

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610000710. X

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 100999550A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

[22] 申请日 2006.1.10

[21] 申请号 200610000710. X

[71] 申请人 解放军总医院第二附属医院

地址 100091 北京市海淀区黑山扈路甲 17 号

共同申请人 东莞市祥云升生物科技有限公司

[72] 发明人 何秀云 庄玉辉 张小刚 汪海滨

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 29 页 附图 7 页

[54] 发明名称

结核分枝杆菌融合蛋白及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种结核分枝杆菌融合蛋白、编码该多肽的多核苷酸，包含该多核苷酸的载体和宿主细胞。本发明还涉及该融合蛋白的制备，以及其在结核病预防和治疗中的应用。

1. 一种结核分枝杆菌融合蛋白，其具有序列 4 所示的氨基酸序列，或该序列经过取代，缺失或插入一个或多个氨基酸后所得的氨基酸序列，且该融合蛋白具有结核杆菌抗原免疫原活性。

2. 编码权利要求 1 的结核分枝杆菌融合蛋白的多核苷酸。

3. 包含权利要求 2 所述多核苷酸的载体，该载体优选杂合的 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+)或 PET15b 质粒。

4. 包含权利要求 3 所述载体的宿主细胞，优选原核宿主细胞，更优选，大肠杆菌 BL21(DE3)或 HMS174(DE3)。

5. 制备权利要求 1 的结核分枝杆菌融合蛋白的方法，其包括以下步骤：

1) 获得权利要求 2 所述的多核苷酸序列，优选序列 3 所示的多核苷酸序列；

2) 将该多核苷酸序列导入载体，优选 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+)或 PET15b 杂合质粒；

3) 将该质粒导入宿主细胞，优选原核宿主细胞，更优选，大肠杆菌 BL21(DE3)或 HMS174(DE3)；

4) 在有利于所述多核苷酸序列表达的条件下培养所述宿主细胞；和

5) 收获、纯化及复性所述蛋白。

6. 包含权利要求 1 所述结核分枝杆菌融合蛋白的组合物。

7. 包含权利要求 1 所述融合蛋白的结核病诊断试剂盒

8. 包含权利要求 1 所述融合蛋白的结核病治疗组配药盒。

9. 权利要求 8 的结核病治疗组配药盒，其还包含抗结核病药物，以及所述融合蛋白用于治疗结核病的使用说明。

10. 一种结核病预防疫苗，其包含权利要求 1 的融合蛋白或编码该融合蛋白的核酸。

11. 权利要求 1 的融合蛋白、权利要求 2 的多核苷酸或权利要求 6 所述的组合物在制备预防或治疗结核病个体的药物或疫苗中的用途。

12. 权利要求 11 的用途，其中所述个体为未感染结核杆菌人群、结核杆菌感染人群、对抗结核药物耐受的结核病患者或迁延不愈的慢性结核病患者。

结核分枝杆菌融合蛋白及其应用

技术领域

本发明涉及一种利用基因工程制备的结核分枝杆菌融合蛋白，以及该蛋白在结核病新疫苗预防结核病和结核病免疫治疗中的应用。

背景技术

结核分枝杆菌(简称结核杆菌)是结核病的致病菌，每年全世界大约三百万人罹患结核杆菌导致的结核病。我国是世界上 22 个结核病高负担国家之一，病人人数居世界第二位，仅次于印度。近年来，结核病的发病人数在我国又呈上升趋势。2000 年全国结核病第四次流行病学调查显示我国感染人数多(多达 5.5 亿，感染率 45%，明显高出全球平均感染水平)、患病人数多(活动性肺结核患者约 500 万人)、新发患者多(新发活动性肺结核患者约 150 万人/年)、死亡人数多(约 20 万人/年死于结核病)、耐药患者多(约 30% 患者耐药)。以上数据说明全球、特别是中国结核病控制任务十分艰巨和迫切。

结核病是一种呼吸道传染病，对于传染病预防、控制，疫苗是最有效手段。卡介苗(BCG)是目前唯一的结核病疫苗，其是一种减毒活疫苗，于 1921 年由法国的 Calmette 和 Guerin 对牛型结核杆菌连续 13 年传代 230 代后毒力减弱后研制成功的疫苗，为了纪念这两位医生的伟大贡献，将预防结核病的疫苗称为卡介苗 (Bacille Calmette Guerin, 简称 BCG)。由于当时无冷冻保藏技术，菌株在斜面上生长，还由于战争等因素，最早研制的 BCG 菌株可能已丢失，现在全世界生产 BCG 疫苗的菌株有多株，我国 BCG 菌株是丹麦株。BCG 为新生儿接种疫苗，能预防儿童重症结核病，如结核性脑膜炎、粟粒性结核，但它对肺结核预防作用未得到肯定[Baily GV, et al, Ind. J. Med. Res., 72: 1-74, 1980]。BCG 对暴露于环境分枝杆菌和已感染结核杆菌的人群无保护作用[Brandt L., et al. Infect. Immun., 70:672-678, 2002]。鉴于此，我国已于 2000 年停止成人卡介苗接种。为了提高结核病诊断，在结核病低发病率国家，新生儿已不再接种卡介苗。BCG 为活疫苗，不能用于免

免疫功能低下人群，例如艾滋病患者的结核病的预防，而免疫功能低下或缺陷的人群又是结核病易感人群。

美国在上世纪八十年代中后期，结核病出现回升，结核病新疫苗研制引起全球重视，WHO 在上世纪末成立了结核病疫苗研制小组。

我国是结核病高发区，有近5.5亿人感染结核杆菌，其中10%感染者会发展成结核病。预防结核杆菌感染人群发展成结核病，可降低结核病发病率，这在结核病控制中会起到事半功半的效果。高危人群一般采用口服异烟肼预防，需较长时间服用，不易坚持，并且异烟肼常见周围神经炎、肝功能损害副反应，同时还见致癫痫、致精神障碍、植物神经功能紊乱等特殊副反应[郭丽萍等，中国煤炭工业医学杂志，3(9): 940-941, 2000]。所以高危人群需疫苗进行预防，这样简单、方便，并且副作用小。

报道的结核病新型疫苗分为两大类，即菌体活疫苗(包括减毒活疫苗、重组卡介苗)和非菌体疫苗(包括蛋白亚单位疫苗和 DNA 疫苗)。减毒活疫苗一般为营养缺陷菌株，如亮氨酸合成缺陷的菌株。已报道 fadD26 基因突变结核杆菌菌株，fadD26 基因产物类似乙酰辅酶 A，负责 phthiocerol dimycocerosates 合成，fadD26 突变引起结核杆菌毒力降低[Infant E, et al. Clinical and Experimental Immunology, 141:21-28, 2005]。减毒菌株存在返祖的隐患[Sampson SL, et al, Infect. Immun., 72: 3031-3037, 2004]。菌体活疫苗对于免疫功能低下人群不能接种，同时可能与 BCG 具有相同命运，即对已感染人群无保护作用。DNA 疫苗一出现，由于刺激机体细胞免疫，结核病 DNA 疫苗研究成为热点，多篇文章报道 DNA 疫苗[Sugawara I, et al, Tuberculosis, 83: 331-337, 2003]。DNA 疫苗是通过编码基因与真核载体连接，构建重组真核表达载体，通过大肠杆菌进行重组质粒扩增后，抽提重组表达载体 DNA，DNA 经严格纯化后，裸露的 DNA 经肌肉注射进行免疫。经过不同课题组研究发现，DNA 疫苗和蛋白亚单位疫苗作为治疗性疫苗安全、可靠、效果较好。

抗原选择对 DNA 疫苗和蛋白亚单位疫苗研究十分重要，单一抗原对动物感染结核杆菌保护作用不理想，多个单独蛋白联合或融合蛋白效果优于单一抗原。目前报道抗原联合采用融合蛋白和多个抗原如鸡尾酒形式简单混合，可以以 DNA 形式、重组蛋白形式或直接用结核杆菌培养滤液分泌蛋白[Robert A.D., Immunology, 85: 502 - 508, 1995]。已报道 Ag85B(Rv1886c)

蛋白和 ESAT-6(Rv3875)蛋白按 1:1 混合免疫小鼠, 其效果优于单独 ESAT-6 蛋白, 比单独 Ag85B 蛋白和 Ag85B - ESAT-6 融合蛋白效果差 [Olsen AW, et al, Infect. Immun., 72: 6148-6150, 2004]; Ag85B DNA 疫苗、MPT64(Rv1980c)DNA 疫苗和 MPT83(Rv2873)DNA 疫苗按 1:1:1 混合免疫牛 [Cai H, et al, Vaccine, 23:3887-3895, 2005]。单个重组抗原混合与融合蛋白比较, 如前所述, 融合蛋白效果优于单个抗原混合, 同时从生产角度, 生产一个融合蛋白比同时生产两个重组蛋白经济、工艺简单。近几年, 报道融合蛋白用于 DNA 疫苗、蛋白亚单位疫苗和重组卡介苗研究, 融合蛋白主要有 Ag85B - ESAT-6、ESAT-6 - Ag85B、Mtb72F(mtb39-Ag85B) [Langermans JAM, et al. Vaccine, 23:2740-2750, 2005, Neinnich Olsen A., et al, Infect. Immun., 69: 2773-2778, 2001]。

我国耐药患者多, 约 30% 患者耐药, 近 40 年来未见化疗治疗结核病新药上市, 同时化疗面临结核病耐药率居高不下的难题。耐药病人采用免疫治疗以提高化疗效果是目前解决耐药病人和难治结核病人的方法之一。目前, 临床上用于结核病免疫治疗药主要是注射用胸腺肽和冻干治疗用母牛分枝杆菌菌苗-“微卡”(其英文名称为 thymopolypeptides for injection 和 Freeze-dried M. Vaccae Vaccine for Therapy-Vaccae)。胸腺肽有发热、发烧不良反应。母牛分枝杆菌(M. Vaccae)通过破细胞而制备的名为‘微卡’的无细胞菌苗 [王国治, 中国防痨杂志, 2002], 已于 2001 年上市, 主要用于结核病免疫治疗, 也可以用于结核杆菌感染者预防治疗。

目前, 极需要进一步开发免疫原性强、副作用小、并且可有效预防或治疗结核病的疫苗。本发明提供了一种融合蛋白, 其表达量占全菌体蛋白的 33% - 38%, 显著高于现有技术中结核分枝杆菌融合蛋白的重组表达量, 完全可满足临床应用的要求。并且, 具有显著的刺激针对结核分枝杆菌的免疫应答的作用, 可作为预防、治疗结核病的疫苗抗原, 用于结核病的预防或治疗, 以及结核病的诊断、流行病学调查和监测。本发明结核分枝杆菌融合蛋白可作为结核病新疫苗研制, 可互补或替代 BCG, 为结核病的预防和治疗提供了一种新的可选择途径。

发明内容

发明概述:

本发明公开了一种结核分枝杆菌融合蛋白，该蛋白包含序列 4 所示的氨基酸序列，或该序列经过、取代，缺失或插入一个或多个氨基酸，优选，1-50 个氨基酸，更优选，1-35 个氨基酸，更优选，1-25 个氨基酸，更优选，1-15 个氨基酸，更优选 1-5 个氨基酸后所得的氨基酸序列，且该融合蛋白具有结核杆菌抗原免疫原性活性。

在本发明的一个实施方案中，本发明的结核分枝杆菌融合蛋白具有序列 4 所示的氨基酸序列经过取代，缺失或插入一个或多个氨基酸，优选，1-50 个氨基酸，更优选，1-35 个氨基酸，更优选，1-25 个氨基酸，更优选，1-15 个氨基酸，更优选 1-5 个氨基酸后所得的氨基酸序列，且该蛋白具有结核杆菌抗原免疫原性活性。

在本发明的一个具体实施方案中，所述融合蛋白由序列 4 所示的氨基酸序列组成。

本发明涉及编码上述结核分枝杆菌融合蛋白的核苷酸序列，该核苷酸序列优选与序列 3 有 80% 同源性，优选 85% 同源性，优选 90% 同源性，优选 95% 同源性，优选 96% 同源性，优选 97% 同源性，优选 98% 同源性，优选 99% 同源性的核苷酸序列，且该核苷酸序列所编码的蛋白具有结核杆菌抗原免疫原性活性，最优选该核苷酸序列与序列 3 具有 100% 同源性。本发明还涉及包含上述核苷酸序列的载体，优选原核生物载体，更优选杂合的 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+)或 PET15b 质粒，以及包含所述核苷酸序列或载体的宿主细胞，优选原核宿主细胞，更优选，大肠杆菌 BL21(DE3)或 HMS174(DE3)。

本发明还涉及制备上述结核分枝杆菌融合蛋白的方法，其包括以下步骤：

- 1) 制备编码本发明结核分枝杆菌融合蛋白的多核苷酸序列，优选序列 3 所示的多核苷酸序列；
- 2) 将该多核苷酸序列导入载体，优选原核生物载体，优选 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+)或 PET15b 杂合质粒；
- 3) 将该质粒导入宿主细胞，优选原核宿主细胞，更优选，大肠杆菌 BL21(DE3)或 HMS174(DE3)细胞；
- 4) 在有利于所述多核苷酸序列表达的条件下培养所述宿主细胞；和
- 5) 收获、纯化及复性所述蛋白。

在一个实施方案中，上述结核分枝杆菌融合蛋白由严格条件下，优选在低、中或高严格条件下，更优选在中度严格条件下，最优选在高严格条件下与序列 3 所示核苷酸序列杂交的核苷酸序列编码，并且由上述核苷酸序列编码的结核分枝杆菌蛋白具有结核杆菌抗原免疫原活性。

在本发明的一个优选实施方案中，本发明的融合蛋白通过如下方法制备，该方法包括以下步骤：

- 1) 制备序列 3 所示的多核苷酸序列；
- 2) 将该多核苷酸序列导入 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+) 或 PET15b 杂合质粒；
- 3) 将该质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3)或 HMS174(DE3)宿主细胞；
- 4) 在有利于所述多核苷酸序列表达的条件下培养所述宿主细胞；和
- 5) 收获、纯化及复性所述蛋白。

本发明涉及包含所述结核分枝杆菌融合蛋白的组合物、以及包含所述结核分枝杆菌融合蛋白或组合物的结核病诊断试剂盒或结核病治疗组配药盒。

本发明还涉及包含所述结核分枝杆菌融合蛋白，组合物或编码该蛋白的核酸的结核病预防疫苗，或免疫治疗疫苗。该疫苗包括蛋白亚单位疫苗，复合疫苗或 DNA 疫苗。

本发明的一个技术方案中涉及本发明的结核分枝杆菌融合蛋白，组合物或编码该蛋白的核酸用于预防或治疗结核病，例如，用于为健康人群(包括感染结核杆菌和未感染结核杆菌)接种疫苗，以预防结核病；用于为结核病人正常的抗结核病化学药物治疗提供辅助免疫治疗，以提高机体免疫力。本发明的结核分枝杆菌融合蛋白，组合物或编码该蛋白的核酸尤其用于未感染结核杆菌人群、感染结核杆菌但未发病的人群、对抗结核病化学药物治疗耐受的结核病人群或迁延不愈的慢性结核病人群的结核病的预防或治疗。本发明的结核分枝杆菌融合蛋白，组合物或编码该蛋白的核酸可与抗结核病化学治疗药物，例如，常用一线药：异烟肼 (INH)、链霉素 (SM)、对氨基柳酸钠(PAS)；控制用一线抗结核药：利福平 (RFP)、卡那霉素 (KM)、异胺丁醇 (EB)；常用二线抗结核药：吡嗪酰胺 (PZA)、卷曲霉素(CPM)、乙硫异菸胺(1314Th)、氨硫脲(TB1)；新型抗结核药：喹诺酮类药物、如氧氟沙星、丙氟哌酸、帕氟沙星等；利福霉素类衍生物，如利福定 (RFD)、

利福喷丁(RFT)、利福布丁(RBU)、CGP 类长效利福霉素(如 CGP27557、CGP29861 等); 新型大环内酯类药物, 如: 6-甲氧基红霉素、罗红霉素、阿奇红霉素; β -内酰胺类, 如: 阿莫西林-克拉维酸、氨苄西林-克拉维酸、替卡西林-克拉维酸; 氨基糖甙类, 如: 丁氨卡那霉素; 数种不同药物按一定量配方的抗结核复合药, 如 INH 与 RFP 制成胶囊的 Rifamate, INH、RFP、PZA 制成糖衣片的卫肺特, 同时或顺序联合应用。

本发明的一个技术方案涉及本发明的结核分枝杆菌融合蛋白, 组合物或编码该蛋白的核酸在制备用于预防或治疗结核病的药物或疫苗中的用途。例如, 所述药物或疫苗可用于健康人群(包括感染结核杆菌和未感染结核杆菌)、接受抗结核病化学药物治疗的结核病人、抗结核病化学药物治疗耐受的结核病人群或迁延不愈的慢性结核病人群的结核病的预防或治疗。所述药物还可以包含上述抗结核病化学治疗药物, 优选, 链霉素(SM)、卡那霉素(KM)、异烟肼(INH)、利福平(RFP)、利福定(RFD)、吡嗪酰胺(PZA)、异胺丁醇(EB)、卷曲霉素(CPM)、对氨柳酸钠(PAS)、喹诺酮类药物等。

本发明还涉及包含本发明融合蛋白, 或编码该蛋白的核酸的结核病诊断试剂盒, 以及预防或治疗结核病的组配药盒。所述试剂盒或组配药盒中包含装有本发明的结核分枝杆菌融合蛋白, 或编码该蛋白的核酸的容器。所述组配药盒中还可以包含装有上述抗结核病化学治疗药物的容器, 还可以包含本发明的结核分枝杆菌融合蛋白, 或编码该蛋白的核酸与结核病化疗药物同时、或顺序使用的说明。

发明详述:

本发明涉及一种融合蛋白, 该融合蛋白包括如序列 4 所示的氨基酸序列, 或该序列经过取代、添加或缺失了一个或多个氨基酸残基的序列。一般来说, 该融合蛋白与序列 4 所示的氨基酸残基具有至少大约 80%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 85%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 90%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 91%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 92%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 93%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 94%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 95%的氨基酸序列相同性, 更优选至少大约 96%的氨基酸序列相同性, 更

优选至少大约 97% 的氨基酸序列相同性，更优选至少大约 98% 的氨基酸序列相同性且还更优选至少大约 99% 的氨基酸序列相同性，条件是融合蛋白具有结核杆菌抗原免疫原性活性。此处所述的氨基酸序列相同性百分数可以本领域已有的各种方法测定，例如，使用公众可得到的计算机软件，例如 BLAST，BLAST-2，ALIGN，ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量序列对比的合适参数，包括在所比较的序列全长上达到最大对位排列所需的任何算法。

具有免疫原活性的本发明融合蛋白的空间结构和抗原表位可以采用本领域已知的网络软件和数据库进行分析，例如可以采用网络软件，通过数据库：www.expasy.ch 进行 SYFPEITHI 分析。例如，通过对本发明蛋白的 HLA-A*6801 15 - mers、HLA-DRB1*0101 15 - mers、HLA-DRB1*0301 (DR17) 15 - mers、HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4) 15 - mers、HLA-DRB1*0701 15 - mers、HLA-DRB1*1101 15 - mers、HLA-DRB1*1501 (DR2b) 15 - mers 的表位分析发现，序列 4 中大约 1 - 32 位氨基酸、大约 53 - 92 位氨基酸、大约 118 - 186 位氨基酸、大约 203 - 293 位氨基酸、大约 321 - 367 位氨基酸、大约 377 - 400 位氨基酸和大约 417 - 477 位氨基酸对融合蛋白免疫原性表位的构成关系密切，因此，本发明特别优选的融合蛋白包含序列 4 中上述氨基酸区域中的至少一个、二个、三个、四个、五个、六个或七个，或者包含仅含有保守氨基酸取代的上述至少一个、二个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸区域。本发明最优选融合蛋白包含序列 4，或由序列 4 组成。

在一个实施方案中，本发明提供了结核分枝杆菌融合蛋白的功能性片断。例如，与序列 4 所示融合蛋白质相比，所述片断缺失了对于融合蛋白的所需生物学活性而言，不是必需的氨基酸残基，例如序列 4 中 33 - 52 位氨基酸、93 - 117 位氨基酸、294 - 320 位氨基酸、187 - 202 位氨基酸、368 - 376 位氨基酸或 401 - 416 位氨基酸。

在一个实施方案中，本发明提供了序列 4 所示融合蛋白的功能性变体。在序列 4 全长序列中或在本文上述表位结构域中的变异，可使用任一技术，例如，美国专利号 5,364,934 中所述的保守和非保守突变的指导来产生。也可采用扫描氨基酸分析序列鉴定一个或多个氨基酸。其中优选的扫描氨基酸是相对较小的中性氨基酸。这类氨基酸包括丙氨酸，甘氨酸，丝氨酸，

和半胱氨酸。一般来说丙氨酸是该组中优选的扫描氨基酸，因为它消除了 β -碳之外的侧链且改变变体主链构象的可能性较小(Cunningham 和 Wells, Science, 244: 1081-1085(1989))。丙氨酸通常优选的另一原因是它是最常见的氨基酸。另外，在包埋的和暴露的位置都经常发现它(Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976))。如果丙氨酸取代不能产生足够量的变体，可使用同功能的其它氨基酸。

氨基酸取代可以是一个氨基酸被具有相似结构和/或化学特性的另一氨基酸取代，例如亮氨酸被异亮氨酸取代，即保守氨基酸取代。插入或缺失可任选是在大约 1 到 5 个氨基酸的范围内。通过在序列中系统地产生氨基酸的插入，缺失或取代并检测所得变体是否具有序列 4 所示融合蛋白所表现出的免疫原活性，可测定允许的变异。

在具体实施方案中，在本发明的融合蛋白的变体制备中保守取代是有利的。该保守取代在表 1 中在举例性取代，优选在优选取代的标题下表示。

表 1

<u>原始残基</u>	<u>举例性取代</u>	<u>优选取代</u>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr

Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

本发明的融合蛋白具有刺激机体产生针对结核分枝杆菌的免疫应答的表位，具有免疫原活性，可有效刺激机体针对结核杆菌的免疫应答。

本文所述的“免疫原活性”是指抗原刺激机体免疫系统，使之产生抗体和/或效应淋巴细胞的性能。能刺激机体产生免疫应答的外原性抗原刺激机体产生免疫应答的种类分为体液免疫和细胞免疫[林学颜，等. 现代细胞与分子免疫学，1-11，1999]。体液免疫检测可利用本领域已知的各种检测方法来检测，例如，琼脂双扩散法、ELISA 法。细胞免疫可通过例如淋巴细胞增殖、转化、淋巴细胞分泌细胞因子水平、皮试超敏反应实验等本领域常用方法来检测[Olsen AW, et al, Infect. Immun., 72: 6148-6150, 2004]。

术语“免疫应答”是指当外来物质或微生物进入生物体时免疫系统的反应。一般情况下，免疫应答分为特异性和非特异性反应，而这两部分紧密地交叉关联。非特异性免疫应答被认为是抵抗各种各样外来物质和感染物质的即时防御。特异性免疫应答是表征生物体抵抗外来物质的一种高效防御机制，其在滞后期之后产生抵抗所述外来物质并且对于所述物质是高度特异性的。特异性免疫应答对于保护个体抵抗所述微生物的感染是至关重要的，同时，特异性免疫应答对于保护从特异性感染恢复的个体在将来抵抗这种特异性感染的现象中也起着决定作用。

本发明的融合蛋白可激发或者增强针对结核分枝杆菌的免疫应答，从而可制备成结核病预防性疫苗或治疗性疫苗，例如，亚单位疫苗、DNA 疫苗或复合疫苗，用于免疫未感染结核分枝杆菌的人群，以赋予该人群对结核分枝杆菌的免疫力；也可以施用于已感染结核分枝杆菌、但没有发病的人群，以预防其发病；还可以施用于结核病发病人群，以辅助抗结核病药物的治疗，以提高疗效，缩短疗程，减少抗结核药物的副作用。

本发明融合蛋白的核酸序列是指该核苷酸序列优选与序列 3 有 80% 同源性，优选 85% 同源性，优选 90% 同源性，优选 95% 同源性，优选 96% 同源性，优选 97% 同源性，优选 98% 同源性，优选 99% 同源性的核苷酸序

列，且该核苷酸序列所编码的蛋白具有结核杆菌抗原免疫原活性，最优选该核苷酸序列与序列3具有100%同源性。

在其它实施方案中，编码本发明融合蛋白的多核苷酸是编码免疫原活性融合蛋白且与序列3的核苷酸序列能够杂交，优选在严格杂交和洗涤条件下杂交的核酸分子，更优选在中度严格条件下，最优选在高度严格条件下杂交的核酸分子。

杂交反应的“严格性”是本领域的普通技术人员容易测定的，且一般根据探针长度，洗涤温度，和盐浓度凭经验进行计算。一般来说，探针越长需要的合适退火温度越高，而探针越短需要的温度越低。杂交一般依赖于变性DNA在低于其解链温度的环境中存在互补链时重退火的能力。探针与可杂交序列之间所需的同源性程度越高，可使用的相对温度越高。结果，随着相对温度越高则倾向于使得反应条件更严格，而温度越低则严格程度越低。对于杂交反应更详细的情况和解释参见，Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

本文定义的“严格条件”或“高度严格条件”可通过下列条件确定：(1)采用低离子强度和高温度洗涤，例如50℃，0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基磺酸钠；(2)杂交期间采用诸如甲酰胺等变性剂，例如，50%(v/v)甲酰胺与0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液，pH 6.5，含750 mM氯化钠，75 mM柠檬酸钠，42℃，或(3)采用42℃，50%甲酰胺，5 x SSC (0.75M NaCl, 0.075M柠檬酸钠)，50 mM磷酸钠(pH 6.8)，0.1%焦磷酸钠，5 x Denhardt's 溶液，超声处理的鲑精DNA (50μg/ml)，0.1% SDS，和10%葡聚糖硫酸酯，在42℃的0.2 x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)和55℃的50%甲酰胺中洗涤，接着在55℃下含有EDTA的0.1 x SSC中进行高度严格洗涤。

“中度严格条件”可按 Sambrook 等，Molecular Cloning : A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 所述确定，且包括使用比上文所述严格程度更低的洗涤溶液和杂交条件(例如，温度，离子强度和% SDS)。中度严格条件的例子是在含有：20%甲酰胺，5 x SSC(150mM NaCl, 15 mM柠檬酸三钠)，50 mM磷酸钠(pH 7.6)，5 x Denhardt's 溶液，10%葡聚糖硫酸酯，和20mg/ml变性剪切的鲑精DNA中37℃下温育过夜，接着在大约37-50℃下在1 x SSC中洗膜。本领域的技术人员将认识到如何调节温度，

离子强度等以适应诸如探针长度等因素的需要。

本发明同时还提供了可使所述结核杆菌融合蛋白大量制备的方法。

在本发明的一个实施方案中，本发明提供了结核分枝杆菌融合蛋白的构建体的制备。该重组融合蛋白的构建体通过连接子连接两个蛋白编码基因，构成融合蛋白编码基因构建体，从而在大肠杆菌中表达。所述的连接子通常为疏水性氨基酸的多肽接头，只要其具有良好的柔顺性和折叠性，保证融合蛋白中两个蛋白形成与天然蛋白类似的空间构象。所述的连接子优选(Gly4Ser)₁₋₄，也可采用 Ala-Ala 作为连接子。

本发明的一个优选实施方案涉及如序列 3 所示的结核分枝杆菌融合蛋白核酸构建体的构建。序列 3 所示核酸序列可通过本领域常用的方法制备，优选根据结核杆菌蛋白编码基因序列，设计合成两对 PCR 引物，优选序列 5 和 6，以及序列 7 和 8 所示序列的引物，克隆出如序列 3 所示的核苷酸序列。然后对该序列通过本领域已知方法进行如下突变：1.使其编码 N 端第 1 个氨基酸的碱基突变，由 GTG 突变为 ATG；2. 在第 1 个氨基酸和第 2 个氨基酸中插入 1 个氨基酸，三联密码为 GTG；3.在两个蛋白编码基因中间加入连接子 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser；4.使终止密码 TAG 突变为 TAA。多核苷酸序列结构的改变影响核酸高级结构例如二级结构，从而影响该核酸在宿主细胞中的表达水平。插入三联密码第二位碱基还可为 A、G、C，第三位碱基还可为 A、T、C，还可进行其它碱基突变，连接子还可为 (Gly4Ser)₂、(Gly4Ser)₃、(Gly4Ser)₄，该连接子可通过 N 端蛋白编码基因扩增加入，也可通过 C 端蛋白编码基因扩增加入。

融合蛋白可通过基因工程方法将序列 3 所示核酸序列克隆入表达载体，用此表达载体转化宿主细胞制备。根据常规方法，可将含本发明结核分枝杆菌融合蛋白的 cDNA 或 DNA 序列的核酸分子包含在表达构建体中，然后通过常规方法转化细胞。转化是指作为染色体外成份或者经过染色体整合将 DNA 导入生物以便该 DNA 能够复制。根据所用的宿主细胞，使用适合于该细胞的标准技术进行转化。Cohen, 美国国家科学院院报, 69: 2110(1972) 和 Mandel 等, 分子生物学杂志, 53: 154(1970)所述的采用氯化钙的钙处理方法通常可用于原核或其它含有细胞壁 of 细胞。

通常，优选原核生物用于本发明 DNA 序列构建体的表达。例如，大肠杆菌，枯草芽孢杆菌等芽孢杆菌和诸如鼠伤寒沙门氏菌或粘质沙雷氏菌等

肠杆菌科其它细菌，和假单胞菌属的各种细菌。

一般来说，含有与原核宿主细胞相适合的复制子和调控序列的质粒载体都能与所述宿主结合使用。但优选编码本发明蛋白的 DNA 序列插入到 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+)或 PET15b 载体形成重组表达载体。编码本发明蛋白的核酸与 PET28a-c、PET24a-d、PET30a、PET22b(+)或 PET15b 形成的杂合质粒具有高度的稳定性，有利于本发明目的蛋白的表达。

结核分枝杆菌的启动子不能被大肠杆菌 RNA 聚合酶识别，T7 噬菌体 RNA 聚合酶只能识别 T7 噬菌体启动子，所以选择 T7 噬菌体启动子应选择能编码 T7 噬菌体 RNA 聚合酶的宿主菌才能实现表达。理论上含有(DE3)溶源菌，并在表达蛋白前不产生 T7 噬菌体 RNA 聚合酶的宿主菌均可选择，例如，HMS174(DE3)，JM109(DE3)，BL21(DE3)均能高效表达本发明目的蛋白，但优选 HMS174(DE3)和 BL21(DE3)，这两种宿主细胞表达本发明目的蛋白的产量更高，而且其生长速度快，有利于提高生产效率。

在本发明的优选实施方案中，如图 1 所示，制备含有序列 3 所示多核苷酸序列的核酸分子和 PET28a 质粒的表达构建体，并将该构建体转化 BL21(DE3)，经 IPTG（为 Sigma 公司产品，购自耀北生物公司）诱导培养 4-5 小时后，收集菌体。目的蛋白表达量经凝胶光密度扫描定量测定，结果占全菌体蛋白的 33% - 38%，所得目的蛋白经质谱法检测，分子量约为 48.4KDa。

可采用常规的纯化方法纯化所得到的蛋白，并使其复性。已知的纯化方法包括，例如离子交换剂进行的吸附和脱附、超速离心、凝胶过滤、亲和层析或特异性纯化方法。纯化后的本发明蛋白可用包括，例如，二硫苏糖醇或二巯基乙醇在内的常规复性剂复性。

本发明所制备的融合蛋白可作为结核病预防和治疗的亚单位疫苗。所述亚单位疫苗是由具有免疫原活性的有效成分构成的疫苗。该疫苗中基本不含有病原微生物中无免疫原效应、甚至能使机体产生不良反应的其余成分，从而提高了免疫效果，减少了接种疫苗后的不良反应。蛋白亚单位疫苗更安全、可靠。

本发明也涉及编码本发明融合蛋白的核酸所制备的 DNA 疫苗。DNA 疫苗是通过编码基因与真核载体连接，构建重组真核表达载体，通过大肠

杆菌进行重组质粒扩增后，抽提重组表达载体 DNA，DNA 经严格纯化后，裸露的 DNA 经肌肉注射进行免疫。DNA 疫苗研制所用真核载体有 pJW4303、pVAX、pCDNA3.0 等。

DNA 疫苗载体构建与重组蛋白载体构建步骤是相同的，只是载体不同，重组蛋白构建载体在宿主细胞，例如在大肠杆菌中表达后需进行纯化蛋白，而构建 DNA 疫苗载体只需直接纯化质粒 DNA。

本发明融合蛋白的编码基因也可用于重组 BCG 的制备。所述重组 BCG 是把所述融合蛋白编码基因插入载体，然后使载体转染 BCG，该蛋白在 BCG 中表达。

研制 DNA 疫苗、亚单位疫苗和重组 BCG 所用抗原、融合抗原可以通用，只是载体不同。例如，Kita Y 等将 Mtb72f 融合蛋白导入 BCG 构建的重组 BCG 菌株 72frBCG，该菌株在小鼠、豚鼠保护实验表明效果与 BCG 一致，猴子实验表明与 BCG 保护性效果一致，但脏器损伤减轻[Kita Y, et al. *Vaccine*, 23: 2132-2135, 2005]。

本发明的融合蛋白可作为复合疫苗的成分用于免疫或治疗结核病。例如本发明的疫苗可与多种抗原或不同疫苗同时或依次免疫预防结核病，从而提高保护作用。

本发明的一个实施方案涉及包含本发明结核分枝杆菌融合蛋白、编码该蛋白的核酸的结核病预防、治疗疫苗。

本发明还涉及包含本发明结核分枝杆菌融合蛋白的结核病诊断试剂盒或结核病预防或治疗的组配药盒。在所述试剂盒或组配药盒中，本发明的融合蛋白优选以干燥粉末形式存在，在使用前稀释至所需浓度；也可以一定浓度的溶液形式存在。所述试剂盒或组配药盒中还可包括一个容器和位于该容器表面的或与该容器相关的标签或包装插页。适当的容器有瓶子，小瓶，注射器等。该容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。该容器可内含本发明融合蛋白，并具有无菌存取口(例如该容器可以是带有能通过皮内注射针穿刺的塞子的小瓶)。所述标签或包装插页说明本发明结核分枝杆菌融合蛋白用于结核病预防或治疗，或结核病检测的使用方法，或其它药物联合使用的方法和用途说明。另外，所述试剂盒或组配药盒中还可进一步包括第二个容器，第三个容器等，所述容器中可含有可药用的缓冲剂，例如注射用的无菌水(BWFI)、磷酸缓冲盐、Ringer'溶液和葡萄糖溶液，或者

含有抗结核病的化学治疗药物。上述试剂盒中还可包括满足用户需要的其它材料，如其它缓冲液、稀释剂，滤器，针头和注射器等。

可将本发明的结核分枝杆菌融合蛋白制备成结核病诊断、筛选试剂盒，在临床上用于方便、快速和准确的诊断结核病。而且，在进行大规模的结核病流行病学调查和监测中该试剂盒更显其优势。

在用于结核病检测的试剂盒中，本发明的结核分枝杆菌融合蛋白也可以是经过标记的。具体可使用酶、荧光物质、发光物质、放射性物质、金属螯合物等标记。优选的标记性酶例如，过氧化物酶，碱性磷酸酶， β -D-半乳糖苷酶，苹果酸脱氢酶，葡萄球菌核酸酶， δ -5-类固醇异构酶， α -甘油磷酸脱氢酶，三糖磷酸异构酶，辣根过氧化物酶，天冬酰胺酶，葡萄糖氧化酶，核糖核酸酶，尿素酶，过氧化氢酶，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，葡糖淀粉酶，以及乙酰胆碱酯酶等。优选的荧光物质有，异硫氰酸荧光素，藻胆蛋白，罗丹明，藻红蛋白，藻蓝蛋白，别藻蓝蛋白，以及邻苯二醛。优选的发光物质有异鲁米诺，光泽精，鲁米诺，芳香族吡啶酯，咪唑，吡啶盐及其修饰型酯，萤光素，萤光素酶，和水母发光蛋白。优选的放射性物质有 ^{125}I , ^{127}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{35}S 等。优选的金属物质有胶体金等。

与上述标记物结合的方法是已知的。具体可使用直接和间接标记法。常用的直接标记法是，将本发明蛋白与标记物通过一种交联剂以化学共价键结合。交联剂有 N,N'-邻亚苯基二马来酰亚胺，4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己酸 N-琥珀酰亚氨基酯，6-马来酰亚氨基己酸 N-琥珀酰亚氨基酯，4,4'-二硫代吡啶，及其它已知的交联剂。间接标记法的实例有，将本发明蛋白与低分子量半抗原如生物素、二硝基苯、吡哆醛、或荧光胺结合，以及将本发明蛋白用半抗原的结合配对物间接标记。抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白可作为生物素的识别配体使用。

当标记物为酶时，其底物和显色剂可用于测定其活性。当使用过氧化物酶时，以 H_2O_2 作为底物溶液，并以 2,2'-连氮-双-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸]铵盐(ABTS)、5-氨基水杨酸、邻苯二胺、4-氨基氨基替比林、或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺等作为显色剂。当使用碱性磷酸酶时，可用邻硝基苯磷酸、对硝基苯磷酸等作为底物。当使用 β -D-半乳糖苷酶时，可使用荧光素-二-(β -D-半乳吡喃糖苷)、4-甲基伞形基(umbelliferyl)- β -D-半乳吡喃糖苷等作为底物。

本发明涉及应用包含本发明的结核分枝杆菌融合蛋白的试剂或试剂盒

对个体，例如结核病疑似患者、疫区人群或有可能感染结核杆菌的个体进行检测，以辅助结核病的诊断或筛选出可疑患者。

在一个实施方案中，结核病的辅助实验室诊断可使用常规的血清学方法，例如，可以使用包含本发明的结核分枝杆菌融合蛋白的试剂或试剂盒检测血清、脑脊液等体液中的抗结核分枝杆菌抗体。检测抗结核分枝杆菌抗体的方法有间接试验，如将本发明结核分枝杆菌融合蛋白抗原吸附于固相载体，然后加入待检血清，如有相应抗体存在，则与抗原在载体上形成抗原-抗体复合物，洗涤后加入酶标抗抗体或胶体金标记抗抗体，显色观察结果。所述的间接试验方法例如 ELISA 法、斑点酶免疫渗滤法、斑点金标免疫渗滤法等。或者，血清学检测可使用夹心法，例如，使待检样品与结合至不溶性载体的本发明活性蛋白和标记的本发明蛋白反应，检测该反应产生的夹心复合物中的抗体量。或者还可用竞争试验来进行抗结核分枝杆菌抗体的检测，例如，使标记的抗结核分枝杆菌抗体与样品中的抗结核分枝杆菌抗体和本发明蛋白竞争性反应，根据与本发明蛋白反应的标记的抗结核分枝杆菌抗体的量来确定样品中的抗结核分枝杆菌抗体的量。样品中抗结核分枝杆菌抗体的效价高于对照 1-4 倍，优选 2-3 倍，更优选 2 倍，在临床上对结核病有辅助诊断意义，在结核病流行病学调查方面有监控意义。

任何生物学样品，如血浆、血清、血液、尿液、组织液、或脑脊液等体液，只要它们含有抗结核分枝杆菌抗体，就可用本发明蛋白，包含该蛋白的组合物或试剂盒来检测。

在一个实施方案中，本发明的蛋白也可通过结核病常用的皮内接种皮肤试验来进行结核病的辅助诊断，或进行结核病的流行病学调查和监测。例如，可用 Mantoux 法，灭菌 1 ml 一次性注射器，吸取 0.1 ml 本发明结核分枝杆菌蛋白于左前臂掌侧 1/3 处皮内注射，见有皮丘证明注射成功。于注射后 24 小时测量注射局部红肿或皮下硬结的横、纵径(mm)。注射局部红晕(或硬结)的平均横、纵直径 ≥ 5 mm 为阳性，平均直径 < 5 mm 或无反应(以 0 表示)为阴性。在结核病的流行病学调查中，健康人群皮内接种皮肤试验试剂后，对皮肤试验反应阳性特别是强阳性的健康人群是预防流行病需要监控的主要人群。

在上述结核病血清学检测和皮肤检测试验中所用到的包含本发明结核

分枝杆菌蛋白的所有试剂或试剂盒都包括在本发明的范围内。

附图说明

图 1 显示重组质粒酶切图谱。融合表达质粒 NcoI 和 HindIII 双酶切可见约 1.5 kb 片段的的目的基因和约 5.3kb 的线性质粒 DNA, NcoI 和 BamHI 双酶切可见约 1.2 kb 片段的的目的基因和约 5.6 kb 的线性质粒 DNA; BamHI 和 HindIII 双酶切可见约 0.3 kb 片段的的目的基因和约 6.5 kb 的线性质粒 DNA, BamHI 单酶切融合表达质粒只见约为 6.8 kb 片段, N 端蛋白基因重组载体 NcoI 和 BamHI 双酶切可见约 1.2 kb 片段的的目的基因和约 5.3 kb 的线性质粒 DNA, N 端蛋白基因重组载体 BamHI 双酶切可见约 6.5 kb 的线性质粒 DNA, 编码蛋白的 DNA 序列在准确的酶切位点与载体连接成功, 重组质粒中含有预表达蛋白的融合基因, 且插入的外源基因大小与理论一致。

图 2 为 DNA 序列图谱。该图显示 DNA 序列与设计完全符合, 首先突变位点序列正确, 连接子序列正确, 与基因组互补部分与基因组 DNA 序列完全一致。图 2-1 为 T7 启动子测序, 第 48 为碱基为目的基因碱基, 所读序列为 1-549bp, 图 2-2 为 T7 终止子测序 38KDa 基因, 第 67 位为目的基因, 所读序列为包括 BamHI 酶切位点、连接子和 390-1115bp。图 2-3 为 T7 终止子测序, 第 60 位为目的基因, 所读序列为包括终止子、EAST6 序列 1-285bp、连接子、和 38KDa 基因 970-1125bp。

图 3 显示重组工程菌 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。该图显示工程菌在 IPTG 诱导条件下表达重组蛋白, 而且主要以包涵体形式表达, 工程菌不经 IPTG 诱导几乎不表达重组蛋白。

图 4 显示全菌体蛋白扫描图, 第 5 条带为目的蛋白带占全菌体 38.5%。扫描结果如下:

条带	体积	Norm'd Vol(μ g)	条带%
1	42.50	2.91	无
2	55.00	3.77	无
3	93.50	6.41	无
4	79.50	5.45	无
5	562.00	38.5	无
6	407.88	27.95	无

7	56.00	3.82	无
8	103.50	8.92	无
9	9.78	0.66	无
10	0.00	0.00	无
11	0.00	0.00	无
12	0.00	0.00	无
13	23.50	1.61	无

图 5 为本发明重组蛋白的纯化结果。包涵体溶解液经两次阴离子柱层析获得纯度较高的重组蛋白。层析纯化时，蛋白上样量为 10 μ g。纯化后经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定呈一条带。

实施例

在下文中，本发明参考实施例进行具体阐述，但这些实施例不构成对本发明的限制。

实施例 1：结核分枝杆菌融合蛋白的制备

根据 38KDa(Rv0934)基因 Pab 序列和 ESAT-6(Rv3875)基因序列，作者设计合成了两对 PCR 引物。Pab 上游引物长 38 个碱基，如序列 5 所示，5'端设计了保护碱基和 NCO I 酶切位点(含起始密码 ATG)，Pab 下游引物长 40 个碱基，如序列 6 所示，5'端设计 BamH I 酶切位点和连接子。此引物的 PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，紫外检测呈现特异扩增条带，约为 1151 bp，符合设计要求。ESAT-6 编码基因上游引物长 32 个碱基，如序列 7 所示，5'端设计了保护碱基和 BamH I 酶切位点，ESAT-6 下游引物长 33 个碱基，如序列 8 所示，5'端设计 HindIII 酶切位点和终止子 TAA。此引物的 PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，紫外检测呈现特异扩增条带，约为 300 bp，符合设计要求。

对 PCR 扩增产物进行突变，第一个蛋白第 1 位氨基酸的三联密码子 GTG 突变为 ATG，第一个和第二个氨基酸中间插入 Val(三联密码为 GTG)，在两个蛋白中间加入连接序列为 GGAGGTGGAGGAATC-(序列 9)，终止密码 TAG 突变为 TAA。以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板，通过 Taq PlusI DNA 聚合酶(购自上海生工生物工程技术服务有限公司)，PCR 技术获得编码 pab 基因、连接子和 ESAT-6 编码基因，两基因通过连接酶连接成本发明蛋白的多核苷酸，如序列 3。连接子突变 GGAGGTGGAGGATCC，该

序列中第 1-4 氨基酸三联密码子第三为密码可为 A、T、G、C, 第 5 个氨基酸三联密码子 ATC 可突变为 TCT、AGT、AGC。

Pab 多核苷酸和表达载体经 NcoI 和 BamHI (New England Biolabs 公司产品, 购自友谊中联生物科技有限公司) 酶切后经 1.0% 琼脂糖(为 Sigma 公司产品, 购自北京鼎国生物技术发展中心)凝胶电泳分离, 切割含 DNA 条带的琼脂块, 并按 DNA 快速纯化试剂盒说明书回收 DNA。回收的多核苷酸和 PET28a 质粒表达载体(为 invitrogen 公司产品)在 T₄ DNA 连接酶 (New England Biolabs 公司产品, 购自友谊中联生物科技有限公司) 作用下连接成重组杂合质粒 1(P38), 重组杂合质粒 1 转化感受态大肠杆菌 DH5 α (购自北京鼎国生物技术发展中心), 通过挑选重组大肠杆菌菌落筛选和鉴定含重组杂合质粒的大肠杆菌杆菌 DH5 α , 要求重组杂合质粒 1 的单酶切和双酶切图谱符合图 1。重组杂合质粒 1 中插入的目的基因经 DNA 全自动测序证明序列与设计完全符合。重组杂合质粒 1 与 ESAT-6 编码基因经 BamHI 和 HindIII (New England Biolabs 公司产品, 购自友谊中联生物科技有限公司) 酶切后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切割含 DNA 条带的琼脂块, 并按 DNA 快速纯化试剂盒说明书回收 DNA。回收的多核苷酸和重组杂合质粒 1 在 T₄ DNA 连接酶作用下连接成重组杂合质粒 2(P3810), 重组杂合质粒 2 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 通过挑选重组大肠杆菌菌落筛选和鉴定含重组杂合质粒 2 的大肠杆菌杆菌 DH5 α , 要求重组杂合质粒 2 的单酶切和双酶切图谱符合图 1。重组杂合质粒 2 中插入的目的基因经 DNA 全自动测序证明 ESAT-6 基因序列与设计完全符合。目的基因序列正确的重组杂合质粒 2 转化表达宿主菌 BL21(DE3)(购自北京鼎国生物技术发展中心), 该重组大肠杆菌培养至光密度为 0.6-0.8 时, 加入 0.5mmol/L - 1mmol/L IPTG 诱导培养, 诱导 4-5 小时, 收集菌体。在此诱导培养条件下, 目的蛋白表达量经凝胶光密度扫描占全菌体蛋白的 30% - 38%。本发明蛋白通过核酸序列的改变和载体与宿主细胞的选择实现了高效表达。

实施例 2: 本发明结核分枝杆菌融合蛋白的纯化、复性和鉴定

菌体加入裂解缓冲液 (1g 细菌加 3ml 裂解缓冲液) 悬浮菌体。超声破碎细菌, 功率 200 W, 超声 20 秒, 间隙 20 秒, 共超声 80 次; 4℃、12 000 rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 沉淀分别用含 1% Triton-X100 (Sigma 公司产品,

购自北京经科宏达生物技术有限公司)、2% Triton-X100 的裂解缓冲液各洗涤包涵体 1 次。50 mmol/L Tris.Cl/8 M 尿素(pH8.5)溶解包涵体, 置 4°C 至大部分包涵体溶解, 4°C、12 000 rpm 离心 15 min, 收集上清。

50 mmol/L Tris.Cl/8 M 尿素(pH8.5) 平衡离子交换柱 sepharose-FF (Amersham Biosciences 公司产品, 购自北京经科宏达生物技术有限公司), 包涵体溶解上清液上样于阴离子交换柱。上样完毕, 用 50 mmol/L Tris.Cl/8 M 尿素(pH8.5) 充分洗去未结合的蛋白, 然后 0-0.3 M NaCl 梯度阶段洗脱, 同时收集蛋白 SDS - PAGE 电泳检测洗脱峰对应收集管的溶液, 含目的蛋白的收集管合并透析脱盐和去尿素复性, 复性过程: 缓冲液为 50 mmol/L Tris.Cl/6 M 尿素(pH8.8)、4°C 透析过夜; 缓冲液为 50 mmol/L Tris.Cl/3 M 尿素(pH8.8)、4°C 透析过夜; 缓冲液为 50 mmol/L Tris.Cl (pH8.8)、4°C 透析 2 天。通过初步降低缓冲液尿素浓度, 从而缓慢去掉蛋白中的尿素而达到复性。再过同一阴离子柱, 0-0.5 M NaCl 阶段洗脱, SDS - PAGE 检测洗脱峰, 含目的蛋白较多且较纯的收集管合并, 透析除盐。

纯化蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶光密度扫描显示该蛋白纯度接近 96% 左右, HPLC 纯度测定显示纯度也接近 96%。

肽指纹图谱由协和蛋白质组中心完成, 表明本发明多肽赖氨酸和精氨酸在多肽序列中位置是准确的, 测试氨基酸与理论氨基酸同源性达约 90%。证明该蛋白为目的蛋白。

N 端氨基酸序列分析由北京大学完成, 该蛋白 N 末端 15 个氨基酸依次是蛋氨酸(M)-缬氨酸(V)-赖氨酸(K)-异亮氨酸(I)-精氨酸(R)-亮氨酸(L)-组氨酸(H)-苏氨酸(T)-亮氨酸(L)-亮氨酸(L)-丙氨酸(A)-缬氨酸(V)-亮氨酸(L)-苏氨酸(T)-丙氨酸(A)。N 端结果证明起始氨基酸正确、编码氨基酸三联密码正确。

实施例 3: 本发明结核分枝杆菌融合蛋白促进淋巴细胞增殖、转化

MTT 还原法测淋巴细胞转化: 淋巴细胞来源于 10 个健康人, 10 个活动性肺结核患者, 肝素抗凝血加入分离试剂离心分离, 吸取淋巴细胞, 用 RPMI1640 培养液 (GIBCO 产品, 购自北京欣经科生物技术有限公司) 稀释后, 取部分细胞液进行台盼蓝染色镜检计活菌数, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml, 每孔加细胞悬液 100 μ l, 加 RPMI1640 培养液稀释抗原 100 μ l, 对照

组加 RPMI1640 培养液 100 μ l, 每组设 4 个复孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱孵育 6-7 天, 每孔弃培养液 120 μ l, 加 MTT (AMRESC 产品, 购自北京欣经科生物技术有限公司) (5mg/ml) 10 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱孵育 4 小时, 加促溶剂 90 μ l(0.01N HCl-异丙醇), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱 2 小时, 测 570nm 波长 OD 值, 并计算刺激指数(SI=加抗原孔平均 OD_{570nm}/未加抗原孔 OD_{570nm})。结果见表 1。

表 1: 本发明融合蛋白用于淋巴细胞转化实验试验结果

分组	PHA 刺激 淋巴细胞转化(SI) 平均值 \pm SD	本发明蛋白刺激 淋巴细胞转化(SI) 平均值 \pm SD
健康人	1.72(0.2)	1.33(0.31)
肺结核患者	1.18(0.1)	1.22(0.08)

PHA(Sigma 产品, 购自北京欣经科生物技术有限公司)刺激淋巴细胞转化, 70%的健康人、20%的肺结核患者的刺激指数 SI>1.5, 本发明蛋白刺激淋巴细胞转化, 31%的健康人、25%的肺结核患者刺激指数 SI>1.5。

本发明蛋白刺激肺结核病人淋巴细胞转化与对照 PHA 无显著性差异, 而刺激健康人淋巴细胞转化存在显著性差异, 结果表明重组蛋白能有效刺激肺结核病人淋巴细胞转化。

实施例 4: 本发明结核分枝杆菌融合蛋白用于血清诊断

ELISA 法检测 192 份血清: 本发明蛋白每孔包被 0.2-1 μ g, 对照孔加入包被液。该试验所用包被液为 2.94 g/L NaHCO₃ 和 1.50 g/L Na₂CO₃。包被 2 小时以上, 弃去液体, 然后用 PBST 洗板 3 次, 每次 3 分钟。样品稀释液 (含 0.1%BSA(Spanish 产品, 北京华绿渊生物技术发展中心) 的 PBST) 1:100 稀释待检血清样品, 每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 1 小时, 同前洗板 3 次。用样品稀释液(含 0.1%BSA 的 PBST)按要求稀释 HRP 标记的二抗(兔抗人 IgG(购自北京欣经科生物技术有限公司)), 每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 1 小时, 同前洗板 3 次, 每孔加 100 μ l 显色液(柠檬酸和磷酸二氢钠缓冲液溶解 DAB, 临用前加 H₂O₂ 显色, 加 2M 硫酸 2 滴终止反应, 酶标仪上测量各孔 492nm 波长处

OD。健康人血清 OD 平均值加上 2 个标准差为临界值 (cut off)，大于临界值为阳性。192 份血清 ELISA 检测结果见表 2。

表 2: 重组蛋白用 ELISA 法检测血清的结果

血清来源	份数	阳性反应(灵敏度(%))	特异性(%)
健康人群	72	3(4.2)	95.8%
肺结核患者	120	84(70.0)	-
涂片阳性	60	50(83.3)	-
涂片阴性	60	34(56.7)	-

表中结果表明本发明融合蛋白用于肺结核病人血清检测敏感性为 70% 以上，特异性高达 95% 以上，本发明蛋白用于结核病血清学诊断具有重要意义。

实施例 5: 本发明结核分枝杆菌融合蛋白的预防作用

以小鼠为试验动物，试验组注射本发明蛋白与佐剂(分枝杆菌成分，主要为多糖和核酸)；阴性对照组注射生理盐水；阳性对照组只在第一次免疫时注射 5×10^5 个 BCG，每隔 2-3 周免疫一次，共免疫 3 次，最后一次免疫后 1-2 个月静脉注射活结核分枝杆菌 H37Rv $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ ，2-4 周后杀鼠，小鼠脾磨碎接种改良罗氏培养基，培养 3-4 周进行菌落计数。结果见表 3

表 3: 本发明蛋白用于预防小鼠脾脏结核杆菌分离数对数值

攻击后周数	本发明蛋白免疫 x±SD	BCG 免疫 x±SD	对照 x±SD
2	3.94±0.60★	3.62±0.52★	4.98±0.25
3	3.76±0.47★	2.45±0.89★	5.30±0.35
4	4.03±0.76★	3.96±0.60★	5.56±0.33

本发明融合蛋白用于预防，有较强的抑制结核杆菌的作用，试验组与对照组脾脏结核杆菌分离数对数值有显著差异(P<0.05)。★表示 P<0.05

实施例 6: 本发明结核分枝杆菌融合蛋白的治疗作用

小鼠静脉注射活结核分枝杆菌 H37Rv $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ 以制备结核分枝杆菌感染模型, 本发明蛋白与佐剂(分枝杆菌成分, 主要为多糖和核酸)混合进行肌肉注射为单纯预防治疗组, 单纯化疗组(常规短程化疗)、本发明蛋白与佐剂(分枝杆菌成分, 主要为多糖和核酸)混合进行肌肉注射、同时进行化学治疗为化疗加免疫组, 生理盐水治疗组为对照组, 治疗 3、4 周, 分别取各组动物各 5 只, 解剖取肺、肝、脾、淋巴结作病理观察, 取全脾于研磨器研磨后接种改良罗氏培养基, 培养 3-4 周进行菌落计数。结果见表 4

表 4: 本发明蛋白免疫治疗后小鼠脾脏结核杆菌分离数对数值结果

治疗周数	本发明蛋白治疗 $x \pm SD$	化疗 + 本发明蛋白免疫治疗($x \pm SD$)	单纯化疗 $x \pm SD$	对照 $x \pm SD$
3	$3.04 \pm 0.60^*$	$2.86 \pm 1.03^*$	$3.15 \pm 0.28^*$	4.57 ± 0.67
4	$3.67 \pm 0.57^*$	$3.12 \pm 0.85^*$	$4.43 \pm 0.52^*$	5.40 ± 0.48

*: $P < 0.05$

结果表明: 本发明蛋白用于免疫治疗, 有较强的抑制结核杆菌的作用, 联合化疗效果更佳。各试验组与对照组脾脏结核杆菌分离数对数值有显著差异($P < 0.05$)。

序列表

<110> 解放军总医院第二附属医院
东莞市祥云升生物科技有限公司

<120> 结核分枝杆菌融合蛋白及其应用

<130> C05P0058

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

gtgaaaattc gtttgcatc gctgttggcc gtgttgaccg ctgcccgcct gctgctagca    60
gcggcgggct gtggctcgaa accaccgagc ggttcgccctg aaacgggcgc cggcggcggt    120
actgtcgcga ctacccccgc gtcgtcgccc gtgacgttgg cggagaccgg tagcacgctg    180
ctctaccgcg tgttcaacct gtggggtccg gccittcacc agaggatcc gaacgtcacg    240
atcaccgctc agggcaccgg ttctgggtgcc gggatcgcgc aggcccccgc cgggacggtc    300
aacattgggg cctccgacgc ctatctgtcg gaaggtgata tggccgcgca caaggggctg    360
atgaacatcg cgctagccat ctccgctcag caggtcaact acaacctgcc cggagtgagc    420
gagcacctca agctgaacgg aaaagtcctg gcggccatgt accagggcac catcaaaacc    480
tgggacgacc cgcagatcgc tgcgtcaac cccggcgtga acctgcccgg caccgcggta    540
gttccgctgc accgctccga cgggtccggt gacaccttct tgttaccca gtaccigtcc    600
aagcaagatc ccgagggctg gggcaagtcg cccggcttcg gcaccaccgt cgacttcccg    660
gcggtgccgg gtgctgtggg tgagaacggc aacggcggca tggtgaccgg ttgcgccgag    720
acaccgggct gcgtggccta tctcggcatc agcttcctcg accagggcag tcaacgggga    780

```

ctcggcgagg cccaactagg caatagctct ggcaatttct tgttgcccga cgcgcaaagc 840
 attcaggccg cggcggctgg cticgcatcg aaaaccccgg cgaaccaggc gatttcgatg 900
 atcgacgggc ccgccccgga cggctaccgg atcatcaact acgagtacgc catcgtcaac 960
 aaccggcaaa aggacgccgc caccgcgag acctigcagg catttctgca ctgggcgatc 1020
 accgacggca acaaggcctc gttcctcgac caggttcatt tccagccgct gccgccccgc 1080
 gtggtgaagt tgtctgacgc gttgatcgcg acgatttcca gctag 1125

<210> 2
 <211> 288
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 2
 atgacagagc agcagtggaa tticgcggt atcgaggccg cggcaagcgc aatccaggga 60
 aatgtcacgt ccattcattc cctccttgac gaggggaagc agtccctgac caagctcgca 120
 gcggcctggg gcggtagcgg ttcggaggcg taccagggtg tccagcaaaa atgggacgcc 180
 acggctaccg agctgaacaa cgcgctgcag aacctggcgc ggacgatcag cgaagccggt 240
 caggcaatgg cticgaccga aggcaacgic actgggatgt tcgcatag 288

<210> 3
 <211> 1428
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 3
 atggtgaaaa ttctttgca tacgctgttg gccgtgtga ccgctgcgcc gctgctgcta 60
 gcagcggcgg gctgtggctc gaaaccaccg agcggttcgc ctgaaacggg cgccggcgcc 120
 ggtactgtcg cgactacccc cgcgtcgtcg ccggtgacgt tggcggagac cggtagcacg 180

ctgctctacc cgctgttcaa cctgtggggt ccggcctttc acgagaggta tccgaacgtc 240
 acgatcaccg ctcagggcac cggttctggt gccgggatcg cgcaggccgc cgccgggacg 300
 gtcaacattg gggcctccga cgcctatctg tcggaagggtg atatggccgc gcacaagggg 360
 ctgatgaaca tcgcgctagc catctccgct cagcagggtca actacaacct gcccgagtg 420
 agcgagcacc tcaagctgaa cggaaaagtc ctggcggcca tgtaccaggg caccatcaaa 480
 acctgggacg acccgagat cgctgcgctc aaccccgcg tgaacctgcc cggcaccgcg 540
 gtagttccgc lgcaccgctc cgacgggtcc ggtgacacct tcttgttac ccagtaccig 600
 tccaagcaag atcccagagg ctggggcaag tcgcccggct tcggcaccac cgtcgacttc 660
 ccggcgggtc cgggtgcgct gggtgagaac ggcaacggcg gcatggtgac cggttgcgcc 720
 gagacaccgg gctgcgtggc ctatatcggc atcagcttcc tcgaccaggc cagtcaacgg 780
 ggactcggcg aggcccaact aggcaatagc tctggcaatt tcttgttgc cgacgcgcaa 840
 agcattcagg ccgcggcggc tggcttcgca tcgaaaacc cggcgaacca ggcgatttcg 900
 atgatcgacg ggcccgcgcc ggacggctac ccgatcatca actacgagta cgccatcgtc 960
 aacaaccggc aaaaggacgc cgccaccgcg cagaccttgc aggcaattct gcactgggcg 1020
 atcaccgacg gcaacaaggc ctcgttctc gaccaggttc atttccagcc gctgccgccc 1080
 gcggtggtga agttgtctga cgcgttgatc gcgacgattt ccagcggagg tggaggatcc 1140
 atgacagagc agcagtgaa ittcgcgggt atcgaggccg cggcaagcgc aatccaggga 1200
 aatgtcacgt ccattcattc cctccttgac gagggggagc agtccctgac caagctcgca 1260
 gcggcctggg gcggtagcgg itcggaggcg taccagggtg tccagcaaaa atgggacgcc 1320
 acggctaccg agctgaacaa cgcgctgcag aacctggcgc ggacgatcag cgaagccggt 1380
 caggcaatgg cttcgaccga aggcaacgtc actgggatgt tcgcataa 1428

<210> 4

<211> 475

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Met Val Lys Ile Arg Leu His Thr Leu Leu Ala Val Leu Thr Ala Ala
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Cys Gly Ser Lys Phe Phe Ser Gly
 20 25 30

Ser Pro Glu Thr Gly Ala Gly Ala Gly Thr Val Ala Thr Thr Pro Ala
 35 40 45

Ser Ser Pro Val Thr Leu Ala Glu Thr Gly Ser Thr Leu Leu Tyr Pro
 50 55 60

Leu Phe Asn Leu Trp Gly Pro Ala Phe His Glu Arg Tyr Pro Asn Val
 65 70 75 80

Thr Ile Thr Ala Gln Gly Thr Gly Ser Gly Ala Gly Ile Ala Gln Ala
 85 90 95

Ala Ala Gly Thr Val Asn Ile Gly Ala Ser Asp Ala Tyr Leu Ser Glu
 100 105 110

Gly Asp Met Ala Ala His Lys Gly Leu Met Asn Ile Ala Leu Ala Ile
 115 120 125

Ser Ala Gln Gln Val Asn Tyr Asn Leu Pro Gly Val Ser Glu His Leu
 130 135 140

Lys Leu Asn Gly Lys Val Leu Ala Ala Met Tyr Gln Gly Thr Ile Lys
 145 150 155 160

Thr Trp Asp Asp Pro Gln Ile Ala Ala Leu Asn Pro Gly Val Asn Leu
 165 170 175

Pro Gly Thr Ala Val Val Pro Leu His Arg Ser Asp Gly Ser Gly Asp
 180 185 190

Thr Phe Leu Phe Thr Gln Tyr Leu Ser Lys Gln Asp Pro Glu Gly Trp
 195 200 205

Gly Lys Ser Pro Gly Phe Gly Thr Thr Val Asp Phe Pro Ala Val Pro
 210 215 220

Gly Ala Leu Gly Glu Asn Gly Asn Gly Gly Met Val Thr Gly Cys Ala
 225 230 235 240

Glu Thr Pro Gly Cys Val Ala Tyr Ile Gly Ile Ser Phe Leu Asp Gln
 245 250 255

Ala Ser Gln Arg Gly Leu Gly Glu Ala Gln Leu Gly Asn Ser Ser Gly
 260 265 270

Asn Phe Leu Leu Pro Asp Ala Gln Ser Ile Gln Ala Ala Ala Ala Gly
 275 280 285

Phe Ala Ser Lys Thr Pro Ala Asn Gln Ala Ile Ser Met Ile Asp Gly
 290 295 300

Pro Ala Pro Asp Gly Tyr Pro Ile Ile Asn Tyr Glu Tyr Ala Ile Val
 305 310 315 320

Asn Asn Arg Gln Lys Asp Ala Ala Thr Ala Gln Thr Leu Gln Ala Phe
 325 330 335

Leu His Trp Ala Ile Thr Asp Gly Asn Lys Ala Ser Phe Leu Asp Gln
 340 345 350

Val His Phe Asp Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu Ser Asp Ala
 355 360 365

Leu Ile Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Thr Glu Gln
 370 375 380

Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly
 385 390 395 400

Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu
 405 410 415

Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser Glu Ala Tyr Gln
 420 425 430

Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu Leu Asn Asn Ala

435 440 445
 Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly Gln Ala Met Ala
 450 455 460

 Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 465 470 475

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 引物

<220>
 <223> 从 5' 端到 3' 端

<400> 5
 catgccatgg tgaaaattcg ttgcatacg ctgttggc 38

<210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 引物

<220>
 <223> 从 5' 端到 3' 端

<400> 6
 cgggatcctc cacctccgct ggaaatcgtc gcgatcaacg 40

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 引物

<220>
 <223> 从 5' 端到 3' 端

<400> 7
cgggatccat gacagagcag cagtggaatt tc 32

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> 引物

<220>
<223> 从 5' 端到 3' 端

<400> 8
cccaagctta tgcgaacatc ccagtgacgt tgc 33

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> 引物

<220>
<223> 从 5' 端到 3' 端

<400> 9
ggaggtaggag gaatc 15

- | | |
|------------------|----------------|
| 1 Rdna 标志物 | 2 p38-10 |
| NcoI+HindIII | 3 P38-10 |
| BamHI+HindIII | 4 P38-10 |
| NcoI+BamHI | 5 P38-10 BamHI |
| 6 P38 NcoI+BamHI | 7 p38 BamHI |
| 8 100 bp 梯形带 | |

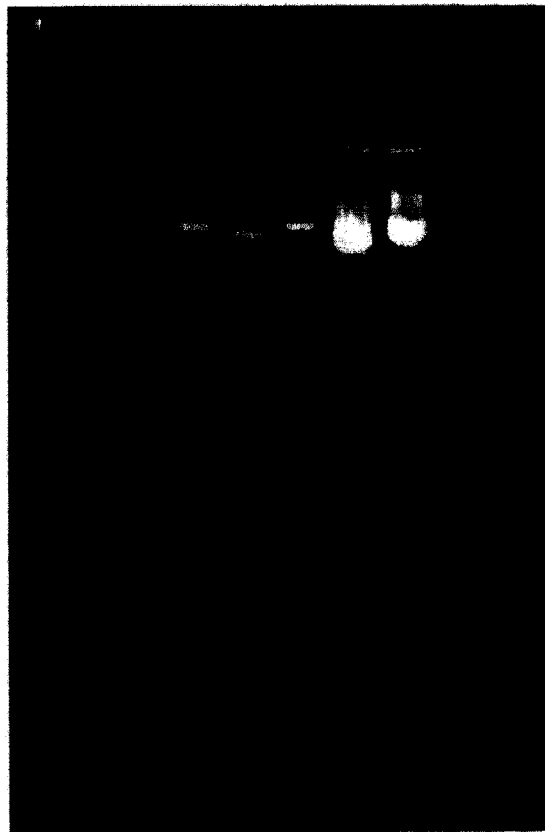
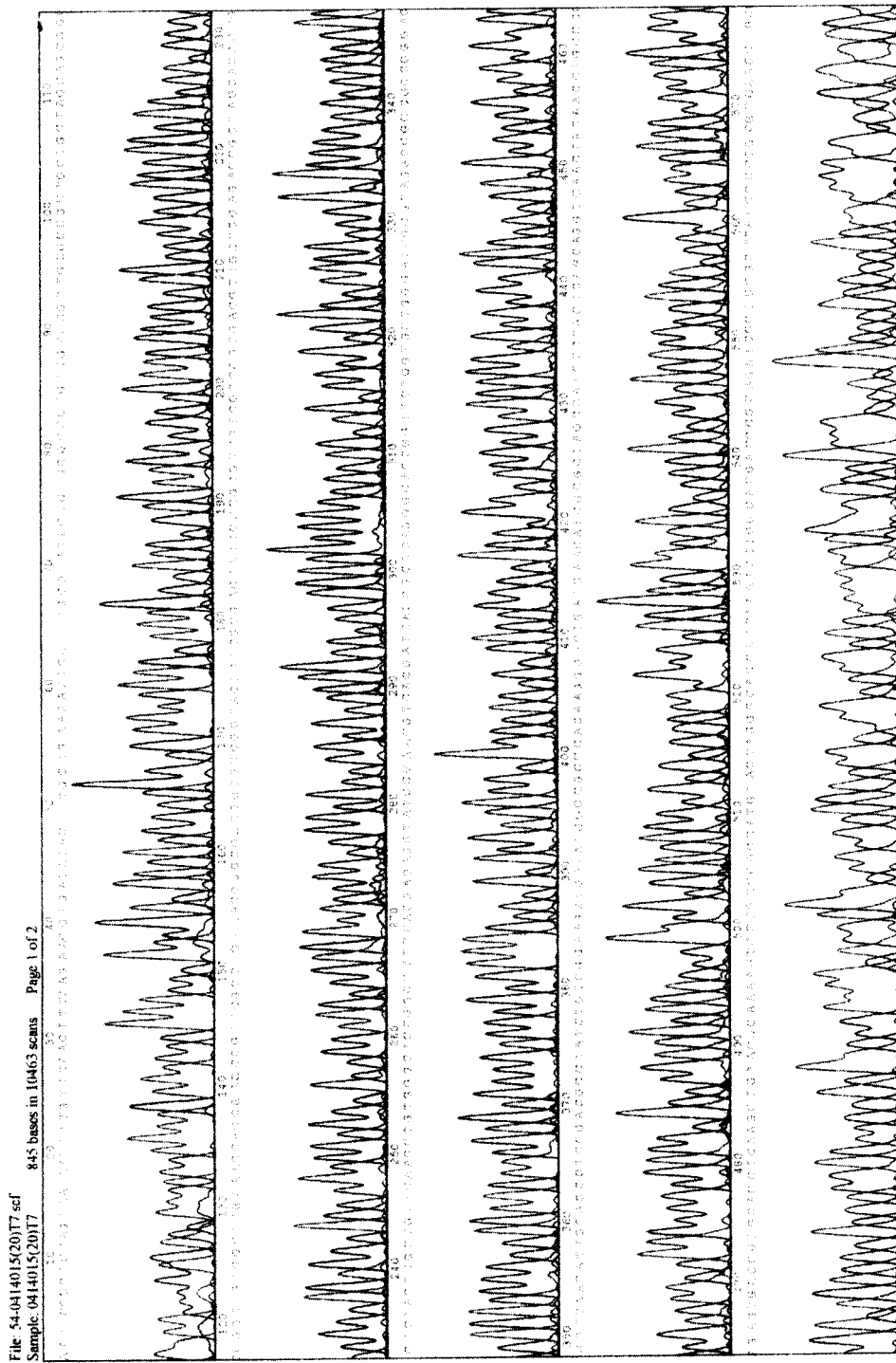
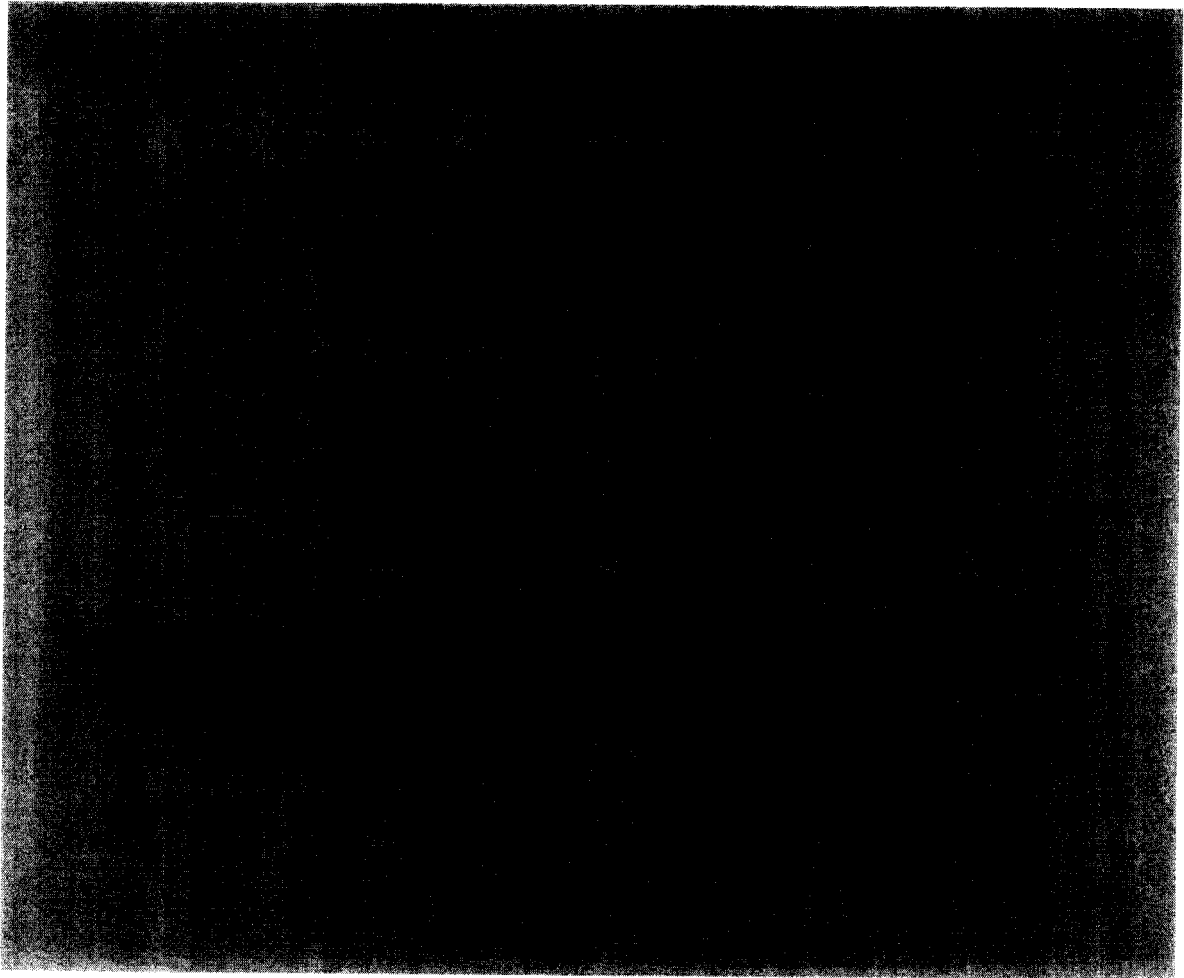


图 1



File: 54-0414015(20)177.scf
Sample: 0414015(20)177
845 bases in 10463 scans Page 1 of 2

图 2 正向测序



1-9 不同 IPTG 浓度诱导 p38-10/BL21 (DE3) 宿主菌
(依次为 2、1.4、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0)

10 蛋白分子量

图 3

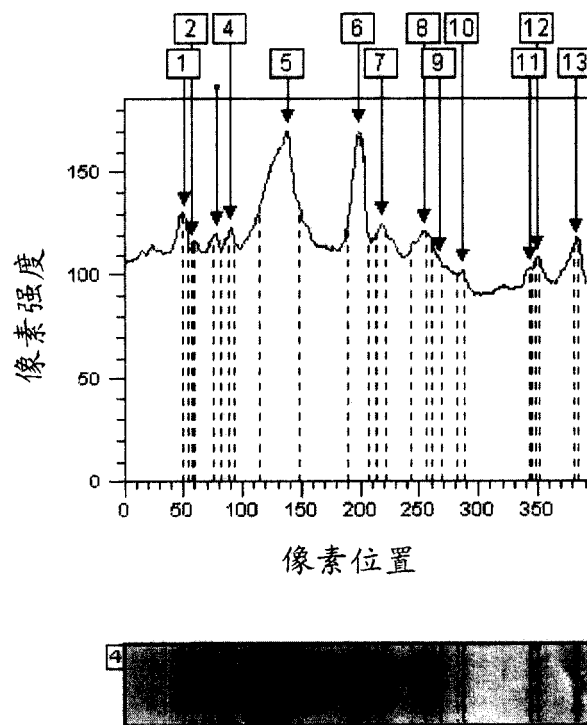
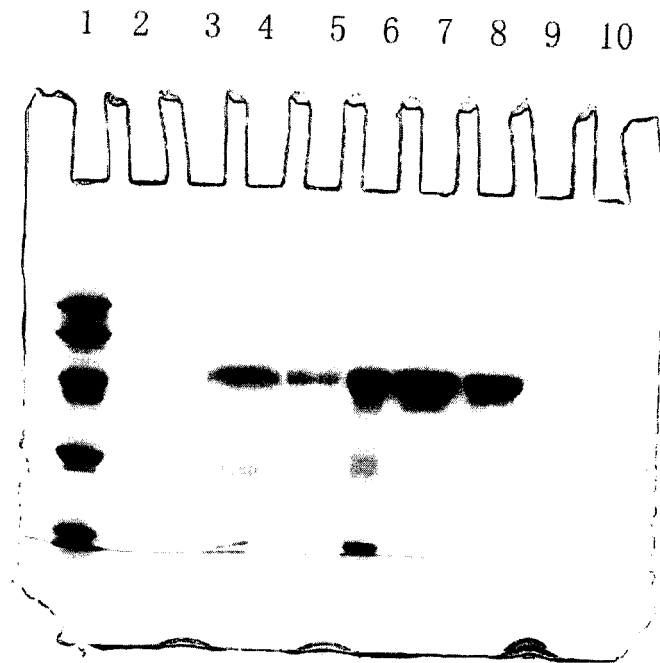


图 4



- 1 蛋白标志物
- 2 未加样
- 4、5、7、8 第二次过柱纯化收集蛋白
- 6 第一次过柱纯化收集蛋白

图 5

专利名称(译)	结核分枝杆菌融合蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN100999550A	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	CN200610000710.X	申请日	2006-01-10
[标]申请(专利权)人(译)	解放军总医院第二附属医院 东莞市祥云升生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	解放军总医院第二附属医院 东莞市祥云升生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	解放军总医院第二附属医院 东莞市祥云升生物科技有限公司		
[标]发明人	何秀云 庄玉辉 张小刚 汪海滨		
发明人	何秀云 庄玉辉 张小刚 汪海滨		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/35 C12N15/31 C12N15/63 C12N1/21 C12P21/02 A61K38/16 G01N33/53 A61P31/06		
CPC分类号	C07K2319/40 C07K14/35 A61K2039/55594 A61K39/04 A61K39/00 A61P31/06 A61P37/04		
其他公开文献	CN100999550B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种结核分枝杆菌融合蛋白、编码该多肽的多核苷酸，包含该多核苷酸的载体和宿主细胞。本发明还涉及该融合蛋白的制备，以及其在结核病预防和治疗中的应用。