



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102317311 A

(43) 申请公布日 2012.01.11

(21) 申请号 201080006238.5

(22) 申请日 2010.02.02

(30) 优先权数据

20090031 2009.02.02 FI

12/364,128 2009.02.02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.08.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FI2010/050059 2010.02.02

(87) PCT申请的公布数据

W02010/086512 EN 2010.08.05

(71) 申请人 维利奥有限公司

地址 芬兰赫尔辛基

(72) 发明人 W·M·德福斯 A·帕尔瓦

I·帕尔瓦 J·雷乌纳宁

I·冯奥索夫斯基 R·萨托卡里

S·韦斯特隆德 M·坎凯宁

T·萨卢斯耶尔维 S·廷屈宁

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄草生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 14/335 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

权利要求书 4 页 说明书 24 页

序列表 54 页 附图 14 页

(54) 发明名称

鼠李糖乳杆菌菌毛多肽和产生它们的方法

(57) 摘要

本发明涉及生命科学和食品、饲料或制药工业。具体而言,本发明涉及新的肽、菌毛结构、多核苷酸以及包含所述多核苷酸、肽或菌毛结构的载体、宿主细胞、产品和药物组合物。本发明也涉及基因簇和抗体。另外,本发明涉及用于产生所述肽或菌毛结构或产生包含所述肽或菌毛结构的产品的的方法。另外,本发明涉及用于筛选细菌菌株、用于减低或抑制致病菌黏附、促进细菌细胞黏附于黏液和用于调节受试者中免疫应答的治疗以及用途和方法。再者,本发明涉及用于检测益生菌菌株或病原菌株的方法。

1. 肽,其包含与 SEQ ID NO 4(GG00444) 具有至少 91%序列同一性的序列或其片段或变体。
2. 肽,其包含与 SEQ ID NO 1(GG00441) 具有至少 94%序列同一性的序列或其片段或变体。
3. 肽,其包含与 SEQ ID NO 2(GG00442) 具有至少 94%序列同一性的序列或其片段或变体。
4. 肽,其包含与 SEQ ID NO 3(GG00443) 具有至少 84%序列同一性的序列或其片段或变体。
5. 肽,其包含与 SEQ ID NO 5(GG02369) 具有至少 83%序列同一性的序列或其片段或变体。
6. 肽,其包含与 SEQ ID NO 6(GG02370) 具有至少 94%序列同一性的序列或其片段或变体。
7. 肽,其包含与 SEQ ID NO 7(GG02371) 具有至少 93%序列同一性的序列或其片段或变体。
8. 肽,其包含与 SEQ ID NO 8(GG02372) 具有至少 93%序列同一性的序列或其片段或变体。
9. 根据权利要求 1 和 3-4 和 / 或 6-8 任一项所述的肽,其中该肽是菌毛结构的一部分。
10. 菌毛结构,其包含根据权利要求 1 和 3-4 和 / 或 6-10 任一项所述的至少一种肽。
11. 根据权利要求 10 所述的菌毛结构,其包含根据权利要求 1 和 3-4 所述的肽。
12. 根据权利要求 10 所述的菌毛结构,其包含根据权利要求 6-8 所述的肽。
13. 根据前面权利要求任一项所述的肽或菌毛结构,其是重组的。
14. 根据前面权利要求任一项所述的肽或菌毛结构,其来自细菌。
15. 根据前面权利要求任一项所述的肽或菌毛结构,其来自鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)。
16. 根据前面权利要求任一项所述的肽或菌毛结构,其来自鼠李糖乳杆菌 GG (LGG) 菌株。
17. 根据前面权利要求任一项所述的肽或菌毛结构,其与胃肠道结合。
18. 根据前面权利要求任一项所述的肽或菌毛结构,其与黏液结合。
19. 产品,包含根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构。
20. 根据权利要求 19 所述的产品,其是食品或饲料产品。
21. 根据权利要求 20 所述的产品,其中该食品选自由奶产品、烘焙产品、巧克力和甜食、糖和口香糖、谷物产品、小吃、基于浆果或水果的产品和饮料 / 饮品组成的组。
22. 根据权利要求 21 所述的产品,其中该食品选自由乳、酸乳、酸奶、奶酪与 spreads、乳粉、儿童食品、婴儿食品、学步儿童食品、婴儿配方食品、果汁和汤组成的组。
23. 药物组合物,包含根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构。
24. 产品,其包含作为药物使用的根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构。
25. 根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构的产品,其用于预防或治疗腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼

吸道感染、龋齿、肠易激综合征、炎性肠病、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激或腹痛。

26. 根据权利要求 18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构在制造药物中的用途,所述药物用于预防或治疗腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、肠易激综合征、炎性肠病、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激或腹痛。

27. 多核苷酸,其包含 SEQ ID NOs 9-16 任一者的序列或其简并序列或编码根据权利要求 1-9 或 13-18 任一项所述的肽。

28. 载体,其包含根据权利要求 27 所述的多核苷酸。

29. 宿主细胞,其包含根据权利要求 27 所述的多核苷酸或根据权利要求 1-18 任一项所述的肽。

30. 基因簇,其包含根据权利要求 27 所述的至少一种多核苷酸。

31. 抗体,其针对根据权利要求 1-9 或 13-18 任一项所述的肽的任一种或针对它们的功能域。

32. 用于治疗或预防腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、肠易激综合征、炎性肠病、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激或腹痛的方法,包括对受试者施用根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构。

33. 筛选包含 SEQ ID NOs 9-16 的至少一种多核苷酸或其片段的细菌菌株的方法,其中该方法包括:

i) 提供来自细菌菌株的 DNA 或 RNA;

ii) 将对 SEQ ID NOs 9-16 的多核苷酸或其片段特异的引物或探针与来自步骤 i) 的 DNA 或 RNA 杂交并任选地扩增该多核苷酸或其片段;

iii) 检测与 SEQ ID NOs 9-16 的多核苷酸或其片段同源的至少一种多核苷酸或其片段。

34. 根据权利要求 31 所述的 SEQ ID NOs 9-16 的至少一种多核苷酸或其片段或至少一种抗体用于筛选细菌菌株的用途。

35. 使用根据权利要求 31 的至少一种抗体筛选包含根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构的细菌菌株的方法,其中该方法包括:

i) 提供细菌菌株的蛋白质;

ii) 使用所述一种或多种抗体检测至少一种多肽、菌毛结构或其片段。

36. 根据权利要求 33 或 35 所述的方法或根据权利要求 34 所述的用途,其中细菌菌株是益生性的。

37. 减低或抑制致病菌对受试者胃肠道、对其上皮或对其黏液黏附的方法,其中该方法包括对受试者施用根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽和 / 或菌毛结构。

38. 根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽和 / 或菌毛结构用于减低或抑制致病菌对受试者胃肠道、对其上皮或对其黏液黏附的用途。

39. 促进细菌细胞黏附于或任何其他物质黏附于黏液或上皮的方法,其中该方法包括:

- i) 产生根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构或其片段；
- ii) 在细菌细胞上或任何其他物质上展示该肽、菌毛结构和 / 或其片段；
- iii) 使所述细菌细胞或任何其他物质与黏液或上皮接触。

40. 根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构用于促进细菌细胞或任何其他物质黏附于黏液或上皮的用途。

41. 调节受试者中免疫应答的方法, 其中该方法包括:

- i) 产生根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构或其片段；
- ii) 在宿主细胞上展示该肽、菌毛结构和 / 或其片段；
- iii) 任选地使该宿主细胞与另一个宿主细胞接触。

42. 根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构用于调节受试者中免疫应答的用途。

43. 产生根据权利要求 19-22 任一项所述的产品的的方法, 其中该方法包括对该产品产生根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构的步骤。

44. 根据权利要求 43 所述的方法, 其中该方法包括添加根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构至该产品。

45. 产生根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- i) 提供根据权利要求 27 所述的至少一种多核苷酸；
- ii) 用所述多核苷酸转化宿主细胞；
- iii) 培养来自步骤 ii) 的宿主细胞以产生所述肽或菌毛结构；
- iv) 任选地回收所述肽或菌毛结构。

46. 产生根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- i) 破坏产生或包含根据权利要求 1-18 任一项所述的至少一种肽或菌毛结构的细胞；
- ii) 任选地回收所述肽或菌毛结构。

47. 根据权利要求 46 所述的方法, 其中所述细胞是死细胞或活细胞。

48. 产生根据权利要求 1-9 或 13-18 任一项所述的至少一种肽的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- i) 提供氨基酸；
- ii) 通过合成至少一种肽从步骤 i) 的氨基酸制造本发明的至少一种肽。

49. 通过使用生物信息学方法检测潜在的益生性细菌菌株的方法, 其中该方法包括以下步骤:

- i) 提供根据权利要求 1-9、13-18 或 27 所述的至少一种肽、多核苷酸或其片段的序列；
- ii) 将步骤 i) 的序列针对序列集合的序列进行比较；
- iii) 检测与步骤 i) 的序列具有生物学适合片段的序列。

50. 通过使用生物信息学方法检测根据权利要求 1-18 所述的肽或菌毛结构有效针对的病原菌株的方法, 其中该方法包括:

- i) 提供根据权利要求 1-9、13-18 或 27 所述的至少一种肽、多核苷酸或其片段的序列；
- ii) 将步骤 i) 的序列针对序列集合的序列进行比较；

iii) 检测与步骤 i) 的序列具有生物学适合片段的序列。

鼠李糖乳杆菌菌毛多肽和产生它们的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及生命科学和食品、饲料或制药工业。具体而言,本发明涉及新的肽、蛋白质、菌毛结构、多核苷酸以及包含所述多核苷酸、肽、蛋白质或菌毛结构的载体、宿主细胞、产品和药物组合物。本发明也涉及基因簇和抗体。另外,本发明涉及用于产生所述肽、蛋白质、或菌毛结构或产生包含所述肽、蛋白质、或菌毛结构的产品的的方法。另外,本发明涉及用于筛选细菌菌株、用于减低或抑制致病菌黏附、促进细菌细胞黏附于黏液和 / 或上皮和 / 或用于调节受试者中免疫应答的疗法以及用途和方法。再者,本发明涉及用于检测待鉴定和 / 或抑制的益生菌菌株或病原菌株的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 细菌病原体对宿主组织的侵袭性黏附经常受到从微生物细胞表面向外突出的称作菌毛或伞毛的延长毛发样蛋白质性纤维的促进。在革兰氏阴性致病细菌中,充分认识到菌毛作为定植物在发病机理中的作用并且菌毛装配的总体机理因超过 50 年的研究被清晰地定义。结构最充分表征的革兰氏阴性菌毛是例如存在于肠致病性大肠杆菌 (*E. coli*) 中的 I 型形式和例如存在于奈瑟氏菌属 (*Neisseria*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种以及大肠杆菌中的 IV 型形式。一般,革兰氏阴性菌毛长 (长度 1 至 4 μm) 且薄 (宽度 5 至 8nm), 并且还显示柔性和坚韧的结构特性。这些菌毛总体上由一系列非共价连接的多个蛋白亚基组成,其中所述多个蛋白亚基的装配依赖于特定伴侣蛋白,但是不依赖任何酶活性。经常地,具有黏附特性的蛋白质位于菌毛的顶端。通常认为微生物表面的蛋白质亚基的插入长度促进黏附性顶端蛋白质与相应宿主细胞受体部位之间的无障碍接触,其中所述的宿主细胞受体部位由胞外基质 (ECM) 的组件或糖蛋白和糖脂的特定糖部分潜在地代表 (Scott J. R. 和 **Zähler** D, 2006, *Mol Microbiol* 62, 320-330 ; Telford, J. L., 等人 2006, *Nat Rev Microbiol* 4, 509-519)。

[0004] 革兰氏阳性菌毛样结构的存在实际上首先在二十世纪 60 年代后期借助牛肾盂炎棒杆菌 (*Corynebacterium renale*) 的电子显微镜结果 (Yanagawa, R. 等人 1968, *Jpn J Vet Res* 16, 31-37) 观察到,并且在后续数年中,已经在一些其他革兰氏阳性细菌物种中找到菌毛,包括在人类中的 3 种主要侵袭性致病链球菌病原体即,酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 中最近发现菌毛 (Telford, J. L., 等人 2006, *Nat Rev Microbiol* 4, 509-519)。革兰氏阳性菌毛的最详细表征研究源自棒杆菌、链球菌和芽孢杆菌病原体。

[0005] 不同于革兰氏阴性细菌中,革兰氏阳性细菌中的菌毛在宽度上窄得多 (2 至 3nm) 并且更难以眼观区分,这也提示在许多革兰氏阳性细菌物种中为何忽视这些菌毛的存在 (Kang, H. J. 等人 2007, *Science* 318, 1625-1628)。迄今,已经通过白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 中菌毛生物发生的体内表征研究实施对菌毛装配过程的最彻底描述,这也通常是对全部革兰氏阳性菌毛的总体描述 (Ton-That, H. 和 Schneewind, O. 2004, *Trends Microbiol* 12, 228-234)。在结构上,原型菌毛作为由共价交联的蛋白质亚基 (称作菌毛蛋白) 组成的聚合物出现,其中所述的蛋白质亚基又共价地在基部锚定于细

胞壁的肽聚糖组分,同时这两种共价键均酶促依赖于不同分选酶家族膜结合转肽酶(即分别是菌毛蛋白特异性分选酶和持家性分选酶)的催化作用(Mandlik, A. 等人 2008, Trends Microbiol 16, 33-40)。革兰氏阳性菌毛一般由 3 种菌毛蛋白亚基组成,并且在白喉棒杆菌的情况下,这些蛋白质(或编码它们的基因)命名为完全形成菌毛的轴或主链的主要菌毛蛋白亚基 SpaA (spaA) (分选酶介导的菌毛蛋白装配)、附属小菌毛蛋白亚基 SpaB (spaB) 和位于菌毛顶端的具有黏附特性的另一种小菌毛蛋白亚基 SpaC (spaC) (图 1)。编码这 3 种菌毛蛋白亚基的基因作为菌毛蛋白基因簇连同紧邻的至少一种编码菌毛蛋白特异性分选酶的基因定位于相同基因座内部。另外,菌毛蛋白簇内部的基因经常在两端侧翼为转座元件,提示其源于水平基因转移。全部这些基因的转录处于相同的方向并显示有操纵子调控作用(Scott J. R. 和 Zahner D, 2006, Mol Microbiol 62, 320-330)。

[0006] 依赖于每种菌毛蛋白亚基一级序列内部的几个不同保守基序和结构域的整体革兰氏阳性菌毛装配过程的修订模型包括 4 个基本阶段(Mandlik, A. 等人 2008, Proc Natl Acad Sci USA 105, 14147-14152; Telford, J. L., 等人 2006, Nat Rev Microbiol 4, 509-519) (图 1)。在第一阶段,各自含有 N 端信号肽的菌毛蛋白通过 Sec 依赖性途径经细菌细胞膜分泌并且随后因 C 端跨膜结构域的存在而停留在细胞膜中,其中所述的 C 端跨膜结构域由具有约 20 个残基的疏水区和带正电荷的尾组成。

[0007] 在装配过程的第二阶段,紧邻于该跨膜结构域之前的细胞壁分选信号(CWSS),优选 LPXTG- 基序,可用于细胞膜锚定的菌毛蛋白的分选酶依赖性剪切。菌毛蛋白特异性分选酶剪切在苏氨酸(T)和甘氨酸(G)残基之间的这个 5 残基基序并且形成酰基-酶中间体,其涉及苏氨酸残基的羧基与存在于分选酶的催化口袋内部的半胱氨酰硫醇之间的共价硫酯键。

[0008] 第三阶段代表菌毛蛋白亚基通过形成异肽键而聚合并且涉及剪切硫酯键和通过亲核攻击来自赖氨酸(K)残基侧链的 ϵ 氨基从菌毛蛋白亚基释放分选酶,其中所述的赖氨酸(K)残基在第二个菌毛蛋白亚基的菌毛蛋白基序(WXXXVXVYPKN)中保守。认为酰胺键在第一菌毛蛋白亚基中的苏氨酸残基的 C- 末端羧基和来自第二菌毛蛋白亚基的菌毛蛋白基序赖氨酸中的侧链氨基之间形成,其中所述的第二菌毛蛋白亚基作为共价硫酯仍与另一种菌毛蛋白特异性分选酶结合(Budzik, J. M. 等人 2008, Proc Natl Acad Sci USA 105, 10215-10220)。在这个菌毛装配模型中,逐步增长的聚合物结构由菌毛基部处的额外菌毛蛋白亚基送入并且总体长度受与菌毛蛋白特异性分选酶结合的可用菌毛蛋白亚基的量控制。由于菌毛蛋白基序是主要菌毛蛋白亚基(SpaA)及附属小菌毛蛋白亚基(SpaB)的特征性特征,然而在展示黏附特性的小菌毛蛋白亚基(SpaC)的一级序列中缺失,这种菌毛蛋白亚基有可能位于菌毛轴和第一菌毛蛋白亚基的顶端以启动菌毛聚合。

[0009] 聚合的菌毛对细胞壁的附着代表装配过程的第四阶段。这里,附属小菌毛蛋白亚基(SpaB)发出停止菌毛聚合的信号,但是仅当与持家性分选酶结合时才如此,所述持家性分选酶的基因在基因组上其他地方编码。在这个终末阶段,逐步增长的主要菌毛蛋白亚基(SpaA)的逐步增长的聚合结构通过菌毛蛋白特异性分选酶从硫酯键转移,以与作为持家性分选酶酰基-酶中间体被偶联的 SpaB 小菌毛蛋白亚基的菌毛蛋白-基序中赖氨酸的侧链形成酰胺键。由肽聚糖脂质 II 前体的五肽的氨基的亲核攻击随后允许持家性分选酶催化连接 SpaB 菌毛蛋白连接的菌毛聚合物附着于细胞壁。E-box 代表第三且表征较少的保守

的一级序列基序 (YXLXETXAPXGY), 其存在于来自众多革兰氏阳性细菌的菌毛蛋白亚基的 LPXTG 基序与菌毛蛋白基序之间。

[0010] 迄今, 借助 X 射线晶体学的三维 (3-D) 结构测定已经仅针对两种革兰氏阳性菌毛蛋白亚基蛋白揭示对于装配和功能的结构深入认识。Krishnan 等人 (2007, Structure 15: 893-903) 已经解析了无乳链球菌的小菌毛蛋白 GBS52 的晶体结构并且揭示存在与金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 胶原结合蛋白 Cna 共享结构相似性的两种 IgG 样结构域折叠, 这也表明这个小菌毛蛋白亚基如何可能促进菌毛黏附于特定宿主组织。由 Kang 等人 (2007, Science 318, 1625-1628) 解析的来自酿脓链球菌的主要菌毛蛋白 Spy0128 的晶体结构已经展示菌毛蛋白亚基内部的赖氨酸和天冬氨酸残基的侧链之间自我产生的分子内异肽键也如何能够弥补分选酶催化的分子间异肽键以维持菌毛的总体强度和稳定性。

[0011] 大部分益生微生物是革兰氏阳性乳杆菌和双歧杆菌成员并且具有在发酵食品和乳制品中使用的悠久传统 (Goldin, B. R. 和 Gorbach, S. L. 2008, Clin Infect Dis 46, S96-S100; Ljungh, A. 和 Wadstrom, T. 2006, Curr Issues Intest Microbiol 7, 73-89; Salminen, S. 等人 1998, Br J Nutr 80, S147-S171)。文献中未描述过益生性乳杆菌的菌毛结构或编码这些菌毛结构的基因。从未在鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 中证实菌毛样结构或多核苷酸的存在。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明的目的是提供新的菌毛多肽以及编码它们的多核苷酸。另外, 本发明的目的是提供新的菌毛结构。再者, 本发明的目的是提供涉及上述肽、多肽、蛋白质、菌毛结构和多核苷酸的新方法、用途和产品。

[0014] 本发明涉及肽, 其中所述的肽包含与 SEQ ID NO 1 (GG00441) 具有至少 94% 序列同一性、与 SEQ ID NO 2 (GG00442) 具有至少 94% 序列同一性、与 SEQ ID NO 3 (GG00443) 具有至少 84% 序列同一性、与 SEQ ID NO 4 (GG00444) 具有至少 91% 序列同一性、与 SEQ ID NO 5 (GG02369) 具有至少 83% 序列同一性、与 SEQ ID NO 6 (GG02370) 具有至少 94% 序列同一性、与 SEQ ID NO 7 (GG02371) 具有至少 93% 序列同一性或者与 SEQ ID NO 8 (GG02372) 具有至少 93% 序列同一性的序列或其片段或变体。

[0015] 本发明也涉及编码肽序列的多核苷酸, 其中所述的肽序列与 SEQ ID NO 1 (GG00441) 或其片段或变体具有至少 94% 序列同一性、与 SEQ ID NO 2 (GG00442) 或其片段或变体具有至少 94% 序列同一性、与 SEQ ID NO 3 (GG00443) 或其片段或变体具有至少 84% 序列同一性、与 SEQ ID NO 4 (GG00444) 或其片段或变体具有至少 91% 序列同一性、与 SEQ ID NO 5 (GG02369) 或其片段或变体具有至少 83% 序列同一性、与 SEQ ID NO 6 (GG02370) 或其片段或变体具有至少 94% 序列同一性、与 SEQ ID NO 7 (GG02371) 或其片段或变体具有至少 93% 序列同一性或者与 SEQ ID NO 8 (GG02372) 或其片段或变体具有至少 93% 序列同一性。

[0016] 本发明也涉及包含至少一种本发明肽的菌毛结构、包含至少一种本发明肽或菌毛结构的产品并涉及包含至少一种本发明肽或菌毛结构的药物或营养组合物。

[0017] 另外, 本发明涉及产品, 其包含用作药物或用于预防或治疗腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、肠易激综合征 (IBS)、炎性肠病 (IBD)、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激

或腹痛的至少一种本发明肽或菌毛结构。

[0018] 另外,本发明涉及至少一种本发明肽或菌毛结构在制造用于预防或治疗腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、IBS、IBD、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激或腹痛的药物中的用途。

[0019] 另外,本发明涉及用于预防或治疗腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、IBS、IBD、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激或腹痛的至少一种本发明肽或菌毛结构。

[0020] 此外,本发明涉及包含 SEQ ID NOs 9-16 任一者或其简并序列的序列或编码本发明肽的多核苷酸,涉及包含本发明多核苷酸的载体,涉及包含本发明的多核苷酸或肽的宿主细胞并且涉及包含至少一种本发明多核苷酸的基因簇。

[0021] 另外,本发明涉及针对本发明肽或其功能域的一种或多种抗体。

[0022] 本发明也涉及用于预防或治疗腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、癌症、特应性疾病、病毒病、传染病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、IBS、IBD、粘膜炎症、肠通透性紊乱、肥胖症、代谢综合征、氧化性应激或腹痛的方法,包括施用至少一种本发明肽或菌毛结构至受试者。

[0023] 本发明也涉及用于筛选包含至少一种本发明多核苷酸或其片段的细菌菌株的方法,其中该方法包括:

[0024] i) 提供来自细菌菌株的 DNA 或 RNA;

[0025] ii) 使针对本发明多核苷酸或其片段特异的引物或探针与来自步骤 i) 的 DNA 或 RNA 杂交并任选地扩增该多核苷酸或其片段;

[0026] iii) 检测与本发明多核苷酸或其片段同源的至少一种多核苷酸或其片段。

[0027] 本发明也涉及至少一种本发明多核苷酸或其片段或至少一种本发明抗体用于筛选细菌菌株的用途。

[0028] 本发明涉及使用至少一种本发明抗体筛选包含至少一种本发明肽或菌毛结构的细菌菌株的方法,其中该方法包括:

[0029] i) 提供细菌菌株的蛋白质;

[0030] ii) 使用所述抗体检测至少一种多肽、菌毛结构或其片段。

[0031] 本发明涉及减低或抑制致病细菌对受试者胃肠道、对其上皮或对其黏液黏附的方法,其中该方法包括施用至少一种本发明肽和/或菌毛结构至该受试者。

[0032] 本发明涉及至少一种本发明肽和/或菌毛结构用于减低或抑制致病细菌对受试者胃肠道、对其上皮或对其黏液黏附的用途。

[0033] 本发明涉及用于减低或抑制致病细菌对受试者胃肠道、对其上皮或对其黏液黏附的至少一种本发明肽或菌毛结构。

[0034] 本发明涉及促进细菌细胞黏附于或任何其他物质黏附于黏液或上皮的方法,其中该方法包括:

[0035] i) 产生至少一种本发明肽或菌毛结构或其片段;

[0036] ii) 在细菌细胞上或任何其他物质上展示该肽、菌毛结构和/或其片段;

[0037] iii) 使所述细菌细胞或任何其他物质与黏液或上皮接触。

[0038] 本发明涉及至少一种本发明肽和 / 或菌毛结构用于促进细菌细胞或任何其他物质黏附于黏液或上皮的用途。

[0039] 本发明涉及用于促进细菌细胞或任何其他物质黏附于黏液或上皮的至少一种本发明肽和 / 或菌毛结构。

[0040] 本发明涉及调节受试者中免疫应答的方法,其中所述方法包括:

[0041] i) 产生至少一种本发明肽或菌毛结构或其片段;

[0042] ii) 在宿主细胞上展示该肽、菌毛结构和 / 或其片段;

[0043] iii) 任选地使该宿主细胞与黏液或另一个宿主细胞接触。

[0044] 本发明涉及至少一种本发明肽或菌毛结构用于调节免疫应答的用途。

[0045] 本发明涉及用于调节免疫应答的至少一种本发明肽或菌毛结构。

[0046] 本发明涉及产生本发明产品的方法,其中该方法包括对产品产生至少一种本发明肽或菌毛结构的步骤。

[0047] 本发明也涉及产生至少一种本发明肽或菌毛结构的方法,其中该方法以下步骤:

[0048] i) 提供本发明的至少一种多核苷酸;

[0049] ii) 用所述多核苷酸转化宿主细胞;

[0050] iii) 培养来自步骤 ii) 的宿主细胞以产生所述肽或菌毛结构;

[0051] iv) 任选地回收所述肽或菌毛结构。

[0052] 此外,本发明涉及产生至少一种本发明肽或菌毛结构的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0053] i) 破坏产生或包含至少一种本发明肽或菌毛结构的细胞;

[0054] ii) 任选地回收所述肽或菌毛结构。

[0055] 另外,本发明涉及产生至少一种本发明肽的方法,其中该方法以下步骤:

[0056] i) 提供氨基酸;

[0057] ii) 用合成至少一种肽从步骤 i) 的氨基酸制造本发明的至少一种肽。

[0058] 本发明涉及通过使用生物信息学方法检测潜在的益生性细菌菌株的方法,其中该方法包括以下步骤:

[0059] i) 提供至少一种肽、多核苷酸或其片段的序列;

[0060] ii) 将步骤 i) 的序列针对序列集合的序列进行比较;

[0061] iii) 检测与步骤 i) 的序列具有生物学适合片段或与步骤 i) 的序列具有高同一性的序列。

[0062] 本发明也涉及通过使用生物信息学方法检测本发明肽或菌毛结构有效针对的病原菌株的方法,其中该方法包括:

[0063] i) 提供至少一种肽、多核苷酸或其片段的序列;

[0064] ii) 将步骤 i) 的序列针对序列集合的序列进行比较;

[0065] iii) 检测与步骤 i) 的序列具有生物学适合片段或与步骤 i) 的序列具有高同一性的序列。

[0066] 本发明的肽、菌毛结构和多核苷酸提供了用于食品、饲料、化妆品和制药工业中进一步开发的工具。本发明使得多种细菌菌株的快速与有效筛选方法和可靠且精确的定性或定量分析成为可能。因此,本发明的方法和手段使得发现新的益生细菌菌株以及发现新产

品（包括成分、补充剂和营养品）、药物和治疗方法成为可能。另外，借助本发明，更有效和特异的疗法变得可获得。

[0067] 存在向消费者提供新产品的持续、明显的需要，其中所述的新产品对健康具有明确证实的效果并且以这样的形式产生，从而允许这些产品原样地或作为另一种产品（如药品或食品或饲料产品）的一部分使用。根据本发明，产品也可用作允许作为例如日常膳食或药物的便利部分（convenient part）或补充剂使用的胶囊剂、丸剂或片剂。

[0068] 附图简述

[0069] 图 1a 和 1b 显示革兰氏阳性棒状杆菌中菌毛装配和共价附着于细胞壁的模式。

[0070] 图 2 显示包括编码菌毛蛋白特异性分选酶、主要菌毛轴蛋白、小菌毛轴蛋白和加帽菌毛蛋白质的基因的鼠李糖乳杆菌 GG (LGG) 菌毛簇。CWSS 表示细胞壁分选信号，即在许多革兰氏阳性细菌中发现的保守基序，Pilin 基序和 E- 盒也表示在许多革兰氏阳性细菌中存在的保守基序。

[0071] 图 3 显示与 LGG 菌毛结构的肽 GG00442、GG00443、GG00444、GG02370、GG02371 和 GG02372 结合的多克隆抗体的实例。

[0072] 图 4 显示 LGG 的突出菌毛结构的相差原子力显微镜显微图片。

[0073] 图 5a 和 5b 显示重组组氨酸标记的 LGG 蛋白即 SpaA、SpaB、SpaC、SpaD 和 SpaF 菌毛蛋白与人肠黏液的体外结合。使用切除的人肠组织作为聚苯乙烯微量滴定平板上的黏液来源。通过酶联免疫吸附测定法检测结合的蛋白质。

[0074] 图 6a 和 6b 分别地显示使用 SpaA 和 SpaC 菌毛蛋白特异性多克隆抗体时，在 mTSB- 培养基或 MRS+0.6% 牛胆汁培养基中培育的 LGG 和（作为阴性对照的）鼠李糖乳杆菌 LC705 (LC705) 的细胞壁级分的蛋白质印迹。图 6a 显示在 LGG 中存在含有 SpaA 的菌毛和 SpaA 单体，并且图 6b 显示在 LGG 中存在含有 SpaC 的菌毛和 SpaC 单体。泳道 1：重组 SpaA/SpaC 菌毛蛋白；泳道 2：在 mTSB 中培育的 LGG；泳道 3：在 MRS+0.6% 牛胆汁中培育的 LGG；泳道 4：在 mTSB 中培育的 LC705；泳道 5：在 MRS+0.6% 牛胆汁中培育的 LC705。使用的抗体在每幅图的顶部显示。在图 6b 中，分图 A：泳道 1 至 5 曝光 1 秒；分图 B：泳道 2-5 分别曝光 60 秒。分子量标准的位置在左边显示为千道尔顿。HMW 表示高分子量梯。图 6c 显示含有 SpaB 的菌毛和 SpaB 单体在 LGG 细胞壁级分的蛋白质印迹中存在。泳道 1：分子量标记；泳道 2：在 MRS 中培育的 LGG。用 SpaB 菌毛蛋白特异性多克隆抗体、山羊抗兔 IgG-AP 缀合物 (Bio Rad) 和 BCIP/NBT 显色剂进行检测。

[0075] 图 7a-c 显示 PCR 筛选具有菌毛结构的新益生菌菌株的结果。图 7a-c 分别显示鼠李糖乳杆菌 GG、鼠李糖乳杆菌 LC705 和干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) ATCC 334 的扩增产物。泳道 1：分子量标记；泳道 2：采用 SpaF 的引物的扩增产物；泳道 3：采用 SpaE 的引物的扩增产物；泳道 4：采用 SpaD 的引物的扩增产物；泳道 5：采用 SpaC 的引物的扩增产物；泳道 6：采用 SpaB 的引物的扩增产物；泳道 7：采用 SpaA 的引物的扩增产物。

[0076] 图 8a-d 显示表明 spaC、spaB 或 spaA 在干酪乳杆菌 ATCC 334、鼠李糖乳杆菌 LC705 和鼠李糖乳杆菌 GG 中存在的 DNA 印迹杂交信号。图 8a 显示通过琼脂糖凝胶电泳分离的已消化基因组 DNA 并且图 8b、8c 和 8d 显示分别使用 DIG- 标记的鼠李糖乳杆菌 GG spaC 基因的 801-bp PCR 扩增产物、鼠李糖乳杆菌 GG spaB 基因的 612-bp PCR 扩增产物或鼠李糖乳杆菌 GG spaA 基因的 780-bp PCR 扩增产物作为探针时，相同 DNA 的 DNA 印迹杂交。泳道 1：

分子量标记 I HindIII- ϕ X174HaeIII 混合物 ;泳道 2 :DIG 标记的分子量标记 II (Roche) ;泳道 3 :用 HindIII 消化的干酪乳杆菌 ATCC 334 ;泳道 4 :用 HindIII 消化的鼠李糖乳杆菌 LC705,泳道 5 :用 HindIII 消化的鼠李糖乳杆菌 GG ;泳道 6 :- ;泳道 7 :未标记的探针。

[0077] 图 9 显示用活的鼠李糖乳杆菌 GG 2×10^6 cfu/ml 或用大约 30pmol/ml 纯化的 His 标签标记的鼠李糖乳杆菌 GG 蛋白 SpaA、SpaB 和 SpaC 刺激巨噬细胞期间的 TNF- α 水平。

[0078] 图 10 显示来自人肠黏液致病细菌屎肠球菌由鼠李糖乳杆菌 GG 或 SpaC、SpaB 和 SpaA 菌毛蛋白逐出。黏附 (%) 表述为 5 个平行实验的平均数 \pm S. D. 。 * 指显著减少的屎肠球菌黏附 ($P < 0.05$)。

[0079] 图 11a 和 11b 显示编码图 2 中所述的菌毛操纵子的核苷酸序列。图 11a 显示编码 GG00441-GG00444 基因的操纵子 (粗体)。推定性保守元件 -35 序列 (下划线)、-10 序列 (双下划线)、核糖体结合位点 (下划线斜体) 和 rho 终止子 (点下划线)。图 11b 显示编码 GG02369-GG02372 基因的操纵子 (粗体)。推定性保守元件 -35 序列 (下划线)、-10 序列 (双下划线)、核糖体结合位点 (下划线斜体) 和 rho 终止子 (点下划线)。

[0080] 发明详述

[0081] 乳酸细菌已经在食物工业中长久使用并且它们如今用在多种食物供给品如乳产品中。例如,已知乳杆菌和双歧杆菌具有益生效果,但是没有充分理解益生菌影响健康的方式。因此,需要深入研究益生菌。

[0082] 本发明基于革兰氏阳性细菌也具有菌毛结构的研究结果。另外,本发明基于在革兰氏阳性细菌中、具体在乳杆菌中,更具体在鼠李糖乳杆菌中的新菌毛肽和结构中的发现。

[0083] 菌毛结构的肽

[0084] 总体而言,革兰氏阳性细菌菌毛从细菌的外膜伸出,通常 1-4 μ m 长和 2-8nm 宽并且以低数目出现。认为菌毛促进细菌黏附于靶表面。实际上,如本文中所示,表达“菌毛结构”指修长的毛状或毛发样蛋白质纤维,包含多个蛋白亚基 (优选地多于 1 个亚基)。这些蛋白质的装配可以依赖于特定蛋白质,即分选酶。具有黏附特性的蛋白质通常位于菌毛的顶部。具有异聚体菌毛结构的其他蛋白质可以是黏附性的。如本文中所示,表述“菌毛结构的部分”指菌毛的任何组分,优选该菌毛的任何蛋白质或任何片段或任何变体。在本发明的优选实施方案中,菌毛结构位于微生物的表面上或源自其中。

[0085] 如本文中所示,表述“肽”指任何肽,如二肽、多肽、蛋白质和 / 或菌毛蛋白。

[0086] 在本发明的具体实施方案中,菌毛蛋白的特征性特征是主要菌毛蛋白亚基 (SpaA),附属小菌毛蛋白亚基 (SpaB) 和加帽菌毛蛋白亚基 (SpaC)。

[0087] 菌毛蛋白特异性分选酶通过转移 SpaA 至逐步增长的菌毛蛋白聚合物结构中的 SpaC 来起作用 (图 1)。在本发明的优选实施方案中,包含与 SEQ ID NO 1 (GG00441) 具有至少 94% 序列同一性的序列或与 SEQ ID NO5 (GG002369) 具有至少 83% 序列同一性的序列的肽是菌毛蛋白特异性分选酶 (图 2, 对于编码 2 图中所述的菌毛操纵子的核苷酸序列,还见图 11)。

[0088] SpaA 同样形成菌毛结构的主链。不同菌毛结构的长度取决于 SpaA 在主链中的量 (图 1)。在本发明的优选实施方案中,包含与 SEQ ID NO2 (GG00442) 具有至少 94% 序列同一性的序列或与 SEQ ID NO6 (GG002370) 具有至少 94% 序列同一性的序列的肽是主要菌毛轴蛋白,即主要菌毛蛋白亚基 (图 2, 对于编码 2 图中所述的菌毛操纵子的核苷酸序列,还见

图 11)。GG00442 和 GG02370 含有分选酶识别位点,因而是分选酶的底物。

[0089] SpaB 同样在菌毛形成的最晚时期(终末阶段)添加至菌毛结构并且它形成菌毛至细胞壁的连接(图 1)。在本发明的优选实施方案中,包含与 SEQ ID NO 3(GG00443)具有至少 84%序列同一性的序列或与 SEQ ID NO7(GG002371)具有至少 93%序列同一性的序列的肽是小菌毛轴蛋白(图 2,对于编码 2 图中所述的菌毛操纵子的核苷酸序列,还见图 11)。GG00443 和 GG002370 含有分选酶识别位点,因而是分选酶的底物。

[0090] SpaC 可能位于菌毛轴和第一菌毛蛋白亚基的顶端以启动菌毛聚合(图 1)。在本发明的优选实施方案中,包含与 SEQ ID NO 4(GG00444)具有至少 91%序列同一性的序列或与 SEQ ID NO 8(GG002372)具有至少 93%序列同一性的序列的肽是结合性菌毛蛋白(图 2,对于编码 2 图中所述的菌毛操纵子的核苷酸序列,还见图 11)。GG00444 蛋白含有 von Willebrand 因子(vWF)结构域,并且 GG00444 和 GG02372 含有分选酶识别位点,因而是分选酶的底物。

[0091] 在本发明的具体实施方案中,本发明的肽或多肽包含与 SEQ ID NO 1、2、3、4、5、6、7 或 8 的氨基酸序列或与其片段或变体具有至少 60、65、70、75、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.8、99.9 或 100%同一性的序列。

[0092] 根据本发明的具体实施方案,该肽与 SEQ ID NO 1、2、3、4、5、6、7 或 8 的氨基酸序列任一者或与其片段或变体具有至少 60、65、70、75、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.8、99.9 或 100%同一性。

[0093] 在本发明的另一个具体实施方案中,该肽具有在序列 SEQ ID NO 1、2、3、4、5、6、7 或 8 任一者或其片段或变体中所示的序列。

[0094] 与本发明序列比较的任何序列或片段的同一性指与本发明完整序列比较的任何序列的同一性。序列同一性可以例如通过使用 BLAST(基本局部比对搜索工具)或 FASTA(FAST-AII)确定。在所述搜索中,设置参数“空位罚分”和“矩阵”一般选择为默认。

[0095] 如本文中所示,肽的片段或变体指肽的可以具有生物学功能的任何部分或变体。变体指在肽序列中具有微小变动如例如小缺失、突变或插入的肽。如本文中所示,“肽的功能性片段或变体”例如指能够在不同菌毛蛋白亚基之间形成异肽键(例如,菌毛蛋白特异性分选酶的转肽酶活性)、作为分选酶的底物(例如,SpaA、SpaB、SpaC、SpaD、SpaE 和 SpaF 的功能)或与细胞壁结合(例如,SpaC 和 SpaF 的功能)或与其他蛋白质或片段结合(例如,SpaC 的功能)的片段或变体。另外,“肽的功能性片段或变体”可以指包含生物学结构域的任何片段或变体。

[0096] 如今,多肽内部的结构域通常定义为空间上明显的结构,其可想象地折叠并独立地发挥作用(Ponting C. P. 和 Russell R. R. 2002, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 31: 45-71)。

[0097] 基于使用流行结构域-数据库 PFAM(Finn, R. D. 等人 2009 年 11 月 17 日, *Nucleic Acids Res.* [先于印刷版的电子版发布])的工具分析例如 SEQ ID NO 4 的多肽序列,本研究中将 SEQ ID NO 4 的多肽序列表征为具有小于或等于 0.1 的显著性 E 值的 3 个结构域。

[0098] 从 SEQ ID NO 4 第 137 至 271 位的氨基酸形成第一结构域(PF00092-von Willebrand 因子 A 型结构域),其中所述的第一结构域也存在于许多介导和参与蛋白

质-蛋白质相互作用的蛋白质中 (Colombatti, A. 等人 1993, Matrix. 13 :297-306 ; Whittaker C.A. 和 Hynes R.O. 2002, Mol Biol Cell. 13 :3369-87 ;Konto-Ghiorghi, Y 等人 2009, PLoS Pathog. 5 :e1000422)。含有 von Willebrand 因子 A 型结构域的蛋白质经常在多蛋白质复合体中发挥作用并且已经记载参与真核生物中的众多生物学事件,包括膜运输、蛋白酶体、转录、DNA 修复、细胞黏附、移行、归巢、图式形成和信号转导 (Colombatti, A. 等人 Matrix. 13 :297-306)。最近,证实致病性无乳链球菌菌株 NEM316 的菌毛蛋白的 von Willebrand 因子 A 型结构域是该蛋白质对人上皮细胞的黏附功能必需的 (Konto-Ghiorghi, Y. 等人 2009, PLoS Pathog. 5 :e1000422)。

[0099] 从 SEQ ID NO 4 第 617 至 691 位的氨基酸形成第二结构域 (PF05738-Cna 蛋白 B 型结构域) 并且从 SEQ ID NO 4 第 749 至 821 位的氨基酸形成第三结构域 (PF05738-Cna 蛋白 B 型结构域)。已经记载 Cna 蛋白 B 型结构域在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 胶原结合表面蛋白中共有重要作用。然而,该区域不介导胶原蛋白结合,但是相反,作为“柄”发挥作用,其中所述的柄将该蛋白质的其他区域从细菌表面伸出并且因而促进细菌黏附于胶原 (Deivanayagam, C. C. 等人 2000, Structure. 8 :67-78)。最近,对 Cna 蛋白 B 型结构域提出另一个特性,因为指出它含有证实对于菌毛装配和不同菌毛蛋白亚基连接在一起重要的异肽键形成残基 (Kang, H. J. 等人 2007, Science 318, 1625-1628)。片段的序列同一性百分数可以如完整多肽那样,使用相同的工具和设置进行度量。

[0100] 可以如上所述与 SEQ ID NO 4 类似地分析本发明的任何多肽序列。Cna 蛋白 B 型结构域存在于 SEQ ID NO 2 (第 73-155 和第 193-295 位氨基酸)、SEQ ID NO 3 (第 72-164 位氨基酸)、SEQ ID NO 6 (第 374-470 和第 69-168 位氨基酸)、SEQ ID NO 7 (第 238-328 位氨基酸) 和 SEQ ID NO 8 (第 743-805 和第 839-906 位氨基酸) 中。

[0101] 基于现有知识,具有足够高同一性百分数的多肽共享相似的空间结构并且有可能涉及相似的 (尽管并非必然涉及相同的) 功能。功能与结构等价性的序列水平同一性百分数是比对长度的函数 (Sander C. 和 Schneider R. 1991, Proteins. 9 :56-68)。例如,当具有至少 50 个氨基酸的多肽的序列水平同一性百分数超过 35% 时,它们具有良好的结构相似性。因而,现有知识说明序列同一性百分数高于 35% 并且长度超过 50 个氨基酸的多肽序列可能涉及相似的功能、具有相似的空间结构并且使用相同的抗体相关筛选方法予以检测。

[0102] 在本发明的优选实施方案中,具有 SEQ ID NO 2-4 或 6-8 的肽是菌毛结构的一部分。在本发明的另一个优选实施方案中,本发明的菌毛结构包含本发明的至少 1 种肽,更优选地包含本发明的至少 2 种或至少 3 种肽。另外,在本发明的优选实施方案中,该菌毛结构包含肽 GG00442 (SEQ ID NO 2), GG00443 (SEQ ID NO 3) 和 GG00444 (SEQ ID NO 4) 和 / 或肽 GG02370 (SEQ ID NO 6), GG02371 (SEQ ID NO 7) 和 GG02372 (SEQ ID NO 8)。

[0103] 革兰氏阳性及益生性细菌

[0104] 本发明的肽或菌毛结构可以来自任何细菌,如革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。然而,在本发明的优选实施方案中,所述肽或菌毛结构来自革兰氏阳性细菌。可以包含本发明肽或菌毛结构的革兰氏阳性细菌包括但不限于乳杆菌、乳球菌、双歧杆菌、丙酸杆菌、明串珠菌、链球菌、棒状杆菌、放线菌和分枝杆菌。

[0105] 在本发明的优选实施方案中,所述肽或菌毛结构来自益生性细菌 (如益生性乳杆

菌、乳球菌、双歧杆菌、肠球菌、丙酸杆菌、明串珠菌和链球菌或酵母。益生菌是活的微生物，优选地是非致病性微生物，当以足够的量施用至人或动物时，其促进宿主的健康 (Fuller, R. 1989, J. Appl. Microbiol. 66 :365-378)。当作为食物或食物补充剂以足够的量消费时，益生菌将对宿主产生有益的健康好处。

[0106] 益生菌在人或动物中的健康好处包括可能预防和治疗许多疾病。益生菌的健康促进作用例如包括平衡和维系肠菌群、刺激免疫系统和抗癌变活性。益生菌在人肠道中有用效果基于活细菌细胞、其细胞结构和代谢产物所引起的几个独立因素。

[0107] 如果一种细菌满足以下要求，则可以称它为益生菌 (Lee, Y-K 和 Salminen, S. 1995 Trend Food Sci Technol, 6 :241-245) :它在消化道中优势的苛刻条件 (胃部低 pH、消化系统的酸, 等) 下仍是活的 ;附着于肠壁 ;定植至 GIT ;在肠内代谢 ;是技术上可应用的 (承受加工过程) ;显示经临床检验和报道过的健康效果 ;并且是消费安全的。

[0108] 胃肠道不同部分之间的微生物含量存在巨大差异，全部肠细菌的约 95% 出现在结肠中。除暂居微生物之外，估计超过 400 个细菌物种在结肠中旺盛生长。优势物种如下：拟杆菌属 (Bacteroides)、双歧杆菌属 (Bifidobacterium)、粪球菌属 (Coprococcus)、消化链球菌属 (Peptostreptococcus)、真细菌属 (Eubacterium) 和瘤胃球菌属 (Ruminococcus)。乳杆菌属 (Lactobacillus)、链球菌属 (Streptococcus)、梭杆菌属 (Fusobacterium)、韦荣球菌属 (Veillonella)、丙酸杆菌属 (Propionibacterium) 和肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 物种的数目略少。所述物种的某些代表有用的微生物，而其他甚至可以有有害 (Tannock, G. W. 1998, Int. Dairy J. 8 :527-533)。肠菌群组成的变化或其量的突然降低 (因重度腹泻、抗生素治疗等所致) 增加了潜在致病性物种的感染性，这可以造成严重后果 (变态反应爆发、肠病、癌症)。

[0109] 在本发明的优选实施方案中，所述肽或菌毛结构与胃肠道 (GIT) 结合，最优选地与胃肠道的上皮结合。在本发明的另一个优选的实施方案中，所述肽或菌毛结构与黏液结合。黏液是来自黏液产生细胞的滑腻分泌产物，粘稠胶质。黏液保护例如在 GIT 中的上皮细胞。除了杀菌酶类和免疫球蛋白之外，黏液也含有粘蛋白和无机盐。如本文中所示，胃肠道指从嘴至肛门的管，其参与消化食物。GIT 包括口、食道、胃、十二指肠、空肠、回肠、小肠、大肠 (结肠)、盲肠、直肠和肛门。

[0110] 记载最详细的益生菌包括鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)GG、约氏乳杆菌 (*L. johnsonii*)LA1、干酪乳杆菌 (*L. casei*)Shirota 和乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*)Bb12。此外，已经在本领域文献中描述众多的其他益生菌。在本发明的优选实施方案中，所述肽或菌毛结构来自鼠李糖乳杆菌，最优选地来自鼠李糖乳杆菌 GG (LGG, **LGG®**) 菌株，其是最初来自美国的非致病性革兰氏阳性分离株 (US4839281 A)。LGG 菌株分离自人粪便，它能够在 pH 3 良好生长并且甚至在更低 pH 3 以及高胆酸含量下存活。该菌株显示优异的黏液和上皮细胞黏附性并且定植 GIT。来自葡萄糖的乳酸产率是良好的：在 MRS 培养液中培育时，该菌株产生 1.5-2% 乳酸。该菌株不发酵乳糖并且它不从乳糖产生乳酸。该菌株发酵以下糖类：D-阿拉伯糖、核糖、半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、鼠李糖、卫矛醇、肌醇、甘露醇、山梨醇、N-乙酰葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶苷、水杨苷、纤维二糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、松三糖、龙胆二糖、D-塔格糖、L-岩藻糖和葡萄糖酸。该菌株在 15-45°C 良好生长，最佳温度是 3-37°C。LGG 已经以保藏号 ATCC 53103 保藏于保藏机构美国典型培

养物保藏中心。

[0111] 菌毛基因

[0112] 编码菌毛结构的菌毛蛋白的基因簇集在 LGG 基因组中的相同基因座上。在 LGG 基因组中通过生物信息学方法总计找到编码菌毛肽的两个不同基因簇（图 2，对于编码 2 图中所述的菌毛操纵子的核苷酸序列，还见图 11）。

[0113] 在本发明的一个优选实施方案中，所述多核苷酸具有 SEQ ID NOs 9-16 任一者或其简并序列或片段的序列，或它编码本发明的肽或其片段。具有 SEQ ID NOs 9-16 任一者中所示序列的简并序列的核苷酸意指它含有 1 个或多个不同的核苷酸，但是仍编码相同的氨基酸。如本文中所述的“多核苷酸”是核苷酸序列，如 DNA 或 RNA 序列，并且可以是单链或双链的多核酸。术语“多核苷酸”包括基因组 DNA、cDNA 和 mRNA。多核苷酸也可以是分离的 DNA。

[0114] 在本发明的另一个优选的实施方案中，所述基因簇包含本发明的至少一种多核苷酸。在本发明的另一个优选的实施方案中，所述基因簇包含本发明的至少 2 种、至少 3 种或至少 4 种多核苷酸。最优选地，该基因簇包含 SEQ ID NOs 9-12 或 SEQ ID NOs 13-16 中所示的多核苷酸。如本文中所述，“基因簇”指编码联合功能（协同作用）所需的肽 / 蛋白质（在此例如编码菌毛结构）的至少 2 个基因的集合。相同簇的基因通常一起归并在相同的遗传基因座上。

[0115] 根据本发明的具体实施方案，该多核苷酸与 SEQ ID NO 9、10、11、12、13、14、15 或 16 的核苷酸序列任一者或与其片段具有至少 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5、99.8、99.9 或 100 % 同一性。

[0116] 在本发明的另一个具体实施方案中，该多核苷酸具有在序列 SEQ ID NO 9、10、11、12、13、14、15 或 16 任一者中所示的序列。

[0117] 产品和药物组合物

[0118] 在本发明的一个优选实施方案中，所述产物包含本发明的至少一种肽或菌毛结构。该产物也可以包含本发明的至少 2 种或至少 3 种肽。在一个优选的实施方案中，产物包含本发明肽的至少一个片段。本发明的产品可以选自但不限于由食品、动物饲料、营养品、食物补充剂、食物成分、健康食品、药品和化妆品组成的组。在发明的一个优选实施方案中，产品是食品或饲料产品。在本发明的另一个实施方案中，产品是功能性食品，即具有任何健康促进和 / 或疾病预防或治疗特性的食品。优选地，本发明的食品选自由奶产品、烘焙产品、巧克力和甜食、糖和口香糖、谷物产品、小吃、基于浆果或水果的产品和饮料 / 饮品组成的组。奶产品包括但不限于乳、酸乳、酸奶和其他发酵的乳产品如奶酪和膏糊 (spreads)、乳粉、儿童食品、婴儿食品、学步儿童食品、婴儿配方食品、果汁和汤。除本发明的肽或菌毛结构之外，该产品也可以含有其他 starters、益生菌等。

[0119] 在本发明的优选实施方案中，该产品是药物组合物。在本发明的一个优选实施方案中，该药物组合物包含本发明的至少一种肽或菌毛结构，并且在另一个实施方案中包含本发明的至少 2 种或至少 3 种肽。药物组合物可以例如以固体、半固体或液体形式，如以片剂、丹剂、胶囊剂、溶液剂、乳剂、混悬剂、阴道凝胶剂和软膏剂、阴道栓剂等形式使用。优选地，该组合物用于口服施用或用于肠道施用。

[0120] 除本发明的至少一种肽或菌毛结构之外, 药物组合物还可以包含益生元, 可药用载体 (例如水、葡萄糖或乳糖)、佐剂、赋形剂、辅助赋形剂、杀菌剂、稳定剂、增稠剂或着色剂、香料、粘合剂、填充剂、润滑剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂、凝胶剂、抗氧化剂、防腐剂、缓冲剂、pH 调节剂、湿润剂或相应产品中通常存在的组分。

[0121] 本发明的产品或药物组合物包含足以产生所希望效果的量的所述肽或菌毛结构。商业地获得或通过本领域已知的常规技术制备所述产品或药物组合物的其他成分以及其他特定组分。

[0122] 所述产品或药物组合物可以通过本领域已知的任何方法制造。对产品产生肽或菌毛结构意指该肽或菌毛结构可以例如添加至任何产品或与任何物质混合。该肽或菌毛结构也可以在产品中产生, 例如, 通过适宜条件下表达。在成品完成期间, 可以与制备过程中或在其之后添加或混合肽或菌毛结构。在本发明的优选实施方案中, 将本发明的肽或菌毛结构添加至产品。

[0123] 生产方法

[0124] 本发明的肽或菌毛结构可以例如通过合成方法 (例如, 肽合成法) 或通过采用基因修饰生物的重组生产法产生。在本发明的优选实施方案中, 所述肽或菌毛结构是重组的。如本文中所用, “重组” 遗传材料指一般作为一种或多种遗传材料 (例如各种来源的 DNA 链) 组合的材料, 并且它已经通过合并或插入所述序列产生。重组产生能够对基因或基因产物, 或者例如基因的表达实现特定和 / 或特别性状 (例如过量表达或不足表达)。本发明的多核苷酸可以例如置于任何内源或外源调节物 (如启动子) 的控制下。重组蛋白衍生自重组 DNA。

[0125] 至少一种目的多核苷酸可以从细胞分离或合成地产生。可以将这种核苷酸转化至宿主细胞。用于产生本发明任何肽的合适宿主细胞可以是任意的真核细胞或微生物, 优选地是细菌, 最优选地乳酸细菌如乳杆菌、乳球菌、双歧杆菌、肠球菌、明串珠菌和链球菌, 或丙酸杆菌、或酵母。

[0126] 如本文中所用, “转化” 指通过外来遗传材料、优选通过 DNA 遗传地改变细胞, 从而导致这种遗传材料的表达。可以原样地导入外来遗传材料或将其掺入任何其他遗传材料, 如载体、质粒等。任何基因工程方法或任何分子克隆方法可以用于以本发明的多核苷酸转化宿主细胞。存在多种导入外来材料至真核细胞中的方法。材料, 如聚合物 (例如, DEAE- 葡聚糖或聚乙烯亚胺)、脂质体和纳米粒子 (例如, 金) 已经作为载体用于转化。遗传材料也可以通过使用例如病毒或载体作为载体导入细胞。用于导入外来材料至细胞中的其他方法包括但不限于核转染法、电穿孔法、接合法、转染法、声致穿孔法 (sonoporation)、热休克法和磁转染法 (magnetofection)。多种转染试剂 (如磷酸钙或脂转染胺试剂) 的使用是本领域熟知的。用于导入外来材料至细菌细胞中的优选方法是电穿孔法。

[0127] 本发明的肽或菌毛结构也可以由天然表达该肽或菌毛结构的细胞产生。

[0128] 在天然细胞或转化的宿主细胞已经在适宜条件下产生本发明的肽后, 可以例如从细胞中纯化该肽或可以回收分泌形式的肽, 例如, 从培养基回收。为了纯化该肽, 可以例如通过超声处理、辐射、加热、裂解、机械搅拌 (剪切)、酶方法、' cell bomb' 或化学试剂 (低渗休克、去垢剂和溶剂) 或其混合物破坏细胞。肽或菌毛结构可从正在生长或有代谢活性的生物, 即活生物和 / 或冻干生物, 或无活力的生物, 例如, 热杀死、照射或裂解的生物获

得。肽或菌毛结构可从死细胞或活细胞获得。

[0129] 肽或菌毛结构可以在一个细胞中产生并且随后展示在相同的细胞上,或该肽或菌毛结构可以在除了表面上展示该肽或菌毛结构的细胞之外的另一个细胞中产生。

[0130] 任何已知方法如免疫法可以用于产生针对本发明肽的抗体。可以针对所述肽的任何表位或功能域产生抗体并且这些抗体可以单克隆或多克隆的。在本发明的优选实施方案中,抗体是多克隆的(图3)。如本文中所示,“肽的功能域”指该肽的具有生物学功能的任何部分。

[0131] 治疗

[0132] 细菌,一大类单细胞微生物,在真核生物如人、动物和植物中引起多种疾病。然而,仅在近年来菌毛在重要病原体表面上的存在引起研究者当中的兴趣。因为GIT及其小型生物群影响受试者的健康,所以细菌菌毛的利用强化了新疗法。本发明的肽、菌毛结构或多核苷酸可以用于治疗或预防由微生物如细菌或病毒所致或由任何其他原因如失衡营养、压力生活方式或遗传素质所致疾病的方法中。可用本发明的肽、菌毛结构、多核苷酸或用本发明药品预防或治疗的疾病或不适包括但不限于腹泻如旅行者腹泻、动脉性高血压、血管病、变态反应、特应性疾病、尿道感染、呼吸道感染、龋齿、肠易激综合征、炎性肠病,以及治疗轻微肠不适以及增强/促进个体总体健康。本发明的组合物也用于预防和治疗胃肠病症和疾病,并用于促进总体健康。所述病症或疾病优选地选自自由粘膜炎症、肠通透性紊乱、IBD、IBS和其他胃肠病症组成的组。在本发明的特别实施方案中,肽或菌毛结构作为疫苗使用(免疫应答)。

[0133] 减少或抑制致病菌黏附于受试者GIT的方法导致预防或缓解由该病原体所致的症状。病原体因本发明肽或菌毛结构的竞争从GIT的上皮或表面逐出。本申请的实施例11描述了用LGG菌毛蛋白逐出有害致病菌的竞争测定法。待逐出的优选病原体包括但不限于大肠杆菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、拟杆菌、利斯特菌、葡萄球菌、肠球菌、梭菌和链球菌。如本文中所示,“致病菌”指引起任何疾病或任何有害作用的任意细菌。如本文中所示,“黏附”指至少两个分子或结构因化学或物理结合/力或无这些结合/力情况下彼此锚定。不同类型的黏附,如机械黏附、化学黏附、分散性黏附(dispersive adhesion)、静电黏附和扩散黏附,是已知的。黏附可以是可逆或不可逆的事件,但是在生物化学系统中,黏附通常是可逆的。

[0134] 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)是新出现医院内感染病原体的肠细菌,包括高度抵抗临床重要的抗生素万古霉素的万古霉素抗性肠球菌(VRE)(de Regt, M. J. 等人,2008, *J Antimicrob Chemother.* 62(6): 1401-1406)。这些物种属于引起住院患者中血液、手术部位和肠道感染的医院内感染的前三位细菌病原体(Richards, M. J 等人,2000, *Infect Control Hosp Epide-miol* 21: 510-515)。肠球菌可以引起类型广泛的疾病:尿道感染、菌血症、败血症、心内膜炎、伤口和组织感染、腹内和盆腔感染(Kayser, F.H. 等人 2003, *Int J Food Microbiol* 88(2-3): 255-262),并且感染手术部位,尤其在植入装置存在的情况下(Baldassarri L 等人, 2005, *Int J Artif Organs* 28(11):1101-1109)以及引起脑膜炎(Pintado V 等人,2003, *Medicine(Baltimore)*. 82(5):346-64)、慢性根尖牙周炎(Hancock H. H 等人,2001. *Oral Surg Oral Med Oral pathol* 91:579-586)和尖周损害(Sunde PT 等人,2002, *J Endod* 28:

304-310)。

[0135] 近来,已经描述尿肠球菌分离株含有位于表面的菌毛,并且值得注意地,绝大部分(71%)的医院获得的尿肠球菌菌株和重要部分(43%)的非医院的尿肠球菌菌株含有菌毛基因(Hendricks AP等人,2008, *Microbiology* 154 :3212-3223)。在一项双盲和安慰剂作对照的研究中,已经描述鼠李糖乳杆菌 GG 的消费有效地清除来自 VRE 阳性患者中感染的肠球菌(Manley K. J 等人,2007 *Med J Aust.* 186(9) :454-457)。含有菌毛的鼠李糖乳杆菌 GG 与 VRE 之间竞争的分子证据源自结合研究,该研究表明鼠李糖乳杆菌对人胃肠黏液的结合作用比抗万古霉素的尿肠球菌高 20-130 倍(Pultz N. J 等人,2006 *Curr Microbiol.* 52(3) :221-224)。令人惊奇地,在本发明的结合测定法中,纯化的 His 标签标记的 LGG 蛋白 SpaA、SpaB 和 SpaC 抑制病原体例如抗万古霉素尿肠球菌与黏液的结合。

[0136] 减低或抑制致病菌对受试者胃肠道、对其上皮或对其粘液黏附的方法可以包括以下步骤:i) 产生至少一种本发明肽或其片段或菌毛结构;ii) 在细胞或黏液上展示该肽、片段和/或菌毛结构。

[0137] 除减少有害或致病菌的粘附之外,本发明还提供促进有益细胞或其他物质如酶、重组细胞、微胶囊、纳米胶囊或药物与 GIT 黏附的可能性。促进细菌细胞与黏液和与 GIT 黏附的方法或本发明肽或菌毛结构用于促进细菌细胞黏附于肠粘液的用途涉及新肽或菌毛结构在体内、离体或体外黏附于 GIT 的令人惊奇的能力。所述菌毛肽或菌毛结构作为将细胞或任何其他物质如药物、酶、微生物、重组细胞、微胶囊、纳米胶囊与 GIT 连接的工具而发挥作用。

[0138] 调节受试者中免疫应答的方法和所述肽或菌毛结构用于调节免疫应答的用途基于出乎意料的发现,即本发明的肽或菌毛结构引起免疫应答的变化。免疫应答指针对身体、离体或体外系统中抗原的应答或指针对另一种调节物的应答。这种应答可以由淋巴细胞和/或由特异性抗体识别抗原所介导。免疫应答的一个目的是摧毁抗原(其通常为外源)或中和之。如本文中所示,“调节”指免疫应答的任何变动,如增加或减少。免疫应答的变动可以通过任何合适的医学、生理学或生物学试验监测,所述的试验包括但不限于这些试验,它们基于检测信号途径的激活以及检测标记基因的转录或翻译水平或蛋白质(例如抗体或受体)的量。目前,不存在可用于确定细胞或生物中免疫应答的单一标记。然而,优选的标记包括但不限于肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 12(IL-12)、IL-10、IL-1 β 和干扰素 α (IFN- α)。其他可能的标记是 IL-1 α 、IL-6、IL-18、IFN- γ 、IL-4、TGF- β 、IL-1Ra 和 IL-18BP。在本发明的优选实施方案中,标记选自由 TNF- α 、Th1 细胞因子、IL-10 和 IL-12 组成的组。

[0139] TNF- α 是炎性细胞因子(Bertazza L 和 Mocellin S. 2008, *Front Biosci.* 13 :2736-43),其激活免疫系统并启动炎症反应以对抗感染。TNF- α 也随 IL-6 和 INF- γ 一起介导炎症的全身作用,如发热和合成急性期蛋白。适宜量的 TNF- α 以及其他促炎细胞因子的产生对于消除感染是重要的。然而,不适宜或过多量的促炎细胞因子,如 TNF- α ,已经与病理生理状况如类风湿性关节炎、椎关节炎、眼色素层炎、银屑病和炎性肠病关联。与 IFN- γ 一样, TNF- α 也是 Th1 型细胞因子之一,并且因此它激活巨噬细胞并抑制 B 细胞并且因而促进 Th1 型免疫。TNF- α 也参与肥大细胞活化,并且因此参与变态反应。Th1 型应答导致细胞介导的免疫。Th1 型应答协调针对胞内病原体的宿主应答并且在激活吞噬细胞和促进

微生物杀伤方面发挥中心作用,这在不同的感染(如呼吸道感染和胃肠感染如腹泻)中是重要的。Th1 型应答在也在平衡变态反应中的免疫应答方面是重要 - 在变态反应中,免疫应答偏向 Th2 型应答,导致超敏反应,并且刺激 Th1 型免疫应答的物质可以平衡这种情况。

[0140] 可以从任何生物学样品或受试者通过体外、离体或体内试验检查免疫应答的变动。益生性菌株的特性可以在细胞培养(体外)中利用例如外周血单核细胞(PBMC)、人单核细胞、巨噬细胞和树突细胞进行研究。离体实验的实例包括确定嗜中性粒细胞和单核细胞的吞噬作用、突发性氧化作用,即嗜中性粒细胞和单核细胞的超氧化物产生、NK 细胞活性、淋巴细胞增殖和外周血单核细胞、单核细胞或淋巴细胞的细胞因子产生。体内实验包括但不限于确定针对疫苗的应答(例如疫苗特异性抗体或疫苗特异性抗体形成细胞),迟发型超敏反应和针对减毒病原体的应答。

[0141] 作为益生作用的备选,本发明的肽或菌毛结构可以在细胞或受试者中引起任何其他作用。这些其他作用也可以相对于益生作用单独或额外地出现。益生作用可以是其他免疫调节物和肽或菌毛结构的组合。

[0142] 在本发明,用于治疗或预防的受试者可以是任何真核生物,优选地是人或动物,特别是宠物和生产动物。所述动物可以选自由生产动物和宠物组成的组,如奶牛、马、猪、山羊、绵羊、家禽、狗、猫、兔、爬行动物和蛇。

[0143] 筛选方法

[0144] 本发明的任何多核苷酸或其任意片段可以用于筛选具有相似菌毛结构的细菌菌株。在筛选细菌菌株的方法中,可以例如通过基于 PCR 的方法,如常规 PCR 和测序法或微型测序法;杂交方法,如 DNA 印迹杂交或 RNA 印迹杂交;使用不同程序及参数的任何生物信息学方法;和通过使用针对本发明肽的抗体的任何基于抗体的方法、流式细胞术、免疫沉淀法、免疫共沉淀法、免疫组织化学、免疫荧光法、ELISA 和 ELIS-POT 技术确定至少一种编码菌毛肽或其片段的多核苷酸或其片段。因此,在本发明的优选实施方案中,使用基于 LGG 菌毛基因设计引物,通过 PCR 筛选具有菌毛结构的新细菌菌株。在本发明的另一个优选实施方案中,使用本发明 LGG 基因的扩增产物作为探针,通过 DNA 印迹杂交筛选具有菌毛结构的新细菌菌株。

[0145] 在用于筛选本发明多核苷酸的同源序列或片段的方法中优选引物或探针的严格杂交条件。如本文中所示,“同源序列”或“具有高同一性的序列”指与另一个序列可以相同或但不必相同的序列。然而,这些序列是相似的并且它们具有高同一性%。

[0146] “生物学适合片段”指相似的序列或具有超过 35% 同一性百分数和超过 50 个氨基酸长度的序列。

[0147] 在本发明的另一个优选实施方案中,通过计算方法从现存或新建立的序列列表或数据库中筛选具有菌毛结构的新细菌菌株和联种群。

[0148] 待筛选的样品可以取自任何生物或任何物质,并且可以是例如细菌培养物、组织样品、血样(血清或血浆样品)、食物样品或环境样品。在本发明的优选实施方案,待筛选的细菌菌株是潜在的益生性细菌菌株。

[0149] 就本发明的筛选方法而言,可以检测与致病性细菌菌株或包含已知致病性组分的细菌菌株相关的菌株。此类菌株可以包含这样的序列,其具有在功能上与本发明序列如与 SEQ ID NO 4(GG00444) 相对应的片段,和至少 35% 至 100% 序列同一性,或包含本发明的多

核苷酸,如包含 SEQ ID NO12 的多核苷酸或其简并序列形式,或编码本发明的肽。

[0150] 在本发明中,筛选可以在体内、体外、在计算机上或离体条件下实施。

[0151] 本发明由以下实施例说明,所述实施例无论如何不意图是限制性的。

[0152] 实施例 1. 重组 LGG 菌毛蛋白的克隆、表达和纯化

[0153] 使用侧翼 5' - 末端和 3' 末端寡核苷酸引物对 (一条引物含有 EcoRI 位点 (对于 GG02372, SacI 位点) 并且另一条引物带 XhoI 位点 (见表 1)) 从 LGG 基因组 DNA 中 PCR 扩增 SpaA (GG00442)、SpaB (GG00443)、SpaC (GG00444)、SpaD (GG02370)、SpaE (GG02371) 和 SpaF (GG02372) 的编码序列,不包括编码 N 端信号肽和 C 端细胞壁分选信号 (CWSS) 的区域。扩增的 PCR 片段用限制性核酸内切酶 EcoRI (或对于 GG02372, SacI) 和 XhoI 切割,随后连接到受 T7 调节的表达载体 pET28b+ 中的相应位点中,并且所得重组质粒 (对于 GG00442, pKTH5319; 对于 GG00443, pKTH5320; 对于 GG00444, pKTH5321; 对于 GG02370, pKTH5324; 对于 GG02371, pKTH5379; 并且对于 GG02372, pKTH5341) 在用于表达胞内 C 端六组氨酸标记蛋白质的大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) pLysS 中增殖。在使用标准方案的全部 DNA 操作中使用已建立的方法。为了蛋白质生产,将大肠杆菌在 37°C 于补充有 50 μ g/ml 卡那霉素的 Luria-Bertani 培养基中培育至对数中期,通过 1mM IPTG 诱导蛋白质表达 3 小时,通过离心收获细胞,并且将细胞沉淀重悬于裂解缓冲液 [50mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 300mM NaCl, 10mM 咪唑] 中。通过超声处理破坏细胞,通过离心澄清,并且将无细胞的裂解物通过 0.45 μ m 滤器。随后通过 Ni^{2+} 螯合的亲合层析法纯化加 6 组氨酸标签的菌毛蛋白。简言之,将无细胞的裂解物分别施加至 Ni-NTA 琼脂糖柱 (Qiagen),用洗涤缓冲液 [50mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 300mM NaCl, 20mM 咪唑] 洗涤,并且蛋白质用洗脱缓冲液 [50mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 300mM NaCl, 250mM 咪唑] 从该柱洗脱。将含有纯化蛋白质的柱级分汇集,对于 SpaA (GG00442)、SpaC (GG00444)、SpaD (GG02370)、SpaE (GG02371) 和 SpaF (GG02372) 蛋白而言,使用 BioRad EconoPac 10DG 脱盐柱针对 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 进行缓冲液交换,并且对于 SpaB (GG00443) 蛋白而言,针对 50mM 乙酸钠 (pH 5.1) 进行缓冲液交换,并且使用 30kDa Microsep 滤器 (Pall Life Sciences) 浓缩。通过 SDS-PAGE 监测重组菌毛蛋白的纯度并且通过 A_{280} 量值估计蛋白质浓度。

[0154] 实施例 2. 重组 LGG 菌毛蛋白特异性多克隆抗体的产生

[0155] 根据 Johnston B. A. 等人 (1991, Laboratory of Animal Science 41:15-21) 描述的免疫方案产生对 SpaA (GG00442)、SpaB (GG00443)、SpaC (GG00444)、SpaD (GG02370)、SpaE (GG02371) 和 SpaF (GG02372) 菌毛蛋白特异的兔多克隆抗体。简述之,起初施用皮下 (SC) 注射 (1ml) 400 μ g 纯化的重组菌毛蛋白在弗氏完全佐剂中的 1 : 1 混合物,随后以 3 周间隔三次加强注射 (SC) 200 μ g 蛋白质在弗氏不完全佐剂中的 1 : 1 混合物。最后加强注射后两周进行终末血液收集。使用标准方案实施从该血液制备抗血清。

[0156]

表 1

基因	正向寡核苷酸引物 *	反向寡核苷酸引物 **
SpaA (GG00442)	5' -TCGGGTTCA <u>GAA</u> TCTACGAAATGATACGAC (SEQ NO 19)	5' -TGCCAGTACCACC <u>CTCGAG</u> TGCCAGAATAC (SEQ NO 20)
SpaB (GG00443)	5' -GCAGACACAG <u>AAT</u> CAACTGTGCCGACC (SEQ NO 21)	5' -CAACTGTATCACCC <u>CTCGAG</u> TGGCAACAATTGACG (SEQ NO 22)
SpaC (GG00444)	5' -CAGTTCAGTTGT <u>GAAT</u> TCCACTGATAACATTTCG (SEQ NO 23)	5' -AGCCCTGACCACC <u>CTCGAG</u> CGGCCAAAATTTC (SEQ NO 24)
SpaD (GG02370)	5' -ACCCGTACAG <u>AAT</u> TCGACAACGACTGTG (SEQ NO 25)	5' -GTCCGATTCCGCC <u>CTCGAG</u> CGGCCAAATAATTG (SEQ NO 26)
SpaE (GG02371)	5' -CCACATTGGGTT <u>CAGAAT</u> TCTGATCAAACTG (SEQ NO 27)	5' -TGCGCCAATCGGA <u>CTCGAG</u> CGGCCAAAATAAC (SEQ NO 28)
SpaF (GG02372)	5' -GCAAAATTGGCAG <u>GAGCT</u> CGGTCCCCGGTAG (SEQ NO 29)	5' -CCGCTACCACC <u>CTCGAG</u> CGGGTAGGAGTG (SEQ NO 30)

* 和 ** 正向寡核苷酸引物中的限制性核酸内切酶 EcoRI 与 SacI 和反向寡核苷酸引物中的 XhoI 位点加下划线并以粗体表示

[0157] 实施例 3. 通过生物信息学方法预测蛋白质编码序列

[0158] 使用 Glimmer3 (Delcher A. L. 等人 2007, Bioinformatics. 23 :673-679) 和分析 LGG 的完整基因组序列, 完成蛋白质编码序列的预测。使用迭代模式脚本 (iteration-mode

script)(g3-iterated.csh)应用Glimmer3,同时默认参数如下调整:最小基因长度(150bp)和最大重叠(50bp)。使用BLAST(Altschul S.F.等人1997,Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)并搜索推定性核糖体结合位点,纠正初始预测的起点。原样接受对GG00441,GG00442,GG00443,GG00444,GG02369,GG02370和GG02371的Glimmer3预测结果,而手工纠正GG02372的预测结果以在下游21bp开始。使用Tran-sTermHP(Kingsford CL.等人2007,Genome Biol. 8:R22.)预测Rho依赖性终止位点,该软件显示GG00441、GG00442、GG00443与GG00444;GG02369、GG02370、GG02371和GG02372作为单一转录物转录并且因而形成自身的操纵子。

[0159] 通过将预测的蛋白质编码序列转化成蛋白质序列和通过针对公共序列数据库执行同源性搜索获得注释(Wheeler D.L.等人2008,Nucleic Acids Res. 36:D13-21)。仅接受来自这些序列的注释,其中所述序列与查询的局部比对结果具有 $\geq 35\%$ 氨基酸同一性并覆盖 $\geq 80\%$ 的主题序列。基于该搜索,将GG00441和GG02369注释为分选酶;将GG00444注释为含有von Willebrand因子结构域的蛋白质;将GG02370和GG02371注释为保守的假定蛋白质;并且将GG02372注释为外膜蛋白。没有获得GG00442和GG00443的注释。

[0160] 通过集成InterPro和COG分析(Mulder N.J.等人2007,Nucleic Acids Res. 35:D224-D228;Tatusov R.L.等人2000,Nucleic Acids Res. 28:33-36)的信息并开展特定结构域分析获得关于所述序列的其他注释和信息。使用Hmmer软件包的Hmmer搜索工具并且使用从公共数据库PFAM和TIGRFAM获得的分选酶相关结构域模型执行特定结构域搜索(Finn R.D.等人2008,Nucleic Acids Res. 36:D281-288;Haft D.H.等人2003,Nucleic Acids Res. 31:371-373)。以下模型用来搜索分选酶识别位点:TIGR01167、TIGR03063、TIGR03065、TIGR03068和PF00746并且以下模型用来搜索分选酶:TIGR01076、TIGR03064、PF04203和PF07170。搜索出PFAM模型的fs-模型与Is-模型和TIGR模型的全长模型。两种搜索类型,序列搜索和结构域搜索均使用。高于该数据库给出的已记录受信截断值的匹配评分视为显著的。在序列-模型为显著的情况下中,接受每个结构域命中。这些搜索说明GG00441和GG02369是分选酶,并且说明GG00442、GG00443、GG02370和GG02372含有分选酶识别位点,因而是这些分选酶的可能底物。使用正则表达式搜索(采用图式LPXTG和LVNTG(Ton-That H等人2004,MoI Microbiol. 53:251-261),其中X指任意氨基酸)也搜索分选酶识别位点,从而揭示以下匹配:GG00442和GG00443、GG00444、GG02370、GG02371和GG02372。使用从原始YXLXETXAPXGY图式衍生的YXXXETXXPX(G/N)X作为正则表达式搜索E盒(Ton-That, H等人2004,MoI Microbiol. 53:251-261)。E盒搜索揭示对GG00442、GG00443、GG00444、GG02370和GG02372的命中,从而验证这些序列是分选酶底物的可能性。使用SignalP3工具,使用隐蔽马尔科夫模型法和神经网络法,测试可能的分泌信号的存在。在全部情况下,两种方法均预测GG00441,GG00442,GG00443,GG02370,GG02371和GG02372的肽序列含有适于分泌的信号。

[0161] 实施例4. 对公共数据库的生物信息学筛选

[0162] 本发明的肽序列、其片段、其变体、其多核苷酸序列、其片段或其变体可以用于针对公共和私人序列集合执行计算搜索并且因而用于检测包含相似的肽序列、多核苷酸序列或菌毛结构的细菌菌株。生物信息学筛选方法的另一个优选用途是选择由所述肽序列、多核苷酸序列或菌毛结构富集的细菌群落。生物信息学搜索提供了用于检测具有下述序列的

菌株的似乎合理的方法,其中所述的序列存在于公共序列集合中,但从未由专家注释或处理过。

[0163] 使用算法如 BLAST(Altschul, S.F. 等人 1997, *Nucleic Acids Res.* 25(17) : 3389-3402) 或 FASTA(Pearson, W. R. 1990, *Methods Enzymol* 183 :63-98) (优选地使用默认参数) 执行生物信息学搜索。使用 BLAST 和 FASTA 算法来针对其他序列集合比较所选择的序列并且报告统计显著的命中。从例如由美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 提供的以下公共序列集合:非冗余蛋白质序列、环境样品、完整基因组鸟枪法读出和基因组调查序列;或优选地从例如使用高通量测序方法生成的私人序列集合中搜索肽序列、多核苷酸序列或菌毛结构。

[0164] SEQ ID NO 1-8 或其片段的肽序列用来通过针对 NCBI 非冗余蛋白质序列集合执行标准 Blast 搜索而筛选肽的显著性匹配。当找到显著性肽匹配时,将编码该目的肽的细菌划分为推定的益生菌株或划分为该肽对其有效的推定性病原体。

[0165] 实施例 5. 显示 LGG 菌毛的原子力显微术

[0166] LGG 菌株在 MRS (LabM) 琼脂平板上于 37°C 厌氧培育 20 小时。细菌细胞稀释于无菌水中,固定至云母载片上并风干。通过纳米级 IIIa 多模式 AFM(原子力显微镜, Digital Instruments, Santa Barbara) 显微镜和 J 扫描仪获得细菌的局部解剖图片和相差图片(图 4)。

[0167] 实施例 6. 如通过非定量 ELISA 测定法评估的重组 LGG 蛋白与人肠黏液的结合

[0168] 在体外评估 6 组氨酸标记的重组 SpaA、SpaB、SpaC、SpaD、SpaF 菌毛蛋白与人肠黏液的结合。使用切除的人肠组织作为黏液的来源。切除的人肠组织的使用由图尔库大学和图尔库大学中心医院联合伦理委员会批准(二者均在芬兰图尔库中)并且从患者获得书面知情同意书。从组织的健康部分分离黏液,其中所述的组织从例如因结直肠癌接受结肠手术的患者获得。肠组织的处理和黏液的分离如先前所述进行(Vesterlund, S 等人, 2005; *Res Microbiol.* 156(2) :238-244; *J Micro-biol Methods* 2005, 60(2) :225-233)。黏液通过在 4°C 过夜孵育被动地固定在聚苯乙烯微量滴定平板 (Maxisorp, Nunc, Denmark) 上。各孔用磷酸缓冲盐水 (PBS; pH 7.2) 洗涤 3 次并且用 PBS 中的 0.5% (w/v) 牛血清白蛋白 (Sigma A7030) 在室温封闭 1 小时。移去封闭液并添加在 BSA-PBS 中的 0.5 或 0.05nmol 的 6 组氨酸标记的菌毛蛋白,随后在 37°C 孵育 1 小时。在孵育和洗涤后,通过酶联免疫吸附测定法检测结合的蛋白质。通过小鼠 4His 抗体 (Qiagen, 34670) 和作为第二抗体的山羊抗小鼠 IgG Fab 特异性碱性磷酸酶缀合物 (Sigma, A1293) 检测菌毛蛋白。稀释度 1 : 2000 和 1 : 5000 (v/v) 分别用于第一和第二抗体。以 2mg/ml 浓度添加二乙醇胺 -MgCl₂- 缓冲液 (Reagen, 170057, Finland) 中的底物 4-硝苯基磷酸二钠盐 (pNPP, Sigma, A7030) 并且 1 小时后在 405nm 处测量显色。结果是来自三次平行量值的平均数 ± 标准差 (图 5a-b)。

[0169] 实施例 7. 细胞壁结合的菌毛蛋白的提取和蛋白质印迹

[0170] MRS (LabM) 中的 LGG 和 LC705 (阴性对照) 细胞的新鲜 10 小时培养物在用 20g/l Bacto 胨 (Difco) 富集的 mTSB 培养基 (15g/l TSB 培养基, BD Biosciences) 或补充有 0.6% 牛胆汁 (Sigma) 的 MRS 培养基中接种 (1%) 并且在 37°C 培育。通过测量光密度 (OD₆₀₀) 监测生长并且通过离心收集处于静止生长期的细胞。

[0171] 基本上如他处 (Avall-Jaaskelainen, S. 等人 2003, *Appl Environ Microbiol*

69:2230-2236) 所述进行细菌细胞的分级分离。简而言之,细菌 (10^9 cfu) 用 PBS 洗涤 1 次并且通过在细胞磨机随玻璃珠一起拍打 3 次持续 2 分钟进行匀浆 (**Bühler Vibrogen-Zellmühle**)。细菌匀浆重悬于 500 μ l PBS 中并以 1,000g 离心 5 分钟。上清液以 16,000g 在 +4°C 离心 30 分钟以收集细胞壁。得到的沉淀物重悬于补充有 5mM $MgCl_2$, 5mM $CaCl_2$, 10mg/ml 溶菌酶, 和 42U/ml 变溶菌素的 50 μ l 的 50mM Tris-Cl (pH 8.0) 中。重悬的细胞壁沉淀物在 37°C 孵育 3 小时以释放细胞壁结合的多肽。

[0172] 酶促处理的细胞壁级分在 4-15% 梯度凝胶 (Bio-Rad) 上运行并转移至 Immobilon-P PVDF 膜 (Millipore)。该膜用 ECL Advance™ 蛋白质印迹检测试剂盒 (Amersham), 根据制造商使用说明进行蛋白质印迹分析。1 : 25,000 稀释 SpaA 和 SpaC 菌毛蛋白特异性多克隆第一抗体 (见实施例 2) 并且 1 : 100,000 稀释山羊抗兔 IgG(H+L)-HRP- 缀合物 (Bio-Rad) 第二抗体。用 SpaB 菌毛蛋白特异性多克隆第一抗体、山羊抗兔 IgG-AP 缀合物 (Bio Rad) 和 BCIP/NBT 显色剂检测 SpaB 菌毛蛋白。

[0173] 革兰氏阳性细菌中的菌毛由彼此共价连接的菌毛蛋白亚基组成。单体型菌毛蛋白亚基通过分选酶的作用逐一添加至正在生长的菌毛, 并且作为结果, 在给定时间点上, 每个独立的细胞在其表面上携带长度不同的菌毛 (Scott J.R. 和 Zahner D. 2006, Mol Microbiol 62 :320-330)。因而, 显示菌毛存在的经典方法是将变溶菌素 / 溶菌酶处理的细胞壁级分进行蛋白质印迹分析: 如果菌毛存在, 则会检测到印迹上的高分子量梯 (HMW), 并且在许多情况下也会观察到菌毛蛋白单体 (Scott, J.R. 和 Zahner D. 2006, Mol Microbiol 62 :320-330)。从图 6a、6b 和 6c 中显而易见含有 SpaA、SpaB 和 SpaC 的菌毛在 LGG 中存在, 因为可以使用 SpaA、SpaB 和 SpaC 特异性抗体从 LGG 细胞壁提取物中鉴定出单体型 SpaA、SpaB 和 SpaC 菌毛蛋白亚基和 HMW, 而 LC705 细胞是 SpaA、SpaB 和 SpaC 部分缺陷型。记录来自 SpaC 印迹的化学发光信号所需的曝光时间是 60 秒, 而曝光时间 1 秒对于 SpaA 印迹是足够的, 这暗示 SpaA 应当以比 SpaC 更高的数目存在于菌毛中。这种相对数目上的差异可能表明 SpaA 是形成菌毛蛋白亚基的轴, 而 SpaC 可能充当菌毛尖端黏附素。还应指出在补充有胆汁的培养基中培育的 LGG 细胞内找到菌毛, 这表明菌毛也许在人胃肠道中表达。

[0174] 实施例 8. 通过 PCR 筛选具有菌毛结构的新益生菌株。

[0175] 乳杆菌在 MRS 培养液中在 +37°C 厌氧培育 10 小时。基因组 DNA 如下文分离。将 1ml 培养物以 14,000g 离心 2 分钟。收集的细胞重悬于 480 μ l 的 50mM EDTA 中, 添加 100 μ l 的 50mg/ml 溶菌酶 (Amresco, Solon, OH, USA) 和 20 μ l 的 50U/ μ l 变溶菌素 (Sigma) 并且将混合物在 37°C 孵育 1 小时。混合物以 14000 离心 2 分钟, 弃去上清液并且用 **Wizard®** 基因组 DNA 纯化试剂盒 (Promega), 根据制造商的说明书提取细菌沉淀。纯化的 DNA 悬浮于 200 μ l Tris-EDTA (TE) 缓冲液中。使用约 200ng 基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板。使用 Dynazyme 聚合酶 (Finnzymes, Espoo, Finland) 和表 2 中所示的基于 GG00442、GG00443、GG00444 和 GG02370、GG02371、GG02372 基因序列的寡核苷酸引物进行 PCR。PCR 反应用 PCT-200 仪 (MJ Research, Waltham, MA, USA) 进行并且含有 10mM Tris-HCl, 1.5mM $MgCl_2$, 50mM KCl 和 0.1% Triton-X 100 (pH 8.8)。引物以 1- μ M 使用并且脱氧核苷酸为 200 μ M 浓度。初始变性是 94° 持续 2 分钟。第一循环在 95°C、65°C 和 72°C 上各 1 分钟, 后续 5 个循环是各自在 95°C、60°C 和 72°C 1 分钟, 并且最后 25 个循环是各自在 95°C、55°C 和 72°C 上 1 分钟。为终止循环, 将反应混合物在 72°C 维持 5 分钟并且在 4°C 维持 15 分钟。扩增的 DNA

条带通过凝胶电泳在 0.7% 琼脂糖凝胶中分离（见图 7a-c）。

[0176] 全部菌株 LGG、LC705 和干酪乳杆菌 ATCC 334 均显示本发明的菌毛结构（见图 7a-c）。

[0177]

表 2

基因	正向寡核苷酸引物	反向寡核苷酸引物
SpaA (GG00442)	5'-TCTCGGGTTTAAATGGCACTC (SEQ NO 31)	5'-TCTGTATTGGCAGCAGCATC (SEQ NO 32)
SpaB (GG00443)	5'-TCCTTCCGTCGGTTAGTGAT (SEQ NO 33)	5'-CGTTTGTGGCAACAAATTGAC (SEQ NO 34)
SpaC (GG00444)	5'-CCAAATTGGCAACAGACCTT (SEQ NO 35)	5'-GCCATCTGGTCTTTTGT (SEQ NO 36)
SpaD (GG02370)	5'-CGGACGCCCTTTACCAATTA (SEQ NO 37)	5'-AACAGTTTCGTACCGCATC (SEQ NO 38)
SpaE (GG02371)	5'-TATGACGCGTAAGCAAGCAC (SEQ NO 39)	5'-TGGCCGTCAAATTAACACAAA (SEQ NO 40)
SpaF (GG02372)	5'-CTACCGGAGCATGTCGAGTT (SEQ NO 41)	5'-GGCCATTTTCATCAGTCGTT (SEQ NO 42)

[0178] 用于扩增菌毛基因的引物的实例在表 2 中显示,但不限于这些引物。使用鼠李糖乳杆菌 GG DNA 作为模板和表 2 引物所扩增的 PCR 产物的大小对于 SpaA、SpaB、SpaC 分别是

780bp、612bp 和 801bp、并且对于 SpaD、SpaE 和 SpaF 分别是 688bp、705bp 和 799bp。

[0179] 实施例 9. 通过 DNA 印迹杂交筛选具有菌毛基因的新益生菌

[0180] 使用来自实施例 8 的 LGG 扩增产物作为探针,通过 DNA 印迹杂交筛选具有菌毛结构的新益生菌株。将杂交条件调整至严格,从而使探针仅与相同序列杂交,或调整至低严格,从而允许某些量的序列差别。将 SpaA、B、C、D、E 和 F 的 PCR 扩增产物在 NuSieve 低熔点琼脂糖 (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) 中纯化并以 DIG 系统 (Roche Diagnostics) 标记。细菌菌株的总 DNA 用 HindIII 消化,并且得到片段在 0.7% 琼脂糖凝胶中分离。将琼脂糖中的 DNA 片段印迹到尼龙膜上并且根据 DIG- 系统的标准步骤杂交。严格杂交在 68°C 进行,洗涤是在室温于 2x SSC-0.1% SDS 中两次,并且在 68°C 于 0.1x SSC-0.1% SDS 中持续 15 分钟两次。具有较低严格性的杂交在 60°C 进行,并且最后两次洗涤在 50°C 于 0.5xSSC-0.1% SDS 中持续 15 分钟。杂交结果用碱性磷酸酶-缀合的抗体和 NBT/BCIP 颜色反应 (DIG 系统, Roche) 检测。

[0181] 图 8a 显示通过琼脂糖凝胶电泳分离的已消化基因组 DNA (图 8a) 和使用鼠李糖乳杆菌 GG spaC 基因 (801bp)、spaB (612bp) 或 spaA (780bp) 的 DIG- 标记 PCR 扩增产物作为探针时,相同 DNA 的 DNA 印迹杂交结果 (图 8b-8d)。使用表 2 中显示的 SpaC, SpaB 或 SpaA 引物进行 PCR 反应。在 +68°C 进行杂交。

[0182] 杂交信号表示 spaC、spaB 和 spaA 在干酪乳杆菌 ATCC 334 (泳道 3) 和鼠李糖乳杆菌 GG (泳道 5) 中存在,但是在鼠李糖乳杆菌 LC705 (泳道 4) 不存在。

[0183] 实施例 10. 借助纯化的 LGG 菌毛蛋白的免疫调节

[0184] 人巨噬细胞从健康志愿者的血液 (血沉棕黄层级分) 中如先前所记载那样分离 (Miettinen, M. 等人 2000, J Immunol 164 :3733-3740 ;Miettinen, M. 等人 2008, J Leuk Biol 84 :1092-1100)。基本上,使用来自 4 位健康供血者的新鲜收集的富含白细胞的血沉棕黄层 (由供应芬兰赫尔辛基,芬兰红十字会输血机构提供) 并且通过 Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala SE) 梯度离心分离外周血单核细胞 (PBMC), 实现这一点。单核细胞通过在 6 孔塑料平板 (Falcon Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ, US) 上黏附从 PBMC 中纯化并且在巨噬细胞无血清培养基 (Gibco Invitrogen, Grand Island NY, US) 中在 10ng/ml 重组人 (rh)GM-CSF (Leucomax, Schering-Plough, Innishannon, IRL) 存在下培养 7 日以获得巨噬细胞。巨噬细胞以每孔大约 4 百万个细胞的浓度在 6 孔微量滴定平板中孵育并且用相等数目的活细菌 (LGG 和酿脓链球菌 T1M1) 或大约 3、100、3000 或 10000 等 fmol 纯化的 His-Tag 标记的 LGG 蛋白 SpaA 和 SpaC 刺激。在孵育 6 小时和 24 小时后,如先前所述那样测定对免疫标记物的量或信号途径激活或受体表达的调节 (Miettinen, M. 等人 1996, Infec immunol64 :5403-5405 ;Miettinen, M. 等人 2000, J Immunol 164 :3733-3740 ;Miettinen, M. 等人 2008, J Leuk Biol 84 :1092-1100)。

[0185] 图 9 显示用活 LGG 细菌 (2×10^6 cfu/ml) 或用纯化的 His 标签标记的 LGG 蛋白 SpaA、SpaB 和 SpaC (大约 30pmol/ml) 刺激巨噬细胞期间的 TNF- α 水平。TNF- α 水平在采用 SpaA 和 SpaC 的刺激中增加。

[0186] 一般而言,益生性 LGG 和病原体酿脓链球菌 T1M1 的细胞显示免疫调节活性并且在 PBMC 或巨噬细胞中诱导特异性 Th1 样应答 (Miettinen, M. 等人 2000, J Immunol 164 : 3733-3740 ;Veckman, V. 等人 2003, J Leuk Biol 74 :395-402)。令人瞩目地,纯化的 LGG

菌毛蛋白也在巨噬细胞中诱导应答,从而展示它们在免疫调节方面的功能性。另外,这些实验显示 LGG 菌毛蛋白对人宿主细胞发信号。

[0187] 实施例 11. 采用 LGG 菌毛蛋白的竞争测定法

[0188] 肠组织的处理和黏液的分离如实施例 6 所述进行。

[0189] 根据 Vesterlund, S. 等人 2006 (Microbiology 152(6):1819-1826) 实施竞争测定法。黏液 (Sigma) 以浓度 0.5mg/ml 通过在 4°C 过夜孵育被动地固定在聚苯乙烯微量滴定平板 (Maxisorp, Nunc, Denmark) 上。各孔用磷酸缓冲盐水 (PBS; pH 7.2) 洗涤 2 次。屎肠球菌在脑心浸液培养液中并且 LGG 在 MRS 培养液中于 37°C 厌氧条件下过夜培养。对于屎肠球菌培养物,将 $10 \mu\text{l ml}^{-1}$ [$5' -3\text{H}$] 胸苷 (16.7Ci mmol^{-1} ; 618GBq mmol^{-1}) 添加至代谢放射标记的细菌。细菌细胞通过离心收获并用 PBS 缓冲液洗涤两次。用 PBS 调节细菌悬液的 OD_{600} 至 0.25。

[0190] 将调节过浓度的屎肠球菌细胞悬液以 $100 \mu\text{l}$ 体积添加至各孔,在每个实验中使用 5 个平行孔。允许细菌在 37°C 黏附 1 小时并且各孔用 $200 \mu\text{l}$ PBS 洗涤 2 次以除去未黏附的细菌。添加 $100 \mu\text{l}$ 调节过浓度的 LGG 细胞悬液或 0.5nmol 在 $100 \mu\text{l}$ PBS 缓冲液中的 SpaC 蛋白并且随后在 37°C 孵育 1 小时。各孔用 $200 \mu\text{l}$ PBS 洗涤 2 次并且与黏液结合的细菌被释放并用 1% SDS-0.1M NaOH 通过 60°C 孵育 1 小时裂解,随后通过液体闪烁计数法测量放射性。通过比较黏附细菌的数目与所添加细菌的数目计算细菌的黏附率 (%)。配对斯氏 t 检验用来确定对照与样品之间差异的显著性 ($P < 0.05$)。

[0191] 图 10 显示 LGG 和 LGG 菌毛蛋白 SpaA、SpaB 和 SpaC 替换了来自人肠黏液的黏附的致病细菌 (屎肠球菌)。

Lys Thr Ala Ala Lys Arg Asn Gln Gln Ile Leu Thr Arg Gln Thr Val
 100 105 110

Ala Gln Leu Thr Ile Pro Lys Ile Gly Leu Ser Leu Pro Val Phe Asp
 115 120 125

His Thr Ser Asp Trp Leu Leu Gln Phe Gly Ala Cys Leu Leu Asp Gly
 130 135 140

Thr Ser Tyr Pro Thr Gly Gly Lys Asn Thr His Ala Val Ile Ser Ala
 145 150 155 160

His Arg Gly Val Pro Asn Ala Glu Leu Phe Thr Arg Val Pro Ala Leu
 165 170 175

Lys Lys Gly Asp Lys Phe Phe Ile Ser Ile Gly Asn His Lys Leu Ala
 180 185 190

Tyr Gln Val Phe Lys Arg Gln Val Ile Glu Pro Ser Asp Thr Arg Gln
 195 200 205

Leu Arg Ile Val Pro Gly Gln Asp Leu Val Thr Leu Met Thr Cys Thr
 210 215 220

Pro Tyr Met Ile Asn Ser His Arg Leu Leu Ile Thr Gly Arg Arg Ile
 225 230 235 240

Pro Tyr Val Lys Ala Asp Glu Glu Ala Ser Ser Trp Ala Val Trp Trp
 245 250 255

Asn Lys Leu Lys Leu Ile Val Ala Leu Leu Gly Ala Val Ile Ile Leu
 260 265 270

[0003]

Gly Val Ile Gly Phe Val Met Arg Ser Leu Met Leu Gly Arg Lys His
 275 280 285

Tyr Leu Leu Glu Val Pro Ala Glu Ala Thr Gln Val Val Val Lys Arg
 290 295 300

Gly Arg His Ile His Ser Phe Lys Ser Asp Gln Thr Gly Val Thr Asp
 305 310 315 320

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

Gly Arg Thr Lys Tyr Lys Ala Tyr Val Lys Lys Ile Arg Asp Lys Ser
 340 345 350

Phe Gln Leu Lys Glu Tyr His
 355

<210> 2

<211> 334

<212> PRT

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 2

Met Lys Lys Thr Ile Ala Lys Lys Val Leu Thr Leu Thr Ser Thr Ile
 1 5 10 15

Leu Met Thr Leu Leu Met Val Leu Gly Phe Asn Gly Thr Arg Val Gln
 20 25 30

Ala Asp Thr Asn Asp Thr Thr Thr Gln Asn Val Val Leu Thr Lys Tyr
 35 40 45

Gly Phe Asp Lys Asp Val Thr Ala Ile Asp Arg Ala Thr Asp Gln Ile

[0004]

50	55	60
Trp Thr Gly Asp Gly Ala Lys Pro Leu Gln Gly Val Asp Phe Thr Ile		
65	70	75 80
Tyr Asn Val Thr Ala Asn Tyr Trp Ala Ser Pro Lys Asp Tyr Lys Gly		
	85	90 95
Ser Phe Asp Ser Ala Pro Val Ala Ala Thr Gly Thr Thr Asn Asp Lys		
	100	105 110
Gly Gln Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ile Gln Ser Lys Asp Ala Ser Gly		
	115	120 125
Lys Thr Arg Ala Ala Val Tyr Leu Phe His Glu Thr Asn Pro Arg Ala		
130	135	140
Gly Tyr Asn Thr Ser Ala Asp Phe Trp Leu Thr Leu Pro Ala Lys Ala		
145	150	155 160
Ala Ala Asp Gly Asn Val Tyr Val Tyr Pro Lys Asn Val Gln Lys Thr		
	165	170 175
Thr Tyr Glu Arg Thr Phe Val Lys Lys Asp Ala Glu Thr Lys Glu Val		
	180	185 190
Leu Glu Gly Ala Gly Phe Lys Ile Ser Asn Ser Asp Gly Lys Phe Leu		
	195	200 205
Lys Leu Thr Asp Lys Asp Gly Gln Ser Val Ser Ile Gly Glu Gly Phe		
210	215	220
Ile Asp Val Leu Ala Asn Asn Tyr Arg Leu Thr Trp Val Ala Glu Ser		

[0005]

225	230	235	240
Asp Ala Thr Val Phe Thr Ser Asp Lys Ser Gly Lys Phe Gly Leu Asn	245	250	255
Gly Phe Ala Asp Asn Thr Thr Thr Tyr Thr Ala Val Glu Thr Asn Val	260	265	270
Pro Asp Gly Tyr Asp Ala Ala Ala Asn Thr Asp Phe Lys Ala Asp Asn	275	280	285
Ser Ser Ser Asp Ile Leu Asp Ala Pro Ser Gly Ile Leu Pro His Thr	290	295	300
Gly Gly Thr Gly Thr Val Ile Phe Ala Ile Leu Gly Val Ala Leu Ile	305	310	315
Ala Phe Gly Ala Val Ala Tyr Arg Lys Arg Arg Asn Gly Phe	325	330	
<210>	3		
<211>	241		
<212>	PRT		
<213>	鼠李糖乳杆菌		
<400>	3		
Met Thr Lys Ser Phe Arg Pro Leu Val Ile Leu Thr Phe Cys Leu Ala	1	5	10
Leu Leu Val Ser Leu Ala Thr Thr Thr Leu Gln Gln Thr Gln Ala Ala	20	25	30
Thr Val Pro Thr Thr Val Asp Val Val Leu His Lys Leu Leu Phe Lys	35	40	45

[0006]

Asp Thr Leu Pro Thr Gln Gln Ala Asn Asn Gly Thr Thr Lys Pro Asp
50 55 60

Phe Ser Gln Ala Asp Val Pro Leu Asn Gly Val Thr Phe Thr Val Tyr
65 70 75 80

Asp Val Thr Ala Asp Phe Trp Gln Leu Val Ser Lys Asn Gly Gly Ala
85 90 95

Ile Glu Val Ala Gln Thr Thr Leu Ser Gln Asp Ser Tyr Gln Pro Ala
100 105 110

Ser Ser Ser Leu Ile Ala Gln Val Val Thr Ala Gly Gln Gly Glu Ala
115 120 125

Tyr Phe Gly Asp Leu Pro Leu Arg Gln Gly Gln His Ala Ala Val Tyr
130 135 140

Leu Phe Lys Glu Thr Ala Ala Pro Lys Asn Ile Glu Ala Ser Gln Asn
145 150 155 160

Leu Val Val Val Met Ser Ser Asn Leu Gln His Gly Asn Gln Ser Arg
165 170 175

Ile Asp Leu Phe Pro Lys Asn Lys Met Val Ser Arg His Thr Asp Ala
180 185 190

Pro Lys Lys Val Pro Lys Lys Ile Arg Gln Leu Leu Pro Gln Thr Gly
195 200 205

Asp Thr Val Ala Ala Trp Leu Ser Val Leu Gly Leu Ile Ile Phe Ala
210 215 220

[0007]

Thr Asn Thr Pro Gly Leu Tyr Asp Val Tyr Leu Asn Val Lys Gly Asn
 115 120 125

Lys Gln Gln Asn Val Lys Pro Val Asp Ile Val Leu Val Val Asp Met
 130 135 140

Ser Gly Ser Met Glu Ser Asn Arg Trp Gly Thr Asn Arg Ala Gly Ala
 145 150 155 160

Val Arg Thr Gly Val Lys Asn Phe Leu Thr Ser Ile Gln Asn Ala Gly
 165 170 175

Leu Gly Asn Tyr Val Asn Val Gly Leu Ile Gly Phe Ser Ser Pro Gly
 180 185 190

Tyr Ile Gly Gly Lys Ser Gly Tyr Ile Ser Val Lys Leu Gly Lys Ala
 195 200 205

Gly Asn Ala Ser Gln Gln Gln Ala Ile Asn Gly Ala Leu Ser Pro Arg
 210 215 220

Phe Gln Gly Gly Thr Tyr Thr Gln Ile Gly Leu Arg Gln Gly Ser Ala
 225 230 235 240

Met Leu Asn Ala Asp Thr Ser Gly Asn Lys Lys Met Met Ile Leu Leu
 245 250 255

Thr Asp Gly Val Pro Thr Phe Ser Asn Glu Val Ile Asn Ser Glu Trp
 260 265 270

Ile Asn Gly Thr Leu Tyr Gly Thr Asn Phe Gly Ser Ser Arg Asp Glu
 275 280 285

[0009]

Pro Gly Asn Thr Ala Arg Leu Arg Trp Pro Tyr Thr Asp Ser Ser Gly
290 295 300

His Tyr Ile Tyr Asp Thr Trp Pro Ala Thr Leu Gly Glu Ala Lys Ile
305 310 315 320

Ala Lys Asp Ser Gly Asn Glu Val His Ala Leu Gly Ile Gln Leu Ala
325 330 335

Asp Asp Asp His Tyr Met Thr Lys Glu Lys Ile Arg Gln Asn Met Gln
340 345 350

Leu Ile Thr Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Glu Asp Ala Asp Ser Ala Asp
355 360 365

Ala Val Glu Ala Tyr Leu Asn Asn Gln Ala Lys Asp Ile Ile Lys Asn
370 375 380

Phe Asn Thr Val Thr Asp Gly Thr Ile Thr Asp Pro Ile Gly Thr Gln
385 390 395 400

Phe Gln Tyr Ala Asn Asn Gln Ala Thr Val Thr Ser Val Gly Lys Gln
405 410 415

Thr Val Pro Ala Ser Glu Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gln Asp Gly Gln
420 425 430

Leu Thr Val Asn His Met Asn Leu Gly Gln Asp Gln Glu Val Gln Ile
435 440 445

His Tyr Gln Val Arg Ile Lys Thr Glu Asp Ala Gly Phe Lys Pro Asp
450 455 460

[0010]

Phe Trp Tyr Gln Met Asn Gly Glu Thr Leu Leu Thr Pro Lys Ala Gly
465 470 475 480

Ala Ala Ala Val Asp Phe Gly Ile Pro Ser Gly Arg Ala Pro Ala Thr
485 490 495

Thr Val Tyr Val Gln Lys Gln Trp Arg Gln Leu Ser Asn Gln Ser Leu
500 505 510

Pro Asp Thr Leu Asn Val Thr Val Gln Arg Lys Val Ala Asp Gly Ser
515 520 525

Leu Asp Pro Asn Trp Gln Gln Thr Leu Val Leu Lys Lys Ala Asp Asn
530 535 540

Trp Lys Ala Ser Phe Thr Ala Pro Ala Tyr Asn Asn Gln Gly Gln Ser
545 550 555 560

Phe Ser Tyr Val Val Lys Ser Glu Asp Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser
565 570 575

Ser Phe Ile Ser Ser Gln Asn Met Asp Gln Gln Thr Ala Thr Leu Thr
580 585 590

Leu Thr Asn Gln Gln Tyr Gly Phe Gln Phe Gln Lys Lys Thr Thr Asp
595 600 605

Gly Thr Asp Leu Ser Ala Asp Gln Leu Lys Ala Met Gln Phe Asn Leu
610 615 620

Thr Gln Tyr Ser Asp Asn Ser Phe Gln Gln Ala Ser Lys Thr Asn Ala
625 630 635 640

[0011]

Ile Thr Ser Thr Asp Leu Gln Ala Leu Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Ile
645 650 655

Gln Glu Ala Ala Ala Pro Thr Gly Tyr Gln Leu Asp Gly Thr Thr Tyr
660 665 670

Leu Phe Gln Leu Thr Ser Asp Gly Gln Trp Gln Tyr His Gly Thr Lys
675 680 685

Asp Asn Val Thr Ser Gly Ser Val Ile Asn Gly Gln Gln Thr Leu Asn
690 695 700

Pro Val Gly Asp Lys Ser Asp Asp Phe Thr Val Thr Gly Asp His Gln
705 710 715 720

Gln Ile Leu Thr Leu Thr Lys Tyr Asp Glu Pro Lys Pro Ser Met Thr
725 730 735

Leu Arg Val Ile Lys Gln Asp Asn Gln Ser Gln Tyr Leu Ala Gly Ala
740 745 750

Ala Phe Thr Leu Gln Pro Ser Ala Gly Glu Ala Glu Thr Ile Thr Ser
755 760 765

Ser Ala Thr Ser Glu Gly Gln Ala Phe Ala Thr Lys Leu Val Ala Asp
770 775 780

Gly Thr Tyr Thr Met Ser Glu Thr Lys Ala Pro Asp Gly Tyr Gln Ser
785 790 795 800

Asn Pro Ala Lys Ile Ala Ile Gln Val Ala Thr Thr Gly Lys Glu Ala
805 810 815

[0012]

Thr Val Thr Ile Asp Gly Glu Ala Leu Lys Pro Gly Glu Ser Lys Asn
820 825 830

Gly Tyr Thr Leu Ala Ile Asp Gly Ser Thr Ile Thr Leu Gln Ala Ile
835 840 845

Asn Gln Pro Leu Ala Ile Leu Pro His Thr Gly Gly Gln Gly Tyr Gln
850 855 860

Arg Leu Leu Gly Ile Ala Leu Gly Leu Ile Ser Ala Ala Phe Leu Leu
865 870 875 880

Leu Leu Val Val Leu Ile Lys Arg Arg Val Val Lys Gln His Asp
885 890 895

<210> 5

<211> 274

<212> PRT

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 5

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

Ile Leu Leu Phe Thr Ala Gly Ala Ala Cys Phe Cys Tyr Pro Phe Ala
20 25 30

Ala Thr Ala Ile Asn Glu Leu Leu Leu Thr Ser Arg Arg Ala Ala Ala
35 40 45

Gln Gln Glu Ala Lys Gln Asn Ala Ala Ala Gln Asp Glu Gln Arg Ala
50 55 60

[0013]

Ala Glu Asn Arg Ala Leu Ala Gln Thr Gly Leu Arg Pro Gly Gln Asp
65 70 75 80

Pro Phe Gln Ser Arg Gln Lys Phe Asn Gln Ala Tyr Val Lys Arg His
85 90 95

Leu Ile Gly Arg Val Val Ile Pro Lys Leu Ala Val Asp Leu Pro Leu
100 105 110

Phe Asp Thr Thr Asn Asn Thr Leu Leu Asp Gln Gly Ala Val Val Leu
115 120 125

Pro Gly Thr Ser Tyr Pro Arg Gly Gly Lys Asn Thr His Thr Val Val
130 135 140

Ser Ala His Gly Gly Leu Pro Thr Lys Arg Phe Phe Thr Asp Leu Ser
145 150 155 160

Lys Leu Lys Arg Gly Gln Lys Phe Phe Leu Gln Val Asn Gly Lys Lys
165 170 175

Met Ala Tyr Gln Val Phe Arg Ile Lys Thr Val Arg Pro Asp Glu Thr
180 185 190

Gln Ser Leu Arg Ile Glu Pro Gly Arg Asp Leu Ala Thr Leu Met Thr
195 200 205

Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn Ser His Arg Leu Leu Val Thr Gly Lys
210 215 220

Arg Val Pro Tyr Thr Glu Ser Leu Glu His Ala Ala Glu Ser Ala Asp
225 230 235 240

[0014]

Arg Trp Arg Leu Trp Leu Ser Ile Ala Val Val Val Gly Val Leu Gly
 245 250 255

Leu Ala Leu Leu Ser Phe Tyr Leu Ala Arg Arg Tyr Leu Arg Arg Pro
 260 265 270

Arg Ala

<210> 6

<211> 517

<212> PRT

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 6

Met Gln Val Thr Phe Lys Lys Ile Gly His Ser Leu Leu Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Met Leu Met Ser Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Gly Lys Pro Val
 20 25 30

His Ala Ala Thr Thr Thr Val Asp Phe Thr Leu His Lys Ile Glu Gln
 35 40 45

Thr Ser Asp Glu Gln Ile Gln Asn Thr Gly His Asp Leu Gly Leu Thr
 50 55 60

Gly Arg Lys Pro Val Gln Gly Ala Gln Phe Lys Ile Phe Asn Val Thr
 65 70 75 80

Asp Ala Phe Tyr Gln Leu Leu Glu Asn His Asp Lys Thr Thr Ala Ala
 85 90 95

Ser Met Ile Ser Gln Asn Leu Gly Gln Tyr Val Asn Leu Gln Asp Pro

[0015]

100	105	110
Asn Ala Ala Thr Val Thr Thr Asp Ala Asp Gly Leu Ala Ala Phe Lys 115	120	125
Gly Leu Ala Ala Lys Thr Asn Gly Arg His Ser Val Tyr Ala Phe His 130	135	140
Glu Ala Val Thr Pro Gln Pro Tyr Gln Lys Ala Ala Asp Met Ile Val 145	150	155 160
Ser Leu Pro Val Arg Gln Asp Asp Gly Ser Asp Leu Thr Asn Ile His 165	170	175
Leu Tyr Pro Lys Asp Ser Leu Val Thr Lys Asn Leu Thr Glu Ile Asn 180	185	190
Glu Gln Ala Val Ala Thr Lys Asp Leu His Asp Val Ala Val Gly Asp 195	200	205
Val Leu Thr Tyr Gln Val Gln Phe Gln Ile Pro His Asp Ile Gly Ala 210	215	220
Leu Ala Asp His Ser Gln Asp Thr Phe Lys Tyr Asn Gln Phe Lys Val 225	230	235 240
Leu Asp Tyr Met Thr Lys Glu Gly Leu Thr Phe Lys Ala Leu Thr Ala 245	250	255
Ile Thr Val Asp Gly Gln Asp Ile Leu Lys Ala Leu Thr Gly Lys Met 260	265	270
Ala Phe Met Ser Ser Asn Asp Ala Ala Trp Gln Gln Thr His Asn Tyr		

[0016]

	275	280	285	
Pro Phe Gly Phe Glu Leu Asp Phe Leu Gly Gly Thr Asp Pro Asp Ala				
290		295		300
Val Arg Asn Leu Leu Thr Gln Tyr Ala Gly Lys Arg Val Thr Val Ala				
305		310		315
Tyr Thr Gly Ile Val Asn Glu Lys Met Ile Pro Asp Gln Lys Val Gly				
	325		330	335
Asn Thr Ala Glu Val Ser Phe Asp Pro Asp Ser Lys Ile Thr Val Asn				
	340		345	350
Gly Pro Glu Ile Gln Thr Gly Gly Ile Arg Phe Phe Lys His Glu Ala				
	355		360	365
Gly Ser Ser Lys Ser Leu Ala Asn Ala Thr Phe Ile Leu Gln Arg Met				
	370		375	380
Asn Gly Asn Val Arg Glu Tyr Ala Val Leu Glu Gly Val Asn Gly Met				
	385		390	395
Ala Gly Thr Tyr Gln Pro Thr Lys Ile Thr Trp Thr Thr Asn Gln Asp				
	405		410	415
Ala Ala Thr Arg Leu Lys Thr Ser Gly Ala Glu Thr Ala Asn Leu Thr				
	420		425	430
Ile Gln Gly Leu Leu Pro Gly Arg Tyr Thr Leu Val Glu Thr Ala Ala				
	435		440	445
Pro Glu Gly Tyr Glu Ile Leu Asp Pro Thr Thr Asp Phe Glu Val Ile				

[0017]

Gly Ala Asn Phe Glu Val Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Leu Lys Pro Asn
85 90 95

Met Thr Pro Glu Ala Ile Arg Ala Leu Val Asp Arg Tyr Gln Asn Met
100 105 110

Thr Arg Lys Gln Ala Leu Lys Phe Ala Arg Ala Asn Leu Lys Leu Ala
115 120 125

Gly Gln Gly Asn Lys Gly Ile Gly Leu Met Asn Thr Lys Asn Asp Pro
130 135 140

Thr Leu Gly Glu Asp Gly Ile Ser Arg Ile Thr Val Ser Val Asp Gln
145 150 155 160

Gln Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Leu Met Ile Glu Val Ala Pro Asp Pro
165 170 175

Ser Thr Glu Leu Asn Val Asp Leu Glu Arg Lys Ser Ser Pro Met Leu
180 185 190

Val Val Phe Pro Val Thr Asp Pro Ile Ser Gly Asn Pro Leu Gln Thr
195 200 205

Ile His Leu Tyr Pro Lys Asn Val Gly Tyr Val Arg Asp Pro Tyr Phe
210 215 220

Phe Lys Phe Gly Val His Pro Asp Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly
225 230 235 240

Ala Ile Phe Ala Ile Tyr Arg Ile Glu Asn Gly Lys Lys Leu Tyr Leu
245 250 255

[0019]

Asp Met Ser Pro Val Thr Asp Leu Arg Asn Lys Trp Val Ser Thr Thr
 260 265 270

Asp Pro Leu His Asp Asp Arg Val Asn Lys Phe Val Ser Asp Gln Asp
 275 280 285

Gly Leu Val Asn Thr Gly Glu Arg Phe Leu Pro Ala Gly Glu Tyr Phe
 290 295 300

Phe Glu Glu Leu Gln Gly Val Pro Gly Tyr Glu Val Asp Ala Lys Ser
 305 310 315 320

Arg Ala Ile Lys Ile Glu Ile Pro Asp Ser Trp Glu Asp Glu Asp Gly
 325 330 335

Asn Arg Arg Phe Val Leu Ile Asp Gly Gln Pro Met Gln Glu Asn Phe
 340 345 350

Gly Gly Val Val Thr Pro Glu Met Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Arg Val
 355 360 365

Tyr Asn Tyr Ala Asp Lys Gln Ala Ser Thr Thr Gly Asp Gln Thr Ala
 370 375 380

Gly Pro Ser Thr Thr Gln Leu Gly Asn His Gly Gln Asp Thr Asn Gly
 385 390 395 400

Thr Gly Thr Arg Thr Pro Lys Arg Gln Ser Gly Tyr Leu Pro Ala Met
 405 410 415

Ser Asp Trp Arg Asn Leu Arg Phe Val Leu Leu Gly Ser Leu Leu Leu
 420 425 430

[0020]

Leu Leu Ala Thr Tyr Phe Phe Ile Lys Asn Lys Lys Ala Arg His His
 435 440 445

Ala Cys Lys
 450

<210> 8
 <211> 983
 <212> PRT
 <213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 8

Met Pro Arg Lys Trp Ile His Met Leu Met Leu Leu Leu Met Leu Val
 1 5 10 15

Thr Gln Ile Gly Ser Ala Ala Val Pro Val Ala Lys Ser Ala Gln Thr
 20 25 30

Asn Pro Lys His Asp Val Arg Asp Ala Ser Val Gln Pro Ser Thr Arg
 35 40 45

Pro Ala Ala Ser Glu Ala Ala Glu Phe Asp Leu Glu Ala Ala Ala Ser
 50 55 60

Ala Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Lys Gln Thr Thr Ser Lys Ala Arg
 65 70 75 80

Gln His Ile Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ser Trp His Gly Asp Gly His
 85 90 95

Thr Leu Thr Tyr Asn Val Asp Ile Gln Arg Ser Glu Ile Gln Val Lys
 100 105 110

[0021]

Leu Ile Leu Ala Lys Pro Gln Asp Gln Thr Gly Gln Gln Val Val Lys
 115 120 125

Phe Ala Asn Ala Gln Gly Phe Thr Ser Gln Pro Ala His Thr Asn Gly
 130 135 140

Glu Ile Thr Arg Arg Leu Ala Glu Lys Thr Ala Glu Lys Gly Glu Tyr
 145 150 155 160

Leu Leu Thr Lys Lys Leu Pro Asp Thr Lys Gln Gln Ala Ala Ser Val
 165 170 175

Lys Leu Ser Leu Asp Gly Phe Asn Asp Ala Ala Gln Val Leu Ala Leu
 180 185 190

Asp Val Asp Leu Gln Leu Pro Ala Arg Leu Ala Asn Asp Asp Val Gln
 195 200 205

Glu Pro Ala Ala Leu Ser Lys Asp Ala His Ser Leu Ile Leu Pro Pro
 210 215 220

Ser Ala Leu Gly Thr Ile Lys Ile His Ala Thr Lys Ala Asp Gly Ala
 225 230 235 240

Ala Leu Ser Asp Glu Glu Ala Gln Ile Tyr Arg Lys Pro Asn Ser Ser
 245 250 255

Thr Arg Ser Lys Tyr Gly Ser Arg Trp Ala Met Glu Asn Gly Val Ser
 260 265 270

Ser Asp Tyr Val Ser Arg Ser Asp Ala Thr Ala Ile Ile Phe Lys Asp
 275 280 285

[0022]

Ala Val Gln Asn Pro Ser Gly Pro Ser Asn Leu Leu Asp Ala Lys Ile
290 295 300

Lys Val Asp Ile Asp His Val Gly Ser Ala Ser Asp Leu Asp Gly Asn
305 310 315 320

Arg Phe Glu Ile Gly Ala Tyr Val Glu Leu Thr Gly Ile Arg Val Arg
325 330 335

Pro Val Glu Trp Gly Thr Thr Pro Gln Asp Val Gly Ile Asp Phe Ser
340 345 350

Asn Asn Phe Phe Ser Gly Met Ser Phe Ala Asn Val Leu Tyr Tyr Asp
355 360 365

Trp Arg Val Ile Phe Tyr Asp Lys Ala Thr Arg Gln Arg Leu Asn Phe
370 375 380

Ile Pro Gln Ser Glu Ala Asn Gln Asn Ser Thr Leu Thr Phe Thr Ser
385 390 395 400

Leu Asn Pro Gly Glu Phe Val Trp Thr Glu Gln Ala Gly Met Thr Pro
405 410 415

Thr Tyr Asp Asp Arg Phe Ile Thr Asp Trp Gln Phe Glu Glu Gly Thr
420 425 430

Trp Ile Thr Ser Asp Lys Ala Thr Phe Glu Thr Glu Lys Leu Gly Ala
435 440 445

Arg Gly Lys Glu Gln Arg Gly Tyr Thr Ser Gln Thr Trp Gly Asn Trp
450 455 460

[0023]

Val Asp Pro Ile Asp His Glu Asn Met Thr Glu Trp Glu Asp Arg Leu
465 470 475 480

Gly Ala Pro Thr Phe Gly Arg Gly Ala Val Ala Phe Thr Leu Asn Gly
485 490 495

Thr Ser His Thr Phe Arg Arg Gly Thr Tyr Ser Asn Gly Gly Gly Thr
500 505 510

Trp Val Ala Asn Gly Ser Gly Gln Ile Glu Leu Ile Asp Pro Asn Val
515 520 525

Thr Asn Asn Lys Ser Val Ser Ala Asn Ala Glu Ala Gly Gly Gly Ala
530 535 540

Glu Glu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Trp Thr Ala Asn Asp Leu Asp Asp
545 550 555 560

Gln Val Val Asn Gln His Tyr Asn Gly Glu Pro Phe Tyr Tyr Tyr Ile
565 570 575

Asn Gln Glu Val Tyr Ser Met Gly Asp Tyr Val Val Lys Pro Thr Lys
580 585 590

Ile Val Val Thr Asp Leu Leu Pro Glu His Val Glu Leu Ile Pro Asp
595 600 605

Asn Asn Asn Ser Pro Pro Thr Tyr Gln Lys Ala Phe Gln Leu Phe Asn
610 615 620

Ala Thr Asp Pro Asp Ala Val Gly Gln Asp Arg Lys Met Thr Leu Thr
625 630 635 640

[0024]

Glu Asp Val Ser Asp Phe Val Val Thr Gln Glu Gly Asp Arg Gln Arg
 645 650 655

Ile Thr Leu Thr Ile Gly Arg Glu Asp Val Gln Lys Ile His Phe His
 660 665 670

Ser Gly Phe Phe Ser Leu Arg Leu Lys Val Arg Pro Thr Lys Asp Pro
 675 680 685

Asn Thr Leu Thr Lys Arg Leu Thr Leu Val Asn Lys Ala Thr Val Lys
 690 695 700

Phe Phe Asp Thr Glu Glu Arg Tyr Ser Lys Glu Thr Asn Ala Val Gln
 705 710 715 720

Val His Leu Asp Pro Ala Gly Arg Phe Pro Ala Glu Phe Thr Lys Lys
 725 730 735

Asn Gln Tyr Gly Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Phe Val Leu Lys Gln
 740 745 750

Gly Asp Thr Gln Leu Gln Thr Ala Thr Ala Asp Ser Gln Gly Lys Val
 755 760 765

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Tyr Gln Val Ser Glu Ile Ala
 770 775 780

Ala Ala Gly His Glu Leu Gln Ala Glu Phe Asp Leu Lys Val Ala Ala
 785 790 795 800

Asp Gly Thr Val Thr Val Gly Arg Asn Gly Glu Ile Trp Pro Asp Thr
 805 810 815

[0025]

Thr Val Ile Asn Gln Leu Lys Pro Thr Glu Leu Glu Leu Ile Lys Ile
820 825 830

Glu Lys Gly Lys Asn Lys Leu Ala Asn Ala Ser Phe Ala Leu Tyr Arg
835 840 845

Gly Asp Gln Thr Thr Pro Val Ala Gln Gly Thr Thr Asp Glu Asn Gly
850 855 860

Gln Leu Arg Phe Thr His Gln Leu Thr Pro Gly Thr Tyr Arg Leu Thr
865 870 875 880

Glu Thr Lys Ala Pro Ala Gly Phe Asp Arg Leu Asn Gly Ser Phe Thr
885 890 895

Phe Lys Ile Asn Ala His Gly Thr Met Val Asp Leu Ala Tyr Ser Gly
900 905 910

Ser Asp Leu Ser Ser Asp Glu Tyr Gly Phe Glu Phe Ile Pro Asp Ala
915 920 925

Glu Asp Lys Leu Asn Arg Ile Arg Phe Thr Leu Thr Asn His Ser Leu
930 935 940

Glu Thr Leu Leu Pro Lys Thr Gly Gly Ser Gly Ile Leu Leu Phe Leu
945 950 955 960

Met Val Ala Ile Ser Ala Cys Gly Gly Gly Trp Leu Leu Tyr Leu Tyr
965 970 975

Leu Lys Arg Lys Glu Ala Arg
980

[0026]

<210> 9	
<211> 1080	
<212> DNA	
<213> 鼠李糖乳杆菌	
<400> 9	
gtgacaaaac gaacacgtcg acctttagac ttgattgata ttgtgattgg atgtcttctt	60
ttagcggggtt ttgggtgttt atgctatcca ttgcaagtg atgcttaoctt ttcttacc	120
aatcagcaag tcatecagag gtaecgacaa caagaagcgc ggaagaatca gatgggtgtt	180
cggcggaat ataacgacta tcagcaaaaa aataaacagt tggcagcaag tcaacaagt	240
cccggcgtt cagttttta tcattctgtt aatgatcaag gaaccgcaa aacagcagcc	300
aaacgcaatc acaaatctt gactcggcag acagttgctc agttgacgat tcccaaat	360
ggccttagtc tgccggtttt tgatcataca agcgattgce ttctacaatt tgccgctgt	420
ttattggatg gtacaagtta tccaactggt ggtaaaaata cccatgetgt catttcagc	480
catcgtggtg tgccaaacgc tgaacttttt acccgagtac cagcgttaaa aaaagcgac	540
aagtttttta ttagcatagg caatcataaa ttggcttacc aagtcttta gcgccaggt	600
attgagccaa gtgatacccg gcagctaaga attgtgccgg gacaggatct tgtgacctt	660
atgacctgca cgccttatat gatcaattct catcgattgt tgataacggg tcgccgaatt	720
ccttacgta aggcagatga agagcttca agttggcgg tttggtgaa caaattaaag	780
ctaatagtcg cacttttagg cgggtgate attttaggeg tgatcggtt cgtaatgce	840
agtttgatgc ttggccgaaa gcattatttg ctggaagtac cggctgaagc cacacaagtc	900
gtggtgaaac gagtcgaca tatacattct tttaaatcag atcaaacctgg ggtgactgac	960
atcagcctgc ctgtaatca ttatcgagtc gcaattgtca caccgcttg cggactaag	1020
tacaagctt atgtcaaaaa aatcgggat aaaagcttcc aattaaaga atatcattaa	1080

[0027]

<210>	10	
<211>	1005	
<212>	DNA	
<213>	鼠李糖乳杆菌	
<400>	10	
atgaaaaaga caattgccaa gaaagtgtg acattaacca gcacgatect aatgacatta		60
ctgatggttc tegggtttaa tggeactegg gttcaagcag atacgaatga tacgacaaca		120
caaaacgttg tcttactaa atacggggtt gacaaagatg ttactgcat tgatcgtgcg		180
actgatcaaa tttggaccgg cgatgggtgct aagcctttac aaggcgttga tttcaccatt		240
tacaacgtga cagccaatta ttggcatcg cetaaggatt ataaaggcag ttttgatagt		300
gctccggttg ccgcaaccgg tacgactaat gacaaggggc aactaaccca agcattacct		360
atccaatcaa aagatgccag tggttaagact cgtgctgtg tctatctttt ccatgaaacc		420
aatccgcgag ctggttataa cacgtctgcc gatttctggt taaccttacc agccaaggca		480
gcagecgacg ggaatgteta tgtetacca aagaatgttc aaaagaccac ctatgagcgc		540
acttttllta agaaagatgc tgagactaaa gaagtgcctg aaggagccgg ctllaagatt		600
agcaatagtg atggcaagtt tttgaagttg acagataaag atggtcaaag cgtcagcacc		660
ggcgaaggat ttatcgatgt attggccaat aactategat tgacgtgggt tgctgaaagc		720
gatgctactg ttttcacgtc tgataagagc ggtaagttg gcttaaatgg atttgctgat		780
aacaccacaa cttacacggc agttgaaaca aacgtgccgg atggttatga tgctgctgcc		840
aatacagact ttaaagctga taattcgtct agcgacattc tagatgcacc aagcgttatt		900
ctgccacaca ctggtggtac tggeacagtc atttttgcga ttttggcgtg tgccttaatt		960
gcatttgag cagttgccta tcgcaagcgc cgcaatggtt tctaa		1005

<210>	11
<211>	726
<212>	DNA

[0028]

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 11

```

atgactaaat ccttccgtcc gttagtgatt ttgacctttt gcttggcaact actagtcagt      60
ttggcaacga caacgttgca gcagacacag gcggaactg tgccgaccac tgttgatggt      120
gtgttgcata agctgttggt taaagatacc ttgccaactc aacaagcaaa taacgggaca      180
acaaaacccg acttttcgca ggcagatgtg ccgttaaacg gtgtgacggt cacagtttat      240
gacgtgaccg ctgacttttg gcagcttgtc tccaaaaatg gcggtgcgat tgaggtagca      300
caaacgacgt tgagtcaaga tagctatcag cctgctagct ccagccttat cgcacagggt      360
gtgacggctg gtcagggaga agcgtacttt ggcgatttac cactccgaca gggcagcat      420
gtlgegglll atctllllaa agaaaaggcg gcacctaaaga atallgaagc cagtcagaat      480
cttgtggttg tcatgtcaag caacctcaa catgggaate aatcacgcat tgatttattt      540
cctaagaaca aaatggtaag tegtacaccc gatgceccca aaaaagttcc aaagaaaata      600
cgtcaattgt tgccacaaac gggtgataca gttgcagett ggctttcagt getcgggttg      660
ataatctteg cgacagtact tgcttttaac ataaaaaac aaaaaattaa taagtgggag      720
agataa                                             726

```

<210> 12

<211> 2688

<212> DNA

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 12

```

atgacagcta aagtggcgag aactgggcat ttgttecgcg tcttattgat tttgatgagt      60
atgtaacag gcttagtgac aagtggcagt tcagttgtga cagccactga taacattegc      120
ccaacctatc aaaccgatgc taatgttacc tatccgacaa attcgtggca ggtcacggga      180
caacaaaatg taatcaatca acgtggcggg gatcaagttt cagggtggga taataataca      240

```

[0029]

atatggaatg gtgatgcgac tgataccaag aactcttacc tgaaatttgg tgaccecaat	300
aatccggatt atcagattcg aaaatatgct aaagagacga ataccctgg attgtaegac	360
gtttatttga acgtcaaagg caataaacag caaaatgtga agcctgtaga tattgtctta	420
gttggtgata tgtctgggtc aatggagtca aacagatggg gcacgaatcg agctgggtct	480
gttcgtactg gcgttaagaa tttcttgact tctattcaaa acgccgtct ggtaattac	540
gtcaatgttg gtttaattgg gttttctagt cctggttata tcggtggcaa atcgggttat	600
attagtgtca aattaggcaa agcaggtaat gccagccagc aacaagcgaat taatggtgca	660
ttgagtccaa gtttcaagg ggttacgtat acgcagattg gtttgcggca aggatcagcc	720
atgctgaatg cggacaccag tggcaataaa aaaatgatga ttttgtaac tgatggcgtg	780
cagacttttt ctaacgaggt gataaattca gtagtgataa atggtacatt gtaggcact	840
aattttggat ccagcagaga tgaaccaggg aacaccgcac gacttcgatg gccatacacc	900
gatagttcag gtcattatat atatgatact tggccagcaa cattgggtga ggccaagata	960
gcaaaggata gtggtaatga ggtgcacgcg ttaggcatcc aactggetga cgacgaccac	1020
tacatgacga aagaaaaaat acgcaaaaac atgcagetta ttaccaatte accggattta	1080
tacgaagatg ctgatagtgc cgatgctggt gaggcttatt tgaacaatca ggcaaaggac	1140
attatcaaaa actttaatac tgtcaccgac ggcacgatca cagaccgat tggtagcga	1200
tttcaatatg cgaacaacca ggcgaccgtt acgagtgtcg gcaagcaaac tgtgccagea	1260
agtgagttgc caagtgcggc gatccaagat ggtcaattga cggatgaatca catgaacttg	1320
ggtcaggatc aggaagtca aatccattat caagtacgga tcaaacaga ggatgctggc	1380
ttcaagcctg atttttggta ccaaatgaat ggtgaaacat tgttgacacc aaaagcgggc	1440
gtgcccgtg ttgactttgg gattccttca ggcagggcac cagcaactac agtttatgtg	1500
cagaagcaat ggcgccagtt aagcaatcaa tcgttaccgg atacgetcaa cgtcacggtg	1560

[0030]

cagcgaaaag tggctgaecg ttcgcttgat ccaaattggc aacagacctt agtccttaaa	1620
aaagctgata actggaaage tagctttacg gcacctgctg ataacaatca gggctcaaagt	1680
ttttcatatg tcgttaagag tgaagatgcc tcgggaattg atttgagttc gtttatcagt	1740
tctcaaaata tggatcagca aacagcaacg ttgactttga caaatcagca gtatggtttt	1800
cagtttcaga aaaaaacaac cgatggtact gatttatcag cagatcagtt gaaggccatg	1860
cagttaact taaccagta cagcgataac agttttcagc aggcaccaa aaccaacgcc	1920
atcacgtcaa cggatctgca ggcactagcg ccagggtatt acggtattca ggaagctgca	1980
geacctacag gttatcaact tgatgggaca acgtatcttt ttcagetaac gtctgatggg	2040
caatggcaat accatggcac aaaggacaat gtgacatcag ggagtgttat taatggccag	2100
cagactttga atcctgttgg tgataagtca gatgatttta cggtgaccgg ggatecaccag	2160
caaattctga cgctaacgaa atatgatgaa ccaaagccat ccatgacttt gcgggtcatc	2220
aaacaggata atcaaagcca atatcttgca ggtgcagcgt tcacctgca accaagtget	2280
ggcgaagctg agacgataac atcatcggcg acatctgagg gacaagcgtt tgcgacaaaa	2340
ttagttgcag atggtaccta tacgatgtca gaaacaaaag caccagatgg ctatcaaage	2400
aatcctgcaa agattgcat tcaggtagct acgactggta aagaggcaac cgtcacgatt	2460
gacggtgagg cattgaagcc gggegaaagt aagaacggat acacattage gattgatgce	2520
agcacgatea ctttgcagge gattaatcag ccacttgcaa ttttgcgca tacaggtggt	2580
cagggtatc agcgattgct tggatcgcga ctgggattga tcagcgcagc gttcctttta	2640
ttactggttg ttttgataaa gcgacgggtg gtgaagcaac atgactaa	2688

<210> 13

<211> 825

<212> DNA

<213> 鼠李糖乳杆菌

[0031]

<400> 13
 atgacaaaaa aagcgtcggg gacaagtcgg ctgttacgct ggttcgcat ctacttttt 60
 actgcgggag ccgcgtgttt ctgtatccg ttcgcggcaa cgctattaa tgaattgcta 120
 ctaaccagtc gccgagcagc agcacagcaa gaagccaagc aaaatgccgc cgcccaagat 180
 gagcaacggg cagcggagaa ccgtgcactt gcccagaetg gtttgcgtcc gggacaggat 240
 ccgtttcaaa gtaggcagaa atttaaccaa gcctatgtga aacggcatct gatcgggcca 300
 gtggttatec cgaaattagc gttgatctg cccctttttg acaccaccaa caacacgctg 360
 ttagatcaag gggcagtggg gttaccaggt actagctatc cgcggggagg caagaacacg 420
 calacagtlg ttccggcaca cggcggcctg cccaccaaac gctlllccac cgatctgagc 480
 aagttgaaac gagggcagaa gttctttctc caagtcaacg gcaaaaagat ggcgtatcag 540
 gtctttcgga tcaaaaccgt gcggccggat gaaaccaga gtttgcgat tgaaccggga 600
 cgcgatttgg ccacattaat gacctgtacc ccgtatatga tcaactccca ccgcctgtta 660
 gtgaccggca aacgggtacc ttataccgaa tcaactgagc acgcccgca gtctgtgat 720
 cgctggcgct tgttgtaag tatecgggtt gtcgtcggag tgctgggatt ggcattgctg 780
 agtttctatc tggctcggcg ctatcttcgc cgaccgegg cgtaa 825

<210> 14

<211> 1554

<212> DNA

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 14

atgcaagtaa cgtttaaaa gatcgggcac agtctcttgg cagcgtgat gtcctgagc 60
 ttcttttac cactgcttag tgccggcaaa ccgtacatg ccgcgacaac gactgtggat 120
 ttcacgctgc acaaaatcga acaaacagc gacgaacaga ttcaaaatac cgccacgac 180
 cttggactga ccgggcgtaa accggtgcaa ggcgctcaat ttaaaatctt caacgtgacg 240

[0032]

gacgcctttt accaattact ggaaaatcat gataagacaa ccgctgcgag catgatatcg	300
caaaacctgg gtcagtatgt gaatctccag gatcctaattg cagcaactgt cacgactgat	360
gcagacggct tggcggcatt caaaggatta gccgccaaaa ccaatggccg gcatagcgtg	420
tacgcatttc acgaagccgt gaccccgcaa ccgtatcaaa aagcagcaga tatgatcgtg	480
agtctgccag tgcggcaaga cgatggatcg gatctgacca acattcatct ttatcctaaa	540
gacagtcttg ttaccaaaaa tctgacggaa atcaatgaac aagcgggtggc aacaaaagat	600
ctccatgatg tcgcggttgg cgatgtgctc acgtatcagg ttcagttcca gattccgcat	660
gatattggcg cgctggetga tcacagtcaa gacactttta agtacaacca atttaaagtg	720
ctggattata tgaccaagga aggccttact ttttaaggcat tgacggcaat cacggttgac	780
ggtcaggaca ttttaaagge attaacggga aaaatggcct tcatgagttc taatgacgca	840
gcttggcaac aaacacacaa ctatccattc gggtttgaac tggactttct aggcgggacc	900
gatcccgatg cggtagaaa cctgttgacc caatatgccg gcaaaccgct gaccgttgcc	960
tacaccggaa tcgtcaatga gaaaatgate ccagacaaa aagtcggtaa cacggctgaa	1020
gtgagctttg atcctgacag caagattacc gtcaatggtc cggaaatcca gactggcggg	1080
attcggttct tcaaacaaga agccgatct tccaaaagtt tggccaacgc gaactttcctc	1140
ttacagcgaa tgaacggcaa tgtcgcgaa tatgcagttc ttgaaggcgt taacggtatg	1200
gccggaacct accaacggac caagattacc tggacaacga atcaagacgc ggcaacgaga	1260
ctcaaaacca gtggagccga gacagccaac ttaaccattc aagggtggtt gccagggcga	1320
tataccttgg ttgaaaccgc ggcaccagaa ggctatgaaa tccttgatcc gacaacagat	1380
tttgaagtca ttgcegttac ttgggttacg aaaacgattc gcatcgcaa cacgccggtg	1440
aatcaattat tgccgatgac aggcggaate ggactcttcg ccttctgat gatcggggcc	1500
atcttaattg gtggcggtea cctaatgaag aaaaagacca gcaagaaagt ctaa	1554

[0033]

<210>	15	
<211>	1356	
<212>	DNA	
<213>	鼠李糖乳杆菌	
<400>	15	
atgcgacgat	tttattggtg gcttgtcccg ttgcttctat tgattggtat cgtgcttggc	60
aacacaccac	attgggttca cgcggctgat caaactgccg agatttgtat ccataagcga	120
atttatcggg	atattcgcca accggaagac gtttggtatg aaaatgacgg tcatcggatt	180
gacccgaata	accggataa agatggctac aaattattaa gcaaaaccag cgggctgaat	240
ggtgctaact	ttgaggteta tgatgccage tccttattga aaccgaatat gacgcctgaa	300
gcaattcggg	ctttagtga tcgttatcag aatatgacgc gtaagcaage actgaaattt	360
ggcggggcca	acctgaaatt agccggctca gggaacaaag gtatcgggct gatgaataca	420
aaaaacgata	caacactcgg tgaagatggg atcagccgaa taaccgtttc tgcgatcaa	480
caggcaccga	ctaaagctta tctgatgata gaggtggcac cggatccttc aaccgaacte	540
aatgtggact	tagagcgcaa aagtccgag atgttagttg ttttccagt cacggatcct	600
atcagtggca	accggttaca gaccatccat ctgtatccga aaaatgtcgg ttatgtccgc	660
gatccgtatt	tcttcaagtt cggcgtgcac cctgatggta cgagtaaagc gttagccggt	720
gegatctttg	ctatttaccg aattgagaat ggtaagaagc tttatctcga tatgtcgcca	780
gtaaccgact	tgcgcaacaa atgggtgagc actactgate cgttgcata tgaccgcgtg	840
aacaaatttg	tttccgatca agatgggcta gtttaatacag gtgaacgctt tttgccgcc	900
ggagaatatt	tctttgaaga attgcaaggc gttcccggct atgaagtgga tgctaaaagc	960
cgcgcgatca	aaatcgagat tectgattct tgggaagacg aagatggcaa ccggcgcttt	1020
gigttaattg	acggccagcc gatgcaggaa aactttggcg ggggtgtgac accggaaatg	1080
atcagttagc	gctaccgcg agtttataac tatgccgata agcaggcgtc gacaaccggt	1140

[0034]

gatcaaaccg cggggccatc aacgaccag cttggcaatc acgggcagga tacgaacggc	1200
accggaacgc gtacacctaa gcgtaatcc gggtatttgc cggccatgtc cgattggcgc	1260
aatttacgct ttgtcctttt agggagtctg ttactactac tggccactta cttcttcatt	1320
aaaaataaga aagcgaggca ccacgcatgc aagtaa	1356
<210> 16	
<211> 2952	
<212> DNA	
<213> 鼠李糖乳杆菌	
<400> 16	
ttgcctagga aatggattca tatgctgatg ttactgctga tgctggtcac gcaaattggc	60
agtgcgcggg tcccgttagc caaaagcgt cagactaatc caaagcacga tgteccggat	120
gcgtcagtgc agccgagcac tcgtcctgcc gcacccgaag ctgctgagtt tgatctggaa	180
gcagcggcta gtgcgccatc aaccagcgcg gccgccaagc aaactacttc aaaagctcgg	240
cagcacatca agctagaagc aggaagtct tggcacggcg atggtcatac gttaacttac	300
aacgttgaca ttcagcggtc tgaattcag gttaagttga ttttagccaa gccacaggat	360
caaacggggc agcaagtcgt caagttcgt aatgccaag gattcacgtc ccagcctgca	420
catactaacg gtgaaataac gcgccgctt gcagagaaaa cggcagaaaa aggtgaatac	480
cttttaacca aaaagctgcc tgatacaaag cagcaagcag ctagtgtgaa actcagtctg	540
gatggattta atgacgctgc tcaggtatta gcgcttgatg ttgacttgca gctgcctgcg	600
gccttgcta acgatgatgt gcaggaaccg gctgcactca gcaaagatgc gcacagtctg	660
attttaccgc cgtctgcact tgggacgatt aaaattcacg caactaaage tgatggcgcc	720
gcactttcgg atgaagaggc gcaaatttat cgcaaaccaa atagtagtac ccgttcaaaa	780
tacggatcac gttgggcgat ggagaatggc gtttcatcag attatgtgtc gcgttctgat	840

[0035]

gccaccgcca ttatTTTTaa agatgCGgtt caaaatecca gtggtccttc taacctgcta	900
gatgccaaga tcaaagtgga tattgatcat gttggctcag caagtgatct tgatggaaac	960
cgTTTTgaga ttggTgetta tGttgaacta acaggtatTC gcgtccgtcc agtcgaatgg	1020
ggcactaccC ctcaggatgt cggcattgat ttttccaaca acttcttttc cgggatgtca	1080
ttgccaatg ttttGtacta tgactggcgc gtgatttttt atgacaaggc aacgagacag	1140
cgattgaact ttattccgca aagtgaagcc aatcaaaatt cgacctgac gtttacttcg	1200
ttgaatcccG gtgagtttGt ctggacggag caggcgggga tgacgccac ttatgacgat	1260
cggtttatca cggattggca atttgaggaa ggaacctgga ttacctcaga taaagcgaca	1320
ttcgaaaccG aaaaactggg cgtcgcggg aaggaacaac gtgggtacac ctcacagacc	1380
tgggaaact gggtcgatcc aattgatcac gagaatatga cggaatggga agatcgacta	1440
ggtgcgcaa catttggcg tggtgccgtt gcgtttactt taaacggtac cagtcatacc	1500
tttagacgcg gcacttattc caacggcggc ggtacttggg ttgccaatgg gagtggacia	1560
atcgagttga ttgacccaaa tgcaccaac aacaaaagcg tgagcgaaa tgcgaagcc	1620
ggtggcggag ccgaggaaga taaaaccgac accatctgga ccgcaaatga tttagacgat	1680
caggtggtca atcagcatta caacggcgag ccattttact actacatcaa ccaggaagta	1740
tacagtatgg gcgattacgt ggtgaagccg accaaaattg ttgtgacgga cctgctaccg	1800
gagcatgtcg agttgattcc ggacaataac aacagtcgcc cgacttatca aaaagcgttc	1860
cagctcttta atgcaactga tccggatgcg gttggccaag atcggaaaat gacgctgact	1920
gaggacgtgt cggattttgt cgtgacgcaa gaagcgcgac gccagcgaat cacgctgaca	1980
atcggacgtg aagatgtgca gaaaattcat tttcatagcg gctttttctc acttcgattg	2040
aaggtgcggc caacaaagga tccggacacc ctgacaaaac gacttacgct ggtcaataaa	2100
gcgaccgtta aatTTTToga cactgaggaa cgttacagta aggaaacca cgcagtgcag	2160

[0036]

gttcattcttg atccggcagg cagatttcca gctgaattta ccaagaaaa ccagtatggc	2220
gcagtgetgc cgggtagtgc gtttgtcttg aagcaaggag aactcaact gcaaacagca	2280
actgcccatt cgcagggtaa agtctcattt ggaacgetaa aaccggcga ctatcaggta	2340
agcgaattg ccgctgccgg tcacagttg caggctgaat ttgatttaa agtggcagct	2400
gacggtaactg tgacagtcgg ccgcaacggc gagatttggc cagacaccac ggtgatcaac	2460
caactgaaac ccaccgaact tgagttgatc aaaattgaaa aaggtaaaaa caaactgcc	2520
aatgcaagtt ttgccctata ccgtggcgat caaacaccc ctgttgetca aggaacgact	2580
gatgaaaatg gccagttgcg attcacacat cagttgacc ccggaaactta tegttaacg	2640
gaaaccaaag ccgctgccgg atttgatcgg ctgaacggat cgtttacett caagattaac	2700
gcgcatggca caatggtaga tcttgcgtat agtggcagcg atttaagcag tgatgagtat	2760
gggtttgaat ttatccctga tgcagaggat aagtngaate ggattegett cacactgacg	2820
aaccattcgt tggaaacact cctaccgaaa actgggtgta cgggtatctt gctgtttctc	2880
atggtcgcga tcagtgcgtg tgccggcggc ttgctgcttt acctgtatct gaagcgaag	2940
gagcccgctt aa	2952

<210> 17

<211> 6894

<212> DNA

<213> 鼠李糖乳杆菌

<400> 17

acgatgttc agtgcggatt ggactgcttg aatttcaacc aggtaactg ctctgagga	60
cttcccttc gggaagaatt ccctaagcag tccattggcg ttctgcttg tgccacgctc	120
ccaaggcgag tacggatgtg cgaagtaaat ctgggttcca acaatctctg ataacttgc	180
aaactcgaa ccattgtcaa aagtatact ctcaaatcc ttggccccgt agtcgtgat	240
cgtgtcctgc aagctttta ggcagggtc cgcattgatg tcaggaatct tgacgatgat	300

[0037]

ctcagtcegg ctgtaccggt ctgtgagcgt cattaatgct ggctcatcag ctaagcgaat	360
acctttgacc aagtcgcctt cccaatgtcc cacgcctgtg eggtcattca eggccgcagg	420
acgcaactcg attgagtcgc cgtatatctt cttattcttg cgcttgtggg cgttcttata	480
gcctttgatg eggcgtcgga gcttcttggg aagtgtcatg ttgtctagcg caagcagccc	540
ggcgtcgatg tagcgataca cagttgtcgt tgaagggcaa gccttgcctt ggtcgcgata	600
gaagtgtacg aagctatcaa cgctgtgtac gcgcggetta cgagtaagct ccttggcgag	660
agccttgaag aacgcacggc cggctttaag aaaggcgtag tgaccggttc tatecgttt	720
acggtcgtgc atggcttggg cagtttccgc aagatagaact tgatgcgagt gacgcttcga	780
gtcgagctga gttacagate cacgcgtgat ttctctgag attgtcgtt tactgcgatg	840
aagcttctgt gcaatcacgg tcgcggtgtc accagcagcc tgaaggcctt gaattgtage	900
acggtcgcta aaactgagtt gttgtaatg cttgtgggtg ttagtctgag agtgggtcat	960
gaagattcct gctttcttgt ttagctagca ctaacaagaa taggtcttca tggcctttat	1020
ggtctagtcg tcagggtggt gcacttgaat tgtaaactgg ggttaaaatt ttacttgaga	1080
ggagggtaaa atttacgaag atgacagcta aagtggcgag aactgggcat ttgttcgcgg	1140
tcttattgat tttgatgagt atgttaacag gcttagtgac aagtggcagt tcagttgtga	1200
cagccactga taacattcgc ccaacctatc aaaccgatgc taatggtacc tatccgacaa	1260
attcgtgcea ggtcacggga caacaaaatg taatcaatca acgtggcggg gatcaagttt	1320
cagggtggga taataataca atatggaatg gtgatgcgac tgataccacg aactcttacc	1380
tgaaatttgg tgaccecaat aatccggatt atcagattcg aaaatatgct aaagagacga	1440
ataccctgg attgtacgac gtttatttga acgtcaaagg caataaacag caaatgtga	1500
agcctgtaga tattgtctta gttgttgata tgtctgggtc aatggagtca aacagatggg	1560
gcacgaatcg agctggtgct gttcgtactg gcgttaagaa tttcttgact tetattcaaa	1620

[0038]

acgccggtct gggtaattac gtcaatgttg gtttaattgg gttttctagt cctggttata	1680
tcgggtggcaa atcgggttat attagtgtca aattaggcaa agcaggtaat gccagccage	1740
aacaagcgat taatggtgca ttgagtccaa ggtttcaagg gggtagctat acgcagattg	1800
gtttgcggca aggatcagcc atgctgaatg cggacaccag tggcaataaa aaaatgatga	1860
ttttgttaac tgatggcgtg cegacttttt ctaacgaggt gataaattca gagggtataa	1920
atggtacatt gtatggcact aattttggat ccagcagaga tgaaccaggg aacaccgcac	1980
gacttcgatg gccatacacc gatagttcag gtcattatat atatgatact tggccagcaa	2040
cattgggtga ggccaagata gcaaaggata gtggtaatga ggtgcacgcg ttaggcatcc	2100
aactggctga cgacgaccac tacatgacga aagaaaaaat acgcaaaaac atgcagetta	2160
ttaccaatte accggattta tacgaagatg ctgatagtgc cgatgctggt gaggettatt	2220
tgaacaatca ggcaaaggac attatcaaaa actttaatac tgtcacgac ggcacgatca	2280
cagacccgat tggtagcaa tttcaatatg cgaacaacca ggcgaccgtt acgagtgtcg	2340
gcaagcaaac tgtgccagca agtgagttgc caagtgcggc gatccaagat ggtcaattga	2400
cggtgaatca catgaacttg ggtcaggatc aggaagtca aatccattat caagtacgga	2460
tcaaaacaga ggatgctggtc ttcaagcctg atttttggta ccaaatgaat ggtgaaacat	2520
tgttgacace aaaagcgggc gctgccgctg ttgactttgg gattccttca ggcagggcac	2580
cagcaactac agtttatgtg cagaagcaat ggcgccagtt aageaatcaa tcgttaccgg	2640
atacgtcaa cgtcacggtg cagcgaagag tggctgacgg ttcgcttgat ccaaattggc	2700
aacagacctt agtccttaaa aaagctgata actggaaagc tagctttacg gcacctgcgt	2760
ataacaatca gggtcaaagt tttcatatg tcgttaagag tgaagatgcc tcgggaattg	2820
atttgagttc gtttatcagt tctcaaaata tggatcagca aacagcaacg ttgactttga	2880
caaatcagca gtatggtttt cagtttcaga aaaaaacaac cgatgggtact gatttatcag	2940

[0039]

cagatcagtt gaaggccatg cagtttaact taaccagta cagegataac agttttcage	3000
aggcatccaa aaccaacgcc atcacgtcaa cggatctgca ggcaactagcg ccagggtatt	3060
acggatttca ggaagctgca gcacctacag gttatcaact tgatgggaca acgtatcttt	3120
ttcagctaac gtctgatggg caatggcaat accatggcac aaaggacaat gtgacatcag	3180
ggagtgttat taatggccag cagactttga atcctgttgg tgataagtca gatgatttta	3240
cggtgaccgg ggatcaccag caaattctga cgctaacgaa atatgatgaa ccaaagccat	3300
ccatgacttt gcggttcate aaacaggata atcaaagcca atatcttgca ggtgcagcgt	3360
tcacctgca accaagtget ggcaagctg agacgataac atcatcggeg acatctgagg	3420
gacaageggt tgcgacaaaa ttagttgcag atggtaceta tacgatgtca gaaacaaaag	3480
caccagatgg ctatcaaaagc aatcctgcaa agattgccat tcaggtagct acgactggta	3540
aagaggcaac cgtcacgatt gacggtgagg cattgaagcc gggcgaaagt aagaacggat	3600
acacattagc gattgatggc agcacgatca ctttgcaggc gattaatcag ccacttgcaa	3660
ttttgccgca tacagtggt cagggtatc agcgattgct tggtatcgca ctgggattga	3720
tcagcgcage gttcctttta ttactggttg ttttgataaa gcgacgggtg gtgaagcaac	3780
atgactaaat ccttccgtcc gttagtatt ttgaccttt gcttggcaact actagtcagt	3840
ttggcaacga caacgttgca gcagacacag gcggcaactg tgccgaccac tgttgatgtt	3900
ggtttgcata agctgttggt taaagatacc ttgccaactc aacaagcaaa taacgggaca	3960
acaaaaccg acttttcgca ggcagatgtg cggtaaacg gtgtgacgtt cacagtttat	4020
gacgtgaccg ctgacttttg gcagcttgtc tccaaaaatg gcggtgcgat tgaggtagca	4080
caaacgacgt tgagtcaaga tagctatcag cctgctagct ccagccttat cgcacaggtt	4140
gtgacggctg gtcagggaga agcgtacttt ggcgatttac cactccgaca ggggcagcat	4200
getgcggttt atctttttaa agaaacggcg gcacctaaaga atattgaage cagtcagaat	4260

[0040]

cttgtggttg tcatgtcaag caaccttcaa catgggaatc aatcaatgat tgattttatt	4320
cetaagaaca aaatggtaag tegtacacacc gatgceccca aaaaagtcc aaagaaaata	4380
cgtaattgt tgccacaaac ggtgataca gttgcagett ggctttcagt gctcgggttg	4440
ataatcttcg cgacagtact tgcttttaac ataaaaacc aaaaaattaa taagtgggag	4500
agataagaat gaaaaagaca attgccaaga aagtgtgac attaaccagc acgatcctaa	4560
tgacattact gatggttctc ggttttaatg gcaactcgggt tcaagcagat acgaatgata	4620
cgacaacaca aaacgttgc ctactaaat acgggtttga caaagatgtt actgccattg	4680
atcgtgcgac tgatcaaatt tggaccggcg atggtgetaa gcctttaca ggcgttgatt	4740
tcaccattta caacgtgaca gccattatt gggcatcgcc taaggattat aaaggcagtt	4800
ttgatagtgc tccggttgc gcaaccgta cgactaatga caaggggcaa ctaaccaag	4860
cattacctat ccaatcaaaa gatgccagtg gtaagactcg tgctgctgctc tatetttcc	4920
atgaaacca tccgcgagct ggtataaca cgtctgccga tttctggtta acctaccag	4980
ccaaggcagc agccgacggg aatgtctatg tctacccaaa gaatgttcaa aagaccacct	5040
atgagcgcac ttttgtaag aaagatgctg agactaaaga agtgcttgaa ggagccgct	5100
ttaagattag caatagtgat ggcaagtttt tgaagttgac agataaagat ggtcaaagcg	5160
tcagcatcgg cgaaggattt atcgatgat tggccaataa ctatcgattg acgtgggttg	5220
ctgaaagega tgctactggt ttcacgtctg ataagagcgg taagtttggc ttaaattgat	5280
ttgctgataa caccacaact tacacggcag ttgaaacaaa cgtgccggat ggttatgatg	5340
ctgctgccaa tacagacttt aaagctgata attcgtctag cgacattcta gatgcacaa	5400
gcggtattct gccacacact ggtggtactg gcacagtcat ttttgcgatt ttggcggttg	5460
ccttaattgc atttggagea gttgcctatc gcaagcgcg caatggttcc taaaaagtta	5520
ataagataaa tgagtcaagc aagagcgtcg atggcgtct tgttttgata tggcgaggtta	5580

[0041]

atcagagtga caaaacgaac acgtcgacct ttagacttga ttgatattgt gattggatgt	5640
cttcttttag cgggttttgg tgttttatgc tatccatttg caagtgatgc ttacgtttct	5700
taccaaaatc agcaagtcac cgacaggtat cgacaacaag aagcgcggaa gaatcagatg	5760
gtgttgccgc gggaatataa cgactatcag caaaaaata aacagttggc agcaagtcaa	5820
caagtccccg gcgttgccag ttttaatcat gctgttaatg atcaaggaac cgcaaaaaca	5880
gcagccaaac gcaatcaaca aatcttgact cggcagacag ttgctcagtt gacgattccc	5940
aaaattggcc ttagtctgcc ggtttttgat catacaagcg attggettct acaatttggc	6000
gcctgtttat tggatggtac aagtatcca actggtggtg aaaataccca tgetgtcatt	6060
tcagegcate gtggtgtgcc aaacgctgaa ctttttaccg gagtaccage gttaaaaaaa	6120
ggcgacaagt tttttattag cataggcaat cataaattgg cttaccaagt ctttaagegc	6180
caggttattg agccaagtga taccggcag ctaagaattg tgccgggaca ggatcttgtg	6240
accttaatga cctgcacgcc ttatatgac aattctcacc gattgttgat aacgggtcgc	6300
cgaattcctt acgttaagcc agatgaagag gcttcaagtt gggcggtttg gtggaacaaa	6360
ttaaagctaa tagtgcact tttaggcgcg gtgatcattt taggcgtgat cggtttcgta	6420
atgcgcagtt tgatgcttgg ccgaaagcat tttttgctgg aagtaccggc tgaagccaca	6480
caagtctgg tgaacgagg tcgacatata cattctttta aatcagatca aactggggtg	6540
actgacatca gcctgcctgg taatcattat cgagtcgcaa ttgtcacacc gcttggccgg	6600
actaagtaca aggcttatgt caaaaaaatt cgggataaaa gctttcaatt aaaagaatat	6660
cattaagatc ttaaaatttg ttaaatatcc ttttgggtta atttaaatga ggaaaggatc	6720
aatattttaa gactgatatt gagttaata aactaaaaac gaccaactta ttaaaact	6780
atgtctgtat atttcaagct tttgaagtag gacgatgcaa catgaatgag tattagaaaa	6840
ccggttcacc aaagatgact ttccatagtg gaagccgtct tttttgatat ttaa	6894

[0042]

<210>	18	
<211>	7540	
<212>	DNA	
<213>	鼠李糖乳杆菌	
<400>	18	
gcccatggta ctgccgagtt cactgttgac ggggcgcagt tgcgtattca tattgagatg		60
tttgatacac ctgcaaacgt ccagcattgg gaacacttcc atggttttcc ggatggcaag		120
ccagctgaga tagccaccgc ggccaagat gctaattgtg acggctttgt tgatttacct		180
gaaacggaac cggtttccgg tacaacgatg gtcccgtttg atgccgagcc tgctaaaatg		240
cacgtacca atgacagcta tccagtagcc gatgctgacg ggcaactatgc ttatgacaag		300
ctcgtggatt taaaagagct gcagaaggcg ttcaaggcag catttggtag tgaagatttg		360
caattagata aacgggttgt ttacattcat ggtgttccgg acagtttga acttcagat		420
acggttaaag gaaccgtcat gaactatgat gcacacgtca cactgccaat tgcctgggt		480
aaaattgtcc gcgcttagta gcaaaatata atttaataac gtaggttgtt cccgatccgt		540
ctgagcgttt ccagcttagt caggteggga tttttgtgc gccaaatcct aaaacttata		600
aatactggaa tgatcattca tatattcgct gctaattata atttaagaag taatataccg		660
aagaaaactt tatttataaa ataacaatta ttatagttcc gtttacgcag ttcactttgt		720
tacgcttaat tcagcaaca gtgaaaaatg taacatgaaa ggagcacc c gattgectag		780
gaaatggatt catatgctga tgttactgct gatgctggtc acgcaaattg gcagtgccgc		840
ggtcccggta gccaaaagcg ctcaactaa tccaaagcac gatgtccggg atgcgtcagt		900
gcagccgagc actcgtcctg ccgatccga agctgctgag tttgatctgg aagcagcggc		960
tagtgcgcca tcaaccagcg cggccgcaa gcaaactact tcaaaagctc ggcagcat		1020
caagctagaa gcaggaagt cttggcacgg cgatggatcat acgttaactt acaacgttga		1080

[0043]

cattcagegg tctgaaatc aggttaagtt gattttagecc aagccacagg atcaaacggg	1140
gcagcaagtc gtcaagtctg ctaatgceca aggattcacg tcccagcctg cacatactaa	1200
cggtgaaata acgcgccggc ttgcagagaa aacggcagaa aaaggtgaat accttttaac	1260
caaaaagctg cctgatacaa agcagcaagc agctagtgtg aaactcagtc tggatggatt	1320
taatgacgct gctcaggtat tagcgttga tgttgacttg cagctgcctg cgcgcctggc	1380
taacgatgat gtgcaggaac cggtgcact cagcaaagat gcgcacagtc tgattttacc	1440
gccgtctgca cttgggacga ttaaaattca cgcaactaaa gctgatggcg ccgcactttc	1500
ggatgaagag gcgcaaattt atcgcaaac aaatagtagt acccgttcaa aatacggatc	1560
acgttggggc atggagaatg gcgtttcacc agattatgtg tcgcgttctg atgccaccgc	1620
cattatTTTT aaagatcggg ttcaaaatcc cagtggctct tctaaactgc tagatgceaa	1680
gatcaaagtg gatattgacc atgttggtc agcaagtgat cttgatggaa accgttttga	1740
gattggtgct tatgttgaac taacaggtat tcgcgtccgt ccagtcgaat ggggcactac	1800
ccctcaggat gtcggcattg atttttccaa caacttcttt tccgggatgt catttgccaa	1860
tgtttgtac tatgactggc gcgtgatttt ttatgacaag gcaacgagac agcgattgaa	1920
ctttattccg caaagtgaag ccaatcaaaa ttcgacctg acgtttactt cgttgaatcc	1980
cggtgagttt gtctggacgg agcaggcggg gatgacgcc acttatgacg atcggtttat	2040
caaggattgg caatttgagg aaggaacctg gattacctca gataaacga cattcgaaac	2100
cgaaaaactg ggcgctcgcg ggaaggaaca acgtgggtac acctcacaga cctggggaaa	2160
ctgggtcgat ccaattgacc acgagaatat gacggaatgg gaagatcgac taggtgcgcc	2220
aacatttggg cgtggtgccg ttgcgtttac tttaaacggt accagtcata cctttagacg	2280
cggcacttat tccaacggcg gcggtacttg ggttgccaat gggagtggac aaatcgagtt	2340
gattgacceaa aatgtacceaa acaacaaaag cgtgagcgca aatgccgaag ccggtggcgg	2400

[0044]

agccgaggaa gataaaaccg gcaccatctg gaccgcaa atgatttagacg atcaggtggt	2460
caatcageat tacaacggcg agccatttta ctactacatc aaccaggaag tatacagtat	2520
ggcgattac gtggtgaagc cgaccaa aat tgttgtgacg gacctgctac cggagcatgt	2580
cgagttgatt cggacaata acaacagtcc cccgacttat caaaaagcgt tccagctctt	2640
taatgcaact gatccggatg cggttggcca agatcggaaa atgacgctga ctgaggacgt	2700
gtcggatttt gtcgtgacgc aagaaggcga tcggcagcga atcacgctga caatcggacg	2760
tgaagatgtg cagaaaatc atttcatag cggtttttc tcacttcgat tgaaggtgcg	2820
gcaacaaag gatccggaca cctgacaaa acgacttaac ctggtcaata aagcagcgt	2880
taaatttttc gacctgagg aacgttacag taaggaaacc aacgcagtgc aggttcatct	2940
tgatccgca ggcagatttc cagctgaatt taccaagaaa aaccagtatg ggcagtgct	3000
gccggtagt cggttgtct tgaagcaagg agacactcaa ctgcaaacag caactgccga	3060
ttcgcagggt aaagtctcat ttggaacgct aaaacceggc gactatcagg taagcgaat	3120
tgcgctgcc ggtcacgagt tgcaggctga atttgattta aaagtggcag ctgacggtac	3180
tgtgacagtc ggccgcaacg gcgagatttg gccagacacc acggtgatca accaactgaa	3240
accaccgaa cttgagttga tcaaaattga aaaaggtaaa aacaaactcg ccaatgcaag	3300
ttttgcctta taccgtggcg atcaaaccac ccctgttget caaggaacga ctgatgaaaa	3360
tggccagttg cgattcacac atcagttgac cccgggaact tategctta cggaaaccaa	3420
agcgcctgcc ggatttgatc ggctgaacgg atcgtttacc ttcaagatta acgcgcatgg	3480
cacaatggta gatcttgcgt atagtggcag cgatttaagc agtgatgagt atgggtttga	3540
attatcct gatgcagagg ataagttgaa tcggattcgc ttcacactga cgaaccattc	3600
gttgaaaca ctctaccga aaactggtgg tagcggatc ttgctgtttc tcatggctgc	3660
aatcagtgcg tgtggcgcg gctggctgct ttacctgtat ctgaagcga aggaggcccc	3720

[0045]

ttaagatgcg acgattttat tggtagcttg tcccgttget tctattgatt ggtatcgtgc	3780
ttggcaacac accacattgg gttcacgegg ctgatcaaac tgccgagatt gtgatccata	3840
agcgaattta tcgggatatt cgccaaccgg aagacgtttg gtatgaaaat gacggtcac	3900
ggattgacc gaataaccgg gataaagatg gctacaaatt attaagcaaa accagcgggc	3960
tgaatggtgc taactttgag gtctatgatg ccagctcctt attgaaaccg aatatgacgc	4020
ctgaagcaat tcgggcttta gttgatcgtt atcagaatat gacgcgtaag caagcactga	4080
aatttgccgc ggccaacctg aaattagccg gtcaaggaa caaaggatc gggtgatga	4140
atacaaaaa cgatccaaca ctcggtgaag atgggatcag ccgaataacc gtttctgtcg	4200
atcaacagge accgactaaa gcttatctga tgatcgaggt ggcaccgat cettcaaccg	4260
aactcaatgt ggacttagag cgcaaaagtt cgccgatgtt agttgttttt ccagtcacgg	4320
atcctatcag tggcaaccgg ttacagacca tccatctgta tccgaaaaat gtcggttatg	4380
tcgcgatcc gtatttcttc aagttcggcg tgcaccctga tggtagagt aaacggttag	4440
ccggtgcgat ctttgctatt taccgaattg agaatgtaa gaagctttat ctgatatgt	4500
cgccagtaac cgacttgcgc acaaatggg tgagcactac tgatccgttg catgatgacc	4560
gegtgaacaa atttgtttcc gatcaagatg ggctagttaa tacagtgaa cgetttttgc	4620
ccgccggaga atatttcttt gaagaattgc aagcggttcc cgctatgaa gtggatgcta	4680
aaagccgcgc gatcaaaatc gagattcctg attcttggga agacgaagat ggcaaccggc	4740
gctttgtgtt aattgacggc cagccgatgc aggaaaactt tggcggggtg gtgacaccgg	4800
aatgatcag tagcggctac ccgcgagttt ataactatgc cgataagcag gcgtcgacaa	4860
ccggtgatca aaccgcgggg ccatcaacga cccagcttgg caatcacggg caggatacga	4920
acggcaccgg aacgegtaca cetaagcgtc aatccgtta tttgccggcc atgtccgatt	4980
ggcgcaattt acgctttgtc ctttaggga gtctgttaact actactggcc acttacttct	5040

[0046]

tcattaaaa taagaaagcg aggcaccacg catgcaagta acgtttaaaa agatcgggca	5100
cagtctcttg gcagcgetga tgctcatgag cttectteta ceactgctta gtgcgggcaa	5160
accgtacat gccgcgacaa cgactgtgga tttcacgctg cacaaaatcg aacaaaccag	5220
tgacgaacag attcaaaata cggccacga ccttgactg accgggogta aaccgggtgca	5280
aggcgtcaa tttaaaatth tcaacgtgac ggacgccttt taccaattac tggaaaatca	5340
tgataagaca accgctgca gcatgatata gcaaacctg ggtcagtatg tgaatctcca	5400
ggatccta at gcagcaactg tcacgactga tgcagacggc ttggcggcat tcaaaggatt	5460
agccgcaaaa accaatggcc ggcatagcgt gtaacgcttt cacgaagccg tgaccccga	5520
accgtatcaa aaagcagcag atatgatcgt gagtctgcca gtgcggcaag acgatggate	5580
ggatctgacc aacattcacc ttatcctaa agacagtctt gttaccaaaa atctgacgga	5640
aatcaatgaa caagcgggtg caacaaaaga tctccatgat gtcgcggttg gcgatgtgct	5700
cacgtatcag gttcagttcc agattccgca tgatattggc gcgctggctg atcacagtca	5760
agacactttt aagtacaacc aatttaaagt gctggattat atgaccaagg aagcccttac	5820
ttttaaggca ttgacggcaa tcacggttga cggtcaggac attttaaagg cattaaccgg	5880
aaaaatggcc ttcattgagtt ctaatgacgc agcttggeaa caaacacaca actatccatt	5940
cgggtttgaa ctggacttcc taggcgggac cgatcccgat gcggtacgaa acctgttgac	6000
ccaatatgcc ggcaaacgcg tgaccgttgc ctacaccgga atcgtcaatg agaaaatgat	6060
cccagaccaa aaagtcggta acacggctga agtgagcttt gatcctgaca gcaagattac	6120
cgtaaatggt ccggaatcc agactggcgg gattcggttc ttcaaacacg aagccggatc	6180
ttcaaaaagt ttggccaacg cgactttcat cttacagcga atgaacggca atgtgcgcga	6240
atatgcagtt cttgaaggcg ttaacggtat ggccggaacc taccaaccga ccaagattac	6300
ctggacaacg aatcaagacg cggcaacgag actcaaaacc agtggagccg agacagccaa	6360

[0047]

cttaaccatt caagggctgt tgccagggcg atataccttg gttgaaaccg eggcaccaga	6420
aggctatgaa atccttgatc cgacaacaga ttttgaagtc attgccggta cttggggtag	6480
gaaaacgatt cgcacgcca acacgccggg gaatcaatta ttgccgatga caggcggaat	6540
cgactcttc gccttctga tgatcggggc catcttaatg ggtggcggtc acctaatgaa	6600
gaaaaagacc agcaagaaag tetaatggcc tatgacaaaa aaagcgtcgg ggacaagtcg	6660
gctgttacgc tggttcgtca tettactttt tactgeggga gccgcgtgtt tetgctatec	6720
gttcgggca accgctatta atgaattgct actaaccagt cgccgagcag cagcacagca	6780
agaagccaag caaaatgccg ccgccaaga tgagcaacgg gcagcggaga accgtgcaact	6840
tgccagact ggtttgcgtc cgggacagga tccgtttcaa agtaggcaga aatttaacca	6900
agcctatgtg aaacggcctc tgatcggggc agtggttate ccgaaattag cggttgatct	6960
gccccctttt gacaccacca acaacacgct gttagatcaa ggggcagtgg tgettaccag	7020
tactagctat ccgcggggag gcaagaacac gcatacagtt gtttcggcac accgcgctt	7080
gcccacaaa cgtttttca ccgactgag caagttgaaa cgagggcaga agttcttct	7140
ccaagtaac ggcaaaaaga tggegtatca ggtctttcgg atcaaaaccg tgcggccgga	7200
tgaaacccag agcttgcgca ttgaaccggg acgcgatttg gccacattaa tgacctgtac	7260
cccgatatg atcaactccc accgctgtt agtgaccgac aaacgggtac cttataccga	7320
atcaactgag cacgcgccg agtctgctga tcgctggcgc ttgtggtaa gtatcgcggt	7380
tgctcggga gtgctgggat tggcattgct gagtttctat ctgctcggc gctatcttcg	7440
ccgaccgcg gcgtaactg gaaagagaat gttagaaagt aagaaagttc gccgttgtgc	7500
agggataggt ctgtggacgg cgggcttttt tgtgtttcga	7540

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

[0048]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 19	
tcgggttcag aattctacga atgatacgac	30
<210> 20	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 20	
tgccagtacc accctcgagt ggcagaatac	30
<210> 21	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 21	
gcagacacag aattcaactg tgcgacc	28
<210> 22	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 22	
caactgtatc accctcgagt ggcaacaatt gacg	34

[0049]

<210>	23	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	23	
	cagttcagtt gtgaattcca ctgataacat tcg	33
<210>	24	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	24	
	agccctgacc accctcgagc ggcaaaattg c	31
<210>	25	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	25	
	accggtacag aattcgacaa cgactgtg	28
<210>	26	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	

[0050]

<400> 26
gtccgattcc gccctcgagc ggcaataatt g 31

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 27
ccacattggg ttcagaattc tgatcaaact g 31

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 28
tgcgccaatc ggactcgagc ggcaataac 30

<210> 29
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 29
gcaaattggc aggagctogg tcccggtag 29

<210> 30
<211> 28
<212> DNA

[0051]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 30	
ccgctaccac cctcgagcgg taggagtg	28
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 31	
tctcgggttt aatggcactc	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 32	
tctgtattgg cagcagcactc	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 33	
tccttcgctc cgtagtgat	20

[0052]

- <210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 寡核苷酸
- <400> 34
cgtttggc aacaattgac 20
- <210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 寡核苷酸
- <400> 35
ccaaattggc aacagacctt 20
- <210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 寡核苷酸
- <400> 36
gccatctggc gctttgttt 20
- <210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 寡核苷酸

[0053]

<400> 37	
cggacgcctt ttaccaatta	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 38	
aacaggtttc gtaccgcatc	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 39	
tatgacgcgt aagcaagcac	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 40	
tggccgtcaa ttaacacaaa	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	

[0054]

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 41

ctaccggagc atgtcgagtt

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 42

ggccattttc atcagtcggtt

20

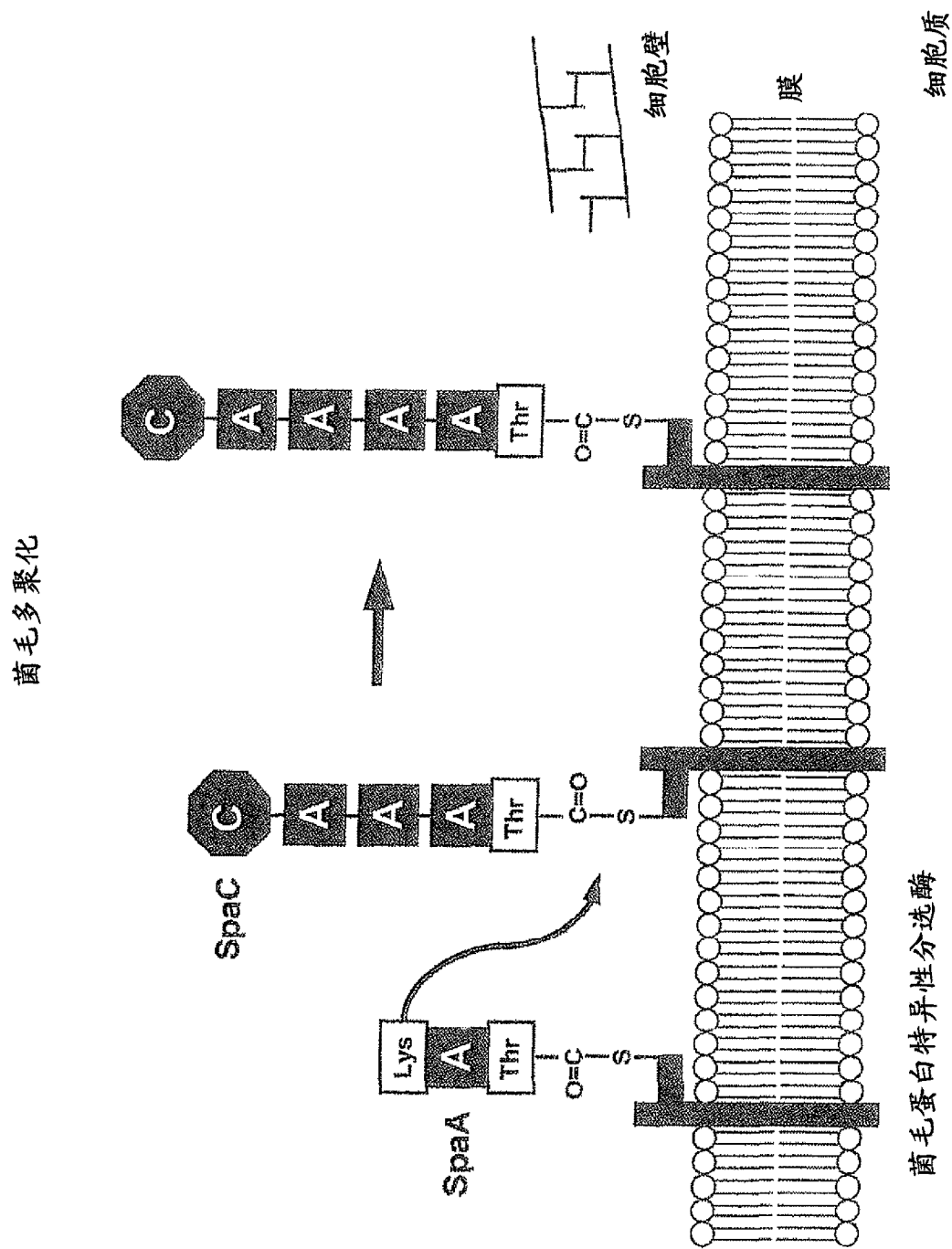


图 1A

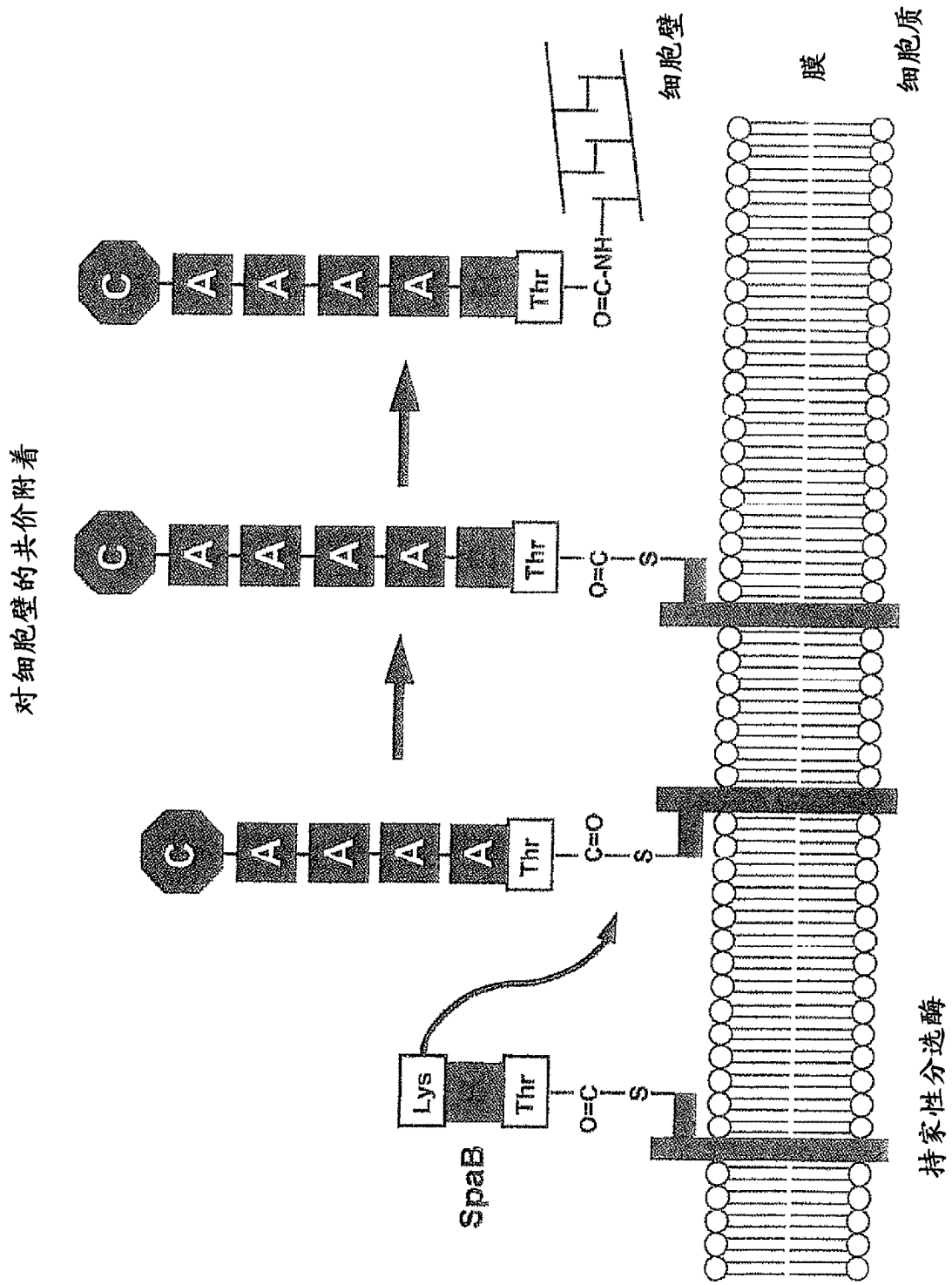


图 1B

LGG 菌毛族

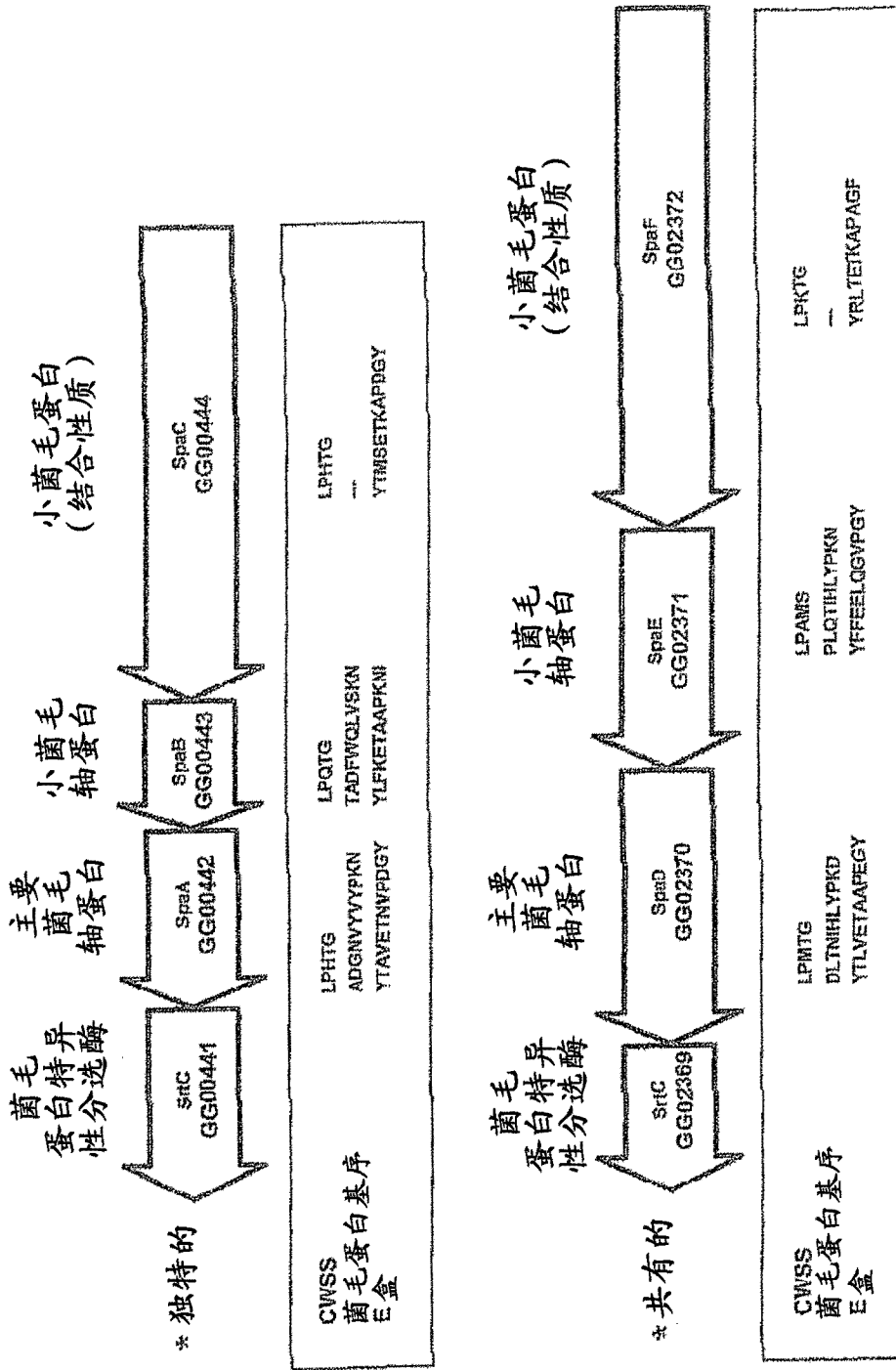


图 2

LGG 菌毛蛋白多克隆抗体

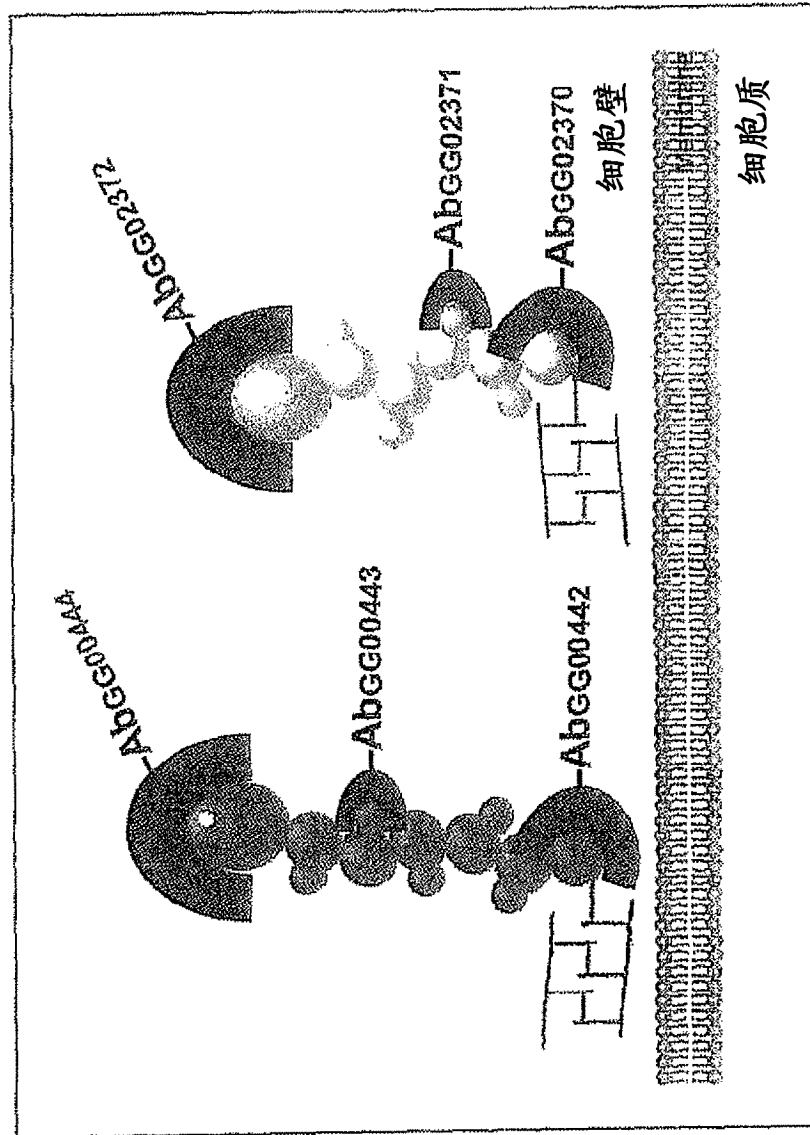


图 3

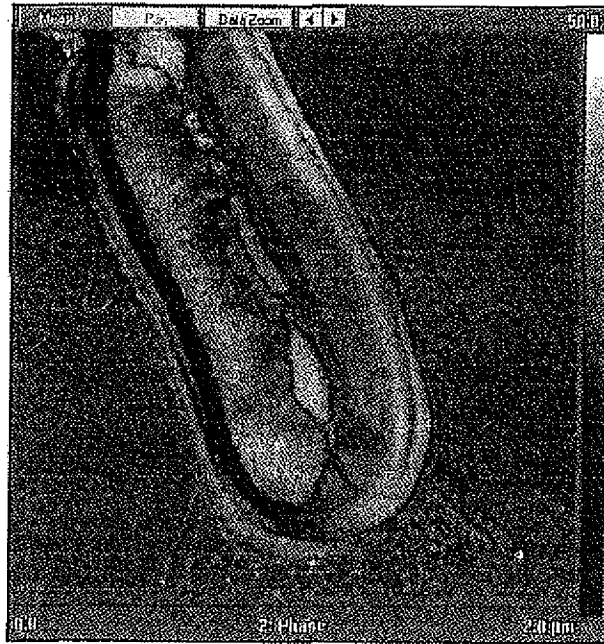


图 4

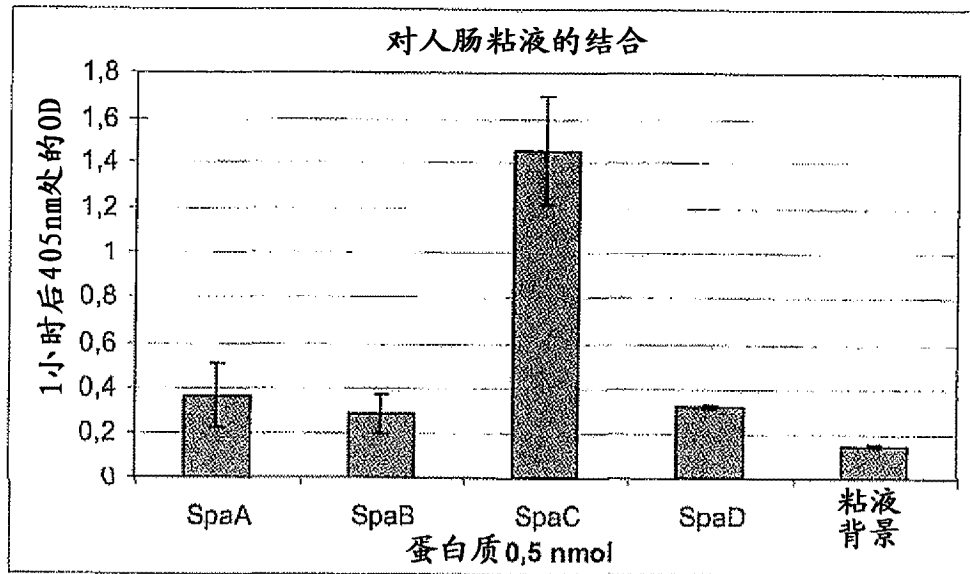


图 5A

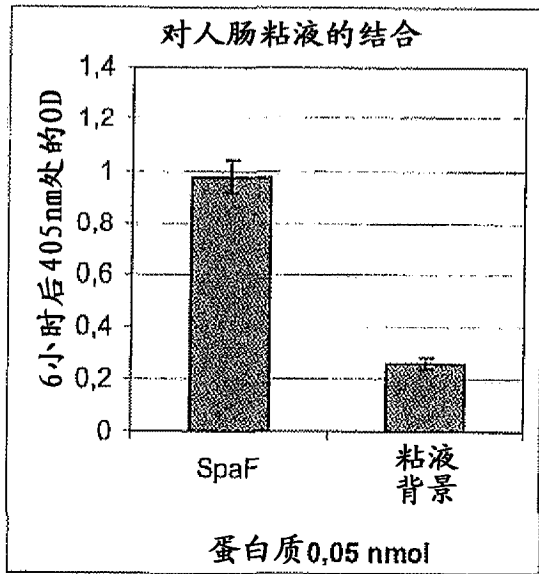


图 5B

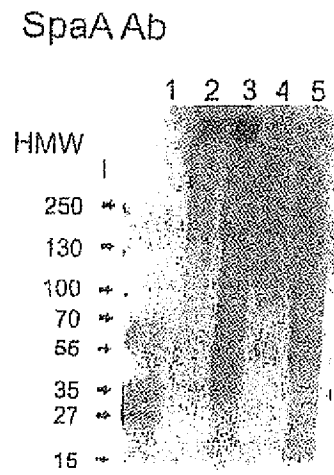


图 6A

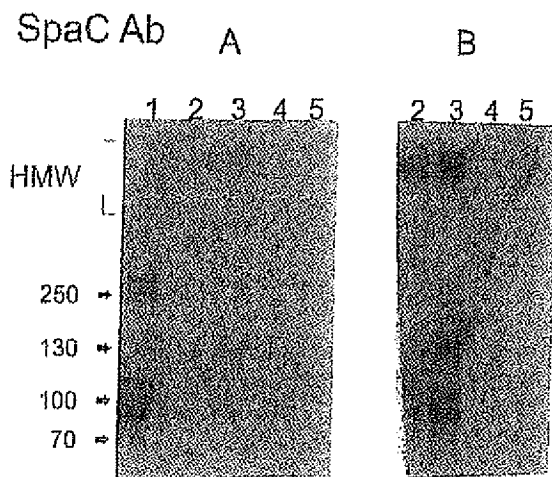


图 6B



图 6C

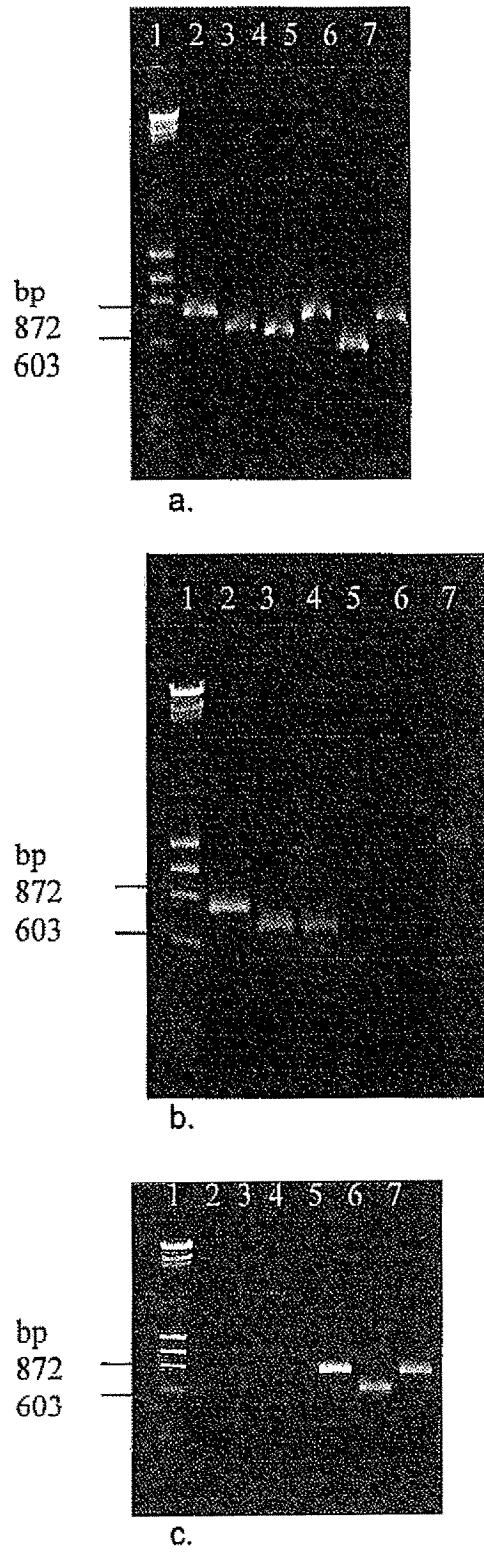
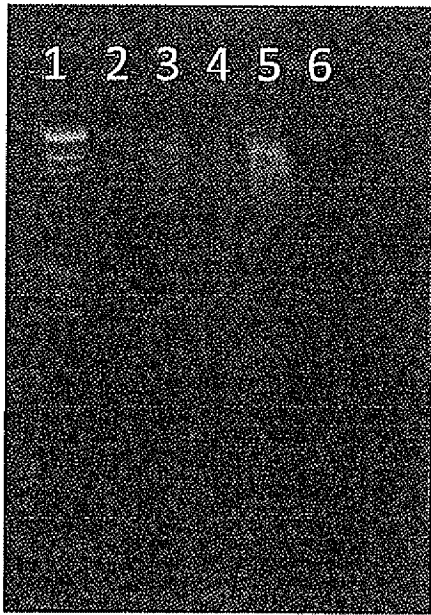
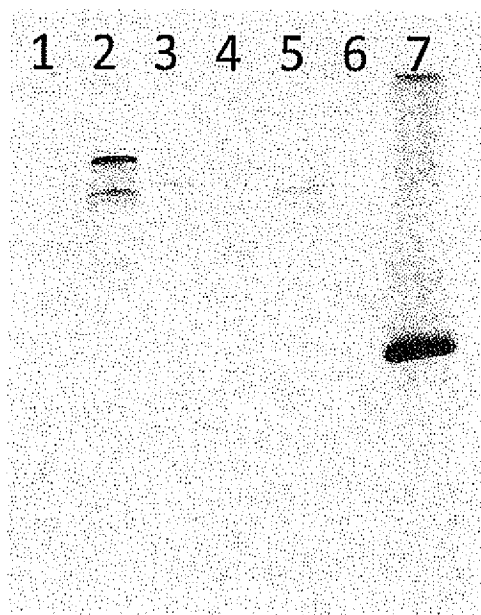


图 7A-C



a.



b.



c.



d.

图 8

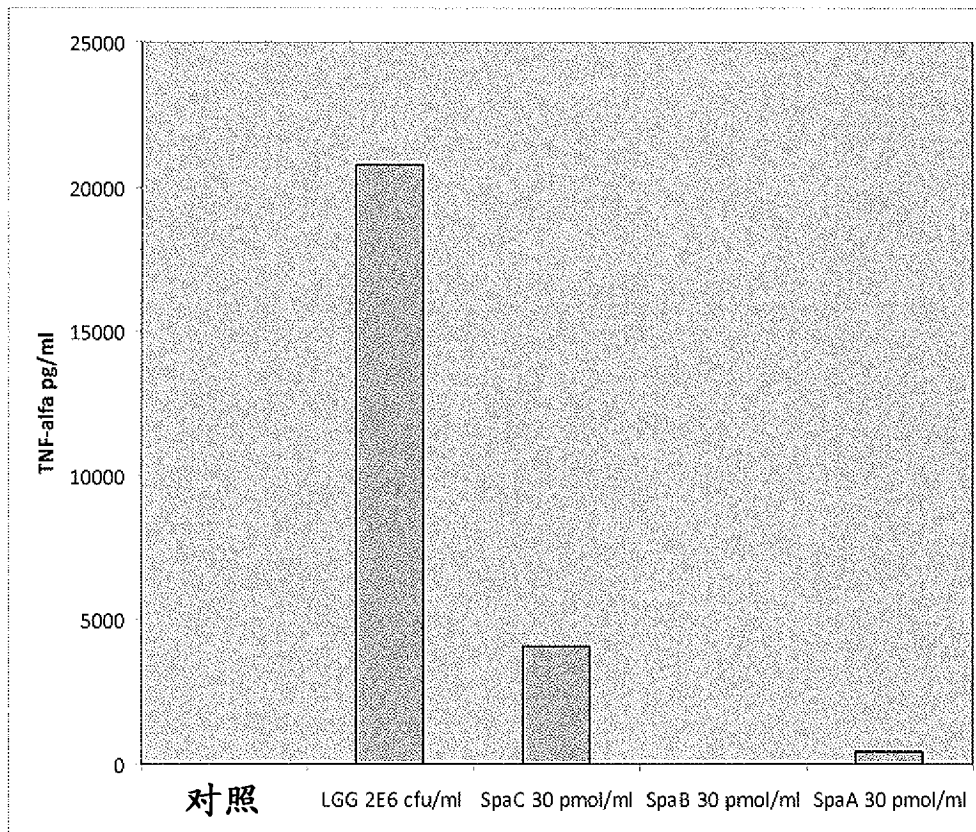


图 9

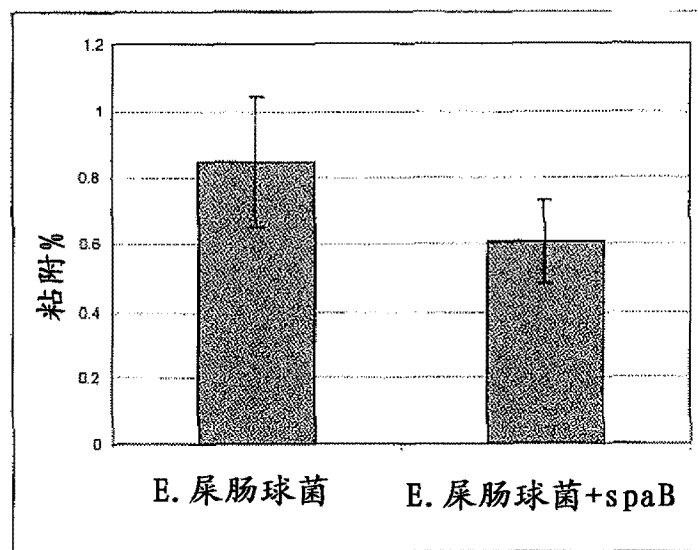
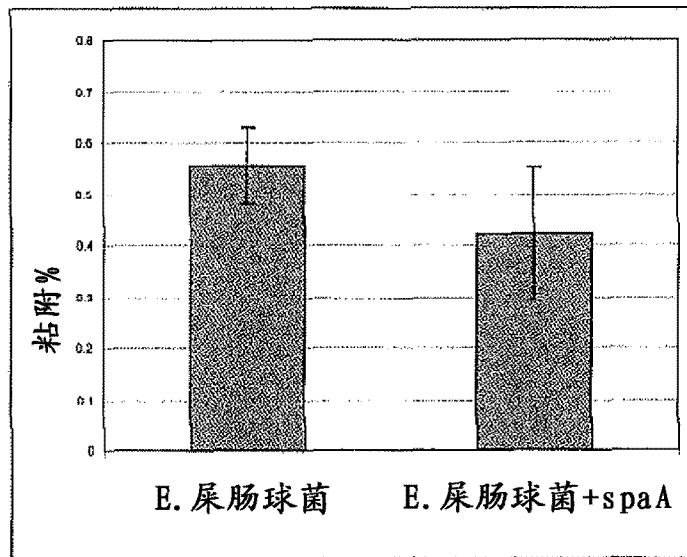
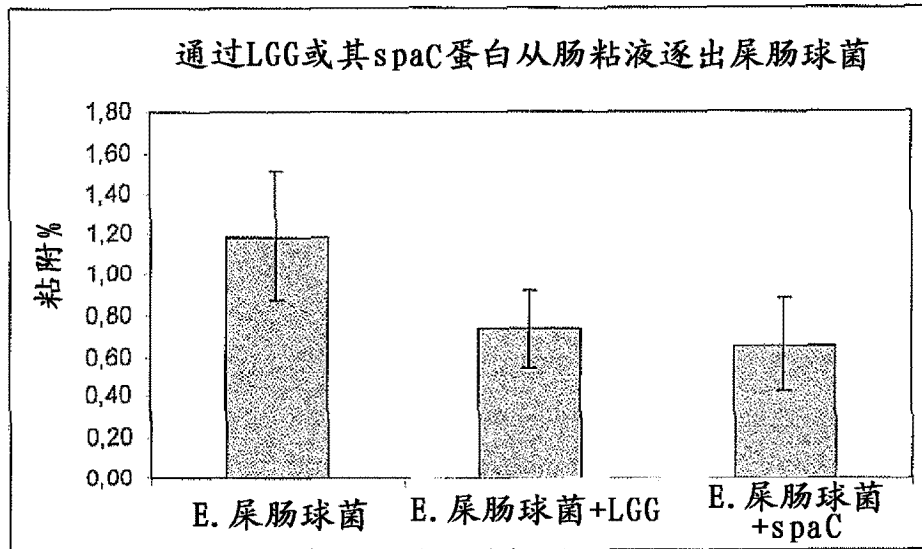


图 10

GG00441-GG00444_coding_strand

acgatgggtcagtcgggattggacagctgaattcaaceagggttaactgctctgagggaactcccttcgggaagaattccctaaagcagtcattg
gcgtctcgtttgtgccacgctcccaaggcgagtagcggatgtgcgaaaglaaatctgggttccaacaatctctgataacttggcaaacctggaaacca
ttgtcaaaaagtatactctcaaatctctggccccgttagctgctgacgtgctcctgcaaggcttfaaggcaggtgtccgcagtagtcaggaaatctt
gacgatgactcagtcggctgtacogttctgtgagctcattaatgctggctcaccagctaaagcgaataactttgaccaagtcgecttcccaatgt
cccacgcctgtgctgggicattcacggccgcagggacgcaactcgattgagtcgcccgtatatactcttattcttgcgctgtggggcgttctatagccctt
gatgcggcgtcgggagctcttgggaagtgtcatgttcttagcgcgaagcagcccgccgctgatgtagcgcatacacagttgtcgttgaaggggcaa
gccttggcccgtgctgcgataaagtgtacgaagctatcaacgctgtgtacgcggccttacgagtaagctccctggcggagagccttgaagaac
gcacggccggcttaagaaaaggcgtagtaccgggtctatcgcgcttaccggctcgtcatggcttgggcaagttccgcaagatagactgtatgcga
gtgacgcttcgagctgagctgagttacagatccacgctgtgattctcgtgagattgctccttaccgctgagatgaagcttctgtcaatcacggctcgcg
gtgtaccagcagcctgaaggccctgaattgttagcagcggctcctaaaactgagttgtgttaatgcttgggggtttagctgagaggtgggtcct
gaagattcctgcttctgtttagctagcactaacaagaalaggcttcatggccctttaggctagctgcagggtgttgcactgaattgtaaaactgg
ggttaaaatttactgaggggggtaaaatttacgaagatgacagctaaagttggcgagaactgggcaattgttgcggcttcttattgattttg
atgagtatgttaacaggcttagtgacaagtgccagttcagttgtgacagccactgataaacttgcgccaaactatcaaaaccgatgctaat
ggtaacctaccgcaaaattcgtggcagggtcaggggacaacaaaatgtaatacaaacgctggcggggatacaagtttcagggtgggata
ataatacaaatatgggaatgggtgatgcgactgataccacgaactcttacctgaaatttgggtgaccccaataatecggattatcagatctgaa
aataatgctaaagagacgaataccctggattgtacgacgttatttgaacgtaaaaggcaataaacagcaaaatgtgaagcctgttagat
attgtcttagttgtgafatgtctgggtcaatggagtcacacagatggggcagcaatcgagctgggtctgtctgactgggttaagaatt
tcttgaactctatcaaaaacggcctgggttaattacgtaattgttgggttaattgggtttctagctctgggtatatacgggtggcaaatcgg
gtatattagtgcaaattaggcaaaagcaggfaattgcagccagcaacaagcattaatggfctgtagtccaaagggttcaagggggt
acgtatacgcagattgggttggcgaaggatcagccatgctgaattggggacaccagttggcaataaaaaaatgattgattttgtaactga
tggcgtgcccacttttctaaagagggtgataaattcagagtgagataaattggtaactgtatggcaactaatttggatccagcagagatga
accagggaaacccgacgacttcgatggccatacaccgatgttcaggctattatataatgatacttggccagcaacttgggtgagg
ccaagatagcaaaaggatagttgtaattgagggtgacggcttaggcatacaactggctgnegacgaccaactacatgaagaangaaaa
ataegcaaaaactgcagcttatacnaiteacoggtattatacgaagatgctgatgtgcegatgctgttggagcttattgaaacaate
aggcaaaaggacattatacaaaaacttaatacigtcaacgaeggcaegatacagaaccgattggtaacnaattcaatattggaacaa
ccaggcgaccgttacgagtgctggcangcaaaactgtgcagcaagtgagttgcaagtgccggatccaagatggtaattgagcgggtg
aaateacatgaacttgggtcaggatcaggaagtcaaatcattatacaagtaaggatcaaaaacagaggatgctggctcaagcctgattt
ttgtaecaaatgaattggtaaaacttgttgaacnaaaaggcggcgtcggctgttgaacttgggattccitcaggcagggcaacag
caactaagtttatgtgagangcaatggcgcagttaaagaatcaatcgftaccggatacgtcaacgtcagcgggtcagcgaanaagt
ggctgacgggttgccttgatcaaaattggcaacagaccttagtcccttaaaaaagctgataaactggaaagctagcttaccggcaactcgtga
taanaactcagggtcaaaagttttcatatgtcgttaagagtgaagatgctcgggaattgattgagttcgtttacagttcnaaatatgg
ateageaaaacagcaactgtgacttgaacaaateagcagatgtggtttcagttcagaaaaaaacnaecgatggtaactgattateagea
gatcagttgaaggccatgacgttttaacttaaccagtaacaggaataacagtttcaagcagccatccaaaaacacgcctacagctaac
ggafctgaggcaactagegcagggtatfacgggtatcaggaagctgcagcaactacaggttatacaactgtatgggaacacgtatctttt
tcagctaacgtctgatggcaatggcaataaccatggcaacaaggacaatgtgacatcagggagtggttattaatggccagcagacttg
aatctgttgggtgataaagtcagatgtatttaccgtgacgggggatcaccagcaaatctgacgtcaacgaaatfatgtaacaaagcc
atecatgacttgcgggtcacaacaggataatacaagccaatcttgcaggtgcagccttaccctgcaacaaagctcggcgaag
ctgagacgataaactatcggcgacatctgaggggacaagcgtttggcnaaaatagttgagatggtaectatacagatgtcagaaac
aaaagcaacngatggctatacaaaagcaatectgcaaaagtgcattcaggtagetaogaetggtaangaggcaacogtcaagattgac
gggtgaggcaattgaagccgggcaaaagtaagaaeggntacacattagcagttgatggcagcaogataacttgcaggcagattatcag
ccacttgcuaatttgcgcatacaggtggctcagggctatacgcagttgcttggtaacgactgggattgacagcgcagcgttcttatt
actgggtgtttgataangeagcgggtgggtgaagcaacatgactaatactctcgtcgttagtgattttgacatttgccttggcactacta
gtcagtttggcaacgaacggtgcagcagacaacggcggcaactgtgcgacaacatgttgatgtgtgttgcataagctgtgtttaa
gataccttgcnaactcaacangeaataacgggcaacaaaaaccgacttctgcaggcagatgtgcccgttaaaegggtgacgttca
cagttatgacgtgaccctgacttggcagcttgcctcaaaaatggcgggtgagattgaggtagcacaacagcagcttggatcaagata
gctatcagcctgtgactcagccttatcgcacaggtgtgacggcttggcagggagaagcgtacttggcgatttaccactcgcaggg
ggcagcatgtcgggttatcttttaagaaacggcggcaactaagaataatgaagccagtcagaaactctgtgggtgtcatgtcaagca
acctcaaatgggaanteaateacgcaatgatttcttaagaacaaaatggtaagctgcaacccgatgccccaaaaaagtcca
aagaaaaactgcaattgttgcacaacgggtgatacagttgcagcttggcttcaagctcgggttgaatactctcgcagcagtaactg
cttttaacataaaaaacaaaaatfaataagtgaggagagataagaaatgaanaagaacttgcagaagaanggtgacattaacag
cacgactcaatgacattactgattgtctcgggttfaatggcactcgggttcaagcagatacgaatgatacgaenacaaaaactgtg
ccttactaanaactcgggttgaacaaagatgttactgcaatgacgtgcgaactgatcaaatggaccggcaggtgtgtaagccttcaaa

ggcgttgatttcaaccattfaacacgtgacagccaattattgggeatcgectaaggattataaaggcagtttgatagtgctcgggtgceg
 caaccggtaacgactaatgacaaggggcaactaacccaagcattacctatccaatcaaaagatgccagtggtagnctegtgtgtgt
 ctatctttccatgaaaccaatecgcgagctggttataacaegtctgcgatttctggttaacctaccagccaaggcagcagcgg
 gaatgtctatgtctacecaagaatgttcaaaagaccacctatgagcgcactttgttaagaagatgctgagactaaagaagtgttg
 aaggagccggttfaagattageaattagtgatggcaagttttgaagttgacagataaagatgggtcaaacgctcagcatcggcgaagg
 atttatcgatgtattggccaataactatcgattgacgtgggttctgaaagcgatgctactgttttcagctctgataagagcggtaagtgg
 gcttaaatggatttctgataacaccacaacttacacggcagttgaanacaaacgtgcggatgggttatgatgtctgccaatacagac
 tftaaagetgataatfctgtctagcagcattctagatgaccaagegggtattctgcccacacactgggtgtaactggcaagtcattttgcat
 ttggggcgttgccttaattgcaattgggagcagttgcctatcgcaagecgcgcaatgggttctaaaaagttlaataagataaatgagcaagcaa
 gagcgtgatggcgtctgtttgatatggcgggtaacagagtgacaaaacgcaaacgctgcaccttagacttgattgataattgtgattg
 gatgtctcttttagcgggtttgggttttatgctatccatttgeaagtgatgcttaagttcttaccnaaaateagcaagtcategacaggta
 tegacaacaagaagecgggaagaatecagatgggttgcggcgggaatatacgcactatcagcaaaaaataaacagttggcagcaa
 gtcaacaagtgcggcgggttgcagtttataatcatgtgttaatgataaggaaccgcaaaaacagcagccaaaacgcaatcaacaat
 ctgactcggcagacagttgctcagttgacgattecaaaaattggccttagctctgcgggttttgatcatacaagcgattggctctacaat
 ttggcgcctgtttattggatggtaacaagttatccaactgggtgtaaaaaatacceatgctgtcatttcagcgcctcgtggtgtgccaacgc
 tgaacttttaccaggatcaccagcgttaaaaaaggcgacaagtttttattagcataggcaatcaaaaattggttaccagcttttaag
 cgccagggttattgagccaagtgataaccggcagctaaagaattgtgcgggacaggatcttggtaacettaatgacctgcacgccttataatg
 atcaattctcctcagattgttgataacgggtcgcgaattcttaegttaaggcagatgaagaggctcaagttggggcgggttgggtggaa
 aattaaagctaatagctgcaacttttaggcgcgggtgatcattttaggcgtgatcgggttctgtaatgcgcagttgatgcttggccgaaagc
 attatttgetggaagtaccggctgaagccacacaagctggtgtaaaacgagggtgacatatacattctttaaatcagatcaaaatggg
 gtgactgacatcagcctgctggttaattattatcgagctgcaattgtcacaccgcttggcggactaagtacaaggcttatgtcaaaaa
 attcgggataaaaagcttcaattaaaagaatatacattaaagatcttaaaatgtttaaataatcctttgggttaatttaaatgaggaaaggatcaaat
 ttaagactgatattgatttaataaacaaaaacgaccaacttataaacactatgtctgtatattcaagcctttgaagtaggacgatgcaacatga
 atgagtattagaaaaccgggtcatcaagatgactttccatagtggaagccgctttttgatatttaa

图 11A

GG02369-GG02372_coding_strand

gccccgtactgcccagctcactgttgacggggcgcagttgcglaticafatfagagalgttfgafacacrtgcaaacgtccagcatgggaacac
 tccatggtttccggatggcaagccagctgagatagccaccgogcccaagatgclaalggtagcggctttgtgalttacctgaaacggaaacc
 ggttccggtaaacagatggcccgtttgatccggagcctgctaaaafgcacgtacccaafgacagctatccagtagccgalgtgacgggocact
 atgcttatgacaagctcgtggattfaanaagagctgcagaaggcgtcaaggcagcattggtagtgaagattgcaalttagataaacgggtgttga
 caticatggtgtccggacagtttggaaactccagatacggftaaagggaaccgcatgaactatgatgcacacgtcacactgccaatggcgtggg
 taaaattgcccgccttagtagcaaaaataaiftaataacgtaggtgttcccagaccgtctgagcgtttccagcttagtcagggtcgggattttgtg
 cggcaaacctaaactataaactctggaaatgacattcatalatfocgtctaatataalttaagaagtaatafacggaaacacitattataaa
 ataacaaltattatagttccgtttacgcagttcactctgttacgcttaattcagcaacaagtgaanaatgtaacatgaaaggcggaccggatgect
 aggaaatggattcattatgctgatgtacgtctgatctggtaecgcaaatfegcagtgccgggtecgggtagccanaagcctcagnc
 taatecaanagcagatgcccggatgctgcaatgctgcagccgagcaatcgtctccgcaatecgaagctgctgattttagatgtaggaagcag
 cggctagtggecaatcaaacagcggcggcggcaangcaaaactaettcaaaagctegggcagcaatcaagctaggaageagggaangtett
 ggcaecggcagtggtcaatgtaactcaaacgctgcaatcagcggctgcaaatcaggttaagttagatttagccaagecaaggatc
 aaacggggcagcangctgcaagtctgcaatgcccaggatcaccgtcccagctgcaataactaacgggtgaaataacggcggcggct
 tgcagagaaaacggcagaaaagggtgaatcettttaaceaaaanagctgctgatacaanagcagcaagcagctagtgtagaaactca
 gctctggatggatttaatagctgctcaggtatttagcgttgatgttgcactgcaagctgctgcccggctaacgatgatgtgcaggaa
 accggctgcaactcagcaaaagatgctgcacagctetgattttaaccggctgctgctgggacgataaaaatcaecgcaactaaagctgatg
 ggcggcactctgggatgaaggcggcaaatftategcaaaccaaatagtagtaaccggtcaanaatcgggatcagctggggcagatgga
 gaatggcggttcaatcagatfatgtgctggcttctgatgcaecggcaattattftaagatgegggtcaaaaatccaggtggctcttcaact
 gctagatgccaagatcaaaagtggtatattgacatgttggctcagcaangtacttgaatggaaaccggtttgagattgggtcttatgttga
 ctaacaggatfctgctcctgctcagctgaatggggcactaccctcaggatgtcggcattgattttccaacaactctttccgggagctc
 atttgcgaatgtttgactatgactggcggctgattttttagcaaggcaacgagacagcagattgaactttatccgcaaaagtgaagcc
 aatcaaaaatcgaccctgacgttactctgctgaatcccggctgagttgtctggacggagcaggcgggggatgacgcccacitagtacgat
 cgggttatacgggatggcaatftgagggaaggaaactggattacctcagataaaagcgaactctgaaaccgaaanaactggggcctcggc
 ggaagggaacacgtgggtacacctcagacctggggaaactgggtcgaatcaatgatacagagaatafgcgggaatgggaagat
 cgaactaggtgcccacatftggggcgtggctgctgttactttaaaccggtaccagtcatacctttagacggcggcaacttattcaacg
 gggcgggtacttgggttcccaatgggagtggaacaaatcgagttgattgaccccaatgtaaccaacaacaaangcgtgagcgaatg
 ccgaagccgggtggggagccgagggaagatnaaacggcacaatctggaccgcaaatgatttagacgatacaggttgcaatcagcatt
 acaacggcggagcaatftactactacntcaaceagggaagtatacagtatggcgatcagctgggtgaagcagcaaaaatgttggtagc
 gaactgctaccggagcagctgagttgatctcggcaataaacaacagtecccgacttateaaaangcgtccagctetttaatgcaact
 gatccggatgegggttggccaagatcgggaaaatgacgtgactgagggaagctgctggaatttctgctgacgcaagaaggcagctggcagc
 gaatcagctgacaatcggcagtggaagatgtgcagaaaatcattttcaatagcggcttttctcactcagattgaaggtggggccaaca
 aggatccggacaccctgacaaaacgactacgctggtaataaagcagcggtaaattttgcacactgaggaaactgacagtaaggga
 aaccaacgagtgacgggttctctgatccggcaggcagatttcagctgaatttaaccaagaaaaccngatagggcagctgctgccc
 ggtagctgggtttcttgaagcaaggagacactcaactgcanaacagcaactgctgctgacgggttaaagctctatttggaaactgtaa
 accggggcagctatcaggtaagcgaatgtccgctgcccgtcagcaggtgacggctgaaattgattttaaagtgccagctgacggtaactg
 tgacagctggcggcgaacggcggagattggccagcaacacgggtgataccaactgaaaccaaccgaaactttagattgatacaaatgga
 aanaaggtanaaaacacctgccaatgcaag(tttgcttataccgtggcgatcaaaaccaaccctgttctcaaggaaacgactgatgaa
 aatggcagctggcattcaacacatcagttgacccgggaaacttatcgttaacgggaaaccaangcggctgcccggatttgatcggctgaa
 cggatcgtttacctcaagattaaacggcagtggaacaatgggtgacttctgctatagttggcagcagattaaagcagtgatgagtaggggtt
 gaatttacctgatgcagaggatagttgaaatcggatctccttcaactgacgaaccaatcgttggaaacactcctacggaaaactgggt
 ggtagcgggtatcttctgtttctcagctgcaateagctgctgtggcggcggctggctgcttaccctgatactgaaagcgaanagggggccc
 gttaaagatggcagattttatgggtggcttctccgttctctatgattggatcgtgcttggcaacacacacattgggttcaecggcgt
 gatcaaacctgcccagattgtgatacnaagcgaatttatcgggatactcggcaaccgggaagcagttgggtatgaaaatgncggctatc
 gattgaccgcaataaccggataaagatggctacaaattatagcaaaaaccagcggcgtgaatgggtgctaaccttgggtctatgaty
 ccagctccttattgaaaacgcaatagcgcctgaagcaatfegggccttagttgatcttatacgaatafgacggctgaagcaagcactga
 aatttgcggcgggcaaccctgaaatagcggctcaagggaacaaaggatcgggctgatagaatacaaaaaacgatacaaacctcgggtg
 aagatgggatcagcgaataaccgtttctgctgatacaacaggcaaccgactaaagcttatactgatacagaggtggcaccggatcctca
 accgaactcaatgtggcaacttagagcgaanaagctgcccagctgattgttttccagtaecgggactcaatcagtgggcaaccggctacg
 accatccatctgtatcgaanaatgctggctatgctccggatccctgattctcaagctcggcgtgacaccctgattggtacagtaaacgggt
 tagccgggtgcatcttctattaccgaattgagaatggtaagaagcttatactcgatattctgcccagtaaccgacttgcgcaacaaatg
 ggtgagcactactgacccgtgcatgatacggcgtgaaacaaattgttccgatacagatgggctagtttaatacaggtgaacgcttttg
 ccgcgggagaataattcttgaagaatgcaaggcgttcccggctatgaagtggtatgctaaaagcggcggatcaaaaatcagatfccc

专利名称(译)	鼠李糖乳杆菌菌毛多肽和产生它们的方法		
公开(公告)号	CN102317311A	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN201080006238.5	申请日	2010-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	维利奥有限公司		
申请(专利权)人(译)	维利奥有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	维利奥有限公司		
[标]发明人	WM德福斯 A帕尔瓦 I帕尔瓦 J雷乌纳宁 I冯奥索夫斯基 R萨托卡里 S韦斯特隆德 M坎凯宁 T萨卢斯耶尔维 S廷屈宁		
发明人	W·M·德福斯 A·帕尔瓦 I·帕尔瓦 J·雷乌纳宁 I·冯奥索夫斯基 R·萨托卡里 S·韦斯特隆德 M·坎凯宁 T·萨卢斯耶尔维 S·廷屈宁		
IPC分类号	C07K14/335 C12N1/15 C12N1/21 C12N15/31 C07K16/12 G01N33/48 G01N33/53 A61K38/16 C12Q1/68 A23L23/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A23K1/1631 C07K16/12 A23L1/3053 C07K14/335 C07K16/1285 A23K20/147 A23L33/18 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/12 A61P3/04 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/02 A61P17/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P39/06		
优先权	2009000031 2009-02-02 FI 12/364128 2009-02-02 US		
其他公开文献	CN102317311B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生命科学和食品、饲料或制药工业。具体而言，本发明涉及新的肽、菌毛结构、多核苷酸以及包含所述多核苷酸、肽或菌毛结构的载体、宿主细胞、产品和药物组合物。本发明也涉及基因簇和抗体。另外，本发明涉及用于产生所述肽或菌毛结构或产生包含所述肽或菌毛结构的产品的的方法。另外，本发明涉及用于筛选细菌菌株、用于减低或抑制致病菌黏附、促进细菌细胞黏附于黏液和用于调节受试者中免疫应答的治疗以及用途和方法。再者，本发明涉及用于检测益生菌菌株或病原菌株的方法。

表 1

基因	正向寡核苷酸引物*	反向寡核苷酸引物**
SpaA (G60U42)	5'-TGGGTTGAAATTCAGTGGTGGAGAC (SEQ NO 19)	5'-TGGGAGACAGCCAGCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 20)
SpaB (G60U43)	5'-GGGAGTGAATTCAGTGGTGGAGAC (SEQ NO 21)	5'-GAGTGGTGGAGACCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 22)
SpaC (G60U44)	5'-GAGTGGTGGAGTTCAGTGGTGGAGAC (SEQ NO 23)	5'-AGCCGAGACCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 24)
SpaD (G60U370)	5'-AGCCGAGACCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 25)	5'-TGGGAGACAGCCAGCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 26)
SpaE (G60U371)	5'-GAGTGGTGGAGTTCAGTGGTGGAGAC (SEQ NO 27)	5'-AGCCGAGACCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 28)
SpaF (G60U372)	5'-GAGTGGTGGAGTTCAGTGGTGGAGAC (SEQ NO 29)	5'-AGCCGAGACCCGATGGGAAATAC (SEQ NO 30)

* 和 ** 正向寡核苷酸引物中的限制性核酸内切酶 EcoRI 与 SacI 和反向寡核苷酸引物中的 XbaI 位点加下划线并以粗体表示