



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I526539 B

(45) 公告日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 21 日

(21) 申請案號：100147730

(22) 申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 21 日

(51) Int. Cl. : C12N7/04 (2006.01)

C12N15/33 (2006.01)

C12N15/82 (2006.01)

(30) 優先權：2011/06/13 美國

61/496,371

2010/12/22 美國

61/426,401

(71) 申請人：首蓆股份有限公司 (加拿大) MEDICAGO, INC. (CA)

加拿大

(72) 發明人：德奧斯特 馬克 安德烈 D'AOUST, MARC-ANDRE (CA)；考特爾 曼儂

COUTURE, MANON (CA)；拉沃伊 皮埃爾 奧利維爾 LAVOIE, PIERRE-

OLIVIER (CA)；維西納 路易斯 菲力普 VEZINA, LOUIS-PHILIPPE (CA)

(74) 代理人：蔡清福

(56) 參考文獻：

WO 2009/009876A1

WO 2009/076778A1

WO 2010/077712A1

Benjamin J. Chen et al., "Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but Not the Matrix Protein, Are Required for Assembly and Budding of Plasmid-Derived Virus-Like Particles", JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 81, No. 13, July 2007, p. 7111-7123.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：13 共 234 頁

(54) 名稱

植物中生產類病毒顆粒(VLP)的方法及以該方法生產之 VLP

METHOD OF PRODUCING VIRUS-LIKE PARTICLES (VLPS) IN PLANTS AND VLP PRODUCED BY SUCH METHOD

(57) 摘要

提供一種在植物中生產一類病毒顆粒(VLP)的方法以及包含 VLP 的組成物。該方法涉及將包含在植物中具活性且操作性地連結至連續地編碼來自病毒三聚表面蛋白質(trimeric surface protein)或其片段而融合至流感穿膜區域以及胞質尾之膜外區域的調控區域的一嵌合核苷酸序列之核酸引至植物或植物的部分，胞外區域係來自非流感病毒三聚表面蛋白質並且相關於流感穿膜區域以及胞質尾為異源性的。將植物或植物的部分於允許核酸表現的條件下培養，從而生產 VLP。亦提供由此方法生產之一 VLP。

A method of producing a virus like particle (VLP) in a plant, and compositions comprising VLPs, are provided. The method involves introducing a nucleic acid comprising a regulatory region active in the plant and operatively linked to a chimeric nucleotide sequence encoding, in series, an ectodomain from a virus trimeric surface protein or fragment thereof, fused to an influenza transmembrane domain and cytoplasmic tail, into the plant, or portion of the plant, the ectodomain is from a non-influenza virus trimeric surface protein and heterologous with respect to the influenza transmembrane domain, and the cytoplasmic tail. The

plant or portion of the plant are incubated under conditions that permit the expression of the nuclei acid, thereby producing the VLP. A LP produced by this method are also provided.

指定代表圖：

第1A圖，SEQ ID NO：1：HIV ConS

ΔCFI的共同核酸序列（原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線）。

ATGCGCGTGC GCGGCATCCAGCGCAACTGCCAGCACCTGTGGCGCTGGGGCACCCCTGATCCTGGGGCATGCTG
ATGATCTGCTCCGCCGCCGAGAACCTGTGGGTGACCGTGTACTACGGCGTGCCCGTGTGGAAGGAGGCCAAC
ACCACCCTGTTCTGCGCTCCGACGCCAAGGCCTACGACACCGAGGTGCACAACGTGTGGGCCACCCACGCCT
GCGTGCCACCGACCCCAACCCCAAGGAGATCGTGTGGAGAACGTGACCGGAGAACTTCAACATGTGGAAGA
ACAAATGTTGGAGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGT
GACCCCTGTGCGTGACCTGAACCTGCACCAACGTGAACGTGACCAACACCACCAACAACACCGAGGAGAAG
GGCGAGATCAAGAAGTGTCTTCAACATCACCCGAGATCGCGACAAGAAGCAGAAGGTGTACGCCCTGT
TCTACCGCTGGACGTGGTCCCATCGACGACAACAACAACACTCTCCAACCTACCGCCTGATCAACTGCAAC
ACCTCCGCCATCACCGAGCCTGCCCAAGGTGTCTTCGAGCCCATCCCATCACTACTGCGCCCGCGCCGG
CTTCGCTGCTGAAGTGAACGCAAGAAAGTTCAACGGCACCGGCCCTGCAAGAACGTGTCCACCGTGCAG
TGCAACCCACGCGATCAAGCTGTTGTTCCACCCAGCTGCTGCTGAACGGCTCCCTGGCCGAGGAGGATCA
TCATCCGCTCCGAGAACATCAACAACAAGCCAGACATCATCGTGCAGCTGAACGAGTCCGTGGAGATCAA
CTGCACCCGCCCAACAACAACCCGCAAGTCCATCCGATCGGCCCGGCCGACGCCCTTCTACGCCACCGGC
GACATCATCGGCGACATCCGCCAGGCCACTGCAACATCTCCGGCACAAGTGAACAAGACCTGCAGCAGG
TGGCCAAGAAGCTGCGCGAGCACTTCAACAACAAGACCATCATCTCAAGCCCTCCTCGGCGGGCACCTGGA
GATCACCCACTCCTTCAACTGCCGCGGCGAGTTCCTTACTGCAACACTCCGGCCTGTTCAACTCCACTG
GATCGGCAACGGCAACAAGAAACAACAACAACCAACGACACCATCACCTGCCCTGCCGATCAAGCAGATC
ATCAACATGTGGCAGGGCGTGGGCCAGGCCATGTACGCCCGCCCATCGAGGGCAAGATCACCTGCAAGTCC
AACATCACCGCCTGCTGCTGACCCCGCAGCGCGGCAACAACAACAACCAACGAGACCGAGATCTTCGCCCCG
GCGGCGGCGACATGCGCGACAACCTGGCGCTCCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGATCGAGCCCTGG
GCGTGGCCCCACCAAGGCCAAGCTGACCGTGCAGGCCCGCCAGCTGTGTCGGCATCGTGCAGCAGCAGT
CCAACCTGCTGCGCGCATCGAGGCCAGCAGCACCTGCTGCAGCTGACCGTGTGGGGCATCAAGCAGCTGC
AGGCCCGCGTGTGCCGTGGAGCGCTACCTGAAGGACCAAGCAGCTGCTGGAGATCTGGGACAACATGACCT
GGATGGAGTGGGAGCGCGAGATCAACAACACTACCGACATCATCTACTCCCTGATCGAGGAGTCCGAGAACC
AGCAGGAGAAGAACGAGCAGGAGTGTGCGCCCTGGACAAGTGGGCGCTCCCTGTGAACTGGTTCGACATCA
CCAACGGCTGTGGTACATCAAGATCTTATCATGATCGTGGCGGCTGATCGGCCTGCGCATCGTGTTCGCC
GTGCTGTCCATCGTGAACCGCTGCGCCAGGGCTACTCCCCCTGTCTTCCAGACCCTGATCCCCAACCCCCG
CGGCCCGACCGCCCGAGGGCATCGAGGAGGAGGGCGGCGAGCAGGACCGCGACCGCTCCATCCGCTGG
TGAACGGCTTCTGCGCTGCGCTGGGACGACCTGCGCTCCCTGTGCTGTCTCTACCCACCGCTGCGCGAC
TTCATCCTGATCGCGCCCGCACCGTGGAGTGTGGGCCGCAAGGGCTGCGCCCGGGCTGGGAGGCCCTG
AAGTACTGTGGAACCTGCTGCAGTACTGGGGCCAGGAGCTGAAGAACCTCCGCATCTCCCTGCTGGACACCA
CCGCCATCGCGTGGCGAGGGCACCGACCGCTGATCGAGGTGGTGCAGGGCGCTGCCGCGCATCTGA
ACATCCCCCGCCATCCGCCAGGCCCTGGAGCGCGCCCTGCTGTAA

符號簡單說明：

HIN . . . 人類免疫
缺陷病毒

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係相關於在植物中生產嵌合病毒蛋白 (chimeric virus protein)。更具體地，本發明亦相關於在植物中生產包含嵌合病毒蛋白的類病毒顆粒 (virus-like particle, VLP)。

【先前技術】

疫苗接種經由引發個體在感染前發動防禦以提供對由類似媒介物引起之疾病的保護。傳統地，此經由活的減弱 (live attenuated) 或完全去活化 (whole inactivated) 形式之感染物的使用作為免疫原 (immunogen) 而達成。為了避免使用全病毒 (例如殺死的或減弱的病毒) 作為疫苗的危險，已將重組病毒蛋白例如次單元 (subunit) 實行為疫苗。肽與次單元疫苗兩者皆受到一些潛在的限制。由於不正確的折疊、不良抗原呈現 (antigen presentation) 或碳水化合物與脂質組成的差異，次單元疫苗可能表現不良致抗原性 (immunogenicity)。主要問題為在其自然環境中確保工程蛋白的構型仿似抗原的構型之困難度。必須使用適合的佐劑以及在胜肽的例子中之載體蛋白以加強免疫反應。此外這些疫苗主要引起體液免疫 (humoral response)，並因此可能無法引起有效的免疫。次單元疫苗對於可證實以全去活化病毒提供保護的疾病經常是無效的。

類病毒顆粒 (VLPs) 為包含在致抗原組成物的潛在候選。VLPs 酷似成熟的病毒粒子，但它們不包含病毒的遺傳

物質。因此，VLPs 性質上為不可複製的，其使得將它們作為疫苗投予是安全的。此外，可將 VLPs 設計為在 VLP 的表面上表現病毒糖蛋白，其為它們最原生之生理構形。此外，因為 VLPs 類似完整的病毒粒子並且為多價粒子結構，VLPs 在引發對糖蛋白的中和抗體比起可溶的套膜蛋白抗原可能是更有效的。

為了疫苗的目的，在昆蟲與哺乳動物系統中已產生超過三十個不同病毒的 VLPs (Noad, R. and Roy, P., 2003, *Trends Microbiol* 11: 438-44)。許多研究證實在細胞培養中使用哺乳動物表現質體或桿狀病毒載體之重組流感蛋白自組裝至 VLPs (例如，Gomez-Puertas et al., 1999, *J. Gen. Virol*, 80, 1635-1645 ; Neumann et al., 2000, *J. Virol.*, 74, 547-551 ; Latham and Galarza, 2001, *J. Virol.*, 75, 6154-6165)。

Gomez-Puertas et al. (1999, *J. Gen. Virol.*, 80, 1635-1645) 證實流感 VLPs 的有效形成視病毒蛋白質的表現程度而定。Neumann et al. (2000, *J. Virol.*, 74, 547-551) 建立以哺乳動物表現質體為基礎的系統，以完全由選殖的 cDNAs 產生傳染性流感類病毒顆粒。Latham 與 Galarza (2001, *J. Virol.*, 75, 6154-6165) 報導在以共同表現 HA、NA、M1 與 M2 基因之重組桿狀病毒感染的昆蟲細胞中的流感 VLP 之形成。此研究證實在真核細胞中流感病毒粒子蛋白於共同表現後自組裝並且需要 M1 基質蛋白用於 VLP 生產。

在許多表現系統中，包括桿狀病毒、牛痘病毒、果蠅

(DS-2) 細胞、Vero 細胞以及酵母球形質體，來自人類免疫缺陷病毒(HIV)的 Pr^{55gag} 之表現造成類病毒顆粒(VLPs)的組裝與釋出，其與未成熟的 HIV 病毒粒子之形態相似(由 Deml et al., 2005, Molecular Immunology 42: 259-277 回顧)。

可將 HIV 套膜蛋白 gp160 併入 Gag-衍生的 VLPs。然而，儘管 Pr^{55gag} 的高度表現僅併入有限數量的套膜蛋白。Wang et al.展示 HIV 套膜蛋白的穿膜區域(transmembrane domain)與胞質尾區域(cytosolic tail domain)(TM/CT)被另一病毒套膜蛋白的那些區域之取代，其包括造成套膜蛋白併入至 Pr^{55gag} 衍生的 VLPs 增加之流感血球凝集素(Journal of Virology, 2007, 81: 10869-10878)。當使用桿狀病毒表現系統在昆蟲細胞中共同表現時，包含 HA TM/CT 的嵌合 HIV 套膜蛋白亦顯示被併入流感 M1 衍生的 VLPs (WO2008/005777)。

流感病毒滲入細胞係取決於 HA 依賴性受體媒介之胞飲作用。流感病毒感染週期係由病毒粒子表面 HA 蛋白附著於含有唾液酸的細胞受體(醣蛋白與醣脂質)而開始。神經胺酸酶(NA)蛋白媒介唾液酸受體的處理。在內化之含有流感病毒粒子的內體之酸性範圍中，HA 蛋白歷經構形變化，其導致病毒與細胞膜的融合、病毒脫殼(uncoating)以及以 M2 為媒介的 M1 蛋白質由核鞘相關的核糖核蛋白(nucleocapsid-associated ribonucleoproteins, RNPs)釋出，其遷移至細胞核以進行病毒 RNA 合成。Latham 與 Galarza

(200, J. Virol. 75, 6154- 6165) 報導在以共同表現 HA、NA、M1 與 M2 基因之重組桿狀病毒感染之昆蟲細胞中流感 VLPs 的生成。此外，Gomez-Puertas et al. (2000, J Virol. 74, 11538-11547) 教導除了血球凝集素 (HA)，流感病毒的基質蛋白 (M1) 對於 VLP 由昆蟲細胞出芽 (budding) 為關鍵的。然而，Chen et al. (2007, J. Virol. 81, 7111-7123) 教導 M1 對 VLP 生成可能是不需要的。

大部分具特徵的出芽機制使用宿主路徑的液泡蛋白質分類路徑 (vacuolar protein sorting pathway, VPS) (見 Chen and Lamb, Virology 372, 2008)。許多具套膜的病毒已顯示與 VPS 路徑的蛋白質交互作用，其需要運輸所需的內體分類複合體 (ESCRT) 蛋白質複合體的作用 (見 Chen 與 Lamb 2008 的表格 I)。發現與 VPS 路徑之蛋白質交互作用的晚期蛋白區域位於病毒的核心以及基質蛋白，因而 VPS 依賴性出芽需要基質或核心蛋白質的存在。流感 HA 之胞質尾的棕櫚醯化為出芽所需但此機制還不清楚並且可能涉及其他表面蛋白區域的參與。出芽的最低需求仍然未知並且不能排除在此過程中的胞外區域之參與。此外，植物中的 VPS 路徑所知甚少 (見 Schellmann S., and Pimpl P., Current Op Plant Biol 12:670-676, 200)。

已知流感的出芽是與 VPS 路徑獨立的。流感病毒的出芽涉及 Rab11 路徑 (Bruce et al., J. Virol 84:58485859, 2010)。Rab 蛋白質為定位於細胞內之運輸囊泡表面的

GTPase 錨點，並且它們涉及從供給者間隔、運輸、對接以及融合至接受者間隔的囊泡生成 (VazquezMartinez 與 Malagon *Frontiers in Endocrinology* 2:1-9, 2011)。已確定在植物中 Rab11 路徑的組成物。然而，植物的運輸組成物進化導致植物內膜系統的數個特定特徵，包括例如大且特化的液泡、高基堆疊的快速移動與內體間隔的獨特組織，以及擴充數目的 Rab GTPase (Rojo E., and Deneke J., *Plant Phys* 147:1493-1503, 2008)。流感顆粒或病毒出芽係依賴於 Rab11 (Bruce et al., *J. Virol* 84:5848-5859, 2010) 但仍未確定與 Rab11 或 Rab11 相關蛋白質交互作用的蛋白質或蛋白質區域。然而，出芽過程以及 VLP 生產可能需要的最小區域或 HA 區域為未知的。

在植物中，若不設計於葉綠體中累積，HIV Pr^{55gag} 以極低量累積 (Meyers et al., 2008, *BMC Biotechnology* 8:53; Scotti et al., 2010, *Planta* 229: 1109-1122)。然而，在葉綠體中的累積與正確折疊的 HIV 套膜蛋白之併入為不相容的，因為後者的成熟與折疊需要特定分泌路徑的轉譯後修飾 (post-translational modification)。Rybicki et al. (2010, *Plant Biotechnology Journal* 8: 620-637) 提到「似乎沒有人能在植物中以合理產量成功表現全 HIV Env gp160 蛋白質或甚至大部分的蛋白質」。

狂犬病病毒 (RV) 為桿狀病毒科 (Rhabdoviridae) 的成員。類似此科的大部分成員，RV 為不分段的、負股 RNA 病

毒，其基因組編碼五個病毒蛋白質：RNA-依賴性 RNA 聚合酶 (L)；核蛋白 (N)；磷酸化蛋白 (P)；位於病毒蛋白套膜內側的基質蛋白 (M)；以及外表面的醣蛋白 (G)。
Dietzschold B et al. (1991), Crit. Rev. Immunol. 10: 427-439。

以細胞培養為基礎的狂犬病疫苗限制在於細胞培養中使去活化的病毒品系生長。這些疫苗包含生長於細胞培養的病毒。現今的生物技術方法旨在表現狂犬病病毒的鞘蛋白 (coat protein) 基因以發展出可配置為具活性疫苗的安全重組蛋白。已顯示在中國倉鼠卵巢細胞中狂犬病病毒醣蛋白的穩定表現 (Burger et al., 1991)。獲得與從受病毒感染的細胞分離的 G 蛋白共同遷移之全長的、醣化的 67 K 蛋白質。

WO/1993/001833 教導在含有 RNA 基因組，其包括一 3' 區域以及由狂犬病 M 蛋白之鞘以及狂犬病 M1 蛋白環繞的填充區域 (filler domain) 之桿狀病毒表現系統中的類病毒顆粒 (VLPs) 生產。此 VLP 亦包括狂犬病 G 蛋白的脂質套膜。

水痘帶狀疱疹病毒 (Varicella Zoster virus, VZV)，亦稱為人類疱疹病毒 3 (HHV3)，為疱疹病毒科 (Herpesviridae) 病毒之 α -疱疹病毒 (alphaherpesvirus) 亞科的一員。表現醣蛋白或外被蛋白的 VLPs 先前已從不同的疱疹病毒科成員產生。由套膜外被蛋白組成的輕粒子 (L-顆粒)，已由受單純疱疹病毒第 1 型 (HSV-1)、馬疱疹病毒第 1 型 (EHV-1) 或偽狂犬病病毒感染的細胞獲得 (McLauchlan and Rixon (1992) J. Gen. Virol. 73: 269-276 ; U.S. Pat. No. 5,384,122)。不同類

型的 VLP，稱為前病毒 DNA 複製套膜顆粒 (PREPs)，可在病毒 DNA 複製抑制劑的存在下由受 HSV-1 感染的細胞產生。PREPs 在結構上與 L-顆粒相似，但包含不同的蛋白質組成 (Dargan et al. (1995) *J. Virol.* 69: 4924-4932; U.S. Pat. No. 5,994,116)。已經由使用酵母菌 Ty 反轉錄轉位子編碼的 p1 蛋白質技術生產來自 VZV 的 gE 蛋白質之雜交 VLPs 表現片段 (Garcia-Valcarcel et al. (1997) *Vaccine* 15: 709-719; Welsh et al. (1999) *J. Med. Virol.* 59: 78-83; 美國專利號 6,060,064)。US 2011/0008838 描述包含至少一 VZV 蛋白質但不包含酵母菌 Ty 蛋白質的嵌合 VLPs。嵌合 VLPs 包含病毒核心蛋白質例如流感 M1 或新城病蛋白質 M 以及至少一水痘帶狀疱疹病毒 (VZV) 蛋白質。

於 2003 年，新進化的冠狀病毒 (CoV) 傳播造成嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 流行病的全球性威脅 (Kuiken, T. et al., 2003, *Lancet* 362: 263-270)。如同其他冠狀病毒，SARS-CoV 具有套膜顆粒伴隨典型的周圍突起的形態，該突起環繞病毒核心表面，稱為「冠狀」或「突棘」(Ksiazek, T. G. et al., 2003, *N Engl J Med* 348: 1953-1966; Lin, Y. et al., 2004, *Antivir Ther* 9: 287-289)。在冠狀病毒顆粒核心外是脂質套膜層，其主要包含三個膜蛋白，最充足的 M (膜) 蛋白質、小 E (套膜) 蛋白質以及 S (棘) 蛋白質。S 蛋白質的同源三聚體集合形成上述的冠狀物，其涉及冠狀病毒的病毒結合至宿主受體、病毒進入的膜融合、細胞至細胞傳播以及

組織驅性。

已使用桿狀病毒表現系統生產 SARS VLPs (Ho, Y. et al., 2004, *Biochem Biophys Res Commun* 318: 833-838; Mortola, E. and Roy, P., 2004, *FEBS Lett* 576: 174-178)。然而，由於昆蟲細胞與哺乳動物細胞本身的差異，於昆蟲 (SF9) 細胞中組裝的 VLP 展現了 110 nm 的半徑尺寸，其較真實的 SARS-CoV 病毒粒子的 78 nm 大許多 (Lin, Y. et al., 2004, *supra*, and Ho, Y. et al., 2004, *supra*)。此外，仍未調查以昆蟲細胞為基礎的 SARS-VLP 之致抗原性。其他研究者亦試著使用哺乳動物表現系統以生產 SARS VLP (Huang, Y. et al., 2004, *J Virol* 78: 12557-65)。然而，VLP 的胞外釋出效率不高，並且 VLP 的產量不能令人滿意。例如 WO/2005/035556 描述製作 SARS-CoV-類病毒顆粒 (SARS-CoV-VLPs) 的系統，其包含在哺乳動物細胞中表現 SARS-CoV E 蛋白質、SARS-CoV M 蛋白質以及 SARS-CoV S 蛋白質的一或更多重組載體。

在任何系統的 VLP 生成對於蛋白質的結構樹立相當高的要求——改變蛋白質序列延伸可能對多肽本身的表現沒有效果，然而結構的研究缺乏證明此類改變對 VLP 生成的效果。蛋白質的各種區域與結構的合作已隨著病毒一起演進，並且在不喪失 VLP 生成下對類似的改變可能是不容修正的。

為了改良 VLPs 為疫苗候選，需要探索昆蟲與哺乳細胞

之外的其他表現系統。因此有需要評估植物表現系統的能力，以生產嵌合蛋白 VLP。特別地，有需要識別將組裝進 VLP 的病毒蛋白質最小數目並且評估那些 VLP 的形態與致抗原性。

【發明內容】

本發明係相關於在植物中生產嵌合病毒蛋白。更具體地，本發明亦相關於在植物中生產包含嵌合病毒蛋白的類病毒顆粒。

本發明提供在植物中生產類病毒顆粒 (VLP) 的方法，其包含，

a) 將包含在植物中具活性的調節區域並且連續地操作性連結至編碼來自病毒三聚表面蛋白質或其片段的膜外區域、融合至流感穿膜區域以及胞質尾之嵌合核苷酸序列的核酸引入植物或植物的部分，膜外區域係來自非流感病毒三聚表面蛋白質並且相關於流感穿膜區域以及胞質尾為異源性的，以及

b) 於允許核酸表現的條件下培養植物或植物的部分，從而生產 VLP。

如上所述的方法可進一步包含步驟(c) 將植物收穫並純化 VLP。此外，VLP 可不包含病毒基質或核心蛋白質。

本發明提供上述方法，其中來自病毒三聚表面蛋白質或其片段之膜外區域可衍生自反轉錄病毒、桿菌病毒、疱疹病

毒、冠狀病毒、副黏液病毒、痘病毒或絲狀病毒科的病毒。來自病毒三聚表面蛋白質的膜外區域可衍生自例如來自慢病毒、狂犬病病毒、水痘病毒、冠狀病毒或伊波拉病毒屬。來自病毒三聚表面蛋白質的膜外區域可衍生自例如但不限於 HIV、狂犬病病毒、VZV、RSV、SARS 病毒、伊波拉病毒、麻疹、腮腺炎、水痘、巨細胞病毒、伊波拉/絲狀病毒、疱疹病毒、艾巴氏病毒或天花。在其原生形式的病毒三聚表面蛋白質可包含膜外區域以及穿膜區域/胞質尾，舉例來說但不限於 F 蛋白質 (RSV、麻疹、腮腺炎、新城病)、S 蛋白質 (SARS)、env 蛋白質 (HIV)、G 蛋白質 (狂犬病)、包括 E、B、C、I、H 的套膜糖蛋白 (VZV、巨細胞病毒、疱疹病毒、艾巴氏病毒)、GP 糖蛋白 (伊波拉、馬堡)、血球凝集素 (天花病毒、牛痘病毒)。

本發明亦提供如上所述的方法，其中在引入的步驟中 (步驟 a)，該核酸在植物中為暫時地表現。替代地，在引入的步驟中 (步驟 a)，該核酸可在植物中穩定地表現。

本發明亦包括如同上述的方法，其中在引入的步驟中 (步驟 a)，將選自編碼一或多於一的帶位子蛋白質、質子通道蛋白質、蛋白酶抑制劑或其結合物的核酸序列之群組的一或多於一個額外核酸引入植物中。

本發明提供以上述方法生產的 VLP。該 VLP 之嵌合病毒三聚表面蛋白可包含植物特定的 N-聚糖或經修飾的 N-聚糖。該 VLP 亦可包含一或多於一衍生自植物的脂質。

本發明包括含有有效劑量的如上所述用於引起免疫反應之 VLP，以及藥學上可接受之載體的組成物。

本發明係相關於在植物中生產來自反轉錄病毒、桿狀病毒、疱疹病毒、冠狀病毒或絲狀病毒科之病毒的嵌合病毒三聚表面蛋白質以及生產含有這些嵌合病毒三聚表面蛋白質的類病毒顆粒。

此外，本發明係相關於在植物中生產人類免疫缺陷病毒 (HIV)、狂犬病毒、水痘帶狀疱疹病毒 (VZV)、嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 病毒或伊波拉病毒嵌合三聚表面蛋白質。本發明相關於在植物中生產 HIV、狂犬病、VZV、SARS 以及伊波拉嵌合類病毒顆粒。

根據本發明，有提供在植物中生產嵌合 HIV、狂犬病、VZV、SARS 或伊波拉 VLP 的方法，其包含將操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合 HIV、狂犬病、VZV、SARS 或伊波拉病毒蛋白質的核酸引入植物或植物的部分，並且於允許核酸表現的條件下培養植物或植物的部分，從而生產嵌合 HIV、狂犬病、VZV、SARS 或伊波拉 VLP。

本發明進一步提供含有嵌合 HIV、狂犬病、VZV、SARS 或伊波拉蛋白質的 VLP。該 VLP 可經由如同本發明提供的方法生產。亦可在植物內生產 HIV、狂犬病、VZV、SARS 或伊波拉 VLP。

根據本發明之嵌合 VLPs 或由 HIV、狂犬病、VZV、SARS

或伊波拉衍生的蛋白質生產之 VLPs 不包含 M1 蛋白質。已知 M1 蛋白質結合 RNA，其可視為 VLP 製備的汙染。當獲得抗原 (VLP) 產物之管理批准時，RNA 的存在是不希望的，因此缺少 RNA 的嵌合 VLP 製備可能是有利的。

雖然原生的 HIV Env 蛋白質不善累積於植物中，融合至來自流感 HA 之穿膜 (TM) 以及胞質尾 (CT) 區域的嵌合 HIV Env 蛋白質在植物中以高程度累積並且在無核心或基質蛋白下出芽至 HIV VLP。

此發明之摘要不一定描述本發明的所有特徵。

【實施方式】

下列描述為一較佳之具體實施例。

本發明係相關於類病毒顆粒 (VLPs)。更具體地，本發明係針對包含嵌合病毒蛋白質之 VLPs，以及在植物中生產嵌合 VLP 的方法。VLPs 包含融合 (嵌合) 蛋白，其連續地包含來自病毒三聚表面蛋白質 (病毒的三聚表面蛋白質) 或其片段之膜外區域，其與穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT) 融合。來自病毒三聚表面蛋白質的膜外區域相關於 TM/CT 為異源的。TM/CT 為來自流感血球凝集素 (HA) 之 TM/CT。

病毒三聚表面蛋白質 (亦稱為病毒三聚表面蛋白質) 為於具套膜病毒的表面發現之蛋白質，其以三聚體的形式 (通常為同源三體) 並且位於每個單體的 C 端末端包含穿膜區域

以及胞質尾區域 (TM/CT)。病毒三聚表面蛋白質可以是醣蛋白或套膜蛋白。三聚體為經由三個通常為非共價性鍵結的蛋白質形成的巨分子複合體。在不希望受理論約束的情況下，蛋白質的三聚區域對此類三聚體的形成可以是重要的。因此病毒三聚表面蛋白質或其片段的單體可包含三聚區域。病毒三聚表面蛋白質或其片段進一步包含膜外區域。三聚表面蛋白質的膜外區域係暴露於外部環境並且不包括穿膜區域以及胞質尾區域。如同本文所描述的，來自病毒三聚表面蛋白質的膜外區域不是衍生自流感病毒。

根據本發明的各種具體實施例之嵌合 VLP 包含穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT) 由流感 HA 獲得之 TM/CT 取代的病毒三聚表面蛋白質。該病毒三聚表面蛋白質相關於 TM/CT 為異源性的。病毒三聚表面蛋白質可沒有限制地衍生自反轉錄病毒科、桿狀病毒科、疱疹病毒科、冠狀病毒科、副黏液病毒科、痘病毒科或絲狀病毒科的病毒。此病毒三聚表面蛋白質可衍生自例如慢病毒屬、狂犬病病毒屬、水痘病毒屬、冠狀病毒屬或伊波拉病毒屬。病毒三聚表面蛋白質可衍生自例如但不限於 HIV、狂犬病病毒、VZV、RSV、SARS 病毒、伊波拉病毒、麻疹、腮腺炎、水痘、巨細胞病毒、伊波拉/絲狀病毒、疱疹病毒、EpsteinBarr 病毒或天花。病毒三聚表面蛋白質可以是例如三聚表面蛋白質並且在其原生形式可包含穿膜區域/胞質尾，其例如但不限於：

- a. F 蛋白質 (副黏液病毒科：RSV、麻疹、腮腺炎、

新城病)；

- b. S 蛋白質 (冠狀病毒科：SARS)；
- c. env 蛋白質 (反轉錄病毒科：HIV)；
- d. G 蛋白質 (桿狀病毒科：狂犬病)；
- e. 套膜醣蛋白例如 E、B、C、I、H (疱疹病毒科：VZV、巨細胞病毒、疱疹病毒、艾巴氏病毒)；
- f. GP 醣蛋白 (絲狀病毒科：伊波拉、馬堡)；
- g. 血球凝集素 (痘病毒科：天花病毒、牛痘病毒)。

可根據本發明使用之數種病毒三聚表面蛋白質的非限制性範例係更詳細描述於下。

HIV

本發明提供包含嵌合人類免疫缺陷病毒 (HIV) 蛋白質的 VLP，以及生產嵌合 HIV VLP 的方法，此嵌合 HIV 蛋白質包含帶有例如 HIV Env 蛋白質以及一部份流感血球凝集素 (HA) (例如穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT)) 之融合蛋白質。

本發明提供包含操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合 HIV 蛋白質之核苷酸序列的核酸。

此外，本發明提供在植物中生產嵌合 HIV VLP 的方法。該方法涉及將操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合 HIV 蛋白質之核酸引入至植物或植物的部分，並且將植物或植物的部分於容許核酸表現的條件下培養，從而生產嵌合 HIV VLP。

本發明進一步提供包含嵌合 HIV 蛋白質的 VLP。可經由

如同本發明所提供之方法生產此 VLP。

狂犬病病毒

本發明亦提供包含嵌合狂犬病病毒蛋白質的 VLP，以及生產嵌合狂犬病 VLP 的方法，此嵌合狂犬病病毒蛋白質包含帶有例如狂犬病 G 蛋白質以及一部份的流感血球凝集素 (HA) (例如穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT)) 之融合蛋白質。

本發明提供包含操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合狂犬病病毒蛋白質之核苷酸序列的核酸。

此外，本發明提供在植物中生產嵌合狂犬病病毒 VLP 的方法。該方法涉及將操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合狂犬病病毒蛋白質之核酸引入至植物或植物的部分，並且將植物或植物的部分於容許核酸表現的條件下培養，從而生產嵌合狂犬病病毒 VLP。

本發明進一步提供包含嵌合狂犬病病毒蛋白質的 VLP。可經由如同本發明所提供之方法生產此 VLP。

VZV

本發明亦針對包含嵌合水痘帶狀疱疹病毒 (VZV) 蛋白質的 VLP，以及生產嵌合 VZV VLP 的方法，此嵌合 VZV 蛋白質包含帶有例如 VZV 醣蛋白 E 以及一部份的流感血球凝集素 (HA) (例如穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT)) 之融合蛋白質。

本發明提供包含操作性地連結至在植物中具活性的調

節區域之編碼嵌合 VZV 蛋白質之核苷酸序列的核酸。

此外，本發明提供在植物中生產嵌合 VZV VLP 的方法。該方法涉及將操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合 VZV 蛋白質之核酸引入至植物或植物的部分，並且將植物或植物的部分於容許核酸表現的條件下培養，從而生產嵌合 VZV VLP。

本發明進一步提供包含嵌合 VZV 蛋白質的 VLP。可經由如同本發明所提供之方法生產此 VLP。

SARS

本發明亦針對包含嵌合嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 病毒蛋白質的 VLP，以及生產嵌合 SARS VLP 的方法，此嵌合 SARS 蛋白質包含帶有例如 SARS 糖蛋白 S 以及一部分的流感血球凝集素 (HA) (例如穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT)) 之融合蛋白質。

本發明提供包含操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合 SARS 蛋白質之核苷酸序列的核酸。

此外，本發明提供在植物中生產嵌合 SARS VLP 的方法。該方法涉及將操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合 SARS 病毒蛋白質之核酸引入至植物或植物的部分，並且將植物或植物的部分於容許核酸表現的條件下培養，從而生產嵌合 SARS VLP。

本發明進一步提供包含嵌合 SARS 病毒蛋白質的 VLP。可經由如同本發明所提供之方法生產此 VLP。

伊波拉

本發明亦針對包含嵌合伊波拉病毒蛋白質的 VLP，以及生產嵌合伊波拉 VLP 的方法，此嵌合伊波拉病毒蛋白質包含帶有例如伊波拉病毒套膜糖蛋白以及一部分的流感血球凝集素 (HA) (例如穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT)) 之融合蛋白質。

本發明提供包含操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合伊波拉病毒蛋白質之核苷酸序列的核酸。

此外，本發明提供在植物中生產嵌合伊波拉 VLP 的方法。該方法涉及將操作性地連結至在植物中具活性的調節區域之編碼嵌合伊波拉病毒蛋白質之核酸引入至植物或植物的部分，並且將植物或植物的部分於容許核酸表現的條件下培養，從而生產嵌合伊波拉 VLP。

本發明進一步提供包含嵌合伊波拉病毒蛋白質的 VLP。可經由如同本發明所提供之方法生產此 VLP。

嵌合作用與 VLP 生成

水泡性口炎病毒 (類桿狀病毒之狂犬病) 以及單純疱疹病毒 (類疱疹病毒之水痘帶狀疱疹病毒) 兩者以 VSP-4 依賴性方式出芽 (Taylor et al. J. Virol 81:13631-13639, 2007; Crump et al., J. Virol 81:7380-7387, 2007)。由於 VSP4 與基質蛋白質的後期功能區交互作用，此意味需要基質蛋白質用於出芽，以及作為一個必然結果，用於 VLP 生產。然而，如同本文中所描述的，當將 TM/CT 區域以流感 HA 的那些者

取代時，狂犬病以及 VZV VLP 可在沒有基質蛋白質下生產。在不希望受理論約束的情況下，此意味嵌合作用可消除對狂犬病與 VZV 之 VLP 生成之基質蛋白質共同表現的依賴。

將如同上述的病毒三聚表面蛋白質之膜外區域融合至穿膜區域以及胞質尾區域 (TM/CT)，從而使病毒三聚表面蛋白質相關於 TM/CT 為異源的。此 TM/CT 可以是來自流感血球凝集素 (HA) 的 TM/CT，例如來自 H5 或 H3 的 TM/CT，例如但不限於 A/印尼/5/05 亞型 (H5N1；「H5/Indo」；GenBank 登錄號 ABW06108.1)、H5 A/越南/1194/2004 (A-越南；GenBank 登錄號 ACR48874.1)、H5 A/安徽/1/2005 (A-安徽；GenBank 登錄號 ABD28180.1)；H3 A/布里斯班/10/2007 (「H3/Bri」；GenBank 登錄號 ACI26318.1)、H3 A/威斯康辛/67/2005 (A-WCN；GenBank 登錄號 ABO37599.1)。數個 H3 與 H5 序列邊界之 TM/CT 係於 WO 2010/148511 中描述 (將其以引用的方式併入本文)。舉例來說，不將其視為限制 TM/CT 之胺基酸序列，可包括：

H5 (A/印尼/05/2005) TM/CT (SEQ ID NO : 41) :

QILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRIC

I

H3 (A/布里斯班/10/2007) TM/CT (SEQ ID NO : 42) :

DWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI

以及編碼 SEQ ID NO : 41 或 42 之胺基酸序列的任何核

苷酸序列。

在本發明中提到的特定核酸序列，可以是「大體上同源的」或「大體上相似」於與一或多於一如同本文所定義的核苷酸序列在嚴格的雜交條件下雜交之序列或互補序列。當至少大約 70%或更佳地 75%之核苷酸與定義長度之核苷酸序列相配時，序列為「大體上同源」或「大體上相似」，規定此類同源序列表現此序列的一或多於一之特性，或如同本文所描述之編碼產物。舉例來說，來自病毒三聚表面蛋白質之大體上同源的膜外區域，其與由 H3 或 H5 獲得的穿膜區域以及胞質尾區域融合、與 H3 或 H5 之 TM/CT 大體上同源的穿膜區域以及胞質尾並且融合至來自病毒三聚表面蛋白質之膜外區域，或來自病毒三聚表面蛋白質之大體上同源的 TM/CT 與大體上同源的膜外區域兩者，以形成 VLP。嵌合蛋白質的正確折疊對於蛋白質的穩定性、集合體 (multimer) 的形成、VLP 的形成與功能可能是重要的。蛋白質的折疊可被一或更多因素影響，其包括但不限於，蛋白質的序列、蛋白質的相對豐度、細胞內的擁擠程度、可結合或暫時結合於折疊的、部分折疊的或未折疊的蛋白質之輔助因子的可得性。

這種序列相似性可使用核苷酸序列比對程序測定，例如在 DNASIS 中提供者 (使用例如但不限於下列參數：GAP 懲罰 5、頂對角線 5#、固定 GAP 懲罰 10、k-元組 2、浮動差距 10 以及視窗尺寸 5)。然而，序列對齊比對的其他方法為

本領域熟知的，例如 Smith & Waterman 演算法 (1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482)、Needleman & Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970)、Pearson & Lipman (1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444) 以及經由這些演算法之計算實施 (GAP、BESTFIT、FASTA 以及 BLAST，其經由 NIH 提供)，或經由手動對齊以及目視檢查 (見例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. 1995 supplement)。或於嚴格的條件下使用南方或北方雜交 (見 Maniatis *et al.*, in *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)。較佳地，大體上同源的序列表現出對於所定義長度分子至少約 80% 以及最佳地至少約 90% 之序列相似性。

此類嚴格雜交條件的一個範例可為於 65°C 下在 4 X SSC 中雜交隔夜 (約 16-20 小時)，接著於 65°C 下在 0.1 X SSC 中清洗 1 小時，或於 65°C 下在 0.1 X SSC 中清洗 2 次，每次 20 或 30 分鐘。替代地範例性嚴格雜交條件可為於 42°C 下在 50% 甲醯胺、4 X SSC 中隔夜 (16-20 小時)，接著於 65°C 下在 0.1 X SSC 中清洗 1 小時，或於 65°C 下在 0.1 X SSC 中清洗 2 次，每次 20 或 30 分鐘，或於 65°C 下在 Church 磷酸鹽緩衝水溶液 (7% SDS; 0.5M NaPO₄ 緩衝液 pH 7.2; 10 mM EDTA) 中隔夜 (16-20 小時) 的雜交，針對獨特的序列區域伴隨於 50°C 下在 0.1 X SSC、0.1% SDS 的兩次清洗，每次 20 或 30 分鐘，或者於 65°C 下在 2 X SSC、0.1% SDS 的兩

次清洗，每次 20 或 30 分鐘。

編碼嵌合多肽、嵌合蛋白質、融合蛋白質、嵌合病毒蛋白質或嵌合病毒三聚表面蛋白質的核酸可描述為「嵌合核酸」或「嵌合核苷酸序列」。舉例來說，其不認為是限制，可將包含嵌合 HIV 蛋白質、嵌合狂犬病病毒蛋白質、嵌合 VZV 蛋白質、嵌合 SARS 或嵌合伊波拉病毒蛋白質的類病毒顆粒描述為「嵌合 VLP」。

由「嵌合蛋白質」或「嵌合多肽」，亦稱為融合蛋白質，它意指為包含來自兩個或多於兩個來源的胺基酸序列之蛋白質或多肽，其例如但不限於來自病毒三聚表面蛋白質或其片段的膜外區域，舉例來說 F 蛋白質（例如 RSV、麻疹、腮腺炎、新城病）、S 蛋白質（例如 SARS）、env 蛋白質（HIV）、G 蛋白質（狂犬病）、套膜糖蛋白例如 E、B、C、I、H（VZV、巨細胞病毒、疱疹病毒、艾巴氏病毒）、GP 糖蛋白（例如伊波拉、馬堡）、血球凝集素（例如天花病毒、牛痘病毒），以及例如 HA 的 TM/CT，其以單一多肽融合。此嵌合蛋白質或多肽可包括與多肽或蛋白質的剩餘部分相同或同源的信號肽。

該用語「信號肽」為本領域熟知的並且一般意指胺基酸的短（大約 5-30 胺基酸）序列，一般發現於引導新轉譯的多肽轉位至特定胞器或協助多肽鏈的特定區域相對於其他者的定位之多肽的 N 端。作為非限制性的範例，此信號肽可能以蛋白質的轉位至內質網為目標及/或協助相對於新生

多肽之膜錨定區域之 N 端近端區域的定位，以協助成熟蛋白質(不視為限制之例如成熟 HA 蛋白質)的切割與折疊。

信號肽 (SP) 對蛋白質或病毒蛋白質可為原生的，或是信號肽相關於蛋白質或表現的病毒蛋白質之一級序列可為異源的。蛋白質或病毒蛋白質可包含來自第一型流感、亞型或病毒株的信號肽，伴隨來自一或多於一不同型流感、亞型或病毒株之 HA 的平衡。舉例來說可使用 HA 的 B、H1、H2、H3、H5、H6、H7、H9 亞型或流感 B 型的原生信號肽以在植物系統中表現嵌合病毒蛋白質。在本發明的一些具體實施例中，SP 可能是流感 B 型、H1、H3 或 H5；或是 H1/Bri、H1/NC、H5/Indo、H3/Bri 或 B/Flo 亞型。在一些具體實施例中，SP 可能是 HIV Env 蛋白質、狂犬病 G 蛋白質、VZV 醣蛋白 E、SARS 醣蛋白 S 或伊波拉病毒套膜醣蛋白。

信號肽亦可能是非原生的，舉例來說，來自蛋白質、病毒蛋白質、病毒三聚表面蛋白質或病毒三聚表面蛋白質以外的病毒血球凝集素，或來自植物、動物或細菌的多肽。可使用的信號肽的一個非限制性範例為苜蓿草 (alfalfa) 蛋白質雙硫鍵異構酶 (PDI SP；登錄號 Z11499 之核苷酸 32-103)。

因此本發明提供包含原生的或非原生之信號肽的嵌合病毒蛋白質，以及編碼此類嵌合病毒蛋白質之核酸。

在其他特性中，表現之嵌合病毒蛋白質的正確折疊對蛋白質的穩定性、單體集合體的生成、VLP 的生成、嵌合病毒蛋白質的功能與嵌合病毒蛋白質被抗體辨認可能是重要

的。蛋白質的折疊與累積可被一或更多因素影響，其包括但不限於，蛋白質的序列、蛋白質的相對豐度、細胞內的擁擠程度、於細胞隔間內的 pH、可結合或暫時結合於折疊的、部分折疊的或未折疊的蛋白質之輔助因子的可得性、一或更多帶位子蛋白質的存在，或諸如此類者。

熱休克蛋白 (Hsp) 或壓力蛋白 (stress protein) 為帶位子蛋白質的範例，其可參與於各種細胞程序包括蛋白質合成、細胞內運輸、錯誤折疊的預防、蛋白質聚集的預防、蛋白質複合體的組裝與分解、蛋白質折疊以及蛋白質解聚作用。此類帶位子蛋白質的範例包括但不限於 Hsp60、Hsp65、Hsp 70、Hsp90、Hsp100、Hsp20-30、Hsp10、Hsp100-200、Hsp100、Hsp90、Lon、TF55、FKBPs、環菲林、ClpP、GrpE、泛蛋白、鈣聯蛋白以及蛋白質雙硫鍵異構酶(見例如 Macario, A.J.L., *Cold Spring Harbor Laboratory Res.* 25:59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. *Ann. Rev. Genet.* 27:437-496 (1993); 美國專利號 5,232,833)。如同本文所描述，可使用帶位子蛋白質例如但不限於 Hsp40 與 Hsp70 以確保嵌合病毒蛋白質的折疊。

Hsp70 的範例包括來自哺乳動物細胞的 Hsp72 以及 Hsc73、來自細菌的 DnaK，特別地為分枝桿菌例如麻瘋分枝桿菌 (*Mycobacterium leprae*)、結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 以及牛分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*) (例如 Bacille-Calmette Guerin：此處提及為 Hsp71)。來自大腸桿菌

(*Escherichia coli*)、酵母菌以及其他原核生物的 DnaK，以及來自真核生物例如阿拉伯芥 (*A. thaliana*) 的 BiP 與 Grp78 (Lin et al. 2001 Cell Stress and Chaperones 6:201-208)。Hsp70 的特定範例為阿拉伯芥 Hsp70 (由 Genbank ref: AY120747.1 編碼)。Hsp70 能專一地結合 ATP 以及未折疊的多肽與肽，從而參與蛋白質折疊與展開以及在蛋白質複合體之組裝與分解。

Hsp40 的範例包括來自原核生物例如 *E. coli* 與分枝桿菌的 DnaJ 以及來自真核生物例如苜蓿草 (alfalfa) 之 HSJ1、HDJ1 與 Hsp40 (Frugis et al., 1999. Plant Molecular Biology 40:397-408)。Hsp40 的特定範例為 *M. sativa* MsJ1 (Genbank ref: AJ000995.1)。Hsp40 扮演於其他細胞活動中之蛋白質折疊、耐熱性與 DNA 複製中的分子帶位子角色。

在 Hsps 中，Hsp70 以及其共同帶位子 Hsp40 涉及在合成完成之前轉譯與新合成之多肽的穩定。在不希望受理論約束的情況下，Hsp40 結合至未折疊 (新生或新轉移) 的多肽之疏水區 (hydrophobic patches)，因而促進 Hsp70-ATP 複合體與多肽的交互作用。ATP 水解導致多肽、Hsp70 與 ADP 間穩定複合體的生成以及 Hsp40 的釋出。Hsp70-ADP 複合體與多肽疏水區的結合防止它們與其他疏水區的交互作用，防止不正確折疊以及與其他蛋白質之聚集體的形成 (於 Hartl, FU. 1996. Nature 381:571-579 中回顧)。

原生帶位子蛋白質可能促進低表現量的重組蛋白質之

正確折疊，但隨著表現量的增加，原生帶位子的豐度可能變為限制因素。在農桿菌轉殖之葉的嵌合病毒蛋白質之高表現量可能導致嵌合病毒蛋白質在細胞溶質中的累積，並且一或多於一的帶位子蛋白質例如 Hsp70、Hsp40 或 Hsp70 與 Hsp40 兩者的共同表現可能降低錯誤折疊或聚集的蛋白質量，並且增加表現容許類病毒顆粒生成的三級與四級結構特徵之蛋白質數量。

因此，本發明亦提供在植物中生產嵌合病毒蛋白質 VLP 的方法，其中編碼嵌合病毒蛋白質的第一核酸係與編碼帶位子的第二核酸共同表現。可將第一與第二核酸於同一步驟引至植物中，或可相繼地引至植物中。

根據本發明之由病毒衍生蛋白質生產的嵌合 VLP 不包含病毒基質或核心蛋白質。病毒基質蛋白質為組織與維持病毒顆粒結構的蛋白質。病毒基質蛋白質通常與細胞膜直接交互作用並且可涉及出芽程序。病毒核心蛋白質為構成核鞘的部分以及典型地直接關聯於病毒核酸的蛋白質。病毒基質或核心蛋白質的範例為流感 M1、RSV M 以及反轉錄病毒 gag 蛋白質。已知 M1 蛋白質結合 RNA (Wakefield L., and Brownlee G.G, Nucl Acids res 11:85698580, 1989)，其為 VLP 製備的汙染。當獲得嵌合 VLP 產物之管理批准時，RNA 的存在是不希望的，因此缺少 RNA 的嵌合 VLP 製備可能是有利的。

本申請書中的用語「調節區域」、「調節元素」或「啟動

子」之使用係意圖典型地反映核酸之部分，但非總是基因的蛋白質編碼區域上游，該編碼區域可由 DNA 或 RNA 或者 DNA 與 RNA 兩者組成。當調節區域為具活性的，並且與興趣基因於操作的結合或操作地連結時，此可造成興趣基因的表現。調節元素可能媒介器官專一性或控制進展的或時序的基因活化。「調節區域」可包括啟動子元素、表現基礎啟動子活性之核心啟動子元素、對回應外部刺激為可誘導之元素、媒介啟動子活性之元素例如負調控元素或轉錄增強子。如同本文使用的，「調節區域」亦可包括轉錄之後具活性的元素，舉例來說，調節基因表現的調節元素例如轉譯與轉錄增強子、轉譯與轉錄抑制子、上游活化序列以及 mRNA 不穩定性決定因素。這些後者因素中的幾個可位於編碼區域近端。

在此揭露內容之上下文中，該用語「調節元素」或「調節區域」典型地意指通常但非總是於結構基因的編碼序列上游 (5') 之 DNA 序列，其經由提供 RNA 聚合酶及/或轉錄需要的其他因子之辨識而於特定位點開始以控制編碼區域的表現。然而，要了解位於內含子內的其他核苷酸序列或序列的 3' 亦可有助於興趣編碼區域表現之調節。提供 RNA 聚合酶或其他轉錄元素辨識以確保於特定位點起始之調節元素的範例為啟動子元素。大部分但非全部地，真核生物的啟動子元素包含 TATA 盒、由腺苷酸與胸腺苷酸鹼基對組成之保留核酸序列，其通常位於轉錄起始位點上游大約 25 鹼基

對。啟動子元素包含負責轉錄的起始之基礎啟動子元素，以及修飾基因表現的其他調節元素（如上所列者）。

有幾種類型的調節區域，包括那些發展性調節，可誘導的（inducible）或非誘導的（constitutive）。被發展性調節的或在其控制之下控制基因的分化表現的調節區域，係於那器官或組織發育期間的特定時間於某些器官或器官之組織內活化。然而，發展性調節的一些調節區域可於特定器官或組織內於特定發育階段較佳地活化，它們也可以發展性調節的方式具有活性，或同樣地在植物中的其他器官或組織位在基本量。組織特異的調節區域之範例，例如 see-specific 調節區域，其包括 napin 啟動子，以及 cruciferin 啟動子（Rask et al., 1998, *J. Plant Physiol.* 152: 595-599；Bilodeau et al., 1994, *Plant Cell* 14: 125-130）。葉特異性啟動子的範例包括 plastocyanin 啟動子（見 US 7,125,978，將其以引用的方式併入本文）。

可誘導的調節區域是能夠對誘導子反應而直接或間接活化一或更多 DNA 序列或基因之轉錄者。在缺少誘導子下，DNA 序列或基因將不會被轉錄。典型地特異性地結合至可誘導調節區域以活化轉錄作用之蛋白質因子可以未活化形式存在，其再被誘導子直接或間接轉變為活化形式。然而，蛋白質因子亦可不存在。誘導子可以是化學劑例如蛋白質、代謝產物、生長調節劑、除草劑或酚類化合物或由熱、冷、鹽、有毒元素直接施加或經由病原體或疾病之劑（例如

病毒)之作用間接施加的生理壓力。可將包含可誘導調節區域之植物細胞經由外部應用誘導子至細胞或植物(例如經由噴灑、澆灌、加熱或類似的方法)而暴露於誘導子。可誘導的調節元素可衍生自植物或非植物基因(例如 Gatz, C. and Lenk, L.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358; 將其以引用的方式併入)。潛在的可誘導啟動子之範例包括但不限於可由四環黴素誘導之啟動子(Gatz, C., 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89-108; 將其以引用的方式併入)、可由類固醇誘導之啟動子(Aoyama, T. and Chua, N.H., 1997, Plant 1. 2, 397-404; 將其以引用的方式併入)以及可由乙醇誘導之啟動子(Salter, M.G., et al., 1998, Plant 10urnal 16, 127-132; Caddick, M.X., et al., 1998, Nature Biotech. 16, 177-180, 將其以引用的方式併入)、可由細胞分裂素誘導之 IB6 與 CKI 1 基因(Brandstatter, I. and Kieber, J.J., 1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982-985; 將其以引用的方式併入)以及可由生長素誘導之元素 DR5 (Ulmasov, T., et al., 1997, Plant Cell 9, 1963-1971; 將其以引用的方式併入)。

結構性調節區域於整個植物的各部分以及持續地於整個植物發育中導引基因表現。已知的結構性調節元素包括關聯於 CaMV 35S 轉錄物之啟動子(Odell et al., 1985, Nature, 313: 810-812)、稻肌動蛋白 1(Zhang et al., 1991, Plant Cell, 3: 1155-1165)、肌動蛋白 2(An et al., 1996, Plant J., 10:

107-121) 或 tms 2 (U.S. 5,428,147, 將其以引用的方式併入本文) 以及磷酸三碳糖異構酶 (triosephosphate isomerase 1) 基因 (Xu et al., 1994, *Plant Physiol.* 106: 459-467)、玉米泛蛋白 1 基因 (Cornejo et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646)、阿拉伯芥泛蛋白 1 與 6 基因 (Holtorf et al., 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646) 以及菸草轉譯起始因子 4A 基因 (Mandel et al., 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 995-1004)。

該用語「結構性」(constitutive) 如同本文中所使用, 不一定指基因在非誘導調節區域的控制下於所有細胞類型中以相同量表現, 而是指即使常常觀察到豐度的變化, 基因在廣泛的細胞類型中表現。非誘導的調節元素可與其他序列耦合以進一步增強它們操作性結合的核苷酸序列之轉錄及/或轉譯。舉例來說, CPMV-HT 系統係衍生自豇豆嵌紋病毒 (CPMV) 的未轉譯區域並且展現相關編碼序列之增強轉譯。所謂「原生」意指核酸或胺基酸序列為天然地發生, 或「野生型」。所謂「操作性地連結」意指使特定序列例如調節元素以及興趣編碼區域直接或間接交互作用以進行所欲功能, 例如基因表現之媒介或調節。操作性地連結序列之交互作用可例如經由與操作性地連結序列交互作用的蛋白質媒介。

嵌合蛋白質或多肽可在包含以病毒為基礎的、DNA 或 RNA 表現系統之表現系統中表現, 例如但不限於豇豆嵌紋病毒屬 (comovirus) 為基礎的表現卡匣以及雙生病毒

(geminivirus) 為基礎的擴增元素。

如同本文所描述之表現系統可包含以雙向 (bipartite) 病毒或帶有兩條環狀單股基因組的病毒為基礎之表現卡匣。舉例來說，兩條環狀單股病毒可能是豇豆嵌紋病毒科 (Comoviridae)。豇豆嵌紋病毒科之屬包括豇豆嵌紋病毒屬、線蟲核多角體病毒屬 (Nepovirus)、豆科病毒屬 (Fabavirus)、櫻桃銼葉病毒屬 (Cheravirus) 以及溫州蜜柑矮縮病毒屬 (Sadwavirus)。豇豆嵌紋病毒屬包括豇豆嵌紋病毒 (CPMV)、豇豆嚴重嵌紋病毒 (CPSMV)、胡瓜嵌紋病毒 (SqMV)、紅三葉草斑駁病毒 (RCMV)、扁豆斑駁病毒 (BPMV)、蕪菁環斑病毒 (TuRSV)、蠶豆真嵌紋病毒 (BBtMV)、蠶豆染色病毒 (BBSV)、蘿蔔嵌紋病毒 (RaMV)。包含對本發明的各方面有用的增強子元素之豇豆嵌紋病毒 RNA-2 序列的範例包括但不限於：CPMV RNA-2 (GenBank 登錄號 NC_003550)、RCMV RNA-2 (GenBank 登錄號 NC_003738)、BPMV RNA-2 (GenBank 登錄號 NC_003495)、CPSMV RNA2 (GenBank 登錄號 NC_003544)、SqMV RNA-2 (GenBank 登錄號 NC_003800)、TuRSV RNA-2 (GenBank 登錄號 NC_013219.1)、BBtMV RNA-2 (GenBank 登錄號 GU810904)、BBSV RNA2 (GenBank 登錄號 FJ028650)、RaMV (GenBank 登錄號 NC_003800)。

兩條環狀單股病毒豇豆嵌紋病毒 RNA 基因組的片段意

指 RNA-1 與 RNA-2。RNA-1 編碼涉及複製的蛋白質而 RNA-2 編碼細胞-細胞移動所需的蛋白質以及兩蛋白衣蛋白質。可使用任何合適的以豇豆嵌紋病毒為基礎之卡匣包括 CPMV、CPSMV、SqMV、RCMV 或 BPMV，舉例來說，表現卡匣可以 CPMV 為基礎。

「表現卡匣」意指包含在宿主細胞中在適合的啟動子或興趣核酸轉錄的其他調節元素的控制之下、並且操作性地連結於此之興趣核酸的核苷酸序列。

表現系統亦可包含來自雙生病毒的擴增元素，舉例來說，來自豆類黃矮病毒 (BeYDV) 之擴增元素。BeYDV 屬於適應於雙子葉植物的 Mastreviruses 屬。BeYDV 為具有單股環狀 DNA 基因組的單體 (monopartite) 並且可經由旋轉環狀機制複製至非常高的拷貝數。已使用 BeYDV 衍生之 DNA 複製子載體系統在植物中的快速高產量蛋白質生產。

如同本文中所使用的，該術語「擴增元素」意指包含雙生病毒基因組一或更多長間隔區 (long intergenic region, LIR) 的至少部分之核酸片段。如同本文中所使用的，「長間隔區」意指包含能夠經由雙生病毒 Rep 蛋白質媒介切除及複製之 rep 結合位點的長間隔區的區域。在一些方面，包含一或更多 LIR 的核酸片段可進一步包含雙生病毒基因組的短間隔區 (SIR)。如同本文中所使用的，「短間隔區」意指互補之股 (Mastrevirus 之短 IR (SIR))。任何合適的雙生病毒衍生之擴增元素可用於本文。見舉例來說 WO2000/20557；

WO2010/025285 ; Zhang X. et al. (2005, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93, 271-279) 、Huang Z. et al. (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 103, 706-714) 、Huang Z. et al (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 106, 9-17) ; 將其以引用的方式併入本文。

可將嵌合蛋白質或嵌合多肽生產為來自嵌合核苷酸序列的轉錄物，與在合成後切割的嵌合蛋白質或嵌合多肽，並根據需要連結以形成單體聚合體蛋白質。因此，嵌合蛋白質或嵌合多肽亦包括含有經由雙硫橋 (disulphide bridge) 連結的次單元之蛋白質或多肽 (即單體聚合體蛋白質)。舉例來說，可將含有來自二或多於二來源之胺基酸序列的嵌合多肽處理成次單元以及由雙硫橋連結的次單元，以生產嵌合蛋白質或嵌合多肽。

根據本發明各種具體實施例之嵌合病毒蛋白質包含來自流感 HA 之穿膜區域與胞質尾 (TM/CT)。TM/CT 可以是來自流感病毒的任何型、亞型的原生 HA TM/CT，其包括，舉例來說，B、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 以及 H16 型或亞型。H1、H3、H5 或 B 型或亞型的非限制性範例包括 A/新喀里多尼亞/20/99 亞型 (H1N1)、H1 A/加州/04/09 亞型 (H1N1)、A/印尼/5/05 亞型 (H5N1)、A/布里斯班/59/2007、B/佛州/4/2006 以及 H3 A/布里斯班/10/2007 (見例如 WO2009/009876 ; WO 2009/076778 ; WO 2010/003225 ; WO 2010/003235，將其以

引用的方式併入本文)。進一步地，TM/CT 可以是那些 HA TM/CT 中之任一者，其中已刪除 1、2、3、4 或 5 胺基酸，或已將 1、2、3、4 或 5 胺基酸之任何種類的間隔子或連結子序列加於其上。

較佳地，TM/CT 係來自 H5 或 H3，其例如但不限於 A/印尼/5/05 亞型 (H5N1；“H5/Indo”；GenBank 登錄號 ABW06108.1)、H5 A/越南/1194/2004 (A-越南；GenBank 登錄號 ACR48874.1)、H5 A/安徽/1/2005 (A-安徽；GenBank 登錄號 ABD28180.1)；H3 A/布里斯班/10/2007 (「H3/Bri」；GenBank 登錄號 ACI26318.1)、H3 A/威斯康辛/67/2005 (A-WCN；GenBank 登錄號 ABO37599.1)。幾個 H3 與 H5 序列邊界的 TM/CT 描述於 WO 2010/148511 (將其經由引用的方式併入本文)。TM/CT 胺基酸序列之非限制性範例包括 SEQ ID NO：41 與 42，以及編碼 SEQ ID NO：41 與 42 之胺基酸序列的任何核苷酸序列。

在流感病毒的血球凝集素中容許胺基酸變化。此類變化提供不斷被識別的新病毒株。新病毒株間的感染性可能改變。然而，維持隨後形成 VLP 的血球凝集素三聚體的形成。因此，本發明提供包含血球凝集素胺基酸序列的嵌合病毒蛋白質，或編碼包含血球凝集素胺基酸序列的嵌合病毒蛋白質之核酸，其在植物中生成 VLP，並且包括已知序列以及可能發展出的變異型 HA 序列。

該用語「類病毒顆粒」(VLP)或「類病毒顆粒」或「VLP」

意指自組裝並且包含結構蛋白質例如嵌合病毒蛋白質之結構。VLP 與嵌合 VLP 一般地在形態上與抗原性為類似於感染中產生的病毒粒子，但缺乏足以複製的遺傳資訊因而為非感染性的。VLP 與嵌合 VLP 可在合適的宿主細胞包括植物宿主細胞中生產。在於合適條件下由宿主細胞萃取並且分離與進一步純化之後，VLP 與嵌合 VLP 可純化為完整結構。

本發明之嵌合 VLP 可在以缺乏將蛋白質唾液酸化的能力為特徵之宿主細胞中生產，舉例來說植物細胞、昆蟲細胞、真菌以及其他包括海綿、腔腸動物門、環節動物門、節肢動物門、軟體動物門、線蟲動物門、輪形動物門、扁形動物門、毛顎動物門、有觸手綱、披衣菌屬、螺旋體門、革蘭氏陽性菌、藍綠藻、古細菌以及諸如此類的生物體。見例如 Gupta et al., 1999. *Nucleic Acids Research* 27:370-372 ; Toukach et al., 2007. *Nucleic Acids Research* 35:D280-D286 ; Nakahara et al., 2008. *Nucleic Acids Research* 36:D368-D371 。

本發明亦提供由表現嵌合 VLP 之細胞質膜獲得脂質套膜之嵌合 VLP。舉例來說，若於植物為基礎的系統表現嵌合病毒，造成的嵌合 VLP 可由植物細胞的質膜獲得脂質套膜。

一般而言，該用語「脂質」意指脂溶性（親油的）、自然發生的分子。根據本發明的一些方面在植物中生產的嵌合 VLP 可與植物衍生的脂質複合。植物衍生的脂質可能是以脂雙層的形式，並且可進一步包含圍繞 VLP 的套膜。植物衍生的脂質可能包含生產 VLP 植物之質膜的脂質組成物，其

包括磷脂質、三-、二-以及單甘油酯，以及脂溶性固醇或包含固醇的代謝產物。範例包括磷脂醯膽鹼 (PC)、磷脂醯乙醇胺 (PE)、磷脂醯肌醇、磷脂醯絲胺酸、鞘髓磷脂、植物固醇或其結合物。植物衍生的脂質可替代的稱為「植物脂」。植物固醇的範例包括油菜籽固醇、豆固醇、麥角固醇、菜子固醇、d-7-豆固醇、d-7-燕麥固醇、胡蘿蔔固醇、麥固醇、24 甲基膽固醇、膽固醇 或 β -麥固醇-見例如 Mongrand et al., 2004。如同本領域之技術人員將了解的，細胞質膜的脂質組成可隨著獲得細胞之細胞或生物體或物種的培養或生長條件而變化。一般而言， β -麥固醇為最豐富的植物固醇。

細胞膜一般包含脂雙層以及各種功能之蛋白質。特定脂質的局部濃度可發現於脂雙層，稱為「脂筏」(lipid rafts)。這些脂筏微區域可富含神經脂質與固醇。在不希望受理論約束的情況下，在胞飲與胞吐作用、病毒或其他感染性之劑的進入或外出、細胞間訊息傳遞、與細胞或個體的其他結構組成成分例如細胞內與細胞外間質之交互作用中，脂筏可能具有重要角色。

在植物內生產之 VLP 可誘導包含植物特異 N-聚醣之嵌合病毒蛋白質。因此，此發明亦提供包含具有植物特異 N-聚醣之嵌合病毒蛋白質的 VLP。

此外，已知植物中 N-聚醣的修飾作用（見例如 U.S. 60/944,344；將其以引用的方式併入本文）並且可生產具有修飾 N-聚醣之嵌合病毒蛋白質。含有修飾的醣基化模式之

嵌合病毒蛋白質，舉例來說具有降低的海藻糖苷化、木糖苷化或海藻糖苷化與木糖苷化兩者，可獲得 N-聚醣，或可獲得具有修飾的醣基化模式之嵌合病毒蛋白質，其中蛋白質缺乏海藻糖苷化 (fucosylation)、木糖苷化 (xylosylation) 或兩者，以及含有增加的醣基化。此外，轉譯後修飾之調節，舉例來說，當相較於表現嵌合病毒蛋白質之野生型植物，尾端半乳糖的添加可造成表現之嵌合病毒蛋白質海藻糖苷化與木糖苷化的降低。

舉例來說，不將其視為限制，具有經修飾的醣基化模式之嵌合病毒蛋白質的合成可經由共同表現嵌合病毒蛋白質與編碼 β -1.4-半乳糖基轉移酶 (GalT) 的核苷酸序列而達成，其例如但不限於哺乳動物 GalT 或人類 GalT，然而亦可使用來自另一來源的 GalT。亦可將 GalT 的催化區域融合至 N-乙醯葡萄糖胺移轉酶 (N-acetylglucosaminyl transferase, GNT1) 的 CTS 區域 (即，胞質尾、穿膜區域、幹區域) 以生產 GNT1-GalT 混合酶，並可將混合酶與嵌合病毒蛋白質共同表現。嵌合病毒蛋白質亦可與編碼 N-乙醯葡萄糖胺移轉酶 III (N-acetylglucosaminyltransferase III, GnT-III) 的核苷酸序列，其例如但不限於哺乳動物 GnT-III 或人類 GnT-III，亦可使用來自其他來源的 GnT-III 共同表現。此外，亦可使用包含融合至 GnT-III 的 GNT1 CTS 之 GNT1-GnT-III 混合酶。

因此本發明亦提供包含具有經修飾之 N-聚醣的嵌合病

毒蛋白質之 VLP。

在不希望受理論約束的情況下，在嵌合病毒蛋白質之植物 N 聚醣的存在可經由促進由抗原呈現細胞對嵌合病毒蛋白質之結合而刺激免疫反應。使用植物 N 聚醣的免疫反應刺激已由 Saint-Jore-Dupas et al. (2007) 提出。此外，VLP 的結構對於抗原呈現以及當與植物衍生之脂質層複合時增強 VLP 的佐劑效果可能是有利的。

VLP 可經由例如血凝試驗、電子顯微鏡或經由尺寸排阻色層分析法評估結構與尺寸。

對於尺寸排阻色層分析法，可將總可溶性蛋白質從植物組織中經由將冷凍粉碎的植物材料樣本在萃取緩衝液中均質化 (Polytron) 而萃取，以及經由離心移除不可溶材料。以冰冷丙酮或 PEG 沉澱亦可以是有利的。將可溶性蛋白質量化，並且將萃取物通過 SephacrylTM 管柱，舉例來說 SephacrylTM S500 管柱。可使用 Blue Dextran 2000 作為校正標準品。在色層分析後，可將餾分經由免疫墨點法進一步分析以測定餾分的蛋白質補體。

分離的餾分可以是例如上清液 (若經離心、沉積或沉澱) 或過濾液 (若經過濾)，且富含蛋白質或外殼構造蛋白質，例如舉例來說類簇生結構或較高階層、較高分子量的顆粒例如 VLP。分離的餾分可經由例如額外的離心步驟、沉澱、層析步驟 (例如，尺寸排阻、離子交換、親和力層析)、切向流過濾或其結合而進一步處理以分離、純化、濃縮或其結合

蛋白質或外殼構造蛋白質。可經由使用合適的偵測抗體、毛細管電泳、電子顯微鏡或對本領域的技術人員將是顯著的任何其他方法例如原生或 SDS-PAGE、西方墨點分析確認純化蛋白質或外殼構造蛋白質的存在。

溶析概況可視所使用的溶析條件而變化。第 7、80 以及 11B 圖顯示包含嵌合 VLP 的植物萃取物之尺寸排阻色層分析法溶析概況之範例。在這個情況下，包含嵌合 HIV、嵌合狂犬病 G 以及嵌合 VZV 病毒三聚表面蛋白質的 VLP 於管柱之排除液量 (void volume) 溶析出，簇生物與高分子量結構由大約餾分 13 至 14 溶析，以及低分子量或嵌合病毒三聚表面蛋白質的可溶性形式由餾分約 15 至約 17 溶析。

可將 VLP 使用任何合適的方法例如化學或生化萃取以純化或萃取。VLP 對乾燥、熱、pH、表面活性劑與清潔劑相對地敏感。因此使用最大化產量、最小化帶有細胞蛋白質之 VLP 餾分的汙染、維持蛋白質或 VLP 以及當需要時，相關脂質套膜或膜的完整性的方法、放鬆細胞壁以釋出蛋白質或 VLP 的方法可能是有用的。舉例來說，可使用生產原生質體及/或原生質球的方法（見舉例來說 WO 2011/035422，將其以引用的方式併入本文）以獲得如同本文所描述之 VLP。將清潔劑或表面活性劑例如 SDS 或 Triton X-100 的使用最小化或消除對於改善 VLP 萃取產量可能是有利的。可再將 VLP 經由例如電子顯微鏡或經由如上所述之尺寸排阻色層分析法評估結構與尺寸。

本發明之一或多於一或更多的嵌合遺傳基因構築體可於被本發明之核苷酸序列或基因構築體或載體轉化的任何適合的植物宿主中表現。適合的宿主範例包括但不限於包括苜蓿草、油菜籽、甘藍屬、玉米、菸草屬、苜蓿草、馬鈴薯、人參、豌豆、燕麥、水稻、大豆、小麥、小麥、向日葵、棉花以及諸如此類的農作物。

本發明之一或更多嵌合遺傳基因構築體可進一步包含3'不轉譯區域。3'不轉譯區域意指含有包括聚腺苷酸化訊號以及能夠造成 mRNA 處理或基因表現的任何其他調節訊號之 DNA 片段的基因部分。聚腺苷酸化訊號通常以造成追蹤 mRNA 先驅物之3'端的聚腺苷酸的添加為特徵。雖然變化並不少見，聚腺苷酸化訊號通常由對標準形式 5' AATAAA-3'同源性的存在而確認。合適的3'區域之非限制性範例為包含農桿菌屬 (*Agrobacterium*) 腫瘤誘導 (Ti) 質體基因例如胭脂胺酸合成酶 (nopaline synthase, NOS) 基因、植物基因例如大豆貯藏蛋白質基因、1,5-二磷酸核酮糖酶基因的小次單元 (ssRUBISCO; US 4,962,028; 將其以引用的方式併入本文)、用於調節質體藍素表現的啟動子，其描述於 US 7,125,978 (將其以引用的方式併入本文) 的聚腺苷酸化訊號之3'已轉錄非轉譯區域。

本發明之一或更多嵌合遺傳基因構築體亦可能需要包括進一步的增強子，轉譯或轉錄增強子。增強子可位於要轉錄的序列之5'或3'。增強子區域為本領域之技術人員所熟知

的，並且可包括 ATG 起始密碼子、相鄰序列或諸如此類。起始密碼子如果存在，可與編碼序列之讀取框架同相（「對準框架」）以提供已轉錄序列之正確轉譯。

本發明之基因構築體可使用 Ti 質體、Ri 質體、植物病毒載體、直接 DNA 轉化作用、顯微注射、電穿孔等引入植物細胞。此類技術的回顧見例如 Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988) ; Geierson and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988) ; 以及 Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997)。其他方法包括直接 DNA 攝取、脂質體的使用、電穿孔，例如使用原生質體、顯微注射、重金屬微粒子或晶鬚以及真空滲透。見例如 Bilang, et al. (Gene 100: 247-250, 1991)、Scheid et al. (Mol. Gen. Genet. 228: 104-112, 1991)、Guerche et al. (Plant Science 52: 111-116, 1987)、Neuhaus et al. (Theor. Appl Genet. 75: 30-36, 1987)、Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987) ; Howell et al. (Science 208: 1265, 1980)、Horsch et al. (Science 227: 1229-1231, 1985)、DeBlock et al. (Plant Physiology 91: 694-701, 1989)、Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988)、Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and

Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989)、Liu and Lomonosoff (J Virol Meth, 105:343-348, 2002)、美國專利號 4,945,050 ; 5,036,006 ; 以及 5,100,792、於 May 10, 1995 提出之美國專利申請輯編號 08/438,666 , 以及於 Sep. 25, 1992 提出之 07/951,715 (將其所有以引用的方式併入此)。

如下描述的，可使用短暫表現的方法以表現本發明之基因構築體 (見 Liu and Lomonosoff, 2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348 ; 將其以引用的方式併入本文)。替代地，可使用以真空為基礎的短暫表現方法，如同由 Kapila et al., 1997 所描述的 (將其以引用的方式併入本文)。這些方法可能包括，舉例來說但不限於，農桿菌接種 (Agroinoculation) 或農桿菌滲透 (Agro-infiltration)、注射器滲透 (syringe infiltration) 的方法，然而，如上所提亦可使用其他短暫方法。伴隨農桿菌接種、農桿菌滲透或注射器滲透，包含想要的核酸之農桿菌混合物進入組織的細胞間隙，舉例來說，葉、植物的空中部分 (包括莖、葉以及花)、植物的其他部分 (莖、葉、花) 或整株植物。在穿越表皮後，農桿菌感染並轉移 t-DNA 複本至細胞。附加體地轉錄 t-DNA 並且轉譯 mRNA ，導致在感染細胞中之興趣蛋白質的生產，然而，細胞核內的 t-DNA 通過為暫時性的。

為協助轉化的植物細胞之鑑定，可進一步操作本發明的基因構築體以包括植物可選擇標記。有用的可選擇標記包括提供對化學物質具抗性之酵素例如抗生素，舉例來說，健他

黴素 (gentamycin)、潮黴素 (hygromycin)、康黴素 (kanamycin) 或除草劑例如 phosphinothrycin、草甘膦 (glyphosate)、chlorosulfuron 以及諸如此類。類似地，可使用提供可經由顏色改變識別的化合物生產之酵素例如 GUS (β -葡萄糖醛酸酶, beta-glucuronidase) 或螢光例如螢光素酶 (luciferase) 或 GFP。

亦考量本發明部分為基因轉殖植物、包含本發明之嵌合基因構築體的植物細胞或種子。從植物細胞再生整個植物的方法亦為本領域所熟知。一般而言，將轉化的植物細胞於合適的培養基中培養，其可包含選擇性之劑例如抗生素，其使用選擇性標記以促進轉化的植物細胞之鑑定。一旦癒傷組織形成，根據已知的方法採用合適的植物荷爾蒙可促進發芽，並將芽轉移至發根培養基以供植物再生。可再使用植物建立重複之子代，其由種子或使用無性繁殖技術。亦可不使用組織培養產生基因轉殖植物。

本發明包括核苷酸序列：

表格 1. 序列識別編號列表。

序列識別編號：	描述	表格/圖示
1	HIV ConS Δ CFI共同核酸序列 (原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線)	第1 A圖
2	IF-ApaI-SpPDI.c	第1B圖
3	SpPDI-HIV gp145.r	第1C圖

4	IF-SpPDI-gp145.c	第1D圖
5	WtdTm-gp145.r	第1E圖
6	表現卡匣編號995，從PacI(啟動子上游)至AscI(緊接NOS終止子的下游)。消除的SbfI限制位點以粗體。PDISP-HIV ConS ΔCFI下加底線。	第1F圖
7	PDISP-HIV ConS ΔCFI的胺基酸序列	第1G圖
8	IF-H3dTm+gp145.r	第2A圖
9	Gp145+H3dTm.c	第2B圖
10	H3dTm.r	第2C圖
11	表現卡匣編號997，從PacI(啟動子上游)至AscI(緊接NOS終止子的下游)。消除的SbfI限制位點是粗體。PDISP-HIV Con S ΔCFI-A/布里斯班/10/2007 H3 TM+CT下加底線。	第2D圖
12	PDISP-HIV ConSΔCFI-A/布里斯班/10/2007 H3 TM+CT 的胺基酸序列	第2E圖
13	IF-H5dTm+gp145.r	第3A圖
14	Gp145+H5dTm.c	第3B圖
15	IF-H5dTm.r	第3C圖
16	表現卡匣編號999，從PacI(啟動子上游)至AscI(緊接NOS終止子的下游)。消除的SbfI限制位點是粗體。PDISP-HIV ConS ΔCFI-A/印尼/5/2005 H5 TM+CT下加底線。	第3D圖
17	PDISP-HIV ConS ΔCFI-A/ 印尼 /5/2005 H5 TM+CT的胺基酸序列	第3E圖
18	表現卡匣編號172，從XmaI(啟動子質體藍素之上游)至EcoRI(緊接質體藍素終止子的下游)。TBSV P19核酸序列下加底線。	第4A圖
19	TBSV P19沉默抑制子的胺基酸序列。	第4B圖
20	IF-wtSp-VZVgE.c	第10A圖
21	IF-H5dTm+VZVgE.r	第10B圖
22	合成的VZV Ge基因(與來自Genebank 登錄號AY013752.1的nt 3477-5348對應)	第10C圖
23	VZVgE+H5dTm.c	第10D圖

24	表現卡匣編號946，由PacI（啟動子之上游）至AscI（緊接NOS終止子的下游）。VZV gE-A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線。	第 10E 圖
25	VZV gE- A/印尼/5/2005 H5的胺基酸序列 TM+CT	第10F圖
26	IF-wtSp-SARsgS.c	第12B圖
27	IF-H5dTm+SARsgS.r	第12C圖
28	合成的SARS gS基因（與來自Genebank登錄號AY278741.1的nt 21492-25259相對應）（原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線）。	第 12D 圖
29	SARsgS+H5dTm.c	第12E圖
30	表現卡匣編號916，由PacI（啟動子之上游）至AscI（緊接NOS終止子的下游），SARS gS-A/印尼/5/2005 H5 TM+CT下加底線。	第 12F 圖
31	SARS gS- A/印尼/5/2005 H5之胺基酸序列 TM+CT	第12G圖
32	IF-RabG-S2+4.c	第8B圖
33	RabG+H5dTm.r	第8C圖
34	合成的Rab G基因（與來自Genebank 登錄號EF206707的nt 3317-4891對應）（原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線）。 from Genebank accession number EF206707) (Native	第8D圖
35	IF-H5dTm.c	第8E圖
36	由左而右之基因構築體141 t-DNA（下加底線）。2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS表現系統具有質體藍素P19-質體藍素沉默抑制劑表現卡匣	第 8F 圖
37	由2X35S啟動子至NOS終止子的表現卡匣編號1074。PDISP-Rab G -A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線。	第8H圖

38	PDISP-Rab G- A/印尼/5/2005 H5 TM+CT之胺基酸序列	第8I圖
39	由左而右之基因構築體144 t-DNA (下加底線)。具有質體藍素P19-質體藍素沉默抑制劑表現卡匣之2X35SCPMV-HT-PDISP-NOS至BeYDV+複製酶表現系統	第8J圖
40	由右至左之表現卡匣編號1094, BeYDV LIR.PDISP-Rab G -A/印尼/5/2005 H5 TM+CT下加底線	第8L圖
41	H5 (A/印尼/05/2005) TM/CT: QILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGS LQCRICI	
42	H3 (A/布里斯班/10/2007) TM/CT: DWILWISFAISCFLLCVALLGFIMWACQKGNIRCNICI	
43	IF-Opt_EboGP.s2+4c	第13A圖
44	H5iTMCT+Opt_EboGP.r	第13B圖
45	優化合成之GP基因	第13C圖
46	Opt_EboGP+H5iTMCT.c	第13D圖
47	基因構築體1192	第13F圖
48	表現卡匣編號1366	第13G圖
49	來自A/印尼/5/2005之薩伊95伊波拉病毒-H5 TM+CT的PDISP-GP之胺基酸序列	第13H圖

本發明將進一步以下列範例說明。

範例

基因構築體

表格 2：包含編碼 HIV 蛋白質的序列之基因構築體

表現系統	擴增系統	Sp	5'	蛋白質	3'	NptII (Ori tDNA)	質體藍素 -P19 (Ori tDNA)	構築體編號
CPMV HT	-	Wt Sp	-	Gp145ΔCFI	wt TM+CT	L→R	-	994
CPMV HT	-	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	wt TM+CT	L→R	-	995
CPMV HT	-	Wt Sp	-	Gp145ΔCFI	H3 A/Bri TM+CT	L→R	-	996
CPMV HT	-	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H3 A/Bri TM+CT	L→R	-	997
CPMV HT	-	Wt Sp	-	Gp145ΔCFI	H5 A/Indo TM+CT	L→R	-	998
CPMV HT	-	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H5 A/Indo TM+CT	L→R	-	999
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	wt TM+CT	-	L→R	985
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H3 A/Bri TM+CT	-	L→R	987
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	Gp145ΔCFI	H5 A/Indo TM+CT	-	L→R	989

表格 3：包含編碼狂犬病病毒蛋白質的序列之基因構築體

表現系統	擴增系統	Sp	5'	蛋白質	3'	NptII (Ori tDNA)	質體藍 -P19 (Ori tDNA)	素	基 築 號	因 體 編
CPMV HT	-	wt SP	-	狂犬病G	-	-	L→R		1070	
CPMV HT	-	Sp PDI	-	狂犬病G	-	-	L→R		1071	
CPMV HT	BeYDV+rep	wt SP	-	狂犬病G	-	-	L→R		1090	
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	狂犬病G	-	-	L→R		1091	
CPMV HT-		Sp PDI	-	狂犬病G	H5 TM+CT	A/Indo-	L→R		1074	
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	狂犬病G	H5 TM+CT	A/Indo-	L→R		1094	
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	狂犬病 (A447S)	G-		L→R		1072	
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI	-	狂犬病 (A447S)	G-		L→R		1092	

CPMV HT-		Sp PDI -	狂犬病 (M44I+V392G)	G-	-	L→R	1073
CPMV HT	BeYDV+rep	Sp PDI -	狂犬病 (M44I+V392G)	G-	-	L→R	1093
CPMVHT		Sp PDI -	狂犬病 (M44I+V392G)	GH5 TM+CT	A/Indo-	L→R	1075
CPMVHT	BeYDV+rep	Sp PDI -	狂犬病 (M44I+V392G)	GH5 TM+CT	A/Indo-	L→R	1095

表格 4：包含編碼 VZV 蛋白質的序列之基因構築體

表現系統	擴增系統	5'	蛋白質	3'	NptII (Ori tDNA)	藍質體素-P19 (Ori tDNA)	基因構築號
CPMV HT-		Wt Sp	VZV gE	wt TM+CT	L→R		944
CPMV HT-		Sp PDI	VZV gE	wt TM+CT	L→R	-	945
CPMV HT-		Wt Sp	VZV gE	HS TM+CT	A/IndoL→R	-	946
CPMV HT-		Sp PDI	VZV gE	HS TM+CT	A/IndoL→R	-	947

表格 5: 包含編碼 SARS 蛋白質的序列之基因構築體

表現系統	擴增系統	Sp	5'	蛋白質	3'	NptII (Ori tDNA)	質體素-P19 (Ori tDNA)	藍體構築號	基因體編
CPMV HT		Wt Sp	-	SARS gS	wt TM+CT	L→R		914	
CPMV HT	-	Sp PDI	-	SARS gS	wt TM+CT	L→R	-	915	
CPMV HT		Wt Sp	-	SARS gS	H5 TM+CT	A/IndoL→R	-	916	
CPMV HT		Sp PDI	-	SARS gS	H5 TM+CT	A/IndoL→R	-	917	

實施例 1：具有 HIV 蛋白質的表現卡匣之組裝

2X35S-CPMV HT -PDISP-HIV ConS Δ CFI-NOS (基因構築體編號 995)

將融合至 HIV ConS Δ CFI 具有原生的穿膜區域以及胞質尾之編碼苜蓿草 PDI 信號肽的序列轉殖至如下的 2X35S-CPMV-HT 表現系統。首先，將 HIV ConS Δ CFI 基因的核酸序列，其包含原生信號肽與穿膜區域以及胞質尾區域經由 GeneArt AG (Regensburg, Germany) 根據於 Liao et al (2006, *Virology* 353: 268-282) 中揭露的序列合成。HIV ConS Δ CFI 的核酸序列展示於第 1A 圖 (SEQ ID NO: 1)。將苜蓿草蛋白質雙硫異構酶 (PDISP) (核苷酸 32-103; 登錄號 Z11499) 的信號肽經由 Darveau et al. (*Methods in Neuroscience* 26: 77-85 (1995)) 呈現的以 PCR 為基礎之接合方法連結至 HIV ConS Δ CFI。在 PCR 的第一回合，將包含 PDISP 的片段使用引子 IF-ApaI-SpPDI.c (第 1B 圖, SEQ ID NO: 2) 及 SpPDI-HIV gp145.r (第 1C 圖, SEQ ID NO: 3) 擴增，並且以基因構築體編號 540 (對於基因構築體編號 540 的序列見 WO 2010/003225 之第 52 圖, SEQ ID NO: 61, 將其以引用的方式併入本文) 作為模板。將包含 ConS Δ CFI 而不帶原生信號肽的第二片段使用引子 IF-SpPDI-gp145.c (第 1D 圖, SEQ ID NO: 4) 以及 WtdTm-gp145.r (第 1E 圖, SEQ ID NO: 5) 擴增，其使用合成的 ConS Δ CFI 片段 (第 1A 圖, SEQ ID NO: 1) 作為模板。在 PCR 的第二回合，使用引子

IF-ApaI-SpPDI.c(第1B圖,SEQ ID NO:2)與 WtdTm-gp145.r(第1E圖,SEQ ID NO:5)隨著來自 PCR 之第一回合的 PCR 產物兩者作為模板。將生成的 PCR 產物以 ApaI 限制酶消化並轉殖至以 ApaI/StuI 消化之經修飾的 972 基因構築體。將經修飾的 972 受體質體(對於基因構築體編號 972 的原始序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖,SEQ ID NO:134,將其以引用的方式併入本文)處理以消除 2X35S 啟動子上游的 SbfI 限制位點。SbfI 位點經由以 SbfI 消化質體 972 而消除,以 T4 DNA 聚合酶處理生成的質體以移除 3' 外懸並再接合經處理的質體,造成不帶 SbfI 位點之經修飾的 972 質體。給予生成的基因構築體編號 995(第 1F 圖,SEQ ID NO:6)。PDISP-HIV ConS ΔCFI 的胺基酸序列係展示於第 1G 圖(SEQ ID NO:7)。質體 995 示意係展示於第 1H 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

2X35S-CPMV HT -PDISP-HIV ConS ΔCFI+ H3 A/布利斯班/10/2007(TmD + Cyto tail)-NOS(基因構築體編號 997)

將融合至 HIV ConS ΔCFI 以及 H3 A/布利斯班/10/2007 之穿膜以及胞質尾區域之編碼苜蓿草 PDI 信號肽的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈現的以 PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下的 2X35S-CPMV-HT 表現系統。在 PCR 的第一回合,將包含 PDISP-HIV ConS ΔCFI 而不帶原生穿膜以及胞質尾區域的片段使用引子 IF-ApaISpPDI.c(第 1B 圖,SEQ ID NO:2)

以及 IF-H3dTm+gp145.r (第 2A 圖, SEQ ID NO: 8) 擴增, 使用基因構築體 995 (第 1F 圖, SEQ ID NO: 6) 作為模板。將包含 H3 A/布利斯班/10/2007 之穿膜以及胞質尾區域的第二片段使用引子 Gp145+H3dTm.c (第 2B 圖, SEQ ID NO: 9) 以及 H3dTm.r (第 2C 圖, SEQ ID NO: 10) 擴增, 使用基因構築體編號 776 (對於基因構築體編號 776 序列見 WO 2010/003225 之第 60 圖, SEQ ID NO: 69, 將其以引用的方式併入本文) 作為模板。再將來自兩擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之模板, 使用 IF-ApaI-SpPDI.c (第 1B 圖, SEQ ID NO: 2) 以及 H3dTm.r (第 2C 圖, SEQ ID NO: 10) 作為引子。再將第二回合 PCR 的產物以 ApaI 消化並轉殖至以 ApaI 以及 StuI 限制酶消化之基因構築體編號 995 (第 1F 圖, SEQ ID NO: 6) (Figure 1F, SEQ ID NO: 6)。給予生成的基因構築體編號 997 (第 2D 圖, SEQ ID NO: 11)。PDISP-HIV ConS ΔCFI-A/布利斯班/10/2007 H3 TM+CT 的胺基酸序列係展示於第 2E 圖 (SEQ ID NO: 12)。質體 997 示意係展示於第 2F 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

2X35S-CPMV HT-PDISP-HIV ConS ΔCFI-H5 A/印尼 /5/2005 (TmD + Cyto tail) -NOS (基因構築體編號 999)

將融合至 HIV ConS ΔCFI 以及 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質尾區域之編碼苜蓿草 PDI 信號肽的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈

現的以 PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下的 2X35S-CPMV-HT 表現系統。在 PCR 的第一回合，將包含 PDISP-HIV ConS Δ CFI 而不帶原生的穿膜以及胞質尾區域的片段使用引子 IF-ApaISpPDI.c (第 1B 圖, SEQ ID NO: 2) 以及 IF-H5dTm+gp145.r (第 3A 圖, SEQ ID NO: 13) 擴增，使用基因構築體 995 (第 1F 圖, SEQ ID NO: 6) 作為模板。將包含 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質尾區域的第二片段使用引子 Gp145+H5dTm.c (第 3B 圖, SEQ ID NO: 15) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 擴增，使用基因構築體編號 972 (對於基因構築體編號 972 序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖, SEQ ID NO: 134, 將其以引用的方式併入本文) 作為模板。再將來自兩擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之模板，使用 IF-ApaI-SpPDI.c (第 1B 圖, SEQ ID NO: 2) 以及 IFH5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 作為引子。再將第二回合 PCR 的產物以 ApaI 消化並轉殖至以 ApaI 以及 StuI 限制酶消化之基因構築體編號 995 (第 1F 圖, SEQ ID NO: 6)。給予生成的基因構築體編號 999 (第 3D 圖, SEQ ID NO: 16)。PDISP-HIV ConS Δ CFI- A/印尼/5/2005 H5 TM+CT. TM+CT 的胺基酸序列係展示於第 3E 圖 (SEQ ID NO: 17)。質體 999 示意係展示於第 3F 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

質體藍素-P19-質體藍素 (基因構築體編號 172)

如下所述將編碼來自番茄叢矮病毒 (Tomato Bushy Stunt

Virus, TBSV) 的 P19 沉默抑制子的序列轉殖至苜蓿草質體藍素啟動子以及 3'UTR 與終止子之間。將基因構築體編號 R472 (對於組裝見 WO 2010/003225 A1, 將其以引用的方式併入本文, 以及對於 R472 質體之示意見 WO 2010/003225 A1 之第 86 圖) 以限制酶 DraIII (起始 ATG 上游 84 鹼基對) 以及 SacI (終止碼下游 9 鹼基對) 消化以移除包含 84 bp 來自苜蓿草質體藍素啟動子以及編碼 TBSV P19 沉默抑制子的序列之片段。將生成的片段轉殖至先前以 DraIII 與 SacI 消化的基因構築體 540 (對於組裝見 WO 2010/003225, 將其以引用的方式併入本文, 以及對於 540 質體之示意, 見相同專利的第 6 圖)。給予生成的基因構築體編號 172 (SEQ ID NO: 4A, 第 18 圖)。TBSV P19 蛋白質的胺基酸序列係展示於第 4B 圖 (SEQ ID NO: 19)。質體 172 示意係展示於第 4C 圖。

植物生質之製備、接種與農桿菌滲透

該用語「生質」以及「植物物質」如同本文中所使用地係意指反映衍生自植物的任何材料。生質或植物物質可包含整個植物、組織、細胞或其任何部分。進一步地, 生質或植物物質可包含細胞內植物組成物、細胞外植物組成物、植物的液體或固體萃取物或其結合物。進一步地, 生質或植物物質可包含來自植物的葉、莖、果實、根或其結合物的植物、植物細胞、組織、液體萃取物或其結合物, 其。植物的部分可包含植物物質或生質。

圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物係從充滿商業

的泥炭蘚基質之平地中的種子生長。容許植物生長於 16/8 光照週期以及 25°C 日/20°C 夜之溫度制度下的溫室。在播種後三星期，將個別的植株挑選出來，移植於盆中並使其在相同環境條件下於溫室生長額外的三星期。

將以每個基因構築體轉染之農桿菌於以 10 mM 2-(N-嗎啉)乙磺酸 (MES)、20 μ M 乙醯丁香酮、50 μ g/ml 康黴素以及 25 μ g/ml 卡本西林 pH5.6 補充的 YEB 培養基生長直到它們達到 OD₆₀₀ 介於 0.6 與 1.6 之間。將農桿菌懸浮液在使用前離心並重新懸浮於滲透培養基(10 mM MgCl₂ 以及 10 mM MES pH 5.6) 並且於 4°C 儲存隔夜。在滲透之日，將培養批次以 2.5 培養體積稀釋並在使用前使其回溫。將圓葉菸草整株植物在 20-40 Torr 真空下倒置於在一氣密的不銹鋼罐中之細菌懸浮液 2 分鐘。將植物返回溫室 2-6 日的培養期間直到收穫。除非另外指出，所有滲透係以菌株 AGL1/172 以 1:1 比率共同滲透而操作。

如同本文所描述地，包含各種基因構築體之農桿菌 (*A. tumefaciens*) 菌株經由使用字首「AGL1」稱呼。舉例來說，包含基因構築體編號 995 之農桿菌 (見第 1H 圖) 稱為「AGL1/995」。

葉收穫以及總蛋白質萃取

在培養之後，收穫植物的空中部分，於 -80°C 下冷凍並粉碎成片狀。經由在三倍體積的冷 50 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.1% Triton X-100 以及 1 mM 苯基甲磺醯氟中將每

個冷凍粉碎的植物材料樣品均質化 (Polytron) 以萃取總可溶性蛋白質。在均質化作用之後，將泥漿狀物於 4°C 以 10,000 g 離心 10 分鐘 並且將這些澄清的粗萃取物 (上清液) 保存用於分析。

蛋白質分析與免疫墨點法

澄清的粗萃取物之總蛋白質含量係經由 Bradford 試驗 (Bio-Rad, Hercules, CA) 測定，使用胎牛血清白蛋白作為參考標準品。經由 SDS-PAGE 分離蛋白質並且電轉移至用於免疫偵測之聚二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)。在免疫墨點法之前，將膜以 5% 脫脂牛奶以及在 Tris 緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS-T) 中之 0.1% Tween-20 於 4°C 遮蔽 16-18 小時。

經由在 TBS-Tween 20 0.1% 中之 2% 脫脂牛奶中以 2 µg/ml、1:2500 稀釋之山羊多株抗 gp120 一級抗體 (Abcam, ab21179) 培養以操作免疫墨點法。化學發光偵測係於在 TBS-Tween 20 0.1% 之 2% 脫脂牛奶中以 1:10000 稀釋之與過氧化酶共軛的驢抗-山羊二級抗體 (JIR 705-035-147) 培養之後進行。免疫反應複合體係由使用發光胺 (luminol) 作為基質 (Roche Diagnostics Corporation) 之化學發光而偵測。

範例 2：植物中之原生與嵌合 HIV 套膜蛋白質表現

HIV ConS ΔCFI 為帶有縮短的可變環、切割位點的刪除、融合區域以及於 gp41 的免疫優勢區域之共同 HIV 群組

M 套膜蛋白。已顯示在天竺鼠中激發類似或比野生型套膜蛋白更大廣度與力價的交叉亞型中和抗體。(Liao et al., *Virology* (2006) 353: 268-282)。

第 5 圖展示使用於此研究的基因構築體。在基因構築體編號 995 中，將成熟 HIV ConS Δ CFI (其後以 Env 簡稱) 的編碼區域，其包含原生的 TM/CT，置於 CPMV-HT 表現系統之控制之下。在基因構築體編號 997 與 999 中，將 HIV Env 之 TM/CT 區域分別以來自 A/布里斯班/10/2007 (H3N2) 以及 A/印尼/05/2005 (H5N1) 的流感血球凝集素 (HA) 的 TM/CT 區域取代。在所有例子中，將植物來源的信號肽—來自苜蓿草蛋白質雙硫異構酶 (PDI) 蛋白質—取代原生 HIV Env 蛋白質信號肽。

於農桿菌滲透之圓葉菸草植物中比較來自基因構築體 995、997 以及 999 的 HIV Env 生產。將來自以 AGL1/995、GAL1/997 以及 AGL1/999 滲透的植物之蛋白質萃取物經由西方墨點法分析，並且將結果顯示於第 6 圖，其中第 1 至 4 道為包含各種量之重組 HIV-1 gp160 (ab68171) 的陽性控制組；第 5 道，陰性控制組；第 6 至 8 道，由 AGL1/995-滲透之葉萃取之蛋白質；第 9 與 10 道，由 AGL1/997-滲透之葉萃取之蛋白質；第 11 與 12 道，由 AGL1/999-滲透之葉萃取之蛋白質。

如同第 6 圖所顯示的，原生 HIV Env 之表現在用於偵測的條件下無法被偵測，確認先前報導植物中 HIV Env 蛋白質

的極低累積量 (Rybicki et al., 2010, *Plant Biotechnology Journal* 8: 620-637)。Env 的嵌合形式，其中將 TM/CT 區域以流感 H3 (基因構築體#997) 或 H5 (基因構築體#999) 之 TM/CT 區域取代，其累積較原生形式高得多之量。如上所提，基因構築體#997 以及#999 基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

範例 3 嵌合 HIV Env 組裝至類病毒顆粒

亦評估植物中嵌合 HIV Env 在缺乏核心或基質蛋白質下組裝至 VLP 的能力。將來自 AGL1/997 (Env/H3) 與 AGL1/999 (Env/H5) 的蛋白質萃取物施以凝膠過濾層析法接著使用山羊抗 gp120 抗體分析 Env 含量洗滌餾分。在第 7A 圖中表示的西方墨點法顯示在來自經 AGL1/999 滲透之植物的萃取物中，洗滌餾分中的嵌合 Env/H5 含量波峰在餾分 7 至 10，表示它們以大於 2 百萬道爾頓 (dalton) 之極高分子量結構組裝。餾分 7 至 18 的相對蛋白質含量的測試清楚顯示絕大多數的宿主蛋白質於餾分 11 至 18 洗滌出 (第 7B 圖)。這些結果顯示 Env/H5 組裝至高分子量結構大小超過同源三聚體所期望的之分子量大小。在 AGL1/997 滲透之植物中的 Env/H3 獲得類似結果。合併這些結果證實嵌合 HIV Env/H5 以高量累積於農桿菌滲透的植物並在缺乏核心或基質蛋白質時組裝至類病毒顆粒。這些結果亦證實流感 HA TM/CT 區域融合至非流感抗原是足以組裝並釋出呈現

非流感抗原的 VLP。

範例 4：具有狂犬病蛋白質的表現卡匣之組裝

C-2X35S-CPMV HT-PDISP-狂犬病醣蛋白 G (RabG)
+H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾(TM+CT)-NOS(基
因構築體編號 1074；第 8A、8H 圖)

將融合至 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域之編碼狂犬病醣蛋白 G (RabG) 膜外區域的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈現的以 PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下在包含質體藍素-P19-質體藍素質體中之 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS 表現系統。在 PCR 的第一回合，將包含 Rab G 膜外區域而不帶原生信號肽、穿膜以及胞質區域的片段使用引子 IF-RabG-S2+4.c (第 8B 圖，SEQ ID NO：32) 以及 RabG+H5dTm.r (第 8C 圖，SEQ ID NO：33) 擴增，使用合成的 Rab G 基因 (與來自 Genebank 登錄號 EF206707 之 nt3317-4891 相對應) (第 8D 圖，SEQ ID NO：34) 作為模板。將包含 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域的第二片段使用引子 IFH5dTm.c (第 8E 圖，SEQ ID NO：35) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖，SEQ ID NO：15) 擴增，使用基因構築體編號 972 (對於基因構築體編號 972 序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖，SEQ ID NO：134，將其以引用的方式併入本文) 作為模板。然後將來自兩次擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之

模板，使用 IF-RabG-S2+4.c (第 8B 圖，SEQ ID NO: 32) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖，SEQ ID NO: 15) 作為引子。將生成的片段與苜蓿草 PDI 信號肽對準框架使用來自 Clontech (Mountain View, CA) 之 In-Fusion 轉殖系統而轉殖於 2X35S-CPMV HTNOS 表現系統。將基因構築體 141 (第 8F、8G 圖) 以 SbfI 與 StuI 限制酶消化並用於 In-Fusion 組裝反應。基因構築體編號 141 為用於在 CPMV HT 為基礎之表現卡匣中的興趣基因之「In Fusion」轉殖之受體質體。它也併入於苜蓿草質體藍素基因啟動子與終止子下的 TBSV P19 沉默抑制子共同表現的基因構築體。此載體為以 pCAMBIA 為基礎之質體以及由左至右 t-DNA 邊界的序列係於第 8F 圖呈現 (SEQ ID NO: 36)。載體 141 的示意圖係於第 8G 圖中呈現。給予生成的基因構築體編號 1074 (第 8H 圖，SEQ ID NO: 37)。PDISP - Rab G - A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列係展示於第 8I 圖 (SEQ ID NO: 38)。質體 1074 示意係展示於第 8A 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

D-2X35S-PDISP-狂犬病醣蛋白 G (RabG) +H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾 (TM+CT) -NOS intoBeYDV + 複製酶擴增系統 (基因構築體編號 1094; 第 8L、8M 圖)

將融合至 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域之編碼狂犬病醣蛋白 G (RabG) 膜外區域的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈現的以

PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下在包含質體藍素-P19-質體藍素表現卡匣中之 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS 之 BeYDV+複製酶表現系統。在 PCR 的第一回合，將包含 Rab G 膜外區域而不帶原生信號肽、穿膜以及胞質區域的片段使用引子 IF-RabG-S2+4.c (第 8B 圖, SEQ ID NO: 32) 以及 RabG+H5dTm.r (第 8C 圖, SEQ ID NO: 33) 擴增，使用合成的 Rab G 基因 (與來自 Genebank 登錄號 EF206707 之 nt3317-4891 相對應) (第 8D 圖, SEQ ID NO: 34) 作為模板。將包含 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域的第二片段使用引子 IFH5dTm.c (第 8E 圖, SEQ ID NO: 35) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 擴增，使用基因構築體編號 972 (對於基因構築體編號 972 序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖, SEQ ID NO: 134, 將其以引用的方式併入本文) 作為模板。然後將來自兩次擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之模板，使用 IF-RabG-S2+4.c (第 8B 圖, SEQ ID NO: 32) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 作為引子。將生成的片段與 2X35S-CPMV HTNOS 表現卡匣中之苜蓿草 PDI 信號肽對準框架，使用來自 Clontech (Mountain View, CA) 之 In-Fusion 轉殖系統而轉殖於 BeYDV+複製酶擴增系統。將基因構築體 144 以 SbfI 與 StuI 限制酶消化並用於 In-Fusion 組裝反應。基因構築體編號 144 為用於在 CPMV HT 為基礎之表現卡匣中的興趣基因之「In Fusion」轉殖至 BeYDV 擴增系統之受

體質體。它也併入於苜蓿草質體藍素基因啟動子與終止子下的 TBSV P19 沉默抑制子共同表現的基因構築體。此載體為以 pCAMBIA 為基礎之質體以及由左至右 t-DNA 邊界的序列係於第 8J 圖呈現 (SEQ ID NO : 39)。載體 144 的示意圖係於第 8K 圖中呈現。給予生成的基因構築體編號 1094 (第 8L 圖, SEQ ID NO : 40)。PDISP - Rab G - A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列係展示於第 8I 圖 (SEQ ID NO : 38)。質體 1094 示意係展示於第 8M 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

範例 5：植物中嵌合狂犬病蛋白質的表現

G 蛋白質係與 PDI Sp (基因構築體 1071) 融合而表現。基因構築體 1074 為狂犬病 G 蛋白質與 PDI Sp 以及 H5A/Indo TM+CT 區域之融合。基因構築體 1094 為狂犬病 G 蛋白質與 BeYDV + rep, PDI Sp 以及 H5A/Indo TM+CT 區域的融合。基因構築體 1091 為狂犬病 G 蛋白質與 PDI Sp 以及 BeYDV + rep 的融合。

圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物係從充滿商業的泥炭蘚基質之平地中的種子生長。容許植物生長於 16/8 光照週期以及 25°C 日/20°C 夜之溫度制度的溫室。在播種後三星期，將個別的植株挑選出來，移植於盆中並使其在相同環境條件下於溫室生長額外的三星期。

將以每個基因構築體 (基因構築體 1071、1071、1074、

1091 以及 1094) 轉染之農桿菌於以 10 mM 2-(N-嗎啉)乙磺酸 (MES)、20 μ M 乙醯丁香酮、50 μ g/ml 康黴素以及 25 μ g/ml 卡本西林 pH5.6 補充的 YEB 培養基生長，直到它們達到 OD₆₀₀ 介於 0.6 與 1.6 之間。將農桿菌懸浮液在使用前離心並重新懸浮於滲透培養基 (10 mM MgCl₂ 以及 10 mM MES pH 5.6) 並且於 4°C 儲存隔夜。在滲透之日，將培養批次以 2.5 倍培養體積稀釋並在使用前使其回溫。將圓葉菸草整株植物在 20-40 Torr 真空下倒置於在一氣密的不銹鋼罐中之細菌懸浮液 2 分鐘。將植物返回溫室 2-6 日的培養期間直到收穫。除非另外指出，所有滲透係以菌株 AGL1/172 以 1:1 比率共同滲透而操作。

在培養之後，收穫植物的空中部分，於 -80°C 下冷凍並粉碎成片狀。經由在三倍體積的冷 50 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.1% Triton X-100 以及 1 mM 苯基甲磺醯氟中將每個冷凍粉碎的植物材料樣品均質化 (Polytron) 以萃取總可溶性蛋白質。在均質化作用之後，將泥漿狀物於 4°C 以 10,000 g 離心 10 分鐘 並且將這些澄清的粗萃取物 (上清液) 保存用於分析。

澄清的粗萃取物之總蛋白質含量係經由 Bradford 試驗 (Bio-Rad, Hercules, CA) 測定，使用胎牛血清白蛋白作為參考標準品。經由 SDS-PAGE 分離蛋白質並且電轉移至用於免疫偵測之聚二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)。在免疫墨點法之前，將膜以

5%脫脂牛奶以及在 Tris 緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS-T) 中之 0.1% Tween-20 於 4°C 遮蔽 16-18 小時。

經由在 TBS-Tween 20 0.1% 中之 2% 脫脂牛奶中的 0.5ug/ul 之 Santa Cruz SE-57995 一級抗體培養以操作免疫墨點法。化學發光偵測係於培養之後以在 TBS-Tween 20 0.1% 之 2% 脫脂牛奶中以 1:10,000 稀釋之與過氧化酶共軛的山羊抗-老鼠 JIR, 115-035-146 二級抗體進行。免疫反應複合體係由使用發光胺 (luminol) 作為基質 (Roche Diagnostics Corporation) 之化學發光而偵測。

如同第 8N 圖中顯示的, 狂犬病 G 蛋白質係以與 PDI Sp (基因構築體 1071)、BeYDV + rep (基因構築體 1094 或 1091)、H5A/ Indo TM+CT 區域 (基因構築體 1074) 或其組合融合而表現。

範例 6: 嵌合狂犬病 G 蛋白質組裝至類病毒顆粒

亦評估植物中嵌合狂犬病 G 蛋白質在缺乏核心或基質蛋白質下組裝至 VLP 的能力。將來自使用基因構築體 1074 或基因構築體 1094 轉化之植物的蛋白質萃取物澄清並且施以凝膠過濾層析法接著使用 Santa Cruz SE-57995 一級抗體進行狂犬病 G 含量洗滌餾分之分析。在第 8O 圖中表示的西方墨點法顯示在來自經滲透之植物的萃取物中, 對使用基因構築體 1074 生產之蛋白質, 洗滌餾分中嵌合狂犬病 G 含量的波峰位於餾分 8 至 14, 以及使用基因構築體 1094 製備之

蛋白質萃取物的大部分蛋白質於餾分 8 至 12 洗滌出之餾分，表示它們以大於 2 百萬道爾頓 (dalton) 之極高分子量結構組裝。這些結果顯示狂犬病 G 組裝至高分子量結構大小超過同源三聚體所期望的之分子量大小。

第 9A 圖顯示由基因構築體 1074 表現之純化狂犬病 G 蛋白質之免疫墨點分析。第 9B 圖顯示衍生自基因構築體 1074 的表現之純化狂犬病 G 蛋白質 VLP 的穿透式電子顯微鏡圖片，其顯示 VLP 形態。

因此，狂犬病 G 在農桿菌滲透之植物中以高量累積並且在缺乏核心或基質蛋白質下組裝至類病毒顆粒。這些結果亦證實流感 HA 之 TM/CT 區域至非流感抗原例如狂犬病 G 蛋白質的融合足以組裝並釋出呈現非流感抗原之 VLP。

範例 7：表現卡匣與 SARS 之組裝

B-2X35S-CPMV HT-嚴重急性呼吸道症候群病毒糖蛋白 S (SARS Gs) +H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾 (TM+CT) -NOS (基因構築體編號 916；第 12A、12F 圖)

將融合至 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域之編碼 SARS 糖蛋白 S (SARS gS) 膜外區域的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈現的以 PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下的 2X35S-CPMV-HT 表現系統。在 PCR 的第一回合，將包含 SARS gS 膜外區域而不帶原生穿膜以及胞質區域的片段使

用引子 IFwtSp-SARSGS.c (第 12B 圖, SEQ ID NO: 26) 以及 IF-H5dTm+SARSGS.r (第 12C 圖, SEQ ID NO: 27) 擴增, 使用合成的 SARS gS 基因 (與來自 Genebank 登錄號 AY278741.1 之 nt2149225259 相對應; 第 12D 圖, SEQ ID NO: 28) 作為模板。將包含 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域的第二片段使用引子 SARSGS+H5dTm.c (第 12E 圖, SEQ ID NO: 29) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 擴增, 使用基因構築體編號 972 (對於基因構築體編號 972 序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖, SEQ ID NO: 134, 將其以引用的方式併入本文) 作為模板。然後將來自兩次擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之模板, 使用 IF-wtSp-SARSGS.c (第 12B 圖, SEQ ID NO: 26) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 作為引子。再將第二次 PCR 的產物以 ApaI 與 StuI 消化並轉殖至以 ApaI 以及 StuI 限制酶消化之基因構築體編號 995 (第 1F 圖, SEQ ID NO: 6)。給予生成的基因構築體編號 916 (第 12F 圖, SEQ ID NO: 30)。SARS gS - A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列係展示於第 12G 圖 (SEQ ID NO: 31)。質體 916 示意係展示於第 12A 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

範例 8: 在植物中嵌合 SARS 具有與不具有生產增強因子之表現實驗

使用包含 SARS gS 基因具有野生型信號肽以及 H5A/

Indo 穿膜以及胞質尾區域之基因構築體 916 表現 SARS 蛋白質。

圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物係從充滿商業的泥炭蘚基質之平地中的種子生長。容許植物生長於 16/8 光照週期以及 25°C 日/20°C 夜之溫度制度的溫室。在播種後三星期，將個別的植株挑選出來，移植於盆中並使其在相同環境條件下於溫室生長額外的三星期。

將以每個基因構築體 (基因構築體 916) 轉染之農桿菌於以 10 mM 2-(N-嗎啉)乙磺酸 (MES)、20 μ M 乙醯丁香酮、50 μ g/ml 康黴素以及 25 μ g/ml 卡本西林 pH5.6 補充的 YEB 培養基生長直到它們達到 OD_{600} 介於 0.6 與 1.6 之間。將農桿菌懸浮液在使用前離心並重新懸浮於滲透培養基 (10 mM $MgCl_2$ 以及 10 mM MES pH 5.6) 並且於 4°C 儲存隔夜。在滲透之日，將培養批次以 2.5 倍培養體積稀釋並在使用前使其回溫。將圓葉菸草整株植物在 20-40 Torr 真空下倒置於在一氣密的不銹鋼罐中之細菌懸浮液 2 分鐘。將植物返回溫室 2-6 日的培養期間直到收穫。除非另外指出，所有滲透係以菌株 AGL1/172 以 1:1 比率之共同滲透而操作。

在培養之後，收穫植物的空中部分，於 -80°C 下冷凍並粉碎成片狀。經由在三倍體積的冷 50 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.1% Triton X-100 以及 1 mM 苯基甲磺醯氟中將每個冷凍粉碎的植物材料樣品均質化 (Polytron) 以萃取總可溶性蛋白質。在均質化作用之後，將泥漿狀物於 4°C 以 10,000

g 離心 10 分鐘 並且將這些澄清的粗萃取物（上清液）保存用於分析。

澄清的粗萃取物之總蛋白質含量係經由 Bradford 試驗（Bio-Rad, Hercules, CA）測定，使用胎牛血清白蛋白作為參考標準品。經由 SDS-PAGE 分離蛋白質並且電轉移至用於免疫偵測之聚二氟乙烯（PVDF）膜（Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN）。在免疫墨點法之前，將膜以 5% 脫脂牛奶以及在 Tris 緩衝液（Tris-buffered saline, TBS-T）中之 0.1% Tween-20 於 4°C 遮蔽 16-18 小時。

經由在 TBS-Tween 20 0.1% 中之 2% 脫脂牛奶中以 2 ug/ul 之 Imgenex. IMG-690 一級抗體操作免疫墨點法。化學發光偵測係於培養之後以在 TBS-Tween 20 0.1% 之 2% 脫脂牛奶中以 1:10,000 稀釋之與過氧化酶共軛的老鼠抗-兔 IgG，JIR，115-035-144 二級抗體進行。免疫反應複合體係由使用發光胺（luminol）作為基質（Roche Diagnostics Corporation）之化學發光而偵測。

第 12H 圖顯示在煙草中的嚴重急性呼吸道症候群（SARS）病毒蛋白質 S 表現之免疫墨點分析。觀察基因構築體 916（帶有野生型信號肽以及 H5A/ Indo 穿膜以及胞質尾區域之 SARS gS 基因）的表現。

範例 9：表現卡匣與 VZV 蛋白質之組裝

A-2X35S-CPMV HT-水痘帶狀疱疹病毒糖蛋白 E

(VZVgE) +H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾 (TM+CT) -NOS (基因構築體編號 946)

將融合至 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域之編碼 VZV 糖蛋白 E(VZV gE)膜外區域的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈現的以 PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下的 2X35S-CPMV-HT 表現系統。在 PCR 的第一回合，將包含 VZV gE 膜外區域而不帶原生穿膜以及胞質區域的片段使用引子 IF-wtSp-VZVgE.c (第 10A 圖, SEQ ID NO: 20) 以及 IF-H5dTm+VZVgE.r (第 10B 圖, SEQ ID NO: 21) 擴增，使用合成的 VZV gE 基因 (與來自 Genebank 登錄號 AY013752.1 之 nt3477-5348 相對應; 第 10C 圖, SEQ ID NO: 22) 作為模板。將包含 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域的第二片段使用引子 VZVgE+H5dTm.c (第 10D 圖, SEQ ID NO: 23) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 擴增，使用基因構築體編號 972 (對於基因構築體編號 972 序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖, SEQ ID NO: 134, 將其以引用的方式併入本文) 作為模板。然後將來自兩次擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之模板，使用 IF-wtSp-VZVgE.c (第 10A 圖, SEQ ID NO: 20) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖, SEQ ID NO: 15) 作為引子。再將第二次 PCR 的產物以 ApaI 與 StuI 消化並轉殖至以 ApaI 以及 StuI 限制酶消化之基因構築體編號 995(第 1F 圖, SEQ ID

NO: 6)。給予生成的基因構築體編號 946 (第 A5 圖, SEQ ID NO: A5)。VZV gE- A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列係展示於第 10F 圖 (SEQ ID NO: 25)。質體 946 示意係展示於第 10G 圖。此基因構築體不編碼 M1 蛋白質。

範例 10：植物中之嵌合 VZV 蛋白質表現

使用基因構築體 946 展示水痘帶狀疱疹病毒 (VZV) E 蛋白質的表現, 其包含帶有野生型信號肽以及 H5A/ Indo TM+CT 區域之 VZV gE 基因。

圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物係從充滿商業的泥炭蘚基質之平地中的種子生長。容許植物生長於 16/8 光照週期以及 25°C 日/20°C 夜之溫度制度的溫室。在播種後三星期, 將個別的植株挑選出來, 移植於盆中並使其在相同環境條件下於溫室生長額外的三星期。

將以每個基因構築體 (基因構築體 946) 轉染之農桿菌於以 10 mM 2-(N-嗎啉)乙磺酸 (MES)、20 μ M 乙醯丁香酮、50 μ g/ml 康黴素以及 25 μ g/ml 卡本西林 pH5.6 補充的 YEB 培養基生長, 直到它們達到 OD₆₀₀ 介於 0.6 與 1.6 之間。將農桿菌懸浮液在使用前離心並重新懸浮於滲透培養基 (10 mM MgCl₂ 以及 10 mM MES pH 5.6) 並且於 4°C 儲存隔夜。在滲透之日, 將培養批次以 2.5 倍培養體積稀釋並在使用前使其回溫。將圓葉菸草整株植物在 20-40 Torr 真空下倒置於在一氣密的不銹鋼罐中之細菌懸浮液 2 分鐘。將植物返回

溫室 2-6 日的培養期間直到收穫。除非另外指出，所有滲透係以菌株 AGL1/172 以 1:1 比率之共同滲透而操作。

在培養之後，收穫植物的空中部分，於 -80°C 下冷凍並粉碎成片狀。經由在三倍體積的冷 50 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.1% Triton X-100 以及 1 mM 苯基甲磺醯氟中將每個冷凍粉碎的植物材料樣品均質化 (Polytron) 以萃取總可溶性蛋白質。在均質化作用之後，將泥漿狀物於 4°C 以 10,000 g 離心 10 分鐘 並且將這些澄清的粗萃取物 (上清液) 保存用於分析。

澄清的粗萃取物之總蛋白質含量係經由 Bradford 試驗 (Bio-Rad, Hercules, CA) 測定，使用胎牛血清白蛋白作為參考標準品。經由 SDS-PAGE 分離蛋白質並且電轉移至用於免疫偵測之聚二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)。在免疫墨點法之前，將膜以 5% 脫脂牛奶以及在 Tris 緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS-T) 中之 0.1% Tween-20 於 4°C 遮蔽 16-18 小時。

經由在 TBS-Tween 20 0.1% 中之 2% 脫脂牛奶中以 1 ug/ul 之老鼠 mAb 抗-VZVgE 蛋白質 (abcam, ab52549) 作為一級抗體以操作免疫墨點法。化學發光偵測係於培養之後以在 TBS-Tween 20 0.1% 之 2% 脫脂牛奶中以 1:10,000 稀釋之與過氧化酶共軛的山羊抗-老鼠，JIR, 115-035-146 作為二級抗體進行。免疫反應複合體係由使用發光胺 (luminol) 作為基質 (Roche Diagnostics Corporation) 之化學發光而偵測。

第 11A 圖於第 7-9 道顯示來自基因構築體 946 之水痘帶狀疱疹病毒 (VZV) E 蛋白質表現之免疫墨點分析 (分別為 20、10 以及 2 μg 萃取物)。第 1 至 5 道，陽性控制組-重組 VZV gE，分別為 500、100、50、10 以及 5 ng；第 6 道為陰性控制組。

亦評估植物中嵌合 VZV E 蛋白質在缺乏核心或基質蛋白質下組裝至 VLP 的能力。將來自使用基因構築體 946 轉化之植物的蛋白質萃取物澄清並且施以凝膠過濾層析法接著使用老鼠 mAb 抗 VZVgE 蛋白質 (abcam, ab52549) 一級抗體進行 VZV E 蛋白質洗滌餾分之分析。在第 11B 圖中表示的西方墨點法顯示在來自經滲透之植物的萃取物中，嵌合 VZV E 蛋白質洗滌餾分的波峰位於餾分 10 至 13，表示 VZV E 蛋白質以大於 2 百萬道爾頓 (dalton) 之極高分子量結構組裝。這些結果顯示 VZV E 蛋白質組裝至高分子量結構大小超過同源三聚體所期望的之分子量大小。

因此，VZV E 蛋白質以高量累積於農桿菌滲透之植物並且於缺乏核心或基質蛋白質下組裝至類病毒顆粒。這些結果亦顯示將流感 HA 之 TM/CT 區域融合至非流感抗原例如 VZV E 蛋白質足以組裝並釋出呈現非流感抗原的 VLP。

範例 11. 表現卡匣與嵌合伊波拉病毒糖蛋白 (GP) 之組裝

A-2X35S-CPMV HT-PDISP- 薩伊伊波拉病毒 GP

(EboGP) +H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾 (TM+CT) -NOS (基因構築體編號 1366)

將融合至 H5 A/印尼/5/2005 之穿膜以及胞質區域之編碼來自病毒株薩伊 1995 之伊波拉病毒醣蛋白 (GP) 膜外區域的序列使用由 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995)) 呈現的以 PCR 為基礎之接合方法轉殖至如下在包含質體藍素-P19-質體藍素表現卡匣中之 2X35S-CPMV HT-PDISP-NOS 表現系統。伊波拉 GP 基因是由野生型基因序列對密碼子使用以及對 GC 含量最佳化(與來自 Genebank 登錄號 AY354458 之 nt 6039-8069 相對應)。再將隱蔽剪接位點、Shine Delgarno 序列、RNA 去穩定序列以及原核生物核糖體進入位點由最佳化序列移除以避免不想要的結構或序列。在 PCR 的第一回合，將包含編碼膜外區域(不帶信號肽、穿膜以及胞質區域)序列之最佳化 GP 基因的片段使用引子 IF-Opt_EboGP.s2+4c (第 13A 圖，SEQ ID NO: 43) 以及 H5iTMCT+Opt_EboGP.r (第 13B 圖，SEQ ID NO: 44) 擴增，以合成的 GP 基因(第 13C 圖，SEQ ID NO: 45) 作為模板。將包含來自流感 A/印尼/5/2005 之 H5 之穿膜以及胞質區域的第二片段使用引子 Opt_EboGP+H5iTMCT.c (第 13D 圖，SEQ ID NO: 46) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖，SEQ ID NO: 15) 擴增，使用基因構築體編號 972 (對於基因構築體編號 972 序列見 WO 2010/003225 之第 94 圖，SEQ ID NO: 134，將其以引用的方式併入本文) 作為模板。然後將

來自兩次擴增之 PCR 產物混合並且使用作為第二回合的擴增之模板，使用 IF-Opt_EboGP.s2+4c (第 13A 圖，SEQ ID NO: 43) 以及 IF-H5dTm.r (第 3C 圖，SEQ ID NO: 15) 作為引子。使用來自 Clontech (Mountain View, CA) 之 In-Fusion 轉殖系統，將生成的 PCR 產物與卡匣中苜蓿草 PDI 信號肽對準框架而轉殖至 2X35SCPMV HT-NOS 表現系統。將基因構築體 1192 (第 13E 圖) 以 SacII 與 StuI 限制酶消化並用於 In-Fusion 組裝反應。基因構築體編號 1192 為用於在 CPMV HT 為基礎之表現卡匣中與苜蓿草 PDI 信號肽對準框架之興趣基因的「In Fusion」轉殖至 BeYDV 擴增系統之受體質體。它也併入於苜蓿草質體藍素基因啟動子與終止子下的 TBSV P19 沉默抑制子共同表現的基因構築體。此載體為以 pCAMBIA 為基礎之質體以及由左至右 t-DNA 邊界的序列係於第 13F 圖呈現 (SEQ ID NO: 47)。給予生成的基因構築體編號 1366 (第 13G 圖，SEQ ID NO: 48)。來自薩伊 95 之 PDISP-GP 伊波拉 virus-H5 TM+來自 A/印尼/5/2005CT 的胺基酸序列係展示於第 13H 圖 (SEQ ID NO: 49)。質體 1366 示意係展示於第 13I 圖。

範例 12. 植物中之嵌合伊波拉病毒 GP 的表現

使用包含帶有野生型信號肽以及 H5A/ Indo TM+CT 區域之 EV GP 基因的基因構築體 1366 示例伊波拉病毒 (EV) 糖蛋白 (GP) 之表現。

圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物係從充滿商業的泥炭蘚基質之平地中的種子生長。容許植物生長於 16/8 光照週期以及 25°C 日/20°C 夜之溫度制度的溫室。在播種後三星期，將個別的植株挑選出來，移植於盆中並使其在相同環境條件下於溫室生長額外的三星期。

將以每個基因構築體 (基因構築體 946) 轉染之農桿菌於以 10 mM 2-(N-嗎啉)乙磺酸 (MES)、20 μ M 乙醯丁香酮、50 μ g/ml 康黴素以及 25 μ g/ml 卡本西林 pH5.6 補充的 YEB 培養基生長，直到它們達到 OD₆₀₀ 介於 0.6 與 1.6 之間。將農桿菌懸浮液在使用前離心並重新懸浮於滲透培養基 (10 mM MgCl₂ 以及 10 mM MES pH 5.6) 並且於 4°C 儲存隔夜。在滲透之日，將培養批次以 2.5 倍培養體積稀釋並在使用前使其回溫。將圓葉菸草整株植物在 20-40 Torr 真空下倒置於在一氣密的不銹鋼罐中之細菌懸浮液 2 分鐘。將植物返回溫室 2-6 日的培養期間直到收穫。除非另外指出，所有滲透係以菌株 AGL1/172 以 1:1 比率共同滲透而操作。

在培養之後，收穫植物的空中部分，於 -80°C 下冷凍並粉碎成片狀。經由在三倍體積的冷 50 mM Tris pH 8.0、0.15 M NaCl、0.1% Triton X-100 以及 1 mM 苯基甲磺醯氟中將每個冷凍粉碎的植物材料樣品均質化 (Polytron) 以萃取總可溶性蛋白質。在均質化作用之後，將泥漿狀物於 4°C 以 10,000 g 離心 10 分鐘 並且將這些澄清的粗萃取物 (上清液) 保存用於分析。

澄清的粗萃取物之總蛋白質含量係經由 Bradford 試驗 (Bio-Rad, Hercules, CA) 測定，使用胎牛血清白蛋白作為參考標準品。經由 SDS-PAGE 分離蛋白質並且電轉移至用於免疫偵測之聚二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)。在免疫墨點法之前，將膜以 5% 脫脂牛奶以及在 Tris 緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS-T) 中之 0.1% Tween-20 於 4°C 遮蔽 16-18 小時。

經由在 TBS-Tween 20 0.1% 中之 2% 脫脂牛奶中以 150 ng/ml 之親和力純化之兔抗-伊波拉 GP 薩伊 (IBT Bioservices, 0301-012) 作為一級抗體操作免疫墨點法。化學發光偵測係於培養之後以與過氧化酶共軛的山羊抗兔二級抗體 (JIR 11-035-144)，將其在 TBS-Tween 20 0.1% 之 2% 脫脂牛奶中以 1 : 7500 稀釋而進行。免疫反應複合體係由使用發光胺 (luminol) 作為基質 (Roche Diagnostics Corporation) 之化學發光而偵測。第 13J 圖顯示在來自以基因構築體編號 1366 轉形的植物之蛋白質萃取物中的嵌合伊波拉病毒 GP 表現的免疫墨點分析。獲得的結果顯示嵌合伊波拉 GP 係暫時性地表現。

將所有引用以此方式併入以作為參考。

本發明已關於一或更多具體實施例而描述。然而對於本領域之技術人員而言，在不悖離如同申請專利範圍中所定義之本發明範圍下可作出數個改變與修飾將是明顯的。

【圖式簡單說明】

本發明的這些與其他特徵從下列對所附圖示作出參照的描述中將變得更顯著，其中：

第 1 圖顯示數個核苷酸以及胺基酸序列，以及根據本發明的各個具體實施例的表現卡匣。

第 1A 圖顯示 HIV ConS Δ CFI 的共同核酸序列（原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域以底線）。第 1B 圖顯示寡核苷酸 IF-ApaI-SpPDI.c 的核苷酸序列。第 1C 圖顯示寡核苷酸 SpPDI-HIV gp145.r 的核苷酸序列。第 1D 圖顯示寡核苷酸 IF-SpPDI-gp145.c 的核苷酸序列。第 1E 圖顯示寡核苷酸 WtdTm-gp145.r 的核苷酸序列。第 1F 圖顯示表現卡匣編號 995，從 PacI（啟動子上游）至 AscI（緊接 NOS 終止子的下游）。消除的 SbfI 限制位點為粗體。PDISP-HIV ConS Δ CFI 下加底線。第 1G 圖顯示 PDISP-HIV ConS Δ CFI 的胺基酸序列。第 1H 圖顯示基因構築體編號 995 的示意圖。

第 2 圖顯示數個核苷酸以及胺基酸序列，以及根據本發明的各個具體實施例的表現卡匣。第 2A 圖顯示寡核苷酸 IF-H3dTm+gp145.r 的核苷酸序列。第 2B 圖顯示寡核苷酸 Gp145+H3dTm.c 的核苷酸序列。第 2C 圖顯示寡核苷酸 H3dTm.r 的核苷酸序列。第 2D 圖顯示表現卡匣編號 997，從 PacI（啟動子上游）至 AscI（緊接 NOS 終止子的下游）。消除的 SbfI 限制位點是粗體。PDISP-HIV Con S Δ CFI-A/布利斯班/10/2007 H3 TM+CT 下加底線。第 2E 圖顯示

PDISP-HIV ConS Δ CFI-A/布里斯班/10/2007 H3 TM+CT 的胺基酸序列。第 2F 圖顯示基因構築體編號 997 的示意圖。

第 3 圖顯示數個核苷酸以及胺基酸序列，以及根據本發明的各個具體實施例的表現卡匣。第 3A 圖顯示寡核苷酸 IF-H5dTm+gp145.r 的核苷酸序列。第 3B 圖顯示寡核苷酸 Gp145+H5dTm.c 的核苷酸序列。第 3C 圖顯示寡核苷酸 IF-H5dTm.r 的核苷酸序列。第 3D 圖顯示表現卡匣編號 999，從 PacI (啟動子上游) 至 AscI (緊接 NOS 終止子的下游)。消除的 SbfI 限制位點是粗體。PDISP-HIV ConS Δ CFI-A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線。第 3E 圖顯示 PDISP-HIV ConS Δ CFI-A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列。第 3F 圖顯示基因構築體編號 999 的示意圖。

第 4 圖顯示根據本發明的各個具體實施例的胺基酸序列以及數個表現卡匣。第 4A 圖顯示表現卡匣編號 172，從 XmaI (質體藍素啟動子之上游) 至 EcoRI (緊接質體藍素終止子的下游)。TBSV P19 核酸序列下加底線。第 4B 圖顯示 TBSV P19 沉默抑制子的胺基酸序列。第 4C 圖顯示基因構築體編號 172 的示意圖。

第 5 圖顯示如同本文描述表現之嵌合 HIV Env 基因的示意圖。

第 6 圖顯示在以農桿菌轉殖之菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 葉中的 HIV Env 蛋白質表現之西方墨點分析。第 1 至 4 道，重組 HIV-1 gp160 (ab68171)，分別為 100、

50、10 與 5 ng，於由模擬滲透植物萃取之 20 μg 葉蛋白質（陽性控制組）中。第 5 道，來自模擬滲透植物之 20 μg 蛋白質（陰性控制組）。第 6 至 8 道，從 AGL1/995-滲透的葉中萃取的蛋白質（分別為 20 μg 、10 μg 與 2 μg ，由模擬滲透植物萃取之葉蛋白質完成至 20 μg ）。第 9 與 10 道，從 AGL1/997-滲透的葉中萃取的蛋白質（分別為 20 μg 與 10 μg ，由模擬滲透植物萃取之葉蛋白質完成至 20 μg ）。第 11 與 12 道，從 AGL1/999-滲透的葉中萃取的蛋白質（分別為 20 μg 與 10 μg ，由模擬滲透植物萃取之葉蛋白質完成至 20 μg ）。

第 7 圖顯示經由尺寸排阻色層分析法（size exclusion chromatography）之 HIV ConS ΔCFI -衍生結構之特徵。將生產 Env/H5 嵌合蛋白質、從以 AGL1/999 滲透的葉萃取之蛋白質經由凝膠過濾法於經校正之 S-500 高解析管柱分離。(A) 經由使用抗 gp120 抗體之免疫偵測發現洗滌餾分的 HIV Env 蛋白質含量。第 1 至 4 道，重組物 HIV-1 gp160 (ab68171)，分別為 100、50、10 與 5 ng，於模擬滲透植物萃取之 20 μg 葉蛋白質（陽性控制組）中。第 5 道，從模擬滲透植物萃取之 20 μg 蛋白質（陰性控制組）。第 6 道，從 AGL1/999-滲透的葉中萃取的蛋白質 20 μg 。第 7 至 18 道，來自凝膠過濾層析法的洗滌餾分 7 至 18。(B) 來自凝膠過濾層析法的洗滌餾分 7 至 18 之相對蛋白質含量。

第 8A 圖顯示基因構築體編號 1074 的示意圖。（於包含

質體藍素 P19-質體藍素沉默抑制劑之載體的 C-2X35S-狂犬病糖蛋白 G (RabG) +H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域與胞質尾 (TM+CT)-NOS)。第 8B 圖顯示引子 IF-RabG-S2+4.c (SEQ ID NO:32)。第 8C 圖顯示引子 RabG+H5dTm.r (SEQ IDNO:33)。第 8D 圖顯示合成的 Rab G 基因 (與來自 Genebank 登錄號 EF206707 的 nt 3317-4891 對應；原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線；SEQ ID NO:34)。第 8E 圖顯示引子 IFH5dTm.c (SEQ ID NO:35)。第 8F 圖由左而右顯示基因構築體 141 t-DNA (下加底線)。具有質體藍素 P19-質體藍素沉默抑制劑表現卡匣的 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS 表現系統 (SEQ ID NO:36)。第 8G 圖顯示基因構築體編號 141 的示意圖。用於質體線性化的 SbfI 與 StuI 限制酵素位點註明於圖示。第 8H 圖顯示表現卡匣編號 1074 由 2X35S 啟動子至 NOS 終止子的序列。PDISP-Rab G -A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線。(SEQ ID NO:37)。第 8I 圖顯示 PDISPRab G- A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列 (SEQ ID NO:38)。第 8J 圖由左而右顯示基因構築體 144 t-DNA 核苷酸序列 (下加底線)。具有質體藍素 P19-質體藍素沉默抑制劑表現卡匣之 2X35S-CPMV-HT-PDISP-NOS 至 BeYDV +複製酶表現系統 (SEQ ID NO:39)。第 8K 圖顯示基因構築體 144 的示意圖。用於質體線性化的 SbfI 與 StuI 限制酵素位點註明於圖示。第 8L 圖顯示表現卡匣編號 1094 的核苷酸序列由右至左 BeYDV

LIR.PDISP-Rab (G -A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線 (SEQ ID NO: 40)。第 8M 圖顯示基因構築體編號 1094 的示意圖。第 8N 圖顯示植物中狂犬病 G 蛋白質表現之免疫墨點分析。狂犬病 G 蛋白質係與 PDI Sp (基因構築體 1071)、BeYDV + rep、H5A/ Indo TM+CT 區域或其組合融合而表現。更具體地, 基因構築體 1074 為狂犬病 G 蛋白質與 PDI Sp 以及 H5A/ Indo TM+CT 區域之融合。基因構築體 1094 為狂犬病 G 蛋白質與 BeYDV + rep、PDI Sp 以及 H5A/ Indo TM+CT 區域之融合。基因構築體 1091 為狂犬病 G 蛋白質與 PDI Sp 以及 BeYDV + rep 之融合。第 8O 圖顯示由基因構築體 1074 與基因構築體 1094 表現之蛋白質的濃縮與澄清萃取物的尺寸排阻色層分析法免疫墨點分析。

第 9A 圖顯示由基因構築體 1074 表現的純化狂犬病 G 蛋白質之免疫墨點分析。第 9B 圖顯示衍生自基因構築體 1074 表現的純化 VLP 之穿透式電子顯微鏡圖片。

第 10 圖顯示製備 A-2X35S-水痘帶狀疱疹病毒醣蛋白 E (VZVgE) +H5 A/印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾 (TM+CT) -NOS (基因構築體編號 946) 的順序。第 10A 圖顯示引子 IF-wtSp-VZVgE.c (SEQ ID NO 20); 第 10B 圖顯示引子 IF-H5dTm+VZVgE.r (SEQ ID NO: 21)。第 10C 圖顯示合成的 VZV Ge 基因 (SEQ ID NO: 22; 與來自 Genebank 登錄號 AY013752.1 的 nt 3477-5348 對應) (原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線)。第 10D

圖顯示 VZVgE+H5dTm.c 的引子 (SEQ ID NO: 23)。第 10E 圖顯示表現卡匣編號 946 (SEQ ID NO: 24)，由 PacI (啟動子之上游) 至 AscI (緊接 NOS 終止子的下游)。VZV gE-A/ 印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線。第 10F 圖顯示 VZV gE-A/ 印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列 (SEQ ID NO: 25)。第 10G 圖顯示基因構築體編號 946 之示意圖。

第 11A 圖顯示水痘帶狀疱疹病毒 (VZV) E 蛋白質表現之免疫墨點分析。第 1 至 5 道，重組 VZV gE，分別為 500、100、50、10 與 5 ng (陽性控制組)。第 6 道由模擬滲透葉片之萃取物 (陰性控制組)。第 7-9 道來自基因構築體 946 之重組蛋白，分別為 20、10 與 2 μ g 萃取物。基因構築體 946 包含具有野生型信號肽與 H5A/ Indo TM+CT 區域之 VZV gE 基因。第 11B 圖顯示粗萃取物 (基因構築體 946) 尺寸排阻色層分析法之表現的免疫墨點分析。

第 12A 圖顯示基因構築體編號 916 的示意圖 (B-2X35S-嚴重急性呼吸道症候群 病毒糖蛋白 S (SARS gS) +H5 A/ 印尼/5/2005 穿膜區域以及胞質尾 (TM+CT) -NOS)。第 12B 圖顯示引子 IF-wtSp-SARSGS.c (SEQ ID NO: 26)。第 12C 圖顯示引子 IF-H5dTm+SARSGS.r (SEQ ID NO: 27)。第 12D 圖顯示合成的 SARS gS 基因 (SEQ ID NO: 28；與來自 Genbank 登錄號 AY278741.1 的 nt 21492-25259 相對應；原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線)。第 12E 圖顯示引子 SARSGS+H5dTm.c (SEQ ID NO: 29)。第

12F 圖顯示表現卡匣編號 916 (SEQ ID NO: 30) 由 *PacI* (啟動子之上游) 至 *AscI* (緊接 NOS 終止子的下游) 之核苷酸序列。SARS gS-A/印尼/5/2005 H5 TM+CT 下加底線。第 **12G** 圖顯示 SARS gSA/印尼/5/2005 H5 TM+CT 的胺基酸序列 (SEQ ID NO: 31)。第 **12H** 圖顯示嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 病毒蛋白質 S 表現之免疫墨點分析。基因構築體 916 包含具有野生型信號肽以及 H5 A/Indo 穿膜以及胞質尾區域的 SARS Gs 基因。第 1 道來自模擬滲透的植物萃取物 (陰性控制組)。第 2 至 4 道, 來自基因構築體 916 的重組蛋白質 (20、10 以及 5 μ g 之萃取物)。

第 **13A** 圖顯示引子 IF-Opt_EboGP.s2+4c (SEQ ID NO: 43) 的核苷酸序列。第 **13B** 圖顯示引子 H5iTMCT+Opt_EboGP.r (SEQ ID NO: 44) 的核苷酸序列。第 **13C** 圖顯示優化的合成 GP 基因之核苷酸序列 (對於野生型基因序列與來自 Genbank 登錄號 AY354458 之 nt 6039-8069 相對應。基因係針對密碼子使用以及 GC 含量、隱蔽剪接位點之刪除、Shine Delgamo 序列、RNA 去穩定序列以及原核生物核糖體進入位點優化) (原生信號肽以粗體、原生穿膜以及胞質區域下加底線) (SEQ ID NO: 45)。第 **13D** 圖顯示引子 opt_EboGP+H5iTMCT.c (SEQ ID NO: 46) 的核苷酸序列。第 **13E** 圖顯示基因構築體編號 1192 的示意圖。將用於質體線性化的 *SacII* 與 *StuI* 限制酵素位點註明於圖示。第 **13F** 圖顯示基因構築體編號 1192 從左至右核

苷酸序列 t-DNA 邊界 (下加底線)。具有質體藍素 P19-質體藍素沉默抑制劑表現卡匣的 2X35S/ CPMV -HT/PDISP/NOS (SEQ ID NO. 47)。第 13G 圖顯示表現卡匣編號 1366 從 2X35S 啟動子至 NOS 終止子之核苷酸序列。來自 A/印尼/5/2005 之薩伊 95 伊波拉病毒-H5 TM+CT 的 PDISP-GP 序列下加底線 (SEQ ID NO: 48)。第 13H 圖顯示來自 A/印尼/5/2005 之薩伊 95 伊波拉病毒-H5 TM+CT 的 PDISP-GP 之胺基酸序列 (SEQ ID NO. 49)。第 13I 圖顯示基因構築體編號 1366 的示意圖。第 13J 圖顯示伊波拉病毒糖蛋白 (GP) 蛋白質表現之免疫墨點分析。將五百毫微克攪入由模擬滲透的植物萃取之 20 μ g 蛋白質並裝載作為陽性控制組 (C+)。將由模擬滲透的植物中萃取之二十微克蛋白質裝載作為陰性控制組 (C-)。基因構築體編號 1366 包含帶有野生型信號肽以及 H5A/ Indo TM+CT 區域之伊波拉病毒 GP 基因。括號中的數字表示使用於滲透接種物製備的起始細菌培養量。(200) 表示將 200 ml 培養物以 2,3 L 滲透緩衝液混合, 以及 (400) 表示將 400 ml 培養物以 2,1 L 滲透緩衝液混合。

【主要元件符號說明】

HIV：人類免疫缺陷病毒

PacI：啟動子上游

AscI：緊接 NOS 終止子的下游

NOS：胭脂胺酸合成酶

PDISP：苜蓿草蛋白質雙硫異構酶

CT：胞質尾

TM：穿膜

XmaI：啟動子質體藍素啟動子之上游

EcoRI：緊接質體藍素終止子的下游

TBSV：番茄叢矮病毒

SP：信號肽

PDI：編碼苜蓿草

Env：成熟 HIV ConS Δ CFI

H3/H5：流感

RabG：狂犬病醣蛋白 G

CPMV：豇豆嵌紋病毒

BeYDV：豆類黃矮病毒

VZV：水痘帶狀疱疹病毒

VZVgE：水痘帶狀疱疹病毒醣蛋白 E

SARS Gs：嚴重急性呼吸道症候群病毒醣蛋白 S

SARS：嚴重急性呼吸道症候群

M：膜

EboGP：薩伊伊波拉病毒 GP

序列列表

- <110> Medicago Inc.
D'Aoust, Marc-Andre
Couture, Manon
Lavoie, Pierre-Olivier
Vezina, Louis-Philippe
- <120> 植物中類病毒顆粒生產
- <130> V83777WO
- <150> US 61/426,401
<151> 2010-12-22
- <150> US 61/496,371
<151> 2011-06-13
- <160> 49
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 2376
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> HIV ConS (delta) CFI 之共同核酸序列
- <400> 1
atgcgcgtgc gcggcatcca gcgcaactgc cagcacctgt ggcgctgggg caccctgatc 60
ctgggcatgc tgatgatctg ctccgccgcc gagaacctgt gggtgaccgt gtactacggc 120
gtgcccgtgt ggaaggaggc caacaccacc ctgttctgcg cctccgacgc caaggcctac 180
gacaccgagg tgcacaactgt gtgggccacc cacgcctgcg tgcccacoga cccaacccc 240
caggagatcg tgctggagaa cgtgaccgag aactcaaca tgtggaagaa caacatggtg 300

gagcagatgc acgaggacat catctccctg tgggaccagt ccctgaagcc ctgctgaag	360
ctgaccccc tgtgctgac cctgaactgc accaactga acgtgacaa caccaccaac	420
aacaccgagg agaaggcga gatcaagaac tgccttca acatcaccac cgagatccgc	480
gacaagaagc agaagggtga cgcctgttc taccgctgg acgtggtgcc catcgacgac	540
aacaacaaca actcctcaa ctaccgctg atcaactgca acacctccgc catcaccag	600
gcctgcccc aaggtgtcct cgagcccatc cccatccact actgcccc cgccgcttc	660
gccatcctga agtgaacga caagaagtic aacggcaccg gccctgcaa gaactgttc	720
accgtgcagt gcacccacgg catcaagccc gtggtgtcca cccagctgct gctgaacggc	780
tcctggccg aggaggagat catcatccgc tccgagaaca tcaccaaaa cgccaagacc	840
atcatctgc agctgaacga gtccgtggag atcaactgca cccgccccaa caacaacacc	900
cgcaagtcca tccgcatcgg ccccgccag gccttctac ccaccggcga catcatcggc	960
gacatccgc aggccactg caacatctcc ggcaccaagt ggaacaagac cctgcagcag	1020
gtggccaaga agtgcgcga gcacttcaac aacaagacca tcatctcaa gccctctcc	1080
ggcggcgacc tggagatcac caccactcc tcaactgcc gggcgagti cttctactgc	1140
aacacctccg gcctgtcaa ctccacctgg atcggcaacg gcaccaagaa caacaacaac	1200
accaacgaca ccatcacct gccctgccgc atcaagcaga tcatcaacat gtggcagggc	1260
gtgggccagg ccatgtacgc ccccccatc gagggcaaga tcacctgcaa gtccaacatc	1320
accggcctgc tgctgaccgc cgacggcggc aacaacaaca ccaacgagac cgagatcttc	1380
cgccccggcg gcggcgacat gcgcgacaac tggcgtccg agctgtacaa gtacaaggtg	1440
gtgaagatcg agccccggg cgtggcccc accaaggcca agctgaccgt gcaggccccg	1500
cagctgctgt ccggcatcgt gcagcagcag tccaacctgc tgcgcgcat cgaggcccag	1560

cagcacctgc tgcagctgac cgtgtggggc atcaagcagc tgcaggcccg cgtgctggcc 1620
 gtggagcgcct acctgaagga ccagcagctg ctggagatct gggacaacat gacctggatg 1680
 gagtgggagc gcgagatcaa caactacacc gacatcatct actccctgat cgaggagtcc 1740
 cagaaccagc aggagaagaa cgagcaggag ctgctggccc tggacaagtg ggccctccctg 1800
 tggaactggt tcgacatcac caactggctg tggatcatca agatcttcat catgatcgtg 1860
 ggcggcctga tcggcctgcg catcgtgttc gccgtgctgt ccatcgtgaa ccgcgtgcg 1920
 cagggctact cccccctgtc ctccagacc ctgatccca acccccgcg ccccgaccg 1980
 cccgagggca tcgaggagga gggcggcgag caggaccgcg accgctccat ccgctggtg 2040
 aacggcttc tggccctggc ctgggacgac ctgcgctccc tgtcctgtt ctctaccac 2100
 cgctgcgcg acttcatct gatcgccgc cgcaccgtgg agctgctggg ccgcaaggc 2160
 ctgcgccgcg gctgggagcg cctgaagtac ctgtggaacc tgctgcagta ctggggccag 2220
 gagctgaaga actccgcat ctccctgctg gacaccaccg ccatcgccgt ggccgagggc 2280
 accgaccgcg tgatcaggt ggtgcagcgc gcctgccgcg ccatcctgaa catccccgc 2340
 cgcatccgc agggcctgga gcgcgccctg ctgtaa 2376

<210> 2
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IF-ApaI-SpPDI.c

<400> 2
 tgcccaaatt tgcggggccc atggcgaaaa acgttgcgat tticggctta 50

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SpPDI-HIV gp145.r

<400> 3

cacaggttct cggcggcgaa gatctgagaa ggaaccaaca caagaagag

49

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-SpPDI-gp145.c

<400> 4

tctcagatct tcgccgccga gaacctgtgg gtgacctgt actac

45

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> WtTM-gp145.r

<400> 5

cctttacagc agggcgcgct ccaggccctg gcggatgc

38

<210> 6

<211> 4155

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表現卡匣編號 995

<400> 6

ttaattaagt cgacaagctt gcatgccggt caacatgggt gagcacgaca cacttgctca	60
ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga ctttcaaca	120
aagggaata tccggaacc tcctcggatt ccattgcca gctatctgtc actttattgt	180
gaagatagt gaaaaggaag gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc	240
catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag	300
catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgataa	360
catggtggag cagcacacac ttgtctactc caaaaatata aaagatacag tctcagaaga	420
ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca	480
ttgccagct atctgtcact ttatttgtaa gatagtggaa aaggaagggt gctcctacaa	540
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgtcc	600
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	660
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca	720
ctatcctcag caagaccctt cctctatata aggaagtca tttcatttgg agaggatta	780
aaatcttaat aggtttgat aaaagcgaac gtggggaaac ccgaaccaa ccttctcta	840
aactctctct catctctctt aaagcaaact tctctctgt ctttcttgcg tgagcgaat	900
tcaacgttgt cagatcgtgc ttcggcacca gtacaacgtt ttcttctact gaagcgaat	960
caaagatctc ttgtggaca cgtagtgcgg cgccattaaa taacgtgtac ttgtcctatt	1020
ctgtcgggtg tggtcttggg aaaagaaagc ttgctggagg ctgctgtica gcccataca	1080

ttacttgta cgattctgct gactttcggc gggtgcaata tctctacttc tgcttgacga	1140
ggattgtg cctgtactic ttcttcttc ttctgtcga ttggttctat aagaaatcta	1200
gtatttctt tgaacagag ttccctg gtttcgaac ttggagaaag attgtaagc	1260
ttctgtatat tctgccccaaa ttgtcgggc ccatggcgaa aaacgttgcg atttcggct	1320
tattgttctc tcttctgtg ttggttctt ctcagatctt cgccgccgag aacctgtggg	1380
tgacctgta ctacggcgtg cccgtgtgga aggaggccaa caccaccctg ttctgcgct	1440
ccgacgccaa ggcctacgac accgaggtgc acaacgtgtg ggccaccac gcctgcgtgc	1500
ccaccgacc caacccccag gagatcgtgc tggagaacgt gaccgagaac ttcaacatgt	1560
ggaagaacaa catggtggag cagatgcacg aggacatcat ctccctgtgg gaccagtccc	1620
tgaagccctg cgtgaagctg acccccctgt gcgtgaccct gaactgcacc aacgtgaacg	1680
tgaccaacac caccaacaac accgaggaga agggcgagat caagaactgc tcctcaaca	1740
tcaccaccga gatccgcgac aagaagcaga aggtgtacgc cctgttctac cgcttgacg	1800
tggtgcccat cgacgacaac aacaacaact ctccaacta ccgctgatc aactgcaaca	1860
cctccgccat caccagggc tgcaccaagg tgccttcga gcccatcccc atccactact	1920
gcgccccgc cggcttcgcc atcctgaagt gcaacgacaa gaagtcaac ggcaccggcc	1980
cctgcaagaa cgtgtccacc gtgcagtga cccacggcat caagcccgtg gtgtccacc	2040
agctgctgct gaacggctcc ctggccgagg aggagatcat catccgctcc gagaacatca	2100
ccaacaacgc caagaccatc atcgtgcagc tgaacgagtc cgtggagatc aactgcacc	2160
gccccaaaa caacaccgc aagtccatcc gcatcggccc cggccaggcc ttctacgcca	2220
ccggcgacat catcggcgac atccgccagg cccactgcaa catctccggc accaagtga	2280
acaagaccct gcagcaggtg gccaaagaagc tgcgcgagca cttcaacaac aagaccatca	2340

tctcaagcc ctctccggc ggcgacctg agatcaccac cactccttc aactgccg	2400
gcgagtctt ctactgcaac acctccggcc tgttcaact cacctggatc ggcaacggca	2460
ccaagaacaa caacaacacc aacgacacca tcacctgcc ctgccgcatc aagcagatca	2520
tcaacatgtg gcagggcgtg ggccaggcca tgtacgcccc ccccatcgag ggcaagatca	2580
cctgcaagtc caacatcacc ggctgtctg tgacctgca cgccggcaac aacaacacca	2640
acgagaccga gatctccgc cccggcggcg gcgacatgcg cgacaactgg cgctccgagc	2700
tgtacaagta caagtggtg aagatcgagc cctggggcgt ggccccacc aaggccaagc	2760
tgacctgca ggcccgcag ctgctgtccg gcatcgtgca gcagcagtcc aacctgctg	2820
gcgccatga ggcccagcag cacctgctg agctgacctg gtggggcatc aagcagctg	2880
aggcccgcgt gctggccgtg gagcgctacc tgaaggacca gcagctgctg gagatctggg	2940
acaacatgac ctggatggag tgggagcgc agatcaacaa ctacaccgac atcatctact	3000
ccctgatcga ggagtccag aaccagcagg agaagaacga gcaggagctg ctggccctgg	3060
acaagtgggc ctccctgtgg aactggttcg acatcaccaa ctggctgtgg tacatcaaga	3120
tcttcaicat gatcgtgggc ggctgatcg gcctgcgat cgtgttcgcc gtgctgtcca	3180
tcgtgaaccg cgtgcgccag ggtactccc cctgtctt ccagaccctg atcccaacc	3240
cccgcggccc cgaccgccc gagggcatcg aggaggagg cgccgagcag gaccgagacc	3300
gctccatccg cctggtgaac ggcttctgg cctggcctg ggacgacctg cgctccctgt	3360
gcctgttctc ctaccaccgc ctgcgcgact tcactctgat cgccgcccgc accgtggagc	3420
tgctgggccc caagggcctg cgcccggtt gggaggccct gaagtacctg tggaacctgc	3480
tgcaagtctg gggccaggag ctgaagaact ccgcatctc cctgctggac accaccgcca	3540

tcgccgtggc cgagggcacc gaccgctga tcgaggtggt gcagcgcgcc tgcgcgcca 3600
 tcctgaacat cccccccgc atccgccagg gcctggagcg cgcctgctg taaaggccta 3660
 tttcttag ttgaattta ctgttaticg gtgtgcatt ctatgttgg tgagcggtt 3720
 tctgtgctca gagtgtgtt atttatgta atttaattc ttgtgagct cctgttagc 3780
 aggtcgtccc tcagcaagg acacaaaag atttaattt tattaaaaa aaaaaaaaa 3840
 aagaccggga atcgatatac aagcttatcg acctgcagat cgtcaaca tttggcaata 3900
 aagtticta agattgaac ctgttgccgg tctgcatg attatcatat aatttctgt 3960
 gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgatg acgttattta tgagatgggt 4020
 tttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aatatagcg 4080
 cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg ttactagatc tctagagtct 4140
 caagcttggc gcgcc 4155

<210> 7

<211> 772

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDISP-HIV ConS (delta) CFI 之胺基酸序列

<400> 7

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val

1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Ala Glu Asn Leu Trp Val Thr Val

20 25 30

Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Asn Thr Thr Leu Phe Cys
 35 40 45

Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala
 50 55 60

Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Ile Val Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu
 85 90 95

Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro
 100 105 110

Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn Cys Thr Asn Val
 115 120 125

Asn Val Thr Asn Thr Thr Asn Asn Thr Glu Glu Lys Gly Glu Ile Lys
 130 135 140

Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Ile Arg Asp Lys Lys Gln Lys
 145 150 155 160

Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn
 165 170 175

Asn Asn Asn Ser Ser Asn Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala
 180 185 190

Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His

195	200	205	
Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys			
210	215	220	
Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr			
225	230	235	240
His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser			
	245	250	255
Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn Asn			
	260	265	270
Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys			
	275	280	285
Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly			
290	295	300	
Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala			
305	310	315	320
His Cys Asn Ile Ser Gly Thr Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gln Val			
	325	330	335
Ala Lys Lys Leu Arg Glu His Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys			
	340	345	350
Pro Ser Ser Gly Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys			
	355	360	365

Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser Thr
 370 375 380

Trp Ile Gly Asn Gly Thr Lys Asn Asn Asn Asn Thr Asn Asp Thr Ile
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Gly Val
 405 410 415

Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Lys Ile Thr Cys Lys
 420 425 430

Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn
 435 440 445

Thr Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460

Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 485 490 495

Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 500 505 510

Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln
 515 520 525

Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 530 535 540

Leu Leu Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu
 545 550 555 560

Ile Asn Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln
 565 570 575

Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp
 580 585 590

Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile
 595 600 605

Lys Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val
 610 615 620

Phe Ala Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro
 625 630 635 640

Leu Ser Phe Gln Thr Leu Ile Pro Asn Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro
 645 650 655

Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Gln Asp Arg Asp Arg Ser Ile
 660 665 670

Arg Leu Val Asn Gly Phe Leu Ala Leu Ala Trp Asp Asp Leu Arg Ser
 675 680 685

Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Phe Ile Leu Ile Ala
 690 695 700

Ala Arg Thr Val Glu Leu Leu Gly Arg Lys Gly Leu Arg Arg Gly Trp
 705 710 715 720

Glu Ala Leu Lys Tyr Leu Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Gly Gln Glu
 725 730 735

Leu Lys Asn Ser Ala Ile Ser Leu Leu Asp Thr Thr Ala Ile Ala Val
 740 745 750

Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Arg Ala Cys Arg
 755 760 765

Ala Ile Leu Asn
 770

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-H3dTm+gp145.r

<400> 8

ccatagtatc caatcgatgt accacagcca gttggtgatg tcgaac 46

<210> 9

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Gp145+H3TM.c

<400> 9

tggtctggg acatcgattg gatactatgg atttcctttg ccatatcat 49

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> H3dTM.r

<400> 10

ccttcaaatg.caaatgttgc acctaattgt gcctt 35

<210> 11

<211> 3735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表現卡匣編號 997

<400> 11

ttaattaagt cgacaagctt gcatgccggt caacatggg gagcacgaca cactgtcta 60

ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga ctttcaaca 120

aagggttaata tccggaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt 180

gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgcat cattgagata aaggaaaggc 240

catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag 300

catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgataa 360

catggiggag cagcacacac ttgtctactc caaaaatata aaagatacag ttcagaaga 420

ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc toggattcca	480
ttgccagct atctgtcact ttatttgaa gatagtggaa aaggaagggtg gctcctacaa	540
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgggcc	600
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	660
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca	720
ctatccttgc caagacctt cctctatata aggaagtcca ttccattgg agaggtatta	780
aaatcttaat aggttttgat aaaagcgaac gtggggaaaac ccgaacccaaa ccttcttcta	840
aactctctct catctctctt aaagcaaaact tctctctgtt ctttcttgcg tgagcgatct	900
tcaacgttgt cagatcgtgc ttcggcacca gtacaacgtt ttcttctact gaagcgaat	960
caaagatctc ttgtggaca cgtagtgcgg cgccattaaa taacgtgtac ttgtcctatt	1020
ctgtcgggtg tggcttggg aaaagaaagc ttgtggagg ctgctgttca gcccataca	1080
ttacttgta cgattctgct gactttcggc ggggtcaata tctctacttc tgcttgacga	1140
ggattgttg cctgtacttc ttcttcttc ttctgtctga ttggttctat aagaaatcta	1200
gtatttctt tgaacagag ttctccgtg gtttctgaac ttggagaaaag attgtaagc	1260
ttctgtatat tctgccc aaa ttgtcgggc ccatggcgaa aaacgttgcg atttctggct	1320
tattgtttc tcttctgtg ttggttctt ctcagatctt cgccgccgag aacctgtggg	1380
tgaccgtgta ctacggcgtg cccgtgtgga aggaggccaa caccacctg ttctgcgcct	1440
ccgacgccaa ggcctacgac accgaggtgc acaacgtgtg ggccaccac gcctgcgtgc	1500
ccaccgacc caacccccag gagatcgtgc tggagaacgt gaccgagaac ttcaacatgt	1560
ggaagaacaa catggtggag cagatgcacg aggacatcat ctccctgtgg gaccagtccc	1620

tgaagccctg cgtgaagctg acccccctgt gcgtgacct gaactgcacc aacgtgaacg	1680
tgaccaacac caccaacaac accgaggaga agggcgagat caagaactgc tcctcaaca	1740
tcaccaccga gatccgcgac aagaagcaga aggtgtacgc cctgttctac cgcttggacg	1800
tggtgcccat cgacgacaac aacaacaact cctccaacta ccgcctgatc aactgcaaca	1860
cctccgccat caccaggcc tgcccaagg tgccttoga gcccatccc atccactact	1920
gcgccccgc cggcttcgcc atcctgaagt gcaacgacaa gaagttcaac ggcaccggcc	1980
cctgcaagaa cgtgtccacc gtgcagtga cccacggcat caagcccgtg gtgtccacc	2040
agctgctgct gaacggctcc ctggccgagg aggagatcat catccgctcc gagaacatca	2100
ccaacaacgc caagaccatc atcgtgcagc tgaacgagtc cgtggagatc aactgcacc	2160
gccccacaa caacaccgc aagtccatcc gcatcggccc cggccaggcc ttctacgcca	2220
ccggcgacat catcggcgac atccgccagg cccactgcaa catctccggc accaagtgga	2280
acaagaccct gcagcaggtg gccagaagc tgcgcgagca ctcaacaac aagaccatca	2340
tcctcaagcc ctctccggc ggcgacctg agatcaccac cactccttc aactgcccg	2400
gcgagttct ctactgcaac acctccggcc tgttcaactc cacctggatc ggcaacggca	2460
ccaagaacaa caacaacacc aacgacacca tcaccctgcc ctgccgcatc aagcagatca	2520
tcaacatgtg gcagggcgtg ggccaggcca tgtacgccc ccccatcgag ggcaagatca	2580
cctgcaagtc caacatcacc ggctgtctgc tgaccgcga cggcggcaac aacaacacca	2640
acgagaccga gatctccgc ccggcggcg gcgacatgcg cgacaactgg cgctccgagc	2700
tgtacaagta caagtggtg aagatcgagc ccttggcgt ggccccacc aaggccaagc	2760
tgaccgtgca ggcccggcag ctgctgtccg gcatctgca gcagcagtc aacctgctgc	2820
gcgccatga ggcccagcag cacctgtctgc agctgacct gtggggcatc aagcagctgc	2880

aggcccgctg gctggccgtg gagcgctacc tgaaggacca gcagctgctg gagatctggg 2940
 acaacatgac ctggatggag tgggagcgcg agatcaacaa ctacaccgac atcatctact 3000
 ccctgacga ggagtcccag aaccagcagg agaagaacga gcaggagctg ctggccctgg 3060
 acaagtgggc ctccctgtgg aactggttcg acatcaccaa ctggctgtgg tacatcgatt 3120
 ggatactatg gatttcctt gccatatcat gtttttgc tttgtgtgct ttgttgggt 3180
 tcatcatgtg ggctgccaa aaaggcaaca ttagtgcaa cattgcatt tgaaggccta 3240
 tttcttag ttgaatta ctgtattcg gtgtgcatt ctatgttgg tgagcgttt 3300
 tctgtctca gagtgtgtt atttatgta attaattc ttgtgagct cctgtttagc 3360
 aggtcgtccc ttcagcaagg acacaaaaag atttaattt tattaaaaa aaaaaaaaaa 3420
 aagaccggga atcgatac aagcttatc acctgcagat cgttcaaca ttggcaata 3480
 aagtttcta agattgaac ctgtgccg icttgcgat attatcatat aatttctgt 3540
 gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt 3600
 tttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aatatagcg 3660
 cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc tctagagtct 3720
 caagcttggc gcgcc 3735

<210> 12

<211> 646

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PDISP-HIV ConS (delta) CFI-A/布利斯班/10/2007 H3 TM+CY 之胺基酸序列

<400> 12

Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn
 165 170 175

Asn Asn Asn Ser Ser Asn Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala
 180 185 190

Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His
 195 200 205

Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys
 210 215 220

Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr
 225 230 235 240

His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser
 245 250 255

Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn Asn
 260 265 270

Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys
 275 280 285

Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly
 290 295 300

Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala
 305 310 315 320

His Cys Asn Ile Ser Gly Thr Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gln Val

	325	330	335
Ala Lys Lys Leu Arg Glu His Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys			
	340	345	350
Pro Ser Ser Gly Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys			
	355	360	365
Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser Thr			
	370	375	380
Trp Ile Gly Asn Gly Thr Lys Asn Asn Asn Asn Thr Asn Asp Thr Ile			
	385	390	395
			400
Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Gly Val			
	405	410	415
Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Lys Ile Thr Cys Lys			
	420	425	430
Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn			
	435	440	445
Thr Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp			
	450	455	460
Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro			
	465	470	475
			480
Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln			
	485	490	495

Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 500 505 510

Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln
 515 520 525

Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 530 535 540

Leu Leu Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu
 545 550 555 560

Ile Asn Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln
 565 570 575

Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp
 580 585 590

Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile
 595 600 605

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
 610 615 620

Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
 625 630 635 640

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
 645

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-H5TM+gp145.r

<400> 13

aattgacagt attggatgt accacagcca gttggtgatg tcgaac

46

<210> 14

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Gp145+H5TM.c

<400> 14

ctggctgtgg tacatccaaa tactgtcaat ttattcaaca gtggc

45

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-H5TM.r

<400> 15

cctttaaag caaattctgc attgtaacga tccat

35

<210> 16

<211> 3735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表現卡匣編號 999

<400> 16

ttaattaagt cgacaagctt gcatgccggt caacatggg gagcacgaca cacttgtcta	60
ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga ctttcaaca	120
aagggtaata tccggaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt	180
gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc	240
catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag	300
catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtataa	360
catggggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatc aaagatacag tctcagaaga	420
caaagggca attgagactt tcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca	480
ttgccagct aictgtcact ttatttgtaa gatagtggaa aaggaagggtg gctctacaa	540
atgcatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgtcc	600
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	660
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatctc cactgacgta agggatgacg cacaatcca	720
ctatcctcg caagaccctt cctctatata aggaagtca ttcattigg agaggtatta	780
aaatctaat aggtttgat aaaagcgaac gtggggaaac ccgaaccaa ccttctcta	840
aactctctct caictctctt aaagcaaact tctctcttgt cttcttgcg tgagcgtct	900
tcaacgtgt cagatogtc ttccgacca gtacaacgtt ttcttcaact gaagcgaat	960
caaagatctc ttgtggaca cgtagtgcgg cgccataaa taacgtgtac ttgtctatt	1020
ctgtcgggtg tggcttggg aaaagaaagc ttgctggagg ctgctgttca gcccataca	1080

ttacttgta cgattctgct gacttcggc gggtgcaata tctctactc tgcttgacga 1140
 ggtattgtg cctgtactc tttctcttc ttcttgctga ttggttctat aagaaatcta 1200
 gtatttctt tgaacacagag tttcccgtg gtttcgaac ttggagaaag attgtaagc 1260
 ttctgtatat tctgccaaa ttgtcgggc ccatggcgaa aaacgttgcg atttcggct 1320
 tattgtttc tcttctgtg ttggttcctt ctcatctt cggcccgag aacctgtggg 1380
 tgaccgtgta ctacggcgtg cccgtgtgga aggaggccaa caccaccctg ttctgcct 1440
 ccgacgcaa ggcctacgac accgaggcgc acaacgtgtg ggccaccac gcctgcgtg 1500
 ccaccgacc caacccccag gagatcgtgc tggagaacgt gaccgagaac tcaacatgt 1560
 ggaagaacaa catggtggag cagatgcacg aggacatcat ctccctgtgg gaccagtccc 1620
 tgaagccctg cgtgaagctg acccccctgt gcgtgacct gaactgcacc aactgaacg 1680
 tgaccaacac caccaacaac accgaggaga agggcgagat caagaactgc tcttcaaca 1740
 tcaccaccga gatccgcgac aagaagcaga aggtgtacgc cctgttctac cgcctggacg 1800
 ttgtgccat cgacgacaac aacaacaact cctccaacta ccgctgac aactgcaaca 1860
 cctccgcat caccaggcc tgcaccaagg tgccttca gccatccc atccactact 1920
 gcgccccgc cggcttgc atctgaagt gcaacgacaa gaagtcaac ggcaccggcc 1980
 cctgcaagaa cgtgtccacc gtgcagtga cccacggcat caagcccgtg gtgtccacc 2040
 agctgtctgt gaacggctcc ctggccgagg aggagatcat catccgtcc gagaacatca 2100
 ccaacaacgc caagaccatc atcgtgcagc tgaacgagtc cgtggagatc aactgcacc 2160
 gccccaaaa caacaccgc aagtccatcc gcatcgccc cggccaggcc ttctacgcca 2220
 ccggcgacat catcggcgac atccgccagg cccactgcaa catctccgc accaagtga 2280
 acaagacct gcagcaggtg gccaagaagc tgcgcgagca ctcaacaac aagaccatca 2340

tcttcaagcc ctctccggc ggcgacctgg agatcaccac cactccttc aactgccg	2400
gcgagtctt ctactgcaac acctccggcc tgttcaactc cacctggatc ggcaacggca	2460
ccaagaacaa caacaacacc aacgacacca tcaccctgcc ctgccgcatc aagcagatca	2520
tcaacatgtg gcagggcgtg ggccaggcca tgtacgcccc ccccatcgag ggcaagatca	2580
cctgcaagtc caacatcacc ggctgtctgc tgaccgcga cggcggcaac aacaacacca	2640
acgagaccga gatctccgc cccggcggcg gcgacatgcg cgacaactgg cgctccgagc	2700
tgtacaagta caaggtggtg aagatcgagc ccctgggcgt ggccccacc aaggccaagc	2760
tgaccgtgca ggcccggcag ctgctgtccg gcatcgtgca gcagcagtcc aacctgctgc	2820
gcgccatcga ggcccagcag cacctgctgc agctgaccgt gtggggcatc aagcagctgc	2880
aggcccgcgt gctggccgtg gagcgtacc tgaaggacca gcagctgctg gagatctggg	2940
acaacatgac ctggatggag tgggagcgcg agatcaacaa ctacaccgac atcatctact	3000
ccctgatcga ggagtcccag aaccagcagg agaagaacga gcaggagctg ctggccctgg	3060
acaagtgggc ctccctgtgg aactggttcg acatcaccaa ctggctgtgg tacatcaaaa	3120
tactgtcaat ttattcaaca gtggcgagtt cctagcact ggcaatcatg atggctggtc	3180
taicttatg gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag aattgcatt taaaggccta	3240
ttttcttag ttgaattta ctgtattcg gtgtgcattt ctatgtttgg tgagcggttt	3300
tctgtgctca gagtgtgttt atttatgta atttaattc ttgtgagct cctgtttagc	3360
aggtcgtccc tcagcaagg acacaaaaag attttaatti tattaaaaaa aaaaaaaaaa	3420
aagaccggga atcgatatc aagcttatcg acctgcagat cgttcaacaa tttggcaata	3480
aagtttcta agattgaatc ctgttccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt	3540

gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt 3600
 ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg 3660
 cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggg gtcctctatg ttactagatc tctagagtct 3720
 caagcttggc gcgcc 3735

<210> 17
 <211> 646
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PDISP-HIV ConS
 (delta) CFI-A/印尼/5/2005 H5 TM+CY 之胺基酸序列

<400> 17

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Ala Glu Asn Leu Trp Val Thr Val
 20 25 30

Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Asn Thr Thr Leu Phe Cys
 35 40 45

Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala
 50 55 60

Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Ile Val Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu

85

90

95

Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro
 100 105 110

Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn Cys Thr Asn Val
 115 120 125

Asn Val Thr Asn Thr Thr Asn Asn Thr Glu Glu Lys Gly Glu Ile Lys
 130 135 140

Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Ile Arg Asp Lys Lys Gln Lys
 145 150 155 160

Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn
 165 170 175

Asn Asn Asn Ser Ser Asn Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala
 180 185 190

Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His
 195 200 205

Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asp Lys Lys
 210 215 220

Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr
 225 230 235 240

His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser
 245 250 255

Leu Ala Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn Asn
 260 265 270

Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys
 275 280 285

Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly
 290 295 300

Gln Ala Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala
 305 310 315 320

His Cys Asn Ile Ser Gly Thr Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gln Val
 325 330 335

Ala Lys Lys Leu Arg Glu His Phe Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys
 340 345 350

Pro Ser Ser Gly Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys
 355 360 365

Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Ser Thr
 370 375 380

Trp Ile Gly Asn Gly Thr Lys Asn Asn Asn Asn Thr Asn Asp Thr Ile
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Gly Val
 405 410 415

Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Lys Ile Thr Cys Lys
 420 425 430

Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn
 435 440 445

Thr Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp
 450 455 460

Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro
 465 470 475 480

Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln
 485 490 495

Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 500 505 510

Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln
 515 520 525

Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln
 530 535 540

Leu Leu Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu
 545 550 555 560

Ile Asn Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln
 565 570 575

Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp
 580 585 590

Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile
 595 600 605

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala
 610 615 620

Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 625 630 635 640

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 645

- <210> 18
- <211> 1967
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 表現卡匣編號 172

<400> 18
 cccgggctgg tatattata tgtgtcaaa taactcaaaa accataaaag ttaagttag 60
 caagtgtga ctttttact tgaacaaaa tattcaccta ctactgttat aaatcattat 120
 taaacattag agtaaagaaa tatggatgat aagaacaaga gtagtgatat ttgacaaca 180
 atttgttgc aacattgag aaaatttgt tgttctctct tticattggc caaaaacaat 240
 agagagagaa aaaggaagag ggagaataaa aacataatgt gtagtgaga gagaaagttg 300
 tacaaaagtt gtacaaaat agttgtacaa atatcattga ggaattgac aaaagctaca 360

caaataaggg ttaattgctg taaataaata aggatgacgc attagagaga tgtaccatta	420
gagaattht ggcaagtcat taaaagaaa gaataaatta thtttaaat taaaagttga	480
gtcattgat taaacatgtg attattaat gaattgatga aagagttgga ttaaagttgt	540
attagtaatt agaattggt gtcaaatta attgacatt tgatctttc ctatatattg	600
ccccatagag tcagttact cattttata tttcatagat caaataagag aaataacggt	660
atattaatcc ctccaaaaa aaaaaacggt atatttacta aaaaatctaa gccacgtagg	720
aggataacag gatccccgta ggaggataac atccaatcca accaatcaca acaatcctga	780
tgagataacc cactttaagc ccacgcatct gtggcacatc tacattatct aaatcacaca	840
ttctccaca catctgagcc acacaaaaac caatccacat ctttatcacc cattctataa	900
aaatcacac ttgtgagtc tacacttga ttccttcaa acacatacaa agagaagaga	960
ctaattaatt aattaatcat ctgagagaa aatggaacga gctatacaag gaaacgacgc	1020
tagggaacaa gctaacagt aacgttggga tggaggatca ggaggtacca ctctccctt	1080
caaacttct gacgaaagtc cgagttggac tgagtggcgg ctacataacg atgagacgaa	1140
ttcgaatcaa gataatccc ttggttcaa ggaaagctgg ggttcggga aagttgtatt	1200
taagagatat ctgagatag acaggacgga agcttactg cacagagtcc ttgatcttg	1260
gacgggagat tcggttaact atgcagcatc tcgattttc ggttcgacc agatcggatg	1320
tacctatagt attcggttc gaggagttag taccacctt tctggagggt cgcgaactct	1380
tcagcatctc tgtgagatgg caattcggtc taagcaagaa ctgctacagc ttgccccaat	1440
cgaagtggaa agtaatgtat caagaggatg ccctgaaggt actcaaacct tcgaaaaaga	1500
aagcgagtaa gtcgagggcg agctctaagt taaaatgctt ctctgtctcc tatttataat	1560
atggtttgtt attgtaatt ttgttctgt agaagagctt aattaatcgt tgttgtatg	1620

aaatactatt tgtatgagat gaactggtgt aatgtaattc atttacataa gtggagtcag 1680
 aatcagaatg tttctccat aactaactag acatgaagac ctgccgcgta caattgtctt 1740
 atattigaac aactaaaatt gaacatcttt tgccacaact ttataagtgg ttaatatagc 1800
 tcaaatatat ggtcaagttc aatagattaa taatggaaat atcagttatc gaaattcatt 1860
 aacaatcaac ttaacgttat taactactaa tttatatca tccccttga taaatgatag 1920
 tacaccaatt aggaaggagc atgctcgagg cctggctggc cgaattc 1967

<210> 19

<211> 172

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TBSV P19 沉默抑制子之胺基酸序列

<400> 19

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
 1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
 20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu
 35 40 45

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
 50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-H5TM+VZV.gE.r

<400> 21

aattgacagt atttgcgta gaagtgggta cgttccgggg tttagc 46

<210> 22

<211> 1872

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 VZV gE 基因 (與來自 Genebank 登錄號 AY013752.1 之 nt 3477-5348 相對應)

<400> 22

atggggacag ttaataaacc tgtggggtggg gtattgatgg ggttcggaat tatcacggga 60

:acgttgcgta taacgaatcc ggtcagagca tccgtcttgc gatacgaatga tttcacacc 120

gatgaagaca aactggatac aaactccgta tatgagcctt actaccatfc agatcatgcg 180

gagtcttcat gggtaaactcg gggagagtct tcgcgaaaag cgtacgatca taactcacct 240

tatatatggc cacgtaatga ttatgatgga ttttagaga acgcacacga acacatggg 300

gtgtataatc agggccgtgg tatcgatagc ggggaacggg taatgcaacc cacacaaatg 360

tctgcacagg aggatcttgg ggacgatacg ggcacccacg ttatccctac gttaaacggc 420

gatgacagac ataaaattgt aatgtggac caacgtcaat acggtgacgt gtttaaagga 480

gatcttaatc caaaaccca aggccaaaga ctattgagg tgcagtgga agaaaatcac 540

ccgttactt tacgcgcacc gattcagcgg atttatggag tccggtacac cgagacttgg 600

agctttttgc cgtcattaac ctgtacggga gacgcagcgc ccgcatcca gcatatatgt 660

ttaaaacata caacatgctt tcaagacgtg gtggtggatg tggattgocg gaaaataact	720
aaagaggatc agttggccga aatcagttac cgtttcaag gtaagaagga agcggaccaa	780
ccgtggattg ttgtaaacac gagcacactg ttgatgaac tcgaattaga ccccccgag	840
attgaaccgg gtgtcttgaa agtacttcgg acagaaaaac aatactggg tgtgtacatt	900
tggaacatgc gcggctccga tggtagctt acctacgcca cgttttggg cacctggaaa	960
ggggatgaaa aaacaagaaa ccctacgccc gcagtaactc ctcaaccaag aggggctgag	1020
ttcatatgt ggaattacca ctgcatgta tttcagttg gtgatacgtt tagcttgca	1080
atgcatctc agtataagat acatgaagcg ccattgatt tgctgttaga gtggtgtat	1140
gtccccatcg atcctacatg tcaaccaatg cggttatatt ctacgtgtt gtatcatccc	1200
aacgcacccc aatgcctctc tcatatgaat tccggttga catttacctc gccacattta	1260
gcccagcgtg ttgcaagcac agtgtatcaa aattgtgaac atgcagataa ctacaccgca	1320
tattgtctgg gaatatctca tatggagcct agctttggtc taatcttaca cgacgggggc	1380
accacgttaa agttttaga tacacccgag agtttgcgg gattatacgt ttttgggtg	1440
tattttaacg ggcattgga agccgtagca tacactgtt tatccacagt agatcattt	1500
gtaaacgcaa ttgaagagcg tggatticcg ccaacggccg gtcagccacc ggcgactact	1560
aaaccaaggg aaattacccc cgtaaacccc ggaacgtcac cactictacg atatgccgca	1620
tggaccggag ggcttcgagc agtagtacti ttatgtctcg taatatttt aatctgtacg	1680
gctaaacgaa tgagggttaa agcctatagg gtagacaagt ccccgataa ccaaagcatg	1740
tattacgctg gccttccagt ggacgattc gaggactcgg aatctacgga tacggaagaa	1800
gagtttgata acgcgattgg agggagtcac gggggttcga gttacacggt gtatatagat	1860

aagaccggg ga

1872

<210> 23

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VZVgE+H5TM.c

<400> 23

gccactgtg aataaattga cagtattgt cgtagaagtg gtgacg

46

<210> 24

<211> 3522

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表現卡匣編號 946

<400> 24

ttaattaagt cgacaagctt gcatgccggg caacatggg gagcacgaca cactgtcta

60

ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga ctttcaaca

120

aagggtaata tccggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt

180

gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc

240

catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag

300

catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caatggatt gatgtgataa

360

catggtggag cagcacacac ttgttactc caaaaatc aaagatacag ttcagaaga

420

ccaaagggca attgagactt ttcaacaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca

480

ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaagggtg gctcctaca

540

atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgggcc	600
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	660
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca	720
ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagtca tttcatttgg agaggtattia	780
aaatcttaat aggtttgat aaaagcgaac gtggggaaac ccgaaccaa ctttcttcta	840
aactctctct catctctctt aaagcaaaact tctctcttgt ctttcttgcg tgagcgtatct	900
tcaacgttgi cagatcgtgc ttcggcacca gtacaacgti ttctttcact gaagcgaat	960
caaagatctc ttgtggaca cgtagtgcgg cgccattaa taactgttac ttgtcctatt	1020
cttgcgggtg tggicttggg aaaagaaagc ttgctggagg ctgctgttca gccccataca	1080
ttactigtta cgattctgct gactttcggc gggtgcaata tctctacttc tgcttgacga	1140
ggatttgttg cctgtacttc ttcttcttc ttcttgctga ttggttctat aagaaatcta	1200
gtattttcti tgaacagag tticcctgtg gttttcgaac ttggagaaag attgtaagc	1260
ttctgtatat tctgcccaaa ttgtcgggc ccatggggac agttaataaa cctgtggtgg	1320
gggtattgat ggggttcgga attatcacgg gaacgttgcg tataacgaat ccggtcagag	1380
catccgtctt gcgatacgat gatttcaca ccgatgaaga caaactggat acaaactccg	1440
tatatgagcc ttactacat tcagatcatg cggagtcttc atgggtaaat cggggagagt	1500
cttcgcgaaa agcgtacgat cataactcac cttatatatg gccacgtaat gattatgatg	1560
gatttttaga gaacgcacac gaacaccatg ggggtgataa tcagggccgt ggtatcgata	1620
gcggggaacg gttaatgcaa cccacacaaa tctctgcaca ggaggatctt ggggacgata	1680
cgggcatcca cgttatccct acgttaaagc gcgatgacag acataaaatt gtaaattgtg	1740

accaacgtca atacgggtgac gtgtttaag gagatctta tccaaaaccc caaggccaaa	1800
gactcattga ggtgtcagtg gaagaaaatc acccgtttac ttacgcgca ccgattcagc	1860
ggatttatgg agtccggtag accgagactt ggagctttt gccgtcatta acctgtacgg	1920
gagacgcagc gcccgccatc cagcatatat gttaaaaca tacaacatgc ttcaagacg	1980
tgttggtgga tgtggattgc gcggaaaata ctaaagagga tcagtggcc gaaatcagtt	2040
accgtttca aggtaagaag gaagcggacc aaccgtggat tgttgtaaac acgagcacac	2100
tgttgatga actcgaatta gaccccccg agattgaacc ggggtcttg aaagtactic	2160
ggacagaaaa acaatacttg ggtgtgtaca ttggaacat gcgcggctcc gatggtacgt	2220
ctacctacgc cacgttttg gtcacctgga aaggggatga aaaaacaaga aaccctacgc	2280
ccgcagtaac icctcaacca agaggggctg agtttcatai gtggaattac cactcgcag	2340
tatttcagt tggatagc tttagcttg caatgcatct icagtataag atacatgaag	2400
cgccattga ttgctgta gagggtgt atgccccat cgtacctaca tgtcaaccaa	2460
tgcggtata ttctacgtgt ttgatcacc ccaacgcacc ccaatgcctc tctcatatga	2520
attccggtg tacatttacc tcgccacatt tagcccagcg tgttgcaagc acagtgtac	2580
aaaattgtga acatgcagat aactacaccg catattgtct gggaatatct catatggagc	2640
ctagcttgg tctaactta cagcagggg gcaccacgtt aaagtttga gatacccg	2700
agagttgtc gggattatac gttttgtgg tttatttaa cgggcatgtt gaagccgtag	2760
cataactgt tttatccaca gtagatcatt ttgtaaacgc aattgaagag cgtggattc	2820
cgccaacggc cgtcagcca ccggcgacta ctaaaccbaa ggaaattacc cccgtaaacc	2880
ccggaacgtc accacttcta cgacaaatac tgtcaattta ttcaacagtg gcgagttccc	2940
tagcactggc aatcatgatg gctggictat ctttatggat gtgctccaat ggatcgttac	3000

aatgcagaat ttgcatttaa aggcctattt tcttagtiti gaatttactg ttattcgggtg 3060
 tgcatttcta tgtttggiga gcggtttctt gigtccagag tgtgtttatt ttatgtaatt 3120
 taatttctti gtgagctcct gtttagcagg tcgtcccttc agcaaggaca caaaaagatt 3180
 ttaattttat taaaaaaaaa aaaaaaaaaag accgggaatt cgatatcaag cttatcgacc 3240
 tgcagatcgt tcaaacattt ggcaataaag tticttaaga ttgaatcctg ttgccggtct 3300
 tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgtaag catgtaataa ttaacatgta 3360
 atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta 3420
 atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc 3480
 atctatgta ctagatctct agagtctcaa gcttggcgcg cc 3522

- <210> 25
- <211> 575
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> VZV gE- A/印尼/5/2005 H5 TM+CY 之胺基酸序列

<400> 25

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

Ile Ile Thr Gly Thr Leu Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Ala Ser Val
 20 25 30

Leu Arg Tyr Asp Asp Phe His Thr Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Asn
 35 40 45

Ser Val Tyr Glu Pro Tyr Tyr His Ser Asp His Ala Glu Ser Ser Trp
 50 55 60

Val Asn Arg Gly Glu Ser Ser Arg Lys Ala Tyr Asp His Asn Ser Pro
 65 70 75 80

Tyr Ile Trp Pro Arg Asn Asp Tyr Asp Gly Phe Leu Glu Asn Ala His
 85 90 95

Glu His His Gly Val Tyr Asn Gln Gly Arg Gly Ile Asp Ser Gly Glu
 100 105 110

Arg Leu Met Gln Pro Thr Gln Met Ser Ala Gln Glu Asp Leu Gly Asp
 115 120 125

Asp Thr Gly Ile His Val Ile Pro Thr Leu Asn Gly Asp Asp Arg His
 130 135 140

Lys Ile Val Asn Val Asp Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly
 145 150 155 160

Asp Leu Asn Pro Lys Pro Gln Gly Gln Arg Leu Ile Glu Val Ser Val
 165 170 175

Glu Glu Asn His Pro Phe Thr Leu Arg Ala Pro Ile Gln Arg Ile Tyr
 180 185 190

Gly Val Arg Tyr Thr Glu Thr Trp Ser Phe Leu Pro Ser Leu Thr Cys
 195 200 205

Thr Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ile Gln His Ile Cys Leu Lys His Thr
 210 215 220

Thr Cys Phe Gln Asp Val Val Val Asp Val Asp Cys Ala Glu Asn Thr
 225 230 235 240

Lys Glu Asp Gln Leu Ala Glu Ile Ser Tyr Arg Phe Gln Gly Lys Lys
 245 250 255

Glu Ala Asp Gln Pro Trp Ile Val Val Asn Thr Ser Thr Leu Phe Asp
 260 265 270

Glu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Glu Ile Glu Pro Gly Val Leu Lys Val
 275 280 285

Leu Arg Thr Glu Lys Gln Tyr Leu Gly Val Tyr Ile Trp Asn Met Arg
 290 295 300

Gly Ser Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Phe Leu Val Thr Trp Lys
 305 310 315 320

Gly Asp Glu Lys Thr Arg Asn Pro Thr Pro Ala Val Thr Pro Gln Pro
 325 330 335

Arg Gly Ala Glu Phe His Met Trp Asn Tyr His Ser His Val Phe Ser
 340 345 350

Val Gly Asp Thr Phe Ser Leu Ala Met His Leu Gln Tyr Lys Ile His
 355 360 365

Glu Ala Pro Phe Asp Leu Leu Leu Glu Trp Leu Tyr Val Pro Ile Asp

370	375	380	
Pro Thr Cys Gln Pro Met Arg Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Tyr His Pro			
385	390	395	400
Asn Ala Pro Gln Cys Leu Ser His Met Asn Ser Gly Cys Thr Phe Thr			
	405	410	415
Ser Pro His Leu Ala Gln Arg Val Ala Ser Thr Val Tyr Gln Asn Cys			
	420	425	430
Glu His Ala Asp Asn Tyr Thr Ala Tyr Cys Leu Gly Ile Ser His Met			
	435	440	445
Glu Pro Ser Phe Gly Leu Ile Leu His Asp Gly Gly Thr Thr Leu Lys			
	450	455	460
Phe Val Asp Thr Pro Glu Ser Leu Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Val			
465	470	475	480
Tyr Phe Asn Gly His Val Glu Ala Val Ala Tyr Thr Val Val Ser Thr			
	485	490	495
Val Asp His Phe Val Asn Ala Ile Glu Glu Arg Gly Phe Pro Pro Thr			
	500	505	510
Ala Gly Gln Pro Pro Ala Thr Thr Lys Pro Lys Glu Ile Thr Pro Val			
	515	520	525
Asn Pro Gly Thr Ser Pro Leu Leu Arg Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser			
	530	535	540

相對應)

<400> 28

atgtttattt tcttattatt tcttactctc actagtgga gtagcctga ccggtgcacc	60
actttgatg atgttcaagc tcctaattac actcaacata cttcatctat gaggggggtt	120
tactatcctg atgaaatth tagatcagac actctttatt taactcagga ttatttctt	180
ccattttatt ctaatgttac agggtttcat actattaatc atacgtttgg caaccctgtc	240
atacctttta aggatggtat ttattttgct gccacagaga aatcaaatgt tgcctgtggt	300
tgggtttttg gttctacat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat taacaattct	360
actaatgttg ttatacgagc atgtaacttt gaattgtgtg acaacccttt ctttgcctgtt	420
tctaaacca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt taattgcact	480
ttcgagtaca tatctgatgc ctttctgctt gatgtttcag aaaagtcagg taattttaa	540
cacttacgag agtttgggtt taaaaataaa gatgggtttc tctatgttta taagggtat	600
caacctatag atgtagttcg tgaictacct tctggtttta aactttgaa acctattttt	660
aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat tttagagcca ttcttacagc cttttcacct	720
gctcaagaca ttggggcac gtcagctgca gcctattttg ttggctattt aaagccaact	780
acatttatgc tcaagtatga tgaatgggt acaatcacag atgctgttga ttgttctcaa	840
aatccacttg ctgaactcaa atgctctgtt aagagctttg agattgacaa aggaatttac	900
cagacctcta atttcagggt tgttcctca ggagatgttg tgagattccc taatattaca	960
aacttgtgtc cttttggaga ggttttaat gctactaaat tcccttctgt ctatgcatgg	1020
gagagaaaa aaatttctaa ttgtttgct gattactctg tgctctacaa ctcaacattt	1080
ttttcaacct ttaagtgtca tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct ttgttctcc	1140

aatgctatg cagattctt ttagtcaag ggagatgatg taagacaaat agcgccagga	1200
caaactggg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatticat gggttgtgc	1260
cttgcttga atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaattataa ttataaatat	1320
aggtatctta gacatggcaa gcttaggccc ttgagagag acatatctaa tgtgccttc	1380
tcccctgatg gcaaacctg caccccacct gctcttaatt gtiattggcc attaatgat	1440
tatggtttt acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagtgt agtacttct	1500
ttgaacttt taaatgcacc ggccacgggt tgtggaccaa aattatccac tgacctatt	1560
aagaaccagt gtgtcaattt taatttaat ggactcactg gtactgggtg gtaactcct	1620
tctcaaaga gatticaacc atttcaacaa ttggccgtg atgttctga ttcactgat	1680
tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccttgctc tttgggggt	1740
gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct tcatctgaag ttgctgttct atatcaagat	1800
gtaactgca ctgatgttc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc agcttggcgc	1860
atatattcta ctggaacaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat aggagctgag	1920
catgtcgaca ctcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttg tgctagtac	1980
catacagttt ctttattacg tagtactagc caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct	2040
ttaggtgctg atagtcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc tactaactt	2100
tcaattagca ttactacaga agtaatgcct gttctatgg ctaaacctc cgtagattgt	2160
aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tgtgctaatt tgcttctcca atatggtagc	2220
tttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca	2280
cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaatg tacaaaacc caacttgaa atatttgggt	2340
ggttttaatt tttcacaat attacctgac cctctaaagc caactaagag gtcttttatt	2400

gaggacttgc tcttaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc	2460
gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcatfctg cgcagaagtt caatggactt	2520
acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc tgctctagtt	2580
agtggactg ccactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctctca aatacctttt	2640
gctatgcaaa tggcatatag gticaatggc attggagtta cccaaaatgt tctctatgag	2700
aacaaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac aaggcgatta gtcaaattca agaatcactt	2760
acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttg ttaaccagaa tgctcaagca	2820
ttaaacacac ttgttaaaca acttagctct aattttggtg caatttcaag tttgctaaat	2880
gataccttt cgcgacttga taaagtcgag gcggaggctac aaattgacag gtaattaca	2940
ggcagacttc aaagccttca aacctatgta acacaacaac taatcagggc tgctgaaatc	3000
agggtctctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa	3060
agagttgact tttgtggaaa gggctaccac cttatgtcct tcccacaagc agccccgat	3120
ggtgttctct tctacatgt cacgtatgtg ccattcccagg agaggaactt caccacagcg	3180
ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac ttccctcgtg aaggtgtttt tttgtttaat	3240
ggcacttctt ggtttattac acagaggaac ttctttctc cacaaataat tactacagac	3300
aatacattg tctcaggaaa ttgtgatgc gtattggca tcattaacaa cacagttat	3360
gatcctctgc aacctgagct cgactcattc aaagaagagc tggacaagta ctcaaaaat	3420
catacatcac cagatgttga tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc tttctgcaac	3480
attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaatga atcactcatt	3540
gaccticaag aattgggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta ttttggctc	3600

ggcttcattg ctggactaat igccatcgtc atggttaciaa tcttgctttg ttgcatgact	3660
agttgttgca gttgcctcaa ggggtgcatgc tcttgggtt ctggctgcaa gttgatgag	3720
gatgactctg agccagtctt caagggtgtc aaattacatt acacataa	3768
<210> 29	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SARSgS+H5TM.c	
<400> 29	
atatattaaa tggcctcaaa tactgtcaat ttattcaaca gtg	43
<210> 30	
<211> 5496	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 表現卡匣編號 916	
<400> 30	
ttaattaagt cgacaagctt gcatgccggt caacatgggt gagcacgaca cacttgicta	60
ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga ctttcaaca	120
aagggttaata tccggaacc tctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt	180
gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgcat cattgcgata aaggaaaggc	240
catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag	300
catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggtt gatgtgataa	360
catggtggag cagcacacac ttgttactc caaaaataic aaagatacag tctcagaaga	420

ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca	480
ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aagggaagggtg gctcctacaa	540
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgggcc	600
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	660
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca	720
ctatcctcg caagaccctt cctctatata aggaagtcca ttccatttgg agaggtatta	780
aaatctaata aggtttgat aaaagcgaac gtgggggaaac ccgaaccaa ccttcttcta	840
aactctctct catctctctt aaagcaaact tctctcttgt ctttcttgcg tgagcgtatc	900
tcaacgttgt cagatcgtgc ttcggcacca gtacaacgtt ttctttcact gaagcgaat	960
caaagatctc ttgtggaca cgtagtgcgg cgccattaaa taacgtgtac ttgtcctatt	1020
ctgtcgggtg tggcttggg aaaagaaagc ttgctggagg ctgctgttca gccccataca	1080
ttacttgta cgattctgct gactttcggc gggtgcaata tctctacttc tgcttgacga	1140
ggtatigtig cctgtacttc ttcttcttc ttcttctga ttggttctat aagaaatcta	1200
gtatttctt tgaaacagag tttcccgtg gtttcgaac ttggagaaag attgtaagc	1260
ttctgtatat tctgccc aaa ttgtcgggc ccatgtttat ttcttatta ttcttactc	1320
tcactagtgg tagtgacctt gaccgggtgca ccacttttga tgatgtcaa gctcctaatt	1380
acactcaaca tacttcatct atgagggggg ttactatcc tgatgaaatt ttagatcag	1440
acactcttta ttaactcag gatttattc ttccatttta ttctaattgt acagggttc	1500
atactattaa tcatacgtt ggcaaccctg tcatacctt taaggatggt atttatttg	1560
ctgccacaga gaaatcaaat gttgtccgtg gttgggtttt tggttctacc atgaacaaca	1620

agtcacagtc ggtgattatt attacaatt ctactaatgt tgttatacga gcatgtaact	1680
ttgaattgtg tgacaaccct tctttgctg ttictaaacc catgggtaca cagacacata	1740
ctatgatatt cgataatgca ttaattgca ctttcgagta catatctgat gccttttgcg	1800
ttgatgttc agaaaagtca ggtaattta aaccttacg agagttgtg ttaaaaata	1860
aagatgggtt tctctatgtt tataagggt atcaacctat agatgtagt cgtgatctac	1920
ctctgggtt taacacttg aaacctatt ttaagtgcc tcttggatt aacattaca	1980
atthagagc cattctaca gcctttcac ctgctcaaga cattggggc acgtcagctg	2040
cagcctatt tgttgctat ttaaagccaa ctacattat gctcaagtat gatgaaaatg	2100
gtacaatcac agatgctgtt gattgtctc aaaatccact tgctgaactc aaatgctctg	2160
ttaagagctt tgagattgac aaaggaattt accagacctc taattcagg gtgttcct	2220
caggagatgt tgtgagattc cctaatatta caaactgtg tcctttgga gaggtttta	2280
atgctactaa atccctct gctatgcat gggagagaaa aaaaattct aattgtgtg	2340
ctgattactc tgtgctctac aactcaacat tttttcaac ctttaagtgc tatggcgtt	2400
ctgccactaa gttgaatgat cttgctctc ccaatgtcta tgcagattct tttgtagtca	2460
aggagatga tgtaagacaa atagcgccag gacaaactgg tgttattgct gattataatt	2520
ataaattgcc agatgattc atgggtgtg tccttgcttg gaatactagg aacattgatg	2580
ctactcaac tgtaattat aattataat ataggtatct tagacatggc aagcttaggc	2640
ccttgagag agacatatct aatgtgectt tctcccctga tggcaaacct tgcacccac	2700
ctgctctaa ttgtattgg ccattaaatg attatgggtt ttacaccact actggcattg	2760
gctaccaacc ttacagagt gtagtacttt ctttgaact tttaatgca ccggccacgg	2820
tttgggacc.aaaattaicc actgacctta ttaagaacca gtgtgtcaat ttaatttta	2880

atggactcac tggactggt gtgtaactc ctctcaaa gagattcaa ccatttcaac	2940
aatttgccg tgatgttct gatttactg attcctcg agatcctaaa acatctgaaa	3000
tattagacat ttcacctgc tctttgggg gtgtaagtgt aattacacct ggaacaaatg	3060
cttcatctga agttgctgt ctatatcaag atgtaactg cactgatgtt tctacagca	3120
ttcatgcaga tcaactcaca ccagcttggc gcatatatt tactggaaac aatgtattcc	3180
agactcaagc aggctgtctt ataggagctg agcatgtcga cacttctat gagtgcgaca	3240
ttcctattgg agctggcatt tgtgctagt accatacagt ttcttatta cgtagtacta	3300
gccaaaaatc tatttggct tatactatgt cttaggtgc tgatagtca attgcttact	3360
ctaataacac cattgctata cctactaact ttcaattag cactactaca gaagtaatgc	3420
ctgttctat ggctaaaacc tccgtagatt gtaatatga catctgcgga gatttactg	3480
aatgtgctaa ttgctctc caatatgga gctttgcac acaactaaat cgtgcactct	3540
caggtattgc tgcgaacag gatcgcaaca cacgtgaagt gttcgtcaa gtcaaacaaa	3600
tgtacaaaac cccaacttg aaatatttg gtggtttta ttttcacaa atattacctg	3660
acctctaaa gccaaactaag aggtcttta ttgaggactt gctcttfaat aaggtgacac	3720
tgcctgatgc tggcttcag aagcaatat gcgaatgcct aggtgatatt aatgctagag	3780
atctcattg tgcgcagaag ttcaatggac ttacagtgt gccacctctg ctactgatg	3840
atatgattgc tgcctacact gctgctctag ttagtgtac tgcactgct ggatggacat	3900
ttggigtgg cgctgctct caaacctt ttgctatgca aatggcatat aggttcaatg	3960
gcattggagt tacccaaaat gtctctatg agaaccacaaa acaaatgcc aaccaattta	4020
acaaggcgat tagtcaaatt caagaatcac ttacaacaac atcaactgca tgggcaagc	4080

tgcaagacgt tgtaaccag aatgctcaag cattaaacac acttgtaaa caacttagct 4140
 ctaatttgg tgcaattca agtgtgctaa atgatatcct ttcgcgacti gataaagtcg 4200
 aggcggaggt acaaattgac aggttaatta caggcagact tcaaagcctt caaacctatg 4260
 taacacaaca actaatcagg gctgctgaaa tcagggcttc tgctaactcti gctgctacta 4320
 aaatgtctga gtgtgttctt ggacaatcaa aaagagtga cttttgtgga aagggtacc 4380
 accttatgtc ctcccacaa gcagccccgc atgggtgtgt cticctacat gtcacgatg 4440
 tgccatcca ggagaggaac ttcaccacag cgccagcaat ttgtcatgaa ggcaaagcat 4500
 acttccctcg tgaagggtgt tttgtgtta atggcacttc ttggttatt acacagagga 4560
 acttctttc tccacaaata attactacag acaatacatt tgtctcagga aattgtgatg 4620
 tcgtattgg catcattaac aacacagttt atgacctct gcaacctgag ctgactcat 4680
 tcaaagaaga gctggacaag tacttcaaaa atcatacatc accagatgtt gatcttggcg 4740
 acatttcagg cattaacgct tctgtcgtca acatcaaaa agaaattgac cgcctcaatg 4800
 aggtcgctaa aaatttaaat gaatcactca ttgacctca agaattggga aaatatgagc 4860
 aatatattaa atggcctcaa atactgtcaa ttatcaaac agtggcgagt tccctagcac 4920
 tggcaatcat gatggctggt ctatctttat ggatgtgctc caatggatcg ttacaatgca 4980
 gaattgcat taaaggcct atttcttta gttgaattt actgttatic ggtgtgcatt 5040
 tctatgttig gtgagcgggt tictgtgctc agagtgtgtt tattttatgt aatttaattt 5100
 ctttgtgagc tctgttttag caggctgtcc cticagcaag gacacaaaaa gattttaatt 5160
 ttattaaaaa aaaaaaaaaa aaagaccggg aaticgatat caagcttatic gacctgcaga 5220
 tcgticaaac atttgcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat 5280
 gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat 5340

gacgttatt atgagatggg ttttatgat tagagtcccg caattataca ttaatacgc 5400

gatagaaaac aaaatatagc gcgcaacta ggataaatta tcgcgcgagg tgcacatcat 5460

gttactagat ctctagagtc tcaagcttgg cgcgcc 5496

<210> 31

<211> 1233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> :SARS gS- A/印尼/5/2005 H5 TM+CY 之氨基酸序列

<400> 31

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu
1 5 10 15

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
 20 25 30

His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
 35 40 45

Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
 50 55 60

Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Gly Asn Pro Val
65 70 75 80

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn
 85 90 95

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln
 100 105 110

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys
 115 120 125

Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met
 130 135 140

Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr
 145 150 155 160

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser
 165 170 175

Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
 180 185 190

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp
 195 200 205

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu
 210 215 220

Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro
 225 230 235 240

Ala Gln Asp Ile Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr
 245 250 255

Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile
 260 265 270

Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys
 275 280 285

Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn
 290 295 300

Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr
 305 310 315 320

Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser
 325 330 335

Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr
 340 345 350

Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly
 355 360 365

Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala
 370 375 380

Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly
 385 390 395 400

Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe
 405 410 415

Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser

420

425

430

Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu
 435 440 445

Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly
 450 455 460

Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp
 465 470 475 480

Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
 485 490 495

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
 500 505 510

Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn
 515 520 525

Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg
 530 535 540

Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp
 545 550 555 560

Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys
 565 570 575

Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser
 580 585 590

Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr
 595 600 605

Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr
 610 615 620

Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu
 625 630 635 640

His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile
 645 650 655

Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys
 660 665 670

Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala
 675 680 685

Tyr Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile
 690 695 700

Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys
 705 710 715 720

Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu
 725 730 735

Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile
 740 745 750

Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys
 755 760 765

Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe
 770 775 780

Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile
 785 790 795 800

Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met
 805 810 815

Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile
 820 825 830

Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr
 835 840 845

Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala
 850 855 860

Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe
 865 870 875 880

Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn
 885 890 895

Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala
 900 905 910

Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly
 915 920 925

Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu
 930 935 940

Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn
 945 950 955 960

Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp
 965 970 975

Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln
 980 985 990

Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala
 995 1000 1005

Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp
 1010 1015 1020

Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala
 1025 1030 1035

Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln
 1040 1045 1050

Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys
 1055 1060 1065

Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser

1070	1075	1080
Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn 1085	Phe Phe Ser Pro Gln 1090	Ile Ile Thr 1095
Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser 1100	Gly Asn Cys Asp Val 1105	Val Ile Gly 1110
Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr 1115	Asp Pro Leu Gln Pro 1120	Glu Leu Asp 1125
Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp 1130	Lys Tyr Phe Lys Asn 1135	His Thr Ser 1140
Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp 1145	Ile Ser Gly Ile Asn 1150	Ala Ser Val 1155
Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile 1160	Asp Arg Leu Asn Glu 1165	Val Ala Lys 1170
Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile 1175	Asp Leu Gln Glu Leu 1180	Gly Lys Tyr 1185
Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro 1190	Gln Ile Leu Ser Ile 1195	Tyr Ser Thr 1200
Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu 1205	Ala Ile Met Met Ala 1210	Gly Leu Ser 1215
Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly 1220	Ser Leu Gln Cys Arg 1225	Ile Cys Ile 1230

<210> 32

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-RabG-S2+4.c

<400> 32

tctcagatct tcgccaatt ccctatttac acgataccag ac

42

<210> 33

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RabG+H5TM.r

<400> 33

ctgttgaata aattgacagt atttgatact tccccagtt cgggagac

48

<210> 34

<211> 1575

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 Rab G 基因(與來自 Genebank 登錄號 EF206707 之 nt 3317-4891 相對應)

<400> 34

atggttcctc aggctctcct gttgtacce ctctgggtt ttccatttg tttgggaaa

60

ttccctattt acacgatacc agacaagctt ggtccctgga gcccgattga catacatcac

120

ctcagctgcc caaacaattt ggtagtggag gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc

180

tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc ttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc	240
acaggcgttg tgacggaggc tgaaacctac actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg	300
ttcaaaagaa agcatttccg cccaacacca gatgcatgta gagccgcgta caactggaag	360
atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg	420
cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat	480
tggacccat atgacagatc ccttacttcg agggcttcc ctagcgggaa gtgctcagga	540
gtagcgggtg ctctaccta ctgctccact aaccacgatt acaccatttg gatgcccag	600
aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt tttaccaata gtagagggaa gagagcatcc	660
aaagggagtg agacttgcgg cttttagat gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga	720
gcatgcaaac tcaagttatg tggagttcta ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc	780
gcatgcaaaa catcaaatga aaccaaattg tgcctcccg atcagttggt gaacctgcac	840
gacttfcgt cagacgaaat tgagcacctt gttgtagagg agttggtcag gaagagagag	900
gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc	960
agtcatttaa gaaaacttg ccttgggtt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc	1020
ttgatggaag ccatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctccctca	1080
aaaggggtgt taagagttgg ggggaggtgt catcctcatg tgaacggggt gttttcaat	1140
ggtataatat taggacctga cggcaatgct ttaatcccag agatgcaatc atccctcctc	1200
cagcaacata tggagtgtt ggaatcctcg gttatcccc ttgtgcaccc cctggcagac	1260
ccgtctaccg tttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttgtgaagt tcacctccc	1320
gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta	1380
ttactgagtg caggggccct gactgccttg atgttgataa tttictgat gacatgtgt	1440

agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggaggtg 1500

tcagtcactc.cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa.gagtgggggt 1560

gagaccagac tgtga 1575

<210> 35

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IF-H5TM.c

<400> 35

caaatactgt caattattc aacagtggc 29

<210> 36

<211> 4899

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基因構築體 141

<400> 36

tggcaggata tatttggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60

gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atccgggct ggtatattta tatgtgtca 120

aataactcaa aaaccataaa agtftaagtt agcaagtgtg tacattttta ctgaacaaa 180

aatattcacc tactactgtt ataatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240

ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaattti 300

gttgttctct ctttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag.aggagaata 360

aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac	420
aaatattcatt gaggaattg acaaaagcta cacaaataag ggtaattgc tgtaataaa	480
taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaatti ttggcaagtc attaaaaaga	540
aagaataaat tatttttaa attaaaagt gagtcattg attaaacatg tgattattta	600
atgaattgat gaaagagttg gattaagt gtattagtaa ttagaattg gtgtcaaatt	660
taattgaca ttgatctt tctatata tgcacctag agtcagttaa ctctttta	720
tattcatag atcaataag agaaataac gtatattaat ccctcaaaa aaaaaaacg	780
gtatattac taaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatcccc taggaggata	840
acatccaatc caaccaatca caacaatct gatgagataa cccacttaa gccacgcat	900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattctcca cacatctgag ccacacaaa	960
accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacactt	1020
gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atctgagag	1080
aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttg	1140
gatggaggat caggaggatc cacttctccc ttcaacttc ctgacgaaag tccgagttg	1200
actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggttc	1260
aaggaaagct ggggttcgg gaaagtgtt ttaagagat atctcagata cgacaggacg	1320
gaagcttcac tgcacagagt ccttgatct tggacgggag attcggttaa ctatgcagca	1380
tctcgattt tgggttcga ccagatcgga tgtacctata gtattcgtt tggaggatt	1440
agtatcaccg ttctggagg gtcgcgaact cttcagcatc tctgtgagat ggcaattcg	1500
tctaagcaag aactgctaca gcttgcacca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga	1560
tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaa gaaagcagat aagttaaat gcttctcgt	1620

ctctattta taatatggtt tgtattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
 tcgttgttgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
 :ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa :ctagacatga agacctgccg 1800
 .cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
 .gtggtaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
 .tatcgaaatt cattaacaat .caacttaacg ttattaacta ctaattttat atcatccct 1980
 ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgttc 2040
 .ccgccttcag ttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg .cctctccccg 2100
 .cgcgttggga attactagcg .cgtgtcgaca agcttgcattg :ccggtcaaca tggaggagca 2160
 cgacacactt gtctactcca .aaaatatcaa .agatacagtc tcagaagacc .aaagggcaat 2220
 tgagacttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat 2280
 ctgtcacttt atttgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc .tctacaaat gccatcattg 2340
 cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc .ctctgccgac .agtgggccca .aagatggacc 2400
 .cccaccacg .aggagcatcg tggaaaaaga .agacgttcca .accacgtctt caaagcaagt 2460
 ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacactgtc tactccaaaa atatcaaaga 2520
 tacagtctca gaagaccaa .gggcaattga gactttcaa caaagggtaa tatccggaaa 2580
 cctctcggga ficcattgcc cagctatctg tcactttatt .gtgaagatag tggaaaagga 2640
 aggtggctcc tacaatgcc atcattgca taaaggaaag gccatcgtt .aagatgcctc 2700
 tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga 2760
 cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat .atctccactg acgtaaggga 2820

tgacgcacaa tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca	2880
tttgagagg tattaaaac ttaataggtt ttgataaag cgaacgtggg gaaacccgaa	2940
ccaaaccttc ttctaaactc tctctcatct ctcttaaagc aaacttctct ctgtctttc	3000
ttgcgtgagc gatcttcaac gttgtcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt	3060
tcactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca ttaaataacg	3120
tgtactgtc ctattctgt cggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgc ggaggctgct	3180
gttcageccc atacattact tgttacgatt ctgctgactt tcggcgggtg caatatctct	3240
acttctgctt gacgaggtat tgtgcctgt acttcttct tcttcttctt gctgattggt	3300
tctataagaa atctagtatt ttcttgaaa cagagtttc ccgtggttt cgaacttga	3360
gaaagattgt taagcttctg tatattctgc ccaaattgt cgggcccctg gcgaaaaacg	3420
ttgcgattt cggcttattg tttctcttc ttgtttggt tcttctcag atcttgcct	3480
gcaggctcct cagccaaaac gacaccccca tctgtctatc cactggcccc tggatctgct	3540
gcccuaacta actccatggt gaccctggga tgctgtgca agggctattt cctgagcca	3600
gtgacagtga cctggaactc tggatccctg tccageggtg tgcacacctt cccagctgtc	3660
ctgcagtctg acctctacac tctgagcagc tcagtactg tcccctccag cacctggccc	3720
agcgagaccg tcacctgcaa cgttgcccac ccggccagca gcaccaaggt ggacaagaaa	3780
attgtgcca gggattgtgg ttgtaagcct tgcataatga cagtcccaga agtatcatct	3840
gtcttcatct tcccccaaa gcccaaggat gtgctacca ttactctgac tctaaggtc	3900
acgtgtgttg tggtagacat cagcaaggat gatcccaggg tccagttcag ctggtttgta	3960
gatgatgtgg aggtgcacac agctcagacg caaccccggg aggagcagtt caacagcact	4020
ttccgctcag tcagtgaact tccatcatg caccaggact ggctcaatgg caaggagcga	4080

tcgtcacca tcaccatcac catcaccatc accattaaag gcctatttc tttagttga 4140
 attactgtt attcgggtg .catttctatg ttgggtgagc ggttttctgt gctcagagt 4200
 tgtttatfff atgtaattta atttcttgt gagctcctgt ttagcaggtc gtccttcag 4260
 caaggacaca aaaagatttt aattttatta aaaaaaaaaa aaaaaaagac cgggaattcg 4320
 atatcaagct tatcgacctg .cagatcgffc aacatttgg caataaagtt tcttaagatt 4380
 gaatcctgtt gccggctctg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgtaagca 4440
 tgaataaatt aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt 4500
 .cccgaatta tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa 4560
 attatcgcgc gcgggtgcat ctatgtfact agatctctag agtctcaagc ttggcgcgcc 4620
 cacgtgacta gtggcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt 4680
 tacccaactt aatgccttg .cagcacatcc cctttcgcc agctggcgta atagcgaaga 4740
 ggccccacc gatcgccctt cccaacagtt .gcgcagcctg aatggcgaat gctagagcag 4800
 cttgagcttg gatcagattg tcgtttcccg ccttcagttt aaactatcag tgtttgacag 4860
 gatataattg cgggtaaacc taagagaaaa gagcgttta 4899

<210> 37

<211> 3249

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表現卡匣編號 1074

<400> 37

gtcaacatgg tggagcacga cacactgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60

gaagaccaa gggcaatga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga	120
ttccatigcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc	180
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt	240
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc	300
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatgggtg agcacgacac acttgtctac	360
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaagg caattgagac tttcaaca	420
agggtaatat ccggaaacct cctcggatic cattgccag ctatctgtca cttattgtg	480
aagatagtgg aaaaggaagg tggctctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc	540
atcgtigaag atgcctctgc cgacagtgg cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc	600
atcgtgaaa aagaagacgt tccaaccag tcttcaaagc aagtggattg atgtgatc	660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttctctata	720
taaggaagt catttcatt ggagaggtat taaaatctta ataggtttg ataaaagcga	780
acgtgggaa acccgaacca aacctctc taaactctc ctatctctc ttaaagcaaa	840
cttctctt gctttctg cgtgagcgt ctcaacgtt gtcagatcgt gcttcggcac	900
cagtacaacg ttttcttca ctgaagcga atcaaagatc tcttgtgga cacgtagtgc	960
ggcgccatta aataacgtg acttgccta tcttgcgg tgtggtctg ggaaaagaaa	1020
gcttgcctgga ggctgctgt cagccccata cactactgt tacgattctg ctgactttcg	1080
gcgggtgcaa tatcttact tctgctgac gaggtattgt tgcctgtact tcttctct	1140
tcttctgct gattggtct ataagaaatc tagtatttc ttgaaacag agtttccc	1200
tggtttcga acttgagaa agattgtaa gcttctgtat attctgccca aattgtcgg	1260
gccaatggcg aaaaacgtg cgatttcgg cttattgtt tcttcttg tgttggtcc	1320

ttctcagatc ttgcctaaat tccctattta cacgatacca gacaagcttg gtccttggag	1380
cccgattgac atacatcacc tcagctgccc aaacaatttg gtagtggagg acgaaggatg	1440
caccaacctg tcagggttct cctacatgga acttaaagtt ggatacatct tagccataaa	1500
aatgaacggg ttacttgca caggcgttgt gacggaggct gaaacctaca ctaacttctg	1560
tggttatgtc acaaccacgt tcaaaagaaa gcatttccgc ccaacaccag atgcatgtag	1620
agcccgctac aactggaaga tggccggtga ccccagatat gaagagtcctc tacacaatcc	1680
gtaccctgac taccgctggc ttcgaactgt aaaaaccacc aaggagtctc tcgttatcat	1740
atctccaagt gggcagatt tggaccata tgacagatcc cttcactcga gggcttccc	1800
tagcgggaag tgetcaggag tagcgggtgc ttctacctac tgctcacta accacgatta	1860
caccatttgg atgcccgaga atccgagact agggatgtct tgtgacattt ttaccaatag	1920
tagaggggaag agagcatcca aagggagtga gacttgcggc tttgtagatg aaagaggcct	1980
atataagtct taaaaggag catgcaaact caagttatgt ggagtcttag gacttagact	2040
tatggatgga acatgggtcg cgatgcaaac atcaaatgaa accaaatggt gccctcccga	2100
tcagttggg aacctgcacg actttcgctc agacgaaatt gacaccttg ttgtagagga	2160
gttggtcagg aagagagagg agtgtctgga tgcactagag tccatcatga caaccaagtc	2220
agtgagttc agacgtctca gtcatttaag aaaactgtc cctgggtttg gaaaagcata	2280
taccatattc aacaagacct tgatggaagc cgatgctcac tacaagtcag tcagaacttg	2340
gaatgagatc ctccctcaa aagggtgtti aagagttggg gggaggtgtc atcctcatgt	2400
gaacgggggtg ttttcaatg gtataatatt aggacctgac ggcaatgtct taatcccaga	2460
gatgcaatca tccctcctcc agcaacatat ggagttgttg gaatcctcgg ttatccccct	2520

tgtgcacccc ctggcagacc cgtctaccgt ttcaaggac ggtgacgagg ctgaggattt 2580
 tgttgaagtt caccttcccg atgtgcacaa tcaggtctca ggagttgact tgggtctccc 2640
 gaactggggg aagtatcaaa tactgtcaat ttattcaaca gtggcgagtt ccctagcact 2700
 ggcaatcatg atggctggtc tatctttatg gatgtgctcc aatggatcgt tacaatgcag 2760
 aattgcatt taaaggccta tttctttag ttigaattta ctgttattcg gtgtgcattt 2820
 ctatgtttgg tgagcgggtt tctgtgctca gagtgtgttt attttatgta atttaattc 2880
 ttgtgagct cctgtttagc aggtcgtccc tcagcaagg acacaaaaag attttaattt 2940
 tattaaaaa aaaaaaaaaa aagaccggga atcgatatc aagcttatcg acctgcagat 3000
 cgttcaaaca ttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcatg 3060
 attatcatat aatttctgtt gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg 3120
 acgttattha tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg 3180
 atagaaaaca aaatatagcg cgcaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcactatg 3240
 ttactagat 3249

- <210> 38
- <211> 502
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> PDISP-Rab G- A/印尼/5/2005 H5 TM+CY 之胺基酸序列
- <400> 38

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Lys Phe Pro Ile Tyr Thr Ile Pro
 20 25 30

Asp Lys Leu Gly Pro Trp Ser Pro Ile Asp Ile His His Leu Ser Cys
 35 40 45

Pro Asn Asn Leu Val Val Glu Asp Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly
 50 55 60

Phe Ser Tyr Met Glu Leu Lys Val Gly Tyr Ile Leu Ala Ile Lys Met
 65 70 75 80

Asn Gly Phe Thr Cys Thr Gly Val Val Thr Glu Ala Glu Thr Tyr Thr
 85 90 95

Asn Phe Val Gly Tyr Val Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg
 100 105 110

Pro Thr Pro Asp Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Trp Lys Met Ala Gly
 115 120 125

Asp Pro Arg Tyr Glu Glu Ser Leu His Asn Pro Tyr Pro Asp Tyr Arg
 130 135 140

Trp Leu Arg Thr Val Lys Thr Thr Lys Glu Ser Leu Val Ile Ile Ser
 145 150 155 160

Pro Ser Val Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asp Arg Ser Leu His Ser Arg
 165 170 175

Val Phe Pro Ser Gly Lys Cys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr

	180		185		190
Cys Ser Thr Asn His Asp Tyr Thr Ile Trp Met Pro Glu Asn Pro Arg					
	195		200		205
Leu Gly Met Ser Cys Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala					
	210		215		220
Ser Lys Gly Ser Glu Thr Cys Gly Phe Val Asp Glu Arg Gly Leu Tyr					
	225		230		235
					240
Lys Ser Leu Lys Gly Ala Cys Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly					
		245		250	
					255
Leu Arg Leu Met Asp Gly Thr Trp Val Ala Met Gln Thr Ser Asn Glu					
	260		265		270
Thr Lys Trp Cys Pro Pro Asp Gln Leu Val Asn Leu His Asp Phe Arg					
	275		280		285
Ser Asp Glu Ile Glu His Leu Val Val Glu Glu Leu Val Arg Lys Arg					
	290		295		300
Glu Glu Cys Leu Asp Ala Leu Glu Ser Ile Met Thr Thr Lys Ser Val					
	305		310		315
					320
Ser Phe Arg Arg Leu Ser His Leu Arg Lys Leu Val Pro Gly Phe Gly					
		325		330	
					335
Lys Ala Tyr Thr Ile Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His					
	340		345		350

Tyr Lys Ser Val Arg Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys
 355 360 365

Leu Arg Val Gly Gly Arg Cys His Pro His Val Asn Gly Val Phe Phe
 370 375 380

Asn Gly Ile Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn Val Leu Ile Pro Glu Met
 385 390 395 400

Gln Ser Ser Leu Leu Gln Gln His Met Glu Leu Leu Glu Ser Ser Val
 405 410 415

Ile Pro Leu Val His Pro Leu Ala Asp Pro Ser Thr Val Phe Lys Asp
 420 425 430

Gly Asp Glu Ala Glu Asp Phe Val Glu Val His Leu Pro Asp Val His
 435 440 445

Asn Gln Val Ser Gly Val Asp Leu Gly Leu Pro Asn Trp Gly Lys Tyr
 450 455 460

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala
 465 470 475 480

Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 485 490 495

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 500

<210> 39

<211> 6863

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基因構築體 144

<400> 39

tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg	60
gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatattta tatgttgca	120
aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta ctgaacaaa	180
aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg	240
ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacatttg agaaaatftt	300
gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata	360
aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac	420
aaatattcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaataag ggtaattgc tgtaaataaa	480
taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga	540
aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta	600
atgaattgat gaaagagtig gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt	660
taattigaca ttgatcttt tcctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcattttta	720
tatttcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctcmetaa aaaaaaacg	780
gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata	840
acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccacttta gcccacgcat	900
ctgtggcaca tctacattat ctaaatacaca cattcttcca cacatcigag ccacacmetaa	960

accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
 gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080
 aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140
 gatggaggat caggaggtag cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
 actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggttcc 1260
 aaggaaagct ggggtttcgg gaaagtgtg ttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
 gaagcttcac tgcacagagt ccttggatct tggacgggag attcgggtaa ctatgcagca 1380
 tctcgatttt tgggtttcga ccagatcggg tgtacctata gtattcgggt tggaggagt 1440
 agtatcaccg ttctggagg gtcgcgaact cticagcacc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
 tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
 tgcctgaag gtactcaaac ctctgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttctctgt 1620
 ctctattta taatatggtt tgttattgtt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
 tctgtgtgt tatgaaatac tatttgtatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
 ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
 cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aacttataa 1860
 gtggtaata tagctcaaat atatggtcaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
 tatcgaaatt cattaacaat caactaacg ttattaacta ctaattttat atcatcccct 1980
 ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgttcc 2040
 ccgccttcag ttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
 cgcgtggga attactagcg cgtgtcgaca cgcgtggcgc gccctagcag aaggcatgtt 2160

gttgtgactc cgaggggttg cctcaaactc tatctataa cgggcgtgga ggcattggagg 2220
 caagggcatt ttgtaattt aagtagttag tggaaaatga cgtcatttac ttaaagacga 2280
 agtcttgcga caaggggggc ccacgccgaa ttttaattt accggcgtgg cccacactta 2340
 tcgcgagtgc ttagcacga gcggtccaga tttaaagtag aaaagtccc gccactagg 2400
 gttaaagggtg ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat ggtatttggat aaagcgtata 2460
 ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtaca agcttctta gccggtcaac 2520
 atggtggagc acgacacact tgttactcc aaaaatatca aagatacagt ttcagaagac 2580
 caaagggcaa ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg gaaacctct cggattccat 2640
 tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa aggaagggtgg ctctacaaa 2700
 tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg cctctgccga cagtggctcc 2760
 aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgtcc aaccacgtct 2820
 tcaaagcaag tggattgatg tgataacatg gtggagcacg acacacttgt ctactcaaaa 2880
 aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agactttca acaaagggtta 2940
 atatccggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata 3000
 gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt 3060
 gaagatgcct ctgccgacag tggccccaaa gatggacccc caccacagag gagcatcgtg 3120
 gaaaaagaag acgtccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tcttccact 3180
 gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga 3240
 agttcatttc atttgagag gtattaaat ctaaataggt ttgataaaa gcgaacgtgg 3300
 ggaaacccga accaaacctt ctctaaact ctctctatc tctctaaag caaacttctc 3360
 tcttcttctt ctgctgtgag cgatcttcaa cgttctcaga tctgtcttcg gcaccagtac 3420

aacgttttct ttactgaag cgaaatcaaa gatctcttg tggacacgta gtgcggcgcc 3480
 attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtgtt cttgggaaaa gaaagcttgc 3540
 tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat tctgctgact ttcggcgggt 3600
 gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgtgctg tacttcttcc ttcttctct 3660
 tgctgattgg tictataaga aatctagtat ttctttgaa acagagtttt cccgtggttt 3720
 tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg cccaaattg tcgggcccac 3780
 ggcgaaaaac gttgcgattt tcggcttatt gttttctctt cttgtgttgg ttcccttcca 3840
 gatcttgcgc tgcaggctcc tcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc 3900
 ctggatctgc tgcccaaac aactccatgg tgacctggg atgcctggtc aagggtatt 3960
 tccttgagcc agtgacagtg acctggaact ctggatccct gtccagcggg gtgcacacct 4020
 tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ctctgagcag ctcaagtact gtcccctcca 4080
 gcacctggcc cagcgagacc gtcacctgca acgttgccca cccggccagc agcaccaagg 4140
 tggacaagaa aattgtgccc agggattgtg gttgtaagcc ttgcatatgt acagtcccag 4200
 aagtatcatic tgtcttatic ttcccccaa agcccaagga tgtgctcacc attactctga 4260
 ctctaaggc cacgtgtgtt gtggtagaca tcagcaagga tgatcccag gtccagtcca 4320
 gctggtttgt agatgatgtg gaggtgcaca cagctcagac gcaaccccgaggaggagcagt 4380
 tcaacagcac ttccgctca gtcagtgaac ttccatcat gcaccaggac tggctcaatg 4440
 gcaaggaagg cctattttct ttagttgaa ttactgtta ttcggtgtgc atttctatgt 4500
 ttggtgagcg gttttctgt ctcagagtgt gtttattta tgtaatttaa ttctttgtg 4560
 agctcctgtt tagcaggtcg tccctcagc aaggacacaa aaagatttta atttattaa 4620

aaaaaaaaa aaaaaagacc ggaattcga tatcaagctt atcgacctgc agatcgttca 4680
 aacattggc aataaagtti cftaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattac 4740
 atataattc tgtgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgta 4800
 ttatgagat gggttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa 4860
 aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcgc tatgttacta 4920
 gatctctaga gtctcaagct tggcgcgggg taccgagctc gaattccgag tgtacttcaa 4980
 gtcagtggg aatcaataaa atgattatti tatgaatata ttccattgtg caagtagata 5040
 gaaattacat atgttacata acacacgaaa taaacaaaa aacacaatcc aaaacaaca 5100
 .ccccaaaca aataacacta tatatatcct cgtatgagga gaggcacgtt cagtgactcg 5160
 acgattccc agcaaaaaa gctccccgt cacacatata gtgggtgacg caattatctt 5220
 caaagtaac ctctgttga ctgtcattg ataacatcca gtcttcgca ggattgcaaa 5280
 gaattataga agggatccca ccttttattt tcttctttt tccatattta ggggtgacag 5340
 tgaaatcaga ctggcaacct attaatgct tccacaatgg gacgaacttg aaggggatgt 5400
 cgtcgatgat attatagggt gcgtgttcat cgtagtgtgt gaagtcgatg gtccccgtcc 5460
 agtagttgtg tcgcccgaga ctctagccc aggtgtctt tccggtacga gttgtccgc 5520
 .agatgtagag gctgggggtgt ctgaccccag tccttccctc atcctggta gatcggccat 5580
 ccaactcaagg tcagattgtg ctgatcgtg ggagacagga tgtatgaaag ttaggcac 5640
 gatgcttaca tgatataggt gcgtctctt ccagttgtgc agatcttctt ggcagcggag 5700
 atctgattct gtgaaggcgc acacgtactg ctgaggtgt ggaggaaata attgttggc 5760
 tgaatattcc agccattgaa gctttgtgc ccaticatga ggaattctt cttgatcat 5820
 gicaagatac tctccttag acgttcagt ctggataata gttcgcacgc gtgcgtcaga 5880

tttgcgagga gagaccttat gatctcggaa atctcctctg gttttaatat ctccgtcctt	5940
tgatatgtaa tcaaggactt gtttagagtt tctagctggc tggatattag ggtgatttcc	6000
ttcaaaatcg aaaaaagaag gatccctaata acaagggttt ttatcaagct ggataagagc	6060
atgatagtgg gtagtgccat ctgatgaag ctcaagaagca acaccaagga agaaaataag	6120
aaaagggtg agtttctccc agagaaactg gaataaatca tctctttgag atgagcactt	6180
ggggtaggta aggaaaacat atttagattg gagtctgaag ttcttgctag cagaaggcat	6240
gttgtgtga ctccgagggg ttgcctcaaa ctctatctta taaccggcgt ggaggcatgg	6300
aggcaagggc attttggtaa tftaagtagt tagtggaaaa tgacgtcatt tacttaaaga	6360
cgaagtcttg cgacaagggg ggcccacgcc gaatttfaat attaccggcg tggccccacc	6420
ttatcgcgag tgctttagca cgagcgggtcc agatttaag tagaaaagtt cccgccact	6480
agggtaaag gtgtcacac tataaaagca tatacgaatg gatggtatt gatggagcgt	6540
atattgtaic aggtatttcc gtcggatacg aattattcgt acggccggcc actagtggca	6600
ctggccgtcg tttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc	6660
ctgcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc	6720
ccttccaac agttgcgag cctgaatggc gaatgctaga gcagcttgag ctggatcag	6780
attgctgtt cccgccttca gtttaacta tcagtgttg acaggatata ttggcgggta	6840
aacctaagag aaaagagcgt tta	6863

<210> 40
 <211> 5279
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 表現卡匣編號 1094

<400> 40

ctagcagaag gcatgttgti gtgactccga ggggttcct caaactctat cttataaccg	60
gcgtggaggc atggaggcaa gggcatttg gtaatttaag tagttagtgg aaaatgacgt	120
cattactta aagacgaagt cttgcgacaa ggggggccc cgccgaatti taatattacc	180
ggcgtggccc caccttatcg cgagtgcctt agcacgagcg gtccagattt aaagtagaaa	240
agttcccgcc cactaggggtt aaagtggtc aactataaa agcatatacg atgtgatggt	300
atttgataaa gcgtatattg tatcaggtat ttccgtcggg tacgaattat tcgtacaagc	360
ttcttaagcc ggtcaacatg gtggagcacg acacactgt ctactccaaa aatatcaaag	420
atacagtcctc agaagaccaa agggcaattg agactttica acaaagggtg atatccggaa	480
acctcctcgg aticcattgc ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg	540
aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct	600
ctgccgacag tggccccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag	660
acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga taacatggtg gagcacgaca	720
cactigtcta ctcaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga	780
ctttcaaca aagggttaata tccggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc	840
actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgcat cattgcgata	900
aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac	960
ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt	1020
gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc	1080
cttcctctat ataaggaaagt tcatttcatt tggagaggtg ttaaaatctt aataggttti	1140

gataaaagcg aacgtgggga aacccgaacc aaacctctt ctaaactctc tctcatctct 1200
cttaaagcaa acttctctct tgtcttctt gcgtgagcga tcttcaacgt tgcagatcg 1260
tgcttcggca ccagtacaac gtttcttc actgaagcga aatcaaagat ctctttgtgg 1320
acacgtatg cggcgccatt aaataacgtg tacttgcctt attctgtcg gtgtggtctt 1380
gggaaaagaa agcttgctgg aggtgctgt tcagcccat acattactg ttacgattct 1440
gctgacttc ggcggtgca atatctctac ttctgctga cgaggattg ttgcctgtac 1500
ttcttcttc ticttctgc tgattggtc tataagaaat ctagtattt ctttgaaca 1560
gagtttccc gtggttctg aacttgaga aagattgta agcttctgta tattctgcc 1620
aaattgtcg ggcccatggc gaaaaacgti gcgatttctg gcttattgtt ttctctctt 1680
gtgttggtc ctctcagat ctctgcaaaa ttccctattt acacgatacc agacaagctt 1740
ggtccctgga gcccgattga catacatcac ctacgctgcc caacaattt ggtagtggag 1800
gacgaaggat gcaccaacct gtcagggctc tctacatgg aacttaaagt tggatacatc 1860
ttagccataa aatgaacgg gttcactgc acaggcgtg tgacggaggc tgaaacctac 1920
actaactcg ttggttatgt cacaaccacg ttcaaaagaa agcatttccg cccaacacca 1980
gatgcatgta gagccgcgta caactggaag atggccggtg accccagata tgaagagtct 2040
ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg ctctgaactg taaaaccac caaggagtct 2100
ctcgttatca tatctcaag tgtggcagat ttggacccat atgacagatc ccttactcg 2160
agggtcttcc ctacgggaa gtgctcagga gtagcgtgt ctctaccta ctgctccact 2220
aaccacgatt acaccattg gatgcccag aatccgagac taggatgtc ttgtacatt 2280
ttaccaata gtagaggaa gagagcatcc aaaggagtg agacttgcgg cttttagat 2340

gaaagaggcc tatataagtc tftaaaagga gcatgcaaac tcaagttatg tggagttcta	2400
ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaatgg	2460
tgcctcccg atcagttggt gaacctgcac gacttcgct .cagacgaaat tgagcacctt	2520
gtttagagg agttggcag gaagagagag gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg	2580
acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggtt	2640
ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca	2700
gtcagaactt ggaatgagat cctccctca aaagggtgtt taagagttgg ggggaggtgt	2760
.catcctcatg tgaacgggggt gttttcaat ggtataatat taggacctga cggcaatgc	2820
ttaatcccag agatgcaatc atccctctc cagcaacata tggagttgtt ggaatcctcg	2880
ggtatcccc ttgtgacccc cctggcagac ccgtctaccg tttcaagga cggtgacgag	2940
gctgaggatt ttgttgaagt tcacctccc gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac	3000
ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatcaa atactgtcaa ttattcaac agtggcgagt	3060
tccctagcac tggcaatcat gatggctggt ctatctttat ggatgtgctc caatggatcg	3120
ttacaatgca gaattgcat taaaggcct attttctta gtttgaattt actgttattc	3180
ggtgtgcatt tctatgttg gtgagcgggt ttctgtgctc agagtgtgtt tattttatgt	3240
aatttaattt cttigtgagc tctgtttag caggtcgtcc cttcagcaag gacacaaaaa	3300
gattttaatt ttattaaaaa aaaaaaaaaa aaagaccggg aaticgatat caagcttatc	3360
gacctgcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttccg	3420
gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca	3480
tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg ttttatgat tagagtcccg caattataca	3540
ttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg	3600

tgcactctat gttactagat ctctagagtc tcaagcttgg cgcggggtac cgagctcgaa 3660
 ttccgagtgt acttcaagtc agttggaaat caataaaatg attattttat gaatatatt 3720
 cattgtgcaa gtagatagaa attacatatg ttacataaca cacgaaataa acaaaaaaac 3780
 :acaatccaaa acaaacacce caaacaaaat aacactatat atatcctcgt atgaggagag 3840
 :gcacgttcag tgactcgacg attcccagac aaaaaaagtc tcccctcac acatatagtg 3900
 :ggtagcga tttcttcaa agtaatcctt ctgttgactt gtcattgata acatccagtc 3960
 ttctcagga ttcaaagaa ttatagaagg gatcccacct ttattttct tctttttcc 4020
 :atatttagg ttgacagtga aatcagactg gcaacctatt aattgcttc acaatgggac 4080
 :gaactgaag gggatgctg :cgtatgatt ataggtggcg tgttcacgt agttggtgaa 4140
 :gtcgtggtc cgttcagc agttgtgctg cccgagactt ctgcccagg tggctttcc 4200
 :ggtacgagtt ggtccgcaga ttagaggct ggggtgctg accccagtc ttcctcatc 4260
 :ctggttagat cggccatcca ctcaaggta gatttgctt gatcgtagga gacaggatg 4320
 :atgaaagtgt aggcatgat gcttacatga tataggtgcg tctcttcca gttgtgcaga 4380
 tctctgtggc agcggagatc tgattctgtg aaggcgaca cgtactgctc aggtgtgga 4440
 :ggaaataatt tgttgctga atattccagc cattgaagct ttgtgcca tcatgaggg 4500
 aattcttcti tgatcatgic aagatactcc tcttagacg ttgcagtctg gataatagt 4560
 cgccatcgtg cgtcagattt gcgaggagag acctatgat ctcgaaatc tctctggtt 4620
 ttaatactc cgtccttga tatgtaatca aggacttgt tagagtttct agctggctgg 4680
 atattaggtt gatttcttc aaaatcgaaa aaagaaggat ccctaataca aggttttta 4740
 tcaagctgga taagagcatg atagtgggta gtgccatctt gatgaagctc agaagcaaca 4800

ccaaggaaga aaataagaaa aggtgtgagt ttctcccaga gaaactggaa taaatcatct 4860
 ctttgagatg agcactggg gtaggtaagg aaaacatatt tagattggag tctgaagttc 4920
 ttgctagcag aaggcatgtt gttgtgactc cgaggggttg cctcaaactc tatctataa 4980
 ccggcgtgga ggcatggagg caagggcatt ttgtaattt aagtagttag tggaaaatga 5040
 cgtcatttac ttaaagacga agtcttgcga caaggggggc ccacgccgaa tttaaatatt 5100
 accggcgtgg cccacacctta tcgcgagtgc ttagcacga gcggtccaga tttaaagtag 5160
 aaaagttccc gccactagg gttaaagtg ttcacactat aaaagcatat acgatgtgat 5220
 ggtattgat ggagcgtata ttgtatcagg tatttccgtc ggatacgaat tattcgtac 5279

<210> 41

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> H5 (A/印尼/05/2005) TM/CT

<400> 41

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 20 25 30

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 35

<210> 42

<211> 38

ttgaataaat tgacagtatc tggcgccatc cggccacca gttatcgt	48
<210> 45	
<211> 2031	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 優化合成之 GP 基因(對於野生型基因序列與來自 Genbank 登錄號 AY354458 之 nt 6039-8069 相對應)。	
<400> 45	
atgggggtga ccggaatcct tcagctcct cgcgataggt tcaaacggac gtccttcttt	60
ctctgggtga tcatcctgtt tcagcgcacc ttctcaatcc ctctgggagt gatccacaat	120
tcgactctcc aggtgagcga ggtcgacaaa ctctgtgtcc gcgataagtt gtccagcacc	180
aatcagctca gaagtgttg cctcaacctg gaggggaatg gggtcgccac agacgtgcca	240
tccgcgacca agcgtgggg ctttcggctc ggtgtcccc ctaaagtcgt gaattacgag	300
gccggggagt gggctgaaaa ctgctacaac ctggaaatca agaaaccga cggcagcgag	360
tgtctgcccg cggccccaga cgggatcagg ggttccccga ggtgccggtc cgtgcacaag	420
gtctcgggaa ccggcccgtg cgcggcgat ttgccttc ataaggagg cgcattcttt	480
ctctacgata gactggctc cacggtcac tatcgcggca ccacctcgc ggagggggtg	540
gtggcattcc tcatcctgcc gcaggctaag aaagattct tcagctcca ccctctcagg	600
gaaccagica acgccacaga ggatccctc tcgggatatt acagcaccac aattcgtac	660
caggccacag gcttcgggac caatgagact gactacctgt tcgaggtgga caacctaaca	720
tacgtgcagc tcgaatcgc gtttaccocg cagttccttt tgcaactaa cgagacgat	780
tataccagtg gtaaaccggag caacacgacc gggaagctca tctggaaagt aaaccggag	840

atcgacacca cgattggaga gtgggcttfc tgggaaacca agaaaaacct gacccggaag	900
atcaggtcgg aggagttgag cttcactgcc gtctccaata gagcaaaaa catcagcggc	960
cagagccctg cccggacttc cagcgacca ggtaccaaca ccacgacaga ggaccacaag	1020
attatggcct cggagaattc ctctgcaatg gtccaggtgc atagccaggg gcgcgaagct	1080
gccgtctgc acctgacaac ctggcaacg atttcacca gccacaacc acccacgaca	1140
aagcccgggc ccgacaactc cacccataat accccgtct ataagctgga catttcgaa	1200
gtacgcagg tggagcagca ccaccggagg accgacaacg actcaacage tagcgatacc	1260
cctcccgcc ccacggcagc gggcccaccc aaggctgaga acaccaatac gagcaagggc	1320
accgacctc tggaccccgc gactaccacg agccccaga atcacagcga aacggcgggc	1380
aacaacaaca cacaccatca ggatactggg gaggagtcgg cctccagcgg aaaactgggc	1440
ctgatcacia acaccatagc cggggctgcc gggctgatca ctggaggccg gagggcacgc	1500
agagaggcca ttgtgaacgc ccagcccaa tgcaaccaa acctccacta ctggaccacg	1560
caggacgagg gggccgctat cggcctggcc tggatcccat actttgggcc cgccgctgag	1620
ggcatataca cggagggcct catgcacaat caggacggac tgatctcgg actccgccag	1680
cttgccaacg agaccactca ggcgttcag ctgtttctgc gggccactac cgagctcagg	1740
acgtcagca ttctgaatcg gaaggcaatc gatttcctac tccagcggtg gggcgggaca	1800
tgccacatcc tgggaccga ttgttcacg gagccccacg actggaccaa gaacattaca	1860
gataaaatcg accagatcat tcatgattc gtggacaaga cactgccgga ccagggggac	1920
aacgataact ggtggaccgg atggcgccag tggatccag ccgggattgg cgtgacaggt	1980
gtcattatcg ccgtgatcgc cctgtttgc attgcaaat tcttttcta g	2031

<210> 46

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Opt_EboGP+H5iTMCT.c

<400> 46

ggatggcgcc agatactgtc aatttattca acagtggcga gttcc

45

<210> 47

<211> 4897

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基因構築體 1192

<400> 47

tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg

60

gacgtttta atgtactgaa ttaacgccga atcccgggct ggtatatta tatgttgca

120

aataacicaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa

180

aatattcacc tactactgtt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg

240

ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttgtt gcaacattg agaaaatttt

300

gttgttctct cttttcatig gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata

360

aaaacataat gtgagtatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac

420

aatatcatt gaggaattg acaaaagcta cacaaataag ggttaattgc tgtaaataaa

480

taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga

540

aagaataaat ttttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattatta

600

atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660

taatttgaca ttgatcttt tctatatat tgccccatag agtcagttaa ctcatcttta 720

tattcatag atcaaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaaa aaaaaaacg 780

gtatatttac taaaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840

acatccaatc caaccaatca caacaatct gatgagataa cccactttaa gccacgcat 900

ctgtggcaca tctacattat ctaaatacaca cattcttcca cacatctgag ccacacaaaa 960

accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020

gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaatc atcttgagag 1080

aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140

gatggaggat caggaggtag cacttctccc ttcaaacctc ctgacgaaag tccgagttgg 1200

actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggttfc 1260

aaggaaagct ggggttfcgg gaaagttgta ttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320

gaagcttcac tgcacagagi ccttgatct tggacgggag attcggttaa ctatgcagca 1380

tctcgatttt tgggttfcga ccagatcgga tgtacctata gtattcgggt tggaggagt 1440

agtatcaccg ttctggagg gtcgcgaact cttcagcacc tctgtgagat ggcaattcgg 1500

tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560

tgccctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaaat gcttctcgt 1620

ctcctattta taatatggtt tgttatigt aatttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680

tcgttggtgt tatgaaatac tatttgitat agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740

ataagtggag tcagaatcag aatgttccct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800

cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860

gtggtaata tagctcaaat atatggtaa gttcaataga ttaataatgg aaatatcagt 1920
 taccgaaatt cattaacaat caactaacg ttattaacta ctaatttat atcatcccct 1980
 ttgataaatg atagtacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgttc 2040
 ccgccttcag ttgcaagct gctctagccg ttagccaat acgcaaaccg cctctcccgc 2100
 cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgcctg ccggtcaaca tgggtggagca 2160
 cgacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggaat 2220
 tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat 2280
 ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaaggtggc tctacaaat gccatcattg 2340
 cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc cctgcccac agtgggtcca aagatggacc 2400
 cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 2460
 ggattgatgt gataacatgg tggagcacga cacactgtc tactccaaa atatcaaaga 2520
 tacagtctca gaagaccaa gggcaatiga gactttcaa caaagggtaa tatccgaaa 2580
 cctctcgga ttccattgcc cagctatctg tcaatttat gtgaagatag tggaaaagga 2640
 aggtggctcc tacaatgcc atcattgca taaaggaaag gccatcgtt aagatgcctc 2700
 tgccgacagt ggtcccaaag atggacccc acccacgagg agcatcgtg aaaaagaaga 2760
 cgtccaacc acgtctcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga 2820
 tgacgcaca tcccactatc ctccgaaga ccttctct atataaggaa gttcattca 2880
 ttggagagg tattaaaac ttaataggtt ttgataaag cgaacgtggg gaaaccgaa 2940
 ccaaacctc ttctaaactc tctctcatc ctctaaagc aaacttctc ctgtcttc 3000
 ttgcgtgagc gatctcaac gttgtcagat cgtgctcgg caccagtaca acgtttctt 3060

tcactgaagc gaaatcaaag atctctttgt ggacacgtag tgcggcgcca taaataacg 3120
 tgtactgtc ctattctgt cgggtgtggtc ttgggaaaag aaagcttgct ggaggctgct 3180
 gttcagcccc atacattact tgttacgatt ctgctgacti tggcggggtg caatatctct 3240
 acttctgctt gacgaggtat tgttgctgt acttctttct tcttcttctt gctgattggt 3300
 tctataagaa atctagtatt ttcttgaaa cagagtttc ccgtggtttt cgaacttga 3360
 gaaagattgt taagctctg tatattctgc ccaaatttgt cgggccccatg gcgaaaaacg 3420
 ttgcgattt cggcttattg ttctcttc ttgtgttgg tcttctcag atcttcgccg 3480
 cggctctca gccaaaacga ccccccatc tgtctatcca ctggccccctg gatctgctgc 3540
 ccaaactaac tccatgggga ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt 3600
 gacagtgacc tggaaactctg gatccctgtc cagcgggtg cacaccttcc cagctgtcct 3660
 gcagtctgac ctctacactc ttagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggccccag 3720
 cgagaccgtc acctgcaacg ttgccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat 3780
 tgtgccagg gattgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt 3840
 ctctacttc cccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggcac 3900
 gtgtgtgtg gtagacatca gcaaggatga tcccagggtc cagttcagct ggtttgtaga 3960
 tgatgtggag gtgcacacag ctacagcgc accccgggag gagcagtica acagcacttt 4020
 ccgtcagtc agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagcgtc 4080
 gctcaccatc accatcacca tcaccatcac cattaaaggc ctattttctt tagtttgaat 4140
 ttactgttat tgggtgtgca ttctatgtt tggtagcgg ttctctgtgc tcagagtgtg 4200
 ttattttat gtaatttaat ttctttgtga gctcctgttt agcaggtcgt cccttcagca 4260
 aggacacaaa aagatttaa ttattataa aaaaaaaaaa aaaaagaccg ggaattcgat 4320

atcaagctta tcgacctgca gatcgttcaa acatttggca ataaagttic ttaagattga	4380
atcctgttgc cggctcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg	4440
taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc	4500
cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat	4560
tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag atctctagag tctcaagctt ggcgcgccca	4620
cgtgactagt ggcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtta	4680
cccaacttaa tcgccttga gcacatcccc ctctgccag ctggcgtaat agcgaagagg	4740
cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgc tagagcagct	4800
tgagcttggga tcagattgtc gttccccgcc ttcagtttaa actatcagtg ttgacagga	4860
tatattggcg ggtaaaccta agagaaaaga gcgttta	4897
<210>	48
<211>	3780
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	表現卡匣編號 1366
<400>	48
gtcaacatgg tggagcacga cacactgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca	60
gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga	120
ttccattgcc cagctatctg tcacttttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc	180
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt	240
ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc	300

acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatgggtgg agcacgacac acttgtctac	360
tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac tttcaacaa	420
agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg	480
aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc	540
atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc	600
atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tctcaaagc aagtggattg atgtgatatc	660
tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttctctata	720
taaggaagt catttcatt ggagaggat taaaatctta ataggtttg ataaaagcga	780
acgtggggaa acccgaacca aacctcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa	840
cttctctctt gtctttcttg cgtgagcga ctccaacgtt gtcagatcgt gcttcggcac	900
cagtacaacg ttttcttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc	960
ggcgccatta aataacgtgt acttgtccta ttctgtcgg tgtggctctg ggaaaagaaa	1020
gcttctgga ggctgctgt cagccccata cattactgt tacgattctg ctgacttctg	1080
gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttctct	1140
tcttctgtct gattggtct ataagaaatc tagtatttc ttgaaacag agttttcccg	1200
tggtttctga acttggagaa agattgttaa gcttctgtat attctgcca aattgtcgg	1260
gccccatggcg aaaaacgttg cgatttctgg ctattgttt tcttctctg tgttggttcc	1320
ttctcagatc ttgccatcc ctctgggagt gatccacaat tgcactctcc aggtgagcga	1380
ggtcgacaaa ctctgtgcc gcgataagtt gtccagcacc aatcagctca gaagtgttg	1440
ctcaacctg gaggggaatg gggctgccac agacgtgcca tccgcgacca agcgtgggg	1500
cttctggtcg ggtgttcccc ctaaagctgt gaattacgag gccggggagt gggtgaaaa	1560

ctgtacaac ctggaatca agaaaccga cggcagcgag tgtctgccg cggccccaga	1620
cgggatcagg ggttccccga ggtgccggta cgtgcacaag gtctcgggaa ccggcccgtg	1680
cgccggcgat ttgccttc ataaggagg cgcatcttt ctctacgata gactggcctc	1740
cacggtcatc tatcgcggca ccacctcgc ggaggggggtg gtggcattcc tcctctgcc	1800
gcaggctaag aaagattct tcagctccca ccctctcagg gaaccagtca acgccacaga	1860
ggatccctcc tcgggatatt acagcaccac aattcggtag caggccacag gcttcgggac	1920
caatgagact gagtacctgt tcgaggtgga caacctaaca tacgtgcagc tcgaatcgcg	1980
gtttaccccg cagttcctt tgcaactta cgagacgac tataaccagt gtaaacggag	2040
caacacgacc gggaagctca tctggaaagt aaaccgggag atcgacacca cgattggaga	2100
gtgggcttcc tgggaaacca agaaaaacct gaccgggag atcaggtcgg aggagttgag	2160
cttactgcc gtctcaata gagcaaaaaa catcagcggc cagagccctg cccggacttc	2220
cagcgacca ggtaccaaca ccacgacaga ggaccacaag attatggcct cggagaattc	2280
ctctgcaatg gtccaggtgc atagccagg ggcggaagct gccgtctgc acctgacaac	2340
cttgcaacg attccacca gccacaacc acccagaca aagcccgggc ccgacaactc	2400
caccataat acccggctc ataagctgga catttccgaa gctacgcagg tggagcagca	2460
ccaccggagg accgacaac actcaacagc tagcgatacc cctcccgcc ccacggcagc	2520
gggcccacc aaggctgaga acaccaatac gagcaagggc accgacctc tggacccgc	2580
gactaccag agccccaga atcacagcga aacggcgggc aacaacaaca cacaccatca	2640
ggatactggg gaggagtcgg cctccagcg aaaactgggc ctgatcaca acaccatagc	2700
cggggtcgc gggctgatca ctggaggccg gagggcagc agagaggcca ttgtaacgc	2760

ccagcccaaa tgcaacccaa acctccacta ctggaccacg caggacgagg gggccgctat 2820
 cggcctggcc tggatcccat actttgggcc cgccgctgag ggcatataca cggagggcct 2880
 catgcacaat caggacggac tgatctgceg actccgccag ctgccaacg agaccactca 2940
 ggcgttcag ctgtttctgc gggccactac cgagctcagg acgttcagca ttctgaatcg 3000
 gaaggcaatc gatttctac tccagcggtg gggcgggaca tgccacatcc tgggaccgga 3060
 ttgtgcatc gagccccacg actggaccaa gaacattaca gataaaatcg accagatcat 3120
 tcatgatttc gtggacaaga cactgccgga ccagggggac aacgataact ggtggaccgg 3180
 atggcgccag atactgtcaa ttattcaac agtggcgagt tccctagcac tggcaatcat 3240
 gatggctggt ctatcttat ggatgtgctc caatggatcg ttacaatgca gaatttgcatt 3300
 ttaaaggcct attttctta gtttgaatt actgttattc ggtgtgcatt tctatgtttg 3360
 gtgagcgggt ttctgtgctc agagtgtgtt tatttatgt aatttaatt ctttgtgagc 3420
 tcctgtttag caggctgtcc ctccagcaag gacacaaaaa gattttaatt ttataaaaa 3480
 aaaaaaaaa aaagaccggg aattcgatat caagcttalc gacctgcaga tcgttcaaac 3540
 atttggcaat aaagttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata 3600
 taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt 3660
 atgagatggg ttttatgat tagagtcccg caattataca ttaatacgc gatagaaaac 3720
 :aaatatagc gcgcaacta ggataaatta tcgcgcgceg tgatcatctat gttactagat 3780

<210> 49

<211> 679

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自薩伊 95 伊波拉病毒之 PDISP-GP -H5 TM+來自 A/印尼/5/2005 之 CY 之
胺基酸序列

<400> 49

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn
20 25 30

Ser Thr Leu Gln Val Ser Glu Val Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys
35 40 45

Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly
50 55 60

Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe
65 70 75 80

Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp
85 90 95

Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu
100 105 110

Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg
115 120 125

Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala
130 135 140

Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr
 145 150 155 160

Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu
 165 170 175

Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg
 180 185 190

Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr
 195 200 205

Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr
 210 215 220

Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe
 225 230 235 240

Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly
 245 250 255

Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu
 260 265 270

Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn
 275 280 285

Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu Glu Leu Ser Phe Thr Ala Val Ser
 290 295 300

Asn Arg Ala Lys Asn Ile Ser Gly Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser
 305 310 315 320

Asp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Thr Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser
 325 330 335

Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln Val His Ser Gln Gly Arg Glu Ala
 340 345 350

Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 355 360 365

Pro Pro Thr Thr Lys Pro Gly Pro Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro
 370 375 380

Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu Ala Thr Gln Val Glu Gln His His
 385 390 395 400

Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr Ala Ser Asp Thr Pro Pro Ala Thr
 405 410 415

Thr Ala Ala Gly Pro Pro Lys Ala Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Gly
 420 425 430

Thr Asp Leu Leu Asp Pro Ala Thr Thr Thr Ser Pro Gln Asn His Ser
 435 440 445

Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu
 450 455 460

Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly

465 470 475 480

Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Glu Ala Ile
485 490 495

Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr
500 505 510

Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly
515 520 525

Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Thr Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp
530 535 540

Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala
545 550 555 560

Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile
565 570 575

Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr
580 585 590

Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr
595 600 605

Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp
610 615 620

Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp
625 630 635 640

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

HIV：人類免疫缺陷病毒

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

104年10月26日修正替換頁
第187-188頁

Arg Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu

645

650

655

Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser

660

665

670

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile

675

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：100147730

C12N 7/04(2006.01)

※申請日期：100.12.21

※IPC 分類：C12N 15/33(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

植物中生產類病毒顆粒(VLP)的方法及以該方法生產之 VLP/
Method Of Producing Virus-like Particles (VLPs) In Plants And
VLP Produced By Such Method

二、中文發明摘要：

提供一種在植物中生產一類病毒顆粒 (VLP) 的方法以及包含 VLP 的組成物。該方法涉及將包含在植物中具活性且操作性地連結至連續地編碼來自病毒三聚表面蛋白質 (trimeric surface protein) 或其片段而融合至流感穿膜區域以及胞質尾之膜外區域的調控區域的一嵌合核苷酸序列之核酸引至植物或植物的部分，胞外區域係來自非流感病毒三聚表面蛋白質並且相關於流感穿膜區域以及胞質尾為異源性的。將植物或植物的部分於允許核酸表現的條件下培養，從而生產 VLP。亦提供由此方法生產的一 VLP。

三、英文發明摘要：

A method of producing a virus like particle (VLP) in a plant, and compositions comprising VLPs, are provided. The method involves introducing a nucleic acid comprising a regulatory region active in the plant and operatively linked to a chimeric nucleotide sequence encoding, in series, an ectodomain from a virus trimeric surface protein or fragment thereof, fused to an influenza transmembrane domain and cytoplasmic tail, into the plant, or portion of the plant, the ectodomain is from a non-influenza virus trimeric surface protein and heterologous with respect to the influenza transmembrane domain, and the cytoplasmic tail. The plant or portion of the plant are incubated under conditions that permit the expression of the nucleic acid, thereby producing the VLP. A LP produced by this method are also provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種在一植物中生產一類病毒顆粒 (VLP) 的方法，其包含，

a) 將包含在該植物中具活性的一調節區域並且連續地操作性連結至編碼來自一病毒三聚表面蛋白質的一膜外區域、融合至一流感穿膜區域以及胞質尾區域(TM/CT)之一嵌合核苷酸序列的一核酸引入該植物或該植物的部分，其中該 TM/CT 由一流感血球凝集素 TM/CT 所組成，且該膜外區域係來自一非流感病毒三聚表面蛋白質並且相關於該流感穿膜區域以及該胞質尾區域為異源性的，以及

b) 於允許該核酸表現的條件下培養該植物或該植物的部分，從而生產該 VLP，該 VLP 包括複數個病毒蛋白，其中該等病毒蛋白由複數個嵌合病毒表面蛋白所組成。

2. 如申請專利範圍第 1 項中所述之方法，其中來自該病毒三聚表面蛋白質之該膜外區域係衍生自反轉錄病毒、桿狀病毒、疱疹病毒、冠狀病毒、副黏液病毒、痘病毒或絲狀病毒科的一病毒。

3. 如申請專利範圍第 1 項中所述之方法，其中來自該病毒三聚表面蛋白質之該膜外區域係衍生自慢病毒、狂犬病病毒、水痘病毒、冠狀病毒或伊波拉病毒屬。

4. 如申請專利範圍第 1 項中所述之方法，其中來自該病毒三聚表面蛋白質之該膜外區域係衍生自人類免疫缺陷病

毒 (HIV)、狂犬病病毒、水痘帶狀疱疹病毒 (VZV)、嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 病毒、伊波拉病毒、麻疹、腮腺炎、水痘、巨細胞病毒、伊波拉/絲狀病毒、疱疹病毒、艾巴氏病毒或天花病毒。

5.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其中來自該病毒三聚表面蛋白質之該膜外區域係衍生自F蛋白質、S蛋白質、env蛋白質、G蛋白質、E套膜醣蛋白、B套膜醣蛋白、C套膜醣蛋白、I套膜醣蛋白、H套膜醣蛋白、GP醣蛋白或血球凝集素。

6.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其中在引入的該步驟 (步驟 a) 中，該核酸係於該植物中暫時地表現。

7.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其中在引入的該步驟 (步驟 a) 中，該核酸係於該植物中穩定地表現。

8.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其進一步包含：
c) 收穫該植物並且純化該VLP的一步驟。

9.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其中在引入的該步驟 (步驟 a) 中，將選自編碼一或多於一的帶位子蛋白質、質子通道蛋白質、蛋白酶抑制劑或其結合物之核苷酸序列之群組的一或多於一個額外核酸引入該植物中。

10.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其中該VLP不包含一病毒基質或一核心蛋白質。

11.如申請專利範圍第1項中所述之方法，其中在引入的該步驟 (步驟 a) 中，該流感穿膜區域以及胞質尾區域為

一 H5 穿膜區域以及胞質尾區域、一 H1 穿膜區域以及胞質尾區域或一 H3 穿膜區域以及胞質尾區域。

12.如申請專利範圍第 1 項中所述之方法，其中該流感穿膜區域以及該胞質尾區域從 H5 (A/印尼/05/2005)獲得且包括 SEQ ID NO:41 所定義的核酸序列，或該流感穿膜區域以及該胞質尾區域從 H3 (A/布里斯班/10/2007)獲得且包括 SEQ ID NO:42 所定義的序列。

13.一種經由申請專利範圍第 11 項中所述之方法生產之 VLP。

14.如申請專利範圍第 13 項中所述之 VLP，其包含帶有植物特異之 N-聚醣或經修飾之 N-聚醣的一嵌合病毒蛋白質。

15.如申請專利範圍第 13 項中所述之 VLP，其包含一或多於一衍生自該植物的脂質。

16.一種包含一有效劑量之如同申請專利範圍第 13 項中所述之誘導一免疫反應的 VLP 以及一藥學上可接受之載體的組成物。

