



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101784561 A

(43) 申请公布日 2010. 07. 21

(21) 申请号 200880103542. 4

(22) 申请日 2008. 06. 13

(30) 优先权数据

07290749. 6 2007. 06. 15 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 02. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/002614 2008. 06. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02008/152528 EN 2008. 12. 18

(83) 生物保藏信息

CNCM I-3747 2007. 04. 23

CNCM I-3749 2007. 04. 23

CNCM I-3748 2007. 04. 23

(71) 申请人 巴斯德研究所

地址 法国巴黎市

申请人 法国国家科学研究中心

(72) 发明人 于格·贝杜埃勒

埃洛蒂·布里安-利茨勒

菲利普·迪萨尔 菲利普·德普雷斯

利蒂希娅·布勒芒

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国 涂勇

(51) Int. Cl.

C07K 14/18 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

C12N 15/62 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 28 页 序列表 46 页

附图 4 页

(54) 发明名称

用于诊断或筛选节肢介体病毒感染的方法、
在所述方法和它们的应用中使用的试剂

(57) 摘要

一种用于诊断或筛选节肢介体病毒感染、优选黄病毒科感染、更优选黄病毒感染的方法,在所述方法和它们的应用中使用的试剂。所述方法包括:(i) 将来源于受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触,此 Ig 结合蛋白抗所研究的受试者或动物种类的特定种类的 Ig 分子,以及(ii) 将(i)中形成的免疫复合物与由杂合蛋白组成的检测分子一起温育,此杂合蛋白至少包含节肢介体病毒的 ED3 结构域和碱性磷酸酶(PhoA),检测出所述免疫复合物就是所述样品中节肢介体病毒存在的标记。

1. 一种用于诊断或筛选在受试者或动物寄主中节肢介体病毒的方法,其特征在于,其包括:

(i) 将来源于受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触,所述 Ig 结合蛋白抗所研究的受试者或动物种类的特定种类的 Ig 分子;以及

(ii) 将 (i) 中形成的免疫复合物与由杂合蛋白组成的检测分子一起温育,所述杂合蛋白至少包含节肢介体病毒的 ED3 结构域和碱性磷酸酶 (PhoA),检测出所述免疫复合物就是在所述样品中存在节肢介体病毒的标记。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 Ig 结合蛋白选自由抗 IgM 抗体、抗 IgG 抗体和抗 IgA 抗体所组成的组。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述节肢介体病毒是黄病毒。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其特征在于,所述碱性磷酸酯酶选自下组:大鼠、小鼠、鸡、牛、酵母以及细菌的碱性磷酸酶。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述碱性磷酸酶是大肠菌的碱性磷酸酶并且包含序列 SEQ ID NO:25。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其特征在于,所述杂合蛋白进一步包含多肽标记。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述多肽标记选自由 HIS(六聚组氨酸)、c-MYC、HA、VSV-G、HSV、V5 和 FLAG 所组成的组。

8. 如权利要求 1 至 7 中的任一项所述的方法,其特征在于,所述杂合蛋白优选包含六聚组氨酸、黄病毒 ED3 结构域和大肠杆菌的碱性磷酸酶。

9. 如权利要求 5 或 8 所述的方法,其特征在于,所述大肠菌的碱性磷酸酶被修饰过。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述大肠菌碱性磷酸酶包括在其活性位点上的两个突变:D153G 和 D330N,并且包含序列 SEQ ID NO:24。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 ED3 结构域多肽选自下组:黄热病病毒 ED3 结构域多肽、西尼罗河病毒 ED3 结构域多肽、登革热病毒 ED3 结构域多肽、圣路易斯脑炎病毒 ED3 结构域多肽、墨莱溪谷脑炎病毒 ED3 结构域多肽以及日本脑炎病毒 ED3 结构域多肽。

12. 一种杂合蛋白,其特征在于,它包含多肽标记、节肢介体病毒 ED3 结构域和碱性磷酸酶。

13. 如权利要求 12 所述的杂合蛋白,其特征在于,它包含六聚组氨酸、选自下组的黄病毒 ED3 结构域:黄热病病毒 ED3 结构域多肽、西尼罗河病毒 ED3 结构域多肽、登革热病毒 ED3 结构域多肽、圣路易斯脑炎病毒 ED3 结构域多肽、墨莱溪谷脑炎病毒 ED3 结构域多肽以及日本脑炎病毒 ED3 结构域多肽;以及

大肠杆菌碱性磷酸酶。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的杂合蛋白,其特征在于,所述杂合蛋白优选呈多聚体形式,更优选呈二聚体形式。

15. 如权利要求 12、13 或 14 所述的杂合蛋白,其特征在于,它选自下组:包含序列 SEQ ID NO:2 的 (H6-ED3. DEN1-PhoA)₂、包含序列 SEQ ID NO:4 的 (H6-ED3. DEN2-PhoA)₂、包含序列 SEQ ID NO:6 的 (H6-ED3. DEN3-PhoA)₂、包含序列 SEQ ID NO:8 的 (H6-ED3. DEN4-PhoA)₂、

包含序列 SEQ ID NO:10 的 (H6-ED3.WN-PhoA)₂ 以及包含序列 SEQ ID NO:12 的 (H6-ED3.YF-PhoA)₂。

16. 编码如权利要求 12 至 15 中任一项所述杂合蛋白的核酸。

17. 如权利要求 16 所述的核酸,其特征不在于,其选自下组:编码 H6-ED3.DEN1-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO:1、编码 H6-ED3.DEN2-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO:3、编码 H6-ED3.DEN3-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO:5、编码 H6-ED3.DEN4-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO:7、编码 H6-ED3.WN-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO:9 和编码 H6-ED3.YF-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO:11。

18. 一种制备如权利要求 12 至 15 中任一项所述杂合蛋白的方法,其特征不在于,其包括:

(a) 通过将编码节肢介体病毒的 ED3 多肽、优选黄病毒 ED3 多肽的序列插入载体 pEBL1 (SEQ ID NO:13) 中,得到表达载体,所述表达载体包含编码如权利要求 12 至 15 中任一项所述杂合蛋白的序列,

(b) 用 (a) 中获得的载体转化合适的大肠杆菌菌株、优选 XL1-Blue 菌株,

(c) 在合适的培养基中培养所述改造过的菌株,以及

(d) 从周质的提取物中纯化标记 -ED3-PhoA 杂合蛋白。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其特征不在于,步骤 (a) 中的所述表达载体选自如权利要求 12 至 15 中任一项定义的杂合蛋白的表达载体所组成的组。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其特征不在于,所述表达载体包含编码杂合蛋白 H6-ED3.DEN1-PhoA 的序列 (pEBL11,于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3748 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心,28 rue du Docteur Roux,75015,巴黎))。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其特征不在于,所述表达载体包含编码杂合蛋白 H6-ED3.WN-PhoA 的序列 (pEBL15,于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3749 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心,28 rue du Docteur Roux,75015,巴黎))。

22. 于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3747 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心,75015,巴黎)的表达载体 pEBL1。

23. 于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3748 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心,28 rue du Docteur Roux,75015,巴黎)的表达载体 pEBL11。

24. 于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3749 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心,28 rue du Docteur Roux,75015,巴黎)的表达载体 pEBL15。

25. 一种用于筛选受试者或动物中节肢介体病毒抗体、优选黄病毒抗体的方法,所述方法包括:

(i) 将来源于所述受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触,所述 Ig 结合蛋白抗所研究的受试者或动物种的特定种类的 Ig 分子,

(ii) 将 (i) 中形成的免疫复合物与检测分子一起温育,所述检测分子由至少含有节肢介体病毒的 ED3 结构域和碱性磷酸酶的杂合蛋白组成,以及

(iii) 检测所述节肢介体病毒抗体的存在。

26. 一种用于诊断和 / 或筛选在受试者中的节肢介体病毒抗体、优选黄病毒抗体的试剂盒,其包含:

- 被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体,所述 Ig 结合蛋白抗所研究的动物种的特定种类的 Ig 分子,

- 至少如权利要求 12 至 15 中任一项所述的杂合蛋白,所述杂合蛋白至少包含节肢介体病毒 ED3 结构域和碱性磷酸酶,

- 至少一个阳性对照,优选来自受感染的个体的对照血清,以及

- 至少一个阴性对照,优选来自未感染的个体的对照血清。

27. 如权利要求 26 所述的试剂盒,其特征在于,所述 Ig 结合蛋白优选自由抗 IgM、抗 IgG 和抗 IgA 所组成的组,所述杂合蛋白包含六聚组氨酸、合适的黄病毒的病毒 ED3 结构域、和大肠杆菌的碱性磷酸酶。

28. 如权利要求 27 所述的试剂盒,其特征在于,所述碱性磷酸酶是修饰过的碱性磷酸酯酶并且包含序列 SEQ ID NO:24,所述碱性磷酸酯酶包括在其活性位点上的两个突变: D153G 和 D330N。

29. 包含病原体的合适抗原和碱性磷酸酶的杂合蛋白的应用,用于感染所述病原体的体外诊断或用于所述病原体流行病学的研究。

30. 包含病原体的合适抗原和碱性磷酸酶的杂合蛋白的应用,用于抗所述病原体或其免疫原的疫苗接种的体外确证。

31. 包含蛋白或其片段和碱性磷酸酶的杂合蛋白的应用,用于研究由 PhoA 融合的所述蛋白或其片段与分子、蛋白或细胞之间的相互作用。

32. 一种用于诊断病原体感染、确证病原体或其免疫原接种、或研究所述病原体流行病学的方法,其特征在于,其包括:

(i) 将来源于受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触,所述 Ig 结合蛋白抗所研究的动物种的特定种类的 Ig 分子,

(ii) 将 (i) 中形成的免疫复合物与由杂合蛋白组成的检测分子一起温育,所述杂合蛋白包含病原体的合适抗原和碱性磷酸酶,所述免疫复合物的存在就是所述感染的标记。

33. 一种用于研究在融合于 PhoA 的蛋白或其片段与分子、蛋白或细胞之间的相互作用的方法,其特征在于,其包括:

(i) 将所述分子、蛋白或细胞与包含融合于 PhoA 的蛋白或其片段的杂合蛋白相接触,以及

(ii) 检测在融合于 PhoA 的蛋白或其片段与所述分子、所述蛋白或所述细胞之间最终形成的复合物。

34. 一种用于筛选抗节肢介体病毒的化合物的方法,所述方法包括:

(i) 将最终结合在固相载体上的抗节肢介体病毒的抗体或节肢介体病毒表面分子的受体与包含融合于 PhoA 的节肢介体病毒表位的杂合蛋白相接触,

(ii) 通过测定合适的信号,例如对硝基苯酚的形成,来检测在所述抗节肢介体病毒抗体或所述受体与所述表位之间形成的复合物,

(iii) 加入待检测的化合物,以及

(iv) 通过测定合适的信号并且将获得的信号与 (ii) 中获得的信号相比较,检测在所述抗节肢介体病毒抗体或所述受体与所述表位之间形成的复合物的量与在步骤 (ii) 中检测到的复合物的量相比是否降低。

用于诊断或筛选节肢介体病毒感染的方法、在所述方法和它们的应用中使用的试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种用于诊断或筛选节肢介体病毒 (arbovirus) 感染、优选黄病毒科 (flaviviridae) 感染、更优选黄病毒 (flavivirus) 感染的方法,在所述方法和它们的应用中使用的试剂。

背景技术

[0002] 节肢介体病毒(节肢动物传播的病毒)是在自然界循环中在吸血的节肢动物载体和易染病的脊椎动物寄主上保持的病毒。本发明包括了所有含有包膜蛋白的节肢介体病毒,虽然说明书主要集中在黄病毒种类。

[0003] 许多节肢介体病毒并且特别是许多黄病毒会引起人类或动物的严重的疾病,尤其是黄热病病毒(YFV)、登革热病毒(DENV)、西尼罗河病毒(WNV)等等。

[0004] 目前通过一些方法可以检测黄病毒的感染,包括病毒分离、用 RT-PCR 检测病毒 RNA、以及靶向病毒蛋白或抗病毒免疫球蛋白分子的免疫化学试验。许多黄病毒在初次感染或继发性感染期间,病毒 RNA、病毒蛋白、病毒粒子以及不同种类的抗体(IgM、IgA 和 IgG) 的出现和消失的动力学被很好地记录下来。

[0005] 检测对抗病毒并存在于病人血清中的抗体,是通过免疫吸附试验建立了一个制定完善的和值得推荐的方法,用于黄病毒感染诊断(Kuno, 2003 ;WHO, 1997)。这些诊断的目的至少是双重的:用实例确认区分黄病毒性疾病与其他有相似临床病状的疾病;和传播的监控。

[0006] 由于一些因素,使得感染黄病毒的诊断变得复杂。目前大多数用来测试抗一种黄病毒的抗体的血清学试验,会与这个家族的其他成员发生交叉反应(Kuno, 2003)。这些交叉反应在一些黄病毒共传播的区域可能是有问题的。例如,许多抗 WNV 的抗体,会与 JEV(日本脑炎病毒)、SLEV(圣路易斯脑炎病毒)甚至和 DENV 发生交叉反应(Granwehr et al., 2004)。许多抗 DENV 的抗体,与 YFV 和 JEV 交叉反应(Vorndam and Kuno, 1997)。

[0007] DENV 的四个血清型存在着一个特殊的问题。严重形式的登革热、登革出血热(DHF) 和休克综合症(DSS) 的发病机制,一直是争论的话题。有两个主要的理论被提出来。一般接受的假设是继发性感染或免疫增强理论(Halstead, 2003 ;Mongkolsapaya et al., 2003)。另一个假设强调了病毒因子的参与(McBrSEQ Ide and Bielefeldt-Ohmann, 2000)。因此初次和继发性感染的区别是理解 DHF 发病机制的关键。在初次感染和继发感染中都存在着病毒 mRNA 和抗原(Alcon et al., 2002)。因此,DENV 抗体的检测为区别感染的不同模式提供了唯一的方法。

[0008] 目前诊断试验使用酶联免疫吸附试验 ELISA 或快速试纸法(dipstick format) 来识别黄病毒感染。

[0009] 用于检测病人血清中的病毒抗体的免疫吸附试验 (ISA) 属于两种主要类型:间接 ISA 和抗体特异性捕获 ISA。

[0010] 在间接 ISA 中,用病毒抗原 (virAg) 敏化固相载体。在分析中被固定的抗原与人类或动物血清相互反应。最终,被结合的抗体由报告系统所显示,此报告系统通常是由免疫球蛋白结合蛋白 (@Ig) 和酶 (Enz) 之间的聚集体组成,典型的酶是辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (PhoA)。这就是酶联免疫吸附试验 (ELISA)。也可以使用其他种类的探针,比如荧光团或胶态金。间接 ISA 的一般图示如下:

[0011] 支持物-病毒抗原: :血清: :@Ig- 报告分子 (1)

[0012] 其中“-”代表共价键或固定化;并且“: :”代表非共价键相互作用。Ig 结合蛋白可能对特定种类 Ig 具有特异性 (@IgX, 其中 X = M, A 或 G)。在这种情况下,可以称作 IgX 特异性间接 ISA。已经描述过间接 ISA 的一些变体,尤其是抗原捕获 ISA、表位阻断 ISA 以及亲合 ISA (Blitvich et al., 2003; Johnson et al., 2000; Matheus et al., 2005)。

[0013] 在 IgM、IgA 或 IgG 特异性捕获 ISA 中,用 Ig 结合蛋白 (@IgX, X = M、A 或 G) 敏化固相载体,该 Ig 结合蛋白可抗所研究的动物种类中的特定种类的 Ig 分子,并且大多数通常由异源抗体组成。被固定的 Ig 结合蛋白连续地与所分析的血清、病毒抗原和接着的报告系统反应,此报告系统一般是抗原结合分子 (@virAg) 和酶 (Enz) 的结合物。一般的 IgX 特异性捕获 ISA (XAC-ISA) 可以图示如下:

[0014] 支持物-@IgX: :血清: :病毒抗原: :@virAg- 报告分子 (2)

[0015] 视 Ig 结合蛋白 (@IgX) 而定,可以称作 IgM、IgG 或 IgA 抗体捕获免疫吸附试验 (MAC-ELISA、GAC-ELISA 或 AAC-ELISA)。

[0016] 用于 IgM 抗体的免疫吸附试验属于确定近期被黄病毒感染的最有用的血清学方案,因为这些 IgM 分子在感染初期出现,在疾病过程中快速增加,并且与 IgG 抗体相比与其他病毒的交叉反应较少 (Kuno, 2003)。最早在感染后第 5 天就可以检测 IgM 分子,但是通常它们与单体抗原的亲合力比其他类型的免疫球蛋白低。

[0017] MAC-ELISA 优于 IgM 特异性间接 ELISA,因为来自于以前被相关病毒感染的 IgG 抗体对后者的试验的灵敏度有抑制作用 (Vorndam and Kuno, 1997)。WHO 推荐它用于一些黄病毒感染、并且尤其是登革热的血清学诊断 (WHO, 1997)。

[0018] MAC-ELISA 有下列优点:如果得到配对的血清样本, IgM 上升的、稳定的或下降的滴度能显示出感染的时间。对单个样本的 MAC- 和 GAC-ELISA 平行试验中的 IgM 与 IgG 抗体的比值能用来区分初次感染和继发性感染,因为 IgM/IgG 的比值在前面的情况下是高于一,在后面的情况下是低于一 (Innis et al., 1989)。它可以检测脑脊髓液和唾液中的抗黄病毒的 IgM (Kao et al., 2005; Teles et al., 2005)。人们已经开发了 IgA 特异性的 ELISA。IgA 应答发展在 IgM 应答之后、但在 IgG 应答之前。平行 MAC-ELISA 和 AAC-ELISA 试验中的 IgA/IgM 比值能显示出 DENV 和 WNV 的感染是近期的、还是几个月之前的 (Prince and Lape-Nixon, 2005; Talarmin et al., 1998)。

[0019] 免疫吸附试验的特异性主要来自于分析中的血清与抗原的相互作用,因此取决于抗原制品的内在性质。但是,它也可能来自于报告分子的内在性质。

[0020] 直到最近以来,用于 ISA 的抗原主要是被研究中的病毒感染的乳鼠大脑 (SMB) 或细胞培养物的提取物。这些抗原日益增多地被重组的 prM/gpE 病毒样颗粒 (VLP) 取代,其中 prM 和 gpE 是病毒的膜蛋白与包膜蛋白的前体,或具有 gpE 的重组胞外结构域 (sE)。非结构性蛋白 NS1 也已经被用作 IgG 特异性间接 ELISA 和 MAC-ELISA 的抗原。NS1 可以区分

初次感染和继发性感染,并且能正确识别初次感染的病人的血清中的感染性 DENV 的血清型 (Shu et al., 2004; Shu et al., 2003; Shu et al., 2002)。

[0021] 许多 MAC-ELISA 使用抗病毒的多克隆抗体作为检测分子。这些多克隆抗体的批次之间在效力上是不同的,并且是病毒交叉反应性的,这将限制试验的特异性 (Martin et al., 2000)。因此,单克隆抗体 (mAb) 比多克隆抗体 (pAb) 有更多优势,并且减少了特异性上的变化。广泛交叉反应性的 mAb,例如 mAb4G2 和 mAb6C-1,已被与酶结合并被广泛用作检测分子 (Kuno, 2003)。在位点 S169P 和 G257R 上的中和逃逸突变株已经在 gpE 的结构域 1 和 2 之间的界面上绘制了 mAb4G2 的表位 (Serafin and Aaskov, 2001)。

[0022] 存在着其他种类的 ISA,例如夹心 ELISA (R. J. Kerschbaumer et al., 1996),它的形式如下:

[0023] 支持物-@GST: :GST-(3D6 表位); :scFv3D6-PhoA,

[0024] 其中的 @GST 代表抗谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 的抗体;GST-(3D6 表位) 是 GST 和抗体 3D6 的表位的杂合蛋白;以及 scFv3D6-PhoA 是抗体 3D6 单链可变片段 (scFv) 和碱性磷酸酶的杂合蛋白。

[0025] 夹心 ELISA 试验被用于检测病人血清中抗原的存在,而不是如同本发明中的检测抗感染物的抗体的存在。此外,这种方法需要分离和表征至少两个待在试验中使用的非竞争性的抗体。

[0026] 另外一种 ISA 是反向 ELISA (D. Ludolfs et al., 2007),它的形式如下:

[0027] 支持物-RF: :血清: :rED3-HRP

[0028] 其中 Rheumatoid 因子 (RF) 是可识别 IgG 免疫球蛋白的 Fc 片段的自身免疫性抗体;以及 rED3-HRP 是辣根过氧化物酶 (HRP) 与西尼罗河病毒包膜蛋白重组结构域 3 (rED3) 的化学结合物。辣根过氧化物酶 HRP 是单体蛋白,而碱性磷酸酶是二聚体,以及 rED3-HRP 杂合蛋白是通过 rED3 和 HRP 两个配对物化学耦合得到的。

[0029] 这项研究的作者清楚地提到,他们的“反向 ELISA”不检测任何特异性的 IgM 抗体 (472 页,左列,31 行以及以下)。他们得出结论,他们的反向 ELISA 能提高世界上对于西尼罗河病毒感染流行的认识。因此这个方法学最适合用在病毒感染流行的长期流行病学研究中。

[0030] 另外一种 ISA 是间接 IgG ELISA (D. W. C. Beasley et al., 2004),它的形式如下:

[0031] 支持物-rED3: :血清: :@IgG-HRP

[0032] 其中的 @IgG-HRP 是辣根过氧化物酶和抗人类 IgG 抗体的化学结合物。

[0033] 作者清楚地提到,重组结构域 rED3 被覆盖在微量滴定板的孔上的抗体微弱结合 (2764 页,34-39 行),因此不适合用于抗体捕获 ELISA。

[0034] 抗原在捕获 ELISA 中的使用

[0035] * 由乳鼠大脑 (SMB) 或细胞培养物衍生而来的病毒抗原

[0036] 当使用由 SMB 或细胞培养物衍生而来的病毒抗原时, GAC- 或 MAC-ELISA 的特异性相差不多 (Cardosa et al., 1992)。使用这些抗原制品进行的 MAC-ELISA 对于病毒的血清复合物一般是特异性的,但是很难区分血清复合物中的感染病毒。例如,它们能区分 DENV 与 JEV 或 WNV 的感染 (Innis et al., 1989; Martin et al., 2002)。但是,它们很难区分 4 种 DENV 血清型的感染,即使在大多数的例子中感染血清型的信号是最强的 (Nawa

et al.,2000)。如果同时检测 JEV 血清复合物的这些黄病毒并使用精确的特定的诊断算法 (Martinet al.,2002;2004),它们能区分 WNV 感染与 SLEV 或 JEV 感染。但是,这种特异性的诊断只对初次感染是可能的,因为在正经历继发性感染和进一步的感染的病人中交叉反应性非常重要 (Kao et al.,2005;Teles et al.,2005)。

[0037] *将重组体 prM/gpE-VLP 和 sE 用作抗原

[0038] 根据检测灵敏度、特异性、精确度和其他统计测试的许多标准,在 MAC-ELISA 中使用来自于一些黄病毒的 prM/gpE-VLP,与 SMB 衍生的抗原相比,会进行地一样好或更好 (Holmes et al.,2005;Martin et al.,2002;Martin et al.,2000;Muerhoff et al.,2002)。对于 DENV, VLP 可以成功地检测初次感染的感染血清型 (Shu et al.,2002;Shu and Huang,2004)。对于 SLEV, VLP 不与抗 WNV 和波瓦生病毒的 IgM 抗体交叉反应,这与由 SMB 衍生的抗原正相反 (Purdy et al.,2004)。对于 TBEV (Tick-Borne Encephalitis Virus, 蜱传播的脑炎病毒), VLP 不与抗 JEV 的 IgM 抗体交叉反应,与市场上的抗原正相反 (Yoshii et al.,2003)。但是对于 WNV, VLP 与高比例的被其他黄病毒 (JEV、SLEV、DENV、YFV) 感染或接种的病人的血清发生交叉反应 (Hogrefe et al.,2004)。在果蝇细胞中作为重组蛋白被表达的 gpE 的胞外结构域 sE,被用于 MAC- 和 GAC-ELISA 的色谱分析中。这种免疫色谱测试,使用来自于 DENV 的 4 种血清型的重组 sE 结构域,其特异性和灵敏度可以与用 SMB 提取物作为抗原进行的传统的 MAC- 和 GAC-ELISA 相媲美 (Cuzzubbo et al.,2001)。

[0039] *rED 3 作为抗原

[0040] 一些因素与 ED3 结构域作为免疫试验中的抗原是相关的:它是高抗原性的和免疫原性的;最强的中和抗体是抗这个结构域的 (Crill and Roehrig,2001;Sanchez et al.,2005);ED3 结构域的序列比 gpE 的其他结构域的序列远得多 (Gritsun et al.,1995);与不同的黄病毒交叉反应的对抗 gpE 的 ED1 和 ED2 结构域的抗体比对抗 ED3 结构域的抗体要多 (Crill and Chang,2004;Kanai et al.,2006;Modis et al.,2005;Roehrig,2003;Sanchez et al.,2005)。对于 DENV,大肠杆菌的 TrpE 蛋白与四种 ED3 结构域的血清型形成的杂合蛋白 TrpE-ED3,与细胞培养衍生的病毒抗原进行了比较。这两种抗原在检测恢复期血清中的抗 DENV 的 IgM 或 IgG 抗体上是一样灵敏的。但是,在区分 DENV 感染和 YFV 或 JEV 接种上, TrpE-ED3 抗原比细胞培养物衍生的抗原有更高的特异性 (Simmons et al.,1998)。对于 DENV,重组分离的 ED3 结构域 (rED3) 可以用免疫印迹条带试验来成功地检测感染血清型 (Ludolfs et al.,2002)。对于 WNV,在猴子、人类和马的血清试验中, rED3 在 IgG 特异性的间接 ELISA 中比 SMB 衍生的抗原有更灵敏和更特异性的应答。它可以清楚地区分抗 WNV 和抗其他相关黄病毒的 IgG 应答 (JEV、SLEV、MVEV) (Beasley et al.,2004)。对于 TBEV, rED3 在 IgG 特异性的间接 ELISA 中比 SMB 衍生的抗原也有更灵敏和更特异性的应答。它可以区分蜱传播的 (TBEV) 和蚊传播的 (YFV、DENV) 黄病毒,但是不能区分黄病毒 TBEV 血清复合物的成员 (Holbrook et al.,2004)。

[0041] 但是,分离的 ED3 结构域只能用于 IgG 或 IgM 特异性间接 ISA 的理由在下文中解释。

[0042] 当使用具有重组抗原的捕获 ELISA 时,将出现效价和折叠的问题以及检测的问题。

[0043] - 效价和折叠

[0044] 实际上,初步实验已经表明,来自于 WNV 的 rED3 结构域被覆盖在微量滴定板孔上的抗体微弱地结合,或者由于空间位阻的原因只是被捕获而并没有被检测的抗体结合。因此可以得出结论, rED3 可能并不直接适用于捕获型试验 (Beasley et al., 2004)。但是,其他的解释也同样很有道理。黄病毒在它们的表面展示了 180 个单体 (90 个二聚体) 的 gpE, 因此 gpE 和它的 ED3 结构域是以多个和相连的拷贝存在的 (Kuhn et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2003)。相同分子的 IgG、IgA 或 IgM 能同时结合二至五个它的表位拷贝, 并且这种结合的多价模式导致了明显很强的亲合力 (抗体亲抗原性)。抗原的效价在 prM/gpE VLP 中也是很高的 (Ferlenghi et al., 2001); 其对于重组的抗原, 象二聚体形式的水溶性 gpE (sE), 效价是二 (Kanai et al., 2006; Modis et al., 2003; Modis et al., 2005; Rey et al., 1995), 但是对于分离的 ED3 结构域只是一。因此, 单体 rED3 结构域和 IgM 的一个结合位点之间的亲合力对于 MAC-ELISA 是不够的。对于 IgG 或 IgA 捕获 ELISA, 也能碰到类似的问题, 尤其是初次感染。为了克服单体 rED3 结构域的这种局限, 工程化它们的寡聚化是必要的。

[0045] ED3 结构域含有两个半胱氨酸残基。它们形成二硫键, 此二硫键对于结构域正确折叠和结构域的抗原完整性是必要的 (Roehrig et al., 2004)。rED3 可以以正确折叠的状态在埃希氏菌属大肠杆菌的周质间隙中生成, 在其中可以形成必不可少的二硫键。在周质间隙中的产生有个附加的优势, 就是蛋白能通过简单的渗透休克而以浓缩的并且部分纯化的形式被提取出来。

[0046] - 检测

[0047] 为了定量比较针对一些不同抗原的血清的应答 (例如针对不同的病毒血清型) 从而推导出它的特异性, 测试的检测系统对于所有测试的抗原必须是一样的。当使用多克隆抗体时情况就可能不是这样了。抗不同病毒或病毒血清型的普通表位的单克隆抗体的使用可能会引起下面的问题: (i) 抗原与人类血清的结合可能掩盖住示踪物单克隆抗体的表位。(ii) 示踪抗体和不同的抗原之间的亲合力可以取决于表位的具体结构。结果, 测试的输出信号与捕获的抗原量之间的关系可能因不同的抗原而变化。

[0048] 因此, 需要比现有技术的试剂更好地适合 ELISA 试验、并且更优选适合 XAC-ELISA 试验的试剂。

发明内容

[0049] 因此, 本发明涉及一种用于诊断或筛选在受试者或动物寄主中节肢介体病毒的方法, 其特征在于, 其包括:

[0050] (i) 将来源于受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触, 此 Ig 结合蛋白抗所研究的受试者或动物种类的特定种类的 Ig 分子, 并且通常由异源抗体 (抗 IgX 抗体) 组成; 以及

[0051] (ii) 将 (i) 中形成的免疫复合物与由杂合蛋白组成的检测分子一起温育, 此杂合蛋白至少包含节肢介体病毒的 ED3 结构域、优选包含黄病毒的 ED3 结构域和碱性磷酸酶 (PhoA), 检测出所述免疫复合物就是存在所述样品中节肢介体病毒的标记。

[0052] 根据进行所述方法的一个优选的实施方式, Ig 结合蛋白选自由抗 IgM、抗 IgG 和抗 IgA 所组成的组 (@IgX, X = M、A 或 G)。

[0053] 根据进行所述方法的另一个优选的实施方式,所述节肢介体病毒优选是黄病毒。

[0054] 根据进行所述方法的另一个优选的实施方式,所述碱性磷酸酶选自大鼠、小鼠、鸡、牛、酵母以及细菌碱性磷酸酶、优选大肠杆菌的碱性磷酸酶所组成的组。

[0055] 根据实施所述方法的进一步的优选的实施方式,所述杂合蛋白进一步包括多肽标记,该标记例如使用于从周质的提取物中纯化所述杂合蛋白。这种多肽标记的例子可以是 HIS(hexahistidine,六聚组氨酸)、c-MYC、HA、VSV-G、HSV、V5 和 FLAG(Sigma 产品)。

[0056] 因此,根据实施所述方法的进一步优选实施方式,所述杂合蛋白优选包含六聚组氨酸——一种合适的黄病毒 ED3 结构域和大肠杆菌的碱性磷酸酶,并且包含序列 SEQ ID NO: 25。

[0057] 优选碱性磷酸酶由序列 SEQ ID NO:25 组成。

[0058] 根据所述实施方法的实施方式,所述大肠杆菌的碱性磷酸酶是被修饰过的。更优选所述大肠杆菌的碱性磷酸酶在它的活性位点上包括两个突变:D153G 和 D330N,并且包含序列 SEQ ID NO:24(Le Du 等人,2002 的编号)。在欧洲专利申请 No. 0752475 中已经描述过这种修饰的 PhoA。

[0059] 优选碱性磷酸酶由序列 SEQ ID NO:2 组成。

[0060] 碱性磷酸酶的其他修饰也是可能的,并且包括在本发明中。

[0061] 出乎意料地,通过使用上述的检测分子,即,其至少包含黄病毒的结构域 ED3 和大肠杆菌的碱性磷酸酶,优选六聚组氨酸、黄病毒的结构域 ED3 和大肠杆菌的碱性磷酸酶(优选修饰过的碱性磷酸酶)的杂合蛋白,用于检测黄病毒的 IgX 抗体捕获免疫吸附测试可以在一些水平上得到显著的提高:

[0062] (i) 用限定的同源分子种类替换在一些测试中使用的试剂(抗原或检测系统)粗制品;

[0063] (ii) 减少测试中必须的试剂数量和步骤;

[0064] (iii) 用能够在细菌中生成并容易被纯化的重组成分来取代涉及在安全实验室里对于制品的感染性的病毒、动物或细胞培养操作的测试中的所有成分。

[0065] 因此,检测分子优选 (H6-ED3-PhoA)₂ 杂合蛋白;所以,(H6-ED3-PhoA)₂ 杂合蛋白的结合性通过 PhoA 部分的酶活性显现出来。许多产生比色的或化学荧光反应的 PhoA 的底物可以被用来显示。优选使用微量滴定板来固定抗 IgG 或抗 IgM 的抗体。固定也可以用其他类型和规格的载体,尤其是光学纤维。

[0066] 因此,可以用 (H6-ED3-PhoA)₂ 杂合蛋白进行测试,用于检测抗 ED3 结构域的其他免疫球蛋白型,比如 IgA 和 IgE,从而检测来源于人和不同动物例如小鼠、牛和马的免疫球蛋白,并且检测除血清外的其他体液中的免疫球蛋白。同样也可以用来源于那些没有被提及的其他节肢介体病毒或其他黄病毒的 ED3 结构域来进行测试,因为来源于这个分类群的病毒的 E 糖蛋白具有高度同源的结构。也可以用其他抗原蛋白或蛋白片段间的杂合体来进行测试,无论它们是否来源于病原体,以及无论它们在这些试剂中是以单体还是多聚体状存在。也可以延伸至包括另一种不同于 PhoA 的示踪蛋白的双功能杂合蛋白。最终,也可以延伸至这种情况:通过基因融合或与不同于示踪蛋白的特异性蛋白组件的化学耦合,来得到抗原的寡聚化。在 ED3 结构域的核酸或氨基酸序列的基础上,通过化学合成编码 ED3 结构域的 DNA 片段的可能性,极大地推进了杂合体的构建。

[0067] 象 (H6-ED3-PhoA)₂ 或更普遍的 (Ag-PhoA)₂ 的双功能二聚杂合体有很多的应用。它们可以被用来 (i) 检测抗与 PhoA 融合的抗原 (Ag) 的抗体 ;(ii) 检测抗抗原来自于其或模拟其的病原体的抗体 ;(iii) 诊断病原体感染或验证病原体或免疫原的接种 ;(iv) 研究病原体的流行病学 ;(v) 研究与 PhoA 融合蛋白或蛋白片段与分子、蛋白或细胞之间的相互作用 ;(vi) 在化学文库中筛选和识别可改变融合蛋白或蛋白片段与靶分子、细胞的蛋白之间的相互作用的分子。

[0068] 以前没有描述过使用 rED3 来成功地检测被感染的个体血清中的 IgM。

[0069] 通过构建其基因序列和碱性磷酸酶基因的杂合体,本发明依赖于同时将重组抗原二聚化和将它融合于酶示踪物的可能性。这样,得到可以检测低亲合力的抗体的试剂;例如 IgM 免疫球蛋白,其是五聚体的并且在被节肢介体病毒感染的初期出现。这个早期检测可以用作流行病管理的手段。因此,它清楚地与那些基于 IgG 的检测并且只能用追溯研究的测试(这些测试例如各种夹心法、反向和间接 ELISA)区分开来。

[0070] 尤其是,如本发明所述的优于现有技术的方法和试剂的优点包括:(i) 在低安全等级实验室里生产诊断试剂;(ii) 在单个步骤并且不需要任何化学反应步骤中,对于每个病毒生产单个试剂;(iii) 使用人工的二聚体抗原能检测在感染初期出现并且亲合力低的 IgM;(iv) 针对病毒和感染种类的特异性检测;(iv) 通过将抗原和酶示踪物融合来简化并加速诊断测试。

[0071] 因此,优选地,所述的杂合体 (H6-ED3-PhoA)₂ 是在编码六聚组氨酸、病毒结构域 ED3 以及大肠杆菌的碱性磷酸酶的序列之间的基因水平上构建的。六聚组氨酸标记使得杂合体可以通过镍离子柱进行纯化。PhoA 是二聚的周质蛋白。基因水平上过客蛋白与 PhoA 的融合导致了杂合蛋白的二聚化、它输出至周质间隙、以及保持折叠和两部分的功能 (Boulain and Ducancel, 2004)。而且,过客蛋白在 PhoA 二聚体的晶体结构上插入的对称点位于分子的相同一侧,靠近另一个分子(17.6 Å)并且远离催化位点(> 32.5 Å) (Le Duet al., 2002)。

[0072] 因此,杂合体 (ED3-PhoA-H6)₂ 的构建解决了抗原效价的问题。该杂合体包括它们自己的酶示踪物,并且杂合体的酶部分并不取决于其抗原部分的本性。利用这个新的试剂,MAC- 或者 AAC- 或者 MAC-ELISA 只包括三种参与分子,如下图示:

[0073] 支持物 -@IgX : :血清 : : (H6-ED3-PhoA)₂ (3)

[0074] 其中 X = M、A 或 G。

[0075] 根据实施本发明方法的另一种实施方式,包膜蛋白结构域 3 多肽选自下组:黄热病病毒包膜蛋白结构域 3 多肽、西尼罗河病毒包膜蛋白结构域 3 多肽、登革热病毒包膜蛋白结构域 3 多肽、圣路易斯脑炎病毒包膜蛋白结构域 3 多肽、墨莱溪谷脑炎病毒包膜蛋白结构域 3 多肽以及日本脑炎病毒包膜蛋白结构域 3 多肽。

[0076] 更优选 ED3 结构域选自 WNY (称为 ED3. WN)、黄热病毒 (ED3-YF) 或登革热病毒 (血清型 1、2、3 或 4),并且优选选自 DENY 的血清型 1 (称为 ED3. DEN1)。

[0077] 例如在国际 PCT 专利申请 W02004/016586 中描述了黄病毒的 ED3 多肽。

[0078] 这些新的试剂出乎意料地简化了 MAC-、AAC- 和 GAC-ELISA,有助于使得它们更具重现性和定量性,并且因此更具特异性。它们的制备只需要低等级的生物安全性和技术方法。

[0079] 本发明也涉及一种杂合蛋白,其特征在于,它包括合适的多肽标记、节肢介体病毒 ED3 结构域和碱性磷酸酶。

[0080] 尤其是,本发明涉及能用于如本发明所述方法的杂合蛋白。

[0081] 根据所述杂合蛋白的优选的实施方式,其包含六聚组氨酸、合适的黄病毒 ED3 结构域和大肠杆菌的碱性磷酸酶。

[0082] 所述的杂合蛋白优选是多聚体形式,更优选二聚体形式,例如 (H6-ED3-PhoA)₂。

[0083] 根据所述杂合蛋白的另一个优选的实施方式:

[0084] - 当 ED3 结构域来自 DEN1 病毒时,所述的杂合蛋白 (H6-ED3. DEN1-PhoA) 代表序列 (SEQ ID NO :2)。

[0085] - 当 ED3 结构域来自 DEN2 病毒时,所述的杂合蛋白 (H6-ED3. DEN2-PhoA) 代表序列 (SEQ ID NO :4)。

[0086] - 当 ED3 结构域来自 DEN3 病毒时,所述的杂合蛋白 (H6-ED3. DEN3-PhoA) 代表序列 (SEQ ID NO :6)。

[0087] - 当 ED3 结构域来自 DEN4 病毒时,所述的杂合蛋白 (H6-ED3. DEN4-PhoA) 代表序列 (SEQ ID NO :8)。

[0088] - 当 ED3 结构域来自西尼罗河病毒时,所述的杂合蛋白 (H6-ED3. WN-PhoA) 代表序列 (SEQ ID NO :10),以及

[0089] - 当 ED3 结构域来自黄热病病毒时,所述的杂合蛋白 (H6-ED3. YF-PhoA) 代表序列 (SEQ ID NO :12)。

[0090] 本发明也涉及编码如本发明所述杂合蛋白的核酸。

[0091] 所述的核酸优选自下组:编码 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO :1、编码 H6-ED3. DEN2-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO :3、编码 H6-ED3. DEN3-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO :5、编码 H6-ED3. DEN4-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO :7、编码 H6-ED3. WN-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO :9 和编码 H6-ED3. YF-PhoA 杂合蛋白的序列 SEQ ID NO :11。

[0092] 根据与 EP0407259 和 EP0752475 描述的方法类似的方法可以得到所述的杂合蛋白。

[0093] 优选地,它们是通过将正确的 ED3 插入表达载体 pEBL 1 (SEQ ID NO :13) 中而得到,此载体包含了含有两个突变 (D153G 和 D330N) 的修饰过的碱性磷酸酶 (SEQ ID NO :24),编号参见 Le Du 等人,2002。

[0094] 所述的表达载体于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3747 保藏在 CNCM (法国培养物和微生物国家保藏中心,28rue du Docteur Roux,75015,巴黎)。

[0095] 本发明同样涉及了制备如本发明所述杂合蛋白的方法,所述方法的特征在于,其包括:

[0096] (a) 通过将编码合适的节肢介体病毒的 ED3 多肽、优选黄病毒 ED3 多肽的序列插入至载体 pEBL1 (SEQ ID NO :13) 中,得到包含编码如上限定的杂合蛋白的序列的表达载体,

[0097] (b) 用 (a) 中获得的载体转化合适的大肠杆菌、优选 XL1-Blue 菌株 (Bullock 等人,1997 描述),

[0098] (c) 在合适的培养基中培养所述改造过的菌株,以及

[0099] (d) 从周质提取物中纯化标记 -ED3-PhoA 杂合蛋白。

[0100] 当标记是六聚组氨酸时,纯化步骤 (d) 通过在 NiNTA 树脂柱上的亲和层析来进行。

[0101] 如此得到的不同表达载体包含了表达合适的杂合蛋白的序列:

[0102]

载体	杂合蛋白表达
PEBL 11	H6-ED3-DEN1-PhoA
PEBL 12	H6-ED3-DEN2-PhoA
PEBL 13	H6-ED3-DEN3-PhoA
PEBL 14	H6-ED3-DEN4-PhoA
PEBL 15	H6-ED3-WN-PhoA
PEBL 17	H6-ED3-YF-PhoA

[0103] 根据实施所述方法的一个实施方式,步骤 (a) 中的表达载体选自由如上限定的杂合蛋白的表达载体所组成的组,更优选杂合蛋白 H6-ED3. DEN1-PhoA 的表达载体 (pEBL11, 于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3748 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心, 28rue du Docteur Roux, 75015, 巴黎)) 和杂合蛋白 H6-ED3. WN-PhoA 的表达载体 (pEBL15, 于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3749 保藏在 CNCM(法国培养物和微生物国家保藏中心, 28rue du Docteur Roux, 75015, 巴黎))。

[0104] 本发明也涉及用于筛选受试者或动物中节肢介体病毒抗体、优选黄病毒抗体的方法,所述方法包括:

[0105] (i) 使来源于所述受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触,此 Ig 结合蛋白抗所研究的受试者或动物种类的特定种类的 Ig 分子,

[0106] (ii) 将 (i) 中形成的免疫复合物与检测分子一起温育,此检测分子由至少含有节肢介体病毒 ED3 结构域和碱性磷酸酶的杂合蛋白所组成,以及

[0107] (iii) 检测所述的节肢介体病毒抗体的存在。

[0108] 所述的检测优选通过加入 pNPP 并测定对硝基苯酚的形成来进行。

[0109] 在所有提到的方法和试剂盒中, Ig 结合蛋白、ED3 结构域、碱性磷酸酶以及多肽标记如同上述所描述的。

[0110] 本发明也涉及用于诊断和 / 或筛选受试者中节肢介体病毒抗体、优选黄病毒抗体的试剂盒,其包含:

[0111] - 用 Ig 结合蛋白敏化的固相载体,此 Ig 结合蛋白抗所研究的动物种类的特定种类的 Ig 分子,并且通常由异源抗体 (抗 IgX 抗体) 组成,以及

[0112] - 至少一种杂合蛋白,其至少包含节肢介体病毒 ED3 结构域和碱性磷酸酶,

[0113] - 至少一个阳性对照,优选来自感染的个体的参照血清,以及

[0114] - 至少一个阴性对照,优选来自未感染的个体的参照血清。

[0115] Ig 结合蛋白优选自由抗 IgM、抗 IgG 和抗 IgA (@IgX, X = M、A 或 G) 所组成的组,并且所述的杂合蛋白包括六聚组氨酸、合适的黄病毒的病毒 ED3 结构域和大肠杆菌的碱性磷酸酶。

[0116] 根据所述试剂盒的一个优选的实施方式,碱性磷酸酶是修饰过的碱性磷酸酶,包括在它的活性位点上的两个突变:D153G 和 D330N(Le Du 等人的编号)。

[0117] 优选碱性磷酸酶包含序列 SEQ ID NO:24。

[0118] 本发明也涉及包含病原体的合适抗原和碱性磷酸酶的杂合蛋白用于被所述病原体感染的体外诊断、或用于所述病原体流行病学研究的应用。

[0119] 本发明也涉及包含病原体的合适抗原和碱性磷酸酶的杂合蛋白用于抗所述病原体或其免疫原的疫苗接种的体外确证的应用。

[0120] 本发明也涉及包含蛋白或其片段和碱性磷酸酶的杂合蛋白用于研究与碱性磷酸酶融合的所述蛋白或其片段与分子、蛋白或细胞之间相互作用的应用。

[0121] 本发明也涉及诊断被病原体感染、用于确证被病原体或其免疫原接种、或用于研究所述病原体流行病学的方法,其特征在于,其包括:

[0122] (i) 将来源于受试者或动物的样品与被 Ig 结合蛋白敏化的固相载体相接触,此 Ig 结合蛋白抗研究的动物种类的特定种类的 Ig 分子,

[0123] (ii) 将 (i) 中形成的免疫复合物与由杂合蛋白组成的检测分子一起温育,此杂合蛋白包含病原体的合适抗原和碱性磷酸酶,所述的免疫复合物的存在就是所述感染的标记。

[0124] 本发明也涉及研究融合于 PhoA 的蛋白或其片段与分子、蛋白或细胞之间的相互作用的方法,其特征在于,包括:

[0125] (i) 将所述的分子、蛋白或细胞与包含融合于 PhoA 的蛋白或其片段的杂合蛋白相接触,以及

[0126] (ii) 检测在融合于 PhoA 的蛋白或其片段与所述分子、所述蛋白或所述细胞之间最终形成的复合物。

[0127] 本发明也涉及筛选抗节肢介体病毒的化合物的方法,所述的方法包括:

[0128] (i) 将最终结合在固相载体上的抗节肢介体病毒的抗体或节肢介体病毒表面分子的受体与包含融合于 PhoA 的节肢介体病毒表位的杂合蛋白相接触;

[0129] (ii) 通过测定合适的信号,例如对硝基苯酚的形成,来检测在所述抗节肢介体病毒抗体或所述受体与所述表位形成的复合物;

[0130] (iii) 加入要检测的化合物;以及

[0131] (iv) 通过测定合适的信号,并且比较获得的信号与 (ii) 中获得的信号,来检测在所述抗节肢介体病毒抗体或所述受体与所述表位之间形成的复合物的量相对于在步骤 (ii) 中检测到的复合物的量是否降低。

[0132] 在所有的的方法中,通过加入 4-硝基苯基磷酸盐(pNPP)并测定对硝基酚的形成来直接测定复合物的形成。

附图说明

[0133] 除了上述规定,本发明也包括其他规定,可从下面的实施本发明的实施例以及附图描述中体现出来,其中:

[0134] 图 1. 质粒 pLB11、pVP5、pLIP5GN-H6 和 pEBL1 的结构。bla 和 aph 基因各自编码氨苄西林和卡那霉素抗性。ss 代表信号序列并且 H6 代表六聚组氨酸。下面部分是,在

pLIP5GN-H6 和 pEBL1 中的 phoA 信号序列的 5' 末端和 phoA 基因的主要部分之间的详细序列。垂直的箭头标明信号肽的切割位点。不属于 phoA 基因或其产物的残基是用斜体字排字的。

[0135] 图 2. 用 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体进行简化的小鼠血清 GAC-ELISA。实心符号, 来自被 DENV1 感染的小鼠的血清; 空心符号, 未感染小鼠的对照血清。方形, 25℃ 下 2.5 小时显示的值; 圆形, 4℃ 下过夜显示的值; 菱形, 空白的平均值。2.5 小时和过夜的对照血清信号迭加。

[0136] 图 3. 用 H6-ED3. WN-PhoA 杂合蛋白进行简化的小鼠血清 MAC-ELISA。实心符号, 用 gpE. WN 免疫的小鼠的血清; 空心符号, 未免疫的小鼠的对照血清。方形, 25℃ 下 3 小时显示的值; 圆形, 4℃ 下过夜显示的值; 菱形, 空白的平均值。

[0137] 图 4. 简化的针对抗原的 GAC-ELISA 的特异性。用 H6-ED3. DEN1-PhoA 和 H6-ED3. WN-PhoA 杂合蛋白平行进行的测试。实心符号, 被 DENV1 感染的小鼠血清; 空心符号, 未感染的小鼠的对照血清。圆形, 同种的 H6-ED3. DEN1-PhoA 抗原; 方形, 非同种的 H6-ED3. WN-PhoA 抗原; 菱形, 空白的平均值。在 4℃ 下过夜显示的值。

[0138] 图 5. 简化的针对抗原的 MAC-ELISA 的特异性。用 H6-ED3. DEN1-PhoA 和 H6-ED3. WN-PhoA 杂合体平行进行的测试。实心符号, 被 WNV 感染的小鼠的血清; 空心符号, 未感染的小鼠的对照血清。圆形, 同种的 H6-ED3. WN-PhoA 抗原; 方形, 非同种的 H6-ED3. DEN1-PhoA 抗原; 菱形, 空白的平均值。在 4℃ 下过夜显示的值。

[0139] 图 6. 在用 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体进行的人血清的简化 MAC-ELISA 中信号的浓度依赖性。实心符号, 初次感染 DENV1 的病人的血清; 空心符号, DENV1 的继发性感染。在 25℃ 下 3 小时显示的值。

[0140] 图 7. 用 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体进行的被 DENV 四种血清型感染的病人的血清的简化的 MAC- 和 GAC-ELISA。血清被稀释 400 倍, 并且在 25℃ 下 3 小时测试显示的值。(A), 简化的 MAC-ELISA。(B), 简化的 GAC-ELISA。(C), MAC- 和 GAC-ELISA 的信号的值 r 。样品 1. 1, 被 DENV1 初次感染的血清; 1. 2, 被 DENV1 继发性感染的血清; 2、3 和 4, 被 DENV2、DENV3 和 DENV4 感染的血清; C, 健康个体的血清; N 和 B, 分别没有添加血清或抗人 Ig 的测试中的信号。

具体实施方式

[0141] 下面的例子是用来阐明本发明, 但并非对其进行限制。

[0142] 实施例 1: 材料和方法

[0143] - 培养基、缓冲液和试剂盒

[0144] 已经描述过培养基 LB (Sambrook and Russell, 2001) 和 SB (Plückthun, 1996)。氨苄西林使用的浓度是 200 μ g/mL, 卡那霉素是 50 μ g/mL。含有氨苄西林的 LB 培养基被用于所有的基因构建体。用 Qiaprep Spin Miniprep 试剂盒 (购自 Qiagen) 进行质粒 DNA 的制备, 用 Gel Extraction 试剂盒 (购自 Qiagen) 从琼脂凝胶中提取 DNA, 用 Quick Ligation 试剂盒 (Roche) 连接 DNA, 用 NuPAGE Novex 系统 (Invitrogen) 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。用 96 孔微量滴定板 (Maxisorb, Nunc) 进行酶联免疫吸附测试 (ELISA)。PBS 缓冲液 (磷酸缓冲盐溶液) 购自 Invitrogen 或 Sigma-Aldrich; 牛血清白蛋白购自 Roche; 低脂奶粉购

自 Regilait; Tween 20、4-硝基苯基磷酸盐 (pNPP) 和 5-溴-4-氯-3-碘磷酸盐 (Xp) 购自 Sigma-Aldrich。缓冲液 A 含有 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM NaCl; 缓冲液 B, 含有 PBS 中 0.05% Tween; 缓冲液 C, 含有 PBS 中 0.1% Tween; 缓冲液 D, 10% 乙醇胺, pH 9.8, 0.01M $MgSO_4$; 缓冲液 E, 缓冲液 D 中 20 μ M $ZnCl_2$ 。

[0145] - 细菌、质粒和病毒株

[0146] 已经描述过大肠杆菌 XL1-Blue 菌株 (Bullock et al., 1987) 和质粒 pET20b+ (www.novagen.com)、pUC-4K (基因库登录号 No. X06404) (Vieira and Messing, 1982)、pCR-Blunt (Bernard et al., 1994)、pQUANTAbody (Boulain and Ducancel, 2004)、pLB11 (Lisova et al., 2007) 以及 pVP5 (Lisova et al., 2007)。XL1-Blue 超级感受态细胞 (Stratagene)、pCR-Blunt (Invitrogen)、pET20b+ (Novagen) 以及 pUC-4K (Amersham Biosciences) 购自供应商。质粒 pLIP5GN-H6 是 pQUANTAbody 的衍生物 (图 1)。已经描述过登革热病毒的血清型 1 的 FGA/89 病毒株 (DENV1; 基因库登录号 AF226687) (Duartedos Santos et al., 2000)、西尼罗河病毒的 IS-98-ST1 病毒株 (WNV; 基因库 AF481864; (Malkinson et al., 2002))、麻疹病毒的 Schwarz 病毒株的重组型 MV_{Schw} 以及它的衍生型 MV_{Schw} -sEWNV (Despres et al., 2005)。pUC-4K 携带 aph 基因, 以可容易移动的 DNA 盒形式赋予卡那霉素抗性。在启动子 ptac 的控制下, pQUANTAbody 携带来自大肠杆菌的 phoA 基因的突变等位基因。这个等位基因编码在其活性部位有两个突变 D153G 和 D330N 并有提高的催化性能的碱性磷酸酶 (PhoA) (Boulain and Ducancel, 2004; Le Du et al., 2002; Muller et al., 2001)。pLIP5GN-H6 与 pQUANTAbody 的不同之处在于六个组氨酸密码子 (H6) 和多克隆位点区域的存在, 两者都位于 phoA 的密码子 27 和 28 之间、信号序列的下游 (图 1)。pLB11 和 pVP5 在 pET20b+ 的 NcoI 和 XhoI 限制位点之间各自携带编码 ED3. DEN1 和 ED3. WN 的基因片段 (图 1)。MV_{Schw}-sEWNV 表达来源于 WNY 的水溶性形式的 gpE。

[0147] - 抗体和抗血清

[0148] 山羊抗人的 IgM 和 IgG (Sigma-Aldrich) 购自供应商。人的血清来自于法国圭亚那的巴斯德研究所国家节肢介体病毒参照中心的保藏库。它们是从显示出基本的登革热临床症状 (发热、头痛、肌肉疼痛、关节疼痛) 并伴随着 / 或不伴随发疹和少量出血表现的病人那里收集。血清通过标准的诊断方法来表征, 尤其是使用小鼠大脑提取物作为抗原的 GAC- 和 MAC-ELISA。

[0149] 山羊抗小鼠的 IgM (Pierce) 和 IgG (Sigma-Aldrich) 购自供应商。已经描述过小鼠的单克隆抗体 mAb4E11 (Bedouelle et al., 2006)。已经描绘了 ED3. DEN1 结构域表面的表位; 它是不连续的和构象的 (Lisova et al., 2007)。通过在 J0 天用病毒感染 BALB/c 小鼠, 在 J28 天用相同的病毒攻击以及在 J53 天采血, 得到抗 DENV1 的小鼠血清。从相同种类的未感染的小鼠得到对照血清。阳性血清 IgG 的滴度如下所述, 并且通过抗结构域 ED3. DEN1 的间接 ELISA 来测定, 等于 30,000 (Despres et al., 2005)。通过在 J0 天用重组的病毒 MV_{Schw} -sE_{WNV} 感染 CD46-IFNAR 小鼠, 在 J18 天采血, 获得抗来源于 WNY 的 sE 的血清。用“空”病毒 MV_{Schw} 感染小鼠, 获得对照血清。阳性和对照血清的 IgM 的滴度各自等于 1000 和 100。

[0150] 实施例 2: 中间载体 pEBL1 的构建, 于 2007 年 4 月 23 日以保藏号 I-3747 保藏在 CNCM (法国培养物和微生物国家保藏中心, 28 rue du Docteur Roux, 75015, 巴黎)。

[0151] 位于质粒 pLIP5GN-H6 克隆区域的限制性位点是非常近的,在这个区域很难进行双重限制性切割操作。因此将卡那霉素抗性盒插入这个区域的 SalI 位点。用 SalI 酶消化质粒 pUC-4,并且含有 aph 基因的 DNA 片段通过琼脂糖凝胶电泳纯化。同样用 SalI 消化 pLIP5GN-H6。纯化的片段和线形的载体通过连接进行重组。通过将连接的混合物转化进 XL1-Blue 感受态细胞,并且在含有氨苄西林和卡那霉素的 LB 培养基上筛选转化细胞,来回收重组质粒 pEBL1 (SEQ ID NO :13)。

[0152] 更确切地说:

[0153] *XL1-Blue (pEBL1)

[0154] XL1-Blue (pEBL1) 是含有 pEBL1 质粒的大肠埃希氏杆菌菌株。pEBL1 被工程化用来简化在六聚组氨酸、想要的过客蛋白 (黄病毒的 ED3) 和来自大肠杆菌的具有提高的催化性能的碱性磷酸酶之间的融合蛋白的构建。在 pEBL1 中,将赋予卡那霉素抗性的 DNA 盒插入过客基因的位置。因此根据 Hermann 等人以前在 1990 年描述的克隆策略,过客基因的插入是容易实施和监控的。

[0155] *用于 XL1-Blue (pEBL) 构建的细菌菌株和质粒

[0156] 见实施例 1。

[0157] *测定活性来确证微生物的存活力

[0158] 生物体是氨苄西林和卡那霉素抗性的:通过将生物体平皿接种在含有 LB 琼脂培养基、100 μ g/ml 氨苄西林和 50 μ g/ml 卡那霉素的皮式培养皿上,能够检验表现型。

[0159] 实施例 3:ED3-PhoA 杂合基因的构建

[0160] 方法

[0161] 编码黄病毒 ED3 结构域和 PhoA 之间杂合蛋白的 ED3-phoA 杂合基因,其构建如下所述:用限制性内切酶 SmaI 首先消化质粒 pEBL1 (见实施例 2),用电泳来验证消化的完成,并且通过在 MicrospinG25 柱 (Amersham-Biosciences) 上的大小排阻层析将被消化的 DNA 脱盐。然后用 SalI 酶消化线形 pEBL,并且用电泳和对应卡那霉素抗性盒的 DNA 片段 (1252bp) 的出现来监控此限制性切割。通过使用两个寡核苷酸引物和高保真聚合酶 Pfu-Turbo (Stratagene) 的 PCR 来扩增 ED3 基因。在 ED3 基因 5' 末端杂交的引物引入了 SalI 位点,在 3' 末端杂交的引物引入了 ScaI 和 SpeI 位点。ScaI 位点 (AGT-ACT) 优于 SmaI 位点 (CCC-GGG),是因为后者引入了一个罕用密码子 CCC。ScaI、SpeI 和 SalI 位点在 ED3. DEN1 和 ED3. WN 基因中是没有的。用 SalI 和 ScaI 消化 PCR 产物。通过琼脂糖凝胶和提取来纯化消化产物,然后通过连接来重组。重组的质粒通过转化被引入 XL1-Blue 菌株,并且重组细菌通过在 Xp 指示培养基上形成蓝色菌落和对卡那霉素敏感而被筛选。

[0162] 用于扩增来源于质粒 pLB11 的 ED3. DEN1 的引物,含有下面的序列,其中限制性位点被在其下面划线:

[0163] 5' -GCCGGCGGTCGACAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCAC-3' (SEQ ID NO :14)

[0164] 5' -GTTTAGTACTAGTTCCTATGCTGCT TCCCTTC-3' (SEQ ID NO :15)。

[0165] 同样地,用于扩增 ED3. WN 的引物含有下面的序列:

[0166] 5' -GCCGGCGGTCGACAAAGGAACAACCTATGGCGTCTG-3' (SEQ ID NO :16);

[0167] 5' -GGTGAGTACTAGTTCCTATGCTGCT ACCAGAC-3' (SEQ ID NO :17)。

[0168] 重组质粒,编码 H6-ED3. DEN1-PhoA 的 pEBL11 和编码 H6-ED3. WN-PhoA 的 pEBL15

的序列,通过与 pEBL1 克隆区域之外杂交的寡核苷酸来检测。

[0169] 5' -GCACTGGCACTCTTACCGTTAC-3' (SEQ ID NO :18) ;

[0170] 5' -CAGTCTGATCACCCGTTAAAC-3' (SEQ ID NO :19)。

[0171] 实施例 4 :双功能的 ED3-PhoA 杂合体的生成和纯化

[0172] 生成和纯化

[0173] H6-ED3-PhoA 杂合体是由 XL1-Blue 菌株中的质粒 pEBL11 和 pEBL15 产生的。通过将分离的菌落接种于 SB 液体培养基 (1/10 体积) 并 37℃ 过夜培养,得到生产菌株的预培养物。将预培养物以一定体积的相同的培养基稀释得到初始的吸光度 $A_{600nm} = 0.25-0.30$,在 30℃ 下培养直到 $A_{600nm} = 1.5-2.0$,用 0.2mM IPTG 来诱导启动子 ptac,进一步在相同的温度下培养 2 小时,得到生成物。所有接下来的步骤在 4℃ 下进行。培养物以 5000rpm 离心 10 分钟。细菌沉淀物重悬浮在含 5mM 咪唑、1mg/ml 多粘菌素 B 硫酸盐 (Sigma-Aldrich) 的缓冲液 A (1/40 体积) 中,并且细菌悬浮液用磁力搅拌仪轻柔搅拌 1 小时。通过在 13000rpm 下离心悬浮液 10 分钟来收集周质提取物,并且在 -20℃ 下冷冻。通过 NiNTA 树脂柱 (培养物的 0.6ml/L, Qiagen) 的亲和层析从周质提取物中纯化 ED3-PhoA 杂合体。用周质提取物上柱,并且用含 20mM 咪唑的缓冲液 A (10 体积的树脂) 洗涤。被结合的蛋白以 40 到 100mM 梯度的咪唑缓冲液 A 洗脱。用还原条件的 SDS-PAGE (12% 丙烯酰胺) 分析纯化物的组分。收集含有 H6-ED3-PhoA 并被纯化至 > 90% 的部分,汇集,并且通过 P10 柱 (Amersham biosciences) 的大小排阻层析被转移至 PBS 缓冲溶液中。它们在转移进 PBS 之前或之后在 -80℃ 下骤冷,功能性质方面没什么不同 (见结果)。纯化的 H6-ED3-PhoA 杂合体的浓度通过使用 A_{280nm} 和单体的消光系数 $\epsilon_{280nm} = 40680M^{-1}cm^{-1}$ 来确定,此消光系数用 subroutine Pepstats of the software suite EMBOSS (Rice et al., 2000) 由它们的氨基酸序列计算而来。

[0174] 间接 ELISA

[0175] 间接 ELISA 在 200 μ L/ 孔体积的微量滴定板上进行。抗体 mAb4E11 用 PBS 稀释 10000 倍。孔板的孔 1 到 11 用抗体溶液加样,孔 12 用 PBS 单独加样,孔板在 4℃ 下过夜温育用于吸附反应。用缓冲液 B (3 次) 洗涤小孔,在 25℃ 下用 3% BSA 的缓冲液 B 封闭 3 小时,并且用缓冲液 B (4 次) 再次洗涤。H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体 (0.2 μ M 初始浓度) 用 1% BSA 的缓冲液 B 依次以 2 倍梯度稀释。孔 1-10 用杂合体的前 10 次的稀释来加样,孔 11 用稀释缓冲液单独加样,并且孔 12 用杂合体的最低的稀释溶液来加样。孔板在 25℃ 下温育 1 小时,用于捕获反应。小孔象上述那样被洗涤,捕获的杂合体通过加入含 5mM (2mg/ml) pNPP 的缓冲液 D 来显示。4℃ 下过夜于 A_{405nm} 处检测对硝基苯酚的形成。

[0176] 酶活性

[0177] 在 25℃ 下于缓冲液 D 或 E 中,于 A_{405nm} 处检测从 pNPP 形成的对硝基苯酚盐 (pNP)。pNPP (5mM) 的起始浓度是饱和的 (Le Du et al., 2002), 并且因此动力学参数 k_{cat} 可以通过公式来计算:

$$[0178] \quad dA_{405nm}/dt = k_{cat}E_0 \epsilon_{405nm}(pNP) \quad (4)$$

[0179] 其中 dA_{405nm}/dt 是 pNP 形成的初始速度; E_0 是 (H6-ED3-PhoA)₂ 二聚体的总浓度; 以及 $\epsilon_{405nm}(pNP) = 1.78 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (Muller et al., 2001)。 k_{cat} 值通过 E_0 的几个值来测定,并且求平均值。

[0180] H6-ED3-PhoA 杂合体的功能性

[0181] 为了评估 H6-ED3-PhoA 杂合体的功能性,测定它们的磷酸酶活性,并且分析它们被单克隆抗体 mAb4E11 的识别。H6-ED3. DEN1-PhoA 和 H6-ED3. WN-PhoA 杂合体对于 pNPP 脱磷酸化变成 pNP 是有活性的,在缓冲液 D 中在 25℃ 下对于一个二聚体分子 k_{cat} 值分别等于 $190 \pm 18 s^{-1}$ 和 $154 \pm 6 s^{-1}$ 。在间接 ELISA 中被结合的 H6-ED3. DEN1-PhoA 特异性地固定 mAb4E11,被它内在的磷酸酶活性显示。这些结果表明,杂合体的 PhoA 部分是正确折叠的并且是二聚体的,因为 PhoA 的二聚体形式的活性是它的单体形式的 100 倍 (Boulanger and Kantrowitz, 2003)。它们表明,杂合体的 ED3. DEN1 部分作为抗原是正确折叠的和有功能的,因为 mAb4E11 的表位是不连续的、构象的和包含在结构域里的 (Lisova et al., 2007)。因为每个杂合体分子的抗原性质通过其内在的磷酸酶活性显示出来,结果表明绝大部分的 H6-ED3. DEN1-PhoA 分子同时具有所有必需的性质,即它们的 PhoA 部分是二聚体的和有活性的,并且它们的 ED3. DEN1 部分是抗原性的和处于二价的状态。在 PhoA 多肽链位点 7 中的两个残基都位于 PhoA 二聚体结构的同一侧 (Le Du et al., 2002)。因此, H6-ED3-PhoA 二聚体中 ED3 部分的两个拷贝也应当在分子的同一侧并且根据抗体亲抗原模式与免疫球蛋白相互作用。上面的结果足以显示, H6-ED3-PhoA 杂合体能够在 GAC- 和 MAC-ELISA 中使用。

[0182] 通过间接 ELISA 来显示 H6-ED3. DEN1-PhoA 和抗体 mAb4E11 之间的识别的存在,其表位是不连续的和构象的,其中 mAb4E11 被固定在微量滴定板的小孔中并且通过杂合体的碱性磷酸酶活性来显示与杂合体的结合。这个实验表明,每个杂合体分子的两个部分 ED3. DEN1 和 PhoA 是同时有功能性的。因此,这两个部分是正确折叠的,它们必需的二硫键在周质的氧化介质中形成,并且它们的组合是二聚体的,因为 PhoA 只有在寡聚状态才是有显著活性的。每个杂合体分子都是二聚的和双功能的。

[0183] 间接 ELISA 实验表明,有可能通过 $(H6-ED3. DEN1-PhoA)_2$ 来检测 ED3. DEN1 结构域和抗体 mAb4E11 之间的识别。该杂合体可以用来检测 ED3 和其他分子,象抑制剂、其他抗体、受体或甚至整个细胞之间的相互作用。

[0184] H6-ED3. DEN1-PhoA 和 H6-ED3. WN-PhoA 的催化常数 k_{cat} 的值确证了杂合体分子 PhoA 部分的高活性和它们的二聚体的状态。重组 ED3 通过 PhoA 的人工二聚化部分地模仿了它们在整个病毒表面的多聚性的呈现和它们与抗体或其他受体相互作用的多价位的模式。

[0185] 实施例 5 :GAC-ELISA 和 MAC-ELISA

[0186] 方法

[0187] 捕获 ELISA 在 100 μ L/ 孔体积的微量滴定板上进行。抗 IgG 和抗 IgM 的抗体用 PBS 稀释 (终浓度是 1mg/mL)。孔板上的孔 1 至 11 用抗体溶液加样,并且孔 12 只用 PBS 加样。孔板在 4℃ 下过夜温育,用于吸附反应。第二天早晨,用缓冲液 C (3 次) 洗涤小孔,在 37℃ 下用 3% (w/v) 奶粉的缓冲液 C 封闭 1 小时,然后用缓冲液 C (3 次) 再次洗涤。分析中的血清和对照血清用 1% 奶粉的缓冲液 C 稀释 100 倍,然后依次稀释; H6-ED3-PhoA 杂合体用相同的缓冲液稀释 (单体的最终浓度是 0.5 μ M)。孔 1-10 用血清的前 10 次的稀释液来加样,孔 11 用稀释缓冲液单独加样,并且孔 12 用血清的最低的稀释溶液来加样。孔板在 37℃ 下温育 1 小时,用于抗体捕获反应。小孔用缓冲液 C 洗涤 (3 次) 然后用 H6-ED3-PhoA 溶液加样。孔板在 37℃ 下温育 1 小时,用于结合反应。按上述步骤洗涤小孔,并且通过添加 5mM

pNPP 的缓冲液 E 来显示被结合的 H6-ED3-PhoA 分子。在 25℃ 下几小时或 4℃ 下过夜后测定 $A_{405\text{nm}}$ 。如果血清的信号值至少是空白对照的两倍时,认为血清的信号是有效的。血清的滴度等于仍然有效的最大稀释倍数。用于小鼠血清进行的捕获 ELISA 试验与用于人血清的试验一样,除了延长洗涤之外,抗 IgM 抗体使用的最终浓度是 2.4mg/mL, H6-ED3. DEN1-PhoA 单体的最终浓度是 0.2 μM , 以及 pNPP 在缓冲液 D 中。

[0188] 结果

[0189] 用于抗黄病毒的 IgG 的定量的简化的 GAC-ELISA

[0190] 它用来检验 H6-ED3-PhoA 杂合体是否能够在免疫的小鼠的血清中检测出抗同种的黄病毒的 IgG, 因此可以简化常用于血清学的 GAC-ELISA 方案。因此, 抗小鼠 IgG 的抗体通过在塑料上的被动吸附而被固定在微量滴定板上。用该被固定的抗体来捕获存在于小鼠血清中的 IgG。抗 ED3 结构域的 IgG, 通过 H6-ED3-PhoA 杂合体经其抗原部分的结合性和它的 PhoA 部分的催化活性来显示 (见公式 3)。

[0191] 用被 DENV1 免疫的小鼠的血清来进行测试。未免疫的小鼠的血清、没有添加抗 IgG 抗体的空白试样以及没有添加血清的空白试样被用作对照 (见材料和方法部分)。被 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体催化并在 $A_{405\text{nm}}$ 处监控的由 pNPP 生成的 pNP, 被用作信号来显示结合反应 (图 2)。低饱和度的 $A_{405\text{nm}}$ 信号形成与免疫血清浓度的函数关系。这些试验独立重复三次, 过夜后显现的免疫血清的滴度 > 50000 (2.5 小时后 > 12500)。未免疫的血清的信号与空白信号相比没什么不同, 反之过夜后免疫血清的信号显示视浓度而定比空白信号高 2 至 18 倍 (2.5 小时后 2 至 6 倍)。这些结果确证了 H6-ED3. DEN1-PhoA 的两部分在同一个分子杂合体中是同时有功能的。它们表明, 此杂合体能灵敏地、定量地并且特异性地检测血清中抗 ED3. DEN1 结构域的 IgG 的存在, 因此能检测出登革热病毒的感染。

[0192] 用于抗黄病毒的 IgM 的定量的简化的 MAC-ELISA

[0193] 同样地, 它用来检验 H6-ED3-PhoA 杂合体是否能够在免疫的小鼠的血清中检测出抗黄病毒的 IgM, 因此可以简化常用的 MAC-ELISA 方案。抗小鼠 IgM 的抗体被固定化。用该固定化的抗体来捕获存在于小鼠血清中的 IgM。抗 ED3 结构域的 IgM 用二价的 H6-ED3-PhoA 杂合体来显示 (见公式 3)。

[0194] 用被嵌合体病毒 MV_{Schw}-sEWNV 免疫的小鼠的血清来进行测试, MV_{Schw}-sEWNV 表达 WNY 的 gpE 的分泌型。用空载体 MV_{Schw} 免疫的小鼠血清、没有添加抗 IgM 抗体的空白试样以及没有添加血清的空白试样被用作对照 (见材料和方法部分)。H6-ED3. WN-PhoA 杂合体用来显示结合反应 (图 3)。低饱和度的信号形成与免疫血清浓度的函数关系。过夜后显现的免疫血清的滴度 > 800 (3 小时后 > 400)。过夜温育后未免疫的血清的 $A_{405\text{nm}}$ 信号比空白信号最多高 1.7 倍, 反之免疫血清的信号视浓度而定比空白信号高 2 至 6.4 倍。温育 3 小时后显示对于未免疫血清这些数字是 1.2 倍, 对于免疫血清是 2 至 2.6 倍。注意, 对于血清的相对浓度 $\leq 2.5\%$, 未免疫血清的信号没有显著地与空白信号区分开来。这些结果确证了 H6-ED3. WN-PhoA 的两部分在同一个分子杂合体中是同时有功能的。它们表明, 杂合体可以灵敏地、定量地和特异性地检测抗 ED3. WN 结构域的 IgM 的存在。它们表明, 杂合体可以使人们早期检测出与 WNY 的接触 (在第 8 天)。

[0195] 实施例 6 : 通过 ED3-PhoA 杂合体来辨别黄病毒

[0196] 根据本发明通过实施交叉反应来测定简化的 GAC- 和 MAC-ELISA 的特异性。将被

DENV1 病毒免疫的小鼠的血清提交给两个被 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体或 H6-ED3. WN-PhoA 显示的平行 GAC-ELISA 试验 (图 4)。相应地,将被 MV_{Schw} -sEWNV 嵌合病毒免疫的小鼠的血清提交给两个被 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体或 H6-ED3. WN-PhoA 显示的平行 MAC-ELISA 试验 (图 5)。过夜显示后, GAC-ELISA 中同种的信号比非同种的信号最多高达 5.4 倍, 并且 MAC-ELISA 中最多高达 3.9 倍。当然, 当考虑到特异的信号 (血清的信号减去空白的信号) 时, 这些数值会大得多。这些结果表明, 如同这里所描述的, GAC- 和 MAC-ELISA 是特异性的, 并且它们可以允许人们确定涉及的感染或免疫接种的黄病毒的种类。

[0197] 实施例 7 : 用简化的 GAC- 和 MAC-ELISA 来测试人的血清

[0198] 用 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体来检测来自曾感染过登革热病毒 DENV1 至 DENV4 四种血清型之一的病人的血清。对于 DENV1, 三个血清样品是在症状开始之后的第 9 天与第 28 天之间采集, 对应于登革热病毒的初次感染; 两个血清样品在第 13 天和第 18 天采集, 对应于继发性感染。对于 DENV2、DENV3 和 DENV4, 在第 8 天和第 32 天之间采集样品, 不知道是初次感染还是继发性感染状态。这些血清以前以乳鼠大脑作为抗原, 用 GAC- 和 MAC-ELISA 标准方法测试过。使用下面的对照: 一个试验中没有添加抗人 IgG 或 IgM 的固定抗体; 一个实验中没有添加血清; 两个实验中使用的是没有被登革热病毒感染的病人的血清。

[0199] 对于在 MAC-ELISA (图 6) 中初次感染 DENV1 病人的血清和对于在 GAC-ELISA (未图示) 中继发性感染 DENV1 病人的血清, 饱和度的 A_{405nm} 信号形成与血清中浓度的函数关系。它直线型上升直至血清的相对浓度 $> 2.5\%$ 。因此, 使用相对浓度用于以下分析。25°C 下 3 个小时的试验的显现是足够的。

[0200] 在 20 个检测的血清中, 只有对应于初次感染的三个血清在 MAC-ELISA 中给出阳性信号, 即, 超过对照信号的两倍; 所有其他的血清给的信号与对照是相同的 (图 7A)。因此, 根据本发明简化的 MAC-ELISA 可以检测出 DENV1 的初次感染, 并且将 DENV1 感染和其他三种血清型区分开来。在 GAC-ELISA 中四种血清样品给出阳性信号: 两个样品来自于 DENV1 继发性感染的病人; 来自于 DENV2 感染的病人的六个样品中的一个样品 (2d); 来自于 DENV4 感染的病人的两个样品中的一个样品 (4a) (图 7B)。因此, 根据本发明简化的 GAC-ELISA 可以在症状开始后第 13 天检测出 DENV1 的继发性感染。病人的血清 2d 和 4a 在简化的 GAC-ELISA 中得分为阳性, 可能以前被 DENV1 未注意地感染过。采集样品的当天和在简化的 MAC-ELISA 和 GAC-ELISA 中的信号值之间没有看到相关性。

[0201] 用平行的 MAC-ELISA 和 GAC-ELISA 中的信号比值 r 来测定登革病毒的感染是否是初次感染还是继发性感染类型。根据本发明计算简化的捕获 ELISA 中的信号比值 (图 7C)。对应于 DENV1 初次感染的三个血清的 $r > 1.90$ 。对应 DENV2、DENV3 和 DENV4 感染的血清 $r < 1.4$, 除了血清 2d 和 4a 之外。对应于 DENV1 继发性感染的血清, 血清 2d 和 4a 的 $r < 0.4$ 。因此, 比值 r 可以区分初次感染和继发性感染, 以及也区分 DENV1 的初次感染和其他 DENV 血清型的感染。

[0202] $(H6-ED3. DEN1-PhoA)_2$ 杂合体被成功地应用于简化的 GAC-ELISA 中, 来显示在抗病毒被高免疫的小鼠的血清中、或在经受了病毒继发性感染的病人的血清中抗 DENV1 的 IgG 的存在。相同的杂合体被成功地应用于简化的 MAC-ELISA 中, 来显示在经受了病毒的初次感染的病人的血清中抗 DENV1 的 IgM 的存在。简化的 GAC-ELISA 使得我们能区分小鼠的 DENV1 感染和 WNV 感染。简化的 GAC-ELISA 和 MAC-ELISA 组合使得我们能区分人的 DENV1

感染和其他三种 DENV 血清型感染,以及区分 DENV1 的初次感染和继发性感染。

[0203] 同样, (H6-ED3.WN-PhoA)₂ 杂合体被成功地应用于简化的 MAC-ELISA 中,来显示小鼠的血清中抗 WNV 的 IgM 的存在。简化的 MAC-ELISA 使得我们能区分 WNV 感染和 DENV1 感染。简化的 GAC-ELISA 和 MAC-ELISA 的高特异性和灵敏度可能来自于两个因素:ED3 结构域作为抗原的使用和检测系统的独立性,包括针对抗原的本性和它与血清的免疫球蛋白的相互作用的与 PhoA 的融合。(H6-ED3-PhoA)₂ 的双功能的二聚体的特异性应当比直到目前还在使用的抗原和检测系统的特异性要高。

[0204] 实施例 8 :用简化的 MAC-ELISA 来检测人的血清

[0205] 在进一步的试验系列中,收集被登革热病毒四种血清型 DEN1 至 DEN4 之一感染或被黄热病病毒 (YFV) 感染的病人的血清,并用 MAC-ELISA 标准方法 (Talarmin et al., 1998) 和 PCR (Lanciotti et al., 1992) 来表征。标准 MAC-ELISA 使用感染的乳鼠大脑的提取物作为抗原,并且 PCR 使用对于每个病毒血清型 (表 I) 特异的引物。引物的序列和扩增的条件如 (Lanciotti et al., 1992) 所述。尤其是引物的序列如下所示:

[0206] 引物 D1 :5' -TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3' (SEQ ID NO :26)。

[0207] 引物 D2 :5' -TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3' (SEQ ID NO :27)。

[0208] 引物 TS1 :5' -CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3' (SEQ ID NO :28)。

[0209] 引物 TS2 :5' -CGCCACAAGGGGCATGAACAG-3' (SEQ ID NO :29)。

[0210] 引物 TS3 :5' -TAACATCATCATGAGACAGAGC-3' (SEQ ID NO :30)。

[0211] 引物 TS4 :5' -CTC TGT TGT CTAAA CAA GAGA-3' (SEQ ID NO :31)。

[0212] 扩增发生在含有下列成分的 100 μ l 体积中 :50mM KCl、10mM Tris(pH 8.5)、1.5mM MgCl₂、0.01% gelatin、200 μ M 四种脱氧核苷酸三磷酸盐的每种、5mM 二硫苏糖醇、50pmol 每个引物、2.5 个单位的 rav-2 重组 RT (Amersham, Arlington Heights, Ill.) 和 2.5 个单位的 Amplitaq 聚合酶 (Perkin Elmer, Norwalk, 康涅狄格州)。这个反应允许在热循环程序中进行,42℃下孵育 1 小时,然后进行 35 次循环的变性 (94℃, 30 秒),引物退火 (55℃, 1 分钟) 和引物延伸 (72℃, 2 分钟)。

[0213] 表 I. 用于简化 MAC-ELISA 和 GAC-ELISA 分析的人血清的数量。

[0214]

血清	ELISA	DEN 杂合体	YF 杂合体
DEN1	MAC	30	18
DEN2	MAC	44	24
DEN3	MAC	38	18
DEN4	MAC	13	13
YF	MAC	19	19
DEN1	GAC	18	0

血清	ELISA	DEN 杂合体	YF 杂合体
DEN2	GAC	24	0
DEN3	GAC	18	0

[0215] 在上述的表 I 中,第 1 列:用标准诊断方法在病人血清中检测出的黄病毒(见本文)。第 3 列:用对应于 DENV 四种血清型的 H6-ED3-PhoA 杂合体平行检测的血清的数量。第 4 列:用四种 H6-ED3. DEN-PhoA 杂合体 and H6-ED3. YF-PhoA 杂合体平行检测的血清的数量。第 4 列的血清组成了第 3 列血清的一个亚组。

[0216] 19 个感染 YFV 病人的血清中有四个来自于卡宴市(法国圭亚那)的巴斯德研究所并且对应于近期刚接种抗 YFV 的病人,剩余的 15 个血清来自于达喀尔(塞内加尔)的巴斯德研究所。

[0217] 根据本发明通过简化的 MAC-ELISA,使用五个对应的 H6-ED3-PhoA 杂合体并且按以前所描述的方法(见实施例 5),对采集的血清进行试验。简化的 MAC-ELISA 的一般形式如下所示:

[0218] 支持物 -@huIgX : :血清 : : (H6-ED3-PhoA)₂

[0219] 其中 @huIgM 是抗人 IgM 的抗体。发明者认为血清试验的信号 A 是阳性的,只要它比对照的信号 Ac 高两倍以上,即 $A > 2Ac$ 。后者存在于实施的 n 次重复试验 ($n \geq 3$)、并且不添加抗人 IgM 的抗体的试验。

[0220] 表 II 给出了对于每种血清和杂合体的阳性信号的比例。对于每种血清,同种的杂合体的阳性信号的比例是最大的,除了 DENV4 感染的病人的血清之外。在最近的例子中,ED3. DEN1-PhoA 和 ED3. DEN2-PhoA 杂合体的阳性信号的比例是最高的。DEN2 和 YF 血清很少与非同种的杂合体反应。相反,DEN1 血清经常与 DEN2 和 DEN3 杂合体反应,并且 DEN4 血清与每种 DEN 杂合体反应。相反,对于每种杂合体,同种的血清的阳性信号的比例是最大的,除了 ED3. DEN4-PhoA 与每种血清都很微弱的反应之外。尤其是, DEN1 和 YF 杂合体很少与非同种的血清反应。

[0221] 表 II. 通过简化的 MAC-ELISA 使用 H6-ED3-PhoA 杂合体来检测人的血清。

[0222]

杂合体	阳性血清的比例 (%)				
	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4	YF
DEN1	83	11	16	23	0
DEN2	63	73	26	23	4
DEN3	37	9	47	15	17
DEN4	3	7	3	8	15
YF	0	5	0	0	47

[0223] 在上述的表 II 中,第 1 列给出了用于测试的 H6-ED3-PhoA 杂合体类型,即,其 ED3

部分的病毒来源。2-6 列给出了每种血清和杂合体的阳性血清的比例。如果血清的信号 A 高于对照信号 Ac 的两倍 ($A \geq 2Ac$), 血清的信号被认为是阳性的; 如果低于对照信号的两倍 ($A < 2Ac$), 则是阴性的。表 I 中给出了人血清的数量和性质。

[0224] 表 III 给出了每种血清和每种杂合体的比例 (血清信号)/(对照信号) 的平均值, 即 $\langle A/Ac \rangle$ 。对于每种血清, 同种的杂合体的平均值是最大的, 除了 DEN4 的血清之外。然而, 对于每种杂合体, 同种的血清的平均值一般来说不是最大的。

[0225] 表 III. 简化的 MAC-ELISA 中的人血清的相对信号。

[0226]

杂合体	血清的相对信号				
	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4	YF
DEN1	10.0	1.9	1.4	1.9	1.3
DEN2	5.3	5.0	2.0	1.8	1.4
DEN3	3.0	2.0	2.6	1.4	1.6
DEN4	1.3	1.6	1.2	1.3	1.7
YF	1.4	1.4	1.6	1.7	2.5

[0227] 在上述的表 III 中, 第 1 列给出了在试验中使用的 H6-ED3-PhoA 杂合体。2-6 列给出了每种血清和杂合体的 A/Ac 平均值。详情见表 II 说明。

[0228] 实施例 9: 使用临界信号的简化的 MAC-ELISA 的灵敏度和特异性

[0229] 表 IV 的第 1 行给出了每种血清和同种的杂合体的简化的 MAC-ELISA 的灵敏度。这个灵敏度对于 DEN1 和 DEN2 血清是高的, 对于 DEN3 和 YF 血清是中等的, 对于 DEN4 血清是低的。如果只限于来自于卡宴市的巴斯德研究所和对应于接种病人的四个 YF 血清, 灵敏度会高得多 (四个阳性信号)。ED3. YF-PhoA 杂合体, 其序列对应于 YFN 的疫苗菌株 17D, 与检测出抗野生型菌株的 IgM 相比, 可能更好地检测出抗疫苗病毒的 IgM。

[0230] 表 IV. 用于人血清的简化的 MAC-ELISA 的灵敏度和特异性。

[0231]

性质	参数	检测				
		DEN1	DEN2	DEN3	DEN4	YF
灵敏度 (%)	2xAc	83	73	47	8	47
血清型特异性 (%)	2xAc	20	78	50	0	无
血清型特异性 (%)	Amax	100	97	89	0	无
种群特异性 (%)	2xAc	100	94	89	100	89
病毒特异性 (%)	Amax	100	100	89	0	89

[0232] 在表 IV 中, 第 1 行的灵敏度被定义为当用同种的 H6-ED3-PhoA 杂合体一起测定时给出阳性信号的血清的比例 (见表 II 的对角线)。在第 2 行中的 DEN 血清型特异性被定义

为在用同种的 DEN 杂合体测定时给出阳性信号的血清中,当用三个非同种的 DEN 杂合体测定时给出阴性信号的血清的比例。在第 3 行中的 DEN 血清型特异性被定义为在用同种的杂合体测定时给出阳性信号的血清中,当用同种 DEN 杂合体测定时给出的信号高于用三个非同种的 DEN 杂合体测定时给出的信号的血清的比例。测定第 2 行和第 3 行的 DEN 血清型特异性使用的是表 I、第 3 列的血清。在第 4 行中的种群特异性被定义为用同种 DEN 杂合体测定时给出阳性信号并且用 YF 杂合体测定时给出阴性信号的 DEN 血清的比例;以及用同种的 YF 杂合体测定时给出阳性信号并且用所有的四个 DEN 杂合体测定时给出阴性信号的 YF 血清的比例。在第 5 行中的病毒特异性被定义为在用同种的杂合体测定时给出阳性信号的血清中,用同种的杂合体测定时给出的信号高于用非同种的杂合体测定时给出的信号的血清的比例。第 4 行和第 5 行的种群特异性和病毒特异性的测定使用的是表 I、第 4 列的血清。其他详情见表 II。

[0233] 在简化的 MAC-ELISA 中 DEN 血清型的 ED3-PhoA 特异性是计算为:在用同种的杂合体测定时给出阳性信号 ($A > 2Ac$) 的血清中,用三个非同种的杂合体测定时给出阴性信号 ($A < 2Ac$) 的血清的比例。该血清型特异性对于 ED3. DEN2-PhoA 是高的,对于 DEN3 杂合体是中等的,对于 DEN4 杂合体是低的(表 IV,第 2 行)。

[0234] 在简化的 MAC-ELISA 中病毒种群的 ED3-PhoA 杂合体的特异性一方面计算为用同种 ED3. DEN-PhoA 杂合体测定时给出阳性信号并且用 ED3. YF-PhoA 杂合体测定时给出阴性信号的 DEN 血清的比例;另一方面计算为用同种的 ED3. YF-Ph 杂合体测定时给出阳性信号并且用所有的 ED3. DEN-PhoA 杂合体测定时给出阴性信号的 YF 血清的比例。病毒种群的特异性每个都 $\geq 89\%$,对于 ED3. DEN1-PhoA 和 ED3. DEN4-PhoA 杂合体,高达 100% (表 IV,第 4 行)。

[0235] 实施例 10:使用最大信号的简化的 MAC-ELISA 的特异性

[0236] ED3-PhoA 杂合体的这样的模结构使得在简化的 MAC-ELISA 中的信号强度仅仅取决于在它的 ED3 部分用血清的抗体之间的识别特性。这种特性使得人们能定量地比较用携带不同 ED3 结构域的 ED3-PhoA 杂合体测定时由特定的血清得到的信号。因此,发明者计算出用同种 ED3-PhoA 杂合体测定时给出阳性信号、以及用同种杂合体测定时给出的信号高于用非同种杂合体测定时给出的信号的血清的比例。发明者计算了四种 ED3. DEN 杂合体的这些比例,然后计算了五种 ED3-PhoA 杂合体的这些比例。用这种方式计算的四种 DEN 杂合体的血清型特异性,对于 DEN1、DEN2 和 DEN3 杂合体是 $\geq 89\%$,对于 DEN4 杂合体是零(表 IV、第 3 行)。计算五种杂合体的病毒特异性是 $\geq 89\%$,除了 DEN4 杂合体之外(表 IV、第 5 行)。

[0237] 实施例 11:用简化的 GAC-ELISA 来检测人的血清

[0238] 收集被登革热病毒的三种血清型 DEN1、DEN2 和 DEN3 中的一种感染的病人的血清,并且用 IgG 特异性的间接 ELISA 和 PCR 标准方法来表征。间接 ELISA 使用感染的乳鼠大脑的提取物作为抗原,并且 PCR 使用对每个病毒血清型特异的引物(表 I)。根据本发明通过简化的 GAC-ELISA,使用三个对应的 H6-ED3-PhoA 杂合体按照以前所描述的方法(见实施例 5),对收集的血清进行试验。简化的 GAC-ELISA 的一般形式如下所示:

[0239] 支持物-@huIgG : :血清 : : (H6-ED3-PhoA)₂

[0240] 其中 @huIgG 是抗人 IgG 的抗体。当血清试验的信号高于对照的信号两倍时,发明

者认为它是阳性的。后者存在于实施的 n 次重复试验 ($n \geq 3$) 并且不添加抗人 IgG 的抗体的试验中。在简化的 GAC-ELISA 中用同种杂合体测定时的阳性血清的比例是低的, 并且最大不超过 29% (表 V)。

[0241] 表 V. 用于人血清的简化的 GAC-ELISA 的灵敏度和特异性。

[0242]

性质	参数	检测		
		DEN1	DEN2	DEN3
灵敏度 (%)	2xAc	28	29	17
血清型特异性 (%)	2xAc	60	0	0
血清型特异性 (%)	A _{max}	100	29	33

[0243] 在表 V 中, 灵敏度和血清型特异性的定义如同表 IV。表 I 中给出了人血清的数量和性质。

[0244] 在实施例 8-11 中表征的 H6-ED3-PhoA 使得发明者通过简化的 MAC-ELISA 能早期识别出登革热病毒或黄热病病毒最近的感染。除了 DEN4 病毒外, 灵敏度以如下顺序从高到非常高: DEN1 > DEN2 > DEN3 = YF >> DEN4。

[0245] 这些灵敏度的差异可能归因于依照于病毒的 ED3 结构域的不同免疫原性水平。在这种假设下, ED3. DEN4 结构域的免疫原性可能比其他三个血清型 DEN1-DEN3 或 YFV 结构域的免疫原性小。作为另一种选择, 灵敏度的差异可能归因于特定的菌株、以及因此发明者用于构建重组杂合体的病毒的序列。例如, 用于 YFV 感染的简化的 MAC-ELISA 可以通过任意使用两个杂合体来得到改进, 一个对应于 17D 疫苗菌株并且另一个对应于野生型菌株。

[0246] 五个被检测的杂合体都有很好的病毒种群特异性, 即登革热种群对比黄热病种群都高于 89%。当用不同的杂合体进行定量比较相同的血清试验时, 它们也都有很好的血清型特异性, 除了 DEN4 杂合体之外都高于 89%。这个结果表明, 抗 ED3. DEN4 的抗体识别黄病毒之间共有的表位。

[0247] 用 H6-ED3-PhoA 杂合体的血清型 DEN1-DEN3 对人血清进行的简化的 GAC-ELISA, 其灵敏度低。这个结论是否是普遍的并且应当延伸至其他病毒或生物体, 尚需确定。图 2 和 4 显示了用 H6-ED3. DEN1-PhoA 杂合体对被 DENV1 免疫的小鼠的血清进行简化的 GAC-ELISA 的灵敏度。发明者也显示了对人血清进行的简化的 MAC- 和 GAC-ELISA 的信号定量比较, 并且它能区分 DENV1 的初次感染和继发性感染, 见实施例 7 和图 7。

[0248] 因此, 可以在低等级的安全性实验室中制备重组的 H6-ED3-PhoA 杂合体。它们能早期检测黄病毒的感染, 并且允许临床医生区分病毒的种群或甚至登革热病毒的血清型。

[0249] 参考文献

[0250] Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., and Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. J Clin Microbiol 40, 376-381.

- [0251] AnandaRao, R. , Swaminathan, S. , Fernando, S. , Jana, A.M. , and Khanna, N. (2005). A custom-designed recombinant multi-epitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Protein Expr Purif* 41, 136-147.
- [0252] Beasley, D. W. , Holbrook, M. R. , Travassos Da Rosa, A. P. , Coffey, L. , Carrara, A. S. , Phillippi-Falkenstein, K. , Bohm, R. P. , Jr. , Ratterree, M. S. , Lillibridge, K. M. , Ludwig, G. V. , et al. (2004). Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection. *J Clin Microbiol* 42, 2759-2765.
- [0253] Bedouelle, H. , Belkadi, L. , England, P. , Guijarro, J. I. , Lisova, O. , Urvoas, A. , Delepierre, M. , and Thullier, P. (2006). Diversity and junction residues as hotspots of binding energy in an antibody neutralizing the dengue virus. *FEBS J* 273, 34-46.
- [0254] Bernard, P. , Gabant, P. , Bahassi, E. M. , and Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148, 71-74.
- [0255] Blitvich, B. J. , Marlenee, N. L. , Hall, R. A. , Calisher, C. H. , Bowen, R. A. , Roehrig, J. T. , Komar, N. , Langevin, S. A. , and Beaty, B. J. (2003). Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species. *J Clin Microbiol* 41, 1041-1047.
- [0256] Boulain, J. C. , and Ducancel, F. (2004). Expression of recombinant alkaline phosphatase conjugates in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 267, 101-112.
- [0257] Boulanger, R. R. , Jr. , and Kantrowitz, E. R. (2003). Characterization of a monomeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution. *J Biol Chem* 278, 23497-23501.
- [0258] Bullock, W. O. , Fernandez, J. M. , and Short, J. M. (1987). XL1-Blue : a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- [0259] Cardoso, M. J. , Tio, P. H. , Nimmannitya, S. , Nisalak, A. , and Innis, B. (1992). IgM capture ELISA for detection of IgM antibodies to dengue virus : comparison of 2 formats using hemagglutinins and cell culture derived antigens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23, 726-729.
- [0260] Crill, W. D. , and Chang, G. J. (2004). Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol* 78, 13975-13986.
- [0261] Crill, W. D. , and Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75, 7769-7773.
- [0262] Cuzzubbo, A. J. , Endy, T. P. , Nisalak, A. , Kalayanarooj, S. , Vaughn, D. W. , Ogata, S. A. , Clements, D. E. , and Devine, P. L. (2001). Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic

assay. Clin Diagn Lab Immunol 8,1150-1155.

[0263] Despres, P., Combredet, C., Frenkiel, M. P., Lorin, C., Brahic, M., and Tangy, F. (2005). Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. J Infect Dis 191,207-214.

[0264] Duarte dos Santos, C. N., Frenkiel, M. P., Courageot, M. P., Rocha, C. F., Vazeille-Falcoz, M. C., Wien, M. W., Rey, F. A., Deubel, V., and Despres, P. (2000). Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. Virology 274,292-308.

[0265] Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T., Allison, S. L., Schalich, J., Heinz, F. X., Harrison, S. C., Rey, F. A., and Fuller, S. D. (2001). Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. Mol Cell 7, 593-602.

[0266] Granwehr, B. P., Lillibridge, K. M., Higgs, S., Mason, P. W., Aronson, J. F., Campbell, G. A., and Barrett, A. D. (2004). West Nile virus: where are we now? Lancet Infect Dis 4,547-556.

[0267] Gritsun, T. S., Holmes, E. C., and Gould, E. A. (1995). Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. Virus Res 35,307-321.

[0268] Halstead, S. B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. Adv Virus Res 60,421-467.

[0269] Hermann, M., and Bedouelle, H. (1990). A method for monitoring double restriction cuts within a polylinker. Res Microbiol 141,187-189.

[0270] Hogrefe, W. R., Moore, R., Lape-Nixon, M., Wagner, M., and Prince, H. E. (2004). Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. J Clin Microbiol 42,4641-4648.

[0271] Holbrook, M. R., Shope, R. E., and Barrett, A. D. (2004). Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. J Clin Microbiol 42,4101-4110.

[0272] Holmes, D. A., Purdy, D. E., Chao, D. Y., Noga, A. J., and Chang, G. J. (2005). Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. J Clin Microbiol 43,3227-3236.

[0273] Innis, B. L., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P., and Hoke, C. H. (1989). An enzyme-linked

immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 40,418-427.

[0274] Johnson, A. J. , Martin, D. A. , Karabatsos, N. , and Roehrig, J. T. (2000). Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38, 1827-1831.

[0275] Kanai, R. , Kar, K. , Anthony, K. , Gould, L. H. , Ledizet, M. , Fikrig, E. , Marasco, W. A. , Koski, R. A. , and Modis, Y. (2006). Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J Virol* 80,11000-11008.

[0276] Kao, C. L. , King, C. C. , Chao, D. Y. , Wu, H. L. , and Chang, G. J. (2005). Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect* 38,5-16.

[0277] . Kerschbaumer, R. J. , Hirschl, S. , Schwager, C. , Ibl, M. , and Himmler, G. (1996) pDAP2: a vector for construction of alkaline phosphatase fusion proteins. *Immunotechnology* Volume 2, Issue 2, June, Pages 145-150

[0278] Kuhn, R. J. , Zhang, W. , Rossmann, M. G. , Pletnev, S. V. , Corver, J. , Lenches, E. , Jones, C. T. , Mukhopadhyay, S. , Chipman, P. R. , Strauss, E. G. , et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108,717-725.

[0279] Kuno, G. (2003). Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv Virus Res* 61,3-65.

[0280] Lanciotti, R. S. , Calisher, C. H. , Gubler, D. J. , Chang, G. J. , Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30, 545-551.

[0281] Le Du, M. H. , Lamoure, C. , Muller, B. H. , Bulgakov, O. V. , Lajeunesse, E. , Menez, A. , and Boulain, J. C. (2002). Artificial evolution of an enzyme active site: structural studies of three highly active mutants of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J Mol Biol* 316,941-953.

[0282] Lisova, O. , Hardy, F. , Petit, V. , and Bedouelle, H. (2007). Mapping to completeness and transplantation of a group specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of the dengue virus. *J. Gen. Virol.* , in press.

[0283] Ludolfs, D. , Schilling, S. , Altenschmidt, J. , and Schmitz, H. (2002). Serological differentiation of infections with dengue virus serotypes 1 to 4 by using recombinant antigens. *J Clin Microbiol* 40,4317-4320.

[0284] Ludolfs, D. , Niedrig, M. , Paweska, J. T. and Schmitz, H. (2007). Reverse ELISA for the detection of anti West Nile virus IgG antibodies in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, Number 7, July, Pages 467-473.

[0285] Malkinson, M. , Banet, C. , Weisman, Y. , Pokamunski, S. , King, R. , Drouet,

M. T., and Deubel, V. (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 8, 392-397.

[0286] Martin, D. A., Biggerstaff, B. J., Allen, B., Johnson, A. J., Lanciotti, R. S., and Roehrig, J. T. (2002). Use of immunoglobulin m cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 544-549.

[0287] Martin, D. A., Noga A., Kosoy O., Johnson, A. J., Petersen, L. R., Lanciotti, R. S. (2004). Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile Virus and St. Louis Encephalitis virus infections during the 2002 West Nile Virus epidemic in the United States. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11, 1130-1133.

[0288] Martin, D. A., Muth, D. A., Brown, T., Johnson, A. J., Karabatsos, N., and Roehrig, J. T. (2000). Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 38, 1823-1826.

[0289] Matheus, S., Deparis, X., Labeau, B., Lelarge, J., Morvan, J., and Dussart, P. (2005). Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample. *J Clin Microbiol* 43, 2793-2797.

[0290] McBride, W. J., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2, 1041-1050.

[0291] Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6986-6991.

[0292] Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S. C. (2005). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* 79, 1223-1231.

[0293] Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., et al. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9, 921-927.

[0294] Muerhoff, A. S., Jiang, L., Shah, D. O., Gutierrez, R. A., Patel, J., Garolis, C., Kyrk, C. R., Leckie, G., Frank, A., Stewart, J. L., and Dawson, G. J. (2002). Detection of HCV core antigen in human serum and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. *Transfusion* 42, 349-356.

[0295] Mukhopadhyay, S., Kim, B. S., Chipman, P. R., Rossmann, M. G., and Kuhn, R. J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science* 302, 248.

[0296] Muller, B. H., Lamoure, C., Le Du, M. H., Cattolico, L., Lajeunesse, E., Lemaitre, F., Pearson, A., Ducancel, F., Menez, A., and Boulain, J. C. (2001). Improving

Escherichia coli alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket. *Chembiochem* 2, 517–523.

[0297] Nawa, M., Yamada, K. I., Takasaki, T., Akatsuka, T., and Kurane, I. (2000). Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 774–777.

[0298] Plückthun, A. (1996). Producing antibodies in Escherichia Coli: from PCR to fermentation, In *Antibody Engineering*, J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, and D. J. Chiswell, eds. (New-York: Oxford University Press), pp. 203–252.

[0299] Prince, H. E., and Lape-Nixon, M. (2005). Evaluation of a West Nile virus immunoglobulin A capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 231–233.

[0300] Purdy, D. E., Noga, A. J., and Chang, G. J. (2004). Noninfectious recombinant antigen for detection of St. Louis encephalitis virus-specific antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 42, 4709–4717.

[0301] Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291–298.

[0302] Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16, 276–277.

[0303] Roehrig, J. T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* 59, 141–175.

[0304] Roehrig, J. T., Volpe, K. E., Squires, J., Hunt, A. R., Davis, B. S., and Chang, G. J. (2004). Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J Virol* 78, 2648–2652.

[0305] Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press).

[0306] Sanchez, M. D., Pierson, T. C., McAllister, D., Hanna, S. L., Puffer, B. A., Valentine, L. E., Murtadha, M. M., Hoxie, J. A., and Doms, R. W. (2005). Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* 336, 70–82.

[0307] Serafin, I. L., and Aaskov, J. G. (2001). Identification of epitopes on the envelope (E) protein of dengue 2 and dengue 3 viruses using monoclonal antibodies. *Arch Virol* 146, 2469–2479.

[0308] Shu, P. Y., Chen, L. K., Chang, S. F., Su, C. L., Chien, L. J., Chin, C., Lin, T. H., and Huang, J. H. (2004). Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 42, 2489–2494.

[0309] Shu, P. Y., Chen, L. K., Chang, S. F., Yueh, Y. Y., Chow, L., Chien, L. J., Chin, C., Lin, T. H., and Huang, J. H. (2003). Comparison of capture immunoglobulin M (IgM)

and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 622–630.

[0310] Shu, P. Y., Chen, L. K., Chang, S. F., Yueh, Y. Y., Chow, L., Chien, L. J., Chin, C., Yang, H. H., Lin, T. H., and Huang, J. H. (2002). Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. *J Clin Microbiol* 40, 1840–1844.

[0311] Shu, P. Y., and Huang, J. H. (2004). Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 642–650.

[0312] Simmons, M., Potter, K. R., Escamilla, J., Graham, R., Watts, D. M., Eckels, K. H., and Hayes, C. G. (1998). Evaluation of recombinant dengue viral envelope B domain protein antigens for the detection of dengue complex-specific antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 58, 144–151.

[0313] Talarmin, A., Labeau, B., Lelarge, J., and Sarthou, J. L. (1998). Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol* 36, 1189–1192.

[0314] Teles, F. R., Prazeres, D. M., and Lima-Filho, J. L. (2005). Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol* 15, 287–302.

[0315] Vieira, J., and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259–268.

[0316] Vorndam, V., and Kuno, G. (1997). Laboratory diagnosis of dengue virus infections, In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, D. J. Gubler, and G. Kuno, eds. (Cambridge: CAB International), pp. 313–333.

[0317] WHO (1997). *Dengue Haemorrhagic Fever: diagnosis, prevention, treatment and control*. Second edn (Geneva: WHO Publications).

[0318] Wu, H. C., Huang, Y. L., Chao, T. T., Jan, J. T., Huang, J. L., Chiang, H. Y., King, C. C., and Shaio, M. F. (2001). Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *J Clin Microbiol* 39, 977–982.

[0319] Yao, Z. J., Kao, M. C., Loh, K. C., and Chung, M. C. (1995). A serotype-specific epitope of dengue virus 1 identified by phage displayed random peptide library. *FEMS Microbiol Lett* 127, 93–98.

[0320] Yoshii, K., Hayasaka, D., Goto, A., Obara, M., Araki, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I. (2003). Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens expressed in mammalian cells for serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J Virol Methods* 108, 171–179.

序列表

<110> 巴斯德研究所
法国国家科学研究中心
于格·贝杜埃勒
埃洛蒂·布里安-利茨勒
菲利普·迪萨尔
菲利普·德普雷斯
利蒂希娅·布勒芒

<120> 用于诊断或筛选节肢介体病毒感染的方法、在所述方法和它们的应用中使用的试剂

<130>PFRCA0901997S

<160>31

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>1788

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 H6-ED3. DEN1-PhoA 基因的 DNA (来自 pEBL11)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1).. (63)

<220>

<221>CDS

<222> (64).. (1788)

<223> H6-ED3. DEN1-PhoA (88-105 = His 标记 ;127-444 = ED3. DEN1 ;64-81 以及
454-1788 = PhoA)

<400>1

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttaccac tgtagacaaaa 60

gcc cgg aca cca gaa atg ccc gtc gaa cat cac cat cac cat cac gac	108
Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp	
1 5 10 15	
gat gac gat aag gtc gac aaa ggg atg tca tat gtg atg tgc aca ggc	156
Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly	
20 25 30	
tca ttt aag cta gag aag gaa gtg gct gag acc cag cat ggg act gtc	204
Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val	
35 40 45	
cta gtg cag gtt aaa tac gaa gga aca gat gcg cca tgc aag atc ccc	252
Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro	
50 55 60	
ttt tcg acc caa gat gag aaa gga gtg acc cag aat ggg aga ttg ata	300
Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile	
65 70 75	
aca gcc aat ccc ata gtt act gac aaa gaa aaa cca gtc aac att gag	348
Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu	
80 85 90 95	
aca gaa cca cct ttt ggt gag agc tac atc ata gta ggg gca ggt gaa	396
Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Ile Val Gly Ala Gly Glu	
100 105 110	
aaa gct ttg aaa cta agc tgg ttc aag aag gga agc agc ata ggg aaa	444
Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys	
115 120 125	
act agt ggg gtt ctg gaa aac cgg gct gct cag ggc gat att act gca	492
Thr Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala	
130 135 140	
ccc ggc ggt gct cgc cgt tta acg ggt gat cag act gcc gct ctg cgt	540
Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg	
145 150 155	
gat tct ctt agc gat aaa cct gca aaa aat att att ttg ctg att ggc	588
Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly	
160 165 170 175	
gat ggg atg ggg gac tcg gaa att act gcc gca cgt aat tat gcc gaa	636
Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu	
180 185 190	
ggt gcg ggc ggc ttt ttt aaa ggt ata gat gcc tta ccg ctt acc ggg	684
Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly	
195 200 205	

caa tac act cac tat gcg ctg aat aaa aaa acc ggc aaa ccg gac tac	732
Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr	
210 215 220	
gtc acc gac tcg gct gca tca gca acc gcc tgg tca acc ggt gtc aaa	780
Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys	
225 230 235	
acc tat aac ggc gcg ctg ggc gtc gat att cac gaa aaa gat cac cca	828
Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro	
240 245 250 255	
acg att ctg gaa atg gca aaa gcc gca ggt ctg gcg acc ggt aac gtt	876
Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val	
260 265 270	
tct acc gca gag ttg cag ggt gcc acg ccc gct gcg ctg gtg gca cat	924
Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His	
275 280 285	
gtg acc tcg cgc aaa tgc tac ggt ccg agc gcg acc agt gaa aaa tgt	972
Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys	
290 295 300	
ccg ggt aac gct ctg gaa aaa ggc gga aaa gga tcg att acc gaa cag	1020
Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln	
305 310 315	
ctg ctt aac gct cgt gcc gac gtt acg ctt ggc ggc ggc gca aaa acc	1068
Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr	
320 325 330 335	
ttt gct gaa acg gca acc gct ggt gaa tgg cag gga aaa acg ctg cgt	1116
Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg	
340 345 350	
gaa cag gca cag gcg cgt ggt tat cag ttg gtg agc gat gct gcc tca	1164
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser	
355 360 365	
ctg aat tcg gtg acg gaa gcg aat cag caa aaa ccc ctg ctt ggc ctg	1212
Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu	
370 375 380	
ttt gct gac ggc aat atg cca gtg cgc tgg cta gga cog aaa gca acg	1260
Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr	
385 390 395	
tac cat ggc aat atc gat aag ccc gca gtc acc tgt acg cca aat ccg	1308
Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro	
400 405 410 415	

caa cgt aat gac agt gta cca acc ctg gcg cag atg acc gac aaa gcc	1356
Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala	
420 425 430	
att gaa ttg ttg agt aaa aat gag aaa ggc ttt ttc ctg caa gtt gaa	1404
Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu	
435 440 445	
ggt gcg tca atc gat aaa cag aat cat gct gcg aat cct tgt ggg caa	1452
Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln	
450 455 460	
att ggc gag acg gtc gat ctc gat gaa gcc gta caa cgg gcg ctg gaa	1500
Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu	
465 470 475	
ttc gct aaa aag gag ggt aac acg ctg gtc ata gtc acc gct gat cac	1548
Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His	
480 485 490 495	
gcc cac gcc agc cag att gtt gcg ccg gat acc aaa gct ccg ggc ctc	1596
Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu	
500 505 510	
acc cag gcg cta aat acc aaa gat ggc gca gtg atg gtg atg agt tac	1644
Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr	
515 520 525	
ggg aac tcc gaa gag gat tca caa gaa cat acc ggc agt cag ttg cgt	1692
Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg	
530 535 540	
att gcg gcg tat ggc ccg cat gcc gcc aat gtt gtt gga ctg acc gac	1740
Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp	
545 550 555	
cag acc gat ctc ttc tac acc atg aaa gcc gct ctg ggg ctg aaa taa	1788
Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys	
560 565 570	

<210>2

<211>574

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>2

```

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

```

290	295	300
Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu		
305	310	315
Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe		
325	330	335
Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu		
340	345	350
Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu		
355	360	365
Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe		
370	375	380
Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr		
385	390	395
His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln		
405	410	415
Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile		
420	425	430
Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly		
435	440	445
Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile		
450	455	460
Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe		
465	470	475
Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala		
485	490	495
His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr		
500	505	510
Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly		
515	520	525
Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile		
530	535	540
Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln		
545	550	555
Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys		
565	570	

<210>3

<211>1788

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 H6-ED3. DEN2-PhoA 基因的 DNA (来自 pEBL12)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1).. (63)

<220>

<221>CDS

<222> (64).. (1788)

<223> H6-ED3. DEN2-PhoA (88-105 = His 标记 ;127-444 = ED3. DEN2 ;64-81 以及 454-1788 = PhoA)

<400>3

```

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtgacaaaa 60
gcc cgg aca cca gaa atg ccc gtc gaa cat cac cat cac cat cac gac 108
      Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp
      1           5           10           15
gat gac gat aag gtc gac aaa gga atg tca tac tct atg tgt aca gga 156
Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly
      20           25           30
aag ttt aaa att gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata 204
Lys Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile
      35           40           45
gtt atc aga gta caa tat gaa ggg gac ggc tct cca tgt aag atc cct 252
Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro
      50           55           60
ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cac gtc tta ggt cgc ctg att 300
Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile
      65           70           75
aca gtt aac ccg atc gta aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa 348
Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu
      80           85           90           95
gca gaa cct cca ttc gga gac agc tac atc atc ata gga gta gag ccg 396
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro
      100          105          110
gga caa ttg aaa ctc aac tgg ttt aag aaa gga agt tcc atc ggc caa 444

```

Gly	Gln	Leu	Lys	Leu	Asn	Trp	Phe	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Gln	
115				120				125								
act	agt	ggg	gtt	ctg	gaa	aac	cgg	gct	gct	cag	ggc	gat	att	act	gca	492
Thr	Ser	Gly	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	
130				135				140								
ccc	ggc	ggt	gct	cgc	cgt	tta	acg	ggt	gat	cag	act	gcc	gct	ctg	cgt	540
Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	
145				150				155								
gat	tct	ctt	agc	gat	aaa	cct	gca	aaa	aat	att	att	ttg	ctg	att	ggc	588
Asp	Ser	Leu	Ser	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	
160				165				170				175				
gat	ggg	atg	ggg	gac	tcg	gaa	att	act	gcc	gca	cgt	aat	tat	gcc	gaa	636
Asp	Gly	Met	Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Tyr	Ala	Glu	
180				185				190								
ggt	gcg	ggc	ggc	ttt	ttt	aaa	ggt	ata	gat	gcc	tta	ccg	ctt	acc	ggg	684
Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	
195				200				205								
caa	tac	act	cac	tat	gcg	ctg	aat	aaa	aaa	acc	ggc	aaa	ccg	gac	tac	732
Gln	Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	
210				215				220								
gtc	acc	gac	tcg	gct	gca	tca	gca	acc	gcc	tgg	tca	acc	ggt	gtc	aaa	780
Val	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	
225				230				235								
acc	tat	aac	ggc	gcg	ctg	ggc	gtc	gat	att	cac	gaa	aaa	gat	cac	cca	828
Thr	Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	
240				245				250				255				
acg	att	ctg	gaa	atg	gca	aaa	gcc	gca	ggt	ctg	gcg	acc	ggt	aac	gtt	876
Thr	Ile	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	
260				265				270								
tct	acc	gca	gag	ttg	cag	ggt	gcc	acg	ccc	gct	gcg	ctg	gtg	gca	cat	924
Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	
275				280				285								
gtg	acc	tcg	cgc	aaa	tgc	tac	ggt	ccg	agc	gcg	acc	agt	gaa	aaa	tgt	972
Val	Thr	Ser	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	
290				295				300								
ccg	ggt	aac	gct	ctg	gaa	aaa	ggc	gga	aaa	gga	tcg	att	acc	gaa	cag	1020
Pro	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	
305				310				315								
ctg	ctt	aac	gct	cgt	gcc	gac	gtt	acg	ctt	ggc	ggc	ggc	gca	aaa	acc	1068

Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr	
3203	25
330	335
ttt gct gaa acg gca acc gct ggt gaa tgg cag gga aaa acg ctg cgt	1116
Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg	
340	345
350	
gaa cag gca cag gcg cgt ggt tat cag ttg gtg agc gat gct gcc tca	1164
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser	
355	360
365	
ctg aat tcg gtg acg gaa gcg aat cag caa aaa ccc ctg ctt ggc ctg	1212
Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu	
370	375
380	
ttt gct gac ggc aat atg cca gtg cgc tgg cta gga ccg aaa gca acg	1260
Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr	
385	390
395	
tac cat ggc aat atc gat aag ccc gca gtc acc tgt acg cca aat ccg	1308
Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro	
400	405
410	415
caa cgt aat gac agt gta cca acc ctg gcg cag atg acc gac aaa gcc	1356
Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala	
420	425
430	
att gaa ttg ttg agt aaa aat gag aaa ggc ttt ttc ctg caa gtt gaa	1404
Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu	
435	440
445	
ggt gcg tca atc gat aaa cag aat cat gct gcg aat cct tgt ggg caa	1452
Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln	
450	455
460	
att ggc gag acg gtc gat ctc gat gaa gcc gta caa cgg gcg ctg gaa	1500
Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu	
465	470
475	
ttc gct aaa aag gag ggt aac acg ctg gtc ata gtc acc gct gat cac	1548
Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His	
480	485
490	495
gcc cac gcc agc cag att gtt gcg ccg gat acc aaa gct ccg ggc ctc	1596
Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu	
500	505
510	
acc cag gcg cta aat acc aaa gat ggc gca gtg atg gtg atg agt tac	1644
Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr	
515	520
525	
ggg aac tcc gaa gag gat tca caa gaa cat acc ggc agt cag ttg cgt	1692

Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg	
530	535 540
att gcg gcg tat ggc ccg cat gcc gcc aat gtt gtt gga ctg acc gac	1740
Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp	
545	550 555
cag acc gat ctc ttc tac acc atg aaa gcc gct ctg ggg ctg aaa taa	1788
Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys	
560	565 570

<210>4

<211>574

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>4

Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp Asp	
1	5 10 15
Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys	
20	25 30
Phe Lys Ile Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val	
35	40 45
Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe	
50	55 60
Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr	
65	70 75 80
Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala	
85	90 95
Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly	
100	105 110
Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Thr	
115	120 125
Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro	
130	135 140
Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp	
145	150 155 160

Ser	Leu	Ser	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	Asp
				165				170				175			
Gly	Met	Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Tyr	Ala	Glu	Gly
				180				185				190			
Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln
				195				200				205			
Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val
				210				215				220			
Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Thr
225				230				235				240			
Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Thr
				245				250				255			
Ile	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser
				260				265				270			
Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	Val
				275				280				285			
Thr	Ser	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro
290				295				300							
Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu
305				310				315				320			
Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe
				325				330				335			
Ala	Glu	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	Glu
				340				345				350			
Gln	Ala	Gln	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu
355				360				365							
Asn	Ser	Val	Thr	Glu	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe
370				375				380							
Ala	Asp	Gly	Asn	Met	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Tyr
385				390				395				400			
His	Gly	Asn	Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Gln
				405				410				415			
Arg	Asn	Asp	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	Met	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile
				420				425				430			
Glu	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly
				435				440				445			
Ala	Ser	Ile	Asp	Lys	Gln	Asn	His	Ala	Ala	Asn	Pro	Cys	Gly	Gln	Ile
450				455				460							
Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe

465	470	475	480
Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala			
	485	490	495
His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr			
	500	505	510
Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly			
	515	520	525
Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile			
	530	535	540
Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln			
545	550	555	560
Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys			
	565	570	

<210>5

<211>1788

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 H6-ED3. DEN3. PhoA 基因的 DNA (来自 pEBL13)

<220>

<221> 信号肽

<222>(1).. (63)

<220>

<221>CDS

<222>(64).. (1788)

<223>H6-ED3. DEN3-PhoA (88-105 = His 标记 ;127-444 = ED3. DEN3 ;64-81 以及
454-1788 = PhoA)

<400>5

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtgacaaaa	60
gcc cgg aca cca gaa atg ccc gtc gaa cat cac cat cac cat cac gac	108
Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp	
1 5 10 15	
gat gac gat aag gtc gac aaa ggg atg agc tat gca atg tgc ttg aat	156
Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn	

20	25	30	
acc ttt gtg ttg aag aaa gaa gtc tcc gaa acg cag cat ggg aca ata			204
Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile			
35	40	45	
ctc att aag gtt gag tac aaa ggg gaa gat gca ccc tgc aag att cct			252
Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro			
50	55	60	
ttc tcc acg gag gat gga caa ggg aaa gct cac aat ggt aga ctg atc			300
Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile			
65	70	75	
aca gcc aac cca gtg gtg acc aag aag gag gag cct gtc aac att gag			348
Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu			
80	85	90	95
gct gaa cct cct ttt ggg gaa agt aac ata gtg att gga att gga gac			396
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp			
100	105	110	
aaa gcc ttg aaa atc aac tgg tac aag aag gga agc tcg att ggg aag			444
Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys			
115	120	125	
act agt ggg gtt ctg gaa aac cgg gct gct cag ggc gat att act gca			492
Thr Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala			
130	135	140	
ccc ggc ggt gct cgc cgt tta acg ggt gat cag act gcc gct ctg cgt			540
Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg			
145	150	155	
gat tct ctt agc gat aaa cct gca aaa aat att att ttg ctg att ggc			588
Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly			
160	165	170	175
gat ggg atg ggg gac tcg gaa att act gcc gca cgt aat tat gcc gaa			636
Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu			
180	185	190	
ggt gcg ggc ggc ttt ttt aaa ggt ata gat gcc tta ccg ctt acc ggg			684
Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly			
195	200	205	
caa tac act cac tat gcg ctg aat aaa aaa acc ggc aaa ccg gac tac			732
Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr			
210	215	220	
gtc acc gac tcg gct gca tca gca acc gcc tgg tca acc ggt gtc aaa			780
Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys			

225	230	235	
acc tat aac ggc gcg ctg ggc gtc gat att cac gaa aaa gat cac cca			828
Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro			
240	245	250	255
acg att ctg gaa atg gca aaa gcc gca ggt ctg gcg acc ggt aac gtt			876
Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val			
260	265	270	
tct acc gca gag ttg cag ggt gcc acg ccc gct gcg ctg gtg gca cat			924
Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His			
275	280	285	
gtg acc tcg cgc aaa tgc tac ggt ccg agc gcg acc agt gaa aaa tgt			972
Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys			
290	295	300	
ccg ggt aac gct ctg gaa aaa ggc gga aaa gga tcg att acc gaa cag			1020
Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln			
305	310	315	
ctg ctt aac gct cgt gcc gac gtt acg ctt ggc ggc ggc gca aaa acc			1068
Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr			
320	325	330	335
ttt gct gaa acg gca acc gct ggt gaa tgg cag gga aaa acg ctg cgt			1116
Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg			
340	345	350	
gaa cag gca cag gcg cgt ggt tat cag ttg gtg agc gat gct gcc tca			1164
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser			
355	360	365	
ctg aat tcg gtg acg gaa gcg aat cag caa aaa ccc ctg ctt ggc ctg			1212
Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu			
370	375	380	
ttt gct gac ggc aat atg cca gtg cgc tgg cta gga ccg aaa gca acg			1260
Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr			
385	390	395	
tac cat ggc aat atc gat aag ccc gca gtc acc tgt acg cca aat ccg			1308
Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro			
400	405	410	415
caa cgt aat gac agt gta cca acc ctg gcg cag atg acc gac aaa gcc			1356
Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala			
420	425	430	
att gaa ttg ttg agt aaa aat gag aaa ggc ttt ttc ctg caa gtt gaa			1404
Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu			

435	440	445	
ggt gcg tca atc gat aaa cag aat cat gct gcg aat cct tgt ggg caa			1452
Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln			
450	455	460	
att ggc gag acg gtc gat ctc gat gaa gcc gta caa cgg gcg ctg gaa			1500
Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu			
465	470	475	
ttc gct aaa aag gag ggt aac acg ctg gtc ata gtc acc gct gat cac			1548
Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His			
480	485	490	495
gcc cac gcc agc cag att gtt gcg ccg gat acc aaa gct ccg ggc ctc			1596
Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu			
500	505	510	
acc cag gcg cta aat acc aaa gat ggc gca gtg atg gtg atg agt tac			1644
Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr			
515	520	525	
ggg aac tcc gaa gag gat tca caa gaa cat acc ggc agt cag ttg cgt			1692
Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg			
530	535	540	
att gcg gcg tat ggc ccg cat gcc gcc aat gtt gtt gga ctg acc gac			1740
Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp			
545	550	555	
cag acc gat ctc ttc tac acc atg aaa gcc gct ctg ggg ctg aaa taa			1788
Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys			
560	565	570	

<210>6

<211>574

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>6

Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp Asp
1 5 10 15
Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr

				20				25				30			
Phe	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Gln	His	Gly	Thr	Ile	Leu
35				40				45							
Ile	Lys	Val	Glu	Tyr	Lys	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	Cys	Lys	Ile	Pro	Phe
50				55				60							
Ser	Thr	Glu	Asp	Gly	Gln	Gly	Lys	Ala	His	Asn	Gly	Arg	Leu	Ile	Thr
65				70				75				80			
Ala	Asn	Pro	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Glu	Glu	Pro	Val	Asn	Ile	Glu	Ala
85				90				95							
Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Glu	Ser	Asn	Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Lys
100				105				110							
Ala	Leu	Lys	Ile	Asn	Trp	Tyr	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser	Ile	Gly	Lys	Thr
115				120				125							
Ser	Gly	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	Pro
130				135				140							
Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp
145				150				155				160			
Ser	Leu	Ser	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	Asp
165				170				175							
Gly	Met	Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Tyr	Ala	Glu	Gly
180				185				190							
Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln
195				200				205							
Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val
210				215				220							
Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Thr
225				230				235				240			
Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	His	Pro	Thr
245				250				255							
Ile	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser
260				265				270							
Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	His	Val
275				280				285							
Thr	Ser	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro
290				295				300							
Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu
305				310				315				320			
Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe
325				330				335							

Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu		
340	345	350
Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu		
355	360	365
Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe		
370	375	380
Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr		
385	390	395
His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln		
405	410	415
Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile		
420	425	430
Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly		
435	440	445
Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile		
450	455	460
Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe		
465	470	475
Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala		
485	490	495
His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr		
500	505	510
Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly		
515	520	525
Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile		
530	535	540
Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln		
545	550	555
Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys		
565	570	

<210>7

<211>1788

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 H6-ED3. DEN4-PhoA 基因的 DNA (来自 pEBL14)

<220>

<221> 信号肽

<222>(1).. (63)

<220>

<221>CDS

<222>(64).. (1788)

<223>H6-ED3. DEN4-PhoA(88-105 = His 标记 ;127-444 = ED3. DEN4 ;64-81 以及
454-1788 = PhoA)

<400>7

```

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtgacaaaa 60
gcc cgg aca cca gaa atg ccc gtc gaa cat cac cat cac cat cac gac 108
    Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp
      1          5          10          15
gat gac gat aag gtc gac aaa gga atg tca tac acg atg tgc tca gga 156
Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly
      20          25          30
aag ttc tca att gat aaa gag atg gca gaa aca cag cat ggg aca aca 204
Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr
      35          40          45
gtg gtg aaa gtc aag tat gag ggt gct gga gct cca tgt aaa gtt ccc 252
Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro
      50          55          60
ata gag ata aga gat gtg aac aag gaa aaa gtg gtt ggg cgt atc atc 300
Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile
      65          70          75
tca tct acc cct ttt gct gag aat acc aat agt gtg acc aat ata gaa 348
Ser Ser Thr Pro Phe Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
      80          85          90          95
ttg gaa ccc cct ttt ggg gat agc tac ata gta ata ggt gta gga gac 396
Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp
      100          105          110
agt gca tta aca ctc cat tgg ttc agg aaa ggg agt tcc att ggc aag 444
Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
      115          120          125
act agt ggg gtt ctg gaa aac cgg gct gct cag ggc gat att act gca 492
Thr Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala
      130          135          140

```

ccc ggc ggt gct cgc cgt tta acg ggt gat cag act gcc gct ctg cgt	540
Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg	
145 150 155	
gat tct ctt agc gat aaa cct gca aaa aat att att ttg ctg att ggc	588
Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly	
160 165 170 175	
gat ggg atg ggg gac tcg gaa att act gcc gca cgt aat tat gcc gaa	636
Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu	
180 185 190	
ggt gcg ggc ggc ttt ttt aaa ggt ata gat gcc tta ccg ctt acc ggc	684
Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly	
195 200 205	
caa tac act cac tat gcg ctg aat aaa aaa acc ggc aaa ccg gac tac	732
Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr	
210 215 220	
gtc acc gac tcg gct gca tca gca acc gcc tgg tca acc ggt gtc aaa	780
Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys	
225 230 235	
acc tat aac ggc gcg ctg ggc gtc gat att cac gaa aaa gat cac cca	828
Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro	
240 245 250 255	
acg att ctg gaa atg gca aaa gcc gca ggt ctg gcg acc ggt aac gtt	876
Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val	
260 265 270	
tct acc gca gag ttg cag ggt gcc acg ccc gct gcg ctg gtg gca cat	924
Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His	
275 280 285	
gtg acc tcg cgc aaa tgc tac ggt ccg agc gcg acc agt gaa aaa tgt	972
Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys	
290 295 300	
ccg ggt aac gct ctg gaa aaa ggc gga aaa gga tcg att acc gaa cag	1020
Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln	
305 310 315	
ctg ctt aac gct cgt gcc gac gtt acg ctt ggc ggc ggc gca aaa acc	1068
Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr	
320 325 330 335	
ttt gct gaa acg gca acc gct ggt gaa tgg cag gga aaa acg ctg cgt	1116
Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg	
340 345 350	

gaa cag gca cag gcg cgt ggt tat cag ttg gtg agc gat gct gcc tca	1164
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser	
355 360 365	
ctg aat tcg gtg acg gaa gcg aat cag caa aaa ccc ctg ctt ggc ctg	1212
Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu	
370 375 380	
ttt gct gac ggc aat atg cca gtg cgc tgg cta gga ccg aaa gca acg	1260
Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr	
385 390 395	
tac cat ggc aat atc gat aag ccc gca gtc acc tgt acg cca aat ccg	1308
Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro	
400 405 410 415	
caa cgt aat gac agt gta cca acc ctg gcg cag atg acc gac aaa gcc	1356
Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala	
420 425 430	
att gaa ttg ttg agt aaa aat gag aaa ggc ttt ttc ctg caa gtt gaa	1404
Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu	
435 440 445	
ggt gcg tca atc gat aaa cag aat cat gct gcg aat cct tgt ggg caa	1452
Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln	
450 455 460	
att ggc gag acg gtc gat ctc gat gaa gcc gta caa cgg gcg ctg gaa	1500
Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu	
465 470 475	
ttc gct aaa aag gag ggt aac acg ctg gtc ata gtc acc gct gat cac	1548
Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His	
480 485 490 495	
gcc cac gcc agc cag att gtt gcg ccg gat acc aaa gct ccg ggc ctc	1596
Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu	
500 505 510	
acc cag gcg cta aat acc aaa gat ggc gca gtg atg gtg atg agt tac	1644
Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr	
515 520 525	
ggg aac tcc gaa gag gat tca caa gaa cat acc ggc agt cag ttg cgt	1692
Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg	
530 535 540	
att gcg gcg tat ggc ccg cat gcc gcc aat gtt gtt gga ctg acc gac	1740
Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp	
545 550 555	

cag acc gat ctc ttc tac acc atg aaa gcc gct ctg ggg ctg aaa taa 1788
 Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys
 560 565 570

<210>8

<211>574

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>8

Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp Asp
 1 5 10 15
 Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys
 20 25 30
 Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr Val
 35 40 45
 Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile
 50 55 60
 Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr Pro Phe Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu
 85 90 95
 Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Ser
 100 105 110
 Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys Thr
 115 120 125
 Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro
 130 135 140
 Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg Asp
 145 150 155 160
 Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp
 165 170 175
 Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly
 180 185 190
 Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln
 195 200 205

Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val			
210	215	220	
Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr			
225	230	235	240
Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr			
	245	250	255
Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser			
	260	265	270
Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val			
	275	280	285
Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro			
	290	295	300
Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu			
305	310	315	320
Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe			
	325	330	335
Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu			
	340	345	350
Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu			
	355	360	365
Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe			
	370	375	380
Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr			
385	390	395	400
His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln			
	405	410	415
Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile			
	420	425	430
Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly			
	435	440	445
Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile			
	450	455	460
Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe			
465	470	475	480
Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala			
	485	490	495
His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr			
	500	505	510
Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly			

515	520	525
Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile		
530	535	540
Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln		
545	550	555
Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys		
565	570	

<210>9

<211>1797

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 H6-ED3. WN-PhoA 基因的 DNA (来自 pEBL15

<220>

<221> 信号肽

<222>(1).. (63)

<220>

<221>CDS

<222>(64).. (1797)

<223>H6-ED3. WN-PhoA (88-105 = His 标记 ;127-453 = ED3. WN ;64-81 以及 463-1797 = PhoA)

<400>9

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtgacaaaa	60
gcc cgg aca cca gaa atg ccc gtc gaa cat cac cat cac cat cac gac	108
Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp	
1 5 10 15	
gat gac gat aag gtc gac aaa gga aca acc tat ggc gtc tgt tca aag	156
Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys	
20 25 30	
gct ttc aag ttt ctt ggg act ccc gca gac aca ggt cac ggc act gtg	204
Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val	
35 40 45	
gtg ttg gaa ttg cag tac act ggc acg gat gga cct tgc aaa gtt cct	252
Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro	

50	55	60	
atc tcg tca gtg gct tca ttg aac gac cta acg cca gtg ggc aga ttg			300
Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu			
65	70	75	
gtc act gtc aac cct ttt gtt tca gtg gcc acg gcc aac gct aag gtc			348
Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val			
80	85	90	95
ctg att gaa ttg gaa cca ccc ttt gga gac tca tac ata gtg gtg ggc			396
Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly			
100	105	110	
aga gga gaa caa cag att aat cac cat tgg cac aag tct ggt agc agc			444
Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser			
115	120	125	
att ggc aaa act agt ggg gtt ctg gaa aac cgg gct gct cag ggc gat			492
Ile Gly Lys Thr Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp			
130	135	140	
att act gca ccc ggc ggt gct cgc cgt tta acg ggt gat cag act gcc			540
Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala			
145	150	155	
gct ctg cgt gat tct ctt agc gat aaa cct gca aaa aat att att ttg			588
Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu			
160	165	170	175
ctg att ggc gat ggg atg ggg gac tcg gaa att act gcc gca cgt aat			636
Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn			
180	185	190	
tat gcc gaa ggt gcg ggc ggc ttt ttt aaa ggt ata gat gcc tta ccg			684
Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro			
195	200	205	
ctt acc ggg caa tac act cac tat gcg ctg aat aaa aaa acc ggc aaa			732
Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys			
210	215	220	
ccg gac tac gtc acc gac tcg gct gca tca gca acc gcc tgg tca acc			780
Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr			
225	230	235	
ggt gtc aaa acc tat aac ggc gcg ctg ggc gtc gat att cac gaa aaa			828
Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys			
240	245	250	255
gat cac cca acg att ctg gaa atg gca aaa gcc gca ggt ctg gcg acc			876
Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr			

260	265	270	
ggt aac gtt tct acc gca gag ttg cag ggt gcc acg ccc gct gcg ctg			924
Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu			
275	280	285	
gtg gca cat gtg acc tcg cgc aaa tgc tac ggt ccg agc gcg acc agt			972
Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser			
290	295	300	
gaa aaa tgt ccg ggt aac gct ctg gaa aaa ggc gga aaa gga tcg att			1020
Glu Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile			
305	310	315	
acc gaa cag ctg ctt aac gct cgt gcc gac gtt acg ctt ggc ggc ggc			1068
Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly			
320	325	330	335
gca aaa acc ttt gct gaa acg gca acc gct ggt gaa tgg cag gga aaa			1116
Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys			
340	345	350	
acg ctg cgt gaa cag gca cag gcg cgt ggt tat cag ttg gtg agc gat			1164
Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp			
355	360	365	
gct gcc tca ctg aat tcg gtg acg gaa gcg aat cag caa aaa ccc ctg			1212
Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu			
370	375	380	
ctt ggc ctg ttt gct gac ggc aat atg cca gtg cgc tgg cta gga ccg			1260
Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro			
385	390	395	
aaa gca acg tac cat ggc aat atc gat aag ccc gca gtc acc tgt acg			1308
Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr			
400	405	410	415
cca aat ccg caa cgt aat gac agt gta cca acc ctg gcg cag atg acc			1356
Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr			
420	425	430	
gac aaa gcc att gaa ttg ttg agt aaa aat gag aaa ggc ttt ttc ctg			1404
Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu			
435	440	445	
caa gtt gaa ggt gcg tca atc gat aaa cag aat cat gct gcg aat cct			1452
Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro			
450	455	460	
tgt ggg caa att ggc gag acg gtc gat ctc gat gaa gcc gta caa cgg			1500
Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg			

465	470	475	
gcg ctg gaa ttc gct aaa aag gag ggt aac acg ctg gtc ata gtc acc			1548
Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr			
480	485	490	495
gct gat cac gcc cac gcc agc cag att gtt gcg ccg gat acc aaa gct			1596
Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala			
500	505	510	
ccg ggc ctc acc cag gcg cta aat acc aaa gat ggc gca gtg atg gtg			1644
Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val			
515	520	525	
atg agt tac ggg aac tcc gaa gag gat tca caa gaa cat acc ggc agt			1692
Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser			
530	535	540	
cag ttg cgt att gcg gcg tat ggc ccg cat gcc gcc aat gtt gtt gga			1740
Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly			
545	550	555	
ctg acc gac cag acc gat ctc ttc tac acc atg aaa gcc gct ctg ggg			1788
Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly			
560	565	570	575
ctg aaa taa			1797
Leu Lys			

<210>10

<211>577

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>10

Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp Asp			
1	5	10	15
Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ser Lys Ala			
20	25	30	
Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val			
35	40	45	
Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ile			

50	55	60
Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val		
65	70	75
Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala Lys Val Leu		
85	90	95
Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg		
100	105	110
Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile		
115	120	125
Gly Lys Thr Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile		
130	135	140
Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala		
145	150	155
Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu		
165	170	175
Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr		
180	185	190
Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu		
195	200	205
Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro		
210	215	220
Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly		
225	230	235
Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp		
245	250	255
His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly		
260	265	270
Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val		
275	280	285
Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu		
290	295	300
Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr		
305	310	315
Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala		
325	330	335
Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr		
340	345	350
Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala		
355	360	365

Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu
370 375 380
Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys
385 390 395 400
Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro
405 410 415
Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp
420 425 430
Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln
435 440 445
Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys
450 455 460
Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala
465 470 475 480
Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala
485 490 495
Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro
500 505 510
Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met
515 520 525
Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln
530 535 540
Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu
545 550 555 560
Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu
565 570 575
Lys

<210>11

<211>1788

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 H6-ED3. YF-PhoA 基因的 DNA (来自 pEBL17)

<220>

<221> 信号肽

<222>(1).. (63)

<220>

<221>CDS

<222>(64).. (1788)

<223>H6-ED3. YF-PhoA(88-105 = His 标记;127-444 = ED3. YF;64-81 以及
454-1788 = PhoA)

<400>11

```

gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgttac tgtttacccc tgtgacaaaa 60
gcc cgg aca cca gaa atg ccc gtc gaa cat cac cat cac cat cac gac 108
    Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His His His His Asp
      1          5          10          15
gat gac gat aag gtc gac aaa ggg aca tcc tac aaa ata tgc act gac 156
Asp Asp Asp Lys Val Asp Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp
      20          25          30
aaa atg ttt ttt gtc aag aac cca act gac act ggt cat ggc act gtt 204
Lys Met Phe Phe Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val
      35          40          45
gtg atg cag gtg aaa gtg tca aaa gga gcc ccc tgc agg att cca gtg 252
Val Met Gln Val Lys Val Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val
      50          55          60
ata gta gct gat gat ctt aca gcg gca atc aat aaa ggc att ttg gtt 300
Ile Val Ala Asp Asp Leu Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val
      65          70          75
aca gtt aac ccc atc gcc tca acc aat gat gat gaa gtg ctg att gag 348
Thr Val Asn Pro Ile Ala Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu
      80          85          90          95
gtg aac cca cct ttt gga gac agc tac att atc gtt ggg aga gga gat 396
Val Asn Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp
      100          105          110
tca cgt ctc act tac cag tgg cac aaa gag gga agc tca ata gga aag 444
Ser Arg Leu Thr Tyr Gln Trp His Lys Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys
      115          120          125
act agt ggg gtt ctg gaa aac cgg gct gct cag ggc gat att act gca 492
Thr Ser Gly Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala
      130          135          140
ccc ggc ggt gct cgc cgt tta acg ggt gat cag act gcc gct ctg cgt 540
Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala Ala Leu Arg
      145          150          155

```

gat tct ctt agc gat aaa cct gca aaa aat att att ttg ctg att ggc	588
Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly	
160 165 170 175	
gat ggg atg ggg gac tcg gaa att act gcc gca cgt aat tat gcc gaa	636
Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu	
180 185 190	
ggt gcg ggc ggc ttt ttt aaa ggt ata gat gcc tta ccg ctt acc ggg	684
Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly	
195 200 205	
caa tac act cac tat gcg ctg aat aaa aaa acc ggc aaa ccg gac tac	732
Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr	
210 215 220	
gtc acc gac tcg gct gca tca gca acc gcc tgg tca acc ggt gtc aaa	780
Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys	
225 230 235	
acc tat aac ggc gcg ctg ggc gtc gat att cac gaa aaa gat cac cca	828
Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro	
240 245 250 255	
acg att ctg gaa atg gca aaa gcc gca ggt ctg gcg acc ggt aac gtt	876
Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val	
260 265 270	
tct acc gca gag ttg cag ggt gcc acg ccc gct gcg ctg gtg gca cat	924
Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His	
275 280 285	
gtg acc tcg cgc aaa tgc tac ggt ccg agc gcg acc agt gaa aaa tgt	972
Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys	
290 295 300	
ccg ggt aac gct ctg gaa aaa ggc gga aaa gga tcg att acc gaa cag	1020
Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln	
305 310 315	
ctg ctt aac gct cgt gcc gac gtt acg ctt ggc ggc ggc gca aaa acc	1068
Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr	
320 325 330 335	
ttt gct gaa acg gca acc gct ggt gaa tgg cag gga aaa acg ctg cgt	1116
Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg	
340 345 350	
gaa cag gca cag gcg cgt ggt tat cag ttg gtg agc gat gct gcc tca	1164
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser	
355 360 365	

ctg aat tcg gtg acg gaa gcg aat cag caa aaa ccc ctg ctt ggc ctg	1212
Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu	
370 375 380	
ttt gct gac ggc aat atg cca gtg cgc tgg cta gga ccg aaa gca acg	1260
Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr	
385 390 395	
tac cat ggc aat atc gat aag ccc gca gtc acc tgt acg cca aat ccg	1308
Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro	
400 405 410 415	
caa cgt aat gac agt gta cca acc ctg gcg cag atg acc gac aaa gcc	1356
Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala	
420 425 430	
att gaa ttg ttg agt aaa aat gag aaa ggc ttt ttc ctg caa gtt gaa	1404
Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu	
435 440 445	
ggt gcg tca atc gat aaa cag aat cat gct gcg aat cct tgt ggg caa	1452
Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln	
450 455 460	
att ggc gag acg gtc gat ctc gat gaa gcc gta caa cgg gcg ctg gaa	1500
Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu	
465 470 475	
ttc gct aaa aag gag ggt aac acg ctg gtc ata gtc acc gct gat cac	1548
Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His	
480 485 490 495	
gcc cac gcc agc cag att gtt gcg ccg gat acc aaa gct ccg ggc ctc	1596
Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu	
500 505 510	
acc cag gcg cta aat acc aaa gat ggc gca gtg atg gtg atg agt tac	1644
Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr	
515 520 525	
ggg aac tcc gaa gag gat tca caa gaa cat acc ggc agt cag ttg cgt	1692
Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg	
530 535 540	
att gcg gcg tat ggc ccg cat gcc gcc aat gtt gtt gga ctg acc gac	1740
Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp	
545 550 555	
cag acc gat ctc ttc tac acc atg aaa gcc gct ctg ggg ctg aaa taa	1788
Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys	
560 565 570	

<210>12

<211>574

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>12

```

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

```

Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr			
225	230	235	240
Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr			
	245	250	255
Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser			
	260	265	270
Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val			
	275	280	285
Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro			
	290	295	300
Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu			
305	310	315	320
Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe			
	325	330	335
Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu			
	340	345	350
Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu			
	355	360	365
Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe			
	370	375	380
Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr			
385	390	395	400
His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln			
	405	410	415
Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile			
	420	425	430
Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly			
	435	440	445
Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln Ile			
	450	455	460
Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu Glu Phe			
465	470	475	480
Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala Asp His Ala			
	485	490	495
His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly Leu Thr			
	500	505	510
Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr Gly			
	515	520	525
Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile			

530	535	540	
Ala Ala Tyr Gly Pro His	Ala Ala Asn Val Val	Gly Leu Thr Asp Gln	
545	550	555	560
Thr Asp Leu Phe Tyr Thr	Met Lys Ala Ala Leu	Gly Leu Lys	
565	570		

<210>13

<211>7727

<212>DNA

<213> 质粒 pEBL1

<220>

<221>misc_feature

<222>(1732).. (2976)

<223> 卡那霉素抗性盒 (来自 pUC4K) (antisens)

<400>13

```

aggccctttc gtcttcaaga attcgacacc atcgaatggt gcaaaacctt tcgcggtatg 60
gcatgatagc gcccgaaga gagtcaattc aggggtggtga atgtgaaacc agtaacgtta 120
tacgatgtcg cagagtatgc cgggtgtctct tatcagaccg tttcccgcgt ggtgaaccag 180
gccagccacg tttctgcgaa aacgcgggaa aaagtggaag cggcgatggc ggagctgaat 240
tacattccca accgcgtggc acaacaactg gcgggcaaac agtcgttgct gattggcggt 300
gccacctcca gtctggccct gcacgcgcgcg tcgcaaattg tcgcggcgat taaatctcgc 360
gccgatcaac tgggtgccag cgtggtggtg tcgatggtag aacgaagcgg cgtcgaagcc 420
tgtaaagcgg cgggtgcaca tcttctcgcg caacgcgtca gtgggctgat cattaactat 480
ccgctggatg accaggatgc cattgtctgt gaagctgcct gcactaatgt tccggcggtta 540
tttcttgatg tctctgacca gacaccatc aacagtatta ttttctccca tgaagacggt 600
acgcgactgg gcgtggagca tctggtegca ttgggtcacc agcaaatcgc gctgttagcg 660
ggcccattaa gttctgtctc ggcgcgctct cgtctggctg gctggcataa atatctcact 720
cgcaatcaaa ttcagccgat agcgggaacgg gaaggcgact ggagtccat gtccggtttt 780
caacaaacca tgcaaatgct gaatgagggc atcgttccca ctgcgatgct ggttgccaac 840
gatcagatgg cgctgggcgc aatgcgcgcc attaccgagt ccgggctgcg cgttggtgcg 900
gatattctcg tagtgggata cgacgatacc gaagacagct catgttatat cccgccgtca 960
accaccatca aacaggattt tcgcctgctg gggcaaacca gcgtggaccg cttgctgcaa 1020
ctctctcagg gccaggcggg gaagggcaat cagctgttgc ccgtctcact ggtgaaaaga 1080
aaaaccacce tggcgccccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttgge cgattcatta 1140
atgcagctgg cacgacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgaattct ggcgaaacct 1200
ctgaccagcc agaaaacgac ctttctgtgg tgaaaccgga tgctgcaatt cagagcgcca 1260
gcaagtgggg gacagcagaa gacctgaccg ccgcagagtg gatgtttgac atggtgaaga 1320

```

ctatcgcacc atcagccaga aaaccgaatt ttgctgggtg ggctaacgat atccgcctga	1380
tgcgtgaacg tgacggacgt aaccaccgcg acatgtgtgt gctgttccgc tgggcatgcc	1440
aggacaactt ctggtccggt aacgtgctga gcccggccaa gcttactccc catccccctg	1500
ttgacaatta atcatcggtt cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	1560
caggaaacag gataccttta tgtatttgta catggagaaa ataaagtga acaaagcact	1620
attgcactgg cactcttacc gttactgttt acccctgtga caaaagccccg gacaccagaa	1680
atgcccgtcg aacatcacca tcaccatcac gacgatgacg ataaggctga cctgcagggg	1740
ggggggggaa agccacgttg tgtctcaaaa tctctgatgt tacattgcac aagataaaaa	1800
tatatcatca tgaacaataa aactgtctgc ttacataaac agtaatacaa ggggtgttat	1860
gagccatatt caacgggaaa cgtcttgctc gaggccgcga ttaaattcca acatggatgc	1920
tgattttatat ggggtataaat gggctcgcga taatgtcggg caatcagggtg cgacaatcta	1980
tcgattgtat gggaagcccc atgcgccaga gttgtttctg aaacatggca aaggtagcgt	2040
tgccaatgat gttacagatg agatggctcag actaaactgg ctgacggaat ttatgcctct	2100
tccgaccatc aagcatttta tccgtactcc tgatgatgca tggttactca ccactgcgat	2160
ccccgggaaa acagcattcc aggtattaga agaatacct gattcagggtg aaaatatgtt	2220
tgatgcgctg gcagtgttcc tgcgccggtt gcattcgatt cctgtttgta attgtccttt	2280
taacagcgat cgcgtatttc gtctcgctca ggcgcaatca cgaatgaata acggtttggt	2340
tgatgcgagt gattttgatg acgagcgtaa tgggtggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa	2400
atgcataagc ttttgccatt ctacaccgat tcagtcgtca ctcatggtga tttctcactt	2460
gataacctta tttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttg acgagtcgga	2520
atgcagacc gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct	2580
tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg	2640
cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc taatcagaat tggttaattg gttgtaacac	2700
tggcagagca ttacgtgac ttgacgggac ggcggctttg ttgaataaat cgaacttttg	2760
ctgagttgaa ggatcagatc acgcattctc ccgacaacgc agaccgttcc gtggcaaagc	2820
aaaagttcaa aatcaccaac tggtcacact acaacaaagc tctcatcaac cgtggctccc	2880
tcactttctg gctggatgat ggggcgattc aggcctggta tgagtcagca acaccttctt	2940
cacgagcgag acctcagcgc ccccccccc ctgcaggctg acgagctccc ggggttctgg	3000
aaaaccgggc tgctcagggc gatattactg cacccgcggt tgctcgccgt ttaacgggtg	3060
atcagactgc cgctctgcgt gattctctta gcgataaacc tgcaaaaaat attattttgc	3120
tgattggcga tgggatgggg gactcggaaa ttactgccgc acgtaattat gccgaagggtg	3180
cgggcggctt ttttaaaggt atagatgcct taccgcttac cgggcaatac actcactatg	3240
cgctgaataa aaaaaccggc aaaccggact acgtcaccca ctcggtgca tcagcaaccg	3300
cctggtcaac cgggtgtcaaa acctataacg gcgcgctggg cgctcgatatt cacgaaaaag	3360
atcacccaac gattctggaa atggcaaaag ccgcaggctt ggccgaccggt aacgtttcta	3420
ccgcagagtt gcagggtgcc acgcccgtg cgctggtggc acatgtgacc tcgcgcaaat	3480
gctacggtcc gagegcgacc agtgaaaaat gtccgggtaa cgctctggaa aaaggcggaa	3540
aaggatcgat taccgaacag ctgcttaacg ctctgtccga cgttacgctt ggccggcgcg	3600
caaaaacctt tgctgaaacg gcaaccgctg gtgaatggca gggaaaaacg ctgcgtgaac	3660

aggcacaggc	gcgtgggttat	cagttgggtga	gcgatgctgc	ctcactgaat	tcggtgacgg	3720
aagcgaatca	gcaaaaaccc	ctgcttggcc	tgtttgctga	cggcaatatg	ccagtgcgct	3780
ggctaggacc	gaaagcaacg	taccatggca	atatcgataa	gcccgcagtc	acctgtacgc	3840
caaatccgca	acgtaatgac	agtgtacca	ccctggcgca	gatgaccgac	aaagccattg	3900
aattgttgag	taaaaatgag	aaaggctttt	tcctgcaagt	tgaagggtgcg	tcaatcgata	3960
aacagaatca	tgctgcgaat	ccttgtgggc	aaattggcga	gacggtcgat	ctcgatgaag	4020
ccgtacaacg	ggcgctggaa	ttcgctaaaa	aggagggtaa	cacgctggtc	atagtcaccg	4080
ctgatcacgc	ccacgccagc	cagattgttg	cgccggatac	caaagctccg	ggcctcaccc	4140
aggcgctaaa	taccaaagat	ggcgccagtga	tggtgatgag	ttacgggaac	tccgaagagg	4200
attcacaaga	acataccggc	agtcagttgc	gtattgcggc	gtatggcccc	catgccgcca	4260
atgttgttgg	actgaccgac	cagaccgate	tcttctacac	catgaaagcc	gctctggggc	4320
tgaataaaaa	ccgcgccccg	cagtgaattt	tcgctgccgg	gtggtttttt	tgctgttagc	4380
aaccgacttt	aatggcagat	cacgggcgca	tacgctcatg	gttaaaacat	gaagagggat	4440
ggtgctatga	aaataacatt	actggttacc	ttgcttttcg	gtctggtttt	tttaaccacc	4500
gtcggcgctg	ccgagagaac	tttaacccca	caacaacagc	gtatgacctc	ctgtaatcag	4560
caggcgacgg	cgcaggcggt	gaaaggggat	gctcgtaaga	cctacatgag	tgattgcctg	4620
aagaacagca	agtctgcgcc	tggcgaaaaa	agtttgacgc	cacagcagca	aaagatgcgc	4680
gaatgcaata	atcaagcaac	acaacaatct	ctgaaagggtg	atgatcgtaa	taagtttatg	4740
agtgccctgcc	tcaagaaagc	cgctgatac	ctgatagtgc	taacgggtga	gctacgaaaa	4800
tggctcaccc	gaaatatcat	acttctgcct	ttagctccgt	ctctataatt	tgggaaaatt	4860
gtttctgaat	gttcccaaaa	ataatgaatg	atgaaaactt	tttcaaaaaa	gcggcggcgc	4920
acggggagga	acctccttta	actcctcaaa	acgaacatca	gcggctccggg	ctgcgcttcg	4980
cccgtcgcgt	cagactaccc	cgtgcggttg	gcctggctgg	catgtttctta	ccgattgctt	5040
caacgctggt	ttcacacccg	ccgcggggct	ggtggtggct	ggtgttggtc	ggctgggcgt	5100
tcgtctggcc	gcatttagcc	tggcagatag	cgagcagggc	cgtcgatccg	cttagccggg	5160
aaattttacaa	cttaaaaacc	gatgcagtat	tagcgggaat	gtgggtaggc	gtaatgggcg	5220
taaacgtgct	gccttccacc	gcgatgttga	tgattatgtg	tctgaatttg	atgggggcag	5280
gcggcccccg	tctgtttgtc	gcgggtctgg	tgttgatggt	ggtttcctgc	ctgttcaccc	5340
tcgagcaaga	cgtttcccg	tgaatatggc	tcataacacc	ccttgtatta	ctgtttatgt	5400
aagcagacag	ttttattgtt	catgatgata	tatttttatc	ttgtgcaatg	taacatcaga	5460
gattttgaga	cacaacgtgg	ctttgttgaa	taaatcgaac	ttttgctgag	ttgaaggatc	5520
agatcacgca	tcttcccgac	aacgcagacc	gttccgtggc	aaagcaaaaag	ttcaaaaatca	5580
ccaactggte	cacctacaac	aaagctctca	tcaaccgtgg	ctccctcact	ttctggctgg	5640
atgatggggc	gattcaggcc	tggatatgagt	cagcaacacc	ttcttcacga	ggcagacctc	5700
agcgctagcg	gagtgtatac	tggcttacta	tgttggcact	gatgagggtg	tcagtgaagt	5760
gcttcattgtg	gcaggagaaa	aaaggctgca	ccggtgcgtc	agcagaatat	gtgatacagg	5820
atatattccg	cttccctcgct	cactgactcg	ctacgctcgg	tcgttcgact	gcggcgagcg	5880
gaaatggctt	acgaacgggg	cggagatttc	ctggaagatg	ccaggaagat	acttaacagg	5940
gaagtgagag	ggccgcggca	aagccgtttt	tccataggct	ccgccccctt	gacaagcatc	6000

acgaaatctg acgctcaa	at cagtgg	tggc gaaacccgac	aggactataa	agataaccagg	6060
cgtttccccc	tggcggtcc	ctcgtgcgt	ctcctgttcc	tgcctttcgg	6120
tcattccgct	gttatggccg	cgtttgtctc	attccacgcc	tgacactcag	6180
gcagttcgct	ccaagctgga	ctgtatgcac	gaaccccccg	ttcagtcga	6240
ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	ccggaaagac	atgcaaaagc	6300
gcagccactg	gtaattgatt	tagaggagtt	agtcttgaag	tcatgcgccg	6360
aactgaaagg	acaagttttg	gtgactgcgc	tcctccaagc	cagttacctc	6420
gttggtagct	cagagaacct	tcgaaaaacc	gccctgcaag	gcggtttttt	6480
gcaagagatt	acgcgcagac	caaaacgac	tcaagaagat	catcttatta	6540
cgctcagttg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	atgagattat	6600
cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	aagtttttaa	tcaatctaaa	6660
gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	6720
tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgtcgtg	tagataacta	6780
gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgcga	gacccacgct	6840
agattttatca	gcaataaacc	agccagccgg	aagggccgag	cgcagaagtg	6900
tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	ttgccgggaa	gctagagtaa	6960
agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	tgctgcaggc	atcgtgggtg	7020
gttttggtatg	gcttcattca	gtcccggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	7080
catgtttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	cggctcctccg	atcgttgtca	7140
ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	agcactgcat	aattctctta	7200
atccgtaaga	tgcttttctg	tgactgggtga	gtactcaacc	aagtcattct	7260
tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	gtcaacacgg	gataataaccg	7320
cagaacttta	aaagtgtctca	tcattggaaa	acgttcttcg	gggcgaaaac	7380
cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	accactcgt	gcacccaact	7440
atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	agcaaaaaca	ggaaggcaaa	7500
aaagggaata	aggcgacac	ggaaatgttg	aatactcata	ctcttccttt	7560
ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	gagcggatac	atatttgaat	7620
aaataaacia	ataggggttc	cgcgcacatt	tccccgaaaa	gtgccacctg	7680
aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	aaataggcgt	atgcacg	7727

<210>14

<211>39

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>14

gccggcggtc gacaaaggga tgtcatatgt gatgtgcac

39

<210>15

<211>35

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>15

gttttagtact agtttttcct atgctgcttc ccttc

35

<210>16

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>16

gccggcggtc gacaaaggaa caacctatgg cgtctg

36

<210>17

<211>35

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>17

ggtgagtact agttttgcca atgctgctac cagac

35

<210>18

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>18

g c a c t g g c a c t c t t a c c g t t a c
22

<210>19

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>19

c a g t c t g a t c a c c c g t t a a a c
21

<210>20

<211>126

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>SEQ ID NO:13 的片段

<220>

<221>CDS

<222>(1)..(126)

<223>1-63 = 信号肽 ;64-81 = 成熟 PhoA ;88-105 = His 标记

<400>20

gtg	aaa	caa	agc	act	att	gca	ctg	gca	ctc	tta	ccg	tta	ctg	ttt	acc	48
Val	Lys	Gln	Ser	Thr	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Phe	Thr	
1				5						10					15	
cct	gtg	aca	aaa	gcc	cgg	aca	cca	gaa	atg	ccc	gtc	gaa	cat	cac	cat	96
Pro	Val	Thr	Lys	Ala	Arg	Thr	Pro	Glu	Met	Pro	Val	Glu	His	His	His	
				20						25					30	

cac cat cac gac gat gac gat aag gtc gac 126
His His His Asp Asp Asp Asp Lys Val Asp
35 40

<210>21

<211>42

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>21

Val Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15
Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Glu His His His
20 25 30
His His His Asp Asp Asp Asp Lys Val Asp
35 40

<210>22

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自 SEQ ID NO:13 的片段

<220>

<221>CDS

<222>(3)..(32)

<223>18-32 = PhoA

<400>22

gt cga cga gct ccc ggg gtt ctg gaa aac cgg 32
Arg Arg Ala Pro Gly Val Leu Glu Asn Arg
1 5 10

<210>23

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>23

Arg Arg Ala Pro Gly Val Leu Glu Asn Arg

1 5 10

<210>24

<211>450

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>PhoA(D153G, D330N- 根据入藏登录号 1KH7A 相关结构编号)

<400>24

Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn Arg Ala Ala Gln Gly Asp

1 5 10 15

Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr Gly Asp Gln Thr Ala

20 25 30

Ala Leu Arg Asp Ser Leu Ser Asp Lys Pro Ala Lys Asn Ile Ile Leu

35 40 45

Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile Thr Ala Ala Arg Asn

50 55 60

Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp Ala Leu Pro

65 70 75 80

Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys Lys Thr Gly Lys

85 90 95

Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ala Trp Ser Thr

100 105 110

Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val Asp Ile His Glu Lys

115 120 125

Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr

130	135	140
Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ala Thr Pro Ala Ala Leu		
145	150	155
Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser		
165	170	175
Glu Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile		
180	185	190
Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly		
195	200	205
Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys		
210	215	220
Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp		
225	230	235
Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu		
245	250	255
Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro		
260	265	270
Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr		
275	280	285
Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr		
290	295	300
Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu		
305	310	315
Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asn His Ala Ala Asn Pro		
325	330	335
Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg		
340	345	350
Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr		
355	360	365
Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala		
370	375	380
Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val		
385	390	395
Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser		
405	410	415
Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly		
420	425	430
Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly		
435	440	445

Leu Lys
450

<210>25

<211>450

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>PhoA(根据入藏登录号 1KH7A 相关结构编号)

<400>25

Arg	Thr	Pro	Glu	Met	Pro	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp
1				5					10					15	
Ile	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala
				20				25					30		
Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu
				35				40					45		
Leu	Ile	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn
				50				55					60		
Tyr	Ala	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro
65				70				75					80		
Leu	Thr	Gly	Gln	Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys
				85				90					95		
Pro	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr
				100				105					110		
Gly	Val	Lys	Thr	Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys
				115				120					125		
Asp	His	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr
				130				135					140		
Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu
145				150				155					160		
Val	Ala	His	Val	Thr	Ser	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser
				165				170					175		
Glu	Lys	Cys	Pro	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile
				180				185					190		
Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Gly
				195				200					205		

Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys		
210	215	220
Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp		
225	230	235 240
Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu		
245	250	255
Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro		
260	265	270
Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro Ala Val Thr Cys Thr		
275	280	285
Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr		
290	295	300
Asp Lys Ala Ile Glu Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu		
305	310	315 320
Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro		
325	330	335
Cys Gly Gln Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg		
340	345	350
Ala Leu Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr		
355	360	365
Ala Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala		
370	375	380
Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met Val		
385	390	395 400
Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr Gly Ser		
405	410	415
Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn Val Val Gly		
420	425	430
Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly		
435	440	445
Leu Lys		
450		

<210>26

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 D1	
<400>26	
t c a a t a t g c t g a a a c g c g c g a g a a a c c g	
28	
<210>27	
<211>29	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 D2	
<400>27	
ttgcaccaac agtcaatgtc ttcaggttc	29
<210>28	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 TS1	
<400>28	
cgtctcagtg atccggggg	19
<210>29	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 TS2	
<400>29	
cgccacaagg ggcatgaaca g	21

<210>30

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 TS3

<400>30

taacatcatc atgagacaga gc

22

<210>31

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

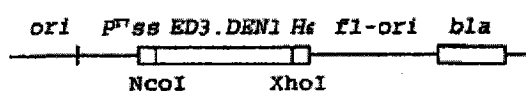
<223> 引物 TS3

<400>31

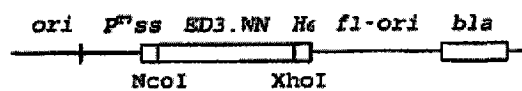
ctctgttgtc ttaaacaaga ga

22

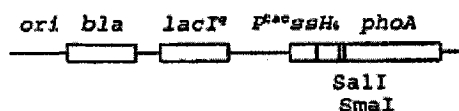
pLB11



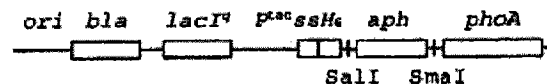
pVP5



pLIP5GN-H6



pEBL1



信号肽

GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA
M K Q S T I A L A
CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG
L L P L L F T P V

↓

成熟

PhoA

ACA AAA GCC CGG ACA CCA GAA ATG CCC
T K A R T P E M P

His-标记

GTC GAA CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAC
V E H H H H H H D

DrdI

Sali

SacI

SmaI

GAT GAC GAT AAG GT CGA CGA GCT CCC
D D D K R R A P

PhoA

GGG GTT CTG GAA AAC CGG ...
G V L E N R ...

信号肽

GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA
M K Q S T I A L A
CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC CCT GTG
L L P L L F T P V

↓

成熟

PhoA

ACA AAA GCC CGG ACA CCA GAA ATG CCC
T K A R T P E M P

His-标记

GTC GAA CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAC
V E H H H H H H D

DrdI

Sali

Kan^r

GAT GAC GAT AAG GTC GAC / - aph - /
D D D K V D

Sali SacI SmaI PhoA

GT CGA CGA GCT CCC GGG GTT CTG GAA
R R A P G V L E

AAC CGG ...

N R ...

图 1

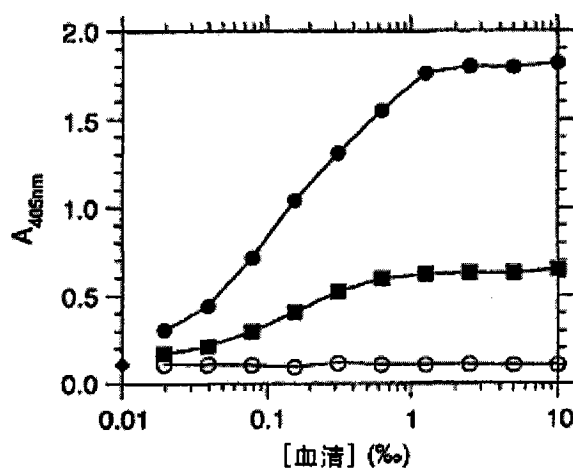


图 2

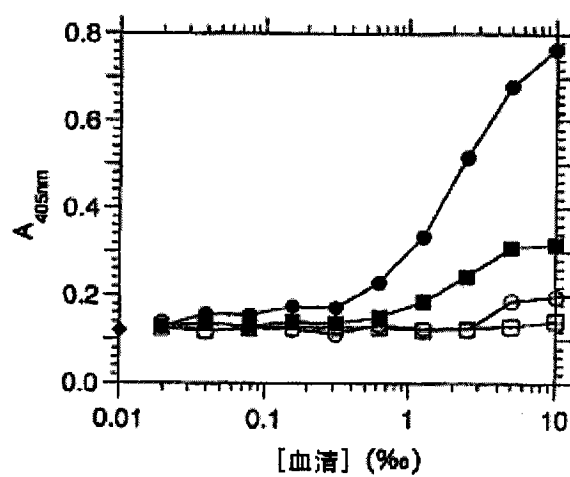


图 3

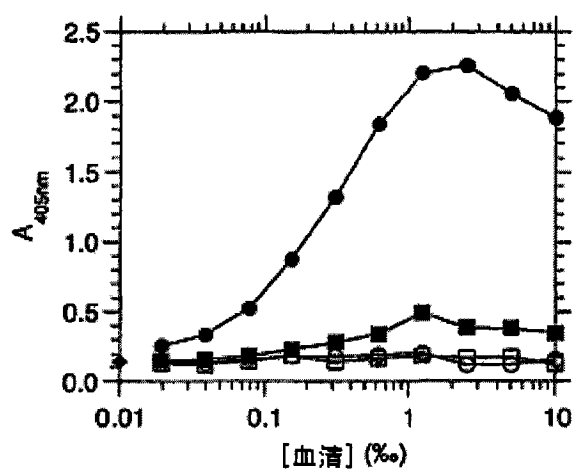


图 4

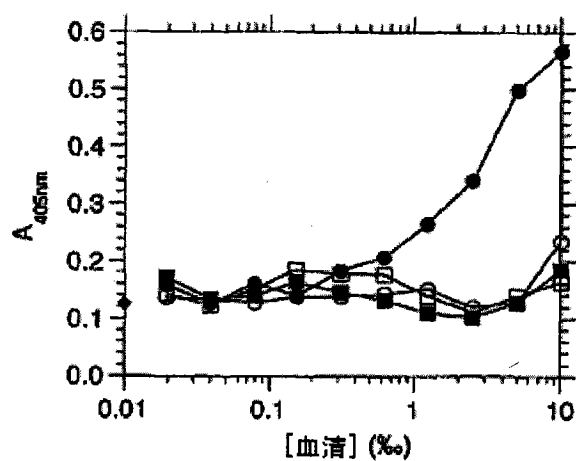


图 5

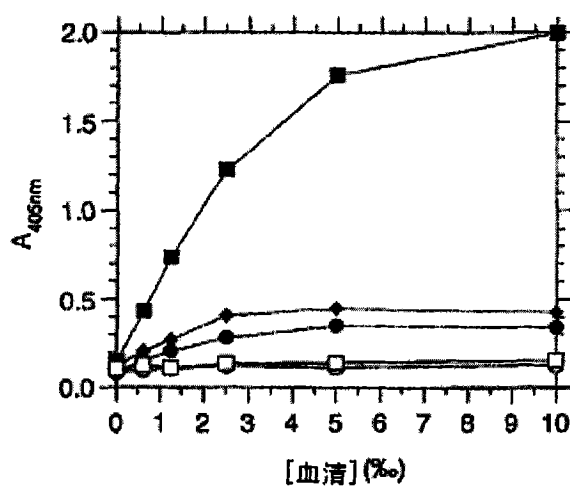


图 6

