[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610054468.4

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1899610A

[22] 申请日 2006.7.20
[21] 申请号 200610054468.4
[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 高 原 杨 珺 张卫军 毛旭虎 郭 刚 吴 超 石 云
[74] 专利代理机构 重庆志合专利事务所
代理人 胡荣珲
权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 3 页

[54] 发明名称

幽门螺杆菌抗原重组疫苗

[57] 摘要

本发明公开了基于幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白(NapA)抗原的重组疫苗、其制备方法及其诱导抗幽门螺杆菌感染的保护性免疫反应中的应用。 该疫苗由作为基本活性成分的单独的幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白(NapA)，或幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白(NapA)与粘附素 HpaA、尿素酶 B 亚单位活性片段(UreB414)构成的融合蛋白质，以及一种或多种医药上可接受佐剂和赋形剂组成。

1、由作为基本活性成分的单独的幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白（NapA）或幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白（NapA）与粘附素 HpaA、尿素酶 B 亚单位活性片段构成的融合蛋白质，以及有一种或多种医药上可接受佐剂和赋形剂构成的重组疫苗组合物。

2、根据权利要求 1 的重组疫苗组合物，其中所述的佐剂是分子内佐剂。

3、根据权利要求 1 的重组疫苗组合物，其中所述的佐剂选自大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位（LTB）、霍乱毒素 CT 或其 B 亚单位（CTB）。

4、制备权利要求 1 的重组疫苗组合物的方法，该方法包括以下步骤：

（1）分别提供编码中性粒细胞激活蛋白 NapA、粘附素 HpaA 和尿素酶 B 亚单位活性片段的核苷酸序列，

（2）在 DNA 连接酶的存在下，按适当次序连接步骤（1）的核苷酸序列，得到融合基因序列，

（3）用步骤（2）的融合基因转化适当的宿主细胞，并在适于表达所述融合基因的条件下，培养被转化的宿主细胞，

（4）回收并纯化步骤（3）的融合蛋白质，

（5）加入一种或多种载体或赋形剂，得到所需的重组疫苗组合物。

5、根据权利要求 1 的重组疫苗组合物用于诱导抗幽门螺杆菌的特异性保护性免疫反应。

幽门螺杆菌抗原重组疫苗

技术领域

本发明涉及重组蛋白质疫苗， 特别是涉及基于幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白（Hp-NAP)抗原的重组疫苗、其制备方法及其在预防和治疗幽门螺杆菌感染性疾病中的应用。

背景技术

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori，Hp)是定植于人胃粘膜的革兰氏阴性螺杆菌，世界上约有50%的人感染幽门螺杆菌。有关幽门螺杆菌人们已经做了大量的研究工作，包括遗传学、生理学以及致病因子等，而且也证实它是胃部疾病的主要致病因素。对于不同个体，不同的幽门螺杆菌菌株可以导致不同的病变，从临床无症状到慢性胃炎、消化性溃疡甚至胃癌。1998年日本学者 Watanadbe 等首先报道 Hp 感染的蒙古沙鼠可致胃癌发生，为 Hp 感染能诱发胃癌提供了直接证据。

近年来研究发现，疫苗接种应该是防治 Hp 感染的最有效的方法。随着该菌有效的保护性抗原的陆续发现,相应的基因克隆及动物模型的不断完善，Hp 疫苗研制的可行性大大提高,其中基因工程尿素酶亚单位疫苗已进入III期临床试验阶段。与此同时，多亚单位融合蛋白疫苗也越来越受到人们的关注。Ruggiero 等人（Ruggiero P, Peppoloni S, Rappuoli R, et al. The quest for a vaccine against Helicobacter pylori: how to move from mouse to man? Microbes Infect. 2003 5(8):749-56..）认为，在细菌感染过程中，由于宿主与致病菌之间的复杂作用机制，单一抗原组分的疫苗难以产生完全而有效的保护作用。因此，在 Hp 单一保护性抗原疫苗研究基础上，构建的多亚单位或包括多个抗原组分的疫苗，将能够激发机体产生比单一亚单位成分更强的免疫反应，并可减少机体变态反应的发生几率。

幽门螺杆菌产生一系列独特的毒力因子，其中包括中性粒细胞激活蛋白（Hp-NAP）、黏附蛋白和尿素酶。

Hp-NAP 可以激起中性粒细胞的天然免疫反应，使胃粘膜炎症部位出现中性粒细胞浸润，并且刺激胃粘膜细胞产生 IL-8。有研究表明，幽门螺杆菌感染后， 粘膜炎症部位的中性粒细胞浸润与粘膜损伤进而导致十二指肠溃疡有密切关系。Evans 等人(Evans Jr., D.J., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N. and Kvietys, P.R. Characterization of a Helicobacter pylori neutrophil activating protein. Infect. Immun,2001,63:2213-2220)首次定义了幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白，并且发现这种蛋白可以刺激人类中性粒细胞释放活性氧簇，阻断 ***napA*** 基因的表达可使相关炎性反应减弱。

另一方面，Hp 菌体培养条件苛刻，难以进行大规模培养。细菌抗原组分复杂，且含量较

低，直接从全菌中分离纯化出保护性抗原的难度较大，方法繁琐，不利于疫苗的产业化制备。

因此，本领域特别需要提供一种基于幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白（Hp-NAP）抗原的、对幽门螺杆菌感染具有更强、更完全的保护效果的多价重组疫苗。

发明内容

本发明提供一种以幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白（Hp-NAP）为基本活性成分的重组疫苗、其制备方法及其在预防和治疗幽门螺杆菌感染性疾病中的应用。

根据在本发明的一个优选实施方案， 所述疫苗以幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白 NapA 为基本活性成分，并含有一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂。

根据在本发明的另一个优选实施方案， 所述疫苗以幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白 NapA 与粘附素 HpaA、尿素酶 B 亚单位活性功能片段 UreB414 串联结合形成的融合蛋白为基本活性成分， 并含有一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂。

为了完成本发明，首先以 DNA 重组技术获得单个重组蛋白和融合重组蛋白，然后再与佐剂成分，如大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位（LTB）、霍乱毒素 CT 或其 B 亚单位（CTB）或铝盐佐剂等，以不同组合方式（蛋白物理性混合或基因水平再融合等）制备出不同类型（分子外佐剂或分子内佐剂）的重组疫苗。

中性粒细胞激活蛋白为近来发现的幽门螺杆菌的主要毒力因子之一。其中， 中性粒细胞激活蛋白 NapA 是大小约 150 kD 的 蛋白质。***NapA*** 可促进人中性粒细胞的活化，增加中性粒细胞 CD11b/CD18 的表达, 并提高对内皮细胞的黏附性(Evans D. J. Jr, et al (1995) Infect Immun 63(6):2213-2220). 阻断 ***napA*** 基因的表达可使相关炎性反应减弱。

尿素酶是一种催化尿素水解成氨和碳酸的镍离子依赖性酶，为幽门螺杆菌中表达最丰富的蛋白质。尿素酶通过中和胃酸帮助细菌在胃内的定居并为细菌蛋白质合成提供氨。宿主组织可直接受到尿素酶介导的氨产生的损伤，或间接受到尿素酶诱导的炎性反应的刺激作用的损伤。阻断尿素酶的作用将抑制幽门螺杆菌在宿主内的定居、减少细菌蛋白质合成，并降低与幽门螺杆菌相关的炎性反应。

有人发现，口服接种幽门螺杆菌尿素酶或重组尿素酶 B 亚单位(rUreB)可保护小鼠免受幽门螺杆菌的感染（预防性疫苗）并可消除已存在的感染（治疗性疫苗）(Michetti et al., 1994; Corthesy-Theulaz et al., Gastroenterol.,)。Hirota 等人（Hirota K, Nagata K, Norose Y, et al. Infect Immun. 2001, 69(11):6597-603）的研究发现，抗尿素酶 B 亚单位单克隆抗体可有效地阻断尿素酶活性，并因此确定尿素酶分子中第 321～339 位氨基酸序列与酶活性相关。

口服接种的关键性因素是使用粘膜佐剂（例如霍乱毒素），疫苗接种后，佐剂有助于将全身性抗体的产生转化成分泌性抗体的产生。

本发明的疫苗是采用 DNA 重组技术制备的。由于表达效率高，而且产物易于分离和纯

化，所以可以以高产率获得高纯度的疫苗产物。

可以将本发明的重组疫苗蛋白与佐剂（LTB、氢氧化铝等）组合，制成带有不同的分子外或分子内佐剂的疫苗，以适用于不同免疫接种方法和途径的需要。同时，本发明还选用了Hp的粘附素HpaA和尿素酶B亚单位的模拟活性片段（UreB414），与NapA结合构建成融合蛋白抗原，以增强疫苗的免疫保护效力。

由于UreB分子量较大（66KD），故存在蛋白表达效率低和纯化难度大等困难。因此我们尝试选择分子的功能性片段替代全长蛋白分子，既可有效地诱导宿主的免疫应答，而且更便于DNA操作。为此，我们借助单克隆抗体筛选出尿素酶活性相关的功能片段（UreB414）并以其替代完整的尿素酶分子。

根据本发明的优选实施方案，作为本发明疫苗的主要活性成分，可以基因重组技术生产的幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白NapA，或由幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白NapA与尿素酶B亚单位活性功能片段UreB414、粘附素HpaA以任何次序串联结合形成的融合蛋白质。

例如，可以按照本领域技术人员熟知的DNA操作技术（例如参见Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour，1989）完成已知核苷酸序列的切接、重组载体的构建、蛋白质产物的表达、表达产物的纯化和鉴定等操作，进而实现幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白NapA，或包括串联结合的幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白NapA与尿素酶B亚单位活性片段UreB414、粘附素HpaA和分子内佐剂（LTB或CTB）组成的融合蛋白质的重组制备。

简单地说，使用常规的DNA重组技术，分别制备中性粒细胞激活蛋白NapA及其与尿素酶B亚单位活性片段UreB414、粘附素HpaA的融合蛋白。然后，再将如此得到的单一重组蛋白（例如NapA）和融合重组蛋白（例如NapA-HpaA-UreB414）与佐剂成分，如大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位（LTB）、霍乱毒素CT或其B亚单位CTB等，以不同组合方式（蛋白质物理性混合或基因融合）制备得到不同类型（分子外佐剂或分子内佐剂）的DNA重组疫苗。

该方法包括以下步骤：

（1）分别提供编码中性粒细胞激活蛋白NapA、粘附素HpaA和尿素酶B亚单位活性片段的核苷酸序列，

（2）在DNA连接酶的存在下，按适当次序连接步骤（1）的核苷酸序列，得到融合基因序列，

（3）用步骤（2）的融合基因转化适当的宿主细胞，并在适于表达所述融合基因的条件下，培养被转化的宿主细胞，

（4）回收并纯化步骤（3）的融合蛋白质，

（5）加入一种或多种载体或赋形剂，得到所需的重组疫苗组合物。

为了实现本发明，例如可以从幽门螺杆菌标准菌株中分离并扩增得到编码幽门螺杆菌NapA、UreB414和HpaA抗原或毒力因子的DNA片段。然后将这些DNA片段按照适当顺序连接到用同样酶切的表达载体例如上，得到用作携带上述片段的重组 DNA。用所说的重组DNA转化适当的宿主细胞例如大肠杆菌细胞，在适于表达所需蛋白质的条件下培养被转化的宿主细胞，然后从细胞培养物和/或培养基中分离并纯化所需的蛋白质。

分析结果显示，本发明的重组蛋白的表达具有如下基本特征：①本发明中所构建的重组表达质粒均可在原核表达系统—大肠杆菌中诱导表达。；②重组蛋白 NapA 的表达率约为 50%；重组融合蛋白 NapA-LTB 表达率约 30%；重组融合蛋白 NapA-HpaA-UreB414-LTB 表达率约 20%；重组融合蛋白 NapA-CTB 表达率约 25%；重组融合蛋白 NapA-HpaA-UreB414-CTB 表达率约 23%；③被表达的各重组蛋白均以可溶形式或包涵体形式存在，纯化后产物的纯度在 90%以上；④各重组蛋白均能够诱导动物产生较高滴度的特异性抗体产生。

根据本发明的一个优选实施方案，可以针对 Hp 保护性抗原成分中性粒细胞激活蛋白NapA进行单基因克隆，获得单个重组蛋白，再以不同的组合方式与佐剂成分如大肠杆菌不耐热肠毒素LT或其B亚单位LTB、霍乱毒素CT或其B亚单位CTB及铝盐佐剂等，以适当比例进行物理混合或吸收，以制备Hp多价组合疫苗。

根据本发明的另一个优选实施方案，可以将中性粒细胞激活蛋白 NapA、尿素酶 B 亚单位活性片段 UreB414 和粘附素 HpaA 进行基因水平连接，构建表达重组融合蛋白，并在此基础上再与大肠杆菌不耐热肠毒素 LT 或其 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 CT 或其 B 亚单位 CTB 等佐剂成分按照适当比例物理混合或吸收，制得具有不同分子外佐剂的重组多价融合蛋白疫苗组合物。

根据本发明的另一个优选实施方案，可以将中性粒细胞激活蛋白 NapA 与尿素酶 B 亚单位活性片段 UreB414 和粘附素 HpaA 的基因与佐剂成分例如大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位（LTB）或霍乱毒素 B 亚单位 CTB 的核苷酸编码序列融合，得到重组的、含有分子内佐剂的多价融合蛋白疫苗组合物。

基本上按照本领域已知的相似方法，制备下列有不同组合的基于幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白 NapA 的重组体融合蛋白质疫苗组合物：

NapA-LTB（SEQ ID NO：16）、NapA-CTB（SEQ ID NO：17）、NapA-HpaA-UreB414-LTB（SEQ ID NO：18）、NapA-HpaA-UreB414-CTB（SEQ ID NO：19）、 NapA-HpaA-UreB414（SEQ ID NO：20）（参见实施例 2-6）。

动物试验结果表明，本发明的疫苗组合物具有良好的抗幽门螺杆菌感染活性，即具有显著地免疫预防效果和清除 Hp 感染的能力。

可按照制药工业中已知的方法（如参见 Remington's Pharmaceutical Science.15th ed.,Mack Publishing Company,1980 ）将本发明的疫苗与一种或多种医药上可接受的载体或赋形剂或稀释剂按适当的比例混合，并按已知方法除菌后制成本发明的疫苗组合物。

根据给药途径的不同，可将本发明的疫苗组合物配制成适于静脉内、肌肉内、体腔内、组织内、皮内或皮下给药的可注射的溶液剂或分散剂；或适于口服给药的粉末剂、片剂、颗粒剂、丸剂、乳剂、悬浮剂或胶囊剂。

为了制备适于胃肠道外途径给药的可注射溶液剂，例如可以使用无菌蒸馏水、注射用水、等渗氯化钠或葡萄糖溶液，或低浓度（如 1-100 mM）磷酸盐缓冲盐水（PBS）、以及含有乙醇、多元醇（如乙二醇、丙二醇及液态聚乙二醇等）的溶剂或分散介质作为载体或稀释剂。在任何情况下，所说的可注射制剂均应是无菌和可流动并适于通过注射器注射给药的。另外，在生产、运输和储存条件下，所说的制剂还必须是稳定的，并能够对抗细菌和真菌等微生物的污染。必要时，可加入抗氧化剂（如抗坏盐酸）、抗生素（如青霉素和链霉或其他抗真菌剂）及防腐剂（如苯甲酸钠、三氯叔丁醇、度米酚、山梨酸等），以及增溶剂和用于维持分散剂中所需颗粒大小的表面活性剂。

为了制备适于口服给药的片剂、粉末剂、胶囊剂、颗粒剂或乳剂，可以使用蔗糖、乳糖、半乳糖等二糖，或甘露醇、山梨醇等六碳多羟基醇，以及玉米淀粉、明胶、脂质、微晶纤维素等作为载体或赋形剂。必要时，也可在这些口服制剂中加入崩解剂、润滑剂、缓冲盐、着色剂、甜味剂、香料、分散剂及表面活性剂。

另外，也可使用制药工业中已知的方法和辅助成份，将本发明的疫苗组合物制成微胶囊剂或脂质体包裹剂。为此，可使用甘油、硬脂酸镁、聚乙二醇、聚丙烯酰胺、胆固醇、卵磷脂、甲基纤维素或羧甲基纤维素、滑石粉、乳糖、葡聚糖、淀粉等作为基质或赋形剂。

本发明的包括幽门螺杆菌的多个保护性抗原成分的重组疫苗，是以 DNA 重组技术生产的。在完成了本发明多价重组疫苗的实验室水平制备的基础上，我们进一步实践并摸索了用于本发明疫苗的中试和工业规模放大生产。初步实验结果显示，在添加有酵母浸出液和微量元素的改良 M9-CAA 培养基内, 10L 发酵菌液可以收获细菌生物量约 600 克（湿重）。经分离和纯化后，得到纯度约为 95%的最终表达产物大约为 1.2-2 克的（NapA-LTB）、NapA-CTB（NapA-HpaA-UreB414-LTB）、（NapA-HpaA-UreB414-CTB）NapA-HpaA-UreB414。

我们的生物学实验结果表明，本发明的重组疫苗在免疫接种后，可在受体动物体内引发显著的抗幽门螺杆菌抗体反应，均具有一定的抗幽门螺杆菌感染活性。 其中 rNapA -HpaA -UreB414- LTB 的保护率最高可达到 96.7%，具有较好的抗幽门螺杆菌感染的活性，是理想的幽门螺杆菌多亚单位基因工程疫苗。

附图说明

图 1 是重叠延伸方法得到的 NapA- HpaA-UreB414-LTB 融合基因

泳道 1 为核酸(DNA)分子量标准（Marker）；

泳道 2 为融合基因 NapA- HpaA-UreB414-LTB 重组质粒 NdeI / Xho I 双酶切产物(5300bp，1590 bp)；

泳道 3 为融合基因 NapA- HpaA-UreB414-LTB 的 PCR 扩增产物(1590bp)；

泳道 4 为核酸(DNA)分子量标准（Marker）

图 2 为融合蛋白 NapA- HpaA-UreB414-LTB 纯化效果 PAGE 电泳图

泳道 1 为蛋白质分子量标准（Marker）；

泳道 2 为目的蛋白洗脱峰样品。

结果显示经过纯化步骤，收获的目的蛋白峰经 UVP 扫描分析纯度达到 95%以上。

图 3 为不同抗原免疫组小鼠产生的血清 IgG 水平

图 4 为不同抗原免疫组小鼠产生的血清 IgA 水平

图 5 为不同抗原免疫组小鼠产生的肠粘液 sIgA 水平

图 6 为不同抗原免疫组小鼠产生的胃粘液 sIgA 水平

具体实施方式

下面结合附图及实施例对本发明作详细描述：

实施例 1 幽门螺杆菌的 HpaA，UreB414，NapA 编码基因的克隆

1.幽门螺杆菌购自 ATCC，本室保种，菌株为 *Helicobacter pylori* 26695（ATCC Number 700392）

2.液氮罐中取出保存的 Hp 菌株涂布于 Hp 专用固体培养基上，于 37℃，含 5% O_2，85% N_2，10% CO_2 条件下培养 72h。基因组抽提试剂盒抽提 Hp 基因组。

3.采用 PCR 方法自 Hp 基因组分别扩增 NapA，HpaA 和 UreB414 的编码基因。

1） 引物设计合成如下（下划线示酶切位点及 linker 碱基序列）

根据 GenBank 公布的基因序列及引物设计原则，设计相应的引物，引入酶切位点。在中间引入设计 linker 的碱基序列。

HpaA	P1	5'-CCCTGCTGTACCACCACCTAATTACCATCCA-3'
		linker
	P3	5'-CAGGTGGAGGTACTGCAGGAACCTTAATAAACCCAG-3'
		linker
UreB414	P4	5'-TCCTGCAGTACCTCCACCTGACACTTTGAATGAA-3'
		linker
	P5	5'-CTCGAGAAATTCTTTTTTG-3'
		XhoI

P6 5'—GCTACCTCCTCCACTTCCGCCTCCAAATTCTTTTTTG—3'

linker

NapA P7 5'—GCGGGCATATGAAAACATTTGAAA—3'

NdeI

P8' 5'-CGCGGATCCTTAAGCTAAATGGGC-3'

BamHI

2） 目的基因的 PCR 扩增：

以幽门螺杆菌基因组 DNA 为模板，以 P1 和 P3，P4 和 P5，P7 和 P8'分别扩增 HpaA、UreB414 和 NapA 基因，采用如下 PCR 体系和程序：

在一个 200μl 微量离心管中加入下列试剂：

模板 DNA	2μl
10×PCR 缓冲液（含氯化镁）	5μl
dNTPs（10mmol/L）	4μl
上、下游引物（0.025 mmol/L）各	1μl
Taq DNA 聚合酶（5u / μl）	1μl
加去离子水至终体积	50μl

混匀后加入矿物油 3 滴

反应条件：94℃预变性 5 分钟后，94℃,90s; 60℃,60s;72℃,90s,35 个循环周期，然后 72℃延伸 10min。

1. PCR 产物的克隆

采用 TA 克隆方法克隆 PCR 产物，方法见文献（于永利，麻彤辉，杨贵贞：TA 克隆及双链 DNA 测序，介绍一种快速克隆及分析 PCR 产物的方法，中国免疫学杂志，1994，10（1）：5）。

2. PCR 产物的序列分析

将 TA 克隆转化菌株送至公司，按常规方法（J.Sambrook, 分子克隆, 冷泉港实验室出版社 1989 聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.21-1.32）提取质粒，采用双脱氧末端终止法，对插入片段进行序列测定。

实施例 2 融合基因 NapA-LTB 的获得

1. NapA 及 LTB 基因扩增

1）引物设计与合成

NapA P7 5'—GCGGGCATATGAAAACATTTGAAA—3'

NdeI

P8 5'—CGGAGGATCCTGCGGAGCTAAATGGGC—3'

linker

LTB P9 5'—GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT—3

linker

P9' 5'—CCGCAGGATCCTCCGGCTCCCCAGTCTATT—3'

linker

P10 5'—CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC—3'

XhoI

分别以幽门螺杆菌 SS1、野生型产毒大肠杆菌 H44815 基因组 DNA 为模板，用 P7 和 P8、P9'和 P10 扩增 NapA、LTB 基因，细菌基因组抽提按天为时代离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒Ⅰ进行。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 10μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 10μL，dNTPs(25mmol/L each) 8μL，上下游引物各 2μL，上述 NapA 或 LTB 基因组各 1μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位 / μL）1μL，加灭菌水至 100μL。

PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

以回收的 NapA 和 LTB 基因为模板，P7 和 P10 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 5μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 4μL，dNTPs(25mmol/L each) 4μL，上下游引物（P7 和 P10）各 1μL，上述 NapA 和 LTB 基因各 2μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位/μL）0.5μL，加灭菌水至 50μL。

重叠延伸 PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

PCR 产物的克隆及序列分析同前。

实施例 3 融合基因 NapA-CTB 的获得

1. NapA 及 CTB 基因扩增

1）引物设计与合成

NapA P7 5'—GCGGGCATATGAAAACATTTGAAA—3'

NdeI

P8 5'—CGGAGGATCCTGCGGAGCTAAATGGGC—3'

linker

CTB P11' 5'—CCGCAGGATCCTCCGATTAAATTAAAATTTGGT—3'

linker

P12 5'—CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG—3'

XhoI

用 P7 和 P8、P11'和 P12 扩增 NapA、CTB 基因，细菌基因组抽提按天为时代离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒Ⅰ进行。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 10μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 10μL，dNTPs(25mmol/L each) 8μL，上下游引物各 2μL，上述 NapA 或 CTB 基因组各 1μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位 / μL）1μL，加灭菌水至 100μL。

PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个

循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

以回收的 NapA 和 CTB 基因为模板，P7 和 P12 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 5μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 4μL，dNTPs(25mmol/L each) 4μL，上下游引物（P7 和 P12）各 1μL，上述 NapA 和 CTB 基因各 2μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位/μL）0.5μL，加灭菌水至 50μL。

重叠延伸 PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

PCR 产物的克隆及序列分析同前。

实施例 4　融合基因 NapA-HpaA-UreB414-LTB 的获得

引物设计与合成

NapA	P7	5'—GCGGGCATATGAAAACATTTGAAA—3'
		NdeI
	P8	5'—CGGAGGATCCTGCGGAGCTAAATGGGC—3'
		linker
HpaA/UreB414/ LTB	P2	5'-CCGCAGGATCCTCCGAATTACCACCC-3'
		linker
	P10	5'—CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC—3'
		XhoI

1）以实施例 1 回收的 HpaA 和 UreB414 基因为模板，以 P1 和 P5 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 5μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 4μL，dNTPs(25mmol/L each) 4μL，上下游引物各 1μL，上述 HpaA 和 UreB414 基因各 2μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位/μL）0.5μL，加灭菌水至 50μL。

重叠延伸 PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

2）以上述回收的 HU 基因和 E.coli H44815 基因组 DNA 为模板，分别以 P1 和 P6、P9 和 P10 为引物克隆 HU 和 LTB 基因，以回收的 HU 和 LTB 基因为模板，P1 和 P10 为引物进行重叠延伸 PCR 反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

3）以上述回收的 HUL 基因和实施例 2 回收的 NapA 基因为模板，分别以 P7 和 P8、P2 和 P10 为引物克隆 NapA 和 HUL 基因，以回收的 NapA 和 HUL 基因为模板，P7 和 P10 为引物进行重叠延伸 PCR 反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

PCR 产物的克隆及序列分析同前。融合基因核苷酸序列见附图 3。

PCR 扩增效果如附图 1 所示。

实施例 5 融合基因 NapA-HpaA-UreB414-CTB 的获得

引物设计与合成

NapA	P7	5'—GCGGGCATATGAAAACATTTGAAA—3'
		NdeI
	P8	5'—CGGAGGATCCTGCGGAGCTAAATGGGC—3'
		linker
CTB	P11	5'—GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGC
		ATTAAATTAAAATTTGGT—3'
		linker
HpaA/UreB414/ CTB	P2	5'-CCGCAGGATCCTCCGAATTACCACCC-3'
		linker
	P12	5'—CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG—3'
		XhoI

1）以实施例 4 回收的 HpaA/UreB414 基因和霍乱杆菌基因组为模板，以 P1 和 P6 、P11 和 P12 为引物克隆 HU 和 CTB 基因。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 5μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 4μL，dNTPs(25mmol/L each) 4μL，上下游引物各 1μL，上述模板基因各 2μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位/μL）0.5μL，加灭菌水至 50μL。

重叠延伸 PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

2）以上述回收的 HUC 基因和实施例 2 回收的 NapA 基因为模板，分别以 P7 和 P8、P2 和 P12 为引物克隆 NapA 和 HUC 基因，以回收的 NapA 和 HUC 基因为模板，P7 和 P12 为引物进行重叠延伸 PCR 反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

PCR 产物的克隆及序列分析同前。

实施例 6 融合基因 NapA-HpaA-UreB414 的获得

以实施例 5 回收的 NapA-HpaA-UreB414-CTB 基因为模板，以 P7 和 P6 为引物克隆 NHU 基因。PCR 扩增体系为：10×不含镁离子扩增缓冲液 5μL，$MgCl_2$(25mmol/L) 4μL，dNTPs(25mmol/L each) 4μL，上下游引物各 1μL，上述模板基因各 2μL，Ex-Taq DNA 聚合酶（5 单位/μL）0.5μL，加灭菌水至 50μL。PCR 扩增反应：94℃预变性 5min，94℃变性 60s，60℃退火 60s，72℃延伸 60s，35 个循环，72℃完全延伸 10min。琼脂糖凝胶电泳后，回收目的片段。

PCR 产物的克隆及序列分析同前。

实施例 7 重组基因表达质粒及高效表达工程菌的构建及筛选

1.重组质粒的构建

将各个融合基因扩增（PCR）产物经 1.0%琼脂糖电泳、胶回收纯化后与载体 pMD-18T 连接，转化大肠杆菌 DH5α，提取质粒，分别用 NcoI/ XhoI 或 NdeI/ XhoI 双酶切，1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

将含目的基因的 pMD-18T 载体及表达载体 pET-28a（+）或 pET-22b(购自美国 Novagen 公司，本室保存)双酶切，酶切产物经 1.0%琼脂糖电泳、目的片段胶回收纯化后，用连接酶连接，转化大肠杆菌 DH5α，提取质粒，双酶切，1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

有关操作具体步骤如下：

1）质粒 DNA 抽提（使用 Omega 公司质粒抽提试剂盒）

[1] 挑取平板上分隔良好的菌落转种于带相应抗生素的 LB 培养液中，37℃摇床培养过夜。

[2] 取菌液分装于 1.5mL 离心管中，12000g 离心 3min，留取沉淀。

[3] 每管加 100μL Solution Ⅰ 悬浮，充分振荡混匀。

[4] 加入 100μL SolutionⅡ，轻柔混匀，冰水浴 5min。

[5] 加入 250μL SolutionⅢ，轻振混匀，室温放置 10min。

[6] 4℃、12000g 离心 10min，将上清移至分离管中。

[7] 12000g 离心 1min，倾倒收集管中的废液。

[8] 加入 500μL washing buffer 于分离管中，同上离心并弃去收集管中的废液。重复洗涤一次。

[9] 12000g 离心 1min，使乙醇完全挥发。

[10] 将分离管置于另一干净 EP 管中并加入一定量的 TE buffer，65℃水浴 5min，12000g 离心 1min。

[11] 取一定量洗脱液进行电泳，其余置于－20℃保存备用。

2）琼脂糖凝胶电泳：

1.0%琼脂糖凝胶，1×TAE 缓冲液，120-150mA，电泳 20-40 分钟。

50×TAE 储存液配方：2.0mol/L Tris base，1.0mol/L NaAc， 0.1mol/L Na_2EDTA；用冰醋酸调节 pH8.3。

3）质粒 DNA 的酶切反应：

1μg 质粒 DNA

1μl 10×缓冲液（见上海生工公司产品说明书）

1μl 限制性内切酶 Nco I/ XhoI 或 NdeI/ XhoI （10u/μl）

用双蒸水补齐至 10μl

混合后 37℃温育 1-2 小时。

4）琼脂糖电泳胶的目的 DNA 回收纯化：

在紫外灯下观察并切下琼脂糖凝胶上的目的 DNA 电泳带，移入 1.5mL EP 管。

加入 Omega 公司胶回收试剂盒的 DNA binding buffer,65℃水浴使凝胶完全溶化并保持溶液 pH 在 5.0~6.0 之间。将溶胶液移入分离管，12000g 离心 1min，弃去收集管中的液体。

加入配套的 Washing buffer , 12000g 离心 1min，弃去收集管中的液体。重复洗涤 1 次。

12000g 离心 1min，分离管移置另一干净 1.5mL EP 管，加入一定体积的 TE buffer，65℃孵育 10min， 12000g 离心 1min，取一定量电泳，UVP 紫外扫描仪检测回收纯化效果。

5）连接反应（使用上海生工公司连接试剂盒）

通过紫外分光光度计检测目的 D N A 片段和载体片段的浓度，根据外源片段与载体摩尔数比一般为 1:2～10 的原则，设计连接反应体系如下：

目的 DNA 1μL

质粒载体 1～2μL

ligation solution 5μL

ddH_2O 2～3μL

Total volume 10μL

22℃连接 12-16h。

6）感受态菌的制备($CaCl_2$ 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 2mL LB 培养液中，37℃摇床培养 12～16h。

(3) 将过夜培养的 DH5a 按 1%比例转种至 LB 培养液中，37℃摇床培养至 OD_{600} 为 0.2～0.4 时，8000g 离心 5min 收集细菌。

(4) 加入 1mL 预冷的 0.1M $CaCl_2$ 重悬沉淀，冰水浴 3h。4℃ 8000g 离心 5min，弃上清。加入 100μL 预冷的 0.1M $CaCl_2$ 悬浮沉淀，冰水浴 1h，备用。

7）连接产物转化

(1)取感受态菌液 100μL，加入连接反应产物；冰水浴 60min，42℃水浴热休克 100s，迅速放置冰水浴 1～2min。

(2)加 100μL LB 培养液，37℃摇床培养 1h。

(3)以 8000g 离心 10min，吸弃 100μL 上清后混匀沉淀，各取 50μL 涂布平板，37℃孵箱培养过夜。

1. 高效表达融合蛋白工程菌的构建及筛选

将含目的融合基因的重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 并提取质粒酶切鉴定。基因工程大肠杆菌 BL21 的感受态菌制备、转化及重组菌的质粒抽提酶切鉴定同前。

取鉴定无误的重组菌接种于 3mL 含 Kan 或 Amp 的 LB 培养液中，37℃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 20mL 含 Kan 或 Amp 的 LB 培养液中，37℃摇床培养 2.5 小时，以 IPTG 诱导 5 小时，SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达形式和表达量，筛选高效表达菌株。

实施例 8 基因重组表达工程菌的发酵

发酵工艺如下：

采用德国 B.Bron 10L 发酵罐，发酵过程中种子菌 10%比例接种，保持 70%溶氧、温度 37℃、pH7.0，在 A600 未达到 2 时不加补料，之后每 0.5h 流加补料一次使葡萄糖、胰化蛋白胨和 8%酵母抽提物的终浓度分别为 0.5%、0.2%、和 0.2%。在第 4 次补料后待葡萄糖浓度降为 0.1%时加入 IPTG 500μmol/L 诱导 4h 收菌。

发酵过程在级联溶氧控制的分批培养基础上，流加补料。

发酵过程所用培养基为改良 M9-CAA 培养基，在 M9-CAA 的基础上添加 0.6%酵母浸出液和 2mg/L $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$、2mg/L$CoCl_2 \cdot 4H_2O$、4mg/L $FeSO_4 \cdot 16H_2O$、5mg/L H_3BO_3、1.6mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、4mg/L $CuSO_4$ 而成。

发酵后回收菌液，4℃离心（8000g）15 分钟。吸弃上清，收集细菌，称重后冻存备用。

结果：10L 发酵菌液可以收获细菌湿重 600 克左右。

实施例 9 重组目的蛋白的纯化及剂型制备

1. 可溶性上清和包涵体提取：将高效表达的菌体 200-500g 以 TE 缓冲液 1：10（W/V）比例悬浮，4℃预冷后采用细胞匀浆机使其混合均匀。采用高压均质机在压力为 40—70Mpa 的条件下进行破菌（共破菌 4~6 次），破菌完毕后，取少量菌液涂片染色，显微镜下观察细胞的完整性，确保细胞破碎完全，随后以 500g 离心 25min，弃沉淀，再以 15,000g 离心 40min，留取上清即为可溶性上清，收集沉淀即为包涵体。可溶性上清直接用于纯化。包涵体以 1：10（W/V）的比例分别用洗涤液 A 和 B 各洗涤 2 次。洗涤条件为：4℃搅拌 20min，15,000g 离心 40min，收集包涵体沉淀；最后将包涵体用包涵体溶解液以 1：10（W/V）的比例混合，4℃搅拌 3h，15,000g 离心 45min，取上清作为下一步纯化的原料。

包涵体提取所用缓冲液：

1) TE 缓冲液：20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH 8.0

2) 包涵体洗涤液 A：5 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris、 1%Triton X-100 ， pH 8.0

3) 包涵体洗涤液 B：20 mmol/L Tris、2mol/L Urea ， pH 8.0

4) 包涵体溶解液： 1 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris、8 mol/L 尿素(pH 8.0)

2. 金属离子螯合层析：选择亲和层析柱Chelating Sepharose进行纯化，使用20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH7.0~9.0 对目的蛋白进行纯化，采用咪唑梯度洗脱。

3. 阴离子柱纯化：选择阴离子柱 HiTrap Q 进行纯化，使用 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, pH7.0~9.0 对目的蛋白进行纯化,采用 NaCl 梯度洗脱。

4. Superdex 凝胶过滤层析脱盐：步骤 3 所获目标蛋白经葡聚糖 PEG 透析袋内浓缩或超滤浓缩后用凝胶过滤柱 Superdex 过滤脱盐，脱尿素及咪唑。

5. 纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE，检定其纯度。Lowry 法检测蛋白浓度。

其中，步骤 2 所述镍离子亲和纯化填料为 Chelating Sepharose HP、Chelating Sepharose FF 之一；

步骤 3 所述阴离子纯化填料为 Q Sepharose HP 、Q Sepharose FF、Q Sepharose XL 之一；

步骤 4 所述凝胶过滤层析柱为 Superdex 75 、Superdex 200、Superdex HR 10/30 之一。

纯化结果如附图 2 所示。

上述方法获得的重组蛋白分别被制备成液体剂型、冷冻干燥剂型或胶囊剂。其中液体剂型供口服、滴鼻或注射使用；冷冻干燥剂型加纯化水或注射用水溶解后供口服、滴鼻或注射使用；胶囊剂型供口服使用。液体剂型制备方法为：向纯化所获得的目的蛋白中加入适当比例（0.1%~0.5%）的稳定剂甘露醇，混匀，除菌过滤后分装，其中用于滴鼻的液体剂型中还加入 1%的卡泊波（carbopol）；冷冻干燥剂型制备方法为：向纯化所获得的目的蛋白中加入适当比例（5%~20%）的稳定剂甘露醇（果糖或山梨醇），混匀，除菌过滤分装后冷冻干燥；胶囊剂型制备方法为：首先向纯化所获得的目的蛋白中加入适当比例（5%~20%）的稳定剂甘露醇，混匀，除菌过滤分装后冷冻干燥，再装填入肠溶胶囊。

实施例 10　分子外佐剂（LT、CT、CTB 或氢氧化铝）的幽门螺杆菌基因工程疫苗的制备

1. 粘膜佐剂一减毒 LT 突变体的制备： 采用基因工程重组技术克隆大肠杆菌不耐热肠毒素（heat-labile enterotoxin, LT）基因，并进行基因突变，构建重组表达载体，在工程菌中诱导表达出减毒 LT 突变体一rLTS63K（由本单位完成，详见: ①冯强,邹全明,蔡绍皙,等. LT 质粒的新法提取及无毒突变体 LTS63K 的构建和序列分析. 免疫学杂志.2002,18(5):385-388. ②冯强,蔡绍皙,杨君,等.生物工程学报.2003,19(5):532-537.）。采用半乳糖亲和层析技术进行纯化，获得纯度大于 95%的减毒性 LT 突变体蛋白（rLTS63K），并以此作为粘膜佐剂。

2. 以 rLTS63K 为佐剂的幽门螺杆菌基因工程疫苗的制备：纯化的 Hp 重组抗原蛋白以不同组合形式与粘膜佐剂 rLTS63K 物理混合，制备出幽门螺杆菌基因工程疫苗。该疫苗以 rLTS63K 作为粘膜佐剂，适用于粘膜途径（胃肠道、鼻粘膜等）的免疫接种。

3. 以 CT、CTB 为佐剂的幽门螺杆菌基因工程疫苗的制备：纯化的 Hp 重组抗原蛋白以不同组合形式与粘膜佐剂 CT 或 CTB 物理混合，制备出幽门螺杆菌基因工程疫苗。该疫苗以

CT 或 CTB 作为粘膜佐剂，适用于粘膜途径（胃肠道、鼻粘膜等）的免疫接种。

4. 以氢氧化铝为佐剂的幽门螺杆菌基因工程疫苗的制备：将不同的 Hp 重组保护性抗原蛋白浓度调整为 2mg/ml，与同样浓度的氢氧化铝以 1:1 体积比混合均匀，4℃静置 5 小时，8000×g 离心 20 秒，弃上清，凝胶沉淀即为幽门螺杆菌基因工程疫苗。该疫苗以氢氧化铝为佐剂，适用于非粘膜途径（肌肉等）的注射免疫接种。

5. 剂型制备同实施例 9。

实施例 11 动物实验

①BALB/c 小鼠免疫后特异性免疫应答

基因工程疫苗口服免疫 Balb/c 小鼠，150μg/只，分别于在 0，1，2，4 周各免疫一次，于末次免疫后 1 周采集血液和胃肠道冲洗液，ELISA 检测血清及胃肠道冲洗液中特异性抗体 IgG 和 sIgA 产生。同时，设立 PBS 对照组。具体分组如下：

组号	免疫抗原	每组动物数
I	rNapA	15 只/组
II	rHpaA	15 只/组
III	rUreB414	15 只/组
IV	rNapA+ rLTB	15 只/组
V	rHpaA+ rLTB	15 只/组
VI	rUreB414+ rLTB	15 只/组
VII	rNapA -HpaA -UreB414	15 只/组
VIII	(rNapA -HpaA -UreB414)+ rLTB	15 只/组
IX	rNapA -HpaA -UreB414- LTB	15 只/组
X	rNapA -HpaA -UreB414- CTB	15 只/组
XI	PBS	15 只/组

（注："+"表示抗原是物理混合，"-"表示抗原是在基因水平连接）

抗体水平检测结果如图 3~6 所示。如图示结果可知，幽门螺杆菌多亚单位基因工程疫苗实验组小鼠特异性抗体水平均有显著提高，与 PBS 对照组、单一亚单位以及单一亚单位加佐剂实验组相比较均有显著增高（$P<0.05$），并且显著高于多亚单位无佐剂实验组（$P<0.05$），提示口服免疫后激发小鼠产生粘膜局部免疫应答和系统性免疫应答。

②蒙古沙鼠口服免疫攻毒保护实验

将不同剂型疫苗免疫（第 0、1、2、4 周各免疫 1 次）沙鼠，末次免疫后 9 天，以幽门螺杆菌标准菌株 SS1 株攻毒，攻毒后 2 周剖杀动物，进行细菌培养和病理切片检查。结果如下图：

组号	免疫抗原	每组动物数	保护率
I	rNapA	30 只/组	20.0%
II	rHpaA	30 只/组	23.3%
III	rUreB414	30 只/组	16.7%
IV	rNapA+ rLTB	30 只/组	43.3%
V	rHpaA+ rLTB	30 只/组	40.0%
VI	rUreB414+ rLTB	30 只/组	36.7%
VII	rNapA -HpaA -UreB414	30 只/组	33.3%
VIII	(rNapA -HpaA -UreB414)+ rLTB	30 只/组	83.3%
IX	rNapA -HpaA -UreB414- LTB	30 只/组	96.7%
X	rNapA -HpaA -UreB414- CTB	30 只/组	90.0%
XI	PBS	30 只/组	0%

可见，rNapA -HpaA -UreB414- LTB 实验组的攻毒保护率为 96.7%，明显高于 PBS 对照组、单一亚单位实验组、单一亚单位加佐剂实验组以及多亚单位无佐剂实验组。

③蒙古沙鼠口服免疫攻毒后存活时间实验

沙鼠免疫攻毒和分组情况同上，只是攻毒 2 周后不再剖杀动物，继续饲养以观察疫苗对沙鼠的毒副作用，同时设立正常沙鼠无免疫组，以排除环境等各方面对实验的影响。

组号	免疫抗原	每组动物数	存活>2 个月动物数
I	rNapA	30 只/组	22 只
II	rHpaA	30 只/组	18 只
III	rUreB414	30 只/组	21 只
IV	rNapA+ rLTB	30 只/组	16 只
V	rHpaA+ rLTB	30 只/组	16 只
VI	rUreB414+ rLTB	30 只/组	19 只
VII	rNapA -HpaA -UreB414	30 只/组	14 只
VIII	(rNapA -HpaA -UreB414)+ rLTB	30 只/组	22 只
IX	rNapA -HpaA -UreB414- LTB	30 只/组	29 只
X	rNapA -HpaA -UreB414- CTB	30 只/组	20 只
XI	PBS	30 只/组	2 只
XII	None	30 只/组	30 只

结果分析：从实验①可知，VIII、IX、X 三组口服免疫后可激发小鼠产生较强的粘膜局部免疫应答和系统性免疫应答；从实验②可见，同样是这三组的保护率较高，超过了 80%，尤其是IX组达到了 96.7%；从实验③得知，IX组的抗原对沙鼠影响最小，其存活率接近正常沙鼠无免疫组，而同样的多亚单位抗原组VIII、X 的沙鼠存活率则明显低于IX组。由以上结果确定 rNapA -HpaA -UreB414- LTB（IX组）是理想的幽门螺杆菌多亚单位基因工程疫苗。

序 列 表

<110> 中国人民解放军第三军医大学

<120> 幽门螺杆菌抗原重组疫苗

<141>

<160> 20

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的带有附加酶切位点的引物序列 P1。

<400> 1

CCCTGCTGTACCACCACCTAATTACCATCCA

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物序列 P2。

<400> 2

CCGCAGGATCCTCCGAATTACCACCC

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的带有附加酶切位点的引物序列 P3。

<400> 3

CAGGTGGAGGTACTGCAGGAACCTTAATAAACCCAG

<210> 4

<211>34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P4。

<400> 4

TCCTGCAGTACCTCCACCTGACACTTTGAATGAA

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P5。

<400>5

CTCGAGAAATTCTTTTTTG

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P6。

<400>6

GCTACCTCCTCCACTTCCGCCTCCAAATTCTTTTTTG

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P7。

<400>7

GCGGGCATATGAAAACATTTGAAA

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P8。

<400>8

CGGAGGATCCTGCGGAGCTAAATGGGC

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P9。

<400>9

GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P10。

<400>10

CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P11。

<400>11

GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCATTAAATTAAAATTTGGT

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P12。

<400>12

CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P8'。

<400>13

CGCGGATCCTTAAGCTAAATGGGC

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P9'。

<400>14

CCGCAGGATCCTCCGGCTCCCCAGTCTATT

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>合成的引物序列 P11 '。

<400>15

CCGCAGGATCCTCCGATTAAATTAAAATTTGGT

<210> 16

<211>756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NapA-LTB 融合蛋白质的 DNA 序列

<400> 16

ATGAAAACAT TTGAAATTTT AAAACATTTG CAAGCGGATG CGATCGTGTT ATTTATGAAA
GTGCATAACT TCCATTGGAA TGTGAAAGGC ACCGATTTTT TCAATGTGCA TAAAGCCACT
GAAGAAATTT ATGAAGAATT TGCGGACATG TTTGATGATC TCGCTGAAAG AATCGCTCAA
TTAGGACACC ACCCCTTAGT CACTTTATCC GAAGCGCTCA AACTCACTCG TGTTAAAGAA
GAAACTAAAA CGAGCTTCCA CTCTAAAGAC ATCTTTAAAG AAATTCTAGG CGATTACAAA
CACCTAGAAA AAGAATTTAA AGAGCTTTCT AACACCGCTG AAAAAGAAGG CGATAAAGTT
ACCGTAACTT ATGCGGACGA TCAATTGGCC AAGTTGCAAA AATCCATTTG GATGCTAGAA
GCCCATTTAG CTCCGCAGGA TCCTCCGGCT CCCCAGTCTA TTACAGAACT ATGTTCGGAA
TATCGCAACA CACAAATATA TACGATAAAT GACAAGATAC TATCATATAC GGAATCGATG
GCAGGTAAAA GAGAAATGGT TATCATTACA TTTAAGAGCG GCGCAACATT TCAGGTCGAA
GTCCCGGGCA GTCAACATAT AGACTCCCAA AAAAAAGCCA TTGAAAGGAT GAAGGACACA
TTAAGAATCA CATATCTGAC CGAGACCAAA ATTGATAAAT TATGTGTATG GAATAATAAA
ACCCCCAATT CAATTGCGGC AATCAGTATG GAAAAC

<210> 17

<211>819

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>NapA-CTB 融合蛋白质的 DNA 序列

<400> 17

ATGAAAACAT TTGAAATTTT AAAACATTTG CAAGCGGATG CGATCGTGTT ATTTATGAAA
GTGCATAACT TCCATTGGAA TGTGAAAGGC ACCGATTTTT TCAATGTGCA TAAAGCCACT
GAAGAAATTT ATGAAGAATT TGCGGACATG TTTGATGATC TCGCTGAAAG AATCGCTCAA
TTAGGACACC ACCCCTTAGT CACTTTATCC GAAGCGCTCA AACTCACTCG TGTTAAAGAA
GAAACTAAAA CGAGCTTCCA CTCTAAAGAC ATCTTTAAAG AAATTCTAGG CGATTACAAA
CACCTAGAAA AAGAATTTAA AGAGCTTTCT AACACCGCTG AAAAAGAAGG CGATAAAGTT
ACCGTAACTT ATGCGGACGA TCAATTGGCC AAGTTGCAAA AATCCATTTG GATGCTAGAA
GCCCATTTAG CTCCGCAGGA TCCTCCGATT AAATTAAAAT TTGGTGTTTT TTTTACAGTT
TTACTATCTT CAGCATATGC ACATGGAACA CCTCAAAATA TTACTGATTT GTGTGCAGAA
TACCACAACA CACAAATATA TACGCTAAAT GATAAGATAT TTTCGTATAC AGAATCTCTA
GCTGGAAAAA GAGAGATGGC TATCATTACT TTTAAGAATG GTGCAATTTT TCAAGTAGAA
GTACCAGGTA GTCAACATAT AGATTCACAA AAAAAAGCGA TTGAAAGGAT GAAGGATACC
CTGAGGATTG CATATCTTAC TGAAGCTAAA GTCGAAAAGT TATGTGTATG GAATAATAAA
ACGCCTCATG CGATTGCCGC AATTAGTATG GCAAATTAA

<210> 18

<211> 1584

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NapA-HpaA-UreB414-LTB 融合蛋白的 DNA 序列

<400> 18

ATGAAAACAT TTGAAATTTT AAAACATTTG CAAGCGGATG CGATCGTGTT ATTTATGAAA
GTGCATAACT TCCATTGGAA TGTGAAAGGC ACCGATTTTT TCAATGTGCA TAAAGCCACT
GAAGAAATTT ATGAAGAATT TGCGGACATG TTTGATGATC TCGCTGAAAG AATCGCTCAA
TTAGGACACC ACCCCTTAGT CACTTTATCC GAAGCGCTCA AACTCACTCG TGTTAAAGAA
GAAACTAAAA CGAGCTTCCA CTCTAAAGAC ATCTTTAAAG AAATTCTAGG CGATTACAAA
CACCTAGAAA AAGAATTTAA AGAGCTTTCT AACACCGCTG AAAAAGAAGG CGATAAAGTT
ACCGTAACTT ATGCGGACGA TCAATTGGCC AAGTTGCAAA AATCCATTTG GATGCTAGAA
GCCCATTTAG CTCCGCAGGA TCCTCCGAAT TACCACCCAG CAAGCGAGAA AGTTCAAGCG
TTAGATGAAA AGATTTTGCT TTTAAGGCCA GCTTTCCAAT ATAGCGATAA TATCGCTAAA
GAGTATGAAA ACAAATTCAA GAATCAAACC GCGCTCAAGG TTGAACAGAT TTTGCAAAAT
CAAGGCTATA AGGTTATTAG CGTAGATAGC AGCGATAAAG ACGATTTTTC TTTTGCACAA

AAAAAAGAAG GGTATTTGGC GGTTGCTATG AATGGCGAAA TTGTTTCACG CCCCGATCCT
AAAAGGACCA TACAGAAAAA ATCAGAACCC GGGTTATTAT TCTCCACCGG TTTGGACAAA
ATGGAAGGGG TTTTAATCCC GGCTGGGTTT ATTAAGGTTC CTGCAGTACC TCCACCTGAC
ACTTTGAATG AAGCTGGTTG TGTAGAAGAC ACTATGGCAG CTATTGCTGG GCGCACTATG
CACACTTTCC ACACTGAAGG CGCTGGCGGC GGACACGCTC CTGATATTAT TAAAGTGGCC
GGCGAACACA ACATTCTACC CGCTTCCACT AACCCCACTA TCCCTTTCAC TGTGAATACA
GAAGCAGAAC ACATGGACAT GCTTATGGTG TGCCACCACT TGGATAAAAG CATTAAAGAA
GATGTTCAGT TCGCTGATTC AAGGATCCGC CCTCAAACCA TTGCGGCTGA AGACACTTTG
CATGACATGG GGATTTTCTC AATCACCAGT TCTGACTCTC AAGCTATGGG TCGTGTGGGT
GAAGTTATCA CTAGAACTTG GCAAACAGCT GACAAAAACA AAAAAGAATT TGGAGGCGGA
AGTGGAGGAG GTAGTGCACC CCAGTCTATT ACAGAACTAT GTTCGGAATA TCGCAACACA
CAAATATATA CGATAAATGA CAAGATACTA TCATATACGG AATCGATGGC AGGTAAAAGA
GAAATGGTTA TCATTACATT TAAGAGCGGC GCAACATTTC AGGTCGAAGT CCCGGGCAGT
CAACATATAG ACTCCCAAAA AAAAGCCATT GAAAGGATGA AGGACACATT AAGAATCACA
TATCTGACCG AGACCAAAAT TGATAAATTA TGTGTATGGA ATAATAAAAC CCCCAATTCA
ATTGCGGCAA TCAGTATGGA TAAC

<210> 19

<211>1647

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NapA-HpaA-UreB414-CTB 融合蛋白质的 DNA 序列

<400> 19

ATGAAAACAT TTGAAATTTT AAAACATTTG CAAGCGGATG CGATCGTGTT ATTTATGAAA
GTGCATAACT TCCATTGGAA TGTGAAAGGC ACCGATTTTT TCAATGTGCA TAAAGCCACT
GAAGAAATTT ATGAAGAATT TGCGGACATG TTTGATGATC TCGCTGAAAG AATCGCTCAA
TTAGGACACC ACCCCTTAGT CACTTTATCC GAAGCGCTCA AACTCACTCG TGTTAAAGAA
GAAACTAAAA CGAGCTTCCA CTCTAAAGAC ATCTTTAAAG AAATTCTAGG CGATTACAAA
CACCTAGAAA AAGAATTTAA AGAGCTTTCT AACACCGCTG AAAAAGAAGG CGATAAAGTT
ACCGTAACTT ATGCGGACGA TCAATTGGCC AAGTTGCAAA AATCCATTTG GATGCTAGAA
GCCCATTTAG CTCCGCAGGA TCCTCCGAAT TACCACCCAG CAAGCGAGAA AGTTCAAGCG
TTAGATGAAA AGATTTTGCT TTTAAGGCCA GCTTTCCAAT ATAGCGATAA TATCGCTAAA
GAGTATGAAA ACAAATTCAA GAATCAAACC GCGCTCAAGG TTGAACAGAT TTTGCAAAAT
CAAGGCTATA AGGTTATTAG CGTAGATAGC AGCGATAAAG ACGATTTTTC TTTTGCACAA
AAAAAAGAAG GGTATTTGGC GGTTGCTATG AATGGCGAAA TTGTTTCACG CCCCGATCCT
AAAAGGACCA TACAGAAAAA ATCAGAACCC GGGTTATTAT TCTCCACCGG TTTGGACAAA
ATGGAAGGGG TTTTAATCCC GGCTGGGTTT ATTAAGGTTC CTGCAGTACC TCCACCTGAC
ACTTTGAATG AAGCTGGTTG TGTAGAAGAC ACTATGGCAG CTATTGCTGG GCGCACTATG
CACACTTTCC ACACTGAAGG CGCTGGCGGC GGACACGCTC CTGATATTAT TAAAGTGGCC
GGCGAACACA ACATTCTACC CGCTTCCACT AACCCCACTA TCCCTTTCAC TGTGAATACA

GAAGCAGAAC ACATGGACAT GCTTATGGTG TGCCACCACT TGGATAAAAG CATTAAAGAA
GATGTTCAGT TCGCTGATTC AAGGATCCGC CCTCAAACCA TTGCGGCTGA AGACACTTTG
CATGACATGG GGATTTTCTC AATCACCAGT TCTGACTCTC AAGCTATGGG TCGTGTGGGT
GAAGTTATCA CTAGAACTTG GCAAACAGCT GACAAAAACA AAAAAGAATT TGGAGGCGGA
AGTGGAGGAG GTAGTATTAA ATTAAAATTT GGTGTTTTTT TTACAGTTTT ACTATCTTCA
GCATATGCAC ATGGAACACC TCAAAATATT ACTGATTTGT GTGCAGAATA CCACAACACA
CAAATATATA CGCTAAATGA TAAGATATTT TCGTATACAG AATCTCTAGC TGGAAAAAGA
GAGATGGCTA TCATTACTTT TAAGAATGGT GCAATTTTTC AAGTAGAAGT ACCAGGTAGT
CAACATATAG ATTCACAAAA AAAAGCGATT GAAAGGATGA AGGATACCCT GAGGATTGCA
TATCTTACTG AAGCTAAAGT CGAAAAGTTA TGTGTATGGA ATAATAAAAC GCCTCATGCG
ATTGCCGCAA TTAGTATGGC AAATTAA

<210> 20

<211>1275

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> NapA-HpaA-UreB414 融合蛋白质的 DNA 序列

<400> 20

ATGAAAACAT TTGAAATTTT AAAACATTTG CAAGCGGATG CGATCGTGTT ATTTATGAAA
GTGCATAACT TCCATTGGAA TGTGAAAGGC ACCGATTTTT TCAATGTGCA TAAAGCCACT
GAAGAAATTT ATGAAGAATT TGCGGACATG TTTGATGATC TCGCTGAAAG AATCGCTCAA
TTAGGACACC ACCCCTTAGT CACTTTATCC GAAGCGCTCA AACTCACTCG TGTTAAAGAA
GAAACTAAAA CGAGCTTCCA CTCTAAAGAC ATCTTTAAAG AAATTCTAGG CGATTACAAA
CACCTAGAAA AAGAATTTAA AGAGCTTTCT AACACCGCTG AAAAAGAAGG CGATAAAGTT
ACCGTAACTT ATGCGGACGA TCAATTGGCC AAGTTGCAAA AATCCATTTG GATGCTAGAA
GCCCATTTAG CTCCGCAGGA TCCTCCGAAT TACCACCCAG CAAGCGAGAA AGTTCAAGCG
TTAGATGAAA AGATTTTGCT TTTAAGGCCA GCTTTCCAAT ATAGCGATAA TATCGCTAAA
GAGTATGAAA ACAAATTCAA GAATCAAACC GCGCTCAAGG TTGAACAGAT TTTGCAAAAT
CAAGGCTATA AGGTTATTAG CGTAGATAGC AGCGATAAAG ACGATTTTTC TTTTGCACAA
AAAAAAGAAG GGTATTTGGC GGTTGCTATG AATGGCGAAA TTGTTTCACG CCCCGATCCT
AAAAGGACCA TACAGAAAAA ATCAGAACCC GGGTTATTAT TCTCCACCGG TTTGGACAAA
ATGGAAGGGG TTTTAATCCC GGCTGGGTTT ATTAAGGTTC CTGCAGTACC TCCACCTGAC
ACTTTGAATG AAGCTGGTTG TGTAGAAGAC ACTATGGCAG CTATTGCTGG GCGCACTATG
CACACTTTCC ACACTGAAGG CGCTGGCGGC GGACACGCTC CTGATATTAT TAAAGTGGCC
GGCGAACACA ACATTCTACC CGCTTCCACT AACCCCACTA TCCCTTTCAC TGTGAATACA
GAAGCAGAAC ACATGGACAT GCTTATGGTG TGCCACCACT TGGATAAAAG CATTAAAGAA
GATGTTCAGT TCGCTGATTC AAGGATCCGC CCTCAAACCA TTGCGGCTGA AGACACTTTG
CATGACATGG GGATTTTCTC AATCACCAGT TCTGACTCTC AAGCTATGGG TCGTGTGGGT
GAAGTTATCA CTAGAACTTG GCAAACAGCT GACAAAAACA AAAAAGAATT TGGAGGCGGA
AGTGGAGGAG GTAGT

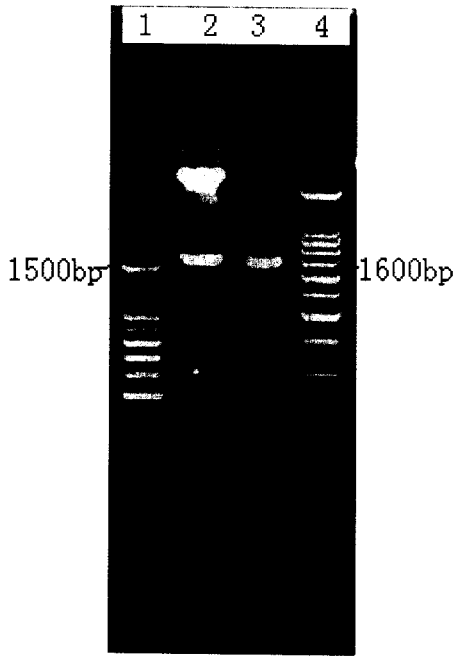


图 1

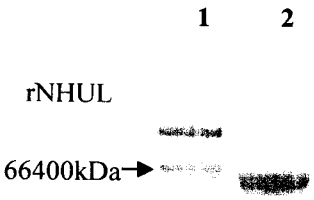


图 2

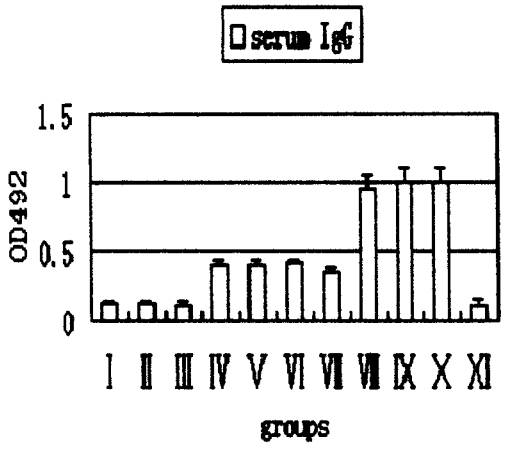

serum IgG
OD492
1.5
1
0.5
0
I II III IV V VI VII VIII IX X XI
groups

图 3

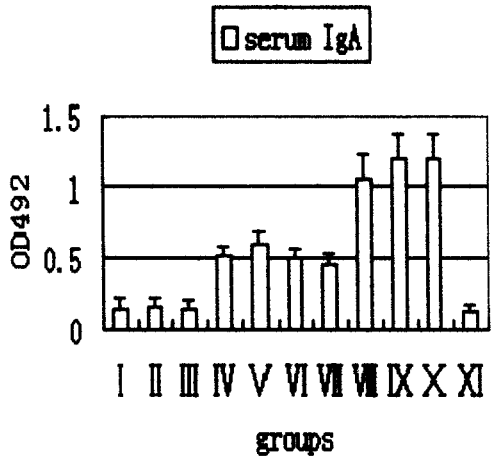

serum IgA
OD492
1.5
1
0.5
0
I II III IV V VI VII VIII IX X XI
groups

图 4

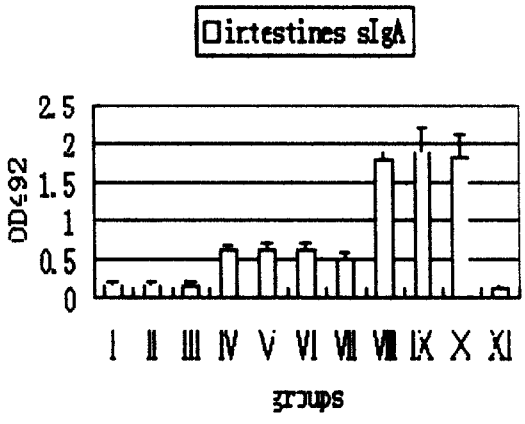

intestines sIgA
OD492
2.5
2
1.5
1
0.5
0
I II III IV V VI VII VIII IX X XI
groups

图 5

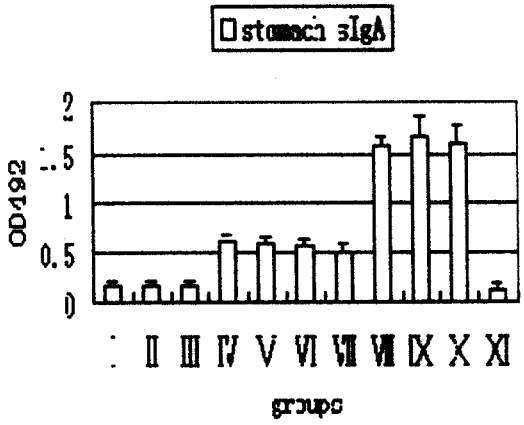


图 6