

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610054061.1

[51] Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

[43] 公开日 2006年7月26日

[11] 公开号 CN 1807452A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/04 (2006.01)

[22] 申请日 2006.1.28

[21] 申请号 200610054061.1

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号

[72] 发明人 邹全明 吴超 石云 周维英

[74] 专利代理机构 重庆华科专利事务所
代理人 康海燕

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 6 页

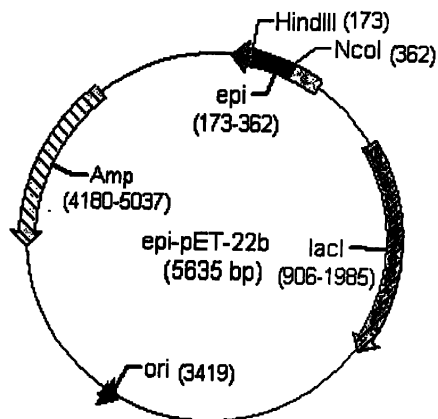
[54] 发明名称

幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的 Th 表位肽、其编码 DNA、疫苗及其应用

[57] 摘要

本发明提供了三个幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的 Th 细胞表位肽及编码 DNA，并提供包含此三个表位肽及额外的一个尿素酶 B 亚单位的 B 细胞表位 (SIKEDVQF) 的疫苗。其中 Th 表位肽是具有下列氨基酸残基序列之一的多肽：1) 具有序列表中序列 2、序列 3、序列 7 的氨基酸序列；2) 将序列表中的序列 2、序列 3、序列 7 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的替换、缺失或添加而成的衍生多肽。其编码的 DNA 是下列核苷酸序列之一：1) 具有序列表中序列 8、序列 9、序列 10 的核苷酸序列。2) 与序列表中序列 8、序列 9、序列 10 具有相同编码产物的核苷酸序列。包含本发明多肽的表位疫苗是具有序列表中序列 12 中的氨基酸序列的蛋白疫苗。本发明多肽作为活性成分制成的疫苗或药

物，可以起到清除幽门螺杆菌感染的作用，在医药领域具有广阔的应用前景。



- 1、三个来自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的辅助性 Th 细胞表位肽。
- 2、权利要求 1 所述的幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的辅助性 Th 细胞表位肽，其特征是具
有下述氨基酸残基序列之一的多肽：
 - 1) 具有列表中的序列 2、序列 3、序列 7 的氨基酸序列的多肽。
 - 2) 将列表中的序列 2、序列 3、序列 7 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的
替换、缺失或添加而形成的衍生多肽。
- 3、编码权利要求 1 所述的幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的辅助性 Th 细胞表位肽的核苷酸
序列。
- 4、根据权利要求 3 所述的核苷酸序列，其特征在于：所述核苷酸序列是下述核苷酸序列
之一：
 - 1) 具有列表中序列 8、序列 9、序列 10 的核苷酸序列。
 - 2) 与列表中序列 8、序列 9、序列 10 具有相同编码产物的核苷酸序列。
- 5、包含权利要求 3 或 4 所述的核苷酸序列的表达载体，转基因细胞系及宿主菌。
- 6、一种疫苗，其特征为包含权利要求 1 中所述的表位肽组成的组。
- 7、如权利要求 6 所述的疫苗，除包含至少一个辅助性 T 细胞表位外，还包含至少一个引
起机体免疫应答的抗原或额外的 B 细胞或毒性 T 淋巴细胞表位。
- 8、一种表位疫苗，它的活性成分为权利要求 1 所述的表位肽及额外的一个来自 UreB 的
B 细胞表位 (SIKEDVQF)，其特征是具列表中的序列 11 的氨基酸残基序列。
- 9、编码权利要求 8 所述的表位疫苗的核苷酸，其特征是具列表中的序列 12 的核苷酸
序列。
- 10、包含权利要求 1 中所述的多肽的组合物，其特征是可以用作预防或治疗幽门螺杆
菌感染的药物组合。

幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的 Th 表位肽、其编码 DNA、疫苗及其应用

技术领域

本发明属于医药生物技术领域，涉及来自幽门螺杆菌 (*Hp*) 的多肽、其编码 DNA 及应用。其中优选的 3 个多肽为来自尿素酶 B 亚单位 (UreB) 的辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 表位，本发明涉及含有这些表位肽的组合物，该组合物可以用于治疗和 (或) 预防幽门螺杆菌感染。本发明提供了包含 3 个优选 Th 表位及一个 B 细胞表位 (SIKEDVQF) 的表位疫苗，此外本发明还涉及包含这些 Th 表位的合成肽疫苗、基因重组亚单位疫苗及核酸疫苗等。

背景技术

1982 年澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 首先从人胃粘膜中分离培养出幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *Hp*)，他们的发现使得在过去的 20 多年中，对于溃疡病的认识和治疗发生了很大的变革。2005 年 10 月 3 日，诺贝尔奖评审委员会宣布，将 2005 年度诺贝尔生理学 and 医学奖授予这两位澳大利亚科学家，以表彰他们发现了幽门螺杆菌 (*Hp*) 以及这种细菌在胃炎和胃溃疡等疾病中的作用。研究已证实 *Hp* 是慢性胃炎、消化性溃疡及胃粘膜相关淋巴组织淋巴瘤 (MALT) 等疾病的重要致病因子，与胃癌的发生相关，世界卫生组织已经把 *Hp* 列为胃癌的 I 类致病因子。有效的治疗和根除 *Hp* 感染已成为人们关注的焦点。

目前临床主要采用抗生素多联疗法治疗 *Hp* 感染，虽然可以达到 85% 的根除率，但存在以下缺点：1、药物疗法毒副作用大；2、复杂的联合用药导致病人的依从性差；3、药物不能防止 *Hp* 的再感染；4、抗生素治疗易产生耐药性而导致治疗失败；5、对发展中国家病人而言，药物疗法在经济上也较困难。免疫接种是预防和控制感染性疾病最经济而有效的方法，鉴于 *Hp* 感染的高发病率及其与慢性胃炎、消化性溃疡以及胃癌、胃粘膜相关淋巴组织淋巴瘤的密切关系，如何通过免疫接种达到防治这些疾病的目的，一直是各国科研人员研究的重点问题。疫苗接种通过有效地调动机体的免疫系统，克服细菌对宿主的免疫逃避来达到预防感染和消除已感染细菌的目的，经济而简便，可在人群中大规模运用，并且对耐药细菌仍然有效，因此研究幽门螺杆菌疫苗具有重要的意义。

动物实验研究表明，疫苗接种可以减少 *Hp* 在胃粘膜定植，并减轻胃粘膜的炎症反应，起到预防和治疗 *Hp* 感染的作用。目前关于 *Hp* 的疫苗研究多是采用全菌疫苗或重组亚单位疫苗及核酸疫苗等，其引发的免疫应答与 *Hp* 自然感染时的免疫应答相似。*Hp* 自然感染时体内产生强烈的细胞与体液免疫应答，但是感染仍慢性持续化甚至终身感染，说明机体已经对 *Hp* 存在免疫耐受，自然感染时产生的免疫应答不能起到保护作用，因而通过疫苗接种的方式清

除 *Hp* 就必须在抗原选择以及表位水平对抗原进行改造，激发更有效的免疫应答。表位疫苗是近年随分子生物学及免疫学的进展而发展起来的一种新的疫苗形式，可以诱导机体产生特异性的免疫应答，并且其副作用轻微、安全性好，是目前疫苗研究的一个新的方向，广泛应用于病毒、肿瘤、及慢性感染性疾病的免疫预防和治疗。借鉴表位疫苗在其它慢性感染性疾病中的研究成果，以 *Hp* 表位为基础设计的疫苗有可能打破机体的免疫耐受，达到预防和治疗 *Hp* 感染的目的。

细胞免疫尤其是 CD4⁺T 淋巴细胞（也称为辅助性 T 淋巴细胞，Th 细胞）在抗 *Hp* 感染中起到了重要的作用。CD4⁺T 淋巴细胞识别的抗原是外来抗原经抗原提呈细胞（APC）处理后与 MHC Ⅱ 类分子结合并提呈到细胞表面的短肽，即 Th 表位。被 Th 表位激活的 CD4⁺T 淋巴细胞可以辅助 B 细胞及 CTL 细胞发挥免疫效应。在 *Hp* 感染中 CD4⁺T 除了发挥辅助功能外还直接发挥免疫效应并且介导免疫保护：应用 MHC I 类分子敲除小鼠和 MHC II 类分子敲除小鼠的研究模型发现，MHC II 类分子敲除的小鼠不能够对 *Hp* 的感染起到保护作用，CD4⁺T 淋巴细胞识别的是结合到 MHC Ⅱ 类分子上的短肽（即 Th 表位），而 CD8⁺T 淋巴细胞识别的是结合到 MHC Ⅰ 类分子上的短肽（即 CTL 表位），因此提示 CD4⁺T 淋巴细胞而非 CD8⁺T 淋巴细胞对 *Hp* 感染起到了免疫保护作用。因而要激发对 *Hp* 的保护性免疫应答，必须激发机体的 CD4⁺T 淋巴细胞免疫应答。

尿素酶（Urease）是 *Hp* 的主要致病因子，对 *Hp* 在人胃粘膜定居起着重要作用，在胃部的酸性环境中，一般细菌很难存活，但是 *Hp* 的尿素酶能够水解尿素而释放氨，在菌体周围形成一层“氨云”保护 *Hp* 抵抗胃酸而在胃粘膜定植，并且释放的氨能直接损害胃粘膜。尿素酶在 *Hp* 菌体中的含量高，占可溶性蛋白的 6%，由 A 和 B 两个亚单位组成，其中 B 亚单位（UreB）为尿素酶活性亚基，在各菌株中相对保守，研究证实 UreB 具有很强的抗原性，是较好的 *Hp* 疫苗的候选抗原。目前关于 *Hp* 的表位研究主要是针对尿素酶的 B 细胞表位开展的，研究发现针对尿素酶 B 亚单位（UreB）不同表位的单抗有的抑制尿素酶的活性，有的则增强尿素酶的活性，有学者尝试用 UreB 上部分片段来制备疫苗，产生抑制尿素酶活性的中和抗体。而目前研究表明抗 *Hp* 感染的免疫保护是由 CD4⁺T 淋巴细胞介导的，因此采用免疫手段预防和治疗 *Hp* 感染必须激发机体的 CD4⁺T 淋巴细胞免疫应答，但遗憾的是目前还未有人鉴定出 *Hp* 的 Th 细胞表位，因此本发明从鉴定 *Hp* 的尿素酶 B 亚单位的 Th 表位入手，研究预防和治疗 *Hp* 感染的方法。

本发明的思路如下：最初的研究以 BALB/c(H-2^d)小鼠为动物模型，在 BALB/c(H-2^d)小鼠的动物模型上研究 *Hp* 的表位疫苗，采用生物软件预测了 UreB 可能 H-2^d 限制性的 Th 表位，并以 CD4⁺T 淋巴细胞增殖试验进行筛选和鉴定，获得了 3 个 UreB 的 Th 表位肽。根据表位

研究的理论,存在杂合性 T 细胞表位(promiscuous T cell epitope)或通用 T 细胞表位(universal T cell epitope)的概念,即一些辅助性 T 细胞表位能够与多种 MHC-II 类分子结合,可以较少的受 MHC 分子的限制。后来又提出超型和超基序的概念,超型(HLA Supertype)是指能与一种表位肽结合的多种 HLA 分子(人的 MHC 分子),与之相对应的能与多种 HLA 结合的表位肽称为“超基序”(Supermotif),用这种超基序表位制备疫苗可以克服 MHC 限制性的问题,获得广泛的保护性。而在小鼠的遗传背景下鉴定出的表位是否也具有这种特性,本发明人又收集了 *Hp* 感染患者的外周血淋巴细胞(PBMC)作为效应细胞,观察了此 3 个表位肽对人的 PBMC 的作用,发现这 3 个表位肽也可以刺激人的 PBMC 增殖。因此本发明的表位肽可以用来研制人或小鼠用的 *Hp* 表位疫苗,并可以用来开发预防或治疗 *Hp* 感染的多肽药物。

此外本发明在鉴定 *Hp* 的 UreB 的 Th 表位基础上发明了一种基于表位肽的疫苗并提供了表位疫苗的设计方法和制备方法,动物实验表明此疫苗具有良好的免疫原性。

发明内容:

本发明经过深入而广泛的研究,对 *Hp* 的 UreB 蛋白进行计算机软件分析的基础上,选择性的合成了 7 条可能诱导机体产生 Th 细胞免疫应答的多肽,通过 CD4⁺T 淋巴细胞增殖试验,筛选出 3 个 Th 表位肽,并对其免疫特性进行评价,发现此 3 个表位肽可以在 BALB/c 小鼠体内引发针对 UreB 的特异性的应答,并且此 3 个表位肽能够刺激 *Hp* 感染者的外周血淋巴细胞增殖,可以用于人用的疫苗及药物的开发。此外获得一种基于 3 个表位肽的表位疫苗,动物实验中显示了良好的免疫原性。具体内容如下:

一、本发明第一个方面,提供了 3 个来自幽门螺杆菌(*Hp*)尿素酶 B 亚单位的辅助性 T 细胞表位肽(即 Th 表位肽)、其编码 DNA 及应用。

1、本发明涉及 7 个来自 *Hp* 的 UreB 蛋白的多肽。这些肽选自下组:具有序列表中序列 1、序列 2、序列 3、序列 4、序列 5、序列 6、序列 7 氨基酸序列的多肽,其特征为经软件预测可能为 Th 表位。

2、本发明提供了 3 个 *Hp* 的 UreB 蛋白的辅助性 T 细胞表位肽,它具有下述特征:

1) 具有序列表中序列 2、序列 3、序列 7 的氨基酸序列。

2) 将序列表中的序列 2、序列 3、序列 7 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的替换、缺失或添加而成的衍生多肽,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行替换时,通常不会改变蛋白质的功能。

3、本发明提供了编码 3 个 *Hp* 的 UreB 蛋白辅助性 T 细胞表位肽的核苷酸序列,其特征为:

- 1) 具有序列表中序列 8、序列 9、序列 10 的核苷酸序列。
- 2) 与序列表中序列 8、序列 9、序列 10 具有相同编码产物的核苷酸序列。
- 4、 本发明多肽可以用常规方法人工合成，也可以用基因工程重组方法获得。
- 5、 本发明多肽可以诱导机体产生特异性的 Th 细胞免疫应答，并且具有清除 Hp 的作用。
- 6、 含有本发明多肽编码核苷酸序列的载体，包括裸 DNA，及转入包含该核苷酸序列载体的原核或真核表达宿主均属于本发明内容。
- 7、 本发明多肽可以用于预防或（和）治疗性的疫苗组合物，其特征在于：
 - 1) 由序列表中序列 2、序列 3、序列 7 中描述的多肽及其衍生多肽组成的组。
 - 2) 此疫苗除了包含序列表中序列 2、序列 3、序列 7 中描述的多肽及其衍生多肽组成的组，还可以包含至少一个引起机体免疫应答的抗原或额外的 B 细胞或毒性 T 淋巴细胞表位(CTL 表位)，或者免疫佐剂。
- 8、 本发明还涉及预防和治疗幽门螺杆菌感染多肽药物，具有以下特征：
 - 1) 活性成分为本发明的 UreB 的表位肽，由序列表中序列 2、序列 3、序列 7 的多肽组成的组；
 - 2) 药物组合物还可含有药学上可接受的载体，所谓的载体包含药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体等，此外免疫组合物中还可以含有免疫佐剂。。
 - 3) 本发明药物可以制成注射液、片剂、粉剂、胶囊、口服液等多种形式。
 - 4) 本发明药物可以与抗生素等联合使用。
 - 5) 一旦配成本发明的组合物，可将其直接给予对象，待预防或治疗的对象可以是动物，尤其是人。
- 9、 本发明的含本发明表位肽的治疗或预防性药物组合物包括疫苗，可以经口服，皮下，静脉注射等方式应用，治疗剂量方案可以是单剂方案或多剂方案。

二、本发明的第二个方面，提供了一种基于表位肽及包含额外的一个 B 细胞表位 (SIKEDVQF) 的表位疫苗及其制备方法。

1、 本发明的疫苗为基因工程重组表位疫苗，该重组表位疫苗蛋白有氨基酸序列 1、氨基酸序列 2、氨基酸序列 3、氨基酸序列 4，其中氨基酸序列 1、氨基酸序列 2、氨基酸序列 3、为 Hp 的 UreB 蛋白的 Th 表位，氨基酸序列 4 为 Hp 的 UreB 蛋白的 B 细胞表位。

2、 上述氨基酸序列 1 为具有序列表中序列 2 的氨基酸序列或其衍生序列，氨基酸序列 2

为具有序列表中序列 3 的氨基酸序列或其衍生序列，氨基酸序列 3 为具有序列表中序列 7 的氨基酸序列或其衍生序列，氨基酸序列 4 的序列为 SIKEDVQF 或其衍生序列。

3、本发明中的疫苗，其特征在与氨基酸序列 1、氨基酸序列 2、氨基酸序列 3、氨基酸序列 4 之间的连接次序为：氨基酸序列 1—氨基酸序列 2—氨基酸序列 3—氨基酸序列 4，氨基酸序列 1—氨基酸序列 2—氨基酸序列 4—氨基酸序列 3，氨基酸序列 1—氨基酸序列 3—氨基酸序列 2—氨基酸序列 4，氨基酸序列 1—氨基酸序列 3—氨基酸序列 4—氨基酸序列 2，氨基酸序列 1—氨基酸序列 4—氨基酸序列 2—氨基酸序列 3，氨基酸序列 1—氨基酸序列 4—氨基酸序列 3—氨基酸序列 2，氨基酸序列 2—氨基酸序列 1—氨基酸序列 3—氨基酸序列 4，氨基酸序列 2—氨基酸序列 1—氨基酸序列 4—氨基酸序列 3，氨基酸序列 2—氨基酸序列 3—氨基酸序列 1—氨基酸序列 4，氨基酸序列 2—氨基酸序列 3—氨基酸序列 4—氨基酸序列 1，氨基酸序列 2—氨基酸序列 4—氨基酸序列 1—氨基酸序列 3，氨基酸序列 2—氨基酸序列 4—氨基酸序列 3—氨基酸序列 1，氨基酸序列 3—氨基酸序列 1—氨基酸序列 2—氨基酸序列 4，氨基酸序列 3—氨基酸序列 1—氨基酸序列 4—氨基酸序列 2，氨基酸序列 3—氨基酸序列 2—氨基酸序列 1—氨基酸序列 4，氨基酸序列 3—氨基酸序列 2—氨基酸序列 4—氨基酸序列 1，氨基酸序列 3—氨基酸序列 4—氨基酸序列 1—氨基酸序列 2，氨基酸序列 3—氨基酸序列 4—氨基酸序列 2—氨基酸序列 1，氨基酸序列 4—氨基酸序列 1—氨基酸序列 2—氨基酸序列 3，氨基酸序列 4—氨基酸序列 1—氨基酸序列 3—氨基酸序列 2，氨基酸序列 4—氨基酸序列 2、氨基酸序列 1—氨基酸序列 3，氨基酸序列 4—氨基酸序列 2—氨基酸序列 3—氨基酸序列 1，氨基酸序列 4—氨基酸序列 3—氨基酸序列 1—氨基酸序列 2，氨基酸序列 4—氨基酸序列 3—氨基酸序列 2—氨基酸序列 1。

4、本发明表位疫苗，其特征在于采用间隔序列作为表位之间的连接，有利于各个表位独自的发挥各自的功能。其中优选的间隔序列为两个赖氨酸（KK）。

5、表位疫苗中包含的表位的数目的增减及额外的表位的添加等都属于本专利保护的

范围。

6、表位疫苗中包含的每个表位的串联拷贝数的增加也属于本发明保护的

范围。

7、本发明提供了表位疫苗的氨基酸序列。

8、本发明提供了编码表位疫苗的核苷酸序列。

9、本发明的表位疫苗采用基因工程的方法获得。

1) 人工合成编码表位疫苗的核苷酸序列，以下用 epi 表示此表位疫苗的核苷酸序列；

2) 构建 pET22b(+)-epi 表达载体；

- 3) 将表达载体转化到 BL21 (DE3) 工程菌中, IPTG 诱导表达重组蛋白, 获得表达目的蛋白的工程菌 BL21-pET22b(+)-epi;
- 4) 纯化表达的重组蛋白, 得到纯化抗原;
- 5) 此工程菌 BL21-pET22b(+)-epi 表达的重组抗原即为 *Hp* 表位疫苗。

10、本发明的表位肽及表位疫苗可以以合成或重组表达的多肽的形式获得, 也可以是裸 DNA 疫苗, 或者是将表位肽及其表位疫苗通过重组到其他载体上获得, 如减毒沙门氏菌, 痘病毒载体, 病毒样颗粒。

11、本发明的表位疫苗具有良好的免疫原性, 在小鼠动物模型中可以诱导产生针对 Th 表位肽特异性的 Th 细胞应答以及针对 B 细胞表位的体液免疫应答, 即产生针对 B 细胞表位的抗体。

本发明的主要优点在于: 用生物信息学预测加实验鉴定的方法快速, 准确, 经济。获得的 3 个表位肽是 *Hp* UreB 来源的 Th 表位肽, 可安全有效地引起针对 *Hp* 的 CD4⁺T 淋巴细胞免疫应答。获得此 Th 细胞表位肽不仅对 *Hp* 发病机制的研究, 而且对疫苗以及治疗制剂的研制均有重要的意义。此外获得一种基于 3 个表位肽的表位疫苗, 动物实验中显示了良好的免疫原性, 特异性好, 具有良好的应用前景。

附图说明:

图 1 显示了 3 个表位肽能够刺激 rUreB 致敏的小鼠的 CD4⁺T 淋巴细胞增殖 (刺激指数 SI>2)。

图 2 显示表位肽刺激淋巴细胞分泌细胞因子的情况。

图 3 表位肽免疫 BALB/c 小鼠的脾淋巴细胞对相应免疫多肽及 rUreB 的增殖效应。

图 4 表位疫苗构建的质粒图, 图中红色标出的部分为插入的目的片段。

图 5 pET22b(+)-epi/BL21 筛选酶切鉴定结果。

图 6 pET22b(+)-epi/BL21 工程菌表达重组蛋白:

泳道 1: 蛋白 Marker;

泳道 2: 22b 空质粒菌诱导前样品;

泳道 3: 22b 空质粒菌诱导后 6h 样品;

泳道 4: 重组蛋白诱导前样品;

泳道 5-9: 分别为重组蛋白诱导后 2h-6h 样品 (箭头所示为重组蛋白)。

图 7 重组蛋白的表达形式鉴定:

泳道 1: 蛋白 Marker;

泳道 2、3: 培养基上清;

泳道 4—6: 诱导表达后细菌的超声上清;

泳道 7—9: 细菌超声后的沉淀。

图 8 重组蛋白纯化结果:

泳道 1: 22b 空质粒菌;

泳道 2: 纯化前样品;

泳道 3—5: 为纯化后的样品。

图 9 重组表位疫苗蛋白 N 端测序结果。

图 10 表位疫苗免疫小鼠的细胞免疫应答。

图 11 表位疫苗免疫小鼠诱导抗体产生。

具体实施方式:

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,应理解的是,这些实施例仅用于说明本发明而不是对本发明的限制,在本发明的构思前提下对本发明制备方法的简单改进,及对本发明表位肽的利用都属于本发明要求保护的范畴。

材料的准备

1、 重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位 (rUreB) 蛋白为本发明单位重组构建。

2、 实验动物: BALB/c 小鼠: 6-8 周龄, SPF 级, 雌性, 体重 18-22g, 购自第三军医大学实验动物中心。

3、 合成多肽: 用二甲亚砜 (DMSO) 溶解成 5mg/ml 的浓度, -70°C 保存, 临用时用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释成 0.5mg/ml 。

4、 RPMI-1640 不完全培养基: RPMI-1640 粉: 10.4g (1 包), Hepes: 2.4g, NaHCO_3 : 2g 加去离子水至 1000ml 搅匀过滤除菌, 分装冻存

5、 RPMI-1640 完全培养基: RPMI-1640 不完全培养基: 800ml, 小牛血清 200ml, 青霉素和链霉素双抗 (终浓度 1 万单位 / ml): 10ml

6、 弗氏佐剂: 弗氏完全佐剂: 石蜡油(1 份)+羊毛脂(1 份)+灭活卡介苗 1 支, 弗氏不完全佐剂: 石蜡油(1 份)+羊毛脂(1 份)

7、 LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl_2 10g 加蒸馏水至 1000ml, 调

整 pH 至 7.4，高压蒸气灭菌。

8、LB 固体培养基: 1.5g 琼脂粉加入 100ml LB 培养液中, 高压蒸气灭菌后(15 磅 20min) 倾倒平板。

9、DNA 电泳缓冲液(50×TAE) : Tris 242g, 冰乙酸 57.1ml, Na₂EDTA · 2H₂O 37.2g, 加水至 1000ml 即可, 应用浓度为 1×TAE。

10、EB 溶液: EB 贮存液(10mg/ml), 0.2g EB 溶解于 20ml H₂O 中, 混匀后于 4℃ 避光保存。

11、EB 染色液: 10μl EB 贮存液, 100ml 1×TAE 缓冲液

12、PBS 缓冲液(pH7.2): Na₂HPO₄ 14mmol , NaH₂PO₄6mmol, NaCl₂ 9g, 加蒸馏水到 1L

13、NcoI、HindIII 中国大连 Takara 公司

14、DNA maker 中国鼎国公司

15、质粒抽提试剂盒 Omega 公司

16、考马斯亮兰 R-250 快速染色系统(参考《精编分子生物学实验指南》)。染色液: 0.29g 考马斯亮兰 R-250 溶于 250 ml 下述脱色液中。脱色液: 250 ml 95%乙醇和 80 ml 冰乙酸, 加双蒸水至 1000 ml。

17、TE buffer(pH 8.0): 10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA

18、PVDF 膜转移缓冲液 (蛋白测序用): CAPS: 2.21g, DTT: 0.5g, 甲醇: 150 ml, 加双蒸水至 1000 ml, 用 NaOH 调校至 pH10.5。

19、ELISA 试剂的配制

1) 包被液: 0.05mmol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.6 : Na₂CO₃ 1.6g, NaHCO₃ 2.9g , NaN₃ 0.2g, 加蒸馏水至 1000 ml

2) 抗体稀释液: 10mmol/L PBS(pH7.3); 0.05%Tween-20; 0.5%BSA

3) 封闭液: 10mmol/L PBS(pH7.3); 2.0% BSA

4) 洗涤液: 10mmol/L PBS(pH7.3); 0.05% Tween-20

5) 底物液: 0.1mmol/L Na₂HPO₄ 5.12ml; 0.05mmol/L 柠檬酸 4.86 ml; OPD 4mg; 30% H₂O₂ 5μl; 加水至 100 ml。

实施例 1、Th 表位的筛选鉴定:

1. 1 表位肽的预测及合成

首先在 NCBI 的蛋白质数据库检索 *Hp* 的 UreB 序列, UreB 在各菌株保守, 选用其中一株 *Helicobacter pylori* 26695 (编号 NP_206872) 的 UreB 氨基酸序列进行预测, UreB 全序列共有 569 个氨基酸。采用网上的在线软件 RANKPEP 软件分析 *Hp* 的 UreB 的氨基酸序列, 筛选了 7 条可能的 Th 表位肽, 用常规的肽全人工合成法 (由北京中科亚光公司协助合成), 制备了 7 条有可能诱导机体产生 Th 应答的多肽, 纯度均在 85% 以上。合成肽的信息见表 1。

NCBI 的蛋白质数据库检索网址:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein&itool=toolbar>

RANKPEP 预测软件可在互联网上如下网址获得:

<http://mif.dfc.harvard.edu/Tools/rankpep.html>

表 1 预测获得的 UreB Th 表位的基本信息

序号	编号	序列信息	软件评分	理论分子量	实测分子量	纯度(%)
P1	U177-192	rnkwmlraaeeysmn	16.15	2012.36	2011.75	91.34
P2	U546-561	fvdgkevtskpankvs	14.73	1705.94	1706.00	89.78
P3	U229-244	sainhaldvadkydvq	14.50	1758.92	1758.50	99.08
P4	U120-135	alageglivtaggidt	12.20	1457.66	1457.95	86.94
P5	U140-157	ispqqiptafasgvttmi	10.47	1862.19	1863.00	95.60
P6	U78-92	ytgiykadigikdgk	21.78	1641.90	1642.55	99.61
P7	U237-251	vadkydvqvaihtdt	13.60	1674.84	1674.55	85.69

1.2 动物免疫:

6—8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 用重组尿素酶 B 亚单位 (rUreB) 加完全福氏佐剂 (CFA) 皮下多点注射免疫, 每只小鼠 100 μ g/0.5ml, 三周后用同样剂量的 rUreB 加不完全弗氏佐剂 (IFA) 加强免疫一次。对照组小鼠用 PBS 替代 rUreB 进行免疫, 免疫方法及程序相同。

1.3 CD4⁺T 淋巴细胞增殖实验鉴定表位肽

小鼠末次免疫后 10—15 天脱臼处死, 无菌取出小鼠脾脏, 钢网上碾磨制备脾单细胞悬液, 用小鼠淋巴细胞分离液 (天津 TBD 公司) 分离小鼠的单个核细胞, 然后再用免疫磁珠阴性选择的方法 (DynaI 公司的试剂盒) 分离小鼠脾细胞中 CD4⁺T 淋巴细胞, 操作按照试剂盒说明书进行。分离后的 CD4⁺T 淋巴细胞用 PE 标记的抗小鼠 CD4 单抗、FITC 标记的抗小鼠 CD3 单抗进行染色, 流式细胞计数鉴定纯度大于 95%。用 RPMI-1640 完全培养基悬浮细胞,

于 96 孔平底培养板，每孔加入 CD4⁺T 淋巴细胞 2×10^5 ，Co⁶⁰ 照射（射线剂量：20Gy）的脾单个核细胞（作为抗原提呈细胞） 4×10^5 ，同时加入稀释好的合成多肽（终浓度为：1.25 μ g/ml），阴性对照孔不加合成多肽，阳性对照孔加入 rUreB（终浓度为：15 μ g/ml），同时设立 CD4⁺T 淋巴细胞加合成多肽及 APC 加 ConA 的对照孔，终体积为 200 μ l/孔，每组做 3 个平行孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养 5 天，于结束培养前 12—16 小时加入氚标记脱氧嘧啶核苷酸 (³H-TdR)，1 μ Ci/孔，继续培养 12—16 小时后用多头细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤纸上，烘干后用 Beckman 液闪计数器测定每分钟脉冲数 (cpm)，计算 3 个复孔的均值 ($\bar{x} \pm s$)，结果以刺激指数 (SI) 表示 (SI = 实验组 cpm 均值 / 阴性对照组 cpm 均值，阴性对照指不加抗原肽刺激的孔)，SI ≥ 2 为阳性。

结果：采用免疫磁珠阴性分选试剂盒进行 CD4⁺T 淋巴细胞的分离，分离后的 CD4⁺T 淋巴细胞经流式鉴定纯度达到 95% 以上。分离的 CD4⁺T 淋巴细胞与 Co⁶⁰ 照射脾单个核细胞及合成多肽共同培养，发现 P2 (U₅₄₆₋₅₆₁)、P3 (U₂₂₉₋₂₄₄)、P7 (U₂₃₇₋₂₅₁) 能够刺激 rUreB 致敏的 BALB/c 小鼠脾脏的 CD4⁺T 淋巴细胞增殖 (SI > 2)。CD4⁺T 淋巴细胞活化增殖需要时别的是抗原提呈细胞表面的 MHC II 与表位肽的复合物，脾单个核细胞在此作为抗原提呈细胞 (APC) 辅助多肽刺激 CD4⁺T 淋巴细胞增殖，Co⁶⁰ 照射可以抑制细胞的增殖，用 ConA 刺激 Co⁶⁰ 照射的 APC，不能使其增殖，说明培养体系中增殖的为 CD4⁺T 淋巴细胞。在 CD4⁺T 淋巴细胞增殖试验时同时还设立了 CD4⁺T 淋巴细胞加抗原的对照，发现缺乏 APC 的情况下 CD4⁺T 淋巴细胞也不能增殖。说明此 3 个多肽刺激淋巴细胞增殖不是非特异性反应，而是 UreB 抗原特异性的。在免疫小鼠时设立了佐剂免疫的对照组，同时进行了 CD4⁺T 淋巴细胞增殖试验，发现 P2 (U₅₄₆₋₅₆₁)、P3 (U₂₂₉₋₂₄₄)、P7 (U₂₃₇₋₂₅₁) 能够刺激 rUreB 免疫的小鼠淋巴细胞增殖，而不能刺激佐剂免疫小鼠的淋巴细胞增殖 (SI < 2)，见图 1。此结果说明此三个多肽能刺激 CD4⁺T 淋巴细胞增殖，并且是 UreB 特异性的。

实施例 2：ELISA 方法检测表位肽诱导 Th 细胞极化方向：

取 rUreB 免疫小鼠的脾细胞，分离脾 CD4⁺T 淋巴细胞，用 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞，于 24 孔平底培养板，每孔加入 CD4⁺T 淋巴细胞 5×10^5 ，Co⁶⁰ 照射 (20Gy) 的脾单个核细胞（作为抗原提呈细胞） 5×10^5 ，同时加入稀释好的合成多肽（终浓度 1.25 μ g/ml），阴性对照孔不加合成多肽，终体积为 0.5ml/孔，每组做 3 个平行孔。于合成表位肽刺激的小鼠脾淋巴细胞后 72 小时收集培养上清 400 μ l、置于 -70 $^{\circ}$ C 备用。采用 eBIOSCIENCE 公司的 Th1/Th2 分型试剂盒检测细胞因子。具体步骤如下：用伽马干扰素 (IFN- γ)、白介素 4 (IL-4)、白介素 2 (IL-2)、白介素 10 (IL-10) 捕获单抗包被酶标板，4 $^{\circ}$ C 过夜，洗涤液洗涤 3 次，用

封闭液封闭，室温 1h，洗涤 3 次，备用。检测时，每孔加入 100 μ l 待测培养上清及倍比稀释的标准品，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h，洗板 5 次，加入 100 μ l 的生物素标记的检测抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，洗板 5 次，再加入 100 μ l HRP 标记的亲合素，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 洗板 7 次，加入 100 μ l TMB 底物，室温放置 15min，最后加入 50 μ l 终止液，在波长 450nm 及 570nm 处分别测吸光度值 (A)，结果用 $A_{450} - A_{570}$ 表示。

结果：P2 (U₅₄₆₋₅₆₁)、P3 (U₂₂₉₋₂₄₄) 分泌的 IL-4 和 IL-10 均显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$)，为 Th2 型表位，P7 (U₂₃₇₋₂₅₁) 分泌 IFN- γ 显著高于阴性对照组，($P < 0.05$)，为 Th1 型表位。(见图 2)。目前关于 *Hp* 的致病机理公认的是 Th1 细胞在致病过程中起主要作用，对于免疫保护机制目前还不清楚，有的认为是 Th1 型免疫应答起主要作用，有的认为是 Th2 应答起主要作用，但目前多倾向于两者的协同作用，引发 Th1/Th2 平衡的免疫应答有利于 *Hp* 感染的免疫保护。因此鉴定出 Th1/Th2 表位对于研究致病机理及免疫保护机制，及疫苗的设计有重要的指导作用。

实施例 3：表位肽协同刺激效应

具体操作同实施例 1，不同点为除采用单独的合成表位肽刺激淋巴细胞外，还用筛选出的 3 个表位肽两两平均混合及全部混合作为刺激原刺激淋巴细胞增殖，表位肽最终的总浓度为 1.25 μ g/ml，其余步骤相同，比较表位肽组合后的刺激效应与单独的表位肽的刺激效应是否有差别。

结果：三个表位肽两两组合及三个混合的刺激效果均高于单独的表位肽刺激（见表 2），提示在后续的疫苗设计中可以将此三个表位进行组合。

表 2. 表位肽的协同刺激效应

表位肽	cpm 值
P2	1723 \pm 128
P3	1836 \pm 202
P7	2103 \pm 264
P2+P3	4065 \pm 463
P2+P7	3861 \pm 253
P3+P7	3623 \pm 321
P1+P2+P3	3860 \pm 167
对照	824 \pm 124

实施例 4：表位肽免疫 BALB/c 小鼠的免疫效应

主要观察机体针对表位肽产生的免疫应答是否能够识别 *Hp* 的 UreB，进一步确证此三个肽是否为 UreB 的表位肽。

4.1 表位肽免疫：

用合成的表位肽加不完全弗氏佐剂（IFA）尾根部及足掌多点皮下免疫 BALB/c 小鼠，间隔 14 天加强免疫一次，共免疫三次。同时设立 PBS 对照免疫组，每组 10 只小鼠。

4.2、免疫效应检测：

表位肽末次免疫后 10 天取小鼠脾脏，用小鼠淋巴细胞分离液分离小鼠的淋巴细胞，用 RPMI-1640 完全培养基调整细胞浓度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ ，于 96 孔板每孔加入 $100\mu\text{l}$ ，再加入 $100\mu\text{l}$ 稀释好的多肽（终浓度为 $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ ）及 rUreB（终浓度为 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ ），阴性对照孔不加合成多肽，终体积为 $200\mu\text{l}/\text{孔}$ ，每组做 3 个平行孔。37℃、5%CO₂ 孵箱培养 5 天，于结束培养前 12—16 小时加入 ³H-TdR， $1\mu\text{Ci}/\text{孔}$ ，继续培养 12—16 小时后用多头细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤纸上，烘干后用 Beckman 液闪计数器测定每分钟脉冲数（cpm），计算 3 个复孔的均值 ($\bar{x} \pm s$)，结果以刺激指数（SI）表示（SI=实验组 cpm 均值/阴性对照组 cpm 均值，阴性对照指不加抗原肽刺激的孔），SI≥2 为阳性。

结果：3 个表位肽均能刺激小鼠产生针对各自免疫多肽及 rUreB 的细胞免疫应答（SI>2），见图 3。

实施例 5：表位肽免疫小鼠后细胞免疫应答的类型

常规无菌取脾细胞后，2000 转离心，弃上清，于细胞沉淀中加入 5ml 红细胞裂解液（0.83% 的氯化铵），吹打混匀后室温放置 2 分钟去除红细胞，用含 2% 牛血清白蛋白（BSA）的 PBS 洗涤 2 遍，调整细胞浓度为 $10^7/\text{ml}$ ，分别取 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液置于两个 EP 管中，试验管加入 PE 标记的抗小鼠 CD4 抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD3 抗体，对照管加入 PE 及 FITC 标记的同型抗体，冰上避光孵育 30min 染色，洗涤 2 次，最后用 $500\mu\text{l}$ 含 2%BSA 的 PBS 重悬，流式细胞仪检测。

结果：表位肽免疫组小鼠，其 CD4⁺T 淋巴细胞的比例均显著高于 PBS 对照组的 CD4⁺T 淋巴细胞比例，提示表位肽免疫后能够促进 CD4⁺T 淋巴细胞增殖。结果见表 3。

表 3 表位肽免疫小鼠后细胞免疫应答的类型

	CD4 ⁺ T 细胞 (%)
对照	21.03±2.12
P1	30.45±3.24*
P2	29.87±2.69*
P3	38.94±1.25*
P1+P2+P3	32.25±3.24*

*表示与对照组相比，差异显著，P<0.05

实施例 6：表位肽口服免疫 BALB/c 小鼠免疫保护效力

6.1 表位肽口服免疫

6—8 周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠随机分成两组，每组 30 只，免疫组将 3 个表位肽等量混合后，加霍乱毒素 B 亚单位(CT-B)佐剂免疫，对照组用 PBS 免疫，剂量为 150 μ g/只/次。

6.2 免疫程序：小鼠免疫前禁食、水 24 小时，饲喂针灌喂胃酸中和液 0.3ml，20 分钟后，按各组要求灌喂总体积 0.3ml、PBS 溶解的抗原和佐剂，免疫时间为 0、1、2、4 周。

6.3 *Hp* 的液体培养：混配 SS1 菌株接种到脑心浸液血琼脂平板，通过抽气换气建立微需氧环境（10%CO₂，5%O₂，85%N₂）37℃培养 2 天，从平板上刮取菌苔，混悬于无菌生理盐水，以麦氏标准比浊管第一管为标准配成浓度为 3 \times 10⁸ 个 / ml 的菌悬液，迅速取 2ml 接种于 200ml 无菌 *Hp* 培养肉汤，微需氧环境及 37℃振荡（120 转 / 分钟）培养，培养 24h 后，取出培养液，每分钟 3000 转的速度离心 5 分钟，保留上清 20ml，充分混悬细菌，立即饲喂针灌喂小鼠。

6.4 *Hp* 攻毒：于末次免疫后 2 周，免疫组与对照组均用 *Hp* SS1 株菌液进行灌喂，所有小鼠提前 24h 断食、断水，每只灌胃 0.3ml、约 10⁸ CFU 菌液，上下午各一次，间隔 6 小时，末次灌胃后 2 小时进食水。

6.5 取样：在末次攻毒后的第 4 周，宰杀免疫及对照小鼠各 15 只，处死前 24 小时断食水，眼球放血，分离血清；取出鼠胃，沿胃大弯剖开，用生理盐水轻轻冲掉胃内残留物，将一半胃粘膜组织涂布 *Hp* 培养基，三线法划线接种，微需氧培养 3—7 天，每天开罐检查，如有可疑菌落生长，通过菌落特点、细菌形态及染色性、快速脲酶试验进行 *Hp* 鉴定，将另一半胃粘膜分别进行尿素酶试验和直接涂片，革兰氏染色镜检。

6.6 结果判定及免疫保护率的计算：

若培养的平板上出现圆形、半透明、湿润的可疑菌落，经涂片、革兰氏染色镜检，见革兰氏阴性螺杆菌状细菌，且尿素酶试验阳性，判定该只小鼠有 *Hp* 感染定植；若胃粘膜直接涂片染色镜检，见革兰氏阴性螺杆菌状细菌，且尿素酶试验阳性，亦判定该只小鼠有 *Hp* 感染定植。判定本实验结果有效的前提条件为：未免疫接种对照组感染率达到 80% 以上，且每组小鼠的存活数在 12 只以上。

感染率（%）=（每组感染小鼠数 / 每组存活小鼠数） \times 100%

保护率（%）=（每组未感染小鼠数 / 每组存活小鼠数） \times 100%

结果：PBS 对照组，感染率达到 90% 以上，表位肽口服免疫组，*Hp* SS1 标准菌株攻毒

后，4周免疫保护率菌为70%，免疫组与对照组相比差异显著，结果提示，表位肽口服免疫小鼠对Hp感染有一定的保护作用。但是由于多肽单独分子量小，在体内易降解，而致免疫原性差，导致在本实验中保护率仅为70%，但是仍然可以说明本发明表位肽对于抗Hp感染具有保护作用，可以通过后续的疫苗设计，使其恢复大分子特性，增加免疫原性等方法，可以达到更好的保护效果。

表4：表位肽免疫的保护效果

组别	实验动物数量	感染数量	未感染数量	感染率	保护率
表位肽免疫组	30	9	21	—	70%
PBS组	30	28	2	93.3%	—

实施例7：表位肽诱导Hp感染患者外周血淋巴细胞增殖

5例Hp感染病人外周血收集自重庆西南医院，均经过胃镜检确诊为Hp感染。5例健康献血者的外周血作为对照，均为无菌采集，用人淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞（PBMC）在液氮中保存备用。

淋巴细胞增殖试验：

5例Hp感染者及5例健康者PBMC用RPMI-1640完全培养基（含10%小牛血清、2mM L-谷氨酰胺、50μM二巯基乙醇及链霉素、青霉素双抗）调整细胞浓度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ ，于96孔板每孔加入100μl，再加入100μl稀释好的多肽（终浓度为1.25μg/ml）及rUreB（终浓度为15μg/ml），阴性对照孔不加合成多肽，终体积为200μl/孔，每组做3个平行孔。37℃、5%CO₂孵箱培养5天，于结束培养前12—16小时加入³H-TdR，1μCi/孔，继续培养12—16小时后用多头细胞收集将细胞器收集于玻璃纤维滤纸上，烘干后用Beckman液闪计数器测定每分钟脉冲数（cpm），计算3个复孔的均值（ $\bar{x} \pm s$ ），结果以刺激指数（SI）表示（SI=实验组cpm均值/阴性对照组cpm均值，阴性对照指不加抗原肽刺激的孔），SI≥2为阳性。

结果：在收集的5例Hp感染患者的PBMC的淋巴细胞增殖试验中，P2、P7能够刺激3例患者的PBMC发生增殖反应，P3能刺激2例患者的PBMC发生增殖反应，而P2、P3、P7均不能刺激健康者的PBMC发生增殖（SI<2），见表5。提示我们的表位肽具有开发人用疫苗的潜能。

表位功能要受到MHC限制性，人的MHC分子又称为HLA，具有很多型别，我们的表位多肽不能完全刺激5例患者的PBMC的淋巴细胞增殖试验，可能是由于HLA型别不匹配，进一步研究5例患者的HLA型别，可以了解3个表位肽的HLA限制性特征，在人用疫苗的

研制过程中可以将其合理组合，使疫苗具有广泛的 HLA 限制性，能够在多数人群中起到保护作用。

表 5 表位肽刺激人外周血淋巴细胞增殖

病人	刺激指数 (SI)		
	P2	P3	P7
1	3.14	0.76	3.75
2	2.39	4.21	1.69
3	1.56	2.96	1.48
4	4.51	1.56	3.32
5	0.81	0.69	3.58
对照 1	0.65	1.65	0.69
对照 2	0.98	0.67	1.57
对照 3	1.36	1.34	1.68
对照 4	0.85	0.97	0.95
对照 5	1.49	1.26	1.02

实施例 8：表位疫苗的设计、构建、表达

1、表位疫苗的设计

将 3 个优选的 Th 细胞表位肽与文献报道的一个来自 UreB 的 B 细胞表位 SIKEDVQF（参见文献：Hirota K.; Nagata K.; Norose Y.; Futagami S.; Nakagawa Y.; Senpuku H.; Kobayashi M.; Takahashi H. (2001). 鉴定幽门螺杆菌的尿素酶的一个可以诱导产生中和抗体的抗原表位 感染与免疫 69, 6597 - 6603.）串联连接起来，表位之间以两个赖氨酸（KK）间隔，KK 是组织蛋白酶 B 的切割位点，在各表位之间加入 KK 间隔序列有利于 Th 表位肽的体内切割，以使各个表位单独发挥效应，并且避免在表位的连接处产生新的结合表位。（参见文献：Yano A.; Onozuka A.; Asahi-Ozaki Y.; Imai S.; Hanada N.; Miwa Y.; Nisizawa T. 一种肽疫苗的巧妙的设计方法 疫苗学 23 (2005) 2322-2326）

构建的疫苗形式如下：

Th 细胞表位（P7—P3—P2）—B 细胞表位（SIKEDVQF）

氨基酸序列如下：

VADKYDVQVAIHTDTKKSAINHALDVADKYDVQKKFVDGKEVTSKPANKVSKKKSI
KEDVQF

2、表位疫苗基因（epigen，简称 epi）的合成：

采用大肠杆菌的优势密码子，将上述构建的疫苗的氨基酸序列转化为核酸序列，两端分别加入酶切位点 NcoI 和 HindⅢ，并对核酸序列进行酶切位点分析，核酸序列自身并无 NcoI 和 HindⅢ酶切位点，共 195 个 bp 表达蛋白部分 186 个 bp，序列如下（其中划线部分为酶切位点）：

NcoI

CCATGGTGGCGGATAAATATGATGTGCAGGTGGCGATCCACACCGATACCAAAAAAAGC
GCGATTAACCACGCGCTGGATGTGGCGGATAAATATGATGTGCAGAAAAAATTTGTGGAT
GGCAAAGAAGTGACCAGCAAACCGGCGAACAAAGTGAGCAAAAAGAGCATTAAAGAA
GATGTGCAGTTT TAAGCTT

Hind□

采用 NcoI 和 Hind□两个酶切位点将全基因连接至 pET22b(+)载体上, 可以利用此载体上的信号肽, 以期望目的蛋白以可溶形式表达, 有利于保持蛋白的活性和抗原性。插入的 DNA 片段带有终止密码子(TAA)插入在载体 His 标签前可以去除 His 标签。全基因序列合成委托 (Genray) 公司完成。构建图见图 4, 合成全基因以质粒形式提供, 质粒名称命名为: pET22b(+)-epi。

3. 感受态菌的制备(CaCl₂法):

[1] 无菌接种环蘸取-70℃冻存的细菌保种液, 三线法划线接种于 LB 平板, 37℃培养 12~16 小时。

[2] 挑取单个菌落接种于 5ml LB 培养液中, 37℃摇床过夜培养。

[3] 将过夜培养的 BL21 按 1%比例转种至 10ml LB 培养基中, 37℃摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.4 时, 取 4ml 菌液转移到 5ml 离心管中, 冰浴 10min,

[4] 5000 转离心 10min, 弃上清。

[5] 加入 1ml 冰预冷的 0.1M CaCl₂ 重悬沉淀, 冰水浴 1h。5000 转离心 10min, 弃上清。加入 100μl 冰预冷的 0.1M CaCl₂ 悬浮沉淀, 冰水浴 1h, 备用。

4. 质粒 pET22b(+)-epi 的转化 (热休克法)

[1] 取感受态菌液 100μl, 转化管加入质粒 pET22b(+)-epi 10μl; 对照管不加质粒。冰水浴 45min, 42℃水浴热休克 90s, 迅速放置冰水浴 2min。

[2] 加 100μl LB 培养液, 37℃摇床培养复苏 1h。

[3] 各取 50μl 涂布 Amp⁺-LB 平板, 37℃孵箱培养过夜。

5 Amp⁺-LB 平板筛选转化成功的细菌

LB 平板上 BL21 布满细菌, Amp⁺-LB 平板 BL21 阴性对照无菌落生长; 挑取转化平板上分隔良好的单个菌落接种于 7ml Amp⁺-LB 培养液中, 37℃摇床培养过夜。取 4ml 抽提质粒。

6. 质粒 DNA 抽提 (使用美国 Omega 公司质粒抽提试剂盒)

[1] 取 4ml 菌液于 5ml 离心管中, 12000g 离心 2min, 留取沉淀。

[2] 每管加 250μl Solution I 悬浮, 充分混匀。

[3] 加入 250μl Solution II, 轻柔颠倒混匀 4-6 次。

[4] 加入 350 μ l Solution III, 轻柔颠倒混匀 4-6 次。

[5] 4 $^{\circ}$ C、12000g 离心 10min, 将上清移至分离柱中。

[6] 12000g 离心 1min, 倾倒收集管中的废液。

[7] 加入 500 μ l Hb buffer 于分离柱中, 12000g 离心 1min, 倾倒收集管中的废液。

[8] 加入 750 μ l DNA wash buffer (加入无水乙醇), 12000g 离心 1min, 重复一次。空柱离心 12000g, 2min。

[9] 室温放置 5-10min, 使乙醇完全挥发。

[10] 将分离柱置于另一干净 1.5ml 的 Ep 管中并加入 50 μ l 的 ddH₂O(55 $^{\circ}$ C 预温), 12000g 离心 1min。收集洗脱液即为抽提的质粒, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

7、质粒双酶切鉴定:

用 NcoI 和 HindIII 双酶切鉴定, 酶切体系如下:

质粒 7 μ l,

NcoI 0.5 μ l,

HindIII 0.5 μ l,

10 \times buffer (K) 1 μ l,

1%BSA 1 μ l ,

混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2h, 2%的琼脂糖凝胶电泳观察酶切结果。

质粒大小和切下的片段在大约 200bp 处, 大小与预期值 (195bp) 相符, 见图 5。

8、IPTG 诱导重组工程菌 BL21(DE3)表达:

取鉴定无误的重组菌接种于 3mL 含 Amp 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。次日将过夜培养的重组工程菌按 1%的比例转种于 10mL 含 Amp 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养, 待 OD₆₀₀ 约 0.6—1.0 时, 加入 IPTG 诱导, 终浓度为 0.5mM, 分别留取诱导前和诱导后 2、3、4、5、6h 的菌液标本, 并测定 OD₆₀₀ 值; 同时诱导空载体 pET22b/BL21 (DE3), 并留取诱导前后标本作为对照。

10、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-SDS-PAGE) 检测重组蛋白的表达

样本处理: 按公式: 菌液量 (ml) = 1 / OD₆₀₀ 取样离心, 弃上清, 收集细菌沉淀加入 100 μ l ddH₂O 和 100 μ l 2 \times 上样 buffer, 重悬混匀, 煮沸 10min, 1000g 离心 3min 后取上清备用。

配置 16% Tricine-SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶, 配方如表 6。待凝胶完全聚合后, 拔出

上样梳，用阴极电泳缓冲液清洗上样孔并用滤纸吸干孔内液体。将待测样本与蛋白 Marker 上样，60V 电泳 1h，100V 3h，凝胶于考马斯亮蓝 R250 染色液中染色 1h，脱色液脱色至背景无色。

表 6、 16% Tricine—SDS-PAGE 胶配方

	分离胶(ml)	浓缩胶(ml)
45%丙烯酰胺	3.56	0.24
Tris cl (pH: 8.45)	3.2	0.744
30%甘油	1.06	--
10%过硫酸铵	0.1	0.02
TEMED	0.004	0.002
H ₂ O	2.08	0.992

重组工程菌 BL21-pET22b(+)-epi 经 IPTG 诱导后，进行电泳观察蛋白表达情况，与对照相比目的蛋白有表达，见图 6。

11、 重组蛋白表达形式鉴定：

超声破菌：超声波裂解菌体，功率 300W，超声 10s，间歇 10s，工作 90 次。取样染色后于显微镜下观察破菌效果，未破细菌 < 2 个/油镜视野为裂菌完全。750g × 30min 离心去掉未破细菌，上清经 12000g × 30min 高速离心，分离上清和沉淀。分别取沉淀及上清做 Tricine-SDS-PAGE 电泳。电泳结果显示重组蛋白要是在超声上清中以可溶形式表达。见图 7。

12、 重组蛋白的纯化：

经 DNASIS 软件预测分析，重组蛋白等电点为 9.53，采用阴离子层析与阳离子层析相结合的方法纯化

[1] 阴离子柱纯化：选择阴离子柱 HiTrap Q 进行纯化，A 液使用 10mmol/L NaHCO₃，PH10B 液采用 10mmol/L NaHCO₃+1M NaCl。

[2] 离子柱纯化：采用 Sepharose SP 阳离子柱，A 液使用 10mmol/L PB，pH6.0，B 液采用 10mmol/L PB+1M NaCl。

[3] 纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE，检定其纯度

结果：纯化的蛋白纯度在 95% 以上，见附图 8。

13、 目的蛋白的 N 端测序

1) 16% 的 Tricine—SDS-PAGE 分离纯化的目的蛋白。

2) 取出 PVDF 膜，用甲醇浸泡数秒，然后放入 CAPS 电转移缓冲液中。

- 3) 取出电泳凝胶，在 CAPS 缓冲液中浸泡 5—10 分钟。
- 4) 将用于电转移的滤纸和海绵放入 CAPS 缓冲液中浸泡，然后按海绵、滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸、海绵的次序将转印夹层装好。
- 5) 将转印夹层插入转移装置，PVDF 膜靠近阳极。用 CAPS 转移缓冲液充满转移槽，在 50V 恒压下电转移 3h。
- 6) 小心取下 PVDF 膜，用去离子水漂洗后，用甲醇浸泡数秒钟，然后用含 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 的 50% 甲醇染色 1min，用含 10% 乙酸的 50% 甲醇脱色至背景清晰为止，用去离子水充分漂洗。

⑥用刀片将目标蛋白条带切下，送中国医学科学院基础医学研究所中心实验室测序 N 端的 5 个氨基酸。

结果：测序报告见图 9，如图所示每个循环都有两个氨基酸同时发生反应，提示样品中存在两种不同 N 末端的肽链。分析表明，这两种肽链是一种蛋白质，其中一部分的 N 末端第一个残基 M 消失，并未观察到其他蛋白质肽链的存在。结论：测序结果 N 端 6 个氨基酸为 MVADKY，与重组表位疫苗蛋白的 N 端序列完全一致。

实施例 9：表位疫苗的免疫效应观察

1、福林（folin）—酚试剂法（也称 Lowry 法）测定纯化蛋白浓度：

- 1) Lowry 蛋白浓度检测试剂（由本校生化教研室提供），
- 2) 样品准备：首先将纯化的蛋白样品 2 倍、5 倍、10 倍稀释，于试管中每管加入 500 μ l；标准管加入标准品（牛血清白蛋白：250 μ g/ml）500 μ l，空白管加双蒸水 500 μ l；均做复管；
- 3) 加入甲试剂（有甲试剂 A 与甲试剂 B 50：1 的比例混合而成）每管 2.5ml，混匀室温放置 10min；
- 4) 加入乙试剂，每管 250 μ l，室温放置 30min；
- 5) 紫外分光光度计检测波长 650nm 处的吸光度，以空白管调零。
- 6) 结果绘制标准曲线，获得标准曲线的回归方程，将样品值待入公式计算样品，取复管的均值为最后浓度。

结果：标准曲线方程： $Y = 0.0021X + 0.0056$

纯化蛋白浓度为 1.45mg/ml。

2、动物免疫

2.1 分组：分为三组，具体见表 7。

表 7 动物分组

组别	数量	抗原	剂量
PBS 对照组	30	PBS	
空载体对照	30	空载体重组菌全菌蛋白	100 μ g/0.5ml/只
表位疫苗免疫组	30	重组表位疫苗蛋白	

2.2 免疫程序

首次采用抗原加完全福氏佐剂免疫,间隔2周采用相同抗原加不完全福氏佐剂加强免疫,于第二次免疫后十天剖杀15只小鼠,检测细胞免疫应答。于免疫四次后第七天取剩下小鼠的血液上清检测抗体水平。

3、细胞免疫应答检测:具体操作同实施例4.2,在本实施例中采用P2、P3、P7及表位疫苗蛋白及重组UreB蛋白作为刺激原,观察淋巴细胞的增殖反应。

结果:P2、P3、P7、表位疫苗重组蛋白及重组UreB蛋白均能刺激表位疫苗免疫的小鼠的淋巴细胞增殖(SI>2),见图10。表明本发明构建表达的表位疫苗重组蛋白免疫小鼠可以引发针对P2、P3、P7三个Th表位肽的细胞免疫应答,表明本发明构建的表位疫苗的方法可以使包含的表位各自发挥效应。并且本发明的表位疫苗可以识别UreB蛋白。

4、酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测抗体的产生:

采用rUreB、*Hp*全菌蛋白、重组表位疫苗蛋白包被的ELISA板检测表位疫苗免疫的血清中的抗体。步骤如下:

- 1) 酶标板的预处理:将新购酶标板用双蒸水浸泡过夜,晾干后备用。
- 2) 用包被液将抗原稀释为合适的浓度:rUreB为2 μ g/ml,*Hp*全菌蛋白及重组表位疫苗蛋白为5 μ g/ml,
- 3)包被:酶标板加100 μ l/孔上述抗原液,4 $^{\circ}$ C过夜,洗涤液洗涤5遍,空干。
- 4) 封闭:加封闭液300 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜,洗涤5遍,空干,密封4 $^{\circ}$ C保存备用。
- 5) 采血及稀释:小鼠眼眶取血,离心取上清用抗体稀释1:1000倍稀释。
- 6) 取包被好的酶标板,加入依次稀释血清100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C水浴30min,洗涤4遍,空干。
- 7) 加辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体工作液(1:20000稀释)100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C水浴30min,洗涤4遍,空干。
- 8) 加底物显色液100 μ l/孔,室温避光反应5~10min。
- 9) 加终止液50 μ l/孔,立即在酶标仪上以492nm波长测定OD值
- 10) 结果判断:OD值大于或等于阴性对照(小鼠免疫前血清1:10倍稀释)的2.1倍时视为抗体阳性。

结果:如图11,表位疫苗免疫组的血清能够与表位重组蛋白及重组UreB蛋白及*Hp*全

菌蛋白反应，而空载体免疫对照组及 PBS 对照组不能与上述抗原反应。说明本发明构建的表位疫苗诱导小鼠产生的抗体能够特异性的识别表位重组蛋白、重组 UreB 蛋白及 *Hp* 全菌蛋白。

根据以上实验可证明，本发明中的 Th 表位多肽具有诱导 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞及人的外周血淋巴细胞增殖的能力，并且能够对 *Hp* 的感染起到保护作用。本发明的表位疫苗利用了本发明的 Th 表位多肽及一个额外的 UreB 的 B 细胞表位肽，实验验证具有良好免疫原性，能够诱导机体的细胞与体液免疫应答，表明本发明的表位疫苗的构建策略是成功的。

本发明的表位疫苗是本发明的多肽在疫苗研制中的一种应用的实施举例，而不是本发明多肽在疫苗研制领域应用的限制，其它利用了本发明多肽的氨基酸序列或 DNA 序列的疫苗也属于本发明的保护范围；本发明的多肽具有抗 *Hp* 感染的作用，用来研制预防性或治疗性多肽药物或免疫制剂。

此外，这里提供的实施方案应看作是举例说明而非限制性的，在阅读了本发明的上述内容之后，本领域技术人员在不违反前面充分阐述的本发明的实质或范围条件下，可对本发明的实施方案做各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

序列 1:

<110> 中国人民解放军第三军医大学

<120> 幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的 Th 表位肽、其编码 DNA、疫苗及其应用

<130>

<160> 12

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)

<220>

<230> 源自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的多肽

<400> 1

Arg Asn Leu Lys Trp Met Leu Arg Ala Ala Glu Glu Tyr Ser Met Asn

1

5

10

15

序列 2:

<210> 2

序列 5:

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> 幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori)

<220>

<230> 源自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的多肽

<400> 5

Ile Ser Pro Gln Gln Ile Pro Thr Ala Phe Ala Ser Gly Val Thr Thr

1

5

10

15

Met Ile

序列 6:

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori)

<220>

<230> 源自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的多肽

<400> 6

Tyr Thr Gly Ile Tyr Lys Ala Asp Ile Gly Ile Lys Asp Gly Lys

1

5

10

15

序列 7:

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori)

<220>

<230> 源自幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的 Th 表位肽

<400> 7

Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln Val Ala Ile His Thr Asp Thr

1 5 10 15

序列 8:

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<230> 根据大肠杆菌的优势密码子合成的编码表位肽的核苷酸序列

<400> 8

ttt gtg gat ggc aaa gaa gtg acc agc aaa ccg gcg aac aaa gtg agc

Phe Val Asp Gly Lys Glu Val Thr Ser Lys Pro Ala Asn Lys Val Ser

1 5 10 15

序列 9:

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<230>根据大肠杆菌的优势密码子合成的编码表位肽的核苷酸序列

<400> 9

agc gcg att aac cac gcg ctg gat gtg gcg gat aaa tat gat gtg cag

Ser Ala Ile Asn His Ala Leu Asp Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln

1 5 10 15

序列 10:

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<230> 根据大肠杆菌的优势密码子合成的编码表位肽的核苷酸序列

<400> 10

gtg gcg gat aaa tat gat gtg cag gtg gcg atc cac acc gat acc

Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln Val Ala Ile His Thr Asp Thr

1

5

10

15

序列 11:

<210> 11

<211> 186

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<230> 根据大肠杆菌的优势密码子合成的编码表位疫苗的核苷酸序列

<400> 11

atg gtg gcg gat aaa tat gat gtg cag gtg gcg atc cac acc gat acc aaa aaa agc gcg60

Met Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln Val Ala Ile His Thr Asp Thr Lys Lys Ser Ala

1

5

10

15

20

att aac cac gcg ctg gat gtg gcg gat aaa tat gat gtg cag aaa aaa ttt gtg gat ggc 120

Ile Asn His Ala Leu Asp Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln Lys Lys Phe Val Asp Gly

25

30

35

40

aaa gaa gtg acc agc aaa ccg gcg aac aaa gtg agc aaa aag agc att aaa gaa gat gtg 180

Lys Glu Val Thr Ser Lys Pro Ala Asn Lys Val Ser Lys Lys Ser Ile Lys Glu Asp Val

45

50

55

60

cag ttt

186

Gln Phe

62

序列 12:

<210> 12

<211> 62

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用两个赖氨酸（Lys Lys）接头将4个来自幽门螺杆菌（*helicobacter pylori*）的表位连接成的表位疫苗

<400> 12

Met Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln Val Ala Ile His Thr Asp Thr

1 5 10 15

Lys Lys Ser Ala Ile Asn His Ala Leu Asp Val Ala Asp Lys Tyr Asp

20 25 30

Val Gln Lys Lys Phe Val Asp Gly Lys Glu Val Thr Ser Lys Pro Ala

35 40 45

Asn Lys Val Ser Lys Lys Ser Ile Lys Glu Asp Val Gln Phe

50 55 60

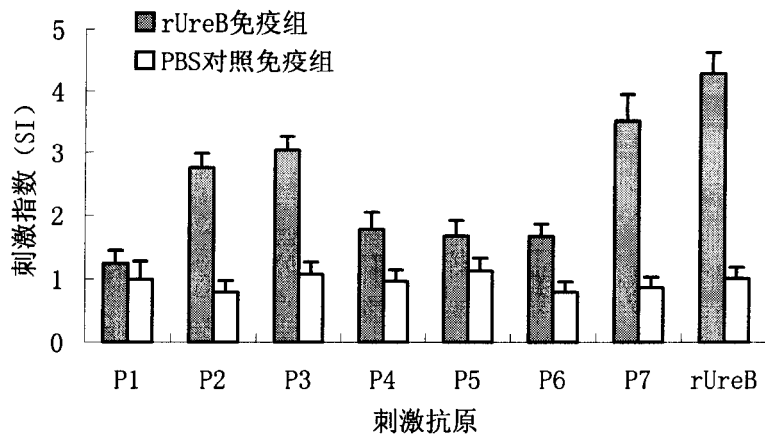
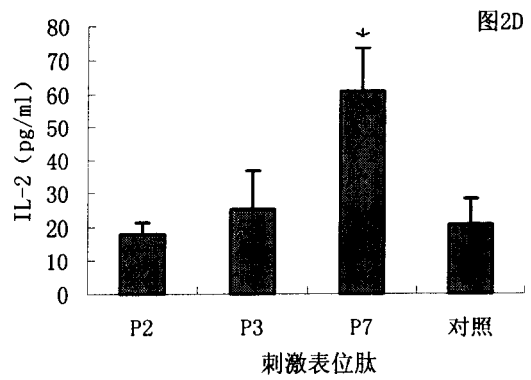
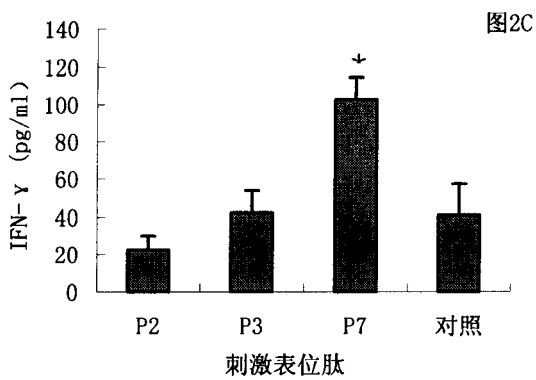
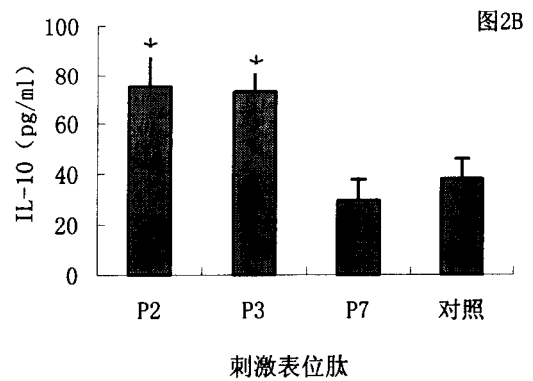
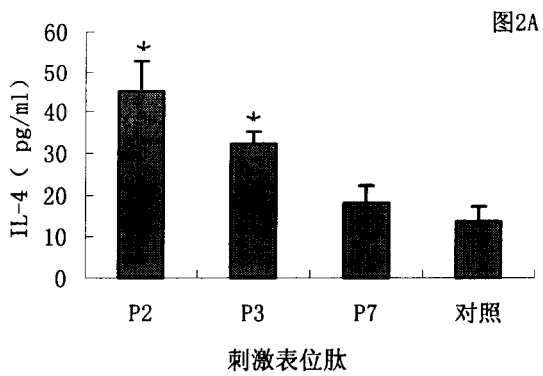


图 1



*表示与 control 组相比, P<0.05

图 2

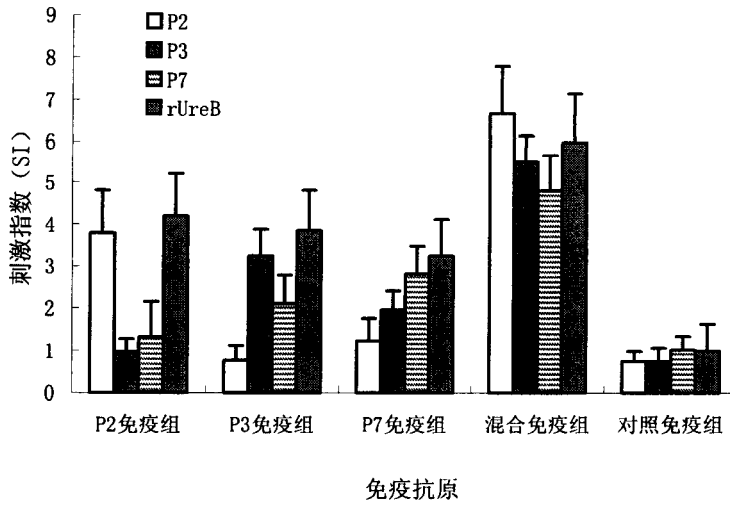


图 3

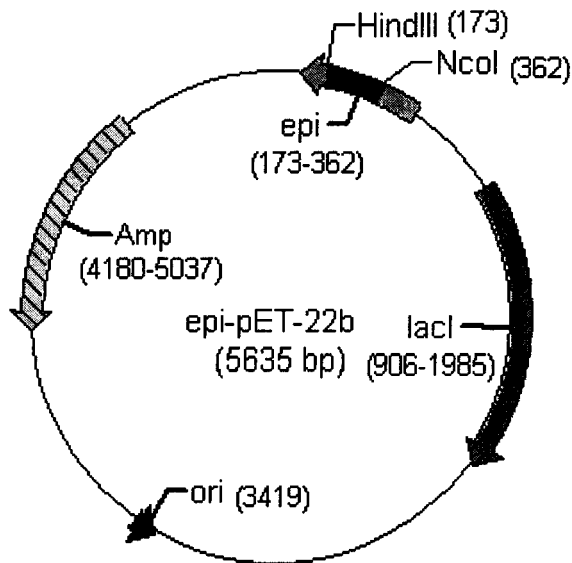


图 4

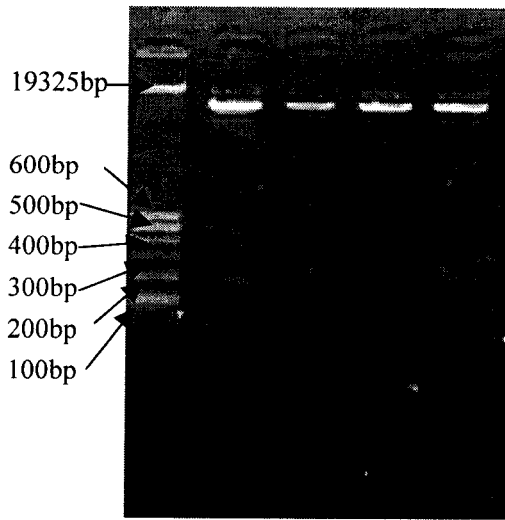


图 5

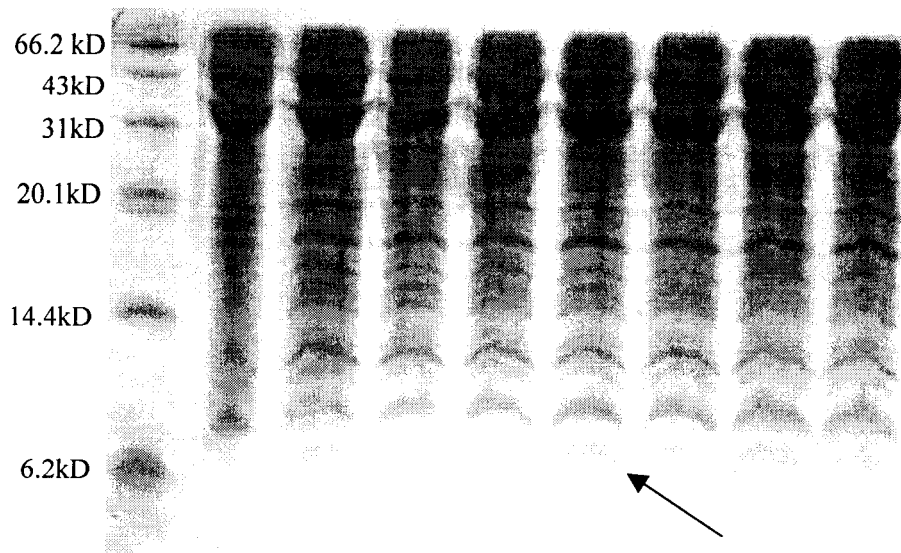


图 6

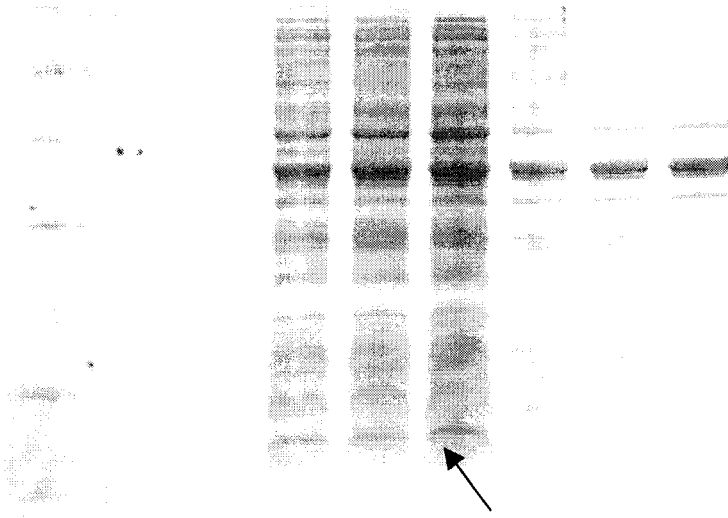


图 7

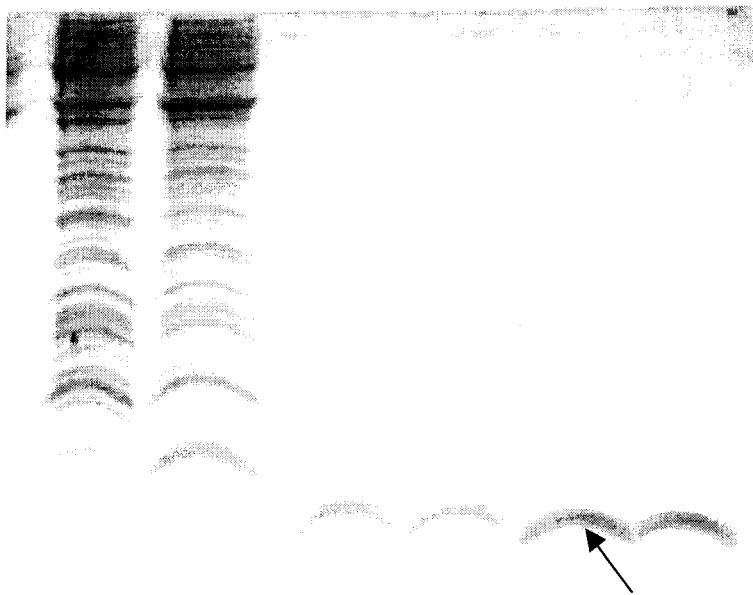


图 8

0/06 2:13 PM

200601010/EPI/3YD

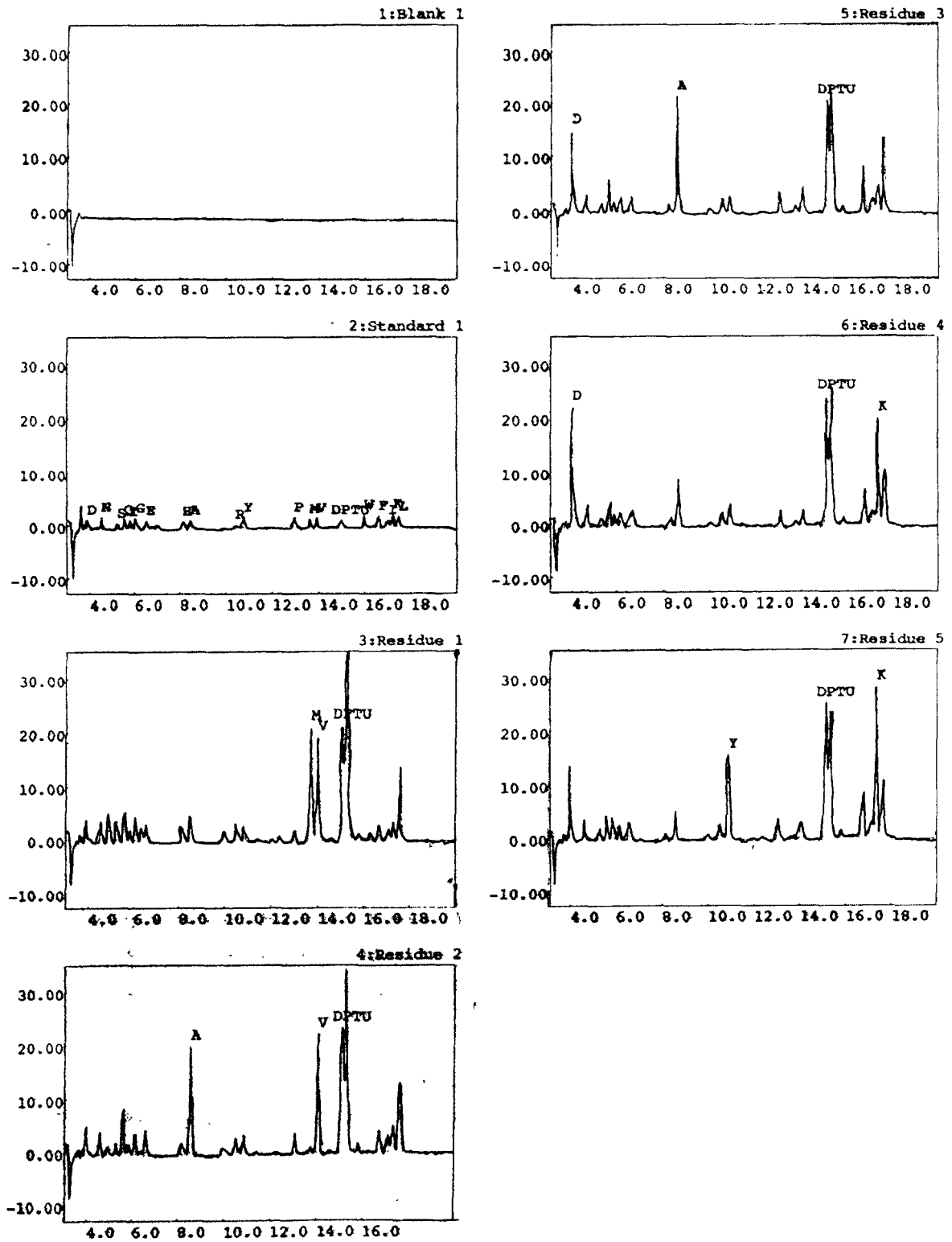


图 9

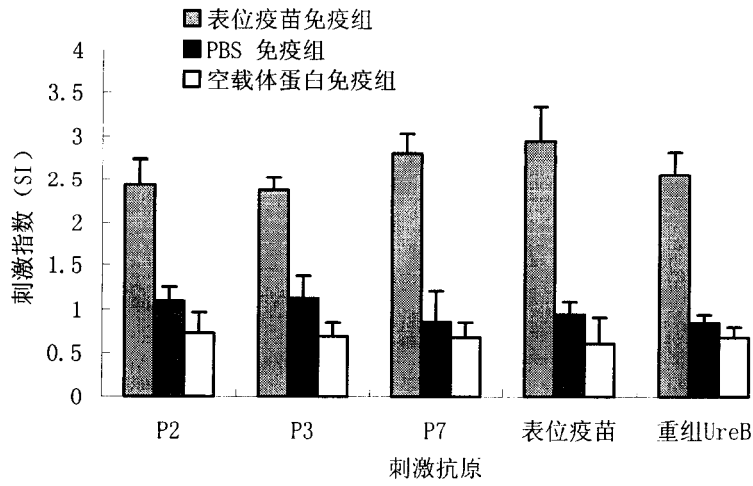


图 10

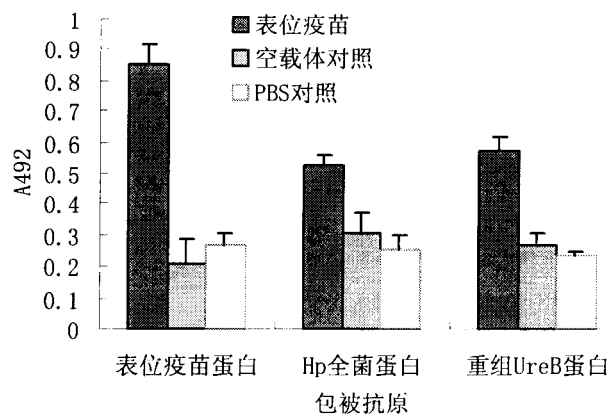


图 11

专利名称(译)	幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的Th表位肽、其编码DNA、疫苗及其应用		
公开(公告)号	CN1807452A	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	CN200610054061.1	申请日	2006-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	邹全明 吴超 石云 周维英		
发明人	邹全明 吴超 石云 周维英		
IPC分类号	C07K14/195 C12N15/31 C12N15/52 C12N15/63 G01N33/53 A61K38/16 A61P31/04		
代理人(译)	康海燕		
其他公开文献	CN100391969C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了三个幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的Th细胞表位肽及编码DNA，并提供包含此三个表位肽及额外的一个尿素酶B亚单位的B细胞表位(SIKEDVQF)的疫苗。其中Th表位肽是具有下列氨基酸残基序列之一的多肽：1)具有序列表中序列2、序列3、序列7的氨基酸序列；2)将序列表中的序列2、序列3、序列7的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的替换、缺失或添加而成的衍生多肽。其编码的DNA是下列核苷酸序列之一：1)具有序列表中序列8、序列9、序列10的核苷酸序列。2)与序列表中序列8、序列9、序列10具有相同编码产物的核苷酸序列。包含本发明多肽的表位疫苗是具有序列表中序列12中的氨基酸序列的蛋白疫苗。本发明多肽作为活性成分制成的疫苗或药物，可以起到清除幽门螺杆菌感染的作用，在医药领域具有广阔的应用前景。

