



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104768572 B

(45) 授权公告日 2021.08.24

(21) 申请号 201380033361.X

(22) 申请日 2013.03.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104768572 A

(43) 申请公布日 2015.07.08

(30) 优先权数据
61/638,831 2012.04.26 US
61/674,619 2012.07.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/031695 2013.03.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/162746 EN 2013.10.31

(73) 专利权人 芝加哥大学
地址 美国伊利诺斯州

(72) 发明人 莫利·麦克多夫 安德里亚·迪登
艾利斯·陈 卡拉·艾默罗
多米尼克·米西亚卡斯
奥拉夫·施内温德

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413
代理人 王庆艳 刘继富

(51) Int.Cl.
A61K 38/43 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2011/127032 A1, 2011.10.13
Alice G. Cheng. "Contribution of
Coagulases towards Staphylococcus
aureus Disease and Protective Immunity".
《Plos Pathogens》. 2010, 第6卷 (第8期), 第5页
右栏第11-17行, 第13页右栏第11行到第14页左
栏第11行, 图4.
Joakim Bjerketorp. "The von Willebrand
factor-binding protein (vWbp)
of Staphylococcus aureus is a coagulase".
《FEM Microbiology Letter》. 2004, 第234卷
309-314.

审查员 姚进孝

权利要求书3页 说明书100页
序列表39页 附图20页

(54) 发明名称

葡萄球菌凝固酶抗原及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗或预防细菌感染、特别
是由葡萄球菌细菌感染引起的感染的方法和组
合物。本发明提供用于刺激细菌的免疫应答的方
法和组合物。在一些实施方案中, 方法和组合物
涉及凝固酶结构域1-2及其变体。

1. 一种免疫原性组合物,其包含第一多肽,所述第一多肽由葡萄球菌凝固酶结构域1-2序列构成,所述结构域1-2序列与SEQ ID NO:33-37或SEQ ID NO:38-41中的序列一致。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述第一多肽包含His标记和/或链霉素标记。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述第一多肽维持葡萄球菌凝固酶中发现的结构域1-2的三维结构。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述结构域1-2来自金黄色葡萄球菌Newman、85/2082、MW2、MSSA476、N315、Mu50、MRSA252、CowanI、WIS或USA300菌株。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述结构域1-2是与在SEQ ID NO:33-37中确定的序列在序列上一致的Coa结构域1-2。

6. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述结构域1-2是与在SEQ ID NO:38-41中确定的序列在序列上一致的vWbp结构域1-2。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述结构域1-2是来自金黄色葡萄球菌N315或USA300的vWbp结构域1-2。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其还包含在序列上与所述第一多肽序列不同的至少第二、第三、第四或第五葡萄球菌凝固酶结构域1-2。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其包含至少四种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2,其中不同的结构域1-2是来自菌株MRSA252、MW2、N315和USA300的葡萄球菌Coa结构域1-2。

10. 根据权利要求8所述的组合物,其中另外的葡萄球菌凝固酶结构域1-2中的至少一种在序列上与SEQ ID NO:33-37或SEQ ID NO:38-41中的序列一致。

11. 根据权利要求1到7中任一项所述的组合物,其还包含一种或更多种另外的葡萄球菌抗原。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中另外的葡萄球菌抗原是Emp、EsxA、EsxB、EsaC、Eap、Ebh、EsaB、Coa、vWbp、vWh、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、IsdC、ClfA、ClfB、SasF和/或非产毒性的SpA。

13. 根据权利要求1到7中任一项所述的组合物,其还包含佐剂。

14. 根据权利要求1到7中任一项所述的组合物,其中所述第一多肽是重组多肽。

15. 一种重组多肽,其由葡萄球菌凝固酶结构域1-2序列构成,所述结构域1-2序列与SEQ ID NO:33-37或SEQ ID NO:38-41中的序列一致。

16. 一种多核苷酸分子,其包含编码权利要求15所述的重组多肽的核酸序列。

17. 一种表达载体,其包含有效地连接至表达控制序列的编码权利要求15所述的重组多肽的核酸序列。

18. 一种宿主细胞,其包含权利要求17所述的表达载体。

19. 权利要求1至14中任一项所述的组合物、权利要求15所述的重组多肽或权利要求17所述的表达载体在制备用于在对象中治疗或预防葡萄球菌感染的药物中的用途。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述对象是人。

21. 根据权利要求19所述的用途,其中基于对葡萄球菌感染的测试来施用所述药物。

22. 根据权利要求19所述的用途,其中所述药物是多次施用的。

23. 根据权利要求19所述的用途,其中所述药物是局部施用。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述药物是静脉内施用、肌肉内施用、血管内施

用、气管内施用、鞘内施用、眼内施用、腹腔内施用、和/或口服施用。

25. 根据权利要求19所述的用途,其中所述药物是以液态、作为固态、半固体来施用的。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述药物是以作为凝胶、片剂、丸剂、乳膏剂、软膏剂、栓剂来施用的。

27. 根据权利要求25所述的用途,其中所述药物是以阴道栓来施用的。

28. 根据权利要求19所述的用途,其中所述药物与一种或更多种抗生素组合施用至所述对象。

29. 根据权利要求19所述的用途,其中所述感染是耐药性感染。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述耐药性感染是耐甲氧西林的。

31. 根据权利要求19所述的用途,其中所述对象患有葡萄球菌感染。

32. 根据权利要求19所述的用途,其中在被确定患有葡萄球菌感染的一周内对对象施用所述药物。

33. 根据权利要求19所述的用途,其中所述对象有免疫缺陷、免疫功能不全、在住院、正在进行侵入性医疗过程、患有呼吸感染、被流感病毒感染或使用呼吸机。

34. 根据权利要求19所述的用途,其还包括测试所述对象对所述药物的反应。

35. 根据权利要求19所述的用途,其中所述对象显示皮肤脓肿、疖和/或疔。

36. 根据权利要求19所述的用途,其中所述第一多肽或重组多肽维持葡萄球菌凝固酶中发现的结构域1-2的三维结构。

37. 一种制造免疫原性组合物的方法,其包括混合:

第一多肽,所述第一多肽由葡萄球菌凝固酶结构域1-2序列构成;和

在序列上与所述第一多肽序列不同的至少一种另外的葡萄球菌凝固酶结构域1-2,其中所述结构域1-2的序列与SEQ ID NO:33-37或SEQ ID NO:38-41中的序列一致。

38. 一种用于治疗或预防葡萄球菌感染的组合物,其包含由葡萄球菌凝固酶结构域1-2序列构成的多肽,所述结构域1-2序列与SEQ ID NO:33-37或SEQ ID NO:38-41中的序列一致。

39. 一种免疫原性组合物,其包含Coa₄和/或vWbp₂,其中Coa₄由金黄色葡萄球菌菌株MRSA252、MW2、N315的Coa D1-2结构域和来自菌株USA300的Coa的全长成熟序列组成,其中所述vWbp₂由金黄色葡萄球菌N315的vWbp D1-2结构域和来自菌株USA300的vWbp的全长成熟序列组成。

40. 根据权利要求39所述的免疫原性组合物,其还包含一种或更多种另外的葡萄球菌抗原。

41. 根据权利要求40所述的免疫原性组合物,其中所述另外的葡萄球菌抗原是Emp、EsxA、EsxB、EsaC、Eap、Ebh、EsaB、Coa、vWbp、vWh、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、IsdC、ClfA、ClfB、SasF和/或非产毒性的SpA。

42. 根据权利要求39所述的组合物,其还包含佐剂。

43. 根据权利要求39所述的组合物,其中所述Coa₄和/或vWbp₂包含His标记和/或链霉素标记。

44. i) 免疫原性组合物,其包含由葡萄球菌凝固酶结构域1-2构成的第一多肽;

ii) 重组多肽,其由葡萄球菌凝固酶结构域1-2构成;或

iii) 表达载体,其包含编码重组多肽的核酸序列,所述重组多肽由葡萄球菌凝固酶结构域1-2构成;

在制备用于在对象中治疗或预防葡萄球菌感染的药物中的用途。

45. 根据权利要求44所述的用途,其还包括:

i) 与所述第一多肽序列不同的第二葡萄球菌凝固酶结构域1-2的用途;

ii) 编码与所述第一多肽序列不同的第二葡萄球菌凝固酶结构域1-2的第二表达载体的用途;和/或

iii) 其中所述表达载体还编码与所述第一多肽序列不同的第二葡萄球菌凝固酶结构域1-2。

46. 一种免疫原性组合物,其包含 CT_{Coa} ,其中所述 CT_{Coa} 由葡萄球菌凝固酶Coa的重复结构域构成,所述免疫原性组合物用于在对象中预防葡萄球菌感染的方法。

47. 根据权利要求46所述的组合物,其中所述 CT_{Coa} 是重组多肽。

48. 一种免疫原性组合物,其包含 CT_{vWbp} ,其中所述 CT_{vWbp} 由葡萄球菌凝固酶vWbp的CT结构域构成,所述免疫原性组合物用于在对象中预防葡萄球菌感染的方法。

49. 根据权利要求48所述的免疫原性组合物,其中所述 CT_{vWbp} 是重组多肽。

葡萄球菌凝固酶抗原及其使用方法

[0001] 本发明是在由国立卫生研究院授予的AI052767、AI052474、HD009007和1-U54-AI-0571153的政府支持下完成的。政府拥有本发明的一定权利。

[0002] 本申请要求2012年4月26日提交的美国临时专利申请61/638,831和2012年7月23日提交的美国临时专利申请61/674,619的优先权,二者皆通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

I. 技术领域

[0004] 本发明通常涉及免疫学、微生物学和病理学的领域。更具体地,其涉及与细菌凝固酶变体有关的方法和组合物,所述细菌凝固酶变体可以用于引起对抗细菌的免疫应答。

II. 背景技术

[0005] 社区获得性感染和医院获得性感染两者的数量在最近几年随着血管内器械增多的使用都在增加。医院获得性(医院内)感染是发病率和死亡率的主要原因,更具体地,在美国其每年影响超过两百万患者。最常见的感染是尿路感染(33%的感染),其次是肺炎(15.5%)、手术部位感染(14.8%)和原发性血流感染(13%) (Emori和Gaynes,1993)。

[0006] 主要的医院病原体包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、凝固酶阴性葡萄球菌(主要是表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*))、肠球菌属(*enterococcus spp.*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。尽管这些病原体导致大致相同数量的感染,但是它们可以产生的疾病的严重性结合抗生素耐药分离株的发生率使该排名平衡朝向了金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*),它们是最重要的医院内病原体。

[0007] 葡萄球菌可以通过产生毒素或侵染导致人类和其他动物的各种各样的疾病。葡萄球菌毒素也是食物中毒的常见原因,这是因为细菌可在储存不当的食物中生长。

[0008] 表皮葡萄球菌是普通的皮肤共生体,其也是作为受损医疗器械的感染和手术部位感染的重要原因的重要机会性病原体。被表皮葡萄球菌感染的医疗器械包括心脏起搏器、脑脊髓液分流器、持续性非卧床腹膜透析导管、整形外科器械和人工心脏瓣膜。

[0009] 金黄色葡萄球菌是具有显著发病率和死亡率的医院内感染的最常见原因。其是以下一些病症的原因:骨髓炎、心内膜炎、脓毒性关节炎、肺炎、脓肿和中毒性休克综合征。金黄色葡萄球菌可以在干燥的表面上存活,这增加了传播的机会。任何金黄色葡萄球菌感染都可以导致葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征,其为一种对吸收到血流中的外毒素的皮肤反应。它还可以导致会威胁生命的被称为脓血症的一种败血症。问题是,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)已经成为医院获得性感染的主要原因。

[0010] 金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌感染一般用抗生素来治疗,其中盘尼西林为选择的药物,而万古霉素用于甲氧西林耐药分离株。对抗生素表现出广谱抗性的葡萄球菌菌株的百分比正在变得越来越普遍,这对有效的抗菌疗法构成威胁。此外,最近出现的耐万古霉素的金黄色葡萄球菌菌株已经引起以下忧虑:MRSA菌株正在形成并传播,对于该MRSA菌株

没有可用的有效疗法。

[0011] 用于葡萄球菌感染的抗生素治疗的另一替代方案正在研究,其使用对抗葡萄球菌抗原的抗体。该疗法涉及多克隆抗血清的施用(W000/15238、W000/12132)或者利用对抗脂磷壁酸的单克隆抗体的治疗(W098/57994)。

[0012] 一种替代途径会是使用活性接种以产生对抗葡萄球菌的免疫应答。金黄色葡萄球菌基因组已经被测序,并且已经鉴定了很多编码序列(W002/094868,EP0786519),这可以导向潜在抗原的鉴定。对于表皮葡萄球菌同样如此。作为这种途径的细化,其他人已经鉴定了通过来自已经患有葡萄球菌感染的患者的超免疫血清识别的蛋白质(W001/98499,W002/059148)。

[0013] 金黄色葡萄球菌将过多的致病因子分泌到细胞外环境中(Archer,1998;Dinges等人,2000;Foster,2005;Shaw等人,2004;Sibbald等人,2006)。如多数分泌的蛋白质一样,这些致病因子通过分泌机构来转运穿过质膜。通过分泌机构分泌的蛋白质具有N-端前导肽,其在前体蛋白质结合于分泌易位子(Sec translocon)中后通过前导肽酶来移除(Dalbey和Wickner,1985;van Wely等人,2001)。最近的基因组分析表明放线菌(Actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicute)成员编码以分泌无关的(Sec-independent)方式识别蛋白质亚单位的其他分泌系统(Pallen,2002)。结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的ESAT-6(早期分泌抗原靶6kDa)和CFP-10(培养滤液抗原10kDa)代表这种新的分泌系统的第一底物,其被命名为结核分支杆菌(*M. tuberculosis*)中的Snm或ESX-1(Andersen等人,1995;Hsu等人,2003;Pym等人,2003;Stanley等人,2003)。在金黄色葡萄球菌中,命名为EsxA和EsxB的两种ESAT-6样因子是通过Ess途径(ESAT-6 secretion system,ESAT-6分泌系统)分泌的(Burts等人,2005)。

[0014] 靶向金黄色葡萄球菌或其产生的外蛋白的第一代疫苗已经达到有限的成功(Lee,1996)。但是仍然需要开发对抗葡萄球菌感染的有效疫苗。也需要用于治疗葡萄球菌感染的其他组合物。

发明内容

[0015] 在感染期间,金黄色葡萄球菌分泌两种凝固酶即Coa和vWbp,其在与宿主凝血酶原和纤维蛋白原结合后,将可溶的纤维蛋白原转化成不可溶的纤维蛋白,诱导纤维蛋白凝块的形成并且导致葡萄球菌疾病。由于Coa和vWbp是用于葡萄球菌凝固和凝聚的重要因素,其促进在鼠中金黄色葡萄球菌脓肿的形成和致死菌血症的发病机理。在此,本发明人证明了对抗凝固酶的可变凝血酶原结合部分的抗体通过中和金黄色葡萄球菌凝块活性来提供类型特异性免疫并且免受葡萄球菌疾病。特别地,通过将来自北美(North-American)分离株的凝固酶的可变部分结合到杂交的Coa和vWbp蛋白中,衍生出亚单位疫苗,其提供了对抗不同凝固酶类型的金黄色葡萄球菌菌株的攻击的保护。

[0016] 在一些实施方案中,提供了包含葡萄球菌凝固酶结构域1-2(例如来自葡萄球菌Coa或vWbp蛋白的结构域1-2)的免疫原性组合物。例如,结构域1-2可以包含以下氨基酸序列或由其构成:与序列表格1(SEQ ID NO:33-37)或序列表格2(SEQ ID NO:38-41)的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、99%、100%一致的氨基酸序列。在一些方面,葡萄球菌凝固酶结构域1-2被包含在小于全长的凝固酶蛋白中。例如,结构域1-2可以被包含在小于全

长的Coa蛋白(例如缺失全部或一部分的L或R结构域节段)或者以小于全长的vWbp蛋白(例如缺失全部或一部分的L或F结构域节段)中。在一些方面,结构域1-2为其中分泌信号序列已经被除去的结构域1-2片段。

[0017] 在一些实施方案中,提供一种包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的免疫原性组合物。例如,组合物可以包含来自葡萄球菌Coa或vWbp蛋白的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2,其中至少一种结构域1-2被包含在小于全长的凝固酶蛋白中。在一些方面,结构域1-2的序列包含以下氨基酸序列或由其组成:与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的氨基酸序列至少80%一致的氨基酸序列。在一些方面,结构域1-2包含以下氨基酸序列或由其组成:与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的氨基酸序列至少85%、90%、95%、98%、99%或100%一致的氨基酸序列。在其他方面,至少一种结构域1-2被包含在小于全长的凝固酶蛋白序列中。在具体的实施方案中,全长的凝固酶蛋白是包含序列SEQ ID NO:42的Coa蛋白。在具体的方面,全长的凝固酶蛋白是包含序列SEQ ID NO:75的vWbp蛋白。在仍另外的方面,小于全长的Coa蛋白缺失所有或部分的L或R结构域节段。在另外的方面,经截短的vWbp蛋白缺失所有或部分的L或F结构域节段。术语“经截短的”蛋白用来指没有达到其全长而因此缺失在正常蛋白质中存在的一个或更多个氨基酸残基的蛋白质或多肽。术语“相对于全长截短的凝固酶蛋白”是用来指不具有凝固酶蛋白全长而因此缺失在正常蛋白质中存在的至少一个氨基酸残基的蛋白质或多肽。

[0018] 在一些实施方案中,葡萄糖凝固酶结构域1-2之一来自金黄色葡萄球菌Newman、85/2082、MW2、MSSA476、N315、Mu50、MRSA252、CowanI、WIS或USA300菌株,或任何其他金黄色葡萄球菌菌株。在一些实施方案中,凝固酶结构域1-2之一包含来自金黄色葡萄球菌N315或USA300的vWbp结构域。

[0019] 在一些方面,结构域1-2之一包含与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 的氨基酸序列至少80%一致的Coa结构域1-2。在其他方面,结构域1-2之一包含与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 的氨基酸序列至少85%、90%、95%、98%、99%一致的Coa结构域1-2。

[0020] 在另一方面,结构域1-2之一包含与序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的序列至少80%一致的vWbp结构域1-2。在其他方面,结构域1-2之一包含与序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的序列至少85%、90%、95%、98%、99%一致的vWbp结构域1-2。

[0021] 在一些实施方案中,结构域1-2之一是Coa结构域1-2,其还包含来自葡萄球菌Coa蛋白的L或R结构域。

[0022] 在一些实施方案中,结构域1-2之一是vWbp结构域1-2,其还包含来自葡萄球菌vWbp蛋白的L或Fgb结构域。

[0023] 在一些方面,免疫原性组合物包含至少三种、四种、或五种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2。在其他方面,免疫原性组合物包含至少四种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2。在具体的实施方案中,所述至少四种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2是来自菌株MRSA252、MW2、N315和USA300的葡萄球菌Coa结构域1-2。

[0024] 在一些实施方案中,设想免疫原性组合物包含被包含在融合蛋白中的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2。

[0025] 在其他实施方案中,所述免疫原性组合物还包含一种或更多种其他葡萄球菌抗

原。在其他实施方案中,所述免疫原性组合物也可以包含佐剂。在具体的实施方案中,其他葡萄球菌抗原为Emp、EsxA、EsxB、EsaC、Eap、Ebh、EsaB、Coa、vWbp、vWh、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、IsdC、ClfA、ClfB、SasF或非产毒性的SpA。

[0026] 实施方案包括一种包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的重组多肽。结构域1-2的序列与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的氨基酸序列至少80%一致。在一些方面,结构域1-2的序列与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的氨基酸序列至少85%、90%、95%、98%、99%一致。

[0027] 在其他实施方案中,设想一种包含编码重组多肽的核酸序列的多核苷酸分子,所述重组多肽包含编码至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的序列。在其他方面,表达载体包含有效地连接至表达控制序列的核酸序列。在另外的方面,也设想一种包含表达载体的宿主细胞。

[0028] 实施方案包括本文中描述的组合物、重组多肽、多核苷酸分子以及表达载体在对象中用于治疗或预防葡萄球菌感染的用途。在一些方面,包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的组合物用于治疗或预防葡萄球菌感染。结构域1-2的序列与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的氨基酸序列至少80%一致,并且结构域1-2的至少一种是经截短的凝固酶蛋白序列。

[0029] 在一些实施方案中,设想一种制造免疫原性组合物的方法,其包括混合至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2多肽。结构域1-2的序列与序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的氨基酸序列至少80%一致,并且结构域1-2中的至少一种是经截短的凝固酶蛋白序列。

[0030] 实施方案包括本文方法中描述的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2和组合物用于治疗细菌和/或葡萄球菌感染的用途。此外,一些实施方案提供可以用于治疗(例如限制对象中的葡萄球菌脓肿形成和/或持续)或预防细菌感染的方法和组合物。在一些情况下,用于刺激免疫应答的方法涉及给对象施用有效量的本文中描述的免疫原性组合物和在一些方面中的其他细菌蛋白质。其他细菌蛋白质包括但不限于(i)分泌的致病因子和/或细胞表面蛋白或肽,或(ii)编码分泌的致病因子和/或细胞表面蛋白或多肽的重组核酸分子。

[0031] 在其他方面,可以给对象施用本文中描述的免疫原性组合物、重组多肽或载体。所述重组多肽或载体可以配制到药物可接受的组合物中。所述组合物还可以包含至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、或19种其他葡萄球菌抗原或其免疫原性片段(例如Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla(例如H35突变体)、IsdC、SasF、vWbp、或vWh)中的一种或更多种。可以使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa(GenBank CAC80837)、Aap(GenBank登录号AJ249487)、Ant(GenBank登录号NP_372518)、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO

00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白(参见PCT公开W02007/113222、W02007/113223、W02006/032472、W02006/032475、W02006/032500,其每一个都通过引用完整地并入本文)。

[0032] 所述葡萄球菌抗原或免疫原性片段可以与以下物质同时施用:本文中描述的包含至少两种不同凝固酶结构域1-2的免疫原性组合物、包含至少两种不同结构域1-2的重组多肽、和/或包含编码至少两种不同结构域1-2的核酸序列的载体。所述葡萄球菌抗原或免疫原性片段可以与以下物质在同一组合物中施用:本文中描述的包含至少两种不同结构域1-2的免疫原性组合物、包含至少两种不同结构域1-2的重组多肽、和/或包含编码至少两种不同结构域1-2的核酸序列的载体。如本文中所使用的,术语“调节”包含词语“提高”或“抑制”的意思。活性的“调节”可以是活性的增加或降低。如本文中所使用的,术语“调节剂”是指影响部分的功能的化合物,包括蛋白质、核酸、基因、生物体等的上调、诱导、刺激、增强、抑制、下调或压制。

[0033] 重组核酸分子可以编码至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2和至少一种葡萄球菌抗原或其免疫原性片段。在具体的方面,所述至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2之一是与序列表格1(SEQ ID NO:33-37)的氨基酸序列至少80%一致的Coa结构域。在另外的方面,所述至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2之一是与序列表格2(SEQ ID NO:38-41)的序列至少80%一致的vWbp结构域。在一些方面,重组核酸分子包含编码经截短的凝固酶蛋白的序列,并且所述经截短的凝固酶蛋白包括所述至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2中的任一种。在具体的实施方案中,所述凝固酶蛋白是包含序列SEQ ID NO:42的Coa蛋白。在具体的方面,所述凝固酶蛋白是包含序列SEQ ID NO:75的vWbp蛋白。

[0034] 在一些实施方案中,包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的组合物或多肽可以与包括但不限于以下表面抗原或分泌的因子组合使用:经分离的Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、或vWh多肽或其免疫原性片段中的一种或更多种。可以使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。在一些实施方案中,Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh、52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、

MHC II类似物 (US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白 (RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF (WO 00/12689)、SdrG/Fig (WO 00/12689)、SdrH (WO 00/12689)、SEA外毒素 (WO 00/02523)、SEB外毒素 (WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白 (US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种可以特别地被排除在本发明的制剂之外。

[0035] 下表列出了葡萄球菌凝固酶结构域1-2与各种其他葡萄球菌抗原的各种组合：

[0036] 表1：葡萄球菌凝固酶结构域1-2与葡萄球菌抗原组合

[0037]

Eap	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ebh		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Emp			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0038]

EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+
Hla _{HISA}																		+	+	+	+
IsdC																			+	+	+
SasF																				+	+
vWbp																					+
vWh																					+

Ebh			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Emp				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA													+	+	+	+	+	+	+	+
ChlB														+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																			+	+
vWh																				+

[0039]

Emp				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaB					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+

CifB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

EsaB					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsaC						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+

[0040]

SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

EsxC					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxA						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ChfA													+	+	+	+	+	+	+	+	+
ChfB														+	+	+	+	+	+	+	+
Coa															+	+	+	+	+	+	+
Hla																+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

EsxA							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EsxB								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0041]

[0042]

SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+
ClfA														+	+	+	+	+	+	+
ClfB															+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				

EsxB									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrC										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA													+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB														+	+	+	+	+	+	+
ClfA															+	+	+	+	+	+
ClfB																+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+

Hla																		+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+	+
IsdC																				+	+	+	+
SasF																					+	+	+
vWbp																						+	+
vWh																							+

SdrC									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrD										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ChfA														+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ChfB															+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+	+
SasF																				+	+	+	+
vWbp																						+	+
vWh																							+

SdrD											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SdrE												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[0043]

IsdA											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB												+	+	+	+	+	+	+	+	+
CifA													+	+	+	+	+	+	+	+
CifB													+	+	+	+	+	+	+	+
Coa														+	+	+	+	+	+	+
Hla															+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																+	+	+	+	+
IsdC																	+	+	+	+
SasF																		+	+	+
vWbp																			+	+
vWh																				+

[0044]

SdrE											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdA												+	+	+	+	+	+	+	+	+
IsdB													+	+	+	+	+	+	+	+
CifA														+	+	+	+	+	+	+
CifB															+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+
IsdC																		+	+	+
SasF																			+	+
vWbp																				+
vWh																				+

CifB															+	+	+	+	+	+	+	+
Coa																+	+	+	+	+	+	+
Hla																	+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																		+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+	+
SasF																			+	+	+	+
vWbp																				+	+	+
vWh																						+

[0046]

CifB																+	+	+	+	+	+	+
Coa																	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+
vWh																						+

Coa																	+	+	+	+	+	+
Hla																		+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																			+	+	+	+
IsdC																			+	+	+	+
SasF																				+	+	+
vWbp																					+	+

vWh																			+
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Hla																+	+	+	+	+	+
Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

Hla _{H35A}																	+	+	+	+	+
IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

IsdC																		+	+	+	+
SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

SasF																			+	+	+
vWbp																				+	+
vWh																					+

[0047]

[0048]

vWbp																			+	+
vWh																				+

vWh																				+
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

[0049] 在另外的方面,本文中所描述的包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的经分离的重组多肽是多聚化的,例如二聚化或者两个或更多个多肽或肽节段的线性融合。在本发明的一些方面,组合物包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多种经分离的细胞表面蛋白或其节段的多聚体或串联体。串联体是具有一个或更多个重复肽单元的直链多肽。至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2可以是连续的或被间隔区或其他肽序列、例如一个或更多个其他细菌肽隔开。在另一方面,在多聚体或串联体中含有的其他多肽或肽包括但不限于Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh或其免疫原性片段中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19种。可以与至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。

[0050] 一些实施方案包括用于在对象中引起对抗葡萄球菌属细菌或葡萄球菌免疫应答的方法,其包括给对象提供有效量的免疫原性组合物或重组多肽,所述免疫原性组合物或重组多肽包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2或者包含编码至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的核酸序列的载体。在一些方面,用于在对象中引起对抗葡萄球菌属细菌或葡萄球菌免疫应答的方法包括给对象提供有效量的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或更多种分泌蛋白和/或细胞表面蛋白或其节段/片段。分泌蛋白或细胞表面蛋白包括但不限于Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp和/或vWh和其免疫原性片段。可以使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD(US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物(US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白(RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF(WO 00/12689)、SdrG/Fig(WO 00/12689)、SdrH(WO 00/12689)、SEA外毒素(WO 00/02523)、SEB外毒

素(WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白(US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。

[0051] 本发明的实施方案包括组合物,所述组合物包含多肽、肽或蛋白质、或者第二蛋白质或肽,所述多肽、肽或蛋白质包含与葡萄球菌凝固酶结构域1-2、特别是Coa结构域1-2(参见序列表格1(SEQ ID NO:33-37))或vWbp结构域1-2(参见序列表格2(SEQ ID NO:38-41))70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的序列,所述第二蛋白质或肽为分泌细菌蛋白或细菌细胞表面蛋白。相似性或一致性,优选一致性,是本领域已知的,多种不同的程序可以用来鉴定蛋白质(或核酸)是否具有与已知序列一致或相似的序列。序列一致性和/或相似性使用现有技术中已知的标准技术来确定,包括但不限于使用Smith&Waterman的局部序列一致性算法(1981)、通过Needleman&Wunsch的序列一致性比对算法(1970)、通过Pearson&Lipman的相似性搜索方法(1988)、通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575 Science Drive,麦迪逊,威斯康星)、Devereux等人描述的最佳匹配(Best Fit)序列程序(1984)(优选使用默认设置)、或者通过检查来确定。优选地,百分比一致性通过使用本领域技术人员已知的且可容易确定的算法来计算。百分比一致性基本上为相同氨基酸的数目除以所比较的氨基酸的总数再乘以100。

[0052] 另外的实施方案包括用于在对象中刺激对抗葡萄球菌属细菌的保护性或治疗性免疫应答的方法,其包括给对象施用有效量的组合物,所述组合物包含(i)包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2如Coa结构域1-2(参见序列表格1(SEQ ID NO:33-37))或vWbp结构域1-2(参见序列表格2(SEQ ID NO:38-41))或其同系物的免疫原性组合物;或(ii)包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2或其同系物的重组多肽;或(iii)包含编码至少两种不同的葡萄球菌结构域1-2或其同系物的序列的核酸分子;或(iv)与本文中描述的细菌蛋白的任何组合或排列一起施用(i)至(iii)中任一项。在一个优选的实施方案中,该组合物不是葡萄球菌属细菌。在一些方面,该对象为人类或奶牛。在另一方面,该组合物以药学上可接受的制剂来配制。葡萄球菌可以为金黄色葡萄球菌。

[0053] 另外的实施方案包括疫苗,所述疫苗包含具有本文中描述的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、或本文中描述的蛋白质或肽的任意其他组合或排列的药学上可接受的组合物,其中所述组合物能刺激对抗葡萄球菌属细菌的免疫应答。该疫苗可以包含本文中描述的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2,或所描述的蛋白质或肽的任意其他组合或排列。在一些方面,本文中描述的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2,或所描述的蛋白质或肽的任意其他组合或排列是多聚化的,例如二聚化或串联化。在另一方面,疫苗组合物含有小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.05%(或其中可得到的任何范围)的其他葡萄球菌蛋白。组合物还可以包含经分离的非凝固酶多肽。通常,疫苗包含佐剂。在一些方面,本发明的蛋白质或肽(共价地或非共价地)连接至佐剂,优选地佐剂化学地缀合至蛋白质。

[0054] 在另外的实施方案中,疫苗组合物是具有编码重组多肽的重组核酸的药学上可接受的组合物,所述重组多肽含有本文中描述的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2,或本文中描述的蛋白质或肽的任意其他组合或排列,其中所述组合物能刺激对抗葡萄球菌

属细菌的免疫应答。在一些方面,重组核酸含有异种启动子。优选地,重组核酸是载体。更优选地,载体是质粒或病毒载体。在一些方面,疫苗包括含有核酸的重组的非葡萄球菌属细菌。重组的非葡萄球菌可以是沙门氏菌或其他革兰氏阳性细菌。疫苗可以包含药学上可接受的赋形剂,更优选佐剂。

[0055] 另外的实施方案包括用于在对象中刺激对抗葡萄球菌属细菌的保护性或治疗性免疫应答的方法,其包括给对象施用有效量的以下组合物:本文中描述的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、或含有至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的重组多肽、或编码至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的核酸的组合物;所述组合物还包含Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、或vWh蛋白或其肽中的一种或更多种。在一个优选的实施方案中,组合物包含非葡萄球菌属细菌。在另一方面,组合物以药学上可接受的制剂来配制。为对象治疗的葡萄球菌可以是金黄色葡萄球菌。本发明的方法也可以另外包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19种或更多种分泌的致病因子和/或细胞表面蛋白,例如以各种组合的Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、或vWh。在一些方面,疫苗制剂包括Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp和vWh。

[0056] 在一些方面,抗原组合可以包括(1)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2与IsdA;(2)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2与ClfB;(3)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2与SdrD;(4)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2与Hla或Hla变体;(5)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2与ClfB、SdrD、和Hla或Hla变体;(6)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、SdrD与Hla或Hla变体;(7)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、ClfB与Hla或Hla变体;(8)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、ClfB与SdrD;(9)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、ClfB、SdrD与Hla或Hla变体;(10)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、ClfB与SdrD;(11)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、SdrD与Hla或Hla变体;(12)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA与Hla或Hla变体;(13)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、IsdA、ClfB与Hla或Hla变体;(14)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、ClfB与SdrD;(15)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、ClfB与Hla或Hla变体;(16)至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、SdrD与Hla或Hla变体。

[0057] 在一些方面,递送本发明的组合物的细菌在长期或持续的生长或脓肿形成方面会被限制或减弱。在另一方面,至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2可以在经减弱的细菌中过表达以进一步增强或补充免疫应答或疫苗制剂。

[0058] 术语“EsxA蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型EsxA多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌EsxA蛋白的免疫应答的变体。

[0059] 术语“EsxB蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型EsxB多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌EsxB蛋白的免疫应答的变体。

[0060] 术语“SdrD蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型SdrD多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌SdrD蛋白的免疫应答的变体。

[0061] 术语“SdrE蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型SdrE多

肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌SdrE蛋白的免疫应答的变体。

[0062] 术语“IsdA蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型IsdA多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌IsdA蛋白的免疫应答的变体。

[0063] 术语“IsdB蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型IsdB多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌IsdB蛋白的免疫应答的变体。

[0064] 术语“Eap蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型Eap多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌Eap蛋白的免疫应答的变体。

[0065] 术语“Ebh蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型Ebh多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌Ebh蛋白的免疫应答的变体。

[0066] 术语“Emp蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型Emp多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌Emp蛋白的免疫应答的变体。

[0067] 术语“EsaB蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型EsaB多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌EsaB蛋白的免疫应答的变体。

[0068] 术语“EsaC蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型EsaC多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌EsaC蛋白的免疫应答的变体。

[0069] 术语“SdrC蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型SdrC多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌SdrC蛋白的免疫应答的变体。

[0070] 术语“ClfA蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型ClfA多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌ClfA蛋白的免疫应答的变体。

[0071] 术语“ClfB蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型ClfB多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌ClfB蛋白的免疫应答的变体。

[0072] 术语“Coa蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型Coa多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌Coa蛋白的免疫应答的变体。

[0073] 术语“Hla蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型Hla多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌Hla蛋白的免疫应答的变体。

[0074] 术语“IsdC蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型IsdC多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌IsdC蛋白的免疫应答的变体。

[0075] 术语“SasF蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型SasF多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌SasF蛋白的免疫应答的变体。

[0076] 术语“vWbp蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型vWbp(血管假性血友病因子结合蛋白)多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌vWbp蛋白的免疫应答的变体。

[0077] 术语“vWh蛋白”是指包含以下的蛋白质:从葡萄球菌属细菌分离的野生型vWh(血管假性血友病因子结合蛋白同系物)多肽及其节段,以及刺激对抗葡萄球菌属细菌vWh蛋白的免疫应答的变体。

[0078] 免疫应答是指生物体中的体液应答、细胞应答、或者体液和细胞应答二者。免疫应答可以通过包括但不限于以下的分析来测量:测量特异性识别蛋白质或细胞表面蛋白的存在或量的分析,测量T细胞活化或增殖的分析,和/或测量在一种或更多种细胞因子的活性或表达方面的调节的分析。

[0079] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与EsxA蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0080] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与EsxB蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0081] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与SdrD蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0082] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与SdrE蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0083] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与IsdA蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0084] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与IsdB蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0085] 本发明的实施方案包括组合物,所述组合物包含与EsaB蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0086] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与ClfB蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0087] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与IsdC蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0088] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与SasF蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0089] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与SdrC蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0090] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与ClfA蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0091] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与Eap蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0092] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与Ebh蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0093] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与Emp蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0094] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与EsaC蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。EsaC多肽的序列可以在蛋白质数据库中找到,其包括但不限于登录号ZP_02760162 (GI:168727885)、NP_645081.1 (GI:21281993) 和NP_370813.1 (GI:15923279),其中每个都通过引用本申请优先权日时的内容并入本文。

[0095] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与Coa蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0096] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与H1a蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0097] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与vWa蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0098] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与vWbp蛋白70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多肽、肽、或蛋白质。

[0099] 在一些方面,多肽或节段/片段可以具有与参考多肽的氨基酸序列至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、或至少99%或更多一致的序列。术语“相似性”是指具有如下序列的多肽:所述序列具有一定百分比的与参考多肽一致或者以参考多肽构成保守性取代的氨基酸。

[0100] 本文中描述的多肽可以包含序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的序列中在至少或至多3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、

211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000或更多个相邻的氨基酸,或者其中可得到的任何范围内的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个不同氨基酸。

[0101] 本文中描述的多肽节段可以包含序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的序列中3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、300、400、500、550、1000或更多个相邻的氨基酸,或者其中可得到的任何范围。

[0102] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与编码Coa蛋白的核酸序列70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多核苷酸。在一些方面,编码菌株USA300的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株N315的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MW2的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MRSA252的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株WIS的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MU50的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株85/2082的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株Newman的Coa蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。

[0103] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与编码vWbp融合蛋白的核酸序列70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多核苷酸。在一些方面,编码菌株USA300的vWbp蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株N315的vWbp蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株Newman的vWbp蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MRSA252的vWbp蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MW2的vWbp蛋白的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。

[0104] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与编码Coa结构域1-2的核酸序列70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多核苷酸。在一些方面,编码菌株N315的Coa结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MW2的Coa结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MRSA252的Coa结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株WIS的Coa结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。

[0105] 在特定的方面,组合物可以包含与编码分别来自菌株WIS、MRSA252、N315、MW2和USA300的五种不同Coa结构域1-2的核酸序列70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多核苷酸。在另外的方面,编码五种不同Coa结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。

[0106] 本发明的另外的实施方案中,组合物可以包含与编码vWbp结构域1-2的核酸序列70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似,或者至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致或相似的多核苷酸。在一些方面,编码菌株N315的vWbp结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MW2的vWbp结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。在一些方面,编码菌株MRSA252的vWbp结构域1-2的核酸序列会具有本文提供的核酸序列的全部或一部分。

[0107] 组合物可以以药学上可接受的组合物来配制。在本发明的一些方面,葡萄球菌属细菌是金黄色葡萄球菌的细菌。

[0108] 在其他方面,组合物可以给对象施用多于一次,可以施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更多次。组合物的施用包括但不限于经口的、肠胃外的、皮下的、肌内的、静脉内的施用,或其各种组合,包括吸入或抽吸。

[0109] 在另外的实施方案中,组合物包含编码本文中描述的多肽或其节段/片段的重组核酸分子。通常,编码本文中描述的多肽的重组核酸分子含有异种启动子。在一些方面,本发明的重组核酸分子为载体,在另外的方面,所述载体为质粒。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些方面,组合物包含含有或表达本文中描述的多肽的重组的非葡萄球菌属细菌。在一些方面,重组的非葡萄球菌属细菌是沙门氏菌或其他革兰氏阳性细菌。组合物通常施用至哺乳动物,如人类对象,但也设想施用至能够引起免疫应答的其他动物。在其他方面,含有或表达多肽的葡萄球菌属细菌是金黄色葡萄球菌。在其他实施方案中,免疫应答是保护性免疫应答。

[0110] 在其他实施方案中,组合物包含编码Eap、Ebh、Emp、EsaB、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、SpA、vWbp或vWh蛋白或肽或其变体中的一个或更多的全部或一部分的重组核酸分子。可以与本文中描述的多肽组合使用的其他葡萄球菌抗原包括但不限于52kDa玻连蛋白结合蛋白(WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白(US6288214)、EFB(FIB)、弹性蛋白结合蛋白(EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白(US6008341)、纤连蛋白结合蛋白

(US5840846)、FnbA、FnbB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物 (US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白 (RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF (WO 00/12689)、SdrG/Fig (WO 00/12689)、SdrH (WO 00/12689)、SEA外毒素 (WO 00/02523)、SEB外毒素 (WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白 (US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白。在特定的方面,细菌是重组的非葡萄球菌属细菌,例如沙门氏菌或其他革兰氏阳性细菌。

[0111] 本文中描述的组合物一般施用至人类对象,但是设想施用至能够引起对葡萄球菌属细菌的免疫应答的其他动物,特别是牛、马、山羊、绵羊和其他家畜,即哺乳类动物。

[0112] 在一些方面,葡萄球菌属细菌是金黄色葡萄球菌。在其他实施方案中,免疫应答是保护性免疫应答。在另外的方面,本发明的方法和组合物可以用于预防、改善、减少或治疗组织或腺体例如乳腺的感染,特别是乳腺炎和其他感染。其他方法包括但不限于预防地降低未显示感染迹象的对象中的细菌负荷,特别是那些疑似或有风险被目标细菌移生的对象,例如在住院、治疗和/或康复期间处于或会处于感染风险或者易于或会易于受感染的患者。

[0113] 所讨论关于本发明的一方面的任何实施方案也可以应用于本发明的其他方面。特别地,在包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2、或包含至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的重组多肽、或编码至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2的核酸的组合物情况下所讨论的任何实施方案都可以施用于其他抗原,例如Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh、52kDa玻连蛋白结合蛋白 (WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白 (US6288214)、EFB (FIB)、弹性蛋白结合蛋白 (EbpS)、EPB、FbpA、纤维蛋白原结合蛋白 (US6008341)、纤连蛋白结合蛋白 (US5840846)、FnbA、FnbB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物 (US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白 (RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF (WO 00/12689)、SdrG/Fig (WO 00/12689)、SdrH (WO 00/12689)、SEA外毒素 (WO 00/02523)、SEB外毒素 (WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白 (US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白(或核酸),反之亦然。还应理解,Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsxA、EsxB、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、Coa、Hla、IsdC、SasF、vWbp、vWh、52kDa玻连蛋白结合蛋白 (WO 01/60852)、Aaa、Aap、Ant、自溶素氨基葡萄糖苷酶、自溶素酰胺酶、Cna、胶原蛋白结合蛋白 (US6288214)、EFB (FIB)、弹性蛋白结合蛋白 (EbpS)、EPB、纤维蛋白原结合蛋白 (US6008341)、纤连蛋白结合蛋白 (US5840846)、FnbA、FnbB、GehD (US 2002/0169288)、HarA、HBP、免疫显性的ABC转运体、IsaA/PisA、层粘连蛋白受体、脂肪酶GehD、MAP、Mg²⁺转运体、MHC II类似物 (US5648240)、MRPII、Npase、RNA III活化蛋白 (RAP)、SasA、SasB、SasC、SasD、SasK、SBI、SdrF (WO 00/12689)、SdrG/Fig (WO 00/12689)、SdrH (WO 00/12689)、SEA外毒素 (WO00/02523)、SEB外毒素 (WO 00/02523)、SitC和Ni ABC转运体、SitC/MntC/唾液结合蛋白 (US5,801,234)、SsaA、SSP-1、SSP-2和/或玻连蛋白结合蛋白中的任何一个或更多个可以特别地被排除在所要保护的组合物之外。

[0114] 实施方案包括含有或不含有细菌的组合物。组合物可以包含或可以不包含毒性减弱的或有活力的或未受损的葡萄球菌细菌。在一些方面,组合物包含非葡萄球菌属的细菌或不含有葡萄球菌细菌。在一些实施方案中,细菌组合物包含本文中描述的分离的或重组表达的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2或对其编码的核酸。组合物可以是或包括重组设计的葡萄球菌属细菌,所述葡萄球菌属细菌已经按以下方式改变:所述方式包括特别地改变细菌的分泌致病因子或细胞表面蛋白。例如,可以重组改性细菌以与未改性的情况下会表达的相比表达更多的致病因子或细胞表面蛋白

[0115] 术语“分离的”可以指基本脱离其原始来源的细胞材料、细菌材料、病毒材料或培养基(当通过重组DNA技术产生时),或者基本不含化学前体或其他化学品(当化学合成时)的核酸或多肽。此外,分离的化合物是指可以作为分离的化合物施用到对象的化合物;换言之,如果化合物被黏附到柱或包埋在琼脂糖凝胶中,则不可以简单地认为该化合物是“分离的”。此外,“分离的核酸片段”或“分离的肽”是不作为片段天然存在和/或通常不处于功能状态的核酸或蛋白片段。

[0116] 部分,例如多肽、肽、抗原或免疫原可以共价或非共价地缀合或连接到其他部分,例如佐剂、蛋白质、肽、支持体、荧光部分或标记物。术语“缀合”或“免疫缀合”广泛地用于限定一个部分与另一试剂的有效缔合,并不意在单独指任何类型的有效缔合,并且不特别地限于化学“缀合”。特别地设想了重组的融合蛋白。本发明的组合物还可以包含佐剂或药学上可接受的赋形剂。佐剂可以共价地或非共价地偶联至本发明的多肽或肽。在一些方面,佐剂被化学地缀合至蛋白质、多肽或肽。

[0117] 术语“提供”根据其普通含义使用以表示“供给或供应以供使用”。在一些实施方案中,通过施用蛋白质直接提供蛋白质,而在其他实施方案中,通过施用编码所述蛋白质的核酸有效地提供蛋白质。在一些方面,本发明设想包含核酸、抗原、肽和/或表位的各种组合的组合物。

[0118] 对象将患有(例如被诊断具有葡萄球菌感染)、将疑似患有、或将有风险进展为葡萄球菌感染。本发明的组合物包含免疫原性组合物,在所述免疫原性组合物中以有效实现预期目的的量含有抗原或表位。更具体地,有效量表示刺激或引起免疫应答、或提供对感染的抵抗、减轻或缓解所必需的活性成分的量。在更具体的方面,有效量预防、缓和或减轻疾病或感染的症状,或者延长治疗中的对象的存活。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其根据本文所提供的详细公开。对于本发明的方法中使用的任何制剂,有效量或剂量可以首先由体外研究、细胞培养和/或动物模型分析来估计。例如,剂量可以以动物模型来配制以获得期望的免疫应答或循环抗体浓度或效价。这种信息可以用于更准确地确定对人类的有用剂量。

[0119] 实施例部分的实施方案应理解为适用于本发明的所有方面的实施方案。

[0120] 术语“或”在权利要求中的使用用于表示“和/或”,除非明确地说明是仅指替代方案,或替代方案是相互排斥的,尽管本公开支持仅指替代方案和“和/或”的定义。还设想使用术语“或”所列出的任何事物也可以被特别地排除。

[0121] 在本申请全文中,术语“约”用于表示数值包含用于确定数值所使用的装置或方法的误差的标准差。

[0122] 根据存在已久的专利法,单数形式的词当在权利要求或说明书中与词语“包括”一

起使用时表示一种或更多种,除非另有明确的说明。

[0123] 本发明的其它目的、特征和优点通过下面的详细描述会变得明显。然而,应该理解,尽管指出本发明的具体实施方案,但是详细说明和具体实施例仅以举例的方式给出,这是因为通过该详细说明在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对本领域技术人员会变得明显。

附图说明

[0124] 以上简要概括的本发明的更具体的描述和一些实施方案在附图中进行说明,使得其中本发明的上述特征、优点和目的以及其他会变得清楚的事实得以实现,并可以被详细地理解。这些附图形成说明书的一部分。然而,应注意,附图示出本发明的一些实施方案,但并不因此被认为是限定其范围。

[0125] 图1A-1D. 对凝固酶的免疫应答。(A) 图用于说明来自金黄色葡萄球菌Newman (Coa_{NM}) 的凝固酶的一级结构,所述凝固酶是通过来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的N端His₆标记纯化的。 Coa_{NM} 包含涉及凝血酶原结合的D1和D2结构域、连接(L) 结构域和重复(R) 结构域,所述重复结构域由27个与纤维蛋白原结合的残基肽序列的串联重复构成。除了 Coa_{NM} ,还纯化了D1_{Coa}、D2_{Coa}、D12_{Coa}、L_{Coa} 和R_{Coa} 结构域。(B) 用经纯化的 Coa_{NM} 使兔免疫,并且通过ELISA检查免疫血清中与 Coa_{NM} 、D1_{Coa}、D2_{Coa}、D12_{Coa}、L_{Coa} 或CT_{Coa} 反应的血清IgG。(C) 通过ELISA测量D12_{Coa} 与人类凝血酶原的缔合或CT_{Coa} 与纤维蛋白原的结合,并用递增浓度的兔IgG干扰,所述兔IgG对抗 Coa_{NM} 或作为对照的鼠疫疫苗抗原V10。(D) 将对 Coa_{NM} ($\alpha\text{-Coa}_{\text{NM}}$)、D12_{Coa} ($\alpha\text{-D12}_{\text{Coa}}$) 或CT_{Coa} ($\alpha\text{-CT}_{\text{Coa}}$) 特异的经亲和纯化的兔IgG添加至柠檬酸盐处理过的小鼠血液,然后用金黄色葡萄球菌Newman接种以监测葡萄球菌凝固酶的抑制。

[0126] 图2A-2C. 作为疫苗抗原的凝固酶结构域。(A) 利用初免-加强策略(prime-booster regimen)使用重组纯化的 Coa_{NM} 、D12_{Coa} 和CT_{Coa} 来使BALB/c小鼠($n=5$)免疫,并通过ELISA分析免疫血清中鼠血清IgG对经纯化的 Coa_{NM} 、D12_{Coa} 或CT_{Coa} 的反应活性。(B) 利用经纯化的 Coa_{NM} 、D12_{Coa} 和CT_{Coa} 初免-加强策略使一群BALB/c小鼠($n=10$)免疫,并通过静脉注射用金黄色葡萄球菌Newman (1×10^8 CFU) 对其进行攻击。监测动物的存活率超过10天。(C) 将对 Coa_{NM} ($\alpha\text{-Coa}_{\text{NM}}$)、D12_{Coa} ($\alpha\text{-D12}_{\text{Coa}}$)、CT_{Coa} ($\alpha\text{-CT}_{\text{Coa}}$) 或V10 ($\alpha\text{-V10}$) 特异的经亲和纯化的兔IgG以5mg/kg体重的浓度注射到首次接受试验的(naive) BALB/c小鼠的腹腔中。通过静脉注射用金黄色葡萄球菌Newman (1×10^8 CFU) 攻击被动免疫的小鼠,并监测动物的存活率超过10天。

[0127] 图3A-3D. 对血管假性血友病因子结合蛋白(vWbp)的免疫应答。(A) 图用于说明来自金黄色葡萄球菌Newman的vWbp (vWbp_{NM}) 的一级结构,所述vWbp是通过来自大肠杆菌的N端His₆标记纯化的。 vWbp_{NM} 包含涉及凝血酶原结合的D1和D2结构域、连接(L) 结构域和纤维蛋白原(Fgb) 结构域。除了 vWbp_{NM} ,还纯化了D1_{vWbp}、D2_{vWbp}、D12_{vWbp}、L_{vWbp}、Fgb_{vWbp} 和CT_{vWbp} 结构域。(B) 用经纯化的 vWbp_{NM} 使兔免疫,并通过ELISA检查免疫血清中与 vWbp_{NM} 、D1_{vWbp}、D2_{vWbp}、D12_{vWbp}、L_{vWbp}、Fgb_{vWbp} 和CT_{vWbp} 反应的血清IgG。(C) 通过ELISA测量D12_{vWbp} 与人类凝血酶原的缔合或CT_{vWbp} 与纤维蛋白原的结合,并用递增浓度的兔IgG干扰,所述兔IgG对抗 vWbp_{NM} 或作为对照的鼠疫疫苗抗原V10。(D) 将对 vWbp_{NM} ($\alpha\text{-vWbp}_{\text{NM}}$)、D12_{vWbp} ($\alpha\text{-D12}_{\text{vWbp}}$) 或CT_{vWbp} ($\alpha\text{-CT}_{\text{vWbp}}$) 特异的经亲和纯化的兔IgG添加至柠檬酸盐处理过的小鼠血液,然后用金黄色葡萄球菌Newman接种以监测葡萄球菌凝固酶的抑制。

[0128] 图4A-4C. 作为疫苗抗原的血管假性血友病因子结合蛋白(vWbp)结构域。(A) 利用初免-加强策略使用重组纯化的vWbp_{NM}、D12_{vWbp}和CT_{vWbp}来使BALB/c小鼠(n=5)免疫,并通过ELISA分析免疫血清中鼠血清IgG对经纯化的vWbp_{NM}、D12_{vWbp}和CT_{vWbp}的反应活性。(B) 利用经纯化的vWbp_{NM}、D12_{vWbp}和CT_{vWbp}的初免-加强策略使一群BALB/c小鼠(n=10)免疫,并通过静脉注射用金黄色葡萄球菌(1×10^8 CFU)对其进行攻击。监测动物的存活率超过10天。(C) 将对vWbp_{NM}(α -vWbp_{NM})、D12_{vWbp}(α -D12_{vWbp})、CT_{vWbp}(α -CT_{vWbp})或V10(α -V10)特异的经亲和纯化的兔IgG以5mg/kg体重的浓度注射到首次接受试验的BALB/c小鼠的腹腔中。通过静脉注射用金黄色葡萄球菌Newman(1×10^8 CFU)攻击被动免疫的小鼠,并监测动物的存活率超过10天。

[0129] 图5A-5F. 利用Coa_{NM}/vWbp_{NM}疫苗的小鼠的免疫和对抗不同金黄色葡萄球菌分离株的疾病保护范围。(A) 利用初免-加强策略使用重组Coa_{NM}/vWbp_{NM}或模拟品(PBS)疫苗用来使BALB/c小鼠(n=5)免疫。通过ELISA分析免疫血清中小鼠血清IgG对经纯化的Coa_{NM}和vWbp_{NM}的反应活性。利用经纯化的Coa_{NM}/vWbp_{NM}或模拟疫苗的初免-加强策略使一群BALB/c小鼠(n=10)免疫,并通过静脉注射用金黄色葡萄球菌USA300(B)、N315(C)、MW2(D)、CowanI(E)或WIS(F)对其进行攻击。监测动物的存活率超过10天。

[0130] 图6A-6C. Coa₄/vWbp₂疫苗的免疫原性。(A) 图用来说明Coa₄和vWbp₂疫苗成分的设计。Coa₄由N端His₆标记,金黄色葡萄球菌菌株MRSA252、MW2、N315的Coa D12结构域,和来自菌株USA300的Coa全长成熟序列,以及C端STREP标记构成。vWbp₂是由N端His₆标记、金黄色葡萄球菌N315的vWbp D12结构域、和来自菌株USA300的vWbp全长成熟序列以及C端STREP标记构成。(B) Coa₄和vWbp₂是通过Ni-NTA和链霉亲和素亲和色谱从大肠杆菌纯化的,并通过考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE进行分析。

[0131] 图7A-7F利用Coa₄/vWbp₂疫苗的小鼠的免疫和对抗不同金黄色葡萄球菌分离株的疾病保护范围。(A) 利用初免-加强策略使用Coa₄/vWbp₂或模拟品(PBS)疫苗来使BALB/c小鼠(n=5)免疫。通过ELISA分析免疫血清中小鼠血清IgG对经纯化的Coa₄和vWbp₂的反应活性。(B) 利用经纯化的Coa₄/vWbp₂或模拟品疫苗的初免-加强策略使一群BALB/c小鼠(n=10)免疫,并且通过静脉注射用金黄色葡萄球菌USA300(B)、N315(C)、MW2(D)、CowanI(E)或WIS(F)对其进行攻击。监测动物存活率超过10天。

[0132] 图8A-B: Coa序列比对。(A) 来自五种金黄色葡萄球菌菌株的Coa核酸序列的比对。(B) 来自选定的金黄色葡萄球菌菌株的Coa结构域1-2的氨基酸序列的比对。

[0133] 图9A-C: vWbp序列比对。(A) 来自五种金黄色葡萄球菌菌株的vWbp核酸序列的比对。(B) 来自选定的金黄色葡萄球菌菌株的vWbp(结构域1序列被遮蔽)的氨基酸序列的比对。(C) 来自选定的金黄色葡萄球菌菌株的不具有两个经截短的等位基因的vWbp的氨基酸序列的比对。

具体实施方式

[0134] 金黄色葡萄球菌是一种移生于人类皮肤和鼻孔的革兰氏阳性微生物,其引起侵袭性疾病,例如皮肤和软组织感染、菌血症、败血病和心内膜炎(Lowy 1998)。被命名为社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)或医院获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(HA-MRSA)的耐抗生素菌株的出现提出了难以应付的治疗挑战(Klevens 2008)。尽管已经启动了多种疫苗开发工作,但还没有可用的经FDA批准的金黄色葡萄球菌疫苗(DeDent 2012)。

[0135] 金黄色葡萄球菌分离株的特点是在被接种到人类柠檬酸盐血浆或血液中时其形成凝块的能力 (Much 1908)。已经将这种表型与凝固酶 (Coa) 的分泌关联 (Cheng 2010), 凝固酶结合凝血酶原并通过将在外部位点 (exosite) 1 插入它们的 N 端残基来改变酶的活性位点, 由此将纤维蛋白原转化成纤维蛋白 (Friedrich 2003)。Coa 的成熟形式由 N 端 D1 和 D2 结构域构成, 其提供与凝血酶原的缔合及凝血酶原的活化 (Panizzi 2004) (图 1A)。连接结构域 (L) 利用 27 个与纤维蛋白原结合的残基肽的串联重复来连接 D12 和 R 区域 (Panizzi 2006) (图 1A)。凝血酶原 Coa 复合物 (葡萄球菌凝固酶) 将可溶的纤维蛋白原转化成不可溶的纤维蛋白, 形成凝块的网状网络 (Friedrich 2003; Kroh 2009)。

[0136] 当注射到动物中时, 经纯化的 Coa 在体内使血液凝结, 认为这促使葡萄球菌摆脱吞噬细胞的杀死 (Hale 1945; Smith 1956)。最近, 凝固酶分型, 即利用特异性抗血清的柠檬酸盐血浆的金黄色葡萄球菌凝固酶的中和用来区分十种不同的血清学 Coa 类型 (Kanemitsu 2001)。还通过 DNA 测序来分析凝固酶 (Coa) 类型, 其分别揭示了在 D1-2 结构域的 coa 序列内的明显差异, 和在连结和重复区域内很小的差异。为了解决金黄色葡萄球菌 coa 基因内的序列差异是否是阴性选择的结果的问题, 所述阴性选择的结果在受感染的个体对分泌的 Coa 形成抗体应答时可能出现, Watanabe 和同事们对来自 126 种金黄色葡萄球菌分离株的 coa 基因进行了测序, 并同时分析其凝固酶的血清型和克隆群 (CC) 类型。克隆群类型的分析通过检查来自 7 种不同基因 (arc、aro、glp、gmK、pta、tpi 和 yqi) 的序列的多位点序列分型 (MLST) 来完成 (Enright 2000)。除了 CC1 和 CC8 菌株的例外情形, 通过 MLST 确定的分离株的大多数具有相同的 coa 序列类型 (Watanabe 2009)。因为发现相同序列类型的 coa 基因分散穿过 MLST 树, 所以 coa 序列的差异很可能通过水平基因转移 (噬菌体转导或 DNA 转化) 产生 (Watanabe 2009)。与合并的人类免疫球蛋白中和多数但不是全部的凝固酶类型 (Streitfeld 1959) 的观察结果一起, 这些结果表明 coa 基因多样化可以使金黄色葡萄球菌能够回避之前暴露于病原体的宿主的体液免疫应答 (Watanabe 2009)。因此, Coa 可以代表金黄色葡萄球菌的保护性抗原, 应当仔细研究其作为免疫抗原的可能用途。

[0137] 在首次描述葡萄球菌凝固酶后近一个世纪, Bjerketorp 和同事发现了 vWbp (Bjerketorp 2002)。vWbp 是一种分泌蛋白, 其除了结合血管假性血友病因子之外, 还与凝血酶原缔合以将纤维蛋白原转化成纤维蛋白 (Friedrich 2003; Kroh 2009; Bjerketorp 2004)。vWbp 显示与 Coa D12 结构域的序列同源性 (Watanabe 2005; Bjerketorp 2004), 但是其 C 端结构域缺少 Coa 的 L 和 R 结构域, 所述 Coa 的 L 和 R 结构域被独特的 vWF 和纤维蛋白原结合位点取代 (Cheng 2010; Bjerketorp 2002)。基因组测序发现在预测的 D1-2 结构域中有差异的两种不同的 vwb 等位基因 (Watanabe 2005)。单独地用经纯化的重组 Coa 或 vWbp 使小鼠免疫不足以引起对抗相同凝固酶类型金黄色葡萄球菌菌株攻击的保护性免疫应答, 然而, 对抗 Coa 和 vWbp 二者的抗体保护动物以防金黄色葡萄球菌脓肿形成和致死菌血症 (Cheng 2010)。类似地, 缺少 coa 和 vwb 的金黄色葡萄球菌 Newman 突变体, 但不是具有单个基因删除的变体, 在脓肿形成和致死菌血症的小鼠模型中显示明显的缺陷 (Cheng 2010)。Coa 和 vWbp 分泌使得金黄色葡萄球菌在血浆存在下凝集, 导致血栓栓塞损伤及心内膜炎, 并且促进葡萄球菌菌血症的致死结果 (McAdow 2011; Panizzi 2011)。利用单价直接凝血酶抑制剂阻断凝固酶延迟了与致死金黄色葡萄球菌攻击有关的死亡时间, 这进一步突出凝固酶对于葡萄球菌疾病的重要性 (McAdow 2011)。

[0138] 关于凝固酶的早期工作证明,在金黄色葡萄球菌感染后,人类以及动物都产生Coa特异性抗体(Tager 1948;Lominski 1946)。当转移至初次接受试验的兔时,这些抗体可以中和金黄色葡萄球菌凝结,并且在一些情况下,可以赋予对金黄色葡萄球菌攻击的免疫力(Lominski 1949;Lominski 1962)。利用含有凝固酶的制剂的兔的主动免疫可以延长已经通过静脉接种用致死剂量的金黄色葡萄球菌攻击的兔的生命(Boake 1956)。比较不同(噬菌体类型)金黄色葡萄球菌分离株通过凝固酶抗血清对血浆凝块的抑制显示噬菌体类型特异性和非特异性中和二者(Lominski 1946;Lominski 1962;Rammelkamp 1950;Duthie 1952;Harrison 1964)。这些数据支持存在Coa的血清类型的一般概念,Coa的血清类型并非严格地与金黄色葡萄球菌噬菌体类型关联(Rammelkamp 1956)。

[0139] 检查包含吸附至磷酸铝的来自金黄色葡萄球菌菌株M1和Newman的经纯化Coa的经纯化凝固酶类毒素对71名患有慢性疝病的患者的治疗性免疫(Harrison 1963)。与安慰剂相比,凝固酶免疫产生凝固酶特异性抗体效价的增加,但不能改善慢性疝病的临床结果(Harrison 1963)。应注意的是,没有检查中和抗体的发展或类型特异性免疫的可能性(Harrison 1963)。因此,尽管早期工作显示凝固酶亚单位疫苗的临床前功效,但是临床研究在人体试验中没有证明功效。由于这些研究的大多数是在1945至1965年进行的,所以必须考虑用于分离高纯度凝固酶的有限工具以及不能够根据其核苷酸序列对金黄色葡萄球菌菌株或凝固酶疫苗制剂分型。另外,早期研究是在不具备vWbp的知识或不具备Coa和vWbp调节的凝血酶原活化和纤维蛋白原裂解的分子机制的知识下进行的(Friedrich 2003;Kroh 2009)。

[0140] 本发明人最近观察到由金黄色葡萄球菌Newman分泌的凝固酶Coa_{NM}和vWbp_{NM}二者对于该菌株在小鼠中引起脓肿形成和迅速致死菌血症的能力均是足够的(Cheng 2010)。在主动和被动免疫实验中,需要对抗Coa_{NM}和vWbp_{NM}二者的抗体以提供对抗脓肿形成或致死菌血症的保护(Cheng 2010)。基于这些观察结果,本发明人假设凝固酶可以作为引起对抗Coa和vWbp的抗体应答的保护性抗原,其保护动物和人类免受金黄色葡萄球菌疾病(Cheng 2010)。与该模型一致的,coa和vwb的表达是金黄色葡萄球菌菌株的通用特点(Cheng 2010)。应注意的是,金黄色葡萄球菌分离株的coa基因是可变的(McCarthy 2010),在氨基酸序列中甚至具有比蛋白A(spa)基因的串联重复更大的变化;spa中的变异用于流行病学分型实验(Watanabe 2009;Koreen 2004)。还没有从患有明显葡萄球菌疾病的人类分离出不能够表达coa的金黄色葡萄球菌突变体。vwb基因是较不可变的(McCarthy 2010)。分析目前可用的金黄色葡萄球菌基因组序列的vwb同源性,本发明人鉴定了三种等位基因。vwb等位基因的两种在其用于D12结构域的编码序列方面不同(金黄色葡萄球菌N315和USA300是这些等位基因的代表),而第三种等位基因在密码子102中具有核苷酸删除,从而产生在密码子107中导致无义突变的移码突变(金黄色葡萄球菌MRSA252)。

[0141] 通过这些观察结果,使得本发明人能够检查对凝固酶的免疫应答,并且证明对抗D1-2结构域的抗体以类型特异性方式中和葡萄球菌凝结。通过用具有来自主要北美分离株[CC1、CC5(USA100)、CC8(USA300)、CC30、CC45]的抗原决定簇的Coa₄/vWbp₂疫苗来注射小鼠(Klevens 2007;Patel 2011),小鼠能够被保护以对抗几种不同金黄色葡萄球菌菌株的攻击。

[0142] 兔或小鼠的Coa和vWbp免疫主要产生对抗Coa_{NM}或vWbp_{NM}的D1-2结构域的抗体。D1-

2特异性抗体中和金黄色葡萄球菌Newman的凝固酶活性,并且在被转移至首次接受试验的动物时提供对抗致死菌血病的保护。 Coa_{NM} 和 vWbp_{NM} 特异性抗体的中和与疾病保护以类型特异性方式发生,而不是与报道的关于化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) M蛋白 (Lancefield 1928; Lancefield 1962) 或化脓链球菌和无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的菌毛 (T) 抗原 (Mora 2005; Niccitelli 2011) 的类型特异性免疫不同。受菌毛抗原的结构疫苗学方法 (Nuccitelli 2011; Schneewind 2011) 启发,本发明人设计了包含来自北美金黄色葡萄球菌分离株CC1、CC5、CC8、CC30和CC45菌株的主要Coa和vWbp类型的D1-2结构域的两种多肽 (Tenover 2012)。纯化产物 Coa_4 和 vWbp_2 用作抗原,并且引起对抗所检查的每种Coa和vWbp类型的D12结构域的抗体应答。用 $\text{Coa}_4/\text{vWbp}_2$ 使小鼠免疫提供对抗代表性金黄色葡萄球菌CC1、CC5、CC8、CC30和CC45菌株的致死菌血病攻击的保护。因此,已经满足了 $\text{Coa}_4/\text{vWbp}_2$ 疫苗产生对抗Coa和vWbp的对抗临床相关的金黄色葡萄球菌的通用免疫应答的设计标准。除了通过对抗D12结构域的抗体对Coa和vWbp的类型特异性中和,对抗R (Coa) 和CT结构域 (vWbp) 的抗体也提供对抗金黄色葡萄球菌疾病的保护。

[0143] I. 葡萄球菌抗原

[0144] A. 葡萄球菌凝固酶

[0145] 凝固酶是由葡萄球菌属细菌产生的将纤维蛋白原转化成纤维蛋白的酶。 Coa 和 vW_h 在没有蛋白质水解的情况下激活凝血酶原 (Friedrich等人,2003)。凝固酶-凝血酶原复合物将纤维蛋白原作为特异性物质识别,将其直接转化成纤维蛋白。活性复合物的晶体结构显示D1和D2结构域与凝血酶原的结合以及将其 $\text{Ile}^1\text{-Val}^2\text{N-}$ 端插入到 Ile^{16} 袋中,通过构形改变在酶原中诱导功能活性位点 (Friedrich等人,2003)。 α -凝血酶的外部位点I、纤维蛋白原识别位点和凝血酶原上的蛋白外部位点I (proexosite I) 被Coa的D2阻挡 (Friedrich等人,2003)。然而,四聚物 (Coa-凝血酶原)₂复合物的缔合物在新的位点处以高亲和力结合纤维蛋白原 (Panizzi等人,2006)。该模型解释了凝固酶的凝结剂性质和有效的纤维蛋白原转化 (Panizzi等人,2006)。

[0146] 纤维蛋白原是大的糖蛋白 ($M_r \sim 340000$),其由 $\text{A}\alpha$ -链、 $\text{B}\beta$ -链、和 γ -链三对链共价连接以形成“三聚体的二聚体”,其中A和B指通过凝血酶裂解释放的血纤维蛋白肽 (Panizzi等人,2006)。细长的分子折叠成三个单独的结构域,即含有所有六个链的N端的中心片段E和主要由 $\text{B}\beta$ -链、和 γ -链的C端形成的两个侧面片段D。这些球状结构域通过长的三重螺旋结构连接。将人类纤维蛋白原转化成自聚合纤维蛋白的凝固酶-凝血酶原复合物通过循环凝血酶抑制剂而不称为靶标 (Panizzi等人,2006)。因此,葡萄球菌凝固酶绕开了生理学血凝固途径。

[0147] 所有的金黄色葡萄球菌菌株均分泌凝固酶和vWbp (Bjerketorp等人,2004; Field和Smith,1945)。尽管早期工作报道了凝固酶对葡萄球菌感染的发病机理的重要贡献 (Ekstedt和Yotis,1960; Smith等人,1947),但是利用分子基因工具的最近调查研究由于在小鼠中利用心内膜炎、皮肤脓肿和乳腺炎模型没有观察到致病表型而挑战了这个观点 (Moreillon等人,1995; Phonimdaeng等人,1990)。产生金黄色葡萄球菌Newman的同基因变体,即一种完全致病的临床分离株 (Duthie等人,1952),本文中描述了 coa 突变体在小鼠中的致死菌血病和肾脓肿模型中确实显示致病缺陷。以本发明人的经验,金黄色葡萄球菌8325-4不是完全致病的,并且假设在该菌株中的突变损害可能在体内不能显示致病缺陷。

而且,所产生的对抗Coa或vWbp的抗体在某种程度上干扰金黄色葡萄球菌Newman感染的发病机制,反映基因删除的影响。Coa和vWbp有助于葡萄球菌脓肿形成和致死菌血症,并且也可以在亚单元疫苗中用作保护性抗原。

[0148] 生物化学研究记录了对抗Coa和vWbp的抗体的生物学价值。抗体通过结合至抗原和阻止其与凝集因子的缔合来防止Coa-凝血酶原和vWbp-凝血酶原复合物的形成。被动转移研究显示了通过Coa和vWbp抗体保护实验动物对抗葡萄球菌脓肿形成和致命攻击。因此,中和Coa和vWbp的抗体产生了对抗葡萄球菌疾病的免疫保护。

[0149] 早期研究显示需要凝固酶用于抵抗血液中的吞噬作用 (Smith等人,1947),且本发明人观察到 Δ coa突变体在经重组水蛭素处理过的小鼠血液中的相似表型 (参见以下实施例3)。由于vWbp对人类凝血酶原显示比对小鼠凝血酶原高的亲和力,所以怀疑对于 Δ vWbp突变体在人类血液中也是一样的。此外,在脓肿损伤中Coa和vWbp的表达以及它们在嗜酸细胞假包膜环境 (葡萄球菌脓肿群落 (SAC)) 或外周纤维蛋白壁中的显著分布表明分泌的凝固酶有助于这些损害的产生。测试了这种假设, Δ coa突变体在脓肿的产生中确实是有缺陷的。阻止Coa与特异抗体作用的对应测试产生相同的效果。因此,提出纤维蛋白的凝集是葡萄球菌脓肿产生中的关键事件,其可以专门用于开发保护性疫苗。由于它们对人类凝血酶原的重叠作用,Coa和vWbp二者均被认为是用于疫苗开发的优秀候选物。

[0150] A. 葡萄球菌蛋白A (SpA)

[0151] 所有的金黄色葡萄球菌菌株都表达蛋白A (spa) 的结构基因 (Jensen,1958; Said-Salim等人,2003),其细胞壁锚定表面蛋白产物 (SpA) 的经良好表征的致病因子包含五种高度同源的免疫球蛋白结合结构域,它们被命名为E、D、A、B和C (Sjodahl,1977)。这些结构域在氨基酸水平上显示约80%的一致性,长度为56至61个残基,并且以串联重复来组织 (Uhlen等人,1984)。SpA被合成为具有N-端YSIRK/GS信号肽和C-端LPXTG基序分选信号的前体蛋白质 (DeDent等人,2008; Schneewind等人,1992)。在葡萄球菌表面显示大量细胞壁锚定蛋白A (DeDent等人,2007; Sjoquist等人,1972)。其免疫球蛋白结合结构域中的每一个都由以下部分构成:组装成三螺旋束并结合免疫球蛋白G (IgG) 的Fc结构域的反向平行 α -螺旋 (Deisenhofer,1981; Deisenhofer等人,1978)、IgM的VH3重链 (Fab) (即B细胞受体) (Graille等人,2000)、在其A1结构域的血管假性血友病因子[vWF AI是血小板的配体] (O' Seaghdha等人,2006) 和在气道上皮表面上 (Gomez等人,2004; Gomez等人,2007) 显示的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 受体I (TNFRI) (Gomez等人,2006)。

[0152] SpA通过其结合IgG的Fc部分的属性阻碍对葡萄球菌的中性白细胞吞噬作用 (Jensen,1958; Uhlen等人,1984)。而且,SpA能够通过其结合至血管假性血友病因子AI结构域来活化血管内凝集 (Hartleib等人,2000)。血浆蛋白、如纤维蛋白原和纤连蛋白用作葡萄球菌 (CIfA和CIfB) 与血小板整合蛋白GPIIb/IIIa之间的桥梁 (O' Brien等人,2002),该活性通过蛋白A与vWF AI的缔合提供,其允许金黄色葡萄球菌通过GPIIb- α 血小板受体来捕获血小板 (Foster,2005; O' Seaghdha等人,2006)。SpA也结合TNFRI,这种相互作用有助于金黄色葡萄球菌肺炎的发病 (Gomez等人,2004)。SpA通过TNFR1调节的TRAF2、p38/c-Jun激酶、分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和Rel-转录因子NF- κ B来活化促炎信号转导。SpA结合进一步诱导TNFR1脱落,该活性看起来需要TNF-转化酶 (TACE) (Gomez等人,2007)。前述SpA活性全部都是通过其五个IgG结合结构域来调节的,并且可以被最初由它们对蛋白A与人类IgG1之间的

相互作用的需要所限定的相同氨基酸取代干扰 (Cedergren等人, 1993)。

[0153] SpA还通过捕获带有IgM的VH3的Fab区域, 即B细胞受体用作B细胞超级抗原 (Gomez等人, 2007; Goodyear等人, 2003; Goodyear和Silverman, 2004; Roben等人, 1995)。在静脉内攻击后, 葡萄球菌蛋白A (SpA) 突变显示在器官组织中葡萄球菌负载的减少并且急剧地减小形成脓肿的能力 (本文中描述的)。在用野生型金黄色葡萄球菌感染期间, 脓肿在48小时内形成, 并且通过由流入的多形核白细胞 (PMN) 初始标记的苏木精-伊红染色的薄切片肾组织的光学显微镜可检测到。在感染的第5天, 脓肿尺寸增加, 并且包封了被嗜酸粒细胞、无定形物质和大量PMN围绕的葡萄球菌的中心群体。组织病理学显示接近在脓肿损伤中心的葡萄球菌病灶以及健康吞噬细胞的外套膜的PMN的大量坏死。本发明人还在脓肿损伤的外围观察到坏死PMN的边缘, 其毗邻将健康肾组织与感染损伤隔开的嗜酸粒细胞假包膜。缺少蛋白A的葡萄球菌变体不能够产生脓肿的组织病理学特征, 并且在感染期间被清除。

[0154] 在先前的研究中, Cedergren等人 (1993) 设计了Fc片段中五种单独的取代, 所述Fc片段结合SpA、L17D、N28A、I31A和K35A的B结构域的亚结构域。这些作者创造出这些蛋白以测试从Fc₁与SpA的一个结构域的复合物的三维结构收集的数据。Cedergren等人确定了这些突变对稳定性和结合的影响, 但没有设想这种取代用于产生疫苗抗原的用途。

[0155] Brown等人 (1998) 描述了构思为基于SpA设计新蛋白的研究, 新蛋白使得在用作亲和配体时能够使用更有利的洗脱条件。所研究的突变包括Q13A、Q14H、N15A、N15H、F17H、Y18F、L21H、N32H、或K39H的单一突变。Brown等人报道了Q13A、N15A、N15H和N32H取代对离解常数几乎不造成差异, 而Y18F取代导致与野生型SpA相比结合亲和力降低为其1/2。Brown等人还报道了L21H和F17H取代使亲和力分别降低为1/5和1/100。作者还研究了两个串联结构域中相似的取代。因此, Brown等人的研究的目的在于生成具有更有利的洗脱模式的SpA, 因此使用His取代以提供结合亲和力的pH敏感性改变。Brown等人没有提到SpA作为疫苗抗原的用途。

[0156] Graille等人 (2010) 描述了SpA的结构域D和人类IgM抗体的Fab片段的晶体结构。Graille等人通过分析晶体结构将与Fab片段相互作用的D结构域氨基酸残基限定为残基Q26、G29、F30、Q32、S33、D36、D37、Q40、N43、E47或L51, 以及限定了形成结构域D亚结构域之间的界面的氨基酸残基。Graille等人限定了这两种蛋白的分子相互作用, 但是没有提到关于相互作用的残基的取代在产生疫苗抗原中的任何用途。

[0157] O' Seaghdha等人 (2006) 描述了旨在阐明结构域D的哪个亚结构域结合vWF的研究。作者生成了结合Fc或VH3的亚结构域中的单一突变, 即氨基酸残基F5A、Q9A、Q10A、F13A、Y14A、L17A、N28A、I31A、K35A、G29A、F30A、S33A、D36A、D37A、Q40A、E47A、或Q32A。作者发现vWF与相同的结合Fc的亚结构域结合。O' Seaghdha等人限定了负责结合vWF的结构域D的亚结构域, 但是没有提到关于相互作用的残基的取代在产生疫苗抗原中的任何用途。

[0158] Gomez等人 (2006) 描述了通过使用F5A、F13A、Y14A、L17A、N21A、I31A、Q32A和K35A中的单一突变来鉴定负责活化TNFR1的残基。Gomez等人没有提到关于相互作用的残基的取代在产生疫苗抗原中的任何用途。

[0159] 重组的亲亲和标记的蛋白A, 其为包含五种IgG结构域 (EDCAB) (Sjodahl, 1977) 但缺少C-端区域X (Guss等人, 1984) 的多肽, 其是从重组大肠杆菌纯化的并且被用作疫苗抗原 (Stranger-Jones等人, 2006)。由于SpA在结合IgG的Fc部分中的属性, 不能测量对蛋白A的

特异性体液免疫应答 (Stranger-Jones等人,2006)。本发明人已经通过生成SPA-DQ9、10k; D36、37A克服了这个障碍。用重组蛋白A (SpA) 免疫的BLAB/c小鼠显示对抗金黄色葡萄球菌菌株静脉内攻击的显著保护:与野生型相比葡萄球菌负载的2.951对数减少 ($P>0.005$, 学生t检验) (Stranger-Jones等人,2006)。SpA特异性抗体可在脓肿形成之前引起吞噬清除,和/或影响脓肿中将葡萄球菌群体与免疫细胞隔开的前述嗜酸粒细胞屏障的形成,因为这些在用蛋白A突变菌株感染期间不会形成。五种SpA结构域(即由命名为E、D、A、B和C的三螺旋束形成的结构域)的每一种都表现出相似的结合性质 (Jansson等人,1998)。在具有和不具有以非竞争性方式在不同位点结合蛋白A的Fc和VH3 (Fab) 配体的两种情况下,结构域D的溶液和晶体结构均已经解出 (Graillie等人,2000)。已知涉及IgG结合的残基 (FS、Q9、Q10、S11、F13、Y14、L17、N28、I31和K35) 的突变对于vWF AI和TNFR1结合也是需要的 (Cedergren等人,1993;Gomez等人,2006;O' Seaghdha等人,2006),而对于VH3相互作用重要的残基 (Q26、G29、F30、S33、D36、D37、Q40、N43、E47) 显示为对其他结合活性没有影响 (Graillie等人,2000; Jansson等人,1998)。SpA特异性地靶向表达与其表面上的IgM相关的VH3家族的B细胞亚单位,即VH3型B细胞受体 (Roben等人,1995)。在与SpA相互作用后,这些B细胞增殖并致力于细胞凋亡,导致天然样B淋巴细胞(即边缘区B细胞和滤泡B2细胞)的优先和持久性删除 (Goodyear等人,2003;Goodyear等人,2004)。

[0160] 蛋白A表面显示和功能的分子基础。蛋白A作为细菌细胞质中的前体被合成,并且通过其YSIRK信号肽在葡萄球菌的横壁、即细胞分裂隔膜处分泌 (DeDent等人,2007;DeDent等人,2008)。在C-端LPXTG分选信号裂解后,蛋白A通过分选酶A锚定至细菌肽聚糖交联桥 (Mazmanian等人,1999;Schneewind等人,1995;Mazmanian等人,2000)。蛋白A是葡萄球菌的最丰富的表面蛋白;几乎所有的金黄色葡萄球菌菌株都表达该分子 (Cespedes等人,2005; Kennedy等人,2008;Said-Salim等人,2003)。葡萄球菌每个分裂周期转交它们细胞壁的15%至20% (Navarre和Schneewind,1999)。鼠科的水解酶裂解肽聚糖的多糖链和细胞壁肽,由此将蛋白A与其所附的C-端细胞壁二糖四肽释放到细胞外介质中 (Ton-That等人,1999)。因此,通过生理学设计,蛋白A既锚定至细胞壁并在细菌表面显示,又在宿主感染期间被释放到周围组织中 (Marraffini等人,2006)。

[0161] 蛋白A捕获细菌表面上的免疫球蛋白,并且该生物化学活性使得葡萄球菌能够逃脱宿主先天的和获得性的免疫应答 (Jensen,1958;Goodyear等人,2004)。令人关注地,蛋白A的区域X (Guss等人,1984),即将IgG结合结构域束缚至LPXTG分选信号/细胞壁锚的重复结构域可能是葡萄球菌基因组中最可变的部分 (Said-Salim,2003;Schneewind等人,1992)。由三螺旋束形成且命名为E、D、A、B和C的蛋白A (SpA) 的五种免疫球蛋白结合结构域中的每一种都表现出相似的结构和功能性质 (Jansson等人,1998)。在具有和不具有以非竞争性方式在不同位点与蛋白A结合的Fc和V_H3 (Fab) 的两种情况下,结构域D的溶液和晶体结构均已经解出 (Graillie等人,2000)。

[0162] 在晶体结构复合物中,Fab通过由四个VH区域β-链构成的表面与结构域D的螺旋II和螺旋III相互作用 (Graillie 2000)。结构域D的螺旋II的主轴相对链的方向为约50°,并且结构域D的内螺旋部分最接近C0链。Fab上相互作用的位点远离Ig轻链和重链恒定区。相互作用涉及以下结构域D残基:螺旋II的Asp-36、螺旋II和螺旋III之间的环中的Asp-37和Gln-40、以及几个其他残基 (Graillie 2000)。相互作用的两个表面都是主要由极性侧链构

成的,通过相互作用埋藏的在结构域D上的三个带负电荷的残基和在2A2Fab上的两个带正电荷的残基在两个分子间提供整体的静电吸引。在Fab和结构域D之间鉴定的五种极性相互作用中,三种在侧链之间。在Arg-H19和Asp-36之间形成盐桥,并在Tyr-H59和Asp-37之间以及Asn-H82a和Ser-33之间产生氢键。由于在蛋白A的所有五个IgG结合结构域中保留了Asp-36和Asp-37,所以本发明人使这些残基突变。

[0163] 负责Fab结合的SpA-D位点与调节Fc结合的结构域表面在结构上是分开的。Fc γ 与结构域D的相互作用主要涉及螺旋I中的残基而较少涉及螺旋II (Gouda等人,1992; Deisenhofer,1981)。除Gln-32、即两个复合物中的较小接触外,调节Fc γ 相互作用的残基中没有一个涉及Fab结合。为了检查这些不同Ig结合位点之间的空间关系,已经将这些复合物中的SpA结构域重叠以构建Fab、SpA-结构域D和Fc γ 分子之间的复合物的模型。在这个三元模型中,Fab与Fc γ 在没有任何相互作用的空间位阻存在下形成绕螺旋II的相对面的夹心结构。这些发现说明,不管其尺寸多小(即56-61aa),SpA结构域都可以同时显示两种活性,这解释了Fab与单个结构域的相互作用是非竞争性的实验证据。用于SpA-D和Fc γ 之间相互作用的残基为Gln-9和Gln-10。

[0164] 相反地,在结构域D上IgG的Fc部分的占据阻止其与vWF A1以及可能地与TNFR1的相互作用 (O' Seaghdha等人,2006)。对于IgG Fc结合必要的残基的突变 (F5、Q9、Q10、S11、F13、Y14、L17、N28、I31和K35) 对于vWF A1和TNFR1结合也是需要的 (O' Seaghdha等人,2006; Cedergren等人,1993; Gomez等人,2006),而对于VH3相互作用必要的残基 (Q26、G29、F30、S33、D36、D37、Q40、N43、E47) 对IgG Fc、vWF A1或TNFR1的结合活性没有影响 (Jansson等人,1998; Graille等人,2000)。蛋白A免疫球蛋白Fab结合活性靶向表达与其表面上的IgM相关的V_H3家族的B细胞亚单位,即这些分子起VH3型B细胞受体的作用 (Roben等人,1995)。在与SpA相互作用后,这些B细胞迅速增殖,然后致力于细胞凋亡,导致天然样B淋巴细胞(即边缘区B细胞和滤泡B2细胞)的优先和持久性删除 (Goodyear and Silverman,2004; Goodyear and Silverman,2003)。多于40%的循环B细胞成为蛋白A相互作用的靶标,V_H3家族代表赋予对抗病原体的保护性体液应答的人类B细胞受体的最大家族 (Goodyear and Silverman,2004; Goodyear和Silverman,2003)。因此,蛋白A类似于葡萄球菌超级抗原起作用 (Roben等人,1995),虽然后一类分子如SEB、TSST-1、TSST-2与T细胞受体形成复合物以不适当地刺激宿主免疫应答,由此促成葡萄球菌感染的特征性疾病特征 (Roben等人,1995; Tiedemann等人,1995)。这些发现一起证明了蛋白A在产生葡萄球菌感染和在调节宿主免疫应答中的贡献。

[0165] C. 其他葡萄球菌抗原

[0166] 过去几十年的研究鉴定了金黄色葡萄球菌外毒素、表面蛋白以及作为重要致病因子的调节分子 (Foster,2005; Mazmanian等人,2001; Novick,2003)。关于这些基因的调节已经实现了很大的进展。例如,葡萄球菌通过以阈值浓度分泌与同源受体结合的自诱导肽进行细菌普查,由此活化磷酸中继 (phospho-relay) 反应和许多外毒素基因的转录活性 (Novick,2003)。葡萄球菌感染的发病机理依赖于这些致病因子(分泌性外毒素、胞外多糖和表面黏附素)。葡萄球菌疫苗的开发受葡萄球菌入侵机制的多层面属性阻碍。公认的是,活的减毒的微生物是高度有效的疫苗;与通过非复制免疫原产生的那些疫苗相比,由这种疫苗引起的免疫应答通常具有更大的量级并具有更长的持续时间。对此的一个解释可能是

活的减毒的菌株在宿主内产生有限的感染并且模拟自然感染的早期阶段。本发明的实施方案旨在包含以下的组合物和方法：不同的凝固酶多肽和肽，特别地，一种或更多种凝固酶结构域1-2，以及在减轻或免疫对抗感染中使用的革兰氏阳性细菌的其他免疫原性细胞外蛋白、多肽和肽（包括分泌性蛋白或肽和细胞表面蛋白或肽）。在具体的实施方案中，细菌是葡萄球菌属细菌。细胞外蛋白、多肽或肽包括但不限于目标细菌的分泌性蛋白和细胞表面蛋白。

[0167] 人类病原体金黄色葡萄球菌跨过细菌包膜分泌EsxA和EsxB，其为两种ESAT-6样蛋白（Burts等人，2005，其通过引用并入本文）。葡萄球菌的esxA和esxB与六个其他基因成簇以转录：esxA esaA essA esaB essB essC esaC esxB。首字母缩略词esa、ess和esx分别代表ESAT-6分泌辅助、ESAT-6分泌系统和细胞外ESAT-6分泌，这取决于编码的蛋白质对分泌起辅助（esa）作用或直接（ess）作用，还是在细胞外环境中分泌（esx）。八个基因的整个簇在本文中被称为Ess簇。EsxA、esxB、essA、essB和essC全都是EsxA和EsxB的合成或分泌所需要的。不能产生EsxA、EsxB和EssC的突变体在金黄色葡萄球菌鼠科脓肿中显示缺陷，这表明该专门的分泌系统可能是人类细菌发病机理的一般策略。关于多种抗原，包括EspA、EspB、Rv3483c和Rv3615c，已经报道了通过ESX-1途径分泌非WXG100基质。还已经表明，替代的ESX-5途径在病原性分枝杆菌中分泌WXG100和非WXG蛋白二者（Abdallah等人，2007；Abdallah等人，2006）。

[0168] 金黄色葡萄球菌Ess途径可以被视为具有专门的运输成分（Ess）、辅助因子（Esa）和同源分泌基质（Esx）的分泌模型。EsxA和EsxB分泌需要EssA、EssB和EssC。因为EssA、EssB和EssC预计为跨膜蛋白，所以设想这些蛋白质形成分泌装置。在ess簇中的蛋白的一些可以主动地运输分泌的基质（作为马达）而其他的可以调节运输（调节器）。调节可以实现，但不应限于分泌性多肽的转录或转译后机制、分选特异性基质至限定位置（例如细胞外介质或宿主细胞）、或为感染期间的分泌事件计时。这时，不清楚所有分泌的Esx蛋白是起毒素作用还是直接促进发病。

[0169] 葡萄球菌依赖于经表面蛋白调节的至宿主细胞的黏附或对组织的入侵作为逃脱免疫防御的策略。此外，在感染期间，金黄色葡萄球菌利用表面蛋白来使铁与宿主隔绝。涉及葡萄球菌发病机理的表面蛋白的大部分具有C-端分选信号，即它们通过分选酶共价地连接至细胞壁包膜。此外，缺少表面蛋白锚定所需的基因，即分选酶A和B的葡萄球菌菌株，在疾病的若干不同小鼠模型中显示明显的致病缺陷。因此，由于相应的基因对于葡萄球菌疾病的进展是必要的，所以表面蛋白抗原代表了确认的疫苗靶标，其可以被利用在本发明的不同实施方案中。分选酶超级家族是负责将表面蛋白致病因子锚定至肽聚糖细胞壁层的革兰氏阳性转肽酶。在金黄色葡萄球菌中已经鉴定了两种分选酶异构体，即SrtA和SrtB。已经表明这些酶识别在基质蛋白中的LPXTG基序。SrtB异构体在血红素铁获取和铁体内平衡中看起来是重要的，而SrtA异构体通过调节细菌的经由将黏附素和其他蛋白质共价锚定至细胞壁肽聚糖而黏附至宿主组织的能力而在革兰氏阳性细菌的发病机理中起关键作用。在一些实施方案中，凝固酶变体，特别是本文中描述的一种或更多种结构域1-2可以与其他葡萄球菌蛋白如Coa、Eap、Ebh、Emp、EsaC、EsaB、EsxA、EsxB、Hla、SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、IsdC、SasF、vWbp和/或vWh蛋白质组合使用。

[0170] 本发明的一些方面包括涉及包含以下的蛋白质组合物的方法和组合物：多肽，肽，

或编码凝固酶变体、特别是本文中描述的一种或更多种凝固酶结构域1-2的核酸,和其他葡萄球菌抗原,例如通过Ess途径运输的其他蛋白质,或分选酶基质。这些蛋白质可以通过删除、插入和/或取代来改性。

[0171] Esx多肽包括来自葡萄球菌属中的细菌的Esx蛋白的氨基酸序列。Esx序列可以来自具体的葡萄球菌物种,例如金黄色葡萄球菌,并且可以来自具体的菌株,例如Newman。在一些实施方案中,EsxA序列是来自菌株Mu50的SAV0282(对于Newman其为相同的氨基酸序列),并且可以用Genbank登录号Q99WU4(gi|68565539)访问,其通过引用并入本文。在其他实施方案中,EsxB序列是来自菌株Mu50的SAV0290(对于Newman其为相同的氨基酸序列),并且可以用Genbank登录号Q99WT7(gi|68565532)访问,其通过引用并入本文。在其他实施方案中,可以使用通过Ess途径运输的其他多肽,其序列可以由本领域技术人员利用数据库和网络可获取资源来确定。

[0172] 分选酶基质多肽包括但不限于来自葡萄球菌属的细菌的SdrC、SdrD、SdrE、IsdA、IsdB、ClfA、ClfB、IsdC或SasF蛋白的氨基酸序列。分选酶基质多肽序列可以来自特定的葡萄球菌物种,例如金黄色葡萄球菌,并且可以来自特定的菌株,例如Newman。在一些实施方案中,SdrD序列来自菌株N315并且可以用Genbank登录号NP_373773.1(gi|15926240)访问,其通过引用并入本文。在其他实施方案中,SdrE序列来自菌株N315并且可以用Genbank登录号NP_373774.1(gi|15926241)访问,其通过引用并入本文。在其他实施方案中,IsdA序列是来自菌株Mu50的SAV1130(其为对于Newman相同的氨基酸序列),并且可以用Genbank登录号NP_371654.1(gi|15924120)访问,其通过引用并入本文。在其他实施方案中,IsdB序列是来自菌株Mu50的SAV1129(对于Newman其为相同的氨基酸序列),并且可以用Genbank登录号NP_371653.1(gi|15924119)访问,其通过引用并入本文。在其他实施方案中,可以使用通过Ess途径运输或通过分选酶加工的其他多肽,其序列可以由本领域技术人员利用数据库和网络可获取资源来确定。

[0173] 在本发明的环境中可以使用的各种蛋白质的实例可以通过分析细菌基因组的数据库提交内容来确定,其包括但不限于登录号NC_002951(GI:57650036和GenBank CP000046)、NC_002758(GI:57634611和GenBank BA000017)、NC_002745(GI:29165615和GenBank BA000018)、NC_003923(GI:21281729和GenBank BA000033)、NC_002952(GI:49482253和GenBank BX571856)、NC_002953(GI:49484912和GenBank BX571857)、NC_007793(GI:87125858和GenBank CP000255)、NC_007795(GI:87201381和GenBank CP000253),其中的每一个都通过引用并入。

[0174] 如本文中使用的,“蛋白质”或“多肽”是指包含至少十个氨基酸残基的分子。在一些实施方案中,使用了蛋白质或多肽的野生型版本,然而,在本发明的许多实施方案中,使用经改性的蛋白质或多肽来产生免疫应答。以上描述的术语可以交换地使用。“经改性的蛋白质”或“经改性的多肽”或“变体”是指相对于野生型蛋白质或多肽而言其化学结构、特别是其氨基酸序列发生改变的蛋白质或多肽。在一些实施方案中,经改性的/变体的蛋白质或多肽具有至少一种经改性的活性或功能(认识到蛋白质或多肽可以具有多种活性或功能)。特别地设想的是,经改性的/变体的蛋白质或多肽在一种活性或功能方面可能改变了,但在其他方面还保留了野生型活性或功能,例如免疫原性。

[0175] 在一些实施方案中,蛋白质或多肽(野生型或经改性的)的大小可以包括但不限于

5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500个或更大,和其中可得到的任何范围的氨基分子,或本文中描述或参考的相应氨基酸序列的衍生物。设想多肽可以通过截短,即使其短于它们相应的野生型形式来突变,但是它们也可以通过融合或缀合具有特殊功能(例如,用于靶向或定位,用于提高免疫原性,用于纯化目的等)的异源蛋白质序列来改变。

[0176] 如本文中使用的,“氨基分子”是指本领域中已知的任何氨基酸、氨基酸衍生物、或氨基酸模拟物。在一些实施方案中,蛋白质分子的残基是连续的,没有任何非氨基酸分子打断氨基分子残基的序列。在其他实施方案中,序列可以包含一种或更多种非氨基分子部分。在具体的实施方案中,蛋白质分子的残基的序列可以被一种或更多种非氨基分子部分打断。

[0177] 因此,术语“蛋白质组合物”涵盖以下氨基分子序列:所述氨基分子序列包含在天然合成的蛋白质中的20个普通氨基酸中的至少一种,或至少一种经改性的或不寻常的氨基酸。

[0178] 蛋白质组合物可以通过本领域技术人员已知的任何技术来制造,包括(i)通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,(ii)从天然来源分离蛋白质化合物,或(iii)化学合成蛋白质物质。先前已经公开了各种基因的核苷酸以及蛋白质、多肽和肽序列,并且其可以在公认的计算机化数据库中找到。一种这样的数据库为National Center for Biotechnology Information's Genbank and GenPept数据库(在万维网 ncbi.nlm.nih.gov/上)。使用本文中公开的技术或本领域普通技术人员应当知道的技术可以扩增和/或表达这些基因的编码区域。

[0179] 本发明的凝固酶、特别是凝固酶结构域D1-2、SpA和其他多肽的氨基酸序列变体可以是取代变体、插入变体或删除变体。与野生型相比,本发明的多肽的变体可以影响多肽的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更多个非连续的或连续的氨基酸。变体可以包含与本文中提供或参考的任何序列如序列表格1 (SEQ ID NO:33-37) 或序列表格2 (SEQ ID NO:38-41) 的序列至少50%、60%、70%、80%或90%、包括其间所有值和范围一致的氨基酸序列。变体可以包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个取代氨基酸。设想通过Ess途径加工或分泌的多肽或其他表面蛋白(参见表1)或来自任何葡萄球菌物种和菌株的分选酶基质用于本文中描述的组合物和方法中。

[0180] 删除变体一般缺少天然或野生型蛋白质中的一个或更多个残基。可以删除单个残基或者可以删除多个连续的氨基酸。可以将终止密码子引入(通过取代或插入)到编码的核酸序列中以生成截短的蛋白质。插入突变体通常涉及在多肽的非端点处添加物质。这可以

包括插入一个或更多个残基。也可以生成被称为融合蛋白的末端添加。这些融合蛋白包括本文中描述的或参考的一种或更多种肽或多肽的多聚体或串联体。

[0181] 取代变体通常含有在蛋白质内的一个或更多个位点处将一个氨基酸交换为另一个,并可以设计为调整多肽的一种或更多种性质,而有或没有其他功能或性质的丢失。取代可以是保守性的,即一个氨基酸用一个相似形状和电荷的氨基酸取代。保守性取代在本领域是众所周知的,包括例如以下的变化:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸盐到谷氨酸盐;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酸到天冬酰胺;谷氨酸盐到天冬氨酸盐;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬酰胺或谷氨酸;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;蛋氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者,取代可以是非保守性的,使得影响多肽的功能或活性。非保守性的改变一般涉及用化学上不同的残基来取代残基,例如用非极性或不带电荷的氨基酸取代极性 or 带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0182] 表2:金黄色葡萄球菌菌株的示例性表面蛋白

[0183]

SAV#	SA#	表面	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0111	SA0107	Spa	492	450	450	520	516	492
SAV2503	SA2291	FnBPA	1015	1038	1038	741	-	1015
SAV2502	SA2290	FnBPB	943	961	961	677	965	957
SAV0811	SA0742	ClfA	946	935	989	933	1029	928
SAV2630	SA2423	ClfB	907	877	877	913	873	905
Np	Np	Cna	1183	-	-	-	1183	1183
SAV0561	SA0519	SdrC	955	953	953	947	906	957
SAV0562	SA0520	SdrD	1347	1385	1385	1315	-	1365
SAV0563	SA0521	SdrE	1141	1141	1141	1166	1137	1141
Np	Np	Pls	-	-	-	-	-	-
SAV2654	SA2447	SasA	2275	2271	2271	2271	1351	2275
SAV2160	SA1964	SasB	686	2481	2481	2481	2222	685
	SA1577	SasC	2186	213	2186	2186	2189	2186
SAV0134	SA0129	SasD	241	241	241	241	221	241
SAV1130	SA0977	SasE/IsdA	350	350	350	350	354	350
SAV2646	SA2439	SasF	635	635	635	635	627	635
SAV2496		SasG	1371	525	927	-	-	1371
SAV0023	SA0022	SasH	772	-	772	772	786	786
SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	-	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

[0184] 本发明的蛋白质可以是重组的,或体外合成的。或者,非重组的或重组的蛋白质可

以从细菌中分离。还设想可以在本发明的组合物和方法中实施含有这种变体的细菌。因此，蛋白质不需要进行分离。

[0185] 术语“功能等同的密码子”在本文中用来指编码相同氨基酸的密码子，例如用于精氨酸或丝氨酸的六个密码子，并且还指编码生物等同的氨基酸的密码子(参见以下表3)。

[0186] 表3:密码子表

氨基酸			密码子					
[0187]	丙氨酸	Ala A	GCA	GCC	GCG	GCU		
	半胱氨酸	Cys C	UGC	UGU				
	天冬氨酸	Asp D	GAC	GAU				
	谷氨酸	Glu E	GAA	GAG				
	苯丙氨酸	Phe F	UUC	UUU				
	甘氨酸	Gly G	GGA	GGC	GGG	GGU		
	组氨酸	His H	CAC	CAU				
	异亮氨酸	Ile I	AUA	AUC	AUU			
	赖氨酸	Lys K	AAA	AAG				
	亮氨酸	Leu L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
	蛋氨酸	Met M	AUG					
	天冬酰胺	Asn N	AAC	AAU				
	脯氨酸	Pro P	CCA	CCC	CCG	CCU		
	谷氨酰胺	Gln Q	CAA	CAG				
	精氨酸	Arg R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
	丝氨酸	Ser S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
	苏氨酸	Thr T	ACA	ACC	ACG	ACU		
	缬氨酸	Val V	GUA	GUC	GUG	GUU		
	色氨酸	Trp W	UGG					
	酪氨酸	Tyr Y	UAC	UAU				

[0188] 还应理解氨基酸和核酸序列可以包含另外的残基，例如分别包含另外的N端或C端氨基酸，或者5'或3'序列，并且其仍基本上如在本文所公开的序列之一中所述的，只要序列符合上述标准即可，包括在涉及蛋白质表达的情况下维持生物蛋白活性(例如免疫原性)。末端序列的添加特别地适用于例如可以包含在编码区的5'部分或3'部分侧面的各种非编码序列的核酸序列。

[0189] 以下是基于改变蛋白质的氨基酸以生成变体多肽或肽的讨论。例如，一些氨基酸可以取代为蛋白质结构中的其他氨基酸，具有或没有明显的与结构、如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点相互作用的结合能力的损失。由于正是蛋白质的相互作用的能力和本性限定蛋白质的功能活性，所以可以在蛋白质序列中和在其基础上的DNA编码序列中进行一些氨基酸取代，从而产生具有期望性质的蛋白质。因此本发明人设想，在基因的DNA序列中可以进行各种变化。

[0190] 设想在本发明的组合物中，每ml具有约0.001mg至约10mg的总的多肽、肽和/或蛋白质。组合物中蛋白质的浓度可以是大约、至少约或至多约0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、

7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/ml或更大(或者其中可得到的任何范围)。其中,大约、至少约或至多约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%可以是凝固酶结构域1-2或凝固酶或其变体,并可以与其他肽或多肽、例如其他细菌肽和/或抗原组合使用。

[0191] 本发明设想了施用葡萄球菌凝固酶结构域1-2或其变体以实现对抗与葡萄球菌病原体感染相关的疾病或病情的进展的保护性治疗或治疗性作用。

[0192] 在一些方面,在制备治疗或预防葡萄球菌感染方面有效的免疫原性组合物中使用葡萄球菌抗原的组合。葡萄球菌感染通过几个不同阶段进展。例如,葡萄球菌生命周期涉及共生移生、通过到达邻近的组织或血流来引发感染、和/或在血液中的厌氧繁殖。金黄色葡萄球菌致病决定子和宿主防御机制之间的相互作用会诱导并发症,例如心内膜炎、转移性脓肿形成和败血症。细菌表面上不同的分子涉及感染周期的不同步骤。特定抗原的组合会引起保护以对抗葡萄球菌感染的多个阶段的免疫应答。免疫应答的有效性可以在动物模型试验中和/或利用调理吞噬试验来测量。

[0193] B. 多肽和多肽产生

[0194] 本发明描述了用于本发明的各种实施方案的多肽、肽和蛋白质及其免疫原性片段。例如,分析特异性多肽的免疫应答,或使用特异性多肽来引发免疫应答。在具体的实施方案中,本发明的蛋白质的全部或一部分还可以根据常规技术在溶液中或在固体支撑体上合成。各种自动的合成器是市场上可购得的,并可以根据已知的方案来使用。参见例如Stewart和Young, (1984); Tam等, (1983); Merrifield, (1986); 以及Barany和Merrifield (1979), 每一个都通过引用并入本文。

[0195] 或者,可以采用重组DNA技术,其中将编码本发明的肽的核苷酸序列插入到表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中,并在适合于表达的条件下培养。

[0196] 本发明的一个实施方案包括基因转移到细胞用于多肽或肽的产生和/或呈递的用途,所述细胞包括微生物。可以将关注的多肽或肽的基因转移到合适的宿主细胞中,然后在合适的条件下培养细胞。重组表达载体的产生和其中包含的元素是现有技术中众所周知的,并且在本文中简单讨论。或者,待产生的蛋白质可以是通常由经分离或纯化的细胞合成的内源性蛋白质。

[0197] 本发明的另一实施方案使用用病毒载体转染的自体B淋巴细胞系,所述病毒载体表达免疫产物,更具体地,表达具有免疫原性活性的蛋白质。哺乳动物宿主细胞系的其他实例包括但不限于Vero和HeLa细胞,其他B细胞系或T细胞系,例如CEM、721.221、H9、Jurkat、Raji,以及中国仓鼠卵巢细胞、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、3T3、RIN和MDCK细胞的细胞系。此外,可以选择调节所插入序列的表达,或者以期望的方式改性和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这种改性(例如糖基化)和加工(例如裂解)对于蛋白质的功能可以是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白质的转译后加工和改性的特征性和特异性机制。可以

选择合适的细胞系或宿主体系以确保所表达的外源蛋白的适当改性和加工。

[0198] 可以使用多种选择系统,其包括但不限于分别在tk-细胞、hgprt-细胞或aprt-细胞中的HSV胸腺嘧啶激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因。抗代谢耐受性也可以用作选择的基础:对于二氢叶酸还原酶(dhfr),其赋予对甲氧苄氨嘧啶和甲氨蝶呤的耐药性;对于谷丙转氨酶(gpt),其赋予对霉酚酸的耐药性;对于neo,其赋予对氨基糖苷类G418的耐药性,而对于hygro,其赋予对潮霉素的耐药性。

[0199] 动物细胞可以以两种模式在体外繁殖:作为非锚定依赖的细胞,其在遍及培养物主体的悬浮液中生长;或者作为锚定依赖的细胞,其需要附接于固体基质以用于其繁殖(即单层型细胞生长)。

[0200] 来自连续的确立细胞株的非锚定依赖或悬浮培养物是细胞和细胞产物的大规模产生最广泛使用的方法。然而,悬浮培养的细胞具有限制,例如致肿瘤性和比粘连细胞低的蛋白质产量。

[0201] 在本文中具体提及蛋白质的情况下,优选参考天然或重组蛋白或任选地其中已经移除任何信号序列的蛋白质。蛋白质可以直接从葡萄球菌菌株分离或通过重组DNA技术产生。可以将蛋白质的免疫原性片段并入本发明的免疫原性组合物中。这些是包含从蛋白质的氨基酸序列连续地取得的至少10个氨基酸、20个氨基酸、30个氨基酸、40个氨基酸、50个氨基酸或100个氨基酸、包括其间所有数值和范围的片段。此外,这种免疫原性片段与对抗葡萄球菌蛋白所产生的抗体、或与通过用葡萄球菌感染哺乳动物宿主所产生的抗体免疫地反应。免疫原性片段还包括当以有效剂量施用(单独或作为与载体结合的半抗原)时引起对抗葡萄球菌感染的保护性或治疗性免疫应答的片段,在一些方面,其保护以对抗金黄色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌感染。这种免疫原性片段可以包含例如缺少N-端前导序列的蛋白质,和/或跨膜结构域和/或C-端锚结构域的蛋白质。在一个优选方面,根据本发明的免疫原性片段基本上包含蛋白质的所有胞外结构域,所述蛋白质具有与选自本文中描述或参考的多肽的节段的序列至少85%的一致性、至少90%的一致性、至少95%的一致性或至少97%到99%的一致性,包括其间所有的值和范围。

[0202] 本发明的免疫原性组合物中还包含由一种或更多种葡萄球菌蛋白或葡萄球菌蛋白的免疫原性片段构成的融合蛋白。这种融合蛋白可以重组地制造,并且可以包含至少1、2、3、4、5或6种葡萄球菌蛋白或节段的一部分。或者,融合蛋白可以包含至少1、2、3、4或5种葡萄球菌蛋白的多个部分。这些可以结合不同的葡萄球菌蛋白和/或多个相同蛋白质或蛋白质片段、或相同蛋白质中的免疫原性片段(形成多聚体或串联体)。或者,本发明还包括葡萄球菌蛋白或其免疫原性片段的单个融合蛋白作为具有异源序列的融合蛋白,所述异源序列例如为T细胞表位或纯化标记的提供者,例如为: β -半乳糖苷酶;谷胱甘肽-S-转移酶;绿色荧光蛋白(GFP);表位标记,如FLAG、myc标记、聚组氨酸;或病毒表面蛋白,如流感病毒血凝素;或细菌蛋白,如破伤风类毒素、白喉类毒素或CRM197。

[0203] II. 核酸

[0204] 在一些实施方案中,本发明涉及编码本发明的蛋白质、多肽或肽的重组多核苷酸。包括关于凝固酶、凝固酶结构域1-2、SpA和其他细菌蛋白的核酸序列,其全部通过引用并入本文,并且可以用来制备肽或多肽。

[0205] 如在本申请中所使用的,术语“多核苷酸”是指重组的或已经从总的基因组核酸中

分离的核酸分子。术语“多核苷酸”涵盖寡核苷酸(长度为具有100个或更少残基的核酸),重组的载体,包括例如质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。在一些方面,多核苷酸包括基本上从其天然存在的基因或蛋白编码序列中分离出来的调控序列。多核苷酸可以是单链的(编码链或反义链)或双链的,并且可以是RNA、DNA(基因组DNA、cDNA或合成DNA)、其类似物或其组合。其他编码或非编码序列可以、但不必须地存在于多核苷酸内。

[0206] 在这方面,术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用来指编码蛋白质、多肽或肽的核酸(包括适当转录、转译后改性或定位所需的任何序列)。如本领域技术人员会理解的,该术语涵盖表达或可以调整以适合于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体的基因组序列、表达盒、cDNA序列和更小的改造核酸节段。编码多肽的全部或一部分的核酸可以含有编码本文中描述或参考的一种或更多种氨基酸序列的多核苷酸中的10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000、或更多个核苷酸、核苷或碱基对,包括其间的所有值和范围的连续核酸序列。还设想了特定的多肽可以由以下核酸进行编码:其包含具有稍微不同的氨基酸序列的变化,但是编码相同或基本上相似的蛋白质(参见以上表3)。

[0207] 在具体的实施方案中,本发明涉及经分离的核酸节段和包含编码一种或更多种凝固酶结构域1-2或其变体的核酸序列的重组载体。术语“重组的”可以与多核苷酸或多肽一起使用,并且通常是指在体外产生和/或操纵的或者为这种分子的复制产物的多肽或多核苷酸。

[0208] 在其他实施方案中,本发明涉及经分离的核酸节段和包含以下核酸序列的重组载体:所述核酸序列编码凝固酶多肽或肽或其变体以在对象中产生免疫应答。在各种实施方案中,可以在基因疫苗中使用本发明的核酸。

[0209] 本发明中使用的核酸节段可以与其他核酸序列,如启动子、多腺苷酸化信号、另外的限制酶位点、多克隆位点、其他编码节段等组合使用,使得其总长度可以明显地变化。因此,设想可以采用几乎任何长度的核酸片段,其中总长度优选地由在计划的重组核酸方案中的使用和制备的便利性来限制。在一些情况下,核酸序列可以利用另外的异源编码序列来编码多肽序列,例如以提供多肽的纯化、运输、分泌、转译后改性,或提供治疗效益,例如靶向或功效。如以上所讨论的,可以将标记或其他异源的多肽添加到经改性的多肽编码序列,其中“异源的”是指与经改性的多肽不相同的多肽。

[0210] 在一些其他实施方案中,本发明涉及经分离的核酸节段和在其序列内包含编码序列表格1(SEQ ID NO:33-37)或序列表格2(SEQ ID NO:38-41)的序列之一的连续核酸序列、或编码凝固酶或其他分泌性致病因子和/或表面蛋白的任何其他核酸序列的重组载体,其中所述表面蛋白包括通过Ess途径运输的、由分选酶加工的蛋白、或者通过引用并入的蛋白。

[0211] 在一些实施方案中,本发明提供与本文公开的序列具有基本一致性的多核苷酸变体;与使用本文所述方法(例如使用标准参数的BLAST分析)的本发明多核苷酸序列相比,包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高、包括其间的所有值和范围的序列一致性的那些多核苷酸变体。

[0212] 本发明还设想与所有以上描述的多核苷酸互补的多核苷酸的用途。

[0213] A. 载体

[0214] 本发明的多肽可以由包含在载体中的核酸分子来编码。术语“载体”用来指其中可以插入异源核酸序列以用于引入细胞的载体核酸分子,在所述细胞中其可以复制和表达。核酸序列可以是“异源的”,这表示该核酸序列处于对于其中引入载体的细胞而言或者对于被引入的核酸而言非原有的环境中,其包含与细胞或核酸中的序列同源的序列,但在宿主细胞或核酸内通常找不到该核酸序列的位置中。载体包括DNA、RNA、质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC)。本领域技术人员有能力通过标准重组技术构建载体(例如Sambrook等,2001;Ausubel等,1996,两者都通过引用并入本文)。除了编码一种或更多种凝固酶结构域1-2或其变体之外,载体还可以编码其他多肽序列,例如一种或更多种其他细菌肽、标记物、或免疫原性增强的肽。编码这种融合蛋白的有用载体包括pIN载体(Inouye等人,1985)、编码一段组氨酸的载体、和pGEX载体,其用于产生谷胱甘肽S-转移酶(GST)可溶解的融合蛋白以用于之后的纯化和分离或裂解。

[0215] 术语“表达载体”是指含有对能够被转录的基因产物的至少部分编码的核酸序列的载体。在一些情况下,RNA分子然后被转译为蛋白质、多肽或肽。表达载体可以含有各种“控制序列”,所述“控制序列”是指在特定宿主生物体中有效连接的编码序列的转录和可能的转译所需要的核酸序列。除了控制转录和转译的控制序列之外,载体和表达载体还可以含有用于其他功能的核酸序列,并且在本文中进行描述。

[0216] 1. 启动子和增强子

[0217] “启动子”是控制序列。启动子一般是控制转录的启动和速度的核酸序列的区域。其可以含有遗传因子,在所述遗传因子处调节蛋白和分子可以结合例如RNA聚合酶和其他转录因子。短语“有效地定位”、“有效地连接”、“处于控制之下”和“处于转录控制之下”表示启动子相对于核酸序列处于适当的功能位置和/或取向,以控制转录启动和该序列的表达。启动子可以或可以不与“增强子”一起使用,所述“增强子”是指在核酸序列的转录激活中涉及的顺式作用调控序列。

[0218] 因此,采用在选择用于表达的细胞类型或生物体中有效地指挥DNA节段的表达的启动子和/或增强子可能是重要的。分子生物学技术领域技术人员一般知道启动子、增强子、和细胞类型组合用于蛋白质表达的用途(参见Sambrook等人,2001,其通过引用并入本文)。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的或诱导型的,并且在一些实施方案中,在规定条件下可以引导引入的DNA节段的高水平表达,例如重组蛋白或肽的大规模产生。

[0219] 在本发明中可以采用各种要素/启动子以调节基因的表达。这样的诱导型要素是可以响应于特异性刺激而被激活的核酸序列的区域,其实例包括但不限于免疫球蛋白重链(Banerji等人,1983;Gilles等人,1983;Grosschedl等人,1985;Atchinson等人,1986,1987;Imler等人,1987;Weinberger等人,1984;Kiledjian等人,1988;Porton等人,1990)、免疫球蛋白轻链(Queen等人,1983;Picard等人,1984)、T细胞受体(Luria等人,1987;

Winoto等人,1989;Redondo等人,1990)、HLA DQ和/或DQ α 和/或DQ β (Sullivan等人,1987)、 β 干扰素 (Goodbourn等人,1986;Fujita等人,1987;Goodbourn等人,1988)、白介素-2 (Greene等人,1989)、白介素-2受体 (Greene等人,1989;Lin等人,1990)、MHC II类5 (Koch等人,1989)、MHC II类HLA-DR α (Sherman等人,1989)、 β -肌动蛋白 (Kawamoto等人,1988;Ng等人,1989)、肌肉肌酸激酶 (MCK) (Jaynes等人,1988;Horlick等人,1989;Johnson等人,1989)、前白蛋白 (甲状腺素运载蛋白) (Costa等人,1988)、弹性蛋白酶I (Ornitz等人,1987)、金属硫蛋白 (MTII) (Karin等人,1987;Culotta等人,1989)、胶原酶 (Pinkert等人,1987;Angel等人,1987)、白蛋白 (Pinkert等人,1987;Tronche等人,1989,1990)、 α -胎蛋白 (Godbout等人,1988;Campere等人,1989)、 γ -球蛋白 (Bodine等人,1987;Perez-Stable等人,1990)、 β -球蛋白 (Trudel等人,1987)、c-fos (Cohen等人,1987)、c-Ha-Ras (Triesman,1986;Deschamps等人,1985)、胰岛素 (Edlund等人,1985)、神经细胞黏附分子 (NCAM) (Hirsh等人,1990)、 α 1-抗胰蛋白酶 (Latimer等人,1990)、H2B (TH2B) 组蛋白 (Hwang等人,1990)、小鼠和/或I型胶原蛋白 (Ripe等人,1989)、葡萄糖调控蛋白 (GRP94和GRP78) (Chang等人,1989)、大鼠生长激素 (Larsen等人,1986)、人类血清淀粉样蛋白A (SAA) (Edbrooke等人,1989)、肌钙蛋白I (TN I) (Yutzey等人,1989)、血小板衍生生长因子 (PDGF) (Pech等人,1989)、杜氏肌营养不良 (Klamut等人,1990)、SV40 (Banerji等人,1981;Moreau等人,1981;Sleigh等人,1985;Firak等人,1986;Herr等人,1986;Imbra等人,1986;Kadesch等人,1986;Wang等人,1986;Ondek等人,1987;Kuhl等人,1987;Schaffner等人,1988)、多瘤病毒 (Swartzendruber等人,1975;Vasseur等人,1980;Katinka等人,1980,1981;Tyndell等人,1981;Dandolo等人,1983;de Villiers等人,1984;Hen等人,1986;Satake等人,1988;Campbell等人,1988)、逆转录酶病毒 (Kriegler等人,1982,1983;Levinson等人,1982;Kriegler等人,1983,1984a,b,1988;Bosze等人,1986;Miksicek等人,1986;Celandier等人,1987;Thiesen等人,1988;Celandier等人,1988;Choi等人,1988;Reisman等人,1989)、乳头状瘤病毒 (Campo等人,1983;Lusky等人,1983;Spandidos and Wilkie,1983;Spalholz等人,1985;Lusky等人,1986;Cripe等人,1987;Gloss等人,1987;Hirochika等人,1987;Stephens等人,1987)、乙肝病毒 (Bulla等人,1986;Jameel等人,1986;Shaul等人,1987;Spandau等人,1988;Vannice等人,1988)、人类免疫缺陷病毒 (Muesing等人,1987;Hauber等人,1988;Jakobovits等人,1988;Feng等人,1988;Takebe等人,1988;Rosen等人,1988;Berkhout等人,1989;Laspias等人,1989;Sharp等人,1989;Braddock等人,1989)、巨细胞病毒 (CMV) IE (Weber等人,1984;Boshart等人,1985;Foecking等人,1986)、长臂猿白血病病毒 (Holbrook等人,1987;Quinn等人,1989)。

[0220] 诱导型要素包括但不限于MT II-佛波酯 (TFA) /重金属 (Palmiter等人,1982;Haslinger等人,1985;Searle等人,1985;Stuart等人,1985;Imagawa等人,1987;Karin等人,1987;Angel等人,1987b;McNeall等人,1989);MMTV (小鼠乳腺癌病毒)-糖皮质激素 (Huang等人,1981;Lee等人,1981;Majors等人,1983;Chandler等人,1983;Lee等人,1984;Ponta等人,1985;Sakai等人,1988); β -干扰素-聚(rI)x/聚(rc) (Tavernier等人,1983);腺病毒5E2-E1A (Imperiale等人,1984);胶原酶-佛波酯 (TPA) (Angel等人,1987a);溶基质素-佛波酯 (TPA) (Angel等人,1987b);SV40-佛波酯 (TPA) (Angel等人,1987b);鼠科MX基因-干扰素,新城疫病毒 (Hug等人,1988);GRP78基因-A23187 (Resendez等人,1988); α -2-巨球蛋白-IL-6 (Kunz等人,1989);波形蛋白-血清 (Rittling等人,1989);MHC I类基因H-2 κ b干扰


素(Blonar等人,1989);HSP70-E1A/SV40大T抗原(Taylor等人,1989,1990a,1990b);增殖蛋白-佛波酯/TPA(Mordacq等人,1989);肿瘤坏死因子-PMA(Hensel等人,1989);和促甲状腺激素 α 基因-甲状腺激素(Chatterjee等人,1989)。

[0221] 据认为用于控制编码本发明的多核苷酸的肽或蛋白质表达的特定启动子不是关键性的,只要其能够在靶细胞、优选细菌细胞中表达多核苷酸即可。在靶向人类细胞的情况下,优选将多核苷酸编码区定位成与启动子相邻,并处于启动子的控制之下,所述启动子能够在人类细胞中被表达。一般而言,这种启动子可以包括细菌、人类或病毒的启动子。

[0222] 在其中将载体施用至对象以表达蛋白质的实施方案中,设想与载体一起施用的期望启动子是不被细胞因子下调的启动子、或者是足够强以至于即使被下调仍产生有效量的至少两种不同的葡萄球菌凝固酶结构域1-2以引起免疫应答的启动子。它们的非限制性实例是CMV IE和RSVLTR。特别地,如果表达是在其中期望表达抗原的细胞中,例如在树突细胞或巨噬细胞中,则可以使用组织特异性启动子。哺乳动物MHC I和MHC II启动子是这种组织特异性启动子的实例。

[0223] 2. 起始信号和内部核糖体结合位点(IRES)

[0224] 编码序列的有效转译还可能需要特定的起始信号。这些信号包括AGT启动密码子或相邻的序列。可能需要提供外源性转译控制信号,包括ATG启动密码子。本领域普通技术人员会能够容易地确定这点,并提供必需的信号。

[0225] 在本发明的一些实施方案中,内部核糖体进入位点(IRES)要素的用途被用来产生多基因或多顺反子的信息。IRES要素能够绕开依赖5'  甲基化Cap的转译的核糖体扫描模型而在内部位点开始转译(Pelletier和Sonenberg,1988;Macejak和Sarnow,1991)。IRES要素也可以被连接至异源性开放阅读框。多个开放阅读框可以被一起转录,每一个都被IRES分开,产生多顺反子的信息。利用单个启动子/增强子转录单一信息可以有效地表达多个基因(参见美国专利5,925,565和5,935,819,其通过引用并入本文)。

[0226] 3. 可选择和可筛选的标记物

[0227] 在本发明的一些实施方案中,通过在表达载体中编码可选择或可筛选的标记物可以在体外或体内鉴定含有本发明的核酸结构的细胞。当被转录和转译时,标记物对细胞提供可辨认的变化,从而允许含有表达载体的细胞的简单鉴定。一般地,可选择的标记物是提供允许选择的性质的标记物。阳性可选择的标记物是其中标记物的存在允许其选择的标记物,而阴性可选择的标记物是其中标记物的存在防止其选择的标记物。阳性可选择的标记物的实例是耐药性标记物。

[0228] B. 宿主细胞

[0229] 如本文所使用的,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换地使用。所有这些术语还包括其后代,所述后代是任何及全部后代。应理解全部后代由于有意或无意的突变而可以不相同。在表达异源核酸序列的情况下,“宿主细胞”是指原核细胞或真核细胞,且其包括能够复制载体或表达由载体编码的异源基因的任何可转化的生物体。宿主细胞可以并且已经用作载体或病毒的受体。宿主细胞可以被“转染”或“转化”,这是指通过其将外源性核酸,例如重组蛋白编码序列转移或引入到宿主细胞的过程。转化的细胞包括初级受试细胞及其后代。

[0230] 宿主细胞可以来源于原核生物或真核生物,包括用于复制载体或表达核酸序列的

一部分或全部的细菌、酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。许多细胞系和培养物可用作宿主细胞,并且它们可以通过美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)获得,ATCC是作为活培养物和基因材料的档案馆的组织(www.atcc.org)。

[0231] C. 表达系统

[0232] 存在包含上述组合物的至少一部分或全部的许多表达系统。可以采用基于原核细胞和/或真核细胞的系统用于本发明以产生核酸序列或其同源的多肽、蛋白质和肽。许多这类系统是可商购的或可容易获得的。

[0233] 昆虫细胞/杆状病毒系统可以产生异源核酸节段的高水平蛋白表达,例如在美国专利5,871,986、4,879,236中所述的,两者都通过引用并入本文,并且所述系统可以例如从INVITROGEN®以名称MAXBAC® 2.0购得和从CLONTECH®以名称BACPACK™杆状病毒表达系统购得。

[0234] 除了所公开的本发明的表达系统之外,表达系统的其他实例包括STRATAGENE®的COMPLETE CONTROL诱导型哺乳动物表达系统,其涉及合成的蜕皮素诱导受体或其pET表达系统,即一种大肠杆菌表达系统。诱导型表达系统的另一实例可从INVITROGEN®获得,其携带T-REX™(四环素调节表达)系统,即一种使用全长CMV启动子的诱导型哺乳动物表达系统。INVITROGEN®还提供被称为甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)表达系统的酵母表达系统,其设计用于在甲醇营养型(methylotrophic)酵母甲醇毕赤酵母中高水平地产生重组蛋白。本领域技术人员知道如何表达载体,例如表达构造,以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0235] III. 多糖

[0236] 本发明的免疫原性组合物还可以包含荚膜多糖,其包括PIA(也称为PNAG)和/或金黄色葡萄球菌V型和/或VIII型荚膜多糖和/或表皮葡萄球菌I型、和/或II型和/或III型荚膜多糖中的一种或更多种。

[0237] A. PIA (PNAG)

[0238] 现在清楚的是,鉴定为PS/A、PIA和SAA的葡萄球菌表面多糖的各种形式是相同的化学个体-PNAG(Maira-Litran等人,2004)。因此,术语PIA或PNAG涵盖所有这些多糖或由其衍生的低聚糖。

[0239] PIA是多糖细胞间黏附素,并且其由用N-乙酰基和O-琥珀酰基成分取代的 β -(1 \rightarrow 6)-连接的葡萄糖胺的聚合物构成。这种多糖在金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌中均存在,并且可以从二者中任何一个来源分离(Joyce等人,2003;Maira-Litran等人,2002)。例如,PNAG可以从金黄色葡萄球菌MN8m(W004/43407)分离。从表皮葡萄球菌分离的PIA是生物膜的整体成分。其负责调节细胞-细胞黏附,并且还可能起保护生长的克隆免受宿主的免疫应答的作用。先前被称为多-N-琥珀酰基- β -(1 \rightarrow 6)-葡萄糖胺(PNSG)的多糖最近被证明不具有期望的结构,原因是N-琥珀酰化的鉴定不正确(Maira-Litran等人,2002)。因此,形式上被称为PNSG而现在发现是PNAG的多糖也被术语PIA涵盖。

[0240] PIA(或PNAG)可以具有在以下范围变化的不同大小:大于400kDa、75至400kDa、10至75kDa、由至多30个重复单元(用N-乙酰基和O-琥珀酰基成分取代的 β -(1 \rightarrow 6)-连接的葡萄糖胺)构成的低聚糖。在本发明的免疫原性组合物中可以使用PIA多聚糖或低聚糖的任何

大小,在一个方面,多聚糖大于40kDa。按大小分类可以通过本领域中已知的任何方法实现,例如通过微流化、超声波照射、或通过化学裂解法(W003/53462、EP497524、EP497525)。在一些方面,PIA (PNAG) 为至少或至多40-400kDa、40-300kDa、50-350kDa、60-300kDa、50-250kDa和60-200kDa。

[0241] PIA (PNAG) 由于在氨基基团上乙酸盐/酯的取代而可以具有不同程度的乙酰化。在体外产生的PIA在氨基基团上几乎全部被取代(95%-100%)。或者,可以使用具有小于60%、50%、40%、30%、20%、10%乙酰化的去乙酰化PIA (PNAG)。由于PNAG的非乙酰化表位在介导调节素杀死革兰氏阳性细菌,优选金黄色葡萄球菌和/或表皮葡萄球菌方面是有效的,因此优选使用去乙酰化PIA (PNAG)。在一些方面,PIA (PNAG) 具有40kDa至300kDa的大小,并且是去乙酰化的,以使得少于60%、50%、40%、30%或20%的氨基基团被乙酰化。

[0242] 术语去乙酰化PNAG (dPNAG) 是指其中少于60%、50%、40%、30%、20%或10%的氨基基团被乙酰化的PNAG多糖或低聚糖。在一些方面,通过化学处理天然多糖将PNAG去乙酰化以形成dPNAG。例如,用碱性溶液处理天然PNAG以使得pH升高至高于10。例如,用0.1-5M、0.2-4M、0.3-3M、0.5-2M、0.75-1.5M或1M的NaOH、KOH或NH₄OH处理PNAG。处理在20℃至100℃、25℃至80℃、30℃至60℃、或30℃至50℃、或35℃至45℃的温度下持续至少10至30分钟,或1、2、3、4、5、10、15或20小时。dPNAG可以如W0 04/43405中描述的制备。

[0243] 多糖可以缀合至或不缀合至载体蛋白。

[0244] B. 来自金黄色葡萄球菌的5型和8型多糖

[0245] 在人体中引起感染的金黄色葡萄球菌的多数菌株含有5型或8型多糖。人类菌株的约60%是8型的,约30%是5型的。5型和8型荚膜多糖抗原的结构在Moreau等人(1990)和Fournier等人(1984)中描述。二者在其重复单元中均具有可以用来引入巯基基团的FucNAc和ManNAcA。结构为:

[0246] 5型

[0247] →4)-β-D-ManNAcA (30Ac) - (1→4) -α-L-FucNAc (1→3) -β-D-FucNAc - (1→

[0248] 8型

[0249] →3) -β-D-ManNAcA (40Ac) - (1→3) -α-L-FucNAc (1→3) -β-D-FucNAc - (1→

[0250] 最新(Jones, 2005) NMR图谱将结构修改为:

[0251] 5型

[0252] →4) -β-D-ManNAcA - (1→4) -α-L-FucNAc (30Ac) - (1→3) -β-D-FucNAc - (1→

[0253] 8型

[0254] →3) -β-D-ManNAcA (40Ac) - (1→3) -α-L-FucNAc (1→3) -α-D-FucNAc (1→

[0255] 利用本领域技术人员众所周知的方法,可以从金黄色葡萄球菌的合适菌株中提取多糖,参见美国专利6,294,177。例如,ATCC 12902是5型金黄色葡萄球菌菌株,ATCC 12605是8型金黄色葡萄球菌菌株。

[0256] 多糖是具有天然大小或者可以例如通过微流化、超声辐射或通过化学处理按大小分类。本发明还涵盖了来源于金黄色葡萄球菌的5型和8型多糖的低聚糖。本发明的免疫原性组合物中包含的5型和8型多糖优选如以下描述的与载体蛋白缀合,或者不缀合。本发明的免疫原性组合物可选择地含有5型或8型多糖。

[0257] C. 金黄色葡萄球菌336抗原

[0258] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含美国专利6,294,177中描述的金黄色葡萄球菌336抗原。336抗原包含 β -连接的氨基己糖,不含有O-乙酰基基团,且特异性地结合至以ATCC 55804保藏的金黄色葡萄球菌336型的抗体。在一个实施方案中,336抗原是具有天然大小或者可以例如通过微流化、超声辐射或通过化学处理按大小分类的多糖。本发明还涵盖了来源于336抗原的低聚糖。336抗原可以不缀合至或缀合至载体蛋白。

[0259] D. 来自表皮葡萄球菌的I型、II型和III型多糖

[0260] 在与接种疫苗中使用多糖有关的问题中,事实上多糖本身是差的免疫原。优选的是,本发明中利用的多糖连接至载体蛋白,所述载体蛋白提供旁观者T-细胞帮助提高免疫原性。可以与多糖免疫原缀合的这种载体的实例包括白喉和破伤风类毒素(分别为DT、DT CRM197和TT)、钥孔戚血蓝素(Keyhole Limpet Haemocyanin) (KLH)、和结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)胞外蛋白A(rEPA)、来自流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的蛋白D、肺炎球菌溶血素或以上任何一个的片段。适合使用的片段包括包含T-辅助表位的片段。特别地,来自流感嗜血杆菌的蛋白D片段会优选包含蛋白质的N-端1/3。蛋白D是来自流感嗜血杆菌的IgD结合蛋白(EP 0 594 610 B1),并且是潜在免疫原。此外,葡萄球菌蛋白可以用作为在本发明的多糖缀合中的载体蛋白。

[0261] 在葡萄球菌疫苗中使用会特别有利的载体蛋白为葡萄球菌 α 类毒素。由于缀合的过程降低毒性,所以可以将天然形式缀合至多糖。优选地,基因上脱毒化的 α 毒素如His35Leu或His35Arg变体由于残留的毒性较低而被用作载体。或者,通过用交联试剂、甲醛或戊二醛处理使 α 毒素化学地脱毒。基因上脱毒化的 α 毒素任选地是化学脱毒化的,优选通过用交联试剂、甲醛或戊二醛处理以进一步降低毒性。

[0262] 通过任何已知方法(例如在美国专利4,372,945、4,474,757和4,356,170中描述的那些方法)可以将多糖连接至载体蛋白。优选地,进行CDAP缀合化学过程(参见W095/08348)。在CDAP中,氰基化试剂1-氰基-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐(CDAP)优选用于多糖-蛋白缀合物的合成。氰基化反应可以在相对温和的条件下进行,这避免碱敏感的多糖的水解。该合成允许直接偶联至载体蛋白。

[0263] 缀合优选涉及在载体蛋白和多糖之间产生直接连接。任选地,可以在载体蛋白和多糖之间引入间隔区(例如脂肪二氢化物(ADH))。

[0264] IV. 免疫应答和分析

[0265] 如以上讨论的,本发明涉及在对象中引起或诱导对抗凝固酶或一种或更多种凝固酶结构域1-2或其变体的免疫应答。在一个实施方案中,免疫应答可以保护或治疗患有、疑似患有、或有风险进展成感染或相关疾病的对象,特别是与葡萄球菌相关的那些。本发明的免疫原性组合物的一种用途是在医院或其他具有增加的感染风险的环境下,通过在经受过程前给对象接种以预防医院内感染。

[0266] A. 免疫测定法

[0267] 本发明包括进行血清学分析以评估通过本发明的组合物是否以及在何种程度上诱导或引起免疫应答。存在可以实施的多种类型的免疫测定法。本发明包含的免疫测定法包括但不限于在美国专利4,367,110(双单克隆抗体夹心测定法)和美国专利4,452,901(蛋白质印迹法)中描述的那些。其他测定法包括在体外或体内二者的标记配体免疫沉淀反应和免疫细胞化学法。

[0268] 免疫测定法一般是结合测定。一些优选的免疫测定法是现有技术中已知的各种类型的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和放射免疫测定法 (RIA)。使用组织切片的免疫组织化学检测法也是特别地有用的。在一个实施例中, 将抗体或抗原固定在选定的表面上, 如聚苯乙烯微量滴定板中的孔、浸入杆或柱形支撑物上。然后, 将疑似含有期望的抗原或抗体的测试组合物、如临床样品添加至孔。在结合并冲洗以除去非特异性结合的免疫复合物后, 可以检测结合的抗原或抗体。检测一般通过添加被连接至可检测标记物的另一种对期望的抗原或抗体有特异性的抗体来实现。这种类型的ELISA被称为“夹心ELISA”。检测也可以通过添加对期望的抗原具有特异性的第二抗体, 然后添加对第二抗体有结合亲和力的第三抗体来实现, 所述第三抗体连接至可检测的标记物。

[0269] 其中测试样品与已知量的经标记的抗原或抗体竞争结合的竞争ELISA也是可以实现的。在未知样品中反应性物质的量是通过在用经涂覆的孔孵育之前或期间将样品与已知经标记的物质混合来测定的。反应性物质在样品中的存在用于减少可用于结合至孔的经标记的物质的量, 从而减少最终的信号。与所采用的形式无关, ELISA具有共同的特定特征, 例如涂覆、孵育或结合、冲洗以除去非特异性地结合的物质以及检测结合的免疫复合物。

[0270] 也可以将抗原或抗体连接至固体支撑物, 例如以板、珠、浸入杆、膜或柱形基体的形式, 将待分析的样品应用至所固定的抗原或抗体。在用抗原或抗体涂覆板的过程中, 一般会用抗原或抗体的溶液孵育板的孔, 或者过夜, 或者持续规定的时间段。然后冲洗板的孔以除去未完全吸附的材料。然后用对于测试抗血清是抗原中性的非特异性蛋白“涂覆”孔的任何剩余的可用表面。这些包括牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白和牛奶粉末的溶液。涂覆允许阻断在固定化表面上的非特异性吸附位点, 由此减少由抗血清非特异性结合到表面上导致的背景。

[0271] B. 细菌感染的诊断

[0272] 除了使用蛋白、多肽和/或肽以及结合这些蛋白、多肽和/或肽的抗体来治疗或预防以上描述的感染, 本发明设想了以各种方式的这些多肽、蛋白质、肽和/或抗体的用途, 包括检测葡萄球菌的存在以诊断感染, 是否在也可能被感染的患者或医疗设备中存在。根据本发明, 检测感染存在的优选方法涉及以下步骤: 获得疑似被一种或更多种葡萄球菌属细菌物种或菌株感染的样品, 例如, 从个体如某人的血液、唾液、组织、骨、肌肉、软骨或皮肤取得的样品。在分离样品后, 可以进行用本发明的多肽、蛋白质、肽和/或抗体的诊断分析以检测葡萄球菌的存在, 且用于确定在样品中这种存在的这种分析技术是本领域技术人员公知的, 其包括方法如放射免疫测定法、蛋白质印迹分析法和ELISA测定法。一般而言, 根据本发明, 设想了诊断感染的方法, 其中已经向疑似被葡萄球菌感染的样品添加根据本发明的多肽、蛋白质、肽、抗体或单克隆抗体, 并且通过与多肽、蛋白质、和/或肽结合的抗体, 或者通过与样品中的抗体结合的肽、蛋白质、和/或肽来指示葡萄球菌。

[0273] 因此, 根据本发明的抗体可以用于预防来自葡萄球菌属细菌的感染 (即被动免疫), 或用于治疗正在进行的感染, 或用于用作研究工具。本文中使用的术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异抗体、猿猴源化抗体、和人源化或灵长化抗体以及Fab片段, 例如维持抗体的结合特异性的那些片段, 包括Fab免疫球蛋白表达库的产物。相应地, 本发明设想了抗体的单链, 例如可变重链和轻链的用途。这些类型的抗体或抗体片段中任一种的产生是本领域技术人员众所周知的。在美国专利申请公布

20030153022号中可以找到细菌蛋白的抗体产生的具体实例,其通过引用完整地并入本文。

[0274] 以上描述的多肽、蛋白质、肽和/或抗体中的任何一种都可以用可检测的标记物直接标记以用于葡萄球菌属细菌的鉴定和定量。在免疫测定法中使用的标记物一般是本领域技术人员已知的,包括酶、放射性同位素、荧光物质、发光物质和生色物质,包括有色颗粒,如胶体金或乳胶小珠。合适的免疫测定法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)。

[0275] C. 保护性免疫

[0276] 在本发明的一些实施方案中,蛋白质组合物给对象提供保护性免疫。保护性免疫是指进行特异性免疫应答的身体机能,所述特异性免疫保护对象以免发展涉及免疫应答所对抗的介质的特定疾病或病情。免疫原性上有效的量能够给对象提供保护性免疫。

[0277] 如本文说明书中和所附权利要求部分所使用的,术语多肽或肽是指通过肽键在其间共价地连接的氨基酸的一部分。根据本发明,不同的多肽具有不同的功能。然而,根据一个方面,多肽来源于设计用于在受体中诱导主动免疫应答的免疫原,根据本发明的另一方面,多肽是来源于抗体的多肽,所述抗体是在例如动物中引起主动免疫应答后产生的,并且可以用来在受体中诱导被动免疫。然而,在两种情况下,多肽都是由根据任何可能的密码子使用的多核苷酸编码的。

[0278] 如本文所使用的,短语“免疫应答”或其等同物“免疫学应答”是指在受体患者中对抗本发明的蛋白质、肽、糖类或多肽的体液应答(抗体介导的)、细胞应答(抗原特异性T细胞或其分泌产物介导的)或体液应答和细胞应答两者的形成。这种应答可以是由免疫原的施用诱导的主动应答或由抗体、含有抗体的材料或已接触抗原的T细胞的施用诱导的被动应答。细胞免疫应答由与I类或II类MHC分子关联的多肽表位的呈递引发以活化抗原特异性CD4(+) T辅助细胞和/或CD8(+) 细胞毒素T细胞。该应答也可以涉及单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、嗜碱细胞、树突细胞、星形细胞、小胶质细胞、嗜酸性细胞或先天免疫的其他成分的活化。如本文中使用的,“主动免疫”是指通过施用抗原赋予对象的任何免疫。

[0279] 如本文中使用的,“被动免疫”是指在没有给对象施用抗原下赋予对象的任何免疫。因此,“被动免疫”包括但不限于施用活化的免疫效应物,包括免疫应答的细胞介质或蛋白质介质(例如单克隆和/或多克隆抗体)。单克隆或多克隆抗体组合物可以在用于预防或治疗由携带抗体识别的抗原的生物体造成的感染的被动免疫中使用。抗体组合物可以包含结合至各种抗原的抗体,所述抗原可以进而与各种生物体相关联。抗体组分可以是多克隆抗血清。在一些方面,从已经用抗原攻击过的动物或第二对象中亲和纯化抗体。或者,可以使用抗体混合物,其为在相同的、相关的或不同的微生物或生物体,例如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌,包括但不限于葡萄球菌细菌中存在的抗原的单克隆抗体和/或多克隆抗体的混合物。

[0280] 可以通过对患者施用从具有已知免疫反应性的供体或其他非患者源获得的免疫球蛋白(Ig)和/或其他免疫因子来赋予患者或对象被动免疫。在其他方面,可以对对象施用本发明的抗原性组合物,所述对象然后作为球蛋白的来源或供体,所述球蛋白是响应于抗原性组合物的攻击而产生的(“超免疫球蛋白”),其含有对抗葡萄球菌或其他生物体的抗体。如此处理的对象会捐献血浆,然后可以经由常规的血浆分离方法从所述血浆中获得超免疫球蛋白,然后施用至另一对象以赋予对抗葡萄球菌感染的抗性或者治疗葡萄球菌感染。根据本发明的超免疫球蛋白对于免疫缺陷的个体、对于经受侵入性过程的个体特别有

用,或者对时间不允许个体响应疫苗来产生其自身抗体的情况特别有用。关于与被动免疫相关的示例性方法和组合物,参见美国专利6,936,258、6,770,278、6,756,361、5,548,066、5,512,282、4,338,298和4,748,018,其每一个都通过引用完整地并入本文。

[0281] 为了本说明书和所附权利要求,术语“表位”和“抗原决定因子”可互换地使用,用来指抗原上B细胞和/或T细胞响应或识别的位点。B细胞表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时被保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时被丢失。表位通常以独特空间构型包含至少3个、通常更多、至少5个或8到10个氨基酸。确定表位的空间构型的方法包括例如X射线晶体照像术和2维核磁共振。参见例如Epitope Mapping Protocols (1996)。识别相同表位的抗体可以以简单的免疫测定法鉴定,其显示一种抗体阻断另一种抗体结合至靶抗原的能力。T细胞识别CD8细胞的约9个氨基酸或CD4细胞的约13到15个氨基酸的连续表位。识别表位的T细胞可以通过体外分析来鉴定,所述体外分析测量抗原依赖性增殖,如通过由已接触抗原的T细胞响应表位产生的3H-胸苷并入(Burke等,1994),通过抗原依赖性杀灭(细胞毒性的T淋巴细胞分析,Tiggess等,1996),或通过细胞因子分泌来测定的。

[0282] 细胞介导的免疫学应答的存在可以通过增殖分析(CD4(+) T细胞)或CTL(细胞毒性的T淋巴细胞)分析来确定。体液应答和细胞应答对免疫原的保护性或治疗性效果的相对贡献可以通过从免疫的同源动物中单独分离IgG和T细胞并测量在第二对象中的保护性或治疗性效果来区分。

[0283] 如本文中和权利要求中所使用的,术语“抗体”或“免疫球蛋白”可交换地使用,并且是指用作动物或受体的免疫应答的部分的结构上相关的蛋白质的多个类别的任何一个,其中所述蛋白质包括IgG、IgD、IgE、IgA、IgM和相关蛋白。

[0284] 在正常生理条件下,在血浆和其他体液中以及特定细胞的膜中发现了抗体,并且其是通过B细胞类型的淋巴细胞或它们的功能等同物产生的。IgG类的抗体是由通过二硫键连接在一起的四个多肽链构成的。完整IgG分子的四个链是两个相同的被称为H链的重链和两个相同的被称为L链的轻链。

[0285] 为了产生多克隆抗体,利用一般具有佐剂和如有必要的情况下与载体偶联的抗原或抗原片段使宿主,例如兔或山羊免疫。之后,从宿主的血清收集抗原的抗体。可以针对抗原来亲和纯化多克隆抗体,使其为单特异性的。

[0286] 单克隆抗体可以通过利用抗原的合适供体的超免疫或和离体的通过使用脾细胞或来源于脾的细胞系的初代培养物来产生(Anavi,1998;Huston等人,1991;Johnson等人,1991;Mernaugh等人,1995)。

[0287] 如本文和权利要求中使用的,短语“抗体的免疫学部分”包括抗体的Fab片段、抗体的Fv片段、抗体的重链、抗体的轻链、由重链和轻链构成的异质二聚体、抗体的轻链的可变片段、抗体的重链的可变片段、和抗体的单链变体,其也被称为scFv。此外,术语包括嵌合免疫球蛋白,其是来源于不同物种的融合基因的表达产物,所述物种之一可以是人类,在是人类的情况下,嵌合免疫球蛋白被称为是人源化的。通常,抗体的免疫学部分与获得以用于特异性结合至抗原的完整抗体竞争。

[0288] 任选地,抗体或优选地抗体的免疫学部分可以与具有其他蛋白质的融合蛋白化学

缀合,或表达为具有其他蛋白质的融合蛋白。为了本说明书和所附的权利要求,所有这类融合的蛋白质都包含在抗体或抗体的免疫学部分的定义中。

[0289] 如本文中使用的,术语“免疫原性介质”或“免疫原”或“抗原”可交换地使用以描述在单独、或与佐剂结合、或者存在于显示载体上施用至受体后能够诱导对抗其自身的免疫应答的分子。

[0290] D. 治疗方法

[0291] 本发明的方法包括对由葡萄球菌病原体导致的疾病或病症的治疗。可以提供本发明的免疫原性多肽以在感染有葡萄球菌或疑似已经暴露于葡萄球菌的人体内诱导免疫应答。对于已经测试关于暴露于葡萄球菌阳性的个体或者基于可能的暴露被视为有风险感染的个体,可以采用该方法。

[0292] 特别地,本发明包括一种治疗葡萄球菌感染、特别是医院获得的医院内感染的方法。在选择性外科手术的情况下,使用本发明的免疫原性组合物和疫苗是特别地有利的。这种患者会提前知道手术日期,因此可以提前接种。使用本发明的免疫原性组合物和疫苗来接种健康护理工作也是有利的。

[0293] 在一些实施方案中,治疗在佐剂或载体或其他葡萄球菌抗原的存在下施用。此外,在一些实施例中,治疗包括施用对抗细菌感染常用的其他试剂,例如一种或更多种抗生素。

[0294] 用于免疫接种的肽的使用可能需要、但非必要地将肽缀合至免疫原性载体蛋白,例如乙肝表面抗原、钥孔戚血蓝素或牛血清白蛋白。用于进行这种缀合的方法在本技术领域是众所周知的。

[0295] V. 疫苗和其他药物组合物以及施用

[0296] A. 疫苗

[0297] 本发明包括用于预防或缓解葡萄球菌感染、特别是医院获得性医院内感染的方法。同样地,本发明设想在主动和被动免疫实施方案二者中使用的疫苗。所提出的适合用作疫苗的免疫原性组合物可以由免疫原性凝固酶或其片段或其变体、如一种或更多种凝固酶结构域1-2来制备。在其他实施方案中,凝固酶、其片段或其变体可以与其他分泌性的致病蛋白、表面蛋白或其免疫原性片段组合使用。在一些方面,将抗原性材料深度透析以除去不期望的小分子量分子,和/或将其冻干以更易于配制到期望的载体中。

[0298] 基于蛋白质/肽的疫苗的其他选择涉及引入编码抗原的核酸作为DNA疫苗。关于这点,最近的报道描述了表达10个连续的最小CTL表位(Thomson,1996)或来自多种微生物的B细胞、细胞毒素T淋巴细胞(CTL)和T辅助细胞(Th)表位的组合(An,1997)的重组疫苗病毒的构建,并且成功使用这种构成物来使小鼠免疫以用于引发保护性免疫应答。因此,关于成功利用肽、肽脉冲的抗原呈递细胞、和对肽编码的构成物用于在体内有效的引发保护性免疫应答,文献中有足够的证据。在美国专利5,958,895和5,620,896中示例了核酸序列作为疫苗的用途。

[0299] 含有多肽或肽序列作为活性成分的疫苗的制剂一般在本领域中得到很好的理解,如通过美国专利4,608,251;4,601,903;4,599,231;4,599,230;4,596,792和4,578,770示例的,其全部通过引用并入本文。通常,这种疫苗制备成为液体溶液或为悬浮液的注射剂,也可以制备成在注射前适合于溶解于或悬浮于液体中的固体形式。制剂也可以是乳化的。活性免疫原性成分通常与药学上可接受的且与活性成分相容的赋形剂混合。适合的赋形剂

为例如水、生理盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。此外,如果需要的话,疫苗可以含有一定量的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、或增强疫苗的有效性的佐剂。在具体的实施方案中,疫苗是与如在美国专利6,793,923和6,733,754中描述的物质组合配制的,所述专利通过引用并入本文。

[0300] 疫苗可以进行常规的肠胃外施用,例如,通过皮下或肌肉注射。适合用于其他施用模式的其他制剂包括栓剂和在一些情况下的口服制剂。对于栓剂,常规的黏结剂和载体可以包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯:这种栓剂可以由含有约0.5%至约10%、优选约1%至约2%范围的活性成分的混合物形成。口服制剂包括通常采用的赋形剂,例如,药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、悬浮剂、片剂、丸剂、胶囊、持续释放的制剂或散剂的形式,且含有约10%至约95%、优选约25%至约70%的活性成分。

[0301] 多肽和编码多肽的DNA构成物可以以中性或盐的形式配制到疫苗中。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与肽的自由氨基形成)和利用无机酸如盐酸或磷酸,或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的那些。

[0302] 通常,疫苗以与剂型相容的方式和以会是治疗有效的和免疫原性的量来施用。要施用的量取决于待治疗的对象,包括个体免疫系统合成抗体的能力和期望的保护程度。需要施用的活性成分的确切量取决于医师的判断。然而,合适的剂量范围是在每次免疫接种数百毫克活性成分的量级上。用于最初施用和强化注射剂量的合适方案也是可变的,但是其特征在于最初施用之后进行后续接种或其他施用。

[0303] 应用的方式可以大范围地变化。用于施用疫苗的任何常规方法都是可适用的。据认为这些方法包括以在固态生理学上可接受的基质内或以生理上可接受的分散体口服应用、通过注射等的肠胃外应用。疫苗的剂量将取决于施用的途径,并会根据对象的尺寸和健康而改变。

[0304] 在一些情况下,会期望具有疫苗的多次施用,例如2、3、4、5、6次或更多次施用。接种疫苗可以在1、2、3、4、5、6、7、8到5、6、7、8、9、10、11、12十二周时间间隔、包括其间所有范围来进行。会需要1至5年间隔的周期性强化以维持保护水平的抗体。免疫的过程之后,可以分析对抗抗原的抗体,如在美国专利3,791,932;4,174,384和3,949,064中描述的。

[0305] 1. 载体

[0306] 给定组合物在其免疫原性方面可以是变化的。因此,通常有必要促进宿主免疫系统,例如可以通过将肽或多肽偶联至载体来实现。示例性和优选的载体是钥孔戚血蓝素(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。其他白蛋白如卵白蛋白、小鼠血清蛋白、或兔血清蛋白也可以用作载体。用于将多肽缀合至载体蛋白的方法是本领域中周知的,且包括戊二醛、m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺酯、碳化二亚胺、和二-双偶氮化的联苯胺。

[0307] 2. 佐剂

[0308] 多肽或肽组合物的免疫原性可以通过使用被称为佐剂的免疫应答的非特异性刺激剂来增强。合适的佐剂包括所有可接受的免疫刺激性化合物,例如细胞因子、毒素或合成的组合物。许多佐剂可以被用来增强对抗以下物质的抗体应答:凝固酶和或其变体,例如一种或更多种凝固酶结构域1-2,或本文中设想的任何其他细菌蛋白质或组合。佐剂可以(1)捕获体内的抗原以导致缓慢释放;(2)将在免疫应答中涉及的细胞吸引至施用位点;(3)诱

导免疫系统细胞的增殖或活化;或(4)改善抗原在对象全身的传播。

[0309] 佐剂包括但不限于水包油乳剂、油包水乳剂、矿物盐、多核苷酸和天然物质。可以使用的具体佐剂包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -干扰素、GMCSF、BCG、铝盐如氢氧化铝或其他铝化合物、MDP化合物如thur-MDP和nor-MDP、CGP (MTP-PE)、脂质A和单磷酰脂质A (MPL)。RIBI含有在2%鲨烯/吐温80乳液中的从细菌提取的三种组分,即细胞壁骨架(CWS)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和MPL。甚至可以使用MHC抗原。在美国专利6,814,971;5,084,269;6,656,462中示例了其他佐剂或方法,它们中的每一个都通过引用并入本文。

[0310] 实现佐剂对疫苗的作用的各种方法包括使用试剂如氢氧化铝或磷酸铝,其通常以磷酸盐缓冲的生理盐水中约0.05%至约0.1%的溶液使用;具有糖的合成聚合物(Carbopol®)的添加剂,其以约0.25%的溶液使用;通过以在约70°C至约101°C范围之间的温度分别加热处理30秒至2分钟时间来聚集疫苗中的蛋白质。也可以采用以下物质以产生佐剂作用:通过利用胃蛋白酶处理过的(Fab)将抗体再活化成白蛋白得到的聚集体;具有细菌细胞(例如短棒状杆菌(*C. parvum*))、内毒素或革兰氏阳性细菌的脂多糖成分的混合物;生理学上可接受的油载体(例如二缩甘露醇单油酸酯(Aracel A))中的乳剂;或具有20%的用作阻塞取代物的全氟化碳溶液(Fluosol-DA®)的乳剂。

[0311] 通常优选的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant)(一种含有杀灭的结核分支杆菌的免疫应答非特异性刺激剂)、弗氏不完全佐剂和/或氢氧化铝。

[0312] 在一些方面,优选的是佐剂选择为Th1或Th2型应答的优选诱导剂。高水平的Th1型细胞因子倾向于有助于对给定抗原诱导细胞介导的免疫应答,而高水平的Th2型细胞因子倾向于有利于诱导对抗抗原的体液免疫应答。

[0313] Th1和Th2型免疫应答的区别不是绝对的。实际上,个体会支持被描述为Th1占优或Th2占优的免疫应答。然而,通常便利的是就Mosmann和Coffman在鼠科CD4+T细胞克隆中描述的内容来考虑细胞因子的家族(Mosmann和Coffman,1989)。常规地,Th1型应答与T淋巴细胞的INF- γ 和IL-2细胞因子的产生相关。通常与Th1型免疫应答的诱导直接相关的其他细胞因子不是由T细胞如IL-12产生的。相反地,Th2型应答与其他细胞因子IL-4、IL-5、IL-6、IL-10的分泌有关。

[0314] 除了佐剂,可以期望的是共同施用生物应答改性剂(BRM)以增强免疫应答。已经表明BRM上调T细胞免疫或下调抑制细胞活性。这类BRM包括但不限于西咪替丁(Cimetidine)(CIM;1200mg/d)(Smith/Kline,PA);或低剂量的环磷酰胺(CYP;300mg/m²)(Johnson/Mead,NJ)和细胞因子,如 γ -干扰素、IL-2或IL-12,或者编码免疫辅助功能中涉及的蛋白质的基因,例如B-7。

[0315] B. 脂质组分和部分

[0316] 在一些实施方案中,本发明涉及包含一种或更多种与核酸或多肽/肽相关的脂质的组合物。脂质是在水中不溶且可用有机溶剂提取的物质。本领域技术人员将除本文中具体描述的那些外的化合物理解为脂质,并且其被包含在本发明的组合物和方法中。脂质组分和非脂质可以共价地或非共价地彼此连接。

[0317] 脂质可以是天然存在的脂质或合成脂质。然而,脂质通常是生物物质。生物脂质是本领域中众所周知的,其包括例如中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、甾体、萜烯、溶源性脂质

(lysolipid)、鞘糖脂、糖脂、硫脂、具有酯和连接酯的脂肪酸的脂质、和可聚合化的脂质及其组合。

[0318] 与脂质有关的核酸分子或多肽/肽可以在含有脂质的溶液中分散,用脂质溶解,用脂质乳化,与脂质混合,与脂质组合,共价地键合至脂质,作为脂质中的悬浮液被含有,或者与脂质缔合。本发明的脂质或脂质-痘病毒相关的组合物不受限于任何特定的结构。例如,它们也可以仅仅是分散在溶液中,可能形成尺寸或形状不均一的聚集体。在另一实例中,它们可以以作为微团或具有“塌陷的”结构的双层结构存在。在其他非限制性实例中,还设想脂质体(Gibco BRL)-痘病毒或Superfect(Qiagen)-痘病毒复合物。

[0319] 在一些实施方案中,组合物可以包含约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%、约50%、约51%、约52%、约53%、约54%、约55%、约56%、约57%、约58%、约59%、约60%、约61%、约62%、约63%、约64%、约65%、约66%、约67%、约68%、约69%、约70%、约71%、约72%、约73%、约74%、约75%、约76%、约77%、约78%、约79%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或其间的任何范围的特定脂质、脂质类型、或非脂质组分,例如佐剂、抗原、肽、多肽、糖、核酸或本文中公开的或本领域技术人员应当知道的其他材料。在一个非限制性实例中,组合物可以包含约10%至约20%的中性脂质,和约33%至约34%的脑苷脂,和约1%的胆固醇。在另一非限制性实例中,脂质体可以包含约4%至约12%的萜烯,其中约1%的微团特别地是番茄红素,剩下脂质体的约3%至约11%为包含其他萜烯;和约10%至约35%的磷脂酰胆碱,和约1%的非脂质成分。因此,设想本发明的组合物可以包含以任何组合或百分比范围的任何脂质、脂质类型或其他组分。

[0320] C. 组合治疗

[0321] 本发明的组合物和相关方法,特别是对患者/对象的分泌性致病因子或包含凝固酶结构域1-2或其变体的表面蛋白,和/或其他细菌肽或蛋白的施用也可以与常规治疗的施用组合使用。这些包括但不限于抗生素,如链霉素、环丙沙星、强力霉素、庆大霉素、氯霉素、甲氧苄氨嘧啶、磺胺甲噁唑、氨苄西林、四环素或各种抗生素的组合物施用。

[0322] 在一个方面,设想多肽疫苗和/或治疗与抗菌处理一起使用。或者,治疗可以在数分钟到数周的时间范围内的时间间隔在其他试剂处理之前或之后进行。在其中分别施用其他试剂和/或蛋白质或多核苷酸的实施方案中,通常会确保在各次递送的时间之间不经过明显的时段,使得药剂和抗原性组合物会一直能够对对象发挥有利组合效果。在这种情况下,设想在彼此的约12到24小时内,或在彼此的约6到12小时内施用两种用药程式。在一些情形中,可能需要明显地延长用于施用的时间周期,其中在各自的施用之间经过数天(2、3、4、5、6或7)或数周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0323] 可以采用各种组合,例如抗生素治疗是“A”,而作为免疫治疗方案的一部分给出的免疫原性分子例如抗原为“B”:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
[0324] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0325] 对患者/对象施用本发明的免疫原性组合物会遵循用于施用这类化合物的一般方案,考虑到凝固酶结构域1-2组合物或本文中描述的其他组合物的毒性(如果有的话)。预计在必要的情况下会重复治疗周期。还设想各种标准的治疗如水疗可以与所述治疗组合施用。

[0326] D. 一般药物组合物

[0327] 在一些实施方案中,将药物组合物施用至对象。本发明的不同方面涉及施用有效量的组合物至对象。在本发明的一些实施方案中,可以将葡萄球菌抗原(Ess途径的成员,包括Esa或Esx类别的多肽或肽和/或分选酶物质的成员)施用至患者以保护其免受一种或更多种葡萄球菌病原体的感染。或者,可以将编码一种或更多种这种多肽或肽的表达载体提供给患者作为预防性治疗。另外,这种组合物可以与抗生素或抗菌剂组合施用。这类组合物通常会溶解于或分散于药物可接受的载体或水介质。

[0328] 除了配制用于肠胃外施用的化合物如用于静脉内或肌肉注射的那些化合物之外,其他药学上可接受的形式包括例如片剂或其他用于口服施用的固体;延时释放胶囊;和目前施用的任何其他形式,包括乳膏剂、洗剂、漱口剂、吸入剂等。

[0329] 本发明的活性化合物可以配制用于肠胃外施用,例如配制用于经由静脉内、肌肉内、皮下或甚至腹膜内途径的注射。根据本发明,本领域技术人员会知道含有增加MHC I类分子的表达的化合物的水性组合物的剂型。通常,这种组合物可以制备成作为液体溶液或悬浮液的注射剂;也可以制备适用于在注射前靠添加液体来制备溶液或悬浮液的固体形式;并且剂型还可以是乳化的。

[0330] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在适当地与表面活性剂、如羟丙基纤维素混合的水中来制备。在甘油、液态聚乙二醇、及其混合物中以及在油中也可以制备分散剂。在储存和使用的常规条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0331] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌的水溶液或分散体;包含芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂;以及用于临时制备无菌溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,形式必须是无菌的,并且必须是一定程度上可以容易地注射的流体。其还应是在制造和储存的条件下稳定的,并且必须在防微生物例如细菌和真菌的污染作用的条件下保存。

[0332] 蛋白质组合物可以配制为中性或盐的形式。药物可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的自由氨基形成),其利用无机酸如盐酸或磷酸,或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。利用游离羧基形成的盐还可以来源于无机碱如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱如异丙胺、三甲胺、组胺酸、普鲁卡因等。

[0333] 载体也可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。可以通过以下方式来保持适当的流动性:例如通过使用包被如卵磷脂、通过在分散体的情况下保持需要的粒径、和通过使用表面活性剂。微生物作用的预防可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯

酚、山梨酸、硫汞撒等来实现。在许多情况下,优选包含等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的持久的吸收通过在组合物中使用延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0334] 无菌的可注射溶液通过以下方法来制备:在适当溶剂中将活性化合物以所需量与以上列举的各种其他成分合并,如果需要的话然后进行过滤除菌。通常,分散体通过将各种无菌的活性成分并入到无菌载剂中来制备,所述无菌载剂含有基础分散介质和选自以上列举的那些的所需的成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备的优选方法为真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分和任何另外的期望成分的粉末,所述另外的期望成分来自其预先无菌过滤的溶液。

[0335] 根据本发明的组合物的施用通常会经由各种常用途径。这包括但不限于经口、经鼻或口腔含化的施用。或者,施用可以通过正位的、真皮内的、皮下的、肌肉内的、腹膜内的、鼻内的或静脉内的注射。在一些实施方案中,可以吸入疫苗组合物(例如美国专利6,651,655,其通过引用具体地并入)。这类组合物通常会作为药物可接受的组合物施用,所述药物可接受的组合物包含生理可接受的载体、缓冲剂或其他赋形剂。如本文中使用的,术语“药学上可接受的”是指在可靠的医学判断的范围内,适合与人类和动物的组织接触而没有过多毒性、刺激性、过敏反应或与合理的受益/风险比相当的其他问题并发症的那些化合物、物质、组合物、和/或剂型。术语“药学上可接受的载体”是指运载或运输化学剂中涉及的药学上可接受的物质、组合物或载剂,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封物质。

[0336] 对于以水溶液的肠胃外施用,例如,如果必要的话溶液应当被适当地缓冲,并且液体稀释剂首先用足够的生理盐水或葡萄糖使其等渗。这些特定的水溶液尤其地适合静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用和腹膜内施用。在这一点上,根据本公开内容本领域技术人员会知道可以采用的无菌含水介质。例如,一个剂量可以溶解于等渗NaCl溶液,然后或者添加至皮下输液流体或者在建议的输液位点处注射(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,1990)。剂量的一些变化会根据对象的病情有必要地发生。负责施用的人会在任何情况下确定对于个体对象合适的剂量。

[0337] 基于预计的目标来确定治疗或预防组合物的有效量。术语“单位剂量”或“剂量”是指适合在对象中使用的物理不连续的单位,各单位含有计算以产生与其施用、即适当途径和方案相关的上述期望应答的预定量的组合物。根据治疗的数量和单位剂量两者的待施用量均取决于所期望的保护。

[0338] 组合物的确切量还取决于医师的判断,并且对每一个体都是独特的。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用的途径、治疗的预计目标(症状的缓相对治愈)和特定组合物的效力、稳定性及毒性。

[0339] 在配制后,溶液会以与剂型相容的方式和在治疗或预防上有效的量来施用。以各种剂型,例如上述可注射溶液的类型容易地施用制剂。

[0340] E. 体外、离体或体内施用

[0341] 如本文中使用的,术语体外施用是指在从对象移除的或移到对象外的细胞上进行的操作,包括但不限于培养的细胞。术语离体施用是指将已经在体外操作的细胞随后施用至对象。术语体内施用包括在对象内进行的所有操作。

[0342] 在本发明的一些方面,组合物可以体外、离体或体内施用。在一些体外的实施方案

中,将自体B淋巴细胞系与本发明的病毒载体一起孵育24至48小时,或者与凝固酶结构域1-2和/或其变体和/或本文描述的任何其他组合物一起孵育2小时。然后,可以将经转染的细胞用于体外分析,或者可替代地用于离体施用。美国专利4,690,915和5,199,942二者均通过引用并入本文,其公开了用于在治疗应用中使用的血液单核细胞和骨髓细胞的离体操作的方法。

[0343] F. 抗体和被动免疫

[0344] 本发明的另一方面是制备用于预防或治疗葡萄球菌感染的免疫球蛋白的方法,其包括以下步骤:利用本发明的疫苗使受体或供体免疫,然后从受体或供体分离免疫球蛋白。通过该方法制备的免疫球蛋白是本发明的另一方面。本发明的另一方面是包含本发明的免疫球蛋白和药学上可接受载体的药物组合物,其可以用于制造治疗或预防葡萄球菌疾病的药物。本发明的另一方面是用于治疗或预防葡萄球菌感染的方法,其包括对患者施用有效量的本发明的药物制剂的步骤。

[0345] 用于多克隆抗体产生的接种物一般通过将抗原组合物分散在生理学上允许的稀释剂如生理盐水或适合于人类使用的其他佐剂中以形成水性组合物来制备。对哺乳动物施用免疫刺激量的接种物,然后接种过的哺乳动物维持足以使抗原组合物诱导保护性抗体的时间。

[0346] 抗体可以通过众所周知的技术如亲和色谱分离到期望的程度(Harlow和Lane, 1988)。抗体可以包含来自各种常用动物如山羊、灵长动物、驴、猪、马、豚鼠、大鼠或人的抗血清制剂。

[0347] 根据本发明产生的免疫球蛋白可以包含整个抗体、抗体片段或亚片段。抗体可以是任何种类(例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE)的整个免疫球蛋白、嵌合抗体、或具有对本发明的两种或更多种抗原的双特异性的杂交抗体。它们还可以是片段(例如F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv等),包括杂交的片段。免疫球蛋白还包括天然的、合成的或基因改造的蛋白质,其通过与特异性抗原结合形成复合物来起类似于抗体的作用。

[0348] 可以对受体施用本发明的疫苗,所述受体然后作为响应于特异性疫苗的攻击而产生的免疫球蛋白的来源。如此处理的对象会捐献血浆,超免疫球蛋白会经由常规的血浆分离方法从所述血浆中获得。会将超免疫球蛋白施用至另一对象,以赋予对葡萄球菌感染的抗性 or 治疗葡萄球菌感染。本发明的超免疫球蛋白对于治疗或预防婴儿、免疫缺陷个体的葡萄球菌疾病特别有用,或对需要治疗但是个体没有时间响应于疫苗接种而产生抗体的情况特别有用。

[0349] 本发明的另外的方面是药物组合物,其包含与本发明的免疫原性组合物反应的至少两种成分反应的两种或更多种单克隆抗体(或其片段;优选地人类或人源化的),其可以用于治疗或预防由革兰氏阳性菌、优选葡萄球菌、更优选金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌造成的感染。这种药物组合物包含单克隆抗体,所述单克隆抗体可以是任何种类的整个免疫球蛋白、嵌合抗体、或具有对本发明的两种或更多种抗原的双特异性的杂交抗体。它们还可以是片段(例如F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv等),包括杂交的片段。

[0350] 制造单克隆抗体的方法是本领域中众所周知的,包括脾细胞与骨髓瘤细胞的融合(Kohler和Milstein, 1975; Harlow和Lane, 1988)。或者,通过筛选合适的噬菌体展示文库可以获得单克隆Fv片段(Vaughan等人, 1998)。单克隆抗体可以通过已知方法人源化或部分

人源化的。

[0351] VI. 实施例

[0352] 以下实施例是为了说明本发明的各种实施方案的目的提供的,无意图以任何方式限制本发明。本领域技术人员会容易地理解本发明非常适合于实现目的并获得所提及的结果和优点,以及其中固有的那些目的、结果和优点。本实施例与本文描述的方法一起目前是优选实施方案的代表,是示例性的,且不打算在限制本发明的范围。本领域技术人员会想到包含在如权利要求的范围所限定的本发明的精神内的其中的变化和其他用途。

[0353] 实施例1

[0354] 作为对抗金黄色葡萄球菌的保护性免疫应答的决定因素的凝固酶

[0355] A. 结果

[0356] 对抗凝固酶结构域的抗体用来自金黄色葡萄球菌Newman的凝固酶基因(Coa_{NM})的经亲和纯化的His标记的Coa使兔免疫。通过ELISA检查免疫血清,这显示对抗原的血清IgG抗体应答(图1A-1B)。为了分析对特异性亚结构域的抗体应答,使经亲和纯化的重组蛋白(D1_{Coa} 、 D2_{Coa} 、 D12_{Coa} 、 L_{Coa} 和 CT_{Coa})经受ELISA(图1B)。测试具有对抗每一种结构域的抗体的免疫血清(图1B)。应注意,对抗 L_{Coa} 的抗体比识别重复结构域(CT_{Coa})的抗体更加丰富(L_{Coa} 对 CT_{Coa} , $P < 0.05$)。对抗 D12_{Coa} 的抗体比识别重复结构域的那些更加丰富,但是该区别没有达到统计学显著性(D12_{Coa} 对 CT_{Coa} , $P = 0.066$)。为了探索抗体在免疫血清中的生物功能,本发明人使用可变量的经亲和纯化的 Coa_{NM} 抗体来干扰 D12_{Coa} 与人类凝血酶原的缔合或者 CT_{Coa} 与纤维蛋白原的缔合(图1C)。本发明人计算出 120nM $\alpha\text{-Coa}$ IgG阻止 D12_{Coa} 与凝血酶原结合,而 $1.7\mu\text{M}$ $\alpha\text{-Coa}$ IgG阻止 CT_{Coa} 与纤维蛋白原的缔合(图1C)。

[0357] 使用全长 Coa_{NM} ($\alpha\text{-Coa}_{\text{NM}}$)、 D12_{Coa} ($\alpha\text{-D12}_{\text{Coa}}$)或 CT_{Coa} ($\alpha\text{-CT}_{\text{Coa}}$)来使兔 Coa_{NM} 免疫血清经受亲和色谱。将等摩尔量的经亲和纯化的IgG添加至从首次接受试验的BALB/c小鼠获得的柠檬酸盐血液样品,然后用金黄色葡萄球菌CC8菌株Newman接种样品(Baba 2007)。与没有抗体的对照样品相比, $\alpha\text{-Coa}_{\text{NM}}$ 和 $\alpha\text{-D12}_{\text{Coa}}$ IgG二者均导致凝固时间的明显延迟,而 $\alpha\text{-CT}_{\text{Coa}}$ 不导致延迟(图1D)。因此,兔通过产生主要对抗 D12_{Coa} 和 L_{Coa} 并且干扰分泌的Coa的凝固活性的抗原特异性IgG来对 Coa_{NM} 的免疫进行应答。相反地,对抗 CT_{Coa} 的抗体以较小丰度产生,并且不干扰血液的金黄色葡萄球菌体外凝结。

[0358] 金黄色葡萄球菌凝结的类型特异性和交叉保护性抑制为了检查 $\alpha\text{-Coa}_{\text{NM}}$ 阻止从人类感染分离的其他菌株的凝结的能力,将抗原特异性IgG添加至来自首次接受实验的小鼠的柠檬酸盐血液样品,然后用金黄色葡萄球菌85/2082(CC8)、MW2(CC1)、MSSA476(CC1)、N315(CC5)、Mu50(CC5)、MRSA252(CC30)、CowanI(CC30)、WIS(CC45)和USA600(CC45)接种样品(表4)。 Coa_{NM} 特异性IgG延迟金黄色葡萄球菌Newman(CC8)、85/2082(CC8)和MW2(CC1)的凝固,但不延迟MSSA476(CC1)、N315(CC5)、Mu50(CC1)、MRSA252(CC30)、Cowan(CC3)、WIS(CC45)和USA600(CC45)的凝固(表4)。这些结果表明,对抗 Coa_{NM} 的抗体不仅干扰来自相同CC类型(或Coa类型)的金黄色葡萄球菌的凝结,它们还可以干扰来自其他类型(MW2和MSSA476)的菌株的凝结。观察到的交叉保护的并不通用,因为来自相同MLST(或Coa类型)的菌株不会被对抗 Coa_{NM} 的抗体影响凝结。为了检查类型特异性和交叉保护性抑制的普遍性,纯化了 $\text{Coa}_{85/2082}$ 、 Coa_{MW2} 、 Coa_{N315} 、 $\text{Coa}_{\text{MRSA252}}$ 和 Coa_{WIS} 并产生了兔免疫血清(表4)。 $\text{Coa}_{85/2082}$ 特异性IgG抑制金黄色葡萄球菌Newman(CC8)和85/2082(CC8)的凝结,以及较小程

度地抑制N315 (CC5) 和Mu50 (CC5) 的凝结。对抗Coa_{N315}的抗体抑制金黄色葡萄球菌N315 (CC5)、Mu50 (CC5)、Newman (CC8) 和85/2082 (CC8) 以及MRSA252 (CC30) 的凝固;然而,这些抗体不影响金黄色葡萄球菌CowanI (另一个CC30分离株) 或CC1和CC45菌株的凝结。对抗Coa_{MRSA252}的抗体抑制金黄色葡萄球菌CC1和CC5菌株的凝固,但不影响CC30或CC45分离株的凝固。对抗CC45分离株 (WIS) 的抗体抑制金黄色葡萄球菌CC1菌株的凝固,但不影响CC1、CC5、CC30、或CC45菌株的凝固。总之,金黄色葡萄球菌菌株对小鼠血液的凝结总是被对抗相应Coa (CC8、CC5、CC1和CC30分离株) 所产生的抗体抑制。关于对抗来自CC8菌株的两种凝固酶的抗体和关于CC1和CC5菌株的凝固酶中之一观察到了凝结的交叉中和。最后,对抗来自CC1、CC5、CC8、CC30和CC45菌株的Coa的抗体不中和金黄色葡萄球菌CC45菌株或CowanI (CC30) 的凝固。假设在这些分离株中的血液凝固可能是依赖于另一因子,例如vWbp (参见下文)。

表 4: Coa 抗体对葡萄球菌凝结的类型特异性和交叉保护性抑制

		对抗来自不同金黄色葡萄球菌菌株的凝固酶所产生的 Coa 特异性抗体					
金黄色葡萄 球菌	CC 类 型	α - Coa _{Newman}	α - Coa _{85/2082}	α - Coa _{MW2}	α - Coa _{N315}	α - Coa _{MRSA252}	α - Coa _{WIS}
[0359]	Newman	8	1.7	1.5	1.7	1.9	1.7
	85/2082	8	1.5	1.8	1.3	1.5	1.6
	MW2	1	1.2	1.1	1.1	0.8	1.1
	MSSA476	1	1.0	1.1	1.2	0.9	1.4
	N315	5	1.1	1.2	1.3	1.2	1.3
	Mu50	5	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1
	MRSA252	30	0.9	1.2	1.2	1.3	1.0
	CowanI	30	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0
	WIS	45	1.1	1.2	1.2	0.8	1.2
	USA600	45	0.8	1.0	1.2	1.2	0.8

[0360] 凝固酶抗体和它们对葡萄球菌疾病的保护作用将经纯化的Coa_{NM}、D12_{Coa}或CT_{Coa}乳化,并以初免-加强方案注射到BALB/c小鼠中 (n=10)。通过ELISA检查模拟品 (PBS) 或Coa_{NM}、D12_{Coa}和CT_{Coa}免疫的动物的血清对抗原的IgG应答,其在免疫接种过的动物中显示特异性免疫应答但在对照小鼠中不显示 (图2A-2B)。应注意,用Coa_{NM}免疫小鼠主要产生对抗D12_{Coa}的抗体,而较小程度地产生对抗CT_{Coa}的抗体 (图2A)。D12_{Coa}免疫产生与全长Coa_{NM}反应的高效价抗体。相反地,CT_{Coa}免疫产生弱的抗体应答 (图2A)。通过静脉注射用金黄色葡萄球菌Newman攻击小鼠,然后使用10天的观察期来评价对抗致死败血病的保护 (图2B)。与模拟品免疫过

的动物相比,用Coa_{NM}、D12_{Coa}或CT_{Coa}的免疫接种导致增加的死亡时间 (Coa_{NM}对PBS, $P<0.001$; D12_{Coa}对PBS, $P<0.01$; CT_{Coa}对PBS, $P<0.05$)。在产生对抗致死金黄色葡萄球菌攻击的保护方面,对抗Coa_{NM}的免疫应答没有显著地强于用D12_{Coa}或CT_{Coa}的免疫接种 (Coa_{NM}对CT_{Coa}, $P>0.05$; D12_{Coa}对CT_{Coa}, $P>0.05$)。

[0361] 测试了对抗D12_{Coa}或CT_{Coa}的抗体是否提供对抗金黄色葡萄球菌致死攻击的保护。将经亲和纯化的兔IgG以5mg/kg体重的浓度注射到首次接受实验的BALB/c小鼠的腹腔中 (图2C)。24小时后,通过静脉注射金黄色葡萄球菌Newman攻击小鼠 (图2C)。与对照抗体[对V10鼠疫保护性抗原 (DeBord 2006) 特异的IgG (α -V10)]相比,对抗Coa_{NM}、D12_{Coa}或CT_{Coa}的IgG各自导致被攻击动物的对应群体的死亡时间延迟 (所有疫苗对PBS, $P<0.05$) (图2C)。在对抗D12_{Coa}、CT_{Coa}或全长Coa_{NM}的抗体之间没有检测到显著性差异 (图2C)。因此,当与D12_{Coa}和L_{Coa}相比时,用CT_{Coa}结构域的免疫引起低的抗体应答,然而对抗D12_{Coa}和CT_{Coa}的抗体的被动转移提供相似水平的对抗金黄色葡萄球菌Newman致死攻击的保护。这些数据表明,抗体介导的金黄色葡萄球菌Newman凝固酶活性的中和不是疾病保护的先决条件。在暴露于全长Coa_{NM}后,BALB/c小鼠具有稳定的对抗D12_{Coa}和L_{Coa}的免疫应答,但几乎不产生对抗CT_{Coa}的抗体。

[0362] 对抗血管假性血友病因子结合蛋白结构域的抗体用来自金黄色葡萄球菌Newman的vwb基因 (vWbp_{NM}) 的经亲和纯化的His标记的vWbp使兔免疫。通过ELISA检查免疫血清,这显示对抗原的血清IgG抗体应答 (图3A-3B)。为了分析对特异亚结构域的抗体应答,使经亲和纯化的D1_{vWbp}、D2_{vWbp}、D12_{vWbp}、L_{vWbp}和CT_{vWbp}经受ELISA (图3B)。测试具有对抗每一种亚结构域的抗体的免疫血清 (图3B)。应注意,对抗D1_{vWbp}和D2_{vWbp}的抗体比一起识别这两种结构域 (D12_{vWbp}) 的抗体丰度低。与对抗D12_{vWbp}的免疫应答相比,对抗CT_{vWbp}的抗体丰度低30% (D12_{vWbp}对CT_{vWbp}, $P>0.05$)。为了探索抗体在免疫血清中的生物功能,本发明人使用可变量的vWbp_{NM}特异性IgG来干扰D12_{vWbp}与人类凝血酶原的缔合或者CT_{vWbp}与纤维蛋白原的缔合 (图3C-3D)。本发明人计算出1.3 μ M α -vWbp IgG阻止D12_{vWbp}与凝血酶原结合,而1.3 μ M α -vWbp IgG阻止CT_{vWbp}与纤维蛋白原的缔合 (图3D)。

[0363] 将等摩尔量的经亲和纯化的IgG添加至从首次接受试验的BALB/c小鼠获得的柠檬酸盐血液样品,然后用来源于金黄色葡萄球菌Newman的coa突变体接种样品 (Cheng 2010)。与没有抗体的对照样品相比, α -vWbp和 α -D12_{vWbp}二者均导致凝固时间小幅延迟,而 α -CT_{vWbp}不延迟凝固时间 (图3D)。因此,兔通过产生对抗D12_{vWbp}、L_{vWbp}和CT_{vWbp}的抗原特异性IgG分子来对用Coa_{NM}的免疫进行应答。对抗D12_{vWbp}的抗体干扰vWbp介导的小鼠血液的体外凝结。

[0364] 对抗vWbp结构域的抗体及其对葡萄球菌疾病的保护作用将经纯化的vWbp_{NM}、D12_{vWbp}或CT_{vWbp}乳化,并以初免-加强方案注射到BALB/c小鼠中 ($n=10$)。通过ELISA检查模拟品 (PBS) 或vWbp_{NM}、D12_{vWbp}和CT_{vWbp}免疫的动物的血清对抗原的IgG应答,其在免疫接种过的动物中显示特异性免疫应答但在对照小鼠中不显示 (图4A-4B)。应注意,用vWbp_{NM}免疫小鼠主要产生对抗D12_{vWbp}的抗体,而较小程度地产生对抗CT_{vWbp}的抗体 (图4A)。D12_{vWbp}免疫产生与全长vWbp_{NM}反应的高效价抗体 (图4A)。相反地,CT_{vWbp}免疫产生弱的抗体应答。通过静脉注射用金黄色葡萄球菌Newman攻击小鼠,然后使用10天的观察期来评价对抗致死败血病的保护 (图4B)。与模拟品免疫过的动物相比,用vWbp_{NM}、D12_{vWbp}或CT_{vWbp}的免疫接种导致增加的死亡时间 (vWbp_{NM}对PBS, $P<0.01$; D12_{vWbp}对PBS, $P<0.05$; CT_{vWbp}对PBS, $P<0.05$)。在产生对抗致死金黄色葡萄球菌攻击的保护方面,对抗vWbp_{NM}的免疫应答强于用D12_{vWbp}的接种,但不强于用

CT_{vWbp}的免疫接种(vWbp_{NM}对D12_{vWbp}, $P < 0.05$; vWbp_{NM}对CT_{vWbp}, $P > 0.05$) (图4B)。

[0365] 检测了对抗D12_{vWbp}或CT_{vWbp}的抗体是否提供对抗金黄色葡萄球菌致死攻击的保护。将经亲和纯化的兔IgG以5mg/kg体重的浓度注射到首次接受实验的BALB/c小鼠的腹腔中(图4C)。24小时后,通过静脉注射金黄色葡萄球菌Newman攻击小鼠(图4C)。与对照抗体(α -V10)相比,对抗vWbp_{NM}、D12_{vWbp}或CT_{vWbp}的IgG各自导致被攻击动物的对应群体的死亡时间延迟(所有疫苗vs. PBS, $P < 0.05$) (图4C)。在对抗D12_{vWbp}、CT_{vWbp}或全长vWbp_{NM}的抗体之间没有检测到显著性差异(图4C)。因此,与D12_{vWbp}相反,用CT_{vWbp}结构域的免疫引发低的抗体应答。对抗D12_{vWbp}和CT_{vWbp}的抗体的被动转移提供相似水平的对抗金黄色葡萄球菌Newman致死攻击的保护。这些数据表明,抗体介导的金黄色葡萄球菌Newman vWbp的中和与疾病保护有关,所述中和可以通过对抗D12_{vWbp}或CT_{vWbp}的抗体发生。在暴露于全长vWbp_{NM}后,BALB/c小鼠具有稳定的对抗D12_{vWbp}和L_{vWbp}的免疫应答,但几乎不产生对抗CT_{vWbp}的抗体。

[0366] Coa_{NM}/vWbp_{NM}疫苗的交叉保护属性将经纯化的重组Coa_{NM}和vWbp_{NM}乳化,并以初免-加强免疫方案注射到BALB/c小鼠($n=10$)中。通过ELISA检查模拟品(PBS)和Coa_{NM}/vWbp_{NM}免疫的动物的血清对Coa_{NM}以及vWbp_{NM}的IgG应答,其在免疫接种过的动物中显示特异性免疫应答但在对照小鼠中不显示(图5A)。使用利用金黄色葡萄球菌静脉注射小鼠以及10天的观察期来评价对抗各种菌株的致死败血病的疫苗保护(图5)。作为对照,Coa_{NM}/vWbp_{NM}免疫产生对抗金黄色葡萄球菌Newman(CC8) (Cheng 2010) (数据未显示)和USA300(CC8)的保护,但不产生对抗MW2(CC1)或N315(CC5)的保护(图5B-5D)。然而,Coa_{NM}/vWbp_{NM}免疫产生对抗金黄色葡萄球菌CowanI(CC30)和WIS(CC45)的攻击的保护。综合起来,这些数据表明Coa_{NM}/vWbp_{NM}疫苗提供对抗一些但不是全部的凝固酶类型菌株的类型特异性免疫以及交叉保护(图5E-5F)。

[0367] 由Coa₄/vWbp₂疫苗引起的免疫应答经改造的多肽Coa₄具有Coa_{MRSA252}、Coa_{MW2}、Coa_{N315}的D12结构域和全长Coa_{USA300}以及N端His₆和C端STREP标记物(图6A)。Coa₄是通过StrepTactin琼脂糖凝胶亲和色谱纯化的(图6B)。当用考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE分析时,经亲和纯化的Coa₄显示为190kDa多肽。Coa₄包含来自北美患者的最常见凝固酶型金黄色葡萄球菌分离株的D12结构域(CC1、CC5、CC8、CC30、CC45) (DeLeo 2010)。vWbp₂多肽包含vWbp_{N315}的D12结构域和全长vWbp_{USA300}以及N端His₆和C端STREP标记物(图6A)。通过亲和色谱纯化vWbp₂,其产出在考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE上以85kDa的期望质量迁移的多肽(图6B)。用Coa_{NM}/vWbp_{NM}或Coa₄/vWbp₂的初免-加强方案使小鼠($n=5$)免疫,并通过ELISA检测对各种凝固酶和血管假性血友病因子结合蛋白类型的免疫应答(图6C)。Coa_{NM}/vWbp_{NM}疫苗在小鼠中产生结合至来自CC8菌株的凝固酶,但是对Coa_{N315}、Coa_{MRSA252}、Coa_{MW2}或Coa_{WIS}几乎不显示交叉反应性的抗体。通过比较,Coa₄免疫产生不仅对抗CC8型凝固酶、还对抗来自CC1、CC5、CC30和CC45菌株的凝固酶的更高效价的抗体。与vWbp_{NM}相比,vWbp₂产生对抗CC5和CC8菌株的vWbp高效价抗体。

[0368] Coa₄/vWbp₂疫苗的交叉保护属性将经纯化的重组Coa₄/vWbp₂乳化,并使用初免-加强免疫策略注射到BALB/c小鼠($n=10$)中。通过ELISA检查模拟品(PBS)和Coa_{NM}/vWbp_{NM}免疫的动物的血清对Coa₄以及vWbp₂的IgG应答,其在免疫接种过的动物中显示抗原特异性免疫应答但在对照小鼠中不显示(图7A)。使用利用金黄色葡萄球菌静脉注射小鼠以及10天的观察期来评价对抗致死败血病的疫苗保护(图7)。如所预计的,Coa₄/vWbp₂免疫产生对抗金黄

色葡萄球菌CC8菌株USA300的保护 (Cheng 2010)。与Coa_{NM}/vWbp_{NM}相似,Coa₄/vWbp₂疫苗产生对抗金黄色葡萄球菌CowanI (CC30) 和WIS (CC45) 的攻击的保护。与Coa_{NM}/vWbp_{NM}不同,Coa₄/vWbp₂保护小鼠对抗金黄色葡萄球菌N315 (CC5) 或MW2 (CC1) 的致死攻击 (图7B-7D)。综合起来,这些数据表明Coa_{NM}/vWbp_{NM}疫苗提供对抗一些但不是全部的凝固酶类型菌株的类型特异性免疫以及交叉保护 (图7E-7F)。此外,Coa₄/vWbp₂疫苗保护动物对抗从患有葡萄球菌疾病的北美患者分离的相关金黄色葡萄球菌CC类型的攻击。

[0369] 本发明人还检查了Coa₄/vWbp₂免疫是否可以保护小鼠对抗葡萄球菌脓肿形成。利用Coa₄/vWbp₂或模拟品对照的初免-加强策略使BALB/c小鼠免疫,然后通过静脉接种亚致死量的金黄色葡萄球菌菌株USA300、N315、MW2或CowanI来攻击小鼠。攻击后第5天,使动物安乐死,解剖尸体并取出肾。将各个小鼠的两个肾之一的组织固定,切薄片,并用苏木精/伊红染色以用于后续组织病理学分析 (表5)。使另一个肾的组织匀浆化,在琼脂板上摊开来以菌落形成单位计算葡萄球菌负载 (表5)。Coa₄/vWbp₂免疫影响用各种金黄色葡萄球菌菌株感染的小鼠的肾组织中的细菌负载,其对于金黄色葡萄球菌MW2和CowanI导致显著减少,但对于USA300和N315没有导致显著减少。这是预计的结果,因为Coa特异性或vWbp特异性抗体不促进细菌的调理吞噬杀死,但是干扰葡萄球菌脓肿形成,从而降低葡萄球菌在这些损伤的保护性环境内复制的能力 (Cheng 2010)。与模拟品免疫过的动物相比,在用金黄色葡萄球菌菌株USA300、CowanI、MW2或N315攻击后第5天,Coa₄/vWbp₂免疫减少了肾组织中的葡萄球菌脓肿形成 (表5)。

表 5: 用 Coa₄/vWbp₂ 使小鼠主动免疫和对抗金黄色葡萄球菌菌株 USA300、N315、MW2 或 CowanI 的攻击的保护

疫苗	肾组织中的葡萄球菌负载 [*]			脓肿形成 [*]		
	^a log ₁₀ CFU·g ⁻¹ (SEM)	^b 显著性 (P 值)	^c 减少 (log ₁₀ CFU·g ⁻¹)	^d 损伤的 数目	^e 显著性 (P 值)	
[0370]	金黄色葡萄球菌 USA300					
	模拟品	7.31 (0.37)	-	-	8.8 (1.72)	-
	Coa ₄ /vWbp ₂	6.48 (0.41)	0.150	0.835	4.3 (1.11)	0.0434
	金黄色葡萄球菌 N315					
	模拟品	7.25 (0.13)	-	-	16.6 (1.49)	-
	Coa ₄ /vWbp ₂	7.10 (0.24)	0.805	0.151	11.3 (0.84)	0.0205
	金黄色葡萄球菌 MW2					
	模拟品	8.04 (0.25)	-	-	66.5 (8.41)	-
	Coa ₄ /vWbp ₂	7.25 (0.20)	0.029	0.789	27.5 (4.39)	0.0011
	金黄色葡萄球菌 CowanI					
	模拟品	6.94 (0.16)	-	-	7.9 (1.27)	-
	Coa ₄ /vWbp ₂	5.59 (0.51)	0.028	1.35	4.6 (0.73)	0.0279

[0371] 关于凝固酶的早期工作证明,在金黄色葡萄球菌感染后,人类以及动物都产生Coa特异性抗体 (Tager 1948;Lominski 1946)。当转移至初次接受试验的兔时,这些抗体可以中和金黄色葡萄球菌凝结,并且至少在一些情况下,可以赋予对金黄色葡萄球菌攻击的免疫力 (Lominski 1949;Lominski 1962)。利用含有凝固酶的制剂的兔的主动免疫可以延长

已经通过静脉接种用致死剂量的金黄色葡萄球菌攻击的兔的生命 (Boake 1956)。比较不同 (噬菌体类型) 金黄色葡萄球菌分离株通过凝固酶抗血清对血浆凝块的抑制显示噬菌体类型特异性和非特异性中和二者 (Lominski 1946; Lominski 1962; Rammelkamp 1950; Duthie 1952; Harrison 1964)。这些数据支持存在Coa的血清学类型的一般概念, Coa的血清学类型并非严格地与金黄色葡萄球菌噬菌体类型关联 (Rammelkamp 1956)。

[0372] 检查包含吸附至磷酸铝的来自金黄色葡萄球菌菌株M1和Newman的经纯化Coa的经纯化凝固酶类毒素对71名患有慢性疳病的患者的治疗性免疫 (Harrison 1963)。与安慰剂相比, 凝固酶免疫产生凝固酶特异性抗体效价的增加, 但不能改善慢性疳病的临床结果 (Harrison 1963)。应注意的是, 没有检查中和抗体的发展或类型特异性免疫的可能性 (Harrison 1963)。因此, 尽管早期工作显示了凝固酶亚单位疫苗的临床前功效, 但是临床研究在人体试验中没有证明功效。由于这些研究的大多数是在1945至1965年进行的, 所以必须考虑用于分离高纯度凝固酶的有限工具以及不能够根据其核苷酸序列对金黄色葡萄球菌菌株或凝固酶疫苗制剂分型。另外, 早期研究是在不具备vWbp的知识或不具备Coa和vWbp调节的凝血酶原活化和纤维蛋白原裂解的分子机制的知识下进行的 (Friedrich 2003; Kroh 2009)。最近观察到由金黄色葡萄球菌Newman分泌的凝固酶Coa_{NM}和vWbp_{NM}二者对于该菌株在小鼠中引起脓肿形成和迅速致死菌血病的能力均是足够的 (Cheng 2010)。在主动和被动免疫实验中, 需要对抗Coa_{NM}和vWbp_{NM}二者的抗体以提供对抗脓肿形成或致死菌血病的保护 (Cheng 2010)。基于这些观察结果, 假设凝固酶可以作为引起对抗Coa和vWbp的抗体应答的保护性抗原, 其保护动物和人类免受金黄色葡萄球菌疾病 (Cheng 2010)。与该模型一致的, coa和vwb的表达是金黄色葡萄球菌菌株的通用特点 (Cheng 2010)。应注意的是, 金黄色葡萄球菌分离株的coa基因是可变的 (McCarthy 2010), 在氨基酸序列中甚至具有比蛋白A (spa) 基因的串联重复更大的变化; spa中的变异用于流行病学分型实验 (Watanabe 2009; Koreen 2004)。还没有从患有明显葡萄球菌疾病的人类分离出不能够表达coa的金黄色葡萄球菌突变体。vwb基因是较不可变的 (McCarthy 2010)。通过分析目前可用的金黄色葡萄球菌基因组序列的vwb同源性, 鉴定了三种等位基因。vwb等位基因的两种在其用于D12结构域的编码序列方面不同 (金黄色葡萄球菌N315和USA300是这些等位基因的代表), 而第三种等位基因在密码子102中具有核苷酸删除, 从而产生在密码子107中导致无义突变的移码突变 (金黄色葡萄球菌MRSA252)。

[0373] 通过这些观察结果, 在此报道兔或小鼠的Coa和vWbp免疫主要产生对抗Coa_{NM}或vWbp_{NM}的D12结构域的抗体。D12特异性抗体中和金黄色葡萄球菌Newman的凝固酶活性, 并且在被转移至首次接受试验的动物时, 提供对抗致死菌血病的保护。Coa_{NM}和vWbp_{NM}特异性抗体的中和与疾病保护以类型特异性方式发生, 而不是与报道的关于化脓链球菌M蛋白 (Lancefield 1928; Lancefield 1962) 或化脓链球菌和无乳链球菌的菌毛 (T) 抗原 (Mora 2005; Niccietelli 2011) 的类型特异性免疫不同。受菌毛抗原的结构疫苗学方法 (Nuccietelli 2011; Schneewind 2011) 启发, 设计了包含来自北美金黄色葡萄球菌分离株CC1、CC5、CC8、CC30和CC45菌株的主要Coa和vWbp类型的D12结构域的两种多肽 (Tenover 2012)。纯化产物Coa₄和vWbp₂用作抗原, 并且引起对抗所检查的每种Coa和vWbp类型的D12结构域的抗体应答。用Coa₄/vWbp₂使小鼠免疫提供对抗代表性金黄色葡萄球菌CC1、CC5、CC8、CC30和CC45菌株的致死菌血病攻击的保护。因此, 已经满足了Coa₄/vWbp₂疫苗产生对抗Coa

和vWbp的对抗临床相关的金黄色葡萄球菌的通用免疫应答的设计标准。

[0374] 除了通过对抗D12结构域的抗体对Coa和vWbp的类型特异性中和,对抗R (Coa) 和CT结构域 (vWbp) 的抗体也提供对抗金黄色葡萄球菌疾病的保护。由于对抗R和CT结构域的抗体不经由分泌的Coa-凝血酶原和vWbp-凝血酶原复合物影响纤维蛋白的凝结,所以推测这些适应性免疫机制经由另一基质靶向凝固酶。目前不理解对抗Coa的R结构域或vWbp的CT结构域的抗体如何提供保护。看起来可信的是,这些抗体可以经由免疫复合物与噬菌体上Fc受体的结合来介导Coa和vWbp从循环中的移除。在保护的分子机制被揭示前,不能理解靶向Coa的R结构域或vWbp的CT结构域的免疫策略的整体价值。

[0375] B. 材料和方法

[0376] 细菌菌株和培养物的生长在37℃下,在胰酶大豆琼脂上或者液体培养基中培养金黄色葡萄球菌菌株。在37℃下,在Luria Bertani琼脂上或液体培养基中培养大肠杆菌菌株DH5α和BL21 (DE3)。氨比西林 (100μg/mL) 用于pET15b和pGEX2tk选择。用于葡萄球菌DNA扩增的引物在表6中显示。

表 6 所使用的引物

引物名称	序列
F-N315coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAT CAAG (SEQ ID NO: 1)
R-N315coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAAT CAAG (SEQ ID NO: 2)
R-MW2coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAA (SEQ ID NO: 3)
R-MW2coa	TCCCCCGGGTTATTTTGTACTCTAGGCCATA (SEQ ID NO: 4)
F-M252coa	CGCGGATCCATAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAATC AAGAG (SEQ ID NO: 5)
R-M252coa	TCCCCCGGGTTATTTTGTACTCTAGGACCATATGTC (SEQ ID NO: 6)
F-U300coa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAAT (SEQ ID NO: 7)
[0377] R-U300coa	TCCCCCGGGTTATTTTGTACTCTAGGCCATA (SEQ ID NO: 8)
F-WIScoa	CGCGGATCCATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAAT (SEQ ID NO: 9)
R-WIScoa	TCCCCCGGGTTATTTTGTACTCTAGGACCATATGTC (SEQ ID NO: 10)
F-85coa	CGCGGATCCATAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAATC AAGAG (SEQ ID NO: 11)
R-85coa	TCCCCCGGGTTATTTTGTACTCTAGGACCATATGTC (SEQ ID NO: 12)
F-VUSA300FL -XhoI	CCGCTCGAGGTGGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 13)
R-VUSA300FL -BamHI	CGGGATCCTTATTTGCCATTATATACTTTATTGATTT (SEQ ID NO: 14)
F-VN315FL-X hoI	CCGCTCGAGGTGGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 15)
R-VN315FL-B	CGGGATCCTTATTTGCCATTGTATACTTTATTG (SEQ ID

	amHI	NO: 16)
	F-CUSA300-N coI	CATGCCATGGCCTAGGATAGTAACAAAGGATTATAGT GGGAAAT (SEQ ID NO: 17)
	R-CUSA300-B amHI	CGGGATCCTTATTTTGTACTCTAGGCCATA (SEQ ID NO: 18)
	F-CN315-NcoI	CATGCCATGGCTCGAGATAGTAACAAAGGATTATAGT AAAGAATC (SEQ ID NO: 19)
	R-CN315-AvrII	CCTAGGCGGACCATATTGAGAAGC (SEQ ID NO: 20)
	F-CMW2-NcoI	CATGCCATGGCCGCGGATAGTAACAAAGGATTATAGT GGGAAA (SEQ ID NO: 21)
	R-CMW2-XhoI	GGCTCGAGTTTTTTTGACAGTTTTATTTTCCA (SEQ ID NO: 22)
	F-CMRSA-Nco I	CATGCCATGGCCCGGGATAGTAATAAGATTATAGTA AAGAATCAAGAG (SEQ ID NO: 23)
	R-CMRSA-Sac II	TCCCCGCGGATTTTTGACGGTTCTTGTTTTCCAAGATT (SEQ ID NO: 24)
[0378]	F-VUSA300-N coI	CATGCCATGGCCTAGGGTGGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 25)
	R-VUSA300-B amHI	CGGGATCCTTATTTGCCATTATATACTTTATTGATTT (SEQ ID NO: 26)
	F-VN315-NcoI	CATGCCATGGCTCGAGGTGGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 27)
	R-VN315-AvrI I	CCTAGGTGTATTGTTAAAGTCCTTTAAATCAC (SEQ ID NO: 28)
	F-His-CMRSA	CATGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACA GCAGCATAGTAATAAGATTATAGTAAAGAATCAAG AG (SEQ ID NO: 29)
	F-His-VN315	CATGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACA GCAGCGTGGTTTCTGGGGAGAAG (SEQ ID NO: 30)
	R-USA300Coa Strep	CGGGATCCTTACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCATT TTGTTACTCTAGGCCATA (SEQ ID NO: 31)
	R-USA300vwb Strep	CGGGATCCTTACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCATT TGCCATTATATACTTTATTGATTT (SEQ ID NO: 32)

[0379] Coa₄和vWbp₂为了产生杂交蛋白,将来自菌株USA300的coa和cwb进行PCR扩增。5'引物包含插入到载体(pET15b)上的限制位点(NcoI),以及供将来使用的另外的限制酶(AvrII)。3'引物包含用于载体插入的限制位点(BamHI)。将插入物克隆到大肠杆菌菌株DH5α中。在每个之后的克隆循环中,将来自下一个等位基因的D12添加至载体5'以预先插入。在每种情况下,5'引物包含载体位点(NcoI)和供将来使用的另外的限制酶位点。用于每个序列插入物的3'引物含有包含在5'引物中以用于预先插入的限制位点(用于N315的AvrII)。

在之后的克隆循环中,恢复启动子区域和His标记物,并在另一克隆循环中添加C端STREP标记物。对整个载体进行测序以核实DNA序列品质。最后,将每个载体转化到大肠杆菌菌株BL21中以用于蛋白质表达和纯化。

[0380] 蛋白质纯化使具有包含来自金黄色葡萄球菌Newman的coa;来自金黄色葡萄球菌菌株Newman、USA300和N315的vwb;或coa和vwb的亚结构域的表达载体;和含有用于杂交蛋白Coa₄和vWbp₂的基因序列的表达载体的大肠杆菌BL21 (DE3) 在37℃生长,并且在室温下用100mM IPTG诱导过夜。由于在Coa的纯化期间发生降解,使用大肠杆菌DH5α中的pGEX2tk表达载体来表达来自USA300、N315、MW2、MRSA252、85/2082和WIS的coa作为GST标记的构成物。诱导后三小时,将细胞以7000×g离心,悬浮于1×柱缓冲液(0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.5M NaCl),然后在弗氏压碎器中(French pressure cell)以14000磅/英寸²溶解细胞。使溶解物进行40000×g的超速离心30分钟。使pET15b构成物的上清液经受Ni-NTA色谱,用柱缓冲液和10mM咪唑清洗,然后用500mM咪唑洗脱。对于链霉素(strep)标记的蛋白,使溶解物上清液经受StrepTactin琼脂糖色谱(GE Healthcare),以1×strep清洗缓冲液(0.1M Tris-HCl, pH 8, 0.150M NaCl, 0.1M EDTA)清洗,然后以含有2.5mM脱硫生物素的1×strep清洗缓冲液洗脱。对于GST标记的蛋白质,使澄清溶解物的上清液经受谷胱甘肽-琼脂糖色谱。为了除去GST标记物,在用柱缓冲液清洗后,将柱缓冲液换成含有10mM DTT的PreScission蛋白酶裂解缓冲液,并用PreScission蛋白酶(GE Healthcare)在GE提供的单位定义下培养柱过夜。然后,利用另外的蛋白酶裂解缓冲液收集所释放的缺少GST标记物的蛋白质。用PBS透析洗脱液。为了除去内毒素,添加1:100Triton-X114,然后将溶液冷冻10分钟,在37℃培养10分钟,然后以13000×g离心。这重复两次。将上清液装载到HiTrap脱盐柱以除去剩余的Triton-X114。

[0381] 兔抗体用BCA试剂盒(Pierce)测定蛋白质浓度。通过SDS-PAGE分析和卡马斯亮蓝染色核实纯度。对于起始免疫,用在CFA(Difco)中乳化的500μg蛋白质使6个月大的新西兰雌性白兔免疫,或者对于第24天和第48天的增强免疫,用在IFA中乳化的500μg蛋白质使其免疫。在第60天,从兔取血,并且回收血清用于免疫印迹或被动转移实验。为了抗体纯化,将重组的His₆-Coa、His₆-vWbp或His₆-ClfA(5mg)共价地连接至HiTrap NHS活化的HP柱(GE Healthcare)。然后在4℃下,将该抗原基质用于10至20mL兔血清的亲和色谱。用50个柱体积的PBS清洗所填充的基质,用洗脱缓冲液(1M甘氨酸pH 2.5, 0.5M NaCl)洗脱抗体,并立即用1M Tris-HCl(pH 8.5)中和。用PBS、0.5M NaCl在4℃下透析经纯化的抗体过夜。

[0382] 凝结分析将葡萄球菌菌株的过夜培养物以1:100稀释到新鲜TSB中,然后在37℃下生长直至它们达到OD₆₀₀ 0.4。离心1mL培养物,清洗葡萄球菌,并使其悬浮于1mL无菌PBS中以产生1×10⁸CFU/mL的悬浮液。收集来自初次接受试验的BALB/c小鼠的全血,并添加柠檬酸钠至最终浓度1%(w/v)。为了评价在抗体存在下的细菌血液凝结活性,将10μL群体细菌培养物与含有30μM的抗Coa和抗vWbp混合物的10μLPBS在无菌塑料试管(BD Falcon)中混合,然后培养15分钟。向各个试管添加在无菌塑料试管(BD Falcon)中的80μL抗凝结的小鼠血液以实现1×10⁷CFU/mL的最终浓度。在37℃下培养试管,然后通过以定时的间隔倾斜试管至45°来核实血液凝结。对于人类血液实验,从获得同意的个体取10mL血液,将其用柠檬酸钠处理至最终浓度1%(w/v)。然后以上述方式测试血液。所有实验以至少两个独立实验进行重复。

[0383] 主动免疫用在60μL不完全弗氏佐剂和40μL完全弗氏佐剂中乳化的50μg蛋白质注射三周大BALB/c小鼠(n=10)。免疫接种后11天,用分别在100μL不完全弗氏佐剂中乳化的50μg蛋白质强化免疫这些小鼠。在第21天,用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠,通过使用微型红细胞压积毛细管(Fisher)的眼球后出血将血液收集到Z-Gel微型管(Sarstedt)中用于测定半最高效价。以10000×g离心试管3分钟,并收集血清。通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测量半最高抗体效价。

[0384] 抗体的被动转移在感染前6小时,以5mg/kg体重的剂量,用对抗Coa或vWbp的全长或亚结构域构成物、或者V10的全长或亚结构域构成物(对LcrV鼠疫抗原特异的对照IgG)的经亲和纯化的抗体对六周大BALB/c小鼠进行腹腔内注射(n=10)。

[0385] 败血病将葡萄球菌菌株的过夜培养物以1:100稀释到新鲜TSB中,然后生长直至它们达到0.4的OD₆₀₀。以7000×g离心细菌,清洗细菌,然后使其悬浮于十分之一体积的PBS中。用1×10⁸CFU(金黄色葡萄球菌Newman、N315、CowanI和WIS)、5×10⁷CFU(金黄色葡萄球菌USA300)或2×10⁸CFU(金黄色葡萄球菌MW2)在100μL PBS中的悬浮液以眼球后方式对六周大雌性BALB/c小鼠进行注射(n=15)。监测小鼠存活率超过10天。

[0386] 肾脓肿如所描述的制备金黄色葡萄球菌菌株用于败血病,但清洗后,细菌小球以等体积重悬,这导致与败血病相比少一个对数的CFU。为了计算感染后5天时在肾组织中的葡萄球菌负载,通过CO₂室息法使小鼠安乐死,并且在尸体解剖期间取出肾。使每个小鼠的一个肾在PBS和1%Triton X-100中匀浆化。将匀浆的连续稀释液在TSA上展开,然后培育用于克隆形成。在野生型之间以成对比较来分析组织中的细菌负载,而用未配对双尾Student's t-检验来分析突变菌株。对于组织病理学,将另一个肾在室温下在10%福尔马林中固定24小时。将组织包埋在石蜡中,切薄片,用苏木精和伊红染色,然后用光学显微镜检查以计算每个器官的生理学损伤。在野生型之间以成对比较来分析数据,而用未配对双尾Student's t检验来分析数据。

[0387] 凝固酶活性的测量在室温下以等摩尔量的功能性Coa预培养5×10⁻⁸M凝血酶原(Innovative Research)10分钟,然后添加S-2238(生色物质)至在100μL PBS的总反应缓冲液中1mM的最终浓度。在分光光度计中测量在450nm处的吸光度变化10分钟,绘制随时间变化的曲线,并拟合成线性曲线。曲线的斜率(dA/dt)理解为S-2238水解的速率,由此反应酶功能。在以5×10⁻⁹M添加的多克隆抗体存在下重复分析,将数据归一化成没有抑制的平均活性。所有实验重复三次进行。

[0388] 凝固酶活性在1%柠檬酸钠/PBS中,将经纯化的重组Coa或vWbp(10nM)与人类凝血酶原(Innovative Research)混合。初次读数后,添加纤维蛋白原(3μM)(Sigma),然后在读板器(BioTek)中以2.5分钟的间隔根据浊度的增加测量纤维蛋白原至纤维蛋白的转化。作为对照,测量单独的人类α-凝血酶(Innovative Research)或凝血酶原的酶活性。

[0389] 序列表格1:

[0390] 来自菌株MRSA252的Coa的D1-2结构域:

	IVTKDYSKES RVNENSKYDT PIPDWYLGSI LNRLGDQIYY AKELTNKYEY	50
	GEKEYKQAID KLMTRVLGED HYLLEKKKAQ YEAYKKWFEEK HKSENPSSSL	100
[0391]	KKIKFDDFDL YRLTKKEYNE LHQSLKEAVD EFNSEVKNIQ SKQKDLLPYD	150
	EATENRVTNG IYDFVCEIDT LYAAYFNHSQ YGHNAKELRA KLDIILGDAK	200
	DPVRITNERI RKEMMDDLNS IIDDFMDTN MNRPLNITKF NPNIHDTYTNK	250
	PENRDNFDFKL VKETREAIAAN ADESWKTRTV KN (SEQ ID NO: 33)	
[0392]	来自菌株MW2的Coa的D1-2结构域:	
	IVTKDYSKES QVNAGSKNGK QIADGYYWGI IENLENQFYN IFHLLDQHKY	50
	AEKEYKDAVD KKLTRVLEED QYLLERKKEK YEIYKELYKK YKKENPNTQV	100
[0393]	KMKAFDKYDL GDLTMEEYND LSKLLTKALD NFKLEVKKIE SENPDLKPYS	150
	ESEERTAYGK IDSLVDQAYS VYFAYVTDAQ HKTEALNLRA KIDLILGDEK	200
	DPIRVTNQRT EKEMIKDLES IIDDFFIETK LNRPKHITRY DGTKHDYHKKH	250
	KDGFDAVKE TREAVAKADE SWKNKTVKK (SEQ ID NO: 34)	
[0394]	来自菌株WIS的Coa的D1-2结构域:	
	IVTKDYSKES QVNAGSKNGK QIADGYYWGI IENLENQFYN IFHLLDQHKY	50
	AEKEYKDALD KKLTRVLEED QYLLERKKEK YEIYKELYKK YKKENPNTQV	100
[0395]	KMKAFDKYDL GDLTMEEYND LSKLLTKALD NFKLEVKKIE SENPDLRPYS	150
	ESEERTAYGK IDSLVDQAYS VYFAYVTDAQ HKTEALNLRA KIDLILGDEK	200
	DPIRVTNQRT EKEMIKDLES IIDDFFIETK LNRPKHITRY DGTKHDYHKKH	250
	KDGFDAVKE TREAVSKADE SWKTKTVKK (SEQ ID NO: 35)	
[0396]	来自菌株N315的Coa的D1-2结构域:	
	IVTKDYSKES RVNEKSKKGA TVSDYYYWGI IDSLEAQFTG AIDLLEDYKY	50
	GDPIYKEAKD RLMTRVLGED QYLLKKKIDE YELYKKWYKS SNKNTNMLTF	100
[0397]	HKYNLYNLTM NEYNDIFNSL KDAVYQFNKE VKEIEHKNVD LKQFDKDGED	150
	KATKEVYDLV SEIDTLVVTY YADKDYGEHA KELRAKLDLI LGDTDNPHKI	200
	TNERIKKEMI DDLNSIIDDF FMETKQNRPN SITKYDPTKH NFKEKSENKP	250
	NFDKLVEETK KAVKEADESW KNKTVKK (SEQ ID NO: 36)	
[0398]	来自菌株USA300的Coa的D1-2结构域:	
	IVTKDYSKES QVNAGSKNGT LIDSRYLNSA LYLEDYIY AIGLTNKYEY	50
	GDNIYKEAKD RLLEKVLRED QYLLERKKSQ YEDYKQWYAN YKKENPRTDL	100
[0399]	KMANFHKYNL EELSMKEYNE LQDALKRALD DFHREVVDIK DKNSDLKTFN	150
	AAEEDKATKE VYDLVSEIDT LVVSYYGDKD YGEHAKELRA KLDLILGDTD	200
	NPHKITNERI KKEMIDDLNS IIDDFMETK QNRPKSITKY NPTTHNYKTN	250
	SDNKPFDKL VEETKKAVKE ADDSWKKKTV KK (SEQ ID NO: 37)	
[0400]	序列表格2:	

- [0401] 来自菌株N315的vWbp的D1-2结构域:
VVSGEKNPYV SKALELKDKS NKSNSYENYR DSLES LISSL SFADYEKYEE 50
- [0402] PEYEKAVKKY QQKFMAEDDA LKNFLNEEKK IKNADISRKS NNLLGLTHER 100
YSYIFDTLKK NKQEFLKDIE EIQLKNSDLK DFNNT (SEQ ID NO: 38)
- [0403] 来自菌株MW2的vWbp的D1-2结构域:
VVSGEKNPYV SESLKLTNNK NKSRTVEEYK KSLDDLIWSF PNLDNERFDN 50
- [0404] PEYKEAMKKY QQRFMAEDEA LKKFFSEEKK IKNGNTDNLD YLGLSHERYE 100
SVFNTLKKQS EEFLKEIEDI KKDNP ELKDF NE (SEQ ID NO: 39)
- [0405] 来自菌株USA300的D1-2结构域L和Fgb结构域:
VVSGEKNPYV SESLKLTNNK NKSRTVEEYK KSLDDLIWSF PNLDNERFDN 50
PEYKEAMKKY QQRFMAEDEA LKKFFSEEKK IKNGNTDNLD YLGLSHERYE 100
SVFNTLKKQS EEFLKEIEDI KKDNP ELKDF NEEQLKCDL ELNKL ENQIL 150
MLGKTFYQNY RDDVESLYSK LDLIMGYKDE ERANKKAVNK RML ENKKEDL 200
ETIIDEFFSD IDKTRPNNIP VLEDEKQEEK NHKNMAQLKS DTEAAKSDES 250
- [0406] KRSKRSKRSL NTQNHKPASQ EVSEQQKAEY DKRAEERKAR FLDNQKIKKT 300
PVVSLEYDFE HKQRIDNEND KKLVSAPT K KPTSPTTYTE TTTQVPMPTV 350
ERQTQQQIIY NAPKQLAGLN GESHDFTTTH QSPTTSNH TH NNVVEFEETS 400
ALPGRKSGSL VGISQIDSSH LTEREKRVIK REHVREAQKL VDNKYDTHSY 450
KDRINAQQKV NTLSEGHQKR FNKQINKVYN GK (SEQ ID NO: 40)
- [0407] 其他序列:
- [0408] 来自菌株N315的Coa的D1-2和L结构域:
IVTKDYSKES RVNEKSKKGA TVSDYYYWKI IDSLEAQFTG AIDLLEDYKY 50
GDPIYKEAKD RLMTRVLGED QYLLKKKIDE YELYKKWYKS SNKNTNMLTF 100
HKYNLYNLTM NEYNDIFNSL KDAVYQFNKE VKEIEHKNVD LKQFDKDGED 150
KATKEVYDLV SEIDTLVV TY YADKDYGEHA KELRAKLDLI LGDTDNPHKI 200
- [0409] TNERIKKEMI DDLNSIIDDF FMETKQNRPN SITKYDPTKH NFKEKSENKP 250
NFDKLVEETK KAVKEADESW KNKTVKKYEE TVTKSPVKE EKKVEEPQLP 300
KVGNNQQE VKT TAGKAEETTQ PVAQPLVKIP QETIYGETVK GPEYPTMENK 350
TLQGEIVQGP DFLTMEQNRP SLSDNYTQPT TPNPILEGLE GSSSKLEIKP 400
QGTESTLKG I QGESSDIEVK PQATETTEAS QYGP (SEQ ID NO: 41)
- [0410] 全长Coa多肽
- [0411] 菌株USA300

	MKKQIISLGA LAVASSLFTW DNKADAIVTK DYSGKSQVNA GSKNGTLIDS	50
	RYLNSALYYL EDYHYAIGL TNKYEYGDNI YKEAKDRLE KVLREDQYLL	100
	ERKKSQYEDY KQWYANYKKE NPRTDLKMAN FHKYNLEELS MKEYNELQDA	150
	LKRALDDFHR EVKDIKDKNS DLKTFNAAEE DKATKEVYDL VSEIDTLVVS	200
	YYGDKDYGEH AKELRAKLDL ILGDTDNPHK ITNERIKKEM IDDLNSIIDD	250
	FFMETKQNRP KSITKYNPTT HNYKTNSDNK PNFDKLVEET KKAVKEADDS	300
[0412]	WKKKTVKKYG ETETKSPVVK EEKKVEEPQA PKVDNQEVK TTAGKAEETT	350
	QPVAQPLVKI PQGTITGEIV KGPEYPTMEN KTVQGEIVQG PDFLTMEQSG	400
	PSLSNNYTNP PLTNPILEGL EGSSSKLEIK PQGTESTLKG TQGESSDIEV	450
	KPQATETTEA SQYGPRPQFN KTPKYVKYRD AGTGIREYND GTFGYEARPR	500
	FNKPSETNAY NVTTHANGQV SYGARPTQNK PSKTNAYNVT THGNGQVSYG	550
	ARPTQNKPSK TNAYNVTTHA NGQVSYGARP TYKKPSKTNA YNVTTHADGT	600
	ATYGPRVTK (SEQ ID NO: 42)	

[0413] 其他COA核酸序列(表明了结构域)

[0414] USA300

[0415] D1-

[0416] ATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCTGGGAGTAAAAATGGGACATTAATAGATAGCAGATATTTAAATTCAGCTCTATATTATTTGGAAGACTATATAATTTATGCTATAGGATTAATAATAATATGAATATGGAGATAATATTTATAAAGAAGCTAAAGATAGGTTGTTGAAAAAGGTATTAAGGGAAGATCAATATCTTTTGGAGAGAAAGAAATCTCAATATGAAGATTATAAACAATGGTATGCAAATTATAAAAAAGAAAATCCTCGTACAGATTTAAAAATGGCTAATTTTCATAAATATAATTTAGAAGAACTTTTCGATGAAAGAATACAATGAACCTACAGGATGCATTAAGAGAGCACTGGATGATTTTCACAGAGAAGTTAAAGATATTAAGGATAAGAATTCAGACTTGAAAACCTTTT (SEQ ID NO:43)

[0417] D2-

[0418] AATGCAGCAGAAGAAGATAAAGCAACTAAGGAAGTATACGATCTCGTATCTGAAATTGATACATTAGTTGTATCATATTATGGTGATAAGGATTATGGGAGCACGCGAAAGAGTTACGAGCAAACTGGACTTAATCCTTGGA GATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAACGTATTAAAAAAGAAATGATTGATGACTTAAATTCAATTATTGATGATTTCTTTATGGAACTAAACAAAATAGACCGAAATCTATAACGAAATATAATCCTACAACACATAACTATAA AACAAATAGTGATAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACGAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAGATGAT TCTTGAAAAAGAAAACGTCAAAAAA (SEQ ID NO:44)

[0419] L-

[0420] TACGGAGAACTGAAACAAAATCGCCAGTAGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAAGCACC TAAAGTTGATAACCAACAAGAGGTTAAAACCTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAACACAACCAGTTGCACAACCA TTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATTGTAAAAGGTCCGGAATATCCAACGATGGAAAATAAAA CGGTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAACAAAGCGGCCCATCATTAAGCAATAATTA TACAAACCCACCGTTAACGAACCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAACCACAA GGTACTGAATCAACGTAAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAA

CAGAAGCTTCTCAATATGGTCCG (SEQ ID NO:45)

[0421] R-

[0422] AGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGTGAATA
CAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCATCAGAAACAAATGCATATAACGTAACA
ACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGTCCGACACAAAAACAAGCCAAGCAAAACAAACGCATATAACG
TAACAACACATGGAACGGCCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCAACACAAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATA
CAACGTAACAACACATGCAAACGGTCAAGTGTATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAACAAAT
GCATACAATGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO:46)

[0423] N315

[0424] D1-

[0425] ATGAAAAAGCAAATAATTTGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAA
AGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTT
TCAGATTATTACTATTGAAAAATAATTGATAGTTTAGAGGCACAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAGATT
ATAAATATGGAGATCCTATCTATAAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAAGAGTATTAGGAGAAGACCAGTATTT
ATTAAAGAAAAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAAAGTGGTATAAAAAGTTCAAATAAGAACACTAATATGCTT
ACTTTCCATAAATATAATCTTTACAATTTAACAATGAATGAATATAACGATATTTTAACTCTTTGAAAGATGCAG
TTTATCAATTTAATAAAGAAGTTAAAGAAATAGAGCATAAAAATGTTGACTTGAAGCAGTTT (SEQ ID NO:47)

[0426] D2-

[0427] GATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTTCTGAAATTGATACATTAGT
TGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACGAGCAAACTGGACTTAATCCTTGGA
GATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTATAAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAATTCAATTATAG
ATGATTTCTTTATGGAGACTAAACAAAATAGACCGAATTCTATAACAAAATATGATCCAACAAAACACAATTTTAA
AGAGAAGAGTGAATAAACCCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAGACGAA
TCTTGAAAAATAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO:48)

[0428] L-

[0429] TACGAGGAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAATTACC
TAAAGTTGGAACACAGCAAGAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAACACAACCAGTGGCACAGCCA
TTAGTAAAAATTCCACAAGAAACAATCTATGGTGAAGCTGTAAGGTCCAGAATATCCAACGATGGAAAATAAAA
CGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTA
TACTCAACCGACGACACCGAACCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAA
CAGAAGCTTCTCAATATGGTCCG (SEQ ID NO:49)

[0430] R-

[0431] AGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGTGAATA
CAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAACAAATGCATACAACGTAACG
ACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAAACAAGCCAAGTGAAACAAACGCATATAACG
TAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGTGCTCGCCCAACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATA
CAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAAT
GCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAA

CAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAG
CGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ
ID NO:50)

[0432] 菌株MW2

[0433] D1-

[0434] ATGAAAAAGCAAATAATTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAA
AGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCTGGGAGTAAAAATGGGAAACAAATT
GCAGATGGATATTATTGGGGAATAATTGAAAATCTAGAAAACCAGTTTTACAATATTTTTTCATTTACTGGATCAGC
ATAAATATGCAGAAAAAGAATATAAAGATGCAGTAGATAAAATTA AAAACTAGAGTTTTAGAGGAAGACCAATACCT
GCTAGAAAGAAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAAAAATACAAAAAGAGAATCCTAATACT
CAAGTTAAAATGAAAGCATTGTGATAAATACGATCTTGGCGATTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAAAAT
TATTAACAAAAGCATTGGATAACTTTAAGTTAGAAGTAAAGAAAATTGAATCAGAGAATCCAGATTTAAAACCATAT
(SEQ ID NO:51)

[0435] D2-

[0436] TCTGAAAGCGAAGAAAGAACAGCATATGGTAAAATAGATTCACCTTGTTGATCAAGCATATAGTGTATA
TTTTGCCTACGTTACAGATGCACAACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCGAAAATTGATTTGATTTTAGGT
GATGAAAAAGATCCAATTAGAGTTACGAATCAACGTACTGAAAAAGAAATGATTAAGATTTAGAATCTATTATTG
ATGATTTCTTCATTGAAACCAAGTTGAATAGACCTAAACACATTACTAGGTATGATGGAACCTAAACATGATTACCA
TAAACATAAAGATGGATTTGATGCTCTAGTTAAAGAAACAAGAGAAGCGGTTGCAAAGGCTGACGAATCTTGAAAA
AATAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO:52)

[0437] L-

[0438] TACGAGGAACTGTAACAAAATCTCCAGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAATCACC
TAAATTTGATAACCAACAAGAGGTTAAAATTACAGTTGATAAAGCTGAAGAAACAACACAACAGTGGCACAGCCA
TTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATTGTAAAAGGTCCGGAATATCCAACGATGGAATAAAAA
CGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTA
TACTCAACCGACGACACCGAACCCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCATCTGAAACAA
CAGAAGCATCATTATCCAGCAAGACCTCAATTTAACAAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTAC
AGGTATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAA (SEQ ID NO:53)

[0439] R-

[0440] GCGAGACCAAGATTCAATAAGCCATCAGAAACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAC
AGTAACATATGGCGCTCGCCCAACACAAAACAAACCAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAT
GGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATG
CAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAAC
ACACGCAAACGGTCAAGTGTACATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAACAAATGCATACAATGTA
ACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO:54)

[0441] 菌株MRSA252

[0442] D1-

[0443] ATGAAAAAGCAAATAATTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAA

AGCAGATGCGATAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAACAGTAAATACGATACACCAATT
CCAGATTGGTATCTAGGTAGTATTTTAAACAGATTAGGGGATCAAATATACTACGCTAAGGAATTAACATAAAT
ACGAATATGGTGAGAAAGAGTATAAGCAAGCGATAGATAAATTGATGACTAGAGTTTTGGGAGAAGATCATTATCT
ATTAGAAAAAAGAAAGCACAAATATGAAGCATACAAAAATGGTTTGAAAAACATAAAAGTGAAAATCCACATTCT
AGTTTAAAAAGATTAAATTTGACGATTTTGATTTATATAGATTAACGAAGAAAGAATACAATGAGTTACATCAAT
CATTAAGAAGCTGTTGATGAGTTAATAGTGAAGTGAAAAATATTCAATCTAAACAAAAGGATTTATTACCTTAT
(SEQ ID NO:55)

[0444] D2-

[0445] GATGAAGCAACTGAAAATCGAGTAACAAATGGAATATATGATTTTGTGCGAGATTGACACATTATA
CGCAGCATATTTTAATCATAGCCAATATGGTCATAATGCTAAAGAATTAAGAGCAAAGCTAGATATAATTCTTGGT
GATGCTAAAGATCCTGTTAGAATTACGAATGAAAGAATAAGAAAAGAAATGATGGATGATTTAAATTCTATTATTG
ATGATTTCTTTATGGATACAAACATGAATAGACCATTAAACATAACTAAATTTAATCCGAATATTCATGACTATAC
TAATAAGCCTGAAAATAGAGATAACTTCGATAAATTAGTCAAAGAAACAAGAGAAGCAATCGCAAACGCTGACGAA
TCTTGAAAACAAGAACCGTCAAAAAT (SEQ ID NO:56)

[0446] L-

[0447] TACGGTGAATCTGAAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAATTACC
TAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGATAAAATTACAGTTGGTACAACCTGAAGAAGCACCATTACCAATTGCGCAACCA
CTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTGTAAAAGGTCCGGAATATCTAACGATGGAAAATAAAA
CGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTA
TACTCAACCGACGACACCGAACCCCTATTTTAAAAGGTATTGAAGGAACTCAACTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAA
CAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGACCTCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTAC
AGGTATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAA (SEQ ID NO:57)

[0448] R-

[0449] GCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAC
AGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAC
GGCCAAGTATCATACGGAGCTCGTCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACGAACGCATATAACGTAACAACACATG
CAAACGGTCAAGTGTACATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAATGTAACAAC
ACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGTCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO:58)

[0450] 菌株WIS

[0451] D1-

[0452] ATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCTGGGAGTAAAAATGGGAAACAAATTGC
AGATGGATATTATTGGGGAATAATTGAAAATCTAGAGAACCAGTTTTACAATATTTTTCATTTATTGGATCAGCAT
AAATATGCAGAAAAAGAATATAAAGATGCATTAGATAAATTA AAAACTAGAGTTTTAGAGGAAGACCAATACCTGC
TAGAAAGAAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAAAAATACAAAAAGAGAATCCTAATACTCA
GGTTAAAATGAAAGCATTTGATAAATACGATCTTGGCGATTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAAAATTA
TTAACAAAAGCATTGGATAACTTTAAGTTAGAAGTAAAGAAAATTGAATCAGAGAATCCAGATTTAAGACCATAT
(SEQ ID NO:59)

[0453] D2-

[0454] TCTGAAAGTGAAGAGAGAACAGCATATGGTAAATAGATTCACTTGTTGATCAAGCATATAGTGTATA
TTTTGCCTACGTTACAGATGCTCAACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCAAAAATAGATTTGATTTTAGGT
GATGAAAAAGATCCAATTAGAGTGACGAATCAACGTACTGAAAAAGAAATGATTAAAGATTTAGAATCTATTATTG
ATGATTTCTTCATTGAAACAAAGTTGAATAGACCTCAACACATTACTAGATATGATGGAACATAACATGATTACCA
TAAACATAAAGATGGATTTGATGCTTTAGTTAAAGAAACAAGAGAAGCGGTTTCTAAGGCTGACGAATCTTGAAAA
ACTAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO:60)

[0455] L-

[0456] TACGGGGAAACTGAAACAAAATATCCTGTTGTAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAATCACC
TAAAGTTTCTGAAAAAGTGGATGTTTCAGGAAACGGTTGGTACAACCTGAAGAAGCACCATTACCAATTGCGCAACCA
CTAGTTAAATTACCACAAATTGGGACTCAAGGCGAAATTGTAAAAGGTCCCGACTATCCAACCTATGGAAAAATAAAA
CGTTACAAGGTGTAATTGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGTGACAATTA
TACACAACCATCTGTGACTTTACCGTCAATTACAGGTGAAAGTACACCAACGAACCCTATTTTAAAAGGTATTGAA
GGAACTCATCTAAACTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTG
ATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGACCGCAATTTAACAAAAC
ACCTAAATATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATTCGTGAATACAACGATGGAACCTTTTGATATGAA (SEQ
ID NO:61)

[0457] R-

[0458] GCGAGACCAAGATTCAACAAGCCATCAGAAACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAC
AGTATCATATGGGGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGCAAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAC
GGCCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACATACAACAAGCCAAGTGAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATC
GAGATGGCACAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACGAATGCATATAACGTAACAAC
ACACGGAAATGGCCAAGTATCATATGGCGCTCGTCCGACACAAAAGAAGCCAAGCAAAAACAAATGCATATAACGTA
ACAACACATGCAACGGCCAAGTATCATATGGCGCTCGTCCGACATACAACAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACA
ATGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGTCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO:62)

[0459] MU50

[0460] D1-

[0461] GATTGGGCAATTACATTTTGGAGGAATTAATAAATTATGAAAAAGCAAATAATTTGCTAGGCGCATT
AGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCA
AGAGTGAATGAGAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTCAGATTATTACTATTGGAAAATAATTGATAGTTTAGAGG
CACAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAGATTATAAATATGGAGATCCTATCTATAAAGAAGCGAAAGATAG
ATTGATGACAAGAGTATTAGGAGAAGACCAGTATTTATTAAGAAAAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAAAG
TGGTATAAAAGTTCAAATAAGAACTAATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTACAATTTAACAATGAATG
AATATAACGATATTTTAACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAATTTAATAAAGAAGTTAAAGAAATAGAGCATAA
AAATGTTGACTTGAAGCAGTTT (SEQ ID NO:63)

[0462] D2-

[0463] GATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTTCTGAAATTGATACATTAGT
TGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACGAGCAAACTGGACTTAATCCTTGGA
GATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTATAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAATTCATTATAG
ATGATTTCTTTATGGAGACTAAACAAAATAGACCGAATTCTATAACAAAATATGATCCAACAAAACACAATTTTAA

AGAGAAGAGTGAAAAATAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAGACGAA
TCTTGGAATAAACTGTCAAAAAA (SEQ ID NO:64)

[0464] L-

[0465] TACGAGGAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAATTACC
TAAAGTTGGAACCAGCAAGAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAACACAACCAGTGGCACAGCCA
TTAGTAAAAATTCCACAAGAAACAATCTATGGTGAACTGTAAAAGGTCCAGAATATCCAACGATGGAAAAATAAA
CGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTA
TACTCAACCGACGACACCGAACCCATTTTTAGAAAGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAA
CAGAAGCTTCTCAATATGGTCCG (SEQ ID NO:65)

[0466] R-

[0467] AGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGTGAATA
CAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAACAAATGCATACAACGTAACG
ACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAAACAAGCCAAGTGAACAAACGCATATAACG
TAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGTGCTCGCCCAACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATA
CAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAAT
GCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAA
CAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAG
CGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ
ID NO:66)

[0468] 85/2082

[0469] D1-

[0470] ATAGTAACTAAAGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAACAGTAAATACGATACACCAATTCC
AGATTGGTATCTAGGTAGTATTTTAAACAGATTAGGGGATCAAATATACTACGCTAAGGAATTAATAATAATAC
GAATATGGTGAGAAAAGTATAAGCAAGCGATAGATAAATTGATGACTAGAGTTTTGGGAGAAGATCATTATCTAT
TAGAAAAAAGAAAGCACAAATATGAAGCATACAAAAATGGTTTGAAAAACATAAAAGTGAAAATCCACATTCTAG
TTTAAAAAGATTAAATTTGACGATTTTGATTTATATAGATTAACGAAGAAAGAATACAATGAGTTACATCAATCA
TTAAAAGAAGCTGTTGATGAGTTTAATAGTGAAGTGAAAAATATTCAATCTAAACAAAAGGATTTATTACCTTAT
(SEQ ID NO:67)

[0471] D2-

[0472] GATGAAGCAACTGAAAAATCGAGTAACAAATGGAATATATGATTTTGTTTGCGAGATTGACACATTATA
CGCAGCATATTTTAATCATAGCCAATATGGTCATAATGCTAAAGAATTAAGAGCAAAGCTAGATATAATTCTTGGT
GATGCTAAAGATCCTGTTAGAATTACGAATGAAAGAATAAGAAAAGAAATGATGGATGATTTAAATTCTATTATTG
ATGATTTCTTTATGGATACAAACATGAATAGACCATTAAACATAACTAAATTTAATCCGAATATTCATGACTATAC
TAATAAGCCTGAAAAATAGAGATAACTTCGATAAATTAGTCAAAGAAACAAGAGAAGCAGTCGCAAACGCTGACGAA
TCTTGGAACAAGAACCGTCAAAAAT (SEQ ID NO:68)

[0473] L-

[0474] TACGGTGAATCTGAAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTTGAAGAACCTCAATTACC
TAAAGTTGGAACCAGCAAGAGGATAAAATTACAGTTGGTACAACCTGAAGAAGCACCATTACCAATTGCGCAACCA

CTAGTTAAAATTCCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATTGTAAAAGGTCCGGAATATCTAACGATGGAAAATAAAA
CGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCAGATTTCCCAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTA
TACTCAACCGACGACACCGAACCCCTATTTTAAAAGGTATTGAAGGAAACTCAACTAACTTGAAATAAAACCACAA
GGTACTGAATCAACGTTAAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAA
CAGAAGCATCACATTATCCAGCGAGACCTCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTAC
AGGTATCCGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAA (SEQ ID NO:69)

[0475] R-

[0476] GCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAC
AGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAACCAAGCGAAACAAATGCATACAACGTAACACACATGCAAC
GGCCAAGTATCATATGGCGCCCGCCCAACATACAAGAAGCCAAGCGAAACAAACGCATACAACGTAACGACAAATC
AAGATGGCACAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAACAAAGCCAAGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAC
ACATGCAACCGCCAAGTATCATACGGAGCTCGTCCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACGAACGCATATAACGTA
ACAACACATGCAACGGTCAAGTGTACATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACA
ATGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGTCCTAGAGTAACAAAATAA (SEQ ID NO:70)

[0477] Newman

[0478] D1-

[0479] atgaaaaagcaaataatttcgctaggcgcattagcagttgcatctagcttatttacatgggataacaa
agcagatgcatagtaacaaaggattatagtgggaaatcacagttaatgctgggagtaaaaatgggacattaata
gatagcagatatattaaattcagctctatatttttgaagactatataatttatgctataggattaactaataaat
atgaatatggagataatatttataaagaagctaaagataggttggttgaaaaggatttaagggaagatcaatatct
tttgagagaaaagaatctcaatatgaagattataaacaatggtatgcaaattataaaaaagaaaatcctcgtaca
gatttaaaaatggctaattttcataatataatttagaagaactttcgatgaaagaatacaatgaactacaggatg
cattaaagagagcactggatgattttcacagagaagttaaagatattaaggataagaattcagacttgaaaactttt
(SEQ ID NO:71)

[0480] D2-

[0481] aatgcagcagaagaagataaagcaactaaggaagtatacgatctcgatatctgaaattgatacattagt
tgtatcatattatggtgataaggattatggggagcacgcgaaagagttacgagcaaaactggacttaatccttgga
gatacagacaatccacataaaattacaaatgaacgtattaaaaaagaaatgattgatgacttaattcaattattg
atgatttctttatggaaactaaacaaatagaccgaaatctataacgaaatataatcctacaacacataactataa
aacaatagtgataataaacctaatttttgataaattagttgaagaaacgaaaaaagcagttaaagaagcagatgat
tcttgaaaaagaaaactgtcaaaaaa (SEQ ID NO:72)

[0482] L-

[0483] tacggagaaactgaaacaaaatcgccagtagtaaaagaagagaagaaagtgaagaacctcaagcacc
taaagttgataaccaacaagaggttaaaactacggctggttaaagctgaagaaacaacacaccagttgcacaacca
ttagttaaaattccacagggcacaattacaggtgaaattgtaaaagggtccggaatatccaacgatggaaaataaaa
cggtacaaggtgaaatcggtcaaggtcccgattttctaacaaatggaacaaagcgcccatcattaagcaataatta
tacaacccaccgttaacgaaccctattttagaaggtcttgaaggtagctcatctaaacttgaaataaaaccacaa
ggtactgaatcaacgttaaaaggtactcaaggagaatcaagtgatattgaagttaaacctcaagcaactgaaacaa
cagaagcttctcaatatggtccg (SEQ ID NO:73)

[0484] R-

[0485] agaccgcaattttaacaaaacacctaataatgtttaatatagagatgctggtacaggtatccgtgaata
caacgatggaacatttggatatgaagcgagaccaagattcaataagccatcagaaacaaatgcatataacgtaaca
acacatgcaaatgggtcaagtatcatacggagctcgtccgacatacaagaagccaagcgaacgaatgcatacaatg
taacaacacatgcaaacggccaagtatcatacggagctcgtccgacacaaaacaagccaagcaaaacaaacgcata
taacgtaacaacacatggaaacggccaagtatcatatggcgctcgcccaacacaaaacaagccaagcaaaacaaat
gcatacaacgtaacaacacatgcaaacgggtcaagtgtcatacggagctcgcccgacatacaagaagccaagtaaaa
caaatgcatacaatgtaacaacacatgcagatgggtactgcgacatatgggcctagagtaacaaaataa (SEQ ID
NO: 74)

[0486] 来自菌株USA300的全长vWbp多肽

mknkllvlsI galevsqiwe snrasavvsg eknpyvsesI kltnnknksr tveeykksld
dliwsfpnld nerfdnpeyk eamkkyqqrF maedealkkf fseekkikng ntdnldylgl
sheryesvfn tlkkqseefl keiedikkdn pelkdfneee qlkcdlelnk lenqilmlgk
tfyqnyrddv eslyskldli mgykdeeran kkavnkrml e nkkedletii deffsdidkt

[0487] rpnnipvled ekqeeeknhkn maqlksdtea aksdeskrsk rskrsIntqn hkpasqevse
qqkaeydkra eerkarfldn qkikktpvvs leydfekhqr idnendkkkv vsaptkkpts
pttytettq vpmptverqt qqqiynapk qlaglNgesh dftthqspt tsnhthnnv
efeetsalpg rksgslvgis qidsshler ekrvikrehv reaqklvdny kdhthsykdri
naqqkvntls eghqkrfnkq inkvyngk (SEQ ID NO: 75)

[0488] 其他vWbp序列:

[0489] USA300

[0490] GTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTATCTGAGTCGTTGAAACTGACTAATAATAAAAAATAAATC
TAGAACAGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGGATGATTTAATATGGTCCTTTCCAACTTAGATAATGAAAGATTT
GATAATCCTGAATATAAAGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAAT
TTTTTAGTGAAGAGAAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATAATTTAGATTATCTAGGATTATCTCATGAAAGATA
TGAAAGTGTATTTAATACTTTGAAAAAACAAAGTGAGGAGTTCTTAAAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAGATAAC
CCTGAATTGAAAGACTTTAATGAAGAGGAGCAATTAAGTGCGACTTAGAATTAACAAATTAGAAAATCAGATAT
TAATGTTAGGTAACATTTTATCAAACTATAGAGATGATGTTGAAAGTTTATATAGTAAGTTAGATTTAATTAT
GGGATATAAAGATGAAGAAAGAGCAAATAAAAAAGCAGTTAACAAAAGGATGTTAGAAAATAAAAAAGAAGACTTA
GAAACCATAATTGATGAATTTTTTAGTGATATAGATAAAACAAGACCTAATAATATTCCTGTTTTAGAAAGATGAAA
AACAAGAAGAGAAAAATCATAAAAAATATGGCTCAATTAATCTGACACTGAAGCAGCAAAAAGTGATGAATCAAA
AAGAAGCAAGAGAAGTAAAAAGAGTTTAAATACTCAAAATCACAAACCTGCATCTCAAGAAGTTTCTGAACAACAA
AAAGCTGAATATGATAAAAGAGCAGAAGAAAGAAAAGCGAGATTTTTGGATAATCAAAAAATTAAGAAAACACCTG
TAGTGTCATTAGAATATGATTTTGAGCATAAACAACGTATTGACAACGAAAACGACAAGAACTTGTGGTTTCTGC
ACCAACAAAGAAACCAACATCACCGACTACATATACTGAAACAACGACACAGGTACCAATGCCTACAGTTGAGCGT
CAAACCTCAGCAACAAATTATTTATAATGCACCAAAACAATTGGCTGGATTAAATGGTGAAAGTCATGATTTCAAA
CAACGCATCAATCACCAACAACTCAAATCACACGCATAATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCTGCTTTACC
TGGTAGAAAATCAGGATCACTGGTTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTA

ATTAAGCGTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGACCGAA
TAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTTTTAATAAACAAATCAATAAAGTATA
TAATGGCAAATAA (SEQ ID NO:76)

[0491] N315

[0492] GTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTATCAAAAGCTTTAGAATTGAAAGATAAAAGTAATAAATC
CAATTCCTACGAAAATTATAGAGATAGTTTAGAAAAGTTTGATTTTCATCATTATCTTTTGCTGATTATGAAAAATAT
GAAGAGCCAGAATATGAAAAGGCTGTAAAAAATATCAACAAAAATTTATGGCTGAAGATGATGCATTAAAAAATT
TTTTAAATGAAGAAAAGAAGATAAAAAATGCAGATATTAGCAGAAAATCGAATAATTTATTAGGTTTAACACATGA
AAGATATTCTTATATTTTTGATACATTAAAGAAAAATAAACAAGAGTTTTTAAAAAGATATTGAAGAAATACAACGTG
AAAAATAGTGATTTAAAGGACTTTAACAATACAGAGCAACATAATGCCGACGTAGAAAATAAACAATTTAGAAAATA
AAGTATTAATGGTAGGGTATACATTCTATAATACAAATAAGGACGAAGTTGAAGAATTATATAGTGAGTTAGATTT
GATTGTTGGAGAAGTTCAAGATAAGTCGGATAAAAAAGAGCAGTAAATCAAAGGATGTTAAATAGAAAAAAGAG
GATTTAGAATTTATTATAGATAAATTTTTTAAAAAATTCAACAAGAACGTCCAGAGAGTATACCAGCATTAACTA
GTGAAAAAATCATAATCAGACTATGGCATTAAAGTTAAAAGCAGATACAGAAGCTGCTAAAAATGACGTATCAAA
AAGAAGTAAAAGAAGTTTAAATACTCAAAATAATAAATCTACAACACAAGAAATTTCTGAAGAACAAAAAGCTGAA
TATCAAAGAAAGTCAGAGGCATTAAAAGAAAGATTTATAAACAGACAAAAATCTAAAAATGAGTCTGTGGTTTCAC
TAATCGATGACGAAGACGACAACGAAAACGACAGGCAACTTGTGGTTTCTGCGCCATCAAAGAAACCAACAACACC
GACTACATATACTGAAACAACGACTCAGGTACCAATGCCTACAGTTGAGCGTCAAACCTCAGCAACAAATCGTTTAC
AAAACACCAAAACCATTAGCTGGATTAATGGTGAAAGTCATGATTTTACAACAACGCATCAATCACCAACAACCTT
CAAATCATAACGCATAATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGGT
TGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATCAAGCGTGAACACGTTAGAGAA
GCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGACCGATTAAATGCACAACAAAAAGTAAATA
CTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTTTTAATAAACAAATCAATAAAGTATACAATGGCAAATAA (SEQ ID NO:
77)

[0493] MRSA252

[0494] GTGGTTTCTGGGGAGGAGAATCCATATAAATCTGAGTCATTGAAATTAAATGGGAAAAGAAGTACTAC
AATAACTAGTGATAAATATGAAGAAAATTTAGATATGTTAATATCGTCATTATCATTTGCAGATTATGAAAAATAT
GAGGAACCAGAATACAAAGAAGCAGTTAAAAAGTATCAACAAAAATTTATGGCTGAAGATGATGCATTAAAAAATT
TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATAGAAATACTAATACATCAAATTATCTGGGATTAACACACGAAAGATAT
GAGTCAATTTATAATTCATTAATAAATCATCGTGAAGAATTTTCAAAAGAAATCGAAGAAATTAATAATAAAAAATC
CAGTGTTAAAAGAATATAACAATGAGGAACAACTAAAGCTGATACGGAATTAACACTCTTGAAAATCAAGTACT
AATGATAGGTTATACATTTTATCACTCGAATAAAAAATGAAGTAGAAGATTTATATAACAAATTAGATATGATTCTT
GGTTATAAAGATGAAGAGAGAAAAAAGAAGAGGGCTACCAATCAAAGAATGTTCAATAATAAAAAAGAGGATTTAG
AACTATTATTGATGAATTCTTTGGAGAAATTGGACAACAAAGGCCAACATCTATACCAACATTAGCGCCTAAAGA
AGAAAAAGAAACAAATATAAAAAATGCAATAAATTAATCTGACACTGAAGCAGCAAAAAATGATGAAGCAAAA
AGAAGTTTAAATACCCACAATCACAAATCTGTATCTCAAGAAGTCTCTGAACAACAAAAAGCTGACTACGAAAGAA
AAGCTGAAGAAAGAAAAGCGAGATTTTATAGATAAGCAAAAAAATAAGAAAACCTCCTGTAGTTTCATTAGAATATGA
TTTTGAACATAAACAACGTGTTGACAACGAAAACGACAAGCAACTTGTGGTTTCTGAGCCATCAAAGAAACCAACA
ACACCGCCTACATACACTGAAACAACCACACAGCTACCAATGCCTACAGTTGAGCGTCAAACACAGCAACAAATCG

TTTACAAAGCACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATGGTGAAAGTCATGATTTACACAACGCATCAATCACCAAC
TACTTCAAATCACACGCATAATCATCTTATTGAAATTGAAGAAACATCTGCTTTACCTGGTAGAAAGACAGGTTCA
TTGGTTGGTTTGAGTCAAATTGATTCTTCGCATTTAACTGAACGTGAGAAGCGCGTGATTAAACGTGAACACGTGA
GAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGACCGATTAAATGCCCAACAAAAAGT
AAATACTTTAAGTGCAGGTCATCAAAAACGTTTAAATAAACAAATTAATAAAGTATATAATGGCAAATAATTAATG
CATGGCTGCAAAGGAAATAATGAGTTTGCCGTAAAAATAACAACATTTTAACTAGCAATAAATAATATCAAAGTC
ATCATTTCAATGATGCAATCTAGTATAGTCCACATTCTAAACAGGTGTGGACTATTACTTTTTTCACTTTATATTA
CGAAAAAATTATTATGCTTAACTATCAATATCAATAATTAATTTTAAGCTGAAAAACAATAAAAAATGTTAAGACAA
CGTTTACTTCAAGTTAATTATTATACTGAAAATTCTGGTATATAATGCTGTTAGTGAATATAACAGGAAAAATTA
TTGGTTATGATATTGAGTCTATATAAAGGAGAAATAACAGATGAAAAAGAAATTATTAGTTTAACTATGAGCACG
CTATTTGCTACACAATTTATGAATTCAAATCACGCTAATGCATCAACAGAAAGTGTTGATAAAAACTTTGTAGTTC
CAGAATCGGGTATTAATAAAATTATTCCAACCTACGATGAATTTAAAAAGCACCAAAAGTAAATGTTAGTAATTT
AGCTGACAACAAAACTTTGTAGCTTCTGAAGATAAATTGAATAAGATTGCAGATCCATCGGCAGCTAGTAAAATT
GTAGATAAAAACTTTGCCGTACCAGAATCAAATTAGGAATCATTGTACCAGAGTATAAAGAAATCAATAATCGAG
TGAATGTAACAACAAACAATCCAGCTTCAAACAAGTTGACAAGCAAATTGTTGCTAAAGACCCAGAGGTGAATAG
ATTTATTACGCAAAATAAAGTAAACCATCGTTTCATTACTACGCAAAACCCACTATAAGAAAGTTATTACTTCATAC
AAATCAACACATGTACATAAACATGTAAACCATGCAACATCTTCTATCCATCATCACTTTACTATTAAACCATCAG
AAGCACCTAGATATACACACCCATCTCAATCTCAATCGTTAATTATAAATCATCATTTTGCAGTTCCTGGATACCA
TGGTCATAAAGTTGTAACACCAGGACAAGCTAGTATTAGAATTCATCACTTTTGTGCTGTACCTCAAATAAATAGT
TTTAAGGTCATTCCATCATATGGTCACAATTCACATCGTATGCATGTACCAAGTTTCCAAAATAACACAACAGCAA
CACATCAAAATGCAAAAGTAAATAAACTTATAACTATAAATATTTTATACTTATAAAGTAGTCAAAGGTGTAA
AAAACATTTCTCATTTTCAAATCACATGGTTGTAAATTGTAAACCAGCATTAAACATCAAAAATGTAAATTAT
CAATATGCTGTTCCAAGTAATAGCCCTACACACGTTGTTTCTGAGTTTCAGGGTATCTTACCAGCACCACGAGTAT
AAAAATTGACATTAAGTTTACGAGATATGATAAATACCTATTATTTTAAACATAGTCTGCAATCTATGAGGTTGTA
GGCTATGTTTTTGCAGTTTATCAATAAACACCCATCAACAAATTATACCGTTTTTCTACTTTAAAGTTGGAAGT
AACATAATCTTAAATAAATATATTATTAATTAAGATAAATATAAGACTCGAGATTATTGTTAATAGTTTGTTCATC
GCAAGTTAATTATTGTTTCTAAAATATTGGTATATAATTTTCAATGGCGAAGAAAAACAGGGTAAAAAGTCGGTTT
TTAAATCAAAGCAAATAAGGAGTAAAAATGAAAAGGAAAGTACTAGTATTAACAATGGGCGTACTTTGTGCGACA
CAATTATGGCAAACGAATAATGCAAAAGCTTTAGTGACAGAGAGTGGCGTTAATGATACTAAGCAATTTACTGAAG
TAACATCGGAAGAAAAAGTTATAAAAGATGCTATTTGAAAAGTCAATGAAAAGCTTTATTTACTATCCCCAAATGA
TTTGAAGGGATTAGGTGGAGAACACAACGATTACGAAAAAATTACATATAGCACTTCTTCTAATAATGTTTTAGAA
TTATCAATGAGTTCAAAATACGTAGGCGGTAAATCAGGAGCTATGGTTGGTTATAGTGAAATTTACTCATCACATT
TCACAGACCGCGACAAACGTGCTATCAGACGTGATCATGTTAAAGAAGCACAAAACCTGATTAATGATTATAAATA
TACGCAAATATATGAAGACTTTGCTAAAGCTACTGCAAAGGTAAGTACACTTAGTCAGTCTACCAAAATTATTTA
AATAAACAAATTGATAAAGTGAATAATAAGATAGAGAAAACGCTAA (SEQ ID NO:78)

[0495] MW2

[0496] D1D2-

[0497] GTGGTTTCTGGGGAGAAGAATCCATATGTATCTGAGTCGTTGAAACTGACTAATAATAAAAAATAAATC
TAGAACAGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGGATGATTTAATATGGTCCTTTCCAACTTAGATAATGAAAGATTT

GATAATCCTGAATATAAAGAAGCTATGAAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAAT
TTTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGAAATACTGATAATTTAGATTATCTAGGATTATCTCATGAAAGATA
TGAAAGTGATTTAATACTTTGAAAAACAAAGTGAGGAGTTCTTAAAAGAAATTGAAGATATAAAAAAGATAAC
CCTGAATTGAAAGACTTTAATGAATAG (SEQ ID NO:79)

[0498] >USA300_vWbp

[0499] VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKYQQRMAED
EALKKFFSEEKKIKNGNTDNDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEKEIEDIKKDNPELKDFNEEEQLKCDLELNK
LENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYKDEERANKKAVNKRMLLENKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIP
VLEDEKQEEKNHKNMAQLKSDTEAAKSDESKRSKRSKSLNTQNHKPASQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDNQK
IKKTPVVSLEYDFEHKQRIDNEND (SEQ ID NO:80)

[0500] KKLVSAPTCKPTSPPTYTETTTQVPMPPTVERQTQQQIIYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNH
THNNVFEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDSSHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLS
EGHQKRFNKQINKVYNGK (SEQ ID NO:81)

[0501] >N315_vWbp

[0502] VVSGEKNPYVSKALELKDKSNKSNYSYENYRDSLESLLSSLSFADYEKYEPEYKEAVKKYQQKFMAED
DALKNFLNEEKKIKNADISRKSNNLLGLTHERYSYIFDTLKKNKQEFLEKEIEIQLKNSDLKDFNTEQHNADVEI
NNLENKVLVMGYTFYNTNKDEVEELYSELDLIVGEVQDKSDKKRAVNQRMLNRKKEDLEFIIDKFFKKIQQERPE
IPALTSEKNHNQTMALKLKADTEAAKNDVSKRSKRSKSLNTQNNKSTTQEISEEQKAEYQRKSEALKERFINRQKSKN
ESVVSLLIDEDDNDNRQLVVSAP (SEQ ID NO:82) SKKPTTPTTYTETTTQVPMPPTVERQTQQQIVYKTPKPL
AGLNGESHDFTTTHQSPTTSNHTHNNVFEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDSSHLTEREKRVIKREHVREAQKLVD
NYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKVYNGK (SEQ ID NO:83)

[0503] >MRSA252_vWbp

[0504] VVSGEENPYKSESLKLNKGRSTTITSDKYEENLDMLISSLSFADYEKYEPEYKEAVKKYQQKFMAED
DALKNFLVKRKK (SEQ ID NO:84)

[0505] >MW2_vWbp

[0506] VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKYQQRMAED
EALKKFFSEEKKIKNGNTDNDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEKEIEDIKKDNPELKDFNE (SEQ ID NO:
85)

[0507] >Newman_vWbp

[0508] VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNKSRTVEEYKKSLLDIWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKYQQRMAED
EALKKFFSEEKKIKNGNTDNDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEKEIEDIKKDNPELKDFNEEEQLKCDLELNK
LENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYKDEERANKKAVNKRMLLENKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIP
VLEDEKQEEKNHKNMAQLKSDTEAAKSDESKRSKRSKSLNTQNHKPASQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDNQK
IKKTPVVSLEYDFEHKQRIDNEND (SEQ ID NO:86)

[0509] KKLVSAPTCKPTSPPTYTETTTQVPMPPTVERQTQQQIIYNAPKQLAGLNGESHDFTTTHQSPTTSNH
THNNVFEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDSSHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLS
EGHQKRFNKQINKVYNGK (SEQ ID NO:87)

[0510] 参考文献

[0511] 以下参考文献在一定程度上提供示例性程序或对本文所陈述细节的其他补充细

节,它们通过引用明确地并入本文。

- [0512] 美国专利3,791,932
- [0513] 美国专利3,949,064
- [0514] 美国专利4,174,384
- [0515] 美国专利4,338,298
- [0516] 美国专利4,356,170
- [0517] 美国专利4,367,110
- [0518] 美国专利4,372,945
- [0519] 美国专利4,452,901
- [0520] 美国专利4,474,757
- [0521] 美国专利4,554,101
- [0522] 美国专利4,578,770
- [0523] 美国专利4,596,792
- [0524] 美国专利4,599,230
- [0525] 美国专利4,599,231
- [0526] 美国专利4,601,903
- [0527] 美国专利4,608,251
- [0528] 美国专利4,683,195
- [0529] 美国专利4,683,202
- [0530] 美国专利4,684,611
- [0531] 美国专利4,690,915
- [0532] 美国专利4,690,915
- [0533] 美国专利4,748,018
- [0534] 美国专利4,800,159
- [0535] 美国专利4,879,236
- [0536] 美国专利4,952,500
- [0537] 美国专利5,084,269
- [0538] 美国专利5,199,942
- [0539] 美国专利5,221,605
- [0540] 美国专利5,238,808
- [0541] 美国专利5,302,523
- [0542] 美国专利5,310,687
- [0543] 美国专利5,322,783
- [0544] 美国专利5,384,253
- [0545] 美国专利5,464,765
- [0546] 美国专利5,512,282
- [0547] 美国专利5,512,282
- [0548] 美国专利5,538,877
- [0549] 美国专利5,538,880

[0550] 美国专利5,548,066
[0551] 美国专利5,550,318
[0552] 美国专利5,563,055
[0553] 美国专利5,580,859
[0554] 美国专利5,589,466
[0555] 美国专利5,591,616
[0556] 美国专利5,610,042
[0557] 美国专利5,620,896
[0558] 美国专利5,648,240
[0559] 美国专利5,656,610
[0560] 美国专利5,702,932
[0561] 美国专利5,736,524
[0562] 美国专利5,780,448
[0563] 美国专利5,789,215
[0564] 美国专利5,801,234
[0565] 美国专利5,840,846
[0566] 美国专利5,843,650
[0567] 美国专利5,846,709
[0568] 美国专利5,846,783
[0569] 美国专利5,849,497
[0570] 美国专利5,849,546
[0571] 美国专利5,849,547
[0572] 美国专利5,858,652
[0573] 美国专利5,866,366
[0574] 美国专利5,871,986
[0575] 美国专利5,916,776
[0576] 美国专利5,922,574
[0577] 美国专利5,925,565
[0578] 美国专利5,925,565
[0579] 美国专利5,928,905
[0580] 美国专利5,928,906
[0581] 美国专利5,932,451
[0582] 美国专利5,935,819
[0583] 美国专利5,935,825
[0584] 美国专利5,939,291
[0585] 美国专利5,942,391
[0586] 美国专利5,945,100
[0587] 美国专利5,958,895
[0588] 美国专利5,981,274

- [0589] 美国专利5,994,624
- [0590] 美国专利6,00,8341
- [0591] 美国专利6,288,214
- [0592] 美国专利6,294,177
- [0593] 美国专利6,651,655
- [0594] 美国专利6,656,462
- [0595] 美国专利6,733,754
- [0596] 美国专利6,756,361
- [0597] 美国专利6,770,278
- [0598] 美国专利6,793,923
- [0599] 美国专利6,814,971
- [0600] 美国专利6,936,258
- [0601] 美国专利申请2002/0169288号
- [0602] 美国专利申请2003/0153022号
- [0603] Abdallah等人,Mol.Microbiol.,62,667-679,2006.
- [0604] Abdallah等人,Nat.Rev.Microbiol.,5,883-891,2007.Adams&Bird, Nephrology.14:462-470,2009.
- [0605] Albus等人,Infect Immun.59:1008-1014,1991.
- [0606] An,J.Virol.,71(3):2292-302,1997.
- [0607] Anavi,Sc.thesis from the department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv University,Israel,1998.
- [0608] Andersen等人,J.Immunol.,154,3359-3372,1995.
- [0609] Andersen等人,Biol Chem.390:1279-1283,2009.
- [0610] Angel等人,Cell,49:729,1987b.
- [0611] Angel等人,Mol.Cell.Biol.,7:2256,1987a.
- [0612] Archer,Clin.Infect.Dis.,26,1179-1181,1998.
- [0613] Ariens等人,Blood.96:988-995,2000.
- [0614] Arrecubieta等人,J Infect Dis.198:571-575,2008.
- [0615] Atchison和Perry,Cell,46:253,1986.
- [0616] Atchison和Perry,Cell,48:121,1987.
- [0617] Ausubel等人,In:Current Protocols in Molecular Biology,John,Wiley& Sons,Inc,New York,1996.
- [0618] Baba等人,J.Bacteriol.190:300-310,2007.
- [0619] Baba等人,Lancet.359:1819-1827,2002.
- [0620] Baddour等人,J Infect Dis.165:749-753,1992.
- [0621] Baddour等人,J Med Microbiol.41:259-263,1994.
- [0622] Bae和Schneewind,Plasmid,55:58-63,2006.
- [0623] Bae等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,101,12312-12317,2004.
- [0624] Balaban等人,Science.280:438-440,1998.

- [0625] Banerji等人,Cell,27 (2 Pt 1):299-308,1981.
- [0626] Banerji等人,Cell,33 (3):729-740,1983.
- [0627] Barany和Merrifield,In:The Peptides,Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press,NY,1-284,1979.
- [0628] Behring.Deutsche Medizinische Wochenschrift.16:1145-8,1890.
- [0629] Bellus,J.Macromol.Sci.Pure Appl.Chem.,A31 (1):1355-1376,1994.
- [0630] Berger,J Pathol Bacteriol.55,1943.
- [0631] Berkhout等人,Cell,59:273-282,1989.
- [0632] Birch-Hirschfeld,Klinische Wochenschrift.13:331,1934.
- [0633] Bjerketorp等人,FEMS Microbiol Lett.234:309-314,2004.
- [0634] Bjerketorp等人,Microbiol.148:2037-2044,2002.
- [0635] Blancar等人,EMBO J.,8:1139,1989.
- [0636] Blomback等人,Nature.275:501-505,1978.
- [0637] Boake,J Immunol.76:89-96,1956.
- [0638] Bodine和Ley,EMBO J.,6:2997,1987.
- [0639] Borrebaeck,Antibody Engineering--A Practical Guide,W.H.Freeman and Co.,1992.
- [0640] Boshart等人,Cell,41:521,1985.
- [0641] Bosze等人,EMBO J.,5 (7):1615-1623,1986.
- [0642] Boucher和Corey.Clin.Infect.Dis.46:S334-S349,2008.
- [0643] Braddock等人,Cell,58:269,1989.
- [0644] Brown等人,Biochemistry,37:4397-4406,1998.
- [0645] Bubeck Wardenburg和Schneewind.J.Exp.Med.205:287-294,2008.
- [0646] Bubeck-Wardenburg等人,Infect.Immun.74:1040-1044,2007..
- [0647] Bubeck-Wardenburg等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:13831-13836,2006.
- [0648] Bulla和Siddiqui,J.Virol.,62:1437,1986.
- [0649] Burke等人,,J.Inf.Dis.,170:1110-1119,1994.
- [0650] Burlak等人,Cell Microbiol.,9:1172-1190,2007.
- [0651] Burts和Missiakas,Mol.Microbiol.,69:736-46,2008.
- [0652] Burts等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,102:1169-1174,2005.
- [0653] Cadness-Graves等人,Lancet.2:736-738,1943.
- [0654] Camargo&Gilmore,J Bacteriol.190:2253-2256,2008.
- [0655] Campbell和Villarreal,Mol.Cell.Biol.,8:1993,1988.
- [0656] Campere和Tilghman,Genes and Dev.,3:537,1989.
- [0657] Campo等人,Nature,303:77,1983.
- [0658] Carbonelli等人,FEMS Microbiol.Lett.,177 (1):75-82,1999.
- [0659] Cawdery等人,British J Exp Pathol.50:408-412,1969.
- [0660] Cedergren等人,Protein Eng.,6:441-448,1993..
- [0661] Celandier和Haseltine,J.Virology,61:269,1987.

- [0662] Celander等人,J.Virology,62:1314,1988.
- [0663] Cespedes等人,J.Infect.Dis.191 (3) :444-52,2005.
- [0664] Chambers&Deleo.Nature Rev Microbiol.7:629-641,2009.
- [0665] Champion等人,Science,313:1632-1636,2006.
- [0666] Chandler等人,Cell,33:489,1983.
- [0667] Chandler等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94 (8) :3596-601,1997.
- [0668] Chang等人,Lancet.,362 (9381) :362-369,2003.
- [0669] Chang等人,Mol.Cell.Biol.,9:2153,1989.
- [0670] Chapman等人,J Bacteriol.28:343-363,1934.
- [0671] Chatterjee等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:9114,1989.
- [0672] Chen和Okayama,Mol.Cell Biol.,7 (8) :2745-2752,1987.
- [0673] Cheng等人,Trends Microbiol.19:225-232,2011.
- [0674] Cheng等人,FASEB J.,23:1-12,2009.
- [0675] Cheng等人,FASEB J.23 (10) :3393-3404,2009.
- [0676] Cheng等人,PLoS Pathogens.6,2010.
- [0677] Cheung等人,Infect Immun.63:1914-1920,1995.
- [0678] Choi等人,Cell,53:519,1988.
- [0679] Chu等人,Am J Med.118:1416,2005.
- [0680] Clarke等人,Ad Microbial Phys.51:187-224,2006.
- [0681] Cocea,Biotechniques,23 (5) :814-816,1997.
- [0682] Cohen等人,J.Cell.Physiol.,5:75,1987.
- [0683] Cosgrove等人,Infect.Control Hosp.Epidemiol.26:166-174,2005..
- [0684] Costa等人,Mol.Cell.Biol.,8:81,1988.
- [0685] Crawley等人,J Thrombosis Haemostasis.5Suppl 1:95-101,2007.
- [0686] Cripe等人,EMBO J.,6:3745,1987.
- [0687] Culotta和Hamer,Mol.Cell.Biol.,9:1376,1989.
- [0688] Dalbey和Wickner,J.Biol.Chem.,260:15925-15931,1985.
- [0689] Dandolo等人,J.Virology,47:55-64,1983.
- [0690] de Haas等人,J Exp Med.199:687-695,2004.
- [0691] De Villiers等人,Nature,312 (5991) :242-246,1984.
- [0692] DeBord等人,Infect.Immun.,74:4910-4914,2006.
- [0693] DeDent等人,Sem Immunopathol.34:317-333,2012.
- [0694] DeDent等人,EMBO J.27:2656-2668,2008.
- [0695] DeDent等人,J.Bacteriol.189:4473-4484,2007.
- [0696] Deisenhofer等人,Hoppe-Seyh Zeitsch.Physiol.Chem.359:975-985,1978..
- [0697] Deisenhofer,Biochemistry 20:2361-2370,1981.
- [0698] Deivanayagam等人,EMBO J.21:6660-6672,2002.
- [0699] DeLeo等人,Lancet.375:1557-1568,2010.
- [0700] Delvaeye&Conway,Blood.114:2367-2374,2009.

- [0701] Deschamps等人,Science,230:1174-1177,1985.
- [0702] Devereux等人,Nucl. Acid Res.,12:387-395,1984.
- [0703] Diep等人,J. Infect. Dis.,193:1495-1503,2006a.
- [0704] Diep等人,Lancet.,367:731-739,2006b.
- [0705] Dinges等人,Clin. Microbiol. Rev.,13:16-34,2000.
- [0706] Donahue等人,PNAS USA. 91:12178-12182,1994.
- [0707] Doolittle, Blood Rev. 17:33-41,2003.
- [0708] Duthie和Lorenz, J. Gen. Microbiol., 6:95-107,1952.
- [0709] Duthie, J Gen Microbiol. 6:95-107,1952.
- [0710] Duthie, J Gen Microbiol. 10:427-436,1954.
- [0711] Edbrooke等人, Mol. Cell. Biol., 9:1908,1989.
- [0712] Edlund等人, Science, 230:912-916,1985.
- [0713] Ekstedt&Yotis, J Bacteriol. 80:496-500,1960.
- [0714] Ekstedt和Yotis, Ann. N. Y. Acad. Sci., 80:496-500,1960.
- [0715] Emorl和Gaynes, Clin. Microbiol. Rev., 6:428-442,1993.
- [0716] Enright等人, J Clin Microbiol. 38:1008-1015,2000.
- [0717] EP 0786519
- [0718] EP 497524
- [0719] EP 497525
- [0720] Epitope Mapping Protocols In: Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Morris (Ed.), 1996.
- [0721] Etz等人, PNAS USA. 99:6573-6578,2002.
- [0722] Fattom等人, Vaccine. 23:656-663,2004.
- [0723] Fechheimer等人, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467,1987.
- [0724] Feng和Holland, Nature, 334:6178,1988.
- [0725] Ferry等人, Curr Infect Dis Report. 7:420-428,2005.
- [0726] Field和Smith, J. Comp. Pathol., 55:63,1945.
- [0727] Firak和Subramanian, Mol. Cell. Biol., 6:3667,1986.
- [0728] Fitzgerald等人, Nature Rev Microbiol. 4:445-457,2006.
- [0729] Foecking和Hofstetter, Gene, 45 (1) :101-105,1986.
- [0730] Fortune等人, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 102:10676-10681,2005.
- [0731] Foster, Nat. Rev. Microbiol., 3:948-958,2005.
- [0732] Fournier等人, Infect. Immun., 45:87-93,1984.
- [0733] Fowler等人, New England J Med. 355:653-665,2006.
- [0734] Fowler等人, JAMA. 293:3012-3021,2005.
- [0735] Fraley等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352,1979.
- [0736] Friedrich等人, Nature. 425:535-539,2003.
- [0737] Fujita等人, Cell, 49:357,1987.
- [0738] Gailani&Renne, Arteriosclerosis, Thrombosis&Vascular Biol. 27:2507-2513,

2007.

- [0739] Ganesh等人, PLoS Pathogens.4:e1000226,2008.
- [0740] GB Appln.2 202 328
- [0741] Geoghegan等人, J Biol Chem.285:6208-6216,2010.
- [0742] Gilles等人, Cell,33:717,1983.
- [0743] Gloss等人, EMBO J.,6:3735,1987.
- [0744] Godbout等人, Mol.Cell.Biol.,8:1169,1988.
- [0745] Gomez等人, EMBO J.26:701-709,2007..
- [0746] Gomez等人, J.Biol.Chem.281:20190-20196,2006..
- [0747] Gomez等人, Nature Med.10:842-8,2004.
- [0748] Gong等人, Clin Vacc Immunol.CVI 17:1746-1752,2010.
- [0749] Gonzalez等人, CMLS.65:493-507,2008.
- [0750] Goodbourn和Maniatis, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:1447,1988.
- [0751] Goodbourn等人, Cell,45:601,1986.
- [0752] Goodyear和Silverman, J.Exp.Med.,197:1125-1139,2003.
- [0753] Goodyear等人, PNAS USA.101:11392-11397,2004.
- [0754] Gopal, Mol.Cell Biol.,5:1188-1190,1985.
- [0755] Gouda等人, Biochemistry,31 (40) :9665-72,1992.
- [0756] Gouda等人, Biochemistry,37:129-36,1998.
- [0757] Graham和Van Der Eb, Virology,52:456-467,1973.
- [0758] Graille等人, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 97:5399-5404,2000.
- [0759] Gravenkemper等人, J Bacteriol.89:1005-1010,1965.
- [0760] Greene等人, Immunology Today,10:272,1989
- [0761] Grosschedl和Baltimore, Cell,41:885,1985.
- [0762] Guinn等人, Mol.Microbiol.,51:359-370,2004.
- [0763] Guss等人, Eur.J.Biochem.138:413-420,1984.
- [0764] Hair等人, Infect Immun.78:1717-1727,2010.
- [0765] Hale&Smith, Br J Exp Pathol.26:209-216,1945.
- [0766] Hall等人, Infect Immun.71:6864-6870,2003.
- [0767] Haraldsson&Jonsson, J Comp Pathol.94:183-196,1984.
- [0768] Harland和Weintraub, J.Cell Biol.,101 (3) :1094-1099,1985.
- [0769] Harlow等人, Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor
- [0770] Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,Chapter 8,1988.
- [0771] Harrison, Br Med J.2:149-152,1963.
- [0772] Harrison, J Pathol Bacteriol.87:145-150,1964.
- [0773] Harro等人, Clin Vacc Immun.CVI 17:1868-1874,2010.
- [0774] Hartleib等人, Blood.96:2149-2156,2000.
- [0775] Harvey等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83:1084-1088,1986.
- [0776] Haslinger和Karin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:8572,1985.

- [0777] Hauber和Cullen,J.Virology,62:673,1988.
- [0778] Haul等人,J Med Chem.45:1757-1766,2002.
- [0779] Hawiger等人,Nature.258:643-645,1975.
- [0780] Hawiger等人,Biochem.21:1407-1413,1982.
- [0781] Heilmann等人,J Infect Dis.186:32-39,2002.
- [0782] Hen等人,Nature,321:249,1986.
- [0783] Hendrix等人,J Biol Chem.258:3637-3644,1983.
- [0784] Hensel等人,Lymphokine Res.,8:347,1989.
- [0785] Herold等人,JAMA.279:593-598,1998.
- [0786] Herr和Clarke,Cell,45:461,1986.
- [0787] Hijikata-Okunomiya,J Thrombosis Haemostasis.1:2060-2061,2003.
- [0788] Hirochika等人,J.Virol.,61:2599,1987.
- [0789] Hirsch等人,Mol.Cell.Biol.,10:1959,1990.
- [0790] Holbrook等人,Virology,157:211,1987.
- [0791] Horlick和Benfield,Mol.Cell.Biol.,9:2396,1989.
- [0792] Hsu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100:12420-12425,2003.
- [0793] Huang等人,Cell,27:245,1981.
- [0794] Huber-Lang等人,Nature Med.12:682-687,2006.
- [0795] Hug等人,Mol.Cell.Biol.,8:3065,1988.
- [0796] Hussain等人,J Bacteriol.183:6778-6786,2001.
- [0797] Huston等人,In:Methods in Enzymology,Langone (Ed.),Academic Press,NY,203:46-88,1991.
- [0798] Hwang等人,Mol.Cell.Biol.,10:585,1990.
- [0799] Imagawa等人,Cell,51:251,1987.
- [0800] Imbra和Karin,Nature,323:555,1986.
- [0801] Imler等人,Mol.Cell.Biol.,7:2558,1987.
- [0802] Imperiale和Nevins,Mol.Cell.Biol.,4:875,1984.
- [0803] Innis等人,Proc Natl Acad Sci USA,85 (24) :9436-9440,1988.
- [0804] Inoshima等人,Nat Med.17 (10) :1310-4,2011.
- [0805] Inouye和Inouye,Nucleic Acids Res.,13:3101-3109,1985.
- [0806] Jakobovits等人,Mol.Cell.Biol.,8:2555,1988.
- [0807] Jameel和Siddiqui,Mol.Cell.Biol.,6:710,1986.
- [0808] Jansson等人,FEMS Immunol.Med.Microbiol.20:69-78 1998.
- [0809] Jaynes等人,Mol.Cell.Biol.,8:62,1988.
- [0810] Jensen,Acta Path.Microbiol.Scandin.44:421-428,1958.
- [0811] Jensen,APMIS:acta pathol,microbiol et immunol Scandinavica.115:533-539,2007.
- [0812] Johnson等人,Methods in Enzymol.,203:88-99,1991.
- [0813] Johnson等人,Mol.Cell.Biol.,9:3393,1989.

- [0814] Johnstone&Smith,Nature.178:982-983,1956.
- [0815] Jones,Carb.Research,340:1097-1106,2005.
- [0816] Jonsson等人,Oral Dis.,8(3):130-140,2002.
- [0817] Jonsson等人,Infect Immun.49:765-769,1985.
- [0818] Josefsson等人,J Infect Dis.184:1572-1580,2001.
- [0819] Josefsson等人,PLoS One.3:e2206,2008.
- [0820] Joyce等人,Carbohydrate Research 338:903-922 (2003
- [0821] Kadesch和Berg,Mol.Cell.Biol.,6:2593,1986.
- [0822] Kaeppler等人,Plant Cell Rep.,8:415-418,1990.
- [0823] Kaida等人,J Biochem.102:1177-1186,1987.
- [0824] Kallen等人,Ann Emmergency Med.53:358-365,2009.
- [0825] Kaneda等人,Science,243:375-378,1989.
- [0826] Kanemitsu等人,Microbiol Immunol.45:23-27,2001.
- [0827] Kang等人,Am J Infection Control.40:416-20,2011.
- [0828] Kantyka等人,Adv Exp Med Biol.712:1-14,2011.
- [0829] Kapral,J Bacteriol.92:1188-1195,1966.
- [0830] Karesh.Pediatric Focused Safety
- [0831] Review:Argatroban.Pediatric Advisory Committee Meeting,2009.
- [0832] Karin等人,Mol.Cell.Biol.,7:606,1987.
- [0833] Katinka等人,Cell,20:393,1980.
- [0834] Kato等人,J.Biol.Chem.,266:3361-3364,1991.
- [0835] Kawabata等人,J Biochem.97:1073-1078,1985.
- [0836] Kawabata等人,J Biochem.97:325-331,1985.
- [0837] Kawabata等人,J Biochem.98:1603-1614,1985.
- [0838] Kawamoto等人,Mol.Cell.Biol.,8:267,1988.
- [0839] Kennedy等人,J Infect Dis.202:1050-1058,2010.
- [0840] Kennedy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:1327-1332,2008.
- [0841] Kernodle,J Infect Dis.203:1692-1693;author reply 1693-1694,2011.
- [0842] Kiledjian等人,Mol.Cell.Biol.,8:145,1988.
- [0843] Kim等人,Vaccine.28:6382-6392,2001.
- [0844] Kim等人,FASEB J.25:3605-3612,2011.
- [0845] Kim等人,J Exp Med.207:1863-1870,2010.
- [0846] Kinoshita等人,Microbiol Immunol.52:334-348,2008.
- [0847] Klamut等人,Mol.Cell.Biol.,10:193,1990.
- [0848] Klevens等人,Clin.Infect.Dis.,2008;47:927-30,2008.
- [0849] Klevens等人,JAMA,298:1763-1771,2007.
- [0850] Kluytmans等人,Clin Microbiol Rev.10:505-520,1997.
- [0851] Koch等人,Mol.Cell.Biol.,9:303,1989.
- [0852] Kohler和Milstein,Nature 256:495-497 (1975

- [0853] Kolle&Otto.Z Hygiene.41,1902.
- [0854] Kollman等人,Biochemistry.48:3877-3886,2009.
- [0855] Konings等人,Blood.118(14):3942-51,2011.
- [0856] Kopec等人,Thrombosis et diathesis haemorrhagica.18:475-486,1967.
- [0857] Koreen等人,J Clin Microbiol.42:792-799,2004.
- [0858] Krarup等人,PLoS One.2:e623,2007.
- [0859] Kriegler和Botchan,In:Eukaryotic Viral Vectors,Gluzman (Ed.),Cold Spring Harbor:Cold Spring Harbor Laboratory,NY,1982.
- [0860] Kriegler和Botchan,Mol.Cell.Biol.,3:325,1983.
- [0861] Kriegler等人,Cell,38:483,1984a.
- [0862] Kriegler等人,Cell,53:45,1988.
- [0863] Kriegler等人,In:Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes, Van de Woude 等人.eds,Cold Spring Harbor,Cold Spring Harbor Laboratory,1984b.
- [0864] Kroh等人,PNAS USA.106:7786-7791,2009.
- [0865] Kuehnert等人,J Infect Dis.193:172-179,2006.
- [0866] Kuhl等人,Cell,50:1057,1987.
- [0867] Kuklin等人,Infect.Immun.,74:2215-23,2006.
- [0868] Kunz等人,Nucl.Acids Res.,17:1121,1989.
- [0869] Kuroda等人,Lancet.,357:1225-1240,2001.
- [0870] Kwiecinski等人,J Infect Dis.202:1041-1049,2010.
- [0871] Kyte和Doolittle,J.Mol.Biol.,157(1):105-132,1982.
- [0872] Lack,Nature.161:559,1948.
- [0873] Lagergard等人,Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.,11:341-5,1992.
- [0874] Lam等人,J Bacteriol.86:611-615,1963.
- [0875] Lam等人,J Bacteriol.86:87-91,1963.
- [0876] Lancefield,J Immunol.89:307-313,1962.
- [0877] Lancefield,J Exp Med.47:91-103,1928.
- [0878] Larsen等人,Proc Natl.Acad.Sci.USA.,83:8283,1986,1963.
- [0879] Laspia等人,Cell,59:283,1989.
- [0880] Latimer等人,Mol.Cell.Biol.,10:760,1990.
- [0881] Lattar等人,Infect Immun.77:1968-1975,2009.
- [0882] Lee等人,Nature,294:228,1981.
- [0883] Lee等人,Nucleic Acids Res.,12:4191-206,1984.
- [0884] Lee等人,J Infect Dis.156:741-750,1987.
- [0885] Lee,Trends Microbiol.4(4):162-166,1996.
- [0886] Levenson等人,Hum.Gene Ther.,9(8):1233-1236,1998.
- [0887] Levine MM,editor.New generation vaccines.4th ed.New York:Informa Healthcare USA.xxvii,1011,2010
- [0888] Levinson等人,Nature,295:79,1982.

- [0889] Lin等人,Mol.Cell.Biol.,10:850,1990.
- [0890] Lin等人,J Bacteriol.176:7005-7016,1994.
- [0891] Liu等人,Clin Infect Dis.52:285-292,2011.
- [0892] Loeb,J Med Res.10:407-419,1903.
- [0893] Lominski,J Gen Microbiol.3:ix,1949.
- [0894] Lominski&Roberts,J Pathol Bacteriol.58:187-199,1946.
- [0895] Lominski等人,Lancet.1:1315-1318,1962.
- [0896] Loof等人,Blood.118:2589-98,2011.
- [0897] Lorand,Arteriosclerosis,Thrombosis,and Vascular Biol.20:2-9,2000.
- [0898] Lord,Arteriosclerosis,Thrombosis&Vascular Biol.31:494-499,2011.
- [0899] Lowy,N Engl J Med.339:520-532,1998.
- [0900] Luria等人,EMBO J.,6:3307,1987.
- [0901] Lusky和Botchan,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83:3609,1986.
- [0902] Lusky等人,Mol.Cell.Biol.,3:1108,1983.
- [0903] Macejak和Sarnow,Nature,353:90-94,1991.
- [0904] MacGurn等人,Mol.Microbiol.,57:1653-1663,2005.
- [0905] Mainiero等人,J Bacteriol.192:613-623,2010.
- [0906] Maira-Litran等人,Infect.Immun.,70:4433-4440,2002.
- [0907] Maira-Litran等人,Vaccine,22:872-879,2004.
- [0908] Majors和Varmus,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:5866,1983.
- [0909] Markwardt F(1955)Untersuchungen \checkmark \circ ber Hirudin:naturwiss.F,1955.
- [0910] Markwardt,Untersuchungen \checkmark \circ ber Hirudin.Naturwissenschaften,41:537-538,1955.
- [0911] Mazmanian等人,Mol.Microbiol.,40(5):1049-1057,2001.
- [0912] Mazmanian等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:5510-5515,2000.
- [0913] Mazmanian等人,Science,285(5428):760-3,1999.
- [0914] Mazmanian等人,Science.299:906-909,2003.
- [0915] McAdow等人,PLoS Pathogens.7:e1002307,2011.
- [0916] McAdow等人,J Inn Immun.4:141-148,2012.
- [0917] McAdow等人,Coagulases as determinants of protective immune responses against Staphylococcus aureus.In preparation,2012.
- [0918] McAleese等人,Microbiology.149:99-109,2003.
- [0919] McCarthy&Lindsay,BMC Microbiol.10:173,2010.
- [0920] McDevitt等人,Mol Microbiol.16:895-907,1995.
- [0921] McDevitt等人,Euro J Biochem/FEBS.247:416-424,1997.
- [0922] McDevitt等人,Mol Microbiol.11:237-248,1994.
- [0923] McLaughlin等人,PLoS Pathog.,3:e105,2007.
- [0924] McNeall等人,Gene,76:81,1989.
- [0925] Melles等人,FEMS Immunol Med Microbiol.52:287-292,2008.

- [0926] Mernaugh等人, In: Molecular Methods in Plant Pathology, Singh等人 (Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 359-365, 1995.
- [0927] Merrifield, Science, 232 (4748): 341-347, 1986.
- [0928] Miksicek等人, Cell, 46: 203, 1986.
- [0929] Mora等人, PNAS USA. 102: 15641-15646, 2005.
- [0930] Mordacq和Linzer, Genes and Dev., 3: 760, 1989.
- [0931] Moreau等人, Carbohydrate Res., 201: 285-297, 1990.
- [0932] Moreau等人, Nucl. Acids Res., 9: 6047, 1981.
- [0933] Moreillon等人, Infect Immun. 63: 4738-4743, 1995.
- [0934] Mosmann和Coffman, Ann. Rev. Immunol., 7: 145-173, 1989.
- [0935] Much, Biochem Z. 14: 143-155, 1908.
- [0936] Muesing等人, Cell, 48: 691, 1987.
- [0937] Musher等人, Medicine (Baltimore), 73: 186-208, 1994.
- [0938] Mutch等人, Blood. 115: 3980-3988, 2010.
- [0939] Navarre和Schneewind, J. Biol. Chem., 274: 15847-15856, 1999.
- [0940] Na'was T等人, J Clin Immunol. 36: 414-420, 1998.
- [0941] Needleman和Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443, 1970.
- [0942] Ng等人, Nuc. Acids Res., 17: 601, 1989.
- [0943] Ni Eidhin等人, Mol Microbiol. 30: 245-257, 1998.
- [0944] Nicolau和Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982.
- [0945] Nicolau等人, Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.
- [0946] Niemann等人, Circulation. 110: 193-200, 2004.
- [0947] Nilsson等人, J Clin Invest. 101: 2640-2649, 1998.
- [0948] Noble等人, FEMS Microbiol Lett. 72: 195-198, 1992.
- [0949] Novick, Mol. Microbiol., 48: 1429-1449, 2003.
- [0950] Nuccitelli等人, PNAS USA. 108: 10278-10283, 2011.
- [0951] O' Seaghdha等人, FEBS J. 273: 4831-4841, 2006..
- [0952] O'Brien等人, Mol Microbiol. 44: 1033-1044, 2002.
- [0953] Omirulleh等人, Plant Mol. Biol., 21 (3): 415-28, 1993.
- [0954] Ondek等人, EMBO J., 6: 1017, 1987.
- [0955] Ornitz等人, Mol. Cell. Biol., 7: 3466, 1987.
- [0956] O' Seaghdha等人, FEBS J. 273: 4831-4841, 2006.
- [0957] Pallen, Trends Microbiol., 10: 209-212, 2002.
- [0958] Palma等人, Infect Immun. 64: 5284-5289, 1996.
- [0959] Palma等人, J Biol Chem. 276: 31691-31697, 2001.
- [0960] Palma等人, J Biol Chem. 273: 13177-13181, 1998.
- [0961] Palmiter等人, Nature, 300: 611, 1982.
- [0962] Palmqvist等人, Microbes. Infect., 7: 1501-11, 2005.
- [0963] Palmqvist等人, Microbes Infect. 6: 188-195, 2004.

- [0964] Panizzi等人, *J. Biol. Chem.*, 281:1179-1187, 2006.
- [0965] Panizzi等人, *Cell Mol Life Sci.* 61:2793-2798, 2004.
- [0966] Panizzi等人, *Nat Med.* 17:1142-1146, 2011.
- [0967] Patel等人, *Infect Contr Hosp Epidemiol.* 32:881-888, 2011.
- [0968] Paul-Satyaseela等人, *Epidemiol Infect.* 132:831-838, 2004.
- [0969] PCT申请PCT/US89/01025
- [0970] PCT申请W0 00/02523
- [0971] PCT申请W0 00/12132
- [0972] PCT申请W0 00/12689
- [0973] PCT申请W0 00/15238
- [0974] PCT申请W0 01/34809
- [0975] PCT申请W0 01/60852
- [0976] PCT申请W0 01/98499
- [0977] PCT申请W0 02/059148
- [0978] PCT申请W0 02/094868
- [0979] PCT申请W0 03/53462
- [0980] PCT申请W0 04/43407
- [0981] PCT申请W0 06/032472
- [0982] PCT申请W0 06/032475
- [0983] PCT申请W0 06/032500
- [0984] PCT申请W0 07/113222
- [0985] PCT申请W0 07/113223
- [0986] PCT申请W0 94/09699
- [0987] PCT申请W0 95/06128
- [0988] PCT申请W0 95/08348
- [0989] PCT申请W0 98/57994
- [0990] Pearson&Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988.
- [0991] Pech等人, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- [0992] Pelletier和Sonenberg, *Nature*, 334 (6180) :320-325, 1988.
- [0993] Perez-Stable和Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- [0994] Peterson等人, *Infect Immun.* 15:760-764, 1997.
- [0995] Phonimdaeng等人, *J Gen Microbiol.* 134:75-83, 1988.
- [0996] Phonimdaeng等人, *Mol Microbiol.* 4:393-404, 1990.
- [0997] Picard和Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- [0998] Pinkert等人, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- [0999] Plotkin, SA, Orenstein WA, editors (2004) *Vaccines*. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders. xxi, 1662p. p. 2004
- [1000] Ponta等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- [1001] Porton等人, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.

- [1002] Potrykus等人,Mol.Gen.Genet.,199(2):169-177,1985.
- [1003] Powers等人,J Infect Dis.Doi:10.1093/infdis/jis192,2012.
- [1004] Procyk&Blomback,Biochemistry.29:1501-1507,1990.
- [1005] Projan等人,Curr Opin Pharmacol.6:473-479,2006.
- [1006] Pugsley,Microbiol.Rev.,57:50-108,1993.
- [1007] Pym等人,Mol.Microbiol.,46:709-717,2002.
- [1008] Pym等人,Nat.Med.,9:533-539,2003.
- [1009] Que等人,Infect Immun.68:3516-3522,2000.
- [1010] Queen和Baltimore,Cell,35:741,1983.
- [1011] Quinn等人,Mol.Cell.Biol.,9:4713,1989.
- [1012] Rammelkamp等人,J Exp Med.91:295-307,1950.
- [1013] Rammelkamp等人,Ann NY Acad Sci.65:144-151,1956.
- [1014] Redondo等人,Science,247:1225,1990.
- [1015] Reisman和Rotter,Mol.Cell.Biol.,9:3571,1989.
- [1016] Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版.Mack Printing Company, 1289-1329,1990.
- [1017] Resendez Jr.等人,Mol.Cell.Biol.,8:4579,1988.
- [1018] Rijken&Lijnen,J Thrombosis&Haemostasis.7:4-13,2009.
- [1019] Ripe等人,Mol.Cell.Biol.,9:2224,1989.
- [1020] Rippe等人,Mol.Cell Biol.,10:689-695,1990.
- [1021] Rittling等人,Nuc.Acids Res.,17:1619,1989.
- [1022] Roben等人,J.Immunol.154:6437-6445,1995.
- [1023] Rogers等人,Ann NY Acad Sci.128:274-284,1965.
- [1024] Rooijackers等人,Nature Immunol.6:920-927,2005.
- [1025] Rosen等人,Cell,41:813,1988.
- [1026] Rothfork等人,J Immunol.171:5389-5395,2003.
- [1027] Ryan,K.J.,&Ray,C.G. (Eds.).Sherris Medical Microbiology:An Introduction to Infectious Disease.(Fourth Edition.ed.).New York.:McGraw-Hill,2004.
- [1028] Sakai等人,Genes and Dev.,2:1144,1988.
- [1029] Sakharov等人,J Biol Chem.271:27912-27918,1996.
- [1030] Salid-Salim等人,Infect.Control Hosp.Epidemiol.24:451-455,2003.
- [1031] Sambrook等人,In:Molecular cloning,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,2001.
- [1032] Saravolatz等人,Ann Int Med.97:325-329,1982.
- [1033] Sawai等人,Infect Immunity.65:466-471,1997.
- [1034] Schaffner等人,J.Mol.Biol.,201:81,1988.
- [1035] Schneewind等人,Cell 70:267-281,1992.
- [1036] Schneewind等人,EMBO,12:4803-4811,1993.

- [1037] Schneewind&Missiakas,PNAS USA.108:10029-10030,2011.
- [1038] Schneewind等人,Science.268:103-106,1995.
- [1039] Searle等人,Mol.Cell.Biol.,5:1480,1985.
- [1040] Seki等人,Microbiol Immunol.33:981-990,1989.
- [1041] Sharp和Marciniak,Cell,59:229,1989.
- [1042] Shaul和Ben-Levy,EMBO J.,6:1913,1987.
- [1043] Shaw等人,Microbiology,150:217-228,2004.
- [1044] Sheagren,N.Engl.J.Med.310:1368-1373,1984.
- [1045] Sherman等人,Mol.Cell.Biol.,9:50,1989.
- [1046] Shinefield等人,New England J Med.346:491-496,2002.
- [1047] Shopsis等人,J.Clin.Microbiol.,37:3556-63,1999.
- [1048] Sibbald等人,Microbiol.Mol Biol.Rev.,70:755-788,2006.
- [1049] Sievert等人,Clin Infect Dis.46:668-674,2008.
- [1050] Silberman等人,Brit J Haematol.24:101-113,1973.
- [1051] Silverman和Goodyear.Nat.Rev.Immunol.,6:465-75,2006.
- [1052] Sjodahl,Eur.J.Biochem.73:343-351,1977.
- [1053] Sjoquist等人,Eur.J.Biochem.30:190-194,1972.
- [1054] Sleigh和Lockett,J.EMBO,4:3831,1985.
- [1055] Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.,2:482,1981.
- [1056] Smith&Johnstone.Nature.178:982-983,1956.
- [1057] Smith等人,Brit.J.Exp.Pathol.,28:57,1947.
- [1058] Sorensen等人,Infect.Immun.,63:1710-1717,1995.
- [1059] Soulier等人,Thrombosis et diathesis haemorrhagica.17:321-334,1967.
- [1060] Spalholz等人,Cell,42:183,1985.
- [1061] Spandau和Lee,J.Virology,62:427,1988.
- [1062] Spandidos和Wilkie,EMBO J.,2:1193,1983.
- [1063] Spink等人,J Clin Invest.21:353-356,1942.
- [1064] Stanley等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100:13001-13006,2003.
- [1065] Stephens和Hentschel,Biochem.J.,248:1,1987.
- [1066] Stewart和Young,In:Solid Phase Peptide Synthesis,2d.ed.,Pierce Chemical Co.,1984.
- [1067] Stranger-Jones等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,103:16942-16947,2006.
- [1068] Streitfeld等人,Nature.184 (Suppl 21):1665-1666,1959.
- [1069] Strong等人,Biochem.21:1414-1420,1982.
- [1070] Stuart等人,Nature,317:828,1985.
- [1071] Studier等人,Methods Enzymol.185:60-89 1990.
- [1072] Stutzmann等人,Infect Immun.69:657-664,2001.
- [1073] Sullivan和Peterlin,Mol.Cell.Biol.,7:3315,1987.
- [1074] Sutter等人,FEMS Immunol Med Microbiol.63:16-24,2011.

- [1075] Swartzendruber和Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- [1076] Tager&Drumman, *Ann NY Acad Sci.* 128:92-111, 1965.
- [1077] Tager&Hales, *J Immunol.* 60:1-9, 1948.
- [1078] Takebe等人, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- [1079] Tam等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, 1983.
- [1080] Tavernier等人, *Nature*, 301:634, 1983.
- [1081] Taylor和Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- [1082] Taylor和Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- [1083] Taylor等人, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- [1084] Tenover等人, *Antimicrob Agents Chemother.* 56:1324-1330, 2012.
- [1085] Thammavongsa等人, *J Exp Med.* 206:2417-2427, 2009.
- [1086] Thiesen等人, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- [1087] Thomson等人, *J. Immunol.*, 157 (2) :822-826, 1996.
- [1088] Tigges等人, *J. Immunol.*, 156 (10) :3901-3910, 1996.
- [1089] Ton-That等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (22) :12424-9, 1999.
- [1090] Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- [1091] Tronche等人, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- [1092] Trudel和Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- [1093] Tuschcherr等人, *Infect Immun.* 73:7932-7937, 2005.
- [1094] Tyndell等人, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- [1095] Uhlen等人, *J. Biol. Chem.* 259:1695-1702和13628 (Corr.) 1984的vWbp蛋白。
- [1096] Umeda等人, *J Bacteriol.* 141:838-844, 1980.
- [1097] van den Ent和Lowe, *FEBS Lett.*, 579:3837-3841, 2005.
- [1098] van Wely等人, *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:437-454, 2001.
- [1099] Vanassche等人, *J Clin Microbiol.* 48:4248-4250, 2010.
- [1100] Vanassche等人, *J Thrombosis Haemostasis.* 9:2436-2446, 2011.
- [1101] Vanassche等人, *J Thrombosis Haemostasis.* 107, 2012修改的步骤制备的。
- [1102] Vannice和Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- [1103] Vasseur等人, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- [1104] Vaughan等人, *Nat. Biotech.* 16:535-539, 1998.
- [1105] Walker&Nesheim, *J Biol Chem.* 274:5201-5212, 1999.
- [1106] Walsh, *Science.* 261:308-309, 1993.
- [1107] Walsh等人, *Microbiol.* 154:550-558, 2008.
- [1108] Walsh, *Am J Med.* 4:782-782, 2010.
- [1109] Wang和Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- [1110] Wang等人, *PLoS Pathogens.* 6:e1000763, 2010.
- [1111] Ware等人, *Protein Sci.* 8:2663-2671, 1999.
- [1112] Watanabe等人, *PLoS One.* S, 4:e5714, 2009.
- [1113] Watanabe等人, *J Bacteriol.* 187:3698-3707, 2005.

- [1114] Weber等人,Cell,36:983,1984.
- [1115] Weems等人,Antimicrob Agents Chemother.50:2751-2755,2006.
- [1116] Weidenmaier等人,Nature Med.10:243-245,2004.
- [1117] Weigel等人,Science.302:1569-1571,2003.
- [1118] Weinberger等人,Mol.Cell.Biol.,8:988,1984.
- [1119] Weiss等人,J.Antimicrob.Chemother.,53(3):480-6,2004.
- [1120] Wilke等人,PNAS USA.107:13473-13478,2010.
- [1121] Winoto和Baltimore,Cell,59:649,1989.
- [1122] Wolberg,Haemophilia.16 Suppl 3:7-12,2010.
- [1123] Wong等人,Gene,10:87-94,1980.
- [1124] Xu等人,J.Infect.Dis.,189:2323-2333,2004.
- [1125] Xu等人,Mol.Microbiol.,66(3):787-800,2007.
- [1126] Yang等人,PNAS USA.97:14156-14161,2000.
- [1127] Yeaman等人,Antimicrobial Agents Chemotherapy.36:1665-1670,1992.
- [1128] Yutzey等人,Mol.Cell.Biol.,9:1397,1989.
- [1129] Zajdel,Thrombosis Red.6:501-510,1975

序列表

[0001]	<110>	莫利·麦克多夫 安德里亚·迪登 艾利斯·陈 卡拉·艾默罗 多米尼克·森阿卡斯 奥拉夫·施内温德	
	<120>	葡萄球菌凝固酶抗原及其使用方法	
	<130>	PP142812PF	
	<140>	未知	
	<141>	同本申请	
	<150>	61/638,831	
	<151>	2012-04-26	
	<150>	61/674,619	
	<151>	2012-07-23	
	<160>	87	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	41	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	1 cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt aaagaatcaa g	41
	<210>	2	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	2 tccccgggt tattttgtta ctctaggccc ata	33
	<210>	3	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	3 cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt gggaaa	36
	<210>	4	
	<211>	33	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成引物	
	<400>	4 tccccgggt tattttgtta ctctaggccc ata	33
	<210>	5	
	<211>	43	

[0002]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 5	
cgcgatcca tagtaactaa agattatagt aaagaatcaa gag	43
<210> 6	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 6	
tcccccggt tatTTtgTta ctctaggacc atatgtc	37
<210> 7	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 7	
cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt gggaaat	37
<210> 8	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 8	
tcccccggt tatTTtgTta ctctaggccc ata	33
<210> 9	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 9	
cgcgatcca tagtaacaaa ggattatagt gggaaat	37
<210> 10	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成引物	
<400> 10	
tcccccggt tatTTtgTta ctctaggacc atatgtc	37
<210> 11	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0003]	<223> 合成引物	
	<400> 11	
	cgcgatcca tagtaactaa agattatagt aaagaatcaa gag	43
	<210> 12	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 12	
	tcccccggt tatittgtta ctctaggacc atatgtc	37
	<210> 13	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 13	
	ccgctcgagg tggtttctgg ggagaag	27
	<210> 14	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 14	
	cgggatcctt atttgccatt atatacttta ttgattt	37
	<210> 15	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 15	
	ccgctcgagg tggtttctgg ggagaag	27
	<210> 16	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 16	
	cgggatcctt atttgccatt gtatacttta ttg	33
	<210> 17	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 17	
	catgccatgg cctaggatag taacaaagga ttatagtggg aaat	44

	<210> 18	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 18	
	cgggatcctt atttgttac tctaggcca ta	32
	<210> 19	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 19	
	catgccatgg ctcgagatag taacaaagga ttatagtaaa gaatc	45
	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 20	
	cctaggcgga ccatattgag aagc	24
[0004]	<210> 21	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 21	
	catgccatgg ccgcgatag taacaaagga ttatagtggg aaa	43
	<210> 22	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 22	
	ggctcgagtt ttttgacagt tttatttttc ca	32
	<210> 23	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成引物	
	<400> 23	
	catgccatgg cccgggatag taactaaaga ttatagtaaa gaatcaagag	50
	<210> 24	
	<211> 38	

[0005]	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 24		
	tccccgcgga tttttgacgg ttcttgTTTT ccaagatt	38	
	<210> 25		
	<211> 34		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 25		
	catgccatgg cctagggtgg ttctgggga gaag	34	
	<210> 26		
	<211> 37		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 26		
	cgggatcctt atttgccatt atatacttta ttgattt	37	
	<210> 27		
	<211> 34		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 27		
	catgccatgg ctcgaggtgg ttctgggga gaag	34	
	<210> 28		
	<211> 32		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 28		
	cctagtgta ttgttaaagt cctttaaatc ac	32	
	<210> 29		
	<211> 76		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成引物		
	<400> 29		
	catgccatgg gcagcagcca tcatcatcat catcacagca gcatagtaac taaagattat	60	
	agtaaagaat caagag	76	
	<210> 30		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		

[0006]

<220>
 <223> 合成引物
 <400> 30
 catgccatgg gcagcagcca tcatcatcat catcacagca gcgtggtttc tggggagaag 60
 <210> 31
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成引物
 <400> 31
 cgggatcctt acttctcaaa ttgaggatga gaccattttg ttactctagg cccata 56
 <210> 32
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成引物
 <400> 32
 cgggatcctt acttctcaaa ttgaggatga gaccatttgc cattatatac tttattgatt 60
 t 61
 <210> 33
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <400> 33
 Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Lys Glu Ser Arg Val Asn Glu Asn Ser
 1 5 10 15
 Lys Tyr Asp Thr Pro Ile Pro Asp Trp Tyr Leu Gly Ser Ile Leu Asn
 20 25 30
 Arg Leu Gly Asp Gln Ile Tyr Tyr Ala Lys Glu Leu Thr Asn Lys Tyr
 35 40 45
 Glu Tyr Gly Glu Lys Glu Tyr Lys Gln Ala Ile Asp Lys Leu Met Thr
 50 55 60
 Arg Val Leu Gly Glu Asp His Tyr Leu Leu Glu Lys Lys Lys Ala Gln
 65 70 75 80
 Tyr Glu Ala Tyr Lys Lys Trp Phe Glu Lys His Lys Ser Glu Asn Pro
 85 90 95
 His Ser Ser Leu Lys Lys Ile Lys Phe Asp Asp Phe Asp Leu Tyr Arg
 100 105 110
 Leu Thr Lys Lys Glu Tyr Asn Glu Leu His Gln Ser Leu Lys Glu Ala
 115 120 125
 Val Asp Glu Phe Asn Ser Glu Val Lys Asn Ile Gln Ser Lys Gln Lys
 130 135 140

Asp Leu Leu Pro Tyr Asp Glu Ala Thr Glu Asn Arg Val Thr Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Tyr Asp Phe Val Cys Glu Ile Asp Thr Leu Tyr Ala Ala Tyr Phe
 165 170 175
 Asn His Ser Gln Tyr Gly His Asn Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu
 180 185 190
 Asp Ile Ile Leu Gly Asp Ala Lys Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Glu
 195 200 205
 Arg Ile Arg Lys Glu Met Met Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp
 210 215 220
 Phe Phe Met Asp Thr Asn Met Asn Arg Pro Leu Asn Ile Thr Lys Phe
 225 230 235 240
 Asn Pro Asn Ile His Asp Tyr Thr Asn Lys Pro Glu Asn Arg Asp Asn
 245 250 255
 Phe Asp Lys Leu Val Lys Glu Thr Arg Glu Ala Ile Ala Asn Ala Asp
 260 265 270
 Glu Ser Trp Lys Thr Arg Thr Val Lys Asn
 275 280

[0007]

<210> 34
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 34

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

```

Leu Asp Asn Phe Lys Leu Glu Val Lys Lys Ile Glu Ser Glu Asn Pro
130          135          140

Asp Leu Lys Pro Tyr Ser Glu Ser Glu Glu Arg Thr Ala Tyr Gly Lys
145          150          155          160

Ile Asp Ser Leu Val Asp Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Phe Ala Tyr Val
165          170          175

Thr Asp Ala Gln His Lys Thr Glu Ala Leu Asn Leu Arg Ala Lys Ile
180          185          190

Asp Leu Ile Leu Gly Asp Glu Lys Asp Pro Ile Arg Val Thr Asn Gln
195          200          205

Arg Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys Asp Leu Glu Ser Ile Ile Asp Asp
210          215          220

Phe Phe Ile Glu Thr Lys Leu Asn Arg Pro Lys His Ile Thr Arg Tyr
225          230          235          240

Asp Gly Thr Lys His Asp Tyr His Lys His Lys Asp Gly Phe Asp Ala
245          250          255

Leu Val Lys Glu Thr Arg Glu Ala Val Ala Lys Ala Asp Glu Ser Trp
260          265          270

Lys Asn Lys Thr Val Lys Lys
275

<210> 35
<211> 279
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 35

Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Gly Lys Ser Gln Val Asn Ala Gly Ser
1          5          10          15

Lys Asn Gly Lys Gln Ile Ala Asp Gly Tyr Tyr Trp Gly Ile Ile Glu
20          25          30

Asn Leu Glu Asn Gln Phe Tyr Asn Ile Phe His Leu Leu Asp Gln His
35          40          45

Lys Tyr Ala Glu Lys Glu Tyr Lys Asp Ala Leu Asp Lys Leu Lys Thr
50          55          60

Arg Val Leu Glu Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Glu Lys
65          70          75          80

Tyr Glu Ile Tyr Lys Glu Leu Tyr Lys Lys Tyr Lys Lys Glu Asn Pro
85          90          95

Asn Thr Gln Val Lys Met Lys Ala Phe Asp Lys Tyr Asp Leu Gly Asp
100         105         110

Leu Thr Met Glu Glu Tyr Asn Asp Leu Ser Lys Leu Leu Thr Lys Ala

```

[0008]

115	120	125
Leu Asp Asn Phe Lys Leu Glu Val Lys Lys Ile Glu Ser Glu Asn Pro 130	135	140
Asp Leu Arg Pro Tyr Ser Glu Ser Glu Glu Arg Thr Ala Tyr Gly Lys 145	150	155
Ile Asp Ser Leu Val Asp Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Phe Ala Tyr Val 165	170	175
Thr Asp Ala Gln His Lys Thr Glu Ala Leu Asn Leu Arg Ala Lys Ile 180	185	190
Asp Leu Ile Leu Gly Asp Glu Lys Asp Pro Ile Arg Val Thr Asn Gln 195	200	205
Arg Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys Asp Leu Glu Ser Ile Ile Asp Asp 210	215	220
Phe Phe Ile Glu Thr Lys Leu Asn Arg Pro Gln His Ile Thr Arg Tyr 225	230	235
Asp Gly Thr Lys His Asp Tyr His Lys His Lys Asp Gly Phe Asp Ala 245	250	255
Leu Val Lys Glu Thr Arg Glu Ala Val Ser Lys Ala Asp Glu Ser Trp 260	265	270
Lys Thr Lys Thr Val Lys Lys 275		
<210> 36		
<211> 277		
<212> PRT		
<213> 金黄色葡萄球菌		
<400> 36		
Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Lys Glu Ser Arg Val Asn Glu Lys Ser 1	5	10
Lys Lys Gly Ala Thr Val Ser Asp Tyr Tyr Trp Lys Ile Ile Asp 20	25	30
Ser Leu Glu Ala Gln Phe Thr Gly Ala Ile Asp Leu Leu Glu Asp Tyr 35	40	45
Lys Tyr Gly Asp Pro Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Met Thr 50	55	60
Arg Val Leu Gly Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Lys Lys Lys Ile Asp Glu 65	70	75
Tyr Glu Leu Tyr Lys Lys Trp Tyr Lys Ser Ser Asn Lys Asn Thr Asn 85	90	95
Met Leu Thr Phe His Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Leu Thr Met Asn Glu 100	105	110

[0009]

Tyr Asn Asp Ile Phe Asn Ser Leu Lys Asp Ala Val Tyr Gln Phe Asn
 115 120 125
 Lys Glu Val Lys Glu Ile Glu His Lys Asn Val Asp Leu Lys Gln Phe
 130 135 140
 Asp Lys Asp Gly Glu Asp Lys Ala Thr Lys Glu Val Tyr Asp Leu Val
 145 150 155 160
 Ser Glu Ile Asp Thr Leu Val Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Lys Asp Tyr
 165 170 175
 Gly Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly
 180 185 190
 Asp Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu
 195 200 205
 Met Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr
 210 215 220
 Lys Gln Asn Arg Pro Asn Ser Ile Thr Lys Tyr Asp Pro Thr Lys His
 225 230 235 240
 Asn Phe Lys Glu Lys Ser Glu Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val
 245 250 255
 [0010] Glu Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Glu Ser Trp Lys Asn
 260 265 270
 Lys Thr Val Lys Lys
 275
 <210> 37
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <400> 37
 Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Gly Lys Ser Gln Val Asn Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Gly Thr Leu Ile Asp Ser Arg Tyr Leu Asn Ser Ala Leu Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu Glu Asp Tyr Ile Ile Tyr Ala Ile Gly Leu Thr Asn Lys Tyr
 35 40 45
 Glu Tyr Gly Asp Asn Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Leu Glu
 50 55 60
 Lys Val Leu Arg Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Ser Gln
 65 70 75 80
 Tyr Glu Asp Tyr Lys Gln Trp Tyr Ala Asn Tyr Lys Lys Glu Asn Pro
 85 90 95

	Arg	Thr	Asp	Leu	Lys	Met	Ala	Asn	Phe	His	Lys	Tyr	Asn	Leu	Glu	Glu	
				100					105					110			
	Leu	Ser	Met	Lys	Glu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Leu	Lys	Arg	Ala	
			115					120					125				
	Leu	Asp	Asp	Phe	His	Arg	Glu	Val	Lys	Asp	Ile	Lys	Asp	Lys	Asn	Ser	
		130					135					140					
	Asp	Leu	Lys	Thr	Phe	Asn	Ala	Ala	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	
	145					150					155					160	
	Val	Tyr	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Tyr	
				165					170						175		
	Gly	Asp	Lys	Asp	Tyr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Glu	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	
				180					185					190			
	Asp	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Thr	Asp	Asn	Pro	His	Lys	Ile	Thr	Asn	Glu	
		195						200					205				
	Arg	Ile	Lys	Lys	Glu	Met	Ile	Asp	Asp	Leu	Asn	Ser	Ile	Ile	Asp	Asp	
		210					215					220					
	Phe	Phe	Met	Glu	Thr	Lys	Gln	Asn	Arg	Pro	Lys	Ser	Ile	Thr	Lys	Tyr	
	225					230					235					240	
[0011]	Asn	Pro	Thr	Thr	His	Asn	Tyr	Lys	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Lys	Pro	Asn	
					245					250					255		
	Phe	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Ala	Val	Lys	Glu	Ala	Asp	
			260						265					270			
	Asp	Ser	Trp	Lys	Lys	Lys	Thr	Val	Lys	Lys							
		275					280										
	<210>	38															
	<211>	135															
	<212>	PRT															
	<213>	金黄色葡萄球菌															
	<400>	38															
	Val	Val	Ser	Gly	Glu	Lys	Asn	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	
	1				5					10					15		
	Lys	Asp	Lys	Ser	Asn	Lys	Ser	Asn	Ser	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ser	
			20						25					30			
	Leu	Glu	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Phe	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	Tyr	
			35					40					45				
	Glu	Glu	Pro	Glu	Tyr	Glu	Lys	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Gln	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Met	Ala	Glu	Asp	Asp	Ala	Leu	Lys	Asn	Phe	Leu	Asn	Glu	Glu	Lys	Lys	
	65					70					75					80	

Ile Lys Asn Ala Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asn Asn Leu Leu Gly Leu
85 90 95

Thr His Glu Arg Tyr Ser Tyr Ile Phe Asp Thr Leu Lys Lys Asn Lys
100 105 110

Gln Glu Phe Leu Lys Asp Ile Glu Glu Ile Gln Leu Lys Asn Ser Asp
115 120 125

Leu Lys Asp Phe Asn Asn Thr
130 135

<210> 39
<211> 132
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 39

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
85 90 95

Glu Arg Tyr Glu Ser Val Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu
100 105 110

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Asn Glu
130

<210> 40
<211> 482
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 40

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

[0012]

[0013]

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
 50 55 60
 Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
 85 90 95
 Glu Arg Tyr Glu Ser Val Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu
 100 105 110
 Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
 115 120 125
 Asp Phe Asn Glu Glu Glu Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys
 130 135 140
 Leu Glu Asn Gln Ile Leu Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asp Asp Val Glu Ser Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Leu Ile Met Gly
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Glu Glu Arg Ala Asn Lys Lys Ala Val Asn Lys Arg Met
 180 185 190
 Leu Glu Asn Lys Lys Glu Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe
 195 200 205
 Ser Asp Ile Asp Lys Thr Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp
 210 215 220
 Glu Lys Gln Glu Glu Lys Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser
 225 230 235 240
 Asp Thr Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser
 245 250 255
 Lys Arg Ser Leu Asn Thr Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val
 260 265 270
 Ser Glu Gln Gln Lys Ala Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys
 275 280 285
 Ala Arg Phe Leu Asp Asn Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser
 290 295 300
 Leu Glu Tyr Asp Phe Glu His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Val Val Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr
 325 330 335
 Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg
 340 345 350

Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly
 355 360 365

Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr
 370 375 380

Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser
 385 390 395 400

Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile
 405 410 415

Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu
 420 425 430

His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His
 435 440 445

Ser Tyr Lys Asp Arg Ile Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser
 450 455 460

Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn
 465 470 475 480

Gly Lys

[0014]

<210> 41
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 41

Ile Val Thr Lys Asp Tyr Ser Lys Glu Ser Arg Val Asn Glu Lys Ser
 1 5 10 15

Lys Lys Gly Ala Thr Val Ser Asp Tyr Tyr Tyr Trp Lys Ile Ile Asp
 20 25 30

Ser Leu Glu Ala Gln Phe Thr Gly Ala Ile Asp Leu Leu Glu Asp Tyr
 35 40 45

Lys Tyr Gly Asp Pro Ile Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Met Thr
 50 55 60

Arg Val Leu Gly Glu Asp Gln Tyr Leu Leu Lys Lys Lys Ile Asp Glu
 65 70 75 80

Tyr Glu Leu Tyr Lys Lys Trp Tyr Lys Ser Ser Asn Lys Asn Thr Asn
 85 90 95

Met Leu Thr Phe His Lys Tyr Asn Leu Tyr Asn Leu Thr Met Asn Glu
 100 105 110

Tyr Asn Asp Ile Phe Asn Ser Leu Lys Asp Ala Val Tyr Gln Phe Asn
 115 120 125

[0015]

Lys Glu Val Lys Glu Ile Glu His Lys Asn Val Asp Leu Lys Gln Phe
 130 135 140

Asp Lys Asp Gly Glu Asp Lys Ala Thr Lys Glu Val Tyr Asp Leu Val
 145 150 155 160

Ser Glu Ile Asp Thr Leu Val Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Lys Asp Tyr
 165 170 175

Gly Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly
 180 185 190

Asp Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu
 195 200 205

Met Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr
 210 215 220

Lys Gln Asn Arg Pro Asn Ser Ile Thr Lys Tyr Asp Pro Thr Lys His
 225 230 235 240

Asn Phe Lys Glu Lys Ser Glu Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val
 245 250 255

Glu Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Glu Ser Trp Lys Asn
 260 265 270

Lys Thr Val Lys Lys Tyr Glu Glu Thr Val Thr Lys Ser Pro Val Val
 275 280 285

Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Pro Gln Leu Pro Lys Val Gly Asn
 290 295 300

Gln Gln Glu Val Lys Thr Thr Ala Gly Lys Ala Glu Glu Thr Thr Gln
 305 310 315 320

Pro Val Ala Gln Pro Leu Val Lys Ile Pro Gln Glu Thr Ile Tyr Gly
 325 330 335

Glu Thr Val Lys Gly Pro Glu Tyr Pro Thr Met Glu Asn Lys Thr Leu
 340 345 350

Gln Gly Glu Ile Val Gln Gly Pro Asp Phe Leu Thr Met Glu Gln Asn
 355 360 365

Arg Pro Ser Leu Ser Asp Asn Tyr Thr Gln Pro Thr Thr Pro Asn Pro
 370 375 380

Ile Leu Glu Gly Leu Glu Gly Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Lys Pro
 385 390 395 400

Gln Gly Thr Glu Ser Thr Leu Lys Gly Ile Gln Gly Glu Ser Ser Asp
 405 410 415

Ile Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr
 420 425 430

Gly Pro

<210> 42
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌

<400> 42

Met Lys Lys Gln Ile Ile Ser Leu Gly Ala Leu Ala Val Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Leu Phe Thr Trp Asp Asn Lys Ala Asp Ala Ile Val Thr Lys Asp Tyr
 20 25 30

Ser Gly Lys Ser Gln Val Asn Ala Gly Ser Lys Asn Gly Thr Leu Ile
 35 40 45

Asp Ser Arg Tyr Leu Asn Ser Ala Leu Tyr Tyr Leu Glu Asp Tyr Ile
 50 55 60

Ile Tyr Ala Ile Gly Leu Thr Asn Lys Tyr Glu Tyr Gly Asp Asn Ile
 65 70 75 80

Tyr Lys Glu Ala Lys Asp Arg Leu Leu Glu Lys Val Leu Arg Glu Asp
 85 90 95

[0016]

Gln Tyr Leu Leu Glu Arg Lys Lys Ser Gln Tyr Glu Asp Tyr Lys Gln
 100 105 110

Trp Tyr Ala Asn Tyr Lys Lys Glu Asn Pro Arg Thr Asp Leu Lys Met
 115 120 125

Ala Asn Phe His Lys Tyr Asn Leu Glu Glu Leu Ser Met Lys Glu Tyr
 130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Ala Leu Lys Arg Ala Leu Asp Asp Phe His Arg
 145 150 155 160

Glu Val Lys Asp Ile Lys Asp Lys Asn Ser Asp Leu Lys Thr Phe Asn
 165 170 175

Ala Ala Glu Glu Asp Lys Ala Thr Lys Glu Val Tyr Asp Leu Val Ser
 180 185 190

Glu Ile Asp Thr Leu Val Val Ser Tyr Tyr Gly Asp Lys Asp Tyr Gly
 195 200 205

Glu His Ala Lys Glu Leu Arg Ala Lys Leu Asp Leu Ile Leu Gly Asp
 210 215 220

Thr Asp Asn Pro His Lys Ile Thr Asn Glu Arg Ile Lys Lys Glu Met
 225 230 235 240

Ile Asp Asp Leu Asn Ser Ile Ile Asp Asp Phe Phe Met Glu Thr Lys
 245 250 255

[0017]

Gln Asn Arg Pro Lys Ser Ile Thr Lys Tyr Asn Pro Thr Thr His Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Asn Ser Asp Asn Lys Pro Asn Phe Asp Lys Leu Val Glu
 275 280 285
 Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Asp Ser Trp Lys Lys Lys
 290 295 300
 Thr Val Lys Lys Tyr Gly Glu Thr Glu Thr Lys Ser Pro Val Val Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Pro Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Gln
 325 330 335
 Gln Glu Val Lys Thr Thr Ala Gly Lys Ala Glu Glu Thr Thr Gln Pro
 340 345 350
 Val Ala Gln Pro Leu Val Lys Ile Pro Gln Gly Thr Ile Thr Gly Glu
 355 360 365
 Ile Val Lys Gly Pro Glu Tyr Pro Thr Met Glu Asn Lys Thr Val Gln
 370 375 380
 Gly Glu Ile Val Gln Gly Pro Asp Phe Leu Thr Met Glu Gln Ser Gly
 385 390 395 400
 Pro Ser Leu Ser Asn Asn Tyr Thr Asn Pro Pro Leu Thr Asn Pro Ile
 405 410 415
 Leu Glu Gly Leu Glu Gly Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Lys Pro Gln
 420 425 430
 Gly Thr Glu Ser Thr Leu Lys Gly Thr Gln Gly Glu Ser Ser Asp Ile
 435 440 445
 Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr Gly
 450 455 460
 Pro Arg Pro Gln Phe Asn Lys Thr Pro Lys Tyr Val Lys Tyr Arg Asp
 465 470 475 480
 Ala Gly Thr Gly Ile Arg Glu Tyr Asn Asp Gly Thr Phe Gly Tyr Glu
 485 490 495
 Ala Arg Pro Arg Phe Asn Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val
 500 505 510
 Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln
 515 520 525
 Asn Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Gly Asn
 530 535 540
 Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys
 545 550 555 560

Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr
565 570 575

Gly Ala Arg Pro Thr Tyr Lys Lys Pro Ser Lys Thr Asn Ala Tyr Asn
580 585 590

Val Thr Thr His Ala Asp Gly Thr Ala Thr Tyr Gly Pro Arg Val Thr
595 600 605

Lys

<210> 43
<211> 447
<212> DNA
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 43
atagtaacaa aggattatag tgggaaatca caagttaatg ctgggagtaa aaatgggaca 60
ttaatagata gcagatatatt aaattcagct ctatattatt tggagagacta tataatttat 120
gctatagatg taactaataa atatgaatat ggagataata ttataaaaga agctaaagat 180
aggttggttg aaaaggtatt aagggaagat caatatcttt tggagagaaa gaaatctcaa 240
tatgaagatt ataacaatg gtatgcaaat tataaaaaag aaaatcctcg tacagattta 300
aaaatggcta attttcataa atataattta gaagaacttt cgatgaaaga atacaatgaa 360
ctacaggatg cattaaagag agcactggat gattttcaca gagaagttaa agatattaag 420
gataagaatt cagacttgaa aactttt 447

[0018]

<210> 44
<211> 399
<212> DNA
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 44
aatgcagcag aagaagataa agcaactaag gaagtatacg atctcgtatc tgaaattgat 60
acattagttg tatcatatta tggtgataag gattatgggg agcacgcgaa agagttacga 120
gcaaaactgg acttaatcct tggagataga gacaatccac ataaaattac aaatgaacgt 180
attaaaaaag aaatgattga tgaacttaaat tcaattattg atgatttctt tatggaaact 240
aaacaaaata gaccgaaatc tataacgaaa tataatccta caacacataa ctataaaaca 300
aatagtata ataaacctaa ttttgataaa ttagttgaag aaacgaaaaa agcagttaaa 360
gaagcagatg attcttggaa aaagaaaact gtcaaaaaa 399

<210> 45
<211> 471
<212> DNA
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 45
tacggagaaa ctgaaacaaa atgccagta gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct 60
caagcaccta aagttgataa ccaacaagag gttaaaacta cggctggtaa agctgaagaa 120
acaacacaac cagttgcaca accattagtt aaaattccac agggcacaat tacagtgtaa 180
attgtaaaag gtccggaata tccaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaatcgtt 240
caaggtcccc attttctaac aatggaacaa agcgcccat cattaagcaa taattatata 300

	aacccacgt taacgaaccc tattttagaa ggtcttgaag gtagctcatc taaacttgaa	360
	ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcaac tgaacaaca gaagcttctc aatatggtcc g	471
	<210> 46	
	<211> 435	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 46	
	agaccgcaat ttaacaaaac acctaaatat gttaaatata gagatgctgg tacaggtatc	60
	cgigaatata acgatggaac atttgatata gaagcgagac caagattcaa taagccatca	120
	gaaacaaatg catataacgt aacaacacat gcaaatggtc aagtatcata cggagctcgt	180
	ccgacacaaa acaagccaag caaaacaac gcatataacg taacaacaca tggaaacggc	240
	caagtatcat atggcgctcg cccaacacaa aacaagccaa gcaaaacaaa tgcatacaac	300
	gtaacaacac atgcaaacgg tcaagtgtca tacggagctc gcccgacata caagaagcca	360
	agtaaaacaa atgcatacaa tgtaacaaca catgcagatg gtactgcgac atatgggcct	420
	agagtaacaa aataa	435
	<210> 47	
	<211> 510	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 47	
[0019]	atgaaaaagc aaataatttc gctagcgcca ttagcagttg catctagctt atttcatgg	60
	gataacaaag cagatgcgat agtaacaaag gattatagta aagaatcaag agtgaatgag	120
	aaaagtaaaa agggagctac tgtttcagat tattactatt ggaaaataat tgatagtta	180
	gaggcacaat ttactggagc aatagactta ttggaagatt ataaatatgg agatcctatc	240
	tataaagaag cgaagatag attgatgaca agagtattag gagaagacca gtatttatta	300
	aagaaaaaga ttgatgaata tgagctttat aaaaagtgtt ataaaagttc aaataagaac	360
	actaatatgc ttactttcca taaatataat ctttacaatt taacaatgaa tgaatataac	420
	gatattttta actctttgaa agatgcagtt tatcaattta ataaagaagt taaagaata	480
	gagcataaaa atgttgactt gaagcagttt	510
	<210> 48	
	<211> 399	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 48	
	gataaagatg gagaagacaa ggcaactaaa gaagtttatg acctgttttc tgaaattgat	60
	acattagttg taacttatta tgctgataag gattatgggg agcatgcgaa agagttacga	120
	gcaaaactgg acttaatcct tggagatata gacaatccac ataaaattac aatgagcgt	180
	ataaaaaaag aaatgatcga tgacttaaat tcaattatag atgatttctt tatggagact	240
	aaacaaaata gaccgaattc tataacaaaa tatgatccaa caaacacaaa ttttaagag	300
	aagagtgaat ataaacctaa ttttgataaa ttagttgaag aaacaaaaaa agcagttaaa	360
	gaagcagacg aatcttgtaa aaataaaact gtcaaaaaa	399

[0020]	<210>	49	
	<211>	471	
	<212>	DNA	
	<213>	金黄色葡萄球菌	
	<400>	49	
		tacgaggaaa ctgtaacaaa atctcctgtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
		caattacctt aagttggaaa ccagcaagag gttaaaacta cggtctgtaa agctgaagaa	120
		acaacacaac cagtggcaca gccattagta aaaattccac aagaacaat ctatggtgaa	180
		actgtaaaag gtccagaata tccaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcgtt	240
		caaggtcccg attttctaac aatggaaca aacagacat ctttaagcga taattatact	300
[0020]		caaccgacga caccgaaccc tattttagaa ggtcttgaag gtagctcatt taaacttgaa	360
		ataaaaccac aaggtactga atcaacgttg aaaggtattc aaggagaatc aagtgatatt	420
		gaagttaaac ctcaagcaac tgaacaaca gaagcttctc aatatgtgcc g	471
	<210>	50	
	<211>	597	
	<212>	DNA	
	<213>	金黄色葡萄球菌	
	<400>	50	
		agaccgcaat ttaacaaaac acctaagtat gtgaaatata gagatgctgg tacaggtatc	60
		cgtgaatata acgatggaac atttgatata gaagcgagac caagattcaa caagccaagt	120
		gaaacaaatg catacaacgt aacgacaaat caagatggca cagtatcata cggagctcgc	180
		ccaacacaaa acaagccaag tgaacaaaac gcatataacg taacaacaca tgcaaatggt	240
		caagtatcat acggtgctcg cccaacacaa aaaaagccaa gcaaaacaaa tgcatataac	300
		gtaacaacac atgcaaatgg tcaagtatca tatggcgctc gcccgacaca aaaaaagcca	360
		agcaaaacaa atgcatataa cgtacaaca catgcaaatg gtcaagtatc atacggagct	420
		cgcccgacat acaagaagcc aagcgaaaca aatgcataca acgtaacaac acatgcaaat	480
		ggtcaagtat catatggcgc tcgccgaca caaaaaaagc caagcgaaac aaacgcatat	540
		aacgtaacaa cacatgcaga tggtagctgc acatatgggc ctagagtaac aaaataa	597
[0020]	<210>	51	
	<211>	525	
	<212>	DNA	
	<213>	金黄色葡萄球菌	
	<400>	51	
		atgaaaaagc aaataatttc gctaggcgca ttagcagttg catctagcct atttacctgg	60
		gataacaaag cagatgcgat agtaacaaag gattatagtg ggaaatcaca agttaatgct	120
		gggagtaaaa atgggaaaca aatgcagat ggatattatt ggggaataat tgaaaatcta	180
		gaaaaccagt tttaacaatat ttttcattta ctggatcagc ataaatatgc agaaaaagaa	240
		tataaagatg cagtagataa attaaaaact agagtttttag aggaagacca atacctgcta	300
		gaaagaaaaa aagaaaaata cgaaatttat aaagaactat ataaaaata caaaaaagag	360
		aatcctaata ctcaagttaa aatgaaagca ttgataaat acgatcttgg cgatttaact	420
		atggaagaat acaatgactt atcaaaaata ttaacaaaag cattggataa ctttaagtta	480
		gaagtaaaga aaattgaatc agagaatcca gatttaaaac catat	525
[0020]	<210>	52	

[0021]	<211> 390	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 52	
	tctgaaagcg aagaaagaac agcatatggt aaaatagatt cacttggtga tcaagcatat	60
	agtgatatatt ttgcctacgt tacagatgca caacataaaa cagaagcatt aaatcttagg	120
	gcgaaaattg atttgatttt aggtgatgaa aaagatccaa ttagagttac gaatcaacgt	180
	actgaaaaag aaatgattaa agatttagaa tctattattg atgatttctt cattgaaacc	240
	aagtgaata gacctaaaca cattactagg tatgatggaa ctaaacaatga ttaccataaa	300
	cataaagatg gatttgatgc tctagttaaa gaaacaagag aagcggttgc aaaggtgac	360
	gaatcttga aaaataaaac tgtcaaaaaa	390
[0021]	<210> 53	
	<211> 564	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 53	
	tacgaggaat ctgtaacaaa atctccagtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caatcaccta aatttgataa ccaacaagag gttaaaatta cagttgataa agctgaagaa	120
	acaacacaac cagtggcaca gccattagtt aaaaticcac agggcacaat tacaggtgaa	180
	attgtaaaag gtccggaata tccaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcgtt	240
	caaggtccag atttccaac aatggaacaa aacagaccat cttaagcga taattatact	300
	caaccgacga caccgaaccc tatittgataa ggtcttgaag gtagctcctc taaacttgaa	360
[0021]	ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcatc tgaacaaca gaagcatcac attatccagc aagacctcaa	480
	tttaacaaaa cacctaataa tgttaaatat agagatgctg gtacaggtat ccgtgaatac	540
	aacgatggaa catttgataa tgaa	564
	<210> 54	
	<211> 423	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 54	
	gcgagaccaa gattcaataa gccatcagaa acaaacgcat acaacgtaac gacaaatcaa	60
	gatggcacag taacatatgg cgctcgccca acacaaaaca aaccaagcaa aacaaatgca	120
	tacaacgtaa caacacatgc aaatgtgcaa gtatcatatg gcgctcgccc gacacaaaac	180
	aagccaagca aaacaaatgc atataacgta acaacacatg caaatggtca agtatcatac	240
	ggagctcgcc cgacacaaaa caagccaagc aaacaaatg catataacgt aacaacacac	300
	gcaaacggtc aagtgtcata cgagctcgc ccgacataca agaagccaag taaaacaaat	360
	gcatacaatg taacaacaca tgcagatggt actgcgacat atgggcctag agtaacaaaa	420
	taa	423
[0021]	<210> 55	
	<211> 525	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 55	

	atgaaaaagc aaataatttc gctaggcgca ttagcagttg catctagctt atttacatgg	60
	gataacaaag cagatgcgat agtaactaaa gattatagta aagaatcaag agtgaatgag	120
	aacagtaaat acgatacacc aattccagat tggtatctag gtagtatttt aaacagatta	180
	ggggatcaaa tatakacgc taaggaatta actaataaat acgaatatgg tgagaaagag	240
	tataagcaag cgatagataa attgatgact agagttttgg gagaagatca ttatctatta	300
	gaaaaaaga aagcacaata tgaagcatac aaaaaatggt ttgaaaaaca taaaagtga	360
	aatccacatt ctagttttaa aaagattaaa ttgacgatt ttgatttata tagattaacg	420
	aagaaagaat acaatgagtt acatcaatca ttaaaagaag ctgttgatga gtttaatagt	480
	gaagtgaaaa atattcaatc taaacaaaag gatttattac cttat	525
	<210> 56	
	<211> 399	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 56	
	gatgaagcaa ctgaaaatcg agtaacaaat ggaatatatg attttgttg cgagattgac	60
	acattatacg cagcatattt taatcatagc caatatggtc ataatgctaa agaattaaga	120
	gcaaagctag atataattct tggtgatgct aaagatcctg ttagaattac gaatgaaaga	180
	ataagaaaag aaatgatgga tgatttaaat tctattattg atgatttctt tatggataca	240
	aacatgaata gaccattaaa cataactaaa tttaatccga atattcatga ctatacta	300
	aagcctgaaa atagagataa cttcgataaa ttagtcaaag aaacaagaga agcaatcgca	360
[0022]	aacgctgacg aatcttggaa aacaagaacc gtcaaaaat	399
	<210> 57	
	<211> 564	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 57	
	tacggtgaat ctgaaacaaa atctcctggt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caattaccta aagttgaaa ccagcaagag gataaaatta cagttgttac aactgaagaa	120
	gcaccattac caattgcga accactagtt aaaattccac agggcacaat tcaagtgaa	180
	attgtaaaa gtccggaata tctaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcggt	240
	caaggtccag atttcccaac aatggaacaa aacagacat ctttaagcga taattatact	300
	caaccgacga caccgaaccc tattttaaaa ggtattgaag gaaactcaac taaactgaa	360
	ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcaac tgaacaaca gaagcatcac attatccagc gagacctcaa	480
	tttaacaaaa cacctaagta tgtgaaatat agagatgctg gtacaggtat ccgtgaatac	540
	aacgatggaa catttgata tgaa	564
	<210> 58	
	<211> 342	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 58	
	gcgagaccaa gattcaaca gccaaagcga acaaatgcat acaacgtaac gacaaatcaa	60
	gatggcacag tatcatatgg cgctgcccc acacaaaaca agccaagcga aacaaacgca	120

	tataacgtaa caacacatgc aaacggccaa gtatcatacg gagctcgtcc gacacaaaac	180
	aagccaagcg aaacgaacgc atataacgta acaacacatg caaacggtca agtgtcatac	240
	ggagctcgcc caacacaaaa caagccaagt aaaacaaatg catacaatgt aacaacacat	300
	gcagatggta ctgcgacata tggtcctaga gtaacaaaaa aa	342
	<210> 59	
	<211> 447	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 59	
	atagtaacaa aggattatag tgggaaatca caagttaatg ctgggagtaa aaatgggaaa	60
	caaatgfcag atggatatta ttggggaata attgaaaatc tagagaacca gttttacaat	120
	atTTTTcatt tattggatca gcataaatat gcagaaaaag aatataaaga tgcattagat	180
	aaattaaaaa ctagagtttt agaggaagac caatacctgc tagaaagaaa aaaagaaaaa	240
	tacgaaatTT ataaagaact atataaaaaa tacaataaag agaatacctaa tactcaggtt	300
	aaaatgaaag catttgataa atacgatctt ggcgatttaa ctatggaaga atacaatgac	360
	ttatcaaaat tattaacaaa agcatgtgat aactttaagt tagaagtaaa gaaaattgaa	420
	tcagagaatc cagatttaag accatat	447
	<210> 60	
	<211> 390	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
[0023]	<400> 60	
	tctgaaagtg aagagagaac agcatatggt aaaatagatt cacttgttga tcaagcatat	60
	agtgtatatt ttgcctacgt tacagatgct caacataaaa cagaagcatt aaatcttagg	120
	gcaaaaatag atttgatttt aggtgatgaa aaagatccaa ttagagtgcac gaatcaacgt	180
	actgaaaaag aaatgattaa agatttagaa tctattattg atgatttctt cattgaaaca	240
	aagtgaata gacctcaaca cttactaga tatgatggaa ctaaacatga ttaccataaa	300
	cataaagatg gatttgatgc tttagttaaa gaaacaagag aagcggtttc taaggctgac	360
	gaatcttggg aaactaaaac tgtcaaaaaa	390
	<210> 61	
	<211> 597	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 61	
	tacggggaaa ctgaacaaa atatcctgtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caatcaccta aagtttctga aaaagtggat gttcaggaaa cggttggtac aactgaagaa	120
	gcaccattac caattgcgca accactagtt aaattaccac aaattgggac tcaaggcgaa	180
	attgtaaaag gtcccgacta tccaactatg gaaaataaaa cgttacaagg tgtaattgtt	240
	caaggtccag atttcccaac aatggaacaa aacagacat ctttaagtga caattataca	300
	caaccatctg tgactttacc gtcaattaca ggtgaaagta caccaacgaa ccctatttta	360
	aaaggtattg aaggaaactc atctaaactt gaaataaaac cacaaggtag tgaatcaacg	420
	ttgaaaggta ttcaaggaga atcaagtgat attgaagtta aacctcaagc aactgaacaa	480

	acagaagcat cacattatcc agcgagaccg caatttaaca aaacacctaa atatgtgaaa	540
	tatagagatg ctggtacagg taticgtgaa tacaacgatg gaacttttgg atatgaa	597
	<210> 62	
	<211> 504	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 62	
	gcgagaccaa gattcaacaa gccatcagaa acaaacgcat acaacgtaac gacaaatcaa	60
	gatggcacag tatcatatgg ggctcgccca acacaaaaca agccaagcaa aacaaatgca	120
	tataacgtaa caacacatgc aaacggccaa gtatcatatg gcgctcgccc gacatacaac	180
	aagccaagtg aaacaaatgc atacaacgta acgacaaatc gagatggcac agtatcatat	240
	ggcgctcgcc cgacacaaaa caagccaagc gaaacgaatg catataacgt aacaacacac	300
	ggaaatggcc aagtatcata tggcgctcgt ccgacacaaa agaagccaag caaaacaaat	360
	gcataatacg taacaacaca tgcaaacggc caagtatcat atggcgctcg tccgacatac	420
	aaacagccaa gtaaacaaaa tgcatacaat gtaacaacac atgcagatgg tactgcgaca	480
	tatggtccta gagtaacaaa ataa	504
	<210> 63	
	<211> 546	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 63	
[0024]	gattgggcaa ttacattttg gaggaattaa aaaattatga aaaagcaaat aatttcgcta	60
	ggcgcattag cagttgcatc tagcttattt acatgggata acaaagcaga tgcgatagta	120
	acaaaggatt atagtaaaga atcaagagtg aatgagaaaa gtaaaaaggg agctactgtt	180
	tcagattatt actattggaa aataattgat agtttagagg cacaatttac tggagcaata	240
	gacttattgg aagattataa atatggagat cctatctata aagaagcgaa agatagattg	300
	atgacaagag tattaggaga agaccagtat ttattaaaga aaaagattga tgaatatgag	360
	ctttataaaa agtggataaa aagttcaaat aagaacacta atatgcttac tttccataaa	420
	tataatcttt acaatttaac aatgaatgaa tataacgata tttttaactc ttgaaagat	480
	gcagtttatc aatttaataa agaagttaaa gaaatagagc ataaaaatgt tgacttgaag	540
	cagttt	546
	<210> 64	
	<211> 399	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 64	
	gataaagatg gagaagacaa ggcaactaaa gaagtttatg accttgtttc tgaaattgat	60
	acattagtgt taacttatta tgctgataag gattatgggg agcatgcaa agagttacga	120
	gcaaaactgg acttaatcct tggagataga gacaatccac ataaaattac aaatgagcgt	180
	ataaaaaaag aaatgatcga tgacttaaat tcaattatag atgatttctt tatggagact	240
	aaacaaata gaccgaattc tataacaaaa tatgatccaa caaacacaa ttttaagag	300
	aagagtgaag ataaacctaa ttttgataaa ttagttgaag aaacaaaaaa agcagttaaa	360
	gaagcagacg aatcttggaa aaataaaact gtcaaaaaa	399

<210>	65	
<211>	471	
<212>	DNA	
<213>	金黄色葡萄球菌	
<400>	65	
	tacgaggaaa ctgtaacaaa atctcctgtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caattaccta aagttggaag ccagcaagag gttaaaacta cggctggtaa agctgaagaa	120
	acaacacaac cagtggcaca gccattagta aaaattccac aagaaacaat ctatggtgaa	180
	actgtaaaaa gtccagaata tccaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaatcgtt	240
	caaggtcccg attttctaac aatggaacaa aacagacat ctttaagcga taattatact	300
	caaccgacga caccgaacct tattttagaa ggtcttgaag gtagctcatt taaacttgaa	360
	ataaaaccac aaggtactga atcaacgttg aaaggtattc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcaac tgaacaaca gaagcttctc aatatggtcc g	471
<210>	66	
<211>	597	
<212>	DNA	
<213>	金黄色葡萄球菌	
<400>	66	
	agaccgcaat ttaacaaaac acctaagtat gtgaaatata gagatgctgg tacaggtatc	60
	cgtgaatata acgatggaac atttgatat gaagcgagac caagattcaa caagccaagt	120
	gaaacaaatg catacaacgt aacgacaaat caagatggca cagtatcata cggagctcgc	180
	ccaacacaaa acaagccaag tgaacaaaac gcatataacg taacaacaca tgcaaatggt	240
[0025]	caagtatcat acggtgctcg cccaacacaa aaaaagccaa gcaaaacaaa tgcatataac	300
	gtaacaacac atgcaaatgg tcaagtatca tatggcgctc gcccgacaca aaaaagcca	360
	agcaaaacaa atgcatataa cgtaacaaca catgcaaatg gtcaagtatc atacggagct	420
	cgcccgacat acaagaagcc aagcgaaaca aatgcataca acgtaacaac acatgcaaat	480
	ggtcaagtat catatggcgc tcgcccga caaaaaaagc caagcgaaac aaacgcata	540
	aacgtaacaa cacatgcaga tggtagtcgc acatatgggc ctagagtaac aaaataa	597
<210>	67	
<211>	447	
<212>	DNA	
<213>	金黄色葡萄球菌	
<400>	67	
	atagtaacta aagattatag taaagaatca agagtgaatg agaacagtaa atacgataca	60
	ccaattccag attggtatct aggtagtatt ttaaacagat taggggatca aatatactac	120
	gctaaggaat taactaataa atacgaatat ggtgagaaaag agtataagca agcgatagat	180
	aaattgatga ctagagtttt gggagaagat cattatctat tagaaaaaaa gaaagcacia	240
	tatgaagcat acaaaaaatg gtttgaaaaa cataaaagtg aaaatccaca ttctagttaa	300
	aaaaagatta aatttgacga ttttgattta tatagattaa cgaagaaaga atacaatgag	360
	ttacatcaat cattaaaaga agctgttgat gaggtttaata gtgaagtga aatatattca	420
	tctaaacaaa aggattttatt accttat	447
<210>	68	

[0026]	<211> 399	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 68	
	gatgaagcaa ctgaaatcg agtaacaaat ggaatatatg attttgtttg cgagattgac	60
	acattatagc cagcatattt taatcatagc caatatgggc ataagtctaa agaattaaga	120
	gcaaagctag atataattct tggatgatgc aaagatcctg ttagaattac gaatgaaaga	180
	ataagaaaag aaatgatgga tgattttaa tctattattg atgatttctt tatggataca	240
	aacatgaata gaccattaaa cataactaaa tttaatccga atattcatga ctataactaat	300
	aagcctgaaa atagagataa cttcgataaa ttagtcaaag aaacaagaga agcagtcgca	360
	aacgctgacg aatcttgga aacaagaacc gtcaaaaat	399
	<210> 69	
	<211> 564	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 69	
	tacggtgaat ctgaacaaa atctcctgtt gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caattaccta aagttggaag ccagcaagag gataaaatta cagttggtag aactgaagaa	120
	gcaccattac caattgcgca accactagtt aaaattccac agggcacaat tcaaggtgaa	180
	attgtaaaag gtccggaata tctaacgatg gaaaataaaa cgttacaagg tgaaatcgtt	240
	caaggtccag atttccaac aatggaacaa aacagaccat ctttaagcga taattatact	300
	caaccgacga caccgaaccc tattttaaaa ggtattgaag gaaactcaac taaacttgaa	360
	ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcaac tgaacaaca gaagcatcac attatccagc gagacctcaa	480
	tttaacaaaa cacctaagta tgtgaaatat agagatgctg gtacaggtat ccgtgaatac	540
	aacgatggaa catttgata tgaa	564
	<210> 70	
	<211> 504	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 70	
	gcgagaccaa gattcaacaa gccaaagcgaa acaaatgcat acaacgtaac gacaaatcaa	60
	gatggcacag tatcatatgg cgctcgccc acacaaaaca aaccaagcga acaaatgca	120
	tacaacgtaa caacacatgc aaacggccaa gtatcatatg gcgcccgcgc aacatacaag	180
	aagccaagcg aaacaaacgc atacaacgta acgacaaatc aagatggcac agtatcatat	240
	ggcgctgcgc cgacacaaaa caagccaagc gaaacaaacg catataacgt aacaacacat	300
	gcaaacggcc aagtatcata cggagctcgt ccgacacaaa acaagccaag cgaaacgaac	360
	gcataaacg taacaacaca tgcaaacggt caagtgtcat acggagctcg cccaacacaa	420
	aacaagccaa gtaaaacaaa tgcatacaat gtaacaacac atgcagatgg tactgcgaca	480
	tatggtccta gagtaacaaa ataa	504
	<210> 71	
	<211> 525	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	

	<400> 71	
	atgaaaaagc aaataatttc gctaggcgca ttagcagttg catctagctt atttacatgg	60
	gataacaaag cagatgcgat agtaacaaag gattatagtg ggaaatcaca agttaatgct	120
	gggagtaaaa atgggacatt aatagatagc agatatttaa attcagctct atattatttg	180
	gaagactata taatttatgc tataggatta actaataaat atgaatatgg agataatatt	240
	tataaagaag ctaaagatag gttgttgga aaggatttaa gggaagatca atatcttttg	300
	gagagaaaga aatctcaata tgaagattat aaacaatggg atgcaaatta taaaaagaa	360
	aatcctcgta cagattiaaa aatggctaatt tttcataaat ataatttaga agaactttcg	420
	atgaaagaat acaatgaact acaggatgca ttaaagagag cactggatga ttttcacaga	480
	gaagttaaag atattaagga taagaattca gacttgaaaa ctttt	525
[0027]	<210> 72	
	<211> 399	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 72	
	aatgcagcag aagaagataa agcaactaag gaagtatacg atctcgatc tgaaattgat	60
	acattagttg tatcatatta tggatgataag gattatgggg agcacgcgaa agagttacga	120
	gcaaaactgg acttaatcct tggagataca gacaatccac ataaaattac aaatgaacgt	180
	attaaaaaag aaatgattga tgacttaaat tcaattattg atgatttctt tatggaaact	240
	aaacaaata gaccgaaatc tataacgaaa tataatccta caacacataa ctataaaaca	300
	aatagtata ataaacctaa ttttgataaa ttagttgaag aaacgaaaaa agcagttaaa	360
	gaagcagatg attcttggaa aaagaaaact gtcaaaaaa	399
	<210> 73	
	<211> 471	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 73	
	tacggagaaa ctgaacaaa atcgccagta gtaaaagaag agaagaaagt tgaagaacct	60
	caagcaccta aagttgataa ccaacaagag gttaaaacta cggctggtaa agctgaagaa	120
	acaacacaac cagttgcaca accattagtt aaaattccac agggcacaaat tacaggtgaa	180
	attgtaaaag gtccggaata tccaacgatg gaaaataaaa cggatcaagg tgaaatcggt	240
	caaggtcccg attttctaac aatggaacaa agcggcccat cattaagcaa taattatata	300
	aaccaccgt taacgaacce tattttagaa ggtcttgaag gtagctcatc taaacttgaa	360
	ataaaaccac aaggtactga atcaacgtta aaaggtactc aaggagaatc aagtgatatt	420
	gaagttaaac ctcaagcaac tgaacaaca gaagcttctc aatatgtgcc g	471
	<210> 74	
	<211> 516	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
	<400> 74	
	agaccgcaat ttaacaaaac acctaaatat gttaaataa gagatgctgg tacaggtatc	60
	cgatgaatata acgatggaac atttgatat gaagcgagac caagattcaa taagccatca	120
	gaaacaaatg catataacgt aacaacacat gcaaatggte aagtatcata cggagctcgt	180

```

ccgacataca agaagccaag cgaaacgaat gcatacaatg taacaacaca tgcaaacggc      240
caagtatcat acggagctcg tccgacacaa aacaagccaa gcaaaacaaa cgcatataac      300
gtaacaacac atggaaacgg ccaagtatca tatggcgctc gcccaacaca aaacaagcca      360
agcaaaacaa atgcatacaa cgtaacaaca catgcaaacg gtcaagtgtc atacggagct      420
cgcccgacat acaagaagcc aagtaaaaca aatgcataca atgtaacaac acatgcagat      480
ggtactgcga catatgggcc tagagtaaca aaataa                                516

```

<210> 75
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <400> 75

```

Met Lys Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Leu Gly Ala Leu Cys Val Ser
1          5          10          15

```

```

Gln Ile Trp Glu Ser Asn Arg Ala Ser Ala Val Val Ser Gly Glu Lys
          20          25          30

```

```

Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu Thr Asn Asn Lys Asn Lys
          35          40          45

```

```

Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser Leu Asp Asp Leu Ile Trp
50          55          60

```

[0028] Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe Asp Asn Pro Glu Tyr Lys
65 70 75 80

```

Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe Met Ala Glu Asp Glu Ala
          85          90          95

```

```

Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys Ile Lys Asn Gly Asn Thr
100          105          110

```

```

Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His Glu Arg Tyr Glu Ser Val
115          120          125

```

```

Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu Phe Leu Lys Glu Ile Glu
130          135          140

```

```

Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys Asp Phe Asn Glu Glu Glu
145          150          155          160

```

```

Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys Leu Glu Asn Gln Ile Leu
165          170          175

```

```

Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr Arg Asp Asp Val Glu Ser
180          185          190

```

```

Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Leu Ile Met Gly Tyr Lys Asp Glu Glu Arg
195          200          205

```

```

Ala Asn Lys Lys Ala Val Asn Lys Arg Met Leu Glu Asn Lys Lys Glu
210          215          220

```


[0029]

Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe Ser Asp Ile Asp Lys Thr
 225 230 235 240
 Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp Glu Lys Gln Glu Glu Lys
 245 250 255
 Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser Asp Thr Glu Ala Ala Lys
 260 265 270
 Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Leu Asn Thr
 275 280 285
 Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val Ser Glu Gln Gln Lys Ala
 290 295 300
 Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys Ala Arg Phe Leu Asp Asn
 305 310 315 320
 Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser Leu Glu Tyr Asp Phe Glu
 325 330 335
 His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp Lys Lys Leu Val Val Ser
 340 345 350
 Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr
 355 360 365
 Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile
 370 375 380
 Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His
 385 390 395 400
 Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His
 405 410 415
 Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys
 420 425 430
 Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr
 435 440 445
 Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln
 450 455 460
 Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Ile
 465 470 475 480
 Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg
 485 490 495
 Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys
 500 505
 <210> 76
 <211> 1449
 <212> DNA

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 76

```

gtggtttctg gggagaagaa tccatatgta tctgagtcgt tgaaactgac taataataaa      60
aataaatcta gaacagtaga agagtataag aaaagcttgg atgatttaat atggtccttt      120
ccaaacttag ataataaag atttgataat cctgaatata aagaagctat gaaaaaatat      180
caacagagat ttatggctga agatgaggct ttgaagaaat tttttagtga agagaaaaaa      240
ataaaaaatg gaaatactga taatttagat tatctaggat tatctcatga aagatatgaa      300
agtgatatta atactttgaa aaaacaaagt gaggagtctt taaaagaaat tgaagatata      360
aaaaagata accctgaatt gaaagacttt aatgaagagg agcaattaaa gtgcgactta      420
gaattaaaca aattagaaaa tcagatatta atgttaggta aaacatttta tcaaaactat      480
agagatgatg ttgaaagttt atatagtaag ttagatttaa ttatgggata taaagatgaa      540
gaaagagcaa ataaaaaagc agttaacaaa aggatgttag aaaataaaaa agaagactta      600
gaaaccataa ttgatgaatt ttttagtgat atagataaaa caagacctaa taatattcct      660
gttttagaag atgaaaaaca agaagagaaa aatcataaaa atatggctca attaaaatct      720
gacactgaag cagcaaaaaa tgatgaatca aaaagaagca agagaagtaa aagaagttaa      780
aataactcaa atcacaaacc tgcatctcaa gaagtttctg aacaacaaaa agctgaatat      840
gataaaagag cagaagaaag aaaagcgaga tttttggata atcaaaaaat taagaaaaca      900
cctgtagtgt cattagaata tgattttgag cataaacaac gtattgacaa cgaaaacgac      960
aagaaacttg tggtttctgc accaacaagc aaaccaacat caccgactac atatactgaa     1020
acaacgacac aggtaccaat gcctacagtt gagcgtaaaa ctcagcaaca aattatttat     1080
aatgcaccaa aacaattggc tggattaaat ggtgaaagtc atgatttcac aacaacgcac     1140
caatcaccaa caacttcaa tcacacgcac aataatgttg ttgaatttga agaaacgtct     1200
gctttacctg gtagaaaatc aggatcactg gttggtataa gtcaaattga ttcttctcat     1260
ctaactgaac gtgagaagcg tgtaattaag cgtgaacacg ttagagaagc taaaagtta     1320
gttgataatt ataaagatac acatagttaa aaagaccgaa taaatgcaca aaaaaaagta     1380
aatactttta gtgaaggtca taaaaaacgt ttaataaac aaatcaataa agtatataat     1440
ggcaaataa                                     1449

```

[0030]

<210> 77

<211> 1425

<212> DNA

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 77

```

gtggtttctg gggagaagaa tccatatgta tcaaaagctt tagaattgaa agataaaagt      60
aataaatcca attcttacga aaattataga gatagtttag aaagtttgat ttcattatta     120
tcttttctg attatgaaaa atatgaagag ccagaatatg aaaaggctgt aaaaaaatat     180
caacaaaaat ttatggctga agatgatgca ttaaaaaatt ttttaaatga agaaaagaag     240
ataaaaaatg cagatattag cagaaaaatc aataatttat taggtttaac acatgaaaga     300
tattcttata tttttgatac attaaagaaa aataaacaag agtttttaaa agatattgaa     360
gaaatacaac tgaaaaatag tgatttaaag gactttaaca atacagagca acataatgcc     420
gacgtagaaa taaacaattt agaaaataaa gtattaatgg tagggatatac attctataat     480

```

	acaaataagg acgaagtga agaattatat agtgagttag atttgattgt tggagaagtt	540
	caagataagt cggataaaaa aagagcagta aatcaaagga tgtaaataag aaaaaaagag	600
	gatttagaat ttattataga taaatttttt aaaaaaattc aacaagaacg tccagagagt	660
	ataccagcat taactagtga aaaaaatcat aatcagacta tggcattaaa gttaaaagca	720
	gatacagaag ctgctaaaaa tgacgtatca aaaagaagta aaagaagttt aaataactcaa	780
	aataataaat ctacaacaca agaaatttct gaagaacaaa aagctgaata tcaaagaaag	840
	tcagaggcat taaaagaaa atttataaac agacaaaaat ctaaaaatga gtctgtggtt	900
	tcactaatcg atgacgaaga cgacaacgaa aacgacaggc aacttgtggt ttctgcgcca	960
	tcaaagaaac caacaacacc gactacatat actgaaacaa cgactcaggt accaatgcct	1020
	acagttgagc gtcaaaacta gcaacaaatc gtttacaaaa caccaaaacc attagctgga	1080
	ttaaatgggtg aaagtcatga ttccacaaca acgcatcaat caccaacaac ttcaaatcat	1140
	acgcataata atgttgtga atttgaagaa acgtctgctt tacctggtag aaaatcagga	1200
	tcactggttg gtataagtca aattgattct tctcatctaa ctgaacgtga gaagcgtgta	1260
	atcaagcgtg aacacgttag agaagctcaa aagttagttg ataattataa agatacacat	1320
	agttataaag accgattaaa tgcacaacaa aaagtaaata ctttaagtga aggtcatcaa	1380
	aaacgtttta ataaacaaat caataaagta tacaatggca aataa	1425
	<210> 78	
	<211> 3694	
	<212> DNA	
	<213> 金黄色葡萄球菌	
[0031]	<400> 78	
	gtggtttctg gggaggagaa tccatataaa tctgagtcac tgaaattaaa tgggaaaaga	60
	agtactacaa taactagtga taaatatgaa gaaaatttag atatgttaat atcgtcatta	120
	tcatttgcag attatgaaaa atatgaggaa ccagaatata aagaagcagt taaaaagtat	180
	caacaaaaat ttatggctga agatgatgca ttaaaaaatt ttttagtgaa gagaaaaaaa	240
	taaaaaatag aaataactaat acatcaaatt atctgggatt aacacacgaa agatatgagt	300
	caattttataa ttcatataaa aatcatcgtg aagaattttc aaaagaaatc gaagaaatta	360
	ataataaaaa tccagtgtta aaagaatata acaatgagga acaaaactaaa gctgatacgg	420
	aattaaacac tcttgaaaaa caagtactaa tgatagggtta tacattttat cactcgaata	480
	aaaaatgaagt agaagattta tataacaaat tagatatgat tcttggttat aaagatgaag	540
	agagaaaaaa gaagagggct accaatcaaa gaatgttcaa taataaaaaa gaggatttag	600
	aaactattat tgatgaattc ttggagaaa ttggacaaca aaggccaaca tctataccaa	660
	cattagcgcc taaagaagaa aaagaacaa atataaaaaa tgcaaataaa ttaaaatctg	720
	acactgaagc agcaaaaaat gatgaagcaa aaagaagttt aaataccac aatcacaat	780
	ctgtatctca agaagtctct gaacaacaaa aagctgacta cgaaagaaaa gctgaagaaa	840
	gaaaagcgag atttttagat aagcaaaaaa ataagaaaac tcctgtagtt tcattagaat	900
	atgattttga acataaaciaa cgtgttgaca acgaaaacga caagcaactt gtggtttctg	960
	agccatcaaa gaaaccaaca acaccgccta catacactga aacaaccaca cagctaccaa	1020
	tgcttacagt tgagcgtcaa acacagcaac aaatcgttta caaagcacca aaaccattag	1080
	ctggattaaa tggtgaaagt catgatttca caacaacgca tcaatcacca actacttcaa	1140

[0032]

```

atcacacgca taatcatctt attgaaattg aagaaacatc tgctttacct ggtagaaaga 1200
caggttcatt ggttggtttg agtcaaattg attcttcgca ttttaactgaa cgtgagaagc 1260
gcgtgattaa acgtgaacac gtgagagaag ctcaaaagtt agttgataat tataaagata 1320
cacatagtta taaagaccga ttaaatgccc aacaaaaagt aaatacttta agtgcaggtc 1380
atcaaaaacg ttttaataaa caaattaata agtatataa tggcaaataa ttaatgcatg 1440
gctgcaaagg aaataatgag ttgcccgtaa aaataacaac attttaaact agcaataaat 1500
aatatcaaag tcatcatttc aatgatgcaa tctagtatag tccacattct aaacaggtgt 1560
ggactattac ttttttctac ttatattacg aaaaaattat tatgcttaac tatcaatata 1620
aataattaat tttaaagctga aaaacaataa aaatgttaag acaacgttta cttcaagtta 1680
attattatac tgaaaattct ggtatataat gctgttagtg aatataacag gaaaattaaa 1740
ttggttatga tattgagtct atataaagga gaaataacag atgaaaaaga aattattagt 1800
tttaactatg agcacgctat ttgtacaca atttatgaat tcaaatcacg ctaatgcata 1860
aacagaaagt gttgataaaa actttgtagt tccagaatcg ggtattaata aaattattcc 1920
aacttacgat gaatttaaaa aagcaccaaa agtaaatgtt agtaatttag ctgacaacaa 1980
aaactttgta gcttctgaag ataaattgaa taagattgca gatccatcgg cagctagtaa 2040
aattgtagat aaaaactttg ccgtaccaga atcaaaatta ggaatcattg taccagagta 2100
taaagaaatc aataatcgag tgaatgtaac aacaaacaat ccagcttcaa aacaagttga 2160
caagcaaatt gttgctaaag acccagaggt gaatagattt attacgcaa ataaagtaaa 2220
ccatcgtttc attactacgc aaaccacta taagaaagtt attacttcat acaaatcaac 2280
acatgtacat aaacatgtaa accatgcaac atcttctatc catcatcact ttactattaa 2340
accatcagaa gcacctagat atacacacce atctcaatct caatcgttaa ttataaatca 2400
tcattttgca gttcctggat accatggta taaagttgta acaccaggac aagctagtat 2460
tagaattcat cacttttgtg ctgtacctca aataaatagt ttttaagttca ttccatcata 2520
tggtcacaat tcacatcgta tgcatgtacc aagtttccaa aataacacaa cagcaacaca 2580
tcaaatgca aaagtaata aaacttataa ctataaatat ttttatactt ataaagtagt 2640
caaagtgta aaaaaacatt tctcatttct aaaatcacat ggttgtaaaa ttgttaaacc 2700
agcattaaac atcaaaaatg taaattatca atatgctgtt ccaagtaata gccctacaca 2760
cgttgcticc gagtttcagg gtatcttacc agcaccacga gtataaaaaa tgacattaag 2820
tttacgagat atgataata cctattattt taaacatagt ctgcaatcta tgaggttgta 2880
ggctatgttt ttgacagttt atcaataaac acccatcaac aaattatacc gtttttctac 2940
tttaaaagtt ggaagtaaca taatcttaaa taaatatatt attaatgaag ataaatataa 3000
gactcgagat tattgttaat agtttgttca tcgcaagtta attattgttt ctaaaatatt 3060
ggtatataat tttcaatggc gaagaaaaca gggtaaaaaa gtcggttttt aaatcaaagc 3120
aaataaggag taaaaaatga aaaggaaagt actagtatta acaatgggcg tactttgtgc 3180
gacacaatta tggcaaacga ataatgcaa agcttttagtg acagagagtg gcgttaatga 3240
tactaagcaa ttactgaag taacatcgga agaaaaagtt ataaaagatg ctatttcgaa 3300
agtcaatgaa agctttattt actateccca aaatgatttg aagggattag gtggagaaca 3360
caacgattac gaaaaaatta catatagcac ttcttcta atgttttag aattatcaat 3420

```

gagttcaaaa tacgtaggcg gtaaatacagg agctatgggtt gggtatagtg aaatttactc 3480
 atcacatttc acagaccgcg acaaactgtgc taccagacgt gatcatgtta aagaagcaca 3540
 aaacttgatt aatgattata aatatacgca aatatatgaa gactttgcta aagctactgc 3600
 aaaggtaagt acacttagtc agtctacca aaattattta aataaataaa ttgataaagt 3660
 gaataataag atagagaaaa ctgaaaaacg ctaa 3694

<210> 79

<211> 399

<212> DNA

<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 79

gtggtttctg gggagaagaa tccatatgta tctgagtcgt tgaaactgac taataataaa 60
 aataaatcta gaacagtaga agagtataag aaaagcttgg atgatttaaat atggtccttt 120
 ccaaacttag ataatagaaag atttgataat cctgaatata aagaagctat gaaaaaatat 180
 caacagagat ttatggctga agatgaggct ttgaagaaat tttttagtg agagaaaaaa 240
 ataaaaaatg gaaatactga taatttagat tatctaggat tatctcatga aagatatgaa 300
 agtgtattta atactttgaa aaaacaaagt gaggagttct taaaagaaat tgaagatata 360
 aaaaaagata accctgaatt gaaagacttt aatgaatag 399

<210> 80

<211> 320

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

[0033]

<400> 80

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
 1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
 20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
 35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
 50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
 65 70 75 80

Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
 85 90 95

Glu Arg Tyr Glu Ser Val Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu
 100 105 110

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
 115 120 125

Asp Phe Asn Glu Glu Glu Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys
 130 135 140

[0034]

Leu Glu Asn Gln Ile Leu Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asp Asp Val Glu Ser Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Leu Ile Met Gly
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Glu Glu Arg Ala Asn Lys Lys Ala Val Asn Lys Arg Met
 180 185 190
 Leu Glu Asn Lys Lys Glu Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe
 195 200 205
 Ser Asp Ile Asp Lys Thr Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp
 210 215 220
 Glu Lys Gln Glu Glu Lys Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser
 225 230 235 240
 Asp Thr Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser
 245 250 255
 Lys Arg Ser Leu Asn Thr Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val
 260 265 270
 Ser Glu Gln Gln Lys Ala Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys
 275 280 285
 Ala Arg Phe Leu Asp Asn Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser
 290 295 300
 Leu Glu Tyr Asp Phe Glu His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 <210> 81
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <400> 81
 Lys Lys Leu Val Val Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr
 1 5 10 15
 Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg
 20 25 30
 Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly
 35 40 45
 Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr
 50 55 60
 Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser
 65 70 75 80
 Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile
 85 90 95
 Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu

	100	105	110
	His Val Arg Glu Ala Gln Lys 115	Leu Val Asp Asn Tyr Lys 120	Asp Thr His 125
	Ser Tyr Lys Asp Arg Ile Asn Ala Gln Gln Lys 130	Val Asn Thr Leu Ser 140	
	Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn 145	150	155 160
	Gly Lys		
<210>	82		
<211>	320		
<212>	PRT		
<213>	金黄色葡萄球菌		
<400>	82		
	Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Lys Ala Leu Glu Leu 1	5	10 15
	Lys Asp Lys Ser Asn Lys Ser Asn Ser Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Ser 20	25	30
	Leu Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Ser Phe Ala Asp Tyr Glu Lys Tyr 35	40	45
[0035]	Glu Glu Pro Glu Tyr Glu Lys Ala Val Lys Lys Tyr Gln Gln Lys Phe 50	55	60
	Met Ala Glu Asp Asp Ala Leu Lys Asn Phe Leu Asn Glu Glu Lys Lys 65	70	75 80
	Ile Lys Asn Ala Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asn Asn Leu Leu Gly Leu 85	90	95
	Thr His Glu Arg Tyr Ser Tyr Ile Phe Asp Thr Leu Lys Lys Asn Lys 100	105	110
	Gln Glu Phe Leu Lys Asp Ile Glu Glu Ile Gln Leu Lys Asn Ser Asp 115	120	125
	Leu Lys Asp Phe Asn Asn Thr Glu Gln His Asn Ala Asp Val Glu Ile 130	135	140
	Asn Asn Leu Glu Asn Lys Val Leu Met Val Gly Tyr Thr Phe Tyr Asn 145	150	155 160
	Thr Asn Lys Asp Glu Val Glu Glu Leu Tyr Ser Glu Leu Asp Leu Ile 165	170	175
	Val Gly Glu Val Gln Asp Lys Ser Asp Lys Lys Arg Ala Val Asn Gln 180	185	190
	Arg Met Leu Asn Arg Lys Lys Glu Asp Leu Glu Phe Ile Ile Asp Lys 195	200	205

Phe Phe Lys Lys Ile Gln Gln Glu Arg Pro Glu Ser Ile Pro Ala Leu
 210 215 220
 Thr Ser Glu Lys Asn His Asn Gln Thr Met Ala Leu Lys Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Asp Thr Glu Ala Ala Lys Asn Asp Val Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser
 245 250 255
 Leu Asn Thr Gln Asn Asn Lys Ser Thr Thr Gln Glu Ile Ser Glu Glu
 260 265 270
 Gln Lys Ala Glu Tyr Gln Arg Lys Ser Glu Ala Leu Lys Glu Arg Phe
 275 280 285
 Ile Asn Arg Gln Lys Ser Lys Asn Glu Ser Val Val Ser Leu Ile Asp
 290 295 300
 Asp Glu Asp Asp Asn Glu Asn Asp Arg Gln Leu Val Val Ser Ala Pro
 305 310 315 320
 <210> 83
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <400> 83
 Ser Lys Lys Pro Thr Thr Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln
 1 5 10 15
 Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile Val Tyr
 20 25 30
 Lys Thr Pro Lys Pro Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe
 35 40 45
 Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn
 50 55 60
 Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg
 85 90 95
 Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu
 100 105 110
 Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Leu Asn Ala
 115 120 125
 Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn
 130 135 140
 Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys
 145 150

[0036]

<210> 84
<211> 80
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 84

Val Val Ser Gly Glu Glu Asn Pro Tyr Lys Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Asn Gly Lys Arg Ser Thr Thr Ile Thr Ser Asp Lys Tyr Glu Glu Asn
20 25 30

Leu Asp Met Leu Ile Ser Ser Leu Ser Phe Ala Asp Tyr Glu Lys Tyr
35 40 45

Glu Glu Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Val Lys Lys Tyr Gln Gln Lys Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Asp Ala Leu Lys Asn Phe Leu Val Lys Arg Lys Lys
65 70 75 80

<210> 85
<211> 132
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 85

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
85 90 95

Glu Arg Tyr Glu Ser Val Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu
100 105 110

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Asn Glu
130

<210> 86
<211> 320
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

[0037]

<400> 86

Val Val Ser Gly Glu Lys Asn Pro Tyr Val Ser Glu Ser Leu Lys Leu
1 5 10 15

Thr Asn Asn Lys Asn Lys Ser Arg Thr Val Glu Glu Tyr Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Asp Asp Leu Ile Trp Ser Phe Pro Asn Leu Asp Asn Glu Arg Phe
35 40 45

Asp Asn Pro Glu Tyr Lys Glu Ala Met Lys Lys Tyr Gln Gln Arg Phe
50 55 60

Met Ala Glu Asp Glu Ala Leu Lys Lys Phe Phe Ser Glu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Lys Asn Gly Asn Thr Asp Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Ser His
85 90 95

Glu Arg Tyr Glu Ser Val Phe Asn Thr Leu Lys Lys Gln Ser Glu Glu
100 105 110

Phe Leu Lys Glu Ile Glu Asp Ile Lys Lys Asp Asn Pro Glu Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Asn Glu Glu Glu Gln Leu Lys Cys Asp Leu Glu Leu Asn Lys
130 135 140

[0038]

Leu Glu Asn Gln Ile Leu Met Leu Gly Lys Thr Phe Tyr Gln Asn Tyr
145 150 155 160

Arg Asp Asp Val Glu Ser Leu Tyr Ser Lys Leu Asp Leu Ile Met Gly
165 170 175

Tyr Lys Asp Glu Glu Arg Ala Asn Lys Lys Ala Val Asn Lys Arg Met
180 185 190

Leu Glu Asn Lys Lys Glu Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe
195 200 205

Ser Asp Ile Asp Lys Thr Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp
210 215 220

Glu Lys Gln Glu Glu Lys Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser
225 230 235 240

Asp Thr Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser
245 250 255

Lys Arg Ser Leu Asn Thr Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val
260 265 270

Ser Glu Gln Gln Lys Ala Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys
275 280 285

Ala Arg Phe Leu Asp Asn Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser
290 295 300

Leu Glu Tyr Asp Phe Glu His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp
305 310 315 320

<210> 87
<211> 162
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌

<400> 87

Lys Lys Leu Val Val Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr
1 5 10 15

Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg
20 25 30

Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly
35 40 45

Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr
50 55 60

[0039]

Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser
65 70 75 80

Ala Leu Pro Gly Arg Lys Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile
85 90 95

Asp Ser Ser His Leu Thr Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu
100 105 110

His Val Arg Glu Ala Gln Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His
115 120 125

Ser Tyr Lys Asp Arg Ile Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser
130 135 140

Glu Gly His Gln Lys Arg Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn
145 150 155 160

Gly Lys

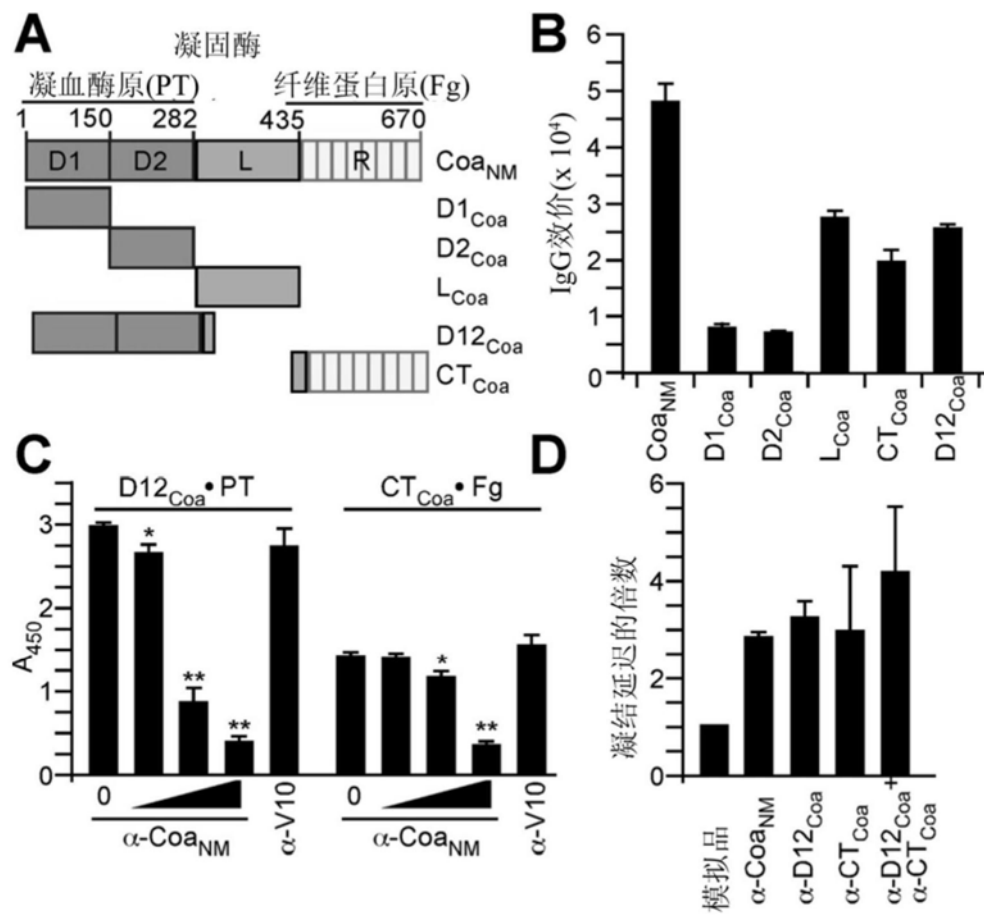


图1

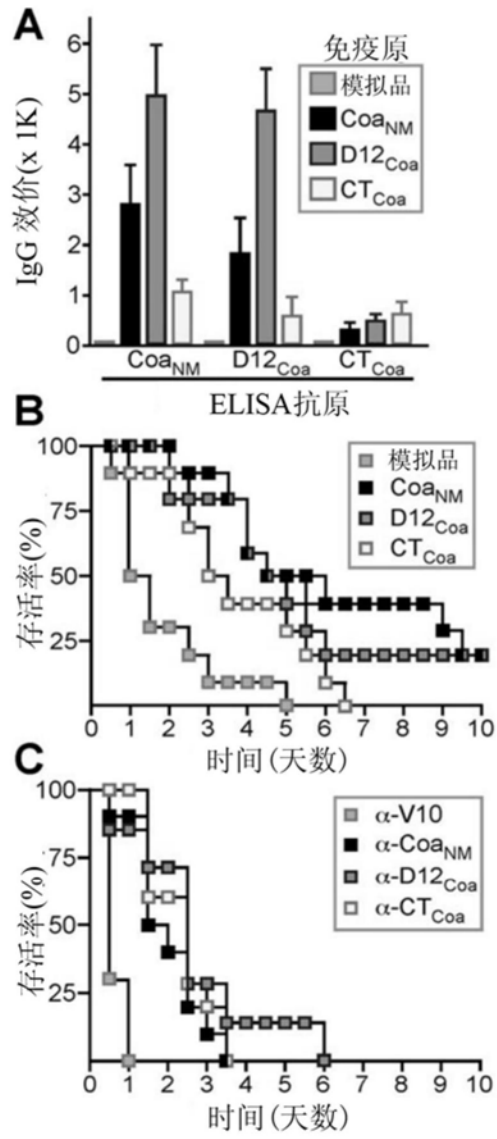


图2

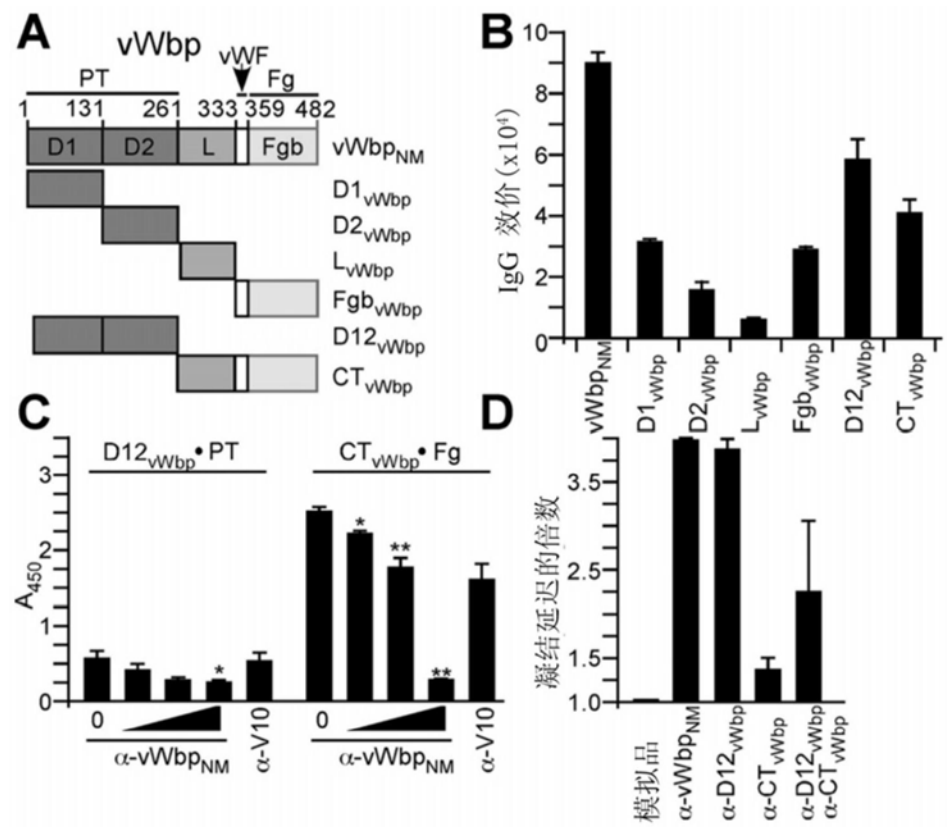


图3

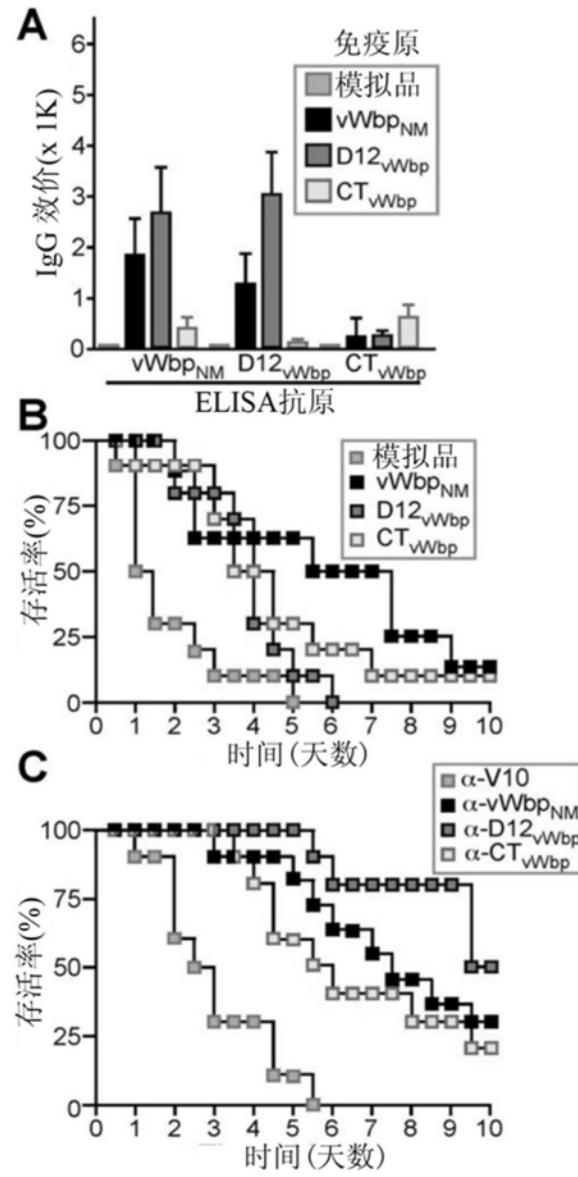


图4

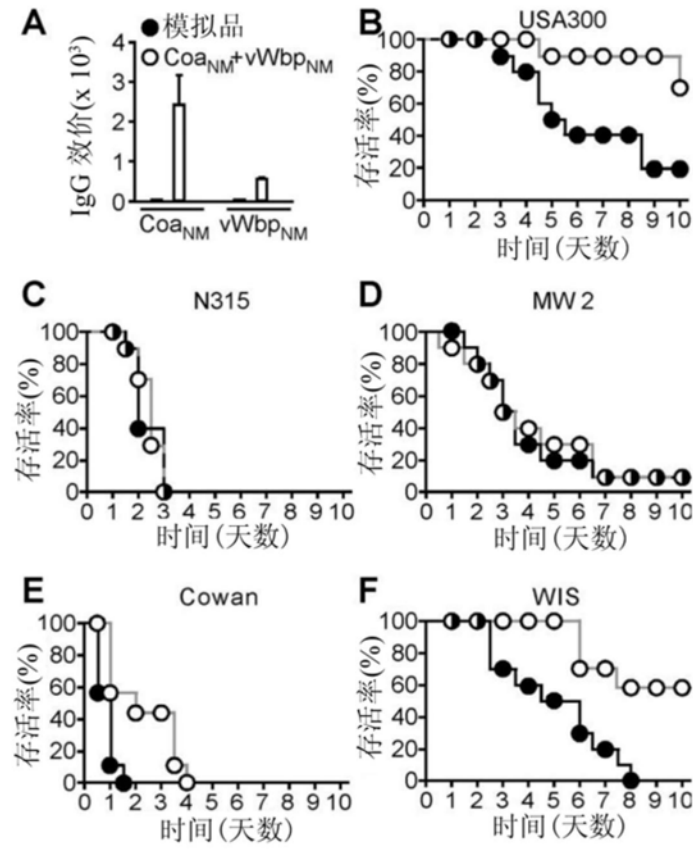


图5

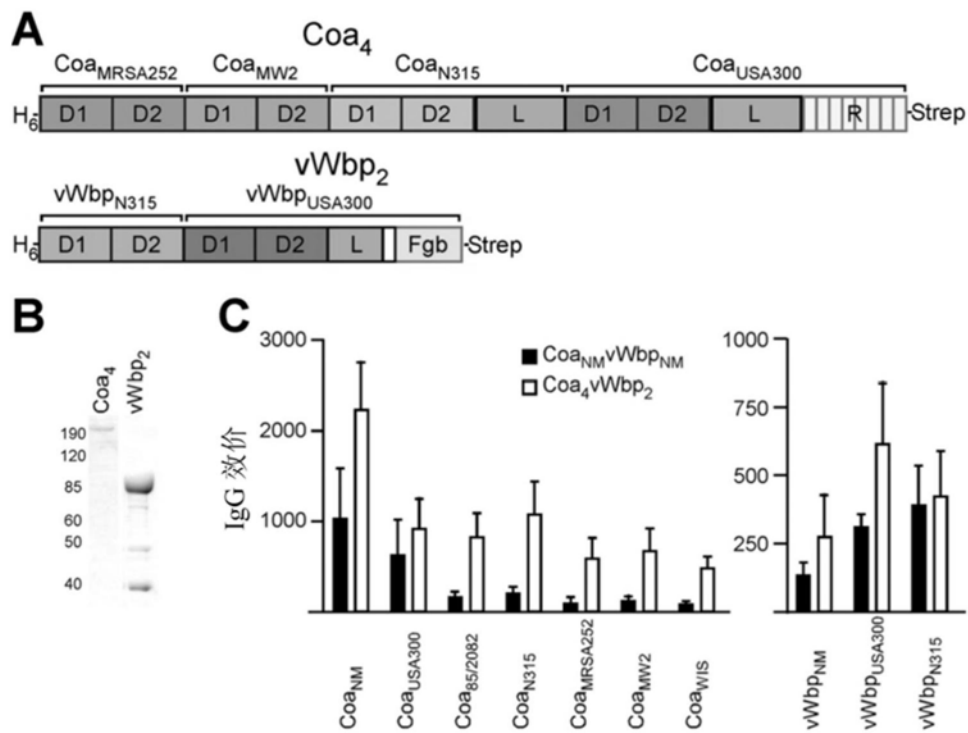


图6

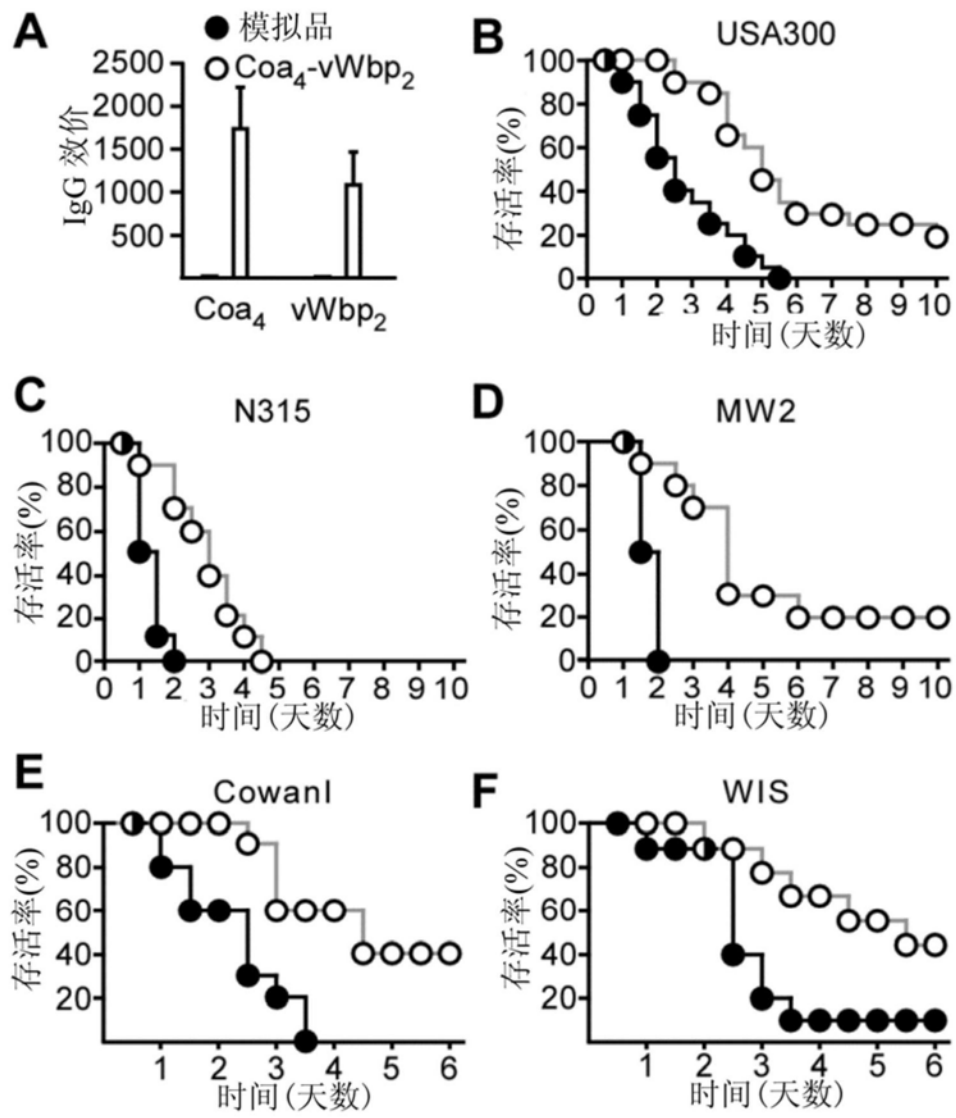


图7

来自五种金黄色葡萄球菌菌株的Coa的比对

```

USA300_Coa    ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG 60
N315_Coa      ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG 60
MRSA252_Coa   ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG 60
MW2_Coa       ATGAAAAAGCAAATAATTTCCGCTAGGCCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTACATGG 60
WIS_Coa       -----

USA300_Coa    GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCT 120
N315_Coa      GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAG 120
MRSA252_Coa   GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAG 120
MW2_Coa       GATAACAAAGCAGATGCGATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCT 120
WIS_Coa       -----ATAGTAACAAAGGATTATAGTGGGAAATCACAAGTTAATGCT 42
                ***** ** ***** ***** **

USA300_Coa    GGGAGTAAAAATGGGAC-ATTAAT---AGATAGCAGATATTTAAATTCAGCTCTATATTA 176
N315_Coa      AAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTC-AGATTATTACTATTGGGAAATAATT---GATAG 176
MRSA252_Coa   AACAGTAAATACGATAC-ACCAATTCCAGATTG---GTATCTAGGTAGTATTTTAAACAG 176
MW2_Coa       GGGAGTAAAAATGGGAA-ACAAATTCAGATGGATATTATTGGGGAATAATT---GAAAA 176
WIS_Coa       GGGAGTAAAAATGGGAA-ACAAATTCAGATGGATATTATTGGGGAATAATT---GAAAA 98
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    TTTGGAAGACTATATAATTTAT---GCTATAGGATTAACATAAATATGAATATGGAG 232
N315_Coa      TTTAGAGG---CACAATTTACTGCGACCAATAGACTTATTGGAAAGATTATAAATATGGAG 232
MRSA252_Coa   ATTAGGGGATCAAAATATACTAC---GCTAAGGAATTAACATAAATACGAATATGGTG 232
MW2_Coa       TCTAGAAAACCA---GTTTAC-AATATTTTTCATTACTGGATCAGCATAAATATGCAG 232
WIS_Coa       TCTAGAGAACCA---GTTTAC-AATATTTTTCATTATTGGATCAGCATAAATATGCAG 154
                * * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    ATAATATTTATAAAGAAGCTAAAGATAGGTTGTTGGAAAAGGTTATTAAGGGAAGATCAAT 292
N315_Coa      ATCTATCTATAAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAGAGTATTAGGAGAGACCAAGT 292
MRSA252_Coa   AGAAAGAGTATAAGCAAGCGATAGATAAAATTGATGACTAGAGTTTGGGAGAGATCAAT 292
MW2_Coa       AAAAAGATATAAAGATGCAGTAGATAAATTAATACTAGAGTTTAGAGGAGACCAAT 292
WIS_Coa       AAAAAGATATAAAGATGCATTAGATAAATTAATACTAGAGTTTAGAGGAGACCAAT 214
                * * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    ATCTTTTGAGAGAGAAAGAACTCTCAATATGAAGATTATAAACAATGGTATGCAAAATATA 352
N315_Coa      ATTTATTAAAGAAAAAGATTGATGAATATGAGCTTTATAAAGAGTGGTATAAAGTT-CA 351
MRSA252_Coa   ATCTATTAGAAAAAGAAAGCACAATATGAAGCATACAAAAAATGGTTGAAAAACATA 352
MW2_Coa       ACCTGCTAGAAAGAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAANAATACA 352
WIS_Coa       ACCTGCTAGAAAGAAAAAGAAAAATACGAAATTTATAAAGAACTATATAAANAATACA 274
                * * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    AAAAAGAAATCCTCGTACAGATTAAAAATGGCTAATTTTCATAAATATAATTTAGAAG 412
N315_Coa      AATAAGAACACT-----AATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTACA 397
MRSA252_Coa   AAAGTGAAATCCACATTCTAGTTTAAAAAGATTAAATTTGACGATTTTGATTTATATA 412
MW2_Coa       AAAAAGAGAAATCCTAATACTCAAGTTAAAAATGAAAGCATTTGATAAATACGATCTTGGCG 412
WIS_Coa       AAAAAGAGAAATCCTAATACTCAGTTAAAAATGAAAGCATTTGATAAATACGATCTTGGCG 334
                ** * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    AACTTTTCGATGAAAGAATACAATGAACACAGGATGCATTAAAGAGAGCACTGGATGATT 472
N315_Coa      ATTTAACAATGAATGAATATAACGATATTTTAACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAAT 457
MRSA252_Coa   GATTAACGAAGAAAGAATACAATGAGTTACATCAATCATTAAAGAAAGCTGTTGATGAGT 472
MW2_Coa       ATTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAAAATTTAACAAGCATTGGGATAACT 472
WIS_Coa       ATTTAACTATGGAAGAATACAATGACTTATCAAAATTTAACAAGCATTGGGATAACT 394
                * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    TTCACAGAGAGTTAAAGATATTAAGGATAAGAATTCAGACTTGAAAACCTTTTAAATGCAG 532
N315_Coa      TTAATAAAGAGTTAAAGAAATAGAGCATAAAAATGTTGACTTGAAAGCAGTTTGATAAAG 517
MRSA252_Coa   TTAATAGTGAAGTGAAATATTTCAATCTAAACAAAGGATTTATTACCTTATGATGAAG 532
MW2_Coa       TTAAGTTAGAGTAAAGAAAATGAATCAGAGAATCCAGATTTAAACCATATTTCTGAAA 532
WIS_Coa       TTAAGTTAGAGTAAAGAAAATGAATCAGAGAATCCAGATTTAAGACCATATTTCTGAAA 454
                ** * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    CAGAAGAAGATAAAGCAACTAAGGAAGTATACGATCTCGTATCTGAAATTTGATACATTAG 592
N315_Coa      ATGGAGAAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTCTGAAATTTGATACATTAG 577
MRSA252_Coa   CAAGTGAAATCGAGTAACAAATGGAATATATGATTTGTTGCGAGATTGACACATTAT 592
MW2_Coa       GCGAAGAAAGAACAGCATATGGTAAAAATAGATTCACTTGTGATCAAGCATATAGTGTAT 592
WIS_Coa       GTGAAGAGAGAACAGCATATGGTAAAAATAGATTCACTTGTGATCAAGCATATAGTGTAT 514
                ** * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa    TTGTATCATATTATGTCGATAAGGATTATGGGGAGCACGCGAAAGAGTTACGAGCAAAAC 652

```

```

N315_Coa      TTGTAACCTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGAGCATGCGAAAGAGTTACGAGCAAAAC 637
MRSA252_Coa  ACCGAGCATATTTTAAATCATAGCCAATATGGTCATAATGCTAAAGAATTAGAGGCAAAAGC 652
MW2_Coa      ATTTTGCCCTACGTTACAGATGCACACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCGAAAA 652
WIS_Coa      ATTTTGCCCTACGTTACAGATGCTCAACATAAAACAGAAGCATTAAATCTTAGGGCGAAAA 574
              * * * * *
USA300_Coa   TGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAACGTATTAAAA 712
N315_Coa     TGGACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAACGTATTAAAA 697
MRSA252_Coa  TAGATATAATCTTTGGTGATGCTAAAGATCCTGTTAGAAATACGAATGAAAGAAATAGAA 712
MW2_Coa      TTGATTGATTTTAGGTGATGAAAAAGATCCAATTAGAGTTACGAATCAACGTACTGAAA 712
WIS_Coa      TAGATTGATTTTAGGTGATGAAAAAGATCCAATTAGAGTTACGAATCAACGTACTGAAA 634
              * * * * *
USA300_Coa   AAGAAATGATTGATGACTTAAATTCATTATTGATGATTCTTTATGGAACTAAACA-A 771
N315_Coa     AAGAAATGATCGATGACTTAAATTCATTATTAGATGATTCTTTATGGAGACTAAACA-A 756
MRSA252_Coa  AAGAAATGATGGATGATTAAATTCATTATTGATGATTCTTTATGGATAC-AAACATG 771
MW2_Coa      AAGAAATGATTAAAGATTAGAAATCTATTATTGATGATTCTTCATTGAAACCAAGTT-G 771
WIS_Coa      AAGAAATGATTAAAGATTAGAAATCTATTATTGATGATTCTTCATTGAAACCAAGTT-G 693
              * * * * *
USA300_Coa   AATAGACCGAAATCTATAACGAAATATAATCCTACAACACATAACTATAAAACAAATAGT 831
N315_Coa     AATAGACCGAATCTTATAACGAAATATGATCCACAAACACAAATTTTAAAGAGAGAGT 816
MRSA252_Coa  AATAGACCATTAACATAAATAAATTTAATCCGAATATTCATGACTATACTAATAAGCCT 831
WIS_Coa      AATAGACCTAAACACATTACTAGGTATGATGGAACATAACATGATTACCA-----T 822
              * * * * *
USA300_Coa   GATAATAAACCTAATTTTGATAAAATTAGTTGAAGAAACGAAAAAGCAGTTAAAGAAGCA 891
N315_Coa     GAAATAAACCTAATTTTGATAAAATTAGTTGAAGAAACGAAAAAGCAGTTAAAGAAGCA 876
MRSA252_Coa  GAAATAGAGATAAATTCGATAAATTAGTCAAAGAAACAAGAGAAGCAATCGCAACGCT 891
MW2_Coa      AAACATAAAGATGGATTGATGCTCTAGTTAAAGAAACAAGAGAAGCGGTTGCAAGGCT 882
WIS_Coa      AAACATAAAGATGGATTGATGCTTTAGTTAAAGAAACAAGAGAAGCGGTTCTAAGGCT 804
              * * * * *
USA300_Coa   GATGATTCTTGGAAAAAGAAAAGTGTCAAAAAATACGGAGAACTGAAACAAAATCGCCA 951
N315_Coa     GACGAATCTTGGAAAAATAAAAGTGTCAAAAAATACGAGGAACCTGTAACAAAATCTCCT 936
MRSA252_Coa  GACGAATCTTGGAAAAACAAGAACCGTCAAAAATACGGTGAATCTGAAACAAAATCTCCT 951
MW2_Coa      GACGAATCTTGGAAAAATAAAAGTGTCAAAAAATACGAGGAACCTGTAACAAAATCTCCA 942
WIS_Coa      GACGAATCTTGGAAAAATAAAAGTGTCAAAAAATACGGGGAACCTGAAACAAAATATCCT 864
              * * * * *
USA300_Coa   GTAGTAAAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACTCAAGCACCTAAAGTTGATAACCAACAA 1011
N315_Coa     GTTGTAAAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACTCAATACCTAAAGTTGGAAACCAAGCAA 996
MRSA252_Coa  GTTGTAAAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACTCAATACCTAAAGTTGGAAACCAAGCAA 1011
MW2_Coa      GTTGTAAAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACTCAATCACCTAAATTTGATAACCAACAA 1002
WIS_Coa      GTTGTAAAGAGAGAGAAAGTTGAAGAACTCAATCACCTAAAGTTCTGAAAAGTG 924
              * * * * *
USA300_Coa   GAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACACACAAACAGTTGCACAAACCTTA 1071
N315_Coa     GAGGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACACACAAACAGTTGGCACAGCCATTA 1056
MRSA252_Coa  GAGGTTAAATACAGTTGGTACAACCTGAAGAAACACCAATACCAATTGCGCAACCACTA 1071
MW2_Coa      GAGGTTAAATACAGTTGATAAAGCTGAAGAAACACACAAACAGTTGGCACAGCCATTA 1062
WIS_Coa      GATGTTCAAGAAACGTTGGTACAACCTGAAGAAACACCAATACCAATTGCGCAACCACTA 984
              * * * * *
USA300_Coa   GTTAAATTCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATGTAAAGGTCCGGAATATCCAACG 1131
N315_Coa     GTTAAATTCACAGAAACAATCTATGGTGAACCTGTAAAGGTCCAGAAATATCCAACG 1116
MRSA252_Coa  GTTAAATTCACAGGGCACAATTCAAGGTGAAATGTAAAGGTCCGGAATATCTAACG 1131
MW2_Coa      GTTAAATTCACAGGGCACAATTACAGGTGAAATGTAAAGGTCCGGAATATCCAACG 1122
WIS_Coa      GTTAAATTCACACAAATGGGACTCAAGGCGAAATGTAAAGGTCCGGAATATCCAACG 1044
              * * * * *
USA300_Coa   ATGGAAAAATAAACGGTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCGATTTTCTAACATGGAA 1191
N315_Coa     ATGGAAAAATAAACGGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCGATTTTCTAACATGGAA 1176
MRSA252_Coa  ATGGAAAAATAAACGGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCGATTTCCCAACATGGAA 1191
MW2_Coa      ATGGAAAAATAAACGGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCGATTTCCCAACATGGAA 1182
WIS_Coa      ATGGAAAAATAAACGGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCGATTTCCCAACATGGAA 1104
              * * * * *
USA300_Coa   CAAAGCGGCCCATCATTAAGCAATAATTATACAAACCCA----- 1230
N315_Coa     CAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCG----- 1215
MRSA252_Coa  CAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCG----- 1230

```

```

MW2_Coa      CAAAACAGACCATCTTTAAGCGATAATTATACTCAACCG----- 1221
WIS_Coa      CAAAACAGACCATCTTTAAGTGACAATTATACACAACCATCTGTGACTTTACCGTCAATT 1164
              **** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa   -----CCGTTAACGAACCCCTATTTTGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAAA 1278
N315_Coa     -----ACGACACCGAACCCCTATTTTGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAAA 1263
MRSA252_Coa  -----ACGACACCGAACCCCTATTTTAAAGGTATTGAAGGAAACTCAACTAAA 1278
MW2_Coa      -----ACGACACCGAACCCCTATTTTGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAAA 1269
WIS_Coa      ACAGGTGAAAGTACACCAACGAACCCCTATTTTAAAGGTATTGAAGGAAACTCATCTAAA 1224
              * * * * * * * * * * * * * * * * * *

USA300_Coa   CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGT 1338
N315_Coa     CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGT 1323
MRSA252_Coa  CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGT 1338
MW2_Coa      CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTAAAGGTACTCAAGGAGAATCAAGT 1329
WIS_Coa      CTTGAAATAAAACCACAAGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGT 1284
              *****

USA300_Coa   GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA 1398
N315_Coa     GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA 1383
MRSA252_Coa  GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA 1398
MW2_Coa      GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA 1389
WIS_Coa      GATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAGAAGCTTCTCAATATGGTCCGAGA 1344
              *****

USA300_Coa   CCGCAATTTTAAACAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1458
N315_Coa     CCGCAATTTTAAACAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1443
MRSA252_Coa  CCTCAATTTTAAACAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1458
MW2_Coa      CCTCAATTTTAAACAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1449
WIS_Coa      CCGCAATTTTAAACAAACACCTAAATATGTTAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATCCGT 1404
              ** *****

USA300_Coa   GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCCA----- 1512
N315_Coa     GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCCAAGTGAA 1503
MRSA252_Coa  GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCCAAG---- 1514
MW2_Coa      GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCCAATCAGAA 1509
WIS_Coa      GAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAATAAGCCCAATCAGAA 1464
              *****

USA300_Coa   -----TCA----- 1515
N315_Coa     ACAAATGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAGATATCATACGGAGCTCGCCCA 1563
MRSA252_Coa  -----C----- 1515
MW2_Coa      ACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAGATATCATATGGCGCTCGCCCA 1569
WIS_Coa      ACAAACGCATACAACGTAACGACAAATCAAGATGGCAGATATCATATGGGGCTCGCCCA 1524
              *

USA300_Coa   -----GAAACAAATGCATATAACGTAAACACACATGCAAAATGGTCAA 1557
N315_Coa     ACACAAACCAAGCCAGTGAACAAACGCATATAACGTAAACACACATGCAAAATGGTCAA 1623
MRSA252_Coa  -----GAAACAAATGCATATAACGTAAACACACATGCAAAATGGTCAA 1557
MW2_Coa      ACACAAACCAAGCCAGTGAACAAACGCATATAACGTAAACACACATGCAAAATGGTCAA 1629
WIS_Coa      ACACAAACCAAGCCAGTGAACAAACGCATATAACGTAAACACACATGCAAAACGGCCAA 1584
              *****

USA300_Coa   GTATCATACGGAGCTCGTCCGACA----- 1581
N315_Coa     GTATCATACGGTGTCTCGCCCAACA----- 1647
MRSA252_Coa  GTATCATATGGCGCTCGCCCGACA----- 1581
MW2_Coa      GTATCATATGGCGCTCGCCCGACA----- 1653
WIS_Coa      GTATCATATGGCGCTCGCCCGACATACAACAAGCCAGTGAACAAATGCATACAACGTA 1644
              *****

USA300_Coa   -----CAAAACAAGCCAAAGC 1596
N315_Coa     -----CAAAAAAAGCCAAAGC 1662
MRSA252_Coa  -----CAAAACAAGCCAAAGC 1596
MW2_Coa      -----CAAAACAAGCCAAAGC 1668
WIS_Coa      ACGACAAATCGAGATGGCAGATATCATATGGCGCTCGCCCGACAAAAACAAGCCAAAGC 1704
              *****

USA300_Coa   AAAACAAACGCATATAACGTAAACAACACATGGAACCGGCCAAGTATCATATGGCGCTCGC 1656
N315_Coa     AAAACAAATGCATACAACGTAAACAACACATGCAAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGC 1722
MRSA252_Coa  GAAACAAACGCATATAACGTAAACAACACATGCAAAACGGCCAAAGTATCATACGGAGCTCGT 1656
MW2_Coa      AAAACAAATGCATATAACGTAAACAACACATGCAAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGC 1728
WIS_Coa      GAAACGAATGCATATAACGTAAACAACACACGGAAATGGCCAAAGTATCATATGGCGCTCGT 1764

```

```

      **** ** ***** ***** ***** * *** ** ***** ** *****
USA300_Coa      CCAACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAACGTAACAACACATGCAAACGGT 1716
N315_Coa        CCGACACAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAATGGT 1782
MRSA252_Coa     CCGACACAAAACAAGCCAAGCGAAACGAACGCATATAACGTAACAACACATGCAAACGGT 1716
MW2_Coa         CCGACACAAAACAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACACGCAAACGGT 1788
WIS_Coa         CCGACACAAAAGAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAACGTAACAACACATGCAAACGGC 1824
      **** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** **

USA300_Coa      CAAGTGTTCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAAT 1776
N315_Coa        CAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACAAC 1842
MRSA252_Coa     CAAGTGTTCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAAT 1776
MW2_Coa         CAAGTGTTCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAAT 1848
WIS_Coa         CAAGTATCATATGGCGCTCGTCCGACATACAACAAGCCAAGTAAAACAAATGCATACAAT 1884
      **** ***** ** ***** ** ** * ** ***** ***** *****

USA300_Coa      GTAACAACACATGCA----- 1791
N315_Coa        GTAACAACACATGCAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCA 1902
MRSA252_Coa     GTAACAACACATGCA----- 1791
MW2_Coa         GTAACAACACATGCA----- 1863
WIS_Coa         GTAACAACACATGCA----- 1899
      *****

USA300_Coa      -----GATGGTACTGCGACATATGGGCCT 1815
N315_Coa        AGCGAAACAAACGCATATAACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCT 1962
MRSA252_Coa     -----GATGGTACTGCGACATATGGTCCT 1815
MW2_Coa         -----GATGGTACTGCGACATATGGGCCT 1887
WIS_Coa         -----GATGGTACTGCGACATATGGTCCT 1923
      ***** *****

USA300_Coa      AGAGTAACAAAATAA 1830
N315_Coa        AGAGTAACAAAATAA 1977
MRSA252_Coa     AGAGTAACAAAATAA 1830
MW2_Coa         AGAGTAACAAAATAA 1902
WIS_Coa         AGAGTAACAAAATAA 1938
      *****

```

图8A

来自所研究的菌株的vwb的比对

```

USA300_vwb -----
Newman_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTATCATTGGGAGCATTATGTGTATCACAAATTTGGGAA 60
MW2_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTATCATTGGGAGCATTATGTGTATCACAAATTTGGGAA 60
MRSA252_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTATCATTGGGAGCATTATGTGTATCACAAATTTGGGAA 60
N315_vwb TTGAAAAATAAATTGCTAGTTTTATCATTGGGAGCATTATGTGTATCACAAATTTGGGAA 60

USA300_vwb -----GTGGTTTCTGGGAGAGAAGATCCATATGTATCTGAGTCGTTG 42
Newman_vwb AGTAATCGTGCGAGTGCAGTGGTTTCTGGGAGAGAAGATCCATATGTATCTGAGTCGTTG 120
MW2_vwb AGTAATCGTGCGAGTGCAGTGGTTTCTGGGAGAGAAGATCCATATGTATCTGAGTCGTTG 120
MRSA252_vwb AGCAATCGTGCGAGTGCAGTGGTTTCTGGGAGAGAAGATCCATATAAATCTGAGTCATTG 120
N315_vwb AGTAATCATGCGAGTGCAGTGGTTTCTGGGAGAGAAGATCCATATGTATCAAAAGCTTTA 120
*****

USA300_vwb AAACGTACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAAC-AGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGGGA 101
Newman_vwb AAACGTACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAAC-AGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGGGA 179
MW2_vwb AAACGTACTAATAATAAAAAATAAATCTAGAAC-AGTAGAAGAGTATAAGAAAAGCTTGGGA 179
MRSA252_vwb AAATTAATGCGAAGAAAGTACTCAATAAAGTATGATATATGAGAGAAATTTAGA 179
N315_vwb GAATTTGAAGATAAAAGTAAATAAATCCAAATCTTAC-GAAATTTATAGAGATAGTTTGA 179
*****

USA300_vwb TGATTTAATATGGTCCTTTTCCAAACTTAGATAAATGAAGATTTGATAATCCTGAATATAA 161
Newman_vwb TGATTTAATATGGTCCTTTTCCAAACTTAGATAAATGAAGATTTGATAATCCTGAATATAA 239
MW2_vwb TGATTTAATATGGTCCTTTTCCAAACTTAGATAAATGAAGATTTGATAATCCTGAATATAA 239
MRSA252_vwb TATGTTAATATCGTCATTATCATTGTCAGATTATGAAGAAATATGAGGAACCAAGATACAA 239
N315_vwb AAGTTTGATTTTATCATTATCTTTTGTCTGATTATGAAGAAATATGAGGAGCCAGATATGA 239
*****

USA300_vwb AGAAGCTATGAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATTT 221
Newman_vwb AGAAGCTATGAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATTT 299
MW2_vwb AGAAGCTATGAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGAGGCTTTGAAGAAATTT 299
MRSA252_vwb AGAAGCTATGAAAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGATGCATT-AAAAAATTT 298
N315_vwb AAAGGCTGTAAGAAATATCAACAGAGATTTATGGCTGAAGATGATGCATTAAAAAATTT 299
*****

USA300_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA---ATTAGATTATCTA--- 276
Newman_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA---ATTAGATTATCTA--- 354
MW2_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA---ATTAGATTATCTA--- 354
MRSA252_vwb TTTTAGTGAAGAGAAAAAATAAAAAATGGAATACTGATA---ATTAGATTATCTA--- 353
N315_vwb TTTAATGAAGAGAAAGATATAAAAAATGCAGATATTAGCAGAAAAATCGAATAATTTATT 359
*****

USA300_vwb --GGATTATCTCATGAAGATATGAAAGTGTATTTAATACCTTTGAAAAAACAAAGTGAGGA 335
Newman_vwb --GGATTATCTCATGAAGATATGAAAGTGTATTTAATACCTTTGAAAAAACAAAGTGAGGA 413
MW2_vwb --GGATTATCTCATGAAGATATGAAAGTGTATTTAATACCTTTGAAAAAACAAAGTGAGGA 413
MRSA252_vwb --GGATTACACACGAAAGATATGAGTCAATTTAATATCATTAAAAAATCATCGTGAAGA 412
N315_vwb AGGTTTACACATGAAGATATTTCTTATATTTTGTATACATTAAAGAAAAATAACAAAGA 419
*****

USA300_vwb GTTCTTAAAGAAATGAAGATATAAAAAAGATAACCGTGAATTGAAAGACTTTAATGA 395
Newman_vwb GTTCTTAAAGAAATGAAGATATAAAAAAGATAACCGTGAATTGAAAGACTTTAATGA 473
MW2_vwb GTTCTTAAAGAAATGAAGATATAAAAAAGATAACCGTGAATTGAAAGACTTTAATGA 473
MRSA252_vwb ATTTTCAAAGAAATCGAAGAAATTAATAATAAAAAATCCAGTGTAAAGAAATATAACAA 472
N315_vwb GTTTTAAAGATATTGAAGAAATCAACTGAAAAATAGTGTATTTAAAGGACTTTAACAA 479
*****

USA300_vwb AGAGGAGCAATTAAAGTCCGACTTAGAATTAACAAATTAGAAAATCAGATATTAATGTT 455
Newman_vwb AGAGGAGCAATTAAAGTCCGACTTAGAATTAACAAATTAGAAAATCAGATATTAATGTT 533
MW2_vwb ATAG----- 477
MRSA252_vwb TGAGGAACAAACTAAAGCTGATACGGAATTAACACTCTTGAAAAATCAAGTACTAATGAT 532
N315_vwb TACAGAGCAACATAATGCCGCGTAGAATAAACAAATTTAGAAAATAAGTATTAATGTT 539

USA300_vwb AGGTAAACATTTTATCAAACTATAGAGATGATGTTGAAAGTTTATATAGTAAGTTAGA 515
Newman_vwb AGGTAAACATTTTATCAAACTATAGAGATGATGTTGAAAGTTTATATAGTAAGTTAGA 593
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AGGTTATACATTTTATCACTCGAATAAAAAATGAAGTAGAAGATTTATATAACAAATTAGA 592
N315_vwb AGGTTATACATTTTATCACTCGAATAAAAAATGAAGTAGAAGATTTATATAAGTATTAGA 599

```

USA300_vwb	TTTAATTATGGGATATAAAGATGAAGAAAAG---GCAAAATAAAAAAGCAGTTAACAAAAG	572
Newman_vwb	TTTAATTATGGGATATAAAGATGAAGAAAAG---GCAAAATAAAAAAGCAGTTAACAAAAG	650
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TATGATTCTTGGTTATAAAGATGAAGAGAGA---AAAAAGAAGAGGGCTACCAATCAAAG	649
N315_vwb	TTTGATTGTTGGA---GAAGTTCAAGATAAGTCGGATAAAAAAAGAGCAGTAAATCAAAG	656
USA300_vwb	GATGTTAGAAAATAAAAAAGAAGACTTAGAAACCATAATTGATGAATTTTTTAGTGATAT	632
Newman_vwb	GATGTTAGAAAATAAAAAAGAAGACTTAGAAACCATAATTGATGAATTTTTTAGTGATAT	710
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AATGTTCAATAATAAAAAAGAGGATTTAGAACTATTATTGATGAATTCCTTGGAGAAAT	709
N315_vwb	GATGTTAAATAGAAAAAAGAGGATTTAGAATTTATTATAGATAAAATTTTTAAAAAAT	716
USA300_vwb	AGATAAAACAAGACCTAATAA-TATTCCTGTTTTAGAAGATGAAAAACAAGAAGAGAAAA	691
Newman_vwb	AGATAAAACAAGACCTAATAA-TATTCCTGTTTTAGAAGATGAAAAACAAGAAGAGAAAA	769
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TGG-ACAACAAAGGCCAACATCTATACCAACATTAGCGCTAAAGAAGAAAAAGAAACAA	768
N315_vwb	TCA-ACAAGAAGCTCCAGAGAGTATACCAAGCTTAACTAGTGAAAAA-AATCATAATCAG	774
USA300_vwb	ATCATAAAAATATGGCTCAATTAAAACTTGACACTGAAGCAGCAAAAAGTGATGAATCAA	751
Newman_vwb	ATCATAAAAATATGGCTCAATTAAAACTTGACACTGAAGCAGCAAAAAGTGATGAATCAA	829
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATATAAAAATGCAAAATAAATTAATACTTGACACTGAAGCAGCAAAAATGATGAAGCAA	828
N315_vwb	ACTATGGCATT-AAAAAGTTAAAGCAGATACAGAAGCTGCTAAAAATGACGTATCAA	829
USA300_vwb	AAAGAAGCAAGAGAAGTAAAGAAGTTTAAATACTCAAAATCACAACCTGCATCTCAAG	811
Newman_vwb	AAAGAAGCAAGAGAAGTAAAGAAGTTTAAATACTCAAAATCACAACCTGCATCTCAAG	889
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAAGAAG-----TTTAAATACCCACAATCACAATCTGTATCTCAAG	870
N315_vwb	AAAGAAG-----TAAAGAAGTTTAAATACTCAAAATATAAATCTACAACACAAG	880
USA300_vwb	AAGTTTCTGAACAACAAAAAGCTGAATATGATAAAAGAGCAGAAGAAAGAAAGCGAGAT	871
Newman_vwb	AAGTTTCTGAACAACAAAAAGCTGAATATGATAAAAGAGCAGAAGAAAGAAAGCGAGAT	949
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAGTCTCTGAACAACAAAAAGCTGACTACGAAAGAAAGCTGAAGAAAGAAAGCGAGAT	930
N315_vwb	AAATTTCTGAAGAACAAAAAGCTGAATATCAAAAGAAAGTCAGAGGCATTAAAGAAAGAT	940
USA300_vwb	TTTTGGATAATCAAAAAATTAAGAAAAACCTGTAGTGTGCTATTAGAATATGATTTTGAGC	931
Newman_vwb	TTTTGGATAATCAAAAAATTAAGAAAAACCTGTAGTGTGCTATTAGAATATGATTTTGAGC	1009
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TTTATAGATAAGCAAAAAATAAGAAAACTCCTGTAGTTTCATTAGAATATGATTTTGAAC	990
N315_vwb	TTATAAACAGACAAAAATCTAAAAATGAGTCTGTGGTTTCACTAA-----TCGATG	991
USA300_vwb	ATAAACAACTGATTGACAAACGAAACGACAAAGAACTTGTGGTTTCTGCACCAACAAAGA	991
Newman_vwb	ATAAACAACTGATTGACAAACGAAACGACAAAGAACTTGTGGTTTCTGCACCAACAAAGA	1069
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ATAAACAACTGTTGACAAACGAAACGACAAAGCAACTTGTGGTTTCTGAGCCATCAAAGA	1050
N315_vwb	ACGAAGA-----CGACAAACGAAACGACAGGCACTTGTGGTTTCTGCGCCATCAAAGA	1045
USA300_vwb	AACCAACATCACCGACTACATATACTGAAACAACGACAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1051
Newman_vwb	AACCAACATCACCGACTACATATACTGAAACAACGACAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1129
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AACCAACAACACCGCTACATACACTGAAACAACGACAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1110
N315_vwb	AACCAACAACACCGACTACATATACTGAAACAACGACTCAGGTACCAATGCCTACAGTTG	1105
USA300_vwb	AGCGTCAAACCTCAGCAACAAATTTATTAATGCACCAAAACAATTGGCTGGATTAAATG	1111
Newman_vwb	AGCGTCAAACCTCAGCAACAAATTTATTAATGCACCAAAACAATTGGCTGGATTAAATG	1189
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AGCGTCAAACACAGCAACAAATCGTTTACAAAGCACCACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATG	1170
N315_vwb	AGCGTCAAACCTCAGCAACAAATCGTTTACAAACACCAAAACCATTAGCTGGATTAAATG	1165
USA300_vwb	GTGAAAGTCATGATTTCAACAACAGCATCAATCACCAACAACCTCAAATCACACGCATA	1171
Newman_vwb	GTGAAAGTCATGATTTCAACAACAGCATCAATCACCAACAACCTCAAATCACACGCATA	1249


```

MW2_vwb -----
MRSA252_vwb GTGAAAGTCATGATTTTCAACAACACGCATCAATCACCACACTACTTCAAATCACACGCATA 1230
N315_vwb GTGAAAGTCATGATTTTCAACAACACGCATCAATCACCACAACTTCAAATCATACGCATA 1225

USA300_vwb -----
Newman_vwb ATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGG 1231
MW2_vwb ATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGG 1309
MRSA252_vwb -----
N315_vwb ATCATCTTATTGAAATTGAAGAAACATCTGCTTTACCTGGTAGAAAACAGGTTTATTGG 1290
ATAATGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGG 1285

USA300_vwb -----
Newman_vwb TTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATTAAGC 1291
MW2_vwb TTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATTAAGC 1369
MRSA252_vwb -----
N315_vwb TTGGTTTGAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATTAAGC 1350
TTGGTATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAATTAAGC 1345

USA300_vwb -----
Newman_vwb GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA 1351
MW2_vwb GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA 1429
MRSA252_vwb -----
N315_vwb GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA 1410
GTGAACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATA 1405

USA300_vwb -----
Newman_vwb AAGACCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTT 1411
MW2_vwb AAGACCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTT 1489
MRSA252_vwb -----
N315_vwb AAGACCGATTAAATGCCCAACAAAAAGTAAATACTTTAAAGTGCAGGTCATCAAAAACGTT 1470
AAGACCGATTAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTT 1465

USA300_vwb -----
Newman_vwb TTAATAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAATAA----- 1449
MW2_vwb TTAATAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAATAA----- 1527
MRSA252_vwb -----
N315_vwb TTAATAAACAAATTAATAAAGTATATAATGGCAATAATTAATGCATGGCTGCAAGGAA 1530
TTAATAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAATAA----- 1503

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb ATAATGAGTTTGCCGTAAAAATAACAACATTTTAACTAGCAATAAATAATATCAAAGTC 1590
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb ATCATTTCATGATGCAATCTAGTATAGTCCACATCTAAACAGGTGTGGACTATTACTT 1650
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TTTTCACTTTTATATTACGAAAAAATTATTATGCTTAACATCAATATCAATAATTAATTT 1710
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TAAGCTGAAAAACAATAAAATGTTAAGACAACGTTTACTTCAAGTTAATTATTACTG 1770
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AAAATCTGGTATATAATGCTGTTAGTGAATATAACAGGAAATTAATTTGGTTATGATA 1830

```

```
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TTGAGTCTATATAAAGGAGAAAATAACAGATGAAAAAGAAATTATTAGTTTAACTATGAG 1890
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb CACGCTATTTGCTACACAATTTATGAATTCAAATCACGCTAATGCATCAACAGAAAGTGT 1950
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TGATAAAAACTTTGTAGTTCAGAAATCGGGTATTAATAAAATTATTCCAACCTTACGATGA 2010
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb ATTTAAAAAGCACAAAAGTAAATGTTAGTAATTTAGCTGACAACAAAACCTTTGTAGC 2070
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TTCTGAAGATAAAATGAATAAGATTGCAGATCCATCGGCAGCTAGTAAATTTGTAGATAA 2130
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AAACCTTGCCGTACCAGAATCAAAATTAGGAATCATTGTACCAGAGTATAAAGAAATCAA 2190
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TAATCGAGTGAATGTAACAACAACAATCCAGCTTCAAAACAAGTTGACAAGCAAATTGT 2250
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TGCTAAAGACCCAGAGGTGAATAGATTATTACGCCAAAATAAAGTAAACCATCGTTTCAT 2310
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TACTACGCAAAACCCACTATAAGAAAGTTATTACTTCATACAAATCAACACATGTACATAA 2370
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb ACATGTAAACCATGCAACATCTTCTATCCATCATCACTTTACTATTAAACCATCAGAAGC 2430
N315_vwb -----
```

USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ACCTAGATATACACACCCATCTCAATCTCAATCGTTAATTATAAATCATCATTTTGCAGT	2490
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TCCTGGATACCATGGTCATAAAGTTGTAACACCAGGACAAGCTAGTATTAGAATTCATCA	2550
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	CITTTGTGCTGTACCTCAAATAAATAGTTTTAAGGTCATTCCATCATATGGTCACAATTC	2610
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	ACATCGTATGCATGTACCAAGTTTCCAAAATAACACACAGCAACATCAAAATGCCAA	2670
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AGTAAATAAACTTATAACTATAAATATTTTATACCTATAAAGTAGTCAAAGGTGTAAA	2730
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	AAAACATTTCTCATTTTCAAAATCACATGGTTGTAAATTTGTTAAACCAGCATTAACAT	2790
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	CAAAAATGTAAATTATCAATATGCTGTGCCAAGTAATAGCCCTACACACGTTGTTCTCTGA	2850
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	GTTTCAGGGTATCTTACCAGCACCACGAGTATAAAATGACATTAAGTTTACGAGATAT	2910
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	GATAAATACCTATTATTTTAAACATAGTCTGCAATCTATGAGGTTGTAGGCTATGTTTTT	2970
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	
Newman_vwb	-----	
MW2_vwb	-----	
MRSA252_vwb	TGCAGTTTATCAATAAACACCCATCAACAAATTATACCGTTTTCTACTTTTAAAGTTGG	3030
N315_vwb	-----	
USA300_vwb	-----	

```

Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AAGTAACATAATCTTAAATAAAATATATTATTAAATTAAGATAAAATATAAGACTCGAGATTA 3090
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TTGTTAATAGTTTGTTCATCGCAAGTTAATTATTGTTTCTAAATATTGGTATATAATTT 3150
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TCAATGGCGAAGAAAACAGGGTAAAAAAGTCGGTTTTTAAATCAAAGCAAATAAGGAGTA 3210
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AAAATGAAAAGGAAAGTACTAGTATTAAACAATGGGCGTACTTTGTGCGACACAATTATG 3270
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb GCAAACGAATAATGCAAAAGCTTTAGTGACAGAGAGTGGCGTTAATGATACTAAGCAATT 3330
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb TACTGAAGTAACATCGGAAGAAAAAGTTATAAAAGATGCTATTTCGAAAGCAATGAAAG 3390
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb CTTTATTTACTATCCCCAAAATGATTTGAAGGGATTAGGTGGAGAACACAACGATTACGA 3450
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AAAAATTACATATAGCACTTCTTCTAATAATGTTTGTAGATTATCAATGAGTTCAAAATA 3510
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb CGTAGGCGGTAAATCAGGAGCTATGGTTGGTTATAGTGAAATTTACTCATCATTTCAC 3570
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----
MRSA252_vwb AGACCGCGACAAACGTGCTATCAGACGTGATCATGTTAAAGAAGCACAAAACCTTGATTAA 3630
N315_vwb -----

USA300_vwb -----
Newman_vwb -----
MW2_vwb -----

```

MRSA252_vwb	TGATTATAAATATACGCAAATATATGAAGACTTTGCTAAAGCTACTGCAAAGGTAAGTAC 3690
N315_vwb	-----
USA300_vwb	-----
Newman_vwb	-----
MW2_vwb	-----
MRSA252_vwb	ACTTAGTCAGTCTCACC AAAATTATTTAAATAAACAAATTGATAAAGTGAATAATAAGAT 3750
N315_vwb	-----
USA300_vwb	-----
Newman_vwb	-----
MW2_vwb	-----
MRSA252_vwb	AGAGAAACTGAAAAACGCTAA 3772
N315_vwb	-----

图9A

```

MW2_vWbp      VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNSRTVEEYKKSLLDILWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKY 60
Newman_vWbp    VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNSRTVEEYKKSLLDILWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKY 60
USA300_vWbp    VVSGEKNPYVSESLKLTNNKNSRTVEEYKKSLLDILWSFPNLDNERFDNPEYKEAMKKY 60
N315_vWbp      VVSGEKNPYVSKALELKDKKNKNSYENYRDSLESLSLSSFADYEKYEPEYKAVKKY 60
MRSA252_vWbp   VVSGEENPYKSESLKLNKRTTITSOKYEENLMLISSLSFADYEKYEPEYKAVKKY 60
*****:*** *::*:...: ..: : ::*...*: ** *:. * *:::*****:***

MW2_vWbp      QQRFMAEDEALKKFFSEKKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEKEIE 118
Newman_vWbp    QQRFMAEDEALKKFFSEKKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEKEIE 118
USA300_vWbp    QQRFMAEDEALKKFFSEKKIKNGNTDN--LDYLGLSHERYESVFNTLKKQSEEFLEKEIE 118
N315_vWbp      QQKFMAEDDALKNPLNEFKKTKNADISPKSNNLGLLTHEBYSYIFDTLKKKQEFLEKEIE 120
MRSA252_vWbp   QQKFMAEDDALKNPLVKKKK----- 80
**::*****:***:*.:.**

MW2_vWbp      DIKKDNPELKDFNE----- 132
Newman_vWbp    DIKKDNPELKDFNEEQQLKCDLELNKLENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYK 178
USA300_vWbp    DIKKDNPELKDFNEEQQLKCDLELNKLENQILMLGKTFYQNYRDDVESLYSKLDLIMGYK 178
N315_vWbp      EIOLKNSDLKDFNNTQHNADVEINNLENKVLVGYTTPYNTNKDEVEELYSELDELIVGEE 180
MRSA252_vWbp   -----

MW2_vWbp      ----- 238
Newman_vWbp    DEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIPVLEDEKQSEKNHKNMAQL 238
USA300_vWbp    DEERANKKAVNKRMLNKKEDLETIIDEFFSDIDKTRPNNIPVLEDEKQSEKNHKNMAQL 238
N315_vWbp      QDKSGDKRAVNQRMLNKKEDLEFIIDKFFKKIQQERPEIIPALTSEKN--HNQTMALKL 238
MRSA252_vWbp   -----

MW2_vWbp      ----- 298
Newman_vWbp    KSDTEAAKSDSEKRSKRSKRLNTQNHKSPASQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDNQKIK 298
USA300_vWbp    KSDTEAAKSDSEKRSKRSKRLNTQNHKSPASQEVSEQQKAEYDKRAEERKARFLDNQKIK 298
N315_vWbp      KADTEAAKNDVSKRSKRS---LNTQNNKSTQELISEEQKAEYQKSEALKERFINRQKSK 295
MRSA252_vWbp   -----

MW2_vWbp      ----- 358
Newman_vWbp    KTPVVSLEYDFEHKQRIQNDNDKKLVVSAPTCKKPTSPPTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI 358
USA300_vWbp    KTPVVSLEYDFEHKQRIQNDNDKKLVVSAPTCKKPTSPPTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI 358
N315_vWbp      NESVVSLLIDDED---DNENDRQLVVSAPSCKPTTPTTYTETTTQVPMPTVERQTQQQI 350
MRSA252_vWbp   -----

MW2_vWbp      ----- 418
Newman_vWbp    IYNAPKQLAGLNGESHDTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS 418
USA300_vWbp    IYNAPKQLAGLNGESHDTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS 418
N315_vWbp      VYKTPKPLAGLNGESHDTTTHQSPTTSNHTHNNVVEFEETSALPGRKSGSLVGISQIDS 410
MRSA252_vWbp   -----

MW2_vWbp      ----- 478
Newman_vWbp    SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV 478
USA300_vWbp    SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV 478
N315_vWbp      SHLTEREKRVIKREHVREAQKLVDNYKDTHSYKDRINAQQKVNTLSEGHQKRFNKQINKV 470
MRSA252_vWbp   -----

MW2_vWbp      -----
Newman_vWbp    YNGK 482
USA300_vWbp    YNGK 482
N315_vWbp      YNGK 474
MRSA252_vWbp   -----

```

图9B

图9C