

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200510011582.4

[51] Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/465 (2006.01)
C12N 15/69 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1300307C

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2005.7.15

[21] 申请号 200510011582.4

[73] 专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市五山路 483 号

[72] 发明人 曹永长 覃健萍 毕英佐 舒鼎铭

马静云 谢青梅

审查员 曹克浩

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

代理人 向 华

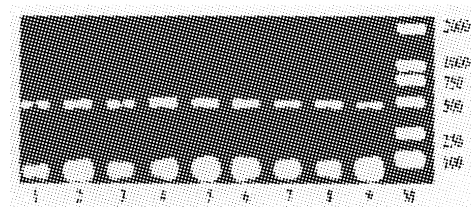
权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 6 页

[54] 发明名称

表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体

[57] 摘要

本发明涉及一个表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体, 所述重组 T4 噬菌体具有鸡缩胆囊素 33 肽基因或其多串联体的核苷酸序列。本发明也提供了鸡缩胆囊素 33 肽或其多串联体的氨基酸残基序列, 以及利用重组 T4 噬菌体对动物进行主动免疫的技术及其应用。



1. 一种表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体, 其含有缩胆囊素编码基因, 其中编码基因为 SEQ ID No.1 的核苷酸序列或 SEQ ID No.1 的核苷酸串联体序列。

2. 根据权利要求 1 所述的重组 T4 噬菌体, 其特征在于编码基因选自 SEQ ID No.1 的核苷酸多串联体序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的重组 T4 噬菌体, 其特征在于核苷酸序列 SEQ ID No.1 编码氨基酸序列为 SEQ ID No.2 的多肽。

4. 一种构建重组 T4 噬菌体的方法, 包括步骤:

1). 克隆核苷酸序列 SEQ ID No.1, 或根据 *Bam*H I 和 *Bgl* II 互为同尾酶的特性, 获得 SEQ ID No.1 的核苷酸多串联体序列;

2). 将核苷酸序列 SEQ ID No.1 或 SEQ ID No.1 的核苷酸多串联体序列插入 pR 质粒中构建相应的重组整合质粒;

3). 将 2) 中获得的重组整合质粒与缺陷性 T4 噬菌体 T4-Z1 进行同源重组, 获得表达 CCK-33 肽的重组 T4 噬菌体。

5. 一种提高动物采食量并增重的方法, 其将包含权利要求 1-3 任何一项所述的重组 T4 噬菌体的疫苗用于所述动物。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其特征在于所述动物为猪、牛、兔或鸡、鸭、鹅。

7. 一种制备抗 CCK 的特异性抗体的方法, 包括将权利要求 1-3 任何一项所述的重组 T4 噬菌体直接免疫或将其与佐剂配合制成疫苗免疫蛋鸡, 并收集免疫鸡的鸡蛋来获得抗 CCK 的特异性抗体。

8. 权利要求 1-3 中任何一项所述的重组 T4 噬菌体在制备检测动物血清中 CCK 特异性抗体的抗原中的应用。

表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体

技术领域

本发明涉及表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体的特征和应用。本发明进一步涉及重组 T4 噬菌体对猪、兔、牛、鸡、鸭、鹅等动物的主动免疫技术及其应用。

背景技术

缩胆囊素 (Cholecystokinin, CCK) 是一种调节动物采食量的有效因子。缩胆囊素又称胆囊收缩素或促胰酶素, 是由小肠粘膜的 I 细胞分泌的多肽类激素。CCK 前体为 130 个氨基酸, 逐步分解成为小分子的 CCK, 目前发现的 CCK 有 CCK-83, CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-12, CCK-8 和 CCK-4。其不同部位主要在羧基端, 但长度延伸在氨基端。餐后血浆中主要为大分子 CCK, 包括 CCK-58, CCK-39, CCK-33 和 CCK-12。这些大分子 CCK 经胰蛋白酶水解后均成为 8 肽的氨基酸残基, 即 CCK-8。CCK-8 具有 CCK 分子的全部活性, 与 8 肽的胃泌素结构相似, 都具有相同的氨基末端序列 Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, 该序列是 CCK 和胃泌素发挥其生物活性所必需的。CCK 存在于脑和胃肠道中, 是脑内含量较多的一种脑肠肽 (brain-gut peptide) 类物质。CCK 在各部位的含量则差别很大。在胃肠道, CCK 有促进胆囊、胃和幽门括约肌收缩; 促进远端十二指肠和空肠蠕动; 促进胆汁、胃酸、胰液的分泌; 增强胰酶的活性; 促进胰岛素、胰高血糖素、降钙素的释放; 调节胰多肽在肠道和胰液中的释放; 抑制胃排空等功能。CCK 受体有两种: CCK-A 受体和 CCK-B 受体, 其中

CCK-A 受体在外周器官含量很高, 而 CCK-B 受体在中枢神经系统中含量很高。CCK-A 受体有两个结合位点: 高亲和力位点和低亲和力位点。近年来的研究表明 CCK 是和 CCK-A 的低亲和力位点结合使动物产生饱感从而使动物采食停止。

CCK 可以降低多种动物的采食量。CCK-A 受体基因敲除大鼠表现为肥胖、易饥饿、采食增加 (Schwartz 等, 1999)。研究发现, 在多种动物中, 无论是外源性 CCK, 还是机体自身生成的内源性 CCK 都能使机体产生饱感 (Della Fera 等, 1979, 1981; Gibbs 等, 1973; Mc Laughlin 等, 1980)。外源性注入 CCK 也会降低动物的采食量。中枢和外周引入 CCK 具有相同的降低采食量的作用, CCK 作为神经递质直接在脑内产生饱感。小剂量 CCK 就可以有效地抑制采食, 在狗、鼠、兔、猴等多种哺乳动物及人体实验研究中发现, 无论生理剂量或药理剂量的 CCK 都能抑制进食后的胃排空活动 (Doong 等, 1998), 进而抑制动物采食。血浆 CCK 浓度与胃排空率呈反比关系。

对 CCK 免疫的研究已经开展了较长时间, 早期研究表明, 利用免疫调控技术可有效调控体内激素的分泌, 从而调节动物的生产性能 (Della 等, 1981; Lawrence 等, 1986; Pekas, 1991, 1993; Schanbacher 等, 1994)。目前, 在猪和一些反刍动物上已有以 CCK 为抗原进行主动免疫和被动免疫的研究报道, 结果表明对动物生产性能有一定的调控作用。Jens 等 (1978) 用 CCK-33 单独免疫兔子, 在加强免疫 3 次后, 获得了效价很高的抗 CCK-33 的抗血清, 说明 CCK 有一定的抗原性, 可以用来接种动物使之产生抗体。而国内, 陈均辉 (1992) 用 CCK-8 大分子与牛

血清蛋白 (BSA) 联结形成全抗原免疫兔子, 加强免疫后也获得了高滴度的抗 CCK-8 抗血清。虽然 CCK 免疫调控在猪、羊上有一定效果, 但为了在生产中能够应用该技术, 必须寻找到一种 CCK 免疫原, 其免疫用量少, 免疫过程方便可行, 抗体相对稳定、易于保存使用, 而且能大量生产抗体, 又符合动物保护法规的方法。

用 CCK 作抗原主动免疫动物可以提高动物的采食量和增重。Pekas 和 Trout(1990)用 CCK 免疫生长猪后, 其采食量和增重分别提高了 8.2% 和 10.6%, 胴体重提高 8.7%, 体长增加 2.4%, 对瘦肉/脂肪的比值和蛋白质/脂肪的比值没有影响, 但 CCK 免疫猪的胴体瘦肉和脂肪重增加。由此可见, CCK 免疫后, 猪的生长速度增加是因为胴体增重增加, 但对胴体组成没有影响。McLaughlin 等 (1985) 用 CCK 主动免疫鼠后发现, 处理组比对照组的采食量增加了 9% ($P < 0.04$), 增重提高了 17% ($P < 0.02$)。这些研究结果表明应用 CCK 主动免疫动物对于动物的采食具有一定的促进作用, 但结论也仅限于一些哺乳动物, 对于其它动物方面的效果还有待进一步实验证实。

以上研究都是将化学合成的, 或者是从动物组织中分离纯化的 CCK 或其活性部分与大分子物质 (如 BSA 等) 偶联, 然后免疫动物。但还没有用噬菌体表达 CCK 或其活性部分 (如 CCK-33 肽、CCK-8 肽) 的报道。

噬菌体表面展示技术 (phage display) 是 1980 年代发展起来的一项新的生物技术 (Smith, 1985), 它能将表达的外源多肽和蛋白质以融合蛋白的形式展示在噬菌体表面, 并保持相对独立的空间构象和生物活性。T4 噬菌体属于有尾噬菌体中 A 群 A2 亚群的典型成员, 其基本形态

结构是头长径约 95 nm ,横径约为 65 nm。T4 噬菌体衣壳由 3 种必需衣壳蛋白组成,主要的衣壳蛋白 gp23 和 2 个次要衣壳蛋白 gp24、gp20。其中分子量为 45kDa 的 gp23 在每个病毒颗粒中有 960 个拷贝,而其余 2 个次要衣壳蛋白拷贝数较少, gp24 有 55 个拷贝,而 gp20 只有 12 个拷贝。此外,在衣壳的外表面包被着 2 种非必需外壳蛋白:分子量为 9 kDa 的 SOC 和分子量为 40 kDa 的 HOC,二者相距 7 nm,以对称的形式分布于噬菌体二十面体表面。SOC 和 HOC 仅提供噬菌体额外的稳定能力,是在噬菌体衣壳装配完成后才组装到衣壳表面的,它们的缺失不影响 T4 噬菌体的繁殖和感染。将外源蛋白与 T4 噬菌体表面的 SOC 或者 HOC 蛋白形成融合蛋白,从而可以获得具有外源蛋白的重组 T4 噬菌体。采用这样的方法,获得了表达爱滋病毒 (HIV) gp120 V3 肽、脊髓灰质炎病毒 VP1 (Ren et al, 1996)、脑膜炎奈氏菌 PorA (Jiang et al, 1997) 抗原蛋白、传染性囊病病毒 VP2 (曹永长等, 2003)、禽流感 H5 亚型和 H9 亚型 HA 蛋白 (吕英姿等, 2002) 的重组 T4 噬菌体。

发明内容

本发明的目的在于获得表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体,为主动免疫缩胆囊素和缩胆囊素抗体的检测提供一种新的抗原。

本发明提供的重组 T4 噬菌体是采用基因重组的方法获得的。其构建方法是:

首先是构建一系列含有缩胆囊素 33 肽基因多串联体的重组质粒。这些质粒是采用基因工程方法获得的,具体构建方法如下:

(1) 根据鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子,设计合

成 cck-33 基因, 基因序列为: GGTTC TACTGGCCGCTTCTCTGTCCTTG GCAACCG
TGTACAGAGCATTGATCCGACGCACCGTATTAATGACCGTGACTACATGGGCTGGATGGA
TTTT.

(2) 将 cck-33 基因插入 pRSETA 质粒, 获得重组质粒 pRSETA-1CCK, 具体操作如下:

根据人工合成的 cck-33 基因设计特异性引物, 采用 PCR 方法, 以人工合成的 cck-33 基因为模板, 扩增 cck-33 基因片段。用 2% 琼脂糖凝胶 (含 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到大小约 120bp 的特异性条带。

用 *Sac*I 和 *Bam*HI 在 37°C 分别消化 CCK-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接消化的 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选, 获得插入了 cck-33 基因的转化子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 cck-33 基因的转化子进行 PCR 筛选。用 2% 琼脂糖凝胶 (含 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到大小约 120bp 的特异性条带。

对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37°C , 200 r/m 振荡培养 16~20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得重组质粒命名为 pRSETA-1CCK。

(3) 根据 *Bam*HI 和 *Bgl*II 互为同尾酶的特性, 构建 cck-33 基因 2 串联体 (简称 2cck), 具体操作如下:

将重组质粒 pRSETA-1CCK 用两组酶在 37°C 进行消化: 第一组用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行消化, 回收较小的片段; 第二组用 *Bgl*II、*Hind*III 和 CIAP

进行消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得含有 2cck 的重组子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 2cck 的重组子进行 PCR 筛选。用 2% 琼脂糖凝胶（含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭，EB）电泳检测 PCR 产物，观察到约 230bp 的特异性条带。

对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37 $^{\circ}$ C，200 r/m 振荡培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-2CCK。

（4）在 pRSETA-2CCK 的基础上构建 cck-33 基因的 4 串联体（简称 4cck），具体操作如下：

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用两组酶在 37 $^{\circ}$ C 进行消化：第一组用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行消化，回收较小的片段；第二组用 *Bgl*II、*Hind*III 和 *C*IAP 进行消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得含有 4cck 基因的重组子。然后用特异性引物 P3（5' -GATAAG GATCGATGGGGATCC-3'）/P4（5' -ATGGTACCAGCTG CAGATCT-3'）对含有 4cck 的重组子进行 PCR 筛选。对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37 $^{\circ}$ C，200 r/m 振荡培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-4CCK。

采用相同的方法，分别获得含有 cck-33 基因 6 串联体（简称 6cck）、8 串联体（简称 8cck），相应地命名为 pRSETA-6CCK、pRSETA-8CCK。

在获得含有 cck-33 基因多串联体重组质粒的基础上, 构建含有 cck-33 基因多串联体的整合质粒。下面以含有 4cck 整合质粒的构建为例说明其构建方法。

(1) 采用特异性引物 Pup2 (5'-ATTGAATTCTGATGACGATAAGGAT-3') / Pdn2 (5'-ATCGAATTCCTACATGGTACCAGCTGC-3'), 用 PCR 方法从质粒 pRSETA-4CCK 中扩增 4cck 基因。PCR 反应体系 (100 μ L) 组成如下: 10 $\times$ PCR buffer 10 μ L, dNTPs 8 μ L, Taq 酶 1 μ L, Pup2 1 μ L, Pdn2 1 μ L, pRSETA-4CCK 1 μ L, ddH₂O 78 μ L。PCR 扩增程序如下: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 2~31: 94 $^{\circ}$ C 40 sec, 64 $^{\circ}$ C 40 sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec; 循环 32: 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物。

(2) 将 4cck 基因插入 pR 质粒 (Ren et al, 1996) 中, 构建重组整合质粒 pR-4CCK, 其操作步骤如下:

用 EcoR I 在 37 $^{\circ}$ C 分别消化 4cck 基因的 PCR 产物和质粒 pR, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接消化的 4cck 的 PCR 产物和质粒 pR。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选, 获得插入了 4cck 基因的重组子。然后用 1 对特异性引物 SOC-S (5'-GAATCATATGGCTA GTCTCGCGG-3') / Pdn2 进行 PCR 筛选。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/m 振荡培养 16~20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得重组整合质粒 pR-4CCK。

然后, 用重组整合质粒 pR-4CCK 和缺陷性 T4 噬菌体 T4-Z1 (Ren et al, 1996) 进行同源重组, 获得表达 CCK-33 肽 4 串联体蛋白 (4CCK)

的重组 T4 噬菌体，其操作步骤如下：

用整合质粒 pR-4CCK 转化大肠杆菌 E₂，获得的大肠杆菌为 E-4CCK；

在装入 500 μ L SC 培养液的器皿中加入 1 μ L 氨卞青霉素 (Amp)，然后加入 10 μ L E-4CCK，在 37℃ 培养至光密度值 OD₆₀₀ 大约为 0.5 时，加入 50 μ L T4-Z1，在 35℃ 200 r/m 振荡培养至有细菌碎片出现，获得的产物为未鉴定的重组 T4 噬菌体；

在 1 个经过灭菌的器皿中加入培养超过 12 h 的大肠杆菌 E₂ 600 μ L，不加溶菌酶，将在 2~10℃ 储存的 SC 顶层培养基放在微波炉中溶解，待琼脂温度降到 45℃ 左右的时候取 2 mL 倒入装有大肠杆菌 E₂ 的器皿中，将混合液混匀，立即倒在预先配置的 SC 底层培养基平皿上，当琼脂完全冷凝时，在 SC 顶层培养基上分别点 10 μ L 未鉴定的重组 T4 噬菌体，待吸收完毕后，放在 37℃ 培养 16 h 以上。如果 E-4CCK 中的质粒与 T4-Z1 发生了重组，成功地将 4cck 基因转入 T4 噬菌体中，则在没有加溶菌酶和平皿上可以生长出噬菌斑；

在平皿上铺含有 E₂ 细菌的 SC 顶层培养基，用灭菌牙签把生长出的噬菌斑在 SC 顶层培养基上点梅花斑，放在 37℃ 培养 12 h 以上，生长良好的梅花斑用消毒好的刀片将其剥下，浸泡在磷酸缓冲液中 6 h；

用特异性引物 Pup2/Pdn2 从梅花斑浸泡液中扩增到特异性条带，则说明已获得表达 4CCK 蛋白的重组 T4 噬菌体，命名为 T4-4CCK。

SC 培养液按下列方法配制：每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone 和 5 g NaCl，加双蒸水定容至 1000mL，15 lpf/in² 高压灭菌 20min 后 4℃ 保存。

SC 底层培养基按下列方法配制：每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone, 5 g NaCl 和 12 g 琼脂粉，双蒸水定容至 1000mL，15 lpf/in² 高压灭菌 20min，冷却至 50℃，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-Cl 和 10 mL 25% 柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后倒平板，4℃ 保存。

SC 顶层培养基按下列方法配制：每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone, 5 g NaCl 和 7 g 琼脂粉，双蒸水定容至 1000mL，15 lpf/in² 高压灭菌 20min，4℃ 保存。用时加热溶解，冷却至 50℃，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-Cl 和 10 mL 25% 柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后备用。

采用类似的方法，构建表达 CCK-33 肽（1CCK）和 CCK-33 肽 8 串联体（8CCK）的重组噬菌体，相应地将这些重组噬菌体命名为 T4-1CCK 和 T4-8CCK。

表达 CCK-33 肽多串联体的重组 T4 噬菌体的特征为：

（1）本发明提供的重组噬菌体 T4-1CCK、T4-4CCK 和 T4-8CCK 都具有序列表中序列 1 的核苷酸序列，或序列 1 的串联体序列。序列 1 又称为 cck-33 基因，由 99 个碱基对组成，是根据鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子而设计的。序列 1 的串联体序列，是用若干个碱基将两个 cck-33 基因以首尾相连的方式，将若干个 cck-33 基因连接起来形成的序列。对于序列 1 和序列 1 的多串联体，采用 PCR 方法可以扩增出特异性条带，也可以采用 DNA 序列测定的方法进行确定。

（2）本发明提供的重组质粒的表达产物具有序列表中序列 2 的氨基酸序列，或序列 2 的串联体序列。序列 2 又称为 CCK-33 肽，是由序列 1 编码的。序列 2 的串联体序列，是用若干个氨基酸将两个 CCK-33

肽以首尾相连的方式，将若干个 CCK-33 肽连接起来形成的序列。采用抗 CCK-33 肽的特异性抗体，或者抗 CCK-8 肽的特异性抗体，或者抗其它形式的 CCK 的特异性抗体，都可以检测到该多肽产物。

(3) 本发明提供的重组质粒还包括具有 CCK 等同序列的质粒。CCK 等同序列，是与 cck-33 基因的核苷酸序列，或 CCK-33 肽的氨基酸残基序列相比有一个或若干个核苷酸或氨基酸残基的差别，包括碱基或氨基酸残基的改变、缺失、添加、或插入，或与 cck-33 基因序列中的连续 24 个碱基以上的区段有 75%以上的同源性。

本发明提供的重组噬菌体具有重要的应用价值。应用之一是将所述的重组噬菌体作为抗原，采用重组噬菌体直接免疫或将其与佐剂配合免疫猪、牛、兔、鸡等动物，可以促进动物采食，提高生产性能。

本发明提供的重组噬菌体的第二个应用，是采用重组噬菌体直接免疫或将其与佐剂配合制成疫苗免疫蛋鸡，通过收集免疫鸡的鸡蛋，可以大量获得抗 CCK 的特异性抗体。

本发明提供的重组噬菌体的另一个应用，是将所述的重组噬菌体作为抗原，应用于包括但不限于 ELISA (酶联免疫吸附试验)，检测动物血清中的 CCK 特异性抗体。

本发明具有明显的优点和效果。(1) 本发明根据大肠杆菌偏爱密码子设计基因序列，采用基因工程的方法获得的重组噬菌体，表达量高，易于纯化，成本低。(2) 本发明获得的 CCK-33 肽多串联体具有很好的免疫原性。CCK 在动物体内主要以羟基端酰胺化的 CCK-8 和 CCK-33 的形式存在。由于 CCK-33 和 CCK-8 的分子量太小，不能直接作为抗原免疫

动物，一般需要将它们与大分子物质（如 BSA）偶联。本发明提供的重组 T4 噬菌体巧妙地将 CCK-33 肽或其多串联体与 T4 噬菌体头部的 SOC 蛋白融合后，展示在 T4 噬菌体表面。由于 SOC 位点在 T4 噬菌体头部表面具有 960 个拷贝，所以与 SOC 融合表达的 CCK-33 肽或其多串联体的拷贝数高。由于 CCK-33 肽或其多串联体分布于 T4 噬菌体头部表面，因而 T4 噬菌体本身充当了 CCK-33 肽或其多串联体的载体，当本发明提供的重组 T4 噬菌体作为抗原时，CCK-33 肽或其多串联体的免疫原性比单独的 CCK 蛋白的免疫原性强。作为疫苗的抗原、或者作为免疫检测的抗原使用时，比人工合成的 CCK 多肽，甚至和其它的蛋白表达系统表达的 CCK 多肽或其多串联体相比，本发明所述的重组 T4 噬菌体具有明显的优点。

以下结合实施例和附图对本发明提供的表达 CCK-33 肽多串联体的重组噬菌体的构建、重组噬菌体的特征分析、应用途径作具体说明。

附图说明

图 1 为 cck-33 基因及其多串联体构建示意图。pRSET A 为克隆质粒载体，pRSETA-1CCK 为插入了 cck-33 基因的重组质粒，pRSETA-2CCK 为插入了 cck-33 基因 2 串联体（2cck）的重组质粒，pRSETA-4CCK 为插入了 cck-33 基因 4 串联体（4cck）的重组质粒，pRSETA-6CCK 为插入了 cck-33 基因 6 串联体（6cck）的重组质粒，pRSETA-8CCK 为插入了 cck-33 基因 8 串联体（8cck）的重组质粒。BamH I、HindIII、Bgl II、Sac I 是质粒上的限制性内切酶位点。

图 2 为 cck-33 基因及其多串联体的 PCR 鉴定结果图。泳道 1、2 是

cck-33 基因及其多串联体的 PCR 产物,泳道 M 为 DNA 分子量标记。A 为 cck-33 基因 PCR 产物, B 为 cck-33 基因 4 串联体 (4cck) PCR 产物, C 为 cck-33 基因 8 串联体 (8cck) PCR 产物。

图 3 为用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 分别对重组质粒 pRSETA-1CCK、pRSETA-2CCK、pRSETA-4CCK、pRSETA-6CCK 和 pRSETA-8CCK 进行双酶切的电泳鉴定图。M 为 DNA 分子量标准 DL2 000; 1 泳道为 pRSETA-1CCK 质粒酶切产物, 外源片段大小约为 120 bp; 2 泳道为 pRSETA-2CCK 质粒酶切产物, 外源片段大小约为 230 bp; 3 泳道为 pRSETA-4CCK 质粒酶切产物, 外源片段大小约为 450 bp; 4 泳道为 pRSETA-6CCK 质粒酶切产物, 外源片段大小约为 700 bp; 5 泳道为 pRSETA-8CCK 质粒酶切产物, 外源片段大小约为 1100 bp。

图 4 为重组整合质粒 pR-CCK 的构建示意图。1CCK 表示 cck-33 基因, 4CCK 表示 cck-33 基因 4 串联体, 8CCK 表示 cck-33 基因 8 串联体。pR 表示整合质粒, pR-1CCK 表示插入了 cck-33 基因的重组整合质粒, pR-4CCK 表示插入了 cck-33 基因 4 串联体 (4cck) 的重组整合质粒, pR-8CCK 表示插入了 cck-33 基因 8 串联体 (8cck) 的重组整合质粒。Amp^r 表示氨苄青霉素抗性, Kp^r 表示卡那霉素抗性。e、soc、den V 都是 T4 噬菌体上的基因。EcoR I、*Bam*H I、*Nde* I、*Hind*III、*Pst* I、*Pvu* I 是质粒上的限制性内切酶位点。

图 5 为 cck-33 基因 4 串联体 (4cck) 在重组 T4 噬菌体 SOC 位点展示模式图。A 为重组整合质粒 pR-4CCK; B 为缺陷型 T4 噬菌体 Φ T4-Z1; C 为重组后携带有目的基因 4CCK 的重组 T4 噬菌体 T4-4CCK。

图 6 为重组噬菌体 T4-1CCK 的 PCR 鉴定结果图。泳道 1~3 是含有 cck 基因的重组噬菌体的 PCR 产物,泳道 4 为阴性对照,泳道 M 为分子量标记。

图 7 为重组噬菌体 T4-4CCK 的 PCR 鉴定结果图。泳道 1~9 是含有 4cck 基因的重组噬菌体的 PCR 产物,泳道 M 为分子量标记。

图 8 为重组噬菌体 T4-8CCK 的 PCR 鉴定结果图。泳道 1 是含有 8cck 基因的重组噬菌体的 PCR 产物,泳道 M 为分子量标记。

图 9 为野生型 T4 噬菌体及重组噬菌体免疫电镜图谱。A 为野生型 T4 噬菌体。B 为重组噬菌体 T4-4CCK。C 为与 CCK 阳性血清反应的重组噬菌体 T4-4CCK。

图 10 重组噬菌体和野生型噬菌体的 SDS-PAGE (12%) 检测图。M 为蛋白质分子量标准; 1 泳道为重组噬菌体 T4-4CCK; 2 泳道为野生型 T4 噬菌体。箭头所指为 SOC-4CCK 融合蛋白。

实施例

实施例 1. 含有 cck-33 基因 (1cck) 的重组质粒的构建

根据鸡 cck 基因的碱基序列及大肠杆菌高频密码子,设计合成 cck-33 基因,基因序列为:GGTTCTACTGGCCGCTTCTCTGTCCT TGGCAACCGTGTA CAGAGCATTGATCCGACGCACCGTATTAATGACCGTGACTACATGGGCTGGATGGATTTT。

根据人工合成的 cck-33 基因设计特异性引物 P1 (5' -CATGGATCCGG TTCTACTGGCCGCT-3') /P2 (5' -CATGAGCTCCCAAAATCCATCCAGCC-3'), 采用 PCR 方法,以人工合成的 cck-33 基因为模板,扩增 cck-33 基因片段。扩增 cck-33 基因片段的 PCR 反应体系 (200 μ L) 组成如下: 20 μ L 10

× PCR buffer, 16 μ L dNTPs, 2 μ L Taq 酶, 1.5 μ L 引物 P1, 1.5 μ L 引物 P2, 0.5 μ L 人工合成的 cck-33 基因模板, 最后加水至总体积达到 200 μ L。PCR 温度循环程序如下: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 2~31: 94 $^{\circ}$ C 40 sec, 56 $^{\circ}$ C 40 sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec; 循环 32: 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。用 2%琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到特异性条带。

用 *Sac*I 和 *Bam*HI 在 37 $^{\circ}$ C 分别消化 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接消化的 cck-33 基因的 PCR 产物和质粒 pRSETA。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选, 获得插入了 cck-33 基因的转化子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 cck-33 基因的转化子进行 PCR 筛选。检测 cck-33 基因片段的 PCR 反应体系 (20 μ L) 组成如下: 2 μ L 10× buffer, 1.6 μ L dNTPs, 0.2 μ L Taq 酶, 0.5 μ L 引物 P1, 0.5 μ L 引物 P2, 1 μ L 待检菌液, 最后加水至总体积 20 μ L。PCR 扩增在 Mastercycler gradient PCR 仪 (Eppendorf 公司) 上进行, 温度循环程序如下: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 2~31: 94 $^{\circ}$ C 40 sec, 56 $^{\circ}$ C 40 sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec; 循环 32: 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。用 2%琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭, EB) 电泳检测 PCR 产物, 观察到特异性条带 (图 2)。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/m 振荡培养 16~20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得重组质粒命名为 pRSETA-1CCK。

实施例 2. 含有 cck-33 基因 2 串联体 (2cck) 的重组质粒的构建

将重组质粒 pRSETA-1CCK 用两组酶在 37℃ 进行消化: 第一组用 *Bam*H I 和 *Hind*III 进行消化, 回收较小的片段; 第二组用 *Bgl*II、*Hind*III 和 CIAP 进行消化, 回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选, 获得含有 2cck 的重组子。然后用特异性引物 P1/P2 对含有 2cck 基因的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施例 1”。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37℃, 200 r/m 振摇培养 16 ~ 20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得的重组质粒命名为 pRSETA-2CCK。

实施例 3. 含有 cck-33 基因 4 串联体 (4cck) 的重组质粒的构建

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用两组酶在 37℃ 进行消化: 第一组用 *Bam*H I 和 *Hind*III 进行消化, 回收较小的片段; 第二组用 *Bgl*II、*Hind*III 和 CIAP 进行消化, 回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选, 获得含有 4cck 的重组子。然后用特异性引物 P3 (5' -GATAAGGATC GATGGGGATCC-3') /P4 (5' -ATGGTACCAGCTGCAGATCT-3') 对含有 4cck 的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施例 1”。电泳检测 PCR 产物, 观察到特异性条带 (图 2)。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37℃, 200 r/m 振摇培养 16 ~ 20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得的重组质粒命名为 pRSETA-4CCK。

实施例 4. 含有 cck-33 基因 6 串联体 (6cck) 的重组质粒的构建

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用 *Bam*H I 和 *Hind*III 在 37℃ 进行消化: 回

收较小的片段；将重组质粒 pRSETA-4CCK 用 *Bgl*II、*Hind*III 和 CIAP 进行酶切消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得含有 6cck 的重组子。然后用特异性引物 P3/P4 对含有 6cck 的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施例 1”。对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振摇培养 16~20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-6CCK。

实施例 5. 含有 cck-33 基因 8 串联体 (8cck) 的重组质粒的构建

将重组质粒 pRSETA-2CCK 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 在 37℃ 进行消化，回收较小的片段；将重组质粒 pRSETA-6CCK 用 *Bgl*II、*Hind*III 和 CIAP 进行酶切消化，回收较大的片段。接着在 T4 连接酶的作用之下，连接回收的大片段和小片段。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选，获得含有 8cck 的重组子。然后用特异性引物 P3/P4 对含有 8cck 的重组子进行 PCR 筛选。PCR 方法参照“实施例 1”。电泳检测 PCR 产物，观察到特异性条带 (图 2)。对 PCR 筛选阳性的细菌，挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中，37℃，200 r/m 振摇培养 16—20 h，抽提质粒，再经限制性内切酶消化和序列测定，获得的重组质粒命名为 pRSETA-8CCK。

实施例 6. 含有 cck-33 基因 4 串联体 (4cck) 的整合质粒的构建

采用特异性引物 Pup2 (5' -ATTGAATTCTGATGACGATAAGGAT-3') /Pd n2 (5' -ATCGAATTCCTACATGGTACCAGCTGC-3')，用 PCR 方法从质粒 pRSETA-4CCK 中扩增 4cck 基因。PCR 反应体系 (100 μ L) 组成如下：10 $\times$ PC

R buffer 10 μ l, dNTPs 8 μ L, Taq 酶 1 μ L, Pup2 1 μ L, Pdn2 1 μ L, pRSETA-4CCK 1 μ l, ddH₂O 78 μ L. PCR 扩增在 Mastercycler gradient PCR 仪 (Eppendorf 公司) 上进行, 程序如下: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 循环 2~31: 94 $^{\circ}$ C 40 sec, 64 $^{\circ}$ C 40 sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec; 循环 32: 72 $^{\circ}$ C 10 min. 扩增产物在 4 $^{\circ}$ C 保存。

用 EcoR I 在 37 $^{\circ}$ C 分别消化 4CCK 基因的 PCR 产物和质粒 pR, 接着在 T4 连接酶的作用之下, 连接消化的 4cck 的 PCR 产物和质粒 pR。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。经 Amp^r 抗性筛选, 获得插入了 4cck 基因的重组子。然后用 1 对特异性引物 SOC-S (5' -GAATCATATGGCTAGTCTCGCGG-3') /Pdn2 进行 PCR 筛选。对 PCR 筛选阳性的细菌, 挑取单菌落接种于 3 mL LA 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/m 振荡培养 16~20 h, 抽提质粒, 再经限制性内切酶消化和序列测定, 获得重组整合质粒 pR-4CCK。

实施例 7. 表达 CCK-33 肽 4 串联体 (4CCK) 的重组 T4 噬菌体的获得

用重组整合质粒 pR-4CCK 和缺陷性 T4 噬菌体 T4-Z1 (Ren et al, 1996) 进行同源重组, 获得表达 4CCK 的重组 T4 噬菌体。

先用整合质粒 pR-4CCK 转化大肠杆菌 E₁, 获得的大肠杆菌为 E-4CCK。然后进行以下操作:

在装入 500 μ L SC 培养液的试管中加入 1 μ L Amp, 然后加入 10 μ L E-4CCK, 在 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 大约 0.5 时, 加入 50 μ L T4-Z1, 继续在 35 $^{\circ}$ C 200 r/m 振荡培养至有细菌碎片出现, 获得的产物为未鉴定的重组 T4 噬菌体;

在1个经过灭菌的器皿中加入培养超过12小时的大肠杆菌 E₂ 600 μL, 不加溶菌酶, 将在 4℃ 储存的 SC 顶层培养基放在微波炉中溶解, 待琼脂温度降到 45℃ 左右的时候取 2 mL 倒入装有大肠杆菌 E₂ 的器皿中, 将混合液在旋涡震荡器上混匀, 立即倒在预先配置的 SC 底层培养基平皿上。等到琼脂完全冷凝时, 在 SC 顶层培养基上分别点 10 μL 未鉴定的重组 T4 噬菌体, 待吸收完毕后, 放在 37℃ 培养 16 h 以上, 如果 E-4CCK 中的质粒与 T4-Z1 发生了重组, 成功地将 4cck 基因转入 T4 噬菌体中, 则在不加溶菌酶的培养皿上可以生长出噬菌斑;

在灭菌的平皿上铺 SC 顶层培养基, 然后用灭菌牙签把生长出的噬菌斑在 SC 顶层培养基上点梅花斑, 放在 37℃ 培养 12 h 以上, 生长良好的梅花斑用消毒好的刀片将其剥下, 浸泡在磷酸缓冲液中 6 h;

采用 PCR 筛选 T4 噬菌体转化子。检测 4cck 基因的 PCR 反应体系组成如下: 每 25 μL 反应体系中含 2.5 μL 10 × PCR 缓冲液, 2 μL dNTPs, 0.3 μL Taq 酶, 0.5 μL Pup2, 0.5 μL Pdn2, 1 μL 梅花斑浸泡液和 18.2 μL 双蒸水。将反应混合物混匀、离心后, 在 PCR 仪上进行温度循环。温度循环程序如下: 首先 94℃ 3min; 然后 94℃ 40 sec、51℃ 40sec、72℃ 90sec, 共循环 30 次; 最后 72℃ 10min。采用 1% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭) 电泳对 PCR 反应产物进行检测。如果观察到特异性条带, 则说明已获得了表达 4CCK 蛋白的重组 T4 噬菌体, 命名为 T4-4CCK。

SC 培养液按下列方法配制: 每 1000 mL 中含有 10 g Tryptone 和 5 g NaCl, 加双蒸水定容至 1000 mL, 15 lpf/in² 高压灭菌 20 min, 冷却

至 50℃，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-Cl 和 10 mL 25%柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后铺平板，4℃保存。

SC 底层培养基按下列方法配制：每 1 000 mL 中含有 10 g Tryptone, 5 g NaCl 和 12 g 琼脂粉，双蒸水定容至 1 000 mL，15 lpf/in²高压灭菌 20 min，冷却至 50℃，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-Cl 和 10 mL 25%柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后铺平板，4℃保存。

SC 顶层培养基按下列方法配制：每 1 000 mL 中含有 10 g Tryptone, 5 g NaCl 和 7 g 琼脂粉，双蒸水定容至 1 000 mL，15 lpf/in²高压灭菌 20 min，4℃保存。用时加热溶解，冷却至 50℃，加入灭菌的 50 mL 1 mol/L Tris-Cl 和 10 mL 25%柠檬酸钠·2H₂O 溶液，摇匀后备用。

实施例 8. 重组 T4 噬菌体的免疫电镜观察

分别取野生型 T4 噬菌体、重组 T4 噬菌体和 1/3 体积 CCK 阳性血清混合，37℃放置 1 小时后，直接涂片。同时用不加阳性血清的上述噬菌体作对照。磷钨酸负染，JEM-1010 型透射电镜观察。比较与 CCK 抗血清反应前后的噬菌体形态，发现野生型 T4 噬菌体的形态不受 CCK 阳性血清的影响；而重组 T4 噬菌体的形态受 CCK 阳性血清影响明显。未与 CCK 阳性血清反应的重组 T4 噬菌体的形态与野生型 T4 噬菌体形态相同，头部为白色；而与阳性血清作用之后的重组 T4 噬菌体头部变黑。

实施例 9. 重组 T4 噬菌体的 SDS-PAGE 检测

大量培养重组噬菌体 T4-4CCK，离心浓缩，当噬菌体浓度达到 10¹¹ 个/mL 时，进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 方法如下：取重组噬菌体 T4-4CCK 和 T4 噬菌体 SOC 缺失株 T4-Z1 各 100 μL，然后加入 2×上样

缓冲液 100 μL , 混匀后, 样品在 -80°C 冰箱和 37°C 烘箱内分别冻融三次。参照汪家政等 (2000) 编《蛋白质手册》方法制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE)。成层胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%。将待检样品煮沸 5 min, 取 30 μL 加入凝胶点样孔中, 在电场作用下进行电泳。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸。电压为 80 v/cm, 待溴酚蓝到达成层胶底部时电压升高到 160 v/cm。待溴酚蓝接近凝胶底部时, 停止电泳, 取下凝胶, 置于 1% 考马斯亮蓝溶液中染色过夜, 用脱色液脱色。在约 30kD 处可见特异性条带 (图 10)。

实施例 10. 重组噬菌体对肉鸡的免疫效果

将重组噬菌体 T4-4CCK 制成油乳剂疫苗进行肉鸡免疫实验, 疫苗中 T4-CCK 的含量为 10^{10} 个/mL。将 360 只胡须肉鸡饲养至 20 日龄后随机分成 2 组, 每组三个重复, 每个重复 60 只鸡, 1 组为对照组, 2 组为重组噬菌体免疫组。20 日龄免疫第一次, 以后每隔 20 天免疫一次, 共免疫 3 次。肉鸡饲养至 90 日龄结束。实验结束时, 称重并统计耗料量, 计算全期的平均增重、平均采食量和料肉比。结果表明重组噬菌体免疫组的体增重和采食量明显高于对照组, 料肉比也有所下降。

表 1 重组噬菌体 T4-4CCK 免疫对肉鸡生长性能的影响

组别	体增重 (g/只)	采食量 (g/只)	料肉比
对照组	808.64 ± 12.80	3031.62 ± 71.34	3.75 ± 0.03
免疫组	847.96 ± 24.20	3087.38 ± 95.82	3.64 ± 0.01

分别在 35、55 和 90 天龄时采血, 测定血清中 CCK 抗体。

在 96 孔酶标板上,每孔加上纯化的 0.2 mg/mL 大肠杆菌表达的 4CCK 融合蛋白 100 μ L, 4℃包被过夜。弃去包被液,每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次,在纱布上拍干清洗缓冲液后,每孔加入 5%脱脂奶粉 100 μ L 封闭液, 37℃封闭 2 h。弃去封闭液,每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次,在纱布上拍干清洗缓冲液,每孔加入最适稀释浓度的一抗 100 μ L, 37℃反应 1 h。弃去一抗,每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次,在纱布上拍干清洗缓冲液后,每孔加入用 1:1000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体) 100 μ L, 37℃反应 1 h。弃去二抗,每孔用 200 μ L 清洗缓冲液洗酶标板 3 次,在纱布上拍干清洗缓冲液后,每孔加入显色缓冲液 100 μ L,当达显色高峰时(约 10~30 min)加入 1 mol/L H_2SO_4 100 μ L 终止反应,在酶标仪上读取 OD_{450} 值。用 P/N 表示抗体水平。空白对照组 3 次检测的结果均为 $P/N < 2$,且三次的结果变化幅度非常小。而免疫组 3 次检测 P/N 均超过 2,且后两次结果高于第一次(表 2)。

表 2 重组噬菌体 T4-4CCK 免疫后鸡血清中 CCK 抗体的 ELISA 检测(P/N)

组别	日龄(天)		
	35	55	90
对照组	1.350 ± 0.016	1.566 ± 0.045	1.568 ± 0.045
免疫组	2.548 ± 0.210	3.183 ± 0.221	5.440 ± 0.553

序列表

<110>华南农业大学

<120>表达缩胆囊素基因的重组 T4 噬菌体

<140>

<141>

<160>2

<210>1

<211>99

<212>DNA

<213>缩胆囊素-33 (Choleystokinin-33, CCK-33)

<220>

<221>cDNA

<222> (1) ... (99)

<220>

<221>CDS

<222>

<400>1

```

ggt tct act ggc cgc ttc tct gtc ctt ggc aac cgt gta cag agc att    48
Gly Ser Thr Gly Arg Phe Ser Val Leu Gly Asn Arg Val Gln Ser Ile
1           5           10           15

```

```

gat ccg acg cac cgt att aat gac cgt gac tac atg ggc tgg atg gat    96
Asp Pro Thr His Arg Ile Asn Asp Arg Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp
          20           25           30

```

```

ttt    99
Phe
33

```

<210>2

<211>33

<212>PRT

<213>缩胆囊素-33 (Choleystokinin-33, CCK-33)

<400>2

```

Gly Ser Thr Gly Arg Phe Ser Val Leu Gly Asn Arg Val Gln Ser Ile
1           5           10           15

```

```

Asp Pro Thr His Arg Ile Asn Asp Arg Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp
          20           25           30

```

```

Phe
33

```

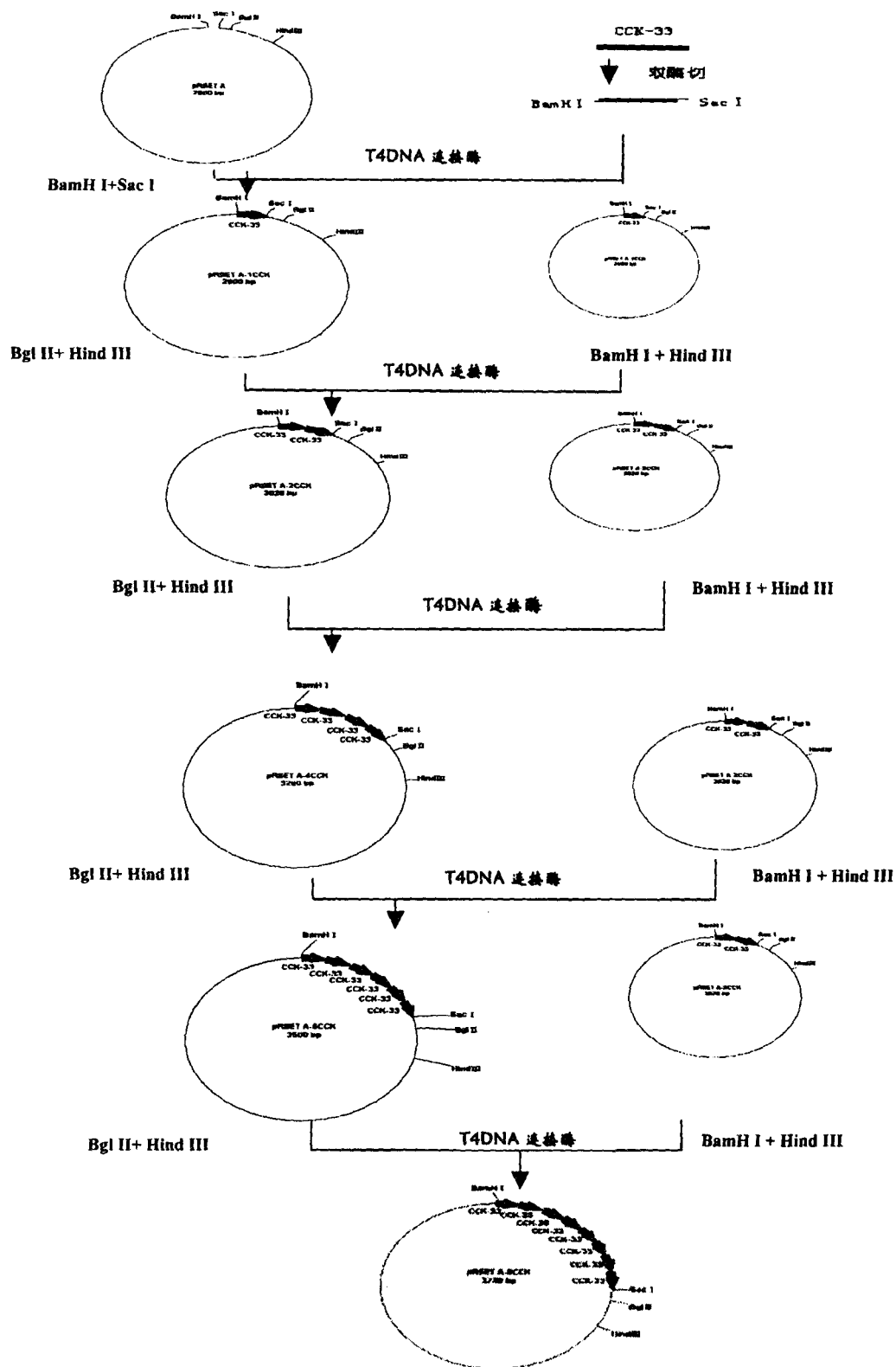


图 1

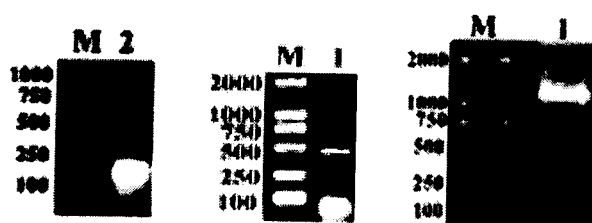


图 2

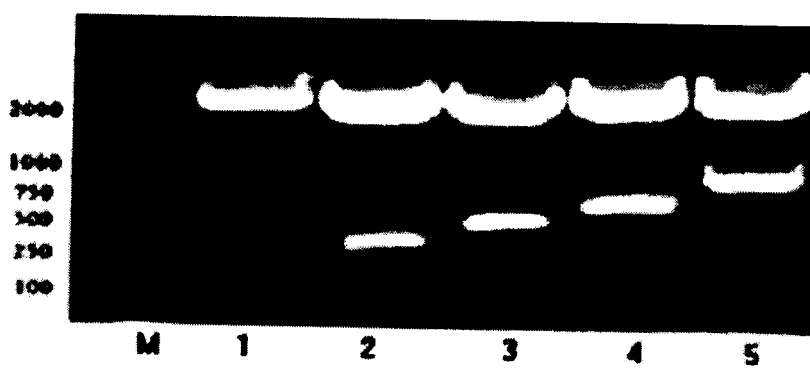


图 3

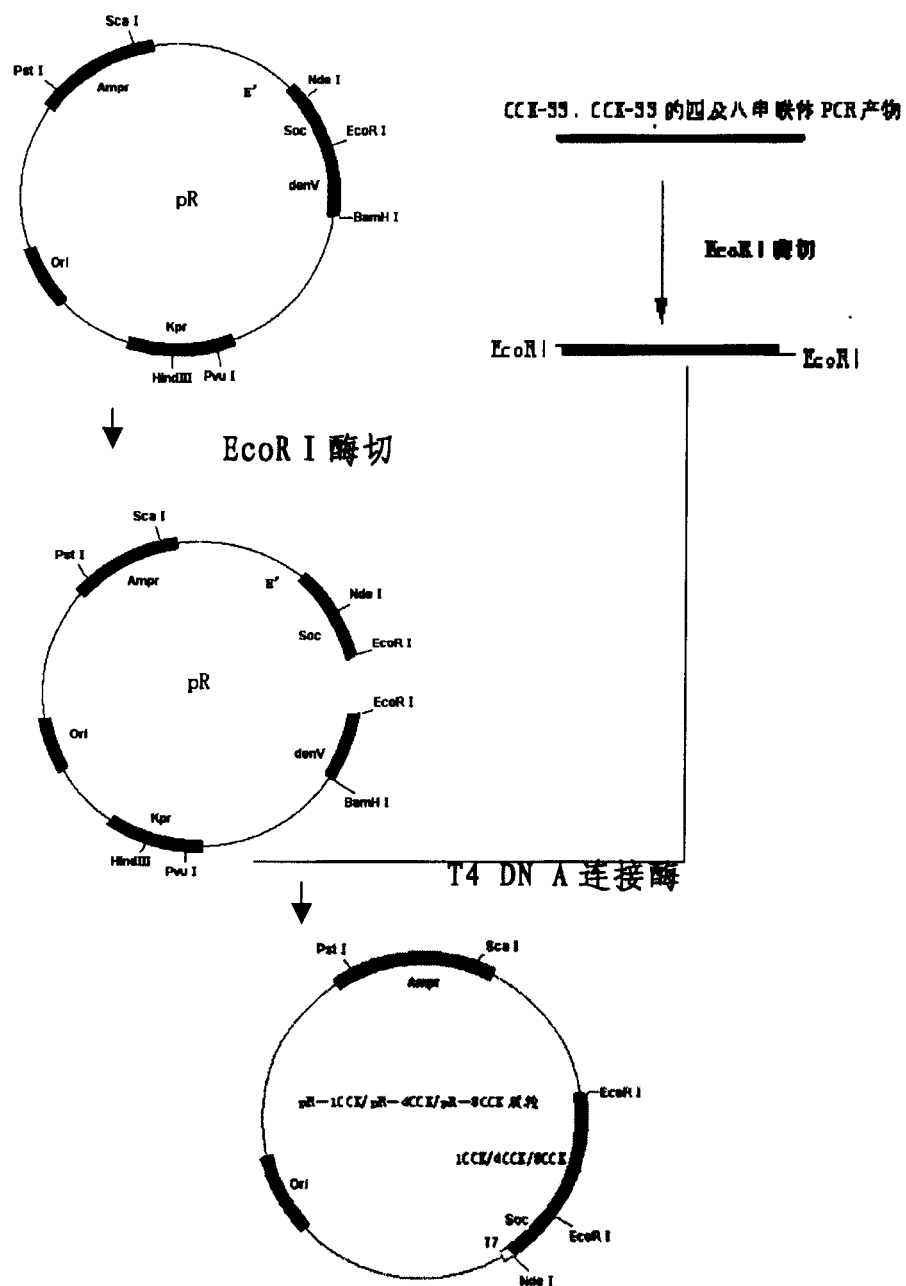
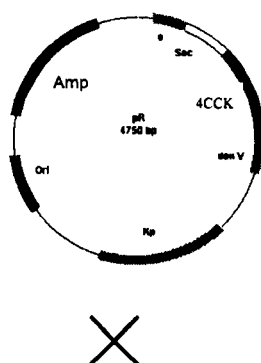
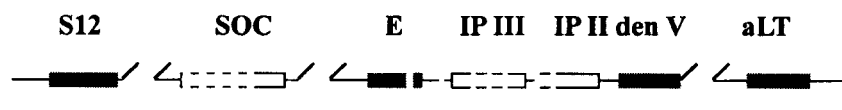


图 4

A



B



C

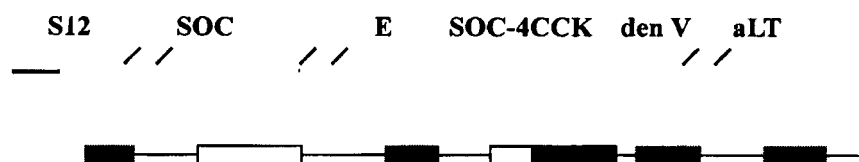


图 5

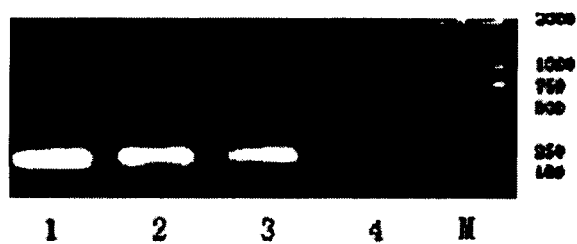


图 6

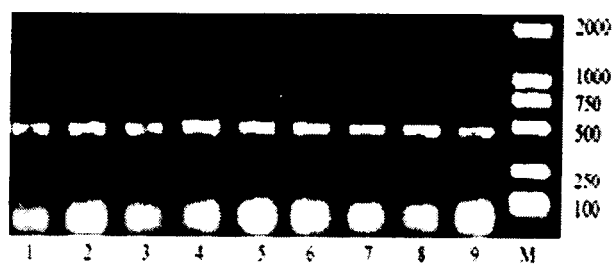


图 7

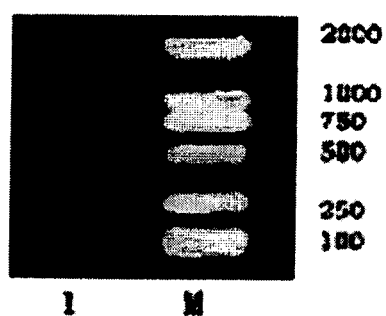


图 8

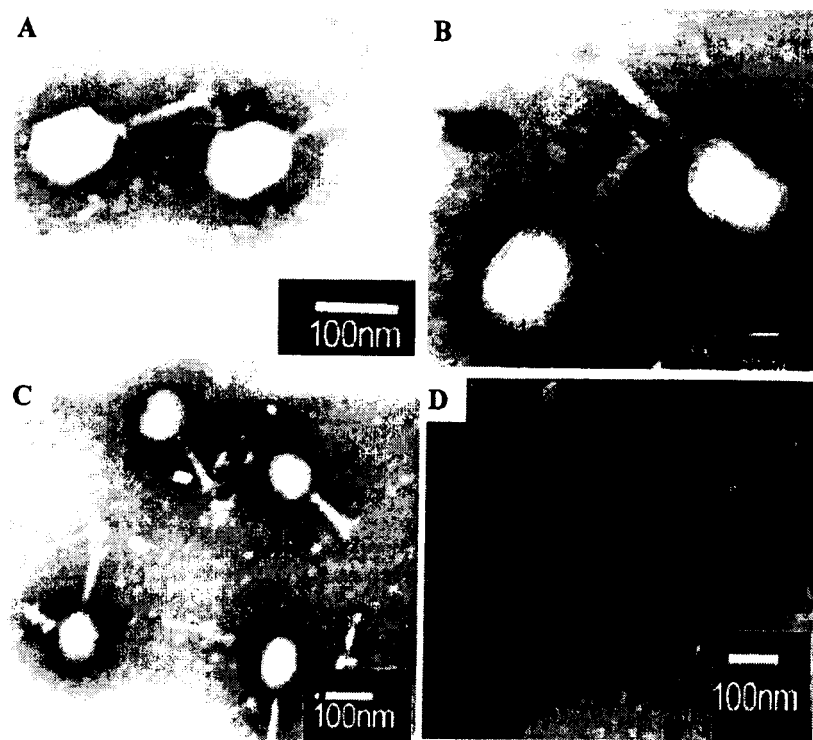


图 9

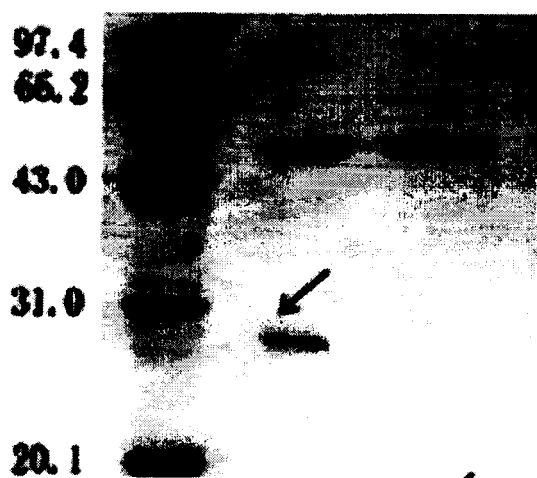


图 10

专利名称(译)	表达缩胆囊素基因的重组T4噬菌体		
公开(公告)号	CN1300307C	公开(公告)日	2007-02-14
申请号	CN200510011582.4	申请日	2005-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	曹永长 覃健萍 毕英佐 舒鼎铭 马静云 谢青梅		
发明人	曹永长 覃健萍 毕英佐 舒鼎铭 马静云 谢青梅		
IPC分类号	C12N7/01 C12N15/12 C07K14/465 C12N15/69 A23K1/00 A23K1/16 C07K16/18 G01N33/53 A23K10/18		
代理人(译)	向华		
其他公开文献	CN1687407A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一个表达缩胆囊素基因的重组T4噬菌体，所述重组T4噬菌体具有鸡缩胆囊素33肽基因或其多串联体的核苷酸序列。本发明也提供了鸡缩胆囊素33肽或其多串联体的氨基酸残基序列，以及利用重组T4噬菌体对动物进行主动免疫的技术及其应用。

