[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/31
C12N 15/63 C07K 14/21
C07K 19/00 A61K 39/02
G01N 33/569

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02811689.5

[43] 公开日 2004 年 7 月 21 日

[11] 公开号 CN 1514879A

[22] 申请日 2002.5.15 [21] 申请号 02811689.5
[30] 优先权
[32] 2001. 5.15 [33] US [31] 60/290，653
[86] 国际申请 PCT/CA2002/000706 2002.5.15
[87] 国际公布 WO2002/092625 英 2002.11.21
[85] 进入国家阶段日期 2003.12.11
[71] 申请人 希雷生物化学有限公司
地址 加拿大魁北克
[72] 发明人 D·马丁 J·哈迈尔
B·R·布罗德尔 S·里奥克斯
J·库图里

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 6 页 说明书 43 页 序列表 19 页
附图 8 页

[54] 发明名称 粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌)抗原

[57] 摘要

本发明涉及可用于预防、诊断和/或治疗目的的粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)多肽。

(SEQ ID NO: 1)

```
   1 ATGGACACTG ACATGAAACA TTTAACAAAA CATCGCCTAT CAGCTGCCAT
  51 CATTGGCGTT TTATTATTCA TTAGCCCATC AGTGCAAGCA AATACGACAC
 101 ACCATCACAC GCTAACCAGT AGCGAGCTTA AACTTGCTGA TGATAGTATT
 151 ATTGATAGTA TCAATCAATT GGGTGAGCTG ACCGTCAATA TTCCAAATAC
 201 ACAATATTTT CAAACCAACA ACGGTGTGAG CGTTGCTTTT ACGCCATTAC
 251 ATGAGCTGCC TATTGTCGAT ATCAGCTTGT ATTTTAATGC AGGGTCAGCG
 301 TATGACCATC AGGTTGGCAA ATCAGGCACG GCTAACATGG TTGCAACCAT
 351 GCTCACCCAA GGAACTGACA GCCTTTCTGA AGATGAGTTT GTTGCTGCCA
 401 AAGAGCGTCT TGGCATTGAT TTTACCAGTA CAGCAAATAA GGATAACTTA
 451 ACTTTATCAT TAAGAAGCTT GTCTGATCAA TCATTATTAA ATCAAGCCGC
 501 CGATTTAATG GTCGATGCTG TCACTCAACC TGCTTTTGAT GATAAGACTC
 551 TACAACGCAA CAAAAATCAG CTCATCACCA GTTTAAAACA AAAAAGCAA
 601 AACCCTTATC ATGTAGCTTC TGTTGCTTAT CATCAAGCCG TATATGAAAA
 651 TCATCCTTAT GCACACGCAA CCACAGGCGA TGAAGATAGT ATTGCCAAAA
 701 TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTTGGC ATACTTTTAT TAATGCAAAT
 751 AATGCGACAC TGGTGATTAC AGGTGATATG ACCGCCGAGC AAGCCAAATC
 801 ACTTGCCAAC CATCTGACCG CCAAATTACC GACAGGCAAG TCGTATAAAA
 851 ATACGCTGGA TTTGACAAAA CCAGTTAAGG CTCGTCATAT CCATATTCCT
 901 CACAACAGTA GTCAAACCCA AATCATCATC GGTCATCCCA CCAGTAAAGT
 951 ACGCACGGAC AAAGCAGGTC GTCAAGAGTT CAGCGATTTT TCATTAGGTA
1001 ATGAAATTTT GGCAGGTGGT GATTTTAATG CCAGATTGAT GAAAACCATT
1051 CGAGAGCAAA AAGGCTACAC TTATGGCATT TATGGCGGTA TGGAACGCCT
1101 CAGAGCAGGT GGTAATTATG TGGTTGAATT TTCAACCGAT GGCGATAAAG
1151 CAGCCGATGC CATTTTAGAG ACGCTACACA TCATTAATGA GTCGCTGAAT
1201 GAAGGCATAA CCCAAGAAGA GCTTGAGTTG GTGCGTTTGG GCAATAAAAA
1251 TGGTTTTTGC AATATTTTTT CAAGCAATGC CAGTATTCAT CGTGTCATTG
1301 GTGCTTTATT TGTTGCCGAT TATCCAAAAG ATCATCTTAA CCATACGCTC
1351 AATCGCTTGG ATAATGCCAC GATAAATAGT GTTAATACCG CACTGAACTT
1401 GCGTATCAAG CCTGATGAAT TTATCATCAT CACCGTGGGT AAAACTAAGC
1451 CAAATTTGGA CAAATAA
```

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1. 包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸:

(a) 编码与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(b)编码与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(c) 编码与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物序列的多肽的多核苷酸;

(e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸;

(f) 编码多肽带有表位的部分的多核苷酸,该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(g) 包含选自 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13 或其片段或类似物的序列的多核苷酸;

(h) 与(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)中的多核苷酸互补的多核苷酸。

2. 包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸:

(a) 编码与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列;

(b) 编码与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列;

(c) 编码与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列；

(d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的多肽的多核苷酸；

(e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸；

(f) 编码多肽带有表位的部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列；

(g) 包含选自 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13 的序列的多核苷酸；

(h) 与(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)中的多核苷酸互补的多核苷酸。

3. 权利要求 1 的多核苷酸，其中所述多核苷酸是 DNA。

4. 权利要求 2 的多核苷酸，其中所述多核苷酸是 DNA。

5. 权利要求 1 的多核苷酸，其中所述多核苷酸是 RNA。

6. 权利要求 2 的多核苷酸，其中所述多核苷酸是 RNA。

7. 分离的多核苷酸，其在严谨条件下与(a)编码多肽的 DNA 序列或(b)编码多肽的 DNA 序列的互补序列杂交；其中所述多肽包含选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

8. 权利要求 1 的多核苷酸，其在严谨条件下与(a)编码多肽的 DNA 序列或(b)编码多肽的 DNA 序列的互补序列杂交；其中所述多肽包含选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

9. 权利要求 2 的多核苷酸，其在严谨条件下与(a)编码多肽的 DNA 序列或(b)编码多肽的 DNA 序列的互补序列杂交；其中所述多肽包含选自 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14 的序列。

10. 权利要求 1 的多核苷酸，其在严谨条件下与(a)编码多肽的 DNA 序列或(b)编码多肽的 DNA 序列的互补序列杂交；其中所述多肽包含来自包含选自 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽的至少 10 个连续氨基酸残基。

11. 权利要求 2 的多核苷酸，其在严谨条件下与(a)编码多肽的 DNA 序列或(b)编码多肽的 DNA 序列的互补序列杂交；其中所述多肽包含来自包含选自 SEQ ID NO：2、4、6、8、10、12、14 的序列的多肽的至少 10 个连续氨基酸残基。

12. 包含权利要求 1 的多核苷酸的载体，其中所述 DNA 与表达控制区有效连接。

13. 包含权利要求 2 的多核苷酸的载体，其中所述 DNA 与表达控制区有效连接。

14. 利用权利要求 12 的载体转染的宿主细胞。

15. 利用权利要求 13 的载体转染的宿主细胞。

16. 产生多肽的方法，其包含在适于表达所述多肽的条件下培养权利要求 14 的宿主细胞。

17. 产生多肽的方法，其包含在适于表达所述多肽的条件下培养权利要求 15 的宿主细胞。

18. 包含选自下列多肽的分离的多肽:

(a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽，该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的氨基酸序列;

(b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽，该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的氨基酸序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽，该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的氨基酸序列;

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽;

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 多肽带有表位的部分，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除 N 端甲硫氨酸残基;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除分泌氨基酸序列。

19. 包含选自下列多肽的分离的多肽:

(a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽，该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的氨基酸序列;

(b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽，该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的氨基酸序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽，该第二种多肽具有包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的氨基酸序列；

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的多肽；

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽；

(f) 多肽带有表位的部分，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 的序列；

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除 N 端甲硫氨酸残基；

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除分泌氨基酸序列。

20. 包含两种或多种具有选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽的嵌合多肽；只要将所述多肽连接成嵌合多肽。

21. 包含两种或多种具有选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽的嵌合多肽；只要将所述多肽连接成嵌合多肽。

22. 药物组合物，其包含权利要求 18-21 任一项的多肽以及药物可接受载体、稀释剂或佐剂。

23. 预防性或治疗性治疗易受莫拉氏菌感染宿主的莫拉氏菌感染的方法，其包含给予所述宿主预防或治疗量的权利要求 22 的组合物。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述宿主是新生儿、婴儿或儿童。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述宿主是无免疫应答的宿主。

26. 权利要求 23 的方法，其中所述宿主是成年人。

27. 治疗性或预防性治疗中耳炎、窦炎、持续性咳嗽、急性喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎和侵袭性疾病的方法，其包含给予所述宿主治疗或预防量的权利要求 22 的组合物。

28. 诊断易受莫拉氏菌感染宿主的莫拉氏菌感染的方法，其包含

(a)从宿主获得生物样品；

(b)将该生物样品与对权利要求 18-21 任一项的多肽具有反应性的抗体或其片段温育，以形成混合物；

(c)在混合物中检测表明存在莫拉氏菌的特异性结合的抗体或片段。

29. 在包含或怀疑包含莫拉氏菌抗原的特异性抗体的生物样品中检测所述抗体的方法，其包含

(a)从宿主获得生物样品；

(b)将该生物样品与权利要求 18-21 任一项的一种或多种多肽或其片段温育，以形成混合物；

(c)在混合物中检测表明存在莫拉氏菌的特异性抗体的特异性结合的抗原或片段。

30. 权利要求 22 的药物组合物用于制备预防性或治疗性治疗莫拉氏菌感染的药物中的用途。

31. 试剂盒，其包含权利要求 18-21 任一项的多肽，用于检测或诊断莫拉氏菌感染。

粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌)抗原

发明领域

本发明涉及可能用来预防、诊断和/或治疗粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)感染的多肽，特别是粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)的多肽。

发明背景

粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)(**Moraxella (Branhamella) catarrhalis**)是引起人呼吸道感染的革兰氏阴性双球菌。如今认为粘膜炎莫拉氏菌是继肺炎链球菌(**Streptococcus pneumoniae**)和流感嗜血杆菌(**Haemophilus influenzae**)之后，引起婴幼儿中耳炎的第三个最常见病因。粘膜炎莫拉氏菌也与几种其它类型的感染有关，包括窦炎、持续性咳嗽、成人急性喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎、以及无免疫应答宿主中的侵袭性疾病。

大约 90%的粘膜炎莫拉氏菌菌株耐受抗生素(β-内酰胺酶阳性)，而且复发性中耳炎发病率高，因此有必要开发保护宿主防止粘膜炎莫拉氏菌感染的疫苗。粘膜炎莫拉氏菌感染诱导针对细菌细胞表面上抗原的免疫应答。但尚未鉴定其中许多表面蛋白质，也未确定防止不同菌株感染的免疫应答。

为开发保护宿主防止粘膜炎莫拉氏菌感染的疫苗，主要致力于外膜蛋白质，例如称为泛在的表面蛋白质 A (UspA)的高分子量蛋白质。该蛋白质被认为是有希望的候选疫苗，因其单克隆抗体和多克隆抗体在小鼠肺清除模型中均显示杀菌和保护作用。然而，该蛋白质在不同粘膜炎莫拉氏菌菌株间的变异较强。除该蛋白质以外，注意到其它的粘膜炎莫拉氏菌蛋白质可作为可能的候选疫苗。具有保守性表位的转

铁蛋白结合蛋白暴露于细菌表面。然而，不同菌株之间蛋白质的抗体交叉反应性程度存在差异。 其它研究者还关注 45-kDa 蛋白质 CD (OMP CD)。该蛋白质在粘膜炎莫拉氏菌菌株间高度保守，但慢性阻塞性肺病的成年人对 OMP CD 的免疫应答具有变异性。

因此，仍亟需可用于预防、诊断和/或治疗粘膜炎莫拉氏菌(布兰汉氏菌属)感染的粘膜炎莫拉氏菌多肽。

发明概述

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 70％同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面涉及包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽。

其它方面提供了由本发明多核苷酸编码的多肽、药物组合物、包含有效连接表达控制区的本发明多核苷酸的载体、利用所述载体转染的宿主细胞以及包含在适于表达的条件下培养所述宿主细胞的多肽产生方法。

附图简述

图 1 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC2 基因的 DNA 序列；SEQ ID NO: 1。 下划线部分序列代表前导肽编码区。

图 2 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC2 多肽的氨基酸序列；SEQ ID NO: 2。 下划线序列代表 30 个氨基酸残基的前导肽。

图 3 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 的 BVH-MC2 基因的部分 DNA 序列；SEQ ID NO: 3。

图 4 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 的 BVH-MC2 多肽的部分氨基酸序列；SEQ ID NO: 4。

图 5 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU T-25 的 BVH-MC2 基因的部分 DNA 序列；SEQ ID NO: 5。

图 6 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU T-25 的 BVH-MC2 多肽的部分氨基酸序列；SEQ ID NO: 6。

图 7 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 M-12 的 BVH-MC2 基因的部分 DNA 序列；SEQ ID NO: 7。

图 8 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 M-12 的 BVH-MC2 多肽的部分氨基酸序列；SEQ ID NO: 8。

图 9 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC3 基因的 DNA 序列；SEQ ID NO: 9。 下划线部分序列代表前导肽编码区。

图 10 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC3 基因的氨基酸序列；SEQ ID NO: 10。 下划线序列代表 46 个氨基酸残基的前导肽。

图 11 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC4 基因的 DNA 序列；SEQ ID NO: 11。下划线部分序列代表前导肽编码区。

图 12 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC4 多肽

的氨基酸序列；SEQ ID NO: 12。 下划线序列代表 42 个氨基酸残基的前导肽。

图 13 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC5 基因的 DNA 序列；SEQ ID NO: 13。下划线部分序列代表前导肽编码区。

图 14 代表来自粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的 BVH-MC5 多肽的氨基酸序列；SEQ ID NO: 14。 下划线序列代表 60 个氨基酸残基的前导肽。

图 15 描述使用 MacVector 序列分析软体的 Clustal W 程序 (6.5 版)对粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2、ETSU 658、ETSU T-25 和 M-12 的 BVH-MC2 基因的部分核苷酸序列进行的比较。共有序列一行位于比对下方，其中*和空格分别代表序列间相同的核苷酸以及差异。

图 16 描述使用 MacVector 序列分析软体的 Clustal W 程序 (6.5 版)对粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2、ETSU 658、ETSU T-25 和 M-12 的 BVH-MC2 部分开放阅读框架的预测的氨基酸序列进行的比较。共有序列性一行位于比对下方，其中*代表相同的氨基酸残基。

发明详述

本发明提供纯化和分离的多核苷酸，其编码可用于预防、诊断和/或治疗莫拉氏菌感染的莫拉氏菌多肽。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 70% 同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 80% 同一性的多

肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具至少 95%同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 70％同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 80％同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具至少 95%同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面涉及包含选自 SEQ ID Nos: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽。

本发明一方面涉及以包含 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 或 14 的氨基酸序列为特征的多肽。

本发明一方面提供了编码多肽带有表位的部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面提供了编码多肽带有表位的部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面涉及编码多肽带有表位的部分，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

本发明一方面涉及编码多肽带有表位的部分，该多肽包含选自 SEQ ID Nos: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具至少 70%同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具有至少 80％同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具至少 90%同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面提供了编码与第二种多肽具至少 95%同一性的多肽的分离的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

本发明一方面涉及包含选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽。

本发明一方面提供了包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸:

(a) 编码与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列；

(b) 编码与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列；

(c) 编码与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽的多核苷酸，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列；

(d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物序列的多肽的多核苷酸；

(e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸；

(f) 编码多肽带有表位的部分的多核苷酸，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列；

(g) 包含选自 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13 或其片段或类似物的序列的多核苷酸；

(h) 与(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)中的多核苷酸互补的多核苷酸。

本发明一方面提供了包含选自下列多核苷酸的分离的多核苷酸:

(a) 编码与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(b) 编码与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(c) 编码与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽的多核苷酸,该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(d) 编码包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽的多核苷酸;

(e) 编码能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽的多核苷酸;

(f) 编码多肽带有表位的部分的多核苷酸,该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(g) 包含选自 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11 和 13 的序列的多核苷酸;

(h) 与(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)或(g)中的多核苷酸互补的多核苷酸。

本发明一方面提供了包含选自下列多肽的分离的多肽:

(a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽;

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 多肽带有表位的部分，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除 N 端甲硫氨酸残基;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除分泌氨基酸序列。

本发明一方面提供了包含选自下列多肽的分离的多肽:

(a) 与第二种多肽具有至少 70%同一性的多肽，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(b) 与第二种多肽具有至少 80%同一性的多肽，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(c) 与第二种多肽具有至少 95%同一性的多肽，该第二种多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(d) 包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽;

(e) 能够产生对包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽具有结合特异性的抗体的多肽;

(f) 多肽带有表位的部分，该多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列;

(g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除 N 端甲硫氨酸残基;

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)中的多肽，其中去除分泌氨基酸序列。

本领域技术人员应当理解，本发明包括编码本专利申请此处所述多肽的类似物例如突变体、变体、同源物和衍生物的 DNA 分子，即多核苷酸及其互补序列。本发明也包括本发明的 DNA 分子对应的 RNA

分子。除 DNA 和 RNA 分子以外，本发明包括相应的多肽以及特异性结合该多肽的单克隆抗体。

在另一实施方案中，本发明的多肽是抗原性的。

在另一实施方案中，本发明的多肽是免疫原性的。

在另一实施方案中，本发明的多肽可以激发宿主的免疫应答。

在另一实施方案中，本发明也涉及能够产生与上述本发明多肽具有结合特异性的抗体的多肽。

“具有结合特异性”的抗体是识别并结合所选多肽、而基本上不识别并结合样品中(例如，天然包括所选肽的生物样品)其它分子的抗体。以所选多肽为抗原，利用 ELISA 分析可以测定其特异性结合。

根据本发明，生物学研究中的"保护"定义为显著提高存活曲线、存活率或存活时间。分别使用对数秩和检验比较存活曲线，以及 Fisher 精确检验比较存活率和至死天数的统计分析，可用来计算 P 值并确定两组之间的差异是否在统计上有显著意义。P 值 0.05 被认为不显著。

本发明另一方面提供了本发明多肽的抗原性/免疫原性片段、或其类似物。

本发明的片段应该包括一种或多种这样的表位性区域，或与这样的区域基本类似，以保留其抗原性/免疫原性性质。因此，对于本发明的片段，同一性程度也许没有关系，因为它们可能与此处所述多肽或其类似物的特定部分具有 100%的同一性。 本发明进一步提供了具有本发明多肽序列的至少 10 个连续氨基酸残基的片段。在一个实施方案

中，至少 15 个连续的氨基酸残基。在一个实施方案中，至少 20 个连续的氨基酸残基。

技术人员应当理解，本发明多肽的类似物也在本发明范围内得到应用，即作为抗原性/免疫原性物质。 因此，举例来说，本发明包括包含一种或多种添加、缺失、置换等的蛋白质或多肽。

此处所用本发明多肽的"片段"、"类似物"或"衍生物"包括其中一个或多个氨基酸残基被替换为保守性或非保守性氨基酸残基(优选保守性)的、可能天然或非天然存在的多肽。在一个实施方案中，本发明多肽的衍生物和类似物应与图示序列或其片段具有大约 80%同一性。也就是说，80%的残基相同。在另一实施方案中，多肽具有大于 80%的同一性。 在另一实施方案中，多肽具有大于 85%的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 90%的同一性。 在另一实施方案中，多肽具有大于95%的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 99%的同一性。 在另一实施方案中，本发明多肽的类似物具有少于约 20 个氨基酸残基的置换、修饰或缺失，更优选少于 10 个。

这些置换对该多肽的二级结构和亲水性质影响极小。优选本领域已知的保守性置换，即所置换的残基共有物理或化学性质，例如疏水性、大小、电荷或功能基团。 其中包括例如 Dayhoff, M.在 Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 中以及 Argos, P.在 EMBO J. 8,779-785, 1989 中所述的置换。 例如，属于下列各组之一的天然或非天然氨基酸代表保守性变化:

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his; 以及

phe, tyr, trp, his。

优选的置换还包括相应 L-氨基酸的 D-对映异构体的置换。

在另一方法中，该类似物可以是融合多肽，例如通过有效标识目的多肽，引入使纯化更为容易的部分。可能需要去除"标签"，或可能融合多肽自身保有充分可用的抗原性。

同源性百分比定义为同一性百分比加上相似性或氨基酸类型保守性百分比的总和。

在一个实施方案中，本发明多肽的类似物与图示序列或其片段具有大约 70%同一性。也就是说，70%的残基相同。 在另一实施方案中，多肽具有大于 80%的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 85%的同一性。 在另一实施方案中，多肽具有大于 90%的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 95%的同一性。在另一实施方案中，多肽具有大于 99%的同一性。在另一实施方案中，本发明多肽的类似物具有少于约 20 个氨基酸残基的置换、修饰或缺失，更优选少于 10 个。

在一个实施方案中，本发明多肽的类似物与图示序列或其片段具有大约 70%同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 80%的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 85%的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 90%的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 95%的同源性。在另一实施方案中，多肽具有大于 99%的同源性。 在另一实施方案中，本发明多肽的类似物具有少于约 20 个氨基酸残基的置换、修饰或缺失，更优选少于 10 个。

人们可以利用诸如 CLUSTAL 程序比较氨基酸序列。该程序对氨基酸序列进行比较，通过在视情况而定的任一序列中插空而找到最佳

比对。有可能计算氨基酸同一性或同源性，进行最佳比对。 类似 BLASTx 的程序可比对最长一段的相似序列，为该匹配赋值。因此有可能实现比对，其中找到各具有不同得分的若干相似性区域。 两种同一性分析均包含于本发明之内。

在另一方法中，该类似物或衍生物可以是融合多肽，例如通过有效标识目的蛋白质或多肽，引入使纯化更为容易的部分， 可能需要去除"标签"，或可能融合多肽自身保有充分可用的抗原性。

众所周知，有可能筛选抗原性多肽，以鉴定表位区，即决定该多肽抗原性或免疫原性的区域。 进行这种筛选的方法为本领域所公知。因此，本发明的片段应该包括一种或多种这样的表位区，或与这种区域基本类似，以保留其抗原性/免疫原性性质。

因此，对于本发明的片段，同一性程度也许没有关系，因为它们可能与此处所述多肽、类似物的特定部分具有 100%的同一性。

因此，对于类似物、衍生物和片段而言，重要的是它们具有至少所来源蛋白质或多肽的一定程度的抗原性/免疫原性。

本发明还包括与可改变该多肽生物学或药理学性质的其它化合物融合的多肽，即提高半衰期的聚乙二醇(PEG)；便于纯化的前导或分泌氨基酸序列；前原-和原-序列；以及(多)糖。

另外，当发现氨基酸区域具有多态性时，可能需要改变一种或多种特定氨基酸，以更有效摹拟不同莫拉氏菌株的不同表位。

此外，可以通过末端-NH_2的酰化作用(例如乙酰化、或巯基乙酸酰胺化、末端羧基酰胺化，例如利用氨或甲胺)修饰本发明的多肽，以提

供稳定性、提高疏水性，用于连接或结合支持物或其它分子。

本发明还包括该多肽片段和类似物的异型和同型多肽多聚体。这些多聚体形式包括，例如利用交联剂例如亲和素/生物素、戊二醛(gluteraldehyde)或二甲基 superimidate 交联的一种或多种多肽。 这种多聚体形式还包括通过重组 DNA 技术产生的多顺反子 mRNA 制备的包含两个或多个串联或颠倒的连续序列的多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含一种或多种本申请附图中定义的多肽、或其片段或类似物的嵌合多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含两种或多种具有选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列的多肽的嵌合多肽；只要该多肽被连接成嵌合多肽。

在另一实施方案中，本发明还涉及包含两种或多种具有选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽的嵌合多肽，只要该多肽被连接成嵌合多肽。

本发明多肽的片段、类似物或衍生物优选包含至少一个抗原性区域，即至少一个表位。

为了形成抗原性聚合物(即合成的多聚体)，可以使用具有双卤代乙酰基(bishaloacetyl)、硝基芳卤(nitroarylhalides)等的多肽，这些试剂对硫基具有特异性。因此，不同多肽的两个巯基之间的连接可能是单键或可能由至少 2 个、一般至少 4 个、不多于 16 个、但通常不多于约 14 个碳原子的连接基团组成。

在特定实施方案中，本发明的多肽片段和类似物不包含起始残基，

例如甲硫氨酸(Met)或缬氨酸(Val)。优选多肽不引入前导或分泌序列(信号序列)。可根据已建立的分子生物学技术确定本发明多肽的信号部分。一般而言，可能从莫拉氏菌培养物分离目的多肽，随后测序，以确定成熟蛋白质的起始残基，从而确定成熟多肽的序列。

应当理解，可以制备和/或使用无起始密码子(甲硫氨酸或缬氨酸)和/或无前导肽的多肽，以利于制备和纯化重组多肽。众所周知，克隆无编码前导肽序列的基因将使该多肽限于大肠杆菌细胞质中，便于回收(Glick, B. R.和 Pasternak, J. J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA", 第二版, ASM Press, Washington DC, 109-143 页)。

本发明另一方面提供了(i)包含本发明多肽连同载体、稀释剂或佐剂物质的组合物；(ii)包含本发明多肽和载体、稀释剂或佐剂的药物组合物；(iii)包含本发明多肽和载体、稀释剂或佐剂的疫苗；(iv)通过给予宿主致免疫有效量的本发明多肽，激发免疫应答，例如对莫拉氏菌的保护性免疫应答，从而诱导宿主中针对莫拉氏菌的免疫应答的方法；特别是(v)通过给予所需宿主预防性或治疗性剂量的本发明多肽，而预防和/或治疗莫拉氏菌感染的方法。

本发明另一方面提供了(i)包含本发明多核苷酸连同载体、稀释剂或佐剂物质的组合物；(ii)包含本发明多核苷酸和载体、稀释剂或佐剂的药物组合物；(iii)通过给予宿主致免疫有效量的本发明多核苷酸，激发免疫应答，例如对莫拉氏菌的保护性免疫应答，从而诱导宿主中针对莫拉氏菌的免疫应答的方法；特别是(iv)通过给予所需宿主预防性或治疗性剂量的本发明多核苷酸，而预防和/或治疗莫拉氏菌感染的方法。

本发明多肽也可以在免疫之前耦联或缀合载体蛋白质，例如破伤风毒素、白喉毒素、乙型肝炎病毒表面抗原、脊髓灰质炎病毒 VP1 抗原或任何其它病毒性或细菌性毒素或抗原、或任何合适蛋白质以刺激形成更强免疫应答。可以通过化学或遗传方法进行耦联或缀合。有关肽-载体缀合的更详细说明参见 Van Regenmortel, M. H. V., Briand J. P., Muller S., Plaué S., «Synthetic Polypeptides as antigens» in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 19 卷 (ed.) Burdou, R. H. & Van Knippenberg P. H. (1988), Elsevier New York。

本发明另一方面提供了包含一种或多种本发明莫拉氏菌多肽与药物可接受佐剂的混合的药物组合物。合适的佐剂包括(1)水包油型乳剂，例如 MF59™、SAF™、Ribi™; (2)弗氏完全或不完全佐剂; (3) 盐，即 $AlK(SO_4)_2$、$AlNa(SO_4)_2$、$AlNH_4(SO_4)_2$、$Al(OH)_3$、$AlPO_4$，硅土、高岭土; (4)皂甙衍生物例如 Stimulon™，或其形成的颗粒例如 ISCOMs (免疫刺激复合物); (5) 细胞因子例如白细胞介素、干扰素、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF); (6)诱导粘膜免疫的其它物质，例如碳多核苷酸，即多聚 IC 和多聚 AU，去毒霍乱菌毒素(CTB)以及大肠杆菌热不稳定性毒素。佐剂的更详细说明参见 M. Z. I Khan 等人综述 Pharmaceutical Research, 11 卷, No. 1 (1994)2-11 页，还参见 Gupta 等人综述 Vaccine, 卷 13, No. 14, 1263-1276 页(1995)以及 WO 99/24578。优选的佐剂包括 QuilA™、QS21™、Alhydrogel™和 Adjuphos™。

可通过注射、快速输注、鼻咽吸收、皮肤吸收、或含服、或口服，经肠胃外给予本发明的药物组合物。

本发明的药物组合物可用于预防莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌感染所致疾病和症状，所述于 Manual of Clinical Microbiology, P. R.

Murray (主编), E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover 和 R. H. Yolken. ASM Press, Washington, D. C. 第七版, 1999,1773 页。在一个实施方案中，本发明的药物组合物可用于治疗或预防中耳炎、窦炎、持续性咳嗽、急性喉炎、化脓性角膜炎、新生儿结膜炎。 在一个实施方案中，本发明的疫苗组合物可用于治疗或预防莫拉氏菌感染和/或由莫拉氏菌感染所致疾病和症状。在另一实施方案中，该莫拉氏菌感染为粘膜炎莫拉氏菌。

在另一实施方案中，本发明提供了预防或治疗易受莫拉氏菌感染宿主的莫拉氏菌感染的方法，其包含给予所述宿主预防性或治疗性数量的本发明组合物。

本申请所用术语"宿主"包括哺乳动物。在另一实施方案中，该哺乳动物是人。

在特定实施方案中，将药物组合物给予处于莫拉氏菌感染危险中的宿主，例如新生儿、婴儿、儿童、老人以及无免疫应答的宿主。

在特定实施方案中，将药物组合物给予处于莫拉氏菌感染危险中的宿主，例如成人。

药物组合物的单位剂型优选约 0.001 - 100 μg/kg (抗原/体重)，更优选 0.01 - 10 μg/kg，最优选 0.1 - 1 μg/kg，1 - 3 次，免疫之间间隔约 1- 6 周。

药物组合物的单位剂型优选约 0.1μg - 10 mg，更优选 1 μg - 1 mg，最优选 10 - 100 μg，1 - 3 次，免疫之间间隔约 1- 6 周。

本发明另一个方面提供了编码多肽的多核苷酸，该多肽的特征在

于，氨基酸序列包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12、14 或其片段或类似物的序列。

在一个实施方案中，多核苷酸如 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13 所示，可能包括开放阅读框架(ORF)，其编码本发明的多肽。

应当理解，图示多核苷酸序列可以改变为简并密码子，但仍编码本发明多肽。因此，本发明进一步提供可与此处上述的多核苷酸序列(或其互补序列)杂交的多核苷酸，序列之间具有 70%同一性。 在一个实施方案中，序列之间具有至少 80%同一性。在一个实施方案中，序列之间具有至少 85%同一性。 在一个实施方案中，序列之间具有至少 90%同一性。在另一实施方案中，多核苷酸在严谨条件下杂交，即具有至少 95%同一性。 在另一实施方案中，具有多于 97%的同一性。

本领域技术人员很容易确定合适的严谨杂交条件(例如参见 Sambrook 等人, (1989) Molecular cloning : A Laboratory Manual,第二版, Cold Spring Harbor, N. Y.; Current Protocols in Molecular Biology, (1999) Ausubel F. M.等人编著., John Wiley & Sons, Inc., N. Y.)。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

(a) 编码多肽的 DNA 序列，或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列;

其中所述多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14、或其片段或类似物的序列。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

(a) 编码多肽的 DNA 序列，或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列；

其中所述多肽包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

(a) 编码多肽的 DNA 序列，或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列；

其中所述多肽包含至少 10 个连续的氨基酸残基，其来自包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14、或其片段或类似物的序列的多肽。

在另一实施方案中，本发明提供可在严谨条件下与下列序列杂交的多核苷酸

(a) 编码多肽的 DNA 序列，或

(b) 编码多肽的 DNA 序列的互补序列；

其中所述多肽包含至少 10 个连续的氨基酸残基，其来自包含选自 SEQ ID No: 2、4、6、8、10、12 或 14 的序列的多肽。

在另一实施方案中，多核苷酸如 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13 所示，或为其片段或类似物，编码本发明的多肽。

在另一实施方案中，多核苷酸如 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11 或 13 所示，编码本发明的多肽。

本领域技术人员容易理解，多核苷酸包括 DNA 和 RNA。

本发明还包括与本申请所述多核苷酸互补的多核苷酸。

另一方面，编码本发明多肽的多核苷酸、或其片段、类似物或衍生物，可用于 DNA 免疫方法。也就是说，能够将它们引入可进行复制和表达的载体，通过注射从而在体内产生抗原性多肽。 例如，可将多核苷酸引入质粒载体，位于在真核细胞中起作用的 CMV 启动子控制之下。优选肌内注射该载体。

本发明另一方面提供了通过重组技术在宿主细胞中表达编码所述多肽的多核苷酸、并回收所表达的多肽产物、从而制备本发明多肽的方法。另外，可以根据已经建立的化学合成技术制备该多肽，即液相或固相合成寡肽，连接起来制备完整的多肽(区段连接)。

下列参考文献描述了获取并鉴定多核苷酸和多肽的一般方法：Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M.等人编著, John Wiley and Sons, Inc. New York; PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering, White B. A.编著, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 页; Protein Purification, Principles and Practices, Scopes R. K., Springer-Verlag, New York, 第三 版, 1993, 380 页; Current Protocols in Immunology, Coligan J. E.等人编著, John Wiley & Sons Inc., New York。

本发明提供了产生多肽的方法，其包含在适于表达所述多肽的条件下培养本发明的宿主细胞。

为进行重组制备，利用编码本发明多肽的载体转染宿主细胞，然后在适当改变的培养基中培养，以活化启动子、选择转化子或扩增基因。合适的载体可在所选宿主中存活并复制，包括染色体、非染色体

以及合成 DNA 序列，例如细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒、联合质粒和噬菌体 DNA 得到的载体。 可以利用限制性内切酶将多肽序列引入载体适当位点，使其有效连接包含启动子、核糖体结合位点(共有序列区域或 SD 序列)以及任选操纵子(控制元件)的表达控制区。可以根据已确立的分子生物学原理，选择适于指定宿主和载体的各个表达控制区元件(Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M.等人编著, John Wiley and Sons, Inc. New York)。合适的启动子包括但不限于 LTR 或 SV40 启动子、E. coli lac、tac 或 trp 启动子以及噬菌体 λ P_L 启动子。载体优选引入复制起点以及选择标志，即氨苄青霉素抗性基因。 合适的细菌性载体包括 pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 以及真核载体 pBlueBacIII、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG 和 pSVL。宿主细胞可能是细菌，即大肠杆菌(E. coli)、枯草杆菌(Bacillus subtilis)、链霉菌(Streptomyces)；真菌，即黑曲霉(Aspergillus niger)、构巢曲菌(Aspergillus nidulins)；酵母，即糖酵母属(Saccharomyces)或真核细胞，即 CHO、COS。

在培养物中表达多肽后，一般离心收集细胞，然后利用物理或化学方法裂解(如果该表达多肽未分泌到培养基中)，保留得到的粗提物，以分离目的多肽。根据多肽性质，利用已建立的技术从培养基或裂解物中纯化多肽，即使用硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、羟基磷灰石层析以及凝集素层析。使用 HPLC 完成最终纯化。

该多肽可能在有或没有前导或分泌序列的情况下表达。在前一种情况下，可能利用翻译后加工去除前导序列(参见 US 4,431,739; US

4,425,437 和 US 4,338,397)，或在纯化所表达的多肽之后，通过化学去除。

另一方面，本发明的莫拉氏菌多肽可用于莫拉氏菌感染、特别是粘膜炎莫拉氏菌感染的诊断性检验。可能有若干诊断方法，例如，可以按照以下方法检测生物样品中的莫拉氏菌生物体:

(a)从宿主获得生物样品;

(b)将与本发明的莫拉氏菌多肽具有反应性的抗体或其片段与该生物样品温育，以形成混合物；以及

(c)在混合物中检测表示存在莫拉氏菌的特异性结合的抗体或片段。

另外，在包含或怀疑包含莫拉氏菌抗原的特异性抗体的生物样品中检测所述抗体的方法，可能如下进行:

a)从宿主获得生物样品;

b)将本发明的一种或多种莫拉氏菌多肽或其片段与该生物样品温育，以形成混合物；以及

c)在混合物中检测特异性结合的抗原或片段，其表示存在莫拉氏菌的特异性抗体。

本领域技术人员应当承认，该诊断性检验可能具有几种形式，包括免疫学检验，例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定或乳胶凝集测定，可基本确定生物体中是否存在该蛋白质的特异性抗体。

编码本发明多肽的 DNA 序列也可能用来设计 DNA 探针，用于在怀疑包含莫拉氏菌的生物样品中检测这种细菌。本发明的检测方法包含:

(a)从宿主获得生物样品;

(b)将具有编码本发明多肽的DNA序列的一种或多种DNA探针与

该生物样品温育，以形成混合物；以及

(c)在混合物中检测表示存在莫拉氏细菌的特异性结合的 DNA 探针。

本发明的 DNA 探针还可用于检测循环中的莫拉氏菌，即样品中的莫拉氏菌核酸，例如使用聚合酶链式反应，作为诊断莫拉氏菌感染的方法。探针可能使用常规技术合成并可能固定于固相上，或者利用可检测标志进行标记。本申请优选的 DNA 探针是具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少约 6 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。在另一实施方案中，优选的 DNA 探针是具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少约 15 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。在另一实施方案中，优选的 DNA 探针是具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少约 30 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。在另一实施方案中，优选的 DNA 探针是具有与本发明莫拉氏菌多肽的至少约 50 个连续核苷酸互补的序列的寡聚体。

检测宿主中莫拉氏菌的另一诊断方法包含:

(a)利用可检测标志标记与本发明多肽或其片段具有反应性的抗体;

(b)将该标记抗体或标记片段给予宿主；以及

(c)在宿主中检测表示存在莫拉氏菌的特异性结合的标记抗体或标记片段。

另外，在包含或怀疑包含莫拉氏菌抗原的特异性抗体的生物样品中检测所述抗体的方法，可能如下进行:

a)从宿主获得生物样品;

b)将该生物样品与本发明的一种或多种莫拉氏菌多肽或其片段温育，以形成混合物；以及

c)检测混合物中特异性结合的抗原或片段，其表示存在莫拉氏菌的特异性抗体。

本领域技术人员应当承认，该诊断性检验可能具有几种形式，包括免疫学检验，例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定或乳胶凝集测定，可基本确定生物体中是否存在该蛋白质的特异性抗体。

编码本发明多肽的DNA序列也可能用来设计DNA探针，用于在怀疑包含莫拉氏菌的生物样品中检测这种细菌。本发明的检测方法包含:

(a)从宿主获得生物样品;

(b)将该生物样品与具有编码本发明多肽的DNA序列的一种或多种DNA探针温育，以形成混合物；以及

(c)在混合物中检测表示存在莫拉氏菌的特异性结合的DNA探针。

本发明一方面提供抗体在治疗和/或预防莫拉氏菌感染中的用途。

本发明另一方面在于本发明莫拉氏菌多肽作为免疫原在制备特异性抗体中的用途，用于诊断特别是治疗莫拉氏菌感染。利用适当的筛选方法，例如通过在测试模型中测定特定抗体被动防止莫拉氏菌感染的能力，可以确定合适的抗体。动物模型的例子之一为此处实施例所述小鼠模型。 该抗体可能是完整抗体或其抗原结合片段，并可能属于任何免疫球蛋白类型。该抗体或片段可能来源于动物，特别是哺乳动物，更特别是小鼠、大鼠或人。可能是天然抗体或其片段，或如果需要，可能是重组抗体或抗体片段。 术语重组抗体或抗体片段是指利用分子生物学技术制备的抗体或抗体片段。可能是多克隆的、或优选单克隆的抗体或抗体片段。 可能特异性针对与莫拉氏菌多肽有关的多种表位，但优选特异性针对一种。

本发明一方面提供抗体在预防和/或治疗莫拉氏菌感染中的用途。

本发明另一方面在于本发明的莫拉氏菌多肽作为免疫原在制备特异性抗体中的用途，用于诊断特别是治疗莫拉氏菌感染。利用适当的筛选方法，例如通过在测试模型中测定特定抗体被动防止莫拉氏菌感染的能力，可以确定合适的抗体。动物模型的例子之一为此处实施例所述小鼠模型。 该抗体可能是完整抗体或其抗原结合片段，并可能属于任何免疫球蛋白类型。该抗体或片段可能来源于动物，特别是哺乳动物，更特别是小鼠、大鼠或人。可能是天然抗体或其片段，或如果需要，可能是重组抗体或抗体片段。 术语重组抗体或抗体片段是指利用分子生物学技术制备的抗体或抗体片段。可能是多克隆的、或优选单克隆的抗体或抗体片段。 可能特异性针对与莫拉氏菌多肽有关的多种表位，但优选特异性针对一种。

本发明另一方面在于针对本发明多肽的抗体在被动免疫中的用途。可以使用本申请所述抗体。

本发明另一方面在于通过给予宿主数量足以提供被动免疫的本发明多肽进行免疫、从而产生抗体的方法。

在另一实施方案中，本发明提供本发明的药物组合物在制备预防性或治疗性治疗莫拉氏菌感染的药物中的用途。

在另一实施方案中，本发明提供包含本发明多肽的试剂盒，用于检测或诊断莫拉氏菌感染。

除非另外定义，此处所用全部技术和科学术语具有本发明所属领域技术人员通常所理解的相同含义。此处提及的所有出版物、专利申请、专利及其它参考文献均全文引入以供参考。 如有冲突，则按本说明书、包括定义为准。此外，材料、方法和实施例仅为说明目的，而非意在限制。

实施例 1

本实施例阐明 BVH-MC2 基因及相应多肽的克隆和分子特征。

从粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC2 (SEQ ID NO : 1)基因编码区，使用下列寡聚物，其中包含供加入限制性位点 NdeI (CATATG)和 XhoI (CTCGAG)的碱基突出端：DMAR544 (5'-CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATCACACG-3') ; DMAR545 (5'-GAGTTATTCTCGAGTTTGTCCAAATTTGGCTTAGTTTTAC-3')。使用 QIAgen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒，按照厂家说明(Chatsworth, CA)，从琼脂糖凝胶中纯化 PCR 产物，并用 NdeI 和 XhoI (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canada)消化。 pET21b(+)载体(Novagen, Madison, WI)经 NdeI 和 XhoI 消化，利用 QIAgen (Chatsworth, CA)的 QIAquick 凝胶提取试剂盒，从琼脂糖凝胶中纯化。将 NdeI-XhoI PCR 产物连接到 NdeI-XhoI pET21b(+)表达载体。按照 Simanis 方法(Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D. M. Glover (ed), 109-135 页)，将连接产物转化大肠杆菌株 DH5α [*Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17* (r_K-m_K+) *deoR thi-1 supE44* λ^- *gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。 使用 QIAgen 试剂盒(Chatsworth, CA)纯化包含 BVH-MC2 基因的重组 pET21b(+)质粒(rpET21b(+))，测序 DNA 插入序列(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing 试剂盒，ABI, Foster City, CA)。

表 1. 用于 PCR 扩增粘膜炎莫拉氏菌基因的寡核苷酸引物。

基因	引物 I.D.	限制性位点	载体	序列
BVH-MC2	DMAR544	*Nde*I	pET21b (+)	5'-CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATC-ACACG-3' (SEQ ID No: 15)
BVH-MC2	DMAR545	*Xho*I	pET21b (+)	5'-GAGTTATTCTCGAGTTTGTCCAAATTTGGC-TTAGTTTTAC-3' (SEQ ID No: 16)
BVH-MC2	DMAR544a	*Bgl*II	pCMV-GH	5'-TCAGTGAGATCTTGAATACGACACACCATC-3'(SEQ ID No: 17)
BVH-MC2	DMAR545a	*Sal*I	pCMV-GH	5'-GATTTGAGTTGTCGACTTATTTGTCCAAAT-TTG-3'(SEQ ID No: 18)
BVH-MC3	DMAR592	*Nde*I	pET21b (+)	5'-CGGAGTGCCATATGAGCTTAATTAATAAAT-TAAATG-3' (SEQ ID No: 19)
BVH-MC3	BMAR593	*Xho*I	pET21b (+)	5'-TATAACTCGAGGTTTTGTGCAACAGGTGTTG-3' (SEQ ID No: 20)
BVH-MC3	DMAR592a	*Bgl*II	pCMV-GH	5'-CGCTTGAGATCTTGGAAGATGTGTATCAGC-GTGC-3' (SEQ ID No: 21)
BVH-MC3	DMAR593a	*Hind*III	pCMV-GH	5'-CAATAACAAAGCTTTCAGTTTTGTGCAACA-GGTGTTG-3' (SEQ ID No: 22)
BVH-MC4	RIOS71	*Nde*I	pET21b (+)	5'-AACCGCACATATGTATCGCTTGGTGTCACC-ACC-3' (SEQ ID No: 23)
BVH-MC4	RIOS72	*Xho*I	pET21b (+)	5'-GGTGACTCGAGGTACTCATCACCAACTAAT-CGCAC-3' (SEQ ID No: 24)
BVH-MC4	RIOS71a	*Bam*HI	pCMV-GH	5'-GCAGGATCCTTATCGCTTGGTGTCACC-3' (SEQ ID No: 25)

BVH-MC4	RIOS72a	*Sal*I	pCMV-GH	5'-ATCAATCGGGTCGACTTAGTACTCATCACCA-3' (SEQ ID No: 26)
BVH-MC5	RIOS59	*Nde*I	pET21b (+)	5'-AAAGCTTCATATGGCCCAAAGTCAAGAATC-TGCC-3' (SEQ ID No: 27)
BVH-MC5	RIOS60	*Xho*I	pET21b (+)	5'-CGATAACTCGAGTTGAACATCAGGCACCTGC-3' (SEQ ID No: 28)
BVH-MC5	RIOS59a	*Bgl*II	pCMV-GH	5'-ACCATTCAAAAGAGATCTTGGCCCAAAGTC-AAGAATCTG-3' (SEQ ID No: 29)
BVH-MC5	RIOS60a	*Sal*I	pCMV-GH	5'-GTTAGACCGAGTCGACTCATTGAACATCAG-GCA-3' (SEQ ID No: 30)

已经确定，编码 BVH-MC2 多肽的开放阅读框架(ORF)包含 1467 bp，编码 488 个氨基酸残基的多肽，其预测的 pI 为 6.08，预测的分子量为 53754.35 Da。使用 Spscan 软件(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)分析预测的氨基酸残基序列(SEQ ID NO: 2)，提示存在 30 个氨基酸残基的信号肽(MDTDMKHLTKHRLSAAIIGVLLFISPSVQA)，在丙氨酸和天门冬酰胺残基间的切割位点处结束。

为利用 PCR 扩增证实存在 BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1)基因，使用以下 4 个不同的粘膜炎莫拉氏菌菌株：粘膜炎莫拉氏菌 ETSU C-2、ETSU T-25 和 ETSU 658 临床分离物由 East Tennessee State University 提供；粘膜炎莫拉氏菌菌株 M-12 由 centre de recherche en infectiologie du centre hospitalier de l'université Laval 提供。这些实验使用大肠杆菌 XL1 Blue MRF'作为阴性对照。使用寡核苷酸引物

DMAR544 和 DMAR545 (表 1)，从 4 株粘膜炎莫拉氏菌菌株和对照大肠杆菌菌株的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400，Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增 BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1)基因。在 94°C 30 秒、51°C 30 秒、72°C 1 分 20 秒进行 30 个循环，最后 72°C 延伸 7 分钟，进行 PCR。 在 1%琼脂糖凝胶中分离 PCR 产物，通过溴化乙锭染色观察。PCR 扩增结果如表 2 所示。分析扩增产物表明，BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1)基因存在于所检测的所有 4 个粘膜炎莫拉氏菌菌株的基因组中。同样利用这些寡核苷酸引物 PCR 扩增对照的大肠杆菌 DNA，未检测到产物。

测序其它菌株的 BVH-MC2 基因，证实该基因在粘膜炎莫拉氏菌菌株间具有高水平的分子保守性。使用上述寡核苷酸引物 DMAR544 和 DMAR545，PCR 扩增来自菌株 ETSU 658 (SEQ ID NO: 3)、ETSU T-25 (SEQ ID NO: 5)以及 M-12 (SEQ ID NO: 7)的粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC2 基因的各自编码区。 使用 QIAgen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒，按厂家说明书(Chatsworth, CA)从琼脂糖凝胶中纯化 PCR 产物，测序 DNA 插入序列(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing 试剂盒, ABI, Foster City, CA)。按实施例 1 的相同方法获得全序列。预测的菌株 ETSU C-2 (SEQ ID NO: 2)、ETSU 658 (SEQ ID NO: 4)、ETSU T-25 (SEQ ID NO: 6)以及 M-12 (SEQ ID NO: 8)的氨基酸序列分别如图 2、4、6 和 8 所示。图 15 和 16 分别描述粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC2 的共有序列核苷酸和预测的氨基酸序列。逐对比较 BVH-MC2 预测的多肽序列，显示 100%同一性。后一结果清楚表明 BVH-MC2 多肽在粘膜炎莫拉氏菌分离物之间高水平的分子保守性。

表 2. PCR 扩增鉴定粘膜炎莫拉氏菌基因。

菌株类别	PCR 扩增鉴定			
	BVH-MC2	BVH-MC3	BVH-MC4	BVH-MC5
ETSU C-2	+	+	+	+
ETSU 658	+	+	+	+
ETSU T-25	+	+	+	+
M-12	+	+	+	+
E. coli	-	-	-	-

实施例 2

本实施例阐明 BVH-MC3 基因及相应多肽的克隆和分子特征。

从粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC3 (SEQ ID NO : 9)基因编码区，使用下列寡聚物，其中包含供加入限制性位点 NdeI (CATATG)和 XhoI (CTCGAG)的碱基突出端：表 1 所示的 DMAR592 和 DMAR593。用来将 BVH-MC3 克隆到表达载体并测序的方法与实施例 1 类似。

已经确定，编码 BVH-MC3 的开放阅读框架(ORF)包含 1656 bp，编码 551 个氨基酸残基的多肽，其预测的 pI 为 4.68，预测的分子量为 58910.13 Da。使用 Spscan 软件(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)分析预测的氨基酸残基序列(SEQ ID NO: 10)，提示存在 46 个氨基酸残基的信号肽(MSLINKLNER ITPHVLTSIKNQDGDNADKSNLLTAFYTIFAGRLSN)，在天门冬酰胺和谷氨酸残基间的切割位点处结束。

使用寡核苷酸引物 DMAR592 和 DMAR593 进行 PCR 扩增以后，

显示在所检测的 4 个粘膜炎莫拉氏菌菌株中存在 BVH-MC3 基因(表 2)。用来 PCR 扩增 BVH-MC3 基因的方法与实施例 1 类似。同样利用这些寡核苷酸引物 PCR 扩增对照的大肠杆菌 DNA，未检测到该产物。

实施例 3

本实施例阐明 BVH-MC4 基因及相应多肽的克隆和分子特征。

从粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC4 (SEQ ID NO：11)基因编码区，使用下列寡聚物，其中包含供加入限制性位点 NdeI (CATATG)和 XhoI (CTCGAG)的碱基突出端：表 1 所示的 RIOS71 和 RIOS72。用来将 BVH-MC4 克隆到表达载体并测序的方法与实施例 1 类似。

已经确定，编码 BVH-MC4 的开放阅读框架(ORF)包含 1251 bp，编码 416 个氨基酸残基的多肽，其预测的 pI 为 4.84，预测的分子量为 46125.11 Da。使用 Spscan 软件(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)分析预测的氨基酸残基序列(SEQ ID NO: 12)，提示存在 42 个氨基酸残基的信号肽(MDTKHIQQNWLLPDGVADVLFTDAQKQESLRDALLFVLTAHG)，在甘氨酸和酪氨酸残基间的切割位点处结束。

使用寡核苷酸引物 RIOS71 和 RIOS72 进行 PCR 扩增以后，显示在所检测的 4 个粘膜炎莫拉氏菌菌株中存在 BVH-MC4 基因(表 2)。用来 PCR 扩增 BVH-MC4 基因的方法与实施例 1 类似。同样利用这些寡核苷酸引物 PCR 扩增对照的大肠杆菌 DNA，未检测到该产物。

实施例 4

本实施例阐明 BVH-MC5 基因及相应多肽的克隆和分子特征。

从粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增粘膜炎莫拉氏菌 BVH-MC5 (SEQ ID NO：13)基因编码区，使用表 1 所示的 RIOS59 和 RIOS60 寡聚物，其中包含供加入限制性位点 NdeI (CATATG)和 XhoI (CTCGAG)的碱基突出端。用来将 BVH-MC5 克隆到表达载体并测序的方法与实施例 1 类似。

已经确定，编码 BVH-MC5 的开放阅读框架(ORF)包含 639 bp，编码 212 个氨基酸残基的多肽，其预测的 pI 为 7.45，预测的分子量为 24020.08 Da。使用 Spscan 软件(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)分析预测的氨基酸残基序列(SEQ ID NO: 14)，提示存在 60 个氨基酸残基的信号肽(MNNFVYQLQSFWYELN QVNRHTIAQSPKYIQLTVLGLIVMIIGIFGWLLAIL PTIQKLNA)，在两个丙氨酸之间的切割位点处结束。

使用寡核苷酸引物 RIOS59 和 RIOS60 进行 PCR 扩增以后，显示在所检测的 4 个粘膜炎莫拉氏菌菌株中存在 BVH-MC5 基因(表 2)。用来 PCR 扩增 BVH-MC5 基因的方法与实施例 1 类似。同样利用这些寡核苷酸引物 PCR 扩增对照的大肠杆菌 DNA，未检测到该产物。

实施例 5

本实施例阐明在 CMV 质粒 pCMV-GH 中克隆粘膜炎莫拉氏菌基因。

将粘膜炎莫拉氏菌多肽 DNA 编码区插入质粒载体 pCMV-GH(Tang 等人，Nature, 1992,356: 152)中，位于巨细胞病毒(CMV)启动子转录控制下的人生长激素(hGH)基因下游。该 CMV 启动子在大肠杆菌细胞中是无功能质粒，但在将该质粒给予真核细胞后活

化。 该载体还引入了氨苄青霉素抗性基因。

从粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU C-2 的基因组 DNA 中 PCR (DNA 热循环仪 GeneAmp PCR 系统 2400, Perkin Elmer, San Jose, CA)扩增 BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1)、BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9)、BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11)和 BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13)基因不带有其前导肽区的编码区，使用表 1 所示的寡核苷酸引物，其中包含供加入限制性位点 BamHI (GGATCC)、BglII (AGATCT)、SalI (GTCGAC)或 HindIII (AAGCTT)的碱基突出端。使用 QIAgen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒(Chatsworth, CA)，从琼脂糖凝胶中纯化 PCR 产物，并用限制性内切酶(Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfe, Canada)消化。利用 BamHI、BglII、SalI 或 HindIII 消化 pCMV-GH 载体(Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)，并使用 QIAgen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒(Chatsworth, CA)从琼脂糖凝胶中纯化。 将消化的 DNA 片段连接到消化的 pCMV-GH 载体，产生位于 CMV 启动子控制下的 hGH-BVH-MC2、hGH-BVH-MC3、hGH-BVH-MC4 和 hGH-BVH-MC5 融合多肽。按照 Simanis 方法(Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D. M. Glover (ed), 109-135 页)，将连接产物转化大肠杆菌菌株 DH5α [*Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17* (r_K-m_K+) *deoR thi-1 supE44* λ^- *gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)。使用 QIAgen 试剂盒(Chatsworth, CA)纯化重组 pCMV 质粒，通过 DNA 测序证实 DNA 插入片段的核苷酸序列。

实施例 6

本实施例阐明 DNA 在激发对粘膜炎莫拉氏菌多肽抗原的免疫应答中的用途。

在 50 μg 表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的质粒

pCMV-GH-GM-CSF(Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)的存在下，肌内注射 100 μl 编码 BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1)、BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9)、BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11)和 BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13)基因的 50 μg 重组 pCMV-GH，注射 3 次，间隔 2 或 3 周，免疫每组 8 只雌性 BALB/c 小鼠(Charles River, St-Constant, Québec, Canada)。在 50 μg pCMV-GH-GM-CSF 存在下，给一组小鼠注射 50 μg pCMV-GH，作为对照。每次免疫之前以及第三次注射后七天，从眼窝采集血样，使用相应的 His-Tag 标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽作为包被抗原，利用 ELISA 测定血清抗体反应。如实施例 7 所示制备并纯化这些 His 标签标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽。

实施例 7

本实施例阐明粘膜炎莫拉氏菌重组多肽的制备和纯化。

使用带有 BVH-MC2 (SEQ ID NO: 1)、BVH-MC3 (SEQ ID NO: 9)、BVH-MC4 (SEQ ID NO: 11)和 BVH-MC5 (SEQ ID NO: 13)基因的重组 pET21b(+)质粒电穿孔(Gene Pulser II 仪器，BIO-RAD Labs, Mississauga, Canada)转化大肠杆菌菌株 AD494 (DE3) [*Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR ΔmalF3 F' [lac*$^{+}$ *(lacI*^{q}*) pro] trxB :: Kan (DE3)*] (Novagen, Madison, WI)。在该大肠杆菌菌株中，控制重组多肽表达的 T7 启动子由 T7 RNA 聚合酶(存在于λDE3 原噬菌体)特异性识别，T7 RNA 聚合酶基因位于可由异丙基-β-d-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导的 lac 启动子控制之下。将 AD494(DE3)/rpET21b(+)转化子在包含 100 μg/ml 羧苄青霉素(Sigma-Aldrich, Canada Ltd., Oakville, Canada)的 LB 培养基中(蛋白胨 10 g/L、酵母抽提物 5 g/L、NaCl 10 g/L)、于 37°C、250 转/分振荡培养，直至 A_{600} 达到 0.5。为诱导 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽生成，将细胞在终浓度 1 mM IPTG 存在下再培养 3 小时。离心沉淀 500 ml 培养物的诱导细胞，冻于-70°C。

根据 His• Tag 序列(6 个连续组氨酸残基)可结合固定于 His• Bind 金属螯合树脂的二价阳离子(Ni^{2+})的特性，利用亲和层析从 IPTG 诱导 AD494(DE3)/rpET21b(+)的可溶性细胞质组分中纯化该重组多肽。简言之，从 IPTG 诱导的 500 mL 培养物中获得的沉淀细胞重悬于包含 1 mM PMSF 的裂解缓冲液(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM 咪唑, pH 7.9)，超声处理，12,000 X g 离心 20 分钟，去除碎片。将上清置于 Ni-NTA 琼脂糖柱(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada)。利用 250 mM 咪唑 - 500mM NaCl - 20 mM Tris pH 7.9 洗脱 His 标签标记的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽。 通过对 PBS 4°C 透析，从样品中去除盐和咪唑。利用 MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois)测定从大肠杆菌可溶组分中获得的重组多肽数量。

实施例 8

本实施例阐明该 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组多肽与人腭扁桃体以及利用粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫小鼠后收集的血清的反应性。

如表 3 所示，在免疫印迹中，人腭扁桃体中存在的抗体可识别 BVH-MC2、BVH-MC3 和 BVH-MC4 His 标签的重组多肽。表明与粘膜炎莫拉氏菌一般接触的人形成特异性针对这些多肽的抗体。这些特别的人类抗体可能与防止粘膜炎莫拉氏菌感染有关。此外，免疫印迹还显示，利用富含可在小鼠模型中诱导显著肺清除的膜多肽的粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫小鼠后收集的血清，还形成可识别 BVH-MC2 His 标签的重组多肽的抗体。这些结果表明，在保护小鼠抗感染的粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂中存在该多肽，可诱导与相应 BVH-MC2 His 标签的重组多肽反应的抗体。

表 3. 人腭扁桃体以及利用粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫后的

小鼠血清与粘膜炎莫拉氏菌 His 标签的融合重组多肽在免疫印迹中的反应性。

纯化的重组多肽 I.D.[1]	表观分子量 (kDa)[2]	免疫印迹反应性	
		人腭扁桃体[3]	小鼠血清[4]
BVH-MC2	50	+	-
BVH-MC3	70	+	+
BVH-MC4	40	+	-
BVH-MC5	20	-	-

[1] 使用如实施例7所述制备并纯化的His标签的重组多肽进行免疫印迹。

[2] SDS-PAGE 之后测定 His 标签的重组多肽的分子量。

[3] 人腭扁桃体不经稀释，进行免疫印迹。

[4] 利用富含膜多肽的粘膜炎莫拉氏菌抗原性制剂免疫后收集的小鼠血清合并，稀释 1/500，进行免疫印迹。这些小鼠可防止粘膜炎莫拉氏菌的攻击。

实施例 9

本实施例阐明 BVH-MC2、BVH-MC3、BVH-MC4 和 BVH-MC5 多肽的抗体可接近粘膜炎莫拉氏菌菌株表面。

细菌在包含 0.25%葡萄糖的脑心浸液(BHI)培养基中，于 37°C 、8% CO_2 环境中生长至 OD_{490nm} 为 0.650 (~ 10^8 CFU/ml)。然后加入抗

BVH-MC2、抗 BVH-MC3、抗 BVH-MC4、抗 BVH-MC5 或对照血清，4°C 温育振摇 2 小时，使之与细胞结合。 样品在封闭缓冲液[包含 2% 牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)]中洗涤 4 次，然后加入 1 ml 利用封闭缓冲液特定稀释的缀合荧光素(FITC)的山羊抗小鼠 IgG Fc (γ)片段。 暗处振摇室温再培养 60 分钟后，样品在封闭缓冲液中洗涤 4 次，利用 0.25 %甲醛的 PBS 缓冲液 4°C 固定 18 小时。细胞在 PBS 缓冲液中洗涤 2 次，重悬于 0.5 ml PBS 缓冲液中。细胞于 4°C 暗处保存，直至流式细胞术分析(Epics® XL; Beckman Coulter, Inc.)。流式细胞术分析表明，BVH-MC2、BVH-MC3、BVH-MC4 和 BVH-MC5 的特异性抗体可有效识别所检测的同源(ETSU C-2)粘膜炎莫拉氏菌菌株表面暴露的相应表位(表 4)。 已经确定，在所分析的 10,000 个莫拉氏菌细胞中，超过 70%标记有特异性血清中的抗体。这些观察清楚表明，这些多肽可到达细胞表面，而易于被抗体识别。表明抗粘膜炎莫拉氏菌抗体在防护粘膜炎莫拉氏菌感染中具有重要作用。

表 4. 测定 BVH-MC2、BVH-MC3、BVH-MC4 和 BVH-MC5 的特异性抗体于粘膜炎莫拉氏菌 ETSU-C2 完整细胞的表面的附着。

血清类别	荧光指数[2]	标记细胞的%[3]
BVH-MC2 特异性血清混合物[4]	3.6	72.8
BVH-MC3 特异性血清混合物	7.5	82.8
BVH-MC4 特异性血清混合物	10.9	92.4
BVH-MC5 特异性血清混合物	6.7	77.4
阴性对照血清混合物[4]	1	7.4
阳性对照血清[5]	43.8	98.7

[1] 小鼠皮下注射混合 10 μg QuilA 佐剂(Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada)的 20 μg 纯化的重组多肽，注射 5 次，间隔 2 周。 血清按 1/50 稀释。

[2] 将利用免疫血清标记细胞后获得的荧光中间值除以利用对照小鼠血清获得的荧光值，计算荧光指数。 荧光值为 1 表示在完整莫拉氏菌细胞表面未结合抗体。

[3] 标记细胞占 10,000 个分析细胞的%。

[4] 合并从未免疫或伪免疫(sham-immunized)小鼠收集的血清，稀释 1/50，作为该分析的阴性对照。

[5] 将利用 20 μg 纯化的外膜多肽免疫小鼠获得的血清稀释 1/1000，用作该分析的阳性对照。

实施例 10

本实施例阐明抗 BVH-MC2 小鼠血清的杀菌活性。

将细菌接种于巧克力琼脂平板，在 37°C、8% CO_2 环境中培养 18 小时。细菌细胞然后重悬于溶菌缓冲液[10% Hanks'平衡盐溶液(HBSS)和 1%水解酪蛋白，pH 7.3]，至 OD_{490nm} 为 0.25，稀释为 8×10^4 CFU/ml。混合 25 μl 细菌悬液、50 μl 稀释的热灭活待检血清和 15 μl HBSS，37°C、8% CO_2 下振荡(200 转/分)温育 15 分钟，进行杀菌分析。然后加入终浓度 10%的含补体的兔血清，混合物于 37°C、8% CO_2 下再振荡(200 转/分)温育 60 分钟。温育结束时将 10 μl 分析混合物接种巧克力琼脂平板，测定活细菌数。将平板于 37°C、8% CO_2 环境下温育 18-24 小时。利用热灭活的、免疫前收集的小鼠血清和兔补体温育细菌，作为对照。

按下列数学式确定裂解%:

$$100-\left[\frac{A}{B}\times 100\right]$$

A = 细菌与免疫血清温育时得到的 CFU

B = 由放血前的血清得到的 CFU

使用粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 评价血清的杀菌活性。确定利用纯化的重组 BVH-MC2 多肽(SEQ ID NO: 2)免疫后收集的小鼠血清的裂解百分比为 71.3 (表 5)。

表 5. 评价抗 BVH-MC2 小鼠血清的杀菌活性。

类别	细菌滴度	裂解%
BVH-MC2 特异性血清混合物[1]	1/35	71.3
阳性对照血清[2]	1/35	92.7

[1] 小鼠皮下注射混合 10 μg QuilA 佐剂(Cedarlane Laboratories, Hornby, Canada)的 20 μg 纯化的重组多肽，注射 5 次，间隔 2 周。

[2] 将利用 20 μg 纯化的外膜多肽免疫小鼠获得的血清稀释 1/35，用作该分析的阳性对照。

实施例 11

本实施例阐明抗 BVH-MC3 小鼠血清的杀菌活性。

将细菌接种于巧克力琼脂平板，在 37°C、8% CO_2 环境中培养 18 小时。细菌细胞然后重悬于溶菌缓冲液[10% Hanks'平衡盐溶液(HBSS)

和1%水解酪蛋白，pH 7.3]，至 OD_{490nm} 为 0.25，稀释到 8×10^4 CFU/ml。混合 25 μl 细菌悬液、50 μl 稀释的热灭活待检血清和 15 μl HBSS，37°C、8% CO_2 下振荡(200 转/分)温育 15 分钟，进行杀菌分析。然后加入终浓度 10%的含补体的兔血清，混合物于 37°C、8% CO_2 下再振荡(200 转/分)温育 60 分钟。温育结束时将 10 μl 分析混合物接种巧克力琼脂平板，测定活细菌数。将平板于 37°C、8% CO_2 环境下温育 18-24 小时。利用热灭活的、免疫前收集的小鼠血清和兔补体温育细菌，作为对照。使用粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 评价血清的杀菌活性。按下列数学式确定裂解%:

$$100-\left[\frac{A}{B}\times 100\right]$$

A = 细菌与免疫血清温育时得到的 CFU

B = 由放血前的血清得到的 CFU

在利用纯化的重组 BVH-MC3 多肽免疫的 7 只小鼠的血清中发现杀菌性抗体(表 6)。对照小鼠的血清没有记录到杀菌活性(数据略)。

表 6. 评价抗 BVH-MC3 小鼠血清的杀菌活性。

血清类别[1]	裂解%
S1[2]	33.3
S2	67.9
S3	89.6
S4	66.2
S5	78.0
S6	90.1
S7	37.1
阳性对照血清[2]	77.3

[1] 小鼠 S1-S7 皮下注射混合 10 μg QuilA 佐剂(Cedarlane

Laboratories, Hornby, Canada)的 20 μg 纯化的重组多肽，注射 5 次，间隔 2 周。

[2] 从 BVH-MC3 免疫小鼠收集的每份小鼠血清按 1/50 稀释。

[3] 将利用 20 μg 纯化的外膜多肽免疫小鼠获得的血清按 1/50 稀释，用作该分析的阳性对照。

实施例 12

本实施例阐明通过用纯化的重组 BVH-MC3 多肽免疫诱导的对小鼠抗粘膜炎莫拉氏菌感染的保护作用。

在 10% QuilA 佐剂(Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada)存在下利用 20 μg 亲和纯化的 His 标签的粘膜炎莫拉氏菌重组 BVH-MC3 多肽、或单独 QuilA 佐剂的 PBS 溶液作为对照，皮下免疫每组雌性 BALB/c 小鼠(Charles River)，免疫 5 次，间隔 2 周。在每次免疫前的第 0、14、28、42 和 56 天、以及第 5 次注射后的 14 天 (第 70 天)，从眼窝采集血样。一周以后，利用大约 $1x10^6$ CFU 的粘膜炎莫拉氏菌菌株 ETSU 658 肺内攻击小鼠。将粘膜炎莫拉氏菌攻击接种物接种于巧克力琼脂板块，以测定 CFU，确证攻击剂量。 感染 5 小时以后，通过腹膜内注射戊巴比妥钠(Euthanyl™)处死小鼠。切下完整的肺，在组织匀浆器中匀浆。 通过接种系列稀释的肺匀浆液，测定 CFU，评价细菌清除作用。按下列数学式确定清除%:

$$100-\left[\frac{A}{B}\times 100\right]$$

A = 利用 BVH-MC3 多肽免疫的小鼠得到的 CFU

B = 由对照小鼠得到的 CFU

如表 7 所示，利用 BVH-MC3 多肽免疫的小鼠与对照组小鼠相比，测定其活细菌数量减少 54%。因此，利用重组 BVH-MC3 多肽免疫可促进从小鼠肺中快速清除异种粘膜炎莫拉氏菌菌株。

表 7. 通过用纯化的重组 BVH-MC3 多肽免疫小鼠的肺部清除莫拉氏菌

从对照组回收的细菌（肺匀浆物的 CFU/ml）[a]	从 BVH-MC3 组回收的细菌（肺匀浆物的 CFU/ml）[b]	细菌清除 (%)[c]
$2.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5 \pm 7.9 \times 10^4$	54

[a] 6 只小鼠的平均值±标准差。

[b] 7 只小鼠的平均值±标准差。

[c] 利用 $1x10^6$ CFU 的细菌肺内攻击小鼠，攻击 5 小时后从肺中回收存活细菌。利用上述数学式计算清除%。

<110> Shire Biochem Inc.

<120> 粘膜炎莫拉氏菌（布兰汉氏球菌属）抗原

<130> 74872-83

<150> US 60/290,653
<151> 2001-05-15

<160> 30

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 1467
<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌(Moraxella catarrhalis)

<400> 1
atggacactg acatgaaaca tttaacaaaa catcgcctat cagctgccat cattggcgtt 60

ttattattca ttagcccatc agtgcaagca aatacgacac accatcacac gctaaccagt 120

agcgagctta aacttgctga tgatagtatt attgatagta tcaatcaatt gggtgagctg 180

accgtcaata ttccaaatac acaatatttt caaaccaaca acggtgtgag cgttgctttt 240

acgccattac atgagctgcc tattgtcgat atcagcttgt attttaatgc agggtcagcg 300

tatgaccatc aggttggcaa atcaggcacg gctaacatgg ttgcaaccat gctcacccaa 360

ggaactgaca gcctttctga agatgagttt gttgctgcca aagagcgtct tggcattgat 420

tttaccagta cagcaaataa ggataactta actttatcat taagaagctt gtctgatcaa 480

tcattattaa atcaagccgc cgatttaatg gtcgatgctg tcactcaacc tgcttttgat 540

gataagactc tacaacgcaa caaaaatcag ctcatcacca gtttaaaaca aaaaaagcaa 600

aacccttatc atgtagcttc tgttgcttat catcaagccg tatatgaaaa tcatccttat 660

gcacacgcaa ccacaggcga tgaagatagt attgccaaaa ttgatcgtga tgagctgctt 720

aatttttggc atacttttat taatgcaaat aatgcgacac tggtgattac aggtgatatg 780

accgccgagc aagccaaatc acttgccaac catctgaccg ccaaattacc gacaggcaag 840

tcgtataaaa atacgctgga tttgacaaaa ccagttaagg ctcgtcatat ccatattcct 900

cacaacagta gtcaaaccca aatcatcatc ggtcatccca ccagtaaagt acgcacggac 960

aaagcaggtc gtcaagagtt cagcgatttt tcattaggta atgaaatttt ggcaggtggt 1020

gattttaatg ccagattgat gaaaaccatt cgagagcaaa aaggctacac ttatggcatt 1080

tatggcggta tggaacgcct cagagcaggt ggtaattatg tggttgaatt ttcaaccgat 1140

ggcgataaag cagccgatgc cattttagag acgctacaca tcattaatga gtcgctgaat 1200

gaaggcataa cccaagaaga gcttgagttg gtgcgtttgg gcaataaaaa tggttttgcc 1260

aatatttttt caagcaatgc cagtattcat cgtgtcattg gtgctttatt tgttgccgat 1320

tatccaaaag atcatcttaa ccatacgctc aatcgcttgg ataatgccac gataaatagt 1380

gttaataccg cactgaactt gcgtatcaag cctgatgaat ttatcatcat caccgtgggt 1440

aaaactaagc caaatttgga caaataa 1467

<210> 2
<211> 488
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 2

```
Met Asp Thr Asp Met Lys His Leu Thr Lys His Arg Leu Ser Ala Ala
1               5                  10                  15

Ile Ile Gly Val Leu Leu Phe Ile Ser Pro Ser Val Gln Ala Asn Thr
            20                  25                  30

Thr His His His Thr Leu Thr Ser Ser Glu Leu Lys Leu Ala Asp Asp
        35                  40                  45

Ser Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Leu Gly Glu Leu Thr Val Asn Ile
    50                  55                  60

Pro Asn Thr Gln Tyr Phe Gln Thr Asn Asn Gly Val Ser Val Ala Phe
65                  70                  75                  80

Thr Pro Leu His Glu Leu Pro Ile Val Asp Ile Ser Leu Tyr Phe Asn
                85                  90                  95

Ala Gly Ser Ala Tyr Asp His Gln Val Gly Lys Ser Gly Thr Ala Asn
            100                 105                 110

Met Val Ala Thr Met Leu Thr Gln Gly Thr Asp Ser Leu Ser Glu Asp
        115                 120                 125

Glu Phe Val Ala Ala Lys Glu Arg Leu Gly Ile Asp Phe Thr Ser Thr
    130                 135                 140

Ala Asn Lys Asp Asn Leu Thr Leu Ser Leu Arg Ser Leu Ser Asp Gln
145                 150                 155                 160

Ser Leu Leu Asn Gln Ala Ala Asp Leu Met Val Asp Ala Val Thr Gln
                165                 170                 175

Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn Pro Tyr His Val Ala Ser Val
        195                 200                 205

Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn His Pro Tyr Ala His Ala Thr
    210                 215                 220

Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240

Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile
                245                 250                 255
```

```
Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala Lys Ser Leu Ala Asn His Leu
            260                 265                 270

Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu
        275                 280                 285

Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile His Ile Pro His Asn Ser Ser
    290                 295                 300

Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp
305                 310                 315                 320

Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile
                325                 330                 335

Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu
            340                 345                 350

Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg
        355                 360                 365

Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala
    370                 375                 380

Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn
385                 390                 395                 400

Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys
                405                 410                 415

Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser Asn Ala Ser Ile His Arg Val
            420                 425                 430

Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr Pro Lys Asp His Leu Asn His
        435                 440                 445

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

Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu Phe Ile Ile Ile Thr Val Gly
465                 470                 475                 480

Lys Thr Lys Pro Asn Leu Asp Lys
                485
```

<210> 3
<211> 1299
<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 3

```
gagcttaaac ttgctgatga tagtattatt gatagtatca atcaattggg tgagctgacc     60

gtcaatattc caaatacaca atattttcaa accaacaacg gtgtgagcgt tgcttttacg    120

ccattacatg agctgcctat tgtcgatatc agcttgtatt ttaatgcagg gtcagcgtat    180

gaccatcagg ttggcaaatc aggcacggct aacatggttg caaccatgct cacccaagga    240

actgacagcc tttctgaaga tgagtttgtt gctgccaaag agcgtcttgg cattgatttt    300

accagtacag caaataagga taacttaact ttatcattaa gaagcttgtc tgatcaatca    360
```

ttattaaatc aagccgccga tttaatggtc gatgctgtca ctcaacctgc ttttgatgat 420

aagactctac aacgcaacaa aaatcagctc atcaccagtt taaaacaaaa aaagcaaaac 480

ccttatcatg tagcttctgt tgcttatcat caagccgtat atgaaaatca tccttatgca 540

cacgcaacca caggcgatga agatagtatt gccaaaattg atcgtgatga gctgcttaat 600

ttttggcata cttttattaa tgcaaataat gcgacactgg tgattacagg tgatatgacc 660

gccgagcaag ccaaatcact tgccaaccat ctgaccgcca aattaccgac aggcaagtcg 720

tataaaaata cgctggattt gacaaaacca gttaaggctc gccatatcca tattcctcac 780

aacagtagtc aaacccaaat catcatcggt caccccacca gtaaagtacg cacggacaaa 840

gcaggtcgtc aagagttcag cgatttttca ttaggtaatg aaattttggc aggtggtgat 900

tttaatgcca gattgatgaa aaccattcga gagcaaaaag gctacactta tggcatttat 960

ggcggtatgg aacgcctcag agcaggtggt aattatgtgg ttgaattttc aaccgatggc 1020

gataaagcag ccgatgccat tttagagacg ctacacatca ttaatgagtc gctgaatgaa 1080

ggcataaccc aagaagagct tgaattggtg cgtttgggta ataaaaatgg ttttgccaat 1140

atttttcaa gcaatgccag tattcatcgt gtcattggtg ctttatttgt tgccgattat 1200

ccaaaagatc atcttaacca tacgctcaat cgcttggata atgccacgat aaatagtgtt 1260

aataccgcac tgaacttgcg tatcaagcct gatgaattt 1299

<210> 4
<211> 433
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 4

```
Glu Leu Lys Leu Ala Asp Asp Ser Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Leu
1               5                  10                  15

Gly Glu Leu Thr Val Asn Ile Pro Asn Thr Gln Tyr Phe Gln Thr Asn
            20                  25                  30

Asn Gly Val Ser Val Ala Phe Thr Pro Leu His Glu Leu Pro Ile Val
        35                  40                  45

Asp Ile Ser Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Ser Ala Tyr Asp His Gln Val
    50                  55                  60

Gly Lys Ser Gly Thr Ala Asn Met Val Ala Thr Met Leu Thr Gln Gly
65                  70                  75                  80

Thr Asp Ser Leu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ala Ala Lys Glu Arg Leu
                85                  90                  95

Gly Ile Asp Phe Thr Ser Thr Ala Asn Lys Asp Asn Leu Thr Leu Ser
            100                 105                 110

Leu Arg Ser Leu Ser Asp Gln Ser Leu Leu Asn Gln Ala Ala Asp Leu
        115                 120                 125
```

```
Met Val Asp Ala Val Thr Gln Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln
    130                 135                 140

Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn
145                 150                 155                 160

Pro Tyr His Val Ala Ser Val Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn
                165                 170                 175

His Pro Tyr Ala His Ala Thr Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys
            180                 185                 190

Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala
        195                 200                 205

Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala
    210                 215                 220

Lys Ser Leu Ala Asn His Leu Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser
225                 230                 235                 240

Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile
                245                 250                 255

His Ile Pro His Asn Ser Ser Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro
            260                 265                 270

Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp
        275                 280                 285

Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg
    290                 295                 300

Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr
305                 310                 315                 320

Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe
                325                 330                 335

Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His
            340                 345                 350

Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu
        355                 360                 365

Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser
    370                 375                 380

Asn Ala Ser Ile His Arg Val Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Lys Asp His Leu Asn His Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr
                405                 410                 415

Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu
            420                 425                 430

Phe
```

<210> 5
<211> 1299

<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 5
gagcttaaac ttgctgatga tagtattatt gatagtatca atcaattggg tgagctgacc 60

gtcaatattc caaatacaca atattttcaa accaacaacg gtgtgagcgt tgcttttacg 120

ccattacatg agctgcctat tgtcgatatc agcttgtatt ttaatgcagg gtcagcgtat 180

gaccatcagg ttggcaaatc aggcacggct aacatggttg caaccatgct cacccaagga 240

actgacagcc tttctgaaga tgagtttgtt gctgccaaag agcgtcttgg cattgatttt 300

accagtacag caaataagga taacttaact ttatcattaa gaagcttgtc tgatcaatca 360

ttattaaatc aagccgccga tttaatggtc gatgctgtca ctcaacctgc ttttgatgat 420

aagactctac aacgcaacaa aaatcagctc atcaccagtt taaaacaaaa aaagcaaaac 480

ccttatcatg tagcttctgt tgcttatcat caagccgtat atgaaaatca tccttatgca 540

cacgcaacca caggcgatga agatagtatt gccaaaattg atcgtgatga gctgcttaat 600

ttttggcata cttttattaa tgcaaataat gcgacactgg tgattacagg tgatatgacc 660

gccgagcaag ccaaatcact tgccaaccat ctgaccgcca aattaccgac aggcaagtct 720

tataaaaata cgctggattt gacaaaacca gttaaggctc gccatatcca tattcctcac 780

aacagtagtc aaacccaaat catcatcggt caccccacca gtaaagtacg cacggacaaa 840

gcaggtcgtc aagagttcag cgatttttca ttaggtaatg aaattttggc aggtggtgat 900

tttaatgcca gattgatgaa aaccattcga gagcaaaaag gctacactta tggcatttat 960

ggcggtatgg aacgcctcag agcaggtggt aattatgtgg ttgaattttc aaccgatggc 1020

gataaagcag ccgatgccat tttagagacg ctacacatca ttaatgagtc gctgaatgaa 1080

ggcataaccc aagaagagct tgagttggtg cgtttgggca ataaaaatgg ttttgccaat 1140

atttttttcaa gcaatgccag tattcatcgt gtcattggtg ctttatttgt tgccgattat 1200

ccaaaagatc atcttaacca tacgctcaat cgcttggata atgccacgat aaatagtgtt 1260

aataccgcac tgaacttgcg tatcaagcct gatgaattt 1299

<210> 6
<211> 433
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 6
Glu Leu Lys Leu Ala Asp Asp Ser Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Leu
1 5 10 15

Gly Glu Leu Thr Val Asn Ile Pro Asn Thr Gln Tyr Phe Gln Thr Asn
20 25 30

Asn Gly Val Ser Val Ala Phe Thr Pro Leu His Glu Leu Pro Ile Val
35 40 45

```
Asp Ile Ser Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Ser Ala Tyr Asp His Gln Val
    50                  55                  60

Gly Lys Ser Gly Thr Ala Asn Met Val Ala Thr Met Leu Thr Gln Gly
65                  70                  75                  80

Thr Asp Ser Leu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ala Ala Lys Glu Arg Leu
                85                  90                  95

Gly Ile Asp Phe Thr Ser Thr Ala Asn Lys Asp Asn Leu Thr Leu Ser
            100                 105                 110

Leu Arg Ser Leu Ser Asp Gln Ser Leu Leu Asn Gln Ala Ala Asp Leu
        115                 120                 125

Met Val Asp Ala Val Thr Gln Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln
    130                 135                 140

Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn
145                 150                 155                 160

Pro Tyr His Val Ala Ser Val Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn
                165                 170                 175

His Pro Tyr Ala His Ala Thr Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys
            180                 185                 190

Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala
        195                 200                 205

Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala
    210                 215                 220

Lys Ser Leu Ala Asn His Leu Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser
225                 230                 235                 240

Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile
                245                 250                 255

His Ile Pro His Asn Ser Ser Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro
            260                 265                 270

Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp
        275                 280                 285

Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg
    290                 295                 300

Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr
305                 310                 315                 320

Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe
                325                 330                 335

Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His
            340                 345                 350

Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu
        355                 360                 365

Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser
    370                 375                 380
```

Asn Ala Ser Ile His Arg Val Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr
385 390 395 400

Pro Lys Asp His Leu Asn His Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr
405 410 415

Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu
420 425 430

Phe

<210> 7
<211> 1299
<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 7
gagcttaaac ttgctgatga tagtattatt gatagtatca atcaattggg tgagctgacc 60

gtcaatattc caaatacaca atattttcaa accaacaacg gtgtgagcgt tgcttttacg 120

ccattacatg agctgcctat tgtcgatatc agcttgtatt ttaatgcagg gtcagcgtat 180

gaccatcagg ttggcaaatc aggcacggct aacatggttg caaccatgct cacccaagga 240

actgacagcc tttctgaaga tgagtttgtt gctgccaaag agcgtcttgg cattgatttt 300

accagtacag caaataagga taacttaact ttatcattaa gaagcttgtc tgatcaatca 360

ttattaaatc aagccgccga tttaatggtc gatgctgtca ctcaacctgc ttttgatgat 420

aagactctac aacgcaacaa aaatcagctc atcaccagtt taaaacaaaa aaagcaaaac 480

ccttatcatg tagcttctgt tgcttatcat caagccgtat atgaaaatca tccttatgca 540

cacgcaacca caggcgatga agatagtatt gccaaaattg atcgtgatga gctgcttaat 600

ttttggcata cttttattaa tgcaaataat gcgacactgg tgattacagg tgatatgacc 660

gccgagcaag ccaaatcact tgccaaccat ctgaccgcca aattaccgac aggcaagtcg 720

tataaaaata cgctggattt gacaaaacca gttaaggctc gccatatcca tattcctcac 780

aacagtagtc aaacccaaat catcatcggt caccccacca gtaaagtacg cacggacaaa 840

gcaggtcgtc aagagttcag cgatttttca ttaggtaatg aaattttggc aggtggtgat 900

tttaatgcca gattgatgaa aaccattcga gagcaaaaag gctacactta tggcatttat 960

ggcggtatgg aacgcctcag agcaggtggt aattatgtgg ttgaattttc aaccgatggc 1020

gataaagcag ccgatgccat tttagagacg ctacacatca ttaatgagtc gctgaatgaa 1080

ggcataaccc aagaagagct tgaattggtg cgtttgggta ataaaaatgg ttttgccaat 1140

atttttcaa gcaatgccag tattcatcgt gtcattggtg ctttatttgt tgccgattat 1200

ccaaaagacc atcttaacca tacgctcaat cgcttggata atgccacgat aaatagtgtt 1260

aataccgcac tgaacttgcg tatcaagcct gatgaattt 1299

<210> 8
<211> 433
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 8

```
Glu Leu Lys Leu Ala Asp Asp Ser Ile Ile Asp Ser Ile Asn Gln Leu
1               5                  10                  15

Gly Glu Leu Thr Val Asn Ile Pro Asn Thr Gln Tyr Phe Gln Thr Asn
            20                  25                  30

Asn Gly Val Ser Val Ala Phe Thr Pro Leu His Glu Leu Pro Ile Val
        35                  40                  45

Asp Ile Ser Leu Tyr Phe Asn Ala Gly Ser Ala Tyr Asp His Gln Val
    50                  55                  60

Gly Lys Ser Gly Thr Ala Asn Met Val Ala Thr Met Leu Thr Gln Gly
65                  70                  75                  80

Thr Asp Ser Leu Ser Glu Asp Glu Phe Val Ala Ala Lys Glu Arg Leu
                85                  90                  95

Gly Ile Asp Phe Thr Ser Thr Ala Asn Lys Asp Asn Leu Thr Leu Ser
            100                 105                 110

Leu Arg Ser Leu Ser Asp Gln Ser Leu Leu Asn Gln Ala Ala Asp Leu
        115                 120                 125

Met Val Asp Ala Val Thr Gln Pro Ala Phe Asp Asp Lys Thr Leu Gln
    130                 135                 140

Arg Asn Lys Asn Gln Leu Ile Thr Ser Leu Lys Gln Lys Lys Gln Asn
145                 150                 155                 160

Pro Tyr His Val Ala Ser Val Ala Tyr His Gln Ala Val Tyr Glu Asn
                165                 170                 175

His Pro Tyr Ala His Ala Thr Thr Gly Asp Glu Asp Ser Ile Ala Lys
            180                 185                 190

Ile Asp Arg Asp Glu Leu Leu Asn Phe Trp His Thr Phe Ile Asn Ala
        195                 200                 205

Asn Asn Ala Thr Leu Val Ile Thr Gly Asp Met Thr Ala Glu Gln Ala
    210                 215                 220

Lys Ser Leu Ala Asn His Leu Thr Ala Lys Leu Pro Thr Gly Lys Ser
225                 230                 235                 240

Tyr Lys Asn Thr Leu Asp Leu Thr Lys Pro Val Lys Ala Arg His Ile
                245                 250                 255

His Ile Pro His Asn Ser Ser Gln Thr Gln Ile Ile Ile Gly His Pro
            260                 265                 270

Thr Ser Lys Val Arg Thr Asp Lys Ala Gly Arg Gln Glu Phe Ser Asp
        275                 280                 285

Phe Ser Leu Gly Asn Glu Ile Leu Ala Gly Gly Asp Phe Asn Ala Arg
    290                 295                 300
```

Leu Met Lys Thr Ile Arg Glu Gln Lys Gly Tyr Thr Tyr Gly Ile Tyr
305 310 315 320

Gly Gly Met Glu Arg Leu Arg Ala Gly Gly Asn Tyr Val Val Glu Phe
325 330 335

Ser Thr Asp Gly Asp Lys Ala Ala Asp Ala Ile Leu Glu Thr Leu His
340 345 350

Ile Ile Asn Glu Ser Leu Asn Glu Gly Ile Thr Gln Glu Glu Leu Glu
355 360 365

Leu Val Arg Leu Gly Asn Lys Asn Gly Phe Ala Asn Ile Phe Ser Ser
370 375 380

Asn Ala Ser Ile His Arg Val Ile Gly Ala Leu Phe Val Ala Asp Tyr
385 390 395 400

Pro Lys Asp His Leu Asn His Thr Leu Asn Arg Leu Asp Asn Ala Thr
405 410 415

Ile Asn Ser Val Asn Thr Ala Leu Asn Leu Arg Ile Lys Pro Asp Glu
420 425 430

Phe

<210> 9
<211> 1656
<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 9
atgagcttaa ttaataaatt aaatgaacgc attacgccgc atgtcttaac ttcgattaaa 60

aatcaagatg gcgataatgc tgataaatct aatttgttaa ccgcatttta taccattttt 120

gcaggacgct tgagtaatga agatgtgtat cagcgtgcca atgctttgcc tgataatgag 180

cttgagcatg ggcatcatct gctcaatgtt gcttttagtg atgtttcaac tggtgaagat 240

cagattgctt ctttgagtaa tcaattagcc gatgaatatc atgtttcgcc agtaacggca 300

cgcaccgcaa tcgcaacggc agcacctttg gctttggcac gcattaaaga gcaagcaggt 360

gcattatctg taccgtcttt tattcgtact caattggcta aagaagaaaa ccgtttgcca 420

acttgggcgc atactttatt gccagcaggg ctatttgcaa ccgctgccac aaccaccgcc 480

gagcctgtaa cgacagcctc tgctgttgtg aaagagcctg tcaaaccaag tgttgtgaca 540

gaaccagttc atccagctgc ggctaccacc ccagtcaaaa caccaactgc ccagcattac 600

gaaaacaaag aaaaaagtcc ttttctaaaa acgattctac cgattattgg attgattatt 660

tttgcaggct tggcatggct tttgttaaga gcatgtcaag acaaaccaac acctgttgcg 720

gcacctgttg cgacagatac agcacctgtg gtagcggata atgctgtaca ggcagaccca 780

acacaaacag gtgttgccca agcacctgca acgcttagct tgtctgttga tgaaacgggt 840

caagcgttgt actcgcaccg tgctcaggtt ggtagtgaag agcttgcagg tcatatccgt 900

gcagctattg ctcaagtctt tggcgtacaa gatttaacca ttcaaaatac caatgtacat 960

accgctacga tgccagcggc agaatactta ccagcaattt tgggtttgat gaaaggtgta 1020

ccaaattcaa gcgttgtgat tcatgatcat acggtacgct ttaatgcaac cacgccagaa 1080

gatgtagcaa aactggtaga gggtgctaaa aatattctac ccgctgattt tactgtagaa 1140

gcagaacctg aacttgatat taatactgcg gttgccgata gtattgaaac agcgcgtgtt 1200

gctattgttg ctttgggtga tacggttgaa gaaaatgaga tggatatttt aatcaatgca 1260

ttaaataccc aaatcattaa ctttgcttta gactcaaccg aaattcccca agaaaataaa 1320

gaaatcttgg atttggctgc cgaaaaatta aaggcagtgc ctgaaacaac tttgcgtatc 1380

attggtcata cagacactca aggcacacat gagtataatc aagatttatc agaatctcgt 1440

gctgctgctg ttaaagagta tttggtatca aaaggtgttg ctgctgaacg cttgaacact 1500

caaggtgcaa gttttgatta tccagttgca tcaaatgcta ccgaacaagg tcgcttccaa 1560

aaccgtcgta ttgagtttgt acttttccaa gaaggtgaag caattactca agtcggtcat 1620

gctgaagatg caccaacacc tgttgcacaa aactga 1656

<210> 10
<211> 551
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 10

Met Ser Leu Ile Asn Lys Leu Asn Glu Arg Ile Thr Pro His Val Leu
1 5 10 15

Thr Ser Ile Lys Asn Gln Asp Gly Asp Asn Ala Asp Lys Ser Asn Leu
20 25 30

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

Val Tyr Gln Arg Ala Asn Ala Leu Pro Asp Asn Glu Leu Glu His Gly
50 55 60

His His Leu Leu Asn Val Ala Phe Ser Asp Val Ser Thr Gly Glu Asp
65 70 75 80

Gln Ile Ala Ser Leu Ser Asn Gln Leu Ala Asp Glu Tyr His Val Ser
85 90 95

Pro Val Thr Ala Arg Thr Ala Ile Ala Thr Ala Ala Pro Leu Ala Leu
100 105 110

Ala Arg Ile Lys Glu Gln Ala Gly Ala Leu Ser Val Pro Ser Phe Ile
115 120 125

Arg Thr Gln Leu Ala Lys Glu Glu Asn Arg Leu Pro Thr Trp Ala His
130 135 140

Thr Leu Leu Pro Ala Gly Leu Phe Ala Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ala
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Thr Ala Ser Ala Val Val Lys Glu Pro Val Lys Pro
165 170 175

```
Ser Val Val Thr Glu Pro Val His Pro Ala Ala Ala Thr Thr Pro Val
            180                 185                 190

Lys Thr Pro Thr Ala Gln His Tyr Glu Asn Lys Glu Lys Ser Pro Phe
        195                 200                 205

Leu Lys Thr Ile Leu Pro Ile Ile Gly Leu Ile Ile Phe Ala Gly Leu
    210                 215                 220

Ala Trp Leu Leu Leu Arg Ala Cys Gln Asp Lys Pro Thr Pro Val Ala
225                 230                 235                 240

Ala Pro Val Ala Thr Asp Thr Ala Pro Val Val Ala Asp Asn Ala Val
                245                 250                 255

Gln Ala Asp Pro Thr Gln Thr Gly Val Ala Gln Ala Pro Ala Thr Leu
            260                 265                 270

Ser Leu Ser Val Asp Glu Thr Gly Gln Ala Leu Tyr Ser His Arg Ala
        275                 280                 285

Gln Val Gly Ser Glu Glu Leu Ala Gly His Ile Arg Ala Ala Ile Ala
    290                 295                 300

Gln Val Phe Gly Val Gln Asp Leu Thr Ile Gln Asn Thr Asn Val His
305                 310                 315                 320

Thr Ala Thr Met Pro Ala Ala Glu Tyr Leu Pro Ala Ile Leu Gly Leu
                325                 330                 335

Met Lys Gly Val Pro Asn Ser Ser Val Val Ile His Asp His Thr Val
            340                 345                 350

Arg Phe Asn Ala Thr Thr Pro Glu Asp Val Ala Lys Leu Val Glu Gly
        355                 360                 365

Ala Lys Asn Ile Leu Pro Ala Asp Phe Thr Val Glu Ala Glu Pro Glu
    370                 375                 380

Leu Asp Ile Asn Thr Ala Val Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Arg Val
385                 390                 395                 400

Ala Ile Val Ala Leu Gly Asp Thr Val Glu Glu Asn Glu Met Asp Ile
                405                 410                 415

Leu Ile Asn Ala Leu Asn Thr Gln Ile Ile Asn Phe Ala Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Thr Glu Ile Pro Gln Glu Asn Lys Glu Ile Leu Asp Leu Ala Ala Glu
        435                 440                 445

Lys Leu Lys Ala Val Pro Glu Thr Thr Leu Arg Ile Ile Gly His Thr
    450                 455                 460

Asp Thr Gln Gly Thr His Glu Tyr Asn Gln Asp Leu Ser Glu Ser Arg
465                 470                 475                 480

Ala Ala Ala Val Lys Glu Tyr Leu Val Ser Lys Gly Val Ala Ala Glu
                485                 490                 495

Arg Leu Asn Thr Gln Gly Ala Ser Phe Asp Tyr Pro Val Ala Ser Asn
            500                 505                 510
```

Ala Thr Glu Gln Gly Arg Phe Gln Asn Arg Arg Ile Glu Phe Val Leu
515 520 525

Phe Gln Glu Gly Glu Ala Ile Thr Gln Val Gly His Ala Glu Asp Ala
530 535 540

Pro Thr Pro Val Ala Gln Asn
545 550

<210> 11
<211> 1251
<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 11
atggatacaa aacacattca gcaaaattgg cttctacctg atggtgtggc tgatgtacta 60

tttaccgatg ctcaaaaaca agaaagcctg cgtgatgcct tgctatttgt gctaaccgca 120

cacggttatc gcttggtgtc accaccatta atagagtata ccgaaagtct gctaaataat 180

gctgacgaag atctaaaacg ccaaactttc aaatttatcg atcagctcaa tggtcgtttg 240

atgggtttgc gtgccgatat tacgccacaa attctacgca ttgatagcaa atatggtcaa 300

ggcatcagcc gttactgtta tgttgggcaa gttgtcaaaa ccctaccgac tggtctgttt 360

gggctgcgta caccgcttca attgggtgct gagatttttg ggatagatga tatccgtgcc 420

gagcttgagc tgattgatct attggccgca ttggcagatg agatcggact aggccgagag 480

atgctacatg tggatattgg tcatgtcgct atttttgatc gcttgtgtca gttgcatggc 540

gtttcaaata aagatgctga tgagctgatt ggcatttacc ataaaaaagc catgccagaa 600

cttgccaaat ggtgccaaaa tattggcaat agcctaaaca gcccaagcga tgcaaccgat 660

tttttggtat tggctaagca tacattaagc agtgatcgga caccaaatgc cgaggcttta 720

ttaagtaaac tgtccgataa agctcgccaa gataataaaa tcatccaagc ggcaaatgag 780

cttgctactt tggcggcaca tatcagagcg gtgggtatga gtgtgagtat tgatgtgact 840

gaattgtcag gatatcatta tcatactggt gtggtattta atgtctattt gggtaataga 900

accacacaga ctcaagcttt ggtacgaggc ggtcgctttg atggtatctc aactcacagc 960

gtagcaaggg gcgcaactgg ttttagcatg gatattaatc gtttgcttga atttgtagag 1020

cttgaagaag atactgtgat tttggtggat tatcacgatt tgcaaaatgc tgatgcagac 1080

acaaaagctg atttggccac acaaattaaa accttgcaat ctgaaggctg tattgtcatt 1140

aagcctttga ctgtagatga taagcctaac cagattgatg gtgttttgca ttgggacacc 1200

gatcaagata agccgatttg ggcggtgcga ttagttggtg atgagtacta a 1251

<210> 12
<211> 416
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 12

```
Met Asp Thr Lys His Ile Gln Gln Asn Trp Leu Leu Pro Asp Gly Val
1               5                  10                  15

Ala Asp Val Leu Phe Thr Asp Ala Gln Lys Gln Glu Ser Leu Arg Asp
            20                  25                  30

Ala Leu Leu Phe Val Leu Thr Ala His Gly Tyr Arg Leu Val Ser Pro
        35                  40                  45

Pro Leu Ile Glu Tyr Thr Glu Ser Leu Leu Asn Asn Ala Asp Glu Asp
    50                  55                  60

Leu Lys Arg Gln Thr Phe Lys Phe Ile Asp Gln Leu Asn Gly Arg Leu
65                  70                  75                  80

Met Gly Leu Arg Ala Asp Ile Thr Pro Gln Ile Leu Arg Ile Asp Ser
                85                  90                  95

Lys Tyr Gly Gln Gly Ile Ser Arg Tyr Cys Tyr Val Gly Gln Val Val
            100                 105                 110

Lys Thr Leu Pro Thr Gly Leu Phe Gly Leu Arg Thr Pro Leu Gln Leu
        115                 120                 125

Gly Ala Glu Ile Phe Gly Ile Asp Asp Ile Arg Ala Glu Leu Glu Leu
    130                 135                 140

Ile Asp Leu Leu Ala Ala Leu Ala Asp Glu Ile Gly Leu Gly Arg Glu
145                 150                 155                 160

Met Leu His Val Asp Ile Gly His Val Ala Ile Phe Asp Arg Leu Cys
                165                 170                 175

Gln Leu His Gly Val Ser Asn Lys Asp Ala Asp Glu Leu Ile Gly Ile
            180                 185                 190

Tyr His Lys Lys Ala Met Pro Glu Leu Ala Lys Trp Cys Gln Asn Ile
        195                 200                 205

Gly Asn Ser Leu Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Asp Phe Leu Val Leu
    210                 215                 220

Ala Lys His Thr Leu Ser Ser Asp Arg Thr Pro Asn Ala Glu Ala Leu
225                 230                 235                 240

Leu Ser Lys Leu Ser Asp Lys Ala Arg Gln Asp Asn Lys Ile Ile Gln
                245                 250                 255

Ala Ala Asn Glu Leu Ala Thr Leu Ala Ala His Ile Arg Ala Val Gly
            260                 265                 270

Met Ser Val Ser Ile Asp Val Thr Glu Leu Ser Gly Tyr His Tyr His
        275                 280                 285

Thr Gly Val Val Phe Asn Val Tyr Leu Gly Asn Arg Thr Thr Gln Thr
    290                 295                 300

Gln Ala Leu Val Arg Gly Gly Arg Phe Asp Gly Ile Ser Thr His Ser
305                 310                 315                 320

Val Ala Arg Gly Ala Thr Gly Phe Ser Met Asp Ile Asn Arg Leu Leu
                325                 330                 335
```

```
Glu Phe Val Glu Leu Glu Glu Asp Thr Val Ile Leu Val Asp Tyr His
            340                 345                 350

Asp Leu Gln Asn Ala Asp Ala Asp Thr Lys Ala Asp Leu Ala Thr Gln
        355                 360                 365

Ile Lys Thr Leu Gln Ser Glu Gly Cys Ile Val Ile Lys Pro Leu Thr
    370                 375                 380

Val Asp Asp Lys Pro Asn Gln Ile Asp Gly Val Leu His Trp Asp Thr
385                 390                 395                 400

Asp Gln Asp Lys Pro Ile Trp Ala Val Arg Leu Val Gly Asp Glu Tyr
                405                 410                 415
```

<210> 13
<211> 639
<212> DNA
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 13
atgaataatt ttgtgtatca gctacaaagt ttttggtatg agcttaatca ggtcaatcgt 60

cataccattg ctcaatcacc caaatatata cagctgacgg tacttggttt gatcgtgatg 120

atcattggca tttttggctg gctacttgcg attttaccaa ccattcaaaa gcttaatgca 180

gcccaaagtc aagaatctgc cttaattgat gaatttgcca ctaaatatca taaagcccag 240

cagtttgacc atctaagcca tcaggtcata caaaaaaata cacaacttga aaatcagctc 300

aatgctctgc cacgcacagc accgatgagc gagattatcg gaatgataaa taccaaagca 360

caagcggtta atgtgcaggt ggtgagtgca tcagttcaag caggtcgtga acaggattat 420

tataccgaac gccctatcgc agtgagtgcg acaggggatt atcatgcttt gggtcgatgg 480

ttacttgagt tgtcagaggc taaccatttg ctgacagtgc atgattttga tctgaaggct 540

ggtttgaacc atcagctgat gatgattgct cagatgaaaa cttatcaagc aaacaaacgc 600

ccaaaaccag ttgctcagca ggtgcctgat gttcaatga 639

<210> 14
<211> 212
<212> PRT
<213> 粘膜炎莫拉氏菌

<400> 14
```
Met Asn Asn Phe Val Tyr Gln Leu Gln Ser Phe Trp Tyr Glu Leu Asn
1               5                   10                  15

Gln Val Asn Arg His Thr Ile Ala Gln Ser Pro Lys Tyr Ile Gln Leu
            20                  25                  30

Thr Val Leu Gly Leu Ile Val Met Ile Ile Gly Ile Phe Gly Trp Leu
        35                  40                  45

Leu Ala Ile Leu Pro Thr Ile Gln Lys Leu Asn Ala Ala Gln Ser Gln
    50                  55                  60
```

Glu Ser Ala Leu Ile Asp Glu Phe Ala Thr Lys Tyr His Lys Ala Gln
65 70 75 80

Gln Phe Asp His Leu Ser His Gln Val Ile Gln Lys Asn Thr Gln Leu
85 90 95

Glu Asn Gln Leu Asn Ala Leu Pro Arg Thr Ala Pro Met Ser Glu Ile
100 105 110

Ile Gly Met Ile Asn Thr Lys Ala Gln Ala Val Asn Val Gln Val Val
115 120 125

Ser Ala Ser Val Gln Ala Gly Arg Glu Gln Asp Tyr Tyr Thr Glu Arg
130 135 140

Pro Ile Ala Val Ser Ala Thr Gly Asp Tyr His Ala Leu Gly Arg Trp
145 150 155 160

Leu Leu Glu Leu Ser Glu Ala Asn His Leu Leu Thr Val His Asp Phe
165 170 175

Asp Leu Lys Ala Gly Leu Asn His Gln Leu Met Met Ile Ala Gln Met
180 185 190

Lys Thr Tyr Gln Ala Asn Lys Arg Pro Lys Pro Val Ala Gln Gln Val
195 200 205

Pro Asp Val Gln
210

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 15
catcagtgca tatgaatacg acacaccatc acacg 35

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 16
gagttattct cgagtttgtc caaatttggc ttagttttac 40

<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 17
tcagtgagat cttgaatacg acacaccatc 30

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 18
gatttgagtt gtcgacttat ttgtccaaat ttg 33

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 19
cggagtgcca tatgagctta attaataaat taaatg 36

<210> 20
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 20
tataactcga ggttttgtgc aacaggtgtt g 31

<210> 21
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 21
cgcttgagat cttggaagat gtgtatcagc gtgc 34

<210> 22
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 22
caataacaaa gctttcagtt ttgtgcaaca ggtgttg 37

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 23
aaccgcacat atgtatcgct tggtgtcacc acc 33

<210> 24
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 24
ggtgactcga ggtactcatc accaactaat cgcac 35

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 25
gcaggatcct tatcgcttgg tgtcacc 27

<210> 26
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 26
atcaatcggg tcgacttagt actcatcacc a 31

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 27
aaagcttcat atggcccaaa gtcaagaatc tgcc 34

<210> 28
<211> 31

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 28
cgataactcg agttgaacat caggcacctg c 31

<210> 29
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 29
accattcaaa agagatcttg gcccaaagtc aagaatctg 39

<210> 30
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 30
gttagaccga gtcgactcat tgaacatcag gca 33

图1 (SEQ ID NO: 1)

```
   1  ATGGACACTG ACATGAAACA TTTAACAAAA CATCGCCTAT CAGCTGCCAT
  51  CATTGGCGTT TTATTATTCA TTAGCCCATC AGTGCAAGCA AATACGACAC
 101  ACCATCACAC GCTAACCAGT AGCGAGCTTA AACTTGCTGA TGATAGTATT
 151  ATTGATAGTA TCAATCAATT GGGTGAGCTG ACCGTCAATA TTCCAAATAC
 201  ACAATATTTT CAAACCAACA ACGGTGTGAG CGTTGCTTTT ACGCCATTAC
 251  ATGAGCTGCC TATTGTCGAT ATCAGCTTGT ATTTTAATGC AGGGTCAGCG
 301  TATGACCATC AGGTTGGCAA ATCAGGCACG GCTAACATGG TTGCAACCAT
 351  GCTCACCCAA GGAACTGACA GCCTTTCTGA AGATGAGTTT GTTGCTGCCA
 401  AAGAGCGTCT TGGCATTGAT TTTACCAGTA CAGCAAATAA GGATAACTTA
 451  ACTTTATCAT TAAGAAGCTT GTCTGATCAA TCATTATTAA ATCAAGCCGC
 501  CGATTTAATG GTCGATGCTG TCACTCAACC TGCTTTTGAT GATAAGACTC
 551  TACAACGCAA CAAAAATCAG CTCATCACCA GTTTAAAACA AAAAAAGCAA
 601  AACCCTTATC ATGTAGCTTC TGTTGCTTAT CATCAAGCCG TATATGAAAA
 651  TCATCCTTAT GCACACGCAA CCACAGGCGA TGAAGATAGT ATTGCCAAAA
 701  TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTTGGC ATACTTTTAT TAATGCAAAT
 751  AATGCGACAC TGGTGATTAC AGGTGATATG ACCGCCGAGC AAGCCAAATC
 801  ACTTGCCAAC CATCTGACCG CCAAATTACC GACAGGCAAG TCGTATAAAA
 851  ATACGCTGGA TTTGACAAAA CCAGTTAAGG CTCGTCATAT CCATATTCCT
 901  CACAACAGTA GTCAAACCCA AATCATCATC GGTCATCCCA CCAGTAAAGT
 951  ACGCACGGAC AAAGCAGGTC GTCAAGAGTT CAGCGATTTT TCATTAGGTA
1001  ATGAAATTTT GGCAGGTGGT GATTTTAATG CCAGATTGAT GAAAACCATT
1051  CGAGAGCAAA AAGGCTACAC TTATGGCATT TATGGCGGTA TGGAACGCCT
1101  CAGAGCAGGT GGTAATTATG TGGTTGAATT TTCAACCGAT GGCGATAAAG
1151  CAGCCGATGC CATTTTAGAG ACGCTACACA TCATTAATGA GTCGCTGAAT
1201  GAAGGCATAA CCCAAGAAGA GCTTGAGTTG GTGCGTTTGG GCAATAAAAA
1251  TGGTTTTGCC AATATTTTTT CAAGCAATGC CAGTATTCAT CGTGTCATTG
1301  GTGCTTTATT TGTTGCCGAT TATCCAAAAG ATCATCTTAA CCATACGCTC
1351  AATCGCTTGG ATAATGCCAC GATAAATAGT GTTAATACCG CACTGAACTT
1401  GCGTATCAAG CCTGATGAAT TTATCATCAT CACCGTGGGT AAAACTAAGC
1451  CAAATTTGGA CAAATAA
```

图2 (SEQ ID NO: 2)

```
   1  MDTDMKHLTK HRLSAAIIGV LLFISPSVQA NTTHHHTLTS SELKLADDSI
  51  IDSINQLGEL TVNIPNTQYF QTNNGVSVAF TPLHELPIVD ISLYFNAGSA
 101  YDHQVGKSGT ANMVATMLTQ GTDSLSEDEF VAAKERLGID FTSTANKDNL
 151  TLSLRSLSDQ SLLNQAADLM VDAVTQPAFD DKTLQRNKNQ LITSLKQKKQ
 201  NPYHVASVAY HQAVYENHPY AHATTGDEDS IAKIDRDELL NFWHTFINAN
 251  NATLVITGDM TAEQAKSLAN HLTAKLPTGK SYKNTLDLTK PVKARHIHIP
 301  HNSSQTQIII GHPTSKVRTD KAGRQEFSDF SLGNEILAGG DFNARLMKTI
 351  REQKGYTYGI YGGMERLRAG GNYVVEFSTD GDKAADAILE TLHIINESLN
 401  EGITQEELEL VRLGNKNGFA NIFSSNASIH RVIGALFVAD YPKDHLNHTL
 451  NRLDNATINS VNTALNLRIK PDEFIIITVG KTKPNLDK*
```

图3(SEQ ID NO: 3)

```
   1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATAGTATCA ATCAATTGGG
  51 TGAGCTGACC GTCAATATTC CAAATACACA ATATTTTCAA ACCAACAACG
 101 GTGTGAGCGT TGCTTTTACG CCATTACATG AGCTGCCTAT TGTCGATATC
 151 AGCTTGTATT TTAATGCAGG GTCAGCGTAT GACCATCAGG TTGGCAAATC
 201 AGGCACGGCT AACATGGTTG CAACCATGCT CACCCAAGGA ACTGACAGCC
 251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGTT GCTGCCAAAG AGCGTCTTGG CATTGATTTT
 301 ACCAGTACAG CAAATAAGGA TAACTTAACT TTATCATTAA GAAGCTTGTC
 351 TGATCAATCA TTATTAAATC AAGCCGCCGA TTTAATGGTC GATGCTGTCA
 401 CTCAACCTGC TTTTGATGAT AAGACTCTAC AACGCAACAA AAATCAGCTC
 451 ATCACCAGTT TAAAACAAAA AAAGCAAAAC CCTTATCATG TAGCTTCTGT
 501 TGCTTATCAT CAAGCCGTAT ATGAAAATCA TCCTTATGCA CACGCAACCA
 551 CAGGCGATGA AGATAGTATT GCCAAAATTG ATCGTGATGA GCTGCTTAAT
 601 TTTTGGCATA CTTTTATTAA TGCAAATAAT GCGACACTGG TGATTACAGG
 651 TGATATGACC GCCGAGCAAG CCAAATCACT TGCCAACCAT CTGACCGCCA
 701 AATTACCGAC AGGCAAGTCG TATAAAAATA CGCTGGATTT GACAAAACCA
 751 GTTAAGGCTC GCCATATCCA TATTCCTCAC AACAGTAGTC AAACCCAAAT
 801 CATCATCGGT CACCCCACCA GTAAAGTACG CACGGACAAA GCAGGTCGTC
```

图3(SEQ ID NO: 3)(续)

```
 851 AAGAGTTCAG CGATTTTTCA TTAGGTAATG AAATTTTGGC AGGTGGTGAT
 901 TTTAATGCCA GATTGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAAG GCTACACTTA
 951 TGGCATTTAT GGCGGTATGG AACGCCTCAG AGCAGGTGGT AATTATGTGG
1001 TTGAATTTTC AACCGATGGC GATAAAGCAG CCGATGCCAT TTTAGAGACG
1051 CTACACATCA TTAATGAGTC GCTGAATGAA GGCATAACCC AAGAAGAGCT
1101 TGAATTGGTG CGTTTGGGTA ATAAAAATGG TTTTGCCAAT ATTTTTTCAA
1151 GCAATGCCAG TATTCATCGT GTCATTGGTG CTTTATTTGT TGCCGATTAT
1201 CCAAAAGATC ATCTTAACCA TACGCTCAAT CGCTTGGATA ATGCCACGAT
1251 AAATAGTGTT AATACCGCAC TGAACTTGCG TATCAAGCCT GATGAATTT
```

图4(SEQ ID NO: 4)

```
  1 ELKLADDSII DSINQLGELT VNIPNTQYFQ TNNGVSVAFT PLHELPIVDI
 51 SLYFNAGSAY DHQVGKSGTA NMVATMLTQG TDSLSEDEFV AAKERLGIDF
101 TSTANKDNLT LSLRSLSDQS LLNQAADLMV DAVTQPAFDD KTLQRNKNQL
151 ITSLKQKKQN PYHVASVAYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
201 FWHTFINANN ATLVITGDMT AEQAKSLANH LTAKLPTGKS YKNTLDLTKP
251 VKARHIHIPH NSSQTQIIIG HPTSKVRTDK AGRQEFSDFS LGNEILAGGD
301 FNARLMKTIR EQKGYTYGIY GGMERLRAGG NYVVEFSTDG DKAADAILET
351 LHIINESLNE GITQEELELV RLGNKNGFAN IFSSNASIHR VIGALFVADY
401 PKDHLNHTLN RLDNATINSV NTALNLRIKP DEF
```

图5(SEQ ID NO: 5)

```
   1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATAGTATCA ATCAATTGGG
  51 TGAGCTGACC GTCAATATTC CAAATACACA ATATTTTCAA ACCAACAACG
 101 GTGTGAGCGT TGCTTTTACG CCATTACATG AGCTGCCTAT TGTCGATATC
 151 AGCTTGTATT TTAATGCAGG GTCAGCGTAT GACCATCAGG TTGGCAAATC
 201 AGGCACGGCT AACATGGTTG CAACCATGCT CACCCAAGGA ACTGACAGCC
 251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGTT GCTGCCAAAG AGCGTCTTGG CATTGATTTT
 301 ACCAGTACAG CAAATAAGGA TAACTTAACT TTATCATTAA GAAGCTTGTC
 351 TGATCAATCA TTATTAAATC AAGCCGCCGA TTTAATGGTC GATGCTGTCA
 401 CTCAACCTGC TTTTGATGAT AAGACTCTAC AACGCAACAA AAATCAGCTC
 451 ATCACCAGTT TAAAACAAAA AAAGCAAAAC CCTTATCATG TAGCTTCTGT
 501 TGCTTATCAT CAAGCCGTAT ATGAAAATCA TCCTTATGCA CACGCAACCA
 551 CAGGCGATGA AGATAGTATT GCCAAAATTG ATCGTGATGA GCTGCTTAAT
 601 TTTTGGCATA CTTTTATTAA TGCAAATAAT GCGACACTGG TGATTACAGG
 651 TGATATGACC GCCGAGCAAG CCAAATCACT TGCCAACCAT CTGACCGCCA
 701 AATTACCGAC AGGCAAGTCT TATAAAAATA CGCTGGATTT GACAAAACCA
 751 GTTAAGGCTC GCCATATCCA TATTCCTCAC AACAGTAGTC AAACCCAAAT
 801 CATCATCGGT CACCCCACCA GTAAAGTACG CACGGACAAA GCAGGTCGTC
 851 AAGAGTTCAG CGATTTTTCA TTAGGTAATG AAATTTTGGC AGGTGGTGAT
 901 TTTAATGCCA GATTGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAAG GCTACACTTA
 951 TGGCATTTAT GGCGGTATGG AACGCCTCAG AGCAGGTGGT AATTATGTGG
1001 TTGAATTTTC AACCGATGGC GATAAAGCAG CCGATGCCAT TTTAGAGACG
1051 CTACACATCA TTAATGAGTC GCTGAATGAA GGCATAACCC AAGAAGAGCT
1101 TGAGTTGGTG CGTTTGGGCA ATAAAAATGG TTTTGCCAAT ATTTTTTCAA
1151 GCAATGCCAG TATTCATCGT GTCATTGGTG CTTTATTTGT TGCCGATTAT
1201 CCAAAAGATC ATCTTAACCA TACGCTCAAT CGCTTGGATA ATGCCACGAT
1251 AAATAGTGTT AATACCGCAC TGAACTTGCG TATCAAGCCT GATGAATTT
```

图6 (SEQ ID NO: 6)

```
  1 ELKLADDSII DSINQLGELT VNIPNTQYFQ TNNGVSVAFT PLHELPIVDI
 51 SLYFNAGSAY DHQVGKSGTA NMVATMLTQG TDSLSEDEFV AAKERLGIDF
101 TSTANKDNLT LSLRSLSDQS LLNQAADLMV DAVTQPAFDD KTLQRNKNQL
151 ITSLKQKKQN PYHVASVAYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
201 FWHTFINANN ATLVITGDMT AEQAKSLANH LTAKLPTGKS YKNTLDLTKP
251 VKARHIHIPH NSSQTQIIIG HPTSKVRTDK AGRQEFSDFS LGNEILAGGD
301 FNARLMKTIR EQKGYTYGIY GGMERLRAGG NYVVEFSTDG DKAADAILET
351 LHIINESLNE GITQEELELV RLGNKNGFAN IFSSNASIHR VIGALFVADY
```

图6 (SEQ ID NO: 6) (续)

401 PKDHLNHTLN RLDNATINSV NTALNLRIKP DEF

图7 (SEQ ID NO: 7)

```
   1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATAGTATCA ATCAATTGGG
  51 TGAGCTGACC GTCAATATTC CAAATACACA ATATTTTCAA ACCAACAACG
 101 GTGTGAGCGT TGCTTTTACG CCATTACATG AGCTGCCTAT TGTCGATATC
 151 AGCTTGTATT TTAATGCAGG GTCAGCGTAT GACCATCAGG TTGGCAAATC
 201 AGGCACGGCT AACATGGTTG CAACCATGCT CACCCAAGGA ACTGACAGCC
 251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGTT GCTGCCAAAG AGCGTCTTGG CATTGATTTT
 301 ACCAGTACAG CAAATAAGGA TAACTTAACT TTATCATTAA GAAGCTTGTC
 351 TGATCAATCA TTATTAAATC AAGCCGCCGA TTTAATGGTC GATGCTGTCA
 401 CTCAACCTGC TTTTGATGAT AAGACTCTAC AACGCAACAA AAATCAGCTC
 451 ATCACCAGTT TAAAACAAAA AAAGCAAAAC CCTTATCATG TAGCTTCTGT
 501 TGCTTATCAT CAAGCCGTAT ATGAAAATCA TCCTTATGCA CACGCAACCA
 551 CAGGCGATGA AGATAGTATT GCCAAAATTG ATCGTGATGA GCTGCTTAAT
 601 TTTTGGCATA CTTTTATTAA TGCAAATAAT GCGACACTGG TGATTACAGG
 651 TGATATGACC GCCGAGCAAG CCAAATCACT TGCCAACCAT CTGACCGCCA
 701 AATTACCGAC AGGCAAGTCG TATAAAAATA CGCTGGATTT GACAAAACCA
 751 GTTAAGGCTC GCCATATCCA TATTCCTCAC AACAGTAGTC AAACCCAAAT
 801 CATCATCGGT CACCCCACCA GTAAAGTACG CACGGACAAA GCAGGTCGTC
 851 AAGAGTTCAG CGATTTTTCA TTAGGTAATG AAATTTTGGC AGGTGGTGAT
 901 TTTAATGCCA GATTGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAAG GCTACACTTA
 951 TGGCATTTAT GGCGGTATGG AACGCCTCAG AGCAGGTGGT AATTATGTGG
1001 TTGAATTTTC AACCGATGGC GATAAAGCAG CCGATGCCAT TTTAGAGACG
1051 CTACACATCA TTAATGAGTC GCTGAATGAA GGCATAACCC AAGAAGAGCT
1101 TGAATTGGTG CGTTTGGGTA ATAAAAATGG TTTTGCCAAT ATTTTTTCAA
1151 GCAATGCCAG TATTCATCGT GTCATTGGTG CTTTATTTGT TGCCGATTAT
1201 CCAAAAGACC ATCTTAACCA TACGCTCAAT CGCTTGGATA ATGCCACGAT
1251 AAATAGTGTT AATACCGCAC TGAACTTGCG TATCAAGCCT GATGAATTT
```

图8 (SEQ ID NO: 8)

```
   1 ELKLADDSII DSINQLGELT VNIPNTQYFQ TNNGVSVAFT PLHELPIVDI
  51 SLYFNAGSAY DHQVGKSGTA NMVATMLTQG TDSLSEDEFV AAKERLGIDF
 101 TSTANKDNLT LSLRSLSDQS LLNQAADLMV DAVTQPAFDD KTLQRNKNQL
 151 ITSLKQKKQN PYHVASVAYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
 201 FWHTFINANN ATLVITGDMT AEQAKSLANH LTAKLPTGKS YKNTLDLTKP
 251 VKARHIHIPH NSSQTQIIIG HPTSKVRTDK AGRQEFSDFS LGNEILAGGD
 301 FNARLMKTIR EQKGYTYGIY GGMERLRAGG NYVVEFSTDG DKAADAILET
 351 LHIINESLNE GITQEELELV RLGNKNGFAN IFSSNASIHR VIGALFVADY
 401 PKDHLNHTLN RLDNATINSV NTALNLRIKP DEF
```

图9 (SEQ ID NO: 9)

```
   1 ATGAGCTTAA TTAATAAATT AAATGAACGC ATTACGCCGC ATGTCTTAAC
  51 TTCGATTAAA AATCAAGATG GCGATAATGC TGATAAATCT AATTTGTTAA
 101 CCGCATTTTA TACCATTTTT GCAGGACGCT TGAGTAATGA AGATGTGTAT
 151 CAGCGTGCCA ATGCTTTGCC TGATAATGAG CTTGAGCATG GGCATCATCT
 201 GCTCAATGTT GCTTTTAGTG ATGTTTCAAC TGGTGAAGAT CAGATTGCTT
 251 CTTTGAGTAA TCAATTAGCC GATGAATATC ATGTTTCGCC AGTAACGGCA
 301 CGCACCGCAA TCGCAACGGC AGCACCTTTG GCTTTGGCAC GCATTAAAGA
 351 GCAAGCAGGT GCATTATCTG TACCGTCTTT TATTCGTACT CAATTGGCTA
 401 AAGAAGAAAA CCGTTTGCCA ACTTGGGCGC ATACTTTATT GCCAGCAGGG
 451 CTATTTGCAA CCGCTGCCAC AACCACCGCC GAGCCTGTAA CGACAGCCTC
 501 TGCTGTTGTG AAAGAGCCTG TCAAACCAAG TGTTGTGACA GAACCAGTTC
 551 ATCCAGCTGC GGCTACCACC CCAGTCAAAA CACCAACTGC CCAGCATTAC
 601 GAAAACAAAG AAAAAAGTCC TTTTCTAAAA ACGATTCTAC CGATTATTGG
 651 ATTGATTATT TTTGCAGGCT TGGCATGGCT TTTGTTAAGA GCATGTCAAG
 701 ACAAACCAAC ACCTGTTGCG GCACCTGTTG CGACAGATAC AGCACCTGTG
 751 GTAGCGGATA ATGCTGTACA GGCAGACCCA ACACAAACAG GTGTTGCCCA
 801 AGCACCTGCA ACGCTTAGCT TGTCTGTTGA TGAAACGGGT CAAGCGTTGT
 851 ACTCGCACCG TGCTCAGGTT GGTAGTGAAG AGCTTGCAGG TCATATCCGT
```

图9 (SEQ ID NO: 9) (续)

```
 901 GCAGCTATTG CTCAAGTCTT TGGCGTACAA GATTTAACCA TTCAAAATAC
 951 CAATGTACAT ACCGCTACGA TGCCAGCGGC AGAATACTTA CCAGCAATTT
1001 TGGGTTTGAT GAAAGGTGTA CCAAATTCAA GCGTTGTGAT TCATGATCAT
1051 ACGGTACGCT TTAATGCAAC CACGCCAGAA GATGTAGCAA AACTGGTAGA
1101 GGGTGCTAAA AATATTCTAC CCGCTGATTT TACTGTAGAA GCAGAACCTG
1151 AACTTGATAT TAATACTGCG GTTGCCGATA GTATTGAAAC AGCGCGTGTT
1201 GCTATTGTTG CTTTGGGTGA TACGGTTGAA GAAAATGAGA TGGATATTTT
1251 AATCAATGCA TTAAATACCC AAATCATTAA CTTTGCTTTA GACTCAACCG
1301 AAATTCCCCA AGAAAATAAA GAAATCTTGG ATTTGGCTGC CGAAAAATTA
1351 AAGGCAGTGC CTGAAACAAC TTTGCGTATC ATTGGTCATA CAGACACTCA
1401 AGGCACACAT GAGTATAATC AAGATTTATC AGAATCTCGT GCTGCTGCTG
1451 TTAAAGAGTA TTTGGTATCA AAAGGTGTTG CTGCTGAACG CTTGAACACT
1501 CAAGGTGCAA GTTTTGATTA TCCAGTTGCA TCAAATGCTA CCGAACAAGG
1551 TCGCTTCCAA AACCGTCGTA TTGAGTTTGT ACTTTTCCAA GAAGGTGAAG
1601 CAATTACTCA AGTCGGTCAT GCTGAAGATG CACCAACACC TGTTGCACAA
1651 AACTGA
```

图10 (SEQ ID NO: 10)

```
   1 MSLINKLNER ITPHVLTSIK NQDGDNADKS NLLTAFYTIF AGRLSNEDVY
  51 QRANALPDNE LEHGHHLLNV AFSDVSTGED QIASLSNQLA DEYHVSPVTA
 101 RTAIATAAPL ALARIKEQAG ALSVPSFIRT QLAKEENRLP TWAHTLLPAG
 151 LFATAATTTA EPVTTASAVV KEPVKPSVVT EPVHPAAATT PVKTPTAQHY
 201 ENKEKSPFLK TILPIIGLII FAGLAWLLLR ACQDKPTPVA APVATDTAPV
 251 VADNAVQADP TQTGVAQAPA TLSLSVDETG QALYSHRAQV GSEELAGHIR
 301 AAIAQVFGVQ DLTIQNTNVH TATMPAAEYL PAILGLMKGV PNSSVVIHDH
 351 TVRFNATTPE DVAKLVEGAK NILPADFTVE AEPELDINTA VADSIETARV
 401 AIVALGDTVE ENEMDILINA LNTQIINFAL DSTEIPQENK EILDLAAEKL
 451 KAVPETTLRI IGHTDTQGTH EYNQDLSESR AAAVKEYLVS KGVAAERLNT
 501 QGASFDYPVA SNATEQGRFQ NRRIEFVLFQ EGEAITQVGH AEDAPTPVAQ
 551 N*
```

图11(SEQ ID NO: 11)

```
   1 ATGGATACAA AACACATTCA GCAAAATTGG CTTCTACCTG ATGGTGTGGC
  51 TGATGTACTA TTTACCGATG CTCAAAAACA AGAAAGCCTG CGTGATGCCT
 101 TGCTATTTGT GCTAACCGCA CACGGTTATC GCTTGGTGTC ACCACCATTA
 151 ATAGAGTATA CCGAAAGTCT GCTAAATAAT GCTGACGAAG ATCTAAAACG
 201 CCAAACTTTC AAATTTATCG ATCAGCTCAA TGGTCGTTTG ATGGGTTTGC
 251 GTGCCGATAT TACGCCACAA ATTCTACGCA TTGATAGCAA ATATGGTCAA
 301 GGCATCAGCC GTTACTGTTA TGTTGGGCAA GTTGTCAAAA CCCTACCGAC
 351 TGGTCTGTTT GGGCTGCGTA CACCGCTTCA ATTGGGTGCT GAGATTTTTG
 401 GGATAGATGA TATCCGTGCC GAGCTTGAGC TGATTGATCT ATTGGCCGCA
 451 TTGGCAGATG AGATCGGACT AGGCCGAGAG ATGCTACATG TGGATATTGG
 501 TCATGTCGCT ATTTTTGATC GCTTGTGTCA GTTGCATGGC GTTTCAAATA
 551 AAGATGCTGA TGAGCTGATT GGCATTTACC ATAAAAAAGC CATGCCAGAA
 601 CTTGCCAAAT GGTGCCAAAA TATTGGCAAT AGCCTAAACA GCCCAAGCGA
 651 TGCAACCGAT TTTTTGGTAT TGGCTAAGCA TACATTAAGC AGTGATCGGA
 701 CACCAAATGC CGAGGCTTTA TTAAGTAAAC TGTCCGATAA AGCTCGCCAA
 751 GATAATAAAA TCATCCAAGC GGCAAATGAG CTTGCTACTT TGGCGGCACA
 801 TATCAGAGCG GTGGGTATGA GTGTGAGTAT TGATGTGACT GAATTGTCAG
 851 GATATCATTA TCATACTGGT GTGGTATTTA ATGTCTATTT GGGTAATAGA
 901 ACCACACAGA CTCAAGCTTT GGTACGAGGC GGTCGCTTTG ATGGTATCTC
 951 AACTCACAGC GTAGCAAGGG GCGCAACTGG TTTTAGCATG GATATTAATC
1001 GTTTGCTTGA ATTTGTAGAG CTTGAAGAAG ATACTGTGAT TTTGGTGGAT
1051 TATCACGATT TGCAAAATGC TGATGCAGAC ACAAAAGCTG ATTTGGCCAC
1101 ACAAATTAAA ACCTTGCAAT CTGAAGGCTG TATTGTCATT AAGCCTTTGA
1151 CTGTAGATGA TAAGCCTAAC CAGATTGATG GTGTTTTGCA TTGGGACACC
1201 GATCAAGATA AGCCGATTTG GGCGGTGCGA TTAGTTGGTG ATGAGTACTA
1251 A
```

图12 (SEQ ID NO: 12)

```
  1 MDTKHIQQNW LLPDGVADVL FTDAQKQESL RDALLFVLTA HGYRLVSPPL
 51 IEYTESLLNN ADEDLKRQTF KFIDQLNGRL MGLRADITPQ ILRIDSKYGQ
101 GISRYCYVGQ VVKTLPTGLF GLRTPLQLGA EIFGIDDIRA ELELIDLLAA
151 LADEIGLGRE MLHVDIGHVA IFDRLCQLHG VSNKDADELI GIYHKKAMPE
201 LAKWCQNIGN SLNSPSDATD FLVLAKHTLS SDRTPNAEAL LSKLSDKARQ
251 DNKIIQAANE LATLAAHIRA VGMSVSIDVT ELSGYHYHTG VVFNVYLGNR
301 TTQTQALVRG GRFDGISTHS VARGATGFSM DINRLLEFVE LEEDTVILVD
351 YHDLQNADAD TKADLATQIK TLQSEGCIVI KPLTVDDKPN QIDGVLHWDT
401 DQDKPIWAVR LVGDEY*
```

图13 (SEQ ID NO: 13)

```
  1 ATGAATAATT TTGTGTATCA GCTACAAAGT TTTTGGTATG AGCTTAATCA
 51 GGTCAATCGT CATACCATTG CTCAATCACC CAAATATATA CAGCTGACGG
101 TACTTGGTTT GATCGTGATG ATCATTGGCA TTTTTGGCTG GCTACTTGCG
151 ATTTTACCAA CCATTCAAAA GCTTAATGCA GCCCAAAGTC AAGAATCTGC
201 CTTAATTGAT GAATTTGCCA CTAAATATCA TAAAGCCCAG CAGTTTGACC
251 ATCTAAGCCA TCAGGTCATA CAAAAAAATA CACAACTTGA AAATCAGCTC
301 AATGCTCTGC CACGCACAGC ACCGATGAGC GAGATTATCG GAATGATAAA
351 TACCAAAGCA CAAGCGGTTA ATGTGCAGGT GGTGAGTGCA TCAGTTCAAG
401 CAGGTCGTGA ACAGGATTAT TATACCGAAC GCCCTATCGC AGTGAGTGCG
451 ACAGGGGATT ATCATGCTTT GGGTCGATGG TTACTTGAGT TGTCAGAGGC
501 TAACCATTTG CTGACAGTGC ATGATTTTGA TCTGAAGGCT GGTTTGAACC
551 ATCAGCTGAT GATGATTGCT CAGATGAAAA CTTATCAAGC AAACAAACGC
601 CCAAAACCAG TTGCTCAGCA GGTGCCTGAT GTTCAATGA
```

图14 (SEQ ID NO: 14)

```
  1 MNNFVYQLQS FWYELNQVNR HTIAQSPKYI QLTVLGLIVM IIGIFGWLLA
 51 ILPTIQKLNA AQSQESALID EFATKYHKAQ QFDHLSHQVI QKNTQLENQL
101 NALPRTAPMS EIIGMINTKA QAVNVQVVSA SVQAGREQDY YTERPIAVSA
151 TGDYHALGRW LLELSEANHL LTVHDFDLKA GLNHQLMMIA QMKTYQANKR
201 PKPVAQQVPD VQ*
```

图15

```
ETSU C-2      1 GAGCTTAAACTTGCTGATGATAGTATTATTGATAGTATCAATCAATTGGG   50
ETSU 658      1 GAGCTTAAACTTGCTGATGATAGTATTATTGATAGTATCAATCAATTGGG   50
ETSU T-25     1 GAGCTTAAACTTGCTGATGATAGTATTATTGATAGTATCAATCAATTGGG   50
M-12          1 GAGCTTAAACTTGCTGATGATAGTATTATTGATAGTATCAATCAATTGGG   50
                **************************************************

ETSU C-2     51 TGAGCTGACCGTCAATATTCCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG  100
ETSU 658     51 TGAGCTGACCGTCAATATTCCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG  100
ETSU T-25    51 TGAGCTGACCGTCAATATTCCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG  100
M-12         51 TGAGCTGACCGTCAATATTCCAAATACACAATATTTTCAAACCAACAACG  100
                **************************************************

ETSU C-2    101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC  150
ETSU 658    101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC  150
ETSU T-25   101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC  150
M-12        101 GTGTGAGCGTTGCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCTATTGTCGATATC  150
                **************************************************

ETSU C-2    151 AGCTTGTATTTTAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAATC  200
ETSU 658    151 AGCTTGTATTTTAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAATC  200
ETSU T-25   151 AGCTTGTATTTTAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAATC  200
M-12        151 AGCTTGTATTTTAATGCAGGGTCAGCGTATGACCATCAGGTTGGCAAATC  200
                **************************************************
```

图15（续）

```
ETSU C-2    201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAGGAACTGACAGCC 250
ETSU 658    201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAGGAACTGACAGCC 250
ETSU T-25   201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAGGAACTGACAGCC 250
M-12        201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTCACCCAAGGAACTGACAGCC 250
                ************************************************

ETSU C-2    251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
ETSU 658    251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
ETSU T-25   251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
M-12        251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
                ************************************************

ETSU C-2    301 ACCAGTACAGCAAATAAGGATAACTTAACTTTATCATTAAGAAGCTTGTC 350
ETSU 658    301 ACCAGTACAGCAAATAAGGATAACTTAACTTTATCATTAAGAAGCTTGTC 350
ETSU T-25   301 ACCAGTACAGCAAATAAGGATAACTTAACTTTATCATTAAGAAGCTTGTC 350
M-12        301 ACCAGTACAGCAAATAAGGATAACTTAACTTTATCATTAAGAAGCTTGTC 350
                ************************************************

ETSU C-2    351 TGATCAATCATTATTAAATCAAGCCGCCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA 400
ETSU 658    351 TGATCAATCATTATTAAATCAAGCCGCCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA 400
ETSU T-25   351 TGATCAATCATTATTAAATCAAGCCGCCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA 400
M-12        351 TGATCAATCATTATTAAATCAAGCCGCCGATTTAATGGTCGATGCTGTCA 400
                ************************************************

ETSU C-2    401 CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCAACAAAAATCAGCTC 450
ETSU 658    401 CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCAACAAAAATCAGCTC 450
ETSU T-25   401 CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCAACAAAAATCAGCTC 450
M-12        401 CTCAACCTGCTTTTGATGATAAGACTCTACAACGCAACAAAAATCAGCTC 450
                ************************************************

ETSU C-2    451 ATCACCAGTTTAAAACAAAAAAAGCAAAACCCTTATCATGTAGCTTCTGT 500
ETSU 658    451 ATCACCAGTTTAAAACAAAAAAAGCAAAACCCTTATCATGTAGCTTCTGT 500
ETSU T-25   451 ATCACCAGTTTAAAACAAAAAAAGCAAAACCCTTATCATGTAGCTTCTGT 500
M-12        451 ATCACCAGTTTAAAACAAAAAAAGCAAAACCCTTATCATGTAGCTTCTGT 500
                ************************************************

ETSU C-2    501 TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACACGCAACCA 550
ETSU 658    501 TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACACGCAACCA 550
ETSU T-25   501 TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACACGCAACCA 550
M-12        501 TGCTTATCATCAAGCCGTATATGAAAATCATCCTTATGCACACGCAACCA 550
                ************************************************

ETSU C-2    551 CAGGCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT 600
ETSU 658    551 CAGGCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT 600
ETSU T-25   551 CAGGCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT 600
M-12        551 CAGGCGATGAAGATAGTATTGCCAAAATTGATCGTGATGAGCTGCTTAAT 600
                ************************************************

ETSU C-2    601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTGATTACAGG 650
ETSU 658    601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTGATTACAGG 650
ETSU T-25   601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTGATTACAGG 650
M-12        601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAATAATGCGACACTGGTGATTACAGG 650
                ************************************************

ETSU C-2    651 TGATATGACCGCCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCGCCA 700
ETSU 658    651 TGATATGACCGCCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCGCCA 700
ETSU T-25   651 TGATATGACCGCCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCGCCA 700
M-12        651 TGATATGACCGCCGAGCAAGCCAAATCACTTGCCAACCATCTGACCGCCA 700
                ************************************************

ETSU C-2    701 AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAATACGCTGGATTTGACAAAACCA 750
ETSU 658    701 AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAATACGCTGGATTTGACAAAACCA 750
ETSU T-25   701 AATTACCGACAGGCAAGTCTTATAAAAATACGCTGGATTTGACAAAACCA 750
M-12        701 AATTACCGACAGGCAAGTCGTATAAAAATACGCTGGATTTGACAAAACCA 750
                ********** ********** ********** **********
```

图15（续）

```
ETSU C-2    751 GTTAAGGCTCGTCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT  800
ETSU 658    751 GTTAAGGCTCGCCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT  800
ETSU T-25   751 GTTAAGGCTCGCCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT  800
M-12        751 GTTAAGGCTCGCCATATCCATATTCCTCACAACAGTAGTCAAACCCAAAT  800
                ********** ****************************************

ETSU C-2    801 CATCATCGGTCATCCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAGCAGGTCGTC  850
ETSU 658    801 CATCATCGGTCACCCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAGCAGGTCGTC  850
ETSU T-25   801 CATCATCGGTCACCCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAGCAGGTCGTC  850
M-12        801 CATCATCGGTCACCCCACCAGTAAAGTACGCACGGACAAAGCAGGTCGTC  850
                *********** ****************************************

ETSU C-2    851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT  900
ETSU 658    851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT  900
ETSU T-25   851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT  900
M-12        851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATTAGGTAATGAAATTTTGGCAGGTGGTGAT  900
                ************************************************

ETSU C-2    901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA  950
ETSU 658    901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA  950
ETSU T-25   901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA  950
M-12        901 TTTAATGCCAGATTGATGAAAACCATTCGAGAGCAAAAAGGCTACACTTA  950
                ************************************************

ETSU C-2    951 TGGCATTTATGGCGGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTATGTGG 1000
ETSU 658    951 TGGCATTTATGGCGGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTATGTGG 1000
ETSU T-25   951 TGGCATTTATGGCGGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTATGTGG 1000
M-12        951 TGGCATTTATGGCGGTATGGAACGCCTCAGAGCAGGTGGTAATTATGTGG 1000
                ************************************************

ETSU C-2   1001 TTGAATTTTCAACCGATGGCGATAAAGCAGCCGATGCCATTTTAGAGACG 1050
ETSU 658   1001 TTGAATTTTCAACCGATGGCGATAAAGCAGCCGATGCCATTTTAGAGACG 1050
ETSU T-25  1001 TTGAATTTTCAACCGATGGCGATAAAGCAGCCGATGCCATTTTAGAGACG 1050
M-12       1001 TTGAATTTTCAACCGATGGCGATAAAGCAGCCGATGCCATTTTAGAGACG 1050
                ************************************************

ETSU C-2   1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAAGAAGAGCT 1100
ETSU 658   1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAAGAAGAGCT 1100
ETSU T-25  1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAAGAAGAGCT 1100
M-12       1051 CTACACATCATTAATGAGTCGCTGAATGAAGGCATAACCCAAGAAGAGCT 1100
                ************************************************


ETSU C-2   1101 TGAGTTGGTGCGTTTGGGCAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTTCAA 1150
ETSU 658   1101 TGAATTGGTGCGTTTGGGTAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTTCAA 1150
ETSU T-25  1101 TGAGTTGGTGCGTTTGGGCAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTTCAA 1150
M-12       1101 TGAATTGGTGCGTTTGGGTAATAAAAATGGTTTTGCCAATATTTTTTCAA 1150
                *** ************** ********************************

ETSU C-2   1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTCATTGGTGCTTTATTTGTTGCCGATTAT 1200
ETSU 658   1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTCATTGGTGCTTTATTTGTTGCCGATTAT 1200
ETSU T-25  1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTCATTGGTGCTTTATTTGTTGCCGATTAT 1200
M-12       1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTCATTGGTGCTTTATTTGTTGCCGATTAT 1200
                ************************************************

ETSU C-2   1201 CCAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
ETSU 658   1201 CCAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
ETSU T-25  1201 CCAAAAGATCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
M-12       1201 CCAAAAGACCATCTTAACCATACGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
                ******** ****************************************

ETSU C-2   1251 AAATAGTGTTAATACCGCACTGAACTTGCGTATCAAGCCTGATGAATTT  1299
ETSU 658   1251 AAATAGTGTTAATACCGCACTGAACTTGCGTATCAAGCCTGATGAATTT  1299
ETSU T-25  1251 AAATAGTGTTAATACCGCACTGAACTTGCGTATCAAGCCTGATGAATTT  1299
M-12       1251 AAATAGTGTTAATACCGCACTGAACTTGCGTATCAAGCCTGATGAATTT  1299
                ************************************************
```

图16

```
ETSU C-2      1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNGVSVAFTPLHELPIVDI  50
ETSU 658      1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNGVSVAFTPLHELPIVDI  50
ETSU T-25     1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNGVSVAFTPLHELPIVDI  50
M-12          1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFQTNNGVSVAFTPLHELPIVDI  50
                ************************************************

ETSU C-2     51 SLYFNAGSAYDHQVGKSGTANMVATMLTQGTDSLSEDEFVAAKERLGIDF 100
ETSU 658     51 SLYFNAGSAYDHQVGKSGTANMVATMLTQGTDSLSEDEFVAAKERLGIDF 100
ETSU T-25    51 SLYFNAGSAYDHQVGKSGTANMVATMLTQGTDSLSEDEFVAAKERLGIDF 100
M-12         51 SLYFNAGSAYDHQVGKSGTANMVATMLTQGTDSLSEDEFVAAKERLGIDF 100
                ************************************************

ETSU C-2    101 TSTANKDNLTLSLRSLSDQSLLNQAADLMVDAVTQPAFDDKTLQRNKNQL 150
ETSU 658    101 TSTANKDNLTLSLRSLSDQSLLNQAADLMVDAVTQPAFDDKTLQRNKNQL 150
ETSU T-25   101 TSTANKDNLTLSLRSLSDQSLLNQAADLMVDAVTQPAFDDKTLQRNKNQL 150
M-12        101 TSTANKDNLTLSLRSLSDQSLLNQAADLMVDAVTQPAFDDKTLQRNKNQL 150
                ************************************************

ETSU C-2    151 ITSLKQKKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
ETSU 658    151 ITSLKQKKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
ETSU T-25   151 ITSLKQKKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
M-12        151 ITSLKQKKQNPYHVASVAYHQAVYENHPYAHATTGDEDSIAKIDRDELLN 200
                ************************************************

ETSU C-2    201 FWHTFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNTLDLTKP 250
ETSU 658    201 FWHTFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNTLDLTKP 250
ETSU T-25   201 FWHTFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNTLDLTKP 250
M-12        201 FWHTFINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLTAKLPTGKSYKNTLDLTKP 250
                ************************************************

ETSU C-2    251 VKARHIHIPHNSSQTQIIIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFSLGNEILAGGD 300
ETSU 658    251 VKARHIHIPHNSSQTQIIIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFSLGNEILAGGD 300
ETSU T-25   251 VKARHIHIPHNSSQTQIIIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFSLGNEILAGGD 300
M-12        251 VKARHIHIPHNSSQTQIIIGHPTSKVRTDKAGRQEFSDFSLGNEILAGGD 300
                ************************************************

ETSU C-2    301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
ETSU 658    301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
ETSU T-25   301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
M-12        301 FNARLMKTIREQKGYTYGIYGGMERLRAGGNYVVEFSTDGDKAADAILET 350
                ************************************************

ETSU C-2    351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
ETSU 658    351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
ETSU T-25   351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
M-12        351 LHIINESLNEGITQEELELVRLGNKNGFANIFSSNASIHRVIGALFVADY 400
                ************************************************

ETSU C-2    401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRIKPDEF 433
ETSU 658    401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRIKPDEF 433
ETSU T-25   401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRIKPDEF 433
M-12        401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRIKPDEF 433
                *********************************
```