

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 5/00

C07H 21/02 C07H 21/04

C12N 15/00 C12N 15/63



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01818456.1

[43] 公开日 2004年2月4日

[11] 公开号 CN 1473166A

[22] 申请日 2001.9.12 [21] 申请号 01818456.1

[30] 优先权

[32] 2000.9.12 [33] US [31] 09/660,587

[86] 国际申请 PCT/US01/28759 2001.9.12

[87] 国际公布 WO02/22782 英 2002.3.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.5.6

[71] 申请人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

[72] 发明人 D·H·沃克 于学杰

J·W·麦克布里奇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 25 页 序列表 24 页
附图 17 页

[54] 发明名称 犬埃里希体的同源 28kD 免疫优势
蛋白质基因及其用途

[57] 摘要

本发明针对犬埃里希体的一个多形性多基因家族的同源免疫反应性 28kDa 蛋白质基因, p28 - 1、-2、-3、-5、-6、-7、-9 的克隆、测序和表达。还公开了编码犬埃里希体所有 9 个同源 28kDa 蛋白质基因的多基因基因座。重组犬埃里希体 28kDa 蛋白质与犬埃里希体感染的犬的恢复期抗血清反应, 可用于开发对于疾病预防和血清诊断特别有效的疫苗和血清诊断法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种编码犬埃里希体 30kDa 蛋白质的分离的 DNA 序列, 其特征在于, 所述蛋白质与抗犬埃里希体血清具有免疫反应性。
- 5 2.如权利要求 1 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述蛋白质含有选自 SEQ ID No. 2, 4, 6, 40, 42, 44 和 46 的氨基酸序列。
- 3.如权利要求 2 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述蛋白质具有 N-末端信号序列。
4. 如权利要求 3 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述蛋白质是经翻译后修饰
10 成 28kDa 蛋白质。
5. 如权利要求 1 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述 DNA 含有选自 SEQ ID No. 1, 3, 5, 39, 41, 43 和 45 的序列。
- 6.如权利要求 1 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述 DNA 包含在犬埃里希体的一个基因座中。
- 15 7.如权利要求 6 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述基因座是长 10, 677bp 的一个多基因基因座。
8. 如权利要求 7 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述基因座含有编码犬埃里希体同源性 28kDa 蛋白质的基因。
9. 如权利要求 8 所述的 DNA 序列, 其特征在于, 所述犬埃里希体的同源性 28kDa
20 蛋白选自 p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8 和 p28-9。
- 10.一种含有权利要求 1 所述的 DNA 序列的载体。
- 11.如权利要求 10 所述的载体, 其特征在于, 所述载体是一种表达载体, 当所述载体被引入细胞时, 能够表达选自 SEQ ID No. 1, 3, 5, 39, 41, 43 和 45 的序列编码的肽或多肽。
- 25 12.一种重组蛋白质, 其特征在于, 该蛋白质含有选自 SEQ ID No. 2, 4, 6, 40, 42, 44 和 46 的氨基酸序列。
- 13.如权利要求 12 所述的氨基酸序列, 其特征在于, 所述氨基酸序列由含有选自 SEQ ID No. 1, 3, 5, 39, 41, 43 和 45 的序列的核酸区段所编码。
- 14.一种宿主细胞, 其特征在于, 该细胞含有选自 SEQ ID No. 1, 3, 5, 39, 41, 43

和 45 的核酸区段。

15.一种产生权利要求 12 所述的重组蛋白质的方法，其特征在于，该方法包括步骤：

获得含有表达区的载体，所述表达区含有与启动子可操纵性连接的、编码选自 SEQ ID No. 2, 4, 6, 40, 42, 44 和 46 的氨基酸序列的序列；
5 将所述载体转染入细胞；和
在有效表达所述表达区的条件下培养所述细胞。

16.一种抗体，其特征在于，该抗体与含有选自 SEQ ID No. 2, 4, 6, 40, 42, 44 和 46 的氨基酸序列的多肽具有免疫反应性。

10 17.一种抑制个体内犬埃里希体感染的方法，其特征在于，该方法包括步骤：
在接触前或怀疑已接触，或已感染犬埃里希体时鉴定个体；和
以抑制犬埃里希体感染的有效量施用含有犬埃里希体 28kDa 抗原的组合物。

18.如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述 28kDa 抗原是重组蛋白质，它含有选自 SEQ ID No. 2, 4, 6, 40, 42, 44 和 46 的氨基酸序列。

15 19.如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述重组蛋白质由含有选自 SEQ ID No. 1, 3, 5, 39, 41, 43 和 45 的序列的基因编码。

20.如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述含有 28kDa 抗原的组合物分散于药物学上可接受的载体中。

20

犬埃里希体的同源 28kD 免疫优势蛋白质基因及其用途

5 发明背景

发明领域

本发明一般涉及分子生物学领域。本发明更具体涉及犬埃里希体中同源 28-kDa 蛋白质基因的分子克隆和特征确定，以及编码犬埃里希体该 28kDa 同源蛋白质的多基因基因座及其用途。

10 相关领域的描述

犬埃里希体病也称作犬热带全血细胞减少症，是一种犬扁虱携带的立克次氏体疾病，首次于 1935 年在非洲和 1963 年在美国发现 (Donatien 和 Lestoquard, 1935; Ewing, 1963)。该疾病在越战期间，美国军犬中流行性爆发后被更好的认识 (Walker 等, 1970)。

- 15 犬埃里希体病的病因是犬埃里希体，一种小革兰氏阴性专性胞内细菌，显示对单核吞噬细胞的嗜性 (Nyindo 等, 1971)，并由棕色犬虱 (*Rhipicephalus sanguineus*) 传播 (Groves 等, 1975)。犬埃里希体病的进展有三个阶段：急性、亚临床和慢性。急性阶段的特征是发热、食欲减退、抑郁、淋巴结病和轻度血小板减少 (Troy 和 Forrester, 1990)。犬通常从急性期恢复，但是变成在几个月或
- 20 甚至几年中成为该病菌的持续传染携带者，而没有临床症状 (Harrus 等, 1998)。某些犬进入慢性阶段，特征是血小板减少、高球蛋白血症、食欲减退、消瘦和出血，特别是鼻出血，然后死亡 (Troy 和 Forrester, 1990)。

- 表面抗原性的调节可能是在宿主中建立这种持续感染的重要机制。虽然对该病的发病机制了解得很少，但在相关的埃里希体属、无形体属、考德里体属的成员中所述的多基因家族可能涉及主要表面抗原表达的改变，从而逃脱免疫监视。
- 25 着边无形体 (*Anaplasma marginale*)，一种与犬埃里希体密切相关的生物，显示了主要表面蛋白 3 (*msp-3*) 基因的改变，导致菌株之间的抗原多态性 (Alleman 等, 1997)。

基于 16S rRNA 基因的分子分类学分析，确定了犬埃里希体和恰菲埃里希体 (人

单核细胞埃里希体病(HME)的病因)是密切相关的(Anderson等, 1991; Anderson等, 1992; Dawson等, 1991; Chen等, 1994)。报道了犬埃里希体和恰菲埃里希体的64、47、40、30、29和23kDa抗原之间可观的交叉反应性(Chen等, 1994; Chen等, 1997; Rikihisa等, 1994; Rikihisa等, 1992)。用人和犬恢复期血清作免疫印迹分析免疫反应性抗原, 鉴定出许多犬埃里希体的免疫优势蛋白质, 包括30kDa蛋白(Chen等, 1997)。另外, 已描述犬埃里希体的30kDa蛋白质是免疫应答早期识别的主要免疫优势抗原, 它与恰菲埃里希体的30kDa蛋白质是不同的抗原(Rikihisa等, 1992; Rikihisa等, 1994)。犬埃里希体的其它分子量在20-30kDa之间的免疫优势蛋白质也已被鉴定(Brouqui等, 1992; Nyindo等, 1991; Chen等, 1994; Chen等, 1997)。

已在相关生物,包括恰菲埃里希体和反刍类考德里氏体(*Cowdria ruminantium*)中报道了多基因家族编码的同源28-32kDa免疫优势蛋白质(Sulsona等, 1999; Ohashi等, 1998a; Reddy等, 1998)。近来, 描述了恰菲埃里希体中编码23-28kDa蛋白质的21个成员的多基因家族(Yu等, 2000)。恰菲埃里希体28kDa外膜蛋白质是表面暴露的, 含有三个主要超变区(Oashi等, 1998a)。重组恰菲埃里希体P28似乎在小鼠中提供了抵抗同源攻击感染的保护, 针对重组蛋白产生的抗血清与犬埃里希体的30kDa蛋白质交叉反应(Ohashi等, 1998a)。报道了恰菲埃里希体分离物中基因中的多样性(Yu等, 1999a), 用单克隆抗体的研究进一步证明了表达的P28蛋白质中的多样性(Yu等, 1993)。相反, 报道了犬埃里希体地理学不同的分离物中基因完全保守, 提示犬埃里希体在北美洲中可能是保守的(McBride等, 1999, 2000)。

现有技术的缺陷在于不能克隆和确定犬埃里希体的新的同源性28kDa免疫反应性蛋白质基因, 和含有同源28kDa蛋白质基因的单个多基因基因座的特征。另外, 现有技术的缺陷在于缺乏犬埃里希体免疫反应性基因的重组蛋白质。本发明填补了本领域这一长期存在的需要。

发明内容

本发明的一些实施例描述了犬埃里希体同源成熟28kDa免疫反应性蛋白质基因(称为、、、、、、)的分子克隆、测序、特征确定和表达, 以及对含有9种犬埃里希体28kDa蛋白质基因(到)的一个基因座的鉴定

(10677bp)。p28 基因中的 8 种位于一条 DNA 链上，一种 p28 基因在互补链上。9 种 p28 基因成员中的核酸同源性是 37-75%，氨基酸同源性是 28-72%。

在本发明的一个实施例中，提供了编码犬埃里希体 30kDa 免疫反应性蛋白质的 DNA 序列。优选蛋白质具有选自 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44、46 的氨基酸序列，基因具有选自 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43、45 的核酸序列，是多态性多基因家族的成员。通常蛋白质具有 N-末端信号肽，它在翻译后加工中被切下，产生成熟 28-kDa 蛋白质。另外，编码 28kDa 蛋白质的基因优选包含在一个多基因座中，它的大小是 10,677bp，编码 9 种犬埃里希体的同源 28kDa 蛋白质。

在本发明的另一个实施例中，提供了一种表达载体，它含有编码犬埃里希体 28-kDa 免疫反应性的基因，并能在引入细胞时表达该基因。

在本发明的另一个实施例中，提供了一种重组蛋白质，它具有选自 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44、46 的氨基酸序列。优选该氨基酸序列是由选自 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43、45 的核酸序列编码的。优选该重组蛋白质含有 4 个可变区，它们可以是暴露于表面、亲水和具有抗原性。重组蛋白质可用作抗原。

在本发明的另一个实施例中，提供了一种产生重组蛋白质的方法，包括步骤：获得一种载体，它含有一个表达区，其中含有与启动子可操纵性连接的、编码选自 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44、46 的氨基酸序列的序列；将该载体转染入细胞；在有效表达该表达区的条件下培养细胞。

还在一些实施例中描述了本发明，作为在个体中抑制犬埃里希体感染的方法，包括步骤：在接触前或怀疑已接触，或已感染犬埃里希体时鉴定个体；和以抑制犬埃里希体感染有效量施用含有犬埃里希体 28kDa 抗原的组合物。抑制可通过任何方式，例如刺激个体的体液或细胞免疫应答反应，或通过其它方法，例如抑制 28kDa 抗原的正常功能，或甚至与抗原竞争与个体体内的一些因子相互作用发生。

可从下文为了公开而提供的本发明优选例的描述中，更加清楚的了解本发明的其它方面、特征和优点。

附图简述

因此，将获得并详细理解本发明上述特征、优点和目的中的内容，以及其它将变得清楚的内容，更具体的、对本发明上面简述的内容将参考某些在附图中说

明的实施例。这些图是说明书的一部分。然而要注意的是，附图说明了本发明的优选例，因此不应认为是对其范围的限制。

图 1 显示了 p28-7 基因，包括邻近的 5' 和 3' 非编码序列的核酸序列 (SEQ ID NO:1) 和推测的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)。ATG 起始密码子和 TAA 终止子用黑体
5 标示，23 氨基酸前导信号序列下划线标示。

图 2 显示了表达的 50kDa 重组 p28-7 硫氧还蛋白融合蛋白质 (泳道 1, 箭头) 和 16kDa 硫氧还蛋白对照 (泳道 2, 箭头) 的 SDS-PAGE, 和重组 p28-7-硫氧还蛋白融合蛋白用恢复期犬埃里希体犬抗血清的对应免疫印迹 (泳道 3)。犬埃里希体抗血清未检测到硫氧还蛋白对照 (未显示)。

图 3 显示了 p28-7 蛋白质 (ECa28-1, SEQ ID NO:2)、p28-5 蛋白质 (ECa28SA2, 部分序列, SEQ ID NO:7)、p28-4 蛋白质 (ECa28SA1, SEQ ID NO:8)、恰菲埃里希体 P28 (SEQ ID NO:9)、恰菲埃里希体 OMP-1 家族 (SEQ ID NO:10-14) 和反刍类考德里氏体 (*C. ruminantium*) MAP-1 蛋白质 (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列的排列对比。p28-7 氨基酸序列作为共有序列。未显示的氨基酸与 p28-7 相同, 用点表示。
10 用对应的一字母缩写显示分歧的氨基酸。为了氨基酸序列的最大排列引入的缺口用长划线标出。可变区用下划线标出并命名为 (VR1、VR2、VR3 和 VR4)。箭头表示信号肽的推测的信号肽酶切割位点。
15

图 4 显示了用非平衡树构建从推测的氨基酸序列得到的犬埃里希体 p28-7 (Eca28-1)、p28-5 (ECa28SA2, 部分序列)、p28-4 (ECa28SA1), 恰菲埃里希体 *omp-1*
20 多基因家族的成员, 和反刍类考德里氏体 *map-1* 蛋白质的系统发生学相关性。每对分枝的长度代表配对氨基酸序列之间的距离。比例尺测定序列之间的距离。

图 5 显示了用 6 种不同的限制性酶完全消化犬埃里希体基因组 DNA, 并与 p28-7 DIG 标记的探针杂交的 Southern 印迹分析 (泳道 2-7); DIG 标记的分子量标记 (泳道 1 和 8)。

图 6 显示了犬埃里希体 p28-7 的预测的蛋白质特征 (ECa28-1, Jake 株) 和恰菲埃里希体 P28 (Arkansas 株) 的比较。用 6 肽窗口, 表面可能性预测了表面残基。表面残基是任何具有 2.0nm² 以上的水可接触表面积的残基。预测值高于 1 的六肽被视为表面区。抗原性指数预测可能的抗原决定簇。指数值大于 0 的区域是可能的抗原决定簇。T-细胞基序用 5 个氨基酸的基序 (残基 1-甘氨酸或极性氨基酸,
25

残基 2-疏水氨基酸, 残基 3-疏水氨基酸, 残基 4-疏水氨基酸或脯氨酸, 和残基 5-极性或甘氨酸), 确定了可能的 T-细胞抗原决定簇的位置。比例尺表示氨基酸位置。

图 7 显示了犬埃里希体 28-kDa 蛋白质基因 *p28-5*(核苷酸 1-849: SEQ ID NO:3; 氨基酸序列: SEQ ID NO:4) 和 *p28-6*(核苷酸 1195-2031: SEQ ID NO:5; 氨基酸序列: SEQ ID NO:6), 包括基因间非编码序列(28NC2, 核苷酸 850-1194: SEQ ID NO:31) 的核酸序列和推测的氨基酸序列。ATG 起始密码子和 TAA 终止子用黑体标示。

图 8 显示了犬埃里希体 28kDa 蛋白基因的基因座(5.592Kb, 含有 5 个基因) 示意图, 表明基因组的朝向和基因间非编码区域(28NC1-4)。基因座 1 和 2(阴影) 显示的 28kDa 蛋白质已被描述过(McBride 等, 1999; Reddy 等, 1998; Ohashi 等, 1998)。 *p28-5* 的完整序列和新的 28kDa 蛋白质基因(称为 *p28-6*) 已测定了序列。 完成了 *p28-5*、 *p28-6* 和 *p28-7* 之间非编码基因间区(28NC2-3) 与先前未连接的基因座 1 和 2 的连接。

图 9 显示采用非平衡树构建法根据氨基酸序列得到的犬埃里希体 *p28-4*(Eca28SA1)、 *p28-5*(Eca28SA2)、 *p28-6*(Eca28SA3), *p28-7*(Eca28-1) 和 *p28-8*(Eca28-2) 的系统发生学相关性。每对分枝的长度代表配对氨基酸序列之间的距离。比例尺测定序列之间的距离。

图 10 显示了犬埃里希体 28kDa 蛋白质基因基因间非编码核酸序列(SEQ ID NO:30-33) 的排列对比。用点(.) 表示的未显示的核酸与非编码区 1(28NC1) 相同。 用对应的一字母缩写显示分歧的氨基酸。为了氨基酸序列的最大排列对比, 引入的缺口用长划线(-) 标出。推测的转录启动子区(-10 和-35) 以及核糖体结合位点(RBS) 加框标示。

图 11 显示了 9 种犬埃里希体基因 *p28* 基因座(10,677bp) 的示意性图, 表明基因组朝向和基因间非编码区域。实施例 8 中鉴定了 *p28* 基因(*p28-1*、 *2*、 *3*、 *9*) (没有阴影)。先前鉴定了阴影标示的 *p28* 基因, 并命名如下: *p28-4*, *p30a*(Ohashi 等, 1998b) 和 ORF1(Reddy 等, 1998); *p28-5* 和 *p28-6*(McBride 等, 2000); *p28-7*、 *p28*(McBride 等, 1999) 和 *p30*(Ohashi 等, 1998b); 和 *p28-8*、 *p30-1*(Ohashi 等, 1998b)。

图 12 显示了犬埃里希体 P28-1 到 P28-9 根据氨基酸序列的系统发生关系。每

对分枝的长度代表配对氨基酸之间的距离。比例尺测定序列之间的分歧百分数。

图 13 显示了犬埃里希体 p28-1 基因的核酸序列(SEQ ID NO:39)和推测的氨基酸序列(SEQ ID NO:40)。

图 14 显示了犬埃里希体 p28-2 基因的核酸序列(SEQ ID NO:41)和推测的氨基酸序列(SEQ ID NO:42)。

图 15 显示了犬埃里希体 p28-3 基因的核酸序列(SEQ ID NO:43)和推测的氨基酸序列(SEQ ID NO:44)。

图 16 显示了犬埃里希体 p28-9 基因的核酸序列(SEQ ID NO:45)和推测的氨基酸序列(SEQ ID NO:46)。

10 发明详述

本发明描述了编码犬埃里希体 30-kDa 蛋白质的同源性基因的克隆、测序和表达。还进行了 7 种犬埃里希体分离物和恰菲埃里希体 omp-1 多基因家族中的同源性基因的比较性分子分析。如下鉴定了几种新的 28-kDa 蛋白质基因：

p28-7(ECa28-1)具有一个 834bp 的开放阅读框，编码具有 30.5kDa 的预测分子量的 278 个氨基酸的蛋白质(SEQ ID NO:2)。鉴定出一个 N-末端信号序列，提示蛋白质经过翻译后修饰变成 27.7kDa 的成熟蛋白质。

P28-6(ECa28SA3)具有 840bp 的开放阅读框，编码 280 氨基酸的蛋白质(SEQ ID NO:6)。

用 PCR 扩增犬埃里希体的 28kDa 蛋白质基因，得到先前未曾测序的 p28-5(Eca28SA2)区域。p28-5 的序列分析揭示有一个编码 283 个氨基酸蛋白质(SEQ ID NO:4)的 849bp 的开放阅读框。

采用对 28kDa 蛋白质基因的基因间非编码区特异性的引物作 PCR 扩增，对连接先前分离的基因座的区域测序，从而鉴定了一个含有 5 种 28kDa 蛋白质基因(p28-4、-5、-6、-7 和-8)的基因座(5.592-kb)。预测该 5 种 28kDa 蛋白质具有信号肽，可得到成熟蛋白质，并且具有 51-72%氨基酸同源性。分析了基因间区，揭示各基因的假设启动子区，提示这些基因可独立表达和差异性表达。基因间非编码区(28NC1-4)的大小是 299-355bp，具有 48-71%的同源性。

另外，对串联排列的 p28 基因上述 5 个基因的基因座的 DNA 上游和下游先前未知区域进行了测序，鉴定到 p28-1、-2、-3 和-9。因此，本发明鉴定到了横跨

10,677bp 的 9 基因犬埃里希体 p28 基因座。

本发明特别针对犬埃里希体的同源 28kDa 蛋白质基因 p28-1、-2、-3、-6、-7 和 p28-9，和先前部分测序的 p28-5 的完整序列。还公开了编码犬埃里希体的 9 种同源 28kDa 外膜蛋白的多基因基因座。8 种 p28 基因位于一条 DNA 链上，在互
5 补链上发现了一个 p28 基因。9 个 p28 基因成员之间的核酸同源性是 37-75%，氨基酸同源性范围是 28-72%。

根据本发明，可以使用本领域能力范围内的常规分子生物学、微生物学和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有完整的解释，见例如 Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); "DNA Cloning: A
10 Practical Approach," 卷 I 和 II (D.N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)。

15 本发明包括基本纯的 DNA，它编码犬埃里希体的 28kDa 免疫反应性蛋白质。本发明的 DNA 编码的蛋白质可以与 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44 或 46 中列出的氨基酸具有至少 80%(优选 85%，更优选 90%，和最优选 95%)的序列相同性。更优选的，该 DNA 包括 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43、45 的核苷酸编码序列，或这些序列的简并变体。

20 本领域熟知蛋白质的氨基酸序列是由编码该蛋白质的 DNA 的核苷酸序列确定的。由于遗传密码的简并性(即对于大多数氨基酸而言，一种氨基酸有一种以上的核苷酸三联体(密码子))，不同的核苷酸序列可以编码特定的氨基酸或多肽。因此，本发明的多核苷酸序列还包含那些编码本发明多肽或其片段或变体的简并序列。

25 本发明还包括基本纯的 DNA，它含有 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43 或 45 所列出的核苷酸区域的至少 15 个连续核苷酸(优选 20，更优选 30，甚至更优选 50 和最优选全部)序列。

“基本纯的 DNA”指通过将 DNA 的一些或全部分子从其天然存在的微环境中分离出来，或通过改变本发明 DNA 的侧接序列，而分离出来(部分或完全纯化)

的 DNA。因此该术语包括例如掺入载体、自主复制质粒或病毒、或原核细胞或整合细胞的基因组 DNA 的重组 DNA；或独立于其它序列作为单个分子存在的 DNA(例如 cDNA 或基因组或聚合酶链式反应(PCR)或限制性内切酶消化产生的 cDNA 片段)。还包括重组 DNA，它是编码其它多肽序列，例如融合蛋白的杂交基因的一部分。本发明还包括重组 DNA，它包括编码犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白质的 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43 或 45 中列出的核苷酸的一部分。

DNA 应该与 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43 或 45 中列出的核苷酸的编码序列具有至少约 70%，优选至少 75%(例如至少 80%)，最优选至少 90%的序列相同性。两条序列之间的相同性是匹配或相同位置数目的直接函数。当两条序列中都有亚基位置被同一个单体亚基占据，例如如果两条 DNA 分子中的给定的位置都被腺嘌呤占据，那么它们在该位置是相同的。例如，如果长 10 个核苷酸的序列中有 7 个位置与第二条 10 个核苷酸的序列中相应的位置相同，那么这两条序列具有 70%的序列相同性。比较序列长度通常至少是 50 个核苷酸，优选至少 60 个核苷酸，更优选至少 75 个核苷酸，最优选 100 个核苷酸。通常用序列分析软件(例如遗传学计算机小组的序列分析软件包，威斯康星大学生物技术中心，1710 University Avenue, Madison, WI 53705)测定序列相同性。

本发明还包括含有编码犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白基因的 DNA 序列的载体，所述载体能在宿主中复制，含有可操纵性连接的：a)复制起始点；b)启动子；和 c)编码所述蛋白质的 DNA 序列。优选本发明的载体含有 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43 或 45 所示的 DNA 序列的一部分。

“载体”可定义为可复制核酸构建物，例如质粒或病毒核酸。载体可以用于扩增和/或表达编码犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的核酸。表达载体是一种可复制构建物，其中编码多肽的核酸序列与能影响多肽在细胞中的表达的合适控制序列可操纵性连接。对控制序列的需要可根据所选的细胞和所选的转化方法而变。通常控制序列包括转录启动子和/或增强子、合适的 mRNA 核糖体结合位点、和控制转录终止和翻译的序列。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有合适转录和翻译控制信号的表达载体。见例如 Sambrook 等, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Press, N.Y.中描述的技术。如果转录控制序列有效控制基因的转录，基因及其转录控制序列定义为“可操纵性连接”。

本发明的载体包括但不限于质粒载体和病毒载体。优选本发明的病毒载体是衍生自反转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、SV40 病毒或疱疹病毒。

一般含有促进插入的 DNA 片段有效转录的启动子序列的表达载体与宿主联用。本文所用的术语“宿主”意味着不仅包括原核细胞，还包括真核细胞，例如
5 酵母、植物和动物细胞。编码犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白质的重组 DNA 分子或基因可使用任何本领域一般技术人员已知的技术转化宿主。尤其优选的是用含有编码犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的基因编码序列的载体转化原核细胞。

原核细胞宿主可以包括大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、
10 粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)。真核宿主包括酵母，例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、哺乳动物细胞和昆虫细胞。可以用本领域已知的方法发酵并培养转化的宿主，以实现最佳细胞生长。

本文所用的术语“工程改造的”或“重组”的细胞是指一种引入了编码犬埃里希体抗原的重组基因的细胞。因此，工程改造的细胞与不含有重组引入的基因
15 的天然存在的细胞不同。工程改造的细胞是具有人工引入的一种或多种基因的细胞。重组引入的基因可以是 cDNA 基因、基因组基因拷贝形式，或包含的基因邻接一启动子，但不是天然与该引入基因相连。另外，重组基因可以整合入宿主基因组，或可以包含在载体、或转染入宿主细胞的细菌基因组中。

本发明还针对基本纯的犬埃里希体 28-30kDa 免疫反应性蛋白，它含有 SEQ ID
20 NO:2、4、6、40、42、44 或 46 列出的氨基酸序列。

“基本纯的蛋白质”意味着从与其天然相伴随的至少一部分成分分开的蛋白质。通常当某蛋白质至少 60%重量没有其它体内天然相伴的蛋白质和其它天然存在的有机分子时，蛋白质是基本纯的。优选蛋白质制品的纯度至少 75%，更优选至少 90%，最优选至少 99%重量。可通过例如，从天然来源提取；表达编码犬埃里希体的 28kDa 免疫反应性蛋白的重组核酸；或化学合成该蛋白质来获得犬埃里希体的基本纯的 28-kDa 免疫反应性蛋白质。可通过任何合适的方法，例如使用对犬埃里希体的 28kDa 免疫反应性蛋白的特异性抗体进行免疫亲和层析等柱层析，聚丙烯酰胺凝胶电泳，或 HPLC 分析方法测定纯度。当将蛋白质从其天然状态伴随的至少一些污染物中分离出来时，该蛋白质基本没有天然伴随成分。因此，化

学合成的或在不同于天然起源细胞的细胞系统中产生的蛋白质，定义为基本无天然伴随成分。因此，基本纯的蛋白质包括大肠杆菌、其它原核细胞或天然不存在的其它生物中合成的真核蛋白质。

除了基本上全长的蛋白质，本发明还包括犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的片段(例如抗原片段)(SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44 或 46)。本文所用的术语“片段”用于指一般长度至少 10 个残基，更通常至少 20 个残基，优选至少 30(例如 50)个残基，但比全长完整序列短的多肽。犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的片段可以用本领域技术人员已知的方法产生，例如通过酶消化天然存在的或重组的犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白，或通过化学合成。可通过本文所述的方法评估候选片段显示犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的特征的能力(例如，与犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白特异性抗体结合)。

可用纯化的犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白或犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的抗原性片段产生新的抗体，或通过使用本领域技术人员已知的标准方法测试现有抗体(例如作为诊断试验中的阳性对照)。

如本领域熟知的那样，某给定的多肽其免疫原性可改变。因此常需将免疫原(例如本发明的多肽)与载体偶联。示范性和优选载体是匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)和人血清清蛋白。偶联多肽和载体蛋白质的方法是本领域熟知的，包括戊二醛、间马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和双固氮二氨基联苯胺法。还知道可通过本领域熟知的遗传工程技术将肽偶联于蛋白质。

本领域还已知可使用免疫应答的非特异性刺激剂(称为佐剂)来增强特定免疫原的免疫原性。示范性和优选的佐剂包括完全 BCG、Detox, (RIBI, Immunochem Research Inc.) ISCOMS 和氢氧化铝佐剂(Superphos, Biosector)。

本发明包括用犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白或犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的片段作为免疫原，在例如家兔中产生多克隆抗血清。使用本领域技术人员已知的单克隆和多克隆抗体产生的标准方法。可筛选该方法产生的单克隆抗体是否具有鉴定重组犬埃里希体 cDNA 克隆，和将其与已知 cDNA 克隆区分开来的能力。

本发明不仅包括完整的单克隆抗体，还包括免疫活性抗体片段，例如 Fab 或 (Fab)₂ 片段；工程改造产生的单链 Fv 分子；或嵌合分子，例如含有一种抗体(如小

鼠抗体)的结合特异性, 和另一种抗体(例如人抗体)的剩余部分的嵌合抗体。

在一个实施例中, 抗体或其片段可以与毒素或可检测标记, 例如放射性标记、非放射性同位素标记、荧光标记、化学发光标记、顺磁标记、酶标记或产色标记连接。本领域一般技术人员应了解这些和其它适用于本发明的标记。这些标记与
5 抗体或其片段的结合可用本领域普通技术人员所知的标准技术来完成。

还考虑了可用本发明的新颖蛋白质制备药物组合物。该药物组合物含有本发明的新颖活性组合物和药物学上可接受的载体。本领域一般技术人员无须过多实验不难确定施用本发明活性成分的合适剂量和给药途径。

词组“药物学上可接受的”指当给予个体时, 不会产生过敏或类似不良反应的分子或组合物。含有作为活性成分的蛋白质的水相组合物的制备是本领域熟知的。通常, 将这些组合物制备成可注射的溶液或悬液; 也可制备成可在注射前溶解或悬浮于液体中的固态形式。还可乳化该制备物。
10

可将蛋白以中性或盐形式配制在组合物中。药物学上可接受的盐包括酸加成盐(由蛋白质的游离氨基形成), 和与无机酸, 如盐酸或磷酸, 或乙酸、草酸、酒石酸、杏仁酸等有机酸形成的盐。还可与无机碱, 如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物, 和有机碱, 如异丙基胺、三甲基胺、组氨酸、普鲁卡因等衍生的游离羧基形成盐。
15

配制后, 以与剂量配方兼容的方式, 和治疗有效量施用这些溶液。不难以各种剂型, 如可注射溶液施用这些制剂。

对于水溶液肠胃道外施药, 如需要可适当缓冲该溶液, 首先用足够的盐水或葡萄糖将稀释液变成等渗。这些具体水溶液特别适合静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。就此而言, 本领域技术人员, 根据本文公开内容将了解可使用无菌水溶液。例如, 可将一剂量溶于 1 毫升等渗 NaCl 溶液中, 或加到 1000 毫升作皮下灌注液或注射到预定输液部位(见例如“Remington 药物科学” 15 版, 1035-1038
20 页和 1570-1580)。根据待治疗个体的情况, 须对剂量作某些改动。负责给药的人员在任何情况下都将能确定各个患者的合适剂量。
25

在本发明的一个实施例中, 提供了编码犬埃里希体 30kDa 免疫反应性蛋白的 DNA 序列。优选该蛋白质具有选自 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44、46 的氨基酸序列, 基因具有选自 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、43、45 的核酸序列, 是多

态性多基因家族的成员。更优选的，该蛋白质具有 N-末端信号序列，它在翻译后加工后切断，产生成熟的 28kDa 蛋白质。优选的是编码 28kDa 蛋白质的 DNA 包含在一个多基因基因座中，它的大小是 10,677bp，编码 9 个犬埃里希体的同源 28kDa 蛋白。

- 5 在本发明的另一个实施例中，提供了一种表达载体，它含有编码犬埃里希体 28kDa 免疫反应性蛋白的基因，当引入细胞时该载体能表达该基因。

 在本发明的另一个实施例中，提供了一种重组蛋白质，该蛋白质含有选自 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44、46 的氨基酸序列。优选氨基酸序列是由选自 SEQ ID NO:1、3、5、39、41、3、45 的核酸序列所编码。更优选该重组蛋白质含有 4 个
10 表面暴露的、亲水和抗原性可变区。仍然优选的是该重组蛋白是一种抗原。

 本发明的另一个实施例提供了一种产生该重组蛋白的方法，包括以下步骤：获得含有表达区的一载体，该表达区含有选自与启动子可操纵性连接的 SEQ ID NO:2、4、6、40、42、44、46 的氨基酸序列的编码序列；将载体转染入细胞，并在有效表达该表达区的条件下培养细胞。

- 15 在一些实施例中还描述了本发明抑制个体犬埃里希体感染的方法，包括步骤：鉴定怀疑已接触或感染犬埃里希体的个体；和给予能有效抑制犬埃里希体感染剂量的含有犬埃里希体 28kDa 抗原的组合物。该抑制作用可以通过任何方法，例如刺激个体的体液或细胞免疫应答，或通过其它途径，例如抑制 28kDa 抗原的正常功能，或甚至同该抗原竞争与个体体内一些因子相互作用而发生。

- 20 给出下列例子，用于说明本发明的各种实施例，而不意味以任何方式限制本发明。

实施例 1

ECa28-1 (p28-7) 基因的未知 5' 和 3' 区域的测序

埃里希体和纯化

- 25 Dr. Edward Breitschwerdt, (College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC) 提供了犬埃里希体 (Florida 株和分离物 Demon, DJ, Jake, 和 Fuzzy)。Dr. Richard E. Corstvet (School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA) 提供了犬埃里希体 (Louisiana 株), Dr. Jacqueline Dawson (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) 提供了犬埃里希体

(Oklahoma 株)。以补充有 10%胎牛血清和 2mM L-谷氨酰胺的 DMEM 培养的 DH82 细胞中 37°C 进行埃里希体的增殖。用一般的细胞染色法观察犬埃里希体桑椹体的存在, 监测在 DH82 细胞中的胞内生长。当 100% 细胞被埃里希体感染时, 用细胞刮棒收集 DH82 细胞。17, 000xg 离心细胞 20 分钟。用 Braun-Sonic2000 超声发生器以 40W30 秒, 在冰上破碎细胞沉淀两次。如前所述纯化埃里希体(Weiss E, 1975)。将细胞裂解液加到 42%—36%—30% 泛影葡胺的不连续梯度上, 80, 000xg 离心 60 分钟。收集重带和轻带中的埃里希体, 并用蔗糖-磷酸-谷氨酰胺缓冲液 (SPG, 218mM 蔗糖、3.8mM KH₂PO₄、7.2mM K₂HPO₄、4.9mM 谷氨酰胺, pH7.0) 洗涤, 离心沉淀。

10 核酸制备

如前所述(McBride 等, 1996), 将泛影葡胺纯化的埃里希体重新悬浮在 600 微升 10mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)和 1%十二烷基磺酸钠(SDS, w/v)和 100ng/ml 蛋白酶 K 中, 制备犬埃里希体基因组 DNA。将该混合物在 56°C 保温 1 小时, 用苯酚/氯仿/异戊醇(24:24:1)的混合物抽提核酸两次。用纯乙醇沉淀 DNA, 用 70%乙醇洗涤一次, 干燥并重悬浮于 10mM Tris(pH7.5)中。用高纯度质粒分离试剂盒(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)纯化质粒 DNA, 并用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen, Santa Clarita, CA)纯化 PCR 产物。

ECa28-1(p28-7)基因的克隆

用 Universal GenomeWalker 试剂盒(CLONTECH, Palo Alto, CA)根据厂商提供的方法测定 p28-7 基因的全长序列。用 5 种限制性酶(*Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Sca*I, *Stu*I)完全消化犬埃里希体(Jake 分离物)基因组 DNA, 产生钝端 DNA。将试剂盒中提供的接头(API)与犬埃里希体 DNA 的每一端连接。将该基因组文库用作模板, 采用与 p28-7 序列已知部分互补的引物, 和对接头 API 特异性的引物, 通过 PCR 来寻找 p28-7 基因的未知 DNA 序列。用于基因组步查的 p28-7 特异性引物是从衍生自引物 793(SEQ ID NO:16)和 1330(SEQ ID NO:17)PCR 扩增 p28-7 的已知 DNA 序列设计的。引物 394((5'-GCATTTCCACAGGATCATAGGTAA-3'; 核苷酸 687-710, SEQ ID NO. 21)和 394C (5'-TTACCTATGATCCTGT GGAAATGC-3; 核苷酸 710-687, SEQ ID NO. 22))用于与提供的引物 API 连接, 通过 PCR 扩增 p28-7 基因的未知 5'和 3'区。对相应于用引物 394C 和 API 扩增的 p28-7 基因 5'区(2000bp)的 PCR

产物用引物 793C(5'-GAGTA ACCAACAGCTCCTGC-3', SEQ ID No. 23)单向测序。用同一引物双向测序对应于以引物 394 和 AP1 扩增的 p28-7 基因 3'区(580bp)的 PCR 产物。对邻接开放阅读框的 5'和 3'区的非编码区进行测序,设计与这些区域互补的引物 EC28OM-F (5'-TCTACTTTGCACTTCC ACTATTGT-3', SEQ ID NO. 24)和 EC28OM-R (5'-ATTCTTTTGCCACTATTT TTCTTT-3', SEQ ID NO. 25)以扩增整个 p28-7 基因。

DNA 测序

用 ABI Prism 377 DNA 测序仪(Perkin- Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)对 DNA 进行测序。用引物 EC28OM-F (SEQ ID No. 24)和 EC28OM-R (SEQ ID No. 25), 95°C 5 分钟, 30 轮 95°C 30 秒, 62°C 1 分钟, 72°C 2 分钟, 和 72°C 延伸 10 分钟的热循环方案通过 PCR 扩增 7 种犬埃里希体分离物(来自 North Carolina 的 4 种, Oklahoma, Florida 和 Louisiana 各一种)的整个 p28-7 基因。得到的 PCR 产物用相同引物双向测序。

实施例 2

15 犬埃里希体 ECa28-1(p28-7)基因的 PCR 扩增、克隆、测序和表达
表达载体

用引物-EC28OM-F 和 EC28OM-R PCR 扩增了整个犬埃里希体 p28-7 基因, 并克隆入 pCR2.1-TOPO TA 克隆载体, 获得所需组的限制性酶切割位点(Invitrogen, Carlsbad, CA)。用 BstX 1 从 pCR2.1-TOPO 上切下插入物, 连接入 pcDNA3.1 真核表达载体(Invitrogen, Carlsbad, CA), 称为 pcDNA3.1/EC28 用于后面的研究。扩增 pcDNA3.1/EC28 质粒, 用 KpnI-XbaI 双消化切下基因, 并定向连接到 pThioHis 原核表达载体(Invitrogen, Carlsbad, CA)中。该克隆(称为 pThioHis/EC28)在大肠杆菌 BL21 中产生了一个重组的硫氧还蛋白融合蛋白。

实施例 2

25 犬埃里希体 ECa28-1(p28-7)基因的 PCR 扩增、克隆、测序和表达
表达载体

用引物 EC28OM-F 和 EC28OM-R PCR 扩增了全长的犬埃里希体 p28-7 基因, 并克隆入 pCR2.1-TOPO TA 克隆载体, 以获得所需的限制性酶切位点组(Invitrogen, Carlsbad, CA)。用 BstX 1 从 pCR2.1-TOPO 上切下插入物, 连接入 pcDNA3.1 真核

表达载体(Invitrogen, Carlsbad, CA), 称为 pcDNA3.1/EC28, 用于随后的研究。扩增 pcDNA3.1/EC28 质粒, 用 KpnI-XbaI 双消化切下该基因, 并定向连接入 pThioHis 原核表达载体中(Invitrogen, Carlsbad, CA)。该克隆(称为 pThioHis/EC28)在大肠杆菌 BL21 中产生重组的硫氧还蛋白融合蛋白。离心粗纯化呈不溶相的重组融合蛋白。在天然条件下用镍-NTA 旋转柱(Qiagen, Santa Clarita, CA)从溶解的细胞裂解物中, 纯化得到对照的硫氧还蛋白融合蛋白。

蛋白质印迹分析

在 4-15%Tris-HCl 梯度凝胶(Bio-Rad, Hercules, CA)上对重组犬埃里希体 p28-7 融合蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 并用半干转移槽(Bio-Rad, Hercules, CA)转移到纯硝酸纤维素(Schleicher & Schuell, Keene, NH)膜上。将该膜与 1:5000 稀释的受犬埃里希体感染的恢复期犬抗血清保温 1 小时, 洗涤, 然后与抗犬 IgG(H&L)碱性磷酸酶偶联的亲合层析纯化的二抗(1:1000)保温 1 小时 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。结合的抗体用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑(BCIP/NBT)底物(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。

Southern 印迹分析

为了确定与 p28-7 基因同源的多基因是否存在于犬埃里希体基因组中, 用标准方法(Sambrook 等, 1989)进行了基因组的 Southern 印迹分析。用各限制性酶 BanII、EcoRV、HaeII、KpnI 和 SpeI 完全消化犬埃里希体基因组 DNA, 它们不在 p28-7 基因内切割, AseI 在核酸 34、43 和 656 处切开 p28-7。通过用引物 EC28OM-F 和 EC28OM-R 和地高辛(DIG)-标记的脱氧核苷酸三磷酸(dNTP) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 作 PCR 扩增产生探针, 并用 AseI 消化。用琼脂糖凝胶电泳分离消化的探针(566-bp), 凝胶纯化然后用于杂交。完全消化的基因组犬埃里希体 DNA 电泳并转移到尼龙膜(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)上, 与 p28-7 基因 DIG-标记的探针在 DIG Easy hyb 缓冲液中, 根据厂商的方案(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)40°C 杂交 16 小时。用抗-DIG 碱性磷酸酶-偶联抗体和发光底物(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)检测结合的探针, 并曝光 BioMax 科学显影胶片(Eastman Kodak, Rochester, NY)。

序列分析和比较

从国家生物技术信息中心(NCBI)获得恰菲埃里希体 p28 和反刍类考德里氏体 map-1 DNA 序列。用 LASERGENE 软件(DNASTAR, Inc. Madison, WI)进行核苷酸和推测的氨基酸序列和蛋白质以及系统发生分析。用 McGeoch 和 von Heijine 的方法, 使用 PSORT 程序(McGeoch, 1985; von Heijne, 1986)进行翻译后加工分析, 以

5 识别信号序列。

用设计用于扩增该全长基因的引物对 7 种不同犬埃里希体株的 p28-7 进行序列分析。分析揭示该基因的序列在 North Carolina (4 种), Louisiana, Florida 和 Oklahoma 的分离物中是保守的。

结果

- 10 用 Jotun-Hein 算法排列对比了恰菲埃里希体 p28 和反刍类考德里氏体 map-1 的核酸序列产生具有高同源(>90%)区域的共有序列。这些同源区(反刍类考德里氏体 map-1 核苷酸 313-332 和 823-843; 恰菲埃里希体 p28 的 307-326 和 814-834)被定为 PCR 扩增的引物退火位点的目标。用引物 793 (5-
- 15 GCAGGAGCTGTTGGTTACTC-3') (SEQ ID NO. 16)和 1330 (5'- CCTTCCTCCAAGTTCTATGCC-3') (SEQ ID NO. 17)完成了犬埃里希体 p28-7 基因的 PCR 扩增, 得到 518bp 的 PCR 产物。用引物 793 和 1330 扩增犬埃里希体 DNA, 热循环方案为 95°C 2 分钟, 95°C 30 秒、62°C 1 分钟、72°C 2 分钟的 30 轮循环, 然后 72°C 延伸 10 分钟, 保持在 4°C。通过直接用引物 793 和 1330 对产物测序获得犬埃里希体 PCR 产物的核酸序列。
- 20 序列分析揭示有一个编码 170 个氨基酸的蛋白质的开放阅读框, 犬埃里希体 PCR 扩增获得的 518bp 序列和恰菲埃里希体 p28 基因的 DNA 序列的排列对比, 揭示 70%以上的相似性, 表明这些基因是同源的。

用引物 394 和 793C 进行接头 PCR, 以确定全基因序列的 5'和 3'区段。引物 394 产生 4 种 PCR 产物(3kb、2kb、1 拷贝和 0.8kb), 对 0.8kb 的产物用引物 394

25 和 AP1 进行双向测序。推测的序列与 518bp 产物的 3'末端重叠, 将开放阅读框延伸 12 个 bp 至终止密码子。还对 p28-7 基因 3'末端的另一个 625bp 非编码序列进行了测序。

用引物 394C 和提供的引物 AP1 扩增 p28-7 基因的 5'末端。这些引物扩增得到 3 种 PCR 产物(3.3、3-kb 和 2kb)。用引物 793C 对 2-kb 片段进行单向测序。序

列提供了 p28-7 基因的推测的起始密码子, 并完整了编码 278 个氨基酸的蛋白质的 834bp 开放阅读框。产生 p28-7 基因 5'非编码区的其它 144bp 的可阅读序列。从邻近 p28-7 基因的互补非编码区设计引物 EC28OM-F 和 EC28OM-R。

用相同引物直接对用这些引物扩增的 PCR 产物进行测序。图 1 显示了犬埃里希体 p28-7 基因(SEQ ID NO:1)的完整 DNA 序列。用这些引物扩增的 p28-7 PCR 片段含有整个开放阅读框和来自 5'非编码引物区的 17 个其它氨基酸。将基因直接亚克隆入 pThioHis 表达载体, 并用该构建物转化大肠杆菌 BL21。表达的 p28-7 硫氧还蛋白融合蛋白是不可溶的。表达的蛋白质具有与硫氧还蛋白结合的另 114 个氨基酸, 5 个氨基酸是肠激酶识别位点, 32 个氨基酸来自多克隆位点和 N-末端的 5'非编码引物区。来自犬埃里希体感染的犬恢复期抗血清识别表达的重组融合蛋白, 但不和硫氧还蛋白对照反应(图 2)。

实施例 3

犬埃里希体 p28-7 基因的序列同源性

用 Clustal 法排列对比了犬埃里希体 p28-7(834bp)和包括信号序列的恰菲埃里希体 omp-1 基因家族(p28-7、omp-1A、B、C、D、E 和 F)的核酸序列, 以检测这些基因之间的同源性(排列未显示)。在犬埃里希体 p28-7、恰菲埃里希体 p28 和 omp-1F 之间核酸同源性相等保守(68.9%)。恰菲埃里希体 omp-1 家族中的其它推定的外膜蛋白基因, omp-1D(68.2%)、omp-1E(66.7%)、omp-1C(64.1%)、反刍类考德里氏体 map-1(61.8%)、犬埃里希体 28kDa 蛋白 1 基因(60%)和 28kDa 蛋白 2 基因(部分)(59.5%)也与 p28-7 是同源的。恰菲埃里希体 omp-1B 与犬埃里希体 p28-7 的核酸同源性(45.1%)最少。

犬埃里希体 p28-7(SEQ ID NO:2)和恰菲 P28 的预测氨基酸序列的排列对比, 揭示了导致 4 个可变区(VR)的氨基酸取代。鉴定了犬埃里希体 P28-7 和恰菲埃里希体 OMP-1 家族可变区的氨基酸序列和位置中的取代或缺失(图 3)。包括信号肽的氨基酸比较揭示, 犬埃里希体 P28-7 与恰菲埃里希体 OMP-1 家族的 OMP-1F 具有最高的同源性(68%), 然后是恰菲 P28(65.5%)、OMP-1E(65.1%)、OMP-1D(62.9%)、OMP-1C(62.9%)、反刍类考德里氏体 MAP-1(59.4%)、犬埃里希体 28kDa 蛋白质 1(55.6%)和 28kDa 蛋白质 2(部分)(53.6%)和 OMP-1B(43.2%)。基于氨基酸序列的系统发生关系显示, 犬埃里希体 P28-7 和反刍类考德里氏体 MAP-1、恰菲

埃里希体 OMP-1 蛋白以及犬埃里希体 28kDa 蛋白 1 和 2(部分)是相关的(图 4)。

实施例 4

犬埃里希体 P28-7 的预测的表面可能性和免疫反应性

用疏水和亲水概况图分析犬埃里希体 P28-7, 预测 P28-7 上的表面暴露区域(图 5 6)。在犬埃里希体 P28-7 中鉴定出 8 个含有 3-9 个氨基酸的主要表面暴露区域, 与恰菲埃里希体 P28 上的表面暴露区域的情况相似(图 6)。犬埃里希体 P28-7 上较大的表面暴露区域中的 5 个, 位于蛋白质的 N 末端区域。在犬埃里希体 P28-7 的全部 4 个可变区中发现了表面暴露的亲水区域。用 Rothbard-Taylor 算法(Rothbard 和 Taylor, 1988)在 P28-7 中预测了 10 个 T-细胞基序, 用 Jameson-Wolf 抗原性算法(图 6) (Jameson 和 Wolf, 1988)预测了犬埃里希体 P28-7 的高抗原性。在犬埃里希体 P28-7 和恰菲埃里希体 P28 之间观察到抗原性和 T-细胞基序的相似性。

实施例 5

犬埃里希体 p28-7 基因同源基因组拷贝的检测

用限制性酶 *BanII*, *EcoRV*, *HaeII*, *KpnI*, *SpeI*(在 p28-7 基因中没有限制性内切酶位点)和 *AseI*(在核苷酸 34、43 和 656 有内部限制性内切酶位点)分别完全消化犬埃里希体 DNA, 进行基因组 Southern 印迹分析, 揭示存在至少 3 种同源 p28-7 基因拷贝(图 5)。虽然犬埃里希体 p28-7 具有内部 *AseI* 内部限制位点, 用于杂交实验的 DIG-标记的探针针对 *AseI* 消化基因产生的一个 DNA 片段内的基因区。用 *AseI* 消化产生 3 个条带(约 566bp、850bp 和 3kb), 它们与 p28-7DNA 探针杂交, 表示基因组中存在与 p28-7 同源的多基因。用 *EcoRV* 和 *SpeI* 消化, 产生与 p28-7 基因探针杂交的两个条带。

实施例 6

犬埃里希体 ECa28SA2(p28-5)、ECa28SA3(p28-6)的 PCR 扩增

多基因基因座的基因和鉴定

为了特异性扩增 ECa28SA2(p28-5)下游的可能未知基因, 用对 p28-5 特异性的引物 46f(5'-ATATACTTCCTACCTAATGTCTCA-3', SEQ ID No. 18)和引物 1330(SEQ ID NO:17)进行扩增, 1330 针对 p28-7 基因 3'末端的保守区。凝胶纯化扩增产物, 克隆入 TA 克隆载体(Invitrogen, Santa Clarita, CA)。对克隆进行双向测序, 使用引物: 来自载体的 M13 反向、46f、ECa28SA2 (5'-

AGTGCAGAGTCTTCGGTTTC-3', SEQ ID No. 19), *Eca5.3* (5'-GTTACTTGCGGAGGACAT-3', SEQ ID No. 20)。用热循环方案 95°C 2 分钟, 30 轮的 95°C 30 秒, 48°C 1 分钟, 72°C 1 分钟, 然后 72°C 延伸 10 分钟, 维持在 4°C。

用这些引物扩增得到一含有 2 个开放阅读框的 2-kb PCR 产物。第一个开放
5 阅读框含有 p28-5 基因的已知区域和该基因先前未测序的 3' 部分。在 p28-5 下游发现另一个不相同, 但同源的 28kDa 蛋白基因, 称为 *Eca28SA3*(p28-6)。

用对应于 p28-6 内区域的特异性引物, 称为 *EcaSA3-2* (5'-CTAGGATTA
GGTTATAGTATAAGTT-3', SEQ ID No. 26) 和与 p28-7 内某区域退火的引物
793C (SEQ ID NO: 23) 扩增基因 p28-6 和 p28-7 之间的基因间区。用热循环方案 95
10 °C 2 分钟, 30 轮的 95°C 30 秒, 48°C 1 分钟, 72°C 1 分钟, 然后 72°C 延伸 10 分钟,
维持在 4°C 扩增 DNA。

扩增得到一 800bp PCR 产物, 它含有 p28-6 的 3' 末端, p28-6 和 p28-7 (28NC3)
之间的基因间区, 和 p28-7 的 5' 末端, 与先前分离的基因座连接 (图 8)。p28-5 的 849bp
的开放阅读框编码 283 氨基酸蛋白, p28-6 具有编码 280 个氨基酸蛋白质的 840bp
15 开放阅读框。p28-6 和 p28-7 之间的基因间非编码区域长 345bp (图 7 和 8)。

实施例 7

犬埃里希体 p28-4、p28-5、p28-6、p28-7 和 p28-8 蛋白质的核酸和氨基酸同
源性

用 Clustal 法排列对比了全部 5 种犬埃里希体 28kDa 蛋白质基因的核酸和氨
20 基酸序列, 以检测这些基因之间的同源性。核酸同源性是 58-75%, 在犬埃里希体
28-kDa 蛋白质基因成员之间观察到 67-72% 相似的氨基酸同源性。

转录启动子区域

通过与共有的大肠杆菌启动子区和恰菲埃里希体的启动子比较, 分析 28kDa
蛋白质基因之间的基因间区的启动子序列 (Yu 等, 1997; McClure, 1985)。在对应于
25 基因 p28-5、p28-6、p28-7 和 p28-8 (*Eca28-2*) 的 4 个基因间序列中鉴定出推定的启
动子序列, 包括 RBS, -10 和 -35 区 (图 10)。p28-4 (*Eca28SA1*) 的上游非编码区是
未知的, 没有分析。

N-末端信号序列

氨基酸序列分析揭示, 全长犬埃里希体 p28-7 具有 30.5kDa 的推测分子量,

整个 p28-6 具有 30.7kDa 的推测分子量。两条蛋白质具有 23 个氨基酸的推测 N-末端信号肽(MNCKKILITTALMSLMYYAPSSIS, SEQ ID No. 27), 与恰菲埃里希体 P28(MNYKKILITSALISLISSLPGV SFS, SEQ ID NO. 28), 和 OMP-1 蛋白家族预测的相似(Yu 等, 1999a; Ohashi 等, 1998b)。

- 5 在 p28-7 的氨基酸 21、22 和 23 处发现信号肽酶的优选切割位点(SIS; Ser-X-Ser) (Oliver, 1985)。在氨基酸位置 25 处还存在另一个推定的切割位点 (MNCKKILITTALISLMYSIPSIS SFS, SEQ ID NO. 29), 与恰菲埃里希体 P28 的预测切割位点(SFS)相同, 这导致具有 27.7kDa 预测分子量的成熟 p28-7。预测 p28-5 先前报道的部分序列的信号切割位点在氨基酸 30。然而, 信号序列分析预测 p28-
10 4 具有不可切割的信号序列。

总结

- 从包括犬埃里希体、恰菲埃里希体、反刍类考德里氏体的多个立克次氏体鉴定并克隆了具有相似分子量的蛋白质(Reddy 等, 1998; Jongejan 等, 1993; Ohashi 等, 1998)。先前描述了恰菲埃里希体中具有 6 个同源 p28 基因的一个基因座, 和犬埃
15 里希体中的 2 个基因座, 各含有一些同源 28kDa 蛋白质基因。

- 本发明显示了与恰菲埃里希体 omp-1 多基因家族以及反刍类考德里氏体 map-1 基因同源的犬埃里希体编码成熟 28-kDa 蛋白质的基因的克隆、表达和特征确定。鉴定出两种新的 28kDa 蛋白质基因 p28-7 和 p28-6。在本发明中对于另一种犬埃里希体 28kDa 蛋白质基因, 先前部分测序(Reddy 等, 1998)的 p28-5 完全测
20 序。还公开了含有 5 种犬埃里希体 28kDa 蛋白质基因(p28-4、p28-5、p28-6、p28-7 和 p28-8)的犬埃里希体中的一个基因座的鉴定和特征确定。

- 犬埃里希体 28kDa 蛋白质与恰菲埃里希体 OMP-1 家族以及反刍类考德里氏体 MAP-1 蛋白是同源的。最同源的犬埃里希体 28kDa 蛋白(p28-6、p28-7 和 p28-8)在该基因座中依次排列。这些蛋白质的同源性是 67.5-72.3%。这些 28kDa 蛋白
25 质中的趋多样是 27.3-38.6%。犬埃里希体 28kDa 蛋白质 p28-4 和 p28-5 同源性最小, 为 50.9-59.4%, 多样性是 53.3-69.9%。基因间的不同主要在于 4 个超变区, 提示这些区域是表面暴露的, 受到免疫系统的选择压力。报道了 p28-7 在 7 种犬埃里希体分离物中的保守性(McBride 等, 1999), 提示犬埃里希体在北美可能是纯系的。相反, 报道了恰菲埃里希体中 p28 的显著多样性(Yu 等, 1999a)。

全部犬埃里希体 28kDa 蛋白质似乎是从 30kD 蛋白质翻译后加工成成熟 28kD 蛋白的。近来,在恰菲埃里希体 P28 上鉴定出一条信号序列(Yu 等, 1999a), N-末端氨基酸测序证实,蛋白质翻译后加工,切下信号序列产生成熟蛋白(Ohashi 等, 1998)。OMP-1F 和 OMP-1E 的前导序列已被提出是前导信号肽(Ohashi 等, 1998)。

5 在恰菲埃里希体 OMP-1F、OMP-1E 和 P28 上鉴定的信号序列与犬埃里希体 28kDa 蛋白的前导序列是同源的。p28 基因的启动子序列未被实验所确定,但通过与 RBS、大肠杆菌和其它埃里希体的-10 和-35 启动子区的共有序列比较,鉴定了可能的启动子区(Yu 等, 1997; McClure, 1985)。这些启动子区将使每个基因可能被转录和翻译,提示这些基因可以在宿主中差异表达。在犬中持续感染可能与 p28

10 基因的差异表达有关,导致体内抗原改变,因此使生物规避免疫应答。

发现犬埃里希体 28kDa 蛋白基因显示与恰菲埃里希体 omp-1 基因家族和反刍类考德里氏体 map-1 基因的核酸和氨基酸序列同源性。先前研究已证明犬埃里希体 30kDa 蛋白,它与针对恰菲埃里希体的恢复期抗血清反应,但相信抗原是不同的(Rikihisa 等, 1994)。根据犬埃里希体 28kDa 蛋白质 4 个可变区中氨基酸取代比较所得发现,支持该可能性。这些发现一起提示负责犬埃里希体和恰菲埃里希体

15 P28 之间的抗原差异的氨基酸位于这些可变区中,可轻易接触免疫系统。

报道了免疫反应性肽位于反刍类考德里氏体、恰菲埃里希体、犬埃里希体 28kDa 蛋白的可变区中(Reddy 等, 1998)。犬埃里希体和恰菲 P28 的分析揭示,所有可变区具有预测的表面暴露的氨基酸。在犬中的研究显示,缺乏犬埃里希体和

20 恰菲埃里希体的交叉保护(Dawson 和 Ewing, 1992)。该观察可能与这些埃里希体品种的 P28 可变区中以及其它免疫学重要抗原的抗原性差异有关。另一个研究发现,恰菲埃里希体感染的病人的恢复期人抗血清识别恰菲埃里希体的 29/28kDa 蛋白,也与犬埃里希体的同源蛋白质反应(Chen 等, 1997)。犬埃里希体 28kDa 蛋白和恰菲埃里希体 P28 上的同源和交叉反应性表位似乎被免疫系统识别。

25 犬埃里希体 28kDa 蛋白可能是重要的免疫保护性抗原。几个报道证明,犬埃里希体的 30kDa 抗原显示强免疫反应性(Rikihisa 等, 1994; Rikihisa 等, 1992)。人和犬恢复期抗血清中的抗体与恰菲埃里希体和犬埃里希体的该大小范围内的蛋白质反应,提示它们可能是重要的免疫保护性抗原(Rikihisa 等, 1994; Chen 等, 1994; Chen 等, 1997)。另外,针对 30、24 和 21kDa 蛋白的抗体在对犬埃里希体

的免疫应答中很早产生(Rikihisa 等, 1994; Rikihisa 等, 1992), 提示这些蛋白质可能在疾病急性阶段的免疫应答中尤其重要。近来, 在恰菲埃里希体中鉴定出分子量为 28kDa 的编码外膜蛋白的同源基因家族, 用重组恰菲埃里希体 P28 的免疫小鼠产生针对同源攻击的免疫力(Ohashi 等, 1998)。恰菲埃里希体 P28 被证明存在于外膜, 免疫电子显微镜将 P28 定位在该微生物的表面, 因此提示它可能作为粘附素起作用(Ohashi 等, 1998)。可能在研究中鉴定的恰菲埃里希体的 28kDa 蛋白具有相同的位置, 可能起到相同作用。

不同犬埃里希体株 p28-7 的比较揭示, 该基因明显完全保守。用恰菲埃里希体的研究显示多样性的免疫学和分子证据。恰菲埃里希体感染的病人具有对 29/28kDa 蛋白质可变化的免疫反应性, 提示其具有抗原多样性(Chen 等, 1997)。近来已产生了分子证据, 支持恰菲埃里希体 p28 基因中有抗原多样性(Yu 等, 1999a)。5 种恰菲埃里希体分离物中的比较, 揭示两种分离物(Sapulpa 和 St. Vincent)是 100%相同的, 但其它三种(Arkansas, Jax, 91HE17)具有多样性, 在氨基酸水平上达 13.4%。犬埃里希体 p28-7 的保守提示, 美国发现的犬埃里希体株是基因相同的, 因此犬埃里希体 28kDa 蛋白是美国犬埃里希体病的吸引人的候选疫苗。美国以外的其它犬埃里希体分离物可提供关于犬埃里希体起源和进化的信息。28kDa 蛋白的保守性使它成为可靠血清诊断犬埃里希体病的重要的候选试剂。

现在还知道多种同源基因的作用; 然而, 犬中犬埃里希体的持续感染可能与由于同源 28kDa 蛋白基因表达变化导致的抗原性改变相关, 因此使犬埃里希体能规避免疫监视。msp-3 基因在着边无形体中的变化部分引起 MSP-3 蛋白的改变, 导致持续感染(Alleman 等, 1997)。检测急性和慢性感染犬中犬埃里希体 28kDa 蛋白基因表达的研究, 可提供 28kDa 蛋白基因家族在感染持续中的作用的理

实施例 8

犬埃里希体 p28-1、p28-2、p28-3 和 p28-9 基因的鉴定

25 通过为 *p28-1* (ECa28-75C)和 *p28-5* (ECa28-5-818f)设计的基因特异性引物, 双向延伸 p28 基因座, 对上述串联排列的 p28 基因的 5 个基因座的 DNA 上游和下游的未知区域进行测序。进行多基因步查如下获得未知序列: 用引物 p28-5-818f (5'-TTA AAC ATA TGC CAC TTC GGA CTA-3', SEQ ID No. 34)扩增 5 个基因座 1.9kp 下游, 并测序, 产生 900bp 的扩增子, 用 1191 (5'-TAT GAT CGT GTA AAA

TTG CTG TGA GTA T-3', SEQ ID No. 35), 产生 1kb 的扩增子。用引物 ECa28-75C (5'-TAC TGG CAC GTG CTG GAC TA-3', SEQ ID No. 36)对 5 个基因座 DNA 上游的 3.67kbp 进行扩增和测序,产生 1.6kbp 扩增子;用 ECa5'-1600 (5'-CAC CAA TAA ATG CAG AGA CTT C-3', SEQ ID No. 37), 产生 1.6kbp 扩增子;用 3125 (5'-AAT
5 CCA TCA TTT CTC ATT ACA GTG TG-3', SEQ ID No. 38), 产生 800bp 扩增子。
9 个串联排列基因的该基因座含有 4 个新的 p28 基因和上述 5 个 p28 基因, 命名为 p28-1 到 p28-9(图 11)。

用 Clustal 法排列对比了犬埃里希体 p28 基因的核酸和氨基酸序列, 以检测这些基因之间的同源性。这些蛋白质的同源性为 67.5-75%, 这些 P28 蛋白中的多样性
10 性为 26.9-38%。犬埃里希体 P28 蛋白 P28-1、P28-2 和 P28-9 与其它 p28 基因同源性最小, 为 37-49%, 多样性为 53-77%。9 个 p28 基因的核酸同源性是 28-72%。
图 12 显示了基于犬埃里希体 p28 氨基酸序列的系统发生关系。

核苷酸序列和登录号

完全的 9 基因犬埃里希体(Jake 株)p28 基因座的核酸和氨基酸序列的 GenBank
15 登录号是 AF082744。该登录号原来是给 p28-7 的, 但已用 9 基因 p28 基因座的序列, 包括 p28-7 更新。本研究中描述的其它犬埃里希体分离物的 p28-7 的核酸和氨基酸序列的 GenBank 登录号是: Louisiana, AF082745; Oklahoma, AF082746; Demon, AF082747; DJ, AF082748; Fuzzy, AF082749; Florida, AF082750。

用犬埃里希体感染的犬的恢复期血清的免疫印迹观察到 28kDa 范围内的许多
20 条带(Rikihisa 等, 1994), 多个 p28 蛋白的表达可能是该观察结果的解释。Southern 印迹研究提示, 基因组中除了该基因座中的 5 个成员外, 存在其它 p28 基因(McBride 等, 1999; Ohashi 等, 1998b)。

在该研究中, 鉴定出含有编码同源性, 但非相同的 p28 基因的 9 个串联排列的犬埃里希体 p28 基因的一个基因座。9 个基因的基因座包括 4 个新 p28 基因(图
25 13-16)和上述报道的 5 个串联排列的 p28 基因。8 个 p28 基因位于一条 DNA 链上, 一个 p28 基因在互补链上。9 个 p28 基因成员中核酸同源性是 37-75%, 氨基酸同源性是 28-72%。

发现犬埃里希体 P28 与其它物种, 例如恰菲埃里希体的 28kDa 蛋白像其与自身一样密切相关(McBride 等, 2000)。发现蛋白质中的区别主要在几个主要超变区

中,提示这些区域是表面暴露的,受到免疫系统的选择压力(McBride等,2000)。

报道了7种地理学上不同的分离物中犬埃里希体 p28 基因(p28-7)的保守性(McBride等,1999),提示犬埃里希体在北美可能是高度保守的。类似的,犬埃里希体的 120kDa 糖蛋白在美国的分离物中也是保守的(Yu等,1997)。相反,恰菲埃里希体的 120kDa 和 28kDa 蛋白质基因在分离物中是多样的(Yu等,1999a; Chen等,1997)。恰菲埃里希体 28kDa 蛋白质基因的多样性似乎是由于超变区中的点突变所致,该突变可能是由于选择性免疫压力(Yu等,1999a)。这些资料提示犬埃里希体可能是较近被引入北美的,这可能是分离物中观察到的保守的原因。犬埃里希体分离物中 p28 基因的保守可提供机会来开发疫苗和血清诊断性抗原,它们对于疾病预防和血清诊断将特别有效。P28 的混合物可提供最可靠的血清诊断试验,但用一种 P28 血清诊断对于免疫诊断是有用的(Ohashi等,1998b; McBride等,1999)。

本文引用了下列文献

- Alleman A.R.等,(1997) *Infect Immun* 65: 156-163.
- 15 Anderson B.E.等,(1991) *J Clin Microbiol* 29: 2838-2842.
- Anderson B.E.等,(1992) *Int J Syst Bacteriol* 42: 299-302.
- Brouqui P.等,(1992) *J Clin Microbiol* 30: 1062-1066.
- Chen S.M.等,(1997) *Clin Diag Lab Immunol* 4: 731-735.
- Chen S.M.等,(1994) *Am J Trop Med Hyg* 50: 52-58.
- 20 Dawson J.E.等,(1992) *Am J Vet Res* 53: 1322-1327.
- Dawson J.E.等,(1991) *J Infect Dis* 163: 564-567.
- Donatien 等,(1935) *Bull Soc Pathol Exot* 28: 418-9.
- Ewing,(1963) *J Am Vet Med Assoc* 143: 503-6.
- Groves M.G.等,(1975) *Am J Vet Res* 36: 937-940.
- 25 Harrus S.等,(1998) *J Clin Microbiol* 36: 73-76.
- Jameson B.A.等,(1988) *CABIOS* 4: 181-186.
- Jongejan F.等,(1993) *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 46: 145-152.
- McBride J.W.等,(1996) *J Vet Diag Invest* 8: 441-447.
- McBride 等,(1999) *Clin Diagn Lab Immunol*. 6: 392-399.

- McBride 等, (2000) *Gene* ;出版中
- McClure, (1985) *Ann Rev Biochem* 54: 171-204.
- McGeoch D.J. (1985) *Virus Res* 3: 271-286.
- Nyindo M.等, (1991) *Am J Vet Res* 52: 1225-1230.
- 5 Nyindo 等, (1971) *Am J Vet Res* 32: 1651-58.
- Ohashi 等, (1998a) *Infect Immun* 66: 132-9.
- Ohashi 等, (1998b) *J Clin Microb* 36: 2671-80
- Reddy 等, (1998) *Biochem Biophys Res Comm* 247: 636-43.
- Rikihisa 等, (1994) *J Clin Microbiol* 32: 2107-12.
- 10 Rothbard J.B.等, (1988) *The EMBO J*7: 93-100.
- Sambrook J.等, (1989) *于 Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
- Sulsona 等, (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 300-305.
- Troy G.C.等, (1990) *Canine ehrlichiosis.* 于 *Infectious diseases of the dog and cat .*
- 15 Green C.E. (ed). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- von Heijne, (1986) *Nucl Acids Res* 14: 4683-90.
- Walker 等, (1970) *J Am Vet Med Assoc* 157: 43-55.
- Weiss E.等, (1975) *Appl Microbiol* 30: 456-463.
- Yu 等, (1993) *J. Clin. Microbiol.* 31: 3284-3288.
- 20 Yu 等, (1997) *Gene* 184: 149-154.
- Yu 等, (1999a) *J. Clin. Microbiol.* 37: 1137-1143.
- Yu 等, (2000) *Gene* 248: 59-68.

本说明书提到的任何专利或出版物指出了本发明涉及的领域中技术人员的水平。这些专利和出版物在此引入以供参考，程度相同，如同各独立出版物是特别

25 和单独表明引入以供参考的一样。

本领域技术人员将易于理解，本发明适用于实施提到的目的和获得提到的结果和优点，以及与之相关的。本文描述的实施例、方法、程序、处理、分子和特定的化合物以优选例为代表，是示范性的，而不意味着限制本发明的范围。本领域技术人员对其中所作的改变和其它用途都将包括在权利要求所述的本发明的范

30 围内。

- <110> D.H.沃克(Walker, David H.)
J.W.麦克布里奇(McBride, Jere W.)
于学杰(Yu, Xue-Jie)
- <120> 犬埃里希体的同源 28kD 免疫优势蛋白质基因及其用途
- <130> D6152CIP2/PCT
- <141> 2001-09-12
- <150> 09/660,587
- <151> 2000-09-12
- <160> 46
- <210> 1
- <211> 1607
- <212> DNA
- <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)
- <220> .
- <223> 犬埃里希体 p28-7 核酸序列
- <400> 1
- ```

atattatatta ttaccaatct tatataatat attaaatttc tcttacaaaa 50
atctctaattg ttttataacct aatatatata ttctggcttg tatctacttt 100
gcaactccac tattgttaat ttattttcac tattttaggt gtaatatgaa 150
ttgcaaaaaa attcttataa caactgcatt aatatcatta atgtactcta 200
ttccaagcat atctttttct gatactatac aagatggtaa catgggtggt 250
aacttctata ttagtggaag gtagtgacca agtgtctcac attttggtag 300
cttctcagct aaagaagaaa gcaaatcaac tgttgagatt tttggattaa 350
aacatgattg gtagtggaag ccaatactta agaataaaca cgctgacttt 400
actgttccaa actattcgtt cagatacgag aacaatccat ttctagggtt 450
tgcaggagct atcgttact caatgggtgg cccaagaata gaattcgaaa 500
tatcttatga agcattcgac gtaaaaagtc ctaatatcaa ttatcaaaat 550
gacgcgcaca ggtactgcgc tctatctcat cacacatcg cagccatgga 600
agctgataaa tttgtcttct taaaaaacga aggggttaatt gacatatcac 650
ttgcaataaa tgcatgttat gatataataa atgacaaagt acctgtttct 700
ccttatatat gcgcaggtat tggtagctgat ttgatttcta tgtttgaagc 750
tacaagtctt aaaatttctt accaaggaaa actgggcatt agttactcta 800
ttaatccgga aacctctggt ttcateggtg ggcatttcca caggatcata 850
gtagaatgag ttagagatat tctgcaata gtacctagta actcaactac 900
aataagtgga ccacaatttg caacagtaac actaaatgtg tgtcactttg 950
gtttagaact tggaggaaga ttttaacttct aattttattg ttgccacata 1000
ttaaaaatga tctaacttgg tttttawtat tgctacatac aaaaaaagaa 1050
aaatagtgcc aaaagaatgt agcaataaga gggggggggg ggaccaaat 1100
tatcttctat gcttcccaag ttttttcygc ctatttatga cttaaacac 1150
agaaggtaat atcctcacgg aaaacttata ttcaaatatt ttatttatta 1200
ccaatcttat ataataatatt aaatttctt tacaanaatc actagtattt 1250
tataccaaaa tatatattct gacttgcttt tcttctgcac ttctactatt 1300
tttaatttat ttgtcactat taggttataa taawatgaat tgcmaaagat 1350
ttttcatagc aagtgcattg atatactaa tgtctttctt acctagcgta 1400
tctttttctg aatcaataca tgaagataat ataaatggta actttttacat 1450
tagtgcaaag tatatgccaa gtgcctcaca ctttggcgta ttttcagtta 1500

```

aagaagagaa aaacacaaca actggagttt tcggattaaa acaagattgg 1550  
gacggagcaa cactaaagga tgcaagcwgc agccacacaw tagaccaag 1600  
tacaatg 1607

<210> 2

<211> 278

<212> PRT

<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>

<223> 犬埃里希体 p28-7 蛋白氨基酸序列

<400> 2

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

<210> 3

<211> 849

<212> DNA

<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>

<221> mat\_peptide

<223> p28-5 的核酸序列

<400> 3

```

atgaattgta aaaaagtttt cacaataagt gcattgatat catccatata 50
cttcctacct aatgtctcat actctaacce agtatatggt aacagtatgt 100
atggtaattt ttacatatca ggaaagtaca tgccaagtgt tcctcatttt 150
ggaatttttt cagctgaaga agagaaaaaa aagacaactg tagtatatgg 200
cttaaaagaa aactgggcag gagatgcaat atctagtcaa agtccagatg 250
ataattttac cattcgaat tactcattca agtatgcaag caacaagttt 300
ttagggtttg cagtagctat tggttactcg ataggcagtc caagaataga 350
agttgagatg tcttatgaag catttgatgt gaaaaatcca ggtgataatt 400
acaaaaacgg tgcttacagg tatttgtcct tatctcatca agatgatgcg 450
gatgatgaca tgactagtgc aactgacaaa ttgtatatt taattaatga 500
aggattactt aacatatcat ttatgacaaa catatgttat gaaacagcaa 550
gcaaaaatat acctctctct cttacatat gtgcaggat tggtactgat 600
ttaattcaca tgtttgaaac tacacatcct aaaatttctt atcaaggaaa 650
gctagggttg gcctacttcg taagtgcaga gtcttcggtt tcttttggtg 700
tatattttca taaaattata aataataagt taaaaaatgt tccagccatg 750
gtacctatta actcagacga gatagtagga ccacagttg caacagtaac 800
attaaatgta tgctactttg gattagaact tggatgtagg ttcaacttc 849

```

<210> 4

<211> 283

<212> PRT

<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>

<223> p28-5 蛋白的氨基酸序列

<400> 4

```

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

```

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

<210> 5  
 <211> 840  
 <212> DNA  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <223> p28-6 的核酸序列

<400> 5  
 atgaattgca aaaaaattct tataacaact gcattaatgt cattaatgta 50  
 ctatgctcca agcatatctt tttctgatac tatacaagac gataacactg 100  
 gtagcttcta catcagtgga aaatatgtac caagtgtttc acattttggt 150  
 gttttctcag ctaaagaaga aagaaactca actggtggag tttttggatt 200  
 aaaacatgat tggaatggag gtacaatadc taactcttct ccagaaaata 250  
 tattcacagt tcaaaattat tcgtttaaat acgaaaacaa cccattctta 300  
 gggtttcgag gagctattgg ttattcaatg ggtggcccaa gaatagaact 350  
 tgaagtcttg tacgagacat tcgatgtgaa aaatcagaac aataattata 400  
 agaacggcgc acacagatac tgtgctttat ctcatcatag ttcagcaaca 450  
 agcatgtcct cgcgaagtaa caaatttggt ttcttaaaaa atgaagggtt 500  
 aattgactta tcatttatga taaatgcatg ctatgacata ataattgaag 550  
 gaatgccttt ttcaccttat atttgtgcag gtggttggtac tgatgtgtt 600  
 tccatgtttg aagctataaa tcctaaaatt tcttaccag gaaaactagg 650  
 attaggttat agtataagtt cagaagcctc tgttttatc ggtggacact 700  
 ttcacagagt cataggtaat gaatttagag acatccctgc tatggttctt 750  
 agtggatcaa atcttccaga aaaccaattt gcaatagtaa cactaaatgt 800  
 gtgtcacttt ggcatagaac ttggaggaag atttaacttc 840

<210> 6  
 <211> 280  
 <212> PRT  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <223> p28-6 蛋白的氨基酸序列

&lt;400&gt; 6

```

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

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; PRT

<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; p28-5 蛋白的部分氨基酸序列

&lt;400&gt; 7

```

Met Asn Cys Lys Lys Val Phe Thr Ile Ser Ala Leu Ile Ser Ser
 5 10 15
Ile Tyr Phe Leu Pro Asn Val Ser Tyr Ser Asn Pro Val Tyr Gly
 20 25 30
Asn Ser Met Tyr Gly Asn Phe Tyr Ile Ser Gly Lys Tyr Met Pro
 35 40 45

```

Ser Val Pro His Phe Gly Ile Phe Ser Ala Glu Glu Glu Lys Lys  
 50 55 60  
 Lys Thr Thr Val Val Tyr Gly Leu Lys Glu Asn Trp Ala Gly Asp  
 65 70 75  
 Ala Ile Ser Ser Gln Ser Pro Asp Asp Asn Phe Thr Ile Arg Asn  
 80 85 90  
 Tyr Ser Phe Lys Tyr Ala Ser Asn Lys Phe Leu Gly Phe Ala Val  
 95 100 105  
 Ala Ile Gly Tyr Ser Ile Gly Ser Pro Arg Ile Glu Val Glu Met  
 110 115 120  
 Ser Tyr Glu Ala Phe Asp Val Lys Asn Gln Gly Asn Asn  
 125 130

<210> 8

<211> 287

<212> PRT

<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>

<223> p28-4 蛋白的氨基酸序列

<400> 8

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

|                                                             |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                             | 245 | 250 | 255 |
| Leu Pro Asp Gly Ser Asn Ile Lys Val Gln Gln Ser Ala Thr Val |     |     |     |
|                                                             | 260 | 265 | 270 |
| Thr Leu Asp Val Cys His Phe Gly Leu Glu Ile Gly Ser Arg Phe |     |     |     |
|                                                             | 275 | 280 | 285 |
| Phe Phe                                                     |     |     |     |

<210> 9  
 <211> 281  
 <212> PRT  
 <213> 恰菲埃里希体(*Ehrlichia chaffeensis*)

<220>  
 <223> 恰菲埃里希体 P28 的氨基酸序列

<400> 9  
 Met Asn Tyr Lys Lys Val Phe Ile Thr Ser Ala Leu Ile Ser Leu  
                   5                  10                  15  
 Ile Ser Ser Leu Pro Gly Val Ser Phe Ser Asp Pro Ala Gly Ser  
                   20                  25                  30  
 Gly Ile Asn Gly Asn Phe Tyr Ile Ser Gly Lys Tyr Met Pro Ser  
                   35                  40                  45  
 Ala Ser His Phe Gly Val Phe Ser Ala Lys Glu Glu Arg Asn Thr  
                   50                  55                  60  
 Thr Val Gly Val Phe Gly Leu Lys Gln Asn Trp Asp Gly Ser Ala  
                   65                  70                  75  
 Ile Ser Asn Ser Ser Pro Asn Asp Val Phe Thr Val Ser Asn Tyr  
                   80                  85                  90  
 Ser Phe Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Phe Leu Gly Phe Ala Gly Ala  
                   95                  100                 105  
 Ile Gly Tyr Ser Met Asp Gly Pro Arg Ile Glu Leu Glu Val Ser  
                  110                 115                 120  
 Tyr Glu Thr Phe Asp Val Lys Asn Gln Gly Asn Asn Tyr Lys Asn  
                  125                 130                 135  
 Glu Ala His Arg Tyr Cys Ala Leu Ser His Asn Ser Ala Ala Asp  
                  140                 145                 150  
 Met Ser Ser Ala Ser Asn Asn Phe Val Phe Leu Lys Asn Glu Gly  
                  155                 160                 165  
 Leu Leu Asp Ile Ser Phe Met Leu Asn Ala Cys Tyr Asp Val Val  
                  170                 175                 180  
 Gly Glu Gly Ile Pro Phe Ser Pro Tyr Ile Cys Ala Gly Ile Gly  
                  185                 190                 195  
 Thr Asp Leu Val Ser Met Phe Glu Ala Thr Asn Pro Lys Ile Ser  
                  200                 205                 210  
 Tyr Gln Gly Lys Leu Gly Leu Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Glu Ala  
                  215                 220                 225  
 Ser Val Phe Ile Gly Gly His Phe His Lys Val Ile Gly Asn Glu  
                  230                 235                 240  
 Phe Arg Asp Ile Pro Thr Ile Ile Pro Thr Gly Ser Thr Leu Ala  
                  245                 250                 255  
 Gly Lys Gly Asn Tyr Pro Ala Ile Val Ile Leu Asp Val Cys His  
                  260                 265                 270  
 Phe Gly Ile Glu Leu Gly Gly Arg Phe Ala Phe  
                  275                 280



## &lt;223&gt; 恰菲埃里希体 OMP-1C 的氨基酸序列

&lt;400&gt; 11

```

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

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 286

&lt;212&gt; PRT

<213> 恰菲埃里希体 (*Ehrlichia chaffeensis*)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 恰菲埃里希体 OMP-1D 的氨基酸序列

&lt;400&gt; 12

```

Met Asn Cys Glu Lys Phe Phe Ile Thr Thr Ala Leu Thr Leu Leu
 5 10 15
Met Ser Phe Leu Pro Gly Ile Ser Leu Ser Asp Pro Val Gln Asp
 20 25 30

```

```

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

```

Leu

<210> 13

<211> 278

<212> PRT

<213> 恰菲埃里希体(*Ehrlichia chaffeensis*)

<220>

<223> 恰菲埃里希体 OMP-1E 的氨基酸序列

<400> 13

```

Met Asn Cys Lys Lys Phe Phe Ile Thr Thr Ala Leu Val Ser Leu
 5 10 15
Met Ser Phe Leu Pro Gly Ile Ser Phe Ser Asp Pro Val Gln Gly
 20 25 30
Asp Asn Ile Ser Gly Asn Phe Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Met Pro
 35 40 45
Ser Ala Ser His Phe Gly Met Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Asn
 50 55 60
Pro Thr Val Ala Leu Tyr Gly Leu Lys Gln Asp Trp Glu Gly Ile
 65 70 75

```

Ser Ser Ser Ser His Asn Asp Asn His Phe Asn Asn Lys Gly Tyr  
 80 85 90  
 Ser Phe Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Phe Leu Gly Phe Ala Gly Ala  
 95 100 105  
 Ile Gly Tyr Ser Met Gly Gly Pro Arg Val Glu Phe Glu Val Ser  
 110 115 120  
 Tyr Glu Thr Phe Asp Val Lys Asn Gln Gly Asn Asn Tyr Lys Asn  
 125 130 135  
 Asp Ala His Arg Tyr Cys Ala Leu Gly Gln Gln Asp Asn Ser Gly  
 140 145 150  
 Ile Pro Lys Thr Ser Lys Tyr Val Leu Leu Lys Ser Glu Gly Leu  
 155 160 165  
 Leu Asp Ile Ser Phe Met Leu Asn Ala Cys Tyr Asp Ile Ile Asn  
 170 175 180  
 Glu Ser Ile Pro Leu Ser Pro Tyr Ile Cys Ala Gly Val Gly Thr  
 185 190 195  
 Asp Leu Ile Ser Met Phe Glu Ala Thr Asn Pro Lys Ile Ser Tyr  
 200 205 210  
 Gln Gly Lys Leu Gly Leu Ser Tyr Ser Ile Asn Pro Glu Ala Ser  
 215 220 225  
 Val Phe Ile Gly Gly His Phe His Lys Val Ile Gly Asn Glu Phe  
 230 235 240  
 Arg Asp Ile Pro Thr Leu Lys Ala Phe Val Thr Ser Ser Ala Thr  
 245 250 255  
 Pro Asp Leu Ala Ile Val Thr Leu Ser Val Cys His Phe Gly Ile  
 260 265 270  
 Glu Leu Gly Gly Arg Phe Asn Phe  
 275

<210> 14

<211> 280

<212> PRT

<213> 恰菲埃里希体(*Ehrlichia chaffeensis*)

<220>

<223> 恰菲埃里希体 OMP-1F 的氨基酸序列

<400> 14

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

|                                                             |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                             | 125 | 130 | 135 |
| Asn Asp Ala His Lys Tyr Tyr Ala Leu Thr His Asn Ser Gly Gly |     |     |     |
|                                                             | 140 | 145 | 150 |
| Lys Leu Ser Asn Ala Gly Asp Lys Phe Val Phe Leu Lys Asn Glu |     |     |     |
|                                                             | 155 | 160 | 165 |
| Gly Leu Leu Asp Ile Ser Leu Met Leu Asn Ala Cys Tyr Asp Val |     |     |     |
|                                                             | 170 | 175 | 180 |
| Ile Ser Glu Gly Ile Pro Phe Ser Pro Tyr Ile Cys Ala Gly Val |     |     |     |
|                                                             | 185 | 190 | 195 |
| Gly Thr Asp Leu Ile Ser Met Phe Glu Ala Ile Asn Pro Lys Ile |     |     |     |
|                                                             | 200 | 205 | 210 |
| Ser Tyr Gln Gly Lys Leu Gly Leu Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Glu |     |     |     |
|                                                             | 215 | 220 | 225 |
| Ala Ser Val Phe Val Gly Gly His Phe His Lys Val Ile Gly Asn |     |     |     |
|                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Glu Phe Arg Asp Ile Pro Ala Met Ile Pro Ser Thr Ser Thr Leu |     |     |     |
|                                                             | 245 | 250 | 255 |
| Thr Gly Asn His Phe Thr Ile Val Thr Leu Ser Val Cys His Phe |     |     |     |
|                                                             | 260 | 265 | 270 |
| Gly Val Glu Leu Gly Gly Arg Phe Asn Phe                     |     |     |     |
|                                                             | 275 | 280 |     |

<210> 15

<211> 284

<212> PRT

<213> 反刍类考德里氏体(*Cowdria ruminantium*)

<220>

<223> 反刍类考德里氏体 MAP-1 的氨基酸序列

<400> 15

|                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Met Asn Cys Lys Lys Ile Phe Ile Thr Ser Thr Leu Ile Ser Leu |     |     |
|                                                             | 5   | 10  |
| Val Ser Phe Leu Pro Gly Val Ser Phe Ser Asp Val Ile Gln Glu |     |     |
|                                                             | 20  | 25  |
| Glu Asn Asn Pro Val Gly Ser Val Tyr Ile Ser Ala Lys Tyr Met |     |     |
|                                                             | 35  | 40  |
| Pro Thr Ala Ser His Phe Gly Lys Met Ser Ile Lys Glu Asp Ser |     |     |
|                                                             | 50  | 55  |
| Arg Asp Thr Lys Ala Val Phe Gly Leu Lys Lys Asp Trp Asp Gly |     |     |
|                                                             | 65  | 70  |
| Val Lys Thr Pro Ser Gly Asn Thr Asn Ser Ile Phe Thr Glu Lys |     |     |
|                                                             | 80  | 85  |
| Asp Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Phe Leu Gly Phe Ala |     |     |
|                                                             | 95  | 100 |
| Gly Ala Val Gly Tyr Ser Met Asn Gly Pro Arg Ile Glu Phe Glu |     |     |
|                                                             | 110 | 115 |
| Val Ser Tyr Glu Thr Phe Asp Val Arg Asn Pro Gly Gly Asn Tyr |     |     |
|                                                             | 125 | 130 |
| Lys Asn Asp Ala His Met Tyr Cys Ala Leu Asp Thr Ala Ser Ser |     |     |
|                                                             | 140 | 145 |
| Ser Thr Ala Gly Ala Thr Thr Ser Val Met Val Lys Asn Glu Asn |     |     |
|                                                             | 155 | 160 |
| Leu Thr Asp Ile Ser Leu Met Leu Asn Ala Cys Tyr Asp Ile Met |     |     |
|                                                             | 170 | 175 |
|                                                             |     | 180 |



---

<212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> primer\_bind  
 <223> 用于犬埃里希体 28-kDa 蛋白基因测序的引物

<400> 19  
 agtgcagagt ctteggtttc 20

<210> 20  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> primer\_bind  
 <223> 用于犬埃里希体 28-kDa 蛋白质基因测序的引物

<400> 20  
 gttacttgcg gaggacat 18

<210> 21  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> 犬埃里希体 p28-7 的核苷酸 687-710  
 <223> PCR 引物 394

<400> 21  
 gcatttcac aggatcatag gtaa 24

<210> 22  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> primer\_bind  
 <222> 犬埃里希体 p28-7 的核苷酸 710-687  
 <223> PCR 引物 394C

<400> 22  
 ttacctatga tcctgtggaa atgc 24

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> primer\_bind

<223> 与犬埃里希体 p28-7 的一个区域退火的引物 793C, 用于扩增基因 p28-6 和 p28-7 基因间区

<400> 23  
gagtaaccaa cagctcctgc 20

<210> 24  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> primer\_bind  
<222>  
<223> 与邻近 p28-7 开放阅读框的非编码区互补的引物 EC280M-F

<400> 24  
tctactttgc acttccacta ttgt 24

<210> 25  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> primer\_bind  
<222>  
<223> 与邻近 p28-7 的开放阅读框互补的引物 EC280M-R

<400> 25  
attcttttgc cactatTTTT cttt 24

<210> 26  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> primer\_bind  
<223> 对应于 p28-6 内区域的引物 ECaSA3-2, 用于扩增基因 p28-6 和 p28-7 之间的基因间区 NC3

<400> 26  
ctaggattag gttatagtat aagtt 25

<210> 27  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 犬埃里希体 (*Ehrlichia canis*)

<220>  
<221> PEPTIDE  
<223> p28-7 和 p28-6 的预测的 N-末端信号肽

<400> 27  
Met Asn Cys Lys Lys Ile Leu Ile Thr Thr Ala Leu Met Ser Leu  
5 10 15

Met Tyr Tyr Ala Pro Ser Ile Ser  
20

<210> 28  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 恰菲埃里希体(*Ehrlichia chaffeensis*)

<220>  
<223> 恰菲埃里希体 P28 的 N-末端信号肽的氨基酸序列

<400> 28  
Met Asn Tyr Lys Lys Ile Leu Ile Thr Ser Ala Leu Ile Ser Leu  
5 10 15  
Ile Ser Ser Leu Pro Gly Val Ser Phe Ser  
20 25

<210> 29  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
<223> p28-7 的推测切割位点的氨基酸序列

<400> 29  
Met Asn Cys Lys Lys Ile Leu Ile Thr Thr Ala Leu Ile Ser Leu  
5 10 15  
Met Tyr Ser Ile Pro Ser Ile Ser Ser Phe Ser  
20 25

<210> 30  
<211> 299  
<212> DNA  
<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
<223> 基因间非编码区 1 (28NC1) 的核酸序列

<400> 30  
taatacttct attgtacatg ttaaaaatag tactagtttg cttctgtggt 50  
ttataaacgc aagagagaaa tagttagtaa taaattagaa agttaaatat 100  
tagaaaagtc atatgttttt cattgtcatt gatactcaac taaaagtagt 150  
ataaatgtta cttattaata attttacgta gtatattaaa ttcccttac 200  
aaaagccact agtattttat actaaaagct atactttggc ttgtatttaa 250  
tttgtatttt tactactggt aatttacttt cactgtttct ggtgtaaat 299

<210> 31  
<211> 345  
<212> DNA  
<213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
<223> 基因间非编码区 2 (28NC2) 的核酸序列

<400> 31  
 taatttcggtg gtacacatat cacgaagcta aaattgtttt tttatctctg 50  
 ctgtatacaa gagaaaaaat agtagtgaaa attacctaac aatatgacag 100  
 tacaagtta ccaagcttat tctcacaaaa ctctctgtgt cttttatctc 150  
 ttacaatga aatgtacact tagcttcact actgtagagt gtgtttatca 200  
 atgctttgtt tattaatact ctacataata tgtaaattt ttcttacaaa 250  
 actcactagt aatttatact agaatatata ttctgacttg tatttgcttt 300  
 atacttccac tattgttaat ttattttcac tattttaggt gtaat 345

<210> 32  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <223> 基因间非编码区 3 (28NC3) 的核酸序列

<400> 32  
 tgattttatt gttgccacat attaaaaatg atctaaactt gtttttatta 50  
 ttgctacata caaaaaaag aaaatagtg gcaaaagaat gtagcaataa 100  
 gagggggggg ggggactaaa ttaccttct attcttctaa tattctttac 150  
 tatattcaaa tagcacaact caatgcttcc aggaaaatat gtttctaata 200  
 ttttatttat taccaatcct tatataatat attaaattc tcttacaaaa 250  
 atctctaagt ttttatactt aatatatata ttctggcttg tatttacttt 300  
 gcacttccac tattgttaat ttattttcac tattttaggt gtaat 345

<210> 33  
 <211> 355  
 <212> DNA  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)  
 <220>  
 <223> 基因间非编码区 4 (28NC4) 的核酸序列

<400> 33  
 taattttatt gttgccacat attaaaaatg atctaaactt gtttttawta 50  
 ttgctacata caaaaaaaga aaaatagtg gcaaaagaat tagcaataag 100  
 aggggggggg gggaccaaatt ttatcttcta tgcttccaa gttttttcyc 150  
 gctatttatg acttaaacaa cagaaggtaa tatectcac gaaaacttat 200  
 cttcaaatat tttatttatt accaatctta tataatat taaatttctc 250  
 ttacaaaaat cactagtatt ttatacaaaa atatatattc tgacttgctt 300  
 ttcttctgca cttctactat ttttaattta ttgtcacta ttaggttata 350  
 ataaw 355

<210> 34  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物 p28-5-818f

<400> 34  
 ttaaacatat gccacttcgg acta 24

<210> 35

<211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物 1191  
  
 <400> 35  
 tatgatcgtg taaaattgct gtagtat 28  
  
 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物 ECa28-75C  
  
 <400> 36  
 tactggcacg tgctggacta 20  
  
 <210> 37  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物 ECa5'-1600  
  
 <400> 37  
 caccaataaa tgcagagact tc 22  
  
 <210> 38  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引物 3125  
  
 <400> 38  
 aatccatcat ttctcattac agtgtg 26  
  
 <210> 39  
 <211> 879  
 <212> DNA  
 <213> 犬埃里希体 (*Ehrlichia canis*)  
  
 <220>  
 <223> 犬埃里希体 p28-1 的核酸序列  
  
 <400> 39  
 atgaataata aactcaaatt tactataata aacacagtat tagtatgctt 50

```

attgtcatta cctaataat cttcctcaaa ggcataaac aataacgcta 100
aaaagtacta cggattatat atcagtggac aatataaacc cagtgtttct 150
gttttcagta atttttcagt taaagaaacc aatgcatata ctaaaaacct 200
tatagtctta aaaaaagatg ttgactctat tgaaccaag actgatgcca 250
gtgtaggtat tagtaaccca tcaaatttta ctatccccta tacagctgta 300
tttcaagata attctgtcaa tttcaatgga actattgggt acacctttgc 350
tgaaggtaca agagttgaaa tagaagggtc ttatgaggaa tttgatgta 400
aaaaccctgg aggctataca ctaagtgatg cctatcgcta ttttgatta 450
gcacgtgaaa tgaaggtaa tagttttaca cctaaagaaa aagtttctaa 500
tagtattttt cacactgtaa tgagaaatga tggattatct ataatatctg 550
ttatagtaaa tgtttgctac gatttctctt tgaacaattt gtcaatatcg 600
cctacatat gtggaggagc aggggtagat gctatagaat tcttcgatgt 650
attacacatt aagtttgcatt atcaaagcaa gctaggtatt gcttattctc 700
taccatctaa cattagtctc tttgctagtt tatattacca taaagtaatg 750
ggcaatcaat ttaaaaaattt aaatgtccaa catgttgcgt aacttgcaag 800
tatacctaaa attacatccg cagttgctac acttaatat ggttattttg 850
gaggtgaaat tggtgcaaga ttgacattt 879

```

<210> 40  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)  
 <220>  
 <223> 犬埃里希体 p28-1 蛋白的氨基酸序列

<400> 40  
 Met Asn Asn Lys Leu Lys Phe Thr Ile Ile Asn Thr Val Leu Val  
                   5                  10                  15  
 Cys Leu Leu Ser Leu Pro Asn Ile Ser Ser Ser Lys Ala Ile Asn  
                   20                  25                  30  
 Asn Asn Ala Lys Lys Tyr Tyr Gly Leu Tyr Ile Ser Gly Gln Tyr  
                   35                  40                  45  
 Lys Pro Ser Val Ser Val Phe Ser Asn Phe Ser Val Lys Glu Thr  
                   50                  55                  60  
 Asn Val Ile Thr Lys Asn Leu Ile Ala Leu Lys Lys Asp Val Asp  
                   65                  70                  75  
 Ser Ile Glu Thr Lys Thr Asp Ala Ser Val Gly Ile Ser Asn Pro  
                   80                  85                  90  
 Ser Asn Phe Thr Ile Pro Tyr Thr Ala Val Phe Gln Asp Asn Ser  
                   95                  100                 105  
 Val Asn Phe Asn Gly Thr Ile Gly Tyr Thr Phe Ala Glu Gly Thr  
                  110                 115                 120  
 Arg Val Glu Ile Glu Gly Ser Tyr Glu Glu Phe Asp Val Lys Asn  
                  125                 130                 135  
 Pro Gly Gly Tyr Thr Leu Ser Asp Ala Tyr Arg Tyr Phe Ala Leu  
                  140                 145                 150  
 Ala Arg Glu Met Lys Gly Asn Ser Phe Thr Pro Lys Glu Lys Val  
                  155                 160                 165  
 Ser Asn Ser Ile Phe His Thr Val Met Arg Asn Asp Gly Leu Ser  
                  170                 175                 180  
 Ile Ile Ser Val Ile Val Asn Val Cys Tyr Asp Phe Ser Leu Asn  
                  185                 190                 195  
 Asn Leu Ser Ile Ser Pro Tyr Ile Cys Gly Gly Ala Gly Val Asp  
                  200                 205                 210  
 Ala Ile Glu Phe Phe Asp Val Leu His Ile Lys Phe Ala Tyr Gln

```

 215 220 225
Ser Lys Leu Gly Ile Ala Tyr Ser Leu Pro Ser Asn Ile Ser Leu
 230 235 240
Phe Ala Ser Leu Tyr Tyr His Lys Val Met Gly Asn Gln Phe Lys
 245 250 255
Asn Leu Asn Val Gln His Val Ala Glu Leu Ala Ser Ile Pro Lys
 260 265 270
Ile Thr Ser Ala Val Ala Thr Leu Asn Ile Gly Tyr Phe Gly Gly
 275 280 285
Glu Ile Gly Ala Arg Leu Thr Phe
 290 293

```

<210> 41  
 <211> 840  
 <212> DNA  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <223> 犬埃里希体 p28-2 的核酸序列

```

<400> 41
atgaattata agaaaattct agtaagaagc gcgttaatct cattaatgtc 50
aatcttacca tatcagtctt ttgcagatcc tgtaggttca agaactaatg 100
ataacaagaaggccttctac attagtgcaa agtacaatcc aagtatatca 150
cacttttagaa aattctctgc tgaagaaact cctattaatg gaacaaattc 200
tctcactaaa aaagttttcg gactaaagaa agatggtgat ataacaaaaa 250
aagacgattt tacaagagta gctccaggca ttgattttca aaataactta 300
atatacggat tttcaggaag tattggttac tctatggacg gaccaagaat 350
agaacttgaa gctgcatatc aacaatttaa tccaaaaaac accgataaca 400
atgatactga taatggtgaa tactataaac attttgcatt atctcgtaaa 450
gatgcaatgg aagatcagca atatgtagta cttaaaaatg acggcataac 500
ttttatgtca ttgatggtta atacttgcta tgacattaca gctgaaggag 550
tatctttcgt accatatgca tgtgcaggtg taggagcaga tcttataact 600
atttttaaag acctcaatct aaaatttgc tacciaaggaa aaataggtat 650
tagttaccct atcacaccag aagtctctgc atttattggt ggatactacc 700
atggcgttat tggtaataaa ttgagaaga tacctgtaat aactcctgta 750
gtattaatg atgctcctca aaccacatct gcttcagtaa ctcttgacgt 800
tggatacttt ggcgagagaa ttggaatgag gttcaccttc 840

```

<210> 42  
 <211> 280  
 <212> PRT  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <223> 犬埃里希体 p28-2 蛋白的氨基酸序列

```

<400> 42
Met Asn Tyr Lys Lys Ile Leu Val Arg Ser Ala Leu Ile Ser Leu
 5 10 15
Met Ser Ile Leu Pro Tyr Gln Ser Phe Ala Asp Pro Val Gly Ser
 20 25 30
Arg Thr Asn Asp Asn Lys Glu Gly Phe Tyr Ile Ser Ala Lys Tyr
 35 40 45
Asn Pro Ser Ile Ser His Phe Arg Lys Phe Ser Ala Glu Glu Thr

```

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

<210> 43  
 <211> 828  
 <212> DNA  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <223> 犬埃里希体 p28-3 的核酸序列

<400> 43  
 atgaactgta aaaaaattct tataacaact acattggtat cactaacaat 50  
 tcttttacct ggcatatctt tctccaaacc aatacatgaa aacaatacta 100  
 caggaaactt ttacattatt ggaaaatag taccaagtat ttcacatttt 150  
 gggaactttt cagctaaaga agaaaaaac acaacaactg gaatttttgg 200  
 attaaaagaa tcatggactg gtggtatcat ccttgataaa gaacatgcag 250  
 cttttaatat cccaaattat tcatttaaat atgaaaataa tccattttta 300  
 ggatttgcag gggtaattgg ctattcaata ggtagtccaa gaatagaatt 350  
 tgaagtatca tacgagacat tcgatgtaca aaatccagga gataagttta 400  
 acaatgatgc acataagtat tgtgctttat ccaatgattc cagtaaaaca 450  
 atgaaaagtg gtaaatcgt ttttctcaa aatgaaggat taagtgcatt 500  
 atcactcatg ttaaatgtat gttatgatat aataaacaaa agaatgcctt 550  
 tttcacctta catatgtgca ggcattggta ctgacttaat attcatgttt 600  
 gacgctataa accataaage tgcttatcaa ggaaaattag gttttaatta 650  
 tccaataagc ccagaagcta acatttctat ggggtgtgcac tttcacaag 700

taacaaacaa cgagtttaga gttcctgttc tattaactgc tggaggactc 750  
 gctccagata atctatttgc aatagtaaag ttgagtatat gtcattttgg 800  
 gttagaattt gggtagcagg tcagtttt 828

<210> 44  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> 犬埃里希体(*Ehrlichia canis*)

<220>  
 <223> 犬埃里希体 p28-3 蛋白的氨基酸序列

<400> 44  
 Met Asn Cys Lys Lys Ile Leu Ile Thr Thr Thr Leu Val Ser Leu  
 5 10 15  
 Thr Ile Leu Leu Pro Gly Ile Ser Phe Ser Lys Pro Ile His Glu  
 20 25 30  
 Asn Asn Thr Thr Gly Asn Phe Tyr Ile Ile Gly Lys Tyr Val Pro  
 35 40 45  
 Ser Ile Ser His Phe Gly Asn Phe Ser Ala Lys Glu Glu Lys Asn  
 50 55 60  
 Thr Thr Thr Gly Ile Phe Gly Leu Lys Glu Ser Trp Thr Gly Gly  
 65 70 75  
 Ile Ile Leu Asp Lys Glu His Ala Ala Phe Asn Ile Pro Asn Tyr  
 80 85 90  
 Ser Phe Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Phe Leu Gly Phe Ala Gly Val  
 95 100 105  
 Ile Gly Tyr Ser Ile Gly Ser Pro Arg Ile Glu Phe Glu Val Ser  
 110 115 120  
 Tyr Glu Thr Phe Asp Val Gln Asn Pro Gly Asp Lys Phe Asn Asn  
 125 130 135  
 Asp Ala His Lys Tyr Cys Ala Leu Ser Asn Asp Ser Ser Lys Thr  
 140 145 150  
 Met Lys Ser Gly Lys Phe Val Phe Leu Lys Asn Glu Gly Leu Ser  
 155 160 165  
 Asp Ile Ser Leu Met Leu Asn Val Cys Tyr Asp Ile Ile Asn Lys  
 170 175 180  
 Arg Met Pro Phe Ser Pro Tyr Ile Cys Ala Gly Ile Gly Thr Asp  
 185 190 195  
 Leu Ile Phe Met Phe Asp Ala Ile Asn His Lys Ala Ala Tyr Gln  
 200 205 210  
 Gly Lys Leu Gly Phe Asn Tyr Pro Ile Ser Pro Glu Ala Asn Ile  
 215 220 225  
 Ser Met Gly Val His Phe His Lys Val Thr Asn Asn Glu Phe Arg  
 230 235 240  
 Val Pro Val Leu Leu Thr Ala Gly Gly Leu Ala Pro Asp Asn Leu  
 245 250 255  
 Phe Ala Ile Val Lys Leu Ser Ile Cys His Phe Gly Leu Glu Phe  
 260 265 270  
 Gly Tyr Arg Val Ser Phe  
 275

<210> 45  
 <211> 813  
 <212> DNA

<213> 犬埃里希体 (*Ehrlichia canis*)

<220>

<223> 犬埃里希体 p28-9 的核酸序列

<400> 45

```

atgaattaca aaagatttgt ttaggtggt acgctgagta catttgttt 50
tttcttatct gatggtgctt tttctgatgc aaatTTTTCT gaagggagga 100
gaggacttta tataggtagt cagtataaag ttggtattcc caattttagt 150
aatTTTTcag ctgaagaaac aattcctggt attacaaaa agatttttgc 200
gtaggtctt gataagtctg agataaatac tcacagcaat tttacacgat 250
catatgacc tacttatgca agcagttttg cagggttag tggatcatt 300
ggatattatg ttaatgactt taggtagaa tttgaaggt cttatgagaa 350
tttgaacct gaaagacaat ggtaccctga gaatagccaa agctacaaat 400
ttttgcttt gtctcgaat gctacaaata gtgataata gtttatagta 450
ctagagaata acggcgttgt tgacaagtct cttaatgtaa atgtttgta 500
tgatattgct agtggtagta ttcctttagc accttatatg tgtgctggtg 550
ttggtgcaga ttatataaag ttttaggta taccattgcc taagttttct 600
tatcaagtta agtttggtgt caactaccct ctaaagtta atactatggt 650
gtttggtggg ggttattacc ataagttgt aggtgatagg catgagagag 700
tagaaatagc ttaccatcct actgcattat ctgacgttcc tagaactact 750
tcagcttctg ctactttaa tactgattat tttggttggg agattggatt 800
tagatttgcg cta 813

```

<210> 46

<211> 271

<212> PRT

<213> 犬埃里希体 (*Ehrlichia canis*)

<220>

<223> 犬埃里希体 p28-9 蛋白的氨基酸序列

<400> 46

```

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

```





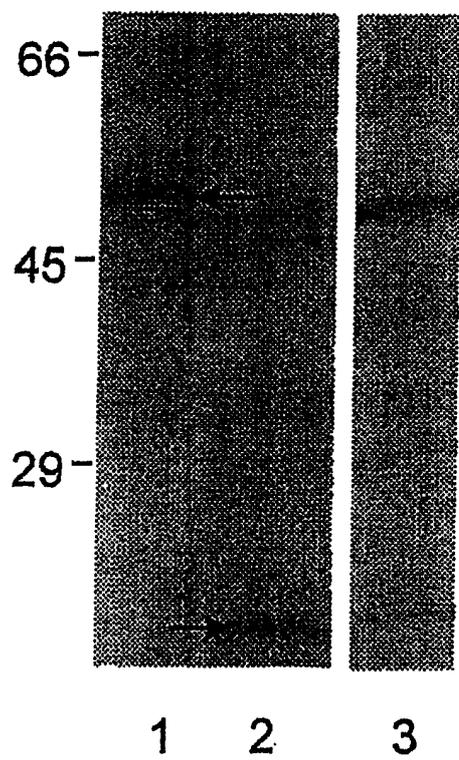


图 2



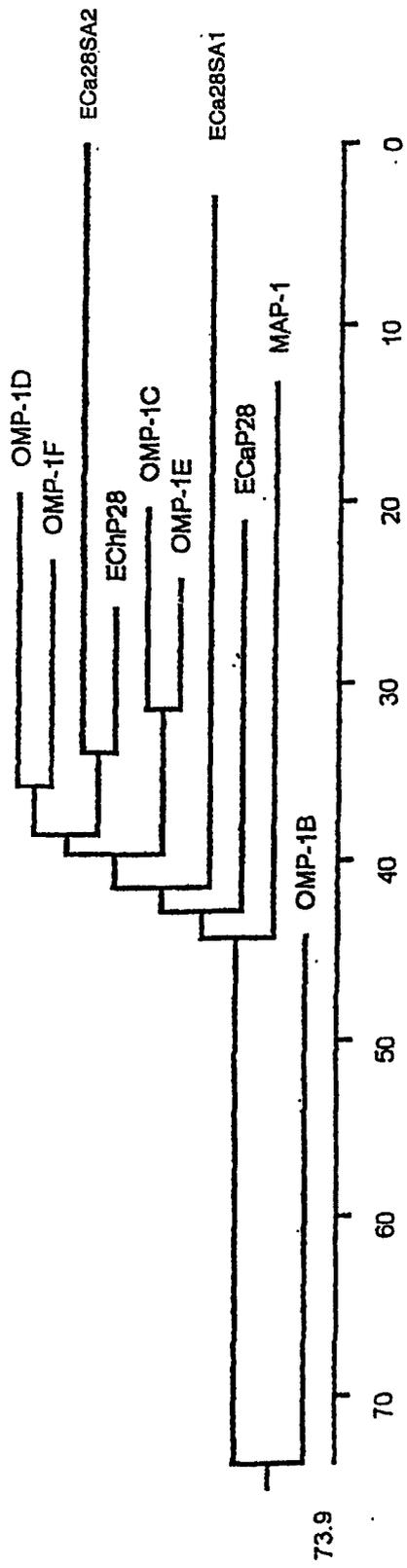


图 4

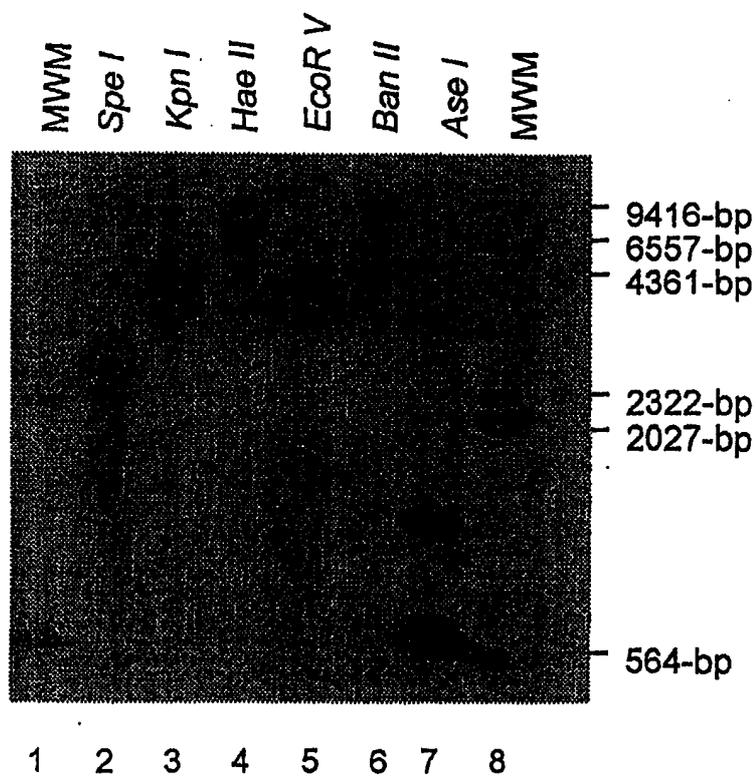


图 5

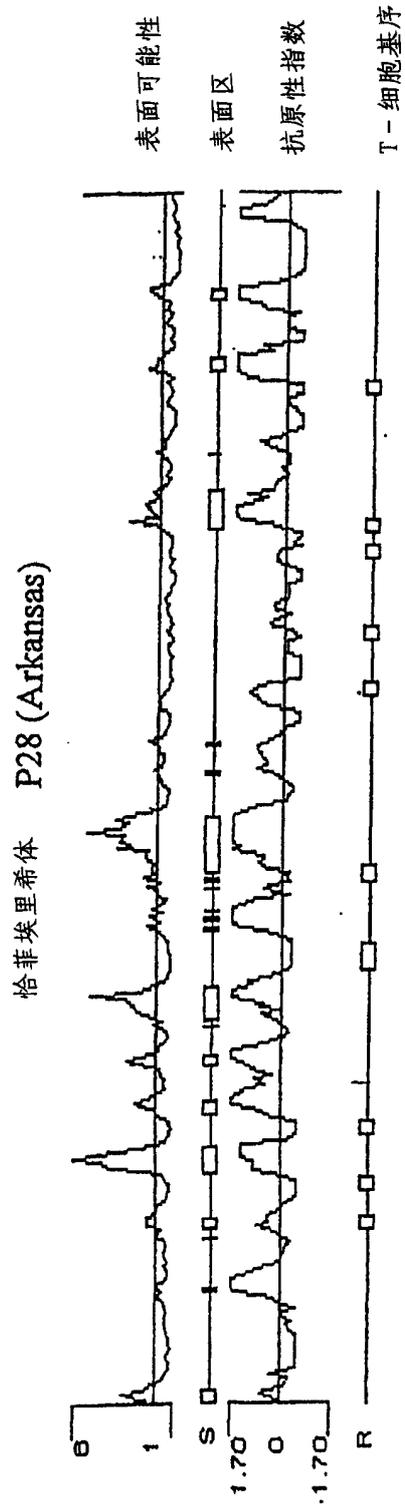
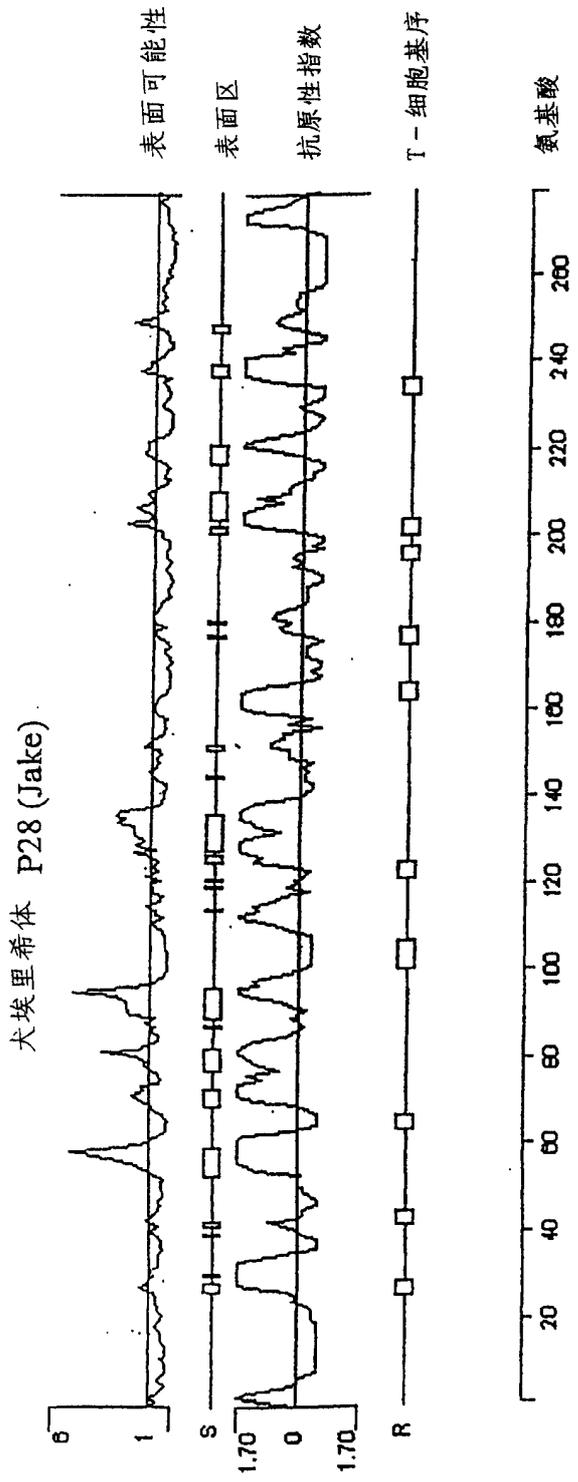


图 6

**Eca28SA2**

ATGAATTGTAAAAAAGTTTTCCACAATAAGTGCATTGATATCATCCATATACTTCCTACCT 60  
M N C K K V F T I S A L I S S I Y F L P

AATGTCTCATACTCTAACCCAGTATATGGTAACAGTATGTATGGTAATTTTTACATATCA 120  
N V S Y S N P V Y G N S M Y G N F Y I S

GGAAAGTACATGCCAAGTGTTCCTCATTGGAATTTTTTTCAGCTGAAGAAGAGAAAAAA 180  
G K Y M P S V P H F G I F S A E E E K K

AAGACAACCTGTAGTATATGGCTTAAAAGAAAACCTGGGCAGGAGATGCAATATCTAGTCAA 240  
K T T V V Y G L K E N W A G D A I S S Q

AGTCCAGATGATAATTTTTACCATTTCGAAATTACTCATTCAAGTATGCAAGCAACAAGTTT 300  
S P D D N F T I R N Y S F K Y A S N K F

TTAGGGTTTTGCAGTAGCTATTGGTTACTCGATAGGCAGTCCAAGAATAGAAGTTGAGATG 360  
L G F A V A I G Y S I G S P R I E V E M

TCTTATGAAGCATTGTGATGTGAAAAATCCAGGTGATAATTACAAAAACGGTGCTTACAGG 420  
S Y E A F D V K N P G D N Y K N G A Y R

TATTGTGCTTTATCTCATCAAGATGATGCCGGATGATGACATGACTAGTGCAACTGACAAA 480  
Y C A L S H Q D D A D D D M T S A T D K

TTTGTATAFTTAATTAATGAAGGATTACTTAAACATATCATTATGACAAACATATGTTAT 540  
F V Y L I N E G L L N I S F M T N I C Y

GAAACAGCAAGCAAAAATATACCTCTCTCTCCTTACATATGTGCAGGTATTGGTACTGAT 600  
E T A S K N I P L S P Y I C A G I G T D

TTAATTCACATGTTTGAAACTACACATCCTAAAATTTCTTATCAAGGAAAGCTAGGGTTG 660  
L I H M F E T T H P K I S Y Q G K L G L

GCCTACTTCGTAAGTGCAGAGTCTTCGGTTTTCTTTGGTATATATTTTCATAAAAATTATA 720  
A Y F V S A E S S V S F G I Y F H K I I

AATAATAAGTTTTAAAAATGTTCCAGCCATGGTACCTATTAACCTCAGACGAGATAGTAGGA 780  
N N K F K N V P A M V P I N S D E I V G

CCACAGTTTGCAACAGTAACATTAAATGTATGCTACTTTGGATTAGAACTTGGATGTAGG 840  
P Q F A T V T L N V C Y F G L E L G C R

↓ (SEQ ID NO: 3)

TTCAACTTCTAATTTTCGTGGTACACATATCACGAAGCTAAAATGTTTTTTTTATCTCTGC 900  
F N F \* (SEQ ID NO: 4)

TGTATACAAGAGAAAAAATAGTAGTGAAAATTACCTAACAATATGACAGTACAAGTTTAC 960  
CAAGCTTATTCTCACAAAACCTTCTGTGTCTTTTTATCTCTTTACAATGAAATGTACACTT 1020

图 7-1

AGCTTCACTACTGTAGAGTGTGTTTATCAATGCTTTGTTTATTAATACTCTACATAATAT 1080  
 GTTAAATTTTTCTTACAAAACCTCACTAGTAATTTATACTAGAATATATATTCTGACTTGT 1140  
 (SEQ ID NO: 31)  
**ECa28SA3**  
 ATTTGCTTTATACTTCCACTATTGTTAATTTATTTTCACTATTTTAGGTGTAATATGAAT 1200  
 M N

TGCAAAAAAATTCTTATACAACTGCATTAATGTCATTAATGTACTATGCTCCAAGCATA 1260  
 C K K I L I T T A L M S L M Y Y A P S I

TCTTTTTCTGATACTATAACAAGACGATAACACTGGTAGCTTCTACATCAGTGGAAAATAT 1320  
 S F S D T I Q D D N T G S F Y I S G K Y

GTACCAAGTGTTCACATTTTGGTGTTTTCTCAGCTAAAGAAGAAAGAAACTCAACTGTT 1380  
 V P S V S H F G V F S A K E E R N S T V

GGAGTTTTTGGATTAAAACATGATTGGAAATGGAGGTACAATATCTAACTCTTCTCCAGAA 1440  
 G V F G L K H D W N G G T I S N S S P E

AATATATTCACAGTTCAAAATTATTCGTTTAAATACGAAAACAACCCATTCTTAGGGTTT 1500  
 N I F T V Q N Y S F K Y E N N P F L G F

GCAGGAGCTATTGGTTATTCAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTGTACGAG 1560  
 A G A I G Y S M G G P R I E L E V L Y E

ACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAATAATTATAAGAACGGCGCACACAGATACTGTGCT 1620  
 T F D V K N Q N N N Y K N G A H R Y C A

TTATCTCATCATAGTTCAGCAACAAGCATGTCTCCGCAAGTAACAAATTTGTTTTCTTA 1680  
 L S H H S S A T S M S S A S N K F V F L

AAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTATGATAAATGCATGCTATGACATAATAATT 1740  
 K N E G L I D L S F M I N A C Y D I I I

GAAGGAATGCCTTTTTTACCTTATATTTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTTTCCATG 1800  
 E G M P F S P Y I C A G V G T D V V S M

TTTGAAGCTATAAATCCTAAAATTTCTTACCAAGGAAAACCTAGGATTAGGTTATAGTATA 1860  
 F E A I N P K I S Y Q G K L G L G Y S I

AGTTCAGAAGCCTCTGTTTTTATCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAATGAATTT 1920  
 S E E A S V F I G G H F H R V I G N E F

AGAGACATCCCTGCTATGGTTCCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTTGCAATA 1980  
 R D I P A M V P S G S N L P E N Q F A I  
 (SEQ ID NO: 5)

GTAACACTAAATGTGTGTCACCTTGGCATAGAACTTGGAGGAAGATTTAACTTCTGA 2031  
 V T L N V C H F G I E L G G R F N F \*  
 (SEQ ID NO: 6)

图 7-2

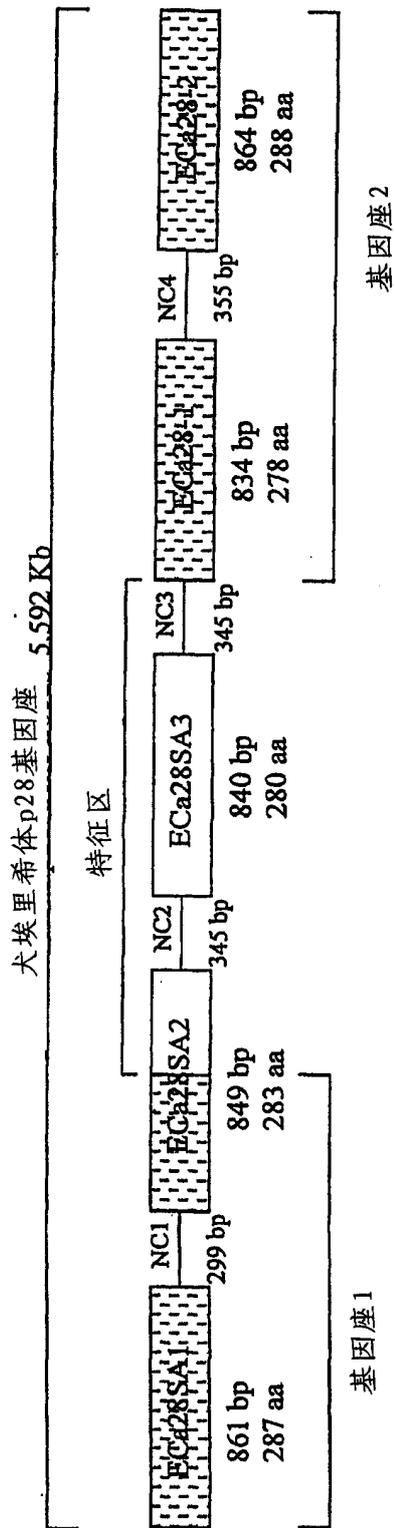


图 8

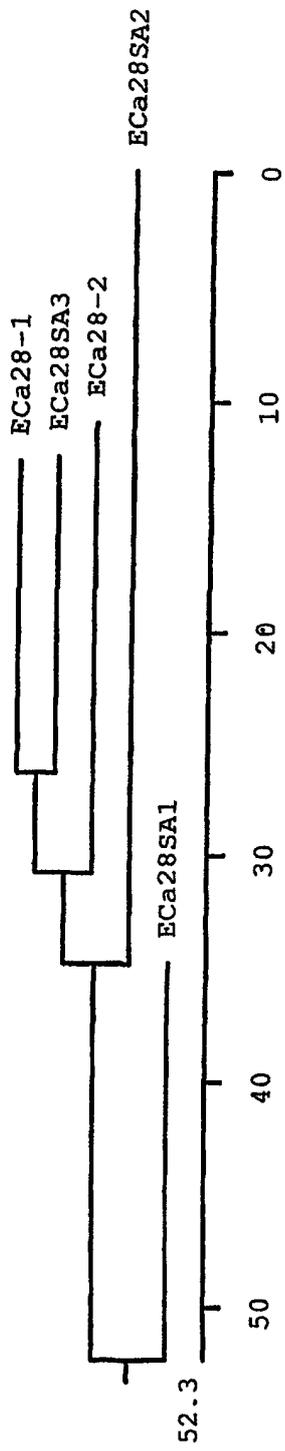


图 9

```

1 TAACTCTATGCT-ACAAGTTAAATAAGTACGAGTTCCTCTCTGCTT--TATAACSCAGAGAGAA--ATAGT-----TAGTAATAAATTAAGAA-----TTAAA--TATT--AGAAAAT-CA 28nc1
1 . . . TCGTGC-A--C . . . A-C-CG . . . -GC-AA-T-G-TT-T-A-CIC-CC-G-T-.AAG . . . A-A-TAG . . . -G--AAATPACC . . . AC . . . TGAC . . . T-CANGTTACC . . . SCT . . . CTC-C . . . C-T-T 28nc2
1 .G-TT-AT-G . . . CC . . . A GA-CTA-AC . . . T-T-A-TA . . . GC . . . C-T-AA . . . A-K . . . AA GCCAAGATG . . . C GAGG . . . SSS . . . GGGGAC . . . TT . . . CCTTC--T-TTC-T-T 28nc3
1 . . . TT-AT-G . . . CC . . . A CA-CTA-AC . . . T-T-ATA . . . GC . . . C-T-AA . . . A-A AACAAAGATG . . . C GAGG . . . SSS . . . GGGGAC . . . TT . . . CTTT-C-T-T 28nc4

112 TANGTTTCATGTCATGAT-ACTCACATG--AAAGTATAT-----AAATGCT-----TACTTATTAATAT-PTACGTAGTATATAAATTCCTTACAAAAGCCACAGATTTATA 28nc1
136 .G . . . C . . . T . . . C . . . C . . . T . . . -G . . . A . . . -CTAC . . . -CT . . . C . . . C . . . C . . . T . . . C . . . T . . . C . . . A . . . A . . . G 28nc2
138 A . . . A . . . C . . . T . . . -ACT-----T A . . . -SCAC . . . CTC-A-GCTGCA-SS-A . . . A-GT-TCTAATTT-T CC . . . CC . . . TA . . . A AT 28nc3
138 C . . A T . . . G . . . T . . . AC-ACAG . . . G CCTCACGG-A CT . . . ATTTCAATTT-T CC . . . C . . . TA . . . A AT 28nc4

222 CFAAAGC-TATACCTTGGCTTATATTTATTTACTCTTAAATTTACTT-TCACTGTT----TCGTGGCTAAAT 28nc1
249 .-T-G-ATA . . . T . . . C . . . A GC A . . . C . . . CE F A TA 28nc2
259 .T-T-TATA . . . T . . . C C G . . . C . . . CT F A TA 28nc3
376 .G ATA T . . . C . . . A CT CTC G C T . . . T -10 A . . . AGG . . . TATA-A-RBS 28nc4

```

```

28nc1 (SEQ ID NO:30)
28nc2 (SEQ ID NO:31)
28nc3 (SEQ ID NO:32)
28nc4 (SEQ ID NO:33)

```



10

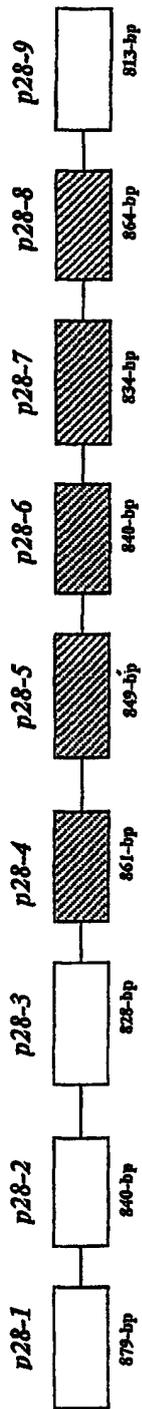


图 11

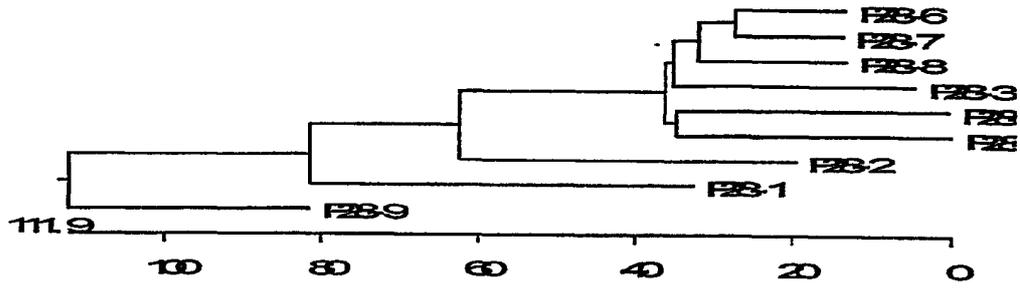


图 12

ATGAATAATAAACTCAAATTTACTATAATAAACACAGTATTAGTATGCTTATTGTCATTA 60  
 M N N K L K F T I I N T V L V C L L S L  
 CCTAATATATCTTCCTCAAAGGCCATAAAACAATAACGCTAAAAAGTACTACGGATTATAT 120  
 P N I S S S K A I N N N A K K Y Y G L Y  
 ATCAGTGGACAATATAAACCCAGTGTTCGTTTCAGTAATTTTTCAGTTAAAGAAACC 180  
 I S G Q Y K P S V S V F S N F S V K E T  
 AATGTCATAACTAAAAACCTTATAGCTTTAAAAAAGATGTTGACTCTATTGAAACCAAG 240  
 N V I T K N L I A L K K D V D S I E T K  
 ACTGATGCCAGTGTAGGTATTAGTAACCCATCAAATTTTACTATCCCTATACAGCTGTA 300  
 T D A S V G I S N P S N F T I P Y T A V  
 TTTCAAGATAATTCTGTCAATTTCAATGGAAC TATTGGTTACACCTTTGCTGAAGGTACA 360  
 F Q D N S V N F N G T I G Y T F A E G T  
 AGAGTTGAAATAGAAGGTTCTTATGAGGAATTTGATGTTAAAAACCTGGAGGCTATACA 420  
 R V E I E G S Y E E F D V K N P G G Y T  
 CTAAGTATGCTATCGCTATTTTGCATTAGCACGTGAAATGAAGGTAATAGTTTACA 480  
 L S D A Y R Y F A L A R E M K G N S F T  
 CCTAAAGAAAAAGTTTCTAATAGTATTTTTCACACTGTAATGAGAAATGATGGATTATCT 540  
 P K E K V S N S I F H T V M R N D G L S  
 ATAATATCTGTTATAGTAAATGTTTCTACGATTTCTCTTTGAACAATTTGTCAATATCG 600  
 I I S V I V N V C Y D F S L N N L S I S  
 CCTTACATATGTTGGAGGAGCAGGGGTAGATGCTATAGAATCTTCGATGTATTACACATT 660  
 P Y I C G G A G V D A I E F F D V L H I  
 AAGTTGCATATCAAAGCAAGCTAGGTATTGCTTATTCTCTACCATCTAACATTAGTCTC 720  
 K F A Y Q S K L G I A Y S L P S N I S L  
 TTTGCTAGTTTATATTACCATAAAGTAATGGGCAATCAATTTAAAAATTTAAATGTCCAA 780  
 F A S L Y Y H K V M G N Q F K N L N V Q  
 CATGtTGCTGAACTTGCAAGTATACCTAAAATTACATCCGCAGTTGCTACACTTAATATT 840  
 H V A E L A S I P K I T S A V A T L N I  
 GGTATTTTGGAGGTGAAATTGGTGCAAGATTGACATTT (SEQ ID No. 39) 879  
 G Y F G G E I G A R L T F (SEQ ID No. 40)

图 13

ATGAATTATAAGAAAATTCTAGTAAGAAGCGCCTTAATCTCATTAAATGTCAATCTTACCA 60  
 M N Y K K I L V R S A L I S L M S I L P  
 TATCAGTCTTTTGCAGATCCTGTAGGTTCAAGAACTAATGATAACAAAGAGGCTTCTAC 120  
 Y Q S F A D P V G S R T N D N K E G F Y  
 ATTAGTGCAAAGTACAATCCAAGTATATCACACTTTAGAAAATTCTCTGCTGAAGAACT 180  
 I S A K Y N P S I S H F R K F S A E E T  
 CCTATTAATGGAACAAATCTCTCACTAAAAAAGTTTTTCGGACTAAAGAAAGATGGTGAT 240  
 P I N G T N S L T K K V F G L K K D G D  
 ATAACAAAAAAGACGATTTTACAAGAGTAGCTCCAGGCATTGATTTTCAAATAACTTA 300  
 I T K K D D F T R V A P G I D F Q N N L  
 ATATCAGGATTTTCAGGAAGTATTGGTACTCTATGGACGGACCAAGAATAGAACTTGAA 360  
 I S G F S G S I G Y S M D G P R I E L E  
 GCTGCATATCAACAATTTAATCCAAAAACACCGATAACAATGATACTGATAATGGTGAA 420  
 A A Y Q Q F N P K N T D N N D T D N G E  
 TACTATAAACATTTTGCATTATCTCGTAAAGATGCAATGGAAGATCAGCAATATGTAGTA 480  
 Y Y K H F A L S R K D A M E D Q Q Y V V  
 CTTAAAAATGACGGCATAACTTTTATGTCAATGATGGTTAATACTTGCTATGACATTACA 540  
 L K N D G I T F M S L M V N T C Y D I T  
 GCTGAAGGAGTATCTTTCGTACCATATGCATGTGCAGGTATAGGAGCAGATCTTATCACT 600  
 A E G V S F V P Y A C A G I G A D L I T  
 ATTTTAAAGACCTCAATCTAAAATTTGCTTACCAAGGAAAAATAGGTATTAGTTACCCT 660  
 I F K D L N L K F A Y Q G K I G I S Y P  
 ATCACACCAGAAGTCTCTGCATTTATGGTGGATACTACCATGGCGTTATTGGTAATAAA 720  
 I T P E V S A F I G G Y Y H G V I G N K  
 TTTGAGAAAGATACCTGTAATAACTCCTGTAGTATTAATGATGCTCCTCAAACCACATCT 780  
 F E K I P V I T P V V L N D A P Q T T S  
 GCTTCAGTAACTCTTGACGTTGGATACTTTGGCGGAGAAATGGAATGAGGTTACCTTC 840  
 A S V T L D V G Y F G G E I G M R F T F  
 (SEQ ID No. 41)  
 (SEQ ID No. 42)

图 14

ATGAACTGTAAAAAATTCCTTATAACAACACTACATTGGTATCACTAACAATTCCTTTACCT 60  
 M N C K K I L I T T T L V S L T I L L P  
 GGCATATCTTTCTCCAACCAATACATGAAAACAATACTACAGGAACTTTTACATTATT 120  
 G I S F S K P I H E N N T T G N F Y I I  
 GGAAATATGTACCAAGTATTTACATTTTGGGAACCTTTTCAGCTAAAGAAGAAAAAAC 180  
 G K Y V P S I S H F G N F S A K E E K N  
 ACAACAACCTGGAAATTTTGGATTAAAAGAATCATGGACTGGTGGTATCATCCTTGATAAA 240  
 T T T G I F G L K E S W T G G I I L D K  
 GAACATGCAGCTTTTAATATCCCAAATTATTCATTTAAATATGAAAATAATCCATTTTA 300  
 E H A A F N I P N Y S F K Y E N N P F L  
 GGATTGCAGGGTAATTGGCTATTCAATAGGtAGTCCAAGAATAGAATTGAaGtATCA 360  
 G F A G V I G Y S I G S P R I E F E V S  
 TACGAGACATTCGATGTACAAATCCAGGAGATAAGTTAACAATGATGCACATAAGTAT 420  
 Y E T F D V Q N P G D K F N N D A H K Y  
 TGTGCTTTATCCAATGATTCCAGTAAAACAATGAAAAGTGGTAAATTCGTTTTTCTCAA 480  
 C A L S N D S S K T M K S G K F V F L K  
 AATGAAGGATTAAGTGACATATCACTCATGTAAATGTATGTTATGATATAATAAACAAA 540  
 N E G L S D I S L M L N V C Y D I I N K  
 AGAATGCCTTTTTACCTTACATATGTGCAGGCATTGGTACTGACTTAATATTTCATGTTT 600  
 R M P F S P Y I C A G I G T D L I F M F  
 GACGCTATAAACCATAAAGCTGCTTATCAAGGAAAATTAGGTTTTAATTATCCAATAAGC 660  
 D A I N H K A A Y Q G K L G F N Y P I S  
 CCAGAAGCTAACATTTCTATGGGTGTGCACCTTTCACAAAGTAAACAACAACGAGTTTGA 720  
 P E A N I S M G V H F H K V T N N E F R  
 GTTCCTGTTCTATTAACCTGCTGGAGGACTCGCTCCAGATAATCTATTTGCAATAGTAAAG 780  
 V P V L L T A G G L A P D N L F A I V K  
 TTGAGTATATGTCATTTTGGGTAGAAATTGGGTACAGGTGAGTTTT (SEQ ID No. 43) 828  
 L S I C H F G L E F G Y R V S F (SEQ ID No. 44)

图 15

ATGAATTACAAAAGATTTGTTGTAGGTGTTACGCTGAGTACATTTGTTTTTTCTTATCT 60  
 M N Y K R F V V G V T L S T F V F F L S  
 GATGGTGCCTTTTTCTGATGCAAATTTTCTGAAGGGAGGAGGACTTTATATAGGTAGT 120  
 D G A F S D A N F S E G R R G L Y I G S  
 CAGTATAAAGTTGGTATTCCAATTTTAGTAATTTTTCAGCTGAAGAAACAATTCCTGGT 180  
 Q Y K V G I P N F S N F S A E E T I P G  
 ATTACAAAAAGATTTTTCGGTTAGGTCTTGATAAGTCTGAGATAAATACTCACAGCAAT 240  
 I T K K I F A L G L D K S E I N T H S N  
 TTTACACGATCATATGACCCTACTTATGCAAGCAGTTTTCAGGGTTTACTGGTATCATT 300  
 F T R S Y D P T Y A S S F A G F S G I I  
 GGATATTATGTTAATGACTTTAGGGTAGAATTTGAAGTCTTATGAGAATTTTGAACCT 360  
 G Y Y V N D F R V E F E G S Y E N F E P  
 GAAAGACAATGGTACCCTGAGAATAGCCAAAGCTACAAATTTTTGCTTGTCTCGAAAT 420  
 E R Q W Y P E N S Q S Y K F F A L S R N  
 GCTACAAATAGTGATAATAAGTTTATAGTACTAGAGAATAACGGCGTTGTTGACAAGTCT 480  
 A T N S D N K F I V L E N N G V V D K S  
 CTTAATGTAATGTTTGTATGATATTGCTAGTGGTAGTATTCCTTTAGCACCTTATATG 540  
 L N V N V C Y D I A S G S I P L A P Y M  
 TGTGCTGGTGTGGTGCAGATTATATAAAGTTTTTAGGTATATCATTGCCTAAGTTTTCT 600  
 C A G V G A D Y I K F L G I S L P K F S  
 TATCAAGTTAAGTTTGGTGTCAACTACCCTCTAAATGTTAATACTATGTTGTTGGTGGG 660  
 Y Q V K F G V N Y P L N V N T M L F G G  
 GGTATTACCATAAGTTGTAGGTGATAGGCATGAGAGAGTAGAAATAGCTTACCATCCT 720  
 G Y Y H K V V G D R H E R V E I A Y H P  
 ACTGCATTATCTGACGTTCTAGAACTACTTCAGCTTCTGCTACTTTAAATACTGATTAT 780  
 T A L S D V P R T T S A S A T L N T D Y  
 TTTGGTTGGGAGATTGGATTTAGATTTGCGCTA (SEQ ID NO. 45) 813  
 F G W E I G F R F A L (SEQ ID No. 46)

 16