B 陽性對照組（各由十隻魚組成）施予腹膜內注射以含油佐劑之製劑，其中 A 組接受單一注射 4 微克 LtB 蛋白每隻魚而 B 組接受單一注射 20 微克親和素蛋白每隻魚，二者皆為純化自玉米表現系統之重組蛋白。九組各含有 35 隻魚，其中 C 至 G 組為陰性對照組。C 組接受市售的魚飼料丸粒。D 組接受包括 5%非基因轉移玉米胚芽之飼料丸粒。E 組接受含 10%非基因轉移玉米胚芽之飼料丸粒。F 組接受以具有 10%非基因轉移玉米粉之魚碎粉製成的飼料丸粒且 G 組接受含 20%非基因轉移玉米粉之飼料丸粒。於實驗組中，H 組接受含 5% LtB 基因轉移玉米胚芽之魚飼料丸粒，而 I 組接受含 10% LtB 玉米胚芽之飼料丸粒。J 組接受含 10%含基因轉移親和素粉末之飼料丸粒，而 K 接受含 20%親和素粉末之飼料丸粒。

表 1

組別	疫苗	魚隻 數量	所需玉米重 (g)	總體蛋白含量 (mg)	10 天餵食量 (g)
A	注射 Lt-B 陽性對照組	10	0	0.040*	40
B	注射親和素 陽性對照組	10	0	0.20*	40
C	陰性對照組 1 (正常食物)	35	0	0	140
D	陰性對照組 2 5% 正常玉米胚芽	35	0	0	140
E	陰性對照組 2 10% 正常玉米胚芽	35	0	0	140
F	陰性對照組 4 10% 正常玉米粉	35	14	0	140
G	陰性對照組 5 20% 正常玉米粉	35	28	0	140
H	5% 重組 LtB 玉米胚芽碎粉	35	7	2.1	140
I	10% 重組 LtB 玉米胚芽碎粉	35	14	4.2	140
J	10% 親和素玉米粉	35	14	20.61	140
K	20% 親和素玉米粉	35	28	41.22	140

*每隻魚各施予腹膜內(ip)注射 0.1 毫升含有存在油佐劑中之 4 微克經純化重組 LtB (A 組)或 20 微克親和素(B 組)的 PBS。

將魚保持於 10°C 下。於餵食後二、四、七、十四及二十一天，犧牲五隻在九個餵食組 C-K 中之魚，使用 ELISA 測量重組蛋白於糞便中之存在量。於八週時，將十隻存於所有十一組中的魚犧牲、秤重並以 ELISA 測量血清中之專一性抗體。

ELISA 偵測糞便中之標記蛋白質：

ELISAs 為代表性之夾層形式其中係將微滴定平盤於 4 °C 下過夜覆蓋以兔子抗-親和素或抗-LtB 抗體。將於糞便（稀釋於 PBST 中）加入各槽並將平盤於 4°C 下培育過夜以捕捉親和素或 LtB 蛋白。將平盤與山羊抗-親和素抗體（載體實驗室，柏林根漢，CA）或小鼠生物素化 LtB 抗體反應，隨後再與抗-山羊鹼性磷酸酶共軛物（傑克森免疫研究，西格魯，PA）或 Extra 親和素-鹼性磷酸酶（西格馬-亞利奇加拿大股份有限公司，奧克戴，ON）反應。以對-硝基酚磷酸酯（皮耳斯，供應商 MJS Biolynx 股份有限公司，布洛維，ON，加拿大）偵測鹼性磷酸酶，並於 405 nm 下於平盤計讀機（Bio Tek 儀器股份有限公司，維蒙特）讀取數值。

ELISA 偵測魚血清中之專一性抗-親和素與抗-LtB 抗體

：

使用夾層式 ELISA 偵測魚血清中之專一性抗體。將平盤各槽於 4°C 下以經純化 LtB 或經純化由玉米表現之親和素（西格馬）覆蓋過夜，將兩倍稀釋於 PBST-1% BSA 之魚血清加入並將平盤於 17°C 下培育過夜以捕捉魚抗體。將第一級抗體，單株抗-大西洋鮭魚 Ig（席得蘭實驗室股份有限公司，ON，加拿大），隨後之第二級經鹼性磷酸酶標示抗-小鼠 Ig 抗體（席得蘭）加入平盤中，該二者皆經稀釋於 PBST-1% BSA。待加入對-硝基酚磷酸酯（皮耳斯）後，使用微量滴定平盤計讀機（Bio Tek 儀器公司）於 405 nm

下讀取數值。計算抗體力價以終點稀釋值表示。

如圖 14 所示，經研磨表現該二標記蛋白之玉米添加至飲食並不影響魚類生長。於延長時間（於停止餵食經處理飲食後至少 21 天）仍可於糞便中偵測到該二標記蛋白，如表 2 所示。

表 2
餵食後之天數

組別	2	4	7	14	21
5% LtB	5/5	4/4	5/5	4/5	NS
10% LtB	5/5	4/4	3/4	3/4	2/4
10% 親和素	5/5	5/5	4/5	5/5	4/4
20% 親和素	3/3	4/4	5/5	4/4	4/4

口服投藥標記蛋白質可誘發體液免疫反應。於免疫接種 8 週後，僅陰性對照組中之魚不具有可偵測之專一性血清抗體反應。餵食未經純化由玉米所表現標記蛋白之魚類與注射以存在油佐劑中之純蛋白質的魚類一樣強壯。

實施例 5

以 IPNV 進行之餵食研究

完成餵食含有感染性胰壞死病毒 VP2 及 VP3 蛋白之玉米所描述之方法。預期在動物糞便及器官中存在有該等病毒蛋白質以及有抗體反應。待魚類以毒性病毒進行免疫激發後，預期口服投藥由玉米表現之 IPNV 蛋白質會生保護作用。

將魚分成七組並貼標籤以供鑑別。陽性對照組 A 係由施予會誘發對抗 IPNV 保護作用之市售疫苗注射的魚類所組成，而陰性對照組係餵予市售之魚飼料丸粒。其於各組係餵予含有其中具有及不具所表現 IPNV 蛋白質之玉米胚芽的

食物 5 天、餵予正常食物 12 天及餵予含有如表 3 所列示之玉米胚芽的食物 5 天。玉米胚芽混入食物之百分比（克玉米每克食物）為 10%與 20%。

表 3

組別	魚隻數量	處理
A	55	ip 注射市售疫苗
B	55	正常食物
C	85	非轉殖基因玉米胚芽混合入食物中 20%比例
D	85	NVA 玉米胚芽 10%比例
E	85	NVA 玉米胚芽 20%比例
F	85	NVB 玉米胚芽 10%比例
G	85	NVB 玉米胚芽 20%比例

於疫苗接種後 4 週時，將所有魚隻適應鹽水數天然後保持於設定於包圍溫度(9-12℃)下之流動鹽水中。於轉移至鹽水 5 週後，將於暴露至共居 IPNV 攻擊。將首次用於實驗之魚注射以活的 IPNV 並加入含有經免疫接種魚隻的魚池中。偵測每日死亡率達五週。

於施予疫苗接種後 1 至 5 週之每週基點及施予攻擊之時間點，從 C 至 G 組中每組各取五隻魚犧牲，並採樣糞便與器官以檢測 IPNV 蛋白質之存在量及分布情形。亦對在攻擊時間點殺死之魚隻（包括取自 A 組與 B 組中的五隻魚）採血並藉由 ELISA 進行血清測試抗體存在量。

【圖式簡單說明】

(一) 圖式部分

圖 1 列示大麥阿伐澱粉酶訊號序列融合至編碼親和素成熟蛋白之序列(SEQ ID NO: 1)。

圖 2 為 pPH15158 之質體圖譜。

圖 3 列示玉米最適化 *pat* 序列 (SEQ ID NO: 2)。

圖 4 為 PGN7101 之質體圖譜。

圖 5A 為玉米密碼子最適化 *LtB* 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 3)。

圖 5B 為 BAASS:*LtB* 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 4)。

圖 6 為 IPNV VP2 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5)。

圖 7 為 BAASS:VP2 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 6)。

圖 8 為 IPNV VP3 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 7)。

圖 9 為 BAASS:VP3 之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 8)。

圖 10 為 PGN9084 之質體圖譜

圖 11 為 PGN9111 之質體圖譜

圖 12 為經表現於種子 (由結果 NVA 所得者) 之 VP2 及 VP3 蛋白質的西方轉漬圖。

圖 13 為經表現於種子 (由結果 NVB 所得者) 之 VP2 及 VP3 蛋白質的西方轉漬圖。

圖 14 為列示在時間點 0 (第一類柱狀) 及免疫接種後 8 週 (第二類柱狀) 時之魚平均重量的柱狀圖。

圖 15 為列示大西洋鮭魚在注射後或餵食經表現於玉米之重組親和素 (A) 或 *LtB* (B) 達 8 週時以 ELISA 測得之平均抗體反應的柱狀圖。各組之取樣動物數量 (N) 標示於各組下方。

(二) 元件代表符號

(無)

補充序列表

<110> 諾華公司
波第基因公司

<120> 用植物表現之重組蛋白質免疫魚類

<140> TW 092134999

<141> 2003-12-11

<150> US 60/433,381

<151> 2002-12-13

<160> 8

<170> PatentIn 3.2版

<210> 1

<211> 459

<212> DNA

<213> 大麥(Hordeum vulgare)

<400> 1

atggccaaca agcacctgag cctctccctc ttctctgtgc tctctggcct ctccgcctcc	60
ctcgccagcg gcgccaggaa gtgctccctc accggcaagt ggaccaatga cctcggtctc	120
aacatgacca tcggcgccgt gaactccagg ggcgagtcca ccggcaccta catcaccgcc	180
gtgaccgcca cctccaacga gatcaaggag tccccctcc acggtacca gaacaccatc	240
aacaagagga cccagcccac cttcggcttc accgtgaact ggaagttctc cgagtccacc	300
accgtgttca ccggccagtg cttcatcgac cgcaacggca aggaggtgct caagaccatg	360
tggctcctga ggagctccgt gaatgacatc ggcgacgact ggaaggccac ccgcgtgggc	420
atcaacatct tcacccgcct ccgcacccag aaggagtga	459

<210> 2

<211> 552

<212> DNA

<213> 玉米(Zea mays)

<400> 2

atgtcccccg agcgccgccc cgctcgagatc cgcccggcca ccgcccgcga catggccgcc	60
gtgtgcgaca tcgtgaacca ctacatcgag acctccaccg tgaacttcgg caccgagccg	120
cagacccccg aggagtggat cgacgacctg gagcgctcc aggaccgcta cccgtggctc	180
gtggccgagg tggagggcgt ggtggccggc atcgcttacg ccggcccgtg gaaggcccgc	240
aacgcctacg actggaccgt ggagtccacc gtgtacgtgt cccaccgcca ccagcgctc	300
ggcctcggtc ccacctcta caccacctc ctcaagagca tggaggccca gggcttcaag	360
tccgtggtgg ccgtgatcgg cctcccgaac gaccgtccg tgcgcctcca cgaggccctc	420
ggctacaccg cccgcggcac cctccgcgcc gccggctaca agcacggcgg ctggcacgac	480
gtcggcttct ggcagcgga cttcgagctg ccggccccgc cgcgcccgtg gcgcccgtg	540
acgcagatct ga	552

<210> 3

<211> 309

<212> DNA

<213> 玉米

<400> 3
gccccgcagt ccatcaccga gctctgctcc gagtaccaca acacccagat ctacaccatc 60
aacgacaaga tcctctccta caccgagagc atggccggca agcgcgagat ggtgatcatc 120
accttcaagt ccggcgccac cttccagggtg gaggtgccgg gctcccagca catcgactcc 180
cagaagaagg ccatcgagcg catgaaggac accctccgca tcacctacct caccgagacc 240
aagatcgaca agctctgcgt gtggaacaac aagaccccgga actccatcgc cgccatcagc 300
atggagaac 309

<210> 4
<211> 382
<212> DNA
<213> 大麥

<400> 4
atggccaaca agcacctgag cctctccctc ttcctcgtgc tcctcggcct ctccgcctcc 60
ctcgccagcg gcgccccgca gtccatcacc gagctctgct ccgagtacca caacacccag 120
atctacacca tcaacgacaa gatcctctcc tacaccgaga gcatggccgg caagcgcgag 180
atggtgatca tcaccttcaa gtccggcgcc accttccagg tggagggtgcc gggctcccag 240
cacatcgact ccgagaagaa ggccatcgag cgcatgaagg acaccctccg catcacctac 300
ctcaccgaga ccaagatcga caagctctgc gtgtggaaca acaagacccc gaactccatc 360
gccgccatca gcatggagaa ct 382

<210> 5
<211> 1413
<212> DNA
<213> 感染性胰臟壞死病毒

<400> 5
aacaccaaca aggcaaccgc aacttacttg aaatccatca tgcttccaga gactggacca 60
gcaagcatcc cggacgacat aacggagaga cacatcctaa aacaagagac ctcgtcatac 120
aacctagagg tctccgaatc aggaagtggc attcttgttt gtttccctgg ggcaccaggc 180
tcacggatcg gtgcacacta cagatggaat gcgaaccaga cggggctgga gttcgaccag 240
tggctggaga cgtcgcagga cctgaagaaa gccttcaact acgggaggct gatctcaagg 300
aaatacgaca tccaaagctc cacactaccg gccggtctct atgctctgaa cgggacgctc 360
aacgctgcc a cttcgaagg cagtctgtct gaggtggaga gcctgaccta caacagcctg 420
atgtccctaa caacgaaccc ccaggacaaa gtcaacaacc agctggtgac caaaggagtc 480
acagtcctga atctaccaac agggttcgac aaaccatacg tccgcctaga ggacgagaca 540
ccccagggtc tccagtcaat gaacggggcc aagatgaggt gcacagctgc aattgcaccg 600
cggagggtacg agatcgacct cccatcccaa cgcctacccc ccgttcctgc gacaggaacc 660
ctcaccactc tctacgaggg aaacgccgac atcgtcaact ccacaacagt gacgggagac 720
ataaacttca gtctggcaga acaacccgca aacgagacca agttcgactt ccagctggac 780
ttcatggggc ttgacaacga cgtcccagtt gtcacagtgg tcagctccgt gctggccaca 840
aatgacaact acagaggagt ctgagccaag atgacccagt ccatcccgcg cgagaacatc 900

```

acaaagccga tcaccagggg caagctgtca tacaagatca accagcagac agcaatcggc 960
aacgtcgcca ccctggggcac aatgggtcca gcatccgtct ccttctcatc agggaaacgga 1020
aatgtccccg gcgtgctcag accaatcaca ctggtggcct atgagaagat gacaccgctg 1080
tccatcctga ccgtagctgg agtgtccaac tacgagctga tcccaaacc agaactcctc 1140
aagaacatgg tgacacgcta tggcaagtac gaccccgaa gtctcaacta tgccaagatg 1200
atcctgtccc acaggggaaga gctggacatc aggacagtgt ggaggacaga ggagtacaag 1260
gagaggacca gagtcttcaa cgaaatcacg gacttctcca gtgacctgcc cacgtcaaag 1320
gcatggggct ggagagacat agtcagagga attcggaaag tcgcagctcc tgtactgtcc 1380
acgctgtttc caatggcagc accactcatc gga 1413

```

<210> 6
<211> 1485
<212> DNA
<213> 大麥

```

<400> 6
atggcgaaca agcacctgag ccttagcctc ttctcgtgc tcttgggcct ctccgcctcc 60
ctcgcctccg gcaacaccaa caaggcaacc gcaacttact tgaaatccat catgcttcca 120
gagactggac cagcaagcat cccggacgac ataacggaga gacacatcct aaaacaagag 180
acctcgtcat acaacctaga ggtctccgaa tcaggaagtg gcattcttgt ttgtttccct 240
ggggcaccag gctcacggat cggtgacac tacagatgga atgcgaacca gacggggctg 300
gagttcgacc agtggctgga gacgtcgag gacctgaaga aagccttcaa ctacgggagg 360
ctgatctcaa ggaaatacga catccaaagc tccacactac cggccggtct ctatgctctg 420
aacgggacgc tcaacgctgc caccttcgaa ggcagtctgt ctgagggtga gacgctgacc 480
tacaacagcc tgatgtccct aacaacgaac cccaggaca aagtcaacaa ccagctggtg 540
accaaaggag tcacagtcct gaatctacca acagggttcg acaaacata cgtccgccta 600
gaggacgaga caccacaggg tctccagtca atgaacggg ccaagatgag gtgcacagct 660
gcaattgcac cgcggaggtg cgagatcgac ctcccatccc aacgcctacc ccccgttcct 720
gcgacaggaa cctcaccac tctctacgag ggaaacgccg acatcgtcaa ctccacaaca 780
gtgacgggag acataaactt cagtctggca gaacaaccg caaacgagac caagttcgac 840
ttccagctgg acttcatggg ccttgacaac gacgtcccag ttgtcacagt ggtcagctcc 900
gtgctggcca caaatgacaa ctacagagga gtctcagcca agatgacca gtccatccc 960
accgagaaca tcacaaagcc gatcaccagg gtcaagctgt catacaagat caaccagcag 1020
acagcaatcg gcaacgtcgc caccctgggc acaatgggtc cagcatccgt ctcccttctca 1080
tcagggaacg gaaatgtccc cggcgtgctc agaccaatca cactggtggc ctatgagaag 1140
atgacaccgc tgtccatcct gaccgtagct ggagtgtcca actacgagct gatcccaaac 1200
ccagaactcc tcaagaacat ggtgacacgc tatggcaagt acgacccga aggtctcaac 1260
tatgccaaga tgatcctgtc ccacaggga gagctggaca tcaggacagt gtggaggaca 1320
gaggagtaca aggagaggac cagagtcttc aacgaaatca cggacttctc cagtgcctg 1380

```

cccacgtcaa aggcattggg ctggagagac atagtcagag gaattcggaa agtcgcagct 1440
cctgtactgt ccacgctgtt tccaatggca gcaccactca tcgga 1485

<210> 7
<211> 705
<212> DNA
<213> 感染性胰臟壞死病毒

<400> 7
gacgaggagc tgcagcgcct cctgaacgcc acgatggcca gggccaagga ggtccaggac 60
gccgagatct acaaacttct taagctcatg gcatggacca gaaagaacga cctcaccgac 120
cacatgtacg agtgggtcaaa agaggacccc gatgcactaa agttcggaaa gctcatcagc 180
acgccaccaa agcaccctga gaagcccaaa ggaccagacc aacaccacgc ccaagaggcg 240
agagccaccc gcatatcatt ggacgccgtg agagccgggg cggaacttcgc cacaccggaa 300
tggttcgcgc tgaacaacta ccgcgcccca tctcccgggc agttcaagta ctacctgatc 360
actggacgag aaccagaacc aggcgacgag tacgaggact acataaaaca acccattgtg 420
aaaccgaccg acatgaacaa aatcagacgt ctagccaaca gtgtgtacgg cctccacac 480
caggaaccag caccagagga gttctacgat gcagttgcag ctgtattcgc acagaacgga 540
ggcagaggtc ccgaccagga ccaaatgcaa gacctcaggg agctcgcaag acagatgaaa 600
cgcaggccca ggaacgccga tgcgccacgc aggaccaggg cgccagcgga accggcaccg 660
cccggacgct caaggttcac gccagcgga gacaacgctg aggtg 705

<210> 8
<211> 777
<212> DNA
<213> 大麥

<400> 8
atggcgaaca agcacctgag ccttagcctc ttctctgtgc tcttgggcct ctccgcctcc 60
ctcgcctccg gcgacgagga gctgcagcgc ctctgaacg ccacgatggc caggggccaag 120
gaggtccagg acgccgagat ctacaaactt cttaagctca tggcatggac cagaaagaac 180
gacctcaccg accacatgta cgagtgggtca aaagaggacc ccgatgcact aaagttcgga 240
aagtcacatc gcacgccacc aaagcaccct gagaagccca aaggaccaga ccaacaccac 300
gccaagagg cgagagccac ccgcatatca ttggacgccg tgagagccgg ggcggaactc 360
gccacaccgg aatgggtcgc gctgaacaac taccgcggcc catctcccgg gcagttcaag 420
tactacctga tcaactggacg agaaccagaa ccaggcgacg agtacgagga ctacataaaa 480
caaccatttg tgaaaccgac cgacatgaac aaaatcagac gtctagccaa cagtgtgtac 540
ggcctccac accaggaacc agcaccagag gagttctacg atgcagttgc agctgtattc 600
gcacagaacg gaggcagagg tcccgaccag gaccaaatgc aagacctcag ggagctcgca 660
agacagatga aacgcaggcc caggaaacgc gatgcgccac gcaggaccag ggcgccagcg 720
gaaccggcac cgccggagc ctcaaggttc acgccagcg gagacaacgc tgaggtg 777

伍、中文發明摘要：

本發明係關於製造可表現一種當投藥予魚類時會在魚體內產生抗原性或免疫反應之胺基酸序列的植物。該胺基酸序列於一項具體實施態樣中為得自引起魚類病狀之生物體的抗原。可將植物組織餵予魚類，或與其他物料混合再餵予魚類，或經萃取後投藥予魚類。

陸、英文發明摘要：

Plants are produced that express an amino acid sequence that, when administered to a fish, produce an antigenic or immune response in the fish. The amino acid sequence in one embodiment is antigen from an organism that causes pathology in fish. The plant tissue may be fed to the fish, or mixed with other materials and fed to fish, or extracted and administered to the fish.

拾、申請專利範圍：

1. 一種用於治療或預防性處理魚類之醫藥組合物，其包含治療上有效量之由玉米 (*Zea Mays*) 衍生得的重組胺基酸序列，其中該重組胺基酸序列當投藥予魚類時會產生抗原性或免疫反應，其中該重組胺基酸序列不是由納入 SEQ ID Nos: 5、6、7 或 8 之任一者的 DNA 序列所編碼。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該胺基酸序列為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原。

3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之醫藥組合物，其係供口服投藥予魚類。

4. 根據申請專利範圍第 3 項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經調製以供口服遞送至魚類。

5. 根據申請專利範圍第 4 項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係呈可食用飼料丸粒之形式。

6. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含轉殖基因玉米材料。

7. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之醫藥組合物，其中該重組胺基酸序列為得自 IPNV 之 VP2 或 VP3 蛋白或其任何致免疫性部份。

8. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之醫藥組合物，其中該魚類為鮭類魚類。

9. 一種魚類飼料，其包含由玉米衍生之重組胺基酸序列，其中該重組胺基酸序列當投藥予魚類時會產生抗原性或免疫反應，其中該重組胺基酸序列不是由納入 SEQ ID

Nos: 5、6、7 或 8 之任一者的 DNA 序列所編碼。

10. 根據申請專利範圍第 9 項之魚類飼料，其中該重組胺基酸序列為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原。

11. 根據申請專利範圍第 9 或 10 項之魚類飼料，其中該重組胺基酸序列係包含於玉米組織，視需要地於種子組織中。

12. 根據申請專利範圍第 9 或 10 項之魚類飼料，其進一步包含至少一種營養劑或賦形劑。

13. 一種製備魚類口服疫苗調配物之方法，其包含將由玉米衍生之重組胺基酸序列或包含該胺基酸序列之轉殖基因玉米材料與一或多種賦形劑及視需要地一或多種營養劑混合，其中該重組胺基酸序列當投藥予魚類時會產生抗原性或免疫反應，其中該重組胺基酸序列不是由納入 SEQ ID Nos: 5、6、7 或 8 之任一者的 DNA 序列所編碼。

14. 一種玉米細胞，其包含編碼當投藥予魚類時會產生抗原性或免疫反應之胺基酸序列的重組核糖核酸序列，其中該重組胺基酸序列不是由納入 SEQ ID Nos: 5、6、7 或 8 之任一者的 DNA 序列所編碼。

15. 根據申請專利範圍第 14 項之玉米細胞，其中該胺基酸序列為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原。

16. 一種餵食魚類之方法，其包含以包含編碼當投藥予魚類時會於該魚體內產生抗原性或免疫反應之胺基酸序列的核糖核酸序列之玉米或來自該種玉米的玉米材料餵食魚類，其中該重組胺基酸序列不是由納入 SEQ ID Nos: 5、6

、7 或 8 之任一者的 DNA 序列所編碼。

17. 根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該胺基酸序列為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原。

拾壹、圖式：

如次頁

、7 或 8 之任一者的 DNA 序列所編碼。

17. 根據申請專利範圍第 16 項之方法，其中該胺基酸序列為引起魚類疾病或病狀之生物體的抗原。

拾壹、圖式：

如次頁

圖 1

BAASS-親和素序列：

ATGGCCAACAAGCACCTGAGCCTCTCCCTCTTCCTCGTGCTCCTCGGCCTCTCCGCCTCCCT
CGCCAGCGGCGCCAGGAAGTGCTCCCTCACC GGCAAGTGGACCAATGACCTCGGCTCCAACA
TGACCATCGGCGCCGTGAACTCCAGGGGCGAGTTACCCGGCACCTACATCACC GCGGTGACC
GCCACCTCCAACGAGATCAAGGAGTCCCCCTCCACGGTACCCAGAACACCATCAACAAGAG
GACCCAGCCCACCTTCGGCTTCACCGTGAAGTTCTCCGAGTCCACCACCGTGTTCA
CCGGCCAGTGCTTCATCGACCGCAACGGCAAGGAGGTGCTCAAGACCATGTGGCTCCTGAGG
AGCTCCGTGAATGACATCGGCGACGACTGGAAGGCCACCCGCGTGGGCATCAACATCTTCAC
CCGCCTCCGCACCCAGAAGGAGTGA

玉米最適化(mo) *pat* 序列：

```
atgtccccgagcgccgccccgtcgagatccgcccggccaccgcccgcgacatggccgcccgtgtg
cgacatcgtgaaccactacatcgagacctccaccgtgaacttccgcaccgagccgcagaccccg
aggagtggatcgacgacctggagcgccctccaggaccgctaccgctggctcgtggccgaggtggag
ggcgtggtggccggcatcgccacgcccggccgctggaaggcccgcaacgcctacgactggaccgt
ggagtccaccgtgtacgtgtcccaccgcccaccagcgccctcggcctcggtccaccctctacacc
acctcctcaagagcatggaggcccagggttcaagtccgtggtggccgtgatcggcctcccgaa
gaccggtccgtgcgccctccacgaggccctcggtacaccgcccgcggcaccctccgcgcccgg
ctacaagcacggcggtggcacgacgtcggttctggcagcgcgacttcgagctgccggccccgc
cgccccggtgcgcccgtgacgcagatctga
```

圖 4

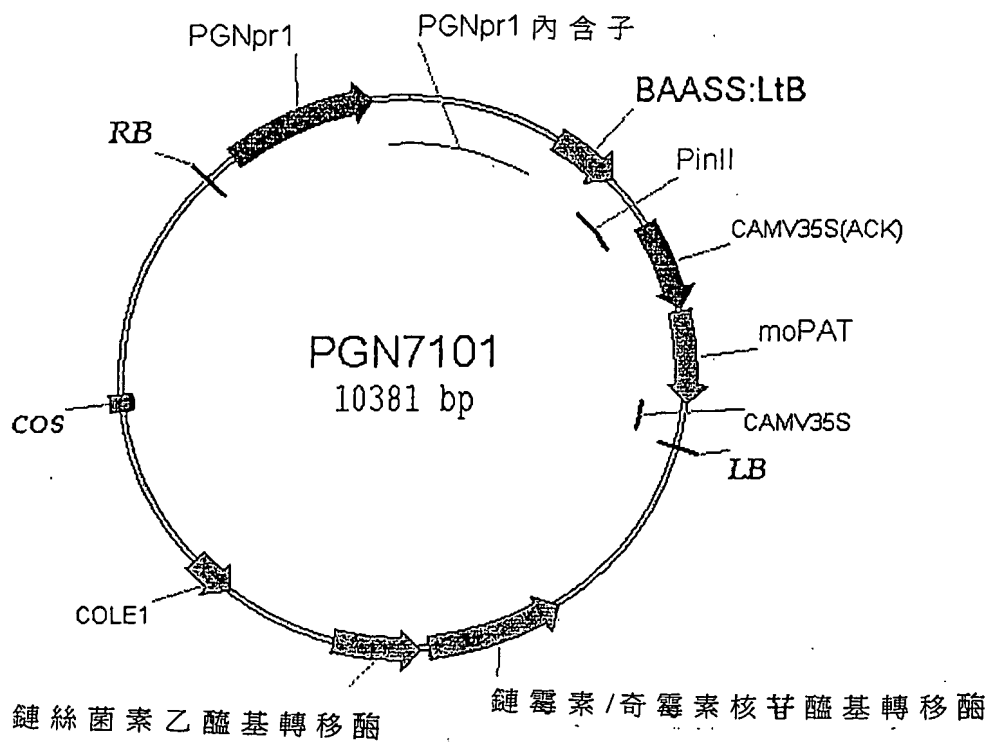


圖 5A

LtB 序列：

```
gccccgcagtccatcacccgagctctgctccgagtaccacaacacccagatctacaccatcaacga  
caagatcctctcctacaccgagagcatggccggcaagcgcgagatggatcatcaccttcaagt  
ccggcgccaccttccaggtggaggtgccgggctcccagcacatcgactcccagaagaaggccatc  
gagcgcgatgaaggacaccctccgcatcacctacctcaccgagaccaagatcgacaagctctgcgt  
gtggaacaacaagaccccgaactccatcgccgccatcagcatggagaac
```

BAASS:LtB 序列：

```
atggccaacaagcacctgagcctctccctcttctcctcgtgctcctcggcctctccgcctccctcgc  
cagcggcgccccgcagtccatcaccgagctctgctccgagtaccacaacaccagatctacacca  
tcaacgacaagatcctctcctacaccgagagcatggccggcaagcgcgagatggtgatcatcacc  
ttcaagtccggcgccaccttccaggtggaggtgccgggctcccagcacatcgactcccagaagaa  
ggccatcgagcgcgatgaaggacaccctccgcacacacacacacacacacacacacacacacac  
tctgcgtgtggaacaacaagacccccgaactccatcgccgccatcagcatggagaact
```

VP.2 序列得自 IPNV :

aacaccaacaaggcaaccgcaacttacttgaaatccatcatgcttccagagactggaccagcaag
catcccggacgacataacggagagacacatcctaaaacaagagacctcgtcatacaacctagagg
tctccgaatcaggaagtggcattcttgtttgtttccctggggcaccagggtcacggatcggtgca
cactacagatggaatgcgaaccagacggggctggagttcgaccagtggctggagacgtcgagga
cctgaagaaagccttcaactacgggaggtgatctcaaggaaatacgacatccaaagctccacac
taccggccggtctctatgctctgaacgggacgctcaacgctgccaccttcgaaggcagtctgtct
gaggtggagagcctgacctacaacagcctgatgtccctaacaacgaacccccaggacaaagtcaa
caaccagctggtgaccaaaggagtcacagtcctgaatctaccaacagggttcgacaaaccatacg
tccgcctagaggacgagacacccccagggtctccagtcaatgaacggggccaagatgaggtgcaca
gctgcaattgcaccgagggtacgagatcgacctcccatcccaacgcctacccccggttcttgc
gacaggaaccctcaccactctctacgagggaaacgccgacatcgtaactccacaacagtgcagg
gagacataaaacttcagtctggcagaacaacccgcaaacgagaccaagttcgacttcagctggac
ttcatgggccttgacaacgacgtcccagttgtcacagtggtcagctccgtgctggccacaaatga
caactacagaggagtctcagccaagatgacccagtcctcccgaccgagaacatcacaaagccga
tcaccagggtcaagctgtcatacaagatcaaccagcagacagcaatcggcaacgtcgccaccctg
ggcacaatgggtccagcatccgtctcttctcatcagggaacggaaatgtccccggcggtgctcag
accaatcacactgggtggcctatgagaagatgacaccgctgtccatcctgaccgtagctggagtgt
ccaactacgagctgatcccaaaccagaactcctcaagaacatggtgacacgctatggcaagtac
gaccccgagggtctcaactatgccaagatgatcctgtcccacagggaagagctggacatcaggac
agtgtggaggacagaggagtacaaggagaggaccagagtcttcaacgaaatcacggacttctcca
gtgacctgcccacgtcaaaggcatggggctggagagacatagtcagaggaattcggaaagtcgca
gtcctgtactgtccacgctgtttccaatggcagcaccactcatcgga

BAASS:VP2 序列得自 IPNV :

```
atggcgaacaagcacctgagccttagcctcttccctcgtgctcctgggcctctccgcctccctcgc  
ctccggcaacaccaacaaggcaaccgcaacttacttgaaatccatcatgcttccagagactggac  
cagcaagcatcccggacgacataacggagagacacatcctaaaacaagagacctcgtcatacaac  
ctagaggtctccgaatcaggaagtggcattcttgtttgtttccctggggcaccagggtcacggat  
cgggtgcacactacagatggaatgcgaaccagacgggggtggagttcgaccagtgggtggagacgt  
cgcaggacctgaagaaagccttcaactacgggagggtgatctcaaggaaatacgacatccaaagc  
tccacactaccggccggtctctatgctctgaacgggacgctcaacgctgccaccttcgaaggcag  
tctgtctgaggtggagagcctgacctacaacagcctgatgtccctaacaacgaacccccaggaca  
aagtcaacaaccagctggtgaccaaaggagtcacagtcctgaatctaccaacagggttcgacaaa  
ccatacgtccgcctagaggacgagacaccccagggtctccagtcaatgaacggggccaagatgag  
gtgcacagctgcaattgcaccgcgagggtacgagatcgacctcccatcccaacgcctacccccg  
ttcctgcgacaggaaccctcaccactctctacgagggaaacgccgacatcgtcaactccacaaca  
gtgacgggagacataaaacttcagtctggcagaacaacccgcaaacgagaccaagttcgacttcca  
gctggacttcatgggccttgacaacgacgtcccagttgtcacagtggtcagctccgtgctggcca  
caaatgacaactacagaggagtctcagccaagatgacccagtcctcccgaccgagaacatcaca  
aagccgatcaccagggtcaagctgtcatacaagatcaaccagcagacagcaatcggcaacgtcgc  
caccctggggcacaatgggtccagcatccgtctccttctcatcagggaaacggaaatgtccccggcg  
tgctcagaccaatcacactggtggcctatgagaagatgacaccgctgtccatcctgaccgtagct  
ggagtggtccaactacgagctgatcccaaaccagaactcctcaagaacatgggtgacacgctatgg  
caagtacgacccccgaagggtctcaactatgccaaagatgatcctgtccacaggggaagagctggaca  
tcaggacagtggtggaggacagaggagtacaaggagaggaccagagctttcaacgaaatcacggac  
ttctccagtgacctgcccacgtcaaaggcatggggctggagagacatagtcagaggaattcggaa  
agtcgcagctcctgtactgtccacgctgtttccaatggcagcaccactcatcgga
```

圖 8

VP3 序列得自 IPNV :

gacgaggagctgcagcgcctcctgaacgccacgatggccagggccaaggaggtccaggacgccga
gatctacaaacttcttaagctcatggcatggaccagaaagaacgacctcaccgaccacatgtacg
agtgggtcaaaagaggaccccgatgcactaaagttcggaagctcatcagcacgccaccaaaagcac
cctgagaagcccaaaggaccagaccaacaccacgccaagaggcgagagccacccgcatatcatt
ggacgccgtgagagccggggcggaacttcgccacaccggaatgggtcgcgctgaacaactaccgcg
gcccattctcccgggcagttcaagtactacctgatcactggacgagaaccagaaccaggcgacgag
tacgaggactacataaaacaaccattgtgaaaccgaccgacatgaacaaaatcagacgtctagc
caacagtgtgtacggcctcccacaccaggaaccagcaccagaggagttctacgatgcagttgcag
ctgtattcgcacagaacggaggcagaggtcccgaccaggaccaaatagcaagacctcaggagctc
gcaagacagatgaaacgcaggcccaggaacgccgatgcgccacgcaggaccagggcgccagcgga
accggcaccgcccggacgctcaagggttcacgcccagcgagacaacgctgaggtg

BAASS:VP3 序列得自 IPNV:

```
atggcgaacaagcacctgagccttagcctcttctcgtgctcctgggcctctccgcctccctcgc  
ctccggcgacgaggagctgcagcgctcctgaacgccacgatggccagggccaaggaggtccagg  
acgccgagatctacaaacttcttaagctcatggcatggaccagaaagaacgacctcaccgaccac  
atgtacgagtgggtcaaaagaggaccccgatgcactaaagtctcgaaagctcatcagcacgccacc  
aaagcaccttgagaagcccaaaggaccagaccaacaccacgccaagaggcgagagccacccgca  
tatcattggacgcccgtgagagccggggcggacttcgccacaccggaatgggtcgcgctgaacaac  
taccgcggcccatctcccgggcagttcaagtactacctgatcactggacgagaaccagaaccagg  
cgacgagtacgaggactacataaaacaaccattgtgaaaccgaccgacatgaacaaaatcagac  
gtctagccaacagtggtgtacggcctcccacaccaggaaccagcaccagaggagttctacgatgca  
gttgacagctgtattcgcacagaacggaggcagaggtcccgaccaggaccaaatgcaagacctcag  
ggagctcgcaagacagatgaaacgcaggcccaggaacgccgatgcgccacgcaggaccaggcg  
cagcggaaccggcaccgcccggacgctcaaggttcacgcccagcggagacaacgctgaggtg
```

圖 10

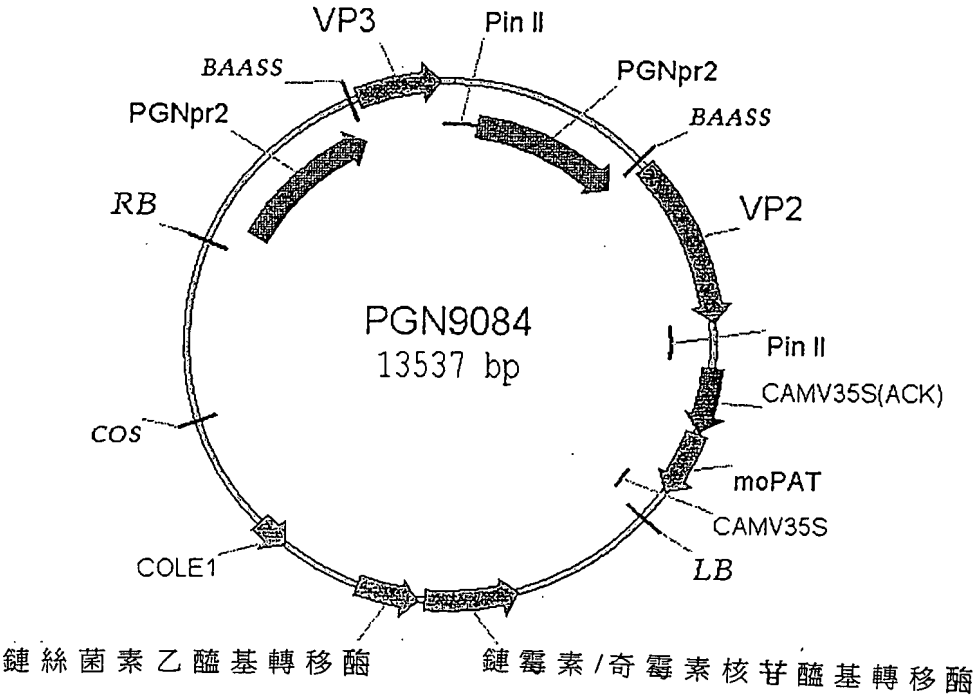


圖 11

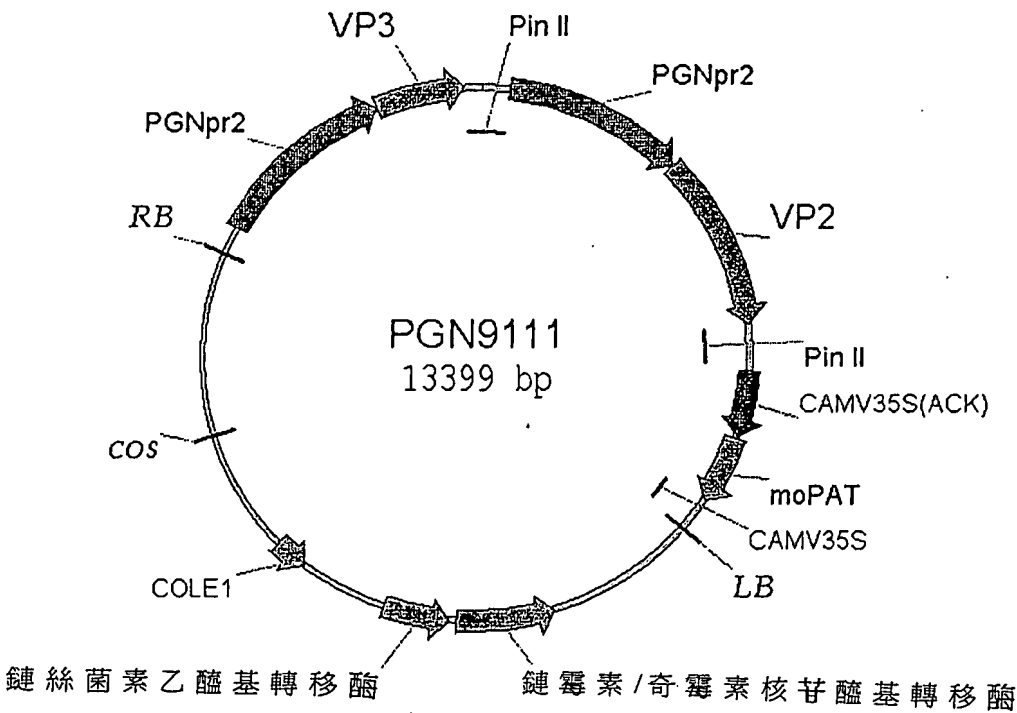


圖 12

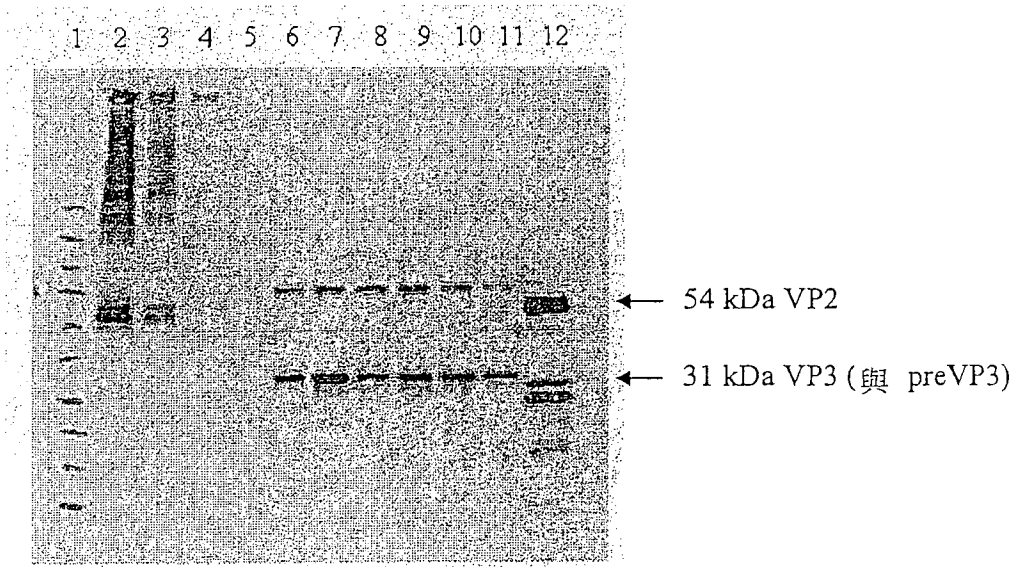
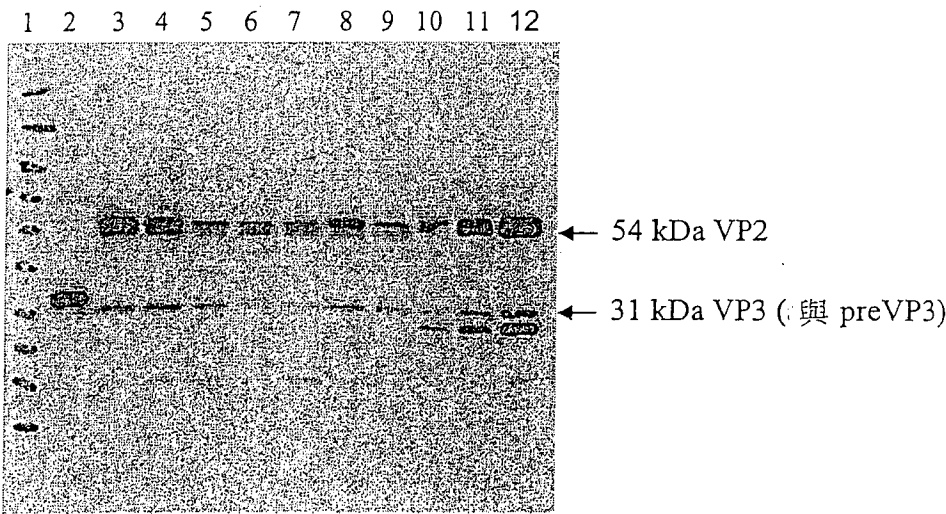
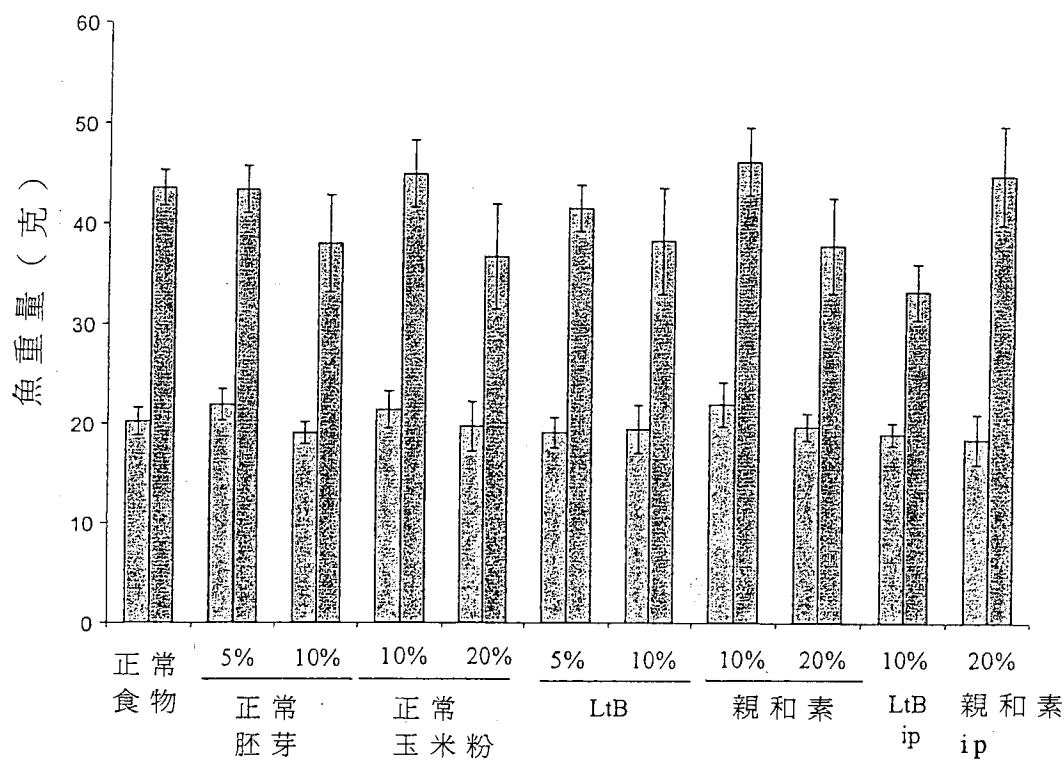
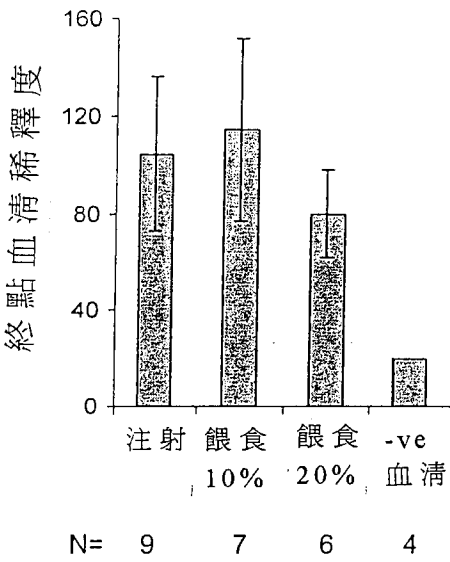


圖 13





A) 親和素



B) LtB (1/80 血清稀釋度)

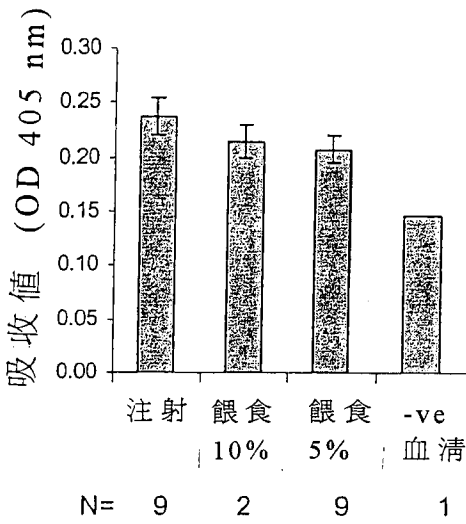


圖 15

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)