

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410044285.5

[51] Int. Cl.

A61K 39/215 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年9月27日

[11] 授权公告号 CN 1276777C

[22] 申请日 2004.5.18

[21] 申请号 200410044285.5

[30] 优先权

[32] 2003.5.21 [33] CN [31] 03126634.7

[71] 专利权人 中山大学肿瘤防治中心

地址 510060 广东省广州市东风东路 651 号

[72] 发明人 黄文林 曾益新 汪 健 刘然义

黄嘉凌 黄必军 赖 坤 吴立志

梁志慧 柯妙拉 吴秀菊

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 刘孟斌

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54] 发明名称

腺病毒载体 SARS 疫苗及其制备方法, 冠状病毒 S 基因的应用

[57] 摘要

本发明属于生物基因工程领域, 具体涉及腺病毒载体 SARS 疫苗, 其制备方法以及相关冠状病毒 S 基因在制备预防非典型肺炎 (SARS) 疫苗方面的应用。通过生物工程手段, 将相关冠状病毒 S 基因与缺陷型腺病毒重组结合, 使保护性免疫原蛋白或多肽在其中表达, 经过扩增培养、纯化、制剂而制成一种能引起粘膜免疫原性的基因疫苗, 诱导呼吸道粘膜免疫反应, 使机体产生相应抗体, 防止病毒侵染。本发明与传统的灭活病毒颗粒疫苗比较, 安全性高, 使用方便, 不受肌肉注射等特定条件限制, 具有广泛的临床应用前景。

1、一种 SARS 疫苗，其特征在于它包含 SARS 相关冠状病毒 S 基因和复制缺陷型腺病毒。

2、根据权利要求 1 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E1 区完全缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。

3、根据权利要求 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E3 区完全缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。

4、根据权利要求 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E3 区部分缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。

5、根据权利要求 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒为 E3 区不缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒。

6、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于缺陷型腺病毒内装 CMV 启动子和 BGHpolyA 。

7、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于它包含 SARS 相关冠状病毒 S 基因全长。

8、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁ 结构域在内的序列。

9、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₂ 结构域在内的序列。

10、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁、S₂ 结构域在内的序列。

11、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 疫苗，其特征在于克隆到腺病毒载体中的为碱基号为 3686~3648 的 SARS 相关冠状病毒 S 基因跨膜区及 C 端片段。

12、一种 SARS 疫苗的制备方法，包括

- (1) 取得 SARS 相关冠状病毒的 S 基因；
- (2) 将 S 基因与缺陷型腺病毒重组结合；
- (3) 转染包装细胞；
- (4) 经扩增、分离、纯化，制成制剂。

13、根据权利要求 12 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于提取 S 基因后，将其克隆到 pshuttle 质粒，再将其与腺病毒骨架质粒连接结合。

14、根据权利要求 12 所述的 SARS 疫苗的制备方法，其特征在于根据 S 基因序列设计 PCR 引物如下：

- v1 GGTCTAGAGT TGTGGTTTCA AGTGAT
v2 TTTCTAGACC ATGGGTTGTG TCCTTGCT
V3 TTTCTAGACC ATGGCATATA GGTTCAATG
V4 TAGGTACCAA TGCCAGTAGT GGTG
V5 TTGGTACCTC CGCCTCGACT TT
V6 CCGGTACCAT AAGTTCGTTT ATGTGT

15、根据权利要求 12 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于包装细胞为整合了 C 亚类 5 型腺病毒 Ad5 E1 区基因的细胞系或细胞株。

16、根据权利要求 15 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于包装细胞为 293 细胞。

17、根据权利要求 12 所述的 SARS 疫苗制备方法，其特征在于所述制剂为喷雾剂或注射剂。

18、SARS 相关冠状病毒 S 基因在制备预防 SARS 的疫苗中的应用。

腺病毒载体 SARS 疫苗及其制备方法， 冠状病毒 S 基因的应用

一、技术领域

本发明属于生物基因工程领域，具体涉及腺病毒载体 SARS 疫苗，其制备方法以及揭示相关冠状病毒 S 基因在制备预防非典型肺炎（SARS）疫苗方面的应用。

二、背景技术

中国广东地区从去年末开始爆发非典型肺炎（atypical pneumonia），发病急，传染性强，抗生素治疗无效。目前，此病已传播至 30 多个国家和地区，WHO 已将之命名为严重急性的呼吸道综合症（severe acute respiratory syndrome, SARS）。

目前，世界许多国家的科学家均从不同病人血清中独立分离到新型的冠状病毒（coronavirus），病毒基因序列分析结果表明，它们与已知的冠状病毒有 50%~60% 的同源性，世界卫生组织（WHO）已经公布，引起 SARS 的病原体是冠状病毒的变异株。

冠状病毒是一种非节段性正链的 RNA 病毒，其基因组近 30kb，可以在人和动物中传播，主要感染人和动物的呼吸系统，冠状病毒颗粒是一种具有内核心及囊膜包被地病毒，共有四种结构蛋白：刺突蛋白（spike, S），膜蛋白（membrane, M），囊膜蛋白（envelop, E），及核蛋白（nucleoprotein, N）。由于冠状病毒是一种 RNA 病毒，十分不稳定，容

易发生突变以逃避宿主的免疫监督与排斥。因此，必须寻找到 SARS 相关冠状病毒中稳定性好且具有免疫保护作用的抗原，以进行相关疫苗的研制。

目前较少应用灭活的病毒颗粒疫苗，因为全病毒颗粒携带了病毒全基因组，安全性顾虑较大。虽然既往的冠状病毒易在体外培养获得，但此次 SARS 相关的冠状病毒毒性极大且遗传背景不完全清楚，因此大规模制备冠状病毒颗粒不可行。基因工程技术的发展为亚单位疫苗的开发提供了极大的便利，而且亚单位疫苗的可操作性及生物安全性好。若能筛选到具有免疫原性的病毒抗原决定簇，结合基因工程技术，可方便地对抗原决定簇进行改造，以增强其稳定性、免疫原性、生物安全性。显然，借助基因工程技术，可以非常方便地制备有效的亚单位疫苗。

根据目前研究显示，冠状病毒已知的四种结构蛋白中，刺突蛋白（spike S）是具有诱导保护性免疫反应的结构蛋白，部分学者的研究结构已经证实了冠状病毒刺突蛋白 C 末端为其抗原决定簇所在，同时，SARS 相关冠状病毒通过呼吸道引起感染，而目前仍未有可以预防 SARS 的疫苗。

另外，资料显示，腺病毒本身很容易感染呼吸道粘膜上皮，较易诱导呼吸道粘膜免疫反应，并且腺病毒作载体表达的免疫原在宿主细胞中表达、加工、折叠、修饰、提呈，基本上保持了免疫原的天然构象，生物活性高。

所述条件为利用缺陷型腺病毒作为载体研制和生产腺病毒 SARS 疫苗提供了坚实的理论基础。

三、发明内容

本发明的第一个目的在于提供一种能预防流行性疾病“非典型肺炎”的腺病毒 SARS 疫苗，更好的防止“非典型肺炎”的发生和传播；本发明另外的目的在于提供一种利用缺陷型腺病毒作为载体，通过基因克隆、重组等手段，制备腺病毒载体 SARS 疫苗的方法以及揭示 SARS 相关冠状病毒 S 基因在制备疫苗中的应用。

本发明的目的是这样实现的：通过生物工程手段，将 SARS 相关冠状病毒 S 基因（冠状病毒共有四个结构基因，S 基因为其中之一，见下文详述）与缺陷型腺病毒重组结合，构成一种能引起粘膜免疫原性的基因疫苗。

所用 Spike 基因片段序列为：

使用 Gene bank 中所公布的 S 基因序列（Gene bank 查询号：gb AY278554.2）作为模版，根据序列设计 PCR 引物如下：

v1 GGTCTAGAGT TGTGGTTTCA AGTGAT

v2 TTTCTAGACC ATGGGTTGTG TCCTTGCT

V3 TTTCTAGACC ATGGCATATA GGTTCAATG

V4 TAGGTACCAA TGCCAGTAGT GGTG

V5 TTGGTACCTC CGCCTCGACT TT

V6 CCGGTACCAT AAGTTCGTTT ATGTGT

其中 V1 和 V4 为一对，扩增 S 基因 N 端片段；V2 和 V5 为一对引物，扩增 S 基因 M 区片段；V3 和 V6 为一对引物，扩增 S 基因 C 端片段（如图 1），扩增后的结构见图 2。

腺病毒 SARS 疫苗的制备:

首先, 收集分离康复病人血清, 通过分离提取得到冠状病毒总 RNA, 通过反转录、测序、挑选等步骤得到 S 基因。接着, 将 S 基因克隆到 pShuttle 质粒得到克隆体 (保藏单位: 中国典型培养物保藏中心; 保藏日期: 2003 年 5 月 17 日; 保藏号: CCTCC M 203036 E. coli DH5a/pShuttle-SN 以及 CCTCC M 203037 E. coli DH5a/pShuttle-SC), 再将其与腺病毒骨架质粒 (pAdeno-X™) 连接 (其中 pShuttle、pAdeno-X 均购自 CLONTECH Laboratory, Inc, USA)。连接后共同转染 293 细胞, 经进一步的纯化鉴定后, 用 293 细胞大量扩增, 收集病毒液, 分离纯化, 即为腺病毒 SARS 疫苗。它可以制成喷雾剂或其它形式的药剂。主要的技术路线见图 4。

本发明是一种基因工程疫苗, 即是使用缺陷型腺病毒作为载体的基因疫苗, 它利用本身很容易感染呼吸道粘膜上皮的腺病毒作为载体, 使保护性免疫原蛋白或多肽在其中表达, 诱导呼吸道粘膜免疫反应; 通过诱导粘膜免疫性反应, 使机体产生相应抗体, 防止病毒侵染。本发明与传统的灭活病毒颗粒疫苗比较, 它安全性高, 并且使用方便, 不受肌肉注射等特定条件限制。

目前, SARS 正在世界各地快速传播, 作为一种病毒性传染病, 眼下尚未找到可以有效治疗的药物, 此种情况下, 预防是最好的手段。现已证实 SARS 相关冠状病毒刺突蛋白 C 末端为其抗原决定簇所在。因此, 本发明正是根据此发现, 合成 SARS 相关冠状病毒刺突蛋白基因, 将其克隆到腺病毒载体, 经过扩增培养、纯化、制剂而成, 能有效诱导粘膜

产生抗体，产生体液免疫防止病毒侵染机体，具有广泛的临床应用前景。

四、附图说明

图 1 是 S 基因片段扩增示意图。

图 2 是带有 S 基因 (Spike-S) 的重组缺陷型腺病毒结构图。

图 3 是 pShuttle-Sc、 pShuttle-SM、 pShuttle-SN 重组体酶切结果。

图 4 是 pShuttle-Sc、 pShuttle-SM、 pShuttle-SN 重组体测序结果。

图 5 是 RT-PCR 检测 Ad-S_N 和 Ad-S_M 的表达试验结果

图 6 是 Western blot 检测 Ad-S_N 的表达试验结果

图 7 是 Ad-S_N 注射或呼吸道免疫均诱导雌性大鼠产生特异性抗体 (IgG) 的体内表达试验结果

图 8 是 Ad-S_N 注射或呼吸道免疫均诱导雄性大鼠产生特异性抗体 (IgG) 的体内表达试验结果

图 9 是本发明疫苗制备的技术路线图。

五、具体实施方式

以下将通过具体实施例来进一步说明本发明。

实施例 1

腺病毒载体 SARS 疫苗的制备方法：

腺病毒载体 SARS 疫苗的制备分为前期构建和后期扩增二部分：

前期构建：

取得 SARS 相关冠状病毒 spike (S_F、S_N、S_M、S_C) 基因后，用 PCR 方法进行扩增，经 PCR 后，用 XbaI+KpnI 37°C 酶切，同时用此酶酶切 pShuttle，连接，转化大肠杆菌 DH5a，利用卡那霉素 (Kan^R) 抗性

筛选阳性克隆，培养、纯化后得到 pS_F/S_N/S_M/S_C-Shuttle，用 I-CeuI+P1-SceI 酶切，同时用此酶酶切 PAdeno-XTM，酶切后连接，转化大肠杆菌 DH5a，利用氨苄 (Amp⁺) 抗性筛选阳性克隆即得 pAd-S_F/S_N/S_M/S_C。

扩大培养：

得到 pAd-S_F/S_N/S_M/S_C 后，再经 PaeI 酶切、质粒经线性化后转染包装细胞，包装细胞为整合了 C 亚类 5 型腺病毒 (Ad5) E1 区基因的细胞系 (株)，例如 293 细胞。经过空斑筛选，PCR 鉴定为 Ad-S_F/S_N/S_M/S_C 后，大量培养 293 细胞，用 Ad-S_F/S_N/S_M/S_C 感染 293 细胞，经氯化铯分离纯化，制剂等步骤，即得到腺病毒 SARS 疫苗。

SARS 疫苗包含 SARS 相关冠状病毒 S 基因和和缺陷型腺病毒。缺陷型腺病毒为 E1 区完全缺失的 C 亚类的 5 型腺病毒，即 Ad5。该缺陷型腺病毒的 E3 区可以为完全缺失或部分缺失或不缺失。缺陷型腺病毒内装 CMV 启动子和 BGHpolyA。

Ad-S_F/S_N/S_M/S_C

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因全长。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁ 结构域在内的序列。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₂ 结构域在内的序列。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因包括 S₁、S₂ 结构域在内的序列 (碱基号为：49~3585)。

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因跨膜区（碱基号为：3686~3648）及 C 端片段。

实施例 2

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因 N 端片段。其余同实施例 1。

实施例 3

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因中间片段。其余同实施例 1。

实施例 4

克隆到腺病毒载体中的为 SARS 相关冠状病毒 S 基因 C 端片段。

其余同实施例 1。

实施例 5

S 基因转化 pShuttle 质粒和鉴定：

用 XbaI+KpnI 37℃ 水浴条件酶切，同时用此酶酶切 pShuttle，连接，转化大肠杆菌 DH5a，培养，利用卡那霉素（Kan^R）抗性筛选阳性克隆，分别得到 pShuttle-Sc、pShuttle-SM、pShuttle-SN，通过常规琼脂凝胶电泳鉴定和检测序列鉴定，结果见图3、图4。

实施例 6

对克隆得到的 Ad-S_N/S_M 进行体外表达试验。

用 2.5~40 MOI 感染 VeroE6 细胞，弃去病毒悬液，加入细胞培养液，37℃、5%CO₂ 条件下培养，于感染后 48h 收集培养细胞上清，分别用 RT-PCR 法检测 Ad-S_n 和 Ad-S_{nm} 的表达水平，用 Western blot 法检测

Ad-Sn 的表达水平，结果见图 5、图 6。

实施例 7

对克隆得到的 Ad- S_N 进行体内表达试验。

将试验对象按照下述方式分组：Ad-Sn 滴鼻组、Ad-lacZ 滴鼻组（对照，先用 3%戊巴比妥腹注麻醉，滴鼻 0.5mL/只）、Ad-Sn 尾静脉注射组、Ad-lacZ 尾静脉注射组（对照，尾静脉注射给药 0.5mL/只）、空白对照组（不作任何处理）。然后按照下述方式给药：每周给药一次，连续三周；从第一次给药后一周开始取血，最后一次给药 2 周后处死动物取血和组织，用 ELISA 法测定大鼠抗 SARS IgG 浓度，结果见图 7、图 8。

实施例 8

绿猴肾细胞（Vero E6）细胞免受 SARS 攻击

1. 接种 Vero E6 细胞到 96 孔板， 2×10^4 /孔。
2. 24 小时后，接种腺病毒 SARS 疫苗，方法：用 1640 培养液按 4 倍稀释病毒原液，接种时先将 96 孔板中培养液吸出弃去，PBS 清洗孔一遍后，加入不同稀释度的病毒液，每一个稀释度加 5 个孔，50 μ L/孔。同时以 1640 培养液（不含病毒）为阴性对照。37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，饱和湿度条件下孵育 1 小时后，加入含 5%新生牛血清的 1640 培养液，200 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。
3. 24 小时后，接种 SARS 病毒，方法：1640 培养液稀释 SARS 病毒至 100TCID₅₀，接种时先将 96 孔板中培养液吸出弃去，PBS 清洗孔一遍后，加入不同稀释度的病毒液，每一个稀释度加 5 个孔，50 μ L/孔。同时以 1640 培养液（不含病毒）为阴性对照。37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，

饱和湿度条件下孵育 1 小时后，加入含 5% 新生牛血清的 1640 培养液，200 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂，饱和湿度条件下培养。

4. 此后每隔 12 到 24 小时观察并记录细胞病变情况，计算结果时各稀释度的每孔细胞病变评分相加，得出细胞病变指数，取各组平均数，如下：

组别 \ 病变情况%	12 小时	24 小时	48 小时	72 小时
阴性对照 (1640 液)	0	0	0	0
SARS 病毒攻击组	20	35	85	100
疫苗保护组	5	10	25	40

<110>中山大学肿瘤防治中心

<120>腺病毒载体 SARS 疫苗及其制备方法，冠状病毒 S 基因的应用

<160>4

<210>1

<211>3780

<212>DNA

<213>病毒种

<220>

<221>CDS

<222>(1)···(3780)

<400>1

```

atgtttatth tcttattatt tcttactctc actagtggta gtagccttga ccggtgcacc 60
acttttgatg atgttcaage tcttaattac actcaacata cttcatctat gagggggggt 120
tactatcctg atgaaatth tagatcagac actctthatt taactcagga tttatthctt 180
ccatthtatt ctaatgttac agggthtcat actattaatc atacgtthtg caaccctgtc 240
atacctthta aggatggtat thatthtgct gccacagaga aatcaaatgt tgtccgtggt 300
tgggtthttg gttctacat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat taacaattct 360
actaatgttg ttatacgagc atgtaactth gaattgtgtg acaaccctth cthtgctgtt 420
tctaaacca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt taattgcact 480
ttcgagtaca tatctgatgc cthttcgctt gatgtthcag aaaagtcagg taatthtaaa 540
cacttacgag agthtggtt taaaaataaa gatgggtthc tctatgtthta taagggtat 600

```

caacctatag atgtagttcg tgatctacct tctggtttta acactttgaa acctatTTTT 660
aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat tttagagcca ttcttacagc cttttcacct 720
gctcaagaca ttggggcac gtcagctgca gcctatTTTg ttggctatTT aaagccaact 780
acatttatgc tcaagtatga tgaaaatggt acaatcacag atgctgttga ttgttctcaa 840
aatccacttg ctgaactcaa atgctctggt aagagctttg agattgacaa aggaatttac 900
cagacctcta atttcagggt tgttccctca ggagatgTTg tgagattccc taatattaca 960
aacttgtgtc cttttggaga ggtttttaat gctactaaat tcccttctgt ctatgcatgg 1020
gagagaaaaa aaatttctaa ttgtgttgc gattactctg tgctctacaa ctcaacattt 1080
ttttcaacct ttaagtgcta tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct ttgcttctcc 1140
aatgtctatg cagattcttt tgtagtcaag ggagatgatg taagacaaat agcgccagga 1200
caaactggtg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatttcat gggttgtgtc 1260
cttgcttga atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaattataa ttataaatat 1320
aggtatctta gacatggcaa gcttaggcc tttgagagag acatatctaa tgtgccttcc 1380
tcccctgatg gcaaacttg cacccacct gctcttaatt gttattggcc attaaatgat 1440
tatggTTTT acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagtTgt agtactttct 1500
tttgaacttt taaatgcacc ggccacggtt tgtggaccaa aattatccac tgaccttatt 1560
aagaaccagt gtgtcaattt taattttaat ggactcactg gtactggtgt gttaactcct 1620
tcttcaaaga gatttcaacc attcaacaa tttggccgtg atgtttctga tttcactgat 1680
tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccttgcgc ttttgggggt 1740
gtaagtgtaa ttacacctgg acaaatgct tcactgaag ttgctgttct atatcaagat 1800
gttaactgca ctgatgttcc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc agcttggcgc 1860
atatattcta ctggaacaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat aggagctgag 1920

catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttg tgctagttac 1980
catacagttt ctttattacg tagtactagc caaaaatcta ttgtggctta tactatgtct 2040
ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc tactaacttt 2100
tcaattagca ttactacaga agtaatgcct gtttctatgg ctaaacctc cgtagattgt 2160
aatatgtaca tctgeggaga ttctactgaa tgtgctaatt tgcttctcca atatggtagc 2220
ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga tcgcaacaca 2280
cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaaatg tacaaaacce caactttgaa atattttggt 2340
ggttttaatt tttcacaat attacctgac cctctaaagc caactaagag gtcttttatt 2400
gaggacttgc tctttaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa gcaatatggc 2460
gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcatttgctg cgcagaagtt caatggactt 2520
acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc tgctctagtt 2580
agtggactg ccaactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctcttca aatacctttt 2640
gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc attggagtta cccaaaatgt tctctatgag 2700
aaccaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac aaggcgatta gtcaaattca agaactcatt 2760
acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttg ttaaccagaa tgctcaagca 2820
ttaaacacac ttgttaaaca acttagctct aattttggtg caatttcaag tgtgctaaat 2880
gatatccttt cgcgacttga taaagtcgag gcgagggtac aaattgacag gtttaattaca 2940
ggcagacttc aaagccttca aacctatgta acacaacaac taatcagggc tgctgaaatc 3000
agggettctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg acaatcaaaa 3060
agagttgact tttgtgaaa gggctaccac cttatgtcct tcccacaagc agccccgcat 3120
ggtgttgtct tctacatgt cacgtatgtg ccatcccagg agaggaactt caccacagcg 3180
ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac ttcctcgtg aagggttttt tgtgtttaat 3240

ggcacttctt ggtttattac acagaggaac ttcttttctc cacaataat tactacagac 3300
 aatacatttg tctcaggaaa ttgtgatgtc gttattggca tcattaacaa cacagtttat 3360
 gatcctctgc aacctgagct tgactcattc aaagaagagc tggacaagta cttcaaaaat 3420
 catacatcac cagatgttga tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc tgtegtcaac 3480
 attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaatga atcactcatt 3540
 gaccttcaag aattgggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta tgtttggtc 3600
 ggcttcattg ctggactaat tgccatcgtc atggttacaa tcttgctttg ttgcatgact 3660
 agttgttgca gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgtggtt ctgctgcaa gttgatgag 3720
 gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt acacataaac gaacttatgg 3780

<210>2

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>根据 spike 基因碱基序列设计的用于 PCR 扩增 spike 基因 N 端的引物（一对）

<400>2

ggtctagagt tgtggtttca agtgat
 taggtaccaa tgccagtagt ggtg

<210>3

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>根据 spike 基因碱基序列设计的用于 PCR 扩增 spike 基因 M 端的引物（一对）

<400>3

tttctagacc atgggttggtg tccttgct

ttggtacctc cgctcgact tt

<210>4

<211>50

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>根据 spike 基因碱基序列设计的用于 PCR 扩增 spike 基因 M 端的引物（一对）

<400>4

tttctagacc atggcatata ggttcaatg

ccgtaccat aagttcgttt atgtgt

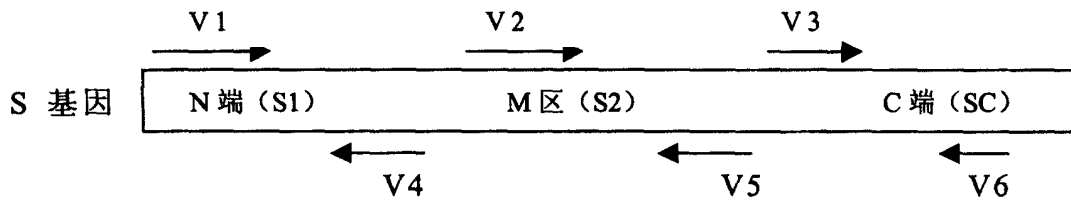


图1

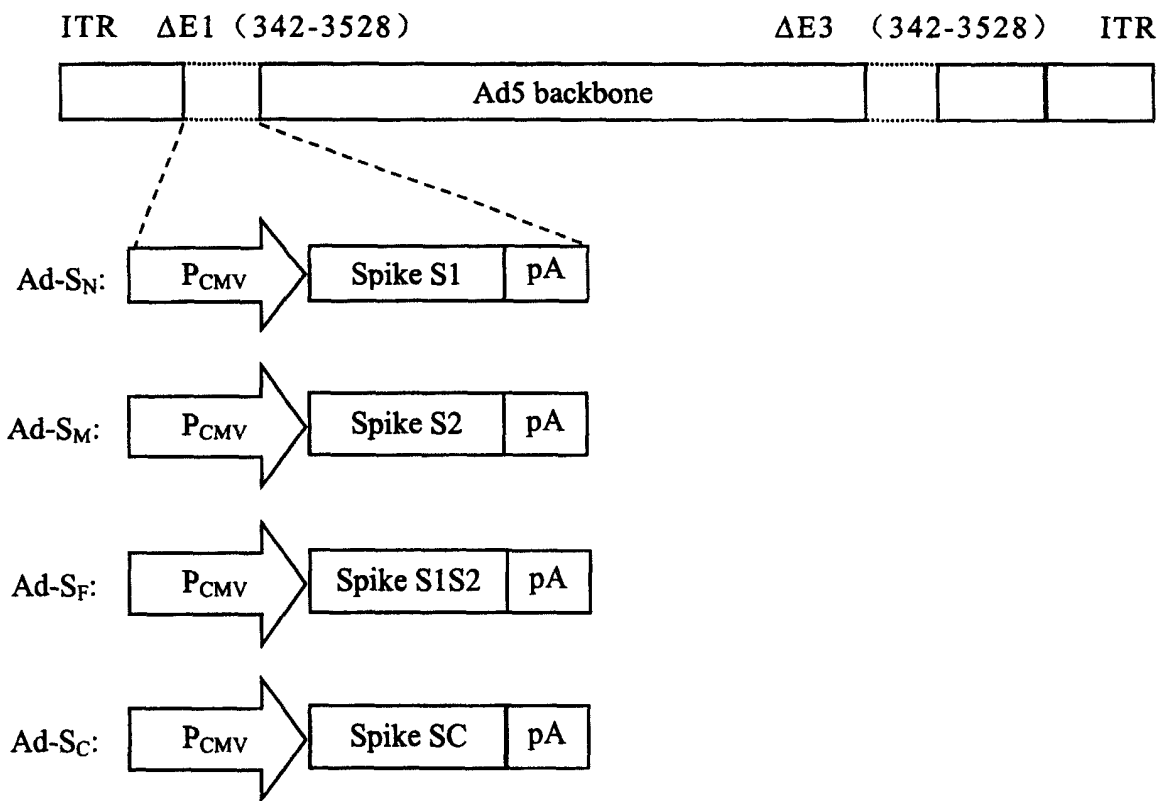


图2



图3

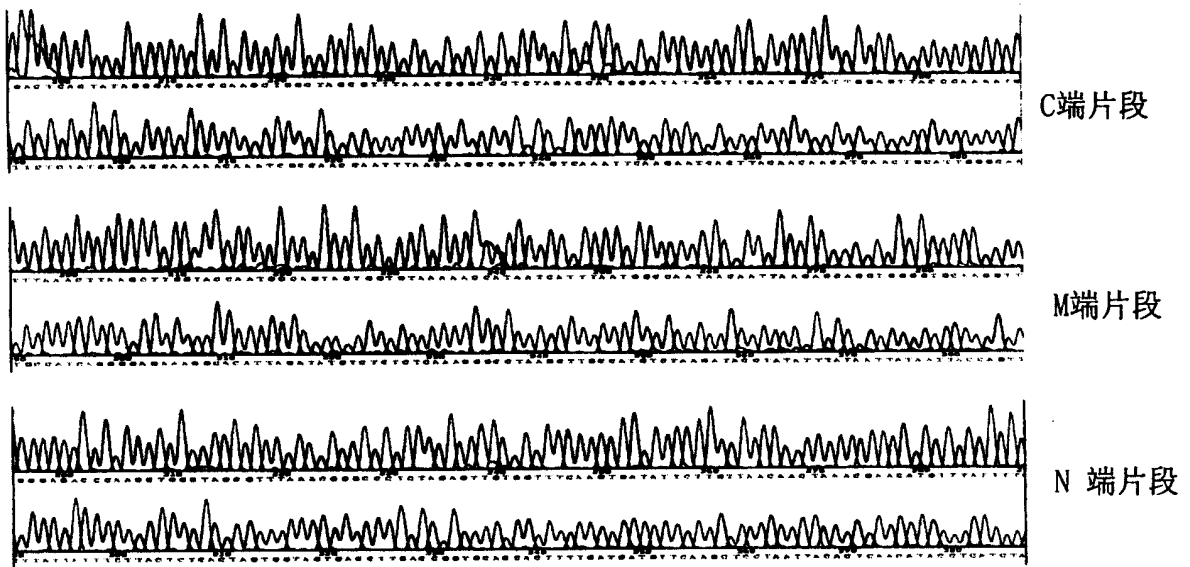


图4

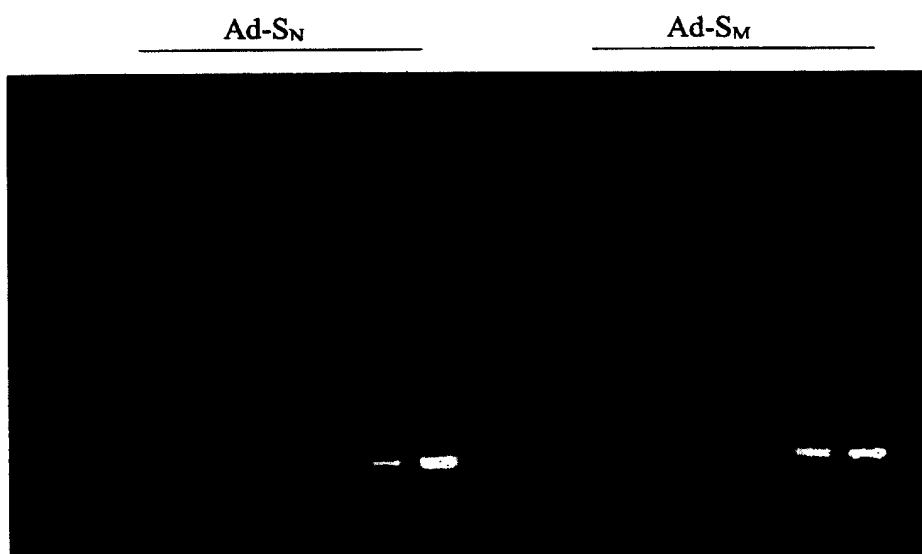


图5



图6

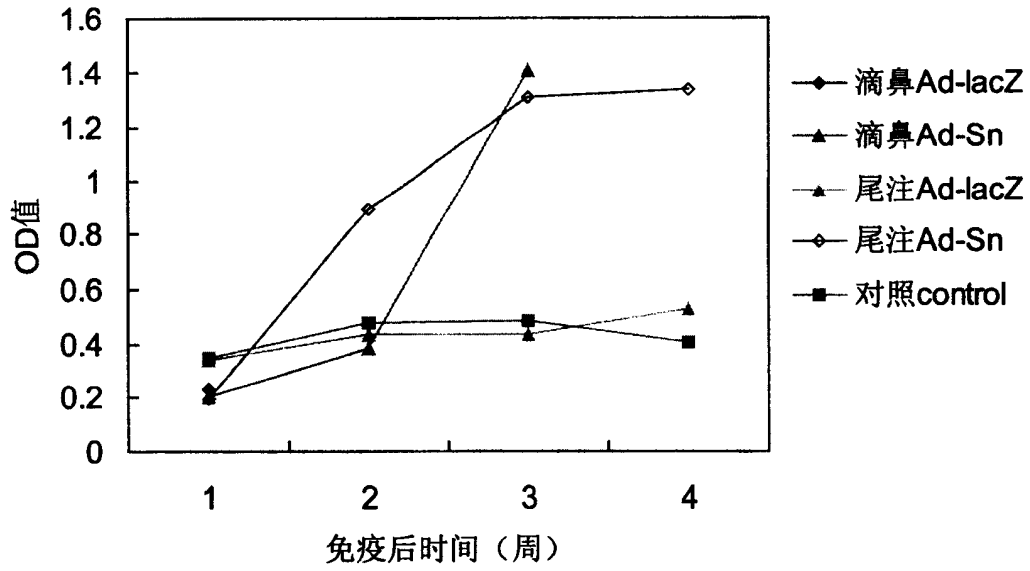


图7

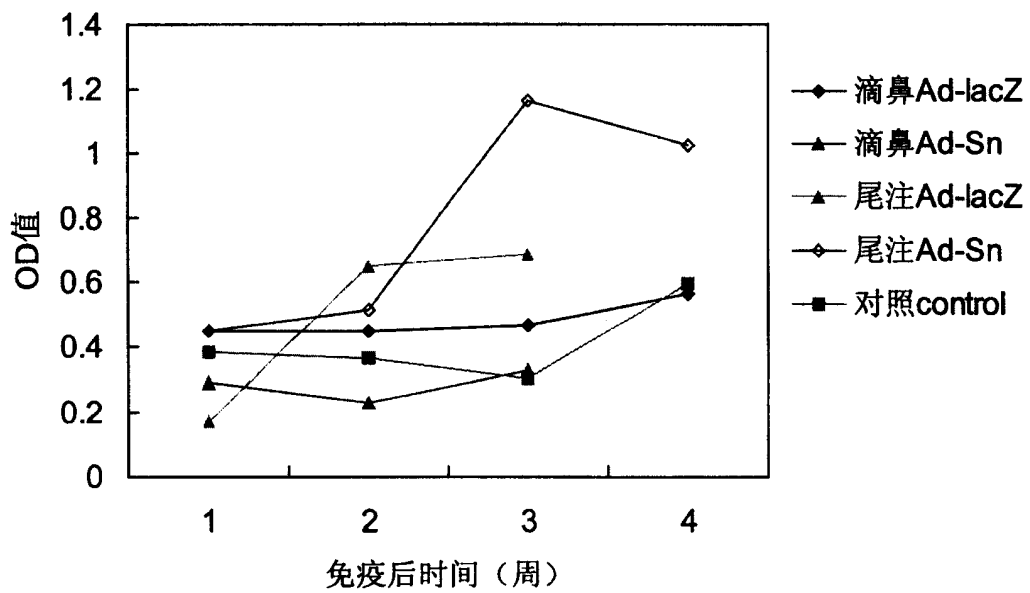


图8

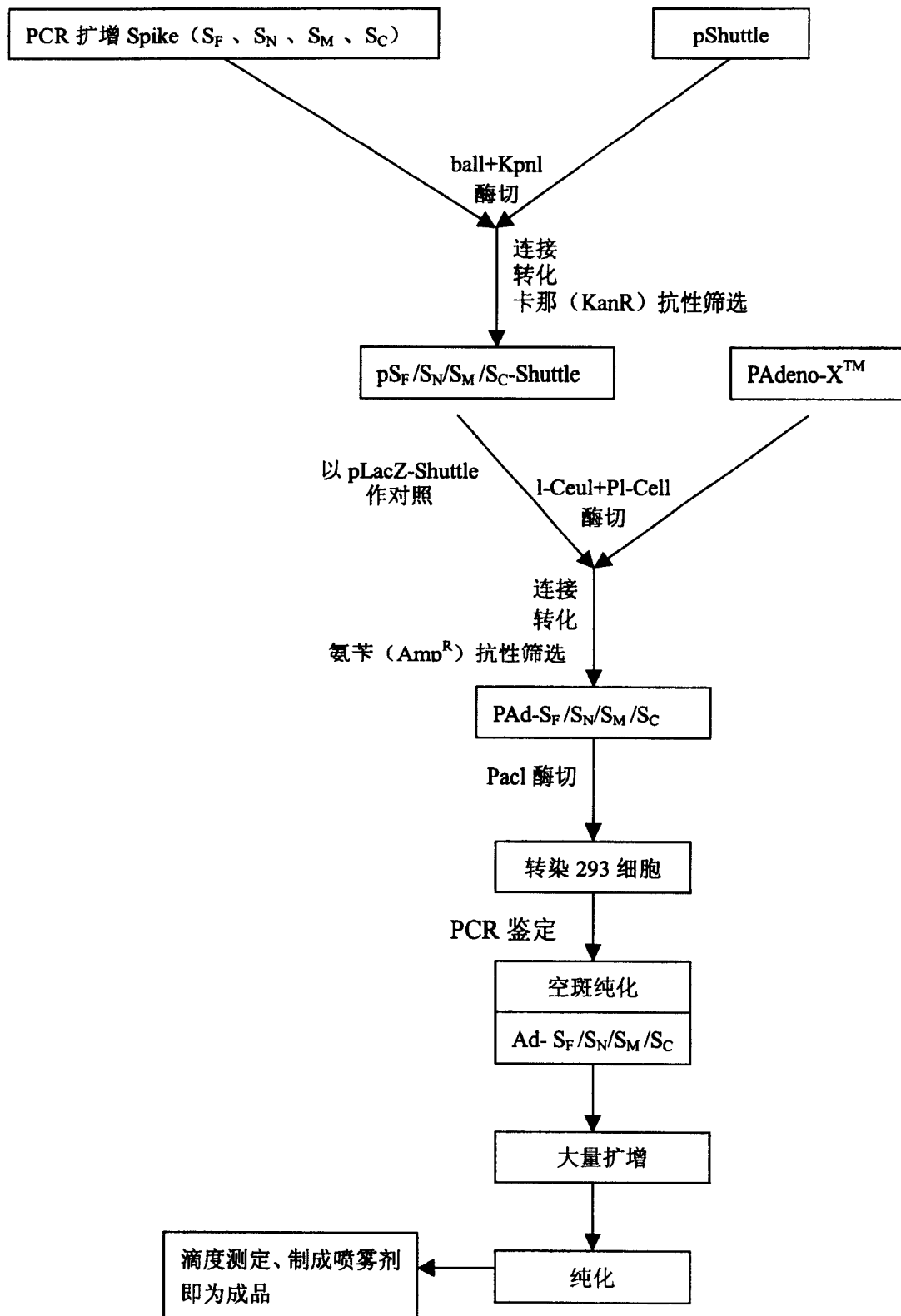


图9