

公告本

申請日期	88 年 11 月 25 日
案 號	88120620
類 別	C12N 15/00, 15/85, 15/86, C07H 2/04

A4
C4

I221481

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	犬埃里希氏體之編碼 28 仟道耳吞、免疫顯性同質蛋白質的基因及其用途
	英 文	Homologous 28-kilodalton immunodominant protein genes of ehrlichia canis and uses thereof
二、發明 人	姓 名	(1) 大衛·華克 Walker, David H. (2) 于學杰 Yu, Xue-Jie (3) 潔爾·麥克布萊德 McBride, Jere W.
	國 籍	(1) 美國 (2) 中國 (3) 美國
住、居所		(1) 美國德州葛文斯頓北丹斯拜二十二號 22 North Dansby, Galveston, Texas 77551, U.S.A.
		(2) 美國德州葛文斯頓中央市大道六四二四號 6424 Central City Boulevard, #828, Galveston, Texas 77551, U.S.A. (3) 美國德州葛文斯頓加梅卡海灘九四五七號 9457 Jamaica Beach, Galveston, TX 77554, U.S.A.
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 研究發展基金會 Research Development Foundation
	國 籍	(1) 美國
	住、居所 (事務所)	(1) 美國內華達州·卡爾森市北區街四〇二號 402 North Division Street, Carson City, Nevada 89703, USA
	代 表 人 姓 名	(1) 詹姆士·威勒 Weiler, James F.

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS) A4規格 (210×297公釐)

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， ☐ 有 ☐ 無主張優先權
美國	1998 年 11 月 30 日	09/201,458	☒ 有主張優先權
美國	1999 年 3 月 3 日	09/261,358	☒ 有主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (3)

蛋白質基因 (p 2 8) 係與反芻類考德里氏體 (*Cowdria ruminantium*) m a p - 1 基因同質且經選殖出者。用重組 p 2 8 免疫化的小鼠根據挑激 5 天後的周圍血液 P C R 分析可對抗同質性株的挑激感染 (Ohashi et al., 1998)。此外也報導過對 *E. chaffeensis* omp-1 基因族和反芻類考德里氏體 m a p - 1 基因呈同質性的犬埃里希氏體所含兩類似，但不相同的級聯排列 2 8 - k D a 基因之分子選殖 (Reddy et al., 1998)。

先前技藝的缺乏處在於缺少犬埃里希氏體的新同質性 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質基因和含有該等同質性 2 8 - k D a 蛋白質基因的單一多基因座之選殖和示性。再者，先前技藝的缺乏處在於缺少彼等犬埃里希氏體免疫反應性基因之重組蛋白質。本發明可滿足技藝中的此種長期性缺乏與需求。

發明概述

本發明述及犬埃里希氏體同系性成熟 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質基因 (經命名為 E C a 2 8 - 1 , E C a 2 8 S A 3 和 E C a 2 8 S A 2) 之分子選殖，定序，示性及表現及含有五種犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質基因 (E C a 2 8 S A 1 , E C a 2 8 S A 2 , E C a 2 8 S A 3 , E C a 2 8 - 1 和 E C a 2 8 - 2) 之單一基因座 (5 . 5 9 2 - k b) 之鑑定。與 *E. chaffeensis* 及在諸犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質之間的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (4)

比較顯示出 E C a 2 8 - 1 擁有與 E. chaffeensis omp-1 多基因族共有的大部份胺基酸同質性且在犬埃里希氏體分離物之間具有高度保守性。此 5 種 2 8 - k D a 蛋白質皆經預測具有可導致成熟蛋白質的信號肽，且具有 5 1 至 7 2 % 之胺基酸同質率。基因間區的分析顯示出每一基因的臆測啓動子區，由此推測這些基因可能各自獨立地且差別地表現。基因間非密碼區的大小為 2 9 9 至 3 5 5 - b p，且有 4 8 至 7 1 % 之同質率。

於本發明一實施例中，提出編碼犬埃里希氏體所含 3 0 - k D a 免疫反應性蛋白質之 D N A 序列。較佳者，此蛋白質具有選自 S E Q I D N O . 2，S E Q I D N O . 4 和 S E Q I D N O . 6 之中的胺基酸序列，且該基因具有選自 S E Q I D N O . 1，S E Q I D N O . 3 和 S E Q I D N O . 5 之中的核酸序列且為多形多基因族之一員。通常該蛋白質具有一 N - 端信號序列其在後一轉譯程序後即斷掉而導致產生一成熟的 2 8 - k D a 蛋白質。更佳者，編碼 2 8 - k D a 蛋白質的 D N A s 係包含在一單一多基因座內，其大小為 5 . 5 9 2 k b 且編碼犬埃里希氏體全部五種同質性 2 8 - k D a 蛋白質。

於本發明另一實施例中，提出一表現載體其包括編碼犬埃里希氏體所含一 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質之基因且其能夠在該載體經導到細胞內時表現出該基因。

於本發明又另一實施例中，提出一種重組蛋白質其包

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

括選自 S E Q I D N O . 2 , S E Q I D N O . 4 和 S E Q I D N O . 6 之中的胺基酸序列。較佳者，該胺基酸序列係經選自 S E Q I D N O . 1 , S E Q I D N O . 3 和 S E Q I D N O . 5 之中的核酸序列所編碼。較佳者，該重組蛋白質包括四個可變區其皆為經表面表現，具親水性且具抗原性者。該重組蛋白質可用為抗原。

於本發明又另一實施例中，提出一種產生重組蛋白質之方法，其包括下述諸步驟：取得一載體其包括一表現區，內含經操作地聯結到一啟動子且編碼選自 S E Q I D N O . 2 , S E Q I D N O . 4 和 S E Q I D N O . 6 之中的胺基酸序列之一序列；將該載體轉染到一細胞內；及在可以有效地表現出該表現區的條件下培養該細胞。

本發明也可以在某些實施例中經描述為一種抑制一對象被犬埃里希氏體感染之方法其包括下述諸步驟：鑑定疑似經暴露於犬埃里希氏體或經其感染之對象；及給用一抑制犬埃里希氏體感染有效量的包括犬埃里希氏體 28 - k D a 抗原之組成物。該抑制作用可透過任何手段來發生，例如，刺激該對象的體液或細胞免疫反應，或其它手段例如抑制該 28 - k D a 抗原之正常功能，或甚至於針對與該對象體內所含某些藥劑的交互作用與該抗原競爭。

本發明的其它及進一步部份，特徵和優點可從下面提出作為揭示目的之本發明現行較佳實施例的說明獲得明瞭

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明 (6)

。

發明之詳細說明

本發明述及編碼犬埃里希氏體 30 - 仟道耳吞 (k D a) 蛋白質的同質基因之選殖，定序和表現。此外也對七種犬埃里希氏體分離物與 *E. chaffeensis* omp-1 多基因族之間的同質基因實施比較分子分析。鑑定出兩種新的 28 - k D a 蛋白質基因，E C a 28 - 1 和 E C a 28 S A 3。E C a 28 - 1 具有一 834 - b p 開放讀碼架構其編碼一有預測分子量為 30.5 k D a 的 278 胺基酸蛋白質 (S E Q I D N O . 2)。鑑定出一 N - 端信號序列由此推測該蛋白質係經後一轉譯改質成 27.7 - k D a 成熟蛋白質。E C a 28 S A 3 具有一 840 - b p 開放讀碼架構其編碼一 280 胺基酸蛋白質 (S E Q I D N O . 6)。

使用 P C R 擴增犬埃里希氏體的 28 - k D a 蛋白質基因，完成先前未定序的 E C a 28 S A 2 區。

E C a 28 S A 2 的序列分析揭露出一編碼 283 胺基酸蛋白質 (S E Q I D N O . 4) 之 849 - b p 開放讀碼架構。使用對 28 - k D a 蛋白質基因具特定性的引子進行 P C R 擴增使基因間非密碼區將先前分開的基因座聯結起來，因而鑑定出含有所有五種 28 - k D a 蛋白質基因的單一基因座 (5.592 - k b)。該五種 28 - k D a 蛋白質皆經預測具有導致成熟蛋白質的信號肽，且

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

後

五、發明說明（ 7 ）

具有 5 1 至 7 2 % 的同質率。基因間區的分析揭露出對每一基因的臆測啓動子區，由此推測這些基因可獨立地且差別地表現。基因間非密碼區（ 2 8 N C 1 - 4 ）的大小為 2 9 9 至 3 5 5 - b p，且具 4 8 至 7 1 % 同質率。

本發明係有關犬埃里希氏體的兩種新的同質 2 8 - k D a 蛋白質基因，E C a 2 8 - 1 和 E C a 2 8 S A 3，及先前經部份定序過的 E C a 2 8 S A 2 之完整序列。此外也揭示出編碼犬埃里希氏體全部 5 種同質 2 8 - k D a 外膜蛋白質之一多基因座。

於本發明一實施例中，提出編碼犬埃里希氏體 3 0 - k D a 免疫反應性蛋白質之 D N A 序列。較佳者，該蛋白質具有選自 S E Q I D N O . 2，S E Q I D N O . 4 和 S E Q I D N O . 6 之中的胺基酸序列，且該基因具有選自 S E Q I D N O . 1，S E Q I D N O . 3 和 S E Q I D N O . 5 之中的核酸序列並為一多形多基因族之一員。更佳者，該蛋白質具有一 N - 端信號序列共在後一轉譯程序後切斷導致一成熟 2 8 - k D a 蛋白質之產生。甚至更佳者，該編碼 2 8 - k D a 蛋白質的 D N A s 係包含在單一多基因座內其具有 5 . 5 9 2 k b 之大小且編碼犬埃里希氏體的全部五種同質性 2 8 - k D a 蛋白質。

於本發明另一實施例中，提出一種表現載體其包括一編碼犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質之基因且能夠在該載體經導到一細胞內時表現該基因。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

後

五、發明說明(8)

於本發明又另一實施例中，提出一種重組蛋白質其包括一選自 SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 和 SEQ ID NO. 6 之中的胺基酸序列。較佳者，該胺基酸序列係由選自 SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 5 之中的核酸序列所編碼。較佳者，該重組蛋白質包括四個可變區其經表面曝露出，具親水性和抗原性。甚至較佳者，該重組蛋白質為一種抗原。

於本發明又另一實施例中，提出一種產生重組蛋白質之方法，其包括下列諸步驟：取得一載體其包括一表現區內含編碼選自 SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 和 SEQ ID NO. 6 之中的胺基酸序列且經操作地聯結到一啟動子之序列；將該載體轉染到一細胞內；及在可以有效地表現該表現區的條件下培養該細胞。

本發明也可在某些實施例中說明為一種抑制一對象受犬埃里希氏體感染之方法其包括下列諸步驟：鑑定出疑似業經暴露到犬埃里希氏體或經其感染之對象；及給該對象服用一組成物其包括一可有效抑制犬埃里希氏體感染的量之犬埃里希氏體 28 - k D a 抗原。該抑制作用可透過任何手段而發生，例如刺激對象的體液或細胞免疫反應，或經由其它手段例如抑制該 28 - k D a 抗原的正常功能，或甚至於與抗原競爭該對象體內某種藥劑之交互作用。

根據本發明可以採用技藝技術範圍內的習用分子生物學，微生物學，和重組 D N A 技術。彼等技術在文獻中有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

完整地解說，參看，例如，Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach," Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription and Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

因此，若在本文出現時，下列諸名詞具有下面所述之定義。

“複製子” (replicon) 為可在體內作為 D N A 複製的自主單位之任何遺傳元件 (如質體，染色體，病毒)，亦即，其能夠在本身的控制下進行複製。

“載體”為一種複製子，例如質體，噬菌體或粘接質體，其上接有另一 D N A 節段以促成所接節段的複製者。

“D N A 分子”指的是去氧核糖核苷酸 (腺嘌呤，鳥嘌呤，胸腺嘧啶，胞嘧啶) 之聚合物形式，其可呈單股形式，或雙股螺旋。此名詞只代表該分子的一級和二級構造，而不將其限制到任何特別的三級形式。依此，此名詞包括雙股 D N A 其出現於，與其它一起者，線型 D N A 分子 (如，限制片段)，病毒，質體，和染色體之中者。在本文中討論構造時係根據一般慣例只依沿著未轉錄 D N A 股 (亦即，對 m R N A 具序列同質性之股) 的 5 ' 至 3 ' 方

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

向給出序列。

D N A “密碼序列”為雙股 D N A 序列其在恰當調節序列的控制下可在活體內經轉錄和轉譯成多肽。密碼序列的邊界係由在 5' (胺基) 端的起始密碼子與在 3' (羧基) 端的轉譯停止密碼子所決定。密碼序列可包括，但不限於，原核生物序列，得自真核生物 m R N A 的 c D N A，來自真核生物 (如，哺乳動物) D N A 的基因組 D N A 序列，及甚至於合成型 D N A 序列，於密碼序列的 3' 常有一聚腺苷酸化信號序列及轉錄終止序列。

轉錄和轉譯控制序列皆為 D N A 調節序列，例如啟動子，強化子 (enhancers)，聚腺苷酸化信號，終止基因，等，提供密碼序列在宿主細胞內的表現所用者。

“啟動子序列”為一 D N A 調節區其能夠在細胞內結合 R N A 聚合酶及起始下游 (3' 方向) 密碼序列的轉錄。為了定義本發明目的起見，啟動子序列係在其 3' 端結合轉錄起始部位且向上游 (5' 方向) 延展以包括起始在背景上可偵檢到水平之轉錄所需的最低數目之鹼或元件。在啟動子序列內含有一轉錄起始部位以及促成 R N A 聚合酶結合的蛋白質結合功能部位 (一致序列)。真核生物啟動子常，但非總是，含有 “T A T A” 匣和 “C A T” 匣。原核生物啟動子除了 - 1 0 和 - 3 5 一致序列之外含有 S - D 序列 (Shine-Dalgarno sequence)。

“表現控制序列”為一 D N A 序列其可控制和調節另一 D N A 序列的轉錄和轉譯。密碼序列後 “在 R N A 聚合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

酶要將該密碼序列轉錄成 m R N A ，其接著經轉譯成該密碼序列所編碼的蛋白質之時處於轉錄和轉譯控制序列的控制之下”。

“信號序列”可包括在靠近密碼序列之處。此序列編碼一信號肽，位於多肽的 N - 端處，其可與宿主細胞溝通以導引該多肽到細胞表面或將該多肽分泌到培養基內，且在蛋白質離開細胞之前此信號肽即被剪掉。信號序列常與多種原核生物和真核生物天生蛋白質相關聯。

“寡核苷酸”一詞於本文中係用以指本發明探針 (Probe) ，且經定義為由兩個或更多個核糖核苷酸，較佳者 3 個以上者所構成之分子。其真正的大小決定於許多因素其轉而決定於該寡核苷酸的最終功能和用途。

“引子” (primer) 一詞於本文中係用以指一寡核苷酸，不論為自然發生者或經純化的限制消化物或合成方式產生者，在置於誘導對核酸股互補的引子延伸產物之合成的條件，亦即於核苷酸與誘導劑例如 D N A 聚合酶的存在中及適當的溫度和 p H 下，之時，能夠作為合成起始點者。引子可為單股或為雙股且必須足夠長以在誘導劑存在中導引合意延伸產物之合成。引子的實際長度決定於許多因素，包括溫度，引子來源及方法用途。例如，用於診斷應用時，決定於目標序列的複雜性，該寡核苷酸引子典型地含有 1 5 - 2 5 或更多個核苷酸，雖則其亦可含有較少的核苷酸。

本發明引子係經選擇成對特別標的 D N A 序列的不同

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

股“實質地”互補者。此意謂著引子必須具足夠互補性以與彼等的個別股雜交。因此，引子序列不需反映出模版的真正序列。例如，可在引子的 5' 端接上一非互補性核苷酸片段，引子的其餘序列則對該股互補。另外，可在引子內散置非互補性鹼或更長的序列，其限制條件為該引子序列要只有對該序列足夠的互補性或可與該序列雜交由是形成供延伸產物合成所用的模版。

當一外源或異質性 D N A 被導到一細胞之內部時該細胞即被該 D N A 所“轉形”。該轉形性 D N A 可能或可能不被整合（共價鍵結）到細胞的基因組內。於例如原核生物，酵母和哺乳動物細胞中，該轉形 D N A 可能保持在基因副體（episomal）元件例如質體之上。就真核生物細胞而言，經穩定轉形的細胞為其中該轉形 D N A 係經整合到染色體內使得其可透過染色體複製而由子細胞遺傳到。這種穩定性係由該真核生物細胞建立由含有轉形 D N A 的子細胞群所構成的細胞系或株系之能力所證實。“株系”（clone）為從單一細胞或先代細胞經由有絲分裂衍生之一群細胞。“細胞系”（cell line）為能夠在試管內（in vitro）穩定生長許多代之一原細胞株系。

兩 D N A 序列在一確定長度的 D N A 序列上有至少約 75 %（較佳者至少 80 %，且最佳者至少約 90 % 或 95 %）核苷酸匹配時即為“實質地同質”。實質同質的序列可經由用序列數據庫中可取得之標準軟體比對諸序列，或在處於，例如，對特殊系統所定義的嚴緊條件下進行

五、發明說明 (13)

的南方氏雜交實驗中，予以鑑定出來。定義恰當的雜交條件係技藝技巧之內者。參看，例如 Maniatis et al., 上文；DNA Cloning, Vols, I&II，上文；Nucleic Acid Hybridization，上文。

D N A 構成物的“異質”區為在一較大 D N A 分子內所含在自然中不與該較大分子締合之可鑑定性 D N A 節段。依此，當異質區包括一哺乳動物基因，該基因常側接著 D N A 其不側接在來源生物基因組內的哺乳動物的基因組 D N A。於另一實施例中，密碼序列為一構成物其中該密碼序列本身不是出現在自然界中者（如一 c D N A 其中基因組密碼序列含有介入子（introns），或具有不同於天生基因的密碼之合成序列）。對偶基因變異或天然發生的突變事件不會產生本文所定義的異質 D N A 區。

最常用於彼等研究中的標記物（labels）為放射性元素，酵素，於暴露到紫外光會發螢光的化學品，及其他者。有許多種螢光物質係已知者且可用為標記物。彼等包括，例如，螢光素，若丹明（rhodamine），金絲雀黃，Texas Red, A M C A 藍和 Lucifer Yellow。特別偵檢性物質為在山羊體內製備的抗一兔子抗體其透過異硫氰酸鹽而與螢光素拼合。

蛋白質也可用放射性元素或用酵素予以標記。放射性標記可用任何現行可用到的計數程序予以偵檢。較佳的同位素可以選自 ^3H ， ^{14}C ， ^{32}P ， ^{35}S ， ^{13}C ， ^{15}N ， ^{51}Cr ， ^{57}Co ， ^{58}Co ， ^{59}Fe ， ^{90}Y ， ^{125}I ，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

^{1 3 1} I , 和 ^{1 8 6} R e 。

酵素標記物同樣有用，且可用任何目前所用的比色法，光譜光度計法，螢光光譜光度計法，電流分析法或氣體定量分析法等技術予以偵檢。酵素係經由與橋聯性分子例如碳化二醯亞胺，二異氰酸酯，戊二醛等而拼合到所選粒子上。可用於彼等程序中的許多酵素都是已知且可利用者。較佳者為過氧化酶， β -葡萄糖苷酸酶， β -D-葡萄糖甘酶， β -D-半乳糖甘酶，脲酶，葡萄糖氧化酶加過氧化酶及鹼性磷酸酶。美國專利第 3, 6 5 4, 0 9 0, 3, 8 5 0, 7 5 2, 和 4, 0 1 6, 0 4 3 號皆利用實施例示出彼等的其它標記物質與方法之揭示內容。

如本文所用者，“宿主”一詞意欲包括不僅是原核生物而且也包括真核生物細胞例如酵母菌，植物和動物細胞。本發明編碼犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質的重組 D N A 分子或基因可用來經由使用諸於此技者所普遍已知的任何技術將宿主轉形。特別較佳者為使用含有本發明編碼犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質的基因之密碼序列的載體於原核生物轉形之目的。

原核生物宿主可包括大腸桿菌 (E. Coli)，鼠傷寒沙門氏菌 (S. typhimurium)，黏質沙雷氏菌 (Serratia marcessens) 與枯草芽胞桿菌 (Bacillus Subtilis)。真核生物宿主包括酵母菌例如巴斯德畢赤酵母 (Pichia pastoris)，哺乳動物細胞和昆蟲細胞。

一般而言，是以含有可幫助嵌入的 D N A 片段有效轉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

錄的啓動子序列之表現載體配合宿主使用。該表現載體典型地含有一複製原，啓動子，終止子，以及能夠在經轉形細胞中提供表現型選擇之特定基因。經轉形的宿主可根據技藝中已知可達到最適細胞生長的手段予以醱酵和培養。

本發明包括一實質純的編碼犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質的 D N A，該 D N A 的一股會在高嚴緊性下雜交到含有至少 15 個連續的 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 所含核苷酸之序列。爲本發明 D N A 所編碼的蛋白質可能與 S E Q I D N O . 2 或 S E Q I D N O . 4 或 S E Q I D N O . 6 中所列胺基酸共有至少 80 % 的序列同一率（較佳者 85 %，更佳者 90 %，且最佳者 95 %）。更佳者，該 D N A 包括 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 密碼核苷酸序列或彼等序列的簡併變異體。

本發明 D N A 要雜交的探針較佳者包括 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 所列密碼核苷酸序列或其互補體所含至少 20 個相連接的核苷酸，更佳者 40 個核苷酸，甚至更佳者 50 個核苷酸，且最佳者 100 個或更多個核苷酸（多達 100 %）。彼等探針可用來以包括下列諸步驟的方法偵檢犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質在人類細胞內之表現：（a）將得自該細胞的 m R N A 接觸經標記的雜交探針；及（b）偵檢該探針與該 m R N A 之雜交。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明（ 16）

本發明也包括一實質純的 D N A 其含有至少 1 5 個相連接的選自 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 中所列核苷酸的區中所含核苷酸（較佳者 2 0 個，更佳者 3 0 個，甚至更佳者 5 0 個，且最佳者全部）。

“高嚴緊性”意指 D N A 雜交和洗滌條件其特徵在於高溫和低鹽濃度，例如 6 5 °C 在約 0 . 1 × S S C 鹽濃度之洗滌條件，或其功能相當者。例如，高嚴緊性條件可包括在約 4 2 °C 下於約 5 0 % 甲醯胺存在中進行雜交；在約 6 5 °C 下用含有 1 % S D S 的約 2 × S S C 進行第一次洗滌；接著用約 0 . 1 × S S C 在約 6 5 °C 下進行第二次洗滌。

“實質純 D N A ”意指不是該 D N A 天然發生背景的部份之 D N A ，其係藉由將該背景所含某些或全部分子分離（部份或全部純化），或藉由變更側接於所示 D N A 的序列而得者。該名詞因而包括，例如，重組 D N A 其係經摻加到載體，自主複雜性質體或病毒，或原核生物或真核生物基因組 D N A 之內，或其係以與其它序列無關的分隔分子存在（如經由聚合酶鏈型反應（P C R）或核酸內切限制酶消化所產生的 c D N A 或基因或 c D N A 片段）。其亦包括重組 D N A 其為編碼加添的多肽序列，如融合蛋白質之雜種基因（hybrid gene）的一部份。此外也包括重組 D N A 其包括 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 所列核苷酸的一部份

五、發明說明 (17)

致使其包括編碼犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質的基因之交替接合變異體。

該 D N A 可具有相對於 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 中所列密碼核苷酸序列之至少約 70 % 的序列同一率，較佳者至少 75 % (如，至少 80 %) ；且最佳者至少 90 % 。兩序列之間的同一率為匹配或同一性位置的數目之直接函數。當同時在兩序列中的一個次單元位置被相同的單體型次單元所佔據，例如若在兩 D N A 分子中的一所予位置都被腺嘌呤所佔據時，則彼等在該位置具同一性。舉例而言，若長度為 10 個核苷酸的序列中有 7 個位置對第 10 - 核苷酸序列中的對應諸位置具有同一性，則該兩序列具有 70 % 序列同一率。比較序列的長度通常為至少 50 個核苷酸，較佳者至少 60 個核苷酸，更佳者至少 75 個核苷酸，且最佳者 100 個核苷酸。序列同一率典型地係使用序列分析軟體予以測量 (例如，Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705) 。

本發明包括一載體其包括一 D N A 序列其包括編碼犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質之基因且該載體能夠在宿主體內複製，該載體包括，以可操作性鍵聯著的 (a) 一複製源； b) 啟動子，和 c) 編碼該蛋白質的 D N A 序列。較佳者，本發明載體含有 S E Q I D

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

條

五、發明說明 (18)

N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D
N O . 5 所示 D N A 序列的一部份。

“載體”可經定義為可複製的核酸構成物，如質體或病毒核酸。載體可經用來擴增及／或表現編碼犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質之核酸。表現載體為一種可複製型構成物其中編碼多肽的核酸序列係經可操作地聯結到適當的能夠促成多肽在細胞內表現出之控制序列。對彼等控制序列的需求係依所選細胞和所用的轉形方法而變異。通常，控制序列包括轉錄啟動子及／或強化子，適當的 m R N A 核糖體結合部位，及控制轉錄和轉譯的終止之序列。可以使用諳於此技者所熟知之方法來構成含有恰當轉錄和轉譯控制信號之表現載體。參看，例如，在 Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Cold Sping Harbor Press, N. Y. 中所載諸技術。一基因與共轉錄控制序列在該轉錄控制序列可以有效地控制該基因的轉錄時即經定義為“可操作地聯結著”。本發明載體包括，但不限於，質體載體與病毒載體。較佳的本發明病毒載體為衍生自反轉錄病毒，腺病毒，腺病毒伴隨病毒，S V 40 病毒，或疱疹病毒。

“實質純蛋白質”意指從天然伴隨著的至少某些成分分離開之蛋白質。典型地，該蛋白質在至少 60 % 不含共在活體內 (in vivo) 天然伴隨著的蛋白質與其它天然發生的有機分子時即為實質地純者。較佳者，該製備物的純度為至少 75 重量 %，更佳者至少 90 重量 % 且最佳者至少

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

給

五、發明說明 (19)

99 重量 %。實質純的犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質可經由，例如從天然來源萃取；經由表現編碼犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質的重組核酸，或經由化學合成該蛋白質而得到。純度可經由任何恰當方法而測得，例如，管柱層技術如免疫親和性層析術其中係使用對犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質具特定性之抗體，聚丙烯醯胺凝膠電泳，或 H P L C 分析。蛋白質在與至少某些於其自然狀態中相伴隨的彼等雜質分離時即為實質地不含自然伴隨成分。依此，經化學合成或在不同於其自然起源的細胞之細胞系統中產生之蛋白質即為，依定義，實質地不含其自然伴隨成分者。因此，實質純蛋白質包括在大腸桿菌，其它原核生物，或彼等不自然發生的任何其它生物中合成之真核生物蛋白質。

除了實質全長度蛋白質之外，本發明也包括犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質 (S E Q I D N O : 2 或 S E Q I D N O . 4 或 S E Q I D N O . 6) 的片段 (如，抗原性片段)。如本文所用者，“片段”係用於一多肽，其長度通常比完整固有序列少至少 10 個殘基，更典型者少至少 20 個殘基，且較佳者至少 30 (如，50) 個殘基。犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質片段可經由諸於此技者所已知的方法產生，例如將天然發生型或重組型犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質予以酵素消化，經由使用編碼著確定的犬埃里希氏體 28 - k D a 免疫反應性蛋白質片段

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

作

五、發明說明 (20)

的表現載體實施重組 D N A 技術，或經由化學合成。候選片段展現出犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質所具特性（如，結合到對犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質具特定性的抗體）之能力可用本文所述方法予以評估。經純化的犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質或犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質抗原片段可用來產生新的抗體或採用諳於此技者所知的標準方案測試既有的抗體（如在診斷檢定中作為陽性對照樣）。包括在本發明中者為經由使用犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質或犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質片段作為在，例如兔子內的免疫原所產生的多株抗血清。其中係採用諳於此技者所已知的單株和多株抗體產生用之標準方案。以這種程序產生的單株抗體可經針對其鑑定重組犬埃里希氏體 c D N A 株系之能力，及將彼等與已知 c D N A 株系區別之能力進行篩選。

本發明更包括犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質片段其係由 S E Q I D N O : 1 或 S E Q I D N O . 3 或 S E Q I D N O . 5 所含部份所至少部份地編碼，例如交替 m R N A 接合產物或交替蛋白質處理事件的產物，或其中有一段序列經刪除者。犬埃里希氏體 2 8 - k D a 免疫反應性蛋白質的片段或完整蛋白質可經共價地鍵聯到另一多肽，如作為標記的，配體或增加抗原性的工具者。

“醫藥可接受”一語指的是在給人類服用時不會產生

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

始

五、發明說明 (21)

過敏性或類似的不當反應之分子整體和組成物。含有蛋白質作為活性成分的水性組成物之製備係技藝中熟知者。典型地，彼等組成物係經製備成注射劑，可為液體溶液或懸浮液；不過也可以製備成適合在注射前溶於或懸浮於液體內之固體形式。製劑也可以經乳化。

蛋白質可用中性或鹽形式調配到組成物內。醫藥可接受鹽，包括酸加成型（與蛋白質所含自由胺基形成者）且其係與無機酸例如鹽酸或磷酸，或與有機酸如乙酸，草酸，酒石酸，扁桃酸等形成者。與自由羧基形成的鹽也可以衍生自無機鹼例如，鈉，鉀，銨，鈣，或鐵的氫氧化物，及有機鹼例如異丙胺，三甲胺，組胺酸，普魯卡固，等。

調配之後，可用與劑方相容的方式及以治療有效量給用。該調配物可用多種劑形例如注射液而容易地給用。

供以例如，水溶液形式非經腸給用時，可視需要將溶液適當地緩衝且將液體稀釋劑先用足量的食鹽水或葡萄糖予以變成等張性。彼等特別的水溶液特別適合於靜脈內，肌肉內，皮下，和腹膜內給用。於此方面，可以採用的無菌水性介質皆為諳於此技者就本揭示內容看來為已知者。例如，可將一劑量溶到 1 毫升等張性 NaCl 溶液中，再加入到 100 毫升皮下灌注液中或於擬定的注輸部位進行注射（參看例如 “Remington's Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 和 1570-1580）。劑量會因接受治療的對象之情況而必須有某些變異。無論如何，負責給藥者都要針對個別對象決定恰當的劑量。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

如技術中所熟知者，所給多肽可能在其免疫原性有所變異。所以常需將免疫原（如，本發明多肽）搭配載劑。範例和較佳載劑為鑰匙血藍蛋白（K L H）和人類血清白蛋白。其它載劑可包括多種淋巴細胞活素和佐劑例如 I L 2，I L 4，I L 8 和它者。

將多肽拼合到載劑蛋白質所用的工具皆為技藝中熟知者且包括戊二醛，間－順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基－N－羥基丁二醯亞胺酯，碳化二醯亞胺和雙－二偶氮化聯苯胺。此外也要知道者，也可以經由技藝中熟知的遺傳工程技術將肽拼合到蛋白質。

技藝中也熟知者，對一特殊免疫原的免疫原性可經由使用非特定性免疫反應刺激劑稱為佐劑者予以增強。範例且較佳的佐劑包括完全 B C G，Detox（RIBI Immunochem Research Inc.）ISCOMS 和氫氧化鋁佐劑（Superphos, Biosector）。

如本文所用者“補體”一詞係用以定義一核酸股其可在嚴緊條件下雜交到第一核酸序列以形成雙股型分子。嚴緊條件為可使兩核酸序列以高度同質性雜交，但排除掉無規序列的雜交者。例如，在低溫／或高離子強度下雜交稱為低嚴緊性而在高溫及／或低離子強度下雜交稱為高嚴緊性。合意嚴性的溫度和離子強度經了解係可應用於特殊探針強度，序列的長度和鹼含量及雜交混合物中的甲醯胺之存在。

如本中所用者，“（經遺傳工程）處理”（engineered

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

）或“重組”的細胞一詞意欲指稱其內部已導入重組基因之細胞，例如導入編碼 *Ehrlichia chaffeensis* 抗原的基因者。所以，經處理細胞可與不含重組導入基因的天然發生細胞相區別。經處理細胞因而為具有透過人手導入的基因或多基因之細胞。重組導入的基因係呈 c D N A 基因，基因組基因複本之形式，或包括鄰接著不是自然伴隨該特殊導入基因的啓動子之基因。此外，重組基因可經整合到宿主基因組內，或可包含在載體內，或在經轉染到宿主細胞內的細菌基因組內。

下面的實施例係給出以闡明本發明各種實施例所用而無意以任何方式限制本發明。

實施例 1

埃里希氏體與純化

犬埃里希氏體（佛羅里達株和分離株 Demon, DJ, Jake, and Fuzzy）係由 Dr. Edward Breitschwerdt, (College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC) 所提供。犬埃里希氏體（路易斯安株）是由 Dr. Richard E. Corstvet (School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA) 所提供而犬埃里希氏體（奧克拉荷馬株）係由 Dr. Jacqueline Dawson (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) 所提供。埃里希氏體的繁殖係在 D H 8 2 細胞內於補充 1 0 % 小牛血清和 2 m M L - 穀胺醯胺的 D M E M 中在 3 7

五、發明說明 (24)

℃ 下實施。在 D H 8 2 細胞中的細胞內生長係使用一般細胞學染色方法以犬埃里希氏體桑葚體的存在予以監測。在 1 0 0 % 細胞皆經埃里希氏體感染時收取細胞並於離心機內以 1 7 , 0 0 0 x g 沈著 2 0 分鐘。用 Braun-Sonic 2000 超聲波處理機在 4 0 W , 於冰上將細胞丸打碎 3 0 秒。依先前所述 (Weiss et al., 1975) 純化埃里希氏體。將溶裂物裝載在 4 2 % - 3 6 % - 3 0 % 泛影葡胺不連續梯度上並以 8 0 , 0 0 0 x g 離心一小時。收集含有埃里希氏體的重帶與輕帶並用蔗糖 - 磷酸鹽 - 穀胺酸緩衝液 (S P G , 2 1 8 m M 蔗糖 , 3 . 8 m M KH_2PO_4 , 7 . 2 m M K_2HPO_4 , 4 . 9 m M 穀胺酸 , p H 7 . 0) 予以洗滌後再離心沈著。

實施例 2

核酸製備

犬埃里希氏體基因組 D N A 係經由將經泛影葡胺純化的埃里希氏體再懸浮於 6 0 0 微升含 1 % 十二烷基硫酸鈉 (S D S , w / v) 和 1 0 0 毫微克 / 毫升蛋白酶 K 的 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 7 . 5) 內依先前所述 (McBride et al., 1996) 予以製備。將此混合物溫浸在 5 6 ℃ 下一小時後, 用酚 / 氯仿 / 異戊醇 (2 4 : 2 4 : 1) 混合物萃取核酸兩次。以絕對乙醇沈澱法沈澱 D N A , 用 7 0 % 乙醇洗一次, 乾燥後再懸浮於 1 0 m M T r i s (p H 7 . 5) 內。使用 High Pure Plasmid

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 純化質體 D N A , 並使用 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA) 純化 P C R 產物。

實施例 3

犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質基因之 P C R 擴增

經選擇要供 P C R 擴增所用的犬埃里希氏體

E C a 2 8 - 1 基因區係根據在 E. chaffeensis p28 和反芻類考德里氏體 m a p - 1 基因的 Jotun-Hein 算法比對產生的一致序列中所觀察到的同質率 (> 9 0 %) 為基礎進行選擇。前向引子 7 9 3 (5 - G C A G G A G C T G T T G G T T A C T C - 3 ') (S E Q I D N O . 1 6) 與逆向引子 1 3 3 0 (5 ' - C C T T C C T C C A A G T T C T A T G C C - 3 ') S E Q I D N O . 1 7) 係分別對應於反芻類考德里氏體 M A P - 1 的核苷酸 3 1 3 - 3 3 2 和 8 2 3 - 8 4 3 及 E. chaffeensis p28 的核苷酸 3 0 7 - 3 2 6 和 8 3 4 - 8 1 4 。犬埃里希氏體 (a North Carolina isolate, Jake) D N A 係經用引子 7 9 3 和 1 3 3 0 擴增其中所用熱循環剖面為 9 5 ° C 2 分鐘 , 和 3 0 個循環的 9 5 ° C 3 0 秒 , 6 2 ° C 一分鐘 , 7 2 ° C 2 分鐘接著 7 2 ° C 伸展 1 0 分鐘 , 及保持在 4 ° C 。 P C R 產物係在 1 % 瓊脂糖凝膠上分析的。此種經擴大的 P C R 產物再用引子 7 9 3 和 1 3 3 0 直接定序。

使用對 E C a 2 8 S A 2 基因具特定性經命名為

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

4 6 f 的引子 (5' - A T A T A C T T C C T A C C T A A T G T C T C A - 3' , S E Q I D N O . 1 8) 和引子 1 3 3 0 (S E Q I D N O . 1 7) 來擴增目標區。將擴增產物予以凝膠純化並選殖到 T A 選殖載體內 (Invitrogen, Santa Clarita, CA) 。用引子 : M 1 3 逆向得自載體 , 4 6 f , E C a 2 8 S A 2 (5' - A G T G C A G A G T C T T C G G T T T C - 3' , S E Q I D N O . 1 9) E C a 5 . 3 (5' - G T T A C T T G C G G A G G A C A T - 3' , S E Q I D N O . 2 0) 對選殖物進行雙向定序。用下面的熱循環剖面擴增 D N A : 9 5 ° C 2 分鐘 , 和 3 0 個循環的 9 5 ° C 3 0 秒 , 4 8 ° C 一分鐘 , 7 2 ° C 一分鐘接著 7 2 ° C 伸展 1 0 分鐘及保持在 4 ° C 。

實施例 4

定序 E C a 2 8 - 1 基因的未知 5' 和 3' 區

使用 Universal GenomeWalker Kit (CLONTECH, Palo Alto, CA) 根據製造商所提供的方案測定 E C a 2 8 - 1 的全長度序列。使用 5 種限制酵素 (DraI, EcoRV, PvuII, ScaI, StuI) 將基因組犬埃里希氏體 (Jake 分離株) D N A 完全消化產生鈍端 D N A 。將套劑中供應的一轉接子 (A P 1) 連接到犬埃里希氏體 D N A 的每一端。使用基因組庫作為模版 , 採用一對 E C a 2 8 - 1 序列的已知部分具互補性之引子及一對轉接子 A P 1 具特定性的引子經由

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

P C R 尋找 E C a 2 8 - 1 基因的未知 D N A 序列。對 E C a 2 8 - 1 具特定性用於基因組行走 (genome walking) 的引子係從用引子 7 9 3 (S E Q I D N O . 1 6) 和 1 3 3 0 (S E Q I D N O . 1 7) P C R 擴增 E C a 2 8 - 1 衍生所得已知 D N A 序列設計而得者。使用引子 3 9 4 (5 ' - G C A T T T C C A C A G G A T C A T A G G T A A - 3 ' ; 核苷酸 6 8 7 - 7 1 0 , S E Q I D N O . 2 1) 和 3 9 4 C (5 ' - T T A C C T A T G A T C C T G T G G A A A T G C - 3 ; 核苷酸 7 1 0 - 6 8 7 , S E Q I D N O . 2 2) 配合所供應的引子 A P 1 經由 P C R 擴增 E C a 2 8 - 1 基因的未知 5 ' 和 3 ' 區。用引子 3 9 4 C 和 A P 1 擴增所得對應於 E C a 2 8 - 1 基因 5 ' 區的 P C R 產物 (2 0 0 0 - b p) 再用引子 7 9 3 C (5 ' - G A G T A A C C A A C A G C T C C T G C - 3 ' , S E Q I D N O . 2 3) 予以雙向定序。用引子 3 9 4 和 A P 1 擴增所得對應於 E C a 2 8 - 1 基因 3 ' 區的 P C R 產物 (5 8 0 - b p) 再用相同引子予以雙向定序。將 5 ' 和 3 ' 區上鄰接開放讀碼架構的非密碼區皆經定序, 並設計出對這些區具互補性的引子 E C 2 8 O M - F (5 ' - T C T A C T T T G C A C T T C C A C T A T T G T - 3 ' , S E Q I D N O . 2 4) 和 E C 2 8 O M - R (5 ' - A T T C T T T T G C C A C T A T T T T T C T T T - 3 ' , S E Q I D N O . 2 5) 用以擴增整

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (28)

個 E C a 2 8 - 1 基因。

實施例 5

犬埃里希氏體分離株之定序

用 ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA)定序 D N A 。七犬埃里希氏體分離株 (四株來自北卡羅來納, 及來自奧克拉荷馬, 佛羅里達, 和路易西安那的各一株) 所含整個 E C a 2 8 - 1 基因皆用引子 E C 2 8 O M - F (S E Q I D N O . 2 4) 和 E C 2 8 O M - R (S E Q I D N O . 2 5) 以下述熱循環剖面予以 P C R 擴增: 9 5 ° C 5 分鐘, 及 3 0 個循環的 9 5 ° C 3 0 秒, 6 2 ° C 一分鐘, 和 7 2 ° C 2 分鐘及 7 2 ° C 延伸 1 0 分鐘。所得 P C R 產物再用相同的引子予以雙向定序。

實施例 6

犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 的選殖與表現

用引子 - E C 2 8 O M - F 和 E C 2 8 O M - R 將整個犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 基因予以 P C R - 擴增並選殖到 p C R 2 . 1 - T O P O T A 選殖載體內以得到合意組合的限制酵素切斷部位 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 。用 B s t X 1 從 p C R 2 . 1 - T O P O 切下該嵌體並連接到 p c D N A 3 . 1 真核生物表現載體內 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 命名為 p c D N A 3 . 1 /

五、發明說明 (31)

實施例 9

序列分析和比較

E. chaffeensis p28 和反芻類考德里氏體 m a p - 1 D N A 序列係得自 the National Center of Biotechnology Information (NCBI) (World Wide Web site at URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)。核苷酸序列與經推演出的胺基酸序列，以及蛋白質分析與種系分析都是用 LASERGENE 軟體 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) 實施的。後一轉譯處理的分析是以 McGeoch and von Heijne 對信號序列辨識的方法使用 P S O R T 程式實施的 (McGeoch, 1985; von Heijne, 1986) (World Wide Web site at URL: PRIVATE HREF= "<http://www.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/form.htm>", MACROBUTTON HtmlResAnchor <http://www.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/form.htm>)。

本研究所述犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 基因的核酸序列和胺基酸序列之 GenBank 登錄號碼為： Jake, AF082744; Louisiana, AF082745; Oklahoma, AF082746; Demon, AF082747; DJ, AF082748; Fuzzy, AF082749; Florida, AF082750。

得自七不同犬埃里希氏體株的 E C a 2 8 - 1 之序列分析係用經設計成用以擴增整個基因的引子實施的。分析揭露出此基因的序列在得自北卡羅來納 (四株)，路易西安那，佛羅里達和奧克拉荷馬的諸分離株之間具保守性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

實施例 10

E C a 2 8 - 1 的 P C R 擴增，選殖，定序和表現

使用 Jotun-Hein 算法比對得自 *E. chaffeensis* p28 和反芻類考德里氏體 *m a p - 1* 的核酸序列產生一有高同質率 ($> 90\%$) 區之一致序列。這些同質區 (*反芻類考德里氏體 m a p - 1* 的核苷酸 3 1 3 - 3 3 2 和 8 2 3 - 8 4 3 ; *E. chaffeensis* p28 的 3 0 7 - 3 2 6 和 8 1 4 - 8 3 4) 都作為引子對合部位接受目標導引而用於 P C R 擴增中。犬埃里希氏體 *E C a 2 8 - 1* 和 *E. chaffeensis* p28 基因的擴增係用引子 7 9 3 和 1 3 3 0 完成的，導致 5 1 8 - b p P C R 產物。犬埃里希氏體 P C R 產物的核酸序列係經由使用引子 7 9 3 和 1 3 3 0 直接將產物定序而得者。序列分析揭露出編碼 1 7 0 胺基酸蛋白質之開放讀碼，且犬埃里希氏體 P C R 擴增所得 5 1 8 - b p 序列與 *E. chaffeensis* p28 基因的 D N A 序列之併列比對顯露出大於 7 0 % 的類似性，顯示該等基因係同質者。用引子 3 9 4 和 7 9 3 C 實施轉接子 P C R 以測定整個基因所含序列的 5 ' 和 3 ' 節段。引子 3 9 4 產生四種 P C R 產物 (3 - k b , 2 - k b , 1 - k b , 和 0 . 8 - k b) ，且該 0 . 8 - b p 產物係經由使用引子 3 9 4 和 A P 1 予以雙向定序。推導出的序列與 5 1 8 - b p 產物的 3 ' 端相重疊，將開放讀碼架構向終止密碼子延伸 1 2 - b p 。此外也對 *E C a 2 8 - 1* 基因 3 ' 端的另一 6 2 5 - b p 非密碼序

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (33)

列予以定序。使用引子 3 9 4 C 與供給的引子 A P 1 來擴增 E C a 2 8 - 1 基因的 5' 端。用這些引子擴增導致三種 P C R 產物 (3 . 3 - k b , 3 - k b , 和 2 - k b) 。用引子 7 9 3 C 對 2 - k b 片段進行單向定序。其序列提出 E C a 2 8 - 1 基因的推定起始密碼子且完成編碼 2 7 8 胺基酸蛋白質的 8 3 4 - b p 開放讀碼架構。產生在 E C a 2 8 - 1 基因 5' 非密碼區中的另一 1 4 4 - b p 可讀性序列。從鄰接 E C a 2 8 - 1 基因的互補非密碼區設計出引子 E C 2 8 O M - F 和 E C 2 8 O M - R 。

用這些引子擴增所得 P C R 產物係用相同的引子直接定序。犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 基因的完全 D N A 序列 (S E Q I D N O . 1) 示於圖 1 之中。用這些引子擴增所得 E C a 2 8 - 1 P C R 片段含有完整的開放讀碼架構及從 5' 非密碼引子區的 1 7 附加胺基酸。將該基因導引地分殖到 pThioHis 表現載體內，並用此構成物轉形大腸桿菌 (B L 2 1) 。表現出的 E C a 2 8 - 1 硫氧化還原蛋白融合蛋白質係不可溶者。表現出的蛋白質在 N 端具有伴隨著硫氧化還原蛋白的附加 1 1 4 胺基酸，用為腸激酶辨識部位的 5 個胺基酸，及來自多選殖部位與 5' 非密碼引子區的 3 2 個胺基酸。得自經犬埃里希氏體感染的狗之恢復期抗血清可辨識該經表現的重組融合蛋白質，但不與硫氧化還原蛋白對照樣發生反應 (圖 2) 。

實施例 1 1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

序列同質性

E C a 2 8 - 1 (8 3 4 - b p) 和 E. chaffeensis omp-1 基因族的核酸序列包括信號序列 (E C a 2 8 - 1 , o m p - 1 A , B , C , D , E , 和 F) , 皆使用 Clustal 法予以對齊比較以檢討這些基因的同質性 (并列情形未示出) 。在 E C a 2 8 - 1 與 E. chaffeensis p28 及 o m p - 1 F 之間同樣保留住核酸同質性 (6 8 . 9 %) 。在 E. chaffeensis omp-1 族中的其它推定外膜蛋白質基因 , o m p - 1 D (6 8 . 2 %) , o m p - 1 E (6 6 . 7 %) , o m p - 1 C (6 4 . 1 %) , 反芻類考德里氏體 m a p - 1 (6 1 . 8 %) , 犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質 1 基因 (6 0 %) 與 2 8 - k D a 蛋白質 2 基因 (部份) (5 9 . 5 %) 也對 E C a 2 8 - 1 呈同質性。E. chaffeensis omp-1B 對 E C a 2 8 - 1 具有最低的核酸同質率 (4 5 . 1 %) 。

E C a 2 8 - 1 預測胺基酸序列 (S E Q I D N O . 2) 與 E. chaffeensis p28 的比對顯露出胺基酸取代導致四可變區 (V R) 。E C a 2 8 - 1 與 E. chaffeensis omp-1 族所含可變區的胺基酸序列中之取代或缺失及其位置皆經鑑定出 (圖 3) 。包括信號肽的胺基酸比較揭露出 E C a 2 8 - 1 擁有與 E. chaffeensis omp-1 族中的 O M P - 1 F (6 8 %) 最大之同質率 , 接著為 E. chaffeensis p28 (6 5 . 5 %) , O M P - 1 E (6 5 . 1 %) , O M P - 1 D (6 2 . 9 %) , O M P - 1 C (6 2 . 9 %) , 反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (35)

芻類考德里氏體 M A P - 1 (5 9 . 4 %) , 犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質 1 (5 5 . 6 %) 和 2 8 - k D a 蛋白質 2 (部份) (5 3 . 6 %) , 及 O M P - 1 B (4 3 . 2 %) 。以胺基酸序列為基的種系關係顯示 E C a 2 8 - 1 與反芻類考德里氏體 M A P - 1 , E. chaffeensis omp-1 蛋白質 , 及犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質 1 和 2 (部份) 都有相關聯 (圖 4) 。

實施例 1 2

預測的表面機率與免疫反應性

使用水療法 (hydropathy) 和親水性剖面分析犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 以預測在 E C a 2 8 - 1 上的表面暴露區 (圖 6) 。在 E C a 2 8 - 1 上面鑑定出八個含 3 至 9 個胺基酸的主要表面暴露區且都類似於在 E. chaffeensis p28 上所含表面暴露區剖面 (圖 6) 。在 E C a 2 8 - 1 上面有 5 個較大的表面暴露區係位於蛋白質的 N - 端區。表面暴露親水性區都出現在 E C a 2 8 - 1 的所有四個可變區內。使用 Rothbard-Taylor 算法預測出 E C a 2 8 - 1 中有 1 0 個 T - 細胞型主 (Rothbard and Taylor, 1988) , 並用 Jameson-Wolf 抗原性算法預測出 E C a 2 8 - 1 的高抗原性 (圖 6) (Jameson and Wolf, 1988) 。於 E C a 2 8 - 1 與 E. chaffeensis p28 之間可觀察到在抗原性與 T - 細胞型主上的類似性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (36)

實施例 1 3

E C a 2 8 - 1 基因同質基因組複本之偵檢

對於經用不在 E C a 2 8 - 1 基因內有核酸內切限制酶部位的限制酵素 B a n II , E c o R V , H a e II , K p n I , S p e I , 及在核苷酸 3 4 , 4 3 和 6 5 6 有核酸內部限制酶部位的 A s e I 獨立地完全消化過之犬埃里希氏體 D N A 進行基因組南方氏點漬分析顯露出含有至少三個同質 E C a 2 8 - 1 基因複本 (圖 5) 。雖然 E C a 2 8 - 1 具有內部 A s e I 內部限制部位 , 但在雜交實驗中所用的 D I G - 標記探針卻目標導向於在該基因經 A s e I 消化產生的單一 D N A 序列內部之基因區。A s e I 消化產生 3 帶 (大約為 5 6 6 - b p , 8 5 0 - b p , 和 3 - k b) 其都可與 E C a 2 8 - 1 D N A 探針雜交顯示出在基因組內含有對 E C a 2 8 - 1 同質之多基因。用 E c o R V 和 S p e I 消化則產生兩個可與 E c a 2 8 - 1 基因探針雜交之帶。

實施例 1 4

2 8 - k D a 蛋白質基因座之鑑定

使用對應於 E C a 2 8 S A 3 內部諸區且名為 E C a S A 3 - 2 的特定引子 (5 ' - C T A G G A T T A G G T T A T A G T A T A A G T T - 3 ' , S E Q I D N O . 2 6) 及可對合到 E C a 2 8 - 1 內的一區之引子 7 9 3 C (S E Q I D N O . 2 3) 來擴增在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (37)

基因 S A 3 與 E C a 2 8 - 1 之間的基因間區。用相同的引子將 8 0 0 - b p 產物定序。用下述熱循環剖面擴增 D N A : 9 5 ° C 2 分鐘及 3 0 個循環的 9 5 ° C 3 0 秒 , 5 0 ° C 一分鐘 , 7 2 ° C 一分鐘接著 7 2 ° C 延伸 1 0 分鐘及保持在 4 ° C 下。

實施例 1 5

2 8 - k D a 蛋白質基因之 P C R 擴增及多基因座之鑑定

爲了特定地擴增在 E C a 2 8 S A 2 下游的可能未知基因，乃使用對 E C a 2 8 S A 2 具特定性之引子 4 6 f，及目標導向於 E C a 2 8 - 1 基因 3' 端上的一保守區之引子 1 3 3 0 進行擴增。用這些引子擴增 - 2 - k b P C R 產物其含有 2 開放讀碼架構。第一個開放讀碼架構含有已知的基因區，E C a S A 2，及該基因先前未定序過的 3' 部份。在 E C a S A 2 下游處發現另一非同一但同質的 2 8 - k D a 蛋白質基因，命名爲 E C a 2 8 S A 3。經由用對 E C a 2 8 S A 3 基因 3' 端具特定性的引子 S A 3 - 2 配合可對合到 E C a 2 8 - 1 5' 端的逆向引子 7 9 3 C 進行擴增而將兩已知基因座連接起來。擴增 8 0 0 - b y P C R 產物其含有 E C a 2 8 S A 3 的 3' 端，在 E C a 2 8 S A 3 與 E C a 2 8 - 1 之間的基因間區 (2 8 N C 3) 及 E C a 2 8 - 1 的 5' 端，而將先前分開的基因座連接起來 (圖 8)。E C a 2 8 S A 2 的 8 4 9 - b p 開放讀碼

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

架構編碼 - 2 8 3 胺基酸蛋白質，且 E C a 2 8 S A 3 具有一編碼 2 8 0 胺基酸蛋白質的 8 4 0 - b p 開放讀碼架構。在 E C a 2 8 S A 3 與 E C a 2 8 - 1 之間的基因間非密碼區具有 3 4 5 - b p 之長度 (圖 7 和 8) 。

實施例 1 6

核酸和胺基酸同質性

使用 Clustal 法將全部五種犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質基因的核酸和胺基酸序列予以比對以探討彼等基因之間的同質性。在犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質基因成員之間觀察到 5 8 至 7 5 % 範圍的核酸同質率及 6 7 至 7 2 % 的類似之胺基酸同質率 (圖 9) 。

實施例 1 7

轉錄啓動子區

經由比較一致性大腸桿菌啓動子區與來自 E. chaffeensis 的啓動子以分析在 2 8 - k D a 蛋白質基因之間的基因間區的啓動子序列 (Yu et al., 1997; McClure, 1985) 。

包括 R B S , - 1 0 和 - 3 5 區的推定啓動子序列係於對應於基因 E C a 2 8 S A 2 , E C a 2 8 S A 3 , E C a 2 8 - 1 和 E C a 2 8 - 2 的 4 基因間序列中鑑定出 (圖 1 0) 。 E C a 2 8 S A 1 上游非密碼區仍未知且未予分析。

五、發明說明 (39)

實施例 1 8

N - 端信號序列

胺基酸序列分析揭露出整個犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 具有 3 0 . 5 - k D a 的推導分子量且整個 E C a 2 8 S A 3 具有 3 0 . 7 k D a 之推導分子量。兩種蛋白質都具有一經預測有 2 3 胺基酸之 N - 端信號肽 (M N C K K I L I T T A L M S L M Y Y A P S I S , S E Q I D N O . 2 7) , 其類似於對 E. chaffeensis p28 (M N Y K K I L I T S A L I S L I S S L P G V S F S , S E Q I D N O . 2 8) , 和 O M P - 1 蛋白質所預測者 (Yu et al., 1998; Ohashi et al., 1998b) 。信號肽酶的較佳切斷部位 (S I S ; S e r - X - S e r) (Oliver, 1985) 係在 E C a 2 8 - 1 的胺基酸 2 1 , 2 2 , 和 2 3 處。此外也含有相同於對 E. chaffeensis p28 預測切斷部位 (S F S) 且位於胺基酸位置 2 5 之另一推定切斷部位 (M N C K K I L I T T A L I S L M Y S I P S I S S F S , S E Q I D N O . 2 9) , 且可導到一有預測分子量為 2 7 . 7 - k D a 之成熟 E C a 2 8 - 1 。先前報導過的 E C a 2 8 S A 2 所具部份序列所含信號切斷部位經預測係在胺基酸 3 0 處。不過信號序列分析預測 E C a 2 8 S A 1 具有一不可切斷之信號序列。

摘要

從多種立克次氏體包括犬埃里希氏體, E. chaffeensis 和

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

反芻類考德里氏體鑑定且選殖出具有類似的分子量之蛋白質 (Reddy et al., 1998; Jorgejan et al., 1993; Ohashi et al., 1998) 。先前已述及在 *E. chaffeensis* 中有單一基因座其含有 6 個同質 p 28 基因，而在犬埃里希氏體中有 2 個基因座，各含一些同質性 28 - k D a 蛋白質基因。

本發明展示對 *E. chaffeensis* omp-1 多基因族和反芻類考德里氏體 m a p - 1 基因同質的編碼犬埃里希氏體成熟 28 - k D a 蛋白質的基因之選殖，表現與示性。鑑定出兩種新的 28 - k D a 蛋白質基因，E C a 28 - 1 和 E C a 28 S A 3 。另一種先前已部份定序過的犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因，E C a 28 S A 2 (Reddy et al., 1998) 在本發明中予以完全定序。此外也揭示出在含有全部五個犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因的犬埃里希氏體內單一基因座之鑑定與示性。

犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質係對 *E. chaffeensis* omp-1 族和反芻類考德里氏體 M A P - 1 蛋白質呈同質性。最同質的犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質 (E C a 28 S A 3 ， E C a 28 - 1 和 E C a 28 - 2) 係在該基因座內依次排列。彼等蛋白質的同質率在 67 . 5 % 至 72 . 3 % 範圍內。於這些 28 - k D a 蛋白質之間的差異率為 27 . 3 % 至 38 . 6 % 。犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質 E C a 28 S A 1 和 E C a 28 S A 2 為同質性最低者，其同質率為 50 . 9 % 至 59 . 4 % 且其差異率為 53 . 3 至 69 . 9 % 。諸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (41)

基因之間的差別主要在於四個高度可變區且可推測出彼等區皆為表面暴露且遭受到免疫系統的選擇性壓力。已有報導 E C a 2 8 - 1 在犬埃里希氏體分離株之間的保守性 (McBride et al., 1999) , 可推測犬埃里希氏體在北美可能為純系者 (clonal) 。相反地, 有報導提及 p 2 8 在諸 E. chaffeensis 分離株之間的明顯異樣性 (Yu et al., 1998) 。

所有犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質都顯示係從 3 0 - k D a 蛋白質經由後轉譯處理成為成熟 2 8 - k D a 蛋白質。最近, 在 E. chaffeensis p28 上鑑別出一信號序列 (Yu et al., 1998) , 且 N - 端胺基酸定序確證該蛋白質係經後 - 轉譯處理過導致該信號序列切斷而產生一成熟蛋白質 (Ohashi et al., 1998) 。 O M P - 1 F 和 O M P - 1 E 的前導序列也已被提出為前導信號肽 (Ohashi et al., 1998) 。在 E. chaffeensis O M P - 1 F , O M P - 1 E 和 p 2 8 上鑑定出的信號序列都對犬埃里希氏體 2 8 - k D a 蛋白質的前導序列具同質性。p 2 8 基因的啟動子序列尚未經實驗測定出, 不過倒有經由比較大腸桿菌與其它埃里希氏體所含 R B S , - 1 0 和 - 3 5 啟動子區之一致序列而鑑定出推定的啟動子區 (Yu et al., 1997; McClure, 1985) 。彼等啟動子序列也使每一基因可潛在地經轉錄和轉譯, 因而推測這些基因可在宿主內差別地表現。狗感染的持續現象可能 p 2 8 基因的差別表現有關導致活體內抗原變化促使生物避開免疫反應。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (42)

犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因經發現展現出對 *E. chaffeensis* omp-1 基因族與反芻類考德里氏體 m a p - 1 基因的核酸與胺基酸序列同質性。先前研究已鑑定出一種犬埃里希氏體 30 - k D a 蛋白質其可與抗 *E. chaffeensis* 的恢復期抗血清反應，不過經認為具有抗原區別性 (Rikihisa et al., 1994)。根據犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質所含四個可變區中的胺基酸取代之比較所得發現可支持這種可能性。彼等發現一起也可推測促成犬埃里希氏體與 *E. chaffeensis* p28 之間的抗原性差異之胺基酸係位於彼等可變區內且都易都接近到免疫系統。據報導該免疫反應性肽係位於反芻類考德里氏體，*E. chaffeensis* 和犬埃里希氏體所含 28 - k D a 蛋白質的可變區內 (Reddy et al., 1998)。犬埃里希氏體與 *E. chaffeensis* p28 的分析揭露出所有可變區都具有經預測的表面暴露胺基酸。對狗的一項研究展示出缺乏犬埃里希氏體與 *E. chaffeensis* 之間的交叉保護 (Dawson and Ewing, 1992)。這種發現可能關聯到 p 28 所含可變區中以及這些埃里希氏體物種所含其它免疫重要性抗原中的抗原性差異。另一研究發現得自經 *E. chaffeensis* 感染患者的恢復期人類抗血清可辨識 *E. chaffeensis* 的 29 / 28 - k D a 蛋白質且也可以與犬埃里希氏體的同質蛋白質反應 (Chen et al., 1997)。在犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質與 *E. chaffeensis* p28 上的同質交叉反應性抗原決定部位顯示出可被免疫系統所辨識。

犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質可能為重要的免疫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

保護性抗原。有幾份報告證實犬埃里希氏體 30 - k D a 抗原展現出強免疫反應性 (Rikihisa et al., 1994; Rikihisa et al., 1992)。得自人類和狗的恢復期抗血清中所含抗體對來自 *E. chaffeensis* 和犬埃里希氏體在此尺寸範圍內的蛋白質有一致性反應，可推測彼等可為重要的免疫保護性抗原 (Rikihisa et al., 1994; Chen et al., 1994; Chen et al., 1997)。此外，對 30，24 和 21 - k D a 蛋白質的抗體係在對犬埃里希氏體發生免疫反應的早期就發現者 (Rikihisa et al., 1994; Rikihisa et al., 1992)，可推測這些蛋白質在疾疾緊急狀態的免疫反應中可能為特別重要者。最近，有一族編碼分子量為 28 - k D a 的外膜蛋白質之同質基因已在 *E. chaffeensis* 中鑑定出，且用重組 *E. chaffeensis* p28 免疫化的小鼠顯示出具有發展出的對抗同質挑激之免疫性 (Ohashi et al., 1998)。 *E. chaffeensis* p28 業經證實係存在於外膜中，且免疫電子顯微術已將 p 28 定位出係位於生物體表面上，因而推測其可作為黏附素 (adhesin) (Ohashi et al., 1998)。同樣地，在本研究中鑑定出的犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質具有相同的位置且可能用為類似的功能。

將來自不同株犬埃里希氏體的 E C a 28 - 1 進行比較揭露出該基因顯然後完全保守者。涉及 *E. chaffeensis* 的研究已證實 E C a 28 - 1 中的多異性之免疫學和分子證據。經 *E. chaffeensis* 感染的患者對 29 / 28 - k D a 蛋白質具有可變的免疫反應性，可推測其中有抗原多異性 (Chen

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (44)

et al., 1997) 。最近已產生支持 *E. chaffeensis* p28 基因中有抗原多異性之證據 (Yu et al., 1998) 。五種 *E. chaffeensis* 分離株的比較揭露出其中兩分離株 (Sapula 和 St. Vincent) 係 100 % 相同者，但其餘三株 (Arkansas, Jax, 91HE17) 係在胺基酸水平上有多達 13.4 % 之互異性。

ECa28-1 的保守性可推測在美國發現的犬埃里希氏體株可能為遺傳上相同者，因而犬埃里希氏體 28-kDa 蛋白質為一種吸引人的疫苗候選物可供美國犬埃里希氏體症所用。對美國以外的犬埃里希氏體分離株進一步分析可提供有關犬埃里希氏體來源與演化之資料。28-kDa 蛋白質的保守性使其成為犬埃里希氏體症的可靠血液診斷之一重要潛在候選物。

多同質基因的角色在此點上尚屬未知；不過，犬埃里希氏體對狗的感染之持續性可以理解地係有關因同質 28-kDa 蛋白質基因的可變性表現所致抗原變異性，因而使犬埃里希氏體能夠逃避免疫監視。邊緣無形體 (*Anaplasma marginale*) 中 msp-3 基因的變異性部份地促成 MSP-3 蛋白質之變異，而導致持久性感染 (Alleman et al., 1997) 。在經急性與慢性感染的狗內探討犬埃里希氏體 28-kDa 蛋白質基因表現之研究可提供該 28-kDa 蛋白質基因族在感染持續性中的角色上之深入瞭解。

下列參考文獻係在本文中引述者。

五、發明說明 (45)

- Alleman A.R., et al., (1997) *Infect Immun* **65**: 156-163.
- Anderson B.E., et al., (1991) *J Clin Microbiol* **29**: 2838-2842.
- Anderson B.E., et al., (1992) *Int J Syst Bacteriol* **42**: 299-302.
- Brouqui P., et al., (1992) *J Clin Microbiol* **30**: 1062-1066.
- Chen S.M., et al., (1997) *Clin Diag Lab Immunol* **4**: 731-735.
- Chen S.M., et al., (1994) *Am J Trop Med Hyg* **50**: 52-58.
- Dawson J.E., et al., (1992) *Am J Vet Res* **53**: 1322-1327.
- Dawson J.E., et al., (1991) *J Infect Dis* **163**: 564-567.
- Donatien, et al., (1935) *Bull Soc Pathol Exot* **28**: 418-9.
- Ewing, (1963) *J Am Vet Med Assoc* **143**: 503-6.
- Groves M.G., et al., (1975) *Am J Vet Res* **36**: 937-940.
- Harrus S., et al., (1998) *J Clin Microbiol* **36**: 73-76.
- Jameson B.A., et al., (1988) *CABIOS* **4**: 181-186.
- Jongejan F., et al., (1993) *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **46**: 145-152.
- McBride J.W., et al., (1996) *J Vet Diag Invest* **8**: 441-447.
- McBride, et al., (1999) *Clin Diagn Lab Immunol.*; (In press).
- McClure, (1985) *Ann Rev Biochem* **54**: 171-204.
- McGeoch D.J. (1985) *Virus Res* **3**: 271-286.
- Nyindo M., et al., (1991) *Am J Vet Res* **52**: 1225-1230.
- Nyindo, et al., (1971) *Am J Vet Res* **32**: 1651-58.
- Ohashi, et al., (1998) *Infect Immun* **66**: 132-9.
- Ohashi, et al., (1998) *J Clin Microb* **36**: 2671-80
- Reddy, et al., (1998) *Biochem Biophys Res Comm* **247**: 636-43.

五、發明說明 (46)

Rikihisa, et al., (1994) *J Clin Microbiol* **32**: 2107-12.

Rothbard J.B., et al., (1988) *The EMBO J* **7**: 93-100.

Sambrook J., et al., (1989) In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

Troy G.C., et al., (1990) Canine ehrlichiosis. In *Infectious diseases of the dog and cat*. Green C.E. (ed). Philadelphia: W.B. Saunders Co.

von Heijne, (1986) *Nucl Acids Res* **14**: 4683-90.

Walker, et al., (1970) *J Am Vet Med Assoc* **157**: 43-55.

Weiss E., et al., (1975) *Appl Microbiol* **30**: 456-463.

Yu, et al., (1997) *Gene* **184**: 149-154.

Yu, et al., (1998) *J. Clin. Microbiol.* (In press).

在本說明書中提及的任何專利或文章皆顯示出諳於本發明所屬技藝者之水平。彼等專利與文章皆以每一個別文章皆個別地指示要併於本文作為參考般的相同程度併於本文作為參考。

諳於此技者皆可順利了解本發明係經良好地調整以進行諸項目標且得到所提及的目的和優點，以及其中所明稟者。本文述及的本發明實施例伴隨著方法，程序，處理，分子，和特定化合物係現有較佳實施例的代表，為示範性者且無意作為對本發明範圍的限制者。其中的改變和其它用法都可由諳於此技者據以實施出且皆包括在申請專利範圍所含範圍所界定之本發明旨意之內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明 (47)

圖式之簡略說明

綜上所述，上述本發明特徵，優點和目的，以及可變得清晰，能達到且可詳細了解的其它者之事項，更特別者上文概述之本發明說明可經由參照附圖中所示範說明的本發明某些實施例而獲得。彼等圖式係構成本說明書的一部份。不過，要特別提及者，該等附圖係示範說明本發明較佳實施例因而不可視為要限制其範圍者。

圖 1 顯示出 E C a 2 8 - 1 基因的核苷酸序列 (S E Q I D N O . 1) 和推演出的胺基酸序列 (S E Q I D N O . 2) ，其包括鄰接的 5 ' 和 3 ' 非密碼序列。A T G 起始密碼子和 T A A 終止密碼子係以黑體字顯示，而 2 3 胺基酸階梯信號序列係下面畫線者。

圖 2 顯示出經表現出的 5 0 k D a 重組 E C a 2 8 - 1 硫氧化還原蛋白 (道 1 ，箭號) 和 1 6 - k D a 硫氧化還原蛋白對照樣 (道 2 ，箭號) ，及可被恢復期犬埃里希氏體犬抗血清辨識的重組 E C a 2 8 - 1 ，硫氧化還原蛋白的融合蛋白質之免疫漬點的 S S - P A G E 。硫氧化還原蛋白對照樣不被犬埃里希氏體抗血清所偵檢到 (未顯示出) 。

圖 3 顯示出 E C a 2 8 - 1 蛋白質 (S E Q I D N O . 2) ， E C a 2 8 S A 2 (部份序列， S E Q I D N O . 7) ， E C a 2 8 S A 1 (S E Q I D N O . 8) ， E . chaffeensis P28 (S E Q I D N O . 9) ， E . chaffeensis OMP-1 族 (S E Q I D N O . 1 0)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (48)

— 1 4) 與反芻類考德里氏體 M A P — 1 (S E Q I D N O . 1 5) 諸胺基酸序列之併列比較。E C a 2 8 — 1 胺基酸序列係以一致序列呈出。未顯示出的胺基酸皆相同於 E C a 2 8 — 1 且以點表出。趨異性胺基酸係以對應的一字母縮寫示出。為使胺基酸序列有最大併列比對而導入的間隙係用短劃表出。可變區皆在下而畫線並表出 (V R 1 , V R 2 , V R 3 , 和 V R 4) 。箭號指示出信號肽的預期信號肽酶切斷部位。

圖 4 顯示出犬埃里希氏體 E C a 2 8 — 1 與 E C a 2 8 S A 2 (部份序列) 和 E C a 2 8 S A 1 , E . chaffeensis OMP-1 多基因族的 6 成員, 及反芻類考德里氏體 m a p — 1 , 從推演出的胺基酸序列利用不平衡樹構成推得之種系相關性。每一對分枝的長度代表說配對的胺基酸序列之間的距離。標度係用以測量序列之間的距離。

圖 5 顯示出犬埃里希氏體基因組 D N A 經用六種個別的限制酵素完全消化且與 E C a 2 8 — 1 P I G — 標示探針雜交後 (道 2 — 7) ; 經 D I G — 標示的分子量標誌物 (道 1 和 8) 之南方氏點漬分析。

圖 6 顯示出經預測的 E C a 2 8 — 1 (Jake 株) 和 E . chaffeensis P28 (Arkansas 株) 蛋白質特性之比較。經由使用六肽窗以表面機率預測表面殘基。表面殘基為有 > 2.0 平方奈米 (nm^2) 的水可接近表面積之任何殘基。其值大於 1 的六肽經視為表面區。抗原指數預測潛在的抗原決定子。其值大於零的區域為潛在的抗原決定子。經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (49)

由使用殘基 1 - 甘胺酸或極性，殘基 2 - 疏水性，殘基 3 - 疏水性，殘基 4 - 疏水性或脯胺酸，及殘基 5 - 極性或甘胺酸之 5 - 胺基酸型主 (motif) 以 T - 細胞型主定出潛在 T - 細胞抗原決定子之位置。標度指出胺基酸位置。

圖 7 顯示出犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因 E C a 28 S A 2 的核酸序列與推演出的胺基酸序列 (核苷酸 1 - 849 ; S E Q I D N O . 3 ; 胺基酸序列 : S E Q I D N O . 4) 及 E C a 28 S A 3 所具者 (核苷酸 1195 - 2031 ; S E Q I D N O . ; 胺基酸序列 : S E Q I D N O . 6) 內含基因間的非密碼序列 (N C 2 , 核苷酸 850 - 1194 ; S E Q I D N O . 31) 。 A T G 起始密碼子和終止密碼子皆以黑體示出。

圖 8 顯示出五種犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因座 (5 . 592 - k b) 之概示圖其中指示出基因組取向及基因間非密碼區 (28 N C 1 - 4) 。在基因座 1 和 2 (黑影處) 示出的 28 - k D a 蛋白質基因係業經說明過者 (McBride et al., 1999; Reddy et al., 1998; Ohashi et al., 1998) 。 E C a S A 2 和一新命名的 28 - k D a 蛋白質基因 (E C a S A 3 - 未加黑影者) 之完全序列皆經定序出。在 E C a 28 S A 2 , E C a 28 S A 3 和 E C a 28 - 1 之間的非密碼基因間區 (28 N C 2 - 3) 都完整而連接先前未聯結的基因座 1 與 2 。

圖 9 顯示出利用不平衡樹構成以胺基酸序列為基礎所

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (50)

得五種犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因成員之種系相關性。每一分枝配對的長度代表胺基酸配對之間的距離。標度係測量諸序列之間的距離。

圖 10 顯示出犬埃里希氏體 28 - k D a 蛋白質基因的基因間非密碼核酸序列 (S E Q I D N O . 30 - 33) 之排列比對。未示出而以點 (·) 表出的核酸係相同於非密碼區 1 (28 N C 1) 者。趨異性係以對應的一字母縮寫示出。為達胺基酸序列的最大比對率而導入的間隙係以短畫 (-) 表出。推定的轉錄啓動子區 (- 10 和 - 35) 及核糖體結合部位 (R B S) 皆框起來。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：犬埃里希氏體之編碼28千道耳吞、
免疫顯性同質蛋白質的基因及其用途)

本發明係有關得自犬埃里希氏體(*Ehrlichia canis*)所含多形複基因族的同質免疫反應性28-千道耳吞蛋白質基因，*E C a 28-1*和*E C a 28 S A 3*之選殖，定序和表現。此外也提出另一28-千道耳吞蛋白質基因，*E C a S A 2*的完全序列。本發明更揭示出編碼犬埃里希氏體所含全部五個同基28-千道耳吞蛋白質基因之複基因座。重組犬埃里希氏體28-千道耳吞蛋白質可與得自經犬埃里希氏體感染的狗之恢復期抗血清發生反應。

英文發明摘要(發明之名稱：)

**HOMOLOGOUS 28-KILODALTON IMMUNODOMINANT PROTEIN
GENES OF *EHRlichia CANIS* AND USES THEREOF**

The present invention is directed to the cloning, sequencing and expression of homologous immunoreactive 28-kDa protein genes, *ECa28-1* and *ECa28SA3*, from a polymorphic multiple gene family of *Ehrlichia canis*. A complete sequence of another 28-kDa protein gene, *ECaSA2*, is also provided. Further disclosed is a multigene locus encoding all five homologous 28-kDa protein genes of *Ehrlichia canis*. Recombinant *Ehrlichia canis* 28-kDa proteins react with convalescent phase antiserum from an *E. canis*-infected dog.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

綑

公告本

1 ATTTTATTATTACCAATCTATATAATATATTAAATTTCTCTTACAAAAATCTCTAATG 60
 61 TTTTATACCTAATATATATATTCTGGCTTGTATCTACTTTGCACCTTCCACTATTGTTAAT 120
 121 TTATTTTCACTATTTTAGGTGTAATATGAATTGCAAAAAAATTCTTATAACAAGTCATT 180
 M N C K K I L I T T A L
 181 AATATCAITAATGTACTCTATTCCAAGCATATCTTTTTCTGATACTATACAAGATGGTAA 240
 I S L M Y S I P S I S F S D T I Q D G N
 241 CATGGGTGGTAACTTCTATATTAGTGGAAAGTATGTACCAAGTGTCTCACATTTTGGTAG 300
 M G G N F Y I S G K Y V P S V S H F G S
 301 CTTCTCAGCTAAAGAAGAAAGCAAATCAACTGTTGGAGTTTTTGGATTAAACATGATTG 360
 F S A K E E S K S T V G V F G L K H D W
 361 GGATGGAAGTCCAATACTTAAGAATAAACACGCTGACTTTACTGTTCCAACTATTTCGTT 420
 D G S P I L K N K H A D F T V P N Y S F
 421 CAGATACGAGAACAATCCATTTCTAGGGTTTGCAGGAGCTATCGGTTACTCAATGGGTGG 480
 R Y E N N P F L G F A G A I G Y S M G G
 481 CCCAAGAATAGAATTGAAATATCTTATGAAGCATTGACGTAAAAAGTCCTAATATCAA 540
 P R I E F E I S Y E A F D V K S P N I N
 541 TTATCAAAATGACGCGCACAGGTACTGCGCTCTATCTCATCACACATCGGCAGCCATGGA 600
 Y Q N D A H R Y C A L S H H T S A A M E
 601 AGCTGATAAATTTGTCTTCTTAAAAAACGAAGGGTTAATTGACATATCACTTGCAATAAA 660
 A D K F V F L K N E G L I D I S L A I N
 661 TGCATGTTATGATATAATAAATGACAAAGTACCTGTTTCTCCTTATATATGCGCAGGTAT 720
 A C Y D I I N D K V P V S P Y I C A G I
 721 TGGTACTGATTGATTCTATGTTTGAAGCTACAAGTCCTAAAATTTCTACCAAGGAAA 780
 G T D L I S M F E A T S P K I S Y Q G K
 781 ACTGGGCATTAGTTACTCTATTAATCCGGAAACCTCTGTTTTTCATCGGTGGGCATTTCCTA 840
 L G I S Y S I N P E T S V F I G G H F H
 841 CAGGATCATAGGTAATGAGTTTAGAGATATTCTGCAATAGTACCTAGTAACTCAACTAC 900
 R I I G N E F R D I P A I V P S N S T T
 901 AATAAGTGGACCACAATTTGCAACAGTAACACTAAATGTGTGTCACTTTGGTTTAGAACT 960
 I S G P Q F A T V T L N V C H F G L E L
 961 TGGAGGAAGATTAACTTCTAAATTTTATTGTTGCCACATATTAAAAATGATCTAAACTTG 1020
 C G R F N F (SEQ ID NO: 2)
 1021 TTTTAWTATTGCTACATACAAAAAAGAAAAATAGTGGCAAAAGAATGTAGCAATAAGA 1080
 1081 GGGGGGGGGGGGACCAAATTTATCTTCTATGCTTCCCAAGTTTTTTCYCGCTATTTATGA 1140
 1141 CTAAACAACAGAAGGTAATATCCTCACGGAAACTTATCTTCAAATATTTTATTTATTA 1200
 1201 CCAATCTTATATAATATATTAATTTCTCTTACAAAAATCACTAGTATTTTATACCAAAA 1260
 1261 TATATATTCTGACTTGCTTTTCTTCTGCACTTCTACTATTTTAAATTTATTTGTCATAT 1320
 1321 TAGGTTATAATAAWATGAATTGCMAGATTTTTCATAGCAAGTGCATTGATATCACTAA 1380
 1381 TGTCTTTCTTACCTAGCGTATCTTTTTCTGAATCAATACATGAAGATAATATAAATGGTA 1440
 1441 ACTTTTACATTAGTGCAAGTATATGCCAAGTGCCTCACACTTTGGCGTATTTTCAGTTA 1500
 1501 AAGAAGAGAAAAACACAACACTGGAGTTTTTCGGATTAAACAAGATTGGGACGGAGCAA 1560
 1561 CACTAAAGGATGCAAGCWCAGCCACACAWTAGACCCAAGTACAATG 1607

(SEQ ID NO: 1)

圖 1

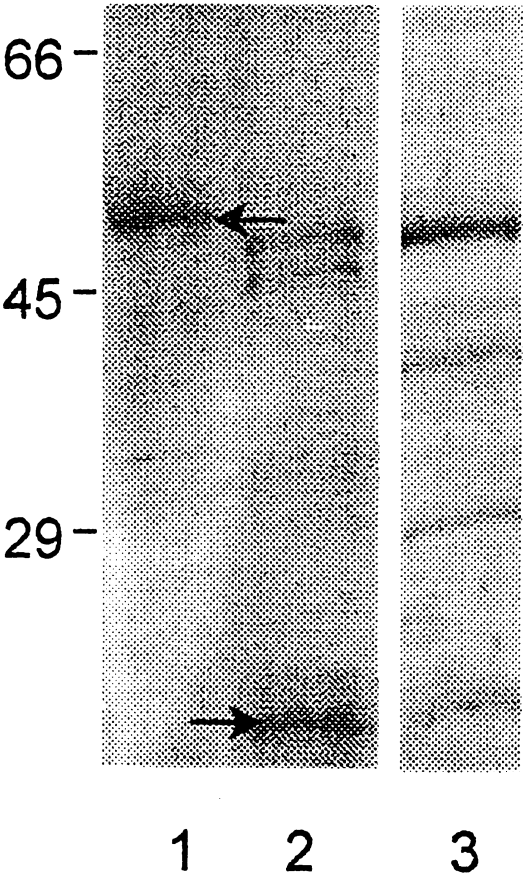
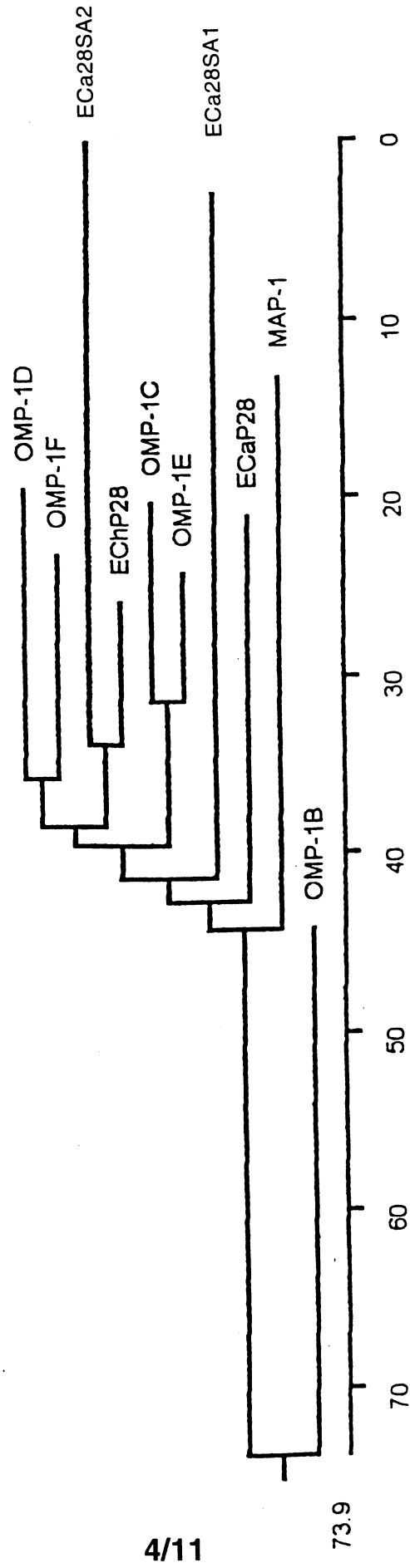
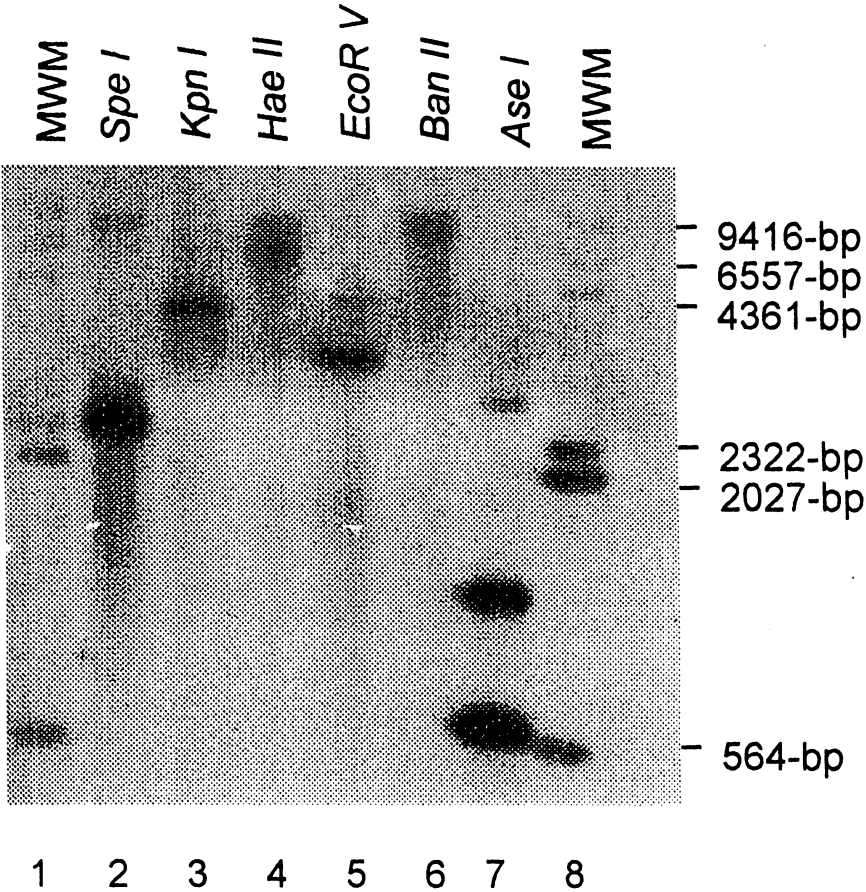


圖 2

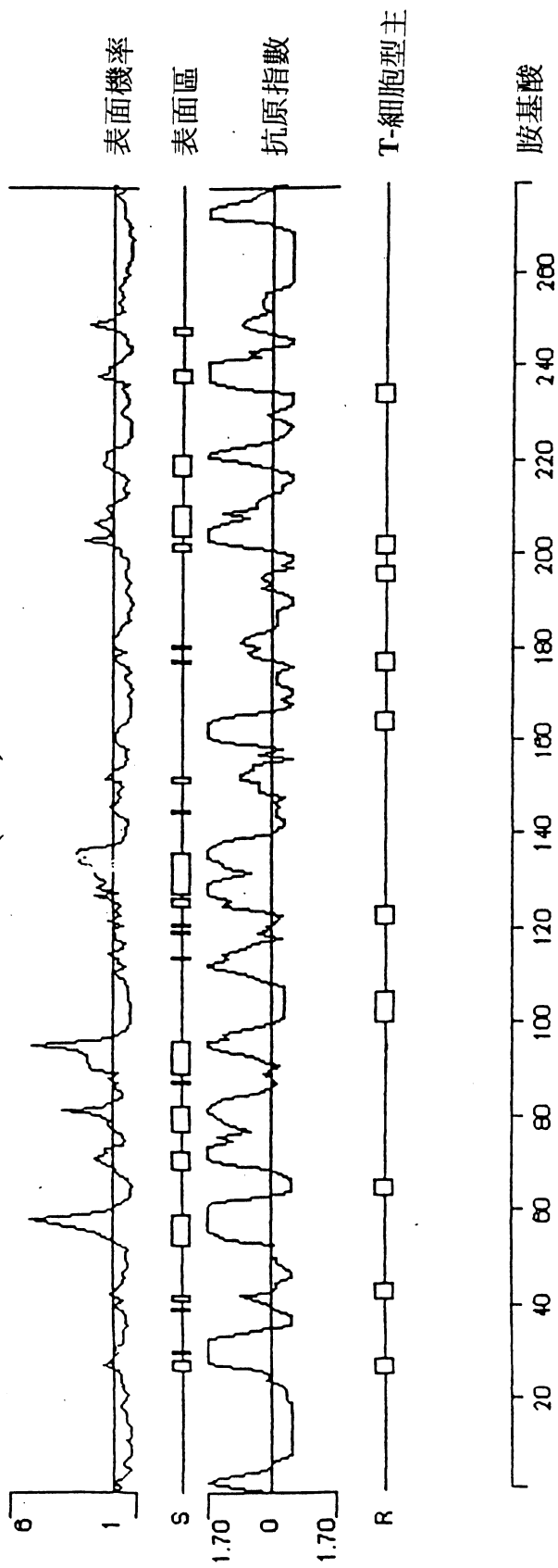


4/11

73.9



犬埃里希氏體 P28 (Jake)



E. chaffeensis P28 (Arkansas)

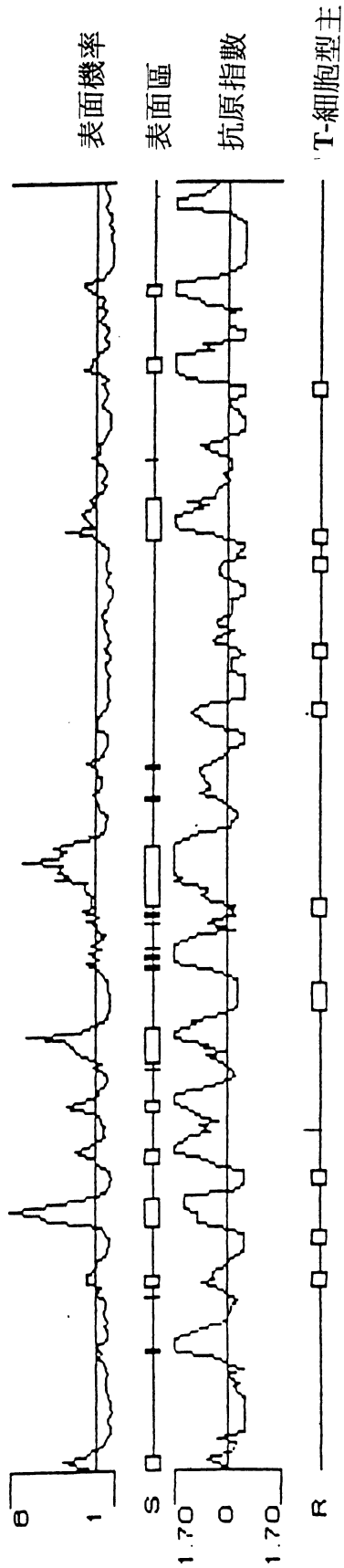


圖 6

Eca28SA2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

↓ (SEQ ID NO: 3)

TTCAACTTCTAATTTTCGTGGTACACATATCACGAAGCTAAAATTGTTTTTTTATCTCTGC 900
F N F * (SEQ ID NO: 4)

TGTATACAAGAGAAAAAATAGTAGTGAAAATTACCTAACAATATGACAGTACAAGTTTAC 960
CAAGCTTATTCTCACAAAACCTTCTGTGTCTTTTATCTCTTTACAATGAAATGTACACTT 1020

AGCTTCACTACTGTAGAGTGTGTTTATCAATGCTTTGTTTATTAATACTCTACATAAAT 1080
GTTAAATTTTCTTACAAAACCTCACTAGTAATTTATACTAGAATATATATTCTGACTTGT 1140
ECa28SA3 (SEQ ID NO: 31)

ATTGCTTTATACTTCCACTATTGTTAATTTATTTTCACTATTTTAGGTGTAATATGAAT 1200
M N

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

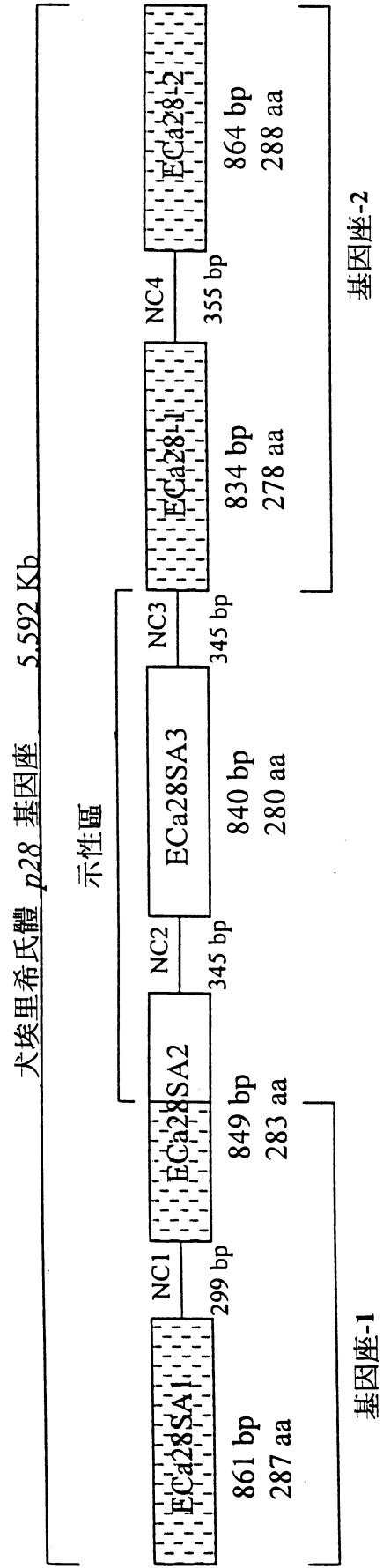
AGTTCAGAAGCCTCTGTTTTTATCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAATGAATTT 1920
S E E A S V F I G G H F H R V I G N E F

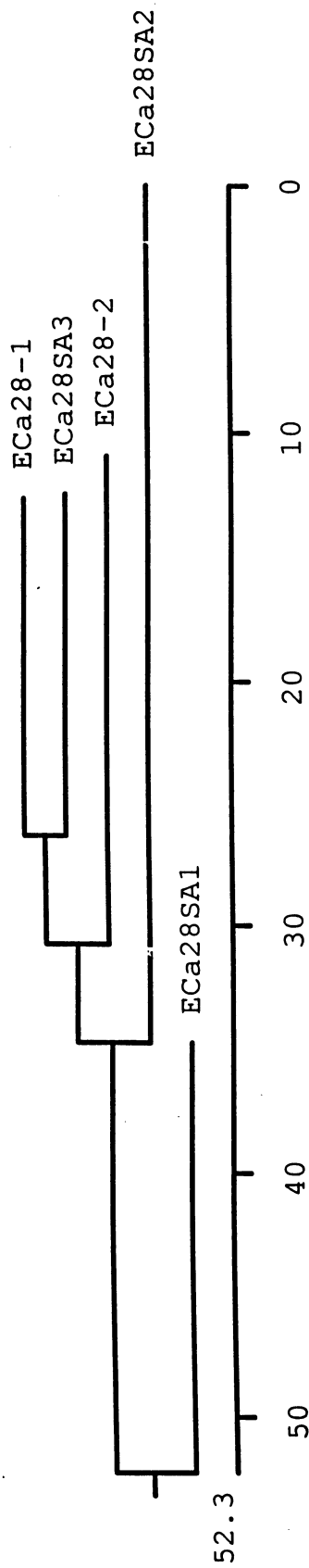
AGAGACATCCCTGCTATGGTTCCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTTGCAATA 1980
R D I P A M V P S G S N L P E N Q F A I

(SEQ ID NO: 5)
GTAACACTAAATGTGTGTCACTTTGGCATAGAACTTGGAGGAAGATTTAACTTCTGA 2031
V T L N V C H F G I E L G G R F N F *

(SEQ ID NO: 6)

图 7-2





1 TAATACCTCTATTGT-ACATGTTAAAAATAGTACTAGTTTGCTTCTGTGGTT--TATAACGCCAAGAGAGAA--ATAGT-----TAGTAATAAATTAGAAAG-----TTAAA--TATT--AGAAAAGT-CA 28nc1
1 ...TTCTGGG-A-C...A.C.CG...GC..AA.T.G.TT..T.A.CTC.GC.G..T..AAG...A.A..TAG...G--AAAATTACC..AC...TGAC..T.CAAGTTTACC..GCT...CTC.C...C.T.T 28nc2
1 .G..TT.AT.G...CC...A...CA.CTA.AC...T..T.A.TA..GC..C.T..AA..A.A...AA...GGCAAAAGATG...C...GAGG.GGG.GGGGAC...TT...CTTC--T.TTC.T.T 28nc3
1 ...TT.AT.G...CC...A...CA.CTA.AC...T..T.ANTA..GC..C.T..AA..A.A...AA...GGCAAAAGATG...C...GAGG.GGG.GGGGAC...TT...CTTC--T.TGC.T..C 28nc4
112 TAGTTTTTCATTGTCATTGAT-ACACAACATA-----AAAGTAGTAT-----TACTTATTAAATAT-TTACGTAGTATATTTAAATTTCCCTTACAAAAGCCACTAGTATTTTATA 28nc1
136 .G...C...T...CTCT--T.CA...G...A..GTAC..CT...CT.GACTACTGTAG.G...GTTTATCAATGCTT.GT...--C.C..A..A..G...TT...CT...A...A... 28nc2
139 A..A..C..T--ACT-----T...A...GCAC...CTC.A.GCTTCCA-GG-A...A.GT-TCTTATATTT..T...CC...CC..TA..A...T...A..G... 28nc3
138 C.A...TCVC.CT...T..G...T..AC.ACAG..G...A...CCTCACGG-A...CT..ATCTCAATATTT..T...CC...CC...TA..A...T...AT... 28nc4
222 CTAAAGC-TATACCTTGGCTGTGTTTAAATTTTACTACTGTGTTAAATTTACTT-TCACGTGT--TCTGGTGAAT 28nc1
269 -T..G.ATA...T.C..A...GC...A..C..CC...T...A...A...TA... 28nc2
268 .T..TATA...T.C...C...C.C.CC...T...T...A...TA... 28nc3
276 .C...ATA...T.C..A...CT...CT..C..C..C..C...T..T...T...T...G...A..AGG.TATA-A--RBS
-35 -10

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

五、發明說明 ()

發明背景

發明領域

本發明概括地有關分子生物學之領域。更特定言之，本發明係有關犬埃里希氏體 (*Ehrlichia canis*) 之同質 28 - k D a 蛋白質基因之分子選殖和鑑定，及編碼該犬埃里希氏體 28 - k D a 同質蛋白質的多基因座，及其用途。

先前技藝說明

犬埃里希氏體病，也稱為犬熱帶型全部血球減少症 (*canine tropical pancytopenia*) 為首先在 1935 年於非洲及 1963 年在美國所述及之經由扁蝨所帶來的狗立克次氏體病 (Donatien and Lestoquard, 1935; Ewing, 1963)。於越戰中美國軍犬所發生的獸疫流行後，對這種疾病方有較佳的認識 (Walker et al., 1970)。

犬埃里希氏體病的病原體係犬埃里希氏體，其係為一種小的革蘭氏陰性專性胞內細菌，其對單核吞噬細胞具有刺激向性 (Nyindo et al., 1971) 且其係經由棕狗扁蝨，血紅扇頭蜱 (*Rhipicephalus sanguineus*) 傳播 (Groves et al., 1975)。犬埃里希氏體病的病程係經由三階段，急性、亞臨床及慢性。急性階段的特徵係發熱、厭食、抑鬱、淋巴腺病及溫和血小板減少症 (Troy and Forrester, 1990)。典型地，狗會從急性階段恢復過來，但會變為該病原體的持續性感染載體而於數月或甚至數年內皆未出現疾病徵象 (Harrus et al., 1998)。於某些情況中會發展出慢性階段其特

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 () 2

徵在於血小板減少症，高球蛋白血症，厭食，消瘦及出血，特別是血刀血，接著即死亡 (Troy and Forrester, 1990)。

根據 16S rRNA 基因的分子生物分類學分析測定出犬埃里希氏體與 *E. chaffeensis*，人類單核細胞埃里希氏體症的病原劑，有密切相關聯性 (Anderson et al., 1991; Anderson et al., 1992; Dawson et al., 1991; Chen et al., 1994)。經報導在犬埃里希氏體與 *E. chaffeensis* 之間於 64, 47, 40, 30, 29 和 23 - kDa 諸抗原有顯著的交叉反應性 (Chen et al., 1994; Chen et al., 1997; Rikihisa et al., 1994; Rikihisa et al., 1992)。用人類和犬恢復期血清經免疫點漬 (immunoblot) 進行的免疫反應性抗原分析導致鑑定出犬埃里希氏體所含的眾多免疫顯性蛋白質，包括 30 - kDa 蛋白質 (Chen et al., 1997)。此外，犬埃里希氏體所含 30 - kDa 蛋白質經述及為在一於抗原上不同於 *E. chaffeensis* 所含 30 - kDa 蛋白質的免疫反應中早期被辨識出的主要免疫顯性抗原 (Rikihisa et al., 1992; Rikihisa et al., 1994)。此外也鑑定出犬埃里希氏體所含分子質量在 20 至 30 - kDa 之間的其它免疫顯性蛋白質 (Brouqui et al., 1992; Nyindo et al., 1991; Chen et al., 1994; Chen et al., 1997)。

最近，已對 *E. chaffeensis* 述及編碼其 23 至 28 - kDa 的多基因族 (omp-1) 之選殖與定序 (Ohashi et al., 1998)。 *E. chaffeensis* 的 28 - kDa 免疫顯性外膜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ()
29

E C 2 8 供後續研究使用。將 p c D N A 3 . 1 /
E C 2 8 質體擴增，並用 K p n I / X b a I 雙重酶切作
用切割該基因，且將其導向地連接到 pThioHis 原核生物表
現載體內 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。該選殖物 (命名為
pThioHis / E C 2 8) 在大腸桿菌 B L 2 1 中產生重組硫氧
化還原蛋白融合蛋白質。將該重組融合蛋白質藉由離心粗
製純化於不溶相中。對照組硫氧化還原蛋白融合蛋白質係
使用鎳 - N T A 旋轉管柱 (Qiagen, Santa Clarita, CA) 從可
溶性細胞溶裂物在自然條件下純化。

實施例 7

西方免疫點漬分析

在 4 - 1 5 % T r i s - H C l 梯度凝膠 (Bio-Rad,
Hercules, CA) 上，對重組犬埃里希氏體 E C a 2 8 - 1 融
合蛋白質實施 S D S - 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (S D S -
P A G E)，並使用半乾轉移室 (Bio-Rad, Hercules, CA)
將該融合蛋白質轉移到純硝基纖維素上 (Schleicher &
Schuell, Keene, NH)。將該膜與得自於經犬埃里希氏體感
染之狗且經稀釋 1 : 5 0 0 0 後的恢復期抗血清一起培育
一小時，經洗滌後，再與抗 - 犬 I g G (H & L) 鹼性磷
酸酶共軛之經親和純化的二級抗體以 1 : 1 0 0 0 之比例
培育 1 小時 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg,
MD)。結合的抗體係經由 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吡啶基磷
酸酯 / 硝基藍四唑鹽 (B C I P / N B T) 受質 (Kirkegaard & Perry Laboratories,

五、發明說明 (30)

Gaithersburg, MD) 予以顯現。

實施例 8

南方氏點漬分析

爲了測定犬埃里希氏體基因組中是否含有對 E C a 2 8 - 1 基因同質的多基因，乃使用標準程序 (Sambrook et al., 1989) 實施基因組南方氏點漬分析。犬埃里希氏體基因組 D N A 係用不在 E C a 2 8 - 1 內切割的限制酵素 B a n II, E c o R V, H a e II, K p n I 和 S p e I, 及在核苷酸 - 3 4, 4 3 和 6 5 6 消化 E C a 2 8 - 1 的 A s e I 分別予以完全消化。用引子 E C 2 8 O M - F 和 E C 2 8 O M - R 及經異羥洋地黃毒苷元 (D I G) - 標記去氧核苷酸三磷酸 (d N T P s) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 經由 P C R 擴增產生探針並用 A s e I 消化過。經消化的探針 (5 6 6 - b p) 係經瓊脂糖凝膠電泳予以分離，凝膠純化後用於雜交中。經完全消化的基因組犬埃里希氏體 D N A 經電泳後轉移到耐綸膜 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 並與 E C a 2 8 - 1 基因 D I G - 標記探針在 DIG Easy Hyb 緩衝液中根據製造商的方案 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 在 4 0 °C 下雜交 1 6 小時。用抗 - D I G 鹼性磷酸酶 - 拚合抗體及發光性受質 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 偵檢經結合探針並曝光到 BioMax 科學造像軟片 (Eastman Kodak, Rochester, NY)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

補充

公告本

序列表

<110> 研究發展基金會

<120> 犬埃里希氏體之編碼 28 仟道耳吞、免疫顯性蛋白質的基因及其用途

<130> 831178

<140> TW 088120620

<141> 1999-11-25

<150> US 09/201,458 和 US 09/261,358

<151> 1998-11-30 和 1999-03-03

<160> 33

<210> 1

<211> 1607

<212> D N A

<213> 犬埃里希氏體

<220>

<223> E C a 28-1 之核酸序列

<400> 1

```

attttatttta ttaccaatct tatataatat attaaatttc tcttacaaaa atctcctaag 60
ttttataacct aatatatata ttctggcttg tatctacttt gcacttccac tattgttaag 120
ttattttcac tatttttaggt gtaatatgaa ttgcaaaaaa attcctataa caactgcatt 180
aatatcatta atgtactcta ttccaagcat atctttttct gatactatac aagatggtaa 240
catgggtggt aacttctata ttagtggaag gtatgtacca agtgtctcac attttggtag 300
cttctcagct aaagaagaaa gcaaatcaac tgttggagtt tttggattaa aacatgattg 360
ggatggaagt ccaataactta agaataaaca cgctgacttt actgttccaa actattcggt 420
cagatacgag aacaatccat ttctagggtt tgcaggagct atcggttact caatgggtgg 480
cccaagaata gaattcgaaa tatcttatga agcattcgac gtaaaaaagtc ctaatatcaa 540
ttatcaaaat gacgcgcaca ggtactgcgc tctatctcat cacacatcgg cagccatgga 600
agctgataaa tttgtcttct taaaaaacga agggttaatt gacatatcac ttgcaataaa 660
tgcattgttat gatataataa atgacaaagt acctgtttct ccttatatat gcgcagggtat 720
tggtactgat ttgatttcta tgtttgaagc tacaagtcct aaaatttcct accaaggaaa 780
actgggcatt agttactcta ttaatccgga aacctctgtt ttcattcggtg ggcatttcca 840

```

caggatcata ggtaatgagt ttagagatat tcctgcaata gtacctagta actcaactac 900
aataagtgga ccacaatttg caacagtaac actaaatgtg tgtcactttg gtttagaact 960
tggaggaaga tttaacttct aattttattg ttgccacata ttaaaaatga tctaaacttg 1020
tttttawtat tgctacatac aaaaaaagaa aaatagtggc aaaagaatgt agcaataaga 1080
gggggggggg ggaccaaatt tatcttctat gcttcccaag ttttttcycg ctatttatga 1140
cttaaacaac agaaggtaat atcctcacgg aaaacttatc ttcaaatatt ttatttatta 1200
ccaatcttat ataatatatt aaatttctct tacaaaaatc actagtattt tataccaaaa 1260
tatatatctt gacttgcttt tcttctgcac ttctactatt tttaatttat ttgtcactat 1320
taggttataa taawatgaat tgcmaaagat ttttcatagc aagtgcattg atatcactaa 1380
tgtctttctt acctagcgta tctttttctg aatcaataca tgaagataat ataaatggta 1440
actttttacat tagtgcaaag tatatgccaa gtgcctcaca ctttggcgta ttttcagtta 1500
aagaagagaa aaacacaaca actggagttt tcggattaaa acaagattgg gacggagcaa 1560
cactaaagga tgcaagcwgc agccacacaw tagaccaag tacaatg 1607

<210> 2
<211> 278
<212> PRT
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> ECa28-1 蛋白質之胺基酸序列
<400> 2

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

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

<210> 3
 <211> 849
 <212> DNA
 <213> 犬埃里希氏體
 <220>
 <221> 成熟肽
 <223> ECa28SA2 之核酸序列
 <400> 3

atgaattgta aaaaagtttt cacaataagt gcattgatat catccatata cttcctacct 60
aatgtctcat actctaaccc agtatatggg aacagtatgt atggtaattt ttacatatca 120
ggaaagtaca tgccaagtgt tcctcatttt ggaatttttt cagctgaaga agagaaaaaa 180
aagacaactg tagtatatgg cttaaaagaa aactgggcag gagatgcaat atctagtcaa 240
agtccagatg ataattttac cattcgaaat tactcattca agtatgcaag caacaagttt 300
ttagggtttg cagtagctat tggttactcg ataggcagtc caagaataga agttgagatg 360
tcttatgaag catttgatgt gaaaaatcca ggtgataatt acaaaaacgg tgcttacagg 420
tattgtgctt tatctcatca agatgatgcg gatgatgaca tgactagtgc aactgacaaa 480
tttgtatatt taattaatga aggattactt aacatatcat ttatgacaaa catatgttat 540
gaaacagcaa gcaaaaatat acctctctct ccttacatat gtgcagggtat tgggtactgat 600
ttaattcaca tgtttgaaac tacacatcct aaaatttctt atcaaggaaa gctagggttg 660
gcctacttcg taagtgcaga gtcttcgggt tcttttggtt tatattttca taaaattata 720
aataataagt ttaaaaatgt tccagccatg gtacctatta actcagacga gatagtagga 780
ccacagtttg caacagtaac attaaatgta tgctactttg gattagaact tggatgtagg 840
ttcaacttc 849

<210> 4
<211> 283
<212> PRT
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> ECa28SA2 蛋白質之胺基酸序列
<400> 4

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

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

- <210> 5
- <211> 840
- <212> DNA
- <213> 犬埃里希氏體
- <220>
- <221> 成熟肽
- <223> ECa28SA3 之核酸序列

<400>5

atgaattgca	aaaaaattct	tataacaact	gcattaatgt	cattaatgta	ctatgctcca	60
agcatatctt	tttctgatac	tatacaagac	gataacactg	gtagcttcta	catcagtgga	120
aaatatgtac	caagtgtttc	acatttttgg	gttttctcag	ctaaagaaga	aagaaactca	180
actgttggag	tttttggatt	aaaacatgat	tggaatggag	gtacaatatc	taactcttct	240
ccagaaaata	tattcacagt	tcaaaattat	tcgttttaaat	acgaaaacaa	cccattctta	300
gggtttgcag	gagctattgg	ttattcaatg	ggtggcccaa	gaatagaact	tgaagttctg	360
tacgagacat	tcgatgtgaa	aaatcagaac	aataattata	agaacggcgc	acacagatac	420
tgtgctttat	ctcatcatag	ttcagcaaca	agcatgtcct	ccgcaagtaa	caaatttggt	480
ttcttaaaaa	atgaagggtt	aattgactta	tcatttatga	taaatgcatg	ctatgacata	540
ataattgaag	gaatgccttt	ttcaccttat	atgtgtgcag	gtgttggtac	tgatgttggt	600
tccatgtttg	aagctataaa	tcctaaaatt	tcttaccaag	gaaaactagg	attaggttat	660
agtataagtt	cagaagcctc	tgtttttatc	ggtggacact	ttcacagagt	cataggtaat	720
gaatttagag	acatccctgc	tatggttcct	agtggatcaa	atcttccaga	aaaccaatth	780
gcaatagtaa	cactaaatgt	gtgtcacttt	ggcatagaac	ttggaggaag	atttaacttc	840

<210>6

<211>280

<212>PRT

<213>犬埃里希氏體

<220>

<223>ECa28SA3 蛋白質之胺基酸序列

<400>6

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

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

- <210> 7
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> 犬埃里希氏體
- <220>
- <223> ECa28SA2 蛋白質之部分胺基酸序列
- <400> 7

```

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

```

```

<210>      8
<211>    287
<212>    PRT
<213>    犬埃里希氏體
<220>
<223>    ECa28SA1 蛋白質之胺基酸序列
<400>      8

```

```

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

```


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

<210> 9

<211> 281

<212> PRT
 <213> 查菲埃里希氏體
 <220>
 <223> 查菲埃里希氏體 P28 之胺基酸序列
 <400> 9

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

```

Ser Val Phe Ile Gly Gly His Phe His Lys Val Ile Gly Asn Glu
      230                      235                      240
Phe Arg Asp Ile Pro Thr Ile Ile Pro Thr Gly Ser Thr Leu Ala
      245                      250                      255
Gly Lys Gly Asn Tyr Pro Ala Ile Val Ile Leu Asp Val Cys His
      260                      265                      270
Phe Gly Ile Glu Leu Gly Gly Arg Phe Ala Phe
      275                      280

```

```

<210>      10
<211>      283
<212>      PRT
<213>      查菲埃里希氏體
<220>
<223>      查菲埃里希氏體 OMP-1B 之胺基酸序列
<400>      10

```

```

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

```

```

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

```

```

<210>      11
<211>      280
<212>      PRT
<213>      查菲埃里希氏體
<220>
<223>      查菲埃里希氏體 OMP-1C 之胺基酸序列
<400>      11

```

```

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

```

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

<210> 12
 <211> 286

<212> PRT
 <213> 查菲埃里希氏體
 <220>
 <223> 查菲埃里希氏體 OMP-1D 之胺基酸序列
 <400> 12

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

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

<210> 13
<211> 278
<212> PRT
<213> 查菲埃里希氏體
<220>
<223> 查菲埃里希氏體 OMP-1E 之胺基酸序列
<400> 13

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

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

<210> 14
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> 查菲埃里希氏體
 <220>
 <223> 查菲埃里希氏體 OMP-1F 之胺基酸序列
 <400> 14

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

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

<210> 15

<211> 284
 <212> PRT
 <213> 反芻類考德里氏體
 <220>
 <223> 反芻類考德里氏體 MAP-1 之胺基酸序列
 <400> 15

```

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

	215	220	225
Ser Ile Phe Ile Gly Gly His Phe His Arg Val Ile Gly Asn Glu			
	230	235	240
Phe Lys Asp Ile Ala Thr Ser Lys Val Phe Thr Ser Ser Gly Asn			
	245	250	255
Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Gly Phe Ala Ser Ala Ile Leu Asp			
	260	265	270
Val Cys His Phe Gly Ile Glu Ile Gly Gly Arg Phe Val Phe			
	275	280	

- <210> 16
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> 引子結合
- <222> 反芻類考德里氏體 MAP-1 之核苷酸 313-332, 亦為查菲埃里希氏體 P28 之核苷酸 307-326
- <223> PCR 之正向引子 793
- <400> 16

gcaggagctg ttggttactc 20

- <210> 17
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> 引子結合
- <222> 反芻類考德里氏體 MAP-1 之核苷酸 823-843, 亦為查菲埃里希氏體 P28 之核苷酸 814-834
- <223> PCR 之逆向引子 1330
- <400> 17

ccttcctcca agttctatgc c 21

<210>	18
<211>	24
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<221>	引子結合
<223>	對 ECa28SA2基因具專一性之引子 46f
<400>	18

atatacttcc tacctaattgt ctca 24

<210>	19
<211>	20
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<221>	引子結合
<223>	用於犬埃里希氏體之 28 kDa 蛋白質基因之定序的引子
<400>	19

agtcgagagt cttcggttttc 20

<210>	20
<211>	18
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<221>	引子結合
<223>	用於犬埃里希氏體之 28 kDa 蛋白質基因之定序的引子
<400>	20

gttacttgcg gaggacat 18

<210>	21	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	引子結合	
<222>	ECa28-1 之核苷酸 687-710	
<223>	PCR 之引子 394	
<400>	21	
gcatttccac aggatcatag gtaa		
		24
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	引子結合	
<222>	ECa28-1 之核苷酸 710-687	
<223>	PCR 之引子 394C	
<400>	22	
ttacctatga tcctgtggaa atgc		
		24
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	引子結合	
<223>	結合至 ECa28-1 之區域的引子 793C,其用於放大基因 ECa28SA3 與 ECa28-1 間之基因間區域	
<400>	23	
gagtaaccaa cagctcctgc		
		20

<210>	24
<211>	24
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<221>	引子結合
<222>	
<223>	與 ECa28-1 之開放讀譯區的鄰近非編碼區域 為互補之引子 EC28OM-F
<400>	24

tctacttttgc acttccacta ttgt 24

<210>	25
<211>	24
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<221>	引子結合
<222>	
<223>	與 ECa28-1 之開放讀譯區的鄰近非編碼區域 為互補之引子 EC28OM-R
<400>	25

attctttttgc cactatTTTT cttt 24

<210>	26
<211>	25
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<221>	引子結合
<223>	對應於 ECa28SA3 之區域的引子 EcaSA3-2,其係用於放大基因 ECa28SA3 與 ECa28-1 間之基因間區域

<400> 26

ctaggattag gttatagtat aagtt 25

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> 犬埃里希氏體

<220>

<221> 肽

<223> 預期之 ECa28-1 和 ECa28SA3 之 N 端訊號肽

<400> 27

Met Asn Cys Lys Lys Ile Leu Ile Thr Thr Ala Leu Met Ser Leu

5 10 15

Met Tyr Tyr Ala Pro Ser Ile Ser

20

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> 查菲埃里希氏體

<220>

<223> 查菲埃里希氏體 P28 之 N 端訊號肽之胺基酸序列

<400> 28

Met Asn Tyr Lys Lys Ile Leu Ile Thr Ser Ala Leu Ile Ser Leu

5 10 15

Ile Ser Ser Leu Pro Gly Val Ser Phe Ser

20 25

<210> 29

<211> 26
<212> PRT
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> ECa28-1 之推定切割位置的胺基酸序列

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

<210> 30
<211> 299
<212> DNA
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> 基因間非編碼區域 1 之核酸序列 (28NC1)

<400> 30
taatacttct attgtacatg ttaaaaatag tactagtttg cttctgtggt ttataaacgc 60
aagagagaaa tagttagtaa taaattagaa agttaaatat tagaaaagtc atatgttttt 120
cattgtcatt gatactcaac taaaagtagt ataaatgtta cttattaata attttacgta 180
gtatatataa tttcccttac aaaagccact agtatatttat actaaaagct atactttggc 240
ttgtatttaa tttgtatttt tactactggt aatttacttt cactgtttct ggtgtaaat 299

<210> 31
<211> 345
<212> DNA
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> 基因間非編碼區域 2 之核酸序列 (28NC2)

<400> 31

taatttcgtg gtacacatat cacgaagcta aaattgtttt tttatctctg ctgtatacaa 60
gagaaaaaat agtagtgaaa attacctaac aatatgacag tacaagttta ccaagcttat 120
tctcacaaaa cttcttgtgt cttttatctc tttaaatga aatgtacact tagcttcaact 180
actgtagagt gtgtttatca atgctttgtt tattaatact ctacataata tgttaaattt 240
ttcttacaaa actcactagt aatttatact agaatatata ttctgacttg tatttgcttt 300
atacttccac tattgttaat ttattttcac tatttttaggt gtaat 345

<210> 32
<211> 345
<212> DNA
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> 基因間非編碼區域 3 之核酸序列 (28NC3)

<400> 32

tgattttatt gttgccacat attaaaaatg atctaaactt gtttttatta ttgctacata 60
caaaaaaaag aaaaatagtg gcaaaagaat gtagcaataa gagggggggg ggggactaaa 120
tttaccttct attcttctaa tattctttac tatattcaaa tagcacaact caatgcttcc 180
aggaaaatat gtttctaata ttttatttat taccaatcct tatataatat attaaatttc 240
tcttacaaaa atctctaagt ttttataactt aatatatata ttctggcttg tatttacttt 300
gcacttccac tattgttaat ttattttcac tatttttaggt gtaat 345

<210> 33
<211> 355
<212> DNA
<213> 犬埃里希氏體
<220>
<223> 基因間非編碼區域 4 之核酸序列 (28NC4)

<400> 33

taattttatt gttgccacat attaaaaatg atctaaactt gtttttawta ttgctacata 60
caaaaaaaga aaaatagtgg caaaagaatg tagcaataag aggggggggg gggaccaaatt 120
ttatcttcta tgcttcccaa gttttttcyc gctatttatg acttaaacia cagaaggtaa 180
tatcctcacg gaaaacttat cttcaaatat tttatttatt accaatctta tataatatat 240

taaatttctc ttacaaaaat cactagtatt ttataccaaa atatatttc tgacttgctt 300
ttcttctgca cttctactat ttttaattta ttgtcacta ttaggttata ataaw 355

六、申請專利範圍

附件 2 A :

第 88120620 號 專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 93 年 5 月 7 日修正

1 . 一種 D N A 序列，其編碼犬埃里希氏體（*Ehrlichia canis*）的 28 - 仟道耳吞蛋白質，其中該蛋白質具有由 S E Q I D N O . 4 和 S E Q I D N O . 6 所構成之胺基酸序列。

S E Q I D N O : 4

Met	Lys	Tyr	Lys	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Leu
				5					10				15	

Thr	Ser	Phe	Thr	His	Phe	Ile	Pro	Phe	Tyr	Ser	Pro	Ala	Arg	Ala
				20					25				30	

Ser	Thr	Ile	His	Asn	Phe	Tyr	Ile	Ser	Gly	Lys	Tyr	Met	Pro	Thr
				35					40				45	

Ala	Ser	His	Phe	Gly	Ile	Phe	Ser	Ala	Lys	Glu	Glu	Gln	Ser	Phe
				50					55				60	

Thr	Lys	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Asp	Gln	Arg	Leu	Ser	His	Asn	Ile
				65					70				75	

Ile	Asn	Asn	Asn	Asp	Thr	Ala	Lys	Ser	Leu	Lys	Val	Gln	Asn	Tyr
				80					85				90	

Ser	Phe	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Pro	Phe	Leu	Gly	Phe	Ala	Gly	Ala
				95					100				105	

Ile	Gly	Tyr	Ser	Ile	Gly	Asn	Ser	Arg	Ile	Glu	Leu	Glu	Val	Ser
				110					115				120	

His	Glu	Ile	Phe	Asp	Thr	Lys	Asn	Pro	Gly	Asn	Asn	Tyr	Leu	Asn
				125					130				135	

Asp	Ser	His	Lys	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	His	Gly	Ser	His	Ile	Cys
				140					145				150	

六、申請專利範圍

Ser	Asp	Gly	Asn	Ser	Gly	Asp	Trp	Tyr	Thr	Ala	Lys	Thr	Asp	Lys
				155					160					165
Phe	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Glu	Gly	Leu	Leu	Asp	Val	Ser	Phe	Met
				170					175					180
Leu	Asn	Ala	Cys	Tyr	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu	Lys	Met	Pro	Phe	Ser
				185					190					195
Pro	Tyr	Ile	Cys	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Leu	Ile	Ser	Met	Phe
				200					205					210
Glu	Thr	Thr	Gln	Asn	Lys	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gly	Lys	Leu	Gly	Leu
				215					220					225
Asn	Tyr	Thr	Ile	Asn	Ser	Arg	Val	Ser	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	His
				230					235					240
Phe	His	Lys	Val	Ile	Gly	Asn	Glu	Phe	Lys	Gly	Ile	Pro	Thr	Leu
				245					250					255
Leu	Pro	Asp	Gly	Ser	Asn	Ile	Lys	Val	Gln	Gln	Ser	Ala	Thr	Val
				260					265					270
Thr	Leu	Asp	Val	Cys	His	Phe	Gly	Leu	Glu	Ile	Gly	Ser	Arg	Phe
				275					280					285

Phe Phe

S E Q I D N O : 6

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

六、申請專利範圍

Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Tyr	Gln	Lys	Phe	Asp	Ala	Lys	Asn	Pro	Asp	
Asn	Asn	Asp	Thr	Asn	Ser	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Gly	Leu	
Ser	Arg	Glu	Asp	Ala	Ile	Ala	Asp	Lys	Lys	Tyr	Val	Val	Leu	Lys	
Asn	Glu	Gly	Ile	Thr	Phe	Met	Ser	Leu	Met	Val	Asn	Thr	Cys	Tyr	
Asp	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Phe	Ile	Pro	Tyr	Ala	Cys	Ala	
Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Leu	Ile	Asn	Val	Phe	Lys	Asp	Phe	Asn	Leu	
Lys	Phe	Ser	Tyr	Gln	Gly	Lys	Ile	Gly	Ile	Ser	Tyr	Pro	Ile	Thr	
Pro	Glu	Val	Ser	Ala	Phe	Ile	Gly	Gly	Tyr	Tyr	His	Gly	Val	Ile	
Gly	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	Ile	Pro	Val	Ile	Thr	Pro	Val	Val	Leu	
Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Thr	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Thr	Ile	Asp	Thr	
Gly	Tyr	Phe	Gly	Gly	Glu	Val	Gly	Val	Arg	Phe	Thr	Phe			

2. 如申請專利範圍第1項之DNA序列，其中該DNA具有由SEQ ID NO. 3和SEQ ID NO. 5所構成之核苷酸序列。

SEQ ID NO: 3

Met	Asn	Cys	Lys	Lys	Val	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	
Ile	Tyr	Phe	Leu	Pro	Asn	Val	Ser	Tyr	Ser	Asn	Pro	Val	Tyr	Gly	
Asn	Ser	Met	Tyr	Gly	Asn	Phe	Tyr	Ile	Ser	Gly	Lys	Tyr	Met	Pro	

六、申請專利範圍

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

S E Q I D N O : 5

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

六、申請專利範圍

Thr Asp Leu Val Ser Met Phe Glu Ala Thr Asn Pro Lys Ile Ser		
200	205	210
Tyr Gln Gly Lys Leu Gly Leu Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Glu Ala		
215	220	225
Ser Val Phe Ile Gly Gly His Phe His Lys Val Ile Gly Asn Glu		
230	235	240
Phe Arg Asp Ile Pro Thr Ile Ile Pro Thr Gly Ser Thr Leu Ala		
245	250	255
Gly Lys Gly Asn Tyr Pro Ala Ile Val Ile Leu Asp Val Cys His		
260	265	270
Phe Gly Ile Glu Leu Gly Gly Arg Phe Ala Phe		
275	280	

3 . 如申請專利範圍第 1 項之 D N A 序列，其中該 D N A 係包含在犬埃里希氏體的單一基因座內。

4 . 如申請專利範圍第 3 項之 D N A 序列，其中該基因座為長度 5 . 5 9 2 k b 之多基因基因座。

5 . 如申請專利範圍第 4 項之 D N A 序列，其中該基因座編碼犬埃里希氏體之同質 2 8 - 仟道耳吞蛋白質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂