



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103189387 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201180047044. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 08. 01

*G07K 14/22* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61P 37/04* (2006. 01)

2010903418 2010. 07. 30 AU

*G01N 33/68* (2006. 01)

*A61K 39/095* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

*G01N 33/53* (2006. 01)

2013. 03. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2011/000971 2011. 08. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02012/012851 EN 2012. 02. 02

(71) 申请人 格里菲斯大学

地址 澳大利亚昆士兰州

(72) 发明人 迈克尔·保罗·詹宁斯

伊恩·理查德·安塞尔姆·皮克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

权利要求书3页 说明书28页 附图21页

(54) 发明名称

重组脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 孔蛋白

(57) 摘要

本发明提供了脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) PorA 构建体, 其一个或更多个可变区通过插入完整保守区或保守区氨基酸而被破坏。PorA 的高免疫原性可变区是引发不具有广泛保护性的菌株特异性免疫应答的原因, 所以破坏可变区使得免疫应答针对保守区表位, 从而针对更广谱的脑膜炎奈瑟氏菌菌株提供有效免疫。本发明还提供了编码核酸、基因构建体、表达 PorA 构建体的宿主细胞, 以及用于检测和治疗脑膜炎奈瑟氏菌感染的组合物、试剂盒和方法。

1. 分离的蛋白质,其包含脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)PorA 蛋白的氨基酸序列,其中所述 PorA 蛋白的一个或更多个可变区通过包含一个或更多个 PorA 保守区或保守区氨基酸而被破坏。

2. 权利要求 1 所述分离的蛋白质,其中所述一个或更多个可变区选自 VR1 区、VR2 区、SVR1 区和 SVR2 区。

3. 权利要求 2 所述分离的蛋白质,其中所述一个或更多个可变区选自 VR1 区和 VR2 区。

4. 权利要求 1 所述分离的蛋白质,其中所述 porA 保守区是环 2、环 3、环 7 和 / 或环 8 的氨基酸序列,或者包含所述氨基酸序列。

5. 前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质,其中所述一个或更多个可变区或其一个或更多个氨基酸被缺失。

6. 权利要求 1 至 4 中任一项所述分离的蛋白质,其中所述一个或更多个可变区包含一个或更多个插入到其中的 PorA 保守区或保守区氨基酸。

7. 前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质,其包含 SEQ ID NO :5-22 中任一个所示的氨基酸序列。

8. 前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质,其包含 SEQ ID NO :11-22 中任一个所示的氨基酸序列。

9. 分离的蛋白质,其是前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质的变体,并与其具有至少 80% 的序列同一性,其中所述分离的蛋白质不是野生型 PorA 蛋白。

10. 分离的蛋白质,其是前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质的衍生物。

11. 分离的蛋白质,其是包含前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质的至少二十(20) 个连续氨基酸的片段,或者包含所述片段。

12. 前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质,其能够引发免疫应答,所述免疫应答与所述相应野生型 PorA 蛋白所引发的免疫应答相比菌株特异性更低。

13. 权利要求 12 所述分离的蛋白质,其中所述免疫应答提供针对多种脑膜炎奈瑟氏菌菌株的保护。

14. 外膜蛋白囊泡 (OMV),其包含前述权利要求中任一项所述分离的蛋白质。

15. 分离的核酸,其编码权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质。

16. 权利要求 15 所述分离的核酸,其包含 SEQ ID NO :26-43 中任一个所示的核苷酸序列。

17. 权利要求 15 所述分离的核酸,其包含 SEQ ID NO :32-43 中任一个所示的核苷酸序列。

18. 分离的核酸,其包含与权利要求 15 至 17 中任一项所述核苷酸序列具有至少 80% 同一性的核苷酸序列。

19. 基因构建体,其包含权利要求 15 至 18 中任一项所述分离的核酸以及一种或更多种另外的核苷酸序列。

20. 宿主细胞,其包含权利要求 19 的基因构建体。

21. 权利要求 20 的宿主细胞,其是细菌。

22. 权利要求 21 的宿主细胞,其是脑膜炎奈瑟氏菌。

23. 一种制备重组蛋白质的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 培养权利要求 20 至 22 中任一项的宿主细胞,使得所述重组蛋白质在所述宿主细胞中表达;以及

(ii) 分离所述重组蛋白质。

24. 抗体或抗体片段,其与权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质相结合,或者针对所述蛋白质而产生。

25. 一种检测哺乳动物中的脑膜炎奈瑟氏菌细菌的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 使权利要求 24 的抗体或抗体片段与得自哺乳动物的生物样品合并;以及

(ii) 确定所述样品中是否存在包含所述抗体或抗体片段和脑膜炎奈瑟氏菌细菌或 PorA 蛋白的复合物,其中所述复合物的存在指示所述脑膜炎奈瑟氏菌细菌。

26. 一种检测针对脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 使得自哺乳动物的生物样品与权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质相接触;以及

(ii) 确定所述样品中是否存在包含所述分离的蛋白质和脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 抗体的复合物。

27. 一种检测针对脑膜炎奈瑟氏菌的杀菌抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 使得自用权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质进行了免疫的哺乳动物的生物样品与脑膜炎奈瑟氏菌细菌相接触;以及

(ii) 确定所述样品中是否存在所杀菌抗体。

28. 一种检测脑膜炎奈瑟氏菌细菌的方法,所述方法包括以下步骤:使用权利要求 15 至 18 中任一项所述分离的核酸对得自哺乳动物的生物样品中的核酸序列进行检测,以指示所述脑膜炎奈瑟氏菌细菌的存在。

29. 权利要求 26 至 28 中任一项的方法,其中所述生物样品可来自于人。

30. 用于检测脑膜炎奈瑟氏菌感染的试剂盒,所述试剂盒包含:权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质,权利要求 15 至 18 中任一项所述分离的核酸,和/或权利要求 24 的抗体或抗体片段,和任选的一种或更多种其他试剂。

31. 药物组合物,其包含:权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质,权利要求 14 的外膜囊泡(OMV),权利要求 15 至 18 中任一项所述分离的核酸,权利要求 19 的基因构建体,权利要求 20 至 22 中任一项的宿主细胞,权利要求 24 的抗体或抗体片段,和可药用载体、稀释剂或赋形剂。

32. 权利要求 31 的药物组合物,其是疫苗。

33. 权利要求 31 或权利要求 32 的药物组合物,其包含处于外膜蛋白囊泡(OMV)中的所述分离的蛋白质。

34. 权利要求 32 或权利要求 33 的药物组合物,其包含细菌,所述细菌含有染色体整合的基因构建体。

35. 权利要求 34 的药物组合物,其中所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

36. 一种预防或治疗哺乳动物的脑膜炎奈瑟氏菌感染的方法,所述方法包括以下步骤:向所述哺乳动物施用权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质,权利要求 14 的外膜囊泡,权利要求 15 至 18 中任一项所述分离的核酸,权利要求 19 的基因构建体,权利要求 20 至 22 中任一项的宿主细胞,权利要求 24 的抗体或抗体片段,和/或权利要求 31 至 35 中任

一项的药物组合物,从而预防或治疗所述哺乳动物的所述脑膜炎奈瑟氏菌感染。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述宿主细胞是细菌,所述细菌包含染色体整合的基因构建体。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

39. 权利要求 36 的方法,其中所述分离的蛋白质处于外膜蛋白囊泡 (oMV) 中。

40. 权利要求 36 至 39 中任一项的方法,其中所述哺乳动物是人。

41. 权利要求 1 至 13 中任一项所述分离的蛋白质、权利要求 14 的外膜囊泡、权利要求 15 至 18 中任一项所述分离的核酸、权利要求 19 的基因构建体、权利要求 20 至 22 中任一项的宿主细胞、权利要求 24 的抗体或抗体片段,其用于预防或治疗哺乳动物的脑膜炎奈瑟氏菌感染。

42. 权利要求 41 之用途的宿主细胞,其是细菌,所述细菌包含染色体整合的基因构建体。

43. 权利要求 42 之用途的宿主细胞,其中所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

44. 权利要求 31 所述分离的蛋白质,其处于外膜蛋白囊泡 (oMV) 中。

## 重组脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 孔蛋白

### 技术领域

[0001] 本发明涉及构成修饰形式的脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) PorA 蛋白的新蛋白质, 编码这些蛋白质的核酸, 及其在治疗性和预防性方法中的用途、组合物、特别是疫苗。更特别地, 通过破坏 PorA 表面环中的非保守氨基酸, 本发明提供了可用于疫苗的蛋白质和编码核酸, 与相应的野生型 PorA 蛋白的预期结果相比, 所述疫苗针对更广谱的脑膜炎奈瑟氏菌菌株提供有效免疫。

### 背景技术

[0002] 脑膜炎奈瑟氏菌是革兰氏阴性菌, 是流行性脑脊髓膜炎和败血症的病原体。其已知的唯一宿主是人, 约 10% 的人群可无症状地携带它 (Caugant 等, 1994, *J. Clin. Microbiol.* 32323)。

[0003] 脑膜炎奈瑟氏菌可表达多糖荚膜, 而这允许其根据所表达荚膜的性质对该细菌进行分类。脑膜炎奈瑟氏菌有至少十二个血清组: A、B、C、29-E、H、I、K、L、W135、X、Y 和 Z, 其中血清组 A、B 和 C 引起 90% 的脑膜炎球菌病 (Poolman 等, 1995, *Infect. Agents and Dis.* 413)。有针对血清组 A 和 C 的疫苗可用, 但是血清组 B 荚膜多糖的免疫原性不佳, 在人中不诱导保护。

[0004] 因此正在检查另一些膜组分和胞外组分是否适合包含在疫苗中。实例包括 1、2 和 3 类外膜蛋白 (孔蛋白 (porin); 由 por 基因编码) 和 4 类外膜蛋白 (Rmp) 和 5 类外膜蛋白 (Opacity 蛋白; 由 opa 和 opc 基因编码)。但是, 脑膜炎奈瑟氏菌通过抗原性和相变异而非常有效地逃避免疫应答。例如, Opc 蛋白是具有高度免疫原性 (Wiertz 等, 1996, *Infect Immun.* 64298-304) 的粘附素 / 侵袭素 (Virji 等, 1995, *Mol Microbiol.* 18741-54), 但是其表达是可相变的 (phase-variable) (Sarkari 等, 1994, *Mol Microbiol.* 13207-17), 并且通过转换 (diversion) 产生针对高免疫原性移动靶标 (特别是 PorA) 的免疫应答。

[0005] PorA 在菌株之间高度可变并且在患者和无症状携带者中均产生免疫应答, 其程度使得它已作为代表血清亚型系统的用于菌株鉴定的标志物 (McGuinness 等, 1990, *J Exp Med.* 1711871-82)。PorA 是关键抗原, 其已用于先前有效且已注册的疫苗制剂中, 并且被认为是引发有效杀菌抗体的理想抗原。但是, 表面环在菌株之间的可变性使得靶标可变, 并且疫苗通常是 PorA 类型特异性的。虽然已做出了许多努力以产生覆盖多至六种不同 PorA 类型的多价 PorA 疫苗 (van der Voort 等, 1996, *Infect Immun.* 642745-51), 但是该靶标已被断定为可变性过高, 因此最近的疫苗开发基本抛弃了这种抗原。

[0006] PorA 单体拓扑学的现有模型显示出八个胞外环 (Derrick 等, 1999, *Infect. Immun.* 672406-13; van der Ley 等, 1991, *Infect. Immun.* 592963)。最长的环 (1 和 4) 可变性最高, 因此称为可变区 1 (VR1) 和可变区 2 (VR2)。环 5 和 6 中看到的可变性较低 (分别为半可变区 SVR1 和 2), 其余的环中基本上没有可变性。预计环 3 在由 PorA 三聚体的每一个亚基形成的孔中形成“塞 (plug)”。即使在 VR1 和 VR2 内, 大部分可变性只限于预测形成每个环尖端的残基。实际上, 在小鼠和经免疫的人志愿者中, 表位作图都表明大多数抗体应答针

对环 1 和 4 的“顶端”——菌株之间可变的区域 (van der Voort 等, 1997, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 17139-48), 推测这解释了抗 PorA 应答的菌株特异性。

### 发明内容

[0007] 本发明人认识到, PorA 的高免疫原性表面环是引发不具广泛保护性的菌株特异性免疫应答的原因, 使得掺入来源于特定脑膜炎奈瑟氏菌菌株的 PorA 蛋白的疫苗倾向于优先针对该特定菌株提供免疫。因此, 本发明人试图生产这样的 PorA 蛋白: 其引发的免疫应答的菌株特异性不像野生型 PorA 引发的免疫应答那样高。与用野生型 PorA 免疫后的预期结果相比, 通过使免疫应答主要针对保守性表位, 包含所述分离蛋白质的疫苗应针对更广谱的脑膜炎奈瑟氏菌菌株提供免疫。

[0008] 在第一方面中, 本发明提供了包含脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白之氨基酸序列的分离蛋白质, 其中所述 PorA 蛋白的可变区中的一个或多个氨基酸被破坏。

[0009] 合适地, 所述 PorA 蛋白可变区中的一个或多个氨基酸通过包含一个或多个 PorA 保守区或保守区氨基酸而被破坏 (例如, 与野生型 PorA 相比)。优选地, 所述保守区是保守环 2、保守环 3、保守环 7 和 / 或保守环 8 的氨基酸序列, 或者包含以上氨基酸序列。

[0010] 合适地, 所述可变区选自 VR1、VR2、SVR1 和 SVR2 区。

[0011] 优选地, 所述可变区选自 VR1 和 VR2 区。

[0012] 所述可变区和所述保守区可以是、衍生自或来源于相同或不同的 PorA 蛋白。

[0013] 合适地, 本发明的分离蛋白质能够引发免疫应答。

[0014] 优选地, 所述免疫应答的菌株特异性低于由相应的野生型 PorA 蛋白引发的免疫应答。

[0015] 更优选地, 所述免疫应答提供了针对一种或更多种脑膜炎奈瑟氏菌菌株 (或者甚至更优选地针对多种脑膜炎奈瑟氏菌菌株) 的保护。

[0016] 本发明提供了本方面分离蛋白质的一些具体实施方案。图 1 和 2 提供了本方面分离蛋白质的一些具体实例 (SEQ ID NO :11-22)。优选地, 所述分离蛋白质包含 SEQ ID NO : 11-22 中任一个所示的氨基酸序列。

[0017] 优选地, 所述分离蛋白质中被破坏的可变区不由 VR1 和 / 或 VR2 区的缺失组成 (例如 SEQ ID NO :2-4 所述)。

[0018] 根据第一方面, 本发明包括本发明分离蛋白质的同源物、片段、变体和衍生物。

[0019] 在该方面的一个具体实施方案中, 所述分离蛋白质存在于外膜蛋白囊泡 (Outer Membrane Protein Vesicle, OMV) 中。

[0020] 在第二方面中, 本发明提供了编码根据第一方面的多肽的分离核酸。

[0021] 图 2 中提供了本方面分离核酸的一些具体实例 (SEQ ID NO :23-43)。优选地, 所述分离核酸包括 SEQ ID NO :32-43 中任一个所述的核苷酸序列。

[0022] 根据第二方面, 本发明包括本发明分离核酸的同源物、片段、变体和衍生物。

[0023] 在第三方面中, 本发明提供了包含根据第二方面的分离核酸和一种或更多种其他核苷酸序列的基因构建体。

[0024] 在一种优选形式中, 所述基因构建体是包含表达载体和根据第二方面的分离核酸的表达构建体, 其中所述分离核酸与所述表达载体中的一种或更多种调节核酸有效连接。

[0025] 在第四方面中,本发明提供了包含根据第三方面的基因构建体的宿主细胞。

[0026] 在一个优选实施方案中,所述宿主细胞是包含染色体整合的表达构建体的细菌。

[0027] 优选地,所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

[0028] 在本发明的第五方面中,提供了一种产生根据第一方面的重组分离蛋白质的方法,所述方法包括以下步骤:

[0029] (i) 培养包含根据第三方面的表达载体的宿主细胞,以使所述多肽在所述宿主细胞中表达;以及

[0030] (ii) 分离所述重组多肽。

[0031] 在第六方面中,本发明提供了与本发明的分离蛋白质、其片段、变体或衍生物结合或者针对它们而产生的抗体或抗体片段。

[0032] 在第七方面中,本发明提供了一种检测脑膜炎奈瑟氏菌细菌的方法,所述方法包括以下步骤:-

[0033] (i) 使第六方面的抗体或抗体片段与得自哺乳动物的生物样品合并;以及

[0034] (ii) 确定所述样品中是否存在包含所述抗体或抗体片段与脑膜炎奈瑟氏菌细菌和/或脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白的复合物,其中所述复合物存在指示所述脑膜炎奈瑟氏菌细菌。

[0035] 在第八方面中,本发明提供了一种检测针对脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:-

[0036] (i) 使得自哺乳动物的生物样品与第一方面的分离蛋白质相接触;以及

[0037] (ii) 确定所述样品中是否存在包含所述分离蛋白质与脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 抗体的复合物。

[0038] 在第九方面中,本发明提供了一种检测针对脑膜炎奈瑟氏菌的杀菌抗体的方法,所述方法包括以下步骤:-

[0039] (i) 使得自经第一方面分离蛋白质免疫之哺乳动物的生物样品与脑膜炎奈瑟氏菌细菌相接触;以及

[0040] (ii) 确定所述样品中是否存在所述杀菌抗体。

[0041] 在第十方面中,提供了一种检测脑膜炎奈瑟氏菌细菌的方法,所述方法包括以下步骤:检测得自哺乳动物的生物样品中根据第二方面的核酸序列,从而指示存在所述细菌。

[0042] 优选地,所述哺乳动物是人。

[0043] 在第十一方面中,本发明提供了用于检测脑膜炎奈瑟氏菌感染的试剂盒,所述试剂盒包含:根据第一方面的分离蛋白质;根据第二方面的分离核酸;和/或第六方面的抗体或抗体片段;和任选的一种或更多种其他试剂。

[0044] 在第十二方面中,本发明提供了包含以下的药物组合物:根据第一方面的分离蛋白质;根据第二方面的分离核酸;根据第三方面的基因构建体;根据第四方面的宿主细胞;和/或根据第六方面的抗体或抗体片段;和可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0045] 在一个实施方案中,所述药物组合物包含含有染色体整合的表达构建体的细菌。

[0046] 优选地,所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

[0047] 在另一个实施方案中,所述药物组合物包含外膜蛋白囊泡(OMV)中的分离蛋白质。

[0048] 合适地,所述药物组合物是免疫原性组合物。

[0049] 优选地,所述药物组合物是疫苗。

[0050] 在第十三方面中,本发明提供了一种预防或治疗哺乳动物的脑膜炎奈瑟氏菌感染的方法,所述方法包括以下步骤:将根据第一方面的分离蛋白质、根据第二方面的分离核酸、根据第三方面的基因构建体、根据第四方面的宿主细胞、根据第六方面的抗体或抗体片段和/或根据第十二方面的药物组合物施用于哺乳动物,从而预防或治疗所述哺乳动物的所述脑膜炎奈瑟氏菌感染。

[0051] 在一个实施方案中,所述方法施用包含染色体整合的表达构建体的细菌。

[0052] 优选地,所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

[0053] 在另一个实施方案中,所述方法施用外膜蛋白囊泡(OMV)中的分离蛋白质。

[0054] 优选地,上述方面的哺乳动物是人。

[0055] 贯穿完整本说明书,除非上下文另有要求,否则词语“包含”、“含有”和“包括”将被理解为意在包括所述的整体或整体群,但并不排除任何其他整体或整体群。

### 附图说明

[0056] 图1:与本发明分离蛋白质的一些实施方案相比的野生型 PorA 氨基酸序列的排列。粗体下划线表示 van der Ley 模型环(van der Ley 等,1991, Infect. Immun. 592963)。斜体表示 VR1 和 VR2。- 表示插入空格以实现比对。野生型 MC58 菌株 PorA 氨基酸序列(SEQ ID NO :1)、pPorDELL1(SEQ ID NO :2)、pPorDELL4(SEQ ID NO :3)、pPorDELL1-4(SEQ ID NO :4)、pPorDELL1-4-5(SEQ ID NO :5)、pDELVR1(SEQ ID NO :6)、pDELVR2(SEQ ID NO :7)、pDELVR1-2(SEQ ID NO :8)、pDELVR1-2-5(SEQ ID NO :9)、pDELVR1-2-5-6(SEQ ID NO :10)、pVR2-7(SEQ ID NO :11)、pVR2-8(SEQ ID NO :12)、pΔVR1VR2-7(SEQ ID NO :13)、pΔVR1VR2-8(SEQ ID NO :14)、pVR1-7VR2-8(SEQ ID NO :15)、pVR1-7VR2-8Δ5(SEQ ID NO :16)、pPOR7in1(SEQ ID NO :17)、pPor8in4(SEQ ID NO :18) 和 pPOR7in1,8in4(SEQ ID NO :19)。

[0057] 图2:(A) 本发明分离蛋白质的一些实施方案的氨基酸序列(SEQ ID NO :2-18, 参见图1)和编码核酸序列如下:pPorΔL1(SEQ ID NO :23)、pPorΔL4(SEQ ID NO :24)、pPorΔL1-4(SEQ ID NO :25)、pPorDEL1-4-5(SEQ ID NO :26)、pDELVR1(SEQ ID NO :27)、pDELVR2(SEQ ID NO :28)、pDELVR1-2(SEQ ID NO :29)、pDELVR1-2-5(SEQ ID NO :30)、pDELVR1-2-5-6(SEQ ID NO :31)、pVR2-7(SEQ ID NO :32)、pVR2-8(SEQ ID NO :33)、pΔVR1VR2-7(SEQ ID NO :34)、PΔVR1VR2-8(SEQ ID NO :35)、pVR1-7VR2-8(SEQ ID NO :36)、pVRi-7VR2-8Δ5(SEQ ID NO :37)、pPOR7in1(SEQ ID NO :38)、pPor8in4(SEQ ID NO :39) 和 pPOR7in1,8in4(SEQ ID NO :40)。还提供了野生型 MC58 菌株 porA 核苷酸序列(SEQ ID NO :44)。(B) 其中 VR1 和/或 VR2 区已缺失并且被保守的环7或环8氨基酸替换的本发明分离蛋白质的另一些实施方案的氨基酸序列和编码核酸。氨基酸序列 pVR1-7VR2-7(SEQ ID NO :20)、VR18VR28(SEQ ID NO :21) 氨基酸序列 pVR1-8VR2-7(SEQ ID NO :22)、DNA 序列 pVR1-7VR2-7(SEQ ID NO :41)、DNA 序列 pVR1-8VR2-8(SEQ ID NO :42) 和 DNA 序列 pVR1-8VR2-7(SEQ ID NO :43)。

[0058] 图3:(A) 在 VR1、VR2、SVR1 和 SVR2 中的一个或多个中存在不同序列的 MC58 和另

两种PorA野生型的部分氨基酸序列排列 (SEQ ID NO :85-87)。粗体下划线表示MC58PorA的van der Ley模型 (van der Ley等,1991,Infect. Immun. 592963)环。斜体表示MC58PorA的VR1和VR2。-指示插入空格以实现比对。比对下的\*表示在全部3种序列中相同的残基,而圆点表示序列之间的保守氨基酸。(B)来自菌株MC58、BZ133、BZ232和400的PorA序列与共有序列 (SEQ ID NO :1和88-90)的比对。环1、4、5、6、7和8突出显示并且如van der Ley等1991(见上)或者Derrick等1999(见上)的模型所述。在比对中,.表示与MC58PorA相同的序列,-表示序列比对中的缺口。在共有序列中,\*表示在全部这些序列中保守的氨基酸。:表示保守残基。·表示半保守残基。

[0059] 图4:PorA蛋白构建体的Western印迹检测。将脑膜炎奈瑟氏菌的脱氧胆酸盐OMV在预制的8-12% Novex聚丙烯酰胺凝胶上分离并用考马斯亮蓝染色(左图)或进行Western印迹(右图)。使用抗PorA多克隆抗体(Santa-Cruz Biotechnology Inc.)检测PorA。泳道1:分子量标志物(左侧指示表观大小,以kDa为单位)。泳道2:19 OMV,泳道3:9-FixOMV,泳道4:9-10MV,泳道5:1728-20MV,泳道6:027-3,泳道7:028-100MV,泳道8:145-50MV。表5中描述了菌株。

[0060] 图5:porA蛋白构建体的Western印迹检测。从不同PorA血清亚型及其同基因porA::tet突变体的四种菌株中通过十二烷基肌氨酸钠(sarkosyl)提取制备膜蛋白,通过电泳分离,然后进行考马斯亮蓝染色(上图)或western免疫印迹(下图)。通过10只来自菌株1728-2之脱氧胆酸盐OMV接种疫苗的小鼠的合并血清来检测Western印迹中的蛋白质。

[0061] 图6:用来自表达重组PorA构建体之菌株的OMV接种疫苗的小鼠血清的ELISA分析:检测对异源PorA的表面表位的交叉反应性。示出了实验1(A)和实验2(B)的几何平均效价数据(来自一式三份的孔)的倒数。

[0062] 发明详述

[0063] 应理解,本发明的核心是认识到,通过破坏野生型PorA蛋白中包含非保守氨基酸的表面环,免疫后可引发免疫应答,其通过使免疫应答针对保守表位序列,将提供对抗多种异源脑膜炎奈瑟氏菌菌株的保护。

[0064] 在一方面中,本发明提供了包含脑膜炎奈瑟氏菌PorA蛋白氨基酸序列的分离蛋白质,其中所述PorA蛋白的一个或更多个可变区被破坏,使得该分离PorA蛋白引发针对多种脑膜炎奈瑟氏菌菌株的免疫应答。合适地,所述PorA蛋白的可变区中的一个或更多个氨基酸通过包含一个或更多个PorA保守区或保守区氨基酸而被破坏(例如,与野生型PorA蛋白相比)。

[0065] 为了本发明的目的,“分离的”意指材料已从其天然状态移出或者已经受人为操作。分离的材料可大体上或基本上不含在天然状态下通常与其相伴随的组分,或者可经操作而与在其天然状态下通常与其相伴随的组分一起处于人工状态。分离的材料可以是天然或重组形式。

[0066] “蛋白质”意指氨基酸多聚体。所述氨基酸可以是本领域所公知的天然氨基酸或非天然氨基酸。

[0067] “肽”是具有不多于六十(60)个氨基酸的蛋白质。

[0068] 多肽是具有多于六十(60)个氨基酸的蛋白质。

[0069] 本文中的“破坏”意指虽然本发明的分离的蛋白质包含 PorA 蛋白的氨基酸序列（包括跨膜和 / 或胞内氨基酸序列），但是一个或多个可变区或可变区氨基酸至少部分或者完全缺失并且已被一个或多个保守区氨基酸替换，和 / 或所述一个或多个可变区在可变区氨基酸序列中存在或插入了一个或多个保守区氨基酸。

[0070] 合适地，所述可变区选自 VR1、VR2、SVR1 和 SVR2 区。优选地，所述分离的蛋白质中被破坏的可变区不由 VR1 和 / 或 VR2 区（例如 SEQ ID NO :2-4 中所述）的缺失组成。

[0071] 表 1 提供了本文所述可变区（即 VR1、VR2、SVR1、SVR2）和本文所述保守区与 PorA（例如，例如脑膜炎奈瑟氏菌菌株 MC58 野生型 PorA 蛋白的氨基酸序列；SEQ ID NO :1）的表面环或胞外环 1-8 的氨基酸序列比较。还参照图 3A 和 3B，其展示了脑膜炎奈瑟氏菌的多个菌株和血清型之间可变区氨基酸序列的多样性。参照 <http://pubmlst.org/neisseria/PorA/vr1.shtml> 和 <http://pubmlst.org/neisseria/PorA/vr2.shtml>，并且如 Russell 等，2004, Emerg Infect Dis. 10674-8 所述，更充分说明了 VR1 和 VR2 的可变性。因此，应理解，本发明适用于脑膜炎奈瑟氏菌任何菌株或血清型的 PorA。

[0072] 图 1 和 2 提供了本发明分离的蛋白质的一些具体实例（SEQ ID NO :5-22，或者优选 SEQ ID NO :11-22）。

[0073] 以上可变区中可变性最高的是 VR1 和 VR2。SVR1 和 SVR2 是半可变区，SVR1 包含的非保守氨基酸比 SVR2 多。因此，优选被破坏的可变区是 VR1 和 / 或 VR2 区。但是，在一些具体实施方案中，SVR1 被单独破坏或者与一个或多个其他可变区（如 VR1 和 / 或 VR2）一起被破坏。

[0074] 特别地，由图 3 和表 1 将明显看出，环 1、4、5 和 6 一般与本文所涉及的可变区相关。但是，应理解，VR1 是环 1 的非保守或可变子序列（例如，AQAANGGASGQVKVTKVTKA；SEQ ID NO :45）并且 VR2 是环 4 的非保守或可变子序列（例如，YYTKNTNNLTLVP；SEQ ID NO :46）。因此，除 VR1 和 / 或 VR2 破坏之外，本发明分离蛋白质可在环 1 和 / 或 4 中不是 VR1 和 VR2 一部分的一个或多个氨基酸处被破坏。

[0075] 相似地，除 SVR1 和 / 或 SVR2 破坏之外，本发明分离蛋白质可在环 1 和 / 或 6 中不是 SVR1 和 SVR2 一部分的一个或多个氨基酸处被破坏。

[0076] 在 Claudio 等，1998, Clin Diagn, Lab Immunol. 5845-855 中，根据菌株 MC50 的 PorA 基因（登录号 X12899）将 SVR1 和 SVR2 最初定义为 247 至 261 位（SVR1）和 299 至 302 位（SVR2）位氨基酸。本文所涉及的 van der Ley 模型具有环 6，如包含 LSENGDKAKTKNSTTE（SEQ ID NO :52；参见表 1）。根据图 3B 所示排列中这些其他残基中的一些中所看到的变化，SVR2 区通常（但不必然）可包含大多数而非所有的环 6 氨基酸，例如 ENGDKTKN（SEQ ID NO :91）。

[0077] 从以上应理解，在一个一般性实施方案中，本发明分离蛋白质中可缺失一个或多个完整的 PorA 可变区，或者可缺失一个或多个 PorA 可变区中的一个或多个氨基酸，其中一个或多个保守 PorA 氨基酸（例如环 2、3、7 和 / 或 8 的氨基酸）或者完整的保守环（例如环 2、3、7 和 / 或 8）有效替换缺失的可变区或可变区氨基酸。

[0078] 一些具体实施方案包括 SEQ ID NO :5-16 和 20-22 所述的氨基酸序列。一些优选实施方案包括 SEQ ID NO :11-16 和 20-22 所述的氨基酸序列。

[0079] 应理解，每个 VR1、VR2、SVR1 和 / 或 SVR2 区可独立地被操作为缺失（例如，SEQ ID

NO :5-10),被保守环 7 或 8 的氨基酸替换(例如,SEQ ID NO :11-16 和 20-22)。这种操作可以组合在一起,使得一个可变区可缺失而另一个可变区被保守环 7 或 8 的氨基酸替换(例如,SEQ ID NO :13&14),或者不同可变区可均被保守环 7 或 8 的氨基酸替换(例如,SEQ ID NO :15、16 和 20-22)。

[0080] 例如,多个可变区氨基酸可以是任何可变区(包括 VR1、VR2、SVR1 和 SVR2 在内)的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 25 个或更多个氨基酸。合适地,所述氨基酸是连续的。表 2 和表 3 和图 1 提供了一些具体实例。

[0081] 还例如,环 2、3、7 或 8 的多个保守氨基酸可以是这些环中任何一个的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个或更多个氨基酸。合适地,氨基酸是连续的。表 2 和表 3 和图 1 提供了一些具体实例。

[0082] 优选地,VR1 和 VR2 完全缺失,或者一个或多个 VR1 或 VR2 氨基酸缺失。在一些具体实施方案中,环 7 氨基酸替换整个 VR1 区和 / 或环 8 氨基酸替换整个 VR2 区(SEQ ID NO :11-16)。在另一些实施方案中,VR1 区缺失并且被保守的环 8 或环 7 氨基酸序列替换,和 / 或 VR1 区缺失并且被保守的环 7 或环 8 氨基酸序列替换(SEQ ID NO :20-22)。

[0083] 在另一个一般性实施方案中,一个或多个保守氨基酸(例如环 2、3、7 和 / 或 8 氨基酸)或整个保守环(例如环 2、3、7 和 / 或 8)插入到或以其他方式存在于 PorA 可变区(包括 VR1、VR2、SVR1 和 SVR2 在内)中。合适地,存在一个或更多个可变区中的氨基酸,其中所述保守环氨基酸存在于或插入到可变区氨基酸序列中。

[0084] 优选地,所述保守环氨基酸存在于或插入到 PorA 的 VR1 和 / 或 VR2 区中。一些具体实施方案包括 SEQ ID NO :17-19 所述的氨基酸序列。

[0085] 在一个替代实施方案中,所述 PorA 蛋白的一个或更多个可变区被破坏(例如,与野生型 PorA 蛋白相比)并且不包含一个或更多个 PorA 保守区或保守区氨基酸。SEQ ID NO :5-10 中提供了该替代实施方案的一些优选实例,其中一个或更多个可变区缺失并且未插入或存在一个或更多个 PorA 保守区或保守区氨基酸。

[0086] 还应理解,虽然图 1(SEQ ID NO :1) 和表 1 涉及脑膜炎奈瑟氏菌菌株 MC58,但是本发明可对脑膜炎奈瑟氏菌的任何菌株实施。更特别地,本发明分离蛋白质可包含多种不同脑膜炎奈瑟氏菌菌株的氨基酸序列。例如,包含基本来源于或对应于脑膜炎奈瑟氏菌菌株 M1336PorA(基因库登录号 AAF70297.1) 的氨基酸序列的 PorA 蛋白中可包含脑膜炎奈瑟氏菌菌株 2996PorA(基因库登录号 X60105.1) 的保守氨基酸。

[0087] 表 7 中提供了 PorA 蛋白构建体的总结。

[0088] 应理解,破坏一个或更多个可变区使得分离蛋白质保守氨基酸序列的免疫原性改变、修饰或以其他方式提高(相对于野生型或未破坏的 PorA 蛋白)。合适地,本发明分离蛋白质引发针对多种脑膜炎奈瑟氏菌菌株的免疫应答。

[0089] 本文使用的“引发免疫应答”指本发明分离蛋白质在其所施用的哺乳动物中能够产生免疫应答,其中所述应答针对脑膜炎奈瑟氏菌和 / 或所述蛋白质。优选地,所述免疫应答包括产生杀菌抗体。更优选地,所述免疫应答对脑膜炎奈瑟氏菌感染具有保护性。

[0090] 合适地,与由野生型 PorA 蛋白和 / 或没有破坏一个或更多个可变区的 PorA 蛋白引发的免疫应答相比,所述分离蛋白质引发的免疫应答的菌株特异性更低,或交叉反应性更大。

[0091] 本文上下文中使用的“菌株特异性”是指免疫应答针对或至少主要针对自体脑膜炎奈瑟氏菌菌株。

[0092] 本文使用的“交叉反应性”意指本发明分离蛋白质能够引发针对一种或更多种异源脑膜炎奈瑟氏菌菌株的免疫应答。

[0093] 本文使用的“交叉保护性”意指本发明分离蛋白质能引发免疫应答,从而提供对抗一种或更多种异源脑膜炎奈瑟氏菌菌株感染的保护。

[0094] 本发明还提供了本发明分离蛋白质的片段、同源物和衍生物,例如包含 SEQ ID NO :2-22(或优选 SEQ ID NO :11-22)中任一个所述的氨基酸序列。

[0095] 在一个实施方案中,蛋白质“片段”包含构成所述分离蛋白质的少于 100%,但至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或 90-99%的氨基酸序列。

[0096] 在另一个实施方案中,“片段”是长度为例如至少 6 个,优选至少 10、12、15 个,更优选至少 20 或 30 个氨基酸的肽。

[0097] 在一个优选实施方案中,所述片段包含本文所述被破坏的可变区的氨基酸序列。优选地,所述片段不由 VR1 和 / 或 VR2 区的缺失组成(例如 SEQ ID NO :2-4 所述)。

[0098] 肽片段可通过采用标准重组核酸技术得到或者使用常规液相或固相合成技术合成。例如,例如,可参照书名为“Synthetic Vaccines”的出版物(Nicholson 编辑,Blackwell Scientific Publications 出版)中包含的第九章(Atherton 和 Shephard,名为“Peptide Synthesis”)中所述的溶液合成或固相合成。或者,通过用蛋白酶(如 endoLys-C、endoArg-C、endoGlu-C 和葡萄球菌 V8-蛋白酶)消化本发明多肽可产生肽。消化片段可通过例如高效液相色谱(HPLC)技术进行纯化。

[0099] 还应理解,考虑了包含多个相同或不同片段的较大肽和多肽。

[0100] 合适地,本发明分离蛋白质的片段包含一个或更多个抗原决定簇或表位。优选地,所述抗原决定簇或表位能够引发针对多种脑膜炎奈瑟氏菌菌株的免疫应答。

[0101] 免疫原性片段可通过将所述片段施用于哺乳动物并检测哺乳动物的免疫应答来鉴定。这种应答包括产生特异性结合脑膜炎奈瑟氏菌和 / 或所述分离蛋白质、变体或衍生物的要害,和 / 或产生对抗脑膜炎奈瑟氏菌感染的保护性作用。

[0102] 任选地,在上述方法中测试具体片段的免疫原性之前,可使用多种预测性方法来推断具体片段是否可用于得到与天然抗原交叉反应的抗体。这些预测性方法可基于氨基末端或羧基末端序列,如例如 Ausubel 等,第 11.14 章(见上)所述。或者,这些预测性方法可基于亲水性预测,如例如 Kyte&Doolittle1982, J. Mol. Biol. 157:105 和 Hopp&Woods, 1983, Mol. Immunol. 20:483(通过引用并入本文)所述;或基于二级结构预测,如例如 Choo&Fasman,1978, Ann. Rev. Biochem. 47:251(通过引用并入本文)所述。

[0103] 此外,“表位作图”使用本发明抗体通过以下过程鉴定交叉反应性表位:首先测试其提供交叉保护的能力,然后鉴定所述抗体识别的表位。Coligan 等, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(见上)提供了一种示例性方法。

[0104] 本文使用的蛋白质“同源物”与本发明分离蛋白质具有可确定的核苷酸或氨基酸序列关系。合适地,与野生型 PorA 蛋白相比,所述同源物的可变区(例如, VR1、VR2、SVR1 和 / 或 SVR2)包含一个或更多个被破坏的氨基酸。

[0105] 合适地,所述同源物不是野生型 PorA 蛋白。优选地,所述变体不由 VR1 和 / 或 VR2

区的缺失组成（例如 SEQ ID NO :2-4 所述）。

[0106] 优选地，蛋白质同源物与本发明氨基酸序列具有至少 70% 或 75%，优选至少 80% 或 85% 或更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，本发明氨基酸序列包括但不限于 SEQ ID NO :5-22 或优选 SEQ ID NO :11-22 中任何一个所述的氨基酸序列。

[0107] 例如，这些同源物具有的氨基酸序列不同于本文示例的那些，但是具有免疫原性并且优选提供交叉保护性免疫。

[0108] 本文使用的术语“同源物”包括变体蛋白质。本文使用的本发明“变体”蛋白质的一个或多个氨基酸缺失或者被替换为不同氨基酸。本领域公认的是，一些氨基酸可在不改变多肽免疫原性活性的情况下被替换或缺失（保守替换）。

[0109] 通过引入保守性较低的替换或缺失（非保守替换）可使免疫原性有更显著的改变。

[0110] 术语“变体”还包括由等位基因变体的氨基酸序列产生或者包含该氨基酸序列的本发明分离蛋白质。

[0111] 本文中一般用于描述各个蛋白质及核酸之间序列关系的术语包括“比较窗（comparison window）”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“实质同源性”。因为各个核酸/蛋白质可各自包含（1）核酸/蛋白质共有的完全核酸/蛋白质序列中的一个或多个部分，和（2）核酸/蛋白质之间不同的一个或多个部分，所以序列比较通常如下进行：在“比较窗”中比较序列，从而鉴定和比较局部区域的序列相似性。“比较窗”指与参照序列相比，通常 6、9 或 12 个连续残基的概念性片段。比较窗可包括与参照序列相比约 20% 或更少的添加或缺失（即缺口），以实现与相应序列的最佳比对。用于比对比较窗的最佳序列比对可通过计算机执行算法（Intelligenetics 的 Geneworks 程序；Wisconsin Genetics 软件包版本 7.0 中的 GAP, BE STFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA, 通过引用并入本文）进行，或者通过观察和选定的多种方法中任何一种来产生的最佳比对（即，在比较窗中产生最高百分比同源性）进行。还可参照例如 Altschul 等, 1997, Nucl. Acids Res. 253389（通过引用并入本文）公开的程序 BLAST 家族进行。在 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel 等编著（John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999）的第 19.3 单元中可发现序列分析的详细讨论。

[0112] 本文使用的术语“序列同一性”以其最广泛含义使用，包括考虑到使用标准算法进行的合适比对、比较窗中的同一性程度的精确核苷酸或氨基酸匹配数。因此，“序列同一性百分比”通过以下来计算：在比较窗中比较两个最佳比对的序列，确定两条序列中出现相同核酸碱基（如 A、T、C、G、I）位置的数目以得到匹配位置的数目，用匹配位置数目除以比较窗中总位置数目（即，窗大小），然后将结果乘以 100 以得到序列同一性百分比。例如，“序列同一性”可理解为意指通过 DNASIS 计算机程序（Windows 为 2.5 版本，得自于 Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA）计算的“匹配百分比”。

[0113] 因此，技术人员完全有能力通过重组 DNA 技术制备本发明蛋白质和核酸同源物，例如以上定义的变体。例如，本发明核酸可使用随机诱变（例如使用转座子诱变）或者定点诱变进行突变。然后所得 DNA 片段被克隆到合适的表达宿主（例如大肠杆菌）中。

[0114] 本文使用的“衍生物”蛋白质已通过以下方法改变：例如，通过与另一些化学部分缀合或复合，通过翻译后修饰（例如磷酸化、乙酰化等）、糖基化修饰（例如，添加、移除或改变糖基化）和 / 或包含本领域理解的另外的氨基酸序列。

[0115] 另外的氨基酸序列可包括产生融合蛋白的融合伴侣氨基酸序列。例如，融合伴侣氨基酸序列可有助于所述分离的融合蛋白的检测和 / 或纯化。非限制性实例包括金属结合（如多组氨酸）融合伴侣、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、蛋白 A、谷胱甘肽-S- 转移酶 (GST)、荧光蛋白序列（如 GFP）、表位标签（如 myc、FLAG 和血凝素标签）。

[0116] 另一些衍生物包括具有可与基于寡糖的疫苗组分相融合的多肽的分离蛋白质，其中所述多肽充当载体蛋白。

[0117] 本发明考虑的另一些衍生物包括但不限于，修饰侧链，在肽、多肽或蛋白质合成期间并入非天然氨基酸和 / 或其衍生物，和使用交联剂和其他方法在本发明多肽、片段和变体上施加构象限制。

[0118] 本发明的另一方面提供了编码本发明分离蛋白质（包括分离蛋白质的片段变体和衍生物在内）的分离核酸。

[0119] 本文使用的术语“核酸”指单链或双链 DNA 和 RNA。DNA 包括基因组 DNA 和 cDNA。RNA 包括 mRNA、RNA、RNAi、siRNA、cRNA 和自催化 RNA。核酸也可以是 DNA-RNA 杂交体。核酸包含通常含有 A、G、C、T 或 U 碱基的核苷酸的核苷酸序列。但是，核苷酸序列可包括另一些碱基，例如肌苷、甲基胞嘧啶、甲基肌苷、甲基腺苷和 / 或硫脲核苷，但不限于此。

[0120] “多核苷酸”是具有八十 (80) 个或更多个连续核苷酸的核酸，而“寡核苷酸”具有少于八十 (80) 个连续核苷酸。

[0121] “探针”可以是为了例如在检测 Northern 或 Southern 印迹中检测互补序列而被合适标记的单链或双链寡核苷酸或多核苷酸。

[0122] “引物”通常是单链寡核苷酸，优选具有 15-50 个连续核苷酸，其能够退火至互补核酸“模板”上，通过 DNA 聚合酶（如 Tag 聚合酶、RNA 依赖性 DNA 聚合酶或 Sequenase™）以模板依赖性方式延伸。

[0123] 本发明分离核酸的一些具体实施方案包含图 2 所述的核苷酸序列 (SEQ ID NO : 26-43)。

[0124] 优选地，所述分离核酸包含 SEQ ID NO :32-43 中任何一个所述的核苷酸序列。

[0125] 本发明的另一具体方面提供了编码本发明分离蛋白质的分离核酸同源物。

[0126] 在一个实施方案中，核酸同源物编码本发明分离蛋白质的同源物或变体。

[0127] 合适地，核酸同源物不编码脑膜炎奈瑟氏菌的野生型 PorA 蛋白。优选地，核酸同源物包含编码 PorA 中一个或更多个被破坏可变区的核苷酸序列，如本文所述。

[0128] 在另一个实施方案中，核酸同源物与本发明分离核酸（例如，图 2 中举例说明的和 / 或 SEQ ID NO :26-43，或优选 SEQ ID NO :32-43）具有至少 60% 或 65%，优选至少 70% 或 75%，更优选至少 80% 或 85%，甚至更优选至少 90% 或 95% 的核苷酸序列同一性。

[0129] 在又一个实施方案中，在至少低严格度条件下，优选在至少中度严格度条件下，更优选在高严格度条件下，核酸同源物与本发明分离核酸（例如图 2 中举例说明的和 / 或 SEQ ID NO :26-43，或优选 SEQ ID NO :32-43）杂交。

[0130] 本文使用的“杂交”指使至少部分互补的核苷酸序列配对以产生 DNA-DNA、RNA-RNA

或 DNA-RNA 杂交体。包含互补核苷酸序列的杂交体序列通过本领域所公知的互补嘌呤和嘧啶之间的碱基配对发生。

[0131] 就这一点而言,应理解修饰嘌呤(例如,肌苷、甲基肌苷和甲基腺苷)和修饰嘧啶(硫脲核苷和甲基胞嘧啶)也可参加碱基配对。

[0132] 本文使用的“严格度”指温度和离子强度条件,以及在杂交期间是否存在某些有机溶剂和/或去污剂。严格度越高,杂交核苷酸序列之间所需的互补性水平越高。

[0133] “高严格度条件”指仅有具有高频率互补碱基的核酸会杂交的那些条件。本文涉及的高严格度条件包括并涵盖:-

[0134] (i) 在 42°C 下至少约 31% v/v 至至少约 50% v/v 的甲酰胺和至少约 0.01M 至至少约 0.15M 的盐用于杂交,以及在 42°C 下至少约 0.01M 至至少约 0.15M 的盐用于清洗;

[0135] (ii) 在 65°C 下 1% BSA、1mM EDTA、0.5M NaHPO<sub>4</sub>(pH7.2)、7% SDS 用于杂交,和在超过 65°C 的温度下 (a) 0.1×SSC, 0.1% SDS; 或 (b) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaHPO<sub>4</sub>(pH7.2)、1% SDS 用于清洗约 1 小时;和

[0136] (iii) 在 68°C 或 68°C 以上 0.2×SSC, 0.1% SDS 用于清洗约 20 分钟。

[0137] 一般来说,清洗在  $T_m = 69.3 + 0.41(G+C)\%$  -12°C 下进行。一般来说,错配碱基数目每增加 1%, 双螺旋 DNA 的  $T_m$  降低约 1°C。

[0138] 尽管如此,但是严格度条件也为本领域所公知,例如 Ausubel 等(见上)的第 2.9 和 2.10 章中描述的。本领域技术人员还认识到,可对多种因素进行操作以优化杂交特异性。最终清洗的严格度的优化可起到确保高杂交程度的作用。

[0139] 通常,通过印迹技术鉴定互补核苷酸序列,所述印迹技术包括将核苷酸固定化到基质(优选合成膜,如硝酸纤维素)上的步骤,杂交步骤,和通常使用标记探针或其他互补核酸的检测步骤。Southern 印迹用于鉴定互补 DNA 序列;northern 印迹用于鉴定互补 RNA 序列。斑点印记(dot blotting)和狭缝印迹(slot blotting)可用于鉴定互补 DNA/DNA、DNA/RNA 或 RNA/RNA 多核苷酸序列。这些技术为本领域技术人员所公知,并且已在 Ausubel 等(见上)的第 2.9.1 至 2.9.20 页中进行描述。根据这些方法,Southern 印迹包括:通过凝胶电泳根据大小分离 DNA 分子,将经大小分离的 DNA 转移至合成膜,以及使与膜结合的 DNA 与互补核苷酸序列杂交。当在 cDNA 或基因组 DNA 文库中鉴定互补核酸时,使用替代的印迹步骤,例如通过菌斑杂交或菌落杂交。在 Sambrook 等(见上)的第 8-12 章中描述了该方法的另一些典型实例。

[0140] 用于检测杂交至固定化核酸的标记核酸的方法为本领域技术人员所公知。这些方法包括放射自显影、化学发光、荧光和比色检测。

[0141] 核酸也可被分离、检测和/或进行使用核酸序列扩增技术实现的重组 DNA 技术。

[0142] 合适的核酸扩增技术为技术人员所公知,其包括聚合酶链反应(PCR)、链置换扩增(SDA)、滚环复制(RCR)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、Q-β 复制酶扩增和螺旋酶依赖性扩增,但是并不限于此。

[0143] 本文使用的“扩增产物”指由核酸扩增产生的核酸产物。

[0144] 核酸扩增技术可包括具体的定量和半定量技术,例如本领域公知的 qPCR、实时 PCR 和竞争 PCR。

[0145] 本发明的又一方面提供了包含本发明分离核酸和一种或更多种另外的核苷酸序

列的基因构建体。

[0146] 合适地,所述基因构建体的形式为本领域公知的质粒、噬菌体、粘粒、酵母或细菌人工染色体,或者包含它们的遗传组分。

[0147] 基因构建体可适合用于在细菌或其他宿主细胞中维持并扩增分离核酸,用于通过重组 DNA 技术操作和 / 或表达本发明核酸或编码蛋白质。

[0148] 为了进行宿主细胞表达,所述基因构建体是表达构建体。合适地,所述表达构建体包含本发明核酸,所述本发明核酸与一种或更多种表达载体中另外的序列有效连接。表 2 和表 3 中提供了表达构建体的一些非限制性实例。

[0149] “表达载体”可以是自主复制的外染色体载体 (extra-chromosomal vector) (例如质粒) 或整合到宿主基因组中的载体。

[0150] “有效连接”指所述另外的核苷酸序列相对于本发明核酸被定位成引发、调节或以其他方式控制转录。

[0151] 在一个实施方案中,所述另外的核苷酸序列是调控序列。调控核苷酸序列一般适合于用于表达的宿主细胞。本领域已知多种适当的表达载体和合适的调控序列用于多种宿主细胞。

[0152] 通常,所述一种或更多种调控核苷酸序列可包括但不限于,启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录启动和终止序列、翻译启动和终止序列和增强子或激活子序列。

[0153] 本发明考虑了本领域已知的组成型或诱导型启动子。所述启动子可以是天然启动子,或将多于一种启动子元件组合在一起的杂合启动子。

[0154] 在另一个实施方案中,所述另外的核苷酸序列是允许选择转化宿主细胞的选择标记基因。选择标记基因为本领域所公知并且可随所使用的宿主细胞改变而改变。

[0155] 另外的核苷酸序列的一个具体实施方案包含修饰的多聚 G 序列。野生型 porA 基因在其启动子中具有多聚 G 区段 (tract), 其在菌株内和菌株之间可变,从而引起可变表达水平。为了确保本发明分离蛋白质的一致表达,可对多聚 G 区段进行修饰以减少变化,因为 G<sub>11</sub> 与 PorA 的最佳表达有关。为了减少多聚 G 区段中的改变,可对其进行修饰使得它被替换为 G<sub>5</sub>AG<sub>5</sub>。

[0156] 所述表达构建体还可包含编码融合伴侣的另外的核苷酸序列 (通常由表达载体提供),使得本发明重组多肽表达为前文所述的融合蛋白。

[0157] 所述表达构建体还可包含一种或更多种有助于表达构建体中的分离核酸同源重组到细菌基因组中的另外的核苷酸序列。仅举例说明,脑膜炎奈瑟氏菌的内源性 porA 基因可被替换为外源性核苷酸序列 (例如, pLK6 的 LacZ-Kan<sup>r</sup> 盒; Szabo 等, 1992, J. Bacteriol 174:7245-7252) 或 pJJ260 的 sacB-Kan<sup>r</sup>-Tef<sup>r</sup> 盒 (Neil 等, 2009, Infect Immun. 77:2285-2293), 所述外源性核苷酸序列使得能够选择转化体并与包含本发明分离核酸和另外的核苷酸序列 (例如, pLK6 的 LacZ-Kan<sup>r</sup> 盒或 pJJ260 的 sacB-Kan<sup>r</sup>-Tef<sup>r</sup> 盒) 的表达构建体同源重组。另一些同源重组方法为本领域技术人员所公知。

[0158] 为了通过亲和色谱纯化融合多肽的具体目的,用于亲和色谱的相关基质分别是谷胱甘肽、淀粉糖、和镍或钴缀合树脂。许多这样的基质可以以“试剂盒”形式使用,例如与 (HIS<sub>6</sub>) 融合伴侣使用的 QIAexpress™ 系统 (Qiagen) 和 Pharmacia GST 纯化系统。

[0159] 优选地,所述融合伴侣还具有蛋白酶切割位点,例如 X<sub>a</sub> 因子或凝血酶,其允许相关蛋白酶部分地消化本发明融合多肽,从而从其中释放本发明重组多肽。然后可通过后续的色谱分离将释放的多肽与融合伴侣分离。

[0160] 本发明分离蛋白质(包括片段、衍生物和同源物在内)可通过本领域技术人员已知的任何合适方法来制备。优选地,所述分离蛋白质是重组蛋白质。

[0161] 仅举例说明,本发明重组分离蛋白质可通过包括以下步骤的方法来产生:

[0162] (i) 制备表达构建体,其包含与一种或更多种调控核苷酸序列有效连接的本发明分离核酸;

[0163] (ii) 用该表达构建体转染或转化合适的宿主细胞;

[0164] (iii) 在所述宿主细胞中表达重组蛋白;以及

[0165] (iv) 分离所述重组蛋白与所述宿主细胞。

[0166] 用于表达的合适宿主细胞可以是原核或真核的。例如,合适宿主细胞可以是哺乳动物细胞、植物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或细菌细胞。用于表达本发明分离蛋白质的一种优选宿主细胞是细菌。所用细菌可以是大肠杆菌或脑膜炎奈瑟氏菌。

[0167] 在一个优选实施方案中,所述宿主细胞是脑膜炎奈瑟氏菌。优选地,脑膜炎奈瑟氏菌宿主细胞被修饰成不表达内源性 PorA、Opa、Opc 或荚膜多糖并且表达期望的脂多糖表型。

[0168] 将基因构建体引入宿主细胞(无论是原核还是真核)为本领域所公知,如例如 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Ausubel 等编著(John Wiley&Sons, Inc. 1995-2009),特别是第 9 和 16 章中所述。关于脑膜炎奈瑟氏菌的转化,这些方法为本领域所公知。还应理解,脑膜炎奈瑟氏菌是“天然”可转化的。

[0169] 本领域技术人员可使用标准方法便利地制备重组蛋白,所述标准方法如例如 Sambrook 等, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989),特别是第 16 和 17 部分;CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Ausubel 等编著(John Wiley&Sons, Inc. 1995-2009),特别是第 10 和 16 章中;和 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE. Coligan 等编著(John Wiley&Sons, Inc. 1995-2009),特别是第 1、5 和 6 章中所述。

[0170] 本发明还提供了针对本文所公开的分​​离蛋白质、片段、同源物和衍生物产生并且与其结合的抗体和/或抗体片段。合适地,所述抗体和/或抗体片段不结合野生型 PorA 蛋白。优选地,所述抗体和/或抗体片段特异性结合被破坏的 PorA 可变区(例如,VR1、VR2、SVR1 或 SVR2 区)并且不结合野生型 PorA 可变区(例如,VR1、VR2、SVR1 或 SVR2 区)。

[0171] 抗体可以是多克隆的或单克隆的,天然的或重组的。例如,在 Coligan 等,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(John Wiley&Sons NY, 1991-1994) 的第 2 章和 Harlow, E. & Lane, D. Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988(两篇均通过引用并入本文)中可发现适用于抗体生产、纯化和使用的公知方案。

[0172] 一般来说,本发明抗体与本发明分离蛋白质、片段、同源物或衍生物结合或缀合。例如,所述抗体可以是多克隆抗体。例如,可通过将本发明分离蛋白质、片段、同源物或衍生物注射到生产物种(可包括小鼠或兔子)中以得到多克隆抗血清来制备这种抗体。生

产多克隆抗体的方法为本领域技术人员所公知。例如,在 Coligan 等, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(见上)和 Harlow, E. & Lane, 1988(见上)中描述了可使用的示例性方法。

[0173] 单克隆抗体可使用标准方法来产生,如例如 **Köhler** & Milstein, 1975, Nature 256, 495 的文章(通过引用并入本文)中所述,或者通过其最近的修改方法,如例如 Coligan 等, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(见上)中所述,通过使来源于生产物种的脾或其他抗体生产细胞永生化来进行,所述生物物种已用一种或更多种本发明分离蛋白质、片段、同源物或衍生物接种。

[0174] 本发明在其范围内还包括抗体片段,例如以上提及的多克隆或单克隆抗体的 Fc、Fab 或 F(ab)<sub>2</sub> 片段。或者,所述抗体或抗体片段可包括针对本发明肽的单链 Fv 抗体(scFv)。例如,根据美国专利 No 5, 091, 513、欧洲专利 No 239, 400 或 Winter & Milstein, 1991, Nature 349 293 的文章中分别描述的方法,可制备这种 svFv。

[0175] 抗体和抗体片段可用于针对脑膜炎奈瑟氏菌感染的被动免疫。优选地,所述抗体具有杀菌性。

[0176] 抗体和抗体片段可用于前文所述的表位作图。

[0177] 本发明抗体和抗体片段可用于亲和色谱。例如,可参照 Coligan 等, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 第 9.5 章(见上)中描述的免疫亲和色谱方法。

[0178] 抗体和抗体片段可用于检测脑膜炎奈瑟氏菌细菌和 / 或脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白。

[0179] 在一方面中,一种检测哺乳动物的脑膜炎奈瑟氏菌的方法包括以下步骤:-

[0180] (i) 使本发明抗体或抗体片段与得自于哺乳动物的生物样品合并;以及

[0181] (ii) 确定所述样品中是否存在包含所述抗体或抗体片段与脑膜炎奈瑟氏菌细菌和 / 或脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白的复合物,其中所述复合物存在指示所述脑膜炎奈瑟氏菌细菌。

[0182] 生物样品中是否存在脑膜炎奈瑟氏菌细菌可通过以下方法来确定:从哺乳动物中得到生物样品,将上述抗体或抗体片段与生物样品混合,检测指示样品中脑膜炎奈瑟氏菌细菌存在的特异性结合抗体或抗体片段。通常,所述特异性结合的抗体或抗体片段与生物样品中的脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白形成复合物。

[0183] 合适地,所述脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白衍生自或来源于感染所述哺乳动物的脑膜炎奈瑟氏菌细菌。

[0184] 本文使用的术语“生物样品”指可从个体(如患者)中提取、未处理、处理、稀释或浓缩的样品。合适地,所述生物样品选自全血、血清、血浆、唾液、尿、汗、腹水、腹膜液、滑液、羊水、脑脊液、皮肤活检等。

[0185] 在另一方面中,一种检测生物样品中针对脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白的抗体的方法包括以下步骤:-

[0186] (i) 使得自于哺乳动物的生物样品与本发明分离蛋白质(例如,根据 SEQ ID NO: 2-22 或优选 SEQ ID NO: 11-22)相接触;以及

[0187] (ii) 确定所述样品中是否存在包含所述分离蛋白质与抗脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 抗体的复合物。

[0188] 合适地,所述抗脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 抗体是应答于脑膜炎奈瑟氏菌细菌感染哺

乳动物而引发的内源性抗体。

[0189] 可使用用于蛋白质检测的任何合适技术,其包括免疫测定、蛋白质阵列(包括蛋白质原位阵列、DNA-蛋白质阵列和核酸可编程阵列和二维(2D)表达谱),但是并不限于此。免疫测定可包括但不限于本领域技术人员所公知的免疫印迹、Western 印迹和斑点印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和免疫色谱技术(ICT)。例如,可参照 Coligan 等,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY(见上)的第7章,其公开了可根据本发明使用的多种免疫测定。免疫测定可包括本领域理解的竞争性测定。

[0190] 在一个优选实施方案中,通过用标记修饰所述分离蛋白质、片段、同源物或衍生物或者所述抗体或抗体片段来实现检测。一个实施方案在免疫测定中使用标记蛋白质、片段、同源物或衍生物来检测脑膜炎奈瑟氏菌特异性抗体。另一个实施方案在免疫测定中使用标记抗体或抗体片段来检测 PorA 蛋白。

[0191] 关于抗体和抗体片段,所述标记可包括以下:

[0192] (A) 将标记与抗体或抗体片段直接连接;

[0193] (B) 将标记与抗体或抗体片段间接连接;即,标记与另一种试剂(例如二抗)连接,后者进而与抗体或抗体片段结合;和

[0194] (C) 与抗体或抗体片段的后续反应产物连接。

[0195] 所述标记可选自色素原(chromogen)、催化剂、酶、荧光团、化学发光分子、镧系离子(如铕  $\text{Eu}^{34}$ )、放射性同位素和直接可视标记。在直接可视标记的情况下,可使用胶体金属或非金属颗粒、染料颗粒、酶或底物、有机聚合物、胶乳颗粒、脂质体或其他包含信号产生物质的囊泡等。

[0196] 用于本发明的酶标记的非限制性实例包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶等,所述酶标记可单独使用或与溶液中的第二酶组合使用。

[0197] 荧光团的非限制性实例包括异硫氰酸荧光素(FITC)、别藻蓝素(APC)、荧光素衍生物(如 FAM 和 ROX)、德克萨斯红(Texas Red)、四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITL)、R-藻红蛋白(RPE)、Alexa 和 Bodipy 荧光团,但是并不限于此。

[0198] 本发明还提供了一种检测生物样品中抗脑膜炎奈瑟氏菌抗体(例如,杀菌抗体)的方法。

[0199] 在一方面中,提供了一种检测针对脑膜炎奈瑟氏菌的杀菌抗体的方法,其包括以下步骤:-

[0200] (i) 使得自于经本发明分离蛋白质(例如,根据 SEQ ID NO:2-22 或优选 SEQ ID NO:11-22)免疫之哺乳动物的生物样品与脑膜炎奈瑟氏菌相接触;以及

[0201] (ii) 确定所述样品中是否存在所述杀菌抗体。

[0202] 通常,所述杀菌抗体应答于分离蛋白质的免疫而引发。下文实施例中提供了检测杀菌抗体的杀菌测定的一个实例。

[0203] 在另一个一般性方面中,本发明提供了基于核酸的检测方法。

[0204] 在一个实施方案中,一种检测生物样品中脑膜炎奈瑟氏菌细菌的方法包括以下步骤:从患者中分离生物样品,并且使用本发明分离核酸来检测样品中编码 PorA 蛋白的核酸序列。核酸的检测可使用任何合适技术进行。例如,如本领域所公知,本发明的标记核酸可

作为探针用于得自于患者的核酸提取物的 Southern 印迹。

[0205] 或者,本发明的标记核酸可作为探针用于患者的 RNA 或 eDNA 提取物的 Northern 印迹。优选地,将患者的核酸提取物与对应于本发明核酸序列有义序列和反义序列的寡核苷酸引物配合使用,通过核酸扩增技术(如 PCR),从而产生扩增产物。扩增产物可通过多种技术中的任何一种进行检测,例如通过上文所述的探针杂交。

[0206] 多种自动化固相检测技术也适用于检测核酸。这些技术包括本领域公知的超大规模固定化引物阵列(VLSIPS™)、PCR 扩增产物的基于磁珠的捕获和核酸阵列。

[0207] 本发明还提供了用于检测脑膜炎奈瑟氏菌感染的试剂盒。所述试剂盒可包含一种或更多种用于检测生物样品中脑膜炎奈瑟氏菌细菌、内源性脑膜炎奈瑟氏菌 PorA 蛋白或编码核酸、或抗体的检测剂。根据所采用测试方法的性质,所述试剂盒包含一种或更多种上述的具体检测剂。在这一点上,所述试剂盒可包含本发明分离蛋白质、片段、同源物、衍生物、抗体、抗体片段或核酸(例如,引物或探针)中的一种或更多种。如上文所述,这些物质的任何一种或更多种可被标记。根据所采用的检测方法,所述试剂盒还可任选地包含一种或更多种其他试剂,例如检测试剂(如标记的二抗、用于比色或生物性发光检测的酶和/或底物)、阳性和/或阴性对照、清洗液、稀释缓冲液、蛋白质或核酸大小标记、DNA 聚合酶、DNA 连接酶、Taq 聚合酶等。

[0208] 本发明的另一些方面提供了用于治疗哺乳动物脑膜炎奈瑟氏菌感染的预防性和治疗性方法和/或药物组合物。

[0209] 在一个具体方面中,预防或治疗哺乳动物脑膜炎奈瑟氏菌感染的方法包括向哺乳动物施用免疫原性剂的步骤,所述免疫原性剂选自:

[0210] (i) 本发明的分离蛋白质(例如,根据 SEQ ID NO :2-22 或优选 SEQ ID NO :11-22),包括其同源物、衍生物和片段;

[0211] (ii) 本发明的分离核酸(例如,SEQ ID NO :23-43 或优选 SEQ ID NO :32-43),包括其同源物、衍生物和片段;

[0212] (iii) 编码(ii)的分离核酸的表达构建体;

[0213] (iv) 包含(iii)的表达构建体的宿主细胞;

[0214] (v) 与本发明分离蛋白质结合的抗体或抗体片段;和/或

[0215] (vi) 包含(i)-(v)中一种或更多种,从而预防或治疗所述哺乳动物的所述脑膜炎奈瑟氏菌感染的药物组合物。

[0216] 合适地,所述免疫原性剂在所述哺乳动物中引发免疫应答,其与由野生型 PorA 蛋白和/或没有一个或更多个被破坏可变区的 PorA 蛋白引发的免疫应答相比菌株特异性更低,或交叉免疫性更高。优选地,所引发的免疫应答是保护性免疫应答。

[0217] 优选地,所述哺乳动物是人。

[0218] 在一个具体的优选实施方案中,本发明分离蛋白质(包括其同源物、衍生物和片段)存在于 OMV 中。

[0219] 制备 OMV 疫苗有许多公知方法,例如,如 Frasch, C, L. van Alphen 等.(2001). Outer Membrane Protein Vesicle Vaccines for Meningococcal Disease. Meningococcal Vaccines :Methods and Protocols. A. Pollard and M. Maiden 编著, Humana Press. 66 : 81-107 中所述。

[0220] 在另一个具体的优选实施方案中,本发明分离蛋白质(包括其同源物、衍生物和片段)由包含染色体整合的表达构建体的细菌表达。优选地,所述细菌是脑膜炎奈瑟氏菌。

[0221] 合适地,所述药物组合物包含可药用载体、稀释剂或赋形剂。

[0222] “可药用载体、稀释剂或赋形剂”指可安全用于全身施用的固体或液体填充剂、稀释剂或封装物质。根据具体的施用途径,可使用本领域公知的多种载体。这些载体可选自糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、海藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳化剂、等渗盐水和盐(如矿物盐,包括盐酸盐、溴化物和硫酸盐)、有机酸(如乙酸盐、丙酸盐和丙二酸盐)和无热原水。

[0223] 一篇描述可药用载体、稀释剂和赋形剂的有用文献是 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N. J. USA, 1991), 其通过引用并入本文。

[0224] 任何安全的施用途径可用于施用本发明免疫原性剂。例如,可采用经口、直肠、肠胃外、舌下、口含、静脉内、关节内、肌内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹膜内、脑室内、透皮等。例如,肌内和皮下注射适用于施用免疫原性组合物、疫苗和 DNA 疫苗。

[0225] 剂型包括片剂、分散体、悬液、注射剂、溶液、糖浆剂、锭剂、胶囊、栓剂、气雾剂、透皮贴剂等。这些剂型还可包括特别设计成具体用于该目的的注射或植入控制释放装置或者经修饰而额外发挥这种作用的其他形式的植入物。例如,可用例如疏水聚合物包被治疗剂来实现所述治疗剂的控制释放,所述疏水聚合物包括丙烯酸树脂、蜡、高碳脂肪醇、聚乳酸和聚乙醇酸和某些纤维素衍生物(如羟丙甲纤维素)。此外,可通过使用其他聚合物基质、脂质体和/或微球来实现控制释放。

[0226] 适用于口服或肠胃外施用的本发明药物组合物可呈现为离散单元(如胶囊、小袋或片剂,其各自包含预定量的一种或更多种本发明治疗剂),粉末或颗粒,或者水性液体、非水性液体中的溶液或悬液、水包油乳液或油包水液体乳液。这些组合物可使用制药业方法中的任何一种来制备,但是所有的方法都包括将一种或更多种上述免疫原性剂与构成一种或更多种必需成分的载体结合的步骤。一般来说,所述组合物通过以下过程制备:使本发明免疫原性剂与液体载体或细小固体载体或二者均匀并密切混合,然后,如果需要,则使产物成形为期望外观。

[0227] 可以以与剂型配方相容的方式和免疫原性有效的这种量施用上述组合物,以使患者免于脑膜炎奈瑟氏菌感染或治疗已有的感染。在本发明上下文中,施用于患者的剂量应足以随时间在患者中产生有益应答,例如降低脑膜炎奈瑟氏菌水平,或抑制脑膜炎奈瑟氏菌感染。待施用免疫原性剂的量可取决于待治疗对象,包括其年龄、性别、体重和一般健康状况。在这一点上,施用所需免疫原性剂的确切量取决于医师的判断。

[0228] 在确定治疗或预防脑膜炎奈瑟氏菌中待施用免疫原性药剂的有效量时,医生可评价循环血浆水平、疾病进展和抗脑膜炎奈瑟氏菌抗体的产生。无论如何,本领域技术人员都可容易地确定本发明免疫原性剂的合适剂量。该剂量可以是约几纳克至几毫克的本发明免疫原性剂。

[0229] 在一些具体实施方案中,本发明免疫原性剂可以以治疗性或预防性疫苗施用。因此,本发明延伸至涉及生产包含一种或更多种本发明免疫原性剂作为活性物质的疫苗。关于生产这样疫苗考虑了多种可用方法。示例性方法包括,例如 NEW GENERATION

VACCINES(1997, Levine 等, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel Hong Kong) 所述的那些方法,其通过引用并入本文。

[0230] 本发明免疫原性剂可与其他抗原(包括其他抗原的 B 或 T 细胞表位)混合、缀合或融合。此外,它可与下述载体缀合。

[0231] 当使用本发明半抗原肽(即,与相应抗体反应,但自身不可引发免疫应答的肽)时,其可与免疫原性载体缀合。有用的载体为本领域所公知并且包括例如:甲状腺球蛋白;白蛋白,如人血清白蛋白;来自破伤风、白喉百日咳、假单胞菌(*Pseudomonas*)、大肠杆菌、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和链球菌(*Streptococcus*)毒素的毒素,类毒素或任何突变的交叉反应性材料(crossreactive material, CRM);聚氨基酸,如聚(赖氨酸:谷氨酸);流感病毒;轮状病毒 VP6、细小病毒 VP1 和 VP2;乙型肝炎病毒核心蛋白;乙型肝炎病毒重组疫苗等。或者,可使用载体蛋白或其他免疫原性蛋白质的片段或表位。例如,本发明半抗原肽可与细菌毒素、类毒素或 CRM 的 T 细胞表位偶联。在这一点上,可参照美国专利 No5, 785, 973。

[0232] 本发明免疫原性剂可以与脑膜炎奈瑟氏菌抗原或其他生物体(包括病原菌流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)、卡他莫拉菌(*M. catarrhalis*)、淋病奈瑟氏菌(*N. gonorrhoeae*)、大肠杆菌、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)等)的抗原组合作为多价亚单元疫苗施用。或者或另外,它们可与脑膜炎奈瑟氏菌的寡糖或多糖组分配合施用。

[0233] 疫苗和其他免疫原性组合物可包含本领域所公知的佐剂。本发明考虑的佐剂包括但不限于:表面活性物质,例如十六烷基胺、十八烷基胺、十八烷基氨基酸酯、溶血卵磷脂、二甲基双十八烷基溴化铵、N,N-双十八烷基-N',N'双(2-羟乙基-丙二酰胺)、甲氧基十六烷基甘油和多聚醇(pluronic polyol);聚胺,例如吡喃、硫酸葡聚糖、聚 IC 卡波姆;肽,例如胞壁酰二肽和衍生物、二甲基甘氨酸、促吞噬肽(tuftsins);油乳剂;以及矿物凝胶如磷酸铝、氢氧化铝或明矾;淋巴因子、QuilA 和免疫刺激复合物(ISCOMS)。在关于 OMV 递送的一些实施方案中,这些囊泡可通过或不通过佐剂(如铝盐)产生。

[0234] 关于佐剂的实例,也可参照国际公开 W099/36544,其通过引用并入本文。

[0235] 在一些具体实施方案中,用于治疗脑膜炎奈瑟氏菌感染的组合物和方法(包括疫苗和免疫方法)可包括编码本发明分离蛋白质的 DNA 表达构建体。

[0236] 例如,本发明免疫原性剂可由减毒的病毒宿主表达。“减毒的病毒宿主”指天然基本无毒性或被处理成基本无毒性的病毒载体。可通过任何合适的物理方法(如热处理)或化学方法(如甲醛处理)使病毒基本无毒性。“基本无毒性”指其感染性被破坏的病毒。理想地,破坏病毒的感染性而不影响携带病毒免疫原性的蛋白质。由上可知,应理解,减毒的病毒宿主可包含活病毒或灭活病毒。

[0237] 可用于本发明疫苗的减毒病毒宿主可包含病毒载体,包括腺病毒、巨细胞病毒,并优选痘病毒,如牛痘(例如美国专利 No. 4, 603, 112)和减毒的沙门氏菌(*Salmonella*)菌株(例如,如美国专利 No. 4, 550, 081 所述)。因为活疫苗导致可给予基本持久性免疫的延长刺激,所以其特别有利。描述了多种可适用于使用奈瑟氏菌蛋白质免疫的病毒载体和递送方法的另一篇参考文献是国际公开 W099/36544,其通过引用并入本文。

[0238] 多价疫苗可由一种或更多种表达脑膜炎奈瑟氏菌不同表位(例如,脑膜炎奈瑟氏菌的其他表面蛋白质或表位)的微生物来制备。此外,疫苗中可掺入其他病原微生物

的表位。例如,这可包括构建重组牛痘病毒以表达本发明核酸序列。在引入到宿主之后,所述重组牛痘病毒表达免疫原性剂,从而引发宿主 CTL 应答。例如,可参照美国专利 No4,722,848(通过引用并入本文),其描述了用于免疫方法的牛痘载体和方法。

[0239] 用于本发明免疫原性剂的治疗性施用或免疫的多种其他载体对本公开领域技术人员是很明显的。为了可容易理解本发明并产生实际效果,现借助以下非限制性实施例描述一些具体的优选实施方案。

## 实施例

### [0240] 引言

[0241] PorA 是脑膜炎奈瑟氏菌的主要蛋白质。PorA 在菌株之间高度可变并且在患者和无症状携带者中均产生免疫应答,其程度使得其已被用作代表血清亚型系统的菌株鉴定标志物 (McGuinness 等 1990, 见上)。PorA 单体拓扑学的通用模型显示出八个胞外环 (Derrick 等 1999, 见上;van der Ley 等 1991, 见上)。如表 1 所归纳,最长的环 (1 和 4) 可变性最大,环 5 和 6 中看到的可变性较小(分别为半可变区 SVR1 和 2),其余的环中基本上没有可变性。预计环 3 在由 PorA 三聚体的每一个亚基形成的孔中形成“塞(plug)”。即使在环 1 和 4 中,菌株之间的大部分变化限于预计形成每个环尖端的那些残基。这些被称为可变区 (VR) 1 和 2。已鉴定了许多菌株的 VR1 和 VR2 序列(参见,例如图 3 和表 3 和 4;Russell 等,2004, *Emerg. Infect. Dis.* 10674; <http://pubmlst.org/neisseria/PorA/vr1.shtml> 和 <http://pubmlst.org/neisseria/PorA/vr2.shtml>)。出乎意料地,有大量科学文献描述了 VR1/VR2 外侧区域如何也有助于针对脑膜炎奈瑟氏菌的免疫应答 (Jordans 等,2004, *Infect. Immun.* 726503-10;van der Voort 等,1996, 见上;Martin 等,2000, *Vaccine* 182476-81;Wedge 等,2003, *Infect. Immun.* 713775-81;Kotelnikova 等,2005, *Bull. Exp. Biol.* 139593-5;美国专利 7,238,345)。

[0242] 本发明提供了本文举例说明的两个一般性实施方案:(1) 缺失可变区,以使免疫应答集中于在脑膜炎奈瑟氏菌菌株之间保守的 PorA 区域;和 (2) 新提供的保守区增强了针对脑膜炎奈瑟氏菌保守区的免疫应答。

### [0243] 实施例 1

[0244] 产生可变环或可变区缺失的 PorA 等位基因,带有选择标记的 porA 等位基因

[0245] porA 基因和侧翼序列由脑膜炎奈瑟氏菌菌株 MC58 的基因组 DNA 通过 PCR 进行扩增并克隆到 pGEMTeasy 中以产生 pPorA。将该质粒用作模板用于多个反向 PCR 反应,或用于限制性酶消化介导的重组构建。对质粒进行测序。以这种方式制备的质粒具有表 2 和表 3 所列的一种或更多种缺失和/或破坏。其他质粒通过标准分子生物学方法(限制性酶消化、连接、克隆)构建,以产生用选择标记替换 porA 基因的质粒(参见表 2)。很明显,氨基酸缺失的数目可以大于或小于所述的那些。

### [0246] 实施例 2

[0247] 用保守区替换了可变区的质粒

[0248] 将质粒 pDELVR1-2 和 pPorA 用作模板,通过 PCR 和其他标准分子生物学技术产生多个 PorA 等位基因,所述 PorA 等位基因中 porA 的 VR1 和 VR2 编码区被表 3 和图 1 所述的环 7 和 8 序列替换或修饰。很明显,编码 PorA 其他保守氨基酸序列(例如,称为“环 2”的

序列, VSVGGGATQWGNR (SEQ ID NO :48)) 或任何其他保守 PorA 肽序列的 DNA 序列可掺入到环 1 和 / 或 4 中以增强对人或动物免疫系统的呈递。

[0249] 图 1 示出所述 MC58 和重组 PorA 序列的排列。

[0250] 实施例 3

[0251] 用表达重组 PorA 的基因替换野生型 PorA

[0252] 可通过自然转化和同源重组将带有表 2、表 3 和图 1 和图 2 所述 PorA 核苷酸序列的质粒转化到脑膜炎奈瑟氏菌中, 导致野生型 porA 被替换为重组序列。或者, 重组 porA 等位基因可由包含所述重组 porA 等位基因的质粒扩增, 这些扩增产物可用于转化脑膜炎奈瑟氏菌。为了有助于鉴定转化体, 制备了受体脑膜炎奈瑟氏菌菌株, 其中 porA 基因缺失并且被替换为 pLK6 基因的 LacZ-Kan<sup>r</sup> 盒或 pJJ260 的 sacB-Kan<sup>r</sup>-Tet<sup>r</sup> 盒 (参见表 2)。菌株 **63** 是受体菌株 (Virji 等, 1995, 见上)。菌株 **69** (Virji 等, 1995, 见上) 也用 pPorDel:LacZkan 转化, 在包含 X-Gal 的培养基上生长之后选择蓝色菌落。然后将 **62**:delPorASacB 的染色体 DNA 转化到 **69**:delPorALacZ 中并在 X-Gal 上选择, 选择白色菌落以产生 **69delPorASacB**。将前一菌株作为用于以包含变体 porA 等位基因的质粒转化的受体。在含 10% 蔗糖的培养基上生长允许选择 porA:sacB 等位基因已被替换为变体 PorA 基因的克隆。以这种方法, 产生了脑膜炎奈瑟氏菌菌株, 其表达缺失环 1、4 和 5 或者 VR1 和 VR2 分别被环 7 和 8 替换或修饰的 PorA。很明显, 重组 porA 基因可与其他启动子转录连接并且可通过同源重组插入到脑膜炎奈瑟氏菌染色体中。

[0253] 实施例 4

[0254] 修饰多聚 G 区段以改善细菌表达

[0255] 野生型 porA 基因在其启动子中具有在菌株内或菌株之间可变的的多聚 G 区段, 并且引起可变的表达。为了确保 PorA 和变体的一致表达, 对多聚 G 区段进行修饰以减少变化, 因为 11G 与 PorA 的最优表达有关。为了减少多聚 G 区段中的变化, 可对其进行修饰使得其被替换为 G<sub>5</sub>AG<sub>5</sub>。该序列与 G<sub>11</sub> 长度相同, 但是其长度变化不像 G<sub>11</sub> 同聚物区段那样频繁。为此, 合成了包含 porA 上游约 330 个核苷酸的序列, 其修饰区域包含替代天然多聚 G 区段的 G<sub>5</sub>AG<sub>5</sub>。该序列包含编码 PorA 前 38 个氨基酸的核苷酸, 并且还整合有 pJJ260 卡那霉素抗性基因的一部分。该序列通过 DNA2.0 合成, 克隆到质粒载体中。其用 SphI 和 RsrII 进行切除, 并用于替换 pPorDel:SacB 的 SphI-RsrII 片段。将所得质粒 pPorDelSacFixG 转化到脑膜炎奈瑟氏菌菌株 **69** 中 (Virji 等, 1995, 见上), 得到菌株 **63-Fix**。这种受体的 porA 启动子的所有或部分可被替换。**63-Fix** (用于后续转化) 在启动子中包含 G11。用包含重组 porA 的 DNA 进行后续转化导致 TetRSacBKan 区域被替换为变体 porA 等位基因。以这种方式, 质粒 DNA 或 PCR 扩增物 (用引物 PorAF1 :5' GTTCGGTCGTTTCCGATAA-3' (SEQ ID NO : 54) 和 OMWF5' -GGGGTATAATTGAAGACGTATCGG-3' (SEQ ID NO :92) 扩增) 或基因组 DNA 通过在含 10% 蔗糖的培养基上选择而允许鉴定具有重组 porA 表达的菌株。后续分析进一步鉴定了启动子中 G 残基的数目 (参见表 5)。很明显, 重组 porA 基因可与其他启动子转录连接并通过同源重组插入到脑膜炎奈瑟氏菌的染色体中。例如, 脑膜炎奈瑟氏菌 porB 基因的启动子和奈瑟氏菌 opa 基因的启动子从脑膜炎奈瑟氏菌或淋病奈瑟氏菌的基因组 DNA 扩增, 并且在将重组等位基因转化到脑膜炎奈瑟氏菌之前, 使用扩增物替换表 3 所述质粒中任何

一种的 porA 启动子。例如,登录号 AE002098.2 的核苷酸 2157459-2157528 包含脑膜炎奈瑟氏菌菌株 MC58porB 基因的启动子 (5' -TAAATGCAAAGCTAAGCGGCTTGGAAAGCCCGGCCGGCTTA A ATTTCTTAACCAAAAAAGGAATACAGCA-3';SEQ ID NO :93)。相似地,如 Belland 等.1997, Mol Microbiol. 23 :123-35 所述,使用引物通过 PCR 可扩增淋病奈瑟氏菌菌株 MS11opaA 的启动子。

#### [0256] 实施例 5

[0257] 重组 PorA 引发针对异源 PorA 表位的交叉反应性

[0258] 可由脑膜炎奈瑟氏菌制备包含本发明 PorA 蛋白的外膜囊泡 (OMV) 并作为疫苗施用。制备 OMV 疫苗及其带有或不带有佐剂 (如铝盐) 的制剂有许多公知的方法,如 Frascch 等.(2001), Outer Membrane Protein Vesicle Vaccines for Meningococcal Disease. Meningococcal Vaccines :Methods and Protocols. A. Pollard and M. Maiden 编著, Humana Press. 66 :81-107 所述。

[0259] 简言之,通过脱氧胆酸盐方法分离 OMV 蛋白并通过 BCA 测定蛋白质浓度,然后吸附于氢氧化铝凝胶 (Sigma)。在第 0、21 和 28 天向 10 只 BALB/c 小鼠的组注射 0.1-10  $\mu$ g 总蛋白质,然后在最后一次施用疫苗 14 天后通过末端放血收集血液。可由通过公知方法由血液制备血清。简言之,使血液在室温下凝固 1 至 2 小时,然后在 4°C 孵育过夜。在 4°C 下 5 分钟以 10,000  $\times$ g 离心 10 分钟后收集作为上清液的血清。将血清稀释于 PBS 并用于针对四种菌株及其同基因  $\Delta$ porA::tet 突变体的十二烷基肌氨酸钠不溶性蛋白质的 Western 免疫印迹。二抗是山羊抗小鼠 IgG 碱性磷酸酶缀合物 (Sigma),并且使用 NBT/BCIP (Sigma) 通过比色法来检测结合。这表明接种 OMV 的小鼠的血清识别所有菌株的 PorA (参见表 5 和图 5),所述 OMV 包含菌株 1728-2 (表达 VR1 替换为环 7 和 VR2 替换为环 8 的 PorA ;SEQ ID NO :15) 的分离蛋白质。所用菌株 (及其相关 PorA 血清亚型) 是 MC58 (P1. 7, 16-2)、BZ133 (P1. 18-1, 3)、BZ232 (P1. 5-2, 2-2) 和 400 (P1. 19, 15)。

#### [0260] 实施例 6

[0261] 重组 PorA 引发针对异源 PorA 表面表位的交叉反应性 (通过 ELSIA 测定)

[0262] 将在固体培养基 (BHI 琼脂) 上过夜培养的细菌传代培养 4 小时,然后重悬至 A600nm = 0.1,热灭活 (56°C, 30 分钟),然后涂覆平底 96 孔板 (Nunc immunosorp)。如实施例 5 所述从接种了 0.1-0.5  $\mu$ g 蛋白质 (作为 OMV 制备) 的小鼠中收集血清。在本测定中对来自疫苗接种小鼠的血清识别细菌细胞的能力进行测试。二抗是山羊抗小鼠免疫球蛋白 HRP 缀合物 (DAKO P0447, 针对小鼠免疫球蛋白 (主要是 IgG) 产生)。图 6A 和 6B 和表 6 中报道的倒数几何平均效价是读数高于在阴性对照 (定义为阴性对照 OD 加 3SD 的平均值) 的最后一次稀释度。在每种情况下,针对亲本菌株 (400、BZ133 和 BZ232) 和各自的同基因 PorA 突变菌株对血清进行测试。出乎意料地,来自菌株 1728-2 (表达 VR1 替换为环 7 和 VR2 替换为环 8 的 PorA ;SEQ ID NO :15) 和菌株 D145 (表达环 1、4 和 5 缺失的 PorA ;SEQ ID NO :5) 的 OMV 引发识别这三种测试菌株的抗体,其效价高于三种测试 PorA 突变菌株。相反地,在本实验中来自菌株  $\phi$  9 (表达 PorA P1. 7, 16-2)、菌株 027-3 (表达 SEQ ID NO :13 的 PorA) 和菌株 028-10 (表达 SEQ ID NO :14 的 PorA) 没有一致地引发与 PorA 突变菌株相比更好地识别野生型菌株的鼠抗体。

#### [0263] 实施例 7

[0264] 评价带有变体 PorA 的 OMV 靶向自体或异源菌株之能力的杀菌测定

[0265] 通过 Hoogerhout 等, 1995 *Infection and Immunity* 63 :3473-3478 所述方法的修改方法进行本测定。简言之, 细菌在 5% CO<sub>2</sub> 中在 37°C 在 BHI 板上过夜培养。将来自此过夜培养物的细菌在相同条件下传代培养 4 至 6 小时, 然后重悬于 1mL PBS 中。将细菌悬液调节为 PBS 中约 10<sup>5</sup> cfu/mL。在 56°C 将待测试血清热灭活 45 分钟。幼兔补体得自于商品供应商 (如 PelFreez)。在无菌聚苯乙烯平底 96 孔微滴定板上进行测定。每个孔的总体积是 24 μL, 其包含: 12 μL PBS 中的两倍连续稀释的血清和 6 μL 细菌悬液 (包含 300-900 个细菌)。将血清和细菌在室温下孵育 10 分钟, 然后添加 6 μL PBS 中的 80% 补体 (最终浓度为 20% v/v)。对照是 a) PBS、细菌和补体; b) PBS、细菌和血清。在添加所有组分并混合之后, 将每个对照孔中的 7 μL 等份试样转移至 BHI 琼脂板。将微滴定板在 5% CO<sub>2</sub> 中在 37°C 孵育 60 分钟。这次孵育之后, 将每个对照孔中的 7 μL 等份试样转移至 BHI 琼脂板。所有的 BHI 板在 5% CO<sub>2</sub> 中在 37°C 孵育 14-18 小时, 然后对细菌菌落进行计数。血清杀菌报告为至少 90% 细菌被杀死的最高倒数稀释度。在每种情况下, 针对 MC58、MC58por::tet 和针对表达异源性 PorA 或其 PorA 突变体的菌株测试了单独或合并的小鼠血清 (MC58PorA 是 P1. 7, 16. 2, 而例如菌株 2996 和 M990 分别是 P1. 5. 1, 2-2 和 P1. 18, 25, 参见图 3A)。

[0266] 贯穿本说明书的目的是描述一些本发明优选实施方案, 而并非将本发明限制在任何一个实施方案或特征的具体集合。因此, 本领域技术人员应理解, 根据本公开内容, 在不偏离本发明范围的情况下可对举例的具体实施方案进行多种修饰和改变。

[0267] 本文提及的所有计算机程序、算法、专利和科学文献均通过引用并入本文。

[0268] 表 1. MC58PorA (P1. 7, 16. 2, 登录号 AF226344) 的环序列。粗体指示血清亚型之间相同或保守的残基。环的范围遵循 van der Ley 等, 1991 (见上) 或 Derrick 等, 1999 (见上) 提出的 PorA 模型的先例。

[0269]

环	序列
1 (VR1)	<b>VEGRNYQLQLTEAQAANGGASGQVKVTKVTKAKRKSRIIRTKI</b> (SEQ ID NO: 47)
2	<b>VSV-GGGATQWGNR</b> (SEQ ID NO: 48)
3	<b>ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDD</b> (SEQ ID NO: 49)
4 (VR2)	<b>PIQNSKSAYTPAYYTKNTN&gt;NNLTLVPAVVGKPGS</b> (SEQ ID NO: 50)
5 (SVR1)	<b>RHANVGRDAFELFLLGSGSDQAKGTDPLKNH</b> (SEQ ID NO: 51)
6 (SVR2)	<b>LSENGDK-TKNSTTE</b> (SEQ ID NO: 52)
7	<b>FDLIERGKKGENTS</b> (SEQ ID NO: 53)
8	<b>KRNTGIGNYTQIN</b> (SEQ ID NO: 54)

[0270]

表2 用于SEQ ID NO: 1-10的细菌表达的表结构建体

质粒名		所用引物或方法
<b>pPorA</b>	包含与基因座NMB1429的密码框相同的 <i>porA</i> 等位基因的质粒	PorAF1: 5' GTTCGGTGGTTCCGATAA-3' (SEQ ID NO: 55) PorARev1: 5' TTGAAACCCCTGACCCTCTG-3' (SEQ ID NO: 56)
<b>pPorDel</b>	<i>PorA</i> 基因被缺失	porDELup 5'-TATACCCGGGTG CAT ATC GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA-3' (SEQ ID NO: 57) porDELdown 5'- TCC GTC GGT TTG CGC CAC AAA TTC -3' (SEQ ID NO: 58)
<b>pPorDel:LacZkan</b>	插入了 LacZkan 的 pPorDel	LacZkan 使用 laczstuF:GTGAAAAGGCCCTGATCCCCGTCGTTTACAA (SEQ ID NO: 59) laczStukanR:GTGAAAAGGCCCTCAATTCTGATTAGAAAACCTC (SEQ ID NO: 60) 扩增, 用 <i>SmaI</i> 消化并连接到用 <i>SmaI</i> 消化的 pPorDel
<b>pPorDel: SacB</b>	插入了 TetR SacB KanR 的 pPorDel	TetR-SacB-KanR 用 <i>SmaI</i> 从 pJJ260 上切下并连接到经 <i>SmaI</i> 消化的 pPorDel 中
<b>pPorDel:Tet</b>	插入了 TetS 的 pPorDel	TetM 用 <i>HincII</i> 从 pGEMTetM 切除并连接到经 <i>SmaI</i> 消化的 pPorDel 中
<b>pPorDelSacFixG</b>		掺有 GSAG5 的合成序列克隆到 pPorDel: SacB 的 <i>SphI</i> - <i>RsrII</i> 位点中
<b>pPorΔL1</b>	ΔLoop1 38-63 位 氨基酸缺 失	DEL_Loop1_up_5'-CTG GTA GTT CCT GCC TTC CACGG-3' (SEQ ID NO: 61) DEL_Loop1_down 5'-AGC CAA GCC GCT AAC GGT GGA-3' (SEQ ID NO: 62) pPorA 作为模板
<b>pPorΔL4</b>	ΔLoop4 187-211 位 氨基酸缺 失	DEL_L4up 5'-GAT CCG AAC GAA TTG AAC GCT GC-3' (SEQ ID NO: 63) DEL_L4down 5'GTT GTC GGC AAG CCC OGA TC-3' (SEQ ID NO: 64) pPorA 作为模板
<b>pPorΔL1-4</b>	ΔLoop1 ΔLoop4	DEL_L4up DEL_L4down, 用 pPorΔL1 作为模板

[0271]

	38-63位氨基酸缺失	187-211位氨基酸缺失		
<b>pPorD145</b>	<b>ΔLoop1</b> 38-63位氨基酸缺失	<b>ΔLoop4</b> 187-211位氨基酸缺失	<b>ΔLoop5</b> 248-268位氨基酸缺失	<b>DEL_L5_up</b> 5'-TCC GAC ATT GGC GTG TCT CGC-3' (SEQ ID NO: 65) <b>DEL_L5-down</b> 5'-TTG AAA AAC CAT CAG GTA CAC CGT CTG-3' (SEQ ID NO: 66) <b>pPorAL1-4</b> 作为模板
<b>pDELVRI</b>	<b>ΔVRI</b> 43-63位氨基酸缺失			<b>delVRI_up</b> 5'-TTC AGT CAA TTG CAG CTG GTA GTT CCT-3' (SEQ ID NO: 67) <b>DEL_Loop1_down</b> 5'-AGC CAA GCC GCT AAC GGT GGA-3' (SEQ ID NO: 68) <b>pPorA</b> 作为模板
<b>pDELVR2</b>		<b>ΔVR2</b> 197-209位氨基酸缺失		包含缺失的合成区域，用于替换pPorA中包含VR2区的BssHIII-KpnI片段
<b>pDELVRI-2</b>	<b>ΔVRI</b> 43-63位氨基酸缺失	<b>ΔVR2</b> 197-209位氨基酸缺失		包含缺失的合成区域，用于替换pDELVRI中包含VR2区的BssHIII-KpnI片段
<b>pDELVRI-2-5</b>	<b>ΔVRI</b> 43-63位氨基酸缺失	<b>ΔVR2</b> 197-209位氨基酸缺失	<b>ΔLoop5</b> 248-268位氨基酸缺失	<b>DEL_L5_up</b> 5'-TCC GAC ATT GGC GTG TCT CGC-3' (SEQ ID NO: 69) <b>DEL_L5-down</b> 5'-TTG AAA AAC CAT CAG GTA CAC CGT CTG-3' (SEQ ID NO: 70) <b>pDELVRI-2</b> 作为模板
<b>pDELVRI-2-5-6</b>	<b>ΔVRI</b> 43-63位氨基酸缺失	<b>ΔVR2</b> 197-209位氨基酸缺失	<b>ΔLoop5</b> 248-268位氨基酸缺失	环6的298-306位氨基酸也缺失， <b>DEL_L6_up</b> 5'-AGA CAA ATC CAA CTG AGC CGC CAA (SEQ ID NO: 71)

[0272]

			DEL_L6_down 5' AGT ACG ACC GAA ATT GCC GCC ACT -3' (SEQ ID NO:72) 用 pDELVR1-2-5 作为模板
--	--	--	--

表3 用于SEQ ID NO: 11-19的细菌表达的的表达构建体

质粒名	VRI	VR2	所用引物
pVR2-7	WT	197-209位氨基酸 替换为331-344位 氨基酸	Loop4-7up 5' ACC GCG TTC GAT AAA GTC GAA AGC CGG CGT ATA GGC GGA CTT -3' (SEQ ID NO: 73) Loop4-7down 5'- AAA AAA GGC GAA AAT ACC AGC CCG GCT GTT GTC GGC AAG C-3' (SEQ ID NO: 74) pPorA 作为PCR模板
pVR2-8	WT	197-209位氨基 酸替换为370- 382位氨基酸	Loop4-8up 5' GCC GGT ATT GCG TTT AGC CGG CGT ATA GGC GGA CTT (SEQ ID NO: 75) Loop4-8down 5'-ATC GGC AAC TAC ACT CAA ATT AAT CCG GCT GTT GTC GGC AAG C-3' (SEQ ID NO: 76) pPorA 作为模板
pΔVR1VR2-7	ΔVR1 43-63位氨基酸 缺失	197-209位氨基酸 替换为331-344位 氨基酸	所用引物: delVR1_up, DEL_Loop1_down pVR2-7 作为模板
pΔVR1VR2-8	ΔVR1 43-63位氨基酸缺 失	197-209位氨基 酸替换为370- 382位氨基酸	所用引物: delVR1_up, DEL_Loop1_down pVR2-8 作为模板
pVR1-7VR2-8	43-63位氨基酸替 换为331-344位氨 基酸	197-209位氨基 酸替换为370- 382位氨基酸	Loop1-7up 5' ACC GCG TTC GAT AAA GTC GAA TTC AGT CAA TTG CAG CTG GTA GTT CCT-3' (SEQ ID NO: 77) Loop1-7down 5'-AAA AAA GGC GAA AAT ACC AGC AGC CAA GCC GCT AAC GGT GGA-3' (SEQ ID NO: 78)

[0273]

<p><b>pVR1-7VR2-8Del5</b></p>	<p>197-209位氨基酸 替换为370-382位 氨基酸</p>	<p>43-63位氨基酸 替换为331-344 位氨基酸</p>	<p><b>pVR2-8</b> 作为模板 ΔLoop5248-268位氨基酸缺失 使用引物 DEL_L5_up_5'-TCC GAC ATT GGC GTG TCT CGC-3' (SEQ ID NO:79) DEL_L5-down 5'-TTG AAA AAC CAT CAG GTA CAC CGT CTG-3' (SEQ ID NO:80)</p>
<p><b>pPor7in1</b></p>	<p>环7插入到VR1 中: 331-344位氨基酸 插入到VR1 中</p>	<p>环7插入到VR1 中: 331-344位氨基酸 插入到VR1 中</p>	<p>7into1up: 5' ACC GCG TTC GAT AAA GTC GAA CGC TCC ACC GTT AGC GGC TTG TGC-3' (SEQ ID NO:81) 7into1down: 5'-5' -AAA AAA GGC GAA AAT ACC AGC AGC GGT CAG GTA AAA GTT ACT AAA GTT ACT AAG-3'-3' (SEQ ID NO:82)</p>
<p><b>pPor8in4</b></p>	<p>环8插入到VR2 中: 370-382位氨基酸 插入到VR2 中</p>	<p>环8插入到VR2 中: 370-382位氨基酸 插入到VR2 中</p>	<p>pPorA 作为模板 8into4up: 5' GCC GGT ATT GCG TTT GTT TGT ATT CTT AGT ATA ATA AGC-3' (SEQ ID NO:83) 8into4down: 5'- ATC GGC AAC TAC ACT CAA ATT AAT AAC AAT CTT ACT CTC GTT CCG GCT GTT-3' (SEQ ID NO:84)</p>
<p><b>pPor7in1-8in4</b></p>	<p>环7插入到VR1: aa 331-344 inserted into VR1</p>	<p>环7插入到VR1: aa 331-344 inserted into VR1</p>	<p>pPorA 作为模板 引物: 8into4up &amp; 8into4down pPor7in1 作为模板</p>

[0274] 表 4. 脑膜炎奈瑟氏菌重组菌株的衍生

[0275]

供体等位基因/受体菌株	质粒/PCR/基因组	所得脑膜炎奈瑟氏菌克隆
PorDel:Tet	pPorDel:Tet 转化进 ϕ9 中	9ΔPorTa
PorDel:LacZkan	pPorDel:LacZkan 转化进 ϕ9 中	ϕ2ΔPorlacZkan
PorDel:LacZkan	ϕ2ΔPorlacZkan 的 gDNA cut9ΔPorTa	ϕ9ΔPorlac
PorDel: SacB	pPorSacB 转化进 MC58	58PorSacI
PorSacB	58PorSacI ϕ9ΔPorlac	ϕ9delPorASacb
PorDelSacFixG	pPorDelSacFixG 转化进 ϕ3	ϕ3Fix3A
PorA:SacB Kan 11G	ϕ3Fix3A 的 gDNA 转化进 ϕ9	9-Fix

[0276] 表 5. 用于疫苗研究的脑膜炎奈瑟氏菌重组菌株

[0277]

等位基因	质粒/PCR/基因组供体DNA转化进受体菌株	所得脑膜炎奈瑟氏菌克隆 (评价)
PorDel:Tet	pPorDel:Tet 转化进 ϕ9	9ΔPorTa
WT porA	pPorA 转化进 9-Fix	9-5, (启动子中为 11G )
WT porA	pPorA 转化进 9-Fix	9-1, (启动子中为 11G )
1728	pVR1-7VR2-8 转化进 9-Fix	1728-2, (启动子中为 11G )
0-27	pΔVR1 VR2-7 的 PCR 产物 (引物 OMWF 和 ARI) 转化进 9-Fix	027-3 (启动子中为 11G )
0-28	pΔVR1 VR2-8 的 PCR 产物 (引物 OMWF 和 ARI) 转化进 9-Fix	028-10 (启动子中为 11G )
ΔL1ΔL4ΔL5	pΔL1ΔL4ΔL5 的 PCR 产物 (引物 OMWF 和 ARI) 转化进 9-Fix	145-5 (启动子中为 11G )

[0278] 表 6. 实施例 6 实验 2 的列表数据。来自 10 只用 0.1-0.5 μg 脱氧胆酸盐 OMV 免疫接种的小鼠的合并血清的两倍连续稀释液用作一抗，以针对 ELISA 测定中所列菌株 (“测试菌株”) 的热处死细菌。在本表格中，P- 表示 porA 基因被破坏的菌株。

[0279]

	免疫原 :					
	ϕ9	ϕ9 P-	1728-2	D145	027-3	028-10
测试的菌株						
400	16000	32000	406375	256000	3177	15996
400P-	12699	64000	40317	64000	7998	31989
BZ133	8000	64000	203187	128000	5035	50816
BZ133P-	8000	64000	50797	64000	7998	15996
BZ232	6350	32000	161270	80635	12706	15996
BZ232P-	6350	40317	64000	40317	50816	40272

[0280] 表 7. 蛋白质构建体的总结

[0281]

构建体	SEQ ID NO
-----	-----------

仅缺失 V 区	2-10
V 区的缺失替换为保守环	11-16 和 20-22
将保守环插入 V 区中	17-19

PorA MC58	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGG-	49
pPORDEL1	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQ-----	37
pPorDEL4	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGG-	49
pPor1-4	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQ-----	37
pPorDEL1-4-5	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQ-----	37
pDELVR1	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pDELVR2	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGG-	49
pDELVR1-2	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pDELVR1-2-5	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pDELVR1-2-5-6	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pVR2-7	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGG-	49
pVR2-8	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGG-	49
pDELVR1VR2-7	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pDELVR1VR2-8	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pVR1-7VR2-8	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pVR1-7VR2-8DEL5	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTE-----	42
pPor7in1	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGA	50
pPor8in4	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGG-	49
pPor7in1-8in4	1	MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGA	50

PorA MC58	50	----- <u>ASGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFG</u> SFIFGFKGSEDLG	86
pPORDEL1	38	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	60
pPorDEL4	50	-----ASGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	86
pPor1-4	38	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	60
pPorDEL1-4-5	38	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	60
pDELVR1	43	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	65
pDELVR2	50	-----ASGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	86
pDELVR1-2	43	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	65
pDELVR1-2-5	43	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	65
pDELVR1-2-5-6	43	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	65
pVR2-7	50	-----ASGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	86
pVR2-8	50	-----ASGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	86
pDELVR1VR2-7	43	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	65
pDELVR1VR2-8	43	-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	65
pVR1-7VR2-8	43	FDFIERGKKGENTS-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	79
pVR1-7VR2-8DEL5	43	FDFIERGKKGENTS-----SRIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	79
pPor7in1	51	FDFIERGKKGENTSSGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	100
pPor8in4	50	-----ASGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	86
pPor7in1-8in4	51	FDFIERGKKGENTSSGQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFIFGFKGSEDLG	100

PorA MC58	87	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	136
pPORDEL1	61	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	110
pPorDEL4	87	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	136
pPor1-4	61	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	110
pPorDEL1-4-5	61	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	110
pDELVR1	66	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	115
pDELVR2	87	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	136
pDELVR1-2	66	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	115
pDELVR1-2-5	66	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	115
pDELVR1-2-5-6	66	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	115
pVR2-7	87	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	136
pVR2-8	87	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	136
pDELVR1VR2-7	66	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	115
pDELVR1VR2-8	66	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	115
pVR1-7VR2-8	80	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	129
pVR1-7VR2-8DEL5	80	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	129
pPor7in1	101	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	150
pPor8in4	87	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	136
pPor7in1-8in4	101	DGLKAVWQLEQDVS <b>VAGGGATQWGN</b> RESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDD	150

PorA MC58	137	<b>ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDD</b> MPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	186
pPORDEL1	111	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	160
pPorDEL4	137	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	186
pPor1-4	111	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	160
pPorDEL1-4-5	111	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	160
pDELVR1	116	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	165
pDELVR2	137	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	186
pDELVR1-2	116	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	165
pDELVR1-2-5	116	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	165
pDELVR1-2-5-6	116	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	165
pVR2-7	137	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	186
pVR2-8	137	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	186
pDELVR1VR2-7	116	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	165
pDELVR1VR2-8	116	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	165
pVR1-7VR2-8	130	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	179
pVR1-7VR2-8DEL5	130	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	179
pPor7in1	151	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	200
pPor8in4	137	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	186
pPor7in1-8in4	151	ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPI	200

PorA MC58	187	<u>QNSKSAYTPAYYTKNTN</u> ----- <u>NNLTLVPAVVGKPGSDVYYA</u>	223
pPORDEL1	161	QNSKSAYTPAYYTKNTN-----NNLTLVPAVVGKPGSDVYYA	197
pPorDEL4	187	-----VVGKPGSDVYYA	198
pPor1-4	161	-----VVGKPGSDVYYA	172
pPorDEL1-4-5	161	-----VVGKPGSDVYYA	172
pDELVR1	166	QNSKSAYTPAYYTKNTN-----NNLTLVPAVVGKPGSDVYYA	202
pDELVR2	187	QNSKSAYTP-----APAVVGKPGSDVYYA	210
pDELVR1-2	166	QNSKSAYTP-----APAVVGKPGSDVYYA	189
pDELVR1-2-5	166	QNSKSAYTP-----APAVVGKPGSDVYYA	189
pDELVR1-2-5-6	166	QNSKSAYTPA-----PAVVGKPGSDVYYA	189
pVR2-7	187	QNSKSAYTPAFDFIERGKKGENT-----SPAVVGKPGSDVYYA	224
pVR2-8	187	QNSKSAYTPAKRNTGIGNYTQIN-----PAVVGKPGSDVYYA	223
pDELVR1VR2-7	166	QNSKSAYTPAFDFIERGKKGENT-----SPAVVGKPGSDVYYA	203
pDELVR1VR2-8	166	QNSKSAYTPA-----KRNTGIGNYTQIN-----PAVVGKPGSDVYYA	202
pVR1-7VR2-8	180	QNSKSAYTPA-----KRNTGIGNYTQIN-----PAVVGKPGSDVYYA	216
pVR1-7VR2-8DEL5	180	QNSKSAYTPA-----KRNTGIGNYTQIN-----PAVVGKPGSDVYYA	216
pPor7in1	201	QNSKSAYTPAYYTKNTN-----NNLTLVPAVVGKPGSDVYYA	237
pPor8in4	187	QNSKSAYTPAYYTKNTNKRNTGIGNYTQINNNLTLVPAVVGKPGSDVYYA	236
pPor7in1-8in4	201	QNSKSAYTPAYYTKNTNKRNTGIGNYTQINNNLTLVPAVVGKPGSDVYYA	250

PorA MC58	224	GLNYKNGGFAGNYAFKYAR <u>HANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ</u>	273
pPORDEL1	198	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	247
pPorDEL4	199	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	248
pPor1-4	173	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	222
pPorDEL1-4-5	173	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVG-----LKNHQ	201
pDELVR1	203	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	252
pDELVR2	211	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	260
pDELVR1-2	190	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	239
pDELVR1-2-5	190	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVG-----LKNHQ	218
pDELVR1-2-5-6	190	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVG-----LKNHQ	218
pVR2-7	225	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	274
pVR2-8	224	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	273
pDELVR1VR2-7	204	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNASELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	253
pDELVR1VR2-8	203	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	252
pVR1-7VR2-8	217	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	266
pVR1-7VR2-8DEL5	217	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVG-----LKNHQ	245
pPor7in1	238	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	287
pPor8in4	237	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	286
pPor7in1-8in4	251	GLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQ	300

PorA MC58	274	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	323
pPORDEL1	248	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	297
pPorDEL4	249	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	298
pPor1-4	223	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	272
pPorDEL1-4-5	202	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	251
pDELVR1	253	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	302
pDELVR2	261	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	310
pDELVR1-2	240	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	289
pDELVR1-2-5	219	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	268
pDELVR1-2-5-6	219	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ----- <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	260
pVR2-7	275	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	324
pVR2-8	274	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	323
pDELVR1VR2-7	254	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	303
pDELVR1VR2-8	253	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	302
pVR1-7VR2-8	267	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	316
pVR1-7VR2-8DEL5	246	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	295
pPor7in1	288	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	337
pPor8in4	287	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	336
pPor7in1-8in4	301	VHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD <b>LS</b> ENGDKTKN <b>STTE</b> IAATASYRFGNAVP	350

PorA MC58	324	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	373
pPORDEL1	298	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	347
pPorDEL4	299	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	348
pPor1-4	273	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	322
pPorDEL1-4-5	252	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	301
pDELVR1	303	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	352
pDELVR2	311	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	360
pDELVR1-2	290	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	339
pDELVR1-2-5	269	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	318
pDELVR1-2-5-6	261	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	310
pVR2-7	325	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	374
pVR2-8	324	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	373
pDELVR1VR2-7	304	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	353
pDELVR1VR2-8	303	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	352
pVR1-7VR2-8	317	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	366
pVR1-7VR2-8DEL5	296	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	345
pPor7in1	338	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	387
pPor8in4	337	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	386
pPor7in1-8in4	351	RISYAHGFDFIERG <b>KKGENTS</b> SYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWL <b>KRNT</b>	400

PorA MC58	374	<u>GIGNY</u> TQINAASVGLRHKF	392
pPORDEL1	348	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	366
pPorDEL4	349	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	367
pPor1-4	323	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	341
pPorDEL1-4-5	302	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	320
pDELVR1	353	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	371
pDELVR2	361	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	379
pDELVR1-2	340	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	358
pDELVR1-2-5	319	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	337
pDELVR1-2-5-6	311	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	329
pVR2-7	375	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	393
pVR2-8	374	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	392
pDELVR1VR2-7	354	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	372
pDELVR1VR2-8	353	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	371
pVR1-7VR2-8	367	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	385
pVR1-7VR2-8DEL5	346	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	364
pPor7in1	388	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	406
pPor8in4	387	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	405
pPor7in1-8in4	401	GIGNY <u>TQ</u> INAASVGLRHKF	419

图 1

**DNA 序列 pPor $\Delta$ L1**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAACCTACCAGAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATCG  
 GCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGC  
 GCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTCCG  
 CGTTGCGAATCAGTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGG  
 GTATTTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGC  
 GTTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTTATTATACTAAGAATACAAAACAATAATCT  
 TACTCTCGTTCGGCTGTTGTCCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGGTT  
 TTGCCGGGAACATATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTTGAGTTGTTCTTGATCGGC  
 AGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGA  
 AGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGACCG  
 AAATTGCCGCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTTATC  
 GAACCGGTAATAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCAAACGCAC  
 TTCGCCCATCGTGTCTGGCGCTTGCTGAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCG  
 TCGGTTTGCGCCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pPor $\Delta$ L1**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQSRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLDGDLKAVWQLEQDVSVAG  
 GGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSEPFSGFSGS  
 VQFVPIQNSKSAYTPAYYTKNTNNNLTLVPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLI  
 SGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGLNLALAAQLDLSNGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFI  
 ERGKKGENTS YDQI IAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYQINAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pPor $\Delta$ L4**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAACCTACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAAGCCGCTAACGGTGGAGCGAGCG  
 GTCAGGTAAAAGTTACTAAAAGTTACTAAGGCCAAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATC  
 GGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGG  
 CGGCGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTCCG  
 GCGTTGCGAATCAGTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTG  
 GGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAG  
 CGTTCAATTCGTTCCGATCGTGTGTCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGCG  
 GTTTTGCCGGGAACATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTTGAGTTGTTCTTGATC  
 GGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGA  
 GGAAGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGA  
 CCGAAATTGCCGCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTT  
 ATCGAACCGGTAATAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCAAACG  
 CACTTCGCCCATCGTGTCTGGCGCTTGCTGAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCT  
 CCGTCCGTTTGCGCCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pPor $\Delta$ L4**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASQVVKVTKVTKAKSRIRTKISDFGSFI  
 GFKGSEDLDGDLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQL  
 GIFKRHDDMPVSVRYDSEPFSGFSGSVQFVPIVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLI  
 GSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGLNLALAAQLDLSNGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFI  
 IERGKKGENTS YDQI IAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYQINAASVGLRHKF\*

**DNA序列 pPor $\Delta$ L1-4**

ATGCCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGAAGGCAGGAAGTACCAGAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATCG  
 GCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGC  
 GGCGGCGGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCCGGTACGCTGCGCGCCGGTCCG  
 CGTTGCCAATCAGTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGG  
 GTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGC  
 GTTCAATTCGTTCCGATCGTTGTCCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGG  
 TTTTGCCGGGAAGTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGATCG  
 GCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAG  
 GAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGAC  
 CGAATTCGCCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTTA  
 TCGAACCGGTAATAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTCAAACGC  
 ACTTCGCCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTC  
 CGTCGGTTTGGCCACAAAATCTAA

**氨基酸序列 pPor $\Delta$ L1-4**

MRKKLTAIVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQSRIRTKISDFGSGIFGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAG  
 GGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPFSGFSGS  
 VQFVPIVVGKPGSDVYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYE  
 EGGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSVDQIIAGVDYDFSKR  
 TSAIVSGAWLKRNTGIGNYTIINAASVGLRHKF\*

**DNA序列 pPorDEL1-4-5**

ATGCCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGAAGGCAGGAAGTACCAGAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATCG  
 GCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGC  
 GGCGGCGGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCCGGTACGCTGCGCGCCGGTCCG  
 CGTTGCCAATCAGTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGG  
 GTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGC  
 GTTCAATTCGTTCCGATCGTTGTCCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGG  
 TTTTGCCGGGAAGTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGATTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGA  
 CGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAAC  
 AAAACAGTACGACCGAAATTCGCCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCA  
 TGGTTTCGACTTTATCGAACCGGTAATAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATG  
 ATTTTCAAACGCCTTCGCCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAA  
 ATTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTGGCCACAAAATCTAA

**氨基酸序列 pPorDEL1-4-5**

MRKKLTAIVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQSRIRTKISDFGSGIFGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAG  
 GGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPFSGFSGS  
 VQFVPIVVGKPGSDVYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKT  
 KNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSVDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTI  
 INAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pDELVR1**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATT  
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC  
GTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTAC  
GCTGCGCGCCGGTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATG  
TGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATCCCCCGAATTTTCC  
GGTTTCAGCGGCAGCGTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTTATTATACTAAGAA  
TACAAAATAATACTTACTCTCGTTCGGGCTGTGTGCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATT  
ACAAAATGGCGGTTTTGCCGGGAACTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTGAG  
TTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAACCATCAGGTACACCGTCTGAC  
GGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACA  
AAAACAGTACGACCGAAATGCCGCCACTGCTTCCACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCAT  
GGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGA  
TTTTTCCAAACGCCTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAA  
TTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTGCGCCACAAATTCTAA

**氨基酸序列 pDELVR1**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTESRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQD  
VSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFS  
GFGSGVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKNTNNTLVPVAVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFE  
LFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAH  
GDFDIERGKKGENTSVDQI IAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTIINAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pDELVR2**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAAGCCGCTAACGGTGGAGCGAGCG  
GTCAGGTAAAAGTTACTAAAGTTACTAAGCCAAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATC  
GGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGG  
CGGCGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTC  
GCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTG  
GGTATTTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAG  
CGTTCAATTTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTCCGGCTGTTGTCGGCAAGCCCGGATCGG  
AATGTGATGATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGCGGTTTTGCCGGAACTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCC  
AATGTCGGACGTAATGCTTTTGTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAA  
AAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATT  
TGTCTGAAAATGGCGACAAAACAAAACAGTACGACCGAAATGCCGCCACTGCTTCCACCGCTTCGGTAATGCA  
GTTCCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGTACGATCA  
AATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTTCCAAACGCCTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATA  
CCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTGCGCCACAAATTCTAA

**氨基酸序列 pDELVR2**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASQVKVTKVTKAKSRIIRTKISDFGSFI  
GFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQL  
GIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFGSGVQFVPIQNSKSAYTPAPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHA  
NVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNA  
VPRISYAHGDFDIERGKKGENTSVDQI IAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTIINAASVGLRHKF\*

**DNA序列 pDELVR1-2**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATT  
 TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC  
 GTATCCGTTGCCGGCGCGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTAC  
 GCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATG  
 TGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTCCTGACGCTACGATTCCTCCCGAATTTTCC  
 GGTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTCCGGCTGTTGTCCG  
 CAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGCGGTTTTGCCGGGAACATATGCCTTTAAAT  
 ATGCGAGACACGCCAATGTTCGGACGTAATGCTTTTGTGATTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGT  
 ACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGC  
 GGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACAAAACAGTACGACCGAAATGCCGCCACTGCTTCTTACC  
 GCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAATAAAGGCGAAAAT  
 ACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCTTGATTATGATTTTTCAAACGCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTG  
 GCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTTGCGCCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pDELVR1-2**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTESRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQD  
 VSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFS  
 FGSVQFVPIQNSKSAYTPAPAVVVKPGSDVYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKG  
 TDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKG  
 TSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTIINAASVGLRHKF\*

**DNA序列 pDELVR1-2-5**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATT  
 TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC  
 GTATCCGTTGCCGGCGCGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTAC  
 GCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATG  
 TGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTCCTGACGCTACGATTCCTCCCGAATTTTCC  
 GGTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTCCGGCTGTTGTCCG  
 CAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGCGGTTTTGCCGGGAACATATGCCTTTAAAT  
 ATGCGAGACACGCCAATGTTCGGATTGAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTG  
 AATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACAAAACAGTACGACCGAAATGCCGC  
 CACTGCTTCTTACCCTTCGGTAATGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTA  
 AAAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCTTGATTATGATTTTTCAAACGCACTTCCGCCATC  
 GTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTTGC  
 CCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pDELVR1-2-5**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQSRIIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAG  
 GGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGS  
 VQFVPIVVKPGSDVYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKT  
 KNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTI  
 INAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pVR2-7**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAGCCGCTAACGGTGGAGCGAGCG  
GTCAGGTAAAAGTTACTAAAGTTACTAAGGCCAAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATC  
GGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGG  
CGGCGGCGGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTC  
GCGTTGCCAATCAGTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTG  
GGTATTTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCGAATTTTCCGGTTTCAGCGGCAG  
CGTTCAATTTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCTTATACGCGCGCTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAG  
GCGAAAATACCAGCCCGGCTGTTGTCCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGC  
GGTTTTGCCGGAACTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGAT  
CGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATG  
AGGAAGCGCGCTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACG  
ACCGAAATGCCGCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCATGGTTTCGACTT  
TATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCCAAC  
GCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCC  
TCCGTCGGTTTGGCCACAAATTCTAA

**氨基酸序列 pVR2-7**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASQVKVTKVTKAKSRIRTKISDFGSFI  
GFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQL  
GIFKRHDDMPVSVRYDSEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAFDFIERGKKGENTSPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNG  
GFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGLNLALAAQLDLENGDKTKNST  
TEIAATASYRFGNAVPRISYAHGDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYQINAAS  
SVGLRHKF\*

**DNA 序列 pVR2-8**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAGCCGCTAACGGTGGAGCGAGCG  
GTCAGGTAAAAGTTACTAAAGTTACTAAGGCCAAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATC  
GGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGG  
CGGCGGCGGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTC  
GCGTTGCCAATCAGTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTG  
GGTATTTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCGAATTTTCCGGTTTCAGCGGCAG  
CGTTCAATTTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCGCGCTAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACA  
CTCAAATTAATCCGGCTGTTGTCCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGCGGT  
TTTGCCGGAACTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGATCGG  
CAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGG  
AAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGACC  
GAAATTGCCGCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCATGGTTTCGACTTTAT  
CGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCCAACGCA  
CTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCC  
GTCGGTTTGGCCACAAATTCTAA

**氨基酸序列 pVR2-8**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASQVKVTKVTKAKSRIRTKISDFGSFI  
GFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQL  
GIFKRHDDMPVSVRYDSEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAKRNTGIGNYQINPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGG  
FAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGLNLALAAQLDLENGDKTKNST  
EIAATASYRFGNAVPRISYAHGDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYQINAAS  
VGLRHKF\*

**DNA 序列 pΔVR1VR2-7**

ATGCGAAAAAAGCTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGGCGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATT  
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC  
GTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTAC  
GCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATG  
TGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTCCTGACGCTACGATTCCCCGAATTTTCC  
GGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTTTTCGACTTTATCGA  
ACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCCCGCTGTTGTGCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGA  
ATTACAAAATGGCGGTTTTCGCCGGAATATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCGGACGTAATGCTTCT  
GAGTTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAACCATCAGGTACACCGTCT  
GACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTCTGAAAACGGCGACAAA  
CCAAAACAGTACGACCGAAATTCGCCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCC  
CATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTA  
TGATTTTCCAAACGCACTTCGCCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACT  
AAATTAACGCCCGCTCCGTCGGTTTGGCCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pΔVR1VR2-7**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTESRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDLKAVWQLEQD  
VSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSEFES  
GFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAFDFIERGKKGENTSPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAS  
ELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYA  
HGDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTOINAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pΔVR1VR2-8**

ATGCGAAAAAAGCTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGGCGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATT  
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC  
GTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTAC  
GCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATG  
TGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTCCTGACGCTACGATTCCCCGAATTTTCC  
GGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTAAACGCAATACCGG  
CATCGGCAACTACACTCAAATTAATCCGGCTGTTGTGCGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATT  
ACAAAATGGCGGTTTTGCCGGGAATATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCGGACGTAATGCTTTTGAG  
TTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAACCATCAGGTACACCGTCTGAC  
GGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCA  
AAAACAGTACGACCGAAATTCGCCCACTGCTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCAT  
GGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGA  
TTTTTCCAAACGCACTTCGCCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAA  
TTAATGCCCGCTCCGTCGGTTTGGCCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pΔVR1VR2-8**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTESRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDLKAVWQLEQD  
VSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSEFES  
GFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAKRNTGIGNYTOINPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFE  
LFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYA  
HGDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTOINAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pVR1-7VR2-8**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGGAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAATTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAG  
GCGAAAAATACCAGCAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGAT  
TTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGG  
CAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCCAATCAGTTTGACG  
ATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTTCAAACGCCACGAC  
GACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCA  
AAACAGCAAGTCCGCTATACGCCGGCTAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATCCGGCTGTTG  
TCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGGTTTTGCCGGGAACATATGCCTTT  
AAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGACGTAATGCTTTTGGAGTTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAA  
AGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCT  
TGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGACCGAAATGCCGCCACTGCTTCC  
TACCGCTTCGGTAATGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGA  
AAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCCAAACGCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCG  
CTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCCGTTTGCGCCACAAATTC  
TAA

**氨基酸序列 pVR1-7VR2-8**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEFDFIERGKKGENTSSRIRTKISDFGSFIGFKGSED  
LGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHD  
DMPVSVRYDSEPFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAKRNTGIGNYTQINPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAF  
KYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLSENGDKTKNSTTEIAATAS  
YRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRHKE  
\*

**DNA 序列 pVR1-7VR2-8Δ5**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
AATCAAAGCCGGCGTGGAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAATTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAG  
GCGAAAAATACCAGCAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGAT  
TTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGG  
CAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCCAATCAGTTTGACG  
ATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTTCAAACGCCACGAC  
GACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCA  
AAACAGCAAGTCCGCTATACGCCGGCTAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATCCGGCTGTTG  
TCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGGTTTTGCCGGGAACATATGCCTTT  
AAATATGCGAGACACGCCAATGTCCGATTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGG  
CTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGACCGAAATG  
CCGCCACTGCTTCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGC  
GGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCCAAACGCACTTCCGC  
CATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCCGTT  
TGCGCCACAAATTC TAA

氨基酸序列 **pVR1-7VR2-8Δ5**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEFDIFIERGKKGENTSSRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTFAKRNTGIGNYTQINPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLSSENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSVDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRHKF\*

DNA 序列 **pDELVR1-2-5-6**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA AATCAAAGCCGGCGTGGAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATT TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC GTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTAC GCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATG TGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCACCCGAATTTTCC GGTTCAGCGGCAGCGTTCAATTTCGTTCCGATCCAAAAACAGCAAGTCCGCTTATACGCCGGCTCCGGCTGTTGTCGG CAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGGTTTTGCGCGGAACATATGCCTTTAAT ATGCGGAGACACGCCAATGTCGGATTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTG AATCTCGCCTGGCGGCTCAGTTGGATTGTCTAGTACGACCGAAATGCGCCACTGCTTCTACCGCTTCGGTAA TCGAGTTCCACGCATCAGCTATGCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCTACG ATCAAATCATCGCCGGCTTGATTATGATTTTTCCAAACGCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGC AATACCGGCATCGGCAACTTAACTCAAATTAATGCCGCTCCGTCCGTTTTGCGCCACAAATTCTAA

氨基酸序列 **pDELVR1-2-5-6**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTESRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQD VSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFS GFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGLKNHQVHRLTGGYEEGGL NLALAAQLDLSSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSVDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKR NTGIGNYTQINAASVGLRHKF\*

DNA 序列 **pPOR7in1**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA AATCAAAGCCGGCGTGGAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAAGCCGCTAACGGTGGAGCGTTCC ACTTTATCGAACCGGTAAAAAAGCGAAAATACCAGCAGCGGTGAGGTAAAAGTTACTAAAGTTACTAAGGCCAAA AGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTTCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCT GAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCT TTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCC ATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTTT CCGTACGCTACGATTCACCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCG CCTATACGCCGGCTTATTATACTAAGAATACAAAATAAATCTTACTCTCGTTCCGGCTGTTGTCGGCAAGCCCGGA TCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGGTTTTGCGCGGAACATATGCCTTTAATATGCGGAGACA CGCCAATGTCGGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCT TGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTG GATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACAAAACAGTACGACCGAAATGCGCCACTGCTTCTACCGCTTCGGTAA TGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCTACG ATCAAATCATCGCCGGCTTGATTATGATTTTTCCAAACGCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGC AATACCGGCATCGGCAACTTAACTCAAATTAATGCCGCTCCGTCCGTTTTGCGCCACAAATTCTAA

**氨基酸序列 pPOR7in1**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGAFDFIERGKKGENTSSGQVKVTKVTKAK  
 SRIRTKISDFGSFIGFKGSELDGDLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDDASQA  
 IDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKNTNNLTLVPAVVGKPG  
 SDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQL  
 DLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKR  
 NTGIGNYTQINAASVGLRHKF\*

**DNA 序列 pPOR8in4**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAGGCAGGAAGTACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAAGCCGCTAACGGTGGAGCGAGCG  
 GTCAGGTAAAAGTTACTAAAGTTACTAAGGCCAAAAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATC  
 GGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCCG  
 CGGCGGCGGACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTC  
 GCGTTGCCAATCAGTTTGACGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTG  
 GGTATTTTCAAACGCCACGACGACATGCCGCTTCCGTACGCTACGATTCCTCCCGAATTTTCCGGTTTCAGCGGCAG  
 CGTTCAATTGCTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCGCTTATACGCCGGCTTATTATACTAAGAATACAAAACAAACGCA  
 ATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATAATAATCTTACTCTCGTTCCGGCTGTTGTCCGGCAAGCCCGGATCG  
 GATGTGATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGGCGGTTTTGCCGGAACTATGCCTTTAAATATGCGAGACACGC  
 CAATGTCGGACGTAATGCTTTGAGTTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGA  
 AAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGGCGGCTCAGTTGGAT  
 TTGCTGAAAATGGCGACAAAACAAAACAGTACGACCGAAATGCGCCACTGCTTCTTACCCTTCGGTAATGC  
 AGTTCCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTTATCGAACCGGTAAGGCGAAAATACCAGCTACGATC  
 AAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTCCAAAACGCACTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAACGCAAT  
 ACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCTCCGTCCGTTTTGCGCCACAAATTTCTAA

**氨基酸序列 pPor8in4**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASGQVKVTKVTKAKSRIRTKISDFGSFI  
 GFKGSELDGDLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRVANQFDDASQAIDPWDSNNDVASQL  
 GIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKNTNKRNTGIGNYTQINNNLTLVPAVVGKPGS  
 DVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLD  
 LSENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKR  
 TGIGNYTQINAASVGLRHKF\*

**DNA序列 pPor7in1-8in4**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGGCAGGAATACCAGCTGCAATTGACTGAAGCACAAAGCCGCTAACGGTGGAGCGTTCCG  
 ACTTTATCGAACCGGGTAAAAAAGGCGAAAAATACCAGCAGCGGTGAGGTAAAAGTTACTAAAGTTACTAAGGCCAAA  
 AGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTGGGCGACGGGCT  
 GAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGGCGCACCCAGTGGGGCAACAGGGAATCCT  
 TTATCGGCTTGGCAGGCCAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTTCGCGTTGCGAATCAGTTTACGATGCCAGCCAAGCC  
 ATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGACATGCCGGTTTC  
 CGTACGCTACGATCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAAACAGCAAGTCCG  
 CCTATACGCCGGCTTATTATACTAAGAATACAAACAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATAAT  
 AATCTTACTCTCGTTCCGGCTGTTGTCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAATGG  
 CGGTTTTGCCGGGAATATGCCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTGCGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGA  
 TCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTAT  
 GAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCTTGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTAC  
 GACCGAAATTGCCGCCACTGCTTCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACT  
 TTATCGAACCGGGTAAAAAAGGCGAAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCCAAA  
 CGCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTTGGCTGAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGC  
 CTCGCTCGGTTTGGCCACAAATCTAA

**氨基酸序列 pPor7lin-8in4**

MRKKLTAIVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGAFDFIERGKKGENTSSGQVKVTKVTKAK  
 SRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQA  
 IDPWDSNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAYYTKNTNKRNTGIGNYTQINN  
 NLTLVPAVVGKPGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGY  
 EEGGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATASYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSK  
 RTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRHKE\*

图 2A

**DNA序列 pVR1-7VR2-7**

ATATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGC  
 GAAATCAAAGCCGGCGTGAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAATTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAA  
 AGGCGAAAAATACCAGCAGCCGCATCAGGACGAAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGG  
 ATTTGGGCGACGGGCTGAAGGCTGTTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGG  
 GGCAACAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTCCGCTTGGCAATCAGTTTGA  
 CGATGCCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACG  
 ACGACATGCCGGTTTCCGTACGCTACGATTCCCCCGAATTTCCGGTTTTCCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATC  
 CAAAACAGCAAGTCCGCTATACGCCGGCTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAAATACCAGCCCGGC  
 TGTTGTCCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCCGGTTTTGCCGGGAACATG  
 CCTTTAAATATGCGAGACACGCCAATGTCGGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAA  
 GCCAAAGGTACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTGAATCT  
 CGCCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGCTGAAAAATGCCGACAAAAACAAAAACAGTACGACCGAAATGCCCGCCACTG  
 CTTCCTACCGCTTCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTTCCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAA  
 GCGAAAAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCAAACGCACCTCCGCCATCGTGT  
 TGGCGCTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTTGCCCCACA  
 AATTCTAA

**氨基酸序列 pVR1-7VR2-7**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEFDFIERGKKGENTSSRIRTKISDFGSFIGFKGSED  
 LGDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQLGIFKRHD  
 DMPVSVRYDSEPFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYT PAFDFIERGKKGENTS PAVVGKPGSDVYAGLNYKNGGFAGNYA  
 FKYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLSENGDKTKNSTTEIAATA  
 SYRFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTS YDQI IAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRHK  
 F\*

**DNA序列 pVR1-8VR2-8**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGAAGGCAGGAACTACCAGCTGCAATTGACTGAAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACA  
 CTCAAATTAATAGCCGCATCAGGACGAAAAATCAGTGATTTCCGGCTCGTTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTG  
 GCGACGGGCTGAAGGCTGTTTTGGCAGCTTGAGCAAGACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAA  
 CAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTCCGCTTGGCAATCAGTTTGACGATG  
 CCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTCAAACGCCACGACGAC  
 ATGCCGGTTTTCCGTACGCTACGATTCCCCGAATTTCCGGTTTTCCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAA  
 CAGCAAGTCCGCCTATACGCCGGCTAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATCCGGCTGTTGTGCG  
 GCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCCGGTTTTGCCGGGAACATGCCTTTAAA  
 TATGCGAGACACGCCAATGTCGGACGTAATGCTTTTGAGTTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAAAGG  
 TACCGATCCCTTGAAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCTTGG  
 CGGCTCAGTTGGATTGCTGAAAAATGGCGACAAAAACAAAAACAGTACGACCGAAATGCCGCCACTGCTTCCTAC  
 CGTTCCGGTAATGCAGTTCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTTCCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAA  
 TACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCAAACGCACCTCCGCCATCGTGTCTGGCGCTT  
 GGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCCTCCGTCGGTTTTGCCCCACAAATCTAA

**VR18VR28**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEKRNTGIGNYTQINSRIRTKISDFGSFIGFKGSEDL  
 GDGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQLGIFKRHDD  
 MPVSVRYDSEPFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYT PAKRNTGIGNYTQINPAVVGKPGSDVYAGLNYKNGGFAGNYAFK  
 YARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLSENGDKTKNSTTEIAATASY  
 RFGNAVPRISYAHGFDFIERGKKGENTS YDQI IAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRHKF

**DNA序列 pVR1-8VR2-7**

ATGCGAAAAAACTTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCCGTTGCCGATGTCAGCCTATACGGCGA  
 AATCAAAGCCGGCGTGGAAGGCAGGAATACCAGCTGCAATTGACTGAAAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACA  
 CTCAAATTAATAGCCGCATCAGGACGAAAATCAGTGATTTCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGGAGTGAGGATTTG  
 GCGACGGGCTGAAGGCTGTTTGGCAGCTTGAGCAAAACGTATCCGTTGCCGGCGGGCGCGACCCAGTGGGGCAA  
 CAGGGAATCCTTTATCGGCTTGGCAGGCGAATTCGGTACGCTGCGCGCCGGTCGCGTTGCCAATCAGTTTGACGATG  
 CCAGCCAAGCCATTGATCCTTGGGACAGCAATAATGATGTGGCTTCGCAATTGGGTATTTTCAAACGCCACGACGAC  
 ATGCCGGTTCCGTACGCTACGATCCCCCGAATTTCCGGTTTCAGCGGCAGCGTTCAATTCGTTCCGATCCAAAA  
 CAGCAAGTCCGCCATACGCCGGCTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGAAAATACCAGCCCGGCTGTTG  
 TCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGTATTATGCCGGTCTGAATTACAAAAATGGCGGTTTTGCGGGAACTATGCCTTT  
 AAATATGCGGAGACACGCCAATGTCGGACGTAATGCTTTTGGATTGTTCTTGATCGGCAGCGGGAGTGATCAAGCCAA  
 AGGTACCGATCCCTTGA AAAAACCATCAGGTACACCGTCTGACGGGCGGCTATGAGGAAGGCGGCTTGAATCTCGCCT  
 TGGCGGCTCAGTTGGATTTGTCTGAAAATGGCGACAAAACCAAAAACAGTACGACCGAAATTGCCGCCACTGCTTCC  
 TACCGCTTCGGTAATGCAGTCCACGCATCAGCTATGCCCATGGTTTCGACTTTATCGAACGCGGTAAAAAAGGCGA  
 AAATACCAGCTACGATCAAATCATCGCCGGCGTTGATTATGATTTTTCCAAACGCACTTCCGCCATCGTGTCTGGCG  
 CTTGGCTGAAACGCAATACCGGCATCGGCAACTACACTCAAATTAATGCCGCTCCGTCGGTTTGCGCCACAAATTC  
 TAA

**氨基酸序列 pVR1-8VR2-7**

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEKRNTGIGNYTQINSRIRTKISDFGSFIGFKGSEDL  
 GDGLKAVWQLEQNVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLRAGRANQFDDASQAI DPWDSNNDVASQLGI FKRHDD  
 MPVSVRYDSPEFSGFSGSVQFVPIQNSKSAYTPAFDFIERGKKGENTSPAVVGKPGSDVYVYAGLNYKNGGFAGNYAF  
 KYARHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNHQVHRLTGGYEEGGLNLALAAQLDLENGDKTKNSTTEIAATAS  
 YRFGNAVPRISYAHGDFIERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGIGNYTQINAASVGLRHKF

图 2B





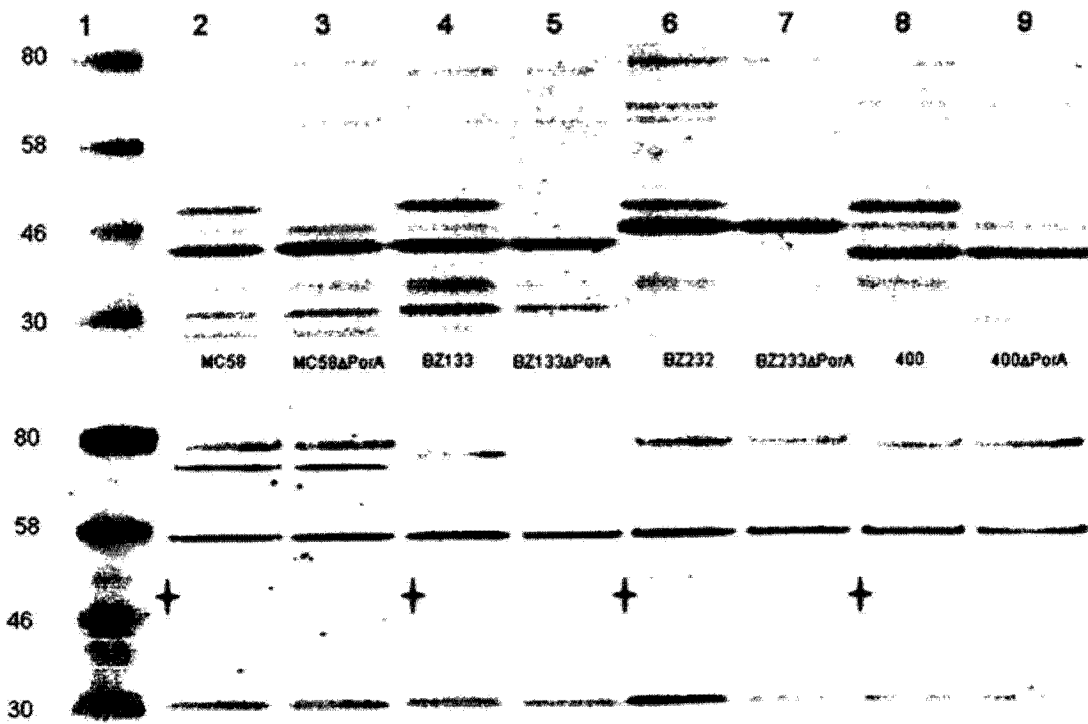
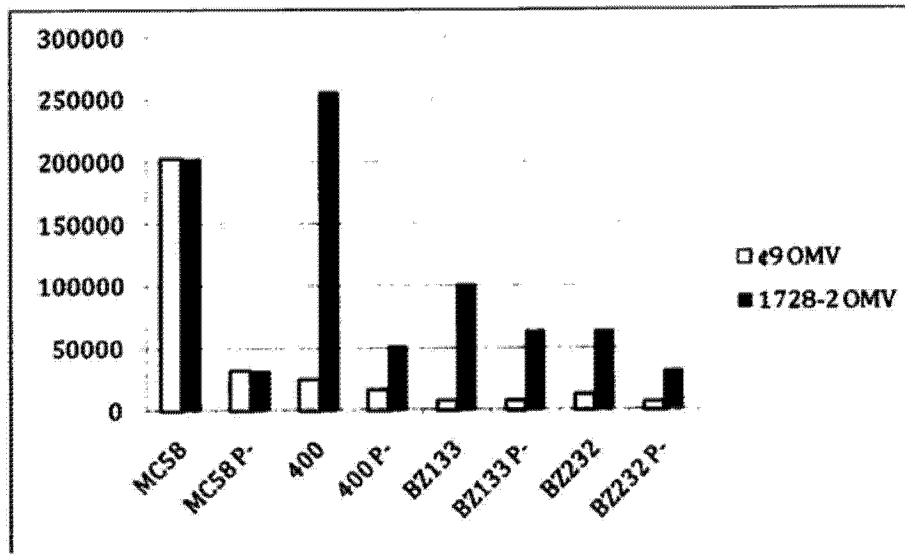


图 5

**A**



**B**

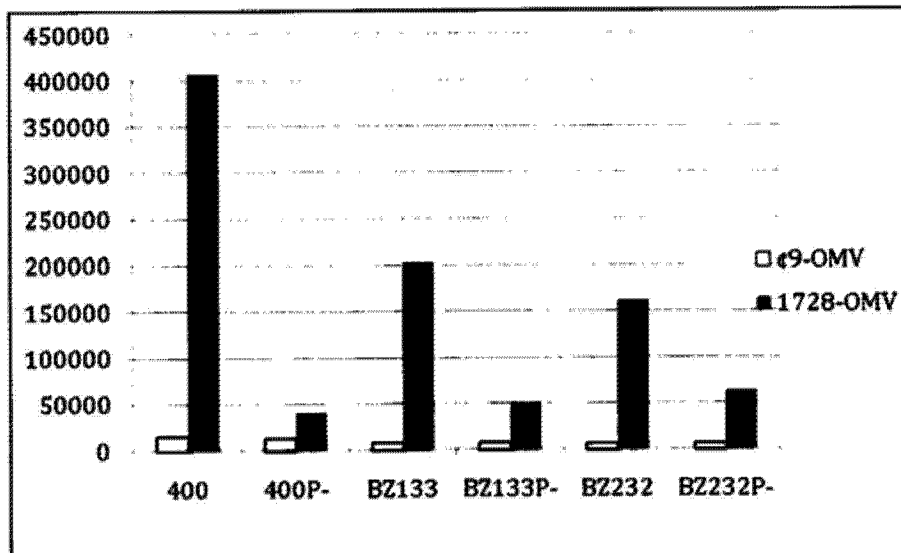


图 6

专利名称(译)	重组脑膜炎奈瑟氏菌PorA孔蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">CN103189387A</a>	公开(公告)日	2013-07-03
申请号	CN201180047044.4	申请日	2011-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	格里菲斯大学		
申请(专利权)人(译)	格里菲斯大学		
当前申请(专利权)人(译)	格里菲斯大学		
[标]发明人	迈克尔·保罗·詹宁斯 伊恩·理查德·安塞尔姆·皮克		
发明人	迈克尔·保罗·詹宁斯 伊恩·理查德·安塞尔姆·皮克		
IPC分类号	C07K14/22 A61P37/04 G01N33/68 A61K39/095 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/22 A61K39/095 C07K16/1217 C07K2317/33		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2010903418 2010-07-30 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)PorA构建体, 其一个或多个可变区通过插入完整保守区或保守区氨基酸而被破坏。PorA的高免疫原性可变区是引发不具有广泛保护性的菌株特异性免疫应答的原因, 所以破坏可变区使得免疫应答针对保守区表位, 从而针对更广谱的脑膜炎奈瑟氏菌株提供有效免疫。本发明还提供了编码核酸、基因构建体、表达PorA构建体的宿主细胞, 以及用于检测和治疗脑膜炎奈瑟氏菌感染的组合物、试剂盒和方法。

环	序列
1 (VR1)	VEGRNYQLQLTEAQAANGGASGQVKVTKVTKAKRKSRIRTKI (SEQ ID NO:47)
2	VSV-GGGATQWGNR (SEQ ID NO:48)
3	ASQAIDPWSNNDVASQLGIFKRHDD (SEQ ID NO:49)
4 (VR2)	PIQNSKSAYTPAYYTKNTNNTLTPAVVVGKPGS (SEQ ID NO:50)
5 (SVR1)	RHANVGRDAFELFLIGSGSDQAKGTDPLKNH (SEQ ID NO:51)
6 (SVR2)	LSENGDK-TKNSTE (SEQ ID NO:52)
7	FDLIERGKKGENTIS (SEQ ID NO:53)
8	KRNTGICNYTQIN (SEQ ID NO:54)