

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310114934.X

C12N 15/30

C12N 15/63

C12N 1/11

C12Q 1/68

G01N 33/53

G01N 33/68

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1226413C

[22] 申请日 2003.11.13

[21] 申请号 200310114934.X

[71] 专利权人 首都医科大学

地址 100054 北京市右安门外西头条 10 号

[72] 发明人 诸欣平 杨雅平 杨静 雷丽萍

审查员 常矛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 4 页

[54] 发明名称 旋毛虫 TS88 基因、其蛋白产物及用途

[57] 摘要

本发明涉及一种来自旋毛虫的新的多核苷酸分子，含有该多核苷酸分子的重组载体，所编码的蛋白质及由所述蛋白质免疫动物产生的抗体。本发明还涉及所述多核苷酸分子、蛋白质和抗体的应用。

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

1. 一种分离的多核苷酸分子，其特征在于所述多核苷酸分子的核苷酸序列选自下列之一：
 - (A) 如图 1 所示序列中的核苷酸序列；
 - (B) 与 (A) 的核苷酸序列编码相同氨基酸序列的蛋白质，但因遗传密码的简并性而在氨基酸序列上有所不同的核苷酸序列；
 - (C) 与 (A) 或 (B) 所述核苷酸序列互补的核苷酸序列。
2. 一种由权利要求 1 的多核苷酸分子编码的多肽，其氨基酸序列是如图 1 所示序列中的氨基酸序列。
3. 一种重组表达载体，其特征在于其含有权利要求 1 所述的多核苷酸分子。
4. 由权利要求 3 所述的重组表达载体转化的宿主细胞。
5. 一种生产权利要求 2 多肽的方法，包括在能使所述多肽表达的条件下培养权利要求 4 所述的宿主细胞。
6. 一种用于体外诊断旋毛虫感染的诊断试剂盒，其特征在于含有权利要求 2 所述的多肽。
7. 权利要求 2 所述的多肽在制备用于体外诊断旋毛虫感染的诊断试剂盒中的用途。

旋毛虫 Ts88 基因、其蛋白产物及用途

发明领域

本发明涉及一种来自旋毛虫的新的核酸分子，含有该核酸的重组，所编码的蛋白质及由所述蛋白质免疫动物产生的抗体。本发明还涉及所述核酸、蛋白质和抗体的应用。

背景技术

旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*, 简称旋毛虫), 可感染人及 150 多种动物, 它所引起的旋毛虫病是一种人畜共患寄生虫病, 呈全球性分布, 严重地威胁了人类健康并对畜牧业造成巨大经济损失。旋毛虫生活史简述如下: 当人或动物宿主生食或半生食含旋毛虫囊包的肉类 (猪肉、狗肉等), 囊包内幼虫在胃液、肠液作用下逸出并在小肠内发育为成虫。雌、雄虫交配后雌虫产新生幼虫。新生幼虫侵入肠粘膜淋巴管或静脉, 随淋巴和血循环到达宿主横纹肌继续发育。旋毛虫的致病过程分为三期: 侵入期、幼虫移行及囊包形成期, 即在该虫生活史的每个环节均可使宿主致病。

旋毛虫病临床表现复杂多样, 诊断较困难, 给及时的治疗造成一定难度, 因此该病的免疫诊断及预防成为当务之急。由于病原体不能在体外大量传代培养, 限制了抗原的获取; 加之旋毛虫抗原的复杂性、多样性, 造成目前尚无理想的高敏感度、高特异性的抗原作为诊断候选抗原分子。

本发明的目的在于: 寻找和克隆旋毛虫抗原新基因, 对该基因的重组蛋白进行免疫学功能的研究, 为旋毛虫病的免疫诊断提供新的候选抗原分子。

发明内容

本发明的一个方面提供了一种多核苷酸分子, 其中包含图 1 (SEQ ID

NO:1) 所示的核苷酸序列或者其高度同源序列。

本发明的另一个方面提供了上述多核苷酸分子所编码的多肽(在本发明中有时称作 Ts88 蛋白), 含有上述多核苷酸分子的重组载体(包括重组表达载体)和宿主细胞。

本发明进一步提供融合蛋白形式的多肽, 所述融合蛋白中本发明的旋毛虫 Ts88 蛋白与本领域已知的载体或融合对象融合。本发明进一步提供由上述蛋白质的基本部分组成的多肽。本发明的多肽适用于预防哺乳动物旋毛虫病的疫苗组合物中和用作诊断试剂。

本发明进一步提供制备上述多肽的方法, 其包括在适于表达多肽的条件下培养用上述重组表达载体转化的宿主细胞, 所说的载体包含含有编码上述多肽之核苷酸序列的多核苷酸分子, 其中所述核苷酸序列是以可操作方式与一个或多个调节元件连接的; 再从细胞培养物中回收所表达的多肽。

本发明的又一个方面提供了针对所述多肽的抗体。

本发明又提供了用于旋毛虫病诊断的试剂盒。

本发明还提供了与上述多核苷酸分子能杂交或与具有作为本发明多核苷酸分子之互补物的核苷酸序列的多核苷酸分子能杂交的寡核苷酸分子。

附图说明

图 1 是 Ts88 全长 cDNA 核酸序列及所编码的蛋白质的氨基酸序列。

图 2 是新克隆的旋毛虫 Ts88 基因与旋毛虫基因组 DNA 和小鼠基因组 DNA 的 Southern 杂交结果。其中 M 是 DNA 分子量标记, 泳道 1 是小鼠基因组 DNA, 泳道 2 是旋毛虫基因组 DNA。

图 3 是将 Ts88 基因插入到 pET-28c(+)原核表达载体内构建成的 Ts88 重组质粒的构建示意图。

图 4 是大肠杆菌 BL21 株中表达的旋毛虫 Ts88 重组蛋白的电泳图。其中 M 是蛋白质分子量标记, 泳道 1 是被 Ts88 重组质粒转化了的大肠杆菌 BL21 株未经 IPTG 诱导时的裂解物, 泳道 2 是被 Ts88 重组质粒转

化了的大肠杆菌 BL21 株经 IPTG 诱导、亲和层析后的杂蛋白洗脱液，泳道 3 是亲和层析后洗脱的含 Ts88 重组蛋白的收集液，泳道 4 是纯化复性后的 Ts88 重组蛋白。箭头所指为重组蛋白条带。

图 5 是 Western 免疫印迹鉴定 Ts88 重组蛋白的免疫特性。其中 M 是 Marker 蛋白分子量 (19-206KD)，泳道 1 是纯化的 Ts88 基因表达蛋白与旋毛虫病人血清反应，泳道 2 是纯化的 Ts88 重组蛋白与感染旋毛虫的猪血清反应，泳道 3 是纯化的 Ts88 重组蛋白与感染旋毛虫的兔血清反应，泳道 4 是纯化的 Ts88 重组蛋白与人工免疫兔血清反应，泳道 5 是纯化的 Ts88 重组蛋白与 Ts88 重组蛋白免疫鼠血清反应。

具体实施方式

本文所用的术语“多核苷酸分子”、“多核苷酸序列”、“编码序列”、“开放阅读框(ORF)”等是指单链或双链的 DNA 和 RNA 分子，可包含一个或多个原核序列，cDNA 序列，包含外显子和内含子的基因组 DNA 序列，化学合成的 DNA 和 RNA 序列，以及有义和相应的反义链。本文使用的术语“ORF”是指编码特定的旋毛虫蛋白质即 Ts88 蛋白所需的、没有任何干扰性终止密码子的最小核苷酸序列。

生产和操作本文公开的多核苷酸分子及寡核苷酸分子的方法是本领域技术人员已知的，并可按照已描述的重组技术(参见 Maniatis 等, 1989, 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约; Ausubel 等, 1989, 分子生物学当前技术, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY; Sambrook 等, 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; Innis 等(编), 1995, PCR 策略, Academic Press, Inc., San Diego; 和 Erlich(编), 1992, PCR 技术, 牛津大学出版社, New York)完成。

本发明提供了包含编码旋毛虫 Ts88 蛋白的核苷酸序列的一种分离多核苷酸分子。该多核苷酸分子可用于实施本发明。在进一步的优选实施方案中，本发明分离的多核苷酸分子包含选自下列成员的核苷酸序列：(1) SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列；(2) 与 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列

至少 70% 相同、优选至少 80% 相同、更优选至少 90% 相同、最优选 95% 相同的核苷酸序列；(3) 在中等严谨杂交条件下(即在 0.5M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM EDTA 中于 65℃ 与结合于滤膜的 DNA 杂交, 并在 0.2xSSC/0.1%SDS 中于 42℃ 洗涤的条件; 参见 Ausubel 等(编), 1989, 分子生物学当前技术, 第 1 卷, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., NY, P. 2.10.3)、优选高度严谨杂交条件(即在 0.5M NaHPO₄、7%SDS、1mM EDTA 中于 65℃ 与结合于滤膜的 DNA 杂交, 并在 0.1x SSC/0.1% SDS 中于 68℃ 洗涤条件; 参阅 Ausubel 等, 1989, 上述文献)下与具有 SEQ ID NO: 1 或其互补序列的多核苷酸分子能杂交的核苷酸序列; (4) 与 SEQ ID NO: 1 编码相同序列的蛋白质、但因遗传密码的简并性而在序列上有所不同的核苷酸序列; 或者(5) 与(1)-(4)中任一核苷酸序列互补的核苷酸序列。

本文所说的多核苷酸分子“可用于实施本发明”是指该多核苷酸分子可用于以标准扩增技术扩增旋毛虫特异性多核苷酸分子, 或作为诊断试剂用以检测被旋毛虫感染的动物体液或组织样品中旋毛虫特异性多核苷酸的存在。

本发明进一步提供包含编码同源于旋毛虫 Ts88 蛋白之多肽的核苷酸序列的一种分离多核苷酸分子。本文中提到的同源于旋毛虫 Ts88 蛋白的多肽时所使用的术语“同源”是指多肽本来具有旋毛虫 Ts88 蛋白的氨基酸序列, 但其中一个或多个氨基酸残基已被不同的氨基酸残基保守地取代, 并且所得到的多肽可用于实施本发明。保守氨基酸取代是本领域已知的。造成这样的取代的规则包含由 Dayhof, M.D.(1978, 国家生物医学研究基金, Washington, D.C., 第 5 卷, 增刊 3)等所述的取代规则。更具体地说, 保守氨基酸取代发生在与其酸性、极性或侧链大小相关联的氨基酸家族内。一般可将遗传编码的氨基酸分为四组: (1)酸性氨基酸 = 天冬氨酸、谷氨酸; (2)碱性氨基酸 = 赖氨酸、精氨酸、组氨酸; (3)非极性氨基酸 = 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸; (4)不带电的极性氨基酸 = 甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸也共

同分类为芳香氨基酸。任何特定组内的一个或多个取代，例如用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、或用谷氨酸取代天冬氨酸、或用丝氨酸取代苏氨酸，或任何其他氨基酸残基结构上相关的氨基酸残基，例如有相似酸性、极性、侧链大小的，或在其某些组合方面有相似性的氨基酸残基取代，一般对多肽的功能或免疫原性不会有太大影响。

基本同源的蛋白质和多肽其特征在于具有一个或多个氨基酸取代、删除或添加。这些改变优选影响较小的变换，即保守氨基酸取代(见表 2)及其它不会严重影响蛋白质或多肽的折叠和活性的取代；小的删除，通常是 1-约 30 个氨基酸的小删除；及小的氨基或羧基末端延伸，诸如氨基末端甲硫氨酸残基，长达约 20-25 个残基的小连接肽，或便于纯化的小延伸(亲和标记)，如多组氨酸束、蛋白 A(Nilsson 等, EMBO J.4: 1075, 1985; Nilsson 等, 酶学方法, 198: 3, 1991)。编码亲和标记的 DNA 可从产品供应商处购买到。

本文中所说的多肽“可用于实施本发明”是指该多肽可用作诊断试剂，以检测新近被旋毛虫感染的、或已被旋毛虫感染的动物血液或血清样品中旋毛虫特异性抗体的存在。

本发明进一步提供由本发明的旋毛虫 Ts88 相关性多核苷酸分子的基本部分组成的多核苷酸分子。旋毛虫 Ts88 相关性多核苷酸分子的“基本部分”在本文中是指组成上小于 Ts88 相关性多核苷酸分子的完整核苷酸序列，但包含 Ts88 相关性多核苷酸分子之核苷酸序列的至少约 5%，较好至少约 10%，并可用于实施本发明的多核苷酸分子。

本发明进一步提供与本发明上述多核苷酸分子能杂交，或与具有作为本发明上述多核苷酸分子之互补物的核苷酸序列的多核苷酸分子能杂交的多核苷酸分子。这样的寡核苷酸分子较好是至少长约 15nt，更好是长约 25 nt，尤其是至少 50nt，并可在高度严紧条件下与一种或多种上述多核苷酸分子杂交。所说的高度严紧条件是在 6XSSC/0.5%焦磷酸钠中洗膜，并且洗膜温度对于长约 14 碱基者为大约 37℃，长约 17 碱基者为大约 48℃，长约 20 碱基者为大约 55℃，长约 23 碱基者为大约 60℃。本发明的较长寡核苷酸分子的其他杂交条件可由本领域技术人员按照标准技

术来确定。在一优选实施方案中，本发明的寡核苷酸分子互补于本发明上述多核苷酸分子至少之一的一部分。

本发明的寡核苷酸分子可用于多种目的，其中包括作为扩增旋毛虫特异性多核苷酸分子的引物以用于诸如疾病鉴别诊断，或者编码或用作基因调节的反义分子。就诊断方面来说，可使用适当设计的引物检测动物组织或体液等样品中旋毛虫特异性多核苷酸分子的存在。特异性扩增产物的产生可支持旋毛虫感染的诊断，而缺少扩增的产物则可能指示没有感染。例如 Innis 等人(1995, 出处同前)和 Erlicch(1992, 出处同前)编辑的前述文献中描述了进行扩增的方法，例如聚合酶链反应(PCR)方法。本领域已知的其他扩增技术也可使用，例如连接酶链反应法。也可使用本文公开的多核苷酸分子的序列设计用于从旋毛虫的其他种或株系中分离同源基因的引物。

本发明进一步提供包含本发明多核苷酸分子的克隆载体、表达载体、包含任何所说载体的被转化宿主细胞，以及由其衍生的新的株系或细胞系。在一优选实施方案中，本发明提供包含一种多核苷酸分子的重组载体，所说多核苷酸分子具有编码旋毛虫 Ts88 蛋白的核苷酸序列。

优选地，本发明的重组载体，特别是表达载体的构建方式能使得本发明多核苷酸分子的编码序列与转录和翻译编码序列所需的一个或多个调节元件可操作性地连接，以产生多肽。本文中使用的术语“调节元件”包括但不只限于编码诱导型和非诱导型启动子、增强子、操纵子及本领域已知的可用于驱动和/或调节多核苷酸编码序列表达的其它元件的核苷酸序列。另外，本文所说的编码序列与一个或多个调节元件“可操作性地连接”是指调节元件可有效地调节并允许转录编码序列或翻译其 mRNA，或发挥两方面的功能。

构建包含与适当的调节元件可操作性地连接的特定编码序列的重组载体的方法是已知的，并可使用这些方法实现本发明。这些方法包括体外重组技术、合成技术和体内遗传重组（如参见 Maniatis 等人(1989)的上述文献）。

可用于表达本发明的旋毛虫 Ts88 蛋白编码序列的各种载体是本领域

已知的，其中包括含有特定编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 和粘粒 DNA 表达载体。可经加工而含有本发明的多核苷酸分子的质粒包括 pUC8、pUC9、pBR322 和 pBR329(Biorad Laboratories, Richmond, CA)、pPL 和 pKK223(Pharmacia, Piscataway, NJ)、pQE50(Qiagen, Chatsworth, CA)和 pGEM-T EASY (Promega, Madison, WI)等。可经加工而含有本发明的多核苷酸分子的典型真核表达载体包括蜕皮激素诱导型哺乳动物表达系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、基于巨细胞病毒启动子-增强子的系统(Promega, Madison, WI; Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen), 和基于杆状病毒的表达系统 (Promega) 等。

这些和其他载体的调节元件可在其强度和特异性方面各不相同。基于所利用的宿主/载体系统，可以使用多种适当的转录和翻译元件中的任一种。例如，当在哺乳动物细胞系统中克隆时，可使用从哺乳动物细胞基因组中分离的启动子，如小鼠金属硫蛋白启动子，或从生长于这些细胞内的病毒中分离的启动子，如痘苗病毒 7.5K 启动子或莫洛尼鼠类肉瘤病毒长末端重复序列。可使用以重组 DNA 或合成技术得到的启动子以转录被插入的序列。另外，在特定诱导子，例如适于金属硫蛋白启动子的锌和镉离子的存在下，由某些启动子启动的表达可以被增强。转录调节区或启动子的非限制性例子包括用于细菌的 β -gal 启动子、T7 启动子、TAC 启动子、trp 和 lac 启动子、trp-lac 融合启动子等；用于酵母的糖酵解酶启动子，如 ADH- 和 ADH-II 启动子、GPK 启动子、PGI 启动子、TRP 启动子等；以及用于哺乳动物细胞的 SV40 早期和晚期启动子、腺病毒主要晚期启动子等。本发明进一步提供包含旋毛虫 Ts88 基因之启动子的核苷酸序列的多核苷酸分子，其可用于在旋毛虫中表达本发明的编码序列。

为足够地翻译被插入的编码序列，还需要特异性起始信号。这些信号一般包括 ATG 起始密码子及相邻序列。在将包含其自身的起始密码子和相邻序列的本发明的多核苷酸分子插入到适当的表达载体中的情况下，可能不必加入另外的翻译控制信号。然而，当只插入一部分编码序列时，可能需要包括 ATG 起始密码子等的外源翻译控制信号。可从各种

来源，即天然和合成来源，得到这些外源翻译控制信号和起始密码子。再者，起始密码子必须与编码区的读框一致，以确保整个插入片段符合读框地翻译。

也可构建将表达包含本发明蛋白质或多肽和融合对象的融合蛋白质的表达载体。这样的融合蛋白质例如可用于产生抗旋毛虫蛋白的抗血清、研究旋毛虫蛋白的生化性质、工程化修饰表现有不同免疫学或功能性质的旋毛虫蛋白、帮助鉴定或纯化重组表达的旋毛虫蛋白或改善其稳定性。可能的融合蛋白表达载体包括但不只限于插入了编码 β 半乳糖苷酶和 *trpE* 融合体、麦芽糖结合蛋白融合体、谷胱甘肽-S-转移酶融合体及多组氨酸融合体（载体区域）之序列的载体。可用于构建编码这些和其他融合蛋白的表达载体的方法是本领域已知的。

可用融合蛋白质帮助纯化已表达的蛋白质。在一非限制性实施方案中，可使用直链淀粉树脂纯化 Ts88-麦芽糖结合性融合蛋白，可使用谷胱甘肽琼脂糖小球纯化 Ts88-谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白质，可使用二价镍树脂纯化 Ts88-多组氨酸融合蛋白质。或者，也可使用抗载体蛋白质或肽的抗体对融合蛋白质进行亲和层析纯化。例如，可将编码单克隆抗体之靶表位的核苷酸序列工程化转移到与调节元件可操作性地连接的表达载体中，并限定其位置以使所表达的表位融合到本发明的旋毛虫蛋白上。在一非限制性实施方案中，可用标准技术在相当于 Ts88 蛋白之氨基或羧基末端的某个点上插入编码 FLAGTM 表位标记(其为亲水性标记肽)(Znternational Biotechnologies Inc.)的核苷酸序列中，然后可使用市售的抗 FLAGTM 抗体检测并亲和纯化所表达的 Ts88 蛋白-FLAGTM 表位融合体产物。

也可以修饰表达载体使之含有编码特定蛋白酶切割位点的多接头序列，从而可经特定蛋白酶处理而从载体区域或融合对象释放出已表达的旋毛虫蛋白。例如，融合蛋白载体可包含编码凝血酶或因子 Xa 裂解位点的核苷酸序列。

可使用已知方法将位于旋毛虫蛋白编码序列上游且读框一致的信号序列加工到表达载体中，以指导所表达之蛋白质的运输和分泌。信号序

列的非限制性实例包括 α 因子、免疫球蛋白、外膜蛋白质、青霉素酶及T细胞受体等的信号序列。

为了有助于筛选出经本发明重组载体转化或转染的宿主细胞，可以工程化修饰载体使之进一步包含报道基因产物或其他选择标志的编码序列。这样的编码序列较好是与上述调节元件可操作性地连接的。用于实施本发明的报道基因是本领域熟知的，包括编码氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白、萤火虫荧光素酶和人生长激素等的基因。编码选择标志的核苷酸序列是本领域已知的，包括编码赋予抗生素抗性或抗代谢物抗性，或提供营养缺陷型需要等的基因产物的那些核苷酸序列。这些序列的例子包括编码胸苷激酶活性，或抗氨甲喋呤、氨基青霉素、卡那霉素、氯霉素、氨基糖苷或潮霉素等的那些序列。

本发明进一步提供包含本发明的多核苷酸分子或重组载体的已转化宿主细胞，以及由之衍生的细胞系。可用于实施本发明的宿主细胞可以是真核或原核细胞。这样的已转化宿主细胞包括但不只限于微生物，例如用重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA载体转化的细菌，或者用重组载体转化的酵母，或者是动物细胞，如用重组病毒载体如杆状病毒感染昆虫细胞，或用重组病毒载体如腺病毒或痘苗病毒感染的哺乳动物细胞等。例如，可使用大肠杆菌菌株，如DH5 α 菌株。真核宿主细胞包括酵母细胞，但也可有效地利用小鼠、仓鼠、牛、猴或人细胞系等哺乳动物细胞。可用于表达本发明的重组蛋白质的真核宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NIH/3T3等。

较好是将本发明的重组载体转化或转染到细胞的基本均一培养物的一个或多个宿主细胞中。一般可按照已知技术，例如原生质体转化、磷酸钙沉淀、氯化钙处理、微量注射、电穿孔、经与重组的病毒接触进行感染、脂质体介导的转染、DEAE-葡聚糖转染、转导、接合或微粒轰击等技术将载体导入宿主细胞内。可使用标准方法选择转化体，例如通过选择表达与重组表达载体相关的可选择标志如抗生素抗性的细胞的方法。

一旦将表达载体导入宿主细胞后，即可使用Southern杂交分析、限

制性酶切分析、包括反转录酶 PCR(rt-PCR)的 PCR 分析等标准技术证实本发明的多核苷酸分子是否整合并保留在宿主细胞基因组中或以附加体形式存在，或者用免疫学检测法检测预期的蛋白质产物。可用本领域已知的至少下列四种一般性方法中的一种鉴定含有和/或表达本发明的多核苷酸分子的宿主细胞：(i)DNA-DNA、DNA-RNA、或 RNA-反义 RNA 杂交；(ii)检测“标志”基因功能的存在；(iii)检测特异性 mRNA 转录本在宿主细胞中的表达，以估计转录水平；或(iv)以本领域已知的免疫检测法检测成熟多肽产物的存在。

一旦已将本发明的多核苷酸分子稳定导入到适当的宿主细胞中之后，即可克隆增殖已转化的宿主细胞，并在有助于最大量产生所编码的多肽的条件下培养所得到的细胞。这样的条件一般包括培养已转化的细胞达到高密度。当表达载体含有诱导型启动子时，可根据需要，利用温度改变、营养素耗尽、加入义务诱导剂(如糖类类似物，例如异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、过量代谢付产物积聚等适当诱导条件以诱导表达。

当多肽保留在宿主细胞内时，应收获并裂解细胞，并在本领域已知的尽可能减少蛋白质降解的提取条件下，例如于 4℃ 和/或有蛋白酶抑制剂存在条件下，从裂解物中基本上纯化或分离产物。如多肽能从宿主细胞中分泌出来，则可简单地收集已耗尽的营养素培养基，并从中基本上纯化或分离多肽。

必要时，可使用标准方法，包括但不只限于硫酸铵沉淀，大小分级分离、离子交换层析、HPLC、密度梯度离心及亲和层析法，从细胞裂解物或培养基中基本上纯化或分离多肽。如果多肽缺乏生物学活性，则可作根据分子大小、或与多肽特异性抗体的反应性，或根据融合体标记的存在检测之。用于实施本发明时，多肽可以是已分泌到培养液中或存在于细胞裂解物中的未纯化状态，但较好是已从中得到基本纯化或分离。本文中所说的多肽“基本上已纯化”，是指该多肽构成特定制剂中蛋白质的至少约 20%(重量)。另外，本文中所说的多肽“已分离”，指的是该多肽构成特定制剂中蛋白质的至少约 80%(重量)。

因此, 本发明提供由本发明多核苷酸编码的基本上已纯化或分离的旋毛虫 Ts88 蛋白. 在一优选实施方案中, 旋毛虫 Ts88 蛋白具有图 1(SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列.

本发明进一步提供同源于所述旋毛虫 Ts88 蛋白的多肽, 其中术语“同源”具有上文就多肽所限定的含义.

本发明进一步提供由本发明任何一种上述多肽的基本部分组成的多肽. 本文使用的术语 - 本发明多肽的“基本部分”或“肽片段”意指组成上小于相应全长度多肽之完整氨基酸序列、但包含其氨基酸序列的至少约 10%、较好至少约 20%、并可用于实施本发明的多肽 (“可用于”具有上文就多肽所限定的含义). 特别优选的是具有免疫原性 (即能够诱导免疫反应而产生特异地抗相应的全长度旋毛虫多肽的抗体) 的肽片段.

本发明进一步提供包含与本领域已知的载体或融合对象融合的任一种上述多肽的融合蛋白质.

本发明的多肽可用于多种目的, 包括作为诊断试剂, 例如以 ELISA 检测等标准检测法筛选动物血液或血清样品中的旋毛虫特异性抗体; 或如下所述用作产生多克隆或单克隆抗体的抗原, 其中可以使用所述抗体作为诊断试剂, 例如以 Western 印迹检测法等标准技术筛选动物细胞、组织或体液样品中的旋毛虫特异性蛋白质.

可以在蛋白质水平上修饰本发明的任何多肽, 以改善或改变其生物学或免疫学特征. 可使用已知技术对多肽进行一种或多种化学修饰, 以制备其类似物.

可以在分子上连接一个或多个化学基团或另一种蛋白质如血清白蛋白、匙孔虫咸血兰蛋白或 BSA, 或者多聚氨基酸(如多聚赖氨酸), 或多糖(如 Sepharose, 琼脂糖, 或经过修饰或未经修饰的纤维素)上等, 以制备本发明多肽的衍生物. 进行这些连接反应的方法是蛋白质化学领域中已知的.

本发明进一步提供抗本发明多肽的分离抗体. 在一优选实施方案中, 可使用已知方法产生抗旋毛虫 Ts88 蛋白的抗体. 可用部分或基本上纯化或分离的旋毛虫 Ts88 重组蛋白, 或其如上文描述的同系物、融合蛋白、

基本部分、类似物或衍生物免疫选自猪、牛、马、兔、山羊、绵羊或小鼠等各种宿主动物。可使用下文描述的佐剂提高抗体产生量。

可从被免疫动物的血清中得到和分离多克隆抗体，并使用常规方法试验其对抗原的特异性。或者，也可使用由培养的连续细胞系生产抗体分子的任何技术制备并分离单克隆抗体。这些技术包括但不只限于原先由 Kohler 和 Milstein(自然, 1975, 256: 495 - 497)描述的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, 1983, 今日免疫学, 4:72; Cote 等, 1983, 美国国家科学院院报, 80: 2026 - 2030), 以及 EBV 杂交瘤技术(Cole 等, 1985, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 86). 或者, 可采用已述的生产单链抗体的技术(如参见美国专利 4, 946, 778)生产旋毛虫抗原特异性单链抗体。

含有本发明多肽的特异性结合位点的抗体片段也包括在本发明范围内, 并可用已知技术制备。这样的片段包括但不只限于可由胃蛋白酶消化完整抗体分子而产生的 $F(ab')_2$ 片段, 和可经还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥而产生的 Fab 片段。或者, 也可构建 Fab 表达文库(Huse 等, 1989, 科学, 246: 1275 - 1281), 以迅速鉴定对旋毛虫蛋白有所需特异性的 Fab 片段。

生产和分离单克隆抗体及抗体片段的技术是本领域已知的, 并在例如下列文献中给出了更详细的描述: Harlow 和 Lane, 1988, 抗体: 实验室手册, 冷泉港实验室和 J.W. Cooding, 1986, 单克隆抗体: 原理与实践, Academic Press, London (其列为本文参考文献)。

下列实施例只是举例描述, 而不用来限制本发明的范围。

实施例

实施例 1 旋毛虫抗原基因 Ts88 的克隆及序列分析

1. 旋毛虫动物模型的建立:

按传统的胃蛋白酶消化法(Gamble HR. Comparison of immune effects in mice immunized with *Trichinella spiralis* adult and larval antigens, J Parasitol. 1985 Oct, 71(5):680-682) 消化并收集黑龙江猪源的

旋毛虫幼虫，给昆明鼠以每只 200 条喂食，常规动物室饲养保存。

2. 筛选血清的制备

收集分离自猪体的黑龙江株旋毛虫（国际标准虫株编码 ISS533）成虫（参考文献《旋毛虫新生幼虫差减 cDNA 文库的构建及其初步筛选》，刘明远，中国兽医学报，2001.21（4）：355-358），将成虫虫体放于研磨器中，冰浴下快速研磨 15 分钟。将研磨后的液体移入 10ml 离心管，超声（于冰上）3 次，3 分钟/次，中间休息 1 分钟。反复冻融数次，离心取上清即得全虫可溶性抗原。免疫日本大耳白兔（200 μ g/只），隔周加强 3 次，获得人工免疫兔血清；实验兔喂以 4000 条旋毛虫肌幼虫，4 周后获人工感染兔血清。经 ELISA 测定两者的血清滴度均达 1：8000。

3. 免疫筛选表达文库

旋毛虫成虫 λ ZAP II cDNA 表达文库购自刘明远（参考文献《中国旋毛虫分离株成虫和新生幼虫基因文库的构建和筛选》，中国兽医学报，1998，18（2）：147-150.）。

1 μ l 旋毛虫成虫 λ ZAP II cDNA 表达文库稀释液加入 600 μ l 宿主菌 XL1-Blue 中，37 $^{\circ}$ C，吸附 20 分钟加入顶层琼脂，倒置于 42 $^{\circ}$ C 温箱中培养至有针尖大小的噬菌斑长出。把硝酸纤维素膜（Gelman 公司）铺在平板上，放在 37 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜。第二天在室温下将膜做好标记，从平板上揭下，浸入被大肠杆菌噬菌体裂解液（STRTAGENE 公司）预先吸附的一抗工作液（人工免疫兔血清和人工感染兔血清，均为 1：1000）30 分钟。把膜浸入二抗工作液（碱性磷酸酶-羊抗兔 IgG，为 1：7500，Promega 公司），30 分钟。浸入显色液 NBT、BCIP（Promega 公司）中，充分显色后，加入终止液（试剂盒 ProtoBlot Immunoscreening System，Promega 公司）。用人工免疫兔血清筛选获得 9 个阳性克隆，再用人工感染兔血清复筛，获得 3 个阳性克隆，体外剪切环化后（参考文献《从卵巢癌 cDNA 表达文库筛选肿瘤抗原基因的研究》，袁明，细胞与分子免疫学杂志，2001，17（2）：138-140），经 PCR 及 Southern Blot 鉴定，选取编号为 Ts88 克隆进行 DNA 序列测定。

4. 5'端 cDNA 末端快速扩增技术获 DNA 全长

用 5'-RACE 试剂盒 (Gibco BRL 公司) 进行 Ts88 基因的 5' 末端延伸。根据该基因的 cDNA 第一链设计三个特异扩增引物进行 PCR。引物序列为:

T88-R1: GGCTCGAGTCAGTTGACCGATGCTGTGG(SEQ ID NO:3);

T88-R2: CGGACATCTGCTTCCACTGT(SEQ ID NO:4);

T88-R3: TTGCTACTGACTTGCATGCT(SEQ ID NO:5).

扩增产物经克隆测序, 获 Ts88 cDNA 全长序列, 示于图 1 (SEQ ID NO:1) 中:

```

TTATTTACCGAACTTAAAAGTTTTTGTGAATATTATAGCAAGTATTTTACTCGATTGCAACGCTCATGAACACTGTACTT      80

GCAAGGAATGCAGTGAGAGAGTGAGTGAATTGTACGCTGTTGCTCTGTTTTAAATTATCAATTCAAATAAATATTGTTTG      160

CTGATTAGCAGATTTGTGCATTTTACAAAACGCCAAATAATTTATTTTCCATTTGAAATTGCCGTTGAACGGAAACTTT      240

AAAATTTACATGCAAACGCCTCCTCCACCGGAATAATGAAAGCATCGGCAGTGAAATGTGAAAATGAACAGGCAGTGAAT      320

                                     M K A S A V K C E N E Q A V N      15

GCTGAACGAGAACAATATGTGGAAAATGGCCAAAAGTGCGAAGAGCAAATGCACCCCGATTAATCGATCTGCTTGTGCA      400

A E R E Q Y V E N G Q K C E E Q N A P R L I D L L V Q      42

AGITCACTATGACAATGATAATTGTTGATGGTTTCAACGAAAAGAAATGGCACCATATTTTGTGGAGTGTGCTCAGCA      480

V H Y D N D N L L M V S T E R N G T I F C G V L L S      68

TGCAAGTCAGTAGCAATGAGACACCGTTCCGGCATGAATGCGAGCAAATTTGAACAGTGGAAGCAGATGTCCGCACAGCAG      560

M Q V S S N E T P F G M N A S K F E Q W K Q M S A Q Q      95

CATCGCGATGATATTTGTGAACTCAAAGAAATCTCTTCAGTAATATCCAGGCAGACATCCGAAGCGGCCGATACGAAGCC      640

H R D D I C E L K E I S S V I S R Q T S E A A D T K P      122

GTCATACAGTGAACGGTGAACGATTTTCAGAAGGAAATAAAATGGCGTACAACACTGATCACTGGTCGATGGCTAGAAAAA      720

S Y S E T V N D F R R K L K W R T T D H W S M A R K      148

ATAAATGGGGAATGAGGAGGCGAACACGTGGCGTGAAACGGTTATTGTTGTGCATCAAATGCCAACAGCAAGAAGCGAAC      800

```

N K W G M R R R T R G V K R L L L C I K C Q Q Q E A N 175

ACGTTCAACGTTGTTAAAGCTGCTGGCAAAAGAAAGTCGACAATAATTGAAAGTGATGATGATGATGATGATGGTGGAGC 880

T F N V V K A A G K R K S T I I E S D D D D D D G G A 202

GAGAAATTTGACCACAATTTCCCGGTTAAGCGGTTGCTTAAGTTCACAGCTTCAACTTCGGTTGCGAACAAAAAGCGTC 960

R N L T T I S R L S G S L K F T A S T S V A N K K R 228

CACGCAGCCGTATTAGTTCCGGTATTCAAATTAATGATGATGATGATGATGGTCAATTGGCTCAATCTGCAAACAACGTT 1040

P R S R I S S G I Q I N D D D D D G Q L A Q S A N N V 255

AAATTGGAACAAGCAACCGTTGTTCAATGGAACCGAGCCGAGCATTCTGGCAACAAGGAGAAAATGGTCGTTGCACC 1120

K L E T K Q P L F N G T E P S I S G N K E K M V V A P 282

GTTGACTTTGAAAATTTCTTACGGTAAACGCAGTCAGAAGAAAACGACTGTCATCAAGCCGAAAAGTGCTGCAGTAGTAG 1200

L T L K I S Y G K R S Q K K T T V I K P K S A A V V 308

TTTCAACCGGACGATTGACCGCTGCCAGTAGAAGAAACGGTTCCAAATCGCAAGGTATTATTGAAATGGAACTGACCAC 1280

V S T G R L T A A S R R N G S K S Q G I I E M E T D H 335

CAGGCTGTGTTGTCTTCTGTTGAGCCTTCTTCTCTGTAATTGACGATCACTGCAGTGTATGCAGCAGTAGTAGTAGCAG 1360

Q A V L S S V Q P S S S V I D D H C S V C S S S S S S 362

TAGCGACGGTTCACAACACCAGGTAGGCGATTGGTTTGGGCAAAGTTGAAAGGCTATTACCGTGGCCAGCAGAAATTT 1440

S D G S Q H Q V G D L V W A K L K G Y S P W P A E I 388

GCTCGCTAAATGAGCGTCGAATTCGCGTCCGATGGTGTGGTACGGCCGATCAGACCAACTCGGTGCCGTTGTCGAGCGTT 1520

C S L N E R R I R V R W C G T A D Q T N S V P L S S V 415

GAAAATTTCCAACAAAAATTCACCAATTATTACAACCCCTTCAAAAAGGCAAGAATACCAACAGGCGGTGGCCGACGCCCT 1600

E N F Q Q K F T N Y Y N P S Q R Q E Y Q Q A V A D A L 442

TGTCAAAGATCTGCTCGCCGGTCTCAACGGTCTTTGCTATTGCAAGCTGTTGTCGCCGGATTGTCGAACTGAAATGCTGC 1680

```

V K D L L A G L N G L C Y S K L L S P D C R T E M L      468
AACTGTTGCAGCAAGATCGACCACAAACGGCCACAGCATCGGTCAACTGAATCAGAAACAAATTCATCTATCTATCTTA 1760
Q L L Q Q D R P Q T A T A S V N *                      484
GATATCTAGATGTAGGAATGAAGACGAAGAAGAAGAAAAATATCGACCGCTCGTCAAAATTCAAACCTAAACCCAAAAATC 1840
CCCCAATTGAAAATCTACACAAACTTATTGCTTATTATTATTATTCTTATTCATTTAAGCATTGTTGCTGACGAATGTAT 1920
ATGTTGAAATAAAAACCTTGACAATATTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1966

```

(SEQ ID NO: 1)

5. cDNA 序列与编码的氨基酸分析

Ts88 cDNA 全长 1966bp, 起始密码子 ATG 位于序列第 276bp 处, TGA 为终止密码子, 开放阅读框架长 1452bp, 编码的蛋白质含 484 个氨基酸, 相应的氨基酸序列表示为图 1 (SEQ ID NO:2).

6. Ts88 基因特异性鉴定

提取旋毛虫成虫基因组 DNA (10 μg)、小鼠基因组 DNA (10 μg), 经琼脂糖电泳, 转移至硝酸纤维素膜 (Gelman 公司), Ts88 cDNA 为探针 (1.2 μg), 进行 Southern 杂交, 地高辛标记 (试剂盒 Promega 公司). 该基因与旋毛虫成虫基因组 DNA 出现杂交信号, 不与小鼠基因组 DNA 反应. 表明该基因为旋毛虫特异性基因 (图 2).

实施例 2 Ts88 基因重组蛋白及其抗体的制备

1. Ts88 基因重组质粒表达载体的构建

Ts88 基因片段经 Sac I 和 Xho I 酶切后, 获得长度为 1136bp 的片段, 与具同样粘性末端的原核表达载体 pET-28c (+) (购自 Novagen 公司) 以 3: 1 的摩尔比在 T₄ 连接酶 (Promega 公司) 作用下 15℃ 过夜连接. 表达载体构建示意图参见图 3.

2. Ts88 基因原核表达及纯化

将正确连接的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(Novagen 公司), 经 37℃, 150rpm, 1.0mM IPTG 诱导 3 小时, 获得 Ts88 基因重组蛋白, 分子量

约 37KD。重组蛋白经 His-binding 亲和层析柱纯化 (Novagen 公司) 和 Refolding kit 复性 (Novagen 公司) (图 4)。

3. 制备重组蛋白抗体

分实验组和对照组, 每组 10 只 BABL/c 鼠。纯化的 Ts88 重组蛋白加等体积的弗氏佐剂 (Promega 公司) 经皮肤多点注射免疫实验组 BABL/c 鼠 (200 μ g/只), 对照组注射生理盐水, 加强免疫 3 次。末次加强后 8 天取血收集血清。

4. 抗体鉴定

以 300ng Ts88 重组蛋白为抗原包被 96 孔酶标板, 一抗为待检血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的相应二抗 (Sigma 公司), 该蛋白可与 Ts88 重组蛋白免疫血清反应, ELISA 测定抗体效价高达 1: 30000, 说明 Ts88 基因的重组蛋白具有较强的抗原性。

实施例 3 Ts88 重组蛋白的免疫诊断

1. 免疫诊断分析

按卢圣栋主编的《现代分子生物学实验技术》步骤操作。纯化的 Ts88 表达蛋白(1.5 μ g)经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜 (Gelman 公司), 用 DAB 显色法 (Amersco 公司) 检测, 分别以感染寄生虫的各种病人血清 1: 50、感染猪血清 1: 50、感染兔血清 1: 100、人工免疫兔血清 1: 100, Ts88 重组蛋白免疫血清 1: 2000 作为第一抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的相应二抗 (Sigma 公司)。结果显示约 37KD 处均呈现一明显的蛋白印迹带(图 5), 表明 Ts88 重组蛋白可被感染旋毛虫的人、猪、兔血清及 Ts88 重组蛋白免疫鼠血清所识别。同时 Ts88 表达蛋白不被感染其它蠕虫 (蛔虫、鞭虫、血吸虫、肝吸虫、囊虫) 的病人血清所识别, 也不被下述阴性对照血清 (正常鼠血清、正常猪血清、正常人血清) 所识别。说明 Ts88 重组蛋白具有很好的特异性, 可作为诊断试剂。

上文列出的所有专利、专利申请和出版物均全文引入本文作为参考文献。

本发明的范围不只限于所述的特定实施方案，这些方案只是作为本发明个别方面的单一举例说明给出的。功能等同的组合物和方法均在本发明的范围之内。确实，除了本文所示的和描述的内容外，对本发明各种改动对于阅读了上述内容的本领域技术人员来说都是显而易见的。这些改动将落入本发明待批权利要求的范围之内。

序列表

<110> 首都医科大学

<120> 旋毛虫 Ts88 基因, 其蛋白产物及用途

<130> IDC030102

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1966

<212> DNA

<213> 旋毛虫 Ts88 cDNA 的核酸序列

<400> 1

```

ttatttaccg aacttaaag tttttgtgaa tattatagca agtattttac tcgattgcaa      60
cgctcatgaa cactgtactt gcaaggaatg cagtgagaga gtgagtgaat tgtacgctgt     120
tgctctgttt taaattatca attcaaataa atattgtttg ctgattagca gatttgtgca     180
tttttcaaaa acgccaataa atttatittc catttgaaat tgccgttgaa cggaaacttt     240
aaaatttaca tgcaaacgcc tctccaccg gaataatgaa agcatcggca gtgaaatgtg     300
aaaatgaaca ggcagtgaat gctgaacgag aacaatatgt ggaaaatggc caaaagtgcg     360
aagagcaaaa tgcaccccgga ttaatcgatc tgcttgtgca agttcactat gacaatgata     420
atattgtgat ggtttcaacg gaaagaaatg gcacatatt ttgtggagtg ttgctcagca     480
tgcaagtcag tagcaatgag acaccgttcg gcatgaatgc gagcaaattt gaacagtgga     540
agcagatgtc cgcacagcag catcgcgatg atatttgtga actcaaagaa atctcttcag     600
taatatccag gcagacatcc gaagcggccg atacgaagcc gtcatacagt gaaacggtga     660
acgatttcag aaggaaatta aatggcgta caactgatca ctggtcgatg gctagaaaaa     720
ataaatgggg aatgaggagg cgaacacgtg gcgtgaaac gttattgttg tgcatcaaat     780
gccaacagca agaagcgaac acgttcaacg ttgttaaagc tgctggcaaa agaaagtcca     840
caataattga aagtgatgat gatgatgatg atggtgagc gagaaatttg accacaattt     900
cccggttaag cggttcgctt aagttcacag ctcaacttc ggttgcaaac aaaaagcgtc     960
cacgcagccg tattagttcc ggtattcaaa ttaatgatga tgatgatgat ggtcaattgg    1020

```

ctcaatctgc aaacaacggt aaattggaaa caaagcaacc gttgttcaat ggaaccgagc 1080
 cgagcatttc tggcaacaag gagaaaatgg tcgttgacc gttgactttg aaaatttctt 1140
 acggtaaacg cagtcagaag aaaacgactg tcatcaagcc gaaaagtgct gcagtagtag 1200
 tttcaaccgg acgattgacc gctgccagta gaagaaacgg ttccaaatcg caaggtatta 1260
 ttgaaatgga aactgaccac caggctgtgt tgtcttctgt tcagccttct tcctctgtaa 1320
 ttgacgatca ctgcagtgta tgcagcagta gtagtagcag tagcgacggt tcacaacacc 1380
 aggtaggcga tttggtttgg gcaaagtga aaggctattc accgtggcca gcagaaattt 1440
 gctcgtataa tgagcgtcga attcgcgtcc gatggtgtgg tacggccgat cagaccaact 1500
 cgggtgccgtt gtcgagcgtt gaaaatttcc aacaaaaatt caccaattat tacaaccctt 1560
 cacaaaggca agaataccaa caggcggttg cgcagccct tgtcaaagat ctgctcgcgg 1620
 gtctcaacgg tctttgctat tcgaagctgt tgctgccgga ttgtcgaact gaaatgctgc 1680
 aactgttgca gcaagatcga ccacaaacgg ccacagcacc ggtcaactga atcagaaaca 1740
 aatttcatct atctatctta gatattctaga ttaggaatg aagacgaaga agaagaaaaa 1800
 tatcgaccgc tcgtcaaaat tcaactaaa cccaaaaatc cccaattga aaatctacac 1860
 aaacttattg cttattatta ttattcttat tcatttaagc attgttgctg acgaatgtat 1920
 atgttgaat aaaacttgac aatattgtaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1966

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> 旋毛虫 Ts88 蛋白的氨基酸序列

<400> 2

Met Lys Ala Ser Ala Val Lys Cys Glu Asn Glu Gln Ala Val Asn Ala
 1 5 10 15

Glu Arg Glu Gln Tyr Val Glu Asn Gly Gln Lys Cys Glu Glu Gln Asn
 20 25 30

Ala Pro Arg Leu Ile Asp Leu Leu Val Gln Val His Tyr Asp Asn Asp
 35 40 45

Asn Leu Leu Met Val Ser Thr Glu Arg Asn Gly Thr Ile Phe Cys Gly
50 55 60

Val Leu Leu Ser Met Gln Val Ser Ser Asn Glu Thr Pro Phe Gly Met
65 70 75 80

Asn Ala Ser Lys Phe Glu Gln Trp Lys Gln Met Ser Ala Gln Gln His
85 90 95

Arg Asp Asp Ile Cys Glu Leu Lys Glu Ile Ser Ser Val Ile Ser Arg
100 105 110

Gln Thr Ser Glu Ala Ala Asp Thr Lys Pro Ser Tyr Ser Glu Thr Val
115 120 125

Asn Asp Phe Arg Arg Lys Leu Lys Trp Arg Thr Thr Asp His Trp Ser
130 135 140

Met Ala Arg Lys Asn Lys Trp Gly Met Arg Arg Arg Thr Arg Gly Val
145 150 155 160

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

Phe Asn Val Val Lys Ala Ala Gly Lys Arg Lys Ser Thr Ile Ile Glu
180 185 190

Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Gly Ala Arg Asn Leu Thr Thr Ile
195 200 205

Ser Arg Leu Ser Gly Ser Leu Lys Phe Thr Ala Ser Thr Ser Val Ala
210 215 220

Asn Lys Lys Arg Pro Arg Ser Arg Ile Ser Ser Gly Ile Gln Ile Asn
225 230 235 240

Asp Asp Asp Asp Asp Gly Gln Leu Ala Gln Ser Ala Asn Asn Val Lys

| 245 | 250 | 255 |
|--|-----|-----|
| Leu Glu Thr Lys Gln Pro Leu Phe Asn Gly Thr Glu Pro Ser Ile Ser 260 | | |
| Gly Asn Lys Glu Lys Met Val Val Ala Pro Leu Thr Leu Lys Ile Ser 275 | | |
| Tyr Gly Lys Arg Ser Gln Lys Lys Thr Thr Val Ile Lys Pro Lys Ser 290 | | |
| Ala Ala Val Val Val Ser Thr Gly Arg Leu Thr Ala Ala Ser Arg Arg 305 | | |
| Asn Gly Ser Lys Ser Gln Gly Ile Ile Glu Met Glu Thr Asp His Gln 325 | | |
| Ala Val Leu Ser Ser Val Gln Pro Ser Ser Ser Val Ile Asp Asp His 340 | | |
| Cys Ser Val Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Gln His 355 | | |
| Gln Val Gly Asp Leu Val Trp Ala Lys Leu Lys Gly Tyr Ser Pro Trp 370 | | |
| Pro Ala Glu Ile Cys Ser Leu Asn Glu Arg Arg Ile Arg Val Arg Trp 385 | | |
| Cys Gly Thr Ala Asp Gln Thr Asn Ser Val Pro Leu Ser Ser Val Glu 405 | | |
| Asn Phe Gln Gln Lys Phe Thr Asn Tyr Tyr Asn Pro Ser Gln Arg Gln 420 | | |
| Glu Tyr Gln Gln Ala Val Ala Asp Ala Leu Val Lys Asp Leu Leu Ala 435 | | |

Gly Leu Asn Gly Leu Cys Tyr Ser Lys Leu Leu Ser Pro Asp Cys Arg
 450 455 460

Thr Glu Met Leu Gln Leu Leu Gln Gln Asp Arg Pro Gln Thr Ala Thr
 465 470 475 480

Ala Ser Val Asn

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物 Ts88-R1

<400> 3

ggctcgagtc agttgaccga tgctgtgg

28

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物 Ts88-R2

<400> 4

cggacatctg cttccactgt

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物 Ts88-R3

<400> 5

ttgctactga cttgcatgc

19

```

TTATTTACCGAACTTAAAAGTTTTGTGAATATTATAGCAAGTATTTACTCGATTGCAACGCTCATGAACACTGTACTT 80
GCAAGGAATGCAGTGAGAGAGTGAGTGAATGTACGCTGTGTCTGTGTTTAAATATCAATTCAAATAAATATTGTTTG 160
CTGATTAGCAGATTTGTGCAATTTTACAAAACGCCAAATAATTTATTTCCATTGAAATGCCGTTGAACGGAAACTTT 240
AAAATTTACATGCAAAACGCCTCCTCCACCGGAATAATGAAAGCATCGGCAGTGAAATGTGAAAATGAACAGGCAGTGAAT 320
M K A S A V K C E N E Q A V N 15
GCTGAACGAGAACAATATGTGGAAAATGGCCAAAAGTGCGAAGAGCAAAATGCACCCCGATTAATCGATCTGCTGTGCA 400
A E R E Q Y V E N G Q K C E E Q N A P R L I D L L V Q 42
AGTTCACTATGACAATGATAATTTGTTGATGGTTTCAACGGAAAAGAAATGGCACCATATTTTGTGGAGTGTGTCTCAGCA 480
V H Y D N D N L L M V S T E R N G T I F C G V L L S 68
TGCAAGTCAGTAGCAATGAGACACCGTTCCGGCATGAATGCGAGCAAATTTGAACAGTGGAAAGCAGATGTCOCGACAGCAG 560
M Q V S S N E T P F G M N A S K F E Q W K Q M S A Q Q 95
CATCGCGATGATATTTGTGAACTCAAAGAAATCTTTCAGTAATATCCAGGCAGACATCCGAAGCGGCCGATACGAAGCC 640
H R D D I C E L K E I S S V I S R Q T S E A A D T K P 122
GTCATACAGTGAAACGGTGAACGATTTCAGAAGGAAATAAAATGGCGTACAACCTGATCACTGGTCGATGGCTAGAAAAA 720
S Y S E T V N D F R R K L K W R T T D H W S M A R K 148
ATAAATGGGGAATGAGGAGCGAACACGTGGCGTGAACCGTTATTGTTGTGCATCAAATGCCAACAGCAAGAAGCGAAC 800
N K W G M R R R T R G V K R L L L C I K C Q Q Q E A N 175
ACGTTCAACGTTGTTAAAGCTGCTGGCAAAAAGAAAGTCGACAATAATTGAAAGTGATGATGATGATGATGATGATGGTGGAGC 880
T F N V V K A A G K R K S T I I E S D D D D D D G G A 202
GAGAAAATTTGACCACAATTTCCCGTTAAGCGGTTCCGTTAAGTTACAGCTTCAACTTCGGTTGCGAACAAAAAGCGTC 960
R N L T T I S R L S G S L K F T A S T S V A N K K R 228
CACGCAGCCGTATTAGTCCCGTATTCAAATTAATGATGATGATGATGATGGTCAATTGGCTCAATCTGCAAAACAACGTT 1040
P R S R I S S G I Q I N D D D D D G Q L A Q S A N N V 255
AAATGGAAAACAAGCAACCGTTGTTCAATGGAACCGAGCCGAGCATTTCTGGCAACAAGGAGAAAATGGTCGTTGCACC 1120
K L E T K Q P L F N G T E P S I S G N K E K M V V A P 282
GTTGACTTTGAAAATTTCTTACGGTAAACGCAGTCAGAAGAAAACGACTGTCATCAAGCCGAAAAGTGCTGCAGTAGTAG 1200
L T L K I S Y G K R S Q K K T T V I K P K S A A V V 308
TTTCAACCGGACGATTGACCGCTGCCAGTAGAAGAAACGGTTCCAAATCGCAAGGTATTATTGAAATGGAAAACCTGACCAC 1280
V S T G R L T A A S R R N G S K S Q G I I E M E T D H 335
CAGGCTGTGTTGCTTCTGTTACGCCTTCTCTCTGTAAATTGACGATCACTGCAAGTGTATGCAGCAGTAGTAGTAGCAG 1360
Q A V L S S V Q P S S S V I D D H C S V C S S S S S S 362
TAGCGACGGTTCACAACACCAGGTAGGCGATTTGGTTTGGGCAAAAGTTGAAAGGCTATTACCGTGGCCAGCAGAAATTT 1440
S D G S Q H Q V G D L V W A K L K G Y S P W P A E I 388
GCTCGCTAAATGAGCGTCGAATTCGCGTCCGATGGTGTGGTACGGCCGATCAGACCAACTCGGTGCCGTTGTCGAGCGTT 1520
C S L N E R R I R V R W C G T A D Q T N S V P L S S V 415

```

图 1A

```

GAAAATTTCCAACAAAAATTCACCAATTATTACAACCCCTTCACAAAGGCAAGAATACCAACAGGCGGTGGCCGACGCCCT 1600
E N F Q Q K F T N Y Y N P S Q R Q E Y Q Q A V A D A L 442
TGTCAAAGATCTGCTCGCCGGTCTCAACGGTCTTTGCTATTCTGAAGCTGTTGTCGCCGGATTGTCGAACTGAAATGCTGC 1680
V K D L L A G L N G L C Y S K L L S P D C R T E M L 468
AACTGTTGCAGCAAGATCGACCACAAACGGCCACAGCATCGGTCAACTGAATCAGAAACAAATTCATCTATCTATCTTA 1760
Q L L Q Q D R P Q T A T A S V N * 484
GATATCTAGATGTAGGAATGAAGACGAAGAAGAAGAAAAATATCGACCGCTCGTCAAAATTCAAACTAAACCCAAAAATC 1840
CCCCAATTGAAAATCTACACAACTTATTGCTTATTATTATTATTCTTATTCAATTAAGCATTGTTGCTGACGAATGTAT 1920
ATGTTGAAATAAACTTGACAATATTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1966

```

图 1B

(底纹标记的部分为起始密码子与终止密码子)

图 1A+图 1B=图 1

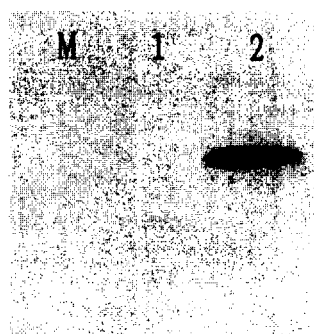


图 2

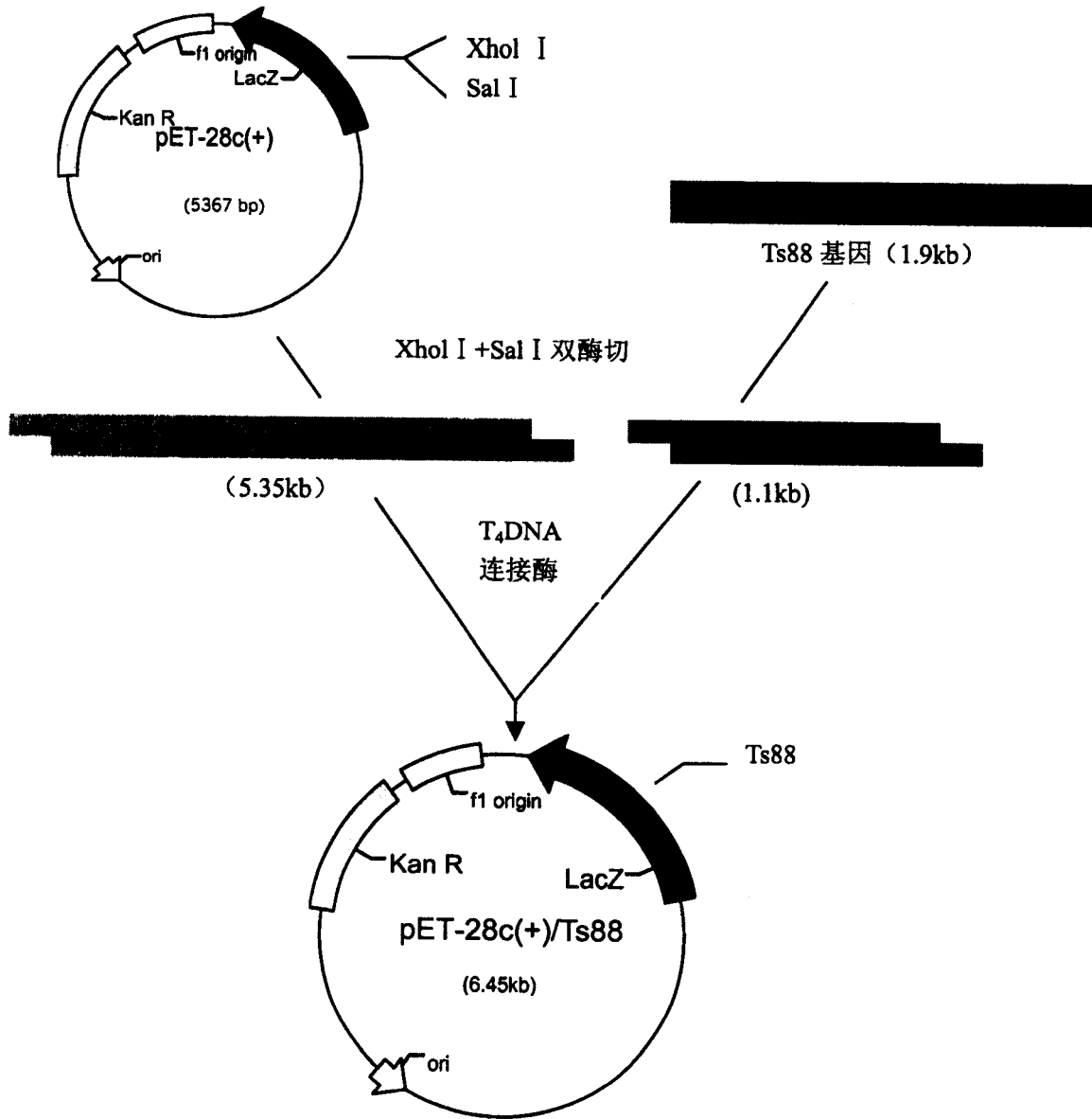


图 3

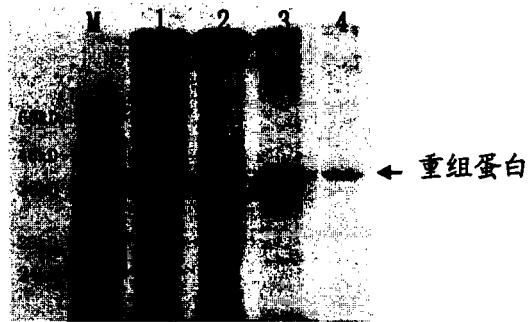


图 4

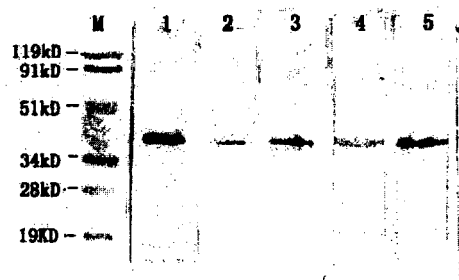


图 5

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 旋毛虫TS88基因、其蛋白产物及用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN1226413C | 公开(公告)日 | 2005-11-09 |
| 申请号 | CN200310114934.X | 申请日 | 2003-11-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 首都医科大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 首都医科大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 首都医科大学 | | |
| [标]发明人 | 诸欣平 杨雅平 杨静 雷丽萍 | | |
| 发明人 | 诸欣平 杨雅平 杨静 雷丽萍 | | |
| IPC分类号 | A61K38/17 A61K39/395 A61P33/00 C07K16/18 C07K19/00 C12N15/11 C12N15/30 C12N15/62 C12N15/63 C12P21/00 C12N1/11 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68 | | |
| 代理人(译) | 刘晓东 | | |
| 其他公开文献 | CN1544628A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种来自旋毛虫的新的多核苷酸分子，含有该多核苷酸分子的重组载体，所编码的蛋白质及由所述蛋白质免疫动物产生的抗体。本发明还涉及所述多核苷酸分子、蛋白质和抗体的应用。

```

TTATTACCGAACTAAAAGTTTTTGTGAATATATAGCAAGTATTTACTCGATTGCAACGCTCATGAACACTGTACTT      80
GCAAGGAATGCAAGTGAAGAGAGTGTAGTGAATTTGACCGTGTGTGCTGTGTTTAAATATCAATTCAAAATAATATGTTTTG      160
CTGATTAAGCAGATTTGTGCATTTTACAAAACCCCAATAATTTATTTTGCATTTGAATTTGCCCTTGAACGGAAACTTT      240
AAAATTTACATGCAAAACCGCTCTCCACCGGAATATAGBBAAGCATTCGGCGATGAAGTTGAAAATGAACAGGCGATGAAT      320
M K S A V K C E N E Q A V N      15
GCTGAAACGAGACAATATGTGGAAAATGGCCAAAAGTGGGAAGAGCAAATGACCCCGAATAATCGATCTGCTGTGCA      400
A E R E Q Y V E N G Q K C B E E Q N A P R L I D L L V Q      42
AGTTCACATGACAATGATAAATTTGATGTTTCAAGCGAAAAGAAATGGCACCATATTTTGGAGTGTGCTCAGCA      480
V H Y D D N L L M V S T E R N G T I F C G V L S      68
TGCAAATGATAGCAATGAGACACCGTTCCGCGATGAATGGAGCAAAATTTGAACAGTGGAAAGCAGATGTCGCCACAGCAG      560
M Q Y S S N E T P F G M N A S K F E Q W K Q M S A Q Q      95
CATCGGATGATTTGTGAACCTCAAAGAAATCTCTCAGTATATCCAGGCGAGACATCCGAAAGCGCCGATACGAAAGCC      140
H R D D I C E L K E I S S V I S R Q T S E A A D T K P      620
GTCATCAGTGAACCGTGAACGATTCAGAAAGAAATAAAAGGGCGTACAACCTGATCACTGGTGGATGGCTAGAAAAA      720
S Y S E T V N D F R R K L K W R T T D H W S M A R K      148
ATAAATGGGGAATGAGAGGGGAAACAGCTGGCGTGAACCGTTATTTTGTGATCAAAATGGCAACAGCAAGAAAGGAAAC      800
N K W G M R R R T R G V K R L L L C I K C Q Q Q E A N      175
ACGTTCAAGCTTTTAAAGCTGCTGGCAAAAGAAAGTCGACAATAATGAAAGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG      880
T F N V V K A A G K R K S T I I E S D D D D D D G G A      202
GAGAATTTGACACAAATTTCCCGTTAAGCGGTGCTTAAGTTACAGCTTCAACTCGGTTGCGAACA AAAAGCGCTC      960
R N L T T I S R I S G S L K F T A S T S V A N K K R      228
CAGCAGCGGATTAATTTCCGATTCAAATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG      1040
P R S R I S S G I Q I N D D D D D G Q L A Q S A N N V      255
AAATTGAAACAAGCAACCGTTTTCATGGAACCGAGCGAGCTTTCGGCAACAAGGAGAAAATGTTGCTGACC      1120
K L E T K Q P L F N G T E P S I S G N K E K M V Y A P      282
GTTGACTTTGAAAATTTCTACGGTAAACCGCAGTCAAGAAAACGACTGTCATCAAGCCGAAAATGCTGCAATGATG      1200
L T L R I S Y G K R S Q K K T T V I K P K S A A V V      1308
TTTCAACCGGAGGATGACCGCTCCAGTGAAGAAACGTTTCCAATTCGCAAGATATATTAATGAAATGAAACTGAAAC      1380
V S T G R L T A A S R R N G S K S Q G I I E M E T D H      335
CAGGCTGTGTTCTGTTTCAAGCTTCTCTCTGTAAATGAGGATCACTGCAAGTGTATGAGCAGATGATGATGATGATGATG      1360
Q A V L S S V Q P S S S V I D D H C S V C S S S S S S      362
TAGCGACGGTTCAACAACACAGGTAGGCGATTTGGTTGGGCAAGTTGAAAGGCTATTCACCGTGGCCAGCAAAAATTT      1440
S D G S Q H Q V G D L V W A K L K G Y S P W P A E I      388
GCTCGTAAATGACGCTGAAATTCGCGCTGATGTTGGTAAAGGCGGATGAGCAACACTGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG      1520
C S L N E R R I R V R W C G T A D Q T N S V P L S S V      415

```

图 1A