

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710113296.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/31 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月21日

[11] 公开号 CN 101182350A

[22] 申请日 2007.11.2

[21] 申请号 200710113296.8

[71] 申请人 山东省农业科学院奶牛研究中心

地址 250100 山东省济南市历城区工业北路  
159-1号

[72] 发明人 杨宏军 王长法 杨少华 高运东  
仲跻峰

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所

代理人 李健康

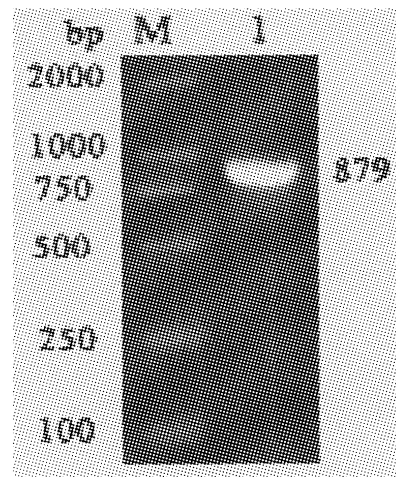
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

[54] 发明名称

金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素及其编码序列

[57] 摘要

本发明公开了一种金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素及编码  $\alpha$ -溶血素的多核苷酸和经基因工程技术产生  $\alpha$ -溶血素的生物学方法；同时还公开了所述金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素的用途。本发明的金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素为进一步研究其致病与免疫机理、疫苗设计奠定了良好的基础。



1. 一种金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽, 其特征在于, 它包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。
2. 如权利要求 1 所述的多肽, 其特征在于, 所述多肽是具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。
3. 一种编码金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽的多核苷酸, 其特征在于它包括:
  - (a) 编码权利要求 1 所述多肽的多核苷酸; 或
  - (b) 编码权利要求 2 所述多肽的多核苷酸; 或
  - (c) 与 (a) 或 (b) 所述多核苷酸互补的多核苷酸; 或
  - (d) 与 (a)、(b) 或 (c) 所述多核苷酸序列有至少 80% 相同性的核苷酸序列。
4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸是编码具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多核苷酸。
5. 如权利要求 4 所述的多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸具有 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列。
6. 一种载体, 其特征在于, 所述载体含有权利要求 3 所述的多核苷酸。---
7. 一种遗传工程化的宿主细胞, 其特征在于, 所述宿主细胞是被权利要求 3 所述的多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞或是被权利要求 6 所述的载体转化或转导的宿主细胞。
8. 权利要求 1 所述金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽的制备方法, 其特征在于, 所述方法包含:
  - (a) 在适合表达金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的条件下, 培养权利要求 7 所述的宿主细胞;
  - (b) 从培养物中分离出金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽。
9. 一种抗体, 其特征在于, 所述抗体为能与权利要求 1 所述的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素特异性结合的抗体。
10. 一种检测金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有权利要求 9 所述的抗体和/或能特异性检测金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的引物。

## 金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及其编码序列

### 技术领域

本发明属于生物技术和兽医学领域，具体地说，本发明涉及新的编码金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的多核苷酸，以及此多核苷酸编码的多肽。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。

### 背景技术

奶牛乳房炎(Mastitis)是造成奶牛业生产效率低、成本高的主要原因，全国奶牛每年因乳房炎造成的损失达100多亿元。目前已证明引发奶牛乳房炎的微生物约有150多种，其中金黄色葡萄球菌感染引发的乳房炎约占30.6%—41.7%。金黄色葡萄球菌感染破坏乳腺组织，导致受感染乳腺泌乳功能下降或丧失，金黄色葡萄球菌还释放损伤性毒素如 $\alpha$ -溶血素等，严重者导致奶牛急性死亡；其次，金黄色葡萄球菌具有传染性，常可导致整个牛场乳房炎蔓延；再者，金黄色葡萄球菌是人、畜共染病原菌，能通过食物链使人患病，严重危害人类健康。

目前，临床上应用抗生素治疗、防治金黄色葡萄球菌乳房炎起到了一定效果，但也带来了“抗性乳”及耐药菌株等危及人类健康的公共卫生问题，因此，此方法受到越来越多的限制。接种疫苗预防是一种最为方便、有效和经济的措施，但国内至今还没有一种具有自主知识产权的金黄色葡萄球菌疫苗可供生产上使用。因而，研制能明显降低金黄色葡萄球菌乳房炎临床感染率，使用方便、作用持久的乳房炎疫苗是奶牛业生产中亟待解决的难题。

金黄色葡萄球菌血清型多，毒力因子复杂。 $\alpha$ -溶血素亦称 $\alpha$ -毒素，是一种胞外毒素，是金黄色葡萄球菌主要毒力因子之一。 $\alpha$ -溶血素蛋白分子量为33.2KD，由293个氨基酸组成。溶血素对多种哺乳动物红细胞有溶血作用，并可作用于平滑肌细胞，引起乳腺平滑肌收缩、麻痹，引发牛的坏疽性乳房炎。

金黄色葡萄球菌的 $\alpha$ -溶血素在感染的过程发挥着重要作用，它分子量较大，均具有良好的免疫原性。通过分子生物学及生物化学方法克隆、表达、纯化金黄色葡萄球菌溶血素，制成亚单位疫苗免疫奶牛，以期疫苗免疫后产生的 $\alpha$ -溶血素抗体能中和金黄色葡萄球菌感染所释放的毒素，减少死亡。

然而，本领域一直未见公开的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素，因此开发金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素迫在眉睫，这也有助于进一步研究金黄色葡萄球菌引发乳腺炎的致病机理和研究相应的疫苗。

### 发明内容

本发明的目的是提供金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码所述金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及其片段、类似物和衍生物氨基酸序列的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供制备所述多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。

本发明以如下技术方案实施完成：

采集奶牛急性坏疽型乳腺炎乳样，分离金黄色葡萄球菌，提取DNA作为模板，利用设计合成的特异性引物，对金黄色葡萄球菌进行 $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -HL)基因的PCR扩增。

将目的基因回收并连接到T载体，鉴定后进行了测序，然后将 $\alpha$ -HL基因连接到pET-32a(+)质粒中，经鉴定后转化大肠杆菌*BL21*感受态细胞，IPTG诱导后采用SDS-PAGE分析蛋白质的表达情况。亲和层析法分离纯化目的蛋白（金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽）。重组蛋白活性检测。利用基因工程蛋白r $\alpha$ -HL混合佐剂免疫试验小鼠，通过ELISA方法检测血清中的抗体水平。

本发明提供的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽，其特征在于，它包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽。更佳地，该多肽不含信号肽序列。

本发明提供的编码金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽的多核苷酸，其特征在于它包括：

(a) 编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物的多核苷酸；或

(b) 编码SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多核苷酸；或

(c) 与(a)或(b)所述多核苷酸互补的多核苷酸；或

(d) 与(a)、(b)或(c)所述多核苷酸序列有至少80%相同性的核苷酸序列。

较佳地，所述多核苷酸是编码具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的多核苷酸。

更佳地，所述多核苷酸是具有SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列的多核苷酸。

本发明提供的载体，其特征在于，所述载体含有如上所述的多核苷酸。

本发明提供的遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞是被如上所述的多核苷酸直接转化或转导的宿主细胞或是被如上所述的载体转化或转导的宿主细胞。

本发明所述金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽的制备方法，其特征在于，所述方法包含：

(a) 在适合表达金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的条件下，培养权利要求7所述的宿主细胞；

(b) 从培养物中分离出金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽。

本发明从金黄色葡萄球菌临床分离株扩增出编码 $\alpha$ -溶血素的基因( $\alpha$ -HL)，与标准株Wood 46(U39769)进行核苷酸同源性比较，序列完全一致，同源性为100%。通过构建大肠杆菌诱导性表达质粒pET32a<sup>+</sup>- $\alpha$ -HL，实现了 $\alpha$ -HL的融合表达。SDS-PAGE结果表明融合蛋白的分子量为53kD，与预期相符。

本发明获得的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素具有良好的抗原性，经甲醛处理可制成类毒素，对金黄色葡萄球菌所致的乳腺炎有部分的保护作用。

本发明克隆表达了金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素基因，其表达产物的生物活性分析表明：表达产物（金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽）可引起实验动物注射部位明显溶血和坏死，小白鼠红细胞溶血试验表明其溶血效价可达到 $2.36 \times 10^4$  HU/mg。这为进一步研究其致病与免疫机理、疫苗设计奠定了良好的基础。

本发明所述金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽和其编码序列的应用。

获得抗体：所制备的抗体为能与如上所述的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素特异性结合

的抗体。

本发明的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素序列或其片段，可被作为引物用于PCR扩增反应，或者作为探针用于杂交反应。

检测金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的试剂盒：所述试剂盒含有如上所述的抗体和/或能特异性检测金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的核酸分子引物。

应用上述试剂盒检测样品中是否存在溶血素的方法是：将样品与溶血素的特异性抗体接触，观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在溶血素。

疫苗组合物：以安全有效量的本发明的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽或其片段再辅以药学上可接受的载体可制备成应用于奶牛的疫苗组合物。

本发明的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素多肽可用作研究其对乳腺致病机理的工具。

## 附图说明

图1. PCR 扩增金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素基因。

其中：M为Marker2000，1为 $\alpha$ -HL基因。

图2. 重组质粒的鉴定。

其中：M为Marker2000，1为PCR鉴定，2，3为重组质粒，4为双酶切鉴定。

图3.  $\alpha$ -HL的SDS-PAGE分析。

其中：M为Protein Marker，1为未诱导，2为诱导，3为纯化蛋白。

图4. 动物毒性试验剖检图。

其中：1为正常对照小鼠腹腔解剖，2为腹腔注射 $\alpha$ -HL后小鼠解剖。

## 具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，从奶牛乳腺炎临床病例中分离到致病性金黄色葡萄球菌，利用聚合酶链式反应克隆到溶血素基因，经测序鉴定后采用基因工程原核表达方法，成功获得了具有生物活性的基因工程溶血素多肽，在此基础上完成了本发明。

在本发明中，术语“ $\alpha$ -溶血素”或“ $\alpha$ -毒素”可互换使用，都指具有金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素氨基酸序列的蛋白或多肽。它们包括含有或不含有信号肽的溶血素。

下面结合具体实施例，进一步阐明本发明有关内容。下列实例中未注明的具体试验方法，通常按照分子克隆实验室手册中所述的条件，或按照制造厂商提供的条件。

### 实施例1

#### 材料和方法

菌株和质粒：以常规方式分离、鉴定获得金黄色葡萄球菌奶牛乳腺炎临床分离株；大肠杆菌BL21(DE3)；pMD18-T载体购自TaKaRa；pET32a<sup>+</sup>载体购自Novagen。

试剂：高保真DNA聚合酶、限制性核酸内切酶(BamH I和HindIII)、T<sub>4</sub>DNA连接酶均购自TaKaRa；DNA胶回收试剂盒购自U-gene；氨苄青霉素购自华美公司；Ni-NTA亲和层析柱是QIAGEN公司产品。

试验动物：昆明系小白鼠，体重18~22g，购自山东中医药大学实验动物中心。

### 实施例2

#### PCR扩增 $\alpha$ -HL基因及其测序和分析

采用酚-氯仿方法提取金黄色葡萄球菌DNA模板。根据GenBank上发表的 $\alpha$ -HL基因序列，设计并合成了如下一对引物：

上游 (含BamH I 酶切位点): 5' - ccggatccgcagattctgatattaa-3' ;

下游 (含HindIII酶切位点): 5' - tcaagcttatttgcattttcttctt-3' 。

50  $\mu$  L PCR反应体系: 10 $\times$  PCR buffer 5  $\mu$  L, Mg<sup>2+</sup> (25mM) 3  $\mu$  L, dNTP (25mM) 4  $\mu$  L, Taq酶 (2.5U) 0.5  $\mu$  L, 引物各1  $\mu$  L, 模板2  $\mu$  L, 无菌双蒸水33.5  $\mu$  L。循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性2min, 94 $^{\circ}$ C 变性1min, 56 $^{\circ}$ C 退火1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸1min, 扩增30个循环, 最后于72 $^{\circ}$ C 延伸5min。

PCR产物与pMD18-T载体连接, 转化*E. coli* DH5 $\alpha$ , 提取质粒经BamH I 和HindIII双酶切后琼脂糖电泳鉴定。鉴定阳性的克隆由上海生物工程技术有限公司测序。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 检测到879bp左右的特异性条带, 与预期大小相符 (见图1)。测序结果显示该基因全长为879bp, 编码293个氨基酸; 核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示, 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。与标准株Wood 46 (U39769) 进行核苷酸同源性比较, 序列完全一致, 同源性为100%。

### 实施例 3

#### 重组表达质粒的构建

提取实施例 2 中阳性质粒, 经 BamH I 和 HindIII 双酶切后, 用试剂盒回收目的片段, 与同样经过 BamH I 和 HindIII 双酶切的 pET32a<sup>+</sup> 表达载体连接, 构建重组表达质粒 pET32a<sup>+</sup>- $\alpha$ -HL, 并将重组质粒进行 BamH I、HindIII 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。

双酶切后可见在 879bp 左右处有一条特异的条带, 并且经 PCR 鉴定在 879bp 左右处扩增出特异条带, 说明重组质粒构建正确 (鉴定结果见图 2)。

### 实施例 4

#### $\alpha$ -HL 基因在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 分析

将重组表达质粒 pET32a<sup>+</sup>- $\alpha$ -HL 及空载体 pET32a<sup>+</sup> 质粒分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养。过夜培养物以 1:100 扩大培养 2~4h 至 OD<sub>600</sub> 值达 0.3~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 继续培养。分别于 1h、2h、3h 及 4h 取 2ml 菌液, 测 OD<sub>600</sub>, 离心收集菌体。SDS-PAGE 鉴定表达情况, 试验步骤参照《蛋白质电泳实验技术》进行。

SDS-PAGE 结果如图 3 所示, 经 IPTG 诱导株在 53kD 左右出现一条特异蛋白带, 与预测分子量一致。经 BandScan 5.0 分析, 蛋白产量约占菌体总蛋白的 30.6%。经蛋白可溶性分析, 所表达蛋白以包涵体形式存在, 提取包涵体再作 SDS-PAGE 分析, 包涵体占沉淀蛋白的 35.9%。

### 实施例 5

#### 亲和层析法分离纯化目的蛋白

重组质粒 pET32a<sup>+</sup>- $\alpha$ -HL 转化大肠杆菌, 挑取单菌落接种 LB 培养基, 培养过夜后按 1% 的比例接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至菌液的 OD<sub>600</sub> 达到 0.4, 加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 3h 后, 离心收获菌体, 沉淀用磷酸盐缓冲液悬浮, 超声波破碎菌体, 再离心收集上清, 经 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化收集目的蛋白 (金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素多肽)。

蛋白纯化完后, 依次用 15L 0.2M 乙酸, 15mL 30% 甘油, 15mL 纯水, 15mL 30% 乙醇处理。最后用乙醇 3 保存于 4 $^{\circ}$ C, 备用。

### 实施例 6

### 表达产物的生物活性分析

表达产物（金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素多肽）溶血效价的测定：将诱导表达  $\alpha$ -HL 的大肠杆菌超声波裂解，离心并收集上清，测定上清液  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  的吸光度值，同时以小白鼠红细胞进行半数红细胞溶血效价的测定，溶血效价的测定参照 Geoffroy 的方法进行。溶血效价的测定结果表明，重组菌 BL21 (pET32a<sup>+</sup>- $\alpha$ -HL) 培养物超声波裂解后离心收集的上清液测得可溶性蛋白的浓度为 1.26mg/ml， $\alpha$ -HL 的溶血效价为  $2.36 \times 10^4$  HU/mg。

表达产物（金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素多肽）的动物毒性试验：将诱导表达  $\alpha$ -HL 的大肠杆菌超声波裂解，离心并收集上清，将上清液和纯化产物分别进行梯度稀释，每一稀释度稀释液腹腔注射 3 只昆明系小白鼠，上清液注射小白鼠的剂量分别为 500  $\mu$ g/只、50  $\mu$ g/只和 5.0  $\mu$ g/只；纯化产物注射小鼠的剂量分别为 40  $\mu$ g/只、4.0  $\mu$ g/只和 0.4  $\mu$ g/只，以磷酸盐缓冲液作为阴性对照。动物毒性试验结果表明，每只小鼠注射 500  $\mu$ g 总蛋白 (<24h 死亡) 或 40  $\mu$ g 纯蛋白 (约 36h 死亡) 可使小白鼠在较短时间内死亡，从死亡时间可推断前者毒性蛋白  $\alpha$ -HL 的含量高于后者，并且证明表达产物具有较高生物活性和较强毒性。剖检发现，注射局部出现溶血和坏疽，所有死亡小白鼠的腹腔内均出现败血症状；肠系膜和肝脏出血，腹水为红色，肺脏无明显病变。剖检病理变化见图 4。

### 实施例 7

#### 表达产物的免疫原性分析

r $\alpha$ -HL 蛋白为所纯化蛋白，将其配制浓度为 0.1mg/1ml，并将 r $\alpha$ -HL 蛋白用 4% 甲醛溶液进行灭活，然后将蛋白与佐剂按照 1:1 的比例充分混合乳化后用于动物免疫。将所制备的疫苗取少量涂布于 5% 绵羊血琼脂平板中，37 $^{\circ}$ C 培养 48h，观察有无细菌生长。并将疫苗进行动物安全检验，分别用 18-22g 的小白鼠 6 只，皮下注射疫苗 10 $\mu$ g/只，观察二周。注意观察小白鼠的精神状态。在所有疫苗涂布的 5% 绵羊血琼脂平板中无任何细菌生长，表明所制备的疫苗无菌性良好。所注射疫苗的小白鼠在观察二周后均健活，精神状态良好，注射部位有轻微红肿，无化脓现象。小鼠随机分组，每组 6 只。第一组注射 r $\alpha$ -HL 蛋白疫苗，第二组为注射生理盐水的对照组。将疫苗分别注射小鼠腹部皮下，并于实验的第 0、14、28 天免疫。免疫后第 1、2、3、4 周采取血样，间接 ELISA 法测定抗体效价。

试验小白鼠在免疫后所采集的血清中均检测到了特异性抗体，各试验组的血清中抗体效价均呈明显上升趋势，在 15d 后（二免后第一次采血）时各组的抗体效价呈快速升高，于免疫后 28d 内各组抗体效价持续升高，抗体效价动态趋势基本相同（抗体效价动态变化数据如表 1 所示）。

表 1 ELISA 检测各免疫组抗体水平

	对照组	溶血素免疫
第一次	0.041 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.149 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
第二次	0.052 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.23 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
第三次	0.058 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.332 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

---

第四次	$0.075 \pm 0.03^c$	$0.51 \pm 0.15^a$
-----	--------------------	-------------------

---

注：a、b、c 表示差异性 ( $p < 0.01$ )

### 实施例 8

#### 检测金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的试剂盒

将含有如上所述的抗体和/或能特异性检测金黄色葡萄球菌  $\alpha$  -溶血素的核酸分子引物以本领域常用方法制成试剂盒，用于金黄色葡萄球菌  $\alpha$  -溶血素的检测。

应用上述试剂盒检测样品中是否存在溶血素的方法是：将样品与溶血素的特异性抗体接触，观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在溶血素。

### 实施例 9

#### 疫苗：

以安全有效量的本发明的金黄色葡萄球菌  $\alpha$  -溶血素多肽或其片段再辅以药学上可接受的载体可制备成应用于奶牛的疫苗组合物。疫苗免疫奶牛后产生的  $\alpha$  溶血素抗体能中和金黄色葡萄球菌感染所释放的毒素，减少死亡。

## 序列表

- <110> 山东省农科院奶牛研究中心  
 <120> 金黄色葡萄球菌溶血素及其编码序列  
 <141> 2007-10-18  
 <160> 2  
 <210> 1  
 <211> 879  
 <212> DNA  
 <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureuse)  
 <400> 1

```

gcagattctg atattaatat taaaaccggt actacagata ttggaagcaa tactacagta 60
aaaacaggtg atttagtcac ttatgataaa gaaaatggca tgcacaaaaa agtattttat 120
agttttatcg atgataaaaa tcacaataaa aaactgctag ttattagaac gaaaggtacc 180
attgctggtc aatatagagt ttatagcgaa gaaggtgcta acaaaagtgg tttagcctgg 240
ccttcagcct ttaaggtaca gttgcaacta cctgataatg aagtagctca aatatctgat 300
tactatccaa gaaattcgat tgatacaaaa gagtatatga gtactttaac ttatggattc 360
aacggtaatg ttactggtga tgatacagga aaaattggcg gccttattgg tgcaaatggt 420
tcgattggtc atacactgaa atatgttcaa cctgatttca aaacaatttt agagagccca 480
actgataaaa aagtaggctg gaaagtgata tttacaata tggatgaatca aaattgggga 540
ccatatgata gagattcttg gaaccggtg tatggcaatc aacttttcat gaaaactaga 600
aatggttcta tgaaagcagc agataacttc cttgatccta acaaagcaag ttctctatta 660
tcttcagggt tttcaccaga cttcgctaca gttattacta tggatagaaa agcatccaaa 720
caacaaacaa atatagatgt aatatacgaa cgagtctgtg atgattacca attgcattgg 780
acttcaacaa attggaaagg taccaatact aaagataaat ggacagatcg ttcttcagaa 840
agatataaaa tcgattggga aaaagaagaa atgacaaat 879
  
```

- <210> 2  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureuse)  
 <400> 2



---

245	250	255
Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr		
260	265	270
Lys Asp Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp		
275	280	285
Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn		
290		

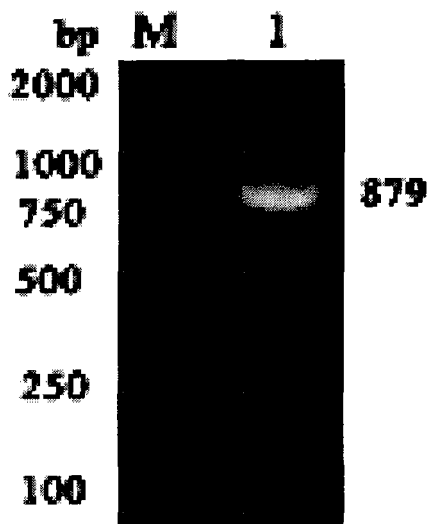


图1

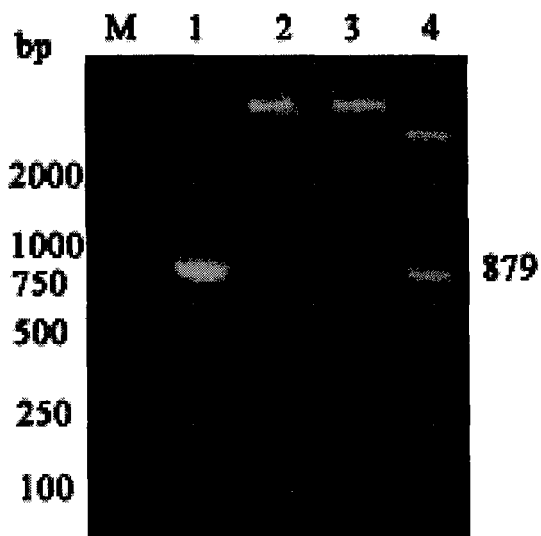


图2

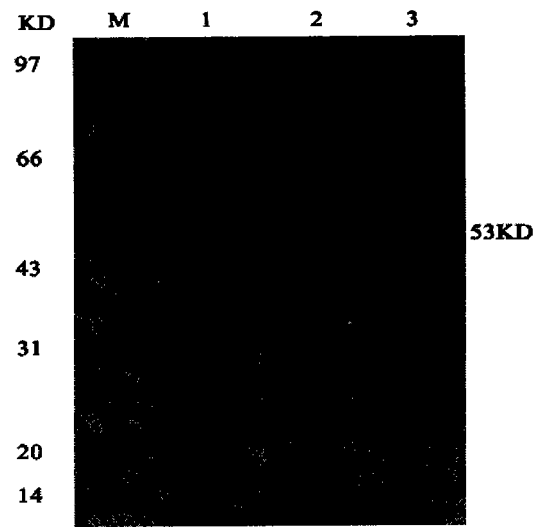


图3



图4

专利名称(译)	金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及其编码序列		
公开(公告)号	<a href="#">CN101182350A</a>	公开(公告)日	2008-05-21
申请号	CN200710113296.8	申请日	2007-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院奶牛研究中心		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院奶牛研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院奶牛研究中心		
[标]发明人	杨宏军 王长法 杨少华 高运东 仲跻峰		
发明人	杨宏军 王长法 杨少华 高运东 仲跻峰		
IPC分类号	C07K14/31 C12N15/31 C07K16/18 G01N33/53 C12Q1/68		
代理人(译)	李健康		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素及编码 $\alpha$ -溶血素的多核苷酸和经基因工程技术产生 $\alpha$ -溶血素的生物学方法；同时还公开了所述金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素的用途。本发明的金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素为进一步研究其致病与免疫机理、疫苗设计奠定了良好的基础。

