

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利说明书

C12N 15/31

C12Q 1/14

C12Q 1/68 A61K 39/09

//(C12N15/31, C12

R1:46)

[21] ZL 专利号 92101913.0

[45]授权公告日 2000年8月16日

[11]授权公告号 CN 1055500C

[22]申请日 1992.3.21 [24]颁证日 2000.6.17

[21]申请号 92101913.0

[30]优先权

[32]1991.3.21 [33]NL [31]9100510

[73]专利权人 中央兽医研究所

地址 荷兰莱利斯塔德

[72]发明人 希尔达·伊利莎白·史密斯

乌利·维西特

[56]参考文献

WOA85008322 1985. 2.28 -

ABSTRACTS OF PAPERS PART 1, 200CH ACS

NATIONECL MEETING WASHI 1990. 8.26 J. R.

Lowe

审查员 孙广秀

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书 4 页 说明书 67 页 附图页数 35 页

[54]发明名称 编码猪链球菌毒性特征的 DNA 序列及衍生的多肽的抗体

[57]摘要

本发明提供了编码致病性猪链球菌的毒性特征性多肽及其部分的 DNA 序列, 以及由之衍生的多肽和抗体。该序列编码 90,000—120,000 道尔顿的多肽或含有比这样一个多肽的更高分子量的多肽, 并编码 135,000—136,000 道尔顿的多肽(胞壁质酶释放蛋白质)或其部分。该序列本身以及由之衍生的多肽和抗体被用来诊断并预防哺乳动物包括人的猪链球菌感染。

ISSN 1008-4274

权利要求书

1、一种检测取自哺乳动物的样品中致病性猪链球菌的方法，包括将所述样品与一种多核苷酸探针或一种多肽或所述多肽的抗体接触，其中所述的多核苷酸探针、多肽或抗体衍生于编码致病性猪链球菌的毒性特征性多肽的 DNA 序列。

2、根据权利要求 1 的方法，其中所述的 DNA 序列编码猪链球菌毒性菌株中的 90,000-120,000 道尔顿多肽或编码低毒性猪链球菌菌株中比前述多肽具有更高分子量并包括前述多肽的多肽，所述的 DNA 序列具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 1A 和 1B 所示的核苷酸序列，或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

3、根据权利要求 1 的方法，其中所述的 DNA 序列编码作为猪链球菌毒性特征的 135,000-136,000 道尔顿多肽，并具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 2 所示的核苷酸序列，或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

4、根据权利要求 2 的方法，其中所述的 DNA 序列是编码所述的较高分子量多肽的一部分的序列或其具有至少 15 个核苷酸的部分序列，所述的较高分子量的一部分不是相应于 90,000-120,000 道尔顿多肽的部分。

5、根据权利要求 2 的方法，其中所述的 DNA 序列是含有图 1B 所示序列 2890 - 3306 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

6、根据权利要求 3 的方法，其中所述的 DNA 序列是含有图 2 所示序列 1100 - 1934 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

7、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种探针，所述的探针包括这样一种序列，所述的序

列编码猪链球菌毒性菌株中的 90,000-120,000 道尔顿多肽或编码低毒性猪链球菌菌株中比前述多肽具有更高分子量并包括前述多肽的多肽，所述的序列具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 1A 和 1B 所示的核苷酸序列，或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

8、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种探针，所述的探针包括这样一种序列，所述的序列编码作为猪链球菌毒性特征的 135,000-136,000 道尔顿多肽，并具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 2 所示的核苷酸序列，或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

9、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种探针，所述的探针包括这样一种序列，所述的序列编码所述的较高分子量多肽的一部分的序列或其具有至少 15 个核苷酸的部分序列，所述的较高分子量的一部分不是相应于 90,000-120,000 道尔顿多肽的部分。

10、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种探针，所述的探针包括这样一种序列，所述的序列是含有图 1B 所示序列 2890 - 3306 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

11、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种探针，所述的探针包括这样一种序列，所述的序列是含有图 2 所示序列 1100 - 1934 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

12、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种多肽，所述的多肽由这样一种序列编码或经其表达而得到，所述的序列编码猪链球菌毒性菌株中的 90,000-120,000 道尔顿多肽或编码低毒性猪链球菌菌株中比前述多肽具有更高分子量并包括

前述多肽的多肽，所述的序列具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 1A 和 1B 所示的核苷酸序列，或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

13、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种多肽，所述的多肽由这样一种序列编码或经其表达而得到，所述的序列编码作为猪链球菌毒性特征的 135,000-136,000 道尔顿多肽，并具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 2 所示的核苷酸序列，或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

14、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种多肽，所述的多肽由这样一种序列编码或经其表达而得到，所述的序列编码所述的较高分子量多肽的一部分的序列或其具有至少 15 个核苷酸的部分序列，所述的较高分子量的一部分不是相应于 90,000-120,000 道尔顿多肽的部分。

15、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种多肽，所述的多肽由这样一种序列编码或经其表达而得到，所述的序列是含有图 1B 所示序列 2890 - 3306 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

16、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种多肽，所述的多肽由这样一种序列编码或经其表达而得到，所述的序列是含有图 2 所示序列 1100 - 1934 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

17、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒，其特征在于含有至少一种抗体，所述的抗体抗一种由这样一种序列编码或经其表达而得到的多肽，所述的序列编码猪链球菌毒性菌株中的 90,000-120,000 道尔顿多肽或编码低毒性猪链球菌菌株中比前述多肽具有更高分子量并包括前述多肽的多肽，所述的序列具有猪链球菌血清型 2

菌株 D - 282 的如图 1A 和 1B 所示的核苷酸序列,或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

18、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒,其特征 在于含有至少一种抗体,所述的抗体抗一种由这样一种序列编码或经其表达而得到的多肽,所述的序列编码作为猪链球菌毒性特征的 135,000-136,000 道尔顿多肽,并具有猪链球菌血清型 2 菌株 D - 282 的如图 2 所示的核苷酸序列,或其相应序列或包含所示序列的至少 15 个核苷酸的部分序列。

19、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒,其特征 在于含有至少一种抗体,所述的抗体抗一种由这样一种序列编码或经其表达而得到的多肽,所述的序列编码所述的较高分子量多肽的一部分的序列或其具有至少 15 个核苷酸的部分序列,所述的较高分子量的一部分不是相应于 90,000-120,000 道尔顿多肽的部分。

20、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒,其特征 在于含有至少一种抗体,所述的抗体抗一种由这样一种序列编码或经其表达而得到的多肽,所述的序列是含有图 1B 所示序列 2890 - 3306 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

21、一种用于权利要求 1 - 6 任一项所述的方法的检测试剂盒,其特征 在于含有至少一种抗体,所述的抗体抗一种由这样一种序列编码或经其表达而得到的多肽,所述的序列是含有图 2 所示序列 1100 - 1934 中的至少 15 个核苷酸的部分序列。

说 明 书

编码猪链球菌毒性特征的DNA序列及 衍生的多肽和抗体

本发明涉及人和兽预防医学领域，特别是涉及由猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 之致病性菌株引起感染的诊断和预防领域。

自1983年来，小猪在差不多断奶时感染猪链球菌血清2型已在荷兰成为一个越来越严重的问题。疾病的特征是出现脑膜炎、关节炎、脓毒血症以致死亡 (Clifton - Hadley, 1983, ref. 6; Vecht et al., 1985, ref. 44; Windson 1977, ref, 50)。据估计，5-10%的饲养场有这样的问題。估计死亡率为2.5%，在受影响的饲养场中平均发病率为2-5%。现有治疗和预防措施的作用很有限。因此所造成经济损失是很大的。该病是一种动物传染病。人也是该病的感染对象，有导致脓毒血症和脑膜炎危险并可能造成持久性后遗症；已报导了一例死亡病例 (Arends and Zanen 1988, ref, 2)。人类病例与皮肤受伤进而与被感染猪肉接触有关。特别是猪饲养场和屠宰场工作人员即属于危险人群。

有证据表明，自1983年以来，荷兰猪饲养场中该发病率升高是由于进口厂携带2型猪链球菌的种畜。带菌动物常常是在扁桃体内隐藏有链球菌的健康成年猪。感染通过这些带菌猪传染给敏感动物，特别是处在断奶期的小猪。对已患病或死亡动物的诊断是基于从临床标本和器官材料中分离并检出2型猪链球菌。确定带菌者是基于使用选择培养基对咽拭子或扁桃体活检组织作细菌学检查 (Van Leengoed et al.,

-1987, ref. 27)。在诊断学试验的基础上确定带菌个体，进而有可能建立控制方案。然而为检查带菌个体须处理大量样品，故消费许多时间；而且由于污染菌的过度生长而出现假阴性结果。最后，对实验数据的整理分析需要有大量的实践经验。再者，诊断和在诊断的基础上进行的可能的控制将因2型猪链球菌菌种内不同菌株在致病性上的差异而进一步复杂化。如果2型猪链球菌的毒性菌株确实与无毒性菌株有结构上的差异，也许有可能对控制程序内的带菌个体进行结构试验，但目前的诊断技术还不能作出这种区分。因此，有针对性的控制仍不可能实现。

毒性差异本身取决于是否存在毒性因子。早在1984年，Arends 和Zanen (ref. 1) 已描述了感染人体之菌株中的“溶菌酶阳性”蛋白质。在动物实验中发现，“溶菌酶阳性”菌株(D-282)对无菌猪是有致病性的，相反“溶菌酶阴性”菌株(T-15)则对其无致病性(Vecht et al. 1989, ref. 43)。菌株D-282的“溶菌酶阳性蛋白质”可能与“胞壁质酶释放蛋白质”(MRP)相同。

荷兰和其他一些国家的猪养殖业均呈锥体结构，即顶部是小数量的繁殖场，动物从这里提供给饲养场。最终由这些饲养场提供给大量增肥养殖场，再从这里将动物产品送到屠宰场。在诊断的基础上建立的控制战略(确认各场、清除阳性带菌个体、进口要求)应须针对该锥体中高处的场所。疫苗也应能在锥体中的较低场中使用。此外，诊断猪链球菌感染的工具和方法在人类医学中可能是有价值的。

本发明的目的是以迄今更为有效方式，提供一种一方面可能用于检验猪链球菌感染，另一方面又可预防这种感染的

方法和工具。

该目的是通过使用来自编码猪链球菌之毒性特征的基因的DNA序列而实现的。在这里，毒性特征应理解为一个多肽，其存在与生物体——在这种情况下是指猪链球菌，特别是2型猪链球菌——的毒性有关。

已发现了两个分别编码定名为MRP(胞壁质酶释放蛋白质)和EF(细胞外因子)，并且似乎与毒性特征有关(即毒性因子)之两种蛋白质的2型猪链球菌毒性菌株的基因。MRP和EP均为高分子量蛋白质。MRP(136KD)是一种与细胞外膜有关并可在胞壁质酶作用下由细胞壁释放的蛋白质。EP(110KD)是一种从细菌体内分泌到生长培养基中的细胞外蛋白质。

根据本发明，已基于这些基因和其表达产物建立了能够区分毒性和非毒性菌株的诊断方法。迄今为止，已在由所说的基因表达一种或两种蛋白质的基础上，发现了2型猪链球菌的三个不同的表型：即MRP⁺EF⁺表型、MRP⁺EF⁻表型和MRP⁻EF⁻表型。发现从有临床病症的猪器官中分离的菌株中，有77%(n=111)具有MRP⁺EF⁺表型，而从无可疑感染之正常屠宰猪扁桃体中分离的菌株，有86%(n=42)属于MRP⁺EF⁺表型。MRP⁺EF⁻表型最常见于有2型猪链球菌感染的病人(74%，n=27)(参见图21)。为此有可能确定猪链球菌毒性菌株的带菌者并进而开发相应疫苗。使用该疫苗，例如可建立在猪养殖场使用的控制2型猪链球菌感染的方法。

因此本发明涉及除编码特异性高分子量多肽外，还编码作为猪链球菌毒性特征之90-120KDa多肽的DNA序列和其

等价序列及其部分，该下文中所称的ef基因具有如图1A所示的2型猪链球菌菌株D-282的核苷酸序列。已确定了编码EF之整个区域的核苷酸序列及其侧翼序列。对ef基因之序列(图1A)的分析，提供了编码843个氨基酸之多肽(计算的分子量为(90,014)的2529核苷酸开放读码(open reading frame)。产生了抗110 KDa EF的单克隆抗体，此抗体可识别所有38个有MRP⁺EF⁻表型之菌株的培养物上清液中的高分子量蛋白质。这表明110KDa EF和高分子量蛋白质的某些抗原决定基是相同的。发现所有91个带MRP⁺EF⁺表型的菌株都不产生这些高分子量蛋白质。同时发现基于编码110KDa EF之基因的DNA探针可与编码MRP⁺EF⁻菌株之高分子量蛋白质的基因杂交。这表明110KDa EF和高分子量蛋白质相关，提示来自带MRP⁺EF⁻表型之菌株的ef基因的至少一部分与来自MRP⁺EF⁺表型菌株的ef基因相同。这里将蛋白质EF的较高分子量对应物称为EF^{*}，并将其编码基因称为ef^{*}基因。相应的核苷酸和氨基酸序列示于图1B中。

本发明涉及编码135-136KDa多肽之基因的DNA序列，其等价序列和其部分，所说的多肽也是猪链球菌的毒性特征，其基因——下文中称为mrp基因——具有猪链球菌血清2型菌株D-282的如图2所示的核苷酸序列。已确定了编码MRP之完整区域的核苷酸序列及其侧翼序列。对mrp基因序列(图2)的分析显示了编码1256氨基酸多肽(计算的分子量为135,794)的3768核苷酸开放读码。

本文中，等价序列应理解为基本上与所示序列相同但可能表现出少许差异的序列，如由定点突变或经取代、缺失、插入或加入等修饰作用造成的差异；同样，等价序列也理

解为不管核苷酸序列有什么差异，但仍能与所示序列或其互补物杂交的序列，以及由之产生的序列，即是说尽管核苷酸有差异但仍能编码同一氨基酸序列。

本发明还涉及在调节序列存在下，含有上述ef基因和/或mrp基因序列的重组多核苷酸。这种类型的重组体，正如病毒载体、质粒或细菌一样，可用于在理想环境中表达该基因或其相关部分，例如产生用于诊断毒性猪链球菌感染或用于控制毒性菌株感染的免疫原性肽。

含有衍生于编码猪链球菌毒性特征之基因的上述序列的多核苷酸探针也构成本发明的一部分。这种类型的探针具体是与上述的一个或两个基因的核苷酸序列相对应的。适用的探针一般至少有10个核苷酸长。可用探针直接检测猪链球菌毒性菌株序列的存在。作为诊断方法和预防方法的一部分，也可用探针作为扩增多肽(如在聚合酶链反应中)的引物。

发现适当的多肽探针是含有来自mrp基因之序列1100-1934的至少10个核苷酸，较好至少15个核苷酸，至多835个或至多532个核苷酸的部分序列。发现另一个适用的多肽探针含有来自ef*基因之序列2890-3306的10-417个，较好15-360个核苷酸的部分序列。其中每个探针都能有效地区分猪链球菌的致病性和非致病性菌株。也可将基于mrp的探针和基于ef*的探针联合使用，作为更有效力的诊断工具。

本发明还涉及衍生于上述多肽序列的多肽。该类型的多肽可由所说基因编码，或者是通过表达所说的序列得到的，并且基本上相当于猪链球菌毒性特征性蛋白质或其部分。例如，该类型的多肽可在免疫学试验中用作抗原，在免疫动物

时用作免疫原，或在生产用于诊断目的的抗体时用作免疫原。以这种方式产生的抗体也构成本发明的一部分。这种类型的抗体可以是单克隆或多克隆的，并且可提供标志物（酶、放射性核素、发光物质或复合物形成剂）；抗体也可与固相载体结合。

本发明还涉及检验猪链球菌致病菌株感染的方法，其中使用了上述的一个或多个多核苷酸探针、多肽和/或抗体。“感染”在本文中是指有疾病症状（狭意感染）和无疾病症状（广意感染，或污染）的情况下存在病原生物体。在进行免疫检验时，如检测样品或临床材料中猪链球菌抗原和/或抗体的存在时，例如可在微量滴定板上使用已由ef/ef*基因或其部分衍生的多肽（110KDa），和/或已产生的抗该多肽的抗体。另外，也可使用衍生于mrp基因或其部分的多肽（136KDa）。可使用已知的程序完成诊断方法。如酶联免疫吸附法（ELISA）和双抗体夹心（DAS）-ELISA法。

可借助诊断试剂盒实践上述方法。本发明的诊断试剂盒分别含有至少一种相当于或衍生于ef/ef*基因或mrp基因之序列或其部分的多核苷酸或多肽，或者含有已产生之抗衍生于所说ef/ef*和mrp序列之一的多肽的抗体。其中也可联合使用探针及其他诊断剂，特别是ef*诊断剂和mrp诊断剂，或者联合使用进行PCR的各引物。试剂盒还可含有完成诊断所需的其他组份，如标记物质、染料等试剂，滤纸、平皿等载体，培养基和标定剂以及诊断操作手册。

本发明还涉及保护动物免于猪链球菌感染的方法，该方法中使用了上述的多核苷酸、多肽或抗体。当使用抗体时，该方法为被动免疫，即直接提供抗病原生物体的抗体；因

为衍生于EF、EF^{*}和MRP的抗体是针对大多数毒性猪链球菌的，所以这种方法对于预防或控制感染为一种有效的方法，特别是在被保护动物本身不能产生足够的抗体时，例如在感染已经发生或感染发生在幼小动物的情况下。

对猪的另一种形式的被动免疫是通过母猪的初乳给小猪提供抗体。在这种情况下，是在母猪妊娠期间，即小猪出生前用一种或两种肽对其进行主动免疫。当使用多肽或多核苷酸（也可选择以重组生物体形式的）时，该方法是一种主动免疫法，即借助直接使用的、或以待表达之基因形式使用的免疫原性多肽来刺激被保护动物产生抗体。

另一种免疫方法是给动物使用负责中和毒性的活性多肽。这种形式的多肽已不再有致病性，而只保留了免疫原性特征。例如，已借助缺失作用对原始ef/ef^{*}或mrp基因进行了修饰，然后表达该基因以得到这样的多肽。

用于保护动物免于遭受猪链球菌感染的疫苗，即含有上述多核苷酸、多肽或抗体的疫苗也构成本发明的一部分。

本发明的特定疫苗是含有并不或并不完全引起相当于EF和MRP之至少一种多肽表达的猪链球菌的疫苗。该材料可来源于一种无毒性或较少毒性的可能的活菌株，或者可由之形成。

已在体内借助就特定毒性因子（MRP和EF）来说带有2型猪链球菌的无菌小猪研究了涉及2型猪链球菌之致病性的毒性因子的作用。以血液学、细菌学和（组织）病理学分析技术监测动物实验结果。

附图说明

图1A：ef基因的核苷酸序列和相邻序列以及由之衍生的

EF氨基酸序列。并标出了推测的核糖体结合位点、推测之启动子的-35和-10区域，以及带互补对称性的区域。信号肽酶的可能裂解位点在核苷酸498-499之间。

在图1A中，

SEQ ID NO: 1

序列类型: 核苷酸及相应蛋白质

序列长度: 4376 碱基对

链型: 单链

拓扑学: 线性

分子类型: 基因组DNA

原始来源生物体: II型猪链球菌(致病性的)

性质: 细胞外蛋白因子(EF)基因

特性:

从bp66到71: 启动子-35区域

从bp89到94: 启动子-10区域

从bp153到158: 启动子-35区域

从bp176到181: 启动子-10区域

从bp350到356: 核糖体结合位点

从bp361到498: 信号肽

从bp499到2890: 成熟肽

从bp4186到4198和bp4203到4215: 双对称性区域

从bp4243到4257和bp4263到4276: 双对称性区域

图1B: 编码菌株1890的2型猪链球菌ef⁺基因之片段的核苷酸序列和推导的1类EF⁺蛋白质的氨基酸序列。指出了推测的核糖体结合位点、推断之启动子序列的-35和-10位

域、重复区域R1-R11、以及推测的终止信号。在编码110KDaEF蛋白质的基因中没有核苷酸2859和5228之间的区域。在编码IV类和V类EF*蛋白质的基因中没有核苷酸3423和4456之间的区域。

在图1B中,

SEQ ID NO: 2

序列类型: 核苷酸及相应蛋白质

序列长度: 6744碱基对

序列类型: 单链

拓朴学: 线性

分子类型: 基因组DNA

原始来源生物体: II型猪链球菌(非致病性的)

性质: 细胞外因子相关蛋白质(EF*)基因

特征:

从bp66到71: 启动子-35区域

从bp86到94: 启动子-10区域

从bp153到158: 启动子-35区域

从bp176到181: 启动子-10区域

从bp350到356: 核糖体结合位点

从bp361到498: 信号肽

从bp499和5826: 成熟肽

从bp2869、3097、3292、3520、4087、4381、4609、4837、5065、5293、5521: 重复单位R1-R11的起始点

从bp2932、3160、3355、3583、4150、4444、

4672、4900、5128、5356、5584：重复序列Asn-Pro-Asn-Leu起始点

从bp6554到6566和bp6571到6583：双对称性区域

从bp6611到6625和6631到6644：双对称性区域

图2：含2型猪链球菌mrp基因4.6Kb EcoRI-Hind III片段的核苷酸序列和由之衍生的MRP氨基酸序列。指出了可能的核糖体结合位点、推测之启动子序列的-35和-10区域、mrp基因后面的互补对称性区域、推测的信号肽的切割位点、富脯氨酸区域、重复氨基酸序列和外膜固着区域。

在图2中，

SEQ ID NO: 3

序列类型：核苷酸及相应蛋白质

序列长度：4118碱基对

链型：单链

拓扑学：线性

分子类型：基因组DNA

原始来源生物体：II型猪链球菌（致病性的）

性质：胞壁质酶释放蛋白（MRP）基因

特征：

从bp4到9：启动子-35区域

从bp29到34：启动子-10区域

从bp40到45：启动子-35区域

从bp63到68：启动子-10区域

从bp147到152：核糖体结合位点

从bp159到299: 信号肽

从bp300到3926: 成熟肽

从bp2757到3014: 富脯氨酸区域

从bp3015到3176、3423到3584及3585到3743: 重复单位

从bp3825到3926: 膜固着序列

从bp4069到4080和bp4087到4098: 双对称性区域

图3: 亚克隆到质粒载体pKUN19(10)中的、含ef片段的限制性酶切图。方框内是开放读码。限制性位点: B - BamHI; Bg - Bgl II; E - EcoRI; K - KpnI; N - NarI; P - PstI; S - SnaBI; Sa - Sall; Sp - SpeI。

图4: 图解说明编码110KDaEF蛋白质的基因和其侧翼区。110KDaEF蛋白质由开放读码1(ORF1)编码。ORF1的3'端与ORF2的5'端重迭。ORF2和ORF3被TAA终止密码子分开。指出了有意义的限制性酶切位点。

图5: 图解说明5个不同类ef*基因和ef基因的PstI - SnaBI片段。箭头指示重复的氨基酸单位。横线标示存在可不同菌株中的区域。间隙标示在不同的菌株中缺少的区域。

图6: 靠近IV和V(A)类ef*基因中及ef基因(B)中缺少之片段的末端的核苷酸序列。最上面和中间的序代表侧接缺少片段之左和右侧端的区域。下面的序列显示见于IV和V类ef*基因(A)和ef基因(B)中的接合点。直接重复序列示于方框中。黑体核苷酸标示转译三联子的第一个碱基。序号是指I类ef*基因中的核苷酸位置(图1A)。

图7: 推断的MRP阳性重组噬菌体之DNA插入段的限制图。粗线指示存在于所有这些克隆中的DNA区。限制性

位点： E - EcoRI； H - Hind III； X - XbaI； K - KpnI； S - SacI。 DNA插入段的B部分被亚克隆到质粒载体pKUN19 (24) 中。

图8： 对由重组质粒和重组噬菌体编码之蛋白质（已用抗MRP的单克隆抗体分离出来）的Western印迹分析。泳道1：阴性对照；从MRP阴性猪链球菌菌株之细胞壁中提取的蛋白质。泳道2：含有从菌株D282之细胞壁中提取之蛋白质的粗MRP制剂。泳道3： pMR7-1。泳道4： pMR7-2。泳道5： pMR9-1。泳道6： pMR9-2。泳道7： pMR10-1。泳道8： pMR10-2。泳道9：带控制插入子的 λ GEM11。泳道10： λ 克隆7。泳道11： λ 克隆9。泳道12： λ 克隆10。泳道13： λ 克隆11。

图9： 用抗MRP/EF 兔K191血清（1：500稀释的）探查之原生质体上清液（PPS）、培养物上清液（Cult. Sup.）和膜囊泡（Membr）部分的Western 印迹。各泳道名称均由编号的菌株命名表示。

图10： 用兔抗MRP/EF血清（K191）、抗MRP血清和抗EF血清（1：500稀释的）探查的选择之猪链球菌2型菌株细胞培养物上清液的Western印迹。PAb揭示了三个猪链球菌2型表型：MRP⁺EF⁺、MRP⁺EF⁻和MRP⁻EF⁻。各泳道命名即相应菌株名称。参考菌株1（D-282）和菌株3至9（MRP⁺EF⁺）是从患猪链球菌性脑膜炎和猪体内分离的。参考菌株2（T-15）和菌株10、12、16和17是从健康猪的扁桃体中分离的。菌株22、23、24、25、26、28和29是从病人体内分离的。

图11： MRP的水亲和性图形。水平线上方和下面的序

列分别代表疏水和亲水区域。

图 12: MRP和几种革兰氏阳性菌之细胞包膜相关蛋白质C末端氨基酸序列间的同源性。猪链球菌MRP与化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的M6蛋白质 (20)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之蛋白质A (16)、G群链球菌之蛋白质G (10)、化脓链球菌之AP4 (13)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 之LP (46)、变异链球菌 (*S. mutans*) 之WAP4 (11)、化脓链球菌之T6和金黄色葡萄球菌之Fn-Bp (39) 的氨基酸序列相比较。

图 13: MRP中重复单位之氨基酸序列的比较。同源区括在方框内。

图 14: 用作探针的mrp和ef基因的片段。各图上方是用于产生探针之限制性位点的定位。用作探针的片段以实心纵线标示。实心纵线左边是探针缩写符号。箭头指示各基因的开放读码 (ORF)。

图 14a: mrp基因的探针。SacI和Hind III位点尚未完全证实, 但它们是通过亚克隆mrp基因的片段而产生的。

图 14b: ef基因的探针。

图 14c: ef*基因的探针。开放纵线标示不是ef基因部分的ef基因的插入段序列。

实施例1

编码致病性猪链球菌2型菌株110KDa细胞外蛋白质之基因的克隆及核苷酸序列分析

材料和方法

细菌菌株和生长条件

使用大肠杆菌菌株JM101(29)和LE392(33)作为重组质粒和噬菌体的宿主。用2型猪链球菌的致病性MRP⁺ EF⁺菌株D282(43)分离染色体DNA。大肠杆菌菌株生长在LB肉汤(Luria broth)(30)中。必要时加入终浓度为50 μg/ml的氨苄青霉素。猪链球菌菌株生长于Todd-Hewitt培养液(Oxoid, Ltd., London, England)中。

DNA文库的构建和免疫学筛选

按克隆载体制造者(Promega, Madison, USA)推荐的方法在λ GEM-11中构建猪链球菌2型菌株D282的DNA文库。将重组噬菌体铺敷在大肠杆菌菌株LE392平皿上并于37℃下保温16小时。将硝酸纤维素滤膜(Schleicher and Schuell, Inc., Dassel, Germany)放在噬斑上,并将平皿继续在37℃下保温2小时。用抗EF的单克隆抗体(Mabs)显示产生EF的重组体(实施例4)。按Sambrook等人(28)所述方法用连接了碱性磷酸酶的抗小鼠血清(Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, USA)检测结合的抗体。经几次单个噬斑分离和免疫学筛选法纯化选择的EF阴性克隆。

十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺电泳(PAGE)和Western印迹分析

用SDS凝胶电泳法分离蛋白质,其中使用4%的堆积胶和6%的分离胶。将分离的蛋白质转移到置于半干(Semi-Dry)转移小室(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)中的硝化纤维素膜上。使用多克隆抗体(Pab, 实施例4)或抗EF的Mabs并与磷性磷酸酶结合的抗兔或抗小鼠血清(Zymed Laboratories)显现特异性蛋白质。

DNA操作和核苷酸序列分析

按常规分子生物学技术(28)将分离的片段(亚)克隆到质粒载体pKUN19(24)中。用购自Promega (Madison, USA)的Erase-a-Base系统造成连续单向性缺失。用双脱氧链终止法(37)测定DNA序列。用软件接口装置PCGENE (Intelli-genetic Corp., Mountain View, CA)和Wisconsin GCG (University of Wisconsin)分析DNA和蛋白质序列。

结果

ef基因的克隆。从2型猪链球菌的菌株D282中分离染色体DNA, 构建DNA文库。用限制性酶Sau3A 部分消化该DNA, 并克隆到噬菌体 λ GEM11置换载体中。该文库中每微克DNA大约含有 5×10^5 个重组体。使用抗EF单克隆抗体(Mab)检验重组噬菌体的2,000个噬斑中是否存在EF的抗原决定基。其中两个噬斑为阴性。用Western 印迹法分析由噬斑中洗脱的蛋白质, 以研究两个选择的重组噬菌体的EF表达。两重组体均编码与猪链球菌分泌的EF共迁移并被抗EF Mabs识别的蛋白质。因此两重组噬菌体都含有EF的完整遗传信息。使用限制性酶分析法定位重组的噬菌体上的遗传信息, 两个克隆都有一个大约13Kb的DNA区域。将此共同DNA区域的部分亚克隆到质粒pKUN19中(图3)并用Western印迹法分析由重组质粒表达的蛋白质。含有6.8Kb KpnI-SalI片段的质粒(pEF2-19, 图3)编码一分子量与EF相同, 且可被抗EF Mabs识别的蛋白质。但含有5.8Kb EcoRV-SalI或5.3Kb BglII-SalI片段的质粒则不表达EF。这些数据表明, EcoRV和BglII位点是在EF表达所

需的区域内。

ef基因的核苷酸序列。 检测含有EF编码区之片段的核苷酸序列。 结果显示该序列(图1A)中存在三个分别编码含843氨基酸、201氨基酸和197氨基酸之多肽的主要开放读码(ORF), 即ORF1(从核苷酸361到2890)、ORF2(从核苷酸2856到3459)和ORF3(从核苷酸3462到4053)。ORF1含有一个推测的ATG起始密码子, 其前面是一个与几种类型革兰氏阳性细菌之核糖体结合位点相似的序列(17)。相反, 在ORF2和3的上游既没见有起始密码子, 也没找到核糖体结合位点。ORF1的3'端与ORF2的5'互相重叠, 尽管它们是在不同的读码中。ORF2和3被一单个的TAA终止密码子分隔开。发现了ORF1两个推测的启动子序列的上游区与常见于革兰氏阳性菌中启动子的-35和-10相符序列(consensus sequence)相似(图1A)。ORF3的下游, 存在着两个外延的双对称性区域。因为两区域均含有一段处在可能的柄-环结构之末端的胸苷残基, 所以这些潜在的转录终止子可能是不依赖于P因子(34、40)的。由于序列数据没有明显揭示ORF2和ORF3上游或其中的转录和转译信号, 故不能肯定这些ORF均表达蛋白质。另一种可能性是整个已测定了序列的区域中只含有一个大的开放读码。如果只存在两处序列错误即会出现这种情况: 在区域2856至2892中有+1碱基对移码, 并且在位置3459处终止密码子中有一处错误。但这种可能性被测定来自三个另外的、独立选择之克隆的ef基因的序列得以排除了。使用最初克隆的片段作杂交探针, 以从染色体中分离3个克隆。这些片段的核苷酸序列与图1A中所示者相同。

EF的氨基酸序列。因为只有ORF1前面接有适当的表达/起始信号，所以该ORF可能编码EF。这一点通过将下述两个片段亚克隆到质粒PKUN19中得以证实：一个是含有整个ORF1和ORF2的SpeI-SnaBI片段；一个是含有ORF1和ORF2的5'端的SpeI-NarI片段(图3)。以Western印迹法分析由重组质粒表达的该蛋白质。在大肠杆菌中两重组质粒编码被抗EF单克隆抗体识别的、并且与猪链球菌分泌的EF有相同分子量的蛋白质。因此可知ORF1编码EF。但根据序列计算的ORF1产物的分子量(90,000)不同于根据SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳估测的EF的分子量(110,000)。

由于EF全都无例外地见于猪链球菌培养物的上清液中，故预想该蛋白质的前面接有信号肽。推断的EF氨基酸序列的前46个氨基酸确实具有典型信号肽的特征。含有6个带正电荷氨基酸之N末端部分后面是有21个氨基酸的疏水核心和推测的信号肽酶裂解位点(45)。推断之氨基酸序列的水处理曲线(25)显示，除信号肽外，EF蛋白质是亲水的，而且并不含有延伸的疏水区域。发现推断的EF氨基酸序列与EMBL数据库中的蛋白质序列之间没有明显的相似性。虽然在ORF2和ORF3的上游没有发现适当的转译起始信号，但推测的ORF2和ORF3之氨基酸序列所显示的某些性质不大会使人们产生这些读码未得以表达的见解。推断的ORF2蛋白质的N末端显示了两个57氨基的高度重复单位(82%相同)。推定的ORF3蛋白质的C末端在功能上相似于几个革兰氏阳性菌细胞包膜定位的蛋白质的C末端(10、12、13、16、41)。疏水区的前面是保守序列Leu-Pro-X-Thr-Gly

-Glu, 且后面跟着一个亲水区。这一相似性提示推定的ORF3蛋白质是与细胞包膜相关联的。

实施例2

编码非致病性猪链球菌2型菌株细胞外蛋白质之基因的克隆及核苷酸序列分析

材料和方法

细菌菌株及生长条件。用大肠杆菌菌株JM101(29)作为重组质粒的宿主。从病人体内分离17个2型链球菌的MRP⁺EF⁺菌株, 从屠宰的猪扁桃腺中分离5个菌株、从患病猪的器官中分离7个菌株, 并有两个菌株来源不明(实施例4)。大肠杆菌菌株生长于LB肉汤(30)中。必要时加入终浓度为50 μg/ml 氨苄青霉素。猪链球菌菌株生长在Todd-Hewitt培养液(Oxid, Ltd., London, England)中。

基因组DNA及寡核苷酸。经在蛋白酶K/SDS溶液中溶解、用苯酚/氯仿提取并用乙醇沉淀以分离基因组DNA。用于聚合酶链反应(PCR)的寡核苷酸序列是: 5'-ATGTAATTGAATTCTCTTTTAAAGT-3'和5'-AAACGTCCGCAGACTTCTAGATTAAAAGC-3'。这些寡核苷酸相应于2型猪链球菌ef基因中的位置35至59和4308至4279。划下线的序列为限制性酶EcoRI和XbaI的识别位点。

DNA操作和核苷酸序列分析按实施例1中所述方法进行。

SDS-PAGE和Western印迹分析按实施例1中所述方

法进行。

Southern 杂交。 按Sambrook等人所述方法(28)将DNA转移到Gene - Screen Plus 膜(New England Nuclear Corp, Dveieich, Germany)上。使用随机引物标记试剂盒(Boehringer GmH, Mannheim, Germany), 用 [$C^{32}P$] dCTP] (3000Ci / mMol, Amersham Corp, Arlington Heights, USA) 标记DNA 探针。按Geen - Screen Plus 膜提供者推荐的方法使印迹与DNA探针杂交。杂交后用 $2\times$ SSC ($1\times$ SSC是0.15M NaCl加0.015M柠檬酸三钠, pH7.0)将滤膜于室温下洗两次, 每次5分钟, 再用 $0.1\times$ SSC加0.5% SDS的溶液于 $65^{\circ}C$ 下洗两次, 每次30分钟。

用聚合酶链反应(PCR)技术扩增基因组DNA片段。使用PCR技术扩增ef*序列。用得自2型猪链球菌之不同MRP⁺ EF* 菌株的基因组DNA作为模板(实施例4)。用琼脂糖凝胶电泳法分离并用Gene Clean (Biol 101, La Jolla, USA)从凝胶中提取已扩增的DNA片段。用EcoRI和XbaI消化纯化的片段并克隆到质粒PKUN19(24)中。为了排除PCR过程中产生的DNA序列错误, 将6个独立选择的克隆混合后用于核苷酸序列分析。

结果

EF*蛋白质的Western印迹。属于MRP⁺ EF* 表型之猪链球菌2型菌株的培养物上清液中含有可被抗EF单克隆抗体识别的蛋白质(实施例4, 6)。这些蛋白质的分子量(MW)有所不同, 并且都高于EF的分子量。将31个MRP⁺ EF*表型菌株分泌的蛋白质与由MRP⁺ EF*表型之菌株分泌的蛋白质

相比较，发现了五类不同分子量的EF^{*}蛋白质。有三个菌株合成了约195KDa的EF^{*}蛋白质(I类)；18个菌株合成了约180KDa的EF^{*}(II类)；1个菌株合成了约175KDa的EF^{*}(III类)；5个菌株合成了约160KDa的EF^{*}(IV类)；4个菌株合成了约155KDa的EF^{*}(V类)。

ef^{*}基因的Southern杂交。研究了编码110KDaEF和EF^{*}蛋白质之基因间的相互关系。用限制性酶PstI消化不同的MRP⁺ EF^{*}菌株(每类中各取两个有代表性的)和MRP⁺ EF⁺菌株D282的染色体DNA(43)。各不同的DNA均与含有完整ef基因的³²P标记的EcoRV-SnaBI片段杂交(图4, 参见实施例1)。结果显示, MRP⁺ EF^{*}及MRP⁺ EF⁺菌株的DNA消化产物含有两个与探针强杂交的PstI片段。这些数据表明, 编码110KDaEF和EF^{*}蛋白质的基因是密切相关的。在所有菌株中, 最大杂交片段的长度都相同。相反, 各菌株间最小杂交片段的长度则彼此不同。此外, 最小杂交片段之长度的变异与不同菌株分泌之EF^{*}蛋白质的分子量变异密切相关。因为最小杂交片段位于ef基因的3'端(图4, 实施例1), 这些数据提示ef和ef^{*}基因不同主要是在它们的3'端。

ef^{*}基因的克隆。使用PCR扩增含ef^{*}的DNA以得到编码不同EF^{*}蛋白质的基因。使用5个不同之2型猪链球菌MRP⁺ EF^{*}菌株(每类各取1个有代表性的菌株)的基因组DNA作为模板。用限制性酶EcoRI和XbaI消化已扩增的片段并克隆到大肠杆菌中。

I类ef^{*}基因。测定含完整I类ef^{*}基因及其侧翼区域的

6.8Kb EcoRI-XbaI片段的核苷酸序列。序列分析揭示了两个开放读码(ORFs, 图1B)。第一个ORF(从核苷酸361到5827)和第二个ORF(从核苷酸5830到6421)分别编码1822氨基酸和197氨基酸的多肽。根据其大小, 预期第一个ORF编码EF^{*}蛋白质(195 KDa)。ORFs被单个TAA终止密码子分隔开。第一个ORF含有一推断的ATG起始密码子, 该密码子的前面是相似于细菌核糖体结合位点的序列(17)。相反, 第二个ORF前面既没有适当的起始密码子, 也没有推定的核糖体结合位点。

在推定的EF^{*}蛋白质之氨基酸序列中, 前46个氨基酸具有典型信号肽的特征(45)。蛋白质成熟部分的C末端含有许多不完全的76氨基酸重复。在I类EF^{*}蛋白质中存在有十个半重复单位(记为R1至R11, 图1B)。前4个重复单位是相邻接的, 后六个半重复单位也是相邻的。但第四和第五个重复单位被113个氨基酸分开, 且第五和第六个单位被22个氨基酸分开(图5)。后五个半单位的氨基酸序列是高度保守的, 而前五个单位是可变的。一个特定氨基酸序列, Asn-Pro-Asn-Leu保留在所有的重复单位中。发现I类EF^{*}序列和EMBL数据库中的任何蛋白质序列间都没有明显同源性。

II、III、IV和V类ef^{*}基因。因为编码各种EF^{*}蛋白质的基因间主要差异在于它们的3'端, 所以测定了II、III、IV和V类基因之小PstI片段的核苷酸序列。比较这些核苷酸序列, 显示各不同ef^{*}基因在该区域是高度同源的。但各ef^{*}基因在重复单位的数目和排列上彼此有所不同(图5)、(51)。与I类ef^{*}不同, II和IV类ef^{*}基因缺少R9和R10区域; III类缺少R6、R7和R9区域, 且IV类缺少R7、R8和

R9区域。另外，IV和V类ef^{*}基因缺少一个含有R4、R5及部分R3和R6区域的1,032bp片段。该区域的转译读码定位在保留了上述区域之缺失片段的3'端。在该1,032bp片段之左和右侧端区域中的核苷酸序列显示了9bp的直接重复(图6A)。

ef^{*}和ef基因间的同源性：因为EF^{*}蛋白质可被抗110KDa蛋白质的Mab识别，并且ef^{*}基因可与ef探针产生强杂交，所以推想ef(实施例1)和ef^{*}基因是部分相同的。比较I类ef和ef^{*}基因的核苷酸序列，显示位在ef和ef^{*}编码区之5'端的2,499个核苷酸是完全相同的。与编码I类EF^{*}蛋白质的基因不同，编码110KDaEF蛋白质的基因缺少一个2,368bp的片段。由于这一缺失而改变了读码，并且使位在2,368bp片段之3'端的区域在ef和ef^{*}基因中以不同的读码被转译。因此，110KDaEF蛋白质将不含有重复的氨基酸单位。分析2,368bp片段之左和右侧端区域上的核苷酸序列，显示了10bp的直接重复(含有1处错配)(图6B)。据此，推测编码110KDa EF蛋白质的基因可能是特异性缺失ef^{*}基因内2,368片段的结果。这将意味着非致病性的猪链球菌菌株可变成致病性的菌株。

实施例3

编码2型猪链球菌136KDa表面蛋白质(MRP)之基因的克隆和核苷酸序列

材料和方法

细菌菌株和生长条件。用大肠杆菌菌株

JM101 (SupE, thi, (lac-proAB-)) [F' tra D36, lacI^qZ Δ M15] 29) 作为重组质粒DNA的宿主。用大肠杆菌菌株LE392 [F, hsd R574 (rK⁻, mK⁺), SupE44, Sup F58, lacY1, 或 Δ (lacIZY) 6, galK2, galT22, melB1, trpR55] (33) 作为重组噬菌体的宿主。从2型猪链球菌的致病性MRP⁺ EF⁺ 菌株D282 (43) 中分离染色体DNA。大肠杆菌菌株生长在LB培养基 (30) 上。固体LB培养基含有1.5%琼脂。需要时可加入终浓度达50 μ g/ml的氨苄青霉素。猪链球菌菌株生长在Todd-Hewitt培养基 (Oxoid Ltd.) 中。

Southern 杂交按实施例2中所述方法进行。

DNA文库的构建和免疫学筛选按实施例1中所述方法进行, 只是其中以MRP代替了EF。

SDS-PAGE和Western印迹分析按实施例1中所述方法进行, 只是其中以MR代替了EF。

核苷酸序列分析按实施例1所述方法进行。

结果

文库的构建和筛选。用限制性酶Sau3A部分消化从2型猪链球菌菌株D282中分离的染色体DNA。然后在噬菌体入GEM11置换载体中构建DNA文库, 得到大约 5×10^5 个重组体/ μ gDNA。用抗MRP的MAb筛选, 1,400个重组噬菌体, 以确定MRP抗原决定基的存在。得到5个呈阳性反应的噬斑。

免疫反应性重组体的特征。用Western印迹法分析从噬斑中洗脱的蛋白质, 以研究5个选择的重组噬菌体对MRP的

表达。所有5个重组体都编码可被抗MRP之MAb识别的蛋白质。但这些蛋白质的分子量(MW)比MRP低。有两个克隆编码约70KDa的蛋白质(克隆10和11);两个克隆编码约80KDa的蛋白质(克隆9和12),一个克隆编码约90KDa的蛋白质(克隆7)。因此,可以认为这5个重组体都不含MRP的完整遗传信息。用限制性酶切分析法比较5个重组体的DNA插入段。所有克隆都有一个大约17Kb的DNA区域(图7A)。但该DNA插段在3'和5'端有所不同。插段3'端长度的变异与剪短之MRP蛋白质的MW变异有着密切地关联(参见图7A)。这种相互关系表明MRP编码序列是定位在DNA插段的3'端。另外将衍生于克隆7、9和10之DNA插段3'端的片段(图7B)克隆到质粒载体pKUN19(24)中也进一步证实了这一点。这些构建体编码的剪短形式的MRP蛋白质与重组噬菌体编码的剪短之MRP蛋白质没有明确可见的区别(图8)。从这些构建体中缺失0.7Kb EcoRI-KpnI片段将终止剪截之MRP蛋白质的表达。这一点提示mrp的表达是由0.7Kb EcoRI-KpnI片段起始的。

完整mrp基因的克隆。使³²P标记的pMR7-2的KpnI-SacI片段与用EcoRI或KpnI消化的2型猪链球菌菌株D282之染色体DNA杂交(图7B),得到完整的MRP基因。7Kb EcoRI片段和7Kb KpnI片段都与探针杂交。基于其大小,预期EcoRI片含有完整的mrp基因,又因为mrp的表达是从0.7Kb EcoRI-KpnI片段开始的,所以预期KpnI片段只包含基因的3'端。从EcoRI和KpnI消化的染色体DNA中分离大小范围为6-8Kb的片段,并连接到pKUN19的EcoRI

KpnI位点中，然后用此连接混合物转化大肠杆菌JM101。所得到的50个选择的重组克隆中，有13个带有与MRP探针杂交的KpnI片段。所有这些重组体克隆都含有带7Kb KpnI插的质粒(pMR-C)。相反，所得的2,500个带EcoRI片段的选择的重组克隆都不与探针杂交。因为预期7Kb EcoRI片段含量完整的mrp基因，故这一发现表明MRP的表达在大肠杆菌中是有毒性的。然而，可通过强行克隆手段，使mrp基因的5'端(分离自pMR7-2)与该基因的3'端(分离自pMR-C)结合，以构建携带完整mrp基因的质粒(pMR11)。与pKUN19的拷贝数相比，该质粒的拷贝数似乎显著减少了，大约减少20倍。低拷贝数可能会使MRP在大肠杆菌中高水平表达的毒性作用减低到可耐受的水平。用Western印迹法分析由含有pMR11的大肠杆菌细胞产生的蛋白质。正如所期望的那样，这些细胞产生了与MRP共迁移的并可被抗MRP多克隆抗体(PAbs)识别的136KDa蛋白质。

mrp基因的核苷酸序列。检测含有完整mrp基因及其侧翼区域之4.6kb EcoRI-Hind III片段的核苷酸序列。如图2所示，序列分析揭示了编码含1,256个氨基酸(计算的MW为135,794)之多肽的3,768个核苷酸的开放读码。推断的ATG起始密码子的前面是与几种类型革兰氏阳性菌中的核糖体结合位点相似的序列(17)。mrp上游的核苷酸序列类似于常见于革兰氏阳性菌中之启动子的-35和-10相符序列。在mrp基因的下游，可检测到显示延伸之双对称性的区域。在相应mRNA中潜在的发夹结构有一个被6bp环分离开

的12bp柄(按照Tinoco等人(40)的规则计算, $\Delta G = -15.9 \text{ Kcal/mol}$)。由于该双对称性区域后面没有富胸苷区, 所以这个潜在的转录终止信号似乎是P因子依赖性的(34)。

MRP的氨基酸序列。 MRP是一种细胞包膜相关蛋白质, 而且必须易位越过胞浆膜。因此成熟蛋白质必须含有信号肽。MRP的前47个氨基酸确实有典型信号肽的特征。包含7个带正电残基的N末端部分后面按着一个21氨基酸的疏水核心, 再后是一个推测的信号肽酶裂解位点(45, 图2中垂直箭头)。切掉信号肽可得到MW为131, 094的成熟肽, 此与根据SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳估测的MRP的MW(136KDa)很接近(实施例4)。在蛋白质的C末端(图11)鉴定了第二个20氨基酸的疏水区。如果这个区域与其他革兰氏阳性菌的包膜相关蛋白质(10、11、12、13、16、20、38、39、46)相类似, 它便很可能是细胞膜固着结构。假定的细胞膜固着结构侧翼的两个区域, 即一个短的高带电荷区域和一个含Leu-Pro-X-Thr-Gly-Glu氨基酸序列的区域, 在革兰氏阳性菌的表面蛋白质中也是高度保守的(图12)。推测氨基酸序列Leu-Pro-X-Thr-Gly-Glu与细胞壁结合有关。

在MRP序列中鉴定另外几个区域。MRP的成熟形式是以824氨基酸的独特N末端序列开始的。这个区域的后面是一段富脯氨酸残基的氨基酸序列: 86个氨基酸中有26个是脯氨酸残基。该区域的后面是三个54氨基酸的重复单位(图13)。第一个单位和第二个单位间被77个氨基酸分开, 但第二和第三个单位相邻接的。第一和第二个单位的序列高度保守, 而第三个是可变的。第三个重复单位后面是包膜固着

序列。MRP序列和EMBL数据库之蛋白质序列间几乎没有同源性。但MRP的一个亚序列，即氨基酸残基619-985与金黄色葡萄球菌的粘连蛋白结合蛋白质的序列(39)具有某些相似性(在377个氨基酸的序列中有17.2%完全相同)。

实施例4

对与2型猪链球菌之毒性有关的两种蛋白质的鉴定

材料和方法

链球菌分离物。从三个不同的来源得到180个2型猪链球菌菌株。其中110个菌株得自荷兰的Animal Health Services。这些菌株是在常规诊断程序中从患病猪的器官中分离的。另外42个菌株是在健康猪被宰杀时从其扁桃体中分离的。还有27个从受到猪链球菌感染的病人身上分离的。另外42个菌株是在健康猪被宰杀时从其扁桃体中分离的。还27个从受到猪链球菌感染的病人身上分离的。扁桃体和人菌株由J. P. Arends, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid voor Groningen en Drente, Groningen, the Netherlands 提供。所有菌株都按以前描述的生物化学和血清学方法(44)作为2型猪链球菌分型。菌株1(即D282)以前已确定是对新生无菌猪有毒性的并且产生了MRP, 而菌株2则无毒性并且不产生MRP(43)。因此, 使用菌株1(MRP⁺)和(MRP⁻)作为参考菌株。

培养条件。使1天龄菌落的各细菌菌株生长在含有6%马血清的Columbia血清琼脂基质(代号CM331; Oxoid, Ltd.)上, 并在Todd-Hewitt培养液(代号CM189; Oxoid)中于37°C保温过夜。从过夜培养物中得到早期静止生

长期培养物，在Todd-Hewitt培养液中稀释10倍，并于37℃保温4小时。

细胞分级分离。分别由180个菌株制备两个细胞分离部分（原生质体上清液和培养物上清液）。由180个菌株中随机选择23个菌株，从其中制备另外两个细胞分离部分（原生质体和膜囊泡）。分别从患病猪和健康猪体内、以及病人体内分离23个菌株。从在Todd-Hewitt培养液内生长的早期静止生长期培养物分离四个细胞部分。按Van der Vossen等人所述方法（47）分离原生质体。在Eppendorf离心机中离心后，收集原生质体和余留的上清液。按Driessen等人所述方法（9）分离膜囊泡。以 $4,000 \times 9$ 将液体培养物离心15分钟，收集培养物上清部分。

抗原和抗血清的制备。将菌株D282的静止生长期培养物离心后收获上清液。过滤（PM30型滤膜；Amicon Corp., Danvers, Mass.）浓缩到浓度为3mg/ml，并对Tris缓冲盐水（50mM, pH7.5）透析一次。用该产物作为抗原，以在兔体内产生多克隆体（PAb），在小鼠体内产生单克隆抗体（MAb）。经肌肉内或皮下接种2mg在等体积费氏不完全佐剂中乳化的蛋白质以免疫兔。第2天重复接种没有佐剂的抗原。5周后经静脉内注射同样剂量抗体，但不加佐剂以进行加强接种。6周后，给兔放血。用一只兔（兔K191）的血清作为探针进行Western印迹分析。

在BALB/C小鼠体内产生抗EF蛋白质的MAb。经腹腔内注射0.5ml含有25 μg在等体积费氏不完全佐剂中乳化的蛋白质抗原，以免疫小鼠；3周重复上述程序。5周后，

用同样剂量的抗原，但不加佐剂给小鼠进行静脉内加强接种。按Van Zijderveld等人所述方法(52)制备杂交瘤细胞系。10-14天后，用酶联免疫吸附法检验杂交瘤细胞是否产生抗EF抗体。然后在菌株D-282之培养物上清液的Western印迹上检验杂交瘤培养物上清液(1:2稀释)中的抗EF MA b。用结合了碱性磷酸酶的抗小鼠免疫球蛋白显现在硝化纤维素滤膜上MA b与110KDa蛋白质的结合。在微量滴定板中经有限稀释将阳性细胞克隆两次。按以前所述方法(52)，使用所得单克隆细胞系在姥鲛烷预处理的雌性BALB/C小鼠体内产生腹水液。

筛选杂交瘤培养物上清液的间接酶联免疫吸附试验。于37°C下，用含有浓缩、透析并在磷酸盐缓冲盐水(pH7.2; 每毫升0.075毫克蛋白质)中稀释的菌株D-282之培养物上清液(见上文)的溶液将聚苯乙烯微量溶定板(Greiner, Nürtingen, Germany)包被16小时，并将这些制备物于37°C下保温16小时。加入20倍稀释的杂交瘤培养物上清液并按述方法(52)检验之。将结合的抗体与已连接了棘根过氧化物酶(HRPO, Nordic, Tilburg, The Netherlands)的抗小鼠免疫球蛋白(1:500稀释的)一起保温。

电泳和Western 吸印试验。在6%或12%聚丙烯酰胺凝胶上用Laemmli所述的SDS-PAGE方法(26)分析各个细胞分离部分。电泳后，用银着染蛋白质(32)。为了进行Western 印迹分析，使用Multiphor II Nova Blot系统(Pharmacia LKB, Vppsala, Sweden)将蛋白质电转印

到硝酸纤维素膜上。用1: 500稀释的兔K191PAb或1: 300稀释的小鼠MAb探查这些印迹。用已连接了碱性磷酸酶的抗兔免疫球蛋白显现已结合的PAb。用1: 1, 000稀释的连接了碱性磷酸酶(Zymed)的抗小鼠免疫球蛋白显现结合的MAb。

结果

得自23个选择之菌株的四个细胞部分的蛋白质分布图。从23个被检菌株制备属于各被研究组(患病猪、健康猪和病人)之两份猪链球菌分离物中的原生质体上清液和膜囊泡部分, 分析其蛋白质分布图形发现两者几乎完全相同。相反, 培养物和原生质体上清液的蛋白质分布图则明显不同。患病猪分离物的蛋白质分布图包含两条不存于大部分健康猪分离物之蛋白质分布图中的蛋白质带。其中一条带代表了被鉴定为MRP的136KDa蛋白质(43)。在SDS-PAGE分析中, 含有6%聚丙烯酰胺的分离胶揭示了培养物和原生质体上清液(菌株1、5、24和26)中都有MRP。第二条带代表了110KDa蛋白质; 因为这种蛋白质只在培养上清中检测到, 故将其指定为EF。MRP和EF两者均存在于毒性参考菌株1(=D-282)的培养物上清中, 但不存于非毒性参考菌株2(=T-15)的所有细胞组分中。从患病猪分离的8个菌株均含有MRP和EF。从健康猪体内分离的8个菌株中, 有6个缺乏这些蛋白质。从病人体内分离的7个菌株中, 有6个含有MRP, 但这6个中只有3个也同时含有EF。

当使用抗培养物上清液的兔K191PAb作为探针进行免疫印迹分析时, 在2型猪链球菌菌株的细胞组分中清楚地检测

到了MRP和EF。菌株1、5、24和26的原生质体上清液、培养物上清液和膜囊泡中都含有136KDaMRP(图9)。因为MRP是原生质体上清液的主要成分，所以这种蛋白质必然定位在细菌的细胞包膜中。菌株1和5的培养物上清液也含有110KDaEF。菌株24和26含有MRP但不含EF；菌株2和13既不含MRP，也不含EF。

基于培养物上清中MRP和EF的存在，区分了2型猪链球菌的下列三个表型： $MRP^+ EF^+$ 、 $MRP^+ EF^-$ 和 $MRP^- EF^-$ (图10)。在高于150KDa之不同分子量处的蛋白质带都与兔K191血清反应，并显现于菌株17、24、25、26和28之培养物上清液的Western印迹中。因为除菌株25之培养物上清液中的以外，这些蛋白质也可被抗EF MAb识别，所以110KDa EF可能与这些蛋白质有关。用小鼠抗EF MAb探查Western印迹，显示所有带有 $MRP^+ EF^-$ 表型的菌株都在其培养物上清液中含有较高分子量蛋白质。另外，所有呈 $MRP^+ EF^+$ 表型的菌株都不含这些蛋白质。用兔K191血清探查表明，在包括菌株25的12个 $MRP^- EF^-$ 菌株培养物清中存在有高分子量蛋白质。用抗EF MAb所作免疫印迹分析显示这些蛋白质与EF无关。当在12%板凝胶上用SDS-PAGE分析四个细胞部分时，未检出与毒性有关联的低分子量蛋白质。

180个菌株之培养物和原生质体上清液的蛋白质分布图。使用6%板凝胶分析所有180个2型猪链球菌菌株是否在培养物和原生质体上清中出现这三个表型。从病猪器官中分离的菌株80%有 $MRP^+ EF^+$ 表型(表1)。

表1

从病猪、宰杀的健康猪和病人体内分离的180个链球菌
菌株中普遍呈现MRP和EF表型

2型猪链球菌表型 从下列来源分离之菌株的数目(%)			
球菌表型	病猪的器官	健康猪的扁桃体	病人
MRP ⁺ EF ⁺	86 (77)	1 (2)	4 (15)
MRP ⁺ EF ⁻	13 (12)	5 (12)	20 (74)
MRP ⁻ EF ⁻	12 (11)	36 (86)	3 (11)

相反，从健康猪的扁桃体中分离的菌株只有2%具有这种表型；这些菌株中86%是MRP⁻ EF⁻。从病人中分离的菌株只有15%有MRP⁺ EF⁺表型。在被检的2型猪链球菌菌株中，有远比猪菌株(12%)多的人菌株(74%)呈MRP⁺ EF⁻表型；89%的人菌株是MRP⁺。未检测到MRP⁻ EF⁺表型。

实施例5

2型猪链球菌在新生无菌猪中的毒性

材料和方法

猪。经剖腹产手术从四只母猪得到52只属于Great Yorkshire 和 Dutch Landrace 杂交的无菌新生猪。两实验中所用的母猪都是姐妹关系。将猪分成12组，每组包括4或5只。各组分别关在无菌不锈钢恒温箱(43)内。

接种物。从三个来源得到分属于MRP⁺ EF⁺、MRP⁺ EF⁻和MRP⁻ EF⁻表型的10份2型猪链球菌菌株：患脑膜炎的猪、屠宰场的健康猪和病人(表2)。按前述方法(44)对菌株进行生物化学和血清学分型。将菌株放在含15%甘油的营养素培养液中在玻璃珠上作为贮备悬浮液于-70℃下保存。生长在含6%马血之Columbia 血液琼脂基质(代号CM331, Oxoid)上的1天令各菌株菌落于37℃下在Todd-Hewitt培养液(代号M189, Oxoid)中保温过夜。在Todd-Hewitt培养液中稀释过夜培养物(1:10)得到早期静止生长期培养物并于37℃保温4小时。约4小时后,当600nm处光密度为0.5时停止保温。然后将大约含有1-3×10⁹CFU/ml的培养物以4000×g离心15分钟。分析上清液中的MRP和EF。洗涤离心沉淀物并悬浮在磷酸缓冲盐水(PBS)、136.89mMNaCl、2.68mMKCl、8.1mMNa₂HPO₄、2.79mMKH₂PO₄溶液(pH7.2)中(A₆₀₀=1),然后用作接种物。使用从患萎缩性鼻炎猪的鼻腔中分离的支气管炎博德特氏菌(*Bordetella Bronchiseptica*)菌株92932诱发猪产生猪链球菌感染(23, 43)。菌株保存在Dorset 鸡卵培养基上。将得自羊血琼脂基质的48小时菌落培养在心脑浸液中以制备接种物。37℃保温18小时后,该培养基中含有大约10⁹CFU/ml。在PBS中稀释此心脑浸液即制得所需接种物。

电泳和Western吸印。用MRP/EF表型的猪链球菌菌株作接种物,并于检测实验结束时回收之分离物的MRP/EF表型。用Caemmler所述的SDS-PAGE(26)(6%聚丙烯

烯酰胺)和Western吸印法分析从所有猪的鼻咽部、被感染病的发炎组织如脑膜和关节中所得分离物的细胞培养物上清液。电泳后用银着染蛋白质(32)。为进行Western印迹分析,使用Multiphor II Nova Blot系统并按照制造厂(Pharmacia LKB)推荐的方法将蛋白质电吸印到硝酸纤维素膜上。将滤膜与分别作1:200稀释的小鼠抗MRP单克隆抗体(MAb)(11.3mg/ml)和抗EF MAb(8.4 mg/ml)的1:1混合物,或与1:500稀释的多克隆抗MRP/EF兔血清(K191)(8.2 mg/ml)(实施例4和6)一起保温。然后使滤膜与1:1000稀释的结合了碱性磷酸酶(AP)的抗小鼠免疫球蛋白或1:3000稀释的与AP结合的抗兔免疫球蛋白G(r+K)(Zymed)一起保温。加入溶于磷酸缓冲液(100mMNaCl、5mMMgCl₂、100mM二乙胺;pH9.5)中的底物溴氯吲基磷酸(Sigma, St. Louis, Mo.)—氮兰四唑(Kerck, Darmstad, Germany)显现已结合的抗体。

实验设计

研究工作包括两次实验,间隔期为5个月。使用一次性塑料注射器经鼻内注射给5天令无菌猪接种加在脑心浸液中的支气管炎博德特氏菌菌株92932的悬浮液。实验I中的接种物含有 0.84×10^7 CFU,实验II为 1.0×10^7 CFU。接种后(pi)两天,用10个2型猪链球菌菌株之一对无菌保温中的猪作相似接种(表2)。

这些菌株接种物的平均 (\pm SD) 量为 $1.4 (+0.60) \times 10^6$ CFU。所有接种都是在呼吸的吸气期向每个鼻孔内注入 0.5ml 细菌悬浮液。两次实验中都用菌株 3 (MRP⁺ EF⁺) 作阳性对照、并用菌株 12 (MRP⁻ EF⁻) 作阴性对照 (参见结果部分)。当病情发展到致死程度或实验结束时 (接种后 3 至 4 周) 杀死猪并进行尸检。

1、菌株 3 是在对猪常规诊断过程中从患脑膜炎猪体内分离的。菌株 10、12、16 和 18 是在屠宰时从健康猪扁桃体中分离的。菌株 22 (No. 830544)、24 (No. 740113)

25 (No. 821021) 和 28 (No. 760366) 是从 2 型猪链球菌性脑膜炎病人中分离的。(括弧内的编号是指 J. P. Arends 和 H. C. Zanen (2) 等人给出编号)。

2、 $\times 10^6$ CFU

病情监测。每天检查猪的临床病征，如发热、中枢神经系统 (CNS) 和肢体功能失调。经颅静脉腔穿刺收集各头猪的血液样品，每周三次。用电导计数器 (Contraves A. G., Zurich, Switzerland) 计数白血细胞 (18)。对吉姆染色 (Giemsa - Stained) 的血涂片作分类计数后计算嗜中性白细胞数。每天收集鼻咽拭子标本和粪便，并直接涂敷在含有 6% 马血的 Columbia 琼脂上。将单种培养物的悬浮液与适当的高价免疫兔血清 (DLO - Central Veterinary Institute, Lelystad, NL) 混合，以其进行玻片凝集试验，进一步证实 2 型猪链球菌和支气管炎博德特氏菌的存在。杀死猪后检查病理学改变。按以前所述方法 (43) 对 CNS、浆膜、肝、脾和扁桃体的组织标本进行细菌学和组

织学检查。

结果

电泳和Western印迹试验。在接种前用免疫印迹法分析猪链球菌菌株的培养物上清液时，鉴别了三种表型。菌株3、10和22属于MRP⁺ EF⁺表型；菌株17、24和28为MRP⁺ EF⁻表型，且菌株12、16、18和25属于MRP⁻ EF⁻表型。兔多克隆抗体(PAb)识别MRP⁺ EF⁻菌株之培养物上清中大于150KDa的蛋白质。另外也可用抗EF MAb检测到这些高分子量蛋白质，这表明110KDa EF和分子量远大于150KDa的蛋白质有共同的抗原决定基。在SDS-PAGE和Western印迹分析中，用作接种物之猪链球菌菌株的表型与在实验结束时从被感染猪之扁桃体和发炎组织中收集的分离物表型完全相同。

表3

在接种2型猪链球菌(分属三种表型的10个菌株)的猪中
观察到的三个疾病参数的出现频率

猪链球菌表型	发热 $T > 40^{\circ}\text{C}$ 的出现率 ¹	血液中PML三个参数的百分率($> 10\% / \text{L}$)	特异性病征 ²	非特异性病征 ³
MRP ⁺ EF ⁺	40	78	57	21
MRP ⁺ EF ⁻	5	16	0	5
MRP ⁻ EF ⁻	0	3	0	0

1、记录的阳性数/记录的总数

2、跛行和神经功能紊乱如共济失调、环行运动、角弓反张及足横置。

3、抑郁、食欲不振及躺卧。

疾病的临床征象。两次实验中，所有接种MRP⁺EF⁺表型菌株的猪，从接种后第2天直肠体温不断上升，在4至8天时高达 41.8°C 。接种MRP⁺EF⁻表型菌株的十头猪，在接种后2至22天之间直肠体温于24至96小时的短时间升高至 40°C 以上。MRP⁺EF⁺组中发烧的发生率最高(40%) (表3)。MRP⁺EF⁺组中多形白细胞(PML)增多的出现率最高(表3)。根据接种三种表型菌株之猪血液样品中FML计数的对数值来进行毒性分析。结果发现接种前3天三组间的

PML几何均数没有明显差异。从接种后第1天开始，接种MRP⁺ EF⁺表型菌株的猪血液样品中的PML平均数明显高于MRP⁺ EF⁺组或MRP⁻ EF⁻组(P<0.01)。接种后第20天，MRP⁺ EF⁺和MRP⁺ EF⁻组中的平均数彼此间无明显差异，但这些平均数与MRP⁻ EF⁻组中的平均数则差异显著(P<0.01)。接种MRP⁺ EF⁺表型菌株的猪发病率为100%。从第2天开始，可观察到抑郁、躺卧、食欲不振及发烧等全身性疾病的非特异性征象。在继后的若干天里，接种猪即出现更为特异的病症，如共济失调、环行运动、角弓反张、躺卧并行走摇晃以及跛足。MRP⁺ EF⁺组中特异性病征的出现率为57% (表3)。实验过程中有九头猪死亡，并在疾病末晚期有三头猪被杀死。因此这些组中的死亡率为12/18 (67%)。九头接种了MRP⁺ EF⁻表型菌株的猪出现发烧或粒细胞增多，或显示出其他非特异性病征，但没有显示特异性临床征象，如神经功能紊乱或跛行。MRP⁻ EF⁻组中的猪则没有显现临床病征(表3)。

病理学发现概括在表3中。在接种MRP⁺ EF⁺表型菌株的猪中检查了CNS、浆膜及关节的严重性和多发性炎症。观察了呈现各种形式的肺炎和支气管炎。与接种MRP⁻ EF⁻表型菌株的猪(22%)或接种MRP⁺ EF⁺表型菌株的猪(11%)相比，作为主动免疫反应的征象——脾脏白髓中B细胞区域的滤泡形成及T细胞区域中的母细胞生成更常见于接种MRP⁺ EF⁻表型菌株的猪中(50%) (表4)。有些接种MRP⁺ EF⁻表型菌株的猪在生发中心出现淋巴细胞溶解，而在白髓周围的边缘区出现炎症，这些都是小动物之急性败血症的

征象(42)。扁桃体中的活性滤泡也更常见于接种MRP⁺ EF⁻或MRP⁻ EF⁻表型菌株的猪中。

1、累及大脑、小脑、脑桥、中脑和延髓，包括其中一个或多个不同的部位。

2、累及腕骨、掌骨、跗骨、跗间骨、膝、肘、肩和髋部关节，包括其中一个或多个不同的关节。

细菌学发现。从接种后第1天开始到实验结束止，每天从所有猪的鼻咽部及粪便拭子标本中分离链球菌菌株和支气管炎博德特氏菌。另外还在接种后6天从接种菌株16的猪(实验I)并在接种后19天从接种菌株24的猪(实验II)分离芽孢杆菌。保持其它的猪没有污染菌。

尸检时，2型猪链球菌大多数是从示有病理改变的器官和组织(CNS、浆膜及关节)中分离的(表5)。支气管炎博德特氏菌只有从肺和扁桃体中分离到。从所有的猪扁桃体中也可同时分离出猪链球菌及支气管炎博德特氏菌这两种细菌。

实施例6

用酶联免疫吸附法分辨毒性和非毒性2型猪链球菌

材料和方法

细菌。

检验了从下列三个来源得到的179个2型猪链球菌菌株：得自常规诊断过程中发现的患病毒猪的器官、得自宰杀之健康猪的扁桃体，以及得自患有2型猪链球菌感染的病人。在初期研究中使用Western吸印技术检测培养物上清中的MRP和EF，并基于这些结果将菌株分成三种表型MRP⁺ EF⁺、MRP⁺ EF⁻和MRP⁻ EF⁻(实施例4)。另外试验的是猪链球菌血清型1至22的22个菌株(15)，22个其他的链球菌菌

株、15个不同菌种的22个细菌菌株，以及1种酵母菌（DLO—Central Veterinary Institute, Lelystad）（表6）。

培养条件和抗原制备。将在含6%马血的Columbia血液琼脂基质（代号CM331, Oxoid Ltd.）上生长过夜之细菌的1天令菌落接种到Todd—Hewitt培养液（代号CM 189, Oxoid）上。37℃生长过夜后，将培养物以4,000×9离心15分钟。各菌株之20小时培养物在600nm处的光密度为0.60至1.04不等。有的菌种密度较低，它们是支气管炎博德特氏菌（0.23）、小球菌属（0.08至0.15）、马肠链球菌（*Streptococcus equinus*）（0.36）、新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）（0.05）。在两次DAS—ELISA试验中，使用未处理之培养物上清的两倍系列稀释液作为试验样品。用超滤法（PM30型滤膜，Amicon Corporation）对2型猪链球菌菌株D—282（MRP⁺ EF⁺）的培养物进行浓缩并部分纯化之。用磷酸盐缓冲盐水（PBS）（136.89 mM NaCl、2.68mM KCl、8.1mM Na₂HPO₄、2.79mM KH₂PO₄, pH7.2）稀释到蛋白质终浓度为75 μg/ml。用该产物作为在直接竞争性ELISA中选择不同单克隆抗体并在间接ELISA中筛选杂交瘤培养物上清液的包被抗原。

多克隆和单克隆抗体的制备。按实施例4中所述方法制备兔（Ra）抗MRP和EF（Ra K₁₉₁）的多克隆抗体（PAb）以及抗EF的三中不同的单克隆抗体（MAb）。基本上按制备识别

EF之MAb的方法制备识别MRP的MAb。在雌性BALB/C小鼠中产生抗体及免疫程序已在上面实施例4中述及。按前述方法(52)制备杂交瘤细胞系。10至14天后，用间接ELISA检测杂交瘤培养物上清液中的抗MRP抗体(详见下文)。然后在菌株D-282之培养物上清液的Western印迹上检测杂交瘤培养物上清液(1:2稀释)中的抗MRP抗体。使用与磷性磷酸酶结合的抗小鼠免疫球蛋白及下述底物显现与136KDa蛋白质结合的MAb。发现5份上清液为阳性。然后在微量滴定板中以有限稀释法这些小孔的细胞克隆两次。

使用与抗MRP抗体呈阳性反应的5个细胞系和与抗EF抗体呈阳性反应的3个细胞系，在姥鲛烷预处理的雌性BALB/C小鼠中产生腹水液。使用硫酸铵沉淀法(50%饱和)从腹水液中纯化抗MRP和EF的MAb，并对PBS透析。5份抗MRP MAb分别标示为MRP₁至MRP₅，三份抗EFMAb,分别标示为EF₁至EF₃。所有MAb的免疫球蛋白同型都是IgG₁，在加于PBS内的1%琼脂糖凝胶中，与小鼠同型特异性抗血清(Nordic)进行双向免疫扩散以检测之。所有PAb和MAb均在-20°C下贮存。

间接ELISA筛选杂交瘤培养物上清液。

用浓缩并透析过的菌株D-282的培养物上清液(见上文所述)于37°C将聚苯乙烯微量滴定板(Greiner Nurtigen, Germany)包被16小时。然后将其用PBS, PH 7.2稀释(75 μg/ml蛋白质)。按Van Zijderveld等人所述方法(52)向各小孔内加入两倍稀释的杂交瘤培养物上清液。洗平板后，加入已与辣根过氧化物酶(HRPO, Nordic)结合的

抗小鼠免疫球蛋白(1:500稀释的)。37°C保温1小时并洗5次后,加入底物以检测已结合的HRPO-抗体结合物,其中底物是溶解于含有0.01M EDTA钠盐之0.01M磷酸盐缓冲液(pH 5.95)中的重结晶5-氨基水杨酸(5-AS)(Merck)的0.1%溶液(wt/vol),且在使用前直接向其中加入了终浓度为0.005%(wt/vol)的过氧化氢。室温下保温2小时后,用Titertek Multiskan 光度计(Flow Labs)测定450nm处吸光率。

直接竞争性ELISA。用直接竞争性ELISA 选择MAb并用以发展MRP和EF双抗体夹心(DAS)ELISA。用Wilson和Nakane所述的高碘酸方法(49)将纯化的抗MRP和抗EF MAb及兔PAb连接到HRPO(Boehringer Mannheim, Germany)上。结合了HRPO的免疫球蛋白在50%甘油中于-20°C下保存。在含有5%胎中血清和0.5%氯化钠的PBS-Tw中制成结合物溶液。将一系列两倍稀释(范围为1:20到1:10,240)的50 μ l未结合的抗MRP MAb加入已用在PBS(75 μ g/ml蛋白)中部分纯化了的菌株D-282之培养物上清液包被的聚苯乙烯微量滴定ELISA板(Greiner)之各小孔内。然后将该板在37°C下保温30分钟。为了使未结合的MAb与MAb结合物竞争,分别加入最适稀释度的5份与HRPO结合的抗MRP MAb各50 μ l。于37°C保温1小时后洗板,然后加入上述底物5-ASH₂O₂以检测结合的HRPO-抗体。室温下保温2小时后读出吸光率值。以只加入结合物之小孔显示平均吸光率为A₄₅₀=50%时的最高稀释度表示竞争效价。

按照与检测抗MRP MAb相似的竞争性ELISA方法检测三种抗EF MAb的抗原决定基特异性。

SDS-PAGE 和Western吸印技术。在以6%聚丙烯酰胺凝胶用SDS-PAGE法分离22个不同血清型猪链球菌及其他微生物的培养物上清液(表6)。按照仪器制造前(Pharmacia LKB)推荐的方法使用Multiphor II Nova Blot 系统将蛋白质电吸印到硝酸纤维素滤膜上。用1:300倍稀释的小鼠MAb探查印迹。用已与磷性磷酸酶(Zymed)结合的抗小鼠免疫球蛋白的1:1000倍稀释液显现已结合的MAb。

结果

直接竞争性ELISA。对5个抗MRP克隆和3个抗EF克隆进行竞争试验。某些抗MRP克隆则彼此相互竞争。有5个抗MRP MAb是针对至少3个不同的抗原决定基的: 第一个由MRP₁和MRP₂识别, 第二个由MRP₃识别, 第三个由MRP₄和MRP₅识别。因为所有这三个抗EF克隆都参与竞争, 所以它们可能是针对同一个抗原决定基。

MRP双抗体夹心ELISA。在使用MRP₃作为俘获抗体并以HRPO-MRP₁作为结合物的MRP DAS-ELISA中, 用加在0.05M碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中的100 μ l每孔含2.3 μ gMRP₃的包被液包被聚苯乙烯微量溶定ELISA板的各小孔。于37 $^{\circ}$ C吸收16小时后, 直接使用包被好的平板或将其保存于-20 $^{\circ}$ C下备用。向小孔内加入在含有0.05%(W/V) Tween 80 中以1:1至1:280两倍系统稀释的各菌株的100 μ l培养物上清液。37 $^{\circ}$ C保温1小时后, 用溶于自来水中的0.05% Tween 80洗5次, 再向小孔内加入100 μ l 含有溶

于PBS (pH 7.2) 之2.2 μ gHRPO 结合的MRP₁ 的溶液。使用棋盘滴定法检测俘获抗体及结合物的最适稀释度。37°C 保温1小时后按上述方法加入底物5-AS H₂O₂。将A₄₅₀>0.2的小孔定为阳性。向各小孔内加入由100 μ l未稀释之2型猪链球毒性菌株4005 (MRP⁺EF⁺) 培养物上清液组成的阳性对照物。另外还加入由100 μ l未稀释的非毒性菌株T₁₅ (MRP⁻EF⁻) 培养物上清液组成的阴性对照物。

使用MRP DAS-ELISA方法试验179个如以前用SDS-PAGE和Western印迹法检测的分别属于三种表型MRP⁺EF⁺、MRP⁺EF⁻和MRP⁻EF⁻的2型猪链球菌菌株。大多数菌株在ELIS中均记录了如它们在Western印迹分析中的相同结果(表7)。在ELISA中, 所有MRP⁺EF⁺ 菌株均为MRP阳性。有一个MRP⁺EF⁻ 菌株为假阴性。3个MRP⁻EF⁻ 菌株(6%)记录为假阳性。MRP DAS-ELISA 的敏感性(TP/TP+FN) (TP=真实阳性, FN=假阴性)为99% (131个菌株中有130个), 特异性(TN/TN+FP) (TN=真实阴性, FP=假阳性)为94% (48个菌株中有45个), 且预测值(TP/TP+FP)为98% (131个菌株中有130个)。MRP DAS-ELISA可很好地区分MRP 阳性和MRP阴性2型猪链球菌菌株。

表7 在 MRP和EF DAS-ELISAs中检验179个 2型猪链球菌(3种表型)的结果

表型	MRP DAS ELISA		EF DAS ELISA	
	菌 株 数		菌 株 数	
	+	-	+	-
MRP ⁺ EF ⁺	92 (100%)	0	92 (100%)	0
MRP ⁺ EF ⁻	38 (97%)	1 (3%)	0	39 (100%)
MRP ⁻ EF ⁻	3 (6%)	45 (94%)	0	48 (100%)

在完成MRP DAP-ELISA试验后, 记录属于2型猪链球菌三种表型之菌株培养物上清液的滴定曲线。从未稀释的92个MRP⁺ EF⁺ 分离物之培养物上清液测得的吸光率平均值(±标准差)为1.2259(±0.1165), 39个MRP⁺ EF⁻ 分离物的平均吸光率为1.2129(±0.2076), 48个MRP⁻ EF⁻ 分离物的平均吸光率为0.1180(±0.2546)。因此可凭视觉读出溶定板的吸光率值而不必进行光度检测即可区分出MRP阳性菌株(表型MRP⁺ EF⁺ 或MRP⁺ EF⁻)和MRP阳性菌株(表型MRP⁻ EF⁻)。

21个其它血清型猪链球菌参考菌株中, 有18个菌株之培养物上清液的吸光率低于0.2。3种血清型为阳性并有下列吸光率值: 血清型3的未稀释培养物上清液A₄₅₀=0.731; 血清型

5 的培养物上清液 $A_{450} = 0.587$ ，血清型 15 (以前的 Lancefield 菌群 T) 的培养物上清液 $A_{450} = 0.516$ 。这些血清型在 Western 印迹分析中也呈阳性；在这些血清型的培养物上清液中 MRP₁ 显然识别了分子量高于 150KDa 的蛋白质。列于表 6 中的所有其他微生物的吸光率均小于 0.2。

EF 双抗体夹心 ELISA。在鉴别试验样品中特异性抗原的 DAS ELISA 试验中，使用了两种不同的 MAbs，一种是作为俘获抗体，另一种则作为结合物，而且如在 MRP DAS-ELISA 试验中那样，它们各自识别抗原上的不同抗原决定基。在 Western 印迹中，EF 识别属于 MRP⁺ EF⁻ 表型之所有菌株培养物上清液中的高分子量 (>150 KDa) EF (实施例 4)。因此用 EF₂ 作为俘获抗体的 ELISA 不太可能区分 MRP⁺ EF⁺ 和 MRP⁺ EF⁻ 菌株。此外，因为三种 EF MAbs 彼此时封闭的，所以我们必须使用 EF₂ 作俘获抗体，且使用多克隆兔血清 (K₁₉₁) 作为结合物。有些 ELISA 试验是使用 EF₁ 作为俘获抗体并以 EF₂ 或 EF₃ 作为结合物，而且这些 MAbs 确实是彼此完全封闭的。

EF DAS-ELISA 的试验程序基本上同于前述的 MRP DAS-ELISA。同 100 μ l 含有 3.3 μ g EF₂ [溶于 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 中] 的溶液包被 ELISA 微量溶定板的各小孔。吸收后，包被的溶定板可直接使用或在 -20°C 下保存备用。使用从 1:1 到 1:1:128 两倍系列稀释的 100 μ l 培养物上清液。保温并冲洗后，向各小孔内加入 100 μ l 溶于 PBS (pH 7.2) 中的含 2.7 μ g 多克隆 Ra K₁₉₁ HRPO 结合物的溶液。37°C 保温 1 小时后，用上述底物 5-AS H₂O₂ 使平

板各孔显色。将 $A_{450} > 0.4$ 的孔定为阳性。各溶定板均使用上述的同样对照。

以EF DAS-ELISA 方法检验 179个有预定蛋白质分布图形的猪链球菌2型菌株令人惊奇的是，在该ELISA中39个 $MRP^+ EF^-$ 菌株都没有记录为阳性，而所有92个 $MRP^+ EF^+$ 菌株则全是阳性（表7）。所有48个 $MRP^- EF^-$ 菌株在该EF DAS-ELISA中都是阴性。因为没有检测出其他的假阳性或假阴性结果，所以EF DAS-ELISA显然能可靠地分辨出高和低分子形式的EF，进而也能分辨开属于 $MRP^+ EF^-$ 和 $MRP^+ EF^+$ 表型的2型猪链球菌菌株。

完成EF DAS-ELISA 试验后，记录属于三种表型之2型猪链球菌菌株培养物上清液的溶定曲线。从未稀释的93个 $MRP^+ EF^-$ 菌株培养物上清液测得的吸光率平均值（±标准差）为0.8204（±0.149），39个 $MRP^+ EF^-$ 菌株的平均吸光率为0.1551（±0.046），48个 $MRP^- EF^-$ 菌株的平均吸光率为0.1061（±0.0371）。因此，同MRP DAS-ELISA一样，可直接阅读溶定板来区分EF阳性菌株（表型 $MRP^+ EF^+$ ）和EF阴性菌株（表型 $MRP^+ EF^-$ 或 $MRP^- EF^-$ ）。

在ELISA 试验中，21个除2型外之其他血清型的猪链球菌参考菌株都不是EF阴性。某些其他菌种具有阳性吸光率值：链球菌Lancefield 菌群G（ $A_{450}=0.445$ ）、菌群L（ $A_{450}=0.348$ ）、马链球菌（ $A_{450}=0.671$ ）以及金黄色葡萄球菌（ $A_{450}=0.718$ ）。

实施例7

使用用聚合酶链反应（PCR）区分2型猪链球菌的致病性

和非致病性菌株

材料和方法

细菌及生条件。选择13个2型猪链球菌菌株来检验是否可用聚合酶链反应(PCR)方法(36)区分2型猪链球菌的三种类型。实施例4和5中已确定了三种菌株之MRP和EF蛋白质的致病性及表达。使菌株在含有6%马血的Columbia血液琼脂基质(代号CM331, Oxoid)上37°C生长过夜。将型猪链球菌菌落接种到10ml Todd-Hewitt培养液(代号CM 189, Oxoid)中, 并于37°C下生长过夜。

DNA 分离。按Maniatis等人(28)所述方法分离过夜培养物的DNA。将DNA用蒸馏水稀释到10ng/ μ l, 然后用于PCR。

临床标本。从宰杀后的母猪得到鼻拭子和扁桃体组织。将鼻拭子分离物接种到血液平皿上。按以前所述方法(27)从扁桃体中分离2型猪链球菌菌株。

样品分离。用稍加改动的Boom等人所述的方法(4)制备用于PCR的临床标本: 将标本加到装有900 μ l L6溶解缓冲液和40 μ l 硅藻土溶液的Eppendorf管中 [L6缓冲液100ml 0.1M TRIS-HCl (pH 6.4) + 120g (异)硫氰酸胍 (GusCN, Fluka cat nr. 50990) + 22ml 0.2M EDTA (pH8.0) + 2.6g Triton x-100。硅藻土溶液是在50ml蒸馏水+500 μ l 32% (W/V) HCl中加入10g硅藻土 (Janssen Chimica Cat.nr.17, 346, 80)]。使临床标本在L6缓冲液中于暗处室温下保温过夜。在带有Durapore膜 (Multiscreen MAHV N45, Millipore)的微量溶定板各

小孔中用移液管溶加150 μ l溶液。将微量溶定板放在真空歧管(MAVM 09600, Millipore)上, 样品用200 μ l L2洗液[L2缓冲液是100ml 0.1M Tris-HCl (pH 6.4) + 120g GuSCN]洗5次, 用200 μ l 70%乙醇洗5次, 并用200 μ l 丙酮洗1次。在各次洗涤之间不得使滤膜变干。用棉纸将微量溶定板底面吸干, 关在56 $^{\circ}$ C下放置15分钟使样品完全干燥。向各小孔内加入75 μ l PCR缓冲液(见下文)。将溶定板置于56 $^{\circ}$ C下保温15分钟。再次将微量溶定板放在真空歧管上。其中Durapore板下面为一标准微量溶定板(Micronic)。施加真空抽吸, 并在下面的微量溶定板中收集含有DNA的PCR缓冲液, 而硅藻土仍留在Durapore滤膜上。

PCR 检测法。PCR 包括10ng纯化的PNA或25 μ l临床标本, 总体积50 μ l。反应混合物含有10mM Tris-HCl (pH9.0)、2mM MgCl₂、50mM KCl、0.01%明胶、四种三磷酸脱氧核苷酸各0.2mM、四种引物各1 μ M、0.5单位Amplitaq聚合酶(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.), 并用2滴石蜡油复盖。大Perkin Elmer热循环器中进行25或40次DNA扩增循环: 94 $^{\circ}$ C 1分钟、55 $^{\circ}$ C 1分钟、72 $^{\circ}$ C 2分钟。在含有溴乙锭的1.5%琼脂糖凝胶上分析10至20 μ l扩增的DNA。

PCR引物。用于PCR的寡核苷酸序列是: P15: 1403-1425: 5'-GGT ATA CCT TGC TGG TAC CGT TC-3'; 16: 1914-1934: 5'-AGT CTC TAC AGC TGT AGC TGG-3'; P14: 2890-2908: 5'-GTT GAA AAC AAA GCG TTC G-3'; 以及 P-35: 3229-3249: 5'-CTT CGA CAA AAT GTC AGA

TTC-3'。寡核苷酸P-15和P-16相当于2型猪链球菌之mrp基因中所指出的位置(实施例3, 图2)。寡核苷酸P-34和P-35相当于在2型猪链球菌ef*基因中指出的位置(实施例2, 图1A)。按照仪器生产厂商提供的操作方法在Applied Biosystem 381A 型合成仪上合成引物。

结果

PCR的特异性。确定了mrp和ef*基因(参见实施例3和2)内可用于鉴别2型猪链球菌之三种表型的两个区域(分别称为m-VI和e-V)。(参见实施例8)。将基于m-VI区域(p-15和p-16)和e-V区域(p-34和p-35)的引物用于PCR中。引物p-15和p-16扩增了m-VI区域中的532 bp 片段。引物P-34和P-35扩增3e-V区域中的360bp片段在用这些引物进行的PCR中使用了4个MRP⁺ EF⁺、4个MRP⁺ EF⁻和5个MRP⁻ EF⁻菌株的染色体DNA。经过25次循环后在琼脂糖凝胶上分析已扩增的片段。从MRP⁺ EF⁺菌株的DNA 扩增了532bp片段。从MRP⁺ EF⁻菌株的DNA 扩增了532bp片段及360bp片段。相反, 从MRP⁻ EF⁻菌株的DNA 则既未扩增532bp片段, 也未扩增360bp片段。这些资料显示, 该PCR技术可用于鉴别2型链球菌的三种表型。

用Western 吸印(实施例4)、ELISA(实施例6)、与DNA探针m-VI和e-V的杂交实验(实施例8)以及PCR技术检测宰杀时从37头母猪扁桃体中分离的82个2型猪链球菌菌株的表型。用这四种方法检测, 从其中36头母猪分离的79个菌株分型完全相同。从1头母猪分离的3个菌株用PCR和DNA杂交实验被分为MRP⁺ EF⁺表型, 用Western吸印和ELISA

方法则被分为MRP⁻ EF⁻ 表型。这些结果表明，PCR可代替其他方法用于确定2型猪链球菌菌株的表型。

PCR的敏感性。用蒸馏水稀释纯化的MRP⁺ EF⁺ 猪链球菌2型菌株的染色体DNA，并直接用于PCR中。经42次PCR循环后，检测到25毫微微克 (fg) DNA。这一结果表明在经过PCR扩增后，可基于链球菌细胞含有1.75fgDNA 这一数据 (35) 在琼脂糖凝胶上检测14个细胞的DNA。决定全部细胞检验PCR的敏感性。为此，在磷酸盐缓冲盐水 (PBS (pH7.2) : 137mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM Na₂HPO₄、2.8 mM KH₂ PO₄) 中稀释并制备用于上述PCR的MRP⁺ EF⁺ 细胞。进行PCR (40次循环) 之前，在含有大约50个细胞的样品中仍可检测到已扩增的片段。

PCR可直接用于临床材料。将系列稀释的2型猪链球菌细胞加到鼻拭子上。发现在进行PCR之前在含有大约50个细胞的样品中仍可检测到已扩增的片段。

实施例8

使用DNA探针鉴别致病性和非致病性2型猪链球菌菌株材料和方法

细菌。分离13个2型猪链球菌菌株 (4个MRP⁺ EF⁺ 菌株，4个MRP⁺ EF⁻ 菌株和5个MRP⁻ EF⁻ 菌株)，以检验是否可用mrp、ef和ef*基因的区域来鉴别2型猪链球菌的三种表型。除菌株16外，这些被检菌株在小猪的感染实验中 (实施例5) 均显示有致病性。

从下列三个来源得到170个2型猪链球菌菌株：自患病猪的器官 (103个菌株)、宰杀的健康猪的扁桃体 (40个菌株) 以

及从病人体内(27个菌株)。使用猪链球菌血清型1至22的参考菌株(15)、21个其他链球菌菌种和45个其他细菌的菌株(38个不同的的菌种, DLO Central Veterinary Institute, 表8)试验mrp和ef探针的特异性。

培养基。大肠杆菌JM101菌株生长在LB培养基30中。需要时加入青霉素至终浓度为50 μ g/ml。所有其他细菌菌株均在含有6%马血Columbia血液琼脂基质(代号CM 331, Oxoid)上37 $^{\circ}$ C生长过夜。将过夜生长的菌落加在10ml Todd-Heuitt 培养液(代号CM 189, Oxoid)中保温并于37 $^{\circ}$ C下生长过夜。

DNA分离及操作。按Maniatis 等人所述方法(28)进行染色体DNA分离和常规DNA操作。按下述步骤制取粗溶胞产物: 将过夜生长的培养物11S 4000 \times 9离心10分钟, 并将沉淀组分重新悬浮于500至1000 μ l TEG-溶菌酶缓冲液[25mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA、50mM葡萄糖和1mg/ml 溶菌酶)中。25 $^{\circ}$ C保温30分钟后, 将此样品用于点印迹分析。

探针。使用质粒pMR11、pEF2-19和pEF17-7(参见实施例1、2、3)产生克隆到pKUN19(24)中的亚克隆。使用Gene-Clean药盒(Bio 101 Inc., La Jolla, USA)从制备性琼脂糖凝胶中分离适当亚克隆的片段。然后使用随机引发的标记药盒(Boehringer GmbH), 按照生产商推荐的操作程序用2-³²PdCTP(3000 Ci/mMol, Amersham)标记纯化的片段并将其用作探针。

Southern 杂交。将13个选择的2型猪链球菌菌株的染色

体DNA (1 μ g DNA) 点在Gene-Screen尼龙膜 (New-England Nuclear Corp., Boston, USA) 上。按照制造厂方推荐的方法将膜与³²P标记的mrp和ef探针一起保温。过夜杂交后, 室温下用2 \times SSC将滤膜洗两次各5分钟, 再用0.1SSC加0.5% SDS于65 $^{\circ}$ C下洗两次每次30分钟 (1 \times SSC=0.15M NaCl + 0.015M 柠檬酸钠)。使用点印迹装置 (Bethesda Research Laboratories) 170个2型猪链球菌菌株、22个1-22型猪链球菌参考菌株组, 以及其他链球菌菌种和其他细菌菌株组, 各取20 μ l DNA 或粗制溶胞产物样品点在Zeta探针尼龙膜 (Biorad) 上。

按制造商推荐的方法使膜与 ³²P标记的mrp和ef探针一起保温。过夜杂交后, 于65 $^{\circ}$ C下40mM磷酸钠缓冲液 (pH7.2) + 5% SDS + 1mM EDTA将膜洗两次各30分钟, 并于65 $^{\circ}$ C下用40mM磷酸钠缓冲液 (pH7.2) + 1% SDS + 1mM EDTA 洗两次每次30分钟。所有(预)杂交均在杂交烘箱 (Hybaid) 内进行。

结果

mrp 探针。使2型猪链球菌之三种表型菌株的染色体DNA杂交到mrp基因的不同区域。使用六个不同的mrp探针 (如图14a中图解所示)。EcoRI-SnaBI片段, 即m-I, 含有整个mrp编码区。m-II、m-III、m-IV和m-V探针含有mrp基因的不同区域。MRP⁺ EP⁺ 和MRP⁺ EF⁺ 菌株与所有的mrp探针强杂交。另外, m-I、m-II、m-IV和m-V探针与5个MRP⁻ EF⁻ 菌株中的4个强杂交。1个MRP⁻ EF⁻ 菌株则不与任何一个mrp探针杂交。这些数据表明4个

MRP⁻ EF⁻ 菌株含有与菌株D-282之mrp基因同源的大区域，而菌株25缺乏完整的mrp基因。但这4个MRP⁻ EF⁻ 菌株只与探针m-III产生微弱杂交，这表明只有探针III-III的一个小部分与它们的DNA同源。探针m-VI是在除去探针m-III的5'端385bp和3'端325bp后构建成的。5个MRP⁻ EF⁻ 菌株完全不与探针m-VI杂交，表明这些菌株缺少与m-VI探针杂交的区域。因此，可以用探针m-VI来区分MRP⁺ 和MRP⁻ 菌株。

ef和ef*探针。三种表型之2型猪链球菌的染色体DNA与ef基因的不同区域杂交。使用了四个不同的ef探针(如图14b中图解所示)。所有MRP⁺ EF⁺ 和MRP⁺ EF^{*} 菌株以及1个MRP⁻ EF⁻ 菌株可与所有的ef探针杂交。

相反地，4个MRP⁻ EF⁻ 菌株都不与任何一个ef探针杂交。这些结果表明，上述这些MRP⁻ EF⁻ 菌株中大多数缺少与ef基因同源的完整区域，而只有1个MRP⁻ EF⁻ 菌株似乎包含与ef基因同源的完整区域。因此探针e-I至e-IV都不能被用来区分三种类型。

因为编码EF*蛋白质的基因含有不存在于编码EF蛋白质的基因中的DNA片段，所以可选用这个额外DNA的一部分作为探针(图14C，探针e-V)。探针e-v可与所有的MRP⁺ EF^{*} 杂交。相反，MRP⁺ EF⁺ 和MRP⁻ EF⁻ 菌株都不与e-V探针杂交。这些数据显示，MRP⁺ EF⁺ 和MRP⁻ EF⁻ 菌株缺少与e-V同源的区域。因此探针对MRP⁺ EF^{*} 菌株是特异的。

因此，如果在互补杂交研究中所用m-VI和e-V，便

有可能鉴别2型猪链球菌的三种表型。如果2型猪链球菌菌株与探针m-VI和e-V杂交，这些菌株应属于MRP⁺ EF⁺表型；如果2型猪链球菌菌株与m-VI杂交但不与e-V杂交，这些菌株即属于MRP⁺ EF⁻表型；最后如果菌株与m-VI和e-V不杂交，则它们便属于MRP⁻ EF⁻表型。

就170个其他2型猪链球菌菌株试验mrp、ef和ef^{*}探针。88个菌株具有MRP⁺ EF⁺表型，37个菌株具有MRP⁺ EF⁻表型，45个菌株具有MRP⁻ EF⁻表型。与前述数据相一致，所有MRP⁺ EF⁺菌株都与探针M-I至M-VI及e-I至e-IV杂交，但都不与探针e-V杂交。再者，所有37个MRP⁺ EF⁻菌株都与所有的探针杂交。然而，45个MRP⁻ EF⁻菌株中，只有两个与探针m-VI和e-V杂交，据此而错误地将其归为MRP⁺ EF⁺菌株。因此，可以使用探针m-VI和e-V以很高的可能性预测2型猪链球菌的表型(168/170; 98.8%)。

m-VI和e-V探针的特异性。试验猪链球菌血清型1至22的参考菌株与探针m-VI和e-V的杂交情况。结果发现，猪链球菌2(菌株735)、4、5和14血清型菌株与m-VI探针杂交，而1/2、2、4、5、6、14和15血清型菌株与e-V探针杂交。这些数据提示，mrp和ef基因对于猪链球菌血清2型不是特异的，但在几种血清型菌株中却存在同源序列。根据这些实验数据，可将血清型2、4、5和15归为MRP⁺ EF⁺表型菌株，而血清型1/2、6和15则应属于MRP⁻ EF⁻表型菌株。

用探针m-I、 m-VI、 e-III和e-V检验猪病原体及几种常见细菌的染色体DNA。被检的各菌种列于表8中。有些菌种(大肠杆菌、氧化克伯氏菌、肺炎克伯氏菌及鼠伤寒沙门氏菌)虽然可与探针m-I杂交,但都不与探针m-VI、 e-III和e-V杂交。这些数据说明虽然在某些菌种中发现了部分mrp基因,但探针m-VI和e-V是对猪链球菌特异的。因此,探针m-VI和e-V具有潜在的诊断价值。

表2 实验设计

猪链球菌 菌株数	猪链球菌 表 型	猪链球菌 分离的来源 ¹	猪链球菌 接种剂量 ²	被接种猪 的数目
3	MRP^+EF^+	猪脑膜	1.84	5
3	MRP^+EF^+	猪脑膜	1.96	4
10	MRP^+EF^+	猪扁桃体	1.52	5
22	MRP^+EF^+	人	2.93	4
17	MRP^+EF^-	猪扁桃体	1.26	4
24	MRP^+EF^-	人	1.22	4
28	MRP^+EF^-	人	1.23	4
12	MRP^-EF^-	猪扁桃体	1.05	5
12	MRP^-EF^-	猪扁桃体	0.98	4
16	MRP^-EF^-	猪扁桃体	0.70	4
18	MRP^-EF^-	猪扁桃体	1.10	4
25	MRP^-EF^-	人	0.97	4

表 4. 接种2型链球菌(三种表型的 10 个菌株)
的猪的各种组织中检查出的病理损伤

组织和病理损伤	有病理损伤的猪的数目		
	表型MRP ⁺ EF ⁺ (被检数 = 18)	表型MRP ⁺ EF ⁻ (被检数 = 12)	表型MRP ⁻ EF ⁻ (被检数 = 22)
<u>CNS</u>			
脑膜炎 ¹	12	0	0
脑炎 ¹	10	1	0
脉络膜炎	7	0	0
脑软化	5	0	0
<u>浆膜 / 关节</u>			
心包 / 心外膜炎	11	1	1
胸膜炎	5	1	0
腹膜炎	14	6	0
多关节炎 ²	15	0	0
<u>肺</u>			
低位支气管肺炎	1	1	1
间质性肺炎	7	5	5
纤维蛋白性肺炎	3	0	0
支气管炎 /	2	2	3
细支气管周炎			
<u>肝</u>			
门静脉周和 / 或 小叶内病灶	11	8	3
<u>脾</u>			
活性白髓	2	6	5
活性红髓	4	0	2
<u>扁桃体</u>			
活性滤泡	3	9	12
腺管渗出	1	5	6

表 5. 从接种 2 型猪链球菌(三种表型的 10 个菌株)
的猪的各种组织中分离链球菌

组织	尸检时从中分离猪链球菌的猪的数目		
	表型 MRP ⁺ EF ⁺ (被检数 = 18)	表型 MRP ⁺ EF ⁻ (被检数 = 12)	表型 MRP ⁻ EF ⁻ (被检数 = 22)
CNS	14	0	0
浆膜	9	2	0
关节	13	2	0
肺	6(9) ¹	0(2) ¹	2(8) ¹

¹ 括弧内的数字表示同时也分离出支气管炎博德特氏菌的猪数。

表 6. 微生物一览表

菌群	微生物	微生物
A	人化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes humanis</i>)	其他菌种
B	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
C	马链球菌 (<i>Streptococcus equi</i>)	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)
	猪类马链球菌 (<i>Streptococcus equisimilis porcine</i>)	猪葡萄球菌 (<i>Staphylococcus hyicus</i>)
	停乳链球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)	绿色气球菌 (<i>Aerococcus viridans</i>)
	兽瘟链球菌 (<i>Streptococcus zooepidemicus</i>)	化脓放线菌 (<i>Actinomyces pyogenes</i>)
	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	大肠杆菌(3X) (<i>Escherichia coli</i>)

尿肠球菌 (<i>Enterococcus faecium</i>)	氧化克来伯氏杆菌 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)
液化肠球菌 (<i>Enterococcus liquefaciens</i>)	肺炎克来伯氏杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
牛链球菌(2X) (<i>Streptococcus bovis</i>)	小球菌菌株 3551 (<i>Micrococcus luteus</i>)
产酶链球菌 (<i>Streptococcus zymogenes</i>)	藤黄小球菌 (<i>Micrococcus</i>)
E 链球菌E 菌群 (<i>Streptococcus group E</i>)	出血败血性巴斯德氏菌 (<i>Pasteurella multocida</i>)
G 链球菌G 菌群(2X) (<i>Streptococcus group G</i>)	普通变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)
L 链球菌 L 菌群(2X) (<i>Streptococcus group L</i>)	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
P 链球菌 P 菌群 (<i>Streptococcus group p</i>)	液化沙雷氏菌 (<i>Serratia liquefaciens</i>)
Q 链球菌 Q 菌群 (<i>Streptococcus group Q</i>)	
乳脂链球菌Ⅲ (<i>Streptococcus milleri</i> Ⅲ)	酵母
血链球菌 (<i>Streptococcus sanguis</i>)	劳伦隐球菌 (<i>Cryptococcus laurentii</i>)
乳房链球菌 (<i>Streptococcus uberis</i>)	

表8. 用于试验探针特异性的其他菌种一览表

球菌 (<i>Streptococcus species</i>)	
无乳链球菌 (<i>S. agalactiae</i>)	马链球菌 (<i>S. equi</i>)
猪类马链球菌 (<i>S. equisimilis porcine</i>)	兽瘟链球菌 (<i>S. zooepidemicus</i>)
停乳链球菌 (<i>S. dysgalactiae</i>)	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)
液化肠球菌 (<i>E. Liquefaciens</i>)	产酶肠球菌 (<i>E. Zymogenes</i>)
尿肠球菌 (<i>E. faecium</i>)	链球菌菌群E (<i>S. group E</i>)
乳脂链球菌 III (<i>Similleri IV</i>)	乳房链球菌 (<i>S. uburis</i>)
人化脓链球菌 (<i>S. pyogenes humanis</i>)	牛链球菌 (<i>S. bovis</i>)
动物链球菌 G (<i>S. animale G</i>)	链球菌菌群 G (<i>S. group G</i>)
链球菌菌群 L 生物型 I (<i>S. group L biotype 1</i>)	链球菌菌群 L 生物型 II (<i>S. group L biotype II</i>)
链球菌菌群 P (<i>S. group P</i>)	链球菌菌群 Q (<i>S. group Q</i>)
血链球菌 (<i>S. sanguis</i>)	
其他细菌	
胸膜肺炎放线杆菌 (<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>)	绿色放线杆菌 (<i>Actinobacillus viridans</i>)
猪放线杆菌 (<i>Actinobacillus suis</i>)	亲水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)

- 化脓放线菌
 (*Actinomyces pyogenes*)
 蜡样芽胞杆菌
 (*Bacillus cereus*)
 枯草芽胞杆菌
 (*Bacillus subtilis*)
 猪布鲁氏杆菌生物型 I
 (*Brucella suis biotype I*)
 大肠弯曲杆菌
 (*Campylobacter coli*)
 空肠弯曲杆菌
 (*Campylobacter jejuni*)
 产气荚膜杆菌 A 无毒性的
 (*Clostridium perfringens A non-toxic*)
 产气荚膜杆菌 A 有毒性的
 (*Clostridium perfringens A toxic*)
 大肠杆菌
 (*Escherichia coli*)
 猪寄生嗜血杆菌
 (*Haemophilus parasuis*)
 肺炎克伯氏菌
 (*Klebsiella pneumoniae*)
 小球菌菌株 3551
 (*Micrococcus strain 3551*)
 鸟结核分支杆菌血清变异 2
 (*Mycobacterium avium serovar 2*)
 猪鼻支原体
 (*Mycoplasma hyorhinis*)
 绿脓假单胞菌
 (*Pseudomonas aeruginosa*)
 地衣型芽胞杆菌
 (*Bacillus licheniformis*)
 支气管炎博德特氏菌
 (*Bordetella bronchiseptica*)
 猪布鲁氏杆菌生物型 II
 (*Brucella suis biotype II*)
 粪弯曲杆菌
 (*Campylobacter faecalis*)
 白色念珠菌
 (*Candida albicans*)
 红斑丹毒丝菌
 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)
 氧化克伯氏菌
 (*Klebsiella oxytoca*)
 单核细胞增多性李斯特氏菌
 (*Listeria monocytogenes*)
 藤黄小球菌
 (*Micrococcus luteus*)
 猪肺炎支原体
 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)
 猪关节液支原体
 (*Mycoplasma hyosynoviae*)
 出血败血性巴斯德氏菌
 (*Pasteurella multocida*)
 鼠伤寒沙门氏菌
 (*Salmonella typhimurium*)
 金黄色葡萄球菌
 (*Staphylococcus aureus*)

普通巴斯德氏菌

(*Pasteurella vulgaris*)

液化沙雷氏菌

(*Serratia liquefaciens*)

表皮葡萄球菌

(*Staphylococcus epidermidis*)

小肠结肠炎耶尔森氏菌

(*Yersinia enterocolitica*)

猪葡萄球菌

(*Staphylococcus hyicus*)

参考文献

1. Arends, J.P., and H.C. Zanen. 1984. Proc. 9th Lancefield Int. Symp. Streptococci Streptococcal Dis., p. 343.
2. Arends, J.P., and H.C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. Rev. Infect. Dis., 10: 131-137.
3. Arends, J.P., N. Hartwig, M. Rudolphy, and H.C. Zanen. 1984. Carrier rate of *Streptococcus suis* capsular type 2 in palatine tonsils of slaughtered pigs. J. Clin. Microbiol. 20: 945-947.
4. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.W. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.
5. Breton, J., W.R. Mitchell, and S. Rosendal. 1986. *Streptococcus suis* in slaughter pigs and abattoir workers. Can. J. Vet. Res., 50: 338-341.
6. Clifton-Hadley, F.A. 1983. *Streptococcus suis* type 2 infections. Br. Vet. J. 139: 1-5.
7. Clifton-Hadley, F.A., T.J.L. Alexander, M.R. Enright, and J. Guise. 1984. Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. Vet. Rec. 115: 562-564.
8. Clifton-Hadley, F.A., T.J.L. Alexander, I. Upton, and W.P.H. Duffus. 1984. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. Vet. Rec., 114: 513-518.
9. Driessen, A.M.J., W. de Vrij, and W.N. Konings. 1985. Incorporation of beef heart cytochrome c oxidase as a proton-motive-force

- generating mechanism in bacterial membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7555-7559.
10. Fahnestock, S.R., P. Alexander, J. Nagle and D. Filpula. 1987. Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G *Streptococcus*. J. Bacteriol. 167: 870-880.
 11. Ferretti, J.J., R.R.B. Russell, and M.L. Dao. 1989. Sequence analysis of the wall-associated protein precursor of *Streptococcus mutans* antigen A. Mol. Microbiol. 3: 469-478.
 12. Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. Mol. Microbiol. 4: 1603-1605.
 13. Frithz, E., L-O. Heden and G. Lindahl. 1989. Extended sequence homology between IgA receptor and M proteins in *Streptococcus pyogenes*. Mol. Microbiol. 3: 1111-1119.
 14. Gogolewski, R.P., Cook, R.W. and O'Connell, C.J.. 1990. *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. Austr. Vet. J., 67: 202-204.
 15. Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jaques, K.R. Mittal, and J. Henrichsen. 1989. Description of 14 new capsular types *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol., 27: 2633-2636.
 16. Guss, B., M. Uhlen, B. Nilsson, M. Lindberg, J. Sjöquist, and J. Sjö Dahl. 1984. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. Eur. J. Biochem. 138: 413-420.
 17. Hager, P.W., and J.C. Rabinowitz. 1985. Translational specificity in *Bacillus subtilis*. In: The Molecular Biology of the Bacilli. Dubnau, D. A. (ed.). New York, Academic Press, pp 1-32.
 18. Ham-Hoffies, A.M., L.A.M.G. van Leengoed, and A. Hoogendoorn. 1986. Calibration of a conducting counter in determining haematological values in blood samples of various animals. Proc. IVth Int. Symp. of Vet. Lab. Diagn. Amsterdam. p. 692-693.
 19. Higgins, R., M. Gottschalk, K.R. Mittal, and M. Beaudoin. 1989. *Streptococcus suis* infections in swine. A sixteen month study. Can. J. Vet. Res., 54: 170-173.
 20. Hollingshead, S.K., V.A. Fischetti, and J.R. Scott. 1987. The complete nucleotide sequence of type 6M protein of the group A *Streptococcus*: repetitive structure and membrane anchor. J. Biol. Chem. 261: 1677-1686.
 21. Hommez, J., L.A. Devriese, J. Henrichsen, and F. Castryck. 1986. Identification and characterisation of *Streptococcus suis*. Vet. Microb., 16: 349-355.
 22. Jaarsveld, B.C., E. van Kregten, R.G. van Kesteren, M. Rozenberg-Arska, and A.K.M. Bartelink. 1990. Fulminante sepsis door *Streptococcus suis*. Ned. Tijdschr. Geneesk., 134: 1462-1464.
 23. Kamp, E.M., and T.G. Kimman. 1988. Induction of nasal turbinate atrophy in germ-free pigs, using *Pasteurella multocida* as well as bacterium-free crude and purified dermonecrotic toxin of *P. multocida*. Am. J. Vet. Res. 49: 1844-1849.
 24. Konings, R.N.H., E.J.M. Verhoeven, and B.P.H. Peeters. 1987. pKUN vectors for the separate production of both DNA strands of

- recombinant plasmids. *Methods Enzymol.* 153: 12-34.
25. Kyte, J., and R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
 26. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of T4. *Nature* 227: 680-685.
 27. Leengoed, L.A.M.G. van, U. Vecht, and E.R.M. Verheyen. 1987. *Streptococcus suis* type 2 infections in pigs in the Netherlands (part two). *Vet. Quart.* 9: 111-117.
 28. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 - Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
 29. Messing, J. 1979. A multipurpose cloning system based on the single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recombinant DNA Technical Bulletin.* NIH Publication no 79-99, 2, no 2, 43-48.
 30. Miller, J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
 31. Moreau, A., R. Higgins, M. Bigras-Poulin, and M. Nadeau. 1989. Rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in weaned pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 1667-1671.
 32. Morissey, J.H. 1981. Silver stains for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.
 33. Murray, N.E., W.J. Brammer, and K. Murray. 1977. Lamboid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150: 53-58.
 34. Platt, T. 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 339-372.
 35. Pozzi, G., M.R. Oggioni, and A. Tomasz. 1989. DNA probe for identification of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 370-372.
 36. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, D.B. Mullis, and H.A. Ehrlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
 37. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
 38. Schneewind, O., K. F. Jones, and V. A. Fischetti. 1990. Sequence and structural characteristics of the trypsin-resistant T6 surface protein of group A Streptococci. *J. Bacteriol.* 172: 3310-3317.
 39. Sigas, C., G. Raucchi, K. Jonsson, P.-E. Lindgren, G. M. Anantharamaiah, M. Hook, and M. Lindberg. 1989. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectine-binding protein from *Staphylococcus aureus*: Use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 16: 699-703.

40. Tinoco, Jr. I., P.N. Borer, B. Dengler, M.D. Devine, O.C. Uhlenbeck, D.M. Crothers, and J. Gralla. 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature* 246: 40-41.
41. Uhlen, M., B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson and M. Lindberg. 1984. Complete sequence of the Staphylococcal gene encoding protein A. *J. Biol. Chem.* 259: 1695-1702.
42. Valli, V.E.O. 1985. The Hematopoietic System-Spleen and Hemolymph Nodes, p. 194-200. In: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer (ed.), *Pathology of Domestic Animals*. Volume 3. 3rd ed. Academic Press, Inc. Orlando Florida.
43. Vecht, U., J.P. Arends, E.J. van der Molen, and L.A.M.G. van Leengoed. 1989. Differences in virulence between two strains of *Streptococcus suis* type 2 after experimentally induced infection of newborn germ-free pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 50: 1037-1043.
44. Vecht, U., L.A.M.G. van Leengoed, and E.R.M. Verheyen. 1985. *Streptococcus suis* infections in pigs in The Netherlands (part one). *Vet. Quart.* 7: 315-321.
45. Von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690.
46. Vos, P., G. Simons, R.J. Siezen, and W. M. de Vos. 1989. Primary structure and organization of the gene for a procaryotic cell envelope-located serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 264: 13579-13585.
47. Vossen, J.M.B.M. van der, J. Kok, and G. Venema. 1985. Construction of cloning, promoter-screening, and terminator-screening shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 540-542.
48. Williams, A.E. and W.F. Blakemore. 1990. Pathogenesis of Meningitis Caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* 162: 474-481.
49. Wilson, B. and Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horse-radish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: W. Knapp, K. Holubar, and G. Wicks (Editors), *Immunofluorescence and related staining techniques*. Biomedical Press, Elsevier, Amsterdam, pp 215-224.
50. Windsor, R.S. 1977. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type 2. *Vet. Rec.* 101: 378-379.
51. Wren, W.B. 1991. A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. *Mol. Microbiol.* 5: 797-803.
52. Zijderveld, F.G. van, Westenbrink, F., Anakotta, J., Brouwers, R.A.M. and van Zijderveld, A.M.. 1989. Characterization of the F41 Fimbrial Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Using Monoclonal Antibodies. *Inf. and Imm.* 57: 1192-1199.

GENIA

AAA	GAT	GCG	AGT	GGT	CAG	AAT	GTT	CAT	GGT	AAG	GCA	ACG	GAT	AAT	AAG	744
Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Val	His	Gly	Lys	Ala	Thr	Asp	Asn	Lys	
			70					75					80			
ATT	TAT	CGT	GTT	GTA	TAC	GTT	TTT	GGT	AAT	GTA	GCA	GGG	ACT	ACG	GAG	792
Ile	Tyr	Arg	Val	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Asn	Val	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	
		85					90					95				
ACA	GAA	GAT	GGT	AAA	CAA	AAT	GTT	GCT	CCA	ACA	TTT	AAC	AGA	AAT	GAT	840
Thr	Glu	Asp	Gly	Lys	Gln	Asn	Val	Ala	Pro	Thr	Phe	Asn	Arg	Asn	Asp	
	100					105					110					
GCA	ACT	AAA	ACT	TTT	CCA	ATC	ACA	GAT	CCA	GAT	AGC	GAC	ATT	CAA	ACT	888
Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Ile	Thr	Asp	Pro	Asp	Ser	Asp	Ile	Gln	Thr	
115					120					125					130	
ATT	TCA	TAC	GAA	GTT	CCA	GCT	GAT	ATT	GCA	AGC	TAT	ACC	TTG	GAT	GAT	936
Ile	Ser	Tyr	Glu	Val	Pro	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	Tyr	Thr	Leu	Asp	Asp	
			135					140					145			
CCA	AAC	TCA	ATT	GTT	ACT	AAT	GGC	ACC	TCA	CCT	GGT	CCA	GTA	TCT	TAC	984
Pro	Asn	Ser	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Gly	Pro	Val	Ser	Tyr	
			150				155						160			
TTA	GAT	GGT	CCA	AAT	GGG	TCA	GCC	ACT	CTC	ACA	CAA	GAT	GGT	TAT	CTA	1032
Leu	Asp	Gly	Pro	Asn	Gly	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Gln	Asp	Gly	Tyr	Leu	
		165				170						175				
ACA	GGA	AGT	TTC	CCT	TGG	GGA	GCA	GGA	GAC	CTA	GCT	GGT	CGT	CGG	ATT	1080
Thr	Gly	Ser	Phe	Pro	Trp	Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	
	180				185						190					
AAA	GTG	ACG	GAT	GCC	ACT	GGT	AAT	ACT	ACT	AAG	AGT	AAT	CCG	TTC	TAT	1128
Lys	Val	Thr	Asp	Ala	Thr	Gly	Asn	Thr	Thr	Lys	Ser	Asn	Pro	Phe	Tyr	
195				200						205					210	
ATG	GTT	GCA	TAT	ACA	GTC	AAG	CCA	GTA	GAT	GAT	AAA	CCT	CTA	GCA	GTA	1176
Met	Val	Ala	Tyr	Thr	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asp	Lys	Pro	Leu	Ala	Val	
				215				220					225			
TCA	AAC	TCT	TCT	GAG	CTG	ACG	GAA	CAG	GCT	ATT	TTT	GAT	AAG	TTG	GTT	1224
Ser	Asn	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Glu	Gln	Ala	Ile	Phe	Asp	Lys	Leu	Val	
			230				235					240				
GTC	GAT	AAG	TCT	GCT	AAA	ACA	ACT	TCA	AAT	AGC	GCT	CTT	GTA	ATT	GAT	1272
Val	Asp	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Ser	Asn	Ser	Ala	Leu	Val	Ile	Asp	
		245				250						255				
TCT	AGC	AAC	TAC	AAA	CAT	TCA	ATT	GCA	GGT	TAT	CGT	ACC	GTA	AAT	TCT	1320
Ser	Ser	Asn	Tyr	Lys	His	Ser	Ile	Ala	Gly	Tyr	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	
	260				265						270					
GAT	GGC	ACA	AAA	ACA	GAA	ACA	GTA	GAG	GAA	ACA	AAT	CTA	TCT	GAT	TTC	1368
Asp	Gly	Thr	Lys	Thr	Glu	Thr	Val	Glu	Glu	Thr	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	
275				280						285					290	

(集選)A

CCA	ACT	GAA	GGT	AAA	TAC	GAA	GTT	CGA	GTA	AAA	ACA	ACC	AAT	GTT	TAC	1416
Pro	Thr	Glu	Gly	Lys	Tyr	Glu	Val	Arg	Val	Lys	Thr	Thr	Asn	Val	Tyr	
				295					300					305		
GGT	CAA	ACT	ATC	TAC	AAC	TGG	ATT	CCT	GTA	AAT	GCC	TAT	AAG	TTG	GAC	1464
Gly	Gln	Thr	Ile	Tyr	Asn	Trp	Ile	Pro	Val	Asn	Ala	Tyr	Lys	Leu	Asp	
			310					315					320			
ACA	GCG	AAG	GAT	GCT	GAA	ATT	CGG	AAG	TAT	ACA	GAC	AAC	CAA	GCC	CCA	1512
Thr	Ala	Lys	Asp	Ala	Glu	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Asp	Asn	Gln	Ala	Pro	
		325					330					335				
ATT	CAT	GCT	ATA	ATG	CAA	ATT	GGT	CAA	GCT	GGA	GAA	AAG	GCA	GCA	GTT	1560
Ile	His	Ala	Ile	Met	Gln	Ile	Gly	Gln	Ala	Gly	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	
	340					345					350					
ATA	TTG	AAG	GAT	ATT	CCA	TCC	GAT	TTC	AGT	ATT	GAA	AAC	TTC	AAT	TTG	1608
Ile	Leu	Lys	Asp	Ile	Pro	Ser	Asp	Phe	Ser	Ile	Glu	Asn	Phe	Asn	Leu	
	355				360					365					370	
AAA	GAT	GGT	GTA	GCA	GAT	GAG	CTT	GCT	AAA	CGT	AAC	TTG	GAA	TTT	GTA	1656
Lys	Asp	Gly	Val	Ala	Asp	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	Asn	Leu	Glu	Phe	Val	
				375					380					385		
AGA	AAT	GAT	GCA	GTG	GCG	ACA	ACT	GAT	ACT	GAT	GGA	GAT	GGC	GCC	AAA	1704
Arg	Asn	Asp	Ala	Val	Ala	Thr	Thr	Asp	Thr	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Lys	
			390					395					400			
GAA	GGA	ATT	GTT	GGA	TAT	ATT	CAA	CCA	AAA	ACT	GGC	GGT	GCA	AAC	AGT	1752
Glu	Gly	Ile	Val	Gly	Tyr	Ile	Gln	Pro	Lys	Thr	Gly	Gly	Ala	Asn	Ser	
		405					410					415				
GGG	GTA	GCC	ACT	TAT	ACA	GGA	TCA	AAT	AAT	CTT	ACT	TAT	GGC	TTC	ACT	1800
Gly	Val	Ala	Thr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Asn	Leu	Thr	Tyr	Gly	Phe	Thr	
	420					425					430					
TAC	AAA	GCT	GTT	GAG	ACA	AAA	GAT	AAG	GCG	AAT	GCC	ACA	GAG	GCT	AAA	1848
Tyr	Lys	Ala	Val	Glu	Thr	Lys	Asp	Lys	Ala	Asn	Ala	Thr	Glu	Ala	Lys	
	435				440					445					450	
ACT	CTC	GAA	TTA	GAT	TAC	ACC	ATC	TTA	TTC	ATA	GAT	ACT	AAA	GCA	CCA	1896
Thr	Leu	Glu	Leu	Asp	Tyr	Thr	Ile	Leu	Phe	Ile	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	
				455					460					465		
GTC	ATG	ACA	CCT	AAA	TCA	GAG	TAC	ATC	CGT	TTT	GTT	GGT	GAA	GAG	TAT	1944
Val	Met	Thr	Pro	Lys	Ser	Glu	Tyr	Ile	Arg	Phe	Val	Gly	Glu	Glu	Tyr	
			470					475					480			
ACG	GTT	AGC	GTC	CCA	GGT	ACG	GAT	AAC	GCC	TTC	CTT	AAT	ACC	GGC	AAA	1992
Thr	Val	Ser	Val	Pro	Gly	Thr	Asp	Asn	Ala	Phe	Leu	Asn	Thr	Gly	Lys	
		485					490					495				
CTA	AAT	GGA	ACT	CTC	TCA	ATT	TTG	AAA	GAT	GGA	GAG	TCA	GGT	TCT	CTT	2040
Leu	Asn	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Gly	Glu	Ser	Gly	Ser	Leu	
	500					505					510					

第14

GTA	TCA	TCA	GAC	TTA	GGT	ACA	AAC	ACT	AAG	ATT	ACT	TCA	GAA	CTG	GAT	2088
Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Thr	Asn	Thr	Lys	Ile	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	
515					520					525					530	
CCT	ACG	GGA	GCA	ACT	GCA	AAC	CAA	GGA	GAT	GAC	GGT	CAA	TCT	TCA	ACT	2136
Pro	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Gly	Gln	Ser	Ser	Thr	
				535					540						545	
AAG	TTT	AAC	GTT	AAG	ATT	ACA	GGT	ACC	GGA	CCT	GCT	ACA	GAA	GGT	ACC	2184
Lys	Phe	Asn	Val	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Thr	Glu	Gly	Thr	
			550					555							560	
GGC	ACT	TAT	AAG	CTT	CGT	GTT	GGA	GAA	GAT	AAC	TAT	CCT	TTT	GGT	CCA	2232
Gly	Thr	Tyr	Lys	Leu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Asn	Tyr	Pro	Phe	Gly	Pro	
		565					570								575	
GAG	GGG	AAA	CTT	GTT	GAT	GGA	AAT	AAA	CCA	GAA	AAT	GTA	GGT	TTG	ACA	2280
Glu	Gly	Lys	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Gly	Leu	Thr	
	580					585									590	
TCT	GTA	AAA	GTT	ACC	TTC	GTA	AAA	CAT	GCT	ACG	GTG	TCA	ACA	CCA	GTT	2328
Ser	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Val	Lys	His	Ala	Thr	Val	Ser	Thr	Pro	Val	
595					600						605				610	
TCT	GTT	GAA	AAT	CCA	GCT	AAC	TTA	ACG	CCA	GAA	GAA	AAA	GCC	GCA	GTT	2376
Ser	Val	Glu	Asn	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	
				615											625	
ATT	GCT	CAA	ATC	AAG	AAA	GAC	AAC	GCA	GAC	AAC	GAA	AGA	TTG	AAG	GGC	2424
Ile	Ala	Gln	Ile	Lys	Lys	Asp	Asn	Ala	Asp	Asn	Glu	Arg	Leu	Lys	Gly	
			630					635							640	
TTG	CCA	GAT	TCA	GCA	TTT	ACA	GTT	AAC	TCA	GAT	GGT	ACT	GTG	TCA	GTT	2472
Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	Thr	Val	Ser	Val	
		645					650								655	
GAC	TAC	AGT	GCC	GGT	GGT	GTC	AAT	GTT	GAT	GGT	GCG	ACA	GAC	ATT	ATT	2520
Asp	Tyr	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Val	Asp	Gly	Ala	Thr	Asp	Ile	Ile	
	660					665									670	
AAG	AAT	GCT	ACC	ACA	AAC	TTG	GCA	GAT	ACA	CGG	AAT	GAA	GCA	AAA	GCA	2568
Lys	Asn	Ala	Thr	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Thr	Arg	Asn	Glu	Ala	Lys	Ala	
675					680					685					690	
GAA	ATC	GAC	ACA	AAA	TTA	GCT	GAA	CAT	AAA	AAA	GCT	ATC	GAA	GCA	AAA	2616
Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Lys	Lys	Ala	Ile	Glu	Ala	Lys	
				695						700					705	
CGG	GAT	GAA	GCG	TTT	TCT	AAA	ATT	GAT	GAT	GAC	ATT	TCC	TTG	AGA	GCA	2664
Arg	Asp	Glu	Ala	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Arg	Ala	
			710						715						720	
GAA	CAG	AGA	CAG	GCT	GCT	AAG	GAT	GCC	GTT	GCT	GCA	GCT	GCT	GGG	GAT	2712
Glu	Gln	Arg	Gln	Ala	Ala	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Asp	
		725					730								735	

第1A

GCT	TTG	AAA	GAA	TTA	GAC	AAC	AAG	GCG	ACA	GAA	GCA	AAA	GAA	AAA	ATT	2760
Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Asp	Asn	Lys	Ala	Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Ile	
	740					745					750					
GAT	AAA	GCT	ACG	ACG	GCC	TCA	GAA	ATC	AAT	GAT	GCT	AAG	ACT	AAT	GGT	2808
Asp	Lys	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Glu	Ile	Asn	Asp	Ala	Lys	Thr	Asn	Gly	
755					760					765					770	
GAG	ATT	AAT	CTG	GAC	AGT	GCA	GAA	GCA	GTA	GGC	GAA	AAA	GCT	ATT	AAC	2856
Glu	Ile	Asn	Leu	Asp	Ser	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Glu	Lys	Ala	Ile	Asn	
				775					780					785		
CAG	TCG	AAG	CGC	AAT	CGG	CAG	AGG	ACA	AAG	GCG	TAG	GT	TCA	ATC	GCC	2903
Gln	Ser	Lys	Arg	Asn	Arg	Gln	Arg	Thr	Lys	Ala	-					
			790					795								
CA	GTC	GAA	GCG	CAA	TCG	GCA	GAG	GAC	AAA	GGC	GTA	GGT	TCA	ATC	GCC	2903
Val	Glu	Ala	Gln	Ser	Ala	Glu	Asp	Lys	Gly	Val	Gly	Ser	Ile	Ala		
CAA	GAT	GTT	CTT	GAC	GCA	GCG	AAA	CAA	GAT	GCT	AAG	AAT	AAG	ATT	GCT	2951
Gln	Asp	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Lys	Gln	Asp	Ala	Lys	Asn	Lys	Ile	Ala	
AAA	GAA	TCC	GAC	GCT	GCT	AAG	TCA	GCC	ATT	GAC	GCG	AAT	CCA	AAC	TTG	2999
Lys	Glu	Ser	Asp	Ala	Ala	Lys	Ser	Ala	Ile	Asp	Ala	Asn	Pro	Asn	Leu	
ACA	GAT	GCA	GAG	AAG	GAA	TCA	GCT	AAG	AAA	GCG	GTA	GAT	GCA	GAT	GCT	3047
Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Glu	Ser	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Asp	Ala	Asp	Ala	
AAA	GCT	GCG	ACA	GAT	GCA	ATT	GAT	GCT	TCA	ACA	AGT	CCA	GTC	GAA	GCG	3095
Lys	Ala	Ala	Thr	Asp	Ala	Ile	Asp	Ala	Ser	Thr	Ser	Pro	Val	Glu	Ala	
CAA	TCG	GCA	GAG	GAC	AAA	GGC	GTA	GGC	GCC	ATC	GCC	AAA	GAC	ATT	CTT	3143
Gln	Ser	Ala	Glu	Asp	Lys	Gly	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Lys	Asp	Ile	Leu	
GAT	GCC	GCG	AAA	CAA	GAT	GCT	AAG	AAC	AAG	ATT	GCT	AAA	GAG	GCA	GAA	3191
Asp	Ala	Ala	Lys	Gln	Asp	Ala	Lys	Asn	Lys	Ile	Ala	Lys	Glu	Ala	Glu	
TCC	GCT	AAG	TCA	GTC	ATT	GAC	TCC	AAT	CCG	AAC	TTG	ACA	GAT	GCA	GCT	3239
Ser	Ala	Lys	Ser	Val	Ile	Asp	Ser	Asn	Pro	Asn	Leu	Thr	Asp	Ala	Ala	
AAG	GAA	GCG	GCT	AAA	TCT	GAA	ATT	GAT	AAA	GCT	GTT	GAG	GAA	GCG	ATT	3287
Lys	Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Asp	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	
GTT	TTA	ATC	AAT	GGT	GTT	AGA	ACT	TAT	CAA	GAG	TTG	GAA	AAA	ATC	AAA	3335
Val	Leu	Ile	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Tyr	Gln	Glu	Leu	Glu	Lys	Ile	Lys	
CTT	CCA	ATG	GCA	GCT	CTA	ATT	AAA	CCA	GCT	GCG	AAA	GTA	ACA	CCA	GTG	3383
Leu	Pro	Met	Ala	Ala	Leu	Ile	Lys	Pro	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Pro	Val	
GTT	GAT	CCA	AAT	AAC	TTG	ACT	GAA	AAA	GAA	ATT	GCT	CGT	ATC	AAG	GCA	3431
Val	Asp	Pro	Asn	Asn	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Ala	
TTC	CTT	AAA	GAG	AAC	AAT	AAC	CTC	CCA	TAA	GGA	ACA	GAG	ATT	AAT	GTT	3479
Phe	Leu	Lys	Glu	Asn	Asn	Asn	Leu	Pro	-	Gly	Thr	Glu	Ile	Asn	Val	
TCT	AAA	GAT	GCT	TCA	GTG	ACA	ATT	AAA	TAT	CCA	GAT	GGA	ACT	ATT	GAT	3527
Ser	Lys	Asp	Ala	Ser	Val	Thr	Ile	Lys	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	

TTGAACA	ACT	TAAACTAGT	TAGTTTTGTT	TAAAATGTAA	TTGAATTGTC	TTTTTAAGTA	60
GGCTGTTTAC	ACGATAITTTG	TCTTCCTTTA	TATAAATATG	ATAGATTTTC	AGTAAATTTT	120	
TCAAAAAAAC	CTCAAAAATA	ACAGATTTTT	TCTTGTATCT	TTGAGGCATA	AGGAGTATAA	180	
IGGTGACGGT	ATTCAAGTAG	AAATTTTATA	TACTCTTGAT	GAAAACATTC	TGTCTACTTT	240	
AAAATAAATA	ATCTACTGGG	TATCCTTCTG	CTAAGTTTTT	AAAGCAGGAG	GTGTGTTTTT	300	
GTACATGGTG	TTACAGGAAC	CAGAAATGAT	CGATTGCGCA	GTAAAATATA	GGAGGATATC	360	
ATG TCT TAT AAA GAT ATG TTC AGA AAA GAA CAA CGT TTT TCT TTT CGT	408						
Met Ser Tyr Lys Asp Met Phe Arg Lys Glu Gln Arg Phe Ser Phe Arg							
-45 -40 -35							
AAA TTT AGC TTT GGT CTA GCT TCG GCA GTC ATT GCA AAC GTT ATT TTG	456						
Lys Phe Ser Phe Gly Leu Ala Ser Ala Val Ile Ala Asn Val Ile Leu							
-30 -25 -20 -15							
GGA GGA GCA ATC GCA AAC AGC CCT GTT GTT CAT GCT AAC ACA GTG ACA	504						
Gly Gly Ala Ile Ala Asn Ser Pro Val Val His Ala Asn Thr Val Thr							
-10 -5 1							
GAA GCA GAG ACA GCT GTA GCA CCA GCT AAC CAA GAC CTT GGA AAT GAG	552						
Glu Ala Glu Thr Ala Val Ala Pro Ala Asn Gln Asp Leu Gly Asn Glu							
5 10 15							
ACT AAA ACG GAA GAA GAA CCC AAG GAA CCA ATC GAA GCA GTT CGC ACG	600						
Thr Lys Thr Glu Glu Glu Pro Lys Glu Pro Ile Glu Ala Val Arg Thr							
20 25 30							
GAC ATG GAA AAC CGT GCA GCT GAA ATC TTG CCG GAG GCG CTG AAT GCT	648						
Asp Met Glu Asn Arg Ala Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ala Leu Asn Ala							
35 40 45 50							

图1B

AGT GTA ACA AAC CAA GCA CCA GTT ATT CCG ACT ATT GGA GAT CTT CCT 696
 Ser Val Thr Asn Gln Ala Pro Val Ile Pro Thr Ile Gly Asp Leu Pro
 55 60 65

AAA GAT GCG AGT GGT CAG AAT GTT CAT GGT AAG GCA ACG GAT AAT AAG 744
 Lys Asp Ala Ser Gly Gln Asn Val His Gly Lys Ala Thr Asp Asn Lys
 70 75 80

ATT TAT CGT GTT GTA TAC GTT TTT GGT AAT GTA GCA GGG ACT ACG GAG 792
 Ile Tyr Arg Val Val Tyr Val Phe Gly Asn Val Ala Gly Thr Thr Glu
 85 90 95

ACA GAA GAT GGT AAA CAA AAT GTT GCT CCA ACA TTT AAC AGA AAT GAT 840
 Thr Glu Asp Gly Lys Gln Asn Val Ala Pro Thr Phe Asn Arg Asn Asp
 100 105 110

GCA ACT AAA ACT TTT CCA ATC ACA GAT CCA GAT AGC GAC ATT CAA ACT 888
 Ala Thr Lys Thr Phe Pro Ile Thr Asp Pro Asp Ser Asp Ile Gln Thr
 115 120 125 130

ATT TCA TAC GAA GTT CCA GCT GAT ATT GCA AGC TAT ACC TTG GAT GAT 936
 Ile Ser Tyr Glu Val Pro Ala Asp Ile Ala Ser Tyr Thr Leu Asp Asp
 135 140 145

CCA AAC TCA ATT GTT ACT AAT GGC ACC TCA CCT GGT CCA GTA TCT TAC 984
 Pro Asn Ser Ile Val Thr Asn Gly Thr Ser Pro Gly Pro Val Ser Tyr
 150 155 160

TTA GAT GGT CCA AAT GGG TCA GCC ACT CTC ACA CAA GAT GGT TAT CTA 1032
 Leu Asp Gly Pro Asn Gly Ser Ala Thr Leu Thr Gln Asp Gly Tyr Leu
 165 170 175

ACA GGA AGT TTC CCT TGG GGA GCA GGA GAC CTA GCT GGT CGT CGG ATT 1080
 Thr Gly Ser Phe Pro Trp Gly Ala Gly Asp Leu Ala Gly Arg Arg Ile
 180 185 190

AAA GTG ACG GAT GCC ACT GGT AAT ACT ACT AAG AGT AAT CCG TTC TAT 1128
 Lys Val Thr Asp Ala Thr Gly Asn Thr Thr Lys Ser Asn Pro Phe Tyr
 195 200 205 210

ATG GTT GCA TAT ACA GTC AAG CCA GTA GAT GAT AAA CCT CTA GCA GTA 1176
 Met Val Ala Tyr Thr Val Lys Pro Val Asp Asp Lys Pro Leu Ala Val
 215 220 225

TCA AAC TCT TCT GAG CTG ACG GAA CAG GCT ATT TTT GAT AAG TTG GTT 1224
 Ser Asn Ser Ser Glu Leu Thr Glu Gln Ala Ile Phe Asp Lys Leu Val
 230 235 240

GTC GAT AAG TCT GCT AAA ACA ACT TCA AAT AGC GCT CTT GTA ATT GAT 1272
 Val Asp Lys Ser Ala Lys Thr Thr Ser Asn Ser Ala Leu Val Ile Asp
 245 250 255

TCT AGC AAC TAC AAA CAT TCA ATT GCA GGT TAT CGT ACC GTA AAT TCT 1320
 Ser Ser Asn Tyr Lys His Ser Ile Ala Gly Tyr Arg Thr Val Asn Ser
 260 265 270

GAT GGC ACA AAA ACA GAA ACA GTA GAG GAA ACA AAT CTA TCT GAT TTC 1368
 Asp Gly Thr Lys Thr Glu Thr Val Glu Glu Thr Asn Leu Ser Asp Phe
 275 280 285 290

CCA ACT GAA GGT AAA TAC GAA GTT CGA GTA AAA ACA ACC AAT GTT TAC 1416
 Pro Thr Glu Gly Lys Tyr Glu Val Arg Val Lys Thr Thr Asn Val Tyr
 295 300 305

GGT CAA ACT ATC TAC AAC TGG ATT CCT GTA AAT GCC TAT AAG TTG GAC 1464
 Gly Gln Thr Ile Tyr Asn Trp Ile Pro Val Asn Ala Tyr Lys Leu Asp
 310 315 320

ACA GCG AAG GAT GCT GAA ATT CGG AAG TAT ACA GAC AAC CAA GCC CCA 1512
 Thr Ala Lys Asp Ala Glu Ile Arg Lys Tyr Thr Asp Asn Gln Ala Pro
 325 330 335

ATT CAT GCT ATA ATG CAA ATT GGT CAA GCT GGA GAA AAG GCA GCA GTT 1560
 Ile His Ala Ile Met Gln Ile Gly Gln Ala Gly Glu Lys Ala Ala Val
 340 345 350

ATA TTG AAG GAT ATT CCA TCC GAT TTC AGT ATT GAA AAC TTC AAT TTG 1608
 Ile Leu Lys Asp Ile Pro Ser Asp Phe Ser Ile Glu Asn Phe Asn Leu
 355 360 365 370

AAA GAT GGT GTA GCA GAT GAG CTT GCT AAA CGT AAC TTG GAA TTT GTA 1656
 Lys Asp Gly Val Ala Asp Glu Leu Ala Lys Arg Asn Leu Glu Phe Val
 375 380 385

AGA AAT GAT GCA GTG GCG ACA ACT GAT ACT GAT GGA GAT GGC GCC AAA 1704
 Arg Asn Asp Ala Val Ala Thr Thr Asp Thr Asp Gly Asp Gly Ala Lys
 390 395 400

GAA GGA ATT GTT GGA TAT ATT CAA CCA AAA ACT GGC GGT GCA AAC AGT 1752
 Glu Gly Ile Val Gly Tyr Ile Gln Pro Lys Thr Gly Gly Ala Asn Ser
 405 410 415

GGG GTA GCC ACT TAT ACA GGA TCA AAT AAT CTT ACT TAT GGC TTC ACT 1800
 Gly Val Ala Thr Tyr Thr Gly Ser Asn Asn Leu Thr Tyr Gly Phe Thr
 420 425 430

TAC AAA GCT GTT GAG ACA AAA GAT AAG GCG AAT GCC ACA GAG GCT AAA 1848
 Tyr Lys Ala Val Glu Thr Lys Asp Lys Ala Asn Ala Thr Glu Ala Lys
 435 440 445 450

ACT CTC GAA TTA GAT TAC ACC ATC TTA TTC ATA GAT ACT AAA GCA CCA 1896
 Thr Leu Glu Leu Asp Tyr Thr Ile Leu Phe Ile Asp Thr Lys Ala Pro
 455 460 465

GTC ATG ACA CCT AAA TCA GAG TAC ATC CGT TTT GTT GGT GAA GAG TAT 1944
 Val Met Thr Pro Lys Ser Glu Tyr Ile Arg Phe Val Gly Glu Glu Tyr
 470 475 480

ACG GTT AGC GTC CCA GGT ACG GAT AAC GCC TTC CTT AAT ACC GGC AAA 1992
 Thr Val Ser Val Pro Gly Thr Asp Asn Ala Phe Leu Asn Thr Gly Lys
 485 490 495

71213

CTA	AAT	GGA	ACT	CTC	TCA	ATT	TTG	AAA	GAT	GGA	GAG	TCA	GGT	TCT	CTT	2040
Leu	Asn	Gly	Thr	Leu	Ser	Ile	Leu	Lys	Asp	Gly	Glu	Ser	Gly	Ser	Leu	
	500						505					510				
GTA	TCA	TCA	GAC	TTA	GGT	ACA	AAC	ACT	AAG	ATT	ACT	TCA	GAA	CTG	GAT	2088
Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Thr	Asn	Thr	Lys	Ile	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	
	515					520				525					530	
CCT	ACG	GGA	GCA	ACT	GCA	AAC	CAA	GGA	GAT	GAC	GGT	CAA	TCT	TCA	ACT	2136
Pro	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Gly	Gln	Ser	Ser	Thr	
				535						540					545	
AAG	TTT	AAC	GTT	AAG	ATT	ACA	GGT	ACC	GGA	CCT	GCT	ACA	GAA	GGT	ACC	2184
Lys	Phe	Asn	Val	Lys	Ile	Thr	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Thr	Glu	Gly	Thr	
			550					555						560		
GGC	ACT	TAT	AAG	CTT	CGT	GTT	GGA	GAA	GAT	AAC	TAT	CCT	TTT	GGT	CCA	2232
Gly	Thr	Tyr	Lys	Leu	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Asn	Tyr	Pro	Phe	Gly	Pro	
		565					570						575			
GAG	GGG	AAA	CTT	GTT	GAT	GGA	AAT	AAA	CCA	GAA	AAT	GTA	GGT	TTG	ACA	2280
Glu	Gly	Lys	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Gly	Leu	Thr	
	580					585						590				
TCT	GTA	AAA	GTT	ACC	TTC	GTA	AAA	CAT	GCT	ACG	GTG	TCA	ACA	CCA	GTT	2328
Ser	Val	Lys	Val	Thr	Phe	Val	Lys	His	Ala	Thr	Val	Ser	Thr	Pro	Val	
	595				600						605				610	
TCT	GTT	GAA	AAT	CCA	GCT	AAC	TTA	ACG	CCA	GAA	GAA	AAA	GCC	GCA	GTT	2376
Ser	Val	Glu	Asn	Pro	Ala	Asn	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	
				615						620					625	
ATT	GCT	CAA	ATC	AAG	AAA	GAC	AAC	GCA	GAC	AAC	GAA	AGA	TTG	AAG	GGC	2424
Ile	Ala	Gln	Ile	Lys	Lys	Asp	Asn	Ala	Asp	Asn	Glu	Arg	Leu	Lys	Gly	
			630					635							640	
TTG	CCA	GAT	TCA	GCA	TTT	ACA	GTT	AAC	TCA	GAT	GGT	ACT	GTG	TCA	GTT	2472
Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	Thr	Val	Ser	Val	
		645						650					655			
GAC	TAC	AGT	GCC	GGT	GGT	GTC	AAT	GTT	GAT	GGT	GCG	ACA	GAC	ATT	ATT	2520
Asp	Tyr	Ser	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Val	Asp	Gly	Ala	Thr	Asp	Ile	Ile	
	660					665						670				
AAG	AAT	GCT	ACC	ACA	AAC	TTG	GCA	GAT	ACA	CGG	AAT	GAA	GCA	AAA	GCA	2568
Lys	Asn	Ala	Thr	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Thr	Arg	Asn	Glu	Ala	Lys	Ala	
	675					680					685				690	
GAA	ATC	GAC	ACA	AAA	TTA	GCT	GAA	CAT	AAA	AAA	GCT	ATC	GAA	GCA	AAA	2616
Glu	Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Ala	Glu	His	Lys	Lys	Ala	Ile	Glu	Ala	Lys	
				695						700					705	
CGG	GAT	GAA	GCG	TTT	TCT	AAA	ATT	GAT	GAT	GAC	ATT	TCC	TTG	AGA	GCA	2664
Arg	Asp	Glu	Ala	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Arg	Ala	
			710							715					720	

15

GAA CAG AGA CAG GCT GCT AAG GAT GCC GTT GCT GCA GCT GCT GGG GAT	2712
Glu Gln Arg Gln Ala Ala Lys Asp Ala Val Ala Ala Ala Ala Gly Asp	
725 730 735	
GCT TTG AAA GAA TTA GAC AAC AAG GCG ACA GAA GCA AAA GAA AAA ATT	2760
Ala Leu Lys Glu Leu Asp Asn Lys Ala Thr Glu Ala Lys Glu Lys Ile	
740 745 750	
GAT AAA GCT ACG ACG GCC TCA GAA ATC AAT GAT GCT AAG ACT AAT GGT	2808
Asp Lys Ala Thr Thr Ala Ser Glu Ile Asn Asp Ala Lys Thr Asn Gly	
755 760 765 770	
GAG ATT AAT CTG GAC AGT GCA GAA GCA GTA GGC GAA AAA GCT ATT AAC	2856
Glu Ile Asn Leu Asp Ser Ala Glu Ala Val Gly Glu Lys Ala Ile Asn	
775 780 785	
CAG GCG AAG GAA AAA GAA CTG GCA AAA GCA GAA GTT GAA AAC AAA GCA	2904
Gln Ala Lys Glu Lys Glu Leu Ala Lys Ala Glu Val Glu Asn Lys Ala	
790 795 800	
TTC GAG GCA TTG GAA AAA GTT AAC AAT AAT CCA AAC TTG TTA GAA GAA	2952
Phe Glu Ala Leu Glu Lys Val Asn Asn <u>Asn Pro Asn Leu</u> Leu Glu Glu	
805 810 815	
GAG AAA AAA GCA TAC TTT GAT GAT ATT AAA GAA TCT AAA GAA GTT GCA	3000
Glu Lys Lys Ala Tyr Phe Asp Asp Ile Lys Glu Ser Lys Glu Val Ala	
820 825 830	
GTT GAG AAA ATC AAT AAT GCT GAA AAT ACT GCT GAA ATT ACG GCA GCA	3048
Val Glu Lys Ile Asn Asn Ala Glu Asn Thr Ala Glu Ile Thr Ala Ala	
835 840 845 850	
ATT GAC GAA GCG GAA ATT GCA TAC AAT GAA GAT GTT ATT AAC GCA GCC	3096
Ile Asp Glu Ala Glu Ile Ala Tyr Asn Glu Asp Val Ile Asn Ala Ala	
855 860 865	
CAA CTT GAT GCT TTG AAT AAG CTT GAA AAA GAT AGC GAA GAA ACT AAG	3144
Gln Leu Asp Ala Leu Asn Lys Leu Glu Lys Asp Ser Glu Glu Thr Lys	
870 875 880	
GCA GCT ATT GAT GCT AAT CCA AAC TTA ACT CCG GAA GAG AAA GCG AAA	3192
Ala Ala Ile Asp Ala <u>Asn Pro Asn Leu</u> Thr Pro Glu Glu Lys Ala Lys	
885 890 895	
GCT ATT GCT AAG GTA GAA GAG CTT GTT AAT AAT GCT GAA TCT GAC ATT	3240
Ala Ile Ala Lys Val Glu Glu Leu Val Asn Asn Ala Glu Ser Asp Ile	
900 905 910	
TTG TCG AAG CCT ACC CCA GAA ACA GTT CAA GCA GTG GAG GAT AAG GCT	3288
Leu Ser Lys Pro Thr Pro Glu Thr Val Gln Ala Val Glu Asp Lys Ala	
915 920 925 930	
GAC AAA GAT CTT GCC AAA GTA GAA CTT CAA GCA GCA GCA GAC GGT GCG	3336
Asp Lys Asp Leu Ala Lys Val Glu Leu Gln Ala Ala Ala Asp Gly Ala	
935 940 945	

(2)15

AAG AAA GGC ATT GAA GCA AAT CCG AAT TTG ACT CCA GAA GAG AAA GAT 3384
Lys Lys Gly Ile Glu Ala Asn Pro Asn Leu Thr Pro Glu Glu Lys Asp
950 955 960

GTA GCT AAG AAG GCA GTA GAA GAC GCG GTT AAG GTG GCG ACA GAC GCT 3432
Val Ala Lys Lys Ala Val Glu Asp Ala Val Lys Val Ala Thr Asp Ala
965 970 975

ATT GAT AAG GCG TCA ACT CCA ACC GAA GTT GAC ACA GCG ACA AGC GAT 3480
Ile Asp Lys Ala Ser Thr Pro Thr Glu Val Asp Thr Ala Thr Ser Asp
980 985 990

GGA GTG AAG GCT ATT GAT GCA GAA GAG TTT AAA GCT ACT CAG AAA GAT 3528
Gly Val Lys Ala Ile Asp Ala Glu Glu Phe Lys Ala Thr Gln Lys Asp
995 1000 1005 1010

GCT AAG AAC AAG ATT GCC AAA GAA GCA GAA TCA GCT AAG AAA GCG ATT 3576
Ala Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu Ala Glu Ser Ala Lys Lys Ala Ile
1015 1020 1025

GAC GAC AAT CCA AAC TTG ACT CCA GAT GAG AAG GAA TCA GCT AAG AAT 3624
Asp Asp Asn Pro Asn Leu Thr Pro Asp Glu Lys Glu Ser Ala Lys Asn
1030 1035 1040

GCA GTG GAA GAG GCG GCT AAG GTA GCA ACA GCC GCT ATT GAT AAA GCA 3672
Ala Ser Glu Glu Ala Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Ile Asp Lys Ala
1045 1050 1055

TCA ACT CCA GAT GCA GTT CAA GTA GAA GAG GAC AAA GGT GTA GCA GCT 3720
Ser Thr Pro Asp Ala Val Gln Val Glu Glu Asp Lys Gly Val Ala Ala
1060 1065 1070

ATC AAT TTG ATT ACT GCC AAG GCA GAT GCT AAA GGT GTC ATT GCT GCT 3768
Ile Asn Leu Ile Thr Ala Lys Ala Asp Ala Lys Gly Val Ile Ala Ala
1075 1080 1085 1090

AAG TTG GCA GAT GAA ATC AAG AAG CTC GAA GAT AAG CAA GCA GAA GCA 3816
Lys Leu Ala Asp Glu Ile Lys Lys Leu Glu Asp Lys Gln Ala Glu Ala
1095 1100 1105

GAA AAA GCT ATC GAT GCG TCA ACT ATG ACT AAT GAG GAG AAA GCA ATC 3864
Glu Lys Ala Ile Asp Ala Ser Thr Met Thr Asn Glu Glu Lys Ala Ile
1110 1115 1120

GCT AAG AAG GCT CTT CAA GAT GTT GTA GAT AAA GGA AAA GCA GAG CTT 3912
Ala Lys Lys Ala Leu Gln Asp Val Val Asp Lys Gly Lys Ala Glu Leu
1125 1135 1135

GAA GAC GCA GCT AGG GTA GCA ACA AAT GAG ATT CAT GAA GCT ACT ACT 3960
Glu Asp Ala Ala Arg Val Ala Thr Asn Glu Ile His Glu Ala Thr Thr
1140 1145 1150

ACA GAA AAA GCG AAA GCG GCG GAA CTT GCT GGC GAA AAG AGC TTG ACA 4008
Thr Glu Lys Ala Lys Ala Ala Glu Leu Ala Gly Glu Lys Ser Leu Thr
1155 1165 1165 1170

第113

GAC ACA GGT AAA GAA GCT AGA GAT GCA GTT GAA TTG GCT AAG GAT AAA Asp Thr Gly Lys Glu Ala Arg Asp Ala Val Glu Leu Ala Lys Asp Lys	4056
1175 1180 1185	
GAA TTA GCT AAG GAA GCA ATC CGA ACA GAA GAA GAA GAA GCT ACT AAA Glu Leu Ala Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Glu Glu Glu Ala Thr Lys	4104
1190 1195 1200	
ATA GTA GAG AAA CTT GCA GAA GAT ACG CGC AAA GCT ATC GAG GAC AAT Ile Val Glu Lys Leu Ala Glu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Glu Asp <u>Asn</u>	4152
1205 1210 1215	
CCA AAC TTG TCA GAT GAA GAT AAG CAA GCG GAA ATT AAA AAG CTA ACT <u>Pro Asn Leu</u> Ser Asp Glu Asp Lys Gln Ala Glu Ile Lys Lys Leu Thr	4200
1220 1225 1230	
GAC GCT GTG GCA AAA ACT TTA GCA ACC ATT CGT GAC AAT GCA GAT AAG Asp Ala Val Ala Lys Thr Leu Ala Thr Ile Arg Asp Asn Ala Asp Lys	4248
1235 1240 1245 1250	
CGT ACG CAA GAA GCA GAA AAA GCT CAA GCC CTA GCA GAT CTT GAA AAA Arg Thr Gln Glu Ala Glu Lys Ala Gln Ala Leu Ala Asp Leu Glu Lys	4296
1255 1260 1265	
GCT AAA GAA ACA CAG AAA ATT GCA GAT AAA GCT GCG ATT GAT AGG TTG Ala Lys Glu Thr Gln Lys Ile Ala Asp Lys Ala Ala Ile Asp Arg Leu	4344
1270 1275 1280	
ACT ATA CTT GTG AAA GAT GGT GAG CTT GAA GCT ACT AAA CAA GAT GCT Thr Ile Leu Val Lys Asp Gly Glu Leu Glu Ala Thr Lys Gln Asp Ala	4392
1285 1290 1295	
AAG AAC AAG ATT GCT AAA GAT GCA GCC GCT GCT AAA GAA GCA ATT GCA Lys Asn Lys Ile Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ile Ala	4440
1300 1305 1310	
AGC AAT CCA AAC TTG ACA GAC GCA GAG AAG AAA ACC TTC ACC GAT GCG Ser <u>Asn Pro Asn Leu</u> Thr Asp Ala Glu Lys Lys Thr Phe Thr Asp Ala	4488
1315 1320 1325 1330	
GTA GAT GCA GAA GTA GCC AAA GCT AAC GAC GCA ATT TCA GCT GCA ACC Val Asp Ala Glu Val Ala Lys Ala Asn Asp Ala Ile Ser Ala Ala Thr	4536
1335 1340 1345	
AGC CCA GCA GAT GTT CAA AAA GAA GAG GAT GCA GGT GTT GCA GCC ATT Ser Pro Ala Asp Val Gln Lys Glu Glu Asp Ala Gly Val Ala Ala Ile	4584
1350 1355 1360	
GCA GAA GAT GTT CTT GAC GCA GCT AAA CAA GAT GCT AAG AAT AAG ATT Ala Glu Asp Val Leu Asp Ala Ala Lys Gln Asp Ala Lys Asn Lys Ile	4632
1365 1370 1375	
GCT AAA GAT GCA GCC GCT GCT AAA GAA GCA ATT GGC TCC AAT CCA AAC Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ile Gly Ser <u>Asn Pro Asn</u>	4680
1380 1385 1390	

第15

TTG ACA GAC GCA GAG AAG AAA ACC TTC ACC GAT GCG GTA GAT GCA GAA	4728
<u>Leu Thr Asp Ala Glu Lys Lys Thr Phe Thr Asp Ala Val Asp Ala Glu</u>	
1395 1400 1405 1410	
GTA GCC AAA GCT AAC GAC GCA ATT TCA GCT GCA ACC AGC CCA GCA GAT	4776
Val Ala Lys Ala Asn Asp Ala Ile Ser Ala Ala Thr Ser Pro Ala Asp	
1415 1420 1425	
GTT CAA AAA GAA GAG GAT GCA GGT GTT GCA GCC ATT GCA GAA GAT GTT	4824
Val Gln Lys Glu Glu Asp Ala Gly Val Ala Ala Ile Ala Glu Asp Val	
1430 1435 1440	
CTT GAC GCA GCT AAA CAA GAT GCT AAG AAT AAG ATT GCT AAA GAA TCC	4872
Leu Asp Ala Ala Lys Gln Asp Ala Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu Ser	
1445 1450 1455	
GAC GCT GCT AAG TCA GCC ATT GAC GCG AAT CCA AAC TTG ACA GAT GCA	4920
Asp Ala Ala Lys Ser Ala Ile Asp Ala <u>Asn Pro Asn Leu</u> Thr Asp Ala	
1460 1465 1470	
GAG AAG GAA TCA GCT AAG AAA GCA GTT GAT GCT GAT GCT AAA GCT GCG	4968
Glu Lys Glu Ser Ala Lys Lys Ala Val Asp Ala Asp Ala Lys Ala Ala	
1475 1480 1485 1490	
ACA GAT GCA ATT GAT GCT TCA ACA AGT CCA GTC GAA GCG CAA TCG GCA	5016
Thr Asp Ala Ile Asp Ala Ser Thr Ser Pro Val Glu Ala Gln Ser Ala	
1495 1500 1505	
GAG GAC AAA GGC GTA GGT TCA ATC GCC CAA GAT GTT CTT GAC GCA GCG	5064
Glu Asp Lys Gly Val Gly Ser Ile Ala Gln Asp Val Leu Asp Ala Ala	
1510 1515 1520	
AAA CAA GAT GCT AAG AAC AAG ATT GCC AAA GAA GTT GCC GCA GCT AAA	5112
Lys Gln Asp Ala Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu Val Ala Ala Ala Lys	
1525 1530 1535	
GAA GCA ATT GAT GCC AAT CCG AAC TTA TCA GAT GCA GAG AAG GAA GCT	5160
Glu Ala Ile Asp Ala <u>Asn Pro Asn Leu</u> Ser Asp Ala Glu Lys Glu Ala	
1540 1545 1550	
TCT AAG AAA GCG GTA GAT GCA GAT GCT AAA GCT ACG ACA GAT GCA ATT	5208
Ser Lys Lys Ala Val Asp Ala Asp Ala Lys Ala Thr Thr Asp Ala Ile	
1555 1560 1565 1570	
GAT GCT TCA ACA AGT CCA GTC GAA GCG CAA TCG GCA GAG GAC AAA GGC	5256
Asp Ala Ser Thr Ser Pro Val Glu Ala Gln Ser Ala Glu Asp Lys Gly	
1575 1580 1585	
GTA GGT TCA ATC GCC CAA GAT GTT CTT GAC GCA GCG AAA CAA GAT GCT	5304
Val Gly Ser Ile Arg Gln Asp Val Leu Asp Ala Ala Lys Gln Asp Ala	
1590 1595 1600	
AAG AAT AAG ATT GCT AAA GAA TCC GAC GCT GCT AAG TCA GCC ATT GAC	5352
Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu Ser Asp Ala Ala Lys Ser Ala Ile Asp	
1605 1610 1615	

第11B

GCG AAT CCA AAC TTG ACA GAT GCA GAG AAG GAA TCA GCT AAG AAA GCG Ala <u>Asn Pro Asn Leu</u> Thr Asp Ala Glu Lys Glu Ser Ala Lys Lys Ala 1620 1625 1630	5400
GTA GAT GCA GAT GCT AAA GCT GCG ACA GAT GCA ATT GAT GCT TCA ACA Val Asp Ala Asp Ala Lys Ala Ala Thr Asp Ala Ile Asp Ala Ser Thr 1635 1640 1645 1650	5448
AGT CCA GTC GAA GCG CAA TCG GCA GAG GAC AAA GGC GTA GGC GCC ATC Ser Pro Val Glu Ala Gln Ser Ala Glu Asp Lys Gly Val Gly Ala Ile 1655 1660 1665	5496
GCC AAA GAC ATT CTT GAT GCC GCG AAA CAA GAT GCT AAG AAC AAG ATT Ala Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ala Lys Gln Asp Ala Lys Asn Lys Ile 1670 1675 1680	5544
GCT AAA GAG GCA GAA TCC GCT AAG TCA GTC ATT GAC TCC AAT CCG AAC Ala Lys Glu Ala Glu Ser Ala Lys Ser Val Ile Asp Ser <u>Asn Pro Asn</u> 1685 1690 1695	5592
TTG ACA GAT GCA GCT AAG GAA GCG GCT AAA TCT GAA ATT GAT AAA GCT <u>Leu</u> Thr Asp Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Ser Glu Ile Asp Lys Ala 1700 1705 1710	5640
GTT GAG GAA GCG ATT GTT TTA ATC AAT GGT GTT AGA ACT TAT CAA GAG Val Glu Glu Ala Ile Val Leu Ile Asn Gly Val Arg Thr Tyr Gln Glu 1715 1720 1725 1730	5688
TTG GAA AAA ATC AAA CTT CCA ATG GCA GCT CTA ATT AAA CCA GCT GCG Leu Glu Lys Ile Lys Leu Pro Met Ala Ala Leu Ile Lys Pro Ala Ala 1735 1740 1745	5736
AAA GTA ACA CCA GTG GTT GAT CCA AAT AAC TTG ACT GAA AAA GAA ATT Lys Val Thr Pro Val Val Asp Pro Asn Asn Leu Thr Glu Lys Glu Ile 1750 1755 1760	5784
GCT CGT ATC AAG GCA TTC CTT AAA GAG AAC AAT AAC CTC CCA TAA Ala Arg Ile Lys Ala Phe Leu Lys Glu Asn Asn Asn Leu Pro - 1765 1770 1775	5829
GGAACAGAGA TTAATGTTTC TAAAGATGCT TCAGTGACAA TTAAATATCC AGATGGAAC T 5889 ATTGATTTGC TATCACCAGT AGAAGTTGTG AAGCAGGCAG ATAAAACTGC TCCTACGGTC 5949 GCAAATGATG GCAAAGGTAA TATTGTGATT GTACCGTCTG AAAAAGCTGT TGAGCTTGTT 6009 GTTTCATACG TAGATAACAA TGGTAAGTCG CAAACTGTAG TTGTTACGAA AGGTACGGAT 6069 GGTTTATGGA CAGCAAGTAA TACAGTGCTG ATTGTGGACC CTGTGACTGG GCAAGTAATC 6129 GTTCCAGGTT CTGTTATTAA GCCAGGTACA GTTGTACAG CATACTCTAA AGACGAGGTT 6189 GGAAATAGTT CTGATTCAGC AGAAGCTGAA GTTGTAGCAG TAGACGAAAA TAATTCTGCA 6249 GCAGGAGTGA AAGTTAAATC AGTTACTACA AATGCTAATA ATGTTGAGAA GAAAGCTAAG 6309 CAATTACCGA ATACTGGTGA GGAAGCAAAT TCAGCAACTT CACTCGGATT AGTAGCTCTT 6369 GGACTCGGAT TAGCACTTCT TGCAGCAAAG AGAAGAAGAG ACGAAGAAGC TTAAGATAAG 6429 CTCTTCCTCA GAACTCTTTT GGAAGCCGCA ATTTTCCTAG AAGATAGTAG TATGATACTC 6489 TTTCATAGCA AGGAAATTCC CTCGCTATGA TTGGTAGGTA TCAGTTATTA TCTATCGAAC 6549 <u>CCCCAAAATC CAAAGTCATT CGACTTTTGA TTTTTTTGAT</u> ACGACATGCT CGTCATACCT 6609 <u>AAAAACAGC CTCTCTTTGC CGAGAGGCTG TTTTTCATGC</u> TTTTAATCTA AAAGTCTGGC 6669 GACGTTTTTT CAATAAAATC CAGTAACCGA TGCTAACATA GGCAATCATA GCTAGGGAAA 6729 CCAGCAGGAT ATAGG 6744	



GAATTCATAA TGTTTTTTTG AGGAATTTTA TAATATTACT TGGCATTTAA AGTTATTTGT	60
AGTATAATAC CTCGAATGAT TGCCGGGAGTT TTCAAGGCTT TGATACAAAG AGTAGAAAAT	120
TTGTGTAATT AAATTAATAT TTATATGGGG GATTTTTT	158
ATG CGT AGA TCA AAT AAA AAA TCA TTT GAC TGG TAC GGT ACG AAA CAA	206
Met Arg Arg Ser Asn Lys Lys Ser Phe Asp Trp Tyr Gly Thr Lys Gln	
-45 -40 -35	
CAA TTT TCG ATT CGT AAG TAT CAT TTT GGG GCA GCA AGC GTT TTG CTT	254
Gln Phe Ser Ile Arg Lys Tyr His Phe Gly Ala Ala Ser Val Leu Leu	
-30 -25 -20	
GGT GTG TCG TTA GTT TTA GGT GCT GGT GCA CAG GTT GTT AAG GCT GAT	302
Gly Val Ser Leu Val Leu Gly Ala Gly Ala Gln Val Val Lys Ala Asp	
-15 -10 -5 1	
GAA ACT GTT GCT TCA TCA GAA CCA ACT ATT GCC AGT AGT GTA GCG CCT	350
Glu Thr Val Ala Ser Ser Glu Pro Thr Ile Ala Ser Ser Val Ala Pro	
5 10 15	
GCT TCA ACA GAA GCG GTT GCA GAA GAA GCA GAA AAA ACA AAT GCT GAA	398
Ala Ser Thr Glu Ala Val Ala Glu Glu Ala Glu Lys Thr Asn Ala Glu	
20 25 30	
AAT ACG AGT GCA GTA GCT ACG ACT TCA ACA GAA GTT GAA AAA GCG AAA	446
Asn Thr Ser Ala Val Ala Thr Thr Ser Thr Glu Val Glu Lys Ala Lys	
35 40 45	
GCT GTT CTT GAA CAG GTA ACA TCA GAA TCA CCA CTT TTG GCT GGT CTT	494
Ala Val Leu Glu Gln Val Thr Ser Glu Ser Pro Leu Leu Ala Gly Leu	
50 55 60 65	

图2.

①②③④

GGT Gly	CAA Gln	AAA Lys	GAG Glu	TTG Leu	GCT Ala	AAA Lys	ACT Thr	GAA Glu	GAT Asp	GCA Ala	ACT Thr	CTT Leu	GCA Ala	AAA Lys	GCT Ala	542
			70					75						80		
ATA Ile	GAG Glu	GAT Asp	GCT Ala	CAA Gln	ACA Thr	AAA Lys	CTT Leu	GCA Ala	GCA Ala	GCT Ala	AAG Lys	GCA Ala	ATT Ile	TTG Leu	GCT Ala	590
			85					90						95		
GAC Asp	TCA Ser	GAA Glu	GCA Ala	ACT Thr	GTT Val	GAG Glu	CAA Gln	GTT Val	GAA Glu	GCG Ala	CAA Gln	GTC Val	GCA Ala	GCG Ala	GTT Val	638
		100						105						110		
AAA Lys	GTA Val	GCC Ala	AAC Asn	GAG Glu	GCG Ala	CTA Leu	GGG Gly	AAT Asn	GAA Glu	TTG Leu	CAA Gln	AAA Lys	TAC Tyr	ACT Thr	GTA Val	686
		115				120								125		
GAT Asp	GGT Gly	CTC Leu	TTG Leu	ACA Thr	GCG Ala	GCT Ala	CTT Leu	GAT Asp	ACA Thr	GTA Val	GCA Ala	CCT Pro	GAT Asp	ACA Thr	ACT Thr	734
130						135					140				145	
GCA Ala	TCA Ser	ACA Thr	TTG Leu	AAA Lys	GTT Val	GGT Gly	GAT Asp	GGC Gly	GAA Glu	GGT Gly	ACC Thr	CTT Leu	CTA Leu	GAT Asp	AGC Ser	782
				150					155					160		
ACT Thr	ACA Thr	ACA Thr	GCA Ala	ACG Thr	CCT Pro	TCA Ser	ATG Met	GCT Ala	GAG Glu	CCA Pro	AAT Asn	GGT Gly	GCA Ala	GCA Ala	ATT Ile	830
				165				170						175		
GCT Ala	CCA Pro	CAT His	ACA Thr	CTT Leu	CGA Arg	ACT Thr	CAA Gln	GAT Asp	GGA Gly	ATT Ile	AAA Lys	GCG Ala	ACA Thr	TCA Ser	GAG Glu	878
		180						185						190		
CCA Pro	AAT Asn	TGG Trp	TAT Tyr	ACT Thr	TTT Phe	GAA Glu	TCG Ser	TAC Tyr	GAT Asp	TTG Leu	TAC Tyr	TCA Ser	TAT Tyr	AAT Asn	AAA Lys	926
		195				200						205				
AAT Asn	ATG Met	GCT Ala	AGC Ser	TCA Ser	ACT Thr	TAT Tyr	AAA Lys	GGA Gly	GCT Ala	GAA Glu	GTT Val	GAT Asp	GCC Ala	TAC Tyr	ATT Ile	974
210						215				220					225	
CGT Arg	TAC Tyr	TCT Ser	TTG Leu	GAT Asp	AAT Asn	GAT Asp	TCG Ser	TCA Ser	ACA Thr	ACT Thr	GCT Ala	GTT Val	TTA Leu	GCA Ala	GAG Glu	1022
				230						235				240		
TTG Leu	GTA Val	AGT Ser	AGG Arg	ACA Thr	ACT Thr	GGT Gly	GAT Asp	GTG Val	TTA Leu	GAG Glu	AAA Lys	TAT Tyr	ACG Thr	ATT Ile	GAA Glu	1070
			245					250						255		
CCG Pro	GGC Gly	GAG Glu	AGT Ser	GTT Val	ACG Thr	TTT Phe	TCA Ser	CAT His	CCG Pro	ACA Thr	AAA Lys	GTT Val	AAT Asn	GCT Ala	AAT Asn	1118
		260					265						270			
AAT Asn	AGC Ser	AAT Asn	ATA Ile	ACT Thr	GTG Val	ACT Thr	TAT Tyr	GAT Asp	ACC Thr	TCA Ser	TTA Leu	GCT Ala	TCT Ser	GCT Ala	AAT Asn	1166
275						280						285				

132

ACT Thr 290	CCT Pro 295	GGA Gly 300	GCA Ala 305	TTG Leu 310	AAA Lys 315	TTC Phe 320	TCT Ser 325	GCT Ala 330	AAT Asn 335	GAT Asp 340	GAT Asp 345	GTT Val 350	TAT Tyr 355	TCA Ser 360	ACA Thr 365	1214
ATT Ile 310	ATT Ile 315	GTA Val 320	CCT Pro 325	GCT Ala 330	TAT Tyr 335	CAG Gln 340	ATT Ile 345	AAT Asn 350	ACA Thr 355	ACT Thr 360	CGT Arg 365	TAC Tyr 370	GTC Val 375	ACT Thr 380	GAA Glu 385	1262
AGT Ser 325	GGC Gly 330	AAA Lys 335	GTT Val 340	TTG Leu 345	GCA Ala 350	ACC Thr 355	TAT Tyr 360	GGT Gly 365	CTT Leu 370	CAA Gln 375	ACT Thr 380	ATT Ile 385	GCA Ala 390	GGA Gly 395	CAG Gln 400	1310
GTA Val 340	GTT Val 345	ACT Thr 350	CCA Pro 355	TCT Ser 360	TCT Ser 365	GTT Val 370	CGT Arg 375	GTA Val 380	TTT Phe 385	ACT Thr 390	GGG Gly 395	TAT Tyr 400	GAT Asp 405	TAT Tyr 410	GTG Val 415	1358
GCA Ala 355	ACT Thr 360	ACA Thr 365	ACT Thr 370	AAA Lys 375	GCC Ala 380	GTT Val 385	CAA Gln 390	GGT Gly 395	CCA Pro 400	TAT Tyr 405	CCA Pro 410	AAG Lys 415	GGA Gly 420	ACG Thr 425	GTA Val 430	1406
TAC Tyr 370	CTT Leu 375	GCT Ala 380	GGT Gly 385	ACG Thr 390	GTT Val 395	CAA Gln 400	AAG Lys 405	GAT Asp 410	ACA Thr 415	GTA Val 420	CAA Gln 425	TAT Tyr 430	AAA Lys 435	GTT Val 440	ATT Ile 445	1454
CGT Arg 390	GAA Glu 395	ATT Ile 400	GTG Val 405	GAG Glu 410	AAC Asn 415	GAC Asp 420	CAA Gln 425	GCA Ala 430	GTT Val 435	CTT Leu 440	AAA Lys 445	TTC Phe 450	TAT Tyr 455	TAT Tyr 460	TTA Leu 465	1502
GAT Asp 405	CCT Pro 410	ACC Thr 415	TAT Tyr 420	AAG Lys 425	GGT Gly 430	GAA Glu 435	GTA Val 440	GAT Asp 445	TGG Trp 450	AGA Arg 455	GGA Gly 460	ACT Thr 465	GAT Asp 470	ACG Thr 475	ACT Thr 480	1550
GGG Gly 420	TTT Phe 425	ATT Ile 430	GAG Glu 435	TTG Leu 440	CTT Leu 445	ACA Thr 450	ACT Thr 455	TCC Ser 460	CCA Pro 465	ACA Thr 470	ACC Thr 475	TAT Tyr 480	AAA Lys 485	GTT Val 490	GGT Gly 495	1598
ACT Thr 435	ATA Ile 440	TAC Tyr 445	GAT Asp 450	TAC Tyr 455	AAT Asn 460	ATT Ile 465	AAT Asn 470	TCA Ser 475	AAA Lys 480	ATT Ile 485	ACA Thr 490	GCT Ala 495	CCA Pro 500	TTT Phe 505	ACT Thr 510	1646
ATT Ile 450	GAT Asp 455	CCT Pro 460	ACC Thr 465	AAG Lys 470	AAT Asn 475	GTT Val 480	ATG Met 485	GTT Val 490	TTC Phe 495	AAG Lys 500	GAA Glu 505	AGT Ser 510	GAA Glu 515	CAG Gln 520	AAC Asn 525	1694
GAG Glu 470	CAA Gln 475	GGT Gly 480	AGC Ser 485	AAA Lys 490	TAT Tyr 495	CGC Arg 500	GTC Val 505	ATT Ile 510	GCT Ala 515	CAA Gln 520	TGG Trp 525	TCA Ser 530	GGA Gly 535	GAT Asp 540	GAA Glu 545	1742
ACC Thr 485	ACT Thr 490	AAA Lys 495	GGT Gly 500	ATA Ile 505	TAT Tyr 510	GGA Gly 515	AAA Lys 520	ATC Ile 525	TAT Tyr 530	ATC Ile 535	GCT Ala 540	ACT Thr 545	CAG Gln 550	GTT Val 555	TGG Trp 560	1790
ACG Thr 500	ACT Thr 505	AAA Lys 510	TTG Leu 515	GGA Gly 520	ACA Thr 525	AAC Asn 530	GAG Glu 535	TGG Trp 540	GGA Gly 545	TGG Trp 550	TTT Phe 555	GAC Asp 560	TAT Tyr 565	TCT Ser 570	GAT Asp 575	1838

(第12)

GAC Asp	CAA Gln	GCT Ala	GGT Gly	ATA Ile	AAA Lys	TTT Phe	AAT Asn	AAC Asn	AAA Lys	GGT Gly	TTT Phe	TGG Trp	CCG Pro	GCA Ala	GGT Gly	1886
515																
520																
525																
GTT Val	CAA Gln	AAT Asn	ACA Thr	CTT Leu	CGA Arg	AAT Asn	GCT Ala	ACT Thr	CCA Pro	GCT Ala	ACA Thr	GCT Ala	GTA Val	GAG Glu	ACT Thr	1934
530																
535																
540																
545																
ACT Thr	TAT Tyr	ATC Ile	TAC Tyr	AAA Lys	GAA Glu	AGT Ser	TCC Ser	AAG Lys	TAT Tyr	GGT Gly	GAT Asp	GTC Val	ATT Ile	GTT Val	GAG Glu	1982
550																
555																
560																
TAC Tyr	TAC Tyr	GAT Asp	ACT Thr	GAC Asp	GGA Gly	AAA Lys	CAA Gln	ATT Ile	GTA Val	AAT Asn	TCA Ser	GTT Val	GTA Val	GAT Asp	ACT Thr	2030
565																
570																
575																
CCT Pro	AAG Lys	TCA Ser	GCT Ala	CTT Leu	GGC Gly	ACA Thr	GAG Glu	TAT Tyr	AAT Asn	ACA Thr	GAT Asp	GTG Val	GAC Asp	CGT Arg	AGA Arg	2078
580																
585																
590																
CCA Pro	GCC Ala	AGC Ser	TTG Leu	GTT Val	GCT Ala	GCT Ala	GAT Asp	GGG Gly	ACA Thr	GTC Val	TAC Tyr	TTC Phe	TAC Tyr	AAA Lys	GAA Glu	2126
595																
600																
605																
GTT Val	AAG Lys	TCT Ser	GAT Asp	TCA Ser	GCT Ala	AAG Lys	ACA Thr	ACC Thr	GGT Gly	ACA Thr	GTA Val	GTT Val	GCA Ala	GGT Gly	ACC Thr	2174
610																
615																
620																
625																
ACA Thr	ACT Thr	GTT Val	AAG Lys	TAT Tyr	GTT Val	TAC Tyr	GAA Glu	AAA Lys	GCT Ala	GGT Gly	AGC Ser	GTT Val	AAT Asn	GTT Val	AAC Asn	2222
630																
635																
640																
TTC Phe	GTT Val	GAC Asp	ATC Ile	AAT Asn	GGT Gly	AAA Lys	GTA Val	ATC Ile	AAA Lys	GCT Ala	CCT Pro	GTT Val	TCA Ser	GAT Asp	GAA Glu	2270
645																
650																
655																
AAA Lys	GAT Asp	GCG Ala	AAA Lys	CCT Pro	GGT Gly	TAC Tyr	AAT Asn	TAT Tyr	GAT Asp	ACC Thr	GAC Asp	TTG Leu	GAT Asp	CAG Gln	AAA Lys	2318
660																
665																
670																
TTA Leu	GCT Ala	TCC Ser	ATC Ile	ACT Thr	TTT Phe	GAA Glu	GGC Gly	AAG Lys	GAA Glu	TAC Tyr	AAA Lys	CTT Leu	GTT Val	CCT Pro	GCT Ala	2366
675																
680																
685																
GGT Gly	GAT Asp	TAT Tyr	CCG Pro	GTT Val	GGT Gly	AAA Lys	GTT Val	GGC Gly	AAG Lys	GGA Gly	AAT Asn	AAC Asn	TTG Leu	ATT Ile	GAA Glu	2414
690																
695																
700																
705																
GTT Val	GGT Gly	AAT Asn	AAT Asn	ACT Thr	GCG Ala	AAA Lys	GGT Gly	ATT Ile	GAC Asp	CCA Pro	ACA Thr	ACA Thr	GGC Gly	AAA Lys	ATT Ile	2462
710																
715																
720																
GAA Glu	GCC Ala	GGT Gly	GTT Val	AAC Asn	AAA Lys	GAA Glu	GTT Val	ACC Thr	TAT Tyr	GTC Val	TAT Tyr	AGA Arg	GCA Ala	GTG Val	ACA Thr	2510
725																
730																
735																

13192

GGT TCT GTA GTT GTA AAT TAC AAA GAT ACA GAA GGT AAT GTG ATT AAA Gly Ser Val Val Val Asn Tyr Lys Asp Thr Glu Gly Asn Val Ile Lys 740 745 750	2558
GAT CCA GAA ACG GAT GTG TCT GAT GCA CCG GTT GGA GAT GCT TAT ACT Asp Pro Glu Thr Asp Val Ser Asp Ala Pro Val Gly Asp Ala Tyr Thr 755 760 765	2606
ACA ACT GAC AAG AAA CCA AAC GAA ATC ATC ACA AAA GAT GGA TCA CGC Thr Thr Asp Lys Lys Pro Asn Glu Ile Ile Thr Lys Asp Gly Ser Arg 770 775 780 785	2654
TAT GTT CTT GTT CCA TCT AAG ACA GAT GGT GAG GAA AAT GGT AAA GTT Tyr Val Leu Val Pro Ser Lys Thr Asp Gly Glu Glu Asn Gly Lys Val 790 795 800	2702
ATC GAA GGA ACA ATC ACA GTA ACT TAT GTT TAC CAG AAA GTT GCA AAC Ile Glu Gly Thr Ile Thr Val Thr Tyr Val Tyr Gln Lys Val Ala Asn 805 810 815	2750
TGG ATT CCA GAG ATT CCA AAT GTA CCA GAA ACA GAC CGT CCA AAA GTA Trp Ile Pro Glu Ile Pro Asn Val Pro Glu Thr Asp Arg Pro Lys Val 820 825 830	2798
CCT TAC CCA TTT GAC CCA ACA GAG CCA GAC GAG CCA ATC GAT CCA ACG Pro Tyr Pro Phe Asp Pro Thr Glu Pro Asp Glu Pro Ile Asp Pro Thr 835 840 845	2846
ACA CCA GGA ACA AAT GGC GAG GTT CCA AAT ATT CCT TAC GTT CCA GGA Thr Pro Gly Thr Asn Gly Glu Val Pro Asn Ile Pro Tyr Val Pro Gly 850 855 860 865	2894
TAT ACA CCG GTT GAT CCT AAG GAT AAC ACG CCG TTG AAA CCA ATT GAT Tyr Thr Pro Val Asp Pro Lys Asp Asn Thr Pro Leu Lys Pro Ile Asp 870 875 880	2942
CCA AAT GAT CCA GGT AAG GGT TAT GTA CCA CCA ACA CCA GAA AAT CCA Pro Asn Asp Pro Gly Lys Gly Tyr Val Pro Pro Thr Pro Glu Asn Pro 885 890 895	2990
GGT GTT GAT ACA CCA ATT CCT TAT GTT CCA GTT AAA AAA GTC GTA ACT Gly Val Asp Thr Pro Ile Pro Tyr Val Pro Val Lys Lys Val Val Thr 900 905 910	3038
AAC CAC GTT GAT GAA GAG GGT AAC CCT ATT GCA CCG CAA GAA GAG GGA Asn His Val Asp Glu Glu Gly Asn Pro Ile Ala Pro Gln Glu Glu Gly 915 920 925	3086
ACA AAA CCA AAC AAA TCA ATC CCA GGT TAC GAG TTC ACA GGT AAA ACT Thr Lys Pro Asn Lys Ser Ile Pro Gly Tyr Glu Phe Thr Gly Lys Thr 930 935 940 945	3134
GTT ACT GAC GAA GAT GGC AAC ACA ACT CAC ATC TAC AAG AAA ACA CCA Val Thr Asp Glu Asp Gly Asn Thr Thr His Ile Tyr Lys Lys Thr Pro 950 955 960	3182

(2)

GAA Glu	GTT Val	AAG Lys	AAT Asn	GGT Gly	ACA Thr	GTT Val	GTT Val	GTT Val	AAC Asn	TAT Tyr	GTA Val	ACA Thr	GAA Glu	GAT Asp	GGC Gly	3230
			965					970					975			
ACA Thr	GTT Val	ATC Ile	AAG Lys	GAA Glu	CCT Pro	GTA Val	ACA Thr	GAT Asp	ACA Thr	CCA Pro	ACT Thr	TCT Ser	CCA Pro	GAA Glu	GGC Gly	3278
			980					985					990			
ACA Thr	CCA Pro	TAC Tyr	GAC Asp	ACT Thr	ACA Thr	GAC Asp	AAC Asn	AAA Lys	CCT Pro	AAG Lys	ACA Thr	ATC Ile	ACT Thr	TTC Phe	AAA Lys	3326
						1000					1005					
GGT Gly	GAA Glu	GAG Glu	TAT Tyr	GAA Glu	TTG Leu	GTT Val	CGT Arg	GTT Val	GAC Asp	GGT Gly	ACA Thr	GAA Glu	AAC Asn	GGT Gly	AAA Lys	3374
1010					1015					1020					1025	
GTT Val	GTA Val	GAA Glu	GGT Gly	GAA Glu	ACA Thr	GTT Val	GTG Val	ACT Thr	TAC Tyr	GTT Val	TAC Tyr	CGT Arg	AAA Lys	GTC Val	GAA Glu	3422
				1030					1035					1040		
ACA Thr	CCT Pro	GCT Ala	AAG Lys	AAA Lys	GTT Val	GTA Val	ACT Thr	AAC Asn	CAC His	GTT Val	GAT Asp	GAA Glu	GAG Glu	GGT Gly	AAC Asn	3470
			1045					1050					1055			
CCT Pro	GTT Val	GCG Ala	CCG Pro	CAA Gln	GAA Glu	GAG Glu	GGA Gly	ACA Thr	AAA Lys	CCA Pro	AAC Asn	AAA Lys	TCA Ser	ATC Ile	CCA Pro	3518
		1060					1065					1070				
GGT Gly	TAC Tyr	GAA Glu	TTT Phe	ACA Thr	GGT Gly	AAA Lys	ACT Thr	GTT Val	ACT Thr	GAC Asp	GAA Glu	GAT Asp	GGC Gly	AAC Asn	ACA Thr	3566
	1075					1080					1085					
ACT Thr	CAC His	ATC Ile	TAC Tyr	AAG Lys	AAA Lys	ACA Thr	CCT Pro	GCT Ala	AAG Lys	AAA Lys	GTT Val	GTG Val	ACT Thr	AAC Asn	CAC His	3614
				1095					1100					1105		
GTT Val	GAT Asp	GAA Glu	GAA Glu	GGT Gly	AAC Asn	CCT Pro	ATT Ile	GCT Ala	CCA Pro	CAA Gln	GAG Glu	GAT Asp	GGG Gly	ACA Thr	ACA Thr	3662
				1110					1115				1120			
CCA Pro	AAA Lys	CGT Arg	CAA Gln	ATT Ile	TCA Ser	GGT Gly	TAC Tyr	GAG Glu	TAT Tyr	GTG Val	CGT Arg	ACT Thr	GTA Val	GTT Val	GAT Asp	3710
		1125						1130					1135			
GAA Glu	GAA Glu	GGT Gly	AAC Asn	ACG Thr	ACA Thr	CAT His	ATT Ile	TAT Tyr	CGC Arg	AAA Lys	CTT Leu	TCT Ser	AAT Asn	AAA Lys	CCA Pro	3758
		1140					1145					1150				
ACA Thr	ACA Thr	CCT Pro	GAG Glu	AAG Lys	GAA Glu	ACT Thr	CCT Pro	GCA Ala	AAA Lys	CCT Pro	CAA Gln	GCA Ala	GGT Gly	AAA Lys	ACC Thr	3806
		1155				1160					1165					
GCT Ala	TCA Ser	GGT Gly	AAA Lys	GCT Ala	CAA Gln	TTG Leu	CCA Pro	AAT Asn	ACT Thr	GGT Gly	GAG Glu	GCT Ala	TCA Ser	TCT Ser	GTG Val	3854
1170					1175					1180					1185	

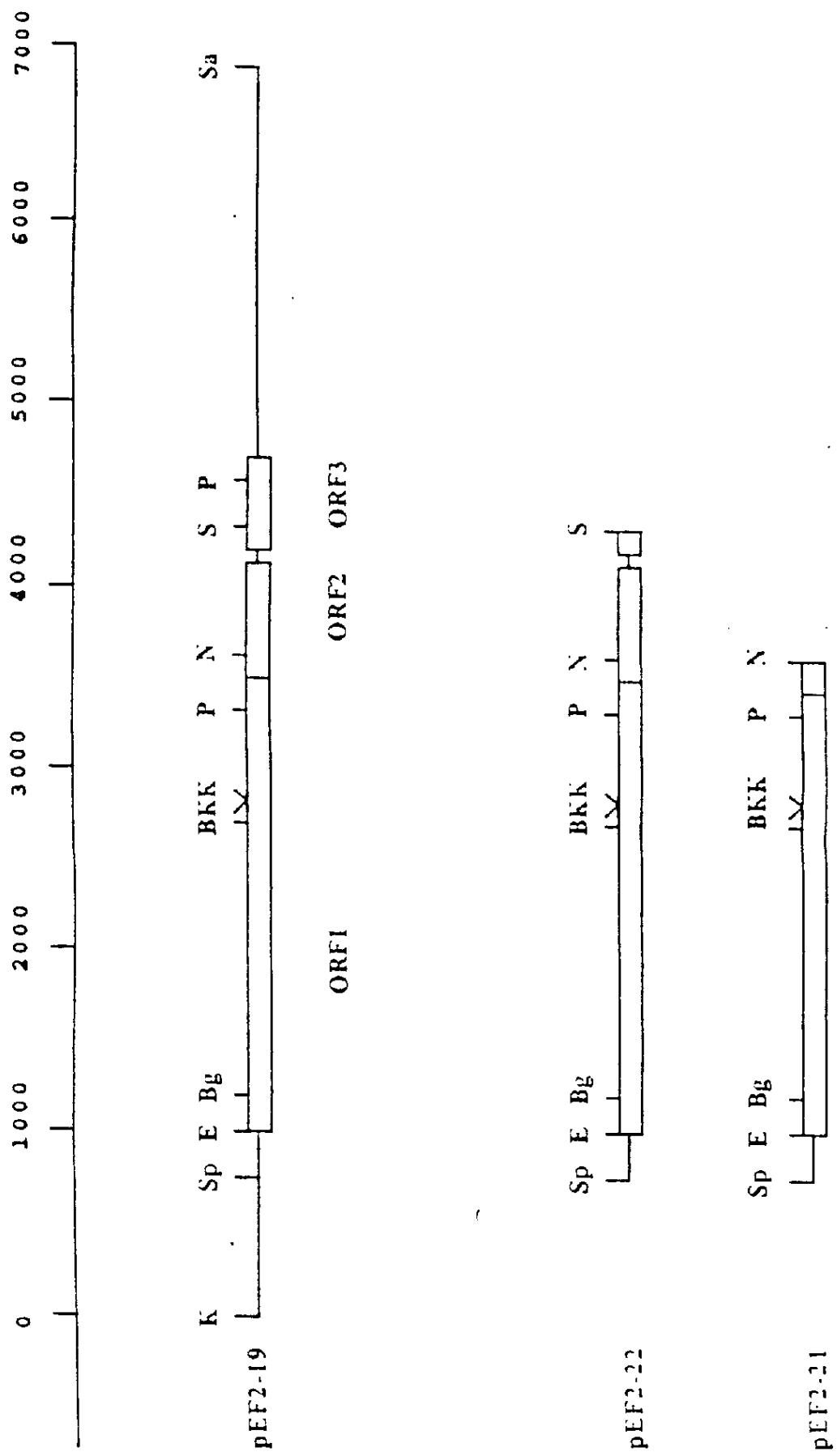


图 3

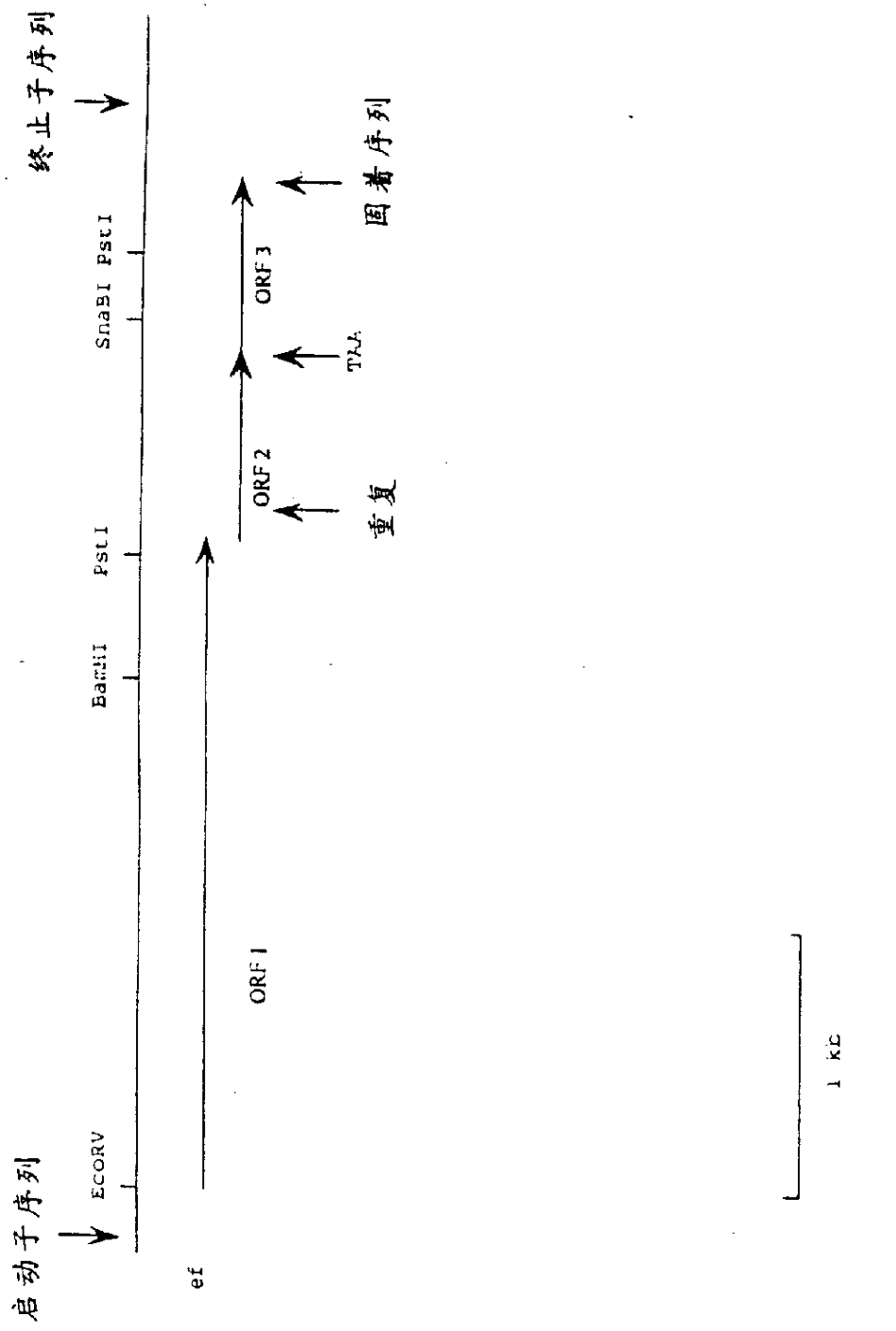


图4

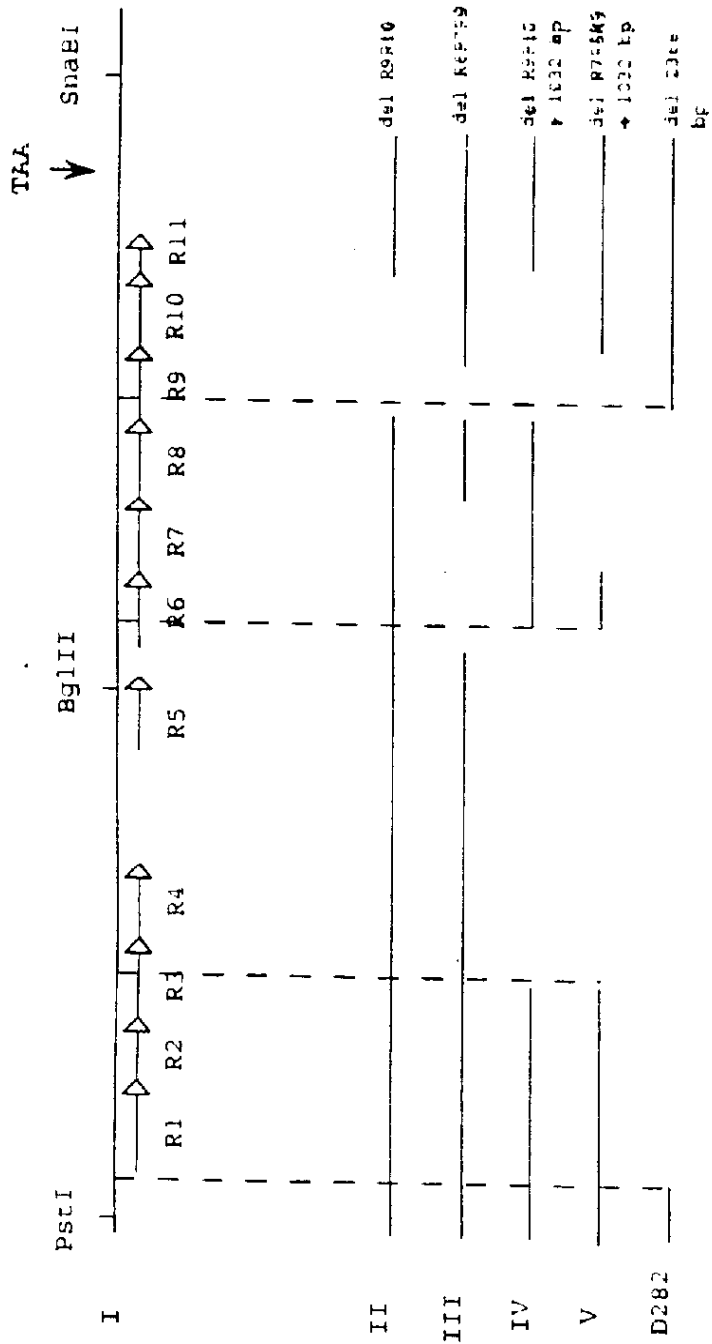


图5

A

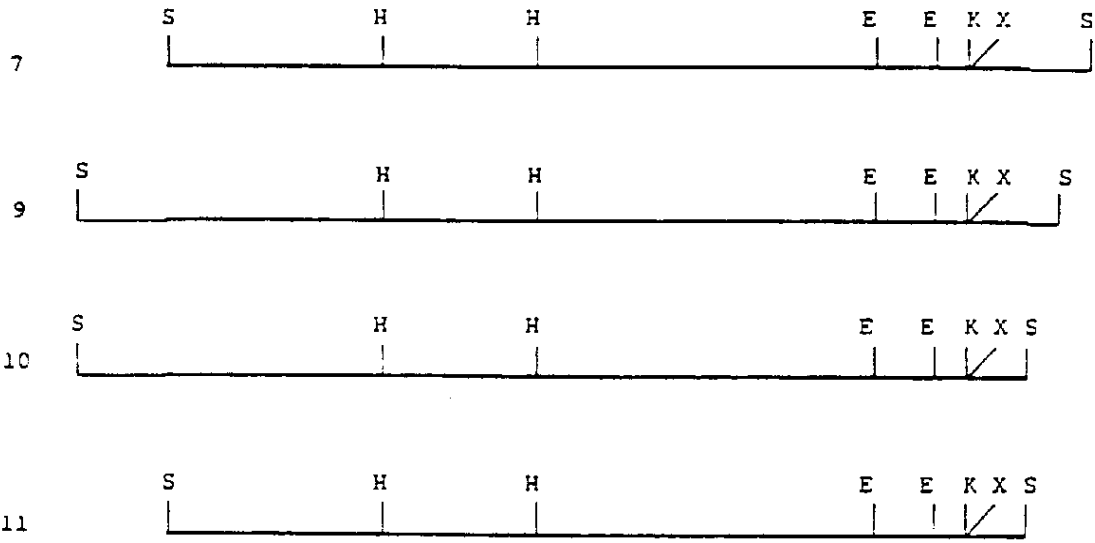
3415 - A A G G T G G C G A C A G A C G C T A T T G A T 左
4447 - C C A A A C T T G A C A G A C G C A G A G A A G 右
- A A G G T G G C G A C A G A C G C A G A G A A G 接合点

B

2848 - G C T A T T A A C C A G G C G A A G G A A A A A 左
5216 - C A A C A A G T C C A G T C G A A G C G C A A T 右
- G C T A T T A A C C A G T C G A A G C G C A A T 接合点

图6

A.



B.



图7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

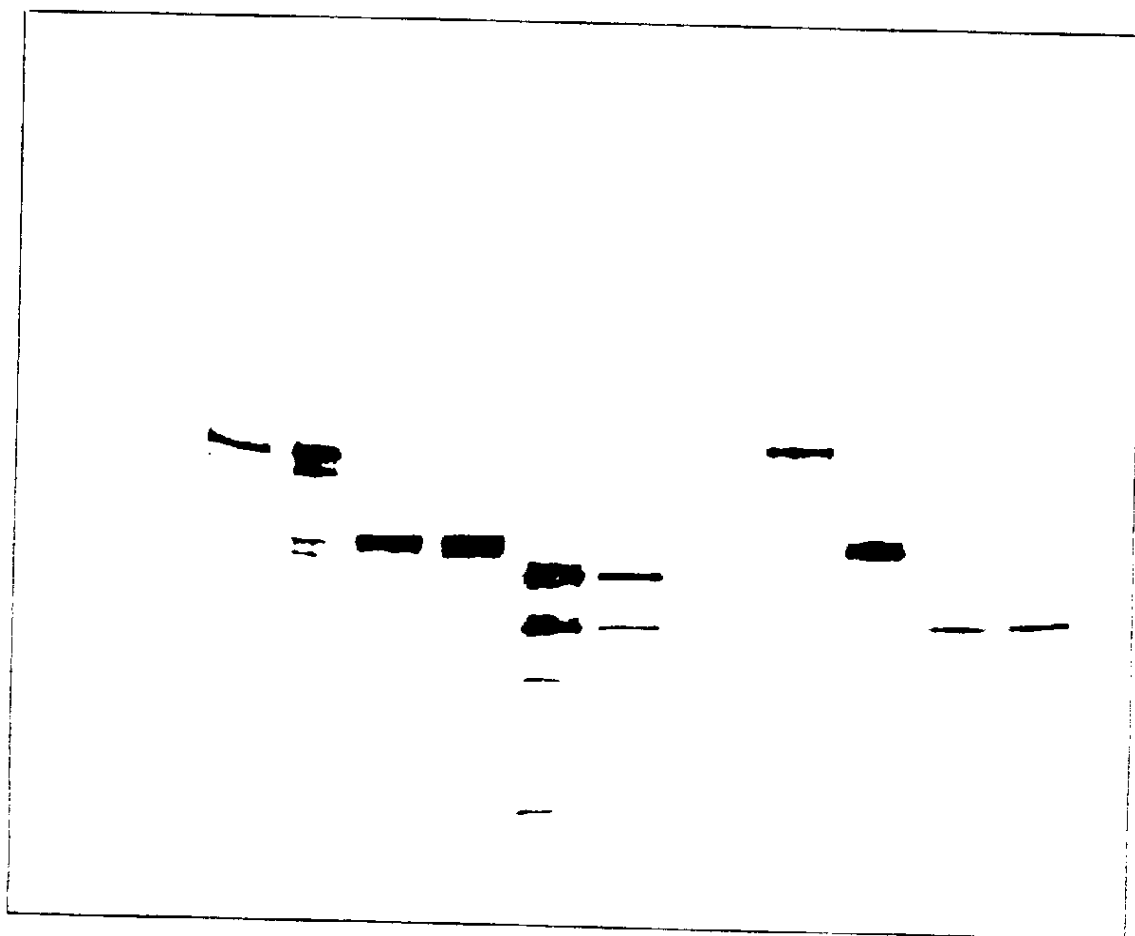
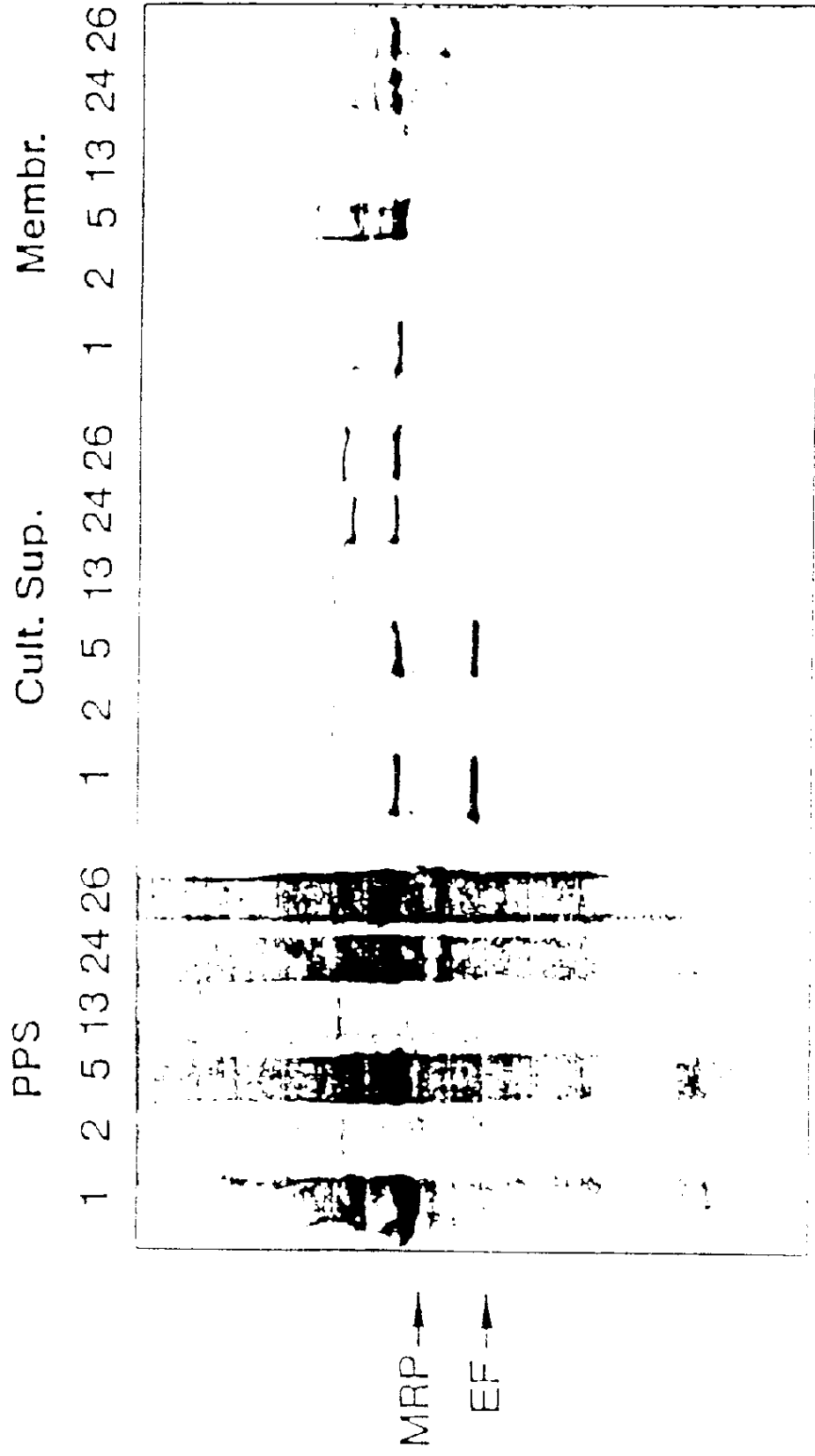


图8



[319]

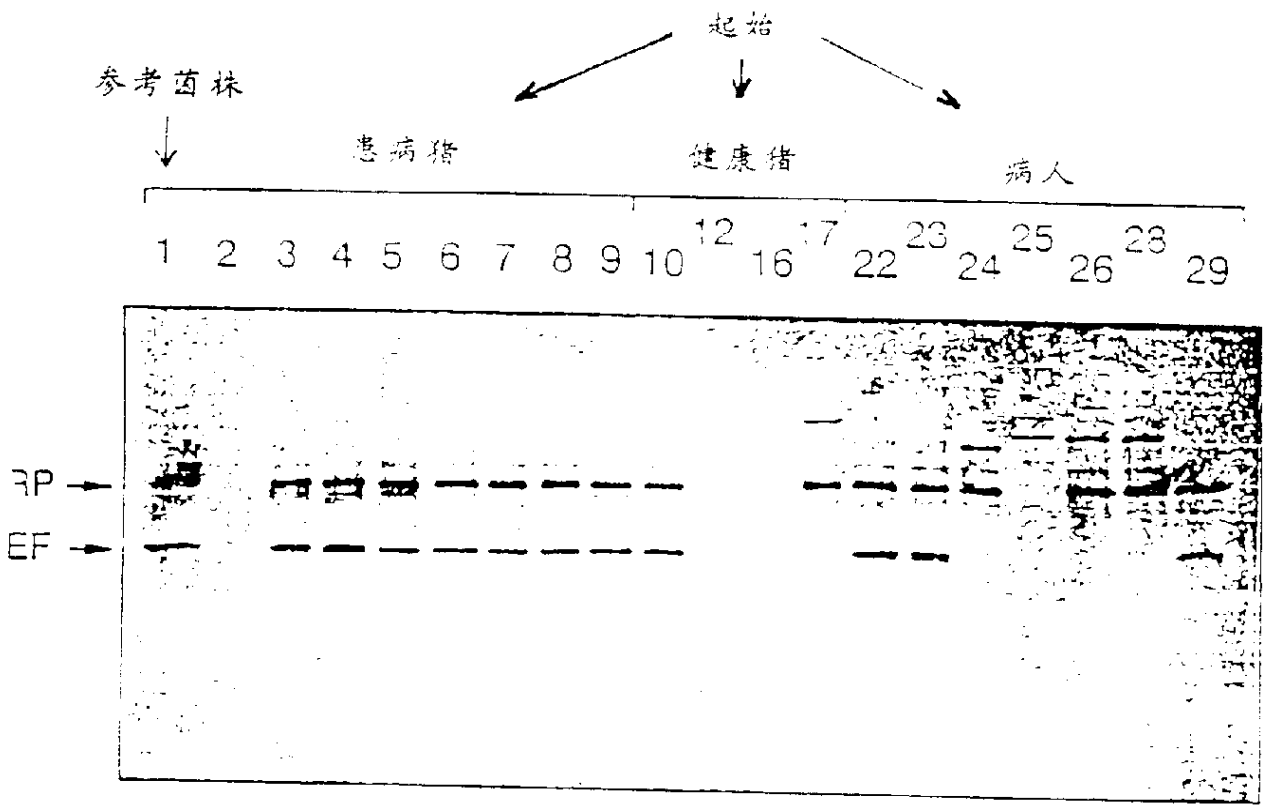


图10

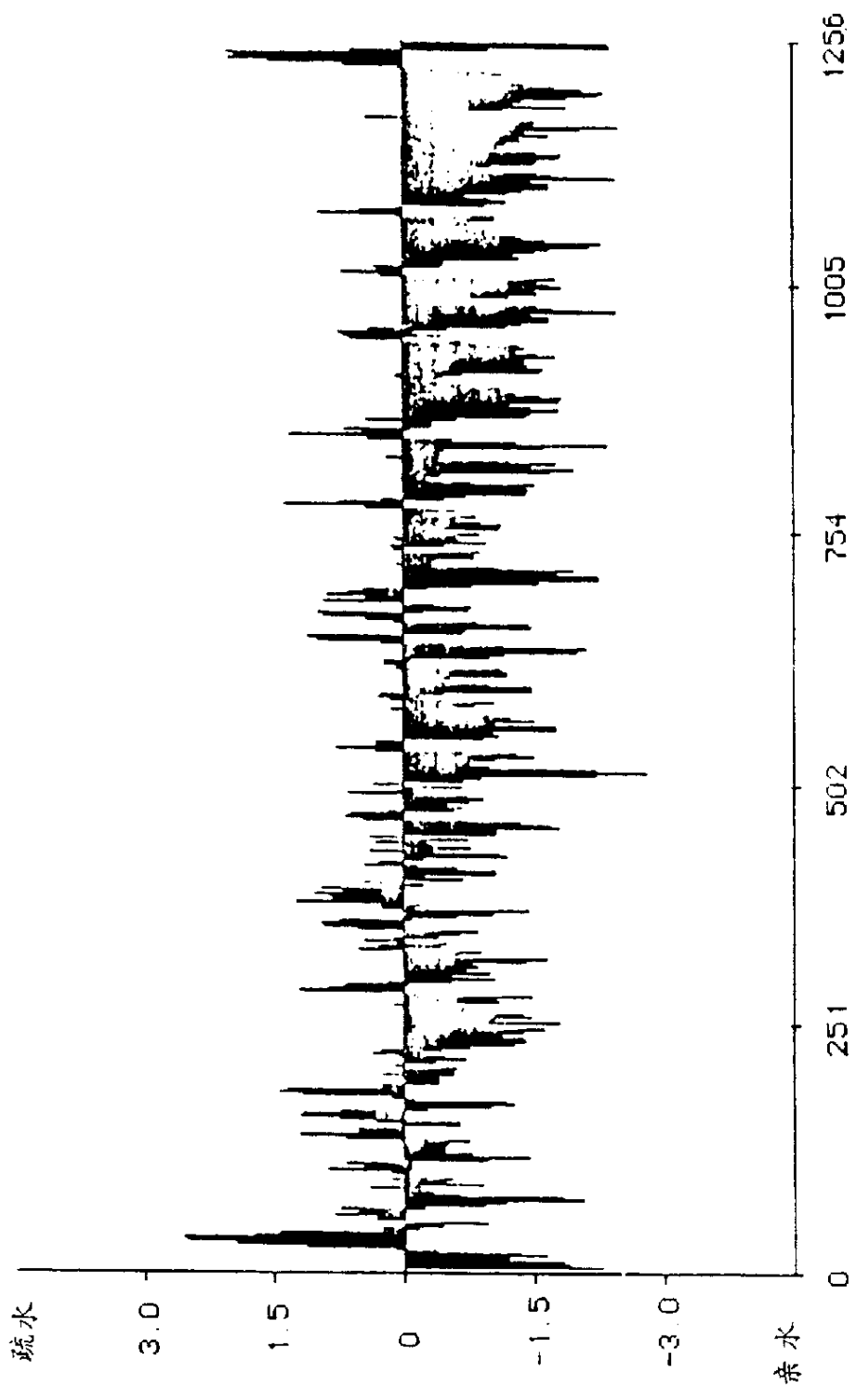


图 11

MRP	LP	N	TG	E	---	-	ASSVAGALGTAML	V	ATLAF	AKARR	NED*
M6	LP	S	TG	E	TR-N	P	FFTAAALTUMATA	G	VARUV-	KAK--	EEN*
A	LP	E	TG	E	--EN	P	LIGTTVFGGLSLA	G	AALLAG	RRR--	EL*
G	LP	S	TG	E	GS-N	P	FFTAAALAVMAGA	G	ALAVAS	KAK--	ED*
AP4	LP	S	TG	E	TR-N	P	FFTAAARTUMUSA	G	MLAL--	KAK--	EEN*
LP	LP	K	TG	E	TTER	P	AFGFLGVIVUSLM	G	VLGV--	KAK--	QREE*
WAP4	LP	S	TG	E	-QAG	L	LLTTUGLUIVAUA	G	UYFY--	RTAR-	----
T6	LP	S	TG	S	IGTY	L	FKRIGSARMIGAI	G	IYIU--	RRK--	A*
Fn-BP	LP	E	TG	G	-EES	T	NKGMFLFGLFSIL	G	LALL--	RRHKK	HKKA*

图 12

U P U K K U U T N H U D E E G N P I A P Q E E G T K P N K S I P G Y E F T G K T U T D E D G N T T H I Y K K
 T P A K K U U T N H U D E E G N P U A P Q E E G T K P N K S I P G Y E F T G K T U T D E D G N T T H I Y K K
 T P A K K U U T N H U D E E G N P I A P Q E D G T T P K R Q I S G Y E Y U - R T U U D E E G N T T H I Y K K

图 13

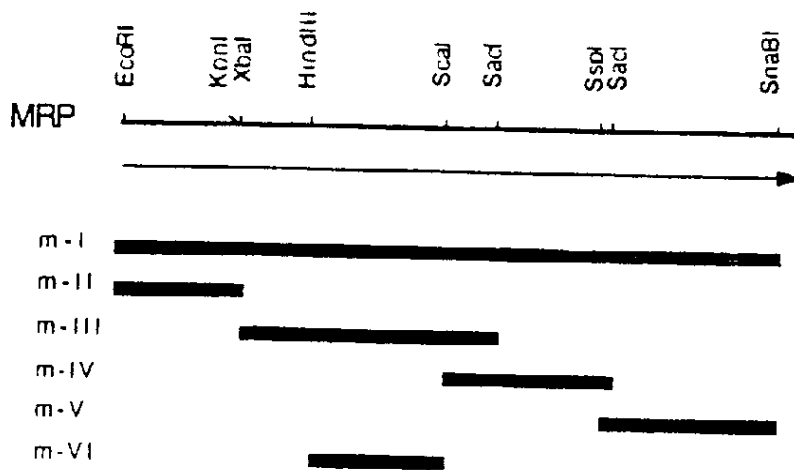


图 14 A

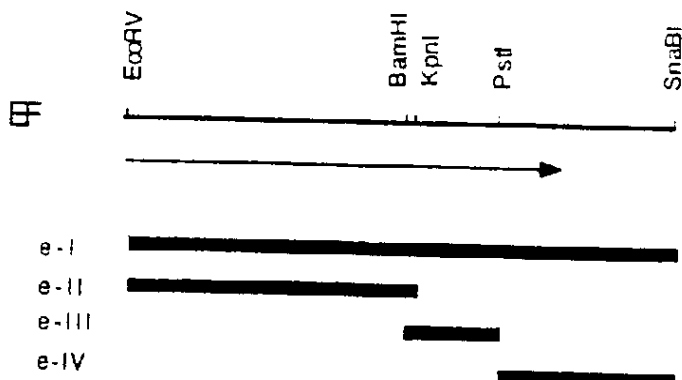


图 14 B

1090

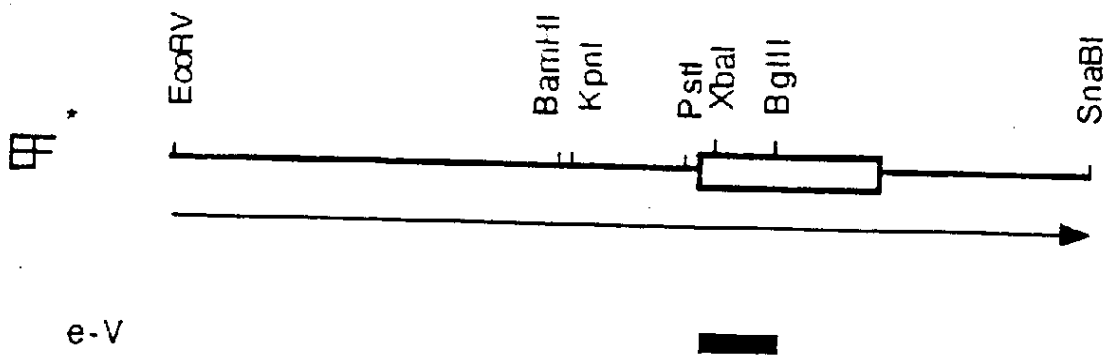


图 14C