

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680022529.7

[51] Int. Cl.

*C12N 15/31 (2006.01)*

*C12N 15/85 (2006.01)*

*C07K 14/20 (2006.01)*

*C07K 16/12 (2006.01)*

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年7月23日

[11] 公开号 CN 101228276A

[51] Int. Cl. (续)

*A61K 39/02 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.6.21

[21] 申请号 200680022529.7

[30] 优先权

[32] 2005.6.23 [33] AU [31] 2005903317

[86] 国际申请 PCT/EP2006/005961 2006.6.21

[87] 国际公布 WO2006/136392 英 2006.12.28

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.21

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

共同申请人 莫道什大学

[72] 发明人 M·贝尔伽德 D·J·汉普森

T·拉

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 凌立

权利要求书 3 页 说明书 51 页 序列表 19 页

[54] 发明名称

多毛短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途

[57] 摘要

本发明描述了多毛短螺旋体的新多核苷酸和氨基酸。这些序列用于诊断动物内的多毛短螺旋体病，以及用作治疗性或预防性治疗动物内的多毛短螺旋体病。这些序列还可以用于诊断，和治疗性和/或预防性治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病，所述的短螺旋体属物种包括密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和猪痢疾短螺旋体。

1. 多核苷酸，其包含选自 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 的序列。
2. 质粒，其包含权利要求 1 的多核苷酸。
3. 权利要求 2 的质粒，其中所述质粒是表达载体。
4. 细胞，其包含权利要求 2 的质粒。
5. 细胞，其包含权利要求 3 的质粒。
6. 免疫原性组合物，其包含权利要求 3 的质粒。
7. 用于治疗或预防多毛短螺旋体的疫苗组合物，其包含权利要求 3 的表达载体。
8. 用于治疗或预防多毛短螺旋体的疫苗组合物，其包含权利要求 4 的细胞。
9. DNA 分子，其包含与权利要求 1 的多核苷酸至少 70% 同源的序列。
10. 质粒，其包含权利要求 9 的多核苷酸。
11. 权利要求 9 的 DNA 分子，其中所述 DNA 分子与权利要求 1 的多核苷酸至少 80% 同源。
12. 质粒，其包含权利要求 11 的多核苷酸。
13. 权利要求 9 的 DNA 分子，其中所述 DNA 分子与权利要求 1 的多核苷酸至少 90% 同源。
14. 质粒，其包含权利要求 13 的多核苷酸。
15. 多肽，其包含选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 的序列。
16. 多核苷酸，其包含权利要求 15 的多肽的编码序列。
17. 质粒，其包含权利要求 16 的多核苷酸。
18. 权利要求 17 的质粒，其中所述质粒是表达载体。
19. 细胞，其包含权利要求 17 的质粒。
20. 免疫原性组合物，其包含权利要求 19 的细胞。
21. 蛋白质，其包含与权利要求 15 的多肽至少 70% 同源的序列。

22. 权利要求 21 的蛋白质，其中所述蛋白质与权利要求 15 的多肽至少 80%同源。
23. 权利要求 22 的蛋白质，其中所述蛋白质与权利要求 15 的多肽至少 90%同源。
24. 免疫原性组合物，其包含权利要求 23 的蛋白质。
25. 免疫原性组合物，其包含权利要求 15 的多肽。
26. 用于治疗或预防多毛短螺旋体的疫苗组合物，其包含权利要求 15 的多肽。
27. 单克隆抗体，其与权利要求 15 的多肽结合。
28. 用于诊断动物内多毛短螺旋体存在的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 27 的单克隆抗体。
29. 用于诊断动物内多毛短螺旋体存在的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 15 的多肽。
30. 用于诊断动物内多毛短螺旋体的存在的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1 的多核苷酸。
31. 在动物内产生对多毛短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 24 的免疫原性组合物。
32. 在动物内产生对多毛短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 25 的免疫原性组合物。
33. 在动物内产生对多毛短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 6 的免疫原性组合物。
34. 在动物内产生对多毛短螺旋体的免疫应答的方法，其包括向所述动物施用权利要求 20 的免疫原性组合物。
35. 治疗或预防需要所述治疗的动物内由多毛短螺旋体引起的疾病的方法，其包括向所述动物施用权利要求 7 的免疫原性组合物。
36. 治疗或预防需要所述治疗的动物内由多毛短螺旋体引起的疾病的方法，包括向所述动物施用治疗有效量的权利要求 8 的疫苗组合物。

---

37. 治疗或预防需要所述治疗的动物内由多毛短螺旋体引起的疾病的方法，其包括向所述动物施用治疗有效量的权利要求 26 的疫苗组合物。

## 多毛短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途

### 发明领域

本发明涉及多毛短螺旋体(*Brachyspira pilosicoli*)的新基因和其中编码的蛋白质。本发明还涉及这些新基因和蛋白质用于诊断多毛短螺旋体病、抗多毛短螺旋体疫苗,和用于筛选杀死多毛短螺旋体或阻断多毛短螺旋体的病理效应的化合物的用途。这些序列还可以用于诊断性和治疗性和/或预防性地治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病,其中所述的其他短螺旋体属物种包括密螺旋体(*B. intermedia*)、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体(*B. aalborgi*)、无害短螺旋体(*B. innocens*)、*B. murdochii*和猪痢疾短螺旋体(*B. hyodysenteriae*)。

### 发明背景

肠道螺旋体病(intestinal spirochaetosis),也称为结肠螺旋体病(colonic spirochaetosis)或螺旋体腹泻(spirochaetal diarrhoea),是限制猪以及成年蛋鸡和肉种鸡产量的重要疾病。肠道螺旋体病由大肠感染肠螺旋体多毛短螺旋体(以前归为蛇行短螺旋体(*Serpulina pilosicoli*))引发。这种螺旋体也感染许多其他动物物种,包括狗和马,以及人。其相关疾病在猪中的了解和研究最多。澳大利亚养猪业中感染的患病率并不明确,但在欧洲和斯堪地那维亚(Scandinavia)的研究显示30%或更多的猪群发生感染。相关疾病为具有间歇性腹泻的结肠炎/盲肠炎和生长率降低。该疾病在猪中的经济重要性尚不清楚,但是因为其广泛传播,应当是很大的。多毛短螺旋体也普遍感染成鸡。在澳大利亚最近的调查中,从43%的肉种鸡群和68%的蛋鸡群中回收到了肠螺旋体,多毛短螺旋体是与这些菌群中44%的亚群相关的螺旋体。感染群排泄物的湿度平均比未感染群高14%。

用从该研究中分离的多毛短螺旋体实验性感染肉种鸡引起产蛋起始的显著延后和蛋产量的持续降低。除了蛋鸡以外，肉种鸡群中蛋产量的损失可对整个肉鸡业产生相当的破坏。这些问题的代价难以预计，但该工业在澳大利亚非常重要。鸡肉业生产零售价 25 亿美元的肉，而蛋业生产价值 3.4 亿美元的蛋。

多毛短螺旋体作为狗和其他动物病原体的角色尚未完全证实，尽管其似乎能够取决于大量其他因素而在较大或较小的程度上影响健康。多毛短螺旋体还感染大量发展中国家人口。在发达国家中，感染主要局限于无免疫应答的个体和同性恋男性中。它已被记录为老人和/或无免疫应答的个体中螺旋体血症的病因。多毛短螺旋体对这些人群的致病影响的完整程度仍有争论。

迄今鲜有开发控制多毛短螺旋体感染的方法的尝试。当猪舍中鉴定出肠螺旋体病的问题时，动物一般用抗微生物剂处理，尽管该疾病易于在撤除治疗后复发。在鸡中对该疾病的了解并不深入，养鸡业尚未具体尝试控制感染。只有一项有记录的研究是利用疫苗控制猪的肠螺旋体病，但该自体菌苗不能提供保护(Hampson DJ, Robertson ID, La T, Oxberry SL 和 Pethick DW. 2000. Influences of diet and vaccination on colonization of pigs by the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli*. *Veterinary Microbiology* 74:75-84)。然而，由于该螺旋体对大肠黏膜有特定的端接连接（end-on attachment），可能可以通过适当的疫苗所诱导的免疫来减弱或阻止其建群。

本发明提供之前没有鉴定过的多毛短螺旋体的新氨基酸序列和编码这些新氨基酸序列的多核苷酸序列。本发明还证实这些新氨基酸序列和 DNA 序列可以用于诊断性测定和抗多毛短螺旋体的疫苗。这些序列还可以用于诊断性和治疗性和/或预防性地治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病，其中所述的其他短螺旋体属物种包括密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和猪痢疾短螺旋体。

## 发明简述

本发明的目的是获得来自多毛短螺旋体的新基因和由这些基因编码的蛋白质。本发明的另一目的是新基因和由这些基因编码的蛋白质可用于治疗性目的和诊断目的。所述基因和/或蛋白质可以在抗多毛短螺旋体疫苗内使用或用来诊断多毛短螺旋体感染。

本发明的目的是获得具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 内所包含的核苷酸序列的多毛短螺旋体新基因。本发明的目的还是获得与 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 同源的核苷酸序列，其中同源性可以是 95%、90%、85%、80%、75%和 70%。本发明还包括 DNA 疫苗或 DNA 免疫原性组合物，其包含 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 的核苷酸序列以及与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。本发明还包括诊断性测定法，其包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 的核苷酸序列的 DNA，以及具有与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列的 DNA。

本发明的目的还是获得质粒，其包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 的序列的 DNA；获得原核表达载体和/或真核表达载体，其包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 的序列的 DNA；以及获得包含质粒的细胞，其中所述质粒包含具有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 的序列的 DNA。

本发明的目的是获得具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列的多毛短螺旋体新蛋白质。本发明的目的还在于拥有与 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的蛋白质。本发明的目的还是包含蛋白质的疫苗或免疫原性组合物，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的氨基酸序列。本发明的另一方面是获得包含一种或多种蛋白质的诊断试剂盒，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的序列，或与 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。

本发明的另一方面是获得编码蛋白质的核苷酸序列，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列。本发明还包括质粒、真核表达载体和原核表达载体以及 DNA 疫苗，其包含具有编码蛋白质的序列的 DNA，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列。包含这些质粒和表达载体的细胞包括在本发明内。

本发明包括单克隆抗体，其与具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列的蛋白质结合或与这样的蛋白质结合，即该蛋白质与 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的序列 95%、90%、85%、80%、75% 和 70% 同源。本发明包括含有单克隆抗体的诊断试剂盒，其中所述的单克隆抗体与具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列的蛋白质结合或与这样的蛋白质结合，即该蛋白质与 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的序列同源 95%、90%、85%、80%、75% 和 70%。这些诊断试剂盒可以检测动物内多毛短螺旋体的存在。所述动物优选是任意的哺乳动物和鸟；更优选是鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。

本发明还构思通过向动物施用 DNA 疫苗而预防或治疗动物内多毛短螺旋体感染的方法，其中所述的 DNA 疫苗含有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 内所列的一种或多种核苷酸序列，或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75% 和 70% 同源的序列。本发明还包括通过向动物施用含有一种或多种蛋白质的疫苗而预防或治疗动物内多毛短螺旋体感染的方法，其中所述的蛋白质含有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所列的氨基酸序列或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75% 和 70% 同源的序列。动物优选是任意的哺乳动物和鸟；更优选是鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。

本发明还构思通过向动物施用免疫原性组合物而诱导动物内免疫应答的方法，其中所述的免疫原性组合物含有 SEQ ID NO: 1、3、5、7 和 9 内所列的一种或多种核苷酸序列或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%

和 70%同源的序列。本发明还包括通过向动物施用含有一种或多种蛋白质的免疫原性组合物而诱导动物内免疫应答的方法，其中所述的蛋白质具有 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 内所包含的氨基酸序列或与这些序列 95%、90%、85%、80%、75%和 70%同源的序列。动物优选是任意的哺乳动物和鸟；更优选是鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。

### 发明详述

本文中使用的冠词“a”和“an”指冠词的一个或多于一个(即指至少一个)的语法对象。例如“一个元件”意指一个元件或多于一个的元件。

术语“氨基酸”旨在包括包含氨基功能性和酸功能性并且能够包含天然存在的氨基酸聚合物内的全部分子，无论其是天然的还是人工的。示例性的氨基酸包括天然存在的氨基酸；其类似物、衍生物和同类物；具有变异侧链的氨基酸类似物以及任何前述物质的立体异构物。

动物可以是任意的哺乳动物或鸟。哺乳动物的实例包括狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。鸟的实例包括鸡、鹅鸭、火鸡和鸚鵡。

术语“保守残基”指作为具有某些共同特性的氨基酸组的成员的氨基酸。术语“保守性氨基酸置换”指将来自一个此类组的氨基酸(概念性地或其他方式)置换成来自相同组的不同氨基酸。定义各个氨基酸之间共同特性的功能性方式是分析同源生物的对应该蛋白质的氨基酸变化的归一化频率(Schulz, G. E. 和 R. H. Schinner., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag)。根据该分析，可以定义氨基酸的组，其中组内的氨基酸主要彼此交换，并且因此它们在其对蛋白质总体结构的影响方面彼此相似(Schulz, G. E. 和 R. H. Schinner., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag)。以如此方式定义的氨基酸组的实例包括：(i)包含 Lys、Arg 和 His 的带正电荷组，(ii) 包含 Glu 和 Asp 的带负电荷组，(iii) 包含 Phe、Tyr 和 Trp 的芳香族组，(iv) 包含 His 和 Trp 的氮环组，(v) 包含

Val、Leu 和 De 的非极性大脂族组，(vi) 包含 Met 和 Cys 的轻度极性组，(vii) 包含 Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和 Pro 的小残基组，(viii) 包含 Val、Leu、De、Met 和 Cys 的脂族组和(ix) 包含 Ser 和 Thr 的小羟基组。

“融合蛋白”或“融合多肽”指如同本领域内已知的术语“嵌合蛋白”那样并可以使用本领域已知技术得以构建。在融合蛋白的众多实例中，存在两种不同的多肽序列并在某些情况下，可以存在更多种类的多肽序列。编码融合蛋白的多核苷酸序列可以符合读框地有效连接，以至于融合蛋白可以得到正确翻译。融合蛋白可以包括来自相同物种或来自不同物种的多肽序列。在多种实施方案中，融合多肽可以含有与第一多肽连接的一个或多个氨基酸序列。在多于一种的氨基酸序列与第一多肽融合的例子中，融合序列可以是相同序列的多重拷贝，或备选地可以是不同的氨基酸序列。融合多肽可以与第一多肽的氨基末端、羧基末端，或者氨基末端及羧基末端融合。示例性的融合蛋白包括含有谷胱甘肽 S-转移酶标签(GST 标签)、组氨酸标签(His-标签)、免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白结合结构域的多肽。

术语“分离的多肽”指多肽，其在某些实施方案中从重组 DNA 或 RNA 中制备或是合成来源的或自然来源的或其组合，该多肽(1)不与其天然形式的蛋白质结合、(2)从该多肽通常存在的细胞内分离、(3)没有来自相同细胞来源的其他蛋白质、(4)由来自不同物种的细胞表达或(5)不存在于自然界内。有可能分离的多肽存在但不足以称作纯化的多肽。

术语“分离的核酸”和“分离的多核苷酸”指多核苷酸，无论是基因组 DNA、cDNA、mRNA、tRNA、rRNA、iRNA，或是从细胞器(如线粒体和叶绿体)或合成来源获得的多核苷酸，该多核苷酸(1)不与分离的核酸天然存在于其内的细胞结合或(2)与不天然连接的多核苷酸有效连接。有可能分离的多核苷酸存在但不足以称作纯化的多核苷酸。

术语“核酸”和“多核苷酸”指聚合形式的核苷酸，无论是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或是核苷酸的两种类型的修饰形式。还应当理解该术

语包括等效物、从核苷酸类似物形成的 RNA 或 DNA 的类似物并且,如适用于所述实施方案那样包括单链(如有义或反义)多核苷酸和双链多核苷酸。

术语“本发明的核酸”和“本发明的多核苷酸”指编码本发明多肽的核酸。本发明的多核苷酸可以包含如下的全部或部分:目的核苷酸序列;与目的核苷酸序列至少 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的核苷酸序列;在严格条件下与目的核酸序列杂交的核苷酸序列;与本发明多肽功能等效的多肽的编码核苷酸序列;与主题氨基酸序列至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 同源或相同的多肽的编码核苷酸序列;具有本发明多肽的活性并与主题氨基酸序列具有至少约 60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更多同源性或同一性的多肽的编码核苷酸序列;因 1 至约 2、3、5、7、10、15、20、30、50、75 个或更多个核苷酸置换、添加或缺失而与目的核酸序列不相同的核苷酸序列,如等位变体;衍生自目的核酸序列并在进化上与其相关的核酸;以及全部前述及本发明其他核酸的互补物,以及由全部前述及本发明其他核酸的遗传密码简并性而产生的核苷酸序列。本发明的核酸还包括目的核苷酸序列的同源物,例如直向同源物和侧向同源物,并且还包括为特定生物(例如宿主细胞)内的表达已进行密码子优化的目的核苷酸序列的变体。

当描述两个核酸区域间的关系时,术语“有效连接的”指并列,其中这两种核酸区域所处关系允许它们以希望的方式发挥作用。例如与编码序列“有效连接”的控制序列以如此方式连接以至在与控制序列兼容的条件下,如当合适分子(例如诱导物和聚合酶)结合至一个或多个控制序列或调节序列时,实现编码序列的表达。

本文中可交换使用的术语“多肽”和术语“蛋白质”及“肽”指氨基酸的聚合物。示例性多肽包括基因产物、天然存在的蛋白质、同源物、直向同源物、侧向同源物、片段以及前述物质的其他等效物、变体和类似物。

用于指参考多肽时，术语“多肽片段”或“片段”指多肽，在其中当与参考多肽本身相比较时，氨基酸残基缺失，而剩余的氨基酸序列通常与参考多肽内的相应位置相同。这类缺失可以出现在参考多肽的氨基末端或羧基末端或备选地在两个末端上。片段一般是至少5、6、8或10个氨基酸长度、至少14个氨基酸长度、至少20、30、40或50个氨基酸长度、至少75个氨基酸长度或至少100、150、200、300、500个或更多个氨基酸长度。片段可以保留参考多肽的一种或多种生物学活性。在某些实施方案中，片段可以包含具有所需生物学活性的结构域和任选位于结构域的一侧或两侧的额外氨基酸，其中所述的额外氨基酸可以是5、10、15、20、30、40、50个或至多100个或更多数目的残基。此外，片段可以包括特定区域的亚片段，其中亚片段保留衍生自其的区域的功能。在另一实施方案中，片段可以具有免疫原性。

术语“本发明多肽”指含有主题氨基酸序列或其等效物或片段的多肽。本发明多肽包括包含主题氨基酸序列的全部或部分的多肽：具有1个至约2、3、5、7、10、15、20、30、50、75个或更多个保守性氨基酸置换的主题氨基酸序列；包括与主题氨基酸序列至少60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列，及其功能性片段。本发明多肽还包括主题氨基酸序列的同源物，例如直向同源物和侧向同源物。

还有可能为了如此目的而修饰本发明多肽的结构，如增强治疗性效力或预防效力或稳定性(例如离体(ex vivo)保存期、在体内蛋白酶解性降解抗性等)。如此修饰的多肽，当为了保留天然存在形式的蛋白质的至少一种活性而设计时，被视作本文中更详细描述的多肽的“功能性等效物”。可以产生如此修饰的多肽，例如通过氨基酸置换、缺失或添加，其中置换可以全部或部分地由保守性氨基酸置换组成。

例如，预计单独的保守性氨基酸置换如用异亮氨酸或缬氨酸替换亮氨酸、用谷氨酸替换天冬氨酸、用丝氨酸替换苏氨酸将不会明显影响所得的分子的生物学活性，这是合理的。多肽氨基酸序列中的变化是否产生功能性同源物可以通过评估变异多肽产生与野生型蛋白质的应答相似的应答的

能力而轻易地确定，其中可以用相同方式轻易地测试已经发生多于一种替换的多肽。

术语“纯化的”指作为主导种类存在的目标种类(即基于摩尔，其丰度超过组合物内的其他各种类)。“纯化的级分”是组合物，在其中目标种类是全部存在种类的至少约 50%(基于摩尔)。在进行溶液或分散体内某种类纯度的测定时，该测定通常不包括所述种类在其中溶解和分散的溶剂或基质；相反，仅考虑已溶解或已分散的所述种类(包括目的种类)。通常，纯化的组合物将具有超过组合物内全部存在种类的约 80%、超过全部存在种类的约 85%、90%、95%、99%或更多的一个种类。目标种类可以纯化至其中组合物基本上是单一种类的基本均一性(不能在组合物内以常规检测方法检测到杂质种类)。本领域技术人员可基于本发明的教导，使用蛋白质纯化的标准技术纯化本发明的多肽。多肽的纯度可以通过本领域技术人员已知的众多方法测定，所述方法包括例如氨基末端氨基酸序列分析、凝胶电泳、质谱分析和本文中所述的方法。

术语“重组蛋白”或“重组多肽”指通过重组 DNA 技术产生的多肽。此类技术的实例包括如此例子，即将所表达蛋白质的编码 DNA 插入至合适表达载体内时，其中所述的合适表达载体随后用于转化宿主细胞以产生由该 DNA 所编码的蛋白质和多肽。

本说明书通篇所用的术语“调节序列”是指诸如启动信号、增强子、调节子和启动子的多核苷酸序列的上位术语，其需要或想要影响与该多核苷酸序列有效连接的编码序列或非编码序列的表达。示例性调节序列在 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA(1990)中描述并包括例如 SV40 的早期启动子和晚期启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 或 TRC 系统、其表达受 T7 RNA 聚合酶指导的 T7 启动子、噬菌体  $\lambda$  的主要操纵子和启动子区域、用于 fd 衣壳蛋白的控制区域、用于 3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶(例如 Pho5)的启动子、酵母  $\alpha$ -交配因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子，以及已知控制原核细

胞或真核细胞或其病毒基因表达的其他序列。此类控制序列的性质和用途可以根据宿主生物而变化。在原核生物中，此类调节序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。术语“调节序列”旨在至少包括其存在可以影响表达的成分并且还可以包括其存在是有利的额外成分，例如前导序列和融合配偶物序列。在某些实施方案中，多核苷酸序列的转录受控于控制该多核苷酸在如此细胞类型内表达的启动子序列(或其他调节序列)，其中所述细胞类型内旨在所述的表达。还将理解多核苷酸可以受控于调节序列，其与控制多核苷酸的天然存在形式表达的那些调节序列相同或不同。

术语“序列同源性”指两种核酸序列间碱基匹配的比例或两种氨基酸序列间氨基酸匹配的比例。当序列同源性表述为百分数例如 50% 时，该百分数指在来自与其他序列加以比较的所需序列中序列长度范围内的匹配比例。容许缺口(在两个序列中任意一个内)以使匹配最大化；通常使用 15 个碱基或更少的缺口长度，更常见使用 6 个碱基或更少的缺口长度、甚至常见使用 2 个碱基或更少的缺口长度。术语“序列同一性”意指序列在比较窗口范围内是相同的(即对于核酸是基于核苷酸对核苷酸，或对于多肽是基于氨基酸对氨基酸)。术语“序列同一性的百分数”通过在比较窗口范围内比较两个已优化比对的序列进行计算。确定在两个序列内均存在的相同氨基酸位置数或相同核苷酸位置数以产生匹配位置数，匹配位置数除以比较窗口内的总位置数，并将结果乘以 100 以产生序列同一性百分数。计算序列同一性的方法是本领域技术人员已知的并且进一步详述如下。

本文所用的术语“可溶的”涉及本发明多肽或其他蛋白质时，意指在细胞培养物内表达时，至少一些部分已表达的多肽或蛋白质停留在细胞的胞质部分内并且在裂解及离心裂解物时，不随细胞碎片发生分级。多肽的可溶性可以通过现有技术已确认的多种方法提高，所述方法包括与异源氨基酸序列融合、缺失氨基酸残基、氨基酸置换(例如在序列中增加具有亲水性侧链的氨基酸残基)和化学修饰(例如添加亲水性基团)。

多肽的可溶性可以通过多种现有技术已确认的方法测量，所述方法包括确定聚集状态的动态光散射、UV 吸收、旨在从非聚集材料中分离已聚

集材料的离心, 以及 SDS 凝胶电泳(例如比较可溶性部分内蛋白质的量与合并的可溶性部分及不溶性部分内蛋白质的量)。当在宿主细胞内表达时, 本发明多肽可以是至少约 1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多可溶性的, 例如, 位细质部分内发现的细胞内已表达蛋白质的总量的至少约 1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些实施方案中, 1 升表达本发明多肽的细胞培养物将产生至少约 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50 毫克或更多的可溶性蛋白。在示例性实施方案中, 本发明多肽是至少约 10%可溶性的并将产生至少约 1 毫克蛋白质。

术语“特异性地杂交”指可检测和特异性的核酸结合。在使与非特异核酸可估计量的可检测的结合最小化的杂交和洗涤条件下, 本发明的多核苷酸、寡核苷酸及核酸与核酸链选择性杂交。可以使用严格条件来实现如本领域已知的并在本文中讨论的选择性杂交条件。通常, 在本发明的多核苷酸、寡核苷酸及核酸与目的核酸序列之间的核酸序列同源性将是至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或更高。在某些情况下, 在根据常规杂交方法和如本文中进一步所述的严格条件下进行杂交和洗涤条件。

术语“严格条件”或“严格杂交条件”指促进两条互补性多核苷酸链间特异性杂交以至于形成双链体的条件。严格条件可以选择为比在定义离子强度和 pH 下的用于给定多核苷酸双链体的热解链点( $T_m$ )低约 5°C。互补性多核苷酸链的长度及它们的 GC 含量将决定双链体的  $T_m$  并因此决定为获得想要的杂交特异性所必需的杂交条件。 $T_m$  是 50%的多核苷酸序列杂交成为完全匹配互补链的温度(在定义离子强度和 pH 下)。在某些情况下, 可能需要增加杂交条件的严格性至大约等同于特定双链体的  $T_m$ 。

可以使用估计  $T_m$  的多种技术。一般, 估计双链体内的 G-C 碱基对对  $T_m$  贡献约 3°C, 而估计 A-T 碱基对贡献约 2°C, 直至理论性最大值约 80-100°C。

然而,可使用更复杂的  $T_m$  模型,在其中考虑 G-C 堆积相互作用、溶剂效应、想要的测定温度等。例如,具有大约  $60^\circ\text{C}$  解离温度( $T_d$ )的探针可以使用式:  $T_d = (((3 \times \#GC) + (2 \times \#AT)) \times 37) - 562) / \#bp - 5$  设计;其中  $\#GC$ 、 $\#AT$  和  $\#bp$  分别是参与双链体形成的鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对数、腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基对数和总碱基对数。

杂交可以以  $5 \times \text{SSC}$ 、 $4 \times \text{SSC}$ 、 $3 \times \text{SSC}$ 、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $1 \times \text{SSC}$  或  $0.2 \times \text{SSC}$  实施至少约 1 小时、2 小时、5 小时、12 小时或 24 小时。可以增加杂交温度以调节反应的严格性,例如从约  $25^\circ\text{C}$  (室温)至约  $45^\circ\text{C}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、 $55^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$  或  $65^\circ\text{C}$ 。杂交反应还可以包括影响严格性的另一种试剂,例如,在 50% 甲酰胺存在下实施的杂交增加在定义温度下的杂交严格性。

杂交反应可以后接单个洗涤步骤,或 2 个或多个洗涤步骤,这些步骤可为相同或不同的盐度和温度。例如,为调节严格性可以升高洗涤的温度从约  $25^\circ\text{C}$  (室温)至约  $45^\circ\text{C}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、 $55^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$ 、 $65^\circ\text{C}$  或更高。洗涤步骤可以在去污剂例如 0.1 或 0.2% SDS 存在下实施。例如,杂交可以后接 2 个在  $65^\circ\text{C}$  的洗涤步骤,每个洗涤步骤在  $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中持续约 20 分钟并且任选地再有 2 个在  $65^\circ\text{C}$  的额外洗涤步骤,每个洗涤步骤在  $0.22 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中持续约 20 分钟。

示例性的严格杂交条件包括  $65^\circ\text{C}$  下在含有 50% 甲酰胺、 $10 \times \text{Denhardt}$  (0.2% Ficoll、0.2% 聚乙烯吡咯烷酮、0.2% 牛血清白蛋白) 和  $200 \mu\text{g/ml}$  变性载体 DNA (例如剪切鲑精 DNA) 的溶液中杂交过夜,随后是 2 个在  $65^\circ\text{C}$  的洗涤步骤,每个洗涤步骤在  $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中持续约 20 分钟,以及 2 个在  $65^\circ\text{C}$  的洗涤步骤,每个洗涤步骤在  $0.22 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中持续约 20 分钟。

杂交可以由在溶液中杂交两种核酸,或将溶液中的一种核酸杂交至另一种结合于固态支持物例如滤膜上的核酸组成。当一种核酸处于固态支持物上时,预杂交步骤可以在杂交前进行。预杂交可以在如杂交溶液那样的相同溶液及在相同温度下实施至少约 1 小时、3 小时或 10 小时(无互补性多核苷酸链)。

合适的严格条件是本领域技术人员已知的或可以由技术人员实验确定。参见,例如 **Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-12.3.6**; Sambrook 等, 1989, **Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.**; S. Agrawal(编辑)**Methods in Molecular Biology, 第 20 卷**; Tijssen(1993)**Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization With Nucleic Acid Probes**, 例如第 2 章第 I 部分 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, New York 和 Tibanyenda, N.等, **Eur. J. Biochem. 139:19(1984)**以及 Ebel, S.等, **Biochem. 31:12083(1992)**。

术语“载体”指能够运输已经与之连接的另一种核酸的核酸。根据本发明可以使用的一种类型的载体是附加体,即能够进行染色体外复制的核酸。其他载体包括能够自主复制并表达与之连接的核酸的那些载体。能够指导与之有效连接的基因表达的载体在本文中称作“表达载体”。通常,重组技术中所用的表达载体常常是“质粒”形式,所述质粒指在其载体形式时不与染色体结合的环状双链 DNA 分子。在本说明书中。“质粒”和“载体”可交换地使用,因为质粒是最常使用的载体形式。然而,本发明旨在包括此类其他形式的表达载体,它们发挥等效功能并在本领域内是迄今已知的。

本发明的核酸可以用作诊断试剂以检测与其特异性结合的靶 DNA 或靶 RNA 序列的存在与否,例如用于测定本发明核酸的表达水平。在一个方面,本发明构思检测在样品内本发明核酸或其部分存在的方法,该方法的步骤是:(a)提供长度为至少 8 个核苷酸的寡核苷酸,该寡核苷酸与本发明核酸的部分互补;(b)使寡核苷酸与含有至少一种核酸的样品在允许此寡核苷酸与本发明核酸或其部分杂交的条件下接触;和(c)检测寡核苷酸与样品内核酸的杂交,因而检测在样品内本发明的核酸或其部分的存在。在另一方面,本发明构思通过如此方式检测样品内本发明核酸或其部分存在的方法,即(a)提供一对单链寡核苷酸,其中每一单链寡核苷酸长度为至少 8

个核苷酸，与本发明核酸的序列互补并且其中与寡核苷酸互补的序列间隔至少 10 个核苷酸；和(b)使寡核苷酸与含有至少一种核酸的样品在杂交条件下接触；(c)扩增两条寡核苷酸引物间的核苷酸序列；和(d)检测被扩增序列的存在，因而检测样品内本发明的核酸或其部分的存在。

在本发明的另一方面，本发明的多核苷酸在表达载体内提供，所述表达载体含有编码本发明多肽的核苷酸序列并与至少一种调节序列有效连接。应当理解的是表达载体的设计可能取决于如此因素，如待转化宿主细胞的选择和/或想要表达的蛋白质的类型。应当考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力和由载体编码的任何其他蛋白质如抗生素标记的表达。

含有本发明多核苷酸的表达载体随后可以用作药剂以治疗感染多毛短螺旋体的动物，或作为疫苗(也是药剂)以防止动物感染多毛短螺旋体，或旨在减少疾病症状和疾病过程，若该动物确实受到感染。使用表达载体作为药剂的一种方式施用核酸疫苗至有感染风险的动物或感染后的动物。在本领域内充分描述了核酸疫苗技术。一些描述可以在美国专利 6,562,376(Hooper 等)、美国专利 5,589,466(Felgner 等)、美国专利 6,673,776 (Felgner 等)和美国专利 6,710,035(Felgner 等)内找到。核酸疫苗可以注射至肌肉或皮下，可以经电穿孔(见 WO 01/23537, King 等和 WO 01/68889, Malone 等)、经脂质组合物(见美国专利 5,703,055, Felgner 等)或本技术领域已知的其他机制进入动物。

表达载体还可以转染至细菌内，所述细菌可以施用至目标动物以诱导针对表达载体内含有的本发明核苷酸所编码的蛋白质的免疫应答。表达载体可以含有真核表达序列以至于在宿主动物内转录并翻译本发明的核苷酸。备选地，表达载体可以在细菌内转录并随后在宿主动物内翻译。用作表达载体的携带者的细菌应当是减毒的但仍有侵染性。可以使用已减毒的但仍有侵染性的志贺氏菌属某种 (*Shigella* spp.)、沙门氏菌属某种 (*Salmonella* spp.)、埃希氏菌属某种 (*Escherichia* spp.) 和气单胞菌属某种 (*Aeromonas* spp.)，这里仅仅例举若干。这些方法的实例可以在美国专利 5,824,538(Branstrom 等)、美国专利 5,877,159(Powell 等)、美国专利

6,150,170(Powell 等)、美国专利 6,500,419(Hone 等)和美国专利 6,682,729(Powell 等)中找到。

备选地，可以将本发明的多核苷酸置于作为载体的某些病毒内。病毒载体可以将本发明的蛋白质表达在病毒表面上或携带本发明的多核苷酸进入动物细胞内，在其中多核苷酸转录并翻译成蛋白质。用病毒载体感染的动物可以发生针对本发明多核苷酸所编码蛋白质的免疫应答。因此，可以减轻或预防在接受病毒载体的动物内由多毛短螺旋体所致的感染。病毒载体的实例可以在美国专利 5,283,191(Morgan 等)、美国专利 5,554,525(Sondermeijer 等)和美国专利 5,712,118(Murphy)中找到。

本发明的多核苷酸可以用来引起本发明多肽在培养中繁殖的细胞内表达和过量表达，例如以产生蛋白质或多肽，包括融合蛋白或融合多肽。

本发明涉及用重组基因转染宿主细胞以表达本发明的多肽。宿主细胞可以是任意的原核细胞或真核细胞。例如，本发明多肽可以表达于细菌细胞内，如大肠杆菌、昆虫细胞(杆状病毒)、酵母、植物细胞或哺乳动物细胞内。在这些例子中，当宿主细胞是人细胞时，它可以位于活受体内或不在其中。本领域技术人员已知其他合适的宿主细胞。另外，宿主细胞可以补充宿主内通常找不到的 tRNA 分子以至于优化了多肽的表达。备选地，可以改变核苷酸序列以优化宿主细胞内的表达，所产生的蛋白质仍将具有与最初编码蛋白质的高度同源性。适用于最大化表达多肽的其他方法将是本领域技术人员已知的。

本发明还涉及产生本发明多肽的方法。例如可以在允许多肽表达发生的合适条件下培养宿主细胞，其编码本发明多肽的表达载体转染。多肽可以被分泌并从细胞与含有该多肽的培养基的混合物中分离。备选地，多肽可以停留在细胞质内，并收获、裂解细胞以及分离蛋白质。

细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的培养基在本领域众所周知。多肽可以使用本领域已知用于纯化蛋白质的技术从细胞培养基、宿主细胞或该两者中分离，所述的技术包括离子交换

色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳及用针对本发明多肽中特定表位呈特异性的抗体的免疫亲和纯化。

因此，编码本发明多肽的全部或所选择部分的核苷酸序列可以用来通过微生物细胞过程或真核细胞过程产生重组形式的蛋白质。标准方法是将序列连接到多核苷酸构建体如表达载体，并转化或转染至宿主即真核宿主(酵母、鸟、昆虫或哺乳动物)或原核宿主(细菌细胞)内。类似的方法或其改良可以用来通过微生物手段或组织培养技术制备本发明的重组多肽。

用于表达本发明多肽的合适载体包括如下类型的质粒：用于原核细胞如大肠杆菌内表达的 pTrcHis 衍生性质粒、pET 衍生性质粒、pBR322 衍生性质粒、pEMBL 衍生性质粒、pEX 衍生性质粒、pBTac 衍生性质粒和 pUC 衍生性质粒。在制备质粒和转化宿主生物中使用的多种方法在本领域众所周知。关于同时适用于原核细胞和真核细胞的其他合适表达系统以及通用重组方法，见 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第二版，编者 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，第 16 和 17 章。

目的多肽的编码序列可以作为包括编码不同多肽的核苷酸序列的融合基因的部分并入。本发明构思含有本发明核酸和编码异源肽的至少一种异源序列的分离的多核苷酸，其中所述的异源序列符合读框地与本发明核酸的核苷酸序列连接，以至于编码含有异源多肽的融合蛋白。异源多肽可以与(a)本发明多肽的羧基末端、(b)本发明多肽的氨基末端或(c)本发明多肽的羧基末端及氨基末端融合。在某些情况下，异源序列编码这样的多肽，该多肽允许检测、分离、增溶与该多肽融合的多肽，和/或使与该多肽融合的多肽稳定化。在其他实施方案中，异源序列编码多肽，如多 His 标签、myc、HA、GST、蛋白 A、蛋白 G、钙调蛋白结合肽、硫氧还蛋白、麦芽糖结合蛋白、多精氨酸、多 His-Asp、FLAG、免疫球蛋白的部分和胞运肽。

在需要产生本发明多肽的免疫原性片段时，可以使用融合表达系统。例如，可以使用轮状病毒的 VP6 衣壳蛋白作为多肽部分的免疫载体蛋白，其为单体形式或是病毒颗粒形式。与待产生针对性抗体的本发明多肽的部

分相对应的核酸序列可以引入到融合基因构建体内，所述融合基因构建体包含用于痘苗病毒晚期结构蛋白的编码序列，以产生使包含本发明蛋白质的部分的融合蛋白作为病毒粒子的部分进行表达的一组重组病毒。乙型肝炎表面抗原也可以以此目的使用。类似地，可以产生嵌合构建体以增强免疫原性，其中该嵌合构建体编码含有本发明多肽的部分及脊髓灰质炎病毒衣壳蛋白的融合蛋白(见，例如欧洲专利公开号：0259149 和 Evans 等,(1989)Nature 339:385; Huang 等,(1988)J. Virol. 62:3855 和 Schlienger 等,(1992)J. Virol. 66:2)。

融合蛋白可以辅助表达和/或纯化蛋白质。例如，本发明多肽可以作为谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白生成。这类 GST 融合蛋白可以用来简化本发明多肽的纯化，如通过利用谷胱甘肽-衍生化基质(见，例如 Current Protocols in Molecular Biology, 编者 Ausubel 等(N. Y.: John Wiley & Sons, 1991))。在另一实施方案中，编码纯化用前导序列(如重组蛋白中所需部分氨基末端上的多-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可以允许使用  $\text{Ni}^{2+}$  金属树脂通过亲和层析纯化已表达的融合蛋白。纯化用前导序列随后可以通过用肠激酶处理除去，以提供纯化的蛋白质(例如见 Hochuli 等,(1987) J. Chromatography 411: 177; 和 Janknecht 等,PNAS 美国 88:8972)。

用于产生融合基因的技术是众所周知的。基本上，根据常规技术进行编码不同多肽序列的多种 DNA 片段的连接，即采用用于连接的平末端或交错末端，限制酶消化以提供合适末端，根据需要补平粘端，碱性磷酸酶处理以避免不想要的连接以及酶连接。在另一实施方案中，融合基因可以通过包括自动 DNA 合成仪在内的常规技术合成。备选地，基因片段的 PCR 扩增可以使用在连续的两个基因片段间产生互补突出端的锚式引物实施，其中所述的两个基因片段随后可以复性以生成嵌合的基因序列(见，例如 Current Protocols in Molecular Biology, 编者 Ausubel 等, John Wiley & Sons: 1992)。

在其他实施方案中，本发明提供固定在固态表面上的本发明核酸，所述的固态表面包括平板、微量滴定平板、载玻片、小珠、颗粒、球、膜、

链、沉淀、凝胶、薄片、管、容器、毛细管、贴片、条等。本发明的核酸可以固定于芯片上作为阵列的部分。该阵列可以含有如本文所述的一种或多种本发明多核苷酸。在一个实施方案中，芯片含有一种或多种本发明多核苷酸作为来自如本发明多核苷酸的相同致病物种内的多核苷酸序列阵列的部分。

在本发明的优选形式中，提供如本文所述的分离的多毛短螺旋体多肽并还提供编码这些多肽的多核苷酸序列。更希望的是以基本上纯化的形式提供多毛短螺旋体多肽。

本发明的优选多肽将具有全长天然多肽的一种或多种生物学特性(例如体内特性、体外特性或免疫特性)。本发明的范围还包括非功能性多肽，因为它们可以用作例如功能性多肽的拮抗剂。可以测定与野生型相关的类似物、片段或衍生物的生物学特性，例如通过生物学测定手段。

多肽，包括类似物、片段和衍生物，可以合成性地制备(例如使用众所周知的固相或液相肽合成技术)。优选使用固相合成技术。备选地，本发明多肽可以是使用众所周知的基因工程技术制备，如下文所述。在另一实施方案，多肽可以(例如通过免疫亲和纯化)从中纯化，该生物学流体例如但不限于来自动物的血浆、粪便、血清或尿，其中所述的动物包括但不限于猪、鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、人、猴、狗、猫、马、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、牛和绵羊。动物可以是任意的哺乳动物、鱼或鸟。

多毛短螺旋体多肽类似物包括具有如此氨基酸序列的那些多肽，其中一个或多个氨基酸用其他氨基酸置换，所述置换基本不改变分子的生物学活性。

根据本发明，重组或通过化学合成产生的本发明多肽和其片段或其他衍生物或类似物，包括融合蛋白，可以用作免疫原以生成识别该多肽的抗体。

当分子能够特异相互作用于免疫系统的抗原识别分子如免疫球蛋白(抗体)或 T 细胞抗原受体时，该分子有“抗原性”。抗原性氨基酸序列含有至少约 5 个并优选至少约 10 个氨基酸。分子的抗原性部分可以是对抗体

识别或 T 细胞受体识别呈免疫优势的部分，或其可以是这样的部分，其中通过使抗原性部分缀合至用于免疫的载体分子而使用该部分以生成针对该分子的抗体。具有抗原性的分子本身不需要是免疫原性的，即能够在载体不存在下激发免疫应答。

“抗体”是结合特异性表位的任何免疫球蛋白，包括抗体及其片段。该术语包括多克隆抗体、单克隆抗体和嵌合抗体以及抗体的抗原结合部分，其中提及的嵌合抗体在美国专利号 4,816,397 和 4,816,567 中进一步详述，所述抗原结合部分包括 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 和 F(v)(包括单链抗体)。因此如本文中用于多种语法形式的短语“抗体分子”构思完整的免疫球蛋白分子及含有抗体结合位点的免疫球蛋白分子的免疫活性部分。“抗体结合位点”是抗体分子的结构性部分，其由重链区和轻链区及特异性结合抗原的高变区构成。

示例性的抗体分子是完整的免疫球蛋白分子、基本上完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子中含有互补位的那些部分，包括本领域称作 Fab、Fab<sup>1</sup>、F(ab')<sub>2</sub> 和 F(v)的那些部分，这些部分优选用于本文中所述的治疗性方法内。

抗体分子的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 部分经众所周知的方法，各自通过由木瓜蛋白酶和胃蛋白酶在基本完整的抗体分子上的蛋白水解反应制备。见，例如 Theofilopolous 等的美国专利号 4,342,566。Fab' 抗体分子部分也是众所周知的，从 F(ab')<sub>2</sub> 部分中随后用巯基乙醇使连接两个重链部分的二硫键还原，然后用还原剂(如碘乙酰胺)烷基化所得蛋白质硫醇而产生。本文中优选含有完整抗体分子的抗体。

处于多种语法形式的短语“单克隆抗体”指仅具有一种能够与特定抗原发生免疫反应的抗体结合位点的抗体。单克隆抗体因此通常显示对该单克隆抗体与之发生免疫反应的任何抗原的单一结合亲和力。单克隆抗体可以因此含有具备多种抗体结合位点的抗体分子，其中每一抗体结合位点对不同抗原呈免疫特异性；例如双特异性(嵌合)单克隆抗体。

术语“佐剂”指增强对抗原的免疫应答的化合物或混合物。佐剂可以作为缓慢释放抗原的组织储存佐剂并且还作为非特异性增强免疫应答的淋巴系统活化剂发挥作用[Hood等在 *Immunology*, 第 384 页, 第二版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California(1984)]。在无佐剂下单用抗原的初次免疫往往不能激发体液或细胞免疫应答。佐剂包括但不限于弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、皂苷、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血磷脂酰胆碱、多聚醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油或烃乳状液、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和人可能使用的佐剂如 BCG(*Bacillus Calmette-Guerin*)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)。优选地,佐剂是可药用的。

本领域已知的多种方法可以用于产生抗本发明多肽的多克隆抗体。为产生抗体,多种宿主动物可以通过注射本发明多肽加以免疫,所述宿主动物包括但不限于兔、小鼠,大鼠、绵羊、山羊等。在一个实施方案,本发明多肽可以缀合至免疫原性载体,例如牛血清白蛋白(BSA)或匙孔血蓝蛋白(KLH)。多种佐剂可以用来提高免疫应答,所述佐剂根据宿主种类包括但不限于弗氏(完全和不完全)佐剂、矿物凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血磷脂酰胆碱、多聚醇、聚阴离子、肽、油乳状液、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚和人可能使用的佐剂如 BCG(*Bacillus Calmette-Guerin*)和小棒杆菌。

为产生抗本发明多肽的单克隆抗体,可以使用通过连续传代细胞系培养产生抗体分子的任何技术。这些技术包括但不限于最初由 Kohler 等,(1975)*Nature*, 256:495-497 开发的杂交瘤技术、三瘤体技术、人 B-细胞杂交瘤技术[Kozbor 等,(1983)*Immunology Today*, A:12]和旨在产生人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术[Cole 等,(1985)在 *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 第 77-96 页, Alan R. Liss, Inc.]。永生性抗体产生细胞系可以通过除融合法之外的技术创造,如用致癌 DNA 直接转化 B 淋巴细胞或用 Epstein-Barr 病毒的转染。见,例如美国专利号 4,341,761、4,399,121、

4,427,783、4,444,887、4,451,570、4,466,917、4,472,500、4,491,632 和 4,493,890。

在本发明另一实施方案中，单克隆抗体可以利用最新技术在无菌动物内产生。根据本发明，可以使用鸡抗体或猪抗体，并该抗体可以通过使用鸡杂交瘤或猪杂交瘤或通过体外用 EBV 病毒转化 B 细胞得到。实际上根据本发明，可以使用为如此产生“嵌合抗体”而开发的技术[Morrison 等,(1984)J. Bacteriol., 159-870; Neuberger 等,(1984)Nature, 312:604-608; Takeda 等,(1985)Nature, 314:452-454]，其中所述的嵌合抗体通过将来自对本发明多肽特异的小鼠抗体分子的基因与来自具有合适生物学活性的抗体分子地基因剪接在一起而产生，本发明的范围包括此类抗体。此类嵌合抗体优选用于治疗肠道疾病或功能紊乱(描述见下)，因为在特定变态反应中这类抗体本身诱导免疫应答的可能性比异种抗体更小。

根据本发明，所述用于产生单链抗体的技术(美国专利 4,946,778) 可适用于产生对本发明多肽特异性的单链抗体。本发明另一实施方案利用所述用于构建 Fab 表达文库的技术[Huse 等,(1989)Science, 246:1275-1281]以允许快速而简单地鉴定对本发明多肽具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

含有抗体分子独特型的抗体片段可以通过已知技术产生。例如，此类片段包括但不限于：可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的  $F(ab')_2$  片段；可以通过还原  $F(ab')_2$  片段的二硫键产生的 Fab' 片段以及可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段。

在抗体产生中，筛选所需要的抗体可以通过本领域已知技术完成，例如放射免疫测定、ELISA、“夹心”免疫测定、免疫放射测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定(例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记)、Western 印迹、沉淀反应、凝集测定(例如凝胶凝集测定、血细胞凝集测定)、补体结合测定、免疫荧光测定、A 蛋白测定、免疫电泳测定等。在一个实施方案中，通过检测在第一抗体上的标记而检测抗体的结合。在另一实施方案，通过检测第二抗体或试剂对第一抗体的结合而检测第一抗体。在另一实施方案中，第二抗体经过标记。用于检测在免疫测定

中结合作用的多种手段是本领域已知的并且处于本发明的范围内。例如为选择可识别本发明多肽的特异性表位的抗体，可以对已生成的杂交瘤测定与含有如此表位的本发明多肽片段相结合的产物。

本发明还包括旨在使用本发明多肽和/或结合至本发明多肽的抗体检测多毛短螺旋体存在的诊断及预测方法，以及用于诊断和预测多毛短螺旋体感染的试剂盒。

诊断及预测方法通常将使用从动物如鸡或猪中获得的生物样品进行。

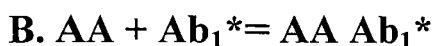
“样品”指怀疑含有短螺旋体属物种如多毛短螺旋体或其多核苷酸或其多肽的动物组织或动物流体。此类组织或流体的实例包括但不限于血浆、血清、粪便材料、尿、肺、心脏、骨骼肌、胃、肠道和体外细胞培养成分。

本发明提供用于检测样品内本发明多肽存在的方法，步骤如下(a)使怀疑含有本发明多肽的样品与抗体在允许形成包含该抗体和本发明多肽的反应复合物的条件下接触，其中所述抗体与本发明多肽(优选结合于固态支持物)特异性结合；和(b)检测样品内包含抗体和本发明多肽的反应复合物的形成，其中检测到反应复合物的形成表示样品内存在本发明的多肽。

优选地，该方法内所用的抗体衍生自亲和纯化的多克隆抗体并且更优选是单克隆抗体。此外，优选本文中所用的抗体分子处于 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 F(v) 部分或完整抗体分子的形式。

基于以上方法检测多毛短螺旋体的特别优选方法包括酶联免疫吸附测定法、放射免疫测定、免疫放射测定和免疫酶测定，包括使用单克隆抗体和/或多克隆抗体的夹心测定法。

尤其有用的这样三种方法利用了用可检测标记物标记的本发明多肽(或其片段)、用可检测标记物标记的抗体 Ab<sub>1</sub> 或用可检测标记物标记的抗体 Ab<sub>2</sub>。该方法可以由如下等式概述，其中星号表示颗粒经过标记并且“AA”代表本发明的多肽：



这些方法和它们的应用均是本领域技术人员熟悉的并且因此可以在本发明的范围内利用。“竞争性”方法即方法 A 在美国专利号 3,654,090 和 3,850,752 内描述。方法 B 是众所周知的竞争性测定技术的代表。方法 C 即“夹心”方法在美国专利号 RE 31,006 和 4,016,043 内描述。其他方法也是已知的并可以利用，如“双抗体”或“DASP”方法。

在任何情况下，本发明的多肽与一种或多种抗体或结合配偶物形成复合物并且复合物中的一个成员用可检测标记物标记。即复合物已经形成，并且根据需要，复合物的量可以通过可用于检测标记物的已知方法确定。

从上述将看出，Ab<sub>2</sub>的特征性特点在于它将 Ab<sub>1</sub> 反应。该反应是因为在一种哺乳动物物种内所产生的 Ab<sub>1</sub> 已经用作另一物种内的抗原以产生抗体 Ab<sub>2</sub>。例如 Ab<sub>2</sub> 可以使用兔抗体作为抗原在山羊内产生。因此，Ab<sub>2</sub> 是在山羊内产生的抗兔抗体。为本说明书和权利要求书的目的，Ab<sub>1</sub> 将称作第一抗体，并且 Ab<sub>2</sub> 将称作第二抗体或抗 Ab<sub>1</sub> 抗体。

这些研究最通常使用的标记物是放射性元素、酶、当暴露于紫外线时发荧光的化学品和其他物质。能够作为标记物利用的荧光物质的实例包括荧光素、罗丹明和金胺。特定检测物质是在山羊内制备并与荧光素经异硫氰酸盐缀合的抗兔抗体。优选同位素的实例包括 <sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>36</sup>Cl、<sup>51</sup>Cr、<sup>57</sup>Co、<sup>58</sup>Co、<sup>59</sup>Fe、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I 和 <sup>186</sup>Re。放射性标记可以通过目前可用的任何计数方法检测。在可以使用多种酶的同时，优选的酶实例是过氧化物酶、β-葡糖醛酸酶、β-D-葡糖苷酶、β-D-半乳糖苷酶、脲酶、葡糖氧化酶加上过氧化物酶，以及碱性磷酸酶。酶通过桥接分子如碳二亚胺、二异氰酸酯、戊二醛等缀合至所选择的颗粒。酶标记物可以通过目前采用的任何比色技术、分光光度技术、荧光分光光度技术、电流分析技术或气体分析技术 (gasometric) 检测。参考美国专利号 3,654,090、3,850,752 和 4,016,043 例如对替代性标记材料和方法的公开。

本发明还提供检测生物样品内抗本发明多肽的抗体的方法，其使用如下步骤：(a)提供本发明的多肽或其片段；(b)将生物样品与所述的本发明多

肽在允许形成抗体-抗原复合物的条件下温育;和(c)确定是否形成具有本发明多肽的抗体-抗原复合物。

在本发明的另一实施方案中,提供用于评测生物样品内抗本发明多肽抗体的水平的体外方法,其使用如下步骤:(a)根据上述方法检测在生物样品内反应复合物的形成;和(b)评测已形成的反应复合物的量,其中反应复合物的量与生物样品内抗本发明多肽抗体的水平对应。

本发明还提供用于监测治疗性治疗动物宿主内与多毛短螺旋体相关的疾病的体外方法,即通过如上所述评测在系列生物样品内的抗本发明多肽抗体的水平,其中所述的系列生物样品在不同时间点上从接受所述治疗性治疗的动物宿主获得。

本发明还提供检测生物样品内多毛短螺旋体存在或不存在的方法,即通过:(a)使生物样品与本发明多核苷酸的多核苷酸探针或引物在合适杂交条件下接触;和(b)检测在探针或引物与样品内的核酸间所形成的任何双链体。

本发明的一个实施方案中,多毛短螺旋体的检测可以如此完成,即使用已知技术,通过直接扩增来自生物样品的多核苷酸序列,并随后检测本发明多核苷酸序列的存在。

在本发明的一个形式中,靶核酸序列通过 PCR 法扩增和随后使用以上提及的任何特异性方法检测。用于检测多核苷酸序列存在的其他诊断性技术包括但不限于:1)等位基因特异性 PCR;2)单链形态分析;3)变性梯度凝胶电泳;4)RNA 酶保护测定;5)使用识别核苷酸错配的蛋白质如大肠杆菌 mutS 蛋白质;6)等位基因特异性寡核苷酸和7)荧光原位杂交。

除以上方法之外,多核苷酸序列还可以使用常规探针技术检测。当使用探针来检测所需的多核苷酸序列的存在时,根据需要可以处理待分析的生物样品如血液或血清以提取核酸。样品多核苷酸序列可以按照多种促进靶序列检测的方式制备;例如变性、限制性消化、电泳或点印迹。样品多核苷酸序列中的目标区域通常必须至少部分是单链,以便与探针的目标序

列形成杂交体。若序列天然是单链的，则无需变性。然而，若序列是双链的，可能需要使序列变性。变性可以通过本领域已知的多种技术实施。

样品多核苷酸序列和探针在促进探针内的靶序列与样品内的推定所需多核苷酸序列形成稳定杂交体的条件下温育。优选地，使用高严格条件以预防假阳性。

检测产生的杂交体(若存在)通常利用标记探针完成。备选地，探针可以是非标记的，但是可以因与标记的配体直接或间接特异性结合而是可检测的。用于标记探针和配体的合适标记物和方法是本领域已知的，并包括例如可以通过已知方法(例如切口平移、随机引发或激酶法)引入放射性标记物、生物素、荧光基团、化学发光基团(例如二氧杂环丁烷、特需触发的二氧杂环丁烷)、酶、抗体等。这种基本方案的变通方案在本领域是已知的，并包括促进从外来物中分离待监测的杂交体的变通方案或促进扩增标记部分的信号的变通方案。

在本发明的范围内还构思本发明的核酸探针测定法可以采用能够检测所需要的本发明多核苷酸序列的核酸探针的混合物。因此，在检测在细胞样品内的本发明多核苷酸序列存在的实例中，使用与多核苷酸序列互补的多于一种的探针并且不同探针的数目尤其备选是2、3或5个不同核酸探针序列。

本文中所述的多核苷酸序列(优选处于探针形式)还可以固定在固态支持物上，以便检测短螺旋体属物种，其包括但不限于多毛短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii*和多毛短螺旋体。备选地，本文中所述的多核苷酸序列将构成可以用来同时检测来自短螺旋体属物种如猪痢疾短螺旋的大量不同基因的DNA分子文库的部分。在本发明的另一变化形式中，本文中所述的多核苷酸序列连同其他多核苷酸序列(如来自细菌或病毒的多核苷酸序列)可以按照如此方式固定于固态支持物上，其中所述的方式允许鉴定短螺旋体属物种如多毛短螺旋体的存在，和/或鉴定结合在固态支持物上的任何其他多核苷酸序列。

用于产生 DNA 分子的固定化文库的技术已经在现有技术中描述。通常，绝大部分现有技术方法描述单链核酸分子文库的合成，使用例如掩蔽技术以便在固体基质多个隔开的位置上建立序列的多种排列。美国专利号 5,837,832 描述了基于超大规模整合技术的用于产生固定至硅基质上的 DNA 阵列的改良方法。美国专利号 5,837,832 特别描述了称作“覆盖”的策略以在可以用来产生本发明固定化 DNA 文库的基质上已空间定义的位置内合成特异性探针组。美国专利号 5,837,832 还提供对仍可以使用的较早技术的参考。因此多核苷酸序列探针可以在基质的表面上原位合成。

备选地，单链分子可以脱离固体基质合成并且预先形成的每种序列可以施加至固体基质上分隔的位置内。例如，使用配备针式装置或压电（pizo-electric）装置的机器人设备，可以将多核苷酸序列直接印刷在基质上。

文库序列通常固定在固体基质的分隔区域表面或其内部。基质可以是多孔的，以允许在基质内部的固定，或基本上是无孔的，此时文库序列通常固定在基质的表面。固体基质可以直接或间接地由可结合于多肽的任何材料制成。合适的固体基质的实例包括平板玻璃、硅片、云母、陶瓷和有机聚合物如塑料，包括聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸酯。还可能使用可广泛获得的半透膜，如硝酸纤维素膜或尼龙膜。半透膜可以固定在更坚固的固态表面上，如玻璃。该表面可以任选地以金属层包被，如金、铂或其他过渡金属。

优选地，固体基质通常是具有硬表面或半硬表面的材料。在优选的实施方案中，基质的至少一个表面是基本平整的，尽管在一些实施方案中，可能需要例如用升高的区域或蚀刻沟将用于不同聚合物的合成区域物理分隔。还优选固体基质适用于在通常 50 至 100  $\mu\text{m}$  的分隔区域内高密度施加 DNA 序列，产生 10000 至 40000 个点/ $\text{cm}^2$  的密度。

将固体基质方便地划分成部分。这可以通过如光蚀刻技术或通过使用疏水性墨水例如基于聚四氟乙烯墨水(Cel-line, 美国)来实现。

在其中存在每一不同文库成员的分隔位置可以具有任何方便的形状，例如圆形、矩形、椭圆形、楔形等。

多核苷酸序列可以通过共价方法或非共价方法附着至基质。多核苷酸序列可以通过结合文库序列的分子层附着至基质。例如，多核苷酸序列可以用生物素加以标记并且基质用抗生物素蛋白和/或链亲和素包被。使用生物素化多核苷酸序列的便利特征是可以轻易地测定偶联至固体基质的效率。由于多核苷酸序列可能与一些固体基质结合很差，经常需要在固体基质(如在玻璃的例子中)和核酸序列之间提供化学界面。合适化学界面的实例包括六甘醇。另一实例是利用聚赖氨酸包被的玻璃，随后使用导入亲和配体的标准方法化学修饰聚赖氨酸。利用偶联剂将分子附着至固体基质表面的其他方法是本领域已知的，见，例如 WO98/49557。

可以通过多种方法测定互补性多核苷酸序列与固定化核酸文库的结合，如结合的多核苷酸序列光学特征的变化(即通过使用溴化乙锭)或通过使用标记的核酸，如用荧光团标记的多肽。不需要使用标记物的其他检测技术包括光学技术，如光声法、反射测量术、椭圆测量术和表面等离子体共振法(见 WO97/49989)。

因此，本发明提供已将至少一种本发明的多核苷酸、优选两种或多种本发明不同的多核苷酸序列在其上面固定的固体基质。

本发明还可以用作预防或治疗，其可以用于刺激动物如鸡和猪内的体液应答和细胞介导性应答的目的，因而提供防止短螺旋体属物种建群的保护，所述的短螺旋体属物种包括但不限于多毛短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体。短螺旋体属物种如多毛短螺旋体的自然感染诱导了针对本文中所述蛋白质的循环抗体滴度。处理的动物可以是任意的哺乳动物和鸟，例如但不限于鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。因此，本文中所述的氨基酸序列或其部分具有形成可提供抗肠螺旋体病保护的全身施用或口服施用预防剂治疗剂的基础的潜力。

因此，在一个实施方案中，本发明提供与可药用载体、稀释剂或赋形剂预先混合的治疗有效量的本文中所述氨基酸序列或其部分或结合该氨基酸序列的抗体或本文中所述的多核苷酸序列。

短语“治疗有效量”用于本文中意指这样的量，其足以至少约 15%、优选至少 50%、更优选至少 90%减少并且最优选预防在动物宿主活力、功能和应答方面的临床明显缺乏。备选地，治疗有效量足以导致改善动物宿主内的明显临床状况。

短语“可药用的”指这样的分子实体和组合物，当施用于动物时，其是可生理忍受的并且通常不产生变态反应或类似不良反应，如心嘈(gastric upset)等。术语“载体”指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药用载体 可以是无菌液体如水和油，包括石油来源、动物来源、植物来源或合成来源的那些油、如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油水溶液优选用作载体，特定用于注射溶液。合适的药用载体在 Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co., Easton, PA,(1990)中描述。

在本发明的更具体形式中，提供药物组合物，其包含治疗有效量的本文中所述氨基酸序列或其类似物、片段或衍生性产物或其抗体，以及可药用稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。此类组合物包括多种缓冲内容物(例如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH 和离子强度的稀释剂和添加剂，如去污剂和增溶剂(例如 Tween 80、多乙氧基醚)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠)、防腐剂(例如硫柳汞、苜醇)和填充物质(例如乳糖、甘露糖醇)。可以将原料引入聚合化合物如聚乳酸、聚乙醇酸等的特定制品内或引入脂质体内。还可以使用透明质酸。此类组合物可以影响本发明蛋白质和衍生物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。见，例如在本文中引用作为参考的 Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版(1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042)第 1435-1712 页。组合物可以制备为液体形式或可以是干燥粉末如冻干形式。

备选地，可以优化本发明的多核苷酸用于在植物(例如玉米(corn))内表达。植物可以用含有优化的多核苷酸的质粒转化。随后培育该植物，并且本发明的蛋白质表达于植物内，或该蛋白质的植物优化形式得到表达。随后收获植物并且将含有本发明蛋白质的植物部分加工成动物的饲料。该动物饲料将在动物摄入时赋予抗多毛短螺旋体免疫性。详细描述这些方法的现有技术实例可以在美国专利 5,914,123(Arntzen 等)、美国专利 6,034,298(Lam 等)和美国专利 6,136,320(Arntzen 等)内找到。

将认识的是可以通过本领域已知的任何手段施用本发明所提供的药物组合物。优选地，通过注射、口服或通过肺途径或鼻途径施用用来施用的药物组合物。更优选通过静脉内、动脉内、腹膜内、肌内或皮下施用途径递送本文中所述的氨基酸序列或衍生自其中的抗体。备选地，可以通过鼻施用法或口服施用法施用正确配制的本文中所述的氨基酸序列或衍生自其中的抗体。

本发明还包括本发明多核苷酸序列以及与编码本发明氨基酸序列的多核苷酸序列可杂交的反义多核苷酸序列和核酶多核苷酸序列的用途，其用于制备调节多毛短螺旋体相关疾病的药物。

想要的是直接施用作为裸核酸构建体的编码用于治疗性方法内的反义构建体或核酶的多核苷酸序列。通过数种已知的转染技术(例如那些包括利用转染剂的转染技术)增强细菌细胞对裸核酸构建体的摄取。这些转染剂的实例包括阳离子物质(例如磷酸钙和 DEAE-葡聚糖)和 lipofectant。通常，混合核酸构建体与转染剂以产生组合物。

备选地，反义构建体或核酶可以与可药用载体或稀释剂组合以产生药物组合物。合适的载体和稀释剂包括等渗盐溶液，例如磷酸盐缓冲盐水。组合物可以配制用于肠胃外、肌内、静脉内、皮下、眼内、口服或透皮施用。所述的施用途径仅作为指导，因为本领域从业者能够轻易地确定用于任何特定动物和条件的最佳施用途径及任意剂量。

本发明还包括用于筛查怀疑感染短螺旋体属物种如多毛短螺旋体的动物，或证实动物已感染短螺旋体属物种如多毛短螺旋体的试剂盒。在本发

明的另一实施方案中，可以制备适合于专科医生使用的试剂盒以确定怀疑感染的动物内存在或不存在短螺旋体属物种，所述短螺旋体属物种包括但不限于多毛短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体，或定量测量短螺旋体属物种(包括但不限于多毛短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体和多毛短螺旋体)感染。处理的动物可以是任意的哺乳动物和鸟，例如但不限于鸡、鹅、鸭、火鸡、鸚鵡、狗、猫、仓鼠、沙鼠、兔、雪貂、马、奶牛、绵羊、猪、猴和人。根据以上所讨论的试验技术，此类试剂盒可以含有至少一种经标记形式的本文中所述氨基酸序列或其结合配偶物，例如其特异性抗体，和根据所选择方法如例如“竞争法”、“夹心法”“DASP 法”等的说明书。备选地，此类试剂盒可以含有与本文中所述多核苷酸序列之一的部分为互补的至少一种多核苷酸序列及其使用的操作说明书。试剂盒还可以含有附属试剂如缓冲液、稳定剂等。

因此，用于证实短螺旋体属物种(包括但不限于多毛短螺旋体、密螺旋体、*B. alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B. murdochii* 和多毛短螺旋体)存在的试验试剂盒可以含有如下成分：

(a) 事先确定量的至少一种标记的免疫化学活性成分，其通过本文中所述氨基酸序列之一或其特异性结合配偶物直接或间接地连接至可检测标记物而获得；

(b) 其他试剂；和

(c) 所述试剂盒使用的说明书。

更具体地，诊断试验盒可以含有：

(a) 已知量的本文以上所述氨基酸序列之一(或结合配偶物)，其通常与固相结合以构成免疫吸附剂，或与合适的标签结合，或存在多种此类终产物等；

(b) 根据需要，其他试剂；和

(c) 所述试剂盒使用的说明书。

在另一变通方案中，试剂盒可以含有：

(a)标记的成分,其通过本文中所述的氨基酸序列之一与可检测标记物偶联而获得;

(b)一种或多种额外的免疫化学试剂,其中至少一种试剂是配体或固定的配体,所述配体选自:

(i)能够与标记的成分(a)结合的配体;

(ii)能够与标记成分(a)的结合配偶物结合的配体;

(iii)能够与至少一种待确定成分结合配体; 或

(iv)能够与至少一种待确定成分的结合配偶物结合的配体; 和

(c)用于实施方案的说明书,其中所述方案旨在检测和/或确定在本文中所述氨基酸序列之一与其特异性结合配偶物之间的免疫化学反应的一种或多种成分。

在本发明中,通过使用多毛短螺旋体特异性单克隆抗体筛选噬菌体文库仅鉴定出 AC1 克隆(其 DNA 序列为 SEQ ID NO: 1 且氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2),该单克隆抗体与 30 kDa 外膜蛋白反应。其他克隆(NAV-P4、NAV-P6、NAV-P11 和 NAV-P14)通过筛选鸟枪基因组文库获得,该文库使用多毛短螺旋体(菌株 95/1000)的澳大利亚猪野毒株制备。下文描述了筛选所有的克隆与已知序列的同源性、克隆进入 pTrcHis 表达载体、表达蛋白质,以及体外和体内的检测。

#### 鉴定 AC1 序列

该单克隆抗体的产生描述于 Lee, B.J.和 Hampson, D.J., A monoclonal antibody reacting with the cell envelope of spirochaetes isolated from cases of intestinal spirochaetosis in pigs and humans, FEMS Microbiology Letters, 131:178-184 (1995)。产生该单克隆抗体的方案如下:在添加了 2% 胎牛血清和 1% 乙醇胆固醇溶液(ethanolic cholesterol solution)的 200 ml 胰酪胨培养液中多毛短螺旋体菌株 3295 至对数晚期,并通过室温下 6,800 x g 离心 10 分钟沉淀。在 PBS 中重悬并洗涤细菌 3 次,每次洗涤后离心该细胞以沉淀。该螺旋体重悬与含有 0.1% (v/v) Triton X-114、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)和 5 mM EDTA 的 20 mL 提取缓冲液中并于 4°C 温

和混合 18 小时。在 4℃ 下 20,000 x g 离心 30 分钟沉淀细胞碎片，并用 10 体积的冰丙酮沉淀水相（可溶性级分）。1000 x g 离心 10 分钟收获沉淀的蛋白质，并将该沉淀重悬于 20 ml PBS。提取的外膜蛋白使用 Biorad Protein Assay 试剂盒（Biorad）定量。市售牛血清白蛋白（BSA）标准物（Sigma）用 PBS 2 倍连续稀释为 6.25 µg/ml 至 100 µg/ml。提取的蛋白质也用相同的缓冲液 2 倍连续稀释为 2 倍至 32 倍。96 孔微量滴定板的小孔中加入 20 µl 的 Biorad Protein Assay 试剂。80 µl 对应的蛋白质标准物和膜蛋白样品加入到适当的小孔中，温和涡旋微量滴定板以混合。BSA 标准物一式三份进行，稀释的膜蛋白样品一式两份进行。然后将该微量滴定板置于微型板读数器（Biorad Model 3550-UV）中，并记录 600 nm 的光密度。BSA 标准物光密度产生的标准曲线用于内插提取的外膜蛋白样品的浓度。

使用由弗氏完全佐剂乳化的 0.25 ml 提取的多毛短螺旋体外膜蛋白（蛋白质含量约为 400 µg/ml）组成的 0.5 ml 疫苗制备物腹腔免疫雌性 Balb/cJ 小鼠。之后该小鼠每周注射不含佐剂的多毛短螺旋体外膜蛋白共六周。末次注射后 4 天取出小鼠的脾脏。分离细胞，使用聚乙二醇与 NS-1 骨髓瘤细胞融合，并用抗原包被的平板中每孔 100 µl 多毛短螺旋体菌株 3295 的外膜蛋白（5 µg/ml）的 ELISA 筛选上清液。测定条件包括 4℃ 下抗原包被于 100 µl 的 0.1 M 碳酸盐缓冲液（pH 9.6）中过夜，然后未结合的位点用含有 1%（w/v）BSA（Sigma）的 150 µl PBS 阻断。加入未稀释的细胞培养上清液之前小孔用 150 µl PBST（0.05% v/v Tween 20）洗涤三次。室温（RT）温育 2 小时后，洗涤小孔（如上），并使用在 PBST 中稀释 5000 倍的山羊抗小鼠 IgG（完整分子）-辣根过氧化物酶（Sigma）检测结合的小鼠抗体。用 150 µl PBST 洗涤小孔三次（如上）。显色包括市售的 K-Blue TMB 底物（ELISA Systems）并允许室温进行 15 分钟。加入 50 µl 1 M 硫酸终止显色，使用微型板读数器（Biorad Model 3550-UV）记录 450 nm 处有色底物反应的吸光度。

一个单克隆抗体（BJL/AC1）结合通过多毛短螺旋体外膜蛋白的 Western 印记确定的 30 kDa 多毛短螺旋体外包被蛋白。该多毛短螺旋体外

膜制备物进行 12%不连续 SDS-PAGE 电泳并印记至硝化纤维素。印记的蛋白质用来自克隆 B JL/AC1 的未稀释杂交瘤细胞上清液免疫染色，然后用辣根过氧化物酶缀合山羊抗小鼠血清(Biorad)检测，并使用 4-氯-1-萘酚显色。55℃下用蛋白酶 K 缓冲液(150 mM Tris-HCl、7 mM EDTA、0.05% SDS, pH 8.0)中的蛋白酶 K(2 mg/ml)处理 2 小时以证实抗原的蛋白质性质，然后使用单克隆抗体 B JL/AC1 对消化的样品进行 Western 印记。

为获得可用量的单克隆抗体 B JL/AC1，从液氮中取出冷冻的杂交瘤储存物，立即在 37℃水浴中解冻。解冻的细胞转移至含有 9 ml 预热 DMEM 的 10 ml 离心管中并 1,000 x g 离心 5 分钟。弃去上清液，细胞沉淀重悬于添加有 100 μM 次黄嘌呤、0.4 μM 氨基蝶呤、16 μM 胸腺嘧啶核苷、0.58 mg/ml 谷氨酰胺、0.22 mg/ml 丙酮酸钠、200 i.u./ml 青霉素、200 μg/ml 链霉素、0.05 mg/ml 庆大霉素 (DMEM-HAT)，并含有 20% (v/v)胎牛血清的 2 ml DMEM 中。杂交瘤在首先 96 孔平底组织培养板中，然后在 24 孔组织培养板中，最后在 25 cm<sup>2</sup> 组织培养瓶中恢复。在瓶培养期间，DMEM-HAT 培养基中添加有 10% (v/v) 胎牛血清。在此阶段，允许杂交瘤细胞生长直到细胞死亡，然后 2,500 x g 离心 5 分钟澄清培养上清液。储存在-20℃之前，通过对多毛短螺旋体全细胞培养物进行 Western 印记测试组织培养上清液。除非另有说明，含有 mAb 的未稀释组织培养上清液用于所有的噬斑印记检测 (plaque-lift assay) 和 Western 印记。

多毛短螺旋体菌株 P43/6/78T 的基因组文库使用以下方案用 QIAamp 组织试剂盒 (Qiagen) 产生。室温下纯化的多毛短螺旋体 P43/6/78T 培养液 6800 x g 离心 10 分钟。细胞重悬于添加有 20 μl 蛋白酶 K (20 mg/ml) 的 180 μl ATL 缓冲液中，并与 55℃温育直至发生完全裂解。室温下用 2 mg/ml RNA 酶 A 温育提取物 5 分钟获得无 RNA 的 DNA。在 70℃温育 10 分钟之前加入 200 μl AL 缓冲液。加入 200 μl 乙醇后，样品以 8000 x g 离心 1 分钟通过 QIAamp 离心柱。该柱用 500 μL AWL 缓冲液洗涤 2 次，并用预热到 70℃的 AE 缓冲液 (200 μl) 洗脱基因组 DNA。通过用 0.5 单位 Sau3A1 限制性酶切 50μl 纯化的 DNA 一小时制备部分消化的 P43/6/78T 基因组

DNA。部分消化的 DNA 在 1X TBE (90 mM Tris-硼酸盐和 1 mM EDTA, pH 8.0) 的 0.4 % (w/v) 琼脂糖凝胶中电泳。从凝胶中切下 2-7 kb 大小的片段并溶解于 70°C 的 1 ml 无菌水中。用苯酚: 氯仿溶液提取溶解的琼脂糖两次, 并用异丙醇沉淀水相。沉淀的部分消化 DNA 重悬于 20  $\mu$ L 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中。部分消化的 DNA 片段连接至 BamH1  $\lambda$  噬菌体臂 (Stratagene) 并使用 Gigapack II 包装提取物将其包装入噬菌体颗粒。在大肠杆菌 XL1-MRF 中扩增包装的噬菌体以形成随机基因组文库。

在噬斑印记检测中使用 mAb BJL/AC1 筛选  $\lambda$  噬菌体文库以寻找 30 kDa 多毛短螺旋体抗原的表达。200  $\mu$ l 大肠杆菌 XL1-Blue 生长在添加有 0.2% (w/v) 麦芽糖和 10 mM MgSO<sub>4</sub> 的 Luria-Bertani (LB) 培养基中, 调整至 600 nm 的光密度为 1.0 并在 10 ml 试管中与含有  $5 \times 10^4$  噬斑形成噬菌体的 100  $\mu$ l 文库悬液混合。37°C 温育 15 分钟后, 48°C 下各管加入 3 ml 熔化的无菌 LB 上层琼脂, 混合后立即倒在 LB 琼脂板上, 旋转以分布均匀。室温下上层琼脂变硬 15 分钟后, 37°C 温育该平板 6-8 小时直到噬斑直径为大约 1 mm。浸渗 10 mM 异丙基硫代- $\beta$ -3-D-半乳糖苷 (IPTG) 的硝化纤维素滤片小心的置于 37°C 下又温育 4-6 小时的平板上。硝化纤维素滤器转移至 Tris 缓冲盐溶液 (TBS) 中并用 TBS 中的 5% (w/v) 脱脂乳粉室温封闭 1 小时。与 mAb BJL/AC1 温育 1 小时后, 在 TBS 中洗涤两次, 每次 10 分钟, 并在 2000 倍稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊抗小鼠血清 (Biorad Laboratories, CA, 美国) 中温育 1 小时, 使用过氧化氢和 4-氯-1-萘酚显示和 mAb 反应的噬斑。挑选与 mAb BJL/AC1 反应的克隆, 用 ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage (Stratagene, La Jolla, CA) 通过共感染大肠杆菌 XL1-MRF 将该克隆切入噬菌粒 pBK-CMV。

携带重组质粒的大肠杆菌克隆在添加 50 mg/L 卡那霉素的 LB 琼脂板上划线并 37°C 培养过夜。将单克隆接种至添加了卡那霉素 (50 mg/l)、PMSF (1 mM) 和 IPTG (1 mM) 的 LB 液体培养基 (10 ml)。在 37°C 将液体培养基培养物振荡培养 12 小时。将每一培养物的 1 ml 以 2500  $\times$  g 离心 15 分钟并洗涤三次。该洗涤过程包括将细胞沉淀重悬于 1 ml 磷酸缓冲盐溶液

(PBS)并 2,500 x g 离心。将洗涤过的细胞沉淀重悬于 PBS (100  $\mu$ l)中准备用于 SDS-PAGE 和 Western 印迹。

蛋白质的 SDS-PAGE 分析涉及使用不连续 Tris-甘氨酸缓冲液系统的电泳分离。将 30  $\mu$ l 蛋白质样品与 10  $\mu$ l 4 × 样品处理缓冲液 (250mM Tris-盐酸 (pH 6.0)、8% (v/v) SDS、200mM DTT、40% (v/v)甘油和 0.04% (v/v) 溴酚蓝) 混合。在将样品(10  $\mu$ l)上样到凝胶的孔中之前将样品煮 5 分钟。凝胶包含积层胶 (125 mM Tris-盐酸 pH 6.8、4% (w/v)的丙烯酰胺、0.15% (w/v)的双丙烯酰胺和 0.1% (w/v)的 SDS) 和分离胶 (375 mM Tris-盐酸 pH 8.8、12% (w/v)的丙烯酰胺、0.31% (w/v)的双丙烯酰胺和 0.1% (w/v)的 SDS)。通过加入 0.1% (v/v) TEMED 和 0.05% (w/v)新制备的硫酸铵溶液使凝胶聚合并倒入 mini-Protean 双板槽 (Biorad)中。室温(RT)下以 150V 电泳样品直至溴酚蓝染料前沿到达凝胶底部。将预染分子量标准物与样品平行电泳以估计分子量。电泳后, 立即将凝胶电转移到硝酸纤维素膜上以用于 Western 印迹。

使用 Towbin 转移缓冲系统将分开的蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶电泳转移至硝酸纤维素膜。电泳后, 将凝胶在转移缓冲液 (25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、20% (v/v)甲醇, pH 8.3) 中平衡 15 分钟。使用 mini-Protean 转移印迹装置(Biorad) 在 4℃以 30V 过夜将凝胶中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。在室温下用含有 5% (w/v)的脱脂乳粉的 10 ml Tris 缓冲盐溶液 (TBS)封闭含有分离的蛋白质的新转移硝酸纤维素膜 1 小时。用含有 0.1% (v/v) Tween 20 的 TBS(TBST)洗涤膜后, 在室温下将膜与 10mL 以 TBST 5000 倍稀释的 AHPS 孵育 1 小时。用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 分钟后, 膜与 10mL 以 TBST 5000 倍稀释的山羊抗猪 IgG (完整分子) -HRP 孵育 1 小时。用 10mL DAB 底物溶液 (0.5 mg/ml 3,3'-二氨基联苯、0.003%过氧化氢、TBS) 使膜显色。用蒸馏水洗涤膜终止显色反应。使膜干燥并扫描用于展示。

多毛短螺旋体噬菌体文库产生 6 个表达分子量为 30 kDa 的蛋白质的克隆。来自这些克隆的蛋白质均与 mAb BJL/AC1 强烈反应。

选择一个质粒(AC1)用于使用 ABI 373A DNA 测序仪(PE Applied Biosystems)直接测序多毛短螺旋体基因组插入片段。使用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒(Qiagen)从大肠杆菌细胞中纯化噬菌粒。使用与插入片段末端任一侧的载体区退火的市售 T3 和 T7 寡核苷酸得到起始插入片段序列。基于每个新获得的插入序列的 3'-OH 端序列设计完全鉴定该插入序列所需的寡核苷酸(表 1)。以由噬菌粒(300ng)、引物(4pmol)和 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (4 μl) (PE Applied Biosystems)组成的 10 μl 体积进行每一个测序反应。循环条件包括 96℃ 2 分钟的变性步骤, 随后是 96℃ 变性 10 秒、以引物解链温度(参见表 1)退火 5 秒和 60℃ 引物延伸 4 分钟的 25 个循环。用含有 120 mM 乙酸钠(pH 4.6)的 95%(v/v)乙醇沉淀以从测序产物中除去残余的染料终止子, 并真空干燥。使用 ABI 373A DNA 测序仪分析测序产物。

使用 SeqEd 版本 1.0.3 (PE Applied Biosystems)编辑和汇编测序结果。使用 Vector NTI 第 6 版(InforMax)和 University of Wisconsin Genetics Computer Group 程序分析核苷酸序列。用推定的假想可读框(ORF)在国家生物信息中心(NCBI)可供使用的所有数据库搜索同源性。该可读框与任何已知蛋白质均没有同源性(参见表 2)。AC1 的 DNA 和氨基酸序列分别可见 SEQ ID NO: 1 和 2。该克隆的 ORF 长为 824 bp 并编码估计分子量为 30.6 kDa 的蛋白质。

表 1

引物名称	T <sub>A</sub> (°C)	序列(5'-3')
T3	60	taaccctcactaaagggaaac (SEQ ID NO: 47)
T7	60	gtaatacgactcactatagggc (SEQ ID NO: 48)
ACI-F0	50	gcatcattaatggatttgaagc (SEQ ID NO: 49)
ACI-F1	50	ctgtaggaggagttgcggttc (SEQ ID NO: 50)
ACI-F2	50	ttactttagttaagcttcatcac (SEQ ID NO: 51)
ACI-F3	50	agcagtaaaagcattgtcattatc (SEQ ID NO: 52)
ACI-F4	50	tgataatattaglatagttgcag (SEQ ID NO: 53)
ACI-F5	50	taaatgtatagtctctcctgcaac (SEQ ID NO: 54)
ACI-R1	50	ttaccctatgcaagctggcggaac (SEQ ID NO: 55)
ACI-R2	50	ttaatttaagagtattaaatgac (SEQ ID NO: 56)

#### 制备用于鸟枪测序的基因组文库

使用多毛短螺旋体的澳大利亚猪野毒株(field isolate, 菌株 95/1000)制备基因组文库。该菌株已充分表征并在猪的实验性攻击后证实是有毒力的。使用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)方法制备合适用于制备基因组 DNA 文库的高质量染色体 DNA。多毛短螺旋体在 100 ml 厌氧性胰酪胨培养基内培养至细胞密度为  $10^9$  个细胞/ml。细胞在  $4,000\times g$  离心 10 分钟收获并且将细胞沉淀重悬于 9.5 ml TE 缓冲液内。添加 SDS 至终浓度 0.5 % (w/v) 并且细胞用 100  $\mu g$  蛋白酶 K 在 37°C 裂解 1 小时。添加 NaCl 至终浓度 0.7 M, 并且在 65°C 温育溶液 20 分钟之前, 添加 1.5 ml CTAB/NaCl 溶液(10% w/v CTAB, 0.7 M NaCl)。裂解物用等体积的氯仿/异戊醇提取, 并且将管在  $6,000\times g$  离心 10 分钟以使相分离。将水相转移至干净的管内并添加 0.6 体积异丙醇至高分子量 DNA 沉淀出来。沉淀的 DNA 使用钩头玻璃棒收集并转移至含有 1 ml 70 % (v/v) 乙醇的管内。该管在  $10,000\times g$  离心并且将沉淀的 DNA 再溶解于 4 ml TE 缓冲液内过夜。使用再溶解的 DNA 溶液制备含有 1.05 g/ml CsCl 和 0.5 mg/ml 溴化乙锭的氯化铯梯度。将该梯度转移至 4 ml 可封口的离心管内并在 15°C 在  $70,000\times g$  离心过夜。在紫外线下观察分

离的 DNA 并使用 15 号针从梯度中抽出高分子量 DNA。通过用 CsCl-饱和的异丙醇连续提取从 DNA 中除去溴化乙锭。将纯化的染色体 DNA 用 2 升 TE 缓冲液透析并用异丙醇沉淀。使用 GeneMachines Hydroshear(Genomic Solution, Ann Arbor, MI)剪切重悬的基因组 DNA 并且使用 Klenow DNA 聚合酶补平剪切的 DNA 以生成平端片段。使用 CloneSmart DNA 连接酶将 100 ng 平端 DNA 片段与 25 ng 的 pSMART VC 载体(Lucigen, Meddleton, WI)连接。连接的 DNA 随后电穿孔进入大肠杆菌电感受态细胞。将小的插入物(2-3 kb)文库和中等插入物(3-10 kb)文库构建成低拷贝形式的 pSMART VC 载体。

### 基因组测序

在获得基因组文库后,挑取含有 pSMART VC 载体大肠杆菌的单个克隆。纯化质粒 DNA 并测序。使用对 pSMART VC 载体特异的正向引物和反向引物,使纯化的质粒接受 pSMART VC 载体的自动化直接测序法处理。每一测序反应均在由 200 ng 质粒 DNA、2 pmol 引物和 4  $\mu$ l ABI PRISM™ Big Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)组成的 10  $\mu$ l 体积内进行。循环条件包括在 96°C 的 2 分钟变性步骤,随后 25 个循环为 96°C 变性 10 秒并在 60°C 持续 4 分钟的合并的引物复性和延伸步骤。残余染料终止剂通过用含有 5 mM 乙酸钠(pH 5.2)、3mM EDTA(pH 8)的 95%(v/v)乙醇沉淀并进行真空干燥从测序产物中除去。使用每一引物对质粒重复测序。使用 ABI 373A DNA 测序仪(PE Applied Biosystems)分析测序产物。

### 注释

将多毛短螺旋体的部分基因组序列装配并注释,使用一系列公用结构域生物信息学工具以分析和再分析序列作为对数据分析的质量保证程序一部分的序列。使用多种程序,包括 GeneMark、GLIMMER、ORPHEUS、SELFID 和 GetORF 预测可读框(ORF)。使用包括 BLAST 和 FASTA 的搜索,用现存国际数据库检查推定 ORF 的同源性(DNA 和蛋白质)。使用包括 PSI-BLAST、FASTA、MOTIFS、FINDPATTERNS、PHD、SIGNALP

和 PSORT 的程序,分析全部预测的 ORF 以确定它们的细胞定位。使用包括 Interpro、Prosite、ProDom、Pfam 和 Blocks 的数据库以预测表面结合蛋白,如跨膜结构域、前导肽、已知表面蛋白的同源物、脂蛋白标签(signature)、外膜锚定基序和宿主细胞结合结构域。用已鉴定的基因及其他物种进行系统发生分析和其他分子进化分析以便辅助赋予功能。经部分测序的两种基因组的计算机(in silico)分析产生存在于可用序列数据内的全部预测 ORF 的全面列表。审查每一 ORF 的描述性信息,如预测的分子量、等电点、疏水性和亚细胞定位以便能够与天然基因产物的体外特性联系。选择此类预测的基因作为潜在的疫苗靶,即该基因编码与其他病原菌内表面定位成分和/或毒力因子相似的蛋白质。

### 生物信息学结果

多毛短螺旋体基因组的鸟枪法测序产生已测序基因组的 84%(预测的 2450 kb 中的 2058.6 kb)。多毛短螺旋体序列由 134 个叠连群组成,平均叠连群大小 132 kb。对于多毛短螺旋体,从 134 个叠连群中预测出 1892 个可读框(ORF)。预测 ORF 与核酸及蛋白质数据库内现存基因的比较表明大约 70%的 ORF 与公共数据库内所含的基因具有同源性。预测 ORF 的其余 30%无已知的同一性。

### 疫苗候选物

为帮助减少作为疫苗候选物接受测试的 ORF 数,建立了两部分试验。潜在的疫苗候选物需要与公共数据库内现有外表面蛋白质和毒力因子具有一些(尽管很小)同源性。潜在的疫苗候选物 ORF 还必须存在于多毛短螺旋体的多个菌株内。基因组鸟枪法测序所获得的 1892 个 ORF 的许多 ORF 通过一个或两个所述试验的挑选,但是本文仅提供这些结果中的四个。表 2 显示基因组鸟枪法测序所获得的 4 个选择为潜在疫苗靶的克隆及它们与从 SWISS-PROT 数据库中获得的其他已知氨基酸序列的相似性。表 2 也提供 AC1 的 ORF 与任何已知蛋白质缺乏同源性的信息。要指出的是氨基酸的同一性百分数没有高于 41%,而氨基酸的相似性百分数保持低于 61%,因而表明这些 ORF 是独特的。

表 2

基因	具有最高同源性的蛋白质的 同一性	同一性 (氨基酸)	相似性 (氨基酸)	登录号
NAV-P4	流感嗜血菌( <i>Haemophilus influenzae</i> )的保护性表面抗原 D15	24% (95/393)	45% (180/393)	P46024
NAV-P6	伤寒沙门氏菌( <i>Salmonella typhi</i> )的 D-甲硫氨酸结合脂蛋白 (MetQ)	41% (106/255)	61% (157/255)	Q8Z992
NAV-P11	热纤梭菌( <i>Clostridium thermocellum</i> )的金属结合蛋白/表面黏附素	41% (117/280)	58% (163/280)	ZP_00313604
NAV-P14	伯氏疏螺旋体( <i>Borrelia burgdorferi</i> )的碱性膜蛋白 D (BmpD)	30% (101/335)	51% (172/335)	Q44743
AC1	与 Swiss-Prot 蛋白质数据库中的蛋白质没有显著同源性	na	na	na

NAV-P4 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 3 和 4 中找到。NAV-P6 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 5 和 6 中找到。NAV-P11 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 7 和 8 中找到。NAV-P14 的 DNA 和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 9 和 10 中找到。

#### 使用聚合酶链式反应(PCR)分析基因分布

设计两引物并优化用于 PCR 检测, 其中所述引物对靶基因编码区的不同区域复性。使用 Oligo Explorer 1.2 设计各个引物并且选择具有大约 55-60°C 计算解链温度的引物组。还选择这些引物组以生成大于 200bp 的 PCR 产物。选择中等严格度引物复性温度 50°C 用于分布分析 PCR。中等严格条件将允许可能的少量错配序列(因为菌株差异)在引物结合位点处出现而不影响引物结合。在 19 个多毛短螺旋体菌株上进行 5 个多毛短螺旋体靶基因的分布分析。表 3 显示在分布分析内使用的引物组。在 25  $\mu$ l 总体积内使用 Taq DNA 聚合酶(Biotech International, Thurmont, MD)进行 PCR 分析。扩增混合物由 1 $\times$ PCR 缓冲液(含有 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、1 单位 Taq DNA 聚合酶、0.2 mM 每种 dNTP(Amersham Pharmacia Biotech,

Piscataway, NJ)、0.5  $\mu\text{M}$  引物对和 1  $\mu\text{l}$  纯化的染色体模板 DNA 组成。循环条件包括 94 $^{\circ}\text{C}$  5 分钟的初始模板变性步骤, 随后 35 个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 秒, 50 $^{\circ}\text{C}$  复性 15 秒和 68 $^{\circ}\text{C}$  引物延伸 4 分钟。使 PCR 产物在 1 $\times$ TAE 缓冲液(40 mM Tris-乙酸盐, 1 mM EDTA)的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 1  $\mu\text{g/ml}$  溴化乙锭溶液染色并在紫外线下观察。

5 个选为疫苗候选物的多毛短螺旋体 ORF 均存在于测试的各菌株内。

表 3

基因	引物名称	引物序列 (5'-3')
ACI	ACI-F7	atcgctaagataattttatactg (SEQ ID NO: 11)
	ACI-R822	gctttgtgctcttgctetaaag (SEQ ID NO: 12)
	ACI-F226	ccattccgcttatagcagcatac (SEQ ID NO: 13)
	ACI-R542	gatactttaataactcttgcaattg (SEQ ID NO: 14)
NAV- P4	P4-F4	cggtgaggagacccttatatacc (SEQ ID NO: 15)
	P4-R1113	aaatcccaaataatagggcaaatag (SEQ ID NO: 16)
	P4-F1072	gcagagccttatttgcttaatttg (SEQ ID NO: 17)
	P4-R2193	atagaatgggtgggttcattgtaaag (SEQ ID NO: 18)
	P4-F458	tggagatattggcttaagggtta (SEQ ID NO: 19)
	P4-R1659	ggcatcgtttgaaataggaaga (SEQ ID NO: 20)
NAV-P6	P6-F35	tgttttagcttcttgcggc (SEQ ID NO: 21)
	P6-R713	tcattatccttatcagaagcccttg (SEQ ID NO: 22)
	P6-F219	tgacggcgatatagatttagatgc (SEQ ID NO: 23)
	P6-R578	accgcacaagcaacatcagg (SEQ ID NO: 24)
NAV-P11	P11-F33	actttcttaaatctcttgtaacaata (SEQ ID NO: 25)
	P11-R864	ccatttgtatagcttctagattctt (SEQ ID NO: 26)
	P11-F263	tggagcattgggcagacact (SEQ ID NO: 27)
	P11-R566	aatgtccgaatgcagggtg (SEQ ID NO: 28)
NAV-P14	P14-F41	ttatcggaatttgcttggt (SEQ ID NO: 29)
	P14-R1142	tcaccagatacattacaagcagt (SEQ ID NO: 30)
	P14-F332	gaattgctgatgctgctggt (SEQ ID NO: 31)
	P14-R858	agcacaagagggtactacgaaa (SEQ ID NO: 32)

随后将用于进一步试验的 5 个选为潜在疫苗候选物的 ORF 克隆至表达载体内, 表达、纯化并评测免疫原性。

#### pTrcHis 质粒提取

将携带 pTrcHis 质粒(Invitrogen, Carlsbad, CA)的大肠杆菌 JM 109 克隆从甘油贮藏物中划线至添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 Luria-Bertani(LB)

琼脂平板上，并在 37°C 培养 16 小时。使用单菌落接种添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 10 ml LB 培养液并将肉汤培养在 37°C 温育 12 小时，同时振荡。全部过夜培养物在 5,000×g 离心 10 分钟，并且使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen, Doncaster VIC)提取细胞内所含的质粒。沉淀的细胞用 250 μl 细胞重悬缓冲液 P1 进行重悬，并随后添加 250 μl 细胞裂解缓冲液 P2 来裂解。裂解的细胞用 350 μl 中和缓冲液 N3 中和并且通过在 20,000×g 离心 10 分钟聚集沉淀的细胞碎片。将上清液转移至离心柱内并在 10,000×g 离心 1 分钟。弃去流通物后，将 500 μl 洗涤缓冲液 PE 施加至柱内并如前进行离心。弃去流通物并在 20,000×g 离心 3 分钟使柱干燥。用 100 μl 洗脱缓冲液 EB 从柱中洗脱质粒 DNA。使用 Dynaquant DNA 荧光测量仪(Hoefler, San Francisco, CA)定量纯化的质粒，并将 DNA 浓度用 TE 缓冲液通过稀释而调节至 100 μg/ml。纯化的 pTrcHis 质粒贮存在-20°C。

### 载体制备

37°C 下将 2μg 纯化的 pTrcHis 质粒用含有 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT 和 100 μg/ml BSA 内的 5 单位 EcoR I (New England Biolabs, Beverly, MA)和 5 单位 Xho I (New England Biolabs)的总体积 50 μl 消化 1-4 小时。经限制酶切的载体通过使 1 μl 消化反应物在 1×TAE 缓冲液内的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上，在 90V 下电泳 1 小时进行验证。电泳的 DNA 用 1 μg/ml 溴化乙锭染色并在紫外线(UV)下观察。

使用 UltraClean PCR Clean-up 试剂盒(Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA)纯化线性化的 pTrcHis 载体。简而言之，将限制酶切反应物(50 μl)与 250 μl SpinBind 缓冲液 B1 混合并将全部体积添加至离心柱。在 8,000×g 离心 1 分钟后，弃去流通物并将 300 μl SpinClean 缓冲液 B2 添加至该柱内。该柱如前离心，并弃去流通物，随后在 20,000×g 离心 3 分钟使该柱干燥。用 50 μl TE 缓冲液从柱中洗脱纯化的载体。使用荧光测量仪定量纯化的线性载体并且将 DNA 浓度用 TE 缓冲液通过稀释而调节至 50 μg/ml。纯化的限制酶切载体贮存在-20°C。



部靶基因插入物。扩增混合物由 1×PCR 缓冲液(含有 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)、1 单位 Taq DNA 聚合酶、0.01 单位 Pfu DNA 聚合酶、0.2 mM 每种 dNTP(Amersham Pharmacia Biotech)、0.5 μM 合适引物对以及 1 μl 纯化的染色体 DNA 组成。染色体 DNA 从与用于基因组测序相同的多毛短螺旋体菌株中制备。循环条件包括在 94°C 5 分钟的初始模板变性步骤, 随后 35 个循环为 94°C 变性 30 秒, 50°C 复性 15 秒和 68°C 引物延伸 4 分钟。使 PCR 产物在 1×TAE 缓冲液的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 1 μg/ml 溴化乙锭溶液染色并在紫外线下观察。在验证存在正确大小的 PCR 产物后, 使用 UltraClean PCR Clean-up 试剂盒(Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA)纯化 PCR 反应物。混合 PCR 反应物(100 μl)与 500 μl SpinBind 缓冲液 B1, 并将全部体积添加至离心柱。在 8,000×g 离心 1 分钟后, 弃去流通物并将 300 μl SpinClean 缓冲液 B2 添加至该柱内。该柱如前离心, 并弃去流通物, 随后在 20,000×g 离心 3 分钟使该柱干燥。用 100 μl TE 缓冲液从柱中洗脱纯化的载体。

#### 基因插入物的限制酶消化

37°C 下将 30 μl 纯化的 PCR 产物用总体积 50 μl 的 100 mM Tris-HCl(pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT 和 100 μg/ml BSA 内的 1 单位 EcoR I 和 1 单位 Xho I (New England Biolabs)消化 1-4 小时。使用 UltraClean PCR Clean-up 试剂盒(见上文)纯化消化的插入 DNA。使用荧光测量仪定量纯化的消化插入 DNA, 并且将 DNA 浓度用 TE 缓冲液通过稀释而调节至 20 μg/ml。纯化的限制性消化插入 DNA 立即用于载体连接。

#### 基因插入物连接至 pTrcHis 载体

在总体积 20 μl 内进行全部连接反应。将 100 ng Xho I /EcoR I -线性化的 pTrcHis 与 20 ng 的 Xho I /EcoR I -限制性酶切的插入物在含有 1 单位 T4 DNA 连接酶(Promega)的 30 mM Tris-HCl(pH 7.8)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT 和 1 mM ATP 内于 16°C 温育 16 小时。还包括不含插入 DNA 的相同连接反应作为载体再环化阴性对照。

### pTrcHis 连接物转化大肠杆菌细胞

感受态大肠杆菌 JM 109(Promega)细胞由-80℃贮藏物在冰上融化并随后将 50 μl 细胞转移至冰冷冷却的含有 5 μl 过夜连接反应物(等同于 25 ng pTrcHis 载体)的 1.5 ml 微量离心管内。通过在工作台上柔和轻弹每个管的底部而混合所述管并在冰上放置 30 分钟。细胞随后通过将管置入 42℃ 水浴 45 秒受到热激, 随后将管再放置在冰上 2 分钟。转化的细胞在 37℃ 在 1 ml LB 培养液恢复 1 小时, 轻柔混合。在 2,500×g 离心 5 分钟收获恢复的细胞并将细胞在 50 μl 新鲜 LB 培养液内重悬。将全部 50 μl 重悬的细胞使用无菌玻璃棒均匀涂布在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。平板在 37℃ 温育 16 小时。

### PCR 检测大肠杆菌内重组 pTrcHis 构建体

将每一构建体的 12 个单转化菌落在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的新鲜 LB 琼脂平板上划线并在 37℃ 温育 16 小时。将来自每一转化事件的单菌落重悬于 50 μl TE 缓冲液内并煮沸 1 分钟。使用 2 μl 煮沸的细胞作为 PCR 模板。扩增混合物由 1×PCR 缓冲液(含有 1.5 mM 的 MgCl<sub>2</sub>)、1 单位 Taq DNA 聚合酶、0.2 mM 每种 dNTP、0.5 μM 的 pTrcHis-F 引物(5'-CAATTT ATCAGACAATCTGTGTG-3' SEQ ID NO: 45)和 0.5 μM 的 pTrcHis-R 引物(5'-TGCCTGGCAGTTCCTACTCTCG-S' SEQ ID NO: 46)组成。循环条件包括 94℃ 5 分钟的变性步骤, 随后 35 个循环为 94℃ 变性 30 秒, 60℃ 复性 15 分钟和 72℃ 引物延 1 分钟。使 PCR 产物在 1×TAE 缓冲液的 1%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 1 μg/ml 溴化乙锭溶液染色并在紫外线下观察。克隆入 pTrcHis 表达载体中的多种插入物多种大小的重组构建体。

### His 标记重组蛋白的实验性表达

将大肠杆菌 JM 109 内的重组 pTrcHis 构建体的 5 至 10 个独立菌落接种至 5 ml 管内的含有 100 mg/L 氨苄青霉素和 1 mM IPTG 的 3 ml LB 培养液中并在 37℃ 振荡温育 16 小时。通过 4℃ 下在 5,000×g 离心 10 分钟收获细胞。抛弃上清液并将每一沉淀用 10 μl Ni-NTA 变性裂解缓冲液(100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH 8.0)重悬。将管涡旋 1 分

钟后，通过在 4℃ 在 10,000×g 离心 10 分钟沉淀细胞碎片。上清液转移至新管内并在 -20℃ 贮存直至分析。

### 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

使用不连续 Tris-甘氨酸缓冲液系统进行蛋白质的 SDS-PAGE 分析。将 30 μl 蛋白质样品与 10 μl 的 4×样品处理缓冲液(250 mM Tris-HCl(pH 6.0)、8%(w/v)SDS、200 mM DTT、40%(v/v)甘油和 0.04 %(w/v)溴酚蓝)混合。将样品煮沸 5 分钟，随后立即将 10 μl 样品加样至凝胶的孔内。凝胶包含浓缩凝胶(125 mM Tris-HCl pH6.8、4% w/v 丙烯酰胺、0.15% w/v 双丙烯酰胺和 0.1% w/v SDS)和分离凝胶(375 mM Tris-HCl pH8.8、12% w/v 丙烯酰胺、0.31% w/v 双丙烯酰胺和 0.1% w/v SDS)。通过添加 0.1%(v/v)TEMED 和 0.05%(w/v)新鲜制备的硫酸铵溶液使这些凝胶聚合并使它们在 mini Protean dual slab Cell(Biorad, Hercules, California)内成型。样品以 150 V 在室温(RT)电泳直至溴酚蓝染料抵达凝胶的底部。预染色分子量标准与样品平行进行电泳以允许估计分子量。在电泳后，凝胶立即使用考马斯亮蓝 G250(Biorad)染色或电转移至用于 Western 印迹的硝酸纤维素膜上。

### Western 印迹分析

使用 Towbin 转移缓冲液系统，将来自 SDS-PAGE 凝胶的已分离蛋白质电转移至硝酸纤维素膜。在电泳后，凝胶在转移缓冲液(25 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, 20% v/v 甲醇, pH 8.3)中平衡 15 分钟。将凝胶内的蛋白质使用 mini Protean transblot 仪(Biorad)在 4℃ 在 30 V 下电转移至硝酸纤维素膜(Protran, Schleicher 和 Schuell BioScience, Inc., Keene, NH)过夜。用含有 5%(w/v)脱脂乳粉的 10 ml tris-缓冲盐水(TBS)在室温封闭含有已分离蛋白质的新转移的硝酸纤维素膜 1 小时。膜用含有 0.1%(v/v)Tween 20(TBST)的 TBS 洗涤并随后与 10 mL 小鼠抗 his 抗体(用 TBST 稀释 5,000 倍)在室温温育 1 小时。在用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 分钟后，将膜与 10 mL 在 TBST 内稀释 5,000 倍的山羊抗小鼠 IgG(完整分子)- AP 在室温温育 1 小时。

使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Biorad)使膜显色。通过用蒸馏水洗涤膜终止显色反应。膜随后经干燥并扫描用于展示。

#### 通过直接序列分析验证重组 pTrcHis 构建体的可读框

将每一构建体的产生正确大小 PCR 产物的两个转化菌落接种至含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 10 ml LB 培养液内并在 37°C 振荡培养 12 小时。全部过夜培养物在 5,000×g 离心 10 分钟并使用如前所述 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒提取细胞内所含的质粒。使用荧光测量仪定量纯化的质粒。使用 pTrcHis-F 和 pTrcHis-R 引物,使两份纯化的质粒接受 pTrcHis 表达盒的自动化直接测序法。每一测序反应在由组成 200 ng 质粒 DNA、2 pmol 引物和 4 μl ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)组成的 10 μl 体积内进行。循环条件包括 96°C 2 分钟的变性步骤,随后 25 个循环为 96°C 变性 10 秒并 60°C 持续 4 分钟的合并的引物复性和延伸步骤。残余染料终止剂通过用含有 85 mM 乙酸钠(pH 5.2)、3mM EDTA(pH 8)的 95%(v/v)乙醇沉淀并进行真空干燥从测序产物中除去。使用每一引物对质粒重复测序。使用 ABI 373A DNA 测序仪(PE Applied Biosystems)分析测序产物。pTrcHis 构建体的核苷酸测序证实全部构建体的表达盒位于正确的可读框内。pTrcHis 表达盒的预测翻译表明全部 his 标记重组蛋白与天然多毛短螺旋体蛋白质推导的氨基酸序列相同。

#### 表达并纯化 His 标记的重组蛋白

将大肠杆菌 JM 109 内重组 pTrcHis 构建体的单菌落接种至 250 ml 锥形瓶内的含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 50ml LB 培养液中并在 37°C 振荡培养 16 小时。以 10 ml 过夜培养物接种 2L 锥形瓶内含有添加 100 mg/L 氨苄青霉素的 1L LB 培养液并在 37°C 培养直至细胞在 600 nm 的光密度是 0.5(大约 3-4 小时)。随后通过添加 IPTG 至 1 mM 终浓度诱导培养物,并将细胞返回到 37°C,同时振荡。在诱导 5 小时后,将培养物转移至 250ml 离心瓶内,并将离心瓶在 4°C 以 5,000×g 离心 20 分钟。抛弃上清液并将

每一沉淀用 8 ml Ni-NTA 变性裂解缓冲液(100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M 尿素, pH 8.0)重悬。重悬的细胞在-20℃贮存过夜。

将细胞混悬液从-20℃贮藏中取出并在冰上融化。随后在冰上超声波破碎细胞裂解物, 3次, 每次30秒, 在超声波破碎间在冰上温育1分钟。裂解的细胞通过4℃下在20,000×g离心10分钟澄清, 并将上清液转移至含有0.5 ml床体积的Ni-NTA琼脂糖树脂(Qiagen)的15 ml柱内。允许重组His<sub>6</sub>标记蛋白质在4℃结合至树脂1小时, 同时颠倒混合。树脂随后用30 ml Ni-NTA 变性洗涤缓冲液(100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Tris-HCl、8 M 尿素, pH 6.3)洗涤, 随后用12 ml Ni-NTA 变性洗脱缓冲液(100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Tris-HCl、8 M 尿素, pH 4.5)洗脱。收集4份的3 ml洗脱级分并贮存在4℃。将30 μl 每种洗脱物用10 μl的4×样品处理缓冲液处理并煮沸5分钟。样品进行SDS-PAGE电泳并用考马斯亮蓝 G250(Biorad)染色。染色的凝胶在蒸馏水内平衡1小时并于室温下在两层纤维素之间干燥过夜。

在中等规模上进行所选重组大肠杆菌菌落的表达以产生用于小鼠接种(见下文)的足够重组蛋白。具有6-组氨酸融合(4 kDa)的全部重组蛋白产生具有与天然蛋白质预测分子量相似的表现分子量的主要蛋白质(见表4)。这些蛋白质在使用抗His抗体的Western印迹中具有高度反应性。成功实现变性条件下对his标记重组蛋白的亲层析纯化。全部重组蛋白的SDS-PAGE和考马斯兰染色表明实现至少至少85%的纯化。使用这种表达方案持续获得2 mg/L的重组蛋白产率。

#### 透析并冻干纯化的His标记重组蛋白

汇集洗脱蛋白质并转移至具有3,500 Da分子量截断(MWCO)的已水化的透析管(Spectrum Laboratories, Inc., Los Angeles, CA)内。取出200 μl等分试样已汇集的洗脱物并使用市售蛋白测定法(Biorad)定量。4℃下将蛋白质在2 L蒸馏水中透析, 同时搅拌。透析缓冲液每隔12小时更换8次。将透析的蛋白质从透析管转移至50 ml离心管内(40 ml最大体积)并将管置于-80℃过夜。将管置入MAXI冷冻干燥机(Heto-Holten, Allerod,

Denmark)并冻干至干燥。冻干的蛋白质随后用 PBS 再次水化至 2 mg/ml 的计算浓度并在-20℃贮存。在透析并且冻干后,成功产生稳定的重组抗原。

#### 使用纯化的重组蛋白的血清学

将 20 µg 纯化的重组蛋白上样至 7 cm IEF 孔内,经 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 TBS-脱脂乳封闭(5% w/v)并装配至多重-筛选仪(Biorad)。小孔与 100 µl 稀释(100倍)的猪血清在室温温育 1 小时。从高度健康状态的猪(n=3)获得猪血清,经实验攻击的猪显示粪便排泄病(fecal shedding)(n=6),天然感染的猪显示粪便排泄病(n=7)。膜随后从仪器中移出并用 TBST 洗涤三次(0.1% v/v),随后与 10 ml 山羊抗猪 IgG(完整分子)-AP(5,000 倍稀释)在室温温育 1 小时。膜用 TBST 洗涤三次,随后使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Biorad)显色。膜在充分显色发生时用自来水洗涤、经干燥并扫描用于展示。

已克隆的全部蛋白质均由 80-100%的一系列猪血清组识别,与健康状态无关,这因而表明基因已经在体内得到表达并且猪能够在接触螺旋体后诱导全身性免疫应答。

#### 使用纯化的 his 标记重组蛋白接种小鼠

对于每一种纯化的 his 标记重组蛋白,对 10 只小鼠进行全身免疫及口服免疫以确定重组蛋白是否具有免疫原性。重组蛋白用 30%(v/v)油包水佐剂乳化并肌肉注射至 10 只小鼠(Balb/cJ; 5 周龄,雄性)的股四头肌内。全部小鼠接受 100 µl 总体积的 100 µg 蛋白质。首次接种三周后,全部小鼠接受与首次接种相同的第二次接种。全部小鼠在第二次接种两周后处死。血清从死后的心脏中获得并在 Western 印迹分析中检测抗多毛短螺旋体细胞提取物抗体。

#### Western 印迹分析

将 20 µg 纯化的重组蛋白上样至 7 cm IEF 孔内,经 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 TBS-脱脂乳封闭(5% w/v)并装配至多重-筛选仪(Bio-Rad)。小室与 100 µl 稀释(100倍)的小鼠血清在室温温育 1 小时。膜从仪器中移出并用 TBST 洗涤三次

(0.1% v/v), 随后与 10 ml 山羊抗小鼠 IgG(完整分子)-AP(5,000 倍稀释)在室温温育 1 小时。膜用 TBST 洗涤三次, 随后使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Biorad)显色。膜在充分显色发生时用自来水洗涤、经干燥并扫描用于展示。

Western 印迹分析显示接种后在小鼠内针对重组疫苗抗原的抗体活性显著增加。全部小鼠均识别分子量与经考马斯兰染色的纯化重组蛋白的分子量相似的重组蛋白。这些实验提供了这样的证据, 即在用于接种小鼠时, 重组蛋白具有免疫原性, 并且采用的接种方案可以诱导针对抗原的特异性循环抗体滴度。

#### 使用纯化的 his 标记重组蛋白接种猪

对于每一种纯化的 his 标记重组蛋白, 对 10 头血清阴性猪用 1ml 疫苗体积内的 1 mg 特定抗原进行肌肉注射。抗原用等体积的油包水佐剂乳化。猪在三周龄接种并在六周龄再接种。使用第二组 10 头血清阴性猪作为阴性对照并不进行接种。全部在 8 周龄以 100ml 的活性多毛短螺旋体培养物( $\sim 10^9$  个细胞/ml)攻击, 并且在实验期间(至攻击后 6 周)和死后检查中观察猪的感染临床病征。

#### 诊断试剂盒

血清从猪舍内已知感染多毛短螺旋体的猪、从已知还未感染多毛短螺旋体的猪和从猪舍内多毛短螺旋体感染状态未知的猪中获得。将 20  $\mu$ g 纯化的重组蛋白上样至 7 cm IEF 孔内, 经 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶电泳并电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 TBS-脱脂乳封闭(5% w/v)并装配至多重-筛选仪(Biorad)。小室与 100  $\mu$ l 稀释(100 倍)的猪血清在室温温育 1 小时。膜从仪器中移出并用 TBST 洗涤三次(0.1% v/v), 随后与 10 ml 山羊抗猪 IgG(完整分子)-AP(5,000 倍稀释)在室温温育 1 小时。膜用 TBST 洗涤三次, 随后使用碱性磷酸酶底物试剂盒(Biorad)显色。膜在充分显色发生时用自来水洗涤、经干燥并扫描用于展示。来自已知感染多毛短螺旋体的猪(阳性对照)的血清与重组蛋白反应, 而来自无感染的猪(阴性对照)的血清不与重

组蛋白反应。可以通过将结果与阳性对照和阴性对照比较而确定猪是否感染多毛短螺旋体。

在已参考具体实施方案描述本发明的同时，对本领域的技术人员而言显而易见的是可以使用这些方法和组合物的变体，旨在可以用不同于本文中具体所述的方式实施本发明。因此，本发明包括如权利要求书所定义的本发明的精神和范围内包含的全部改变。

<110> 诺瓦提斯公司  
莫道什大学

<120> 多毛短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途

<130> H-34325

<150> AU2005903317

<151> 2005-06-23

<160> 56

<170> FastSEQ for Windows 版本 4.0

<210> 1

<211> 824

<212> DNA

<213> 多毛短螺旋体 (*Brachyspira pilosicoli*)

<400> 1

```

atgaaaatcg ctaagataat ttttatactg caaactatac taatattatc atcttcgaat 60
gtttttgctg ttgtaacaag aagttatgca agcacaaaaa aaggttttta tgataatgga 120
ctttacaatg gaataatgct tacagagcaa ggttctttga gtttagctcc tctaatagag 180
aaagaaagt ctatagacgg caaatatata tggaaaatct atcctgctaa agacggaagt 240
atgtatgctg ctataagcgg aatggagct gagttatata aaaaaagtgc taatgaaact 300
aatttcagcc tttttgtaa atctgataat gacaatgctt ttactgctgt aattacagat 360
gatgccggca atgtttatgc ggcagttgga ccttatgcta aaattatgaa atatgacagt 420
aacggaaaag agatttggtc taaagatggt gatgatactt atatatggga catgaagttt 480
gatgctaata gtaatttata tttagctgca ggcgaaaca atgcaagagt attaaaagta 540
tctgttgccg acggaagat tactgaaata ttaaaaacag aatatgctca agctgaaaca 600
atatacaatg aagcaaatgc tatgtatact gctgaaacta aagattatag agtattagta 660
gataaacttt atacagcaa agaggcttat ttagctttat ataataaac taaagaacaa 720
tttgataaaa gtgatgaagc tttactaaa gtaaaagagc gtttagctga acttgaagct 780
atggtaaaag agcttgaaac tttagagcaa gagcaacaaa gcta 824

```

<210> 2

<211> 274

<212> PRT

<213> 多毛短螺旋体

<400> 2

```

Met Lys Ile Ala Lys Ile Ile Phe Ile Leu Gln Thr Ile Leu Ile Leu
 1           5           10           15
Ser Ser Ser Asn Val Phe Ala Val Val Thr Arg Ser Tyr Ala Ser Thr
          20           25           30
Lys Lys Gly Phe Tyr Asp Asn Gly Leu Tyr Asn Gly Ile Met Leu Thr
          35           40           45
Glu Gln Gly Ser Leu Ser Leu Ala Pro Leu Ile Glu Lys Glu Ser Ser
 50           55           60

```

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

<210> 3

<211> 2193

<212> DNA

<213> 多毛短螺旋体

<400> 3

atgcgtgtgg gagaccctta tatacctcag aagtgaatg atgctgttaa tgctataatt 60  
 acaaaactatc aagacaaagg atatttaaag gcttatgttg agcctaaggt tacagaagat 120  
 aaagaggctt ctgatgttgt gatagaaatg aatattgtag agggtaatga ggtaagga 180  
 tcaagcattc gtttcatgg taataccac ttctctccta atgaattaa aagacaaatg 240  
 tctacaaaag aaaatggttt cttatcttg ggtaagtta atgagttaa gtttgaagaa 300  
 gataagtcta aatagtaaa gtattatgct gatagagggt attataaggc taaggttaat 360  
 aatgttcaat atacttatca gtggagagac cctcaagtaa aaaatgagca ggacttgatt 420  
 atagatattt atataacaga gggatgataa tattatcttg gagatattgg cttaagggt 480  
 aattttgtta tacctcaga tgttatacag gctgatataa aatcaaaaa aggtgcttta 540  
 tataattata cttatcatat gtctgattat cagggcatac aaaataaata ttctgaaaag 600  
 ggttatataat tcagacaagt tattcctgtt atatcagtta atgaagaaaa taaaatagtt 660  
 aatataatgt atgatatagt tgaacacgat aaagcacata tagaaaatat tacaatagca 720  
 ggaaacacta aactaaaga ctttgttata cagagatata ttgatataaa acctgggtgaa 780  
 gtattcaact ctgctaaaat acagcgtgta caagagagat tatataatac gcaattcttt 840  
 gacaatatta atattaacgt aaaacctggg tctgctgaag gacttatgga gcttgactt 900  
 aatgttactg atggtaaagc tgctatgggt tctggaggag gcggttttc tactggttcc 960  
 ggatttaagg tatttgcctc cattagagaa aataacttct taggaagagg cttacaatta 1020

```

ggtttaagcg gtgaatttgg tcaaaactcaa aagagaatag cagttaactt tgcagagcct 1080
tatttgctta atttgctat atatttggga ttgatttat ctactttaa tgaaagtgtt 1140
aatacaggcg accagatagg tacagatcaa ttgggtcttc ctaaataatc ttattataca 1200
agacatgggt ttgaaggat tgctagagtt ggttattatt tctttgacta ctattcaact 1260
ttcttaacat ttgacaccat tgtacagcag tatcagcagt ggtatgacca aggtgcaagt 1320
gcagcaggtc cagaccacgt attgaatgat attagaaaat atttagttca tagaataaat 1380
aaaaaagacg gaagctcca aagatggcag agtgattggt ttactacttt tatagtgta 1440
tactcacttc ttagagacag cagaaacgat tatcttaacc ctacaaaggg aagtttctta 1500
agaggtagag tggacttcta cttaaccac actcaattaa tgagattaaa tgctacagga 1560
ttcttagcta tacctgctac aaaatggta tcatttgcac tctatggaga gattggtcag 1620
attgttgcta ttcttggct tcctattcaa aacgatgccg atgtacttta ttatctaac 1680
ccatttgaag atgtagagg ttgggatact tctaaatata ctatatttaa acataataga 1740
ggcttgagta cttatgactt gccaaatgaa aatggtaaaa aagattcttg gagttatggt 1800
agagctaaag taagattctt tgcagagcct cgataccta ttatacctaa aactttggga 1860
tttgttggtt ttcttgatgc tggtaatta tggcttctc attctactgg tcttaatttt 1920
gacggagatg cttataatta tccttcacag ttatggata ttaaagatat atttgatcct 1980
tcacaatata tgtattctgt aggttttgggt ttgagactta ctatacctat atttaatt 2040
agattttatt ttgctaaaag atttgtttat aataaagagg atattggatt tggtaagggc 2100
ttccaagact ttgaggtga tacttattct cctcttggta agtggcttgg aagaggttgg 2160
ggaattgcct ttacaatgaa ccaccattc tat 2193

```

<210> 4

<211> 731

<212> PRT

<213> 多毛短螺旋体

<400> 4

```

Met Arg Val Gly Asp Pro Tyr Ile Pro Gln Lys Leu Asn Asp Ala Val
 1           5           10           15
Asn Ala Ile Ile Thr Asn Tyr Gln Asp Lys Gly Tyr Leu Lys Ala Tyr
 20           25           30
Val Glu Pro Lys Val Thr Glu Asp Lys Glu Ala Ser Asp Val Val Ile
 35           40           45
Glu Met Asn Ile Val Glu Gly Asn Glu Val Lys Val Ser Ser Ile Arg
 50           55           60
Phe His Gly Asn Thr His Phe Ser Pro Asn Glu Leu Lys Arg Gln Met
 65           70           75           80
Ser Thr Lys Glu Asn Gly Phe Leu Ser Leu Gly Lys Phe Asn Glu Phe
 85           90           95
Lys Phe Glu Glu Asp Lys Ser Lys Ile Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Arg
 100          105          110
Gly Tyr Tyr Lys Ala Lys Val Asn Asn Val Gln Tyr Thr Tyr Gln Trp
 115          120          125
Arg Asp Pro Gln Val Lys Asn Glu Gln Asp Leu Ile Ile Asp Ile Tyr
 130          135          140
Ile Thr Glu Gly Asp Lys Tyr Tyr Phe Gly Asp Ile Gly Phe Lys Gly
 145          150          155          160
Asn Phe Val Ile Pro Ser Asp Val Ile Gln Ala Asp Ile Lys Ser Lys
 165          170          175
Lys Gly Ala Leu Tyr Asn Tyr Thr Tyr His Met Ser Asp Tyr Gln Gly
 180          185          190

```

Ile Gln Asn Lys Tyr Ser Glu Lys Gly Tyr Ile Phe Arg Gln Val Ile  
 195 200 205  
 Pro Val Ile Ser Val Asn Glu Glu Asn Lys Ile Val Asn Ile Met Tyr  
 210 215 220  
 Asp Ile Val Glu Asn Asp Lys Ala His Ile Glu Asn Ile Thr Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Asn Thr Lys Thr Lys Asp Phe Val Ile Gln Arg Tyr Ile Asp Ile  
 245 250 255  
 Lys Pro Gly Glu Val Phe Asn Ser Ala Lys Ile Gln Arg Val Gln Glu  
 260 265 270  
 Arg Leu Tyr Asn Thr Gln Phe Phe Asp Asn Ile Asn Ile Asn Val Lys  
 275 280 285  
 Pro Gly Ser Ala Glu Gly Leu Met Glu Leu Gly Leu Asn Val Thr Asp  
 290 295 300  
 Gly Lys Ser Ala Met Val Ser Gly Gly Gly Gly Phe Ser Thr Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Gly Phe Lys Val Phe Ala Ser Ile Arg Glu Asn Asn Phe Leu Gly Arg  
 325 330 335  
 Gly Leu Gln Leu Gly Leu Ser Gly Glu Phe Gly Gln Thr Gln Lys Arg  
 340 345 350  
 Ile Ala Val Asn Phe Ala Glu Pro Tyr Leu Leu Asn Leu Pro Ile Tyr  
 355 360 365  
 Leu Gly Phe Asp Leu Ser Tyr Phe Asn Glu Ser Val Asn Thr Gly Asp  
 370 375 380  
 Gln Ile Gly Thr Asp Gln Phe Gly Leu Pro Lys Tyr Ser Tyr Tyr Thr  
 385 390 395 400  
 Arg His Gly Phe Glu Gly Ile Ala Arg Val Gly Tyr Tyr Phe Phe Asp  
 405 410 415  
 Tyr Tyr Ser Thr Phe Leu Thr Phe Asp Thr Ile Val Gln Gln Tyr Gln  
 420 425 430  
 Gln Trp Tyr Asp Gln Gly Ala Ser Ala Ala Gly Pro Asp His Val Leu  
 435 440 445  
 Asn Asp Ile Arg Lys Tyr Leu Val His Arg Ile Asn Lys Lys Asp Gly  
 450 455 460  
 Ser Phe Gln Arg Trp Gln Ser Asp Trp Phe Thr Thr Phe Ile Val Ser  
 465 470 475 480  
 Tyr Ser Leu Leu Arg Asp Ser Arg Asn Asp Tyr Leu Asn Pro Thr Lys  
 485 490 495  
 Gly Ser Phe Leu Arg Gly Thr Val Asp Phe Tyr Phe Asn His Thr Gln  
 500 505 510  
 Leu Met Arg Leu Asn Ala Thr Gly Phe Leu Ala Ile Pro Ala Thr Lys  
 515 520 525  
 Trp Leu Ser Phe Ala Phe Tyr Gly Glu Ile Gly Gln Ile Val Ala Ile  
 530 535 540  
 Pro Gly Leu Pro Ile Gln Asn Asp Ala Asp Val Leu Tyr Tyr Leu Asn  
 545 550 555 560  
 Pro Phe Glu Asp Val Arg Gly Trp Asp Thr Ser Lys Tyr Thr Ile Phe  
 565 570 575  
 Lys His Asn Arg Gly Leu Ser Thr Tyr Asp Leu Pro Asn Glu Asn Gly  
 580 585 590  
 Gln Lys Asp Ser Trp Ser Tyr Gly Arg Ala Lys Val Arg Phe Phe Ala

```

          595              600              605
Glu Leu Arg Ile Pro Ile Ile Pro Lys Thr Leu Gly Phe Val Gly Phe
 610              615              620
Leu Asp Ala Gly Gln Leu Trp Leu Pro His Ser Thr Gly Leu Asn Phe
 625              630              635              640
Asp Gly Asp Ala Tyr Asn Tyr Pro Ser Gln Phe Met Asp Ile Lys Asp
          645              650              655
Ile Phe Asp Pro Ser Gln Tyr Met Tyr Ser Val Gly Phe Gly Leu Arg
          660              665              670
Leu Thr Ile Pro Ile Phe Asn Ile Arg Phe Tyr Phe Ala Lys Arg Phe
          675              680              685
Val Tyr Asn Lys Glu Asp Ile Gly Phe Gly Lys Gly Phe Gln Asp Phe
          690              695              700
Glu Gly Asp Thr Tyr Ser Pro Leu Gly Lys Trp Leu Gly Arg Gly Trp
 705              710              715              720
Gly Ile Ala Phe Thr Met Asn His Pro Phe Tyr
          725              730

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 807

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 多毛短螺旋体

&lt;400&gt; 5

```

atgaaaaagg ttttattatt attatgtttt tcattgtttt tagcttcttg cggcggaaat 60
aatgataata aaaaagattt aatcacagta aagatagggc atgttggtga atctgacaga 120
actatatgga agcctgtaca agagaaatta ttaaacgaag gcattaaagt agaattagtt 180
tcttttgctg attatactat accaaatcag gcattaaatg acggcgatat agatttagat 240
gcttttcagc accatgcata ctacagcaat gaagttaata ctaaaggta tgatttagct 300
atattgggtg ttacttatat atctgctatg aatatttatt ctcataatat tacaatggt 360
aatgaggta aaaatggaga taaagttgct atacctaag accctgctaa tggcgggaagg 420
gctttaaaag tattagaggc tgctggttta ataaagttaa aagataatgc tccagacaat 480
cctacagtta atgatataga aaatccttta aatttagaga ttatagaggt tgatgcgggc 540
agtttatata gtttgcttcc tgatgttgct tgtgcggtta ttaattgtaa ttatgcttta 600
gattttggtc ttaatccggg tgctgattat atatttagag atgaccctaa aaattatgac 660
aataatatgt atataaactt aatagcttca aggcttctg ataaggataa tgagatttat 720
aagagggtag tagaggctta tcaatctgct gaagtagaaa aagtttatgc tgaagathtt 780
aaggagcctt atatacctgc ttggaaa 807

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 多毛短螺旋体

&lt;400&gt; 6

```

Met Lys Lys Val Leu Leu Leu Cys Phe Ser Leu Phe Leu Ala Ser
 1              5              10              15
Cys Gly Gly Asn Asn Asp Asn Lys Lys Asp Leu Ile Thr Val Lys Ile
          20              25              30
Gly His Val Gly Glu Ser Asp Arg Thr Ile Trp Lys Pro Val Gln Glu
          35              40              45

```

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

<210> 7

<211> 852

<212> DNA

<213> 多毛短螺旋体

<400> 7

atgaaaaatg ttttttattt attactaata ttactttctt taatctcttg taacaataat 60  
 aataatcaaa acacaactga caaacttcaa gtatatgcaa gtatatatcc tatttatgat 120  
 ttcgctaaaa aaattggcgg agagaaaata gatatttata atataacttc agcaggttca 180  
 gagcctcatg actttgagct tacatcaaaa gatatggcta atttaagcaa ggctaatacta 240  
 tttatatata atgggtgcttc aatggagcat tgggcagaca ctgttaaaga tacaataaaa 300  
 gatttaaat atttagaggc ttcttcaaat atcaataacg aagaattaga ccctcatttt 360  
 tggctttcac ctaaaaaagc aaaagttcaa atggaaaata taaaaaatgt acttgcagaa 420  
 ttagacagta aaaacgctga ttattataat tctaattaca atttatatgc tgctaaatta 480  
 gatgagcttg ataaaagctt tagagataat ttacaaaaca taaaaaacac taatttggtt 540  
 gttactcacc ctgcattcgg acatttctgc aaagaatata atcttaatca agttgcaata 600  
 gcaagagatg aagctgatgc taaagccatg gctcaaacaa ttaatttcat aaaaaacaat 660  
 aatattaaaa ctatatttta tgaagacttc tcaagttcta agctttaga ttctattgca 720  
 aaagaacag gagtaaaagt aagtcatta aacctatag agtctttaag tgaagaatat 780  
 attaaatctg gagaggacta tttctctata atgcagaaga atctagaagc tataacaat 840  
 ggtcttaata at 852

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 284

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 多毛短螺旋体

&lt;400&gt; 8

```

Met Lys Asn Val Phe Tyr Leu Leu Leu Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ser
 1           5           10          15
Cys Asn Asn Asn Asn Asn Gln Asn Thr Thr Asp Lys Leu Gln Val Tyr
          20           25           30
Ala Ser Ile Tyr Pro Ile Tyr Asp Phe Ala Lys Lys Ile Gly Gly Glu
          35           40           45
Lys Ile Asp Ile Tyr Asn Ile Thr Ser Ala Gly Ser Glu Pro His Asp
 50           55           60
Phe Glu Leu Thr Ser Lys Asp Met Ala Asn Leu Ser Lys Ala Asn Leu
65           70           75           80
Phe Ile Tyr Asn Gly Ala Ser Met Glu His Trp Ala Asp Thr Val Lys
          85           90           95
Asp Thr Ile Lys Asp Leu Lys Tyr Leu Glu Ala Ser Ser Asn Ile Asn
          100          105          110
Asn Glu Glu Leu Asp Pro His Phe Trp Leu Ser Pro Lys Lys Ala Lys
          115          120          125
Val Gln Met Glu Asn Ile Lys Asn Val Leu Ala Glu Leu Asp Ser Lys
          130          135          140
Asn Ala Asp Tyr Tyr Asn Ser Asn Tyr Asn Leu Tyr Ala Ala Lys Leu
          145          150          155          160
Asp Glu Leu Asp Lys Ser Phe Arg Asp Asn Leu Gln Asn Ile Lys Asn
          165          170          175
Thr Asn Leu Val Val Thr His Pro Ala Phe Gly His Phe Cys Lys Glu
          180          185          190
Tyr Asn Leu Asn Gln Val Ala Ile Ala Arg Asp Glu Ala Asp Ala Lys
          195          200          205
Ala Met Ala Gln Thr Ile Asn Phe Ile Lys Asn Asn Asn Ile Lys Thr
          210          215          220
Ile Phe Tyr Glu Asp Phe Ser Ser Ser Lys Leu Val Asp Ser Ile Ala
          225          230          235          240
Lys Glu Thr Gly Val Lys Val Ser Ala Leu Asn Pro Ile Glu Ser Leu
          245          250          255
Ser Glu Glu Tyr Ile Lys Ser Gly Glu Asp Tyr Phe Ser Ile Met Gln
          260          265          270
Lys Asn Leu Glu Ala Ile Thr Asn Gly Leu Asn Asn
          275          280

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1197

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 多毛短螺旋体

&lt;400&gt; 9

```

atggaaaaaa aatttaaact tggattagtg cctaggctga ttatcggaat tttgcttgg 60
atattttttg gacagcaatt tataccagaa gtaatatcta gagtcatagt aacggcatct 120
ggtatattta gttcttattt aaaatttgta atacctttga tgatagtttc ttatgtatcc 180
atgggtatag ctgatttgaa agaaggttca gggttcttat tgcttgtaac atgtatattg 240
gcttatggct ctacattaat tgctggctct gcatcattct tggtggtta caatttattt 300
cctagcttta tgagtgtga tgatattcag agaattgctg atgctgctgg taattctgtt 360
actcettatt tatctataac cgtaacacct ttattagata ctttagctgc tgttttattt 420
gcatttataa taggacttgg aatatctact atgagaggaa aagaaatagg agaataatta 480
tacaatgtat ttaaagaatt atctactatt attgataaag ttttgcgtgt atctataatt 540
cctttacttc ctctttatat ttgtgttact tttgttgata tgactagatc tggaaaaact 600
tttgtaatat taggaatatt atggaaagta ttcttagtag ttattattat gcatttaata 660
tatcttctaa tagctttctt agtatctggt actataggaa agaaaaatcc ttttatgctt 720
atgaagaacc aaattgcagg atatgcaact gcttaggta cacagtcac tgctgctact 780
atacctgtta atttacaatg tgcagaaaaa gatggtatat ctgaacaaat aagaaatttc 840
gtagtacctc tttgtgctaa tattcacatg gcaggctcta tgattacaat tacagcatgt 900
gccacagcag tatgtttgat gaatcagatt cctatttctt ataatactat acttccattt 960
attgctatgc ttggtattgc tatgatagct tctcctgggt ctcctggcgg ttctataatg 1020
acagctttac cattccttta tatggttggc cttggcggtc ctgacagtcc ttaagtgtct 1080
ataatggttg ctctatacat cactcaagac tcattcggtg ctgcttgtaa tgtatctggt 1140
gataatgctt taggtgttat agtgataca atatataaaa agaaagtgtt aaaagct 1197

```

<210> 10

<211> 399

<212> PRT

<213> 多毛短螺旋体

<400> 10

```

Met Glu Lys Lys Phe Lys Leu Gly Leu Val Pro Arg Leu Ile Ile Gly
 1           5           10          15
Ile Leu Leu Gly Ile Phe Phe Gly Gln Gln Phe Ile Pro Glu Val Ile
 20          25          30
Ser Arg Val Ile Val Thr Ala Ser Gly Ile Phe Ser Ser Tyr Leu Lys
 35          40          45
Phe Val Ile Pro Leu Met Ile Val Ser Tyr Val Ser Met Gly Ile Ala
 50          55          60
Asp Leu Lys Glu Gly Ser Gly Phe Leu Leu Leu Val Thr Cys Ile Leu
 65          70          75          80
Ala Tyr Gly Ser Thr Leu Ile Ala Gly Ser Ala Ser Phe Leu Val Ala
 85          90          95
Tyr Asn Leu Phe Pro Ser Phe Met Ser Ala Asp Asp Ile Gln Arg Ile
 100         105         110
Ala Asp Ala Ala Gly Asn Ser Val Thr Pro Tyr Leu Ser Ile Thr Val
 115         120         125
Thr Pro Leu Leu Asp Thr Leu Ala Ala Val Leu Phe Ala Phe Ile Ile
 130         135         140
Gly Leu Gly Ile Ser Thr Met Arg Gly Lys Glu Ile Gly Glu Tyr Leu
 145         150         155         160
Tyr Asn Val Phe Lys Glu Leu Ser Thr Ile Ile Asp Lys Val Leu Arg
 165         170         175
Val Ser Ile Ile Pro Leu Leu Pro Leu Tyr Ile Cys Gly Thr Phe Val
 180         185         190

```

Asp Met Thr Arg Ser Gly Lys Thr Phe Val Ile Leu Gly Ile Leu Trp  
 195 200 205  
 Lys Val Phe Leu Val Val Ile Ile Met His Leu Ile Tyr Leu Leu Ile  
 210 215 220  
 Ala Phe Leu Val Ser Gly Thr Ile Gly Lys Lys Asn Pro Phe Met Leu  
 225 230 235 240  
 Met Lys Asn Gln Ile Ala Gly Tyr Ala Thr Ala Leu Gly Thr Gln Ser  
 245 250 255  
 Ser Ala Ala Thr Ile Pro Val Asn Leu Gln Cys Ala Glu Lys Asp Gly  
 260 265 270  
 Ile Ser Glu Gln Ile Arg Asn Phe Val Val Pro Leu Cys Ala Asn Ile  
 275 280 285  
 His Met Ala Gly Ser Met Ile Thr Ile Thr Ala Cys Ala Thr Ala Val  
 290 295 300  
 Cys Leu Met Asn Gln Ile Pro Ile Ser Tyr Asn Thr Ile Leu Pro Phe  
 305 310 315 320  
 Ile Ala Met Leu Gly Ile Ala Met Ile Ala Ser Pro Gly Ala Pro Gly  
 325 330 335  
 Gly Ser Ile Met Thr Ala Leu Pro Phe Leu Tyr Met Val Gly Leu Gly  
 340 345 350  
 Gly Pro Asp Ser Pro Leu Ser Ala Ile Met Val Ala Leu Tyr Ile Thr  
 355 360 365  
 Gln Asp Ser Phe Gly Thr Ala Cys Asn Val Ser Gly Asp Asn Ala Leu  
 370 375 380  
 Gly Val Ile Val Asp Thr Ile Tyr Lys Lys Lys Val Val Lys Ala  
 385 390 395

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AC1 的正向引物

<400> 11

atcgctaaga taatttttat actg

24

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物 AC1-R822

<400> 12

gctttgttgc tcttgctcta aag

23

<210> 13

<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 AC1-F226	
<400> 13	
ccatttcgc ttatagcagc atac	24
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 AC1-R542	
<400> 14	
gatactttta atactcttgc attg	24
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P4-F4	
<400> 15	
cgtgtgggag acccttatat acc	23
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 P4-R1113	
<400> 16	
aatcccaaa tatataggca aattaag	27
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P4-F1072	

<400> 17 gcagagcctt atttgcttaa ttg	24
<210> 18 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引物 P4-R2193	
<400> 18 atagaatggg tggttcattg taaag	25
<210> 19 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引物 P4-F458	
<400> 19 ttggagatat tggctttaag ggta	24
<210> 20 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反向引物 P4-R1659	
<400> 20 ggcatcgttt tgaataggaa ga	22
<210> 21 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 正向引物 P6-F35	
<400> 21 tgtttttagc ttcttgcggc	20
<210> 22 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	

---

<220>	
<223> 反向引物 P6-R713	
<400> 22	
tcattatcct tatcagaagc ccttg	25
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P6-F219	
<400> 23	
tgacggcgat atagatttag atgc	24
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 P6-R578	
<400> 24	
accgcacaag caacatcagg	20
<210> 25	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P11-F33	
<400> 25	
actttcttta atctcttgta acaata	26
<210> 26	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 P11-R864	
<400> 26	
ccatttgta tagcttctag attctt	26
<210> 27	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P11-F26	
<400> 27	
tggagcattg ggcagacact	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 P11-R566	
<400> 28	
aatgtccga atgcagggtg	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P14-F41	
<400> 29	
ttatcggaat tttgettgg	20
<210> 30	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 P14-R1142	
<400> 30	
tcaccagata cattacaagc agt	23
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 P14-F332	
<400> 31	

gaattgctga tgctgctggt	20
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 P14-R858	
<400> 32	
agcacaaga ggtactacga aa	22
<210> 33	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 AC1-F1-XhoI	
<400> 33	
aaactcgaga tgaccctaca tattttttca cag	33
<210> 34	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 AC1-R822-EcoRI	
<400> 34	
aaagaattcg cttgttgct cttgctctaa ag	32
<210> 35	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P4-F4-XhoI	
<400> 35	
ctactcgagc gtgtgggaga cccttatata cc	32
<210> 36	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 引物 P4-R1113-EcoRI	
<400> 36	
agagaattca aatcccaa atataaggcaa attaag	36
<210> 37	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P4-F1072-XhoI	
<400> 37	
gttctcgagg cagagcetta tttgcttaatt ttg	33
<210> 38	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P4-R2193-EcoRI	
<400> 38	
gttgaattca tagaatgggt ggttcattgt aaag	34
<210> 39	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P6-F52-XhoI	
<400> 39	
gctctcgagg cggaaataat gataataaaa aag	33
<210> 40	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P6-R807-EcoRI	
<400> 40	
gttgaattct ttccaagcag gtatataagc tc	32
<210> 41	

<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P11-F52-XhoI	
<400> 41	
atcctcgaga acaataataa taatcaaaac acaac	35
<210> 42	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P11-R852-EcoRI	
<400> 42	
gttgaattca ttattaagac catttgttat agcttc	36
<210> 43	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P14-F4-XhoI	
<400> 43	
atactcgagg aaaaaaatt taaacttgga ttagtg	36
<210> 44	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 P14-R1197-EcoRI	
<400> 44	
gttgaattca gcttttaca ctttctttt atatattg	38
<210> 45	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> pTrcHis-F 引物	

---

<400> 45 caatttatca gacaatctgt gtg	23
<210> 46 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> pTrcHis-R 引物	
<400> 46 tgcctggcag ttcctactc tcg	23
<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> T3 引物	
<400> 47 taaccctcac taaaggaac	20
<210> 48 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> T7 引物	
<400> 48 gtaatacgac tcaactatagg gc	22
<210> 49 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> AC1-F0 引物	
<400> 49 gcatcattaa tggattttga agc	23
<210> 50 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>		
<223> AC1-F1 引物		
<400> 50		
ctgtaggagg agtttgcggt tc		22
<210> 51		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> AC1-F2 引物		
<400> 51		
ttactttagt taaagcttca tcac		24
<210> 52		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> AC1-F3 引物		
<400> 52		
agcagtaaaa gcattgtcat tatc		24
<210> 53		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> AC1-F4 引物		
<400> 53		
tgataatatt agtatagttt gcag		24
<210> 54		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> AC1-F5 引物		
<400> 54		
taaatgtata gtctctcctg caac		24

---

<210> 55	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> AC1-F6 引物	
<400> 55	
ttaccctatg caagctggcg gaac	24
<210> 56	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> AC1-F7 引物	
<400> 56	
ttaatttaa gagtattaa tgac	24

专利名称(译)	多毛短螺旋体的基因和蛋白质及其用于诊断和治疗的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101228276A</a>	公开(公告)日	2008-07-23
申请号	CN200680022529.7	申请日	2006-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
[标]发明人	M贝尔伽德 DJ汉普森 T拉		
发明人	M·贝尔伽德 D·J·汉普森 T·拉		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/85 C07K14/20 C07K16/12 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/02		
CPC分类号	A61K2039/53 C07K14/20 A61K39/00		
代理人(译)	凌立		
优先权	2005903317 2005-06-23 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明描述了多毛短螺旋体的新多核苷酸和氨基酸。这些序列用于诊断动物内的多毛短螺旋体病，以及用作治疗性治疗或预防性治疗动物内的多毛短螺旋体病。这些序列还可以用于诊断，和治疗性和/或预防性治疗动物内由其他短螺旋体属物种所致的疾病，所述的短螺旋体属物种包括密螺旋体、*B.alvinipulli*、阿尔堡短螺旋体、无害短螺旋体、*B.murdochii*和猪痢疾短螺旋体。