



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112029736 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 26

(21) 申请号 202010951150.6

(22) 申请日 2020.09.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112029736 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(73) 专利权人 北京中海生物科技有限公司  
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街8号

专利权人 畜科生物工程有限公司

(72) 发明人 陈晴 周远成 王彬 高洁  
伏显华 冯倩倩 杜继文 李淑萍

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所(普通合伙) 11305

代理人 郑明

(51) Int.Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

审查员 于地美

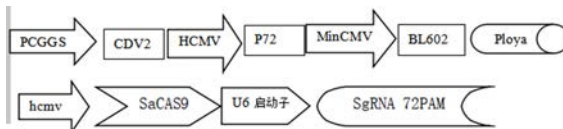
权利要求书1页 说明书11页  
序列表13页 附图4页

(54) 发明名称

一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病活疫苗及其制备,本发明构建的非洲猪瘟病毒CD2V/P72/B602L基因和能敲除野生型P72基因的sacas9 SgRNA序列重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株在BHK细胞株获得可以表达重组CD2V/P72/B602L蛋白抗原,其表达量稳定,同时经过体外细胞模拟实验表明该方法可以干扰病毒复制。以该重组株伪狂病病毒株作为生产毒株,经过悬浮微载体培养获得的表达表达重组CD2V/P72/B602L蛋白抗原制备成活疫苗,可以预防最近流行的非洲猪瘟病毒,还可以做成喷雾饮水形式疫苗减少注射应激反应。



1. 一种预防非洲猪瘟的重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于该疫苗是用重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株作为生产种毒制备的;

所述重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株含有SEQ ID No .1所示的重组序列;

所述SEQ ID No .1所示的重组序列包括sacas9SgRNA基因序列,和编码SEQ ID No .2, SEQ ID No .3和SEQ ID No .4所示CD2V/P72/B602L蛋白序列的基因序列。

2. 如权利要求1所述的一种预防非洲猪瘟的重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于所述的该重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株的构建方法,包括:

(1) 将非洲猪瘟病毒的CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA 干扰素区域重组融合连接入真核质粒载体构建重组臂重组质粒;

(2) 用脂质体转染的方法将所述重组臂重组质粒转染至接种了伪狂犬病病毒的BHK细胞株中;通过荧光显微镜观察得到表达有CD2V/P72/B602L蛋白的重组病毒;

(3) 进行重复低密稀释度铺板克隆筛后获得稳定表达CD2V/P72/B602L蛋白的阳性病毒株,能稳定高效表达CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA;

(4) 通过对重组PRV进行蛋白免疫印迹法筛选出能够高效稳定表达CDV2/P72/ BL602蛋白的阳性克隆病毒株,该重组病毒被命名为重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株。

3. 如权利要求1-2所述的一种预防非洲猪瘟的重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于所述的重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株,在SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No4所示的序列的氨基末端或羧基末端连接上选自如下组的标签:Poly-Arg、Poly-His、FLAG、Strep-tag II、c-myc以及各种loxP位点。

## 一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗及其制备方法,属于兽用生物制品领域。

### 技术背景

[0002] 非洲猪瘟(African swine fever,ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus,ASFV)引起猪的一种急性、烈性传染病。ASFV可感染家猪、野猪和蜱类,无明显的品种、性别和年龄差异,是唯一一种虫媒传播的DNA病毒。广泛分布的蜱类是重要的储存宿主和传播媒介。接触传播、经食物传播和软蜱吸血传播是本病的主要传播途径,病毒在野猪之间、野猪与家猪之间以及在家猪之间循环传播使得该病难以根除。该病病程短、死亡率高,家猪和欧洲野猪的病死率最高达100%,对养猪业危害巨大,造成巨大的经济损失和社会影响。世界动物卫生组织(OIE)将其列为须通报动物疫病,我国将其列为一类动物疫病。目前ASF缺乏有效的疫苗,预防要依靠严格的边境检疫、养殖场良好的生物安全措施以及野猪的跨境移动,而一旦暴发则需要采取紧急根除和净化以及区域化管理等措施以控制疫情恢复生产。非洲猪瘟原发于非洲,1957年蔓延至欧洲,随后又传到了加勒比和巴西<sup>[3-5]</sup>。进入21世纪后,该病传播范围再次扩大,2007年传入东欧的格鲁吉亚、亚美尼亚、阿塞拜疆和俄罗斯地区。在过去几年里该病又向西蔓延,进入乌克兰(2012)、白俄罗斯(2013)、欧盟(立陶宛、波兰、拉脱维亚、爱沙尼亚,2014;希腊2020)以及摩尔多瓦(2016)。2018年8月我国沈阳发生了第一例ASF,此后全国蔓延(包括香港、台湾)。目前亚洲地区中韩国、菲律宾、越南、柬埔寨、印度尼西亚等国家均有疫情发生<sup>[3-4]</sup>,2019年以来共有29个国家/地区报告了新的或正在流行的疫情。由于ASFV难以根除、病死率高、危害大、缺乏有效疫苗。

[0003] ASFV是双链DNA病毒,属于非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属,是该科中唯一一种病毒,通常认为只有一个血清型、24个基因型,对外界抵抗力较强。ASFV的潜伏期是4-19d,具体时间取决于病毒、宿主和感染方式。OIE《陆生动物卫生法典》规定的潜伏期是15d,作为进口隔离、疫点疫区封锁解禁的时间参考。感染猪可能在临床体征出现前2d已开始排毒,感染弱毒株的猪可能在感染70d后仍然持续排毒。ASF流行病学很复杂,受所处环境、猪的生产体系、有无媒介蜱存在、人类活动以及是否存在野猪等因素影响,在非洲、欧洲和亚洲发生的感染和流行模式也不同。ASFV虽然致死率高,但感染性并不像口蹄疫等烈性疫病那么强,可能会在猪群中缓慢传播。因此开发一种可以预防或阻断在猪群中疫苗或药物非常重要。

[0004] PRV属于疱疹病毒科、疱疹病毒亚科,又被称为猪疱疹病毒I型。PRV属于线性双链DNA病毒,基因组全长约为150Kb,分子量约为 $95 \times 10^3$ ku,G+C%含量高达73%;PRV基因组可分为4个部分:长独特区(UL)、短独特区(US)、末端重rJ(TRS)、内部重复序t](IRS)。其中US和UL区域,含有至少70个基因,可编码70~100种蛋白质,成熟的病毒粒子只含有约50种蛋白质。UL区的主要基因包括gB、gC、gH、gK、gL、gM、gN、TK等,其中gB、gH、gK表达的是病毒增殖的必须糖蛋白,gC、gM、gN表达的是病毒增殖的非必须糖蛋白;US区的主要基因包括gD、gE、gG、gI,其中gD基因是病毒增殖的必须糖蛋白基因。PRV表达的糖蛋白在其与细胞的相互作

用、致病过程和免疫原性中发挥着非常重要的作用。近几年对PRV基因组的研究已经基本成熟,PRV基因组中各个基因的定位已经基本明确;在此基础上,国内外的很多专家开始了PRV基因组中各基因功能的研究,尤其是研究与PRV自身复制无关的非必需基因功能;研究发现,与PRV复制无关的基因往往是PRV的毒力基因,这些非必需基因的缺失一方面可以大大降低PRV的毒力,另一方面还可以继续刺激机体产生免疫力,这需PRV成为重组疫苗选择的载体提供了依据。PRV发挥毒力最主要的基因是Tk、gE、gI、gI等,研究证明当PRV这些毒力基因通过自然缺失、人工缺失或被其他外源基因所替代后,PRV的毒力能够得到显著的降低,但是缺失基因的PRV仍然能够正常生长,说明PRV可以成为外源基因插入表达的一个重要载体。PRV作为重组疫苗载体除了具有外源基因容量大、含有多个与复制无关的非必需区域、可在PRV感染的细胞中稳定的修饰、导入外源基因表达的产物可以充分诱导机体产生细胞免疫和体液免疫的特点外,目前应用于预防PRV感染的基因缺失活疫苗株Ba~ha-K61和SA215等已经应用了十几年,安全性好,已使很多国家达到了净化猪伪狂犬病的目的。PRV基因缺失疫苗的生产成本比较低、生产工艺比较简单、原料来源很方便,且对人没有感染性,所以PRV基因缺失疫苗株成为载体重组疫苗的首选。插入外源基因的重组PRV所表达的外源蛋白可以正常进行翻译、翻译后的加工、翻译后的修饰,其中的许多过程都与在体内的过程相类似,因此重组PRV表达出来的外源蛋白具有天然蛋白质的活性,并且还保留外源蛋白原有的抗原性、免疫原性及功能特点。

[0005] 本发明用猪伪狂犬病毒作为载体,用CAS9技术将gI基因为同源臂,将构建含有非洲猪瘟病毒CD2V基因、P72基因和P72分子伴侣基因以及敲除P72野生序列sacas9核定位序列的重组表达框重组到伪狂犬gI基因区域,构建含有非洲猪瘟病毒关键免疫基因CD2V、P72、B602L和干扰非洲猪瘟病毒复制的sacas9SgRNA基因重组伪狂犬病毒株作为生产毒株,经过悬浮微载体培养制备成活疫苗,可以预防最近流行的非洲猪瘟,后期还可以做成喷雾饮水形式疫苗减少注射应激反应。

## 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是如何提高非洲猪瘟亚单位疫苗防疫效果或其他预防方法的缺陷。为了解决上述技术问题,本发明提供了一种稳定廉价高效表达非洲猪瘟病毒CD2V/P72/B602L和sacas9干扰野生非洲猪瘟病毒复制的重组伪狂犬活病毒作为非洲猪瘟活疫苗生产毒株制备预防非洲猪瘟的活疫苗。

[0007] 本发明的技术方案

[0008] 1.一种预防非洲猪瘟的重组伪狂犬病病毒活疫苗及其制备方法,其特征在于该疫苗是用重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株作为生产种毒制备的;

[0009] 所述重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株含有SEQ ID No.1所示的重组序列;

[0010] 所述SEQ ID No.1所示的重组序列包括sacas9SgRNA基因序列,和编码SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4所示CD2V/P72/B602L蛋白序列的基因序列。

[0011] 2.本发明所述的一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于所述的该重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株的构建方法,包括:

[0012] (1)将非洲猪瘟病毒的CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA干扰素区域重组融合连接入真核质粒载体构建重组臂重组质粒;

[0013] (2)用脂质体转染的方法将重组臂的真核表达质粒转染至BHK细胞株中;通过流式分选得到表达有CD2V/P72/B602L蛋白的重组病毒;

[0014] (3)进行重复低密稀释度铺板克隆筛后获得稳定表达CD2V/P72/B602L蛋白的阳性病毒株,能稳定高效表达CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA蛋白病毒株;

[0015] (4)通过对重组PRV进行蛋白免疫印迹即法筛选出能够高效稳定表达CD2V/P72/B602L蛋白的阳性克隆病毒株,该重组病毒被命名为重组伪狂犬病病毒PRVTIE1872V2Sag72株。

[0016] 3.本发明所述的一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于所述的重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株,在SEQ ID No.2SEQ ID No.3SEQ ID No4所示的的氨基末端或羧基末端连接上选自如下组的标签:Poly-Arg、Poly-His、FLAG、Strep-tag II、c-myc以及各种loxP位点。

[0017] 4.本发明所述的一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于该疫苗是将含有非洲猪瘟关键蛋白基因的重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株作为生产种毒进行发酵罐高密度培养,细胞上清浓缩加入保护剂和细胞因子等冻干,而制备成一种通用预防非洲猪瘟的重组伪狂犬病病毒活疫苗。

[0018] 5.本发明所述的一种预防非洲猪瘟的重组伪狂犬病病毒活疫苗,其特征在于重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株在制备诊断、预防非洲猪瘟病毒中的应用。

[0019] 本发明新技术效果

[0020] 本发明涉及一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病病毒活疫苗及其制备,本发明用于制备疫苗的生产毒株,即构建的非洲猪瘟CD2V/P72/B602L和能敲除野生型P72基因的sacas9SgRNA序列重组到伪狂犬病病毒TIE18株中在BHK细胞株获得可以表达重组CD2V/P72/B602L蛋白抗原,其表达量稳定,同时经过体外细胞模拟实验表明该方法可以干扰病毒复制。将该株病毒,经过悬浮微载体培养获得的表达重组CD2V/P72/B602L蛋白抗原制备成活疫苗,可以预防最近流行的非洲猪瘟病毒,还可以做成喷雾饮水形式疫苗减少注射应激反应。

## 附图说明

[0021] 图1载体原件示意图

[0022] 图2转染后细胞状态

[0023] 图3筛选细胞中带EGFP重组PEGFP-gI (CD2V/P72/B602L-sacas9SgRNA-US2病毒荧光显微镜镜下结果

[0024] 图4筛选细胞删除EGFP重组PEGFP-gI (CD2V/P72/B602L-sacas9SgRNA-US2病毒荧光显微镜镜下结果

[0025] 图5wb鉴定重组病毒对非洲猪瘟基因表达结果图5A:CD2V WB结果;图5B:P72和B602L WB结果

[0026] 图6重组PRVTIE1872V2Sag72株对带有目标P72PAM腺病毒荧光干扰素结果图中:6A对照稀释结果;6B实验组稀释结果;6C对照未稀释结果图;6D实验组未稀释结果

[0027] 图7基因扩增结果图图中7A:GIF/BL601(包含CD2V)基因扩增结果;图7B:BL601F/P72R/基因扩增结果;图7C:包含部分SaCAS9/U6/US2基因扩增结果。

[0028] 图8ADV P72/B602L免疫仔猪后血清抗体测定结果图中第一组为对照组,第二组为PRVTIE1872V2Sag72株 $10^8$ TCID<sub>50</sub>组,第三组为PRVTIE1872V2Sag72株 $10^9$ TCID<sub>50</sub>组。

### 具体实施方式

[0029] 本发明所提供的重组CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA基因载体由北京中海生物有限公司构建,重组g1载体以及猪伪狂犬病病毒TIE187株由四川华神兽用生物制品有限公司提供,重组病毒含有CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA表达框,为如下A1)或A2):

[0030] A1) 氨基酸序列如SEQ ID No.2、SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示的蛋白质;

[0031] A2) 在A1)的蛋白质的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到具有相似功能活性的蛋白质。

[0032] 为了使A1)或A2)中的蛋白质便于鉴定,可在序列表中SEQ ID No.2、SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示的氨基酸序列的氨基末端或羧基末端连接上如表1所示的标签。

[0033] 表1标签的序列

[0034]

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6 (通常为5个)	RRRRR
Poly-His	2-10 (通常为6个)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL
Poly-HA	9	YPYDVPDYA

[0035] 上述A2)中的蛋白质,所述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加为不超过10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过9个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过8个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过7个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过6个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过5个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过4个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过3个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过2个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加;或为不超过1个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0036] 上述A1)或A2)中的蛋白质可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0037] 上述A1)或A2)中的蛋白质的编码基因可通过将序列表中SEQ ID No.1所示的DNA序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,或进行一个或几个碱基对的错义突变,和/或在其5'端和/或3'端连上表1所示的标签的编码序列得到。

[0038] 为了解决上述技术问题,本发明还提供了与所述重组(CD2V/P72/B602L)和sacas9SgRNA的主伪狂犬病病毒相关的生物材料,为下述B1)-B5)中至少一种:

[0039] B1) 编码上述重组CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA蛋白的核酸分子SEQ ID No.1;

[0040] B2) 含有B1)所述核酸分子的表达盒;

[0041] B3) 含有B1)所述核酸分子的重组载体、或含有B2)所述表达盒的重组载体;

[0042] B4) 含有B1)所述核酸分子的重组微生物、含有B2)所述表达盒的重组微生物、或含有B3)所述重组载体的重组微生物;

[0043] B5) 含有B1) 所述核酸分子的重组细胞系、含有B2) 所述表达盒的重组细胞系、或含有B3) 所述重组载体的重组病毒细胞系。

[0044] 其中, 所述核酸分子可以是DNA, 如cDNA、基因组DNA或重组DNA; 所述核酸分子也可以是RNA, 如mRNA或HARNA等。

[0045] 以上所述重组病毒PRV和 (CD2V/P72/B602L) 和sacas9SgRNA蛋白相关的生物材料中, B1) 所述核酸分子为如下1) ~4) 中任一所示的基因:

[0046] 1) 核苷酸序列是SEQ ID No.1所示的DNA分子或cDNA分子;

[0047] 2) 编码序列是SEQ ID No.1中第1~12881位所示的DNA分子或cDNA分子;

[0048] 3) 与1) 或2) 限定的DNA分子具有75%或75%以上同一性, 且编码所述重组病毒基因为CD2V/P72/B602L蛋白的DNA分子或cDNA分子;

[0049] 4) 在严格条件下与1) 或2) 或3) 中任一所述限定的DNA分子杂交, 且编码所述重组病毒CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA蛋白的DNA分子或cDNA分子, 也可以继续加入CP204L、E183L、E199L、MGF505-5R等基因。

[0050] 其中, SEQ ID No.1有12881核苷酸组成, 其中编码氨基酸序列如SEQ ID No.2、SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示的蛋白质。

[0051] 上述用于编码所述重组病毒PRV含有CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA型的核酸分子, 本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法, 例如定向进化和点突变的方法, 对本发明的编码所述重组病毒CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA的核酸分子的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的, 与本发明分离得到的编码所述重组病毒PRVCD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA型的核酸分子的核苷酸序列具有75%或者更高同一性且编码重组病毒PRV, 均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0052] 这里使用的术语“同一性”指核酸序列间的序列相似性。“同一性”包括与本发明的SEQ ID No.1所示的DNA分子或cDNA分子具有75%或更高, 或85%或更高, 或90%或更高, 或95%或更高同一性的核苷酸序列; 同一性可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件, 两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示, 其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0053] 所述严格条件是在 $2 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS的溶液中, 在68°C下杂交并洗膜2次, 每次5min, 又于 $0.5 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS的溶液中, 在68°C下杂交并洗膜2次, 每次15min。

[0054] 术语“编码序列”意指直接指定多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界通常由开放阅读框决定, 所述开读框以起始密码子如ATG、GTG或TTG开始, 并且以终止密码子如TAA、TAG或TGA结束。编码序列可以是基因组DNA、cDNA、合成DNA或其组合。

[0055] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤, 其包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0056] 上述生物材料中, 所述表达盒, 是指能够在重组病毒或细胞中表达重组CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA蛋白的DNA, 所述的重组生物具体可为病毒或哺乳细胞也可以是其他表达系统如酵母类、细菌类、藻类以及植物。

[0057] 本发明的又一个目的是提供了上述重组病毒在作为在非洲猪瘟病毒中防治中的应用。所述应用包括疾病诊断和/或预防目的的应用。

[0058] 术语“重组载体”意指线性的或环状的DNA分子, 其包含编码多肽的多核苷酸, 并且

所述多核苷酸与提供用于其表达的调控序列可操作地连接。所述重组载体包含本发明的多核苷酸，其连接于一个或多个调控序列，例如启动子和转录和翻译终止信号，所述调控序列指导所述多肽在表达宿主中产生。多种核苷酸和调控序列可以结合在一起以产生重组载体，所述重组载体可以包括一个或多个方便的限制位点以允许在这些位点插入或取代编码多肽的多核苷酸。可供选择的是可以通过在适当的用于表达的载体中插入包含所述多核苷酸的核酸构建体或多核苷酸来表达所述多核苷酸。在制备表达载体的过程中，将编码序列置于载体中，从而将该编码序列与适当的调控序列可操作地连接以供表达。重组载体可以是任何载体（例如，质粒或病毒），其能够方便地进行重组DNA步骤，并且能够产生多核苷酸的表达。载体的选择将通常依赖于载体与将引入该载体的重组细胞的相容性。载体可以是线状或闭合环状质粒。载体可以是自主复制载体，即，作为染色体外实体存在的载体，其复制独立于染色体复制，例如，质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以含有任何用于确保自复制的手段；或者，载体可以是一种当被引入重组细胞中时，整合到基因组中并且与整合了该载体的染色体一起复制的载体。此外，可以使用单独的载体或质粒或两个或更多个载体或质粒，其共同含有待引入重组细胞基因组的完整DNA，或可以使用转座子。

[0059] 所述载体优选地含有一个或多个选择性标记，其允许简单选择经转化、转染、转导等的细胞。所述载体优选含有元件，其允许载体整合入伪狂犬病病毒基因组或载体在伪狂犬病病毒中独立于基因组的自主复制。为了整合入PRV基因组，载体可依赖编码多肽的多核苷酸的序列或用于通过同源或非同源重组整合入基因组的任何其它载体元件。或者，载体可以含有额外的多核苷酸，saCAS9用于指导通过同源重组整合入宿主PRV基因组染色体中的精确位置。为了增加在精确位置整合的可能性，整合元件应含有足够数量的核酸，如100至10000碱基对，400至10000碱基对，和800至10000碱基对，其与相应的目标序列具有高度序列同一性以增强同源重组的概率。整合元件可为任何序列，其与宿主PRV基因组中的目标序列同源。此外，整合元件可为非编码或编码的多核苷酸。另一方面，可以将载体通过非同源重组整合到重组PRV的基因组中。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指能够使质粒或载体体内复制的多核苷酸。

[0060] 可以将多于一个拷贝的本发明的多核苷酸插入重组细胞以增加多肽的产生。多核苷酸拷贝数的增加可通过如下方法获得：将至少一个额外拷贝的序列整合入宿主细胞基因组，或将可扩增的选择性标记基因包括于多核苷酸，其中可通过在合适的选择剂存在下培养细胞来选择含有选择性标记基因的扩增拷贝，且由此含有多核苷酸的额外拷贝的细胞。用于连接上述元件以构建本发明的重组表达载体的方法是本领域技术人员熟知的。

[0061] 术语“重组PRV”意指任何PRV类型，所述PRV类型对于使用包含本发明多核苷酸的核酸构建体或表达载体的转化、转染、转导等是易感的。术语“重组PRV”涵盖任何亲本PRV的后代，其由于在复制中发生的突变而不同于亲本病毒。

[0062] 所述“重组病毒”，其包含本发明的多核苷酸可操作地连接于一个或多个指导本发明多肽的产生的调控序列。将包含多核苷酸的构建体或载体导入重组PRV中，使所述构建体或载体如前所述作为染色体整体或者作为自复制的染色体外载体维持。术语“重组PRV”包括亲本PRV的任何后代，其由于复制过程中发生的突变而不同于亲本PRV。PRV的选择将在很大程度上依赖于编码多肽的基因及其来源。重组PRV可以是在本发明的多肽的重组产生中



有用的任何有用的材料,例如,原核、真核细胞、重组病毒。

[0063] 本发明还涉及:

[0064] (1) 用于构建本发明CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA重组伪狂犬病病毒的方法,包括:构建PUC19-gI同源臂载体,引入酶切位点,将表达CD2V/P72/B602L基因和sacas9SgRNA表达框中,重组到同源臂酶切位点中,为提高构建可以(CD2V/P72/B602L)和sacas9SgRNA表达框下游加一个或两个含LOXP位点minEGFP表达框,后期删除,以达到高效率重组含有CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA基因rPRV。

[0065] (2) 用PEI转染的方法将线性化的真核表达载体转染至BHK细胞株中;再感染伪狂犬病毒。

[0066] (3) 将上清转接BHK细胞中筛选带有荧光的转染细胞株,收获细胞毒。

[0067] (4) 稀释法筛选荧光簇rPRV病毒,PCR筛选插入基因完整性。

[0068] (5) 以获得稳定重组含有(CD2V/P72/B602L)和sacas9SgRNA和EGFP的重组毒株,再经过含剔除EGFP基因通过挑斑和有限稀释法得到只含仅含有CD2V/P72/B602L)和sacas9SgRNA的重组伪狂犬病病毒株,命名rPRVTIE1872V2Sag72。

[0069] (6) 将筛选得到的稳定表达CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA的rPRVTIE1872V2Sag72株进行条件筛选,获得稳定最优培养条件,悬浮化生产;

[0070] (7) 收集发酵液,加入病毒保护剂或细胞因子如白介素IL2、IL6等,分装冻干即获得含有CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA基因的重组PRVTIE1872V2Sag72病毒株疫苗;免疫动物后可以起到保护动物效果,且对动物安全。

[0071] 实施例

[0072] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0073] 原始毒株PRVTIE18以及载体:重组(CD2V/P72/B602L)和敲除野生型P72基因的sacas9SgRNA载体由本实验室构建。PRVTIE18病毒和gI重组载体由四川华神公司提供,非洲猪瘟基因来至NCBI库中2018年中国爆发病毒株基因按哺乳细胞密码子优化合成。BHK细胞本实验室保存。

[0074] 酶类及其他生化试剂:内切酶、连接酶购自TaKaRa公司,重组酶购置全式金,质粒提取试剂盒购自天跟生物,其它均为国产试剂。

[0075] BHK培养基:DMEM血清培养基,牛血清培养培养基,购自Hyclone公司。

[0076] 实施例1——重组CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA其编码基因的获得,为了提高重组率,将CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA表达框置于重组同源臂gI和US2基因中。具体的基因在重组臂位置如表2所示。

[0077] 表2重组载体设计

[0078]

名称1	基因
gI	1-1121
启动子1	1122-1671
Cd22基因	1672-2754
启动子2	2755-3044

P72基因	3045-4730
启动子3	4731-4279
B601L	4280-6872
WPRE终止子	6873-7463
启动子4	7464-8077
Sacag基因	8079-11248
Polya终止子	11249-11459
U6启动子P72PAMgRNA	11460-11872
US2同源臂	11873-12881

[0079] 克隆SEQ ID No.1所示优化抗原基因,是将含CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA表达框克隆到含gI和US2重组序列中,其编码序列是SEQ ID No.1的第1~12881位所示,其中编码抗原序列由SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4所示。

[0080] 实施例2——重组病毒构建

[0081] 1重组CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA基因重组载体的构建

[0082] 1.1利用PCR扩实验室PRV病毒的gI基因US2基因,在3端gI基因作为同源臂和5端US2基因作为同源臂基因,同时引入Mlu1/Ase1酶切位点,gI基因和US2基因的中间引入Ase1和Mlu1酶切位点,利用gI和US2:拼接成重组臂基因,连pEGFP载体,测序正确保存,摇菌提取载体用Mlu1和Ase1酶切胶回收用于重组CD2V/P72/B602L表达框和sacas9SgRNAPAM基因表达框。

[0083] 引物序列GIF:ggaggcgcgc cggctattaa t 21(序列5)

[0084] GIR:cgagccgggg gagatacgcg t 21(序列6)。

[0085] 1.2表达CD2V/P72/B602L基因表达框扩出(基因合成由擎科生物合成)连入PCDNA3.1NHEI和PMEI多克隆位点中,得到SEQ ID No.2所示的7463bp左右片段是目标片段。将含有表达(CD2V/P72/B602L)基因的编码基因的PCDA3.1编码框按同源重组原则扩出,进行回收纯化备用。

[0086] 引物

[0087] F1:ggaggcgcgc cggctattaa ttctagagat atactgagtc attaggg 27(序列7)

[0088] R1:gggcaccgga gcatcttag gggccgggg t 31(序列8);

[0089] F2:aaccccgccc cctaagatcg ctccggtgcc c 31(序列9)

[0090] R2:gtcaataatc aatgtcaaga ggaggcgggg aggcgccc 39(序列10)。

[0091] 1.3按重组原则载体扩出实验室构建的去掉核定位sacas9SgRNA PAM表达框,进行回收纯化备用。

[0092] 引物:F3:cctcttgaca ttgattattg acta 24(序列11)

[0093] R3:cagggccagc gagccgggg agattcgcg t caaaaatctc gccacaagt tga 53(序列12)。

[0094] 1.4将纯化后的含有同源臂酶切载体1.1项产物、1.2项中表达(CD2V/P72/B602L)基因表达框1.3项产物,按三片段重组原则混合,重组体系为10 $\mu$ L:1.1项酶切载体3 $\mu$ L、1.2项产物表达框1 $\mu$ L、1.3项sacas9SgRNA PAM表达框1 $\mu$ L,2 $\times$ 重组酶缓冲液5 $\mu$ L,50 $^{\circ}$ C15min。重组产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞,获得阳性重组菌,用PCR鉴定阳性克隆并测序。提取阳性载体

送去测序,正确的序列如SEQ ID No.1第1~12881位所示片段得到的重组质粒命名为PEGFP-gI (CD2V/P72/B602L-sacas9SgRNA-US2,如图1;对测序正确菌株接种于100mL含氨苄LB培养基250mL三角瓶中,37℃条件下,220r/min摇床培养过夜,抽提载体。

[0095] 2带CD2V/P72/B602L和SAcas9SgRNA基因重组伪狂犬病病毒(rPRV)病毒获得

[0096] 2.1脂质体转染混合物的制备:

[0097] A液配置:取1个干净的EP管分别加入250μL Opti-MEM、2μg的重组质粒pCU18-gI (CD2V/P72/B602L-sacas9SgRNA-US2和2μg的质粒,充分混匀后室温静置5min。

[0098] B液配置:取1个干净的EP管分别加入250μL Opti-MEM和总质粒体积三倍的Mirus (转染试剂),充分混匀后室温静置5min。用移液枪把B液全部吸入到A液中充分混匀后在超净工作台中室温静置孵育20min。

[0099] 2.2BHK细胞的转染:取已制备好的一瓶BHK细胞培养于37℃5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,培养24h左右弃掉细胞瓶内的细胞培养液,用1×PBS漂洗三次,再用0.25%EDTA胰酶消化,用10%胎牛血清DMEM终止消化,1000r/min室温离心3min,弃掉上清,沉淀用10mL10%胎牛血清DMEM重悬起来,反复吹打均匀,再加入14mL10%胎牛血清DMEM混匀,铺两个六孔板,每孔2mL细胞悬液,置于37℃5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,培养到大约70%~80%细胞出现细胞融合时,选一个生长情况良好的六孔板接种PRV细胞毒。漂洗后加入已稀释的PRV细胞毒并放入37℃5%CO<sub>2</sub>细胞恒温培养箱中,吸附2h后用无血清DMEM漂洗三次细胞。再次吸取2%的胎牛血清DMEM按2mL/孔量加入孔中,放入37℃5%CO<sub>2</sub>细胞恒温培养箱中孵育24h。孵育后用无血清的Opti-MEM漂洗三次细胞,加入1.5mL Opti-MEM避免细胞干死,再用1mL的移液枪将已混合好的A+B转染混合液全部吸出,缓慢滴加于细胞上清中。将六孔板放入37℃5%CO<sub>2</sub>细胞恒温培养箱中孵育6h。孵育结束后取2mL含5%胎牛血清DMEM培养液换掉转染液,放入37℃5%CO<sub>2</sub>细胞恒温培养箱中培养3~5d。同时还要设定两种对照孔,一种是只接了细胞毒没有加转染混合液的孔,另一种是只加了转染混合液没有感染毒的孔。

[0100] 2.3荧光观察:在荧光显微镜下观察细胞病变同时观察有无绿色荧光细胞簇出现。转染前和转染后的细胞形态如图2所示。

[0101] 3重组病毒克隆筛选

[0102] 3.1蚀斑纯化法:转染后在六孔板中培养3~5d之间在倒置荧光显微镜下观察选出绿色荧光细胞簇出现的孔,并用记号笔标记好,弃掉上清,用1×PBS漂洗两次,用玻璃管套住标记的区域,取少量已预热的0.25%EDTA胰酶打入玻璃管中进行细胞消化,消化2min左右,在普通显微镜下观察细胞是否变圆,加入一些10%胎牛血清DMEM终止消化,反复吹打,并全部吸取转移到50mL10%胎牛血清DMEM中,再把两瓶原代细胞用0.25%EDTA胰酶消化,取上述悬液反复吹打,铺5块100mm<sup>2</sup>细胞平皿,以每平皿加入10mL的量接入,进行同步感染。将细胞平皿放入37℃5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱内培养3~5d,及时观察细胞病变和绿色荧光。选出出现绿色荧光斑点的平皿,并用记号笔标记好,弃掉上清,用1×PBS漂洗两次,再次用玻璃管套斑,胰酶消化并全部吸出移入1.5mL EP管中,再加入1mL10%胎牛血清DMEM,用枪反复吹打混匀后取500μL与50mL细胞悬液混匀,铺5块100mm<sup>2</sup>细胞平皿,以每平皿加入10mL的量接入,进行同步感染。将细胞平皿放入37℃5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱内培养3~5d,及时观察细胞病变和绿色荧光。纯化后的病毒结果如图3所示。

[0103] 3.2重组病毒的鉴定:

[0104] 直接用消化细胞DNA作为模板,用3对特异性引物,gIF/CVD2R扩增2000bp包含GI同源臂CD2V基因和部分B602L基因,结果如图7A;引物BL601F/P72R:扩增1800bp包含部分B602L基因和P72基因,结果如图7B;引物SACMVF/US2R扩1500bp片段包含SaCAS9基因U6启动子PAM以及US2基因的片段。所得PCR产物在1%琼脂糖电泳凝胶进行核酸电泳20min,结束后在紫外分析割胶仪下观察电泳结果。PCR结果如图7:说明PEGFP-gI CD2V/P72/B602L-sacas9SgRNA-US2表达框成功重组在gI和US2基因间。

[0105] 上游引物gIF:ggcgtgaaca tcctcaccga cttcatggtg gcgctc 36 (序列13)

[0106] 下游引物CVD2R:ttagatgatg cgggccacgt ggat 24 (序列14)

[0107] 上游引物BL601F:cgccgacctg gtggtgagcg ccagc 25 (序列15)

[0108] 下游引物P72R:tggatgttct tggccttctt gtggtaga 28 (序列16)

[0109] 上游引物SACMVF:gaagaatccc ctgtacaagt actacgag 28 (序列17)

[0110] 下游引物US2R:cacaggtgga cgggggccgt gccccggg 28 (序列18)

[0111] 4无EGFP外源标记rPRV重组病毒获得

[0112] 4.1转染前一天,以合适的细胞和重组病毒(EGFP rPRV)密度接种到细胞培养板孔中;调整合适细胞浓度转染时,细胞要达到 $2 \times 10^6$ 的融合;

[0113] 4.2溶液1:240 $\mu$ L无血清培养基+10 $\mu$ L lipofectamine 2000/孔(总体积250 $\mu$ L)(温育5min);

[0114] 4.3溶液2:225 $\mu$ L无血清培养基+25 $\mu$ L(4 $\mu$ g)含PCDNA3,1Cre基因的重组质粒(购买于杭州宝赛生物)/孔(总体积250 $\mu$ L);

[0115] 4.4将溶液1与溶液2混合,室温下置20min;

[0116] 4.5与此同时,将6孔板中的细胞用无血清培养基冲洗细胞两遍后,加入2mL无血清培养基;

[0117] 4.6将溶液1与溶液2的混合液逐滴加入孔中,摇动培养板,轻轻混匀;在37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>中保温5~6h;

[0118] 4.7 6小时后,更换含有血清的全培养基,在37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>中24~72h检测去EGFP结果。结果如图四。去掉荧光后纯化重组病毒再荧光显微镜下无荧光,说明成功去掉荧光标签。

[0119] 5利用有限稀释法纯化病毒PCR再次验证阳性后,再对培养皿中的接毒细胞WB鉴定PGEFP-gI-CD2V/P72/B602L-sacas9SgRNA-US2蛋白表达水平,结果如图5,对筛选稳定细胞株实验室标记,命名为重组伪狂犬病病毒TIE1872V2Sag72株(rPRV TIE1872V2Sag72株),大量扩繁后保存与液氮中。

[0120] 实施例3——rPRV TIE1872V2Sag72株病毒对假病毒干扰素效果模拟测定

[0121] 1.带荧光P72构建

[0122] 将野生型P72基因(序列19)克隆到PDC315中构建MINIP72egfp基因载体中,保证不移码,测序正确后包装腺病毒。

[0123] 序列19

atgggtggggcc atcatatatt ggggtgcatgt cattcatcct ggcaggatgc tccgattcag 60  
 [0124] ggcacgtccc agatgggggc ccatgggagc cttcaaactgt ttcctcgcaa cggatatgac 120  
 tgggacaacc aaacaccctt agagggcgcc gtttacacgc ttgtagatcc ttttgggaaga 180  
 cccattgtac cgggcacaaa gaatgcgtac cgaaacttgg ttactactg cgaatacccc 240

[0125] 2. 将rPRV和带MINIP72egfp腺病毒共转染BHK悬浮细胞为实验组,阴性对照以普通PRV为对照,保证两组腺病毒加样量相同,稀释检测和未稀释的荧光值都弱于野生PRV病毒实验组,结果如图6;说明重组病毒组的sacas9SgP72PAMRNA原件正常工作,能切割P72基因,如果野毒遇到这个工作原件,切割后干扰病毒复制从而达到预防病毒结果。

[0126] 实施例4——疫苗的制备

[0127] 以本发明所构建的稳定表达CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA的重组株伪狂病毒株(rPRVTIE1872V2Sag72株)作为生产毒株,经过悬浮微载体培养获得的表达表达重组CD2V/P72/B602L蛋白抗原,加入病毒保护剂或细胞因子如白介素IL2、IL6等,分装冻干即制备成本发明所述含有CD2V/P72/B602L和sacas9SgRNA的重组PRVTIE1872V2Sag72株活疫苗,可以预防最近流行的非洲猪瘟,还可以做成喷雾饮水形式疫苗减少注射应激反应。

[0128] 实施例5——部分抗体测定

[0129] 选择p72蛋白多肽FPENSHNIQTAGKQDC,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,并在碳末端C上标记BSA蛋白。取合成并偶联BSA的多肽(纯度99%),使用无菌注射用水溶解至1mg/mL,然后使用0.05M pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释至4ug/mL。取酶标板,每孔加入100μL稀释后的多肽溶液,2-8℃包被12-16小时;去除含多肽的包被液,每孔加入0.1mL封闭液(0.15M PBS,0.05%吐温20,3%BSA,pH 7.4),37℃封闭3h;去除封闭液,使用PBST(0.15M PBS,0.05%吐温20,pH 7.4)洗涤5次;将采集的血清进行100倍稀释,取稀释后的血清每孔加入100μL,设立稀释液对照孔后室温孵育60min;去除血清,使用PBST洗涤5次;每孔加入100μL 1:5000稀释的HRP标记的山羊抗猪IgG,室温孵育30min,使用PBST洗涤5次;加入100μL TMB显色液,室温孵育15min,加入50μL 2M硫酸终止反应,测定OD450光吸收值,以测定孔与阴性对照孔A450nm>2.1判为阳性。测定结果见图8和表3所示。结果显示,免疫组抗体均为阳性,RPV P72/B602L 10<sup>9</sup>TCID<sub>50</sub>组高于10<sup>8</sup>TCID<sub>50</sub>组,rPRVTIE1872V2Sag72株,可以诱导仔猪产生特异性的体液免疫应答。

[0130] 表3免疫ADV p72/B602L后抗体测定结果

组别	免疫前 OD 值	免疫后 2 周 OD 值	免疫后 4 周 OD 值
对照组	0.083±0.012	0.047±0.021	0.067±0.032
[0131] rPRVTIE1872V2Sag72 株 10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub> 组	0.098±0.021	0.578±0.123	1.231±0.234
rPRVTIE1872V2Sag72 株 10 <sup>9</sup> TCID <sub>50</sub> 组	0.768±0.012	0.779±0.231	1.598±0.235

[0132] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的实施例。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	北京中海生物科技有限公司 畜科生物工程有限公司
[0003]	<120>	一种预防非洲猪瘟重组伪狂犬病活疫苗及其制备方法
[0004]	<160>	19
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	12881
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	PGEFP-gI (CDV2/P72/BL602-sacas9SgRNA-US24921
[0010]	<400>	1
[0011]		tagttggcgt gaacatcctc accgacttca tgggtggcgt ccccgagggg caagagtgcc 60
[0012]		cgttcgcccg cgtggaccag caccgcacgt acaagttcgg cgcgtgctgg agcgacgaca 120
[0013]		gcttcaagcg gggcgtggac gtgatgcgat tcttgacgcc gttctaccag cagccccccg 180
[0014]		accgggaggt ggtgaactac tggtagcga agaacggccg gacgctccc cgggcctacg 240
[0015]		ccgccgccac gccgtacgcc atcgaccccg cgcggccctc ggcgggctcg ccgaggccca 300
[0016]		ggccccggcc ccggcccagg ccccggccga agccccagcc cgccccggcg acgccccgcg 360
[0017]		cccccgccg cctgcccag cggcgacgc gggaccacgc cgccgggggg cgccccacgc 420
[0018]		cgcgaccccc gaggcccag acgcccacc gcccttcgc cccgccggcc gtcgtgccc 480
[0019]		gcgggtggcc gcagcccgc gagccgtcc cgccccggac caccgccgcg ccgggcgtct 540
[0020]		cgcgccaccg ctcggtgatc gtcggcacgg gcaccgcgat gggcgcgctc ctggtggcgc 600
[0021]		tgtgcgtcta catcttctc cgctgaggg gggcgaagg gtatgcctc ctgggcggtc 660
[0022]		ccgaggacgc cgacgagcta aaagcgcagc ccggtccgta gcctccgcag taccggcgtc 720
[0023]		gatgatgatg gtggcgcgcg acgtgaccg gctccccgcg gggctcctc tcgccgccct 780
[0024]		gacctggcc gccctgacc cgcgcgtcgg gggcgtcctc ttcagggcg ccggcgtcag 840
[0025]		cgtagcacgc gccggcagc ccgtctcgt gccggcgac gcgccaacc tgacgataga 900
[0026]		cgggacgtg ctgtttctg aggggccctc gccgagcaac tacagcgggc gcgtggagct 960
[0027]		gctgcgcctc gacccaagc gcgcctgcta cacgcgcgag tacgccgcg agtacgacct 1020
[0028]		ctgccccgcg gtgaccacg aagccttcg cggctgcctg cgcaagcgcg agccgctcgc 1080
[0029]		ccggcgcgcg tccgccgcg tggaggcgcg ccgctatta attctagaga tatactgagt 1140
[0030]		cattagggac tttccaatg gttttgccca gtacataagg tcaataggg tgaatcaaca 1200
[0031]		ggaaagtccc attggagcca agtacactga gtcaataggg actttccatt gggttttgcc 1260
[0032]		cagtacaaaa ggtcaatagg gggtagtca atgggtttt ccattattg gcacgtacat 1320
[0033]		aaggtaata ggggtgagtc attgggtttt tccagccatt taattaaac gccatgtact 1380
[0034]		ttcccaccat tgacgtcaat gggctattga aactaatgca acgtgacct taaacggtac 1440
[0035]		tttccatag ctgattaatg ggaaagtacc gttctcgagc caatacacgt caatgggaag 1500
[0036]		tgaaggga gcaaaacgt aacaccgcc cggttttccc ctggaaattc catattggca 1560
[0037]		ctcattctat tggctgagct gcgttctacg tgggtataag aggcgcgacc agcgtcggta 1620
[0038]		ccgtcgagc ctteggctc accaccgtag aacgcagatc gaattcgcca ccatgatcat 1680
[0039]		cctgatcttc ctgatctca gcaacatcgt gctgagcctc gactactggg tgagcttcaa 1740
[0040]		caagaccatc atcctggaca gcaacatcac caacgacaac aacgacatca acggcgtgag 1800
[0041]		ctggaacttc ttcaacaaca gttcaaac cctggccacc tgcggcaagg ccggcaactt 1860

[0042]	ctgcgagtgc agcaactaca gcaccagcat ctacaacatc accaacaact gcagcctgac	1920
[0043]	catcttcccc cacaacgacg tgttcgacac cacctaccag gtggtgtgga accagatcat	1980
[0044]	caactacacc atcaagctgc tgacccccgc ccccccccc aacatcacct acaactgcac	2040
[0045]	caacttcttg atcacctgca agaagaacaa cggcaccaac accaacatct acctgaacat	2100
[0046]	caacgacacc ttcgtgaagt acaccaacga gagcatcctg gagtacaact ggaacaacag	2160
[0047]	caacatcaac aacttcaccg ccacctgcat catcaacaac accatcagca ccagcaacga	2220
[0048]	gaccaccctg atcaactgca cctacctgac cctgagcagc aactacttet acaccttctt	2280
[0049]	caagctgtac tacatcccc tgagcatcat catcggcatc accatcagca tctgtctgat	2340
[0050]	cagcatcatc accttctga gcctgcgcaa gcgcaagaag cacgtggagg agatcgagag	2400
[0051]	ccccccccc gagagcaacg aggaggagca gtgccagcac gacgacacca ccagcatcca	2460
[0052]	cgagcccagc ccccgagcgc ccctgtctcc caagccctac agccgctacc agtacaacac	2520
[0053]	ccccatctac tacatgcgcc ccagcacca gccctgaac ccttcccc tgcccagcc	2580
[0054]	ctgccccccc cccaagcct gcccccccc caagccctgc ccccccca agccctgccc	2640
[0055]	cagcgcgag agctacagcc ccccaagcc cctgcccagc atccccctgc tgcccacat	2700
[0056]	ccccccctg agcaccaga acatcagcct gatccacgtg gaccgcatca tctaacatcg	2760
[0057]	ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact	2820
[0058]	cacggggatt tccaagtctc cacccttg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa	2880
[0059]	atcaacggga ctttcaaaa tgtcgtaac actccgccc attgacgcaa atgggcggtta	2940
[0060]	ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgct	3000
[0061]	ggagacgcca tccacgtgt tttgacctc atagaagatg ccacatggt gggccaccac	3060
[0062]	atcctgggag cctgccacag cagctggcag gacgccccca tccagggcac cagccagatg	3120
[0063]	ggcggccag gccagctgca gacctcccc cgcaacggct acgactggga caaccagacc	3180
[0064]	ccctggagg gcgccgtgta caccctggtg gacccttcg gccgccccat cgtgcccggc	3240
[0065]	accaagaacg cctaccgcaa cctggtgtac tactgcgagt acccggcga gcgcctgtac	3300
[0066]	gagaacgtgc gcttcgacgt gaacggcaac agcctggacg agtacagcag cgacgtgacc	3360
[0067]	acctggtgc gcaagtctg catccccgc gacaagatga ccggtacaa gcacctggtg	3420
[0068]	ggccaggagg tgagcgtgga gggcaccagc ggccccctgc tgtgcaacat ccacgacctg	3480
[0069]	cacaagcccc accagagcaa gccatcctg accgacgaga acgacacca gcgcacctgc	3540
[0070]	agccacacca acccaagtt cctgagccag cacttcccc agaacagcca caacatccag	3600
[0071]	accgcccga agcaggacat cccccatc accgacgcca cctacctgga catccgccgc	3660
[0072]	aactgtcact acagctgcaa cggccccag accccaagt actaccagcc cccctggcc	3720
[0073]	ctgtggatca agctgcgctt ctggttcaac gagaactga acctggccat cccagcgtg	3780
[0074]	agatccccct tcggcagcgc cttcatcacc atcaagctgg ccagccagaa ggacctggtg	3840
[0075]	aacgagttcc ccggcctgtt cgtgcgccag agccgttca tcgcccggcc cccagccgc	3900
[0076]	cgcaacatcc gttcaagcc ctggttcac cccggcgtga tcaacgagat cagcctgacc	3960
[0077]	aacaacgagc tgtacatcaa caacctgtc gtgaccccc agatccacaa cctgttctgtg	4020
[0078]	aagcgcgtgc gttcagcct gatccgcgtg cacaagacc aggtgacca caccaaac	4080
[0079]	aaccaccag acgagaagt gatgagcgc ctgaagtggc ccatcgagta catgttcac	4140
[0080]	ggcctgaagc ccacctgga catcagcagc cagaaccccc accagaccg cgactggcac	4200
[0081]	aagtccggcc acgtggtgaa cgccatcatg cagcccacc accacgccga gatcagcttc	4260
[0082]	caggaccgag acaccgccc gcccgagccc tgcagcagca tcagcagat cagccccgtg	4320
[0083]	acctaccca tcacctgcc catcatcaag aacatcagcg tgaccgcca cggcatcaac	4380

[0084]	ctgatcgaca agttccccag caagttctgc agcagctaca tccccttcca ctacggcggc 4440
[0085]	aacgccatca agacccccga cgacccccgc gccatgatga tcacctcgc cctgaagccc 4500
[0086]	cgcgaggagt accagcccag cggccacatc aacgtgagcc gcgcccgcga gttctacatc 4560
[0087]	agctgggaca ccgactacgt gggcagcatc accaccgccg acctggtggt gagcgccagc 4620
[0088]	gccatcaact tcctgctgct gcagaacggc agcgccgtgc tgcgctacag caccgagggc 4680
[0089]	cgcgccagcc tgctgacctg cggcgacgtg gaggagaacc ccggccccta agatcgctcc 4740
[0090]	ggtgcccgtc agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg 4800
[0091]	gtcggcaatt gaacgggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc 4860
[0092]	gtgtactggc tccgcctttt tcccaggggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc 4920
[0093]	gccgtgaacg ttctttttcg caacgggttt gccgccagaa cacagctgaa gcttcgaggg 4980
[0094]	gctcgcattc ctcttcacg cgccccgc cctacctgag gccgccatcc acgccggttg 5040
[0095]	agtcgcgttc tgccgcctcc cgctgtggt gcctctgaa ctgcgtccgc cgtctaggtg 5100
[0096]	agtttaaagc tcaggtcgag accgggctt tgtccggcgc tcccttgag cctacctaga 5160
[0097]	ctcagccggc tctccacgct ttgcctgacc ctgcttgctc aactctacgt ctttgtttcg 5220
[0098]	ttttctgttc tgcgccgta cagatccaag ctgtgaccgg cgcctacgt agacgccacc 5280
[0099]	atggccgagt tcaacatcga cgagctgtg aagaacgtgc tggaggacc cagcaccgag 5340
[0100]	atcagcgagg agaccctgaa gcagctgtac cagcgcacca acccctacaa gcagttcaag 5400
[0101]	aacgacagcc gcgtggcctt ctgcagctc accaacctgc gcgagcagta catccgccgc 5460
[0102]	ctgatcatga ccagcttcat cggctacgtg ttcaaggccc tgcaggagt gatgccagc 5520
[0103]	tacagcaagc ccaccacac caccaagacc ctgctgagcg agctgatcac cctggtggac 5580
[0104]	acctgaagc aggagaccaa cgacgtgcc agcgagagcg tggatgaacac catcctgagc 5640
[0105]	atgccgaca gctgcaagac ccagaccag aagagcaagg aggccaagac caccatcgac 5700
[0106]	agcttcctgc gcgagcactt cgtgttcgac cccaacctgc acgcccagag cgcctacacc 5760
[0107]	tgcgccgaca ccaacgtgga cacctgcgcc agcatgtgcg ccgacaccaa cgtggacacc 5820
[0108]	tgcgccagca tgtgcccga caccaactg gacacctgc ccagcactg caccagcacc 5880
[0109]	gagtacaccg acctggcca ccccgagcg atccccctgc acatcatgca gaagacctg 5940
[0110]	aacgtgcca acgagctgca ggccgacatc gacgccatca cccagacccc ccagggctac 6000
[0111]	cgcgccgccc cccacatcct gcagaacatc gagctgcacc agagcatcaa gcacatgctg 6060
[0112]	gagaaccccc gcgcttcaa gcccatcctg ttcaacacca agatcaccg ctacctgagc 6120
[0113]	cagcacatcc cccccagga caccttctac aagtggaaact actacatcga ggacaactac 6180
[0114]	gaggagctgc gcgcccac cgagagcatc taccgagaga agcccgacct ggagttcgcc 6240
[0115]	ttcatcatct acgacgtggt ggacagcagc aaccagcaga aggtggacga gttctactac 6300
[0116]	aagtacaagg accagatctt cagcgaggtg agcagcatcc agctgggcaa ctggacctg 6360
[0117]	ctgggcagct tcaaggccaa ccgagcgc tacaactact tcaaccagaa caacgagatc 6420
[0118]	atcaagcgca tcctggaccg ccacgaggag gacctgaaga tcggcaagga gatcctgcgc 6480
[0119]	aacaccatct accacaagaa ggccaagaac atccaggaga ccggccccga cgccccggc 6540
[0120]	ctgagcatct acaacagcac cttccacacc gacagcgca tcaaggcct gctgagcttc 6600
[0121]	aaggagctga agaacctgga gaaggccagc ggcaacatca agaaggccc cgagtacgac 6660
[0122]	ttcatcgagc actgagagga gaagatcaag cagctgctga gcaaggagaa cctgaccccc 6720
[0123]	gacgaggaga gcgagctgat caagaccaag aagcagctgg acaacgcct ggagatgctg 6780
[0124]	aacgtgcccg acgacaccat ccgctggac atgtgggtga acaacaaca caagctggag 6840
[0125]	aaggagatcc tgtacaccaa ggccgagctg taaaatcaac ctctggatta caaaatttgt 6900



[0126] gaaagattga ctggtattct taactatggt gctccttita cgctatgtgg atacgctgct 6960  
[0127] ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggcct tcattttctc ctccttgtat 7020  
[0128] aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccc ttgtcaggca acgtggcgtg 7080  
[0129] gtgtgcaactg tgtttctga cgcaaccccc actggttggg gcattgccac cacctgtcag 7140  
[0130] ctctttccg ggactttcgc tttccccctc cctattgccg cggcggaact catcgccgcc 7200  
[0131] tgcttggccc gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg 7260  
[0132] tcggggaaat catgctcctt tccttggctg ctgectgtg ttgccacctg gattctgcgc 7320  
[0133] gggagctct tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag cggaccttc tccccgggc 7380  
[0134] ctgctgccgg ctctgcggcc tcttcgcgt cttegcctc gccctcagac gagtcggatc 7440  
[0135] tccctttggg ccgcctcccc gccthmvc tcttgacatt gattattgac tagttattaa 7500  
[0136] tagtaataca ttacggggtc attagttcat agccatata tggagtccg cgttacataa 7560  
[0137] cttacggtaa atggcccc tggtgaccg cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata 7620  
[0138] atgacgtatg ttccatagt aacgccaata gggacttcc attgacgtca atgggtggag 7680  
[0139] tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc 7740  
[0140] cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta 7800  
[0141] tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 7860  
[0142] cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggttg actcacggg atttccaagt 7920  
[0143] ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtgtg ttttggcacc aaaatcaac ggactttcca 7980  
[0144] aatgtcgtg acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtg acggtgggag 8040  
[0145] gtctatataa gcagagctct ctggtaact accggtgcca ccatgccagc agccaagcgg 8100  
[0146] aactacatcc tgggctgga catcgcatc accagcgtg gctacggcat catcgactac 8160  
[0147] gagacacggg acgtgatcga tgccggcgtg cggctgttca aagaggcca cgtggaaaac 8220  
[0148] aacgagggca ggcgagcaa gagaggccc agaaggctga agcggcggag gcggcataga 8280  
[0149] atccagagag tgaagaagct gctgttcgac tacaacctgc tgaccacca cagcagctg 8340  
[0150] agcggcatca accctacga ggccagagt aaggcctga gccagaagct gagcaggaa 8400  
[0151] gagtctctg ccgccctgct gcacctggc aagagaagag gcgtgcaca cgtgaacgag 8460  
[0152] gtggaagagg acaccgcaa cgagctgtc accaaagagc agatcagcc gaacagcaag 8520  
[0153] gccctggaag agaaatacgt ggccgaactg cagctggaac ggctgaagaa agacggcga 8580  
[0154] gtgcggggca gcatcaacag attcaagacc agcactacg tgaagaagc caaacagctg 8640  
[0155] ctgaaggtgc agaaggccta ccaccagctg gaccagact tcatcgacac ctacatcgac 8700  
[0156] ctgctgaaa cccggcggac ctactatgag ggacctggc agggcagccc ctteggctg 8760  
[0157] aaggacatca aagaatggtg cgagatgctg atgggccact gcacctact ccccgaggaa 8820  
[0158] ctgcggagcg tgaagtacg ctacaacgc gacctgtaca acgccctgaa cgacctgaa 8880  
[0159] aatctcgtg taccagga cgagaacgag aagctggaat attacgagaa gttccagatc 8940  
[0160] atcgagaacg tttcaagca gaagaagaag cccacctga agcagatgc caaagaaatc 9000  
[0161] ctctgaaacg aaggatat taagggtac agagtacca gcaccgcaa gcccgagttc 9060  
[0162] accaacctga aggtgtacca cgacatcaag gacattaccg cccgaaaga gattattgag 9120  
[0163] aacccgagc tgctggatca gattgccaag atcctgacca tctaccagag cagcaggac 9180  
[0164] atccaggaag aactgacca tctgaactc gagctgacc aggaagagat cgagcagatc 9240  
[0165] tctaactgta agggctatac cggcaccac aacctgacc tgaaggccat caacctgatc 9300  
[0166] ctggacgagc tgtggcacac caacgacaac cagatcgta tcttcaaccg gctgaagctg 9360  
[0167] gtgccaaga aggtggacct gtcccagcag aaagagatcc ccaccacct ggtggacgac 9420

[0168] ttcatcctga gccccgtcgt gaagagaagc ttcatccaga gcatcaaagt gatcaacgcc 9480  
[0169] atcatcaaga agtacggcct gcccaacgac atcattatcg agctggcccc cgagaagaac 9540  
[0170] tccaaggacg cccagaaaat gatcaacgag atgcagaagc ggaaccggca gaccaacgag 9600  
[0171] cggatcgagg aatcatccg gaccaccggc aaagagaacg ccaagtacct gatcgagaag 9660  
[0172] atcaagctgc acgacatgca ggaaggcaag tgcctgtaca gcctggaagc catccctctg 9720  
[0173] gaagatctgc tgaacaaccc cttcaactat gaggtggacc acatcatccc cagaagcgtg 9780  
[0174] tccttcgaca acagcttcaa caacaagtg ctcgtgaagc aggaagaaaa cagcaagaag 9840  
[0175] ggcaaccgga cccattcca gtacctgagc agcagcgaca gcaagatcag ctacgaaacc 9900  
[0176] ttcaagaagc acatcctgaa tctggccaag ggcaaggca gaatcagcaa gaccaagaaa 9960  
[0177] gagtatctgc tggagaacg ggacatcaac aggttctccg tgcagaaaaga cttcatcaac 10020  
[0178] cggaacctgg tggataccag atacgccacc agaggcctga tgaacctgct gcgagactac 10080  
[0179] ttcagagtga acaacctgga cgtgaaagt aagtccatca atggcggett caccagcttt 10140  
[0180] ctgcggcgga agtggaaagt taagaaagag cggaacaagg ggtacaagca ccacgccgag 10200  
[0181] gacgccctga tcattgcaa cgccgattc atcttcaaag agtggaaaga actggacaag 10260  
[0182] gccaaaaaag tgatggaaaa ccagatgttc gaggaaaagc aggccgagag catgcccgag 10320  
[0183] atcgaaacg agcaggagta caaagatc ttcatcccc cccaccagat caagcacatt 10380  
[0184] aaggacttca aggactacaa gtacagccac cgggtggaca agaagcctaa tagagagctg 10440  
[0185] attaacgaca ccctgtactc caccgggaag gacgacaagg gcaacaccct gatcgtgaac 10500  
[0186] aatctgaacg gcctgtacga caaggacaat gacaagctga aaaagctgat caacaagagc 10560  
[0187] cccgaaaagc tgctgatgta ccaccagac cccagacct accagaaact gaagctgatt 10620  
[0188] atggaacagt acggcgacga gaagaatccc ctgtacaagt actacagga aaccgggaac 10680  
[0189] tacctgacca agtactcaa aaaggacaac ggccccgtga tcaagaagat taagtattac 10740  
[0190] ggcaacaaac tgaacgcca tctggacatc accgacgact accccaacag cagaaacaag 10800  
[0191] gtcgtgaagc tgctcctgaa gccctacaga ttcgacgtgt acctggacaa tggcgtgtac 10860  
[0192] aagttcgtga ccgtgaagaa tctggatgtg atcaaaaaag aaaactacta cgaagtgaat 10920  
[0193] agcaagtgtc atgaggaagc taagaagtgt aagaagatca gcaaccagge cgagttttatc 10980  
[0194] gcctccttct acaacaacga tctgatcaag atcaacggcg agctgtatag agtgatcggc 11040  
[0195] gtgaacaacg acctgtgaa ccggatcga gtgaacatga tcgacatcac ctaccgag 11100  
[0196] tacctggaaa acatgaacga caagagcccc cccagatca ttaagacaat cgcctccaag 11160  
[0197] acccagagca ttaagaagta cagcacagac attctgggca acctgtatga agtgaatct 11220  
[0198] aagaagcacc ctcatatcat caaaaaggc taactgtgcc ttctagtgtc cagccatctg 11280  
[0199] ttgtttgcc ctccccgtg cttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt 11340  
[0200] cctaataaaa tgaggaatt gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 11400  
[0201] gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga gaatagcagg catgctgggg 11460  
[0202] aggtcgaggg cctatttccc atgattcctt catatttga tatacgatac aaggctgtta 11520  
[0203] gagagataat tggaattaat ttgactgtaa acacaaagat attagtacaa aatacgtgac 11580  
[0204] gtagaaagta ataatttctt gggtagtgtg cagttttaa attatgtttt aaaatggact 11640  
[0205] atcatatgct taccgtaact tgaagatatt tcgatttctt ggctttatat atcttgtgga 11700  
[0206] aaggacgaaa caccggcttc aaacgttcc tcgcagtttt agtactctgg aaacagaatc 11760  
[0207] tactaaaaca aggcaaatg ccgtgtttat ctcgttttta gtactctgga aacagaatct 11820  
[0208] actaaaaca ggcaaatgc cgtgtttatc tcgtcaactt gttggcgaga tttttgacgc 11880  
[0209] gtatctcccc cggtcgtctg gccctgtctc gcgcgcgct gcgccccgtc gtgcggacgc 11940

[0210]	ggtccgaccc cacggcgccg ttctacatca ccaccgagac gcacgagctg acgcgggcgc 12000
[0211]	ccccggcgga cggctcgaag cccggggagc ccctcaggat cagcccacc cgcgggctgg 12060
[0212]	acacggagtg gtcgtccgtc ctgaacggga tccagtacct gaactcgggg gcccggggca 12120
[0213]	cggccccctg ccacctgtgg atcctggggc cgcggacct ctgcgaccag gtgctcctgg 12180
[0214]	ccgctccccg cagcaccgcc gccggagcct cccacgccca gacgggcgcg cgcctgacct 12240
[0215]	ggcgccggcc cgggctgacg gacgccgacg ccctggacgt gatcgtcgcc gggatccagg 12300
[0216]	cgaccgcgcg catgttcgcg cgggtccaca accgctctg gcgccagcc ggcgagtgga 12360
[0217]	cggaggccct gactcccag atcgtgacct ggggagcgt gcgccggcg cgaggcgggc 12420
[0218]	gcggcaacgg acgcgagcg gcccccgcat gtaccatctc ctagacggca ggatctctcc 12480
[0219]	gcgtccccca ccccccaaa aaacaacaa taaacgtct cgctctggca cccgatgaca 12540
[0220]	cgcctccgtc ctctctctcc ctcccactga cgcaccct cccctcgccg acaacgceat 12600
[0221]	cgteggccgg cgteggccgg accggcggtt ctccccca cccgtcccc cccaccctg 12660
[0222]	ccccccccac ccctgcccc gcttcgctcg actctcgccc cccgcgggag ggttcgcg 12720
[0223]	ctcgtcccc gtctcatccc cccgtctcat cccccgtct cactccatc tccctccctc 12780
[0224]	caccctctct catccccca tctccctcc ccacgaggc cgggagggga aaaaacgccc 12840
[0225]	gagagacgag agagttgagg ttcgagcggc gggccgccc g 12881
[0226]	<210> 2
[0227]	<211> 360
[0228]	<212> PRT
[0229]	<213> 人工序列(African swine fever virus CDV2)
[0230]	<400> 2
[0231]	Met Ile Ile Leu Ile Phe Leu Ile Phe Ser Asn Ile Val Leu Ser Ile
[0232]	1                    5                    10                    15
[0233]	Asp Tyr Trp Val Ser Phe Asn Lys Thr Ile Ile Leu Asp Ser Asn Ile
[0234]	20                    25                    30
[0235]	Thr Asn Asp Asn Asn Asp Ile Asn Gly Val Ser Trp Asn Phe Phe Asn
[0236]	35                    40                    45
[0237]	Asn Ser Phe Asn Thr Leu Ala Thr Cys Gly Lys Ala Gly Asn Phe Cys
[0238]	50                    55                    60
[0239]	Glu Cys Ser Asn Tyr Ser Thr Ser Ile Tyr Asn Ile Thr Asn Asn Cys
[0240]	65                    70                    75                    80
[0241]	Ser Leu Thr Ile Phe Pro His Asn Asp Val Phe Asp Thr Thr Tyr Gln
[0242]	85                    90                    95
[0243]	Val Val Trp Asn Gln Ile Ile Asn Tyr Thr Ile Lys Leu Leu Thr Pro
[0244]	100                    105                    110
[0245]	Ala Thr Pro Pro Asn Ile Thr Tyr Asn Cys Thr Asn Phe Leu Ile Thr
[0246]	115                    120                    125
[0247]	Cys Lys Lys Asn Asn Gly Thr Asn Thr Asn Ile Tyr Leu Asn Ile Asn
[0248]	130                    135                    140
[0249]	Asp Thr Phe Val Lys Tyr Thr Asn Glu Ser Ile Leu Glu Tyr Asn Trp
[0250]	145                    150                    155                    160
[0251]	Asn Asn Ser Asn Ile Asn Asn Phe Thr Ala Thr Cys Ile Ile Asn Asn

[0252]		165		170		175
[0253]	Thr Ile Ser Thr Ser Asn Glu Thr Thr Leu Ile Asn Cys Thr Tyr Leu					
[0254]		180		185		190
[0255]	Thr Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Tyr Thr Phe Phe Lys Leu Tyr Tyr Ile					
[0256]		195		200		205
[0257]	Pro Leu Ser Ile Ile Ile Gly Ile Thr Ile Ser Ile Leu Leu Ile Ser					
[0258]		210		215		220
[0259]	Ile Ile Thr Phe Leu Ser Leu Arg Lys Arg Lys Lys His Val Glu Glu					
[0260]		225		230		235
[0261]	Ile Glu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Asn Glu Glu Glu Gln Cys Gln His					
[0262]		245		250		255
[0263]	Asp Asp Thr Thr Ser Ile His Glu Pro Ser Pro Arg Glu Pro Leu Leu					
[0264]		260		265		270
[0265]	Pro Lys Pro Tyr Ser Arg Tyr Gln Tyr Asn Thr Pro Ile Tyr Tyr Met					
[0266]		275		280		285
[0267]	Arg Pro Ser Thr Gln Pro Leu Asn Pro Phe Pro Leu Pro Lys Pro Cys					
[0268]		290		295		300
[0269]	Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys Pro Cys Pro Pro Pro Lys					
[0270]		305		310		315
[0271]	Pro Cys Pro Ser Ala Glu Ser Tyr Ser Pro Pro Lys Pro Leu Pro Ser					
[0272]		325		330		335
[0273]	Ile Pro Leu Leu Pro Asn Ile Pro Pro Leu Ser Thr Gln Asn Ile Ser					
[0274]		340		345		350
[0275]	Leu Ile His Val Asp Arg Ile Ile					
[0276]		355		360		
[0277]	<210> 3					
[0278]	<211> 540					
[0279]	<212> PRT					
[0280]	<213> 人工序列 (African swine fever virus P72)					
[0281]	<400> 3					
[0282]	Met Val Gly His His Ile Leu Gly Ala Cys His Ser Ser Trp Gln Asp					
[0283]		1		5		10
[0284]	Ala Pro Ile Gln Gly Thr Ser Gln Met Gly Ala His Gly Gln Leu Gln					
[0285]		20		25		30
[0286]	Thr Phe Pro Arg Asn Gly Tyr Asp Trp Asp Asn Gln Thr Pro Leu Glu					
[0287]		35		40		45
[0288]	Gly Ala Val Tyr Thr Leu Val Asp Pro Phe Gly Arg Pro Ile Val Pro					
[0289]		50		55		60
[0290]	Gly Thr Lys Asn Ala Tyr Arg Asn Leu Val Tyr Tyr Cys Glu Tyr Pro					
[0291]		65		70		75
[0292]	Gly Glu Arg Leu Tyr Glu Asn Val Arg Phe Asp Val Asn Gly Asn Ser					
[0293]		85		90		95

[0294]	Leu Asp Glu Tyr Ser Ser Asp Val Thr Thr Leu Val Arg Lys Phe Cys
[0295]	100 105 110
[0296]	Ile Pro Gly Asp Lys Met Thr Gly Tyr Lys His Leu Val Gly Gln Glu
[0297]	115 120 125
[0298]	Val Ser Val Glu Gly Thr Ser Gly Pro Leu Leu Cys Asn Ile His Asp
[0299]	130 135 140
[0300]	Leu His Lys Pro His Gln Ser Lys Pro Ile Leu Thr Asp Glu Asn Asp
[0301]	145 150 155 160
[0302]	Thr Gln Arg Thr Cys Ser His Thr Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gln His
[0303]	165 170 175
[0304]	Phe Pro Glu Asn Ser His Asn Ile Gln Thr Ala Gly Lys Gln Asp Ile
[0305]	180 185 190
[0306]	Thr Pro Ile Thr Asp Ala Thr Tyr Leu Asp Ile Arg Arg Asn Val His
[0307]	195 200 205
[0308]	Tyr Ser Cys Asn Gly Pro Gln Thr Pro Lys Tyr Tyr Gln Pro Pro Leu
[0309]	210 215 220
[0310]	Ala Leu Trp Ile Lys Leu Arg Phe Trp Phe Asn Glu Asn Val Asn Leu
[0311]	225 230 235 240
[0312]	Ala Ile Pro Ser Val Ser Ile Pro Phe Gly Glu Arg Phe Ile Thr Ile
[0313]	245 250 255
[0314]	Lys Leu Ala Ser Gln Lys Asp Leu Val Asn Glu Phe Pro Gly Leu Phe
[0315]	260 265 270
[0316]	Val Arg Gln Ser Arg Phe Ile Ala Gly Arg Pro Ser Arg Arg Asn Ile
[0317]	275 280 285
[0318]	Arg Phe Lys Pro Trp Phe Ile Pro Gly Val Ile Asn Glu Ile Ser Leu
[0319]	290 295 300
[0320]	Thr Asn Asn Glu Leu Tyr Ile Asn Asn Leu Phe Val Thr Pro Glu Ile
[0321]	305 310 315 320
[0322]	His Asn Leu Phe Val Lys Arg Val Arg Phe Ser Leu Ile Arg Val His
[0323]	325 330 335
[0324]	Lys Thr Gln Val Thr His Thr Asn Asn Asn His His Asp Glu Lys Leu
[0325]	340 345 350
[0326]	Met Ser Ala Leu Lys Trp Pro Ile Glu Tyr Met Phe Ile Gly Leu Lys
[0327]	355 360 365
[0328]	Pro Thr Trp Asn Ile Ser Asp Gln Asn Pro His Gln His Arg Asp Trp
[0329]	370 375 380
[0330]	His Lys Phe Gly His Val Val Asn Ala Ile Met Gln Pro Thr His His
[0331]	385 390 395 400
[0332]	Ala Glu Ile Ser Phe Gln Asp Arg Asp Thr Ala Leu Pro Asp Ala Cys
[0333]	405 410 415
[0334]	Ser Ser Ile Ser Asp Ile Ser Pro Val Thr Tyr Pro Ile Thr Leu Pro
[0335]	420 425 430

[0336]	Ile Ile Lys Asn Ile Ser Val Thr Ala His Gly Ile Asn Leu Ile Asp
[0337]	435 440 445
[0338]	Lys Phe Pro Ser Lys Phe Cys Ser Ser Tyr Ile Pro Phe His Tyr Gly
[0339]	450 455 460
[0340]	Gly Asn Ala Ile Lys Thr Pro Asp Asp Pro Gly Ala Met Met Ile Thr
[0341]	465 470 475 480
[0342]	Phe Ala Leu Lys Pro Arg Glu Glu Tyr Gln Pro Ser Gly His Ile Asn
[0343]	485 490 495
[0344]	Val Ser Arg Ala Arg Glu Phe Tyr Ile Ser Trp Asp Thr Asp Tyr Val
[0345]	500 505 510
[0346]	Gly Ser Ile Thr Thr Ala Asp Leu Val Val Ser Ala Ser Ala Ile Asn
[0347]	515 520 525
[0348]	Phe Leu Leu Leu Gln Asn Gly Ser Ala Val Leu Arg
[0349]	530 535 540
[0350]	<210> 4
[0351]	<211> 530
[0352]	<212> PRT
[0353]	<213> 人工序列(African swine fever virus BL602)
[0354]	<400> 4
[0355]	Met Ala Glu Phe Asn Ile Asp Glu Leu Leu Lys Asn Val Leu Glu Asp
[0356]	1 5 10 15
[0357]	Pro Ser Thr Glu Ile Ser Glu Glu Thr Leu Lys Gln Leu Tyr Gln Arg
[0358]	20 25 30
[0359]	Thr Asn Pro Tyr Lys Gln Phe Lys Asn Asp Ser Arg Val Ala Phe Cys
[0360]	35 40 45
[0361]	Ser Phe Thr Asn Leu Arg Glu Gln Tyr Ile Arg Arg Leu Ile Met Thr
[0362]	50 55 60
[0363]	Ser Phe Ile Gly Tyr Val Phe Lys Ala Leu Gln Glu Trp Met Pro Ser
[0364]	65 70 75 80
[0365]	Tyr Ser Lys Pro Thr His Thr Thr Lys Thr Leu Leu Ser Glu Leu Ile
[0366]	85 90 95
[0367]	Thr Leu Val Asp Thr Leu Lys Gln Glu Thr Asn Asp Val Pro Ser Glu
[0368]	100 105 110
[0369]	Ser Val Val Asn Thr Ile Leu Ser Ile Ala Asp Ser Cys Lys Thr Gln
[0370]	115 120 125
[0371]	Thr Gln Lys Ser Lys Glu Ala Lys Thr Thr Ile Asp Ser Phe Leu Arg
[0372]	130 135 140
[0373]	Glu His Phe Val Phe Asp Pro Asn Leu His Ala Gln Ser Ala Tyr Thr
[0374]	145 150 155 160
[0375]	Cys Ala Asp Thr Asn Val Asp Thr Cys Ala Ser Met Cys Ala Asp Thr
[0376]	165 170 175
[0377]	Asn Val Asp Thr Cys Ala Ser Met Cys Ala Asp Thr Asn Val Asp Thr

[0378]	180	185	190
[0379]	Cys Ala Ser Thr Cys Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Asp Leu Ala Asp Pro		
[0380]	195	200	205
[0381]	Glu Arg Ile Pro Leu His Ile Met Gln Lys Thr Leu Asn Val Pro Asn		
[0382]	210	215	220
[0383]	Glu Leu Gln Ala Asp Ile Asp Ala Ile Thr Gln Thr Pro Gln Gly Tyr		
[0384]	225	230	240
[0385]	Arg Ala Ala Ala His Ile Leu Gln Asn Ile Glu Leu His Gln Ser Ile		
[0386]	245	250	255
[0387]	Lys His Met Leu Glu Asn Pro Arg Ala Phe Lys Pro Ile Leu Phe Asn		
[0388]	260	265	270
[0389]	Thr Lys Ile Thr Arg Tyr Leu Ser Gln His Ile Pro Pro Gln Asp Thr		
[0390]	275	280	285
[0391]	Phe Tyr Lys Trp Asn Tyr Tyr Ile Glu Asp Asn Tyr Glu Glu Leu Arg		
[0392]	290	295	300
[0393]	Ala Ala Thr Glu Ser Ile Tyr Pro Glu Lys Pro Asp Leu Glu Phe Ala		
[0394]	305	310	320
[0395]	Phe Ile Ile Tyr Asp Val Val Asp Ser Ser Asn Gln Gln Lys Val Asp		
[0396]	325	330	335
[0397]	Glu Phe Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asp Gln Ile Phe Ser Glu Val Ser Ser		
[0398]	340	345	350
[0399]	Ile Gln Leu Gly Asn Trp Thr Leu Leu Gly Ser Phe Lys Ala Asn Arg		
[0400]	355	360	365
[0401]	Glu Arg Tyr Asn Tyr Phe Asn Gln Asn Asn Glu Ile Ile Lys Arg Ile		
[0402]	370	375	380
[0403]	Leu Asp Arg His Glu Glu Asp Leu Lys Ile Gly Lys Glu Ile Leu Arg		
[0404]	385	390	400
[0405]	Asn Thr Ile Tyr His Lys Lys Ala Lys Asn Ile Gln Glu Thr Gly Pro		
[0406]	405	410	415
[0407]	Asp Ala Pro Gly Leu Ser Ile Tyr Asn Ser Thr Phe His Thr Asp Ser		
[0408]	420	425	430
[0409]	Gly Ile Lys Gly Leu Leu Ser Phe Lys Glu Leu Lys Asn Leu Glu Lys		
[0410]	435	440	445
[0411]	Ala Ser Gly Asn Ile Lys Lys Ala Arg Glu Tyr Asp Phe Ile Asp Asp		
[0412]	450	455	460
[0413]	Cys Glu Glu Lys Ile Lys Gln Leu Leu Ser Lys Glu Asn Leu Thr Pro		
[0414]	465	470	480
[0415]	Asp Glu Glu Ser Glu Leu Ile Lys Thr Lys Lys Gln Leu Asp Asn Ala		
[0416]	485	490	495
[0417]	Leu Glu Met Leu Asn Val Pro Asp Asp Thr Ile Arg Val Asp Met Trp		
[0418]	500	505	510
[0419]	Val Asn Asn Asn Asn Lys Leu Glu Lys Glu Ile Leu Tyr Thr Lys Ala		

	515	520	525
[0420]			
[0421]	Glu Leu		
[0422]	530		
[0423]	<210> 5		
[0424]	<211> 21		
[0425]	<212> DNA		
[0426]	<213> 人工序列(引物GIF)		
[0427]	<400> 5		
[0428]	ggaggcgcgc cgctattaa t 21		
[0429]	<210> 6		
[0430]	<211> 21		
[0431]	<212> DNA		
[0432]	<213> 人工序列(引物GIR)		
[0433]	<400> 6		
[0434]	cgagccgggg gagatacgcg t 21		
[0435]	<210> 7		
[0436]	<211> 47		
[0437]	<212> DNA		
[0438]	<213> 人工序列(引物F1)		
[0439]	<400> 7		
[0440]	ggaggcgcgc cgctattaa ttctagagat atactgagtc attaggg 47		
[0441]	<210> 8		
[0442]	<211> 31		
[0443]	<212> DNA		
[0444]	<213> 人工序列(引物R1)		
[0445]	<400> 8		
[0446]	gggcaccgga gcgatcttag gggccggggt t 31		
[0447]	<210> 9		
[0448]	<211> 31		
[0449]	<212> DNA		
[0450]	<213> 人工序列(引物F2)		
[0451]	<400> 9		
[0452]	aaccccgccc cctaagatcg ctccggtgcc c 31		
[0453]	<210> 10		
[0454]	<211> 39		
[0455]	<212> DNA		
[0456]	<213> 人工序列(引物R2)		
[0457]	<400> 10		
[0458]	gtcaataatc aatgtcaaga ggaggcgggg aggcggccc 39		
[0459]	<210> 11		
[0460]	<211> 24		
[0461]	<212> DNA		



- [0462] <213> 人工序列(引物F3)  
[0463] <400> 11  
[0464] cctcttgaca ttgattattg acta 24  
[0465] <210> 12  
[0466] <211> 53  
[0467] <212> DNA  
[0468] <213> 人工序列(引物R3)  
[0469] <400> 12  
[0470] cagggccagc gagccggggg agattcgcgt caaaaatctc gccacaagt tga 53  
[0471] <210> 13  
[0472] <211> 36  
[0473] <212> DNA  
[0474] <213> 人工序列(引物gIF)  
[0475] <400> 13  
[0476] ggcgtaaca tcctaccga cttcatggtg gcgctc 36  
[0477] <210> 14  
[0478] <211> 24  
[0479] <212> DNA  
[0480] <213> 人工序列(引物CVD2R)  
[0481] <400> 14  
[0482] ttagatgatg cggccacgt ggat 24  
[0483] <210> 15  
[0484] <211> 25  
[0485] <212> DNA  
[0486] <213> 人工序列(引物BL601F)  
[0487] <400> 15  
[0488] cgccgacctg gtggtgagcg ccagc 25  
[0489] <210> 16  
[0490] <211> 28  
[0491] <212> DNA  
[0492] <213> 人工序列(引物P72R)  
[0493] <400> 16  
[0494] tggatgttct tggccttctt gtggtaga 28  
[0495] <210> 17  
[0496] <211> 28  
[0497] <212> DNA  
[0498] <213> 人工序列(引物US2F)  
[0499] <400> 17  
[0500] gaagaatccc ctgtacaagt actacgag 28  
[0501] <210> 18  
[0502] <211> 28  
[0503] <212> DNA

- [0504] <213> 人工序列(引物US2R)
- [0505] <400> 18
- [0506] cacaggtgga cgggggccgt gccccggg 28
- [0507] <210> 19
- [0508] <211> 240
- [0509] <212> DNA
- [0510] <213> 人工合成(野生型P72基因)
- [0511] <400> 19
- [0512] atggtgggcc atcatatatt gggatcatgt cattcatcct ggcaggatgc tccgattcag 60
- [0513] ggcacgtccc agatgggggc ccatgggcag cttcaaactt ttcctcgcaa cggatgatgac 120
- [0514] tgggacaacc aaacaccctt agaggggccc gtttacacgc ttgtagatcc ttttgggaaga 180
- [0515] cccattgtac ccggcaca aaa gaatgcgtac cgaaacttgg tttactactg cgaatacccc 240

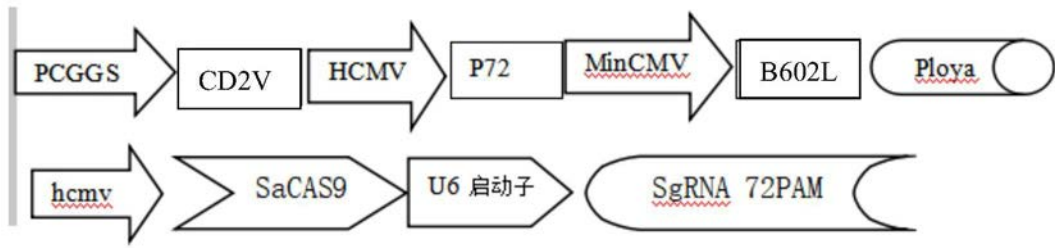


图1

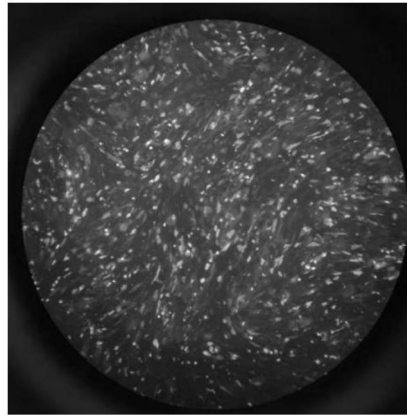


图2

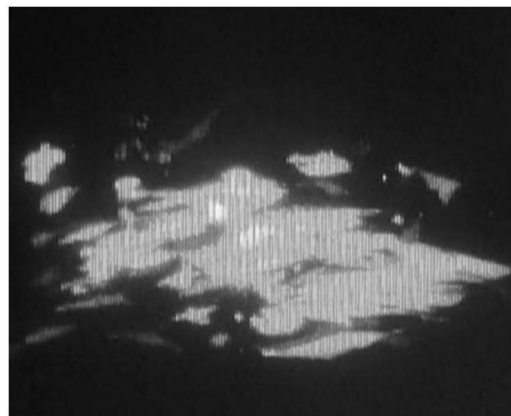


图3

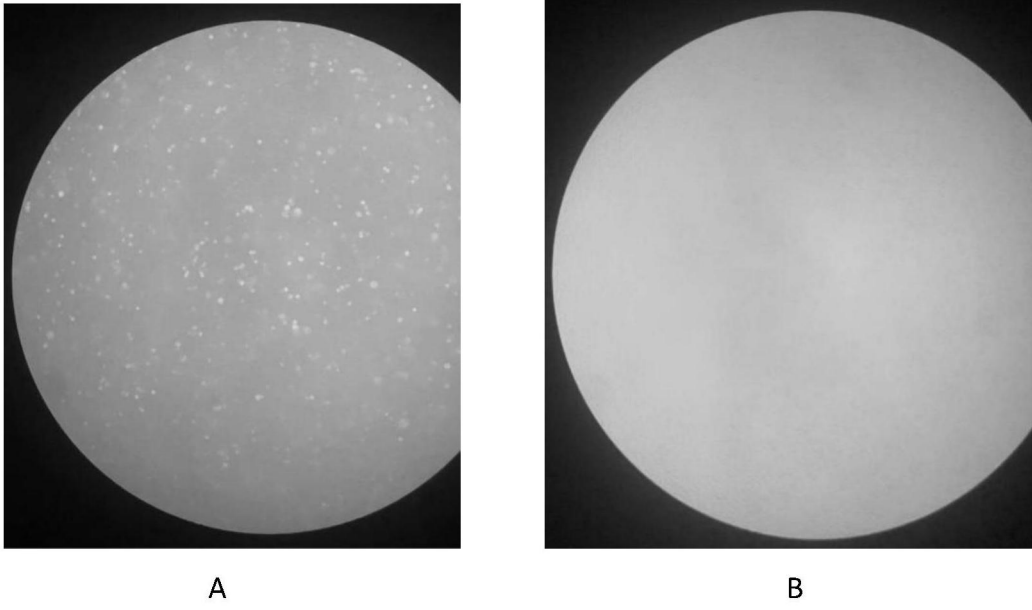


图4

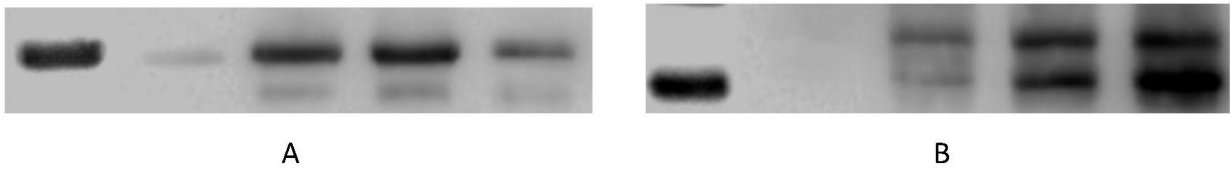


图5

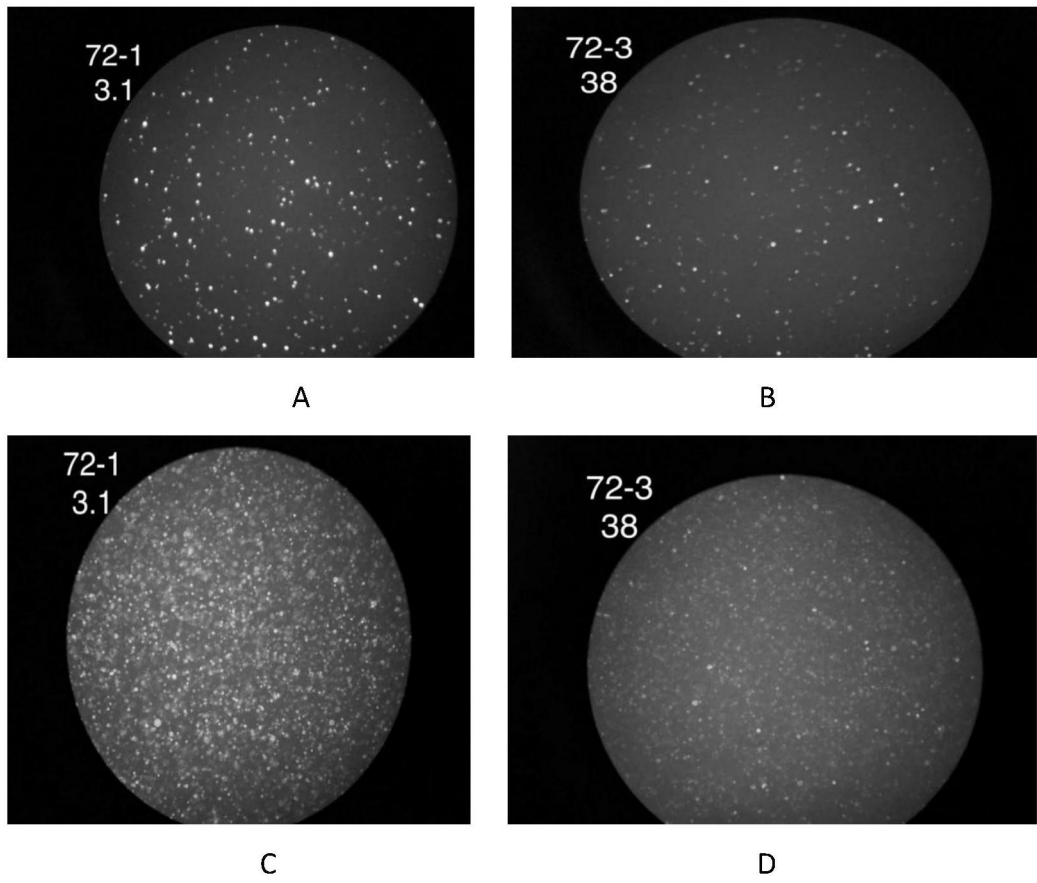


图6

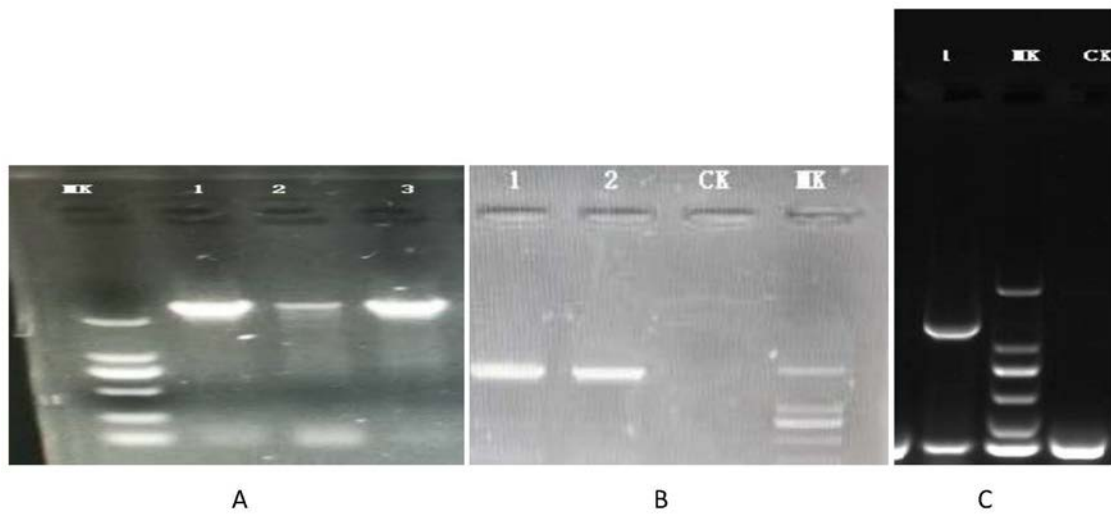


图7

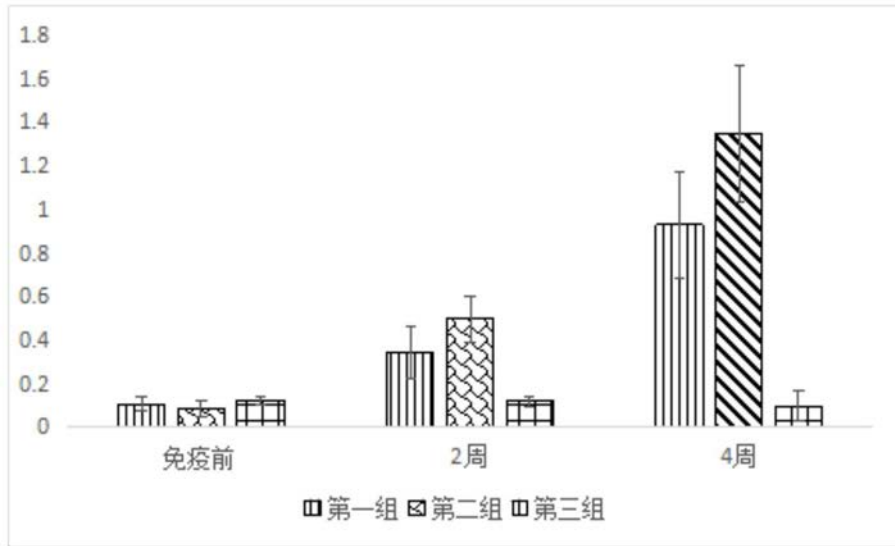


图8