



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102933597 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201180009999. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 02. 16

C07K 14/435(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

1000660 2010. 02. 17 FR

A61K 39/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 黎舒婷

2012. 08. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2011/050645 2011. 02. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/101790 FR 2011. 08. 25

(73) 专利权人 国家食品安全环境及劳工局

地址 法国迈松阿尔福

(72) 发明人 亚历山大·佐切维奇

巴尔迪塞拉·乔瓦尼

桑德兰·A·拉库尔 波利娜·马切

伊莎贝尔·瓦莱 帕斯卡尔·布瓦罗

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 菅兴成

权利要求书1页 说明书9页

序列表3页 附图7页

(54) 发明名称

毛线虫属的抗原性多肽及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抗毛线虫属抗体识别的新型多肽。特别地,所述多肽可用于检测抗毛线虫属抗体和预防毛线虫病。

1. 抗毛线虫属 (Trichinella) 抗体识别的抗原性多肽在制备用于检测生物样品中抗毛线虫属抗体的试剂的用途,其特征在于,所述多肽是序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,使用由序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽和序列如 SEQ ID NO:4 的 21-67 位氨基酸所示的多肽组成的混合物。

3. 抗毛线虫属抗体识别的抗原性多肽,其特征在于,所述抗原性多肽由嵌合多肽组成,所述嵌合多肽包含:

- 一个或多个拷贝的序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽,任选地,所述多肽与一种或多种异源多肽融合,或

- 一个或多个拷贝的序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽以及一个或多个拷贝的序列如 SEQ ID NO:4 的 21-67 位氨基酸所示的多肽,任选地,所述多肽与一种或多种异源多肽融合。

4. 多核苷酸,其编码权利要求 3 所述的抗原性多肽。

5. 重组载体,其包含一种或多种权利要求 4 所述的多核苷酸。

6. 宿主细胞,其由权利要求 5 所述的重组载体转化。

7. 用于检测生物样品中是否存在抗毛线虫属抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽或序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽以及序列如 SEQ ID NO:4 的 21-67 位氨基酸所示的多肽,以及适合配制允许形成抗原 / 抗体复合物的反应介质的缓冲剂和试剂。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒,其特征在于,所述多肽固定在固体支持物上。

9. 免疫原性组合物,其包含序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽或序列如 SEQ ID NO:2 所示的多肽以及序列如 SEQ ID NO:4 的 21-67 位氨基酸所示的多肽,或编码所述多肽的一种或多种多核苷酸,所述多肽或所述多核苷酸与用于增强免疫反应的一种或多种佐剂组合。

10. 如权利要求 9 所述的免疫原性组合物,其特征在于,所述免疫原性组合物为疫苗。

毛线虫属的抗原性多肽及其用途

[0001] 本发明涉及在毛线虫属 (*Trichinella*) 寄生虫中鉴定的新型抗原在毛线虫病 (*Trichinosis*) 的诊断和预防中的用途。

[0002] 毛线虫病是与食用感染有毛线虫属寄生虫的肉类相关的人畜共患病 (*zoonosis*) (MURRELL et al., *Vet Parasitol*, 93, 293-307, 2000)。

[0003] 这种线虫属于有腺纲 (*Adenophorea*), 毛线虫科。毛线虫科包括具有亲缘关系的八个种和三个基因型, 并在系统发育上被分为不同的两组: 一组为感染哺乳动物的有包囊毛线虫 (旋毛形线虫 (*T. spiralis*), 北方毛形线虫 (*T. nativa*), 布氏毛形线虫 (*T. britovi*), 米氏毛形线虫 (*T. murrelli*), 南方毛形线虫 (*T. nelsoni*)); 另一组为感染哺乳动物、鸟类以及爬行动物的没有包囊的毛线虫 (伪毛形线虫 (*T. pseudospirali*), 巴布亚毛形线虫 (*T. papuae*), 津巴布韦毛形线虫 (*T. zimbabwensis*)) (GASSER et al., *Electrophoresis*, 25, 3357-64, 2004)。这些种类全部可以感染人体。

[0004] 这种寄生虫的生物周期属于自异宿主型, 即整个生物周期都发生于同一宿主体内, 此宿主既为中间宿主, 又是终宿主 (BOIREAU et al., *Revue française des laboratoires*, 71-89, 2002)。为了开始新一轮的周期, 侵染性幼虫需要从一个宿主传递到另外一个宿主。这种传递是通过摄取被寄生虫幼虫污染的生肉或几乎不经烹调的肉而实现的。消化过程中, 所述幼虫被释放出来, 穿透肠道上皮, 并在此转变为有生殖能力的成虫 (Ad)。接下来, 受精的雌虫排出新生的 L1 幼虫 (NBL)。这些 NBL 幼虫通过淋巴循环和血流到达横纹肌, 并穿透肌肉细胞 (感染发展阶段 LIM:L1 肌肉幼虫), 引起肌肉细胞的去分化, 形成被保护性胶原蛋白被膜包围的滋养细胞, 其中, 在有包囊的毛线虫情况下形成的被膜较厚, 而无包囊的毛线虫的被膜很薄。

[0005] 虽然毛线虫病在动物中是没有临床症状的, 但是在人体感染中, 肠道寄生阶段的表现伴有恶心的腹泻、呕吐和剧烈的腹痛, 而肌肉侵入阶段相关症状为发热、面部浮肿及肌痛的综合症状 (CAPO & DESPOMMIER, *Clin Microbiol Rev*, 9, 47-54, 1996)。眼、肺、胃肠、心脏以及神经的发病可以产生更多的临床表现, 其发展是可以致命的。以病人持久的肌肉疼痛为标志的慢性感染特性与寄生虫在滋养细胞中存活有关。

[0006] 如果对于感染的诊断及时, 从而得以针对所有寄生环节采取措施, 特别是在 LIM 幼虫周围形成胶原蛋白保护被膜之前, 这样使用抗蠕虫药专门治疗人毛线虫病会更加有效 (FOURESTIE et al., *Parasitol Res*, 75, 36-41, 1988)。

[0007] 流行病学数据表明了该寄生虫在世界各地的地理分布, 并与其传播方式相关, 所述传播方式涉及到了许多野生动物群物种, 所述野生动物群物种还保留了以猪为主要代表的家畜感染周期 (DUPOUY-CAMET, *Vet Parasitol*, 93, 191-200, 2000)。

[0008] 由于对饮食习惯及卫生控制的不力, 人毛线虫病, 这种新兴或再度出现的人畜共患病, 其流行构成了全世界严峻的公共卫生问题 (MURRELL & POZIO, *Int J Parasitol*, 30, 1339-49, 2000)。这些流行主要关系到猪肉、野猪肉及马肉 (BOIREAU et al., *Vet Parasitol*, 93, 309-20, 2000)。

[0009] 因此, 预防人类感染就涉及到把肉完全煮熟和改善动物饲养条件和 / 或改进用于

控制动物（猪、马、野猪和其它对毛线虫属敏感的野生动物）毛线虫病的条件（BOIREAU et al., *Revue française des laboratoires*, 71-89, 2002）。

[0010] 毛线虫病的筛选技术可分为两大类：1) 人工消化肌肉样本后直接检测 L1M 幼虫，和 2) 用各种免疫学方法间接检测针对毛线虫属抗原的抗体。

[0011] 该寄生虫的每个发育阶段，即成虫 (Ab)、L1 幼虫 (NBL)、及 L1 肌肉幼虫 (L1M)，都有与之相对应的特定抗原谱。

[0012] 现阶段用于免疫诊断的抗原制品源自 L1M 阶段幼虫。这是由于两个早期阶段 Ad 和 NBL 的抗原性级分难于纯化，并且直到近期，才鉴定了和这两个阶段中一者和 / 或另一者相关联的免疫显性抗原 (LIU et al., 1-13, 2007)。

[0013] 不论是通过裂解幼虫、离心裂解物和回收上清得到的总可溶性抗原制品，还是更普遍的排泄 / 分泌抗原 (E/S 抗原)，都被广泛使用。

[0014] 当 L1M 幼虫被放置在具备存活条件的培养基中时产生 E/S 抗原；其来自所谓杆状体的特定器官。这个器官由约 50 个圆盘状的杆状细胞组成。这些杆状细胞内含有颗粒，颗粒的内容物通过微管排到寄生虫的食道腔中。该内容物具有极高的抗原性，构成了 E/S 抗原的一部分。这些抗原形成了复杂的蛋白质混合物，其中特别包括一组带有特异碳水化合物分子的糖蛋白（称作 TSL-1 抗原），其中，该碳水化合物为 β -泰威糖 (beta-tyvelose)，据知只存在于毛线虫属中，并且存在于该类寄生虫的所有种中。

[0015] 现阶段用作毛线虫病免疫诊断参考的 E/S 抗原制品得自于旋毛形线虫 L1M 幼虫的培养基。培养 18 至 20 小时后，通过过滤回收培养基，而后将其浓缩 (GAMBLE et al., *Vet Parasitol*, 13, 349-61, 1983; GAMBLE et al., *Vet Parasitol*, 30, 131-7, 1988)。

[0016] 总可溶性抗原制品的主要缺点是其缺少特异性，普遍呈现与其它寄生虫的抗原交叉反应。使用 E/S 抗原则可获得更好的特异性。然而，在这两种情况下，都难以大量地生产标准化批次的抗原。

[0017] 另一个在毛线虫属血清学诊断中遇到的问题就是对应于早期感染阶段的检测“盲窗期”的存在，其表现为假阴性血清学结果。依初始感染剂量而定，该盲窗期可以持续 3 到 8 周。除此之外，在马的体内，从感染开始后的第 25 周可观察到抗体的逐渐消失。

[0018] 在以往的研究中，本发明团队鉴定了两种在毛线虫属中保守的并且是所述属特异性的免疫显性抗原。在 PCT 申请 WO 2007/090960 中有关于这两种抗原的描述。所述抗原之一称为 NBL1 抗原，在 NBL 阶段特异表达，而另外一种称为 411 抗原，则普遍出现于毛线虫属的几个发育阶段。

[0019] 在以纯化重组蛋白形式生产的这些抗原的基础上，开发出了酶联免疫吸附测定 (ELISA) 类的血清学诊断测定。这些测定允许了抗毛线虫 (anti-Trichinella) 特异抗体非常早期的血清学检测。与使用 E/S 抗原的参考酶联免疫吸附测定 (E/SELISA 测定) 相比，在检测是否存在特异性抗毛线虫抗体时，应用了 NBL1 和 411 抗原的 ELSA 测定比 E/S ELISA 测定分别早了 5 到 45 天和 5 到 20 天。然而，以 NBL1 抗原为靶的体液应答随后有减弱的倾向（平均感染开始 8 周后），并且在检测除北方毛形线虫之外的毛线虫属种类感染时，411 抗原较 E/S ELISA 测定有灵敏度低的缺点。

[0020] 如今，发明人发现了两个新的毛线虫属免疫显性抗原。它们可以被用来开发新型血清学诊断测定，或者用来改进已有测定的性能水平。

[0021] 在下文中,将所述两种抗原中的第一种称为“L20h-Ts3”。编码此抗原的 cDNA 克隆序列及由此而推导出的多肽序列在图 1A 中给出,并分别重现在附带的序列表中,编号为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。多肽 SEQ ID NO:2 与近期鉴定的可能由肌肉入侵阶段的旋毛形线虫幼虫所分泌的蛋白中的 SML-3 蛋白 (GenBank ACJ06741) 具有高度的同一性 (91%)。SML-3 蛋白可能在滋养细胞的形成中发挥作用 (GUILIANO et al., Int J Parasitol, 39, 515-24, 2009), 然而它的抗原性质至今还没有被研究过。

[0022] 第二种抗原在下文中被称作“L20h-Ts1”。编码此抗原的 cDNA 克隆序列及依此推导出的多肽序列在图 1B 中给出,并且还重现在附带的序列表中,编号为 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。多肽 SEQ ID NO:4 与毛线虫属或其它生物体中的任何已知蛋白没有任何同一性。

[0023] 以重组形式产生的多肽 L20h-Ts3 和 L20h-Ts1 使得早期检测针对毛线虫属的体液应答成为了可能。不仅如此,与感染约 8 周后就开始减弱的 NBL1 重组抗原相比,以这些抗原为靶的体液应答在感染后持续更久,所以使用 L20h-Ts3 和 L20h-Ts1 多肽使得有可能扩大体液应答检测的时间窗。

[0024] 因此,本发明的主题是抗毛线虫抗体所识别的抗原性多肽作为用于检测生物样品中抗毛线虫抗体的试剂的用途,其特征在于,所述多肽选自于:

[0025] a) 包含 SEQ ID NO:2 序列的多肽,或者包含与 SEQ ID NO:2 序列具有至少 70% 同一性的序列的多肽,以及依照优先递增的顺序,包含与 SEQ ID NO:2 序列具有至少 75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性的序列的多肽;

[0026] b) 包含 SEQ ID NO:4 序列中 21-67 位氨基酸 (代表了 L20h-Ts1 蛋白的成熟形式) 的多肽,或者包含与 SEQ ID NO:4 序列中 21-67 位氨基酸具有至少 70% 同一性的序列的多肽,以及依照优先递增的顺序,包含与 SEQ ID NO:4 序列中 21-67 位氨基酸具有至少 75%、80%、85%、90% 或 95% 同一性的序列的多肽。

[0027] 有利的是,在实施本发明时,可使用包含以上定义的多肽 a) 和多肽 b) 的混合物,或者包含以上定义的多肽 a) 和 / 或多肽 b) 并组合抗毛线虫属抗体所识别的一种或多种其他抗原性多肽的混合物,例如,衍生自 PCT 申请 WO 2007/090960 中所述的 NBL1 和 411 抗原的一种或多种多肽。

[0028] 更具体地,本发明的主题是用于检测生物样品中是否存在抗毛线虫属抗体的方法,所述方法的特征在于其包括:

[0029] - 在允许以上定义的多肽 a) 和 / 或多肽 b) 与可能存在于所述样品中的抗毛线虫属抗体之间形成抗原 / 抗体复合物的条件下,使所述生物样品与所述多肽 a) 和 / 或所述多肽 b) 接触;和

[0030] - 通过任何适当的手段检测可能形成的抗原 / 抗体复合物。

[0031] 一般来说,所述生物样品为血清样品,其可得自于属于可被毛线虫属感染的物种并且需要检测是否存在此寄生虫的任何个体 (哺乳类、鸟类或者爬行类)。所述样品最好是从哺乳类中获得的,例如从牲畜或者从病人中得到。

[0032] 与每种多肽单独使用相比,这种组合尤其使扩大反应谱及扩大检测体液应答的时间窗成为了可能。

[0033] 因此,上述定义的多肽 b) 本身也是本发明的主题的一部分。

[0034] 本发明特别包括嵌合多肽,其包含一个或者多个拷贝的上述多肽 a) 和 / 或一个或

者多个拷贝的上述多肽 b), 并且, 任选地, 所述多肽 a) 和 / 或所述多肽 b) 与一种或者多种异源多肽融合, 例如源于 PCT 申请 WO 2007/090960 中所述的 NBL1 及 411 抗原的一种或多种多肽。

[0035] 本发明的主题还涉及编码本发明多肽 b) 或者编码本发明嵌合多肽的多聚核苷酸, 以及包含所述多核苷酸的重组载体和由所述载体转化的宿主细胞。

[0036] 本发明的主题还涉及包含上述多肽 a) 和多肽 b) 的组合物, 或者是包含上述多肽 a) 和多肽 b) 并组合可由抗毛线虫属抗体识别的一种或者多种其它抗原性多肽的组合物。例如, 衍生自 PCT 申请 WO 2007/090960 中所述的 NBL1 和 411 抗原的一种或多种多肽。

[0037] 上述定义的多肽 a) 和 b) 可以被应用到已知的各种检测抗体的方法中。举例来说, 特别是, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 类的方法 (直接、间接或夹心法)、珠子微凝集法和电泳转移结合免疫标记法。

[0038] 本发明的主题还涉及用于检测生物样品中是否存在抗毛线虫属抗体的试剂盒, 其特征在于其包含上述定义的多肽 a) 和 / 或多肽 b), 以及, 在适当的情况下, 还包含适用于组成允许抗原 / 抗体复合物形成的反应介质的缓冲剂和试剂, 并且任选地包含检测所述抗原 / 抗体复合物的工具。任选地, 其还可包含可由抗毛线虫属抗体识别的一种或多种其它抗原性多肽。比如, 衍生自 PCT 申请 WO 2007/090960 中所述的 NBL1 和 411 抗原的一种或多种多肽。

[0039] 所述多肽最好被固定在固体支持物上。可使用的固体支持物的非限定性实例有微量滴定板、珠子、微珠或微粒、试纸条 (strip) 等。

[0040] 所述试剂盒也包含参照样品, 比如一种或者多种阴性血清和一种或者多种阳性血清。

[0041] 本发明的主题还涉及上述多肽 b) 在制备所述多肽的特异抗体中的应用。

[0042] 这些多肽可以被运用到已知的各种制备抗体的方法中。比如, 可将其用于 (在任选地加入合适的佐剂后) 免疫动物。为了能够从生物流体中纯化针对所述多肽的特异抗体, 也可将其连接到亲和色谱的支持物上。所述生物流体可以是, 例如, 之前被所述多肽免疫的动物的血清, 或者是杂交瘤细胞上清液; 还可以是被毛线虫属感染的动物的血清, 这种情况下, 期望分离出针对所述多肽的特异抗体亚群。

[0043] 本发明还涉及上述多肽 b) 的任何特异抗体。其可包括多克隆抗体或者单克隆抗体。

[0044] 针对多肽的特异抗体可以通过已知的各种手段获得, 特别是包括以下的传统方法: 用所述多肽 (任选地添加合适的佐剂) 来免疫动物和回收其血清 (用于产生多克隆抗体) 或者其淋巴细胞 (用于产生单克隆抗体)。

[0045] 上述的多肽 a) 和 b) 及编码这些多肽的多聚核苷酸可以被用于制备免疫原性组合物, 尤其是抗毛线虫属 (anti-Trichinella) 疫苗。

[0046] 本发明的主题还涉及免疫原性组合物, 其包含上述定义的一种或者多种多肽 a) 和 / 或一种或者多种多肽 b), 或者一种或者多种编码所述多肽的多核苷酸, 所述多肽 a) 和 / 或多肽 b) 或多核苷酸与用于增强免疫应答的一种或者多种佐剂组合。任选地, 所述组合物还可包含由抗毛线虫属抗体识别的一种或者多种其他免疫原性多肽, 比如, 衍生自 PCT 申请 WO 2007/090960 中所述的 NBL1 和 411 抗原的一种或多种多肽。

[0047] 根据一种优选的实施方式,本发明的免疫原性组合物是疫苗。

[0048] 能够增强肽免疫原性的多种佐剂都是本领域技术人员已知的。佐剂的实例包括明矾(氢氧化铝)、弗氏(Freund's)完全佐剂或弗氏不完全佐剂(IFA)、脂质体、病毒体(重组病毒包膜)以及胞壁酸的肽衍生物等。在使用疫苗的情况下,一定要选择药理学上可以接受的佐剂,优选佐剂的实例有水包油乳化佐剂,比如 SEPPIC 公司出售的名为 MONTANIDE ISA 70 和 MONTANIDE ISA 775 的佐剂,其还描述于在专利 EP 480982、EP 825875、US 5422109、US 6251407 和 US 6610309 中。

[0049] 在恰当的情况下,特别是涉及短肽(≤ 30 个氨基酸)的时候,所述多肽可以连接到载体蛋白上。

[0050] 载体蛋白的实例有 KLH(钥孔血蓝蛋白)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白、破伤风类毒素或白喉类毒素。也可以通过将多个拷贝的相同多肽彼此组合,并任选地与其他肽表位组合,以形成嵌合多肽形式的多表位组合物,或者通过多聚链,例如多聚赖氨酸,形成多表位组合物。

[0051] 如果使用多核苷酸作为免疫原,则免疫原性组合物的形式可以是插有待施用的多核苷酸的重组载体。可使用的病毒载体有,例如痘病毒、腺病毒、反转录病毒、慢病毒、疱疹病毒和 AAV 病毒(腺病毒相关病毒)等。其形式也可以是由一种或者多种含有所述多核苷酸的表达载体转化的非病原菌。还可以以裸露 DNA 的形式直接施用所述多核苷酸,或者将其引入脂质体中。在使用疫苗的情况下,则优选使用非病原菌(例如乳酸菌,或者非致病的大肠杆菌(*Escherichia coli*)或者猪沙门氏菌(*Salmonella suis*)菌株),或者是从疫苗病毒株衍生的载体,例如衍生自伪狂犬病(奥耶斯基氏病(*Aujesky's disease*))病毒的疫苗株的载体。

[0052] 下文中的进一步说明将有助于更清楚地了解本发明,其涉及阐明 L20h-Ts3 和 L20h-Ts1 抗原用于毛线虫病的免疫诊断中的用途的实施例。

[0053] 实施例 1:L20h-Ts3 和 L20h-Ts1 抗原的鉴别,及以重组蛋白的形式在原核表达系统中产生这些抗原

[0054] 使用通过实验方法感染有旋毛形线虫的猪的血清及其肠粘膜培养上清,进行毛线虫早期发育阶段的(感染小鼠后 14 小时、20 小时和 48 小时)cDNA 表达文库的免疫筛选。

[0055] 在感染小鼠后 14 和 20 小时得到的 cDNA 文库中的 41 个克隆中鉴别到了 L20h-Ts3 基因。这些克隆之一的核苷酸序列及由此推导出的多肽序列显示在图 1A 中。

[0056] 所述核苷酸序列的长度为 398bp,包括 33bp 的 3' 非编码区(UTR),推定的多聚腺苷酸化信号(在图 1A 中以下划线表示)和开放读码框,该开放读码框编码的蛋白具有 106 个氨基酸,分子量为 11906.0 道尔顿,等电点为 4.21。根据 BENDTSEN 等人的算法(BENDTSEN et al., *J Mol Biol*, 340, 783-95, 2004),没有鉴定出肽信号。对于其同源蛋白的数据库搜索显示,推导出的 L20h-Ts3 多肽序列与称作 SML-3 的旋毛形线虫蛋白(GUILIANO et al., *Int J Parasitol*, 39, 515-24, 2009)有高度的同一性(91%)。

[0057] 用 BamHI-NotI(New England BioLabs, Beverly, Massachusetts)酶切该克隆后,将含有完整的 L20h-Ts3 编码序列的限制性酶切片段亚克隆到 pGEX-6P-1 载体(GenBank U78872)中。此载体拥有位于 N-末端的日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)谷胱甘肽 S 转移酶标签(GSTsj)(GSTsj 与毛线虫属不存在免疫交叉反应)。由此而产生称为

pGEX-6P-1-(L20h-Ts3) 的表达载体,其编码包含 L20h-Ts3 全长序列并且 N 末端带有 GSTsj 标签和 C 末端带有多组氨酸标签的重组蛋白。

[0058] 在感染小鼠后 20 小时和 48 小时得到的 cDNA 文库的 121 个克隆中鉴别到了 L20h-Ts1 基因。这些克隆之一的序列在图 1B 中给出。它的长度为 339bp,包括 139bp 的 3' 非编码区,推定的多聚腺苷酸化信号(在图 1B 中以下划线表示),和开放读码框,该开放读码框编码的蛋白具有 67 个氨基酸,分子量为 7834.9 道尔顿,等电点为 4.42。根据 BENDTSEN 等人的算法(2004),鉴定出一个具有 20 个氨基酸的信号肽(在图 1B 中以黑体字显示)。其同源蛋白的数据库搜索显示,此蛋白与已知的毛线虫属蛋白没有同源性。

[0059] 此克隆经由 BamHI-NotI(New England BioLabs, Beverly, Massachusetts) 酶切后,将编码 L20h-Ts1 中 Tyr21-Ala67 片段的限制性酶切片断(对应于没有信号肽的成熟蛋白)亚克隆到 pGEX-6P-1 载体中。由此产生称为 pGEX-6P-1-(L20h-Ts1) 的表达载体,其编码包含成熟形式的 L20h-Ts1 序列并且 N-末端带有 GSTsj 标签和 C-末端带有多聚组氨酸标签的重组蛋白。

[0060] 将 pGEX-6P-1-(L20h-Ts3) 或者 pGEX-6P-1-(L20h-Ts1) 载体用于转化大肠杆菌(BL21 株)中。加入 0.5mM(终浓度)的异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)并在 37°C、225rpm 转速的条件下温育 3 小时来诱导表达每个重组蛋白(含有 N-末端 GSTsj 标签或者 C-末端多聚组氨酸标签)。将诱导后的细菌离心(4000 \times g、20 分钟、4°C),然后重新悬浮在添加有 0.5mg/mL 溶菌酶的裂解缓冲液(20mM Tris-HCl, pH 8.0;150mM NaCl)中,并以在液氮中三次冻融循环的方式裂解。

[0061] 接下来,在裂解物中加入 5 μ g/mL 的脱氧核糖核酸酶 I(DNase I),并在 37°C 温育 15 分钟。然后,将裂解物与经过裂解缓冲液预平衡的 Ni-NTA 基质(GE Healthcare Europe, Orsay, France)一起置于 50 毫升的 Falcon® 锥形底管(Becton Dickinson, Le Pont-De-Clair, France)中,并放在旋转式摇床上于 4°C 温育 1 小时 30 分钟。为了除去没有结合的蛋白或杂质,将裂解物-基质混合物上样到 PD-10 柱子(GE Healthcare Europe, Orsay, France)上,而后转移到新的 50 毫升 Falcon® 管中,使用 50 毫升的清洗缓冲液 I(20mM Tris-HCl, pH 8.0;300mM NaCl),于旋转式摇床上 4°C 清洗 30 分钟。将混合物离心(1500 \times g, 4°C)5 分钟后,用 50 毫升清洗缓冲液 II(20mM Tris-HCl, pH 8.0;300mM NaCl;30mM 咪唑)于 4°C 清洗 4 次,每次 30 分钟。清洗后再最终离心 5 分钟(1500 \times g, 4°C)。最后,用洗脱缓冲液(20mM Tris-HCl, pH 8.0;300mM NaCl;500mM 咪唑)洗脱每个重组蛋白,并使用分光光度计在 280 纳米波长测定浓度。重组蛋白被分装成小份,并置于 10% 的甘油中放置在 -20°C 保存。

[0062] GSTsj-L20h-Ts3 和 GSTsj-L20h-Ts1 融合蛋白的变性电泳(SDS-PAGE)凝胶分别显示在图 2A 和图 2B 中(第一泳道为分子量标准)。在这些凝胶中, GSTsj-L20h-Ts3 和 GSTsj-L20h-Ts1 蛋白都在预期的融合蛋白分子量位置呈现为单一条带。

[0063] 实施例 2:L20h-Ts3 和 L20h-Ts1 蛋白在蛋白质印迹法中的免疫反应性

[0064] 抗毛线虫血清

[0065] 将 200、1000、20000 条旋毛形线虫(ISS004, 意大利罗马国际毛线虫参照中心)或者布氏毛形线虫(ISS100)的感染性幼虫感染无特定病原猪(SPF 猪)或者传统农场养殖的猪体内。在感染之前 48 小时(阴性对照)和感染开始后(pi)第 5、10、15、20、25、30、40、50

和 60 天取血样。

[0066] 另外,还使用了来源于感染有 20000 个旋毛形线虫 (ISS003) 或者布氏毛形线虫 (ISS002) L1M 幼虫的 SPF 猪血清。在感染之前 24 小时 (阴性对照),和感染后第 1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、20 和 25 周取血样。

[0067] 2004 年,从位于 Ille-et-Vilaine(法国)的舍养工厂化农场收集猪血清,经由人工消化法测定为毛线虫病阴性,并将其作阴性参照血清。

[0068] 蛋白质印迹法

[0069] 用蛋白质印迹法分析重组 L20h-Ts3 和 L20h-Ts1 抗原 (以 GSTsj-L20h-Ts3 和 GSTsj-L20h-Ts1 融合蛋白的形式) 的免疫反应性。

[0070] 在变性条件下对重组蛋白进行电泳 (15%SDS-PAGE, 每孔 700ng 蛋白质),然后将蛋白转渍到硝酸纤维膜上。将膜用含有 0.1% Tween® 20 和 5% 脱脂奶的磷酸盐缓冲液 (PBS-T) 于 4° C 过夜温育而封闭后,使用 PBS-T 清洗 3 次,每次 5 分钟。然后在常温下,使用以下方式温育膜 1 小时:

[0071] - 对于 L20h-Ts3,使用来自经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 SPF 猪的血清,所述血清为感染后的第 -2、5、12、15、20、28 和 60 天所收集,并以 1/300 的比例稀释于含有 5% 脱脂奶的 PBS-T 中;

[0072] - 对于 L20h-Ts1,则使用经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 SPF 猪的血清,所述血清为感染后第 -1、7、14、21、28、49 和 84 天所收集,并以 1/300 的比例稀释于含有 5% 脱脂奶的 PBS-T 中。

[0073] 在 PBS-T 中清洗膜 3 次,每次 5 分钟后,将带有过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 第二抗体按照 1/10000 的比例稀释,使其与膜一起在常温下温育 1 小时。再清洗 3 次后,用 "ECL PLUS WESTERN BLOTTING AND AMERSHAM HYPERFILM ECL" 试剂盒 (GE Healthcare Europe, Orsay, France) 进行显色。

[0074] L20h-Ts3:

[0075] 图 3 中显示了,在感染后第 -2、5、12、15、20、28 和 60 天,从经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 SPF 猪血清中所得到的结果。这些结果表明,从感染后第 20 天起 (从感染后第 15 天开始可见微弱的条带),可以清晰地识别到重组 L20h-Ts3 抗原 (GSTsj-L20h-Ts3),并至少持续到感染后第 60 天。

[0076] L20h-Ts1:

[0077] 所述结果显示在图 4 中。这些结果表明从感染后第 28 天起 (从感染后第 21 天起,可见微弱的条带),可以由经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 SPF 猪血清清晰地识别到重组 L20h-Ts1 抗原 (GSTsj-L20h-Ts1),并至少持续到感染后第 84 天 (图 4A 和图 4B) (应该注意的是,在感染后的第 112 天,另外一头经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 SPF 猪也可以检测到;实验数据未显示)。感染后第 60 天,在感染 200 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的猪中,也可以识别重组 L20h-Ts1 抗原 (GSTsj-L20h-Ts1) (可见微弱条带;实验数据未显示)。

[0078] 实施例 3:重组 L20h-Ts3 抗原在间接 ELISA 中的免疫反应性

[0079] 用间接 ELISA 估测重组 L20h-Ts3 抗原的免疫反应性,并将其与旋毛形线虫的 E/S 抗原及 PCT 申请 WO 2007/090960 中描述的 NBL1 抗原进行比较。

[0080] 所用感染毛线虫的猪的血清如上文实施例 2 中所述。共使用 220 个阴性猪参照血清来判定诊断阈值。

[0081] 作为参照的 E/S 抗原来自于 Pourquier 研究所 (法国 Montpellier) 出售的 ELISA 试剂盒。

[0082] ELISA 测定的方案如下:在微量滴定板中 (Immuno 96MicroWell Plates F96MaxiSorp, Nunc, Roskil, 丹麦),每孔加入 100 μ L 经由敏化缓冲液 (12mM 碳酸钠;35mM 碳酸氢钠, pH 9.6) 稀释的抗原,并在 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。接下来,将每孔用 250 μ L 的清洗缓冲液 (蒸馏水, 0.05% Tween $^{\circledR}$ 20) 清洗 5 次,然后与 200 μ L 的饱和缓冲液 (PBS, 1% 明胶;0.05% Tween $^{\circledR}$ 20) 一起在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。用清洗液清洗 5 次后,每孔加入 200 μ L 稀释于饱和缓冲液中的第一抗体 (血清),在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。用清洗液清洗 5 次后,每孔加入 100 μ L 标记有过氧化物酶的兔抗猪 IgG 第二抗体 (以 1/50000 的比例稀释于饱和缓冲液中),并在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。最后,用清洗液清洗 5 次,每孔加入 100 μ L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, Zymed, 美国加州) 用于暗室显色。每孔中加入 50 μ L 12.5% 的硫酸以终止反应,并使用 Labsystems iEMS Reader MF 酶标仪配合 Ascent 2.6 软件 (Thermo LabSystems, Cergy Pontoise, 法国) 在 450nm 波长进行读数。

[0083] 通过测试 1/10、1/100 和 1/300 的比例稀释的血清样品,和每孔中 50ng、250ng、500ng 和 1 μ g 的 L20h-Ts3 蛋白量,来确定 ELISA 的最佳条件。然后,所得结果用 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验的方法进行分析。这样,在 1/10 的稀释比例的血清和使用 250ng L20h-Ts3 蛋白时,阳性样品和阴性样品的数值之间的差异最大。因此,这些条件被用于接下来的 ELISA 中。

[0084] 由此,这些条件被用于其余的测试。诊断阈值由阴性参照血清来确定。其计算方法依据使用由 Office International des Epizooties [世界动物卫生组织] 定义的公式 (Manual of diagnostic tests and vaccines for land animals, 第 6 版, 2008, 第 2.01.6 章),对应于在 450nm 波长所测 OD 值的平均值再加上 3 倍标准差。

[0085] 图 5 至 13 显示了所述结果。

[0086] 图 5 给出了从 220 个阴性参照血清中测量到的光密度值。根据这些测量结果而确定的诊断阈值为 0.33 个 OD 单位。

[0087] 图 6 给出了在由 20000 个 L1M 旋毛形线虫 L1M 幼虫感染的 SPF 猪血清 (▲) 或者传统农场养殖猪血清 (■) 中测量到的光密度值,其中所述血清收集于感染后的第 5 (猪 1-3)、12 (猪 4-6)、15 (猪 7-9)、20 (猪 10-12) 和 60 (猪 13-15) 天。在其间无法用 E/S ELISA 进行检测的盲窗期以阴影示出。

[0088] 图 7 显示了在感染后的数周中 (沿 x 坐标轴),以 L20h-Ts3 抗原测试时,经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 3 头 SPF 猪的血清的光密度变化 (沿 y 坐标轴)。

[0089] 图 8 显示了在感染后的数周中 (沿 x 坐标轴),以 E/S 抗原测试时,经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 3 头 SPF 猪的血清的光密度变化 (沿 y 坐标轴)。 $\%E/P$ 通过以下公式定义:(所测样品的 OD 值)/(阳性对照样品的 OD 平均值) $\times 100$ 。

[0090] 图 9 显示了在感染后的数周中 (沿 x 坐标轴),以 NBL1 抗原测试时,经实验感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的 3 头 SPF 猪的血清的光密度变化 (沿 y 坐标轴)。

[0091] 图 10 显示了在感染后的数周中 (沿 x 坐标轴),以 L20h-Ts3 抗原测试时,经实验

感染 20000 个布氏毛形线虫 L1M 幼虫的 3 头 SPF 猪的血清的光密度变化（沿 y 坐标轴）。

[0092] 图 11 显示了在感染后的数周中（沿 x 坐标轴），以 E/S 抗原测试时，经实验感染 20000 个布氏毛形线虫 L1M 幼虫的 3 头 SPF 猪的血清的光密度变化（沿 y 坐标轴）。

[0093] 图 12 显示了在感染后的数周中（沿 x 坐标轴），以 NBL1 抗原测试时，经实验感染 20000 个布氏毛形线虫 L1M 幼虫的 3 头 SPF 猪的血清的光密度变化（沿 y 坐标轴）。

[0094] 图 13 显示了由 SPF 猪（▲）或传统农场养殖猪（■）的血清测量的光密度数值，其中所述猪经实验感染 200 个（猪 1-3）或者 1000 个（猪 4-6）旋毛形线虫 L1M 幼虫，并使用 L20h-Ts3 抗原进行检测。

[0095] 当经实验使猪感染 20000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫的时候，能够使用 L20h-Ts3 抗原对于 1/6 的猪（猪 8）在感染后第 15 天检测到，和对于 4/6 的猪在感染后第 20 天检测到（图 6）。而使用 E/S ELISA，则在第 25 天之前都检测不到感染。所获得的实验结果因猪自身健康状况而异，特别是，SPF 猪能够比传统养殖的猪更早地被检测出来。

[0096] 血清转化伴随有一系列具有高滴度的体液应答反应，并在 2/3 感染有旋毛形线虫的猪中持续到感染后第 25 周，在 1/3 感染有旋毛形线虫的的猪中持续到感染后第 12 周（图 7）。使用 E/S ELISA，3 头猪中有 1 头较早地（早 1 周）被检测到（图 8）。对于同样的 3 头猪，使用 NBL1 抗原，从感染后第 3 周起可检测出抗毛线虫属抗体（图 9）。另一方面，3 头猪中的 2 头在感染后第 7 周出现了应答水平的下降。对于第 3 头猪，从 12 周后就无法再检测到抗毛线虫属抗体的存在了。

[0097] 当经实验使猪感染 20000 个布氏毛形线虫 L1M 幼虫的时候，用 L20h-Ts3 抗原可以比使用 E/S ELISA 早 1-2 周检测到血清转化（图 10 和 11）。对所检测的 3 头猪，所得光密度值从感染后第 3 周开始处于高水平，并持续到感染后第 25 周。对于同样 3 头猪，使用 NBL1 抗原（图 12）则可以从感染后第 2 周在其中 1 头猪的血清中测出抗毛线虫属抗体，并且一直持续到感染后第 16 周。在第 2 头猪的血清中，只有在感染后的第 3 和 4 周可以测到抗毛线虫属抗体。最后，在第 3 头猪的血清中检测不到抗毛线虫属抗体。

[0098] 此外，在用中等感染剂量（1000 个旋毛形线虫 L1M 幼虫）感染的 3/6 头猪中，从感染后第 60 天可用 L20h-Ts3 抗原检测到（图 13）。同样，所获得的实验结果因猪的自身健康状况而异。准确地说，在 2/3 的 SPF 猪和 1/3 的传统养殖的猪体内都有检测到。而使用低感染剂量（200 个旋毛形线虫 L1M 幼虫）感染的猪则在感染后第 60 天检测不到。

[0001]

序列表

- <110> 国家食品安全环境及劳工局
亚历山大·佐切维奇
巴尔迪塞拉·乔瓦尼
桑德兰·A·拉库尔
波利娜·马切
伊莎贝尔·瓦莱
帕斯卡尔·布瓦罗
- <120> 毛线虫属的抗原性多肽及其用途
- <130> MJP/11-F1159-7 WO
- <150> FR 10 00660
- <151> 2010-12-17
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 398
- <212> DNA
- <213> 旋毛形线虫(*Trichinella spiralis*)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (34)..(351)

```

<400> 1
gggtcagttt tagcagcttt tatcttcttt ttc atg gca gtt atg cct gaa atc      54
                                   Met Ala Val Met Pro Glu Ile
                                   1           5

aat gcg gat ttg agt cca ttg gaa gaa gcc caa agt tac ata tac caa      102
Asn Ala Asp Leu Ser Pro Leu Glu Glu Ala Gln Ser Tyr Ile Tyr Gln
   10           15           20

tet gat ttg caa agc ggt aaa ggt cat ttc cgc aga gtt ctc gat ata      150
Ser Asp Leu Gln Ser Gly Lys Gly His Phe Arg Arg Val Leu Asp Ile
   25           30           35

agc gat gtc gac aca agt gac gga tta tcc tta acg ata gac gct ctt      198
Ser Asp Val Asp Thr Ser Asp Gly Leu Ser Leu Thr Ile Asp Ala Leu
   40           45           50           55

cca act aca tgt cct gtg tca tca gaa atg act caa gat caa gtg tat      246
Pro Thr Thr Cys Pro Val Ser Ser Glu Met Thr Gln Asp Gln Val Tyr
   60           65           70

tea gat gag tgc ccc gtc acc aga gag gaa tat gac gaa ata gaa tgc      294
Ser Asp Glu Cys Pro Val Thr Arg Glu Glu Tyr Asp Glu Ile Glu Cys
   75           80           85

cat ttg aag ctt gac cat tct aaa act ggc caa att gaa tgt aca tat      342
    
```

[0002]

His Leu Lys Leu Asp His Ser Lys Thr Gly Gln Ile Glu Cys Thr Tyr
 90 95 100

tat gga cat taaactatga gaataaagtg atttaatgaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 398
 Tyr Gly His
 105

<210> 2
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 旋毛形线虫

<400> 2

Met Ala Val Met Pro Glu Ile Asn Ala Asp Leu Ser Pro Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Gln Ser Tyr Ile Tyr Gln Ser Asp Leu Gln Ser Gly Lys Gly His
 20 25 30

Phe Arg Arg Val Leu Asp Ile Ser Asp Val Asp Thr Ser Asp Gly Leu
 35 40 45

Ser Leu Thr Ile Asp Ala Leu Pro Thr Thr Cys Pro Val Ser Ser Glu
 50 55 60

Met Thr Gln Asp Gln Val Tyr Ser Asp Glu Cys Pro Val Thr Arg Glu
 65 70 75 80

Glu Tyr Asp Glu Ile Glu Cys His Leu Lys Leu Asp His Ser Lys Thr
 85 90 95

Gly Gln Ile Glu Cys Thr Tyr Tyr Gly His
 100 105

<210> 3
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 旋毛形线虫

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(201)

<400> 3

atg ttc atc acg ttt atc ttt ctt gct aac ata ctg ctt ctt gtg caa 48
 Met Phe Ile Thr Phe Ile Phe Leu Ala Asn Ile Leu Leu Leu Val Gln
 1 5 10 15

[0003]

A

```

gggtcagtttttagcagcttttatcttctttttcATGGCAGTTATGCCTGAAATCAATGCG 60
                                     M A V M P E I N A 9
GATTTGAGTCCATTGGAAGAAGCCCAAAGTTACATATACCAATCTGATTTGCAAAGCGGT 120
D L S P L E E A Q S Y I Y Q S D L Q S G 29
AAAGTTCATTTCCGCAGAGTTCTCGATATAAGCGATGTCGACACAAGTGACGGATTATCC 180
K G H F R R V L D I S D V D T S D G L S 49
TTAACGATAGACGCTCTTCCAACACTACATGTCCTGTGTCATCAGAAATGACTCAAGATCAA 240
L T I D A L P T T C P V S S E M T Q D Q 69
GTGTATTCAGATGAGTGCCCGTCAACAGAGAGGAATATGACGAAATAGAATGCCATTTG 300
V Y S D E C P V T R E E Y D E I E C H L 89
AAGCTTGACCATTCTAAAACCTGGCCAAATTGAATGTACATATTATGGACATtaaactatg 360
K L D H S K T G Q I E C T Y Y G H 106
agaataaagtgattttaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 398

```

B

```

ATG TTCATCACGTTTATCTTTCTTGCTAACATACTGCTTCTTGTGCAACCATCGGAAGCA 60
M F I T F I F L A N I L L L V Q P S E A 20
TATCGTGGTCACACCAACGATGAAATTCGATTGATGGATGAGTGTAGCGATGAACCATAC 120
Y R G H T N D E I R L M D E C S D E P Y 40
ATACGAGAACAACCTGGGGGAAGATGATTATATGAGTTTAATTGATGCGTGCGTTGAAGAA 180
I R E H L G E D D Y M S L I D A C V E E 60
CGACTTGGACGAAGAGTTGCAtgaagaatataagaaaagctatcaagaattgttcatttt 240
R L G R R V A 67
caagcgacaattttatttatgaaatgaattttattgaaaaatgaaaatctgtttacagtatt 300

cgtaataaatagctatgcagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 339

```

图 1

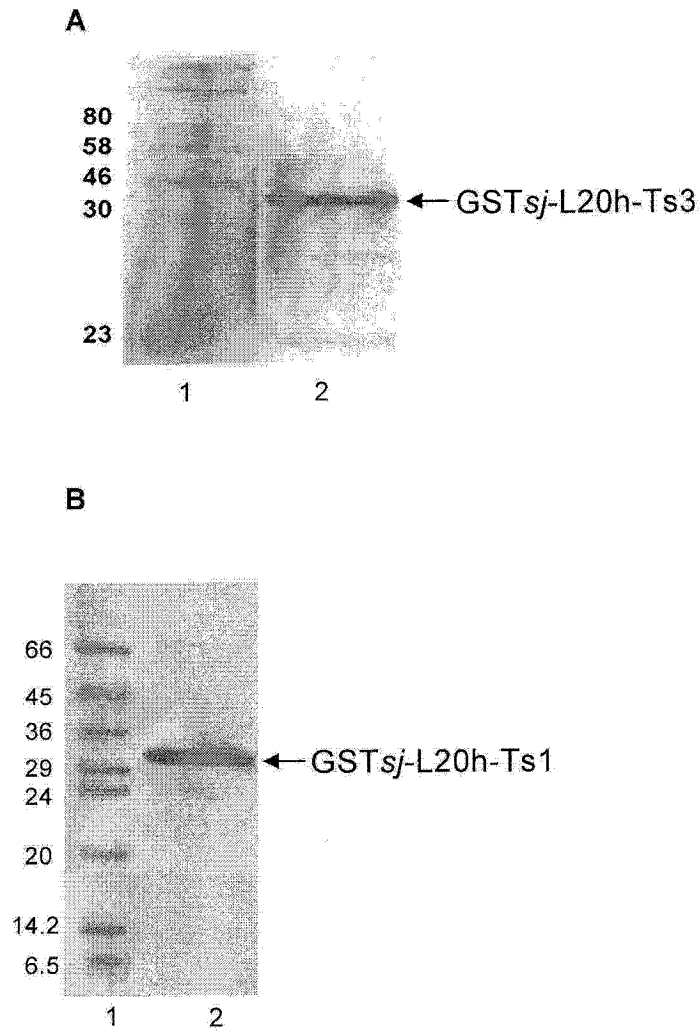


图 2

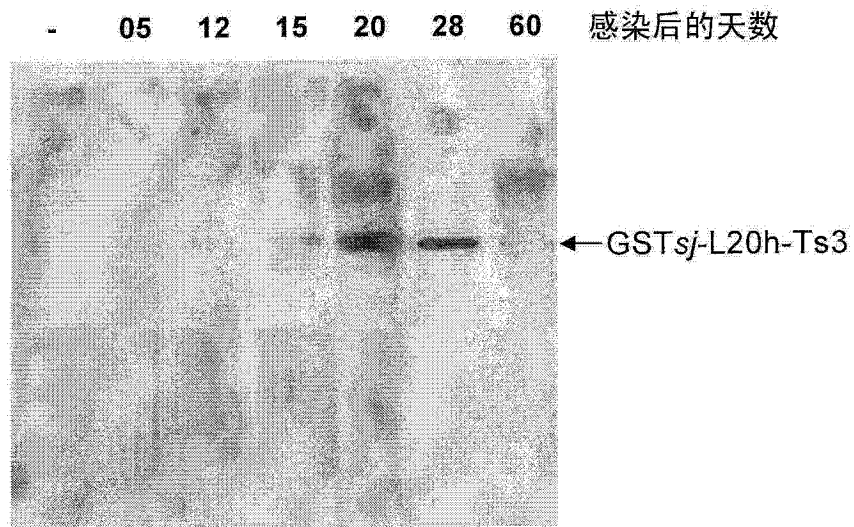


图 3

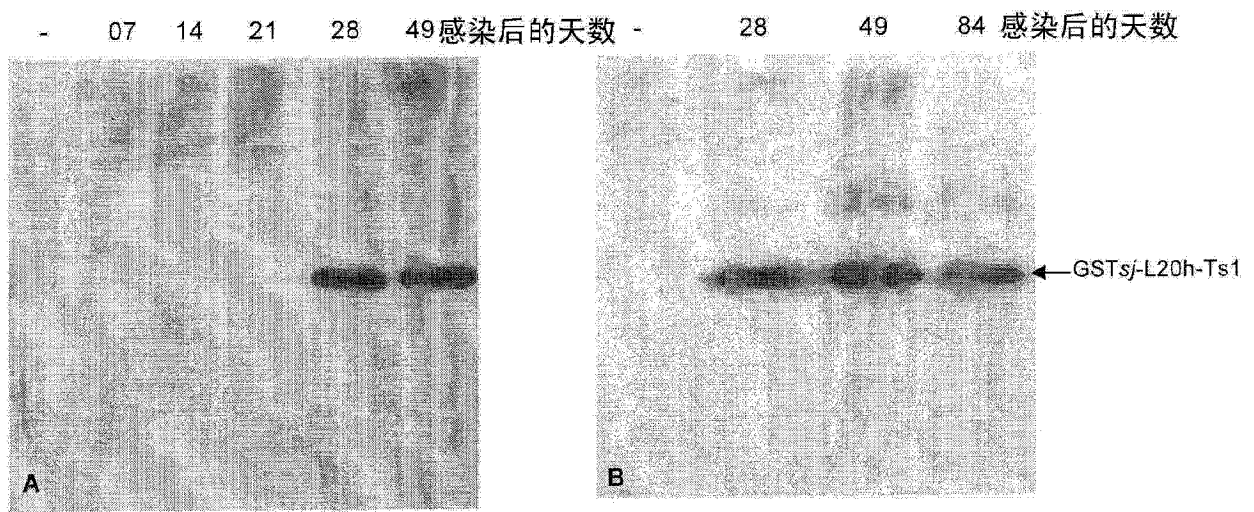


图 4

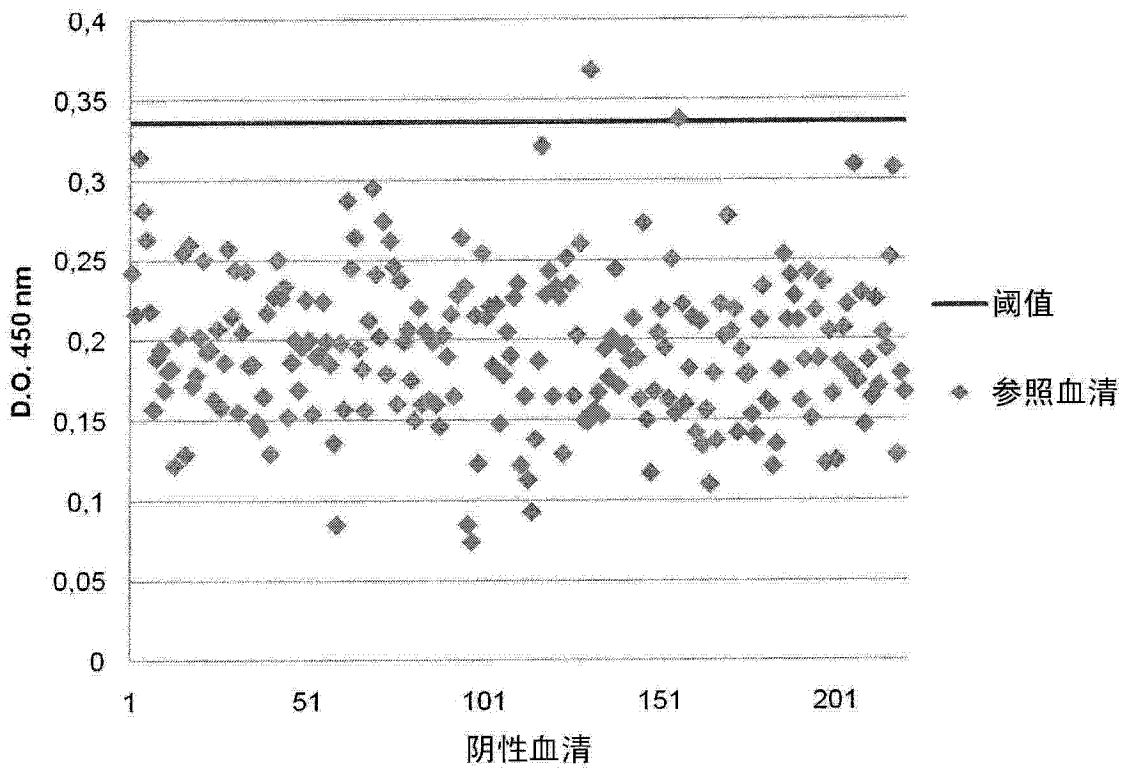


图 5

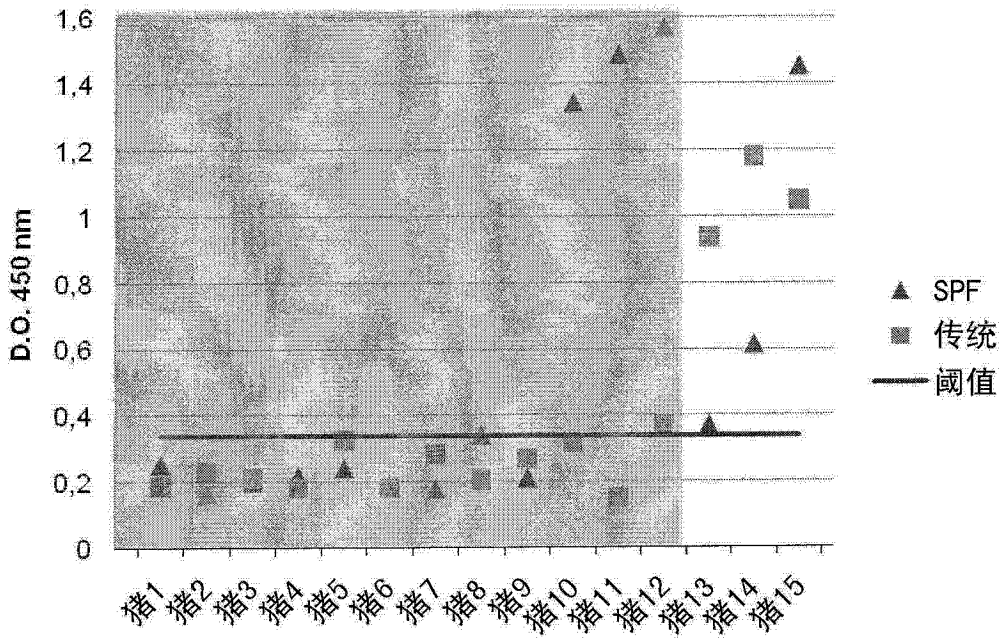


图 6

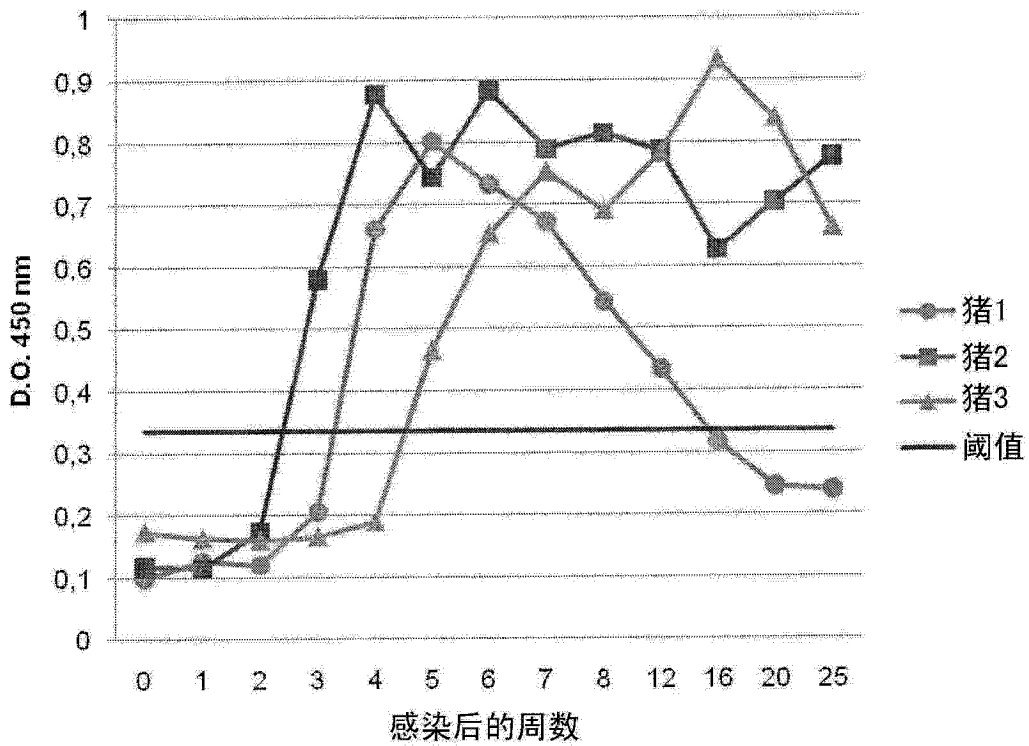


图 7

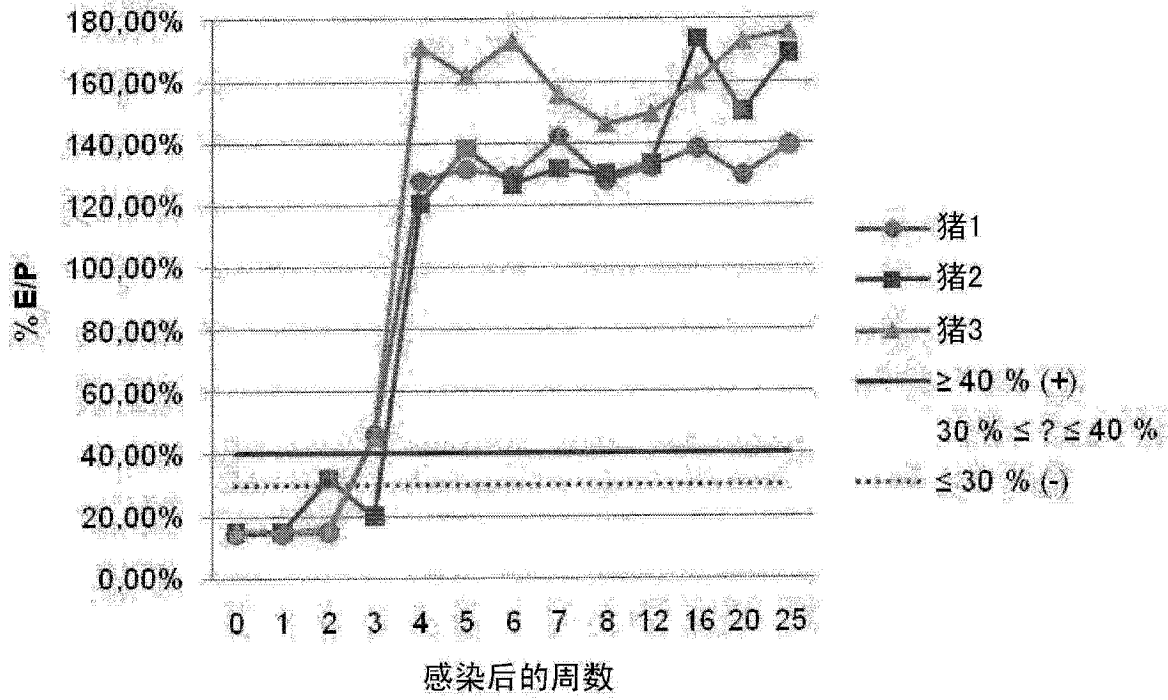


图 8

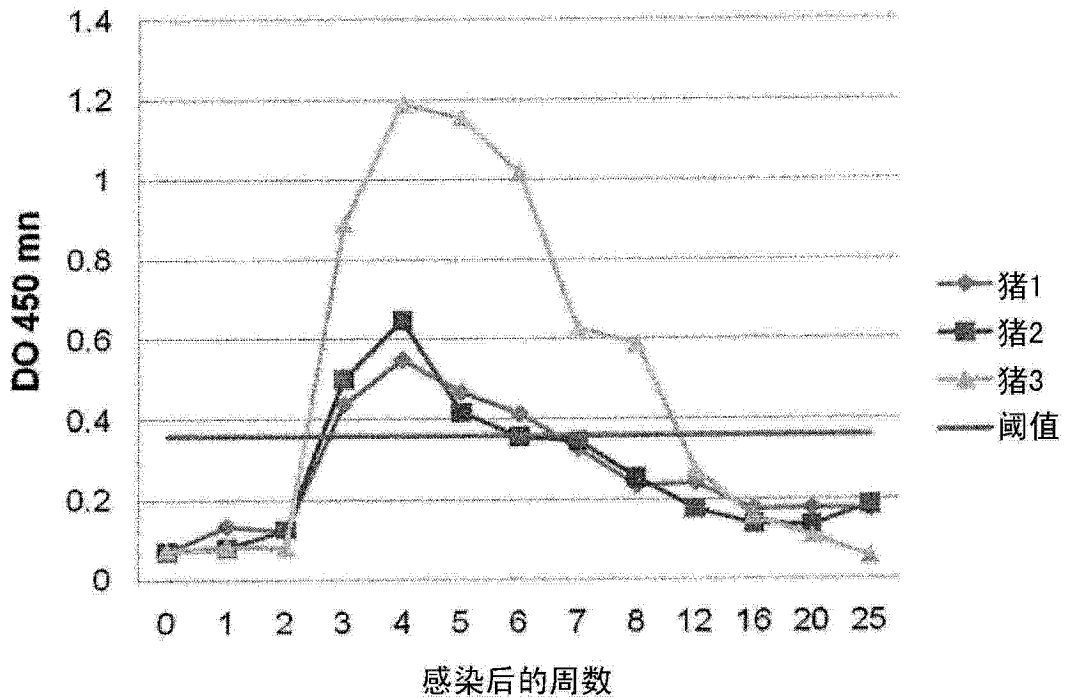


图 9

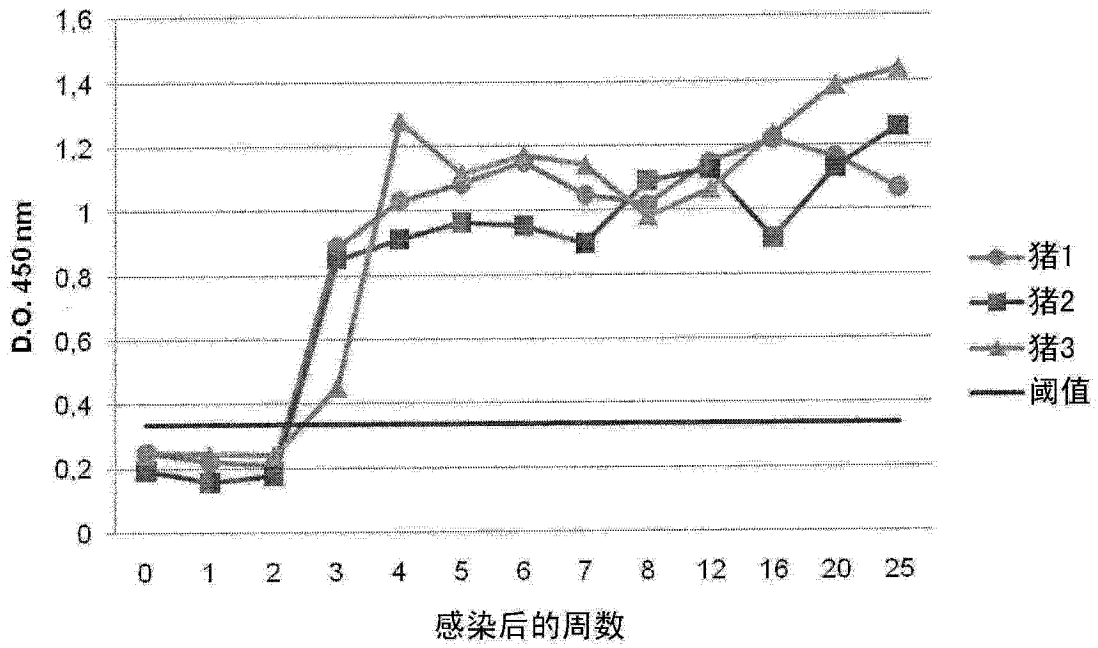


图 10

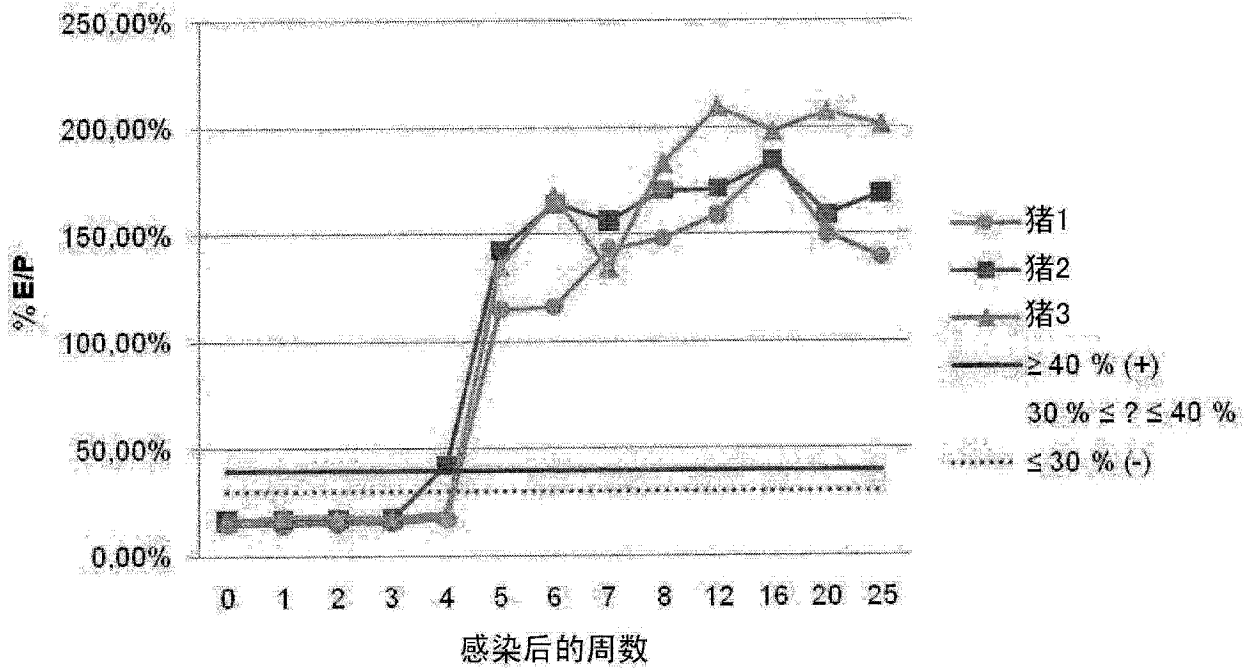


图 11

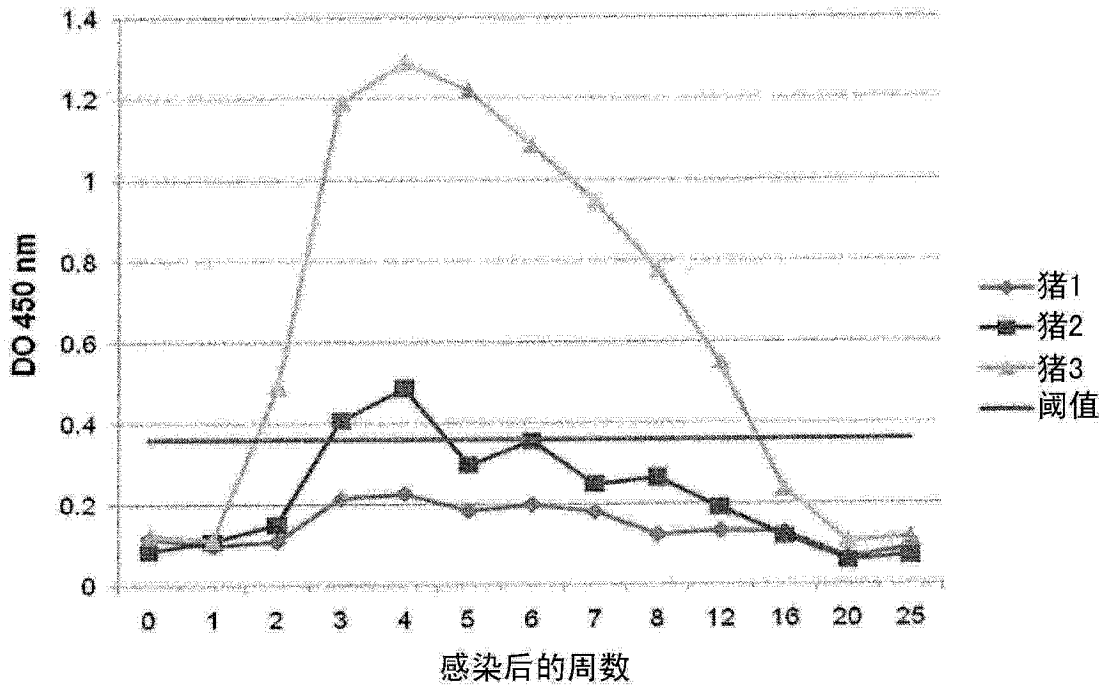


图 12

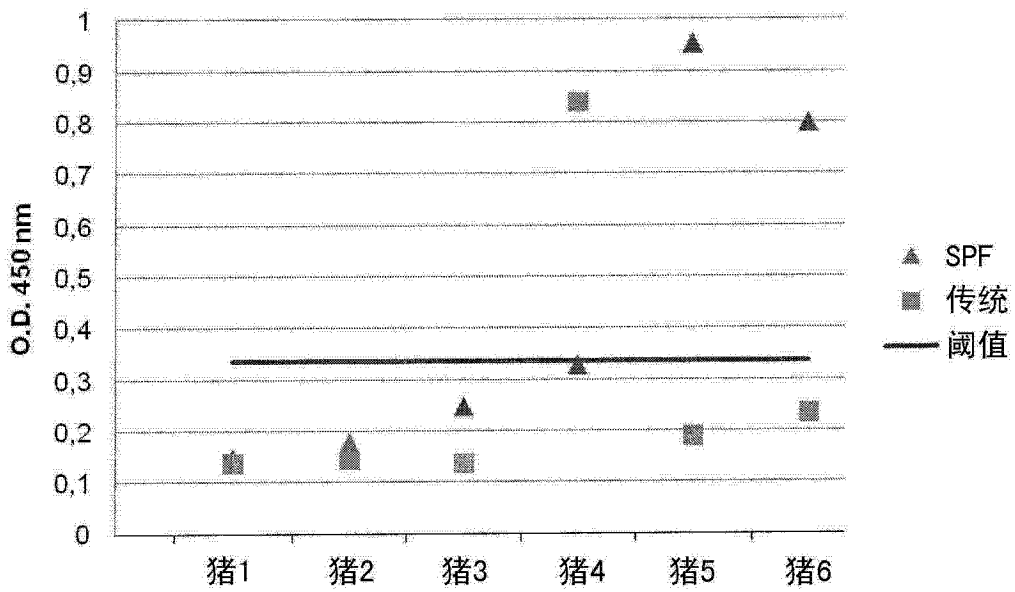


图 13

专利名称(译)	毛线虫属的抗原性多肽及其用途		
公开(公告)号	CN102933597B	公开(公告)日	2015-10-14
申请号	CN201180009999.0	申请日	2011-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	国家食品安全环境及劳工局		
申请(专利权)人(译)	国家食品安全环境及劳工局		
当前申请(专利权)人(译)	国家食品安全环境及劳工局		
[标]发明人	亚历山大佐切维奇 巴尔迪塞拉乔瓦尼 桑德兰A拉库尔 波利娜马切 伊莎贝尔瓦莱 帕斯卡尔布瓦罗		
发明人	亚历山大·佐切维奇 巴尔迪塞拉·乔瓦尼 桑德兰·A·拉库尔 波利娜·马切 伊莎贝尔·瓦莱 帕斯卡尔·布瓦罗		
IPC分类号	C07K14/435 G01N33/53 A61K39/00		
CPC分类号	C07K14/4354 A61K39/00 C07K14/43536 C07K16/18 G01N33/6854 Y02P20/582 A61K39/0003 C07K2319/40 G01N33/56966 G01N2333/4353 G01N2469/20		
优先权	2010000660 2010-02-17 FR		
其他公开文献	CN102933597A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗毛线虫属抗体识别的新型多肽。特别地，所述多肽可用于检测抗毛线虫属抗体和预防毛线虫病。

A

```

gggtcagtttttagcagctttttatcttcttttttcattggcagtttgcctgaaatcaatgcg 60
                                     M A V M P E I N A 9
GATTTGAGTCCATTGGGAAGAAGCCCAAAGTTACATATACCAATCTGATTTGCAAAGCGGT 120
D L S P L E E A Q S Y I Y Q S D L Q S G 29
AAAGTTCATTCCGAGAGTTCFCGATATAAGCGATGTCGACACAAAGTGACGGATTATCC 180
K G H F R R V L D I S D V D T S D G L S 49
TTAACGATAGACGCTCTCCAACACTACATGTCCTGTGTCATCAGAAATGACTCAAGATCAA 240
L T I D A L P T T C P V S S E M T Q D Q 69
GTGTATTCAGATGAGTGCCCGTCACCAGAGGAATATGACGAAATAGAAATGCCATTG 300
V Y S D E C P V T R E E Y D E I E C H L 89
AAGCTTGACATTCTAAAAGTGGCCAAATGAATGTACATATTATGGACATtaaaactatg 360
K L D H S K T G Q I E C T Y Y G H 106
agaataaagtgatattaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 398

```

B

```

ATGTTTCATCACGTTTATCTTTCTTGCTAACATACTGCTTCTTGTGCAACCATCGGAAGCA 60
M F I T F I F L A N I L L V Q P S E A 20
TATCGTGGTCACACCACGATGAAATTCGATTGATGGATGAGTGTAGCGATGAACCATAC 120
Y R G H T N D E I R L M D E C S D E P Y 40
ATACGAGAACACTTGGGGGAAGATGATTATATGAGTTTAATTGATGCGTGCCTTGAGAA 180
I R E H L G E D D Y M S L I D A C V E E 60
CGACTTGGACGAAAGTTCATgaagaatataagaaaagctatcaagaattgttctttt 240
R L G R V A 67
caagcgacaattttatttatgaaatgaatttatgaaaaatgaaaaatctgttcacagtatt 300
cgtaataaataagctatgcagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 339

```