

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480026174.X

[51] Int. Cl.

*C07K 14/195 (2006.01)*

*C12N 15/31 (2006.01)*

*C07K 16/12 (2006.01)*

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*A61K 39/02 (2006.01)*

[43] 公开日 2006年10月18日

[11] 公开号 CN 1849334A

[22] 申请日 2004.9.8

[21] 申请号 200480026174.X

[30] 优先权

[32] 2003.9.12 [33] EP [31] 03077861.7

[86] 国际申请 PCT/EP2004/009995 2004.9.8

[87] 国际公布 WO2005/026200 英 2005.3.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.10

[71] 申请人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72] 发明人 P·韦尔梅杰

[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 3 页 说明书 21 页 序列表 22 页  
附图 1 页

[54] 发明名称

胞内劳森氏菌亚单位疫苗

[57] 摘要

本发明涉及编码新型胞内劳森氏菌 (*Lawsonia intracellularis*) 蛋白质的核酸序列。本发明还涉及包含这些序列的 DNA 片段、重组 DNA 分子、和活体重组载体。本发明还涉及包含这些核酸序列、DNA 片段、重组 DNA 分子、和活体重组载体的宿主细胞。此外,本发明涉及由这些核酸序列编码的蛋白质及其用于制造疫苗的用途。本发明还涉及用于抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗及其制备方法。最后,本发明涉及用于检测胞内劳森氏菌 DNA 以及检测胞内劳森氏菌抗原和针对胞内劳森氏菌的抗体的诊断性测试。

1. 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 所述核酸序列或其所述部分与SEQ ID NO: 1所示核酸序列具有至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%的同源性。

2. 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 所述核酸序列或其所述部分与SEQ ID NO: 3所示核酸序列具有至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%的同源性。

3. 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 所述核酸序列或其所述部分与SEQ ID NO: 5所示核酸序列具有至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%的同源性。

4. 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 所述核酸序列或其所述部分与SEQ ID NO: 7所示核酸序列具有至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%的同源性。

5. 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 所述核酸序列或其所述部分与SEQ ID NO: 9所示核酸序列具有至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%的同源性。

6. 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 所述核酸序列或其所述部分与SEQ ID NO: 11所示核酸序列具有至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%的同源性。

7. 包含依照权利要求1-6的核酸序列的DNA片段。

8. 包含处于功能性相连的启动子控制之下的依照权利要求1-6的核酸序列或依照权利要求7的DNA片段的重组DNA分子。

9. 包含依照权利要求1-6的核酸序列、依照权利要求7的DNA片段、或依照权利要求8的重组DNA分子的活体重组载体。

10. 包含依照权利要求1-6的核酸序列、依照权利要求7的DNA片段、依照权利要求8的重组DNA分子、或依照权利要求9的活体重组载体的宿主细胞。

11. 胞内劳森氏菌蛋白质或其免疫原性片段，所述蛋白质包含与SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%同源的氨基酸序列。

12. 胞内劳森氏菌蛋白质或其免疫原性片段，所述蛋白质包含与SEQ ID NO: 4所示氨基酸序列至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%同源的氨基酸序列。

13. 胞内劳森氏菌蛋白质或其免疫原性片段，所述蛋白质包含与SEQ ID NO: 6所示氨基酸序列至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%同源的氨基酸序列。

14. 胞内劳森氏菌蛋白质或其免疫原性片段，所述蛋白质包含与SEQ ID NO: 8所示氨基酸序列至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%同源的氨基酸序列。

15. 胞内劳森氏菌蛋白质或其免疫原性片段，所述蛋白质包含与SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%同源的氨基酸序列。

16. 胞内劳森氏菌蛋白质或其免疫原性片段，所述蛋白质包含与SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列至少90%、优选92%、更优选94%、甚至更优选96%同源的氨基酸序列。

17. 用于疫苗中的依照权利要求11-16的胞内劳森氏菌蛋白质。

18. 依照权利要求11-16的胞内劳森氏菌蛋白质用于制备抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗的运用。

19. 用于抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗，其特征是包含依照权利要求1-6的核酸序列、依照权利要求7的DNA片段、依照权利要求8的重组DNA分子、依照权利要求9的活体重组载体、依照权利要求10的宿主细胞、

或依照权利要求11-16的蛋白质，以及制药学可接受载体。

20. 依照权利要求19的疫苗，其特征是包含佐剂。

21. 依照权利要求19或20的疫苗，其特征是包含由猪致病性病毒或微生物衍生的额外抗原或编码所述抗原的遗传信息。

22. 依照权利要求21的疫苗，其特征是所述猪致病性病毒或微生物选自：假狂犬病病毒、猪流感病毒、猪细小病毒、可传染的胃肠炎病毒、轮状病毒、埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、支气管炎博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)、副猪嗜血菌 (*Haemophilus parasuis*)、多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*)、猪肺炎枝原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、和大叶性肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。

23. 用于抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗，其特征是包含针对依照权利要求11-16所述蛋白质的抗体。

24. 用于制备依照权利要求19-23的疫苗的方法，所述方法包括将依照权利要求1-6的核酸序列、依照权利要求7的DNA片段、依照权利要求8的重组DNA分子、依照权利要求9的活体重组载体、依照权利要求10的宿主细胞、依照权利要求11-16的蛋白质、或针对依照权利要求11-16所述蛋白质的抗体与制药学可接受载体混合。

25. 用于检测胞内劳森氏菌特异性DNA的诊断性测试，其特征是所述测试包含依照权利要求1-6的核酸序列或其长度为至少12个、优选15个、更优选18个核苷酸的片段。

26. 用于检测针对胞内劳森氏菌的抗体的诊断性测试，其特征是所述测试包含权利要求11-16中所定义的蛋白质或其片段。

27. 用于检测胞内劳森氏菌的抗原性物质的诊断性测试，其特征是所述测试包含针对权利要求11-16中定义的蛋白质或其片段的抗体。

## 胞内劳森氏菌亚单位疫苗

### 发明领域

本发明涉及编码新型胞内劳森氏菌 (*Lawsonia intracellularis*) 蛋白质的核酸序列, 包含这些序列的DNA片段、重组DNA分子、和活体重组载体, 包含这些核酸序列、DNA片段、重组DNA分子、和活体重组载体的宿主细胞, 由这些核酸序列编码的蛋白质及其用于制造疫苗的用途, 用于抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗及其制备方法, 以及用于检测胞内劳森氏菌DNA、用于检测胞内劳森氏菌抗原、和用于检测针对胞内劳森氏菌的抗体的诊断性测试, 等等。

### 发明背景

猪增生性肠病 (PPE或PE) 已经在世界范围成为现代猪养殖业的一种重要疾病。它影响15% - 50%的成长畜群, 和确认存在问题的畜群中高达30%的动物个体。目前, 每头病猪的额外饲料和设备时间成本的年度经济损失估算是5-10美元。PPE是临床症状相差很大的一组慢性和急性病况 (死亡、苍白和贫血、流口水、暗红或鲜红腹泻、萎靡、食欲降低和不愿移动、生长迟缓、和FCR升高)。然而, 存在两种一致的特征。第一种是只在尸检时才看得见的病理学变化, 即小肠和结肠粘膜变厚。第二种是病肠的肠细胞中存在胞质内小型弯曲细菌。这些细菌现在已经确认是PPE的病因, 而且已经命名为胞内劳森氏菌。

几年来, 已经发现胞内劳森氏菌侵袭近乎所有动物, 包括猴、兔、雪貂、仓鼠、狐狸、马, 并广至鸵鸟和鸚鵡等其它动物。胞内劳森氏菌是有鞭毛的革兰氏阴性细菌, 只在真核肠细胞中繁殖, 尚无无细胞培养的描述。为了在细胞中驻扎和繁殖, 胞内劳森氏菌必需穿透分隔的囊细胞。细菌结合细胞膜, 并经由进入性液泡快速进入肠细胞。然后这个进入液泡快速破裂 (3小时内), 而细菌开始活跃并在胞质中自

由繁殖。尚未理解细菌致使受感染细胞不能成熟、继续进行有丝分裂、并形成发育不全囊细胞的机制。

目前对胞内劳森氏菌感染的理解、对该疾病的治疗和控制由于无法在无细胞培养基中培养胞内劳森氏菌这一事实而受阻。虽然有在大鼠肠细胞中成功共培养胞内劳森氏菌的报导，但是这尚未导致用于抗击胞内劳森氏菌的灭活疫苗的开发，尽管显然需要这样的疫苗。

本发明的一个目的是提供用于抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗。

现在令人惊讶的发现胞内劳森氏菌产生六种新型蛋白质，它们能够单独或联合诱导针对胞内劳森氏菌的保护性免疫。

将这些新型蛋白质称为31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白。它们的氨基酸序列显示于SEQ ID NO: 2、4、6、8、10和12中。编码这些蛋白质的基因已经测序，它们的核酸序列显示于SEQ ID NO: 1、3、5、7、9和11中。

本领域众所周知，许多不同的核酸序列能够编码同一种蛋白质。这种现象常常称为每个编码氨基酸的三联体中第二个、并且尤其是第三个碱基的摇摆现象。该现象可以导致异源性约30%的两种核酸序列仍然编码相同的蛋白质。因此，序列同源性约70%的两种核酸序列仍然能够编码同一种蛋白质。

由此，本发明的一个实施方案涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列和编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分，其中所述核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 1所示核酸序列具有至少90%的同源性水平。

优选的是，编码所述胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 1所示核酸序列具有至少92%、优选94%、更优选95%的同源性。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

核苷酸同源性水平可以使用计算机程序“BLAST 2 SEQUENCES”、选择子程序“BLASTN”测定，所述程序可以在[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)上找到。该程序的一篇参考文献是：Tatiana A. Tatusova、Thomas L. Madden, FEMS

Microbiol. Letters 174: 247 - 250, 1999。所用参数是默认参数：匹配奖分 +1, 错配罚分: -2, 开放缺口: 5, 延伸缺口: 2, 缺口 x\_dropoff 50。

用于判定某种核酸序列是否是依照本发明的核酸序列的另一种方法涉及所述核酸序列是否与SEQ ID NO: 1 (或SEQ ID NO: 3、5、7、9、或11, 见下文) 所示核苷酸序列在严谨条件下确能杂交的问题。若核酸序列与SEQ ID NO: 1、或者SEQ ID NO: 3、5、7、9、或11所示核苷酸序列在严谨条件下杂交, 则认为它是依照本发明的核酸序列。

严谨条件的定义是由Meinkoth和Wahl (1984。固定在固相支持物上的核酸的杂交 (Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports) 。Anal. Biochem. 138: 267 - 284) 的公式得出的。

$T_m = [81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{甲酰胺}) - 500/L] - 1 \text{ } ^\circ\text{C} / 1\% \text{错配}$

在该公式中, M指单价阳离子的摩尔浓度; %GC指DNA中鸟苷和胞苷的百分比; L指杂合体的碱基对长度。

严谨条件指核酸序列或其片段与SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、或11中任一所示核酸序列有至多10%错配时仍然发生杂交的那些条件。

此实施方案还涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列和编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 它与SEQ ID NO: 3所示核酸序列具有至少90%的同源性水平。

优选的是, 编码所述胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 3所示核酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的同源性。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案还涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列和编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分, 它与SEQ ID NO: 5所示核酸序列具有至少90%的同源性水平。

优选的是, 编码所述胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 5所示核酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的同源性。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案还涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列和编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分，它与SEQ ID NO: 7所示核酸序列具有至少90%的同源性水平。

优选的是，编码所述胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 7所示核酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的同源性。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案还涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列和编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分，它与SEQ ID NO: 9所示核酸序列具有至少90%的同源性水平。

优选的是，编码所述胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 9所示核酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的同源性。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案还涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列和编码所述蛋白质之免疫原性片段的所述核酸序列之部分，它与SEQ ID NO: 11所示核酸序列具有至少90%的同源性水平。

优选的是，编码所述胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 11所示核酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的同源性。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

因为本发明公开了编码新型胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列，现在第一次有可能获得足够量的这些蛋白质。这可以通过例如使用表达系统来表达编码所述蛋白质的基因来进行。因此，在一个更优选的实施方案中，本发明涉及包含依照本发明的核酸序列的DNA片段。这些DNA片段可以是例如其中克隆了依照本发明的核酸序列的质粒。这些DNA片段可用于例如增加DNA的量，如下文所述用作引物。

表达核酸序列的一项必要条件是将核酸序列与合适的启动子功能性相连，使得所述核酸序列处于该启动子的控制下。对于本领域技术人员显而易见的是，启动子的选择可延伸至能够在用作蛋白质表达宿主细胞的细胞中指导基因转录的任何真核、原核、或病毒启动子。

因此，此实施方案的一种甚至更优选的形式涉及包含依照本发明

的DNA片段或核酸序列且其处于功能性相连的启动子控制之下的重组DNA分子。这可以通过例如标准分子生物学技术 (Maniatis/Sambrook (Sambrook, J., 《分子克隆: 实验室手册》Molecular Cloning: a laboratory manual, 1989, ISBN 0-87969-309-6)) 来获得。功能性相连的启动子指能够控制相连的核酸序列转录的启动子。这种启动子可以是劳森氏菌启动子, 例如参与编码31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、或31.4kD蛋白之基因的体内表达的启动子, 只要该启动子在用于表达的细胞中有功能即可。它还可以是异源启动子。当宿主细胞是细菌时, 可以使用的有用表达控制序列包括Trp启动子和操纵子 (Goeddel等, Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980)、lac启动子和操纵子 (Chang等, Nature 275: 615, 1978)、外在膜蛋白启动子 (Nakamura, K. 和 Inouge, M., EMBO J. 1: 771-775, 1982)、 $\lambda$ 噬菌体启动子和操纵子 (Remaut, E. 等, Nucl. Acids Res. 11: 4677-4688, 1983)、 $\alpha$ -淀粉酶 (枯草芽孢杆菌) 启动子和操纵子, 以及与所选宿主细胞相容的终止序列和其它表达增强和控制序列。当宿主细胞是酵母时, 有用的表达控制序列包括例如 $\alpha$ -交配因子。对于昆虫细胞而言, 可以使用杆状病毒的多角体蛋白或p10启动子 (Smith, G. E. 等, Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165, 1983)。当宿主细胞是哺乳动物来源的细胞时, 例示性的有用表达控制序列包括SV40启动子 (Berman, P. W. 等, Science 222: 524-527, 1983) 或金属硫蛋白启动子 (Brinster, R. L., Nature 296: 39-42, 1982) 或热休克启动子 (Voellmy等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4949-4953, 1985)。

细菌、酵母、真菌、昆虫和哺乳动物细胞表达系统是极其频繁使用的系统。这些系统在本领域是众所周知的, 而且通常可以通过商业途径例如Clontech Laboratories公司 (费边路4030号, 帕洛阿尔托, 加利福尼亚州 94303-4607, 美国) 获得。在这些表达系统之外, 基于寄生虫的表达系统是非常有吸引力的表达系统。这些系统描述于例如公开号为2 714 074的法国专利申请和美国NTIS公开号US 08/043109 (Hoffman, S. 和 Rogers, W., 公开日期1993年12月1日)。

本发明此实施方案的一种甚至还要更优选的形式涉及包含编码本发明的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其免疫原性片段的核酸序列、依照本发明的DNA片段、或依照本发明的重组DNA分子的活体重组载体（LRC）。这些载体是例如细菌和病毒。这些LRC是其中已克隆了额外遗传信息的微生物或病毒。在本案中，所述额外遗传信息指编码本发明的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其免疫原性片段的核酸序列。受到这些LRC感染的动物将产生免疫原性应答，不仅针对于载体的免疫原，还针对于其遗传密码额外地克隆到LRC中的蛋白质（例如31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白）的免疫原性部分。作为细菌LRC的示例，可以使用本领域已知的沙门氏菌减毒株。活体重组载体寄生虫等已被描述于Vermeulen, A. N., *Int. J. Parasitol.* 28: 1121 - 1130, 1998。同样，可以使用LRC病毒作为将核酸序列运输到靶细胞内的途径。活体重组载体病毒也称为载体病毒。常用作载体的病毒有牛痘病毒（Panicali等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4927, 1982）、疱疹病毒（E. P. A. 0473210A2）、和逆转录病毒（Valerio, D. 等; Baum, S. J.、Dicke, K. A.、Lotzova, E.、和Pluznik, D. H. 编, 《今日实验血液学》（*Experimental Haematology Today*）, 1988年, Springer Verlag, 纽约, 第92 - 99页, 1989年）。

可以使用本领域众所周知的体内同源重组技术将重组核酸序列导入所选细菌、寄生虫、或病毒的基因组，从而能够诱导所插入的本发明核酸序列在宿主动物中表达。

最后，本发明此实施方案的另一种形式涉及包含编码本发明蛋白质的核酸序列、包含这种核酸序列的DNA片段、或包含处于功能性相连的启动子控制下的所述核酸序列的重组DNA分子的宿主细胞。这种形式还涉及包含活体重组载体的宿主细胞，所述活体重组载体包含编码依照本发明的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其片段的核酸。宿主细胞可以是细菌起源的细胞，例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、和乳酸杆菌物种，并联合基于细菌的质粒像pBR322或

细菌表达载体像pGEX或是联合噬菌体。宿主细胞还可以是真菌起源的，例如联合酵母特异性载体分子的酵母细胞，或是联合载体或重组杆状病毒的高等真核细胞，像昆虫细胞（Luckow等，Bio-technology 6: 47-55, 1988），联合例如基于Ti质粒的载体或植物病毒载体的植物细胞（Barton, K. A. 等，Cell 32: 1033, 1983），同样联合适当载体或重组病毒的哺乳动物细胞，像HeLa细胞、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）、或Crandell猫肾细胞。

本发明的另一个实施方案涉及依照本发明的新型蛋白质及其免疫原性片段。

免疫原性片段的概念将在下文中定义。

此实施方案的一种形式涉及具有与SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列至少90%同源的氨基酸序列的胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段等。

在一种优选的形式中，此实施方案涉及与SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的序列同源性的所述胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

蛋白质同源性水平可以使用计算机程序“BLAST 2 SEQUENCES”、并选择子程序“BLASTP”测定，所述程序可以在[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)上找到。该程序的一篇参考文献是：Tatiana A. Tatusova、Thomas L. Madden, FEMS Microbiol. Letters 174: 247-250, 1999。所用矩阵是“blosum62”。所用参数是默认参数：开放缺口：11，延伸缺口：1，缺口x-dropoff 50。

此实施方案的另一种形式涉及具有与SEQ ID NO: 4所示氨基酸序列至少90%同源的氨基酸序列的胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段等。

一种优选的形式涉及与SEQ ID NO: 4所示氨基酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的序列同源性的所述胞内劳森氏菌蛋白质

及其免疫原性片段。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案的另一种形式涉及具有与SEQ ID NO: 6所示氨基酸序列至少90%同源的氨基酸序列的胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段, 等等。

一种优选的形式涉及与SEQ ID NO: 6所示氨基酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的序列同源性的所述胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案的另一种形式涉及具有与SEQ ID NO: 8所示氨基酸序列至少90%同源的氨基酸序列的胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段, 等等。

一种优选的形式涉及与SEQ ID NO: 8所示氨基酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的序列同源性的所述胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案的另一种形式涉及具有与SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列至少90%同源的氨基酸序列的胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段, 等等。

一种优选的形式涉及与SEQ ID NO: 10所示氨基酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的序列同源性的所述胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

此实施方案的另一种形式涉及具有与SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列至少90%同源的氨基酸序列的胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段, 等等。

一种优选的形式涉及与SEQ ID NO: 12所示氨基酸序列具有至少92%、优选94%、更优选96%的序列同源性的所述胞内劳森氏菌蛋白质及其免疫原性片段。甚至更优选98%或甚至100%的同源性水平。

可以理解, 对于本文所涵盖的具体蛋白质而言, 单个胞内劳森氏菌菌株之间可以存在天然变异。这些变异可以表现为整个序列中的氨基酸差异, 或是所述序列中氨基酸的缺失、替代、插入、倒置、或添

加。基本上不改变生物学和免疫学活性的氨基酸替代描述于例如 Neurath等,《蛋白质》(The Proteins), Academic出版社, 纽约, 1979。相关氨基酸之间的氨基酸取代或进化中频繁发生的取代特别地有Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val(参阅Dayhof, M. D., 蛋白质序列和结构集(Atlas of proteins sequence and structure), Nat. Biomed. Res. Found., 华盛顿特区, 1978, 第5卷, 增刊3)。其它氨基酸替代包括Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val、和Ala/Glu。根据这一信息,Lipman和Pearson开发了用于快速且灵敏的比较蛋白质(Science 227: 1435 - 1441, 1985)并测定同源蛋白质之间功能相似性的方法。本发明例示性实施方案的这种氨基酸替代以及具有缺失和/或插入的变化属于本发明的范围之内,只要由此得到的蛋白质保持了它们的免疫反应性即可。这解释了为何由不同野外隔离种群分离得到的本发明胞内劳森氏菌蛋白质可能具有约90%的同源性水平、但仍然代表具有相同免疫学特征的不同蛋白质。如果依照本发明的某种蛋白质中存在氨基酸序列的变异,但是提供的蛋白质仍然能够诱发针对胞内劳森氏菌感染或至少针对该感染的临床表现的免疫应答,那么认为那些变异“基本上不影响免疫原性”。

在将蛋白质用于例如接种目的或用于制备抗体时,并不需要使用完整的蛋白质。使用能够就这样或在偶联载体(诸如例如KLH)后诱发针对所述蛋白质的免疫应答的所述蛋白质之片段,即所谓的免疫原性片段,也是可能的。“免疫原性片段”理解为仍然保留其在宿主中诱发免疫应答的能力、即包含B或T细胞表位的全长蛋白质之片段。目前,有多种技术可用于容易的鉴定编码抗原性片段(决定簇)的DNA片段。由Geysen等(专利申请WO 84/03564; 专利申请WO 86/06487; 美国专利NR. 4,833,092; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998 - 4002, 1984; J. Imm. Meth. 102: 259 - 274, 1987)描述的方法(即所谓的PEPSCAN法)易于执行,是快速检测表位(即蛋白质中的免疫学重要区域)的完善方法。该方法在世界范围得到使用,而且在本领域技术

人员中同样是众所周知的。这种(经验)方法尤其适合于检测B细胞表位。同样,在给出编码任何蛋白质的基因序列后,计算机算法能够根据其目前已知的表位在序列和/或结构上的一致性指出特定蛋白质片段是免疫学上重要的表位。这些区域的确定基于的是依照Hopp和Woods(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 38248-3828, 1981)的亲水性标准和依照Chou和Fasman(Advances in Enzymology 47: 45-148, 1987; 美国专利4,554,101)的二级结构方面的综合。同样可以使用计算机借助Berzofsky氏两亲性标准(Science 235: 1059-1062, 1987; 美国专利申请NTIS US 07/005,885)由序列预测T细胞表位。其简明综述参见:关于一般原理,Shan和Lu, Tibtech 9: 238-242, 1991; 关于Malaria表位, Good等, Science 235: 1059-1062, 1987; 关于回顾, Lu, Vaccine 10: 3-7, 1992; 关于HIV表位, Berzowsky, The FASEB Journal 5: 2412-2418, 1991。

因此,本发明另一个实施方案的一种形式涉及能够保护猪免于胞内劳森氏菌感染的疫苗,它包含一种或多种上文所述依照本发明的蛋白质或其免疫原性片段以及制药学可接受载体。

本发明的另一个实施方案涉及用于疫苗的本发明蛋白质。

本发明的另一个实施方案涉及依照本发明的蛋白质用于制造抗击胞内劳森氏菌感染的疫苗的用途。

生产依照本发明的疫苗的一种方法是由取自受感染肠壁的粘膜拭样获得细菌,并通过生物化学方法由细菌纯化依照本发明的蛋白质或其免疫原性片段。然而,这种生产疫苗的方法非常费时。

因此,在疫苗中使用编码依照本发明的蛋白质或其免疫原性片段的基因的表达产物要方便得多。本发明列出了编码31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白的基因的核酸序列。

通过混合一种或多种依照本发明的蛋白质或依照本发明的其免疫原性片段以及下文所述制药学可接受载体,可以容易的生产基于这些基因表达产物的疫苗。

或者,依照本发明的疫苗可以包含上文所述能够表达本发明蛋白

质或其依照本发明的免疫原性片段的活体重组载体。例如基于感染肠上皮或例如呼吸道上皮的沙门氏菌载体或病毒载体的这种疫苗具有优于亚单位疫苗的优势，即它们更好的模拟了胞内劳森氏菌感染的天然途径。此外，它们的自主繁殖也是优势，因为免疫只需要少量的重组载体。

上文所述疫苗都促成主动接种，即宿主的免疫系统受到一种或多种依照本发明的蛋白质或其免疫原性片段的触发而生成针对这些蛋白质的抗体。或者，可以在例如兔中制备这些抗体，或者可以如下所述由生成抗体的细胞系获得这些抗体。然后，可以对宿主动物施用这些抗体。这种接种方法即被动接种是动物已受到感染且没有时间来触发天然免疫应答时的接种选择。它也是给无免疫应答动物接种的优选方法。在这些情况中，所施用的针对胞内劳森氏菌的抗体直接结合细菌。这具有立即降低或终止胞内劳森氏菌生长的优势。因此，本发明此实施方案的一种形式涉及包含针对依照本发明的六种胞内劳森氏菌蛋白中任一种的抗体的疫苗。

疫苗还可以基于如上所述的宿主细胞，其中包含依照本发明的蛋白质或其免疫原性片段。

接种的一种有效的变通方法是直接接种编码相关抗原的DNA。直接接种编码蛋白质的DNA已经在许多不同蛋白质中获得成功(有关综述参见例如Donnelly等, *The Immunologist* 2: 20-26, 1993)。这种接种方法对于对猪进行针对胞内劳森氏菌感染的接种而言非常诱人。因此，本发明此实施方案的另外一些形式涉及包含编码依照本发明的蛋白质或其依照本发明的免疫原性片段的核酸序列的疫苗，以及包含含有所述核酸序列的DNA片段的疫苗。此实施方案的另外一些形式涉及包含依照本发明的重组DNA分子的疫苗。例如可以使用无针头注射器通过皮内施用而容易的施用DNA疫苗。这种施用方法将DNA直接投递至待接种动物的细胞内。1-100微克范围的DNA量就能提供很好的效果。

在另一个实施方案中，依照本发明的疫苗额外包含一种或多种衍生自其它猪致病性生物体和病毒的抗原或编码这些抗原的遗传信息。

这些生物体和病毒优选选自下组：假狂犬病病毒、猪流感病毒、猪细小病毒、可传染的胃肠炎病毒、轮状病毒、埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、支气管炎博德特氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella cholerasuis*)、副猪嗜血菌 (*Haemophilus parasuis*)、多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*)、猪肺炎枝原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、和大叶性肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。

依照本发明的所有疫苗都包含制药学可接受载体。制药学可接受载体可以是例如无菌水或无菌生理盐溶液。在一种更复杂的形式中，载体可以是例如缓冲液。

用于制备疫苗的方法包括将依照本发明的蛋白质或其免疫原性片段与制药学可接受载体混合。

依照本发明的疫苗在优选的形式中还包含佐剂。佐剂通常包含以非特异方式增强宿主免疫应答的物质。本领域知道许多不同的佐剂。佐剂的实例有弗氏完全和不完全佐剂、维生素E、非离子型嵌段聚合物、胞壁酰二肽、Quill A®、矿物油例如Bayol®或Markol®、植物油、Cambopol® (一种均聚物)、或Diluvac® Forte。疫苗中还可以包含所谓的“载体”。载体指多肽与之附着而非共价结合的化合物。常用的载体化合物有例如氢氧化铝、磷酸铝或氧化铝、硅石、高岭土、和斑脱土。这种载体的一种具体形式是所谓的ISCOM (EP 109.942; EP 180.564; EP 242.380) 中，其中抗原部分包埋在载体中。另外，疫苗可以包含一种或多种合适的表面活性化合物或乳化剂，例如Span或Tween。通常，将疫苗与稳定剂混合，例如用于保护倾向于降解的多肽免于降解、延长疫苗的保存期、或提高冻干效率。有用的稳定剂有SPGA (Bovarnik等, *J. Bacteriology* 59: 509, 1950)；碳水化合物，例如山梨醇、甘露醇、海藻糖、淀粉、蔗糖、右旋糖苷、或葡萄糖；蛋白质，诸如清蛋白或酪蛋白或其降解产物；和缓冲剂，诸如碱金属

磷酸盐，等等。另外，可以将疫苗悬浮于生理学可接受的稀释剂中。

无需多言，本发明还包含辅助、添加载体化合物或稀释剂、乳化或稳定多肽的其它方法。

依照本发明的疫苗可以在1-100微克的数量范围内非常合适的施用，尽管原则上可以使用更少的剂量。超过100微克的剂量尽管在免疫学上很合适，但出于商业原因而不太诱人。

可以以低得多的剂量施用基于活体减毒重组载体（诸如上文所述LRC病毒和细菌）的疫苗，因为它们在感染过程中自我繁殖。因此，非常合适的用量范围将是 $10^3$ - $10^9$  CFU（细菌）或PFU（病毒）。

可以执行许多施用方法。口服是非常诱人的施用方法，因为该感染是消化道感染。口服施用的一种优选方法是将疫苗包装到本领域知道且频繁使用的只在经过高度酸性的胃环境后崩解的胶囊中。同样，可以将疫苗与本领域知道的可暂时提高胃pH的化合物混合。全身施用也是合适的，例如通过疫苗的肌肉内施用。如果这种路径是允许的，那么本领域知道的用于全身施用的标准流程是非常合适的。

从针对疾病的保护作用这个角度看，快速且正确诊断胞内劳森氏菌感染是重要的。因此，本发明的另一个目的是提供适于检测胞内劳森氏菌感染的诊断工具。

用于检测胞内劳森氏菌的诊断性测试基于例如由待测动物分离的细菌DNA与特异探针或PCR引物的反应，所述探针或引物基于的是编码31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白的基因的编码序列。若动物中存在胞内劳森氏菌DNA，则它将例如与特异PCR引物特异性结合并随后将在PCR反应中扩增。然后可以在DNA凝胶电泳中容易的检测PCR反应产物。DNA可以非常容易地由取自待测动物的消化道的拭样中存在的微生物中分离。标准PCR教科书中给出了给胞内劳森氏菌DNA的选择性PCR反应确定引物长度的方法。常常使用具有至少12个核苷酸的核苷酸序列的引物，但是超过15个、更优选18个核苷酸的引物在某种程度上选择性更高一些。尤其是长度为至少20个、优选至

少30个核苷酸的引物通常非常适用。PCR技术详尽描述于Dieffenbach和Dreksler, 《PCR引物, 实验室手册》(PCR primers, a laboratory manual), ISBN 0-87969-447-5, 1995。因此, 编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其长度至少为12个、优选15个、更优选18个、以此顺序甚至更优选20、22、25、30、35、或40个核苷酸的部分(其中所述核酸序列或其部分与SEQ ID NO: 1或3所示核酸序列具有至少90%的同源性), 也是本发明的一部分。这些核酸序列可以在PCR反应中作为引物使用, 以增加它们所编码的DNA的量。这可使得快速扩增特异核苷酸序列以作为诊断工具使用, 例如用于例如如上所述在组织中检测劳森氏菌。

另一种基于DNA的测试依据的是由拭样获得的细菌材料的生长, 随后是经典的DNA纯化, 然后再是与放射性或显色标记的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白特异性DNA片段的经典杂交。PCR反应和杂交反应二者在本领域都是众所周知的, 而且特别地描述于Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. 等, 《分子克隆: 实验室手册》Molecular cloning: a laboratory manual, ISBN 0-87969-309-6)。

由此, 本发明的一个实施方案涉及用于检测胞内劳森氏菌DNA的诊断性测试。这种测试包括依照本发明的核酸序列或其对编码31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白的DNA特异的片段。对所述DNA特异的片段被理解为由于与胞内劳森氏菌DNA有更高同源性、因而在可比条件下与胞内劳森氏菌DNA的结合比与其它细菌DNA的结合更好的片段, 例如如上所述至少12个核苷酸的引物。

用于检测血清中的胞内劳森氏菌抗体的诊断性测试可以是例如简单的标准夹心ELISA测试, 其中将依照本发明的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其抗原性片段包被在ELISA板的孔壁上。用于检测这些抗体的一种方法是例如将31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其抗原性片段与来自待测试哺乳动物的血清一起保温, 随后例如与针对相关哺乳动物抗体的已标记抗体一起保温。然后显色反应可以揭示针对胞内劳森氏菌的抗体

的存在与否。诊断性测试系统的另一个实例是例如将包含依照本发明的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其抗原性片段的Western印迹与待测试哺乳动物的血清一起保温,随后分析印迹。

因此,本发明的另一个实施方案涉及用于检测针对胞内劳森氏菌的抗体的诊断性测试。这种测试包括依照本发明的蛋白质或其片段。

同样,本发明涉及用于检测血清中针对胞内劳森氏菌的抗体的方法,其中所述方法包括将血清与依照本发明的31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白或其抗原性片段一起保温。

基于检测胞内劳森氏菌抗原的特异31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白的抗原性物质、因而适于检测胞内劳森氏菌感染的诊断性测试还可以是例如标准ELISA测试。在这种测试的一个实例中,用针对31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和31.4kD蛋白的抗体包被ELISA平板的孔壁。与待测材料一起保温后,向孔中加入已标记的抗胞内劳森氏菌抗体。然后显色反应揭示存在来自胞内劳森氏菌的抗原性物质。因此,本发明的另一个实施方案涉及用于检测胞内劳森氏菌抗原性物质的诊断性测试。这种测试包括针对依照本发明的蛋白质或其片段的抗体。

如上所述表达的依照本发明的多肽或其免疫原性片段可以用于生成抗体,可以是多克隆的、单特异性的、或单克隆的抗体(或其衍生物)。如果想要多克隆抗体,那么用于生成和处理多克隆血清的技术在本领域是众所周知的(例如Mayer和Walter编,《细胞和分子生物学中的免疫化学方法》(Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology), Academic出版社,伦敦,1987)。可以通过本领域众所周知的技术(Kohler和Milstein, Nature 256: 495-497, 1975),通过免疫近交小鼠来制备针对本发明多肽(或其变体或片段)有反应性的本发明单克隆抗体。

用于大规模生产本发明抗体的方法在本领域也是众所周知的。这种方法依赖于在用于噬菌体展示的丝状噬菌体中克隆编码本发明蛋白

质的遗传信息（的片段）。这种技术特别地描述于 <http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html> 中 “filamentous phage display”（丝状噬菌体展示）下的 “Antibody Engineering Page”（抗体工程网页），以及下述综述性论文中：Cortese, R. 等, Trends Biotechn. 12: 262 - 267, 1994; Clackson, T. 和 Wells, J. A., Trends Biotechn. 12: 173 - 183, 1994; Marks, J. D. 等, J. Biol. Chem. 267: 16007 - 16010, 1992; Winter, G. 等, Annu. Rev. Immunol. 12: 433 - 455, 1994; 和 Little, M. 等, Biotechn. Adv. 12: 539 - 555, 1994。随后将噬菌体用于筛选表达骆驼化（camelid）重链抗体的骆驼化表达文库（Muyldermans, S. 和 Lauwereys, M., J. Mol. Recogn. 12: 131 - 140, 1999; 和 Ghahroudi, M. A. 等, FEBS Letters 414: 512 - 526, 1997）。可以扩增文库中表达期望抗体的细胞，随后用于大规模表达抗体。

本发明的另一个实施方案涉及用于检测胞内劳森氏菌抗原性物质的方法，其中所述方法包括将血清、组织、或体液与针对本发明的 31.0kD、24.8kD、76.7kD、56.8kD、28.8kD、和 31.4kD 蛋白或其抗原性片段的抗体一起保温。

最后，本发明的一个实施方案涉及编码胞内劳森氏菌蛋白质的核酸序列或其长度为至少 20 个、以此顺序优选 25、30、35、或 40 个核苷酸的部分，其中所述核酸序列或其部分与 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、或 11 所示核酸序列具有至少 90% 的同源性。这些核酸序列可以在 PCR 反应中作为引物使用，以增加它们所编码的 DNA 的量。这可使得快速扩增特异核苷酸序列以作为诊断工具使用，用于例如如上所述检测组织中的劳森氏菌。

## 实施例

### 实施例 1: 由受感染的猪的回肠分离胞内劳森氏菌

由死于 PE 的猪采集通过组织病理学和抗酸 Ziehl-Neelsen 染色确认受胞内劳森氏菌感染的回肠，并保存于 -80℃。解冻后，由取自受感

染肠壁的粘膜拭样分离胞内劳森氏菌。如Lawson等, *Vet. Microbiol.* 10: 303 - 323, 1985所述, 将回肠拭样在通用匀浆器中在PBS中反复匀浆, 以释放细胞内细菌。将低速离心除去细胞碎片后得到的上清液通过5.0、3.0、1.2、和0.8  $\mu\text{m}$ 滤器 (Millipore) 过滤。随后将滤出液以8000g离心30分钟, 得到胞内劳森氏菌的少量沉淀。使用Percoll梯度进一步纯化这些细菌。通过PCR评估已纯化的细菌的身份 (Jones等, *J. Clin. Microbiol.* 31: 2611 - 2615, 1993), 通过相差显微术评估分离的细菌的纯度 (>95%), 以显示存在的任何污染性细菌或肠碎片。

### 细菌菌株和质粒

携带载体 pLysSrare 和质粒 pET22b 的大肠杆菌宿主菌株 BL21star (DE3) 购自 Novagen (麦迪逊, 威斯康星州, 美国)。pET-HIS1 (1) 如 Schaller 等, *Microbiology* 145: 2105 - 2116, 1999 所述构建。大肠杆菌菌株 TOP10F' 购自 Invitrogen (格罗宁根, 荷兰)。含 30% 甘油的所有细菌菌株原种保存于  $-70^{\circ}\text{C}$ 。

如上所述由受感染的回肠材料分离胞内劳森氏菌细胞。

### 培养基、缓冲液和抗体

依照标准流程制备 LB 培养基。依照标准流程制备 LB 平板, 即在微波炉中融化 LB 培养基 + 1.5% 琼脂, 待溶液冷却至  $45^{\circ}\text{C}$  后倒入平板, 根据需要添加氨苄青霉素 (ACS-Dophar, Raamsdonksveer, 荷兰)。异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃型半乳糖苷 (IPTG) 购自 Biosynth Ag (Staad, 瑞士)。

### PCR 扩增

使用 Geneamp 9700 PCR 系统 (Applied Biosystems, 加利福尼亚州, 美国) 进行 PCR 扩增。使用 Expand 高保真 PCR 系统 (Roche Diagnostics GmbH, 曼海姆, 德国) 进行 PCR。PCR 混合液中含有: 52U/ml

Expand高保真酶混合液、含2.5mM MgCl<sub>2</sub>的Expand HF缓冲液、16mM dNTP (Promega, 威斯康星州, 美国)、20pmol引物、和15ng胞内劳森氏菌染色体DNA作为模板。用于扩增DNA的所有引物列于表1。

### DNA 分离

为了获得高度纯化的劳森氏菌染色体DNA, 使用Biorad染色体DNA分离试剂盒 (Biorad, Veenendaal, 荷兰) 依照制造商的说明书制备DNA。

### DNA 测序

在ABI 310自动化测序仪 (Perkin Elmer, 加利福尼亚州, 美国) 上对DNA进行测序。测序混合液含有: 100ng PCR产物、2 μl终止物预制反应混合液 (Perkin Elmer, 加利福尼亚州, 美国)、2.4pmol引物、6 μl缓冲液 (200mM Tris-HCl pH8.5; 5mM MgCl<sub>2</sub>) 和水至20 μl。将此混合液在Geneamp 9700上进行循环。程序是: 96°C 10秒钟、50°C 5秒钟、60°C 2分钟, 25个循环。使用Dye-Ex柱 (Qiagen, 加利福尼亚州, 美国) 依照制造商的说明书纯化测序循环产物, 并在ABI 310自动化测序仪上运行。使用1.0.4版ABI 310 Collection Software采集软件 (Perkin Elmer, 加利福尼亚州, 美国) 采集测序结果, 并使用3.1版Sequence Analysis序列分析软件 (Perkin Elmer, 加利福尼亚州, 美国) 进行分析。使用1.0.1版Sequence Navigator (序列导航软件) (Perkin Elmer, 加利福尼亚州, 美国) 进行比对。使用4.1.4版Sequencer (序列分析软件) (GeneCodes, 安阿伯, 加利福尼亚州, 美国) 进行序列分析。

### 连接和转化

在含1单位连接酶 (Gibco BRL Life Technologies, 美国) 的1x连接缓冲液中于16°C进行连接过夜。通过热休克用1 μl连接反应液转化大肠杆菌感受态细胞。通过Maniatis/Sambrook的方法, 使用缓冲液

TFB1 (30mM KOAc、100mM RbCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、50mM MnCl<sub>2</sub>、15% 甘油) 和TFB2(10mM RbCl、75mM CaCl<sub>2</sub>、10mM MES、15% 甘油)使BL21star (DE3) 大肠杆菌感受态细胞和TOP10F' 大肠杆菌感受态细胞处于感受态。在补充10mM MgSO<sub>4</sub>和20mM葡萄糖的SOC培养基中于37℃恢复1小时后, 将细胞涂布在含合适抗生素的LB平板上。

### 10xHIS 融合蛋白的表达

将携带pLysSrare和表达载体的大肠杆菌菌株BL21star (DE3) 在5ml含氨苄青霉素的LB中于37℃以200rpm培养过夜。将过夜培养物在50ml含氨苄青霉素的LB中1:100稀释。将培养液在相同条件下培养, 直至NovaspecII分光光度计(Pharmacia, Woerden, 荷兰)上测量OD<sub>600</sub>达到0.5。此时(t=0)用终浓度1mM的IPTG诱导培养物, 并继续培养3个小时(t=3)。取100μl样品用于分析。在相同条件下培养和诱导携带pLysSrare的大肠杆菌菌株BL21star (DE3), 并采集样品作为阴性对照。如下所述, 通过SDS-PAGE及后续考马斯亮蓝染色分析样品。将剩余培养物以5000rpm离心, 并将沉淀保存于-20℃直至下一步使用。

### 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹

使用来自NuPAGE电泳系统(Novex, 圣迭戈, 美国)的4-12% Bis-Tris凝胶进行SDS-PAGE。分离前, 将样品与含β-巯基乙醇的加样缓冲液(样品:缓冲液=2:1)一起煮沸5分钟。将凝胶用考马斯亮蓝染色, 或通过标准半干Western印迹流程转印到Immobulon-P膜(Millipore, 贝德福德, 美国)上。鸡抗劳森氏菌多克隆血清是针对n-GNE(水:油=45:55)中的全细胞制剂制备的。血清E2-839是由显示典型的胞内劳森氏菌感染临床症状和死后损伤的猪获得的。将血清用等体积的携带载体pLysSrare的BL21star (DE3)粗制细胞提取物于4℃预吸收4小时。

基因	正向引物	反向引物	PCR产物
			长度
11	CATGCCATGGATAGTAATAATGATTCAATGATTA	CGCGGATCCTTATTTTGGAGATGTTGACA	750 bp
3	CATGCCATGGCTAAAAAATTACTCTTTACTTC	CGCGGATCCGAAAGGCCAGAGGGTATCCA	692 bp
5	CATGCCATGGCTTCGATCAATACACTTTTCGG	CGCGGATCCCTGTTTTAAAGAAAGTAAAG	2117 bp
7	CATGCCATGGCTAGGGTTACCCACCAATCAAT	CGCGGATCCAATGTATTTTGTAAATTTA	1577 bp
9	CATGCCATGGCTATTTCAATAATAATTCATC	CGCGGATCCCGCCAGAATACGCTGTGTTG	779 bp
1	CATGCCATGGCTTCTTTGGTCATTAACAACAA	CGCGGATCCGCCACTAATGAGTTGGCTTG	884 bp

表 1: 用于扩增和克隆胞内劳森氏菌基因的引物

基因	T7 表达载体	克隆位点	计算分子量	质粒
SEQ ID NO: 11	pET22b	NcoI BamHI	30.7kDa	pET31.4
SEQ ID NO: 3	pETHIS1	NcoI BamHI	26.4kDa	pET24.8
SEQ ID NO: 5	pETHIS1	NcoI BamHI	78.3kDa	pET76.7
SEQ ID NO: 7	pETHIS1	NcoI BamHI	58.4kDa	pET56.8
SEQ ID NO: 9	pETHIS1	NcoI BamHI	28.8kDa	pET28.8
SEQ ID NO: 1	pETHIS1	NcoI BamHI	32.6kDa	pET31.0

表 2: 包含克隆的胞内劳森氏菌基因的质粒一览表

## 结果

### 在基于 T7 的表达载体中克隆劳森氏菌基因

使用表1所列引物，通过PCR扩增劳森氏菌基因。用限制酶NcoI和BamHI消化得到的PCR产物。随后将消化后的PCR产物连接到事先用表2所列相同的两种酶切割的pET22b或pET-HIS1中。用连接混合液转化大肠杆菌TOP10F，并于37℃保温过夜。通过菌落PCR对假定的转化子检查正确的质粒。由此得到6个不同的表达质粒。通过核苷酸序列分析检查这些质粒，而且序列与基于克隆策略的预期一致。

### 在大肠杆菌中由 T7 启动子表达劳森氏菌基因

对表 2 所列的所有质粒测试重组蛋白生成。用质粒转化 BL21star (DE3) pLysSrare, 并进行诱导。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳和 CBB 染色分析诱导培养物 (图 1)。所有六种基因在大肠杆菌 BL21star (DE3) pLysSrare 中都进行充分表达。表达水平达到 150  $\mu$ g/ml。

### 通过 Western 印迹分析表达产物

使用经劳森氏菌全细胞接种的鸡的血清和来自显示典型的胞内劳森氏菌临床症状和死后损伤的猪的血清, 通过 Western 印迹分析表达产物 (图 2)。用鸡和猪血清确实鉴定出了重组劳森氏菌蛋白。

### 附图说明

图 1: 胞内劳森氏菌基因在大肠杆菌 BL21STAR/pLysSRARE 中过度表达的 NuPAGE 分析

第 1 道, 分子量标志; 第 2 道, pET76.7 T=0; 第 3 道, pET76.7 T=3; 第 4 道, pET56.8 T=0; 第 5 道, pET56.8 T=3; 第 6 道, pET24.8 T=0; 第 7 道, pET24.8 T=3; 第 8 道, pET28.8 T=0; 第 9 道, pET28.8 T=3; 第 10 道, pET31.0 T=0; 第 11 道, pET31.0 T=3; 第 12 道, pET31.4 T=0; 第 13 道, pET31.4 T=3; 第 14 道, T=3, 无表达载体。

箭头指示表达产物的位置。

图 2: 胞内劳森氏菌基因在大肠杆菌 BL21STAR/pLysSRARE 中的表达产物的 Western 印迹分析

第 1 道, pET31.4; 第 2 道, pET28.8; 第 3 道, pET31.0; 第 4 道, pET24.8; 第 5 道, pET76.7; 第 6 道, pET56.8; 第 7 道, 无表达载体。

箭头指示表达产物的位置。

<110> AKZO Nobel N.V.

<120> 胞内劳森氏菌亚单位疫苗

<130> 2003.xxx

<160> 12

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1004

<212> DNA

<213> 胞内劳森氏菌 (Lawsonia intracellularis)

<220>

<221> CDS

<222> (55)..(939)

<400> 1

```

tggatatcc attgcatgat ttatggtaac caaccatttc aggaggtttg ccat atg      57
                                         Met
                                         1

tct ttg gtc att aac aac aac atg atg gct gca aat gca gcc cgt aac      105
Ser Leu Val Ile Asn Asn Asn Met Met Ala Ala Asn Ala Ala Arg Asn
      5                10                15

ctc aat gaa agt tat tca cga ctt agc caa tca aca aga cgt cta tct      153
Leu Asn Glu Ser Tyr Ser Arg Leu Ser Gln Ser Thr Arg Arg Leu Ser
      20                25                30

tct gga ctt cgt gtt ggg aca gca gct gat gat tca gca ggg ctt gct      201
Ser Gly Leu Arg Val Gly Thr Ala Ala Asp Asp Ser Ala Gly Leu Ala
      35                40                45

att aga gaa ctt atg cga gcc gat att aaa aca ttt caa caa ggt gca      249
Ile Arg Glu Leu Met Arg Ala Asp Ile Lys Thr Phe Gln Gln Gly Ala
      50                55                60                65

aga aat gca aat gat gct att tca tta gta caa gtt gca gat ggg gca      297
Arg Asn Ala Asn Asp Ala Ile Ser Leu Val Gln Val Ala Asp Gly Ala
      70                75                80

cta ggt gtt ata gat gaa aag ctt atc cga atg aaa gag ctt gct gaa      345
Leu Gly Val Ile Asp Glu Lys Leu Ile Arg Met Lys Glu Leu Ala Glu
      85                90                95

caa gct gct aca ggt act tat aat tca aca caa cgc ttg att att gaa      393
Gln Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Ser Thr Gln Arg Leu Ile Ile Glu
      100                105                110

tct gaa tat caa gca atg gct tca gaa att aca cgt att tct gtt gca      441
Ser Glu Tyr Gln Ala Met Ala Ser Glu Ile Thr Arg Ile Ser Val Ala
      115                120                125

aca gaa ttt aat ggt ata aaa tta tta gat ggt tct cta tct gga cct      489
Thr Glu Phe Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asp Gly Ser Leu Ser Gly Pro
      130                135                140                145

```

```

cat aaa gga act aat cta caa caa aca gga gct cta aga gta cat ttt      537
His Lys Gly Thr Asn Leu Gln Gln Thr Gly Ala Leu Arg Val His Phe
                150                155                160

ggt cca ggg aat agt tca gca gaa gac tat tat gaa att agc ata cat      585
Gly Pro Gly Asn Ser Ser Ala Glu Asp Tyr Tyr Glu Ile Ser Ile His
                165                170                175

tcc gct aca gct tct gca cta ggc ctt gga aat gga act act ggt cct      633
Ser Ala Thr Ala Ser Ala Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Thr Gly Pro
                180                185                190

ggt gct aca atc tct act caa gct gca gca caa gca gcg tta gac gcc      681
Gly Ala Thr Ile Ser Thr Gln Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Asp Ala
                195                200                205

atc aat gat gct atc gtt tct aaa gat aat att cgt gct agc ctt ggt      729
Ile Asn Asp Ala Ile Val Ser Lys Asp Asn Ile Arg Ala Ser Leu Gly
210                215                220                225

acg cta caa aat agg tta gaa gca aca att aca aac tta aat acc caa      777
Thr Leu Gln Asn Arg Leu Glu Ala Thr Ile Thr Asn Leu Asn Thr Gln
                230                235                240

gct gaa aac ctc cag gct gca gaa tca cga att tct gat ata gac gtt      825
Ala Glu Asn Leu Gln Ala Ala Glu Ser Arg Ile Ser Asp Ile Asp Val
                245                250                255

tca aca gaa atg act gaa ttt gta aga aat caa att tta aca caa tct      873
Ser Thr Glu Met Thr Glu Phe Val Arg Asn Gln Ile Leu Thr Gln Ser
                260                265                270

gga gta gca atg ctt tca cag gca aac tca ctg cca aag atg gca agc      921
Gly Val Ala Met Leu Ser Gln Ala Asn Ser Leu Pro Lys Met Ala Ser
                275                280                285

caa ctc att agt ggc taa tccatcacta cataatatgg ttaaggcaga      969
Gln Leu Ile Ser Gly
290

ccaaagacac atggcttggg ggaagaagt tgttg      1004

<210> 2
<211> 294
<212> PRT
<213> 胞内劳森氏菌

<400> 2

Met Ser Leu Val Ile Asn Asn Asn Met Met Ala Ala Asn Ala Ala Arg
1                5                10                15

Asn Leu Asn Glu Ser Tyr Ser Arg Leu Ser Gln Ser Thr Arg Arg Leu
                20                25                30

Ser Ser Gly Leu Arg Val Gly Thr Ala Ala Asp Asp Ser Ala Gly Leu
                35                40                45

```

Ala Ile Arg Glu Leu Met Arg Ala Asp Ile Lys Thr Phe Gln Gln Gly  
50 55 60

Ala Arg Asn Ala Asn Asp Ala Ile Ser Leu Val Gln Val Ala Asp Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Gly Val Ile Asp Glu Lys Leu Ile Arg Met Lys Glu Leu Ala  
85 90 95

Glu Gln Ala Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Ser Thr Gln Arg Leu Ile Ile  
100 105 110

Glu Ser Glu Tyr Gln Ala Met Ala Ser Glu Ile Thr Arg Ile Ser Val  
115 120 125

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

Pro His Lys Gly Thr Asn Leu Gln Gln Thr Gly Ala Leu Arg Val His  
145 150 155 160

Phe Gly Pro Gly Asn Ser Ser Ala Glu Asp Tyr Tyr Glu Ile Ser Ile  
165 170 175

His Ser Ala Thr Ala Ser Ala Leu Gly Leu Gly Asn Gly Thr Thr Gly  
180 185 190

Pro Gly Ala Thr Ile Ser Thr Gln Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Asp  
195 200 205

Ala Ile Asn Asp Ala Ile Val Ser Lys Asp Asn Ile Arg Ala Ser Leu  
210 215 220

Gly Thr Leu Gln Asn Arg Leu Glu Ala Thr Ile Thr Asn Leu Asn Thr  
225 230 235 240

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

Val Ser Thr Glu Met Thr Glu Phe Val Arg Asn Gln Ile Leu Thr Gln  
260 265 270

Ser Gly Val Ala Met Leu Ser Gln Ala Asn Ser Leu Pro Lys Met Ala  
275 280 285

Ser Gln Leu Ile Ser Gly  
290

```

<210> 3
<211> 764
<212> DNA
<213> 胞内劳森氏菌

<220>
<221> CDS
<222> (25)..(717)

<400> 3
acgctaacgt attggaaacc catt atg aaa aaa tta ctc ttt act tca ggc      51
          Met Lys Lys Leu Leu Phe Thr Ser Gly
          1                               5

tgt att ctt att tta aca ggt tgt tct gct cca aac aaa act cct gtt      99
Cys Ile Leu Ile Leu Thr Gly Cys Ser Ala Pro Asn Lys Thr Pro Val
10                               15                               20                               25

gtt gct cct cct ata aca cct cct cca gca tat gta gaa cct gaa gac      147
Val Ala Pro Pro Ile Thr Pro Pro Pro Ala Tyr Val Glu Pro Glu Asp
30                               35                               40

tcc tat agt aat cct ggc tct ctt tac tca tct gct gaa tct gat ggt      195
Ser Tyr Ser Asn Pro Gly Ser Leu Tyr Ser Ser Ala Glu Ser Asp Gly
45                               50                               55

ctt ttt gct gat act cgt gct cga cgt gta ggt gat att gtt atg gta      243
Leu Phe Ala Asp Thr Arg Ala Arg Arg Val Gly Asp Ile Val Met Val
60                               65                               70

aaa att gta gaa aat aat act gct aaa aat aaa gca gat aca aca gct      291
Lys Ile Val Glu Asn Asn Thr Ala Lys Asn Lys Ala Asp Thr Thr Ala
75                               80                               85

gat aaa aaa act gca aat aca tac gga att gat gcg ttt ttt ggt aga      339
Asp Lys Lys Thr Ala Asn Thr Tyr Gly Ile Asp Ala Phe Phe Gly Arg
90                               95                               100                               105

caa tat att ggt gga gga tca aca aaa att cct gta ggt agt gtt gct      387
Gln Tyr Ile Gly Gly Gly Ser Thr Lys Ile Pro Val Gly Ser Val Ala
110                               115                               120

ttt gat aca acc tct gaa agt gga acc act agt aca gga gaa aca aaa      435
Phe Asp Thr Thr Ser Glu Ser Gly Thr Thr Ser Thr Gly Glu Thr Lys
125                               130                               135

cgt gaa gga gct ata aat gga aca att gct gct cgt gta tta cga gtt      483
Arg Glu Gly Ala Ile Asn Gly Thr Ile Ala Ala Arg Val Leu Arg Val
140                               145                               150

atg cca ggt gga tta tta gaa ata gaa ggc gtc cgt gaa aca cgt gta      531
Met Pro Gly Gly Leu Leu Glu Ile Glu Gly Val Arg Glu Thr Arg Val
155                               160                               165

aat aat gaa aca cag tat att gtt atc aca gga ctt ata cga cca atg      579
Asn Asn Glu Thr Gln Tyr Ile Val Ile Thr Gly Leu Ile Arg Pro Met
170                               175                               180                               185

gat ata gag cca gac aac tcc att atg tca aat aga atc tct gat gca      627
Asp Ile Glu Pro Asp Asn Ser Ile Met Ser Asn Arg Ile Ser Asp Ala
190                               195                               200

```

aaa att gct tat tat ggt caa ggt gtt ctt tcc gag aaa caa aaa cct 675  
 Lys Ile Ala Tyr Tyr Gly Gln Gly Val Leu Ser Glu Lys Gln Lys Pro  
                   205                                  210                                  215

ggt tgg ttt aca cgc ttt atg gat acc ctc tgg cct ttc tag 717  
 Gly Trp Phe Thr Arg Phe Met Asp Thr Leu Trp Pro Phe  
                   220                                  225                                  230

tagtctaata tactaagtat aactcaatat ctataaggta aacgtat 764

<210> 4  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> 胞内劳森氏菌

<400> 4

Met Lys Lys Leu Leu Phe Thr Ser Gly Cys Ile Leu Ile Leu Thr Gly  
 1                  5                                  10                                  15

Cys Ser Ala Pro Asn Lys Thr Pro Val Val Ala Pro Pro Ile Thr Pro  
                   20                                  25                                  30

Pro Pro Ala Tyr Val Glu Pro Glu Asp Ser Tyr Ser Asn Pro Gly Ser  
                   35                                  40                                  45

Leu Tyr Ser Ser Ala Glu Ser Asp Gly Leu Phe Ala Asp Thr Arg Ala  
                   50                                  55                                  60

Arg Arg Val Gly Asp Ile Val Met Val Lys Ile Val Glu Asn Asn Thr  
 65                                  70                                  75                                  80

Ala Lys Asn Lys Ala Asp Thr Thr Ala Asp Lys Lys Thr Ala Asn Thr  
                   85                                  90                                  95

Tyr Gly Ile Asp Ala Phe Phe Gly Arg Gln Tyr Ile Gly Gly Gly Ser  
                   100                                  105                                  110

Thr Lys Ile Pro Val Gly Ser Val Ala Phe Asp Thr Thr Ser Glu Ser  
                   115                                  120                                  125

Gly Thr Thr Ser Thr Gly Glu Thr Lys Arg Glu Gly Ala Ile Asn Gly  
                   130                                  135                                  140

Thr Ile Ala Ala Arg Val Leu Arg Val Met Pro Gly Gly Leu Leu Glu  
 145                                  150                                  155                                  160

Ile Glu Gly Val Arg Glu Thr Arg Val Asn Asn Glu Thr Gln Tyr Ile  
                   165                                  170                                  175

Val Ile Thr Gly Leu Ile Arg Pro Met Asp Ile Glu Pro Asp Asn Ser  
180 185 190

Ile Met Ser Asn Arg Ile Ser Asp Ala Lys Ile Ala Tyr Tyr Gly Gln  
195 200 205

Gly Val Leu Ser Glu Lys Gln Lys Pro Gly Trp Phe Thr Arg Phe Met  
210 215 220

Asp Thr Leu Trp Pro Phe  
225 230

<210> 5  
<211> 2200  
<212> DNA  
<213> 胞内劳森氏菌

<220>  
<221> CDS  
<222> (47)..(2164)

<400> 5  
atcaccattc acgtcctgag ggcacccttc tttctgggag attgta atg tog atc 55  
Met Ser Ile  
1

aat aca ctt ttc ggt att ggg aaa agt gca ata gct gga aac cag aca 103  
Asn Thr Leu Phe Gly Ile Gly Lys Ser Ala Ile Ala Gly Asn Gln Thr  
5 10 15

gct cta aac gtt act ggt aat aat ata gca aat gtt aat aca caa gga 151  
Ala Leu Asn Val Thr Gly Asn Asn Ile Ala Asn Val Asn Thr Gln Gly  
20 25 30 35

tat tcc cgc caa agt gta cgc ttc gaa gat agg tat gga ctt aat caa 199  
Tyr Ser Arg Gln Ser Val Arg Phe Glu Asp Arg Tyr Gly Leu Asn Gln  
40 45 50

act cca gga atg ctt ggg cag ggt gtc cat aca gct gaa ata tac cgc 247  
Thr Pro Gly Met Leu Gly Gln Gly Val His Thr Ala Glu Ile Tyr Arg  
55 60 65

aat ttt aat aga ttt gta gaa gat gct tac ctt aat cgt ttt tcc caa 295  
Asn Phe Asn Arg Phe Val Glu Asp Ala Tyr Leu Asn Arg Phe Ser Gln  
70 75 80

aat act cga tgg gac gaa caa agt gct att atg aac tct ata gaa agc 343  
Asn Thr Arg Trp Asp Glu Gln Ser Ala Ile Met Asn Ser Ile Glu Ser  
85 90 95

att ttt aac gaa tca aac cgt aca gga att agt tca cta cta gga gaa 391  
Ile Phe Asn Glu Ser Asn Arg Thr Gly Ile Ser Ser Leu Leu Gly Glu  
100 105 110 115

ttt ttt aaa gga tgg caa aat ctt tcc tta cgt cca gaa gat gca gct 439  
Phe Phe Lys Gly Trp Gln Asn Leu Ser Leu Arg Pro Glu Asp Ala Ala  
120 125 130

act cgt gaa gca gtg ctc tct aca gct aaa aat ctc aca caa ctt att Thr Arg Glu Ala Val Leu Ser Thr Ala Lys Asn Leu Thr Gln Leu Ile 135 140 145	487
aac gat gca aaa tca agt cta caa aaa acc caa caa gaa atg gat ctc Asn Asp Ala Lys Ser Ser Leu Gln Lys Thr Gln Gln Glu Met Asp Leu 150 155 160	535
tac atc caa caa agt gtt aat aaa gtt aat gag tta gta gat gct att Tyr Ile Gln Gln Ser Val Asn Lys Val Asn Glu Leu Val Asp Ala Ile 165 170 175	583
aaa aac att aat aaa caa atc tca gca act tat att cct ggt caa caa Lys Asn Ile Asn Lys Gln Ile Ser Ala Thr Tyr Ile Pro Gly Gln Gln 180 185 190 195	631
aac cct aat caa tta ctt gat caa cga gat caa ctt gtt cga gaa tta Asn Pro Asn Gln Leu Leu Asp Gln Arg Asp Gln Leu Val Arg Glu Leu 200 205 210	679
gca aac ctg gta gat ata gaa gta aag gat aaa ggt gga gga aat ttt Ala Asn Leu Val Asp Ile Glu Val Lys Asp Lys Gly Gly Gly Asn Phe 215 220 225	727
gat ata caa tta aaa tct gga caa cct ctc ctg gaa gga caa ata ggt Asp Ile Gln Leu Lys Ser Gly Gln Pro Leu Leu Glu Gly Gln Ile Gly 230 235 240	775
tat aca ctt agc gtt ggg gga caa cga gtt gaa aac tat tta aaa caa Tyr Thr Leu Ser Val Gly Gly Gln Arg Val Glu Asn Tyr Leu Lys Gln 245 250 255	823
gat tca aaa tat aca ggc act ata acc tct agt ggt tca gac tcc cat Asp Ser Lys Tyr Thr Gly Thr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Asp Ser His 260 265 270 275	871
gaa tat tca ttt gaa att att aat cct cct tct ggt gga gca cct ggg Glu Tyr Ser Phe Glu Ile Ile Asn Pro Pro Ser Gly Gly Ala Pro Gly 280 285 290	919
agt atg cgt gta tca ctt gat gga gga aaa act tgg ctt cgt aac gaa Ser Met Arg Val Ser Leu Asp Gly Gly Lys Thr Trp Leu Arg Asn Glu 295 300 305	967
gat gga tct gaa ctt aac gta cct att cct act acg cct ggt gaa act Asp Gly Ser Glu Leu Asn Val Pro Ile Pro Thr Thr Pro Gly Glu Thr 310 315 320	1015
atc aaa gta aaa aat ctt gaa ata tct ttt gat caa gat cct tcg caa Ile Lys Val Lys Asn Leu Glu Ile Ser Phe Asp Gln Asp Pro Ser Gln 325 330 335	1063
tta gtt tca gga gac agg ttt gat gtt att cca aaa aca ggt tta tac Leu Val Ser Gly Asp Arg Phe Asp Val Ile Pro Lys Thr Gly Leu Tyr 340 345 350 355	1111
tgg aat tca ccc aca aga cct ccg atc aat att act ccc caa aca cta Trp Asn Ser Pro Thr Arg Pro Pro Ile Asn Ile Thr Pro Gln Thr Leu 360 365 370	1159
aat gat ggt aca gaa aat aca ggg cgt ctc act gga gga aaa ctt act Asn Asp Gly Thr Glu Asn Thr Gly Arg Leu Thr Gly Gly Lys Leu Thr 375 380 385	1207

gca tat ttt agt act cgt gat tat aat gca gga aga tat att gat aaa Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Asp Tyr Asn Ala Gly Arg Tyr Ile Asp Lys 390 395 400	1255
ctt gat gca tta gca aac tct att gta tgg gaa gta aac cga atc cac Leu Asp Ala Leu Ala Asn Ser Ile Val Trp Glu Val Asn Arg Ile His 405 410 415	1303
agt caa ggt gct gga gaa caa aaa atg act tac tct tta ggg agt agt Ser Gln Gly Ala Gly Glu Gln Lys Met Thr Tyr Ser Leu Gly Ser Ser 420 425 430 435	1351
caa gta aat cgt aca gat gta cca ctg gga aca tct caa tct ggt ctt Gln Val Asn Arg Thr Asp Val Pro Leu Gly Thr Ser Gln Ser Gly Leu 440 445 450	1399
gcc tat gga aac cgt ctt aca act ggg aac tta tca ttc caa atc tat Ala Tyr Gly Asn Arg Leu Thr Thr Gly Asn Leu Ser Phe Gln Ile Tyr 455 460 465	1447
gat gaa aat gga aaa cct tta cct gta ggc aca cct cca aat gga atc Asp Glu Asn Gly Lys Pro Leu Pro Val Gly Thr Pro Pro Asn Gly Ile 470 475 480	1495
cca gaa tct tta gat ctt gat cca ggt acg cct gga gtt caa aac ttt Pro Glu Ser Leu Asp Leu Asp Pro Gly Thr Pro Gly Val Gln Asn Phe 485 490 495	1543
gat cct tca att cat agt ctt gaa gat cta gtt aat gcc att aac cac Asp Pro Ser Ile His Ser Leu Glu Asp Leu Val Asn Ala Ile Asn His 500 505 510 515	1591
cct aat aac tat ggt gaa ttt atg aaa gct tct att gtt aat gga agt Pro Asn Asn Tyr Gly Glu Phe Met Lys Ala Ser Ile Val Asn Gly Ser 520 525 530	1639
ctc caa ctt acc agt cgt cct gga aca tca ttt gca gca aaa aca gat Leu Gln Leu Thr Ser Arg Pro Gly Thr Ser Phe Ala Ala Lys Thr Asp 535 540 545	1687
aca aca ggt tta ctt gca gcc ctt gga atc aat act ttt ttc caa ggt Thr Thr Gly Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ile Asn Thr Phe Phe Gln Gly 550 555 560	1735
tca gat gct aca gat atg gct ata aaa cct gat gtt att caa aat aca Ser Asp Ala Thr Asp Met Ala Ile Lys Pro Asp Val Ile Gln Asn Thr 565 570 575	1783
aat ttt att aat gct gga aag gtt aat gct aat ggt gaa gtt tct aca Asn Phe Ile Asn Ala Gly Lys Val Asn Ala Asn Gly Glu Val Ser Thr 580 585 590 595	1831
ggt gat aat agt ata gct aaa gaa ctt gct gac ctt gct aca aaa gaa Gly Asp Asn Ser Ile Ala Lys Glu Leu Ala Asp Leu Ala Thr Lys Glu 600 605 610	1879
gta aca att tct act gga tgg gaa act aca cac caa aca tta ggt gct Val Thr Ile Ser Thr Gly Trp Glu Thr Thr His Gln Thr Leu Gly Ala 615 620 625	1927
tat tat ggt gca cta gtt ggt ctt gta gga tct gat act cgt aca gca Tyr Tyr Gly Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Ser Asp Thr Arg Thr Ala	1975

630	635	640	
aaa ttt aat gct gat tat	aat aaa aca ctt tca	aac gaa cta gaa caa	2023
Lys Phe Asn Ala Asp Tyr	Asn Lys Thr Leu Ser	Asn Glu Leu Glu Gln	
645	650	655	
caa gct tta tct att aca	ggc gtt aac cta gat	gaa gaa atg act cag	2071
Gln Ala Leu Ser Ile Thr	Gly Val Asn Leu Asp	Glu Glu Met Thr Gln	
660	665	670	675
ctt att aaa ttt caa cat	tca tat act gca gca	gca aaa ctc att aca	2119
Leu Ile Lys Phe Gln His	Ser Tyr Thr Ala Ala	Ala Lys Leu Ile Thr	
680	685	690	
aca gca gat caa atg ctg	caa act tta ctt tct	tta aaa cag tag	2164
Thr Ala Asp Gln Met Leu	Gln Thr Leu Leu Ser	Leu Lys Gln	
695	700	705	
ggagtaaaca tgagggttac	ccaccaatca atgtat		2200
<210>	6		
<211>	705		
<212>	PRT		
<213>	胞内劳森氏菌		
<400>	6		
Met Ser Ile Asn Thr Leu	Phe Gly Ile Gly Lys	Ser Ala Ile Ala Gly	
1	5	10	15
Asn Gln Thr Ala Leu Asn	Val Thr Gly Asn Asn	Ile Ala Asn Val Asn	
20	25	30	
Thr Gln Gly Tyr Ser Arg	Gln Ser Val Arg Phe	Glu Asp Arg Tyr Gly	
35	40	45	
Leu Asn Gln Thr Pro Gly	Met Leu Gly Gln Gly	Val His Thr Ala Glu	
50	55	60	
Ile Tyr Arg Asn Phe Asn	Arg Phe Val Glu Asp	Ala Tyr Leu Asn Arg	
65	70	75	80
Phe Ser Gln Asn Thr Arg	Trp Asp Glu Gln Ser	Ala Ile Met Asn Ser	
85	90	95	
Ile Glu Ser Ile Phe Asn	Glu Ser Asn Arg Thr	Gly Ile Ser Ser Leu	
100	105	110	
Leu Gly Glu Phe Phe Lys	Gly Trp Gln Asn Leu	Ser Leu Arg Pro Glu	
115	120	125	
Asp Ala Ala Thr Arg Glu	Ala Val Leu Ser Thr	Ala Lys Asn Leu Thr	
130	135	140	

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

Met Asp Leu Tyr Ile Gln Gln Ser Val Asn Lys Val Asn Glu Leu Val  
 165 170 175

Asp Ala Ile Lys Asn Ile Asn Lys Gln Ile Ser Ala Thr Tyr Ile Pro  
 180 185 190

Gly Gln Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Asp Gln Arg Asp Gln Leu Val  
 195 200 205

Arg Glu Leu Ala Asn Leu Val Asp Ile Glu Val Lys Asp Lys Gly Gly  
 210 215 220

Gly Asn Phe Asp Ile Gln Leu Lys Ser Gly Gln Pro Leu Leu Glu Gly  
 225 230 235 240

Gln Ile Gly Tyr Thr Leu Ser Val Gly Gly Gln Arg Val Glu Asn Tyr  
 245 250 255

Leu Lys Gln Asp Ser Lys Tyr Thr Gly Thr Ile Thr Ser Ser Gly Ser  
 260 265 270

Asp Ser His Glu Tyr Ser Phe Glu Ile Ile Asn Pro Pro Ser Gly Gly  
 275 280 285

Ala Pro Gly Ser Met Arg Val Ser Leu Asp Gly Gly Lys Thr Trp Leu  
 290 295 300

Arg Asn Glu Asp Gly Ser Glu Leu Asn Val Pro Ile Pro Thr Thr Pro  
 305 310 315 320

Gly Glu Thr Ile Lys Val Lys Asn Leu Glu Ile Ser Phe Asp Gln Asp  
 325 330 335

Pro Ser Gln Leu Val Ser Gly Asp Arg Phe Asp Val Ile Pro Lys Thr  
 340 345 350

Gly Leu Tyr Trp Asn Ser Pro Thr Arg Pro Pro Ile Asn Ile Thr Pro  
 355 360 365

Gln Thr Leu Asn Asp Gly Thr Glu Asn Thr Gly Arg Leu Thr Gly Gly  
 370 375 380

Lys Leu Thr Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Asp Tyr Asn Ala Gly Arg Tyr  
 385 390 395 400

Ile Asp Lys Leu Asp Ala Leu Ala Asn Ser Ile Val Trp Glu Val Asn  
 405 410 415

Arg Ile His Ser Gln Gly Ala Gly Glu Gln Lys Met Thr Tyr Ser Leu  
 420 425 430

Gly Ser Ser Gln Val Asn Arg Thr Asp Val Pro Leu Gly Thr Ser Gln  
 435 440 445

Ser Gly Leu Ala Tyr Gly Asn Arg Leu Thr Thr Gly Asn Leu Ser Phe  
 450 455 460

Gln Ile Tyr Asp Glu Asn Gly Lys Pro Leu Pro Val Gly Thr Pro Pro  
 465 470 475 480

Asn Gly Ile Pro Glu Ser Leu Asp Leu Asp Pro Gly Thr Pro Gly Val  
 485 490 495

Gln Asn Phe Asp Pro Ser Ile His Ser Leu Glu Asp Leu Val Asn Ala  
 500 505 510

Ile Asn His Pro Asn Asn Tyr Gly Glu Phe Met Lys Ala Ser Ile Val  
 515 520 525

Asn Gly Ser Leu Gln Leu Thr Ser Arg Pro Gly Thr Ser Phe Ala Ala  
 530 535 540

Lys Thr Asp Thr Thr Gly Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ile Asn Thr Phe  
 545 550 555 560

Phe Gln Gly Ser Asp Ala Thr Asp Met Ala Ile Lys Pro Asp Val Ile  
 565 570 575

Gln Asn Thr Asn Phe Ile Asn Ala Gly Lys Val Asn Ala Asn Gly Glu  
 580 585 590

Val Ser Thr Gly Asp Asn Ser Ile Ala Lys Glu Leu Ala Asp Leu Ala  
 595 600 605

Thr Lys Glu Val Thr Ile Ser Thr Gly Trp Glu Thr Thr His Gln Thr  
 610 615 620

Leu Gly Ala Tyr Tyr Gly Ala Leu Val Gly Leu Val Gly Ser Asp Thr  
 625 630 635 640

Arg Thr Ala Lys Phe Asn Ala Asp Tyr Asn Lys Thr Leu Ser Asn Glu

	645		650		655											
Leu	Glu	Gln	Gln	Ala	Leu	Ser	Ile	Thr	Gly	Val	Asn	Leu	Asp	Glu	Glu	
			660					665					670			
Met	Thr	Gln	Leu	Ile	Lys	Phe	Gln	His	Ser	Tyr	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	
		675					680					685				
Leu	Ile	Thr	Thr	Ala	Asp	Gln	Met	Leu	Gln	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	
	690					695					700					
Gln																
705																
<210>	7															
<211>	1740															
<212>	DNA															
<213>	胞内劳森氏菌															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(54)..(1631)															
<400>	7															
cagcagatca	aatgctgcaa	actttacttt	ctttaaaca	gtagggagta	aac	atg										56
						Met										
						1										
agg gtt acc cac caa tca atg tat tct ggc atg atc agt cag atg aac																104
Arg Val Thr His Gln Ser Met Tyr Ser Gly Met Ile Ser Gln Met Asn																
	5						10						15			
aaa agt tta tct gac tat atg gag act aat ata caa ggc ggt aca atg																152
Lys Ser Leu Ser Asp Tyr Met Glu Thr Asn Ile Gln Gly Gly Thr Met																
	20					25						30				
aaa aga ata aac cgt cct tct gat gat cct gca ggt aca gct aga atc																200
Lys Arg Ile Asn Arg Pro Ser Asp Asp Pro Ala Gly Thr Ala Arg Ile																
	35				40						45					
ctc tct tat cgt gga agt att ggt gga ata gaa caa ttt aaa aca aat																248
Leu Ser Tyr Arg Gly Ser Ile Gly Gly Ile Glu Gln Phe Lys Thr Asn																
	50				55				60						65	
act gat aca gct atg gga tgg tta tct ctt gca gat gaa aca ctt aat																296
Thr Asp Thr Ala Met Gly Trp Leu Ser Leu Ala Asp Glu Thr Leu Asn																
	70							75						80		
caa gtt tca aca gtt gtt act aaa att aaa gaa ctt gcc gaa caa gct																344
Gln Val Ser Thr Val Val Thr Lys Ile Lys Glu Leu Ala Glu Gln Ala																
	85						90							95		
gct aca gat aca tat acc cct gac caa cgt gaa gct att ggt ttc caa																392
Ala Thr Asp Thr Tyr Thr Pro Asp Gln Arg Glu Ala Ile Gly Phe Gln																
	100					105							110			
ctc cgc caa ctt atg gga act ctt ata aac ctt tca aat aat caa ttt																440

Leu Arg Gln Leu Met Gly Thr Leu Ile Asn Leu Ser Asn Asn Gln Phe 115 120 125	
gaa ggc aaa cat att ttt tct ggg caa gat tat aat aaa tca tcc ttt Glu Gly Lys His Ile Phe Ser Gly Gln Asp Tyr Asn Lys Ser Ser Phe 130 135 140 145	488
cta gaa gga ctc aca gtc aca agc gga gat ccc aat gtt aac cct aat Leu Glu Gly Leu Thr Val Thr Ser Gly Asp Pro Asn Val Asn Pro Asn 150 155 160	536
cca cca atg cag gtt act gga aca ctt gaa aaa act gga ctt att cgc Pro Pro Met Gln Val Thr Gly Thr Leu Glu Lys Thr Gly Leu Ile Arg 165 170 175	584
ttt gaa aaa gat gaa aca atc cct cca gca gca gat cta aat tat cag Phe Glu Lys Asp Glu Thr Ile Pro Pro Ala Ala Asp Leu Asn Tyr Gln 180 185 190	632
tgg tca act gat ggt ggt aaa act tgg caa act gca acc atc cct gct Trp Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Gln Thr Ala Thr Ile Pro Ala 195 200 205	680
ggg gga cga gaa ata act ata ggt ggt gca gtc gta act gtt cct gct Gly Gly Arg Glu Ile Thr Ile Gly Gly Ala Val Val Thr Val Pro Ala 210 215 220 225	728
cca gct aca aca aat gta aca gca ttt gac cca gat aaa cct ctt gga Pro Ala Thr Thr Asn Val Thr Ala Phe Asp Pro Asp Lys Pro Leu Gly 230 235 240	776
gat act aat ggt tcc tta cta tat gta cgt cct aca gct ata tac caa Asp Thr Asn Gly Ser Leu Leu Tyr Val Arg Pro Thr Ala Ile Tyr Gln 245 250 255	824
ggg agt gat aat aac tca aaa cct att gta gac aga tat ggc act gta Gly Ser Asp Asn Asn Ser Lys Pro Ile Val Asp Arg Tyr Gly Thr Val 260 265 270	872
cca atg cct cca ctt aat acc aat aca gta ggg act ttt tct gat aat Pro Met Pro Pro Leu Asn Thr Asn Thr Val Gly Thr Phe Ser Asp Asn 275 280 285	920
gtc gtt gta aaa ttc cct aat ggt gtt gat tta tca act cct gga tca Val Val Val Lys Phe Pro Asn Gly Val Asp Leu Ser Thr Pro Gly Ser 290 295 300 305	968
ttt gat ttc tct tat agt aca gat gga ggc aaa aca tgg aca gca gga Phe Asp Phe Ser Tyr Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Thr Ala Gly 310 315 320	1016
aac tct gaa gtc att gtt tct cct gga cca cca tca act agt act gca Asn Ser Glu Val Ile Val Ser Pro Gly Pro Pro Ser Thr Ser Thr Ala 325 330 335	1064
aga ctc att ctg cct ggt ggc tat atg gat ata ggt tct gct gat act Arg Leu Ile Leu Pro Gly Gly Tyr Met Asp Ile Gly Ser Ala Asp Thr 340 345 350	1112
aca agt cca aat aat act att cct cct gat gga caa ctt atc ctt cgc Thr Ser Pro Asn Asn Thr Ile Pro Pro Asp Gly Gln Leu Ile Leu Arg 355 360 365	1160

```

ccc caa cga aca gat ctt agt ttt gaa atc atg gaa gga caa aat att    1208
Pro Gln Arg Thr Asp Leu Ser Phe Glu Ile Met Glu Gly Gln Asn Ile
370                      375                      380                      385

act gtc aca aat gta gga aaa gat att ttt ggt gga ata tat tct aca    1256
Thr Val Thr Asn Val Gly Lys Asp Ile Phe Gly Gly Ile Tyr Ser Thr
                      390                      395                      400

aat ggc tca tct aat ttg gaa cct atg ttt gga caa aat gat gga cgt    1304
Asn Gly Ser Ser Asn Leu Glu Pro Met Phe Gly Gln Asn Asp Gly Arg
                      405                      410                      415

aat tta ttt gaa aca gtt gga aat ctt att gcg tac act gaa aca aat    1352
Asn Leu Phe Glu Thr Val Gly Asn Leu Ile Ala Tyr Thr Glu Thr Asn
                      420                      425                      430

aat caa gaa ggc att gca aac gcc ctt aaa gat ctt gaa tta gca caa    1400
Asn Gln Glu Gly Ile Ala Asn Ala Leu Lys Asp Leu Glu Leu Ala Gln
435                      440                      445

aaa aat atc cta act caa gct gca cgt att gga ggt aaa gaa aac cgt    1448
Lys Asn Ile Leu Thr Gln Ala Ala Arg Ile Gly Gly Lys Glu Asn Arg
450                      455                      460                      465

ctt gaa atc aca aaa gaa gct ctt gat aca aat aaa tat gat caa aca    1496
Leu Glu Ile Thr Lys Glu Ala Leu Asp Thr Asn Lys Tyr Asp Gln Thr
                      470                      475                      480

caa cgc tta agt ggt gtt gaa gat gca gac ctt aca gaa cta gta agc    1544
Gln Arg Leu Ser Gly Val Glu Asp Ala Asp Leu Thr Glu Leu Val Ser
                      485                      490                      495

cgc tta gca caa caa caa atg gct tat tct act ata tta aaa tct tct    1592
Arg Leu Ala Gln Gln Gln Met Ala Tyr Ser Thr Ile Leu Lys Ser Ser
500                      505                      510

tct atg att atg cag tta aat tta aca aaa tac att taa tctattacta    1641
Ser Met Ile Met Gln Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Ile
515                      520                      525

aatagcaata gtatgaaaaa attctataat taattatcag atgggttaat gatagtacct    1701

ctatgccttt taataattag taaatggagt tgtccatgc    1740

```

```

<210> 8
<211> 525
<212> PRT
<213> 胞内劳森氏菌

```

```
<400> 8
```

```

Met Arg Val Thr His Gln Ser Met Tyr Ser Gly Met Ile Ser Gln Met
1                      5                      10                      15

Asn Lys Ser Leu Ser Asp Tyr Met Glu Thr Asn Ile Gln Gly Gly Thr
20                      25                      30

Met Lys Arg Ile Asn Arg Pro Ser Asp Asp Pro Ala Gly Thr Ala Arg
35                      40                      45

```

Ile Leu Ser Tyr Arg Gly Ser Ile Gly Gly Ile Glu Gln Phe Lys Thr  
 50 55 60

Asn Thr Asp Thr Ala Met Gly Trp Leu Ser Leu Ala Asp Glu Thr Leu  
 65 70 75 80

Asn Gln Val Ser Thr Val Val Thr Lys Ile Lys Glu Leu Ala Glu Gln  
 85 90 95

Ala Ala Thr Asp Thr Tyr Thr Pro Asp Gln Arg Glu Ala Ile Gly Phe  
 100 105 110

Gln Leu Arg Gln Leu Met Gly Thr Leu Ile Asn Leu Ser Asn Asn Gln  
 115 120 125

Phe Glu Gly Lys His Ile Phe Ser Gly Gln Asp Tyr Asn Lys Ser Ser  
 130 135 140

Phe Leu Glu Gly Leu Thr Val Thr Ser Gly Asp Pro Asn Val Asn Pro  
 145 150 155 160

Asn Pro Pro Met Gln Val Thr Gly Thr Leu Glu Lys Thr Gly Leu Ile  
 165 170 175

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

Gln Trp Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Gln Thr Ala Thr Ile Pro  
 195 200 205

Ala Gly Gly Arg Glu Ile Thr Ile Gly Gly Ala Val Val Thr Val Pro  
 210 215 220

Ala Pro Ala Thr Thr Asn Val Thr Ala Phe Asp Pro Asp Lys Pro Leu  
 225 230 235 240

Gly Asp Thr Asn Gly Ser Leu Leu Tyr Val Arg Pro Thr Ala Ile Tyr  
 245 250 255

Gln Gly Ser Asp Asn Asn Ser Lys Pro Ile Val Asp Arg Tyr Gly Thr  
 260 265 270

Val Pro Met Pro Pro Leu Asn Thr Asn Thr Val Gly Thr Phe Ser Asp  
 275 280 285

Asn Val Val Val Lys Phe Pro Asn Gly Val Asp Leu Ser Thr Pro Gly  
 290 295 300

Ser Phe Asp Phe Ser Tyr Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp Thr Ala  
305 310 315 320

Gly Asn Ser Glu Val Ile Val Ser Pro Gly Pro Pro Ser Thr Ser Thr  
325 330 335

Ala Arg Leu Ile Leu Pro Gly Gly Tyr Met Asp Ile Gly Ser Ala Asp  
340 345 350

Thr Thr Ser Pro Asn Asn Thr Ile Pro Pro Asp Gly Gln Leu Ile Leu  
355 360 365

Arg Pro Gln Arg Thr Asp Leu Ser Phe Glu Ile Met Glu Gly Gln Asn  
370 375 380

Ile Thr Val Thr Asn Val Gly Lys Asp Ile Phe Gly Gly Ile Tyr Ser  
385 390 395 400

Thr Asn Gly Ser Ser Asn Leu Glu Pro Met Phe Gly Gln Asn Asp Gly  
405 410 415

Arg Asn Leu Phe Glu Thr Val Gly Asn Leu Ile Ala Tyr Thr Glu Thr  
420 425 430

Asn Asn Gln Glu Gly Ile Ala Asn Ala Leu Lys Asp Leu Glu Leu Ala  
435 440 445

Gln Lys Asn Ile Leu Thr Gln Ala Ala Arg Ile Gly Gly Lys Glu Asn  
450 455 460

Arg Leu Glu Ile Thr Lys Glu Ala Leu Asp Thr Asn Lys Tyr Asp Gln  
465 470 475 480

Thr Gln Arg Leu Ser Gly Val Glu Asp Ala Asp Leu Thr Glu Leu Val  
485 490 495

Ser Arg Leu Ala Gln Gln Gln Met Ala Tyr Ser Thr Ile Leu Lys Ser  
500 505 510

Ser Ser Met Ile Met Gln Leu Asn Leu Thr Lys Tyr Ile  
515 520 525

<210> 9  
<211> 902  
<212> DNA  
<213> 胞内劳森氏菌

```

<220>
<221> CDS
<222> (63)..(842)

<400> 9
ctttagtaaa tacagtgact atactataat atataaatta ataaattttg gagaagacta      60

tc atg att tca tta aat aat tca tca att caa ata cca caa caa aat      107
Met Ile Ser Leu Asn Asn Ser Ser Ile Gln Ile Pro Gln Gln Asn
   1             5             10             15

ata gaa gaa agt acc tca caa gaa gta act tcc tcc tct ggt gga caa      155
Ile Glu Glu Ser Thr Ser Gln Glu Val Thr Ser Ser Ser Gly Gly Gln
           20             25             30

cct gct aaa gtt gat ggt gta tca atc caa gcc cct aag gct cct gtt      203
Pro Ala Lys Val Asp Gly Val Ser Ile Gln Ala Pro Lys Ala Pro Val
           35             40             45

act tct gca gct agt aac tta gaa gga gta cag caa aga gaa gct caa      251
Thr Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Gly Val Gln Gln Arg Glu Ala Gln
           50             55             60

gaa aat gtt aca aaa atg ggc tta cct gag cta tca gct cct aaa ggt      299
Glu Asn Val Thr Lys Met Gly Leu Pro Glu Leu Ser Ala Pro Lys Gly
           65             70             75

ggg ggt tat gtt cag tca aca gca gct atg ttt gca gaa gtt aca gtt      347
Gly Gly Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala Met Phe Ala Glu Val Thr Val
   80             85             90             95

gat gct atg aat cag caa cgt aaa gct gcg caa gac gta caa aat agt      395
Asp Ala Met Asn Gln Gln Arg Lys Ala Ala Gln Asp Val Gln Asn Ser
           100            105            110

gct ctt gaa gga atg gtt aat aag atg ctg gaa gca gct aaa gat ata      443
Ala Leu Glu Gly Met Val Asn Lys Met Leu Glu Ala Ala Lys Asp Ile
           115            120            125

aaa gaa caa tct aaa tta atg atg ggg tta ggt ata gca agt tct gtt      491
Lys Glu Gln Ser Lys Leu Met Met Gly Leu Gly Ile Ala Ser Ser Val
           130            135            140

atg acc act gca atg gga ttt ggg ggt act ata ggt ggt gta aaa agt      539
Met Thr Thr Ala Met Gly Phe Gly Gly Thr Ile Gly Gly Val Lys Ser
           145            150            155

atg aca gct aac cct gga gta gga aca aca cct caa gca caa gtt act      587
Met Thr Ala Asn Pro Gly Val Gly Thr Thr Pro Gln Ala Gln Val Thr
   160            165            170            175

tca aac aag ctt act tta ggt aag gag att gct gaa ggt ata aga ggt      635
Ser Asn Lys Leu Thr Leu Gly Lys Glu Ile Ala Glu Gly Ile Arg Gly
           180            185            190

ggg atg gat act ggt aaa gag agt caa gtg aaa tct ata gat gct gat      683
Gly Met Asp Thr Gly Lys Glu Ser Gln Val Lys Ser Ile Asp Ala Asp
           195            200            205

ata aga aca act caa gca gaa gaa aag aaa cta gaa gca caa atg gaa      731
Ile Arg Thr Thr Gln Ala Glu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Gln Met Glu
           210            215            220

```

cta gta aag caa ttt gct gaa aat tca aag aac ctt gct cag caa gct 779  
 Leu Val Lys Gln Phe Ala Glu Asn Ser Lys Asn Leu Ala Gln Gln Ala  
 225 230 235

ctg cag att atg tca gaa gtt act agg gat gct aat gca aca aca cag 827  
 Leu Gln Ile Met Ser Glu Val Thr Arg Asp Ala Asn Ala Thr Thr Gln  
 240 245 250 255

cgt att ctg gcg taa taatttatag aacaactaat atgaagttat tgagaaataa 882  
 Arg Ile Leu Ala

atatagattg taatatatag 902

<210> 10  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> 胞内劳森氏菌

<400> 10

Met Ile Ser Leu Asn Asn Ser Ser Ile Gln Ile Pro Gln Gln Asn Ile  
 1 5 10 15

Glu Glu Ser Thr Ser Gln Glu Val Thr Ser Ser Ser Gly Gly Gln Pro  
 20 25 30

Ala Lys Val Asp Gly Val Ser Ile Gln Ala Pro Lys Ala Pro Val Thr  
 35 40 45

Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Gly Val Gln Gln Arg Glu Ala Gln Glu  
 50 55 60

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

Gly Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala Met Phe Ala Glu Val Thr Val Asp  
 85 90 95

Ala Met Asn Gln Gln Arg Lys Ala Ala Gln Asp Val Gln Asn Ser Ala  
 100 105 110

Leu Glu Gly Met Val Asn Lys Met Leu Glu Ala Ala Lys Asp Ile Lys  
 115 120 125

Glu Gln Ser Lys Leu Met Met Gly Leu Gly Ile Ala Ser Ser Val Met  
 130 135 140

Thr Thr Ala Met Gly Phe Gly Gly Thr Ile Gly Gly Val Lys Ser Met  
 145 150 155 160

Thr Ala Asn Pro Gly Val Gly Thr Thr Pro Gln Ala Gln Val Thr Ser  
 165 170 175

Asn Lys Leu Thr Leu Gly Lys Glu Ile Ala Glu Gly Ile Arg Gly Gly  
 180 185 190

Met Asp Thr Gly Lys Glu Ser Gln Val Lys Ser Ile Asp Ala Asp Ile  
 195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ala Glu Glu Lys Lys Leu Glu Ala Gln Met Glu Leu  
 210 215 220

Val Lys Gln Phe Ala Glu Asn Ser Lys Asn Leu Ala Gln Gln Ala Leu  
 225 230 235 240

Gln Ile Met Ser Glu Val Thr Arg Asp Ala Asn Ala Thr Thr Gln Arg  
 245 250 255

Ile Leu Ala

<210> 11  
 <211> 951  
 <212> DNA  
 <213> 胞内劳森氏菌

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (50)..(877)

<400> 11  
 tgcattaact ttctaaatTT ttatttagaa aaacacagag gtaaagata atg ctc ttt 58  
 Met Leu Phe  
 1

tct ttt cgt ttt att acc tat ccc ctc ata aca att ttt ata tta tat 106  
 Ser Phe Arg Phe Ile Thr Tyr Pro Leu Ile Thr Ile Phe Ile Leu Tyr  
 5 10 15

act tgt cat aat gcg ctt gct agt aat aat gat tca atg att acc tct 154  
 Thr Cys His Asn Ala Leu Ala Ser Asn Asn Asp Ser Met Ile Thr Ser  
 20 25 30 35

gaa aat ttt gaa agc caa tta cga ctt ctt ctt cat aac cat cct gag 202  
 Glu Asn Phe Glu Ser Gln Leu Arg Leu Leu Leu His Asn His Pro Glu  
 40 45 50

ctt gtc ctt gat gta cta aga gag cat agc gaa ctt gtc ctt gaa att 250  
 Leu Val Leu Asp Val Leu Arg Glu His Ser Glu Leu Val Leu Glu Ile  
 55 60 65

gcc caa caa ggt tct aaa cag cgt caa cat aaa tcc ctt ata gca cag 298  
 Ala Gln Gln Gly Ser Lys Gln Arg Gln His Lys Ser Leu Ile Ala Gln  
 70 75 80

tgg aaa aaa gac ata act act cca aaa aat atg cat ctg gaa aat aga	346
Trp Lys Lys Asp Ile Thr Thr Pro Lys Asn Met His Leu Glu Asn Arg	
85 90 95	
cca atc cga ggg aat cca aaa gca ccc gta act att gta gca ttt tca	394
Pro Ile Arg Gly Asn Pro Lys Ala Pro Val Thr Ile Val Ala Phe Ser	
100 105 110 115	
gac ttt aca tgt ttg tac tgt tca caa gct tct aaa act gta caa caa	442
Asp Phe Thr Cys Leu Tyr Cys Ser Gln Ala Ser Lys Thr Val Gln Gln	
120 125 130	
atg ctt att gat tat aaa gat aat gta aaa tat att ttt aaa cac ttc	490
Met Leu Ile Asp Tyr Lys Asp Asn Val Lys Tyr Ile Phe Lys His Phe	
135 140 145	
ccg ctt aaa gga cat act att tca caa caa gcg gca ata tat ttc att	538
Pro Leu Lys Gly His Thr Ile Ser Gln Ala Ala Ile Tyr Phe Ile	
150 155 160	
gct gca tct ttc caa agt aat gaa aaa gca tgg gca ctt tat gat ctt	586
Ala Ala Ser Phe Gln Ser Asn Glu Lys Ala Trp Ala Leu Tyr Asp Leu	
165 170 175	
ctt ttt caa aaa aga gat gag cta tta caa aac ggt gaa cag act ctt	634
Leu Phe Gln Lys Arg Asp Glu Leu Leu Gln Asn Gly Glu Gln Thr Leu	
180 185 190 195	
aaa caa gca gta aaa gaa gtg gga cta gat ata aaa aag tta atg agt	682
Lys Gln Ala Val Lys Glu Val Gly Leu Asp Ile Lys Lys Leu Met Ser	
200 205 210	
gac ctc aac aaa gca gaa gta aac aat att ctt gga caa gac ata aaa	730
Asp Leu Asn Lys Ala Glu Val Asn Asn Ile Leu Gly Gln Asp Ile Lys	
215 220 225	
gat gct gca caa ctt gat att agt ggt act cca tac ttt att gtt aat	778
Asp Ala Ala Gln Leu Asp Ile Ser Gly Thr Pro Tyr Phe Ile Val Asn	
230 235 240	
aac ctt atc ctt cgt ggt gca tta cct cct gaa tta ttc aca gaa gca	826
Asn Leu Ile Leu Arg Gly Ala Leu Pro Pro Glu Leu Phe Thr Glu Ala	
245 250 255	
att aat atg gcc tta aaa aat aca aaa gaa gtg tca aca tct cca aaa	874
Ile Asn Met Ala Leu Lys Asn Thr Lys Glu Val Ser Thr Ser Pro Lys	
260 265 270 275	
taa attctaaaag gtgtcataac tacaacacat tactatataa tgaaacctat	927
gctagtatat ttattacaat actt	951
<210> 12	
<211> 275	
<212> PRT	
<213> 胞内劳森氏菌	
<400> 12	
Met Leu Phe Ser Phe Arg Phe Ile Thr Tyr Pro Leu Ile Thr Ile Phe	
1 5 10 15	

Ile Leu Tyr Thr Cys His Asn Ala Leu Ala Ser Asn Asn Asp Ser Met  
 20 25 30

Ile Thr Ser Glu Asn Phe Glu Ser Gln Leu Arg Leu Leu Leu His Asn  
 35 40 45

His Pro Glu Leu Val Leu Asp Val Leu Arg Glu His Ser Glu Leu Val  
 50 55 60

Leu Glu Ile Ala Gln Gln Gly Ser Lys Gln Arg Gln His Lys Ser Leu  
 65 70 75 80

Ile Ala Gln Trp Lys Lys Asp Ile Thr Thr Pro Lys Asn Met His Leu  
 85 90 95

Glu Asn Arg Pro Ile Arg Gly Asn Pro Lys Ala Pro Val Thr Ile Val  
 100 105 110

Ala Phe Ser Asp Phe Thr Cys Leu Tyr Cys Ser Gln Ala Ser Lys Thr  
 115 120 125

Val Gln Gln Met Leu Ile Asp Tyr Lys Asp Asn Val Lys Tyr Ile Phe  
 130 135 140

Lys His Phe Pro Leu Lys Gly His Thr Ile Ser Gln Gln Ala Ala Ile  
 145 150 155 160

Tyr Phe Ile Ala Ala Ser Phe Gln Ser Asn Glu Lys Ala Trp Ala Leu  
 165 170 175

Tyr Asp Leu Leu Phe Gln Lys Arg Asp Glu Leu Leu Gln Asn Gly Glu  
 180 185 190

Gln Thr Leu Lys Gln Ala Val Lys Glu Val Gly Leu Asp Ile Lys Lys  
 195 200 205

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

Asp Ile Lys Asp Ala Ala Gln Leu Asp Ile Ser Gly Thr Pro Tyr Phe  
 225 230 235 240

Ile Val Asn Asn Leu Ile Leu Arg Gly Ala Leu Pro Pro Glu Leu Phe  
 245 250 255

Thr Glu Ala Ile Asn Met Ala Leu Lys Asn Thr Lys Glu Val Ser Thr  
 260 265 270

Ser Pro Lys  
275

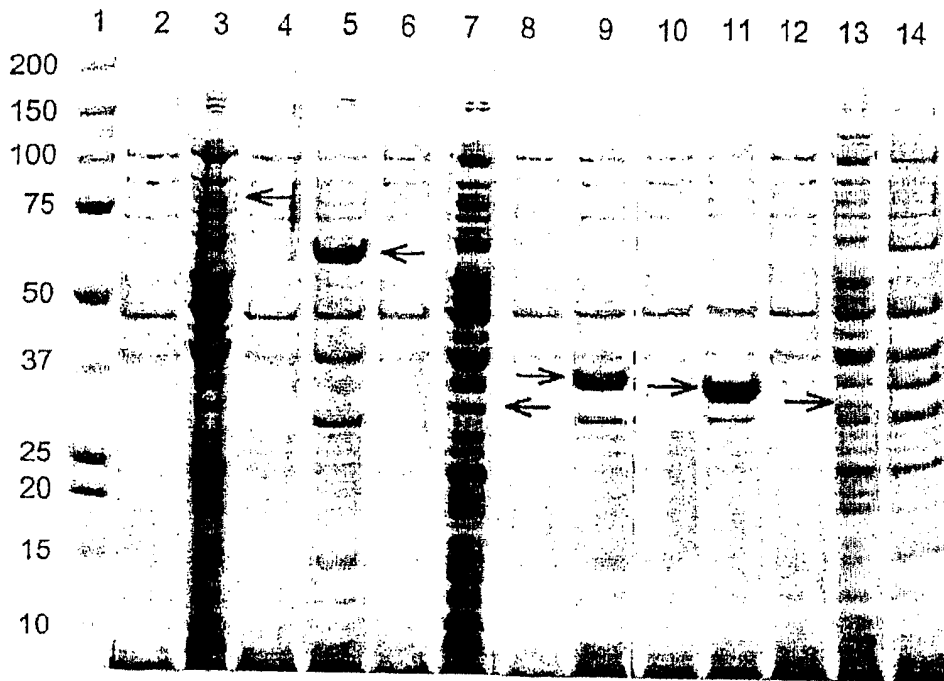


图1

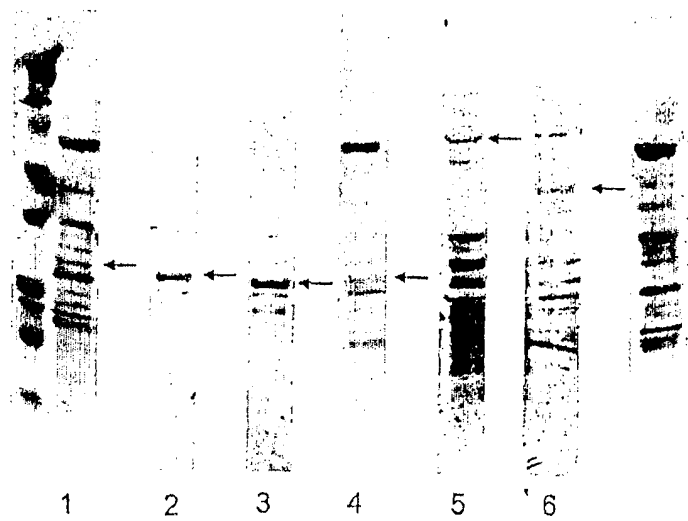


图2