

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/30

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/10 C12N 15/11

C12N 15/31 A61K 39/02

A61P 31/04 C12Q 1/02

G01N 33/68 G01N 33/569

[21] 申请号 00129083.5

[43] 公开日 2001 年 5 月 30 日

[11] 公开号 CN 1296953A

[22] 申请日 2000.9.29 [21] 申请号 00129083.5

[30] 优先权

[32]1999.9.29 [33]US [31]60/156602

[71] 申请人 辉瑞产品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 K·W·金 R·A·马杜拉

E·L·罗塞

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 41 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 猪肺炎支原体 mhp3 基因的核酸和蛋白质及其应用

[57] 摘要

本发明涉及 mhp3 核酸及其编码的蛋白质。本发明还涉及 mhp3 编码的新型脱辅蛋白抗原,该抗原可用于预防和治疗因猪肺炎支原体感染而引发的疾病和症状的疫苗。本发明还涉及重组制备这类抗原的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种蛋白质，其氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4中的至少30个连续氨基酸，其中所述的蛋白质在氨基酸序列Trp Asp Lys Glu后不具有脂肪酸酰化的半胱氨酸，而且不具有C-末端高丝氨酸内酯。
- 5 2. 权利要求1的蛋白质，该蛋白质具有氨基酸序列包含SEQ ID NO:4中的至少50个连续氨基酸。
3. 一种蛋白质，其氨基酸序列中至少包含SEQ ID NO:4中的第1-30位氨基酸。
4. 权利要求3的蛋白质，其氨基酸序列包含SEQ ID NO:4。
- 10 5. 权利要求1、2、3或4中的蛋白质，该蛋白质是分离的蛋白质。
6. 权利要求1的蛋白质，该蛋白质是融合蛋白。
7. 权利要求6的蛋白质，其中融合蛋白为硫氧还蛋白融合蛋白。
8. 一种组合物，其中含有权利要求1、2、3、或4中所述的蛋白质和药理学上可接受的载体。
- 15 9. 权利要求8的组合物，该组合物还包括佐剂。
10. 权利要求8的组合物，其中还包括至少一种选自猪肺炎支原体P46、P65、P97和P102的多肽。
11. 一种具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的免疫原性蛋白质或其片段、变体或衍生物，其中所述的免疫原性蛋白质在氨基酸序列Trp
20 Asp Lys Glu后不具有脂肪酸酰化的半胱氨酸，而且不具有C-末端高丝氨酸内酯。
12. 一种具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的免疫原性蛋白质或其片段、变体或衍生物，其中所述的免疫原性蛋白质在氨基酸序列Trp Asp Lys Glu后不具有脂肪酸酰化的半胱氨酸，而且不具有C-末端高
25 丝氨酸内酯。
13. 一种用于治疗或预防因猪肺炎支原体 (*M. hyopneumoniae*) 感染而引发的动物疾病或症状的方法，该方法包括向该动物施用一种疫苗制剂，该疫苗制剂包含 (i) 一种蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4中的至少30个连续氨基酸，其中所述的蛋白质在氨基酸序列Trp Asp Lys Glu后不具有脂肪酸酰化的半胱氨酸，以及 (ii) 药理学上可接受的载体，所施用疫苗制剂的含量足以增强猪肺炎支原体特异性的细胞或体液应答。
- 30

14. 权利要求13的方法，其中所述的蛋白质氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4. 中的至少50个连续氨基酸。

15. 一种用于治疗或预防因猪肺炎支原体感染而引发的动物疾病或症状的方法，该方法包括向该动物施用一种疫苗制剂，该疫苗制剂包含 (i) 一种抗原性或免疫原性蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4中的至少1~30位氨基酸，以及 (ii) 药物学上可接受的载体，所施用的疫苗制剂的含量足以增强猪肺炎支原体特异性的细胞或体液应答。

16. 权利要求15的方法，其中所述的蛋白质氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

17. 权利要求13、14、15或16的方法，其中所述动物是猪。

18. 一种分离的或纯化的DNA或其互补序列，所述DNA以支原体遗传密码编码一种蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列中含有SEQ ID NO:2中的至少30个连续氨基酸。

19. 权利要求18的DNA，其中所述的蛋白质的序列中包含SEQ ID NO:2中的至少50个连续氨基酸。

20. 权利要求18的DNA，其中所述的DNA质的序列中包含SEQ ID NO:1中的至少90个连续核苷酸。

21. 一种DNA或其互补序列，其中所述DNA以通用遗传密码编码一种其氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4中的至少30个连续氨基酸的蛋白质。

22. 权利要求21的DNA，其中所述的蛋白质的氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4中的至少50个连续氨基酸。

23. 权利要求21的DNA，其中所述DNA的序列中包含SEQ ID NO:3中的至少90个连续核苷酸。

24. 权利要求22的DNA，该DNA与一异源启动子可操作相连。

25. 权利要求24的DNA，该DNA 进一步包含在原核细胞中具有活性的复制起点。

26. 权利要求24的DNA，该DNA 进一步包含在真核细胞中具有活性的复制起点。

27. 一种宿主细胞，其含有权利要求24的分离的DNA。

28. 权利要求27的宿主细胞，其中所述细胞是大肠杆菌BL21，所述DNA是表达载体pBAD/Thio-TOPO。

29. 一种用于制备脱辅-Mhp3或其片段的方法，所述方法包括(i) 在所述脱辅-Mhp3能得以表达的条件下培养权利要求27的细胞，以及(ii) 回收所述蛋白质。

30. 权利要求29的方法，其中所述的蛋白质以可溶形式回收。

5 31. 权利要求29的方法，其中所述的蛋白质以不溶形式回收。

32. 一种用于治疗或预防因猪肺炎支原体感染而引发的动物疾病或症状的方法，该方法包括向该动物施用一种疫苗制剂，该疫苗制剂包含(i) 权利要求20的DNA，以及(ii) 药理学上可接受的载体，所用疫苗制剂的含量足以增强猪肺炎支原体特异性的细胞或体液应答。

10 33. 权利要求32的方法，其中所述动物是猪

34. 一种分离的DNA或其互补序列，所述DNA包括15~40个核苷酸的片段，所述片段能在PCR的严紧条件下与以支原体遗传密码编码其序列中含有SEQ ID NO:2中至少5个连续氨基酸的蛋白质的DNA杂交。

15 35. 权利要求34的分离的DNA，其中所述杂交是猪肺炎支原体特异性的。

36. 一种分离的DNA或其互补序列，所述DNA包括至少90个核苷酸的片段，所述片段能在滤膜杂交的高度严紧条件下与以支原体遗传密码编码其序列中含有SEQ ID NO:2中至少30个连续氨基酸的蛋白质的DNA杂交。

20 37. 一种试剂盒，其中包括至少一个容器，该容器中盛有第一种分离的DNA和第二种分离的DNA，所述第一种分离的DNA包括含至少15个核苷酸的片段，该片段能在PCR的严紧条件下与以支原体遗传密码编码序列中包含SEQ ID NO:2中至少5个连续氨基酸的蛋白质的DNA杂交，所述第二种分离的DNA包括含至少15个核苷酸的片段，该片段能在PCR
25 的严紧条件下与以支原体遗传密码编码其序列中含SEQ ID NO:2中的至少5个连续氨基酸的蛋白质的DNA的互补DNA杂交，其中所述试剂盒包括一份说明该试剂盒如何用于诊断猪肺炎支原体感染的说明书。

38. 权利要求37的试剂盒，其中所述的杂交是猪肺炎支原体特异性的。

30 39. 一种包括至少1个容器的试剂盒，该容器中盛有权利要求34中所述的分离的DNA，其中所述的杂交是猪肺炎支原体特异性的，而且其中所述的试剂盒包括一份说明该试剂盒如何用于诊断猪肺炎支原体感

染的说明书。

40. 一种包括至少1个容器的试剂盒，该容器中盛有一种氨基酸序列中含SEQ ID NO: 4中的至少30个连续氨基酸的蛋白质，以及一份说明该试剂盒如何用于诊断猪肺炎支原体感染的说明书。

5 41. 权利要求40的试剂盒，该试剂盒进一步包括一种抗-猪第二抗体。

42. 权利要求41的试剂盒，其中所述的第二抗体与一种能催化显色反应的酶相连。

10 43. 权利要求42的试剂盒，其中所述的酶选自碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶。

44. 权利要求42的试剂盒，该试剂盒进一步包括比色分析的试剂。

说 明 书

猪肺炎支原体mhp3基因的核酸和蛋白质及其应用

5 mhp3基因编码猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 的一个蛋白。本发明涉及mhp3的核苷酸和蛋白质。本发明还涉及由mhp3编码的新型脱辅蛋白质抗原，该抗原可用于预防和治疗因猪肺炎支原体感染而引发疾病的疫苗中，本发明还涉及这类抗原的重组制备方法。

10 猪肺炎支原体 (*M. hyopneumoniae*) 是一种能引发猪地方性支原体肺炎的细菌病原体。地方性支原体肺炎是导致出现下列症状的慢性疾病：食物消化不良、发育障碍及继发性肺感染的易感性。猪肺炎支原体很容易通过呼吸道分泌物以及通过母猪-仔猪传递而传播开来，并在猪场中大规模地流行。据1991年估计，美国约有99%的猪群被感染，
15 养猪业每年因此耗费约3亿美元。

 目前既无任何简单实验检测猪肺炎支原体，也无遏制感染的有效方法。检测猪肺炎支原体的努力因下述事实而受阻：抗猪肺炎支原体抗体与猪的其它种类支原体之间交叉反应。疫苗领域绝大部分都依赖于猪肺炎支原体的佐剂化胞膜或全细胞制剂，可这些制剂并不能激发
20 显著的免疫应答。此外，猪肺炎支原体基因的克隆及重组表达也未制备出有足够保护力能用于制备商品化疫苗的蛋白质。

 由于缺乏合适的疫苗，地方性支原体肺炎主要通过感染动物的早期检测及分离来控制。用抗生素治疗猪肺炎支原体感染动物在缩短感染过程方面效果不佳。

25 因此，亟需发现通过预防感染或治愈来防止该疾病扩散的方法。一种预防的方法就是免疫。因此，如能体外制备出大量具有抗原性可用于疫苗制剂的猪肺炎支原体蛋白或肽，就可以大大促进保护性疫苗的开发。

 公开号为W096/28472的国际专利申请鉴定出了6种猪肺炎支原体蛋白质抗原，分子量分别为46-48、52-54、60-64、72-75、90-94 和
30 110-114 Kd，而且公开了分子量为52-54、60-64和72-75 Kd 抗原的部分蛋白质序列，以及分子量为46-48 Kd抗原的全长核苷酸及氨基酸

序列。在Faulds'和Lee's 公开的部分肽序列基础上的测定结果表明，该46-48 Kd 抗原（下文中称为P46）对应于Faulds的美国专利US5, 252, 328中的44 Kd 抗原以及文献(Lee et al., 1996, J. Chromatogr. A. 737:273-279)中公开的48 Kd抗原。编码P46的基因
5 p46也已被Futo等人克隆(1995;细菌学杂志177:1915-1917)。此后，该小组的研究表明体外表达的基因产物可用于诊断猪肺炎支原体感染的抗体应答而不与其它种类的支原体交叉反应(Futo et al., 1995. 临床微生物学杂志33:680-683)。Futo等人公开的p46基因的序列及诊断用途还公开于EP 0475 185 A1。

10 WO 96/28472中的60-64 Kd 抗原的部分肽序列与称为P102的蛋白质(描述见下文)具有显著同源性。而且该抗原与Faulds公开的64 Kd 抗原(US5, 252, 328)高度同源。

WO 96/28472中的72-75 Kd 抗原对应于Wise和Kim公开的65 Kd 蛋白(1987, 细菌学杂志, 169:5546-5555和US5, 788, 962)，下文称之为
15 P65。

我们下文中称为Mhp3的52-54 Kd 抗原对应于Wise和Kim公开的50 Kd 膜内在蛋白(1987, 细菌学杂志, 169:5546-5555)和/或Faulds公开的52 Kd蛋白质(US5, 252, 328)。上述52-54 Kd抗原下文称为MHP3。WO 96/28472 公开了成熟蛋白及内部溴化氰片段(internal
20 cyanogen bromide fragment)的氨基端序列。

WO 96/28472中的90-94 Kd 抗原对应于Hsu等人公开的粘附素p97，其描述见下文。

WO 96/28472 还公开了使用60-64 Kd抗原、P46 或者联合使用P65与Mhp3的疫苗实验结果。这些疫苗都激发产生了针对猪肺炎支原体感
25 染的强有力保护作用。

科技及专利文献中有大量有关猪肺炎支原体外膜蛋白的相关报道。例如，Wise和Kim(1987, 细菌学杂志, 169:5546-5555)报道了名为p70、p65(P65, 上述)、p50和p44的4种猪肺炎支原体膜内在蛋白质，后3种经共价脂连接修饰，可激发强的体液免疫应答。对该免疫
30 应答的保护效果未做研究。编码P65蛋白的基因也已克隆，其序列以及二者在疫苗和诊断试剂中的用途见US5, 788, 962。

国际专利申请WO 91/15593公开了猪肺炎支原体的5种蛋白质，它

们的表观分子量分别为105、90、85、70和43 Kd。其中提供了编码85 Kd蛋白质(C蛋白)的基因的全长序列,以及编码其余4种蛋白质的部分核苷酸序列。使用C蛋白的疫苗实验可以赋予多试动物显著的抗猪肺炎支原体保护反应。

5 Faulds的美国专利US5,252,328公开了免疫反应性猪肺炎支原体蛋白的氨基末端序列,其分子量为36、41、44、48、64、68、74.5、79、88.5、96和121 Kd。其它依据电泳迁移率鉴定而未公开蛋白质序列的蛋白质的表观分子量为22.5、34和52 Kd。尽管US5,252,328中提及这些蛋白质可用于疫苗制剂,但是未报道任何疫苗实验结果。

10 国际专利申请WO 95/09870 公开了纯化猪肺炎支原体粘附素的生化方法,该支原体的膜内在蛋白负责黏附到宿主上呼吸道上皮细胞的纤毛上。WO 95/09870 也提供了这些蛋白的测试方法及用途,例如在疫苗及诊断试剂方面的用途。但是,在克隆出名为p97的基因之前无任何粘附素基因的克隆见诸报道,p97的产物下文称为“P97”,研究表明它能够使得菌体与感染了猪肺炎支原体的猪的呼吸道纤毛细胞结合
15 (Hsu et al., 1997, 细菌学杂志 179:1317-1323)。King等人的研究论文(1997;疫苗15:25-35)公开的分子量为124 Kd的粘附素 Mhp1是P97的一种菌株变体。但是,用GST-Mhp1融合蛋白免疫猪以预防猪肺炎支原体的尝试未获得针对地方性支原体肺炎的统计学意义上的显著保
20 护。Wilton 等人(1998,微生物学144:1931-1943)测定出了P97的一种94 Kd变体。此外,研究表明p97 基因是另外还能编码名为P102的第二种蛋白质的操纵子的一部分,该蛋白推测分子量约102 Kd (Hsu et al., 1998, 基因214:13-23)。Minion 和 Hsu 在国际专利申请WO 99/26684中提出P102可用于疫苗制备,但未报道疫苗实验。

25 本发明包括猪肺炎支原体mhp3 基因的核苷酸及蛋白质。本发明还包括由mhp3基因编码的新型脱辅蛋白质抗原,该抗原可用于预防和治疗因猪肺炎支原体感染而引发疾病的疫苗中。本发明还提供了脱辅-Mhp3的重组制备方法。

30 本发明提供了一种包含多肽和药理学可接受载体的疫苗制剂,所述多肽包括SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列或其由至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少100个连续氨基酸组成的任一片段。

在某些实施方案中，该疫苗还包括至少一种其它的免疫原性或抗原性多肽，这种其它多肽可以来源于病毒、细菌或寄生虫。在一个优选实施方案中，所述疫苗还包括至少一种多肽，该多肽选自猪肺炎支原体 P46、P65、P97 和 P102 蛋白及其片段、变体和衍生物。

5 本发明提供了一种包含抗原性或免疫原性的多肽和药物学可接受载体的疫苗制剂，所述多肽包括对应于 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或其衍生物、变体或片段。在优选的实施方案中，所述抗原性或免疫原性多肽以硫氧还融合蛋白的形式表达，优选通过克隆到表达载体 pBAD/硫-TOPO，并用大肠杆菌 BL21 菌株制备而成。在一个特别优选的实施方案中，所述疫苗还包括至少一种多肽，该多肽选自猪肺炎支原体 P46、
10 P65、P97 和 P102 蛋白及其片段、变体和衍生物。

本发明提供了治疗和预防动物因猪肺炎支原体感染引发的疾病或症状的方法，该方法包括向受试者施用足以增强猪肺炎支原体特异性细胞或体液应答的量的疫苗制剂，所述疫苗制剂包括抗原性或免疫原性多肽和药物学可接受载体，所述多肽包括对应于 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或其任一脱辅衍生物、变体或片段。在一个优选实施方案中，
15 所述氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。在另一优选实施方案中，所述动物是猪。

本发明还提供了用于检测猪肺炎支原体的试剂盒。在一个实施方案中，所述试剂盒提供了用于检测抗猪肺炎支原体 Mhp3 蛋白质的循环抗体的试剂。在另一实施方案中，所述试剂盒提供了用于通过聚合酶链反应 (PCR) 或杂交方法检测猪肺炎支原体核酸的试剂。

附图简述

图1是猪肺炎支原体的 Mhp3 (SEQ ID NO:2) 与 Ag234-5 (SEQ ID
25 NO:41) 之间的群集 (Clustal) W (1.7) 序列排布，Ag234-5 最初被认为分离自精氨酸支原体但后来表明出自猪鼻支原体。相同的氨基酸用星号 (*) 表示，高度保守取代用冒号 (:) 表示，保守取代用句点 (.) 表示。总之，这两种蛋白之间的氨基酸同一性百分率为 36.2%。

FIG. 2 的 Western 印迹实验结果表明取自猪肺炎支原体实验攻
30 击后的猪的抗体与提取自猪肺炎支原体、猪鼻支原体或革状支原体的蛋白质提取物，或者与纯化后的重组 Mhp3 之间的反应性。

位于种名之前的缩写M.代表支原体属。

术语“重组 mhp3”是指编码以通用遗传密码编码Mhp3 抗原的核酸。“M. hyopneumoniae mhp3 ”是指以猪肺炎支原体密码编码Mhp3 抗原的核酸。在猪肺炎支原体中，密码子TGA 对应的是一个色氨酸残基而并非翻译终止密码子。因此，重组mhp3 基因与M. hyopneumoniae mhp3 不同之处在于用TGG密码子代替了TGA密码子。

术语“Mhp3”是指由mhp3基因编码的蛋白质。

术语 脱辅蛋白质是指通过例如缺失或突变作为所述脂质组成成份受体起作用的氨基酸而除去了脂质组成成份的蛋白质。

10 术语“ORF”是指“开放阅读框”，即基因的编码区域。

核酸及多肽的“序列同一性百分率”是通过在一个对比窗口中对两个最佳排列的序列进行比较的测定结果，其中所述的最佳排列能提供最高级别的匹配并可向测试或参照序列导入添加或缺失。同一性百分率是通过计算测试序列与参照序列在给定位置上相同氨基酸所占的百分比得出的。最佳序列排列及同一性百分率也可以手工测定，或者更优选用电脑算法，包括但不限于TBLASTN, BIA' STP. FASTA, TFASTA, GAP, BESTFIT, 和 CLUSTALW (Altschul et al., 1990, 分子生物学杂志215(3):403~10; Pearson and Lipman 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444 - 8; Thompson, et al, 1994, 核酸研究 22(22)4873 - 80; Devereux et al., 1984, 核酸研究 12:387-395); Higgins, et al, 1996, 酶学方法266:383 - 402)。优选使用设定了默认参数 (default parameters) 的 NCBI Blast 服务器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 来测定序列同一性百分率。

25 当用于描述启动子时，异源性一词是指该启动子对其所控制表达的开放阅读框而言并非是天然的。

术语“分离的蛋白质”是指蛋白质组合物，其中经过分离的蛋白质所占重量比至少为50%。更优选所述组合物包括约95%，最优选包括99%重量百分比的分离的蛋白质。

30 术语“以可溶形式回收”是指从表达了蛋白质或多肽的细胞的胞质中回收所述的蛋白质或多肽。

术语“以不溶形式回收”是指表达了蛋白或多肽的细胞中的包涵体内回收所述的蛋白质或多肽。

本文使用的术语“功能等同物”是指能够被特异于Mhp3的抗体识别的蛋白质，该蛋白质能够激发产生与内源性Mhp3蛋白基本类似的免疫应答。因此，针对功能等同物的蛋白质的抗体也可以识别Mhp3。

5 术语“免疫原性”是指蛋白质或多肽能够激发产生特异性地针对该蛋白或多肽的免疫应答能力。

“抗原性”一词是指蛋白质或多肽能够与抗该蛋白质或多肽的抗体免疫特异性结合的能力。

本文就疫苗而使用的“保护”一词是指所述疫苗能够防止或减缓某种生物引发疾病的症状，所述疫苗中的抗原就出自该生物。

10 本文使用的“抗体”一词是指能够结合抗原的免疫球蛋白分子。抗体可以是多克隆混合物或单克隆抗体。抗体可以是取自天然或重组来源的完整免疫球蛋白，也可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体可以多种形式存在，包括，例如，Fv, Fab', F(ab')₂以及单链抗体。另外还可使用将编码重链和轻链的基因结合成单个编码序列表达而

15 达而成的单链抗体。

术语“有效量”是指mhp3核苷酸或Mhp3多肽的量足以在其所施用的受试者体内激发产生免疫应答。所述免疫应答可以包括但不限于，细胞和/或体液免疫的诱导。

20 术语“治疗或预防猪肺炎支原体感染”是指抑制猪肺炎支原体的复制，抑制猪肺炎支原体的传播，或者防止猪肺炎支原体在其宿主体内定居，以及减轻猪肺炎支原体感染引发疾病的症状。如果细菌荷载量减少、肺部感染减轻和/或摄食量和/或体重增加，那么就可以认为所述的治疗达到了治疗效果。

25 术语“药理学上可接受的载体”是指载体介质不会干扰活性组分的生物活性的疗效，所述载体介质是化学惰性的，并且不会对其所施用的受试者产生毒害作用。

术语“治疗剂”是指有助于治疗细菌感染或其引发疾病的任何分子、化合物或治疗物，优选其为抗菌剂。

30 如本文所述，本发明人已发现并鉴定了一种编码Mhp3的猪肺炎支原体基因，据信Mhp3通过共价连接到该蛋白上的脂质链与猪肺炎支原体的质膜相连。本发明提供了重组表达不含信号序列及脂质修饰必需

信号的Mhp3 蛋白的方法，该方法能高效并大量地表达Mhp3以用于抗猪肺炎支原体感染引发疾病的疫苗并治疗该疾病。

因此，本发明包括猪肺炎支原体mhp3核苷酸序列及其编码的蛋白质。本发明还包括以通用遗传密码编码这类蛋白质的核酸，该核酸适于在分别例如大肠杆菌和杆状病毒的真细菌及真核宿主中表达这种蛋白质。

本发明还包括具有下述序列的蛋白质：所述序列含有SEQ ID NO:4中的至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少100个连续氨基酸，以及以通用遗传密码编码这类蛋白质的核酸。

本发明还包括用本发明所述的蛋白质和/或抗体治疗猪肺炎支原体引发的疾病的方法。

本发明还包括包含Mhp3 蛋白的疫苗制剂。在某些实施方案中，所述疫苗制剂包括选自P46、P65、P97和P102及其片段、变体和衍生物的分离的蛋白质。

为了清楚地描述，而非限制本发明，将本发明的详述分成以下几个部分，用来描述或说明本发明的特定的特征、实施方案或应用。

mhp3核苷酸序列

本发明包括mhp3基因的核苷酸序列，并包括编码在其它种类猪肺炎支原体中发现的Mhp3种变体的核苷酸序列。本发明的一个优选实施方案包括编码氨基端截短形式的Mhp3蛋白的核苷酸序列，这种形式的Mhp3蛋白没有经共价连接脂肪酸链而修饰因此不会发生膜定位。在本发明的该优选实施方案的一个模式中，对应于Mhp3氨基端的mhp3的5'缺失包括编码Mhp3第2-29位氨基酸的核苷酸序列。在本发明的另一模式中，mhp3的5'缺失对应于前30、31-32或33-40位氨基酸的缺失。

本发明提供了一种分离或纯化的DNA或其互补物，所述DNA以支原体遗传密码编码一种具有下述氨基酸序列的蛋白质：所述氨基酸序列中包括SEQ ID NO:2中的至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少100个连续氨基酸。本发明还提供了一种其序列中包括SEQ ID NO:1中至少90个连续核苷酸的DNA或其互补物。

本发明还提供了一种以通用遗传密码编码具有下述氨基酸序列的蛋白质的DNA或其互补物：其氨基酸序列中包括SEQ ID NO:4中的至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少100个连续氨基酸。本

发明还提供了一种具有SEQ ID NO:3所示序列的DNA。

5 本发明还提供了一种包含15~40个核苷酸的片段的分离后的DNA或其互补物。该片段能在PCR的严紧条件(描述见下文)下与一种以支原体遗传密码编码具有SEQ ID NO:2中的至少5个连续氨基酸序列的蛋白质的DNA杂交。在一个优选实施方案中,所述杂交特异地针对猪肺炎支原体。本文使用的术语“与猪肺炎支原体特异性杂交”是指与猪肺炎支原体基因组选择性杂交而不与猪鼻支原体、絮状支原体、草状支原体等其它相关种类支原体的基因组杂交。

10 本发明还提供了一种包含至少90个核苷酸片段的分离的DNA或其互补物,所述片段能在滤膜杂交的高度严紧条件下(描述见下文)与一种以支原体遗传密码编码具有SEQ ID NO:2中的至少30个连续氨基酸序列的蛋白质的DNA杂交。

15 在一个具体的实施方案中,提供了一种核酸,它能在低严紧条件下与下列核酸杂交:mhp3核酸(例如,具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5所示序列)或其互补物,编码mhp3衍生物或类似物的核酸或其互补物。例如但不限于,使用下列这类低严紧条件进行多于90个核苷酸的区域杂交的方法(参见Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 678~792)。将含有DNA的滤膜在含有
20 下述物质的溶液中40℃预处理6小时: 35%甲酰胺、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA和500 ug/ml变性鲑精DNA。用同种溶液进行杂交,对溶液仅作如下变动: 0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA, 100 ug/ml变性鲑精DNA、10% (wt/vol) 葡聚糖硫酸酯,并使用5~20 × 10⁷ cpm ³²P标记的探针。将滤膜在杂交混合物中40℃保温18~20小时,然后用含2X SSC、
25 25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA和0.1% SDS的溶液55℃洗涤1.5小时。用新鲜溶液替换洗涤液,60℃下继续保温1.5小时。吸干滤膜并进行放射自显影。如有必要,在65~68℃下第三次洗涤滤膜并用胶片再次显影。其它可以用的低严紧条件是本领域技术人员众所周知的(例如,种间交叉杂交)。

30 另一个具体的实施方案中,提供了一种能在高度严紧条件下与mhp3核酸或其互补片段杂交的核酸。例如但不限于,使用下列这类高度严紧条件进行多于90个核苷酸的区域杂交的方法。将含有DNA的滤膜在由

下述物质组成的缓冲液中65℃预杂交8小时至过夜：6X SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA和500 ug/ml变性鲑精DNA。将滤膜在含有100 ug/ml变性鲑精DNA和5~20 x 10⁷ cpm ³²P标记探针的预杂交混合物中65℃杂交48小时。

5 37℃下，在含有2X SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll和0.01% BSA的溶液中洗涤滤膜1小时。接下来，在进行放射自显影之前用0.1X SSC 50℃下再洗涤45分钟。

其它高度严紧条件的选用取决于核酸的特性（例如，长度、GC含量等）以及杂交的目的（检测、扩增等），这些条件都是本领域众所周知的。例如，聚合酶链反应（PCR）中，一段约15~40个碱基的寡核苷酸与互补序列之间严紧杂交是在下述条件下进行的：盐浓度为50 mM KCl、缓冲液浓度为10 mM Tris-HCl、Mg²⁺浓度为1.5 mM、pH值为7-7.5以及退火温度为55~60℃。

15 另一个具体实施方案中，提供了一种能在中等严紧条件下与mhp3核酸或其互补片段杂交的核酸。这类严紧条件的选定是本领域技术人员所熟知的（参见，例如，Sambrook et al., 1989, 分子克隆-实验室手册，第2版冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约，参见，Ausubel et al., eds., 分子生物是最新方法，实验室技术手册系列©1987-1997, 最新方法© 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.）。

20 另外还提供了编码mhp3-所编码蛋白质的衍生物及类似物的核酸，以及mhp3的反义核酸。从本发明中很容易看出“编码mhp3-所编码蛋白质的片段或部分的核酸”应当被理解成是指这样一种连续序列的核酸，它只编码mhp3所编码蛋白质的所指片段或部分而不编码该蛋白质中的其它邻接部分。

25 在一个优选的特定具体方案中，杂交后，按下述条件洗涤。在45℃下用下述溶液将所有膜洗涤2次：40 mM 磷酸钠、pH 7.2、5% SDS、1mM EDTA、0.5% 牛血清白蛋白，每次30分钟，然后用磷酸钠、pH 7.2、1% SDS、1 mM EDTA洗涤4次，每次30分钟，然后将各个膜分别在下述的低、中等、或高度严紧的杂交条件下进行不同处理。就低严紧杂交条件而言，不再洗涤膜。就中等严紧杂交条件而言，接着在55℃下再用40 mM磷酸钠、pH 7.2、1% SDS、1 mM EDTA将膜洗涤4次，每次30分钟。就高度严紧杂交条件而言，接着在55℃下再用40 mM磷酸钠、pH

7.2、1% SDS、1 mM EDTA将膜洗涤4次，每次30分钟，然后在65℃下用磷酸钠、pH 7.2、1% SDS、1 mM EDTA洗涤4次，每次30分钟。

mhp3编码的蛋白质及多肽

5 本发明提供了重组的Mhp3蛋白。在一个实施方案中，该蛋白质的氨基酸序列中包括SEQ ID NO:4中的至少10、至少20、至少30、至少40、至少50或至少100个连续氨基酸并且不与脂肪酸组成成份共价连接。另一个实施方案中，所述蛋白质是一种分离的蛋白质。本发明还提供了包括这类Mhp3蛋白的组合物。在某些具体的实施方案中，所述组合物包括Mhp3蛋白和药物学上可接受的载体，或者Mhp3蛋白和佐剂。在另一个具体实施方案中，所述组合物包括至少一种其它种类的猪肺炎支原体蛋白质，例如但不限于，P46、P65、P97或P102。在其它实施方案中，所述组合物包括Mhp3蛋白和至少一种其它免疫原性或抗原性多肽，这种免疫原性或抗原性多肽不是猪肺炎支原体多肽并且优选是一种病毒、细菌或寄生虫多肽。这样的组合物适于用作联合疫苗。

15 另外，本发明所述的用于疫苗制品的Mhp3蛋白基本上是纯的或均质的。可以使用本领域技术人员熟知的方法测定蛋白质纯度或均一性，例如，首先对样品进行聚丙烯酰胺电泳，接着观察染色凝胶上的单个多肽条带。可以用HPLC或其它本领域熟知的方法进行高分辨率测定。

20 本发明包括典型地从表达编码这些蛋白质的重组核苷酸序列的宿主细胞中纯化出来的多肽。这种蛋白质纯化可以通过本领域熟知的众多方法来实现。在一个实施方案中，本发明所述的Mhp3蛋白以融合蛋白的形式表达，例如与硫氧还蛋白融合。得到的重组融合蛋白可以用亲和层析的方法纯化。在该实施方案的一个模式中，将所述的Mhp3蛋白与异源组成成份切割开来产生基本上纯化的Mhp3蛋白样品。其它方法也可以使用，例如，文献“酶学方法”，1990，Academic Press, Inc., San Diego, “蛋白质纯化：原理及方法”1982，Springer-Verlag, New York中描述的技术。

表达系统

30 本发明包括的表达系统既有原核表达载体也有真核表达载体，它们都可以用来表达mhp3蛋白的截短及全长形式。

在本发明的一个优选实施方案中，所述核酸具有SEQ ID NO:3所示的序列并编码SEQ ID NO:4所示的蛋白质，所述蛋白质包括SEQ ID NO:2

中的第30~444位残基。猪肺炎支原体中的TGA密码子已变为TGG密码子。

5 可以用多种的宿主表达载体系统来表达本发明所述的抗原性蛋白质序列。这类表达宿主系统可以是目的编码序列可以从中产生并随后纯化的载体，也可以是用合适的核苷酸编码序列转化或转染时能够在原位展示出本发明的mhp3 基因产物的细胞。这些包括但不限于微生物，例如用含有mhp3编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌（例如，大肠杆菌、枯草芽胞杆菌）；用含有mhp3基因产物编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母（例如，糖酵母、10 毕赤氏酵母）；用含有mhp3编码序列的重组病毒表达载体（例如杆状病毒）转染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）转染或用含有mhp3编码序列的重组质粒表达载体（例如，Ti质粒）转化的植物细胞系统；或者用含有取自哺乳动物细胞基因组的启动子（例如金属硫蛋白启动子）或哺乳动物15 病毒启动子（如腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子）的重组表达构建体转化的哺乳动物细胞系统（例如，COS、CHO、BHK、293、3T3）。

在一个优选实施方案中，所述表达载体是细菌系统。可以根据所表达mhp3产物的预期用途从大量表达载体中优先选择。例如，当为了20 制备Mhp3药物组合物或生产抗Mhp3抗体而需要制备大量这种蛋白质时，期望使用的载体能介导易纯化的融合蛋白产物高水平表达。优选地，所述载体含有能够介导可诱导的基因表达的启动子。合适的载体包括但不限于，大肠杆菌表达载体pUR278 (Ruther et al., 1983. EMBO J. 2:1791)，其中可将mhp3 编码序列单独连接到载体中的lac Z 编码区域的阅读框中从而生产出融合蛋白；pIN 载体(Inouye & Inouye, 25 1985, 核酸研究, 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989. 生物化学杂志264:5503-5509); pET 载体(Studier and Moffatt 1986, 分子生物学杂志189:113; Rosenberg et al., 1987. 基因 56:125-135; 载体可得自Novagen, Madison, Wisconsin), 其中mhp3 编码序列与多聚(如六聚)组氨酸残基编码序列框内融合; pBAD 载体 (Guzman et 30 al., 1995, 细菌学杂志171:4121-4130), 使用该载体可以使Mhp3的表达置于阿拉伯糖诱导型启动子的调控之下。也可以使用PGEX 载体(Promega 公司) 将外源多肽与谷胱甘肽S-转移酶(GST)表达成融合蛋

白的形式。通常，这类融合蛋白是可溶性的，并且可以通过下述操作很容易地从裂解细胞中纯化出来：吸附至谷胱甘肽-琼脂糖珠上，然后在游离的谷胱甘肽存在下洗脱。PGEX 载体被设计成包括凝血酶或Xa因子蛋白酶切割位点以确保克隆的靶基因产物能够同GST 组成成份分开。可以将mhp3 序列克隆到 λ 表达载体中并在 λ^{-} 菌株中表达。在该实施方案的优选模式中，所述菌株是LW14，其含有温敏 λ 阻遏物，从而使 λ 载体的蛋白质表达在30℃下被抑制而在42℃下被活化。在一个更优选的实施方案中，所述载体Mhp3 被表达为硫氧还蛋白融合蛋白，这样促使通常为不溶性的蛋白质溶解。优选地，硫氧还蛋白-Mhp3 融合蛋白通过将Mhp3 编码序列连接到pBAD 载体pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)中来表达。在一个更优选的实施方案中，用大肠杆菌菌株BL21表达硫氧还蛋白-Mhp3 融合蛋白。其它载体也可使用并为本领域技术人员所熟知。

Mhp3 抗体

15 根据本发明，可以使用mhp3-编码的蛋白质及其衍生物和类似物作为免疫原制备能与这种免疫原免疫特异性结合的抗体。

本领域已知的各种方法都可以用来制备抗Mhp3的多克隆抗体。就制备抗体而言，可以通过注射天然Mhp3蛋白或其合成形式或其衍生物来免疫各种宿主动物，包括但不限于，兔、小鼠、大鼠等。可以根据宿主动物的不同，选用各种佐剂(例如，那些用于制备疫苗的佐剂)增强免疫应答。

就制备抗mhp3-编码的蛋白质序列或其类似物的单克隆抗体而言，任何一项能够用于连续传代细胞系组织培养方法制备抗体分子的技术都可以使用。例如，Kohler和Milstein首创的杂交瘤技术，(Kohler and Milstein 1975, 自然256:49-97)，以及trioma 技术，人B-细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., 1983, 今日免疫学4:72)，以及制备人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术 (Cole et al., 1985. in 单克隆抗体和癌症方法, Alan R. Lisa, Inc., pp.77-96)。在本发明的另一实施方案中，可以用最新技术(参见，例如，PCT/US902545)在无菌动物中制备单克隆抗体。根据本发明，人抗体可以使用，而且可以通过使用人杂交瘤，(Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030) 或者通过用EBV病毒体外转化人B细胞 (Cole et al.,

1985, in 单克隆抗体和癌症疗法, Alan R. Liss, pp. 77-96) 制备而成。实际上, 根据本发明, 也可以使用制备“嵌合抗体”的技术 (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, 自然312:604-608; Takeda et al., 1985, 自然314:452-454), 该技术具体操作是将取自抗mhp3编码蛋白质的小鼠抗体分子的基因与取自具有合适生物活性的人源抗体分子的基因剪接起来; 这类抗体也在本发明的范围之内。

根据本发明, 可以将制备单链抗体的技术 (US4, 946, 778) 改进后用于制备mhp3 基因产物-特异性的单链抗体。本发明另一实施方案使用构建Fab' 表达文库的技术 (Huse et al., 1989, 科学246:1275-1281), 可以快速容易地鉴定出期望的特异性针对mhp3 编码蛋白质或其衍生物或其类似物的单克隆Fab片段。

可以用已知方法制备出含有独特型分子的抗体片段。例如, 这类片段包括但不限于, 经胃蛋白酶消化抗体分子得到的F(ab')₂片段, 通过还原F(ab')₂片段中的二硫键得到的Fab' 片段, 通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子得到的Fab片段, 以及Fv片段。

在抗体制备中, 可以通过本领域已知技术 (例如, 酶联免疫吸附测定或ELISA) 来实现目的抗体的筛选。例如, 为了筛选能够识别mhp3编码蛋白质的一个特定结构域的抗体, 技术人员可以对得到的杂交瘤进行测试, 从中筛选出能够与含这类结构域的Mhp3片段结合的产物。为了筛选出只特异性结合第一种Mhp3 同系物而不能特异结合另一种不同的Mhp3同系物的抗体, 技术人员可以根据只同第一种Mhp3同系物结合而不结合其它Mhp3同系物的结果, 完成筛选。

本发明还提供了特异性针对mhp3编码蛋白质的一个结构域的抗体。另外还提供了特异性针对mhp3编码蛋白质的一个表位的抗体。

上述抗体可以用于本领域中与本发明所述的mhp3编码的蛋白质序列的定位及活性有关的已知方法中, 例如, 测定其在合适生理样品、诊断方法、免疫治疗等实验中的水平。

mhp3试剂盒

本发明还提供了用于检测猪肺炎支原体的试剂盒。在一个实施方案中, 所述试剂盒提供了用于检测抗猪肺炎支原体Mhp3蛋白的循环抗体的试剂。在某些实施方案中, 所述试剂盒包括一份说明该试剂盒可

用于诊断猪肺炎支原体感染的说明书。所述试剂盒中至少包括一个其中盛有一种蛋白质的容器，该蛋白质的氨基酸序列中包含SEQ ID NO:4所示序列中的至少30个连续的氨基酸。在该实施方案的一个模式中，所述试剂盒还包括一种抗-猪的第二抗体。在该实施方案的一个优选模式中，所述第二抗体偶联到一种能够催化显色反应的酶上，例如，偶联到碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶上。在该实施方案的另一模式中，所述试剂盒还包括用于显色反应的试剂。

在另一个实施方案中，所述试剂盒提供了用于检测猪肺炎支原体核酸的试剂。在该实施方案的一个模式中，所述试剂盒提供了用于PCR检测猪肺炎支原体核酸的试剂，并且该试剂盒中包括至少一个其中盛有第一种分离的DNA以及第二种分离的DNA的容器，所述第一种分离的DNA包含至少15个核苷酸的片段，这些片段能在严紧条件下与以支原体遗传密码编码序列中包含SEQ ID NO:2中的至少5个连续氨基酸的蛋白质的DNA杂交，所述第二种分离的DNA包含至少15个核苷酸的片段，这些片段能在严紧条件下与以支原体遗传密码编码序列中包含SEQ ID NO:2中的至少5个连续氨基酸的蛋白质的DNA的互补DNA杂交。在该实施方案的另一模式中，所述试剂盒提供了用于以杂交为基础检测猪肺炎支原体基因组的方法中所使用的试剂，并且该试剂盒中包括至少一个其中盛有一种分离的DNA的容器，所述DNA包含至少15个核苷酸的片段，该片段能在严紧条件下与：以支原体遗传密码编码序列中包含SEQ ID NO:2中的至少5个连续氨基酸的蛋白质的DNA或其互补序列杂交，其中所述杂交特异性地针对猪肺炎支原体。本文使用的术语“与猪肺炎支原体特异性杂交”是指与猪肺炎支原体基因组选择性杂交而不与猪鼻支原体、絮状支原体、蕈状支原体等其它相关种类支原体的基因组杂交。

疫苗制剂以及使用方法

由于本发明所述Mhp3蛋白抗原能够大规模生产，所以这样制备并纯化而成的抗原可以用于生产疫苗制剂。所述Mhp3蛋白还可以用于免疫分析，例如，检测或测量取自免疫后或潜在感染的实验动物的体液样品中的抗该抗原的抗体，从而监测免疫应答和/或诊断动物感染。

含有以免疫原性多肽作活性成分的疫苗制剂的制备是本领域技术人员众所周知的。

疫苗效果的测定

用Mhp3 抗原单独或与至少一种其它多肽联合免疫后监测实验动物的免疫应答，或者使用本领域已知的任一免疫分析实验可测定Mhp3抗原的免疫能力。在一个优选实施方案中，所述的其它多肽选自猪肺炎支原体P46、P65、P97 和P102 蛋白质。可以将体液（抗体）应答和/或细胞介导的免疫力的产生视为免疫应答的指征。

该疫苗的接种方法包括口服、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内或其它任一种常用的免疫途径。受试者免疫应答也可以用下述的多种方法来分析：用已知技术分析得到的免疫血清与Mhp3抗原的反应能力，所述技术如酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫印迹、放射性免疫沉淀等，或者当Mhp3抗原能展示抗原性或免疫原性时，通过保护免疫宿主不受猪肺炎支原体感染和/或减轻免疫宿主因猪肺炎支原体感染所引发的症状来分析免疫应答。

疫苗制剂

本发明所述疫苗包含重组Mhp3和/或其片段、变体及衍生物。在某些实施方案中，本发明所述疫苗中含有Mhp3以及至少一种其它抗原性猪肺炎支原体多肽。适合与Mhp3联合使用的抗原性多肽包括但不限于P46、P65、P97 和P102 蛋白质和/或所述多肽的片段、变体及衍生物。所述疫苗中的非Mhp3多肽，例如P46、P65、P97 和P102 蛋白和/或其片段、变体及衍生物可以从猪肺炎支原体培养物中纯化而来，或以重组表达方法得到。

所述疫苗的合适制剂还包括可注射的液体溶液或悬浮液；也可以制备成在注射前溶于或悬浮于液体中的固体形式。也可以制成乳化剂。通常，将所述的活性成分与药物学上可接受并能与该活性成分匹配的佐剂相混合。

有效佐剂的实例包括，但不限于：氢氧化铝、N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺（thr-MDP）、N-乙酰-去甲（nor）-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1'-2'-棕榈酰-顺（sn）-甘油基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺。

佐剂的效果可以通过下述手段来测定：测量抗含Mhp3多肽表位的免疫原性多肽的抗体的诱导量，测量接种含这种多肽并同时还含有各种佐剂的疫苗后抗体的生成量。

可以将所述多肽配制成中性或盐类的疫苗形式。药物学上可接受的盐类包括酸加成盐（所述肽游离氨基端形成的）以及与无机酸形成的盐，所述无机酸如，盐酸或磷酸等无机酸，或者与乙酸、草酸、酒石酸、马来酸等有机酸。由游离的羧基形成的盐类也可以衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、或氢氧化三铁等无机碱，以及异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等有机碱。

可以使用多种方法将本发明所述疫苗制剂引入体内；这些方法包括但不限于口服、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内途径以及通过划痕（划破皮肤表层，例如用一叉状针）。

10 所述的接种疫苗的受试者优选是一种动物，最优选是猪。

本发明所述的疫苗制剂含有免疫有效量的Mhp3蛋白和药物学上可接受的载体。疫苗制剂包含免疫有效量的一种或多种抗原以及药物学上可接受的载体。本领域所熟知的药物学上可接受的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、无菌的等渗含水缓冲液及其组合。这种可接受载体的一个实例是含有一种或多种稳定剂的生理平衡培养基，所述稳定剂如稳定的水解蛋白、乳糖等。优选该载体是无菌的。制剂形式应该适合所述的接种方式。

20 在一个具体的实施方案中，在第一个容器中提供了一种冻干的本发明所述的Mhp3多肽；第二个容器中包含由50%甘油水溶液、0.25%苯酚、以及一种防腐剂（例如，0.005%亮绿）组成的稀释剂。

可以用标准方法将纯化后的抗原用于疫苗制剂。例如，应该将所述纯化蛋白质调整到一合适的浓度，配以任一合适的疫苗佐剂并包装，备用。合适的疫苗佐剂包括，但不限于：矿物凝胶，例如氢氧化铝；表面活性剂，例如溶血卵磷脂；糖甙，例如Quill A等皂角甙衍生物；多聚醇；聚阴离子；非离子嵌段多聚物，例如多聚醇（Pluronic F-I 27）（BA. S. F., USA）；肽；矿物油，例如Montanide ISA-SO（Seppic, Paris, France），油类乳状液（oil emulsions），例如BayolF/Arlacel A和水等矿物油乳状液，或者一种由植物油、水和乳化剂如卵磷脂组成的油乳状液；明矾，以及MDP。也可以将所述免疫原引入到脂质体中，或者偶联到多糖和/或其它可用于疫苗制剂的聚合物上。当重组抗原是一种半抗原，即具有抗原性因而能与相关抗体选择性反应，但不具有免疫原性因而不能激发免疫应答的分子时，可以将所述半抗原共价偶联

到一种载体或免疫原性分子上；例如，血清白蛋白等大分子蛋白可赋予与其偶联的半抗原免疫原性。可以配制所述半抗原-载体用作疫苗。

本发明所述疫苗的有效剂量(免疫量)可以从根据模式实验系统绘制的剂量-反应曲线中推算出来。

5 本发明还提供了一种含有一个或多个容器的药用包装或试剂盒，这些容器中装有本发明所述疫苗制剂中的一种或多种成分。

因此，本发明提供了一种免疫动物或者治疗或预防动物的各种疾病或症状的方法，该方法包括向该动物施用有效免疫剂量的本发明所述疫苗。

10 用本发明所述疫苗生产的抗体的用途

用本发明所述Mhp3蛋白免疫生产的抗所述抗原的抗体还在诊断免疫分析、被动免疫治疗以及抗独特性抗体制备等方面具有潜在用途。

可以用本领域已知技术(例如，免疫亲和层析、离心、沉淀等)分离生产到的抗体并将其用于诊断免疫分析。也可以将本发明所述抗体用于监控治疗和/或疾病进程。任一本领域已知的免疫分析系统，例如
15 上述的免疫分析系统都可以用于这项用途，这些系统包括但不限于使用下述技术的竞争性或非竞争性分析系统：所述技术如放射性免疫分析、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集试验、补体-固定试验、免疫放射分析、荧光免疫测定、蛋白A免疫测定和免疫电泳试验，等。

20 本发明所述疫苗制剂也可以用于制备可用于被动免疫疗法的抗体，其中通过施用预先制备的抗异源生物的抗体可以为宿主提供短期保护。

在免疫方法中，所用免疫原的量以及免疫方案可由本领域技术人员
25 来确定，并可根据受试者的免疫应答及抗体滴度来测定。

包装

如果需要，可以将所述组合物置于一包装或分装装置，该包装或分装装置包括一个或多个含活性成分的单位剂量形式。所述包装可以例如包括金属或塑料箔、例如泡沫包装。所述包装或分装装置可以配
30 有给药说明。还可以制备组合物，并将其置于一合适容器中，而且标示治疗适应症，上述组合物包括一种置于可接受药用载体中的本发明所述化合物。

实施例

猪肺炎支原体染色体DNA的分离

采用Dybvig 和Alderete (质粒. 20:33-41; 1985)的方法, 从猪肺炎支原体基因组中分离基因组DNA, 其中离心(10 min. 、6000g 、
5 4℃)收获细胞, 然后悬浮于磷酸盐缓冲液中, 加入0.1体积的10%十二烷基硫酸钠裂解。用经Tris-HCl饱和后的苯酚、氯仿及异戊醇(25:24:1)混合物抽提裂解物。用氯仿提取水相, 加入0.1体积的3M乙酸钠和2体积的冰冷乙醇沉淀核酸。-20℃保温1小时, 用微量离心机离心10分钟回收核酸。将核酸重悬于加入了20 μg RNase A/ml的水中,
10 所得样品保存于-20℃。

猪肺炎支原体mhp3的分子克隆

根据此前鉴定的Mhp3的部分氨基酸序列(SEQ ID NOs:7-9), 设计并合成了(Genosys Biotechnologies, Inc.; The Woodlands, TX)简并的寡核苷酸引物KWK40、KWK41、KWK42、KWK43、KWK42RC和KWK43RC
15 (SEQ ID NOs:10-15) (国际专利申请WO 96/28472)。在含有1x PCR 缓冲液 (Perkin Elmer; Foster City, CA)、2.0 mM MgCl₂、1 mM各种引物、400 μM各种脱氧NTP 以及2.5 U AmpliTaq Gold (Perkin Elmer)的50 μl反应溶液中用各种组合的上述引物进行聚合酶链反应(PCR)。扩增条件为: 94℃变性2分钟, 接着进行变性 (94℃、1min)、退火(56
20 ℃、1min)和聚合(72℃, 1min)共25个循环。使用引物KWK41 (SEQ ID NO:11)和 KWK42RC (SEQ ID NO:14), 用410 ng的猪肺炎支原体232菌株(传代次数 n=5)的染色体DNA扩增出长约250 bp 的片段。将该片段亚克隆到pCR2.1-TOPO(Invitrogen; Carlsbad, CA)的TA克隆位点中; 用连接产物转化大肠杆菌TOP10细胞(Invitrogen)。用双脱氧核苷酸
25 链终止测序 (Advanced Genetic Analysis Center; St. Paul, MN) 以及限制性内切酶消化后接琼脂糖凝胶电泳的方法, 对克隆进行鉴定。

反向PCR是一种用于扩增DNA核心区域的侧翼序列的方法 (Ochman, H., Medhora, M.M., Garza, D., and Harti, D.L. 1990. In "PCR法: 方法及应用指南" Academic Press, San Diego, CA) 。用该方法克
30 隆Mhp3编码基因的残留5' 和3' 末端。猪肺炎支原体232菌株 (传代次数 n=5)染色体DNA片段的库 (Pools) 通过仅用下列限制性内切酶消化未切割DNA便可制备而成: AluI, BamHI, EcoRV, EcoRI, HaeIII,

HincII, HindIII, NdeI, PvuII, Sau3AI, SpeI, SspI, XbaI. 消化后, 通过连接环化这些片段, 并用寡核苷酸引物RAC3 (SEQ ID NO:16) 和RAC4 (SEQ ID NO:17) 进行PCR反应, 这两个引物是根据上述250 bp 片段的序列设计而成. 这些引物的扩增条件为: 94℃变性2分钟, 接着进行
5 变性 (94℃、 1min)、退火 (55℃、 1min) 和聚合 (72℃, 2min) 共40个循环. 经SspI-消化的染色体DNA的库产生了长约600 bp 的片段, 将该片段亚克隆到PCR2.1-TOPO中. 该克隆片段的序列分析鉴定了所述基因的5' 末端. 为了得到mhp3 3' 末端的相应序列, 根据这一序列设计寡核苷酸引物RAC7 (SEQ ID NO:18) 和RAC8 (SEQ ID NO:19) .
10 这些引物的扩增条件为: 94℃变性9分钟, 接着进行变性 (94℃、 30秒)、退火 (50℃、 30秒) 和聚合 (72℃, 1分钟) 共40个循环. 当用SpeI-消化的 DNA 库用作模板时, 扩增出多种产物 (从250 bp到大于1 kb); 将得到的片段混合物克隆到PCR2.1-TOPO中. 最大克隆片段 (约1.2Kb) 的序列分析提供了另外的3'序列数据. 从这些数据中设计并合成出了
15 寡核苷酸RAC12 (SEQ ID NO:20) 和 RAC15 (SEQ ID NO:23), 这两引物可用于以HindIII-消化的DNA库作模板的PCR扩增反应中. 反应参数为: 94℃ 变性9分钟, 接着进行变性 (94℃、 30秒)、退火 (55℃、 30秒) 和聚合 (72℃, 2min) 共40个循环, 最后于72℃继续聚合2分钟. 扩增到一长约600 bp的片段, 克隆到pCR2.1-TOPO中并测序. 得到的数
20 据提供了Mhp3编码序列的其余3'序列. 用HincII消化的DNA库作模板进一步用RAC12 (SEQ ID NO:20) 和RAC15 (SEQ ID NO:23) 进行PCR扩增. 扩增条件为: 94℃变性9分钟, 接着进行变性 (94℃、 1分钟)、退火 (55℃、 1分钟) 和聚合 (72℃, 3min) 共35个循环, 最后72℃继续聚合7分钟. 扩增到约700 bp片段, 将其克隆到pCR2.1-TOPO中. 对克隆片
25 段测序得到新的3' 序列数据, 包括编码所述多肽羧基端的序列数据.

用从上述初始测序中得到的结果, 设计用于特异性扩增直接来源于低传代次数 (n=4) 猪肺炎支原体232 菌株染色体DNA的mhp3基因的寡核苷酸引物. 对这些产物直接测序, 以避免因PCR扩增及后续克隆步骤中可能出现的突变而在序列中引入人为假象.

30 用位于mhp3 基因侧翼的合成寡核苷酸从染色体DNA中特异性地扩增出开放阅读框 (ORF). PCR 扩增分三份进行, 50μl样品终体积中含: 引物 Mhp3-U1 (SEQ ID NO:31) 和Mhp3-D (SEQ ID NO:33) 各1μM.

360 ng 纯化的染色体DNA、1x PCR缓冲液 (Ab Peptides, Inc; St. Louis, MO)、dNTP各 200 μ M、7.5 U KlenTaq1 (Ab Peptides, Inc) 以及 0.15 U 克隆的Pfu (Stratagene; La Jolla, CA) 热稳定性聚合酶。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性5分钟, 接着进行变性 (94 $^{\circ}$ C、30秒)、
5 退火(55 $^{\circ}$ C、30秒)和聚合(72 $^{\circ}$ C; 3分钟, 45秒)共40个循环, 最后72 $^{\circ}$ C继续延伸7分钟。扩增后, 收集三份扩增后的样品, 并通过旋转层析 (QIAquickTM PCR纯化试剂盒, Qiagen; Santa Clarita, CA)提取, 纯化到特异性产物。然后, 在ABI自动DNA测序仪 (Lark Technologies Inc., Houston, TX)上, 用双脱氧末端终止反应对收集到的混合物
10 直接测序。

用合成的寡核苷酸引物 (SEQ ID NOs:16~28, 31, 和33) 对猪肺炎支原体232菌株扩增产物的两条DNA带测序。所述 mhp3 基因的核苷酸序列以及推导的由该区域编码的Mhp3蛋白分别见SEQ ID NO:1和SEQ ID No 2。

15 由SEQ ID NO:1中第97-1452位核苷酸组成的 mhp3 ORF编码451个氨基酸的蛋白质 (SEQ ID NO: 2), 该蛋白的理论分子量为49,775 道尔顿。这种编码多肽中含有8个色氨酸残基, 其中的7个由TGA密码子编码 (mRNA中为UGA), 已知该氨基酸在许多支原体亚种 (Dybvig, K., 1990. 微生物学年评44:81-104; Yamao, F., Muto, A., Kawachi, Y., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:2306-2309) 中特异性增加。该
20 编码蛋白质的氨基末端具有特征性的原核细胞信号序列 (von Heijne, G., 1985. 分子生物学杂志184:99-105; Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G., 1997. 蛋白质工程10:1-6), 尽管切割的确切位点目前还未知。该编码蛋白质 (SEQ ID NO: 2) 第29
25 位半胱氨酸残基被认为是经下述处理修饰而成的: 添加与巯基-连结的脂肪酸使Mhp3成为脂蛋白 (Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. 1998. 微生物学和分子生物学评论62:1094-1156)。

当用Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)程序 (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. 分子生物学杂志215:403-410) 将 mhp3 ORF 与现有的核苷酸及蛋白数据库对比时, 登录显示它与精氨酸支原体的Ag 234-5蛋白质 (GenBank Accession No. D1 6674) 之间具有最大同源性。当用 CLUSTAL W
30

(Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., 1994. 核酸研究, 22:4673-4680) 排列这两多肽时, Mhp3和Ag 234-5蛋白质(图1)之间的氨基酸同一性百分率为36.2%。尽管Ag 234-5编码基因最初从精氨酸支原体中鉴定出来 (Ushio, S., Iwaki, K., Taniai, M, Ohta, T., Fukuda, S., Sugimura, K, and Kurimoto, M., 1995. 微生物学和免疫学39:395 - 400), 但是最近研究结果表明该基因实际来自猪鼻支原体 (Droesse, M., Wise, KS., 1998. Abstract E20 ~ 12th International Organisation of Mycoplasma Conference, Sydney, AU)。在那些研究中, 用PCR、Southern印迹杂交以及Western印迹分析得到的结论认为Ag 234-5在包括猪肺炎支原体在内的其它支原体中不是保守的。

使用威斯康星大学遗传学计算机小组的 STEMLoop 程序 (Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O., 1984. 核酸研究 12:387-395), 鉴定mhp 3 ORF的下游序列, 具体为SEQ ID NO: 1中的第1519-1550位核苷酸, 这些核苷酸可以形成一茎-环结构。茎由14个碱基反向重复序列形成, 被4碱基的环间隔开来。该结构的实际存在状态及潜在功能目前还不得而知。

另一个ORF也由SEQ ID NO:5中的DNA片段编码。这个ORF存在于基因 mhp3的相反链中, 包括SEQ ID NO:1中的第602 ~ 1位核苷酸。这个预测的ORF 编码至少为200个氨基酸的蛋白质, 被称为“ORF1”并示于SEQ ID NO:6, 其理论分子量为22, 528 道尔顿。该ORF 经由所述DNA片段 (SEQ ID NO:1) 末端延续并且呈开放状态, 这一事实表明编码多肽的实际分子量可能大于22, 528 道尔顿。尽管 Mhp3 和“ORF1”编码于相反链, 但是它们之间每个密码子第三个碱基 (“摆动”位置) 是相同的。因此, “ORF 1”中的任一特定氨基酸密码子的摆动碱基都为mhp3基因中编码特定氨基酸的相反链所共有。理论上讲, 两种蛋白质的共有编码序列的独特排列能够将Mhp3和“ORF1”的密码子摆动位置上的遗传漂移影响降到最低, 从而使这两种蛋白质的保守程度最高。

质粒及保藏材料的制备

制备mhp3基因片段, 将其保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。将上述使用特异性5'及3'引物Mhp3-U1 (SEQ ID NO:31)及Mhp3-D (SEQ ID NO:33)的三份PCR反应中得到的收集混合物, 使用旋

转层析 (spin chromatography) (QIAquick™) 提取对其进行分离, 并将其插入到pCR2.1-TOPO的TA克隆位点。使用载体特异性测序引物的单一序列延伸反应确证了扩增到的1,692碱基对片段的终点, 结果表明Mhp3的编码基因与乳糖启动子的方向相反。这种质粒构建体被称为
5 pER427, 将其导入大肠杆菌 TOP10细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 得到的菌株被命名为Pz427。

mhp3 基因的定点诱变

制备用于大肠杆菌表达的Mhp3编码DNA需要对猪肺炎支原体mhp3基因进行如下修饰: 除去编码假定前导序列及脂肪酸连接位点半胱氨酸29的序列, 宁将6个TGA密码子转变为TGG密码子。用于扩增不含信号肽编码序列的基因的寡核苷酸引物被称为为RAC 23 (SEQ ID NO:29) 和 RAC 24 (SEQ ID NO:30)。扩增猪肺炎支原体基因组232菌株 (传代次数 n=5) 染色体DNA的条件为: 94℃变性9分钟, 接着进行变性 (94℃、1分钟)、退火 (50℃、1分钟) 和聚合 (72℃, 2分钟) 共25个循环,
15 最后72℃继续聚合7分钟。将扩增到的片段克隆到pCR2.1-TOPO中; 测序并限制性内切酶消化后进行凝胶电泳分析确定克隆是否成功。克隆片段5'末端序列编码起始甲硫氨酸残基, 随后是位于编码多肽第29位半胱氨酸残基后的色氨酸残基 (参见SEQ ID NO:2)。在3'端, 在序列RAC 24 (SEQ ID NO:30)的作用下无意间导入了 (SEQ ID NO:1中第1427
20 和位 1428之间) T核苷酸, 从而使野生型多肽的羧基端7个氨基酸Ile-Thr-Asp-Ile-Asn-Lys-Asn (SEQ ID NO:2)被序列 Asn-Tyr-Arg-Tyr所取代。寡核苷酸RAC 23 (SEQ ID NO:29) 及 RAC 24 (SEQ ID NO:30) 在近5'端分别含有限制性位点NdeI和xbaI, 这样可将所述基因克隆到不同质粒中。另外, 在各引物5'端添加了附加核苷酸 (RAC 23 (SEQ ID
25 NO:29)为6个; RAC 24 (SEQ ID NO:30)为7个) 这样有助于各自限制酶的切割。

编码信号肽的序列一旦被除去, 6个内在的TGA 密码子便保留于基因中。为了确保全长多肽在大肠杆菌中的表达, 通过体外寡核苷酸定点诱变将这些密码子转化为TGG 密码子。将质粒pCR2.1-TOPO:mhp3
30 转化入大肠杆菌CJ236菌株 (dut⁻ ung⁻)。向含有质粒的细胞中加入辅助噬菌体 R408, 生产具有含尿嘧啶-单链(ss) DNA的噬菌体颗粒。分离这些颗粒, 然后提取并沉淀纯化出ssDNA。使用寡核苷酸Mhp3-2M、

Mhp3-3M、Mhp3-4M、Mhp3-5M、Mhp3-6M、Mhp3-7M(见SEQ ID NOs:35-40) 作模板以及来源于MutaGene System (BioRad Laboratories; Hercules, CA)的试剂进行诱变: . 将上述ssDNA、寡核苷酸以及退火缓冲液混合在一起, 加热到70℃, 然后在1小时内将温度降至30℃。加入T4 DNA
5 连接酶、 T7 DNA聚合酶以及合成缓冲液进行互补链的合成。将混合物在冰上放置5分钟, 然后室温放置5分钟, 然后37℃下保温30分钟。将得到的双链DNA 分子转化到DH5α超感受态(UltraComp)细胞(Gibco BRL; Gaithersburg, MD)中。增殖克隆, 通过测序筛选所需突变。所有突变(TGA>TGG)都用该方法确证。此外, 利用寡核苷酸Mhp3-2M (SEQ
10 ID NO:35)序列, 在野生型基因(SEQ ID NO:1)的第388位核苷酸处不经意地发生了A>G转变。这就导致野生型Mhp3 (SEQ ID NO:2)中第98位氨基酸残基由丝氨酸 (AGT) 变为甘氨酸 (GGT) 。

上述变化得到的重组mhp3 基因 (具有或不具有上述非故意 (Inadvertent) A>G转变)描述见SEQ ID NO:3, 所述重组 mhp3 基因
15 编码的开放阅读框见SEQ ID NO:4。

将重组mhp3基因克隆到表达载体和表达宿主菌株中

为了表达重组蛋白, 将突变后的不含信号肽编码序列的mhp3 基因 (SEQ ID NO:3)克隆到pBAD/Thio-TOPO表达质粒(Invitrogen); 将该构建体直接转化入表达宿主大肠杆菌BL21。鉴定出含有适合质粒的克
20 隆。

重组Mhp3 蛋白的表达

将表达硫氧还蛋白-Mhp3融合蛋白的大肠杆菌BL21转化子的冻存溶液融化, 并将其以1:5000 稀释度接种到RWLDM/D vi 已知成分培养基, 所述培养基中含有如下成分: K_2HPO_4 (6g/1), KH_2PO_4 (3 g/1), $(NH_4)_2SO_4$
25 (5g/1), NaCl (2 g/1), 0.2 ml $CaCl_2$ (15 g/1), 0.4 ml $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (5 g/1), 0.4 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (480 g/1), $ZnCl_2$ (6.5 g/1), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (12 g/1), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (5 g/1), $CuSO_4$ (1.5 g/1), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (2 g/1), H_3BO_3 (0.5 g/1), 以及37% HCl (5ml/1)。另外再加入羧苄青霉素至浓度为125 μ g/ml。37℃下, 在5升工作体积的BioFlow 3000发酵罐(New
30 Brunswick Scientific; Edison, N, 1)中, 采取补料分批方法 (50% 葡萄糖) 培养培养物, 直至 A_{625} 达10~20。

用离心的方法, 从上述5升发酵罐中收获表达有重组硫氧还蛋白-

Mhp3大肠杆菌BL21转化子的湿细胞，并将其重悬于磷酸盐缓冲液。机械方法裂解上述细胞。离心后，弃沉淀。将上清液流经离子交换柱，用NaCl梯度溶液洗脱。收集含融合蛋白的级分，透析除去NaCl，用0.2 μm滤器过滤除菌。将该制品用于疫苗实验。

5

重组Mhp3的免疫学特性

用BCA 蛋白分析试剂盒 (Pierce)，测定用上述方法制备的重组硫氧还蛋白-Mhp3的蛋白浓度。简要地说，每种样品用无菌的去离子蒸馏水(ddH₂O)作1/10、1/20、1/40和1/80稀释。将BSA(蛋白质标准)稀释为200~800 μg/ml的浓度。取20 μl样品或标准物以三份孔的方式加入10到96孔微量滴定板。向每孔中加入200 μl以1/50稀释于试剂A中的试剂B。将上述滴定板37℃保温30分钟。560 nm处测定样品吸光度。用BSA标准曲线通过外推法计算各样品的蛋白质浓度。

将重组Mhp3 (蛋白含量可变)以及猪肺炎支原体、猪鼻支原体和15 草状支原体草状亚种整个细菌细胞裂解物的等份试样重悬于10μl终体积，加入 10 μl 2x 还原样品缓冲液(Owl Scientific)。样品100℃加热10 min，将上述的全体积加入到10-孔，1.5 mm 厚，10% Tris-甘氨酸凝胶的独立孔中(Novex)。所述凝胶中还包括未染色的大范围分子量的标准参照物(Novex)。

在100 mA恒定电流下作用1小时，将SDS-PAGE 分离的蛋白质转移20 到PVDF膜 (Owl Scientific)。将印迹置于含5% 脱脂奶粉和0.5% Tween 20的TBS (TBST)封闭缓冲液中，室温保温1小时，同时轻柔振荡。除去封闭缓冲液，用TBST洗膜1次，5分钟。用猪肺炎支原体232菌株进行攻击试验后，从猪体内取得第一抗体。将稀释后的血清加到膜上，室温保温1小时。稀释碱性磷酸酶-偶联蛋白G抗体 (Pierce)，加到25 洗涤后的膜上，室温保温1小时。用TBST洗膜，将底物BCIP/NBT (Kirkegaard and Perry Laboratories) 加到膜上，保温至出现合适的颜色。然后用水浸膜终止反应，室温干燥。

从用猪肺炎支原体实验攻击后的猪体中得到的血清确实识别出了30 纯化后的重组表达Mhp3 (图2)，鉴定出60kDa 条带。这一结果表明所述重组蛋白表达有这样的表位，所述表位能被猪应答猪肺炎支原体全细胞攻击后体内产生的抗体所识别。

测试重组Mhp3作为候选疫苗的效果的动物实验

获取未被猪肺炎支原体免疫或没有猪肺炎支原体引发疾病史的健康杂种猪(约12 ~ 16日龄)。按随机分组方法分配动物。开始实验前,让猪有至少5天的适应新环境的时间。

5 当猪为约19~23日龄时,在第“0”天时,用1 ml 合适实验疫苗通过肌肉(IM; 颈部左侧肌肉)途径免疫动物。

第一次免疫后约2~3周时,给猪第二次接种上述合适实验疫苗,剂量为1 ml (IM; 颈部右侧肌肉)。接近观察所有的猪(1小时或指定的时间内),看其是否出现接种后的信号:呕吐、抑郁、腹泻、共济失调、呼吸急促、或颤抖。

10 第二次免疫后约2~4周时,用1 ml/鼻孔猪肺炎支原体232菌株的活的强毒性肺组织匀浆培养物攻击鼻腔,上述培养物中含约 5.0×10^8 颜色改变单元/ml (CCU/ml)。

15 攻击后约4天时,将所有攻击后的动物作尸体剖检。取肺,并对猪肺炎支原体感染导致的特征性病变作粗略评估。用图象分析测定单个肺部病变的分值。可以从每个攻击动物中获得偏性样品(bias sample),用于细菌分离(组织的CCU/g)、病理组织学及IFA。

微生物的保藏

20 在1999年9月9日,将下列微生物菌株保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, 获得下列保藏号

微生物

Pz427

保藏号

PTA-634

25 本发明不仅限于本发明所述特定实施方案的范围。实际上,本领域技术人员很容易地认识到,除本发明描述的内容外,可以从上述说明书及附图中做出各种改进。这些改进都将落入所附权利要求的范围之内。

本发明中上述的各种参考文献,包括专利申请、专利及公开出版物,在此整体引入作为参考。

SEQUENCE LISTING

<110> King et al.

<120> 猪肺炎支原体mhp 3基因的核酸和蛋白以及其应用

<130> PC10555

<140> To be assigned

<141> 1999-09-29

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1692

<212> DNA

<213> 猪肺炎支原体

<400> 1

```

gtttttgaat ataatagaaa atgtaaaata aaaattaatt tattaaaaaa taattgaaag 60
tcatcgtaat taaaacaatt aattaggaga acaactatga aaaaaaagat aaaatgaaat 120
aaatttcttg gcttaggctt agtttttccg ctttcagcaa tcgcgacaat ctctgccgga 180
tgttgggata aagaaacaac taagaagaa aaatcagccg ataatcaaaa taagcaaatc 240
actgatgtct caaaaatttc aggactagt aatgaacgaa aatccgaaat tatggccgca 300
aaagctgatg caaacaaaaca ttttgggcta aatatggcaa ttgtaaccgc tgggtggaacg 360
gtaaatgata attcatttaa ccaatcaagt tgagaggcaa ttcaacaact tggcgctctt 420
actgtaggtg agattacttc agtagatagt tcaactgtcg aacttgaagg aaaatatagc 480
tcacttgcta ataccaacaa aaatgtttga gtactttctg gttttcaaca cggtgatgcg 540
ttcacaagat gattaaaaat ccctgaaaat aagcaattat ttactgaaaa aaatattatc 600
atactcggaa ttgactgaac tgatactgaa aatgtaattc caacaggtcg atatattaat 660
ttaacctata aaactgaaga agccggatga cttgcaggat atgcgaatgc ttcctttttg 720
gcaaaaaaat tcccaagtga tccaactaaa agatcagcaa ttgttatcgg tgggtgggatt 780
tcgccagctg taactgattt tatcgtcggg tatctagccg gaattaaagc ttgaaatcta 840
aaaaattctg ataaaaaaac aaagataaca actgataaaa tcgagataaa tcttgggttt 900
gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga cttgaacaaa ttgcttcaaa agataaacct 960
tcaaacactat tagctgtcgc tggaccactt actgaaattt tctcggatat aatcgcaaac 1020
caaaatgatc gttatctcat tgggtttgac accgaccaat cacttgttta taaaaaacct 1080
aaaaataaat ttttcacctc aattttgaaa aatttaggtt actccgtttt cagcgttctt 1140
agtgatttat ataccaaaaa atcaaattca agaaatttag cgggctttga atttggtaaa 1200
aaaagtgcaa ccgtttatct tggaaataaa gacaggtttg tcgatattgc tgatacttct 1260
ttagaaggca atgataaaaa actcgcact gaagccattt ctgaagctaa aaaagaattt 1320
gaagaaaaaa ctaagacaat tctgccgaa gaagtctgta aaactttaga aattccggaa 1380
atgcctgata aacaacctga taagcaacag gaaagcttag acaactaat taccgatatt 1440
aataaaaatt aagtaagaaa aaataacaat tttttaacat tatactttt tttagagatt 1500
aattttcttc taatttagtt taatttaata taaaattata ttaaattaaa aaaataaaaa 1560
atccggacta tttttgttcc ggatttttta tttttgtgtt actatttaat ataatgataa 1620
atcaggatta tgcaattgaa tttattcaag tctcgaaaaa atttggcagt ttttatgcca 1680
attacaaaat ag
    
```

<210> 2

<211> 451

<212> PRT

<213> 猪肺炎支原体

<400> 2

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

Ile Ile Ala Asn Gln Asn Asp Arg Tyr Leu Ile Gly Val Asp Thr Asp
 305 310 315 320
 Gln Ser Leu Val Tyr Thr Lys Thr Lys Asn Lys Phe Phe Thr Ser Ile
 325 330 335
 Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Ser Val Phe Ser Val Leu Ser Asp Leu Tyr
 340 345 350
 Thr Lys Lys Ser Asn Ser Arg Asn Leu Ala Gly Phe Glu Phe Gly Lys
 355 360 365
 Lys Ser Ala Thr Val Tyr Leu Gly Ile Lys Asp Arg Phe Val Asp Ile
 370 375 380
 Ala Asp Thr Ser Leu Glu Gly Asn Asp Lys Lys Leu Ala Thr Glu Ala
 385 390 395 400
 Ile Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Lys Thr Lys Thr Ile Pro
 405 410 415
 Ala Glu Glu Val Arg Lys Thr Leu Glu Ile Pro Glu Met Pro Asp Lys
 420 425 430
 Gln Pro Asp Lys Gln Gln Glu Ser Leu Asp Lys Leu Ile Thr Asp Ile
 435 440 445
 Asn Lys Asn
 450

<210> 3
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 为体外表达而制备的mhp3

<400> 3
 atgtgggata aagaacaac taaagaagaa aaatcagccg ataatcaaaa taagcaaatc 60
 actgatgtct caaaaatttc aggactagtt aatgaacgaa aatccgaaat tatggccgca 120
 aaagctgatg caaacaaca ttttgggcta aatattggcaa ttgtaaccgc tgggtggaacg 180
 gtaaatagata attcatttaa ccaatcargt tgggaggcaa ttcaacaact tggcgctctt 240
 actggaggtg agattacttc agtagatagt tcaactgctg aacttgaagg aaaatatagc 300
 tcacttgcta ataccaacaa aaatgtttgg gtactttctg gttttcaaca cggtgatgcg 360
 ttcacaagat ggtaaaaat ccctgaaaat aagcaattat ttactgaaaa aaatattatc 420
 atactcggaa ttgactggac tgatactgaa aatgtaattc caacaggctc atataat 480
 ttaacctata aaactgaaga agccgatgg cttgcaggat atgcgaatgc ttctttttg 540
 gcaaaaaaat tccaagtga tccaactaaa agatcagcaa ttgttatcgg tgggtgggatt 600
 tcgccagctg taactgattt tatcgctggg tatctagccg gaattaaagc ttggaatcta 660
 aaaaattctg ataaaaaac aaagataaca actgataaaa tcgagataaa tcttgggttt 720
 gatgttcaag atacttcaac aaaagaaaga cttgaacaaa ttgcttcaaa agataaacct 780
 tcaacactat tagctgtcgc tggaccactt actgaaattt tctcggatat aatcgcaaac 840
 caaaatgatc gttatctcat tgggtgtgac accgaccaat cacttgttta taaaaaac 900
 aaaaataaat ttttcaectc aattttgaaa aathtaggtt actcgtttt cagcgttctt 960
 agtgatttat ataccaaaa atcaaattca agaaatttag cgggtttga atttggtaaa 1020

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 9

Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Thr Val Asn Asp Asn Lys Pro Asn Gln
1 5 10 15

Trp Val Arg Lys Tyr
20

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<220>

<221> 修饰后的碱基

<222> (9)

<223> n=a, c, g, or t

<220>

<221> 修饰后的碱基

<222> (18)

<223> n=a, c, g, or t

<220>

<221> 修饰后的碱基

<222> (21)

<223> n=a, c, g, or t

<400> 10

tgytgrgcna argaracnac naargargar

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 11

tgttgagcwa aagaaacwac waaagaagaa

30

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (6)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (9)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (11)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (18)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (21)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (24)
 <223> n=a, c, g, or t

<400> 12
 tgrgtnacng cngayggnac ngtnaay

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 13
 tgagtwacwg cwgatggwac wgtwaat

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰后的碱基

27

27

<222> (4)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (7)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (10)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (16)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (19)
 <223> n=a, c, g, or t

<220>
 <221> 修饰后的碱基
 <222> (22)
 <223> n=a, c, g, or t

<400> 14
 rttnacngtn ccertengng tnacyc 26

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 15
 attsacsqts ccatcsgcsg tsactc 26

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 16
 tttgagacat cagtgatttg c 21

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 17
 gaacgaaaat ccgaaattat gg 22

 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 18
 ctatctactg aagaatctca cc 22

 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 19
 gtgatgccgt tcacaagatg 20

 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 20
 cactaagaac gctgaaaacg g 21

 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 21
 gattacaact gtaaaatcga g 21

 <210> 22

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 22
 ggcttcttca gttttatagg 20

 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 23
 aaactcgcaa ctgaagcc 18

 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 24
 gaaatgcctg ataaacaacc 20

 <210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 25
 cttcagaaat ggcttcagtt gc 22

 <210> 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 26
 gctagataac cagcgataaa atcag 25

<210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 27
 tgcataatcc tgatttacc 19

 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 28
 tgaaagtcac cgtaattaaa ac 22

 <210> 29
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 29
 aatcggcata tgtgggataa agaaacaact aaag 34

 <210> 30
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 30
 ggagtaactct agattattaa taccggtaac taag 34

 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

 <400> 31

gtttttgaat ataatagaaa atg 23

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 32
 tttattaaaa aataattgaa agtcatcg 28

<210> 33
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 33
 ctattttgta attggcataa aaactgcc 28

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 34
 gataaaatgg aataaatttc ttgg 24

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 35
 caggttggga ggcaattcaa c 21

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 36
 caaaaatggt tgggtacttt ctgg 24

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 37
 cacaaagtgg ttaaaaatcc c 21

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 38
 ggaattgact ggactgatac tg 22

<210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 39
 gccgatggc ttgcaggata tg 22

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸

<400> 40
 taaagcttgg aatctaaaaa attc 24

<210> 41
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> 猪鼻支原体

<400> 41

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

Lys Tyr Leu Ile Gly Val Asp Thr Asp Gln Ser Lys Ile Phe Ser Pro
 305 310 315 320
 Ala Thr Val Phe Phe Thr Ser Ile Glu Lys His Leu Gly Arg Thr Ile
 325 330 335
 Tyr Gln Val Leu Thr Asp Ile Trp Leu Lys Lys Glu Asp Ser Lys Phe
 340 345 350
 Leu Gly Ser Phe Arg Ser Phe Lys Leu Thr Asn Pro Ala Asn Ala Thr
 355 360 365
 Val Tyr Lys Gly Ile Ser Asp Asp Phe Val Gly Val Ser Asn Ser Thr
 370 375 380
 Val Ala Asp Ala Asp Lys Val Lys Ala Gln Glu Phe Leu Asn Glu Ala
 385 390 395 400
 Thr Ala Asp Phe Lys Lys Gln Ile Gln Ala Asn Pro Thr Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Ser Val Leu Gly Ile Pro Thr Met Leu Ile Asn Asp Asn Asp Ala Lys
 420 425 430
 Asp Asn Glu Lys Ala Ser Leu Phe His Phe Asp Asn Trp Gln Thr Tyr
 435 440 445
 Trp Ala Phe His Ser Arg Phe Ile Asn
 450 455

说明书附图

CLUSTAL W (1.7) 多个序列对齐

```

Mhp3      MKKKIKWNKFLGLGLVFPPLSAIATISAGCWDKETTKEEKSADNQNKQITDVSKISGLVNE  60
Ag234-5   --MNFKKSLLFLTGTISTVASVATFVS-CG--ETDKEGK-----IIRIFDNSFVK--D--  46
          ::* . :: * : .:::***: : * ** ** * * : * * * * :
Mhp3      RKSEIMAAKADANKHFGLNMAIVTAGGTVNDNSFNQSSWEAIQ---QLGALTGGEITSV  116
Ag234-5   RQ-----AEIEKAKNDFNFVLLTAGGTVQDKSFNQSIWEAVLEHYDQIEKTTNLDVRSQ  101
          *: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mhp3      DSS-TAELEGKYSSLANTNKNVWVLSGFQHGDAFTRWLKIPENKQ---LFTKNI IIL  170
Ag234-5   ETNNQSELIGKYKNFLNGNKNVWILLIGFQQGQEFPKFLKQTDSSNGKKYSDLLAEKKV IIV  161
          : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mhp3      GIDWTDT--ENVIPTGRYINLTYKTEEAGWLAGYANASFLAKKFPSPDKRSAIIVIGGG  227
Ag234-5   AVDWDLKEDKDLIKAGHFISLLYKTEEAGFIAGYASSKFLAYKFPNDEAKRTIAPGGGG  221
          : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mhp3      ISPAVTDFIAGYLAGIKAWNLNKSDKKTITTDKIEINLGFVDQDTSTKERLEQIASKDK  287
Ag234-5   HGAGVTDFIAGFLAGIAGIAYKNNNDNPTAKVTISDNNINIDTGFISNDK-TATFINGIVNKS-  279
          ... *****:***** : * . * * . . * . . * : * : * : * : * .
Mhp3      PSTLLAVAGPLTEIFSDIIANQND--RYLIGVDTDQSLVYTKTKNKFFTSILKNLGSVVF  345
Ag234-5   -SLVLPVAGSLTSSVVDAIKKSNKDTKYLIGVDTDQSKIFSPAT-VFFFTSIEKHLGRTIY  337
          * : * . * . * . * . * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mhp3      SVLSDLYTKKNSRNLAGFEFGKKS---ATVYLGIKDRFVDIADTSLEGNDKKLATEAI  401
Ag234-5   QVLTDIWLKKEDSKFLGSFRSFKLTPANAFVYKGISDDEFVGVSNSTVADADKVKAEFL  397
          . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mhp3      SEAKKEFEKTKTIPAEVVRKTTLEIPEMPDKQPDKQEQESLDKLLITDINKN-----  451
Ag234-5   NEATADFKKQIQANPTN-YKSVLGIPTMLINDNDAKDNEKASLFHFDDNWQTYWAFHSRFI  456
          . * . : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mhp3      -
Ag234-5   N 457

```

图 1

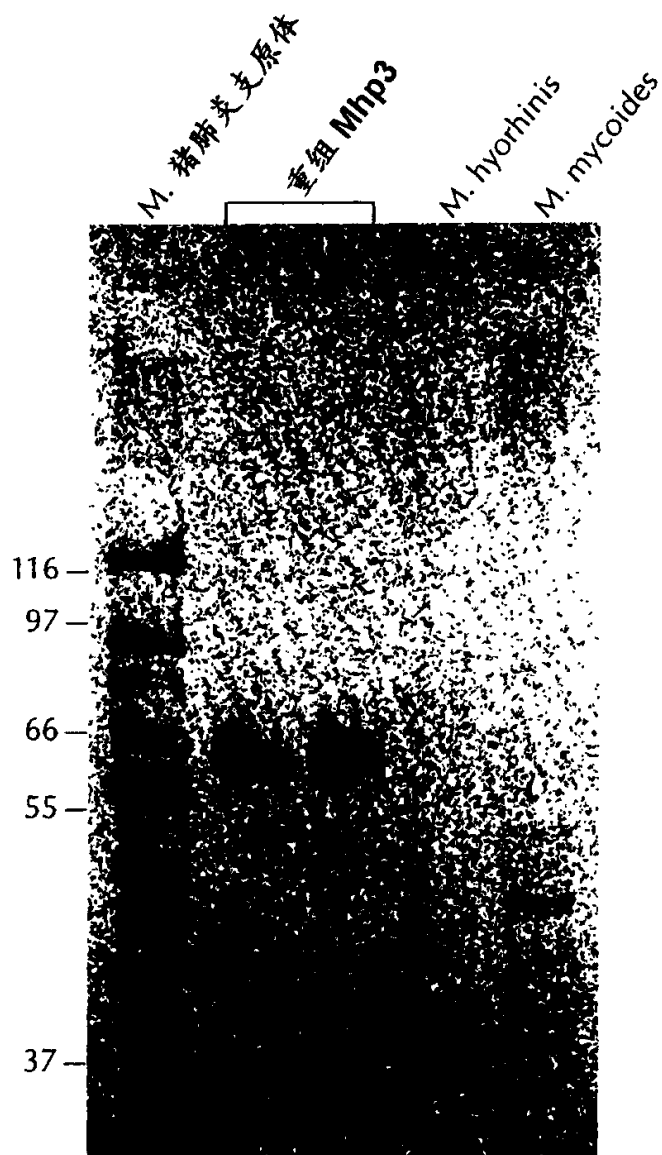


图 2

