



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105802923 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201610232296.9

(22)申请日 2016.04.14

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15路中
国科学院生物物理研究所

(72)发明人 饶子和 孙瑶 王祥喜 杨盼

(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理
有限公司 11250

代理人 李红团

(51)Int.Cl.

C12N 7/04(2006.01)

C12N 15/866(2006.01)

A61K 39/13(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

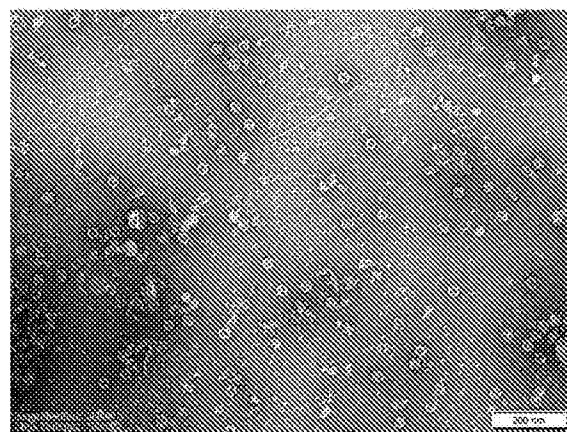
权利要求书2页 说明书7页
序列表14页 附图4页

(54)发明名称

一种重组脊髓灰质炎病毒样颗粒及其制备
方法与应用

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种重
组脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒,并进
一步公开其制备方法,以及其在制备疫苗药物领
域的应用。本发明所述制备重组脊髓灰质炎病毒
样颗粒的方法,在昆虫表达系统中成功的制备了
脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒,且所述
脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒可有效
用于制备基于病毒样颗粒的脊髓灰质炎疫苗。



1. 一种重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)取脊髓灰质炎病毒的P1基因和3CD基因分别克隆到共表达载体中,随后通过转化感受态细胞得到能够分别表达脊髓灰质炎病毒样颗粒的重组病毒载体;

(2)用步骤(1)得到的重组病毒载体转染昆虫细胞,培养后获得含有编码病毒样颗粒蛋白基因的重组病毒;

(3)将步骤(2)获得的重组病毒感染至宿主细胞进行扩增以提高病毒滴度,随后接种高滴度的重组病毒侵染昆虫细胞,以表达上述P1基因和3CD基因,并按照常规纯化方法获得脊髓灰质炎病毒样颗粒。

2. 根据权利要求1所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述P1基因和所述3CD基因均为根据宿主细胞的偏好性进行密码子优化的基因。

3. 根据权利要求2所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于:所述密码子优化是指在不改变野生型脊髓灰质炎病毒P1蛋白和3CD蛋白氨基酸序列的前提下,将野生型脊髓灰质炎病毒P1基因和3CD基因的密码子替换为昆虫细胞偏好的密码子。

4. 根据权利要求3所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中:所述脊髓灰质炎病毒包括I型、II型或III型病毒,所述脊髓灰质炎病毒I型、II型、III型病毒的P1基因和3CD基因分别属于野生型脊髓灰质炎病毒的Mahoney株、MEF-1株和Saukett株。

5. 根据权利要求4所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于:

所述脊髓灰质炎病毒为I型病毒,其优化的P1基因具有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,其优化的3CD基因具有如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;或者,

所述脊髓灰质炎病毒为II型病毒,其优化的P1基因具有如SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列,其优化的3CD基因具有如SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列;或者,

所述脊髓灰质炎病毒为III型病毒,其优化的P1基因具有如SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列,其优化的3CD基因具有如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

6. 根据权利要求1-5任一所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述共表达载体为将所述P1基因和所述3CD基因分别插入到pFastBacTMDual1载体或者Dual1-CMV改造载体的两个多克隆位点处各由一个启动子驱动转录得到的重组质粒;

所述Dual1-CMV改造载体为在pFastBacTMDual1载体基础上将p10启动子改造为CMV启动子获得的改造载体。

7. 根据权利要求6所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述P1基因和所述3CD基因在所述重组表达载体中各由一个启动子驱动转录,驱动所述P1基因的启动子方向和驱动所述3CD基因的启动子方向相反。

8. 根据权利要求1-7任一所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述感受态细胞为DH10Bac感受态细胞,所获得的所述重组病毒载体为重组昆虫杆状病毒载体。

9. 根据权利要求1-8任一所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述目的昆虫细胞选自草地贪夜蛾卵巢细胞系sf9、sf21以及粉纹夜蛾胚胎细胞系High Five。

10. 由权利要求1-9任一所述方法制备得到的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒。
11. 权利要求10所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒用于制备预防及治疗脊髓灰质炎的疫苗药物中的用途。

一种重组脊髓灰质炎病毒样颗粒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种重组脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒,并进一步公开其制备方法,以及其在制备疫苗药物领域的应用。

背景技术

[0002] 脊髓灰质炎(Poliomyelitis)是一种由脊髓灰质炎病毒(Poliovirus,PV)所致的急性传染病,会严重危害儿童的身体健康。脊髓灰质炎病毒侵袭人的神经系统,可在数小时内造成机体完全瘫痪;脊髓灰质炎病毒还可以通过口腔进入体内并在肠道内繁殖,引起的初期症状可表现为发热、乏力、头痛、呕吐、脖颈僵硬以及四肢疼痛。未免疫人群中几乎所有人都可能感染脊髓灰质炎,感染者中有少数人会出现麻痹症状,由于该症状好发于婴幼儿,故又俗称小儿麻痹症。每200例感染病例就有一例导致不可逆转的瘫痪(通常是两腿瘫痪),在瘫痪病例中,约有5-10%的患者会因呼吸肌麻痹而死亡。

[0003] 脊髓灰质炎病毒属于小核糖核酸病毒(Picornaviridae)的肠道病毒属(Enterovirus)。脊髓灰质炎病毒结构为正二十面体结构,直径约为27-30nm,无包膜结构。脊髓灰质炎病毒的基因组为单股正链RNA,由5'非编码区、P1区、P2区、P3区和3'非编码区组成。其中,P1编码病毒的结构蛋白P1前体,可被病毒的蛋白酶前体3CD切割为VP0、VP1和VP3结构蛋白。这三种蛋白与病毒RNA组成病毒颗粒,VP0在组装中进一步裂解为VP2和VP4,完成成熟病毒颗粒的组装。

[0004] 脊髓灰质炎病毒根据血清型被分为I型、II型和III型。其中I型脊髓灰质炎在3种类型中最具神经侵袭性,多数脊髓灰质炎流行及地方性流行病例都是由I型脊髓灰质炎引起的,其次分别为III型和II型,且三种血清型之间并无交叉免疫保护作用。

[0005] 目前,临床上对于脊髓灰质炎的治疗并没有特效药,主要采取的是接种疫苗为主的预防措施。目前国内外普遍使用的用来预防脊髓灰质炎的疫苗有灭活疫苗(Inactivated poliovirus vaccine,IPV)和口服减毒疫苗(Oral poliovirus vaccine,OPV)。其中IPV是由3种类型脊髓灰质炎病毒组成的混合物经过细胞培养、收获上清、纯化以及甲醛灭活等而制备的疫苗。IPV疫苗相较OPV免疫安全性好,但是接种IPV不能形成明显的肠道局部免疫,且成本显著高于OPV。由于IPV需要大量培养活病毒,因此在实验室和制备阶段也存在着泄露的危险。同时IPV中还含有猴病毒(SV40),来自疫苗早期生产和使用过程中的原代恒河猴肾细胞,研究表明,SV40可以使培养的细胞发生转化,并可导致动物产生肿瘤。而OPV为用脊髓灰质炎病毒减毒株经培养、收获病毒液后制成的用于预防脊髓灰质炎的白色固体糖丸,其优点是价格便宜,但其存在基因回复突变和致病性等问题。目前我国广泛使用的疫苗为OPV疫苗,临床显示,与OPV相关的主要不良反应是疫苗相关麻痹性脊髓灰质炎(VAPP)。年平均VAPP的发病率为每100万人口发生0.14例,而在免疫缺陷人群中发生VAPP的风险性最高。

[0006] 1988年,世界卫生组织在全球启动了“消灭脊髓灰质炎”行动,通过实施疾病监测、免疫接种等策略,我国自1995年即实现了脊髓灰质炎野病毒的循环阻断。2000年,经世界卫生组织确认,包括中国在内的西太平洋地区已经基本实现了无脊灰目标;至2010年,全球只

有4个本土脊灰流行的国家,其中3个和我国接壤,即印度、巴基斯坦和阿富汗,对我国病患的防治也构成一定的隐患。直至今日,全球消灭脊髓灰质炎的目标仍然没有达到,仅在2005-2009年,尼日利亚就出现了3660例脊髓灰质炎病毒感染造成的急性弛缓性麻痹患者,我国新疆维吾尔自治区也于2011年发生了I型脊髓灰质炎野毒株输入性疫情。可见,我国对脊髓灰质炎的防治依然不容放松。

[0007] 随着现代生物技术的快速发展,基因工程疫苗成为了近年来新型病毒预防性疫苗主要的发展趋势。其中,基于病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)的基因工程疫苗备受关注。病毒样颗粒是由病毒衣壳蛋白自组装而形成的不含病毒核酸的空心颗粒,具有与天然病毒衣壳蛋白相同或相似的空间构型及抗原表位,具有很强的免疫原性,能有效刺激机体产生体液免疫和细胞免疫应答。并且由于病毒样颗粒不含有病毒的基因组,因此不具备复制能力,其安全性要优于传统的减毒活疫苗和灭活疫苗,所以病毒样颗粒疫苗的出现为研发更为安全有效的疫苗提供了一个新的契机。

发明内容

[0008] 为此,本发明所要解决的技术问题在于提供一种重组脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒,并进一步公开其制备方法,以及其在制备疫苗药物领域的应用。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明所述的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的制备方法,包括如下步骤:

[0010] (1)取脊髓灰质炎病毒的P1基因和3CD基因分别克隆到共表达载体中,随后通过转化感受态细胞得到能够表达脊髓灰质炎病毒样颗粒的重组病毒载体;

[0011] (2)用步骤(1)得到的重组病毒载体转染昆虫细胞,培养后获得含有编码病毒样颗粒蛋白基因的重组病毒;

[0012] (3)将步骤(2)获得的重组病毒感染至宿主细胞进行扩增以提高病毒滴度,随后接种高滴度的重组病毒侵染昆虫细胞,以表达上述P1基因和3CD基因,并按照常规纯化方法获得脊髓灰质炎病毒样颗粒。

[0013] 优选的,所述步骤(1)中,所述P1基因和所述3CD基因均为根据宿主细胞的偏好性进行密码子优化的基因。

[0014] 所述密码子优化是指在不改变野生型脊髓灰质炎病毒P1蛋白和3CD蛋白氨基酸序列的前提下,将野生型脊髓灰质炎病毒P1基因和3CD基因的密码子替换为昆虫细胞偏好的密码子。

[0015] 所述步骤(1)中:所述脊髓灰质炎病毒包括I型、II型或III型病毒,所述脊髓灰质炎病毒I型、II型、III型病毒的P1基因和3CD基因分别属于野生型脊髓灰质炎病毒的Mahoney株、MEF-1株和Saukett株。

[0016] 更具体的,所述脊髓灰质炎病毒为I型病毒,其优化的P1基因具有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列,其优化的3CD基因具有如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列;

[0017] 所述脊髓灰质炎病毒为II型病毒,其优化的P1基因具有如SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列,其优化的3CD基因具有如SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列;

[0018] 所述脊髓灰质炎病毒为III型病毒,其优化的P1基因具有如SEQ ID NO:5所示的核苷酸序列,其优化的3CD基因具有如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列。

[0019] 所述步骤(1)中,所述共表达载体为将所述P1基因和所述3CD基因分别插入到pFastBac™Dual载体或者Dual-CMV改造载体的两个多克隆位点处各由一个启动子驱动转录得到的重组质粒;

[0020] 所述Dual-CMV改造载体为在pFastBac™Dual载体基础上将p10启动子改造为CMV启动子获得的改造载体。

[0021] 所述步骤(1)中,所述P1基因和所述3CD基因在所述重组表达载体中各由一个启动子驱动转录,驱动所述P1基因的启动子方向和驱动所述3CD基因的启动子方向相反。

[0022] 所述步骤(1)中,所述感受态细胞为DH10Bac感受态细胞,所获得的所述重组病毒载体为重组昆虫杆状病毒载体。

[0023] 所述步骤(2)中,所述目的昆虫细胞选自草地贪夜蛾卵巢细胞系sf9、sf21以及粉纹夜蛾胚胎细胞系High Five。

[0024] 本发明还公开了由上述方法制备得到的重组脊髓灰质炎病毒样颗粒。进一步的,所述重组脊髓灰质炎病毒样颗粒为脊髓灰质炎病毒I型、II型或III型病毒样颗粒。

[0025] 本发明还公开了所述重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的中和抗体试验结果。结果表明本发明制备的脊髓灰质炎病毒样颗粒具有较好的免疫原性,对脊髓灰质炎的疫苗药物研发具有广阔的应用前景。

[0026] 本发明所述制备重组脊髓灰质炎病毒样颗粒的方法,在昆虫表达系统中成功的制备了脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒,在动物水平的免疫中和性试验结果显示,纯化获得的脊髓灰质炎病毒样颗粒有较高的免疫原性,且由于其不含有病毒核酸,其安全性会优于传统的减毒和灭活疫苗,故所述脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒可有效应用于制备基于病毒样颗粒的脊髓灰质炎疫苗。

附图说明

[0027] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中,

[0028] 图1为I-P1-Dual、II-P1-Dual和III-P1-Dual质粒及酶切鉴定结果;

[0029] 图2为I-P13CD-Dual、II-P13CD-Dual和III-P13CD-Dual质粒及酶切鉴定结果;

[0030] 图3为Dual-CMV质粒及酶切鉴定结果;

[0031] 图4为I-P1-CMV、II-P1-CMV和III-P1-CMV质粒及酶切鉴定结果;

[0032] 图5为I-P13CD-CMV、II-P13CD-CMV和III-P13CD-CMV质粒及酶切鉴定结果;

[0033] 图6为重组脊髓灰质炎I型病毒样颗粒120KV负染电镜图;

[0034] 图7为重组脊髓灰质炎II型病毒样颗粒120KV负染电镜图;

[0035] 图8为重组脊髓灰质炎III型病毒样颗粒120KV负染电镜图。

具体实施方式

[0036] 实施例1表达基因的选择与密码子的优化设计

[0037] 分别选取脊髓灰质炎I型Mahoney株、II型MEF-1株和III型Saukett株,所述各病毒株的P1蛋白和3CD蛋白的DNA序列参照GenBank,分别为:NC_002058.3、AY238473.1和L23845.1。

[0038] 由金斯瑞公司利用软件对上述编码P1蛋白和3CD蛋白的野生型DNA序列进行改造,密码子采用昆虫细胞中使用频率较高的密码子,同时避免了可能影响基因表达的转录因子结合区、重复序列和RNA高级结构。

[0039] 设计5'端和3'端分别含有EcoRI酶切位点和HindIII酶切位点的优化后P1蛋白表达序列并进行基因合成,获得编码脊髓灰质炎I型Mahoney株P1蛋白的基因序列如SEQ ID NO:1所示;获得编码脊髓灰质炎II型MEF-1株P1蛋白的基因序列如SEQ ID NO:3所示;获得编码脊髓灰质炎III型Saukett株P1蛋白的基因序列如SEQ ID NO:5所示。

[0040] 设计5'端和3'端分别含有NcoI酶切位点和KpnI酶切位点的优化后3CD蛋白表达序列并进行基因合成,获得编码脊髓灰质炎I型Mahoney株3CD蛋白的基因序列如SEQ ID NO:2所示;获得编码脊髓灰质炎II型MEF-1株3CD蛋白的基因序列如SEQ ID NO:4所示;获得编码脊髓灰质炎III型Saukett株3CD蛋白的基因序列如SEQ ID NO:6所示。

[0041] 实施例2脊髓灰质炎病毒P1基因和3CD基因共表达载体的构建

[0042] (1)pFastBac™Dual共表达P1基因和3CD基因的构建

[0043] 采用EcoRI酶和HindIII酶(购于NEB)双酶切分别处理上述如序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5所示序列结构的P1蛋白基因与pFastBac™Dual载体质粒,于37℃水浴反应4小时后,使用小量DNA片段快速胶回收试剂盒(购于博大泰克)进行片段回收。将酶切后三种P1核苷酸片段分别与酶切后pFastBac™Dual载体按照摩尔比9:1的比例混合,加入2×Solution I连接酶(购于大连宝生物工程有限公司),反应体系为10μL,于16℃水浴连接过夜。取10μL连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,并涂布于含有氨苄抗性的LB固体琼脂板,于37℃培养箱培养16小时。从平板上挑取单菌落接种到含有5mL氨苄抗性的液体LB培养基中,于37℃转速为200rpm的摇床中培养过夜。使用质粒小量快速提取试剂盒(购于博大泰克)提取重组质粒,得到I-P1-Dual、II-P1-Dual和III-P1-Dual(质粒跑胶结果见图1,分别对应泳道1、4、6)。分别使用EcoRI酶和HindIII酶进行双酶切鉴定,酶切后结果分别对应图1中泳道2、5、7,与预期结果相符。将上述重组质粒送测序公司进行测序,测序结果进一步证实重组质粒构建成功。

[0044] 采用NcoI酶和KpnI酶(购于NEB)双酶切分别处理上述如序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6所示序列结构的3CD蛋白基因与上述获得的I-P1-Dual、II-P1-Dual和III-P1-Dual质粒,于37℃水浴反应4小时后,使用小量DNA片段快速胶回收试剂盒进行片段回收。将酶切后三种3CD核苷酸片段分别与酶切后I-P1-Dual、II-P1-Dual和III-P1-Dual载体按照摩尔比9:1的比例混合,加入2×Solution I连接酶,反应体系为10μL,于16℃水浴连接过夜。取10μL连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,并涂布于含有氨苄抗性的LB固体琼脂板,于37℃培养箱培养16小时。从平板上挑取单菌落接种到含有5mL氨苄抗性的液体LB培养基中,于37℃转速为200rpm的摇床中培养过夜。使用质粒小量快速提取试剂盒提取重组质粒,得到I-P13CD-Dual、II-P13CD-Dual和III-P13CD-Dual(质粒跑胶结果见图2,分别对应泳道1、4、6)。分别使用NcoI酶和KpnI酶进行双酶切鉴定,酶切后结果分别对应图2中泳道2、5、7,与预期结果相符。将上述重组质粒送测序公司进行测序,测序结果进一步证实共表达载体构建成功。

[0045] (2)基于pFastBac™Dual共表达载体的改造及共表达载体的构建

[0046] 为了进一步提高脊髓灰质炎病毒样颗粒的表达产量,我们将pFastBac™Dual载体

的p10启动子替换为了CMV启动子。采用如SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示序列的引物,以pcDNA3.0质粒为模板,经过PCR扩增得到CMV启动子插入片段(序列结构如SEQ ID NO:9所示)。采用SmaI酶和Sna I酶(购于大连宝生物工程有限公司)双酶切分别处理上述扩增得到的CMV启动子插入片段和pFastBac™Dual1,于37℃水浴反应4小时后,使用小量DNA片段快速胶回收试剂盒进行片段回收。将酶切后的CMV启动子核苷酸片段与酶切后pFastBac™Dual1载体按照摩尔比9:1的比例混合,加入2×Solution I连接酶,反应体系为10μL,于16℃水浴连接过夜。取10μL连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,并涂布于含有氨苄抗性的LB固体琼脂板,于37℃培养箱培养16小时。从平板上挑取单菌落接种到含有5mL氨苄抗性的液体LB培养基中,于37℃转速为200rpm的摇床中培养过夜。使用质粒小量快速提取试剂盒提取重组质粒,得到Dual-CMV改造载体(质粒跑胶结果见图3,对应泳道1)。分别使用SmaI酶和Sna I酶进行双酶切鉴定,酶切后结果对应图3泳道3,与预期结果相符。将上述重组质粒送测序公司进行测序,测序结果进一步证实CMV启动子改造载体构建成功。

[0047] 采用EcoR I酶和Hind III酶双酶切处理上述Dual-CMV改造载体,于37℃水浴反应4小时后,使用小量DNA片段快速胶回收试剂盒进行片段回收。将(1)中酶切后的三种P1核苷酸片段分别与上述酶切后的Dual-CMV改造载体按照摩尔比9:1的比例混合,加入2×Solution I连接酶,反应体系为10μL,于16℃水浴连接过夜。取10μL连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,并涂布于含有氨苄抗性的LB固体琼脂板,于37℃培养箱培养16小时。从平板上挑取单菌落接种到含有5mL氨苄抗性的液体LB培养基中,于37℃转速为200rpm的摇床中培养过夜。使用质粒小量快速提取试剂盒提取重组质粒,得到I-P1-CMV、II-P1-CMV和III-P1-CMV(质粒跑胶结果见图4,分别对应泳道1、3、6)。分别使用EcoR I酶和Hind III酶进行双酶切鉴定,酶切后结果分别对应图4泳道2、4、7,与预期结果相符。将上述重组质粒送测序公司进行测序,测序结果进一步证实重组质粒构建成功。

[0048] 以(1)中所述三种3CD蛋白基因作为模板,通过PCR扩增在片段两端分别引入NheI酶和KpnI酶的酶切位点。其中,

[0049] PCR上游引物为5'-CTAGCTAGCATGGGACCAGGTTTCGACTA-3';

[0050] PCR下游引物分别为:

[0051] 5'-CGGGGTACCTTAGAAAGAGTCCAACCAAC-3'(I-3CD);

[0052] 5'-CGGGGTACCTTAGAAGGAGTCCAACCAAC-3'(II-3CD);

[0053] 5'-CGGGGTACCTTAGAAACTGTCCAACCATC-3'(III-3CD)。

[0054] 采用NheI酶和KpnI酶双酶切分别处理上述扩增得到的3CD蛋白基因和I-P1-CMV、II-P1-CMV和III-P1-CMV质粒,于37℃水浴反应4小时后,使用小量DNA片段快速胶回收试剂盒进行片段回收。将酶切后三种3CD核苷酸片段分别与酶切后I-P1-CMV、II-P1-CMV和III-P1-CMV载体按照摩尔比9:1的比例混合,加入2×Solution I连接酶,反应体系为10μL,于16℃水浴连接过夜。取10μL连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,并涂布于含有氨苄抗性的LB固体琼脂板,于37℃培养箱培养16小时。从平板上挑取单菌落接种到含有5mL氨苄抗性的液体LB培养基中,于37℃转速为200rpm的摇床中培养过夜。使用质粒小量快速提取试剂盒提取重组质粒,得到I-P13CD-CMV、II-P13CD-CMV和III-P13CD-CMV(质粒跑胶结果见图5,分别对应泳道1、3、6)。分别使用NheI酶和KpnI酶进行双酶切鉴定,酶切后结果分别对应图5泳道2、4、7,与预期结果相符。将上述重组质粒送测序公司进行测序,测序结果进一步证实

改造后的共表达载体构建成功。

[0055] 实施例3重组脊髓灰质炎杆状病毒的表达和纯化方法

[0056] 将前述实施例1和2中所述的表达脊髓灰质炎病毒样颗粒蛋白的载体I-P13CD-Dual/CMV、II-P13CD-Dual/CMV和III-P13CD-Dual/CMV分别按照Invitrogen的Bac-to-Bac表达系统说明书,转化至大肠杆菌感受态细胞DH10Bac,于37℃培养箱培养48h后,通过蓝白斑筛选获得重组杆状病毒载体。

[0057] 将上一步获得的重组杆状病毒载体使用Invitrogen的Cellfectin转染试剂转染sf9昆虫细胞获得相应的第一代重组杆状病毒,即重组脊髓灰质炎杆状病毒,分别命名为I-V1-Dual/CMV、II-V1-Dual/CMV和III-V1-Dual/CMV。继续对上述一代毒进行扩增培养,至获得高病毒滴度的三代病毒I-V3-Dual/CMV、II-V3-Dual/CMV和III-V3-Dual/CMV。

[0058] 实施例4脊髓灰质炎病毒样颗粒的表达和纯化方法

[0059] 将实施例3制得的重组脊髓灰质炎杆状病毒I-V3-Dual/CMV、II-V3-Dual/CMV和III-V3-Dual/CMV分别以10MOI的接毒量感染sf9悬浮细胞,以Expression Systems的ESF921昆虫细胞培养基为悬浮培养基,于27℃转速为100rpm摇床中培养3-4天后收获病毒上清。

[0060] 将离心收获的培养上清经过0.22μm滤膜抽滤去除杂质后使用100kD膜包浓缩10倍以上得到浓缩液。于超速离心管底部加入8mL的20%(W/V)蔗糖溶液,蔗糖上层加入浓缩液。经过超速离心3h后倒掉上清,用PBST(1%Tween-20)溶液重悬超速离心沉淀获得重悬液。将重悬液进行高速离心取上清进行15%-45%(W/V)蔗糖密度梯度离心,经过超速离心5h,从上至下依次取出蔗糖梯度组分(600μL每管),病毒样颗粒即富及于8-10号组分中。收集相应组分,用100kD浓缩管进行浓缩脱糖处理,即得纯化的脊髓灰质炎病毒样颗粒蛋白样品。pFastBacTMDual和改造后的Dual-CMV载体表达和纯化病毒样颗粒的方法一致,且经过启动子改造后的Dual-CMV载体表达的病毒样颗粒的产量在同等条件下比未经改造的pFastBacTMDual提高了四倍以上。

[0061] 实施例5脊髓灰质炎病毒样颗粒VLPs的电镜检查

[0062] 分别将实施例4中纯化得到的脊髓灰质炎I型、II型和III型病毒样颗粒取5μL加在镀碳支持膜(购于中镜科仪)上吸附1min,滤纸吸干镀碳支持膜表面残余液体后,用ddH₂O清洗镀碳支持膜表面两次,吸干ddH₂O,加5μL 2%磷钨酸(购于中镜科仪)染色40s,吸干镀碳支持膜表面残液,室温放置干燥后用120KV透射电子显微镜观察其形态结构,结果分别见附图6-8所示。电镜负染结果表明脊髓灰质炎I型(图6)、II型(图7)和III型(图8)病毒样颗粒纯化样品在电镜下可见直径约30nm左右的病毒样颗粒的存在。本实施例的结果表明,携带有密码子优化后的脊髓灰质炎P1基因和3CD基因的重组表达载体在昆虫杆状病毒表达系统中,可以成功的包装出脊髓灰质炎I型、II型和III型的病毒样颗粒。

[0063] 实施例6脊髓灰质炎病毒样颗粒免疫原性的测定

[0064] 稀释实施例4中制备的脊髓灰质炎病毒样颗粒,并加入Al(OH)₃佐剂混合。利用以上纯化的I型病毒样颗粒对大鼠分别在第一周和第三周进行免疫两次,每次每只免疫10μg或25μg。同时设置进口IPV灭活疫苗作为阳性对照和不含有病毒样颗粒样品的佐剂对照。四周后对大鼠进行采血,收集血清,分装后冷冻保存。

[0065] 倍比稀释大鼠血清样品,与稀释到100TCID₅₀的脊髓灰质炎减毒株Sabin I混合均匀,于37℃培养箱中孵育1小时。取100μl的中和液加到96孔Vero细胞中,于37℃培养箱中孵

育3-4小时,观察细胞病变效应即CPE。结果显示两次免疫各10 μ g的脊髓灰质炎I型病毒样颗粒的实验组在血清稀释1024倍时可以完全保护细胞不受病毒侵袭;两次免疫各25 μ g的脊髓灰质炎I型病毒样颗粒的实验组在血清稀释2048倍时可以完全保护细胞不受病毒侵袭;两次免疫各半只进口IPV灭活疫苗的阳性对照组在血清稀释4096倍时可以完全保护细胞不受病毒侵袭。可见,所述病毒样颗粒的效果较好且其纯化及优化的空间更大,而且病毒样颗粒相比减毒疫苗和灭活疫苗具有更高的安全性。

[0066] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110>中国科学院生物物理研究所

<120>一种重组脊髓灰质炎病毒样颗粒及其制备方法与应用

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2658

<212> DNA

<213> Human poliovirus I P1

<400> 1

[0001] gaattcatgg gcgctcaggt ctccagccaa aaggttggag cgcaagagaa ctcaaaccgc 60

gcttacgggtg gcagtacat caactacacc actattaact actaccgtga cagtgtcteg 120

aacgctgcct ctaagcagga ctctcccaa gatcctagca aattcactga gccatcaag 180

gacgtcttga taaaacagc gccaatgtg aactcacga acatcgagge ttgcggttac 240

agtgatcgcg tgttcagct gacgctcggc aactcgacca tcacaacgca agaagcagcg 300

aactccgtgg tcgcatacgg aagatggcca gactacctgc gtgactccga agetaacca 360

gtfgaccaac ctactgagcc cgatgtgget geetgtaggt tetacactct ggatacagtg 420

agttggacaa aggaatcgag gggttgggtg tggaaattgc ctgacgctct gagagatatg 480

ggtctgttcg gccagaacat gtactaccac tacctcgaa gaagcggta cactgtgcac 540

gtccagtgca acgccictaa gttccatcaa ggcgcttgg gagtttgcg cgtgcccag 600

atgtgtctgg ccggtgactc gaacaccact acaatgcata cctectacca aaacgcaaac 660

ccaggcgaaa aggggtgtac gttcacgga actttcacac ctgacaacaa ccagacaagc 720

ccagcaagac gttctgccc agtcgattac ctgctcggta acggcacctt getgggcaac 780

	gccttcggtt tcctcacca aatcattaac ttgaggacta acaactgtgc tacattgggtg	840
	ctgccctacg teaactcctt gagcatcgac agcatggtea agcataacaa ctggggcacc	900
	gcaattctcc cattggcgcc gctgaacttc gcttctgagt cttcactga aatccccatt	960
	acgtgacca tcgtcccat gtgctgtgag tcaacggac tcaggaacat tactctgcca	1020
	agactccagg gtttgcctgt gafgaacacg cccggctcaa accagtacct gaccgcccac	1080
	aactccaaa gtccttgcgc actccccgag ttgacgtta cccctccat cgatattca	1140
	ggggaagtga agaacatgat ggagtggcc gaaatcgaca ctatgattcc ttctgatctg	1200
	agegcaacga agaaaaacac tatggagatg taccgcgtgc gtctgtctga caaaccacac	1260
	acagacgac cgatcctgtg cctctcttg tcaccagctt ccgatccgcg cctcagccac	1320
	accatgctcg gagaaatctt gaactactac acgcattggg ctggttcaact caagttcacc	1380
	ttctgttct gtggattcat gatggctacc ggtaaactct tggctccta cgcaccacca	1440
[0002]	ggagcagacc ctccaagaa acgcaaggag gccatgctcg gaaccacgt gatctgggat	1500
	attggtttgc agagtctgtg cactatgggt gtgccctgga tctcaaacac gacctaccgt	1560
	caaacgattg acgatagctt caccgagggc ggafacatct ctgtctteta ccagactcgc	1620
	attgtcttc ctctctccac accccgtgaa atggacatct tggctctctg cagtctgtgt	1680
	aacgacttct cggctcgcct gctccgtgat actacacaca tcgagcagaa ggctctggcc	1740
	cagggactcg gtcaaatgtt ggagtcaatg atgacaaca ctgttaggga aacagtgggt	1800
	gcagcgacta gtagagatgc cctgccaaac actgaagcat ctggcccgc acattcaag	1860
	gagatcccag cactcaccgc agtggaaacg ggtgctacca accattggt gccgtcagac	1920
	actgtccaga caaggcacgt ggtccaacat aggagtagat cggagtccag catcgaatcg	1980
	ttctctgcta gaggcgctg cgttacgatt atgaccgtgg acaaccagc cagtaagacc	2040
	aacaaggata aactgttgc agtgtggaag atcacgtaca aagacaccgt ccagctgagg	2100

agaaagctcg agttcttcac ttacagecgt ttgatatgg aactcacttt cgttgtgaca	2160
gccaacttca ctgagacaaa caacggacac gcttgaacc aggtctacca aateatgtac	2220
gttcaccgg gtgctccagt gccggaaaag tgggacgatt acactggca aacatctca	2280
aacccttega tctctacac gtaaggcacc gcaactgca gaatctcctt cccctacgtt	2340
ggcattteta acgcctact acactctac gacggattct ccaaggtgcc cctgaaagac	2400
cagtccgtg ccttgggtga cagcctgtac ggcgcagcgt ctctgaacga ctctggaatc	2460
ctcgtgtcc gtgtcgttaa cgtacacaac ccaactaagg tcacaagcaa aatcccgctt	2520
tacctgaagc caaaacatat tctgtgtgg tgccttaggc ctccagagc tgtggcctac	2580
tacggcctg gactcgaact caaggatgg acgtgaccc cctctctac caaagacctg	2640
actacatact aaaagctt	2658

[0003]

<210>	2	
<211>	1946	
<212>	DNA	
<213>	Human poliovirus I 3CD	
<400>	2	
ccatgggacc aggttctgac tacgccgttg caatggcgaa acgcaacatc gtgacagcta	60	
ccactcaaa gggcgagttc acgatgttgg gactgcacga caacgtcctt atctgccta	120	
cccattgctc acccggagaa agtatcgtta ttgatggtaa agaagtggag attctggatg	180	
ctaaggcctc cgaagaccag gccggcacta acctcgagat cacaatcatt acgttgaaac	240	
gcaacgagaa gttcaggac atcagacctc acattcccac acaaatcaca gaaacgaacg	300	
atggagtctt gatcgtgaac acgagtaagt acctaaacat gtacgtgccg gtcggtgctg	360	
tgaccgaaca gggctacctg aaacctgggtg gcaggcaaac cgctagaact ctgatgtaca	420	
acttccctac tctgcccggc cagtgcggag gtgtcattac ctgtactggc aaggtcatcg	480	

	gcattgcacgt tggcggaaac ggttcccacg gtttcgctgc cgcactgaag cgcctcgtact	540
	tcactcagtc ccaaggagag atccaatgga tgcgtccttc taaggaagtg ggctacccta	600
	tcattaacgc accctcaaaa acaaagetgg agcccagtgc gttccactac gtttcgaag	660
	gtgtgaagga gccagctgtc ctgaccaaaa acgatccgag gctcaagact gacttegagg	720
	aagccatttt ctcaaaatac gtgggtaaca agatcacgga agtcgacgag tacatgaagg	780
	aggcagtgga tcattacgeg ggccagetga tgagtctega catcaacacc gaacaaatgt	840
	gcctcgagga tgctatgtac ggaacagacg gtttgaagc ctgggatctg tctacgtcag	900
	caggctacce ctacgtcgcg atgggaaaga aaaagcgcga catcctgaac aagcagacac	960
	gtgatacgaa agagatgcaa aagctgctcg acacctacgg catcaacctc ccattggcca	1020
	cttacgttaa ggatgaactc aggtcgaaaa ccaaggttga gcagggaaag tccagactga	1080
[0004]	tcgagcttc ctccctgaac gactcagtgg caatgcgcat ggcgttcggt aacctctacg	1140
	cggtttcca caagaacctt ggagtcatta caggttcagc cgttggctgt gacctgatt	1200
	tgttctggag taaaatcccc gtgttgatgg aggaaaaget gttcgcattc gattacaccg	1260
	gttacgacgc gagtctgtcg cccgcttggc tcgaagccct caaaatggtg ttggagaaga	1320
	ttggttcgg agacagggtc gattacatcg actactgaa ccactcgcac catctgtaca	1380
	aaaacaagac ttactgcgtc aagggtggca tgcctccgg ctglagegga acatctattt	1440
	tcaactccat gatcaacaac ctgatcatta gaaccttgc tgcataaact tacaaggga	1500
	tcgaactgga tcacctgaag atgattgett acggtgacga tgcategcc agetaccac	1560
	atgaagtiga cgttccctg ctggegcagt ctggaaaaga ctacggtctg acaatgacgc	1620
	cggtgataa gtctgccacc ttgaaaccg tgacttggga gaacgtcact ttctgaaac	1680
	gcttctccg tctgacgag aagtacccat tctcatcca cccagtcatg ccgatgaaag	1740

	aaatcatga gtcgatccgc tggacaaagg accctcgtaa cacgcaagat cacgttcgtt	1800
	ccttgtcct cttgacctgg cataacggcg aggaagagta caacaaatc ctggcaaaga	1860
	ttaggtcct gccaatcgga agagccctgc tctgcccga gtacagcaet ctctaccgcc	1920
	gttggttga ctcttctaa ggtacc	1946
	<210> 3	
	<211> 2652	
	<212> DNA	
	<213> Human poliovirus II P1	
	<400> 3	
	gaatcatgg gtgctcaggt tccagecaa aaagtgggcg cacacgagaa ctctaacagg	60
	gcgtacggtg gctcaacct caactacacc actattaact actacagaga cagtgcateg	120
	aacgtgcct ccaagcagga ctccggcaa gatccaagca aattcaactga gccgatcaag	180
[0005]	gacgtgctga ttaaaaccgc tccaactctc aactctccga acatcgaagc ctgcccatac	240
	tcagataggg tcatgcagct cacattgggt aacagtaaga ttacaacgca agaagcagcg	300
	aactcgggtg tccctacgg tagatggcct gactacatca aggactccga agcaaacccc	360
	gtcgaccaac caactgagcc ggatgttget gectgtcct tctacacact ggataccgtg	420
	acttggcgca aagaaagccg tggctgggtg tggaaagtgc ccgacgccct gaaagatatg	480
	ggtctctcg gccagaacat gttctaccac tacttgggac gcgcaggta caccgtccac	540
	gttcagtgca acgcgagtaa gtccalcaa ggcgcgctgg gagtttctgc tgtcccagag	600
	atgtgtctcg ctggagactc taccactcat atgttcaeta aatacgaaaa cgcacaacct	660
	ggagagaagg gaggagagt caaaggttca ttcaactgg acacgaacgc cacaacct	720
	gcacgtaact tctccccct cgattacctc ttcggttccg gcgtgttggc tggtaacgcg	780
	tctctacc cccaccagat cattaacttg aggaccaaca actgtgctac tctgtgctc	840

	ccatacgtca actccctgag catcgacage atgaccaagc ataacaactg gggcategcc	900
	atittgecte tggcaccctt ggatttegg acggagtett caaccgaaat cccaattaca	960
	ctgacgatcg ccccgatgtg ctgtgagttc aacggactca ggaacattac tgtgccaaga	1020
	acacaaggcc tgctgtcct caacaccccc ggatcaaacc agtacctgac tgcagacaac	1080
	taccaaagtc catgecgat cccggagttc gacgtgacce ctcccatega tattctgggt	1140
	gaagtcgta acatgatgga gctcgtgaa atcgacacta tgattccct caactgacc	1200
	aaccagegca agaacactat ggatatgtac cgtgtggagc tcaacgacgc agegcactca	1260
	gatactcta tctgtgctt ctctttgtca cctgctagtg acccagggt ggccecaaca	1320
	atgctcggcg aaatctgaa ctactacaca cattgggctg gatcctgaa gttcaccttc	1380
	ctgtctgtg glagcatgat ggctaccggc aaactgctcg tgtcttacgc accaccaggt	1440
	gcagaggcac caaagagcag aaaagaagcc atgttgggca cccacgtcat ctgggacatt	1500
[0006]	ggcctgcaga gttcgtgcac tatggtggtg ccttggatct ctaacacaac gtaccgcaa	1560
	acaattaacg atagtttac ggaggcgga tacatctega tgttctacca gacaagggtc	1620
	gtgtgccat tgtcaacgcc gagaaagatg gacatcctgg gcttcgtag tgettgaac	1680
	gacttctcg tgccttctt gctgataacc actcacatct cttaggaage catgccccaa	1740
	ggattgggtg acctgattga ggggtgctgt gaaggcgtga caegtaacgc tctactcca	1800
	ttgacaccgg ccaacaacct gctgataacc cagtccageg gaccegetca ctcgaaggag	1860
	acgccagctc tcaccgccgt ggaaacgggt gccaccaacc ctltggtecc ctgacact	1920
	gttcagacaa ggcattgat ccaaaagagg acacgtagtg agtcgacgt cgaatcttc	1980
	ttcgcacgcg gctcgtcgt cgtatcatt gaggtgaca acgatctcc acaaagcgt	2040
	gctccaaac tttcagcgt ctggaagatc acttacaag acacagtca gctgcacct	2100
	aagctcaggt tcttactta cagcccttc gacatggagt tcacgtctg ggtcacctct	2160

aactacactg atgcaaaca cggacacgcg ctgaaccagg tgtaccaa atcatgtacatt	2220
cctcccggag ctccaatccc gggcaagtgg aacgactaca cgtggcaaac ctcttcaaac	2280
ccatctgtet tctacaccta cgggcccce cggcaagaa tctcgggtccc ttacgttggc	2340
attgctaaeg cctactceca ttctacgac ggattcgeta aggtgccttt ggcgggtcag	2400
gcttctaccg agggcgactc actgtacgga gctgcctccc tcaacgattt cggcagcttg	2460
gcegttcgcg ttgtgaacga tcacaacccc actaagctca catcaaaaat ccgegtctac	2520
atgaagccga aacatgtgcg tgtctggtgc ccaaggcctc ccagagetgt tcttactac	2580
ggccccggag tggactacaa ggalggcctg gccctctcc ccgaaaaagg actgacaacg	2640
tactaaaagc tt	2652

[0007]	<210>	4
	<211>	1946
	<212>	DNA
	<213>	Human poliovirus II3CD

<400>	4
ccatgggacc aggttcgac tacgcegtgg caatggcgaa acgcaacatt ctgaccgcta	60
ccactatcaa gggcgagttc actatgttgg gactgcacga caacgtcgtc atcctgcta	120
cccatgccag ccccgagaa actatcgtga ttgatggtaa agaagttgag gtgctggatg	180
ctaaggccct cgaagaccag gccggcacta acctcgagat cacaattgtc acgttgaaaa	240
ggaacgagaa gttcaggac atcagacctc acattcccac ccaaatcaca gaaacgaacg	300
atggagtgtt gatcgtcaac acttctaagt acccaaacat gtacgtcccg gttggtgctg	360
tgacagaaca gggctacctg aacctcgggtg gcaggcaaac cgctagaact ctcatgtaca	420
acttcctac cagagccgge cagtgcggag gtgtcattac ctgtactggc aaggtcatcg	480
gcatgcaegt cggcggaaac ggttcccacg gttcctgtgc cgcactgaag cgtctact	540

	tcaccagag tcaaggagag attcaatgga tgcgtccttc taaggaagtt ggctaccctg	600
	tgatcaacgc acccagcaaa actaagetgg agecctctgc gtfccactac gtettegaag	660
	gtgtaagga gccagctgtg ctgacaaaat cagatccgcg tctcaagacg gacttcgagg	720
	aagccatttt cagtaaatac gtcggtaaca agatactga agttgacgag tacatgaagg	780
	aggcagtcga tcattacgcg ggccagctga tgtcaactga catcaacaca gaacaaatgt	840
	gcctcgagga tgctatgtac ggaaccgacg gtttggaaagc cttggatctg tctacttcag	900
	caggctaccc ctacgtggcg atgggaaaga aaaagcgcga catcctgaac aaacagacac	960
	gcgatacgaa ggagatgcaa cgtctgctcg acacatacgg catcaacctc ccattggta	1020
	cgtacgtgaa ggatgaactc aggtcaaaaa ctaaggtgga gcagggaaag agtagactga	1080
	tegaggette ctcctgaac gactccgctg caatgcgtat ggcgttcggt aacctctacg	1140
[0008]	cggettcca caagaacct ggagtgtca caggtagcgc cgtcggctgt gacctgatt	1200
	tgtctggtc taaaatcccc gttttgatgg aggaaaagct gttcgcattc gattacaccg	1260
	gttacgacgc gagtctgtcg cccgcttggc tcgaagccct caaaatggtt ttggagaaga	1320
	ttgcttcgg agacagggcg gattacatcg actactgaa ccactcacac catctgtaca	1380
	aaaacaagac gtactgcgtg aagggtgcea tgeectccgg ctgtagecga acctetattt	1440
	teaacagtat gateacaac ctgatcatta gaaccttget gctcaaaact tacaagggaa	1500
	tcgacttga tcacctgaag atgattgctt acggtgacga tgtgategcc tectaccac	1560
	atgaagtega cgcategttg ctggcgcagt ccgaaaaga ctacggtctg acaatgacgc	1620
	cggetgataa gtccgccaca ttcgaaaccg ttacttggga gaacgtgacg ttctgaaac	1680
	gettctccg tgetgacgag aagtacccat tctctgcca cccagttatg ccgatgaaag	1740
	aaattcatga gtcgatccgc tggacaaagg accctcgtaa caegcaagat cacgttaggt	1800

	ccttgtgcct cttggcctgg cataacggcg aggaagagta caacaaattc ctggcaaaga	1860
	ttaggtccgt cccaatcgga agagccctgc tcttgccgga gtactcgacc ctctaccgce	1920
	gttggttga ctcttctaa ggtacc	1946
	<210> 5	
	<211> 2649	
	<212> DNA	
	<213> Human poliovirusIIIPI	
	<400> 5	
	gaatfcattg gagcccaggt gtccagccaa aaggtegggtg cccacgagaa ctcaaaccgt	60
	gcatacgggtg gcagtactat caactacacc actattaact actacaagga ctctgcttca	120
	aacgtgcct ctaaacagga ctactcaca gatccateta agttcacgga gcegetcaag	180
	gacgtcttga tcaaaaccgc tccagccctg aactcgccga acgtggaagc ctgcccgtac	240
[0009]	tccgataggg tcttgcagct cacttggga aacagcaca tcacaacgca agaagcgggtg	300
	aactctgtgg tegettacgg tegettggcca gattcatcc gtgacgatga agccaacct	360
	gttgaccage ctactgagcc cgatgtggca acatgtagat tetacacct ggacactgtc	420
	atgtggggca aggaatcaaa aggatgggtg tggaagctgc cggacgetct cagggatatg	480
	ggcctcttcg gacaaaacat gtactaccac tacttgggta gaagcggcta caccgtcac	540
	gttcagtga acgctctaa attccatcaa ggagcgtgg gtgtgttgc tatcccagag	600
	tactgtctcg ctggcgactc ggataagcag cgtlacact cctacgcaa cgggaacct	660
	ggagagaagg gtggtaaatt ctactcaca tcaacaagg acaacgetgt tacaagtct	720
	aaaagggagt tctgccccgt ggattacctg ctcggtgtg gcgtcttctt gggaaacgce	780
	ttegtttacc cccaccagat cattaaactg agaacgaaca actcagcaac catcgtctt	840
	ccttacgtga acgctctggc tattgacagc atggtgaagc ataacaactg gggaaacgce	900

	attctgccac tcageccgct cgacttcgct caggattctt cagtggagat ccctattacc	960
	gtcaactatcg cgcccatgtg ctccgagttc aacggctctgc gcaacgtcac cgctcctaag	1020
	ttccaaggcc tgccctgtct caacacgccc ggaagcaacc agfacctcac cagegacaac	1080
	caccaatctc catgtgccaat cccggagttc gacgtcacac ctcccatcga catccctggc	1140
	gaagtgaaaa acatgatgga gctggctgaa atcgacacca tgattccctt gaacctggag	1200
	aacacaaaaga ggaacacgat ggatatgtac agagtgactc tcagtgactc ggccgatttg	1260
	tcccagecca tctctgctt gtccctgagc cctgcatcag acccccgcct gactcact	1320
	atgtgggtg aagtctgaa ctactacacg cattggggcg gctcctgaa attcacttc	1380
	ctctctgtg gttccatgat ggetaccgga aagatctcg tggcatacgc gccaccagga	1440
	gcacagctc ccactctcg taaggaggca atgttgggta cacacgtcat ctgggacctc	1500
	ggcttgcaaa gttcgtcac tatggtgtg ccctggattt caaacgtgac ataccgccag	1560
[0010]	accactcaag attcattcac ggaaggcgga tacatcagta tgtctacca gactcgtatt	1620
	gtcgtccat tctcgacacc gaagtccatg aacatgctgg gattcgtcag cgctgtaac	1680
	gacttctctg ttgcctctt gegtgatata aegeatatct ctcagtcage tetgccaaa	1740
	ggaatcgagg aactcattc tgaggtggca cagggtgcgc tgactctcag cttgccaaag	1800
	cagcaagact ctctgccgga facaaaggcc tcgggtcccg cacactccaa agaggttcca	1860
	gctttgactg ccgtggaaac aggcgctacg aaccctctgg ttccctctga caccgtgcag	1920
	actcgccatg tcatccaacg ccgtagtcgt tcggagtcca ccattgaate attctcga	1980
	cgcgagcgt gcgttgciaa cattggtgtg gacaacgaac agecaaccac tagggcccaa	2040
	aagctgttcg caacctggag aatcacttac aaggacacag tccagctcag gagaaaattg	2100
	gagttctca cctacagccg ttccgatatg gagttcacgt tcgtggctac cgccaacttc	2160
	acaacacga acaacggaca cgcactgaac caggtgtacc aaatcatgta cattccaccg	2220

	ggtgceccaa caccgaagtc gtgggacgat tacacatggc agacgtccag caaccccagt	2280
	atctctaca cctacgggtgc agcgcceagct aggatttcag ttccgtacgt gggcctggct	2340
	aacgcctaca gtcattteta cgacggatc gegaaggtec cactcaaac cgacgctaac	2400
	gatcaaatcg gtgacagctt gtactctgcg atgactgtcg acgatttcgg cgttctgget	2460
	atccgtgttg tgaacgacca caaccctacc aaagtgactt ccaaaatccg catttacatg	2520
	aagcctaaac atgtgcgtgt ctggcgcccc aggccctcca gagccgtgcc ttactacgga	2580
	cccgggtgctg actacaaaga taacttgaac cctctgagcg ctaagggcct gacaacgtac	2640
	taaaagctt	2649
	<210> 6	
	<211> 1946	
	<212> DNA	
	<213> Human poliovirusIII3CD	
[0011]	<400> 6	
	ccatgggacc aggtttcgac tacgccgtgg caatggcgaa acgcaacatc gtcaccgcta	60
	ccacttcaaa gggcgagttc actatgttgg gagtttaaga caacgtggct atcctgccta	120
	cccacgcaag cccaggagaa tctatcgcta ttgacggtaa agaagtggag attctggatg	180
	ctaagggcct cgaagaccag getggcacta acctcgagat caccatcatt actttgaaac	240
	gtaacgagaa gttcagggac atcagacctc atattccac ccaaateacc gaaactaacg	300
	atggagtctt gatcgftaac actagcaagt acccaaacat gtacgttccg gtgggtgctg	360
	tgacagagca gggctacctg aacctcgggtg gcaggcaaac agcaagaacg ctgatgtaca	420
	acttccctac tcegetggc cagtgcggag gtgtcattac atgtacgggc aaggtcatcg	480
	gcatgcacgt cggcggaaac ggftcgcattg gcttcctgctc cgcactgaag cgttctact	540
	tactcagat tcaaggagag atccaatgga tgaaccttc taaggaagtg ggctacccta	600

	tcattaacgc accctcgaaa acaaagctgg agccctccgc gtccactac gtcttcgaag	660
	gtgttaaaga gccagctgtc ctgacaaaga acgatccgag cctccgtacg gacttcgagg	720
	aagccatttt ctcgaaatac gteggtaaca agatcactga cgttgatgaa tacatgaagg	780
	aggcagtgga cactacgagc ggccagctga tgtccctcga tatcaacaca gaacaaatgt	840
	gcctcgagga tgctatgtac ggaacggagc gtttgaggc ctggatctg acaacgtccg	900
	caggctaccc ctacgtcgcg atgggaaaga aaaagcgcga catcctgaac aaacagaccc	960
	gtgatactaa ggaaatgcgc cgtctgctcg acacatacgg catcaaccte ccattggtga	1020
	cgtacgtcaa ggatgaactc aggagcaaaa ccaaggtga gcagggaaag tctagactga	1080
	tgaagcctc cagcctcaac gactcctgg caatgaggat ggcgttcgtt aacctctacg	1140
	cggettcca caagaacct ggagtggta caggtagcgc tgtgggtgt gacctgatt	1200
[0012]	tgtctggc taaaatcccc gtctgatgg aggaaaagct gtegcattc gattacaccg	1260
	gttacgagc gtctctgtca cccgcttgg tcgaagcct caaatggc ttggagaaga	1320
	ttggctcgg agacagggtt gattacatcg actactttaa ccacagccac catctgtaca	1380
	aaaacaagac gtactgcgtg aagggtggca tgcccagtg ctgttcggga acctccattt	1440
	tcaactetat gateaacaac ctgatcatta gaacattgt getcaaacg tacaaggga	1500
	tegacttga tcacctgaag atgattgctt acggtgacga tgtatcgc tcataccac	1560
	atgaggtgga cgcattctg ctggcgcaga gtggaaagga ctacggtctg accatgactc	1620
	cggtgataa gactgccacc ttcgaaacag ttacgtggga gaactgact tcttgaaac	1680
	gcttctccg tctgacgaa aagtacctat tctcatcca cccagtcag ccatgaaag	1740
	aaattcatga gtcaatccgc tggaccaagg acctcgtaa cactcaggat caggttcga	1800
	gtttgtgct ctggcctgg cataacggcg aggaagagta caacaaattc ctggctaaga	1860

	ttaggctcgt cccaatcgga agagccctgc tcttgccgga gtactcaacc ctctacagga	1920
	gatggttga cagtttetaa ggtacc	1946
	<210> 7	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<400> 7	
	cgegtatacc gttgacattg attattgac	29
	<210> 8	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<400> 8	
[0013]	tccccgggg agctctgctt atatagacc	29
	<210> 9	
	<211> 589	
	<212> DNA	
	<213>人工序列	
	<400> 9	
	cgttgacatt gattattgac tagtattaa tagtaatcaa ttacggggic attagttcat	60
	agcccatata tggagtccg cgttacataa ctacggtaa atggcccgcc tggctgaccg	120
	cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgecaata	180
	gggacttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca ctggcagta	240
	catcaagtgt atcatatgcc aagtacgecc cctattgacg tcaatgacgg taaatgcccc	300
	gcttggcatt atgccagta catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac	360
	gtattagtea tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga	420

	tagcggttg actcacgggg attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg	480
[0014]	tttggcacc aaaatcaacg ggacttcca aaatgtcgta acaactcgcg cccattgacg	540
	caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctc	589

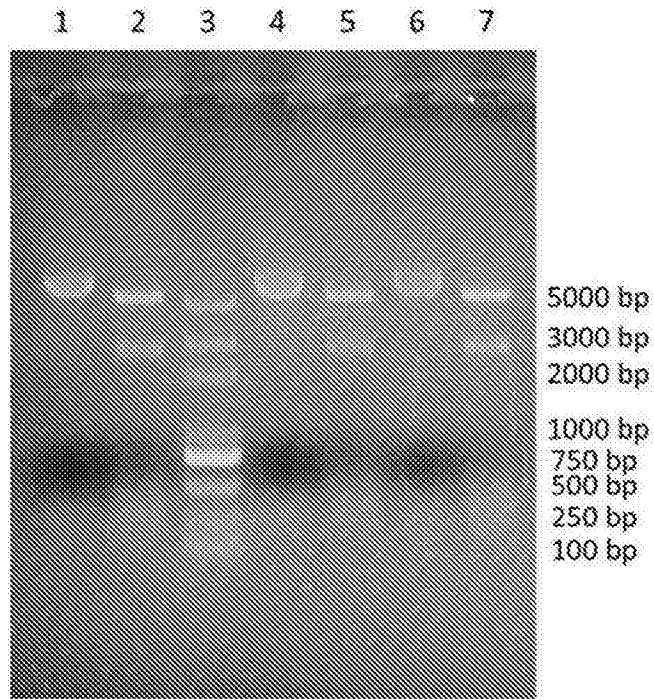


图1

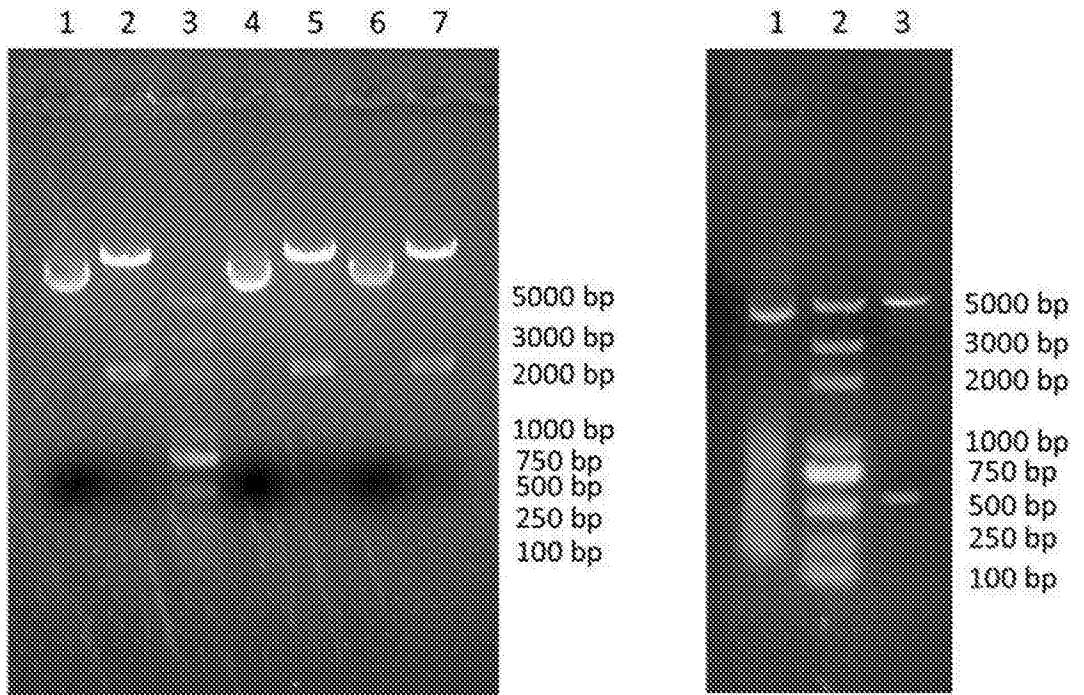


图2

图3

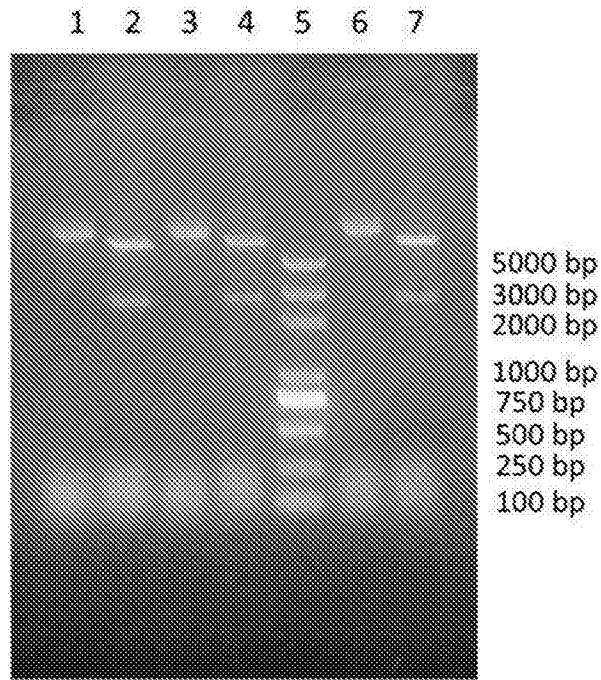


图4

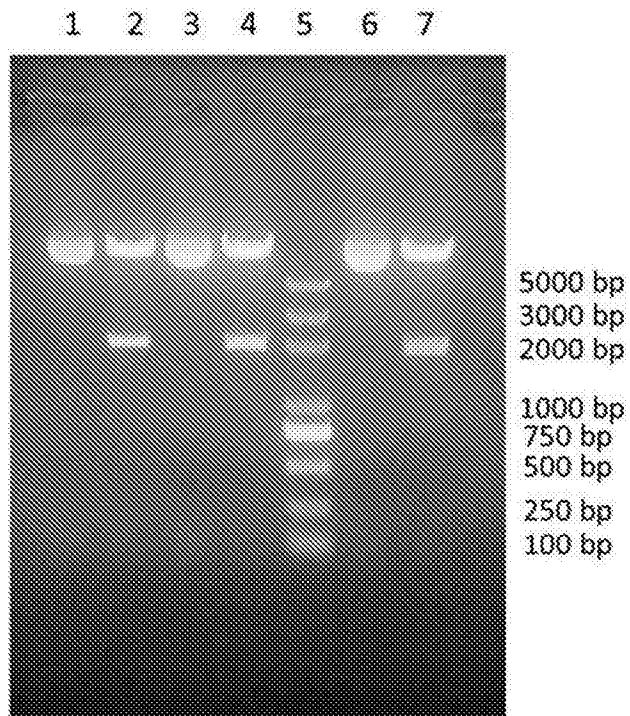


图5

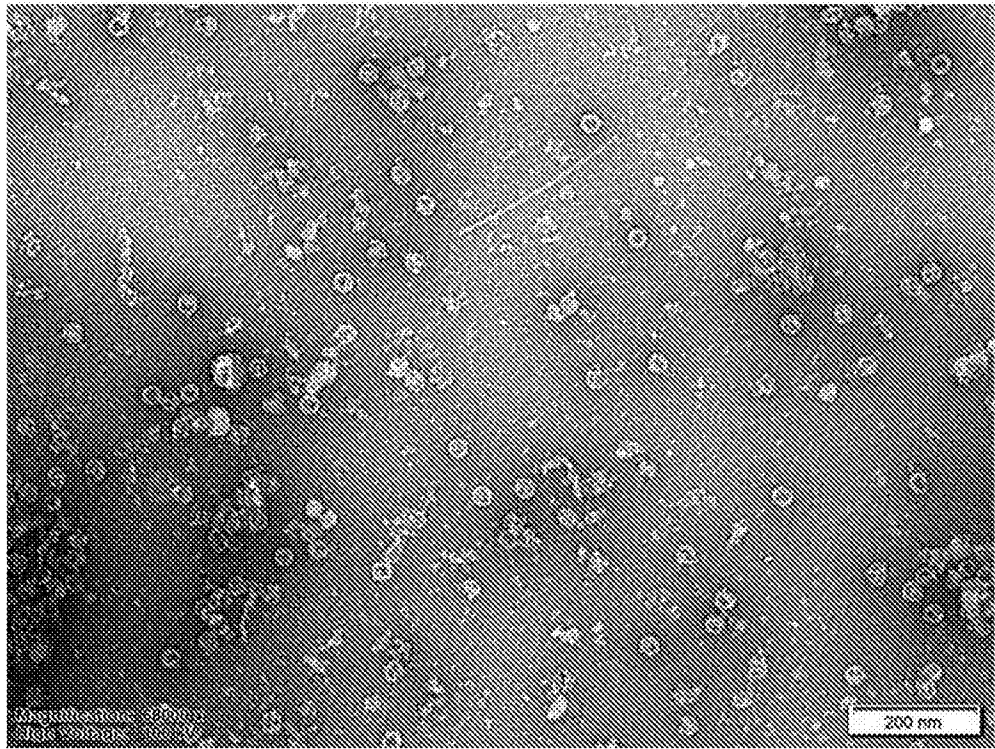


图6

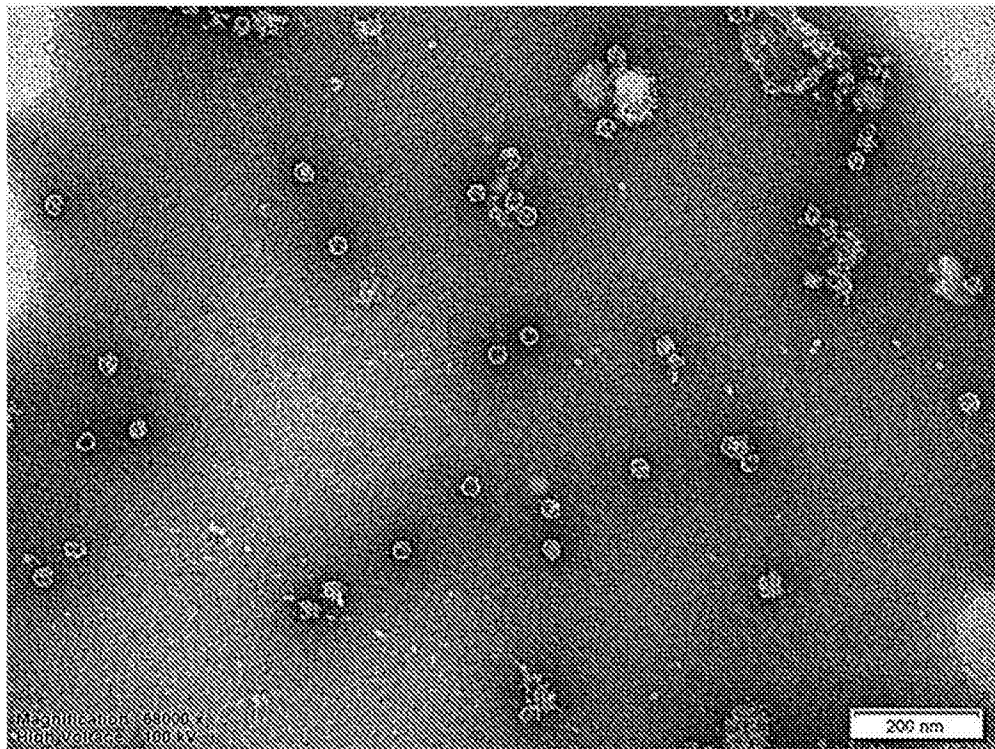


图7

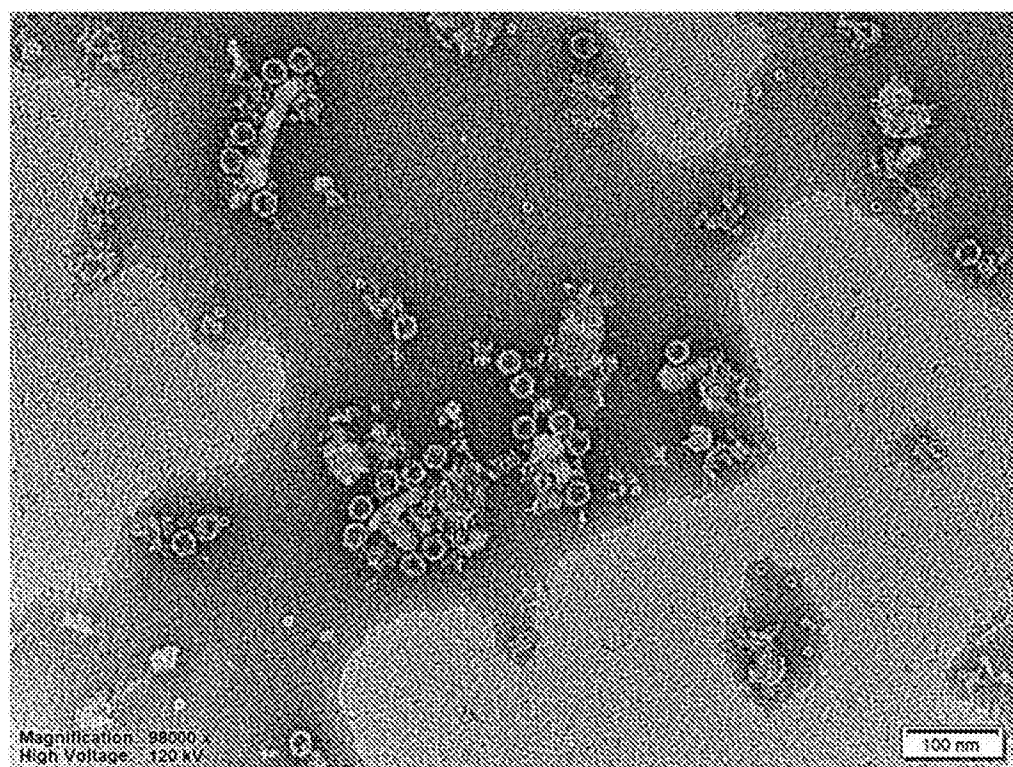


图8