

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03802276.1

C12N 15/53

C12N 15/60

C12N 1/21

G01N 33/53

A61K 38/43

A61K 39/04

[43] 公开日 2005 年 11 月 30 日

[11] 公开号 CN 1703513A

[22] 申请日 2003.4.16 [21] 申请号 03802276.1

[30] 优先权

[32] 2002.4.16 [33] US [31] 60/372,450

[86] 国际申请 PCT/CA2003/000566 2003.4.16

[87] 国际公布 WO2003/089462 英 2003.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.15

[71] 申请人 成都永安制药有限公司

地址 中国四川省成都市

共同申请人 刘 军

[72] 发明人 刘 军 杰弗里·陈

大卫·亚历山大

[74] 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

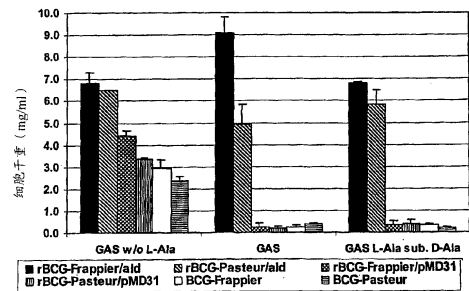
代理人 王 琦 宋志强

权利要求书 3 页 说明书 29 页 序列表 36 页
附图 9 页

[54] 发明名称 包括表达丙氨酸脱氢酶、丝氨酸脱水酶和/或谷氨酰胺合成酶的重组卡介苗菌株的结核病疫苗

[57] 摘要

本发明涉及一种含有可表达一种核酸的活的重组牛型结核菌卡介苗 (*Mycobacterium bovis* - BCG) 菌株, 该核酸编码至少一种具有丙氨酸脱氢酶活性、谷氨酰胺合成酶活性或丝氨酸脱水酶活性的蛋白质或多肽。



1、一种可表达一种核酸的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该核酸编码至少一种具有丙氨酸脱氢酶活性、谷氨酰胺合成酶活性或 L-丝氨酸脱水酶活性的蛋白质或多肽。

5 2、一种可表达一种核酸的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该核酸编码至少一种蛋白质或多肽，选自丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7 到 SEQ ID NO:14]和 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]所组成的组中。

10 3、一种可表达一种核酸的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该核酸包括至少一种全部或部分核酸分子，选自[SEQ ID NO:1]、[SEQ ID NO:5]、[SEQ ID NO:7]、[SEQ ID NO:9]、[SEQ ID NO:11]和[SEQ ID NO:13]所组成的组中。

15 4、一种可表达一种核酸的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该核酸包括一个序列，该序列与至少一种选自[SEQ ID NO:1]、[SEQ ID NO:5]、[SEQ ID NO:7]、[SEQ ID NO:9]、[SEQ ID NO:11]和[SEQ ID NO:13]所组成的组中的核酸具有至少 60%的序列一致性。

5、如权利要求 3 或 4 所述的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，其中核酸分子已被修饰。

20 6、如权利要求 1、2、3、4 或 5 所述的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，其中该牛型结核菌卡介苗菌株选自以下的组中：牛型结核菌-卡介苗-Russia、牛型结核菌-卡介苗-Moreau、牛型结核菌-卡介苗-Japan、牛型结核菌-卡介苗-Sweden、牛型结核菌-卡介苗-Birkhaug、牛型结核菌-卡介苗-Prague、牛型结核菌-卡介苗-Glaxo、牛型结核菌-卡介苗-Denmark、牛型结核菌-卡介苗-Tice、牛型结核菌-卡介苗-Frappier、牛型结核菌-卡介苗-Connaught、牛型结核菌-卡介苗-Phipps 和牛型结核菌-卡介苗-Pasteur。

25 7、一种包括权利要求 1、2、3、4、5 或 6 中的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株的药物组合物。

8、一种包括权利要求 1、2、3、4、5 或 6 中的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株的用于治疗或预防哺乳动物免受分枝杆菌侵害的疫苗或致免疫的组合物。

9、如权利要求 8 所述的疫苗或致免疫的组合物，其中分枝杆菌是结核杆菌。

10、如权利要求 8 或 9 所述的疫苗或致免疫的组合物，进一步包括一种药物上可接受的载体。

11、如权利要求 8、9 或 10 所述的疫苗或致免疫的组合物，进一步包括一种佐剂。

12、如权利要求 8、9、10 或 11 所述的疫苗或致免疫的组合物，进一步包括来源于一种或多种其它病原体的致免疫的物质。

13、一种治疗或预防哺乳动物免受结核杆菌或牛型结核杆菌侵害的方法，包括给哺乳动物施用如权利要求 1、2、3、4、5 或 6 中所述的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株。

14、如权利要求 13 所述的方法，其中哺乳动物是牛。

15、如权利要求 13 所述的方法，其中哺乳动物是人。

16、如权利要求 13 所述的方法，其中疫苗或致免疫的组合物是在有佐剂存在下用药的。

17、一种治疗或预防哺乳动物免受癌症侵害的方法，包括给哺乳动物施用如权利要求 1、2、3、4、5 或 6 中所述活的重组牛型结核菌卡介苗菌株。

18、如权利要求 17 所述的方法，其中疫苗或致免疫的组合物是在有佐剂存在下用药的。

19、如权利要求 17 或 18 所述的方法，其中癌症是膀胱癌。

20、一种包括权利要求 1、2、3、4、5 或 6 中的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株的测试试剂盒。

21、一种含有丙氨酸作为唯一生长氮源的抑制牛型结核菌菌株生长的培养基组合物。

22、一种含有丝氨酸作为唯一生长氮源的抑制牛型结核菌菌株生长的培养

基组合物。

23、如权利要求 21 或 22 所述的培养基组合物，进一步包括：

(a) 一种碳源；

(b) 铁离子；

5 (c) 镁离子；和

(d) SO_4 。

24、如权利要求 23 所述的培养基组合物，其中碳源选自甘油、右旋糖、柠檬酸和葡萄糖所组成的组中。

25、一种抑制牛型结核菌卡介苗生长的方法，包括：

10 (a) 获得一个分枝杆菌的样品；和

(b) 在选择性培养基中培养该样品。

26、如权利要求 25 所述的方法，其中选择性培养基包括以丙氨酸作为唯一生长氮源。

15 27、如权利要求 25 所述的方法，其中选择性培养基包括以丝氨酸作为唯一生长氮源。

28、一种培养牛型结核菌卡介苗的方法，包括：

(a) 获得一个分枝杆菌样品；和

(b) 在不同的培养基中培养该样品。

29、如权利要求 28 所述的方法，其中不同的培养基中含有组氨酸。

包括表达丙氨酸脱氢酶、丝氨酸脱水酶和/或谷氨酰胺合成酶的重组卡介苗菌株的结核病疫苗

技术领域

5 本发明涉及结核病 (tuberculosis, TB) 疫苗。

背景技术

结核病是一种由侵染性病原体结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起的致死性传染病。该病每年引起二百万人的死亡。世界卫生组织(WHO)2001年年报估计在1997年有八百万新增结核病人,而在1999年新增的结核病人达到八百四十万。若按这种趋势发展,估计从2000年至2020年10 年将新增约十亿带菌者,其中二亿人将发病,三千五百万人将死于结核病。HIV/AIDS的传播和对多种药物有抗性的结核病的出现使该病变得更加糟糕。卡介苗(Bacille Calmette-Guerin, BCG),一种牛型结核菌(*Mycobacterium bovis*)的弱毒株,是目前唯一能得到的预防结核病的疫苗。在侵染性动物模型中,证实卡介苗疫苗能诱导对结核杆菌的保护性免疫反应(Baldwins et al., 15 1998)。人体实验也证明卡介苗疫苗能持续的保护人在儿童期免受结核病,特别是脑膜炎。然而卡介苗疫苗的保护作用存在争议,因为它在保护成年人免受肺结核病的有效性方面变化很大(Fine, 1989; Colditz et al., 1994; Sterne et al., 1998)。在二十世纪四十年代和五十年代该疫苗在发达国家,如英国、20 丹麦和北美在实施应用上证明是有效的(有效率为70~80%)。而七十年代在印度的一次规模最大,涉及265,000人的一次临床应用,卡介苗疫苗在保护人们免受肺结核病方面没有检测到它的保护作用。因此研究一种替代BCG的改进疫苗并用于预防结核病是一个很迫切的课题。

对卡介苗保护作用的变异性有几种解释(Anderson, 2001)。最突出的

假说是暴露于环境中的分枝杆菌使寄主对它的抗性变得敏感，因此人们获得异源免疫性，这使疫苗的潜在好处不明显(Fine 1995; Fine and Vynnycky 1998)。另外一个最近的研究显示对那些被环境中分枝杆菌致敏的动物，卡介苗的增殖被抑制，结果卡介苗疫苗只诱导出暂时的免疫反应，而不能提供抗结核病的保护性免疫反应(Brandt et al., 2002)。这一研究也支持长期观察的结果，即对结核病免疫性的诱导需要卡介苗的生产性侵染。卡介苗是一种活疫苗，灭活的卡介苗无保护作用。象结核杆菌一样卡介苗在被侵染寄主的不同组织中能够形成肉芽瘤和脓肿(Hogan et al., 2001)。结核杆菌和牛型结核菌卡介苗能够在肉芽瘤，一种缺乏营养和低氧压的恶劣环境中生存。这种能力可能是由于细菌能改变代谢适应有限的碳、氮和能源资源(Barclay and Wheeler, 1989)。一个最近的研究显示脂肪酸作为碳源是结核杆菌在小鼠体内持续生存和激活巨噬细胞所必需的(Mckinney et al., 2000)。在具免疫活性的个体中继续接种疫苗，卡介苗可能在寄主体中持续存在一段时间，然后被寄主清除(Dann and North 1995; Lagranderie et al., 1996; Moisan et al., 2001)。

开发一种新的有效的卡介苗疫苗的关键是提供长期的保护作用(Orme, 2001; Young, 2000)。现有的卡介苗疫苗在孩子中能抗结核病从而起保护作用，但10至15年后它们的效力减弱了，可能是由于卡介苗疫苗引起的保护性免疫反应逐渐消失(Orme, 2001)。发展改进型疫苗的新策略包括使用弱化的分枝杆菌、亚单位疫苗和DNA疫苗(Andern, 2001)。然而它们中还没有一种证明比卡介苗更有潜力或更有效。牛型结核菌卡介苗的存活和生长是诱导保护性免疫反应所必需的。实验证明用异烟肼对侵染的小鼠进行早期处理抑制细菌的生长，结果阻止了获得性抗性的发展。为了获得更有效的疫苗，在寄主体内能够长期持续存活的卡介苗菌株是必需的。因此需要新的卡介苗重组菌株。

25 发明内容

本发明提供的疫苗克服了卡介苗菌株利用自然产生的氨基酸作为生长

碳源有限能力。另外即使在铵存在时，L-丙氨酸、D-丙氨酸或L-丝氨酸仍然抑制卡介苗菌株的生长。在卡介苗菌株中表达功能性丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]可解除丙氨酸对卡介苗的生长抑制作用。同样在卡介苗菌株中表达功能性L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]可解除L-丝氨酸对卡介苗的生长抑制作用。这种抑制作用的机制是通过阻滞谷氨酰胺合成酶而实现的。在卡介苗中谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的过表达可解除丙氨酸和L-丝氨酸对卡介苗的生长抑制作用。表达或过表达功能性丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、功能性L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]和/或谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的重组卡介苗菌株在寄主体内存活和持续存在的时间更长，从而诱导长期的保护性免疫反应。这种持续性重组卡介苗菌株提供更有

5 有效的抗结核病和抗其它分枝杆菌侵染的疫苗。

10

本发明涉及一种重组牛型结核菌卡介苗菌株，这种重组牛型结核菌卡介苗表达一种编码丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]和/或谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的DNA。我们发现由于缺乏功能性丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]，卡介苗不能利用丙氨酸（L-丙氨酸或D-丙氨酸）作为生长的唯一氮源。我们进一步发现丙氨酸（L-丙氨酸或D-丙氨酸）抑制所有的卡介苗疫苗株的生长。所述的抑制作用可通过在卡介苗中表达功能性丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]而被解除。同样卡介苗菌株不能利用L-丝氨酸作为生长的唯一氮源，并且卡介苗的生长被L-丝氨酸抑制。在卡介苗菌株中表达L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]可解除L-丝氨酸引起的生长抑制作用。

15

20

丙氨酸(L-丙氨酸或D-丙氨酸)和L-丝氨酸对卡介苗生长的抑制作用可能是阻滞了谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的活性。在卡介苗菌株中过表达谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]可解除丙

25

氨酸和 L-丝氨酸对卡介苗的生长抑制作用。谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶提供谷氨酰胺和谷氨酸，它们对于所有氨基酸、蛋白质、嘌呤和嘧啶的生物合成都至关重要。谷氨酰胺合成酶的抑制使细胞生长停止。提供能转化为谷氨酸的氨基酸，如 L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-天冬酰胺和 L-天冬氨酸能解除这种抑制。确实，我们的实验数据显示丙氨酸（L-丙氨酸或 D-丙氨酸）和 L-丝氨酸对卡介苗的生长抑制能通过添加 L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-天冬酰胺或 L-天冬氨酸而解除。

因为卡介苗是活疫苗，表达或过表达丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]和/或谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]能使它在人寄主体内存活更长时间，因而能诱导长期记忆免疫。这些重组卡介苗菌株提供了非常有用的疫苗。

本发明涉及一种活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，它含有一种能表达的核酸，该核酸编码至少一种具有丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]活性、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7 到 SEQ ID NO:14]活性或 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]活性的蛋白质或多肽。

本发明还涉及一种活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，它含有一种能表达的核酸，该核酸编码至少一种选自丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7 到 SEQ ID NO:14]和 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]所组成的组中的蛋白质或多肽。

本发明进一步涉及一种活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，它含有一种能表达的核酸，该核酸含有至少一种全部或部分的核酸分子选自如下组中：[SEQ ID NO:1]、[SEQ ID NO:2]、[SEQ ID NO:5]、[SEQ ID NO:6]、[SEQ ID NO:7]、[SEQ ID NO:8]、[SEQ ID NO:9]、[SEQ ID NO:10]、[SEQ ID NO:11]、[SEQ ID NO:12]、[SEQ ID NO:13]和[SEQ ID NO:14]。

在一个具体的实施方式中，活的重组卡介苗疫苗选自：牛型结核菌-BCG-Russia (*Mycobacterium bovis*-BCG-Russia)、牛型结核菌-BCG- Moreau

(*Mycobacterium bovis*-BCG-Moreau)、牛型结核菌-BCG-Japan(*Mycobacterium bovis*-BCG-Japan)、牛型结核菌-BCG-Sweden(*Mycobacterium bovis*-BCG-Sweden)、牛型结核菌-BCG-Birkhaug(*Mycobacterium bovis*-BCG-Birkhaug)、牛型结核菌-BCG-Prague(*Mycobacterium bovis*-BCG-Prague)、牛型结核菌-BCG-Glaxo(*Mycobacterium bovis*-BCG-Glaxo)、牛型结核菌-BCG-Denmark(*Mycobacterium bovis*-BCG-Denmark)、牛型结核菌-BCG-Tice(*Mycobacterium bovis*-BCG-Tice)、牛型结核菌-BCG-Frappier(*Mycobacterium bovis*-BCG-Frappier)、牛型结核菌-BCG-Connaught(*Mycobacterium bovis*-BCG-Connaught)、牛型结核菌-BCG-Phipps(*Mycobacterium bovis*-BCG-Phipps)和牛型结核菌-BCG-Pasteur(*Mycobacterium bovis*-BCG-Pasteur)所组成的组中。

本发明的另一方面提供一种含有一个活的重组牛型结核菌卡介苗菌株的药物组合物,该菌株含有一种能表达的核酸,该核酸编码至少一种具有丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]活性、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7到SEQ ID NO:14]活性和L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]活性的蛋白质或多肽。

本发明还涉及一种活的重组牛型结核菌卡介苗菌株,它含有一种能表达的核酸,该核酸编码至少一种选自丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7到SEQ ID NO:14]和L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]所组成的组中的蛋白质或多肽。

本发明的另一方面提供一种含有一个活的重组牛型结核菌卡介苗菌株的药物组合物,该菌株含有一种能表达的核酸,该核酸含有至少一种选自如下组中的核酸分子的全部或部分:[SEQ ID NO:1]、[SEQ ID NO:2]、[SEQ ID NO:5]、[SEQ ID NO:6]、[SEQ ID NO:7]、[SEQ ID NO:8]、[SEQ ID NO:9]、[SEQ ID NO:10]、[SEQ ID NO:11]、[SEQ ID NO:12]、[SEQ ID NO:13]和[SEQ ID NO:14]。

本发明的另一方面也提供一种疫苗或致免疫的组合物，用于治疗或预防哺乳动物免受分枝杆菌的侵害。它含有一个活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该菌株含有一种能表达的核酸，该核酸编码至少一种具有丙氨酸脱氢酶 [SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]活性、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7 到 SEQ ID
5 NO:14]活性或 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]活性的蛋白质或多肽。

另一方面，本发明也提供一种疫苗或致免疫的组合物，用于治疗或预防哺乳动物免受分枝杆菌的侵害。它含有一个活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该菌株含有一种能表达的核酸，该核酸编码至少一种选自丙氨酸脱氢酶
10 [SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]、谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]和 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]所组成的组中的蛋白质或多肽。

本发明的另一方面也提供一种疫苗或致免疫的组合物，用于治疗或预防哺乳动物免受分枝杆菌的侵害。它含有一个活的重组牛型结核菌卡介苗菌株，该菌株含有一种能表达的核酸，该核酸含有至少一种选自如下组中的核酸分子的全部或部分： [SEQ ID NO:1]、 [SEQ ID NO:2]、 [SEQ ID NO:5]、
15 [SEQ ID NO:6]、 [SEQ ID NO:7]、 [SEQ ID NO:8]、 [SEQ ID NO:9]、 [SEQ ID NO:10]、 [SEQ ID NO:11]、 [SEQ ID NO:12]、 [SEQ ID NO:13]和[SEQ ID NO:14]。在一个优选的具体实施方式中，该疫苗或致免疫的组合物，能用于治疗或预防哺乳动物免受分枝杆菌的侵害。在另一个优选的具体实施方式中，本发明的疫苗或产生免疫的组合物，进一步含有药物上可接受的载体。在另一个优选的具体实施方式中，该疫苗或致免疫的组合物，进一步含有佐剂。在另一个具体实施方式中，该疫苗或致免疫的组合物，进一步含有来源于一个或多个其它病原体的致免疫的物质。

25 本发明另一方面涉及一种用于治疗或预防哺乳动物免受结核杆菌或牛型结核菌侵害的方法。其中包括给哺乳动物供给本发明的疫苗或致免疫的组

合物。一个具体实施方式下哺乳动物是牛，另一个具体实施方式下哺乳动物是人。还有一种具体实施方式中，疫苗或致免疫的组合物是与佐剂一起给予的。

本发明进一步的方面是一种用于治疗或预防哺乳动物免受癌症的方法。其中包括给哺乳动物施用本发明的疫苗或致免疫的组合物。一种具体实施方式下癌症为膀胱癌。另一种具体实施方式中，疫苗或致免疫的组合物是与佐剂一起给予的。

本发明也涉及一个含有本发明的活的重组卡介苗菌株的测试试剂盒。

本发明进一步涉及一种抑制牛型结核菌卡介苗生长的培养基成分，它包括丙氨酸作为唯一生长氮源。另一种具体实施方式中，丝氨酸是唯一的生长氮源。另一具体实施方式中，本发明的培养基组合物还包括一种碳源、铁、镁和 SO_4 。在另一种具体实施方式中，碳源选自甘油、右旋糖（dextrose）、柠檬酸盐和葡萄糖（glucose）所组成的组中。

本发明涉及一种抑制牛型结核菌卡介苗生长的方法，其中包括如下的步骤：(a)获得一个含有分枝杆菌的样品；和(b)在选择性培养基上培养该样品。一种具体实施方式中，选择培养基是以丙氨酸为唯一氮源。另一种具体实施方式中，选择培养基是以丝氨酸为唯一氮源。

本发明另一方面涉及一种培养牛型结核菌卡介苗的方法，其中包括如下步骤：(a)获得一个含有分枝杆菌的样品；和(b)在不同的培养基上培养该样品。一种具体实施方式中，该培养基含有组氨酸。

附图说明

本发明的优选实施方式将结合以下附图进行描述。

图 1、*ald* 基因的克隆

首先一个 4.5kb 的含有 *ald* 基因[SEQ ID NO:1]的结核杆菌基因组 DNA *Sca* I 片段被连到线性化的 *Ecl*1136II pUC19，产生 pUC-ALD。然后连接含有 *ald* 基因[SEQ ID NO:1]的 1.9kb 的 *Kpn*I 片段到线性化的 *Kpn*I pMD31，产生

分枝杆菌质粒 pALD。

图 2、*sdaA* 基因的克隆

sdaA 基因[SEQ ID NO:5]的克隆由两步完成。首先 9.5kb *Bam*HI 结核杆菌基因组 DNA 片段被连到线性化的 *Bam*HI pMD31，产生 pSDA1。然后用
5 *Pst*I 断裂 pSDA1，随后通过 10.9kb *Pst*I 片段的自连产生质粒 pSDAA。

图 3、在 GAS 中 L-丙氨酸对卡介苗生长的抑制

在 7H9/ADC/甘油/吐温-80 液体培养基中 BCG-Japan、BCG-Frappier、
BCG-Pasteur 生长到稳定阶段，分别接种到两份 5ml 培养体积的 GAS、无
L-丙氨酸的 GAS 和添加了 27mM L-天冬酰胺的 GAS 中。然后培养到细胞密
10 度为每毫升 2×10^7 个细胞。在 37°C 不断摇动培养 16 天，然后取 2ml 细胞培
养液离心，将细胞沉淀冻干，称细胞干重。

图 4、在含有 NH_4Cl (5g/L)的 Sauton 中增加 L-丙氨酸的浓度抑制卡介苗
的生长

在 7H9/ADC/甘油/吐温-80 液体培养基中 a)BCG-Japan、b)BCG-Frappier
15 和 c)BCG-Pasteur 生长到稳定阶段。洗涤细胞，然后重新悬浮于 Sauton 基础
培养基(无氮源)中。重新悬浮的每种菌株的细胞接种到两份 5ml 培养体积的
添加了 NH_4Cl 的 Sauton 培养基和浓度增加的 L-丙氨酸的 Sauton 培养基中。
培养物在 37°C 不断摇动培养 30 天，然后称细胞干重。

图 5、在 GAS 中 D-丙氨酸对卡介苗生长的抑制

20 在 7H9/ADC/甘油/吐温-80 液体培养基中 BCG-Japan、BCG-Frappier、
BCG-Pasteur 生长到稳定阶段，分别接种到 5ml 培养体积的以 D-丙氨酸替代
L-丙氨酸的 GAS、不含 L-丙氨酸的 GAS 和添加 27 mM L-天冬酰胺的 GAS(含
D-丙氨酸)。然后培养到细胞密度为每毫升 2×10^7 个细胞。培养物在 37°C
不断摇动培养 13 天，然后称细胞干重。

25 图 6、在 GAS 培养基中表达丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1]的重组卡介苗
菌株的生长

对 BCG--Frappier/*ald*、BCG--Pasteur/*ald*、BCG--Frappier/pMD31、BCG--Pasteur/pMD31、BCG--Frappier 和 BCG--Pasteur 的生长进行了比较。在 7H9/ADC/甘油/吐温-80 液体培养基中，不同菌株的细胞培养到稳定阶段，洗涤。然后重新悬浮于 Sauton 基础培养基(无氮源)中。重新悬浮的细胞接种到两份 5ml 培养体积的无 L-丙氨酸的 GAS、含 L-丙氨酸的 GAS 和以 D-丙氨酸替代 L-丙氨酸的 GAS 中。培养物在 37℃ 不断摇动培养 15 天，然后称细胞干重。

图 7、在 GAS 中 L-丝氨酸对卡介苗生长的抑制

在 7H9/ADC/甘油/吐温-80 液体培养基中 BCG-Japan、BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 生长到稳定阶段，分别接种到两份 5ml 培养体积的以 L-丝氨酸替代 L-丙氨酸的 GAS、无 L-丙氨酸的 GAS 和添加 27mM L-天冬酰胺的 GAS(含 L-丝氨酸)中。然后培养到细胞密度为每毫升 2×10^7 个细胞。在 37℃ 不断摇动培养 15 天，然后称细胞干重。

图 8、在含有 L-丝氨酸的 GAS 培养基中表达 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5] 的重组卡介苗菌株的生长

对 BCG-Japan/*sdaA*、BCG-Frappier/*sdaA*、BCG-Pasteur/*sdaA*、BCG-Japan、BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 的生长进行了比较。在 7H9/ADC/甘油/吐温-80 液体培养基中，不同菌株的细胞培养到稳定阶段，洗涤细胞。然后重新悬浮于 Sauton 基础培养基(无氮源)中。重新悬浮的细胞接种到两份 5ml 培养体积的无 L-丙氨酸的 GAS、以 L-丝氨酸替代 L-丙氨酸的 GAS 和添加 27 mM L-天冬酰胺的 GAS(含 L-丝氨酸)中。培养物在 37℃ 不断摇动培养 15 天，然后称细胞干重。

图 9、结核杆菌 (*M. tb*) 的 *ald* 基因[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]和牛型结核菌 (*M. bovis*) 的 *ald* 基因[SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4]的 A)核苷酸和 B)氨基酸序列图

在牛型结核菌 *ald* 基因[SEQ ID NO:3]中，点的缺失引起的移码突变用

箭头指示。这一突变对核苷酸密码子和氨基酸的影响的部分被加重。

具体实施方式

卡介苗疫苗株利用氨基酸作为生长氮源的能力是有限的。另外我们发现自然产生的氨基酸 L-丙氨酸和 L-丝氨酸抑制卡介苗菌株的生长。在卡介苗
5 中功能性 L-丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]的表达可解除由丙氨酸引起的生长抑制。在卡介苗中表达功能性 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]可解除由 L-丝氨酸引起的生长抑制。另外过表达谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]可解除由丙氨酸和丝氨酸引起的生长抑制。这些新发现是很有意义的，因为表达或过表达丙氨酸脱氢酶[SEQ ID
10 NO:1; SEQ ID NO:2]， L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]和/或谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的重组卡介苗菌株将在作为寄主的人体内存活得更好，能够诱导长期的免疫记忆，提供更有效的预防结核病的疫苗，特别是在成年人中保护他们免受肺结核病侵害。

早就知道灭活的卡介苗菌株的投放只能引起弱的暂时性免疫反应。保护
15 性免疫反应要求卡介苗在被接种疫苗的寄主体内存活和繁殖。这一观点被最近的一个侵染性动物模型的研究证实。该研究显示预先暴露于活的环境中的分枝杆菌阻滞卡介苗在侵染的小鼠体内增殖。结果卡介苗只诱导暂时的免疫反应，不能提供抗结核病的保护性免疫反应(Brandt et al., 2002)。活的卡介苗不断的分泌多种不同的抗原，这可能对于诱导保护性免疫反应很重要。
20 增殖的卡介苗不断地产生大量抗原使活疫苗优于亚单位疫苗和 DNA 疫苗，它们只瞬时产生少量的抗原。因此卡介苗在寄主体内增殖和持续存在是卡介苗有效性的重要决定因素。

为了在寄主体内生长和持续存在，卡介苗必需能利用寄主体内能够得到的营养物质。脂肪酸分解代谢的一个主要的酶 - 异柠檬酸裂合酶，是在侵染
25 的慢性阶段结核杆菌持续存在所要求的。这一要求依赖于寄主的完全免疫反应(McKinney et al., 2000)。在另一研究中，缺乏一种硝酸盐呼吸作用所需的

主要的酶 - 厌氧硝酸盐还原酶的牛型结核菌卡介苗菌株不能在免疫耐受小鼠的肺、肝和肾组织中持续存在(Fritz et al., 2002)。我们发现, 卡介苗菌株只能利用少数的几种氨基酸作为生长的氮源, 所有的卡介苗菌株的生长都被自然产生的 L-丙氨酸和 L-丝氨酸所抑制, 说明卡介苗在寄主体内生长和持续存在的能力受到限制。在人体内卡介苗生长能够得到的 L-丙氨酸的浓度估计为 0.33 ~ 0.42mM(Barclay and Wheeler, 1989), 这个浓度足够抑制 BCG-Pasteur 或 BCG-Frappier 的生长, 并可显著地降低 BCG-Japan 的生长(图 4)。在寄主细胞外液存在的 L-丝氨酸的浓度为大约 0.1mM(Barclay and Wheeler, 1989), 这个浓度可显著地抑制卡介苗的生长。因为卡介苗的增殖是产生保护性免疫反应所必需的, 在寄主体内氨基酸的这种抑制可能阻止长效保护性免疫的发展, 因此不能保护成年人免受肺结核病。

牛型结核菌卡介苗也用于治疗膀胱癌。大量随机临床实验表明膀胱内注入卡介苗可阻止或延迟肿瘤的复发(回顾 Lamm, 2000; Lockyer and Gillatt, 2001)。为什么卡介苗能发挥这种作用还不清楚。然而抗癌反应需要完整的 T-细胞反应。涉及增加的包括 TNF α 和 IL-6 Th1-型细胞因子的表达(回顾 Prescott et al., 2000)。最有效的治疗状况包括卡介苗的增殖放大, 这说明延长暴露于细菌的时间是需要的。同样, 对于保持吞噬卡介苗能力的肿瘤对这种处理最易受影响(de Boer et al 1996), 说明细菌与肿瘤的相互作用是重要的。因此证明增加持久性的卡介苗菌株可能提供增强的抗肿瘤能力。

我们的研究表明卡介苗不能利用丙氨酸(L-丙氨酸或 D-丙氨酸)作为唯一氮源的原因是它缺乏功能性丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2]。一个编码 L-丙氨酸脱氢酶(*ald*)[SEQ ID NO:1]的基因(Rv2708)在结核杆菌基因组中被鉴定。来源于结核杆菌的这种酶的活性在体外用生化方法得到证明。Ald 分解 L-丙氨酸产生丙酮酸盐和铵, 对 L-丙氨酸具有高度特异性(Hutter and Singh, 1999)。这种酶在结核杆菌的培养上清液中检测到, 而在牛型结核菌 BCG-Japan 和 BCG-Copenhagen 中未检测到, 尽管通过 DNA

Southern 印记显示在这两株菌中均存在该基因(Anderson et al., 1992)。同样我们没有在本报告中 12 个卡介苗菌株的任何一个中检测到丙氨酸脱氢酶活性(数据没有列出)。在这些卡介苗菌株中丙氨酸脱氢酶功能的缺失可能是在 *ald* 基因[SEQ ID NO:3]内出现了突变,这可能起源于牛型结核菌菌株。在 5 发表的牛型结核菌基因组序列[SEQ ID NO:3]中在 *ald* 基因内发现了一个移码突变(图 9)。因此在卡介苗菌株中不能产生全长的 L-丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4], 结果导致卡介苗不能分解丙氨酸。同样卡介苗不能利用 L-丝氨酸作为唯一氮源可能是由于编码 L-丝氨酸脱水酶的基因 *sdaA*[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]发生了突变或表达的改变。在卡介苗中表 10 达结核杆菌的 *sdaA* 基因[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]使卡介苗菌株能以 L-丝氨酸为唯一氮源生长,解除 L-丝氨酸对卡介苗生长的抑制(图 8)。丙氨酸和丝氨酸对卡介苗生长的抑制是由谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的抑制引起的。在卡介苗中过表达谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]可解除 L-丝氨酸、L-丙氨酸和 D-丙氨酸引起的生长抑制。

15 BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 较 BCG-Japan 更易受到丙氨酸的抑制,可能是由于谷氨酰胺合成酶的表达水平或活性的不同。BCG-Japan 与 BCG-Frappier 或 BCG-Pasteur 存在遗传差异(Behr et al., 1999)。经过 13 年对牛型结核菌的一个分离株在体外经过 230 次传代 Calmette 和 Guérin 在 1921 年得到了卡介苗疫苗。从 1924 年开始卡介苗被传到世界许多实验室。

20 这些实验室用不同的方法和处理在体外对该菌传代,直到 1961 年冻干得到菌种的方法被建立。这种实践的结果是不同的卡介苗亚株被建立,它们在生化和遗传上存在差异(Oettinger et al., 1999; Behr et al., 1999)。我们的数据显示卡介苗利用氨基酸作为氮源的能力是不同的,例如 BCG-Japan 能够利用包括 L-精氨酸和 L-赖氨酸的碱性氨基酸生长,而 BCG- Pasteur 和 BCG-Frappier 25 则不能。这些不同可能导致在不同的临床应用中卡介苗的有效性不同。

总而言之,我们用表达功能性丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1; SEQ ID

NO:2]、功能性 L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]和/或谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的重组卡介苗菌株作为疫苗预防结核病和其它分枝杆菌的侵染。这些重组卡介苗疫苗将诱导抵抗结核病的长期保护性免疫反应。

5 核酸分子的改变 修饰

在本申请中公开的核酸分子 DNA 序列可进行多种修饰，这对本领域的技术人员来说是显而易见的。本发明包括在本申请中公开的能够在细菌和哺乳动物细胞中指导表达的序列(或片段)的核苷酸修饰。这些修饰包括核苷酸的替换、插入或缺失，或改变核苷酸的相对位置或顺序。

核酸分子可编码在丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶中变化的保守性氨基酸。本发明包括功能相当的核酸分子，它们编码在丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶中变化的保守性氨基酸和产生在丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶中变化沉默氨基酸。从经验上鉴定保守性氨基酸组的方法已有报道(如, Wu, thomas D. "Discovering Emperically Conserved Amino Acid Substitution Groups in Databases of Protein families") (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list-uids=887723&dopt=Abstract>)。

在丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶中核酸分子可编码非保守性氨基酸的替代、插入或缺失。本发明包括功能相当的核酸分子，这些核酸分子导致在[SEQ ID NO:2、6、8、10、12or 14]中的氨基酸序列内的非保守氨基酸的变化。功能相当的核酸分子包括编码多肽的 DNA 和 RNA，多肽和蛋白质含有非保守氨基酸替代(优选化学性质相近的替代)、插入或缺失。但它们仍保持与[SEQ ID NO:2]所示的丙氨酸脱氢酶、[SEQ ID NO:8、10、12 或 14]所示的谷氨酰胺合成酶或[SEQ ID NO:6]所示的 L-丝氨酸脱水酶相同或相近的丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶活性。

这些 DNA 或 RNA 可编码丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶的片段或变异物。

这些片段可用作免疫剂或产生免疫的组合物。

这些片段和变异物的丙氨酸脱氢酶，谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶的类似活性已被以下描述的分析所证实。

序列一致性

本发明的这些核酸分子还包括具有与本发明的一个能在细菌或哺乳动物细胞内表达的核酸分子至少约：60%一致性、70%一致性、80%一致性、90%一致性、95%一致性、96%一致性、97%一致性、98%一致性、或最优选的含有 99%或 99.5%一致性的核酸分子（或其片段）。一致性反映的是线性的两个核苷酸序列的相似性，因此能够得到它们的最佳匹配。一致性是根据现有技术已知的方法计算的。例如一个核苷酸序列（称为序列 A）与[SEQ ID NO:1]的一部分有 90%的一致性，就是说序列 A 与[SEQ ID NO:1]的这部分一致而仅在这一部分中每 100 个核苷酸中可能包括最多 10 个突变（如被其它核苷酸替代）。

序列一致性（优选每个结构没有编码核酸分子的插入）优选在 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:14 中提供的序列或它们的互补序列具有至少 70%一致性、至少 80%一致性、至少 90%一致性、至少 95%一致性、至少 96%一致性、至少 97%一致性、至少 98%一致性、或最优选的含有至少 99%或 99.5%的一致性。序列一致性的计算优选生物信息学的 GCG 程序（威斯康星大学）。其它程序也可用于序列一致性的计算，如 Clustal W 程序（优选用缺损参数；Thompson, JD et al., Nucleic Acid Res. 22:4673-4680），BLAST P，BLAST X 算法，在基因组研究所的鸟结核分枝杆菌（*Mycobacterium avium*）BLASTN (<http://tigrblast.tigr.org/>)，在 Wellcome Trust Sanger 研究所的牛型结核菌（*Mycobacterium bovis*），牛型结核菌-BCG(Pastuer)，海鱼分枝杆菌（*M. marinum*），麻风分枝杆菌（*M. leprae*），结核杆菌（*M. tuberculosis*）

BLASTN (<http://www.sanger.ac.uk/projects/Microbes/>), 在 Pasteur(Tuberculist) 研究所的结核杆菌 BLAST 搜索 (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>), 在 Pasteur(Leproma)研究所的麻风分枝杆菌 BLAST 搜索(<http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>), 在明尼苏达大学的微生物基因组计划的约内氏杆菌(M. Paratuberculosis) BLAST (<http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/Ptb/> 和 <http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/AGAC/Mptb/Mtpbhome.html>), 在美国国家生物技术信息中心多种的 BLAST 搜索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)和基因组网 (GenomeNet) (化学研究所-生物信息中心) 多种的 BLAST 搜索(<http://blast.genone.ad.jp>).

10 因为遗传密码具有简并性,在[SEQ ID NO:1]中的核酸序列不是编码具有脱氢酶活性多肽的唯一序列;在[SEQ ID NO:7、9、11和13]中的核酸序列不是编码具有谷氨酰胺合成酶活性多肽的唯一序列;和在[SEQ ID NO:5]中的核酸序列不是编码具有 L-丝氨酸脱水酶活性多肽的唯一序列。本发明包括具有与在[SEQ ID NO:1、5、7、9、11和13]中描述的核酸分子相同的主要的遗传信息的核酸分子。与在本申请中描述的序列比,含有一个或多个氨基酸变化,并如在[SEQ ID NO:2、6、8、10、12和14]中所示的多肽的核酸分子(包括 RNA 分子)包括在本发明的范围内。

编码丙氨酸脱氢酶、谷氨酰胺合成酶或 L-丝氨酸脱水酶的核酸的其它功能相等形式可用传统的 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交技术分离得到。

20 杂交

本发明包括与本申请中描述的一个核酸分子具有充分一致性序列的 DNA, 在严谨的杂交条件下进行杂交。

本发明包括与在本申请中描述的核酸分子在严谨条件下杂交具有足够一致性序列的 DNA(杂交技术是现有技术中众所周知的)。本发明也包括与在 25 [SEQ D NO:1]到[SEQ D NO:14]中的一个或多个序列或它们的互补序列杂交的核酸分子。这些核酸分子优选在高严谨条件下杂交(见 Sambrook et al.

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Most Recent Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). 高严谨洗涤在 50 ~ 65 °C 低盐条件 (大约 0.2%SSC) 下进行。

疫苗

5 活的重组疫苗的制备是本领域技术人员所公知的。该疫苗通常被制成液体溶液或悬液状针剂；还可制成适合溶解于或悬浮于注射液体中的固体。药剂还可能是乳状体或包入脂质体的蛋白质。活的免疫产生成分通常与一些药剂学上可接受的与活性成分相容的成型剂混合。适合的赋型剂通常是水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合。另外，如果需要疫苗中可含有

10 少量辅助物质，如润湿剂或乳化剂，pH 缓冲剂和/或增强疫苗有效性的辅剂。有效的辅剂的例子包括但不限于：氢氧化铝、N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酸酰胺(苏氨酸-MDP)、N-乙酰-正胞壁酰-L-丙氨酸基-D-异谷氨酸酰胺(CGP11637, 或称为正-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸基-D-异谷氨酸酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-锡-丙三氧基-3-羟磷酰氧基)-乙酸胺

15 (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine)(CGP 19835A, 又称为 MTP-PE) 和 RIBI.RIBI 含有从细菌内抽提出的三种成分，在 2% 鲨烯/吐温-80™ 乳浊液中的单磷酰脂 A，海藻糖二梅菌酸酯 (dimycolate) 和细胞壁骨架 (MPL+TDM+CWS)。

20 佐剂的有效性可通过测定抗致免疫的多肽的抗体的量而确定。该致免疫的多肽含有结核杆菌抗原序列，该抗原序列是由注入体内的含有不同佐剂的活的重组牛型结核菌卡介苗产生的。疫苗通常是通过肠胃外给药的，如皮下或肌肉内注射。其它形式的适合于给药的模式包括栓剂和在一些情况下以口服的形式。作为栓剂，传统的粘结剂和载体包括例如聚亚烷基二醇或甘油三

25 脂。这种栓剂可为含有 0.5 ~ 10%(优选 1 ~ 2%)的活性成分的混合物。口服剂通常用的成型剂例如：药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、

纤维素、碳酸镁等。这些组合物为溶液、悬液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放剂或粉末等形式，并含有有效成分 10~95%(优选 25~75%)。

疫苗用与剂型相容的方法给药，从而起到预防和/或保护作用。

5 疫苗可单剂给药，也可多剂给药。多剂给药包括一个 1~10 次给药的首次过程，和间隔一段时间如 1~4 个月的第二次给药以保持和/或加强免疫反应，如果需要，几个月后可以再次给予一剂或多剂。剂量的控制应根据个体的需要和具体情况而定。

另外活的重组牛型结核菌卡介苗疫苗也和其它免疫调节剂如免疫球蛋白一起给药。本发明的主题也是一个多价疫苗配方，是包括上面定义的活
10 的重组牛型结核菌卡介苗疫苗与另一个疫苗，特别是另一个如上所定义的重组活的牛型结核菌-卡介苗疫苗的混合物或进行混合。这些疫苗包括不同的插入序列。

药物组合物

本发明的药物组合物可用于治疗或预防哺乳动物免受结核杆菌或牛型
15 结核菌的侵害。本发明的药物组合物可用于治疗犯有退行性疾病 (degenerative disease) 和例如癌症的不适或异常身体状态的病人。

药物组合物可通过片剂、气雾剂给药，气管内滴注和静脉注射方法给人或动物用药。

培养基组合物

20 本发明抑制牛型结核菌卡介苗生长的培养基组合物包括丙氨酸或丝氨酸作为唯一氮源。当丙氨酸为唯一氮源时它的浓度至少为 0.03mM，当丝氨酸为唯一氮源时它的浓度至少为 0.03mM。

培养基组合物还进一步含有约 1.35~约 1.65g/L 的碳源，优选为至少 1.5 g/L；约 0.045~约 0.055 g/L，优选至少 0.05 g/L 的铁；约 0.45~约 0.55 g/L，
25 优选至少 0.5 g/L 的镁和约 0.045~约 0.055 g/L，优选至少 0.05 g/L 的 SO₄。

试剂盒

用于免疫诊断和含有适合标记试剂的试剂盒是由含有本发明的活的重组牛型结核菌卡介苗菌株,在合适的容器中和其它用于分析所需的试剂和材料及一套合适的分析说明书所包装组成的。任何免疫测试方法都可考虑使用,如 ELISA、西部印记(Western blot)、夹心(sandwich)分析方法,5 这些是本领域技术人员所了解的方法。

材料和方法

菌株和培养条件: 研究中采用十二种牛型结核菌卡介苗菌株:BCG-Japan、BCG-Russia、BCG-Moreau、BCG-Sweden、BCG-Birkhaug、BCG-Frappier、BCG-Pasteur、BCG-Glaxo、BCG-Phipps、BCG-Tice、10 BCG-Denmark 和 BCG-Prague 是从 Marcel Behr 博士(McGill 大学)得到的。菌株的鉴定已被详细地描述过(Behr et al., 1999)。Middlebrook 7H9 培养基(Difco)每升含有硫酸铵 0.5g、L-谷氨酸 0.5g、柠檬酸钠 0.1g、维生素 B6 (pyridoxine) 1mg、生物素 0.5mg、磷酸二钠 2.5g、柠檬酸铵铁 40mg、硫酸镁 50mg、氯化钙 0.5mg、硫酸锌 1mg、硫酸铜 1mg 和甘油 2ml; 以及在15 灭菌后加入 5g (部分 V(fraction V); 牛)白蛋白, 2g 右旋糖和 0.05%吐温 80。Sauton 培养基每升含有 L-天冬酰胺 4g、硫酸单钾 0.5g、硫酸镁 0.5g、柠檬酸铵铁 50mg、柠檬酸 2g、硫酸锌 1mg 和甘油 60ml; 灭菌后加入 0.05%吐温 80。甘油-丙氨酸-盐(GAS)培养基每升含有氯化铵 2g、L-丙氨酸 1g、Bacto Casitone(Difco) 0.3g、磷酸二钾 4g、柠檬酸 2 g、柠檬酸铵铁 50mg、六水合20 氯化镁 1.2 g、硫酸钾 0.6 g、10M 氢氧化钠 1.8ml 和 10ml 甘油。灭菌后加入 0.05%吐温 80。卡介苗在 37℃连续摇动培养 3~4 周。

ald 的克隆: *ald*[SEQ ID NO:1]的克隆由二步完成(图 1)。首先一个含有 *ald* 基因的结核杆菌基因组的 4.5kb 的 *Sca* I DNA 片段被连到线性化的 *Ecl*136II pUC19 上,产生 pUC-ALD。然后连接含有 *ald* 基因[SEQ ID NO:1]25 的 1.9kb 的 *Kpn*I 片段到线性化的 *Kpn*I pMD31,产生分枝杆菌质粒 pLAD(Yu et al., 1998)。pALD 质粒被电转入牛型结核菌卡介苗,重组的牛型结核菌卡

介苗在添加有富含 10%油酸 (oleic) /血清/右旋糖/过氧化氢酶(OADC)和 25µg/ml 卡那霉素的 Middlebrook 7H9 琼脂培养基(Difco)上选择培养。

- sdaA* 的克隆: *sdaA*[SEQ ID NO:5]的克隆由二步完成。首先结核杆菌基因组 DNA 的 9.5kb *Bam*HI 片段被连到线性化的 *Bam*HI pMD31 产生 pSDA1。
- 5 然后用 *Pst*I 断裂 pSDA1, 随后 10.9kb *Pst*I 片段自连产生 pSDAA 质粒。pSDAA 质粒被电转入牛型结核菌卡介苗, 重组的牛型结核菌卡介苗在添加有富含 10%油酸 (oleic) /血清/右旋糖/过氧化氢酶(OADC)和 25µg/ml 卡那霉素的 Middlebrook 7H9 琼脂培养基(Difco)上选择培养。

实施例 1

- 10 在甘油-丙氨酸-盐(GAS)培养基中卡介苗的生长: 在我们的研究过程中, 我们发现虽然比在 7H9 培养基中长得慢, BCG-Japan 在 GAS 培养基中能够生长。BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 不能在在 GAS 培养基中能生长, 延长培养时间也不能生长 (2 个月)。其它 BCG 株在 GAS 培养基中的生长也被检测。结果显示 BCG-Japan、BCG-Russia、BCG-Moreau、BCG-Sweden 和
- 15 BCG-Birkhaug 能在 GAS 培养基中生长, 而 BCG-Frappier、BCG-Pasteur、BCG-Glaxo、BCG-Phipps、BCG-Tice、BCG-Denmark 和 BCG-Prague 不能在 GAS 培养基中生长。这是一个有趣的发现, 因为 12 种卡介苗菌株均能在 7H9 和 Sauton broth 培养基中生长 (表 I)。为了弄清为什么有的菌株不能在 GAS 培养基中生长, 对比了 GAS、7H9 和 Sauton 培养基的化学成分。添加在 7H9
- 20 和 Sauton 培养基中有而在 GAS 培养基中没有的硫酸锌(1mg/l)或丙酮酸钠 0.5 %) 是牛型结核菌大菌落生长所要求的, 都不能支持卡介苗菌株在 GAS 培养基中的生长 (数据没有列出)。另外对氮源进行了比较。L-天冬酰胺(4g/l) 是 Sauton 培养基的唯一氮源, 而氯化铵(2g/l)和 L-丙氨酸(1g/l)是 GAS 培养基的主要氮源。L-天冬酰胺 (4g/l)被加入 GAS 培养基, BCG-Frappier、BCG-
- 25 Pasteur、BCG-Glaxo、BCG-Phipps、BCG-Tice、BCG-Denmark 和 BCG-Prague 能快速生长(表 I)。添加 L-天冬氨酸, L-谷氨酰胺或 L-谷氨酸, 但不加其它

氨基酸于 GAS 培养基中也能支持这些卡介苗菌株的生长(表 I)。这些结果表明特定卡介苗菌株不能在 GAS 培养基中的生长是由于菌株不能利用所提供的氮源。

实施例 2

- 5 作为卡介苗生长氮源的氨基酸:上面的结果促使我们检测卡介苗菌株利用不同氨基酸作为唯一氮源的能力。因为 GAS 培养基含有少量的 Bacto Casitone(0.3g/l),这是不同氨基酸和肽的混合物,所以我们选用 Sauton 培养基,它具有确定的组分,作此研究。原始配方里的 L-天冬酰胺分别被每一种氨基酸以同样的浓度(27mM)替代,pH调到 7.0。氯化铵以 27mM 或 1mM 作为唯一氮源也被测定。三个代表菌株:BCG-Japan、BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 的实验结果总结在表 II 中。与表 I 的结果一致当 L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺和 L-谷氨酸被用作唯一氮源时三种卡介苗菌株均长得很快。BCG-Japan 在碱性氨基酸(如 L-精氨酸, L-赖氨酸)中能够生长,而 BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 则不能。更有趣的是没有一种卡介苗菌株能够利用 L-丙氨酸、L-丝氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-蛋氨酸或 L-甘氨酸作为唯一氮源。而其它分枝杆菌,包括病原结核杆菌、鸟结核分枝杆菌和非病原菌包皮垢分枝杆菌(*M.smegmatis*)能够在这些氨基酸上生长。这些结果说明卡介苗疫苗菌株只能利用有限的几种氨基酸作为生长氮源;有的卡介苗菌株,如 BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 只能在四种氨基酸上生长(表 II)。
- 10 20 这种限制可能限制了卡介苗在(寄主)体内的生长和持续存在。

实施例 3

- L-丙氨酸、D-丙氨酸或 L-丝氨酸抑制卡介苗的生长:从上面实验中一个惊人的发现是所有卡介苗菌株均能在以低浓度(1mM)或高浓度(27mM)的氯化铵作为唯一氮源上生长(表 II)。这与在 GAS 培养基中得到的结果是相矛盾的。在 GAS 培养基中 37mM 的氯化铵不支持 BCG-Pasteur 和
- 25

BCG-Frappier 的生长 (表 I)。因为 GAS 培养基中也含有 L-丙氨酸, 而 L-丙氨酸不能被卡介苗菌株用于生长 (表 II)。唯一可能的解释是 L-丙氨酸实际上抑制卡介苗菌株的生长。为了证明这一点, 制成了一种 L-丙氨酸被去除的 GAS 培养基, 然后检测卡介苗菌株在这种培养基中的生长。正如预期的那样, 不能在原始的含有 L-丙氨酸的 GAS 中生长的 BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 则能在没有 L-丙氨酸的 GAS 中迅速生长 (图 3)。BCG-Japan 也能在没有 L-丙氨酸 GAS 培养基中更迅速生长 (图 3)。同样的结果也出现在本报告所列的其它 9 个卡介苗菌株中。

为了进一步证明该结果, 不断增加浓度的 L-丙氨酸被加到含有氯化铵 (5g/l) 的 Sauton 培养基中, 测定 BCG-Japan, BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 的生长 (图 4)。让人吃惊的是, 即使在很低的浓度 (0.25mM) 下, L-丙氨酸完全抑制 BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 的生长。虽然对 BCG-Japan 的抑制没有那么严重, 但当 L-丙氨酸增加到 0.5mM 时对生长的抑制显著, 而当浓度增加到 8~16mM 时生长被完全抑制 (图 4)。总结一下, 这些结果清楚地表明 L-丙氨酸抑制卡介苗菌株的生长。我们进一步发现 D-丙氨酸也抑制卡介苗菌株的生长。在 GAS 培养基中 D-丙氨酸的存在使 BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 停止生长, 并显著地降低 BCG-Japan 的生长 (图 5)。相似地, L-丝氨酸也显著地抑制 BCG-Japan、BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 的生长 (图 7)。

20 实施例 4

L-丙氨酸脱氢酶 [SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2] 在卡介苗中的表达解除 L-丙氨酸和 D-丙氨酸对卡介苗的生长抑制: 丙氨酸是很多分枝杆菌, 包括结核杆菌、鸟结核分枝杆菌和包皮垢分枝杆菌的良好氮源。D-丙氨酸的降解始于消旋为 L-丙氨酸, 然后被 L-丙氨酸脱氢酶分解为铵和丙酮酸。有趣的是功能性 L-丙氨酸脱氢酶在结核杆菌和包皮垢分枝杆菌中可检测到, 而在 BCG-Japan 或 BCG-Copenhagen 中没有检测到 (Andersen et al., 1992; Hutter

and Dick, 1998)。我们没有在本研究所列的卡介苗菌株中检测到 L-丙氨酸脱氢酶活性（数据没有显示）。卡介苗菌株不能利用 L-丙氨酸或 D-丙氨酸作为唯一的生长氮源是由于缺乏功能性 L-丙氨酸脱氢酶。为了证明这一点，在结核杆菌基因组中编码 L-丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:2]的基因 *ald*[SEQ ID NO:1]被克隆到一个穿梭载体，转入 BCG-Pasteur 和 BCG-Frappier 中。得到的重组卡介苗菌株被培养于含有 L-丙氨酸或 D-丙氨酸的 GAS 培养基中测定其生长能力。两个重组菌株，BCG-Frappier/*ald* 和 BCG-Pasteur/*ald* 均在含有 L-丙氨酸或 D-丙氨酸的 GAS 培养基中生长迅速（图 6），而只含有克隆载体的菌株不能生长。这一结果表明功能性 L-丙氨酸脱氢酶[SEQ ID NO:1 ;SEQ ID NO:2]在卡介苗菌株中的表达解除 L-丙氨酸和 D-丙氨酸对卡介苗生长的抑制。

实施例 5

L-丝氨酸脱水酶[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]在卡介苗中的表达解除 L-丝氨酸对卡介苗的生长抑制：L-丝氨酸被结核杆菌、鸟结合分枝杆菌和包皮垢分枝杆菌用作生长的唯一氮源而牛型结核菌卡介苗不能。卡介苗不能用 L-丝氨酸作为生长的唯一氮源可能是由于卡介苗中的编码 L-丝氨酸脱水酶的基因 *sdaA*[SEQ ID NO:5]发生突变或改变表达。在卡介苗中表达结核杆菌的 *sdaA*[SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6]使卡介苗菌株能够在以 L-丝氨酸作为生长的唯一氮源的培养基中生长，解除 L-丝氨酸对卡介苗的生长抑制(图 8)。

20 实施例 6

L-丙氨酸、D-丙氨酸和 L-丝氨酸对卡介苗生长的抑制可能是由于谷氨酰胺合成酶[SEQ ID NO:7]到[SEQ ID NO:14]的活性被抑制。谷氨酰胺合成酶在细菌的氮代谢中起中心作用(Reitzer, 1996)。先后与谷氨酸合成酶和谷氨酰胺合成酶作用催化了谷酰胺和谷氨酸的合成，几乎能为所有的氨基酸、蛋白质和核苷酸提供氮。在大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 和产气克雷

伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 中谷氨酰胺合成酶受反馈抑制调控, 纯化的谷氨酰胺合成酶受 L-丙氨酸、L-丝氨酸和甘氨酸抑制 (Reitzer, 1996)。谷氨酰胺合成酶在结核杆菌和牛型结核菌中被鉴定为细胞外蛋白质 (Harth et al., 1994)。这可能是由于没被降解的 L-丙氨酸抑制了谷氨酰胺合成酶, 结果阻止卡介苗的生长。假如这是正确的话, 那么 L-丝氨酸不能被卡介苗分解 (表 I), 而抑制 BCG 生长的机理可能也是如此。为支持这一假说, 在含有氯化铵作为唯一氮源的 GAS 培养基中加入 L-丝氨酸抑制 BCG-Frappier、BCG-Pasteur 和 BCG-Japan (图 7)。进一步的, 如果谷氨酰胺合成酶是 L-丙氨酸和 L-丝氨酸抑制的靶标, 那么能够转化为谷氨酸的氨基酸将减弱这种作用, 正如在产气克雷伯氏菌 (*K.aerogenes*) 中证实的那样 (Janes and Bender, 1998)。确实, 加入谷氨酸和能够分解产生谷氨酸的氨基酸 (L-谷氨酰胺、L-天冬酰胺和 L-天冬氨酸) 能够使卡介苗菌株在丙氨酸存在条件下生长 (表 I)。但是在那些不能分解产生谷氨酸的氨基酸 (如 L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-亮氨酸) 中则不能生长。与 BCG-Japan 相比 BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 更易受丙氨酸和丝氨酸抑制, 这可能是由于谷氨酰胺合成酶 [SEQ ID NO:7] 到 [SEQ ID NO:14] 的表达水平或活性不同所致, 如 BCG-Japan 比 BCG-Frappier 和 BCG-Pasteur 产生更多的谷氨酰胺合成酶或产生的酶的活性更高。

本发明已被详细描述并给出了具体实施方式作为参考; 但是本领域的普通技术人员应理解, 可在不超出本发明的精神和范围的条件下进行变化。例如, 当提及蛋白质的应用时, 很清楚, 肽和多肽也经常被应用。同样的, 当基因在应用中被描述时, 很清楚的是, 核酸或核酸片段也经常是可被使用的。

所有出版物 (包括 Genbank 中的条目)、专利和专利申请的全部内容在此引入作为参考, 以达到每个出版物、专利或专利申请被明确的并分别的指明其全部内容在此引入作为参考的同样效果。

表 I

在培养基 7H9、Sauton 和甘油-丙氨酸-盐 (GAS) 中结核杆菌、包皮垢分枝杆菌和牛型结核菌卡介苗亚菌株生长的比较。

分枝杆菌 ^a	7H9	Sauton	GAS	GAS+L-Asn ^b	GAS+L-Asp ^b	GAS+L-Glu ^b	GAS+L-Gln ^b
结核杆菌 ^c	+	+	+	+	+	+	+
包皮垢分枝杆菌	+	+	+	+	+	+	+
BCG-Russia	+	+	+	+	+	+	+
BCG-Moreau	+	+	+	+	+	+	+
BCG-Japan	+	+	+	+	+	+	+
BCG-Sweden	+	+	+	+	+	+	+
BCG-Birkhaug	+	+	+	+	+	+	+
BCG-Prague	+	+	-	+	+	+	+
BCG-Glaxo	+	+	-	+	+	+	+
BCG-Denmark	+	+	-	+	+	+	+
BCG-Tice	+	+	-	+	+	+	+
BCG-Frappier	+	+	-	+	+	+	+
BCG-Phipps	+	+	-	+	+	+	+
BCG-Pasteur	+	+	-	+	+	+	+

5 ^a每 5ml 培养物中含有 1×10^7 个包皮垢分枝杆菌或牛型结核菌卡介苗亚菌株的细胞。

^b在 GAS 中添加的 L-Asn, L-Asp、L-Glu 和 L-Gln 的终浓度为 27mM。

^c根据研究文献。

10 表 II

牛型结核菌 BCG-Japan、BCG-Frappier、BCG-Pasteur、结核杆菌、鸟结核分枝杆菌和包皮垢分枝杆菌的生长比较

培养基	BCG-Japan ^b	BCG-Frappier ^b	BCG-Pasteur ^b	结核杆菌 ^c	鸟结核分枝杆菌 ^c	包皮垢分枝杆菌 ^b
Sauton 基	-	-	-	-	-	-
组 1						
Sauton+L-Asn	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sauton+L-Asp	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sauton+L-Glu	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sauton+L-Gln	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sauton+L-Cys	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sauton+NH ₄ Cl	+++	+++	+++	+++	+++	+++
组 2						
Sauton+L-Arg	++	-	-	+++	+++	+++
Sauton+L-His	++	-	-	+++	+++	+++
Sauton+L-Lys	++	-	-	NA	+++	+++
Sauton+L-Pro	++	-	-	NA	-	+++
Sauton+GABA	++	-	-	NA	NA	+++
Sauton+L-鸟氨酸	++	-	-	NA	NA	+++
组 3						
Sauton+L-Ala	-	-	-	+++	+++	+++
Sauton+L-Ser	-	-	-	+++	+++	+++
Sauton+L-Leu	-	-	-	+++	+++	+++
Sauton+L-Ile	-	-	-	+++	+++	+++
Sauton+L-Met	-	-	-	NA	+++	+++
Sauton+甘氨酸	-	-	-	+++	NA	+++
组 4						
Sauton+L-Trp	-	-	-	-	-	-
Sauton+L-Phe	-	-	-	+++	-	-
Sauton+L-Tyr	-	-	-	-	-	-
Sauton+L-Val	-	-	-	NA	-	-
Sauton+L-Thr	-	-	-	NA	-	-

^a所有氨基酸，L-鸟氨酸和 GABA 的终浓度为 27mM。NH₄Cl 浓度在 1mM、27mM 和 96mM 进行测试。

^b每 5ml 培养物中含有 1×10^7 个包皮垢分枝杆菌或牛型结核菌 BCG 亚菌株的细胞。

5 ^c根据研究文献。

参考文献

- Andersen,A.B.F., P.F.Andersen,and L.Ljungqvist.**1992. Structure and function of a 40,000–molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.***60**:2317-23.
- 5 **Andersen,P.**2001.TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol.* **22**:160-8.
- Baldwin,S.L.F.,C.F.D'Souza,A.D.F.Roberts,B.P.F.Kelly,A.A.F.Frank,M.A.F.Lui,J,B.F.Ulmer,K.F.Huygen,D.M.F.McMurray,and I.M.Orme.**1998. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis.*Infect.Immun.***66**:2951-9.
- Behr,M.A.F.,M.A.F.Wilson,W.P.F.Gill,H.F.Salamon,G.K.F.Schoolnik,S.F.Rane,an**
10 **d P.M.Small.**1999.Comparative genomics of BCG vaccines by wholegenome DNA microarray.*Science* **284**:1520-3.
- Brandt,L., C.J.Feino, O.A.Weinreich, B.Chilima, P.Hirsch, R.Appelberg, and P. Andersen.** 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine:Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of
15 Protective Immunity to Tuberculosis. *Infect.Immun.***70**:672-678.
- Barclay,R.and P.R.Wheeler.1989.Metabolism of mycobacterium in tissues,p.37-106.In C.Ratledge,J.Stanford, and J.M.Grange (ed),Clinical aspects of mycobacterial disease.Academic Press,London,United Kindom.
- Brosch,R.F.,S.V.F.Gordon,C.F.Buchrieser,A.S.F.Pym,T.F.Garnier, and S.T.Cole.**
20 2000. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur.*Yeast* **17**:111-23.
- Colditz,G.A.F.,T.F.F.Brewer,C.S.F.Berkey,M.E.F.Wilson,E.F.Burdick,H.V.F.Fine berg, and F.Mosteller.**1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis.Meta-analysis of the published literature.*JAMA* **271**:698-702.
- 25 **de Boer,E.C., Bevers,R.F., Kurth,K.H., and Schamhart,D.H.** 1996. Double fluorescent flow cytometric assessment of bacterial internalization and binding by epithelial cells.*Cytometry.***25**:381-387.

- Dunn,P.L.F. and R.J.North.**1995. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs , induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect .Immun.* **63**:3428-37.
- 5 **Fine,P.E.**1995. Variation in protection by BCG:implications of and for heterologous immunity. *Lancet* **346**:1339-45.
- Fine,P.E.**1989. The BCG story: lessons from the past and implications for the future .*Rev.Infect.Dis.***11**:S353-9.
- Fine,P.E.F. and E.Vynnycky.**1998. The effect of heterologous immunity upon the
10 apparent efficacy of (e.g.BCG) vaccines.*Vaccine* **16**:1923-8.
- Fritz,C.F., S.F.Maass, A.F.Kreft, and F.C.Bange.** 2002. Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific.*Infect.Immun.***70**:286-91.
- Harth,G.F., P.C.F.Zamecnik, J.Y.F.Tang, D.F.Tabatadze, and M.A.Horwitz.** 2000.
15 Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **97**:418-23.
- Harth,G.F.,D.L.F.Clemens, and M.A.Horwitz.**1994. Glutamine synthetase of
20 *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* **91**:9342-6.
- Hogan,L.H.F., W.F.Markofski, A.F.Bock, B.F.Barger, J.D.F.Morrissey, and M.Sandor.** 2001. *Mycobacterium bovis* BCG-induced granuloma formation depends on gamma interferon and CD40 ligand but does not require CD28. *Infect. Immun.*
25 **69**:2596-603.
- Hutter,B.F.and M.Singh.**1999. Properties of the 40 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, a functional L-alanine dehydrogenase.*Biochem.J*,**343**:669-72.

- Hutter,B.F.and T.Dick.**1998. Increased alanine dehydrogenase activity during dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol.Lett*,**167**:7-11.
- Janes,B.K.F.and R.A.Bender.**1998. Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: molecular characterization of the dadAB operon and its regulation by the nitrogen
5 assimilation control protein.*J.Bacteriol.***180**:563-70.
- Lagranderie,M.R.F., A.M.F.Balazuc, E.F.Deriaud, C.D.F.Leclerc, and M.Gheorghiu.** 1996. Comparison of immune responses if mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains, *Infect.Immun.* **64**:1-9.
- Lamm,D.L.** 2000. Efficacy and safety of bacille Calmette-Guerin immunotherapy in
10 superficial bladder cancer.*Clin.Infect.Dis.***31**(Suppl 3):S86-90.
- Lockyer,C.R.,and Gillatt,D.A.** 2001. BCG immunotherapy for superficial bladder cancer.*J.R.Soc.Med.***94**:119-23.
- McKinney,J.D.F., z.B.Honer, E.J.F.Munoz-Elias, A.F.Miczak, B.F.Chen, W.T.F.Chan, D.F.Swenson, J.C.F.Sacchettini, W.R.J.Jacobs,and D.G.Russell.**
15 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase.*Nature* **406**:735-8.
- Moisan,J.F.,W.F.Wojciechowski,C.F.Guilbault,C.F.Lachance,S.Di Marco, E.F. Skamene, G.F.Matlashewski,and D.Radzioch.**2001. Clearance of infection with *Mycobacterium bovis* BCG in mice is enhanced by treatment with S28463
20 (R-848),and its efficiency depends on expression of wild-type Nrampl (resistance allele).-*Antimicrob.Agents Chemother.***45**:3059-64.
- Oettinger,T.F.,M.F.Jorgensen,A.F.Ladefoged,K.F.Haslov,and P.Andersen.** 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree.*Tuber.Lung Dis.***79**:243-50.
- Orme,I.M.**2001. The search for new vaccines against tuberculosis. *J.Leukoc.Biol.*
25 **70**:1-10.
- Prescott,S.,Jackson,A.M.,Hawkyard,S.J.,Alexandroff,A.B.,andJames,K.**2000.

Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette-Guerin: local immune mechanisms. *Clin. Infect. Dis.* **31**(Suppl 3):S91-3.

Reitzer, L.J. 1996. Ammonium assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, a sparagine, L-alanine, and D-alanine, p.380-390. In
5 Neidhardt, F.C (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*, ASM Press, Washington, D.C.

Sterne, J.A., L.C. Rodrigues, and I.N. Guedes. 1998. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *International Journal of Tuberculosis & Lung Disease* **2**:200-207.

Young, D.B. 2000. Current tuberculosis vaccine development. *Clin. Infect. Dis.*
10 **30**:S254-6.

Yu, S.F., E.F. Fiss, and W.R.J. Jacobs. 1998. Analysis of the exochelin locus in *Mycobacterium smegmatis*: biosynthesis genes have homology with genes of the peptide synthetase family. *J. Bacteriol.* **180**:4676-85.

65	70	75	80	
gaa tac ggc cgc ctg cga cac ggg cag atc ttg ttc acg ttc ttg cat				288
Glu Tyr Gly Arg Leu Arg His Gly Gln Ile Leu Phe Thr Phe Leu His				
	85	90	95	
ttg gcc gcg tca cgt gct tgc acc gat gcg ttg ttg gat tcc ggc acc				336
Leu Ala Ala Ser Arg Ala Cys Thr Asp Ala Leu Leu Asp Ser Gly Thr				
	100	105	110	
acg tca att gcc tac gag acc gtc cag acc gcc gac ggc gca cta ccc				384
Thr Ser Ile Ala Tyr Glu Thr Val Gln Thr Ala Asp Gly Ala Leu Pro				
	115	120	125	
ctg ctt gcc ccg atg agc gaa gtc gcc ggt cga ctc gcc gcc cag gtt				432
Leu Leu Ala Pro Met Ser Glu Val Ala Gly Arg Leu Ala Ala Gln Val				
	130	135	140	
ggc gct tac cac ctg atg cga acc caa ggg ggc cgc ggt gtg ctg atg				480
Gly Ala Tyr His Leu Met Arg Thr Gln Gly Gly Arg Gly Val Leu Met				
145	150	155	160	
ggc ggg gtg ccc ggc gtc gaa ccg gcc gac gtc gtg gtg atc ggc gcc				528
Gly Gly Val Pro Gly Val Glu Pro Ala Asp Val Val Val Ile Gly Ala				
	165	170	175	
ggc acc gcc ggc tac aac gca gcc cgc atc gcc aac ggc atg ggc gcg				576
Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Ala Ala Arg Ile Ala Asn Gly Met Gly Ala				
	180	185	190	
acc gtt acg gtt cta gac atc aac atc gac aaa ctt cgg caa ctc gac				624
Thr Val Thr Val Leu Asp Ile Asn Ile Asp Lys Leu Arg Gln Leu Asp				
	195	200	205	
gcc gag ttc tgc ggc cgg atc cac act cgc tac tca tcg gcc tac gag				672
Ala Glu Phe Cys Gly Arg Ile His Thr Arg Tyr Ser Ser Ala Tyr Glu				
	210	215	220	
ctc gag ggt gcc gtc aaa cgt gcc gac ctg gtg att ggg gcc gtc ctg				720
Leu Glu Gly Ala Val Lys Arg Ala Asp Leu Val Ile Gly Ala Val Leu				
225	230	235	240	
gtg cca ggc gcc aag gca ccc aaa tta gtc tcg aat tca ctt gtc gcg				768
Val Pro Gly Ala Lys Ala Pro Lys Leu Val Ser Asn Ser Leu Val Ala				
	245	250	255	

cat atg aaa cca ggt gcg gta ctg gtg gat ata gcc atc gac cag ggc 816
 His Met Lys Pro Gly Ala Val Leu Val Asp Ile Ala Ile Asp Gln Gly
 260 265 270

ggc tgt ttc gaa ggc tca cga ccg acc acc tac gac cac ccg acg ttc 864
 Gly Cys Phe Glu Gly Ser Arg Pro Thr Thr Tyr Asp His Pro Thr Phe
 275 280 285

gcc gtg cac gac acg ctg ttt tac tgc gtg gcg aac atg ccc gcc tcg 912
 Ala Val His Asp Thr Leu Phe Tyr Cys Val Ala Asn Met Pro Ala Ser
 290 295 300

gtg ccg aag acg tcg acc tac gcg ctg acc aac gcg acg atg ccg tat 960
 Val Pro Lys Thr Ser Thr Tyr Ala Leu Thr Asn Ala Thr Met Pro Tyr
 305 310 315 320

gtg ctc gag ctt gcc gac cat ggc tgg cgg gcg gcg tgc cgg tcg aat 1008
 Val Leu Glu Leu Ala Asp His Gly Trp Arg Ala Ala Cys Arg Ser Asn
 325 330 335

ccg gca cta gcc aaa ggt ctt tcg acg cac gaa ggg gcg tta ctg tcc 1056
 Pro Ala Leu Ala Lys Gly Leu Ser Thr His Glu Gly Ala Leu Leu Ser
 340 345 350

gaa cgg gtg gcc acc gac ctg ggg gtg ccg ttc acc gag ccc gcc agc 1104
 Glu Arg Val Ala Thr Asp Leu Gly Val Pro Phe Thr Glu Pro Ala Ser
 355 360 365

gtg ctg gcc tga 1116
 Val Leu Ala
 370

<210> 2

<211> 371

<212> PRT

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221>

<222>

<223> Sequence is identical to SwissProt entry SP:DHA_MYCTU

<400> 2

Met Arg Val Gly Ile Pro Thr Glu Thr Lys Asn Asn Glu Phe Arg Val
 1 5 10 15

Ala Ile Thr Pro Ala Gly Val Ala Glu Leu Thr Arg Arg Gly His Glu
 20 25 30

Val Leu Ile Gln Ala Gly Ala Gly Glu Gly Ser Ala Ile Thr Asp Ala
 35 40 45

Asp Phe Lys Ala Ala Gly Ala Gln Leu Val Gly Thr Ala Asp Gln Val
 50 55 60

Trp Ala Asp Ala Asp Leu Leu Leu Lys Val Lys Glu Pro Ile Ala Ala
 65 70 75 80

Glu Tyr Gly Arg Leu Arg His Gly Gln Ile Leu Phe Thr Phe Leu His
 85 90 95

Leu Ala Ala Ser Arg Ala Cys Thr Asp Ala Leu Leu Asp Ser Gly Thr
 100 105 110

Thr Ser Ile Ala Tyr Glu Thr Val Gln Thr Ala Asp Gly Ala Leu Pro
 115 120 125

Leu Leu Ala Pro Met Ser Glu Val Ala Gly Arg Leu Ala Ala Gln Val
 130 135 140

Gly Ala Tyr His Leu Met Arg Thr Gln Gly Gly Arg Gly Val Leu Met
 145 150 155 160

Gly Gly Val Pro Gly Val Glu Pro Ala Asp Val Val Val Ile Gly Ala
 165 170 175

Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Ala Ala Arg Ile Ala Asn Gly Met Gly Ala
 180 185 190

Thr Val Thr Val Leu Asp Ile Asn Ile Asp Lys Leu Arg Gln Leu Asp
 195 200 205

Ala Glu Phe Cys Gly Arg Ile His Thr Arg Tyr Ser Ser Ala Tyr Glu
 210 215 220

Leu Glu Gly Ala Val Lys Arg Ala Asp Leu Val Ile Gly Ala Val Leu
 225 230 235 240

Val Pro Gly Ala Lys Ala Pro Lys Leu Val Ser Asn Ser Leu Val Ala
 245 250 255

His Met Lys Pro Gly Ala Val Leu Val Asp Ile Ala Ile Asp Gln Gly
 260 265 270

Gly Cys Phe Glu Gly Ser Arg Pro Thr Thr Tyr Asp His Pro Thr Phe
 275 280 285

Ala Val His Asp Thr Leu Phe Tyr Cys Val Ala Asn Met Pro Ala Ser
 290 295 300

Val Pro Lys Thr Ser Thr Tyr Ala Leu Thr Asn Ala Thr Met Pro Tyr
 305 310 315 320

Val Leu Glu Leu Ala Asp His Gly Trp Arg Ala Ala Cys Arg Ser Asn
 325 330 335

Pro Ala Leu Ala Lys Gly Leu Ser Thr His Glu Gly Ala Leu Leu Ser
 340 345 350

Glu Arg Val Ala Thr Asp Leu Gly Val Pro Phe Thr Glu Pro Ala Ser
 355 360 365

Val Leu Ala
 370

<211> 1386
 <212> DNA
 <213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1386)
 <223> Sequence is identical to the complement of nucleotides 13172-14551
 of GenBank entry GB:MTV030 [AL021428]
 Sequence is identical to the complement of nucleotides 13195-14580
 of GenBank entry GB:AE006919

<400> 5
 atg acc atc agc gtc ttc gac ctg ttc acc atc ggc atc ggg ccg tcc 48
 Met Thr Ile Ser Val Phe Asp Leu Phe Thr Ile Gly Ile Gly Pro Ser
 1 5 10 15
 agt tcc cac acc gtg gga ccg atg cgc gcg gca aac cag ttc gta gtt 96
 Ser Ser His Thr Val Gly Pro Met Arg Ala Ala Asn Gln Phe Val Val
 20 25 30
 gcg ctg cgc cgc cgg ggc cac ctg gat gac ctc gag gcg atg cga gtg 144
 Ala Leu Arg Arg Arg Gly His Leu Asp Asp Leu Glu Ala Met Arg Val
 35 40 45
 gat ctg ttc ggc tcg ctc gcg gcc acc gga gcc ggt cat ggc acc atg 192
 Asp Leu Phe Gly Ser Leu Ala Ala Thr Gly Ala Gly His Gly Thr Met
 50 55 60
 tcg gcg ata ttg ctg ggg ctg gaa ggc tgc cag cca gaa acg att acc 240
 Ser Ala Ile Leu Leu Gly Leu Glu Gly Cys Gln Pro Glu Thr Ile Thr
 65 70 75 80
 acc gaa cac aag gaa cgc cgg ctc gcc gag atc gca gcg tcc ggc gtg 288
 Thr Glu His Lys Glu Arg Arg Leu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Gly Val
 85 90 95
 acg cga atc ggc ggt gtc att ccg gtc ccg ctg acc gag cgt gat atc 336
 Thr Arg Ile Gly Gly Val Ile Pro Val Pro Leu Thr Glu Arg Asp Ile
 100 105 110
 gac ctg cat ccc gac atc gtt ctg cca acg cat ccc aac gga atg acg 384
 Asp Leu His Pro Asp Ile Val Leu Pro Thr His Pro Asn Gly Met Thr
 115 120 125

ttc act gcc gcg ggc cca cac ggc cgc gtc ttg gcc acc gag act tat	432
Phe Thr Ala Ala Gly Pro His Gly Arg Val Leu Ala Thr Glu Thr Tyr	
130 135 140	
ttt tcg gtg ggc gga ggg ttc atc gtc acg gaa cag acc agc ggc aac	480
Phe Ser Val Gly Gly Gly Phe Ile Val Thr Glu Gln Thr Ser Gly Asn	
145 150 155 160	
agc ggc caa cat cca tgc tca gtt gcc ctt ccc tac gtg tcg gcc caa	528
Ser Gly Gln His Pro Cys Ser Val Ala Leu Pro Tyr Val Ser Ala Gln	
165 170 175	
gaa ctg ctg gac atc tgt gac cgc ctc gac gtg tca att agc gaa gcg	576
Glu Leu Leu Asp Ile Cys Asp Arg Leu Asp Val Ser Ile Ser Glu Ala	
180 185 190	
gcg ctg cgc aac gaa aca tgt tgc cgc acc gag aac gag gta cgc gcc	624
Ala Leu Arg Asn Glu Thr Cys Cys Arg Thr Glu Asn Glu Val Arg Ala	
195 200 205	
gcg ctg ctg cac ctg cgc gac gtc atg gtt gag tgc gaa cag cgg agc	672
Ala Leu Leu His Leu Arg Asp Val Met Val Glu Cys Glu Gln Arg Ser	
210 215 220	
atc gct cgc gaa ggg ttg ctt cct ggc ggc ctc cgg gtg cgc cgg cga	720
Ile Ala Arg Glu Gly Leu Leu Pro Gly Gly Leu Arg Val Arg Arg Arg	
225 230 235 240	
gcg aag gtg tgg tat gac cgc ttg aac gcc gaa gac ccc act cgc aag	768
Ala Lys Val Trp Tyr Asp Arg Leu Asn Ala Glu Asp Pro Thr Arg Lys	
245 250 255	
ccg gaa ttc gct gag gac tgg gtc aac ctg gtc gcg ctg gca gtc aac	816
Pro Glu Phe Ala Glu Asp Trp Val Asn Leu Val Ala Leu Ala Val Asn	
260 265 270	
gag gag aac gcc tcc ggt ggg cgc gtc gtc acc gcc ccg acc aac ggt	864
Glu Glu Asn Ala Ser Gly Gly Arg Val Val Thr Ala Pro Thr Asn Gly	
275 280 285	
gcc gcc ggc atc gtg ccg gcg gtc ctg cac tac gca atc cac tac acg	912
Ala Ala Gly Ile Val Pro Ala Val Leu His Tyr Ala Ile His Tyr Thr	
290 295 300	
tcg gcc ggc gcg ggg gac ccc gac gat gtc acc gtg cga ttc ctg ctc	960
Ser Ala Gly Ala Gly Asp Pro Asp Asp Val Thr Val Arg Phe Leu Leu	

305	310	315	320	
act gct gga gcc atc gga tcg ttg ttc aag gag cga gca tcg atc tcc				1008
Thr Ala Gly Ala Ile Gly Ser Leu Phe Lys Glu Arg Ala Ser Ile Ser				
	325	330	335	
gga gcc gag gtc ggc tgt cag ggc gag gtc ggc tcc gcg gcc gcc atg				1056
Gly Ala Glu Val Gly Cys Gln Gly Glu Val Gly Ser Ala Ala Ala Met				
	340	345	350	
gcc gcc gcc gga ttg gct gaa atc ctc ggc ggc aca ccg cga caa gtg				1104
Ala Ala Ala Gly Leu Ala Glu Ile Leu Gly Gly Thr Pro Arg Gln Val				
	355	360	365	
gaa aac gcc gcc gag atc gcc atg gaa cac agc ctc ggc ctg acc tgt				1152
Glu Asn Ala Ala Glu Ile Ala Met Glu His Ser Leu Gly Leu Thr Cys				
	370	375	380	
gac ccc atc gcc ggg ctg gtg cag atc ccc tgc atc gaa cgc aac gcg				1200
Asp Pro Ile Ala Gly Leu Val Gln Ile Pro Cys Ile Glu Arg Asn Ala				
385	390	395	400	
att tcc gcc ggc aag gcc atc aac gcc gca cgg atg gca ttg cgc ggc				1248
Ile Ser Ala Gly Lys Ala Ile Asn Ala Ala Arg Met Ala Leu Arg Gly				
	405	410	415	
gac ggc atc cat cgc gtc acc ctc gac cag gtc atc gac acc atg cgc				1296
Asp Gly Ile His Arg Val Thr Leu Asp Gln Val Ile Asp Thr Met Arg				
	420	425	430	
gcc acc ggc gcg gac atg cac acc aag tac aag gaa acc tcg gcc ggc				1344
Ala Thr Gly Ala Asp Met His Thr Lys Tyr Lys Glu Thr Ser Ala Gly				
	435	440	445	
ggg ctc gcc atc aac gtc gca gtc aac atc gtc gag tgt tga				1386
Gly Leu Ala Ile Asn Val Ala Val Asn Ile Val Glu Cys				
	450	455	460	

<210> 6

<211> 461

<212> PRT

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221>

<222>

<223> Sequence is identical to SwissProt entry SP:SDHL_MYCTU

Sequence is identical to GenBank entries GP:AE006919_13 and GP:MTV030_11

<400> 6

Met Thr Ile Ser Val Phe Asp Leu Phe Thr Ile Gly Ile Gly Pro Ser
 1 5 10 15

Ser Ser His Thr Val Gly Pro Met Arg Ala Ala Asn Gln Phe Val Val
 20 25 30

Ala Leu Arg Arg Arg Gly His Leu Asp Asp Leu Glu Ala Met Arg Val
 35 40 45

Asp Leu Phe Gly Ser Leu Ala Ala Thr Gly Ala Gly His Gly Thr Met
 50 55 60

Ser Ala Ile Leu Leu Gly Leu Glu Gly Cys Gln Pro Glu Thr Ile Thr
 65 70 75 80

Thr Glu His Lys Glu Arg Arg Leu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Gly Val
 85 90 95

Thr Arg Ile Gly Gly Val Ile Pro Val Pro Leu Thr Glu Arg Asp Ile
 100 105 110

Asp Leu His Pro Asp Ile Val Leu Pro Thr His Pro Asn Gly Met Thr
 115 120 125

Phe Thr Ala Ala Gly Pro His Gly Arg Val Leu Ala Thr Glu Thr Tyr
 130 135 140

Phe Ser Val Gly Gly Gly Phe Ile Val Thr Glu Gln Thr Ser Gly Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Gln His Pro Cys Ser Val Ala Leu Pro Tyr Val Ser Ala Gln
 165 170 175

Glu Leu Leu Asp Ile Cys Asp Arg Leu Asp Val Ser Ile Ser Glu Ala
 180 185 190

Ala Leu Arg Asn Glu Thr Cys Cys Arg Thr Glu Asn Glu Val Arg Ala
 195 200 205

Ala Leu Leu His Leu Arg Asp Val Met Val Glu Cys Glu Gln Arg Ser
 210 215 220

Ile Ala Arg Glu Gly Leu Leu Pro Gly Gly Leu Arg Val Arg Arg Arg
 225 230 235 240

Ala Lys Val Trp Tyr Asp Arg Leu Asn Ala Glu Asp Pro Thr Arg Lys
 245 250 255

Pro Glu Phe Ala Glu Asp Trp Val Asn Leu Val Ala Leu Ala Val Asn
 260 265 270

Glu Glu Asn Ala Ser Gly Gly Arg Val Val Thr Ala Pro Thr Asn Gly
 275 280 285

Ala Ala Gly Ile Val Pro Ala Val Leu His Tyr Ala Ile His Tyr Thr
 290 295 300

Ser Ala Gly Ala Gly Asp Pro Asp Asp Val Thr Val Arg Phe Leu Leu
 305 310 315 320

Thr Ala Gly Ala Ile Gly Ser Leu Phe Lys Glu Arg Ala Ser Ile Ser
 325 330 335

Gly Ala Glu Val Gly Cys Gln Gly Glu Val Gly Ser Ala Ala Ala Met
 340 345 350

Ala Ala Ala Gly Leu Ala Glu Ile Leu Gly Gly Thr Pro Arg Gln Val
 355 360 365

Glu Asn Ala Ala Glu Ile Ala Met Glu His Ser Leu Gly Leu Thr Cys
 370 375 380

Asp Pro Ile Ala Gly Leu Val Gln Ile Pro Cys Ile Glu Arg Asn Ala
 385 390 395 400

Ile Ser Ala Gly Lys Ala Ile Asn Ala Ala Arg Met Ala Leu Arg Gly
 405 410 415

Asp Gly Ile His Arg Val Thr Leu Asp Gln Val Ile Asp Thr Met Arg
 420 425 430

Ala Thr Gly Ala Asp Met His Thr Lys Tyr Lys Glu Thr Ser Ala Gly
 435 440 445

Gly Leu Ala Ile Asn Val Ala Val Asn Ile Val Glu Cys
 450 455 460

<210> 7

<211> 1437

<212> DNA

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1437)

<223> Sequence is identical to GenBank entry GB:MTU87280 [U87280]

Sequence is identical to nucleotides 163-1599 of GenBank entry
 GB:MTCY427 [Z70692]

Sequence is identical to nucleotides 93-1529 of GenBank entry GB:AE007073

<400> 7

gtg acg gaa aag acg ccc gac gac gtc ttc aaa ctt gcc aag gac gag 48

Met Thr Glu Lys Thr Pro Asp Asp Val Phe Lys Leu Ala Lys Asp Glu	
1	5 10 15
aag gtc gaa tat gtc gac gtc cgg ttc tgt gac ctg cct ggc atc atg	96
Lys Val Glu Tyr Val Asp Val Arg Phe Cys Asp Leu Pro Gly Ile Met	
	20 25 30
cag cac ttc acg att ccg gct tcg gcc ttt gac aag agc gtg ttt gac	144
Gln His Phe Thr Ile Pro Ala Ser Ala Phe Asp Lys Ser Val Phe Asp	
	35 40 45
gac ggc ttg gcc ttt gac ggc tcg tcg att cgc ggg ttc cag tcg atc	192
Asp Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Gln Ser Ile	
	50 55 60
cac gaa tcc gac atg ttg ctt ctt ccc gat ccc gag acg gcg cgc atc	240
His Glu Ser Asp Met Leu Leu Leu Pro Asp Pro Glu Thr Ala Arg Ile	
	65 70 75 80
gac ccg ttc cgc gcg gcc aag acg ctg aat atc aac ttc ttt gtg cac	288
Asp Pro Phe Arg Ala Ala Lys Thr Leu Asn Ile Asn Phe Phe Val His	
	85 90 95
gac ccg ttc acc ctg gag ccg tac tcc cgc gac ccg cgc aac atc gcc	336
Asp Pro Phe Thr Leu Glu Pro Tyr Ser Arg Asp Pro Arg Asn Ile Ala	
	100 105 110
cgc aag gcc gag aac tac ctg atc agc act ggc atc gcc gac acc gca	384
Arg Lys Ala Glu Asn Tyr Leu Ile Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Ala	
	115 120 125
tac ttc ggc gcc gag gcc gag ttc tac att ttc gat tcg gtg agc ttc	432
Tyr Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Ile Phe Asp Ser Val Ser Phe	
	130 135 140
gac tcg cgc gcc aac ggc tcc ttc tac gag gtg gac gcc atc tcg ggg	480
Asp Ser Arg Ala Asn Gly Ser Phe Tyr Glu Val Asp Ala Ile Ser Gly	
	145 150 155 160
tgg tgg aac acc ggc gcg gcg acc gag gcc gac ggc agt ccc aac cgg	528
Trp Trp Asn Thr Gly Ala Ala Thr Glu Ala Asp Gly Ser Pro Asn Arg	
	165 170 175
ggc tac aag gtc cgc cac aag ggc ggg tat ttc cca gtg gcc ccc aac	576
Gly Tyr Lys Val Arg His Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Asn	
	180 185 190

gac caa tac gtc gac ctg cgc gac aag atg ctg acc aac ctg atc aac	624
Asp Gln Tyr Val Asp Leu Arg Asp Lys Met Leu Thr Asn Leu Ile Asn	
195 200 205	
tcc ggc ttc atc ctg gag aag ggc cac cac gag gtg ggc agc ggc gga	672
Ser Gly Phe Ile Leu Glu Lys Gly His His Glu Val Gly Ser Gly Gly	
210 215 220	
cag gcc gag atc aac tac cag ttc aat tcg ctg ctg cac gcc gcc gac	720
Gln Ala Glu Ile Asn Tyr Gln Phe Asn Ser Leu Leu His Ala Ala Asp	
225 230 235 240	
gac atg cag ttg tac aag tac atc atc aag aac acc gcc tgg cag aac	768
Asp Met Gln Leu Tyr Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Trp Gln Asn	
245 250 255	
ggc aaa acg gtc acg ttc atg ccc aag ccg ctg ttc ggc gac aac ggg	816
Gly Lys Thr Val Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Phe Gly Asp Asn Gly	
260 265 270	
tcc ggc atg cac tgt cat cag tcg ctg tgg aag gac ggg gcc ccg ctg	864
Ser Gly Met His Cys His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Ala Pro Leu	
275 280 285	
atg tac gac gag acg ggt tat gcc ggt ctg tcg gac acg gcc cgt cat	912
Met Tyr Asp Glu Thr Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Thr Ala Arg His	
290 295 300	
tac atc ggc ggc ctg tta cac cac gcg ccg tcg ctg ctg gcc ttc acc	960
Tyr Ile Gly Gly Leu Leu His His Ala Pro Ser Leu Leu Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
aac ccg acg gtg aac tcc tac aag cgg ctg gtt ccc ggt tac gag gcc	1008
Asn Pro Thr Val Asn Ser Tyr Lys Arg Leu Val Pro Gly Tyr Glu Ala	
325 330 335	
ccg atc aac ctg gtc tat agc cag cgc aac cgg tcg gca tgc gtg cgc	1056
Pro Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Cys Val Arg	
340 345 350	
atc ccg atc acc ggc agc aac ccg aag gcc aag cgg ctg gag ttc cga	1104
Ile Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Leu Glu Phe Arg	
355 360 365	
agc ccc gac tcg tcg ggc aac ccg tat ctg gcg ttc tcg gcc atg ctg	1152

Ser Pro Asp Ser Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Ala Phe Ser Ala Met Leu
 370 375 380

atg gca ggc ctg gac ggt atc aag aac aag atc gag ccg cag gcg ccc 1200
 Met Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Lys Ile Glu Pro Gln Ala Pro
 385 390 395 400

gtc gac aag gat ctc tac gag ctg ccg ccg gaa gag gcc gcg agt atc 1248
 Val Asp Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile
 405 410 415

ccg cag act ccg acc cag ctg tca gat gtg atc gac cgt ctc gag gcc 1296
 Pro Gln Thr Pro Thr Gln Leu Ser Asp Val Ile Asp Arg Leu Glu Ala
 420 425 430

gac cac gaa tac ctc acc gaa gga ggg gtg ttc aca aac gac ctg atc 1344
 Asp His Glu Tyr Leu Thr Glu Gly Gly Val Phe Thr Asn Asp Leu Ile
 435 440 445

gag acg tgg atc agt ttc aag cgc gaa aac gag atc gag ccg gtc aac 1392
 Glu Thr Trp Ile Ser Phe Lys Arg Glu Asn Glu Ile Glu Pro Val Asn
 450 455 460

atc cgg ccg cat ccc tac gaa ttc gcg ctg tac tac gac gtt taa 1437
 Ile Arg Pro His Pro Tyr Glu Phe Ala Leu Tyr Tyr Asp Val
 465 470 475

<210> 8
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>
 <221>
 <222>
 <223> Sequence is identical to SwissProt entry SP:GLN1_MYCTU
 Sequence is identical to PIR entry PIR:H70775
 Sequence is identical to PRF entry PRF:2323405A

<400> 8
 Met Thr Glu Lys Thr Pro Asp Asp Val Phe Lys Leu Ala Lys Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Glu Tyr Val Asp Val Arg Phe Cys Asp Leu Pro Gly Ile Met

Ser Gly Phe Ile Leu Glu Lys Gly His His Glu Val Gly Ser Gly Gly
 210 215 220

Gln Ala Glu Ile Asn Tyr Gln Phe Asn Ser Leu Leu His Ala Ala Asp
 225 230 235 240

Asp Met Gln Leu Tyr Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Trp Gln Asn
 245 250 255

Gly Lys Thr Val Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Phe Gly Asp Asn Gly
 260 265 270

Ser Gly Met His Cys His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Ala Pro Leu
 275 280 285

Met Tyr Asp Glu Thr Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Thr Ala Arg His
 290 295 300

Tyr Ile Gly Gly Leu Leu His His Ala Pro Ser Leu Leu Ala Phe Thr
 305 310 315 320

Asn Pro Thr Val Asn Ser Tyr Lys Arg Leu Val Pro Gly Tyr Glu Ala
 325 330 335

Pro Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Cys Val Arg
 340 345 350

Ile Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Leu Glu Phe Arg
 355 360 365

Ser Pro Asp Ser Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Ala Phe Ser Ala Met Leu
 370 375 380

Met Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Lys Ile Glu Pro Gln Ala Pro

tcg gtc gcc atc gcc cca gcc gaa ctc gag ggc gcc ttc gag gaa ggc	144
Ser Val Ala Ile Ala Pro Ala Glu Leu Glu Gly Ala Phe Glu Glu Gly	
35 40 45	
atc ggc ttc gac gga tcc tcg atc gag ggc ttt gcg cgg gtc tcg gaa	192
Ile Gly Phe Asp Gly Ser Ser Ile Glu Gly Phe Ala Arg Val Ser Glu	
50 55 60	
tcc gat acg gtg gcg cac ccg gac ccg tcg acc ttc cag gtg ctg ccc	240
Ser Asp Thr Val Ala His Pro Asp Pro Ser Thr Phe Gln Val Leu Pro	
65 70 75 80	
tgg gcc acc agt tcc ggc cac cac cac tca gcg cgg atg ttt tgc gac	288
Trp Ala Thr Ser Ser Gly His His His Ser Ala Arg Met Phe Cys Asp	
85 90 95	
atc acc atg ccg gac ggc tcg ccg tcg tgg gcg gac ccg cgg cac gtg	336
Ile Thr Met Pro Asp Gly Ser Pro Ser Trp Ala Asp Pro Arg His Val	
100 105 110	
ttg cgg cgg cag ctg acg aag gcc ggc gaa ctc ggc ttc tcc tgc tac	384
Leu Arg Arg Gln Leu Thr Lys Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ser Cys Tyr	
115 120 125	
gtg cat ccc gaa atc gag ttc ttc ctg ctc aag ccc gga ccc gag gac	432
Val His Pro Glu Ile Glu Phe Phe Leu Leu Lys Pro Gly Pro Glu Asp	
130 135 140	
ggg tcg gtg ccc gtc ccg gtc gac aac gcc ggc tat ttc gac caa gcg	480
Gly Ser Val Pro Val Pro Val Asp Asn Ala Gly Tyr Phe Asp Gln Ala	
145 150 155 160	
gtg cac gac tcc gcc ttg aac ttt cgc cgc cac gcg atc gat gcc ctg	528
Val His Asp Ser Ala Leu Asn Phe Arg Arg His Ala Ile Asp Ala Leu	
165 170 175	
gaa ttc atg ggc atc tcg gtg gag ttc agc cat cac gaa ggc gca ccc	576
Glu Phe Met Gly Ile Ser Val Glu Phe Ser His His Glu Gly Ala Pro	
180 185 190	
ggc cag cag gag atc gac ctg cgg ttt gcc gac gct ctg tcg atg gct	624
Gly Gln Gln Glu Ile Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ala Leu Ser Met Ala	
195 200 205	
gac aac gtg atg acc ttc cgc tac gtc atc aaa gaa gtc gcg ctg gaa	672
Asp Asn Val Met Thr Phe Arg Tyr Val Ile Lys Glu Val Ala Leu Glu	

210	215	220	
gag ggc gcc cgg gcg tcg ttc atg ccc aag cca ttc ggc cag cac ccg 720			
Glu Gly Ala Arg Ala Ser Phe Met Pro Lys Pro Phe Gly Gln His Pro			
225	230	235	240
ggc tcg gcg atg cac acc cac atg agc ctg ttc gag ggt gat gtc aac 768			
Gly Ser Ala Met His Thr His Met Ser Leu Phe Glu Gly Asp Val Asn			
	245	250	255
gcg ttc cac agc gct gat gat ccg ctg cag ctg tcg gaa gtg ggt aaa 816			
Ala Phe His Ser Ala Asp Asp Pro Leu Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys			
	260	265	270
tcg ttc atc gcc ggg atc ctg gag cac gct tgc gag atc agc gcg gtc 864			
Ser Phe Ile Ala Gly Ile Leu Glu His Ala Cys Glu Ile Ser Ala Val			
	275	280	285
aca aat cag tgg gtc aac tot tac aag cgg ctg gtg cag ggc ggc gaa 912			
Thr Asn Gln Trp Val Asn Ser Tyr Lys Arg Leu Val Gln Gly Gly Glu			
290	295	300	
gcg ccc acg gcc gcg tcg tgg ggg gcc gcc aac cga tcc gcc cta gtg 960			
Ala Pro Thr Ala Ala Ser Trp Gly Ala Ala Asn Arg Ser Ala Leu Val			
305	310	315	320
cgg gtg ccg atg tac acg ccg cac aag acc tcg tcg cgg cgg gtc gaa 1008			
Arg Val Pro Met Tyr Thr Pro His Lys Thr Ser Ser Arg Arg Val Glu			
	325	330	335
gta cgc agc cct gat tcg gcg tgc aat ccc tat ctg aca ttc gcc gtg 1056			
Val Arg Ser Pro Asp Ser Ala Cys Asn Pro Tyr Leu Thr Phe Ala Val			
	340	345	350
ctg ctg gcc gcg gga ttg cgg ggt gta gag aag ggt tac gtg ctg gcc 1104			
Leu Leu Ala Ala Gly Leu Arg Gly Val Glu Lys Gly Tyr Val Leu Gly			
	355	360	365
ccg cag gcc gag gac aac gta tgg gac ctc aca ccc gag gaa cgc cga 1152			
Pro Gln Ala Glu Asp Asn Val Trp Asp Leu Thr Pro Glu Glu Arg Arg			
370	375	380	
gcg atg ggg tac cga gaa ttg ccg tcc agt ttg gat agt gcg ctg cgc 1200			
Ala Met Gly Tyr Arg Glu Leu Pro Ser Ser Leu Asp Ser Ala Leu Arg			
385	390	395	400

gcc atg gag gcc tcc gaa ctc gtc gcg gag gcc ttg ggg gag cac gtt 1248
 Ala Met Glu Ala Ser Glu Leu Val Ala Glu Ala Leu Gly Glu His Val
 405 410 415

ttt gac ttt ttc ttg cgc aac aag cgc acg gag tgg gcg aac tac cgc 1296
 Phe Asp Phe Phe Leu Arg Asn Lys Arg Thr Glu Trp Ala Asn Tyr Arg
 420 425 430

agc cac gtc acg cca tac gag ctg cgc acc tac ctg tcg ctg tag 1341
 Ser His Val Thr Pro Tyr Glu Leu Arg Thr Tyr Leu Ser Leu
 435 440 445

<210> 10

<211> 446

<212> PRT

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221>

<222>

<223> Sequence is identical to SwissProt entry SP:GLN2_MYCTU

Sequence is identical to PIR entry PIR:B70776

<400> 10

Met Asp Arg Gln Lys Glu Phe Val Leu Arg Thr Leu Glu Glu Arg Asp
 1 5 10 15

Ile Arg Phe Val Arg Leu Trp Phe Thr Asp Val Leu Gly Phe Leu Lys
 20 25 30

Ser Val Ala Ile Ala Pro Ala Glu Leu Glu Gly Ala Phe Glu Glu Gly
 35 40 45

Ile Gly Phe Asp Gly Ser Ser Ile Glu Gly Phe Ala Arg Val Ser Glu
 50 55 60

Ser Asp Thr Val Ala His Pro Asp Pro Ser Thr Phe Gln Val Leu Pro
 65 70 75 80

Trp Ala Thr Ser Ser Gly His His His Ser Ala Arg Met Phe Cys Asp
85 90 95

Ile Thr Met Pro Asp Gly Ser Pro Ser Trp Ala Asp Pro Arg His Val
100 105 110

Leu Arg Arg Gln Leu Thr Lys Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ser Cys Tyr
115 120 125

Val His Pro Glu Ile Glu Phe Phe Leu Leu Lys Pro Gly Pro Glu Asp
130 135 140

Gly Ser Val Pro Val Pro Val Asp Asn Ala Gly Tyr Phe Asp Gln Ala
145 150 155 160

Val His Asp Ser Ala Leu Asn Phe Arg Arg His Ala Ile Asp Ala Leu
165 170 175

Glu Phe Met Gly Ile Ser Val Glu Phe Ser His His Glu Gly Ala Pro
180 185 190

Gly Gln Gln Glu Ile Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ala Leu Ser Met Ala
195 200 205

Asp Asn Val Met Thr Phe Arg Tyr Val Ile Lys Glu Val Ala Leu Glu
210 215 220

Glu Gly Ala Arg Ala Ser Phe Met Pro Lys Pro Phe Gly Gln His Pro
225 230 235 240

Gly Ser Ala Met His Thr His Met Ser Leu Phe Glu Gly Asp Val Asn
245 250 255

Ala Phe His Ser Ala Asp Asp Pro Leu Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys
260 265 270

Ser Phe Ile Ala Gly Ile Leu Glu His Ala Cys Glu Ile Ser Ala Val
 275 280 285

Thr Asn Gln Trp Val Asn Ser Tyr Lys Arg Leu Val Gln Gly Gly Glu
 290 295 300

Ala Pro Thr Ala Ala Ser Trp Gly Ala Ala Asn Arg Ser Ala Leu Val
 305 310 315 320

Arg Val Pro Met Tyr Thr Pro His Lys Thr Ser Ser Arg Arg Val Glu
 325 330 335

Val Arg Ser Pro Asp Ser Ala Cys Asn Pro Tyr Leu Thr Phe Ala Val
 340 345 350

Leu Leu Ala Ala Gly Leu Arg Gly Val Glu Lys Gly Tyr Val Leu Gly
 355 360 365

Pro Gln Ala Glu Asp Asn Val Trp Asp Leu Thr Pro Glu Glu Arg Arg
 370 375 380

Ala Met Gly Tyr Arg Glu Leu Pro Ser Ser Leu Asp Ser Ala Leu Arg
 385 390 395 400

Ala Met Glu Ala Ser Glu Leu Val Ala Glu Ala Leu Gly Glu His Val
 405 410 415

Phe Asp Phe Phe Leu Arg Asn Lys Arg Thr Glu Trp Ala Asn Tyr Arg
 420 425 430

Ser His Val Thr Pro Tyr Glu Leu Arg Thr Tyr Leu Ser Leu
 435 440 445

<210> 11
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1353)
 <223> Sequence is identical to nucleotides 4871-6223
 of GenBank entry GB:MTCY180 [Z97193]
 Sequence is identical to nucleotides 7308-8660
 of GenBank entry GB:AE007049

<400> 11
 atg aca gcc aca ccg ctt gcc gcg gcc gcg atc gcc caa ttg gag gca 48
 Met Thr Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ala Ala Ile Ala Gln Leu Glu Ala
 1 5 10 15
 gag ggc gtc gac acc gtc atc ggc acc gtc gtg aac ccc gcc gga ctc 96
 Glu Gly Val Asp Thr Val Ile Gly Thr Val Val Asn Pro Ala Gly Leu
 20 25 30
 acc cag gcc aag acc gtg ccg ata cgc cgg acc aac aca ttc gcc aat 144
 Thr Gln Ala Lys Thr Val Pro Ile Arg Arg Thr Asn Thr Phe Ala Asn
 35 40 45
 cct ggc ctc ggc gcc agt ccg gtg tgg cat acc ttc tgt atc gac caa 192
 Pro Gly Leu Gly Ala Ser Pro Val Trp His Thr Phe Cys Ile Asp Gln
 50 55 60
 tgc agt att gca ttc acc gca gac atc agt gtg gtc ggc gat caa cgt 240
 Cys Ser Ile Ala Phe Thr Ala Asp Ile Ser Val Val Gly Asp Gln Arg
 65 70 75 80
 ctc cgc atc gat ctg tcc gcc ttg cgc atc atc ggc gac ggg ttg gcg 288
 Leu Arg Ile Asp Leu Ser Ala Leu Arg Ile Ile Gly Asp Gly Leu Ala
 85 90 95
 tgg gcg ccc gcc ggg ttc ttc gag cag gac ggc aca ccg gtc ccc gcc 336
 Trp Ala Pro Ala Gly Phe Phe Glu Gln Asp Gly Thr Pro Val Pro Ala
 100 105 110
 tgc agc cga gga aca ctg agc cgg atc gag gcc gcg ctt gct gat gcc 384
 Cys Ser Arg Gly Thr Leu Ser Arg Ile Glu Ala Ala Leu Ala Asp Ala
 115 120 125

ggc atc gac gcg gta atc ggc cac gaa gtc gaa ttc ctc ttg gtc gac	432
Gly Ile Asp Ala Val Ile Gly His Glu Val Glu Phe Leu Leu Val Asp	
130 135 140	
gcg gac ggc cag cgg ctg cct tcg acg ctg tgg gcg cag tac ggt gtc	480
Ala Asp Gly Gln Arg Leu Pro Ser Thr Leu Trp Ala Gln Tyr Gly Val	
145 150 155 160	
gcc ggg gtg ctc gag cac gag gcg ttc gtc cgc gat gtc aac gcc gcg	528
Ala Gly Val Leu Glu His Glu Ala Phe Val Arg Asp Val Asn Ala Ala	
165 170 175	
gca acg gca gca ggc atc gct atc gag cag ttc cat ccc gaa tac ggt	576
Ala Thr Ala Ala Gly Ile Ala Ile Glu Gln Phe His Pro Glu Tyr Gly	
180 185 190	
gcc aac caa ttc gag atc tcg tta gcg ccg cag ccg ccg gtc gcg gcc	624
Ala Asn Gln Phe Glu Ile Ser Leu Ala Pro Gln Pro Pro Val Ala Ala	
195 200 205	
gcc gat cag ctg gtg ctg acc cgc ctc atc atc ggc cgt acc gcc cgc	672
Ala Asp Gln Leu Val Leu Thr Arg Leu Ile Ile Gly Arg Thr Ala Arg	
210 215 220	
cgg cac ggg tta cgc gtg agc cta tcg cca gcg ccc ttc gcc gga agt	720
Arg His Gly Leu Arg Val Ser Leu Ser Pro Ala Pro Phe Ala Gly Ser	
225 230 235 240	
atc gga tcc ggt gcc cac caa cac ttc tcg ctg act atg tcg gaa ggg	768
Ile Gly Ser Gly Ala His Gln His Phe Ser Leu Thr Met Ser Glu Gly	
245 250 255	
atg ctg ttc tcc ggt ggg act gga gca gct ggc atg acc tcg gcc ggg	816
Met Leu Phe Ser Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Met Thr Ser Ala Gly	
260 265 270	
gag gcc gcg gtg gca gga gtg ctt cgc gga cta ccg gac gcc caa ggc	864
Glu Ala Ala Val Ala Gly Val Leu Arg Gly Leu Pro Asp Ala Gln Gly	
275 280 285	
atc ctg tgc gga tcg atc gtg tcc ggt ctg cga atg cga ccc ggt aac	912
Ile Leu Cys Gly Ser Ile Val Ser Gly Leu Arg Met Arg Pro Gly Asn	
290 295 300	
tgg gcc gga atc tat gca tgc tgg ggt acc gaa aac cgg gaa gcg gcg	960

Trp Ala Gly Ile Tyr Ala Cys Trp Gly Thr Glu Asn Arg Glu Ala Ala
 305 310 315 320

gtg cga ttc gtc aag ggc ggg gct ggc agc gcg tac ggc ggg aac gtg 1008
 Val Arg Phe Val Lys Gly Gly Ala Gly Ser Ala Tyr Gly Gly Asn Val
 325 330 335

gag gtg aag gtc gtc gac ccg tcg gcc aac ccg tat ctc gcg tcg gcg 1056
 Glu Val Lys Val Val Asp Pro Ser Ala Asn Pro Tyr Leu Ala Ser Ala
 340 345 350

gcg atc ctc gga ctg gca ctc gac ggc atg aag acc aag gcg gtg ttg 1104
 Ala Ile Leu Gly Leu Ala Leu Asp Gly Met Lys Thr Lys Ala Val Leu
 355 360 365

ccg tcg gaa acg acc gta gac ccg aca cag ctg tct gac gtg gat cgt 1152
 Pro Ser Glu Thr Thr Val Asp Pro Thr Gln Leu Ser Asp Val Asp Arg
 370 375 380

gac cgt gcc ggc att ctg cga ctt gct gcc gat cag gcg gat gca att 1200
 Asp Arg Ala Gly Ile Leu Arg Leu Ala Ala Asp Gln Ala Asp Ala Ile
 385 390 395 400

gct gta ctg gat agt tcg aaa ctg ctt cgg tgc atc ctt ggc gat ccc 1248
 Ala Val Leu Asp Ser Ser Lys Leu Leu Arg Cys Ile Leu Gly Asp Pro
 405 410 415

gtg gta gat gcc gtg gtc gcg gta cgc cag tta gag cat gag cgc tac 1296
 Val Val Asp Ala Val Val Ala Val Arg Gln Leu Glu His Glu Arg Tyr
 420 425 430

ggt gac ctc gat cct gcg cag ctg gcc gac aag ttc cgg atg gct tgg 1344
 Gly Asp Leu Asp Pro Ala Gln Leu Ala Asp Lys Phe Arg Met Ala Trp
 435 440 445

agt gtg taa 1353
 Ser Val
 450

<210> 12

<211> 450

<212> PRT

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221>

<222>

<223> Sequence is identical to PIR entry PIR:C70515

<400> 12

Met Thr Ala Thr Pro Leu Ala Ala Ala Ala Ile Ala Gln Leu Glu Ala
 1 5 10 15

Glu Gly Val Asp Thr Val Ile Gly Thr Val Val Asn Pro Ala Gly Leu
 20 25 30

Thr Gln Ala Lys Thr Val Pro Ile Arg Arg Thr Asn Thr Phe Ala Asn
 35 40 45

Pro Gly Leu Gly Ala Ser Pro Val Trp His Thr Phe Cys Ile Asp Gln
 50 55 60

Cys Ser Ile Ala Phe Thr Ala Asp Ile Ser Val Val Gly Asp Gln Arg
 65 70 75 80

Leu Arg Ile Asp Leu Ser Ala Leu Arg Ile Ile Gly Asp Gly Leu Ala
 85 90 95

Trp Ala Pro Ala Gly Phe Phe Glu Gln Asp Gly Thr Pro Val Pro Ala
 100 105 110

Cys Ser Arg Gly Thr Leu Ser Arg Ile Glu Ala Ala Leu Ala Asp Ala
 115 120 125

Gly Ile Asp Ala Val Ile Gly His Glu Val Glu Phe Leu Leu Val Asp
 130 135 140

Ala Asp Gly Gln Arg Leu Pro Ser Thr Leu Trp Ala Gln Tyr Gly Val
 145 150 155 160

Ala Gly Val Leu Glu His Glu Ala Phe Val Arg Asp Val Asn Ala Ala
 165 170 175

Ala Thr Ala Ala Gly Ile Ala Ile Glu Gln Phe His Pro Glu Tyr Gly
 180 185 190

Ala Asn Gln Phe Glu Ile Ser Leu Ala Pro Gln Pro Pro Val Ala Ala
 195 200 205

Ala Asp Gln Leu Val Leu Thr Arg Leu Ile Ile Gly Arg Thr Ala Arg
 210 215 220

Arg His Gly Leu Arg Val Ser Leu Ser Pro Ala Pro Phe Ala Gly Ser
 225 230 235 240

Ile Gly Ser Gly Ala His Gln His Phe Ser Leu Thr Met Ser Glu Gly
 245 250 255

Met Leu Phe Ser Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Met Thr Ser Ala Gly
 260 265 270

Glu Ala Ala Val Ala Gly Val Leu Arg Gly Leu Pro Asp Ala Gln Gly
 275 280 285

Ile Leu Cys Gly Ser Ile Val Ser Gly Leu Arg Met Arg Pro Gly Asn
 290 295 300

Trp Ala Gly Ile Tyr Ala Cys Trp Gly Thr Glu Asn Arg Glu Ala Ala
 305 310 315 320

Val Arg Phe Val Lys Gly Gly Ala Gly Ser Ala Tyr Gly Gly Asn Val
 325 330 335

Glu Val Lys Val Val Asp Pro Ser Ala Asn Pro Tyr Leu Ala Ser Ala
 340 345 350

Ala Ile Leu Gly Leu Ala Leu Asp Gly Met Lys Thr Lys Ala Val Leu
 355 360 365

Pro Ser Glu Thr Thr Val Asp Pro Thr Gln Leu Ser Asp Val Asp Arg
 370 375 380

Asp Arg Ala Gly Ile Leu Arg Leu Ala Ala Asp Gln Ala Asp Ala Ile
 385 390 395 400

Ala Val Leu Asp Ser Ser Lys Leu Leu Arg Cys Ile Leu Gly Asp Pro
 405 410 415

Val Val Asp Ala Val Val Ala Val Arg Gln Leu Glu His Glu Arg Tyr
 420 425 430

Gly Asp Leu Asp Pro Ala Gln Leu Ala Asp Lys Phe Arg Met Ala Trp
 435 440 445

Ser Val
 450

<210> 13

<211> 1374

<212> DNA

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1374)

<223> Sequence is identical to complement of nucleotides 3104-4477
 of GenBank entry GB:MTV003 [AL008883]
 Sequence is identical to complement of nucleotides 3138-4511
 of GenBank entry GB:AE007117

<400> 13

gtg acc ggc ccc ggt tcg ccg ccg ttg gcg tgg acc gag ttg gag cga 48

atc cgg ttg ggt atg gcc ggt gcg ggt ctg cga ttc gag gcg gtc aaa	624
Ile Arg Leu Gly Met Ala Gly Ala Gly Leu Arg Phe Glu Ala Val Lys	
195 200 205	
ggc gaa tgc aac atg ggc cag cag gag atc ggg ttt cgt tac gac gag	672
Gly Glu Cys Asn Met Gly Gln Gln Glu Ile Gly Phe Arg Tyr Asp Glu	
210 215 220	
gcg ctg gtc acc tgc gac aac cat gcg atc tac aag aac ggc gcc aag	720
Ala Leu Val Thr Cys Asp Asn His Ala Ile Tyr Lys Asn Gly Ala Lys	
225 230 235 240	
gaa atc gcc gac cag cac ggc aag agc cta acg ttc atg gcg aaa tac	768
Glu Ile Ala Asp Gln His Gly Lys Ser Leu Thr Phe Met Ala Lys Tyr	
245 250 255	
gat gaa cgc gaa ggt aat agc tgt cac atc cat gtc tcg ctg cgt ggc	816
Asp Glu Arg Glu Gly Asn Ser Cys His Ile His Val Ser Leu Arg Gly	
260 265 270	
acg gat ggc tcc gcg gtg ttt gcc gac agt aac ggg ccg cac ggc atg	864
Thr Asp Gly Ser Ala Val Phe Ala Asp Ser Asn Gly Pro His Gly Met	
275 280 285	
tcg tcg atg ttc cgc agc ttc gtc gcc ggc cag ttg gcc acg ttg cgc	912
Ser Ser Met Phe Arg Ser Phe Val Ala Gly Gln Leu Ala Thr Leu Arg	
290 295 300	
gaa ttc acg ctg tgc tat gcg ccg acc att aac tcc tac aag cga ttt	960
Glu Phe Thr Leu Cys Tyr Ala Pro Thr Ile Asn Ser Tyr Lys Arg Phe	
305 310 315 320	
gcc gat agc agt ttc gcg ccg acg gcg ctg gct tgg ggg ctg gac aat	1008
Ala Asp Ser Ser Phe Ala Pro Thr Ala Leu Ala Trp Gly Leu Asp Asn	
325 330 335	
cgc acc tgc gcc ctg cgg gtg gtt ggc cac ggg caa aac atc cgg gtc	1056
Arg Thr Cys Ala Leu Arg Val Val Gly His Gly Gln Asn Ile Arg Val	
340 345 350	
gaa tgc cgg gtt ccc ggc ggt gat gtc aac cag tac ctg gcg gtg gcg	1104
Glu Cys Arg Val Pro Gly Gly Asp Val Asn Gln Tyr Leu Ala Val Ala	
355 360 365	
gct ctc att gct gga ggg ttg tac ggt atc gag cgg ggc ctt cag ctg	1152

Ala Leu Ile Ala Gly Gly Leu Tyr Gly Ile Glu Arg Gly Leu Gln Leu
 370 375 380

ccc gag ccc tgt gtc ggc aac gcc tac caa ggc gcc gat gtc gaa cgg 1200
 Pro Glu Pro Cys Val Gly Asn Ala Tyr Gln Gly Ala Asp Val Glu Arg
 385 390 395 400

ctg ccg gtt acg ctg gcc gac gcc gcg gtg ctg ttc gag gat tct gcg 1248
 Leu Pro Val Thr Leu Ala Asp Ala Ala Val Leu Phe Glu Asp Ser Ala
 405 410 415

ctg gtg cgc gag gcg ttc ggc gag gat gtt gtc gcg cac tac ctg aac 1296
 Leu Val Arg Glu Ala Phe Gly Glu Asp Val Val Ala His Tyr Leu Asn
 420 425 430

aac gcg cgt gtg gag ctg gcg gcg ttc aac gcg gcg gtc acc gat tgg 1344
 Asn Ala Arg Val Glu Leu Ala Ala Phe Asn Ala Ala Val Thr Asp Trp
 435 440 445

gag agg ata cgt gga ttt gag cgc ctc tag 1374
 Glu Arg Ile Arg Gly Phe Glu Arg Leu
 450 455

<210> 14

<211> 457

<212> PRT

<213> 结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)

<220>

<221>

<222>

<223> Sequence is identical to PIR entry PIR:F70885

<400> 14

Met Thr Gly Pro Gly Ser Pro Pro Leu Ala Trp Thr Glu Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Gly Asp Val Asp Thr Val Ile Val Ala Phe Thr Asp
 20 25 30

Met Gln Gly Arg Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ser Gly Arg His Phe Val
 35 40 45

Asp Asp Ile Ala Thr Arg Gly Val Glu Cys Cys Ser Tyr Leu Leu Ala
50 55 60

Val Asp Val Asp Leu Asn Thr Val Pro Gly Tyr Ala Met Ala Ser Trp
65 70 75 80

Asp Thr Gly Tyr Gly Asp Met Val Met Thr Pro Asp Leu Ser Thr Leu
85 90 95

Arg Leu Ile Pro Trp Leu Pro Gly Thr Ala Leu Val Ile Ala Asp Leu
100 105 110

Val Trp Ala Asp Gly Ser Glu Val Ala Val Ser Pro Arg Ser Ile Leu
115 120 125

Arg Arg Gln Leu Asp Arg Leu Lys Ala Arg Gly Leu Val Ala Asp Val
130 135 140

Ala Thr Glu Leu Glu Phe Ile Val Phe Asp Gln Pro Tyr Arg Gln Ala
145 150 155 160

Trp Ala Ser Gly Tyr Arg Gly Leu Thr Pro Ala Ser Asp Tyr Asn Ile
165 170 175

Asp Tyr Ala Ile Leu Ala Ser Ser Arg Met Glu Pro Leu Leu Arg Asp
180 185 190

Ile Arg Leu Gly Met Ala Gly Ala Gly Leu Arg Phe Glu Ala Val Lys
195 200 205

Gly Glu Cys Asn Met Gly Gln Gln Glu Ile Gly Phe Arg Tyr Asp Glu
210 215 220

Ala Leu Val Thr Cys Asp Asn His Ala Ile Tyr Lys Asn Gly Ala Lys
 225 230 235 240

Glu Ile Ala Asp Gln His Gly Lys Ser Leu Thr Phe Met Ala Lys Tyr
 245 250 255

Asp Glu Arg Glu Gly Asn Ser Cys His Ile His Val Ser Leu Arg Gly
 260 265 270

Thr Asp Gly Ser Ala Val Phe Ala Asp Ser Asn Gly Pro His Gly Met
 275 280 285

Ser Ser Met Phe Arg Ser Phe Val Ala Gly Gln Leu Ala Thr Leu Arg
 290 295 300

Glu Phe Thr Leu Cys Tyr Ala Pro Thr Ile Asn Ser Tyr Lys Arg Phe
 305 310 315 320

Ala Asp Ser Ser Phe Ala Pro Thr Ala Leu Ala Trp Gly Leu Asp Asn
 325 330 335

Arg Thr Cys Ala Leu Arg Val Val Gly His Gly Gln Asn Ile Arg Val
 340 345 350

Glu Cys Arg Val Pro Gly Gly Asp Val Asn Gln Tyr Leu Ala Val Ala
 355 360 365

Ala Leu Ile Ala Gly Gly Leu Tyr Gly Ile Glu Arg Gly Leu Gln Leu
 370 375 380

Pro Glu Pro Cys Val Gly Asn Ala Tyr Gln Gly Ala Asp Val Glu Arg
 385 390 395 400

Leu Pro Val Thr Leu Ala Asp Ala Ala Val Leu Phe Glu Asp Ser Ala
 405 410 415

Leu Val Arg Glu Ala Phe Gly Glu Asp Val Val Ala His Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Ala Arg Val Glu Leu Ala Ala Phe Asn Ala Ala Val Thr Asp Trp
435 440 445

Glu Arg Ile Arg Gly Phe Glu Arg Leu
450 455

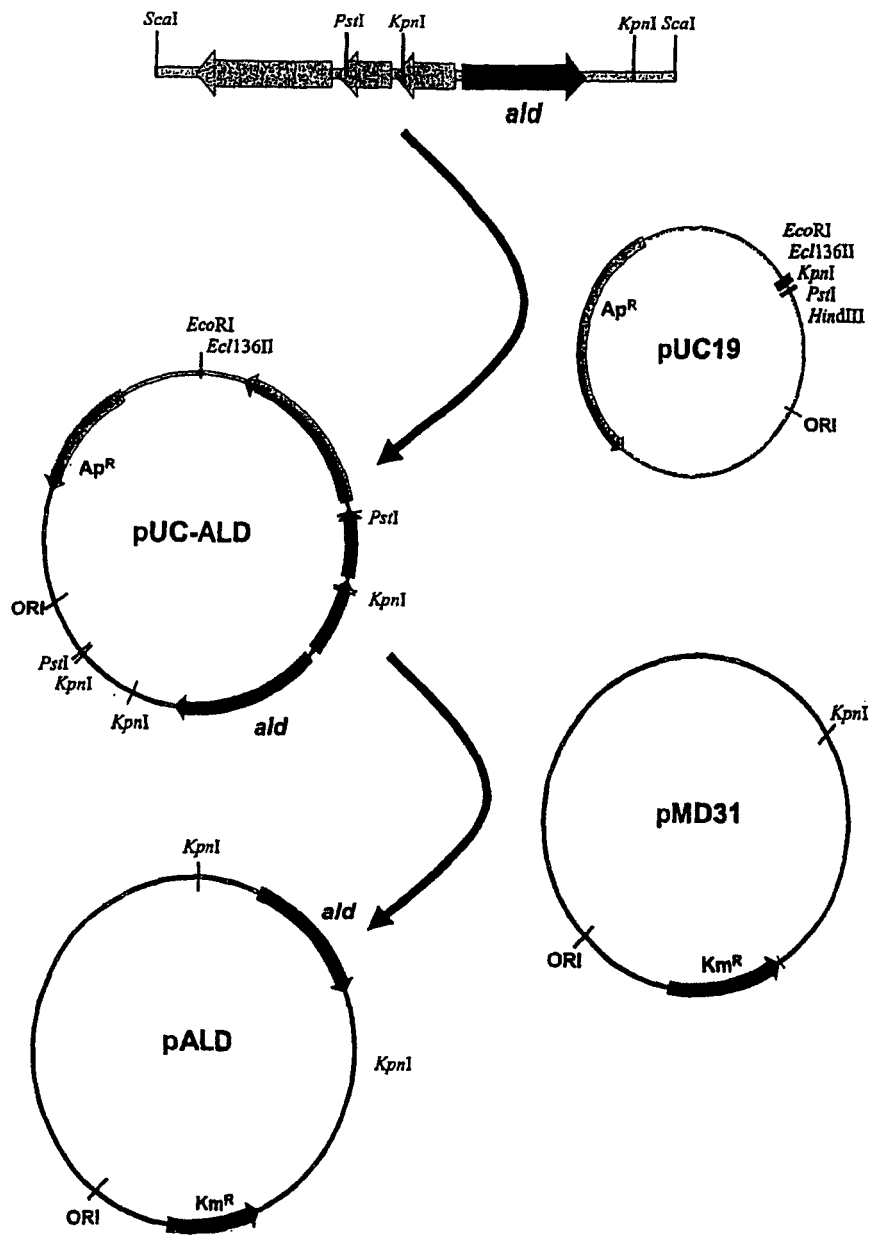


图 1

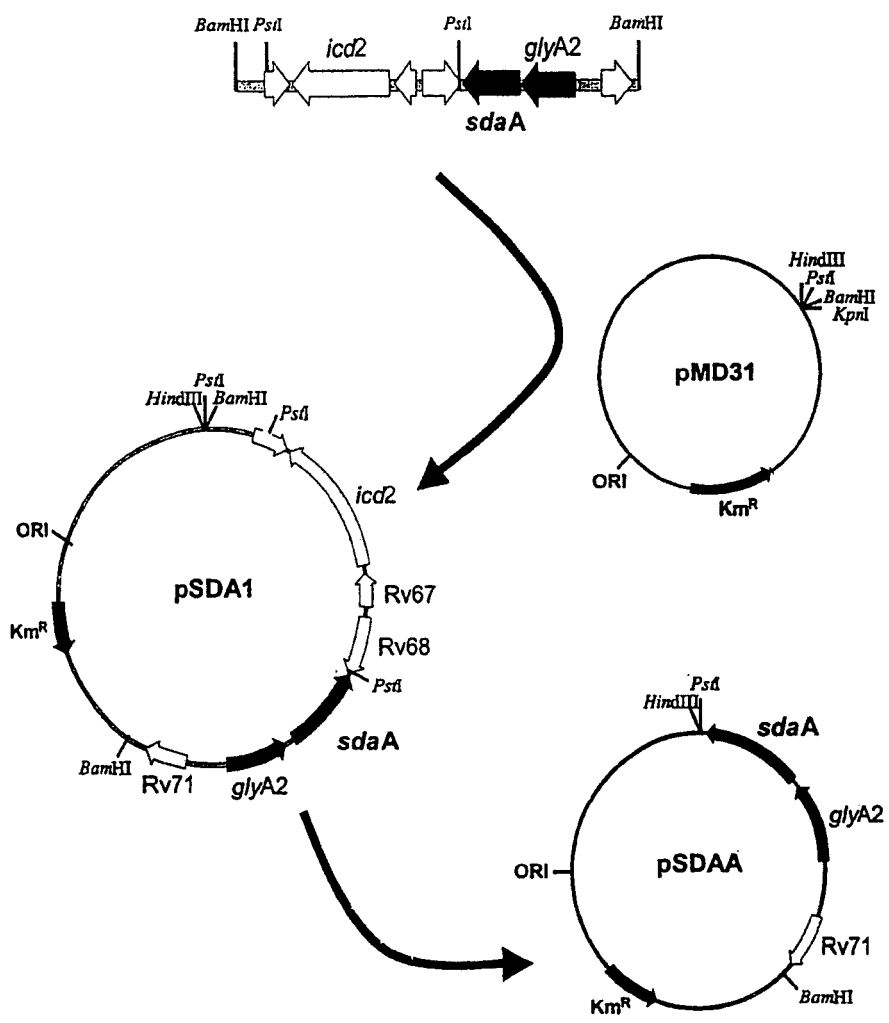


图 2

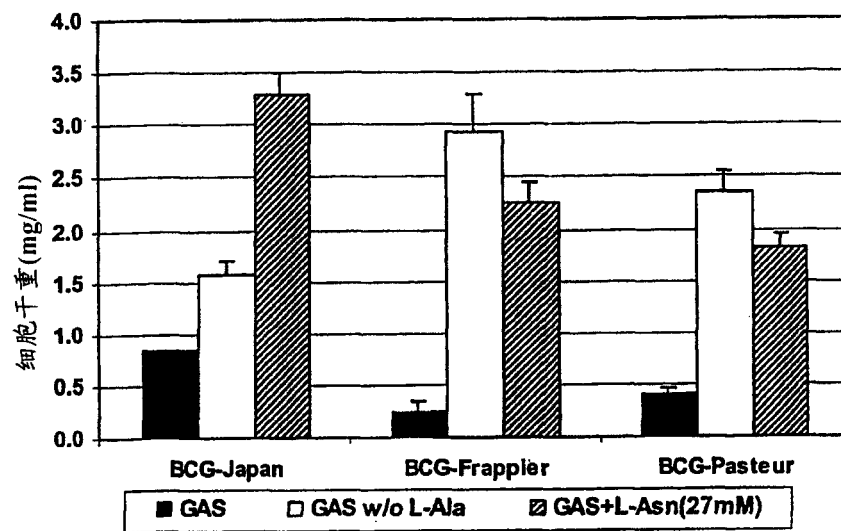


图 3

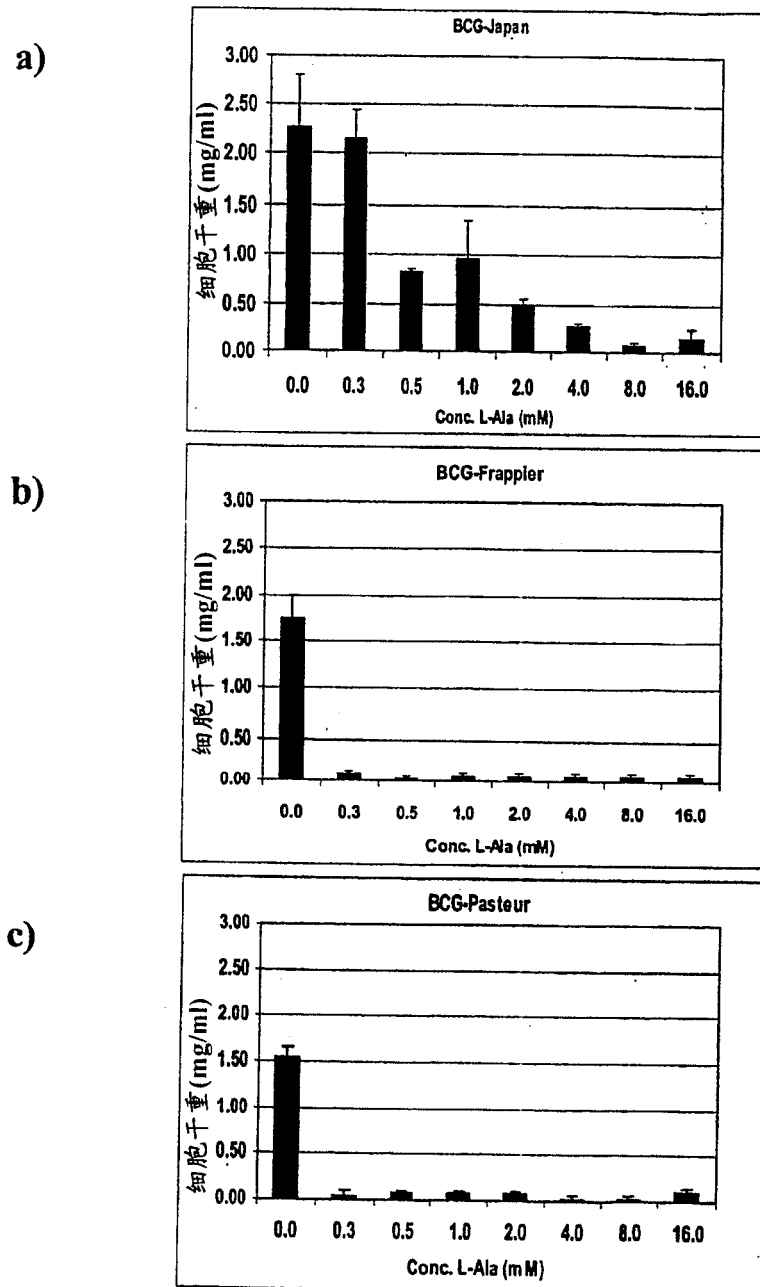


图 4

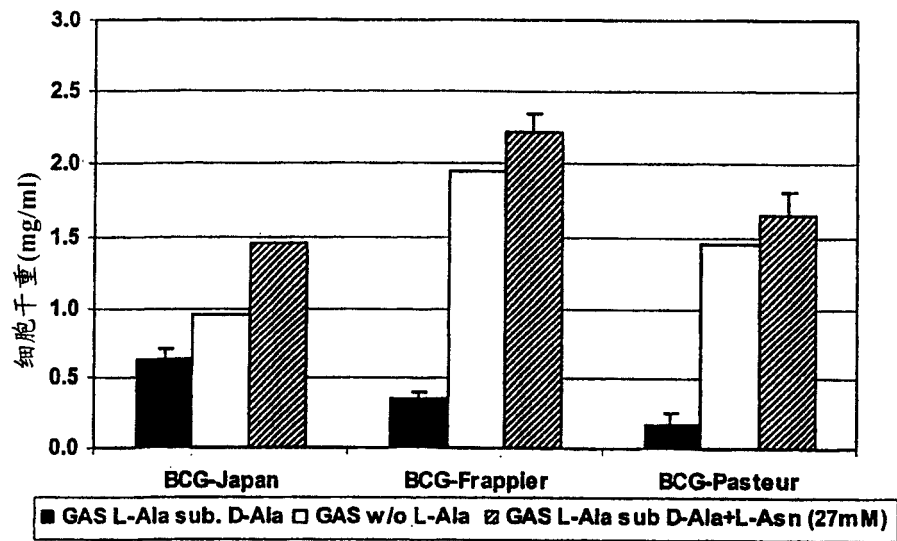


图 5

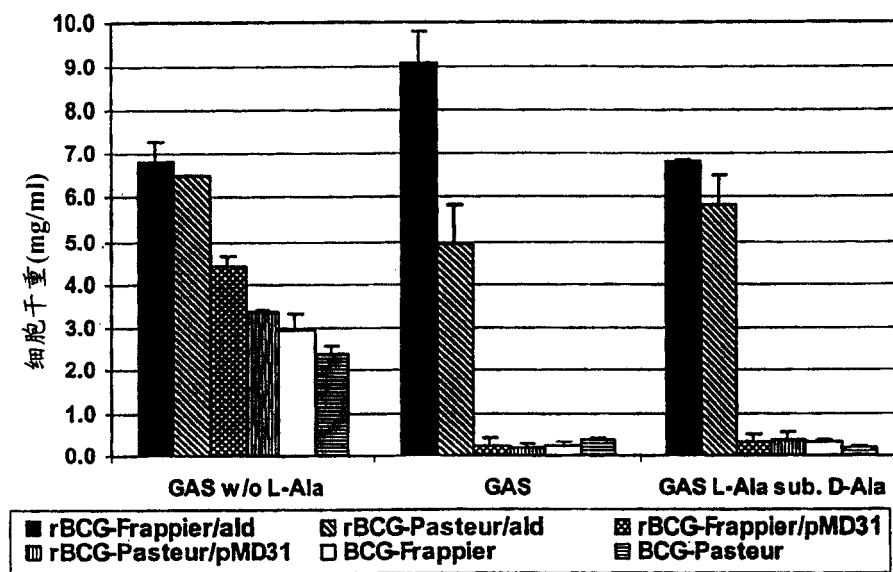


图 6

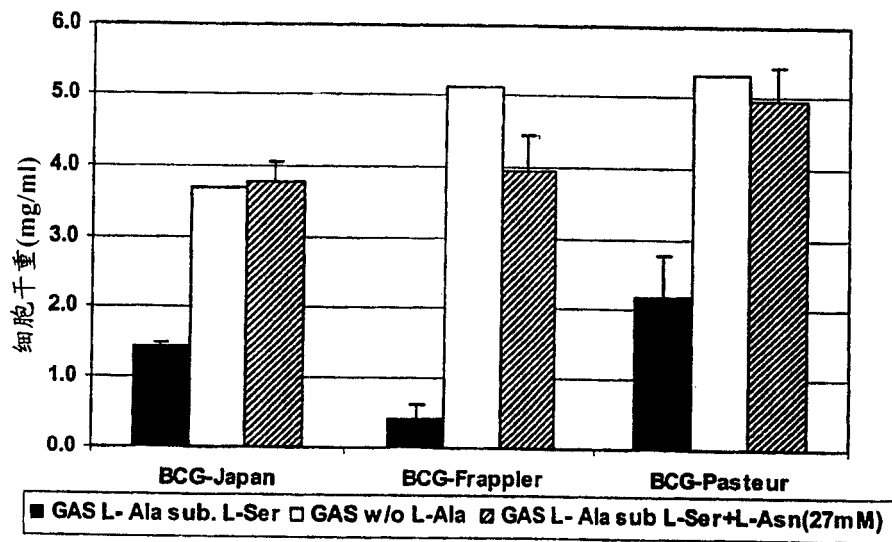


图 7

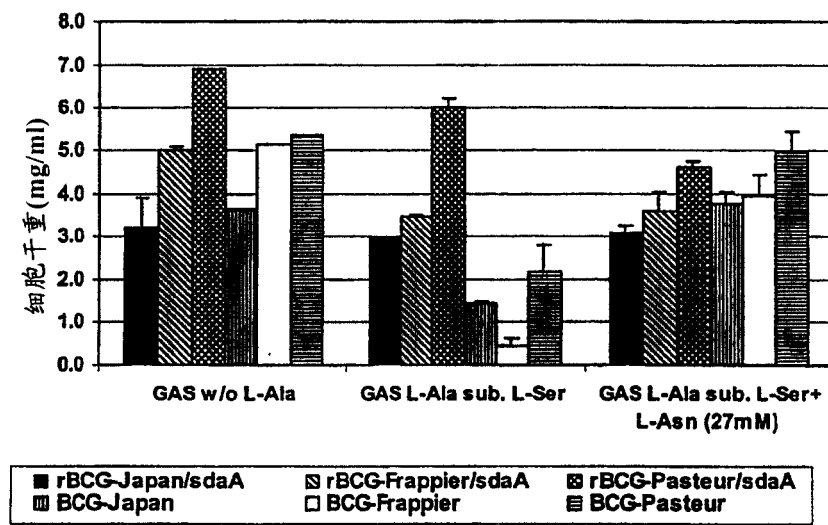


图 8

A

```

M.tb      ATG CGC GTC GGT ATT CCG ACC GAG ACC AAA AAC AAC GAA TTC CGG GTG GCC ATC
M.bovis   ATG CGC GTC GGT ATT CCG ACC GAG ACC AAA AAC AAC GAA TTC CGG GTG GCC ATC

M.tb      ACC CCG GCC GGC GTC GCG GAA CTA ACC CGT CGT GGC CAT GAG GTG CTC ATC CAG
M.bovis   ACC CCG GCC GGC GTC GCG GAA CTA ACC CGT CGT GGC CAT GAG GTG CTC ATC CAG

M.tb      GCA GGT GCC GGA GAG GGC TCG GCT ATC ACC GAC GCG GAT TTC AAG GCG GCA GGC
M.bovis   GCA GGT GCC GGA GAG GGC TCG GCT ATC ACC GAC GCG GAT TTC AAG GCG GCA GGC

M.tb      GCG CAA CTG GTC GGC ACC GCC GAC CAG GTG TGG GCC GAC GCT GAT TTA TTG CTC
M.bovis   GCG CAA CTG GTC GGC ACC GCC GAC CAG GTG TGG GCC GAC GCT GAT TTA TTG CTC

M.tb      AAG GTC AAA GAA CCG ATA GCG GCG GAA TAC GGC CGC CTG CGA CAC GGG CAG ATC
M.bovis   AAG GTC AAA GAA CCG ATA GCG GCG GAA TAC GGC CGC CTG CGA CAC GGG C*GA TCT

M.tb      TTG TTC ACG TTC TTG CAT TTG GCC GCG TCA CGT GCT TGC ACC GAT GCG TTG TTG
M.bovis   TGT TCA CGT TCT TGC ATT TGG CCG CGT CAC GTG CTT GCA CCG ATG CGT TGT TGG

M.tb      GAT TCC GGC ACC ACG TCA ATT GCC TAC GAG ACC GTC CAG ACC GCC GAC GGC GCA
M.bovis   ATT CCG GCA CCA CGT CAA TTG CCT ACG AGA CCG TCC AGA CCG CCG ACG GCG CAC

M.tb      CTA CCC CTG CTT GCC CCG ATG AGC GAA GTC GCC GGT CGA CTC GCC GCC CAG GTT
M.bovis   TAC CCC TGC TTG CCC CGA TGA

M.tb      GGC GCT TAC CAC CTG ATG CGA ACC CAA GGG GGC CGC GGT GTG CTG ATG GGC GGG
M.tb      GTG CCC GGC GTC GAA CCG GCC GAC GTC GTG GTG ATC GGC GCC GGC ACC GCC GGC

M.tb      TAC AAC GCA GCC CGC ATC GCC AAC GGC ATG GGC GCG ACC GTT ACG GTT CTA GAC
M.tb      ATC AAC ATC GAC AAA CTT CGG CAA CTC GAC GCC GAG TTC TGC GGC CCG ATC CAC

M.tb      ACT CGC TAC TCA TCG GCC TAC GAG CTC GAG GGT GCC GTC AAA CGT GCC GAC CTG
M.tb      GTG ATT GGG GCC GTC CTG GTG CCA GGC GCC AAG GCA CCC AAA TTA GTC TCG AAT

M.tb      TCA CTT GTC GCG CAT ATG AAA CCA GGT GCG GTA CTG GTG GAT ATA GCC ATC GAC
M.tb      CAG GGC GGC TGT TTC GAA GGC TCA CGA CCG ACC ACC TAC GAC CAC CCG ACG TTC

M.tb      GCC GTG CAC GAC ACG CTG TTT TAC TGC GTG GCG AAC ATG CCC GCC TCG GTG CCG
M.tb      AAG ACG TCG ACC TAC GCG CTG ACC AAC GCG ACG ATG CCG TAT GTG CTC GAG CTT

M.tb      GCC GAC CAT GGC TGG CCG GCG GCG TGC CCG TCG AAT CCG GCA CTA GCC AAA GGT
M.tb      CTT TCG ACG CAC GAA GGG GCG TTA CTG TCC GAA CCG GTG GCC ACC GAC CTG GGG
M.tb      GTG CCG TTC ACC GAG CCC GCC AGC GTG CTG GCC TGA
    
```

B

```

M.tb      MRVGIPTETKNEFRVAITPAGVAELTRRGHEVLIQAGAGBSAITDADFKAAGALVGTADQVWADADLL
M.bovis   MRVGIPTETKNEFRVAITPAGVAELTRRGHEVLIQAGAGBSAITDADFKAAGALVGTADQVWADADLL

M.tb      LKVKEPIAAEYGRRLRHGQILFTFLHLAASRACTDALLDSGTTSLIAYETVQTADGALPLLAPMSEVAGRLAA
M.bovis   LKVKEPIAAEYGRRLRHGSCSRBCINPREVLAFMRCNIPAPRQLPTRPSRPTAHYPCLPR-

M.tb      QVGAYHLMRTQGGRGVLMGGVPGVEPADVVVICAGTAGYNAARIANGMGATVTVLDINIDIKLRQLDAEFCG
M.tb      RIHTRYSSAYELGAVKRADLVIGAVLVPGAKPLVSNLSLVHMKPGAVLVDIAIDQGGCFEGSRPTTYD

M.tb      HPTFAVHDTLFCVAMPASVPKSTYALTNATHMPYVLELADHGWAACRSNPALAKGLSTHEGALLSERV
M.tb      ATDLGVPFTEPASVLA-
    
```

图 9

专利名称(译)	包括表达丙氨酸脱氢酶、丝氨酸脱水酶和/或谷氨酰胺合成酶的重组卡介苗菌株的结核病疫苗		
公开(公告)号	CN1703513A	公开(公告)日	2005-11-30
申请号	CN03802276.1	申请日	2003-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	成都永安制药有限公司 刘军		
申请(专利权)人(译)	成都永安制药有限公司 刘军		
当前申请(专利权)人(译)	成都永安制药有限公司 刘军		
[标]发明人	刘军 杰弗里陈 大卫亚历山大		
发明人	刘军 杰弗里·陈 大卫·亚历山大		
IPC分类号	A61K39/04 A61P31/06 A61P35/00 C12N1/20 C12N1/21 C12N9/00 C12N9/06 C12N9/88 C12N15/53 C12N15/60 C12R1/32 G01N33/53 A61K38/43		
CPC分类号	C12N9/93 C12N9/88 C12N9/0016		
代理人(译)	王琦 宋志强		
优先权	60/372450 2002-04-16 US		
其他公开文献	CN100572540C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种含有可表达一种核酸的活的重组牛型结核菌卡介苗(Mycobacterium bovis - BCG)菌株, 该核酸编码至少一种具有丙氨酸脱氢酶活性、谷氨酰胺合成酶活性或丝氨酸脱水酶活性的蛋白质或多肽。

