

[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 03803467.0

[51] Int. Cl.
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1323162C

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/02 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

[22] 申请日 2003.1.13 [21] 申请号 03803467.0

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 11 [33] EP [31] 02075089.9

[86] 国际申请 PCT/NL2003/000020 2003. 1. 13

[87] 国际公布 WO2003/058248 英 2003. 7. 17

[85] 进入国家阶段日期 2004. 8. 6

[73] 专利权人 动物饲养与动物健康研究有限公司

地址 荷兰莱利斯塔德

[72] 发明人 P·T·J·威廉姆森

S·F·维斯特芬 D·巴克尔

F·G·范兹德维尔德

J·E·R·瑟尔

[56] 参考文献

CN 1342771A 2002.4.3

WO 9216628A1 1992.10.1

US 5225324A 1993.7.6

Characterization of a specific Mycobacterium paratuberculosis recombinant clone expressing 35,000 - molecular - weight antigen and reactivity with sera from animals with clinical and subclinical Johne's disease. EL - ZAATARI FOUAD A K ET AL, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Vol. 35 No. 7 1997

审查员 彭郁葱

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 赵艳华

权利要求书 2 页 说明书 70 页 附图 2 页

[54] 发明名称

副结核分枝杆菌感染的诊断和疫苗

[57] 摘要

本发明涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列，这种核酸序列的一部分，它编码这种蛋白的免疫原性片段，包含这种核酸序列或其一部分的 DNA 片段、重组 DNA 分子、活重组载体和宿主细胞。本发明也涉及这种序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性部分。此外，本发明涉及包含这种核酸序列或其一部分、包含这种核酸序列或其一部分的 DNA 片段、重组 DNA 分子、活重组载体和宿主细胞、蛋白或其免疫原性部分和抗这种蛋白或其免疫原性部分的抗体的疫苗。另外，本发明涉及所述蛋白在疫苗和制备疫苗中的用途。而且，本发明涉及所述核酸序列、蛋白或抗体用于诊断或接种目的的用途。而且，本发明涉及制备这种疫苗的方法。最后本发明涉及包含这种核酸、蛋白或抗这种蛋白的抗体的诊断试剂盒。

1) 编码 9kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列, 所述核酸序列在鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 316F 中具有如 SEQ ID NO:5 描述的核酸序列。

2) 包含根据权利要求 1 的核酸序列的 DNA 片段。

3) 包含在功能性连接的启动子控制下的根据权利要求 1 的核酸序列或根据权利要求 2 的 DNA 片段的重组 DNA 分子。

4) 包含根据权利要求 1 的核酸序列、根据权利要求 2 的 DNA 片段或根据权利要求 3 的重组 DNA 分子的活重组载体。

5) 包含根据权利要求 1 的核酸序列、根据权利要求 2 的 DNA 片段、根据权利要求 3 的重组 DNA 分子或根据权利要求 4 的活重组载体的宿主细胞。

6) 9kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白, 其在鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 316F 中具有如 SEQ ID NO:6 描述的氨基酸序列。

7) 根据权利要求 6 的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白, 其特征在于所述蛋白由根据权利要求 1 的核酸序列编码。

8) 根据权利要求 1 的核酸序列、根据权利要求 2 的 DNA 片段、根据权利要求 3 的重组 DNA 分子、根据权利要求 4 的活重组载体、根据权利要求 5 的宿主细胞或根据权利要求 6 的蛋白在制备对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗中的应用。

9) 对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗, 其特征在于所述疫苗包含至少一种根据权利要求 6 的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和药物可接受载体。

10) 对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗, 其特征在于所述疫苗包含根据权利要求 1 的核酸序列、根据权利要求 2 的 DNA 片段、根据权利要求 3 的重组 DNA 分子、根据权利要求 4 的活重组载体或根据权利要求 5 的宿主细胞和药物可接受载体。

11) 对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗, 其特征在于所述疫苗

包含抗根据权利要求 6 的蛋白的抗体和药物可接受载体。

12)根据权利要求 9-11 任一项的疫苗,其特征在于所述疫苗包含佐剂。

13)根据权利要求 9-12 任一项的疫苗,其特征在于所述疫苗包含得自对牛致病的微生物的另外的抗原、抗所述抗原的抗体或编码所述抗原的遗传信息。

14)根据权利要求 13 的疫苗,其特征在于所述对牛致病的微生物选自下组:牛疱疹病毒、牛病毒性腹泻病毒、3 型副流感病毒、牛副粘液病毒、口蹄疫病毒、溶血巴斯德氏菌、牛呼吸道合胞病毒、泰累尔氏梨浆虫属、巴贝虫属、锥虫属种、微粒孢子虫属、*Neospora caninum*、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、支原体属、大肠杆菌、肠杆菌属、克雷伯氏菌属、柠檬酸杆菌属和停乳链球菌。

15)根据权利要求 9-14 任一项的疫苗的制备方法,所述方法包括将根据权利要求 1 的核酸序列、根据权利要求 2 的 DNA 片段、根据权利要求 3 的重组 DNA 分子、根据权利要求 4 的活重组载体、根据权利要求 5 的宿主细胞、根据权利要求 6 的蛋白或抗根据权利要求 6 的蛋白的抗体与药物可接受载体混合。

16)诊断试剂盒,包括合适的检测工具和根据权利要求 1 的核酸序列或其引物、根据权利要求 6 的蛋白,或与根据权利要求 6 的蛋白反应的抗体。

17)用于鉴定根据权利要求 6 的蛋白的免疫原性片段的方法,包括检测根据权利要求 1 的核酸中的表位,和产生由所述表位编码的蛋白。

副结核分枝杆菌感染的诊断和疫苗

本发明涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种(*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*)蛋白的核酸序列,这种核酸序列的一部分,它编码这种蛋白的免疫原性片段,包含这种核酸序列或其一部分的DNA片段、重组DNA分子、活重组载体和宿主细胞。本发明也涉及这种序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性部分。此外,本发明涉及包含这种核酸序列或其一部分、包含这种核酸序列或其一部分的DNA片段、重组DNA分子、活重组载体和宿主细胞、蛋白或其免疫原性部分和抗这种蛋白或其免疫原性部分的抗体的疫苗。而且,本发明涉及所述蛋白在疫苗和制备疫苗中的用途。而且,本发明涉及所述核酸序列、蛋白或抗体用于诊断或接种目的的用途。而且,本发明涉及制备这种疫苗的方法。最后本发明涉及包含这种核酸、蛋白或抗这种蛋白的抗体的诊断试剂盒。

分枝杆菌属的细菌是革兰氏阳性抗酸生物体。该属包括许多重要的人和动物病原体。其中,鸟分枝杆菌副结核亚种是副结核或 Johne's 疾病的病因物质,引起很多反刍动物疾病的慢性肉芽肿感染,目前对很多肉类和牛奶工业造成基本上是全世界的经济损失。全世界很大比例的兽群(在21-70%之间)被感染。在欧洲,估计每年的损失是大约 GBP 207/奶牛。在美国,估计每年的损失是大约 15 亿美元。(Harris, N. B.和 Barletta, R. G., *Clinical Microbiology Reviews* 14:489-512 (2001))。

除了其对反刍动物的明显致病性之外,怀疑鸟分枝杆菌副结核亚种是 Crohn's 病的原因,Crohn's 病是一种人的非特异性慢性透壁炎性疾病,最常影响末端回肠和结肠,但也可以发生在从口至肛门的胃肠道的任何部分和肛周区域。(P. Quirke, *Gut* 2001,49 : 755-760 (2001)) ("Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis",

European Commission, D-G Health and Consumer Protection, Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2000年3月21日)。Crohn's病的主要问题之一是对该病不能治愈的事实。这种疾病状况一旦积聚，一生保持存在，引起很大的发病率。

巴氏消毒过的牛奶中存在意外的鸟分枝杆菌副结核亚种的比较耐热菌株连同怀疑其在 Crohn's 病发展中的作用也越来越引起关于其对人群潜在健康的关注的关注。Sung, N. 和 Collins, M. T. in Appl. Environm. Microbiol. 64: 999-1005 (1998)已经描述了这个最新的和意外的发现。

对该问题的认识的增加引起了发展控制和消灭副结核的有效诊断学和疫苗的重新紧迫需要。

鸟分枝杆菌包括一大组分枝杆菌，可以分成三个亚种，鸟分枝杆菌鸟亚种，鸟分枝杆菌唾液亚种和鸟分枝杆菌副结核亚种。鸟分枝杆菌鸟亚种广泛分布在自然环境中，包括土壤和表面健康的动物，以及鸟类和人类中。鸟分枝杆菌鸟亚种分离株是机会病原体并且通常对无免疫应答的宿主引起感染和疾病。目前测定了鸟分枝杆菌鸟亚种菌株 104 的完整基因组序列。鸟分枝杆菌唾液亚种可对鹿引起类似于副结核的疾病。尽管多数反刍动物在六个月龄前感染鸟分枝杆菌副结核亚种，但是临床病变通常仅存在在至少两岁后或更晚发生。在这期间，据信细菌存活在宿主细胞内，但是确实也发生胃肠腔中感染的细胞外发作（感染晚期频率增加），期间细菌变得可以检测到。目前可利用的针对鸟分枝杆菌副结核亚种的（免疫学）诊断学敏感性相对较低，特别是关于感染早期或潜伏期感染的检测，因此不能有效作为疾病控制的工具。虽然可以获得在某些检测上认为可有效使自由兽群不发生临床疾病的全细胞分枝杆菌疫苗，但是这些疫苗基本上都干扰牛肺结核的免疫诊断并且不抑制疾病的传播。迄今为止，已经鉴定了鸟分枝杆菌副结核亚种的抗原成分。以前描述的鸟分枝杆菌副结核亚种的抗原分子包括糖脂和用小试验动物中产生的基本上单一特异性早期血清鉴定的蛋白抗原。细胞壁糖脂分子脂质阿拉的甘露聚糖

(lipoarabinomannan)(LAM)是通过其被产生的抗细菌释放的细胞滤液的单克隆抗体识别而鉴定到的,并且随后被纯化和用于血清诊断学ELISA的开发(Mutharia等, *Infect. Immun.* 1997.65 : 387-394; Jark等, 1997. *Vet. Microbiol.* 57: 189-198)。此外,分子量 14kD(Olsen等 *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001.8 :797-801)、18 kD(bacterioferritin ; Elsaghier等 *Clin. Exp. Immunol.* 1992 90:503-508)、19 kD (AhpD; Olsen等, *Infect. Immun.* 2000.68 : 801-808)、24 kD (p24BCD; Elsaghier等 *Clin. Exp. Immunol.* 1992 90:503-508)、30 kD (p30; Burrels等; *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995.45 : 311-320)、34 kD (Gilot等 *J. Bact.*1993. 175: 4930-4935; De Kesel等 *J. Clin. Microbiol.* 1993.31 : 947-954; Coetsier等, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998.5 : 446-451)、34.5 kD (Mutharia等, *Infect. Immun.* 1997.65 :387-394,)、35 kD 蛋白(Dheenadhayalan 和 Chang, 未发表数据)、38 kD (Elsaghier等 *Clin. Exp. Immunol.* 199290: 503-508)、44.3 kD (Mutharia等, *Infect. Immun.* 1997.65 :387-394)、45 kD (AhpC; Olsen等, *Infect. Immun.* 2000.68 :801-808)、65 kD (hsp65; Koets等, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999.70 : 105-115)、70 kD (hsp70; Stevenson等, 1991. *Nucleic Acids Res.* 19: 4552; Koets等, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999.70 :105-115)的蛋白抗原和过氧化物歧化酶分子(Mullerad等, *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 34: 81 (2002))已经被鉴定和描述了(部分)特性。这些中仅少数被估价用于诊断学或疫苗(34 kD; Coetsier等, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998.5 :446-451) 。因此目前的诊断学和疫苗仍基于相当粗的抗原物质。DE19621488 和中 W09216628 已描述了脂质阿拉伯甘露聚糖(Mutharia等, *Infect. Immun.*1997. 65: 387-394 ; Jark等, 1997. *Vet. Microbiol.* 57: 189-198)和 34 kD 抗原(Gilot等 *J. Bact.* 1993.175 : 4930-4935; De Kesel等 *J. Clin. Microbiol.* 1993.31 : 947-954; Coetsier等, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998.5 : 446-451) 用于诊断和疫苗。已经提出几个其它分子用于诊断学、疫苗和治疗。有插入序列 ISM-1 (EP0288306 和 US

5225324;) 的编码蛋白,分枝杆菌 DAP 分子(US9523226), 36 kD 抗原(US5776692), 可溶性抗原制剂(RU2118538), 具有还原铁的能力的细胞外蛋白 (DE 19728834)和酰基转移酶(W09949054)。

本发明的一个目的是提供能够有助于保护哺乳动物,特别是人和牛不受鸟分枝杆菌副结核亚种感染的致病影响的多肽。而且,很多这些多肽和抗这些多肽的抗体提供了有效的诊断工具。

现在首次惊奇地发现在表达文库中可特异性鉴定和分离的九个不同的多肽,和在 proteomics 中可鉴定的两个另外的多肽,这些不同多肽中的每一个都能够诱导抗鸟分枝杆菌副结核亚种的免疫应答并适合作为疫苗成分。本发明已发现这些多肽可以单独或与彼此组合用作疫苗成分,提供确实有助于保护哺乳动物,特别是人和牛不受鸟分枝杆菌副结核亚种感染并且有助于降低鸟分枝杆菌副结核亚种引起的损害的疫苗。

三种不同的方法用于根据本发明的(编码疫苗成分的基因)疫苗成分和诊断学工具的检测。实施例中更详细地介绍这些方法。一个方法使用非常特异的抗血清检测表达文库中编码免疫反应性鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的基因。使用的抗血清在某种意义上不同于通常用于筛选表达文库的抗血清,即从感染鸟分枝杆菌副结核亚种很长时期的牛获得。而且,这些抗血清取自发现自然感染鸟分枝杆菌副结核亚种,但是没有感染肺结核、布鲁氏杆菌病或造白细胞组织增生(leucosis)的历史的牛。这通过下列发现证实,获得测试血清前大约两年长时间内的至少两个鸟分枝杆菌副结核亚种阳性粪便样品用于筛选,和基本上没有与副结核抗原发生交叉反应的抗引起肺结核的物质的抗体或其它免疫反应。由此获得的血清在鸟分枝杆菌副结核亚种抗原的免疫筛选中非常有效,因为它们非常广泛地反应对抗相关的鸟分枝杆菌副结核亚种肽片段,然而在另一方面,它们与引起肺结核、布鲁氏杆菌病或造白细胞组织增生(leucosis)的病原体显示基本上无或仅很低的特异反应性。

这个方法导致发现三个新的免疫原性蛋白,其编码序列在下面给

出的 SEQ ID NO:1、3 和 5 中描述。

现在已经克隆和测序了编码第一个蛋白的基因，包含免疫原性决定簇的该基因的核酸序列在 SEQ ID NO:1 中描述。全长基因编码分子量 28kD 的蛋白（如 SEQ ID NO:2 中描述）。

本领域熟知，很多不同的核酸序列可编码一个和相同的蛋白。普遍已知这个现象是编码氨基酸的每个三联体的第二和特别是第三个碱基的波动。这个现象可产生仍编码相同蛋白质的两个核酸序列的异种性。因此，原则上，具有低如 70% 序列同源性的两个核酸序列仍可编码一个和相同的蛋白。

因此，本发明的一个实施方案的一个形式涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO:1 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85% 的同源性。

下面定义了免疫原性片段的概念。编码免疫原性片段的核酸序列的长度通常至少 18 或更常 21 个核苷酸，但是优选 24、27、30、33 或甚至 36 个核苷酸。

由于本领域经常遇到的分子量测定的细微变异性，当在聚丙烯酰胺凝胶上凝胶电泳测定时，根据本发明的所有蛋白的分子量可以在一定程度上变化。因此根据本发明的蛋白的分子量应该解释为其理论分子量 \pm 5 kD。

优选，编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的根据本发明的核酸序列或编码那个蛋白的免疫原性片段的核酸序列的一部分与 SEQ ID NO:1 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95% 的同源性。

甚至更优选的是 98%，99% 或甚至 100% 的同源性水平。

可以用可在 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html 找到的计算机程序 "BLAST 2 SEQUENCES" 通过选择子程序："BLASTN" 确定核苷酸同源性的水平。这个程序的参考文献是 Tatiana A. Tatusova,

Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999)。使用的参数是缺省参数：匹配奖励分：+1，不匹配罚分：-2 开放 gap: 5 延伸 gap: 2. Gapx_dropoff : 50.

与 SEQ ID NO 1 或将在下面描述的 SEQ ID NO 3、5、7、9、11、13、15 或 17 中任何一个描述的序列互补的核苷酸序列，或包含根据本发明的序列串联排列的核苷酸序列，也包括在本发明范围内。

这个实施方案的另一个形式涉及编码 14 kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 3 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85% 的同源性。

优选，编码 14 kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 3 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95% 的同源性。

甚至更优选的是 98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的另一个形式还涉及编码 9 kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 5 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85% 的同源性。

优选，编码该 9kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 5 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95% 的同源性。

甚至更优选的是 98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

用于检测免疫学重要的多肽的另一个方法基于使用抗鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的高度特异性单克隆抗体。这个方法具有甚至比使用上述抗鸟分枝杆菌副结核亚种的特异性抗血清的方法更特异的优点。

这些单克隆抗体的使用导致六个另外的免疫原性鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的鉴定和分离。

因此，这个实施方案的另一个形式涉及编码 47kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 7 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85% 的同源性。

优选，编码该 47kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 7 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95% 的同源性。

甚至更优选的是 98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的另一个形式涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 9 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85% 的同源性。

优选，编码这个鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 9 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95% 的同源性。

甚至更优选的是 98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的另一个形式涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 11 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85% 的同源性。

优选，编码这个鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 11 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95% 的同源性。

甚至更优选的是 98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

这个实施方案的另一个形式涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 13 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85%的同源性。

优选，编码这个鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 13 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95%的同源性。

甚至更优选的是 98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

这个实施方案的另一个形式涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 15 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85%的同源性。

优选，编码这个鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 15 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95%的同源性。

甚至更优选的是 98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

这个实施方案的另一个形式涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列或编码所述蛋白的免疫原性片段的所述核酸序列的一部分，其中所述核酸序列或所述其一部分与 SEQ ID NO: 17 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 85%的同源性。

优选，编码这个鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的根据本发明的核酸序列或编码该蛋白的免疫原性片段的该核酸序列的一部分与 SEQ ID NO: 17 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因的核酸序列具有至少 90%、优选 93%、更优选 95%的同源性。

甚至更优选的是 98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

第三个方法，基于鸟分枝杆菌副结核亚种的 proteome 的仔细分析

产生了再两种新疫苗成分的检测。这个方法基于在 2D 凝胶中免疫原性蛋白的鉴定。它具有胜过其它方法的优点，即表达文库中尚未发现或鉴定的蛋白现在可以明确地鉴定为疫苗成分。下列实施例 2 给出了该方法的详细内容。

因此，本发明的另一个实施方案还涉及具有 5.60-6.15 的 pI 的 60kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白。

图 1b 和 d 中可见到这个蛋白是大约 5 个斑点的水平行（由于表现出如不同翻译后修饰或 2D 凝胶电泳样品制备引入的假象(artifacts)的同工形式的微小差异）。

另外，另一个实施方案涉及具有 4.20-4.75 的 pI 的 33kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白。图 1b 和 d 中可见到这个蛋白是大约 3 个斑点的水平行（由于表现出如不同翻译后修饰或 2D 凝胶电泳样品制备引入的假象的同工形式的微小差异）。

既然这些蛋白现在已被明确鉴定，那它们就可以被测序，如根据本领域已知的标准步骤可确定 N 末端的前 15 个氨基酸。现在这种 N 末端测序已商业化并且在标准基础上由专门蛋白测序的公司进行。接着可使用简并探针容易地鉴定编码这些蛋白的基因。这些技术是本领域熟知的。

由于本发明公开了编码新的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列，现在首次可能获得足够量的这些蛋白。这可以如使用表达系统表达根据本发明的编码该蛋白或其免疫原性片段的全部或部分基因来进行。因此，在涉及核酸序列的该实施方案的更优选形式中，本发明涉及包含根据本发明的核酸序列的 DNA 片段。DNA 片段是作为根据本发明核酸序列的载体起作用的一段核苷酸。这种 DNA 片段可以是如质粒，其中克隆根据本发明的核酸序列。例如这种 DNA 片段可有效增加用作引物，DNA 接种疫苗目的和表达根据本发明核酸序列的 DNA 量，如下所述。

表达核酸序列的必要条件是适当启动子与核酸序列功能性连接，使得该核酸序列处于启动子控制之下。对本领域技术人员来说，启动

子的选择扩展到能够指导基因在用作蛋白表达的宿主细胞的细胞中转录的任何真核、原核或病毒启动子是显而易见的。

因此，这个实施方案的甚至更优选形式涉及包含根据本发明的DNA片段和/或核酸序列的重组DNA分子，其中根据本发明的核酸序列置于功能性连接的启动子控制之下。这可依靠如标准分子生物学技术完成。(Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*,1989. ISBN 0-87969-309-6).

功能性连接的启动子是能够控制与它们连接的核酸转录的启动子。这种启动子可以是根据本发明的新基因的天然启动子或鸟分枝杆菌副结核亚种的另一个启动子，只要那个启动子在用于表达的细胞中是有功能的。它也可以是异源启动子。当宿主细胞是细菌时，可以使用的有用的表达控制序列包括 Trp 启动子和操纵子(Godeddel 等, *Nucl. Acids Res.*, 8, 4057, 1980); lac 启动子和操纵子(Chang,等, *Nature*, 275,615,1978); 外膜蛋白启动子 (Nakamura, K. 和 Inouge, M. , *EMBO J.*,1, 771-775,1982), λ 噬菌体启动子和操纵子(Remaut, E.等, *Nucl. Acids Res.*,11, 4677-4688,1983); α -淀粉酶(枯草芽孢杆菌)启动子和操纵子，与所选宿主细胞相容的终止序列和其它表达增强和控制序列。

当宿主细胞是酵母时，有用的表达控制序列包括如 α -交配因子。对于昆虫细胞，可以使用多角体蛋白或杆状病毒的 p10 启动子(Smith, G. E.等, *Mol. Cell. Biol.* 3,2156-65, 1983)。当宿主细胞是脊椎动物时，示例的有用表达控制序列包括(人)巨细胞病毒即早启动子(Seed, B. 等, *Nature* 329, 840-842,1987 ; Fynan, E. F.等, *PNAS* 90,11478-11482, 1993 ; Ulmer, J. B. 等, *Science*259, 1745-1748,1993), 鲁斯氏肉瘤病毒 LTR (RSV, Gorman, C. M. 等, *PNAS* 79, 6777-6781, 1982; Fynan 等, 前述;Ulmer 等,前述), MPSV LTR (Stacey 等, *J. Virology* 50, 725-732, 1984), SV40 即早启动子(Sprague J.等, *J. Virology* 45, 773,1983), SV-40 启动子(Berman, P. W.等, *Science*, 222,524-527,1983),金属硫蛋白启动子(Brinster, R.L.等, *Nature* 296, 39-42,1982),热休克启动子

(Voellmy 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82,4949-53, 1985), Ad2 的主要晚期启动子和 β -肌动蛋白启动子(Tang 等, Nature 356,152-154, 1992)。调节序列也可以包括终止和聚腺苷酸序列。其中可使用的序列是熟知的牛生长激素聚腺苷酸序列, SV40 聚腺苷酸序列, 人巨细胞病毒 (hCMV) 终止子和聚腺苷酸序列。

细菌、酵母、真菌、昆虫和脊椎动物细胞表达系统是很常使用的系统。这种系统是本领域熟知的并且通常可以从商业上获得, 如从 Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, 美国。仅次于这些表达系统, 基于寄生虫的表达系统是有吸引力的表达系统。这种系统如在法国专利申请, 公开号 2714074, 和美国 NTIS 公开号 US 08/043109 中所述(Hoffman, S.和 Rogers, W.: 公开日: 1993 年 12 月 1 日)。

本发明这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及包含根据本发明的编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段的核酸序列、根据本发明的 DNA 片段或根据本发明的重组 DNA 分子的活重组载体 (LRCs)。这些 LRCs 是含另外遗传信息的微生物或病毒, 在这种情况下, 已克隆了根据本发明的编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段的核酸序列。感染这种 LRCs 的牛不仅将产生抗载体的免疫原的免疫学应答, 而且还产生抗蛋白的免疫原性部分(其遗传密码另外克隆入 LRC, 如一个或多个根据本发明的新的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白基因)的免疫学应答。

作为细菌 LRCs 的实例, 可很吸引人地使用本领域已知的减毒沙门氏菌株。

而且, Vermeulen, A. N. (Int. Journ. Parasitol. 28 :1121-1130 (1998))特别描述了活重组载体寄生虫。

此外, LRC 病毒可以用作将核酸序列转入靶细胞的一种方法。活重组载体病毒也可以称作载体病毒。常常用作载体的病毒是牛痘病毒(Panicali 等; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927(1982), 疱疹病毒(E. P. A.0473210A2), 和逆转录病毒(Valerio, D. 等; in Baum, S. J., Dicke,

K. A. , Lotzova, E. 和 Pluznik, D. H. (主编), *Experimental Haematology today-1988*. Springer Verlag, 纽约: 92-99 页(1989))。

本领域熟知的体内同源重组技术可以用于将重组核酸序列导入选择的能够诱导插入的根据本发明的核酸序列在宿主动物中表达的细菌、寄生虫或病毒的基因组中。

本发明这个实施方案的最后一个形式涉及包含根据本发明的编码蛋白的核酸序列、包含这种核酸序列的 DNA 片段或包含在功能性连接的启动子控制之下的这种核酸序列的重组 DNA 分子的宿主细胞。这个形式也涉及含有包含根据本发明的编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段的核酸分子的活重组载体的宿主细胞。

宿主细胞可以是细菌来源的细胞, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)种, 与基于细菌的质粒如 pBR322, 或细菌表达载体如 pEX、pET、pGEX 系列, 或噬菌体组合。该宿主细胞也可以是真核来源, 如酵母细胞与酵母特异性载体分子组合, 或高级真核细胞象昆虫细胞 (Luckow 等; *Bio-technology*6 : 47-55 (1988)) 与载体或重组杆状病毒, 植物细胞与如基于 Ti 质粒的载体或植物病毒载体组合(Barton, K. A. 等; *Cell* 32: 1033 (1983)), 哺乳动物细胞象 Hela 细胞、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或 Crandell 猫肾细胞, 也与适当的载体或重组病毒组合。

本发明的另一个实施方案涉及根据本发明的新的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段。

下面将定义免疫原性片段的概念。

这个实施方案的一个形式涉及 28kD 的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段, 其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO: 2 中描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90%、然而优选 92%、更优选 94%、95%或甚至 96%的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

SEQ ID NO:2 和下述根据本发明的 SEQ ID NO:4、6、8、10、12、

14、16 和 18 中描述的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的免疫原性片段优选按照优选顺序具有至少 6、更优选 7、8、9、10、11、12、15、20、30 或甚至 40 个氨基酸的长度。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:1 描述的核酸序列编码的这个鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

如上面提及的，细菌存活在宿主细胞内，但是确实也发生胃肠腔感染的细胞外发作。这暗示细胞介导和抗体介导的免疫应答都在抵抗疾病的足够保护中起作用。如实施例所示，检查 T 细胞反应和 B 细胞反应的测试已经用于确定根据本发明的蛋白作为疫苗成分的价值。

这个实施方案的另一个形式涉及 14kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:4 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90% 的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95% 或甚至 96% 的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:3 描述的核酸序列编码的 14kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的另一个形式涉及 9kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:6 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90% 的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95% 或甚至 96% 的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:5 描述的核酸序列编码的 9kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的另一个形式涉及 47kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋

白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:8 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90% 的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95% 或甚至 96% 的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:7 描述的核酸序列编码的 47kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的一个其它形式涉及鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:10 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90% 的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95% 或甚至 96% 的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:9 描述的核酸序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的再一个其它形式涉及鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:12 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90% 的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95% 或甚至 96% 的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99% 或甚至 100% 的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:11 描述的核酸序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的再另一个形式涉及鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:14 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90% 的序列同源性，然而优选

92%、更优选 94%、95%或甚至 96%的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:13 描述的核酸序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的再另一个形式涉及鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:16 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90%的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95%或甚至 96%的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:15 描述的核酸序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

这个实施方案的再另一个形式涉及鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性片段，其中该蛋白或免疫原性片段与 SEQ ID NO:18 描述的氨基酸序列按照优选顺序具有至少 90%的序列同源性，然而优选 92%、更优选 94%、95%或甚至 96%的同源性。

甚至更优选的是按照优选顺序 97%、98%、99%或甚至 100%的同源性水平。

这个实施方案的仍甚至更优选形式涉及 SEQ ID NO:17 描述的核酸序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和所述蛋白的免疫原性片段。

可以用可在 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html 找到的计算机程序 "BLAST 2 SEQUENCES" 通过选择子程序: "BLASTN" 确定蛋白质同源性的水平。这个程序的参考文献是 Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250 (1999)。使用的矩阵: "blosum62"。使用的参数是缺省参数: 开放 gap: 11. 延伸

gap: 1. Gapx_dropoff : 50.

应该理解，对于这里包括的特定蛋白，个体鸟分枝杆菌副结核亚种菌株之间可存在自然变异。这些变异可以用整个序列中的氨基酸差异或通过所述序列中缺失、置换、插入、转化或添加氨基酸来表明。如 Neurath 等在 "The Proteins" Academic Press New York (1979) 中描述了基本上不改变生物学和免疫学活性的氨基酸置换。相关氨基酸之间的氨基酸取代或在进化中频繁发生的取代尤其是 Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (见 Dayhof, M. D., 蛋白序列和结构图谱, Nat. Biomed. Res. Found., 华盛顿特区, 1978, 第 5 卷, 第 3 增刊)。其它氨基酸置换包括 Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val 和 Ala/Glu。基于这个信息, Lipman 和 Pearson 开发了快速和敏感蛋白比较并确定同源蛋白之间功能类似性的方法 (Science, 227, 1435-1441, 1985)。本发明的示例实施方案的这种氨基酸置换, 以及具有缺失和/或插入的变异在本发明范围内, 只要所得蛋白保持它们的免疫反应性。

这解释了为什么根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白, 当从不同区域分离株分离时, 可能具有大约 70% 的同源水平, 而仍代表具有相同免疫学特性的相同蛋白。

认为仍提供了能够诱导抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染或至少抗感染的临床表现的免疫应答的蛋白的根据本发明的某些蛋白的氨基酸序列中的那些变异“基本上不影响免疫原性”。

但是当蛋白用于如接种疫苗目的或产生抗体时, 其不是必须使用完整蛋白。也可能使用本身或与载体连接如 KLH 能够诱导抗那个蛋白的免疫应答的那个蛋白的片段, 所谓的免疫原性片段。“免疫原性片段”被理解为仍保留其诱导脊椎动物宿主的免疫应答的能力的全长蛋白的片段, 如包含 B 或 T 细胞表位。简言之, 免疫原性片段是能够诱导抗根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的免疫原性反应的片段。在这种情况下, 可利用多种技术容易地鉴定编码抗原性片段 (决定簇) 的 DNA 片段。Geysen 等 (专利申请 WO84/03564, 专利申请

WO 86/06487, 美国专利 NR. 4,833, 092, Proc. Natl Acad. Sci. 81:3998-4002(1984), J. Imm. Meth.102, 259-274(1987) 描述的方法, 所谓的 PEPSCAN 方法是一种检测表位; 和蛋白的免疫学重要区域的容易实施、快速和很好建立的方法。该方法被广泛使用并且本身是本领域技术人员熟知的。这个(经验)方法特别适合于 B 细胞和 T 细胞表位的检测。而且, 给出编码任何蛋白的基因序列, 计算机运算法则能够基于与现在已知表位的它们的序列和/或结构一致性指定特殊蛋白片段作为免疫学重要的表位。这些区域的确定是基于根据 Hopp 和 Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78:38248-3828 (1981)) 的亲水性标准和根据 Chou 和 Fasman (Advances in Enzymology 47: 45-148 (1987) 和 US Patent 4,554, 101) 的二级结构方面的组合。通过计算机在 Berzofsky's 两亲性标准(Science 235,1059-1062(1987)和美国专利申请 NTIS US 07/005,885)的帮助下从序列可同样地预知 T 细胞表位。在 Shan Lu 的 common principles: Tibtech 9: 238-242 (1991), Good 等的 Malaria epitopes; Science 235: 1059-1062(1987), Lu 的综述; Vaccine 10: 3-7 (1992), Berzofsky 的 HIV-表位; The FASEB Journal 5: 2412-2418 (1991)中可找到简短概述。免疫原性片段通常具有最小长度 6,更常 7-8 个氨基酸, 优选 8 个以上, 如 9、10、12、15 或甚至 20 或更多氨基酸。因此编码这种片段的核酸序列具有至少 18 的长度, 更常 24 和优选 27、30、36、45 或甚至 60 个核酸。

因此, 本发明另一实施方案的一个形式涉及对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗, 它包括至少一种上述根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段和药物可接受载体。

本发明的另一个实施方案涉及根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段用于疫苗。

本发明的再另一个实施方案涉及根据本发明的核酸序列、DNA 片段、重组 DNA 分子、活重组载体、宿主细胞或蛋白或其免疫原性片段在制备疫苗、特别是对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗中的应用。

制备根据本发明疫苗的一种方法是通过使细菌生长，随后从细菌或上清中生物化学纯化鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段。然而这是一种非常耗时的制备疫苗的方法。

因此在疫苗中使用根据本发明的编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或其免疫原性片段的基因的表达产物要方便得多。现在首次成为可能，因为本发明提供了适合作为疫苗成分的编码 9 个新的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的基因的核酸序列。

通过将根据本发明的蛋白或根据本发明的其免疫原性片段与下面描述的药物可接受载体混合可容易地制备基于这些基因的表达产物的疫苗。

可供选择地，根据本发明的疫苗可以包括能够表达根据本发明的蛋白或其免疫原性片段的如上所述的活重组载体。这种疫苗，如基于沙门氏菌载体或病毒载体如疱疹病毒载体，比亚单位疫苗优越，它们更好地模拟鸟分枝杆菌副结核亚种感染的自然方式。而且，它们的自身繁殖是优点，因为免疫仅需要少量重组载体。

疫苗也可以基于如上所述的宿主细胞，它包含根据本发明的蛋白或其免疫原性片段。

根据本发明的疫苗比例如灭活全细菌疫苗和减毒活疫苗具有另外的优点。基于全细胞的疫苗诱导抗所有抗原决定簇的抗体，即细菌上存在的所有表位。因此，针对这种疫苗产生的抗体组可以与野生(field)感染产生的抗体相当。因此，不可能知道动物是否已经感染或已接种。根据本发明的蛋白或其免疫原性片段，即全细菌亚单位，作为疫苗成分具有优点，即接种的动物仅产生抗给予的亚单位的抗体。可疑动物的抗体组与接种和野生感染动物的抗体的简单比较将立即知道可疑动物是否野生感染或接种。对于这种检测，下面将更详细讨论，简单的 ELISA 检测足够。已知基于一个或多个亚单位的这种疫苗是标记疫苗：在它们可与野生感染区别的意义上，它们是“标记的”。下面，更详细地讨论标记疫苗的概念。

很有吸引力的标记疫苗是基于 9kD 蛋白或其免疫原性片段的疫

苗，其序列在 SEQ ID NO:6 中描述。原因如下：抗鸟分枝杆菌副结核亚种和牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)产生的抗体之间有相对高水平的交叉反应性。牛分枝杆菌尤其是牛肺结核的原因。该细菌对其它动物种类也有传染性。而且，这个疾病是动物传染病，即它可以传染给人。世界卫生组织 (WHO) 估计 1990 至 1999 人肺结核 (TB) 发生率和死亡分别增长到 8.8 千万和 3 千万，在发展中国家病例更多。在监督和控制活动常常不充分或无效的多数发展中国家，动物传染病 TB (由牛分枝杆菌引起) 存在于动物中；因此，感染的很多流行病学和公共健康方面很多仍未知。

牛分枝杆菌对其它哺乳动物有传染性的事实是尝试消灭牛分枝杆菌的原因之一。达到这个目的所需的措施之一是消灭诊断检测 (如牛 PPD DTH 检测) 中发现的牛分枝杆菌阳性的牛。并且如上提及，由于消除了检测中发现阳性的牛分枝杆菌和鸟分枝杆菌副结核亚种动物的血清的交叉反应性，所以不考虑感染的原因。

因此，可清晰区别用根据本发明的亚单位疫苗接种和野生感染牛分枝杆菌或鸟分枝杆菌副结核亚种的诊断检测将是很有价值的工具。

发现在 PPD 检测中，鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白不显示与牛分枝杆菌的交叉反应性是本发明的优点之一。氨基酸序列 SEQ ID NO:6 中给出的蛋白属于这些蛋白。

因此，这个实施方案的优选形式涉及包含如 SEQ ID NO:6 描述的蛋白或其免疫原性片段的疫苗。

如果想要一种疫苗不是必须具有可用于如上所述标记目的的性能，那么添加根据本发明的其它蛋白或 65kD 或 70kD 热休克蛋白，或其免疫原性片段将有益。当与单独疫苗比较时，这种组合疫苗增强疫苗的效率。因此，在更优选的形式中，根据本发明的疫苗包含根据本发明的 9kD 蛋白和一种和多种其它蛋白，或一种热休克蛋白或其免疫原性片段。

上述所有疫苗有助于有效接种，即它们触发宿主的防卫系统。

可供选择地，抗体可以在如兔子产生或可以从下面描述的抗体生

成细胞系获得。这种抗体接着可以给予待接种/保护的哺乳动物。这个接种方法，被动接种，是当哺乳动物已经被感染时的接种选择，并且没有时间允许待触发的自然免疫应答。它也是接种倾向于突然高感染压力和免疫受损个体的哺乳动物的优选方法。在这些情况下，给予的抗根据本发明的蛋白或其免疫原性片段的抗体可干扰鸟分枝杆菌副结核亚种。这个方法具有降低或阻止鸟分枝杆菌副结核亚种发展的优点。因此，本发明这个实施方案的一个其它形式涉及对抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染的疫苗，包括抗根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或该蛋白的免疫原性片段的抗体，和药物可接受载体。

这个发明的另一个实施方案仍涉及抗根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或该蛋白的免疫原性片段的抗体。

大规模制备根据本发明的抗体的方法也是本领域已知的。这种方法依靠在用于噬菌体显示的丝状噬菌体中克隆编码根据本发明的蛋白的遗传（片段）信息。在尤其是 <http://aximtl.imt.uni-marburg.de/-rek/aepphage.html> 的 "filamentous phagedisplay" 下 "Antibody Engineering Page" 和综述论文 Cortese, R.等, (1994) 在 Trends Biotechn. 12: 262-267、Clackson, T. & Wells, J. A. (1994) 在 Trends Biotechn. 12: 173-183、Marks, J. D.等, (1992) 在 J. Biol. Chem. 267 :16007- 16010、Winter, G.等, (1994) 在 Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455 和 Little, M.等, (1994) Biotechn. Adv. 12 : 539-555 中描述了这种技术。噬菌体随后用于筛选表达 camelid 重链抗体的 camelid 表达文库。(Muyldermans, S.和 Lauwereys, M. , Journ. Molec.Recogn. 12: 131- 140 (1999)和 Ghahroudi, M. A.等, FEBS Letters 414: 512-526 (1997))。来自表达目的抗体的文库的细胞可复制并随后用于抗体的大规模表达。

仍另一个实施方案涉及制备根据本发明疫苗的方法，包括将根据本发明的抗体与药物可接受载体混合。

接种疫苗的可供选择和有效方法是用编码相关抗原的 DNA 直接接种。用编码蛋白的 DNA 直接接种对于很多不同蛋白已经成功（如

例如 Donnelly 等 *The Immunologist* 2:20-26(1993)综述)。更特别地，Velaz-Faircloth, M.等, (*Infect. & Immun.* 67: 4243-4250(1999))已经描述了 DNA 接种得到的抗鸟分枝杆菌的保护。

接种疫苗的这个方法对于接种牛抗鸟分枝杆菌副结核亚种感染很有吸引力。因此本发明这个实施方案的其它形式仍涉及包含编码根据本发明蛋白或其免疫原性片段的核酸序列的疫苗，包含包括这种核酸序列的 DNA 片段的疫苗或包含根据本发明的重组 DNA 分子的疫苗，和药物可接受载体。

由于上面给出的原因，优选，编码 9kD 蛋白或其免疫原性片段和 SEQ ID NO:5 描述的根据本发明的核酸序列用于接种。

更优选，这种序列与如上所述根据本发明的编码另一个蛋白或其免疫原性片段组合。

适合用于根据本发明的 DNA 疫苗的 DNA 质粒的实例是用于细菌、真核和酵母宿主细胞的常规克隆或表达质粒，很多所述质粒商业上可获得。这种质粒的熟知实例是 pBR322 和 pcDNA3(Invitrogen)。根据本发明的 DNA 片段或重组 DNA 分子应该能够诱导该核苷酸序列的蛋白表达。该 DNA 片段或重组 DNA 分子可以包含一个或多个根据本发明的核苷酸序列。此外，该 DNA 片段或重组 DNA 分子可以包含其它核苷酸序列如具有未甲基化 CpG 二寡核苷酸的免疫刺激寡核苷酸，或编码其它抗原性蛋白或辅佐细胞因子的核苷酸序列。

待用于根据本发明的疫苗的根据本发明的核苷酸序列或包含根据本发明的核苷酸序列的 DNA 质粒，优选可操作连接转录调节序列，可以是裸露的或可以包装在传递系统中。

合适的传递系统是脂类载体、iscoms、dendromers、niosomes、微粒，特别是基于壳聚糖的微粒、多糖基质等等，(更多见下面)，全部都是本领域熟知的。也非常适合作为传递系统的是减毒活细菌如沙门氏菌种，和减毒活病毒如疱疹病毒载体，如上提及。

这个实施方案的其它形式仍涉及包含根据本发明的重组 DNA 分子的疫苗。

DNA 疫苗可例如通过皮内应用而容易地给予,如通过使用无针注射器。这种给药方法将 DNA 直接传递到接种的动物细胞中。10pg-1000 μ g 的 DNA 量提供好的结果。特别是如果 DNA 本身是自身复制的,较少量将足够。优选,使用 1-100 μ g 的微生物中的量。

在更进一步实施方案中,根据本发明的疫苗另外包含得自牛病原生物和病毒的一种或更多抗原,抗那些抗原的抗体或编码这种抗原的遗传信息和/或药物成分如抗生素。当然,这种抗原,抗这种抗原的抗体,或遗传信息可以是鸟分枝杆菌副结核亚种来源的,如另一个鸟分枝杆菌副结核亚种抗原。它也可以是选自另一个牛病原生物或病毒的抗原、抗体或遗传信息。这种生物和病毒优选选自:牛疱疹病毒(Bovine Herpesivirus)、牛病毒性腹泻病毒(Vira Diarrhoea virus)、3型副流感病毒(Parainfluenza type 3 virus)、牛副粘液病毒(Bovine Paramyxovirus)、口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease Virus)、溶血巴斯德氏菌(*Pasteurella haemolytica*)、牛呼吸道合胞病毒(Bovine Respiratory Syncytial Virus)、泰累尔氏梨浆虫属(*Theileria* sp.),巴贝虫属(*Babesia* sp.)、锥虫种(*Trypanosoma* species)、微粒孢子虫属(*Anaplasma* sp.)、*Neospora caninum*、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、支原体(*Mycoplasma*)、大肠杆菌(*E.coli*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏杆菌(*Klebsiella*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)和停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)。

如早先提及的,基于一种或多种根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的疫苗也很适合作为标记疫苗。标记疫苗是能基于不同于野生型感染诱导的抗体组的特征性抗体组而区别接种的和野生感染的哺乳动物的疫苗。如当野生型鸟分枝杆菌副结核亚种上存在的免疫原性蛋白不存在于疫苗中时,诱导不同的抗体组:然后该宿主接种后将不能产生抗那个蛋白的抗体。因此,基于任何根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的疫苗将仅诱导抗该特定蛋白的抗体,而基于活野生型、活减毒或灭活全鸟分枝杆菌副结核亚种的疫苗将诱导抗全部或多

数细菌蛋白的抗体。

简单的 ELISA 检测,使孔中包含除根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白之外的任何其它鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白和孔中仅包含一种或多种纯化的根据本发明鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白足以检测来自牛的血清并足以知道这些牛是用根据本发明蛋白疫苗接种的还是罹患鸟分枝杆菌副结核亚种野生感染。

根据本发明的全部疫苗包含药物可接受载体。药物可接受载体可以是例如无菌水或无菌生理盐溶液。在更复杂的形式中,载体可以是例如缓冲液。

制备疫苗的方法包括将根据本发明的蛋白或其免疫原性片段和/或根据本发明的抗该蛋白或其免疫原性片段的抗体,和/或核酸序列和/或 DNA 片段、重组 DNA 分子、活重组载体或宿主细胞,和药物可接受载体混合。

根据本发明的优选疫苗也可以含有免疫刺激物质,所谓的佐剂。佐剂一般包含以非特异方式加强宿主免疫应答的物质。本领域已知很多不同的佐剂。频繁用于牛疫苗的佐剂的实例是胞壁酰二肽、脂多糖类、几种葡聚糖和聚糖和 Carbopol (R) (一种均聚物)。该疫苗也可以包含所谓的“载体”。载体是蛋白连接的化合物,没有共价结合之。这种载体尤其是生物微胶囊、微藻酸盐、脂质体和 macrosols,全部都是本领域已知的。微粒,尤其是基于壳聚糖(chitosan)的那些,特别是用于经口接种的那些很适合作为疫苗载体。

这种载体的具体形式,其中抗原被部分包入载体中,是所谓的 ISCOM (EP 109.942, EP 180.564, EP 242.380)。此外,该疫苗可以包含一种或多种适合的表面活性化合物或乳剂,如 Span 或 Tween。

优选将抗原与容易获得的和登记用于家畜和/或人的佐剂组合,如氢氧化铝, Th2 样调节佐剂。

也优选在质粒内部或外部添加 CpG 寡核苷酸提高保护。

通常,该疫苗与稳定剂混合,例如来保护倾向于降解的蛋白免遭降解,增加疫苗的保质期,或提高冻干效率。有效的稳定剂尤其是

SPGA (Bovarnik 等; J. Bacteriology 59: 509 (1950)), 碳水化合物如山梨醇、甘露醇、海藻糖、淀粉、蔗糖、葡聚糖或葡萄糖, 蛋白如白蛋白或酪蛋白或其降解产物, 和缓冲液, 如碱金属磷酸盐。此外, 该疫苗可以悬浮于生理可接受稀释剂中。理所当然, 辅佐的、添加载体化合物或稀释剂、乳化或稳定蛋白的其它方法也在本发明中范围中。

基于根据本发明的蛋白或其免疫原性片段的根据本发明的疫苗可以很适合地以每只动物 1-100 微克蛋白的量给予, 尽管原则上也可以使用更小剂量。超过 100 微克的剂量, 尽管免疫学上很适合, 由于商业原因吸引力减少。

基于减毒活重组载体的疫苗, 如上述 LRC 病毒、寄生虫和细菌可以以低得多的剂量给予, 因为在感染期间它们自我繁殖。因此, 对于细菌和病毒, 很适合的量应该为 10^3 - 10^9 CFU/PFU。

根据本发明的疫苗可以例如皮内、皮下、肌内、腹膜内、静脉内或在粘膜表面如口腔或鼻内给予。

对于有效的抗疾病保护, 鸟分枝杆菌副结核亚种感染的快速和正确诊断很重要。因此, 本发明的另一个目的是提供适合鸟分枝杆菌副结核亚种感染的检测的诊断学工具。

根据本发明的核酸序列、蛋白和抗体也适合用于诊断学。

因此, 本发明的另一个实施方案涉及根据本发明的核酸序列、蛋白和抗体用于诊断学。

根据本发明的核酸序列或其片段可以用于检测牛中鸟分枝杆菌副结核亚种的存在。取自鸟分枝杆菌副结核亚种感染的哺乳动物的样品将包含得自所述细菌的核酸物质, 包括编码根据本发明的蛋白的核酸序列。这些核酸序列将与根据本发明的核酸序列杂交。检测与本发明的核酸序列反应的核酸序列的合适方法包括杂交技术, 包括但不限于 PCR 技术和 NASBA 技术。因此, 根据本发明的核酸序列可以用于制备用于 PCR 和或 NASBA 技术的探针和引物。

检测鸟分枝杆菌副结核亚种的诊断学检测试剂盒可以例如包含能够使分离自待检测的牛的鸟分枝杆菌副结核亚种核酸序列与这些工具

反应的工具体。这种工具体是例如特异性引物或(PCR-)引物,也称作引物片段,其基于根据本发明核酸序列。如果动物中存在鸟分枝杆菌副结核亚种的遗传物质,那么这将例如特异性结合特异性 PCR 引物和例如在 cNDA 合成后,将随后变得在 PCR 反应中扩增。接着在 DNA 凝胶电泳中可以容易地检测 PCR 反应产物。标准的 PCR 教科书给出了确定与鸟分枝杆菌副结核亚种 DNA 选择性 PCR 反应的引物的长度。经常使用至少 12 个核苷酸的核苷酸序列的引物片段,但是 15 个以上,更优选 18 个核苷酸的引物也常选择。特别是至少 20 个,优选至少 30 个核苷酸长度的引物通常更适用。Dieffenbach & Drekler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN0-87969-447-5 (1995)中更广泛描述了 PCR 技术。

因此,根据本发明的核酸序列或按照优选顺序具有至少 12、优选 15、更优选 18、甚至更优选 20、22、25、30、35 或 40 个核苷酸长度的那些核酸序列的引物,其中核酸序列或其一部分与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15 或 17 中描述的核酸序列具有至少 70% 同源性,也是本发明的一部分。引物理解为具有至少 12 个核苷酸的长度和与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15 或 17 中描述的核酸序列按照优选顺序具有至少 70%,更优选 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或甚至 100% 同源性。这种核酸序列可以用作 PCR 反应中引物片段为了增加它们编码的 DNA 的量的或用在杂交反应中。这可以在特殊核酸序列印迹中的快速扩增或检测用作检测如上面指出的鸟分枝杆菌副结核亚种的诊断工具。

遗传物质的另一种检测是基于得自如棉拭(swab)的鸟分枝杆菌副结核亚种物质,随后典型的 DNA 纯化,之后与放射性或颜色标记的引物片段典型杂交。颜色标记和放射性标记的片段通常称作检测工具。PCR 引物和杂交反应都是本领域熟知的并且在尤其是 Maniatis/Sambrook (Sambrook, J.等 Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6)中描述。

因此,本发明的一个实施方案涉及检测鸟分枝杆菌副结核亚种核

酸序列的诊断检测试剂盒。这种检测包含根据本发明的核酸序列或其引物片段。

基于检测根据本发明的特定鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的抗原性物质并且因此适合于检测鸟分枝杆菌副结核亚种感染的诊断检测试剂盒尤其可以包含标准 ELISA 检测。在这种检测的一个实例中，ELISA 板的孔壁被针对根据本发明的任何蛋白的抗体包被。与待检测的物质温育后，标记的抗鸟分枝杆菌副结核亚种抗体添加到孔中。然后颜色反应揭示来自鸟分枝杆菌副结核亚种的抗原性物质的存在。

因此，本发明的另一个实施方案涉及检测鸟分枝杆菌副结核亚种的抗原性物质的诊断检测试剂盒。这种检测试剂盒包含抗根据本发明的蛋白或根据本发明的其片段的抗体。

基于检测血清中抗根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的抗体并且因此适合于检测鸟分枝杆菌副结核亚种感染的诊断检测试剂盒尤其可以包括标准 ELISA 检测。在这种检测中，ELISA 板的孔壁被根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白包被。与待检测的物质温育后，标记的抗那个蛋白的抗体添加到孔中。然后缺乏颜色反应揭示鸟分枝杆菌副结核亚种的抗体的存在。

因此，本发明的另一个实施方案涉及检测抗鸟分枝杆菌副结核亚种的抗体的诊断检测试剂盒。这种检测试剂盒包含根据本发明的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白或根据本发明的其片段。

免疫检测的设计可以变化。例如，免疫检测可以基于竞争或直接反应。此外，方案可以使用固相载体或可以使用细胞材料。抗体-抗原复合体的检测可以包括标记抗体的使用；该标记可以是例如酶、荧光、化学发光、放射性或染料分子。

检测与样品中根据本发明的蛋白发生反应的抗体的合适方法包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫荧光检测 (IFT) 和 Western 印迹分析。

例如如上指出表达的根据本发明的蛋白或其免疫原性片段可以用于制备抗体，它可以是多克隆、单特异性或单克隆 (或其衍生物)。如

果想要多克隆抗体,制备和加工多克隆血清的技术是本领域已知的(如 Mayer 和 Walter 主编 *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, London, 1987)。

针对抗根据本发明的蛋白或根据本发明的其免疫原性片段反应的单克隆抗体可以用也是本领域已知的技术(Kohler 和 Milstein, *Nature*,256, 495-497,1975)免疫近交小鼠来制备。

发现鸟分枝杆菌鸟亚种与鸟分枝杆菌副结核亚种具有极其高的同源性。在猪中,而且越来越常在人中,特别是在免疫缺陷的人(如 HIV 阳性)中以明显增加的发生率发现鸟分枝杆菌鸟亚种。

因此,如上提及的根据本发明的蛋白可以同样很好地用于猪和人抗鸟分枝杆菌鸟亚种接种的目的,而且可以用于猪和人的诊断。

实施例

实施例 1

表达文库的筛选.为了鉴定和描述用于诊断、治疗和疫苗的鸟分枝杆菌副结核亚种中抗原的特征,使用 λ TripleEs 表达载体根据 Clontech manual(pT3003-1)和 Stratagene Gigapac III Gold Packaging manual 构建基因组表达文库。简言之,用 Tsp509I 部分消化分离自鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 316F 的细菌基因组 DNA,蔗糖梯度离心得到的平均 2.5 千碱基对的大小的片段与 EcoRI 消化的去磷酸化 λ TripleEs 臂连接。使用 Gigapack III Gold Packaging Extract 和大肠杆菌 XL1Blue 宿主菌株(Clontech(S0924))实施包装反应。文库铺板后,用 1)阳性牛血清(记做 3869)和 2)特异性鸟分枝杆菌副结核亚种单克隆抗体来实施大约 10^6 个噬菌斑的免疫筛选。这导致选择了 125 个阳性 λ TriplEx 重组体。使用 Clontech manual(PT3003-1)描述的方案,这些 125 个阳性噬菌体重组体中的一百一十七个被成功转变为质粒 (pTriplEx)重组体。

这 117 个 pTriplEx 重组体的 DNA 测序使它们分类为不同的抗原

组, 每组表达不同的抗原性蛋白或其片段。血清 3869 分离的重组体中发现 SEQ 2、4 和 6, 单克隆抗体 FabG4 分离的重组体中发现 SEQ 8, 和分别针对鸟分枝杆菌副结核亚种的 5 个抗原分子的 5 个单克隆抗体 (13.67. 1A ;10. 65.3B ; 13.67. 2A; 10.32. 3B;和 10.66. 4B)分离的重组体中发现 SEQ 10、12、14、16 和 18。Blast 检索含有分枝杆菌基因组信息的各种数据库可以进一步鉴定很多抗原性多肽及其编码基因。除了 SEQ ID NO:19 和 21 找到和描述的 hsp65 和 hsp70 热休克蛋白抗原, 迄今为止这里提供的抗原片段无一被鉴定为鸟分枝杆菌副结核亚种相关抗原或认为在上面讨论的鸟分枝杆菌副结核亚种的已知抗原中。

实施例 2

鉴定相关蛋白的 Proteomics 方法.

a) 样品的制备。从 Waston 和 Reed 培养基中的鸟分枝杆菌副结核亚种 316F 的培养物中离心收集细胞。细胞沉淀用 PBS 洗涤一次(10 g 沉淀/40ml PBS), 并以 5ml 的部分保存在-80℃。融解后, 每个样品用 100 ml 冷 PBS(4℃)洗涤两次, 并悬浮于 5 ml 冷 PBS。添加蛋白酶抑制剂 (胃酶抑制剂 12,5μg; 亮抑酶肽 25 μg,Pefabloc™SC 125 μg; 抑肽酶 (aprotinine) 5 μg); 使用 Branson sonifier 250 以 100%输出量和 50%间隔在冰上超声处理悬液 10 分钟。随后添加 Ureum (9M)、DTT (70mM)和 Triton X- 100 (2%), 溶液保存在室温 30 分钟, 偶尔振荡。随后在 16℃以 5,000g 离心悬液 15 分钟,再次在 16℃以 100,000g 离心 30 分钟。随后用 PlusOne 2-D 清理试剂盒 (Amersham Biosciences) 根据制造商提供的方案处理所得样品以除去少量盐、多糖、核酸和脂类。使用 RC DC 蛋白试验(Bio-Rad Laboratories)确定样品的蛋白浓度, 样品保存在-80℃直到 2D-PAGE。典型地, 在 2D-PAGE 中使用大约 100μg 蛋白样品, 随后银染或免疫印迹, 和 2D-PAGE 时使用达 1500μg 蛋白样品, 随后考马斯亮兰染色。

b) 2D-PAGE. 根据制造商提供的方案, 使用 IPGphor 胶条再水合的 Ettan IPGphor 等电聚焦系统(Amersham Biosciences)实施等

电聚焦 (IEF), 和使用陶瓷胶条支撑物实施。典型地, 在含 1.4 mg DTT 和 0.5 % μ l IPG-缓冲液的再水合缓冲液中添加 450 μ l 蛋白样品, 随后 O/N 20 $^{\circ}$ C 孵育实施 24cm 胶条的再水合和蛋白负载。随后, 根据制造商提供的规程实施 IEF。IEF 后, 胶条可以保存在 -20 $^{\circ}$ C 直到二维 PAGE。对于二维 PAGE, 在含 140mg DTT 的 14ml 平衡缓冲液中室温振荡 15 分钟, 随后在含 350mg 碘乙酰胺的 15ml 平衡缓冲液中室温振荡 15 分钟平衡胶条。随后, 胶条简短浸入负极缓冲液中并应用二维 PAGE。根据制造商 (Amersham Biosciences) 提供的规程, 在 12.5 % Ettan Dalt II 凝胶 (26 x 20 cm; 1 mm 厚) 中, 使用 Ettan Dalttwelve 大规格垂直系统实施电泳。对于银染, 凝胶固定在 40% 乙醇、10% 乙酸溶液中并用 plus one 银染试剂盒 (Amersham Biosciences) 染色。对于考马斯亮兰染色, 根据制造商提供的规程, 使用 PhastGel Blue R (Amersham Biosciences) 对凝胶染色。对于免疫印迹, 根据制造商提供的规程, 使用 Trans-Blot SD Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) 将蛋白转移到硝酸纤维素 (Nitrocellulose BA85 ; Schleicher 和 Schuell)。使用标准方案使用含 5% 脱酯奶的 PBS 缓冲液, 与马辣根过氧化物酶缀合的兔抗小鼠或抗牛抗体, 和过氧化物, TMB 和 DONS 作为底物实施单克隆抗体或多克隆抗体对蛋白斑点的识别。结果: 如后图 1, 这个方法可以检测两个免疫学高度相关的蛋白。

一个蛋白是 pI 为 5.6-6.15 的 60kD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白。

图 1b 和 d 中可看到这个蛋白是大约 5 个斑点的水平行。

另一个蛋白是 pI 为 4.20-4.75 的 30KD 鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白。在图 1a 和 d 中可以看到这个蛋白是大约 3 个斑点的水平行。

实施例 3

来自接种和感染山羊的 T 细胞对 14kD 蛋白、9kD 蛋白和 Hsp70 和 Hsp65 的识别。

根据制造商提供的方案, 使用牛干扰素 γ 试验 (BOVIGAM; CSL

laboratories Parkville, Victoria, Australia)检测实验感染鸟分枝杆菌副结核亚种的山羊的外周血样品中 T 细胞的刺激。下列抗原添加到 1.5ml 全血中: 分别来自牛分枝杆菌菌株 AN5(ID-Lelystad,荷兰制备), 来自鸟分枝杆菌鸟亚种菌株 D4 (ID-Lelystad,荷兰制备), 和来自鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 3+5/C (ID-Lelystad,荷兰制备)的重组纯化的 14kD 蛋白、9kD 蛋白、Hsp70 和 Hsp65(0.5 和 5 μ g), 和三个 PPD(3 μ g)。在三个连续时间使用来自大约两岁龄前 12 次经口感染 1ml(OD660=0.059)鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 DSU405650 号(超过 4 周的时间: 每周在星期一、星期三和星期五)的 9 只山羊的双周样品检测这些抗原中的每一个。感染前 4 周用 0.5ml 基于减毒鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 316F (ID-Lelystad,荷兰制备)的实验灭活疫苗接种这些动物中的五只 (188-193)。认为吸收值 ≥ 0.1 (当针对背景值校正时) 和 ≥ 2 倍背景值被认为由于抗原的存在干扰素 γ 的产量增加。

结果: 所有检测的重组抗原诱导至少一只动物干扰素 γ 的产量增加。这表明它们都在 T 细胞介导的免疫应答中起作用。典型的实验在表 1 中显示。9 只动物中五只 (56%) 显示出对 9kD 抗原的应答增加, 九只动物中的三只 (33%) 显示对 14kD, 9 只中的 8 只 (90%) 对 hsp65, 和九只中的三只对 hsp70 的应答增加。

表 1

Exp 5. 040901	188	189	190	191	193	194	195	196	198
AG									
牛	1.778	1.089	0.426	1.167	0.475	0.174	0.162	0.054	0.701
PPD (3 ug)	3.484	1.795	1.348	3.475	3.114	0.731	0.655	0.099	2.466
鸟	3.501	2.664	2.187	> 4	3.319	1.919	1.339	0.254	3.078
副结核PPD (3 ug)	0.022	-0.017	0.102	-0.023	0.022	0.103	0.004	-0.008	0.392
14 kD 0.5 ug	0.018	0.023	0.175	-0.017	0.011	0.151	0.131	-0.002	0.388
14 kD 5 ug	0.103	0.424	0.213	0.006	0.149	0.409	0.025	0.036	0.022
9 kD 0.5 ug	0.139	1.169	0.262	0.009	0.065	1.712	0.243	0.045	0.107
9 kD 5 ug	-0.022	-0.020	-0.012	-0.040	-0.002	-0.007	-0.006	-0.007	-0.002
47 kD 0.5 ug	-0.006	0.001	-0.007	-0.041	-0.010	0.019	0.009	-0.005	-0.010
47 kD 5 ug	0.092	-0.012	0.143	-0.006	-0.011	0.286	0.007	-0.010	0.070
Hsp70 0.5 ug	0.174	0.032	0.220	0.023	0.001	0.969	0.094	0.001	0.187
Hsp70 5 ug	0.633	0.945	0.390	0.105	0.111	0.247	0.456	-0.001	0.121
Hsp65 0.5 ug	1.069	0.949	0.925	0.188	0.357	1.086	0.599	0.049	0.213

实施例 4

用 14 kD、9 kD、47kD、70 kD 和 65 kD 蛋白免疫牛，特异性抗体反应的检测和 DTH 反应性的检测。

a) 免疫

为了评估 14 kD、9 kD、47kD、70 kD 和 65 kD 蛋白的免疫原性和诱导对来自牛分枝杆菌的 PPD 的（交叉反应）DTH 反应的能力，如下免疫牛：1)用基于减毒鸟分枝杆菌副结核亚种 316F(ID-Lelystad, 荷兰制备；4 只动物)的灭活全细胞疫苗 2)W/O 佐剂中的纯化重组 14kD 蛋白（4 只动物）3) W/O 佐剂中的纯化重组 9kD 蛋白（4 只动物）4) W/O 佐剂中的纯化重组 47kD 蛋白（4 只动物）5) W/O 佐剂中的纯化重组 hsp70（2 只动物）6) W/O 佐剂中的纯化重组 hsp65（2 只动物）7)单独 W/O 佐剂（3 只动物）。在第 0 天和第 127 天给予下列量抗原的初次和加强免疫：

抗原	初次 (μg)	加强 (μg)
14kD	207	259
9kD	156	236
47kD	273	305
70kD	348	342
65kD	681	491

在第 0 天（1ml）和 127 天（0.5ml）给予实验疫苗进行的免疫。在第 52 和第 178 天取出血清样品。在第-56 天（免疫前建立动物的 DTH 状态）、第 52 和 178 天进行 DTH 检测。

b) 血清中抗体的检测

通过使用标准 SDS-PAGE 和免疫印迹方案，其中泳道中加样 2.5 μg 纯化重组 14kD、9kD、47kD、65kD 和 70kD 蛋白和 2.5 μg 各种提取物（来自牛分枝杆菌菌株 AN5 的全细胞超声处理物和 PPD；来自鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 B854 的全细胞超声处理物和来自鸟分枝杆菌副结核亚种菌株 3+5/C 的 PPD）来检测来自每个免疫组的一只代表动物的血清样品中的总 IgG 抗体，确定 PPD 中抗原的免疫原性和它

们的存在。

结果：所有代表性血清中的抗体检测相应重组 14、9、47、65 和 70 kD 蛋白（图 2 图 A-E，泳道 1）；重组 14kD 蛋白的抗体不能识别牛分枝杆菌和鸟分枝杆菌副结核全细胞超声处理物和 PPD 中的相应抗原（图 2 图 A，泳道 2-4）；重组 9kD 蛋白的抗体识别牛分枝杆菌和鸟分枝杆菌副结核全细胞超声处理物和鸟分枝杆菌副结核 PPD 中的相应抗原，但不识别牛分枝杆菌 PPD 中的相应蛋白（图 2 图 B，泳道 2-4）；重组 47kD 蛋白的抗体识别（弱）牛分枝杆菌和鸟分枝杆菌副结核全细胞超声处理物中的相应抗原，但不能识别 PPD 中的相应条带（图 2 图 C，泳道 2-4）；重组 65 和 70kD 蛋白的抗体识别牛分枝杆菌和鸟分枝杆菌副结核全细胞超声处理物和 PPD 中的相应抗原（图 2 图 D 和 E，泳道 2-4）。

另外，使用标准 ELISA 方案检测血清样品中总 IgG 抗体来确立抗原的免疫原性，其中用 5 μ g 各种鸟分枝杆菌副结核亚种菌株（B854,5255, 316F, 3+5/C, Teps）或牛分枝杆菌菌株 AN5 的各种提取物（全细胞超声处理物，KCL 提取物，分泌的蛋白）和 5 μ g 重组纯化的 14kD、9 kD、47 kD、70 kD 和 65 kD 蛋白包被孔。任意地，认为在 OD=1.0 超过 1/80 的滴度(titer)是阳性反应的标志。

结果：初次和加强免疫后，对 14kD、9 kD、47 kD、70 kD 和 65 kD 蛋白检测到强烈的特异性抗体反应（滴度> 640；表 2 和 3）。加强免疫后，9 kD 蛋白检测到特异性抗体滴度（滴度 160；表 2 和 3）。

表 2

		OD=1.0 时的血清滴度 (第 52 天)										
		B85 4 For m Cell s	525 5 US O	3+5/ C Joh n.	316 F Exc r.	Tep s KC L	AN5 KC L	14 kD	9 kD	47 kD	Hsp 70	Hsp 65
Paratb	840	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	<5 0	5	40	<5
	643 1	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	<5 0	<5	40	10
	702 9	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	<5 0	<5	20	5
	929 3	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 0	5	<5	40	10
14 kD	595 5	10	20	<5	10	20	40	320	<5	<5	5	20
	700 2	<5	5	<5	<5	10	20	>64 0	<5	40	<5	10
	854 6	40	40	10	20	160	20	>64 0	<5	<5	5	10
	950 6	5	5	<5	10	40	40	>64 0	<5	<5	<5	20
9 kD	172 8	<5	5	<5	5	10	<5	<5	<5	<5	<5	10
	743 0	5	<5	<5	<5	40	10	<5	<5	5	10	10
	811 6	<5	80	5	5	10	5	<5	<5	<5	<5	<5
	878 3	20	80	20	20	40	40	<5	<5	5	5	10

47 kD	296 8	10	20	<5	<5	20	10	<5	<5	>64 0	5	5
	296 9	160	80	40	40	160	10	<5	<5	>64 0	5	10
	384 7	<5	5	<5	<5	10	<5	<5	<5	>64 0	5	5
	391 1	10	5	<5	5	10	5	10	<5	>64 0	5	10
Hsp70	702 0	20	10	10	5	80	10	5	<5	5	>64 0	<5
	704 9	10	20	20	10	20	5	<5	<5	10	>64 0	<5
Hsp65	310 5	10	10	10	5	40	40	<5	<5	20	10	>64 0
	950 5	5	40	20	5	40	80	<5	<5	<5	5	>64 0
佐剂	172 7	<5	<5	<5	<5	10	10	<5	<5	<5	<5	<5
	384 8	10	10	10	20	10	5	<5	<5	<5	<5	<5
	742 9											
无	835 4	20	80	5	5	10	5	<5	<5	<5	<5	>5
	873 8	<5	20	<5	10	5	<5	<5	<5	<5	10	>5

表 3

		OD=1.0 时的血清滴度 (第 178 天)										
		B85 4 For m Cell s	525 5 US O	3+5/ C Joh n.	316 F Exc r.	C KC L	AN5 KC L	14 kD	9 kD	47k D	Hsp 70	Hsp 65
Paratb	840	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	5 5	5 5	10 10	320 320	20 20
	643 1	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<64 0	>64 0	<5 10	10 5	5 5	40 40	20 5
	702 9	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 5	5 5	5 10	10 20	5 40
	929 3	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	>64 0	<5 10	10 10	10 10	20 20	40 40
14 kD	595 5	20	80	<5	20	320	5	>64 0	5	20	10	40
	700 2	<5	20	<5	<5	320	<5	>64 0	10	10	<5	20
	854 6	10	80	5	20	80	10	>64 0	40	5	5	20
	950 6	5	40	<5	10	160	5	>64 0	20	10	10	20
9 kD	172 8	<5	10	<5	20	80	<5	10	<5	40	10	80
	743 0	<5	40	<5	5	80	20	5	160	20	<5	40
	811 6	<5	20	<5	<5	160	40	40	160	80	10	80
	878	40	80	20	80	320	10	10	160	10	5	40

	3											
47 kD	296 8	40	80	10	10	40	<5	10	<5	>64 0	20	40
	296 9	20	80	10	40	320	5	<5	<5	>64 0	5	20
	384 7	<5	80	<5	<5	80	<5	<5	<5	>64 0	10	10
	391 1	80	160	20	10	80	5	40	20	>64 0	10	40
Hsp70	702 0	>64 0	80	80	10	>64 0	40	<5	<5	20	>64 0	5
	704 9	>64 0	640	>64 0	10	>64 0	320	<5	<5	80	>64 0	10
Hsp65	310 5	320	80	160	20	80	40	10	20	40	40	>64 0
	950 5	>64 0	160	>64 0	20	80	80	80	320	160	80	>64 0
佐剂	172 7	<5	20	<5	<5	20	<5	5	<5	<5	<5	<5
	384 8	10	80	10	10	20	5	<5	<5	<5	<5	<5
	742 9	<5	20	<5	<5	40	10	<5	<5	<5	5	10
无	835 4	<5	80	<5	<5	20	10	<5	<5	<5	<5	<5
	873 8	<5	20	<5	<5	80	<5	<5	<5	<5	<5	<5

c) DTH 反应性

根据 EU 指令(directive)64/432 (指令 97/12 和指令 98/46 修正的) 进行迟发型超敏 (DTH) 反应。简言之, 注射 2000 IE 鸟类 PPD, 和 2000 和 5000 IE 牛 PPD 并在 72 小时后检测皮肤厚度的增加。增加超过 2mm 认为是 DTH 反应阳性。在全细胞灭活副结核疫苗组中, 检测初次和加强免疫后所有四只动物中的牛 PPD 反应性 (表 4)。检测初次免疫后用 14kD 蛋白 (1/4) 和 hsp65(1/2), 和加强免疫后 47kD 蛋白 (1/4) 接种的动物中的牛 PPD 反应性 (表 4)。在 9kD 蛋白和 70kD 蛋白免疫的组中未检测到牛 PPD 反应性 (表 4)。

结果: 在 DTH PPD 检测中 9kD 和 Hsp70 蛋白没有给出反应。在需要有助于抗感染的保护和另外在 DTH PPD 检测中不与 PPD 交叉反应的疫苗的情况下, 根据本发明的新的 9kD 蛋白将是选择的疫苗成分, 优选与 Hsp70 组合。

表 4. DTH 反应

		DTH (第 56 天)			DTH (第 52 天)				DTH (第 178 天)		
		A2 k	B2 K		A2 k	B2 k	B5 k		A2 K	B2 K	B5 K
Ptb	840	0	0		23	6	9		12	2	8
	643 1	0	0		25	15	23		6	3	5
	701 9	0	0		11	5	7		10	4	4
	929 3	0	0		17	8	11. 5		6	6	6
14 kD	595 5	0	0		0.5	1.0	0		0	0	0
	700 2	0	0		2.5	0	0		0	0	0
	854 6	0	0		1.5	0	4.5		0	0	0
	950 6	0	0		1.0	0	1.5		5	0	0
9 kD	172 8	0	0		0	0	0		0	0	0
	743 0	0	0		0	0	0		0	0	0
	811 6	0	0		0	0	0		0	0	0
	878 3	0	0		0	0	0		0	0	0

47 kD	296 8	0	0		0	0	0		0	0	0
	296 9	0	0		0	0	0		1	0	0
	384 7	0	0		0	0	0		0	0	0
	391 1	0	0		0	0	0		1	0	4
Hs p70	702 0	0	0		1.5	0	0		0	0	0
	704 9	0	0		0	0	0		0	0	0
Hs p65	310 5	0	0		10	0.5	6		2	0	0
	950 5	0	0		0	0	0		0	0	0
佐剂	172 7	0	0		0	0	0		0	0	0
	384 8	0	0		2.0	0.5	0		1	0	0
	742 9	0	0		0	0	0		0	0	0
无	835 4	2.7	0		2.5	0	0		NT	NT	NT
	873 8	0	0		0	0	0		0	0	0

Δ DTH > 2mm 为粗体。

NT 为未检验；在实验中动物被去除。

附图说明

图 1A 显示 2D 凝胶的 Western 印迹中存在 pI 为 4.20-4.75 的 33kD 蛋白，看起来是大约 3 个斑点的水平行。

图 1B 显示 2D 凝胶的 Western 印迹中存在 pI 为 5.60-6.15 的 60kD 蛋白，看起来是大约 5 个斑点的水平行。

图 1C 显示考马斯亮兰染色的 2D 凝胶，其中可见 33kD 和 66kD 蛋白的特异斑点。

图 1D 显示银染的 2D 凝胶，其中再次可见 33kD 和 66kD 蛋白的特异斑点。

图 2

来自重组纯化 14kD 蛋白（图 A）、重组纯化 9kD 蛋白（图 B）、重组 47kD（图 C）、重组纯化 70kD（图 D）和重组 65kD（图 E）免疫的动物的血清样品（第 178 天）的免疫印迹。

- 1 道，14 (A), 9 (B), 47 (C), 70(D)或 65 kD (E)重组纯化蛋白。
- 2 道，牛分枝杆菌菌株 AN5 全细胞超声处理物。
- 3 道，鸟分枝杆菌副结核菌株 B854 全细胞超声处理物。
- 4 道，来自鸟分枝杆菌副结核菌株 3+5/C 的 PPD。
- 5 道，来自牛分枝杆菌菌株 AN5 的 PPD。

序列表

<110> ID-Lelystad, Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid B.V.

<120> 用于副结核分枝杆菌感染的诊断学和疫苗

<130> XYZ

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1175

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (134)..(1144)

<223>

<400> 1

aattgcctca cgattcaata tcaccactct agtaatagga ttcccactcg taccatcgac	60
tgtgtgtgat tcctgccaga cagcatcggc ggggcgcgcc gacacaacac atagtcagat	120
agaggagact tcc gtg ccg aac cga cgc cga cgc aag ctt tcg aca gcc	169
Val Pro Asn Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ser Thr Ala	
1 5 10	
atg agc gcg gtc gcc gcc ctg gca gtg gcg agt cct tgc gca tac ttc	217
Met Ser Ala Val Ala Ala Leu Ala Val Ala Ser Pro Cys Ala Tyr Phe	
15 20 25	
ctt gtc tac gaa tcg acg gcc ggc aac aag gcg ccc gag cac cac gag	265
Leu Val Tyr Glu Ser Thr Ala Gly Asn Lys Ala Pro Glu His His Glu	
30 35 40	
ttc aag cag gcc gca gtg atg agc gat ctg ccg ggc gag ctg atg ggt	313
Phe Lys Gln Ala Ala Val Met Ser Asp Leu Pro Gly Glu Leu Met Gly	
45 50 55 60	
gcg ctg tcg cag ggc ctg tcg cag ttt ggg atc aac ctg ccc ccg gtg	361
Ala Leu Ser Gln Gly Leu Ser Gln Phe Gly Ile Asn Leu Pro Pro Val	
65 70 75	

ccc gcc ctg agc ggc ggc gcc acc agc act ccc ggt ctg gcc agc ccc Pro Ala Leu Ser Gly Gly Ala Thr Ser Thr Pro Gly Leu Ala Ser Pro 80 85 90	409
ggc ctg ggt agc ccc ggc ctg ggc acg ccc ggc ctg gga acg ccg ggc Gly Leu Gly Ser Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly 95 100 105	457
ctg acc aat ccc ggt ctg acg agc ccc ggt gcg acc agt ccc ggc ctg Leu Thr Asn Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Ala Thr Ser Pro Gly Leu 110 115 120	505
acc agt ccc ggc ctg acc agt cct ggt ttg acc agc ccc ggt ctg acc Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr 125 130 135 140	553
agc ccg ggt gcg gcg ccg acg acg ccc ggg ctc acc gcg ccc ggc gcg Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Thr Pro Gly Leu Thr Ala Pro Gly Ala 145 150 155	601
ctg ccg acc acg ccg ggc ggc ggg gtc gcc acc ccc ggc gcc ggg ctc Leu Pro Thr Thr Pro Gly Gly Gly Val Ala Thr Pro Gly Ala Gly Leu 160 165 170	649
aac ccc gcg ctg tcc aac ccc ggg ctg acc agc ccg gcc ggg acg gcg Asn Pro Ala Leu Ser Asn Pro Gly Leu Thr Ser Pro Ala Gly Thr Ala 175 180 185	697
ccg ggg ctg ggc agc ccg acc gtg gcg ccg agt gag gtg ccg atc gac Pro Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val Ala Pro Ser Glu Val Pro Ile Asp 190 195 200	745
tcc ggg gcc ggc ctg gac ccg ggc gcc ggt ggc acg tac ccg atc ctg Ser Gly Ala Gly Leu Asp Pro Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Pro Ile Leu 205 210 215 220	793
ggc gac ccg tcg acc ttc ggt aac gcc tcg ccg atc ggc ggc ggt ggc Gly Asp Pro Ser Thr Phe Gly Asn Ala Ser Pro Ile Gly Gly Gly Gly 225 230 235	841
acc ggt ctg ggc ggc ggc tcg agc tcg ggt ggc agc ggc ggc ctg gtc Thr Gly Leu Gly Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Leu Val 240 245 250	889
aac gac gtg atg caa gcc gcc aac cag ctc ggc gcg ggt cag gcg atc Asn Asp Val Met Gln Ala Ala Asn Gln Leu Gly Ala Gly Gln Ala Ile 255 260 265	937
gac ctg ctc aag ggc ctg gtg atg ccg gcg atc acg cag ggc atg cac Asp Leu Leu Lys Gly Leu Val Met Pro Ala Ile Thr Gln Gly Met His 270 275 280	985
ggc ggc gcg gcc gcg ggt gct ttg ccc ggc gcg gcc ggt gct ctg ccc Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro 285 290 295 300	1033
ggc gcg gcc ggc gcc ctg ccc ggt gcg gcc ggc gcc ctg ccg ggt gcg Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala 305 310 315	1081
gcg ggc gcc gcg ggt gcg ttg ccg gcg gcc gcc ggc gcc gcg ccg gca Ala Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Pro Ala 320 325 330	1129
ctg ccc ccg gtc tag accttttcca aaccatccac cagacggcac c Leu Pro Pro Val 335	1175

<210> 2

<211> 336

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<400> 2

Val Pro Asn Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ser Thr Ala Met Ser Ala Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Ala Val Ala Ser Pro Cys Ala Tyr Phe Leu Val Tyr Glu
 20 25 30

Ser Thr Ala Gly Asn Lys Ala Pro Glu His His Glu Phe Lys Gln Ala
 35 40 45

Ala Val Met Ser Asp Leu Pro Gly Glu Leu Met Gly Ala Leu Ser Gln
 50 55 60

Gly Leu Ser Gln Phe Gly Ile Asn Leu Pro Pro Val Pro Ala Leu Ser
 65 70 75 80

Gly Gly Ala Thr Ser Thr Pro Gly Leu Ala Ser Pro Gly Leu Gly Ser
 85 90 95

Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly Leu Gly Thr Pro Gly Leu Thr Asn Pro
 100 105 110

Gly Leu Thr Ser Pro Gly Ala Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly
 115 120 125

Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Leu Thr Ser Pro Gly Ala
 130 135 140

Ala Pro Thr Thr Pro Gly Leu Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Thr Thr
 145 150 155 160

Pro Gly Gly Gly Val Ala Thr Pro Gly Ala Gly Leu Asn Pro Ala Leu
 165 170 175

Ser Asn Pro Gly Leu Thr Ser Pro Ala Gly Thr Ala Pro Gly Leu Gly
 180 185 190

Ser Pro Thr Val Ala Pro Ser Glu Val Pro Ile Asp Ser Gly Ala Gly
 195 200 205

Leu Asp Pro Gly Ala Gly Gly Thr Tyr Pro Ile Leu Gly Asp Pro Ser
 210 215 220

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

Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Leu Val Asn Asp Val Met
245 250 255

Gln Ala Ala Asn Gln Leu Gly Ala Gly Gln Ala Ile Asp Leu Leu Lys
260 265 270

Gly Leu Val Met Pro Ala Ile Thr Gln Gly Met His Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly
290 295 300

Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Leu Pro Gly Ala Ala Gly Ala Ala
305 310 315 320

Gly Ala Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Ala Leu Pro Pro Val
325 330 335

<210> 3

<211> 600

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(567)

<223>

<400> 3

ttcgagaagg gatagcaggc ggggccgggc ggtgaaccgc ggaggcgcgc ggtgcgtctt 60

cagggc atg tcc cgt ttg tca ttt gtc tgc agg ctt ttg gcc gca acc 108
Met Ser Arg Leu Ser Phe Val Cys Arg Leu Leu Ala Ala Thr
1 5 10

gct ttc gcc gtc gcc ctg cta ctc ggg ctg ggc gac gtg ccg cgc gcg 156
Ala Phe Ala Val Ala Leu Leu Leu Gly Leu Gly Asp Val Pro Arg Ala
15 20 25 30

gcg gcc acc gac gac cgc ctg caa ttc acc gcg acc acg ctc agc ggc 204
Ala Ala Thr Asp Asp Arg Leu Gln Phe Thr Ala Thr Thr Leu Ser Gly
35 40 45

gcg ccg ttc aac ggc gcc agt ctg cag ggc aag ccc gcc gtg ctg tgg 252
Ala Pro Phe Asn Gly Ala Ser Leu Gln Gly Lys Pro Ala Val Leu Trp
50 55 60

```

ttc tgg acg ccg tgg tgc ccg tac tgc aac gcc gag gcc ccg ggc gtg      300
Phe Trp Thr Pro Trp Cys Pro Tyr Cys Asn Ala Glu Ala Pro Gly Val
      65                      70                      75

agc egg gtg gcc gcc gcc aac ccg ggc gtc acc ttc gtc ggc gtc gcc      348
Ser Arg Val Ala Ala Ala Asn Pro Gly Val Thr Phe Val Gly Val Ala
      80                      85                      90

gcc cac tcc gaa gtc ggc gcc atg gcc aac ttc gtc tcc aag tac aac      396
Ala His Ser Glu Val Gly Ala Met Ala Asn Phe Val Ser Lys Tyr Asn
      95                      100                      105                      110

ctg aac ttc acc acg ctc aac gac gcc gac ggc gcg atc tgg gcc cgc      444
Leu Asn Phe Thr Thr Leu Asn Asp Ala Asp Gly Ala Ile Trp Ala Arg
      115                      120                      125

tac ggc gtg ccc tgg cag ccc gcg tac gtg ttc tac cgg gcg gac ggc      492
Tyr Gly Val Pro Trp Gln Pro Ala Tyr Val Phe Tyr Arg Ala Asp Gly
      130                      135                      140

agc tcc acc ttc gtc aac aac ccc acc tcg gcg atg ccc cag gac gaa      540
Ser Ser Thr Phe Val Asn Asn Pro Thr Ser Ala Met Pro Gln Asp Glu
      145                      150                      155

ctg gcc gcc ccg gtg gcg gcg ctg cgc tgacgtggac cgcggtctgg      587
Leu Ala Ala Arg Val Ala Ala Leu Arg
      160                      165

tcgggctggc ggt      600

<210> 4
<211> 167
<212> PRT
<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<400> 4
Met Ser Arg Leu Ser Phe Val Cys Arg Leu Leu Ala Ala Thr Ala Phe
1                      5                      10                      15

Ala Val Ala Leu Leu Leu Gly Leu Gly Asp Val Pro Arg Ala Ala Ala
20                      25                      30

Thr Asp Asp Arg Leu Gln Phe Thr Ala Thr Thr Leu Ser Gly Ala Pro
35                      40                      45

Phe Asn Gly Ala Ser Leu Gln Gly Lys Pro Ala Val Leu Trp Phe Trp
50                      55                      60

Thr Pro Trp Cys Pro Tyr Cys Asn Ala Glu Ala Pro Gly Val Ser Arg
65                      70                      75                      80

Val Ala Ala Ala Asn Pro Gly Val Thr Phe Val Gly Val Ala Ala His
85                      90                      95

```

Ser Glu Val Gly Ala Met Ala Asn Phe Val Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
100 105 110

Phe Thr Thr Leu Asn Asp Ala Asp Gly Ala Ile Trp Ala Arg Tyr Gly
115 120 125

Val Pro Trp Gln Pro Ala Tyr Val Phe Tyr Arg Ala Asp Gly Ser Ser
130 135 140

Thr Phe Val Asn Asn Pro Thr Ser Ala Met Pro Gln Asp Glu Leu Ala
145 150 155 160

Ala Arg Val Ala Ala Leu Arg
165

<210> 5

<211> 366

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (34)..(366)

<223>

<400> 5

tagcgggtgca ttgactgggg aaggtgtcca cac atg agg ctg tcg ttg agc aaa 54
Met Arg Leu Ser Leu Ser Lys
1 5

ttg ggc gtt gcg gtg ggc agc gcg gca gtg gca ttg acc gcc gcg gcc 102
Leu Gly Val Ala Val Gly Ser Ala Ala Val Ala Leu Thr Ala Ala Ala
10 15 20

ggt gtc gca tcc gcc gac ccc atg gac gcg atc atc aac acc acc tgc 150
Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Met Asp Ala Ile Ile Asn Thr Thr Cys
25 30 35

aac tac ggg cag gtg atc gcc gcg ctg aac gcg tcc gac ccg gcg gct 198
Asn Tyr Gly Gln Val Ile Ala Ala Leu Asn Ala Ser Asp Pro Ala Ala
40 45 50 55

gcc cag cag ctg aac tcg tcg ccg atg gcg cag tcc tac atc cag cgg 246
Ala Gln Gln Leu Asn Ser Pro Met Ala Gln Ser Tyr Ile Gln Arg
60 65 70

ttc ctg gcc tcc ccg ccg gcg aag cgt cag cag atg gcc cag cag atc 294
Phe Leu Ala Ser Pro Pro Ala Lys Arg Gln Gln Met Ala Gln Gln Ile
75 80 85

cag gcc atg ccg gcc gcg cag cag tac atc aac gac atc aac cag gtc 342
Gln Gly Met Pro Ala Ala Gln Tyr Ile Asn Asp Ile Asn Gln Val
90 95 100

gcg gtc acc tgt aac aac ttc tga 366
 Ala Val Thr Cys Asn Asn Phe
 105 110

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<400> 6

Met Arg Leu Ser Leu Ser Lys Leu Gly Val Ala Val Gly Ser Ala Ala
 1 5 10 15

Val Ala Leu Thr Ala Ala Ala Gly Val Ala Ser Ala Asp Pro Met Asp
 20 25 30

Ala Ile Ile Asn Thr Thr Cys Asn Tyr Gly Gln Val Ile Ala Ala Leu
 35 40 45

Asn Ala Ser Asp Pro Ala Ala Ala Gln Gln Leu Asn Ser Ser Pro Met
 50 55 60

Ala Gln Ser Tyr Ile Gln Arg Phe Leu Ala Ser Pro Pro Ala Lys Arg
 65 70 75 80

Gln Gln Met Ala Gln Gln Ile Gln Gly Met Pro Ala Ala Gln Gln Tyr
 85 90 95

Ile Asn Asp Ile Asn Gln Val Ala Val Thr Cys Asn Asn Phe
 100 105 110

<210> 7

<211> 1410

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(1410)

<223>

<400> 7

ctatagcat accccgacgc aqaacaaca cggaaggtag ctccg gtg gct ccg aag 57

														Val	Ala	Pro	Lys		
														1					
gtc	tcg	tcc	gat	ctg	ttc	tcg	cag	att	gtc	aat	tcc	ggt	cct	gga	tcg	105			
Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Phe	Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser				
5					10					15					20				
ttt	ctc	gcc	aag	cag	ctc	ggc	gtc	ccg	caa	ccc	gag	acg	ctg	cgc	cgc	153			
Phe	Leu	Ala	Lys	Gln	Leu	Gly	Val	Pro	Gln	Pro	Glu	Thr	Leu	Arg	Arg				
			25					30						35					
tac	cgg	ccc	ggt	gac	ccg	ccg	ctg	gcc	ggg	tcg	ctg	ctg	atc	ggc	ggc	201			
Tyr	Arg	Pro	Gly	Asp	Pro	Pro	Leu	Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Ile	Gly	Gly				
			40				45						50						
gag	ggc	cgc	gtg	gtc	gag	ccg	ctg	cgg	gcg	gcg	ctg	gcc	aag	gac	tac	249			
Glu	Gly	Arg	Val	Val	Glu	Pro	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	Ala	Lys	Asp	Tyr				
		55					60						65						
gac	ctg	gtc	ggc	aac	aac	ctg	ggc	ggg	cgc	tgg	gcc	gac	cgg	ttc	ggc	297			
Asp	Leu	Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Arg	Trp	Ala	Asp	Arg	Phe	Gly				
	70					75					80								
ggg	ctg	gtc	ttc	gac	gcc	acc	ggg	atc	acc	acc	ccg	gag	ggc	ctg	aag	345			
Gly	Leu	Val	Phe	Asp	Ala	Thr	Gly	Ile	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Lys				
85					90					95					100				
ggg	ctg	tac	gag	ttc	ttc	acc	cca	ctg	ctg	cgc	aac	ctg	ggt	cac	tgc	393			
Gly	Leu	Tyr	Glu	Phe	Phe	Thr	Pro	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Gly	His	Cys				
			105						110					115					
gcc	cgc	gtg	gtg	gtg	gtc	ggc	acc	acg	ccc	gac	gcc	gcc	gcc	ggc	ccg	441			
Ala	Arg	Val	Val	Val	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Asp	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro				
			120					125						130					
cac	gag	cgg	atc	gcc	cag	cgc	gcc	ctg	gag	ggc	ttc	acc	cgg	tca	ttg	489			
His	Glu	Arg	Ile	Ala	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Phe	Thr	Arg	Ser	Leu				
		135					140						145						
ggc	aag	gag	ctg	cgc	aac	ggc	tcg	acg	gtg	gcg	ctg	gtg	tac	ctg	tcg	537			
Gly	Lys	Glu	Leu	Arg	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Ala	Leu	Val	Tyr	Leu	Ser				
	150					155					160								
ccg	gcc	gcc	aaa	ccc	gcc	gcg	acg	ggc	ctg	gag	tcg	acc	atg	cgg	ttc	585			
Pro	Ala	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Thr	Gly	Leu	Glu	Ser	Thr	Met	Arg	Phe				
165					170					175					180				
atc	ctg	tcg	gcc	aag	tcc	gcc	tac	gtc	gac	ggc	cag	gtc	ttc	tac	gtc	633			
Ile	Leu	Ser	Ala	Lys	Ser	Ala	Tyr	Val	Asp	Gly	Gln	Val	Phe	Tyr	Val				
				185					190					195					
ggc	gag	gcc	gac	tcc	acc	ccc	ccg	gcg	gac	tgg	gaa	cgg	ccg	ctg	gac	681			
Gly	Glu	Ala	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala	Asp	Trp	Glu	Arg	Pro	Leu	Asp				
			200					205					210						
ggc	aag	gtc	gcc	atc	gtg	acc	ggt	gcg	gcc	cgc	gga	atc	ggc	gcc	acg	729			
Gly	Lys	Val	Ala	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Ala	Arg	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr				
		215					220					225							
atc	gcc	gag	gtg	ttc	gcc	cgc	gac	ggc	gcc	cgc	gtg	gtc	gcg	atc	gac	777			
Ile	Ala	Glu	Val	Phe	Ala	Arg	Asp	Gly	Ala	Arg	Val	Val	Ala	Ile	Asp				
	230					235						240							
gtg	gaa	tcg	gcc	gcc	gag	acg	ctg	gcc	gag	acg	gcc	agc	cgg	gtc	ggc	825			
Val	Glu	Ser	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Glu	Thr	Ala	Ser	Arg	Val	Gly				
245					250					255					260				
ggc	acc	gcg	ctg	tgg	ctc	gac	gtc	acc	gcc	ccc	gac	gcc	gtc	gac	aag	873			

Gly Thr Ala Leu Trp Leu Asp Val Thr Ala Pro Asp Ala Val Asp Lys	
265 270 275	
atc acc gag cac ctg cgc gag cac cac ggc ggt cac gcc gac atc ctg	921
Ile Thr Glu His Leu Arg Glu His His Gly Gly His Ala Asp Ile Leu	
280 285 290	
gtc aac aac gcc ggg atc acc cgc gac aag ctg ctg gcc aac atg gac	969
Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Lys Leu Leu Ala Asn Met Asp	
295 300 305	
gac gcg cgc tgg gac gcc gtg ttg gcc gtg aat ctg ctt gcc cca ctt	1017
Asp Ala Arg Trp Asp Ala Val Leu Ala Val Asn Leu Leu Ala Pro Leu	
310 315 320	
cgc ctt acc gaa ggg ctg gtg ggc aac ggc agc atc ggc gaa ggc ggc	1065
Arg Leu Thr Glu Gly Leu Val Gly Asn Gly Ser Ile Gly Glu Gly Gly	
325 330 335 340	
cgc atc gtc ggc ctt tcg tcg atg gcc ggc atc gcg ggc aac cgc ggc	1113
Arg Ile Val Gly Leu Ser Ser Met Ala Gly Ile Ala Gly Asn Arg Gly	
345 350 355	
cag acc aac tac gcc acc acc aag gca ggc atg atc ggc ctc acc cag	1161
Gln Thr Asn Tyr Ala Thr Thr Lys Ala Gly Met Ile Gly Leu Thr Gln	
360 365 370	
gcg ctg gcg ccg gag ctc tac gac aag ggc atc acc atc aac gcc gtc	1209
Ala Leu Ala Pro Glu Leu Tyr Asp Lys Gly Ile Thr Ile Asn Ala Val	
375 380 385	
gcg ccg gga ttc atc gag acc cag atg acg gcc gcc atc ccg ctg gcc	1257
Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Gln Met Thr Ala Ala Ile Pro Leu Ala	
390 395 400	
acc cgc gag gtg ggg cgc cgg atg aac tcg ctg ctg cag ggc ggg cag	1305
Thr Arg Glu Val Gly Arg Arg Met Asn Ser Leu Leu Gln Gly Gly Gln	
405 410 415 420	
ccg gtg gac gtc gcc gaa acc atc gcc tac ttc gcc agc ccg gcg tcg	1353
Pro Val Asp Val Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Phe Ala Ser Pro Ala Ser	
425 430 435	
aac gcg gtg acc ggc aac gtc atc cgg gtc tgc ggc cag gcg atg ctg	1401
Asn Ala Val Thr Gly Asn Val Ile Arg Val Cys Gly Gln Ala Met Leu	
440 445 450	
ggg gca tga	1410
Gly Ala	
<210> 8	
<211> 454	
<212> PRT	
<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种	
<400> 8	
Val Ala Pro Lys Val Ser Ser Asp Leu Phe Ser Gln Ile Val Asn Ser	
1 5 10 15	

Gly Pro Gly Ser Phe Leu Ala Lys Gln Leu Gly Val Pro Gln Pro Glu
 20 25 30

Thr Leu Arg Arg Tyr Arg Pro Gly Asp Pro Pro Leu Ala Gly Ser Leu
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Glu Gly Arg Val Val Glu Pro Leu Arg Ala Ala Leu
 50 55 60

Ala Lys Asp Tyr Asp Leu Val Gly Asn Asn Leu Gly Gly Arg Trp Ala
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Gly Gly Leu Val Phe Asp Ala Thr Gly Ile Thr Thr Pro
 85 90 95

Glu Gly Leu Lys Gly Leu Tyr Glu Phe Phe Thr Pro Leu Leu Arg Asn
 100 105 110

Leu Gly His Cys Ala Arg Val Val Val Val Gly Thr Thr Pro Asp Ala
 115 120 125

Ala Ala Gly Pro His Glu Arg Ile Ala Gln Arg Ala Leu Glu Gly Phe
 130 135 140

Thr Arg Ser Leu Gly Lys Glu Leu Arg Asn Gly Ser Thr Val Ala Leu
 145 150 155 160

Val Tyr Leu Ser Pro Ala Ala Lys Pro Ala Ala Thr Gly Leu Glu Ser
 165 170 175

Thr Met Arg Phe Ile Leu Ser Ala Lys Ser Ala Tyr Val Asp Gly Gln
 180 185 190

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

Arg Pro Leu Asp Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Ala Ala Arg Gly
 210 215 220

Ile Gly Ala Thr Ile Ala Glu Val Phe Ala Arg Asp Gly Ala Arg Val
 225 230 235 240

Val Ala Ile Asp Val Glu Ser Ala Ala Glu Thr Leu Ala Glu Thr Ala
 245 250 255

Ser Arg Val Gly Gly Thr Ala Leu Trp Leu Asp Val Thr Ala Pro Asp
 260 265 270

Ala Val Asp Lys Ile Thr Glu His Leu Arg Glu His His Gly Gly His
 275 280 285

Ala Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Thr Arg Asp Lys Leu Leu
 290 295 300

Ala Asn Met Asp Asp Ala Arg Trp Asp Ala Val Leu Ala Val Asn Leu
 305 310 315 320

Leu Ala Pro Leu Arg Leu Thr Glu Gly Leu Val Gly Asn Gly Ser Ile
 325 330 335

Gly Glu Gly Gly Arg Ile Val Gly Leu Ser Ser Met Ala Gly Ile Ala
 340 345 350

Gly Asn Arg Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Thr Thr Lys Ala Gly Met Ile
 355 360 365

Gly Leu Thr Gln Ala Leu Ala Pro Glu Leu Tyr Asp Lys Gly Ile Thr
 370 375 380

Ile Asn Ala Val Ala Pro Gly Phe Ile Glu Thr Gln Met Thr Ala Ala
 385 390 395 400

Ile Pro Leu Ala Thr Arg Glu Val Gly Arg Arg Met Asn Ser Leu Leu
 405 410 415

Gln Gly Gly Gln Pro Val Asp Val Ala Glu Thr Ile Ala Tyr Phe Ala
 420 425 430

Ser Pro Ala Ser Asn Ala Val Thr Gly Asn Val Ile Arg Val Cys Gly
 435 440 445

Gln Ala Met Leu Gly Ala
 450

<210> 9

<211> 625

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> misc_1 特征

<222> (592)..(592)

<223> "n"

<220>

<221> CDS

```

<222> (179)..(625)
<223>

<220>
<221> misc_ 特征
<222> (619)..(619)
<223> "n"

<400> 9
aattcgcgca taccogtcac tggtcacaac gccacatgct ggtaggctgt ggaatcgagg      60
gtcaatccgg atcggacccc aacgtcgact tgtgggcgcc aattcgcggg ttttcgcccc      120
gcaagtgcac gttcggcgcg aatcgggtgag gtgggcacag gtgaatgacg aagaggac      178
atg ctg gtc gcc acg gtg cgg gcg ttc atc gac cgc gag gtc aaa ccg      226
Met Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Phe Ile Asp Arg Glu Val Lys Pro
1          5          10          15
acc gtg cgc gag gtg gag cac gcc gat gcc tat ccc gag gcg tgg atc      274
Thr Val Arg Glu Val Glu His Ala Asp Ala Tyr Pro Glu Ala Trp Ile
20          25          30
gag cag atg aag cgg atc ggg atc tac ggg ctg gcg gtg ccc gag gaa      322
Glu Gln Met Lys Arg Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Ala Val Pro Glu Glu
35          40          45
tac ggt ggt tcg ccg gtg tcc atg ccg tgc tac gtg cgg gtc acc gag      370
Tyr Gly Gly Ser Pro Val Ser Met Pro Cys Tyr Val Arg Val Thr Glu
50          55          60
cag ctg gcg cgc ggc tgg atg agc ctg gcc ggg gcg atg ggc ggg cac      418
Gln Leu Ala Arg Gly Trp Met Ser Leu Ala Gly Ala Met Gly Gly His
65          70          75          80
acc gtg gtg gcc aag ctg cta acg ctg ttc ggc acc gag gac cas aag      466
Thr Val Val Ala Lys Leu Leu Thr Leu Phe Gly Thr Glu Asp Xaa Lys
85          90          95
cgg gcc tac ctg ccg cgg atg gcc agc ggc gaa atc cgg gcc acc atg      514
Arg Ala Tyr Leu Pro Arg Met Ala Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Met
100          105          110
gcg ttg acc gag ccc sgc ggc ggc tcg gac ctg cag aac atg tcg acc      562
Ala Leu Thr Glu Pro Xaa Gly Gly Ser Asp Leu Gln Asn Met Ser Thr
115          120          125
acc gcg ctg ccc gac ccc gac tcc gac ggn ctg gtg gtc aac ggg gcc      610
Thr Ala Leu Pro Asp Pro Asp Ser Asp Gly Leu Val Val Asn Gly Ala
130          135          140
aag acc tgn atc aac      625
Lys Thr Xaa Ile Asn
145

<210> 10
<211> 149

```

```

<212> PRT
<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>
<221> misc_特征
<222> (95)..(95)
<223> 95 位的 'Xaa' 代表 Gln 或 His。
<220>
<221> misc_特征
<222> (118)..(118)
<223> 118 位的 'Xaa' 代表 Gly 或 Arg。
<220>
<221> misc_特征
<222> (147)..(147)
<223> 147 位的 'Xaa' 代表 Trp 或 Cys。
<220>
<221> misc_特征
<222> (592)..(592)
<223> "n"
<220>
<221> misc_特征
<222> (619)..(619)
<223> "n"
<400> 10

Met Leu Val Ala Thr Val Arg Ala Phe Ile Asp Arg Glu Val Lys Pro
1          5          10          15

Thr Val Arg Glu Val Glu His Ala Asp Ala Tyr Pro Glu Ala Trp Ile
20          25          30

Glu Gln Met Lys Arg Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Ala Val Pro Glu Glu
35          40          45

Tyr Gly Gly Ser Pro Val Ser Met Pro Cys Tyr Val Arg Val Thr Glu
50          55          60

Gln Leu Ala Arg Gly Trp Met Ser Leu Ala Gly Ala Met Gly Gly His
65          70          75          80

```

Thr Val Val Ala Lys Leu Leu Thr Leu Phe Gly Thr Glu Asp Xaa Lys
85 90 95

Arg Ala Tyr Leu Pro Arg Met Ala Ser Gly Glu Ile Arg Ala Thr Met
100 105 110

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

Thr Ala Leu Pro Asp Pro Asp Ser Asp Gly Leu Val Val Asn Gly Ala
130 135 140

Lys Thr Xaa Ile Asn
145

<210> 11

<211> 241

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (147)..(239)

<223>

<400> 11
gtgggggcaa gccaaattacg ttcgcatcga cccggcacag gcggtcgctc acgtcatcaa 60

catgcccgtc atccccgatg aggctcgaat gaccttgcta cgcagggcgt gaacgcacga 120

cgaaaacggac cggaggtgaa agggac atg agc cac gcc gat caa ctc gct cgg 173
Met Ser His Ala Asp Gln Leu Ala Arg
1 5

acg cac ctg gcg ccc gat cct gcg gac ctg tcg cgc ctg gtc gcc ggc 221
Thr His Leu Ala Pro Asp Pro Ala Asp Leu Ser Arg Leu Val Ala Gly
10 15 20 25

acc cac cac gac ccg cac gg 241
Thr His His Asp Pro His
30

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<400> 12

Met Ser His Ala Asp Gln Leu Ala Arg Thr His Leu Ala Pro Asp Pro
1 5 10 15

Ala Asp Leu Ser Arg Leu Val Ala Gly Thr His His Asp Pro His
20 25 30

<210> 13

<211> 236

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(214)

<223>

<400> 13

ggacacc aac gtg acc ggg gtg ttt ctc acc gcc cag gcg gcg gcc cgg 49
Asn Val Thr Gly Val Phe Leu Thr Ala Gln Ala Ala Ala Arg
1 5 10

gcg atg atg cgg cag ggc cgc gcc gcc gcc atc atc acc acc gcc tcg 97
Ala Met Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Ala Ile Ile Thr Thr Ala Ser
15 20 25 30

atg tcc ggg cac atc atc aac gtc ccg cag cag gtc ggc cac tac tgc 145
Met Ser Gly His Ile Ile Asn Val Pro Gln Gln Val Gly His Tyr Cys
35 40 45

gcc agc aag gcg gcc gtg atc cag ctg acc aag gcc atg gcc gtc gaa 193
Ala Ser Lys Ala Ala Val Ile Gln Leu Thr Lys Ala Met Ala Val Glu
50 55 60

ttc tgc agg atc cgt cga ctc tagactcgag caagcttatg ca 236
Phe Cys Arg Ile Arg Arg Leu
65

<210> 14

<211> 69

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<400> 14

Asn Val Thr Gly Val Phe Leu Thr Ala Gln Ala Ala Ala Arg Ala Met
1 5 10 15

Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Ala Ile Ile Thr Thr Ala Ser Met Ser
 20 25 30

Gly His Ile Ile Asn Val Pro Gln Gln Val Gly His Tyr Cys Ala Ser
 35 40 45

Lys Ala Ala Val Ile Gln Leu Thr Lys Ala Met Ala Val Glu Phe Cys
 50 55 60

Arg Ile Arg Arg Leu
 65

<210> 15

<211> 419

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> misc_特征

<222> (331)..(331)

<223> "n"

<220>

<221> misc_特征

<222> (398)..(398)

<223> "n"

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(417)

<223>

<400> 15
 cggccaccgc acccagggga gcc atg act cac acc aag gcc ggt cgt gcc 51
 Met Thr His Thr Lys Ala Gly Arg Ala
 1 5

gcg tgg ccg gcc gcc tgc gcg gtc gtc ctg tcc gcc gcc gcg ctg ttg 99
 Ala Trp Pro Ala Ala Cys Ala Val Val Leu Ser Ala Ala Ala Leu Leu
 10 15 20 25

tgc gcg gca gcg gcc gcc gcg gac gaa gcc gat gac gcg ttc ctc gcc 147
 Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Glu Ala Asp Asp Ala Phe Leu Ala
 30 35 40

```

ggc ctg gcc aag ggc ggg atc acc atg ttc gac gac gac gac gcg atc      195
Gly Leu Ala Lys Gly Gly Ile Thr Met Phe Asp Asp Asp Asp Ala Ile
          45                      50                      55

gcc atg ggc cac agc gtg tgc tgc agc atc gac gcc aac ccc aac gtg      243
Ala Met Gly His Ser Val Cys Ser Ser Ile Asp Ala Asn Pro Asn Val
          60                      65                      70

tgc atg ctg gcg ctg cgg ctg acc aag caa acc ccg ttg acg ccg aag      291
Ser Met Leu Ala Leu Arg Leu Thr Lys Gln Thr Pro Leu Thr Pro Lys
          75                      80                      85

caa tcc ggc tac ttc atc ggt ctt tgc gtc gcc agc tac ntg ccc gca      339
Gln Ser Gly Tyr Phe Ile Gly Leu Ser Val Ala Ser Tyr Xaa Pro Ala
          90                      95                      100                      105

gta caa gga cga cgt cga ccc ctc gct ggg ctg gct gat ccc gcc gcc      387
Val Gln Gly Arg Arg Arg Pro Leu Ala Gly Leu Ala Asp Pro Ala Ala
          110                      115                      120

gct gat gtg ang ttg ccg gcc ggc atc ggc gt                          419
Ala Asp Val Xaa Leu Pro Ala Gly Ile Gly
          125                      130

```

<210> 16

<211> 131

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> misc_特征

<222> (103)..(103)

<223> 103 位的 'Xaa' 代表 Met、Val 或 Leu。

<220>

<221> misc_特征

<222> (125)..(125)

<223> 125 位的 'Xaa' 代表 Lys、Arg、Thr 或 Met。

<220>

<221> misc_特征

<222> (331)..(331)

<223> "n"

<220>

<221> misc_特征

<222> (398)..(398)

<223> "n"

<400> 16

Met Thr His Thr Lys Ala Gly Arg Ala Ala Trp Pro Ala Ala Cys Ala
1 5 10 15

Val Val Leu Ser Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala
20 25 30

Asp Glu Ala Asp Asp Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Lys Gly Gly Ile
35 40 45

Thr Met Phe Asp Asp Asp Ala Ile Ala Met Gly His Ser Val Cys
50 55 60

Ser Ser Ile Asp Ala Asn Pro Asn Val Ser Met Leu Ala Leu Arg Leu
65 70 75 80

Thr Lys Gln Thr Pro Leu Thr Pro Lys Gln Ser Gly Tyr Phe Ile Gly
85 90 95

Leu Ser Val Ala Ser Tyr Xaa Pro Ala Val Gln Gly Arg Arg Arg Pro
100 105 110

Leu Ala Gly Leu Ala Asp Pro Ala Ala Ala Asp Val Xaa Leu Pro Ala
115 120 125

Gly Ile Gly
130

<210> 17

<211> 392

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (94)..(390)

<223>

<400> 17

cggcgtagca tcgtcaagtc gttgcccgcg ctgatgccgg agcggcagta aggagttcgg 60

ctggtgcaaa aacgcttgcc cacagtcggt ttg gtg ctg acg gcc gtt gtc gcc 114
Val Leu Thr Ala Val Val Ala
1 5

ggt atc gcc ggg tgc agc gcg gcg cag acc gtg ccg cgc aag gcc gcc 162
Gly Ile Ala Gly Cys Ser Ala Ala Gln Thr Val Pro Arg Lys Ala Ala
10 15 20

```

cgg ctg acc atc gac ggt gcc acc cac acg acc cgc ccg ccg tcc tgc      210
Arg Leu Thr Ile Asp Gly Ala Thr His Thr Thr Arg Pro Pro Ser Cys
  25                               30                               35

cgg cag gac cag atg tat cgg acc atc aac atc ccc gac cac gac ggt      258
Arg Gln Asp Gln Met Tyr Arg Thr Ile Asn Ile Pro Asp His Asp Gly
  40                               45                               50                               55

gga gtc gaa gcg gtg gtg ctg ctc agc ggt tac cgg gtg atg ccg cag      306
Gly Val Glu Ala Val Val Leu Leu Ser Gly Tyr Arg Val Met Pro Gln
                               60                               65                               70

tgg gtg aag atc cgg aac gtc gac ggc ttc acc ggc agt cta ctg gcc      354
Trp Val Lys Ile Arg Asn Val Asp Gly Phe Thr Gly Ser Leu Leu Ala
                               75                               80                               85

asg gcg gag tgg gcg acg cgc acg tcg atc tca cma at                      392
Xaa Ala Glu Trp Ala Thr Arg Thr Ser Ile Ser Xaa
                               90                               95

```

<210> 18

<211> 99

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> misc_特征

<222> (88)..(88)

<223> 88位的‘Xaa’代表 Arg 或 Thr

<220>

<221> misc_特征

<222> (99)..(99)

<223> 99位的‘Xaa’代表 Gln 或 Pro。

<400> 18

```

Val Leu Thr Ala Val Val Ala Gly Ile Ala Gly Cys Ser Ala Ala Gln
  1                               5                               10                               15

```

```

Thr Val Pro Arg Lys Ala Ala Arg Leu Thr Ile Asp Gly Ala Thr His
  20                               25                               30

```

```

Thr Thr Arg Pro Pro Ser Cys Arg Gln Asp Gln Met Tyr Arg Thr Ile
  35                               40                               45

```

```

Asn Ile Pro Asp His Asp Gly Gly Val Glu Ala Val Val Leu Leu Ser
  50                               55                               60

```

```

Gly Tyr Arg Val Met Pro Gln Trp Val Lys Ile Arg Asn Val Asp Gly
  65                               70                               75                               80

```

Phe Thr Gly Ser Leu Leu Ala Xaa Ala Glu Trp Ala Thr Arg Thr Ser
85 90 95

Ile Ser Xaa

<210> 19

<211> 1884

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1884)

<223>

<400> 19
taaccaggag ca atg gct cgt gcg gtc ggt atc gac ctc ggg acc acc aac 51
Met Ala Arg Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn
1 5 10

tcc gtc gtc gca gtc ctc gag ggc ggt gac ccc gtc gtc gtc gcc aac 99
Ser Val Val Ala Val Leu Glu Gly Gly Asp Pro Val Val Val Ala Asn
15 20 25

tcc gag ggc tcg cgg acc acc ccg tcc atc gtc gcg ttc gcc cgc aac 147
Ser Glu Gly Ser Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Ala Arg Asn
30 35 40 45

ggc gag gtg ctc gtc ggc cag ccc gcc aag aac cag gcg gtg acc aac 195
Gly Glu Val Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Asn Gln Ala Val Thr Asn
50 55 60

gtc gac cgc acc atc cgt tcg gtc aag cgg cac atg ggc acc gac tgg 243
Val Asp Arg Thr Ile Arg Ser Val Lys Arg His Met Gly Thr Asp Trp
65 70 75

tcc atc gag atc gac ggc aag aaa tac acc gct cag gag atc agc gcc 291
Ser Ile Glu Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Thr Ala Gln Glu Ile Ser Ala
80 85 90

cgc gtg ctg atg aag ctc aag cgc gac gcc gag gcc tat ctg ggt gag 339
Arg Val Leu Met Lys Leu Lys Arg Asp Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Glu
95 100 105

gac atc acc gac gcg gtc atc acc gta ccg gcg tac ttc aac gac gcc 387
Asp Ile Thr Asp Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala
110 115 120 125

cag cgt cag gcg acc aag gaa gcc ggc cag atc gcc ggc ctc aac gtg 435
Gln Arg Gln Ala Thr Lys Glu Ala Gly Gln Ile Ala Gly Leu Asn Val
130 135 140

ctg cgc atc gtc aac gag ccg acc gcg gcc gcg ctg gcc tac ggc ctg 483

Leu Arg Ile Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Gly Leu 145 150 155	
gac aag ggc gag aag gag cag acc atc ctg gtc ttc gac ctc ggc ggc Asp Lys Gly Glu Lys Glu Gln Thr Ile Leu Val Phe Asp Leu Gly Gly 160 165 170	531
ggc acg ttc gac gtt tcg ctg ctc gag atc ggc gag ggt gtg gtc gag Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Glu Ile Gly Glu Gly Val Val Glu 175 180 185	579
gtc cgc gcc acc agc ggt gac aac caa ctc ggt ggc gac gac tgg gac Val Arg Ala Thr Ser Gly Asp Asn Gln Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp 190 195 200 205	627
gac cgg atc gtc aac tgg ctg gtc gac aag ttc aag ggc acc agc ggc Asp Arg Ile Val Asn Trp Leu Val Asp Lys Phe Lys Gly Thr Ser Gly 210 215 220	675
atc gac ctg acc aag gac aag atg gcc atg cag cgg ctg cgt gag gcc Ile Asp Leu Thr Lys Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu Arg Glu Ala 225 230 235	723
gcc gag aag gcc aag atc gag ttg tcc agc tcg cag agc acc tcg atc Ala Glu Lys Ala Lys Ile Glu Leu Ser Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ile 240 245 250	771
aac ctg ccc tac atc acc gtc gac gcg gac aag aac ccg ctg ttc ctc Asn Leu Pro Tyr Ile Thr Val Asp Ala Asp Lys Asn Pro Leu Phe Leu 255 260 265	819
gac gag cag ctg acc cgc gcc gaa ttc cag cgc atc acc cag gat ctg Asp Glu Gln Leu Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Ile Thr Gln Asp Leu 270 275 280 285	867
ctg gac cgc acc cgt cag ccg ttc aag tcg gtg atc gcc gac gcc ggc Leu Asp Arg Thr Arg Gln Pro Phe Lys Ser Val Ile Ala Asp Ala Gly 290 295 300	915
atc tcg gtg tcc gac atc gac cac gtg gtg ctg gtg ggt ggt tcc acc Ile Ser Val Ser Asp Ile Asp His Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr 305 310 315	963
cgg atg ccc gcg gtg acc gac ctg gtc aag gaa ctc acc ggc ggc aag Arg Met Pro Ala Val Thr Asp Leu Val Lys Glu Leu Thr Gly Gly Lys 320 325 330	1011
gag ccc aac aag ggc gtc aac ccc gac gag gtt gtc gcg gtg ggt gcc Glu Pro Asn Lys Gly Val Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Val Gly Ala 335 340 345	1059
gcc ctg cag gcc ggt gtg ctt aag ggc gag gtg aaa gac gtt ctg ctg Ala Leu Gln Ala Gly Val Leu Lys Gly Glu Val Lys Asp Val Leu Leu 350 355 360 365	1107
ctt gac gtt acg ccg ctg agc ctg ggt atc gag acc aag ggt ggc gtg Leu Asp Val Thr Pro Leu Ser Leu Gly Ile Glu Thr Lys Gly Gly Val 370 375 380	1155
atg acc aag ctg atc gaa cgc aac acc acc atc ccg acc aag cgg tcc Met Thr Lys Leu Ile Glu Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Arg Ser 385 390 395	1203
gag acg ttc acc acg gcc gac gac aac cag ccg tcg gtg cag atc cag Glu Thr Phe Thr Thr Ala Asp Asp Asn Gln Pro Ser Val Gln Ile Gln 400 405 410	1251
gtg tat cag ggt gag cgc gaa atc gcc gcg cac aac aag ctg ctc ggc	1299

Val Tyr Gln Gly Glu Arg Glu Ile Ala Ala His Asn Lys Leu Leu Gly
 415 420 425
 tcc ttc gag ctg acc gga att ccg ccg gcg ccc cgc ggc gtg ccg cag 1347
 Ser Phe Glu Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln
 430 435 440 445
 atc gag gtc acc ttc gac atc gac gcc aac ggc atc gtg cac gtc acc 1395
 Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Val His Val Thr
 450 455 460
 gcc aag gac aag ggc acc ggt aag gag aac acg atc aag atc cag gag 1443
 Ala Lys Asp Lys Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Ile Lys Ile Gln Glu
 465 470 475
 ggc tcc ggc ctg tcc aag gag gag atc gac cgg atg atc aag gac gcc 1491
 Gly Ser Glu Leu Ser Lys Glu Glu Ile Asp Arg Met Ile Lys Asp Ala
 480 485 490
 gag gcg cac gcc gag gag gac cgc aag agg cgc gag gaa gcc gac gtc 1539
 Glu Ala His Ala Glu Glu Ser Arg Arg Lys Arg Arg Glu Glu Ala Asp Val
 495 500 505
 cgc aac caa gcg gaa tcg ctt gtc tac cag acg gag aag ttc gtc aag 1587
 Arg Asn Gln Ala Glu Ser Leu Val Tyr Gln Thr Glu Lys Phe Val Lys
 510 515 520 525
 gac cag cgc gag gcc gag ggc ggc tcg aag gtt ccc gag gag acg ctg 1635
 Asp Gln Arg Glu Ala Glu Gly Gly Ser Lys Val Pro Glu Glu Thr Leu
 530 535 540
 tcc aag gtc gac gcc gcg atc gcc gac gcc aag acg gcc ctg ggc gcc 1683
 Ser Lys Val Asp Ala Ala Ile Ala Asp Ala Lys Thr Ala Leu Gly Gly
 545 550 555
 acc gac atc acc gcg atc aag tcg gcg atg gag aag ctc ggc cag gag 1731
 Thr Asp Ile Thr Ala Ile Lys Ser Ala Met Glu Lys Leu Gly Gln Glu
 560 565 570
 tog caa gcg ctg gga cag gca atc tac gag gcc acc cag gcc gag tcc 1779
 Ser Gln Ala Leu Gly Gln Ala Ile Tyr Glu Ala Thr Gln Ala Glu Ser
 575 580 585
 gcc cag gct ggc ggg ccg gac ggt gcc gcg gcc ggc ggc ggg tcc gga 1827
 Ala Gln Ala Gly Gly Pro Asp Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 590 595 600 605
 tcc gcc gac gat gtt gtg gac gcg gag gtg gtc gac gat gac cgg gag 1875
 Ser Ala Asp Asp Val Val Asp Ala Glu Val Val Asp Asp Asp Arg Glu
 610 615 620
 tcc aag tga 1884
 Ser Lys

<210> 20

<211> 623

<212> PRT

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<400> 20

Met Ala Arg Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Val Val
 1 5 10 15
 Ala Val Leu Glu Gly Gly Asp Pro Val Val Val Ala Asn Ser Glu Gly
 20 25 30
 Ser Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Ala Arg Asn Gly Glu Val
 35 40 45
 Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Asn Gln Ala Val Thr Asn Val Asp Arg
 50 55 60
 Thr Ile Arg Ser Val Lys Arg His Met Gly Thr Asp Trp Ser Ile Glu
 65 70 75 80
 Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Thr Ala Gln Glu Ile Ser Ala Arg Val Leu
 85 90 95
 Met Lys Leu Lys Arg Asp Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Glu Asp Ile Thr
 100 105 110
 Asp Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln
 115 120 125
 Ala Thr Lys Glu Ala Gly Gln Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile
 130 135 140
 Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly
 145 150 155 160
 Glu Lys Glu Gln Thr Ile Leu Val Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe
 165 170 175
 Asp Val Ser Leu Leu Glu Ile Gly Glu Gly Val Val Glu Val Arg Ala
 180 185 190
 Thr Ser Gly Asp Asn Gln Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp Asp Arg Ile
 195 200 205
 Val Asn Trp Leu Val Asp Lys Phe Lys Gly Thr Ser Gly Ile Asp Leu
 210 215 220
 Thr Lys Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu Arg Glu Ala Ala Glu Lys
 225 230 235 240
 Ala Lys Ile Glu Leu Ser Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ile Asn Leu Pro
 245 250 255
 Tyr Ile Thr Val Asp Ala Asp Lys Asn Pro Leu Phe Leu Asp Glu Gln
 260 265 270

Leu Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Ile Thr Gln Asp Leu Leu Asp Arg
 275 280 285

Thr Arg Gln Pro Phe Lys Ser Val Ile Ala Asp Ala Gly Ile Ser Val
 290 295 300

Ser Asp Ile Asp His Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Met Pro
 305 310 315 320

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

Lys Gly Val Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Val Gly Ala Ala Leu Gln
 340 345 350

Ala Gly Val Leu Lys Gly Glu Val Lys Asp Val Leu Leu Leu Asp Val
 355 360 365

Thr Pro Leu Ser Leu Gly Ile Glu Thr Lys Gly Gly Val Met Thr Lys
 370 375 380

Leu Ile Glu Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Arg Ser Glu Thr Phe
 385 390 395 400

Thr Thr Ala Asp Asp Asn Gln Pro Ser Val Gln Ile Gln Val Tyr Gln
 405 410 415

Gly Glu Arg Glu Ile Ala Ala His Asn Lys Leu Leu Gly Ser Phe Glu
 420 425 430

Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val
 435 440 445

Thr Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Val His Val Thr Ala Lys Asp
 450 455 460

Lys Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Ile Lys Ile Gln Glu Gly Ser Gly
 465 470 475 480

Leu Ser Lys Glu Glu Ile Asp Arg Met Ile Lys Asp Ala Glu Ala His
 485 490 495

Ala Glu Glu Asp Arg Lys Arg Arg Glu Glu Ala Asp Val Arg Asn Gln
 500 505 510

Ala Glu Ser Leu Val Tyr Gln Thr Glu Lys Phe Val Lys Asp Gln Arg
 515 520 525

Glu Ala Glu Gly Gly Ser Lys Val Pro Glu Glu Thr Leu Ser Lys Val
 530 535 540

Asp Ala Ala Ile Ala Asp Ala Lys Thr Ala Leu Gly Gly Thr Asp Ile
 545 550 555 560

Thr Ala Ile Lys Ser Ala Met Glu Lys Leu Gly Gln Glu Ser Gln Ala
 565 570 575

Leu Gly Gln Ala Ile Tyr Glu Ala Thr Gln Ala Glu Ser Ala Gln Ala
 580 585 590

Gly Gly Pro Asp Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ala Asp
 595 600 605

Asp Val Val Asp Ala Glu Val Val Asp Asp Asp Arg Glu Ser Lys
 610 615 620

<210> 21

<211> 1701

<212> DNA

<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种

<220>

<221> CDS

<222> (76)..(1701)

<223>

<400> 21
 gcagcctggt cgtcogtcgc gggcaactgca cccggccagg acgtgtcatc cccaatccgg 60

aggaatcact tcgca atg gcc aag aca att gcg tac gac gaa gag gcc cgt 111
 Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg
 1 5 10

cgc ggc ctc gag cgg ggg ctc aac gcc ctc gcc gac gcg gta aag gtc 159
 Arg Gly Leu Glu Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val
 15 20 25

acg ttg ggc ccc aag ggt cgc aac gtc gtc ctg gag aag aag tgg ggt 207
 Thr Leu Gly Pro Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly
 30 35 40

gcc ccc acg atc acc aac gat ggt gtg tcc atc gcc aag gag atc gag 255
 Ala Pro Thr Ile Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu
 45 50 55 60

ctg gag gac ccg tac gag aag atc ggc gcc gag ctg gtc aag gaa gtc 303
 Leu Glu Asp Pro Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val
 65 70 75

gcc aag aag acc gac gac gtc gcc ggt gac ggc acg acg acg gcc acg 351
 Ala Lys Lys Thr Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr
 80 85 90

gtg ctc gcc cag gcg ttg gtc cgc gag ggc ctg cgc aac gtc gcg gcc 399

Val	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Gly	Leu	Arg	Asn	Val	Ala	Ala		
		95					100					105					
ggc	gcc	aac	ccg	ctg	ggt	ctc	aag	cgc	ggc	atc	gag	aag	gcc	gtc	gag		447
Gly	Ala	Asn	Pro	Leu	Gly	Leu	Lys	Arg	Gly	Ile	Glu	Lys	Ala	Val	Glu		
		110				115					120						
aag	gtc	acc	gag	acc	ctg	ctc	aag	tcg	gcc	aag	gag	gtc	gag	acc	aag		495
Lys	Val	Thr	Glu	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	Ala	Lys	Glu	Val	Glu	Thr	Lys		
		125			130					135					140		
gac	cag	atc	gct	gcc	acc	gcg	gcc	atc	tcc	gcg	ggc	gac	cag	tcg	atc		543
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile	Ser	Ala	Gly	Asp	Gln	Ser	Ile		
				145					150						155		
ggc	gac	ctg	atc	gcc	gag	gcg	atg	gac	aag	gtc	ggc	aac	gag	ggc	gtc		591
Gly	Asp	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala	Met	Asp	Lys	Val	Gly	Asn	Glu	Gly	Val		
			160					165					170				
atc	acc	gtc	gag	gag	tcc	aac	acc	ttc	ggc	ctg	cag	ctc	gag	ctc	acc		639
Ile	Thr	Val	Glu	Glu	Ser	Asn	Thr	Phe	Gly	Leu	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr		
		175					180					185					
gag	ggt	atg	cgg	ttc	gac	aag	ggt	tac	atc	tcg	ggc	tac	ttc	gtc	acg		687
Glu	Gly	Met	Arg	Phe	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ile	Ser	Gly	Tyr	Phe	Val	Thr		
		190				195					200						
gac	gcc	gag	cgt	cag	gaa	gcg	gtc	ctc	gag	gac	ccg	ttc	atc	ctg	ctg		735
Asp	Ala	Glu	Arg	Gln	Glu	Ala	Val	Leu	Glu	Asp	Pro	Phe	Ile	Leu	Leu		
		205			210				215						220		
gtc	agc	tcc	aag	gtc	tcg	acc	gtc	aag	gac	ctg	ctg	ccg	ctg	ctg	gag		783
Val	Ser	Ser	Lys	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu		
				225					230						235		
aag	gtc	atc	cag	gcc	ggc	aag	ccg	ctg	ctg	atc	atc	gcc	gag	gac	gtc		831
Lys	Val	Ile	Gln	Ala	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Ile	Ile	Ala	Glu	Asp	Val		
			240				245						250				
gag	ggc	gag	gcc	ctg	tcc	acc	ctg	gtc	gtc	aac	aag	atc	cgc	ggc	acc		879
Glu	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Thr	Leu	Val	Val	Asn	Lys	Ile	Arg	Gly	Thr		
		255				260						265					
ttc	aag	tcg	gtg	gcc	gtc	aag	gcg	ccc	ggc	ttc	ggc	gac	cgc	cgc	aag		927
Phe	Lys	Ser	Val	Ala	Val	Lys	Ala	Pro	Gly	Phe	Gly	Asp	Arg	Arg	Lys		
		270				275					280						
gcg	atg	ctt	cag	gac	atg	gcc	atc	ctc	acc	ggc	ggc	cag	gtc	atc	agc		975
Ala	Met	Leu	Gln	Asp	Met	Ala	Ile	Leu	Thr	Gly	Gly	Gln	Val	Ile	Ser		
		285			290				295						300		
gaa	gag	gtc	ggc	ctg	tcg	ctg	gag	agc	gcc	gac	atc	tcg	ctg	ctc	ggt		1023
Glu	Glu	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala	Asp	Ile	Ser	Leu	Leu	Gly		
				305					310						315		
aag	gcc	cgc	aag	gtc	gtc	gtc	acc	aag	gac	gag	acc	acc	atc	gtc	gag		1071
Lys	Ala	Arg	Lys	Val	Val	Val	Thr	Lys	Asp	Glu	Thr	Thr	Ile	Val	Glu		
			320					325					330				
ggc	gcc	ggt	gac	tcc	gac	gcc	atc	gcc	ggc	cgg	gtg	gcc	cag	atc	cgc		1119
Gly	Ala	Gly	Asp	Ser	Asp	Ala	Ile	Ala	Gly	Arg	Val	Ala	Gln	Ile	Arg		
		335				340						345					
acc	gag	atc	gag	aac	agc	gac	tcc	gac	tac	gac	cgc	gag	aag	ctg	cag		1167
Thr	Glu	Ile	Glu	Asn	Ser	Asp	Ser	Asp	Tyr	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln		
		350				355					360						
gag	cgg	ctg	gcc	aag	ctg	gcc	ggc	ggc	gtg	gcg	gtg	atc	aag	gcc	ggc		1215

Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly 365 370 375 380	
gcc gcg acc gag gtc gag ctc aag gag cgc aag cac cgc atc gag gac Ala Ala Thr Glu Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp 385 390 395	1263
gcg gtc cgc aac gcc aag gcg gcc gtg gag gag ggc atc gtc gcc ggc Ala Val Arg Asn Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly 400 405 410	1311
ggt ggc gtg gcc ctg ctg cac gcg atc ccg gct ctg gac gag ctg aag Gly Gly Val Ala Leu Leu His Ala Ile Pro Ala Leu Asp Glu Leu Lys 415 420 425	1359
ctc gag ggc gaa gag gcg acc ggc gcc aac atc gtc cgg gtg gcc ctc Leu Glu Gly Glu Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Arg Val Ala Leu 430 435 440	1407
gag gct ccg ctg aag cag atc gcc ttc aac ggt ggc ctg gag ccc ggc Glu Ala Pro Leu Lys Gln Ile Ala Phe Asn Gly Gly Leu Glu Pro Gly 445 450 455 460	1455
gtg gtg gcc gag aag gtc cgc aac tcg ccc gcc ggt acc ggc ctc aac Val Val Ala Glu Lys Val Arg Asn Ser Pro Ala Gly Thr Gly Leu Asn 465 470 475	1503
gcc gcc acc ggt gag tac gag gac ctg ctc aag gcc ggc att gcc gac Ala Ala Thr Gly Glu Tyr Glu Asp Leu Leu Lys Ala Gly Ile Ala Asp 480 485 490	1551
ccg gtg aag gtc acc cgc tcg gcg ctg cag aac gcg gcg tcc atc gcg Pro Val Lys Val Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala 495 500 505	1599
ggg ctg ttc ctg acc acc gag gcg gtc gtc gcc gac aag ccg gag aag Gly Leu Phe Leu Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys 510 515 520	1647
gcg gcc gct ccc gcg ggc gac ccg acc ggc ggc atg ggc ggc atg gac Ala Ala Ala Pro Ala Gly Asp Pro Thr Gly Gly Met Gly Gly Met Asp 525 530 535 540	1695
ttc tga Phe	1701
<210> 22	
<211> 541	
<212> PRT	
<213> 鸟分枝杆菌副结核亚种	
<400> 22	
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu 1 5 10 15	
Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro 20 25 30	

Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile
 35 40 45

Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro
 50 55 60

Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr
 65 70 75 80

Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln
 85 90 95

Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro
 100 105 110

Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Lys Val Thr Glu
 115 120 125

Thr Leu Leu Lys Ser Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Asp Gln Ile Ala
 130 135 140

Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile
 145 150 155 160

Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu
 165 170 175

Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg
 180 185 190

Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg
 195 200 205

Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Phe Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys
 210 215 220

Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gln
 225 230 235 240

Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala
 245 250 255

Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val
 260 265 270

Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu Gln
 275 280 285

Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser Glu Glu Val Gly
 290 295 300

Leu Ser Leu Glu Ser Ala Asp Ile Ser Leu Leu Gly Lys Ala Arg Lys
305 310 315 320

Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu Gly Ala Gly Asp
325 330 335

Ser Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Thr Glu Ile Glu
340 345 350

Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala
355 360 365

Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly Ala Ala Thr Glu
370 375 380

Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn
385 390 395 400

Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly Val Ala
405 410 415

Leu Leu His Ala Ile Pro Ala Leu Asp Glu Leu Lys Leu Glu Gly Glu
420 425 430

Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Arg Val Ala Leu Glu Ala Pro Leu
435 440 445

Lys Gln Ile Ala Phe Asn Gly Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu
450 455 460

Lys Val Arg Asn Ser Pro Ala Gly Thr Gly Leu Asn Ala Ala Thr Gly
465 470 475 480

Glu Tyr Glu Asp Leu Leu Lys Ala Gly Ile Ala Asp Pro Val Lys Val
485 490 495

Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Gly Leu Phe Leu
500 505 510

Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys Ala Ala Ala Pro
515 520 525

Ala Gly Asp Pro Thr Gly Gly Met Gly Gly Met Asp Phe
530 535 540

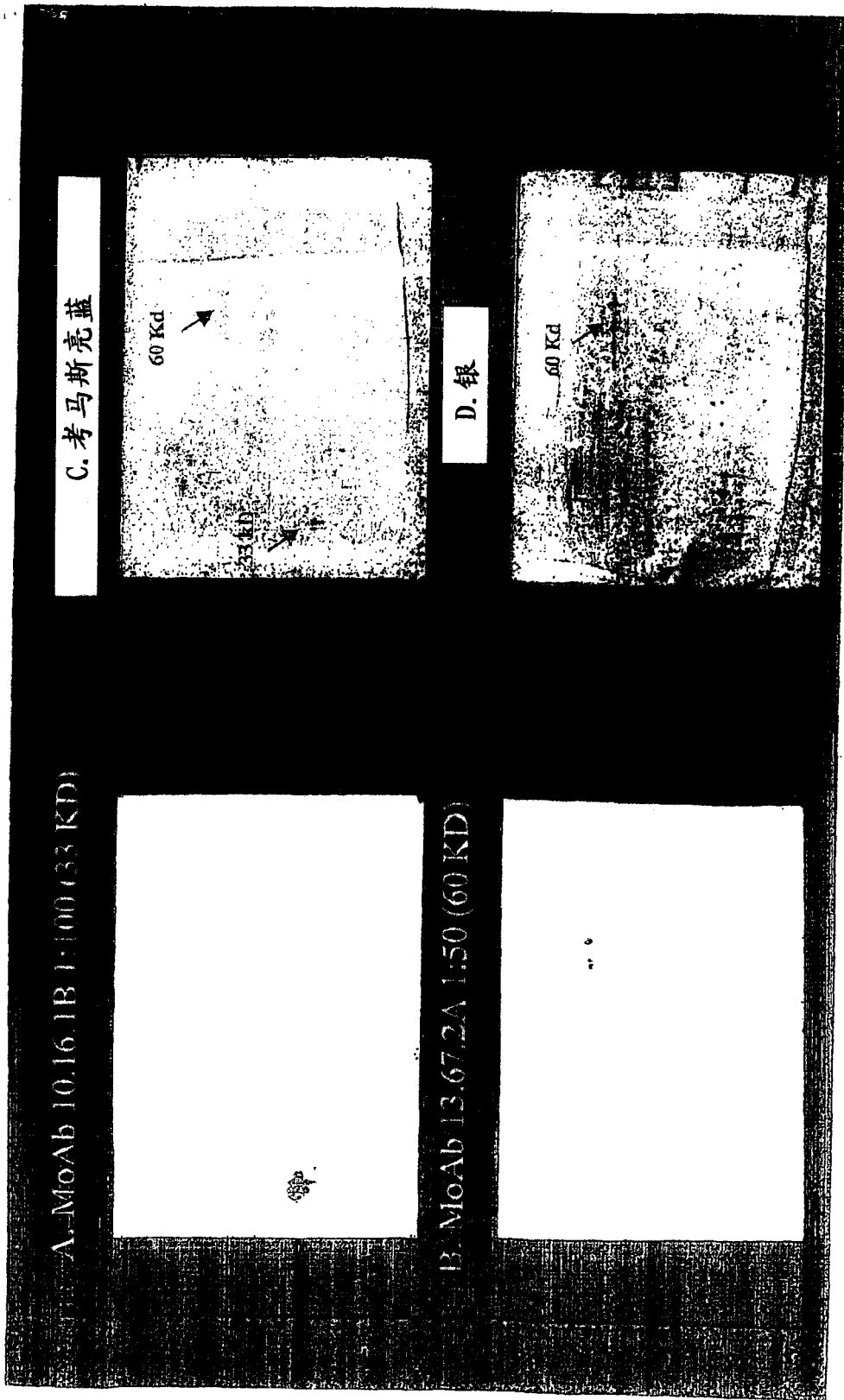
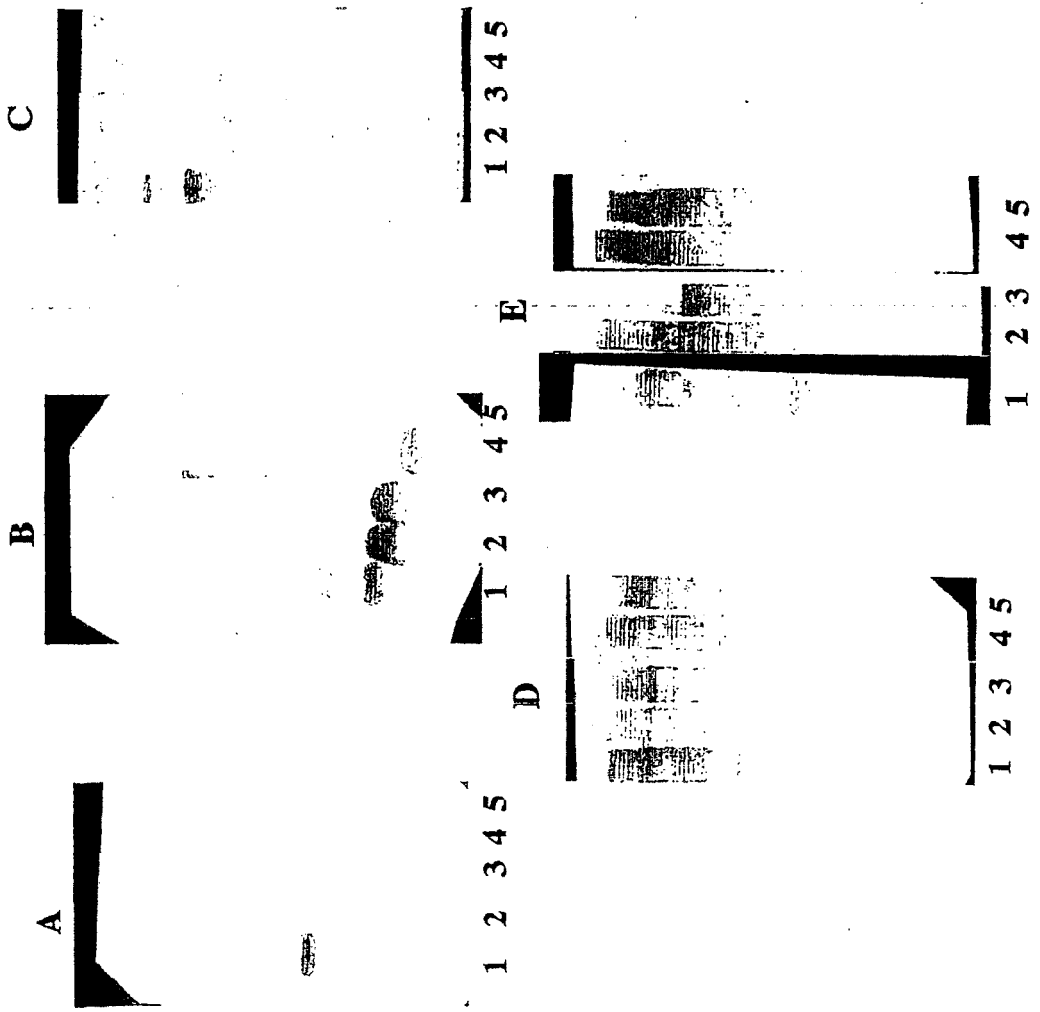


图1



专利名称(译)	副结核分枝杆菌感染的诊断和疫苗		
公开(公告)号	CN1323162C	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN03803467.0	申请日	2003-01-13
[标]发明人	P T J 威廉姆森 S F 维斯特芬 D 巴克尔 F G 范兹德维尔德 J E R 瑟尔		
发明人	P·T·J·威廉姆森 S·F·维斯特芬 D·巴克尔 F·G·范兹德维尔德 J·E·R·瑟尔		
IPC分类号	C12N5/10 G01N33/569 C07K14/35 C12N15/31 C07K16/12 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K39/04 G01N33/53 A61K39/00 A61K39/005 A61K39/02 A61K39/085 A61K39/09 A61K39/108 A61K39/135 A61K39/145 A61K39/155 A61K39/215 A61K39/245 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/09 C12Q1/04		
CPC分类号	A61K2039/51 C07K14/35 A61K2039/53 A61K2039/505 A61K39/00		
代理人(译)	赵艳华		
优先权	2002075089 2002-01-11 EP		
其他公开文献	CN1628249A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及编码鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白的核酸序列，这种核酸序列的一部分，它编码这种蛋白的免疫原性片段，包含这种核酸序列或其一部分的DNA片段、重组DNA分子、活重组载体和宿主细胞。本发明也涉及这种序列编码的鸟分枝杆菌副结核亚种蛋白及其免疫原性部分。此外，本发明涉及包含这种核酸序列或其一部分、包含这种核酸序列或其一部分的DNA片段、重组DNA分子、活重组载体和宿主细胞、蛋白或其免疫原性部分和抗这种蛋白或其免疫原性部分的抗体的疫苗。另外，本发明涉及所述蛋白在疫苗和制备疫苗中的用途。而且，本发明涉及所述核酸序列、蛋白或抗体用于诊断或接种目的的用途。而且，本发明涉及制备这种疫苗的方法。最后本发明涉及包含这种核酸、蛋白或抗这种蛋白的抗体的诊断试剂盒。