

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680016183. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/20 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101175856A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/02 (2006.01)

[22] 申请日 2006.5.10

[21] 申请号 200680016183. X

[30] 优先权

[32] 2005.5.12 [33] AU [31] 2005902418

[86] 国际申请 PCT/EP2006/004385 2006.5.10

[87] 国际公布 WO2006/119983 英 2006.11.16

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.12

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

共同申请人 莫道什大学

[72] 发明人 M·贝尔伽德 D·J·汉普森

T·拉

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 凌立

权利要求书 2 页 说明书 46 页 序列表 21 页

[54] 发明名称

猪痢疾短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途

[57] 摘要

本发明描述了猪痢疾短螺旋体的新多核苷酸和氨基酸。这些序列用于诊断动物内的猪痢疾短螺旋体病，以及用作治疗性或预防性治疗动物内的猪痢疾短螺旋体病。这些序列还可以用于诊断，和治疗性和/或预防性治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病，所述的短螺旋体属物种包括密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体。

1. 多核苷酸，其包含选自 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 的序列。
2. 质粒，其包含权利要求 1 的多核苷酸。
3. 权利要求 2 的质粒，其中所述质粒是表达载体。
4. 细胞，其包含权利要求 2 的质粒。
5. 细胞，其包含权利要求 3 的质粒。
6. 免疫原性组合物，其包含权利要求 3 的质粒。
7. 用于治疗或预防猪痢疾短螺旋体的疫苗组合物，其包含权利要求 3 的表达载体。
8. 用于治疗或预防猪痢疾短螺旋体的疫苗组合物，其包含权利要求 4 的细胞。
9. DNA 分子，其包含与权利要求 1 的多核苷酸至少 70% 同源的序列。
10. 质粒，其包含权利要求 9 的多核苷酸。
11. 权利要求 9 的 DNA 分子，其中所述 DNA 分子与权利要求 1 的多核苷酸至少 80% 同源。
12. 质粒，其包含权利要求 11 的多核苷酸。
13. 权利要求 9 的 DNA 分子，其中所述 DNA 分子与权利要求 1 的多核苷酸至少 90% 同源。
14. 质粒，其包含权利要求 13 的多核苷酸。
15. 多肽，其包含选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 的序列。
16. 多核苷酸，其包含权利要求 15 的多肽的编码序列。
17. 质粒，其包含权利要求 16 的多核苷酸。
18. 权利要求 17 的质粒，其中所述质粒是表达载体。
19. 细胞，其包含权利要求 17 的质粒。
20. 免疫原性组合物，其包含权利要求 19 的细胞。
21. 蛋白质，其包含与权利要求 15 的多肽至少 70% 同源的序列。
22. 权利要求 21 的蛋白质，其中所述蛋白质与权利要求 15 的多肽至

少 80%同源。

23. 权利要求 22 的蛋白质，其中所述蛋白质与权利要求 15 的多肽至少 90%同源。

24. 免疫原性组合物，其包含权利要求 23 的蛋白质。

25. 免疫原性组合物，其包含权利要求 15 的多肽。

26. 用于治疗或预防猪痢疾短螺旋体的疫苗组合物，其包含权利要求 15 的多肽。

27. 单克隆抗体，其与权利要求 15 的多肽结合。

28. 用于诊断动物内猪痢疾短螺旋体存在的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 27 的单克隆抗体。

29. 用于诊断动物内猪痢疾短螺旋体存在的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 15 的多肽。

30. 用于诊断动物内猪痢疾短螺旋体的存在的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1 的多核苷酸。

31. 在动物内产生对猪痢疾短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 24 的免疫原性组合物。

32. 在动物内产生对猪痢疾短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 25 的免疫原性组合物。

33. 在动物内产生对猪痢疾短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 6 的免疫原性组合物。

34. 在动物内产生对猪痢疾短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 20 的免疫原性组合物。

35. 治疗或预防需要所述治疗的动物内由猪痢疾短螺旋体引起的疾病的方法，其包括向所述动物施用权利要求 7 的疫苗组合物。

36. 治疗或预防需要所述治疗的动物内由猪痢疾短螺旋体引起的疾病的方法，包括向所述动物施用治疗有效量的权利要求 8 的疫苗组合物。

37. 治疗或预防需要所述治疗的动物内由猪痢疾短螺旋体引起的疾病的方法，其包括向所述动物施用治疗有效量的权利要求 26 的疫苗组合物。

猪痢疾短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途

发明领域

本发明涉及猪痢疾短螺旋体(*Brachyspira hyodysenteriae*)的新基因和其中编码的蛋白质。本发明还涉及这些新基因和蛋白质用于诊断猪痢疾短螺旋体病、抗猪痢疾短螺旋体疫苗,和用于筛选杀死猪痢疾短螺旋体或阻断猪痢疾短螺旋体的病理效应的化合物的用途。这些序列还可以用于诊断性和治疗性和/或预防性地治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病,其中所述的其他短螺旋体属物种包括密螺旋体(*B. intermedia*)、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体(*B. aalborgi*)、无害短螺旋体(*B. innocens*)、*B. murdochii*和多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)。

发明背景

猪痢疾是在澳大利亚和世界范围内主要的地方流行性猪疾病。猪痢疾是传染性黏膜出血(*mucohaemorrhagic diarrhoeal*)疾病,其特征是大肠上皮表面的广泛炎症及坏死。因猪痢疾所致的经济损失主要由生长迟缓、药疗法成本和死亡率造成。猪痢疾的病原体在1971年最初鉴定为厌氧螺旋体(随后称作猪痢疾密螺旋体(*Treponema hyodysenteriae*))并且最近重新划分至短螺旋体属(*Brachyspira*)为猪痢疾短螺旋体。猪痢疾的疾病谱可以从温和、短暂性或不明显变化至严重或致死。各猪舍内的药疗法策略可能掩盖临床病征并且在一些猪舍内疾病可能被忽略或可能仅为可疑。无论明显的疾病是否发生,猪痢疾短螺旋体可以保持于感染猪内或其他储存宿主如啮齿类动物内或在环境中。所有这些来源为疾病传染至未感染猪群提供潜在可能。

猪痢疾短螺旋体的建群激发强烈的抗螺旋体免疫应答,因此暴露于螺

旋体的间接证据可以通过测量感染动物血内的循环抗体滴度而获得。已经报道这些抗体滴度维持于低水平，即便在已从猪痢疾中恢复的动物内也是如此。因此认为检测抗体的血清学试验具有检测亚临床感染和在其大肠内具有不可检测数目的螺旋体的恢复猪携带者的巨大潜力。这些试验作为易用试剂盒形式如酶联免疫吸附测定时将特别有价值。已经开发多种技术以证实存在抗猪痢疾短螺旋体的循环抗体，这些技术包括间接免疫荧光抗体试验、血凝试验、微量滴定凝集试验、补体激活试验和使用脂多糖或经超声波破碎的完整螺旋体作为抗原的 ELISA。所有这些试验都遭受特异性问题的困扰，因为相关的非致病性肠道螺旋体可以诱导交叉反应抗体。这些试验可用于检测其中存在明显疾病和高循环抗体滴度的畜群，但是这些试验在鉴定亚临床感染畜群和感染猪个体上存在问题。因此，迄今没有用于检测抗猪痢疾短螺旋体抗体的非常灵敏而特异的测定法。合适诊断试验的缺乏已经妨碍猪痢疾的控制。

使用多种方法以控制猪痢疾，这些方法包括预防性使用抗微生物剂以完全转移感染畜群并防止感染携带猪的再进入。所有这些选项代价高昂，并且如果它们充分有效，则需要使用复杂的诊断试验以监测进度。目前，对亚临床感染猪痢疾的畜群和单个健康携带动物的检测仍是主要难题并且正在妨碍执行有效的控制措施。确定性诊断猪痢疾通常需要分离并鉴定来自病猪粪便或黏膜的猪痢疾短螺旋体。所涉及的主要困难包括这些厌氧细菌生长缓慢及其营苛刻的营养要求，以及因猪肠道正常菌群内存在形态学相似的螺旋体所致的混淆。显著改进感染猪个体的诊断通过开发检测来自粪便的螺旋体的聚合酶链式反应(PCR)测定而实现。不幸的是在实际应用中，PCR 检测的限制使它们不能够检测到具有亚临床感染的携带动物。由于这些诊断难题，显然需要能够在猪群和个体水平检测猪痢疾短螺旋体感染的简单而高效的诊断工具。

强烈的抗螺旋体免疫应答在猪痢疾短螺旋体建群后被诱导，并且从猪痢疾中恢复的猪受到保护而不发生再感染。尽管如此，开发疫苗以控制猪痢疾的尝试仅获得非常有限的成功，因为这些疫苗不提供基于畜群的充分

保护，或生产它们过于昂贵且困难以至于它们没有商业实用性。菌苗疫苗提供某些水平的保护，但是菌苗疫苗总是脂多糖血清群特异性的，因此需要使用多价菌苗。此外，菌苗疫苗因螺旋体苛刻的厌氧生长条件而在大规模生产时困难且昂贵。

已经数度尝试开发用于猪痢疾的减毒活疫苗。这种方法具有如此缺点，即减毒株表现建群减少并因此导致免疫刺激减少。生产者和兽医人员因为存在毒力回复可能而不愿意使用猪痢疾活疫苗，尤其当对猪痢疾短螺旋体内的遗传调节及组成知之甚少时。

使用重组亚单位疫苗是有吸引力的选择，因为此类产物将是充分定义的(主要因注册目的)并且相对容易大规模生产。迄今，首个已报道的利用来自猪痢疾短螺旋体重组蛋白的候选疫苗(38 Kd 鞭毛蛋白)没有防止猪内建群。这种失败可能具体涉及所用的特定重组蛋白，以及涉及如递送系统和途径、剂量率、佐剂的选择等其他下游事件(Gabe, JD、Chang, RJ、Slomiany, R、Andrews, WH 和 McCaman, MT(1995), Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the flaB1 gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. *Infection and Immunity* 63:142-148)。最近已报道的用于接种的重组猪痢疾短螺旋体蛋白是与多种病原菌的甲硫氨酸结合脂蛋白具有同源性的 30kDa 外膜脂蛋白(BmpB, 又称作 BlpA)。使用 his 标记的重组 BmpB 对猪接种，随后用猪痢疾短螺旋体实验性攻击，与未接种的对照猪 50-70% 发生疾病相比，导致已接种的猪 17-40% 发生疾病。由于 BmpB 接种的猪的疾病发生率显著低于($P=0.047$)对照猪，因此 BmpB 似乎具有作为猪痢疾疫苗成分的潜质(La, T, Phillips, ND, Reichel, MP 和 Hampson, DJ(2004)Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Veterinary Microbiology* 102:97-109)。已经进行其他众多尝试以鉴定来自猪痢疾短螺旋体的可作为重组疫苗成分使用的外包被蛋白，但是仍然还是没有产生成功的疫苗。需要更全面的方法以鉴

定来自猪痢疾短螺旋体的潜在有用的免疫原性重组蛋白。

迄今，仅报道一项使用 DNA 用于接种的研究。在该项研究中，将编码推定铁蛋白(ferritin)的猪痢疾短螺旋体 *ftnA* 基因克隆至大肠杆菌质粒并且使用该质粒 DNA 来包被用于射弹法接种的金珠。使用猪痢疾的小鼠模型来确定用 DNA 和/或重组蛋白接种的保护性基本特征。用重组蛋白接种诱导了抗铁蛋白的良好全身性应答，然而，用 DNA 接种仅在终末接种后才诱导可检测的全身性应答。用 DNA 接种，随后用重组蛋白加强，则仅在用蛋白质加强后才诱导全身性免疫应答。然而测试的接种方案没有一个能够向小鼠提供抗猪痢疾短螺旋体建群及相关损伤的保护。有趣的是，仅用 DNA 接种小鼠造成了疾病显著恶化(Davis, A.J.、Smith, S.C.和 Moore, R.J.(2005). The *Brachyspira hyodysenteriae* *ftnA* gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. *Current Microbiology* 50: 285-291)。

本发明提供之前没有鉴定过的猪痢疾短螺旋体的新氨基酸序列和编码这些新氨基酸序列的多核苷酸序列。本发明还证实这些新氨基酸序列和 DNA 序列可以用于诊断性测定和抗猪痢疾短螺旋体的疫苗。这些序列还可以用于诊断性和治疗性和/或预防性地治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病，其中所述的其他短螺旋体属物种包括密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体。

发明简述

本发明的目的是获得来自猪痢疾短螺旋体的新基因和由这些基因编码的蛋白质。本发明的另一目的是新基因和由这些基因编码的蛋白质可用于治疗性目的和诊断目的。所述基因和/或蛋白质可以在抗猪痢疾短螺旋体疫苗内使用或用来诊断猪痢疾短螺旋体感染。

本发明的目的是获得具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 内所包含的核苷酸序列的猪痢疾短螺旋体新基因。本发明的目的还是获得与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 同源的核苷酸序列，其中同源性可

以是 95%、90%、85%、80%、75%和 70%。本发明还包括 DNA 疫苗或 DNA 免疫原性组合物，其包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 的核苷酸序列以及与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。本发明还包括诊断性测定法，其包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 的核苷酸序列的 DNA，以及具有与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列的 DNA。

本发明的目的还是获得质粒，其包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 的序列的 DNA；获得原核表达载体和/或真核表达载体，其包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 的序列的 DNA；以及获得包含质粒的细胞，其中所述质粒包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 的序列的 DNA。

本发明的目的是获得具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列的猪痢疾短螺旋体新蛋白质。本发明的目的还在于拥有与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的蛋白质。本发明的目的还是包含蛋白质的疫苗或免疫原性组合物，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的氨基酸序列。本发明的另一方面是获得包含一种或多种蛋白质的诊断试剂盒，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的序列，或与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。

本发明的另一方面是获得编码蛋白质的核苷酸序列，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列。本发明还包括质粒、真核表达载体和原核表达载体以及 DNA 疫苗，其包含具有编码蛋白质的序列的 DNA，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列。包含这些质粒和表达载体的细胞包括在本发明内。

本发明包括单克隆抗体，其与具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列的蛋白质结合或与这样的蛋白质结合，即该蛋白质与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源。本发明包括含有单克隆抗体的诊断试剂盒，其中所述的单克隆抗体与具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列的蛋白质结合或与这样的蛋白质结合，即该蛋白质与 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的序列同源 95%、90%、85%、80%、75%和 70%。这些诊断试剂盒可以检测动物内猪痢疾短螺旋体的存在。所述动物优选是任意的哺乳动物和鸟；更优选是鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。

本发明还构思通过向动物施用 DNA 疫苗而预防或治疗动物内猪痢疾短螺旋体感染的方法，其中所述的 DNA 疫苗含有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 内所列的一种或多种核苷酸序列，或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。本发明还包括通过向动物施用含有一种或多种蛋白质的疫苗而预防或治疗动物内猪痢疾短螺旋体感染的方法，其中所述的蛋白质含有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所列的氨基酸序列或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。动物优选是任意的哺乳动物和鸟；更优选是鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。

本发明还构思通过向动物施用免疫原性组合物而诱导动物内免疫应答的方法，其中所述的免疫原性组合物含有 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 和 13 内所列的一种或多种核苷酸序列或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。本发明还包括通过向动物施用含有一种或多种蛋白质的免疫原性组合物而诱导动物内免疫应答的方法，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 和 14 内所包含的氨基酸序列或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。动物优选是任意的哺乳动物和鸟；更优选是鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、

仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。

发明详述

本文中使用的冠词“a”和“an”指冠词的一个或多于一个(即指至少一个)的语法对象。例如“一个元件”意指一个元件或多于一个的元件。

术语“氨基酸”旨在包括包含氨基功能性和酸功能性并且能够包含天然存在的氨基酸聚合物内的全部分子, 无论其是天然的还是人工的。示例性的氨基酸包括天然存在的氨基酸; 其类似物、衍生物和同类物; 具有变异侧链的氨基酸类似物以及任何前述物质的立体异构物。

动物可以是任意的哺乳动物或鸟。哺乳动物的实例包括狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。鸟的实例包括鸡、鹅鸭、火鸡和鸚鵡。

术语“保守残基”指作为具有某些共同特性的氨基酸组的成员的氨基酸。术语“保守性氨基酸置换”指将来自一个此类组的氨基酸(概念性地或其他方式)置换成来自相同组的不同氨基酸。定义各个氨基酸之间共同特性的功能性方式是分析同源生物的对应蛋白质的氨基酸变化的归一化频率(Schulz, G. E. 和 R. H. Schinner., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。根据该分析, 可以定义氨基酸的组, 其中组内的氨基酸主要彼此交换, 并且因此它们在其对蛋白质总体结构的影响方面彼此相似(Schulz, G. E. 和 R. H. Schinner., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。以如此方式定义的氨基酸组的实例包括: (i) 包含 Lys、Arg 和 His 的带正电荷组, (ii) 包含 Glu 和 Asp 的带负电荷组, (iii) 包含 Phe、Tyr 和 Trp 的芳香族组, (iv) 包含 His 和 Trp 的氮环组, (v) 包含 Val、Leu 和 De 的非极性大脂族组, (vi) 包含 Met 和 Cys 的轻度极性组, (vii) 包含 Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和 Pro 的小残基组, (viii) 包含 Val、Leu、De、Met 和 Cys 的脂族组和(ix) 包含 Ser 和 Thr 的小羟基组。

“融合蛋白”或“融合多肽”指如同本领域内已知的术语“嵌合蛋白”

那样并可以使用本领域已知技术得以构建。在融合蛋白的众多实例中，存在两种不同的多肽序列并在某些情况下，可以存在更多种类的多肽序列。编码融合蛋白的多核苷酸序列可以符合读框地有效连接，以至于融合蛋白可以得到正确翻译。融合蛋白可以包括来自相同物种或来自不同物种的多肽序列。在多种实施方案中，融合多肽可以含有与第一多肽连接的一个或多个氨基酸序列。在多于一种的氨基酸序列与第一多肽融合的例子中，融合序列可以是相同序列的多重拷贝，或备选地可以是不同的氨基酸序列。融合多肽可以与第一多肽的氨基末端、羧基末端，或者氨基末端及羧基末端融合。示例性的融合蛋白包括含有谷胱甘肽 S-转移酶标签(GST 标签)、组氨酸标签(His-标签)、免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白结合结构域的多肽。

术语“分离的多肽”指多肽，其在某些实施方案中从重组 DNA 或 RNA 中制备或是合成来源的或自然来源的或其组合，该多肽(1)不与其天然形式的蛋白质结合、(2)从该多肽通常存在的细胞内分离、(3)没有来自相同细胞来源的其他蛋白质、(4)由来自不同物种的细胞表达或(5)不存在于自然界内。有可能分离的多肽存在但不足以称作纯化的多肽。

术语“分离的核酸”和“分离的多核苷酸”指多核苷酸，无论是基因组 DNA、cDNA、mRNA、tRNA、rRNA、iRNA，或是从细胞器(如线粒体和叶绿体)或合成来源获得的多核苷酸，该多核苷酸(1)不与分离的核酸天然存在于其内的细胞结合或(2)与不天然连接的多核苷酸有效连接。有可能分离的多核苷酸存在但不足以称作纯化的多核苷酸。

术语“核酸”和“多核苷酸”指聚合形式的核苷酸，无论是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或是核苷酸的两类类型的修饰形式。还应当理解该术语包括等效物、从核苷酸类似物形成的 RNA 或 DNA 的类似物并且，如适用于所述实施方案那样包括单链(如有义或反义)多核苷酸和双链多核苷酸。

术语“本发明的核酸”和“本发明的多核苷酸”指编码本发明多肽的核酸。本发明的多核苷酸可以包含如下的全部或部分：目的核苷酸序列；

与目的核苷酸序列至少 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的核苷酸序列；在严格条件下与目的核酸序列杂交的核苷酸序列；与本发明多肽功能等效的多肽的编码核苷酸序列；与主题氨基酸序列至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 同源或相同的多肽的编码核苷酸序列；具有本发明多肽的活性并与主题氨基酸序列具有至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更多同源性或同一性的多肽的编码核苷酸序列；因 1 至约 2、3、5、7、10、15、20、30、50、75 个或更多个核苷酸置换、添加或缺失而与目的核酸序列不相同的核苷酸序列，如等位变体；衍生自目的核酸序列并在进化上与其相关的核酸；以及全部前述及本发明其他核酸的互补物，以及由全部前述及本发明其他核酸的遗传密码简并性而产生的核苷酸序列。本发明的核酸还包括目的核苷酸序列的同源物，例如直向同源物和侧向同源物，并且还包括为特定生物(例如宿主细胞)内的表达已进行密码子优化的目的核苷酸序列的变体。

当描述两个核酸区域间的关系时，术语“有效连接的”指并列，其中这两种核酸区域所处关系允许它们以希望的方式发挥作用。例如与编码序列“有效连接”的控制序列以如此方式连接以至在与控制序列兼容的条件下，如当合适分子(例如诱导物和聚合酶)结合至一个或多个控制序列或调节序列时，实现编码序列的表达。

本文中可交换使用的术语“多肽”和术语“蛋白质”及“肽”指氨基酸的聚合物。示例性多肽包括基因产物、天然存在的蛋白质、同源物、直向同源物、侧向同源物、片段以及前述物质的其他等效物、变体和类似物。

用于指参考多肽时，术语“多肽片段”或“片段”指多肽，在其中当与参考多肽本身相比较时，氨基酸残基缺失，而剩余的氨基酸序列通常与参考多肽内的相应位置相同。这类缺失可以出现在参考多肽的氨基末端或羧基末端或备选地在两个末端上。片段一般是至少 5、6、8 或 10 个氨基酸长度、至少 14 个氨基酸长度、至少 20、30、40 或 50 个氨基酸长度、至少 75 个氨基酸长度或至少 100、150、200、300、500 个或更多个氨基酸长度。

片段可以保留参考多肽的一种或多种生物学活性。在某些实施方案中，片段可以包含具有所需生物学活性的结构域和任选位于结构域的一侧或两侧的额外氨基酸，其中所述的额外氨基酸可以是从5、10、15、20、30、40、50个或至多100个或更多数目的残基。此外，片段可以包括特定区域的亚片段，其中亚片段保留衍生自其的区域的功能。在另一实施方案中，片段可以具有免疫原性。

术语“本发明多肽”指含有主题氨基酸序列或其等效物或片段的多肽。本发明多肽包括包含主题氨基酸序列的全部或部分的多肽：具有1个至约2、3、5、7、10、15、20、30、50、75个或更多个保守性氨基酸置换的主题氨基酸序列；包括与主题氨基酸序列至少60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列，及其功能性片段。本发明多肽还包括主题氨基酸序列的同源物，例如直向同源物和侧向同源物。

还有可能为了如此目的而修饰本发明多肽的结构，如增强治疗性效力或预防效力或稳定性(例如离体(ex vivo)保存期、在体内蛋白酶解性降解抗性等)。如此修饰的多肽，当为了保留天然存在形式的蛋白质的至少一种活性而设计时，被视作本文中更详细描述的多肽的“功能性等效物”。可以产生如此修饰的多肽，例如通过氨基酸置换、缺失或添加，其中置换可以全部或部分地由保守性氨基酸置换组成。

例如，预计单独的保守性氨基酸置换如用异亮氨酸或缬氨酸替换亮氨酸、用谷氨酸替换天冬氨酸、用丝氨酸替换苏氨酸将不会明显影响所得的分子的生物学活性，这是合理的。多肽氨基酸序列中的变化是否产生功能性同源物可以通过评估变异多肽产生与野生型蛋白质的应答相似的应答的能力而轻易地确定，其中可以用相同方式轻易地测试已经发生多于一种替换的多肽。

术语“纯化的”指作为主导种类存在的目标种类(即基于摩尔，其丰度超过组合物内的其他各种类)。“纯化的级分”是组合物，在其中目标种类是全部存在种类的至少约50%(基于摩尔)。在进行溶液或分散体内某种类纯度的测定时，该测定通常不包括所述种类在其中溶解和分散的溶剂或基

质；相反，仅考虑已溶解或已分散的所述种类(包括目的种类)。通常，纯化的组合物将具有超过组合物内全部存在种类的约 80%、超过全部存在种类的约 85%、90%、95%、99%或更多的一个种类。目标种类可以纯化至其中组合物基本上是单一种类的基本均一性(不能在组合物内以常规检测方法检测到杂质种类)。本领域技术人员可基于本发明的教导，使用蛋白质纯化的标准技术纯化本发明的多肽。多肽的纯度可以通过本领域技术人员已知的众多方法测定，所述方法包括例如氨基末端氨基酸序列分析、凝胶电泳、质谱分析和本文中所述的方法。

术语“重组蛋白”或“重组多肽”指通过重组 DNA 技术产生的多肽。此类技术的实例包括如此例子，即将所表达蛋白质的编码 DNA 插入至合适表达载体内时，其中所述的合适表达载体随后用于转化宿主细胞以产生由该 DNA 所编码的蛋白质和多肽。

本说明书通篇所用的术语“调节序列”是指诸如启动信号、增强子、调节子和启动子的多核苷酸序列的上位术语，其需要或想要影响与该多核苷酸序列有效连接的编码序列或非编码序列的表达。示例性调节序列在 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA(1990)中描述并包括例如 SV40 的早期启动子和晚期启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、其表达受 T7 RNA 聚合酶指导的 T7 启动子、噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子区域、用于 fd 衣壳蛋白的控制区域、用于 3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶(例如 Pho5)的启动子、酵母 α -交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子，以及已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒基因表达的其他序列。此类控制序列的性质和用途可以根据宿主生物而变化。在原核生物中，此类调节序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。术语“调节序列”旨在至少包括其存在可以影响表达的成分并且还可以包括其存在是有利的额外成分，例如前导序列和融合配偶物序列。在某些实施方案中，多核苷酸序列的转录受控于控制该多核苷酸在如此细胞类型内表达的启动子序列(或其他调节序列)，

其中所述细胞类型内旨在所述的表达。还将理解多核苷酸可以受控于调节序列,其与控制多核苷酸的天然存在形式表达的那些调节序列相同或不同。

术语“序列同源性”指两种核酸序列间碱基匹配的比例或两种氨基酸序列间氨基酸匹配的比例。当序列同源性表述为百分数例如 50%时,该百分数指在来自与其他序列加以比较的所需序列中序列长度范围内的匹配比例。容许缺口(在两个序列中任意一个内)以使匹配最大化;通常使用 15 个碱基或更少的缺口长度,更常见使用 6 个碱基或更少的缺口长度、甚至常见使用 2 个碱基或更少的缺口长度。术语“序列同一性”意指序列在比较窗口范围内是相同的(即对于核酸是基于核苷酸对核苷酸,或对于多肽是基于氨基酸对氨基酸)。术语“序列同一性的百分数”通过在比较窗口范围内比较两个已优化比对的序列进行计算。确定在两个序列内均存在的相同氨基酸位置数或相同核苷酸位置数以产生匹配位置数,匹配位置数除以比较窗口内的总位置数,并将结果乘以 100 以产生序列同一性百分数。计算序列同一性的方法是本领域技术人员已知的并且进一步详述如下。

本文所用的术语“可溶的”涉及本发明多肽或其他蛋白质时,意指在细胞培养物内表达时,至少一些部分已表达的多肽或蛋白质停留在细胞的胞质部分内并且在裂解及离心裂解物时,不随细胞碎片发生分级。多肽的可溶性可以通过现有技术已确认的多种方法提高,所述方法包括与异源氨基酸序列融合、缺失氨基酸残基、氨基酸置换(例如在序列中增加具有亲水性侧链的氨基酸残基)和化学修饰(例如添加亲水性基团)。

多肽的可溶性可以通过多种现有技术已确认的方法测量,所述方法包括确定聚集状态的动态光散射、UV 吸收、旨在从非聚集材料中分离已聚集材料的离心,以及 SDS 凝胶电泳(例如比较可溶性部分内蛋白质的量与合并的可溶性部分及不溶性部分内蛋白质的量)。当在宿主细胞内表达时,本发明多肽可以是至少约 1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多可溶性的,例如,位细质部分内发现的细胞内已表达蛋白质的总量的至少约 1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些实施方案中,1 升

表达本发明多肽的细胞培养物将产生至少约 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50 毫克或更多的可溶性蛋白。在示例性实施方案中，本发明多肽是至少约 10 % 可溶性的并将从 1 升细胞培养物中产生至少约 1 毫克蛋白质。

术语“特异性地杂交”指可检测和特异性的核酸结合。在使与非特异核酸可估计量的可检测的结合最小化的杂交和洗涤条件下，本发明的多核苷酸、寡核苷酸及核酸与核酸链选择性杂交。可以使用严格条件来实现如本领域已知的并在本文中讨论的选择性杂交条件。通常，在本发明的多核苷酸、寡核苷酸及核酸与目的核酸序列之间的核酸序列同源性将是至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更高。在某些情况下，在根据常规杂交方法和如本文中进一步所述的严格条件下进行杂交和洗涤条件。

术语“严格条件”或“严格杂交条件”指促进两条互补性多核苷酸链间特异性杂交以至于形成双链体的条件。严格条件可以选择为比在定义离子强度和 pH 下的用于给定多核苷酸双链体的热解链点(T_m)低约 5°C。互补性多核苷酸链的长度及它们的 GC 含量将决定双链体的 T_m 并因此决定为获得想要的杂交特异性所必需的杂交条件。 T_m 是 50% 的多核苷酸序列杂交成为完全匹配互补链的温度(在定义离子强度和 pH 下)。在某些情况下，可能需要增加杂交条件的严格性至大约等同于特定双链体的 T_m 。

可以使用估计 T_m 的多种技术。一般，估计双链体内的 G-C 碱基对对 T_m 贡献约 3°C，而估计 A-T 碱基对贡献约 2°C，直至理论性最大值约 80-100°C。

然而，可使用更复杂的 T_m 模型，在其中考虑 G-C 堆积相互作用、溶剂效应、想要的测定温度等。例如，具有大约 60°C 解离温度(T_d)的探针可以使用式： $T_d = (((3 \times \#GC) + (2 \times \#AT)) \times 37) - 562) / \#bp - 5$ 设计；其中 #GC、#AT 和 #bp 分别是参与双链体形成的鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对数、腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基对数和总碱基对数。

杂交可以以 5×SSC、4×SSC、3×SSC、2×SSC、1×SSC 或 0.2×SSC 实

施至少约 1 小时、2 小时、5 小时、12 小时或 24 小时。可以增加杂交温度以调节反应的严格性，例如从约 25°C(室温)至约 45°C、50°C、55°C、60°C 或 65°C。杂交反应还可以包括影响严格性的另一种试剂，例如，在 50% 甲酰胺存在下实施的杂交增加在定义温度下的杂交严格性。

杂交反应可以后接单个洗涤步骤，或 2 个或多个洗涤步骤，这些步骤可为相同或不同的盐度和温度。例如，为调节严格性可以升高洗涤的温度从约 25°C(室温)至约 45°C、50°C、55°C、60°C、65°C 或更高。洗涤步骤可以在去污剂例如 0.1 或 0.2% SDS 存在下实施。例如，杂交可以后接 2 个在 65°C 的洗涤步骤，每个洗涤步骤在 2×SSC、0.1% SDS 中持续约 20 分钟并且任选地再有 2 个在 65°C 的额外洗涤步骤，每个洗涤步骤在 0.22×SSC、0.1% SDS 中持续约 20 分钟。

示例性的严格杂交条件包括 65°C 下在含有 50% 甲酰胺、10×Denhardt(0.2% Ficoll、0.2% 聚乙烯吡咯烷酮、0.2% 牛血清白蛋白)和 200 µg/ml 变性载体 DNA(例如剪切鲑精 DNA)的溶液中杂交过夜，随后是 2 个在 65°C 的洗涤步骤，每个洗涤步骤在 2×SSC、0.1% SDS 中持续约 20 分钟，以及 2 个在 65°C 的洗涤步骤，每个洗涤步骤在 0.22×SSC、0.1% SDS 中持续约 20 分钟。

杂交可以由在溶液中杂交两种核酸，或将溶液中的一种核酸杂交至另一种结合于固态支持物例如滤膜上的核酸组成。当一种核酸处于固态支持物上时，预杂交步骤可以在杂交前进行。预杂交可以在如杂交溶液那样的相同溶液及在相同温度下实施至少约 1 小时、3 小时或 10 小时(无互补性多核苷酸链)。

合适的严格条件是本领域技术人员已知的或可以由技术人员实验确定。参见，例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-12.3.6; Sambrook 等, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; S. Agrawal(编辑)*Methods in Molecular Biology*, 第 20 卷; Tijssen(1993)*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization With*

Nucleic Acid Probes, 例如第 2 章第 I 部分 “**Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays**”, Elsevier, New York 和 Tibanyenda, N.等, *Eur. J. Biochem.* 139:19(1984)以及 Ebel, S.等, *Biochem.* 31:12083(1992)。

术语“载体”指能够运输已经与之连接的另一种核酸的核酸。根据本发明可以使用的一种类型的载体是附加体, 即能够进行染色体外复制的核酸。其他载体包括能够自主复制并表达与之连接的核酸的那些载体。能够指导与之有效连接的基因表达的载体在本文中称作“表达载体”。通常, 重组技术中所用的表达载体常常是“质粒”形式, 所述质粒指在其载体形式时不与染色体结合的环状双链 DNA 分子。在本说明书中。“质粒”和“载体”可交换地使用, 因为质粒是最常使用的载体形式。然而, 本发明旨在包括此类其他形式的表达载体, 它们发挥等效功能并在本领域内是迄今已知的。

本发明的核酸可以用作诊断试剂以检测与其特异性结合的靶 DNA 或靶 RNA 序列的存在与否, 例如用于测定本发明核酸的表达水平。在一个方面, 本发明构思检测在样品内本发明核酸或其部分存在的方法, 该方法的步骤是: (a)提供长度为至少 8 个核苷酸的寡核苷酸, 该寡核苷酸与本发明核酸的部分互补; (b)使寡核苷酸与含有至少一种核酸的样品在允许此寡核苷酸与本发明核酸或其部分杂交的条件下接触; 和(c)检测寡核苷酸与样品内核酸的杂交, 因而检测在样品内本发明的核酸或其部分的存在。在另一方面, 本发明构思通过如此方式检测样品内本发明核酸或其部分存在的方法, 即(a)提供一对单链寡核苷酸, 其中每一单链寡核苷酸长度为至少 8 个核苷酸, 与本发明核酸的序列互补并且其中与寡核苷酸互补的序列间隔至少 10 个核苷酸; 和(b)使寡核苷酸与含有至少一种核酸的样品在杂交条件下接触; (c)扩增两条寡核苷酸引物间的核苷酸序列; 和(d)检测被扩增序列的存在, 因而检测样品内本发明的核酸或其部分的存在。

在本发明的另一方面, 本发明的多核苷酸在表达载体内提供, 所述表达载体含有编码本发明多肽的核苷酸序列并与至少一种调节序列有效连

接。应当理解的是表达载体的设计可能取决于如此因素，如待转化宿主细胞的选择和/或想要表达的蛋白质的类型。应当考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力和由载体编码的任何其他蛋白质如抗生素标记的表达。

含有本发明多核苷酸的表达载体随后可以用作药剂以治疗感染猪痢疾短螺旋体的动物，或作为疫苗(也是药剂)以防止动物感染猪痢疾短螺旋体，或旨在减少疾病症状和疾病过程，若该动物确实受到感染。使用表达载体作为药剂的一种方式施用核酸疫苗至有感染风险的动物或感染后的动物。在本领域内充分描述了核酸疫苗技术。一些描述可以在美国专利 6,562,376(Hooper 等)、美国专利 5,589,466(Felgner 等)、美国专利 6,673,776(Felgner 等)和美国专利 6,710,035(Felgner 等)内找到。核酸疫苗可以注射至肌肉或皮下，可以经电穿孔(见 WO 01/23537, King 等和 WO 01/68889, Malone 等)、经脂质组合物(见美国专利 5,703,055, Felgner 等)或本技术领域已知的其他机制进入动物。

表达载体还可以转染至细菌内，所述细菌可以施用至目标动物以诱导针对表达载体内含有的本发明核苷酸所编码的蛋白质的免疫应答。表达载体可以含有真核表达序列以至于在宿主动物内转录并翻译本发明的核苷酸。备选地，表达载体可以在细菌内转录并随后在宿主动物内翻译。用作表达载体的携带者的细菌应当是减毒的但仍有侵染性。可以使用已减毒的但仍有侵染性的志贺氏菌属某种(*Shigella* spp.)、沙门氏菌属某种(*Salmonella* spp.)、埃希氏菌属某种(*Escherichia* spp.)和气单胞菌属某种(*Aeromonas* spp.)，这里仅仅例举若干。这些方法的实例可以在美国专利 5,824,538(Branstrom 等)、美国专利 5,877,159(Powell 等)、美国专利 6,150,170(Powell 等)、美国专利 6,500,419(Hone 等)和美国专利 6,682,729(Powell 等)中找到。

备选地，可以将本发明的多核苷酸置于作为载体的某些病毒内。病毒载体可以将本发明的蛋白质表达在病毒表面上或携带本发明的多核苷酸进入动物细胞内，在其中多核苷酸转录并翻译成蛋白质。用病毒载体感染的动物可以发生针对本发明多核苷酸所编码蛋白质的免疫应答。因此。可以

减轻或预防在接受病毒载体的动物内由猪痢疾短螺旋体所致的感染。病毒载体的实例可以在美国专利 5,283,191(Morgan 等)、美国专利 5,554,525(Sondermeijer 等)和美国专利 5,712,118(Murphy)中找到。

本发明的多核苷酸可以用来引起本发明多肽在培养中繁殖的细胞内表达和过量表达，例如以产生蛋白质或多肽，包括融合蛋白或融合多肽。

本发明涉及用重组基因转染宿主细胞以表达本发明的多肽。宿主细胞可以是任意的原核细胞或真核细胞。例如，本发明多肽可以表达于细菌细胞内，如大肠杆菌、昆虫细胞(杆状病毒)、酵母、植物细胞或哺乳动物细胞内。在这些例子中，当宿主细胞是人细胞时，它可以位于活受体内或不在其中。本领域技术人员已知其他合适的宿主细胞。另外，宿主细胞可以补充宿主内通常找不到的 tRNA 分子以至于优化了多肽的表达。备选地，可以改变核苷酸序列以优化宿主细胞内的表达，所产生的蛋白质仍将具有与最初编码蛋白质的高度同源性。适用于最大化表达多肽的其他方法将是本领域技术人员已知的。

本发明还涉及产生本发明多肽的方法。例如可以在允许多肽表达发生的合适条件下培养宿主细胞，其编码本发明多肽的表达载体转染。多肽可以被分泌并从细胞与含有该多肽的培养基的混合物中分离。备选地，多肽可以停留在细胞质内，并收获、裂解细胞以及分离蛋白质。

细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的合适培养基在本领域众所周知。多肽可以使用本领域已知用于纯化蛋白质的技术从细胞培养基、宿主细胞或该两者中分离，所述的技术包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳及用针对本发明多肽中特定表位呈特异性的抗体的免疫亲和纯化。

因此，编码本发明多肽的全部或所选择部分的核苷酸序列可以用来通过微生物细胞过程或真核细胞过程产生重组形式的蛋白质。标准方法是将序列连接到多核苷酸构建体如表达载体，并转化或转染至宿主即真核宿主(酵母、鸟、昆虫或哺乳动物)或原核宿主(细菌细胞)内。类似的方法或其改良可以用来通过微生物手段或组织培养技术制备本发明的重组多肽。

用于表达本发明多肽的合适载体包括如下类型的质粒：用于原核细胞如大肠杆菌内表达的 pTrcHis 衍生性质粒、pET 衍生性质粒、pBR322 衍生性质粒、pEMBL 衍生性质粒、pEX 衍生性质粒、pBTac 衍生性质粒和 pUC 衍生性质粒。在制备质粒和转化宿主生物中使用的多种方法在本领域众所周知。关于同时适用于原核细胞和真核细胞的其他合适表达系统以及通用重组方法，见 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第二版，编者 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，第 16 和 17 章。

目的多肽的编码序列可以作为包括编码不同多肽的核苷酸序列的融合基因的部分并入。本发明构思含有本发明核酸和编码异源肽的至少一种异源序列的分离的多核苷酸，其中所述的异源序列符合读框地与本发明核酸的核苷酸序列连接，以至于编码含有异源多肽的融合蛋白。异源多肽可以与(a)本发明多肽的羧基末端、(b)本发明多肽的氨基末端或(c)本发明多肽的羧基末端及氨基末端融合。在某些情况下，异源序列编码这样的多肽，该多肽允许检测、分离、增溶与该多肽融合的多肽，和/或使与该多肽融合的多肽稳定化。在其他实施方案中，异源序列编码多肽，如多 His 标签、myc、HA、GST、蛋白 A、蛋白 G、钙调蛋白结合肽、硫氧还蛋白、麦芽糖结合蛋白、多精氨酸、多 His-Asp、FLAG、免疫球蛋白的部分和胞运肽。

在需要产生本发明多肽的免疫原性片段时，可以使用融合表达系统。例如，可以使用轮状病毒的 VP6 衣壳蛋白作为多肽部分的免疫载体蛋白，其为单体形式或是病毒颗粒形式。与待产生针对性抗体的本发明多肽的部分相对应的核酸序列可以引入到融合基因构建体内，所述融合基因构建体包含用于痘苗病毒晚期结构蛋白的编码序列，以产生使包含本发明蛋白质的部分的融合蛋白作为病毒粒子的部分进行表达的一组重组病毒。乙型肝炎表面抗原也可以以此目的使用。类似地，可以产生嵌合构建体以增强免疫原性，其中该嵌合构建体编码含有本发明多肽的部分及脊髓灰质炎病毒衣壳蛋白的融合蛋白(见，例如欧洲专利公开号：0259149 和 Evans 等,(1989)*Nature* 339:385; Huang 等,(1988)*J. Virol.* 62:3855 和 Schlienger

等,(1992)J. Virol. 66:2).

融合蛋白可以辅助表达和/或纯化蛋白质。例如,本发明多肽可以作为谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白生成。这类 GST 融合蛋白可以用来简化本发明多肽的纯化,如通过利用谷胱甘肽-衍生化基质(见,例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, 编者 Ausubel 等(N. Y.: John Wiley & Sons, 1991))。在另一实施方案中,编码纯化用前导序列(如重组蛋白中所需部分氨基末端上的多-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可以允许使用 Ni^{2+} 金属树脂通过亲和层析纯化已表达的融合蛋白。纯化用前导序列随后可以通过用肠激酶处理除去,以提供纯化的蛋白质(例如见 Hochuli 等,(1987) *J. Chromatography* 411: 177; 和 Janknecht 等,PNAS 美国 88:8972)。

用于产生融合基因的技术是众所周知的。基本上,根据常规技术进行编码不同多肽序列的多种 DNA 片段的连接,即采用用于连接的平末端或交错末端,限制酶消化以提供合适末端,根据需要补平粘端,碱性磷酸酶处理以避免不想要的连接以及酶连接。在另一实施方案中,融合基因可以通过包括自动 DNA 合成仪在内的常规技术合成。备选地,基因片段的 PCR 扩增可以使用在连续的两个基因片段间产生互补突出端的锚式引物实施,其中所述的两个基因片段随后可以复性以生成嵌合的基因序列(见,例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, 编者 Ausubel 等, John Wiley & Sons: 1992)。

在其他实施方案中,本发明提供固定在固态表面上的本发明核酸,所述的固态表面包括平板、微量滴定平板、载玻片、小珠、颗粒、球、膜、链、沉淀、凝胶、薄片、管、容器、毛细管、贴片、条等。本发明的核酸可以固定于芯片上作为阵列的部分。该阵列可以含有如本文所述的一种或多种本发明多核苷酸。在一个实施方案中,芯片含有一种或多种本发明多核苷酸作为来自如本发明多核苷酸的相同致病物种内的多核苷酸序列阵列的部分。

在本发明的优选形式中,提供如本文所述的分离的猪痢疾短螺旋体多肽并且还提供编码这些多肽的多核苷酸序列。更希望的是以基本上纯化的形

式提供猪痢疾短螺旋体多肽。

本发明的优选多肽将具有全长天然多肽的一种或多种生物学特性(例如体内特性、体外特性或免疫特性)。本发明的范围还包括非功能性多肽,因为它们可以用作例如功能性多肽的拮抗剂。可以测定与野生型相关的类似物、片段或衍生物的生物学特性,例如通过生物学测定手段。

多肽,包括类似物、片段和衍生物,可以合成性地制备(例如使用众所周知的固相或液相肽合成技术)。优选使用固相合成技术。备选地,本发明多肽可以是使用众所周知的基因工程技术制备,如下文所述。在另一实施方案,多肽可以(例如通过免疫亲和纯化)从中纯化,该生物学流体例如但不限于来自动物的血浆、粪便、血清或尿,其中所述的动物包括但不限于猪、鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、人、猴、狗、猫、马、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、牛和绵羊。动物可以是任意的哺乳动物或鸟。

猪痢疾短螺旋体多肽类似物包括具有如此氨基酸序列的那些多肽,其中一个或多个氨基酸用其他氨基酸置换,所述置换基本不改变分子的生物学活性。

根据本发明,重组或通过化学合成产生的本发明多肽和其片段或其他衍生物或类似物,包括融合蛋白,可以用作免疫原以生成识别该多肽的抗体。

当分子能够特异相互作用于免疫系统的抗原识别分子如免疫球蛋白(抗体)或 T 细胞抗原受体时,该分子有“抗原性”。抗原性氨基酸序列含有至少约 5 个并优选至少约 10 个氨基酸。分子的抗原性部分可以是对抗体识别或 T 细胞受体识别呈免疫优势的部分,或其可以是这样的部分,其中通过使抗原性部分缀合至用于免疫的载体分子而使用该部分以生成针对该分子的抗体。具有抗原性的分子本身不需要是免疫原性的,即能够在载体不存在下激发免疫应答。

“抗体”是结合特异性表位的任何免疫球蛋白,包括抗体及其片段。该术语包括多克隆抗体、单克隆抗体和嵌合抗体以及抗体的抗原结合部分,其中提及的嵌合抗体在美国专利号 4,816,397 和 4,816,567 中进一步详述,

所述抗原结合部分包括 Fab、F(ab')₂ 和 F(v)(包括单链抗体)。因此如本文中用于多种语法形式的短语“抗体分子”构思完整的免疫球蛋白分子及含有抗体结合位点的免疫球蛋白分子的免疫活性部分。“抗体结合位点”是抗体分子的结构性部分，其由重链区和轻链区及特异性结合抗原的高变区构成。

示例性的抗体分子是完整的免疫球蛋白分子、基本上完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子中含有互补位的那些部分，包括本领域称作 Fab、Fab¹、F(ab')₂ 和 F(v)的那些部分，这些部分优选用于本文中所述的治疗性方法内。

抗体分子的 Fab 和 F(ab')₂ 部分经众所周知的方法，各自通过由木瓜蛋白酶和胃蛋白酶在基本完整的抗体分子上的蛋白水解反应制备。见，例如 Theofilopoulos 等的美国专利号 4,342,566。Fab' 抗体分子部分也是众所周知的，从 F(ab')₂ 部分中随后用巯基乙醇使连接两个重链部分的二硫键还原，然后用还原剂(如碘乙酰胺)烷基化所得蛋白质硫醇而产生。本文中优选含有完整抗体分子的抗体。

处于多种语法形式的短语“单克隆抗体”指仅具有一种能够与特定抗原发生免疫反应的抗体结合位点的抗体。单克隆抗体因此通常显示对该单克隆抗体与之发生免疫反应的任何抗原的单一结合亲和力。单克隆抗体可以因此含有具备多种抗体结合位点的抗体分子，其中每一抗体结合位点对不同抗原呈免疫特异性；例如双特异性(嵌合)单克隆抗体。

术语“佐剂”指增强对抗原的免疫应答的化合物或混合物。佐剂可以作为缓慢释放抗原的组织储存佐剂并且还作为非特异性增强免疫应答的淋巴系统活化剂发挥作用[Hood 等在 Immunology, 第 384 页, 第二版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California(1984)]。在无佐剂下单用抗原的初次免疫往往不能激发体液或细胞免疫应答。佐剂包括但不限于弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、皂苷、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血磷脂酰胆碱、多聚醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油或烃乳状液、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和人可能使用的佐剂如 BCG(Bacille de

Calmette-Guérin)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)。优选地,佐剂是可药用的。

本领域已知的多种方法可以用于产生抗本发明多肽的多克隆抗体。为产生抗体,多种宿主动物可以通过注射本发明多肽加以免疫,所述宿主动物包括但不限于兔、小鼠,大鼠、绵羊、山羊等。在一个实施方案,本发明多肽可以缀合至免疫原性载体,例如牛血清白蛋白(BSA)或匙孔血蓝蛋白(KLH)。多种佐剂可以用来提高免疫应答,所述佐剂根据宿主种类包括但不限于弗氏(完全和不完全)佐剂、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血磷脂酰胆碱、多聚醇、聚阴离子、肽、油乳状液、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和人可能使用的佐剂如 BCG 和小棒杆菌。

为产生抗本发明多肽的单克隆抗体,可以使用通过连续传代细胞系培养产生抗体分子的任何技术。这些技术包括但不限于最初由 Kohler 等,(1975)*Nature*, 256:495-497 开发的杂交瘤技术、三瘤体技术、人 B-细胞杂交瘤技术[Kozbor 等,(1983)*Immunology Today*, A:12]和旨在产生人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术[Cole 等,(1985)在 *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 第 77-96 页, Alan R. Liss, Inc.]。永生性抗体产生细胞系可以通过除融合法之外的技术创造,如用致癌 DNA 直接转化 B 淋巴细胞或用 Epstein-Barr 病毒的转染。见,例如美国专利号 4,341,761、4,399,121、4,427,783、4,444,887、4,451,570、4,466,917、4,472,500、4,491,632 和 4,493,890。

在本发明另一实施方案中,单克隆抗体可以利用最新技术在无菌动物内产生。根据本发明,可以使用鸡抗体或猪抗体,并该抗体可以通过使用鸡杂交瘤或猪杂交瘤或通过体外用 EBV 病毒转化 B 细胞得到。实际上根据本发明,可以使用为如此产生“嵌合抗体”而开发的技术[Morrison 等,(1984)*J. Bacteriol.*, 159-870; Neuberger 等,(1984)*Nature*, 312:604-608; Takeda 等,(1985)*Nature*, 314:452-454],其中所述的嵌合抗体通过将来自对本发明多肽特异的小鼠抗体分子的基因与来自具有合适生物学活性的抗体分子地基因剪接在一起而产生,本发明的范围包括此类抗体。此类嵌合抗

体优选用于治疗肠道疾病或功能紊乱(描述见下),因为在特定变态反应中这类抗体本身诱导免疫应答的可能性比异种抗体更小。

根据本发明,所述用于产生单链抗体的技术(美国专利 4,946,778) 可适用于产生对本发明多肽特异性的单链抗体。本发明另一实施方案利用所述用于构建 Fab 表达文库的技术[Huse 等,(1989)Science, 246:1275-1281]以允许快速而简单地鉴定对本发明多肽具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

含有抗体分子独特型的抗体片段可以通过已知技术产生。例如,此类片段包括但不限于:可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段;可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab' 片段以及可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段。

在抗体产生中,筛选所需要的抗体可以通过本领域已知技术完成,例如放射免疫测定、ELISA、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定(例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记)、Western 印迹、沉淀反应、凝集测定(例如凝胶凝集测定、血细胞凝集测定)、补体结合测定、免疫荧光测定、A 蛋白测定、免疫电泳测定等。在一个实施方案中,通过检测在第一抗体上的标记而检测抗体的结合。在另一实施方案,通过检测第二抗体或试剂对第一抗体的结合而检测第一抗体。在另一实施方案中,第二抗体经过标记。用于检测在免疫测定中结合作用的多种手段是本领域已知的并且处于本发明的范围内。例如为选择可识别本发明多肽的特异性表位的抗体,可以对已生成的杂交瘤测定与含有如此表位的本发明多肽片段相结合的产物。

本发明还包括旨在使用本发明多肽和/或结合至本发明多肽的抗体检测猪痢疾短螺旋体存在的诊断及预测方法,以及用于诊断和预测猪痢疾短螺旋体感染的试剂盒。

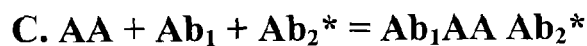
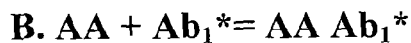
诊断及预测方法通常将使用从动物如鸡或猪中获得的生物样品进行。“样品”指怀疑含有短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋体或其多核苷酸或其多肽的动物组织或动物流体。此类组织或流体的实例包括但不限于血浆、血清、粪便材料、尿、肺、心脏、骨骼肌、胃、肠道和体外细胞培养成分。

本发明提供用于检测样品内本发明多肽存在的方法，步骤如下(a)使怀疑含有本发明多肽的样品与抗体在允许形成包含该抗体和本发明多肽的反应复合物的条件下接触，其中所述抗体与本发明多肽(优选结合于固态支持物)特异性结合；和(b)检测样品内包含抗体和本发明多肽的反应复合物的形成，其中检测到反应复合物的形成表示样品内存在本发明的多肽。

优选地，该方法内所用的抗体衍生自亲和纯化的多克隆抗体并且更优选是单克隆抗体。此外，优选本文中所用的抗体分子处于 Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 F(v)部分或完整抗体分子的形式。

基于以上方法检测猪痢疾短螺旋体的特别优选方法包括酶联免疫吸附测定法、放射免疫测定、免疫放射测定和免疫酶测定，包括使用单克隆抗体和/或多克隆抗体的夹心测定法。

尤其有用的这样三种方法利用了用可检测标记物标记的本发明多肽(或其片段)、用可检测标记物标记的抗体 Ab₁ 或用可检测标记物标记的抗体 Ab₂。该方法可以由如下等式概述，其中星号表示颗粒经过标记并且“AA”代表本发明的多肽：



这些方法和它们的应用均是本领域技术人员熟悉的并且因此可以在本发明的范围内利用。“竞争性”方法即方法 A 在美国专利号 3,654,090 和 3,850,752 内描述。方法 B 是众所周知的竞争性测定技术的代表。方法 C 即“夹心”方法在美国专利号 RE 31,006 和 4,016,043 内描述。其他方法也是已知的并可以利用，如“双抗体”或“DASP”方法。

在任何情况下，本发明的多肽与一种或多种抗体或结合配偶物形成复合物并且复合物中的一个成员用可检测标记物标记。即复合物已经形成，并且根据需要，复合物的量可以通过可用于检测标记物的已知方法确定。

从上述将看出，Ab₂的特征性特点在于它将 Ab₁ 反应。该反应是因为在一种哺乳动物物种内所产生的 Ab₁ 已经用作另一物种内的抗原以产生抗

体 Ab₂。例如 Ab₂ 可以使用兔抗体作为抗原在山羊内产生。因此，Ab₂ 是在山羊内产生的抗兔抗体。为本说明书和权利要求书的目的，Ab₁ 将称作第一抗体，并且 Ab₂ 将称作第二抗体或抗 Ab₁ 抗体。

这些研究最通常使用的标记物是放射性元素、酶、当暴露于紫外线时发荧光的化学品和其他物质。能够作为标记物利用的荧光物质的实例包括荧光素、罗丹明和金胺。特定检测物质是在山羊内制备并与荧光素经异硫氰酸盐缀合的抗兔抗体。优选同位素的实例包括 ³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I 和 ¹⁸⁶Re。放射性标记可以通过目前可用的任何计数方法检测。在可以使用多种酶的同时，优选的酶实例是过氧化物酶、β-葡糖醛酸酶、β-D-葡糖苷酶、β-D-半乳糖苷酶、脲酶、葡糖氧化酶加上过氧化物酶，以及碱性磷酸酶。酶通过桥接分子如碳二亚胺、二异氰酸酯、戊二醛等缀合至所选择的颗粒。酶标记物可以通过目前采用的任何比色技术、分光光度技术、荧光分光光度技术、电流分析技术或气体分析技术 (gasometric) 检测。参考美国专利号 3,654,090、3,850,752 和 4,016,043 例如对替代性标记材料和方法的公开。

本发明还提供检测生物样品内抗本发明多肽的抗体的方法，其使用如下步骤：(a) 提供本发明的多肽或其片段；(b) 将生物样品与所述的本发明多肽在允许形成抗体-抗原复合物的条件下温育；和(c) 确定是否形成具有本发明多肽的抗体-抗原复合物。

在本发明的另一实施方案中，提供用于评测生物样品内抗本发明多肽抗体的水平的体外方法，其使用如下步骤：(a) 根据上述方法检测在生物样品内反应复合物的形成；和(b) 评测已形成的反应复合物的量，其中反应复合物的量与生物样品内抗本发明多肽抗体的水平对应。

本发明还提供用于监测治疗性治疗动物宿主内与猪痢疾短螺旋体相关的疾病的体外方法，即通过如上所述评测在系列生物样品内的抗本发明多肽抗体的水平，其中所述的系列生物样品在不同时间点上从接受所述治疗性治疗的动物宿主获得。

本发明还提供检测生物样品内猪痢疾短螺旋体存在或不存在的方法，

即通过：(a)使生物样品与本发明多核苷酸的多核苷酸探针或引物在合适杂交条件下接触；和(b)检测在探针或引物与样品内的核酸间所形成的任何双链体。

本发明的一个实施方案中，猪痢疾短螺旋体的检测可以如此完成，即使用已知技术，通过直接扩增来自生物样品的多核苷酸序列，并随后检测本发明多核苷酸序列的存在。

在本发明的一个形式中，靶核酸序列通过 PCR 法扩增和随后使用以上提及的任何特异性方法检测。用于检测多核苷酸序列存在的其他诊断性技术包括但不限于：1)等位基因特异性 PCR；2)单链形态分析；3)变性梯度凝胶电泳；4)RNA 酶保护测定；5)使用识别核苷酸错配的蛋白质如大肠杆菌 mutS 蛋白质；6)等位基因特异性寡核苷酸和 7)荧光原位杂交。

除以上方法之外，多核苷酸序列还可以使用常规探针技术检测。当使用探针来检测所需的多核苷酸序列的存在时，根据需要可以处理待分析的生物样品如血液或血清以提取核酸。样品多核苷酸序列可以按照多种促进靶序列检测的方式制备；例如变性、限制性消化、电泳或点印迹。样品多核苷酸序列中的目标区域通常必须至少部分是单链，以便与探针的目标序列形成杂交体。若序列天然是单链的，则无需变性。然而，若序列是双链的，可能需要使序列变性。变性可以通过本领域已知的多种技术实施。

样品多核苷酸序列和探针在促进探针内的靶序列与样品内的推定所需多核苷酸序列形成稳定杂交体的条件下温育。优选地，使用高严格条件以预防假阳性。

检测产生的杂交体(若存在)通常利用标记探针完成。备选地，探针可以是非标记的，但是可以因与标记的配体直接或间接特异性结合而是可检测的。用于标记探针和配体的合适标记物和方法是本领域已知的，并包括例如可以通过已知方法(例如切口平移、随机引发或激酶法)引入放射性标记物、生物素、荧光基团、化学发光基团(例如二氧杂环丁烷、特需触发的二氧杂环丁烷)、酶、抗体等。这种基本方案的变通方案在本领域是已知的，并包括促进从外来物中分离待监测的杂交体的变通方案或促进扩增标记部

分的信号的变通方案。

在本发明的范围内还构思本发明的核酸探针测定法可以采用能够检测所需要的本发明多核苷酸序列的核酸探针的混合物。因此，在检测在细胞样品内的本发明多核苷酸序列存在的实例中，使用与多核苷酸序列互补的多于一种的探针并且不同探针的数目尤其备选是 2、3 或 5 个不同核酸探针序列。

本文中所述的多核苷酸序列(优选处于探针形式)还可以固定在固态支持物上，以便检测短螺旋体属物种，其包括但不限于猪痢疾短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体。备选地，本文中所述的多核苷酸序列将构成可以用来同时检测来自短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋体的大量不同基因的 DNA 分子文库的部分。在本发明的另一变化形式中，本文中所述的多核苷酸序列连同其他多核苷酸序列(如来自细菌或病毒的多核苷酸序列)可以按照如此方式固定于固态支持物上，其中所述的方式允许鉴定短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋体的存在，和/或鉴定结合在固态支持物上的任何其他多核苷酸序列。

用于产生 DNA 分子的固定化文库的技术已经在现有技术中描述。通常，绝大部分现有技术方法描述单链核酸分子文库的合成，使用例如掩蔽技术以便在固体基质多个隔开的位置上建立序列的多种排列。美国专利号 5,837,832 描述了基于超大规模整合技术的用于产生固定至硅基质上的 DNA 阵列的改良方法。美国专利号 5,837,832 特别描述了称作“覆盖”的策略以在可以用来产生本发明固定化 DNA 文库的基质上已空间定义的位置内合成特异性探针组。美国专利号 5,837,832 还提供对仍可以使用的较早技术的参考。因此多核苷酸序列探针可以在基质的表面上原位合成。

备选地，单链分子可以脱离固体基质合成并且预先形成的每种序列可以施加至固体基质上分隔的位置内。例如，使用配备针式装置或压电 (pizo-electric) 装置的机器人设备，可以将多核苷酸序列直接印刷在基质上。

文库序列通常固定在固体基质的分隔区域表面或其内部。基质可以是多孔的，以允许在基质内部的固定，或基本上是无孔的，此时文库序列通常固定在基质的表面。固体基质可以直接或间接地由可结合于多肽的任何材料制成。合适的固体基质的实例包括平板玻璃、硅片、云母、陶瓷和有机聚合物如塑料，包括聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸酯。还可能使用可广泛获得的半透膜，如硝酸纤维素膜或尼龙膜。半透膜可以固定在更坚固的固态表面上，如玻璃。该表面可以任选地以金属层包被，如金、铂或其他过渡金属。

优选地，固体基质通常是具有硬表面或半硬表面的材料。在优选的实施方案中，基质的至少一个表面是基本平整的，尽管在一些实施方案中，可能需要例如用升高的区域或蚀刻沟将用于不同聚合物的合成区域物理分隔。还优选固体基质适用于在通常 50 至 100 μm 的分隔区域内高密度施加 DNA 序列，产生 10000 至 40000 个点/ cm^2 的密度。

将固体基质方便地划分成部分。这可以通过如光蚀刻技术或通过使用疏水性墨水例如基于聚四氟乙烯墨水(Cel-line, 美国)来实现。

在其中存在每一不同文库成员的分隔位置可以具有任何方便的形状，例如圆形、矩形、椭圆形、楔形等。

多核苷酸序列可以通过共价方法或非共价方法附着至基质。多核苷酸序列可以通过结合文库序列的分子层附着至基质。例如，多核苷酸序列可以用生物素加以标记并且基质用抗生物素蛋白和/或链亲和素包被。使用生物素化多核苷酸序列的便利特征是可以轻易地测定偶联至固体基质的效率。由于多核苷酸序列可能与一些固体基质结合很差，经常需要在固体基质(如在玻璃的例子中)和核酸序列之间提供化学界面。合适化学界面的实例包括六甘醇。另一实例是利用聚赖氨酸包被的玻璃，随后使用导入亲和配体的标准方法化学修饰聚赖氨酸。利用偶联剂将分子附着至固体基质表面的其他方法是本领域已知的，见，例如 WO98/49557。

可以通过多种方法测定互补性多核苷酸序列与固定化核酸文库的结合，如结合的多核苷酸序列光学特征的变化(即通过使用溴化乙锭)或通过

使用标记的核酸，如用荧光团标记的多肽。不需要使用标记物的其他检测技术包括光学技术，如光声法、反射测量术、椭圆测量术和表面等离子体共振法(见 WO97/49989)。

因此，本发明提供已将至少一种本发明的多核苷酸、优选两种或多种本发明不同的多核苷酸序列在其上面固定的固体基质。

本发明还可以用作预防或治疗，其可以用于刺激动物如鸡和猪内的体液应答和细胞介导性应答的目的，因而提供防止短螺旋体属物种建群的保护，所述的短螺旋体属物种包括但不限于猪痢疾短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体。短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋体的自然感染诱导了针对本文中所述蛋白质的循环抗体滴度。因此，本文中所述的氨基酸序列或其部分具有形成可提供抗猪痢疾保护的全身施用或口服施用预防剂治疗剂的基础的潜力。

因此，在一个实施方案中，本发明提供与可药用载体、稀释剂或赋形剂预先混合的治疗有效量的本文中所述氨基酸序列或其部分或结合该氨基酸序列的抗体或本文中所述的多核苷酸序列。

短语“治疗有效量”用于本文中意指这样的量，其足以至少约 15%、优选至少 50%、更优选至少 90%减少并且最优选预防在动物宿主活力、功能和应答方面的临床明显缺乏。备选地，治疗有效量足以导致改善动物宿主内的明显临床状况。

短语“可药用的”指这样的分子实体和组合物，当施用于动物时，其是可生理忍受的并且通常不产生变态反应或类似不良反应，如心嘈(gastric upset)等。术语“载体”指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药用载体 可以是无菌液体如水和油，包括石油来源、动物来源、植物来源或合成来源的那些油、如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油水溶液优选用作载体，特定用于注射溶液。合适的药用载体在 Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co., Easton, PA,(1990)中描述。

在本发明的更具体形式中，提供药物组合物，其包含治疗有效量的本

文中所述氨基酸序列或其类似物、片段或衍生性产物或其抗体，以及可药用稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。此类组合物包括多种缓冲内容物(例如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH 和离子强度的稀释剂和添加剂，如去污剂和增溶剂(例如 Tween 80、多乙氧基醚)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠)、防腐剂(例如硫柳汞、苜醇)和填充物质(例如乳糖、甘露糖醇)。可以将原料引入聚合化合物如聚乳酸、聚乙醇酸等的特定制品内或引入脂质体内。还可以使用透明质酸。此类组合物可以影响本发明蛋白质和衍生物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。见，例如在本文中引用作为参考的 Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版(1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)第 1435-1712 页。组合物可以制备为液体形式或可以是干燥粉末如冻干形式。

备选地，可以优化本发明的多核苷酸用于在植物(例如玉米(corn))内表达。植物可以用含有优化的多核苷酸的质粒转化。随后培育该植物，并且本发明的蛋白质表达于植物内，或该蛋白质的植物优化形式得到表达。随后收获植物并且将含有本发明蛋白质的植物部分加工成动物的饲料。该动物饲料将在动物摄入时赋予抗猪痢疾短螺旋体免疫性。详细描述这些方法的现有技术实例可以在美国专利 5,914,123(Arntzen 等)、美国专利 6,034,298(Lam 等)和美国专利 6,136,320(Arntzen 等)内找到。

将认识的是可以通过本领域已知的任何手段施用本发明所提供的药物组合物。优选地，通过注射、口服或通过肺途径或鼻途径施用用来施用的药物组合物。更优选通过静脉内、动脉内、腹膜内、肌内或皮下施用途径递送本文中所述的氨基酸序列或衍生自其中的抗体。备选地，可以通过鼻施用法或口服施用法施用正确配制的本文中所述的氨基酸序列或衍生自其中的抗体。

本发明还包括本发明多核苷酸序列以及与编码本发明氨基酸序列的多核苷酸序列可杂交的反义多核苷酸序列和核酶多核苷酸序列的用途，其用于制备调节猪痢疾短螺旋体相关疾病的药物。

想要的是直接施用作为裸核酸构建体的编码用于治疗性方法内的反义

构建体或核酶的多核苷酸序列。通过数种已知的转染技术(例如那些包括利用转染剂的转染技术)增强细菌细胞对裸核酸构建体的摄取。这些转染剂的实例包括阳离子物质(例如磷酸钙和 DEAE-葡聚糖)和 lipofectant。通常,混合核酸构建体与转染剂以产生组合物。

备选地,反义构建体或核酶可以与可药用载体或稀释剂组合以产生药物组合物。合适的载体和稀释剂包括等渗盐溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。组合物可以配制用于肠胃外、肌内、静脉内、皮下、眼内、口服或透皮施用。所述的施用途径仅作为指导,因为本领域从业者能够轻易地确定用于任何特定动物和条件的最佳施用途径及任意剂量。

本发明还包括用于筛查怀疑感染短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋体的动物,或证实动物已感染短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋体的试剂盒。在本发明的另一实施方案中,可以制备适合于专科医生使用的试剂盒以确定怀疑感染的动物内存在或不存在短螺旋体属物种,所述短螺旋体属物种包括但不限于猪痢疾短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体,或定量测量短螺旋体属物种(包括但不限于猪痢疾短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体和多毛短螺旋体)感染。根据以上所讨论的试验技术,此类试剂盒可以含有至少一种经标记形式的本文中所述氨基酸序列或其结合配偶物,例如其特异性抗体,和根据所选择方法如例如“竞争法”、“夹心法”“DASP法”等的说明书。备选地,此类试剂盒可以含有与本文中所述多核苷酸序列之一的部分为互补的至少一种多核苷酸序列及其使用的操作说明书。试剂盒还可以含有附属试剂如缓冲液、稳定剂等。

因此,用于证实短螺旋体属物种(包括但不限于猪痢疾短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体)存在的试验试剂盒可以含有如下成分:

(a) 事先确定量的至少一种标记的免疫化学活性成分,其通过本文中所述氨基酸序列之一或其特异性结合配偶物直接或间接地连接至可检测标记物而获得;

(b) 其他试剂；和

(c) 所述试剂盒使用的说明书。

更具体地，诊断试剂盒可以含有：

(a) 已知量的本文以上所述氨基酸序列之一(或结合配偶物)，其通常与固相结合以构成免疫吸附剂，或与合适的标签结合，或存在多种此类终产物等；

(b) 根据需要，其他试剂；和

(c) 所述试剂盒使用的说明书。

在另一变通方案中，试剂盒可以含有：

(a) 标记的成分，其通过本文中所述的氨基酸序列之一与可检测标记物偶联而获得；

(b) 一种或多种额外的免疫化学试剂，其中至少一种试剂是配体或固定的配体，所述配体选自：

(i) 能够与标记的成分(a)结合的配体；

(ii) 能够与标记成分(a)的结合配偶物结合的配体；

(iii) 能够与至少一种待确定成分结合配体；或

(iv) 能够与至少一种待确定成分的结合配偶物结合的配体；和

(c) 用于实施方案的说明书，其中所述方案旨在检测和/或确定在本文中所述氨基酸序列之一与其特异性结合配偶物之间的免疫化学反应的一种或多种成分。

制备基因组文库

使用猪痢疾短螺旋体的澳大利亚猪野毒株(field isolate, 株 WAI)制备基因组文库。该株已充分表征并在猪的实验性攻击后证实是有毒力的。使用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)方法制备合适用于制备基因组 DNA 文库的高质量染色体 DNA。猪痢疾短螺旋体在 100 ml 厌氧性胰酪豆胨培养基内培养至细胞密度为 10^9 个细胞/ml。细胞在 $4,000\times g$ 离心 10 分钟收获并且将细胞沉淀重悬于 9.5 ml TE 缓冲液内。添加 SDS 至终浓度 0.5 % (w/v) 并且细胞用 100 μg 蛋白酶 K 在 37°C 裂解 1 小时。添加 NaCl 至终浓度 0.7 M,

并且在 65°C 温育溶液 20 分钟之前, 添加 1.5 ml CTAB/NaCl 溶液(10% w/v CTAB, 0.7 M NaCl)。裂解物用等体积的氯仿/异戊醇提取, 并且将管在 6,000×g 离心 10 分钟以使相分离。将水相转移至干净的管内并添加 0.6 体积异丙醇至高分子量 DNA 沉淀出来。沉淀的 DNA 使用钩头玻璃棒收集并转移至含有 1 ml 70 % (v/v) 乙醇的管内。该管在 10,000×g 离心并且将沉淀的 DNA 再溶解于 4 ml TE 缓冲液内过夜。使用再溶解的 DNA 溶液制备含有 1.05 g/ml CsCl 和 0.5 mg/ml 溴化乙锭的氯化铯梯度。将该梯度转移至 4 ml 可封口的离心管内并在 15°C 在 70,000×g 离心过夜。在紫外线下观察分离的 DNA 并使用 15 号针从梯度中抽出高分子量 DNA。通过用 CsCl-饱和的异丙醇连续提取从 DNA 中除去溴化乙锭。将纯化的染色体 DNA 用 2 升 TE 缓冲液透析并用异丙醇沉淀。使用 GeneMachines Hydroshear(Genomic Solution, Ann Arbor, MI)剪切重悬的基因组 DNA 并且使用 Klenow DNA 聚合酶补平剪切的 DNA 以生成平端片段。使用 CloneSmart DNA 连接酶将 100 ng 平端 DNA 片段与 25 ng 的 pSMART VC 载体(Lucigen, Meddleton, WI)连接。连接的 DNA 随后电穿孔进入大肠杆菌电感受态细胞。将小的插入物(2-3 kb)文库和中等插入物(3-10 kb)文库构建成低拷贝形式的 pSMART VC 载体。

基因组测序

在获得基因组文库后, 挑取含有 pSMART VC 载体大肠杆菌的单个克隆。纯化质粒 DNA 并测序。使用对 pSMART VC 载体特异的正向引物和反向引物, 使纯化的质粒接受 pSMART VC 载体的自动化直接测序法处理。每一测序反应均在由 200 ng 质粒 DNA、2 pmol 引物和 4 µl ABI PRISM™ Big Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)组成的 10 µl 体积内进行。循环条件包括在 96°C 的 2 分钟变性步骤, 随后 25 个循环为 96°C 变性 10 秒并在 60 °C 持续 4 分钟的合并的引物复性和延伸步骤。残余染料终止剂通过用含有 5 mM 乙酸钠(pH 5.2)、3mM EDTA(pH 8)的 95%(v/v)乙醇沉淀并进行真空干燥从测序产物中除去。使用每一引物对质粒重复测序。使用 ABI 373A

DNA 测序仪(PE Applied Biosystems)分析测序产物。

注释

将猪痢疾短螺旋体的部分基因组序列装配并注释, 使用一系列公用结构域生物信息学工具以分析和再分析序列作为对数据分析的质量保证程序一部分的序列。使用多种程序, 包括 GeneMark、GLIMMER、ORPHEUS、SELFID 和 GetORF 预测可读框(ORF)。使用包括 BLAST 和 FASTA 的搜索, 用现存国际数据库检查推定 ORF 的同源性(DNA 和蛋白质)。使用包括 PSI-BLAST、FASTA、MOTIFS、FINDPATTERNS、PHD、SIGNALP 和 PSORT 的程序, 分析全部预测的 ORF 以确定它们的细胞定位。使用包括 Interpro、Prosite、ProDom、Pfam 和 Blocks 的数据库以预测表面缔合蛋白, 如跨膜结构域、前导肽、已知表面蛋白的同源物、脂蛋白标签(signature)、外膜锚定基序和宿主细胞结合结构域。用已鉴定的基因及其他物种进行系统发生分析和其他分子进化分析以便辅助赋予功能。经部分测序的两种基因组的计算机(in silico)分析产生存在于可用序列数据内的全部预测 ORF 的全面列表。审查每一 ORF 的描述性信息, 如预测的分子量、等电点、疏水性和亚细胞定位以便能够与天然基因产物的体外特性联系。选择此类预测的基因作为潜在的疫苗靶, 即该基因编码与其他病原菌内表面定位成分和/或毒力因子相似的蛋白质。

生物信息学结果

猪痢疾短螺旋体基因组的鸟枪法测序产生已测序基因组的 73%(2347.8 kb 中预测的 2300 kb)。猪痢疾短螺旋体序列由 171 个叠连群组成, 平均叠连群大小 13.7 kb。对于猪痢疾短螺旋体, 从 171 个叠连群中预测出 1860 个可读框(ORF)。预测 ORF 与核酸及蛋白质数据库内现存基因的比较表明大约 70% 的 ORF 与公共数据库内所含的基因具有同源性。预测 ORF 的其余 30% 无已知的同一性。

疫苗候选物

为帮助减少作为疫苗候选物接受测试的 ORF 数, 建立了两部分试验。潜在的疫苗候选物需要与公共数据库内现有外表面蛋白质和毒力因子具有

一些(尽管很小)同源性。潜在的疫苗候选物 ORF 还必须存在于猪痢疾短螺旋体的多个菌株内。基因组鸟枪法测序所获得的 1860 个 ORF 的许多 ORF 通过一个或两个所述试验的挑选,但是本文仅提供这些结果中的七个。表 1 显示 7 个选择为潜在疫苗靶的克隆及它们与从 SWISS-PROT 数据库中获得的其他已知氨基酸序列的相似性。要指出的是氨基酸的同一性百分数没有高于 46%,而氨基酸的相似性百分数保持低于 65%,因而表明这些 ORF 是独特的。

表 1

基因	具有最高同源性的蛋白质的同一性	同一性(氨基酸)	相似性(氨基酸)	登录号
NAV-H1	福氏拟杆菌(<i>Bacteroides forsythus</i>)的表面抗原(BspA)	37% (60/158)	53% (93/174)	AAC82625.1
NAV-H2	问号钩端螺旋体(<i>Leptospira interrogans</i>)的外膜蛋白(OmpA)家族	29% (130/445)	47% (213/445)	NP_713795.1
NAV-H3	氨基酸 ABC 转运蛋白胞外结合蛋白	34% (73/212)	57% (122/212)	P54535
NAV-H5	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> 转运系统表面脂蛋白	41% (141/339)	59% (201/339)	ZP_00099372.1
NAV-H6	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> 转运系统表面脂蛋白	46% (157/339)	63% (214/339)	ZP_00099372.1
NAV-H11	艰难梭菌(<i>Clostridium difficile</i>)的毒素 A	24% (49/201)	44% (89/201)	P16154
NAV-H13	鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)的寡肽结合蛋白(OppA)	35% (173/492)	52% (258/492)	P06202

NAV-H1 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 1 和 2 中找到。NAV-H2 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 3 和 4 中找到。NAV-H3 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 5 和 6 中找到。NAV-H5 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 7 和 8 中找到。NAV-H6 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 9 和 10 中找到。NAV-H11 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 11 和 12 内找到。NAV-H13 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 11 和 12 内找到。NAV-H13 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 11 和 12 内找到。

基酸序列分别在 SEQ ID NO: 13 和 14 中找到。

使用聚合酶链式反应(PCR)分析基因分布

设计两引物并优化用于 PCR 检测, 其中所述引物对靶基因编码区的不同区域复性。使用 Oligo Explorer 1.2 设计各个引物并且选择具有大约 55-60°C 计算解链温度的引物组。还选择这些引物组以生成大于 200bp 的 PCR 产物。选择中等严格度引物复性温度 50°C 用于分布分析 PCR。中等严格条件将允许可能的少量错配序列(因为菌株差异)在引物结合位点处出现而不影响引物结合。在 23 个猪痢疾短螺旋体菌株(包括已经证实无毒力的两个菌株)上进行 7 个猪痢疾短螺旋体靶基因的分布分析。表 2 显示在分布分析内使用的引物组。在 25 μ l 总体积内使用 Taq DNA 聚合酶(Biotech International, Thurmont, MD)进行 PCR 分析。扩增混合物由 1 \times PCR 缓冲液(含有 1.5 mM MgCl₂)、1 单位 Taq DNA 聚合酶、0.2 mM 每种 dNTP(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、0.5 μ M 引物对和 1 μ l 纯化的染色体模板 DNA 组成。循环条件包括 94°C 5 分钟的初始模板变性步骤, 随后 35 个循环为 94°C 变性 30 秒, 50°C 复性 15 秒和 68°C 引物延伸 4 分钟。使 PCR 产物在 1 \times TAE 缓冲液(40 mM Tris-乙酸盐, 1 mM EDTA)的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 1 μ g/ml 溴化乙锭溶液染色并在紫外线下观察。

6 个选为疫苗候选物的猪痢疾短螺旋体 ORF 存在于测试的每个菌株内。一克隆 NAV-H3 存在于 96%(23 个中的 22 个)的已分析的猪痢疾短螺旋体菌株内。没有 NAV-H3 ORF 的菌株不是无毒菌株。

表 2

基因	引物名称	引物序列 (5'-3')
NAV-H1	H1-F76	ccattttcttttagatgaatcatatgg (SEQ ID NO: 15)
	H1-R1008	attaggcatagatttgccaaaat (SEQ ID NO: 16)
	H1-F139	attggtattgatgctgcagcttt (SEQ ID NO: 17)
NAV-H2	H1-R389	ttagcgcaaccatcaaatacgt (SEQ ID NO: 18)
	H2-F67	ataacacatagattctattggaatttagaa (SEQ ID NO: 19)
	H2-R1209	tcttaatttgattatgatatcaactcttct (SEQ ID NO: 20)
	H2-F498	cgccaatggtgaaactaatagc (SEQ ID NO: 21)
	H2-R1069	ctgattttgctctttttctgataa (SEQ ID NO: 22)

NAV-H3	H3-F52	tgctgtaattattcaaatatacaataactc (SEQ ID NO: 23)
	H3-R783	taaataacttatctactaatttttgataagtgc (SEQ ID NO: 24)
	H3-F266	tgcagtttgatgatcttattacagc (SEQ ID NO: 25)
	H3-R543	gcctgcaatatcaaatctctctact (SEQ ID NO: 26)
NAV-H5	H5-F55	tgcagtaatacaaacagtggaatac (SEQ ID NO: 27)
	H5-R1071	atttataataaatttttactaaattcaaagg (SEQ ID NO: 28)
	H5-F256	atgggagcaaaattgatagtaacac (SEQ ID NO: 29)
	H5-R847	aagcagcaacagcattataaacag (SEQ ID NO: 30)
NAV-H6	H6-F70	ccaaataactaatacaagtactttgaaatag (SEQ ID NO: 31)
	H6-R783	ttttatataattaacctttgctgaattt (SEQ ID NO: 32)
	H6-F212	ttgctcaccctgctgtagttag (SEQ ID NO: 33)
	H6-R554	gcaacagcattataaacagattctc (SEQ ID NO: 34)
NAV-H11	H11-F101	gcttaggttttcaggacattctcat (SEQ ID NO: 35)
	H11-R765	tttcttaattcatcaactgtttcaa (SEQ ID NO: 36)
	H11-F265	aaagatactgataaagaaatggggc (SEQ ID NO: 37)
	H11-R550	cctttttatataccaatcttctctcag (SEQ ID NO: 38)
NAV-H13	H13-F286	aaatggacagacggaaaaaacag (SEQ ID NO: 39)
	H13-R1209	atftctttccacatctgctga (SEQ ID NO: 40)
	H13-F518	ctttccctacattttatccgctt (SEQ ID NO: 41)
	H13-R962	ccgcctcttgaatctgctc (SEQ ID NO: 42)

随后将用于进一步试验的 7 个选为潜在疫苗候选物的 ORF 克隆至表达载体内，表达、纯化并评测免疫原性。

pTrcHis 质粒提取

将携带 pTrcHis 质粒(Invitrogen, Carlsbad, CA)的大肠杆菌 JM 109 克隆从甘油贮藏物中划线至添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 Luria-Bertani(LB)琼脂平板上，并在 37°C 培养 16 小时。使用单菌落接种添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 10 ml LB 培养液并将肉汤培养在 37°C 温育 12 小时，同时振荡。全部过夜培养物在 5,000×g 离心 10 分钟，并且使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen, Doncaster VIC)提取细胞内所含的质粒。沉淀的细胞用 250 μl 细胞重悬缓冲液 P1 进行重悬，并随后添加 250 μl 细胞裂解缓冲液 P2 来裂解。裂解的细胞用 350 μl 中和缓冲液 N3 中和并且通过在 20,000×g 离心 10 分钟聚集沉淀的细胞碎片。将上清液转移至离心柱内并在 10,000×g 离心 1 分钟。弃去流通物后，将 500 μl 洗涤缓冲液 PE 施加至柱内并如前进行离心。弃去流通物并在 20,000×g 离心 3 分钟使柱干燥。用 100 μl 洗脱缓冲液 EB 从柱中洗脱质粒 DNA。使用 Dynaquant DNA 荧光测量仪

(Hoefer, San Francisco, CA)定量纯化的质粒, 并将 DNA 浓度用 TE 缓冲液通过稀释而调节至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。纯化的 pTrcHis 质粒贮存在 -20°C 。

载体制备

37 $^{\circ}\text{C}$ 下将 2 μg 纯化的 pTrcHis 质粒用含有 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl_2 、1 mM DTT 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 内的 5 单位 EcoR I (New England Biolabs, Beverly, MA) 和 5 单位 Xho I (New England Biolabs) 的总体积 50 μl 消化 1-4 小时。经限制酶切的载体通过使 1 μl 消化反应物在 1 \times TAE 缓冲液内的 1%(w/v) 琼脂糖凝胶上, 在 90V 下电泳 1 小时进行验证。电泳的 DNA 用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭染色并在紫外线(UV) 下观察。

使用 UltraClean PCR Clean-up 试剂盒 (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) 纯化线性化的 pTrcHis 载体。简而言之, 将限制酶切反应物 (50 μl) 与 250 μl SpinBind 缓冲液 B1 混合并将全部体积添加至离心柱。在 8,000 $\times g$ 离心 1 分钟后, 弃去流通物并将 300 μl SpinClean 缓冲液 B2 添加至该柱内。该柱如前离心, 并弃去流通物, 随后在 20,000 $\times g$ 离心 3 分钟使该柱干燥。用 50 μl TE 缓冲液从柱中洗脱纯化的载体。使用荧光测量仪定量纯化的线性载体并且将 DNA 浓度用 TE 缓冲液通过稀释而调节至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。纯化的限制酶切载体贮存在 -20°C 。

用于插入制备物的引物设计

设计引物对以使用基因组 DNA 作为起点, 扩增尽可能多的靶基因的编码区域。全部引物序列包括能够粘端连接所得的扩增子至线性化 pTrcHis 载体的末端限制酶位点。用于克隆的引物序列示于表 3。使用 Amplify 1.2 (University of Wisconsin, Madison, WI) 测试引物并且将理论性扩增子序列插入 pTrcHis 载体序列中的合适位置内。使用 Vector NTI 版本 6 (InforMax) 进行 pTrcHis 嵌合表达盒的推导性翻译以证实基因插入物将位于正确的可读框内。表 3 还提供天然蛋白质的预测分子量(道尔顿)以及如从 SDS-PAGE 中所测定的已表达蛋白质的表观分子量(kDa)。重组蛋白的组氨酸融合使天然蛋白质增加大约 4 kDa。

表 3

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	天然蛋白 质的预测 MW(Da)	重组蛋白 的表观 MW (kDa)
NAV-H1	H1-F76-XhoI H1-R1008-EcoRI	gttctcgagccatttcttagatgaatcatatgg (SEQ ID NO: 43) gttgaattcattagcatagatttgccaaaaat (SEQ ID NO: 44)	37429	42.2
NAV-H2	H2-F57-XhoI H2-R1209-EcoRI	ctactcgagataacacatagattctattggaattagaa (SEQ ID NO: 45) gttgaattctcttaatttgattatgatatcaactcttct (SEQ ID NO: 46)	46934	49.7
NAV-H3	H3-F52-XhoI H3-R783-EcoRI	ctactcgagtgctgaattattcaatacaataaactc (SEQ ID NO: 47) gttgaattctaaatactatctactaattttgataagtg (SEQ ID NO: 48)	29534	32.9
NAV-H5	H5-F55-XhoI H5-R1071-EcoRI	ctactcgagtgctgtaatacaaacagtggaaaatc (SEQ ID NO: 49) gttgaattcattatataaataattttactaaattcaaagg (SEQ ID NO: 50)	39505	43.3
NAV-H6	H6-F70-XhoI H6-R783-EcoRI	agcctcgagccaaataactaatacaagtaactttgaaatag (SEQ ID NO: 51) gttgaattctttatataaataacccttctgtaaitt (SEQ ID NO: 52)	39306	43.9
NAV-H11	H11-F4-XhoI H11-R843-EcoRI	ctactcgagaaatataatctaatgttcatacacatac (SEQ ID NO: 53) gttgaattctacacttagtcttaattttatatacaa (SEQ ID NO: 54)	32934	36.9
NAV-H13	H13-F52-XhoI H13-R1596-EcoRI	atactcgagtggttctaataataatcagaagatgg (SEQ ID NO: 55) gttgaattctctaaatacaaatgatggaattatg (SEQ ID NO: 56)	60810	64.8

基因插入物的扩增

使用基因组 DNA, 在 100 μ l 总体积内使用 Taq DNA 聚合酶(Biotech International)和 Pfu DNA 聚合酶(Promega, Madison, WI)通过 PCR 扩增全部靶基因插入物。扩增混合物由 1 \times PCR 缓冲液(含有 1.5 mM MgCl₂)、1 单位 Taq DNA 聚合酶、0.01 单位 Pfu DNA 聚合酶、0.2 mM 每种 dNTP(Amersham Pharmacia Biotech)、0.5 μ M 合适引物对以及 1 μ l 纯化的染色体 DNA 组成。染色体 DNA 从与用于基因组测序相同的猪痢疾短螺旋体菌株中制备。循环条件包括在 94 $^{\circ}$ C 5 分钟的初始模板变性步骤, 随后 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 50 $^{\circ}$ C 复性 15 秒和 68 $^{\circ}$ C 引物延伸 4 分钟。使 PCR 产物在 1 \times TAE 缓冲液的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 1 μ g/ml 溴化乙锭溶液染色并在紫外线下观察。在验证存在正确大小的 PCR 产物后, 使用 UltraClean PCR Clean-up 试剂盒(Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA)纯化 PCR 反应物。混合 PCR 反应物(100 μ l)与 500 μ l SpinBind 缓冲液

B1, 并将全部体积添加至离心柱。在 $8,000\times g$ 离心 1 分钟后, 弃去流通物并将 300 μl SpinClean 缓冲液 B2 添加至该柱内。该柱如前离心, 并弃去流通物, 随后在 $20,000\times g$ 离心 3 分钟使该柱干燥。用 100 μl TE 缓冲液从柱中洗脱纯化的载体。

基因插入物的限制酶消化

37 $^{\circ}\text{C}$ 下将 30 μl 纯化的 PCR 产物用总体积 50 μl 的 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl_2 、1 mM DTT 和 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA 内的 1 单位 EcoR I 和 1 单位 Xho I (New England Biolabs) 消化 1-4 小时。使用 UltraClean PCR Clean-up 试剂盒(见上文)纯化消化的插入 DNA。使用荧光测量仪定量纯化的消化插入 DNA, 并且将 DNA 浓度用 TE 缓冲液通过稀释而调节至 20 $\mu\text{g/ml}$ 。纯化的限制性消化插入 DNA 立即用于载体连接。

基因插入物连接至 pTrcHis 载体

在总体积 20 μl 内进行全部连接反应。将 100 ng Xho I /EcoR I -线性化的 pTrcHis 与 20 ng 的 Xho I /EcoR I -限制酶切的插入物在含有 1 单位 T4 DNA 连接酶(Promega)的 30 mM Tris-HCl(pH 7.8)、10 mM MgCl_2 、10 mM DTT 和 1 mM ATP 内于 16 $^{\circ}\text{C}$ 温育 16 小时。还包括不含插入 DNA 的相同连接反应作为载体再环化阴性对照。

pTrcHis 连接物转化大肠杆菌细胞

感受态大肠杆菌 JM 109(Promega)细胞由 -80 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏物在冰上融化并随后将 50 μl 细胞转移至冰冷却的含有 5 μl 过夜连接反应物(等同于 25 ng pTrcHis 载体)的 1.5 ml 微量离心管内。通过在工作台上柔和轻弹每个管的底部而混合所述管并在冰上放置 30 分钟。细胞随后通过将管置入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 45 秒受到热激, 随后将管再放置在冰上 2 分钟。转化的细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 在 1 ml LB 培养液恢复 1 小时, 轻柔混合。在 $2,500\times g$ 离心 5 分钟收获恢复的细胞并将细胞在 50 μl 新鲜 LB 培养液内重悬。将全部 50 μl 重悬的细胞使用无菌玻璃棒均匀涂布在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。平板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 16 小时。

PCR 检测大肠杆菌内重组 pTrcHis 构建体

将每一构建体的 12 个单转化菌落在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的新鲜 LB 琼脂平板上划线并在 37°C 温育 16 小时。将来自每一转化事件的单菌落重悬于 50 μ l TE 缓冲液内并煮沸 1 分钟。使用 2 μ l 煮沸的细胞作为 PCR 模板。扩增混合物由 1 \times PCR 缓冲液(含有 1.5 mM 的 $MgCl_2$)、1 单位 Taq DNA 聚合酶、0.2 mM 每种 dNTP、0.5 μ M 的 pTrcHis-F 引物(5'-CAATTTATCAGACAATCTGTGTG-3' SEQ ID NO: 57)和 0.5 μ M 的 pTrcHis-R 引物(5'-TGCCTGGCAGTTCCTACTCTCG-S' SEQ ID NO: 58)组成。循环条件包括 94°C 5 分钟的变性步骤, 随后 35 个循环为 94°C 变性 30 秒, 60°C 复性 15 分钟和 72°C 引物延伸 1 分钟。使 PCR 产物在 1 \times TAE 缓冲液的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 1 μ g/ml 溴化乙锭溶液染色并在紫外线下观察。克隆入 pTrcHis 表达载体中的多种插入物多种大小的重组构建体。

His 标记重组蛋白的实验性表达

将大肠杆菌 JM 109 内的重组 pTrcHis 构建体的 5 至 10 个独立菌落接种至 5 ml 管内的含有 100 mg/L 氨苄青霉素和 1 mM IPTG 的 3 ml LB 培养液中并在 37°C 振荡温育 16 小时。通过 4°C 下在 5,000 \times g 离心 10 分钟收获细胞。抛弃上清液并将每一沉淀用 10 μ l Ni-NTA 变性裂解缓冲液(100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH 8.0)重悬。将管涡旋 1 分钟后, 通过在 4°C 在 10,000 \times g 离心 10 分钟沉淀细胞碎片。上清液转移至新管内并在 -20°C 贮存直至分析。

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

使用不连续 Tris-甘氨酸缓冲液系统进行蛋白质的 SDS-PAGE 分析。将 30 μ l 蛋白质样品与 10 μ l 的 4 \times 样品处理缓冲液(250 mM Tris-HCl(pH 6.0)、8%(w/v)SDS、200 mM DTT、40%(v/v)甘油和 0.04 %(w/v)溴酚蓝)混合。将样品煮沸 5 分钟, 随后立即将 10 μ l 样品加样至凝胶的孔内。凝胶包含浓缩凝胶(125 mM Tris-HCl pH6.8、4% w/v 丙烯酰胺、0.15% w/v 双丙烯酰胺和 0.1% w/v SDS)和分离凝胶(375 mM Tris-HCl pH8.8、12% w/v 丙烯酰胺、0.31% w/v 双丙烯酰胺和 0.1% w/v SDS)。通过添加

0.1%(v/v)TEMED 和 0.05%(w/v)新鲜制备的硫酸铵溶液使这些凝胶聚合并使它们在 mini Protean dual slab Cell(Bio-Rad, Hercules, California)内成型。样品以 150 V 在室温(RT)电泳直至溴酚蓝染料抵达凝胶的底部。预染色分子量标准与样品平行进行电泳以允许估计分子量。在电泳后,凝胶立即使用考马斯亮蓝 G250(Bio-Rad)染色或电转移至用于 Western 印迹的硝酸纤维素膜上。

Western 印迹分析

使用 Towbin 转移缓冲液系统,将来自 SDS-PAGE 凝胶的已分离蛋白质电转移至硝酸纤维素膜。在电泳后,凝胶在转移缓冲液(25 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, 20% v/v 甲醇, pH 8.3)中平衡 15 分钟。将凝胶内的蛋白质使用 mini Protean transblot 仪(Bio-Rad)在 4°C 在 30 V 下电转移至硝酸纤维素膜(Protran, Schleicher 和 Schuell BioScience, Inc., Keene, NH)过夜。用含有 5%(w/v)脱脂乳粉的 10 ml tris-缓冲盐水(TBS)在室温封闭含有已分离蛋白质的新转移的硝酸纤维素膜 1 小时。膜用含有 0.1%(v/v)Tween 20(TBST)的 TBS 洗涤并随后与 10 mL 小鼠抗 his 抗体(用 TBST 稀释 5,000 倍)在室温温育 1 小时。在用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 分钟后,将膜与 10 mL 在 TBST 内稀释 5,000 倍的山羊抗小鼠 IgG(完整分子)- AP 在室温温育 1 小时。使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Bio-Rad)使膜显色。通过用蒸馏水洗涤膜终止显色反应。膜随后经干燥并扫描用于展示。

通过直接序列分析验证重组 pTrcHis 构建体的可读框

将每一构建体的产生正确大小 PCR 产物的两个转化菌落接种至含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 10 ml LB 培养液内并在 37°C 振荡培养 12 小时。全部过夜培养物在 5,000×g 离心 10 分钟并使用如前所述 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒提取细胞内所含的质粒。使用荧光测量仪定量纯化的质粒。使用 pTrcHis-F 和 pTrcHis-R 引物,使两份纯化的质粒接受 pTrcHis 表达盒的自动化直接测序法。每一测序反应在由组成 200 ng 质粒 DNA、2 pmol 引物和 4 μl ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)组成的 10 μl

体积内进行。循环条件包括 96°C 2 分钟的变性步骤, 随后 25 个循环为 96°C 变性 10 秒并 60°C 持续 4 分钟的合并的引物复性和延伸步骤。残余染料终止剂通过用含有 85 mM 乙酸钠(pH 5.2)、3mM EDTA(pH 8)的 95%(v/v) 乙醇沉淀并进行真空干燥从测序产物中除去。使用每一引物对质粒重复测序。使用 ABI 373A DNA 测序仪(PE PE Applied Biosystems)分析测序产物。pTrcHis 构建体的核苷酸测序证实全部构建体的表达盒位于正确的可读框内。pTrcHis 表达盒的预测翻译表明全部 his 标记重组蛋白与天然猪痢疾短螺旋体蛋白质推导的氨基酸序列相同。

表达并纯化 his 标记的重组蛋白

将大肠杆菌 JM 109 内重组 pTrcHis 构建体的单菌落接种至 250 ml 锥形瓶内的含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 50ml LB 培养液中并在 37°C 振荡培养 16 小时。以 10 ml 过夜培养物接种 2L 锥形瓶内含有添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 1L LB 培养液并在 37°C 培养直至细胞在 600 nm 的光密度是 0.5(大约 3-4 小时)。随后通过添加 IPTG 至 1 mM 终浓度诱导培养物, 并将细胞返回到 37°C, 同时振荡。在诱导 5 小时后, 将培养物转移至 250ml 离心瓶内, 并将离心瓶在 4°C 以 5,000×g 离心 20 分钟。抛弃上清液并将每一沉淀用 8 ml Ni-NTA 变性裂解缓冲液(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH 8.0)重悬。重悬的细胞在-20°C 贮存过夜。

将细胞混悬液从-20°C 贮藏中取出并在冰上融化。随后在冰上超声波破碎细胞裂解物, 3 次, 每次 30 秒, 在超声波破碎间在冰上温育 1 分钟。裂解的细胞通过 4°C 下在 20,000×g 离心 10 分钟澄清, 并将上清液转移至含有 0.5 ml 床体积的 Ni-NTA 琼脂糖树脂(Qiagen)的 15 ml 柱内。允许重组 His₆ 标记蛋白质在 4°C 结合至树脂 1 小时, 同时颠倒混合。树脂随后用 30 ml Ni-NTA 变性洗涤缓冲液(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH 6.3)洗涤, 随后用 12 ml Ni-NTA 变性洗脱缓冲液(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH 4.5)洗脱。收集 4 份的 3 ml 洗脱级分并贮存在 4°C。将 30 μl 每种洗脱物用 10 μl 的 4×样品处理缓冲液处理并煮沸 5 分钟。样品进行 SDS-PAGE 电泳并用考马斯亮蓝 G250(Bio-Rad)

染色。染色的凝胶在蒸馏水内平衡 1 小时并于室温下在两层纤维素之间干燥过夜。

在中等规模上进行所选重组大肠杆菌菌落的表达以产生用于小鼠接种(见下文)的足够重组蛋白。具有 6-组氨酸融合(4 kDa)的全部重组蛋白产生具有与天然蛋白质预测分子量相似的表现分子量的主要蛋白质(见表 3)。这些蛋白质在使用抗 His 抗体的 Western 印迹中具有高度反应性。成功实现变性条件下对 his 标记重组蛋白的亲层析纯化。全部重组蛋白的 SDS-PAGE 和考马斯兰染色表明实现至少至少 85% 的纯化。使用这种表达方案持续获得 2 mg/L 的重组蛋白产率。

透析并冻干纯化的 His 标记重组蛋白

汇集洗脱蛋白质并转移至具有 3,500 Da 分子量截断(MWCO)的已水化的透析管 (Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA) 内。取出 200 μ l 等分试样已汇集的洗脱物并使用市售蛋白测定法(Bio-Rad)定量。4 $^{\circ}$ C 下将蛋白质在 2 L 蒸馏水中透析, 同时搅拌。透析缓冲液每隔 12 小时更换 8 次。将透析的蛋白质从透析管转移至 50 ml 离心管内(40 ml 最大体积)并将管置于 -80 $^{\circ}$ C 过夜。将管置入 MAXI 冷冻干燥机(Heto-Holten, Allerod, Denmark)并冻干至干燥。冻干的蛋白质随后用 PBS 再次水化至 2 mg/ml 的计算浓度并在 -20 $^{\circ}$ C 贮存。在透析并且冻干后, 成功产生稳定的重组抗原。

使用纯化的重组蛋白的血清学

将 20 μ g 纯化的重组蛋白上样至 7 cm IEF 孔内, 经 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 TBS-脱脂乳封闭(5% w/v)并装配至多重-筛选仪(Bio-Rad)。小孔与 100 μ l 稀释(100 倍)的猪血清在室温温育 1 小时。从高度健康状态的猪(n=3)、经实验攻击表现临床 SD 的猪(n=5)、天然感染的血清转变的猪(n=5)和从天然感染中恢复的猪(n=4)中获得猪血清。膜随后从仪器中移出并用 TBST 洗涤三次(0.1% v/v), 随后与 10 ml 山羊抗猪 IgG(完整分子)-AP(5,000 倍稀释)在室温温育 1 小时。膜用 TBST 洗涤三次, 随后使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Bio-Rad)显色。膜在充分显色发生时用自来水洗涤、经干燥并扫描用于展

示。

已克隆的全部蛋白质均由 80-100% 的一系列猪血清组识别，与健康状态无关，这因而表明基因已经在体内得到表达并且猪能够在接触螺旋体后诱导全身性免疫应答。

使用纯化的 his 标记重组蛋白接种小鼠

对于每一种纯化的 his 标记重组蛋白，对 10 只小鼠进行全身免疫及口服免疫以确定重组蛋白是否具有免疫原性。重组蛋白用 30%(v/v)油包水佐剂乳化并肌肉注射至 10 只小鼠(Balb/cJ; 5 周龄，雄性)的股四头肌内。全部小鼠接受 100 μ l 总体积的 100 μ g 蛋白质。首次接种三周后，全部小鼠接受与首次接种相同的第二次接种。全部小鼠在第二次接种两周后处死。血清从死后的心脏中获得并在 Western 印迹分析中检测抗猪痢疾短螺旋体细胞提取物抗体。

Western 印迹分析

将 20 μ g 纯化的重组蛋白上样至 7 cm IEF 孔内，经 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 TBS-脱脂乳封闭(5% w/v)并装配至多重-筛选仪(Bio-Rad)。小室与 100 μ l 稀释(100 倍)的小鼠血清在室温温育 1 小时。膜从仪器中移出并用 TBST 洗涤三次(0.1% v/v)，随后与 10 ml 山羊抗小鼠 IgG(完整分子)-AP(5,000 倍稀释)在室温温育 1 小时。膜用 TBST 洗涤三次，随后使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Bio-Rad)显色。膜在充分显色发生时用自来水洗涤、经干燥并扫描用于展示。

Western 印迹分析显示接种后在小鼠内针对重组疫苗抗原的抗体活性显著增加。全部小鼠均识别分子量与经考马斯兰染色的纯化重组蛋白的分子量相似的重组蛋白。这些实验提供了这样的证据，即在用于接种小鼠时，重组蛋白具有免疫原性，并且采用的接种方案可以诱导针对抗原的特异性循环抗体滴度。

使用纯化的 his 标记重组蛋白接种猪

对于每一种纯化的 his 标记重组蛋白，对 10 头血清阴性猪用 1ml 疫苗

体积内的 1 mg 特定抗原进行肌肉注射。抗原用等体积的油包水佐剂乳化。猪在三周龄接种并在六周龄再接种。使用第二组 10 头血清阴性猪作为阴性对照并不进行接种。全部在 8 周龄以 100ml 的活性猪痢疾短螺旋体培养物 ($\sim 10^9$ 个细胞/ml) 攻击, 并且在实验期间(至攻击后 6 周)和死后检查中观察猪的猪痢疾临床病征。

诊断试剂盒

血清从猪舍内已知感染猪痢疾短螺旋体的猪、从已知还未感染猪痢疾短螺旋体的猪和从猪舍内猪痢疾短螺旋体感染状态未知的猪中获得。将 20 μ g 纯化的重组蛋白上样至 7 cm IEF 孔内, 经 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 TBS-脱脂乳封闭(5% w/v)并装配至多重-筛选仪(Bio-Rad)。小室与 100 μ l 稀释(100 倍)的猪血清在室温温育 1 小时。膜从仪器中移出并用 TBST 洗涤三次(0.1% v/v), 随后与 10 ml 山羊抗猪 IgG(完整分子)-AP(5, 000 倍稀释)在室温温育 1 小时。膜用 TBST 洗涤三次, 随后使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Bio-Rad)显色。膜在充分显色发生时用自来水洗涤、经干燥并扫描用于展示。来自已知感染猪痢疾短螺旋体的猪(阳性对照)的血清与重组蛋白反应, 而来自无感染的猪(阴性对照)的血清不与重组蛋白反应。可以通过将结果与阳性对照和阴性对照比较而确定猪是否感染猪痢疾短螺旋体。

在已参考具体实施方案描述本发明的同时, 对本领域的技术人员而言显而易见的是可以使用这些方法和组合物的变体, 旨在可以用不同于本文中具体所述的方式实施本发明。因此, 本发明包括如权利要求书所定义的本发明的精神和范围内包含的全部改变。

序 列 表

<110>诺瓦提斯公司、莫道什大学

<120>猪痢疾短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途

<130> VA/H - 34260

<150> 2005902418

<151> 2005-05-12

<160> 58

<170> FastSEQ for Windows 版本 4.0

<210> 1

<211> 1008

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体 (*Brachyspira hyodysenteriae*)

<400> 1

```

atgttcataa agttaaatt attattatta ttacttatac tattaatatac atgcaataat 60
tataaagtta cagatccatt ttctttagat gaatcatatg gcagcagtaa tatccctggt 120
tctaataatac cggaaaatgt agactcaaaa tattttataa aatcagatta taaagaagat 180
aaaatagaat caataatgca ggaatatttt aacgaatata attgctatat aatcttttta 240
aaagacacta aagacaatat agataacaat aatataataa gcaccatcaa tacaatcatt 300
aaaaaagata aatatcttaa aggtgtttct cttgatttaa gcagaacaga tatgacaaaa 360
ttagcagata attcatttac tgataataaa aatttaattc atgtcaaatt acctaatact 420
ataacaacta taggtgtaag tgcattttca ggttgtttag ttttaaaaac aattaatttt 480
cctgcttcta taacagaaat ttcacaagag gcattcaaaa gctgcagatc tttatatttg 540
gcagacattt caaaaacaaa aatgacaata ataaataatg gaatatttaa tgactgtgct 600
agtttaatta ctattatgct tctgaaact ataatagacg gtataaattc aaaggcattc 660
tatgactgtg catcattaaa aacaattaat atcccatcaa aaacaaaaat aattggagat 720
gctgtattct ataactgtaa atcattggaa tctataagat taaatgctag tataacagga 780
atgggagata gagttttttc aggatgcgtt gctttaaaaa atatagaata tgcaggaaat 840
aatcttcag atataacatc cgtaggaata gatatatattg atgctcaatt aaccgaaaa 900
aatttatatc taccaaatgt agcatcagat gacggaagct ggaataattt cttgggatat 960
gactggaaaa ataaaggcag catcattttt ggcaaatcta tgcctaatt 1008

```

<210> 2

<211> 336

<212> PRT

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 2

```

Met Phe Ile Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Ile
  1           5           10          15
Ser Cys Asn Asn Tyr Lys Val Thr Asp Pro Phe Ser Leu Asp Glu Ser
          20           25           30
Tyr Gly Ser Ser Asn Ile Pro Val Ser Asn Ile Pro Glu Asn Val Asp
          35           40           45
Ser Lys Tyr Phe Ile Lys Ser Asp Tyr Lys Glu Asp Lys Ile Glu Ser
          50           55           60

```

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

<210> 3

<211> 1209

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 3

atgaaaaaaa ttagtttatt tgtttttata ttttctactt tgcttttttag tattttacat 60
 tcagaaataa cacatagatt ctattggaat ttagaaaaag gaaaaagaat agaactctgta 120
 aaaactgctg atgtagagta ttatgaaaat ggtatattaa caagcacata caaagaaaga 180
 aatattgttg atttaactgt tattgctata gtcctaaaag gcggttatag agtaagcgga 240
 gtattcaaaa tctttagaat gatgaaaggt gagaaggttt ttcactctga tgaagaatat 300
 acaagtgatt ttattattca tactaatgga aaatttgaag ttccttataa ttattttatg 360
 cctaattgtaa gacatgttcc tacttttccct gataatgagg taaagcttac tgaatcttgg 420
 aatagagaat ctattgaaat agttaaagta aataatgccc ctaatttaac aatggcattg 480
 tcactctgatt atctattcgc caatgttgaa actaatagcg acggaagcag aatgctgtt 540
 atacaatatc atataatgac tgataaagat ttacttcagg caggactttc aagaaaaggt 600

tatcctgaaa gaatatatgg cttaattat ggtacatttc tttgggatat ggaaaaaat 660
 attcctgtat ctccagcagga gagatatcaa atattattcg gatatggaaa agaattgtct 720
 tatgctagtt tgcagtataa gatgaatatt atcagtactt ataaaattta tgatacaata 780
 acaaaagaag aagaagatta taatagaaaa aaacttgaag ataatctcta caatgatgat 840
 aatgttacta tagatacagt accggaaggt ttggtattaa gacttggaga gattcttttt 900
 gatactgatt ctatacttt aaaacctgaa gcaaaaaata ctatagataa tgttattaag 960
 gcaataaaaag aaacttatcc tgatagagaa attatagtag agggacatac tgataataca 1020
 ggaagaaaag aatataatca ggacttatca gaaaaagag caaaatcagt tgcagattat 1080
 atcttgcta atcttgatca tgataaatta tcttataaag gttttgcaga tgatgaacct 1140
 atagcttcta acgatactcc agacggaaga agaaaaaata gaagagtga taccataatc 1200
 aaattaaga 1209

<210> 4

<211> 403

<212> PRT

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 4

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

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

<210> 7

<211> 1071

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 7

atgaaaaaac ttcttactct tcttattgtg tttgtttttt tatacactgt ttcctgcagt 60
 aatacaaaaca gtggaaaatc acttggttat gaaatagcag ttatcatgag aaatatagat 120
 gacaaatcat ttaatcaaag tacttggaga ggagtaaagg attatgctga acattatggc 180
 ataagctata aatattataa agttcctgat aaaaatgtac aatcaacatt aaatgctata 240
 gatattgctg ttcgtatggg agcaaaattg atagtaacac caggaagtat atttgaacct 300
 gctatttata aagcacagga tatatatact aatgtacatt ttatattgat agacggaaag 360
 cctcaggatg gaacttacac agattataag acagcaaaaa atactattgc tattctttat 420
 gctgaagagg aagcaggatt tttagcagga tacgctatag taaaagaagg ttataactaat 480
 ttaggagtta taggaggtat ggctcttct cctgttataa aattcggata cggatttgta 540
 caaggggcag aatttgcagc agatgaatta aaaatccta aagatagtat aaatataaaa 600
 tacacttatg ttggaaatta tgatgattct caggaaaatc aaaathtagc tgcattctgg 660
 tataaaagcg gtacacaggt aatattcgct ccggcaggag gcgcttctta ttctgttata 720
 aatgctgctg agaataatgg aggtttagtt gtaggaattg atgttgatca aagttttgaa 780
 tctcctactg ttattacttc ttctatgaaa ttgataagag aatctgttta taatgctggt 840
 gctgcttatt ataatggtaa tttcaatgga ggaaaaactt tcatattaga tacaagagtt 900
 aatggagtag gacttccaat gtctacttct aaatttaaag tttttaaaga atatgattat 960

aatatcatat ataactctct tatgagaaaa aaaattaggg tattaaaaga tactgatgcg 1020
 gaaagtgtg ataaattacc tttgaattta gtaaaaatta attatataaa t 1071

<210> 8

<211> 357

<212> PRT

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 8

Met Lys Lys Leu Leu Thr Leu Leu Ile Val Phe Val Phe Leu Tyr Thr
 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ser Asn Thr Asn Ser Gly Lys Ser Leu Gly Tyr Glu Ile
 20 25 30
 Ala Val Ile Met Arg Asn Ile Asp Asp Lys Ser Phe Asn Gln Ser Thr
 35 40 45
 Trp Arg Gly Val Lys Asp Tyr Ala Glu His Tyr Gly Ile Ser Tyr Lys
 50 55 60
 Tyr Tyr Lys Val Pro Asp Lys Asn Val Gln Ser Thr Leu Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Val Arg Met Gly Ala Lys Leu Ile Val Thr Pro Gly Ser
 85 90 95
 Ile Phe Glu Pro Ala Ile Tyr Lys Ala Gln Asp Ile Tyr Thr Asn Val
 100 105 110
 His Phe Ile Leu Ile Asp Gly Lys Pro Gln Asp Gly Thr Tyr Thr Asp
 115 120 125
 Tyr Lys Thr Ala Lys Asn Thr Ile Ala Ile Leu Tyr Ala Glu Glu Glu
 130 135 140
 Ala Gly Phe Leu Ala Gly Tyr Ala Ile Val Lys Glu Gly Tyr Thr Asn
 145 150 155 160
 Leu Gly Val Ile Gly Gly Met Ala Leu Pro Pro Val Ile Lys Phe Gly
 165 170 175
 Tyr Gly Phe Val Gln Gly Ala Glu Phe Ala Ala Asp Glu Leu Lys Ile
 180 185 190
 Pro Lys Asp Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Thr Tyr Val Gly Asn Tyr Asp
 195 200 205
 Asp Ser Gln Glu Asn Gln Asn Leu Ala Ala Ser Trp Tyr Lys Ser Gly
 210 215 220
 Thr Gln Val Ile Phe Ala Pro Ala Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Ala Ala Glu Asn Asn Gly Gly Leu Val Val Gly Ile Asp Val Asp
 245 250 255
 Gln Ser Phe Glu Ser Pro Thr Val Ile Thr Ser Ser Met Lys Leu Ile
 260 265 270
 Arg Glu Ser Val Tyr Asn Ala Val Ala Ala Tyr Tyr Asn Gly Asn Phe
 275 280 285
 Asn Gly Gly Lys Thr Phe Ile Leu Asp Thr Arg Val Asn Gly Val Gly
 290 295 300
 Leu Pro Met Ser Thr Ser Lys Phe Lys Val Phe Lys Glu Tyr Asp Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ile Ile Tyr Asn Ser Leu Met Arg Lys Lys Ile Arg Val Leu Lys
 325 330 335

Asp Thr Asp Ala Glu Ser Val Asp Lys Leu Pro Leu Asn Leu Val Lys
 340 345 350
 Ile Asn Tyr Ile Asn
 355

- <210> 9
- <211> 1080
- <212> DNA
- <213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 9
 atgattaataaa aaattatggt atgtgtgta tttatcacat ctttatttgc attgtcatgc 60
 agcaaaagcc caaatactaa tacaagtact tttgaaatag ctgtacttat agacttaggt 120
 cctattgatg ataaatcttt taatcaggga tcatgggaag gtgtaaagga ttatgccgaa 180
 aattatggta taagtataa atattataga gttcctgata aggacataga ttcttattta 240
 aacactatag atcttgcagt taaatgcggt gctaaattaa tagtaacccc tggatatatg 300
 tttgaacctg caatatataa agctcaagat atttacacaa acgtaaattt catactgata 360
 gatggagaac ctcaagacgg aactataca gattataaaa catcacctaa tacagtagca 420
 attcittatt ctgaagagga agcaggattt ttagcaggat acgctatagt aaaagaaggt 480
 tatactaatt taggatttat gggagggtgtt gctcacctg ctgtagttag attcggatac 540
 ggatttgtag aggggtgctga ttatgctgct gttgaatcaa aattacctaa agattctggt 600
 aatataaaat atactatat aggcaattat gatcctacac ctgaaaatca aactttagct 660
 acttcttggg ataaaagcgg agtacaagta atatttgctg cagctggtgc tgccggaaat 720
 tcagttatga gtgctgctga aaataataac ggattggtaa taggagttga tgttgatcag 780
 agttttgaat ctctactgt tattacttct gctatgaaat tgataagaga atctgtttat 840
 aatgctgttg catcttatta taacggaaat ttcagcggag gaaaaactac tatattagga 900
 gctcaagtta aaggtatagg acttctatg tctacttcta aatttaaagt ttttacagaa 960
 tctgactata atattatata tgactctctt gtaacaaaaa caattaaagt attaaaagat 1020
 actgatatag aaaatgtaa taatttcat ttaaattcag caaaggtaa ttatataaaa 1080

- <210> 10
- <211> 360
- <212> PRT
- <213> 猪痢疾短螺旋体
- <400> 10

Met Ile Lys Lys Ile Met Leu Cys Val Leu Phe Ile Thr Ser Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Cys Ser Lys Ser Pro Asn Thr Asn Thr Ser Thr Phe Glu
 20 25 30
 Ile Ala Val Leu Ile Asp Leu Gly Pro Ile Asp Asp Lys Ser Phe Asn
 35 40 45
 Gln Gly Ser Trp Glu Gly Val Lys Asp Tyr Ala Glu Asn Tyr Gly Ile
 50 55 60
 Ser Tyr Lys Tyr Tyr Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile Asp Ser Tyr Leu
 65 70 75 80
 Asn Thr Ile Asp Leu Ala Val Lys Cys Gly Ala Lys Leu Ile Val Thr
 85 90 95
 Pro Gly Tyr Met Phe Glu Pro Ala Ile Tyr Lys Ala Gln Asp Ile Tyr
 100 105 110

Thr Asn Val Asn Phe Ile Leu Ile Asp Gly Glu Pro Gln Asp Gly Thr
 115 120 125
 Tyr Thr Asp Tyr Lys Thr Ser Pro Asn Thr Val Ala Ile Leu Tyr Ser
 130 135 140
 Glu Glu Glu Ala Gly Phe Leu Ala Gly Tyr Ala Ile Val Lys Glu Gly
 145 150 155 160
 Tyr Thr Asn Leu Gly Phe Met Gly Gly Val Ala His Pro Ala Val Val
 165 170 175
 Arg Phe Gly Tyr Gly Phe Val Gln Gly Ala Asp Tyr Ala Ala Val Glu
 180 185 190
 Ser Lys Leu Pro Lys Asp Ser Val Asn Ile Lys Tyr Thr Tyr Ile Gly
 195 200 205
 Asn Tyr Asp Pro Thr Pro Glu Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ser Trp Tyr
 210 215 220
 Lys Ser Gly Val Gln Val Ile Phe Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Asn
 225 230 235 240
 Ser Val Met Ser Ala Ala Glu Asn Asn Asn Gly Leu Val Ile Gly Val
 245 250 255
 Asp Val Asp Gln Ser Phe Glu Ser Pro Thr Val Ile Thr Ser Ala Met
 260 265 270
 Lys Leu Ile Arg Glu Ser Val Tyr Asn Ala Val Ala Ser Tyr Tyr Asn
 275 280 285
 Gly Asn Phe Ser Gly Gly Lys Thr Thr Ile Leu Gly Ala Gln Val Lys
 290 295 300
 Gly Ile Gly Leu Pro Met Ser Thr Ser Lys Phe Lys Val Phe Thr Glu
 305 310 315 320
 Ser Asp Tyr Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Leu Val Thr Lys Thr Ile Lys
 325 330 335
 Val Leu Lys Asp Thr Asp Ile Glu Asn Val Asn Asn Leu His Leu Asn
 340 345 350
 Ser Ala Lys Val Asn Tyr Ile Lys
 355 360

<210> 11

<211> 843

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 11

atgaaatata tatctaattt gcatacacat actaaatatt gcgatggtaa aaatacagtt 60
 gaagaaaata tacaatatgc tatagataaa gaattaataa gcttaggttt ttcaggacat 120
 tctcattttt ataaagatga tacttctatg tctgaagaaa acactattaa atatttagag 180
 aatataaaaa aggcaaagga tatttataaa gataaaatac aggtatattt aggtatagaa 240
 ggtgattatt attcaaattt aaataaagat actgataaag aaatggggct tgattataga 300
 ataggctcag ttcattatat tgatgatggt aataattctt actttcctat agatatgtca 360
 agagatactt ttaatgaaac tataaagcat tttggtgata tcaaagaagt tatttttaga 420
 tattatgata atgttataaa aatgatagaa acacaaaaac ctgatattat aggtcatttg 480
 gatttggtta gaaaataaa tttgaataaa gaatatttta ctgaagaaga agattggtat 540
 ataaaaaagg tagatgaggt tatagatatt attgaaaaaa atggctccat agttgaaata 600
 aatactaaac ttatgaataa aaataatttg gatgctcatt atcctaataa aaatactata 660

aaaaaattgt tagaaaaaa tgtatctttt acaataaatt cagatgcaca tcaatgtaat 720
aatatagata attgttattt tgaacagtt gatgaattaa agaaacttgg tgtaaactct 780
ataaaaatgt taatagacaa tagttttaa gatattgata taaataaatt aggactaagt 840
gta 843

<210> 12

<211> 281

<212> PRT

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 12

Met Lys Tyr Ile Ser Asn Leu His Thr His Thr Lys Tyr Cys Asp Gly
1 5 10 15
Lys Asn Thr Val Glu Glu Asn Ile Gln Tyr Ala Ile Asp Lys Glu Leu
20 25 30
Ile Ser Leu Gly Phe Ser Gly His Ser His Phe Tyr Lys Asp Asp Thr
35 40 45
Ser Met Ser Glu Glu Asn Thr Ile Lys Tyr Leu Glu Asn Ile Lys Lys
50 55 60
Ala Lys Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Ile Gln Val Tyr Leu Gly Ile Glu
65 70 75 80
Gly Asp Tyr Tyr Ser Asn Leu Asn Lys Asp Thr Asp Lys Glu Met Gly
85 90 95
Leu Asp Tyr Arg Ile Gly Ser Val His Tyr Ile Asp Asp Gly Asn Asn
100 105 110
Ser Tyr Phe Pro Ile Asp Met Ser Arg Asp Thr Phe Asn Glu Thr Ile
115 120 125
Lys His Phe Gly Asp Ile Lys Glu Val Ile Phe Arg Tyr Tyr Asp Asn
130 135 140
Val Ile Lys Met Ile Glu Thr Gln Lys Pro Asp Ile Ile Gly His Leu
145 150 155 160
Asp Leu Val Arg Lys Tyr Asn Leu Asn Lys Glu Tyr Phe Thr Glu Glu
165 170 175
Glu Asp Trp Tyr Ile Lys Lys Val Asp Glu Val Ile Asp Ile Ile Glu
180 185 190
Lys Asn Gly Ser Ile Val Glu Ile Asn Thr Lys Leu Met Asn Lys Asn
195 200 205
Asn Leu Asp Ala His Tyr Pro Asn Lys Asn Thr Ile Lys Lys Leu Leu
210 215 220
Glu Lys Asn Val Ser Phe Thr Ile Asn Ser Asp Ala His Gln Cys Asn
225 230 235 240
Asn Ile Asp Asn Cys Tyr Phe Glu Thr Val Asp Glu Leu Lys Lys Leu
245 250 255
Gly Val Lys Ser Ile Lys Met Leu Ile Asp Asn Ser Phe Lys Asp Ile
260 265 270
Asp Ile Asn Lys Leu Gly Leu Ser Val
275 280

<210> 13

<211> 1596

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 13

```

atgaaaaaaaa ttttttttt atttatgatt tttatatcat ttataatatac atgttctaata 60
aataaatcag aagatggtat atctatattt attaatacag gacctgaacc aaacactata 120
gatcctagta taaatgtaac ttcagatgca atattttatt tgatgcatac atttgaggga 180
ttgctagaga aggatatgaa tggaaaattg attccaggag ttgctgagag ttgggagata 240
agcgaagacg gacttactta tacattcaag cttagaacta attctaaatg gacagacgga 300
aaaacagttg ttgctggtga tttttgtatat tcttggcaaa gagttgttga tcctgctaca 360
ggcagtcaat atggatatca gcatgagcct gtaaaaaatg ctaaagcaat aactgcagga 420
gatatgccta aagaaagttt aggtataaaa gcaatagatg attatacttt ggaagttcag 480
ttggaagctc ctacagcata ttttttagaa cttttaactt tccctacatt ttatccgctt 540
agaaaggata ttatagaaca atacggagat gaatggactt taaatgctga tacttatata 600
ggaaacggag ctttcaaact tatagaaaga aacagagatg aaagtcttgt aatggtaaaa 660
aatactaatt attggaatat agaagatata gttcctgata aaataacatt tgttcttatg 720
gaaaatgaaa ctgcttctgt tgcaggtgtc aaagctggtt ctttgcattt tgcaagatct 780
ttccaagac aggatataaaa gacacttcaa aatgaaggac ttatagtaat aaagcctaga 840
atatcatcat attattactg cttaaattta actaatgaaa tattaagaaga tgtaagagta 900
agaagagcat tatctcttgc tattgacaga aattatatag tagagcagat tacaagaggc 960
ggagagaaac ctgctgggggc ttttagttcct ttcggaatat cagactatga aggagatttc 1020
agagaaaacg gaggagaata tatagatata actaaagacg gatatgttaa gaatgtagaa 1080
gaagctaaaa aattgatggc tgaggcagga taccctaatg gagaaggttt tcctgttatg 1140
gagtttaaag cagatcctgg attacatgta aaaatatttg aagctgttca gcagatgtgg 1200
aaagaaaatc ttggtattga tgtaacttta actcaggaag aatgggctgt atttttgcag 1260
acaagatatg atagaaatat aactatggct aggggagcct ggaatggaga ttttgatgat 1320
cctgtaaaact ttatggcttt atgtttgagt tattctccta ataattacag tgtttatagt 1380
aatagggctt atgatgatat gataaatgag gttatgcttt caggagatca gaaattcagg 1440
atgcagacta tgcataaagc agaggaaatg ctaatgagag aagaagctat aatacccata 1500
tattattata cagaaccttt acttgtatct cctaaattaa aagatgttta ttatgattct 1560
ctaggatttc ataaattcca tcattgttat ttagaa 1596

```

<210> 14

<211> 532

<212> PRT

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 14

```

Met Lys Lys Ile Phe Ile Leu Phe Met Ile Phe Ile Ser Phe Ile Ile
1           5           10           15
Ser Cys Ser Asn Asn Lys Ser Glu Asp Gly Ile Ser Ile Phe Ile Asn
20           25           30
Thr Gly Pro Glu Pro Asn Thr Ile Asp Pro Ser Ile Asn Val Thr Ser
35           40           45
Asp Ala Ile Phe Tyr Leu Met His Thr Phe Glu Gly Leu Leu Glu Lys
50           55           60
Asp Met Asn Gly Lys Leu Ile Pro Gly Val Ala Glu Ser Trp Glu Ile
65           70           75           80
Ser Glu Asp Gly Leu Thr Tyr Thr Phe Lys Leu Arg Thr Asn Ser Lys
85           90           95
Trp Thr Asp Gly Lys Thr Val Val Ala Gly Asp Phe Val Tyr Ser Trp
100          105          110

```

Gln Arg Val Val Asp Pro Ala Thr Gly Ser Gln Tyr Gly Tyr Gln His
 115 120 125
 Glu Pro Val Lys Asn Ala Lys Ala Ile Thr Ala Gly Asp Met Pro Lys
 130 135 140
 Glu Ser Leu Gly Ile Lys Ala Ile Asp Asp Tyr Thr Leu Glu Val Gln
 145 150 155 160
 Leu Glu Ala Pro Thr Ala Tyr Phe Leu Glu Leu Leu Thr Phe Pro Thr
 165 170 175
 Phe Tyr Pro Leu Arg Lys Asp Ile Ile Glu Gln Tyr Gly Asp Glu Trp
 180 185 190
 Thr Leu Asn Ala Asp Thr Tyr Ile Gly Asn Gly Ala Phe Lys Leu Ile
 195 200 205
 Glu Arg Asn Arg Asp Glu Ser Leu Val Met Val Lys Asn Thr Asn Tyr
 210 215 220
 Trp Asn Ile Glu Asp Ile Val Pro Asp Lys Ile Thr Phe Val Leu Met
 225 230 235 240
 Glu Asn Glu Thr Ala Ser Val Ala Gly Val Lys Ala Gly Ser Leu His
 245 250 255
 Phe Ala Arg Ser Phe Pro Arg Gln Asp Ile Lys Thr Leu Gln Asn Glu
 260 265 270
 Gly Leu Ile Val Ile Lys Pro Arg Ile Ser Ser Tyr Tyr Tyr Cys Leu
 275 280 285
 Asn Leu Thr Asn Glu Ile Leu Lys Asp Val Arg Val Arg Arg Ala Leu
 290 295 300
 Ser Leu Ala Ile Asp Arg Asn Tyr Ile Val Glu Gln Ile Thr Arg Gly
 305 310 315 320
 Gly Glu Lys Pro Ala Gly Ala Leu Val Pro Phe Gly Ile Ser Asp Tyr
 325 330 335
 Glu Gly Asp Phe Arg Glu Asn Gly Gly Glu Tyr Ile Asp Ile Thr Lys
 340 345 350
 Asp Gly Tyr Val Lys Asn Val Glu Glu Ala Lys Lys Leu Met Ala Glu
 355 360 365
 Ala Gly Tyr Pro Asn Gly Glu Gly Phe Pro Val Met Glu Phe Lys Ala
 370 375 380
 Asp Pro Gly Leu His Val Lys Ile Phe Glu Ala Val Gln Gln Met Trp
 385 390 395 400
 Lys Glu Asn Leu Gly Ile Asp Val Thr Leu Thr Gln Glu Glu Trp Ala
 405 410 415
 Val Phe Leu Gln Thr Arg Tyr Asp Arg Asn Ile Thr Met Ala Arg Gly
 420 425 430
 Ala Trp Asn Gly Asp Phe Asp Asp Pro Val Asn Phe Met Ala Leu Cys
 435 440 445
 Leu Ser Tyr Ser Pro Asn Asn Tyr Ser Val Tyr Ser Asn Arg Ala Tyr
 450 455 460
 Asp Asp Met Ile Asn Glu Val Met Leu Ser Gly Asp Gln Lys Phe Arg
 465 470 475 480
 Met Gln Thr Met His Lys Ala Glu Glu Met Leu Met Arg Glu Glu Ala
 485 490 495
 Ile Ile Pro Ile Tyr Tyr Tyr Thr Glu Pro Leu Leu Val Ser Pro Lys
 500 505 510

<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 H2-F67 序列	
<400> 19	
ataacacata gattctattg gaatttagaa	30
<210> 20	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 H2-R1209 序列	
<400> 20	
tcttaatttg attatgatat caactcttct	30
<210> 21	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 H2- F498 序列	
<400> 21	
cgccaatggt gaaactaata gc	22
<210> 22	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 H2- R1069 序列	
<400> 22	
ctgattttgc tcttttttct gataa	25
<210> 23	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 H3-F52 序列	

<400> 23 tgtcgtaatt attcaaatac aaataactc	29
<210> 24 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引物 H3- R783 序列	
<400> 24 taaatactta tctactaatt tttgataagt gc	32
<210> 25 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引物 H3- F266 序列	
<400> 25 tgcagtttga tgatcttatt acagc	25
<210> 26 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引物 H3- R543 序列	
<400> 26 gcctgcaata tcaaattctct ctact	25
<210> 27 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引物 H5-F55 序列	
<400> 27 tgcagtaata caaacagtgg aaaatc	26
<210> 28 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>

<223> 反向引物 H5- R1071 序列

<400> 28

atttatataa ttaattttta ctaaattcaa agg

33

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物 H5- F256 序列

<400> 29

atgggagcaa aattgatagt aacac

25

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 H5- R847 序列

<400> 30

aagcagcaac agcattataa acag

24

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物 H6- F70 序列

<400> 31

ccaataacta atacaagtac ttttgaaata g

31

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 H6- R783 序列

<400> 32

ttttatataa ttaacctttg ctgaattt

28

<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 H6- F212 序列	
<400> 33	
ttgctcaccg tgctgtagtt ag	22
<210> 34	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 H6-R554 序列	
<400> 34	
gcaacagcat tataaacaga ttctc	25
<210> 35	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 H11- F101 序列	
<400> 35	
gcttaggttt ttcaggacat tctcat	26
<210> 36	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 H11-R765 序列	
<400> 36	
tttctttaat tcatcaactg tttcaa	26
<210> 37	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 H11- F265 序列	

<400> 37 aaagatactg ataaagaaat ggggc	25
<210> 38 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引物 H11-R550 序列	
<400> 38 ccttttttat ataccaatct tcttcttcag	30
<210> 39 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引物 H13- F286 序列	
<400> 39 aaatggacag acggaaaaac ag	22
<210> 40 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引物 H13-R1209 序列	
<400> 40 atthtctttc cacatctgct ga	22
<210> 41 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引物 H13- F518 序列	
<400> 41 ctttccctac atthtatccg ctt	23
<210> 42 <211> 20 <212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 H13-R962 序列

<400> 42

ccgcctcttg taatctgctc

20

<210> 43

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H1 H1-F76-XhoI 引物序列

<400> 43

gttctcgagc cattttcttt agatgaatca tatgg

35

<210> 44

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H1 H1-R1008-EcoRI 引物序列

<400> 44

gttgaattca ttaggcatag atttgccaaa aat

33

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H2 H2-F57-XhoI 引物序列

<400> 45

ctactcgaga taacacatag attctattgg aatttagaa

39

<210> 46

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H2 H2-R1209-EcoRI 引物序列

<400> 46

gttgaattct cttaatttga ttatgatatc aactcttct

39

<210> 47	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NAV-H3 H3-F52-XhoI 引物序列	
<400> 47	
ctactcgagt gtcgtaatta ttcaaataca aataactc	38
<210> 48	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NAV-H3 H3-R783-EcoRI 引物序列	
<400> 48	
gttgaattct aaatacttat ctactaattt ttgataagtg c	41
<210> 49	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NAV-H5 H5-F55-XhoI 引物序列	
<400> 49	
ctactcgagt gcagtaatac aaacagtgga aaatc	35
<210> 50	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NAV-H5 H5-R1071-EcoRI 引物序列	
<400> 50	
gttgaattca tttatataat taatttttac taaattcaaa gg	42
<210> 51	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> NAV-H6 H6-F70-XhoI 引物序列

<400> 51

agcctcgagc caaatactaa tacaagtact ttgaaatag 40

<210> 52

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H6 H6-R783-EcoRI 引物序列

<400> 52

gttgaattct tttatataat taacctttgc tgaattt 37

<210> 53

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H11 H11-F4-XhoI 引物序列

<400> 53

ctactcgaga aatataatc taatttgcac acacatac 38

<210> 54

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H11 H11-R843-EcoRI 引物序列

<400> 54

gttgaattct acacttagtc ctaatttatt tataatcaa 38

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NAV-H13 H13-F52-XhoI 引物序列

<400> 55

atactcgagt gttctaataa taaatcagaa gatgg 35

<210> 56

<211> 36

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NAV-H13 H13-R1596-EcoRI 引物序列	
<400> 56	
gttgaattct tctaaataac aatgatggaa tttatg	36
<210> 57	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> pTrcHis 正向引物 序列	
<400> 57	
caatttatca gacaatctgt gtg	23
<210> 58	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> pTrcHis 反向引物 序列	
<400> 58	
tgcctggcag ttcctactc tcg	23

专利名称(译)	猪痢疾短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途		
公开(公告)号	CN101175856A	公开(公告)日	2008-05-07
申请号	CN200680016183.X	申请日	2006-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
[标]发明人	M贝尔伽德 DJ汉普森 T拉		
发明人	M·贝尔伽德 D·J·汉普森 T·拉		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/85 C07K14/20 C07K16/12 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/02		
CPC分类号	A61K2039/523 A61K2039/53 C07K14/20 A61K39/00		
代理人(译)	凌立		
优先权	2005902418 2005-05-12 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了猪痢疾短螺旋体的新多核苷酸和氨基酸。这些序列用于诊断动物内的猪痢疾短螺旋体病，以及用作治疗性治疗或预防性治疗动物内的猪痢疾短螺旋体病。这些序列还可以用于诊断，和治疗性和/或预防性治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病，所述的短螺旋体属物种包括密螺旋体、*B.alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无善短螺旋体、*B.murdochii*和多毛短螺旋体。

表 1

基因	具有最高同源性的蛋白质的同一性	同一性(氨基酸)	相似性(氨基酸)	登录号
NAV-H1	福氏拟杆菌(<i>Bacteroides forsythus</i>)的表面抗原(BspA)	37% (60/158)	53% (93/174)	AAC82625.1
NAV-H2	问号钩端螺旋体(<i>Leptospira interrogans</i>)的外膜蛋白(OmpA)家族	29% (130/445)	47% (213/445)	NP_713795.1
NAV-H3	氨基酸 ABC 转运蛋白胞外结合蛋白	34% (73/212)	57% (122/212)	P54535
NAV-H5	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> 转运系统表面脂蛋白	41% (141/339)	59% (201/339)	ZP_00099372.1
NAV-H6	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> 转运系统表面脂蛋白	46% (157/339)	63% (214/339)	ZP_00099372.1
NAV-H11	艰难梭菌(<i>Clostridium difficile</i>)的毒素 A	24% (49/201)	44% (89/201)	P16154
NAV-H13	鼠伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)的寡肽结合蛋白(OppA)	35% (173/492)	52% (258/492)	P06202