

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710000018.1

[51] Int. Cl.

G12N 15/30 (2006.01)

C07K 14/44 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 100999737A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.1.4

[21] 申请号 200710000018.1

[71] 申请人 首都医科大学

地址 100097 北京市右安门外西头条10号

[72] 发明人 诸欣平 杨静 杨雅平 顾园
李强

[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 罗菊华

权利要求书2页 说明书29页 附图2页

[54] 发明名称

旋毛虫副肌球蛋白基因及其应用

[57] 摘要

本发明涉及旋毛虫新抗原基因副肌球蛋白基因，含有该基因的载体的构建及原核表达载体，以及所表达的蛋白。本发明还涉及所述基因及编码的蛋白的应用。旋毛虫副肌球蛋白基因重组蛋白免疫动物后产生高滴度的抗体并对攻击感染产生有效的免疫保护性。

1、分离的多核苷酸分子，其中包含从如下组核苷酸序列中选择的核苷酸序列：

(A) 与 SEQ ID NO: 1 所示序列或 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少 95% 同源的核苷酸序列；

(B) 与 SEQ ID NO: 1 所示序列或 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框的互补序列在中等严格杂交条件、优选高严格杂交条件下可发生杂交的核苷酸序列；

(C) 与 SEQ ID NO: 1 编码相同序列的蛋白质、但因遗传密码的简并性而在序列上有所不同的核苷酸序列；

(D) (A)、(B) 或 (C) 所述核苷酸序列的片段；和

(E) 与 (A)、(B)、(C) 或 (D) 所述核苷酸序列互补的核苷酸序列。

2、如权利要求 1 所述的多核苷酸分子，特征在于具有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列。

3、分离的多肽，其中包含从如下组序列中选择的氨基酸序列：

(A) 与 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少 95% 同源的氨基酸序列；

(B) 由于一或多个（例如 1-25 个、1-20 个，1-15 个，1-10 个，1-5 个）氨基酸残基的替代、缺失或插入而与 SEQ ID NO: 2 所示序列有所不同的氨基酸序列；和

(C) (A) 或 (B) 所述氨基酸序列的免疫原性片段。

4、权利要求 3 的分离的多肽，其中包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。

5、重组载体（优选表达载体），其中包含权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子。

6、含有权利要求 5 的重组表达载体的宿主细胞。

7、生产多肽的方法，包括在能使所述多肽表达的条件下培养权利要

求 6 所述的宿主细胞和回收所表达的多肽。

8、抗体，其可特异性结合权利要求 3 或 4 所述多肽。

9、用于预防或治疗动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的药物组合物，所述的药物组合物中含有权利要求 3 或 4 所述多肽。

10、用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的诊断试剂盒，其中含有权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子、可检测权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子的核酸探针、可特异性扩增权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子的引物、权利要求 3 或 4 所述多肽、或者权利要求 8 所述抗体。

11、权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子、可检测权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子的核酸探针、可特异性扩增权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子的引物、权利要求 3 或 4 所述多肽、或者权利要求 8 所述抗体在制备用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的诊断试剂中的用途。

12、权利要求 1 或 2 所述多核苷酸分子或者权利要求 3 或 4 所述多肽或者权利要求 8 所述抗体在制备用于预防或治疗人畜旋毛虫感染的药物中的用途。

13、寡核苷酸，其中含有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或者其互补序列中的至少 15 个、优选至少 25 个、更优选至少 50 个核苷酸或者其相似序列，所述相似序列能够与 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或者其互补序列在高度严格杂交条件下发生杂交。

14、权利要求 13 的寡核苷酸用于体外诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的用途。

15. 融合蛋白，其中包含权利要求 3 或 4 所述多肽及另一融合对象。

16. 权利要求 15 的融合蛋白，其中所述融合对象是 β -半乳糖苷酶，谷胱苷肽-S-转移酶或多组氨酸等。

旋毛虫副肌球蛋白基因及其应用

发明领域

本发明为一种旋毛虫新抗原基因副肌球蛋白基因，含有该基因的载体的构建及原核表达载体，以及所表达的蛋白及由蛋白免疫动物产生的抗体。本发明还涉及所述基因和蛋白的应用。

背景技术

旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*, 简称旋毛虫), 可感染人及150多种动物, 它所引起的旋毛虫病是一种人畜共患寄生虫病, 呈全球性分布, 严重地威胁了人类健康并对畜牧业造成巨大经济损失。旋毛虫生活史简述如下: 当人或动物宿主生食或半生食含旋毛虫囊包的肉类(猪肉、狗肉等), 囊包内幼虫在胃液、肠液作用下逸出并在小肠内发育为成虫。雌、雄虫交配后雌虫产新生幼虫。新生幼虫侵入肠粘膜淋巴管或静脉, 随淋巴和血循环到达宿主横纹肌继续发育。旋毛虫的致病过程分为三期: 侵入期、幼虫移行及囊包形成期, 即在该虫生活史的每个环节均可使宿主致病。

旋毛虫病临床表现复杂多样, 仅依临床症状及时作出准确诊断较困难, 给及时的治疗造成一定难度, 因此该病的免疫诊断及预防成为当务之急。由于病原体不能在体外大量传代培养, 限制了抗原的获取; 加之旋毛虫抗原的复杂性、多样性, 造成目前尚无很好的高敏感度高特异性的抗原作为诊断或保护性疫苗的候选抗原分子。

发明内容

本发明的目的在于: 寻找和克隆旋毛虫抗原新基因, 对该基因的基因重组蛋白进行免疫学功能的研究, 为旋毛虫病的免疫诊断及免疫预防、治疗提供新的候选抗原分子。

本发明提供了分离的多核苷酸分子，其包含从如下组核苷酸序列中选择的核苷酸序列：

(A) 与 SEQ ID NO: 1 所示序列或 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框（第 75-2732 位核苷酸）至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少 95% 同源的核苷酸序列；

(B) 与 SEQ ID NO: 1 所示序列或 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框的互补序列在中等严格杂交条件、优选高严格杂交条件下可发生杂交的核苷酸序列；

(C) 与 SEQ ID NO: 1 编码相同序列的蛋白质、但因遗传密码的简并性而在序列上有所不同的核苷酸序列；

(D) (A)、(B) 或 (C) 所述核苷酸序列的片段；和

(E) 与 (A)、(B)、(C) 或 (D) 所述核苷酸序列互补的核苷酸序列。

优选地，本发明的多核苷酸分子编码具有免疫原性的多肽。

在一个具体实施方案中，所述的多核苷酸分子具有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或者 SEQ ID NO: 1 第 75-2732 位核苷酸所示开放阅读框序列。

本发明还提供了分离的多肽，其包含从如下组氨基酸序列中选择的氨基酸序列：

(A) 与 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%、尤其是至少 95% 同源的氨基酸序列；

(B) 由于一或多个（例如 1-25 个、1-20 个，1-15 个，1-10 个，1-5 个）氨基酸残基的替代、缺失或插入而与 SEQ ID NO: 2 所示序列有所不同的氨基酸序列；和

(C) (A) 或 (B) 所述氨基酸序列的免疫原性片段。

优选地，本发明的多肽具有免疫原性。

在一个具体实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。

本发明还提供重组载体，其包含本发明所述多核苷酸分子。优选所述重组载体是表达载体，其包含并能够表达包含本发明所述多核苷酸分

子。

本发明还提供含有本发明重组表达载体的宿主细胞。

本发明还提供生产多肽的方法，包括在能使所述多肽表达的条件下培养本发明所述的宿主细胞和回收所表达的多肽。

本发明还提供抗体，其可特异性结合本发明所述多肽。所述抗体可以是多克隆或者单克隆抗体。

本发明还提供用于预防或治疗动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的药物组合物，所述的药物组合物中含有本发明所述多肽或者多核苷酸或者抗体。

本发明还提供用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的诊断试剂盒，其中含有本发明所述多核苷酸分子、可检测本发明所述多核苷酸分子的核酸探针、可特异性扩增本发明所述多核苷酸分子的引物、本发明所述多肽、或者本发明所述抗体。

本发明提供本发明所述多核苷酸分子、可检测本发明所述多核苷酸分子的核酸探针、可特异性扩增本发明所述多核苷酸分子的引物、本发明所述多肽、或者本发明所述抗体在制备用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的诊断试剂中的用途。

本发明还提供本发明所述多核苷酸分子或者多肽或者抗体在制备用于预防或治疗人畜旋毛虫感染的药物中的用途。

本发明还提供寡核苷酸，其含有 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO: 1 第 75-2732 位核苷酸所示开放阅读框序列或者其互补序列中的至少 15 个、优选至少 25 个、更优选至少 50 个核苷酸或者其相似序列，所述相似序列能够与 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列或者其互补序列在高度严格杂交条件下发生杂交。优选地，所述寡核苷酸是可检测本发明所述多核苷酸分子的核酸探针、或者可特异性扩增本发明所述多核苷酸分子的引物。

本发明还提供本发明寡核苷酸用于诊断动物，尤其是牲畜和人中的旋毛虫感染的用途。

本发明还提供融合蛋白，其包含本发明所述多肽及另一融合对象。

在一个具体实施方案中，所述另一融合对象是 β -半乳糖苷酶，谷胱苷肽-S-转移酶或多组氨酸等。

本发明的核苷酸序列可以用免疫筛选从旋毛虫 cDNA 基因文库中获得。本发明还涉及该序列的变异体，例如一个或多个碱基的缺失、添加或替换，但不改变所编码的蛋白质的功能。变异体可以是天然存在的等效变异体或非天然存在的变异体。

本发明的多肽可以通过构建上述基因的原核或真核表达载体，转化到适合的宿主细胞中，从培养物中纯化多肽来制备。本发明的多肽包括序列 2 的多肽，以及具有等效功能的它的衍生物、片段或类似物。

作为具体实例，本发明发明人利用分子生物学技术，如：cDNA 文库免疫筛选、分子克隆、聚合酶链式反应 (PCR)、DNA 序列测定、Southern 杂交、Western 印迹杂交法，克隆鉴定了旋毛虫抗原新基因副肌球蛋白基因；利用基因表达及免疫学技术获得该基因的重组蛋白及高效价免疫血清；并对该蛋白的细胞定位、免疫原性及免疫保护性进行了分析。

该基因达到的技术指标为：

1. 在本发明中采用 cDNA 文库免疫筛选获得该基因的全长 cDNA 序列。全长 2996bp，起始密码子 ATG 位于序列第 74bp 处，TGA 为终止密码子，编码的蛋白质含 885 个氨基酸。

2. 旋毛虫副肌球蛋白基因的 885 个氨基酸重组蛋白在大肠杆菌 BL21 株中获得表达并纯化（图 1）。

3. 旋毛虫副肌球蛋白基因重组蛋白免疫动物获高滴度抗副肌球蛋白免疫血清。

4. 旋毛虫副肌球蛋白基因重组蛋白为感染旋毛虫的病人血清、病猪血清、病兔血清所识别。并与副肌球蛋白基因重组蛋白人工免疫鼠血清发生反应（图 2）。

5. 旋毛虫副肌球蛋白基因重组蛋白免疫动物后对攻击感染产生有效的免疫保护性（表 1）。

本发明发现了旋毛虫副肌球蛋白抗原基因全长 cDNA；获得了纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白及进行了免疫学功能的研究，为旋毛虫病的免

疫预防提供了新的保护性候选抗原分子。并且也可以用于制备诊断试剂。

附图说明

图 1 SDS-PAGE 电泳: 副肌球蛋白基因重组蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化。其中, 各泳道代表:

M. 蛋白分子量 Marker

1. 空载体全菌蛋白

2. 未经 IPTG 诱导的全菌蛋白

3. IPTG 诱导后的全菌蛋白

4. 纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白

箭头所指为重组蛋白带

图 2 Western 免疫印迹鉴定副肌球蛋白基因重组蛋白的免疫特性。其中, 各泳道代表:

1. 纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白与旋毛虫病人血清反应

2. 纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白与感染旋毛虫的猪血清反应

3. 纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白与感染旋毛虫的兔血清反应

4. 纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白与该重组蛋白人工免疫鼠血清反应。

具体实施方式

本文所用的术语“多核苷酸分子”、“多核苷酸序列”、“编码序列”、“开放阅读框(ORF)”等是指单链或双链的 DNA 和 RNA 分子, 可包含一个或多个原核序列, cDNA 序列, 包含外显子和内含子的基因组 DNA 序列, 化学合成的 DNA 和 RNA 序列, 以及有义和相应的反义链。

生产和操作本文公开的多核苷酸分子及寡核苷酸分子的方法是本领域技术人员已知的, 并可按照已描述的重组技术(参见 Maniatis 等, 1989, 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约; Ausubel 等, 1989, 分子生物学当前技术, Greene Publishing Associates

& Wiley Interscience, NY; Sambrook 等, 1989, 分子克隆, 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约; Innis 等(编), 1995, PCR 策略, Academic Press, Inc., San Diego; 和 Erlich(编), 1992, PCR 技术, 牛津大学出版社, New York) 完成。

本发明提供了一种编码免疫原性多肽的分离的多核苷酸分子。在一个实施方案中, 本发明分离的多核苷酸分子包含选自下列成员的核苷酸序列: (1) SEQ ID NO: 1 或者 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框(第 75-2732 位)所示的核苷酸序列; (2) 与 SEQ ID NO: 1 或者 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框所示核苷酸序列至少 70% 相同、优选至少 80% 相同、更优选至少 90% 相同、最优选 95% 相同的核苷酸序列; (3) 在中等严谨杂交条件下(即在 0.5M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM EDTA 中于 65°C 与结合于滤膜的 DNA 杂交, 并在 0.2xSSC/0.1%SDS 中于 42°C 洗涤的条件; 参见 Ausubel 等(编), 1989, 分子生物学当前技术, 第 1 卷, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., NY, P. 2.10.3)、优选高度严谨杂交条件(即在 0.5M NaHPO₄、7%SDS、1mM EDTA 中于 65°C 与结合于滤膜的 DNA 杂交, 并在 0.1x SSC/0.1% SDS 中于 68°C 洗涤条件; 参阅 Ausubel 等, 1989, 上述文献)下与具有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框或者其互补序列的多核苷酸分子能杂交的核苷酸序列; (4) 与 SEQ ID NO: 1 或者 SEQ ID NO: 1 中开放阅读框编码相同序列的蛋白质、但因遗传密码的简并性而在序列上有所不同的核苷酸序列; 或者 (5) 与 (1)-(4) 中任一核苷酸序列互补的核苷酸序列。

在一个实施方案中, 本发明多核苷酸分子包含编码旋毛虫副肌球蛋白的核苷酸序列。

在一个实施方案中, 本发明多核苷酸分子可用于以标准扩增技术扩增旋毛虫特异性多核苷酸分子, 或作为诊断试剂用以检测被旋毛虫感染的动物体液或组织样品中旋毛虫特异性多核苷酸的存在。

本发明进一步提供包含编码同源于本发明旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽之多肽的核苷酸序列的一种分离多核苷酸分子。本文中提到的同源于旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽的多肽时所使用的术语“同源”

是指多肽本来具有旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽的氨基酸序列，但其中一个或多个（例如1-25个、1-20个，1-15个，1-10个，1-5个）氨基酸残基已被不同的氨基酸残基保守地替代，并且所得到的多肽可用于实施本发明。保守氨基酸替代是本领域已知的。造成这样的替代的规则包含由Dayhof, M. D. (1978, 国家生物医学研究基金, Washington, D. C., 第5卷, 增刊3)等所述的替代规则。更具体地说, 保守氨基酸替代发生在与其酸性、极性或侧链大小相关联的氨基酸家族内。一般可将遗传编码的氨基酸分为四组: (1) 酸性氨基酸 = 天冬氨酸、谷氨酸; (2) 碱性氨基酸 = 赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3) 非极性氨基酸 = 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸; (4) 不带电的极性氨基酸 = 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸也共同分类为芳香氨基酸。任何特定组内的一个或多个替代, 例如用异亮氨酸或缬氨酸替代亮氨酸、或用谷氨酸替代天冬氨酸、或用丝氨酸替代苏氨酸, 或任何其他氨基酸残基结构上相关的氨基酸残基, 例如有相似酸性、极性、侧链大小的, 或在其某些组合方面有相似性的氨基酸残基替代, 一般对多肽的功能或免疫原性不会有太大影响。

基本同源的蛋白质和多肽其特征在于具有一个或多个（例如1-25个、1-20个，1-15个，1-10个，1-5个）氨基酸替代、删除或添加。这些改变优选影响较小的变换, 即保守氨基酸替代(见表2)及其它不会严重影响蛋白质或多肽的折叠和活性的替代; 小的删除, 通常是1-约30个氨基酸的小删除; 及小的氨基或羧基末端延伸, 诸如氨基末端甲硫氨酸残基, 长达约20-25个残基的小连接肽, 或便于纯化的小延伸(亲和标记), 如多组氨酸束、蛋白A(Nilsson等, EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson等, 酶学方法, 198: 3, 1991)。编码亲和标记的DNA可从产品供应商处购买到。

本文中所说的多肽“可用于实施本发明”是指该多肽可用作诊断试剂, 以检测新近被旋毛虫感染的、或已被旋毛虫感染的动物血液或血清样品中旋毛虫特异性抗体的存在; 或者可用作抗原产生旋毛虫特异性抗

体(例如特异结合的抗体、中和性抗体、治疗性抗体);或者可作为免疫原对动物进行预防性免疫或者治疗性免疫,或者本文提到的该多肽的任何用途。

本发明进一步提供与本发明上述多核苷酸分子能杂交,或与具有作为本发明上述多核苷酸分子之互补物的核苷酸序列的多核苷酸分子能杂交的寡核苷酸分子。这样的寡核苷酸分子较好是至少长约15nt,更好是长约25nt,尤其是至少50nt,并可在高度严紧条件下与一种或多种上述多核苷酸分子杂交。所说的高度严紧条件是在6XSSC/0.5%焦磷酸钠中洗膜,并且洗膜温度对于长约14碱基者为大约37℃,长约17碱基者为大约48℃,长约20碱基者为大约55℃,长约23碱基者为大约60℃。本发明的较长寡核苷酸分子的其他杂交条件可由本领域技术人员按照标准技术来确定。在一优选实施方案中,本发明的寡核苷酸分子互补于本发明上述多核苷酸分子至少之一的一部分。

本发明的寡核苷酸分子可用于多种目的,其中包括作为扩增旋毛虫特异性多核苷酸分子的引物以用于诸如疾病鉴别诊断,或者编码或用作基因调节的反义分子。就诊断方面来说,可使用适当设计的引物检测动物组织或体液等样品中旋毛虫特异性多核苷酸分子的存在。特异性扩增产物的产生可支持旋毛虫感染的诊断,而缺少扩增的产物则可能指示没有感染。例如Innis等人(1995,出处同前)和Erlicch(1992,出处同前)编辑的前述文献中描述了进行扩增的方法,例如聚合酶链反应(PCR)方法。本领域已知的其他扩增技术也可使用,例如连接酶链反应法。也可使用本文公开的多核苷酸分子的序列设计用于从旋毛虫的其他种或株系中分离同源基因的引物。

本发明进一步提供包含本发明多核苷酸分子的克隆载体、表达载体、包含任何所说载体的被转化宿主细胞,以及由其衍生的新的株系或细胞系。在一优选实施方案中,本发明提供包含一种多核苷酸分子的重组载体,所说多核苷酸分子具有编码旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽的核苷酸序列。

优选地,本发明的重组载体,特别是表达载体的构建方式能使得本

发明多核苷酸分子的编码序列与转录和翻译编码序列所需的一个或多个调节元件可操作性地连接，以产生多肽。本文中使用的术语“调节元件”包括但不只限于编码诱导型和非诱导型启动子、增强子、操纵子及本领域已知的可用于驱动和/或调节多核苷酸编码序列表达的其它元件的核苷酸序列。另外，本文所说的编码序列与一个或多个调节元件“可操作性地连接”是指调节元件可有效地调节并允许转录编码序列或翻译其 mRNA，或发挥两方面的功能。

构建包含与适当的调节元件可操作性地连接的特定编码序列的重组载体的方法是已知的，并可使用这些方法实现本发明。这些方法包括体外重组技术、合成技术和体内遗传重组（如参见 Maniatis 等人(1989)的上述文献）。

可用于表达本发明的旋毛虫副肌球蛋白或者本发明免疫原性多肽编码序列的各种载体是本领域已知的，其中包括含有特定编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 和粘粒 DNA 表达载体。可经加工而含有本发明的多核苷酸分子的质粒包括 pUC8、pUC9、pBR322 和 pBR329 (Biorad Laboratories, Richmond, CA)、pPL 和 pKK223 (Pharmacia, Piscataway, NJ)、pQE50 (Qiagen, Chatsworth, CA) 和 pGEM-T EASY (Promega, Madison, WI) 等。可经加工而含有本发明的多核苷酸分子的典型真核表达载体包括蜕皮激素诱导型哺乳动物表达系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、基于巨细胞病毒启动子-增强子的系统 (Promega, Madison, WI; Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen)，和基于杆状病毒的表达系统 (Promega) 等。

这些和其他载体的调节元件可在其强度和特异性方面各不相同。基于所利用的宿主/载体系统，可以使用多种适当的转录和翻译元件中的任一种。例如，当在哺乳动物细胞系统中克隆时，可使用从哺乳动物细胞基因组中分离的启动子，如小鼠金属硫蛋白启动子，或从生长于这些细胞内的病毒中分离的启动子，如痘苗病毒 7.5K 启动子或莫洛尼鼠类肉瘤病毒长末端重复序列。可使用以重组 DNA 或合成技术得到的启动子以转录被插入的序列。另外，在特定诱导子，例如适于金属硫蛋白启动子

的锌和镉离子的存在下，由某些启动子启动的表达可以被增强。转录调节区或启动子的非限制性例子包括用于细菌的 β -gal 启动子、T7 启动子、TAC 启动子、trp 和 lac 启动子、trp-lac 融合启动子等；用于酵母的糖酵解酶启动子，如 ADH-I 和 ADH-II 启动子、GPK 启动子、PGI 启动子、TRP 启动子等；以及用于哺乳动物细胞的 SV40 早期和晚期启动子、腺病毒主要晚期启动子等。本发明进一步提供包含旋毛虫副肌球蛋白基因之启动子的核苷酸序列的多核苷酸分子，其可用于在旋毛虫中表达本发明的编码序列。

为足够地翻译被插入的编码序列，还需要特异性起始信号。这些信号一般包括 ATG 起始密码子及相邻序列。在将包含其自身的起始密码子和相邻序列的本发明的多核苷酸分子插入到适当的表达载体中的情况下，可能不必加入另外的翻译控制信号。然而，当只插入一部分编码序列时，可能需要包括 ATG 起始密码子等的外源翻译控制信号。可从各种来源，即天然和合成来源，得到这些外源翻译控制信号和起始密码子。再者，起始密码子必须与编码区的读框一致，以确保整个插入片段符合读框地翻译。

也可构建将表达包含本发明蛋白质或多肽和融合对象的融合蛋白质的表达载体。这样的融合蛋白质例如可用于产生抗旋毛虫蛋白的抗血清、研究旋毛虫蛋白的生化性质、工程化修饰表现有不同免疫学或功能性质的旋毛虫蛋白、帮助鉴定或纯化重组表达的旋毛虫蛋白或改善其稳定性。可能的融合蛋白表达载体包括但不只限于插入了编码 β 半乳糖苷酶和 trpE 融合体、麦芽糖结合蛋白融合体、谷胱甘肽-S-转移酶融合体及多组氨酸融合体（载体区域）之序列的载体。可用于构建编码这些和其他融合蛋白的表达载体的方法是本领域已知的。

可用融合蛋白质帮助纯化已表达的蛋白质。在一非限制性实施方案中，可使用直链淀粉树脂纯化副肌球蛋白或免疫原性多肽-麦芽糖结合性融合蛋白，可使用谷胱甘肽琼脂糖小球纯化副肌球蛋白或免疫原性多肽-谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白质，可使用二价镍树脂纯化副肌球蛋白或免疫原性多肽-多组氨酸融合蛋白质。或者，也可使用抗载体蛋白

质或肽的抗体对融合蛋白质进行亲和层析纯化。例如，可将编码单克隆抗体之靶表位的核苷酸序列工程化转移到与调节元件可操作性地连接的表达载体中，并限定其位置以使所表达的表位融合到本发明的旋毛虫蛋白上。在一非限制性实施方案中，可用标准技术在相当于副肌球蛋白或免疫原性多肽之氨基或羧基末端的某个点上插入编码FLAG™表位标记(其为亲水性标记肽)(Znternational Biotechnologies Inc.)的核苷酸序列中，然后可使用市售的抗FLAG™抗体检测并亲和纯化所表达的副肌球蛋白或免疫原性多肽-FLAG™表位融合体产物。

也可以修饰表达载体使之含有编码特定蛋白酶切割位点的多接头序列，从而可经特定蛋白酶处理而从载体区域或融合对象释放出已表达的旋毛虫蛋白。例如，融合蛋白载体可包含编码凝血酶或因子Xa裂解位点的核苷酸序列。

可使用已知方法将位于旋毛虫蛋白编码序列上游且读框一致的信号序列加工到表达载体中，以指导所表达之蛋白质的运输和分泌。信号序列的非限制性实例包括 α 因子、免疫球蛋白、外膜蛋白质、青霉素酶及T细胞受体等的信号序列。

为了有助于筛选出经本发明重组载体转化或转染的宿主细胞，可以工程化修饰载体使之进一步包含报道基因产物或其他选择标志的编码序列。这样的编码序列较好是与上述调节元件可操作性地连接的。用于实施本发明的报道基因是本领域熟知的，包括编码氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白、萤火虫荧光素酶和人生长激素等的基因。编码选择标志的核苷酸序列是本领域已知的，包括编码赋予抗生素抗性或抗代谢物抗性，或提供营养缺陷型需要等的基因产物的那些核苷酸序列。这些序列的例子包括编码胸苷激酶活性，或抗氨甲喋呤、氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、氨基糖苷或潮霉素等的那些序列。

本发明进一步提供包含本发明的多核苷酸分子或重组载体的已转化宿主细胞，以及由之衍生的细胞系。可用于实施本发明的宿主细胞可以是真核或原核细胞。这样的已转化宿主细胞包括但不只限于微生物，例如用重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA载体转化的细菌，或者用重组

载体转化的酵母，或者是动物细胞，如用重组病毒载体如杆状病毒感染的昆虫细胞，或用重组病毒载体如腺病毒或痘苗病毒感染的哺乳动物细胞等。例如，可使用大肠杆菌菌株，如 DH5 α 菌株。真核宿主细胞包括酵母细胞，但也可有效地利用小鼠、仓鼠、牛、猴或人细胞系等哺乳动物细胞。可用于表达本发明的重组蛋白质的真核宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、NIH/3T3 等。

较好是将本发明的重组载体转化或转染到细胞的基本均一培养物的一个或多个宿主细胞中。一般可按照已知技术，例如原生质体转化、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、微量注射、电穿孔、经与重组的病毒接触进行感染、脂质体介导的转染、DEAE-葡聚糖转染、转导、接合或微粒轰击等技术将载体导入宿主细胞内。可使用标准方法选择转化体，例如通过选择表达与重组表达载体相关的可选择标志如抗生素抗性的细胞的方法。

一旦将表达载体导入宿主细胞后，即可使用 Southern 杂交分析、限制性酶切分析、包括反转录酶 PCR (rt-PCR) 的 PCR 分析等标准技术证实本发明的多核苷酸分子是否整合并保留在宿主细胞基因组中或以附加体形式存在，或者用免疫学检测法检测预期的蛋白质产物。可用本领域已知的至少下列四种一般性方法中的一种鉴定含有和/或表达本发明的多核苷酸分子的宿主细胞：(i) DNA-DNA、DNA-RNA、或 RNA-反义 RNA 杂交；(ii) 检测“标志”基因功能的存在；(iii) 检测特异性 mRNA 转录本在宿主细胞中的表达，以估计转录水平；或 (iv) 以本领域已知的免疫检测法检测成熟多肽产物的存在。

一旦已将本发明的多核苷酸分子稳定导入到适当的宿主细胞中之后，即可克隆增殖已转化的宿主细胞，并在有助于最大量产生所编码的多肽的条件下培养所得到的细胞。这样的条件一般包括培养已转化的细胞达到高密度。当表达载体含有诱导型启动子时，可根据需要，利用温度改变、营养素耗尽、加入义务诱导剂(如糖类类似物，例如异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、过量代谢付产物积聚等适当诱导条件以诱导表达。

当多肽保留在宿主细胞内时，应收获并裂解细胞，并在本领域已知的尽可能减少蛋白质降解的提取条件下，例如于 4℃和/或有蛋白酶抑制剂存在条件下，从裂解物中基本上纯化或分离产物。如多肽能从宿主细胞中分泌出来，则可简单地收集已耗尽的营养素培养基，并从中基本上纯化或分离多肽。

必要时，可使用标准方法，包括但不只限于硫酸铵沉淀，大小分级分离、离子交换层析、HPLC、密度梯度离心及亲和层析法，从细胞裂解物或培养基中基本上纯化或分离多肽。如果多肽缺乏生物学活性，则可作根据分子大小、或与多肽特异性抗体的反应性，或根据融合体标记的存在检测之。用于实施本发明时，多肽可以是已分泌到培养液中或存在于细胞裂解物中的未纯化状态，但较好是已从中得到基本纯化或分离。本文中所说的多肽“基本上已纯化”，是指该多肽构成特定制剂中蛋白质的至少约 20%(重量)。另外，本文中所说的多肽“已分离”，指的是该多肽构成特定制剂中蛋白质的至少约 80%(重量)。

因此，本发明提供由本发明多核苷酸编码的基本上已纯化或分离的旋毛虫副肌球蛋白或者免疫原性多肽。在一优选实施方案中，旋毛虫副肌球蛋白或者免疫原性多肽具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

本发明进一步提供同源于所述旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽的多肽，其中术语“同源”具有上文就多肽所限定的含义。

本发明进一步提供由本发明任何一种上述多肽的基本部分组成的多肽。本文使用的术语 - 本发明多肽的“基本部分”或“肽片段”意指组成上小于相应全长度多肽之完整氨基酸序列、但包含其氨基酸序列的至少约 10%、较好至少约 20%、并可用于实施本发明的多肽(“可用于”具有上文就多肽所限定的含义)。特别优选的是具有免疫原性(即能够诱导免疫反应而产生特异地抗相应的全长度旋毛虫多肽的抗体)的肽片段。

本发明进一步提供包含与本领域已知的载体或融合对象融合的一种上述多肽的融合蛋白质。

本发明的多肽可用于多种目的，包括作为诊断试剂，例如以 ELISA 检测等标准检测法筛选动物血液或血清样品中的旋毛虫特异性抗体；或

如下所述用作产生多克隆或单克隆抗体的抗原，其中可以使用所述抗体作为诊断试剂，例如以 Western 印迹检测法等标准技术筛选动物细胞、组织或体液样品中的旋毛虫特异性蛋白质。

可以在蛋白质水平上修饰本发明的任何多肽，以改善或改变其生物学或免疫学特征。可使用已知技术对多肽进行一种或多种化学修饰，以制备其类似物。

可以在分子上连接一个或多个化学基团或另一种蛋白质如血清白蛋白、匙孔虫凝集素蛋白或 BSA，或者多聚氨基酸(如多聚赖氨酸)，或多糖(如 Sepharose，琼脂糖，或经过修饰或未经修饰的纤维素)上等，以制备本发明多肽的衍生物。进行这些连接反应的方法是蛋白质化学领域中已知的。

本发明进一步提供抗本发明多肽的分离抗体。在一优选实施方案中，可使用已知方法产生抗旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽的抗体。可用部分或基本上纯化或分离的旋毛虫副肌球蛋白或免疫原性多肽重组蛋白，或其如上文描述的同系物、融合蛋白、基本部分、类似物或衍生物免疫选自猪、牛、马、兔、山羊、绵羊或小鼠等各种宿主动物。可使用下文描述的佐剂提高抗体产生量。

可从被免疫动物的血清中得到和分离多克隆抗体，并使用常规方法试验其对抗原的特异性。或者，也可使用由培养连续细胞系生产抗体分子的任何技术制备并分离单克隆抗体。这些技术包括但不只限于原先由 Kohler 和 Milstein(自然, 1975, 256: 495-497)描述的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, 1983, 今日免疫学, 4: 72; Cote 等, 1983, 美国国家科学院院报, 80: 2026-2030), 以及 EBV 杂交瘤技术(Cole 等, 1985, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-86)。或者, 可采用已述的生产单链抗体的技术(如参见美国专利 4, 946, 778)生产旋毛虫抗原特异性单链抗体。

含有本发明多肽的特异性结合位点的抗体片段也包括在本发明范围内, 并可用已知技术制备。这样的片段包括但不只限于可由胃蛋白酶消化完整抗体分子而产生的 $F(ab')_2$ 片段, 和可经还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫

桥而产生的 Fab 片段。或者，也可构建 Fab 表达文库 (Huse 等, 1989, 科学, 246: 1275 - 1281), 以迅速鉴定对旋毛虫蛋白有所需特异性的 Fab 片段。

生产和分离单克隆抗体及抗体片段的技术是本领域已知的, 并在例如下列文献中给出了更详细的描述: Harlow 和 Lane, 1988, 抗体: 实验室手册, 冷泉港实验室和 J.W. Cooding, 1986, 单克隆抗体: 原理与实践, Academic Press, London (其列为本文参考文献)。

下列实施例只是举例描述, 而不用来限制本发明的范围。

实施例

实施例 1 旋毛虫副肌球蛋白基因的克隆及序列分析

1. 筛选血清 (人工免疫兔血清和人工感染兔血清) 的制备

收集分离自猪体的黑龙江株旋毛虫 (国际标准虫株编码 ISS533) 成虫, 将成虫虫体放于研磨器中, 冰浴下快速研磨 15 分钟。将研磨后的液体移入 10ml 离心管, 超声 (于冰上) 3 次, 3 分钟/次, 中间休息 1 分钟。反复冻融数次, 离心取上清即得全虫可溶性抗原。免疫日本大耳白兔 (1.6mg/只), 每周加强 1 次, 加强 4 次, 获得人工免疫兔血清; 实验兔喂以 4000 条旋毛虫肌幼虫, 4 周后获人工感染兔血清。经 ELISA 测定, 人工免疫兔血清和人工感染兔血清的血清滴度均达 1:4000 以上。

2. 免疫筛选表达文库

旋毛虫成虫 λ ZAP II cDNA 表达文库购自刘明远 (参考文献《中国旋毛虫分离株成虫和新生幼虫基因文库的构建和筛选》, 中国兽医学报, 1998, 18 (2): 147-150.)。

1 μ l 旋毛虫成虫 λ ZAP II cDNA 表达文库稀释液加入 600 μ l 宿主菌 XL1-Blue 中, 37 $^{\circ}$ C, 吸附 20 分钟加入顶层琼脂, 倒置于 42 $^{\circ}$ C 温箱中培养至有针尖大小的噬菌斑长出。把硝酸纤维素膜 (Gelman 公司) 铺在平板上, 放在 37 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜。第二天在室温下将膜做好标记, 从平板上揭下, 浸入一抗工作液 (人工免疫兔血清用 TBST 以 1:1000 稀释) 30

分钟，血清中加入了大肠杆菌噬菌体裂解液（STRTAGENE 公司）。把膜浸入二抗工作液—1: 7500 碱性磷酸酶-羊抗兔 IgG（Promega 公司），30 分钟。浸入显色液 NBT、BCIP 中（Promega 公司），显色充分后，加入 ddH₂O 终止。用 1: 1000 人工免疫兔血清筛选获得的阳性克隆，再用人工感染兔血清作为一抗（用 TBST 以 1: 1000 稀释）复筛，获得 3 个阳性克隆。经 PCR 及 Southern Blot 鉴定后，选取 Ts86 克隆进行 DNA 序列测定。

3. Ts86cDNA 序列与编码的氨基酸分析

Ts86cDNA 全长 2996bp(见 SEQ ID NO: 1)，开放阅读框（第 75-2732 位碱基，共 2658b），编码 885 个氨基酸（见 SEQ ID NO: 2），其理论分子量为 102KD。编码的蛋白经同源性分析，发现与十二指肠钩虫、旋盘尾丝虫、马来丝虫的副肌球蛋白同源性分别为 82%，82%和 79%，推断为旋毛虫副肌球蛋白基因。

核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1) (加下划线的碱基为开放阅读框的起始终止位置):

```
GGCACGAGCAGATCTAAAAGGATCTGTTGTAAATTGATTCTCCATTCGACAATCGAAAAAAC
TACATCAGCACCA7GTCTCTGTATCGCAGTCCCAGTGCGTCAGTGATGAGATCAGCAAGCAT
GCTCAGCCGAAGTGGCGGATTCGATGCTTACGGATTTGGAGGTTACGGTGCGCCAAGCCTCA
ACGTTGCCGACTTGGGTTCTTTGACCAGACTCGAGGATAAAAATTCGCCTGCTTCAAGATGAT
TTGAAACGGAAAGAGAATTGCGAAACCGAATTGAACGCGAACGTGCCGATTTGTCCTGCCA
ACTGATCAGCTTAACCGATCGATTGGAAGAGGCTGAAGGAACCACCGATGCCCAGATCGACG
CCAATCGAAAGCGTGAATCCGAATTGCAAAAGTTGAGAAAAATATTGGAAGATTCGCAATTG
GAAAGCGAAGATTCGCTGAACCAGCTGCGCAAGAAGCACCAAGAATCCCTTTTAGATTATCA
GCAGCAAATTGAACAACTTCAAAGAAAAATAGCAAAATCGACAGAGAACGACAACGTTTGC
AGCATGAAGTCATTGAACTTACTGCCGGAATTGATCAGATGCAAAAAGACAAGCATGCCGCG
GAAAAAGCTGCCGAAAAGCACGAAGCGCATGCCAGAGAGCTTCAGAACAGAGTTGACGATCT
GGCAAAAATTTGAACGACCTGGCCTCGCAGCGTCAACGTCTGCAACAGGAAAACAACGATT
TGATGAAAGAGTTGCACGATGTCAAAGTGCAAATGGAAAATATTCAACACGTCAAGACTCAA
CTTGCTCAACAGCTCGAAGAAGCACGTCGTCGACTCGAAGATGCGGAACGTGAACGTTTCGCA
```

AATGCAAACCCAGTTGCATCAGATGCAGCTGGAATTGGATTCAATTCAAGGTGCGTTGGAAG
AGGAATCGTCCGCACGTGCCGAAGCAGAGCACAAATTGTCGTTGGCAAATACGGAAATTTCC
CAGTGAAGAGCAAATTCGACGCCGAAGTTTCACTCCACCAAGAAGAAGTTGACGATCTGCG
TAAAAAATGATCCAAAAACAAGCAGAATATGAGGAACAAATTGAAATTATGCTGCAAAGA
TTTCCCAATTGGAAAAGCGAAAAGCCGTCTGCAGTCGGAAGTTGAAGTTTTGATAGTTGAT
TTGGAAAAGGCTCAAAGCACCATTGCCATTTTGGAAAGACAAAAAGAACAGCTCGAAAGAAT
GGTCGCCGAGATGAAGACACGCCTGGACGAGGTGACACAAGAGCTCGAAGCTACGCAACGAG
AACTCAGAGCGACGCAAGCGGAATTGCAAAGATGAAGCATCTTTATGAAAAAGCCGTGAA
CAGAAAGAAGCTCTGGCTAGGGAGAACAAAAAATTGCAAGACGATTTGCATGAAGCAAAGGA
AGCTTTGGCCGACGCGAACAGAAAATTGCACGAGCTGGATTTGGAGAATGCACGTCTGGCCG
GTGAAATCAGAGAACTGCAAATCGCGCTCAAGGAAGCCGAAGCGGCTAGACGTGACGCGGAA
AGTCGCGCACAGCGTGCAGTAGCTGAATTGCAAGCTCTGCGCGTGGAATGGAACGTCGTTT
ACAAGAAAAAGAAGAAGAAATGGAAGCATTGCGCAAAAATATGCAGTTCGAAATTGACCGAC
TGGCTGCAGCGTTGGCTGACGCTGAGGCTCGCATGAAGGCGGAAATTTCCCGTCTGAAGAAG
AAATACCAGGCGGAAATTGCCGAACTGGAAATGACCATCGACAATTTGAACCGGGCCAATTT
GGAAGCACAAAAGACGATCAAAAAACAAGCAGACCAACTGAGGGCTTTGCAAAGCAGCTTCG
AAGATTGCCAACGTCAACTGCAACAAACGCTCGACCAGTATGCAATTGCCAGCGCAAGTTG
TCCGCTTTGTCCGCCGAATTGGAAGACTGCAAGAGTGCCTTGGACACGGCGATCCGGGTGCG
CAAACAAGCCGAAGCGGATCTGGAAGAAGCCCAGGGGAAAATTGCCGATTTGGTCAGCTTGA
ACAACAATTTGACCGCGATCAAGGGCAAATTGGAGACCGACTTGTGACATGCCAAGCCGAT
TTGGACGAGACGACCAAAGAACTGCGAGCCGCCGACGACCGTGCCAACCGAGCTCAGCAGGA
TGCGGTCCGGGCTATGGAACAACCTCCACGAAGAGCAGGAACATTCGATGAAAATCGACGCCA
TGCGCAAAGCGTTGGAAGAGCACGTCAAACAGTTGCAAGTGCAAATCCAAGAAGCCGAAGCG
GCAGCTCTGCTCGGTGGCAAGCGCGTCATTGCCAACTCGAGACCAGGATTCGAGATTTGGA
AATGGCGTTGGATGAAGAATCGAGACGACACAAAGAAACCCAAGCCTGCTTGGCAAAAAGG
ACCGTCGCGTCAAGGAAATGCAAATGCAAGTGGACGAGGAGCACAAAAATTTGTCATGGCC
CAAGATACTGCCGAACGATTGGCCGAAAATTGAACATCTACAAGCGACAGTTGACTGAAGC
GGAATCGTTGACAATGCAAATTTGCAACGTGTCCGTGTTACCAGCACGAATTGGAAGATG
CCGAAGGTCGAGCCGAACAAGCCGAAAGTAGCTTGCACTTGATCCGTGCCAAGCATCGTTCT

TCCGTTTCCATGGGAAAAAGTCTCTCTTCCAAGGTTTACGTGATGGAAGAAGGACATGAATA
 T TGATGAACAATACACTAATAATTAATTGCAGAAATTTATTTTTCTGGTGGAAAGAGCAACCA
 TGTTTTAGCTTCTTTCTTTCTCAATTTACTACCATAATAATAATAATATTATTAATATATTT
 TTAATATACAATGATGATCAATTTTCTTTTTATTTCAGAATGTAATCGCCAATTAGCTTTTTT
 CTTTTTCTCTCTCAAACAACCAACCAATCATAATTCTCTTCTTCATTCACGCCAACAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

开放阅读框内的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2):

MSLYRSPSASVMRSASMLSRSGGFDAYGFGGYGAPSLNVADLGSLTRLEDKIRLLQDDLETE
 RELRNR IERERADLSCQLISLTDRLLEEAGTTDAQIDANKRESELQKLRKILEDSQLESED
 SLNQLRKKHQESLLDYQQQIEQLQKKNKSIDRERQRLQHEVIELTAGIDQMOKDKHAAEKAA
 EKHEAHARELQNRVDDLAKNLNDLASQRQLQENNDLMKELHDVKVQMENIQHVKTQLAQQ
 LEEARRRLEDAERERSQMOTQLHQMQLELDSIQGALEEESARAEAEHKLSLANTEISQWKS
 KFDAEVSLHQBEVDDLKMKMIQKQAEYEEQIEIMLQKISQLEKAKSRLQSEVEVLIVDLEKA
 QSTIAILERQKEQLERMVAEMKTRLDEVTQELEATQREL RATQ AELQKMKHLYEKAVEQKEA
 LARENKKLQDDLHEAKEALADANRKLHELDLENARLAGEIRELQIALKEAEAARRDAESRAQ
 RAV AELQALRVEMERRLQEK EEMEALRKNMQFEIDRLAAALADAEARMKAEISRLKKKYQA
 EIAELEMTIDNLNLANLEAQKTIKKQADQLRALQSSFEDCQRQLQQTLDQYAI AQRKLSALS
 AELEDCKSALDTAIRVRKQAEADLEEAQGKIADLVSLNNNLTAIKGKLETDLSTCQADLDET
 TKELRAADDRANRAQQDAVRAMEQLHEEQEHSMKIDAMRKAL EHV KQLQVQIQEAEAAALL
 GGKRVIAKLETRIRDLEMALDEESRRHKETQACLRKKDRRVKEMQMQVDEEHKNFVMAQDTA
 ERLAEKLN IYKRQLTEAESLTMQNLQRVRRYQHELEDAEGRAEQAESSLHLIRAKHRSSVSM
 GKSLSSKVYVMEEGHEY

实施例 2 制备副肌球蛋白基因重组蛋白及人工免疫鼠血清

1. 副肌球蛋白基因原核表达及纯化

根据 Ts86 cDNA 序列, 设计一对引物, 上游引物为 5
 ‘-CGGGATCCATGTCTCTGTATCGCAGTCCCAGT-3’ (SEQ ID NO: 3) (共 32nt,
 含一个 BamH I 酶切位点), 下游引物为 5

‘-CGGAATTCATATTCATGTCCTTCTCCATCAC-3’ (SEQ ID NO: 4) (共 32nt, 含一个 EcoR I 酶切位点)。以免疫筛库得到的 Ts86 cDNA 克隆为模板, 进行 PCR, 产物经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后, 亚克隆于原核表达载体 PET-28a (+) (Novagen 公司)。正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 株 (Novagen 公司), 经 37°C 150 转/分 1.0mM IPTG 诱导 3 小时, 获得副肌球蛋白基因重组蛋白 (全部开放阅读框共 885 个氨基酸), 重组蛋白经 His-binding 亲和层析柱 (Novagen 公司) 纯化后, 经电洗脱仪 (BIO-RAD 公司) 洗脱使纯度更高 (图 1)。

2. 纯化的副肌球蛋白基因重组蛋白经皮肤多点注射免疫 BALB/c 小鼠 (20 μ g/只), 以后每隔 14 天以相同剂量抗原加等量不完全弗氏佐剂, 加强 2 次。5 周后摘眼球取血。ELISA 测定抗体效价高达 1: 128000 以上。

实施例 3 副肌球蛋白基因重组蛋白的免疫特性

1. 酶联免疫吸附 (ELISA) 检测

以 1 μ g 副肌球蛋白基因重组蛋白 (实施例 2 制备) 为抗原包被 96 孔酶标板, 一抗为待检血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的相应 (羊抗人、羊抗兔或羊抗猪) 二抗, 正常人血清、正常兔血清、正常猪血清分别作为阴性对照。根据待测血清样本 OD 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性判断结果。经 ELISA 检测, 旋毛虫病人血清 (23 份) 阳性率为 86.96%、旋毛虫病兔血清 (2 份) 及旋毛虫病猪血清 (4 份) 均为阳性, 说明该副肌球蛋白基因的重组蛋白具有特异的抗原性, 是具有应用潜力的诊断试剂。

2. Western 印迹分析

纯化的副肌球蛋白基因表达蛋白 (实施例 2 制备) (200ng) 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜, 用 ECL 化学发光试剂盒 (Amersham 公司) 检测, 分别以病人血清 1: 200、感染猪血清 1: 200、感染兔血清 1: 1000、副肌球蛋白基因重组蛋白人工免疫鼠血清 (实施例 2 制备) 1: 10000 作为第一抗体。结果显示约 110kDa 处均呈现一明显的蛋白印迹带 (图 2), 表明副肌球蛋白基因重组蛋白可为感染旋毛虫的病人血清、感

染旋毛虫的猪血清、感染旋毛虫的兔血清及副肌球蛋白基因重组蛋白人工免疫鼠血清所识别。

实施例 4 动物体内保护性实验

BALB/c 小鼠 30 只，随机分为 2 组，每组 15 只。副肌球蛋白基因重组蛋白免疫组以 20 μ g/只的抗原（实施例 2 制备）加等量的弗氏完全佐剂（FCA）皮下注射。以后每隔 14 天以相同剂量抗原加等量不完全弗氏佐剂，加强 2 次。末次注射后 10 天，每只鼠用 400 条旋毛虫感染性幼虫进行攻击感染。对照组注射相同剂量的 Tris-HCL，与免疫组同时接受 400 条旋毛虫感染性幼虫攻击。于攻击 45 天后将小鼠处死，取全部肌肉用胃蛋白酶消化收集幼虫，计数。经单因素方差分析，副肌球蛋白基因重组蛋白免疫组减虫率（肌幼虫减虫率%=(对照组肌幼虫数-免疫组肌幼虫数)/对照组肌幼虫数 \times 100%)为 47%，与对照组比较，有显著性差异($P < 0.01$)（表 1）。

由于本实验副肌球蛋白基因重组蛋白在动物体内产生有效的减虫率，据此可作为保护性候选抗原，应用于旋毛虫病的免疫预防。

表 1 副肌球蛋白基因重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠的保护性结果

组别	BALB/c 的数目	平均肌幼虫数 $\bar{x} \pm SD$	肌幼虫减虫率 %	P 值
免疫组	15	6585 \pm 929.747	47	<0.01
对照组	15	12440 \pm 524.595	-	

上文列出的所有专利、专利申请和出版物均全文引入本文作为参考文献。

本发明的范围不只限于所述的特定实施方案，这些方案只是作为本发明个别方面的单一举例说明给出的。功能等同的组合物和方法均在本发明的范围之内。确实，除了本文所示的和描述的内容外，对本发明各种改动对于阅读了上述内容的本领域技术人员来说都是显而易见的。这些改动将落入本发明待批权利要求的范围之内。

序列表

<110> 首都医科大学

<120> 旋毛虫副肌球蛋白基因及其应用

<130> IDC060097

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2996

<212> DNA

<213> 1

<220>

<221> CDS

<222> (75)..(2732)

<400> 1

ggcacgagca gatctaaaag gatctgttgt aaattgattc tccattcgac aatcgaaaaa 60

actacatcag cacc atg tct ctg tat cgc agt ccc agt gcg tca gtg atg 110

Met Ser Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Ala Ser Val Met

1 5 10

aga tca gca agc atg ctc agc cga agt ggc gga ttc gat gct tac gga 158

Arg Ser Ala Ser Met Leu Ser Arg Ser Gly Gly Phe Asp Ala Tyr Gly

15 20 25

ttt gga ggt tac ggt gcg cca agc ctc aac gtt gcc gac ttg ggt tct 206

Phe Gly Gly Tyr Gly Ala Pro Ser Leu Asn Val Ala Asp Leu Gly Ser

30 35 40

ttg acc aga ctc gag gat aaa att cgc ctg ctt caa gat gat ttg gaa 254

Leu Thr Arg Leu Glu Asp Lys Ile Arg Leu Leu Gln Asp Asp Leu Glu

45 50 55 60

acg gaa aga gaa ttg cga aac cga att gaa cgc gaa cgt gcc gat ttg 302

Thr Glu Arg Glu Leu Arg Asn Arg Ile Glu Arg Glu Arg Ala Asp Leu

65 70 75

tcc tgc caa ctg atc agc tta acc gat cga ttg gaa gag gct gaa gga 350

Ser Cys Gln Leu Ile Ser Leu Thr Asp Arg Leu Glu Glu Ala Glu Gly

80 85 90

acc acc gat gcc cag atc gac gcc aat cga aag cgt gaa tcc gaa ttg 398

Thr Thr Asp Ala Gln Ile Asp Ala Asn Arg Lys Arg Glu Ser Glu Leu

95 100 105

caa aag ttg aga aaa ata ttg gaa gat tcg caa ttg gaa agc gaa gat 446

Gln Lys Leu Arg Lys Ile Leu Glu Asp Ser Gln Leu Glu Ser Glu Asp

110 115 120

tcg ctg aac cag ctg cgc aag aag cac caa gaa tcc ctt tta gat tat 494

Ser Leu Asn Gln Leu Arg Lys Lys His Gln Glu Ser Leu Leu Asp Tyr

125 130 135 140

cag cag caa att gaa caa ctt caa aag aaa aat agc aaa atc gac aga 542

Gln Gln Gln Ile Glu Gln Leu Gln Lys Lys Asn Ser Lys Ile Asp Arg

145 150 155

gaa cga caa cgt ttg cag cat gaa gtc att gaa ctt act gcc gga att 590

Glu Arg Gln Arg Leu Gln His Glu Val Ile Glu Leu Thr Ala Gly Ile

160 165 170

gat cag atg caa aaa gac aag cat gcc gcg gaa aaa gct gcc gaa aag 638

Asp Gln Met Gln Lys Asp Lys His Ala Ala Glu Lys Ala Ala Glu Lys

175	180	185	
cac gaa gcg cat gcc aga gag ctt cag aac aga gtt gac gat ctg gca			686
His Glu Ala His Ala Arg Glu Leu Gln Asn Arg Val Asp Asp Leu Ala			
190	195	200	
aaa aat ttg aac gac ctg gcc tcg cag cgt caa cgt ctg caa cag gaa			734
Lys Asn Leu Asn Asp Leu Ala Ser Gln Arg Gln Arg Leu Gln Gln Glu			
205	210	215	220
aac aac gat ttg atg aaa gag ttg cac gat gtc aaa gtg caa atg gaa			782
Asn Asn Asp Leu Met Lys Glu Leu His Asp Val Lys Val Gln Met Glu			
225	230	235	
aat att caa cac gtc aag act caa ctt gct caa cag ctc gaa gaa gca			830
Asn Ile Gln His Val Lys Thr Gln Leu Ala Gln Gln Leu Glu Glu Ala			
240	245	250	
cgt cgt cga ctc gaa gat gcg gaa cgt gaa cgt tcg caa atg caa acc			878
Arg Arg Arg Leu Glu Asp Ala Glu Arg Glu Arg Ser Gln Met Gln Thr			
255	260	265	
cag ttg cat cag atg cag ctg gaa ttg gat tca att caa ggt gcg ttg			926
Gln Leu His Gln Met Gln Leu Glu Leu Asp Ser Ile Gln Gly Ala Leu			
270	275	280	
gaa gag gaa tcg tcc gca cgt gcc gaa gca gag cac aaa ttg tcg ttg			974
Glu Glu Glu Ser Ser Ala Arg Ala Glu Ala Glu His Lys Leu Ser Leu			
285	290	295	300
gca aat acg gaa att tcc cag tgg aag agc aaa ttc gac gcc gaa gtt			1022
Ala Asn Thr Glu Ile Ser Gln Trp Lys Ser Lys Phe Asp Ala Glu Val			
305	310	315	
tca ctc cac caa gaa gaa gtt gac gat ctg cgt aaa aaa atg atc caa			1070
Ser Leu His Gln Glu Glu Val Asp Asp Leu Arg Lys Lys Met Ile Gln			
320	325	330	
aaa caa gca gaa tat gag gaa caa att gaa att atg ctg caa aag att			1118
Lys Gln Ala Glu Tyr Glu Glu Gln Ile Glu Ile Met Leu Gln Lys Ile			
335	340	345	
tcc caa ttg gaa aaa gcg aaa agc cgt ctg cag tcg gaa gtt gaa gtt			1166
Ser Gln Leu Glu Lys Ala Lys Ser Arg Leu Gln Ser Glu Val Glu Val			
350	355	360	
ttg ata gtt gat ttg gaa aag gct caa agc acc att gcc att ttg gaa			1214
Leu Ile Val Asp Leu Glu Lys Ala Gln Ser Thr Ile Ala Ile Leu Glu			
365	370	375	380
aga caa aaa gaa cag ctc gaa aga atg gtc gcc gag atg aag aca cgc			1262
Arg Gln Lys Glu Gln Leu Glu Arg Met Val Ala Glu Met Lys Thr Arg			
385	390	395	
ctg gac gag gtg aca caa gag ctc gaa gct acg caa cga gaa ctc aga			1310
Leu Asp Glu Val Thr Gln Glu Leu Glu Ala Thr Gln Arg Glu Leu Arg			
400	405	410	
gcg acg caa gcg gaa ttg caa aag atg aag cat ctt tat gaa aaa gcc			1358
Ala Thr Gln Ala Glu Leu Gln Lys Met Lys His Leu Tyr Glu Lys Ala			
415	420	425	
gtc gaa cag aaa gaa gct ctg gct agg gag aac aaa aaa ttg caa gac			1406
Val Glu Gln Lys Glu Ala Leu Ala Arg Glu Asn Lys Lys Leu Gln Asp			
430	435	440	
gat ttg cat gaa gca aag gaa gct ttg gcc gac gcg aac aga aaa ttg			1454
Asp Leu His Glu Ala Lys Glu Ala Leu Ala Asp Ala Asn Arg Lys Leu			
445	450	455	460

cac gag ctg gat ttg gag aat gca cgt ctg gcc ggt gaa atc aga gaa His Glu Leu Asp Leu Glu Asn Ala Arg Leu Ala Gly Glu Ile Arg Glu 465 470 475	1502
ctg caa atc gcg ctc aag gaa gcc gaa gcg gct aga cgt gac gcg gaa Leu Gln Ile Ala Leu Lys Glu Ala Glu Ala Ala Arg Arg Asp Ala Glu 480 485 490	1550
agt cgc gca cag cgt gca gta gct gaa ttg caa gct ctg cgc gtg gaa Ser Arg Ala Gln Arg Ala Val Ala Glu Leu Gln Ala Leu Arg Val Glu 495 500 505	1598
atg gaa cgt cgt tta caa gaa aaa gaa gaa gaa atg gaa gca ttg cgc Met Glu Arg Arg Leu Gln Glu Lys Glu Glu Glu Met Glu Ala Leu Arg 510 515 520	1646
aaa aat atg cag ttc gaa att gac cga ctg gct gca gcg ttg gct gac Lys Asn Met Gln Phe Glu Ile Asp Arg Leu Ala Ala Ala Leu Ala Asp 525 530 535 540	1694
gct gag gct cgc atg aag gcg gaa att tcc cgt ctg aag aag aaa tac Ala Glu Ala Arg Met Lys Ala Glu Ile Ser Arg Leu Lys Lys Lys Tyr 545 550 555	1742
cag gcg gaa att gcc gaa ctg gaa atg acc atc gac aat ttg aac cgg Gln Ala Glu Ile Ala Glu Leu Glu Met Thr Ile Asp Asn Leu Asn Arg 560 565 570	1790
gcc aat ttg gaa gca caa aag acg atc aaa aaa caa gca gac caa ctg Ala Asn Leu Glu Ala Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Ala Asp Gln Leu 575 580 585	1838
agg gct ttg caa agc agc ttc gaa gat tgc caa cgt caa ctg caa caa Arg Ala Leu Gln Ser Ser Phe Glu Asp Cys Gln Arg Gln Leu Gln Gln 590 595 600	1886
acg ctc gac cag tat gca att gcc cag cgc aag ttg tcc gct ttg tcg Thr Leu Asp Gln Tyr Ala Ile Ala Gln Arg Lys Leu Ser Ala Leu Ser 605 610 615 620	1934
gcc gaa ttg gaa gac tgc aag agt gcc ttg gac acg gcg atc cgg gtg Ala Glu Leu Glu Asp Cys Lys Ser Ala Leu Asp Thr Ala Ile Arg Val 625 630 635	1982
cgc aaa caa gcc gaa gcg gat ctg gaa gaa gcc cag ggg aaa att gcc Arg Lys Gln Ala Glu Ala Asp Leu Glu Glu Ala Gln Gly Lys Ile Ala 640 645 650	2030
gat ttg gtc agc ttg aac aac aat ttg acc gcg atc aag ggc aaa ttg Asp Leu Val Ser Leu Asn Asn Asn Leu Thr Ala Ile Lys Gly Lys Leu 655 660 665	2078
gag acc gac ttg tcg aca tgc caa gcc gat ttg gac gag acg acc aaa Glu Thr Asp Leu Ser Thr Cys Gln Ala Asp Leu Asp Glu Thr Thr Lys 670 675 680	2126
gaa ctg cga gcc gcc gac gac cgt gcc aac cga gct cag cag gat gcg Glu Leu Arg Ala Ala Asp Asp Arg Ala Asn Arg Ala Gln Gln Asp Ala 685 690 695 700	2174
gtc cgg gct atg gaa caa ctc cac gaa gag cag gaa cat tcg atg aaa Val Arg Ala Met Glu Gln Leu His Glu Glu Gln Glu His Ser Met Lys 705 710 715	2222
atc gac gcc atg cgc aaa gcg ttg gaa gag cac gtc aaa cag ttg caa Ile Asp Ala Met Arg Lys Ala Leu Glu Glu His Val Lys Gln Leu Gln 720 725 730	2270
gtg caa atc caa gaa gcc gaa gcg gca gct ctg ctc ggt ggc aag cgc	2318

Val Gln Ile Gln Glu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg
 735 740 745
 gtc att gcc aaa ctc gag acc agg att cga gat ttg gaa atg gcg ttg 2366
 Val Ile Ala Lys Leu Glu Thr Arg Ile Arg Asp Leu Glu Met Ala Leu
 750 755 760
 gat gaa gaa tcg aga cga cac aaa gaa acc caa gcc tgc ttg cgc aaa 2414
 Asp Glu Glu Ser Arg Arg His Lys Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Lys
 765 770 775 780
 aag gac cgt cgc gtc aag gaa atg caa atg caa gtg gac gag gag cac 2462
 Lys Asp Arg Arg Val Lys Glu Met Gln Met Gln Val Asp Glu Glu His
 785 790 795
 aaa aat ttc gtc atg gcc caa gat act gcc gaa cga ttg gcc gaa aaa 2510
 Lys Asn Phe Val Met Ala Gln Asp Thr Ala Glu Arg Leu Ala Glu Lys
 800 805 810
 ttg aac atc tac aag cga cag ttg act gaa gcg gaa tcg ttg aca atg 2558
 Leu Asn Ile Tyr Lys Arg Gln Leu Thr Glu Ala Glu Ser Leu Thr Met
 815 820 825
 caa aat ttg caa cgt gtc cgt cgt tac cag cac gaa ttg gaa gat gcc 2606
 Gln Asn Leu Gln Arg Val Arg Arg Tyr Gln His Glu Leu Glu Asp Ala
 830 835 840
 gaa ggt cga gcc gaa caa gcc gaa agt agc ttg cac ttg atc cgt gcc 2654
 Glu Gly Arg Ala Glu Gln Ala Glu Ser Ser Leu His Leu Ile Arg Ala
 845 850 855 860
 aag cat cgt tct tcc gtt tcc atg gga aaa agt ctc tct tcc aag gtt 2702
 Lys His Arg Ser Ser Val Ser Met Gly Lys Ser Leu Ser Ser Lys Val
 865 870 875
 tac gtg atg gaa gaa gga cat gaa tat tga tgaacaatac actaataatt 2752
 Tyr Val Met Glu Glu Gly His Glu Tyr
 880 885
 aattgcagaa atttattttt ctggtggaag agcaaccatg ttttagcttc tttctttctc 2812
 aatttactac cataataata ataataattat taatatattt ttaatataca atgatgatca 2872
 attttctttt tattcagaat gtaatcgcca attagctttt ttctttttct ctctcaaaca 2932
 accaaccaat cataattctc ttcttcattc acgccaacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2992
 aaaa 2996

 <210> 2
 <211> 885
 <212> PRT
 <213> 1
 <400> 2
 Met Ser Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Ala Ser Val Met Arg Ser Ala Ser
 1 5 10 15

 Met Leu Ser Arg Ser Gly Gly Phe Asp Ala Tyr Gly Phe Gly Gly Tyr
 20 25 30

 Gly Ala Pro Ser Leu Asn Val Ala Asp Leu Gly Ser Leu Thr Arg Leu
 35 40 45

 Glu Asp Lys Ile Arg Leu Leu Gln Asp Asp Leu Glu Thr Glu Arg Glu
 50 55 60

Leu Arg Asn Arg Ile Glu Arg Glu Arg Ala Asp Leu Ser Cys Gln Leu
 65 70 75 80
 Ile Ser Leu Thr Asp Arg Leu Glu Glu Ala Glu Gly Thr Thr Asp Ala
 85 90 95
 Gln Ile Asp Ala Asn Arg Lys Arg Glu Ser Glu Leu Gln Lys Leu Arg
 100 105 110
 Lys Ile Leu Glu Asp Ser Gln Leu Glu Ser Glu Asp Ser Leu Asn Gln
 115 120 125
 Leu Arg Lys Lys His Gln Glu Ser Leu Leu Asp Tyr Gln Gln Gln Ile
 130 135 140
 Glu Gln Leu Gln Lys Lys Asn Ser Lys Ile Asp Arg Glu Arg Gln Arg
 145 150 155 160
 Leu Gln His Glu Val Ile Glu Leu Thr Ala Gly Ile Asp Gln Met Gln
 165 170 175
 Lys Asp Lys His Ala Ala Glu Lys Ala Ala Glu Lys His Glu Ala His
 180 185 190
 Ala Arg Glu Leu Gln Asn Arg Val Asp Asp Leu Ala Lys Asn Leu Asn
 195 200 205
 Asp Leu Ala Ser Gln Arg Gln Arg Leu Gln Gln Glu Asn Asn Asp Leu
 210 215 220
 Met Lys Glu Leu His Asp Val Lys Val Gln Met Glu Asn Ile Gln His
 225 230 235 240
 Val Lys Thr Gln Leu Ala Gln Gln Leu Glu Glu Ala Arg Arg Arg Leu
 245 250 255
 Glu Asp Ala Glu Arg Glu Arg Ser Gln Met Gln Thr Gln Leu His Gln
 260 265 270
 Met Gln Leu Glu Leu Asp Ser Ile Gln Gly Ala Leu Glu Glu Glu Ser
 275 280 285
 Ser Ala Arg Ala Glu Ala Glu His Lys Leu Ser Leu Ala Asn Thr Glu
 290 295 300
 Ile Ser Gln Trp Lys Ser Lys Phe Asp Ala Glu Val Ser Leu His Gln
 305 310 315 320
 Glu Glu Val Asp Asp Leu Arg Lys Lys Met Ile Gln Lys Gln Ala Glu
 325 330 335
 Tyr Glu Glu Gln Ile Glu Ile Met Leu Gln Lys Ile Ser Gln Leu Glu

340	345	350
Lys Ala Lys Ser Arg Leu Gln Ser Glu Val Glu Val Leu Ile Val Asp		
355	360	365
Leu Glu Lys Ala Gln Ser Thr Ile Ala Ile Leu Glu Arg Gln Lys Glu		
370	375	380
Gln Leu Glu Arg Met Val Ala Glu Met Lys Thr Arg Leu Asp Glu Val		
385	390	400
Thr Gln Glu Leu Glu Ala Thr Gln Arg Glu Leu Arg Ala Thr Gln Ala		
405	410	415
Glu Leu Gln Lys Met Lys His Leu Tyr Glu Lys Ala Val Glu Gln Lys		
420	425	430
Glu Ala Leu Ala Arg Glu Asn Lys Lys Leu Gln Asp Asp Leu His Glu		
435	440	445
Ala Lys Glu Ala Leu Ala Asp Ala Asn Arg Lys Leu His Glu Leu Asp		
450	455	460
Leu Glu Asn Ala Arg Leu Ala Gly Glu Ile Arg Glu Leu Gln Ile Ala		
465	470	480
Leu Lys Glu Ala Glu Ala Ala Arg Arg Asp Ala Glu Ser Arg Ala Gln		
485	490	495
Arg Ala Val Ala Glu Leu Gln Ala Leu Arg Val Glu Met Glu Arg Arg		
500	505	510
Leu Gln Glu Lys Glu Glu Glu Met Glu Ala Leu Arg Lys Asn Met Gln		
515	520	525
Phe Glu Ile Asp Arg Leu Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ala Arg		
530	535	540
Met Lys Ala Glu Ile Ser Arg Leu Lys Lys Lys Tyr Gln Ala Glu Ile		
545	550	560
Ala Glu Leu Glu Met Thr Ile Asp Asn Leu Asn Arg Ala Asn Leu Glu		
565	570	575
Ala Gln Lys Thr Ile Lys Lys Gln Ala Asp Gln Leu Arg Ala Leu Gln		
580	585	590
Ser Ser Phe Glu Asp Cys Gln Arg Gln Leu Gln Gln Thr Leu Asp Gln		
595	600	605
Tyr Ala Ile Ala Gln Arg Lys Leu Ser Ala Leu Ser Ala Glu Leu Glu		
610	615	620

Asp Cys Lys Ser Ala Leu Asp Thr Ala Ile Arg Val Arg Lys Gln Ala
 625 630 635 640
 Glu Ala Asp Leu Glu Glu Ala Gln Gly Lys Ile Ala Asp Leu Val Ser
 645 650 655
 Leu Asn Asn Asn Leu Thr Ala Ile Lys Gly Lys Leu Glu Thr Asp Leu
 660 665 670
 Ser Thr Cys Gln Ala Asp Leu Asp Glu Thr Thr Lys Glu Leu Arg Ala
 675 680 685
 Ala Asp Asp Arg Ala Asn Arg Ala Gln Gln Asp Ala Val Arg Ala Met
 690 695 700
 Glu Gln Leu His Glu Glu Gln Glu His Ser Met Lys Ile Asp Ala Met
 705 710 715 720
 Arg Lys Ala Leu Glu Glu His Val Lys Gln Leu Gln Val Gln Ile Gln
 725 730 735
 Glu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Val Ile Ala Lys
 740 745 750
 Leu Glu Thr Arg Ile Arg Asp Leu Glu Met Ala Leu Asp Glu Glu Ser
 755 760 765
 Arg Arg His Lys Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Lys Lys Asp Arg Arg
 770 775 780
 Val Lys Glu Met Gln Met Gln Val Asp Glu Glu His Lys Asn Phe Val
 785 790 795 800
 Met Ala Gln Asp Thr Ala Glu Arg Leu Ala Glu Lys Leu Asn Ile Tyr
 805 810 815
 Lys Arg Gln Leu Thr Glu Ala Glu Ser Leu Thr Met Gln Asn Leu Gln
 820 825 830
 Arg Val Arg Arg Tyr Gln His Glu Leu Glu Asp Ala Glu Gly Arg Ala
 835 840 845
 Glu Gln Ala Glu Ser Ser Leu His Leu Ile Arg Ala Lys His Arg Ser
 850 855 860
 Ser Val Ser Met Gly Lys Ser Leu Ser Ser Lys Val Tyr Val Met Glu
 865 870 875 880
 Glu Gly His Glu Tyr
 885

<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 3
cgggatccat gtctctgtat cgcagtccca gt 32

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 4
cggaattcat attcatgtcc ttcttccatc ac 32

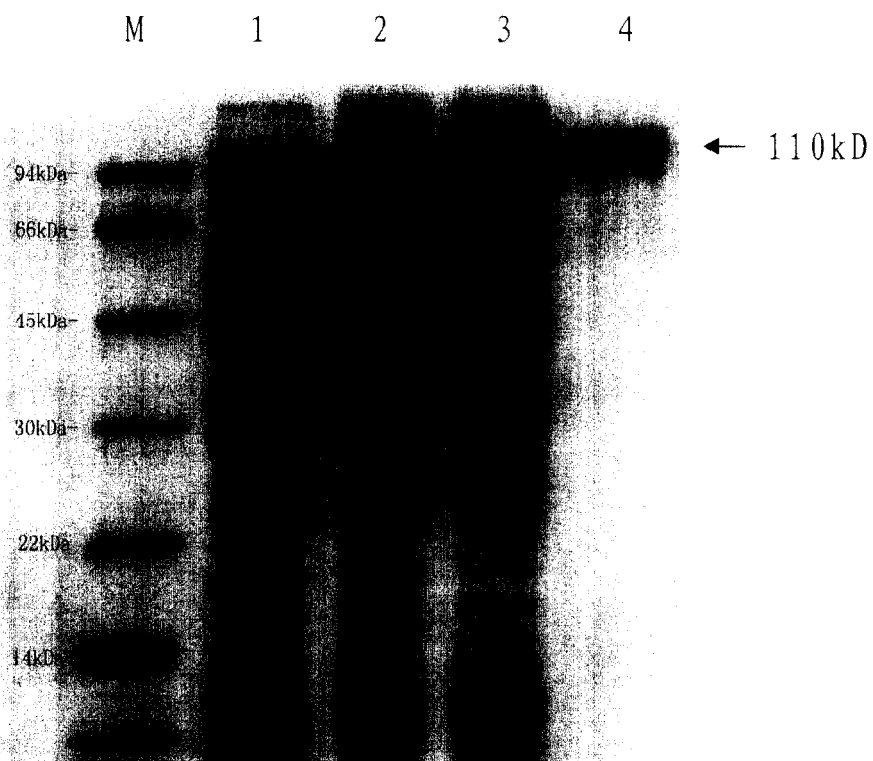


图 1

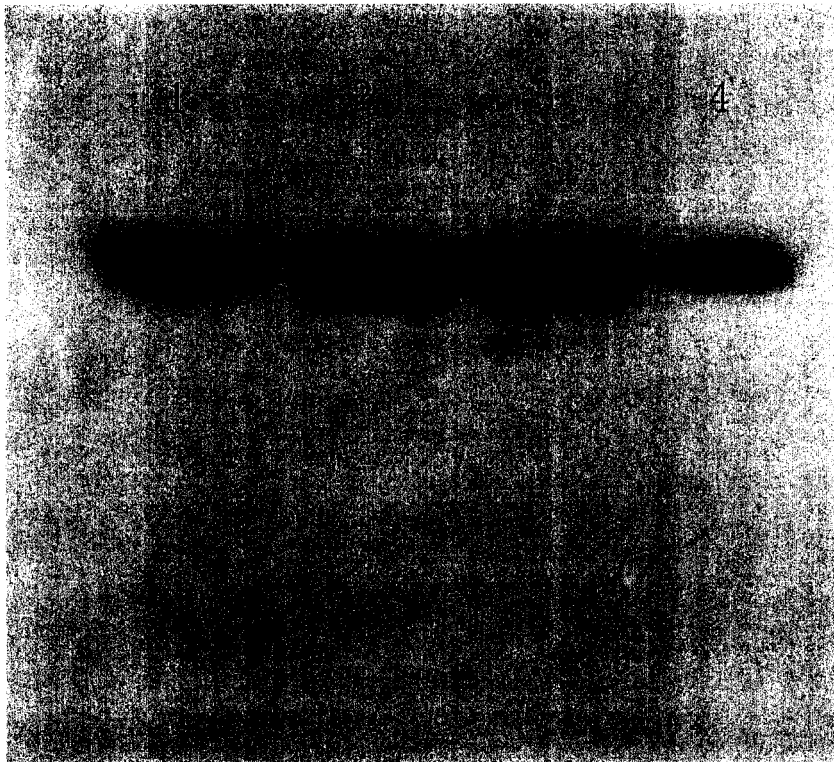


图 2

专利名称(译)	旋毛虫副肌球蛋白基因及其应用		
公开(公告)号	CN100999737A	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	CN200710000018.1	申请日	2007-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
[标]发明人	诸欣平 杨静 杨雅平 顾园 李强		
发明人	诸欣平 杨静 杨雅平 顾园 李强		
IPC分类号	C12N15/30 C07K14/44 C12P21/02 C07K16/18 A61K38/16 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68 A61K31/7088 A61K48/00 C07K19/00		
其他公开文献	CN100460509C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及旋毛虫新抗原基因副肌球蛋白基因，含有该基因的载体的构建及原核表达载体，以及所表达的蛋白。本发明还涉及所述基因及编码的蛋白的应用。旋毛虫副肌球蛋白基因重组蛋白免疫动物后产生高滴度的抗体并对攻击感染产生有效的免疫保护性。

组别	BALB/c 的数目	平均肌幼虫数 $\bar{x} \pm SD$	肌幼虫减虫率 %	P值
免疫组	15	6585±929.747	47	<0.01
对照组	15	12440±524.595	-	