



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1911960 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200610088776. 9

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 1998. 10. 01

G01N 33/563 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/571 (2006. 01)

08/942, 596 1997. 10. 02 US

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

98811817. 3 1998. 10. 01

US 5516638 A, 1996. 05. 14, 全文.

(83) 生物保藏信息

US 5071962 A, 1991. 12. 10, 全文.

98538 1997. 09. 08

US 4427782 A, 1984. 01. 24, 全文.

(73) 专利权人 新兴产品开发盖瑟斯堡公司

审查员 于群

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J·W·杰克逊 J·L·佩斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 刘玥

(51) Int. Cl.

C07K 14/295 (2006. 01)

C07K 16/12 (2006. 01)

A61K 39/118 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 39/40 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 70 页 附图 11 页

(54) 发明名称

衣原体蛋白、其基因序列及用途

(57) 摘要

衣原体蛋白、其基因序列及用途本发明公开了衣原体高分子量 (“HMW”) 蛋白, 其氨基酸序列, 特异性结合 HMW 蛋白的抗体及其编码核酸序列。还公开了包括疫苗的预防和治疗组合物, 含有 HMW 蛋白, 其片段, 或特异性结合 HMW 蛋白或其部分的抗体, 或编码 HMW 蛋白或其片段的核酸序列。

1. 分离的核酸序列,其在 42℃下,在 50%甲酰胺存在下与由 SEQ ID NO:1 的互补序列组成的核苷酸序列杂交并且编码多肽,其中所述多肽可被特异性结合于由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成的多肽的抗体制品识别。

2. 权利要求 1 的核酸序列,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:2。

3. 权利要求 1 的核酸序列,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:15。

4. 权利要求 1 的核酸序列,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:16。

5. 权利要求 1 的核酸序列,其中所述多肽包含 SEQ ID NO:17。

6. 包含权利要求 1-5 任一项的核酸序列的表达载体。

7. 权利要求 6 的载体,进一步包含编码前导序列的核酸。

8. 包含权利要求 6 或 7 的载体的宿主细胞。

9. 分离的多肽,其由权利要求 1-5 的任一项的核酸序列编码。

10. 权利要求 9 的多肽,其包含 SEQ ID NO:2。

11. 权利要求 9 的多肽,其包含 SEQ ID NO:15。

12. 权利要求 9 的多肽,其包含 SEQ ID NO:16。

13. 权利要求 9 的多肽,其包含 SEQ ID NO:17。

14. 分离的抗体,其特异性结合权利要求 9 的多肽。

15. 包含权利要求 14 的抗体的抗血清。

16. 组合物,包含权利要求 1-5 任一项的核酸序列、权利要求 6 或 7 的载体、权利要求 8 的宿主细胞、权利要求 9-13 任一项的多肽,权利要求 14 的抗体或权利要求 15 的抗血清;以及载体。

17. 权利要求 16 的组合物,进一步包含佐剂。

18. 权利要求 17 的组合物,其中所述佐剂是明矾、mLT、QS21、MPL、弗氏完全佐剂,或两种或更多种所述佐剂的组合。

19. 权利要求 16 的组合物,进一步包含与所述多肽组合或缀合的靶向分子。

20. 权利要求 19 的组合物,其中靶向分子是维生素 B12、细菌毒素、单克隆抗体、蛋白、核酸、碳水化合物,或两种或更多种所述靶向分子的组合。

21. 权利要求 16 的组合物,其配制为微粒、胶囊、脂质体制剂或乳剂。

22. 权利要求 16 的组合物,当施用于哺乳动物或鸟类时,其诱导抗所述多肽的体液免疫应答或细胞介导的免疫应答。

23. 诊断试剂,包含:权利要求 1-5 任一项的核酸序列、权利要求 6 或 7 的载体、权利要求 8 的宿主细胞、权利要求 9-13 任一项的多肽,权利要求 14 的抗体,或权利要求 15 的抗血清。

24. 权利要求 9-13 任一项的多肽在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测测试样品中的抗衣原体抗体,所述检测包括以下步骤:

(a) 将所述样品与多肽接触以形成衣原体抗原:抗衣原体抗体免疫复合物;和

(b) 检测步骤 (a) 中形成的所述免疫复合物的存在或测定其量。

25. 用于检测针对衣原体的抗体的诊断试剂盒,其中所述试剂盒包含权利要求 9-13 任一项的多肽、用于使所述多肽或组合物与测试样品接触的容器,和用于检测或测量在所述多肽和所述抗体之间形成的衣原体抗原:抗衣原体抗体免疫复合物的试剂。

26. 权利要求 14 的抗体或权利要求 15 的抗血清在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测测试样品中衣原体的存在,所述检测包含以下步骤:

(a) 将所述样品与所述抗体或所述抗血清接触充分的时间,以允许所述抗体结合衣原体并形成衣原体:抗衣原体抗体免疫复合物;和

(b) 检测步骤 (a) 中形成的所述免疫复合物的存在或测定其量。

27. 用于检测衣原体存在的诊断试剂盒,其中所述试剂盒包含权利要求 14 的抗体或权利要求 15 的抗血清、用于使所述抗体或抗血清与测试样品接触的容器,和用于检测或测量在所述抗体或和所述衣原体之间形成的衣原体:抗衣原体抗体免疫复合物的试剂。

28. 权利要求 1-5 任一项的核酸序列或其互补序列在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测样品中衣原体核苷酸的存在,所述检测包含以下步骤:

a) 将所述样品与核酸序列或其互补序列接触以产生包含所述核酸序列或其互补序列和样品中存在并且可与其特异性杂交的任何所述核苷酸的双链体;和

b) 确定双链体的产生。

29. 用于确定样品中衣原体核苷酸的存在诊断试剂盒,包含:

a) 权利要求 1-5 任一项的核酸序列或其互补序列;

b) 用于使所述核酸序列与样品接触以产生包含所述核酸序列和样品中存在并且可与其特异性杂交的任何所述核苷酸的双链体的试剂;和

c) 确定双链体的产生的试剂。

30. 有效量的权利要求 16 的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在有需要的宿主中产生免疫应答。

31. 权利要求 30 的用途,其中所述免疫应答是体液免疫应答。

32. 权利要求 30 的用途,其中所述免疫应答是细胞介导的免疫应答。

33. 权利要求 30 的用途,其中宿主是鸟类或哺乳动物。

34. 有效量的权利要求 16 的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在需要所述治疗的宿主中预防、治疗或缓解与衣原体相关的疾病。

35. 权利要求 34 的用途,其中所述疾病选自衣原体细菌感染、砂眼、结膜炎、尿道炎、性病淋巴肉芽肿、宫颈炎、附睾炎、子宫内膜炎、盆腔炎性疾病、输卵管炎、不育、宫颈癌和动脉粥样硬化。

36. 权利要求 34 的用途,其中宿主是鸟类或哺乳动物。

37. 权利要求 35 的用途,其中所述疾病是输卵管闭塞。

衣原体蛋白、其基因序列及用途

[0001] 本申请是申请日为 1998 年 10 月 1 日的中国专利申请 98811817.3 “衣原体蛋白、其基因序列及用途”的分案申请。

1. 技术领域

[0002] 本发明一般涉及高分子量的 (“HMW”) 衣原体蛋白,其氨基酸序列,和特异性结合 HMW 蛋白的抗体,包括细胞毒抗体。本发明进一步包括预防和治疗组合物,该组合物含有 HMW 蛋白,其片段,或特异性结合 HMW 蛋白的抗体或其部分,或编码 HMW 蛋白的核苷酸序列或其片段,所述组合物包括疫苗。本发明还提供了预防,治疗或缓解哺乳动物和鸟类中衣原体感染相关疾病的方法和诱导针对衣原体的免疫应答的方法。本发明还提供了编码 HMW 蛋白的分离的核苷酸序列和简并序列,含有所述序列的载体和含有所述载体的宿主细胞。本发明还包括诊断方法和试剂盒。

2. 背景技术

[0003] 衣原体是广泛传播的人类病原体,其导致如性传播疾病,包括肺炎的呼吸系统疾病,新生儿结膜炎和失明等疾病。衣原体是专性细胞内细菌,它感染肺,结膜或生殖道的上皮层。最常见的衣原体种类包括砂眼衣原体,鹦鹉热衣原体,猫心衣原体和肺炎衣原体。最近,新命名的衣原体种类肺炎衣原体 (以前被称为砂眼衣原体 TWAR) 被认为是人类流行性肺炎的主要原因,可能对动脉粥样硬化也起到一定作用。

[0004] 目前,已认定了 18 种导致砂眼和一系列性传播疾病的砂眼衣原体血清变种 :A, B 和 C 血清变种常与砂眼相关,而 D-K 血清变种是生殖道感染最常见的病因。

[0005] 在包括美国的很多发达国家,砂眼衣原体是性传播疾病的主要病因。而美国砂眼衣原体感染的准确发病率仍是未知的,最新的流行病学研究表明每年发生 400 万例以上的衣原体感染,这与所估计的每年 200 万例淋球菌感染形成对比。尽管衣原体感染会涉及所有种族,人种和社会经济群体,但其最常见于 12 至 20 岁的性活跃的年轻人中。大多数生殖泌尿器的衣原体感染在临床上无症状,男性和女性长期携带者居多。在被诊断为衣原体感染的患者中,多至 25% 的男性和 75% 的女性没有明显的感染体征。结果,这些无症状的个体构成了大的病原体库,可继续地在社会中传播病原体。

[0006] 与这种良性携带相去甚远的是,这些感染也可导致严重的疾病,包括 :尿道炎,性病淋巴肉芽肿 (LGV),宫颈炎和男性附睾炎。由宫颈管内膜逐步往上的感染通常会引起子宫内膜炎,盆腔炎性疾病 (PID) 和导致输卵管闭塞并最终导致不育的输卵管炎。

[0007] 新生儿的砂眼衣原体感染是因围产期暴露于母体受感染的宫颈而引起的。将近 70% 从患有衣原体性宫颈炎的母体阴道分娩的新生儿在分娩的过程中被感染。眼睛,口咽部,泌尿生殖道和直肠的粘膜是感染的主要位点。衣原体性的结膜炎已成为新生儿眼炎的最常见形式。约 20-30% 暴露的新生儿在分娩 14 天内会患有包涵体结膜炎,甚至在接受了硝酸银或抗生素软膏预防之后也是如此。在美国,砂眼衣原体也是新生儿肺炎的病因。将近 10-20% 经感染的宫颈分娩的新生儿会患有衣原体肺炎并需要一些类型的医药干预。

[0008] 在发展中国家,砂眼衣原体的眼感染导致砂眼,即一种慢性滤泡性结膜炎,其反复形成瘢痕,导致眼睑变形并最终失明。砂眼是可预防之失明的世界性病因。据世界卫生组织估计,目前世界上有超过 5 亿人,包括约 1.5 亿儿童患有活动性砂眼,超过 600 万人被此疾病致盲。

[0009] 在发达国家,与治疗衣原体感染相关的花费是惊人的。1992 年,美国治疗此病的年花费估计为 25-30 亿美元,到 2000 年为止,年花费预计会超过 80 亿美元。

[0010] 对此健康危机的一个行之有效的解决办法是有效的衣原体疫苗。几种迹象表明开发有效的疫苗是简单易行的。

[0011] 对人和灵长类动物的研究表明通过用整个衣原体免疫接种可产生针对砂眼衣原体的短期保护性免疫力。然而,保护作用的特征在于期限短,具有血清变种特异性,并由粘膜抗体产生。另外,在一些接种者中,当这些个体被不同于免疫所用的血清变种天然感染时,病情会加重。最终阐明这种有害反应是由迟发型超敏反应所引起的。因此,需要开发一种基于亚单位的衣原体疫苗,该疫苗能产生有效但非致敏的免疫应答。这种亚单位疫苗需要引发粘膜中和分泌型 IgA 抗体和 / 或细胞免疫应答才有效。

[0012] 迄今为止,亚单位疫苗的开发几乎仅致力于主要外膜蛋白 (MOMP)。MOMP 是大小约为 40KDa 的膜内在蛋白质,其含有多达约 60% 的传染性原体 (EB) 膜蛋白 (Caldwell, H. D., J. Kromhout 和 L. Schachter, 1981, *Infect. Immun.*, 31 :1161-1176)。MOMP 赋予细胞外 EB 结构上的完整性,据认为,当生物在细胞内生长并且具有代谢活性时, MOMP 作为膜孔蛋白样分子起作用。除了 4 个表面暴露的可变区 (VDI-VDIV) 外, MOMP 在所有 18 个血清变种中是高度保守的。MOMP 的免疫原性高,可引发局部的中和性抗衣原体抗体。然而,此方法也存在

问题。

[0013] 迄今为止,已被作图的大多数 MOMP- 特异性中和表位位于 VD 区,因此,仅产生血清变种特异性的抗体。将血清变种特异性的表位混合于不同的疫苗载体 (如脊髓灰质炎病毒) 以产生广泛交叉反应的中和性抗体的尝试勉强获得成功 (Murdin, A. D., H. Su, D. S. Manning, M. H. Klein, M. J. Parnell 和 H. D. Caldwell, 1993, *Infect. Immun.*, 61 :4406-4414 ;Murdin, A. D., H. Su, M. H. Klein, H. D. Caldwell. 1995, *Infect. Immun.*, 63 : 1116-1121)。

[0014] 砂眼衣原体的两个其它主要外膜蛋白,即 60KDa 和 12KDa 的富含半胱氨酸的蛋白质以及暴露于表面的脂多糖是高度免疫原性的,但与 MOMP 不同的是,尚无证据表明它们可诱导中和性抗体 (Cerrone 等, 1991, *Infect. Immun.*, 59 :79-90)。因此,仍需要新的基于亚单位的衣原体疫苗。

3. 发明内容

[0015] 本发明的目的是提供分离的和基本上纯化的高分子量衣原体蛋白 (“HMW 蛋白”) 或其片段或类似物,其中经 SDS-PAGE 测定, HMW 蛋白的表观分子量约为 105-115KDa。优选 HMW 蛋白基本上具有 SEQ ID NO :2, 15 和 16 中任一个所示的氨基酸序列。优选 HMW 蛋白的片段包括 SEQ IDNO :3, 17 和 25-37。本文所用的“基本上具有 序列”指的是序列与参照序列至少 80%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95% 相同。优选 HMW 蛋白是外膜蛋白, 更优选外膜 HMW 蛋白位于表面。优选 HMW 蛋白具有肝素结合区域。优选 HMW 蛋白具有膜孔蛋

白样区域。本发明欲包括所有的衣原体种类,但其中优选的种类包括砂眼衣原体,鹦鹉热衣原体,猫心衣原体和肺炎衣原体。基本上纯化的 HMW 蛋白至少为 70wt% 纯,优选至少约为 90% wt 纯,可以是其水溶液的形式。

[0016] 本发明还包括重组形式的 HMW 蛋白或其片段或
740
745

[0017] 类似物,其包含在转化的大肠杆菌细胞中,经 SDS-PAGE 测定,被表达的重组形式的 HMW 蛋白的表观分子量约为 105-115KDa。术语 HMW- 衍生的多肽包括 HMW 蛋白的片段;野生型 HMW 蛋白的变体或其片段,其含有一个或多个氨基酸缺失,插入或取代;嵌合蛋白,其含有与整个或部分 HMW 蛋白 C- 末端或 N- 末端或内部区段融合的异源多肽。

[0018] 本文和权利要求书中所用的术语“HMW 蛋白”指的是天然纯化的或重组纯化的高分子量衣原体蛋白,其表观分子量(经 SDS-PAGE 测定)约为 105-115KDa。本文和权利要求书中所用的术语“rHMW 蛋白”指的是重组的 HMW 蛋白。

[0019] 本发明的另一目的是提供分离的基本上纯的编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的核酸分子。优选所编码的 HMW 蛋白含有 SEQ ID NO:2,15 和 16 中任一个所示的氨基酸序列的核酸序列或其片段,尤其是 SEQ IDNO:3,17 和 25-37。本发明还包括含有 SEQ ID NO:1,23-24 中任一个所示的 DNA 序列的分离核酸分子或其互补序列;具有 SEQ ID NO:4-14,18-22 中任一个所示的核酸序列的 HMW DNA 序列片段或其互补序列;和在严紧条件下与上述任一序列杂交的核酸序列。优选地,在严紧条件下杂交的核酸与上述任一序列具有约 70% 的序列同一性,更优选具有约 90% 的序列同一性。

[0020] HMW 蛋白衍生物和类似物的生产和用途也在本发明的范围之内。在具体的实施方案中,衍生物或类似物具有功能活性,即能表现出一种或多种与全长野生型 HMW 蛋白相关的功能活性。例如,具有所需免疫原性或抗原性的衍生物或类似物可被用于免疫测定法中,也可用于免疫接种等等。具体的实施方案涉及可被抗-HMW 抗体结合的 HMW 片段。通过本领域已知的方法可检测 HMW 衍生物或类似物是否具有所需的活性。

[0021] 具体地说,通过提供功能上等同的分子的取代,增加或缺失改变 HMW 序列可制备 HMW 衍生物。由于核苷酸编码序列的简并性,编码与 HMW 基因所编码的序列基本上相同的氨基酸序列的其它 DNA 序列也可用于本发明的实践。它们包括但不限于含有全部或部分基因的核苷酸序列,所述基因的序列通过用编码功能等同的氨基酸残基的不同密码子取代而被改变,从而产生沉默突变。类似地,本发明的 HMW 衍生物包括但不限于含有 HMW 蛋白的全部或部分氨基酸序列作为一级氨基酸序列的衍生物,所述氨基酸序列包括经功能等同的氨基酸残基取代而导致沉默突变的经改变序列。例如,序列中的一个或多个氨基酸残基可被功能上等同的,具有类似极性的另一个氨基酸取代而产生沉默突变。序列中的氨基酸的取代物可从氨基酸所属类的其它成员中选择。例如,非极性(疏水的)氨基酸包括丙氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸,丝氨酸,苏氨酸,半胱氨酸,酪氨酸,天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电(碱性)氨基酸包括精氨酸,赖氨酸和组氨酸。带负电(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0022] 在本发明的具体实施方案中,提供了由 HMW 蛋白的片段组成或含有此片段的蛋白质,所述片段由 HMW 蛋白中至少 6 个(连续的)氨基酸组成。在其它实施方案中,片段由 HMW 蛋白的至少 7 至 50 个氨基酸组成。在具体的实施方案中,该片段不大于 35,100 或 200 个

氨基酸。HMW 的衍生物或类似物包括但不限于含有与 HMW 或其片段基本上同源的区域,或其编码核酸能在严紧,中度严紧或非严紧的条件下与 HMW 编码序列杂交的那些分子(如在不同的实施方案中,与相同长度的氨基酸序列相比或与对比序列相比至少具有 60%或 70%或 80%或 90%或 95%的同一性,序列对比通过本领域已知的计算机同源性程序进行)。

[0023] 例如(但不限于此),有用的计算机同源性程序包括下列:基本局部序列对比检索工具(BLAST)(www.ncbi.nlm.nih.gov)(Altschul 等,1990,分子生物学杂志,215:403-410, BLAST 算法;Altschul 等,1997,核酸研究,25:3389-3402),它是特制用于检索序列相似性的启发式检索算法,该算法使用 Karlin 和 Altschul 1990,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,87:2264-68;1993,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,90:5873-77 的统计方法确定显著性。5 个特定的 BLAST 程序实施下列任务:

[0024] 1)BLASTP 程序将欲检索的氨基酸序列与蛋白质序列数据库相比较。

[0025] 2)BLASTN 程序将欲检索的核苷酸序列与核苷酸序列数据库相比较。

[0026] 3)BLASTX 程序将欲检索的核苷酸序列(两条链)的 6-读码框概念翻译产物与蛋白质序列数据库相比较。

[0027] 4)TBLASTN 程序将欲检索的蛋白质序列与所有 6 个读码框中翻译的核苷酸序列数据库(两条链)相比较。

[0028] 5)TBLASTX 程序将欲检索的核苷酸序列的 6-读码框翻译产物与核苷酸序列数据库的 6-读码框翻译产物相比较。

[0029] Smith-Waterman(数据库:欧洲生物信息学学会 wwwz.ebi.ac.uk/bic_sw/)(Smith-Waterman,1981,分子生物学杂志,147:195-197)是用于序列对比的数学上严密的算法。

[0030] FASTA(见 Pearson 等,1988,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,85:2444-2448)是与 Smith-Waterman 相似的启发式算法。关于 BLAST,Smith-Waterman 和 FASTA 算法之方法和优点的一般性讨论,可参见 Nicholas 等,1998,“有关检索序列数据库和序列评分方法的指导”(www.psc.edu)和其中所提及的参考文献。

[0031] 本发明的 HMW 衍生物和类似物可通过本领域熟知的多种方法制备。导致其产生的操作可在基因或蛋白质水平上发生。例如,可通过本领域熟知的多种策略中的任一种来修饰克隆的 HMW 基因序列(Sambrook 等,1989,分子克隆,实验室手册,第 2 版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约)。可用限制性核酸内切酶在适当的位点裂解序列,必要时进行进一步的酶促修饰,分离并进行体外连接。制备编码 HMW 衍生物或类似物的基因时,应注意确保编码所需 HMW 活性的基因区域中经修饰基因与 HMW 处于相同的翻译读码框中,而不会被翻译终止信号间断。

[0032] 另外,可体外或体内突变编码 HMW 的核酸序列以产生和/或破坏翻译,起始和/或终止序列,或使编码区域产生变异和/或形成新的限制性内切核酸酶位点或破坏原先存在的位点以便于进一步地体外修饰。可使用本领域已知的任何诱变技术,包括但不限于化学诱变,体外定点诱变(Hutchinson, C 等,1978,生物化学杂志,253:6551),使用 **TAB®**接头(Pharmacia)等。

[0033] 也可在蛋白质水平进行 HMW 序列的操作。本发明范围中包括 HMW 蛋白片段或其它衍生物或类似物,它们在翻译期间或之后通过例如已知的保护/封闭基团,蛋白酶裂解,与

抗体分子或其它细胞配体的连接被糖基化,脂质化,乙酰化,磷酸化,酰胺化,衍生化等,从而进行不同修饰。可通过已知技术进行多种化学修饰中的任一种,其包括但不限于通过溴化氰,胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,木瓜蛋白酶, V8 蛋白酶, NaBH_4 进行特异性化学裂解;乙酰化,甲酰化,氧化,还原;在衣霉素的存在下进行代谢合成等。

[0034] 另外,也可化学合成 HMW 的类似物和衍生物。例如,可使用肽合成仪合成对应于 HMW 蛋白中含有所需区域或可在体外介导所需活性的部分的肽。另外,必要时,可在 HMW 序列中导入非典型氨基酸或氨基酸的化学类似物作为取代或添加的氨基酸。非-典型的氨基酸包括但不限于常见氨基酸的 D- 异构体, α - 氨基异丁酸, 4- 氨基丁酸, Abu, 2- 氨基丁酸, γ -Abu, ϵ -Ahx, 6- 氨基己酸, Aib, 2- 氨基异丁酸, 3- 氨基丙酸, 鸟氨酸, 正亮氨酸, 正缬氨酸, 羟脯氨酸, 肌氨酸, 瓜氨酸, 半胱氨酸, t- 丁基甘氨酸, t- 丁基丙氨酸, 苯基甘氨酸, 环己基丙氨酸, β - 丙氨酸, 含氟- 氨基酸, 设计者氨基酸, 如 β - 甲基氨基酸, C α - 甲基氨基酸, N α - 甲基氨基酸和一般的氨基酸类似物。另外,氨基酸可以是 D(右旋的) 或 L(左旋的)。

[0035] 本发明的另一目的是提供适用于转化宿主或将 HMW 蛋白传递给宿主的重组表达载体,其含有 SEQ ID NO:1,23 或 24 所述的核酸分子或其任何片段。优选重组表达载体适用于转化宿主并含有与核酸分子可操作相连的表达元件以通过宿主表达所述 HMW 蛋白或其片段或类似物。更优选表达载体中的表达元件包括以下核酸部分,其编码用于由宿主分泌 HMW 蛋白或其片段或类似物的前导序列,或编码偶联于蛋白或其片段或类似物 N- 或 C- 末端的亲和区。

[0036] 本发明的另一方面包括含有上述表达载体的转化宿主细胞和可由转化的宿主细胞产生的重组 HMW 蛋白或其片段或类似物。

[0037] 本发明的另一方面涉及可被抗体制品识别的 HMW 蛋白,所述抗体制品特异性结合氨基酸序列为 SEQ ID NO:2,15-16 的肽或其片段或其保守取代的类似物。

[0038] 本发明的另一方面是抗原性和 / 或免疫原性组合物,其中组合物含有至少一种选自下列的成分:

[0039] a) HMW 蛋白或其片段或类似物,所述蛋白经 SDS-PAGE 测定其分子量约为 105-115KDa;

[0040] b) 编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的分离核酸分子;

[0041] c) 具有 SEQ ID NO:1,22,23 或 24 的序列的分离核酸分子,其互补序列,或在严紧条件下能与其杂交的核酸序列,或其片段;

[0042] d) 能由含有表达载体的转化宿主产生的分离的重组 HMW 蛋白或其片段或类似物,所述表达载体含有 b) 或 c) 所述的核酸分子和与核酸分子可操作相连的表达元件以通过宿主表达所述 HMW 蛋白或其片段或类似物;

[0043] e) 含有编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的核酸的重组载体;

[0044] f) 含有 e) 之载体的转化细胞,

[0045] 所述组合物还任选含有佐剂,和可药用载体或稀释剂,当施用于宿主时,所述组合物可产生免疫应答。

[0046] 优选的佐剂包括霍乱全毒素或亚单位,大肠杆菌热不稳定全毒素,其亚单位和突变形式,明矾, QS21 和 MPL。特别优选明矾, LTR192G, mLT 和 QS21。

[0047] 本发明还包括在哺乳动物或鸟类中产生免疫应答的方法,所述方法包括给所述哺

乳动物施用有效量的上述抗原性或免疫原性组合物。

[0048] 本发明的另一方面涉及针对本发明的抗原性或免疫原性组合物产生的抗血清,和抗血清中存在的能特异性结合 HMW 蛋白或其片段或类似物的抗体。优选抗体结合具有 SEQ ID NO :2,15-16 的氨基酸序列的 HMW 蛋白或其片段或其保守取代的类似物。本发明还包括特异性结合 HMW 蛋白或其片段或类似物的单克隆抗体。

[0049] 本发明的另一方面包括药物和疫苗组合物,其含有有效量的至少一种选自下列的成分:

[0050] a) HMW 蛋白或其片段或类似物,经 SDS-PAGE 测定,其中分离的蛋白质的分子量约为 105-115KDa;

[0051] b) 编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的分离核酸分子;

[0052] c) 具有 SEQ ID NO :1,22,23 或 24 的序列的分离核酸分子,其互补序列,或在严紧条件下能与其杂交的核酸序列,或其片段;

[0053] d) 能由含有表达载体的转化宿主产生的分离的重组 HMW 蛋白或其片段或类似物,所述表达载体含有 b) 或 c) 所述的核酸分子和与核酸分子可操作相连的表达元件以通过宿主表达所述衣原体 HMW 蛋白或其片段或类似物;

[0054] e) 含有编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的核酸的重组载体;

[0055] f) 含有 e) 之载体的转化细胞;

[0056] g) 特异性结合 a), b), c), d) 或 e) 之组分的抗体,

[0057] 和可药用载体或稀释剂。优选疫苗组合物在粘膜水平上是有效的。

[0058] 本发明还包括诊断试剂,其可以包括上述任何一种或多种组分,如天然 HMW 蛋白,重组 HMW 蛋白,核酸分子,免疫原性的组合物,抗原性的组合物,抗血清,抗体,含有核酸的载体和含有载体的转化细胞。

[0059] 本发明还包括检测待测样品中的衣原体或抗衣原体抗体的方法和诊断试剂盒,其中所述方法包括下列步骤:

[0060] a) 将所述样品与含有衣原体 HMW 蛋白或其片段或类似物的抗原性组合物或免疫原性组合物或其抗体接触以形成衣原体抗原:抗-衣原体抗体免疫复合物;

[0061] b) 检测步骤 a) 中形成的所述免疫复合物的存在或测定其量以作为待测样品中存在所述衣原体或抗衣原体抗体的指征。

[0062] 检测衣原体或其抗体的诊断试剂盒含有抗体,或含有衣原体 HMW 蛋白或其片段或类似物的抗原性或免疫原性组合物,用于使所述抗体或组合物与被怀疑含有抗衣原体抗体或衣原体的待测样品接触的容器,和用于检测或测定所述抗原性或免疫原性组合物或所述抗体与所述待测样品之间形成的衣原体抗原:抗衣原体抗体免疫复合物的试剂。

[0063] 本发明的另一方面提供了测定待测样品中编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的核酸的存在的方法,所述方法包括步骤:

[0064] a) 使待测样品与本文提供的核酸分子接触以产生含有核酸分子和待测样品中编码 HMW 蛋白并能特异性地与以上核酸分子杂交的任何所述核酸分子的双链体;和

[0065] b) 测定双链体的产生。

[0066] 本发明还提供了用于测定样品中编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的核酸的存在的诊断试剂盒及其所用的试剂,其含有:

[0067] a) 本文提供的核酸分子；

[0068] b) 使核酸与待测样品接触以产生双链体的容器,所述双链体含有核酸分子和待测样品中编码 HMW 蛋白并能特异性地与以上核酸分子杂交的任何所述核酸分子;和

[0069] c) 测定双链体产生的试剂。

[0070] 本发明还包括预防,治疗或缓解需要接受治疗的包括哺乳动物和鸟类的动物的衣原体相关疾病的方法,所述方法包括施用有效量的本发明的药物或疫苗组合物。优选的疾病包括衣原体细菌感染,砂眼,结膜炎,

[0071] 4. 缩写

[0072] 抗-HMW = HMW 多肽抗体或抗血清

[0073] ATCC = 美国典型培养物保藏中心

[0074] 免疫-反应 = 能引发细胞或体液免疫应答

[0075] Kda = 千道尔顿

[0076] OG = 正辛基 β -D- 吡喃葡萄糖苷或辛基葡萄糖苷

[0077] OMP(s) = 外膜蛋白

[0078] PBS = 磷酸缓冲盐水

[0079] PAGE = 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0080] 多肽 = 任何长度的肽,优选具有 10 个或更长氨基酸残基的多肽

[0081] SDS = 十二烷基硫酸钠

[0082] SDS-PAGE = 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0083] 本文所述的核苷酸或核酸序列以下列单字母碱基符号表示:

[0084] A(腺嘌呤)

[0085] C(胞嘧啶)

[0086] G(鸟嘌呤)

[0087] T(胸腺嘧啶)

[0088] U(尿嘧啶)

[0089] M(A 或 C)

[0090] R(A 或 G)

[0091] W(A 或 T/U)

[0092] S(C 或 G)

[0093] Y(C 或 T/U)

[0094] K(G 或 T/U)

[0095] V(A 或 C 或 G;非 T/U)

[0096] H(A 或 C 或 T/U;非 G)

[0097] D(A 或 G 或 T/U;非 C)

[0098] B(C 或 G 或 T/U;非 A)

[0099] N(A 或 C 或 G 或 T/U) 或(未知)

[0100] 本文所述的肽和多肽序列以下列单字母氨基酸残基符号表示:

[0101] A(丙氨酸)

[0102] R(精氨酸)

- [0103] N(天冬酰胺)
[0104] D(天冬氨酸)
[0105] C(半胱氨酸)
[0106] Q(谷氨酰胺)
[0107] E(谷氨酸)
[0108] G(甘氨酸)
[0109] H(组氨酸)
[0110] I(异亮氨酸)
[0111] L(亮氨酸)
[0112] K(赖氨酸)
[0113] M(甲硫氨酸)
[0114] F(苯丙氨酸)
[0115] P(脯氨酸)
[0116] S(丝氨酸)
[0117] T(苏氨酸)
[0118] W(色氨酸)
[0119] Y(酪氨酸)
[0120] V(缬氨酸)
[0121] X(未知)
[0122] 参照下文的发明详述,本发明具体实施方案的非限制性实施例和附图可更完整地理解本发明。

5. 附图说明

[0123] 图1:砂眼衣原体 L₂ 原体 (EB) 的 Western 印迹分析。用含有 2- 巯基乙醇的标准 Laemmli SDS-PAGE 样品缓冲液溶解梯度纯化的 EB,煮沸约 3 分钟,上样于含 SDS 的 4-12% Tris- 甘氨酸梯度凝胶上,以 100V 电泳。电泳之后立即于 4℃,约 50V 下,将蛋白质电印迹至 PVDF 膜上。室温下,使用经 1/5,000 稀释的抗-rHMWP 抗体 (K196) 将封闭的膜探测 1.5 小时。洗涤后,室温下用经 1/5,000 稀释的与 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG 抗体将膜处理 1 小时。使用标准的 TMB 底物系统展开印迹。在 EB 和 RB 中检测到 3 条免疫反应的带。点表示约 105-115KDa 的 HMW 蛋白

[0124] 图2:编码砂眼衣原体 LGV L₂ HMW 蛋白的开放阅读框的共有核酸序列。(SEQ ID NO:1)

[0125] 图3:砂眼衣原体 LGV L₂ PCR 开放阅读框的 HMW 蛋白推导的氨基酸序列。(SEQ ID NO:2)

[0126] 图4:大肠杆菌中表达的砂眼衣原体 LGV L₂ 部分纯化的重组 HMW 蛋白的 SDS-PAGE。复染和预先染色的 SDS-PAGE 标准被用作分子量标记。凝胶中分子量标记的位置标在图的左侧和右侧,以一些标记的分子量 (KDa) 标线表示。详见正文实施例 10。泳道 A:标记 12 宽范围的分子量标记 (Novex);肌球蛋白,200KDa;B- 半乳糖苷酶,116.3KDa;磷酸化酶 B, 97.4KDa;牛血清白蛋白,66.3KDa。泳道 B:砂眼衣原体 L2 重组 HMWP。泳道 C:SeeBlue 预

先染色的分子量标记 (Novex) ;肌球蛋白,250KDa ;牛血清白蛋白,98KDa ;谷氨酸脱氢酶,64Kda。

[0127] 图 5 :质粒 pAH306, pAH310, pAH312, pAH316 和 PCR 开放阅读框的图谱。

[0128] 图 6 :砂眼衣原体 L₂, B 和 F 的 HMW 蛋白的推导氨基酸序列。砂眼衣原体 L₂ 序列 (SEQ ID NO :43) 在最上面一行给出,并以成熟蛋白质的第一个残基 E 开始 (参见 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 29-1012)。下划线的是潜在的真核 N-糖基化序列。下划线并括在括号中的是侧翼于富含脯氨酸之区段,长度适于跨越脂质双层的疏水螺旋区域。在 B (参见 SEQ ID NO :15 的氨基酸残基 29-1013) 和 F (参见 SEQ ID NO :16 的氨基酸残基 29-1013) 血清变种中鉴定的氨基酸差异被标于 L₂ HMWP 蛋白序列的下方。

[0129] 图 7 :使用抗 -rHMWP' 抗体对砂眼衣原体 N11 (血清变种为 F) 包涵体进行间接荧光抗体染色。

[0130] A 组实验 :兔 K196 的免疫后血清,衣原体包涵体被染成黄色。

[0131] B 组实验 :兔 K196 的免疫前血清。

[0132] 6. 具体实施方式

[0133] 本文和权利要求书中所用的术语“抗原”及其相关术语“抗原性的”指的是与抗体或 T 细胞受体特异性结合的物质。优选所述抗原是免疫原

[0134] 本文和权利要求书中所用的术语“免疫原性”指的是在动物,优选哺乳动物或鸟类中诱导免疫应答,如抗体和 / 或细胞免疫应答的能力。

[0135] 本文和权利要求书中所用的术语“宿主”指的是动物体内或体外哺乳动物细胞培养物。

[0136] 应施用有效量的抗原性,免疫原性药物,包括但不限于本发明的疫苗,组合物,其中“有效量”被定义为足以在受试者体内产生所需的预防,治疗或缓解应答,包括但不限于免疫应答的量。所需的量随所用 HMW 蛋白,片段,核酸或衍生物的免疫原性,给药对象的种和体重的不同而不同,但使用标准技术可以确定。组合物在受试者体内引发免疫应答,其产生抗体,包括抗 -HMW 蛋白抗体和调理或杀菌的抗体。在本发明优选的非限制性的实施方案中,有效量的本发明组合物产生的抗体滴度比给药前的抗体滴度至少高 3 倍。在本发明优选的,具体的,非限制性的实施方案中,给宿主施用约 0.01 至 2000 μ g,优选 0.1 至 500 μ g。优选组合物另外含有佐剂。

[0137] 免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物可被制成注射剂,液体溶液或乳剂。HMW 蛋白可与一种或多种可药用与 HMW 蛋白相容的赋型剂混合,所述赋型剂包括水,盐水,葡萄糖,甘油,乙醇及其混合物。

[0138] 免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物可进一步含有一种或多种辅剂,如湿润剂或乳化剂, pH 缓冲剂或增强其效力的佐剂。免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物可通过注射非肠道施用,也可经皮下或肌肉施用。

[0139] 或者,可以引发粘膜表面免疫应答的形式配制和传递根据本发明形成的免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物。因此,可通过例如鼻,口 (胃内),眼,鳃,阴道内或直肠内途径将免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物施用于粘膜表面。或者,也可使用其它给药方式,包括栓剂和口服制剂。对栓剂而言,结合剂和载体包括例如 polyalkalene glycols 或甘油三酯。口服制剂包括常用的赋型剂,例如药用级的甜味剂,纤维素和碳酸镁。这些组合

物可采取溶液,悬浮液,片剂,丸剂,胶囊,缓释制剂或粉末的形式,其含有约 0.001 至 95% 的 HMW 蛋白。以与剂量配制相容的方式施用免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物,施用的量应是治疗有效的,保护性的或免疫原性的。

[0140] 另外,免疫原性的,抗原性的药物和疫苗组合物可与一种或多种靶向分子联合或结合使用以传递至免疫系统的特定细胞,如粘膜表面。一些例子包括但不限于维生素 B12,细菌毒素或其片段,单克隆抗体和其它特定的靶向脂质,蛋白质,核酸或碳水化合物。

[0141] 给药的量取决于所治疗的受试者,包括例如个体免疫系统合成抗体,必要时产生细胞介导的免疫应答的能力。给药所需活性成分的精确的量取决于实际操作者的判断。然而,本领域技术人员容易确定适当的剂量范围,其约为 0.1 至 1000 微克 HMW 蛋白,其片段或类似物。初次给药和加强剂量的适当制度也是可变的,但可包括初次给药及再次给药。剂量也可取决于给药途径,并根据宿主的大小而变化。

[0142] 本发明的抗原性的,免疫原性的或药物组合物中 HMW 蛋白的浓度一般约为 0.001 至 95%。仅含有一种病原体的抗原性物质的疫苗为单价疫苗。含有几种病原体的抗原性物质的疫苗为联合疫苗,它也属于本发明。这种联合疫苗含有例如得自多种病原体或相同病原体的不同株或多种病原体的联合的物质。

[0143] 包括疫苗的抗原性的,免疫原性的或药物制品可含有核苷酸载体作为免疫刺激物,所述载体含有编码 HMW 蛋白的基因的至少一部分,或基因的至少一部分可直接用于免疫。

[0144] 为了有效地诱导体液免疫应答 (HIR) 和细胞介导的免疫力 (CMI),一般用佐剂乳化免疫原。如果免疫原与佐剂一起施用将会显著改善免疫原性。佐剂通过将免疫原局部保留在给药位点附近以产生便于将抗原缓释至免疫系统的细胞的储存效应而起作用。佐剂也可将免疫系统的细胞吸引至免疫原储存处并刺激这种细胞引发免疫应答。

[0145] 很多佐剂是有毒的,可诱导肉芽肿,急性和慢性炎症 (弗氏完全佐剂, FCA), 细胞溶解 (皂苷和 Pluronic 聚合物) 和热原性,关节炎和前色素层炎 (LPS 和 MDP)。尽管 FCA 是出色的佐剂并广泛用于研究中,但因其毒性而未被准许用于人或兽用疫苗中。

[0146] 理想佐剂的合乎需要的特征包括:

[0147] (1) 无毒性;

[0148] (2) 能刺激长期免疫应答;

[0149] (3) 操作简单,且在长期储存中具有稳定性。

[0150] (4) 必要时能引发针对通过多种途径给药的抗原的 CMI 或 HIR 或

[0151] (5) 与其它佐剂能协同作用;

[0152] (6) 能选择性地与抗原呈递细胞 (APC) 群体相互作用;

[0153] (7) 能特异性引发适当的 T_H1 或 T_H2 细胞特异性免疫应答;和

[0154] (8) 能选择性增加针对抗原的适当的抗体同种型水平 (例如 IgA)。

[0155] 多年来,一直使用免疫刺激剂或佐剂以改善宿主针对例如疫苗的免疫应答。如脂多糖的内源性佐剂一般是用作疫苗的灭活或减毒细菌的组分。外源性佐剂是免疫调节剂,一般使其与抗原非共价连接,配制它是为了增强宿主的免疫应答。因此,增强针对非肠道传递的抗原的免疫应答的佐剂已被鉴定。氢氧化铝和磷酸铝 (一般总称为明矾) 被常规用作人和兽用疫苗的佐剂。明矾增加针对白喉和破伤风类毒素的抗体应答的效力已经确定,明

矾被用作 HBsAg 疫苗的佐剂。

[0156] 其它外源性佐剂可包括与膜蛋白抗原复合的皂苷（免疫刺激复合物），含矿物油的 pluronic 聚合物，含矿物油的分支杆菌，弗氏完全佐剂，细菌产物，如胞壁酰二肽（MDP）和脂多糖（LPS）以及脂质 A 和脂质体。

[0157] 列入本文作为参考的国际专利申请 PCT/US95/09005 描述了肠毒性大肠杆菌的热不稳定毒素的突变形式（“mLT”），列入本文作为参考的美国专利 5,057,540 描述了佐剂 Qs21，列入本文作为参考的英国专利 2,220,211 中描述了皂苷经 HPLC 纯化的无毒组分 3D-MPL，其中皂苷得自南美树种 *Quilaja saponaria molina* 的树皮。

[0158] 1989 年 8 月 8 日授予 Lockhoff 等人的美国专利 4,855,283（列入本文作为参考）教导了作为免疫调节剂或佐剂的糖脂类似物，包括 N-糖基酰胺，N-糖基脲和 N-糖基氨基甲酸酯，它们的糖基都被氨基酸所取代。Lockhoff 报道了单纯疱疹病毒疫苗和假狂犬病病毒疫苗中的 N-糖磷脂和糖基甘油酯能引发强的免疫应答。已由长链烷基胺和通过异头碳原子与糖直接相连的脂肪酸合成了一些糖脂以模拟天然脂质残基的功能。

[0159] 授予 Moloney 的美国专利 4,258,029（列入本文作为参考）教导了十八酪氨酸盐氧化物（OTH）当与破伤风类毒素和用福尔马林灭活的 I，II 和 III 型脊髓灰质炎病毒疫苗复合时可用作佐剂。合成肽的脂化也被用于增加其免疫原性。

[0160] 因此，根据本发明，含有 HMW 蛋白或其片段或其衍生物或 HMW 编码核酸或其片段或其表达载体的免疫原性的，抗原性的，药物，包括疫苗组合物可进一步含有佐剂，例如但不限于明矾，mLT，QS21 和上文所列的所有其它佐剂。优选佐剂选自明矾，LT，3D-mPL 或卡介苗（BCG）和上述物质的突变或修饰形式，尤其是 mLT 和 LTR192G。本发明的组合物还可进一步含有适当的药物载体，包括但不限于盐水，碳酸氢盐，葡萄糖或其它水溶液。其它适当的药物载体描述于本领域的标准参考书 Remington's 药物科学，Mack 出版公司中（其全文列入本文作为参考）。

[0161] 免疫原性的，抗原性的，药物，包括疫苗组合物可在适当的无毒性的药物载体中被施用，可被包含在微胶囊中，和 / 或包含在缓释的植入体中。

[0162] 免疫原性的，抗原性的，药物，包括疫苗组合物可以几个间隔给药以保持抗体水平，和 / 或与其它杀菌或抑菌方法联合使用。

[0163] 通过本领域技术人员熟知的任何常规方法可得到本文和权利要求书中所用的本发明“抗体”，所述方法例如但不限于“抗体，实验室手册”（E. Harlow, D. Lane, 冷泉港实验室出版社，1989）中描述的方法（其全文列入本文作为参考）。术语“抗体”欲包括所有的抗体形式，例如但不限于多克隆，单克隆，纯化的 IgG，IgM，IgA 及其片段，包括但不限于如 Fv，单链 Fv（scFv），F(ab')₂，Fab 的片段（Harlow 和 Leon，1988，抗体，冷泉港）；单链抗体（美国专利 4,946,778），嵌合或人源化抗体（Morrison 等人，1984，Proc. Natl Acad. Sci. USA 81:6851；Neuberger 等人，1984，自然 81:6851）和互补决定区（CDR）（见 Verhoeyen 和 Windust，分子免疫学，第 2 版，B. D. Hames 和 D. M. Glover，IRL 出版社，牛津大学出版社，1996，p283-325）等。

[0164] 一般说来，用不含或含佐剂或任何能增强免疫原效力之药剂的本发明 HMW 蛋白或其核酸序列或其致免疫的片段或其衍生物免疫动物（可使用多种脊椎动物，最常用的是小鼠，大鼠，豚鼠，牛，猪，仓鼠，绵羊，鸟和兔）并以规则的间隔加强免疫。通过任何常规的方

法测定动物血清中所需抗体的存在。所述动物的血清或血液可用作多克隆抗体的来源。

[0165] 按上文所述处理动物也可得到单克隆抗体。当检测到可接受的抗体滴度时,使动物安乐死,无菌取出脾脏以用于融合。将脾细胞与特别选择的无限增殖的骨髓瘤细胞系混合,将混合物暴露于可促进细胞融合的

[0166] 抗原,免疫原和免疫测定法

[0167] HMW 蛋白或编码该蛋白的核酸,及其片段可用作抗原或免疫原以产生抗 HMW 蛋白的抗体或用作免疫测定法中的抗原,所述免疫测定法包括酶联免疫吸附测定法 (ELISA),放射性免疫测定法 (RIA) 和其它非酶联抗体结合测定法或本领域已知的用于检测抗细菌,抗衣原体和抗 HMW 蛋白的抗体的方法。在 ELISA 测定法中,HMW 蛋白被固定在选定的表面,例如能结合蛋白质的表面,如聚苯乙烯微滴板的孔。洗涤除去不完全吸附的 HMW 蛋白之后,已知对检测样品而言为抗原中性的非特异性蛋白溶液被结合于选定表面。这可封闭固定化表面上的非特异性吸附位点,从而降低抗血清非特异性地与表面结合所致的背景。

[0168] 然后,以有助于免疫复合物(抗原/抗体)形成的方式使固定化的表面与样品,如待测的临床或生物学物质接触,它包括用稀释剂,如牛 γ 球蛋白(BGG)和/或磷酸缓冲盐水(PBS)/吐温溶液稀释样品。然后于约 20 至 37°C 的温度下将样品保温 2 至 4 小时。保温之后,洗涤与样品接触的表面以除去非免疫复合的物质。洗涤程序包括用如 PBS/吐温或硼酸盐缓冲液的溶液洗涤。检测样品与结合的 HMW 蛋白之间形成特异性的免疫复合物之后,洗涤,通过使免疫复合物接触对第一抗体具有特异性的第二抗体可测定免疫复合物形成的出现,甚至是出现的量。如果检测样品来源于人,第二抗体是对人免疫球蛋白具有特异性的抗体,一般为 IgG。

[0169] 为了提供检测工具,第二抗体可具有联合活性,如通过与适当的生色底物保温可产生颜色的酶活性,通过检测颜色的产生即可完成检测,通过使用例如可见的分光光度计并与适当的标准进行比较可进行定

[0170] 另一个实施方案包括诊断试剂盒,其含有进行本发明所需免疫测定法必需的所有基本试剂。诊断试剂盒可以装有必需试剂的一个或多个容器组合的商业包装形式被提供。所述试剂盒可包括 HMW 蛋白或编码该蛋白的核酸或其片段,本发明的单克隆或多克隆抗体以及几种常规的试剂盒组分。常规的试剂盒组分对本领域技术人员而言是显而易见的,其公开于多种出版物中,包括“抗体,实验室手册”(E. Harlow, D. Lane, 冷泉港实验室出版社, 1989) 中描述的方法(其全文列入本文作为参考)。常规的试剂盒组分可包括下列物质,例如微滴板,维持检测混合物之 pH 的缓冲液(例如但不限于 Tris, HEPES 等),缀合的第二抗体,如与过氧化物酶缀合的抗小鼠 IgG(或针对从中得到第一抗体的动物的任何抗 IgG)等,和其它标准试剂。

[0171] 核酸及其用途

[0172] 使用本领域已知的方法,如使用常规的化学方法或使用方便的寡核苷酸引物对进行的聚合酶链反应(PCR)扩增和使用一组连续的寡核苷酸进行的连接酶链反应可合成本发明的核苷酸序列,所述序列包括 DNA 和 RNA 并含有编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的序列。所述序列也可用于从任何衣原体中鉴定和克隆 HMW 蛋白基因,例如可用于筛选衣原体基因组文库或表达文库。

[0173] 编码本发明 HMW 蛋白的核苷酸序列的用途在于它们能与其它蛋白质基因的一段

互补序列选择性地形成双链体分子。根据应用的不同,可使用多种杂交条件得到不同的序列同一性。具体地说,提供的核酸含有与 HMW 蛋白基因的至少 10,15,25,50,100,200 或 250 个核苷酸互补的序列(图 2)。在具体的实施方案中,提供的核酸可在低度,中度或高度严紧的退火条件下与 HMW 蛋白核酸(如具有序列 SEQ ID NO:1,23 或 24)杂交。

[0174] 为了得到高水平的选择性,可使用相对严紧的条件形成双链体,例如但不限于低盐和/或高温条件,如温度约为 50℃至 70℃下使用 0.02M 至 0.15M NaCl。对于一些应用而言,需要较不严紧的杂交条件,例如但不限于在约 20℃至 55℃的温度范围内使用 0.15M 至 0.9M 的盐。通过加入增加量的甲酰胺可使杂交条件变得更加严紧以使杂合的双链体不

[0175] 低度,中度和高度严紧的条件是本领域技术人员众所周知的,并根据碱基组成和特定核酸序列的长度以及得到核酸序列的特定生物体的不同而能可推测地变化。有关这种条件的指导,可参见例如 Sambrook 等,1989,分子克隆,实验室手册,第 2 版,冷泉港实验室出版社,纽约,p9.47-9.57;和 Ausubel 等,1989,分子生物学最新方法,GreenPublishing Associates and Wiley Interscience,纽约(列入本文作为参考)。

[0176] 在制备基因组文库时,产生了 DNA 片段,其中一些可编码部分或全部的衣原体 HMW 蛋白。可使用多种限制性酶在特定位点裂解 DNA。或者,可在锰的存在下使用 DNA 酶以使 DNA 片段化,或通过例如超声处理物理剪切 DNA。然后通过包括但不限于琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳,柱层析和蔗糖梯度离心的标准技术根据大小分离 DNA 片段。然后将 DNA 片段插入适当载体中,包括但不限于质粒,粘粒,噬菌体 λ 或 T_4 ,杆粒和酵母人工染色体(YAC)(例见 Sambrook 等,1989,分子克隆,实验室手册,第 2 版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约;Glover, D.M.(编),1985, DNA 克隆:操作方法, MRL 出版有限公司,英国牛津, Vol. I, II)。通过使核酸与经标记的探针杂交可筛选基因组文库(Benton 和 Davis,1977,科学 196:180;Grunstein 和 Hogness,1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72:3961)。

[0177] 使用本领域众所周知的最适方法,用经标记的对应于 HMW 蛋白任何肽的氨基酸序列的简并寡核苷酸探针筛选基因组文库。在特定的实施方案中,筛选探针是对应于 SEQ ID NO:4 的序列的简并寡核苷酸。在另一个实施方案中,筛选探针可以是对应于 SEQ ID NO:5 的序列的简并寡核苷酸。在另外的实施方案中,寡核苷酸 SEQ ID NO:6-9,12-14 和 18-21 中的任一个都可用作探针。在其它实施方案中,序列 SEQ ID NO:1,10-11 和 22-24 中的任一个或其任何片段,或其任何互补序列或其片段都可用作探针。优选使用的任何探针为 15 个核苷酸或更长。

[0178] 文库中具有编码 HMW 蛋白或其片段的插入 DNA 的克隆会与一个或多

[0179] 另一方面,通过筛选衣原体表达文库也可得到编码部分或全部 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽的核苷酸序列的克隆。例如,分离衣原体 DNA 或由 RNA 产生的衣原体 cDNA,制备随机片段并连接至表达载体(如噬菌体,质粒,噬粒或粘粒)中,将所述载体导入宿主细胞以使载体中的插入序列能被该细胞表达。可使用多种筛选试验选择表达的 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽。在一个实施方案中,可使用本领域已知的方法将本发明的多种抗-HMW 抗体用于鉴定所需克隆,例见 Harlow 和 Lane,1988,抗体:实验室手册,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,附录 IV。将得自文库的克隆或噬斑与抗体接触以鉴定结合的克隆。

[0180] 在一个实施方案中,根据 Olsvick 等,29th ICAAC, Houston, Tex. 1989 所述方法(列入本文作为参考),使用 DYNA 珠检测含有编码 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽之 DNA 的克隆

或噬斑。将抗-HMW 抗体与甲苯磺酰化 DYNA 珠 M280 交联,然后使用这些含抗体的珠吸附表达 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽的克隆或噬斑。表达 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽的克隆或噬斑被鉴定为与珠结合的任何克隆或噬斑。

[0181] 或者,可将抗 HMW 抗体非特异性地固定于适当的支持物,如硅石或 Celite™ 树脂上。然后使用该材料吸附上述表达 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽的细菌菌落。

[0182] 另一方面,可使用 PCR 扩增由衣原体基因组 DNA 产生基本上纯的编码部分或全部 HMW 蛋白的 DNA。可将对应于已知 HMW 蛋白序列的简并或非简并寡核苷酸引物用作引物。在特定的实施方案中,可将编码氨基酸序列为 SEQ ID NO:2,3 或 15-17 之肽或其任一部分的简并或非简并寡核苷酸用作 5' 引物。至于片段的例子,5' 引物可由 SEQ ID NO:4-7,10,12,22-24 中的任一核苷酸序列或其任何部分制成。为 SEQ ID NO:11,13 或 14 之反向互补物的简并或非简并核苷酸序列可用作 3' 引物。

[0183] 使用例如 Perkin-Elmer Cetus 热循环仪和 Taq 聚合酶 (Gene Amp™) 可进行 PCR。可以选择合成几个不同的简并引物以用于 PCR 反应。也可以改变引发 PCR 反应所用杂交条件的严紧性以使简并引物与衣原体 DNA 的相应序列之间的核苷酸序列相似水平更高或更低。成功扩增编码 HMW

[0184] 在临床诊断实施方案中,本发明 HMW 蛋白基因的核苷酸序列可与适当指示物,如标记物联合使用以检测杂交情况。本领域已知多种适当的指示物,包括能提供可测信号的放射性标记,酶标记或其它配体,如亲和素/生物素和地高辛配基标记。在一些诊断实施方案中,可使用酶标记,如脲酶,碱性磷酸酶或过氧化物酶替代放射性标记。使用酶标记时,比色指示底物是已知的,使用它们能提供人眼或分光光度计可见的信号以鉴定与含 HMW 蛋白基因序列的样品的特异性杂交。

[0185] 本发明 HMW 蛋白基因的核酸序列在溶液杂交和利用固相方法的实施方案中可用作杂交探针。在涉及固相方法的实施方案中,将得自样品的受试 DNA (或 RNA) 吸附或要不然粘附于选定的基质或表面,所述样品如临床样品,包括溢泌物,体液 (如血清,羊水,中耳渗出物,唾液,精液,尿液,眼泪,粘液,支气管肺泡灌洗液) 或甚至是组织。然后在所需条件下使固定的单链核酸与选定探针进行特异性杂交,所述探针含有本发明编码 HMW 蛋白或其片段或类似物的基因的核酸序列。根据所需的特定规则,选定的条件取决于具体情况,例如,G+C 含量,靶核酸的类型,核酸的来源,杂交探针的大小等。洗涤杂交表面以除去非特异性结合的探针分子之后,利用标记物检测或甚至定量检测特异性杂交。优先选择衣原体中保守的核酸序列部分。选定的探针至少为 15bp,可以为约 30 至 90bp。

[0186] 表达 HMW 蛋白基因

[0187] 可使用质粒载体在表达系统中表达编码 HMW 蛋白或其片段的基因,所述载体含有得自与宿主细胞相容之物种的复制子和控制序列。表达载体含有转录和翻译插入的蛋白质编码序列所需的所有必需元件。载体一般携有复制位点以及能在转化细胞中提供表型选择的标记序列。例如,可使用含有氨苄青霉素和四环素抗性细胞之基因的 pBR322 转化大肠杆菌。也可使用其它商购的载体,包括但不限于 pZERO, pTrc99A, pUC19, pUC18, pKK223-3, pEX1, pCAL, pET, pSPUTK, pTrxFus,

[0188] 另外,含有与宿主相容之复制子和控制序列的噬菌体载体可用作与这些宿主相关的转化载体。例如,可使用 λ GEM™-11 中的噬菌体制备用于转化宿主细胞,如大肠杆菌

LE392 的重组噬菌体载体。

[0189] 常用于重组 DNA 构建的启动子包括 β -内酰胺酶（青霉素酶）和乳糖启动子系统和其它的微生物启动子，如美国专利 4,952,496 中所述的 T7 启动子系统。启动子的核苷酸序列的有关细节是已知的，本领域技术人员可将它们与基因有效连接。一般根据所需结果选择所用的特定启动子。

[0190] 根据本发明，优选通过重组方法制备 HMW 蛋白，尤其是当分离自衣原体培养物的天然 HMW 蛋白中含有痕量毒性物质或其它污染物时更是如此。使用在异源系统中重组产生的 HMW 蛋白可避免这一问题，所述蛋白可以分离物中污染物最少的方式分离自宿主。在此方面，特别合适的表达宿主包括不具有 LPS 因而不含内毒素的革兰氏阳性细菌。这种宿主包括芽孢杆菌，它们特别适用于产生非热原性的 rHMW 蛋白及其片段或类似物。

[0191] 可使用多种宿主-载体系统表达蛋白质编码序列，它们包括但不限于被病毒（如痘苗病毒，腺病毒等）感染的哺乳动物细胞系统；被病毒（如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统；微生物，如含有酵母载体的酵母，或被噬菌体 DNA，质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌。适于表达 HMW 蛋白基因及其片段，类似物或变体的宿主包括大肠杆菌，芽孢杆菌，嗜血杆菌，真菌，酵母，如毕赤氏糖酵母，包特菌属，或者也可使用杆状病毒表达系统。优选宿主细胞是细菌，最优选细菌是大肠杆菌，枯草芽孢杆菌或沙门氏菌。

[0192] 载体表达元件的强度和特异性有所不同。根据所用的宿主-载体系统，可使用多种适当的转录和翻译元件中的任一种。在优选的实施方案中，表达了含有 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽序列和宿主细胞的 pre 和 / 或 pro 序列的嵌合蛋白。在其它优选的实施方案中，表达了含有与例如亲和纯化肽融合的 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽序列的嵌合蛋白。在其它优选的实施方案中，表达了含有 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽序列和有用的免疫

[0193] 可使用本领域已知的任何将 DNA 片段插入载体中的方法来构建含有嵌合基因的表达载体，所述基因由适当的转录 / 翻译控制信号和蛋白质编码序列组成。这些方法包括体外重组 DNA 和合成技术和体内重组（基因重组）。可通过第二核酸序列调节编码 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽的核酸序列的表达以使插入序列能在被重组 DNA 分子转化的宿主中表达。例如，插入序列的表达可由本领域已知的任何启动子 / 增强子元件来控制。可用于控制插入序列表达的启动子包括但不限于 SV40 早期启动子区域 (Bernoist 和 Chambon, 1981, 自然, 290 :304-310), Rous 肉瘤病毒之 3' 长末端重复中所含的启动子 (Yamamoto 等, 1980, 细胞 22 :787-797), 疱疹病毒胸苷激酶启动子 (Wagner 等, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 :1441-1445), 用于在动物细胞中表达的金属硫蛋白基因调节序列 (Brinster 等, 1982, 自然 296 :39-42); 用于在细菌细胞中表达的 β -内酰胺酶 (Villa-Kamaroff 等, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 :3727-3731), tac (DeBoer 等, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 :21-25), P_L 或 trc 启动子 (也见“重组细菌的有用蛋白质”, Scientific American, 1980, 242 :74-94); 胭脂氨酸合成酶启动子区域或花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子 (Gardner 等, 1981, 核酸研究, 9 :2871) 和用于在植入细胞中表达的光合酶核酮糖二磷酸羧化酶启动子 (Herrera-Estrella 等, 1984, 自然 310 :115-120); 酵母或其它真菌的启动子元件, 如 Gal4 启动子, ADC (醇脱氢酶) 启动子, PGK (磷酸甘油激酶) 启动子, 碱性磷酸酶启动子。

[0194] 通过 3 种一般方法可鉴定含有 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽编码序列的表达载体 : (a)

核酸杂交, (b) “标记”基因功能的存在或缺乏和 (c) 插入序列的表达, 如与抗 HMW 抗体的反应性。在第一种方法中, 使用含有与插入的 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽编码序列同源的序列的探针, 经核酸杂交可检测表达载体中所插入的外源基因的存在。在第二种方法中, 根据因载体中插入外源基因所致的某些“标记”基因功能 (如胸苷激酶活性, 抗生素抗性, 转化表型, 杆状病毒中的包涵体形成等) 的存在与否, 可鉴定和选择重组载体 / 宿主系统。例如, 如果 HMW 蛋白或 HMW 衍生多

[0195] 一旦鉴定并分离出特定的重组 DNA 分子, 可使用本领域已知的几种方法使之增殖。一旦确定了适当的宿主系统和生长条件, 可大量增殖和制备重组表达载体。如上文所解释, 可以使用的表达载体包括但不限于下列载体或其衍生物: 人或动物病毒, 如痘苗病毒或腺病毒; 昆虫病毒, 如杆状病毒; 酵母载体; 噬菌体载体 (如 λ) 和噬粒和粘粒 DNA 载体, 提到的只是一些代表而已。

[0196] 另外, 可选择能调节插入序列的表达, 或以合乎需要的特殊方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。在某些诱导物的存在下, 某些启动子可使表达水平升高; 因此, 可以控制经基因工程改造的 HMW 蛋白或 HMW 衍生多肽的表达。另外, 不同宿主细胞具有特征性的和特异性的翻译和翻译后加工和修饰蛋白质的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以确保能按需要修饰和加工所表达的外源蛋白质。

[0197] 本发明的蛋白质, 多肽, 肽, 抗体和核酸可用作临床或医学诊断衣原体感染的试剂, 也可用作有关衣原体之致病性, 毒力和感染性以及宿主防御机制的科学研究的试剂。例如, 本发明的 DNA 和 RNA 可用作探针以通过杂交或 PCR 扩增鉴定生物样品中衣原体的存在, DNA 和 RNA 也可用于鉴定可能编码与衣原体 HMW 蛋白相关之多肽的其它细菌。本发明的蛋白质可用于制备多克隆和单克隆抗体, 通过亲和层析可将所述抗体用于进一步纯化含有本发明蛋白质的组合物。在标准的免疫测定法中也可使用蛋白质筛选样品中抗衣原体抗体的存在。

[0198] 7. 生物保藏

[0199] 在提交本申请前, 根据布达佩斯条约和 37CFR 1.808 的规定将含有具有本文所述衣原体 HMW 蛋白编码基因之开放阅读框的基因部分的某些质粒保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 该中心位于 10801 Universiy Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, 美国。

[0200] 以本美国专利申请为基础的专利被授权之后, 公众即可得到保藏材料的样品。本文描述和要求权利的发明不受所保藏质粒的范围限制, 因为保藏的方案仅以阐明本发明为目的。编码与本申请所述相似或功能等同的蛋白质或其片段或类似物的任何功能等同的或相似的质粒也包括在本发明的范围之内。

[0201]	质粒	ATCC 保藏号	保藏日
[0202]	pAH342	ATCC98538	1997 年 9 月 8 日

[0203] 8. 实施例

[0204] 上述内容一般性地描述了本发明, 下文实施例提供了更具体的描述。实施例的描述仅是为了阐明本发明, 而不会限制本发明的范围。当情况所需或更为便利时, 形式的变化和等同物的替代也在考虑之列。尽管本文使用了特定的术语, 但这些术语仅是为了描述而不是限制本发明。

[0205] 描述部分和实施例中使用但未详细描述分子遗传学、蛋白质生物化学和免疫学的方法在科学文献中已有详尽的报道,本领域技术人员能熟练掌握这些方法。

[0206] 8.1. 实施例 1:分离和纯化成熟的衣原体蛋白

[0207] 于 37℃,5% CO₂ 中,使用添加有 10% 无衣原体抗体的胎牛血清,葡萄糖和非必需氨基酸的 DMEM 培养基,在标准的 225cm² 组织培养瓶或 Bellco 旋动培养瓶 (Cytodex microcarrier, Pharmacia) 中培养 McCoy 细胞。砂眼衣原体 L₂ 原体 (ATCC VR-902B) 制备自感染的 McCoy 细胞的裂解物。基本地,超声处理被砂眼衣原体 L₂ (LGV) 感染的 McCoy 细胞,离心除去细胞碎片。然后离心含有衣原体原体 (EB) 的上清液,将含有 EB 的沉淀物重新悬浮于 Hank 氏平衡盐溶液 (HBSS) 中。加入 RNA 酶 /DNA 酶溶液,37℃ 保温 1 小时,偶尔混合。将含有 EB 的溶液在 Angiovisc370 (3,5- 双乙酰氨基 -2,4,6- 三碘苯甲酸 melgumine 和 3,5- 双乙酰氨基 -2,4,6- 三碘苯甲酸钠的混合物, Berlex Laboratories, Wayne, NJ) 不连续的密度梯度 (40%, 44% 和 54%) 上分层,超速离心以在梯度上

[0208] 用含 0.1% OGP [高离子强度] 的 HBSS 连续提取纯化的 EB 以除去外周表面蛋白,然后置于冰上。用含有 0.1% OGP, 10mM DTT, 1mM PMSF, 10mMEDTA 的 50mM Tris pH7.4 缓冲液提取同一 EB 制品。透析 (3500MWCO) 提取物以除去去污剂和其它试剂,并通过冻干浓缩。用 HBSS 稀释含蛋白质的提取物,流经商购的肝素-琼脂糖凝胶柱 (Hitrap Col., Pharmacia)。将样品上样于肝素柱之后,通过用过量的 HBSS 洗涤以除去未粘附的蛋白质。用含有 2M 氯化钠的 PBS 分批洗脱结合的蛋白质。充分透析洗脱物以除去盐,然后冻干。通过 SDS-PAGE 对与肝素结合的蛋白质进行大小分级分离,通过银染进行观察或通过 Western 印迹进行分析。如图 1 所示,检测到以中等量存在的约 105-115KDa 的蛋白质。经测定,天然 HMW 蛋白的等电点约为 5.95。

[0209] 为了得到一个 N 末端氨基酸序列,将足够量的 HMW 蛋白 (≥ 5 μg) 电印迹于 PVDF 膜 (Applied Biosystems) 上,用考马斯蓝染色。从膜上释放固定的 HMW 蛋白,用低水平的内肽酶 Lys-C, 内肽酶 Arg-C 和 / 或内肽酶 Glu-C 原位处理之以使天然蛋白质片段化。通过 HPLC 纯化所得肽片段,使用 ABI 430 蛋白质测序仪和标准的蛋白质测序方法测定其 N 末端的氨基酸序列, N- 末端的氨基酸序列为:

[0210] E-I-M-V-P-Q-G-I-Y-D-G-E-T-L-T-V-S-F-X-Y

[0211] 此序列被表示为 SEQ ID NO:3。

[0212] 当使用精确匹配的参数,用 HMW 蛋白 N 末端序列 (20 个残基) 检索复合数据库 PDB+SwissProt+PIR+GenPept 时,未发现精确的同源性,因此, HMW 蛋白是新的衣原体蛋白。由于此蛋白质是在应仅释放外膜蛋白 (如 Omp2) 的条件下分离的,这些数据表明 HMW 蛋白是表面相关蛋白。

[0213] 8.2. 实施例 2:制备针对完整的衣原体 EB 的抗体

[0214] 为了鉴定 HMW 蛋白,针对砂眼衣原体 L₂ 的完整 EB 产生超免疫兔抗血清。用约 250 微克衣原体 EB 对每只动物总共进行 3 次免疫,每次注射 (开始用完全弗氏佐剂,接着用不完全弗氏佐剂) 间隔约 21 天。每次

[0215] 8.3. 实施例 3:测定翻译后修饰

[0216] 最近,已证实几种砂眼衣原体膜相关蛋白在翻译后被修饰。18KDa 和 32KDa 的富含半胱氨酸的 EB 蛋白为凝集素-结合蛋白,已证实它携有特异性的糖类组成成分 (Swanson,

A. F. 和 C. C. Kuo, 1990, *Infect. Immun.* 58 :502-507)。放射性标记的棕榈酸的掺入被用于阐明约 27KDa 的砂眼衣原体 Mip- 样蛋白是脂质化的 (Lundemose, A. G., D. A. Rouch, C. W. Penn 和 J. H. Pearce, 1993, *细菌学杂志*, 175 :3669-3671)。Swanson 等发现 L₂ 血清变种的 MOMP 含有 N- 乙酰葡萄糖胺和 / 或 N- 乙酰半乳糖胺, 这些糖类组成成分介导 MOMP 与 HeLa 细胞膜的结合。

[0217] 为了确定 HMW 蛋白是否为糖基化的, 可在含氟半乳糖或葡萄糖胺的存在下, 在 McCoy 细胞上培养 EB, 对 EB 进行肝素亲和层析, 通过 SDS-PAGE 和放射自显影分析肝素结合蛋白。简单地说, 在标准条件下 (DMEM+10% FCS, 每瓶 35ml, 10% CO₂), 在 T225 瓶中培养 McCoy 细胞至约 90% 铺满, 用足够量的 EB 接种以获得 90% -100% 的感染性。37℃ 感染 3 小时之后, 加入环己酰亚胺 (1 μg/ml) 以抑制宿主细胞合成蛋白质, 再将培养物保温 4 至 6 小时。然后在每个瓶中加入约 0.5mCi 含氟半乳糖 (D-[4,5-³H(N)] 半乳糖, NEN) 或葡萄糖胺 (D-[1,6-³H(N)] 葡萄糖胺, NEN), 再将培养物保温 30 至 40 小时。刮擦收集细胞, 通过梯度离心纯化 EB。通过亲和层析从 1.0% OGP 表面提取物中分离 HMW 蛋白, 用 NaCl 洗脱, 通过使用 ¹⁴C- 标记的分子量标记 (BRL) 的 SDS-PAGE, 然后进行放射自显影分析 HMW 蛋白。于 -70℃ 将干燥的凝胶暴露于 Kodak X-AR 胶片达 1 至 4 周。

[0218] 为了测定合成后的脂质修饰, 根据标准方法在 McCoy 细胞单层上培养砂眼衣原体血清变种 L₂。感染后约 24 小时, 除去常规培养基 (DMEM+10% FCS), 用含有环己酰亚胺 (1 μg/ml) 和 [U-¹⁴C] 棕榈酸 (0.5mCi/T225 瓶, NEN) 的无血清培养基取代之, 再保温 16 至 24 小时以使蛋白质脂质化。按上述制备表面 EB 提取物, 分离肝素结合蛋白, 并通过放射自显影进行分析。

[0219] 通过用适当的糖苷酶处理完整的 EB 或 OGP 表面提取物以评估糖基化或脂质化组成成分的功能性。除去糖类之后, 对提取物进行亲和层析和 SDS-PAGE 以测定 HMW 蛋白是否保留了结合硫酸肝素的能力。

[0220] 8.4. 实施例 4: 克隆 HMW 蛋白基因的 N 末端区段

[0221] 根据 HMW 蛋白的 N 末端氨基酸序列设计简并的寡核苷酸并合成之。然后使用这些寡核苷酸产生基因特异性的 PCR 产物, 该产物可用作杂交探针以筛选砂眼衣原体 L₂ λ ZAPII DNA 文库, 从中分离 HMW 蛋白基因。

[0222] 简单地说, 通过计算机分析 (MacVector, IBI) 从 N 末端和内部氨基酸序列数据中鉴定出适当的低简并性的肽区段, 使用该区段可指导设计低简并性序列 - 特异性的寡核苷酸 PCR 引物套。

[0223] 使用 N 末端一级序列作为指导, 设计出 4 个简并的寡核苷酸探针, 所述探针与编码 HMW 肽的前 6 个残基 E-I-M-V-P-Q (SEQ ID NO :42, 相应于 SEQ ID NO :3 的残基 1-6) 的核苷酸互补并含有所有可能的核苷酸组合 (总的简并性 = 192 个独立序列), 将该探针用作正向扩增引物。

[0224] SEQ ID NO :45' -GAA-ATH-ATG-GTN-CCN-CAA-3'

[0225] SEQ ID NO :55' -GAA-ATH-ATG-GTN-CCN-CAG-3'

[0226] SEQ ID NO :65' -GAG-ATH-ATG-GTN-CCN-CAA-3'

[0227] SEQ ID NO :75' -GAG-ATH-ATG-GTN-CCN-CAG-3'

[0228] 另外还设计了两个寡核苷酸探针, 所述探针代表内部 5 个残基肽 Y-D-G-E-T (SEQ

ID NO:3 的残基 9-13) 的反向互补 DNA 序列并含有所有可能的核苷酸组合 (总的简并性 = 128 个独立序列), 将该探针用作反向扩增引物。

[0229] SEQ ID NO:85' -NGT-YTC-NCC-RTC-ATA-3'

[0230] SEQ ID NO:95' -NGT-YTC-NCC-RTC-GTA-3'

[0231] 在使用 0.2 μmol 规格的柱 (三苯甲基-on, 自动裂解) 和标准亚磷酰胺化学法的 ABI 380B 型 DNA 合成仪上合成寡核苷酸。在 C-18 针筒式柱 (OP 柱, ABI) 上手工纯化粗提的寡核苷酸。用分光光度计

[0232] 使用约 0.2 微克砂眼衣原体 L_2 DNA (如果是单拷贝的话, 约为 3×10^7 拷贝 HMW 蛋白基因) 和约 100pmol 各种正向 (N 末端寡核苷酸) 和反向 (内部寡核苷酸) 引物, 按程序进行标准的 PCR 扩增反应 (2mM Mg^{2+} , 200 μmol dNTP, 0.75 单位 AmpliTaq, 终体积为 50 μl)。至少在开始时应使用高于正常浓度 (约 20pmol/50 μl) 的引物进行扩增以补偿引物简并性。使用标准的 30 轮循环, 3 步热分布, 即 95°C 30 秒; 60°C 45 秒, 72°C 1 分钟获得靶序列的扩增。使用 Idaho Technologies 热循环仪在密封的 50 μl 玻璃毛细管中进行扩增。为了证实扩增反应过程中产生的 PCR 产物特异于 HMW 蛋白编码序列而不是“引物-二聚体”或其它 DNA 扩增假象, 使用硅胶自旋柱 (QIAGEN) 纯化扩增产物, 将其克隆至 PCR 克隆载体 pZERO (StrataGene) 中, 并直接进行 DNA 序列分析。

[0233] 使用常规的双脱氧-终止剂测序化学和经修饰的 T7 DNA 聚合酶 (Sequenase, USB) 测定克隆的 PCR 产物的 DNA 序列。简单地说, 通过用 NaOH 简单处理变性每个双链质粒模板。中和之后, 使用每个变性的模板进行 4 个独立的测序反应。每个反应含有 M13 通用正向测序引物 (21-聚体), 但 ddNTP/dNTP 终止混合物 (即 A, G, C 或 T) 有所不同。通过在反应中包括 [α - ^{35}S]dATP (约 50 μCi /反应, $> 3000\text{Ci}/\text{mmol}$, Amersham) 以标记终止产物。使各个延伸产物变性 (甲酰胺, 约 95°C), 对其进行高分辨率的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (6% 丙烯酰胺, 8M 尿素, TAE 缓冲液, 约 500V, 约 90 分钟)。然后将测序凝胶转移至滤纸 (Whatmann 3MM) 上, 真空干燥, 于 -70°C 进行放射自显影 24 至 72 小时。从每个凝胶上人工读出碱基序列并测定共有序列。

[0234] 通过 PCR 产生适于文库筛选和 / 或 Southern 印迹的 HMW 蛋白-特异性扩增产物, 在扩增过程中, 在反应混合物中加入 [α - ^{35}P]dNTP (每种 dNTP 约 50 μCi , $> 5000\text{Ci}/\text{mmol}$, Amersham) 以均匀地放射性标记所述引物。按上述进行标记反应, 不同的是使用 Bellco 热循环仪在 0.5ml 微量离心管中进行反应。使用离心大小排阻层析柱 (BioSpin6 柱, BioRad) 从反应混合物中除去未掺入的标记物和扩增引物。

[0235] 通过将基因组 DNA 经 EcoRI 部分消化而产生的经大小-分级分离的 $\geq 10\text{kbp}$ 的片段克隆至 λ 克隆载体 λ ZAPII (Stratagene) 中, 构建出高度丰余的砂眼衣原体血清变种 L_2 DNA 文库 ($> 50,000$ 原始克隆)。使用经

[0236] 为了证实纯化的噬粒衍生物携带 HMW 蛋白序列, 制备质粒 DNA, 使用该 DNA 进行含有 HMW 蛋白特异性 PCR 引物套的扩增反应。通过适当大小的 PCR 产物的产生证实 HMW 蛋白特异性插入物的存在。

[0237] 质粒 pAH306 是一个通过这些方法分离的含有 HMW 蛋白编码序列的衍生物。

[0238] pAH306 物理图谱的绘制

[0239] 绘制 pAH306 中插入物的物理图谱, 使用适当的 6-碱基限制性内切核酸酶 (如

EcoRI, HindIII, BamHI, PstI, SmaI, KpnI 等) 测定 HMW 蛋白基因的位置, 通过利用放射性标记的 N 末端特异性 PCR 产物作为探针进行 Southern 杂交以定位 HMW 蛋白编码序列。通过使用由 HMW 蛋白特异性正向引物和与位于克隆载体中的 T3 或 T7 启动子序列互补的反向引物组成的引物套进行 PCR 分析以测定 HMW 蛋白特异性序列的方向和长度。

[0240] 经测定, 质粒 pAH306 含有单个约 6.6kbp 的 EcoRI 片段, 其来源于衣原体。对 pAH306 的定向 PCR 分析阐明该衍生物编码 HMW 蛋白基因约 1.5kbp 的 N 末端区域。

[0241] 经由与不对称 PCR 循环测序方法学 (ABI Prism Dye-Terminator Cycle Sequencing, Perkin-Elmer) 联合使用的常规的“序列-步移”得到 pAH306 编码的 HMW 蛋白基因两条链的 DNA 序列。使用未经消化的质粒 DNA (约 0.5 μ g/rxn) 作为模板以及适当的 HMW 蛋白特异性测序引物 (约 3.5pmol/rxn) 进行测序反应。

[0242] 除了模板和测序引物外, 每个测序反应 (约 20 μ l) 含有 4 种不同的 dNTP (即 A, G, C 和 T) 和 4 种相应的 ddNTP (即 ddA, ddG, ddC 和 ddT)

[0243] 收集由各个反应产生的 DNA 序列数据, 使用 ABI 序列分析软件 (Perkin-Elmer) 在 PowerMAC 计算机上自动分析相对的荧光峰强度。在使用 AutoAssembler 软件 (Perkin-Elmer) 合并成共有序列“行”之前, 为了精确起见, 可人工编辑各个经自动分析的 DNA 序列。对 pAH306 编码的 HMW 蛋白基因区段的两条链进行测序, 将这些数据汇编在一起产生了 HMW 蛋白基因区段的复合序列。编码 HMW 蛋白区段的序列示为 SEQ IDNO:10, 由图 2 中的核苷酸 466 至 1976 表示。pAH306 的图谱示于图 5。

[0244] 使用 GeneRunner 和 Intelligentics 软件进行 HMW 蛋白的 DNA 和推导的氨基酸序列的数据库分析 (如一级氨基酸的同源性, 亲水性分布图, N-/O-糖基化位点, 功能/构象域分析), 证实 HMW 蛋白是新的。

[0245] 8.5. 实施例 5: 克隆 HMW 蛋白基因的 C 末端区段

[0246] 使用染色体步移分离 HMW 蛋白基因的 C 末端部分。选择远离成熟 HMW 蛋白的 N 末端序列并靠近载体的 T3 启动子序列的约 0.6kbp BamHI-EcoRI 片段作为初次染色体步移的探针。简单地说, 用 BamHI 和 EcoRI 完全消化 pAH306, 通过琼脂糖凝胶电泳 (0.8% 琼脂糖溶于 TAE 缓冲液中) 对消化产物进行大小分级分离。从凝胶中切下所需的约 0.6kbp BamHI-EcoRI (B/E) 带, 使用商购的硅胶微量离心层析柱和试剂 (QIAGEN) 纯化之。

[0247] 经由利用商购试剂 (Boehringer Mannheim) 的随机-引物标记方法, 用 [α -dATP] (> 3000Ci/mmol, Amersham) 放射性标记经纯化的 0.6kbp B/E 片段, 使用该片段探测已用 HindIII 完全消化的砂眼衣原体 L₂ 基因组 DNA 的 Southern 印迹。

[0248] 得自 pAH 306 的 0.6kbp B/E 探针与约 1.4kbp 的 HindIII 基因组片段杂交。根据 pAH306 编码的 HMW 蛋白基因区段中由实验得出的限制性图谱, 此片段编码约 0.2kbp C 末端 HMW 蛋白序列。

[0249] 随后, 使用经放射性标记的 0.6kbp B/E 片段探测中等丰余 (约 5,000 个原始克隆) 的砂眼衣原体 L₂ 文库以鉴定含有约 1.4kbp HindIII 片段的克隆。简单地说, 使用 10 倍过量的限制性内切核酸酶 HindIII (每 1 微克基因组 DNA 约 10 个单位, 37°C, 18-24 小时) 完全消化砂眼衣原体 L₂ 基因组 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳 (0.8% 琼脂糖溶于 TAE 缓冲液中) 对消化产物进行大小分级分离。从凝胶中切下大小约为 1.0kbp 至 2.0kbp 的 DNA 片段, 切下的琼脂糖条含有所需的 DNA 片段大小, 将其溶解于增溶/结合溶液 (QX1, QIAGEN) 中并

使用商购的硅胶自旋柱 (QIAGEN) 纯化之。然后将纯化的 1.0-2.0 kbp 基因组 HindIII 片段克隆至 pBlueScript SK- 质粒中, 所述质粒已预先被 HindIII 完全消化并经牛小肠磷酸酶处理以防止载体再连接。

[0250] 于 25℃, 使用 T4 DNA 连接酶 (约 10 个单位 / 反应), 以载体 : 插入物摩尔比约为 1 : 10 的比例, 在约 50 μ l 的终反应体积 (50mM Tris-HCl, pH7.00 ; 10mM NaCl ; 1mM ATP ; 0.5mM DTT) 中进行载体 / 插入物连接约达 16 至 24 小时。连接之后, 使用等分试样 (约 50ng 连接的 DNA) 电穿孔感受态的大肠杆菌宿主, 如大肠杆菌 TOP10。然后将经电穿孔的细胞铺于含约 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂上以选择携有质粒的克隆。通过毛细管作用将约 1000 个携有质粒的 Ap^R 转化子直接从 LB Ap¹⁰⁰ 琼脂平板上转移至尼龙膜 (HyBond N+, Amersham) 上。

[0251] 转移之后, 于 37℃ 再次保温平板以再生活菌落供进一步操作。裂解转移至膜的菌落, 用变性的 SDS/NaOH 溶液处理菌落印迹以释放 DNA。使用 Tris 缓冲的 NaCl 溶液中和和稳定裂解物。通过 UV 照射使释放的 DNA 固定于膜上。使用标准重组 DNA 方法和方法学探测含有经放射性标记的 0.6 kbp B/E 片段的菌落印迹并鉴定携有所需的约 1.4 kbp HindIII 片段的重组衍生物。

[0252] 质粒 pAH 310 是一个通过此方法分离的衍生物, HMW 蛋白的编码区段由图 2 的核苷酸 994-2401 表示。

[0253] 单独和联合使用 HindIII 和 EcoRI 对纯化的质粒 DNA 进行限制性分析并对该 DNA 进行 DNA 序列分析, 两者的结果证实 pAH310 编码预期的约 1.4 kbp HindIII 片段。这些分析也证实了约 1.4 kbp 的插入物由 pAH 306 上存在的相同的约 1.2 kbp HindIII-EcoRI 片段和唯一的编码 C 末端 HMW 蛋白特异性 DNA 的约 0.2 kbp EcoRI-HindIII 片段组成。

[0254] 选择约 0.2 kbp EcoRI-HindIII (E/H) 片段作为第二次染色体步移的探针。简单地说, 用 EcoRI 和 HindIII 完全消化 pAH310, 通过琼脂糖凝胶电泳 (0.8% 琼脂糖溶于 TAE 缓冲液中) 对消化产物进行大小分级分离。从凝胶中切下所需的约 0.2 kbp (E/H) 带, 纯化, 用 [α -p³²]dATP 放射性标记, 将其用作探针以鉴定原始的砂眼衣原体 L₂ λ ZAPII 基因组文库中编码 HMW 蛋白基因 C 末端区段的克隆。

[0255] 质粒 pAH316 是一个通过此方法分离的衍生物, 对 pAH316 的限制性分析阐明此衍生物含有约 4.5 kbp 的砂眼衣原体 L₂ 插入物, 其由大小约为 2.5 kbp 和 2.0 kbp 的两个 EcoRI 片段组成。使用约 0.2 kbp (E/H) 片段作为探针进行 Southern 杂交分析, 将此序列定位于 pAH316 的约 2.5 kbp EcoRI 片段中。利用纯化的 pAH316 质粒 DNA 作为模板和特异于约 0.2 kbp (E/H) 片段和 T3 和 T7 载体序列的扩增引物套进行定向 PCR 分析, 结果表明 pAH316 编码 HMW 蛋白基因 C 末端区段。HMW 蛋白的编码区段由图 2 的核苷酸 1977 至 3420 表示, 示于 SEQ ID NO : 11。

[0256] 8.6. 实施例 6 : 产生截短的 HMW 重组蛋白

[0257] 将 HMW 蛋白 N 末端的那一半作为约 1.5 kbp 的片段 PCR 克隆至商购的大肠杆菌表达质粒 pTrcHisB (Invitrogen) 中。此反应中所用的正向引物被称为 140FXH0 (57- 聚体), 示于 SEQ ID NO : 18, 其含有与成熟 HMW 蛋白的前 10 个 N 末端残基互补的序列。除了 HMW 蛋白编码序列外, 此正向引物也携有唯一的 XhoI 限制性位点, 该位点理想地位于成熟 HMW 蛋白第一个残基 (Glu/E) 的上游, 从而能与载体质粒上编码的 (His)₆ 亲和纯化区域适当地融

合,此正向引物中还携有 5' 末端 6 碱基 G/C 夹子(供有效扩增)和 12 碱基内部间隔序列(供有效的内切核酸酶识别和消化)。

[0258] SEQ ID NO:185' -AAG-GGC-CCA-ATT-ACG-CAG-AGC-TCG-AGA-GAA-ATT-ATG-GTT-CC
T-CAA-GGA-ATT-TAC-GAT-3'

[0259] SEQ ID NO:195' -CGC-TCT-AGA-ACT-AGT-GGA-TC-3'

[0260] 将商购的反向测序引物 SK(20 聚体, StrataGene), SEQ ID NO:19 用作此反应中的反向扩增引物, SK 与 pAH306 中 EcoRI 位点下游的噬粒序列互补。为了提高 HMW 蛋白 ORF 产物(约 1.5kbp)的产量,使用由作为主要扩增聚合酶的 *T. thermophilus* DNA 聚合酶(AdvantagePolymerase)和少量可提供额外的 5' -3' 校正活性的第二高保真性热稳定的 DNA 聚合酶(CloneTech)组成的热稳定性 DNA 聚合酶混合物进行 PCR 扩增。在反应混合物中加入抗-TthDNA 聚合酶抗体以提供自动的“热-起始”条件,该条件可促使> 2kbp 的扩增产物产生。使用商购的碱/SDS 系统(QIAGEN)和硅胶自旋柱(QIAGEN)纯化质粒 DNA,所述 DNA 被用于进行这些扩增反应(约 0.2ng/反应)。

[0261] 使用硅胶自旋柱从未掺入的引物中纯化约 1.5kbp 的扩增产物,使用过量的 XhoI 和 EcoRI(约 10 单位/1 微克 DNA)完全消化该引物。然后将经纯化和消化的 N 末端截短的 HMW 蛋白 ORF 克隆至已用 XhoI 和 EcoRI 消化的商购表达质粒 pTrcHisB 中(5:1,插入物:载体比例)。然后使用连接反应的等分试样电转化适当的大肠杆菌宿主(如 TOP10)。

[0262] 制备随机挑选的氨苄青霉素-抗性转化子的少量 DNA,用 XhoI, EcoRI 或 XhoI+EcoRI 完全消化,通过琼脂糖凝胶电泳检查约 1.5kbp 的截短 HMW 蛋白 ORF 插入物的存在和方向。制备经测定携有约 1.5kbp XhoI/EcoRI 插入物的克隆的少量 DNA,将其用于不对称 PCR DNA 测序反应以证实 HMW 蛋白片段和表达载体的 (His)₆ 亲和纯化区域之间形成的连接的保真性。质粒 pJJ36-J 是一个通过此方法分离的重组衍生物,由图 2 的核苷酸 466 至 1980 表示。HMW 蛋白的截短片段的推导氨基酸序列由图 3 的氨基酸 29 至 532 表示,其示于 SEQ ID NO:17。

[0263] 8.7. 实施例 7:测定其它衣原体中的存在

[0264] 进行聚合酶链反应分析以确定 HMW 基因是否存在于几个临床上认识的砂眼衣原体株以及其它衣原体,如肺炎衣原体中。砂眼衣原体株为得自 ATCC(Rockville, MD)的冻干储存物,根据标准方法将其用于感染 McCoy 细胞次铺满的单层(约 80%)。在 Sorvall RT6000B 离心机中离心感染的单层细胞(约 1,300rpm, 25°C, 30 分钟)和/或在感染时用葡聚糖硫酸酯(约 50 μg/ml)处理以增强低感染性生物变种(非-LGV)与宿主细胞最初的结合,从而增加最终的 EB 产量。大约 48 小时之后,刮擦收集感染的单层细胞,超声破碎宿主细胞以释放原体(EB)。使用 Denamur

[0265] 为了测定这些衣原体株中 HMW 蛋白基因的存在,使用衣原体总 DNA 作为模板和下文所列的 HMW 蛋白区段特异性寡核苷酸引物(21 聚体)套进行扩增反应:

[0266] SEQ ID NO:205' -ATG-GTT-CCT-CAA-GGA-ATT-TAC-3'

[0267] SEQ ID NO:215' -GGT-CCC-CCA-TCA-GCG-GGA-G-3'

[0268] 简单地说,使用约 15 μl 砂眼衣原体 DNA 粗提取物(约 10 μl 商购的肺炎衣原体 DNA)和各约 20pmol SEQ ID NO:20 和 21 所示的正向和反向 HMW 蛋白特异性扩增引物进行标准 PCR 扩增反应(2mM Mg²⁺, 100 μmol dNTP, 0.75 单位 AmpliTaq 聚合酶,终体积 50 μl)。

使用 32 轮循环,3 步热分布,即 95℃ 30 秒;60℃ 30 秒,72℃ 1 分钟获得小靶序列 ($\leq 2\text{ kbp}$) 的扩增。除使用 MAb- 灭活的 Tth/Vent DNA 聚合酶组合 (Advantage PCR, Clontech),使用的 72℃ 延伸时间为所需 PCR 产物大小加上 2 分钟 (即所需 PCR 产物 = 6kbp,延伸时间 = 8 分钟) 外,以与上相同的方法使用粗 DNA 提取物进行 ORF- 克隆和测序所用的较长靶序列的扩增。

[0269] 在 ABI 2400 热循环仪 (Perkin-Elmer) 中,使用 0.2ml 薄壁聚丙烯微量离心管进行常规的和长距离的 PCR。热循环之后,分析反应的等分试样 (约 20 $\mu\text{ l}$),通过标准的琼脂糖凝胶电泳 (0.8% 琼脂糖溶于 TAE 缓冲液) 和溴化乙锭染色鉴定 PCR 产物。结果表明 HMW 蛋白在临床相关的血清变种中是高度保守的;HMW 基因存在于所有受试衣原体样品株中,包括血清变种 B, Ba, D, E, F, G, H, I, J, K, L₁, L₂ 和 MoPn,也存在于肺炎衣原体中。

[0270] 8.8. 实施例 8:测定序列变异

[0271] 为了确定不同衣原体株中 DNA 和氨基酸序列变异的水平,从砂眼衣原体 B 血清变种 (代表砂眼组生物) 和砂眼衣原体 F 血清变种 (代表低感

[0272] 简单地说,使用 LD-PCR 由含有成熟 HMW 蛋白完整编码序列的砂眼衣原体 B 和 F 基因组 DNA 产生约 6kbp HMW 蛋白特异性 DNA 片段。这些 LD-PCR 反应的扩增条件如实施例 6 所述。这些反应中所用的反向扩增引物 (p316Kpn-RC, 56 聚体) 示于 SEQ ID NO:13,其与位于推定 HMW 蛋白终止密码子下游约 3kbp 处的序列互补。作为克隆所需的约 6kbp 扩增产物的辅助工具,衣原体序列 5' 端的单个 KpnI 限制性内切核酸酶位点被设计到 p316Kpn-RC 引物中。这些反应中所用的正向扩增引物 (p306Kpn-F, 56 聚体) 示于 SEQ ID NO:12,其含有与特异于成熟 HMW 蛋白前 10 个氨基酸残基 (30 个核苷酸) 以及特异于 KpnI 位点的 5' 序列互补的序列。设计 p306Kpn-F 以使当约 6kbp 的扩增产物被插入大肠杆菌表达载体 pTrcHisB (ClonTech) 的 KpnI 位点时,编码成熟 HMW 蛋白 N 末端的序列在框内与该载体高度有效的 trc 启动子下游所编码的六-His 亲和区域连接。

[0273] SEQ ID NO:125' -AAG-GGC-CCA-ATT-ACG-CAG-AGG-GTA-CCG-AAA-TTA-TGG-TTC-CTC-AAG-GAA-TTT-ACG-AT-3'

[0274] SEQ ID NO:135' -AAG-GGC-CCA-ATT-ACG-CAG-AGG-GTA-CCC-TAA-GAA-GAA-GGC-ATG-CCG-TGC-TAG-CGG-AG-3'

[0275] 使用硅胶自旋柱 (QIAGEN) 纯化约 6kbp 的 HMW 蛋白产物,使用 10 倍过量的 KpnI (每 1 微克纯化片段约 10 单位,37℃) 对片段进行两轮 8 至 10 小时的 KpnI 消化循环。第二次消化之后,使用 QIAGEN 自旋柱除去残留的限制性酶活性,将约 6kbp KpnI HMW 蛋白片段克隆至预先经 KpnI 完全消化并经牛小肠磷酸酶处理以防止载体再连接的 pTrcHisB 质粒中。

[0276] 于 25℃,使用 T4DNA 连接酶 (约 10 单位 / 反应),以载体:插入物摩尔比约为 1:5 的比例,在约 50 $\mu\text{ l}$ 终反应体积 (50mM Tris-HCl, pH7.00;10mM NaCl;1mM ATP;0.5mM DTT) 中进行载体 / 插入物连接约 2 小时。连接之后,使用等分试样 (约 50ng 连接的 DNA) 电穿孔感受态的大肠杆

[0277] 使用得自各个原始转化子的纯化的 Ap^R 单菌落接种约 5ml LB 肉汤,在 37℃ 保温摇床中中度通气培养过夜 (约 200rpm)。离心收集肉汤培养物中的细胞,使用该细胞制备少量质粒 DNA。提取质粒时使用商购试剂 (QIAGEN Plasmid Mini 试剂盒)。通过在琼脂糖凝胶

(0.8%琼脂糖溶于 TAE 缓冲液) 中电泳未经消化的质粒 DNA 并鉴定比载体质粒大的衍生物可以鉴定出携有插入物的质粒衍生物。含有插入物的衍生物被证实, 单独或联合使用适当的限制性内切核酸酶 (KpnI, EcoRI, HindIII, BamHI 等) 确定 HMW 蛋白插入物相对于载体序列的方向。

[0278] 经由实施例 4 中所述的与不对称染料-终止剂 PCR 循环测序方法学 (ABI Prism Dye-Terminator Cycle Sequencing, Perkin-Elmer) 联合使用的“序列-步移”得到砂眼衣原体 B 和 F HMW 蛋白基因两条链的 DNA 序列。用小量制备的质粒 DNA 和各个 HMW 蛋白序列特异性引物进行反应, 所述引物曾用于测定 L₂ 型衣原体株的 HMW 蛋白基因序列。

[0279] 使用 ABI 310 测序仪收集 DNA 序列数据, 按实施例 4 所述在 PowerMAC 计算机上用适当的计算机软件自动分析这些数据。在使用 AutoAssembler 软件 (Perkin-Elmer) 合并成共有序列“行”之前, 为了精确起见, 可人工编辑各个经自动分析的 DNA 序列。对砂眼衣原体 B 和 F 血清变种的 HMW 蛋白基因的两条链进行测序, 将这些数据汇编在一起产生了砂眼衣原体 B 和 F HMW 蛋白基因的复合共有序列。这些序列示为 SEQ ID NO:15 和 16, L₂, F 和 B 衣原体株的序列比较示于图 6。

[0280] 8.9. 实施例 9: 产生重组蛋白

[0281] 为了产生足够量的重组 HMW 蛋白供免疫原性和动物保护研究, 将 HMW 基因 PCR 克隆至适当的大肠杆菌和杆状病毒表达系统中。在基于大肠杆菌的系统中产生了大量 rHMW 蛋白, 它们是含有 N 末端 (His)₆ 亲和纯化区域的嵌合融合蛋白。按实施例 5 所述, 从砂眼衣原体 L₂ 基因组中以单个 KpnI 片段的形式 PCR 克隆完整的 HMW 蛋白开放阅读框 (ORF), 并以适当的方向在正确的阅读框内与高表达质粒载体

[0282] (His)₆ 亲和纯化区域是高表达基因座的一部分, 所述基因座由高度有效的 tac 启动子 (可被 IPTG 诱导) 和紧接 (His)₆ 亲和纯化区域上游的共有的 Shine 和 Delgarno 核糖体结合位点 (RBS) 组成。砂眼衣原体 LGV L₂, 砂眼衣原体 B 和砂眼衣原体 F 的 HMW 蛋白基因被 PCR 克隆成约 3.0kbp 的片段。这些反应中所用的正向引物 (56 聚体) 被称为 p306Kpn-F, 其含有与成熟 HMW 蛋白前 10 个 N 末端氨基酸残基互补的序列, 示于 SEQ ID NO:12。除了 HMW 蛋白编码序列外, 该正向引物还携有唯一的 KpnI 限制性位点, 该位点理想地位于成熟 HMW 蛋白第一个残基 (Glu) 的上游, 从而能与载体质粒上编码的 (His)₆ 亲和纯化区域适当地融合, 此正向引物中还携有 5' 末端 6 碱基 G/C 夹子 (供有效扩增) 和 12 碱基内部间隔序列 (供有效的内切核酸酶识别和消化)。反向 PCR 引物被称为 p316Kpn-3RC, 其含有与位于 HMW 蛋白终止密码子下游约 0.2kbp 处的砂眼衣原体序列反向互补的序列, 示于 SEQ ID NO:14。至于 p306Kpn-F, 反向引物还含有位于砂眼衣原体序列 5' 端的 KpnI 限制性位点, 6 碱基的 G/C 夹子和 12 碱基的内部间隔序列。

[0283] 为了提高 HMW 蛋白 ORF 产物 (约 3,500bp) 的产量, 使用由作为主要扩增聚合酶的 T. thermophilus DNA 聚合酶和少量可提供额外的 5' -3' 校正活性的第二高保真性热稳定的 DNA 聚合酶 (Advantage Polymerase, CloneTech) 组成的热稳定性 DNA 聚合酶混合物进行 PCR 扩增。在反应混合物中加入抗 -Tth DNA 聚合酶抗体以提供自动的“热-起始”条件, 该条件可促使 > 2kbp 的扩增产物产生。

[0284] 按上文实施例所述, 从 EB 中分离多种砂眼衣原体株的基因组 DNA, 并使用所述 DNA 进行这些反应。扩增之后, 使用商购的硅胶自旋柱 (QIAGEN) 和试剂 (QIAGEN) 从过量引物中

纯化所需反应产物,并用过量的 KpnI (约 10 单位 /1 微克 DNA) 完全消化该产物。然后将经纯化和消化的 KpnI HMW 蛋白 ORF 克隆至已用 KpnI 消化的表达质粒 pTrcHisB 中 (5 : 1, 插入物 : 载体比例)。然后使用连接反应的等分试样电转化适当的大肠杆菌宿主 (如 TOP10)。

[0285] 制备随机挑选的氨苄青霉素 - 抗性转化子的少量 DNA, 用 KpnI, HindIII 或 KpnI+HindIII 完全消化, 通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色检查约 3.2kbp 的 HMW 蛋白 ORF 插入物的存在和方向。按上文实施例所述, 使用小量制备的 DNA 进行不对称 PCR DNA 测序反应以证实 HMW 蛋白片段和载体的 (His)₆ 亲和纯化区域之间形成的连接的保真性。质粒 pAH342 是一个通过此方法分离的衍生物, 其含有砂眼衣原体 L₂ 的 HMW 蛋白基因 ORF 并由图 2 的核苷酸 466 至 3421 表示

[0286] 在含有 100 微克 /ml Ap 的 2X-YT 肉汤中将重组体培养至对数生长中期 (约 0.50. D.₆₀₀) 并用 IPTG (终浓度为 1mM) 诱导 4 至 5 小时以激活载体 trc 启动子引发的转录。离心收集细胞, 使用弗氏压碎器通过裂解制备粗细胞裂解物。

[0287] 或者使用杆状病毒表达系统来表达 rHMW 蛋白。这里, 按与 pTrcHisB 基本上相同的方式, 将砂眼衣原体 L₂ 和砂眼衣原体 F 的 HMW 蛋白 ORF 作为约 3kbp 的 PCR 产物 PCR- 克隆至预先用 KpnI 完全消化并用 CIP 处理以使载体再连接最小化的杆状病毒转移载体 (如 pFastBacHTb) 中。然后通过使用商购的杆粒系统 (Bac-to-Bac, Gibco) 进行位点特异性转座将此次克隆反应中产生的 HMW 蛋白表达元件 (即杆状病毒多角体启动子, N 末端 (His)₆ 亲和纯化区域, HMW 蛋白基因 ORF) 转移至杆状病毒基因组中。

[0288] 简单地说, 使用标准的转化和选择方法学, 用 HMW 蛋白杆状病毒表达质粒转化含有杆粒 (杂合的杆状病毒 - 质粒复制子) 的感受态大肠杆菌 DH10bac (Gibco) 细胞 (庆大霉素抗性)。使用标准的 IPTG/X-Gal 蓝 - 白选择鉴定出 HMW 蛋白表达元件已由表达质粒成功转座至位于杆粒复制子中的 lacZ 基因内适当受体位点的转化子。

[0289] 随机挑选白色的 Gm^R 转化子并重新划线以进行纯化。通过 Ish-Horowitz, N. A. R. 9 : 2989-2993 (1981) (列入本文作为参考) 的方法由肉汤培养物制备杆粒 DNA, 使用该 DNA 转染草地夜蛾 9 细胞。噬斑纯化之后, 使用重组 HMW 蛋白杆状病毒感染大量夜蛾悬浮培养物。使用酵母表达系统产生糖基化形式的 HMW 蛋白。

[0290] 8.10. 实施例 10 : 纯化重组蛋白

[0291] 使用标准的制备性固定化金属亲和层析 (IMAC) 法将重组 HMW 蛋白纯化至均质。简单地说, 于 37°C, 在 51 发酵罐 (New Brunswick) 中的 Luria 肉汤中, 中度通气培养携有含 HMW 蛋白基因的表达质粒的大肠杆菌菌株直至对数生长中期 (约 0.50. D.₆₀₀), 并用 IPTG (终浓度为 1mM) 诱导 4 至 5 小时。收集细胞团块, 用 PBS 洗涤并储存于 -20°C。通过机械振动将冻干细胞团块的等分试样 (湿重约为 9 至 10g) 悬浮于约 120ml D-PBS 中, 穿过弗氏压碎器 (2×, 14,000psi, 4°C) 以裂解细胞。然后通过高速离心 (约 10,000×g, 4°C, 30 分钟) 从 rHMW 蛋白包涵体中除去可溶性的蛋白质。

[0292] 按上述通过混匀和离心将含有 rHMW 蛋白的不溶性沉淀物悬浮于约 20ml 冰冷的 D-PBS 中。通过悬浮于含有 6M 盐酸胍的磷酸钠缓冲液 (0.1M, pH7.0) 中以变性经洗涤的 rHMW 蛋白包涵体, 并将包涵体上样于通过标准方法制备自 Fast-Flow 螯合 Sepharose (Pharmacia) 并因 Ni²⁺ 或 Zn²⁺ 离子而带电的 Ni²⁺- 亲和柱 (1.5cm×25cm, 床体积约为 15ml)。通过用约 5 至 10 倍柱体积的含有 8M 尿素的磷酸钠缓冲液 (0.1M, pH7.0) 洗

涤柱可除去未结合的物质。

[0293] 使用 pH4.0 磷酸钠 /8M 尿素缓冲液 (约 20ml) 洗脱利用 N 末端 (His)₆ 亲和纯化区域与亲和树脂结合的重组 HMW 蛋白。通过加入 1.0M Tris-HCl (约 2.5ml, pH7.5) 中和洗脱物,对含有 SDS(0.5%) 的 TE 缓冲液透析以除去尿素。使用 Centricon-30 离心浓缩器 (Amicon, 30,000MWC0) 浓缩透析物,与 1/5 体积含有 1mM 2-巯基乙醇 (Lammeli) 的 5×SDS 凝胶样品缓冲液混合,100℃煮沸 5 分钟。

[0294] 将样品上样于 Tris/甘氨酸制备性丙烯酰胺凝胶 (4% 浓缩胶,12% 分离胶,30 : 0.8 丙烯酰胺 : bis 溶液,厚度 3mm)。与 rHMW 蛋白样品一起平行电泳预染的分子量标准 (SeeBlue, Novex) 以在凝胶上鉴定大小组分。切下含有分子量约为 105 至 115Kda1 的蛋白质的凝胶带,按厂商说明,使用 Elu-Trap 装置和膜 (S&S) 电洗脱蛋白质。透析经电洗脱的蛋白质以除去 SDS。使用 Micro-BCA 系统 (Pierce),以 BSA 为浓度标准测定样品的蛋白质浓度。如图 4 所示,使用常规的 SDS-PAGE 和商购的银染试剂 (Silver Stain Plus, Novex) 测定 rHMW 蛋白的纯度。

[0295] 经 SDS-PAGE 测定,分离的成熟 rHMW 的表观分子量约为 105 至 115Kda。

[0296] 8.11. 实施例 11 :制备 HMW 蛋白的抗体

[0297] 通过用纯化的 HMW 蛋白或其片段免疫兔产生针对 HMW 蛋白的多价抗血清。用约 250 微克 HMW 蛋白或其片段对每只动物总共进行 3 次免疫,

[0298] 用 PBS 连续稀释抗血清,并通过 ELISA 检测双份稀释样品。在这些试验中,使用经 1/1000 稀释的山羊 HRP-缀合的抗兔抗体作为第二报道抗体。滴度被表示为显示出阳性 ELISA 反应的最大稀释度,即 O.D.₄₅₀ 值 > 高于平均阴性对照值 2SD (预先采血的兔血清)。然后使用超免疫的抗血清探测粗 EB 或 RB 提取物以及 1.0% OGP EB 提取物制品的 Western 印迹以测定其它砂眼衣原体血清变种和其它衣原体是否表达 HMW 蛋白。检测了砂眼衣原体血清变种 B, Ba, D, F, G, I, J, K, L₁, L₂, L₃, MoPn 和肺炎衣原体,发现它们具有表观分子量为 105 至 115Kda 的蛋白质,该蛋白质可与针对 HMW 蛋白产生的抗血清反应。

[0299] 8.12. 实施例 12 :表面定位

[0300] 通过间接荧光抗体 (IFA) 检查 HMW 蛋白在不同衣原体株和衍生物上的表面定位。使用超免疫的抗 HMW 蛋白作为第一抗体,通过本领域已知的方法进行 IFA。通过下列方法,用砂眼衣原体血清变种 L₂, B 和 F,肺炎衣原体或鹦鹉热衣原体之一的完整 EB 感染 Hak 细胞。

[0301] 在 24 孔组织培养板内的 12mm 平盖玻片上,于 DMEM 培养基中将 McCoy 或 Hak 细胞培养至铺满,然后用约 5×10^4 包涵体形成单位 (IFU) 的砂眼衣原体 N11 株 (血清变种 F) 离心接种。保温 24 小时之后,除去培养基,用甲醇将感染细胞固定 10 分钟。然后用 PBS (1×) 洗涤固定的单层以除去固定剂,用 $> 300 \mu$ l 已用 PBS 1/100 稀释的抗 -60Kda1 截短的 HMWP 兔抗体洗去覆盖层。与第一抗体保温 1 小时之后,用 PBS 小心洗涤细胞,再与 1/200 稀释的与 FITC 缀合的小鼠抗兔 IgG 抗体保温约 30 分钟。使用含有 0.0091% Evans Blue 作为复染剂的 PBS 溶液稀释第二抗体以肉眼观察单层。用 PBS 洗涤细胞 2 次以除去第二抗体,从培养

[0302] 平行处理单独用预先采血的兔抗体或与 FITC-缀合的第二抗体染色的相同细胞样品,将其用作抗体特异性 (阴性) 对照。用装配有 plan-neoflur 物镜的 Zeiss Axioskop

光学显微镜,以 1000 倍的放大倍数检查复染的样品。使用砂眼衣原体 N11(血清变种为 F)的结果示于图 7。结果表明:与对照相比,被 HMW 蛋白抗体染色的样品的荧光增强证实了 HMW 蛋白位于表面。另外,被 HMW 蛋白抗体染色样品的荧光显示出与 L₂, B 和 MoPn 血清变种或肺炎衣原体表面定位的 HMW 蛋白的结合。

[0303] 9. 实施例:体外中和模型

[0304] 使用体外中和模型已证实保护性的抗血清抑制多种组织培养细胞系的衣原体感染(中和)。动物模型也是检测疫苗效力所必需的,小型动物(非灵长类)和灵长类模型是临床评价所必需的。已使用豚鼠研究由豚鼠包涵体结膜炎致病原(GPIC)鹦鹉热衣原体引起的实验性眼和生殖器感染。

[0305] 小鼠提供了一致的、可再现的由人生殖道分离物引起的生殖道感染模型。此小鼠模型是普遍被接受的预临床试验,使用该模型将 MOMP 作为亚单位疫苗评价。另一个模型是砂眼感染的灵长类动物模型,其中分泌型 IgA 的诱导是保护作用的基本组成成分。使用上述普遍被接受的体外中和和动物模型系统可测定新亚单位抗原候选物生成疫苗的能力。

[0306] 动物保护作用研究的初步试验是评价超免疫抗 HMW 抗体体外阻断多种砂眼衣原体血清变种(如 L₂, B, F)感染性的能力。尽管使用 McCoy 细胞增殖衣原体,这些细胞也允许经由 Fc 受体进行抗体-介导的摄取。因此,为了评价抗 HMW 抗体对感染性的抑制作用,将未显示出 Fc 受体的 Hak 细胞用于这些分析。

[0307] 于 37°C, 5% CO₂ 中,在 24 孔组织培养板内的盖玻片上培养细胞至次铺满单层(约 90% 铺满 = 1×10^5 个细胞/ml)。用蔗糖-磷酸盐-谷氨酸盐(SPG)缓冲液将抗-HMW-抗体稀释至 100 µg/ml(总蛋白质),然后用 SPG 缓冲液进行连续稀释。用 SPG 缓冲液将预滴定衣原体的冻干等分试样稀释至约 2×10^4 IFU/ml。将 EB 与稀释的抗 HMW 抗体预混合至约 10-20 IFU/µl,于 30°C 在摇动的平台上保温 30 分钟。

[0308] 用 HBSS 洗涤制备的 Hak 细胞,然后与抗 HMW 抗体/衣原体 EB 混合

[0309] 通过与抗衣原体 LPS 抗体(约按 1:500 稀释, ViroStat)保温来染色细胞以观察包涵体,用 PBS 将细胞洗涤 3 次, 37°C 与 FITC-缀合的山羊第二抗体保温 30 分钟。洗涤盖玻片,风干,在玻璃盖玻片上用甘油固定之。在 Zeiss 荧光显微镜下,计数贯穿盖玻片中线的 5 个区域内的包涵体。结果被表示为与异源抗体对照(兔预先采血的血清)相比含包涵体细胞减少的百分比。

[0310] 10. 实施例:疫苗效力(输卵管炎和能育小鼠模型)

[0311] 10.1. 方法

[0312] 10.1.1. 免疫和攻击

[0313] 使用 Tuffrey 鼠不育模型评价 rHMWP 保护动物免受砂眼衣原体诱导的输卵管炎和不孕症的效力。此评价中使用了 3 组,各为 17 只的雌性 C3H HeOuJ 小鼠(约 6 周龄, Jackson Labs)。在第 0, 2 和 3 周,鼻内施用约 20 微升疫苗制剂以免疫 17 只动物的试验组,所述制剂含有约 10 至 12 微克经凝胶纯化的 rHMWP 和约 5 微克作为佐剂的 mLT(SmithKline Beecham)。在免疫之前,使用由溶于 68% 无热原之 PBS 的 16% Ketaject 和 16% Xylaject 组成的麻醉剂混合物使小鼠镇静(每只动物腹膜内注射 100 微升)。使已服用镇静剂的小鼠背朝下,使用标准的实验室移液管施用疫苗制剂;每只鼻孔约滴 10 微升疫苗溶液,两次滴加之间等待 5 至 10 分钟。

[0314] 类似地,用仅含有 5 微克 mLT(即仅用佐剂,无抗原)的制剂免疫 2 组,各为 17 只的雌性小鼠。随后用砂眼衣原体攻击其中一组(假免疫,感染的)并用作阴性能育对照,而另一组未被攻击(假免疫,假感染),将其用作阳性能育对照。

[0315] 第 4 周,给所有动物施用单一腹腔内剂量的孕酮(2.5mg,溶于无热原的 PBS, DepoPro-vera, Upjohn)以稳定子宫上皮细胞。第 5 周,通过两侧对称地在子宫内接种溶于 100 微升蔗糖-磷酸盐-谷氨酸盐(SPG)

[0316] 10.1.2. 组织病理学

[0317] 生殖道在 Bouin 固定剂中处理不少于 24 小时,在 50%、70%和 100%甲醇中逐步脱水,在甲苯中浸泡,石蜡包埋或直接包埋于 OCO 化合物(Tissue-TEK, Miles)中,然后在液氮中速冻。组织切片(约 6 μ m)用苏木精和依红染色(Bouin 固定样品脱石蜡之后)。输卵管和卵巢中的炎症变化如下分级:0,没有明显炎症反应;1,少数单核细胞浸润输卵管卵周空间或粘膜下层;2,同 1 但程度更严重;3,同 2 但输卵管粘膜下层增厚,输卵管腔内有炎症细胞;4,同 3 但程度更严重。子宫颈/阴道内炎症根据观察到的上皮内浸润水平计分。

[0318] 10.1.3. 确定 rHMWP 特异性体液应答

[0319] 免疫和攻击期间通过眶后采血定期收集血样,离心制备血清。用标准实验移液器向阴道内反复注射 50 μ l 无菌 PBS 并立即回收溶液收集阴道分泌物。进行 2 到 3 次注射/回收循环。

[0320] 通过 ELISA 定量抗体(Ab)应答按照 8.11 节所述进行。确定抗体水平的微量 ELISA 板(Maxisorb, NUNC)在 4°C 每孔用大约 0.5-1.0 μ g 凝胶纯化的 rHMWP 包被过夜, rHMWP 溶于 10mM 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH9.6),用含有 0.1% Tween-20 的 PBS(洗涤缓冲液)洗涤,用含有 3% BSA 的 PBS 溶液在 37°C 封闭大约 1 小时。为确定抗原特异性血清 IgG 水平,实验血清用含有 0.5% BSA 的洗涤缓冲液系列稀释,试样(100 μ l)在抗原包被的孔中 37°C 温育约 2 小时。然后洗涤微量板,用

[0321] 10.1.4. 确定 rHMWP 特异性细胞应答

[0322] 每组 6 只雌性 C3H HeO_uJ 小鼠(Jackson Labs)的几组动物分别给予镇静剂,在 0、2 和 3 周如 10.1.3. 节所述通过鼻内给予 rHMWP+mLT 疫苗进行免疫接种。在第 4 周和第 5 周,分别于孕酮处理和尿道内攻击之前,取每组 3 只动物通过 CO₂ 窒息处死,无菌取出脾脏,使用常规方法制成单细胞悬液。分别分析来自免疫动物的脾细胞。阳性对照组(假免疫和假感染)和阴性对照组(假免疫、感染)脾细胞合并,测试再次刺激。

[0323] 为测试脾细胞增殖,在 5 毫升 RPMI 1640 Glutamax I 中碾磨脾脏(5 到 10 转),上述溶液中添加有 10% 胎牛血清、25mM HEPES、50U/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素、1mm 丙酮酸钠、非必需氨基酸和 50 μ M 2-巯基乙醇(Gibco-BRL)。活细胞通过台盼蓝染色计数,在同一培养基中稀释至密度为 1.0-2.0 $\times 10^6$ 细胞/ml(Falocn 2063 聚丙烯管)。在圆底 96 孔培养板(Nunc, Nunc)上建立 3 组重复培养物,每孔是 200 μ l 中的大约 5 $\times 10^5$ 应答细胞。细胞用 1.0 μ g/ml rHMWP 刺激(抗原特异性增殖),或用 4 μ g/ml 伴刀豆球蛋白 A(Boehringer Mannheim)刺激作为阳性刺激对照,未刺激细胞培养物作为细胞激活的阴性对照。在 37°C 5% CO₂ 中温育 72-96 小时后,每孔中细胞用 1.0 μ Ci ³H-胸苷(Amersham)脉冲标记大约 18 小时。脉冲处理过的细胞使用 Tomtec 细胞收获仪(MkIII)收获在玻璃纤维片上,在 3 道 Wallac 1450 Trilux 液闪计数仪上计数 β 发射。样品(单独的或合并的)

的刺激指数 (SI) 定义为 3 孔抗原或 ConA 刺激 T 细胞的胸苷吸收平均值除以 3 孔未刺激细胞的吸收平均值。确定抗原特异性 (rHMWP 特异性) 和 ConA 特异性增殖的 SI。

[0324] 10.2. 结果

[0325] 10.2.1. 异型攻击后对小鼠生殖力的影响

[0326] 用 rHMWP 合并 mL T 进行粘膜免疫可以对由人衣原体临床分离株 (NI1, 血清变种 F) 引起的不育提供保护, 证据如表 1 所示。用 rHMWP 免疫的动物的生殖率 (70%, 即组内可育雌性动物数 / 组内动物总数) 较阴性对照组 (30%, 假免疫、感染) 显著为高。类似地, 与阴性对照组相比, rHMWP 免疫组产出更多的后代, 组生殖力更大 (后代分别为 51 和 24, 生殖力得分为 5.1 ± 4.7 和 2.4 ± 4.6)。从组间来看, 用 rHMWP 疫苗免疫的动物与假感染阳性对照动物 (80% 生殖率, 后代总数为 56, 生殖力 4.9 ± 2.7) 的生殖率、后代总数和生殖力得分相当。

[0327] 本实验中对砂眼衣原体引起的不育的保护也证实了 rHMWP 对抗砂眼衣原体疾病提供跨生物变种和跨血清变种保护的用途。本实验中使用的重组 HMWP 抗原克隆自属于砂眼衣原体性病淋巴肉芽肿 (LGV) 组的菌株 (菌株 L2), 该菌株引起全身性以及更多见为眼和生殖道的局部粘膜感染。这些实验中使用的砂眼衣原体攻击生物 NI1 菌株是属于砂眼生物变种的 F 血清变种的生物, 它们引起多种泌尿生殖道感染。

[0328] 表 1. 大约 2 个繁殖周期后生殖力评估

[0329]

组别	每组动物数	动物生殖力 百分数	后代数	组生殖力 ¹ 均值 $\pm$ SD
rHMWP 免疫组	10	70 $p=0.089^2$	51	5.10 ± 4.68 $p=0.105^3$
假免疫假感染组 (阳性对照)	10	80 $p=0.035$	56	4.90 ± 2.70 $p=0.078$
假免疫感染组 (阴性对照)	10	30	24	2.40 ± 4.61

[0330] 1. 每组幼仔平均数

[0331] 2. Fisher 精确测定, 单侧, 95% 置信区间

[0332] p 值相对阴性对照给出

[0333] 3. Student t 测定, 不成对, Gaussian 分布, 95% 置信区间

[0334] p 值相对阴性对照给出

[0335] 10.2.2. 对细胞免疫应答的影响

[0336] rHMWP 特异性细胞免疫系统激活使用常规脾细胞增殖实验证实。当脾细胞在第 4 周 (孕酮处理之前) (表 2) 和第 5 周 (激素处理后约 7 天, 但在尿道内攻击之前) (表 3) 测试时, 来自 rHMWP 免疫动物的所有样品形成强抗原特异性增殖免疫应答。rHMWP 免疫动物孕酮处理前的抗原特异性刺激指数 (SI) 等于或大于用 ConA 进行促有丝分裂获得的 SI (抗原和 ConA 刺激的平均值获自 3 只 rHMWP 免疫动物, 分别为 26.2 和 18.4)。获自假免疫动物

或未免疫动物（即未接触过 rHMWP 抗原或 mLT 的动物）的脾细胞对 rHMWP 物质的体外再次刺激无应答，因此确立了免疫动物中观察到的增殖应答的特异性。孕酮处理不影响 rHMWP 免疫动物中观察到的抗原特异性增殖应答。激素处理后获得的脾细胞的抗原特异性 SI 大于促有丝分裂刺激获得的 SI（抗原和 ConA 刺激的平均值获自 3 只 rHMWP 免疫动物，分别为 92.4 和 37.8）。来自假免疫或未免疫动物的样品未显示任何抗原特异性增殖应答。

[0337] 表 2. 激素处理前 rHMWP 特异性细胞增殖

[0338]

组别	细胞增殖 (cpm)	刺激指数 (处理 cpm/未处理 cpm)
	未处理/ConA/rHMWP	ConA/rHMWP
rHMWP 免疫动物 1	1557/20739/65741	13.3/42.2
rHMWP 免疫动物 2	1508/26975/28361	17.9/18.8
rHMWP 免疫动物 3	1238/29991/23453	24.0/18.9
假免疫动物（合并的）	1687/30546/1292	18/<1.0
未免疫动物（合并的）	335/23886/838	71/2.5

[0339] 表 3. 激素处理后 rHMWP 特异性细胞增殖

[0340]

组别	细胞增殖 (cpm)	刺激指数 (处理 cpm/未处理 cpm)
	未处理/ConA/rHMWP	ConA/rHMWP
rHMWP 免疫动物 1	767/15934/97458	20.8/127.0
rHMWP 免疫动物 2	546/17212/28172	31.5/51.6
rHMWP 免疫动物 3	297/18139/29300	61.1/98.6
假免疫动物（合并的）	273/18094/150	66.3/<1.0
未免疫动物（合并的）	345/16740/1341	48.5/3.9

[0341] 10.2.3. 对体液免疫应答的影响

[0342] 为了证实全长 rHMWP 免疫产生体液免疫应答，在第 5 周攻击之前（即第 3 次免疫后大约 2 周）收集的血清的 IgG 滴度通过 ELISA 测定。如表 4 所示，用 3 剂大约 10-12 μ g rHMWP 免疫 C3H 小鼠在所有动物中产生可检测水平的抗 rHMWP IgG。同时从这些动物收集阴道分泌物，测定抗 rHMWP 粘膜 IgA。在 3 只动物中检测到了抗原特异性阴道 IgA（表 4）。

[0343] 表 4. rHMWP 特异性体液应答

[0344]

rHMWP 免疫动物	抗 rHMWP 血清 IgG ELISA 滴度	抗 rHMWP 阴道 IgA 存在 与否
4.4	5000	
4.5	6000	
4.6	12000	+
4.7	130	
4.8	100	
4.9	54000	+
4.10	670	
4.11	100	
4.12	570	
4.13	100000	+
4.14	4500	
4.15	400	
4.16	1600	
4.17	2500	
4.18	700	
4.19	70000	
4.20	500	
4.21	2000	
4.22	18000	
4.23	3000	
均值±S. D.	18.5±29.6	

[0345] 11. 实施例 :PJJ701 的构建

[0346] 含有全长衣原体 L₂HMWP 基因的质粒通过选择性除去 pAH306 (见 8.4 节) 中 HMWP N 末端上游的 EcoRI 位点而构建。这通过用 XhoI 完全消化 pAH306, 然后重新连接质粒形成 pAH306-Xho Δ-1 完成。含有剩余的 HMWP C 末端、来自 pAH316 (8.5 节) 的大约 2.5Kbp EcoRI 片段

[0347] 基于 PCR 的定点诱变方法 (Quik-Change 定点诱变系统, Stratagene) 用来实现所需 DNA 改变, 即在 pAH374 的 HMWP 编码序列中除去 NdeI 位点。诱变 PCR 引物 140-Nde-FX 和 14-NdeRCX 长度为 41 个碱基, 互补于含有 NdeI 位点的序列, 将其设计成消除 NdeI 识别位点但不改变相应蛋白编码序列。用来除去 pAH374 中 NdeI 位点的两个 PCR 诱变引物序列如下。

[0348] 140-Nde-FX (SEQ ID NO :38)

[0349] 5' -GGG TTT GGG AAT CAG CAC ATG AAA ACC TCA TAT ACA TTT GC-3'

[0350] 140-Nde-RCX (SEQ ID NO :39)

[0351] 5' -GCA AAT GTA TAT GAG GTT TTC ATG TGC TGA TTC CCA AAC CC-3'

[0352] Pfu DNA 聚合酶 (Stratagene) 诱变和 DpnI 消化以切割任何未改变的 pAH374 亲本质粒之后,突变的质粒 DNA 转化进入大肠杆菌 XL1-Blue。携带质粒的转化子在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 2X-YT 琼脂上选择。抗生素抗性转化子随机挑出,筛选大小同 pAH374 的质粒。转化子中分离的质粒通过 EcoRI 限制性内切酶消化确认。这些质粒中缺少

[0353] 质粒 pAH 374-Nde Δ -1 中缺少内部 NdeI 位点、编码砂眼衣原体 L₂ HMWP 的 DNA 片段通过 PCR 扩增,使用质粒 pAH374-Nde Δ -1 (约 50ng) 和引物 306-Nde-Met1 和 312H6Xba1。引物 306NdeMet1 被设计成包含中央 NdeI 位点,以便定向克隆至 pMG81。306NdeMet1 中的 NdeI 位点与 HMWP 信号序列的 ATG 起始密码子重叠,其 5' 侧翼是 20 个碱基的 G/C 夹子,3' 侧翼是与 HMWP 信号序列的前 15 个残基互补的序列。引物 312H6Xba1 被设计成包含与 HMWP C 末端互补的序列,其后是限定 6 组氨酸亲和纯化结构域的 (CAT)₆ 基序。该引物也含有 2 个 UAA 终止密码子,1 个 XbaI 识别序列,在引物的 3' 末端是 20 个碱基的 G/C 夹子。306NdeMet1 和 312H6Xba1 PCR 引物的序列如下。

[0354] 306NdeMet1 (SEQ ID NO :40)

[0355] 5' -AAG GGC CCA ATT ACG CAG ACA TAT GGA AAC GTC TTT CCA TAA GTTCTT TCT TTC A-3'

[0356] 312H6Xba1 (SEQ ID NO :41)

[0357] 5' -AAG GGC CCA ATT ACG CAG AGT CTA GAT TAT TAA TGA TGA TGA TGATGA TGG AAC CGG ACT CTA CTT CCT GCA CTC AAA CC-3'

[0358] 8.4. 节所述 PCR 扩增条件用来产生 NdeI-XbaI HMWP 基因盒。扩增后,PCR 产物使用羟基磷灰石自旋柱 (QiaGen) 纯化,用大约 10 倍过量的 NdeI 和 XbaI 37°C 消化过夜,在片段末端产生所需的“突出端”。消化的片段使用自旋柱再次纯化,大约 250 纳克连接到大约 50 纳克 pMG81 质粒 DNA 上,该质粒 DNA 事先已用 NdeI 和 XbaI 完全消化,随后用 CIP 处理以防止载体再连接。一份连接反应产物试样用来转化大肠杆菌 AR58 菌株,该菌株已经通过 Lederberg 和 Cohen 法处理变成感受态。转化子在含有 40 μ g/ml 硫酸卡那霉素的 2X-YT 琼脂上选择。由于 pMG81 上温度可诱导的启动子,转化的细胞在 30°C 生长。卡那霉素抗

[0359] 12. 实施例 16 :从 AR58 (PJJ701) 产生全长 rHMWP

[0360] 1 毫升含有质粒 pJJ701 的大肠杆菌菌株 AR58 的冻存原种接种大约 100 毫升含有 40 μ g/ml 卡那霉素的 2X-YT 肉汤,30°C 生长过夜,以制备发酵种子培养物。大约 20 毫升过夜种子培养物用来接种 NewBrunswick Bioflow 3000 发酵罐,发酵罐中装有大约 2 升含有 40 μ g/ml 卡那霉素的 2X-YT 肉汤。AR58 (PJJ701) 培养物在 30°C 充分通气生长,直至 OD₆₂₅ 值为 0.5-0.6。通过提高发酵培养物温度至大约 39 到 42°C 诱导 rHMWP 表达。在较高温度下温育持续大约 4-5 个小时。

[0361] 在诱导期末,某些细胞显示典型的重组蛋白包涵体,使用 HeraeusContifuge 28RS 离心机通过连续流动离心收集大肠杆菌培养物。离心后,从离心管上刮下细胞沉淀,-70°C 保存待用。

[0362] 大约 15gm AR58 (pJJ701) 冻存细胞沉淀在大约 40 毫升冰冷的 10mM 磷酸钠缓冲

液 (pH7.3) 中涡旋搅拌并碾磨。悬浮后,加入溶菌酶 (鸡蛋白,Sigma) 和 DnaseI (牛胰腺,Sigma) 至终浓度分别为 1.0mg/ml 和 0.01mg/ml,混合物在冰上温育 30 到 45 分钟。细胞连续两次通过预冷的 (大约 4℃) SLM Aminco 弗氏压力室 (大约 14Kpsi,1"内径) 以破碎之。在 Sprvall SS34 转头中以大约 20000×g 离心 45 分钟分离含有 rHMWP 的不溶物质 (沉淀)。该离心获得的上清液弃去,沉淀形式的不溶组分在 -20℃ 下储存。

[0363] 为选择性提取污染的蛋白并除去内毒素,含有 rHMWP 的不溶性沉淀在冰上融化,用 10 毫升含有 2.0% Triton X-100 的 PBS 缓冲液洗涤两次。在室温下洗涤,通过常规玻璃组织碾磨机涡旋搅拌和匀浆获得含有 rHMWP 的胶质沉淀悬液。通过在 Sorvall SS34 转头中大约 10000×g 离心 20 分钟 (室温) 洗涤获得含有 rHMWP 的不溶物质。不溶物质用 10 毫升含有 2.0M 氯化钠的 4.0M 尿素溶液洗涤 2 次 (同样涡旋搅拌和匀浆)。洗涤过的 rHMWP 物质同上离心回收。不溶性 rHMWP 组分用含有 1.0% Zwittergent3-14 (Sigma) 的 PBS 溶液再洗 2 次。

[0364] 最后一次洗涤后离心回收的 rHMWP 沉淀在含有 4M 尿素的标准 Laemmli SDS-PAGE 样品缓冲液中于室温溶解 2 小时。溶解的 rHMWP 通过电泳大小分离成大约 110Kdal 的单一蛋白带,使用标准 14cm×20cm×3mm 聚丙烯酰胺 (36 : 1, 丙烯酰胺 : 双丙烯酰胺) Tris/ 甘氨酸 /SDS 制备性凝胶。使用每孔大约 500 μl 的 5 孔制备梳形成的 4% 聚丙烯酰胺浓缩胶在分离胶以上聚合。电泳在 BioRad Protean 单元中使用常规 Tris/ 甘氨酸 /SDS 电泳缓冲液 (BioRad) 大约 22℃ 进行约 12 小时 (约 80 到 85 伏特,恒定电压)。预先染色的分子量标准物 (SeeBlue, Novex) 上样于平行泳道中,用来测量蛋白种类分离的程度和效果。电泳后,拆开凝胶夹层,从与分子量标准物相邻的 rHMWP 样品泳道中取出垂直的胶条,用考马斯兰 R250 染色显示 rHMWP 带。染色的区段在剩余的未染色制备性凝胶上重新定位,鉴定含有 rHMWP 的聚丙烯酰胺条带并切出。

[0365] 使用 Schleicher and Schuell EluTrap 电洗脱仪自凝胶胶条中洗出 rHMWP。电洗脱基本按照厂商说明进行,不同之处在于约 1/4 强度的 SDS 电泳缓冲液 (Novex) 用作洗脱缓冲液。洗脱在约 40mA 于室温中进行 12 到 14 小时。在洗脱期末细胞的极性倒转约 2 到 3 分钟,以除去吸附在 BT1 膜上的任何蛋白。含 rHMWP 的溶液从收集室中除去,4℃ 下储存在聚丙烯锥形管中。

[0366] 过量的 SDS 去污剂使用 SDS 沉淀系统 (SDS-OUT 沉淀试剂盒,Pierce Chemical) 除去。由凝胶洗脱的蛋白溶液中除去过量去污剂按照厂商说明完成。去污剂提取的 rHMWP 用无菌无内毒素的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 稀释大约 15 倍,在 Amicon 搅拌离心室中使用 YM30 超离心膜超离心浓缩到大约 1.0mg/ml。

[0367] 残留的内毒素通过多粘菌素 BAffi-Prep 多粘菌素基质 (BioRad) 处理从浓缩的 rHMWP 溶液中除去。Affi-Prep 处理在 4℃ 下按照厂商说明以分批方式进行过夜。

[0368] 浓缩的多粘菌素 B 处理的 rHMWP 的蛋白浓度使用 Micro BCA 法 (Pierce Chem.) 确定,BSA 作为标准物。

[0369] 纯化的 rHMWP (约 0.9-1.2mg/ml 蛋白浓度) 分别通过 SDS-PAGE、Western 印迹和比色内毒素测定法 (BioWhittaker) 估计纯度、同一性和残余内毒素负荷。凝胶纯化的 rHMWP 物质通过凝胶分析为具有预期分子量 (约 110Kdal) 的单一带,显示其纯度大于 95%,在 Western 印迹中它与 rHMWP 特异性 K196 抗体强烈反应。经计算残余内毒素小于 0.05EU/

μ g。

[0370] 序列表

[0371] <110>Antex Biologics、Inc.

[0372] <120> 衣原体蛋白、其基因序列及用途

[0373] <130>2479.004CN10

[0374] <140>200610088776.9

[0375] <141>1998-10-01

[0376] <150>98811817.3

[0377] <151>1998-10-01

[0378] <150>PCT/US98/20737

[0379] <151>1998-10-01

[0380] <150>US 08/942,596

[0381] <151>1997-10-02

[0382] <160>43

[0383] <170>PatentIn version 3.3

[0384] <210>1

[0385] <211>4435

[0386] <212>DNA

[0387] <213> 人工序列

[0388] <220>

[0389] <223> 重组表达载体

[0390] <220>

[0391] <221>CDS

[0392] <222>(382)..(3417)

[0393] <400>1

[0394] gggcaaaact cttccccccg ggatttatat gggaaagggg aaactttggc ccgtattcaa 60

[0395] gcgccacggg ttttggggcg gaatgaattt tttcgttccg gaaaaagtaa ttccccggga 120

[0396] acgtagggtta tcggtttcat aggcctcgcca aatgggatat aggtggaaaag gtaaaaaaaaa 180

[0397] ctgagccaag caaaggatag agaagtcttg taatcatcgc aggttaaagg ggggatgtta 240

[0398] ttttagcctg caaatagtgt aattattgga tcctgtaaag agaaaaggac gaatgcgctg 300

[0399] aagataagaa catttattga tattaaatta ttaatttttt atgaagcgga gtaattaatt 360

[0400] ttatctctca gcttttgtgt g atg caa acg tct ttc cat aag ttc ttt ctt 411

[0401] Met Gln Thr Ser Phe His Lys Phe Phe Leu

[0402] 1 5 10

[0403] tca atg att cta gct tat tct tgc tgc tct tta aat ggg ggg gga tat 459

[0404] Ser Met Ile Leu Ala Tyr Ser Cys Cys Ser Leu Asn Gly Gly Gly Tyr

[0405] 15 20 25

[0406] gca gca gaa atc atg gtt cct caa gga att tac gat ggg gag acg tta 507

[0407] Ala Ala Glu Ile Met Val Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu Thr Leu

[0408]	30	35	40
[0409]	act gta tca ttt ccc tat act gtt ata gga gat ccg agt ggg act act	555	
[0410]	Thr Val Ser Phe Pro Tyr Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly Thr Thr		
[0411]	45	50	55
[0412]	gtt ttt tct gca gga gag tta aca tta aaa aat ctt gac aat tct att	603	
[0413]	Val Phe Ser Ala Gly Glu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn Ser Ile		
[0414]	60	65	70
[0415]	gca gct ttg cct tta agt tgt ttt ggg aac tta tta ggg agt ttt act	651	
[0416]	Ala Ala Leu Pro Leu Ser Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly Ser Phe Thr		
[0417]	75	80	85
[0418]	gtt tta ggg aga gga cac tcg ttg act ttc gag aac ata cgg act tct	699	
[0419]	Val Leu Gly Arg Gly His Ser Leu Thr Phe Glu Asn Ile Arg Thr Ser		
[0420]	95	100	105
[0421]	aca aat ggg gca gct cta agt aat agc gct gct gat gga ctg ttt act	747	
[0422]	Thr Asn Gly Ala Ala Leu Ser Asn Ser Ala Ala Asp Gly Leu Phe Thr		
[0423]	110	115	120
[0424]	att gag ggt ttt aaa gaa tta tcc ttt tcc aat tgc aat tca tta ctt	795	
[0425]	Ile Glu Gly Phe Lys Glu Leu Ser Phe Ser Asn Cys Asn Ser Leu Leu		
[0426]	125	130	135
[0427]	gcc gta ctg cct gct gca acg act aat aag ggt agc cag act ccg acg	843	
[0428]	Ala Val Leu Pro Ala Ala Thr Thr Asn Lys Gly Ser Gln Thr Pro Thr		
[0429]	140	145	150
[0430]	aca aca tct aca ccg tct aat ggt act att tat tct aaa aca gat ctt	891	
[0431]	Thr Thr Ser Thr Pro Ser Asn Gly Thr Ile Tyr Ser Lys Thr Asp Leu		
[0432]	155	160	165
[0433]	ttg tta ctc aat aat gag aag ttc tca ttc tat agt aat tta gtc tct	939	
[0434]	Leu Leu Leu Asn Asn Glu Lys Phe Ser Phe Tyr Ser Asn Leu Val Ser		
[0435]	175	180	185
[0436]	gga gat ggg gga gct ata gat gct aag agc tta acg gtt caa gga att	987	
[0437]	Gly Asp Gly Gly Ala Ile Asp Ala Lys Ser Leu Thr Val Gln Gly Ile		
[0438]	190	195	200
[0439]	agc aag ctt tgt gtc ttc caa gaa aat act gct caa gct gat ggg gga	1035	
[0440]	Ser Lys Leu Cys Val Phe Gln Glu Asn Thr Ala Gln Ala Asp Gly Gly		
[0441]	205	210	215
[0442]	gct tgt caa gta gtc acc agt ttc tct gct atg gct aac gag gct cct	1083	
[0443]	Ala Cys Gln Val Val Thr Ser Phe Ser Ala Met Ala Asn Glu Ala Pro		
[0444]	220	225	230
[0445]	att gcc ttt gta gcg aat gtt gca gga gta aga ggg gga ggg att gct	1131	
[0446]	Ile Ala Phe Val Ala Asn Val Ala Gly Val Arg Gly Gly Gly Ile Ala		

[0447]	235	240	245	250
[0448]	gct gtt cag gat ggg cag cag gga gtg tca tca tct act tca aca gaa 1179			
[0449]	Ala Val Gln Asp Gly Gln Gln Gly Val Ser Ser Ser Thr Ser Thr Glu			
[0450]	255	260	265	
[0451]	gat cca gta gta agt ttt tcc aga aat act gcg gta gag ttt gat ggg 1227			
[0452]	Asp Pro Val Val Ser Phe Ser Arg Asn Thr Ala Val Glu Phe Asp Gly			
[0453]	270	275	280	
[0454]	aac gta gcc cga gta gga gga ggg att tac tcc tac ggg aac gtt gct 1275			
[0455]	Asn Val Ala Arg Val Gly Gly Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Asn Val Ala			
[0456]	285	290	295	
[0457]	ttc ctg aat aat gga aaa acc ttg ttt ctc aac aat gtt gct tct cct 1323			
[0458]	Phe Leu Asn Asn Gly Lys Thr Leu Phe Leu Asn Asn Val Ala Ser Pro			
[0459]	300	305	310	
[0460]	gtt tac att gct gct aag caa cca aca agt gga cag gct tct aat acg 1371			
[0461]	Val Tyr Ile Ala Ala Lys Gln Pro Thr Ser Gly Gln Ala Ser Asn Thr			
[0462]	315	320	325	330
[0463]	agt aat aat tac gga gat gga gga gct atc ttc tgt aag aat ggt gcg 1419			
[0464]	Ser Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Gly Ala Ile Phe Cys Lys Asn Gly Ala			
[0465]	335	340	345	
[0466]	caa gca gga tcc aat aac tct gga tca gtt tcc ttt gat gga gag gga 1467			
[0467]	Gln Ala Gly Ser Asn Asn Ser Gly Ser Val Ser Phe Asp Gly Glu Gly			
[0468]	350	355	360	
[0469]	gta gtt ttc ttt agt agc aat gta gct gct ggg aaa ggg gga gct att 1515			
[0470]	Val Val Phe Phe Ser Ser Asn Val Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ile			
[0471]	365	370	375	
[0472]	tat gcc aaa aag ctc tcg gtt gct aac tgt ggc cct gta caa ttt tta 1563			
[0473]	Tyr Ala Lys Lys Leu Ser Val Ala Asn Cys Gly Pro Val Gln Phe Leu			
[0474]	380	385	390	
[0475]	agg aat atc gct aat gat ggt gga gcg att tat tta gga gaa tct gga 1611			
[0476]	Arg Asn Ile Ala Asn Asp Gly Gly Ala Ile Tyr Leu Gly Glu Ser Gly			
[0477]	395	400	405	410
[0478]	gag ctc agt tta tct gct gat tat gga gat att att ttc gat ggg aat 1659			
[0479]	Glu Leu Ser Leu Ser Ala Asp Tyr Gly Asp Ile Ile Phe Asp Gly Asn			
[0480]	415	420	425	
[0481]	ctt aaa aga aca gcc aaa gag aat gct gcc gat gtt aat ggc gta act 1707			
[0482]	Leu Lys Arg Thr Ala Lys Glu Asn Ala Ala Asp Val Asn Gly Val Thr			
[0483]	430	435	440	
[0484]	gtg tcc tca caa gcc att tcg atg gga tcg gga ggg aaa ata acg aca 1755			
[0485]	Val Ser Ser Gln Ala Ile Ser Met Gly Ser Gly Gly Lys Ile Thr Thr			

[0486]	445	450	455
[0487]	tta aga gct aaa gca ggg cat cag att ctc ttt aat gat ccc atc gag	1803	
[0488]	Leu Arg Ala Lys Ala Gly His Gln Ile Leu Phe Asn Asp Pro Ile Glu		
[0489]	460	465	470
[0490]	atg gca aac gga aat aac cag cca gcg cag tct tcc aaa ctt cta aaa	1851	
[0491]	Met Ala Asn Gly Asn Asn Gln Pro Ala Gln Ser Ser Lys Leu Leu Lys		
[0492]	475	480	485
[0493]	att aac gat ggt gaa gga tac aca ggg gat att gtt ttt gct aat gga	1899	
[0494]	Ile Asn Asp Gly Glu Gly Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe Ala Asn Gly		
[0495]	495	500	505
[0496]	agc agt act ttg tac caa aat gtt acg ata gag caa gga agg att gtt	1947	
[0497]	Ser Ser Thr Leu Tyr Gln Asn Val Thr Ile Glu Gln Gly Arg Ile Val		
[0498]	510	515	520
[0499]	ctt cgt gaa aag gca aaa tta tca gtg aat tct cta agt cag aca ggt	1995	
[0500]	Leu Arg Glu Lys Ala Lys Leu Ser Val Asn Ser Leu Ser Gln Thr Gly		
[0501]	525	530	535
[0502]	ggg agt ctg tat atg gaa gct ggg agt aca tgg gat ttt gta act cca	2043	
[0503]	Gly Ser Leu Tyr Met Glu Ala Gly Ser Thr Trp Asp Phe Val Thr Pro		
[0504]	540	545	550
[0505]	caa cca cca caa cag cct cct gcc gct aat cag ttg atc acg ctt tcc	2091	
[0506]	Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Ala Ala Asn Gln Leu Ile Thr Leu Ser		
[0507]	555	560	565
[0508]	aat ctg cat ttg tct ctt tct tct ttg tta gca aac aat gca gtt acg	2139	
[0509]	Asn Leu His Leu Ser Leu Ser Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ala Val Thr		
[0510]	575	580	585
[0511]	aat cct cct acc aat cct cca gcg caa gat tct cat cct gca gtc att	2187	
[0512]	Asn Pro Pro Thr Asn Pro Pro Ala Gln Asp Ser His Pro Ala Val Ile		
[0513]	590	595	600
[0514]	ggt agc aca act gct ggt tct gtt aca att agt ggg cct atc ttt ttt	2235	
[0515]	Gly Ser Thr Thr Ala Gly Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile Phe Phe		
[0516]	605	610	615
[0517]	gag gat ttg gat gat aca gct tat gat agg tat gat tgg cta ggt tct	2283	
[0518]	Glu Asp Leu Asp Asp Thr Ala Tyr Asp Arg Tyr Asp Trp Leu Gly Ser		
[0519]	620	625	630
[0520]	aat caa aaa atc aat gtc ctg aaa tta cag tta ggg act aag ccc cca	2331	
[0521]	Asn Gln Lys Ile Asn Val Leu Lys Leu Gln Leu Gly Thr Lys Pro Pro		
[0522]	635	640	645
[0523]	gct aat gcc cca tca gat ttg act cta ggg aat gag atg cct aag tat	2379	
[0524]	Ala Asn Ala Pro Ser Asp Leu Thr Leu Gly Asn Glu Met Pro Lys Tyr		

[0525]	655	660	665
[0526]	ggc tat caa gga agc tgg aag ctt gcg tgg gat cct aat aca gca aat	2427	
[0527]	Gly Tyr Gln Gly Ser Trp Lys Leu Ala Trp Asp Pro Asn Thr Ala Asn		
[0528]	670	675	680
[0529]	aat ggt cct tat act ctg aaa gct aca tgg act aaa act ggg tat aat	2475	
[0530]	Asn Gly Pro Tyr Thr Leu Lys Ala Thr Trp Thr Lys Thr Gly Tyr Asn		
[0531]	685	690	695
[0532]	cct ggg cct gag cga gta gct tct ttg gtt cca aat agt tta tgg gga	2523	
[0533]	Pro Gly Pro Glu Arg Val Ala Ser Leu Val Pro Asn Ser Leu Trp Gly		
[0534]	700	705	710
[0535]	tcc att tta gat ata cga tct gcg cat tca gca att caa gca agt gtg	2571	
[0536]	Ser Ile Leu Asp Ile Arg Ser Ala His Ser Ala Ile Gln Ala Ser Val		
[0537]	715	720	725
[0538]	gat ggg cgc tct tat tgt cga gga tta tgg gtt tct gga gtt tcg aat	2619	
[0539]	Asp Gly Arg Ser Tyr Cys Arg Gly Leu Trp Val Ser Gly Val Ser Asn		
[0540]	735	740	745
[0541]	ttc ttc tat cat gac cgc gat gct tta ggt cag gga tat cgg tat att	2667	
[0542]	Phe Phe Tyr His Asp Arg Asp Ala Leu Gly Gln Gly Tyr Arg Tyr Ile		
[0543]	750	755	760
[0544]	agt ggg ggt tat tcc tta gga gca aac tcc tac ttt gga tca tcg atg	2715	
[0545]	Ser Gly Gly Tyr Ser Leu Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Met		
[0546]	765	770	775
[0547]	ttt ggt cta gca ttt acc gaa gta ttt ggt aga tct aaa gat tat gta	2763	
[0548]	Phe Gly Leu Ala Phe Thr Glu Val Phe Gly Arg Ser Lys Asp Tyr Val		
[0549]	780	785	790
[0550]	gtg tgt cgt tcc aat cat cat gct tgc ata gga tcc gtt tat cta tct	2811	
[0551]	Val Cys Arg Ser Asn His His Ala Cys Ile Gly Ser Val Tyr Leu Ser		
[0552]	795	800	805
[0553]	acc caa caa gct tta tgt gga tcc tat ttg ttc gga gat gcg ttt atc	2859	
[0554]	Thr Gln Gln Ala Leu Cys Gly Ser Tyr Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ile		
[0555]	815	820	825
[0556]	cgt gct agc tac ggg ttt ggg aat cag cat atg aaa acc tca tat aca	2907	
[0557]	Arg Ala Ser Tyr Gly Phe Gly Asn Gln His Met Lys Thr Ser Tyr Thr		
[0558]	830	835	840
[0559]	ttt gca gag gag agc gat gtt cgt tgg gat aat aac tgt ctg gct gga	2955	
[0560]	Phe Ala Glu Glu Ser Asp Val Arg Trp Asp Asn Asn Cys Leu Ala Gly		
[0561]	845	850	855
[0562]	gag att gga gcg gga tta ccg att gtg att act cca tct aag etc tat	3003	
[0563]	Glu Ile Gly Ala Gly Leu Pro Ile Val Ile Thr Pro Ser Lys Leu Tyr		

[0564]	860	865	870
[0565]	ttg aat gag ttg cgt cct ttc gtg caa gct gag ttt tct tat gcc gat	3051	
[0566]	Leu Asn Glu Leu Arg Pro Phe Val Gln Ala Glu Phe Ser Tyr Ala Asp		
[0567]	875	880	885 890
[0568]	cat gaa tct ttt aca gag gaa ggc gat caa gct cgg gca ttc aag agc	3099	
[0569]	His Glu Ser Phe Thr Glu Glu Gly Asp Gln Ala Arg Ala Phe Lys Ser		
[0570]	895	900	905
[0571]	gga cat ctc cta aat cta tca gtt cct gtt gga gtg aag ttt gat cga	3147	
[0572]	Gly His Leu Leu Asn Leu Ser Val Pro Val Gly Val Lys Phe Asp Arg		
[0573]	910	915	920
[0574]	tgt tct agt aca cat cct aat aaa tat agc ttt atg gcg gct tat atc	3195	
[0575]	Cys Ser Ser Thr His Pro Asn Lys Tyr Ser Phe Met Ala Ala Tyr Ile		
[0576]	925	930	935
[0577]	tgt gat gct tat cgc acc atc tct ggt act gag aca acg ctc cta tcc	3243	
[0578]	Cys Asp Ala Tyr Arg Thr Ile Ser Gly Thr Glu Thr Thr Leu Leu Ser		
[0579]	940	945	950
[0580]	cat caa gag aca tgg aca aca gat gcc ttt cat tta gca aga cat gga	3291	
[0581]	His Gln Glu Thr Trp Thr Thr Asp Ala Phe His Leu Ala Arg His Gly		
[0582]	955	960	965 970
[0583]	gtt gtg gtt aga gga tct atg tat gct tct cta aca agt aat ata gaa	3339	
[0584]	Val Val Val Arg Gly Ser Met Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Asn Ile Glu		
[0585]	975	980	985
[0586]	gta tat ggc cat gga aga tat gag tat cga gat gct tct cga ggc tat	3387	
[0587]	Val Tyr Gly His Gly Arg Tyr Glu Tyr Arg Asp Ala Ser Arg Gly Tyr		
[0588]	990	995	1000
[0589]	ggt ttg agt gca gga agt aga gtc cgg ttc taaaaatatt ggtagatag	3437	
[0590]	Gly Leu Ser Ala Gly Ser Arg Val Arg Phe		
[0591]	1005	1010	
[0592]	ttaagtgtta gcgatgccttttttctttgag atctacatca ttttgttttt tagcttgttt	3497	
[0593]	gtgttcctat tcgtatggat tcgcgagctc tctcaagtg ttaacgccta atgtaaccac	3557	
[0594]	tccttttaag ggagacgatg tttacttgaa tggagactgc gcttttgtca atgtctatgc	3617	
[0595]	aggagctgaa gaaggttcga ttatctcagc taatggcgac aatttaacga ttaccggaca	3677	
[0596]	aaaccataca ttatcattta cagattctca agggccagtt cttaaaaatt atgccttcac	3737	
[0597]	ttcagcagga gagacactta ctctgagaga tttttcgagt ctgatgttct cgaaaaatgt	3797	
[0598]	ttcttgcgga gaaaaggga tgatctccgg gaaaaccgtg agtatttccg gagcaggcga	3857	
[0599]	agtgattttc tgggataact ccgtggggta ttctccttta tctactgtgc caacctcatc	3917	
[0600]	atcaactccg cctgctccaa cagttagtga tgctcgaaa gggctctattt tttctgtaga	3977	
[0601]	gactagtttg gagatctcag gcgtcaaaaa aggggtcatg ttcgataata atgccgggaa	4037	
[0602]	tttcggaaca gtttttcgag gtaagaataa taataatgct ggtgggtggag gcagtgggtt	4097	

[0603] ccgctacacc atcaagtacg actttttacag ttaaaaactg taaagggaaa gttttctttca 4157
 [0604] cagataacgt agcctcttgc ggaggcggag tggtttataa aggcattgtg cttttcaaag 4217
 [0605] acaatgaagg aggcatattc ttccgaggga acacagcata cgatgattta aggattcttg 4277
 [0606] ctgctactaa tcaggatcag aatacggaga caggaggcgg tggaggagtt atttgctctc 4337
 [0607] cagatgattc tgtaaagttt gaaggcaata aaggttctat tgtttttgat tacaactttg 4397
 [0608] caaaaggcag aggcggaagc atcctaacga aagaattc 4435
 [0609] <210>2
 [0610] <211>1012
 [0611] <212>PRT
 [0612] <213> 人工序列
 [0613] <220>
 [0614] <223> 合成构建体
 [0615] <400>2
 [0616] Met Gln Thr Ser Phe His Lys Phe Phe Leu Ser Met Ile Leu Ala Tyr
 [0617] 1 5 10 15
 [0618] Ser Cys Cys Ser Leu Asn Gly Gly Gly Tyr Ala Ala Glu Ile Met Val
 [0619] 20 25 30
 [0620] Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu Thr Leu Thr Val Ser Phe Pro Tyr
 [0621] 35 40 45
 [0622] Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly Thr Thr Val Phe Ser Ala Gly Glu
 [0623] 50 55 60
 [0624] Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn Ser Ile Ala Ala Leu Pro Leu Ser
 [0625] 65 70 75 80
 [0626] Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly Ser Phe Thr Val Leu Gly Arg Gly His
 [0627] 85 90 95
 [0628] Ser Leu Thr Phe Glu Asn Ile Arg Thr Ser Thr Asn Gly Ala Ala Leu
 [0629] 100 105 110
 [0630] Ser Asn Ser Ala Ala Asp Gly Leu Phe Thr Ile Glu Gly Phe Lys Glu
 [0631] 115 120 125
 [0632] Leu Ser Phe Ser Asn Cys Asn Ser Leu Leu Ala Val Leu Pro Ala Ala
 [0633] 130 135 140
 [0634] Thr Thr Asn Lys Gly Ser Gln Thr Pro Thr Thr Thr Ser Thr Pro Ser
 [0635] 145 150 155 160
 [0636] Asn Gly Thr Ile Tyr Ser Lys Thr Asp Leu Leu Leu Leu Asn Asn Glu
 [0637] 165 170 175
 [0638] Lys Phe Ser Phe Tyr Ser Asn Leu Val Ser Gly Asp Gly Gly Ala Ile
 [0639] 180 185 190
 [0640] Asp Ala Lys Ser Leu Thr Val Gln Gly Ile Ser Lys Leu Cys Val Phe
 [0641] 195 200 205

[0642]	Gln Glu Asn Thr Ala Gln Ala Asp Gly Gly Ala Cys Gln Val Val Thr
[0643]	210 215 220
[0644]	Ser Phe Ser Ala Met Ala Asn Glu Ala Pro Ile Ala Phe Val Ala Asn
[0645]	225 230 235 240
[0646]	Val Ala Gly Val Arg Gly Gly Gly Ile Ala Ala Val Gln Asp Gly Gln
[0647]	245 250 255
[0648]	Gln Gly Val Ser Ser Ser Thr Ser Thr Glu Asp Pro Val Val Ser Phe
[0649]	260 265 270
[0650]	Ser Arg Asn Thr Ala Val Glu Phe Asp Gly Asn Val Ala Arg Val Gly
[0651]	275 280 285
[0652]	Gly Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Asn Val Ala Phe Leu Asn Asn Gly Lys
[0653]	290 295 300
[0654]	Thr Leu Phe Leu Asn Asn Val Ala Ser Pro Val Tyr Ile Ala Ala Lys
[0655]	305 310 315 320
[0656]	Gln Pro Thr Ser Gly Gln Ala Ser Asn Thr Ser Asn Asn Tyr Gly Asp
[0657]	325 330 335
[0658]	Gly Gly Ala Ile Phe Cys Lys Asn Gly Ala Gln Ala Gly Ser Asn Asn
[0659]	340 345 350
[0660]	Ser Gly Ser Val Ser Phe Asp Gly Glu Gly Val Val Phe Phe Ser Ser
[0661]	355 360 365
[0662]	Asn Val Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Ala Lys Lys Leu Ser
[0663]	370 375 380
[0664]	Val Ala Asn Cys Gly Pro Val Gln Phe Leu Arg Asn Ile Ala Asn Asp
[0665]	385 390 395 400
[0666]	Gly Gly Ala Ile Tyr Leu Gly Glu Ser Gly Glu Leu Ser Leu Ser Ala
[0667]	405 410 415
[0668]	Asp Tyr Gly Asp Ile Ile Phe Asp Gly Asn Leu Lys Arg Thr Ala Lys
[0669]	420 425 430
[0670]	Glu Asn Ala Ala Asp Val Asn Gly Val Thr Val Ser Ser Gln Ala Ile
[0671]	435 440 445
[0672]	Ser Met Gly Ser Gly Gly Lys Ile Thr Thr Leu Arg Ala Lys Ala Gly
[0673]	450 455 460
[0674]	His Gln Ile Leu Phe Asn Asp Pro Ile Glu Met Ala Asn Gly Asn Asn
[0675]	465 470 475 480
[0676]	Gln Pro Ala Gln Ser Ser Lys Leu Leu Lys Ile Asn Asp Gly Glu Gly
[0677]	485 490 495
[0678]	Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe Ala Asn Gly Ser Ser Thr Leu Tyr Gln
[0679]	500 505 510
[0680]	Asn Val Thr Ile Glu Gln Gly Arg Ile Val Leu Arg Glu Lys Ala Lys

[0681]	515	520	525
[0682]	Leu Ser Val Asn Ser Leu Ser Gln Thr Gly Gly Ser Leu Tyr Met Glu		
[0683]	530	535	540
[0684]	Ala Gly Ser Thr Trp Asp Phe Val Thr Pro Gln Pro Pro Gln Gln Pro		
[0685]	545	550	555
[0686]	Pro Ala Ala Asn Gln Leu Ile Thr Leu Ser Asn Leu His Leu Ser Leu		
[0687]	565	570	575
[0688]	Ser Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ala Val Thr Asn Pro Pro Thr Asn Pro		
[0689]	580	585	590
[0690]	Pro Ala Gln Asp Ser His Pro Ala Val Ile Gly Ser Thr Thr Ala Gly		
[0691]	595	600	605
[0692]	Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile Phe Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr		
[0693]	610	615	620
[0694]	Ala Tyr Asp Arg Tyr Asp Trp Leu Gly Ser Asn Gln Lys Ile Asn Val		
[0695]	625	630	635
[0696]	Leu Lys Leu Gln Leu Gly Thr Lys Pro Pro Ala Asn Ala Pro Ser Asp		
[0697]	645	650	655
[0698]	Leu Thr Leu Gly Asn Glu Met Pro Lys Tyr Gly Tyr Gln Gly Ser Trp		
[0699]	660	665	670
[0700]	Lys Leu Ala Trp Asp Pro Asn Thr Ala Asn Asn Gly Pro Tyr Thr Leu		
[0701]	675	680	685
[0702]	Lys Ala Thr Trp Thr Lys Thr Gly Tyr Asn Pro Gly Pro Glu Arg Val		
[0703]	690	695	700
[0704]	Ala Ser Leu Val Pro Asn Ser Leu Trp Gly Ser Ile Leu Asp Ile Arg		
[0705]	705	710	715
[0706]	Ser Ala His Ser Ala Ile Gln Ala Ser Val Asp Gly Arg Ser Tyr Cys		
[0707]	725	730	735
[0708]	Arg Gly Leu Trp Val Ser Gly Val Ser Asn Phe Phe Tyr His Asp Arg		
[0709]	740	745	750
[0710]	Asp Ala Leu Gly Gln Gly Tyr Arg Tyr Ile Ser Gly Gly Tyr Ser Leu		
[0711]	755	760	765
[0712]	Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Met Phe Gly Leu Ala Phe Thr		
[0713]	770	775	780
[0714]	Glu Val Phe Gly Arg Ser Lys Asp Tyr Val Val Cys Arg Ser Asn His		
[0715]	785	790	795
[0716]	His Ala Cys Ile Gly Ser Val Tyr Leu Ser Thr Gln Gln Ala Leu Cys		
[0717]	805	810	815
[0718]	Gly Ser Tyr Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ile Arg Ala Ser Tyr Gly Phe		
[0719]	820	825	830

[0720] Gly Asn Gln His Met Lys Thr Ser Tyr Thr Phe Ala Glu Glu Ser Asp
 [0721] 835 840 845
 [0722] Val Arg Trp Asp Asn Asn Cys Leu Ala Gly Glu Ile Gly Ala Gly Leu
 [0723] 850 855 860
 [0724] Pro Ile Val Ile Thr Pro Ser Lys Leu Tyr Leu Asn Glu Leu Arg Pro
 [0725] 865 870 875 880
 [0726] Phe Val Gln Ala Glu Phe Ser Tyr Ala Asp His Glu Ser Phe Thr Glu
 [0727] 885 890 895
 [0728] Glu Gly Asp Gln Ala Arg Ala Phe Lys Ser Gly His Leu Leu Asn Leu
 [0729] 900 905 910
 [0730] Ser Val Pro Val Gly Val Lys Phe Asp Arg Cys Ser Ser Thr His Pro
 [0731] 915 920 925
 [0732] Asn Lys Tyr Ser Phe Met Ala Ala Tyr Ile Cys Asp Ala Tyr Arg Thr
 [0733] 930 935 940
 [0734] Ile Ser Gly Thr Glu Thr Thr Leu Leu Ser His Gln Glu Thr Trp Thr
 [0735] 945 950 955 960
 [0736] Thr Asp Ala Phe His Leu Ala Arg His Gly Val Val Val Arg Gly Ser
 [0737] 965 970 975
 [0738] Met Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Asn Ile Glu Val Tyr Gly His Gly Arg
 [0739] 980 985 990
 [0740] Tyr Glu Tyr Arg Asp Ala Ser Arg Gly Tyr Gly Leu Ser Ala Gly Ser
 [0741] 995 1000 1005
 [0742] Arg Val Arg Phe
 [0743] 1010
 [0744] <210>3
 [0745] <211>20
 [0746] <212>PRT
 [0747] <213>衣原体
 [0748] <220>
 [0749] <221>SITE
 [0750] <222>(19)..(19)
 [0751] <223>Xaa =未知氨基酸
 [0752] <400>3
 [0753] Glu Ile Met Val Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu Thr Leu Thr Val
 [0754] 1 5 10 15
 [0755] Ser Phe Xaa Tyr
 [0756] 20
 [0757] <210>4
 [0758] <211>18

- [0759] <212>DNA
[0760] <213> 衣原体
[0761] <220>
[0762] <221>misc_feature
[0763] <222>(12).. (12)
[0764] <220>
[0765] <221>misc_feature
[0766] <222>(15).. (15)
[0767] <400>4
[0768] gaaathatgg tncncaa 18
[0769] <210>5
[0770] <211>18
[0771] <212>DNA
[0772] <213> 衣原体
[0773] <220>
[0774] <221>misc_feature
[0775] <222>(12).. (12)
[0776] <223>n = a、t、g 或 c
[0777] <220>
[0778] <221>misc_feature
[0779] <222>(15).. (15)
[0780] <223>n = a、t、g 或 c
[0781] <400>5
[0782] gaaathatgg tncncag 18
[0783] <210>6
[0784] <211>18
[0785] <212>DNA
[0786] <213> 衣原体
[0787] <220>
[0788] <221>misc_feature
[0789] <222>(12).. (12)
[0790] <223>n = a、t、g 或 c
[0791] <220>
[0792] <221>misc_feature
[0793] <222>(15).. (15)
[0794] <223>n = a、t、g 或 c
[0795] <400>6
[0796] gagathatgg tncncaa 18
[0797] <210>7

[0798] <211>18
[0799] <212>DNA
[0800] <213>衣原体
[0801] <220>
[0802] <221>misc_feature
[0803] <222>(12)..(12)
[0804] <223>n = a、t、g 或 c
[0805] <220>
[0806] <221>misc_feature
[0807] <222>(15)..(15)
[0808] <223>n = a、t、g 或 c
[0809] <400>7
[0810] gagathatgg tncncag 18
[0811] <210>8
[0812] <211>15
[0813] <212>DNA
[0814] <213>衣原体
[0815] <220>
[0816] <221>misc_feature
[0817] <222>(1)..(1)
[0818] <223>n = a、t、g 或 c
[0819] <220>
[0820] <221>misc_feature
[0821] <222>(7)..(7)
[0822] <223>n = a、t、g 或 c
[0823] <400>8
[0824] ngtytcnccr tcata 15
[0825] <210>9
[0826] <211>15
[0827] <212>DNA
[0828] <213>衣原体
[0829] <220>
[0830] <221>misc_feature
[0831] <222>(1)..(1)
[0832] <223>n = a、t、g 或 c
[0833] <220>
[0834] <221>misc_feature
[0835] <222>(7)..(7)
[0836] <223>n = a、t、g 或 c

[0837] <400>9
 [0838] ngtytncerr tegta 15
 [0839] <210>10
 [0840] <211>1511
 [0841] <212>DNA
 [0842] <213> 衣原体
 [0843] <400>10
 [0844] gaaatcatgg ttcctcaagg aattttacgat ggggagacgt taactgtatc atttccttat 60
 [0845] actgttatag gagatccgag tgggactact gttttttctg caggagagtt aacattaaaa 120
 [0846] aatcttgaca attctattgc agctttgcct ttaagttggt ttgggaactt attagggagt 180
 [0847] tttactgttt tagggagagg acactcgttg actttcgaga acatacggac ttctacaaat 240
 [0848] ggggcagctc taagtaatag cgctgctgat ggactgttta ctattgaggg ttttaaagaa 300
 [0849] ttatcctttt ccaattgcaa ttcatctatt gccgtactgc ctgctgcaac gactaataag 360
 [0850] ggtagccaga ctccgacgac aacatctaca ccgtctaata gtactattta ttctaaaaca 420
 [0851] gatcttttgt tactcaataa tgagaagttc tcattctata gtaatttagt ctctggagat 480
 [0852] gggggagcta tagatgctaa gagcttaacg gttcaaggaa ttagcaagct ttgtgtcttc 540
 [0853] caagaaaata ctgctcaagc tgatggggga gcttgtcaag tagtcaccag tttctctgct 600
 [0854] atggctaacg aggctcctat tgcctttgta gcgaatgttg caggagtaag agggggaggg 660
 [0855] attgctgctg ttcaggatgg gcagcaggga gtgtcatcat ctacttcaac agaagatcca 720
 [0856] gtagtaagtt tttccagaaa tactgcggta gagtttgatg ggaacgtagc ccgagtagga 780
 [0857] ggagggatatt actcctacgg gaacgttgct ttcctgaata atggaaaaac cttgtttctc 840
 [0858] aacaatgttg cttctcctgt ttacattgct gctaagcaac caacaagtgg acaggcttct 900
 [0859] aatacagta ataattacgg agatggagga gctatcttct gtaagaatgg tgcgcaagca 960
 [0860] ggatccaata actctggatc agtttccctt gatggagagg gagtagtttt ctttagtagc 1020
 [0861] aatgtagctg ctgggaaagg gggagctatt tatgccaaaa agctctcggg tgctaactgt 1080
 [0862] ggccctgtac aatttttaag gaatatcgct aatgatggtg gagegattta tttaggagaa 1140
 [0863] tctggagagc tcagtttate tgctgattat ggagatatta ttttcgatgg gaatcttaaa 1200
 [0864] agaacagcca aagagaatgc tgccgatgtt aatggcgtaa ctgtgtcctc acaagccatt 1260
 [0865] tcgatgggat cgggagggaa aataacgaca ttaagagcta aagcagggca tcagattctc 1320
 [0866] tttaatgate ccatcgagat ggcaaacgga aataaccagc cagegcagtc ttccaaactt 1380
 [0867] ctaaaaatta acgatggtga aggatacaca ggggatattg tttttgctaa tggaagcagt 1440
 [0868] actttgtacc aaaatgttac gatagagcaa ggaaggattg ttcttcgtga aaaggcaaaa 1500
 [0869] ttatcagtga a 1511
 [0870] <210>11
 [0871] <211>1444
 [0872] <212>DNA
 [0873] <213> 衣原体
 [0874] <400>11
 [0875] ttctctaagt cagacaggtg ggagtctgta tatggaagct gggagtacat gggattttgt 60

[0876]	aactccacaa ccaccacaac agcctcctgc cgctaatacag ttgatcacgc tttccaatct	120
[0877]	gcatttgtct ctttcttctt tgtttagcaa caatgcagtt acgaatcctc ctaccaatcc	180
[0878]	tccagcgcaa gattctcatc ctgcagtcac ttgtagcaca actgctgggt ctgttacaat	240
[0879]	tagtgggcct atcttttttg aggatttgga tgatacagct tatgataggt atgattggct	300
[0880]	aggttctaata caaaaaatca atgtcctgaa attacagtta gggactaagc ccccagctaa	360
[0881]	tgcccatca gatttgactc tagggaatga gatgcctaag tatggctatc aaggaagctg	420
[0882]	gaagcttgcg tgggaccta atacagcaaa taatggctcct tatactctga aagctacatg	480
[0883]	gactaaaact ggggtataatc ctgggcctga gcgagtagct tctttggttc caaatagttt	540
[0884]	atggggatcc attttagata tacgatctgc gcattcagca attcaagcaa gtgtggatgg	600
[0885]	gcgctcttat tgtcaggat tatgggttc tggagtttcg aatttcttct atcatgaccg	660
[0886]	cgatgcttta ggtcaggat atcggtatat tagtgggggt tattccttag gagcaaactc	720
[0887]	ctactttgga tcatcgatgt ttggcttagc atttaccgaa gtatttggt gatctaaaga	780
[0888]	ttatgtagtg tgtcgttcca atcatcatgc ttgcatagga tccgtttatc tatctacca	840
[0889]	acaagcttta tgtggatcct atttgttcgg agatgcgttt atccgtgcta gctacgggtt	900
[0890]	tgggaatcag catatgaaaa cctcatatac atttgcagag gagagcgatg ttcgttggga	960
[0891]	taataactgt ctggctggag agattggagc gggattaccg attgtgatta ctccatctaa	1020
[0892]	gctctatttg aatgagttgc gtcctttcgt gcaagctgag ttttcttatg ccgatcatga	1080
[0893]	atcttttaca gaggaaggcg atcaagctcg ggcattcaag agcggacatc tcctaaatct	1140
[0894]	atcagttcct gttggagtga agtttgatcg atgttctagt acacatccta ataaatatag	1200
[0895]	ctttatggcg gcttatatct gtgatgctta tcgcaccatc tctggtactg agacaacgct	1260
[0896]	cctatcccat caagagacat ggacaacaga tgcctttcat ttagcaagac atggagttgt	1320
[0897]	ggtttagagga tctatgtatg cttctctaac aagtaatata gaagtatatg gccatggaag	1380
[0898]	atatgagtat cgagatgctt ctcgaggcta tggtttgagt gcaggaagta gagtccggtt	1440
[0899]	ctaa	1444
[0900]	<210>12	
[0901]	<211>56	
[0902]	<212>DNA	
[0903]	<213> 衣原体	
[0904]	<400>12	
[0905]	aagggcccaa ttacgcagag ggtaccgaaa ttatggttcc tcaaggaatt tacgat	56
[0906]	<210>13	
[0907]	<211>56	
[0908]	<212>DNA	
[0909]	<213> 衣原体	
[0910]	<400>13	
[0911]	aagggcccaa ttacgcagag ggtaccctaa gaagaaggca tgccgtgcta gcggag	56
[0912]	<210>14	
[0913]	<211>57	
[0914]	<212>DNA	

[0915] <213> 衣原体
 [0916] <400>14
 [0917] aagggcccaa ttacgcagag ggtaccggag agctcgcgaa tccatacgaa taggaac 57
 [0918] <210>15
 [0919] <211>1013
 [0920] <212>PRT
 [0921] <213> 衣原体
 [0922] <400>15
 [0923] Met Gln Thr Ser Phe His Lys Phe Phe Leu Ser Met Ile Leu Ala Tyr
 [0924] 1 5 10 15
 [0925] Ser Cys Cys Ser Leu Asn Gly Gly Gly Tyr Ala Ala Glu Ile Met Val
 [0926] 20 25 30
 [0927] Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu Thr Leu Thr Val Ser Phe Pro Tyr
 [0928] 35 40 45
 [0929] Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly Thr Thr Val Phe Ser Ala Gly Glu
 [0930] 50 55 60
 [0931] Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn Ser Ile Ala Ala Leu Pro Leu Ser
 [0932] 65 70 75 80
 [0933] Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly Ser Phe Thr Val Leu Gly Arg Gly His
 [0934] 85 90 95
 [0935] Ser Leu Thr Phe Glu Asn Ile Arg Thr Ser Thr Asn Gly Ala Ala Leu
 [0936] 100 105 110
 [0937] Ser Asp Ser Ala Asn Ser Gly Leu Phe Thr Ile Glu Gly Phe Lys Glu
 [0938] 115 120 125
 [0939] Leu Ser Phe Ser Asn Cys Asn Pro Leu Leu Ala Val Leu Pro Ala Ala
 [0940] 130 135 140
 [0941] Thr Thr Asn Asn Gly Ser Gln Thr Pro Ser Thr Thr Ser Thr Pro Ser
 [0942] 145 150 155 160
 [0943] Asn Gly Thr Ile Tyr Ser Lys Thr Asp Leu Leu Leu Leu Asn Asn Glu
 [0944] 165 170 175
 [0945] Lys Phe Ser Phe Tyr Ser Asn Ser Val Ser Gly Asp Gly Gly Ala Ile
 [0946] 180 185 190
 [0947] Asp Ala Lys Ser Leu Thr Val Gln Gly Ile Ser Lys Leu Cys Val Phe
 [0948] 195 200 205
 [0949] Gln Glu Asn Thr Ala Gln Ala Asp Gly Gly Ala Cys Gln Val Val Thr
 [0950] 210 215 220
 [0951] Ser Phe Ser Ala Met Ala Asn Glu Ala Pro Ile Ala Phe Val Ala Asn
 [0952] 225 230 235 240
 [0953] Val Ala Gly Val Arg Gly Gly Gly Ile Ala Ala Val Gln Asp Gly Gln

[0954]		245		250		255
[0955]	Gln Gly Val Ser Ser Ser Thr Ser Thr Glu Asp Pro Val Val Ser Phe					
[0956]		260		265		270
[0957]	Ser Arg Asn Thr Ala Val Glu Phe Asp Gly Asn Val Ala Arg Val Gly					
[0958]		275		280		285
[0959]	Gly Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Asn Val Ala Phe Leu Asn Asn Gly Lys					
[0960]		290		295		300
[0961]	Thr Leu Phe Leu Asn Asn Val Ala Ser Pro Val Tyr Ile Ala Ala Glu					
[0962]	305		310		315	320
[0963]	Gln Pro Thr Asn Gly Gln Ala Ser Asn Thr Ser Asp Asn Tyr Gly Asp					
[0964]		325		330		335
[0965]	Gly Gly Ala Ile Phe Cys Lys Asn Gly Ala Gln Ala Ala Gly Ser Asn					
[0966]		340		345		350
[0967]	Asn Ser Gly Ser Val Ser Phe Asp Gly Glu Gly Val Val Phe Phe Ser					
[0968]		355		360		365
[0969]	Ser Asn Val Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Ala Lys Lys Leu					
[0970]		370		375		380
[0971]	Ser Val Ala Asn Cys Gly Pro Val Gln Leu Leu Gly Asn Ile Ala Asn					
[0972]	385		390		395	400
[0973]	Asp Gly Gly Ala Ile Tyr Leu Gly Glu Ser Gly Glu Leu Ser Leu Ser					
[0974]		405		410		415
[0975]	Ala Asp Tyr Gly Asp Met Ile Phe Asp Gly Asn Leu Lys Arg Thr Ala					
[0976]		420		425		430
[0977]	Lys Glu Asn Ala Ala Asp Val Asn Gly Val Thr Val Ser Ser Gln Ala					
[0978]		435		440		445
[0979]	Ile Ser Met Gly Ser Gly Gly Lys Ile Thr Thr Leu Arg Ala Lys Ala					
[0980]		450		455		460
[0981]	Gly His Gln Ile Leu Phe Asn Asp Pro Ile Glu Met Ala Asn Gly Asn					
[0982]	465		470		475	480
[0983]	Asn Gln Pro Ala Gln Ser Ser Glu Pro Leu Lys Ile Asn Asp Gly Glu					
[0984]		485		490		495
[0985]	Gly Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe Ala Asn Gly Asn Ser Thr Leu Tyr					
[0986]		500		505		510
[0987]	Gln Asn Val Thr Ile Glu Gln Gly Arg Ile Val Leu Arg Glu Lys Ala					
[0988]		515		520		525
[0989]	Lys Leu Ser Val Asn Ser Leu Ser Gln Thr Gly Gly Ser Leu Tyr Met					
[0990]		530		535		540
[0991]	Glu Ala Gly Ser Thr Leu Asp Phe Val Thr Pro Gln Pro Pro Gln Gln					
[0992]	545		550		555	560

[0993] Pro Pro Ala Ala Asn Gln Ser Ile Thr Leu Ser Asn Leu His Leu Ser
 [0994] 565 570 575
 [0995] Leu Ser Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ala Val Thr Asn Pro Pro Thr Asn
 [0996] 580 585 590
 [0997] Pro Pro Ala Gln Asp Ser His Pro Ala Val Ile Gly Ser Thr Thr Ala
 [0998] 595 600 605
 [0999] Gly Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile Phe Phe Glu Asp Leu Asp Asp
 [1000] 610 615 620
 [1001] atgcaaacgt ctttccataa gttctttctt tcaatgattc tagcttattc ttgctgctct 60
 [1002] 625 630 635 640
 [1003] Val Leu Lys Leu Gln Leu Gly Thr Gln Pro Pro Ala Asn Ala Pro Ser
 [1004] 645 650 655
 [1005] Asp Leu Thr Leu Gly Asn Glu Met Pro Lys Tyr Gly Tyr Gln Gly Ser
 [1006] 660 665 670
 [1007] Trp Lys Leu Ala Trp Asp Pro Asn Thr Ala Asn Asn Gly Pro Tyr Thr
 [1008] 675 680 685
 [1009] Leu Lys Ala Thr Trp Thr Lys Thr Gly Tyr Asn Pro Gly Pro Glu Arg
 [1010] 690 695 700
 [1011] Val Ala Ser Leu Val Pro Asn Ser Leu Trp Gly Ser Ile Leu Asp Ile
 [1012] 705 710 715 720
 [1013] Arg Ser Ala His Ser Ala Ile Gln Ala Ser Val Asp Gly Arg Ser Tyr
 [1014] 725 730 735
 [1015] Cys Arg Gly Leu Trp Val Ser Gly Val Ser Asn Phe Phe Tyr His Asp
 [1016] 740 745 750
 [1017] Arg Asp Ala Leu Gly Gln Gly Tyr Arg Tyr Ile Ser Gly Gly Tyr Ser
 [1018] 755 760 765
 [1019] Leu Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Met Phe Gly Leu Ala Phe
 [1020] 770 775 780
 [1021] Thr Glu Val Phe Gly Arg Ser Lys Asp Tyr Val Val Cys Arg Ser Asn
 [1022] 785 790 795 800
 [1023] His His Ala Cys Ile Gly Ser Val Tyr Leu Ser Thr Lys Gln Ala Leu
 [1024] 805 810 815
 [1025] Cys Gly Ser Tyr Val Phe Gly Asp Ala Phe Ile Arg Ala Ser Tyr Gly
 [1026] 820 825 830
 [1027] Phe Gly Asn Gln His Met Lys Thr Ser Tyr Thr Phe Ala Glu Glu Ser
 [1028] 835 840 845
 [1029] Asp Val Cys Trp Asp Asn Asn Cys Leu Val Gly Glu Ile Gly Val Gly
 [1030] 850 855 860
 [1031] Leu Pro Ile Val Ile Thr Pro Ser Lys Leu Tyr Leu Asn Glu Leu Arg

[1032]	865	870	875	880
[1033]	Pro Phe Val Gln Ala Glu Phe Ser Tyr Ala Asp His Glu Ser Phe Thr			
[1034]		885	890	895
[1035]	Glu Glu Gly Asp Gln Ala Arg Ala Phe Arg Ser Gly His Leu Met Asn			
[1036]		900	905	910
[1037]	Leu Ser Val Pro Val Gly Val Lys Phe Asp Arg Cys Ser Ser Thr His			
[1038]		915	920	925
[1039]	Pro Asn Lys Tyr Ser Phe Met Gly Ala Tyr Ile Cys Asp Ala Tyr Arg			
[1040]		930	935	940
[1041]	Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Thr Leu Leu Ser His Gln Glu Thr Trp			
[1042]		945	950	955
[1043]	Thr Thr Asp Ala Phe His Leu Ala Arg His Gly Val Ile Val Arg Gly			
[1044]		965	970	975
[1045]	Ser Met Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Asn Ile Glu Val Tyr Gly His Gly			
[1046]		980	985	990
[1047]	Arg Tyr Glu Tyr Arg Asp Thr Ser Arg Gly Tyr Gly Leu Ser Ala Gly			
[1048]		995	1000	1005
[1049]	Ser Lys Val Arg Phe			
[1050]		1010		
[1051]	<210>16			
[1052]	<211>1013			
[1053]	<212>PRT			
[1054]	<213>衣原体			
[1055]	<400>16			
[1056]	Met Gln Thr Ser Phe His Lys Phe Phe Leu Ser Met Ile Leu Ala Tyr			
[1057]	1	5	10	15
[1058]	Ser Cys Cys Ser Leu Thr Gly Gly Gly Tyr Ala Ala Glu Ile Met Val			
[1059]		20	25	30
[1060]	Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu Thr Leu Thr Val Ser Phe Pro Tyr			
[1061]		35	40	45
[1062]	Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly Thr Thr Val Phe Ser Ala Gly Glu			
[1063]		50	55	60
[1064]	Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn Ser Ile Ala Ala Leu Pro Leu Ser			
[1065]	65	70	75	80
[1066]	Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly Ser Phe Thr Val Leu Gly Arg Gly His			
[1067]		85	90	95
[1068]	Ser Leu Thr Phe Glu Asn Ile Arg Thr Ser Thr Asn Gly Ala Ala Leu			
[1069]		100	105	110
[1070]	Ser Asp Ser Ala Asn Ser Gly Leu Phe Thr Ile Glu Gly Phe Lys Glu			

[1071]	115	120	125
[1072]	Leu Ser Phe Ser Asn Cys Asn Ser Leu Leu Ala Val Leu Pro Ala Ala		
[1073]	130	135	140
[1074]	Thr Thr Asn Asn Gly Ser Gln Thr Pro Thr Thr Thr Ser Thr Pro Ser		
[1075]	145	150	155
[1076]	Asn Gly Thr Ile Tyr Ser Lys Thr Asp Leu Leu Leu Leu Asn Asn Glu		
[1077]	165	170	175
[1078]	Lys Phe Ser Phe Tyr Ser Asn Leu Val Ser Gly Asp Gly Gly Thr Ile		
[1079]	180	185	190
[1080]	Asp Ala Lys Ser Leu Thr Val Gln Gly Ile Ser Lys Leu Cys Val Phe		
[1081]	195	200	205
[1082]	Gln Glu Asn Thr Ala Gln Ala Asp Gly Gly Ala Cys Gln Val Val Thr		
[1083]	210	215	220
[1084]	Ser Phe Ser Ala Met Ala Asn Glu Ala Pro Ile Ala Phe Ile Ala Asn		
[1085]	225	230	235
[1086]	Val Ala Gly Val Arg Gly Gly Gly Ile Ala Ala Val Gln Asp Gly Gln		
[1087]	245	250	255
[1088]	Gln Gly Val Ser Ser Ser Thr Ser Thr Glu Asp Pro Val Val Ser Phe		
[1089]	260	265	270
[1090]	Ser Arg Asn Thr Ala Val Glu Phe Asp Gly Asn Val Ala Arg Val Gly		
[1091]	275	280	285
[1092]	Gly Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Asn Val Ala Phe Leu Asn Asn Gly Lys		
[1093]	290	295	300
[1094]	Thr Leu Phe Leu Asn Asn Val Ala Ser Pro Val Tyr Ile Ala Ala Glu		
[1095]	305	310	315
[1096]	Gln Pro Thr Asn Gly Gln Ala Ser Asn Thr Ser Asp Asn Tyr Gly Asp		
[1097]	325	330	335
[1098]	Gly Gly Ala Ile Phe Cys Lys Asn Gly Ala Gln Ala Ala Gly Ser Asn		
[1099]	340	345	350
[1100]	Asn Ser Gly Ser Val Ser Phe Asp Gly Glu Gly Val Val Phe Phe Ser		
[1101]	355	360	365
[1102]	Ser Asn Val Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Ala Lys Lys Leu		
[1103]	370	375	380
[1104]	Ser Val Ala Asn Cys Gly Pro Val Gln Phe Leu Gly Asn Ile Ala Asn		
[1105]	385	390	395
[1106]	Asp Gly Gly Ala Ile Tyr Leu Gly Glu Ser Gly Glu Leu Ser Leu Ser		
[1107]	405	410	415
[1108]	Ala Asp Tyr Gly Asp Ile Ile Phe Asp Gly Asn Leu Lys Arg Thr Ala		
[1109]	420	425	430

[1110]	Lys	Glu	Asn	Ala	Ala	Asp	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gln	Ala
[1111]				435					440						445	
[1112]	Ile	Ser	Met	Gly	Ser	Gly	Gly	Lys	Ile	Thr	Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Ala
[1113]			450					455							460	
[1114]	Gly	His	Gln	Ile	Leu	Phe	Asn	Asp	Pro	Ile	Glu	Met	Ala	Asn	Gly	Asn
[1115]	465					470					475					480
[1116]	Asn	Gln	Pro	Ala	Gln	Ser	Ser	Glu	Pro	Leu	Lys	Ile	Asn	Asp	Gly	Glu
[1117]					485					490						495
[1118]	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Ile	Val	Phe	Ala	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Leu	Tyr
[1119]				500					505						510	
[1120]	Gln	Asn	Val	Thr	Ile	Glu	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Arg	Glu	Lys	Ala
[1121]			515					520						525		
[1122]	Lys	Leu	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ser	Gln	Thr	Gly	Gly	Ser	Leu	Tyr	Met
[1123]		530					535						540			
[1124]	Glu	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Asp	Phe	Val	Thr	Pro	Gln	Pro	Pro	Gln	Gln
[1125]	545					550					555					560
[1126]	Pro	Pro	Ala	Ala	Asn	Gln	Leu	Ile	Thr	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Leu	Ser
[1127]					565					570					575	
[1128]	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Asn	Ala	Val	Thr	Asn	Pro	Pro	Thr	Asn
[1129]				580						585					590	
[1130]	Pro	Pro	Ala	Gln	Asp	Ser	His	Pro	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Thr	Thr	Ala
[1131]			595					600							605	
[1132]	Gly	Pro	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Pro	Phe	Phe	Phe	Glu	Asp	Leu	Asp	Asp
[1133]		610					615						620			
[1134]	Thr	Ala	Tyr	Asp	Arg	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Ser	Asn	Gln	Lys	Ile	Asp
[1135]	625					630						635				640
[1136]	Val	Leu	Lys	Leu	Gln	Leu	Gly	Thr	Gln	Pro	Ser	Ala	Asn	Ala	Pro	Ser
[1137]				645						650						655
[1138]	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Met	Pro	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Gly	Ser
[1139]				660						665					670	
[1140]	Trp	Lys	Leu	Ala	Trp	Asp	Pro	Asn	Thr	Ala	Asn	Asn	Gly	Pro	Tyr	Thr
[1141]			675						680						685	
[1142]	Leu	Lys	Ala	Thr	Trp	Thr	Lys	Thr	Gly	Tyr	Asn	Pro	Gly	Pro	Glu	Arg
[1143]		690						695						700		
[1144]	Val	Ala	Ser	Leu	Val	Pro	Asn	Ser	Leu	Trp	Gly	Ser	Ile	Leu	Asp	Ile
[1145]	705					710						715				720
[1146]	Arg	Ser	Ala	His	Ser	Ala	Ile	Gln	Ala	Ser	Val	Asp	Gly	Arg	Ser	Tyr
[1147]				725							730					735
[1148]	Cys	Arg	Gly	Leu	Trp	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Phe	Ser	Tyr	His	Asp

[1149]	740	745	750
[1150]	Arg Asp Ala Leu Gly Gln Gly Tyr Arg Tyr Ile Ser Gly Gly Tyr Ser		
[1151]	755	760	765
[1152]	Leu Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Met Phe Gly Leu Ala Phe		
[1153]	770	775	780
[1154]	Thr Glu Val Phe Gly Arg Ser Lys Asp Tyr Val Val Cys Arg Ser Asn		
[1155]	785	790	795
[1156]	His His Ala Cys Ile Gly Ser Val Tyr Leu Ser Thr Lys Gln Ala Leu		
[1157]	805	810	815
[1158]	Cys Gly Ser Tyr Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ile Arg Ala Ser Tyr Gly		
[1159]	820	825	830
[1160]	Phe Gly Asn Gln His Met Lys Thr Ser Tyr Thr Phe Ala Glu Glu Ser		
[1161]	835	840	845
[1162]	Asp Val Arg Trp Asp Asn Asn Cys Leu Val Gly Glu Ile Gly Val Gly		
[1163]	850	855	860
[1164]	Leu Pro Ile Val Thr Thr Pro Ser Lys Leu Tyr Leu Asn Glu Leu Arg		
[1165]	865	870	875
[1166]	Pro Phe Val Gln Ala Glu Phe Ser Tyr Ala Asp His Glu Ser Phe Thr		
[1167]	885	890	895
[1168]	Glu Glu Gly Asp Gln Ala Arg Ala Phe Arg Ser Gly His Leu Met Asn		
[1169]	900	905	910
[1170]	Leu Ser Val Pro Val Gly Val Lys Phe Asp Arg Cys Ser Ser Thr His		
[1171]	915	920	925
[1172]	Pro Asn Lys Tyr Ser Phe Met Gly Ala Tyr Ile Cys Asp Ala Tyr Arg		
[1173]	930	935	940
[1174]	Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Thr Leu Leu Ser His Gln Glu Thr Trp		
[1175]	945	950	955
[1176]	Thr Thr Asp Ala Phe His Leu Ala Arg His Gly Val Ile Val Arg Gly		
[1177]	965	970	975
[1178]	Ser Met Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Asn Ile Glu Val Tyr Gly His Gly		
[1179]	980	985	990
[1180]	Arg Tyr Glu Tyr Arg Asp Thr Ser Arg Gly Tyr Gly Leu Ser Ala Gly		
[1181]	995	1000	1005
[1182]	Ser Lys Val Arg Phe		
[1183]	1010		
[1184]	<210>17		
[1185]	<211>505		
[1186]	<212>PRT		
[1187]	<213>衣原体		

58

[1227]	Asn Tyr Gly Asp Gly Gly Ala Ile Phe Cys Lys Asn Gly Ala Gln Ala	
[1228]	305	310 315 320
[1229]	Gly Ser Asn Asn Ser Gly Ser Val Ser Phe Asp Gly Glu Gly Val Val	
[1230]		325 330 335
[1231]	Phe Phe Ser Ser Asn Val Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ile Tyr Ala	
[1232]		340 345 350
[1233]	Lys Lys Leu Ser Val Ala Asn Cys Gly Pro Val Gln Phe Leu Arg Asn	
[1234]		355 360 365
[1235]	Ile Ala Asn Asp Gly Gly Ala Ile Tyr Leu Gly Glu Ser Gly Glu Leu	
[1236]		370 375 380
[1237]	Ser Leu Ser Ala Asp Tyr Gly Asp Ile Ile Phe Asp Gly Asn Leu Lys	
[1238]		385 390 395 400
[1239]	Arg Thr Ala Lys Glu Asn Ala Ala Asp Val Asn Gly Val Thr Val Ser	
[1240]		405 410 415
[1241]	Ser Gln Ala Ile Ser Met Gly Ser Gly Gly Lys Ile Thr Thr Leu Arg	
[1242]		420 425 430
[1243]	Ala Lys Ala Gly His Gln Ile Leu Phe Asn Asp Pro Ile Glu Met Ala	
[1244]		435 440 445
[1245]	Asn Gly Asn Asn Gln Pro Ala Gln Ser Ser Lys Leu Leu Lys Ile Asn	
[1246]		450 455 460
[1247]	Asp Gly Glu Gly Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe Ala Asn Gly Ser Ser	
[1248]		465 470 475 480
[1249]	Thr Leu Tyr Gln Asn Val Thr Ile Glu Gln Gly Arg Ile Val Leu Arg	
[1250]		485 490 495
[1251]	Glu Lys Ala Lys Leu Ser Val Asn Ser	
[1252]		500 505
[1253]	<210>18	
[1254]	<211>57	
[1255]	<212>DNA	
[1256]	<213>衣原体	
[1257]	<400>18	
[1258]	aagggcccaa ttacgcagag ctgcagagaa attatggttc ctcaaggaat ttacgat	57
[1259]	<210>19	
[1260]	<211>20	
[1261]	<212>DNA	
[1262]	<213>衣原体	
[1263]	<400>19	
[1264]	cgctctagaa ctagtgatc	20
[1265]	<210>20	

[1266]	<211>22	
[1267]	<212>DNA	
[1268]	<213> 衣原体	
[1269]	<400>20	
[1270]	atggttcctc aaggaattta cg	22
[1271]	<210>21	
[1272]	<211>19	
[1273]	<212>DNA	
[1274]	<213> 衣原体	
[1275]	<400>21	
[1276]	ggtccccat cagcgggag	19
[1277]	<210>22	
[1278]	<211>1515	
[1279]	<212>DNA	
[1280]	<213> 衣原体	
[1281]	<400>22	
[1282]	gaaatcatgg ttcctcaagg aatttacgat ggggagacgt taactgtatc atttcctat	60
[1283]	actgttatag gagatccgag tgggactact gttttttctg caggagagtt aacattaaaa	120
[1284]	aatcttgaca attctattgc agctttgcct ttaagttgtt ttgggaactt attagggagt	180
[1285]	tttactgttt tagggagagg acactcgttg actttcgaga acatacggac ttctacaaat	240
[1286]	ggggcagctc taagtaatag cgctgctgat ggactgttta ctattgaggg ttttaaagaa	300
[1287]	ttatcctttt ccaattgcaa ttcattactt gccgtactgc ctgctgcaac gactaataag	360
[1288]	ggtagccaga ctccgacgac aacatctaca ccgtctaata gtactattta ttctaaaaca	420
[1289]	gatcttttgt tactcaataa tgagaagttc tcattctata gtaatttagt ctctggagat	480
[1290]	gggggagcta tagatgctaa gagcttaacg gttcaaggaa ttagcaagct ttgtgtcttc	540
[1291]	caagaaaata ctgctcaagc tgatggggga gcttgtcaag tagtcaccag tttctctgct	600
[1292]	atggctaacg aggctcctat tgcctttgta gcgaatgttg caggagtaag agggggaggg	660
[1293]	attgctgctg ttcaggatgg gcagcaggga gtgtcatcat ctacttcaac agaagatcca	720
[1294]	gtagtaagtt tttccagaaa tactgcggta gagtttgatg ggaacgtagc ccgagtagga	780
[1295]	ggagggatatt actcctacgg gaacgttgct ttcctgaata atggaaaaac cttgtttctc	840
[1296]	aacaatgttg cttctcctgt ttacattgct gctaagcaac caacaagtgg acaggttct	900
[1297]	aatacagta ataattacgg agatggagga gctatcttct gtaagaatgg tgcgcaagca	960
[1298]	ggatccaata actctggatc agtttctttt gatggagagg gagtagtttt ctttagtagc	1020
[1299]	aatgtagctg ctgggaaagg gggagctatt tatgccaaaa agctctcggg tgctaactgt	1080
[1300]	ggccctgtac aatttttaag gaatatcgct aatgatggtg gagegattta tttaggagaa	1140
[1301]	tctggagagc tcagtttate tgctgattat ggagatatta ttttcgatgg gaatcttaaa	1200
[1302]	agaacagcca aagagaatgc tgccgatgtt aatggcgtaa ctgtgtcctc acaagccatt	1260
[1303]	tcgatgggat cgggagggaa aataacgaca ttaagagcta aagcagggca tcagattctc	1320
[1304]	tttaatgate ccatcgagat ggcaaacgga aataaccage cagegcagtc ttccaaactt	1380

[1305] ctaaaaatta acgatggtga aggatacaca ggggatattg tttttgctaa tggaagcagt 1440
 [1306] actttgtacc aaaatgttac gatagagcaa ggaaggattg ttcttcgtga aaaggcaaaa 1500
 [1307] ttatcagtga attct 1515
 [1308] <210>23
 [1309] <211>3354
 [1310] <212>DNA
 [1311] <213> 人工序列
 [1312] <220>
 [1313] <223> 重组表达载体
 [1314] <400>23
 [1315] atgcaaacgt ctttccataa gttcttttctt tcaatgattc tagcttattc ttgctgctct 60
 [1316] ttaaatgggg gggggtatgc agaaatcatg gttcctcaag gaatttacga tggggagacg 120
 [1317] ttaactgtat cttttcccta tactgttata ggagatccga gtgggactac tgttttttct 180
 [1318] gcaggagagt taacgttaaa aaatcttgac aattctattg cagctttgcc ttttaagttgt 240
 [1319] tttgggaact tattagggag ttttactgtt ttagggagag gacactcgtt gactttcgag 300
 [1320] aacatacgga cttctacaaa tggagctgca ctaagtgaac gcgctaatac cggtttatct 360
 [1321] actattgagg gtttttaaaga attatctttt tccaattgca acccattact tgccgtactg 420
 [1322] cctgctgcaa cgactaataa tggtagccag actccgtcga caacatctac accgtctaata 480
 [1323] ggtactatctt attctaaaac agatcttttg ttactcaata atgagaagtt ctcatcttat 540
 [1324] agtaattcag tctctggaga tgggggagct atagatgcta agagcttaac ggttcaagga 600
 [1325] attagcaagc tttgtgtctt ccaagaaaat actgctcaag ctgatggggg agcttgtcaa 660
 [1326] gtagtcacca gtttctctgc tatggctaac gaggctccta ttgcctttgt agcgaatgtt 720
 [1327] gcaggagtaa gagggggagg gattgctgct gttcaggatg ggcagcaggg agtgtcatca 780
 [1328] tctacttcaa cagaagatcc agtagtaagt ttttccagaa atactgcggt agagtttgat 840
 [1329] gggaacgtag cccgagtagg aggagggatt tactcctacg ggaacgttgc tttcctgaat 900
 [1330] aatggaaaaa ccttgtttct caacaatgtt gcttctcctg ttacattgc tgctgagcaa 960
 [1331] ccaacaaatg gacaggcttc taatacagat gataattacg gagatggagg agctatcttc 1020
 [1332] tgtaagaatg gtgcgcaagc agcaggatcc aataactctg gatcagtttc ctttgatgga 1080
 [1333] gagggagtag ttttcttttag tagcaatgta gctgctggga aagggggagc tatttatgcc 1140
 [1334] aaaaagctct cggttgctaa ctgtggccct gtacaactct tagggaatat cgctaataat 1200
 [1335] ggtggagcga tttattttag agaactctga gagctcagtt tatctgctga ttatggagat 1260
 [1336] atgattttcg atgggaatct taaaagaaca gccaaagaga atgctgccga tgttaaatggc 1320
 [1337] gtaactgtgt cctcacaagc catttcgatg ggatcgggag ggaaaataac gacattaaga 1380
 [1338] gctaaagcag ggcatcagat tctctttaat gateccatcg agatggcaaa cggaaataac 1440
 [1339] cagccagcgc agtcttccga acctctaaaa attaacgatg gtgaaggata cacaggggat 1500
 [1340] attgtttttg ctaatggaaa cagtactttg taccaaaatg ttacgataga gcaaggaagg 1560
 [1341] attgttcttc gtgaaaaggc aaaattatca gtgaattctc taagtcagac aggtgggagt 1620
 [1342] ctgtatatgg aagctgggag tacattggat ttgtgaactc cacaaccacc acaacagcct 1680
 [1343] cctgccgcta atcagtcgat cacgctttcc aatctgcatt tgtctctttc ttctttgtta 1740

[1344]	gcaaacaatg cagttacgaa tcctcctacc aatcctccag cgcaagattc tcatcctgca	1800
[1345]	gtcattggta gcacaactgc tggttctgtt acaattagtg ggcctatctt ttttgaggat	1860
[1346]	ttggatgata cagcttatga taggtatgat tggctagggt ctaatcaaaa aatcgatgtc	1920
[1347]	ctgaaattac agttaggac tcagccccc gctaatgcc catcagattt gactctaggg	1980
[1348]	aatgagatgc ctaagtatgg ctatcaagga agctggaagc ttgcgtggga tcctaataca	2040
[1349]	gcaataatg gtccttatac tctgaaagct acatggacta aaactgggta taatcctggg	2100
[1350]	cctgagcgag tagcttcttt ggttccaaat agtttatggg gatccatttt agatatacga	2160
[1351]	tctgcgcatt cagcaattca agcaagtgtg gatgggcgct cttattgtcg aggattatgg	2220
[1352]	gtttctggag tttcgaattt cttctatcat gaccgcgatg ctttaggtca gggatatcgg	2280
[1353]	tatattagtg ggggttattc cttaggagca aactcctact ttggatcatc gatgtttgg	2340
[1354]	ctagcattta ctgaagtatt tggtagatct aaagattatg tagtgtgtcg ttccaatcat	2400
[1355]	catgcttgca taggatccgt ttatctatct accaaacagg ctttatgtgg atcttatgtg	2460
[1356]	tttgagatg cgtttattcg tgctagctac gggtttggga atcagcatat gaaaacctca	2520
[1357]	tatacatttg cagaggagag cgatgtttgt tgggataata actgtctggt tggagagatt	2580
[1358]	ggagtgggat taccgattgt gattactcca tctaagctct atttgaatga gttgcgtcct	2640
[1359]	ttcgtgcaag ctgagttttc ttatgccgat catgaatctt ttacagagga aggcgatcaa	2700
[1360]	gctcgggcat tcaggagtgg acatctcatg aatctatcag ttcctgttgg agtaaaattt	2760
[1361]	gatcgatgtt ctagtacaca ccctaataaa tatagcttta tgggggctta tatctgtgat	2820
[1362]	gcttatcgca ccatctctgg gactcagaca acactcctat cccatcaaga gacatggaca	2880
[1363]	acagatgcct ttcatttggc aagacatgga gtcatagtta gagggctctat gtatgcttct	2940
[1364]	ctaacaagca atatagaagt atatggccat ggaagatatg agtatcgaga tacttctcga	3000
[1365]	ggttatgggt tgagtgcagg aagtaaagtc cggttctaaa aatattgggt agatagttaa	3060
[1366]	gtgttagcga tgcctttttc tttgagatct acatcatttt gtttttttagc ttgtttgtgt	3120
[1367]	tcctattcgt atggattcgc gagctctcct caagtgttaa cacctaattgt aaccactcct	3180
[1368]	tttaaggggg acgatgttta cttgaatgga gactgcgctt ttgtcaatgt ctatgcaggg	3240
[1369]	gcagagaacg gctcaattat ctacagctaat ggcgacaatt taacgattac cggacaaaac	3300
[1370]	catacattat catttacaca ttctcaaggg ccagttcttc aaaattagcc ttca	3354
[1371]	<210>24	
[1372]	<211>3324	
[1373]	<212>DNA	
[1374]	<213> 人工序列	
[1375]	<220>	
[1376]	<223> 重组表达载体	
[1377]	<400>24	
[1378]	atgcaaacgt ctttccataa gttctttctt tcaatgattc tagcttattc ttgctgctct	60
[1379]	ttaagtgggg ggggggtatgc agcagaaatc atgattcctc aaggaattta cgatggggag	120
[1380]	acgttaactg tatcatttcc ctatactgtt ataggagatc cgagtgggac tactgttttt	180
[1381]	tctgcaggag agttaacgtt aaaaaatctt gacaattcta ttgcagcttt gcctttaagt	240
[1382]	tgttttggga acttattagg gagttttact gtttttaggga gaggacactc gttgactttc	300

[1383]	gagaacatac	ggactttctac	aaatggagct	gcactaagtg	acagcgctaa	tagcgggtta	360
[1384]	tttactattg	agggttttaa	agaattatct	ttttccaatt	gcaactcatt	acttgccgta	420
[1385]	ctgcctgctg	caacgactaa	taatggtagc	cagactccga	cgacaacatc	tacaccgtct	480
[1386]	aatggtacta	tttattctaa	aacagatcct	ttgttactca	ataatgagaa	gttctcattc	540
[1387]	tatagtaatt	tagtctctgg	agatggggga	actatagatg	ctaagagctt	aacggttcaa	600
[1388]	ggaattagca	agcttttgtg	cttccaagaa	aatactgctc	aagctgatgg	gggagcttgt	660
[1389]	caagtagtca	ccagtttctc	tgctatggct	aacgaggctc	ctattgcctt	tatagcgaat	720
[1390]	gttgcaggag	taagaggggg	agggattgct	gctgttcagg	atgggcagca	gggagtgtca	780
[1391]	tcatctactt	caacagaaga	tccagtagta	agtttttcca	gaaatactgc	ggtagagttt	840
[1392]	gatgggaacg	tagcccagat	aggaggaggg	atttactcct	acgggaacgt	tgctttcctg	900
[1393]	aataatggaa	aaaccttggt	tctcaacaat	gttgcttctc	ctgtttacat	tgctgctgag	960
[1394]	caaccaacaa	atggacaggc	ttctaatacg	agtgataatt	acggagatgg	aggagctatc	1020
[1395]	ttctgtaaga	atggtgcgca	agcagcagga	tccaataact	ctggatcagt	ttcctttgat	1080
[1396]	ggagagggag	tagttttctt	tagtagcaat	gtagctgctg	ggaaaggggg	agctatttat	1140
[1397]	gccaaaaagc	tctcggttgc	taactgtggc	cctgtacaat	tcttagggaa	tatcgctaatt	1200
[1398]	gatggtggag	cgatttatct	aggagaatct	ggagagctca	gtttatctgc	tgattatgga	1260
[1399]	gatattatct	tcgatgggaa	tcttaaaaga	acagccaaag	agaatgctgc	cgatgttaatt	1320
[1400]	ggcgtaactg	tgtcctcaca	agccatttcg	atgggatcgg	gagggaaaat	aacgacatta	1380
[1401]	agagctaaag	cagggcacat	gattctcttt	aatgatccca	tcgagatggc	aaacggaaat	1440
[1402]	aaccagccag	cgcagctctc	cgaacctcta	aaaattaacg	atgggtgaagg	atacacaggg	1500
[1403]	gatattgttt	ttgctaattg	aaacagtact	ttgtacaaaa	atgttacgat	agagcaagga	1560
[1404]	aggattgttc	ttcgtgaaaa	ggcaaaaatta	tcagtgaatt	ctctaagtca	gacaggtggg	1620
[1405]	agtctgtata	tggaagctgg	gagtacattg	gattttgtaa	ctccacaacc	accacaacag	1680
[1406]	cctcctgccg	ctaatacagt	gatcacgctt	tccaatctgc	atttgtctct	ttcttctttg	1740
[1407]	ttagcaaaca	atgcagttac	gaatcctcct	accaatcctc	cagcgcaaga	ttctcctcct	1800
[1408]	gcagtcattg	gtagcacaac	tgctggctct	gtcacaatta	gtgggccttt	cttttttgag	1860
[1409]	gatttgatg	atacagctta	tgataggtat	gattggctag	gttctaatac	aaaaatcgat	1920
[1410]	gtcctgaaat	tacagttagg	gactcagccc	tcagctaatt	ccccatcaga	tttgactcta	1980
[1411]	gggaatgaga	tgcctaagta	tggtatcaaa	ggaagctgga	agcttgctgt	ggatcctaatt	2040
[1412]	acagcaaata	atggtcctta	tactctgaaa	gctacatgga	ctaaaactgg	gtataatcct	2100
[1413]	gggcctgagc	gagtagcttc	tttggttcca	aatagtttat	ggggatccat	tttagatata	2160
[1414]	cgatctgcgc	attcagcaat	tcaagcaagt	gtggatgggc	gctcttattg	tcaggagatta	2220
[1415]	tgggtttctg	gagtttcgaa	tttctcctat	catgaccgcg	atgctttagg	tcagggatata	2280
[1416]	cggtatatta	gtgggggtta	ttccttagga	gcaaactcct	actttggatc	atcgatgttt	2340
[1417]	ggtctagcat	ttaccgaagt	atttggtaga	tctaaagatt	atgtagtgtg	tcgttccaat	2400
[1418]	catcatgctt	gcataggatc	cgtttatcta	tctaccaaac	aagctttatg	tggatcctat	2460
[1419]	ttgttcggag	atgcgtttat	ccgtgctagc	tacgggtttg	ggaaccagca	tatgaaaacc	2520
[1420]	tcatacacat	ttgcagagga	gagcgatgtt	cgttgggata	ataactgtct	ggttggagag	2580
[1421]	attggagtgg	gattaccgat	tgtgactact	ccatctaagc	tctatttgaa	tgagttgcgt	2640

- [1422] cctttcgtgc aagctgagtt ttcttatgcc gatcatgaat cttttacaga ggaaggcgat 2700
- [1423] caagctcggg cattcaggag tggatcatctc atgaatctat cagttcctgt tggagtaaaa 2760
- [1424] ttgatcgat gttctagtag acaccctaataaatatagct ttatgggggc ttatatctgt 2820
- [1425] gatgcttata gcaccatctc tgggactcag acaacactcc tatcccatca agagacatgg 2880
- [1426] acaacagatg cctttcattt ggcaagacat ggagtcatag ttagagggtc tatgtatgct 2940
- [1427] tctctaacaa gcaatataga agtatatggc catggaagat atgagtatcg agatacttct 3000
- [1428] cgaggttatg gtttgagtgc aggaagtaaa gtccggttct aaaaatattg gttagatagt 3060
- [1429] taagtgttag cgatgccttt ttctttgaga tctacatcat ttgtttttt agcttgtttg 3120
- [1430] tgttcctatt cgtatggatt cgcgagctct cctcaagtgt taacacctaa tgtaaccact 3180
- [1431] ccttttaagg gggacgatgt ttacttgaat ggagactgcg ctttagtcaa tgtctatgca 3240
- [1432] ggggcagaga acggctcaat tatctcagct aatggcgaca atttaacgat taccggacaa 3300
- [1433] aaccatgcat tatcatttac agat 3324
- [1434] <210>25
- [1435] <211>65
- [1436] <212>PRT
- [1437] <213>衣原体
- [1438] <400>25
- [1439] Pro Tyr Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly Thr Thr Val Phe Ser Ala
- [1440] 1 5 10 15
- [1441] Gly Glu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn Ser Ile Ala Ala Pro Leu
- [1442] 20 25 30
- [1443] Ser Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly Ser Phe Thr Val Leu Gly Arg Gly
- [1444] 35 40 45
- [1445] His Ser Leu Thr Phe Glu Asn Ile Arg Thr Ser Thr Asn Gly Ala Ala
- [1446] 50 55 60
- [1447] Leu
- [1448] 65
- [1449] <210>26
- [1450] <211>24
- [1451] <212>PRT
- [1452] <213>衣原体
- [1453] <400>26
- [1454] Ala Ala Asn Gln Leu Ile Thr Leu Ser Asn Leu His Leu Ser Leu Ser
- [1455] 1 5 10 15
- [1456] Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ala Val
- [1457] 20
- [1458] <210>27
- [1459] <211>8
- [1460] <212>PRT

- [1461] <213> 衣原体
- [1462] <400>27
- [1463] Gly Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe
- [1464] 1 5
- [1465] <210>28
- [1466] <211>7
- [1467] <212>PRT
- [1468] <213> 衣原体
- [1469] <400>28
- [1470] Tyr Gly Asp Ile Ile Phe Asp
- [1471] 1 5
- [1472] <210>29
- [1473] <211>63
- [1474] <212>PRT
- [1475] <213> 衣原体
- [1476] <400>29
- [1477] Gly Tyr Ala Ala Glu Ile Met Val Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu
- [1478] 1 5 10 15
- [1479] Thr Leu Thr Val Ser Phe Pro Tyr Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly
- [1480] 20 25 30
- [1481] Thr Thr Val Phe Ser Ala Gly Glu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn
- [1482] 35 40 45
- [1483] Ser Ile Ala Ala Leu Pro Leu Ser Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly
- [1484] 50 55 60
- [1485] <210>30
- [1486] <211>22
- [1487] <212>PRT
- [1488] <213> 衣原体
- [1489] <400>30
- [1490] Met Ala Asn Gly Asn Asn Gln Pro Ala Gln Ser Ser Lys Leu Leu Lys
- [1491] 1 5 10 15
- [1492] Ile Asn Asp Gly Glu Gly
- [1493] 20
- [1494] <210>31
- [1495] <211>14
- [1496] <212>PRT
- [1497] <213> 衣原体
- [1498] <400>31
- [1499] Ala Asn Gly Ser Ser Thr Leu Tyr Gln Asn Val Thr Ile Glu

[1500]	1	5	10
[1501]	<210>32		
[1502]	<211>10		
[1503]	<212>PRT		
[1504]	<213> 衣原体		
[1505]	<400>32		
[1506]	Lys Leu Ser Val Asn Ser Leu Ser Gln Thr		
[1507]	1	5	10
[1508]	<210>33		
[1509]	<211>45		
[1510]	<212>PRT		
[1511]	<213> 衣原体		
[1512]	<400>33		
[1513]	Val Ile Gly Ser Thr Thr Ala Gly Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile		
[1514]	1	5	10 15
[1515]	Phe Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr Ala Tyr Asp Arg Tyr Asp Trp Leu		
[1516]	20	25	30
[1517]	Gly Ser Asn Gln Lys Ile Asn Val Leu Lys Leu Gln Leu		
[1518]	35	40	45
[1519]	<210>34		
[1520]	<211>64		
[1521]	<212>PRT		
[1522]	<213> 衣原体		
[1523]	<400>34		
[1524]	Val Ile Gly Ser Thr Thr Ala Gly Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile		
[1525]	1	5	10 15
[1526]	Phe Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr Ala Tyr Asp Arg Tyr Asp Trp Leu		
[1527]	20	25	30
[1528]	Gly Ser Asn Gln Lys Ile Asn Val Leu Lys Leu Gln Leu Gly Thr Lys		
[1529]	35	40	45
[1530]	Pro Pro Ala Asn Ala Pro Ser Asp Leu Thr Leu Gly Asn Glu Met Pro		
[1531]	50	55	60
[1532]	<210>35		
[1533]	<211>10		
[1534]	<212>PRT		
[1535]	<213> 衣原体		
[1536]	<400>35		
[1537]	Asp Pro Asn Thr Ala Asn Asn Gly Pro Tyr		
[1538]	1	5	10

[1539] <210>36
 [1540] <211>458
 [1541] <212>PRT
 [1542] <213>衣原体
 [1543] <400>36
 [1544] Gly Gly Ala Cys Gln Val Val Thr Ser Phe Ser Ala Met Ala Ash Glu
 [1545] 1 5 10 15
 [1546] Ala Pro Ile Ala Phe Val Ala Asn Val Ala Gly Val Arg Gly Gly Gly
 [1547] 20 25 30
 [1548] Ile Ala Ala Val Gln Asp Gly Gln Gln Gly Val Ser Ser Ser Thr Ser
 [1549] 35 40 45
 [1550] Thr Glu Asp Pro Val Val Ser Phe Ser Arg Asn Thr Ala Val Glu Phe
 [1551] 50 55 60
 [1552] Asp Gly Asn Val Ala Arg Val Gly Gly Gly Ile Tyr Ser Tyr Gly Asn
 [1553] 65 70 75 80
 [1554] Val Ala Phe Leu Asn Asn Gly Lys Thr Leu Phe Leu Asn Asn Val Ala
 [1555] 85 90 95
 [1556] Ser Pro Val Tyr Ile Ala Ala Lys Gln Pro Thr Ser Gly Gln Ala Ser
 [1557] 100 105 110
 [1558] Asn Thr Ser Asn Asn Tyr Gly Asp Gly Gly Ala Ile Phe Cys Lys Asn
 [1559] 115 120 125
 [1560] Gly Ala Gln Ala Gly Ser Asn Asn Ser Gly Ser Val Ser Phe Asp Gly
 [1561] 130 135 140
 [1562] Glu Gly Val Val Phe Phe Ser Ser Asn Val Ala Ala Gly Lys Gly Gly
 [1563] 145 150 155 160
 [1564] Ala Ile Tyr Ala Lys Lys Leu Ser Val Ala Asn Cys Gly Pro Val Gln
 [1565] 165 170 175
 [1566] Phe Leu Arg Asn Ile Ala Asn Asp Gly Gly Ala Ile Tyr Leu Gly Glu
 [1567] 180 185 190
 [1568] Ser Gly Glu Leu Ser Leu Ser Ala Asp Tyr Gly Asp Ile Ile Phe Asp
 [1569] 195 200 205
 [1570] Gly Asn Leu Lys Arg Thr Ala Lys Glu Asn Ala Ala Asp Val Asn Gly
 [1571] 210 215 220
 [1572] Val Thr Val Ser Ser Gln Ala Ile Ser Met Gly Ser Gly Gly Lys Ile
 [1573] 225 230 235 240
 [1574] Thr Thr Leu Arg Ala Lys Ala Gly His Gln Ile Leu Phe Asn Asp Pro
 [1575] 245 250 255
 [1576] Ile Glu Met Ala Asn Gly Asn Asn Gln Pro Ala Gln Ser Ser Lys Leu
 [1577] 260 265 270

[1578] Leu Lys Ile Asn Asp Gly Glu Gly Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe Ala
 [1579] 275 280 285
 [1580] Asn Gly Ser Ser Thr Leu Tyr Gln Asn Val ThrIle Glu Gln Gly Arg
 [1581] 290 295 300
 [1582] Ile Val Leu Arg Glu Lys Ala Lys Leu Ser Val Asn Ser Leu Ser Gln
 [1583] 305 310 315 320
 [1584] Thr Gly Gly Ser Leu Tyr Met Glu Ala Gly Ser Thr Trp Asp Phe Val
 [1585] 325 330 335
 [1586] Thr Pro Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Ala Ala Asn Gln Leu Ile Thr
 [1587] 340 345 350
 [1588] Leu Ser Asn Leu His Leu Ser Leu Ser Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ala
 [1589] 355 360 365
 [1590] Val Thr Asn Pro Pro Thr Asn Pro Pro Ala Gln Asp Ser His Pro Ala
 [1591] 370 375 380
 [1592] Val Ile Gly Ser Thr Thr Ala Gly Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile
 [1593] 385 390 395 400
 [1594] Phe Phe Glu Asp Leu Asp Asp Thr Ala Tyr Asp Arg Tyr Asp Trp Leu
 [1595] 405 410 415
 [1596] Gly Ser Asn Gln Lys Ile Asn Val Leu Lys Leu Gln Leu Gly Thr Lys
 [1597] 420 425 430
 [1598] Pro Pro Ala Asn Ala Pro Ser Asp Leu Thr Leu Gly Asn Glu Met Pro
 [1599] 435 440 445
 [1600] Lys Tyr Gly Tyr Gln Gly Ser Trp Lys Leu
 [1601] 450 455
 [1602] <210>37
 [1603] <211>325
 [1604] <212>PRT
 [1605] <213>衣原体
 [1606] <400>37
 [1607] Leu Lys Ala Thr Trp Thr Lys Thr Gly Tyr Asn Pro Gly Pro Glu Arg
 [1608] 1 5 10 15
 [1609] Val Ala Ser Leu Val Pro Asn Ser Leu Trp Gly Ser Ile Leu Asp Ile
 [1610] 20 25 30
 [1611] Arg Ser Ala His Ser Ala Ile Gln Ala Ser Val Asp Gly Arg Ser Tyr
 [1612] 35 40 45
 [1613] Cys Arg Gly Leu Trp Val Ser Gly Val Ser Asn Phe Phe Tyr His Asp
 [1614] 50 55 60
 [1615] Arg Asp Ala Leu Gly Gln Gly Tyr Arg Tyr Ile Ser Gly Gly Tyr Ser
 [1616] 65 70 75 80

[1617]	Leu Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Met Phe Gly Leu Ala Phe
[1618]	85 90 95
[1619]	Thr Glu Val Phe Gly Arg Ser Lys Asp Tyr Val Val Cys Arg Ser Asn
[1620]	100 105 110
[1621]	His His Ala Cys Ile Gly Ser Val Tyr Leu Ser Thr Gln Gln Ala Leu
[1622]	115 120 125
[1623]	Cys Gly Ser Tyr Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ile Arg Ala Ser Tyr Gly
[1624]	130 135 140
[1625]	Phe Gly Asn Gln His Met Lys Thr Ser Tyr Thr Phe Ala Glu Glu Ser
[1626]	145 150 155 160
[1627]	Asp Val Arg Trp Asp Asn Asn Cys Leu Ala Gly Glu Ile Gly Ala Gly
[1628]	165 170 175
[1629]	Leu Pro Ile Val Ile Thr Pro Ser Lys Leu Tyr Leu Asn Glu Leu Arg
[1630]	180 185 190
[1631]	Pro Phe Val Gln Ala Glu Phe Ser Tyr Ala Asp His Glu Ser Phe Thr
[1632]	195 200 205
[1633]	Glu Glu Gly Asp Gln Ala Arg Ala Phe Lys Ser Gly His Leu Leu Asn
[1634]	210 215 220
[1635]	Leu Ser Val Pro Val Gly Val Lys Phe Asp Arg Cys Ser Ser Thr His
[1636]	225 230 235 240
[1637]	Pro Asn Lys Tyr Ser Phe Met Ala Ala Tyr Ile Cys Asp Ala Tyr Arg
[1638]	245 250 255
[1639]	Thr Ile Ser Gly Thr Glu Thr Thr Leu Leu Ser His Gln Glu Thr Trp
[1640]	260 265 270
[1641]	Thr Thr Asp Ala Phe His Leu Ala Arg His Gly Val Val Val Arg Gly
[1642]	275 280 285
[1643]	Ser Met Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Asn Ile Glu Val Tyr Gly His Gly
[1644]	290 295 300
[1645]	Arg Tyr Glu Tyr Arg Asp Ala Ser Arg Gly Tyr Gly Leu Ser Ala Gly
[1646]	305 310 315 320
[1647]	Ser Arg Val Arg Phe
[1648]	325
[1649]	<210>38
[1650]	<211>5
[1651]	<212>DNA
[1652]	<213>衣原体
[1653]	<400>38
[1654]	atgct
[1655]	<210>39

[1656]	<211>5	
[1657]	<212>DNA	
[1658]	<213> 衣原体	
[1659]	<400>39	
[1660]	atgcg	5
[1661]	<210>40	
[1662]	<211>6	
[1663]	<212>DNA	
[1664]	<213> 衣原体	
[1665]	<400>40	
[1666]	atatat	6
[1667]	<210>41	
[1668]	<211>5	
[1669]	<212>DNA	
[1670]	<213> 衣原体	
[1671]	<400>41	
[1672]	atata	5
[1673]	<210>42	
[1674]	<211>6	
[1675]	<212>PRT	
[1676]	<213> 衣原体	
[1677]	<400>42	
[1678]	Glu Ile Met Val Pro Gln	
[1679]	1 5	
[1680]	<210>43	
[1681]	<211>984	
[1682]	<212>PRT	
[1683]	<213> 衣原体	
[1684]	<400>43	
[1685]	Glu Ile Met Val Pro Gln Gly Ile Tyr Asp Gly Glu Thr Leu Thr Val	
[1686]	1 5 10 15	
[1687]	Ser Phe Pro Tyr Thr Val Ile Gly Asp Pro Ser Gly Thr Thr Val Phe	
[1688]	20 25 30	
[1689]	Ser Ala Gly Glu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Asp Asn Ser Ile Ala Ala	
[1690]	35 40 45	
[1691]	Leu Pro Leu Ser Cys Phe Gly Asn Leu Leu Gly Ser Phe Thr Val Leu	
[1692]	50 55 60	
[1693]	Gly Arg Gly His Ser Leu Thr Phe Glu Asn Ile Arg Thr Ser Thr Asn	
[1694]	65 70 75 80	

[1695]	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Asp	Gly	Leu	Phe	Thr	Ile	Glu
[1696]					85					90					95	
[1697]	Gly	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Phe	Ser	Asn	Cys	Asn	Ser	Leu	Leu	Ala	Val
[1698]					100					105					110	
[1699]	Leu	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Asn	Lys	Gly	Ser	Gln	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr
[1700]					115					120					125	
[1701]	Ser	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Tyr	Ser	Lys	Thr	Asp	Leu	Leu	Leu
[1702]					130					135					140	
[1703]	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	Phe	Ser	Phe	Tyr	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Asp
[1704]	145									150					155	160
[1705]	Gly	Gly	Ala	Ile	Asp	Ala	Lys	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	Gly	Ile	Ser	Lys
[1706]					165					170					175	
[1707]	Leu	Cys	Val	Phe	Gln	Glu	Asn	Thr	Ala	Gln	Ala	Asp	Gly	Gly	Ala	Cys
[1708]					180					185					190	
[1709]	Gln	Val	Val	Thr	Ser	Phe	Ser	Ala	Met	Ala	Asn	Glu	Ala	Pro	Ile	Ala
[1710]					195					200					205	
[1711]	Phe	Val	Ala	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Val
[1712]					210					215					220	
[1713]	Gln	Asp	Gly	Gln	Gln	Gly	Val	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro
[1714]	225									230					235	240
[1715]	Val	Val	Ser	Phe	Ser	Arg	Asn	Thr	Ala	Val	Glu	Phe	Asp	Gly	Asn	Val
[1716]					245					250					255	
[1717]	Ala	Arg	Val	Gly	Gly	Gly	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Asn	Val	Ala	Phe	Leu
[1718]					260					265					270	
[1719]	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Phe	Leu	Asn	Asn	Val	Ala	Ser	Pro	Val	Tyr
[1720]					275					280					285	
[1721]	Ile	Ala	Ala	Lys	Gln	Pro	Thr	Ser	Gly	Gln	Ala	Ser	Asn	Thr	Ser	Asn
[1722]					290					295					300	
[1723]	Asn	Tyr	Gly	Asp	Gly	Gly	Ala	Ile	Phe	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Gln	Ala
[1724]	305									310					315	320
[1725]	Gly	Ser	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Asp	Gly	Glu	Gly	Val	Val
[1726]					325					330					335	
[1727]	Phe	Phe	Ser	Ser	Asn	Val	Ala	Ala	Gly	Lys	Gly	Gly	Ala	Ile	Tyr	Ala
[1728]					340					345					350	
[1729]	Lys	Lys	Leu	Ser	Val	Ala	Asn	Cys	Gly	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Asn
[1730]					355					360					365	
[1731]	Ile	Ala	Asn	Asp	Gly	Gly	Ala	Ile	Tyr	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu
[1732]					370					375					380	
[1733]	Ser	Leu	Ser	Ala	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ile	Ile	Phe	Asp	Gly	Asn	Leu	Lys

[1734]	385	390	395	400
[1735]	Arg Thr Ala Lys Glu Asn Ala Ala Asp Val Asn Gly Val Thr Val Ser			
[1736]		405	410	415
[1737]	Ser Gln Ala Ile Ser Met Gly Ser Gly Gly Lys Ile Thr Thr Leu Arg			
[1738]		420	425	430
[1739]	Ala Lys Ala Gly His Gln Ile Leu Phe Asn Asp Pro Ile Glu Met Ala			
[1740]		435	440	445
[1741]	Asn Gly Asn Asn Gln Pro Ala Gln Ser Ser Lys Leu Leu Lys Ile Asn			
[1742]		450	455	460
[1743]	Asp Gly Glu Gly Tyr Thr Gly Asp Ile Val Phe Ala Asn Gly Ser Ser			
[1744]	465	470	475	480
[1745]	Thr Leu Tyr Gln Asn Val Thr Ile Glu Gln Gly Arg Ile Val Leu Arg			
[1746]		485	490	495
[1747]	Glu Lys Ala Lys Leu Ser Val Asn Ser Leu Ser Gln Thr Gly Gly Ser			
[1748]		500	505	510
[1749]	Leu Tyr Met Glu Ala Gly Ser Thr Trp Asp Phe Val Thr Pro Gln Pro			
[1750]		515	520	525
[1751]	Pro Gln Gln Pro Pro Ala Ala Asn Gln Leu Ile Thr Leu Ser Asn Leu			
[1752]		530	535	540
[1753]	His Leu Ser Leu Ser Ser Leu Leu Ala Asn Asn Ala Val Thr Asn Pro			
[1754]	545	550	555	560
[1755]	Pro Thr Asn Pro Pro Ala Gln Asp Ser His Pro Ala Val Ile Gly Ser			
[1756]		565	570	575
[1757]	Thr Thr Ala Gly Ser Val Thr Ile Ser Gly Pro Ile Phe Phe Glu Asp			
[1758]		580	585	590
[1759]	Leu Asp Asp Thr Ala Tyr Asp Arg Tyr Asp Trp Leu Gly Ser Asn Gln			
[1760]		595	600	605
[1761]	Lys Ile Asn Val Leu Lys Leu Gln Leu Gly Thr Lys Pro Pro Ala Asn			
[1762]		610	615	620
[1763]	Ala Pro Ser Asp Leu Thr Leu Gly Asn Glu Met Pro Lys Tyr Gly Tyr			
[1764]	625	630	635	640
[1765]	Gln Gly Ser Trp Lys Leu Ala Trp Asp Pro Asn Thr Ala Asn Asn Gly			
[1766]		645	650	655
[1767]	Pro Tyr Thr Leu Lys Ala Thr Trp Thr Lys Thr Gly Tyr Asn Pro Gly			
[1768]		660	665	670
[1769]	Pro Glu Arg Val Ala Ser Leu Val Pro Asn Ser Leu Trp Gly Ser Ile			
[1770]		675	680	685
[1771]	Leu Asp Ile Arg Ser Ala His Ser Ala Ile Gln Ala Ser Val Asp Gly			
[1772]		690	695	700

[1773]	Arg Ser Tyr Cys Arg Gly Leu Trp Val Ser Gly Val Ser Asn Phe Phe
[1774]	705 710 715 720
[1775]	Tyr His Asp Arg Asp Ala Leu Gly Gln Gly Tyr Arg Tyr Ile Ser Gly
[1776]	725 730 735
[1777]	Gly Tyr Ser Leu Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Gly Ser Ser Met Phe Gly
[1778]	740 745 750
[1779]	Leu Ala Phe Thr Glu Val Phe Gly Arg Ser Lys Asp Tyr Val Val Cys
[1780]	755 760 765
[1781]	Arg Ser Asn His His Ala Cys Ile Gly Ser Val Tyr Leu Ser Thr Gln
[1782]	770 775 780
[1783]	Gln Ala Leu Cys Gly Ser Tyr Leu Phe Gly Asp Ala Phe Ile Arg Ala
[1784]	785 790 795 800
[1785]	Ser Tyr Gly Phe Gly Asn Gln His Met Lys Thr Ser Tyr Thr Phe Ala
[1786]	805 810 815
[1787]	Glu Glu Ser Asp Val Arg Trp Asp Asn Asn Cys Leu Ala Gly Glu Ile
[1788]	820 825 830
[1789]	Gly Ala Gly Leu Pro Ile Val Ile Thr Pro Ser Lys Leu Tyr Leu Asn
[1790]	835 840 845
[1791]	Glu Leu Arg Pro Phe Val Gln Ala Glu Phe Ser Tyr Ala Asp His Glu
[1792]	850 855 860
[1793]	Ser Phe Thr Glu Glu Gly Asp Gln Ala Arg Ala Phe Lys Ser Gly His
[1794]	865 870 875 880
[1795]	Leu Leu Asn Leu Ser Val Pro Val Gly Val Lys Phe Asp Arg Cys Ser
[1796]	885 890 895
[1797]	Ser Thr His Pro Asn Lys Tyr Ser Phe Met Ala Ala Tyr Ile Cys Asp
[1798]	900 905 910
[1799]	Ala Tyr Arg Thr Ile Ser Gly Thr Glu Thr Thr Leu Leu Ser His Gln
[1800]	915 920 925
[1801]	Glu Thr Trp Thr Thr Asp Ala Phe His Leu Ala Arg His Gly Val Val
[1802]	930 935 940
[1803]	Val Arg Gly Ser Met Tyr Ala Ser Leu Thr Ser Asn Ile Glu Val Tyr
[1804]	945 950 955 960
[1805]	Gly His Gly Arg Tyr Glu Tyr Arg Asp Ala Ser Arg Gly Tyr Gly Leu
[1806]	965 970 975
[1807]	Ser Ala Gly Ser Arg Val Arg Phe
[1808]	980

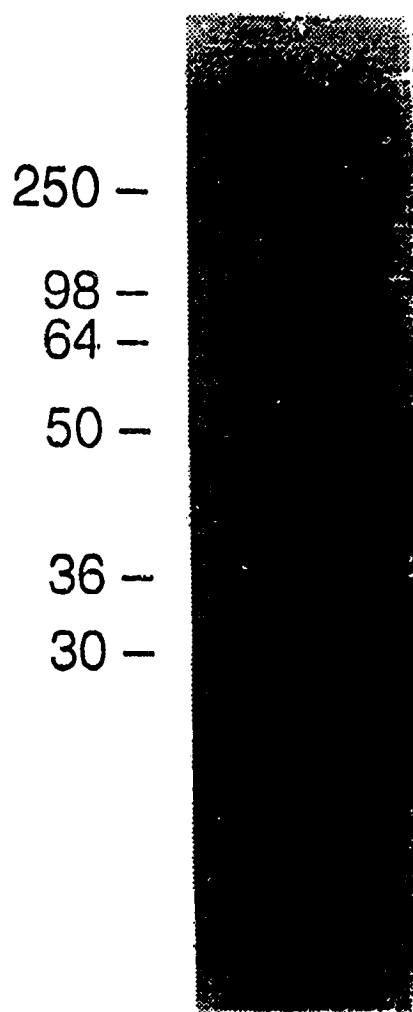


图 1

GGGCAAACTCTTCCCCCGGATTTATATGGGAAAGGGGAACTTTGGC
CCGTATTCAAGCGCCACGGGTTTTGGGCGGAATGAATTTTTTCGTCCG
GAAAAAGTAATCCCCGGAACGTAGGATCGGTTTCATAGGCTCGCCA
AATGGGATATAGGTGGAAAGTAAAAAACTGAGCCAAGCAAAGGATAG
AGAAGTCTTGTAATCATCGCAGGTTAAAGGGGGATGTTATTTAGCCTG
CAAATAGTGAATTATTGGATCCTGTAAAGAGAAAAGGACGAATGCGCTG
AAGATAAGAACATTTATTGATATTAAATTATTAATTTTTATGAAGCGGA
GTAATTAATTTTATCTCTCAGCTTTTGTGTGATGCAAACGCTTTCCATA
AGTTCITTTCTTCAATGATTCTAGCTTATTCTTGCTGCTCTTAAATGGG
GGGGATATGCAGCAGAAATCATGGTTCCTCAAGGAATTTACGATGGGGA
GACGTTAACTGTATCATTTCCCTATACTGTTATAGGAGATCCGAGTGGGA
CTACTGTTTTTCTGCAGGAGAGTTAACATTAAAAATCTTGACAATTCT
ATTGCAGCTTTGCCTTTAAGTTGTTTTGGGAACATTATTAGGGAGTTTAC
TGTTTTAGGGAGAGGACACTCGTTGACTTTCGAGAACATACGGACTTCTA
CAAATCGGGCAGCTCTAAGTAATACGGCTGCTGATGGACTGTTTACTATT
GAGGGTTTTAAAGAATTATCCTTTTCCAATTGCAATTCATTACTTGCCGT
ACTGCCGCTGCAACGACTAATAAGGGTAGCCAGACTCCGACGACAACAT
CTACACCGTCTAATGGTACTATTTATTCTAAACAGATCTTTTGTTACTC
AATAATGAGAAGTTCTCATTCTATAGTAATTTAGTCTCTGGAGATGGGG
AGCTATAGATGCTAAGAGCTTAACGGTTCAAGGAATTAGCAAGCTTTGTG
TCTTCCAAGAAAATACTGCTCAAGCTGATGGGGGAGCTTGTCAGTAGTC
ACCAGTTTCTCTGCTATGGCTAACGAGGCTCCTATTGCCTTTGTAGCGAA
TGTTGCAGGAGTAAGAGGGGGAGGGATTGCTGCTGTTCAGGATGGGCAGC
AGGGAGTGTCATCATCTACTTCAACAGAAGATCCAGTAGTAAGTTTTTCC
AGAAATACTGCGGTAGAGTTTGATGGGAACGTAGCCGAGTAGGAGGAGG
GATTTACTCCTACGGGAACGTTGCTTTCTGAATAATGGAAAACTTGT
TTCTCAACAATGTTGCTTCTCCTGTTTACATTGCTGCTAAGCAACCAACA
AGTGGACAGGCTTCTAATACGAGTAATAATTACGAGATGGAGGAGCTAT
CTTCTGTAAGAATGGTCCGCAAGCAGGATCCAATAACTCTGGATCAGTTT
CCTTTGATGGAGAGGGAGTAGTTTTCTTTAGTAGCAATGTAGCTGCTGGG
AAAGGGGAGCTATTTATGCCAAAAGCTCTCGGTTGCTAACTGTGGCCC
TGTAACAATTTTAAAGGAATATCGCTAATGATGGTGGAGCGATTTATTTAG
GAGAACTGAGAGCTCAGTTTATCTGCTGATTATGGAGATATTATTTTC

图 2A

GATGGGAATCTTAAAAGAACAGCCAAAGAGAATGCTGCCGATGTTAATGG
CGTAACGTGTCTCACAAGCCATTTGATGGGATCGGGAGGAAAAATAA
CGACATTAAGAGCTAAAGCAGGGCATCAGATTCTCTTTAATGATCCCATC
GAGATGGCAAACGGAAATAACCAGCCAGCGCAGTCTTCCAACTTCTAAA
AATTAACGATGCTGAAGGATACACAGGGGATATTGTTTTGCTAATGGAA
GCAGTACTTTGTACCAAAATGTTACGATAGAGCAAGGAAGGATTGTTCTT
CGTGAAAAGGCAAAATTATCAGTGAATTCTCTAAGTCAGACAGGTGGGAG
TCTGTATATGGAAGCTGGGAGTACATGGGATTTTGTAACCCACAACCAC
CACAACAGCCTCCTGCCGCTAATCAGTTGATCAGCCTTTCCAATCTGCAT
TTGTCTCTTTCTTTGTTAGCAAACAATGCAGTTACGAATCCTCCTAC
CAATCCTCCAGCGCAAGATTCTCATCCTGCAGTCATTGGTAGCACAACCTG
CTGGTTCTGTTACAATTAGTGGGCTATCTTTTTGAGGATTTGGATGAT
ACAGCTTATGATAGGTATGATTGGCTAGGTTCTAATCAAAAAATCAATGT
CCTGAAATTACAGTTAGGGACTAAGCCCCAGCTAATGCCCCATCAGATT
TGACTCTAGGGAATGAGATGCCCTAAGTATGGCTATCAAGGAAGCTGGAAG
CTTGCGTGGGATCCTAATACAGCAAATAATGGTCCTTATACTCTGAAAGC
TACATGGACTAAACTGGGTATAATCCTGGGCTGAGCGAGTAGCTTCTT
TGTTCCAAATAGTTTATGGGGATCCATTTTAGATATACGATCTGCCCAT
TCAGCAATTCAAGCAAGTGTGGATGGGCGCTTATTGTGAGGATTATG
GGTTTCTGGAGTTTCAATTTCTTCTATCATGACCGGATGCTTTAGGTC
AGGGATATCGGTATATTAGTGGGGTTATTCCTTAGGAGCAAACCTCCTAC
TTTGGATCATCGATGTTTGGTCTAGCATTTACCGAAGTATTTGGTAGATC
TAAAGATTATGTAGTGTGTCGTTCCAATCATCATGCTTGCATAGGATCCG
TTTATCTATCTACCCAACAAGCTTTATGTGGATCCTATTTGTTGCGAGAT
GCGTTTATCCGTGCTAGCTACGGGTTTGGGAATCAGCATATGAAAACCTC
ATATACATTTGCAGAGGAGAGCGATGTTGTTGGGATAATAACTGTCTGG
CTGGAGAGATTGGAGCGGATTACCGATTGTGATTACTCCATCTAAGCTC
TATTGCAATGAGTTGCGTCCTTTGCTGCAAGCTGAGTTTTCTTATGCCGA
TCATGAATCTTTTACAGAGGAAGGCGATCAAGCTCGGGCATTCAAGAGCG
GACATCTCCTAAATCTATCAGTTCTGTTGGAGTGAAGTTTGATCGATGT
TCTAGTACACATCCTAATAAATATAGCTTTATGGCGGCTTATATCTGTGA
TGCTTATCGCACCATCTCTGGTACTGAGACAACGCTCCTATCCCATCAAG
AGACATGGACAACAGATGCCCTTCATTTAGCAAGACATGGAGTTGTGGTT
AGAGGATCTATGTATGCTTCTCTAACAAGTAATATAGAAGTATATGGCCA
TGGAAGATATGAGTATCGAGATGCTTCTCGAGGCTATGGTTTGAGTGCAG

图 2B

GAAGTAGAGTCCGTTCTAAAAATATTGGTTAGATAGTTAAGTGTAGCG
ATGCCTTTTCTTTGAGATCTACATCATTTTGTGTTTTTAGCTTGTTGTG
TTCCTATTTCGTATGGATTCCGGAGCTCTCCTCAAGTGTTAACGCCTAATG
TAACCACTCCTTTTAAGGGAGACGATGTTTACTTGAATGGAGACTGCCCT
TTTGTCAATGTCTATGCAGGAGCTGAAGAAGGTTTCGATTATCTCAGCTAA
TGGCGACAATTTAAGGATTACCGGACAAAACCATACATTATCATTTACAG
ATTCTCAAGGGCCAGTTCTTCAAAATTATGCCCTTCATTTACGAGGAGAG
ACACTTACTCTGAGAGATTTTTCGAGTCTGATGTTCTCGAAAAATGTTTC
TTCCGGAGAAAAGGGAATGATCTCCGGGAAAACCGTGAGTATTTCCGGAG
CAGCGGAAGTGATTTTCTGGGATAACTCCGTGGGTATTCTCCTTTATCT
ACTGTGCCAACCTCATCATCAACTCCGCCTGCTCCAACAGTTAGTGATGC
TCGGAAAGGGTCTATTTTTCTGTAGAGACTAGTTTGGAGATCTCAGCGG
TCAAAAAAGGGTCATGTTTCGATAATAATGCCGGGAATTTCCGAACAGTT
TTTCGAGGTAAGAATAATAATAATGCTGGTGGTGGAGGCAGTGGGTCCG
CTACACCATCAAGTACGACTTTTACAGTTAAAACTGTAAAGGAAAGTT
TCTTTCACAGATAACGTAGCCTCTTCCGGAGGCGGAGTGGTTTATAAAGG
CATTGTGCTTTTCAAAGACAATGAAGGAGGCATATTCTTCCGAGGGAACA
CAGCATAAGATGATTTAAGGATTCTTGCTGCTACTAATCAGGATCAGAAT
ACCGAGACAGGAGCGGTGGAGGAGTTATTTGCTCTCCAGATGATTCTGT
AAAGTTTGAAGGCAATAAAGGTTCTATTGTTTTTGATTACAACTTTCCAA
AAGGCAGAGGCGGAAGCATCCTAACGAAAGAATTC

图 2C

MQTSFHKFFLSMILAYSCCSLNGGGYAAEIMVPGIYDGETLTVSFPTYV
IGDPSTTVFSAGELTLKNLDNSIAALPLSCFGNLLGSFTVLGRGHSITF
ENIRTSINGAALSNSAADGLFTIEGFKELSF SNCNSLLAVLPAAITNKGS
QTPTTSTPSNGTIYSKTDLLLLNNEKFSFYSNLVSGDGGAI DAKSLTVQ
GISKLCVFQENTAQAQDGGACQVTSFSAMANEAPIAFVANVAGVRGGGIA
AVQDQCGVSSSTSTEDPVVSFSRNTAVEFDGNVARVGGGIYSYGNVAF
NNGKTLFLNNVASPVYIAAKQPTSGQASNTSNNGDGGAI FCKNGAQGS
NNSGVSFDFGEGVVFSSNVAAGKGGAIYAKKLSVANCGPVQFLRNIAND
GGAIYLGESGELSLADYGDIFDGNLKRTAKENAADVNGVTVSSQAISM
CSGGKITTLRAKAGHQILFNDPIEMANGNNQPAQSSKLLKINDGEGYTG
IVFANGSSTLYQNVTEQGRIVLREKAKLSVNSLSQTGGSLYMEAGSTWD
FVTPQPFQPPAANQLITLSNLHLSLSSLLANNAVTPPTNPPAQDSHPA
VIGSTTAGSVTISGPIFFEDLDDTAYDRYDWLGSNOKINVLKLQLGTKPP
ANAPSDLTLGNEMPKYGYQGSWKLAWDPNTANNGPYTLKATWTKGYNPG
PERVASLVPNSLWGSILDIRSAHSAIQASVDGRSYCRGLWVSGVSNFFYH
DRDALGCCYRYISGGYSLGANSYFGSSMFLAFTEVFGRSKDYVVCRSNH
HACIGSVYLSTQALCGSYLFGDAFIRASYGFGNQHMKTSYTFAEESDVR
WDNNCLAGEIGAGLPIVITPSKLYLNELRPFVQAEFSYADHESFTEEGDQ
ARAFKSGHLLNLSVPVGKFDRCSSSTHPNKYSFMAAYICDAYRTISGTET
TLLSHQETWTTDAFHLARHGVVVRGSMYASLTSNIEVYGHGRYEYRDASR
GYGLSAGSRVRF

图 3

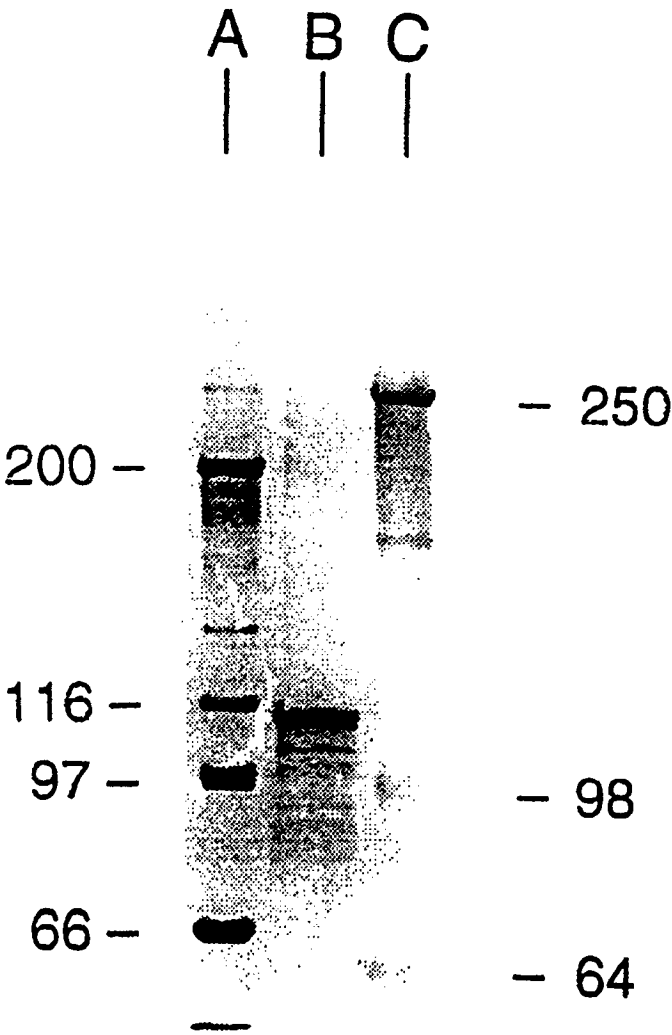


图 4

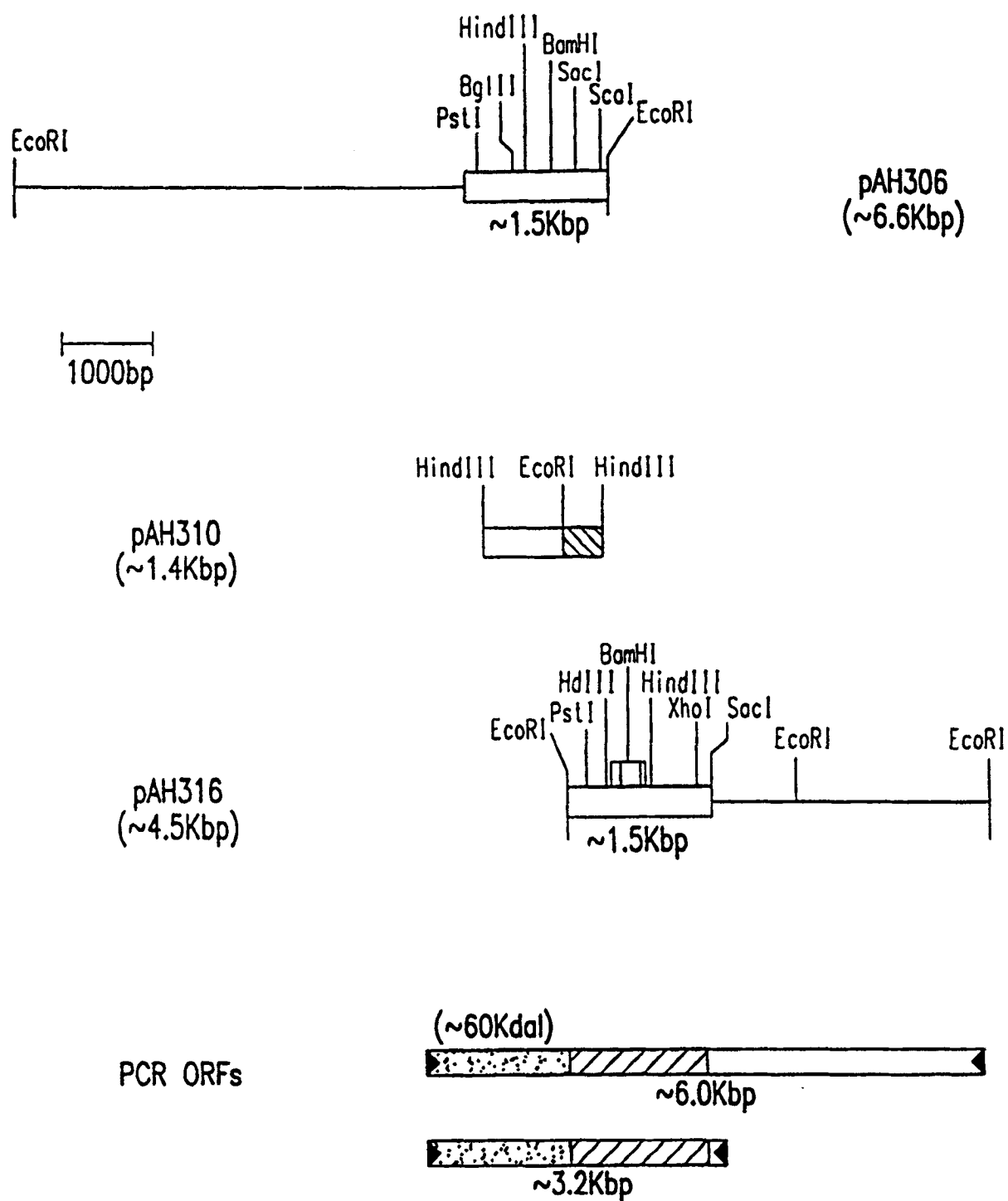


图 5



图 6A

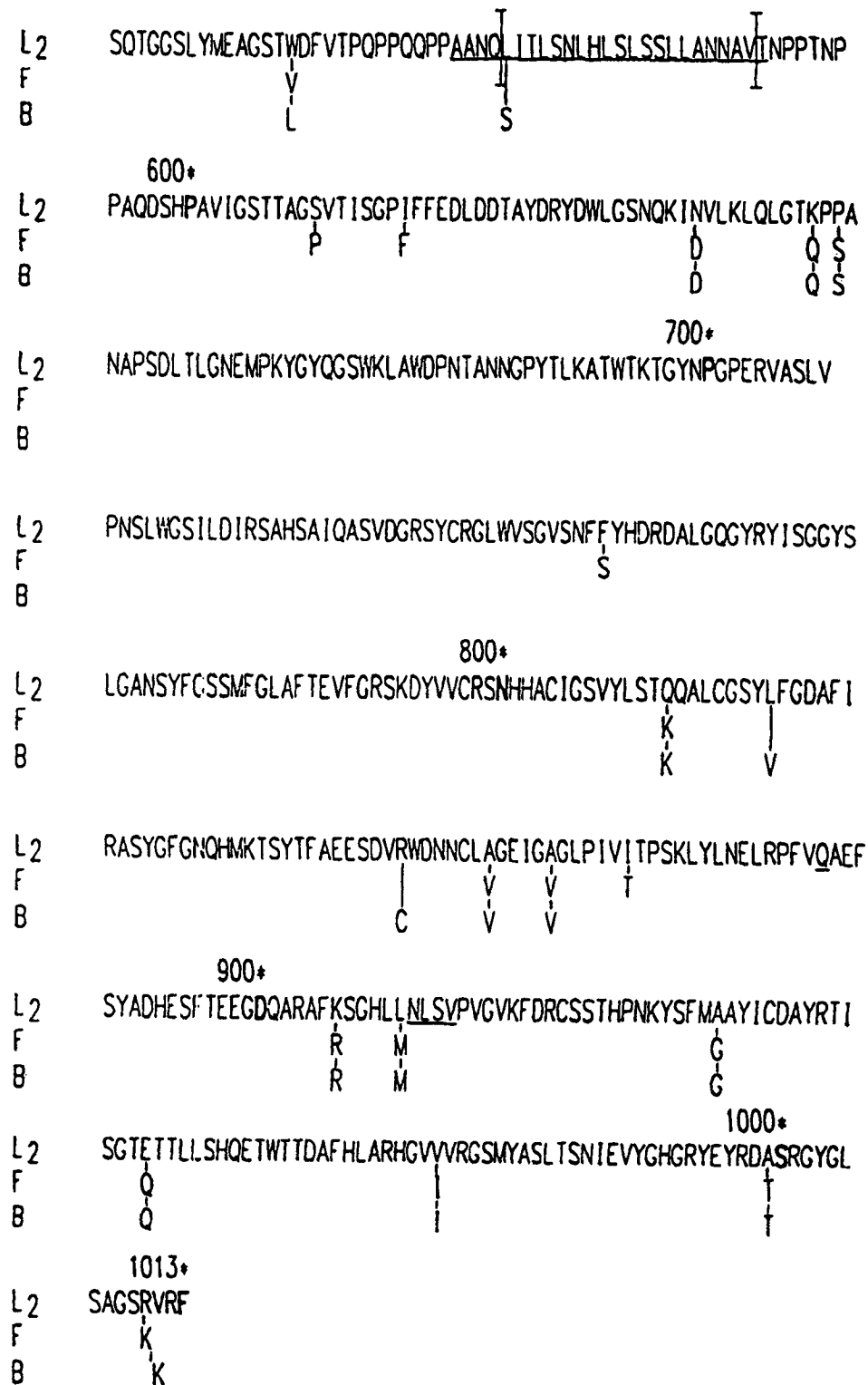


图 6B

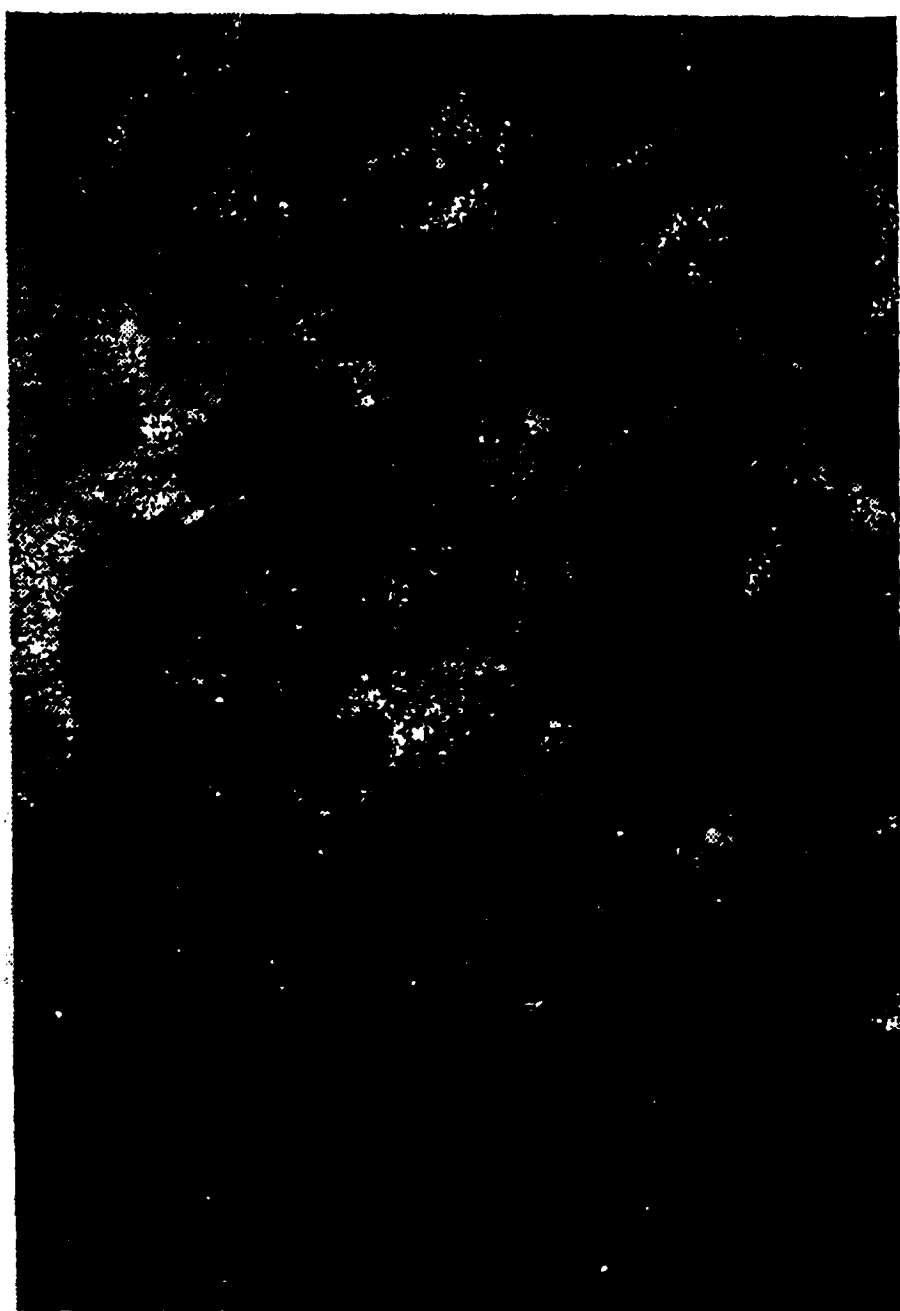


图 7A

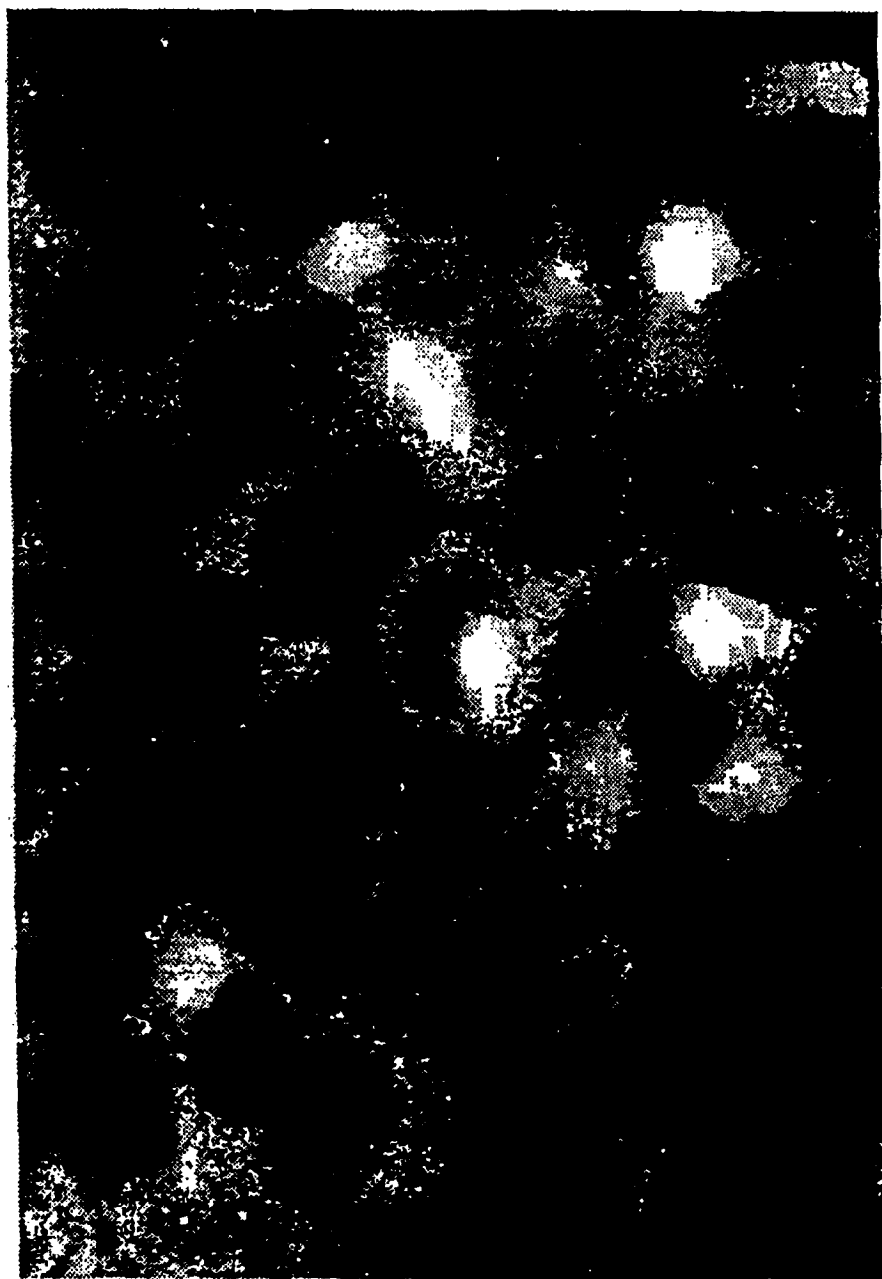


图 7B