

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03813128.5

A61K 49/00

A61K 39/395

A61K 39/40

A61K 39/38

A61K 39/02

G01N 33/53

G01N 33/566

[43] 公开日 2005 年 8 月 24 日

[11] 公开号 CN 1658906A

[22] 申请日 2003.4.4 [21] 申请号 03813128.5

[30] 优先权

[32] 2002.4.5 [33] US [31] 60/370,344

[86] 国际申请 PCT/US2003/010305 2003.4.4

[87] 国际公布 WO2003/086473 英 2003.10.23

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.6

[71] 申请人 衣阿华州立大学研究基金会股份有限公司

地址 美国衣阿华州

[72] 发明人 W·H·苏 T·F·扬

R·F·罗斯 E·M·周

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

(A61K38/21,38:17)G01N33/567C12N3/00

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 14 页

[54] 发明名称 支原体多肽

[57] 摘要

本发明提供涉及支原体的方法和材料。例如，本发明提供的支原体多肽能增加细胞(如猪纤毛气管细胞)的钙释放以及提供的抗体能结合这种支原体多肽。另外，本发明提供鉴定支原体诱导猪纤毛气管细胞钙释放的抑制剂的方法。

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

1. 一种基本纯的多肽, 其特征在于, 所述多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放, 其中所述多肽的分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。

- 5 2. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽是支原体多肽。
3. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽获自致病性肺炎支原体。
4. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽约 80% 纯。
5. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽约 90% 纯。
6. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量约 30kDa。
- 10 7. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量约 60kDa。
8. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量约 65kDa。
9. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量约 90kDa。
10. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量约 120kDa。
11. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽是胰蛋白酶消化的片段。
- 15 12. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量在胰蛋白酶消化后约为 35kDa。
13. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽的分子量在胰蛋白酶消化后约为 50kDa。

14. 一种能结合某多肽的基本纯的抗体, 其特征在于, 所述多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放, 其中所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。

- 20 15. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体是单克隆抗体。
16. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体是小鼠抗体。
17. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述多肽是胰蛋白酶消化的片段。
18. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述多肽是支原体多肽。
- 25 19. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述多肽获自致病性肺炎支原体。
20. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体约 80% 纯。
21. 如权利要求 14 所述的抗体, 其特征在于, 所述抗体约 90% 纯。
22. 一种诱导哺乳动物中免疫应答反应的方法, 其特征在于, 所述免疫应答反应是抗支原体多肽的反应, 所述方法包括在所述哺乳动物能产生抗所述多肽抗体的条件下, 给予所述哺乳动物基本纯的支原体多肽, 其中所述多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放, 所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。
- 30 23. 如权利要求 22 所述的方法, 其特征在于, 所述哺乳动物是小鼠、兔或猪。

24. 一种使抗体结合某多肽的方法，其特征在于，所述多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放，其中所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间，所述方法包括：

a) 获得能结合所述多肽的抗体，

5 b) 在所述抗体结合所述多肽的条件下，使所述抗体接触所述多肽。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

26. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述抗体是小鼠抗体。

27. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述多肽是支原体多肽。

28. 一种鉴定支原体诱导的细胞钙释放的抑制剂的方法，其特征在于，所述方
10 法包括：

a) 使细胞接触支原体多肽和测试化合物，其中所述多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放，所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间，

b) 确定所述测试化合物是否能抑制所述细胞释放钙，其中所述测试化合物若能抑制所述细胞的钙释放，表明所述测试化合物是所述抑制剂。

15 29. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述测试化合物是蛋白酶。

30. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述测试化合物是抗体。

31. 一种鉴定支原体多肽诱导的细胞钙释放的抑制剂的方法，其特征在于，所述多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放，其中所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间，所述方法包括：

20 a) 使细胞接触已用测试化合物预处理的支原体多肽，

b) 确定该测试化合物是否能抑制所述细胞释放钙，其中所述测试化合物若能抑制所述细胞的钙释放，表明所述测试化合物是所述抑制剂。

32. 如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述测试化合物是蛋白酶。

33. 如权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述测试化合物是抗体。

25

支原体多肽

5 关于美国联邦赞助研究的声明

本文所述研究的资金由美国联邦政府提供，联邦政府可拥有本发明的一定权利。

背景

1. 技术领域

10 本发明涉及支原体多肽制品以及含有抗支原体多肽抗体的抗体制品。

2. 背景信息

支原体是一大群包括柔膜体(*Mollicutes*)纲类在内的多种原核生物。支原体缺乏细胞壁，基因组很小，种系发生上与革兰阳性真细菌类相关，是已知的最小自我复制生物体(Razin, *Microbiol. Rev.*, 49:419-455(1985); Razin, *FEMS Microbiol. Lett.*, 79:423-432(1992); Razin 和 Jacobs, *J. Gen. Microbiol.*, 138: 15 407-422(1992))。支原体的表面显然是该微生物与其宿主细胞相互作用的关键部位(Freundt 和 Edward. 1979. “分类和分类法”(Classification and taxonomy). 1-42 页.M. F. Barile 和 S. Razin(主编), 《支原体》(The Mycoplasmas). Academic press, New York, NY; Rogers 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1160-1164(1985); 20 Woese 等, *J. Mol. Evol.*, 21:305-316(1984-1985))。

肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*) (*Mhyo*) 是猪支原体肺炎的病原，它不断导致猪生产商的显著经济损失。此生物是一种胞外病原体定居于猪呼吸道上皮。肺炎支原体感染在与其它猪呼吸道病原体相关中的作用重要性增加(Ross, RF, 1999. “支原体疾病”(Mycoplasmal diseases), 495-509 页, B. E. Straw, 25 S. D'Allaire, W. L. Mengeling 和 D. J. Taylor(主编), 《猪疾病》(Diseases of swine). Iowa State University Press, Ames, IA)。例如，肺炎支原体可加重猪生殖和呼吸道综合症、病毒诱导的肺炎(Thacker 等, *J. Clin. Microbiol.*, 37:620-627 (1999))。肺炎支原体首先通过破坏气管、支气管和细支气管纤毛上皮细胞来诱导肺炎(Debey 等, *Am. J. Vet. Res.*, 53:1705-1710(1992); Mebus 和 30 Underdahl, *Am. J. Vet. Res.*, 38:1249-1254(1977); Tertysnikova 和 Fein, *Cell Calcium*, 21:331-344(1997))。然而，肺炎支原体诱导的纤毛损伤或纤毛损失的机制还不太了解。近来，发展了一种气管上皮细胞模型，使我们能研究肺炎支原

体 91-3 的致病机理(Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:4367-4373(1994))。

肺炎支原体对纤毛上皮的粘附是诱导该生物定居所必须的, 这导致纤毛损失(Mebus 和 Underdahl, *Am. J. Vet. Res.*, 38:1249-1254(1977); Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:1616-1622(1994); Zhang 等, *Infect. Immun.*, 63:1013-1019(1995))。

5 因此, 支原体粘附其宿主细胞是支原体疾病发病中的一个重要起始步骤。粘附过程主要通过受体-配基相互作用所介导(Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:4367-4373(1994); Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:1616-1622(1994); Zhang 等, *Infect. Immun.*, 63:1013-1019(1995); Zielinski 和 Ross, *Am. J. Vet. Res.*, 54:1262-1269(1993))。

10 与此观念一致的是观察到肺炎支原体的强毒株体外能粘附气管组织纤毛, 与肺炎支原体无毒株相反(Young 等, *Vet. Microbiol.*, 71:269-279(1999))。

概述

本发明涉及与支原体多肽制品相关的方法和材料, 这些制品能增加猪纤毛气管细胞的钙释放。这种多肽制品可用于产生能阻断支原体诱导钙释放的多肽片段, 且可用于产生能结合支原体多肽的抗体。本发明也提供能结合支原体多肽的抗体。这种抗体可用于抑制支原体诱导的钙释放并可用于鉴别致病和非致病性支原体。另外, 本发明提供鉴定支原体诱导猪纤毛气管细胞钙释放的抑制剂。这种抑制剂可用于保护猪不发生支原体肺炎且可用于治疗患支原体肺炎的猪。

15

一般, 本发明一个方面的特征是一种基本纯的多肽, 其中该多肽能提高纤毛气管细胞的钙释放, 该多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。该多肽可以是支原体多肽。该多肽可获自致病性肺炎支原体。该多肽可以约 80%纯度或约 90%纯度。该多肽的分子量可约 30、60、65、90 或 120kDa。该多肽可以是胰蛋白酶消化的片段。胰蛋白酶消化后的该多肽分子量可约 35kDa 或 50kDa。

20

另一个方面, 本发明的特征是能结合其多肽的基本纯的抗体, 其中所述的多肽能提高猪纤毛气管细胞的钙释放, 所述多肽的分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体可以是小鼠抗体。所述多肽可以是胰蛋白酶消化的片段。所述多肽可以是支原体多肽。所述多肽可获自致病性肺炎支原体。所述抗体可以约 80%纯度或约 90%纯度。

25

本发明又一方面的特征是一种诱导哺乳动物免疫应答反应的方法, 其中所述免疫应答是针对支原体多肽的。该方法包括在哺乳动物生成抗支原体多肽抗体的条件下, 给予哺乳动物基本纯的支原体多肽, 其中所述多肽能提高猪纤毛气管细胞的钙释放, 所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。哺乳动物可以是小鼠、

30

兔或猪。

本发明另外一方面的特征是使抗体结合多肽的方法，其中所述多肽能提高猪纤毛气管细胞的钙释放，所述多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。该方法包括 (a) 获得能结合所述多肽的抗体，(b) 在抗体结合所述多肽的条件下使抗体接触该多肽。所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体可以是小鼠抗体。所述多肽可以是支原体多肽。

本发明另一方面的特征是鉴定支原体诱导猪纤毛气管细胞钙释放的抑制剂的方法，。该方法包括 (a) 使细胞(如猪纤毛气管细胞)接触支原体多肽和测试化合物，其中所述多肽能提高猪纤毛气管细胞的钙释放，该多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间，(b) 确定测试化合物是否能抑制细胞释放钙，其中测试化合物若能抑制细胞的钙释放，表明该测试化合物是抑制剂。测试化合物可以是蛋白酶或抗体。

在另一个实施方案中，本发明的特征是鉴定支原体多肽诱导细胞(如猪纤毛气管细胞)钙释放抑制剂的方法，其中所述多肽能提高纤毛气管细胞的钙释放，该多肽分子量在约 30kDa 和约 150kDa 之间。该方法包括 (a) 使细胞(如猪纤毛气管细胞)接触已用测试化合物预处理的支原体多肽，(b) 确定该测试化合物是否能抑制细胞释放钙，其中测试化合物若能抑制细胞的钙释放，表明该测试化合物是抑制剂。测试化合物可以是蛋白酶或抗体。

除非另有定义，本文所用的全部技术和科学术语与本发明涉及领域普通技术人员通常理解的含意相同。尽管与本文所述类似和相同的方法和材料可用于实施或测试本发明，但下面描述的是适合的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献全部纳入本文供参考。万一冲突，本说明书会予以控制，包括定义。另外，材料、方法和实施例仅用于阐述不应认为是限制。

本发明的其它特征和优点可从下列详细描述和权利要求而明白。

25

附图说明

图 1 包含描绘纤毛物若能抑制来自细胞猪气管细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 反应的 3 张图。资料是代表性扫描图，显示 (a) 致病性肺炎支原体菌株 9-13 (n=10, 总共 47 个细胞)、(b) 非致病性肺炎支原体菌株 (n=6, 总共 18 个细胞) 和 (c) 絮状支原体 (n=8, 总共 24 个细胞) 的作用。所有三种支原体制品的蛋白浓度是 300 μ g/mL。箭头表示加入支原体。

图 2 是直方状图，描绘所示治疗的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高超过基础水平。PMH 代表致病性肺炎支原体菌株 9-13；NPMH 代表非致病性肺炎支原体；MF 代表絮状支原体。数据

表示为平均值±SE。完整肺炎支原体 9-13 以 30(在 6 次实验中 n=18 个气管细胞)、100(在 7 次实验中 n=16 个细胞)和 300μg/mL(在 10 次实验中 n=47 个细胞)施用。絮状支原体(在 8 次实验中 n=24 个细胞)和非致病性肺炎支原体(在 6 次实验中 n=18 个细胞)以 300μg/mL 施用。箭头表示与其它处理相比有显著性差异(P<0.05)。

5 图 3 包含描绘接种肺炎支原体菌株 9-13 猪纤毛气管细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 反应的 4 张图。资料是代表性扫描图,显示(a)无 Ca^{2+} 的培养基(n=5 个细胞)、(b)用毒胡萝卜素(TG; 1μM)预处理 30 分钟(n=5 个细胞)、(c)用 U-73122(2μM; n=5 个细胞)处理 100 秒和(d)U-73343(2μM; n=5 个细胞)对肺炎支原体诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的效果。箭头表示加入完整支原体(300μg/mL)。

10 图 4 包括描绘猪纤毛气管细胞用百日咳毒素(PTX; 100ng/mL)预处理 3 小时后接种肥大脱粒肽 7(Mas 7)或肺炎支原体的 $[Ca^{2+}]_i$ 反应的 4 张图。资料是(a)肺炎支原体对照(n=9 个细胞)的、(b)用 PTX 处理的肺炎支原体(n=11 个细胞)、(c)Mas 7(10μM)对照(n=9 个细胞)和(d)用 PTX 处理的 Mas 7(n=9 个细胞)的代表性扫描图。

15 图 5 是提出的肺炎支原体-纤毛气管细胞相互作用模型的示意图。Rc=受体; ER=内质网。

图 6 包括描绘接种 *Mhyo* 膜的猪纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 反应的 4 张图,。各扫描图表示各气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。箭头表示施用的时候。(A)膜制品(100μg/mL)增加了 $[Ca^{2+}]_i$ 。(B)用蛋白酶 K 消化阻断了膜诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。将该膜(100μg/0.1mL PBS)37℃与蛋白酶 K(2μg)一起孵育 8 小时,然后加到 0.9mL
20 Krebs-Ringer 重碳酸盐(KRB)缓冲液中的气管细胞上。(C)用胰蛋白酶消化加强了膜诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。将此膜(100μg/0.1mL PBS)37℃与胰蛋白酶(6μg)一起孵育 30 分钟,然后加到 0.9mL KRB 中的气管细胞上。(D)该可溶性膜蛋白比(A)中未消化的膜活性更高。超离心(100,000 x g, 60 分钟)通过胰蛋白酶消化的膜获得上清,制备该可溶性蛋白。

25 图 7 是致病性(P)和非致病性(N) *Mhyo* 的 *Mhyo* 膜多肽用猪抗 *Mhyo* 血清(1:80)探测的免疫印迹照片。标记物泳道通过以 kDa 计的表观分子量(10μg/泳道)鉴定。箭头表示在致病性 *Mhyo*, 而不是非致病性 *Mhyo* 中观察到的多肽条带。

30 图 8 是致病性(P)和非致病性(N) *Mhyo* 的 *Mhyo* 膜多肽的免疫印迹照片。样品用胰蛋白酶消化并用猪抗 *Mhyo* 血清(1:80)探测。标记物泳道通过以 kDa 计的表观分子量(10μg/泳道)鉴定。箭头表示在致病性 *Mhyo*, 但不是非致病性 *Mhyo* 中观察到的多肽带。

图 9 是描绘采用阴离子交换 HPLC 纯化 *Mhyo* 膜多肽的胰蛋白酶消化片段的图。

采用 Tris 缓冲液 (pH8.5) 而且的 0-0.5M NaCl 线性梯度液洗脱该多肽。洗脱物以 280nm 吸光率监测。数字 3 表示组分 3; 而数字 4 表示组分 4。

图 10 是描绘组分 4 (10 μ g/mL) 诱导猪纤毛气管细胞 (n=8 个细胞) 中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的图。此组分引起了 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。箭头表示加入该多肽组分。

5 图 11 是 *Mhyo* 多肽用抗 *Mhyo* 猪恢复期血清探测的免疫印迹照片。标记物泳道通过以 kDa 计的表观分子量鉴定。泳道 1: 组分#4 (10 μ g/泳道); 泳道 2: 纯化前 *Mhyo* 的可溶性胰蛋白酶消化片段 (10 μ g/泳道); 泳道 3: 组分#4 (另一次纯化过程所得; 5 μ g/泳道); 泳道 4: *Mhyo* 的完整细胞抗原 (10 μ g/泳道); 泳道 5: 空白 (无抗原)。第一抗体是猪抗血清 (1:100)。第二抗体是山羊抗猪血清 (1:1000)。阳性
10 条带见于泳道 1 和 3 中约 65kDa 处。

图 12 是描绘用阴离子交换 HPLC 纯化 *Mhyo* 膜蛋白的胰蛋白酶消化片段的图。采用 Tris 缓冲液 (pH8.5) 配的 0-0.5M NaCl 线性梯度液洗脱该多肽。洗脱物以 280nm 吸光率监测。洗脱物的组分 8 表现出 Ca^{2+} 释放能力。

图 13 是描绘组分 8 (1 μ g) 诱导猪纤毛气管细胞 (n=4 个细胞) 中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的图。
15 此组分是引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的唯一洗脱且分。箭头表示加入该多肽组分。

图 14 是描绘与用大豆胰蛋白酶抑制剂 (TI) 预处理的胰蛋白酶消化的 *Mhyo* 膜制品孵育后, 猪纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的图。TI 不能抑制 *Mhyo* 胰蛋白酶消化的膜制品诱导的纤毛气管上皮中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。TI 在 37 $^{\circ}$ C 与胰蛋白酶消化的膜制品孵育 10 分钟, 然后加入。纵座标显示以 nM 计的 $[Ca^{2+}]_i$ 。各扫描图描述一个细胞中的
20 的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。

详细描述

本发明提供涉及支原体的方法和材料。例如, 本发明提供的支原体多肽能增加猪纤毛气管细胞的钙释放以及结合这种支原体多肽的抗体。另外, 本发明提供
25 方法可鉴定支原体诱导猪纤毛气管细胞钙释放的抑制剂,。

在一个实施方案中, 本发明提供基本纯的多肽。如本文所用, 术语“多肽”指具有或没有一种或多种翻译后修饰 (如磷酸化或糖基化) 的任何氨基酸残基链。本发明提供的多肽可是任何大小。例如, 能增加猪纤毛气管细胞钙释放的多肽可以长 10、25、50、75、100、125、150、175、200 个或更多个氨基酸。另外, 能
30 增加猪纤毛气管细胞钙释放的多肽分子量可在约 10kDa 和约 150kDa 之间。例如, 能增加猪纤毛气管细胞钙释放的多肽分子量可以约 10、20、30、40、50、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115 或 120kDa。此外, 能增加细胞 (如

猪纤毛气管细胞)钙释放的多肽可以是胰蛋白酶消化的片段。在这种情况下,胰蛋白酶消化后的多肽分子量可在约 10kDa 和约 80kDa 之间。例如,胰蛋白酶消化后的多肽分子量可以约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 或 80 kDa。在一些实施方案中,能增加细胞(如猪纤毛气管细胞)钙释放的多肽
5 (如全长多肽或胰蛋白酶消化片段)可来自致病性 *Mhyo* 菌株(如致病性肺炎支原体菌株 9-13)。

如本文所用,术语“氨基酸残基”指天然氨基酸残基、非天然氨基酸残基和氨基酸类似物,如果它们结构允许都可以是其 D 和 L 立体异构体。天然氨基酸残基包括但不限于丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、
10 半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和缬氨酸(Val)。非天然氨基酸残基包括但不限于吡啶羧酸、2-氨基脂肪酸、3-氨基脂肪酸、 β -丙氨酸、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、
15 2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基异丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、羟基赖氨酸、别羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、六氢吡啶羧酸和 N-甲基精氨酸。

如本文所用,术语“氨基酸类似物”所指的化合物,结构类似于天然多肽中通常所见的天然产生氨基酸残基,但组成不同,其 C-末端羧基、N-末端氨基或侧链官能团被化学修饰成另一种官能团。氨基酸类似物包括但不限于天冬氨酸类似物天冬氨酸-(β -甲酯);甘氨酸类似物 N-乙基甘氨酸和丙氨酸类似物氨甲酰丙氨酸。其它氨基酸残基和氨基酸类似物的例子列表于 Gross 和 Meienhofer,《肽:分析、合成、生物学》(Peptides:Analysis, Synthesis, Biology), Academic Press,
25 Inc., New York(1983)。氨基酸类似物可天然产生或合成制备。

可通过在氨基和羧基末端加入稳定剂以促进多肽体内存活,而修饰多肽用于体内使用。这可用于肽末端倾向于在细胞摄入前被蛋白酶降解的情况。这种阻断剂可包括但不限于其它相关或不相关的氨基酸序列,这些序列可结合多肽的氨基
30 和/或羧基末端残基(如能结合 N-末端氨基酸的乙酰基或能结合 C-末端氨基酸的酰胺基)。这种结合可在多肽合成中通过化学反应,或通过重组 DNA 技术用标准方法实现。另外,阻断剂如焦谷氨酸或其它分子可结合氨基和/或羧基末端残基。在其

它实施方案中，氨基末端的氨基和/或羧基末端的羧基可用不同分子取代。

多肽也可包含一氨基酸标志。如本文所用，术语“氨基酸标志”指一般较短的氨基酸序列，它可提供方便的检测方法和/或通过与该抗标的记抗体相互作用或通过能识别该标记的其它化合物和分子来纯化。例如，氨基酸标志如 c-myc、红血球凝聚素、聚组氨酸或 Flag 有助于纯化和检测多肽。例如，含聚组氨酸标志的多肽可依靠组氨酸残基对镍离子的亲和性(如在 Ni-NTA 柱上)而纯化，可用抗聚组氨酸抗体(如 Penta-His 抗体; Qiagen, Valencia, CA)在蛋白质印迹中检测。可将氨基酸标志插入多肽序列中的任何地方。例如，可将氨基酸标志插入多肽的氨基和/或羧基末端。

本文所述多肽可用任何方法获得。例如，能增加细胞钙释放的多肽，可通过从天然来源(如来自 *Mhyo* 细胞)提取，通过表达编码该多肽的重组核酸或通过化学合成(如固相合成或其它本领域熟知的方法，包括用 ABI 肽合成仪合成; Applied Biosystems, Foster City, CA)获得。另外，该多肽可通过例如高压液相层析(如反相 HPLC)纯化，或可用凝胶电泳纯化。例如，可从凝胶切下对应于特定多肽的条带并洗脱以获得多肽制品。

本文提供的多肽可以是基本纯化。如本文所用，关于多肽的术语“基本纯的”指该多肽基本上没有其它多肽、脂类、碳水化合物和与其天然相伴随的核酸。因此，基本纯的多肽是从其天然环境中取得的任何多肽且至少 60% 优选 75%，最优选 90%，没有其它天然相伴随成分。本文提供的多肽可以是 60%、65、70、75、80、85、90、95 或 99 纯。通常，基本纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上产生单个主要条带。如果纯化 *Mhyo* 多肽并随后与例如佐剂或药学运载体混合就认为它是基本纯的，因为 *Mhyo* 多肽已与其天然相伴随的细胞成分分离。可用任何方法纯化本文提供的多肽。例如，亲和层析、免疫沉淀、大小排阻层析和离子交换层析可用于纯化 *Mhyo* 多肽。纯化程度可通过任何适当方法测定，包括但不限于：柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相层析。

可用任何方法确定特定多肽是否能增加细胞的钙释放。例如，本文所述技术可用于测定猪纤毛气管细胞的钙释放。

本发明也提供能结合本文所提供多肽的抗体。如本文所用，术语“抗体”指完整抗体以及保持某些选择性结合抗原表位能力的抗体片段。这种片段包括但不限于 Fab、F(ab')₂ 和 Fv 抗体片段。术语“抗原表位”指抗原上的抗原决定簇，它能与抗体的互补部分结合。抗原表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖残基)组成且一般具有三维结构特征以及带电荷特征。

在一个实施方案中，本发明提供的抗体对本文所提供多肽具有特异性结合亲和力和力。这种抗体能用于液相或结合固相的免疫试验。例如，本文提供的抗体可用于直接或间接方式的竞争性和非竞争性免疫试验。这种免疫试验的例子包括放射性免疫试验(RIA)和夹心(免疫测量)试验。

5 本文提供的抗体可用任何方法制备。例如，本文提供的任何基本纯的多肽或其片段可用作免疫原来诱导动物免疫应答反应，从而产生特异抗体。因此，完整的全长多肽或含小肽的片段可用作免疫用抗原。另外，用于免疫动物的免疫原可用化学合成或获自翻译的 cDNA。此外，如果需要，可将免疫原与运载体多肽偶联。常用的化学偶联免疫多肽的载体，包括但不限于匙孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和破伤风类毒素。

10 多克隆抗体的制备是本领域技术人员熟知的(例如 Green 等，“产生多克隆抗血清”(Production of Polyclonal Antisera)，《免疫化学方案》(Immunochemical Protocols)(Manson 主编)，1-5 页(Humana Press 1992)和 Coligan 等，“在兔、大鼠、小鼠和仓鼠中产生多克隆抗血清”(Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters)，《免疫学的现代方案》(Current Protocols in Immunology)，2.4.1 章(1992))。另外，可采用免疫学领域的常见多种技术纯化和/或浓缩多克隆抗体以及单克隆抗体(Coligan 等，第 9 单元，《免疫学的现代方案》，Wiley Interscience，1994)。

15 单克隆抗体的制备也是本领域技术人员熟知的(例如 Kohler 和 Milstein，*Nature* 256:495(1975)；Coligan 等，2.5.1-2.6.7 章；Harlow 等，《抗体：实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual)，726 页(Cold Spring Harbor Pub. 1998)。简言之，获得单克隆抗体可通过给小鼠注射含抗原的组合物，通过分析血清样品确认有抗体产生，取出脾脏以获得 B 淋巴细胞，将 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤，克隆杂交瘤，选择能产生抗该抗原抗体的阳性克隆，从杂交瘤培养物中分离此抗体。单克隆抗体可通过多种已很好建立的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化。这种分离技术包括但不限于用蛋白 A 琼脂糖亲和层析、大小排阻层析和离子交换层析(Coligan 等，2.7.1-2.7.12 章和 2.9.1-2.9.3 章；Barnes 等，“纯化免疫球蛋白 G(IgG)”(Purification of Immunoglobulin(IgG)，《分子生物方法》(Methods in Molecular Biology)，第 10 卷，79-104 页(Humana Press 20 1992))。

另外，单克隆抗体的体外和体内增殖方法是本领域技术人员熟知的。体外增殖可在适当的培养基中进行，如 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(MEM)或 RPMI 1640

培养基，任选补充哺乳动物血清如胎牛血清或痕量元素和生长维持添加物，如正常小鼠腹膜渗出细胞、脾细胞和骨髓巨噬细胞。体外生产提供了相对纯的抗体制品并可放大，产生大量所需抗体。大规模杂交瘤培养可通过均匀悬浮液培养完成，在气升式反应器、连续搅拌反应器、或者固定的或包裹的细胞培养物中培养。进行体内增殖可通过注射细胞克隆到与亲代细胞组织相容的哺乳动物（如 osyngeneic 小鼠）中以导致产生抗体的肿瘤生长。动物在注射前任选用碳氢化合物预处理，具体是油如姥鲛烷（四甲基十五烷）。1 到 3 周后，从动物体液中回收所需单克隆抗体。

抗体片段可通过蛋白酶水解完整抗体或表达编码该片段的核酸来制备。抗体片段可通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体来获得。例如，可用胃蛋白酶切割抗体产生抗体片段以提供名为 $F(ab')_2$ 的 5S 片段。此片段可用硫醇还原剂进一步切割，并任选用封闭基团封闭二硫键断裂产生的巯基以生成 3.5S Fab' 单价片段。或者，用胃蛋白酶切割直接产生 2 个单价 Fab' 片段和 Fc 片段。这些方法的描述见例如 Goldenberg（美国专利号 4, 036, 945 和 4, 331, 647）和其他（Nisonhoff 等, *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230(1960); Porter, *Biochem. J.* 73:119(1959); Edelman 等, 《酶学方法》(Methods in Enzymology), 第 1 卷, 422 页(Academic Press 1967); Coligan 等, 2.8.1-2.8.10 章和 2.10.1-2.10.4 章)。

另外，本发明提供的方法和材料可用于鉴定能抑制支原体诱导细胞（如猪纤毛气管细胞）。钙释放（如 *Mhyo* 多肽诱导的钙释放）的化合物。鉴定支原体诱导的细胞钙释放的抑制剂的方法，可包括将细胞（如猪纤毛气管细胞），在测试化合物存在时与含支原体多肽（如致病性 *Mhyo* 的 *Mhyo* 多肽）的制品一起培养，确定测试化合物是否能抑制该细胞释放钙。在另一个实施方案中，鉴定钙释放抑制剂的方法可包括使细胞接触已预先用支原体多肽制品处理的测试化合物，确定测试化合物是否能抑制该细胞释放钙。钙释放可用本文所述任何方法测定。制品可以是 *Mhyo* 膜多肽粗制品、纯化的 *Mhyo* 多肽制品或 *Mhyo* 膜多肽制品的胰蛋白酶消化产物。如果含支原体多肽的制品诱导的钙释放在某化合物存在时与该化合物缺乏时相比减少，该测试化合物可鉴定为支原体诱导钙释放的抑制剂。“减少”指测试化合物存在时的钙释放低于（如低 5%、10%、25%、50%、75% 或 100%）该化合物缺乏时。任何化合物均可用作测试化合物。例如，可用作测试化合物的分子是多肽（如蛋白酶、抗体、10-50 个氨基酸的多肽）、寡核苷酸、酯、脂类、酯、碳水化合物或类固醇。本领域技术人员不难确定测试化合物的适当用量和适当的培养时间。

本发明在下列实施例中作进一步描述，这不限制权利要求所述的本发明的范

围。

实施例

实施例 1-肺炎支原体增加猪纤毛气管细胞中的胞内钙释放

5 测定了整致病性肺炎支原体、非致病性肺炎支原体和絮状支原体对猪纤毛气管上皮细胞中胞内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的作用。简言之, 纤毛上皮细胞具有 $103 \pm 3\text{nM}$ 的基础 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($n=217$ 个细胞)。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在致病性肺炎支原体菌株 91-3 ($300\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入 100 秒内从基础水平增加至 $250 \pm 19\text{nM}$ ($n=47$ 个细胞), 持续约 60 秒。相反, $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 的非致病性肺炎支原体和絮状支原体不能增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。
10 在无 Ca^{2+} 的培养基中, 致病肺炎支原体仍增加了气管细胞中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。用毒胡萝卜素预处理 ($1\mu\text{M}$, 30 分钟) 耗尽内质网中的 Ca^{2+} 贮存, 去除了肺炎支原体的作用。用百日咳毒素 ($100\text{ng}/\text{mL}$, 3 小时) 或磷脂酶 C 抑制剂 U-73122 ($2\mu\text{M}$, 100 秒) 预处理也去除了肺炎支原体的作用。加入百日咳毒素敏感蛋白 ($\text{G}_{i/o}$) 激活剂肥大(细胞)脱粒肽 7, 增加了纤毛气管细胞中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。这些结果提示致病性肺炎支原体活化了偶
15 联于 $\text{G}_{i/o}$ 的受体, 进而活化磷脂酶 C 途径, 导致内质网释放 Ca^{2+} 。因此, Ca^{2+} 可用作肺炎支原体致病的一种信号。

材料和方法

20 所有试剂购自 Sigma Chemical (St. Louis, MO), 除了 fura-2 AM 获自 Molecular Probes (Eugene, OR), U-73122、U-73343 和肥大(细胞)脱粒肽 7 (Mas 7) 获自 Biomol (Plymouth Meeting, PA)。

采用下列完整支原体: (1) 致病性肺炎支原体 菌株 91-3, 最初克隆自菌株 232, 它在微量滴定粘附试验中表现出对纤毛的高粘附性 (Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62: 1616-1622 (1994)); (2) 非致病性肺炎支原体 菌株 J (ATCC 菌株 25934), 它不粘附
25 纤毛 (Zielinski 和 Ross, *Am. J. Vet. Res.*, 54:1262-1269 (1993)); 絮状支原体菌株 Ms42 (ATCC 菌株 27399), 它在猪中不致病。将以上支原体在 Friis 培养基 (Friis, *Nord. Vet. Med.*, 27:337-339 (1975)) 中培养到对数生长期, 以 $15,000 \times g$ 离心 30 分钟收集。离心后, 收集支原体沉淀并用 50mL PBS 通过 $15,000 \times g$ 离心 15 分钟洗三次。最终沉淀物通过 27-号针头分散于 PBS 中。从 200mL 培养物 ($3.4 \pm 1.7 \times$
30 10^{11} CCU, $n=7$) 收集的支原体全细胞数用含 Friis 培养基的试管作系列稀释测定以颜色变化单位 (CCU) 表示。如上所述此细胞密度对应于 $2.70 \pm 0.08\text{mg}$ 蛋白, 用二金鸡宁酸方法 (Pierce, Rockford, IL) 测量, (Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:4367-

4373(1994)和 Zhang 等, *Infect. Immun.*, 63:1013-1019(1995))。最终支原体浓度用 PBS 调至 3mg 蛋白/mL。

如上所述分离气管细胞(Young 等, *Vet. Microbiol.*, 71:269-279(1999))。简言之, 以无菌技术从 3-6 月龄无特定病原体的用戊巴比妥钠麻醉的猪取得气管。

5 用含 0.15%链霉蛋白酶和 0.01%DNA 酶的无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 MEM 培养基 4℃孵育 24 小时解离获得纤毛细胞。上皮细胞通过 125 x g 离心 5 分钟收集。将细胞沉淀重悬浮于 DMEM(高葡萄糖)和 Ham F-12(1:1)培养基的混合液中, 该混合液含有 5%FBS、0.12U/mL 胰岛素和 100U/mL 青霉素-链霉素。细胞悬浮液转至 90mm 组织培养皿在 5%CO₂中培养 60-90 分钟以去除成纤维细胞。气管上皮细胞保存于液氮直到使用。

10 下列技术用于获得单个细胞中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定。气管细胞用 KRB-Ringer 重碳酸盐(KRB)缓冲溶液配的 4μM 呋喃-2 乙酰氧基甲酯(呋喃-2AM)上样, 该溶液含 136mM NaCl、4.8mM KCl、1.5mM CaCl_2 、1.2mM KH_2PO_4 、1.2mM MgSO_4 、10mM HEPES、5.5mM 葡萄糖和 0.1%BSA, pH7.4, 37℃孵育 30 分钟。离心(700 x g, 2 分钟)上样细胞, 随后以 500-1000 个细胞/mL 浓度重悬浮于 KRB。用 fura-2AM 上样的气管细胞置于特制培养皿中的聚赖氨酸-包被盖玻片上。将含呋喃-2 上样细胞的平皿放在
15 倒置荧光显微镜(Carl Zeiss, NY)镜台上。在 24℃时仅聚焦于活的纤毛气管细胞测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。fura-2 上样的猪纤毛气管细胞在 37℃时迅速退化。获得荧光图像(激发波长为 334 和 380nm; 发射波长为 510±20nm), 通过减去背景产生 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的空间分辨图, 图像在像素-像素基础上划分。将发射的信号数字化、记录和用
20 Attofluor 数字荧光成像系统(Atto Instruments, Rockville, MD)加工。读取荧光 150 秒后, 将支原体与该细胞系统混合。如上所述计算出 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Grynkiewicz 等, *J. Biol. Chem.*, 260: 3440-3450(1985))。根据 Atto Instruments 提供的程序原位进行校准, 使用 Fura-2 penta K⁺作为标准。

为比较气管细胞对致病性肺炎支原体 菌株 91-3、无毒肺炎支原体和絮状支原体的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反应, 细胞用 300μg/mL 的相同浓度处理。各实验中选出 1-5 个纤毛气管细胞用于研究 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化。这些支原体在加到气管细胞前保持于冰上。

为研究 Ca^{2+} 信号传递途径, 将百日咳毒素(PTX, 100ng/mL)与气管细胞预先孵育 3 小时。用毒胡萝卜素(TG, 1μM)37℃预处理细胞 30 分钟, 然后加入支原体以耗尽 ER Ca^{2+} 贮存(Thastrup 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2466-2479(1990))。
30 细胞用磷脂酶 C 抑制剂 U-73122(2μM)(Bleasdale 和 Fisher, *Neuroprotocols*, 3:125-133(1993))或其无活性类似物 U-73343 37℃预处理 100 秒, 然后加入支原体。为证实支原体可通过活化 $G_{i/o}$ 蛋白来增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 用此蛋白的活化剂 Mas

7(10 μ M)(Higashijima等, *J. Biol. Chem.*, 265:14176-14186(1990))来测定它是否能增加气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。另外,测定了PTX是否能阻断Mas 7所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。

用ANOVA或Student t-检验分析关于 $[Ca^{2+}]_i$ 的数据。显著水平设置为 $P<0.05$ 。

5 支原体对猪纤毛气管上皮细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用

肺炎支原体 菌株 91-3 能结合猪气管细胞的纤毛(Debey等, *Am. J. Vet. Res.*, 53:1705-1710(1992); Mebus和Underdahl, *Am. J. Vet. Res.*, 38:1249-1254(1977); Tajima和Yagihashi, *Infect. Immun.*, 37:1162-1169(1982))。测定了纤毛气管细胞接种菌株 91-3 后的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化。纤毛上皮细胞具有 $103\pm 3nM$ 的基础 $[Ca^{2+}]_i$ (n=217个细胞)。接触300 μ g/mL的肺炎支原体 菌株 91-3 后,观察到89%的细胞(10次实验53个细胞中的47个)中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。如图1和2所示,加入致病性肺炎支原体 菌株 91-3(300 μ g/mL)在100秒内增加了纤毛细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。相反,非致病性肺炎支原体(6次实验中的18个细胞)和絮状支原体(9次实验中的24个细胞)在相同浓度(300 μ g/mL)不增加 $[Ca^{2+}]_i$ (图1)。

15 在剂量-反应研究中,30 μ g/mL的肺炎支原体 菌株 91-3(6次实验中的18个细胞)不显著改变 $[Ca^{2+}]_i$ (图2)。然而,100 μ g/mL(7次实验中的16个细胞;84%的细胞有反应)和300 μ g/mL(10次实验中的47个细胞;89%的细胞响应)分别使 $[Ca^{2+}]_i$ 增加至 $110\pm 9nM$ 和 $250\pm 19nM$ (图2)。

由于肺炎支原体 菌株 91-3 可能通过其分泌产物增加纤毛细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$, 20 15,000 x g离心15分钟后收集支原体(300 μ g/mL)上清液测试其增加 $[Ca^{2+}]_i$ 的能力。这些上清液不增加纤毛细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。

肺炎支原体 菌株 91-3 在无 Ca^{2+} 培养液中的作用

为确定胞外 Ca^{2+} 的参与,实验用无 Ca^{2+} 培养液进行,培养液中添加了10 μ M Ca^{2+} 螯合剂EGTA。肺炎支原体 菌株 91-3(300 μ g/mL)仍能增加 $[Ca^{2+}]_i$ (之前: $117\pm 6nM$, 25 之后: $324\pm 31nM$,4次实验中的10个细胞;84%的细胞有反应)(图3a)。这些结果表明增加归于胞内贮存的 Ca^{2+} 释放,而不是通过 Ca^{2+} 流入机制。

TG对肺炎支原体 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的作用

为确定内质网(ER)是否是 Ca^{2+} 释放的来源,纤毛细胞用1 μ M微粒体 Ca^{2+} -ATP酶抑制剂TG处理30分钟。在以前的研究中,发现TG能耗尽ER Ca^{2+} 贮存(Thastrup等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2466-2479(1990)),因为它能去除离子霉素诱导的猪纤毛气管细胞胞内 Ca^{2+} 的释放。类似的,TG处理可去除肺炎支原体 菌株 91-3(300 μ g/mL)诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,证明此生物体可引起猪气管上皮细胞的ER Ca^{2+}

释放。

U-73122 和 U-73343 对肺炎支原体 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的作用

由于肌醇 1, 4, 5-三磷酸(IP_3)可从 ER 释放 Ca^{2+} , 而 IP_3 的生成受磷脂酶 C (PLC) 的催化, 进行了下列实验。气管细胞用 $2\mu M$ 特异性 PLC 抑制剂 (Bleasdale 和 Fisher, *Neuroprotocols*, 3:125-133 (1993)) 作预处理, 然后接种肺炎支原体 菌株 91-3, 去除了纤毛细胞中支原体诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加 (图 3c)。相反, U-73122 的无活性类似物 U-73343 不能防止对支原体的 $[Ca^{2+}]_i$ 反应 (基础: $90 \pm 12 nM$, 峰值: $330 \pm 25 nM$, 4 次实验中的 10 个细胞; 82% 的细胞有反应) (图 3d)。这些发现支持肺炎支原体 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加是通过活化 PLC 而介导。

10 PTX 对肺炎支原体和 Mas 7 诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的作用

进行了下列实验以评估 PTX 敏感 G 蛋白是否能介导肺炎支原体 菌株 91-3 的作用。在不处理对照细胞中, 肺炎支原体 菌株 91-3 增加了 $[Ca^{2+}]_i$ ($254 \pm 57 nM$, 3 次实验中的 9 个细胞; 81% 的细胞有反应; 图 4a)。相反, 纤毛细胞用 $100 ng$ PTX/mL 预处理 3 小时去除了肺炎支原体诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加 (图 4b)。这些结果表明肺炎支原体活化了偶联 PTX 敏感性 G 蛋白 ($G_{i/o}$) 的受体。为证实 $G_{i/o}$ 蛋白参与了气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 研究了 $G_{i/o}$ 活化剂 Mas 7 (Higashijima 等, *J. Biol. Chem.*, 265: 14176-14186 (1990)) 对 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用。将 $10\mu M$ Mas 7 加入纤毛气管细胞在 100 秒内引起 $[Ca^{2+}]_i$ 从 $103 \pm 4 nM$ 的基础水平增加到 $351 \pm 4 nM$ (3 次实验中 $n=9$ 个细胞, 82% 细胞有反应) (图 4c)。用 PTX 预处理这些细胞去除了 Mas 7 的作用 (图 4d)。这些结果证明活纤毛细胞中的 $G_{i/o}$ 能增加 $[Ca^{2+}]_i$ 。

肺炎支原体通过结合纤毛上皮细胞而定居于猪呼吸道 (Mebus 和 Underdahl, *Am. J. Vet. Res.*, 38:1249-1254 (1977); Tajima 和 Yagihashi, *Infect. Immun.*, 37:1162-1169 (1982); Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:1616-1622 (1994))。粘附通过表面蛋白 P97 介导 (Hsu 和 Minion, *Infect. Immun.*, 66:4762-4766 (1998); Hsu 等, *J. Bacteriol.*, 179:1317-1323 (1997); Minion 等, *Infect. Immun.*, 68:3056-3060 (2000))。随即迅速发生纤毛运动停滞和纤毛损失 (Debey 和 Ross, *Infect. Immun.*, 62:5312-5318 (1994))。如本文所证明, Ca^{2+} 流出与纤毛损失相联系。致病性肺炎支原体 菌株 91-3 增加猪纤毛气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。相反, 肺炎支原体非致病菌株 J 和絮状支原体不能做到这点, 表明结合纤毛是 Ca^{2+} 流出诱导的先决条件。肺炎支原体菌株 J 不能结合猪纤毛 (Zhang 等, *Infect. Immun.*, 63:1013-1019 (1995))。 $[Ca^{2+}]_i$ 反应是一种快速反应, 其增加取决于支原体浓度。在另一项关于肺炎支原体诱导嗜中性粒细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的研究中, 10^7 - 10^{10} CCU 的致病菌株提

高了酵母聚糖诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,而非致病菌株不能(Debey等, *Vet. Res. Commun.*, 17:249-257(1993))。加入支原体后90分钟内,致病性肺炎支原体菌株91-3(10^9 CCU)粘附于呼吸上皮细胞的纤毛导致纤毛混乱、聚集和纵裂,而非致病性肺炎支原体菌株不显示纤毛破坏(Debey等, *Am. J. Vet. Res.*, 53:1705-1710(1992); Young等, *Vet. Microbiol.*, 71:269-279(1999))。因此,气管上皮细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化涉及肺炎支原体的致病作用。

对肺炎支原体反应时分离纤毛细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加量级,随细胞而不同,但通常随支原体浓度提高而增加。呼吸道上皮细胞中 Ca^{2+} 反应的不均一性类似于报道的神经胶质细胞(VandenPol等, *J. Neurosci.*, 12:2648-2664(1992))、胆管细胞(Nathanson等, *Am. J. Physiol.*, 271:G86-G96(1996))、巨核细胞(Tertyshnikova和Fein, *Cell Calcium.*, 21:331-344(1997))和软骨细胞(D'Andrea和Vittur, *J. Bone Miner. Res.*, 11:946-954(1996))中的胞外ATP作用。在兔呼吸上皮细胞中, Ca^{2+} 反应的不均一性是由于各个细胞对胞外ATP的敏感性不同(Evens和Sanderson, *Am. J. Physiol.*, 277:L30-L41(1999)和Korngreen等, *J. Physiol. (Lond.)* 508:703-720(1998))。

已报导在其它细菌中 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加是由于微生物或其毒素所致。完整的伤寒杆菌肠上皮中的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加介导了这些细胞的IL-8分泌增加(Gewirtz等, *J. Clin. Invest.*, 105:79-92(2000)和Pace等, *Cell.*, 72:505-514(1993))。伤寒杆菌如何诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增加仍不清楚。大肠杆菌肠毒素可通过从HEp-2细胞释放ER Ca^{2+} 来提高 $[Ca^{2+}]_i$ (Baldwin等, *Infect. Immun.*, 59:1599-1604(1991))。此种释放归因于ryanodine受体 Ca^{2+} 释放通道的活化,因为ryanodine受体拮抗剂硝苯呋海因可阻断此种作用(Danko等, *Biochim. Biophys. Acta.*, 816:18-24(1985)及Heine和Wicher, *Neuroreport.*, 9:3309-3314(1998))。然而,能产生完整verocytotoxin的大肠杆菌可通过 IP_3 途径从HEp-2细胞释放 Ca^{2+} (Ismaili等, *Infect. Immun.*, 63:3316-3326(1995))。绿脓假单胞菌分泌的氧化性毒力因子绿脓素可增加人呼吸道上皮细胞中的 IP_3 形成和 $[Ca^{2+}]_i$,但能减少G蛋白偶联受体拮抗剂诱导的 IP_3 和 $[Ca^{2+}]_i$ 增加(Denning等, *Am. J. Physiol.*, 274:L893-L900(1998))。绿脓素诱导的氧化可引起 IP_3 形成增加(Denning等, *Am. J. Physiol.*, 274:L893-L900(1998))。巴斯德菌*multocida*毒素(PMT)通过活化 G_q -偶联PLC- β_1 同工酶能增加动物不同的完整细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ (Wilson等, *J. Biol. Chem.*, 272:1268-1275(1997))。此PMT作用主要归于它直接活化 G_q -PLC途径,因为将PMT绕过浆膜受体显微注射到非洲爪蟾卵母细胞中仍能活化 G_q -PLC, (Wilson等, *J. Biol.*

Chem., 272:1268-1275(1997))。

一些细菌胞外结构能增加宿主细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 。例如,致病奈瑟球菌(*Neisseria*)的 IV 型菌毛能粘附于宫颈癌衍生的上皮样人细胞系 ME180, 通过菌毛受体提高 $[Ca^{2+}]_i$ (Kallstrom 等, *J. Biol. Chem.*, 273:21777-217782(1998))。 $[Ca^{2+}]_i$ 的增高是建立细菌和宿主细胞间稳定接触起初步步骤所必需的(Kallstrom 等, *J. Biol. Chem.*, 273:21777- 217782(1998))。然而,不清楚奈瑟球菌的菌毛如何引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。

致病性肺炎支原体 菌株 91-3 在无 Ca^{2+} 培养基中能增加 $[Ca^{2+}]_i$, 表明 $[Ca^{2+}]_i$ 增加归因于胞内贮存的 Ca^{2+} 释放。气管细胞用 TG 预处理以耗尽 ER Ca^{2+} 贮存, 从而消除了支原体的作用, 证实此细胞器参与 Ca^{2+} 释放。气管细胞用特异性 PLC 抑制剂 U-73122 预处理也防止了支原体诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 表明支原体诱导的 ER Ca^{2+} 释放通过 PLC 途径。

本文提供的结果说明呼吸上皮中的肺炎支原体受体偶联于 $G_{i/o}$ 。活化 PLC 也与观察到的 A_1 腺苷受体-介导的现象一致(Tomura 等, *J. Biol. Chem.*, 272:23130-23137(1997))。 $G_{i/o}$ 蛋白通常负责腺苷酰环化酶的抑制、调节 K^+ 和 Ca^{2+} 通道、活化 cGMP 磷酸二酯酶。在 $G_{i/o}$ 蛋白中, G_{i2} 和 G_{i3} 能调节 2 种信号传递途径; PLC 活化由 $G_{\beta\gamma}$ 二聚体介导, 而腺苷酰环化酶抑制由 α_i 介导(Tomura 等, *J. Biol. Chem.*, 272:23130- 23137(1997))。

总之, 本文提供的结果表明致病性肺炎支原体受体偶联于 $G_{i/o}$ 。一旦发生这些受体的结合, 此 G 蛋白激活 PLC 途径通过提高 ER 的 Ca^{2+} 释放来增加 $[Ca^{2+}]_i$ (图 5)。另外, 粘附素实验证明肺炎支原体的粘附素包括 P97 不能提高 $[Ca^{2+}]_i$ 。同样, 猪纤毛气管细胞用肺炎支原体菌株 91-3 接种在接种 3 分钟内增加了纤毛搏动频率, 与这些细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加相一致。这些结果与所见到的绵羊呼吸道上皮细胞中 Ca^{2+} 对纤毛搏动频率作用相一致(Salathe 和 Bookman, *J. Physiol. (Lond.)*, 520:851-865(1999)), 从而支持 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化涉及到支原体的致病作用。

实施例 2-可诱导猪纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的 *Mhyo*多肽的特征分析和纯化
支原体缺乏细胞壁且只有一种类型的膜即质膜(Razin S. (1993) “在膜研究中作为模型的支原体膜” (*Mycoplasma membrances as models in membrances research*) (第 2 章), 《亚细胞生化》(*Subcellular Biochemistry*). 第 20 卷:支原体细胞膜, Rottem S, Kahane I. 主编. Plenum Press, New York. 1-28 页)。 *Mhyo*膜可通过渗透裂解该生物体来制备并测试以确定纤毛气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 是否增

加。*Mhyo* 膜可提高纤毛气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ (图 6A)。用蛋白水解酶蛋白酶 K 或木瓜蛋白酶预处理此膜 8 小时可消除此膜的作用(图 6B)。这些结果证明有一种膜多肽引起此作用。令人感兴趣的是胰蛋白酶预处理 30 分钟不仅不能减少 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,甚至还加强膜的作用(图 6C)。胰蛋白酶预处理 30 分钟仍不能降低此膜对 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用。胰蛋白酶消化的膜能产生含更多该受体抗原表位的多肽片段。将支原体的胰蛋白酶消化片段进行超离心(100,000 x g, 60 分钟)。所得含有可溶性多肽的上清液,也能增加纤毛上皮中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。此溶解的膜多肽提高 $[Ca^{2+}]_i$ 的活性至少比未消化膜强 10 倍(图 6D)。

采用蛋白质印迹技术比较致病性 *Mhyo*(91-3) 和非致病性 *Mhyo*(菌株 J) 的外膜多肽。致病性 *Mhyo* 的样品显示有 5 条多肽条带,在非致病 *Mhyo* 的样品中未显示(图 7)。5 条多肽条带分别对应于分子量 30、60、65、90 和 120kDa。

采用蛋白质印迹技术比较胰蛋白酶消化后的致病性 *Mhyo*(91-3) 和非致病性 *Mhyo*(菌株 J) 的外膜多肽。致病性 *Mhyo* 的样品显示有 2 条多肽条带在非致病性 *Mhyo* 的样品中未显示(图 8)。此 2 条多肽条带分别对应于分子量 35 和 50kDa。

用凝胶电泳(21cm x 50cm)可收集量大于约 10 μ g 的这 5 种多肽。一旦收集到,用该多肽制品进行 $[Ca^{2+}]_i$ 试验以确定哪种多肽能增加纤毛气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。另外,用 2 维电泳进一步纯化各多肽。用质谱在进行 N-末端蛋白测序前确认各多肽纯度。一旦确定了 N-末端氨基酸序列,搜索序列数据库以鉴定全长 *Mhyo* 多肽的氨基酸序列。

溶解的 *Mhyo* 多肽通过 HPLC 用阴离子交换柱,采用 Tris 缓冲液(pH8.5; 图 9) 配的 0-0.5M NaCl 线性梯度液纯化。组分#4 是早期组分,在纤毛气管细胞中显示具有 $[Ca^{2+}]_i$ 提高活性(图 10)。蛋白质印迹分析显示组分#4 含有抗 *Mhyo* 恢复期血清识别的 65 kDa 条带(图 11)。此 65 kDa 多肽条带也见于 *Mhyo* 全细胞制品中。

由于组分#4 对应的峰在 NaCl 梯度应用之前或稍后洗脱,进一步分析了后面的部分。此分析显示组分#8 也能增加纤毛气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ (图 12 和 13)。组分#8 在 0.4M NaCl 梯度时洗脱。这些结果表明组分#8 含有纯化的外膜 *Mhyo* 多肽,在纤毛气管细胞中表现具有 $[Ca^{2+}]_i$ 提高活性。

使用离心过滤器,测定了能增加纤毛气管上皮中 $[Ca^{2+}]_i$ 的胰蛋白酶消化多肽片段的大小。用 30kDa 孔径的滤器的滤过物不能增加 $[Ca^{2+}]_i$, 而用 100kDa 孔径滤器的滤过物能增加纤毛气管上皮中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。这些结果表明引起纤毛气管上皮中 $[Ca^{2+}]_i$ 提高的胰蛋白酶消化多肽片段大小可能在约 30 和约 100kDa 之间。

根据最近的报导,0.1U/mL 的胰蛋白酶能增加豚鼠气管上皮中的 $[Ca^{2+}]_i$

(Oshiro 等, *Life Sci.*, 71:547-558(2002))。由于本文所述 $[Ca^{2+}]_i$ 实验中估计的胰蛋白酶浓度约为 1U/mL, 我们测试了胰蛋白酶是否在观察到的胰蛋白酶消化人片段诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增加中发挥作用。发现单用 $\geq 1U/mL$ 的胰蛋白酶能增加猪纤毛上皮中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。然而, 用大豆胰蛋白酶抑制剂(10 U/mL)处理抑制了胰蛋白酶(10 U/mL)诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 但不能阻断观察到的胰蛋白酶消化的 *Mhyo* 多肽片段诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 增加(图 14)。这些结果证明胰蛋白酶 *Mhyo* 制品对 $[Ca^{2+}]_i$ 的刺激作用归因于 *Mhyo* 多肽, 而不是胰蛋白酶。

实施例 3-获得能诱导猪纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的 *Mhyo* 多肽的氨基酸序列

10 将有毒 *Mhyo* 菌株 91-3 在添加 20%无支原体猪血清的 Friis 培养基中培养并如上所述离心收集(Zhang 等, *Infect. Immun.*, 62:1616-1622(1994))。生物体进行渗透裂解和离心(35,000 x g, 60 分钟)获得上述膜制品(Pollack JD. (1998) “酶分析”(Enzyme analysis)(第 10 章), 《分子生物学方法》. 第 104 卷:支原体操作, Miles R & Nicholas A 主编. Humana Press, Iotowa. NJ. 79-93 页)。将此膜制品
15 悬浮于 PBS 并用胰蛋白酶以 17:1 比例(w/w)37°C 处理 30 分钟,接着超离心(10,000 x g, 60 分钟)。所得上清液含有活性胰蛋白酶消化片段, 通过 HPLC 纯化, 采用阴离子交换柱(Waters, DEA 5TW 型)和 Tris 缓冲液(pH8.5)配的 0-0.5M NaCl 线性梯度液。以 280nm 吸光率监测洗脱, 收集组分 4 和 8 并进一步通过 C_{18} 反相 HPLC 纯化, 采用水中 0.08%三氟乙酸水溶液配的 0-60%乙腈线性梯度液。或者, 用凝胶过
20 滤、疏水相互作用或大小排阻层析柱技术进一步纯化此多肽。用 Sep-pak 浓缩纯化多肽, 用乙腈-甲醇作为溶剂系统来洗脱。在氮气流下去除溶剂。此外, 用 SDS-PAGE 确认该多肽的分子量。纯化后, 测定收集自明显峰洗脱物的增加纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 的能力。所得多肽制品的纯度通过质谱(Voyager, DE PRO 型)测定。

C_{18} HPLC 纯化和质谱确定的该多肽用 Applied Biosystems 蛋白测序仪(494 型)
25 进行 N-末端氨基酸测序。或者, 内部序列信息可获自用溴化氰切割和酶如内切蛋白酶 Lys-c 切割产生的片段。纯化切割片段并进行 N-末端氨基酸测序。一旦确定 N-末端氨基酸序列, 搜索序列数据库以鉴定全长 *Mhyo* 多肽的氨基酸序列。

用下列方法测定纤毛气管细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。气管细胞获自无 *Mhyo* 的猪, 如 Yamaya 等(*Am. J. Physiol.*, 262:L713-L724(1992))所述。简言之, 纤毛气管
30 上皮细胞用 0.15%链霉菌蛋白酶和 0.01%DNA 酶在无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 MEM 培养基中通过酶消化分离并在 4°C 孵育 24 小时。加入胎牛血清终止酶消化。细胞取自气管并用 Dulbecco MEM 和 Ham F-12(1:1)培养液离心洗涤。将这些细胞冷冻于液氮中。当

要使用时,37°C迅速解冻细胞使其粘附于特制的30mm培养皿5mm孔中的盖玻片上,该盖玻片已用Kreb-Ringer重碳酸盐(KRB)缓冲液配的聚赖氨酸包被。这类培养皿中的培养体积为200 μ L。各个细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 测定方法采用上述图像系统进行(ZhuGe和Hsu, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275:1077-1083(1995))。

- 5 计算具体实验的 $[Ca^{2+}]_i$ 数据,平均相同处理组中至少5个细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的峰值,与接受安慰剂(KRB)的对照组比较。重复一次 Ca^{2+} 生物试验以确认前面的结果。数据用ANOVA分析,平均值比较用Tukey检验进行。 α 水平设置为 $P \leq 0.05$ 。

实施例4-能诱导猪纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的重组Mhyo多肽的表达和特征分析

- 10 能提高 $[Ca^{2+}]_i$ 的膜Mhyo重组多肽(或其片段)用类似别处所述的方法获得(Hsu和Minion, *Infect. Immun.*, 66:4762-4766(1998))。支原体采用作为色氨酸密码密码子的UGA,它通常是终止密码子。因此,采用抑制子系统在大肠杆菌中表达大部分支原体的基因序列。另外,用定点诱变修饰该UGA密码子。

- 将编码Mhyo多肽(或其片段)的核酸克隆到聚组氨酸融合表达载体如pTrcHis
15 中以促进重组产物的纯化。重组大肠杆菌用IPTG诱导,重组Mhyo多肽的产生通过免疫印迹用抗聚组氨酸抗体监测。用B-PER试剂(Pierce)渗透诱导的大肠杆菌,离心去除细胞碎片。重组蛋白通过金属螯合层析用Talon(Clontech)或ProBond(Invitrogen)树脂纯化。测定该多肽的生物活性以证实它增加纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 的能力。对于大批量生产,采用Bio-Rad的生物层析系统。

- 20 测试重组Mhyo多肽增加纤毛气管细胞中 $[Ca^{2+}]_i$ 和诱导气管上皮纤毛损坏的能力。将分离自非致病性Mhyo(菌株J)的膜制品用作这些实验的阴性对照。插入物中的气管上皮细胞用下列7种处理之一处理:(1)阴性对照(自非致病性Mhyo(菌株J)的膜制品,100 μ g/mL), (2)阳性对照(如Mhyo菌株91-3的膜制品,100 μ g/mL), (3)可溶性胰蛋白酶消化的Mhyo多肽片段(10 μ g/mL), (4)重组Mhyo多肽
25 (0.1 μ g/mL), (5)重组Mhyo多肽(1 μ g/mL), (6)重组Mhyo多肽(10 μ g/mL)和(7)重组Mhyo多肽(100 μ g/mL)。各条件进行3次,整个实验重复至少3遍。如上所述进行 $[Ca^{2+}]_i$ 测定。

- 用下列技术评估粘附、纤毛破坏和纤毛损失。将用无菌技术制备的酶消化上皮细胞以 $4-5 \times 10^5$ 个细胞/ cm^2 的浓度置于Millicell-PCF插入物上(0.45 μ m孔大小,0.6 cm^2 面积,Millipore, Bedford, MA),如Young等, *Vet. Microbiol.*,
30 71: 269-279(2000)所述那样。该插入物包被有人胎盘胶原并置于24孔培养板中。细胞生长于空气-液体界面并从下面无血清的DMEM/F-12(1:1)中获得营养,

DMEM/F-12 含 2% ultrosor G 血清取代物(USG 培养基), 添加青霉素和链霉素。

采用培养 18-22 天后的纤毛气管上皮细胞培养物。弃去培养液用含未处理 *Mhyo* 膜蛋白或重组 *Mhyo* 多肽的新鲜 DMEM/F-12 培养液替换, 37°C、7.2%CO₂ 培养 90 分钟(用于测定粘附和纤毛损坏)或 2 天(用于测定纤毛损失)。培养后, 插入物
5 用 PBS 洗 3 次以去除未附着的支原体。用胰蛋白酶-EDTA 处理插入物解离细胞并用 PBS 洗涤。用戊二醛和多聚甲醛原位固定这些细胞并如上述进行扫描电镜检查 (Young 等, *Vet. Microbiol.*, 71: 269-279(2000)) 以确定 *Mhyo* 与纤毛细胞的粘附以及纤毛破坏和损失程度。照片取自各样品中的 5 个随机视野(16 x 23μm²) 并进行图像分析获得纤毛占据区域(用于确定纤毛损失)和支原体粘附纤毛的数据。

10 另外, 评估粘附和纤毛损失用 Zhang 等(*Infect. Immun.*, 62:1616-1622(1994)) 描述的微量滴定板粘附试验和/或 Debey 和 Ross(*Infect. Immun.*, 62:5312-5318 (1994)) 描述的气管移植模型。

Mhyo 多肽的活性位点用缺失突变和/或重叠肽序列作图。此外用 *Mhyo* 多肽制品接种猪以帮助控制猪支原体肺炎, 和/或用对应于该活性位点的肽序列类似物阻
15 断 *Mhyo* 膜多肽的细胞受体。

实施例 5-产生抗 *Mhyo* 多肽抗体, 该多肽能诱导猪纤毛气管细胞中的 [Ca²⁺]_i 增加

5 只雌性 BALB/c 小鼠(8-10 周大)用纯化 *Mhyo* 膜多肽免疫。能使纤毛气管细胞中 [Ca²⁺]_i 增加的纯化 *Mhyo* 多肽经 HPLC、SDS-PAGE 或其它纯化技术获得。各小
20 鼠给予 3 次双周一次的腹膜内注射 50μg 含弗氏佐剂的多肽。最后一次静脉内加强是在第 3 次注射后 1 个月和与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合前 3 天给予 5μg 多肽盐水溶液。每次融合筛选到约 500 个单独克隆, 所用的 5 只小鼠都产生了 MAbs。杂交瘤筛选用间接 ELISA 进行, ELISA 板包被纯化的 *Mhyo* 膜多肽以及对照絮状支原体和
25 非致病性 *Mhyo*(菌株 J)膜多肽。用山羊抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶偶联物检测 MAbs。

实施例 6-能抑制猪纤毛气管细胞中 *Mhyo* 多肽诱导 [Ca²⁺]_i 增加的抗体鉴定

将不同稀释度的抗体加入支原体膜制品或纯化的 *Mhyo* 多肽中, 然后进行 [Ca²⁺]_i 测定。也将该抗体加入无抗原的样品作为非特异性抗体作用的对照。测定
30 [Ca²⁺]_i 变化的方法见以上所述。

用下列技术评估抗体抑制 *Mhyo* 粘附及 *Mhyo* 诱导纤毛破坏和纤毛损失的能力。采用能阻断 *Mhyo*-和重组 *Mhyo* 多肽诱导纤毛细胞中 [Ca²⁺]_i 增加的多克隆和单克隆

抗体。插入物中的气管上皮细胞用下列处理之一处理：(1)对照，(2)*Mhyo* 菌株 91-3 (10⁹CCU)，(3)抗体制品(A 稀释液)加 *Mhyo* 菌株 91-3，(5)抗体制品(B 稀释液)加 *Mhyo* 菌株 91-3，(6)抗体制品(C 稀释液)加 *Mhyo* 菌株 91-3，(7)抗体制品(D 稀释液)加 *Mhyo* 菌株 91-3。将该抗体加入无 *Mhyo* 的样品作为非特异性抗体作用的对照。另外，用热灭活抗体来验证加热是否能去除对 *Mhyo* 诱导粘附和纤毛损失的特异性抑制作用。各条件进行 3 次，整个实验重复至少 3 遍。

纤毛占据区域和 *Mhyo* 粘附纤毛的数据用 ANOVA 分析，平均值比较用 Tukey 检验进行。α 水平设置为 P≤0.05。

10

其它实施方案

可理解尽管本发明已结合详细描述进行了阐明，但上面的描述目的是阐明而非限制本发明范围，本发明范围由所附权利要求限定。其它方面、优势和修改在下列权利要求范围内。

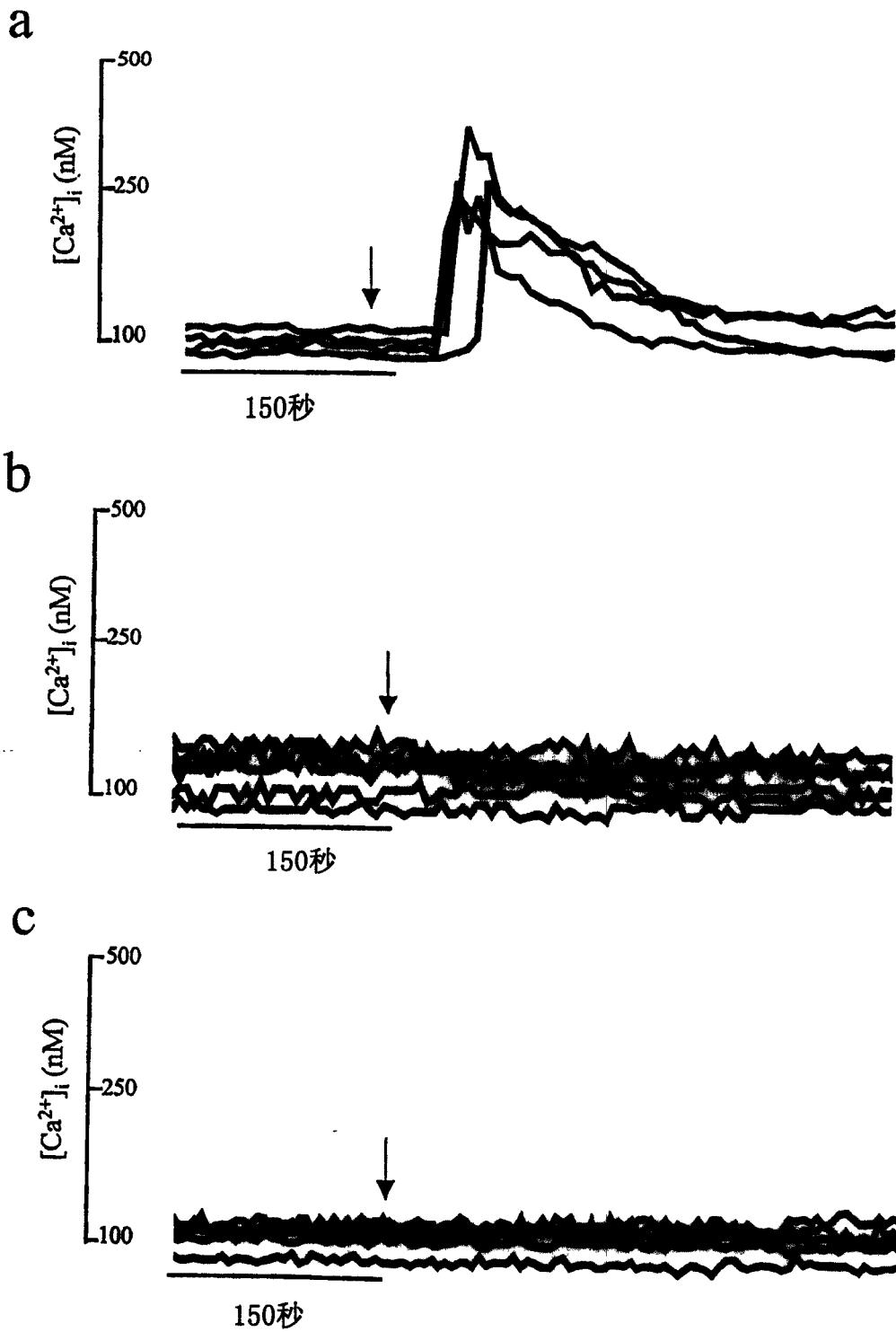


图 1

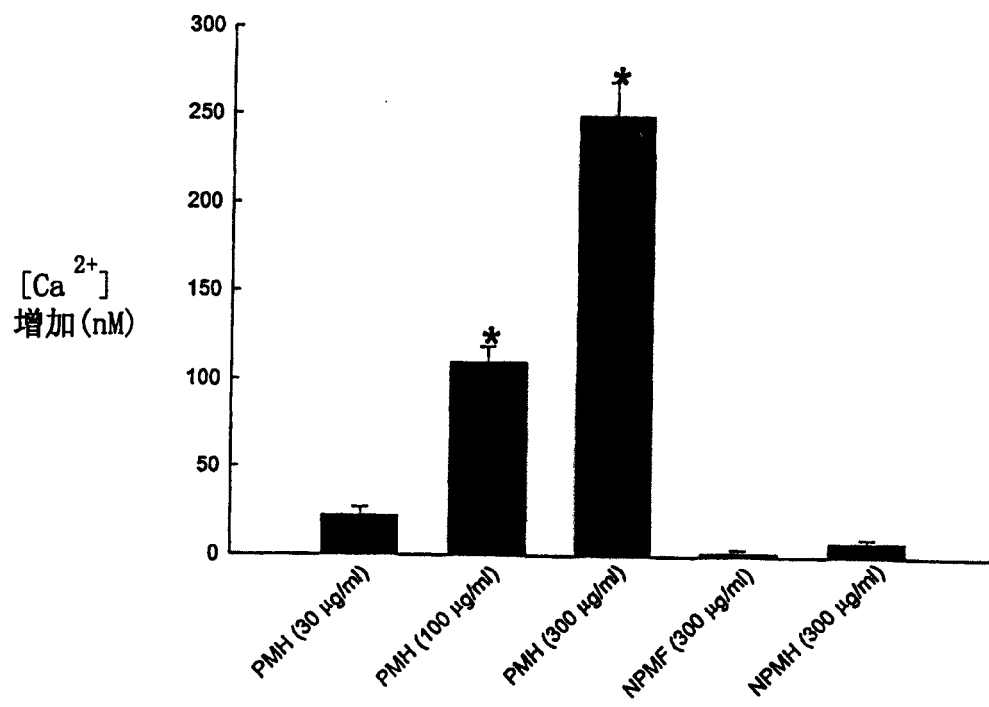


图 2

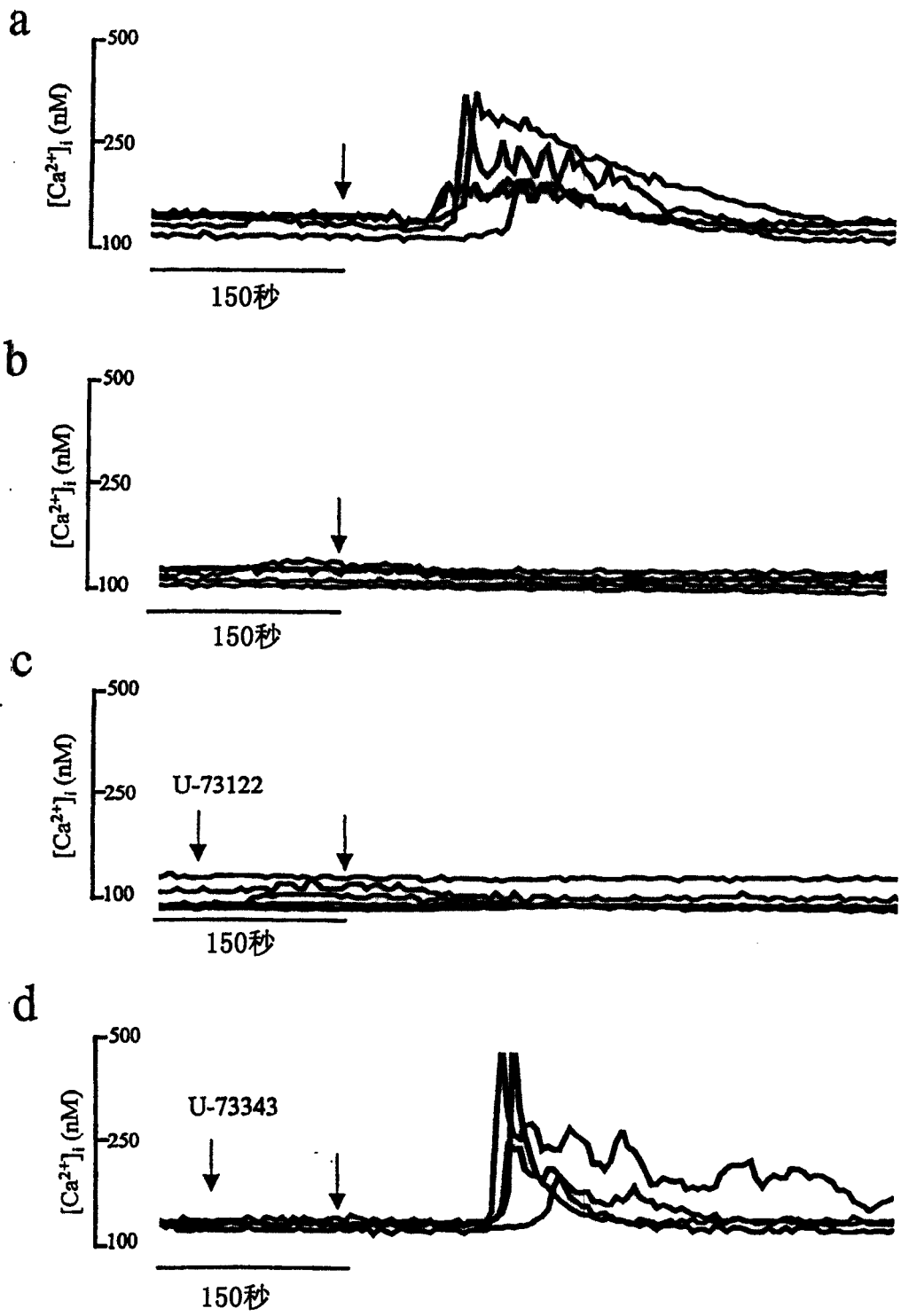


图 3

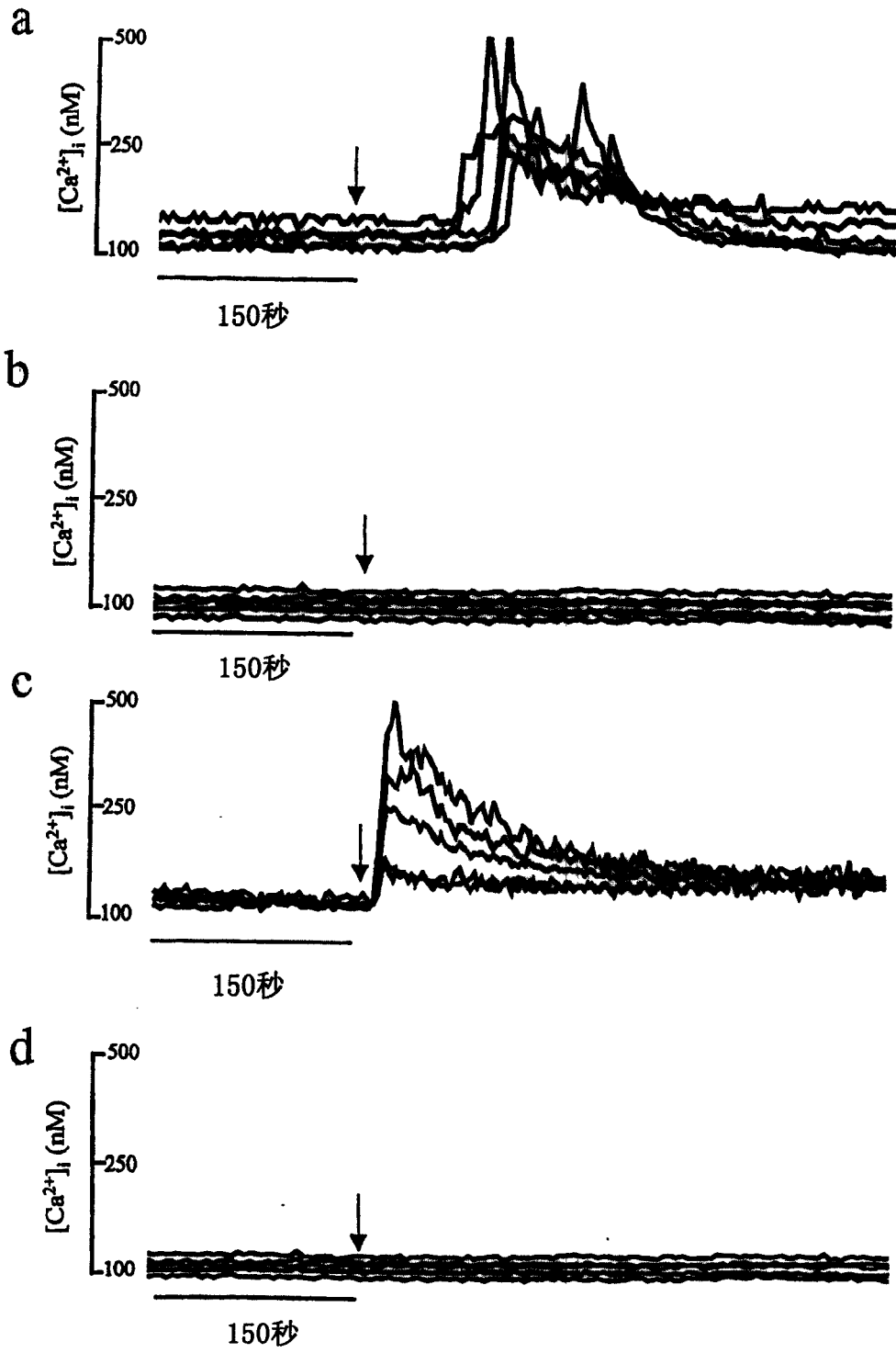


图 4

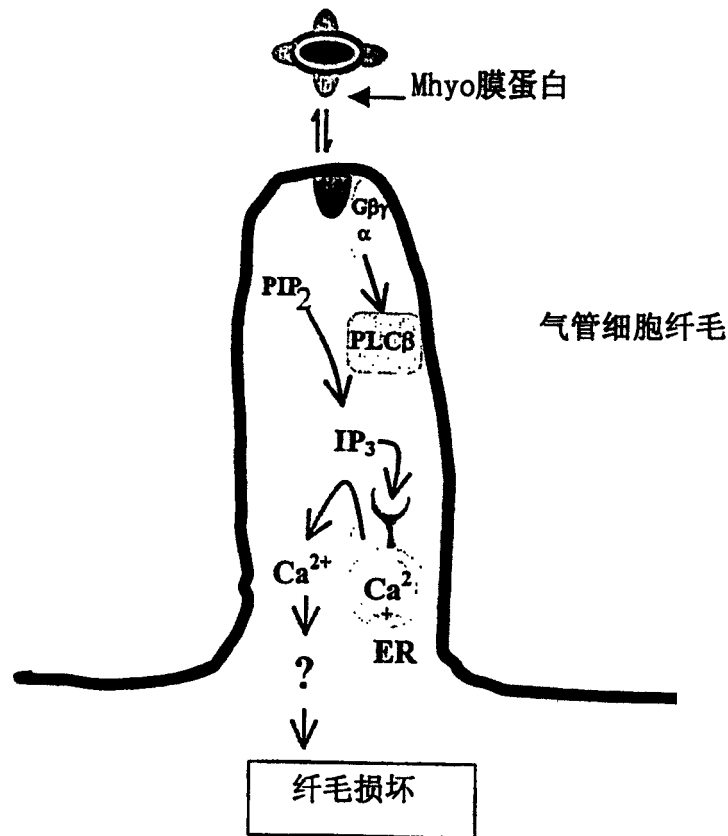


图 5

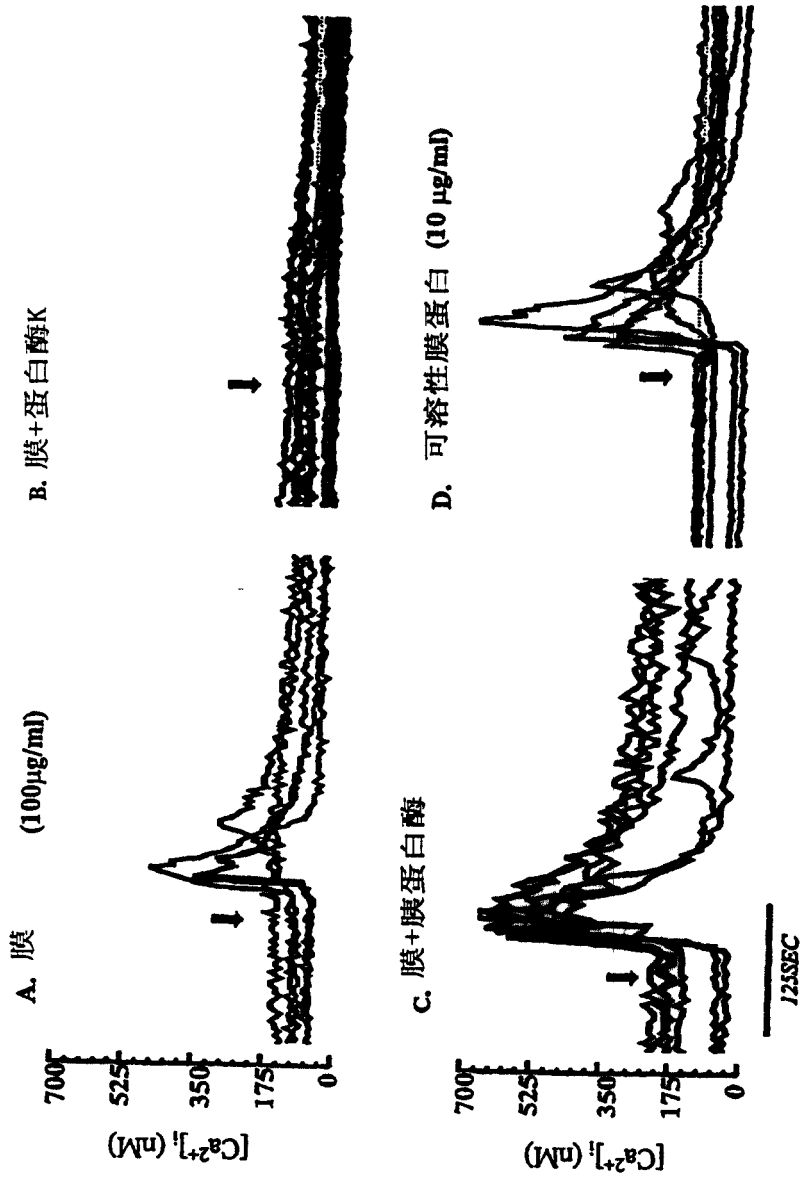


图 6

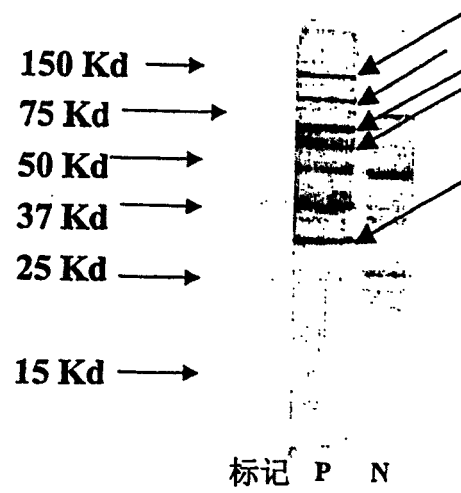


图 7

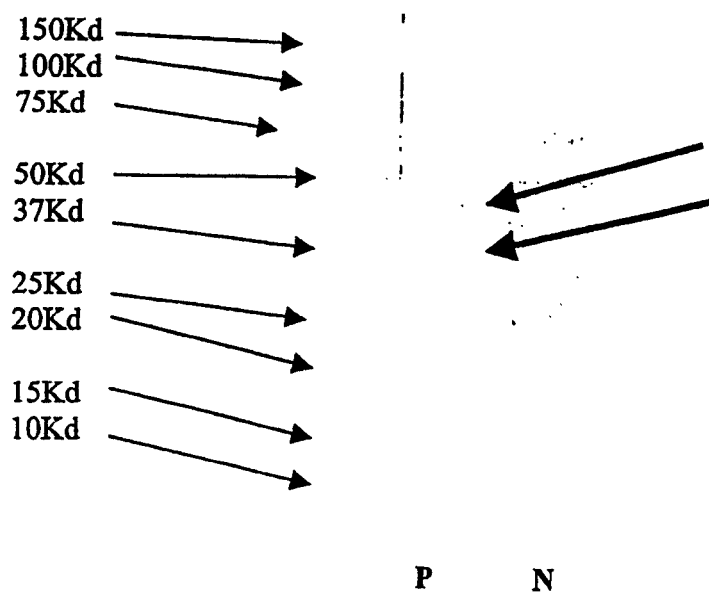


图 8

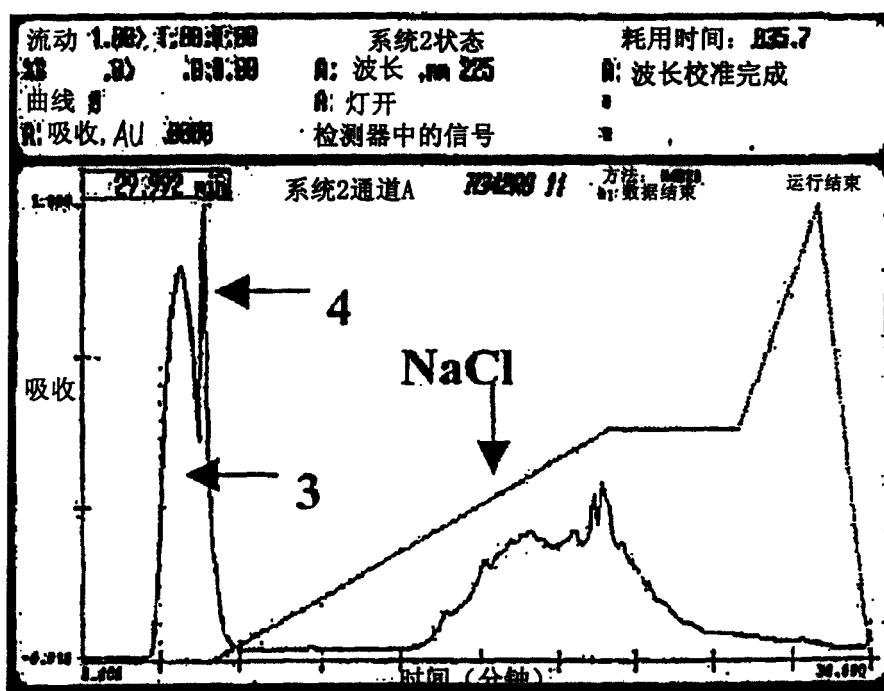


图 9

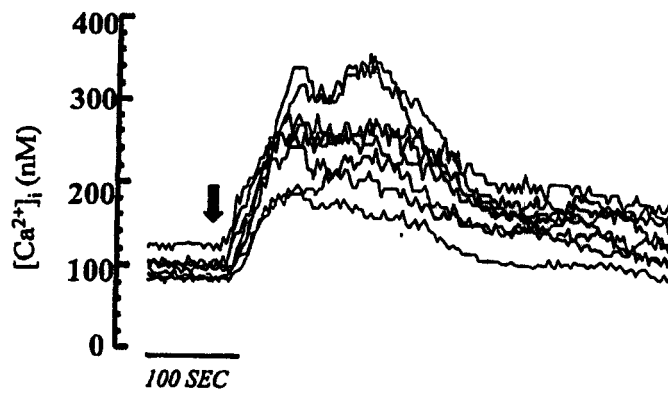
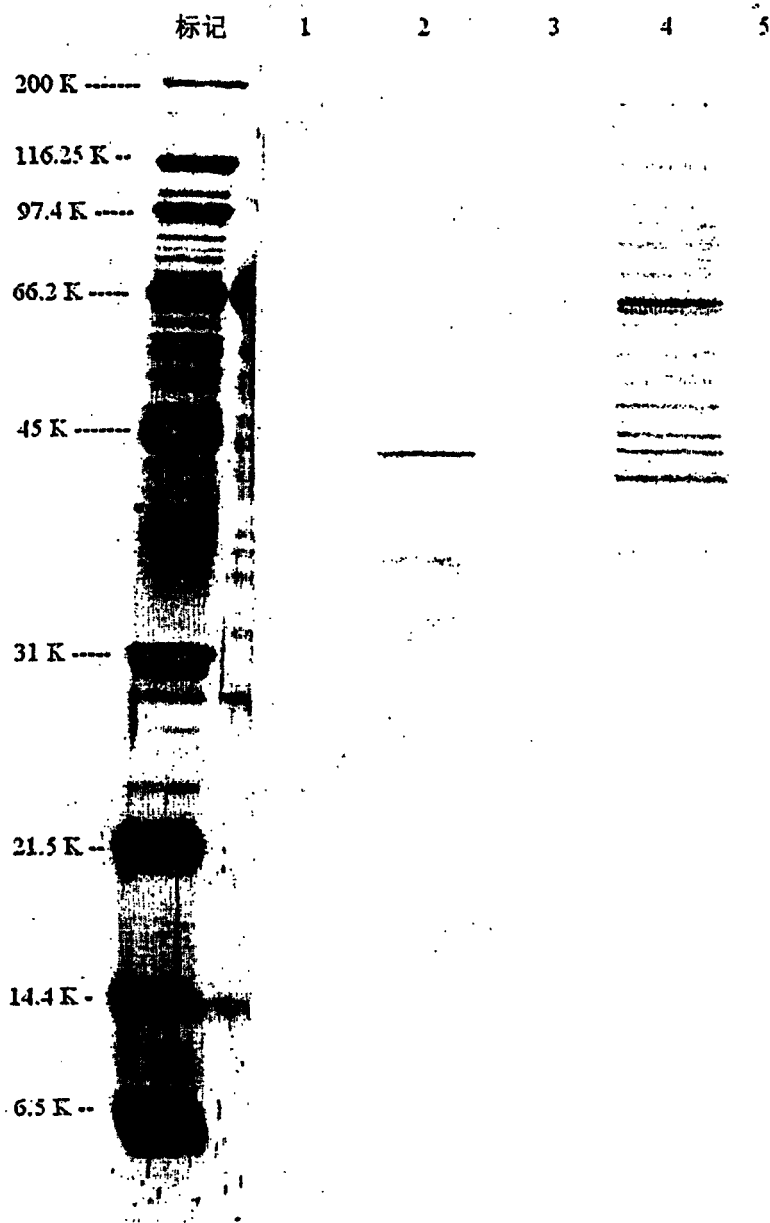


图 10



A.

图 11

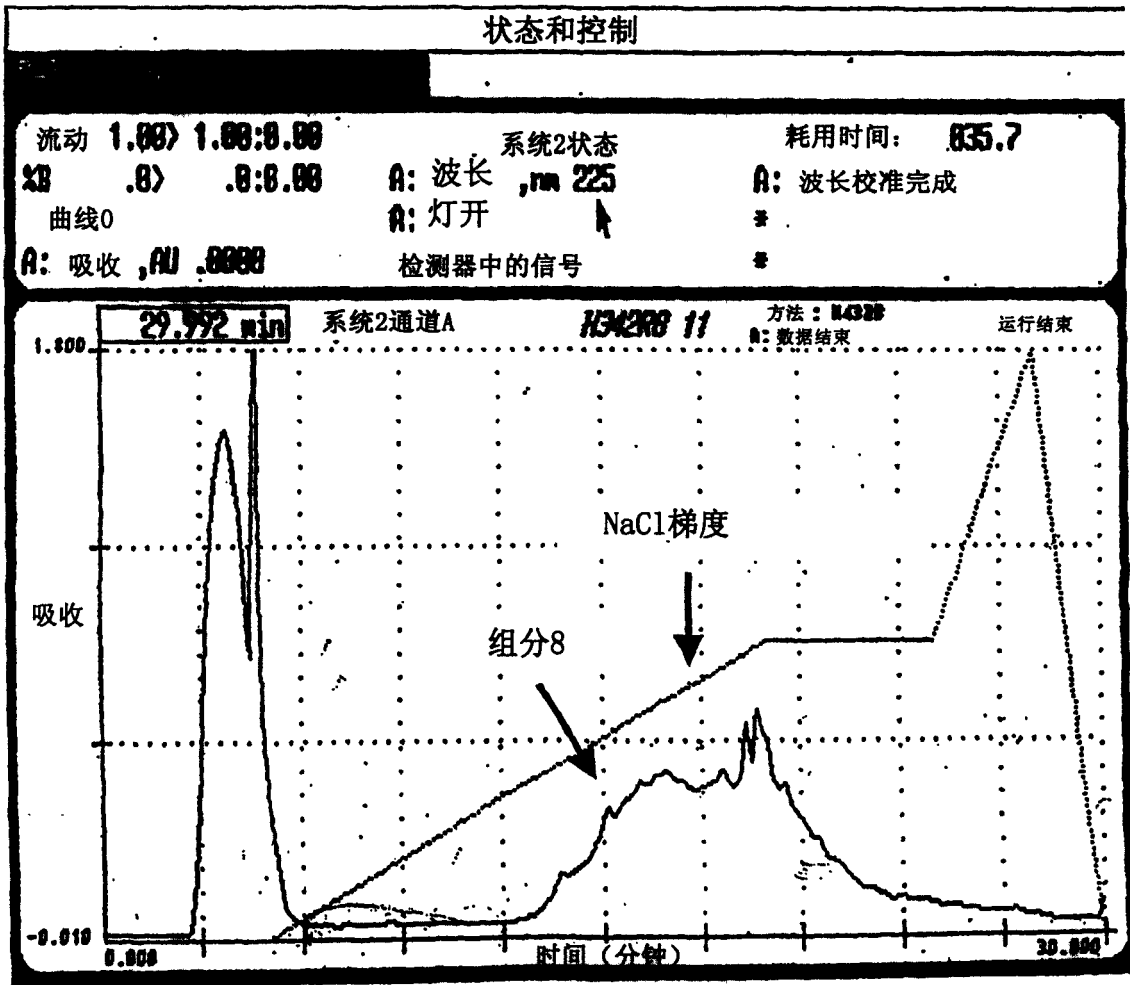


图 12

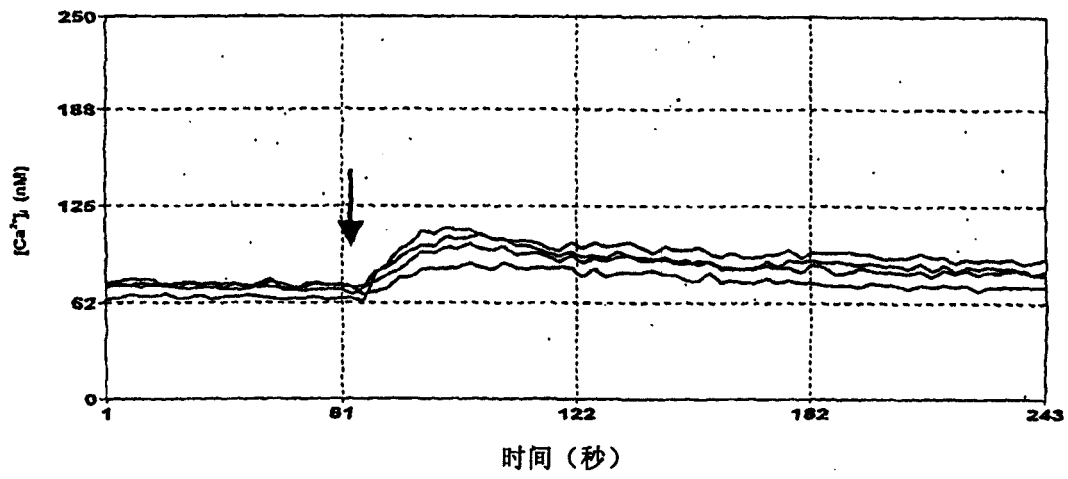


图 13

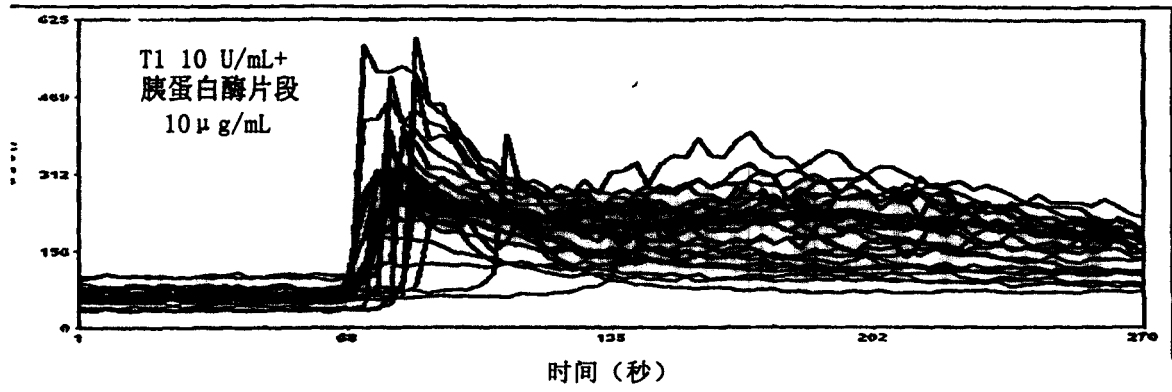


图 14

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 支原体多肽 | | |
| 公开(公告)号 | CN1658906A | 公开(公告)日 | 2005-08-24 |
| 申请号 | CN03813128.5 | 申请日 | 2003-04-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 衣阿华州立大学研究基金会股份有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 衣阿华州立大学研究基金会股份有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 衣阿华州立大学研究基金会股份有限公司 | | |
| [标]发明人 | WH苏 TF扬 RF罗斯 EM周 | | |
| 发明人 | W· H· 苏 T· F· 扬 R· F· 罗斯 E· M· 周 | | |
| IPC分类号 | A61K39/00 A61K39/02 A61P31/04 A61P37/04 C07H21/04 C07K14/30 C07K14/35 C07K16/12 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/37 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/68 A61K49/00 A61K39/395 A61K39/40 A61K39/38 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/567 C12N3/00 | | |
| CPC分类号 | G01N2500/10 G01N33/5014 C07K14/30 A61K39/0241 C07K16/1253 G01N33/6872 G01N2333/30 G01N33/5008 G01N33/56933 C12Q1/37 A61K39/00 | | |
| 代理人(译) | 周承泽 | | |
| 优先权 | 60/370344 2002-04-05 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供涉及支原体的方法和材料。例如，本发明提供的支原体多肽能增加细胞(如猪纤毛气管细胞)的钙释放以及提供的抗体能结合这种支原体多肽。另外，本发明提供鉴定支原体诱导猪纤毛气管细胞钙释放的抑制剂的方法。

