

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/31

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/29 C12N 9/52

C12N 9/02 A61K 39/00

[21] 申请号 00810608.8

[43]公开日 2002年9月4日

[11]公开号 CN 1367832A

[22]申请日 2000.7.20 [21]申请号 00810608.8

[30]优先权

[32]1999.7.21 [33]US [31]09/358,322

[86]国际申请 PCT/US00/19763 2000.7.20

[87]国际公布 WO01/07625 英 2001.2.1

[85]进入国家阶段日期 2002.1.21

[71]申请人 科内尔研究基金会

地址 美国纽约

[72]发明人 常永福

[74]专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

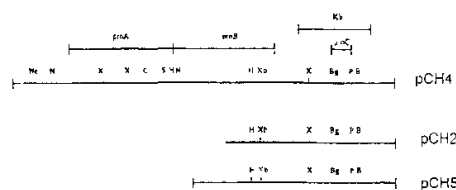
代理人 刘国平

权利要求书 12 页 说明书 33 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 犬埃里希氏体的基因和疫苗

[57]摘要

本发明提供了得自犬埃里希氏体基因组的 5300 个核苷酸的序列。在此克隆片段中,共编码了 4 种蛋白质,ProA,ProB,ORF,和细胞色素氧化酶同系物,并且在羧基末端编码部分脂蛋白信号肽酶同系物。这些蛋白质的抗原特性使它们可用于产生疫苗。本发明的实施方案包括产生 DNA 疫苗,重组疫苗和 T 细胞表位疫苗。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 含有选自下列的所述 DNA 的重组 DNA:

- a) 编码具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
- b) 编码具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
- c) 编码具有如 SEQ. ID. NO. 7 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
- d) 编码具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
- e) 编码具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA; 和
- f) 编码能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的蛋白质的上述 DNA 的任何部分。

2. 权利要求 1 的重组 DNA, 其中所述 DNA 编码至少一种免疫原性表位。

3. 含有选自下列的所述蛋白质的重组蛋白质:

- a) 具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质;
- b) 具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质;
- c) 具有如 SEQ. ID. NO. 7 所示氨基酸序列的蛋白质;
- d) 具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质;
- e) 具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质; 和
- f) 能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的上述蛋白质的任何部分。

4.权利要求 3 的重组蛋白质，其中所述蛋白质包括至少一种免疫原性表位。

5.疫苗，其中所述疫苗保护犬抗犬埃里希氏体感染。

6.权利要求 5 的疫苗，其含有：

a)载体，该载体能表达插入所述载体中的重组 DNA，使得当在适当宿主中提供所述载体时可以表达重组蛋白质；和

b)插入所述载体中的重组 DNA，其中所述 DNA 选自：

i.编码具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

ii.编码具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

iii.编码具有如 SEQ. ID. NO.7 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

iv.编码具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

v.编码具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

和

vi.编码能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的蛋白质的上述 DNA 的任何部分。

7.权利要求 6 的疫苗，其中所述 DNA 进一步含有编码 CpG 基元的 DNA。

8.权利要求 6 的疫苗，其中所述 DNA 进一步含有选自下列的启动子：

- a)巨细胞病毒(CMV)即早期启动子;
- b)人组织纤溶酶原激活物基因(t-PA); 和
- c)人延伸因子 α (EF-1 α)的启动子/增强子区域。

9.权利要求 6 的疫苗, 其中所述载体选自:

- a) pcDNA3;
- b) pCl;
- c) VR1012; 和
- d) VR1020。

10.权利要求 6 的疫苗, 其中通过选自下列的方法将所述疫苗施用于所述宿主:

- a)肌肉注射;
- b)静脉内注射; 和
- c)基因枪注射。

11.权利要求 10 的疫苗, 其中所述宿主是犬。

12.权利要求 5 的疫苗, 其含有:

- a)选自下列的重组蛋白质:
 - i.具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质;
 - ii.具有如 SEQ. ID. NO.5 所示氨基酸序列的蛋白质;

- iii.具有如 SEQ. ID. NO.7 所示氨基酸序列的蛋白质;
- iv.具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质;
- v.具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质; 和
- vi.能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的上述蛋白质的任何部分。

13.权利要求 12 的疫苗, 其中所述疫苗进一步含有选自下列的佐剂:

- a)氢氧化铝;
- b)QuilA; 和
- c)Montamide。

14.权利要求 12 的疫苗, 其进一步含有与所述重组蛋白质可操作相连的细胞因子。

15.权利要求 14 的疫苗, 其中所述细胞因子选自:

- a)白细胞介素-1 β (IL-1 β);
- b)粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);
- c) γ 干扰素(γ -IFN);
- d)IL-1 β 蛋白的氨基酸 VQGEESENDK; 和
- e)能引发抗犬埃里希氏体的改善免疫原性反应的上述任何细胞因子的任何部分。

16.权利要求 12 的疫苗, 其中通过选自下列的方法将所述疫苗施用于

宿主：

a)肌肉注射；和

b)皮下注射。

17.权利要求 16 的疫苗，其中所述宿主是犬。

18.权利要求 5 的疫苗，其含有包括 T 细胞表位的重组蛋白质，其中所述 T 细胞表位含有选自下列的蛋白质的氨基酸肽片段：

a)具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质；

b)具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质；

c)具有如 SEQ. ID. NO. 7 所示氨基酸序列的蛋白质；

d)具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质；

e)具有如 SEQ. ID. NO.11 所示氨基酸序列的蛋白质；和

f)能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的上述蛋白质的任何部分。

19.权利要求 18 的疫苗，其中所述氨基酸肽片段含有 9 至 20 个氨基酸。

20.权利要求 18 的疫苗，其进一步含有编码蛋白质的重组 DNA，所述蛋白质能被内化至真核细胞，包括免疫系统的细胞。

21.权利要求 20 的疫苗，其中所述能内化至真核细胞的蛋白质含有选

自下列的毒素：

- a) 支气管败血性博德特氏杆菌的重组腺苷酸环化酶； 和
- b) 铜绿假单胞菌的重组外毒素 A(PE)。

22. 权利要求 18 的疫苗，其中通过选自下列的方法将所述疫苗施用于宿主：

- a) 肌肉注射； 和
- b) 皮下注射。

23. 权利要求 22 的疫苗，其中所述宿主是犬。

24. 鉴定抗犬埃里希氏体的 T 细胞表位的方法，其包括：

- a) 在蛋白质的整个长度上合成重叠的肽片段，其中所述蛋白质选自：
 - i. 具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质；
 - ii. 具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质；
 - iii. 具有如 SEQ. ID. NO. 7 所示氨基酸序列的蛋白质；
 - iv. 具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质；
 - v. 具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质； 和
 - vi. 能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的上述蛋白质的任何部分；
- b) 检测所述肽片段以测定所述肽片段是否在宿主动物中引发免疫应答； 和
- c) 如果所述片段引发了免疫应答，则将所述肽片段鉴定为所述的犬埃

里希氏体 T 细胞表位。

25.权利要求 24 的方法，其中所述肽片段含有 9 至 20 个氨基酸。

26.产生抗犬埃里希氏体的疫苗的方法，其包括：

a)选择能表达插入所述载体的重组 DNA 的载体；和

b)将重组 DNA 插入所述载体，使得当在适当宿主中提供所述载体时，可以表达重组蛋白质，其中所述 DNA 选自：

i.编码具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

ii.编码具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

iii.编码具有如 SEQ. ID. NO.7 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

iv.编码具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

v.编码具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA；

和

vi.编码能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的蛋白质的上述 DNA 的任何部分。

27.权利要求 26 的方法，其中所述 DNA 进一步含有编码 CpG 基元的 DNA。

28.权利要求 26 的方法，其中所述 DNA 进一步含有选自下列的启动子：

- a)巨细胞病毒(CMV)即早期启动子;
- b)人组织纤溶酶原激活物基因(t-PA); 和
- c)人延伸因子 α (EF-1 α)的启动子/增强子区域。

29.权利要求 26 的方法, 其中所述载体选自:

- a) pcDNA3;
- b) pCl;
- c) VR1012; 和
- d) VR1020。

30.权利要求 26 的方法, 其中通过选自下列的方法将所述疫苗施用于所述宿主:

- a)肌肉注射;
- b)静脉内注射; 和
- c)基因枪注射。

31.权利要求 30 的方法, 其中所述宿主是犬。

32.产生抗犬埃里希氏体的疫苗的方法, 其包括:

- a)选择能表达插入所述载体的重组蛋白质的载体;
- b)将重组 DNA 插入所述载体, 使得当将所述载体转化至细菌菌株时, 可以表达所述重组蛋白质, 其中所述 DNA 选自:

- i. 编码具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
 - ii. 编码具有如 SEQ. ID. NO. 5 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
 - iii. 编码具有如 SEQ. ID. NO. 7 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
 - iv. 编码具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
 - v. 编码具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质的重组 DNA;
- 和
- vi. 编码能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的蛋白质的上述 DNA 的任何部分;
- c) 从所述细菌菌株中收集所述重组蛋白质。

33. 权利要求 32 的方法, 其中所述疫苗进一步含有选自下列的佐剂:

- a) 氢氧化铝;
- b) QuilA; 和
- c) Montamide。

34. 权利要求 32 的方法, 其中所述疫苗进一步含有选自下列的启动子:

- a) tac;
- b) T5; 和
- c) T7。

35. 权利要求 32 的方法, 其中所述细菌菌株是大肠杆菌。

36.权利要求 32 的方法，其中所述载体选自：

a)pREST；

b)pET；和

c)pKK233-3。

37.权利要求 32 的方法，其中所述疫苗进一步含有与所述疫苗可操作相连的细胞因子。

38.权利要求 37 的方法，其中所述细胞因子选自：

a)白细胞介素-1 β (IL-1 β)；

b)粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)；

c) γ 干扰素(γ -IFN)；

d)IL-1 β 蛋白的氨基酸 VQGEEESNDK；和

e)能引发抗犬埃里希氏体的改善免疫原性反应的上述任何细胞因子的任何部分。

39.权利要求 32 的方法，其中通过选自下列的方法将所述疫苗注射至所述宿主：

a)肌肉注射；和

b)皮下注射。

40.权利要求 39 的方法，其中所述宿主是犬。

41.产生 T 细胞表位疫苗的方法，其包括：

a)选择包括 T 细胞表位的重组蛋白质，其中所述 T 细胞表位含有选自下列的蛋白质的氨基酸肽片段：

i.具有如 SEQ. ID. NO. 3 所示氨基酸序列的蛋白质；

ii.具有如 SEQ. ID. NO.5 所示氨基酸序列的蛋白质；

iii.具有如 SEQ. ID. NO.7 所示氨基酸序列的蛋白质；

iv.具有如 SEQ. ID. NO. 9 所示氨基酸序列的蛋白质；

v.具有如 SEQ. ID. NO. 11 所示氨基酸序列的蛋白质；和

vi.能引发抗犬埃里希氏体免疫应答的上述蛋白质的任何部分；

b)从所述蛋白质中鉴定所述 T 细胞表位；

c)将所述 T 细胞表位掺入能将所述表位表达为蛋白质的构建体；和

d)收获所述蛋白质。

42.权利要求 41 的方法，其中所述氨基酸肽片段含有 9 至 20 个氨基酸。

43.权利要求 41 的方法，其中能表达所述表位的所述构建体进一步含有编码蛋白质的重组 DNA，所述蛋白质能被内化至真核细胞，包括免疫系统的细胞。

44.权利要求 43 的方法，其中所述能内化至真核细胞的蛋白质含有选

自下列的毒素：

a)支气管败血性博德特氏杆菌的重组腺苷酸环化酶；和

b)铜绿假单胞菌的重组外毒素 A(PE)。

45.权利要求 41 的方法，其中通过选自下列的方法将所述疫苗注射至宿主：

a)肌肉注射；和

b)皮下注射。

46.权利要求 45 的方法，其中所述宿主是犬。

说明书

犬埃里希氏体的基因和疫苗

发明领域

本发明涉及兽医病原体领域。本发明更具体地涉及细菌的犬病原体犬埃里希氏体的特定基因的序列，以及该技术在开发疫苗中的应用。

发明背景

本发明涉及犬埃里希氏体细菌的基因序列，和抗此生物体的疫苗的开发。

犬埃里希氏体是小的，专性胞内的革兰氏阴性细菌。该细菌是犬单核细胞埃里希病(CME)的致病因子，CME 是一种主要感染犬的蜱传疾病。犬埃里希氏体最常见的载体是褐色犬蜱 *Rhipicephalus sanguineus*。该病最早于 1935 年描述于阿尔及利亚。随后，于 1962 年在美国得以确认，但目前已传播到世界上的很多地方。在越南战争期间，犬单核细胞埃里希病吸引了很多关注，当时有 160 条军犬死于犬埃里希氏体感染。当前，还没有抗犬埃里希氏体的免疫接种措施。该病是威胁生命的疾病，一直是兽医和宠物拥有者所关心的重要健康问题。

犬单核细胞埃里希病是传染性的血液病。该病的主要特征是细胞血液因子的减少。犬埃里希氏体在白血细胞(白细胞)中生长和繁殖，

最终影响整个淋巴系统，并破坏多个器官。通过靶向白血细胞，这些细胞快速死亡。这些死亡的血细胞主要迁移至脾脏，结果使脾脏肿大。骨髓意识到白血细胞的丧失，开始工作以形成新的健康细胞。骨髓将不成熟的细胞发送出去，这些不成熟的细胞不能适当地工作。这些不成熟的细胞经常模仿白血病患者的那些细胞，因此该病被误诊为白血病。犬单核细胞埃里希病使犬易患多种癌症。

犬单核细胞埃里希病分三个时期。第一期即急性期很象是轻微病毒感染。在急性期，大多数(如果不是全部的话)损害是可逆的，动物可能会恢复。此阶段的治疗最为有效，迫切需要早期检测。然而，如果不进行治疗，动物会发展成亚临床(第二)期和/或慢性(第三)期。当动物到达慢性期时，细菌生物体已定居于骨髓内。此期的很多犬遭遇大面积的内出血，或出现致命的并发症，如突然中风，心脏病突发，肾衰竭，脾破裂或肝脏衰竭。

可以在体外，在哺乳动物-衍生的细胞系(DH82)中培养犬埃里希氏体。连续维持这些细胞是困难的，因为在细胞培养物中必须每两周添加一次原代单核细胞(骨髓中发现的白血细胞)。培养物生长很慢，而培养基很昂贵。

有关犬埃里希氏体基因组中的基因的资料主要集中在 16S rRNA 基因上。以前的工作已测定了该基因的序列，所述基因是埃里希氏体家族成员以及世界上大多数生物中普遍存在的组分。该基因在所有生物中的高序列同源性使其难以成为疫苗开发的候选基因。如果希望得到抗此致命疾病的疫苗，必须在该基因组中寻找其它基因。

对 16S rRNA 基因的测序结果表明：犬埃里希氏体与人埃里希病的新病原体恰菲埃里希氏体密切相关(98.2%同源性)。当用抗犬埃里希氏体，恰菲埃里希氏体和尤氏埃里希氏体(另一种人埃里希病的病原体)的抗血清探测时，犬埃里希氏体的 Western 印迹是相似的，表明这三种埃里希氏体之间有密切的抗原关系(Chen 等, 1994)。

已开发出间接荧光抗体试验(IFA)用于检测犬单核细胞埃里希病。IFA 检测犬血液中抗入侵生物的抗体的存在。不幸的是，该试验不是总准确。有时，处于急性期的犬被检测为阴性，因为它们的免疫系统延迟形成抗体。如果慢性期的滴度低的话，会出现另一种错误的阴性结果。该试验的另一个缺点是可发现交叉-反应性。抗犬埃里希氏体的多克隆抗体可与恰菲埃里希氏体呈阳性反应，暗中破坏了该试验的特异性。已使用了另一种试验，即 Giesma 涂片来定位犬血液中实际存在的生物体。不幸的是，尽管使用了适当的染色技术和加强的胶片检查，但经常不能定位生物体。这些试验可能出现的错误使得必须为该疾病提供较好的诊断工具。

由于难以检测蜱咬伤，早期诊断感染，抑制宿主防御和该病持久感染的特性，因此犬迫切需要抗犬埃里希氏体的有效疫苗。

发明简述

本发明公开了犬埃里希氏体基因的新序列资料。具体地说，已鉴定并测序了一个克隆。在此克隆内已鉴定出 4 种被称为 ProA, ProB, ORF(功能未知的开放阅读框)和细胞色素氧化酶同系物的蛋白质。另

外，已发现编码脂蛋白信号肽酶同系物的部分基因。

本发明的实施方案包括用此序列和蛋白质信息生产疫苗。本发明公开的蛋白质的抗原性很强。因此，它们作为疫苗可能是很有用的。通过此项新技术可以制备的疫苗类型包括 DNA 疫苗，重组疫苗和 T 细胞表位疫苗。

附图简述

图 1 显示了 3 个在文库筛选中鉴定的克隆。

优选实施方案的描述

犬埃里希氏体导致破坏性的犬病。目前，还没有疫苗能用于预防该病。本发明提供了开发疫苗所必需的工具。更具体地，已由犬埃里希氏体的基因组片断鉴定出 4 种基因，即 ProA, ProB, ORF 和细胞色素氧化酶同系物。另外，还发现了编码脂蛋白信号肽酶同系物的部分基因。在本发明的实施方案中，可以使用这些蛋白质中的任何一种来开发疫苗。

筛选犬埃里希氏体文库

为了鉴定犬埃里希氏体基因组中的基因，需构建基因组 DNA 表达文库。通过本领域已知的，并列入参考文献(Dawson 等, 1991; Rikihisa, 1992)的技术, 在犬细胞系 DH82 中培养分离自患有犬埃里希病的犬的犬埃里希氏体菌株。收集细胞，按本领域已知技术(Chang

等, 1987; Chang 等, 1989a; Chang 等, 1989b; Chang 等, 1993a; Chang 等, 1993b)所述提取染色体 DNA。为了构建文库, 用 *Sau*3A 部分消化 200 μ g DNA。分离 3 至 8kb 的 DNA 片断, 并与质粒 pHG165 (Stewart 等, 1986)连接。用所述质粒转化大肠杆菌 TB1(Chang 等, 1987)。

用抗犬埃里希氏体的多克隆抗体筛选文库。多克隆抗体产生自被携有犬埃里希氏体的蜱咬过的犬。用大肠杆菌宿主菌株裂解物预吸附多克隆抗体。以 1,000 个菌落形成单位的密度将文库铺于平皿上。将菌落转移至硝酸纤维素滤膜, 用 1ml 预吸附的多克隆抗体探测每个滤膜。用由与碱性磷酸酶-缀合的山羊抗-兔 IgG(Kirkegaard 和 Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)组成的第二抗体鉴定阳性菌落, 然后, 用含有氮蓝四唑(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸(BCIP)的底物溶液显色。将阳性克隆重新筛选 3 次。

由此筛选方法分离出 3 个克隆(图 1)。最长的基因组片段(pCH4)编码 4 个完整的基因和 1 个部分基因。它完整地编码蛋白质 ProA, ProB, ORF 和细胞色素氧化酶同系物, 并含有脂蛋白信号肽酶同系物的部分序列。ProA 和 ProB 位于单个操纵子上。通过本领域已知的, 并列入参考文献(Chang 等, 1987; Chang 等, 1989a; Chang 等, 1989b; Chang 等, 1993a ;

Chang 等, 1993b)的技术进行限制性内切核酸酶消化作图和 DNA 测序。简单地说, 通过在 ABI PRISM 377 型 DNA 系统上进行自动化 DNA 测序来测定 DNA 序列。通过引物步移测定两条链上的完整核苷酸序列。测序反应的热循环利用了 Taq DyeDeoxy™ Terminator Cycle

测序试剂盒。通过使用国家生物技术信息中心(NCBI)的 BLAST 网络服务器，在数据库中搜索同源蛋白质(Althchul 等, 1990; Gish 等, 1993)。

序列信息

对犬埃里希氏体基因进行测序。克隆的片段含有 5, 300 个核苷酸，并编码 4 种蛋白质。在羧基末端也有一个部分基因。SEQ. ID. NO. 1 是完整的核苷酸序列。SEQ. ID. NO. 2 和 3 是 SEQ. ID. NO. 1 的核苷酸 12 至 533 的翻译产物，并编码细胞色素氧化酶同系物。细胞色素氧化酶对毒力至关重要，因此可用于候选疫苗。SEQ. ID. NO. 4 和 5 是 SEQ. ID. NO. 1 的核苷酸 939 至 2252 的翻译产物，并编码 ProA。SEQ. ID. NO. 6 和 7 是 SEQ. ID. NO. 1 的核苷酸 2258 至 3664 的翻译产物，并编码 ProB。初步证据表明 ProA 和 ProB 是蛋白酶。SEQ. ID. NO. 8 和 9 是 SEQ. ID. NO. 1 的核苷酸 4,121 至 4,795 的翻译产物，并编码具有未知功能的蛋白质 ORF。SEQ. ID. NO. 10 和 11 是 SEQ. ID. NO. 1 的核苷酸 4,884 至 5,300 的互补序列的翻译产物，并编码脂蛋白信号肽酶同系物的部分序列。脂蛋白信号肽酶是膜蛋白，本性上不大适合疫苗开发。然而，在生产疫苗时，该蛋白质仍值得研究。

过量表达 ProA, ProB, ORF 细胞色素氧化酶和脂蛋白信号肽酶同系物

在 T7 启动子质粒中过量表达犬埃里希氏体抗原。pRSET 载体允许在 T7 RNA 聚合酶的存在下在大肠杆菌中进行高水平的表达，所述

聚合酶对 T7 启动子具有强亲和性。将抗原基因亚克隆至 pRSET 载体之后，将亚克隆转化至 F'大肠杆菌 JM109 菌株。为了使蛋白质表达水平最高，将转化子培养至 O. D. 600=0.3，暴露于 IPTG (1 mM)达 1 小时，然后以每个细胞 5-10 个噬斑形成单位(pfu)的感染复数(MOI)，用 M13/T7 噬菌体转染。时间进程研究表明在诱导后 2 小时达到最大诱导。

离心收集沉淀物，将细胞重新悬浮于 6M 胍(pH 7.8)。通过本领域已知的，并列入参考文献(Chang 等, 1993c)的技术，用弗式压碎器破碎细胞，以 6000 rpm 旋转总裂解物以分离细胞碎片。按厂商 (Invitrogen, San Diego, CA)说明，在变性条件下使用固定化金属离子亲和层析(IMIAC)纯化每种蛋白质。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)分离蛋白质样品，用考马斯蓝染色之后进行观察。

疫苗开发

在本发明之前，未开发出抗犬埃里希氏体的疫苗。犬埃里希氏体是世界上很多地方的犬和密切相关的犬科动物所特有的。北美犬的风险也正在增加，使用本发明可能会每年挽救数千只犬的生命。极其需要一种犬埃里希氏体疫苗，该疫苗能引发抗这种蜱传犬病的细胞-介导的免疫力。

DNA 疫苗

通过将感兴趣的基因亚克隆至真核质粒载体，可以构建 DNA 疫苗。候选载体包括但不限于 pcDNA3, pCI, VR1012, 和 VR1020。该构建体被用作疫苗。

新鉴定的基因中的每一种，ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶同系物可用于产生 DNA 疫苗(评论见 Robinson, 1997)。另外，这些蛋白质中的任何免疫活性部分都是潜在的候选疫苗。构建在表达载体中含有这些基因中的某一个的质粒。必须以正确的方向插入基因，从而使基因能在真核启动子的控制下被表达。可用的启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)即早期启动子，人组织纤溶酶原激活物(t-PA)基因(鉴定于 Degen 等, 1986)，和人延伸因子 α (EF-1 α)的启动子/增强子区域(鉴定于 Uetsuki 等, 1989)。方向由限制性内切核酸酶消化和 DNA 测序鉴定。

通过对瞬时转染的 COS 细胞进行间接免疫荧光染色来证实这些基因产物的表达。将不含这些基因的相同质粒用作对照。将质粒 DNA 转化至大肠杆菌 DH5 α 。通过氯化铯梯度纯化 DNA，通过本领域已知的，并列入参考文献(Nyika 等, 1998)的标准技术测定浓度。

一旦纯化出载体，将含有 DNA 的载体悬浮于磷酸盐缓冲盐水溶液，直接注射至犬。可用针头经肌肉或静脉内进行接种。或者，可通过本领域已知的，并列入参考文献(Fynan 等, 1993)的技术，使用基因枪将包被有 DNA 的金珠转运至细胞。此类疫苗的基本原理是经接种的宿主在其细胞中表达质粒 DNA，并产生能引起免疫应答的蛋白质。通过此技术，可使用新鉴定的基因中的每一种来产生疫苗。

CpG 分子可用作疫苗中的佐剂。该技术是本领域已知的，并列入本文作为参考(Klinman 等, 1997)。佐剂是辅助抗原或增加针对抗原的免疫应答的物质。基元由未甲基化的 CpG 二核苷酸组成, 所述二核苷酸的侧翼有 2 个 5'嘌呤和 2 个 3'嘧啶。已证实含有 CpG 基元的寡核苷酸可激活免疫系统, 从而加强抗原-特异性免疫应答。在本发明中, 通过混合 CpG 寡核苷酸与 DNA 疫苗, 或使 CpG 基元与质粒 DNA 物理连接即可利用此效果。

重组疫苗

为了开发重组疫苗, 将每种基因分别亚克隆至过量表达载体上, 然后进行纯化以用于疫苗开发。在具有强启动子, 如 tac, T5 或 T7 启动子的质粒中表达 ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶同系物。或者, 将这些蛋白质的免疫活性片段用于开发疫苗。按上述将这些基因中的每一种亚克隆至质粒, 并转化至大肠杆菌菌株。

使用具有强启动子的载体过量表达重组蛋白质。用于此技术的载体包括 pREST(Invitrogen Inc., CA), pKK233-3 (Pharmacia, CA)和 pET 系统(Promega, WI), 但也可使用任何具有强启动子的载体。过量表达之后, 纯化蛋白质并与佐剂混合。可用的佐剂包括但不限于氢氧化铝, QuilA 或 Montamide。通过本领域已知的, 并列入参考文献(Chang 等, 1993c; Chang 等, 1995)的技术将纯化的蛋白质用作免疫原以免疫犬。简单地说, 在大肠杆菌中表达各种蛋白质, 并从中纯化蛋白质。

然后，用纯化的重组疫苗和佐剂肌肉或皮下注射犬。注射引发了免疫应答。

T 细胞表位疫苗

由 CD8⁺ T 淋巴细胞(CTL)介导的直接细胞毒性是抗细胞内病原体防御的主要机理。这些效应淋巴细胞通过识别与细胞表面上的 MHC I 类分子相连的短肽来消除感染细胞。外源抗原进入内体途径，并被呈递至与 II 类分子相关的 CD4⁺ T 细胞，而内源合成的抗原被呈递至与 MHC I 类分子相关的 CD8⁺ T 细胞。犬埃里希氏体是定居于单核细胞和巨噬细胞的胞内病原体。本发明开发出产生犬埃里希氏体-特异性 CTL 反应的新方法，所述 CTL 反应可从感染动物的单核细胞或巨噬细胞中消除生物体。

增加蛋白质疫苗的保护性反应的策略是用蛋白质的选择性表位进行免疫。其基本原理是表位疫苗含有最相关的免疫原性肽组分，而不含不相关的部分。因此，需寻找新鉴定的蛋白质中抗原性最高的部分。

为了从新发现的蛋白质中鉴定出 T-细胞表位，起初通过进行电子检索来寻找与已知的 T-细胞表位同源的序列。另外，进行充分的 T-细胞表位作图。检测每一种蛋白质，ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶同系物和部分脂蛋白信号肽酶同系物的免疫原性肽片段。通过本领域已知的技术对 T 细胞表位进行作图的方法列入本文作为参考 (Launois 等, 1994; Lee 和

Horwitz, 1999)。简单地说，在所研究蛋白质的整个长度上合成短的重叠肽序列(9-20 个氨基酸)。使用已用感兴趣的蛋白质免疫过的健康犬来检测这些短的肽片段。检测这些犬的外周血单核细胞的 T 细胞刺激和 IFN- γ 诱导特性。那些能引发最强反应的片段是最佳的 T-细胞表位候选疫苗。

一旦鉴定出可制备最佳表位的片段，构建支气管败血性博德特氏杆菌的重组腺苷酸环化酶，该酶携有犬埃里希氏体 CD8+ T 细胞表位。支气管败血性博德特氏杆菌的腺苷酸环化酶毒素(CyaA)导致犬病并引发免疫应答。另外，CyaA 较适合胞质内靶向。其对应于 1706 个残基长的蛋白质 N-末端 400 个氨基酸残基的催化结构域(AC)可被传递至很多真核细胞，包括免疫系统的细胞。毒素内化不依赖于受体-介导的胞吞，这表明催化结构域可直接通过胞质膜传递至靶细胞的胞质溶胶。铜绿假单胞菌外毒素 A(PE)是另一种毒素，它可通过本领域已知的，列入参考文献(Donnely 等, 1993)的技术用于此方法，将肽或蛋白质传递至细胞。

已将外源肽(16 个残基)插入 CyaA AC 结构域的多个位点，而不会改变其稳定性或催化和钙调蛋白-结合特性。因此，蛋白质工程可以设计和传递特异性刺激 CTL 的抗原。由于犬埃里希氏体在单核细胞内持续存在，因此，对特异性 CD8+ T 细胞的诱导在犬埃里希病控制方面起着重要作用。

已克隆出支气管败血性博德特氏杆菌的腺苷酸环化酶(AC)毒素(cya)基因。根据支气管败血性博德特氏杆菌的密码子使用情况，设计

合成的双链寡核苷酸，所述寡核苷酸编码 ProA, ProB, ORF 细胞色素氧化酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶同系物的 9 至 20 个氨基酸长的 I 类 T 细胞表位。将互补寡核苷酸插入克隆的 *cya* AC-编码序列的高变区。在其它系统中，该技术是本领域已知的，并列入参考文献(Sebo 等, 1995; Guermonprez 等, 1999)。

对携有嵌合 *cya* 基因的重组质粒进行测序以测定插入表位的拷贝数和方向。从测序的质粒中选择在正确的方向上具有指定为 T-细胞表位(CD8+)的完整插入物拷贝的质粒。新的嵌合蛋白质进入真核细胞的能力是确保表位细胞内靶向所必需的(Fayolle 等, 1996)。

可以两种方法中的一种产生疫苗。重组嵌合蛋白质可以被纯化并用于接种犬。或者，通过等位基因交换产生减毒的支气管败血性博德特氏杆菌菌株，通过框内插入腺苷酸环化酶，该菌株携有 T-细胞表位或犬埃里希氏体基因。等位基因-交换是本领域已知的技术，并列入参考文献 (Cotter 和 Miller, 1994)。

最终，测定用腺苷酸环化酶-ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶同系物或脂蛋白信号肽酶同系物嵌合蛋白质免疫的犬中抗犬埃里希氏体感染的保护作用。用 PBS 将野生型和重组 AC 和 CyA 稀释至工作浓度，将嵌合蛋白质肌内或皮下注射至犬中。或者，将 T-细胞表位框内插入减毒支气管败血性博德特氏杆菌菌株的腺苷酸环化酶基因，给犬施用活细菌。

重组抗原是抗多种病原体的人和动物免疫的理想候选抗原。然而，严重的缺点是相对于天然抗原而言，重组抗原的免疫原性差。因

此, 开发新重组疫苗的主要挑战是拥有能增加抗原免疫原性的新佐剂系统。细胞因子是强有力的免疫调节分子。在本发明中可用作佐剂的细胞因子包括但不限于 IL-12 (白细胞介素-12), GM-CSF (粒细胞-巨噬细胞 集落刺激因子), IL-1 β (白细胞介素-1 β)和 γ -IFN (γ 干扰素)。

这些细胞因子对免疫的宿主具有消极的副作用, 包括致热原的和/或促炎症的症状。因此, 为了避免整个细胞因子蛋白质的副作用, 另一种方法是使用具有所需免疫刺激特性的合成肽片段。IL-1 β 的九肽序列 VQGEESNDK 被赋予强有力的免疫-增强特性, 在这里讨论它是为了阐明细胞因子增加免疫原性的用途。

将该九肽插入 ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶同系物, 或部分脂蛋白信号肽酶同系物蛋白质, 将其免疫原性与天然蛋白质的相比较。据报道, 将该序列插入免疫原性差的重组抗原中可增加免疫后出现强保护性免疫应答的机会。该肽可增强抗 T-依赖型和 T-非依赖型抗原的体内免疫应答。犬 IL-1 β 序列可模拟完整 IL-1 β 分子的很多免疫调节活性, 而明显缺乏该分子的很多不合乎需要的促炎症特性。使用该策略可增强 ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶,部分脂蛋白信号肽酶同系物和其它犬埃里希氏体抗原的免疫原性。

通过插入包括犬埃里希氏体的 ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶蛋白质的片段, 由 pBR322 质粒衍生得到质粒 pYFC199。该质粒含有唯一的 HindIII 位点, 其中可在框内插入编码外源序列的插入物。退火编码犬 IL-1 β 163-171 肽的两个互补寡核苷酸

AGGCTTGTTTCAGGGTGAAGAAGAATCCAACGACAAAAGCTT
和 AAGCTTTTGTTCGTTGGATTCTTCACCCTGAAC TTGCCA, 用
HindIII 切割, 并插入 pYFC199 HindIII 位点。测序携有嵌合 IL-1 β 基
因的重组质粒以测定插入表位的方向。

在犬中检测重组蛋白质作为疫苗的效力。将纯化的蛋白质腹膜内
注射至犬。将无特定病原体(SPF)的犬分成 5 组: 给一组施用重组的
支气管败血性博德特氏杆菌腺苷酸环化酶, 其携有衍生自 ProA, ProB,
ORF, 细胞色素氧化酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶同系物的犬埃里
希氏体 CD8+ T 细胞表位, 给一组施用重组的支气管败血性博德特氏
杆菌腺苷酸环化酶作为对照, 给一组施用 ProA, ProB, ORF, 细胞色素
氧化酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶同系物蛋白质 + 犬 IL-1 β
163-171 插入物, 给一组施用衍生自 ProA, ProB, ORF, 细胞色素氧化
酶同系物或部分脂蛋白信号肽酶同系物的 T 细胞表位, 给最后一组施
用 PBS 作为阴性对照。

给所有动物免疫 4 次(每次 30-40 μ g)。最后一次免疫后 10 天, 用
10⁷ 个犬埃里希氏体攻击犬。在攻击后的第 5 天, 将每只犬的约 1ml
血液采集至 EDTA 管中。通过培养和 PCR 来检测与对照组相比, 免
疫组是否消除了生物体。使用衍生自克隆基因的两个引物扩增这些犬
的组织或血液样品中的基因产物。也可以设计内部引物以用作寡核苷
酸探针, 与 PCR 基因产物杂交。

本发明提供了迫切需要的抗犬埃里希氏体细菌的疫苗。该疫苗
可用于保护全世界的犬免患犬单核细胞埃里希病。

因此，应理解本文所述的本发明的实施方案只是阐明了本发明原理的应用。本文中提到的阐述性实施方案的细节并不想限制权利要求书的范围，其自身列举了被认为是本发明所必需的那些特征。

序列表

<110> 常永福

<120> 用于疫苗开发的犬埃里希氏体基因

<130> crf2322

<150> U.S. 09/358,322

<151> 1999-07-21

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 5300

<212> DNA

<213> 犬埃里希氏体

<400> 1

```
gatcaaataa aatgaaacca agaataagaa aactatttta tggattaata gcaataatac 60
tatctatgat atgttttagtg tacgcttctg taccactata tagtatattt tgtaaagtaa 120
caggttatgg aggtacagta agaacaagta atatatcaaa ttctaaaata ggtaacacta 180
ttattaaagt cagatttaat gcagatatac acaacaact gccatggaaa ttctatccag 240
aagtatctca tgtatttgta aaaccaggag aacaaaaatt gattttctac cgcgcagaaa 300
atctacttga tgaggacact tcaggaatgg ctgtatataa tgttacacca cataaagtag 360
gaaaatattt taataaggta gcttgttttt gtttcaccaa acaaacatta taccctcatc 420
aaaaactat aatgccagta tcatttttta tagatccagc catagaaaca gatcctgaaa 480
ctgctgacgt aaaactcatc actctttcat atgtattcctt taagtacaaa gaataaactt 540
catataccgt acattataaa ctgattaataa aaaataacta ttaatattga gcaaaataat 600
ttatctattc aacagattct tttcaattag agagtattca aaaacactac aactactgct 660
tgcaactttc tatcactgat atataaaagt gaaataaatt taaaaaactt tagttttaat 720
agaagaattt tattaaagc tttgaatcaa atttaattac tgatataaaa atactattaa 780
acattaacaa tgcttaatta aagtattatt atttacctta atttcataac ctttattaac 840
```

aatttcataa taaaaaatact ttactcttat ttttttatca cttgatatta ttaaataatc 900
atataaaactc ccaaataaac tattgcaagg ttatggtaat gatgaaattt tttacttggt 960
ttttcatagt tttcttaaca atagccaatc atgctttatc ctttaacatt aaagttacac 1020
atgaaaaatt agataatgga atggaagtat acgtgattcc aatcatcgc gcaccagcag 1080
tcatgcacat ggtattatac aaagtcggtg gaactgatga tccagtagga tactctggat 1140
tagcacattt ttttgaacac ttaatgttta gtggaacaga aaaatttcct aatctcatca 1200
gcacacttag taatataggg ggaaatttca atgcaagcac atctcaattt tgtactatat 1260
actacgaatt aatacaaaaa caatatttat ctcttgcaat ggatattgaa tcagacagaa 1320
tgcagaattt taaggttacc gacaaagcat taataagaga acaaaaggta gtcttagaag 1380
aaagaaaaat gagagttgaa agccaagcaa aaaacatact agaagaagaa atggaaaatg 1440
cattttatta caatggatat ggagaccag tagtaggatg ggaacatgaa attagcaact 1500
acaacaaaga agttgctgaa gcctttcata agctacatta tagtcctaata aatgctatat 1560
taattgtaac tggagatgca gatccacaag aagtaatcac acttgcaaaa caatactatg 1620
ggaaaatacc atctaataat aagaaacctt caagtcaagt tagggtagaa ccaccgcata 1680
aaacaaatat gactttaaca ttaaaagaca gttcagtaga aatcccagaa ctgtttttaa 1740
tgtatcaaata accaaatggt attaccaata aaaactacat acttaacatg atgtagcag 1800
aaatactcgg tagtggtaaa ttcagcctgc tttacaatga tttggtaatt aacaatccaa 1860
tagttacatc gataaaaaca gattataatt acttaactga cagcgataat tacctttcca 1920
ttgaagctat acctaaaaac gggatctcta cagaagctgt agaacaagaa attcataaat 1980
gtataaataa ttatttagaa aatggaattt cagcagaata tttagaaagt gcaaagtata 2040
aagtaaaagc acatttaact tatgcatttg acggactaac tttcatatca tatttttatg 2100
gcatgcatct aatactagga gtaccgctat cagaaatcag taatatttac gataccatag 2160
acaaagtaag tatccaagat gttactccg ctatggaaaa tatctttcaa aacaatataa 2220
gattaaccgg gcatttatta cctaattggag aatagttatg agaacatat tgtgttacac 2280
attaatattg attttctttt cattcaatac atatgcaaat gatctcaata ttaacataaa 2340
agaagctaca actaaaaata aaatacacta tctatatggt gaacatcata acctaccaac 2400
aatttcctta aaatttgcatt tcaagaaagc aggatacgtt tatgatgcct ttgataagca 2460
aggacttgca tactttacat caaaaatatt aaacgaagga tcaaaaaaca actatgctct 2520
cagttttgca caacaattag aaggcaaagg tatagactta aaatttgata tagacctaga 2580

caatTTTTat atatcattaa aaaccttata agaaaacttt gaagaagccc tagttttact 2640
cagtgattgc atattcaaca ccgtcacaga tcaagaaata ttcaatagaa taatagcaga 2700
acagattgca catgttaaat cattatattc tgctcctgaa tttatagcta caacagaaat 2760
gaatcacgct atattcaaag ggcaccata ttctaacaaa gtttacggga cattaatac 2820
aatcaataat atcaaccagg aagacgttgc attatatata aaaaatagtt ttgacaagga 2880
acaaaatcgtt atcagcgcag caggagatgt agatccaaca cagctatcaa atttactaga 2940
taaataatatt ctttccaaat tgccatctgg taataacaaa aataccatac cagatacgac 3000
tgtaataaga gaagacacat tattatatgt acagagagat gtaccacaaa gtgtcataat 3060
gtttgctaca gacacagtac catatcacag caaagactat catgcatcaa acttgttcaa 3120
tactatgcta ggcggattaa gtctcaattc aatattaatg atagaattaa gagacaagtt 3180
aggattaaca taccatagta gcagttcact atctaactg aatcatagta atgtgctatt 3240
tggtacaata ttactgata ataccacagt aacaaaatgt atatccgtct taacagatat 3300
tatagagcac attaaaaagt atggagttga tgaagacact tttgcaattg caaaatctag 3360
tattaccaac tcttttattt tatctatggt aaataacaat aatgtagtg agatattggt 3420
aagcttacia ttacacgatc tagatccgag ttatattaat aaatacaatt cttactacia 3480
agcaataaca atagaagaag taataaaaat tgccaagaaa attttatcta atgaattagt 3540
aataattgaa gtaggaaaaa acaataacat aatggcaaa caaatagatg ctaaaaaaca 3600
cataccttgg ttaagtatac aggttattgt atttactaca agtattctat taggttgtat 3660
taagtaagta taagtagctt caatcaata aaaaaacatt aaccaaagtg ttagctctac 3720
cggagaagct tattataagc ttttaacctg ggataaatatg aagttttgct aatgttaagc 3780
aaaaaattag taatcacaat atcaaatTTT ctttacagga ttatatttgTg acctaccata 3840
acaacttata tttagaaaat gacaacagat acacacatca ataaattatc actacaattc 3900
aattaataaa acaatgagta tttttactta attatttaat tttatttttt aaaataaaaat 3960
tacaatttta cttactcaat aaaagcagtt atactaccaa gtattggatg gtattaatcg 4020
gagcaattac tacttaatag tatagctggt gacaagccgc aatctgcggt tcttgacaaa 4080
ataatactaa tcagttaaaa ttttgaagtG tttcaccata atggtattat ttatgaaagc 4140
tcatagcaca agtatacgga actttcagcc tttagaaaga gctgctataa tcattgcagt 4200
gttaggttta gctgcattct tgtttgctgc tgctgcctgc agtgatcgtt tccaaagatt 4260

gcaattaaca aatccatttg taatagcagg aatggttggc cttgcagttc ttttagttgc 4320
ttccttaaca gcagcattaa gtatatgctt aactaaaagt aagcaagtca cacaacatgc 4380
tattagacat cgctttggat acgagtcaag cacttcttct tctgtactgc ttgcaatatc 4440
aataatttct ttattacttg ctgcagcatt ttgtggaaag ataatgggta atgacaaccc 4500
agatctattc tttagcaaga tgcaagaact ctccaatcca cttgttggtg cagctattgt 4560
agccgtttct gttttcctac tctcattcgt aatgtatgct gcaaagaaca ttataagtcc 4620
agataaacia actcacgta ttatattatc taatcaacia actatagaag aagcaaaagt 4680
agatcaagga atgaatattt tgtcagcagt actcccagca gctggcattg acatcatgac 4740
tatagcttct tgtgacattt tagcagtgag cagccgggga tcctctcagc atcaatagat 4800
ttatgtttta gcctgtattc acctttttat taggtgttgt atcgtttctt tatataagtg 4860
tggtatatta tataaaacat ctaggagtta cagttaattt gtttcatgtg gttattactc 4920
tttgccatta ttattactat acctaaaaat ataaaagaat ccgccagggt gaatacaggc 4980
caatgtaagt tattgatata aaaatctata aaatcataga cagcaccata tcttattcta 5040
tctatgatat ttctattga ccccccaata atgattacia gaggtaatct ataatgtggc 5100
tgtactataa ataagtagca taaaacacia gtaatcaaaa tcgagatact acaaaaaaca 5160
acattactat attcaaagtt atttaataata ccaaaactaa ttccagcatt ccacactgta 5220
gtaaagcgca agaagcttaa tatctctatt acacctttat ctctatcaa atttactaca 5280
taccatttac ttacctgatc 5300

<210> 2

<211> 522

<212> DNA

<213> 犬埃里希氏体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(522)

<223> 从核苷 12 到 533 破译的蛋白质
(细胞色素氧化酶同系物)。

<400> 2

atg aaa cca aga ata aga aac act att tat gga tta ata gca ata ata 48
 Met Lys Pro Arg Ile Arg Asn Thr Ile Tyr Gly Leu Ile Ala Ile Ile
 1 5 10 15
 cta tct atg ata tgt tta gtg tac gct tct gta cca cta tat agt ata 96
 Leu Ser Met Ile Cys Leu Val Tyr Ala Ser Val Pro Leu Tyr Ser Ile
 20 25 30
 ttt tgt aaa gta aca ggt tat gga ggt aca gta aga aca agt aat ata 144
 Phe Cys Lys Val Thr Gly Tyr Gly Gly Thr Val Arg Thr Ser Asn Ile
 35 40 45
 tca aat tct aaa ata ggt aac act att att aaa gtc aga ttt aat gca 192
 Ser Asn Ser Lys Ile Gly Asn Thr Ile Ile Lys Val Arg Phe Asn Ala
 50 55 60
 gat ata cac aaa caa ctg cca tgg aaa ttc tat cca gaa gta tct cat 240
 Asp Ile His Lys Gln Leu Pro Trp Lys Phe Tyr Pro Glu Val Ser His
 65 70 75 80
 gta ttt gta aaa cca gga gaa caa aaa ttg att ttc tac cgc gca gaa 288
 Val Phe Val Lys Pro Gly Glu Gln Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Ala Glu
 85 90 95
 aat cta ctt gat gag gac act tca gga atg gct gta tat aat gtt aca 336
 Asn Leu Leu Asp Glu Asp Thr Ser Gly Met Ala Val Tyr Asn Val Thr
 100 105 110
 cca cat aaa gta gga aaa tat ttt aat aag gta gct tgt ttt tgt ttc 384
 Pro His Lys Val Gly Lys Tyr Phe Asn Lys Val Ala Cys Phe Cys Phe
 115 120 125
 acc aaa caa aca tta tac cct cat caa aaa act ata atg cca gta tca 432
 Thr Lys Gln Thr Leu Tyr Pro His Gln Lys Thr Ile Met Pro Val Ser
 130 135 140
 ttt ttt ata gat cca gcc ata gaa aca gat cct gaa act gct gac gta 480
 Phe Phe Ile Asp Pro Ala Ile Glu Thr Asp Pro Glu Thr Ala Asp Val
 145 150 155 160
 aaa ctc atc act ctt tca tat gta ttc ttt aag tac aaa gaa 522
 Lys Leu Ile Thr Leu Ser Tyr Val Phe Phe Lys Tyr Lys Glu
 165 170

<210> 3

<211> 174

<212> PRT

<213> 犬埃里希氏体

<400> 3

Met Lys Pro Arg Ile Arg Asn Thr Ile Tyr Gly Leu Ile Ala Ile Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Met Ile Cys Leu Val Tyr Ala Ser Val Pro Leu Tyr Ser Ile
 20 25 30
 Phe Cys Lys Val Thr Gly Tyr Gly Gly Thr Val Arg Thr Ser Asn Ile
 35 40 45
 Ser Asn Ser Lys Ile Gly Asn Thr Ile Ile Lys Val Arg Phe Asn Ala
 50 55 60
 Asp Ile His Lys Gln Leu Pro Trp Lys Phe Tyr Pro Glu Val Ser His
 65 70 75 80
 Val Phe Val Lys Pro Gly Glu Gln Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Ala Glu
 85 90 95
 Asn Leu Leu Asp Glu Asp Thr Ser Gly Met Ala Val Tyr Asn Val Thr
 100 105 110
 Pro His Lys Val Gly Lys Tyr Phe Asn Lys Val Ala Cys Phe Cys Phe
 115 120 125
 Thr Lys Gln Thr Leu Tyr Pro His Gln Lys Thr Ile Met Pro Val Ser
 130 135 140
 Phe Phe Ile Asp Pro Ala Ile Glu Thr Asp Pro Glu Thr Ala Asp Val
 145 150 155 160
 Lys Leu Ile Thr Leu Ser Tyr Val Phe Phe Lys Tyr Lys Glu
 165 170

<210> 4

<211> 1314

<212> DNA

<213> 犬埃里希氏体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1314)

<223> 从核苷 939 到 2252 破译的蛋白质
(ProA).

<400> 4

atg atg aaa ttt ttt act tgt ttt ttc ata gtt ttc tta aca ata gcc 48
 Met Met Lys Phe Phe Thr Cys Phe Phe Ile Val Phe Leu Thr Ile Ala
 1 5 10 15

aat cat gct tta tcc ttt aac att aaa gtt aca cat gaa aaa tta gat	96
Asn His Ala Leu Ser Phe Asn Ile Lys Val Thr His Glu Lys Leu Asp	
20 25 30	
aat gga atg gaa gta tac gtg att cca aat cat cgc gca cca gca gtc	144
Asn Gly Met Glu Val Tyr Val Ile Pro Asn His Arg Ala Pro Ala Val	
35 40 45	
atg cac atg gta tta tac aaa gtc ggt gga act gat gat cca gta gga	192
Met His Met Val Leu Tyr Lys Val Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Gly	
50 55 60	
tac tct gga tta gca cat ttt ttt gaa cac tta atg ttt agt gga aca	240
Tyr Ser Gly Leu Ala His Phe Phe Glu His Leu Met Phe Ser Gly Thr	
65 70 75 80	
gaa aaa ttt cct aat ctc atc agc aca ctt agt aat ata ggc gga aat	288
Glu Lys Phe Pro Asn Leu Ile Ser Thr Leu Ser Asn Ile Gly Gly Asn	
85 90 95	
ttc aat gca agc aca tct caa ttt tgt act ata tac tac gaa tta ata	336
Phe Asn Ala Ser Thr Ser Gln Phe Cys Thr Ile Tyr Tyr Glu Leu Ile	
100 105 110	
cca aaa caa tat tta tct ctt gca atg gat att gaa tca gac aga atg	384
Pro Lys Gln Tyr Leu Ser Leu Ala Met Asp Ile Glu Ser Asp Arg Met	
115 120 125	
cag aat ttt aag gtt acc gac aaa gca tta ata aga gaa caa aag gta	432
Gln Asn Phe Lys Val Thr Asp Lys Ala Leu Ile Arg Glu Gln Lys Val	
130 135 140	
gtc tta gaa gaa aga aaa atg aga gtt gaa agc caa gca aaa aac ata	480
Val Leu Glu Glu Arg Lys Met Arg Val Glu Ser Gln Ala Lys Asn Ile	
145 150 155 160	
cta gaa gaa gaa atg gaa aat gca ttt tat tac aat gga tat ggc aga	528
Leu Glu Glu Glu Met Glu Asn Ala Phe Tyr Tyr Asn Gly Tyr Gly Arg	
165 170 175	
cca gta gta gga tgg gaa cat gaa att agc aac tac aac aaa gaa gtt	576
Pro Val Val Gly Trp Glu His Glu Ile Ser Asn Tyr Asn Lys Glu Val	
180 185 190	
gct gaa gcc ttt cat aag cta cat tat agt cct aat aat gct ata tta	624
Ala Glu Ala Phe His Lys Leu His Tyr Ser Pro Asn Asn Ala Ile Leu	
195 200 205	
att gta act gga gat gca gat cca caa gaa gta atc aca ctt gca aaa	672
Ile Val Thr Gly Asp Ala Asp Pro Gln Glu Val Ile Thr Leu Ala Lys	
210 215 220	
caa tac tat ggg aaa ata cca tct aat aat aag aaa cct tca agt caa	720
Gln Tyr Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Asn Asn Lys Lys Pro Ser Ser Gln	
225 230 235 240	

gtt agg gta gaa cca ccg cat aaa aca aat atg act tta aca tta aaa 768
 Val Arg Val Glu Pro Pro His Lys Thr Asn Met Thr Leu Thr Leu Lys
 245 250 255

gac agt tca gta gaa atc cca gaa ctg ttt tta atg tat caa ata cca 816
 Asp Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Leu Phe Leu Met Tyr Gln Ile Pro
 260 265 270

aat ggt att acc aat aaa aac tac ata ctt aac atg atg tta gca gaa 864
 Asn Gly Ile Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Leu Asn Met Met Leu Ala Glu
 275 280 285

ata ctc ggt agt ggt aaa ttc agc ctg ctt tac aat gat ttg gta att 912
 Ile Leu Gly Ser Gly Lys Phe Ser Leu Leu Tyr Asn Asp Leu Val Ile
 290 295 300

aac aat cca ata gtt aca tcg ata aaa aca gat tat aat tac tta act 960
 Asn Asn Pro Ile Val Thr Ser Ile Lys Thr Asp Tyr Asn Tyr Leu Thr
 305 310 315 320

gac agc gat aat tac ctt tcc att gaa gct ata cct aaa aac ggg atc 1008
 Asp Ser Asp Asn Tyr Leu Ser Ile Glu Ala Ile Pro Lys Asn Gly Ile
 325 330 335

tct aca gaa gct gta gaa caa gaa att cat aaa tgt ata aat aat tat 1056
 Ser Thr Glu Ala Val Glu Gln Glu Ile His Lys Cys Ile Asn Asn Tyr
 340 345 350

tta gaa aat gga att tca gca gaa tat tta gaa agt gca aag tat aaa 1104
 Leu Glu Asn Gly Ile Ser Ala Glu Tyr Leu Glu Ser Ala Lys Tyr Lys
 355 360 365

gta aaa gca cat tta act tat gca ttt gac gga cta act ttc ata tca 1152
 Val Lys Ala His Leu Thr Tyr Ala Phe Asp Gly Leu Thr Phe Ile Ser
 370 375 380

tat ttt tat ggc atg cat cta ata cta gga gta ccg cta tca gaa atc 1200
 Tyr Phe Tyr Gly Met His Leu Ile Leu Gly Val Pro Leu Ser Glu Ile
 385 390 395 400

agt aat att tac gat acc ata gac aaa gta agt atc caa gat gtt aac 1248
 Ser Asn Ile Tyr Asp Thr Ile Asp Lys Val Ser Ile Gln Asp Val Asn
 405 410 415

tcc gct atg gaa aat atc ttt caa aac aat ata aga tta acc ggg cat 1296
 Ser Ala Met Glu Asn Ile Phe Gln Asn Asn Ile Arg Leu Thr Gly His
 420 425 430

tta tta cct aat gga gaa 1314
 Leu Leu Pro Asn Gly Glu
 435

<210> 5

<211> 438

<212> PRT

<213> 犬埃里希氏体

<400> 5

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

aat	aca	tat	gca	aat	gat	ctc	aat	att	aac	ata	aaa	gaa	gct	aca	act	96
Asn	Thr	Tyr	Ala	Asn	Asp	Leu	Asn	Ile	Asn	Ile	Lys	Glu	Ala	Thr	Thr	
			20					25					30			
aaa	aat	aaa	ata	cac	tat	cta	tat	gtt	gaa	cat	cat	aac	cta	cca	aca	144
Lys	Asn	Lys	Ile	His	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	His	His	Asn	Leu	Pro	Thr	
		35					40					45				
att	tcc	tta	aaa	ttt	gca	ttc	aag	aaa	gca	gga	tac	gct	tat	gat	gcc	192
Ile	Ser	Leu	Lys	Phe	Ala	Phe	Lys	Lys	Ala	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Ala	
	50					55					60					
ttt	gat	aag	caa	gga	ctt	gca	tac	ttt	aca	tca	aaa	ata	tta	aac	gaa	240
Phe	Asp	Lys	Gln	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Thr	Ser	Lys	Ile	Leu	Asn	Glu	
65					70					75					80	
gga	tca	aaa	aac	aac	tat	gct	ctc	agt	ttt	gca	caa	caa	tta	gaa	ggc	288
Gly	Ser	Lys	Asn	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Phe	Ala	Gln	Gln	Leu	Glu	Gly	
				85					90					95		
aaa	ggt	ata	gac	tta	aaa	ttt	gat	ata	gac	cta	gac	aat	ttt	tat	ata	336
Lys	Gly	Ile	Asp	Leu	Lys	Phe	Asp	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Phe	Tyr	Ile	
			100					105					110			
tca	tta	aaa	acc	tta	tca	gaa	aac	ttt	gaa	gaa	gcc	cta	gtt	tta	ctc	384
Ser	Leu	Lys	Thr	Leu	Ser	Glu	Asn	Phe	Glu	Glu	Ala	Leu	Val	Leu	Leu	
		115					120					125				
agt	gat	tgc	ata	ttc	aac	acc	gtc	aca	gat	caa	gaa	ata	ttc	aat	aga	432
Ser	Asp	Cys	Ile	Phe	Asn	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	Phe	Asn	Arg	
	130					135					140					
ata	ata	gca	gaa	cag	att	gca	cat	gtt	aaa	tca	tta	tat	tct	gct	cct	480
Ile	Ile	Ala	Glu	Gln	Ile	Ala	His	Val	Lys	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ala	Pro	
145					150					155					160	
gaa	ttt	ata	gct	aca	aca	gaa	atg	aat	cac	gct	ata	ttc	aaa	ggg	cac	528
Glu	Phe	Ile	Ala	Thr	Thr	Glu	Met	Asn	His	Ala	Ile	Phe	Lys	Gly	His	
				165					170					175		
cca	tat	tct	aac	aaa	gtt	tac	ggg	aca	tta	aat	aca	atc	aat	aat	atc	576
Pro	Tyr	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Gly	Thr	Leu	Asn	Thr	Ile	Asn	Asn	Ile	
			180					185					190			
aac	cag	gaa	gac	gtt	gca	tta	tat	ata	aaa	aat	agt	ttt	gac	aag	gaa	624
Asn	Gln	Glu	Asp	Val	Ala	Leu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Ser	Phe	Asp	Lys	Glu	
		195					200					205				
caa	atc	gtt	atc	agc	gca	gca	gga	gat	gta	gat	cca	aca	cag	cta	tca	672
Gln	Ile	Val	Ile	Ser	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu	Ser	
	210					215					220					
aat	tta	cta	gat	aaa	tat	att	ctt	tcc	aaa	ttg	cca	tct	ggt	aat	aac	720
Asn	Leu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Ser	Gly	Asn	Asn	
225					230					235					240	

aaa aat acc ata cca gat acg act gtt aat aga gaa gac aca tta tta	768
Lys Asn Thr Ile Pro Asp Thr Thr Val Asn Arg Glu Asp Thr Leu Leu	
245 250 255	
tat gta cag aga gat gta cca caa agt gtc ata atg ttt gct aca gac	816
Tyr Val Gln Arg Asp Val Pro Gln Ser Val Ile Met Phe Ala Thr Asp	
260 265 270	
aca gta cca tat cac agc aaa gac tat cat gca tca aac ttg ttc aat	864
Thr Val Pro Tyr His Ser Lys Asp Tyr His Ala Ser Asn Leu Phe Asn	
275 280 285	
act atg cta ggc gga tta agt ctc aat tca ata tta atg ata gaa tta	912
Thr Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Asn Ser Ile Leu Met Ile Glu Leu	
290 295 300	
aga gac aag tta gga tta aca tac cat agt agc agt tca cta tct aac	960
Arg Asp Lys Leu Gly Leu Thr Tyr His Ser Ser Ser Ser Leu Ser Asn	
305 310 315 320	
atg aat cat agt aat gtg cta ttt ggt aca ata ttc act gat aat acc	1008
Met Asn His Ser Asn Val Leu Phe Gly Thr Ile Phe Thr Asp Asn Thr	
325 330 335	
aca gta aca aaa tgt ata tcc gtc tta aca gat att ata gag cac att	1056
Thr Val Thr Lys Cys Ile Ser Val Leu Thr Asp Ile Ile Glu His Ile	
340 345 350	
aaa aag tat gga gtt gat gaa gac act ttt gca att gca aaa tct agt	1104
Lys Lys Tyr Gly Val Asp Glu Asp Thr Phe Ala Ile Ala Lys Ser Ser	
355 360 365	
att acc aac tct ttt att tta tct atg tta aat aac aat aat gtt agt	1152
Ile Thr Asn Ser Phe Ile Leu Ser Met Leu Asn Asn Asn Asn Val Ser	
370 375 380	
gag ata ttg tta agc tta caa tta cac gat cta gat ccg agt tat att	1200
Glu Ile Leu Leu Ser Leu Gln Leu His Asp Leu Asp Pro Ser Tyr Ile	
385 390 395 400	
aat aaa tac aat tct tac tac aaa gca ata aca ata gaa gaa gta aat	1248
Asn Lys Tyr Asn Ser Tyr Tyr Lys Ala Ile Thr Ile Glu Glu Val Asn	
405 410 415	
aaa att gcc aag aaa att tta tct aat gaa tta gta ata att gaa gta	1296
Lys Ile Ala Lys Lys Ile Leu Ser Asn Glu Leu Val Ile Ile Glu Val	
420 425 430	
gga aaa aac aat aac ata aat ggc aaa caa ata gat gct aaa aaa cac	1344
Gly Lys Asn Asn Asn Ile Asn Gly Lys Gln Ile Asp Ala Lys Lys His	
435 440 445	
ata cct tgg tta agt ata cag gtt att gta ttt act aca agt att cta	1392
Ile Pro Trp Leu Ser Ile Gln Val Ile Val Phe Thr Thr Ser Ile Leu	
450 455 460	

tta ggt tgt att aag
Leu Gly Cys Ile Lys
465

1407

<210> 7

<211> 469

<212> PRT

<213> 犬埃里希氏体

<400> 7

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

Asn Leu Leu Asp Lys Tyr Ile Leu Ser Lys Leu Pro Ser Gly Asn Asn
 225 230 235 240
 Lys Asn Thr Ile Pro Asp Thr Thr Val Asn Arg Glu Asp Thr Leu Leu
 245 250 255
 Tyr Val Gln Arg Asp Val Pro Gln Ser Val Ile Met Phe Ala Thr Asp
 260 265 270
 Thr Val Pro Tyr His Ser Lys Asp Tyr His Ala Ser Asn Leu Phe Asn
 275 280 285
 Thr Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Asn Ser Ile Leu Met Ile Glu Leu
 290 295 300
 Arg Asp Lys Leu Gly Leu Thr Tyr His Ser Ser Ser Ser Leu Ser Asn
 305 310 315 320
 Met Asn His Ser Asn Val Leu Phe Gly Thr Ile Phe Thr Asp Asn Thr
 325 330 335
 Thr Val Thr Lys Cys Ile Ser Val Leu Thr Asp Ile Ile Glu His Ile
 340 345 350
 Lys Lys Tyr Gly Val Asp Glu Asp Thr Phe Ala Ile Ala Lys Ser Ser
 355 360 365
 Ile Thr Asn Ser Phe Ile Leu Ser Met Leu Asn Asn Asn Asn Val Ser
 370 375 380
 Glu Ile Leu Leu Ser Leu Gln Leu His Asp Leu Asp Pro Ser Tyr Ile
 385 390 395 400
 Asn Lys Tyr Asn Ser Tyr Tyr Lys Ala Ile Thr Ile Glu Glu Val Asn
 405 410 415
 Lys Ile Ala Lys Lys Ile Leu Ser Asn Glu Leu Val Ile Ile Glu Val
 420 425 430
 Gly Lys Asn Asn Asn Ile Asn Gly Lys Gln Ile Asp Ala Lys Lys His
 435 440 445
 Ile Pro Trp Leu Ser Ile Gln Val Ile Val Phe Thr Thr Ser Ile Leu
 450 455 460
 Leu Gly Cys Ile Lys
 465

<210> 8

<211> 675

<212> DNA

<213> 犬埃里希氏体

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(675)

<223> 从核苷 4121 到 4795 破译的蛋白质
(不明功能的 ORF)

<400> 8

```
atg gta tta ttt atg aaa gct cat agc aca agt ata cgg aac ttt cag 48
Met Val Leu Phe Met Lys Ala His Ser Thr Ser Ile Arg Asn Phe Gln
  1                    5                10                15

cct tta gaa aga gct gct ata atc att gca gtg tta ggt tta gct gca 96
Pro Leu Glu Arg Ala Ala Ile Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu Ala Ala
          20                25                30

ttc ttg ttt gct gct gct gcc tgc agt gat cgt ttc caa aga ttg caa 144
Phe Leu Phe Ala Ala Ala Ala Cys Ser Asp Arg Phe Gln Arg Leu Gln
          35                40                45

tta aca aat cca ttt gta ata gca gga atg gtt ggc ctt gca gtt ctt 192
Leu Thr Asn Pro Phe Val Ile Ala Gly Met Val Gly Leu Ala Val Leu
          50                55                60

tta gtt gct tcc tta aca gca gca tta agt ata tgc tta act aaa agt 240
Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ser Ile Cys Leu Thr Lys Ser
          65                70                75                80

aag caa gtc aca caa cat gct att aga cat cgc ttt gga tac gag tca 288
Lys Gln Val Thr Gln His Ala Ile Arg His Arg Phe Gly Tyr Glu Ser
          85                90                95

agc act tct tct tct gta ctg ctt gca ata tca ata att tct tta tta 336
Ser Thr Ser Ser Ser Val Leu Leu Ala Ile Ser Ile Ile Ser Leu Leu
          100                105                110

ctt gct gca gca ttt tgt gga aag ata atg ggt aat gac aac cca gat 384
Leu Ala Ala Ala Phe Cys Gly Lys Ile Met Gly Asn Asp Asn Pro Asp
          115                120                125

cta ttc ttt agc aag atg caa gaa ctc tcc aat cca ctt gtt gtt gca 432
Leu Phe Phe Ser Lys Met Gln Glu Leu Ser Asn Pro Leu Val Val Ala
          130                135                140

gct att gta gcc gtt tct gtt ttc cta ctc tca ttc gta atg tat gct 480
Ala Ile Val Ala Val Ser Val Phe Leu Leu Ser Phe Val Met Tyr Ala
          145                150                155                160

gca aag aac att ata agt cca gat aaa caa act cac gtt att ata tta 528
Ala Lys Asn Ile Ile Ser Pro Asp Lys Gln Thr His Val Ile Ile Leu
          165                170                175
```

tct aat caa caa act ata gaa gaa gca aaa gta gat caa gga atg aat 576
 Ser Asn Gln Gln Thr Ile Glu Glu Ala Lys Val Asp Gln Gly Met Asn
 180 185 190

att ttg tca gca gta ctc cca gca gct ggc att gac atc atg act ata 624
 Ile Leu Ser Ala Val Leu Pro Ala Ala Gly Ile Asp Ile Met Thr Ile
 195 200 205

gct tct tgt gac att tta gca gtg agc agc cgg gga tcc tct cag cat 672
 Ala Ser Cys Asp Ile Leu Ala Val Ser Ser Arg Gly Ser Ser Gln His
 210 215 220

caa 675
 Gln
 225

<210> 9

<211> 225

<212> PRT

<213> 犬埃里希氏体

<400> 9

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

Pro Leu Glu Arg Ala Ala Ile Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu Ala Ala
 20 25 30

Phe Leu Phe Ala Ala Ala Ala Cys Ser Asp Arg Phe Gln Arg Leu Gln
 35 40 45

Leu Thr Asn Pro Phe Val Ile Ala Gly Met Val Gly Leu Ala Val Leu
 50 55 60

Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ser Ile Cys Leu Thr Lys Ser
 65 70 75 80

Lys Gln Val Thr Gln His Ala Ile Arg His Arg Phe Gly Tyr Glu Ser
 85 90 95

Ser Thr Ser Ser Ser Val Leu Leu Ala Ile Ser Ile Ile Ser Leu Leu
 100 105 110

Leu Ala Ala Ala Phe Cys Gly Lys Ile Met Gly Asn Asp Asn Pro Asp
 115 120 125

Leu Phe Phe Ser Lys Met Gln Glu Leu Ser Asn Pro Leu Val Val Ala
 130 135 140

Ala Ile Val Ala Val Ser Val Phe Leu Leu Ser Phe Val Met Tyr Ala
 145 150 155 160

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

Ser Asn Gln Gln Thr Ile Glu Glu Ala Lys Val Asp Gln Gly Met Asn
180 185 190

Ile Leu Ser Ala Val Leu Pro Ala Ala Gly Ile Asp Ile Met Thr Ile
195 200 205

Ala Ser Cys Asp Ile Leu Ala Val Ser Ser Arg Gly Ser Ser Gln His
210 215 220

Gln
225

<210> 10

<211> 417

<212> DNA

<213> 犬埃里希氏体

<220>

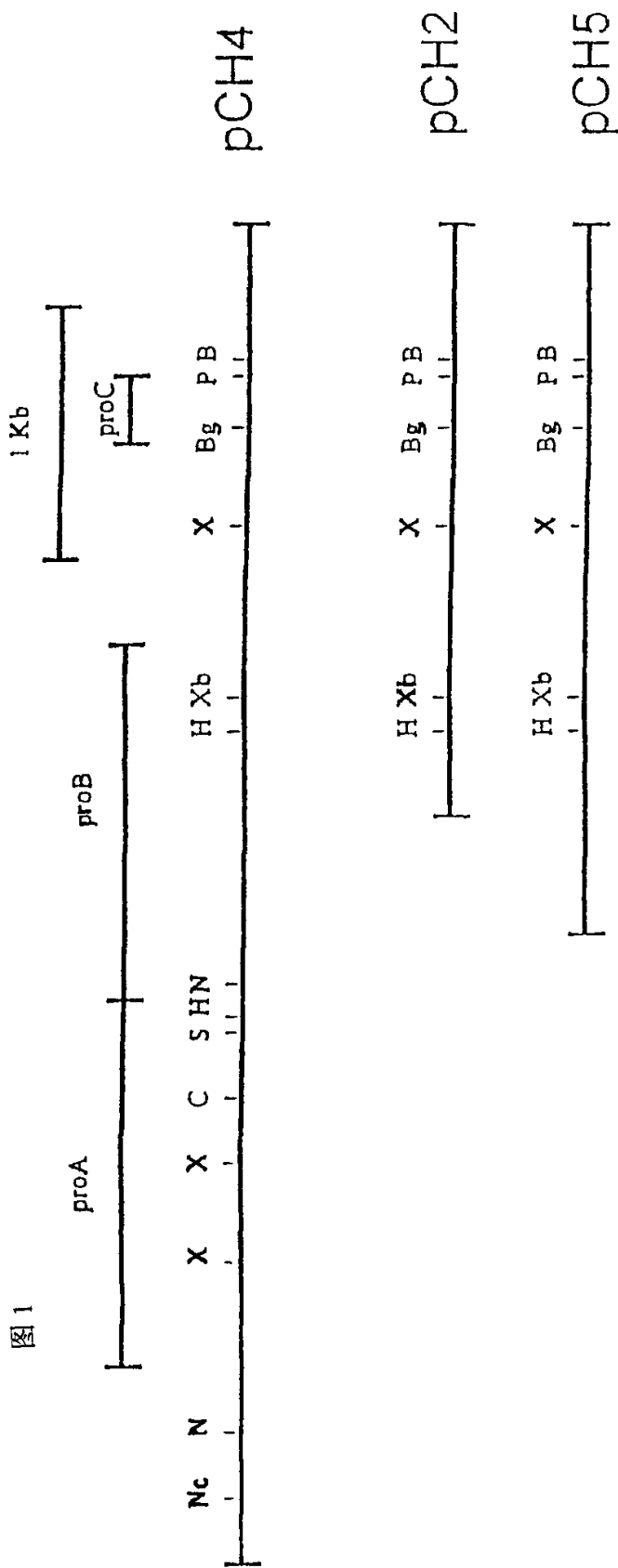
<221> CDS

<222> (1)..(417)

<223> 从核苷 4884 到 5300 衍生的补充序列破译的蛋白质
(编码脂蛋白信号肽酶同系物)

<400> 10

gat cag gta agt aaa tgg tat gta gta aat ttg ata gga gat aaa ggt	48
Asp Gln Val Ser Lys Trp Tyr Val Val Asn Leu Ile Gly Asp Lys Gly	
1 5 10 15	
gta ata gag ata tta agc ttc ttg cgc ttt act aca gtg tgg aat gct	96
Val Ile Glu Ile Leu Ser Phe Leu Arg Phe Thr Thr Val Trp Asn Ala	
20 25 30	
gga att agt ttt ggt ata tta aat aac ttt gaa tat agt aat gtt gtt	144
Gly Ile Ser Phe Gly Ile Leu Asn Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Val Val	
35 40 45	
ttt tgt agt atc tcg att ttg att act tgt gtt tta tgc tac tta ttt	192
Phe Cys Ser Ile Ser Ile Leu Ile Thr Cys Val Leu Cys Tyr Leu Phe	
50 55 60	
ata gta cag cca cat tat aga tta cct ctt gta atc att att ggg ggg	240
Ile Val Gln Pro His Tyr Arg Leu Pro Leu Val Ile Ile Ile Gly Gly	
65 70 75 80	



专利名称(译)	犬埃里希氏体的基因和疫苗		
公开(公告)号	CN1367832A	公开(公告)日	2002-09-04
申请号	CN00810608.8	申请日	2000-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	康乃尔研究基金会有限公司		
申请(专利权)人(译)	科内尔研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	康奈尔研究基金会INC.		
[标]发明人	常永福		
发明人	常永福		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/21 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/39 A61K48/00 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/29 C07K14/47 C12N1/21 C12N9/02 C12N9/52 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N9/0053 A61K39/00 C07K14/29 C12N9/52 Y02A50/403		
代理人(译)	刘国平		
优先权	09/358322 1999-07-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了得自犬埃里希氏体基因组的5300个核苷酸的序列。在此克隆片段中,共编码了4种蛋白质,ProA,ProB,ORF,和细胞色素氧化酶同系物,并且在羧基末端编码部分脂蛋白信号肽酶同系物。这些蛋白质的抗原特性使它们可用于产生疫苗。本发明的实施方案包括产生DNA疫苗,重组疫苗和T细胞表位疫苗。

