



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102281893 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 14

(21) 申请号 200980154492. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 11. 13

A61K 39/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/25 (2006. 01)

2008905922 2008. 11. 14 AU

G01N 33/48 (2006. 01)

61/115, 509 2008. 11. 17 US

A61P 1/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12Q 1/04 (2006. 01)

2011. 07. 13

C12Q 1/68 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2009/001482 2009. 11. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02010/054437 EN 2010. 05. 20

(71) 申请人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司

地址 德国莱茵河畔英格海姆

(72) 发明人 D·J·汉普森 T·拉

M·I·贝尔伽德 N·D·菲利普斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

权利要求书 2 页 说明书 15 页

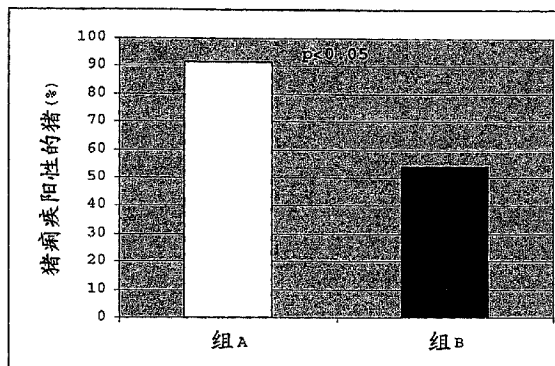
序列表 12 页 附图 5 页

(54) 发明名称

猪痢疾短螺旋体的疫苗株

(57) 摘要

本发明广泛涉及猪痢疾短螺旋体的疫苗株。具体而言,本发明涉及猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株,其缺乏一个或多个毒力因子。本发明还涉及鉴定和制备疫苗株的方法,以及针对腹泻疾病的疫苗组合物和用于诊断腹泻疾病的方法和试剂盒。



1. 猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株,其中所述猪痢疾短螺旋体的疫苗株缺乏一个或多个毒力因子。

2. 权利要求 1 的菌株,其中所述毒力因子由一个或多个多核苷酸序列编码,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似。

3. 猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株,其中所述猪痢疾短螺旋体的疫苗株缺乏由一个或多个多核苷酸序列编码的一个或多个功能性毒力因子,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的菌株,其中所述猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株是减毒株,其包含减弱毒力因子的修饰,使得所述菌株保持其免疫原性特性,以便于具有保护性免疫原性,但不再有毒力。

5. 权利要求 4 的菌株,其中所述修饰导致来自一个或多个多核苷酸序列的 mRNA 表达的减少或阻抑,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列或其组合中的一个或多个基本相似。

6. 权利要求 4 的菌株,其中所述修饰导致一个或多个非功能性产物的翻译,其中功能性产物由一个或多个多肽序列编码,该一个或多个多肽序列与 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 中所示的氨基酸序列中的一个或多个基本相似。

7. 权利要求 2 至 6 中任一项的疫苗株,其中所述多核苷酸序列中的一个或多个是质粒携带的。

8. 权利要求 8 的疫苗株,其中所述修饰由从猪痢疾短螺旋体消除所述质粒引起。

9. 制备猪痢疾短螺旋体的活疫苗株的方法,其包括:(a) 选择猪痢疾短螺旋体的强毒株;(b) 在所述猪痢疾短螺旋体的强毒株中产生修饰,以提供活的减毒猪痢疾短螺旋体菌株;(c) 分离包含所述修饰的活的减毒猪痢疾短螺旋体菌株;和(d) 选择所述分离的猪痢疾短螺旋体菌株,其中所述选择的猪痢疾短螺旋体菌株保持其免疫原性特性,以便于具有保护性免疫原性。

10. 疫苗组合物,其在可药用介质中包含权利要求 1 至 8 中任一项的至少一种猪痢疾短螺旋体的疫苗株。

11. 权利要求 10 的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物还包含佐剂。

12. 在动物中预防腹泻疾病的方法,其包括对所述动物施用有效量的权利要求 1 至 8 中任一项的至少一种猪痢疾短螺旋体的疫苗株,或权利要求 10 或 11 的疫苗组合物。

13. 在动物中诊断毒性猪痢疾短螺旋体建群的方法,其包括步骤:(a) 从所述动物获得样品;和(b) 测定一个或多个多核苷酸序列的存在或缺乏,和/或对应的 mRNA 或编码的蛋白质产物的表达的存在或缺乏,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似,其中所述核酸或对应的 mRNA 或蛋白质产物的存在指示毒性猪痢疾短螺旋体建群在动物中的存在。

14. 用于在动物中诊断毒性猪痢疾短螺旋体建群的试剂盒,其包含具有与 SEQ ID NO : 55-90 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似的多核苷酸序列的一个或多个 PCR 引物。

15. 筛选能够抑制猪痢疾短螺旋体的毒力的化合物的方法,其包括:(a) 用包含一个或多个多核苷酸序列的 DNA 构建体转染细胞,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似;(b) 使所述转染的细胞与候选化合物接触;(c) 比较存在和缺乏候选化合物的情况下,细胞中来自所述核酸分子中的一个或多个的 mRNA 表达的水平或由所述 mRNA 表达编码的蛋白质的水平,其中所述蛋白质具有与 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 中所示的氨基酸序列中的一个或多个基本相似的多肽序列;和 (d) 如果与缺乏化合物时相比,存在候选化合物时存在显著少的 mRNA 和 / 或蛋白质表达,则推断候选化合物是猪痢疾短螺旋体毒力的抑制剂。

16. 筛选能够抑制猪痢疾短螺旋体的毒力的化合物的方法,其包括:(a) 用编码报道基因的 DNA 构建体转染细胞,该报道基因与一个或多个多核苷酸序列的转录调节序列或启动子有效连接,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似;(b) 使所述转染的细胞与候选化合物接触;(c) 比较存在和缺乏候选化合物的情况下,细胞中报道基因表达的水平;和 (d) 如果与缺乏化合物时相比,存在候选化合物时存在显著少的报道基因表达,则推断候选化合物是猪痢疾短螺旋体毒力的抑制剂。

17. 猪痢疾短螺旋体的疫苗株的用途,其用于制备用于预防猪痢疾短螺旋体感染的药物,所述药物包含至少一种权利要求 1 的疫苗株。

18. 用于针对猪痢疾短螺旋体感染而接种动物的试剂盒,其包含:(a) 在可药用介质中包含至少一种权利要求 1 的疫苗株的疫苗组合物;和 (b) 接种动物的说明。

19. 鉴定猪痢疾短螺旋体的候选疫苗株的方法,其包括步骤:(a) 获得猪痢疾短螺旋体的样品;和 (b) 测定由 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 中所示的多肽序列编码的核酸分子中的一个或多个的存在或缺乏,和 / 或对应的 mRNA 或蛋白质产物的表达的存在或缺乏,其中所述核酸或对应的 mRNA 或蛋白质的表达的缺乏指示猪痢疾短螺旋体的疫苗株。

## 猪痢疾短螺旋体的疫苗株

### 技术领域

[0001] 本发明一般涉及猪痢疾短螺旋体 (*Brachyspira hyodysenteriae*) 的疫苗株。

[0002] 前言

[0003] 猪痢疾短螺旋体是感染动物中的许多哺乳动物物种和禽类物种并引起腹泻疾病的厌氧肠道螺旋体。得到充分研究的实例是猪痢疾 (SD)，它是由猪痢疾短螺旋体感染在猪中引起的澳大利亚和全世界显著的猪地方病。SD 是接触传染性粘膜出血性 (mucohaemorrhagic) 腹泻疾病，表征为大肠上皮表面广泛的炎症和坏死。由 SD 引起的经济损失主要来自于生长迟缓、药剂成本和死亡率。SD 在猪舍中建立时，疾病谱可以从轻微、暂时或不明显到严重和甚至致死之间变化。

[0004] 单个猪舍中的药剂策略可以掩蔽临床症状，并且在一些猪舍中，SD 可以变得不被注意，或可以仅被怀疑。无论是否发生明显的 SD，猪痢疾短螺旋体都可以持续存在于受感染的猪中、或其他储存宿主如啮齿类动物中，或环境中。所有这些来源均造成猪痢疾短螺旋体向未受感染的群体传播的可能性。

[0005] 利用许多方法来控制 SD，从抗微生物剂的预防性使用，到受感染的群体的完全转移和预防受感染的猪携带者再进入。所有这些选择都是昂贵而耗时的，因为它们需要使用复杂的诊断测试来监测进展才能完全有效。

[0006] 用于控制由猪痢疾短螺旋体引起的疾病的“黄金标准”将是用疫苗来为动物提供免疫，预防猪痢疾短螺旋体建群和 / 或疾病。历史上，最有效和灵验的疫苗曾是微生物强毒株的活的减毒形式。这些疫苗激活所有阶段的免疫应答并提供持久免疫，即不需要加强（免疫）。

[0007] 已进行了尝试来用免疫原性蛋白质和减毒株针对猪痢疾短螺旋体开发疫苗。但是，在实验性试验中对动物肌内施用猪痢疾短螺旋体的灭活全细胞或亚基具有很小的保护价值。此外，虽然克隆的重组周质鞭毛抗原在 SD 的小鼠模型中表现为赋予保护作用，但该组合物未能在猪中提供保护作用。目前，不存在可获得的有效疫苗用于防御猪痢疾短螺旋体。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的发明人已鉴定了许多猪痢疾短螺旋体毒力因子。这些因子可以用于开发包含活的猪痢疾短螺旋体菌株的疫苗。

[0010] 因此，在第一方面，本发明提供猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株，其中该猪痢疾短螺旋体的疫苗株缺乏一个或多个毒力因子。

[0011] 在一些实施方案中，毒力因子由一个或多个多核苷酸序列编码，该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似。

[0012] 因此，在第二方面，本发明提供猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株，其中该猪痢疾短螺旋体的疫苗株缺乏由一个或多个多核苷酸序列编码的一个或多个功能性毒力因子，该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID

NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似。

[0013] 在一些实施方案中,猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株是减毒株,其包含减弱毒力因子的修饰,使得菌株保持其免疫原性特性,以便于具有保护性免疫原性,但不再是有毒力的。

[0014] 本领域技术人员应理解,可以以导致菌株变得减毒或无毒性的任意方式修饰猪痢疾短螺旋体的减毒株。例如,修饰可以破坏与毒力相关的核酸的功能。在一些实施方案中,修饰导致来自一个或多个多核苷酸序列的 mRNA 表达的减少或阻抑,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列或其组合中的一个或多个基本相似。在一些实施方案中,修饰不影响表达,但导致一个或多个非功能性产物的翻译,其中功能性产物由一个或多个多肽序列编码,该一个或多个多肽序列与 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 中所示的氨基酸序列中的一个或多个基本相似。

[0015] 在一些实施方案中,毒力因子由质粒携带(plasmid-borne)的核酸序列编码。因此,修饰可以包括消除猪痢疾短螺旋体菌株的一个或多个质粒,该质粒包含一个或多个毒力因子。

[0016] 在其他实施方案中,猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株是天然存在的无毒株,该菌株缺乏由多核苷酸序列编码的毒力因子中的一个或多个,该多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似。

[0017] 在第三方面,本发明提供猪痢疾短螺旋体的疫苗株,其中该疫苗株是猪痢疾短螺旋体的活菌株,其缺乏来自一个或多个多核苷酸序列的 mRNA 表达,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列或其组合中的一个或多个基本相似;或表达一个或多个非功能性产物,其中功能性产物由一个或多个多肽序列编码,该一个或多个多肽序列与 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 中所示的氨基酸序列中的一个或多个基本相似,其中该菌株具有免疫原性特性,以便于具有保护性免疫原性。

[0018] 在第四方面,本发明提供制备猪痢疾短螺旋体的活疫苗株的方法,其包括:(a) 选择猪痢疾短螺旋体的强毒株;(b) 在该猪痢疾短螺旋体的强毒株中产生修饰,以提供活的减毒猪痢疾短螺旋体菌株;(c) 分离包含该修饰的活的减毒猪痢疾短螺旋体菌株;和(d) 选择该分离的猪痢疾短螺旋体菌株,其中该选择的猪痢疾短螺旋体菌株保持其免疫原性特性,以便于具有保护性免疫原性。

[0019] 在第五方面,本发明提供疫苗组合物,其在可药用介质中包含至少一种本发明的第一、第二和/或第三方面的猪痢疾短螺旋体的疫苗株。

[0020] 在一些实施方案中,疫苗组合物还包含佐剂。

[0021] 在第六方面,本发明提供在动物中预防腹泻疾病的方法,其包括对该动物施用有效量的至少一种本发明的第一、第二和/或第三方面的疫苗株。

[0022] 在第七方面,本发明提供在动物中诊断毒性猪痢疾短螺旋体建群的方法,其包括步骤:(a) 从该动物获得样品;和(b) 测定一个或多个多核苷酸序列的存在或缺乏,和/或

对应的 mRNA 或编码的蛋白质产物的表达的存在或缺乏, 该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似, 其中该核酸或对应的 mRNA 或蛋白质产物的存在指示毒性猪痢疾短螺旋体建群在动物中的存在。

[0023] 在第八方面, 本发明提供筛选能够抑制猪痢疾短螺旋体的毒力的化合物的方法, 其包括: (a) 用包含一个或多个多核苷酸序列的 DNA 构建体转染细胞, 该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似; (b) 使该转染的细胞与候选化合物接触; (c) 比较存在或缺乏候选化合物的情况下, 细胞中来自该核酸分子中的一个或多个的 mRNA 表达的水平或由该 mRNA 表达编码的蛋白质的水平, 其中该蛋白质具有与 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12 中所示的氨基酸序列中的一个或多个基本相似的多肽序列; 和 (d) 如果与缺乏化合物时相比, 存在候选化合物时存在显著少的 mRNA 和 / 或蛋白质表达, 则推断候选化合物是猪痢疾短螺旋体毒力的抑制剂。

[0024] 应理解, 本发明的筛选方法可以备选地包括编码报道基因的 DNA 构建体, 该报道基因与一个或多个多核苷酸序列的转录调节序列或启动子有效连接, 该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似, 其中, 如果与缺乏化合物时相比, 存在候选化合物时产生显著少的报道基因产物, 则候选化合物是猪痢疾短螺旋体毒力的抑制剂。

[0025] 在第九方面, 本发明提供猪痢疾短螺旋体的疫苗株在制备用于预防猪痢疾短螺旋体感染的药物中的用途, 该药物包含至少一种本发明的第一、第二和 / 或第三方面的疫苗株。

[0026] 在第十方面, 本发明提供用于针对猪痢疾短螺旋体感染接种动物的试剂盒, 其包含: (a) 在可药用介质中包含至少一种本发明的第一、第二和 / 或第三方面的疫苗株的疫苗组合物; 和 (b) 接种动物的说明。

[0027] 在第十一方面, 本发明提供鉴定猪痢疾短螺旋体的候选疫苗株的方法, 其包括步骤: (a) 获得猪痢疾短螺旋体的样品; 和 (b) 测定由 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的多肽序列编码的核酸分子中的一个或多个的存在或缺乏, 和 / 或对应的 mRNA 或蛋白质产物的表达的存在或缺乏, 其中该核酸分子或对应的 mRNA 或蛋白质的表达的缺乏指示猪痢疾短螺旋体的疫苗株。

[0028] 在第十二方面, 本发明提供用于在动物中诊断毒性猪痢疾短螺旋体建群的试剂盒, 其包含一个或多个 PCR 引物, 该一个或多个 PCR 引物具有与 SEQ ID NO :55-90 中所示的核酸序列中的一个或多个基本相似的多核苷酸序列。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 :用于 ORF 1、2、6、7-10 的 PCR 检测的寡核苷酸引物。

[0031] 图 2 :猪痢疾短螺旋体质粒上存在的基因的假定的功能。

[0032] 图 3 :用于 ORF 11-16 的 PCR 检测的寡核苷酸引物。

[0033] 图 4 :用基于微阵列的比较基因组杂交和 PCR 分析来比较猪痢疾短螺旋体的强毒

株和无毒株的质粒基因含量 (\* = PCR 分析)。在不同菌株中缺乏的基因为阴影。框表示与 LPS 生物合成相关的 6 个基因 (ORF 11-16), 它们存在于强毒株中, 但在无毒株中缺失 (P = 存在 ; A = 缺失)。

[0034] 图 5 : 用毒性猪痢疾短螺旋体菌株 WA1 (A 组) 或不包含由 ORF 11-16 编码的毒力因子的猪痢疾短螺旋体的未表征的野外菌株 (B 组) 感染后, 猪痢疾短螺旋体感染和猪痢疾症状阳性的猪的百分比。

[0035] 图 6 : 在暴露于毒性猪痢疾短螺旋体菌株 WA1 (A 组) 和不包含由 ORF 11-16 编码的毒力因子的猪痢疾短螺旋体的未表征的野外菌株 (B 组) 之前和之后, 通过 ELISA 测量的抗猪痢疾短螺旋体全细胞制备物的抗体的水平。

[0036] 发明详述

[0037] 在详细描述本发明之前, 应理解, 本发明不限于具体示例的方法, 其当然可以变化。还应理解, 本发明使用的术语仅是为了描述本发明的特定实施方案的目的, 而并非旨在限制, 其将仅受所附权利要求限制。

[0038] 本文在上文或下文中引用的所有出版物、专利和专利申请在此以其整体引入作为参考。但是, 本文提到的出版物是为了描述和公开在这些出版物中报道, 且可以与本发明结合使用的方法、试剂和载体的目的而引用。本文的任何内容不应解释为认可本发明没有资格由于现有发明而先于这类出版物。

[0039] 此外, 除非另有指明, 本发明的实施利用本领域技术人员的常规免疫学和分子生物学技术及药学。这类技术为技术人员公知, 并充分阐述于文献中。见例如, Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher 和 Wingfield “Current protocols in Protein Science” (1999) 卷 I 和 II (John Wiley & Sons Inc.); Sambrook 等, “Molecular Cloning : A Laboratory Manual” (1989), 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory press); 和 Prescott, Harley 和 Klein “Microbiology” (1999), 第四版 (WBC McGraw-Hill)。

[0040] 必须注意, 除非文中清楚地指明, 本文及所附权利要求中使用的单数形式“一”、“所述”和“该”包括复数指示物。因此, 例如, 提到“一个基因”包括多个这类基因, 而提到“一个动物”是提到一个或多个动物等等。除非另作定义, 本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。虽然可以用与本文所述的那些相似或等同的任意材料和方法来实施或测试本发明, 但现在描述优选的材料和方法。

[0041] 在本发明最广泛的方面, 提供猪痢疾短螺旋体的疫苗株。猪痢疾短螺旋体是厌氧的革兰氏阴性化能营养细菌, 其隶属于螺旋体纲 (class Spirochaetae), 表征为细长的螺旋形状。受猪痢疾短螺旋体感染的动物发展腹泻疾病。受猪痢疾短螺旋体感染的猪类动物发展表征为大肠上皮表面广泛的炎症和坏死的猪痢疾。因此, 虽然尤其考虑本发明的疫苗、化合物和方法适合在猪类动物 (猪和肥猪) 中使用, 但它们也可以应用于动物的其他哺乳动物物种和鸟类物种, 包括人类, 陪伴动物, 如狗和猫, 及家畜, 如鸡和鹅、马、牛和绵羊, 或动物园哺乳动物, 如非人灵长类动物、猫科动物、犬科动物和牛科动物。

[0042] 本发明的疫苗株是猪痢疾短螺旋体的活菌株。本文使用的术语“菌株”描述了可以通过一个或多个特征 (如核糖体 RNA 序列变异、DNA 多态性、血清学分型或毒素产生) 从该物种内的其他菌株区分开来的细菌物种的变体。在本发明中, 通过它们的毒力状态来区分

猪痢疾短螺旋体菌株,即将菌株分类为有毒性的或无毒性的。毒性猪痢疾短螺旋体菌株的实例包括 WA1、B204、Vic2、BW1、NSW5、Q17、NSW15,而无毒株的实例包括 B78<sup>T</sup>、SA2206、VS1、B234、R301、B6933、FM 88.90 和 A1。

[0043] 在一些实施方案中,疫苗株是减毒株。本文用术语“毒性的”、“毒力”或其语法等同形式来描述具有引起与腹泻疾病相关的临床症状的能力的猪痢疾短螺旋体菌株。

[0044] 强毒株的毒性特征源自其毒力因子的产生。本文使用的术语“毒力因子”涉及促进猪痢疾短螺旋体的毒力或猪痢疾短螺旋体引起疾病的能力的产物。毒力因子可以是蛋白质或糖类,且包括凝固酶、胶原酶、溶血素和脂多糖。例如,与鼠李糖生物合成相关的产物也可以是毒力因子。脂多糖(LPS)由三个不同结构域组成:脂质A、核心和O<sup>-</sup>抗原。脂质A作为疏水性膜锚着点起作用,并形成该分子的生物活性成分。核心区由复合寡糖组成,与O<sup>-</sup>抗原相比,其仅显示有限的结构变异性。O<sup>-</sup>抗原包含LPS的最可变的部分,并赋予细菌血清型特异性。它由1至8个糖的重复的糖亚单位组成。每条O链可以包含至多50个这些亚单位。鼠李糖是包括细胞壁的LPS的O<sup>-</sup>特异性抗原中的重要部分和许多病原菌的荚膜中的重要部分。细胞壁和荚膜在感染期间与宿主相互作用,且对细菌存活至关重要。LPS中糖类部分的丧失导致菌株具有粗糙菌落形态。通常,粗糙菌株的毒力强烈降低,而其对抗生素或血清成分的敏感性提高。

[0045] 因此,在一些实施方案中,本发明的毒力因子编码与鼠李糖生物合成相关的产物。

[0046] 在一些实施方案中,毒力因子由一个或多个多核苷酸序列编码,该一个或多个多核苷酸序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列或其功能性变体中的一个或多个基本相似。术语“核酸”、“多核酸”或“多核苷酸”在本文中指处于其所有形式的脱氧核糖核酸和核糖核酸,即单链和双链的DNA、cDNA、mRNA等。

[0047] 本文使用的术语“基本相似”指SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的那些的等同核苷酸序列,但由于一个或多个核苷酸取代、添加或缺失而不同,如等位基因变体,且还将包括由于遗传密码的简并性而不同的序列。等同物还将包括“基本同源”,即至少约85%、优选至少约90%和最优选至少约95%的核苷酸在确定长度的核苷酸序列内匹配的核苷酸序列。可以例如在针对该特定系统定义的高、中或低严格性条件下,在Southern杂交实验中鉴定基本相似的序列。

[0048] 本文以其多种语法形式使用的术语“编码”包括在转录和/或翻译的意义上对应于其他核苷酸或氨基酸的核苷酸和/或氨基酸。

[0049] “双链DNA分子”指处于其正常双螺旋中的脱氧核糖核苷酸(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶)的聚合形式。此术语仅指该分子的一级和二级结构,而不将它限制于任何特定的三级结构形式。因此,此术语包括尤其是见于线状DNA分子(例如限制片段)、病毒、质粒和染色体中的双链DNA。在讨论特定双链DNA分子的结构时,本文可以按照仅沿着DNA的非转录链(即具有与mRNA同源的序列的链)以5'至3'的方向给出序列的常规惯例描述序列。

[0050] 如果按照遗传密码翻译DNA序列产生氨基酸序列(即DNA序列“编码”氨基酸序列),则该DNA序列“对应”于该氨基酸序列。如果两个序列编码同一氨基酸序列,则一个DNA序列“对应”于另一DNA序列。当至少约85%、优选至少约90%和最优选至少约95%

的核苷酸在确定长度的 DNA 序列内匹配,且由 DNA 序列编码的蛋白质的对应的活性等同时, DNA 序列是另一 DNA 序列的“功能性变体”。编码蛋白质的一段 DNA 序列可以称为“基因”。

[0051] 本文用术语“减毒的”来描述已对其进行修饰,使得其不再能够引起疾病(即修饰的菌株是无毒性的)的猪痢疾短螺旋体的强毒株。

[0052] 本文用术语“活的”来描述能够生长和繁殖的猪痢疾短螺旋体。因此,本发明的活的猪痢疾短螺旋体菌株应能在动物结肠中菌群,但不引起与猪痢疾短螺旋体感染引起的腹泻疾病相关的临床症状。此外,本发明的活菌株应能够限制所接种的动物中的复制,并诱导防御猪痢疾短螺旋体的强毒株的保护性免疫应答。

[0053] 本文所述的毒性猪痢疾短螺旋体菌株可以是临床上已知的强毒株,或鉴定为包含毒力因子的菌株。因此,本发明还提供鉴定毒性猪痢疾短螺旋体菌株的方法。例如,鉴定猪痢疾短螺旋体菌株是否是强毒株的第一步是测定毒力因子在该菌株中的存在或缺乏。在一些实施方案中,这些毒力因子由一个或多个多核苷酸序列编码,该一个或多个多核苷酸序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的核酸序列或其功能性等同物中的一个或多个基本相似。可以通过分析与多核苷酸或基因的转录和 / 或翻译相关,或指示多核苷酸或基因的转录和 / 或翻译的任意因子(包括但不限于 RNA 表达水平和蛋白质表达水平,以及该 DNA 序列在染色体或细胞质中的存在)来测定编码这些毒力因子的多核苷酸或基因的存在。用于鉴定多核苷酸或基因或其产物在样品中的存在的技术为本领域技术人员公知,并描述于本文中的其他地方。在一些实施方案中,一个或多个毒力因子在未知菌株中的存在将指示它是强毒株。

[0054] 一旦获得,即可以通过本领域已知的许多方法(包括但不限于多次连续传代、温度敏感减毒作用、突变等)中的任一种来修饰毒性猪痢疾短螺旋体菌株,使得产生的菌株是减毒的,即无毒性且不能在动物中引起疾病。

[0055] 在一些实施方案中,对强毒株的修饰导致编码毒力因子的多核苷酸或基因的表达减少或阻抑,或导致非功能性毒力因子的表达。

[0056] 存在本领域公知的用于减少或消除多核苷酸表达的许多方法。例如,可以用重组 DNA 技术在预定位点,如启动子区或编码序列内引入突变,以产生无义突变。重组 DNA 技术包括克隆目的基因、通过位点定向诱变修饰基因序列、限制酶消化后再连接和随后用突变基因取代野生型基因。

[0057] 诸如将毒力因子基因克隆入质粒、用限制酶消化多核苷酸序列、然后内切核酸酶处理、再连接和在宿主菌株中同源重组的标准重组 DNA 技术全都为本领域已知,且尤其是描述于 Sambrook 等,“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”(1989), 第二版(Cold Spring Harbor Laboratory press)中。例如,可以使用 Clontech 销售的 **TRANSFORMER®** 试剂盒,利用体外位点定向诱变来产生位点定向突变。PCR 技术广泛描述于 Dieffenbach & Dreksler(1995)“PCR Primer-A Laboratory Manual”(Cold Spring Harbour Laboratory Press)中和本文中的其他地方。

[0058] 在一些实施方案中,可以通过插入、缺失或用一个核苷酸取代另一个核苷酸,来在染色体或染色体外 DNA(例如质粒)中预定的位点引入突变,如点突变,其导致具有减少的表达或无表达的突变基因。突变应产生具有降低的引起腹泻疾病(如猪痢疾)的能力的猪痢疾短螺旋体菌株。优选地,突变是缺失突变,其中核酸的切除引起基因的破坏。可以例如

通过缺失相邻的一段碱基对来产生这种突变。甚至非常小的缺失,如 10 个碱基对的一段序列也可以导致基因不编码蛋白质或编码非功能性蛋白质。甚至一个单碱基对的缺失也可以导致无蛋白质或非功能性蛋白质,因为由于这种突变,其他碱基对不再处于正确的阅读框中或转录已被抑制或减少。更优选地,去除更长的一段序列,例如 100 个碱基对。甚至更优选地,缺失全基因。

[0059] 与经典引入的突变相比,定义明确和有意产生的涉及片段或全基因或其组合的缺失的突变具有这样的优势:它们将不回复为野生型。因此,在本发明的一些实施方案中,疫苗株包括活的减毒猪痢疾短螺旋体菌株,其中编码毒力因子的基因中的突变包括缺失或插入,以破坏编码毒力因子的多核苷酸序列,使得不产生对应的蛋白质或该蛋白质是非功能性的。

[0060] 本领域技术人员还将理解,由于已鉴定了猪痢疾短螺旋体的毒力因子,将可能用不超出本文所述的技术来鉴定无毒性或在编码毒力因子的多核苷酸或基因中包含一个或多个先存突变的天然存在的猪痢疾短螺旋体菌株,其可以用作活疫苗株。一旦通过标准技术分离,即可以根据需要使这些天然存在的猪痢疾短螺旋体经受进一步的诱变或重组 DNA 技术,以构建双重或多重突变株。此外,猪痢疾短螺旋体菌株可以包含编码毒力因子的全基因的缺失。在一些实施方案中,猪痢疾短螺旋体菌株将是在所有毒力基因中具有先存缺失突变的野生型无毒株。

[0061] 用于鉴定编码毒力因子的基因中具有一个或多个突变的细菌的技术为本领域技术人员已知。因此,用于检测已通过上文所述技术突变的猪痢疾短螺旋体菌株的常规技术包括 Northern 和 Western 印迹、PCR、ELISA 及本文中其他地方所述的细胞毒性测定。可以按本文中其他地方所述容易地选择无编码毒力因子的功能性基因的突变株。

[0062] 编码本发明的毒力因子的基因可以是质粒携带的。因此,在一些实施方案中,对毒性猪痢疾短螺旋体菌株的修饰包括消除该菌株的一个或多个质粒。本文所用的术语“质粒”指独立于细菌染色体复制的胞质 DNA。已发展了涉及化学和物理试剂的多种方法来从细菌菌株除去或“消除”质粒。细菌菌株质粒的消除不涉及直接物理去除该质粒,而是涉及干扰该质粒的复制和 / 或分配,以提高发生无质粒分配的比率。

[0063] 诸如将细菌培养物暴露于一些化学试剂,例如吡啶橙、吡啶黄素、十二烷基硫酸钠的亚抑制浓度,或暴露于超最适温度,然后选择消除的衍生物的用于消除质粒的标准流程为本领域公知,且尤其是描述于 Sambrook 等,“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”(1989),第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratory press) 中。可以例如通过将培养物暴露于溴化乙锭来从菌株消除质粒。在一个实例中,可以将猪痢疾短螺旋体细胞在厌氧胰酪胨肉汤培养液中培养至对数中期。然后将细胞系列稀释在例如含有约 30  $\mu$ g/ml 溴化乙锭的厌氧胰酪胨肉汤培养液中,并在厌氧条件下伴随摇动维持在约 37°C 约 3 天。将来自最高系列稀释的活培养物系列稀释在含有 30  $\mu$ g/ml 溴化乙锭的厌氧胰酪胨肉汤培养液中,并在相同条件下维持在 37°C 3 天。重复此过程至少另外 9 次,在最后一次传代后洗涤细菌细胞以去除溴化乙锭,并接种在琼脂培养基,如 Fastidious Anaerobic Agar (LabM) 平板上以获得单菌落。

[0064] 用于鉴定消除衍生物的技术为本领域技术人员已知。用于其检测的常规技术,如 Northern 和 Western 印迹、ELISA 及细胞毒性测定为本领域已知。在一个实例中,通过 PCR

针对质粒的丧失筛选单菌落。与所有产物在野生型猪痢疾短螺旋体菌株中的存在相比,所有毒力因子的 PCR 产物的缺乏指示成功的质粒消除。

[0065] 对本领域技术人员而言,显而易见的是,可以将这些相同的技术应用于鉴定缺乏一个或多个包含毒力基因的质粒的天然存在的猪痢疾短螺旋体无毒株。

[0066] 本文使用的“聚合酶链反应”或“PCR”一般指用于体外扩增希望的核苷酸序列的方法。一般而言,PCR 方法涉及 PCR 试剂存在下的引物延伸合成的反复循环,其使用能够优先与模板核酸杂交的两个寡核苷酸引物。通常,用于 PCR 方法中的引物将在待扩增的核苷酸序列两端或其侧翼与模板内的核苷酸序列互补,虽然也可以使用与待扩增的核苷酸序列互补的引物。在一些实施方案中,用于鉴定编码毒力因子的基因的存在 PCR 引物是图 3 中所示的那些。

[0067] 通过使用将与希望的序列特异性结合的引物,还可以用 PCR 来测定具体的序列是否存在,其中扩增产物的存在指示形成了具体的结合复合物。备选地,可以通过电泳(例如毛细管或凝胶电泳)分级分离扩增的样品,转移至适宜的支持物(例如硝酸纤维素),然后用模板序列的片段探测。

[0068] “寡核苷酸引物”、“寡核苷酸探针”或“PCR 引物”是通过已知方法(涉及例如三酯、亚磷酰胺或磷酸酯化学)化学合成的短的单链或双链多脱氧核糖核苷酸。通常,然后例如通过聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化它们。本发明的引物和探针是 DNA 分子,其优选在高严格性条件下与所杂交的编码毒力因子的基因核酸内的相邻核酸残基区域充分互补。定义适当的杂交条件在本领域的技术范围之内。但是,简言之,用于核酸分子杂交或退火的“严格条件”是那些条件:(1) 利用低离子强度和高温进行洗涤,例如 0.015 M NaCl/0.0015M 柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)于 50°C;或(2) 在杂交期间利用变性剂,如甲酰胺,例如含 0.1%牛血清白蛋白/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/含 750mM NaCl、75mM 柠檬酸钠, pH6.5 的 50mM 磷酸钠缓冲液的 50%(体积/体积)甲酰胺于 42°C。另一实例是在 42°C 下使用 50%甲酰胺、5X SSC(0.75M NaCl、0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠(pH6.8)、0.1%焦磷酸钠、5X Denhardt's 溶液、超声处理的鲑精 DNA(50 μg/mL)、0.1% SDS 和 10%硫酸葡聚糖,在 42°C 下在 0.2XSSC 和 0.1% SDS 中洗涤。

[0069] 示例性引物和探针包括长度为至少约 15 个核酸残基和选自 DNA 的任意 15 个或更多个相邻残基的寡核苷酸。优选地,用于本发明的一些实施方案中的寡核苷酸引物和探针长度为至少约 20 个核酸残基。本发明还考虑长度为 150 个核酸残基或更长的寡核苷酸引物和探针。本领域普通技术人员理解,可以容易地测定用于达到特定长度的引物或探针与本发明的核酸分子杂交的核酸杂交条件。达到不同长度的探针的最适杂交条件的这类操作为本领域公知。在一些实施方案中,用于鉴定编码毒力因子的基因的存在寡核苷酸引物如图 3 中所示。

[0070] 本文所用的术语“PCR 试剂”指进行 PCR 过程所需的与模板核酸序列分开的化学品。这些化学品一般由 5 类成分组成:(i) 含水缓冲液;(ii) 水溶性镁盐;(iii) 至少 4 种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP);(iv) 寡核苷酸引物(通常每个模板序列(定义双链模板序列的两条互补链的 5' 端的序列)两个引物);和(v) 多核苷酸聚合酶,优选 DNA 聚合酶,更优选热稳定的 DNA 聚合酶,即可以耐受 90°C 和 100°C 之间的温度至少 10 分钟的总时间而不丧失其约一半以上活性的 DNA 聚合酶。适宜的多核苷酸聚合酶的实例是 HotStarTaq DNA

Polymerase(Qiagen)。

[0071] 4种常规dNTP是胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)和脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)。可以用包含碱基类似物的dNTP,例如脱氧尿苷三磷酸(dUTP)来补充或取代这些常规脱氧核糖核苷三磷酸,该碱基类似物与4种常规碱基一样Watson-Crick配对。

[0072] 扩增反应中可以包含可检测标记。可以通过诸如切口平移、化学和酶促手段等的技术将生物素标记的核苷酸掺入DNA或RNA中。杂交后用诸如抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白、荧光标记剂、酶、胶体金缀合物等的显示手段检测生物素化的引物和探针。还可以用其他荧光化合物、用可免疫检测的荧光衍生物、用生物素类似物等标记核酸。还可以利用与蛋白质连接来标记核酸。还可以使用与放射性或荧光组蛋白单链结合蛋白交联的核酸。本领域普通技术人员将理解,可获得用于检测寡核苷酸引物和探针的其他适宜的方法及其他适宜的可检测标记用于实施本发明。但是,可以在化学合成期间将荧光残基掺入寡核苷酸中。优选地,标记本发明的寡核苷酸引物和探针以使得它们易于检测。可检测标记可以是目检或借助于仪器检测的任意种类或部分。

[0073] 适宜的标记包括荧光染料,例如异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明、德克萨斯红、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、6-羧基荧光素(6-FAM)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、5-羧基荧光素(5-FAM)或N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA),放射性标记,例如<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H等。另一组荧光化合物是在 $\alpha$ 或 $\beta$ 位中具有氨基的萘胺。包含于这类萘胺基化合物中的是1-二甲氨基萘基-5-磺酸盐、1-苯胺基-8-萘磺酸盐和2-p-touidinyl-6-萘磺酸盐。其他染料包括3-苯基-7-异硫氰酸根合香豆素(isocyanatocoumarin),吖啶,如9-异硫氰酸合吖啶吖啶橙(isothiocyantoacridine acridine orange);N-(对-(2-苯并噁唑基)苯基)马来酰亚胺;苯并噁二唑、芪、芪等。最优选地,荧光化合物选自VIC、羧基荧光素(FAM)、**Lightcycler**<sup>®</sup> 640和Cy5。

[0074] 标记可以是两阶段系统,其中扩增的DNA与具有高亲和力结合配偶体(例如抗生物素蛋白、特异性抗体等)的生物素、半抗原等缀合,其中结合配偶体与可检测标记缀合。可以将标记与引物之一或与两条引物缀合。备选地,标记用于扩增的核苷酸库,以便于将标记掺入扩增产物中。

[0075] 本发明的疫苗株应保持其免疫原性特性,并具有保护性免疫原性。本文所用的术语“免疫原性特性”指疫苗株在动物中产生对抗原的发展体液和/或细胞免疫应答的能力。为了本发明的目的,“体液免疫应答”指由抗体分子介导的免疫应答,而“细胞免疫应答”是由T淋巴细胞和/或其他白细胞介导的免疫应答。

[0076] 细胞免疫的一个重要方面涉及溶细胞性T细胞(“CTL”)的抗原特异性应答。CTL对与由主要组织相容性复合体(MHC)编码并表达于细胞表面的蛋白质结合呈递的肽抗原具有特异性。CTL帮助诱导和促进胞内微生物的破坏,或受这类微生物感染的细胞的裂解。细胞免疫的另一方面涉及辅助性T细胞的抗原特异性应答。辅助性T细胞针对在细胞表面上展示与MHC分子结合的肽抗原的细胞发挥作用来帮助刺激非特异性效应细胞的功能,并集中非特异性效应细胞的活性。“细胞免疫应答”还指由活化的T细胞和/或其他白细胞(包括衍生自CD4+和CD8+T细胞的那些)产生的细胞因子、趋化因子及其他这类分子的产

生。

[0077] 引起细胞免疫应答的组合物或疫苗可以用于通过在细胞表面呈递与 MHC 分子结合的抗原来致敏受试者。细胞介导的免疫应答定向在其表面呈递抗原的细胞处或附近。此外,可以产生抗原特异性 T 淋巴细胞来允许免疫的宿主的未来的保护作用。

[0078] 可以通过许多测定来测定特定免疫原刺激细胞介导的免疫应答的能力,如通过淋巴组织增生(淋巴细胞活化)测定、CTL 细胞毒性细胞测定,或通过测定对致敏的受试者中的抗原特异的 T 淋巴细胞。这类测定为本领域公知。测量细胞介导的免疫应答的方法包括测量 T 细胞群体的胞内细胞因子或细胞因子分泌,或通过测量表位特异性 T 细胞。

[0079] 因此,本文所用的术语“免疫原性特性”可以是刺激抗体产生或引起 CTL 产生的特性。因此,本发明的疫苗株的免疫原性特性可以起始以下效应中的一个或多个: B 细胞产生抗体;和/或活化特异性定向存在于本发明的疫苗组合物中的一种或多种抗原的阻抑性 T 细胞。这些应答可以用于中和感染性和预防细菌在肠中建群,和/或介导抗体-补体或抗体依赖性细胞毒作用(ADCC),以向免疫的宿主提供保护作用。因此,疫苗株的免疫原性特性具有“保护性免疫原性”。

[0080] 在一些实施方案中,制备疫苗株的方法不仅包括选择强毒株并在该强毒株中产生修饰的步骤,还包括分离和选择含有该修饰的活的减毒猪痢疾短螺旋体菌株的步骤。分离和选择修饰的猪痢疾短螺旋体菌株的方法为本领域已知并描述于本文中的其他地方。

[0081] 一旦产生,即可以对动物施用本发明的疫苗株来预防由猪痢疾短螺旋体建群引起的痢疾。在一些实施方案中,对动物施用有效量的至少一种猪痢疾短螺旋体的疫苗株。

[0082] 可以考虑诸如受体动物的年龄、性别、体重、物种和病症及给药途径的因素,按剂量和通过医疗或兽医领域技术人员公知的技术施用本发明的疫苗株。给药途径可以是经皮、经黏膜施用(例如口腔、鼻、肛门、阴道)或经肠胃外途径(真皮内、肌内、皮下、静脉内或腹膜内)。疫苗株可以单独施用,或者可以与其他治疗或疗法共同施用或顺次施用。施用的形式可以包括混悬剂、糖浆剂或酏剂,及用于肠胃外、皮下、真皮内、肌内或静脉内施用(例如注射施用)的制剂,如无菌混悬剂或乳剂。

[0083] 可以作为喷雾剂,或混合在食物和/或水中,或在与适宜的载体、稀释剂、佐剂或赋形剂,如无菌水、生理盐水、葡萄糖等的混合物中递送来施用疫苗株。取决于给药途径和希望的制剂,疫苗株可以包含辅助物质,如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂、佐剂、胶凝作用或黏度增强添加剂、防腐剂、增香剂、染料等。可以查阅标准药学文献如“Remington's Pharmaceutical Sciences”(1990),第 18 版(Mack Publishing Co.)来制备适宜的制剂而无需过度的实验。

[0084] 本发明的疫苗株还可以用于制备疫苗组合物。在一些实施方案中,该疫苗组合物在可药用介质中包含本文所述的猪痢疾短螺旋体的疫苗株中的至少一种。本发明还在一些实施方案中提供猪痢疾短螺旋体的疫苗株在制备用于预防猪痢疾短螺旋体感染的药物中的用途。用于制备药物组合物和药物的药物载体为本领域公知,并显示于诸如“Remington's Pharmaceutical Sciences”(1990),第 18 版(Mack Publishing Co.)的教科书中。施用疫苗组合物的方法也为本领域已知并描述于上文。

[0085] 本发明还在一些实施方案中提供通过施用有效量的疫苗组合物来针对猪痢疾短螺旋体感染接种的方法。逻辑上,本发明还提供通过对动物施用有效量的上文所述的疫苗

组合物来赋予动物（如猪）针对猪痢疾短螺旋体感染的免疫的方法。

[0086] 在本发明的实施方案中公开的组合物可以是试剂盒的部分。通常，试剂盒还将包含使用说明。

[0087] 本发明还涉及在动物中诊断毒性猪痢疾短螺旋体建群的方法。在一些实施方案中，该方法包括从疑似患有猪痢疾短螺旋体感染的动物获得样品。

[0088] “样品”指疑似包含猪痢疾短螺旋体或其多核苷酸或其多肽的动物组织、生物流体或其他材料。这类组织、流体或材料的实例包括但不限于血浆、血清、粪便材料、尿、活组织检查材料（包括胃和肠样品）。该样品还可以包含体外细胞培养物组分。

[0089] 可以通过按上文所讨论评估编码毒力因子的多核苷酸或基因的存在或缺乏来测定猪痢疾短螺旋体强毒株是否在动物中建群。可以通过分析与基因的转录和翻译相关或指示基因的转录和翻译的任意因子（包括但不限于 RNA 表达水平和蛋白质表达水平，以及该 DNA 序列在染色体内或染色体外的存在）来测定基因的存在。

[0090] 用于鉴定基因或其产物在样品中的存在的技术为本领域技术人员已知。诸如 Northern 和 Western 印迹、PCR、微阵列和 ELISA 的常规技术为本领域已知，并描述于本文中的其他地方。在一个实施方案中，可以通过 ELISA 来测定编码毒力因子的基因在菌株内的存在。ELISA 测定可以以之为基础的方案包括例如竞争性测定、直接反应测定和夹心型测定。在 ELISA 测定中，可以将样品（包括例如生物流体和组织样品）加至例如微量滴定板（microtitre tray）中的肽包被的孔，其中，如果样品中存在抗体，则形成免疫复合物。可以加入信号产生手段来检测复合物形成。如果样品中存在特异性抗体，则产生可检测信号。

[0091] 例如，可以用在例如碳酸盐缓冲液中的对应于毒力因子的猪痢疾短螺旋体肽包被微量滴定板。使包被在约 4°C 下在湿润的室内过夜进行。可以伴随混合用 PBS-BSA 封闭平板，并用 PBST 洗涤。将稀释的猪血清加至平板并孵育。然后在加入例如山羊抗-猪 IgG-HRP 之前洗涤平板。然后可以加入 K-Blue TMB 底物，使之发生显色，然后加入硫酸终止。然后可以读取每个孔的光密度。此实例中颜色的存在将指示样品中存在对猪痢疾短螺旋体毒力因子特异的抗体，从而指示猪痢疾短螺旋体强毒株在动物中建群。

[0092] 还可以用流通测试形式的就地检验（point of care）装置来诊断猪痢疾短螺旋体强毒株是否在动物中建群。在流通测试中，将生物样品加至在其上固定化抗毒力因子的抗体的硝酸纤维素膜，在样品经过膜时，多肽与固定化抗体结合形成免疫复合物。在含有标记的第二抗体的溶液经过膜时，它与免疫复合物结合。在试验纸检验（strip test）中，一旦加入生物样品，该生物样品即经过包含标记抗体的区域，且多肽与标记抗体结合形成免疫复合物。

[0093] 在生物样品经过包含固相抗体的区域时，多肽与免疫复合物结合。在具有固定化抗体的区域中检测到的第二抗体的量显示毒力因子在样品中的存在或缺乏。

[0094] 本发明还涉及筛选能够调节猪痢疾短螺旋体菌株的毒力的化合物的方法。在一些实施方案中，该筛选方法评价化合物调节猪痢疾短螺旋体毒力因子的表达或靶向猪痢疾短螺旋体毒力因子的活性的可能性。

[0095] 术语“化合物”优选包括但不限于与编码毒力因子的多核苷酸和 / 或多肽结合，使得毒力因子或其靶标的活性或表达被抑制或阻抑的小的有机分子、肽、多肽和抗体。可能的化合物可以是小的有机分子、肽、多肽，如密切相关的蛋白质，或与结合分子上的相同部位

结合的抗体。

[0096] 术语“化合物”还潜在地包括这样的小分子，其结合并占据毒力因子多肽的结合部位，从而阻止其与细胞结合分子结合，使得正常的生物活性被阻止。小分子的实例包括但不限于小的有机分子、肽或肽样分子。可能的多肽拮抗剂的其他实例包括抗体，或者在一些情况下，寡核苷酸或蛋白质，其根据具体情况与多肽的配体、底物、受体、酶等密切相关，例如配体、底物、受体、酶等的片段；或者与本发明的多肽结合但不引起应答，使得多肽的活性被阻止的小分子。其他可能的化合物包括反义分子，这些分子的描述见例如“Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression”(1988)CRC Press。

[0097] 在一些实施方案中，可以希望固定化编码毒力因子的多肽或它们的靶分子或配体，以适应测定的自动化。可以在适合用于容纳反应物的任何容器实现测试化合物与编码毒力因子（或其片段或变体）的蛋白质的结合，或这种蛋白质在存在和缺乏候选化合物的情况下与靶分子或配体的相互作用。

[0098] 这类容器的实例包括微量滴定板、试管和微量离心管。

[0099] 在一些实施方案中，可以提供添加了允许蛋白质之一或二者与基质结合的结构域的融合蛋白质。用于在基质上固定化蛋白质的技术为本领域公知。

[0100] 在一些实施方案中，该方法包括使用编码报道基因的 DNA 构建体，该报道基因在由 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 中所示的多核苷酸序列编码的基因的转录调节序列或启动子的控制之下。使包含该构建体的细胞与待测试的化合物接触，并测量由报道基因产生的信号的量。如果所产生的报道基因产物的量少于未暴露于该化合物的对照细胞所产生的量，则该化合物能够抑制猪痢疾短螺旋体毒力。

[0101] 现将通过仅参考以下非限制性实施例的方式进一步描述本发明。但是，应理解，以下实施例仅是说明性的，而不应以任何方式作为对上述发明的一般性的限制。

[0102] 实施例 1 基因组测序

[0103] 对猪痢疾短螺旋体的澳大利亚猪野外分离株（菌株 WA1）进行了鸟枪法测序。此菌株已得到充分表征，并在实验性攻击猪后显示是有毒性的。将螺旋体培养在厌氧胰酪胨肉汤培养液中，并用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）方法提取 100  $\mu$ g DNA 来制备适合用于制备基因组 DNA 文库的高质量高分子量 DNA。用 GeneMachines Hydroshear 剪切基因组 DNA，并按照 pSMART 载体系统的供应商（Lucigen）推荐的流程克隆片段化的 DNA。将小插入片段（2-3kb）文库和中等插入片段（3-10kb）文库构建在低拷贝形式的 pSMART 载体中，并用 AB 3730 DNA 测序仪测序随机克隆，以提供至少 8x 的基因组覆盖。为了进一步接近基因组序列，从具有 500bp 平均插入片段大小的基因组 DNA 制备用于 Roche GS-FLX 的鸟枪文库。用 Roche GS-FLX DNA 测序仪测序来自此文库的随机克隆。最后，用未连接的相邻序列间的引物步测法来完成基因组序列。

[0104] 实施例 2 注释

[0105] 由 Queensland 的 Australian Genome Research Facility (AGRF) 和 Murdoch University 的 Centre for Comparative Genomics (CCG) 组装并注释了猪痢疾短螺旋体的所有基因组序列。用一系列公有领域生物信息学工具来分析和再分析序列，作为有关数据

分析的质量保证方法的一部分。用包括 GeneMark、GLIMMER、ORPHEUS、SELFID 和 GetORF 的多种程序预测了可读框 (ORF)。用包括 BLAST 和 FASTA 的检索针对与现有国际数据库的同源性 (DNA 和蛋白质) 检查假定的 ORF。用鉴定的基因和其他物种进行了系统发生分析和其他分子进化分析来辅助分配功能。部分测序的基因组的计算机分析产生了在可获得的序列数据中存在的所有预测的 ORF 的全面列表。

[0106] 猪痢疾短螺旋体基因组的来自不同测序平台的数据的组合导致 3,000,694bp 基因组和 35,940bp 环状染色体外质粒的鉴定。预测基因组编码 2,551 个 ORF, 而质粒编码 32 个 ORF。预测的 ORF 与核酸和蛋白质数据库中存在的基因的比较显示, 约 70% 预测的 ORF 与包含于数据库中的基因具有同源性。其余 30% 的 ORF 不具有已知的同一性。质粒上存在的 32 个预测的基因的假定的功能显示于图 2 中。大多数这些基因具有与胞外被膜生物合成, 且尤其是脂多糖 (LPS) 生物合成相关的功能。

[0107] 实施例 3 微阵列分析和 PCR 分析

[0108] 由 Affymetrix 用来自猪痢疾短螺旋体基因组序列和质粒序列的预测的 ORF 设计并制备了定制的 GeneChip。在编码在基因组上的 2,551 个 ORF 中, 1718 个基因表现在 GeneChip 上, 而在编码在质粒上的 32 个 ORF 中, 25 个表现在芯片上。用基于微阵列的比较基因组杂交 (CGH) 来将 6 个高毒性猪痢疾短螺旋体菌株 (菌株 B204、BW1、Vic2、NSW5、NSW15 和 Q17) 和 8 个低毒性菌株 (菌株 B234、SA2206、VS1、A1、B78T、R301、B6933 和 FM88.90) 的基因含量与猪痢疾短螺旋体菌株 WA1 (也是高毒性菌株) 的基因含量相比较。已报道了强毒株在实验性感染和天然感染的猪中引起严重的 SD 临床病征。已报道了无毒株在猪中建群而不引起显著的 SD 临床病征。按照厂家的说明用 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) 从猪痢疾短螺旋体细胞提取高分子量 DNA。用限制酶 RsaI 消化纯化的高分子量 DNA, 并按照厂家的说明使用 BioPrime Array CGH Genomic Labelling System (Invitrogen), 用荧光氰化物染料 (Cy3) 标记产生的限制片段。使标记的基因组片段与猪痢疾短螺旋体 GeneChip 在中等严格的条件下 (37°C) 在 Hybridisation Oven 645 (Affymetrix) 中杂交 16 小时。按厂家的说明用 GeneChip Hybridisation, Wash and Stain Kit (Affymetrix) 洗涤和标记 GeneChip。用 Fluidics Station 450 (Affymetrix) 进行 GeneChip 的洗涤和染色。最后, 用 Scanner 3000 (Affymetrix) 扫描杂交的 GeneChip, 用 GeneChip Operating Software (GCOS, Affymetrix) 分析复合图像。

[0109] 对于 GeneChip 未表现的 7 个质粒 ORF, 设计了 3 个独特的引物对来 PCR 扩增每个 ORF (表 1)。按照厂家的说明用 HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) 对来自用于 CGH 微阵列分析的所有菌株的高分子量 DNA 进行聚合酶链反应 (PCR)。将用于各引物的退火温度设置在低于最适退火温度 5°C, 以允许与微阵列杂交相似的中等严格性。通过琼脂糖凝胶电泳扩增产物, 用溴化乙锭染色, 并在紫外光下观察。ORF 的一个或多个产物的存在是质粒上存在该 ORF 的指示。

[0110] 强毒株和无毒株的质粒基因含量比较显示于图 4 中。这些结果显示, 除无毒株 A1 和 FM88.90 外, 所分析的所有菌株都具有质粒。对于具有质粒的菌株, 所有质粒上都存在 ORF 1-10、17-24 和 26-32。ORF 25 的分布在菌株之间是可变的, 且与它们的毒力不相关。强毒株的质粒上存在 ORF11-16, 但无毒株的质粒上缺乏。这些结果显示, ORF 11-16 编码毒力因子。

[0111] 因此,无鉴定的功能性毒力因子的菌株将可以用作活疫苗株。此外,在未知毒力的菌株中检测 ORF 11-16 将提供测定菌株是否有毒性的有用手段。类似地,评估鉴定的毒力因子的存在可以用于诊断受试者是否受猪痢疾短螺旋体的强毒株感染。

[0112] 实施例 4 质粒的排除 (“消除”)

[0113] 将猪痢疾短螺旋体菌株 WA1 细胞在厌氧胰酪胨豆胨肉汤培养液中培养至对数中期。将细胞系列稀释在含有 30  $\mu$ g/ml 溴化乙锭的厌氧胰酪胨豆胨培养液中,并在厌氧条件下伴随摇动维持在 37°C 3 天。将来自最高系列稀释的活培养物系列稀释在含有 30  $\mu$ g/ml 溴化乙锭的厌氧胰酪胨豆胨肉汤培养液中,并在相同条件下维持在 37°C 3 天。重复此过程另外 9 次,在最后一次传代后洗涤螺旋体以去除溴化乙锭,并接种在 Fastidious Anaerobic Agar (LabM) 平板上以获得单菌落。

[0114] 实施例 5 筛选具有消除的质粒的克隆

[0115] 通过 PCR 针对质粒的丧失筛选在含有溴化乙锭的液体培养基中传代获得的单菌落。设计了靶向 ORF 11-16 的 3 个引物对用于筛选方法 (图 3)。将总计 48 个菌落的细胞挑入 Tris-EDTA 缓冲液中,并在使用 6 个引物组中的每一个的 PCR 反应中作为模板加入。按照厂家的说明用 HotStarTaqDNA Polymerase (Qiagen) 进行 PCR 反应。与所有产物在野生型猪痢疾短螺旋体 WA1 菌株中的存在相比,所有引物组的 PCR 产物的缺失指示成功的质粒消除。

[0116] 实施例 6 用不包含毒力因子 (ORF 11-16) 的猪痢疾短螺旋体的野外菌株实验性感染猪

[0117] 从无猪痢疾的商业猪舍购买了体重约 18kg 的 36 头阉割的雄性猪 (大白猪 x 长白猪 x 杜洛克猪)。对猪进行称重,在耳朵上标记,采集并培养粪便样品,以排除猪痢疾短螺旋体的可能的存在。将猪随机分配至两个组:

[0118] i) 组 A:用毒性猪痢疾短螺旋体菌株 WA1 (即包含在以上实施例 3 中鉴定的毒力因子 (ORF 11-16) 的菌株) 攻击的 12 头猪;和

[0119] ii) 组 B:用不包含在以上实施例 3 中鉴定的毒力因子 (ORF 11-16) 的之前未表征的猪痢疾短螺旋体的野外菌株 (即预测其无毒性的菌株) 攻击的 24 头猪。

[0120] 将各组动物安置在隔离动物房的不同房间中的单个圈中。维持严格的生物安全性流程以预防感染在房间之间传播。猪随意地 (ad libidum) 以不含抗生素的断奶仔猪饲料为食。

[0121] 到达后两周,用 100ml 含有培养至指数对数期的猪痢疾短螺旋体菌株 WA1 的培养液 ( $\sim 10^8$ /ml) 通过胃管攻击组 A 中的猪。以相同的方式,用 100ml 含有培养至指数对数期的猪痢疾短螺旋体的未表征的野外菌株的培养液 ( $\sim 10^8$ /ml) 攻击组 B 中的猪。对两个组,在连续三天内重复攻击。

[0122] 攻击后,每天针对与猪痢疾一致的临床病征,尤其是包含新鲜血液和黏液的腹泻的存在观察猪。去除发展猪痢疾临床病征的猪。每周两次从直肠排泄物采集细菌学拭子,将拭子于厌氧条件下培养在选择性琼脂上。实验性攻击后 4 周结束实验。在攻击的第一天之前和在死后或实验结束后从颈静脉采血。取出血清并用于 ELISA 中的血清学分析。

[0123] 实施例 7 螺旋体培养

[0124] 将细菌学拭子划线在含有 5% (v/v) 去纤维蛋白绵羊血、400ug/ml 壮观霉素及黏

菌素和万古霉素各 25ug/ml 的胰酪胨琼脂平板上。将这些平板在 39℃ 下在有氧环境中孵育 7 天。根据强的  $\beta$ -溶血作用和微观形态将螺旋体鉴定为猪痢疾短螺旋体。传代培养隔离群的亚型,并用物种特异性 PCR 确认为猪痢疾短螺旋体。

[0125] 组 A 中的 12 头猪中有 11 头 (92%) 在实验期间将猪痢疾短螺旋体排泄在其粪便中,并发展猪痢疾的病征。在组 B 中,24 头猪中的 13 头 (54%) 排泄猪痢疾短螺旋体,并发展猪痢疾 (见图 5)。两组间排泄模式和疾病中的这些差异是在统计学上显著的 ( $P = 0.031$ ; Fisher 精确检验)。在两个组中,未在患痢疾的猪的大肠中发现宏观病理学的程度中的差异。

[0126] 因此,与具有毒力因子的菌株相比,不包含实施例 3 中鉴定的毒力因子 (ORF 11-16) 的未表征的猪痢疾短螺旋体的野外菌株在显著少的猪中建群,且攻击后显著少的动物发展疾病。此发现表明,ORF 11-16 在便于建群和允许发展疾病中很重要,这支持 ORF 11-16 编码毒力因子的主张。这些结果还表明 ORF 11-16 在测定猪痢疾短螺旋体的菌株是有毒性的或是无毒性的中的有用性。

[0127] 实施例 8 血清学 ELISA

[0128] 用 100  $\mu$ l/孔在碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 中的超声处理并澄清的猪痢疾短螺旋体全细胞 (1  $\mu$ g/ml) 包被微量滴定板。细胞来自用于各感染中的相同菌株。使包被在 4℃ 下过夜进行。用 150  $\mu$ l PBS-BSA (1% w/v) 在室温 (RT) 下伴随混合封闭平板 1 小时,然后用 150  $\mu$ l PBST (0.05% v/v) 洗涤 3 次。将猪血清在 100  $\mu$ l PBST-BSA (0.1% w/v) 中稀释 400 倍,并伴随混合在 RT 下孵育 2 小时。在加入 100  $\mu$ l 50,000 倍稀释在 PBST-BSA (0.1% w/v) 中的山羊抗-猪 IgG (全分子)-HRP 之前洗涤平板 (如上)。在 RT 下孵育 1 小时后,洗涤平板并加入 100  $\mu$ l TMB 底物。使显色在 RT 下进行 10 分钟,然后加入 100  $\mu$ l 500mM 的硫酸终止。在 450nm 下读取各孔的光密度。

[0129] 在实验性攻击之前,来自两个组的猪都具有相似的抗猪痢疾短螺旋体全细胞制备物的抗体的基线水平。在组 A 中,12 头猪中的 8 头在实验性攻击和实验结束的时间之间显示抗体水平的提高,但在整个组内,抗体水平的高不显著。在组 B 中,24 头猪中的 21 头显示抗体水平的提高,且抗体水平的组提高是显著的 ( $p < 0.001$ ) (见图 6)。

[0130] 因此,暴露于不包含毒力因子的猪痢疾短螺旋体的野外菌株导致通过抗体水平在猪痢疾短螺旋体感染后的显著提高证明的全身免疫应答。这些结果表明,不包含 ORF 11-16 的猪痢疾短螺旋体菌株确实具有免疫原性特性,且可以针对猪痢疾短螺旋体感染诱导保护性免疫 (即具有保护性免疫原性),虽然它具有降低的在猪中建群和引起疾病的能力。因此,这些结果支持无功能性 ORF 的猪痢疾短螺旋体菌株可以用作活疫苗株的主张。

[0001]

## 序 列 表

<110> 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司

<120> 猪痢疾短螺旋体的疫苗株

<130> P79212.AU

<160> 12

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1218

<212> DNA

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

<400> 1

```

atggatagta aaaatacaaa atatcagtct aaattaaatc tagaaaatag aacaccttta      60
caagaaataa tacctcttga aacacctttt gtaatgcatt tagattcttc aacagcttgt      120
aattttaaat gtgaattttg tccttctgca tcttctacaa ataaagatta tgtaaaaaatg      180
aatttggatt tagatttata taaaaaagct atagatgatt taaaagattt taataataat      240
ttgaaaattc taaggtttta caaaattgga gaacctttaa tgaacagaaa tatagccgaa      300
atggtagcat atgcaagaaa tagcaataaa gtagatttta tagatatgac tacaaatgga      360
tcattattaa ctaatgagtt atcattaaag ttggtagatg ctggattgaa taagatcaac      420
atttcaatag aaggtatcaa ttcagaacaa tataataaat atgctcatta taatataaac      480
tttaatgaat ttattaataa tttggctttt ttatataaaa ataaaaaaaaa cttggaaatt      540
acaatgaaaa taccagggtga ttacttgagt gaaagtgaaa aagaagaatt tttaaatata      600
ttctcaccat attgtgataa aatatttatt gaatatttaa cagataatgt ttggcctaat      660
tttagtgtaa atgaaaattc aaaagtaatt aatttattag gaaaaagtca atatggttta      720
gaagttaaaa atagaaaaat ttgttgctat ttattttatg ttttagtatt aaattctaatt      780
ggaactataa gtgcttgctg ttcagattgg caagaaaaac ttattatagg tgatgttaga      840
aaacaaagtc ttaaagaaat atggaactca gataagatga atgaatttag aattttacat      900
ttaaaggta  aaagatttga aatgatggtt tgtaaaaatt gcggaaatat acaatcttct      960
caaatagatg atatagatga ttacgctgaa gaaattttat ctagaatgac cagaccagac      1020
cagaccagac cagaccagac cagaccagac cagaccagac cagacctaat atttatatat      1080
gtagcgatta catatatctt tatattaata gaaaatataa aaaaatacaa cctatgttgc      1140
aatataaaat tgcagcatag gtttttttat ttttagttcta ctattataag gagtgagcaa      1200

```

## [0002]

ttgtgtcaaa taaagaaa 1218

<210> 2

<211> 999

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 2

atggcaaaat ttaaactctaa attaaattta gaaactaggc ataaattaga agaagttata 60

ccattaaaaa cacctttttt aatatattta gatccatcta gtgcttgcaa ctttaaatgt 120

gaattttgtc catctccatt ttctacaaaa gaagattatg taaaacaaat ttttgatttt 180

gaattataca aaaaagtaat agatgattta aatgaatttg atgataatat caaaatgtta 240

agattccata aaattggaga acctttatta aataagaata tagtcaatat ggttaaatat 300

gctaaagata gtggtaaagt taataatata gatatgacta ctaatggagc tttattgact 360

aaagatatta gcgaaggatt agtaaatgcg ggtatgacac agataaatat atcaatagaa 420

ggaattaatg cagaacaata taaaaaatat gtgcattatg atattgatat aaataattta 480

attgaaaata taaaatattt atacagcata aaagatagtt tggaaataat tataaaaata 540

ccttctaatt atctttcaga agatgataaa aaaatatttt tagatatgtt ttctccttat 600

tgtgatagaa tattttatcga aaacttaagt tccatttggc caaatttcaa tataatggaa 660

aatcaaata ttataaatat agatgaaaca aaagatcaat ataatatggg attaaaaaat 720

tataaagttt gtacttggcc attttatgct atatgtataa attctaattg tactgtaagt 780

ccatgtgctt tagattggca ggaaaaatta actggttgag atgtaaaaaa agaaagttta 840

aaaaaaatat ggaattcaga taaattaaac gaacttagaa taagattctt aaaaaagaa 900

gtagaaaata tagatgtatg ttctacttgt ggtaatttaa aatattgtca agtagataat 960

atagatgatt atgctgaaga aattttaaaa aggatttta 999

<210> 3

<211> 1008

<212> DNA

<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 3

atgaaagcta aaataaaacc tagaatagat ttagaaaaca gaactaaatt agaaacggta 60

atcccattag aaacaccttt tattatattt atagatccat ctgataaatg taatttcaaa 120

tgtaagtttt gtccaacagg aatattgaa cttatgcaaa atacatctgg cagaaatttt 180

ggttctatgg attttaattt atataaaaaa attatagatg atttacagca atttgaagga 240

aaggtttaagg ttataagact ttataaagat ggagaaccac tacttaataa gcattttgct 300

## [0003]

gaaatggtag agtatgcaaa aaaatctgat aaagtaaata gggtagatac tactactaat	360
gcttcgcttt taaacaaaga tttatcatta caaattataa atgctggact ggatagaata	420
aatatcttcta tagaaggat gaattctcaa caatatcttg atttttcaaa agctaagtgt	480
aactttgaaa aactagtgga aaatataact tttttctatg agaataggaa acaatgtgaa	540
atgattgtaa aaattaatgg agacataata tctgaagaac aaaagcagga attttataat	600
atatttggtg aaattgctga tggagtaaat atagaaagtg taatgtcttg ctggcctgaa	660
tttgaacttg atggaataag tgtaaactg gaaagaggta tttatggaca agaaataaag	720
gaagtaatgg tttgtcctta tgtatcttat tctatgtcaa taaactctac aggtattgcc	780
agtgcttggt atttagactg ggaaagaaag cttattatag gtgatgtcaa taaagaatca	840
gtaaaaaacta tatggaatag caatgaaatg aataatttaa gaaaattatt cttaaaaaaa	900
gaacgtaa atcccactat atgcaaaaat tgcggacagc ttactcatgg tatgcctgat	960
aatattgatg attatgctga tgaattatta aataaaaataa gtatatta	1008
<210> 4	
<211> 1263	
<212> DNA	
<213> 猪痢疾短螺旋体	
<400> 4	
atgaataaaa taaaaatatt gcatattact ccgcatcttg gtggaggagt tggtagagta	60
ttattagatt ggtttaaata cgaaaaaat gataaatatt ttcaacattc tgttatatgt	120
ttggattatg ctaatgaaaa atcaaaaaaa atactaaaag aattagaact tcaattaaaa	180
gataaatatg atcaaaatga gcatgaaatt ttaaatagata taaaaaaatc agatattgta	240
ttaatgcatt tttggaatca tctcttctt tatcatttca ttattaaaaa tgaattacct	300
gaatgcagat taatcttctg gtcacatatt tcaggtataa atccgcctaa tgtatttaca	360
aataaaatat taaattatcc tgataaatc atatttaca ctccaatgag ctttaaaact	420
aaagaaatta tagaatatag caataaaaat tcaattatat caatatggtc aacatcaaat	480
ttaactaaat atttaaattt aaaaaaagaa aataatcact tttttaatgt tttatatata	540
ggtagctgtg ataatgctaa aatgtataat aattttgtag aattatgtaa taagattaat	600
atagataata ttaagtttat agttgtaggc ggtcctaate atttgaaatt agaagaatat	660
actaagaaat tagggatata taataagttt atttttactg gtaaagtaga agatataatt	720
ccatatttaa aaattagtaa tgtatttggg taccctttaa caagtggatc ttttggatcc	780
tgtgaccaat ctatacaaga agctatgact gctggtttag tacctgttgt ttttgacaat	840

[0004]

gaaatggaaa aatctatgat taataatgac tgcgggtttta tatgtaagaa tgaagatgaa	900
tatgttcagt ctatagaaaa attacgtaac gataaaaatt tattaanaacg aatgcaagaa	960
aattcaaaaa actatgctat aaaagagttt tctatagaaa gaatgtcaaa agattggaat	1020
aaagtattta atgaaattat gattatacaa aaaacttata aaaaatggaa tatagataat	1080
actaatataa aaactataga tatatTTTTT gaaagtttag gtgaatacaa aaaaatattt	1140
gatcttcctt ttgaaaagtt aaagaaagaa ttgtcaaac caaactggac ttcaaattct	1200
aagggtagcc atctgcaata taaatctttt cttgatgatg gaagtttggg caaatttata	1260
ttt	1263

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 858

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 猪痢疾短螺旋体

&lt;400&gt; 5

atgaaaaaag taatagtaac tggaataaat ggacttatag gtcaatatat atctaaacct	60
ttagaagaat taggttttga agtttttggc ataggaacta aatccataaa aaaaagtaat	120
tattgttcta tggatttaa tgatcatata aaattagaaa atatttttaa agaaataaaa	180
cctgaatatt taatacattt agcttgggac actaaaaaag gctatttaga atctgaagct	240
aattttgatt tatttatattc atctataaaa atgcttaaat attttaaaga aaatggcgga	300
aaaaaaaactg tattttgtagg tacttgTTTT gaatataaat ttaaagatac accattaaaa	360
gaaaatgatg accttaatcc tacaacaata tatgctaaaa ctaaaaatta ttttaagggaa	420
atgtctgaat tatactctat taaaaataat atagatTTTT gttggggtag agttttctat	480
acttatggag ataatgaaaa tccaaataga cttttcccgC atattattaa ttctctaaaa	540
gaagataaaa aagtttctat aaattattca caattaaaa aagattatat atttgctggt	600
gatatagcaa aaagtatagc ttttaattatt gattcaaag ttaatggtat tatcaattta	660
tgtacatcaa atacaattag tttggaagaa atagctttaa ccattgctaa aaaatttaat	720
aaaattaact tattagaatt aaaaaatta aacactgaag aacctaaaat tattgtaggg	780
gataattccc gcttagttaa tgaaataggc tttaaaaatt ttactacagt aggtgaatgg	840
gtaaacaaat atttaaat	858

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 564

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 猪痢疾短螺旋体

[0005]

<400> 6  
gtgggaaaaa taaatctgaa ggaaattaat attatgacta tagaaaaaac aaatatagaa 60  
ggtgcatata taatacaaaa taattatata gaagatgaaa gaggatattt cttaagactt 120  
ttttgtaatg atgaacttaa aaaatcaggt attgattttg aagtaaaaca gtcaaatatg 180  
agttatagtg ctaaaaaagg aacattaaga gggatgcatt atcagattgc tccttatgca 240  
gaaataaaaag ttgtaagatg tataaagggg aaagtttttg atgcaatagc tgatataaga 300  
aaagattcgc ctacttttgg tcagcatttt actgtagaat taagcgaaga gaatggaaaa 360  
atgatttata tacctcetta tgtggctcat ggaatagaaa ctcttgaaga tcatagtatg 420  
atatgttatt ttgttgagc ttcttttgta ccaaatgctt atggatattt gagatggaat 480  
gatccttttt ttaatattga ttggcctata aaagataatc taattatgag tgaaaaggat 540  
aaaagtatac cagattttga atat 564

<210> 7  
<211> 406  
<212> PRT  
<213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 7

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

[0006]

Phe Asn Glu Phe Ile Asn Asn Leu Ala Phe Leu Tyr Lys Asn Lys Lys  
 165 170 175  
 Asn Leu Glu Ile Thr Met Lys Ile Pro Gly Asp Tyr Leu Ser Glu Ser  
 180 185 190  
 Glu Lys Glu Glu Phe Leu Asn Ile Phe Ser Pro Tyr Cys Asp Lys Ile  
 195 200 205  
 Phe Ile Glu Tyr Leu Thr Asp Asn Val Trp Pro Asn Phe Ser Val Asn  
 210 215 220  
 Glu Asn Ser Lys Val Ile Asn Leu Leu Gly Lys Ser Gln Tyr Gly Leu  
 225 230 235 240  
 Glu Val Lys Asn Arg Lys Ile Cys Cys Tyr Leu Phe Tyr Val Leu Val  
 245 250 255  
 Leu Asn Ser Asn Gly Thr Ile Ser Ala Cys Cys Ser Asp Trp Gln Glu  
 260 265 270  
 Lys Leu Ile Ile Gly Asp Val Arg Lys Gln Ser Leu Lys Glu Ile Trp  
 275 280 285  
 Asn Ser Asp Lys Met Asn Glu Phe Arg Ile Leu His Leu Lys Gly Lys  
 290 295 300  
 Arg Phe Glu Asn Asp Val Cys Lys Asn Cys Gly Asn Ile Gln Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Gln Ile Asp Asp Ile Asp Asp Tyr Ala Glu Glu Ile Leu Ser Arg Met  
 325 330 335  
 Thr Arg Pro Asp Gln Thr Arg Pro Asp Gln Thr Arg Pro Asp Gln Thr  
 340 345 350  
 Arg Pro Asp Leu Ile Phe Ile Tyr Val Ala Ile Thr Tyr Ile Phe Ile  
 355 360 365  
 Leu Ile Glu Asn Ile Lys Lys Tyr Asn Leu Cys Cys Asn Ile Lys Leu  
 370 375 380  
 Gln His Arg Phe Phe Tyr Phe Ser Ser Thr Ile Ile Arg Ser Glu Gln  
 385 390 395 400  
 Leu Cys Gln Ile Lys Lys  
 405  
 <210> 8  
 <211> 333  
 <212> PRT  
 <213> 猪痢疾短螺旋体  
 <400> 8  
 Met Ala Lys Phe Lys Ser Lys Leu Asn Leu Glu Thr Arg His Lys Leu  
 1 5 10 15

[0007]

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

[0008]

<210> 9  
 <211> 336  
 <212> PRT  
 <213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 9

```

Met Lys Ala Lys Ile Lys Pro Arg Ile Asp Leu Glu Asn Arg Thr Lys
1           5           10           15

Leu Glu Thr Val Ile Pro Leu Glu Thr Pro Phe Ile Ile Phe Ile Asp
          20           25           30

Pro Ser Asp Lys Cys Asn Phe Lys Cys Lys Phe Cys Pro Thr Gly Asn
          35           40           45

Ile Glu Leu Met Gln Asn Thr Ser Gly Arg Asn Phe Gly Ser Met Asp
          50           55           60

Phe Asn Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Asp Asp Leu Gln Gln Phe Glu Gly
65           70           75           80

Lys Val Lys Val Ile Arg Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Pro Leu Leu Asn
          85           90           95

Lys His Phe Ala Glu Met Val Glu Tyr Ala Lys Lys Ser Asp Lys Val
          100          105          110

Asn Arg Val Asp Thr Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Asn Lys Asp Leu
          115          120          125

Ser Leu Gln Ile Ile Asn Ala Gly Leu Asp Arg Ile Asn Ile Ser Ile
          130          135          140

Glu Gly Met Asn Ser Gln Gln Tyr Leu Asp Phe Ser Lys Ala Asn Val
145           150           155           160

Asn Phe Glu Lys Leu Val Glu Asn Ile Thr Phe Phe Tyr Glu Asn Arg
          165          170          175

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

Glu Gln Lys Gln Glu Phe Tyr Asn Ile Phe Gly Glu Ile Ala Asp Gly
          195          200          205

Val Asn Ile Glu Ser Val Met Ser Cys Trp Pro Glu Phe Glu Leu Asp
          210          215          220

Gly Ile Ser Val Asn Met Glu Arg Gly Ile Tyr Gly Gln Glu Ile Lys
225           230           235           240

Glu Val Met Val Cys Pro Tyr Val Phe Tyr Ser Met Ser Ile Asn Ser
          245          250          255

Thr Gly Ile Ala Ser Ala Cys Tyr Leu Asp Trp Glu Arg Lys Leu Ile
          260          265          270

```

[0009]

Ile Gly Asp Val Asn Lys Glu Ser Val Lys Thr Ile Trp Asn Ser Asn  
 275 280 285  
 Glu Met Asn Asn Leu Arg Lys Leu Phe Leu Lys Lys Glu Arg Lys Ser  
 290 295 300  
 His Pro Ile Cys Lys Asn Cys Gly Gln Leu Thr His Gly Met Pro Asp  
 305 310 315 320  
 Asn Ile Asp Asp Tyr Ala Asp Glu Leu Leu Asn Lys Ile Ser Ile Leu  
 325 330 335  
  
 <210> 10  
 <211> 421  
 <212> PRT  
 <213> 猪痢疾短螺旋体  
  
 <400> 10  
 Met Asn Lys Ile Lys Ile Leu His Ile Thr Pro His Leu Gly Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gly Thr Val Leu Leu Asp Trp Phe Lys Tyr Glu Lys Asn Asp Lys  
 20 25 30  
 Tyr Phe Gln His Ser Val Ile Cys Leu Asp Tyr Ala Asn Glu Lys Ser  
 35 40 45  
 Lys Lys Ile Leu Lys Glu Leu Glu Leu Gln Leu Lys Asp Asn Met Tyr  
 50 55 60  
 Gln Asn Glu His Glu Ile Leu Asn Asp Ile Lys Lys Ser Asp Ile Val  
 65 70 75 80  
 Leu Met His Phe Trp Asn His Pro Leu Leu Tyr His Phe Ile Ile Lys  
 85 90 95  
 Asn Glu Leu Pro Glu Cys Arg Leu Ile Leu Trp Ser His Ile Ser Gly  
 100 105 110  
 Ile Asn Pro Pro Asn Val Phe Thr Asn Lys Ile Leu Asn Tyr Pro Asp  
 115 120 125  
 Lys Phe Ile Phe Thr Thr Pro Met Ser Phe Lys Thr Lys Glu Ile Ile  
 130 135 140  
 Glu Tyr Ser Asn Lys Asn Ser Ile Ile Ser Ile Trp Ser Thr Ser Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Lys Tyr Leu Asn Leu Lys Lys Glu Asn Asn His Phe Phe Asn  
 165 170 175  
 Val Leu Tyr Ile Gly Thr Val Asp Asn Ala Lys Met Tyr Asn Asn Phe  
 180 185 190  
 Val Glu Leu Cys Asn Lys Ile Asn Ile Asp Asn Ile Lys Phe Ile Val  
 195 200 205

[0010]

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

<210> 11  
 <211> 286  
 <212> PRT  
 <213> 猪痢疾短螺旋体

<400> 11

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

[0011]

His Ile Lys Leu Glu Asn Ile Phe Lys Glu Ile Lys Pro Glu Tyr Leu  
 50 55 60  
 Ile His Leu Ala Trp Asp Thr Lys Lys Gly Tyr Leu Glu Ser Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Asn Phe Asp Leu Leu Tyr Ser Ser Ile Lys Met Leu Lys Tyr Phe Lys  
 85 90 95  
 Glu Asn Gly Gly Lys Lys Thr Val Phe Val Gly Thr Cys Phe Glu Tyr  
 100 105 110  
 Lys Phe Lys Asp Thr Pro Leu Lys Glu Asn Asp Asp Leu Asn Pro Thr  
 115 120 125  
 Thr Ile Tyr Ala Lys Thr Lys Asn Tyr Leu Arg Glu Met Ser Glu Leu  
 130 135 140  
 Tyr Ser Ile Lys Asn Asn Ile Asp Phe Cys Trp Gly Arg Val Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Thr Tyr Gly Asp Asn Glu Asn Pro Asn Arg Leu Phe Pro His Ile Ile  
 165 170 175  
 Asn Ser Leu Lys Glu Asp Lys Lys Val Ser Ile Asn Tyr Ser Gln Leu  
 180 185 190  
 Lys Lys Asp Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Ile Ala Lys Ser Ile Ala Leu  
 195 200 205  
 Ile Ile Asp Ser Asn Val Asn Gly Ile Ile Asn Leu Cys Thr Ser Asn  
 210 215 220  
 Thr Ile Ser Leu Glu Glu Ile Ala Leu Thr Ile Ala Lys Lys Phe Asn  
 225 230 235 240  
 Lys Ile Asn Leu Leu Glu Leu Lys Lys Leu Asn Thr Glu Glu Pro Lys  
 245 250 255  
 Ile Ile Val Gly Asp Asn Ser Arg Leu Val Asn Glu Ile Gly Phe Lys  
 260 265 270  
 Asn Phe Thr Thr Val Gly Glu Trp Val Asn Lys Tyr Leu Asn  
 275 280 285  
 <210> 12  
 <211> 188  
 <212> PRT  
 <213> 猪痢疾短螺旋体  
 <400> 12  
 Val Gly Lys Ile Asn Leu Lys Glu Ile Asn Ile Met Thr Ile Glu Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Asn Ile Glu Gly Ala Tyr Ile Ile Gln Asn Asn Tyr Ile Glu Asp  
 20 25 30

[0012]

Glu	Arg	Gly	Tyr	Phe	Leu	Arg	Leu	Phe	Cys	Asn	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Asp	Phe	Glu	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Met	Ser	Tyr	Ser	Ala
	50					55					60				
Lys	Lys	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Met	His	Tyr	Gln	Ile	Ala	Pro	Tyr	Ala
65					70					75					80
Glu	Ile	Lys	Val	Val	Arg	Cys	Ile	Lys	Gly	Lys	Val	Phe	Asp	Ala	Ile
				85					90					95	
Ala	Asp	Ile	Arg	Lys	Asp	Ser	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	His	Phe	Thr	Val
			100					105					110		
Glu	Leu	Ser	Glu	Glu	Asn	Gly	Lys	Met	Ile	Tyr	Ile	Pro	Pro	Tyr	Val
		115					120					125			
Ala	His	Gly	Ile	Glu	Thr	Leu	Glu	Asp	His	Ser	Met	Ile	Cys	Tyr	Phe
	130					135					140				
Val	Gly	Ala	Ser	Phe	Val	Pro	Asn	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Arg	Trp	Asn
145					150					155					160
Asp	Pro	Phe	Phe	Asn	Ile	Asp	Trp	Pro	Ile	Lys	Asp	Asn	Leu	Ile	Met
				165					170					175	
Ser	Glu	Lys	Asp	Lys	Ser	Ile	Pro	Asp	Phe	Glu	Tyr				
			180					185							

ORF	引物组	引物名称	序列(5'-3')	结合位点 (核苷酸 位置)	SEQ ID NO
	1	ORF1-F16	ACTGGAGTTGCTGGATTATAGGATC	16-41	13
		ORF1-R575	AAGTEAGGTCTCTGTCTCTTTCC	553-575	14
ORF 1	2	ORF1-F65	CAAATAAAGATCATACTGTATAGGAATAG	65-94	15
		ORF1-R661	ATGTATAGTCACGCATAGTGG	641-661	16
		ORF1-F240	TGTAATACATTTAGCAGGATATGG	240-263	17
	3	ORF1-R623	GGTATAGGATTATTTCAAGTATCAG	598-623	18
		ORF2-F60	GTTTCATACCATTAGAAAAAGAAGAG	60-65	19
		ORF2-R760	GTTTCATACCATTAGAAAAAGAAGAG	742-760	20
ORF 2	2	ORF2-F120	AGAACAAAACAACATAAAGCATC	120-142	21
		ORF2-R325	CATCAGTAAAACAATATAATCCC	302-325	22
		ORF2-F664	CCTGAGCATTTATGGACTTTC	664-683	23
	3	ORF2-R903	TGTACTGTCTGATTTTTTATGGTC	880-903	24
		ORF6-F225	AAATGTAGAAGATATGTATTGCC	225-248	25
		ORF6-R641	ACCTCTCCTATATGTTTTTATACTTAG	614-641	26
ORF 6	2	ORF6-F412	ATTACTACAAAATGTAATCTAATAAATGTAAG	412-441	27
		ORF6-R957	CCATACTATATGACAAAATAAATCTAG	929-957	28
		ORF6-F611	TATCTAAGTATAAAAAACATATAGGAGAGG	611-640	29
	3	ORF6-R1108	CAGCACAAAACACATAGTG	1088-1108	30
		ORF7-F98	AAATACTTGTCAATAATCTTAGTGG	98-122	31
		ORF7-R1916	TTTCATCATAAGCAAAAATAATATC	1891-1916	32
ORF 7	2	ORF7-F310	GTAAGTGGAAAAAGAATGAAACATAC	310-335	33
		ORF7-F1341	AGATTGTCTTGACGAATAAAAAG	1320-1341	34
		ORF7-F961	AATAAATATGACATTAAAGGAATAAAAAATC	961-990	35
	3	ORF7-R1765	CTATGTAGTAGCAAAAATAAATAAATATC	1736-1765	36
		ORF8-F14	TAAATGAAGTATATAAATAAATAAATAAAG	14-43	37
		ORF8-R179	AATAAACATGAAGAATGGTGTC	158-179	38
ORF 8	2	ORF8-F86	ATAAACCAAAATGATTTTAACTATACC	86-113	39
		ORF8-R163	GGTGTCTTAATGCTAATTTATATTCTAG	136-163	40
		ORF8-F145	AAATTAGCATTAAGACCCATTTC	145-167	41
	3	ORF8-R250	CAAGTTTATTTAGTTTTCTTTTCTGAC	224-250	42
		ORF9-F47	ATTTAGAAGATGTAATACCTTTAGAGG	47-73	43
		ORF9-R295	TCATTTTCGCATATTTTATTTTAC	271-295	44
ORF 9	2	ORF9-F247	TTATACAAAATAGGAGAGCCTTTAG	247-271	45
		ORF9-R609	ATCGCAATAATCTGAAAATG	590-609	46
		ORF9-F730	GTATGTACTTATCTTTTTTATTCTATTGTC	730-759	47
	3	ORF9-R923	CATATTGGATTTTTATCTCTATGTC	899-923	48
		ORF10-F20	ATTGGATAGAACATAGAGGGAG	20-41	49
		ORF10-R320	ACTGTATCATTGCTATTTTATTAG	296-320	50
ORF 10	2	ORF10-F381	TATAAAAACATAAGAATATCTCTACAAGG	381-410	51
		ORF10-R747	AACATATAAGGTATAAATGGTTGAG	722-747	52
		ORF10-F721	CCTCAACCATTTTATACCTTATATG	721-745	53
	3	ORF10-R904	TAACATATTTTCTCGTTTTCTTTCCTTG	880-904	54

图 1

质粒 ORF	假定的功能	E-值
ORF 1	核苷二磷酸糖差向异构酶	3.00E-58
ORF 2	糖基转移酶	4.00E-49
ORF 3	鼠李聚糖 (Rhamnan) 合成蛋白质 F (RpgF)	8.00E-24
ORF 4	鼠李聚糖合成蛋白质 F (RpgF)	4.00E-41
ORF 5	鼠李聚糖合成蛋白质 F (RpgF)	4.00E-14
ORF 6	自由基 SAM 结构域蛋白质 (Radical SAM domain protein)	4.00E-14
ORF 7	水解酶	2.00E-90
ORF 8	未知	na
ORF 9	Fe-S 氧化还原酶	1.00E-78
ORF 10	Fe-S 氧化还原酶	8.00E-31
ORF 11	Fe-S 氧化还原酶	6.00E-74
ORF 12	Fe-S 氧化还原酶	9.00E-80
ORF 13	Fe-S 氧化还原酶 dTDP-4-	1.00E-104
ORF 14	糖基转移酶 (RfaG)	6.00E-37
ORF 15	依赖于 NAD 的差向异构酶 / 脱水酶	6.00E-39
ORF 16	dTDP-4-脱氢鼠李糖 3,5-差向异构酶	9.00E-50
ORF 17	Fe-S 氧化还原酶	1.00E-128
ORF 18	葡萄糖-1-磷酸胞苷酰转移酶	5.00E-90
ORF 19	未知	na
ORF 20	涉及染色体分配的 ATP 酶	4.00E-25
ORF 21	未知	na
ORF 22	假定的复制型 DNA 解旋酶	4.00E-12
ORF 23	引发酶	5.00E-23
ORF 24	位点特异重组酶	8.00E-27
ORF 25	糖基转移酶	2.00E-09
ORF 26	鼠李聚糖合成蛋白质 F (RpgF)	2.00E-20
ORF 27	dTDP-葡萄糖 4,6-脱水酶	1.00E-128
ORF 28	葡萄糖-1-磷酸胸苷酰转移酶	1.00E-112
ORF 29	dTDP-4-脱氢鼠李糖还原酶 (RfbD)	5.00E-78
ORF 30	dTDP-4-脱氢鼠李糖 3,5-差向异构酶 (RfbC)	6.00E-62
ORF 31	$\beta$ -1,4-N-乙酰半乳糖胺基转移酶	4.00E-05
ORF 32	糖基转移酶	9.00E-55

图 2

ORF	引物组	引物名称	序列(5'-3')	结合位点1-21 (核苷酸 位置)	SEQ ID NO
ORF 11	1	ORF11-F47	ATAGAACACCTTTACAAGAAATAATACCTC	47-76	55
		ORF11-R408	CAATCCAGCATCTACCAAC	390-408	56
	2	ORF11-F412	AAGATCAACATTTCAATAGAAGGTATC	412-438	57
		ORF11-R800	CAGCAAGCACTTATAGTTCATTAG	776-800	58
	3	ORF11-F960	TCAAATAGATGATATAGATGATTACG	960-985	59
		ORF11-R1185	AATAGTAGAACTAAAATAAAAAACCTATG	1156-1185	60
ORF 12	1	ORF12-F31	GAAACTAGGCATAAATTAGAAGAAG	31-55	61
		ORF12-R977	TCAGCATAATCATCTATATTATCTACTTG	949-977	62
	2	ORF12-F284	TCAATATGGTTAAATATGCTAAAGATAGTG	284-313	63
		ORF12-R395	ATACCCGCATTTACTAATCCTTC	373-395	64
	3	ORF12-F377	GATTAGTAAATGCGGGTATGAC	377-398	65
		ORF12-R791	AAAGCACATGGACTTACAGTAC	770-791	66
ORF 13	1	ORF13-F50	TAGAAACGGTAATCCCATTAG	50-70	67
		ORF13-R372	TAAAAGCGAAGCATTAGTAGTAG	350-372	68
	2	ORF13-F327	TGATAAAGTAAATAGGGTAGATACTACTAC	327-356	69
		ORF13-R747	AAATACATAAGGACAAACCATTAC	724-747	70
	3	ORF13-F294	TTTGTCTGAAATGGTAGAGTATG	294-316	71
		ORF13-R852	TATAGTTTTTACTGATTCTTTATTGACATC	823-852	72
ORF 14	1	ORF14-F38	TTGGTGGAGGAGTTGGTAC	38-56	73
		ORF14-R275	TGATAAAGAAGAGGATGATTCC	254-275	74
	2	ORF14-F331	TCAGGTATAAATCCGCCTAATG	331-352	75
		ORF14-R826	CAGGTACTAAACCAGCAGTCATAG	803-826	76
	3	ORF14-F874	GGTTTTATATGTAAGAATGAAGATG	874-898	77
		ORF14-R1203	CITAGAATTTGAAGTCCAGTTTG	1181-1203	78
ORF 15	1	ORF15-F79	GAAGTTTTTGGCATAGGAAC	79-98	79
		ORF15-R368	TCATTTTCTTTTAATGGTGTATC	346-368	80
	2	ORF15-F216	AAAAGGCTATTTAGAATCTGAAG	216-238	81
		ORF15-R496	CATTATCTCCATAAGTATAGAAACTCTAC	467-496	82
	3	ORF15-F597	TGGTGATATAGCAAAAAGTATAGC	597-620	83
		ORF15-R780	CCCTACAATAATTTTAGGTTCTTCAG	755-780	84
ORF 16	1	ORF16-F1	GTGGGAAAAATAAATCTGAAG	Jan-21	85
		ORF16-R345	GCTTAATCTACAGTAAAATGCTG	322-345	86
	2	ORF16-F129	GTAATGATGAACTTAAAAATCAGGTATTG	125-154	87
		ORF16-R395	ATTCCATGAGCCACATAAGGAG	374-395	88
	3	ORF16-F166	AAACAGTCAAATATGAGTTATAGTGC	166-191	89
		ORF16-R557	AAATCTGGTATACTTTTATCCTTTTTC	532-557	90

图 3

ORF	具有质粒的强毒株							具有质粒的无毒株						缺乏质粒的无毒株	
	WA1	B204	Vic2	BW1	NSW5	Q17	NSW15	B78 <sup>f</sup>	SA2206	VS1	B234	R301	B6933	EM 88.90	A1
ORF 1*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 2*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 6*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 7*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 8*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 9*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 10*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 11	P	P	P	P	P	P	△	△	△	△	△	△	△	△	△
ORF 12	P	P	P	P	P	P	△	△	△	△	△	△	△	△	△
ORF 13	P	P	P	P	P	P	△	△	△	△	△	△	△	△	△
ORF 14	P	P	P	P	P	P	△	△	△	△	△	△	△	△	△
ORF 15	P	P	P	P	P	P	△	△	△	△	△	△	△	△	△
ORF 16	P	P	P	P	P	P	△	△	△	△	△	△	△	△	△
ORF 17	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 18	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 19	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 20	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 21	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 22	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 23	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 24	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 25	P	P	P	△	△	△	P	P	P	P	△	P	△	△	△
ORF 26	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 27	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 28	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 29	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 30	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 31	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△
ORF 32	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	△	△

图 4

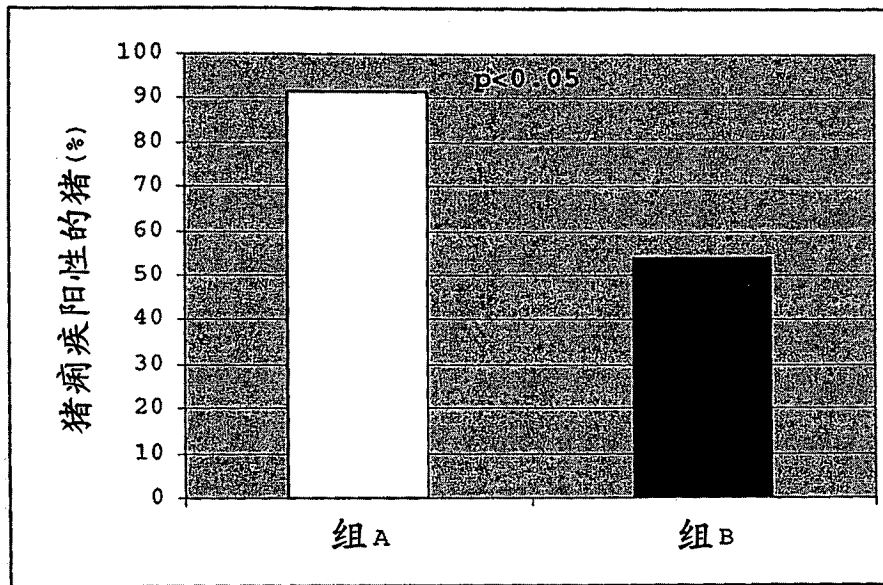


图 5

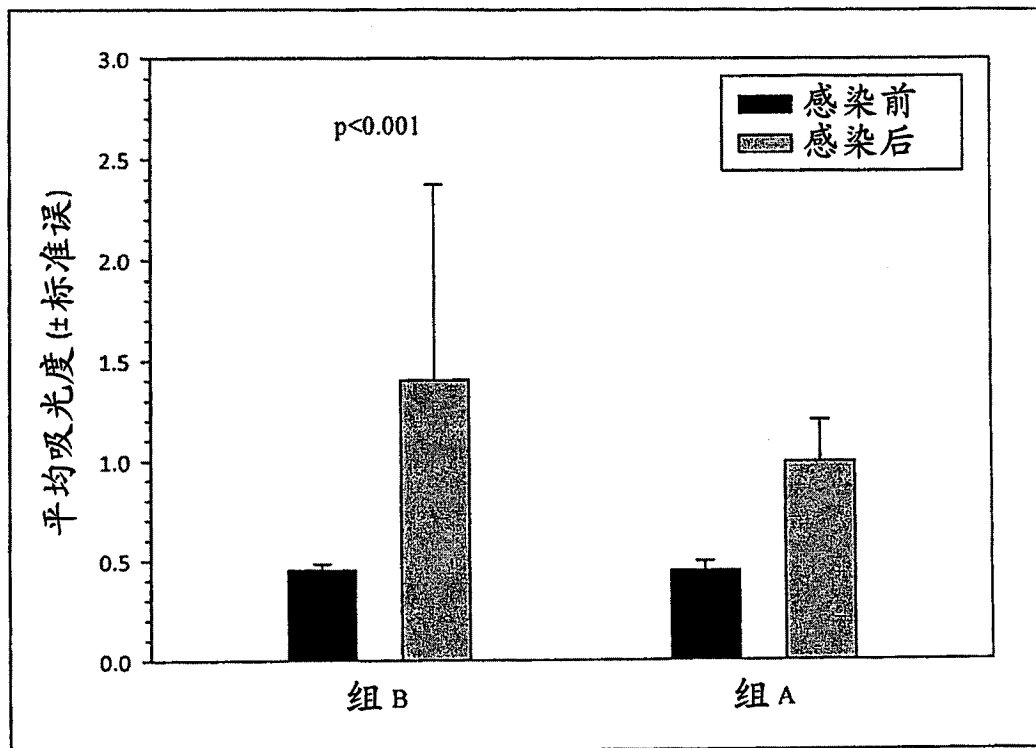


图 6

专利名称(译)	猪痢疾短螺旋体的疫苗株		
公开(公告)号	<a href="#">CN102281893A</a>	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	CN200980154492.7	申请日	2009-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
[标]发明人	DJ汉普森 T拉 MI贝尔伽德 ND菲利普斯		
发明人	D·J·汉普森 T·拉 M·I·贝尔伽德 N·D·菲利普斯		
IPC分类号	A61K39/02 C12Q1/25 G01N33/48 A61P1/00 G01N33/53 C12Q1/04 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K2039/522 G01N2333/20 A61K39/0225 G01N33/56911 G01N2500/10 C12Q1/689 A61P1/00 A61P1/12 A61P31/04 A61P37/00 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q1/25		
代理人(译)	凌立		
优先权	2008905922 2008-11-14 AU 61/115509 2008-11-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明广泛涉及猪痢疾短螺旋体的疫苗株。具体而言，本发明涉及猪痢疾短螺旋体的分离活疫苗株，其缺乏一个或多个毒力因子。本发明还涉及鉴定和制备疫苗株的方法，以及针对腹泻疾病的疫苗组合物和用于诊断腹泻疾病的方法和试剂盒。

