



(45) 授权公告日 2016.01.06

表达来自噬菌体的Red重组酶的
肺炎链球菌染色质

lacZ基因

插入位点, 环区9

环区9侧翼序列

I-SceI 位点

Neo^r 基因

环区9侧翼序列

热稳定延伸PCR

电穿孔

外源DNA

恒定延伸PCR

电穿孔

Ca²⁺选择和正向选择 (在K⁺上无生长)

表达外源序列的肺炎链球菌染色质

1. 一种疫苗,其包含编码 TRAP 多肽的第一多核苷酸序列,其中所述 TRAP 多肽是 SEQ ID NO:2。

2. 根据权利要求 1 所述的疫苗,还包含:

编码能与 CD40 结合的 CD154 多肽的第二多核苷酸序列,其中所述的 CD154 多肽是 SEQ ID NO:4 的 140-149 位氨基酸、或是 SEQ ID NO:10 的 140-149 位氨基酸,或其中所述 CD154 多肽选自 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9 中的一个。

3. 根据权利要求 2 所述的疫苗,其中疫苗包含:

一个以上拷贝的第一多核苷酸序列,

一个以上拷贝的第二多核苷酸序列,或

二者皆有。

4. 根据权利要求 2 所述的疫苗,其中第一多核苷酸序列与第二多核苷酸序列按照处于阅读框内的方式连接。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的疫苗,其中第一多核苷酸包含于载体内。

6. 根据权利要求 5 所述的疫苗,其中载体选自病毒、细菌和脂质体。

7. 根据权利要求 6 所述的疫苗,其中载体是细菌。

8. 根据权利要求 7 所述的疫苗,细菌在其表面上包含 TRAP 多肽。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的疫苗,其中细菌选自沙门氏菌属、杆菌属、埃希氏菌属和乳酸菌属。

10. 根据权利要求 1-4 任一项所述的疫苗,其中第一多核苷酸插入到编码跨膜蛋白的外部部分的多核苷酸序列中。

11. 根据权利要求 1-4 任一项所述的疫苗在制备用于增强受试者中针对艾美球虫属寄生虫的免疫反应的药物中的用途。

12. 根据权利要求 11 所述的用途,其中疫苗通过选自口服、鼻内、或卵内的方法施用。

13. 根据权利要求 11 所述的用途,其中增强的免疫反应包括增强的抗体反应或增强的 T 细胞反应。

14. 根据权利要求 11 所述的用途,其中受试者是家禽类物种或哺乳动物的成员。

15. 根据权利要求 11 所述的用途,其中在向受试者施用前杀死所述疫苗。

16. 根据权利要求 11 所述的用途,其中所述疫苗在受试者体内不能复制。

17. 根据权利要求 1-4 任一项所述的疫苗在制备用于降低受试者中与艾美球虫属寄生虫感染相关的发病率的药物中的用途。

18. 根据权利要求 11 所述的用途,其中疫苗通过肠胃外的方法施用。

增强针对艾美球虫属的免疫反应的组合物和方法

[0001] 本申请是申请号为 200880116875.0, 申请日为 2008 年 11 月 3 日, 发明名称为“增强针对艾美球虫属的免疫反应的组合物和方法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求于 2007 年 11 月 1 日提交的美国临时申请系列号 60/984,612 的优先权, 该临时专利的全部内容在此通过引用并入本文。

[0004] 关于联邦资助研究的声明

[0005] 无。

技术领域

[0006] 本发明涉及增强针对艾美球虫属的免疫反应的组合物和方法。

背景技术

[0007] 球虫病导致世界范围的问题, 其为由顶复门(Apicomplexan) 原动物寄生虫艾美球虫属(Eimeria) 引起的家禽、猪和牛的传染病。就其对家禽工业的经济影响而言, 球虫病位于家禽的前十大传染病之内。顶复门家族的其它成员也引起疾病, 包括疟原虫属(Plasmodium)、隐孢子虫属(Cryptosporidium) 和弓形体属(Toxoplasma), 它们分别是疟疾、隐孢子虫病和弓形体病的致病体。目前可用的抗艾美球虫属的疫苗以可控的低剂量的艾美球虫属寄生虫为基础, 该寄生虫实质上是完整毒力但对药物敏感。用目前的基于艾美球虫属的疫苗接种产生大量的疫苗反应发病率并引起接种畜群的经济损失。因此, 需要有效的低毒力的抗艾美球虫属的疫苗。对艾美球虫属有效的疫苗也可能被证明作为抗其它的顶复门寄生虫的疫苗是有用的。

发明内容

[0008] 本发明公开了包含编码 TRAP 多肽或其免疫原性片段的第一多核苷酸序列的疫苗。TRAP 多肽可以包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3, 或其免疫原性片段。疫苗可选地还包括编码能与 CD40 结合 CD154 多肽的第二多核苷酸序列。CD154 多肽包括 50 个以下的氨基酸, 并包含 140-149 位氨基酸或其同源物。

[0009] 根据本发明所述的疫苗可包含于载体内, 例如病毒、细菌或脂质体。在一个方面, 本发明提供了包含肠炎沙门氏菌(Salmonella enteritidis) 的疫苗, 该肠炎沙门氏菌包含编码 TRAP 多肽的第一多核苷酸序列。

[0010] 在另一方面, 本发明包括通过施用本发明所述的疫苗增强受试者中针对顶复门寄生虫的免疫反应的方法。

[0011] 在又一方面, 本发明包括通过施用本发明所述的疫苗降低受试者中与顶复门寄生虫感染相关的发病率的方法。

附图说明

[0012] 图 1 描述了在肠炎沙门氏菌中进行定点突变的方案。

[0013] 图 2A 至图 2B 描述了重叠延伸 PCR 方法的设计方案,其用于产生插入至 1amB 多核苷酸的环区 9 中的 TRAP 和 TRAP-CD154 插入物。

[0014] 图 3 为柱形图,其显示以表达所示的艾美球虫属 TRAP 序列的沙门氏菌载体接种后,巨型艾美球菌(*Eimeria maxima*)感染后 5 天的死亡百分率。经过 10^4 / 禽形成孢子的巨型艾美球菌卵囊刺激 21 日龄的 Broiler 鸡在刺激之后 5 天的死亡率。在本实验中,孵化日的鸡不进行接种(对照)或者以沙门氏菌载体(表达来自巨型艾美球菌 TRAP 蛋白序列 1、2、3,如附录中描述)进行接种。在第 21 天以完全相同剂量的巨型艾美球菌刺激所有的鸡。尸检表明所有的死亡均与巨型艾美球菌感染相关。用表达序列 2 的载体进行接种的小组中死亡率明显且显著降低。

具体实施方式

[0015] 重组 DNA 技术能使对许多细菌及病毒物种的操作相对容易。一些细菌及病毒有轻微的致病性或无致病性,却能够产生强烈的免疫反应。这些细菌及病毒是诱导针对抗原的免疫反应的有吸引力的疫苗。细菌或病毒疫苗能够模拟自然感染并产生强烈的和持久的粘膜免疫性。生产和施用疫苗通常相对廉价。此外,这样的载体经常能携带一个以上的抗原,而且可以提供针对多种传染性试剂的保护。

[0016] 在一个方面,本发明提供了包含编码 TRAP 多肽或其免疫原性片段的第一多核苷酸序列的疫苗。TRAP 多肽可包含 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:11 的免疫原性片段。疫苗包括任何包含编码能够诱导对多肽的免疫反应的抗原性多肽的多核苷酸的组合物。在另一方面,本发明公开了载体(例如细菌载体)的用途,用于接种和产生针对艾美球虫属或其它顶复门寄生虫如疟原虫属(疟疾的致病体)、弓形体属和隐孢子虫属的免疫反应。沙门氏菌菌株是适当的载体,因为可以使细菌基因发生突变或使其毒性减弱以产生对被感染或免疫的受试者有低致病性或没有致病性但同时保持免疫原性的细菌。

[0017] 已经证明来自巨型艾美球菌(EmTFP250)的高分子量、无性阶段抗原为母体抗体的靶标,所述母源抗体通过饲养被该原生动物寄生虫感染的雌鸡而产生。抗原的氨基酸序列分析揭示 TRAP (凝血栓蛋白相关的无名蛋白)家族的新成员,其含有 16 个凝血栓蛋白 1 型重复和 31 个表皮生长因子样钙结合结构域。EmTFP250 或 TRAP 还包含两个低复合亲水区域,其富含谷氨酸和甘氨酸残基,以及与寄生虫滑行运动相关的跨膜结构域 / 细胞质尾部(其在顶复门微线体蛋白内高度保守)。选出数个潜在表位并在 SEQ ID NO:1-3 和 11 中列出。由于这个抗原的保守性质,通过载体表达这些表位可诱导针对多个顶复门寄生虫的保护性免疫力。

[0018] 沙门氏菌可提供有用的载体,因为它能够在宿主的胃肠道存活并引起粘膜免疫反应。使用沙门氏菌载体的口服疫苗产生强烈的粘膜免疫反应,而且对动物和人类施用都相对容易。然而,与其毒性更强的对应体(counterpart)比较,许多目前的沙门氏菌疫苗菌株在产生强烈的保护性免疫反应方面不那么有效。强毒性菌株提供强烈的免疫反应但也可引起接种的受试者的显著的发病率。可以用作有效的粘膜(例如口服)接种的沙门氏菌菌株可提供一种载体,其能够容易地对受试者进行接种从而抵抗一种或多种致病体,例如顶复门寄生虫。

[0019] 本发明描述了可用作载体的肠炎沙门氏菌菌株,以及使用这个菌株制成的各种重组载体。具体地,本发明提供了能表达外源 TRAP 多肽的肠炎沙门氏菌 13A(SE13A)。此外,本发明公开了疫苗和通过施用疫苗增强受试者的免疫反应的方法,所述疫苗包含编码 TRAP 多肽的 TRAP 多核苷酸序列和编码能够与 CD40 结合的 CD154 多肽或其同源物的 CD154 多核苷酸序列。疫苗可以用于增强针对艾美球虫属或另一个顶复门寄生虫(如疟原虫属、弓形体属或隐孢子虫属)的免疫反应,或用于降低与顶复门寄生虫引起的感染相关的发病率。

[0020] 基于在鸡体内引起粘膜定殖(colonization)和粘膜下易位的不寻常的能力(使相关抗原或表位在商业化鸡体内强烈地呈递),选择了沙门氏菌的野生型分离体,肠炎沙门氏菌 13A(SE13A)(于 2006 年 9 月 13 日保藏于美国模式培养物保藏所(ATCC),保藏号为 PTA-7871)。重要地是,该野生型沙门氏菌分离体在商业化鸡体内不引起临床可检测的疾病或性能的丧失,表明该野生型沙门氏菌对脊椎动物的致病潜在可能性低。

[0021] 可通过灭活细菌的在实验室或生产条件之外持续复制必需的至少一个基因使 SE13A 分离体进一步减毒。能用作载体的减毒或变异的沙门氏菌菌株如下所述。SE13A 用于产生减毒的沙门氏菌菌株以开发疫苗并产生增强的免疫反应。SE13A 对家禽具有侵入性、无致病性,而且不造成可检测的发病率。与非侵入性细菌载体相比,这些特性导致增强的免疫反应。通过使限制细菌传播能力的基因突变而使 SE13A 减毒可以提高疫苗的安全性。具有 *aroA* 或 *htrA* 突变的 SE13A 菌株保留产生免疫反应的能力,但在宿主中的复制受到限制。因此,减毒提高了载体的安全性而未使其免疫原性下降。

[0022] 可以在多种其它沙门氏菌基因中进行突变,这些基因包括但不限于 *cya*、*crp*、*asd*、*cdt*、*phoP*、*phoQ*、*ompR*、外膜蛋白、*dam*、*htrA* 或其它应激相关基因、*aro*、*pur* 和 *gua*。如实施例中所示,发现 *aroA* 和 *htrA* 突变可以使 SE13A 减毒。*aro* 基因是涉及莽草酸酯(shikimate)生物合成途径或芳香酶途径的酶,而 *aro* 突变体是芳香族氨基酸色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的营养缺陷型。*htrA* 是编码降解异常蛋白的细胞周质蛋白酶的应激反应基因。*htrA* 突变体也是减毒的并表现出对过氧化氢敏感性增加。

[0023] 实施例中描述的 *aroA* 和 *htrA* 突变是缺失突变,但可以以各种方式产生突变。适当地,突变为不能通过单一步骤修复的非回复突变(non-reverting mutation)。适当的突变包括缺失、反转、插入及置换。载体可以包括一种以上突变,例如载体可以同时包含 *aroA* 及 *htrA* 突变。产生这种突变的方法是本领域熟知的。

[0024] 可以将编码 TRAP 多肽抗原和来自任何数目的致病生物的其他抗原的多核苷酸插入载体(例如,SE13A)中并由细菌表达。通过载体表达的这些多核苷酸使得在受试者免疫后产生抗原性多肽。可将多核苷酸插入细菌的染色体中,或在质粒或其它染色体外 DNA 上编码。本领域技术人员将理解,存在大量方法以获得载体(例如沙门氏菌)中多核苷酸的表达。多核苷酸可以通过本领域技术人员已知的方法与启动子(例如,组成型启动子、可诱导启动子等等)可操作地连接。适当地,可将编码 TRAP 抗原的多核苷酸插入被表达的细菌的多核苷酸中。适当地,细菌的多核苷酸编码跨膜蛋白,将编码 TRAP 抗原的多核苷酸插入至细菌多核苷酸序列中,以允许 TRAP 抗原在细菌表面表达。例如,编码 TRAP 的多核苷酸可以按照处于阅读框内的方式插入至编码跨膜蛋白外环区的区域中的细菌多核苷酸中,从而使细菌多核苷酸序列保留在阅读框中。参见实施例 1。

[0025] 或者,可将编码 TRAP 抗原的第一多核苷酸插入编码分泌多肽的多核苷酸中。本

领域的技术人员将理解,编码 TRAP 抗原的多核苷酸可以插入众多的细菌多核苷酸中,以使 TRAP 抗原表达并呈递至经过疫苗治疗的受试者的免疫细胞。在实施例中,将编码 TRAP 多肽的第一多核苷酸插入 SE13A 的 lamB 基因的环区 9 中。编码 TRAP 抗原的多核苷酸可以可包含于单一拷贝或一个以上的拷贝中。也可产生包含插入至 lamB 的环区 9 中的多个拷贝的 TRAP 抗原的细菌载体。或者,可以将多个拷贝的表位插入到细菌载体中一个以上的位置。

[0026] 适当地,第一多核苷酸编码 TRAP 多肽的一部分或整个 TRAP 多肽。可将多核苷酸插入到载体中。在实施例中,将 3 个多肽(SEQ ID NO:1-3)加入到 SE13A 中。适当地,插入至载体的 TRAP 多肽部分是免疫原性片段。免疫原性片段是能够激发细胞或体液免疫反应的肽或多肽。适当地,TRAP 的免疫原性片段可以是全长蛋白序列的 6 个或更多个连续的氨基酸、10 个或更多个氨基酸、15 个或更多个氨基酸,或者 20 个或更多个氨基酸。

[0027] 其它适当的包含于疫苗(其具有包含于载体内的 TRAP)中的表位包括但不限于,编码其它艾美球虫属相关多肽的多核苷酸。本领域的技术人员将理解,多种序列可以与任何其它抗原联合使用,而且也可以与编码免疫刺激肽(如 CD154 多肽)的多肽结合使用。

[0028] 如以下更详细描述,包括载体的疫苗可包括 CD154 多肽,CD154 多肽能够与受试者内的 CD40 结合并刺激受试者对载体及其相关抗原产生反应。树突状细胞(DC)的参与对于有力的免疫反应的启动是必需的,因为其具有激活原态 T 细胞的独特的能力,引起 T 细胞扩增并分化为效应细胞。DC 的作用(DC 是机体的几乎所有组织中发现的抗原递呈细胞(APC))是捕获抗原,将抗原运送到相关的淋巴组织,然后把抗原递呈给原态 T 细胞。被 DC 激活后, T 细胞扩增、分化为效应细胞、离开次级免疫器官并进入外周组织。激活的细胞毒性 T 细胞(CTL)能破坏感染了病毒的细胞、肿瘤细胞或者甚至是被细胞内寄生虫(例如沙门氏菌)感染的 APC,并被证明在抗病毒感染的保护中至关重要。CD40 是 TNF 受体家族分子的成员并在多种细胞类型上表达,包括专职的抗原递呈细胞(APC),例如 DC 和 B 细胞。CD40 与其配体 CD154 的相互作用是极其重要的,对于体液和细胞免疫都有刺激作用。可以通过抗 CD40 抗体模拟在 DC 表面表达的 CD40 对 DC 的刺激。然而在体内这是通过在激活的 T 细胞表面表达的 CD40 的天然配体(即 CD154)相互作用发生的。有趣的是,已经鉴定了 CD154 的 CD40 结合区。CD154 的 CD40 结合区可以在载体(如沙门氏菌载体)的表面表达,并可导致对共递呈的肽序列增强的免疫反应。

[0029] 如上所述,可将编码 CD154 多肽的多核苷酸插入载体的染色体中或保持在染色体外。CD154 多肽可以是 CD154 全长蛋白的一部分或整个 CD154 蛋白。适当地,CD154 多肽能够与 CD40 结合。本领域技术人员将理解,可以按照处于阅读框内的方式将这些多核苷酸插入到多种多核苷酸中并在载体的不同部分表达或被分泌。编码能够增强对 TRAP 的免疫反应的 CD154 多肽的多核苷酸也可以编码 TRAP 抗原。可以将编码 CD154 多肽的多核苷酸与编码 TRAP 抗原的多核苷酸连接起来,从而在载体中 CD154 多肽和 TRAP 抗原存在于同一多核苷酸上。在实施例中,编码能够与 CD40 结合的 CD154 多肽的多核苷酸也编码 TRAP 抗原。参见所附序列表中 SEQ ID NO:1, 2, 3 和 11。在实施例中,将编码 TRAP 抗原的多核苷酸(SEQ ID NO:13-15)和编码 CD154 多肽的多核苷酸都插入 lamB 基因的环区 9 中。本领域技术人员将理解,也可以使用编码其它跨膜蛋白和 lamB 基因的其它环区的细菌多核苷酸。

[0030] 如上所述,疫苗中可以包括编码能够增强对抗原的免疫反应的 CD154 多肽的 CD154 多核苷酸。适当地,CD154 多肽长度为 50 个氨基酸以下,更适当地是 40 个以下、30 个

以下或是 20 个以下氨基酸的长度。多肽可介于 10 至 15 个氨基酸之间、10 至 20 个氨基酸之间或 10 至 25 个氨基酸长度之间。CD154 序列和 CD40 结合区在各种物种间不是高度保守的。鸡和人的 CD154 序列分别见于 SEQ ID NO:10 及 SEQ ID NO:4。

[0031] 已经确定了一些物种的 CD154 的 CD40 结合区,包括人、鸡、鸭、小鼠和牛,分别见于 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9。虽然不同物种之间的 CD40 结合区的序列有可变性,但人 CD154 多肽能够增强鸡的免疫反应。因此,人们可以使用物种特异性 CD154 多肽或异源 CD154 多肽来实施本发明。

[0032] 在实施例中制备了几种 SE13A 重组细菌。在每种同时含有 TRAP 和 CD154 多核苷酸的 SE13A 菌株中,TRAP 多肽和 CD154 多肽被编码在同一多核苷酸上,而且它们彼此处于阅读框内并与其所插入至的沙门氏菌 lamB 多核苷酸处于阅读框内。在替代的具体实施方式中,CD154 多肽和 TRAP 多肽可被不同的多核苷酸编码。SE13A 的 aroA htrA TRAP 包含 aroA 和 htrA 的缺失并同时编码 TRAP 表位(SEQ ID NO:1-3)和可选地插入至 lamB 的环区 9 的 CD154 多肽(SEQ ID NO:4)。

[0033] 本发明还提供了包含减毒的沙门氏菌菌株和药学上可接受的载体的组合物。药学上可接受的载体是任何适合体内施用的载体。药学上可接受的适合用于组合物中载体的例子包括但不限于,水、缓冲溶液、葡萄糖溶液或细菌培养液。组合物的附加成份可以适当包括,例如,赋形剂如稳定剂、防腐剂、稀释剂、乳化剂和滑润剂。药学上可接受的载体或稀释剂的例子包括稳定剂,如碳水化合物(例如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、葡萄糖、右旋糖苷)、蛋白(如白蛋白或酪蛋白)、含蛋白试剂(如牛血清或脱脂乳)和缓冲剂(例如磷酸盐缓冲液)。特别是在组合物中添加这样的稳定剂时,该组合物适合冷冻干燥或喷雾干燥。

[0034] 本发明还提供了通过施用包含 TRAP 多肽和能够与 CD40 结合并激活 CD40 的 CD154 多肽的疫苗而增强受试者免疫反应的方法。向受试者施用有效量的包括编码能够与 CD40 结合的 CD154 多肽的多核苷酸的疫苗以增强受试者对疫苗的免疫反应。适当地,疫苗包含编码包括人类 CD154 多肽(SEQ ID NO:4)的 140-149 位氨基酸的多肽或其同源物的多核苷酸。因此,源自一个物种的 140-149 位氨基酸的同源物可用于刺激不同物种中的免疫反应。

[0035] 在本文中鉴定出几种合适的多肽。适当地,多核苷酸编码来自于与受试者同一物种的 CD154 多肽。适当地,将编码 SEQ ID NO:5 的多肽的多核苷酸用于人类受试者,将编码 SEQ ID NO:6 的多肽的多核苷酸用于鸡,将编码 SEQ ID NO:7 的多肽的多核苷酸用于鸭,将编码 SEQ ID NO:8 的多肽的多核苷酸用于小鼠,和将编码 SEQ ID NO:9 的多肽的多核苷酸用于牛。在实施例中,在鸡疫苗载体中使用人类 CD154 多肽(SEQ ID NO:5),而且证明可增强对外源抗原的免疫反应。因此,CD154 多肽和受试者的其它异源组合可用于本发明的方法。CD154 多肽可用于增强受试者对任何外源抗原或存在于疫苗载体中的除 TRAP 多肽之外的抗原性多肽的免疫反应。本领域技术人员将理解,CD154 多肽可用于增强对存在于疫苗中的一种以上抗原性多肽的免疫反应。

[0036] 来自 CD154 的多肽至少部分通过与其受体 CD40 的结合而刺激免疫反应。在实施例中使用了与 CD154 多肽同源的多肽,其在受试者免疫细胞上表达并且能够与巨噬细胞和其它抗原递呈细胞上的 CD40 受体结合。这个配基-受体复合物的结合刺激巨噬细胞(和巨噬细胞谱系细胞,例如树突状细胞)以增强吞噬作用和抗原呈递,并同时增加已知能够激活其它局部免疫细胞(如 B 淋巴细胞)的细胞因子的分泌。因此,CD154 肽相关分子是免疫反

应及扩大的抗体产生的优选靶标。

[0037] 本方法可用的潜在载体包括但不限于沙门氏菌属(肠炎沙门氏菌)、志贺菌属(*Shigella*)、埃希杆菌属(*Escherichia*) (大肠杆菌)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*)、杆菌属(*Bacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、弧菌属(*Vibrio*) (霍乱弧菌)、李斯特菌属(*Listeria*)、腺病毒(*adenovirus*)、痘病毒(*poxvirus*)、疱疹病毒(*herpesvirus*)、甲病毒(*alphavirus*)及腺相关病毒。

[0038] 此外,本发明公开了增强针对顶复门寄生虫的免疫反应的方法和降低与随后感染顶复门寄生虫相关的发病率的方法。简言之,该方法包括向受试者施用有效量的包含编码 TRAP 多肽的第一多核苷酸序列的疫苗。TRAP 多肽可以包括 SEQ ID NO:1-3 和 11。可以以本领域的技术人员熟悉的多种方式将 TRAP 多肽插入载体,包括但不限于在 BMC Biotechnol. 2007Sept, 17:7(1):59 中描述的无痕定点突变系统(*scarless site-directed mutation system*),肠炎沙门氏菌染色体中的无痕定点诱变(*Scarless and Site-directed Mutagenesis*),其全部内容通过引用并入本文。也可以工程化载体使其表达 TRAP 多肽以及如上所述的能够增强免疫反应的其它多肽(如 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:10)。特别的,载体可以表达能够结合 CD40 的 CD154 的多肽以增强受试者对 TRAP 多肽的免疫反应。可选地,载体是细菌,例如肠炎沙门氏菌。

[0039] 将施用的疫苗的有用剂量将根据受试者的年龄、体重和物种、施用的模式及途径、以及寻找对其产生免疫反应的病原体类型而变化。可以以任何足以激发免疫反应的剂量施用组合物。对于细菌疫苗而言,预计 10^3 至 10^{10} 个细菌、 10^4 至 10^9 个细菌、或 10^5 至 10^7 个细菌的剂量范围是适当的。组合物可以只施用一次,或可以施用两次或更多次以增强免疫反应。例如,组合物可以施用两次或更多次,每次隔一周、隔两周或隔三周或隔更多周。在施用之前使细菌适当地存活,但在一些具体实施方式中,在施用之前将细菌杀死。在一些具体实施方式中,细菌能够在受试者体内复制,而在其它具体实施方式中,细菌不能在受试者体内复制。

[0040] 对于向动物或人类的施用而言,可以以多种手段施用组合物,这些手段包括但不限于鼻内、粘膜、通过喷雾、皮内、非肠道、皮下、口服、通过气雾或肌内。点眼施用或添加到饮水或食物中也是适当的。对于鸡而言,可以将组合物施用到卵中。

[0041] 本发明的一些具体实施方式提供增强受试者免疫反应的方法。适当的受试者包括但不限于脊椎动物,适当的哺乳动物、适当的人类和禽类,适当的家禽如鸡。也可以使用其它的动物感染模型。增强免疫反应包括但不限于,诱导受试者的免疫系统介导的治疗性或预防性效应。特别地,增强免疫反应包括但不限于抗体的产生增加、抗体重链的类别转换增强、抗原呈递细胞的成熟、辅助性 T 细胞的刺激、溶细胞性 T 细胞的刺激或 T 及 B 细胞记忆的诱导。

[0042] 预计将来自相同或不同病原体的几个表位或抗原在单一疫苗中组合施用,以产生针对多个抗原的增强的免疫反应。重组疫苗可以编码来自多种病原体微生物、病毒或肿瘤相关抗原的抗原。施用能够表达多种抗原的疫苗具有同时诱导抵抗两种或更多种疾病的免疫力的优点。例如,活的减毒细菌(如肠炎沙门氏菌 13A)为激发抵抗多种抗原的免疫反应提供了适当的载体。

[0043] 可以使用编码抗原的外源多核苷酸构建细菌疫苗,可以使用本领域中广为人知的方法将所述多核苷酸插入至细菌基因组中的任何非必需位点或可选地质粒上携带。一个适当的插入多核苷酸的位点是在跨膜蛋白的外部部分内或将该多核苷酸与靶向用于分泌途径的外源多核苷酸的序列偶联。一个用于插入多核苷酸的适当的跨膜蛋白的例子是 lamB 基因。在实施例中,TRAP 和 CD154 多核苷酸插入 lamB 序列的环区 9 中。

[0044] 外源多核苷酸包括但不限于,编码选自致病性微生物或病毒的抗原的多核苷酸,并包括以产生有效免疫反应的方式表达的多核苷酸。这样的多核苷酸可以来自致病性病毒,如流感病毒(例如 M2e、红细胞凝集素、或神经氨酸酶)、疱疹病毒(例如编码疱疹病毒的结构蛋白的基因)、逆转录病毒(例如 gp160 包膜蛋白)、腺病毒、副粘液病毒、冠状病毒等等。外源多核苷酸也可以获自致病性细菌,例如编码细菌蛋白(如毒素)和外膜蛋白的基因。此外,来自寄生虫(例如其它顶复门寄生虫)的外源多核苷酸是用于载体疫苗的理想候选物。

[0045] 载体中也可以包括编码参与激发免疫系统的多肽的多核苷酸,如活的减毒的沙门氏菌疫苗。多核苷酸可以编码已知具有刺激效应的免疫系统分子,如白细胞介素、肿瘤坏死因子、干扰素,或是另一种参与免疫调节的多核苷酸。疫苗也可包括编码已知刺激免疫反应的肽(例如本文描述的 CD154 多肽)的多核苷酸。

[0046] 以下实施例只是示例性的,而不是限制本发明或所附权利要求的范围。

[0047] 实施例

[0048] 实施例 1. TRAP 和 TRAP/CD154 插入物的构建

[0049] 菌株和培养条件

[0050] 除非另有说明,否则首先将所有质粒保持在 TOP10 大肠杆菌细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中。使用肠炎沙门氏菌 13A 引入突变。肠炎沙门氏菌菌株 13A 是从 USDA/APHIS/NVSL 获得的田野分离体,并以保藏号 PTA-7871 保藏于 ATCC。携带质粒 pKD46 的细菌在 30°C 生长。其它细菌在 37°C 生长。质粒消除在 37°C 实施。

[0051] 将 Luria-Bertani (LB) 培养基用于细胞的常规生长,SOC 培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)用于电穿孔之后的表型表达。在适当时,将以下抗生素添加到培养基中:氨苄西林(Amp) 100 μ g/ml、卡那霉素(Km) 50 μ g/ml 和氯霉素(Cm) 25 μ g/ml。

[0052] 质粒

[0053] 以前描述过质粒 pKD46、pKD13 和 pBC-I-SceI (Datsenko 和 Wanner, PNAS2000, 97:6640-6645 和 Kang 等人, J Bacteriol2004, 186:4921-4930, 二者通过引用全文并入本文)。质粒 pKD46 编码 Red 重组酶酶类,其介导引入的线性 DNA 与染色体 DNA 之间的同源重组。这个质粒还包含氨苄西林抗性基因而且对温度敏感,所以其需要 30°C 的温度以在细胞中维持生长。质粒 pKD13 用作重叠 PCR 反应中 Km 抗性(Km^r)基因的扩增模板。质粒 pBC-I-SceI(在 37°C 维持在细胞中)产生 I-SceI 酶,I-SceI 酶剪切以下 18 个碱基对的稀有识别序列:5' -TAGGGATAACAGGGTAAT-3' (SEQ ID NO:16)。质粒 pBC-I-SceI 还包含氯霉素抗性(Cm^r)基因。

[0054] PCR

[0055] 在表 1 中列出了用于 PCR 的所有引物。通常,PCR 的反应条件如下:在总体积 50 μ L 中含有大约 0.1 μ g 纯化的基因组 DNA、质粒或 PCR 产生的 DNA(Qiagen, Valencia, CA, USA)、

1× 克隆的 Pfu 聚合酶缓冲液、5U Pfu 聚合酶 (Stratagene La Jolla, CA, USA)、1mM dNTP (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) 和每个引物 1.2 μM。使用 DNA 引擎热循环仪 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 在以下扩增条件下进行扩增: 94℃, 2 分钟; 94℃ 持续 30 秒、58℃ 持续 60 秒、72℃ 持续 90 秒 (每 1kb), 共进行 30 个循环; 和 72℃ 持续 10 分钟以进行最后的延伸。每个 PCR 产物经过凝胶纯化 (Qiagen, Valencia, CA, USA), 并以 25 μL 的 EB 缓冲液洗脱以制备用于重叠延伸 PCR 的模板, 或者以 50 μL 的 EB 缓冲液洗脱, 经乙醇沉淀, 并重悬于 5 μL 的 ddH₂O 中, 以使其通过电穿孔进入肠炎沙门氏菌中。

[0056] 表 1 引物序列

[0057]

引物	扩增区	引物序列
lam-up-f lam-up-r	环区9上游	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC 3' (SEQ ID NO:17) 5'GTEATCGCCGTCTTTGATATAGCC 3' (SEQ ID NO:18)
lam-dn-f lam-dn-r	环区9下游	5'ATTTCCCGTTATGCCGCAGC 3' (SEQ ID NO:19) 5'GTAAACAGAGGGCGACGAG 3' (SEQ ID NO:20)
Km-f Km-r	I-SceI/Km ^r 基因	5'GCTATATCAAAGACGGCGATAACTAACTATAACGGTCCCTAAGGTA GCGAATTTCCGGGGATCCGTCGA 3' (SEQ ID NO:21) 5'GCTGCGGCATAACGGGGAATTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' (SEQ ID NO:22)
Kan4f Kan4r	在Km ^r 基因内: 测序	5'CAAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3' (SEQ ID NO:23) 5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3' (SEQ ID NO:24)
SEQ1 hCD154 上游反向	SEQ1 hCD154/ 环区9上游	5'GGAGGACGCAACCGCCGCGGTCCGAAAACCACCACCGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO:25)
SEQ1hCD154 下游正向	SEQ1hCD154/ 环区9下游	5'CCGCGGCGGTTGCGTCTCTCTCTGGGCAGAAAAAGGTTATTATACCATGTCTTCTCTCTCCATTTCGCCGTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO:26)
SEQ2 hCD154 上游反向	SEQ2-hCD154/ 环区9上游	5'TTTTCTTCTTCTTCTTCCGGTTCGGACGTTTCATGACCTTCTTCGGCTTTTCGGCTGAACCGCCGGGGTTTCCGGCGCCGCGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO:27)
SEQ2 hCD154 上游反向	SEQ2-hCD154/ 环区9下游	5'ACCGGAAGAAGAAGAAGAAAAAAGAAGAAGGTGGTGGTTTTCGGACCGCGCGGTTGCGTCTCTCTCTGGGCAGAAAAAGGTTATTATACCATGTCTTCTCTCTCCATTTCGCCGTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO:28)
SEQ3 Hed154 上游反向	SEQ3 hCD154/ 环区9上游	5'GCAACACCACCACCAACCGCCGCGATCAGCAGAACACCACCAACACCACCGCAACCGCCGCGGTTCGGAAAACCACCACCGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO:29)
SEQ3 hCD154 上游反向	SEQ3-hCD154/ 环区9下游	5'GGCGGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGTTTACCTCCGGTGGTGGTGGTGGCGGTGCGCAGGAATCTCTCTCTGGGCAGAAAAAGGTTATTATACCATGTCTTCTCTCTCCATTTCGCCGTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO:30)

[0058]

lam 3f	环区9外部区: 测序	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3' (SEQ ID NO:31)
lam 3r		5'CGCTGGTATTTTGCGGTACA 3' (SEQ ID NO:32)

[0059] 在表 1 中,斜体的核苷酸与 lamB 基因环区 9 插入位点的任一侧互补,其对应于以鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)为注释参照基因组的 1257 位核苷酸。粗体的核苷酸代表 Km-f 引物中的 I-SceI 识别位点。

[0060] 电穿孔

[0061] 第一步是将 pKD46 转化入肠炎沙门氏菌,以使 Red 重组酶酶类可用于介导后续突

变的重组。使用质粒制备试剂盒(Qiagen Valencia, CA, USA)从大肠杆菌BW25113(Datsenko和Wanner, PNAS2000, 97:6640-6645)中收获质粒 pKD46。然后,将 0.5 μ L 的 pKD46DNA 转化进入准备进行电穿孔的肠炎沙门氏菌 13A(Datsenko 和 Wanner, PNAS2000, 97:6640-6645)。简而言之,将细胞接种至 10-15mL 的 2X YT 肉汤培养基中,并在 37°C 中过夜生长。然后将 100 μ L 过夜培养物重新接种至 10mL 新鲜的 2X YT 肉汤培养基中,并置于 37°C 3-4 小时。将等待以 pKD46 质粒进行转化的细胞于 50°C 加热 25 分钟,以帮助灭活宿主限制。将细胞在 ddH₂O 水中洗涤五次,并重悬于 60 μ L 的 10% 甘油。然后,将细胞以 2400-2450kV 脉冲处理 1-6ms,于 30°C 在 SOC 中孵育 2-3 小时,并将其植板于含有合适的抗生素的 LB 介质上。将含有 pKD46 的肠炎沙门氏菌转化子保持于 30°C。当准备这些转化子进行另外的电穿孔反应时,除了冲洗前一小时加入 15% 阿拉伯糖以诱导 Red 重组酶酶类,并且细胞不经过 50°C 加热步骤之外,所有步骤均相同。

[0062] 环区 9 上游 -I-SceI/Km^r- 环区 9 下游构建体

[0063] 通过组合 Red 重组酶系统(Datsenko 和 Wanner, PNAS2000, 97:6640-6645, 通过引用全文并入本文)和重叠 PCR (Horton 等人, BioTechniques1990, 8:528-535, 通过引用全文并入本文)将 I-SceI 酶识别位点和 Km^r基因一起引入 lamB 基因的环区 9。插入位点对应于使用鼠伤寒沙门氏菌 LT2 (*S. typhimurium*)作为注释参考基因组的 lamB 基因的核苷酸 1257。首先,分别扩增紧邻环区 9 插入位点两翼的上游和下游区(分别为环区 9 上游和环区 9 下游)。所使用的引物为 lam-up-f 和 lam-up-r (用于环区 9 上游)以及 lam-dn-f 和 lam-dn-r (用于环区 9 下游)。然后,使用引物 Km-f 和 Km-r 扩增 pKD13 质粒的 Km^r基因。在这里,将 I-SceI 酶位点合成性地添加到 Km-f 引物的 5' 端, I-SceI 酶位点前面是与 loop-up-r 引物互补的区。同样地,将与 loop-dn-f 引物互补的区添加到 Km-r 引物的 5' 端。当在一个 PCR 反应中用作模板时。该互补区允许所有 3 种 PCR 产物退火。图 2A 代表该设计方案。将由环区 9 上游 -I-SceI/Km^r- 环区 9- 下游序列(PCR-A)组成的 PCR 片段经电穿孔导入肠炎沙门氏菌细胞,该细胞含有 pKD46 并经阿拉伯糖诱导,然后将其植板于带有 Km 的 LB 板上。为了验证突变的正确序列方向,我们使用引物对 Kan4F/lam3f 和 Kan4R/lam3r 进行菌落 PCR 反应,其中 Kan4F 和 Kan4R 是 Kmr 基因特异性引物, lam3f 和 lam3r 是位于 lamB 环区 9 区外面的引物。将这些 PCR 片段经过凝胶纯化(Qiagen, Valencia, CA, USA)并用于 DNA 测序。

[0064] 环区 9 上游 -TRAP-CD154- 环区 9 下游构建体

[0065] 最终的重叠 PCR 片段, PCR-B, 包含加入的 TRAP 抗原(与两翼分别为环区 9 上游和下游区的 CD154 序列组合)(图 2B)。组合序列由编码 SEQ ID NO:1-3 的 TRAP 多核苷酸和 CD154 以及间隔物例如丝氨酸(Ser)残基一起组成。

[0066] 为了缩短构建下一片段的步骤的数量,将 TRAP-CD154 序列合成性地添加到 lam-dn-f 引物的 5' 末端, TRAP-CD154 序列的前面是 loop-up-r 引物的互补区。以前使用的环区 9 上游的 PCR 产物可与新构建的 PCR 产物(其中在环区 9 下游的 5' 末端引入了 TRAP-CD154)一起使用以进行最后的 PCR 反应。然而,对于其它的插入序列,由于插入序列的长度较长,需要另外的 PCR 步骤以添加的核苷酸(对于与 loop-up-r 引物连接的插入序列是特异性的)来扩增环区 9 上游。基于大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌蛋白中最常使用的密码子的汇编数据选择 Gly (GGT)和丝氨酸(TCC)以及所有其它氨基酸的编码序列。引物设计

的进一步细节参见表 1。

[0067] I-SceI 位点 /Km^r插入突变

[0068] 第一突变步骤包括设计 PCR 片段, PCR-A, 其作为 I-SceI 位点 /Km^r盒的载体被插入 lamB 位点。PCR-A 由毗邻 Km^r基因的 I-SceI 酶识别位点组成, 其每侧末端带有与 lamB 环区 9 插入位点的上游和下游区(分别为环区 9 上游和环区 9 下游)同源的大约 200-300bp 的侧翼 DNA。将片段引入表达 Red 重组酶酶类的肠炎沙门氏菌细胞, 并选择 Km^r菌落。在通过菌落 PCR 筛选一些菌落之后, 为了想要的插入的 I-SceI 位点 /Km^r序列对阳性克隆进行测序, 选择鉴定后的突变体并命名为 SE164。

[0069] 以 TRAP-CD154 对 I-SceI/Km^r进行基因组置换

[0070] 第二突变步骤要求构建 PCR 片段, 称为 PCR-B, 显示于图 2B, 由最终插入序列 TRAP-CD154 组成, 其两翼为 lamB 同源片段。PCR-B 扩增子没有选择标记物, 并且必须在置换了 SE164 中以前的 I-SceI 位点 /Km^r突变之后进行反向选择。质粒 pBC-I-SceI 编码 Cm^r基因和 I-SceI 酶, 该酶在 SE164 的 I-SceI 位点切割基因组。因此, 将 pBC-I-SceI 与 PCR-B 一起经电穿孔引入 SE164。在 PCR-B 置换 PCR-A 的重组之后, 根据能在 Cm 上而不能在 Km 上生长的能力来选择阳性克隆。对突变体进行 DNA 测序证实成功的 PCR-B 重组之后, 将菌株命名为序列 1、序列 2 和序列 3。对于每个 TRAP-CD154 插入物使用十个随机克隆用于以 lam3f 和 lam3r 进行的 PCR, 然后使用对每个插入序列特异的限制性酶切位点进行消化, 所测的 100% 的克隆对于想要的突变序列而言都是阳性克隆。测序结果证明, 在每种情况下 TRAP-CD154 准确插入到了环区 9 区内而无外来核苷酸的加入。TRAP-CD154 疫苗的插入如下: TRAP-CD154 (SEQ ID NO:33); TRAP-US-CD154 (SEQ ID NO:34); TRAP-DS-CD154 (SEQ ID NO:35)。

[0071] 实施例 2. TRAP-CD154 突变体 / 插入体的减毒

[0072] 通过 aroA 基因和 / 或 htrA 基因的缺失突变实现 SE13A 的减毒。aroA 基因是细菌分支酸途径中的关键基因, 它的突变导致严重的代谢缺陷, 这影响七种不同的生化途径。htrA 基因的突变使细胞耐受暴露于低温和高温、低 pH 和氧化剂和 DNA 损伤性试剂的能力降低, 并降低细菌的毒性。

[0073] 为了实现 SE13A 中的缺失突变, 以 Km 抗性基因序列置换肠炎沙门氏菌的细菌基因组中的靶基因序列。该置换过程通过使用如上所述的重叠延伸 PCR 和 PCR 产物的电穿孔来完成。通过在 Km 抗性基因的两翼带上与目标基因同源的 200-300 个碱基对的序列而将 Km 抗性基因靶向包含目标基因 (aroA 或 htrA) 的基因组区内。一旦获得 Km 抗性突变体, 通过 DNA 测序证实 aroA 和 htrA 的缺失突变。类似的 aroA 和 htrA 沙门氏菌株于 2006 年 9 月 13 日保藏于美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection) (分别为保藏号 PTA-7872 和保藏号 PTA-7873)。预先可在体内按照清除时间检验减毒菌株。两种减毒菌株均比野生型 13A 菌株具有更快的清除时间, 但两种减毒菌株都能够在口腔感染之后在鸡的肝、脾和盲肠扁桃体定殖。分离了包含 TRAP-CD154 并且同时缺乏 aroA 和 htrA 的减毒菌株。

[0074] 实施例 3. 对鸡感染艾美球虫属后免于死亡的保护

[0075] 以大约 1×10^8 cfu 的沙门氏菌分离体 (包含 3 个不同的编码 SEQ ID NO:1-3 的 TRAP 多肽的多核苷酸) 或盐水对照通过口服接种至孵化日的鸡 (n=280)。在 21 日龄时,

用 10^4 个形成孢子的巨型艾美球菌卵囊对鸡经口服进行刺激。在刺激后,每天对鸡进行监控。如图 3 所示,不管给予哪个疫苗菌株,在刺激后第 5 天,与未进行疫苗接种的动物相比鸡的死亡率均下降。死亡率如下:TRAP (SEQ ID NO:1) 7/43 (16.3%); TRAP US (SEQ ID NO:2) 1/46 (2.2%); TRAP DS (SEQ ID NO:3) 6/43 (11%); 对照 (未接种的) 10/46 (21.7%)。令人惊讶地,用包含 SEQ ID NO:2 的 TRAP 多肽的沙门氏菌进行接种的鸡与对照的非接种的鸡相比,显示死亡率明显并且显著地降低 ($P < 0.001$)。进行尸检表明所有的死亡均与巨型艾美球菌感染相关。

[0076] 在重复实验中,疫苗接种的禽 (6/48) 中的死亡率显著低于对照 (17/50),并且在接种的鸡中表现更好,但差异并不显著。

[0077] 另外,从免疫的禽类中收集血清并进行针对 TRAP 的 ELISA。在用 TRAP-US (SEQ ID NO:2) 接种的禽类中产生强有力的 TRAP 特异性抗体反应。

[0078] 实施例 4. 与疫苗接种相关的发病率得到限制

[0079] 为了评估 TRAP US-CD154 (SEQ ID NO:34) 作为潜在疫苗候选物的效力,完成了类似的研究以调查与接种相关的发病率。Broiler 鸡用 1×10^8 cfu/ 禽的沙门氏菌疫苗 (具有 TRAP US 和 CD154 插入物 (SEQ ID NO:34)) 通过口服进行接种或用盐水进行伪接种。在接种后第 3 周,用巨型艾美球菌的形成孢子的卵囊进行双孢子球虫刺激 (10^5 个形成孢子的卵囊 / 禽)。体重的增减在刺激后 7 天进行评估。免疫的禽类的表现显示出显著的 ($p < 0.01$) 改善。免疫的禽类与未接种的对照相比体重增加了约 31%。因此,用含有 TRAP 多肽和能与 CD40 结合的 CD154 多肽的基于沙门氏菌的疫苗进行接种可以保护禽类抵抗与艾美球虫属感染相关的发病和死亡。

[0001]

序列表

<110> 阿肯色大学评议会;德克萨斯A&M大学体系;圭尔夫大学

<120> 增强针对艾美球虫属的免疫反应的组合物和方法

<130> 840023CG-800063

<150> US 60/984,612

<151> 2007-11-01

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 巨型艾美球菌 (Eimeria maxima)

<400> 1

Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> 巨型艾美球菌

<400> 2

Ala Ala Pro Glu Thr Pro Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His
1 5 10 15

Glu Arg Pro Glu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly
20 25 30

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala
35 40

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> 巨型艾美球菌

<400> 3

Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Ala Phe Thr Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gln Glu
35 40

<210> 4

<211> 261

<212> PRT

<213> 智人

[0002]

<400> 4

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu

[0003]

260

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 红原鸡 (*Gallus gallus*)

<400> 6

Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 绿头鸭属 (*Anas sp.*)

<400> 7

Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn
 1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠属 (*Mus sp.*)

<400> 8

Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 西藏黄牛 (*Bos taurus*)

<400> 9

Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser
 1 5 10

<210> 10
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 红原鸡

<400> 10

Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr
 1 5 10 15

[0004]

```

Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met
    20                      25                      30

Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met
    35                      40                      45

Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile
    50                      55                      60

Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser
    65                      70                      75                      80

Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln
    85                      90                      95

Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His
   100                      105                      110

Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val
   115                      120                      125

Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys
   130                      135                      140

Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala
   145                      150                      155                      160

Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu
   165                      170                      175

Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys
   180                      185                      190

Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro
   195                      200                      205

Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr
   210                      215                      220

Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe
   225                      230                      235                      240

Glu Leu Arg Gln Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr
   245                      250                      255

Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu
   260                      265                      270

<210> 11
<211> 70
<212> PRT

```

[0005]

<213> 巨型艾美球菌

<400> 11

Ala Ala Pro Glu Thr Pro Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His
1 5 10 15

Glu Arg Pro Glu Pro Gln Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly
20 25 30

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Val Leu Leu
35 40 45

Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Ala Phe Thr Ser Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gln Glu
65 70

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> 巨型艾美球菌

<400> 12

ggtggtggtt ttccgaccgc ggcgggttgcg 30

<210> 13

<211> 120

<212> DNA

<213> 巨型艾美球菌

<400> 13

gcggcgcccg aaaccccggc ggttcagccg aaagccgaag aaggtcatga acgtccggaa 60

ccggaagaag aagaagaaaa aaaagaagaa ggtggtggtt ttccgaccgc ggcgggttgcg 120

<210> 14

<211> 120

<212> DNA

<213> 巨型艾美球菌

<400> 14

ggtggtggtt ttccgaccgc ggcgggttgcg ggtggtgttg gtggtgttct gctgatcgcg 60

gcgggttggtg gtggtgttgc ggcgtttacc tccggtggtg gtggtgcggg tgcgcaggaa 120

<210> 15

<211> 210

<212> DNA

<213> 巨型艾美球菌

<400> 15

gcggcgcccg aaaccccggc ggttcagccg aaagccgaag aaggtcatga acgtccggaa 60

ccggaagaag aagaagaaaa aaaagaagaa ggtggtggtt ttccgaccgc ggcgggttgcg 120

ggtggtgttg gtggtgttct gctgatcgcg gcggttggtg gtggtgttgc ggcgtttacc 180

tccggtggtg gtggtgcggg tgcgcaggaa 210

[0006]

<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	I-SceI 酶识别序列	
<400>	16	
	tagggataac agggtaat	18
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	环区9上游	
<400>	17	
	tgtacaagtg gacgccaatc	20
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	环区9上游	
<400>	18	
	gttatcgccg tctttgatat agcc	24
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	环区9下游	
<400>	19	
	atttcccgtt atgccgcagc	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	环区9下游	
<400>	20	
	gttaaacaga gggcgacgag	20
<210>	21	
<211>	68	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

[0007]

<223>	I-SceI/Kmr基因	
<400>	21	
	gctatatcaa agacggcgat aactaactat aacggctcta aggtagcgaa ttccgggga	60
	tccgtcga	68
<210>	22	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	I-SceI/Kmr基因	
<400>	22	
	gctgcggcat aacgggaaat tgtaggttg agctgcttcg	40
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Kmr基因内：测序	
<400>	23	
	caaaagcgt ctgaagttcc	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Kmr基因内：测序	
<400>	24	
	gcgtgagggg atcttgaagt	20
<210>	25	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SEQ1 hCD154/ 环区9上游	
<400>	25	
	ggaggacgca accgcgcgg tcggaaaacc accaccggag gaggagtat cgccgtcttt	60
	gatatagcc	69
<210>	26	
<211>	82	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SEQ1hCD154/ 环区9下游	
<400>	26	
	ccgcggcggg tgcgtctctc tctgggcag aaaaaggta ttataccatg tcttcctct	60

[0008]

ccatttcccg ttatgccgca gc	82
<210> 27	
<211> 113	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ2-hCD154/ 环区9上游	
<400> 27	
ttttcttctt cttcttccgg ttccggacgt tcatgacctt cttcgcttt cggtgaacc	60
gccgggggttt ccggcgccgc ggaggaggag ttatgccgt cttgatata gcc	113
<210> 28	
<211> 129	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ2-hCD154/ 环区9下游	
<400> 28	
accggaagaa gaagaagaaa aaaaagaaga aggtggtggt ttccgaccg cggcggttgc	60
gtctctctcc tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tctctctcca ttcccgta	120
tgcgcgcgc	129
<210> 29	
<211> 113	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ3 hCD154/ 环区9上游	
<400> 29	
gcaacaccac caccaaccgc cgcgacacgc agaacaccac caacaccacc cgcaaccgcc	60
gcggtcggaa aaccaccacc ggaggaggag ttatgccgt cttgatata gcc	113
<210> 30	
<211> 129	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> SEQ3-hCD154/ 环区9下游	
<400> 30	
ggcggttggt ggtggtgttg cggcglttac ctccggtggt ggtggtgcgg gtgcgcagga	60
atctctctcc tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tctctctcca ttcccgta	120
tgcgcgcgc	129
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0009]

<220>		
<223>	环区9外部区域：测序	
<400>	31	
	gccatctcgc ttggtgataa	20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	环区9外部区域：测序	
<400>	32	
	cgctgggtatt ttgcggtaca	20
<210>	33	
<211>	87	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TRAP-CD154	
<400>	33	
	tcctcctccg gtggtgggtt tccgaccgcg gcggttgcg cctcctcctg ggcagaaaaa	60
	ggttattata ccatgtcttc ctctcc	87
<210>	34	
<211>	177	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TRAP-US-CD154	
<400>	34	
	tcctcctccg cggcgcgga aaccccgcg gttcagccga aagccgaaga aggtcatgaa	60
	cgtccggaac cggaagaaga agaagaaaaa aaagaagaag gtggtgggtt tccgaccgcg	120
	gcggttgcg cctcctcctg ggcagaaaaa ggttattata ccatgtcttc ctctcc	177
<210>	35	
<211>	177	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TRAP-DS-CD154	
<400>	35	
	tcctcctccg gtggtgggtt tccgaccgcg gcggttgcg gtggtgttg tgggtttctg	60
	ctgatcgagg cggttggttg tgggtttgcg gcgtttacct ccggtggttg tgggtcggtt	120
	gcgcaggaat cctcctcctg ggcagaaaaa ggttattata ccatgtcttc ctctcc	177

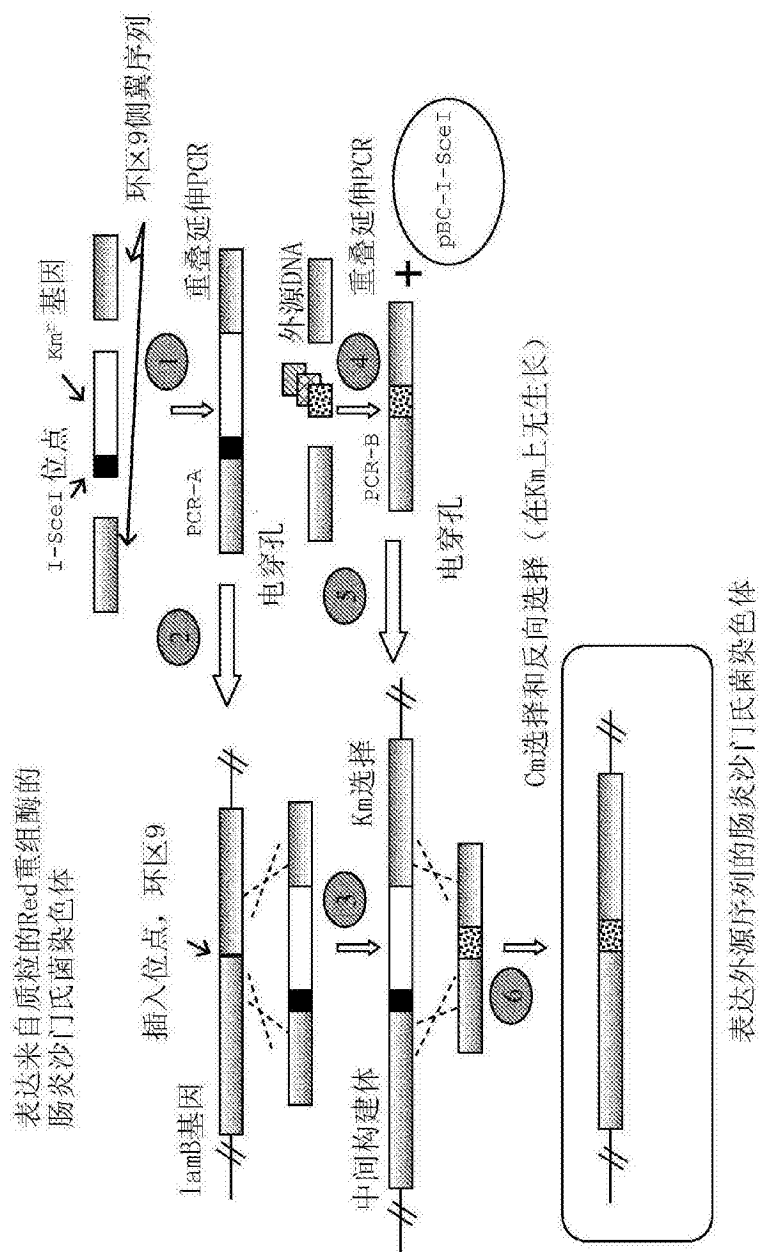


图 1

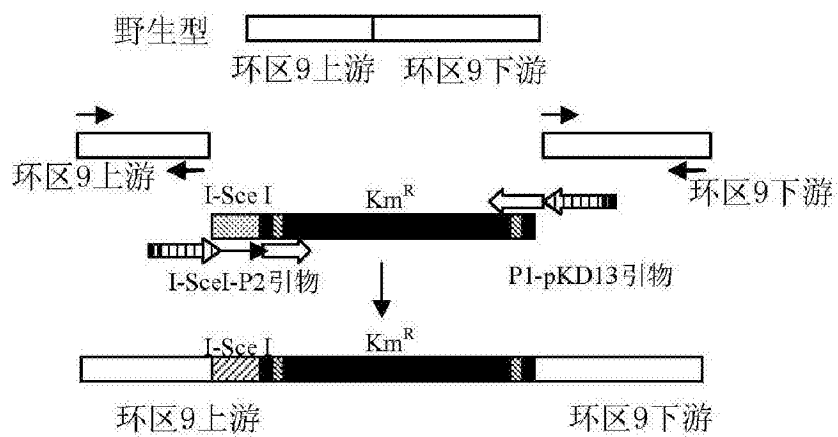
**PCR-A**

图 2A

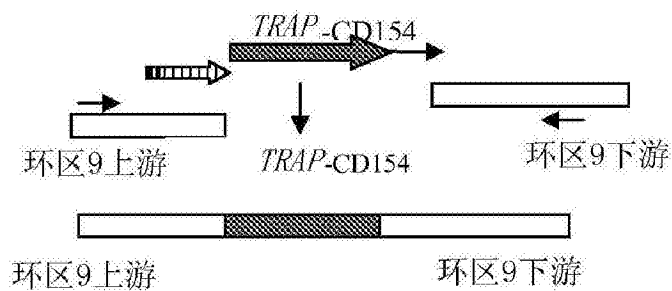
**PCR-B**

图 2B

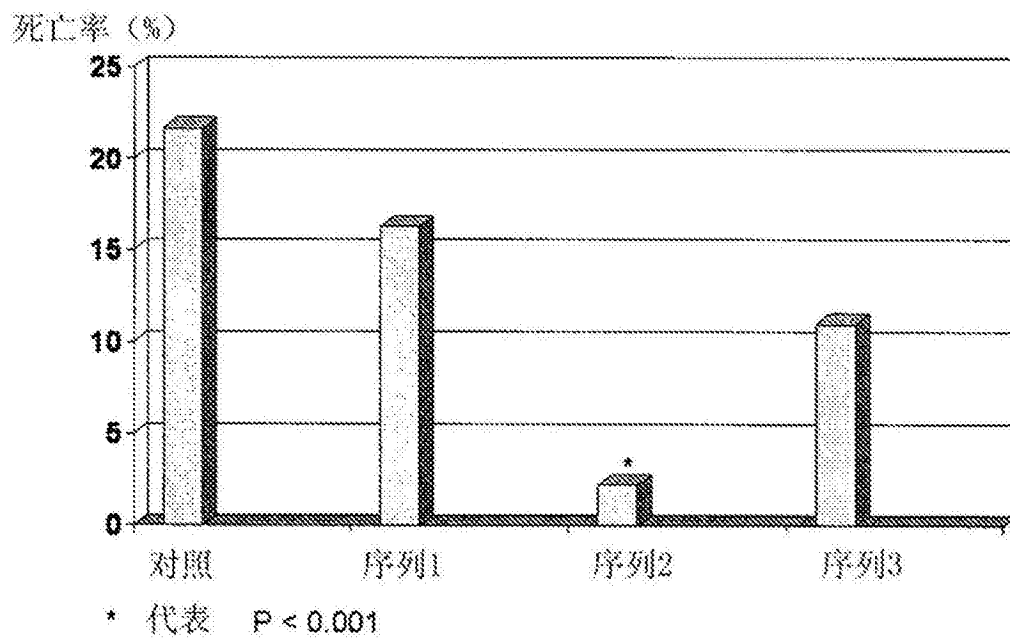


图 3