

[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 200780004750.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101589306A

[22] 申请日 2007.2.7

[21] 申请号 200780004750.4

[30] 优先权

[32] 2006.2.7 [33] FR [31] 06/01058

[86] 国际申请 PCT/FR2007/000221 2007.2.7

[87] 国际公布 WO2007/090960 法 2007.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.7

[71] 申请人 国立农业研究所

地址 法国巴黎

共同申请人 法国食品卫生安全署 吉林大学

[72] 发明人 P·布瓦罗 刘明远 付宝全

D·勒吕恩 C·巴于翁 I·瓦莱

F·勒盖尔耶尔

R·埃尔南德斯贝洛 吴修平

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 20 页 序列表 10 页  
附图 5 页

[54] 发明名称

由抗毛线虫抗体识别的多肽及其应用

[57] 摘要

本发明涉及由抗毛线虫抗体识别的新多肽。本发明还涉及所述多肽检测抗毛线虫抗体和预防旋毛虫病的应用。

1. 由抗毛线虫抗体识别的抗原性多肽作为在生物样品中检测抗毛线虫抗体的试剂的应用，其特征在于所述多肽包含 NBL1 抗原的免疫优势表位，该表位由序列 PSSGSRPTYP (SEQ ID NO: 5) 定义。

2. 权利要求 1 所述的应用，其特征在于使用包含权利要求 1 所定义的一或多种多肽的混合物，所述混合物任选与以下一或多种多肽组合：包含序列 SEQ ID NO: 4 的氨基酸 25-175 的多肽，或包含与序列 SEQ ID NO: 4 的氨基酸 25-175 有至少 70%相同性的序列的多肽。

3. 权利要求 1 所定义的由抗毛线虫抗体识别的抗原性多肽，其中排除由 Genbank 登录号 AAK16520 确定的多肽和由 Genbank 登录号 AAR36900 确定的多肽。

4. 权利要求 3 所述的抗原性多肽，其含有一或多个以下序列：序列 PSSGSRPTYPSSGSR (SEQ ID NO: 6)；序列 PSSGSRPTYPYTGSR (SEQ ID NO: 7)；序列 RPTSPSSGSRPTYP (SEQ ID NO: 8)。

5. 权利要求 4 所述的抗原性多肽，其含有序列 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 363-409。

6. 权利要求 3 所述的抗原性多肽，其特征在于它由嵌合多肽组成，所述嵌合多肽包含一或多个拷贝的权利要求 1 所定义的多肽，任选还有一或多个拷贝的权利要求 2 所定义的多肽，任选其与一或多个其它异源序列融合。

7. 编码权利要求 3 至 6 任一所述的抗原性多肽的多核苷酸。

8. 包含一或多个权利要求 7 所述的多核苷酸的重组载体。

9. 用权利要求 8 所述的重组载体转化的宿主细胞。

10. 权利要求 1 所定义的多肽在获得能用于生产抗体的组合物中的应

用。

11. 特异识别权利要求 1 所定义的多肽的抗体。

12. 权利要求 11 所述的抗体，其特征在于它识别 PSSGSRPTYP 表位 (SEQ ID NO: 5)。

13. 检测生物样品中抗毛线虫抗体存在的方法，该方法特征在于它包括：

-在允许与可能存在于所述样品中的抗毛线虫抗体形成抗原/抗体复合物的条件下，使所述生物样品与权利要求 1 所定义的一或多种多肽接触，任选还与权利要求 2 所定义的一或多种多肽接触；

-通过合适的方式检测可能形成的抗原/抗体复合物。

14. 用于检测生物样品中抗毛线虫抗体存在的试剂盒，其特征在于它包括权利要求 1 所定义的一或多种多肽，任选组合有权利要求 2 所定义的一或多种多肽，以及在适当时包括适于构成允许形成抗原/抗体复合物的反应介质的缓冲液和试剂，并任选包括用于检测所述抗原/抗体复合物的工具。

15. 权利要求 14 所述的试剂盒，其特征在于所述多肽固定于固体支持物上。

16. 免疫原性组合物，其包含权利要求 1 所定义的一或多种多肽，任选组合有权利要求 2 所定义的一或多种多肽，或一或多种编码权利要求 1 所定义多肽的多核苷酸，任选组合有一或多种编码权利要求 2 所定义多肽的多核苷酸，所述免疫原性组合物与一或多种用于增强免疫应答的佐剂组合。

17. 权利要求 16 所述的免疫原性组合物，其特征在于它是疫苗。

## 由抗毛线虫抗体识别的多肽及其应用

本发明涉及毛线虫属(*Trichinella*)寄生虫中所鉴定出的新抗原在诊断和预防旋毛虫病中的应用。

旋毛虫病是与食用了毛线虫属寄生虫侵染 (infestée) 的肉相关的人畜共患病 (MURRELL 等, 2000)。

有腺纲(*Adenophorea*)的线虫属于毛线虫科 (*Trichinellidae*), 其包括 8 个种和 3 个相关基因型, 可分成 2 个不同系统发生组: 一为有包膜的毛线虫 (旋毛形线虫(*T. spiralis*); 本地毛形线虫(*T. nativa*); 布氏线虫(*T. britovi*); 米氏旋毛虫(*T. murrelli*); 纳氏旋毛虫(*T. nelsoni*)), 其侵染 (infestent) 哺乳动物, 另一为无包膜的毛线虫 (假旋毛形线虫(*T. pseudospiralis*); 巴布亚线虫(*T. papuae*); 津巴布韦线虫(*T. zimbabwensis*)), 其侵染哺乳动物、鸟和爬行动物 (GASSER 等, 2004)。所有这些种都侵染 (infester) 人。

所述寄生虫的生物循环是自异宿主的: 它全部都发生在同一宿主中, 该宿主接着会是最后宿主 (带有成体寄生虫) 和中间宿主 (带有侵染性幼虫) (BOIREAU 等, 2002)。为了进行新的循环, 必须使侵染性幼虫从宿主转移到另一个。该转移通过摄食生的或刚烹调过的污染有幼虫的肉而发生。摄食时, 释放出后者并穿过肠上皮, 其中它们将成熟成有性成体 (Ad) 蠕虫。然后, 受孕的雌体排出新生的 L1 幼虫 (L1NN), 其通过淋巴循环和血流到达横纹肌。这些 L1NN 幼虫穿过肌细胞 (侵染发展阶段 L1M: L1 肌肉幼虫), 在此它们分化成由保护性胶原膜 (capsule) 包围的饲养细胞 (cellules nourricières), 对于有包膜的毛线虫, 所述膜是厚的, 对于“无包膜”的毛线虫, 所述膜是非常薄的。

尽管旋毛虫病在动物中是无症状的, 但在最初的肠阶段, 与恶心、呕吐和剧烈腹痛相关的腹泻反应了人侵染, 肌肉侵入阶段相关症状特征在于发烧、面部水肿和肌痛的并发 (CAPO & DESPOMMIER, 1996)。此旋毛虫病的临床景象中还可以加上眼睛、肺、胃肠、心脏和神经攻击, 其进程可能是致命的。特征为患者持续肌肉疼的慢性侵染与寄生虫在饲养细胞中的存活有关。

如果能早期诊断侵染以采取针对所有寄生阶段（尤其是包围 L1M 幼虫的保护性胶原膜形成前）的行动，则特定的用驱肠虫药对人旋毛虫病的治疗将更有效（FOURESTIE 等，1988）。

流行病学数据证明了该寄生虫于世界所有部分的地理分布，其与涉及了还保持了主要以猪为代表的家畜侵染循环的野生动物群的许多物种的传播方法有关（DUPOUY-CAMET, 2000）。

由于饮食习惯和不总是有效的卫生控制，人旋毛虫病流行病（突发或复发性人畜共患病）构成了全世界的现实公共卫生问题（MURRELL & POZIO, 2000）。这些流行病基本涉及猪和野猪肉以及马肉（BOIREAU 等，2000）。

因此防止人污染涉及正确烹调肉和改善饲养条件和/或控制动物旋毛虫病（猪、马、野马和其它对毛线虫敏感的野生动物）的条件（BOIREAU 等，2002）。

用于旋毛虫病的筛选技术分成两类：1)通过毛线虫镜（trichinoscopie）（显微观察肉片）或在人工消化肌肉样品后直接检测 L1 幼虫，和 2)通过各种免疫方法间接检测，用于检测抗毛线虫属抗原的抗体。

寄生虫的每个发育阶段：成体（Ad）、新生幼虫（L1NN）和肌肉幼虫（L1M）有相应的特异抗原谱。

源于 L1M 阶段幼虫的抗原制品目前用于免疫诊断。这是因为两个早期阶段 Ad 和 L1NN 的抗原级分难于纯化，而且至今不可能鉴定出与这两个阶段的一个和/或另一个相关的免疫优势抗原。

原则上使用的总可溶性抗原制品通过裂解幼虫、离心裂解物并回收上清或更常见地通过排泄/分泌抗原（E/S 抗原）来获得。

在存活状态下将 L1M 幼虫置于培养基，这时来产生排泄-分泌抗原；它们源于被称为杆状体的特定器官，杆状体包含约 50 个盘形细胞杆细胞。杆细胞含颗粒，其内容物通过小管流入寄生虫食道内腔。该内容物有非常高的抗原性，构成排泄-分泌抗原部分。这些抗原形成复杂蛋白混合物，其尤其含一组糖蛋白（称为 TSL1 抗原），其带有特定碳水化合物分子（ $\beta$ -泰威糖），其已知仅在毛线虫属中，而且存在于所有该寄生虫的物种中。

排泄-分泌抗原制品目前用作免疫诊断旋毛虫病的参照，其得自旋毛形线虫（*Trichinella spiralis*）L1M 幼虫的培养基。培养 18 至 20 小时后，通过

过滤回收培养基，然后浓缩（GAMBLE 等，1983；GAMBLE 等，1988）。

总可溶性抗原制品的主要缺点是它们缺乏特异性。常常能观察到与其它寄生虫的抗原交叉反应。排泄-分泌抗原使其可能获得更好的特异性。可是，在两种情况下难以大量产生标准批次的抗原。

含  $\beta$ -泰威糖的糖结构代表了 E/S 抗原制品的免疫优势表位（REASON 等，1994；美国专利 5541075 和 5707817），其已被化学合成并被提议用于免疫诊断毛线虫。

该试剂有好的特异性，但其灵敏性似乎低于 E/S 抗原制品。另外，化学合成该结构是昂贵并费力的。

在血清学诊断毛线虫中遇到的另一个问题是存在对应于早期侵染阶段的检测“盲窗”，其由假阴性结果所反应。另外，在马中，侵染后 25 周观察到抗体逐步消失。

为了提供获得在人和动物中早期、特异和灵敏检测毛线虫侵染的方法，发明人鉴定与毛线虫侵染早期阶段相关的免疫优势抗原并将其用于血清学诊断旋毛虫病。为此，他们研究了是否毛线虫在 L1NN 阶段和/或 Ad 阶段表达的基因产物中存在带有所希望的抗原性质的蛋白。

在本文中，他们发现旋毛形线虫蛋白是该生物体 L1NN 阶段特异表达的蛋白部分，其构成了免疫优势抗原，能早期检测抗毛线虫的体液应答，而且它在各种毛线虫间还是保守的。

该蛋白在下文中被称为 NBL1。编码该蛋白的完整 cDNA 序列和由其推导出的多肽序列分别可在 Genbank 以编号 AF331160 和 AAK16520（也已知为 Swissprot Q9BJL7）而获得；这些序列被注释为“丝氨酸蛋白酶 SS2，其特异于新生幼虫”。这些序列也在所附序列表中以编号 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 表述。编码该蛋白的部分 cDNA 序列和由其推导出的多肽序列分别可在 Genbank 以编号 AY491941 和 AAR36900（也已知为 Swissprot Q6RUJ3）而获得。

发明人还表明与抗 NBL1 的体液应答相关的免疫反应性位于该蛋白的 C 末端部分，并鉴定了负责该反应性的免疫优势表位。

而且，发明人利用混合的旋毛形线虫早期 Ad+L1NN 阶段的 cDNA 文库鉴定了新基因，下文称为 411。

该基因序列在所附序列表中以编号 SEQ ID NO:3 表示，其翻译产物的

序列以编号 SEQ ID NO: 4 表示。该基因的翻译产物与假旋毛形线虫中鉴定的 E/S 抗原相关(78.7%相同性),被称为 Tp21-3 蛋白(AAF79206; NAGANO 等, 2001), 而且与旋毛形线虫的假设 ORF17.20 翻译产物(AAB48489) 相关, 其显示出 86.6%的相同性。

411 基因翻译产物也使其可能在早期阶段检测抗各种毛线虫的体液应答。

另外, 每一种 NBL1 和 411 抗原使其能在进行的测试中检测毛线虫侵染的动物, 其至少在侵染后 (pi) D15-D30 期间不能用其它抗原检测, 也不能用 E/S 抗原检测。

NBL1 抗原(或其免疫优势表位)与其 411 抗原的组合使其可能改善诊断灵敏性, 尤其是在侵染早期阶段(侵染后 15 至 20 天)。

所以, 本发明的主旨是将由抗毛线虫抗体识别的抗原多肽作为检测生物样品中抗毛线虫抗体的应用, 其特征在于所述多肽选自:

a) 包含 NBL1 抗原的免疫优势表位的多肽, 该表位由序列 PSSGSRPTYP (SEQ ID NO: 5) 限定;

b) 多肽, 其在下文也被称为 411 抗原, 其包含序列 SEQ ID NO: 4 (其代表 411 蛋白的成熟形式) 的氨基酸 25-175, 或包含与序列 SEQ ID NO: 4 的氨基酸 25-175 序列有至少 80%、更优选至少 85%、90%或 95%相同性的序列。

更特别地, 本发明的主旨是检测生物样品中抗毛线虫抗体存在的方法, 该方法的特征在于它包括:

-在允许与可能存在于所述样品中的抗毛线虫抗体形成抗原/抗体复合物的条件下, 使所述生物样品与如上定义的一或多种多肽 a) 和/或一或多种多肽 b) 接触;

-通过合适的方式检测可能形成的抗原/抗体复合物。

一般来说, 所述生物样品是血清样品。它可得自属于能被毛线虫侵染的物种的任何个体(哺乳动物、鸟或爬行动物), 而且希望在其中检测该寄生虫的存在。有利地, 它是得自哺乳动物的样品, 例如来自耕作动物或来自人患者。

有利地, 使用包含如上定义的一或多种多肽 a) 和/或一或多种多肽 b) 的混合物。

相对于单独使用每一种多肽，该组合使其尤其可能拓宽反应谱。

同样，如上定义的多肽 a) 排除掉由 Genbank 登录号 AAK16520 确定的完整 NBL1 抗原和其由 Genbank 登录号 AAR36900 确定的片段，也是本发明主旨的一部分。

本发明的这些多肽中，尤其涉及的是包括以下序列之一或多个的多肽：序列：PSSGSRPTYPSGSR (SEQ ID NO: 6)；序列 PSSGSRPTYPTGSR (SEQ ID NO: 7)；序列 RPTSPSSGSRPTYP (SEQ ID NO: 8)。

这涵盖诸如 NBL1 抗原的 C 末端区域片段：尤其涉及的是包括以下序列的片段：ENSPEGTVKWASKEDSPVDLSTASRPTNPYTGSRPTSPSSGSRPTYPSGSRPTSPSSGSRPTYPSGSRPTYPSSGSRPTYPYTGSRPTPQKPVF PSYQKYPPAVQKYIDSLPSGTQGTLEYTVTQNGVTTTT (SEQ ID NO: 11)，其对应于序列 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 326-459；以及该序列 SEQ ID NO: 11 的亚片段，尤其是包含以下序列那些：PSSGSRPTYPSGSRPTSPSSGSRPTYPSGSRPTYPSSGSRPTYP (SEQ ID NO: 9)，其对应于序列 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 363-409；以及更特别地，包含以下序列的那些：SRPTNPYTGSRPTSPSSGSRPTYPSSGSRPTSPSSGSRPTYPSSGSRPTYPSSGSRPTYPYTGSRPT (SEQ ID NO: 10)，其对应于序列 SEQ ID NO: 2 的氨基酸 349-415。

同样，如上定义的多肽 b) 排除掉由 Genbank 登录号 AAF79206 和 AAB48489 确定的那些也是本发明主旨的一部分。优选的多肽尤其是序列 SEQ ID NO: 4 的多肽，或是对应于序列 SEQ ID NO: 4 的氨基酸 25-175 的多肽，以及还与序列 SEQ ID NO: 4 的氨基酸 25-175 序列有至少 90%，或优选至少 95% 相同性的多肽。

本发明尤其涵盖嵌合多肽，其包含一或多个拷贝的序列 PSSGSRPTYPT (SEQ ID NO: 5) 或含该序列的 NBL1 抗原片段，和/或如上定义的一或多个拷贝的多肽 b)，任选其与一或多个其它异源序列融合。

本发明的主旨还是编码本发明多肽的多核苷酸及包含所述多核苷酸的重组载体、和所述载体转化的宿主细胞。

本发明的主旨还是包含如上定义的一或多种多肽 a) 和一或多种多肽 b) 的组合物，以及包含编码所述多肽的一或多种多核苷酸的组合物。

如上定义的多肽 a) 和 b) 可用于多种检测抗体的已知方法中。例如，

尤其涉及的是 ELISA 方法（直接、间接或夹心）、在珠上微凝集的方法、以及偶联免疫标记的电泳印迹方法。

本发明的主旨还是用于检测生物样品中抗毛线虫抗体存在的试剂盒，其特征在于它包括如上定义的一或多种多肽 a) 和/或一或多种多肽 b)，以及在适当时包括适于构成反应介质从而能形成抗原/抗体复合物的缓冲液和试剂，并任选包括用于检测所述抗原/抗体复合物的工具。

有利地，所述试剂盒包括固定于固体支持物上的如上定义的多肽 a) 和/或多肽 b)。可用的固体支持物的非限定性例子有微滴定板、珠、微珠或微粒、条等。

所述试剂盒还可包括参照样品，如一或多种阴性血清和一或多种阳性血清。

本发明的主旨还是如上定义的多肽 a) 和/或多肽 b) 制备特异抗所述多肽的抗体的应用。

这些多肽可用于多种制备抗体的已知方法中。例如（任选在加入合适的佐剂之后），它们可用于免疫动物。它们也可接枝到亲和层析支持物上，从而使其可从生物流体中纯化出特异抗所需多肽的抗体。例如，生物流体可以是预先用所需多肽免疫的动物血清、或杂交瘤上清液；它也可以是毛线虫侵染的动物血清，期望从中分离出特异抗所需多肽的抗体的亚群。

本发明还涵盖任何特异抗如上定义的多肽 a) 或多肽 b) 的抗体。它们可以是多克隆或单克隆抗体。优选的抗体是识别 PSSGSRPTYP 表位（SEQ ID NO: 5）的那些。

特异抗多肽的抗体可通过多种已知技术获得，尤其通过常规方法来获得，包括用所需多肽（与任选加入其的合适佐剂）免疫动物，并回收其血清（用于生产多克隆抗体）或其淋巴细胞（用于生产单克隆抗体）。

如上定义的多肽 a) 和 b) 以及编码这些多肽的多核苷酸可用于制备免疫原性组合物，尤其是抗毛线虫疫苗。

本发明的主旨还是免疫组合物，其包含如上定义的一或多种多肽 a) 和/或一或多种多肽 b)、或一或多种编码所述多肽的多核苷酸，其与一或多种用于增强免疫应答的佐剂组合。

根据本发明免疫原性组合物的优选实施方案，它是疫苗。

大量用于提高肽免疫原性的佐剂对于本领域技术人员来说是已知的：

例如，所述佐剂可以是明矾（氢氧化铝）、完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂（IFA）、脂质体、以及病毒颗粒（重构的病毒壳）、胞壁酸的肽衍生物等。对于疫苗，当然将选择药学上可接受的佐剂；例如，优选的佐剂有“油包水”乳化型佐剂，诸如 SEPPIC 公司以 MONTANIDE ISA70 和 MONTANIDE ISA775 的名称出售的佐剂，其在专利 EP480982、EP825875、US5422109、US6251407 和 US6610309 中也有描述。

合适时，尤其对于短肽（ $\leq 30$  个氨基酸），所述多肽可与载体蛋白偶联。

例如，所述载体蛋白尤其可以是 KLH（匙孔血蓝蛋白）、牛血清白蛋白（BSA）、卵白蛋白、破伤风类毒素或白喉类毒素。通过将几个拷贝的相同肽相互结合，并任选于其他肽表位结合，以嵌合多肽的形式或通过多聚链的方式（例如聚赖氨酸）可能形成多表位组合物。

如果将多核苷酸用作免疫原，则免疫原性组合物可以是重组载体形式，其中插入了要给予的多核苷酸。例如，应用中可包括病毒载体，如痘病毒、腺病毒、反转录病毒、慢病毒、疱疹病毒和 AAV（腺相关病毒）等。它也可以是非病原细菌形式，其转化有一或多种含所述多核苷酸的表达载体。多核苷酸可直接以裸 DNA 形式给予，或者它（们）可以整合入脂质体中。对于疫苗，优选使用非病原细菌（如乳酸菌或大肠杆菌（*Escherichia coli*）或猪沙门氏菌（*Samonella suis*）的非病原细菌）、或衍生自疫苗病毒株的载体；例如，衍生自假狂犬病（Aujeszky 氏病）病毒疫苗株的载体。

在以下进一步说明的帮助下将更清晰地理解本发明，其中参考了实施例来阐述 NBL1 和 411 抗原用于早期免疫诊断旋毛虫病的应用。

#### 附图图例

图 1: THX-NBL1 (Cterm) 蛋白的序列。

源于 NBL1 的序列以粗体字显示，源于质粒 pET102 的序列以斜体显示。

图 2: THX-NBL1 (Cterm) 蛋白的免疫反应性。

M: 分子量标记；1: 阴性猪血清；2: 实验性侵染 20000 个旋毛形线虫 L1M 的猪血清。

图 3: 通过 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 或通过 E/S Ag ELISA 在旋毛形线虫侵染的猪血清中检测到的抗毛线虫抗体所展现出的动力学比较。

A: THX-NBL1 (Cterm) ELISA 检测；B: E/S Ag ELISA 检测

沿着 x-轴：侵染后天数；沿着 y-轴：反应性百分数。ELISA 的检测阈值用黑线标记（THX-NBL1（Cterm）ELISA 为 44%，而 E/S Ag ELISA 为 14%）。对每组侵染的猪都标出了样品/阳性对照比率的平均值和标准差。

图 4：NBL1（Cterm）ELISA 的特异性。

沿着 x-轴：230 个源于农场猪或散养猪的阴性样品群。5 个阳性样品源于实验性侵染的猪的血清。阈值等于阴性样品的平均值的两倍。沿着 y-轴：反应性百分数。

图 5：THX-411 蛋白序列。

源于 411 的序列以粗体字显示。源于质粒的序列以斜体显示。

图 6：THX-411 蛋白的免疫反应性。

1：阳性血清 50d pi；2：阳性血清 30d pi；3：阴性血清-5d；4：缀合的对照。M：分子量标记。

图 7：通过 THX-411 ELISA 或通过 E/S Ag ELISA 在旋毛形线虫侵染的猪血清中检测到的抗毛线虫抗体所展现出的动力学比较。

A：通过 THX-411 ELISA 检测；B：通过 E/S Ag ELISA 检测

沿着 x-轴：侵染后天数；沿着 y-轴：反应性百分数。ELISA 的检测阈值用黑线标记（THX-411 ELISA 为 52%，而 E/S Ag ELISA 为 14%）。对每组侵染的猪都标出了样品/阳性对照比率的平均值和标准差。

实施例 1：含 NBL1 C-末端部分的重组 THX-NBL1（CTERM）蛋白的产生  
用 10000 个旋毛形线虫 LIM 实验性侵染后 35 天得到的猪血清进行旋毛形线虫 L1NN cDNA 文库的免疫筛选。测序该血清识别的克隆可确定它们大多编码相同蛋白。

该蛋白是推测的丝氨酸蛋白酶，其 cDNA 序列和其推倒的氨基酸序列分别可在 Genbank 以编号 AF331160 和 AAK16520 获得，在本文中也以编号 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 表述。它在本文中被称为 NBL1。

用寡核苷酸 NBL1CtermF（5'-CACCGAAAATTCTCCTGAAGGA-3'）（SEQ ID NO: 12）和 NBL1CtermR（5'-TGTTGTTGTAGTAACTCC-3'）（SEQ ID NO:13）和 AccuPrime Pfx DNA 聚合酶（Invitrogen）扩增所述蛋白 C-末端部分的一部分，并根据厂商推荐（Invitrogen）用“Champion pET102 Directional TOPO”表达试剂盒将其克隆入质粒 pET102D/topo。

获得的重组质粒被称为 pET102-NBL1 (Cterm), 编码 291AA 的硫氧还蛋白-NBL1 (Cterm) 融合蛋白 (THX-NBL1 (Cterm)), 其 C-末端位置带有聚组氨酸标签。该融合蛋白序列如图 1 所示。

THX-NBL1 (Cterm) 融合蛋白在转化了质粒 pET102-NBL1 (Cterm) 的大肠杆菌 BL21 Star (DE3), BL21 (DE3) pLys 细菌 (Invitrogen) 中表达, 并用亲和层析在变性条件下在 Ni-NTA 柱 (Ni-NTA spin columns 试剂盒; Ni-NTA 珠) 上用供应商 (Qiagen) 推荐的规程进行纯化。

纯化的 THX-NBL1 (Cterm) 融合蛋白在变性条件下电泳 (SDS-PAGE) 后显现出 31.1kDa 的预期大小的条带。

THX-NBL1 (Cterm) 蛋白对无旋毛虫病的猪的血清和 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫侵染的猪的血清的免疫反应性在侵染后 60 天通过 Western 印迹来分析。

在变性条件下电泳 (SDS-PAGE) 后, 根据供应商 (Amersham) 说明将蛋白电印迹到 Hybond P (PVDF) 膜上。膜在 TBS-T (20mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20) 和 5% 脱脂乳中预杂交 1h。在 TBS-T 中 1 分钟洗 2 次后, 然后在 TBS-T 中洗 3 次 5 分钟, 膜与用 TBS 稀释至 1/200 的猪血清保温 1h。洗涤后, 膜与稀释至 1/30000 的标记有碱性磷酸酶 (A1192, Sigma) 的兔抗猪 IgG 二抗保温 20 分钟, 然后与纯的 NBT/BCIP 底物 (E116, Interchim) 保温 30 分钟来显出标记。

结果如图 2 所示。

观察到 THX-NBL1 (Cterm) 与旋毛形线虫侵染的猪血清有很强的免疫反应性。

实施例 2: THX-NBL1 (Cterm) 用于检测抗毛线虫的体液应答的应用。

THX-NBL1 (Cterm) 蛋白如以上实施例 1 所述制备, 通过间接 ELISA 对来自毛线虫侵染的猪的血清与旋毛形线虫排泄/分泌 (E/S) 抗原作比较, 由此来评估。

参照 E/S 抗原根据 GAMBLE 等 (1988) 所述方案制备。它得自 L1M 幼虫的培养上清液, 所述幼虫在 RPMI1640 中以存活条件维持 24h, RPMI1640 含 1% 丙酮酸、15% 胎牛血清 (FCS)、1% L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素和 100 $\mu$ g/mL 链霉素。

对于 ELISA 测试,用 1XPBS 缓冲液稀释抗原,比率为 1.25 $\mu$ g/ml 的 E/S 抗原和 2 $\mu$ g/ml 的 THX-NBL1 (Cterm),于 4 $^{\circ}$ C 在 96 孔板 (MediSorp 板, NUNC) 上保温过夜。洗 3 次 (1XPBS, 0.05% 的 Tween20) 后,将板用洗液稀释至 2% 的脱脂乳溶液于环境温度饱和 1H。

100 $\mu$ l 猪血清用 1XPBS 缓冲液稀释至 1/20,其中添加有 0.05% 的 Tween20,将其加到每个孔中。洗 3 次 (1XPBS, 0.05% 的 Tween20) 后,于 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟,100 $\mu$ l 用 1XPBS 缓冲液稀释至 1/32000 的缀合物 (蛋白 G-过氧化物酶 (P-8170, Sigma)) 溶液,其中添加有 0.05% 的 Tween20,将其加到每个孔中。洗 3 次 (1XPBS, 0.05% 的 Tween20) 后,于 37 $^{\circ}$ C 进一步保温 30 分钟,然后将 100 $\mu$ l 底物 (3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯-过氧化氢: TMB3) 溶液加到每个孔中。在黑暗中于环境温度保温 20 分钟后,加入 100 $\mu$ l/孔的 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。通过测量 450nm 处的吸收对平板读数。

ELISA 板读数的结果以样品血清相对阳性对照血清的反应性百分数的形式来提供。

$$\%S/p = (\text{OD 样品} - \text{OD 阴性对照} / \text{OD 阳性对照} - \text{OD 阴性对照}) \times 100$$

E/S Ag ELISA 的阳性阈值 (等于参照阴性样品的平均值的两倍) 为 14%, THX-NBL1 (Cterm) ELISA 的为 44%。

比较通过 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 或通过 E/S Ag ELISA 在 200、1000 或 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫实验性侵染的常规猪血清中检测到的抗毛线虫抗体所展现出的动力学。

结果在图 3 中给出。

THX-NBL1 (Cterm) 抗原能剂量依赖性地检测抗旋毛形线虫的体液应答。而且,通过该 ELISA 测试方式来检测构象表位并组合通过 Western 印迹方式来检测线性表位证实了毛线虫 NBL1 蛋白的免疫优势性质。

THX-NBL1 (Cterm) ELISA 检测到了 pi 第 25 天前的血清转化,而 E/S Ag ELISA 仅检测到了 10 天以后的血清转化。

还要比较通过 E/S Ag ELISA 和 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 对由旋毛形线虫和另三种欧洲鉴定到的毛线虫 (本地毛形线虫、布氏线虫和假旋毛形线虫) 诱导的体液应答的检测。

结果概述于下表 I。

表 I

毛线虫种	接种量 (a)	感染性 (b)	通过 E/S Ag ELISA 的筛选率	通过 E/S Ag ELISA 的筛选率	通过 E/S Ag ELISA 的总筛选率	通过 THX-NBL1-(Cterm) ELISA 的筛选率	通过 THX-NBL1-(Cterm) ELISA 共检测后的动物数	通过 2 个 ELISA 测试时检测的动物数	通过 THX-NBL1-(Cterm) ELISA 检测前的动物数	通过 2 个 ELISA 测试时或通过 THX-NBL1-(Cterm) ELISA 在前检测的动物数	通过 THX-NBL1-(Cterm) ELISA 诱导的早期检测中的增加量 (c)
旋毛形线虫	200	3	3/3	9/9	7/9	-	-	-	7/7	7/7	5-20
	1000	43.1	3/3			1/3					
	20000	538.9	3/3			3/3					
布氏线虫	200	1.8	1/3	7/9	6/9	-	-	-	6/6	6/6	5-45
	1000	1	3/3			1/3					
	20000	123.1	3/3			2/3					
本地毛形线虫	200	0.0007	1/3	5/9	6/9	-	-	-	6/6	6/6	15-30
	1000	0.0015	1/3			1/3					
	20000	0.1022	3/3			2/3					
假旋毛形线虫	200	0.058	0/3	6/9	5/9	-	-	-	5/5	5/5	5-45
	1000	2.1	3/3			0/3					
	20000	98.9	3/3			2/3					

(a) 以每只猪的毛线虫 LIM 数量表示感染接种量

(b) (以每克肌肉的幼虫表示的) 每只动物平均肌肉寄生虫荷数量

(c) 用天数表示的早期检测中的增加, 其用 NBL1 (Cterm) ELISA 测试与 E/S Ag ELISA 测试比较而通过这两个测试在共检测的动物中获得。

所有这些结果表明,对于高度侵染的动物,THX-NBL1 (Cterm) ELISA 特别能从 pi 第 15 天前早期检测体液应答,而对于 1000L1M 的中度量侵染的动物检测轻微延迟(pi 第 25 天)。根据相同方案用侵染的全动物猪(*porcs holoxéniques infestés*)得到了相似结果。E/S Ag ELISA 检测到的最早血清转化在 pi 的第 25 天。比较用 2 个 ELISA 测试得到的结果,证明用 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 早期检测诊断旋毛形线虫在 5 至 20 天有增加(表 I)。而且,用 E/S Ag ELISA 和 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 诊断的旋毛形线虫侵染的动物都见到用 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 缩小了它们血清学检测窗口。THX-NBL1 (Cterm) ELISA 的灵敏度用该动物实验中筛选 7/9 常规猪的效果来确证,即用 20000 个 L1M 旋毛形线虫侵染 3/3 猪,用 1000 个 L1M 旋毛形线虫侵染 3/3 猪和仅用 200 个 L1M 旋毛形线虫侵染 1/3 猪。检测结果与在这些动物中的旋毛形线虫肌肉寄生虫荷载相关,其平均从 200L1M 实验性侵染的猪的每克 3 个幼虫(LpG)变化到 1000L1M 实验性侵染的猪的 43LpG 和 20000L1M 实验性侵染的猪的 538LpG。

另三种欧洲鉴定到的毛线虫(本地毛形线虫、布氏线虫和假旋毛形线虫)诱导的体液应答本身也以剂量依赖方式被 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 检测,证明毛线虫属中 NBL1 的遗传和抗原保守性(免疫优势)及由此带来的其广谱诊断旋毛虫病的巨大优势。诊断的灵敏度和早期性(pi 第 15 天)被证实了。用 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 缩小血清转化窗口 5 至 45 天,而且像用旋毛形线虫侵染一样,所有用 E/S Ag ELISA 和 THX-NBL1(Cterm) ELISA 诊断的动物都用 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 观察到了缩小的血清检测窗口。而且,分析用本地毛形线虫的侵染证明了 THX-NBL1(Cterm)ELISA 的高灵敏性,其诊断出了 6/9 动物(对比用 E/S Ag ELISA 的 5/9 动物),包括用 E/S Ag ELISA 筛选未揭示的 2 只猪,而肌肉寄生虫荷载平均仅为  $7 \times 10^{-4}$ , 仅为 0.1LpG。

通过取自各实验性侵染前和 pi 至 10 天的所有动物的血清法确证 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 的特异性。超过 200 个散养猪的血清被用于显示分子的特异性。没有对毛线虫阴性的猪与 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 反应。

这些结果在图 4 中给出。

### 实施例 3: NBL1 的免疫优势表位的鉴定

进行计算机 (*in silico*) 分析 NBL1 的 C-末端部分的推导的氨基酸序列, 来预测最有抗原性的区域。

计算机分析的结果选出了 11 种重叠肽, 其覆盖了 NBL1 的 C-末端部分的 113AA (从 AA327 至 AA440)。下文显示了这些肽的序列

N5EM1 NH<sub>2</sub>- NSPEGTVKWASKEDS -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 14)

N5EM2 NH<sub>2</sub>- ASKEDSPVDLSTASR -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15)

N5EM3 NH<sub>2</sub>- LSTASRPTNPYTGSR -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 16)

N5EM4 NH<sub>2</sub>- PYTGSRPTSPSSGSR -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 17)

N5EM5 NH<sub>2</sub>- PSSGSRPTYPSGSR -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 6)

N5EM6 NH<sub>2</sub>- PSSGSRPTSPSSGSR -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 18)

N5EM7 NH<sub>2</sub>- PSSGSRPTYPYTGSR -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7)

N5EM8 NH<sub>2</sub>- PYTGSRPTPQKPVFP -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 19)

N5EM9 NH<sub>2</sub>- QKPVFPSYQKYPPAV -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20)

N5EM10 NH<sub>2</sub>- KYPPAVQKYIDSLPS -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 21)

N5EM11 NH<sub>2</sub>- RPTSPSSGSRPTYPS -CONH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 8)

N5EM 肽对 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫侵染的猪血清 (侵染后 60 天收集) 的抗原性用与实施例 2 所述相同的方案通过间接 ELISA 评估, 其中不同为预先生物素化的肽 (于 1XPBS 中 2 $\mu$ g/ml; 100 $\mu$ l/孔) 在链霉抗生物素蛋白预处理过的板上保温。

检测到 3 个免疫反应性肽 (N5EM5、7 和 11)。免疫反应性肽一级序列分析揭示出存在 10 个氨基酸 (PSSGSRPTYPS) (SEQ ID NO: 5) 的共有基序。而且, 该基序在完整的 NBL1 蛋白序列中出现 4 次。而且, 通过重叠 6AA 肽对表位作图使之可能证明单个 AA (酪氨酸) 对肽内线性表位的免疫反应性的本质重要性。

额外的实验最终证明 N5EM11 相比于 N5EM5 和 N5EM7 在灵敏性和早期性上是最具反应性的肽。

如实施例 2 对于 THX-NBL1 (Cterm) ELISA 所述, 用旋毛形线虫的 E/S 抗原比较该肽。

结果概述于下表 II。

表 II

毛线虫种	接种量 (a)	感染性 (b)	通过E/S Ag ELISA的筛选率	通过E/S Ag ELISA的总筛选率	通过N5EM11 ELISA的筛选率	通过N5EM11 ELISA的总筛选率	通过N5EM11 ELISA共检测后的动物数	通过2个ELISA测试同时检测的动物数	通过N5EM11 ELISA检测前的动物数	通过2个ELISA测试同时或通过N5EM11 ELISA在前期检测的动物数	通过N5EM11 ELISA诱导的早期检测中的增加量 (c)
旋毛线虫	200	3	3/3	9/9	0/3	5/9	-	2/5	3/5	5/5	5-10
	1000	43.1	3/3		2/3						
	20000	538.9	3/3		3/3						
布氏线虫	200	1.8	1/3	7/9	1/3	5/9	-	1/5	4/5	5/5	5-30
	1000	1	3/3		1/3						
	20000	123.1	3/3		3/3						
本地毛线虫	200	0.0007	1/3	5/9	0/3	4/9	-	-	4/4	4/4	15-25
	1000	0.0015	1/3		1/3						
	20000	0.1022	3/3		3/3						
假旋毛线虫	200	0.058	0/3	6/9	0/3	4/9	2/4	-	2/4	2/4	30
	1000	2.1	3/3		2/3						
	20000	98.9	3/3		2/3						

(a) 每只猪的毛线虫 L1M 数量表示感染接种量。

(b) (以每克肌肉的幼虫表示的) 每只动物平均肌肉寄生虫荷载体量

(c) 用天数表示的早期检测中的增加量, 其用 N5EM11 ELISA 测试与 E/S Ag ELISA 测试比较而通过这两个测试在共检测的动物中获得。

这些结果表明 N5EM11 ELISA 可检测中度旋毛形线虫侵染。而且，得到的早期检测是侵染后第 20 天，即比用 E/S Ag ELISA 可能得到的早 5 至 10 天。

也观察到检测峰后抗 N5EM11 抗体滴度降低，这证明了这个早期性质，而且这可用于测定近期侵染的日期。所有旋毛形线虫侵染并用 N5EM11 肽 ELISA 诊断的猪显示出部分相似的血清转化窗口，但在大多数情况下其较用 E/S Ag ELISA 观察到的小。

而且，N5EM11 显示出与本地毛形线虫、布氏线虫和假旋毛形线虫侵染的猪血清有抗原交叉反应，证明该肽在毛线虫 L1NN 阶段的免疫优势。这些抗原交叉反应导致能比用 E/S Ag ELISA 早 5 至 30 天得到检测结果。

然而，注意到对于假旋毛形线虫侵染并用这两个测试共检测的动物的延迟检测，与 E/S Ag ELISA 相比，灵敏度降低。相反，尽管肌肉寄生虫荷载量有残余，但是 N5EM11 ELISA 可能诊断本地毛形线虫侵染而用 E/S Ag ELISA 筛选未检测到的动物。

N5EM11 ELISA 的特异性用取自实验侵染后和至 pi 10 天的 300 个动物的血清来评估。该特异性大于 99%（结果未显示）。

#### 实施例 4: 411 抗原的鉴定和分离

从旋毛形线虫早期侵入性 Ad+L1NN 阶段的 cDNA 文库中选出 411 cDNA 克隆。

确定该 cDNA 克隆的核酸序列及推导的多肽序列，并分别在序列表中以编号 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 分别表示。411 的开放读框编码 20kDa 的推测蛋白。除了信号肽，没有鉴定出蛋白结构域。

比较 411 的完整开放读框与 Genbank 上可得的序列，显示它与假旋毛形线虫中鉴定的 T21-3 排泄/分泌蛋白 (AAF79206; NAGANO 等, 2001) 有 78.7% 的相同性, 与 Polvere 和 Despommier 提交的旋毛形线虫的假设 ORF 17.20 序列 (AAB48489) 有 86.6% 的相同性。这些序列比较将 411 鉴定为毛线虫属共有的该基因家族的新成员。

用寡核苷酸 411F (5'-CACCCGAGAAAACATGCAT-3') (SEQ ID NO: 22) 和 411R (5'-TCCATTCAATTTTGCGTCAC-3') (SEQ ID NO:23) 和 AccuPrime Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen) 扩增 411 的完整开放读框，并根据厂商推荐 (Invitrogen) 用“Champion pET102 Directional TOPO”表达试剂

盒将其克隆入质粒 pET102D/topo。

获得的重组质粒被称为 pET102-411, 编码 330AA 的硫氧还蛋白-411 融合蛋白 (THX-411), 其预测的分子量为 36.7kDa, 而且其 C-末端位置带有聚组氨酸标签。该融合蛋白序列在图 5 中给出。

THX-411 融合蛋白在转化有质粒 pET102-411 的大肠杆菌 BL21 Star (DE3)、BL21 (DE3) pLys 细菌 (Invitrogen) 中表达, 并用亲和层析在变性条件下在 Ni-NTA 柱 (Ni-NTA spin columns 试剂盒; Ni-NTA 珠) 上, 用供应商 (Qiagen) 推荐的方法纯化。

纯化的 THX-411 融合蛋白在变性条件下电泳 (SDS-PAGE) 后显现出 36.7kDa 的预期大小的条带。

THX-411 蛋白对无旋毛虫病的猪和 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫侵染后 30 天和 50 天的相同猪的血清的免疫反应性与 E/S 参照抗体 (如上实施例 2 所述制备) 比较。用与以上实施例 1 所述的相同方法, 通过 Western 印迹进行分析。

结果在图 6 中给出。

观察到 THX-411 与旋毛形线虫侵染的猪血清有很强的免疫反应性, 并能早期检测出抗 411 抗体 (pi 30 天)。由于在 THX-411 制品中留有残余的高分子量细菌蛋白和血清中存在的抗大肠杆菌抗体之间的交叉反应, 因此观察到了轻微的背景噪声。

#### 实施例 5: THX-411 用于检测抗毛线虫的体液应答的应用

如上实施例 4 所述制备的蛋白通过对来自毛线虫侵染的猪的血清的间接 ELISA 与旋毛形线虫的排泄/分泌 (E/S) 抗原作比较来评估。

比较通过 THX-411 ELISA 或通过 E/S Ag ELISA 在 200、1000 或 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫实验性侵染的常规猪血清中检测到的抗毛线虫抗体所展现出的动力学。还比较了通过 E/S Ag ELISA 和 THX-411 ELISA 检测由旋毛形线虫和另三种欧洲鉴定到的毛线虫 (本地毛形线虫、布氏线虫和假旋毛形线虫) 诱导的体液应答。

所用的方法与实施例 2 中所述的相同。使用 2 $\mu$ g/ml 的 THX-411 抗原和 1.25 $\mu$ g/ml 的 E/S 抗原。

E/S Ag ELISA 的正阈值为 14%, 而 THX-411 ELISA 的为 52%。

结果在图 7 及下表 III 中给出。

表 III

毛线虫种	接种量 (a)	感染性 (b)	通过 E/S Ag ELISA 的筛选率	通过 E/S Ag ELISA 的总筛选率	通过 THX-411 ELISA 的筛选率	通过 THX-411 ELISA 的总筛选率	通过 THX-411 ELISA 共检测后的动物数	通过 2 个 ELISA 测试同时检测的动物数	通过 THX-411 ELISA 检测前的动物数	通过 2 个 ELISA 测试同时或通过 THX-411 ELISA 在前期检测的动物数	通过 THX-411 ELISA 诱导的早期检测中的增加量 (c)
旋毛形线虫	200	3	3/3	9/9	1/3	5/9	2/5	1/5	2/5	3/5	5-10
	1000	43.1	3/3		1/3						
	20000	538.9	3/3		3/3						
布氏线虫	200	1.8	1/3	7/9	0/3	4/9	-	-	4/4	4/4	5-20
	1000	1	3/3		2/3						
	20000	123.1	3/3		2/3						
本地毛线虫	200	0.0007	1/3	5/9	1/3	6/9	-	1/6	5/6	6/6	10-20
	1000	0.0015	1/3		2/3						
	20000	0.1022	3/3		3/3						
假旋毛线虫	200	0.058	0/3	6/9	0/3	2/9	1/2	-	1/2	1/2	20
	1000	2.1	3/3		3/3						
	20000	98.9	3/3		3/3						

(a) 每只猪的毛线虫 L1M 数量表示感染接种量。

(b) (以每克肌肉的幼虫表示的) 每只动物平均肌肉寄生虫荷载量

(c) 用天数表示的早期检测中的增加量, 其用 411 ELISA 测试与 E/S Ag ELISA 测试比较而通过这两个测试在共检测的动物中获得。

所有这些结果表明 411 抗原能剂量依赖地检测抗旋毛形线虫的体液应答。而且,用该 ELISA 测试来检测构象表位并组合用 Western 印迹检测线性表位证实了线毛虫 411 蛋白的免疫优势特性。

重组 THX-411 蛋白尤其能早期检测抗旋毛形线虫抗体(对于 20000 个 L1M 高度侵染的动物,从 pi 第 20 天起)。血清转化伴随有具有高滴度并保持至 pi 60 天的体液应答谱。以后在 pi 第 30 天和第 60 天分别检测中等和低荷载量寄生虫侵染的动物的血清转化。用 E/S Ag ELISA 最早检测到的血清转化是在 pi 第 25 天。

用 E/S Ag ELISA 和 THX-411 ELISA 诊断的旋毛形线虫侵染的动物中的 2/5 见到它们用 THX-411 ELISA 的血清学检测窗口较小,早 5 至 10 天。THX-411 ELISA 的灵敏度用该动物实验中筛选 5/9 常规猪的效果来确证,即用 20000 个 L1M 旋毛形线虫侵染 3/3 猪,用 1000 个 L1M 旋毛形线虫侵染 1/3 猪和仅用 200 个 L1M 旋毛形线虫侵染 1/3 猪。检测结果与在这些动物中的旋毛形线虫肌肉寄生虫荷载量相关,其平均从 200 个 L1M 实验性侵染的猪的每克 3 个幼虫(LpG)变化到 1000 个 L1M 侵染的猪的 43LpG 和 20000 个 L1M 侵染的猪的 538LpG。

本地毛形线虫、布氏线虫和假旋毛形线虫诱导的体液应答本身也被 THX-411 ELISA(用 20000 个 L1M 侵染的 10/12 动物)检测到,证明毛线虫属中 411 的遗传和抗原保守性及由此带来的其广谱诊断旋毛虫病的绝对优势。诊断的早期性被证实从 pi 第 20 天开始。用 411 ELISA 缩小血清转化窗口 5 至 20 天,而且像用旋毛形线虫侵染一样,用 E/S Ag ELISA 和 THX-411 ELISA 诊断的 50%至 100%的动物都观察到了用 THX-411 ELISA 使它们血清检测窗口更小。分析用本地毛形线虫的侵染证明了 THX-411 ELISA 的灵敏性提高,其诊断出了 6/9 动物(对比用 E/S Ag ELISA 的 5/9 动物),而肌肉寄生虫荷载量平均仅为  $7 \times 10^{-4}$ ,仅为 0.1LpG。而且,旋毛形线虫和本地毛形线虫侵染的动物得到了相似的体液应答谱,然而由后者物种产生的侵染强度显著较低,提示本地毛形线虫的 511 蛋白天然具有非常高的免疫原性并可用于检测该抗冻物种。

THX-411 ELISA 的特异性用取自实验侵染前和至 pi 10 天的 150 个动物的血清来评估。该特异性大于 99%(结果未显示)。

## 结论

NBL1 和 411 抗原构成了在毛线虫属中保守的免疫优势抗原。使用这些抗原（NBL1 C-末端部分；NBL1 的 N5EM11 肽表位；411 抗原）的 ELISA 测试对毛线虫有超过 99% 的特异性，并能早期（侵染后 15-60 天）诊断出欧洲鉴定出的 4 种毛线虫导致的猪旋毛虫病。

使用纯化的重组 THX-NBL1 (Cterm) 蛋白的 ELISA 测试是毛线虫特异性的并且是灵敏的，所述重组 THX-NBL1 蛋白在蛋白 C-末端部分含有 NBL1 的免疫优势表位，所述测试并能比用 E/S Ag ELISA 早 5 至 45 天诊断出猪旋毛虫病。而且，在用 E/S Ag ELISA 和用 THX-NBL1 (Cterm) 诊断的 100% 的动物中，该测试可比用 E/S Ag ELISA 获得缩小的血清学检测窗口。

使用纯化的重组 THX-411 蛋白的 ELISA 测试重复了用 E/S Ag ELISA 检测到的体液应答的动力学，其中灵敏性目前略微较低（17/36 诊断的动物）。可是，该新的 ELISA 的灵敏性使之可能诊断不能用 E/S Ag ELISA 筛选诊断的一只猪。THX-411 ELISA 可能比用 E/S Ag ELISA 早 5 至 20 天诊断出猪旋毛虫病。而且，用 E/S Ag ELISA 和用 THX-411 ELISA 诊断的 50% 至 100% 的动物能见到它们用 THX-411 ELISA 能使血清学检测窗口更小。

所有这些结果显示 NBL1 和 411 抗原可用于替代 E/S 抗原，或用作其补充，来早期血清学诊断旋毛虫病。另外，这两个新毛线虫抗原的组合可能通过诊断额外动物来增强 ELISA 的灵敏性。

NBL1 (Cterm) 与 N5EM11 型的免疫优势肽的组合和 411 可能增强毛线虫诊断的灵敏性（24/36 检测到的动物）。

NBL1 与 411 的叠加效应通过检测一只由 411 诱导的动物中的增量以及更早检测出一只由 411 诱导的动物而反映。三组合（NBL1、411、N5EM11）通过同时共检测 2 或 3 个抗原的抗体来使 ELISA 测试在所有时候都稳定，而无须额外增加任何数量的动物。

另一方面，通过这两个抗原 NBL1 和 411 获得了  $p_i < 30$  天的早期诊断。

#### 参考文献

MURRELL *et al.*, The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species, *Vet Parasitol*, 93, 293-307, (2000).

GASSER *et al.*, Nonisotopic single-strand conformation polymorphism analysis

- of sequence variability in ribosomal DNA expansion segments within the genus *Trichinella* (Nematoda: Adenophorea), *Electrophoresis*, 25, 3357-3364, (2004).
- BOIREAU *et al.*, Risques parasitaires liés aux aliments d'origine animale [Parasitic risks linked to feeds of animal origin], *French laboratory review*, 71-89, (2002).
- CAPO & DESPOMMIER, Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp, *Clin Microbiol Rev*, 9, 47-54, (1996).
- FOURESTIE *et al.*, Randomized trial of albendazole versus tiabendazole plus flubendazole during an outbreak of human trichinellosis, *Parasitol Res*, 75, 36-41, (1988).
- DUPOUY-CAMET, Trichinellosis: a worldwide zoonosis, *Vet Parasitol*, 93, 191-200, (2000).
- MURRELL & POZIO, Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly, *Int J Parasitol*, 30, 1339-1349, (2000).
- BOIREAU *et al.*, *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk, *Vet Parasitol*, 93, 309-320, (2000).
- GAMBLE *et al.*, Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen, *Vet Parasitol*, 13, 349-361, (1983).
- GAMBLE *et al.*, Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis, *Vet Parasitol*, 30, 131-137, (1988).
- REASON *et al.*, Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*, *Glycobiology*, 4, 593-603, (1994).
- NAGANO *et al.*, Molecular cloning and characterization of a 21 kDa protein secreted from *Trichinella pseudospiralis*, *J Helminthol*, 75, 273-278, (2001).

<110> 国立农业研究所  
法国食品卫生安全署  
吉林大学

<120> 由抗毛线虫抗体识别的多肽及其应用

<130> MJP/mad-F539/130-PCT

<150> FR 06/01058

<151> 2006-02-07

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1609

<212> DNA

<213> *Trichinella spiralis*

<220>

<221> CDS

<222> (90)..(1487)

<400> 1

gaaaagtgcc gctttgtttc aaagacaaat agaaatgaaa caaaggatat tccatagcaa 60

cagtagccat taaaagggtg gctgcatgc atg cat aaa att aca cac aaa agt 113  
Met His Lys Ile Thr His Lys Ser  
1 5

att gta tca cgt cat aca ttt gct gtt tat ttg tta gtt agt ggt cag 161  
Ile Val Ser Arg His Thr Phe Ala Val Tyr Leu Leu Val Ser Gly Gln  
10 15 20

aaa ctg caa tat ata tat ata ttt att tgc aaa atg att aga cgt ctt 209  
Lys Leu Gln Tyr Ile Tyr Ile Phe Ile Cys Lys Met Ile Arg Arg Leu  
25 30 35 40

ttt caa tat acc tca atg act ttt gct tgg att ctt ctc ttc tta tcc 257  
Phe Gln Tyr Thr Ser Met Thr Phe Ala Trp Ile Leu Leu Phe Leu Ser  
45 50 55

gca gct tct cca tca cta ggg gcg ttt gaa tgc ggt gtg cca cat ttt 305  
Ala Ala Ser Pro Ser Leu Gly Ala Phe Glu Cys Gly Val Pro His Phe  
60 65 70

aaa ccc tat ata tgg aaa tct ggt cga att gtt ggt gga act gac gta 353  
Lys Pro Tyr Ile Trp Lys Ser Gly Arg Ile Val Gly Gly Thr Asp Val  
75 80 85

cga cca cac tca cat cca tgg cag att caa ttg tta aag tca gaa acg 401  
Arg Pro His Ser His Pro Trp Gln Ile Gln Leu Leu Lys Ser Glu Thr  
90 95 100

gga ggc tac agc agc ttg tgc ggt ggt agt ctt gtt cat ttc ggt aaa 449  
Gly Gly Tyr Ser Ser Leu Cys Gly Gly Ser Leu Val His Phe Gly Lys  
105 110 115 120

ccc tca aat ggt act cga ttt gta ctt acc gcc gcg cac tgt ata act 497  
Pro Ser Asn Gly Thr Arg Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Thr  
125 130 135

act agc aat atg tat cca aga acg tca aga ttt aca gtt gtg acc ggt Thr Ser Asn Met Tyr Pro Arg Thr Ser Arg Phe Thr Val Val Thr Gly 140 145 150	545
gcc cac aac atc aaa atg cat gaa aaa gaa aaa aag cgc ata cca att Ala His Asn Ile Lys Met His Glu Lys Glu Lys Lys Arg Ile Pro Ile 155 160 165	593
act tcc tat tat gtt cag cac tgg aac cct gtg atg aca aca aac gac Thr Ser Tyr Tyr Val Gln His Trp Asn Pro Val Met Thr Thr Asn Asp 170 175 180	641
att gcg ttg ctt cgc ctg gca gaa act gtt tat tat aat gaa tat acc Ile Ala Leu Leu Arg Leu Ala Glu Thr Val Tyr Tyr Asn Glu Tyr Thr 185 190 195 200	689
agg cct gtc tgt ttg cca gaa cca aat gaa gaa ttg act cct gga gat Arg Pro Val Cys Leu Pro Glu Pro Asn Glu Glu Leu Thr Pro Gly Asp 205 210 215	737
att tgc gtt gtc acc gga tgg ggt gat acg act gaa aat gga act act Ile Cys Val Val Thr Gly Trp Gly Asp Thr Thr Glu Asn Gly Thr Thr 220 225 230	785
tct aat act ttg aag caa gtt ggt gtc aaa att atg aag aaa gga act Ser Asn Thr Leu Lys Gln Val Gly Val Lys Ile Met Lys Lys Gly Thr 235 240 245	833
tgt gca aat gtg aga agt gaa gtt att act ttt tgc gct gga gct atg Cys Ala Asn Val Arg Ser Glu Val Ile Thr Phe Cys Ala Gly Ala Met 250 255 260	881
gag ggt ggt aaa gac agt tgt caa ggt gat tct ggt ggc cca ctg ata Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile 265 270 275 280	929
tgc aag aaa aat ggg aaa agt gtt caa ttc ggt gtc gtt agt tat ggt Cys Lys Lys Asn Gly Lys Ser Val Gln Phe Gly Val Val Ser Tyr Gly 285 290 295	977
act gga tgc gcc aga aaa ggt tat ccc gga gtg tat gcc aaa gtt cca Thr Gly Cys Ala Arg Lys Gly Tyr Pro Gly Val Tyr Ala Lys Val Pro 300 305 310	1025
tca tat gtc aca tgg tta aat aaa gct gca aaa gaa ctt gaa aat tct Ser Tyr Val Thr Trp Leu Asn Lys Ala Ala Lys Glu Leu Glu Asn Ser 315 320 325	1073
cct gaa gga act gta aaa tgg gct tca aaa gaa gat tcg cca gtc gat Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala Ser Lys Glu Asp Ser Pro Val Asp 330 335 340	1121
tta tct act gca tca aga cca act aac cca tat act ggg tca aga ccg Leu Ser Thr Ala Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro 345 350 355 360	1169
aca tct cca tct agt gga tca aga ccc aca tat cca tct agt gga tca Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser 365 370 375	1217
aga cca aca tct cca tct agt gga tca aga ccc aca tat cca tct agt Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser 380 385 390	1265
gga tca aga ccc aca tat cca tct agt gga tca aga cca aca tat cca Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro 395 400 405	1313

---

tat act gga tca aga cct act cct caa aag cca gta ttt cca tca tac 1361  
 Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro Gln Lys Pro Val Phe Pro Ser Tyr  
 410 415 420

caa aaa tat ccg cca gca gtt caa aaa tac att gat agt tta cca agc 1409  
 Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln Lys Tyr Ile Asp Ser Leu Pro Ser 440  
 425 430 435

gga acg caa gga acg ctc gaa tac aca gtc aca cag aat gga gtt act 1457  
 Gly Thr Gln Gly Thr Leu Glu Tyr Thr Val Thr Gln Asn Gly Val Thr 455  
 445

aca aca aca tat tat cac ttt tct aag taa aaatattatg attaattcac 1507  
 Thr Thr Thr Tyr Tyr His Phe Ser Lys 465  
 460

tactgctctg aacgtaatta aaaaaggaat atttattaag cattttaata tgacacatta 1567

tatatattaa aacagtcaaa tttgaaaaaa aaaaaaaaa aa 1609

<210> 2  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> *Trichinella spiralis*

<400> 2

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

Val Tyr Leu Leu Val Ser Gly Gln Lys Leu Gln Tyr Ile Tyr Ile Phe  
 20 25 30

Ile Cys Lys Met Ile Arg Arg Leu Phe Gln Tyr Thr Ser Met Thr Phe  
 35 40 45

Ala Trp Ile Leu Leu Phe Leu Ser Ala Ala Ser Pro Ser Leu Gly Ala  
 50 55 60

Phe Glu Cys Gly Val Pro His Phe Lys Pro Tyr Ile Trp Lys Ser Gly  
 65 70 75 80

Arg Ile Val Gly Gly Thr Asp Val Arg Pro His Ser His Pro Trp Gln  
 85 90 95

Ile Gln Leu Leu Lys Ser Glu Thr Gly Gly Tyr Ser Ser Leu Cys Gly  
 100 105 110

Gly Ser Leu Val His Phe Gly Lys Pro Ser Asn Gly Thr Arg Phe Val  
 115 120 125

Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Thr Thr Ser Asn Met Tyr Pro Arg Thr  
 130 135 140

Ser Arg Phe Thr Val Val Thr Gly Ala His Asn Ile Lys Met His Glu  
 145 150 155 160

Lys Glu Lys Lys Arg Ile Pro Ile Thr Ser Tyr Tyr Val Gln His Trp

				165					170					175	
Asn	Pro	Val	Met	Thr	Thr	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Glu
			180					185					190		
Thr	Val	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Thr	Arg	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Glu	Pro
		195					200					205			
Asn	Glu	Glu	Leu	Thr	Pro	Gly	Asp	Ile	Cys	Val	Val	Thr	Gly	Trp	Gly
	210					215					220				
Asp	Thr	Thr	Glu	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Asn	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	Gly
225					230					235					240
Val	Lys	Ile	Met	Lys	Lys	Gly	Thr	Cys	Ala	Asn	Val	Arg	Ser	Glu	Val
				245					250					255	
Ile	Thr	Phe	Cys	Ala	Gly	Ala	Met	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Gln
			260					265					270		
Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ile	Cys	Lys	Lys	Asn	Gly	Lys	Ser	Val
		275					280					285			
Gln	Phe	Gly	Val	Val	Ser	Tyr	Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Tyr
	290					295					300				
Pro	Gly	Val	Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ser	Tyr	Val	Thr	Trp	Leu	Asn	Lys
305					310					315					320
Ala	Ala	Lys	Glu	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	Glu	Gly	Thr	Val	Lys	Trp	Ala
				325					330					335	
Ser	Lys	Glu	Asp	Ser	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Arg	Pro	Thr
			340					345					350		
Asn	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg
		355					360						365		
Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly
	370					375					380				
Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser
385					390					395					400
Ser	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ser	Arg	Pro	Thr	Pro
				405					410					415	
Gln	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Ser	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Pro	Pro	Ala	Val	Gln
			420					425					430		
Lys	Tyr	Ile	Asp	Ser	Leu	Pro	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Thr	Leu	Glu	Tyr
		435					440					445			

```

Thr Val Thr Gln Asn Gly Val Thr Thr Thr Thr Tyr Tyr His Phe Ser
450                               455                               460

Lys
465

<210> 3
<211> 700
<212> DNA
<213> Trichinella spiralis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(528)

<400> 3
cga gaa aac atg cat tgc caa ttc att ctc tct ttg ctc ctt ttc tct      48
Arg Glu Asn Met His Cys Gln Phe Ile Leu Ser Leu Leu Leu Phe Ser
1                               5                               10                               15

ttg aac gtc gta ttc ttc gaa gcc gcg aaa tca ctg gat gcc gta gac      96
Leu Asn Val Val Phe Phe Glu Ala Ala Lys Ser Leu Asp Ala Val Asp
20                               25                               30

gat gaa tta aaa aga tgt act gag aag caa act gaa att tgt gct caa      144
Asp Glu Leu Lys Arg Cys Thr Glu Lys Gln Thr Glu Ile Cys Ala Gln
35                               40                               45

aca gaa tgc aaa gca gaa gat gca att atg aca gat ctg ctt ctc gag      192
Thr Glu Cys Lys Ala Glu Asp Ala Ile Met Thr Asp Leu Leu Leu Glu
50                               55                               60

gga gaa agc gac att act gat cat cct gac ttc ctt tta tac gca act      240
Gly Glu Ser Asp Ile Thr Asp His Pro Asp Phe Leu Leu Tyr Ala Thr
65                               70                               75                               80

tgc atg caa cgt tgc tgt gca aga ctg aac ggc gct caa gta gct cca      288
Cys Met Gln Arg Cys Cys Ala Arg Leu Asn Gly Ala Gln Val Ala Pro
85                               90                               95

ttg aaa gaa gaa gaa aaa cga aga gga cct tca aaa tta ccg ttc caa      336
Leu Lys Glu Glu Glu Lys Arg Arg Gly Pro Ser Lys Leu Pro Phe Gln
100                              105                              110

agc att ttt gaa gtt gct gat caa aaa aca gtt gaa aga tgt gat gaa      384
Ser Ile Phe Glu Val Ala Asp Gln Lys Thr Val Glu Arg Cys Asp Glu
115                              120                              125

aca atg tgc aag agt tat aga aag aaa tat gaa aat ttg gta gca ttg      432
Thr Met Cys Lys Ser Tyr Arg Lys Lys Tyr Glu Asn Leu Val Ala Leu
130                              135                              140

act tca agc tac aaa aag cta cga tca agc caa gaa ttg aaa gac tac      480
Thr Ser Ser Tyr Lys Lys Leu Arg Ser Ser Gln Glu Leu Lys Asp Tyr
145                              150                              155                              160

aaa caa tgc atc gaa aga tgt gac gca aaa ttg aat gga tta cag taa      528
Lys Gln Cys Ile Glu Arg Cys Asp Ala Lys Leu Asn Gly Leu Gln
165                              170                              175

agccagatat gaagaatgga gatatgcatt acaaagaaaa attttaactg aaataatttt      588

tgttttataa aatctataaa tatcatttct aactgcatta gaattttttt gaagaaaaat      648

```

aaaataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa actcgagggg gggcccggtc cc

700

<210> 4  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213> *Trichinella spiralis*

<400> 4

Arg Glu Asn Met His Cys Gln Phe Ile Leu Ser Leu Leu Leu Phe Ser  
 1 5 10 15

Leu Asn Val Val Phe Phe Glu Ala Ala Lys Ser Leu Asp Ala Val Asp  
 20 25 30

Asp Glu Leu Lys Arg Cys Thr Glu Lys Gln Thr Glu Ile Cys Ala Gln  
 35 40 45

Thr Glu Cys Lys Ala Glu Asp Ala Ile Met Thr Asp Leu Leu Leu Glu  
 50 55 60

Gly Glu Ser Asp Ile Thr Asp His Pro Asp Phe Leu Leu Tyr Ala Thr  
 65 70 75 80

Cys Met Gln Arg Cys Cys Ala Arg Leu Asn Gly Ala Gln Val Ala Pro  
 85 90 95

Leu Lys Glu Glu Glu Lys Arg Arg Gly Pro Ser Lys Leu Pro Phe Gln  
 100 105 110

Ser Ile Phe Glu Val Ala Asp Gln Lys Thr Val Glu Arg Cys Asp Glu  
 115 120 125

Thr Met Cys Lys Ser Tyr Arg Lys Lys Tyr Glu Asn Leu Val Ala Leu  
 130 135 140

Thr Ser Ser Tyr Lys Lys Leu Arg Ser Ser Gln Glu Leu Lys Asp Tyr  
 145 150 155 160

Lys Gln Cys Ile Glu Arg Cys Asp Ala Lys Leu Asn Gly Leu Gln  
 165 170 175

<210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Trichinella spiralis*

<400> 5

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Trichinella spiralis*

&lt;400&gt; 6

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Trichinella spiralis*

&lt;400&gt; 7

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser Arg  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Trichinella spiralis*

&lt;400&gt; 8

Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; PRT

<213> *Trichinella spiralis*

&lt;400&gt; 9

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro  
 1 5 10 15

Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser  
 20 25 30

Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro  
 35 40 45

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 67

&lt;212&gt; PRT

<213> *Trichinella spiralis*

&lt;400&gt; 10

Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser  
 20 25 30

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro  
 35 40 45

Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser  
 50 55 60

Arg Pro Thr  
65

<210> 11  
<211> 134  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 11

Glu Asn Ser Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala Ser Lys Glu Asp Ser  
1 5 10 15

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

Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser  
35 40 45

Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr  
50 55 60

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro  
65 70 75 80

Thr Tyr Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro Gln Lys Pro Val Phe  
85 90 95

Pro Ser Tyr Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln Lys Tyr Ile Asp Ser  
100 105 110

Leu Pro Ser Gly Thr Gln Gly Thr Leu Glu Tyr Thr Val Thr Gln Asn  
115 120 125

Gly Val Thr Thr Thr Thr  
130

<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NBL1CtermF

<400> 12  
caccgaaaat tctcctgaag ga

22

<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NBL1CtermR

<400> 13  
tgttggtgta gtaactcc

18

<210> 14  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 14

Asn Ser Pro Glu Gly Thr Val Lys Trp Ala Ser Lys Glu Asp Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 15  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 15

Ala Ser Lys Glu Asp Ser Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 16  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 16

Leu Ser Thr Ala Ser Arg Pro Thr Asn Pro Tyr Thr Gly Ser Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 17  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 17

Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 18  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 18

Pro Ser Ser Gly Ser Arg Pro Thr Ser Pro Ser Ser Gly Ser Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 19  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Trichinella spiralis*

<400> 19

Pro Tyr Thr Gly Ser Arg Pro Thr Pro Gln Lys Pro Val Phe Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 20  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Trichinella spiralis*

<400> 20

Gln Lys Pro Val Phe Pro Ser Tyr Gln Lys Tyr Pro Pro Ala Val  
 1                   5                   10                   15

<210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Trichinella spiralis*

<400> 21

Lys Tyr Pro Pro Ala Val Gln Lys Tyr Ile Asp Ser Leu Pro Ser  
 1                   5                   10                   15

<210> 22  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> 411F

<400> 22  
 cacccgagaa aacatgcat

19

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> 411R

<400> 23  
 tccattcaat tttgcgtcac

20

MGSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWCPCMKIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI  
DHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGID  
PFTENSPEGTVKWASKEDSPVDLSTASRPTNPYTGSRPTSPSSGSRPTYPSGSRPTSPS  
SGSRPTYPSGSRPTYPSGSRPTYPYTGSRPTPQKPVFPSYQKYPPAVQKYIDSLPSGTQG  
TLEYTVTQNGVTTTTKGELKLEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHH

图1

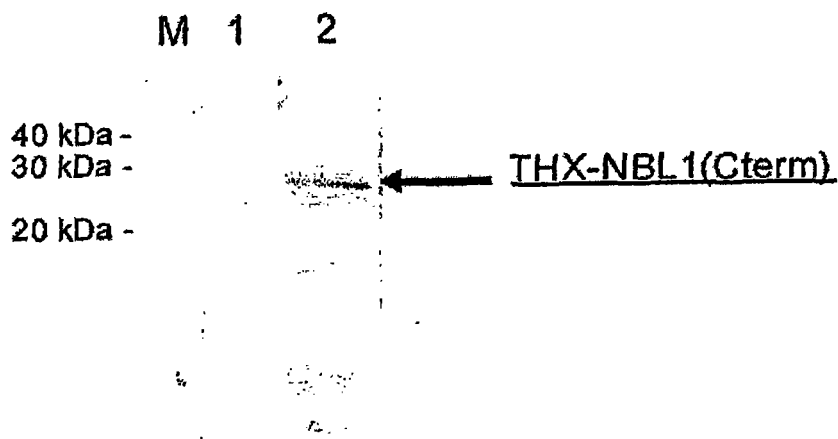
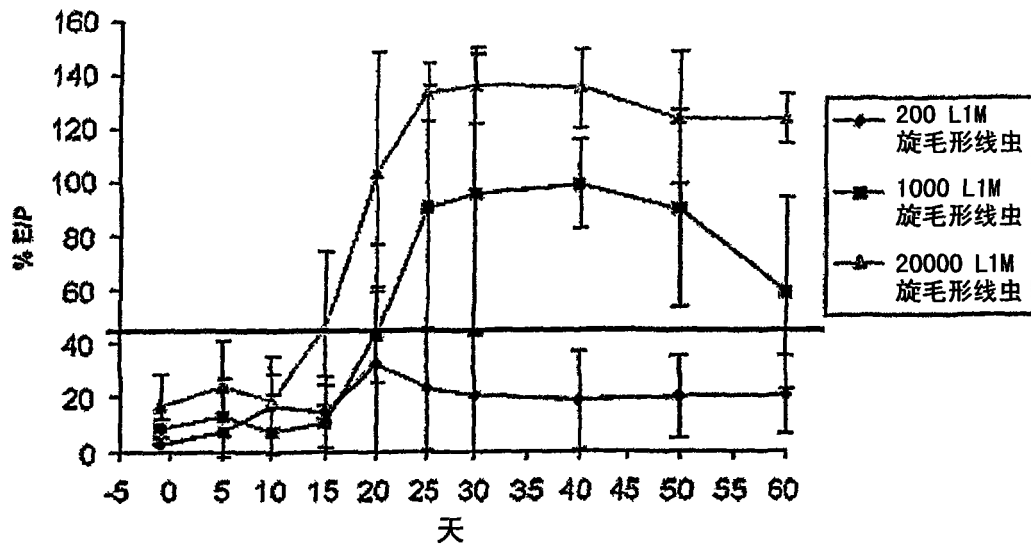
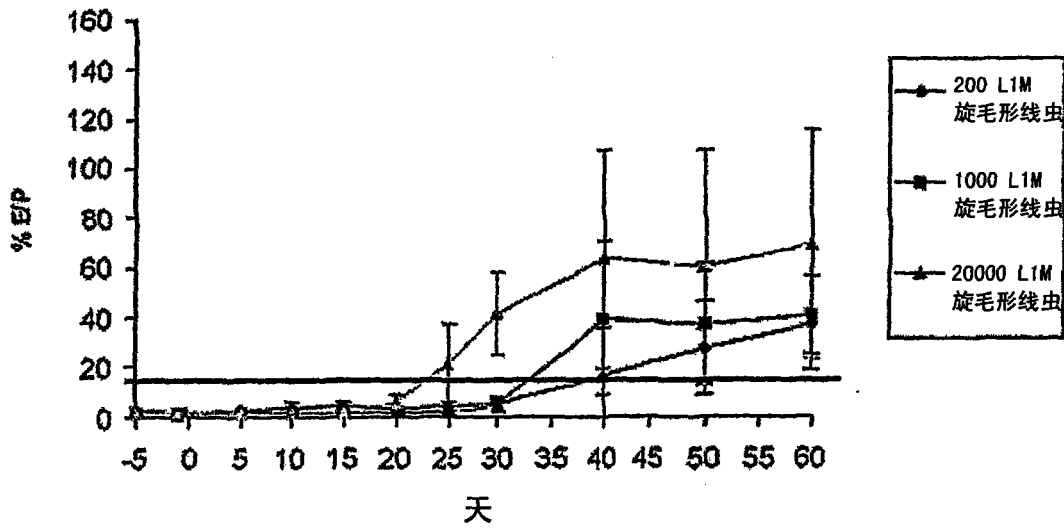


图2

**A** THX-NBL1 (Ctorm) ELISA: 用旋毛形线虫感染的常规猪血清的动力学



**B** E/S Ag ELISA: 用旋毛形线虫感染的常规猪血清的动力学



**图3**

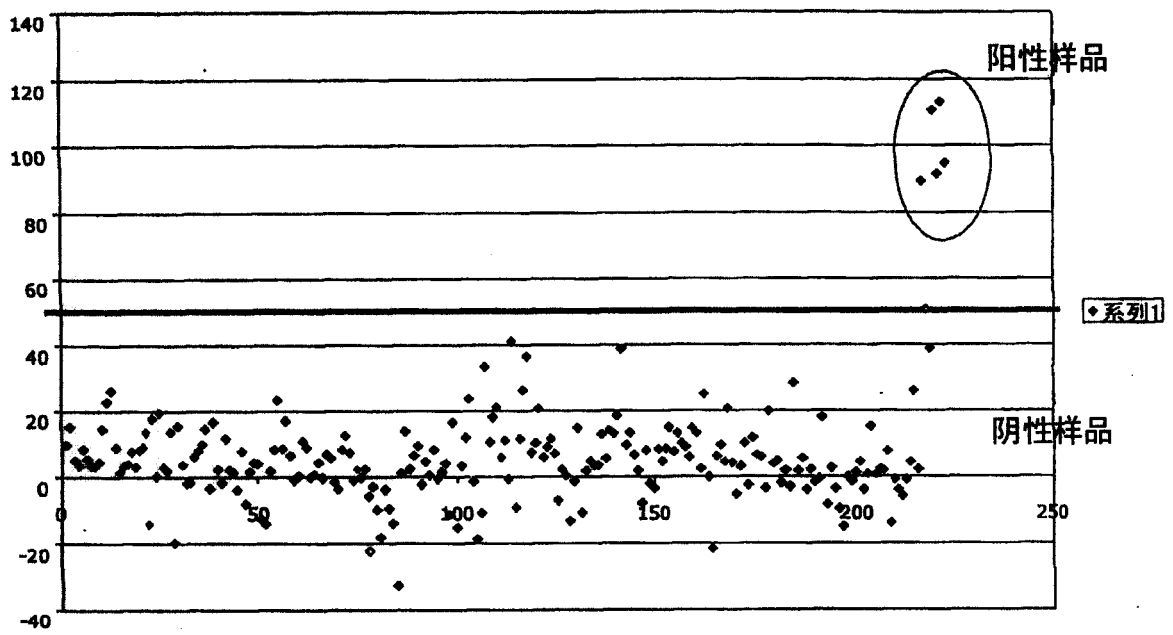


图4

MGSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNI  
DHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGID  
PFTRENMHCQFILSLLLFSLNVVFFEAAKSLDAVDDELKRC<sup>TE</sup>KQTEICAQTECKAEDAIMT  
DLLLEGESDITDHPDFLLYATCMQRCCARLNGAQA<sup>V</sup>APLKEEEKRRGPSKLPFQSI<sup>FE</sup>VADQK  
TVERCDETMCKSYRKKYENLVALTSSYKKLRSSQELKDYKQCIERCDAKLNKGELKLEGKP  
IPNPLGLDSTRTGHHHHH

图5

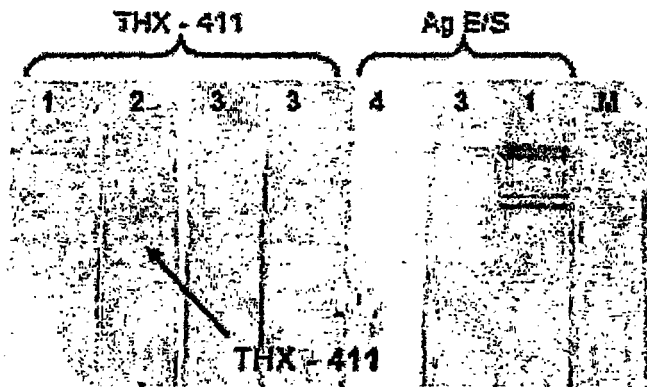
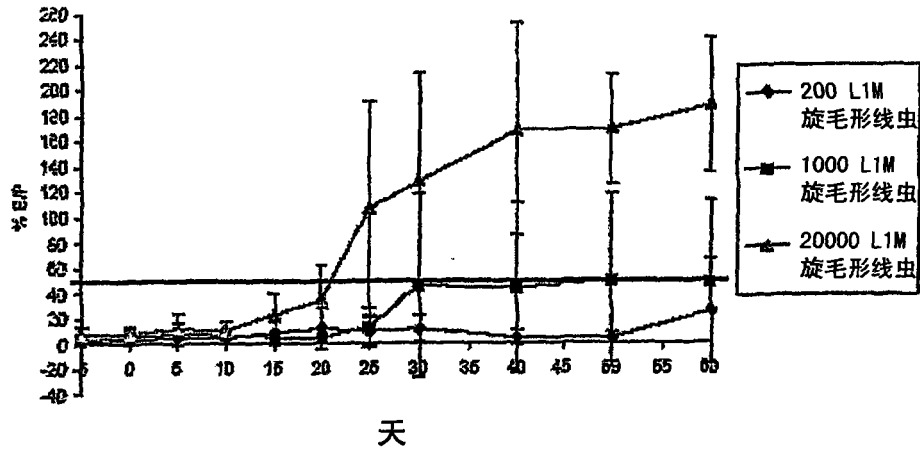


图6

A THX-411 ELISA:用旋毛形线虫感染的常规猪血清的动力学



B E/S Ag ELISA:用旋毛形线虫感染的常规猪血清的动力学

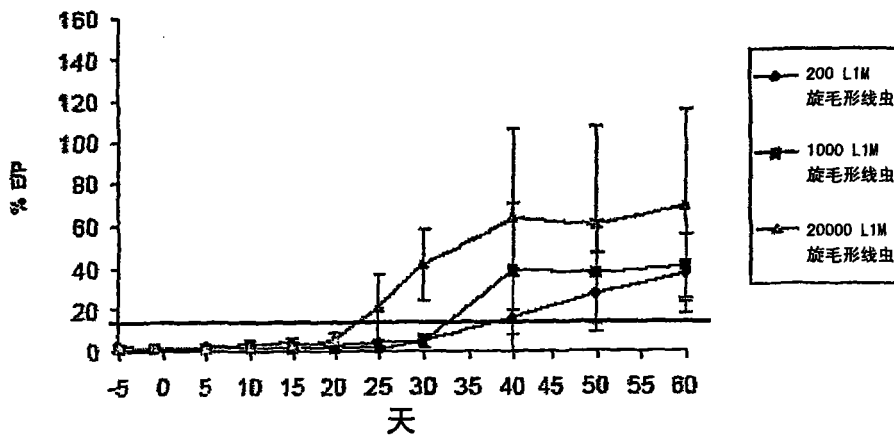


图7

专利名称(译)	由抗毛线虫抗体识别的多肽及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101589306A</a>	公开(公告)日	2009-11-25
申请号	CN200780004750.4	申请日	2007-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	国立农业研究所 吉林大学		
申请(专利权)人(译)	国立农业研究所 吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立农业研究所 吉林大学		
[标]发明人	P 布瓦罗 刘明远 付宝全 D 勒吕恩 C 巴于翁 I 瓦莱 F 勒盖尔耶尔 R 埃尔南德斯贝洛 吴修平		
发明人	P·布瓦罗 刘明远 付宝全 D·勒吕恩 C·巴于翁 I·瓦莱 F·勒盖尔耶尔 R·埃尔南德斯贝洛 吴修平		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/435 C12N9/64		
CPC分类号	G01N2333/4353 C07K14/4354 G01N2469/20 C12N9/6408		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2006001058 2006-02-07 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及由抗毛线虫抗体识别的新多肽。本发明还涉及所述多肽检测抗毛线虫抗体和预防旋毛虫病的应用。

