[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/31
C07K 14/22 C07K 16/12
A61K 39/095 A61K 39/40
A61K 31/711

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818571.9

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433471A

[22] 申请日 2000.11.28 [21] 申请号 00818571.9

[30] 优先权

[32] 1999.11.29 [33] GB [31] 9928197.4

[32] 2000. 3. 9 [33] GB [31] 0005698.6

[86] 国际申请 PCT/IB00/01851 2000.11.28

[87] 国际公布 WO01/38350 英 2001.5.31

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.22

[71] 申请人 启龙股份公司

地址 意大利锡耶纳

共同申请人 国家公共卫生研究所

[72] 发明人 M·M·朱利亚尼 M·皮扎

R·拉普奥利 J·霍尔斯特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 47 页 序列表 35 页

附图 9 页

[54] 发明名称 85kgDa 奈瑟球菌的抗原

[57] 摘要

已克隆、测序和表达了脑膜炎奈瑟球菌和淋病奈瑟球菌的 85kDa 抗原。 这种抗原对脑膜炎奈瑟球菌的多种菌株、血清群和血清型是共有的，而且在淋病奈瑟球菌、多糖奈瑟球菌和乳糖奈瑟球菌中也是共有的。 脑膜炎奈瑟球菌(血清群 A 和 B)和淋病奈瑟球菌的该蛋白质的序列是高度同源的。

ISSN1008-4274

1．包括一个或多个如下氨基酸序列的蛋白质：SEQ ID 1、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5、SEQ ID 7、SEQ ID 8、SEQ ID 9、SEQ ID 11、SEQ ID 12、SEQ ID 13、和 SEQ ID 14 到 104。

2．包括与如下序列相同性高于 50%的序列的蛋白质：SEQ ID 1、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5、SEQ ID 7、SEQ ID 8、SEQ ID 9、SEQ ID 11、SEQ ID 12 或 SEQ ID 13。

3．包括选自以下序列的至少 7 个连续氨基酸的片段的蛋白质：SEQ ID 1、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5、SEQ ID 7、SEQ ID 8、SEQ ID 9、SEQ ID 11、SEQ ID 12 或 SEQ ID 13。

4．与权利要求 1-3 任一所述的蛋白质结合的抗体。

5．编码权利要求 1-3 任一所述的蛋白质的核酸。

6．含有 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 的核酸。

7．含有与 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 序列相同性高于 50%的序列的核酸。

8．含有选自 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 的至少 10 个连续核苷酸的片段的核酸。

9．一种组合物，其特征在于，所述的组合物含有权利要求 1-3 任一所述的蛋白质，权利要求 4 所述的抗体，和/或权利要求 5-8 任一所述的核酸。

10．如权利要求 9 所述的组合物，其特征在于，所述的组合物还含有一种或多种选自以下的免疫原性成分：

- WO99/57280 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO99/36544 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO99/24578 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO97/28273 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO96/29412 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO95/03413 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO99/31132 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的保护性抗原；

- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的保护性抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的保护性抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 W 的保护性抗原；
- 抗流感嗜血菌的保护性抗原；
- 抗肺炎球菌的保护性抗原；
- 抗白喉的保护性抗原；
- 抗破伤风的保护性抗原；
- 抗百日咳的保护性抗原；
- 抗幽门螺旋杆菌的保护性抗原；
- 抗脊髓灰质炎的保护性抗原；和/或
- 抗乙型肝炎病毒的保护性抗原。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的组合物，其特征在于，所述的组合物用作药物。

12. 如权利要求 9 或 10 所述的组合物，其特征在于，所述的组合物用作疫苗。

13. 权利要求 9 或 10 所述的组合物在制备用于治疗或预防奈瑟球菌引起的感染的药物中的用途。

14. 一种治疗患者的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的权利要求 9 或 10 所述的组合物。

85kDa 奈瑟球菌的抗原

在本文中提及的所有文件都全部通过引用纳入本文。

技术领域

本发明涉及来自细菌脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)和淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)的抗原。

背景技术

脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)是不能动的、对人有致病性的革兰氏阴性双球菌。其聚集于咽部，导致脑膜炎，并且偶尔会在不引起脑膜炎的情况下导致败血病。该菌与淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)非常接近，虽然脑膜炎奈瑟球菌与淋病奈瑟球菌间的一个明显差异是在所有致病性脑膜炎奈瑟球菌中存在多糖荚膜。

脑膜炎奈瑟球菌会导致地方性和流行性疾病。在美国其发病率每年每 100,000 人为 0.6-1 人，而且爆发时发病率会更高[Lieberman 等人,(1996)JAMA 275(19):1499-1503; Schuchat 等人(1997) N Engl J Med 337(14):970-976]。在发展中国家，地方性发病率更高，在地方性发病率每年每 100,000 人可达 500 个病例。死亡率特别高，在美国为 10-20%，在发展中国家则更高。在引进针对流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)的偶联疫苗以后，脑膜炎奈瑟球菌是造成美国各年龄层细菌性脑膜炎主要的原因[Schuchat 等人(1997)，同上]。

根据该菌的荚膜多糖，已经鉴定出 12 种脑膜炎奈瑟球菌的血清群。目前使用的脑膜炎球菌疫苗是由血清群 A、C、Y 和 W135 组成的四价多糖疫苗。在针对流感嗜血菌疫苗的成功之后，已开发了针对血清群 A 和 C 的偶联疫苗。

然而脑膜炎球菌 B 仍是一个问题。这种血清群导致约占美国、欧洲和南美脑膜炎总数的 50%。不能采用多糖方法，因为 menB 荚膜多糖是一种α(2-8)-相连的 N-乙酰神经氨酸的聚合物，它也存在于哺乳动物组织中。这就导致了对抗原的耐免，事实上如果引发应答，该应答将会是防自身的，因此是不良的。为了避免引发自体免疫和引发保护性免疫应答，将荚膜多糖进行例如化学修饰，

用 N-丙酰基替代 N-乙酰基，而不改变其特异性抗原性[Romero & Outschoorn(1994) Clin Microbiol Rev 7(4):559-575]。

另一种 menB 疫苗方法是采用外膜蛋白(OMP)的混合物，其仅含有 OMP 或富含在膜孔蛋白中的 OMP，或除去 4 型 OMP(据信其引发封阻杀菌活性的抗体)。这些疫苗的性质还未确定，而且仅对同源菌株有效。为了克服抗原性变异，已经构建了含有高达 9 种不同膜孔蛋白的多价疫苗(例如，Poolman JT(1992) Infect. Agents Dis. 4:13-28]。用于外膜疫苗的其它蛋白是 opa 和 opc 蛋白，但是这些方法均不能克服抗原性变异[例如 Ala' Aldeen 和 Borriello(1996)Vaccine 14(1):49-53]。然而挪威国家公共卫生研究所的疫苗是安全的，在儿童和成年人中可引起菌株-特异性免疫，并能有效预防青少年疾病。

但对这些疫苗的定性都不够，而且至今未探明它们效果和保护作用的分子基础。本发明的目的是确定疫苗的抗原性成分从而对它们定性，以便生产界定更清楚的疫苗(如非细胞亚基疫苗)，并能扩大引发的免疫所针对的奈瑟球菌的范围。

发明公开

蛋白质

本发明提供了包含一个或多个选自以下氨基酸序列的蛋白质：SEQ ID 1、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5、SEQ ID 7、SEQ ID 8、SEQ ID 9、SEQ ID 11、SEQ ID 12 和 SEQ ID 13。

本发明还提供了具有与 SEQ ID 1、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5、SEQ ID 7、SEQ ID 8、SEQ ID 9、SEQ ID 11、SEQ ID 12 或 SEQ ID NO: ID 13 有序列相同性的序列的蛋白质。根据具体的序列，序列相同性的程度宜大于 50%(例如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。这些同源的序列包括突变体和等位基因变体。通常，两种蛋白质间 50%或以上的相同被视为功能相当的指示。两个序列之间的相同性宜用 Smith-Waterman 同源性搜寻算法确定，如在 MPSRCH 程序(Oxford Molecular)中，采用参数“缺口罚分(gap penalty)”为 12，“缺口延伸罚分(gap extension penalty)”为 1 进行缺口仿射搜索。

本发明还提供了含有 SEQ ID 1、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5、SEQ ID 7、SEQ ID 8、SEQ ID 9、SEQ ID 11、SEQ ID 12 或 SEQ ID 13 的片段的蛋白质。该片段必须含有该序列的至少 n 个连续氨基酸，而且根据具体的序列，n 为 7 或以上(如 8、10、12、14、16、18、20 或更大)。该片段宜含有该序列的表位。

当然，本发明的蛋白质可以用多种方法制备(例如，重组表达、从细胞培养物中纯化、化学合成等)，并可以是各种形式(例如天然的、融合的等)。它们宜制成基本上纯净的形式(即基本上不含其它奈瑟球菌或宿主细胞蛋白)。

抗体

另一方面，本发明提供了结合这些蛋白质的抗体。这些抗体可以是多克隆的或是单克隆的，并可用任何适合的方法制备。

核酸

另一方面，本发明提供了包含 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 的核酸。另外，本发明提供了含有与 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 有序列相同性的序列的核酸。根据具体的 SEQ ID，序列相同性的程度宜大于 50%(例如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)。两个序列之间的相同性宜用 Smith-Waterman 同源性搜寻算法确定，如在 MPSRCH 程序(Oxford Molecular)中，采用参数“缺口罚分(gap penalty)”为 12，“缺口延伸罚分(gap extension penalty)”为 1 进行缺口仿射搜索。

此外，本发明还提供了可杂交于 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 (较佳地在“高度严谨”条件下(如 65℃，0.1×SSC，0.5%SDS 溶液中)杂交)的核酸。

还提供了含有 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 的片段的核酸。这些核酸含有 SEQ ID 2、SEQ ID 6 或 SEQ ID 10 的至少 n 个连续核苷酸，而且根据具体的序列，n 为 10 或更大(如 12、14、15、18、20、25、30、35、40 或更大)。

另一方面，本发明提供了编码本发明蛋白质和蛋白质片段的核酸。

还应理解，本发明提供了一类核酸，所述核酸含有与上述序列互补的序列(例如用于反义或探测目的)。

当然，本发明的核酸可以用多种方法制备(例如，化学合成、从基因组或 cDNA 文库、或从生物体本身制得等)，并可以是各种形式(例如单链、双链、载体、探针等)。

此外，术语“核酸”包括 DNA 和 RNA，以及它们的类似物，如含有修饰骨架的那些类似物，还包括肽核酸(PNA)等。

另一方面，本发明提供了含有本发明的核苷酸序列的载体(如表达载体)以及用这些载体转化的宿主细胞。

组合物

另一方面，本发明提供了含有本发明蛋白质、抗体和/或核酸的组合物。这些组合物适合作为例如疫苗、诊断试剂或免疫原性组合物。

本发明的组合物还可含有选自以下一种或多种的免疫原性成分：

- WO99/57280 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO99/36544 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO99/24578 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- Tettelin 等人[Seience(2000) 287:1809-1815;NMB0001 到 NMB2160]公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO97/28273 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO96/29412 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO95/03413 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- WO99/31132 公开的蛋白质或其免疫原性片段；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的保护性抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的保护性抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的保护性抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 W 的保护性抗原；
- 抗流感嗜血菌的保护性抗原；
- 抗肺炎球菌的保护性抗原；
- 抗白喉的保护性抗原；
- 抗破伤风的保护性抗原；
- 抗百日咳的保护性抗原；
- 抗幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)的保护性抗原；
- 抗脊髓灰质炎的保护性抗原；和/或
- 抗乙型肝炎病毒的保护性抗原。

本发明的组合物宜含有选自以下的一种或多种免疫原性成分：

- 含有选自以下的氨基酸序列的蛋白质：如 WO99/24578 所述的 SEQ ID 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158,

160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410, 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578, 580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746, 748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788, 790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830, 832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 和 892(或含有一种或多种这些 SEQ ID 的免疫原性片段的蛋白质，或含有与这些 SEQ ID 之一有序列相同性(宜高于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；

- 含有选自以下氨基酸序列的蛋白质：如 WO99/36544 所述的 SEQ ID 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88,和 90(或含

有一种或多种这些SEQ ID的免疫原性片段的蛋白质，或含有与这些SEQ ID之一有序列相同性(宜高于50%，如60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；

- 由 Tettelin 等人[Science(2000) 287:1809-1815]所公开的 NMB0001 到 NMB2160 的 2160 个基因中任一个基因所编码的蛋白质(或含有这 2160 个基因中的一个或多个的免疫原性片段的蛋白质，或含有与这 2160 个基因中的一个序列相同(宜高于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；
- 含有选自以下氨基酸序列的蛋白质：如 WO99/57280 所述的 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326, 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368, 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410, 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494, 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536, 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578, 580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674,

676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746, 748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788, 790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830, 832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872, 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914, 916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956, 958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998, 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032, 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066, 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, 1086, 1088, 1090, 1092, 1094, 1096, 1098, 1100, 1102, 1104, 1106, 1108, 1110, 1112, 1114, 1116, 1118, 1120, 1122, 1124, 1126, 1128, 1130, 1132, 1134, 1136, 1138, 1140, 1142, 1144, 1146, 1148, 1150, 1152, 1154, 1156, 1158, 1160, 1162, 1164, 1166, 1168, 1170, 1172, 1174, 1176, 1178, 1180, 1182, 1184, 1186, 1188, 1190, 1192, 1194, 1196, 1198, 1200, 1202, 1204, 1206, 1208, 1210, 1212, 1214, 1216, 1218, 1220, 1222, 1224, 1226, 1228, 1230, 1232, 1234, 1236, 1238, 1240, 1242, 1244, 1246, 1248, 1250, 1252, 1254, 1256, 1258, 1260, 1262, 1264, 1266, 1268, 1270, 1272, 1274, 1276, 1278, 1280, 1282, 1284, 1286, 1288, 1290, 1292, 1294, 1296, 1298, 1300, 1302, 1304, 1306, 1308, 1310, 1312, 1314, 1316, 1318, 1320, 1322, 1324, 1326, 1328, 1330, 1332, 1334, 1336, 1338, 1340, 1342, 1344, 1346, 1348, 1350, 1352, 1354, 1356, 1358, 1360, 1362, 1364, 1366, 1368, 1370, 1372, 1374, 1376, 1378, 1380, 1382, 1384, 1386, 1388, 1390, 1392, 1394, 1396, 1398, 1400, 1402, 1404, 1406, 1408, 1410, 1412, 1414, 1416, 1418, 1420, 1422, 1424, 1426, 1428, 1430, 1432, 1434, 1436, 1438, 1440, 1442, 1444, 1446, 1448, 1450, 1452, 1454, 1456, 1458, 1460, 1462, 1464, 1466, 1468, 1470, 1472, 1474, 1476, 1478, 1480, 1482, 1484, 1486, 1488,

1490, 1492, 1494, 1496, 1498, 1500, 1502, 1504, 1506, 1508, 1510, 1512, 1514, 1516, 1518, 1520, 1522, 1524, 1526, 1528, 1530, 1532, 1534, 1536, 1538, 1540, 1542, 1544, 1546, 1548, 1550, 1552, 1554, 1556, 1558, 1560, 1562, 1564, 1566, 1568, 1570, 1572, 1574, 1576, 1578, 1580, 1582, 1584, 1586, 1588, 1590, 1592, 1594, 1596, 1598, 1600, 1602, 1604, 1606, 1608, 1610, 1612, 1614, 1616, 1618, 1620, 1622, 1624, 1626, 1628, 1630, 1632, 1634, 1636, 1638, 1640, 1642, 1644, 1646, 1648, 1650, 1652, 1654, 1656, 1658, 1660, 1662, 1664, 1666, 1668, 1670, 1672, 1674, 1676, 1678, 1680, 1682, 1684, 1686, 1688, 1690, 1692, 1694, 1696, 1698, 1700, 1702, 1704, 1706, 1708, 1710, 1712, 1714, 1716, 1718, 1720, 1722, 1724, 1726, 1728, 1730, 1732, 1734, 1736, 1738, 1740, 1742, 1744, 1746, 1748, 1750, 1752, 1754, 1756, 1758, 1760, 1762, 1764, 1766, 1768, 1770, 1772, 1774, 1776, 1778, 1780, 1782, 1784, 1786, 1788, 1790, 1792, 1794, 1796, 1798, 1800, 1802, 1804, 1806, 1808, 1810, 1812, 1814, 1816, 1818, 1820, 1822, 1824, 1826, 1828, 1830, 1832, 1834, 1836, 1838, 1840, 1842, 1844, 1846, 1848, 1850, 1852, 1854, 1856, 1858, 1860, 1862, 1864, 1866, 1868, 1870, 1872, 1874, 1876, 1878, 1880, 1882, 1884, 1886, 1888, 1890, 1892, 1894, 1896, 1898, 1900, 1902, 1904, 1906, 1908, 1910, 1912, 1914, 1916, 1918, 1920, 1922, 1924, 1926, 1928, 1930, 1932, 1934, 1936, 1938, 1940, 1942, 1944, 1946, 1948, 1950, 1952, 1954, 1956, 1958, 1960, 1962, 1964, 1966, 1968, 1970, 1972, 1974, 1976, 1978, 1980, 1982, 1984, 1986, 1988, 1990, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014, 2016, 2018, 2020, 2022, 2024, 2026, 2028, 2030, 2032, 2034, 2036, 2038, 2040, 2042, 2044, 2046, 2048, 2050, 2052, 2054, 2056, 2058, 2060, 2062, 2064, 2066, 2068, 2070, 2072, 2074, 2076, 2078, 2080, 2082, 2084, 2086, 2088, 2090, 2092, 2094, 2096, 2098, 2100, 2102, 2104, 2106, 2108, 2110, 2112, 2114, 2116, 2118, 2120, 2122, 2124, 2126, 2128, 2130, 2132, 2134, 2136, 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154, 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2184, 2186, 2188, 2190, 2192, 2194, 2196, 2198, 2200, 2202, 2204, 2206, 2208, 2210, 2212, 2214, 2216, 2218, 2220, 2222, 2224, 2226, 2228, 2230, 2232, 2234, 2236, 2238, 2240, 2242,

2244, 2246, 2248, 2250, 2252, 2254, 2256, 2258, 2260, 2262, 2264, 2266, 2268, 2270, 2272, 2274, 2276, 2278, 2280, 2282, 2284, 2286, 2288, 2290, 2292, 2294, 2296, 2298, 2300, 2302, 2304, 2306, 2308, 2310, 2312, 2314, 2316, 2318, 2320, 2322, 2324, 2326, 2328, 2330, 2332, 2334, 2336, 2338, 2340, 2342, 2344, 2346, 2348, 2350, 2352, 2354, 2356, 2358, 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392, 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426, 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460, 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494, 2496, 2498, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528, 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540, 2542, 2544, 2546, 2548, 2550, 2552, 2554, 2556, 2558, 2560, 2562, 2564, 2566, 2568, 2570, 2572, 2574, 2576, 2578, 2580, 2582, 2584, 2586, 2588, 2590, 2592, 2594, 2596, 2598, 2600, 2602, 2604, 2606, 2608, 2610, 2612, 2614, 2616, 2618, 2620, 2622, 2624, 2626, 2628, 2630, 2632, 2634, 2636, 2638, 2640, 2642, 2644, 2646, 2648, 2650, 2652, 2654, 2656, 2658, 2660, 2662, 2664, 2666, 2668, 2670, 2672, 2674, 2676, 2678, 2680, 2682, 2684, 2686, 2688, 2690, 2692, 2694, 2696, 2698, 2700, 2702, 2704, 2706, 2708, 2710, 2712, 2714, 2716, 2718, 2720, 2722, 2724, 2726, 2728, 2730, 2732, 2734, 2736, 2738, 2740, 2742, 2744, 2746, 2748, 2750, 2752, 2754, 2756, 2758, 2760, 2762, 2764, 2766, 2768, 2770, 2772, 2774, 2776, 2778, 2780, 2782, 2784, 2786, 2788, 2790, 2792, 2794, 2796, 2798, 2800, 2802, 2804, 2806, 2808, 2810, 2812, 2814, 2816, 2818, 2820, 2822, 2824, 2826, 2828, 2830, 2832, 2834, 2836, 2838, 2840, 2842, 2844, 2846, 2848, 2850, 2852, 2854, 2856, 2858, 2860, 2862, 2864, 2866, 2868, 2870, 2872, 2874, 2876, 2878, 2880, 2882, 2884, 2886, 2888, 2890, 2892, 2894, 2896, 2898, 2900, 2902, 2904, 2906, 2908, 2910, 2912, 2914, 2916, 2918, 2920, 2922, 2924, 2926, 2928, 2930, 2932, 2934, 2936, 2938, 2940, 2942, 2944, 2946, 2948, 2950, 2952, 2954, 2956, 2958, 2960, 2962, 2964, 2966, 2968, 2970, 2972, 2974, 2976, 2978, 2980, 2982, 2984, 2986, 2988, 2990, 2992, 2994, 2996,

2998, 3000, 3002, 3004, 3006, 3008, 3010, 3012, 3014, 3016, 3018 和 3020(或含有一种或多种这些 SEQ ID 的免疫原性片段的蛋白质,或含有与这些 SEQ ID 之一有序列相同性(宜高于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；

- WO97/28273 的图 4 或图 13 所公开的蛋白质；
- 含有选自如下氨基酸序列的蛋白质：如 WO96/29412 公开的 SEQ ID 1-8(或含有一种或多种这些 SEQ ID 的免疫原性片段的蛋白质，或含有与这些 SEQ ID 之一有序列相同性(宜高于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；
- 含有选自如下氨基酸序列的蛋白质：如 WO95/03413 公开的 SEQ ID 1-23(或含有一种或多种这些 SEQ ID 的免疫原性片段的蛋白质，或含有与这些 SEQ ID 之一有序列相同性(宜高于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；
- 含有选自如下氨基酸序列的蛋白质：如 WO99/31132 公开的 SEQ ID 2(或含有 SEQ ID 2 的免疫原性片段的蛋白质，或含有与 SEQ ID 2 序列相同(宜高于 50%，如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高)的序列的蛋白质)；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 的多糖抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 C 的多糖抗原，如 Costantino 等人(1992)Vaccine 10:691-698 所公开的；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 Y 的多糖抗原；
- 抗脑膜炎奈瑟球菌血清群 W 的多糖抗原；
- 抗流感嗜血菌的多糖抗原；
- 抗肺炎球菌的多糖抗原；
- 抗白喉的保护性抗原，由白喉类毒素如 CRM197 突变体[如，Del Guidice 等人(1998)Molecular Aspects of Medicine 19:1-70]构成；
- 抗破伤风的保护性抗原，由破伤风毒素[如 Wassilak & Orenstein，疫苗，第 4 章(Plotkin & Mortimer 编辑)，1988]构成；
- 抗百日咳的保护性抗原，由百日咳全毒素(PT)和丝状凝血素(FHA)构

成，还可任选地含有百日咳杆菌粘附素(pertactin)和/或凝集原 2 和 3[如，Gustafsson 等人(1996)N. Engl. J. Med. 334:349-355;Rappoli 等人(1991)TIBTECH 9: 232-238]；

- 抗幽门螺旋杆菌的保护性抗原，包含一种或多种 CagA(如 WO93/18150)、VacA(如，WO93/18150)、NAP(如，WO99/53310)、HopX(如 WO98/04702)、HopY(如，WO98/04702)、尿激酶；
- 抗乙型肝炎病毒的保护性抗原，由 HBV 表面抗原和/或 HBV 核心抗原构成。

当组合物含有抗白喉的抗原时，这种组合物宜含有抗破伤风和脊髓灰质炎的抗原。当组合物含有抗破伤风的抗原时，该组合物宜含有抗白喉和脊髓灰质炎的抗原。当组合物含有抗脊髓灰质炎的抗原时，该组合物宜含有抗白喉和破伤风的抗原。

百日咳毒素是毒素蛋白，当存在于组合物中时，宜将其去毒。去毒化可通过化学和/或遗传方法进行。优选的去过毒的突变体是 9K/129G 双突变体[如，Rappuoli(1997)Nature Medicine 3:374-376]。

当组合物含有以不同新生和成熟形式存在的蛋白质时，宜选用该蛋白质的成熟形式。例如，当含有 NspA 时，(WO96/29412;还可参见 Martin 等人(1997)J. Exp. med 185 1173-1183)宜选用没有信号肽的蛋白质成熟形式。

当组合物含有多糖抗原时，宜将多糖偶联于载体蛋白。

组合物中本发明的蛋白质宜与组合物中的至少一种保护性抗原协同地相互作用。

治疗、预防、诊断

本发明还提供了用作药剂(宜为疫苗)或作为诊断试剂的本发明的组合物。本发明还提供了本发明的组合物在生产下列物质中的应用：(i)用于治疗或预防奈瑟球菌属细菌感染的药剂；(ii)用于检测奈瑟球菌属细菌或检测抗奈瑟球菌属细菌抗体是否存在的诊断试剂；和/或(iii)用于产生抗奈瑟球菌属细菌的抗体的试剂。所述奈瑟球菌属细菌可以是任何物种或菌株(例如淋病奈瑟球菌)，但优选脑膜炎奈瑟球菌，尤其是血清群 B。

本发明还提供了一种治疗患者的方法，该方法包括给予患者治疗有效量的本发明的核酸、蛋白质和/或抗体。该方法宜为免疫法。

本发明的疫苗可以是预防性(即预防感染)或治疗性的(即治疗感染后的疾病)。

方法

另一方面，本发明提供了各种方法。

提供了一种生产本发明的蛋白的方法，该方法包括步骤：在诱导蛋白表达的条件下，培育本发明的宿主细胞。

提供了一种生产本发明的蛋白质或核酸的方法，其中用化学法部分或全部地合成所述蛋白或核苷酸。

提供了一种检测本发明的多核苷酸的方法，该方法包括下列步骤：(a)在杂交条件下使本发明的核酸探针与生物样品接触，形成双链体；和(b)检测所述的双链体。

提供了一种检测本发明的蛋白质的方法，该方法包括下列步骤：(a)在适合形成抗体-抗原复合物的条件下使本发明的抗体和生物样品接触；和(b)检测所述复合物。

本发明的实施方案

以下是可用于实施本发明(例如为了免疫或诊断目的而使用所公开的序列)的标准技术和程序的综述。该综述不是对本发明的限制，相反它只是给出了一些可以使用但并非必需的例子。

综述

除非另有描述，本发明的实施将采用分子生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术，这些均是本领域技术人员所知的。这些技术在下列文献中有全面的描述：例如，Sambrook《分子克隆：实验手册》第 2 版(1989)；《DNA 克隆》第 I 和 II 卷(D.N. Glover 编 1985)；《寡核苷酸的合成》(M.J. Gait 编，1984)；《核酸的杂交》(B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编. 1984)；《转录和翻译》(B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编，1984)；《动物细胞培养》(R.I. Freshney 编，1986)；

《固定化细胞和酶》(IRL Press，1986)；B. Perbal，《分子克隆实用指南》(1984)；《酶学方法》系列丛书(Academic Press，Inc.)，尤其是 154 和 155 卷；《哺乳动物细胞的基因转移载体》(J.H. Miller 和 M.P. Calos 编，1987，Cold Spring Harbor Laboratory)；Mayer 和 Walker 编(1987)，《细胞和分子生物学的免疫化学方法》(Academic Press，London)；Scopes,(1987)《蛋白质的纯化：原理和实践》第 2 版(Springer-Verlag，N.Y.)，以及《实验免疫学手册》I-IV 卷(D.M. Weir 和 C.C. Blackwell 编 1986)。

在本说明书中采用了核苷酸和氨基酸的标准缩写。

当组合物中 X+Y 总重量的至少 85%是 X 时，则称含有 X 的组合物“基本无 Y”。较佳地，X 占组合物中 X+Y 总重量的至少约 90%，更佳地为至少约 95%或者甚至 99%(重量)。

术语“包含”指“含有”和“由.....构成”，例如“包含”X 的组合物可以完全由 X 构成，或者可以含有 X 之外的物质，例如 X＋Y。

术语“异源”指在自然界中发现不在一起的两种生物学组分。这种组分可以是宿主细胞、基因、或调控区如启动子。尽管异源组分在自然界中发现不在一起，但是它们能一起起作用，例如当与某基因异源的一种启动子与该基因操作性相连时。另一个例子是奈瑟球菌序列与小鼠宿主细胞异源。另一例子是来自相同或不同蛋白质的两个表位，它们已经以自然界没有的排列方式组装在一个蛋白质中。

“复制起点”是启动和调节多核苷酸(例如表达载体)复制的一种多核苷酸序列。复制起点可作为细胞内多核苷酸复制的自主性单位，能在其自身的控制下进行复制。复制起点是载体在特定宿主细胞中复制所需要的。有了某一复制起点，表达载体就能在细胞中合适蛋白的存在下高拷贝数地复制。这些起点的例子是在酵母中有效的自主复制序列；以及在 COS-7 细胞中有效的病毒性 T-抗原。

“突变体”指与天然或已公开的序列不同但具有序列相同性的 DNA、RNA 或氨基酸序列。根据具体的序列，天然或已公开的序列与突变序列间序列相同性的程度宜高于 50%(如 60%、70%、80%、90%、95%、99%或更高，用上述 Smith-Waterman 算法计算)。如本文所述，本文提供的核酸序列的核酸分子或

区域的“等位基因突变体”，是在另一或第二种分离物基因组的基本上同个基因座上存在的核酸或区域，它们由于例如突变或重组而导致的天然变异而具有类似但不相同的核酸序列。编码区域的等位基因突变体通常编码具有与相比较的基因所编码的蛋白质的类似的活性。等位基因突变体还可编码基因 5’或 3’未翻译区域(如调控区)中的变化(如，参见美国专利 No.5,753,235)。

表达系统

奈瑟球菌属细菌的核苷酸序列可在各种不同的表达系统中表达；例如那些使用哺乳动物细胞、杆状病毒、植物、细菌和酵母的系统。

i. 哺乳动物系统

哺乳动物表达系统是本领域中已知的。哺乳动物启动子是能结合哺乳动物 RNA 聚合酶并启动编码序列(如结构基因)的下游(3')转录成 mRNA 的任何 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区，其通常邻近编码序列的 5'端，还具有一个 TATA 盒，其通常位于转录起始位点上游 25-30 个碱基对(bp)处。认为 TATA 盒指导 RNA 聚合酶 II 在正确位点开始 RNA 合成。哺乳动物启动子还含有一个上游启动子元件，其通常位于 TATA 盒上游 100 至 200bp 内。该上游启动子元件决定了转录启动的速度，并可在两个方向之一上起作用[Sambrook 等人(1989)“克隆基因在哺乳动物细胞中的表达”《分子克隆：实验手册》，第 2 版]。

哺乳动物病毒基因通常是高表达的，具有广泛的宿主范围；因此，编码哺乳动物病毒基因的序列提供了特别有用的启动子序列。例子包括 SV40 早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 LTR 启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)以及单纯疱疹病毒启动子。另外，从非病毒基因(如鼠金属硫蛋白基因)衍生的序列也提供了有用的启动子序列。表达可以是组成型的或受调控的(诱导型)，取决于启动子能否在激素反应性细胞中用促糖皮质激素诱导。

增强元件(增强子)的存在，联合上述启动子元件通常会提高表达水平。增强子是这样一种调控性 DNA 序列，当其与同源或异源启动子相连，合成在正常的 RNA 起始位点开始时，它能刺激转录提高 1000 倍。当增强子位于转录起始位点的上游或下游，处于正常或翻转方向，或距离启动子 1000 个核苷酸以上的距离时，它均具有活性[Maniatis 等人(1987)Science 236:1237；Alberts 等人

(1989) 《细胞分子生物学》，第 2 版]。从病毒衍生的增强子元件可能是特别有用的，因为它们通常具有较宽的宿主范围。例子包括 SV40 早期基因增强子[Dijkema 等人(1985) EMBO J. 4：761]以及衍生自 Rous 肉瘤病毒的长末端重复序列(LTR)的增强子/启动子[Gorman 等人(1982b)Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777]以及来自人巨细胞病毒的增强子/启动子[Boshart 等人(1985) Cell 41:521]。另外，一些增强子仅仅在诱导物(例如激素或金属离子)的存在下是可调节的并具有活性 [Sassone-Corsi 和 Borelli(1986) Trends Genet. 2:215；Maniatis 等人(1987)Science 236:1237]。

DNA 分子可在哺乳动物细胞中胞内表达。启动子序列可以和 DNA 分子直接相连，在这种情况下，重组蛋白 N 端的第一个氨基酸始终是甲硫氨酸，其由 ATG 起始密码子编码。如果需要，可通过和溴化氰体外培育来从蛋白上切下此 N 端。

另外，外来蛋白也可从细胞中分泌到生长培养基中，方法是产生嵌合的 DNA 分子，该 DNA 分子编码的融合蛋白包括一前导序列片段，该片段在哺乳动物细胞中提供了外源蛋白的分泌。较佳的，在前导序列片段和外源基因之间可以有能在体内或体外断裂的加工位点。前导序列片段通常编码一种信号肽，该信号肽由指导从细胞分泌出蛋白质的疏水性氨基酸组成。腺病毒三联前导序列是哺乳动物细胞中分泌外来蛋白的一个前导序列的例子。

通常，哺乳动物细胞识别的转录终止和聚腺苷酸化序列是位于翻译终止密码子 3'的调控区域，因此它和启动子元件一起侧接于编码序列。成熟 mRNA 的 3'端由定点的转录后断裂和聚腺苷酸化形成[Birnstiel 等人(1985) Cell 41:349; Proudfoot 和 Whitelaw(1988) "真核 RNA 的终端和 3'端加工"《转录和剪接》(B.D. Hames 和 D.M. Glover 编)；Proudfoot(1989) Trends Biochem. Sci. 14:105]。这些序列指导 mRNA 的转录，mRNA 能被翻译成该 DNA 编码的多肽。转录终止子/聚腺苷酸化信号的例子包括从 SV40 衍生的那些[Sambrook 等人(1989)“克隆基因在培养的哺乳动物细胞中的表达”《分子克隆：实验指南》]。

通常，上述组件，包括启动子、聚腺苷酸化信号以及转录终止序列被一起放入表达构建物中。如果需要，表达构建物中还包括增强子、具有功能性剪接供体和受体位点的内含子以及前导序列。构建物的表达通常以复制子形式维

持，例如是能在宿主(如哺乳动物细胞或细菌)中稳定维持的染色体外元件(如质粒)。哺乳动物复制系统包括从动物病毒衍生的那些系统，其需要反式作用因子来进行复制。例如，含有乳多空病毒复制系统的质粒，如 SV40[Gluzman(1981) Cell 23:175]或多瘤病毒，在合适的病毒 T 抗原的存在下复制出极高的拷贝数。哺乳动物复制子的其它例子包括衍生自牛乳头瘤病毒和 EB 病毒的复制子。另外，复制子可以有两个复制系统，从而使其能维持在例如哺乳动物细胞中进行表达并能在原核宿主中克隆和扩增。这些哺乳动物细菌穿梭载体的例子包括 pMT2 [Kaufman 等人(1989) Mol. Cell. Biol. 9:946]和 pHEBO[Shimizu 等人(1986)Mol. Cell. Biol. 6:1074]。

所用的转化步骤取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞中的方法是本领域所知的，其包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、Polybrene(1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物)介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸包裹在脂质体中以及将 DNA 直接显微注射到胞核中。

可作为宿主进行表达的哺乳动物细胞系是本领域中已知的，其包括许多从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的无限增殖的细胞系，包括但不局限于，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、海拉细胞、乳仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(如 Hep G2)和其它许多细胞系。

ii. 杆状病毒系统

也可将编码蛋白质的多核苷酸插入合适的昆虫表达载体中，并与该载体中的控制元件操作性相连。载体构建采用本领域已知的技术。总地来说，表达系统的组分包括一种转移载体，通常是细菌质粒，其含有杆状病毒基因组片段以及便于插入待表达异源基因的限制性位点；野生型杆状病毒，其序列与转移载体中的杆状病毒特异性片段同源(这使得异源基因能同源重组到杆状病毒基因组中)；以及合适的昆虫宿主细胞和生长培养基。

将编码蛋白质的 DNA 序列插入转移载体中后，将载体和野生型病毒基因组转染到昆虫宿主细胞中，使载体和病毒基因组重组。表达包装的重组病毒，鉴定并纯化重组噬斑。杆状病毒/昆虫细胞表达系统材料及其方法，除别的以外，可以试剂盒形式购自 Invitrogen，San Diego CA("MaxBac"试剂盒)。这些技术通常是本领域技术人员所知的，在 Summers 和 Smith 的 Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)(后称“Summer 和 Smith 的文章”)

中有充分描述。

在将编码蛋白质的 DNA 序列插入杆状病毒基因组之前，通常将上述组件，包括启动子、前导序列(如果需要)、感兴趣的编码序列以及转录终止序列装配在中间置换型构建物(转移载体)中。该构建物可含有单个基因以及操作性相连的调控元件；多个基因，每个基因有其自己的一套操作性相连调控元件；或是由同一组调控元件调控的多个基因。中间置换型构建物通常保持在一个复制子中，例如能在宿主(如细菌)内稳定保持的染色体外元件(如质粒)。复制子将具有一个复制系统，从而使其能保持在合适的宿主中进行克隆和扩增。

目前，用来将外源基因导入 AcNPV 的最常用的转移载体是 pAc373。还可设计本领域技术人员已知的其它许多载体。这些载体包括如 pVL985(其将多角体蛋白的起始密码子从 ATG 变为 ATT，并在 ATT 下游 32 个碱基对处引入一个 *BamH*I 克隆位点；见 Luckow 和 Summers，Virology(1989)17:31)。

质粒通常还含有多角体蛋白聚腺苷酸化信号(Miller 等人(1988) Ann. Rev. Microbiol.，42:177)以及用来在大肠杆菌中选择和繁殖的原核氨苄青霉素抗性(amp)基因和复制起点。

杆状病毒转移载体通常含有杆状病毒启动子。杆状病毒启动子是能结合杆状病毒 RNA 聚合酶并启动编码序列(如结构基因)下游(5'到 3')转录成 mRNA 的任何 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区，该区通常邻近编码序列的 5'端。该转录起始区通常包括一个 RNA 聚合酶结合位点以及一个转录起始位点。杆状病毒转移载体还可能具有称为增强子的第二区，如果该区域存在，它通常远离结构基因。表达可以是调控型或组成型的。

在病毒感染周期晚期大量转录的结构基因提供了特别有用的启动子序列。例子包括从编码病毒多角体蛋白的基因衍生获得的序列，Friesen 等人(1986)“杆状病毒基因表达的调控”《杆状病毒分子生物学》(Walter Doerfler 编辑)；EPO 公开号 127 839 和 155 476；以及编码 p10 蛋白的基因，Vlak 等人(1988)，J. Gen. Virol. 69:765。

编码合适的信号序列的 DNA 可以衍生自分泌的昆虫或杆状病毒蛋白的基因(如杆状病毒多角体蛋白基因)(Carbonell 等人,(1988) Gene，73:409)。另外，由于哺乳动物细胞翻译后修饰(如信号肽断裂、蛋白水解断裂和磷酸化)的信号看来可被昆虫细胞识别，且分泌和胞核积累所需的信号看来在无脊椎动物细胞和脊椎动物细胞之间是保守的，因此也可用非昆虫来源的前导序列来提供昆虫中的分泌，这些前导序列例如是从编码人α-干扰素(Maeda 等人(1985)，Nature

315:592)、人胃泌素释放的肽(Lebacq-Verheyden 等人(1988)，Molec. Cell. Biol. 8:3129)、人 IL-2(Smith 等人(1985) Proc. Nat'l.Acad Sci. USA，82:8404)、小鼠 IL-3 (Miyajima 等人(1987)Gene 58:273)和人葡糖脑苷脂酶(Martin 等人(1988)DNA，7:99)的基因衍生获得的。

重组多肽或聚蛋白可以在胞内表达，或如果它是用合适的调控序列表达的，就可被分泌。非融合的外源蛋白良好的胞内表达通常需要理想地具有短前导序列的异源基因在 ATG 起始信号前有合适的翻译起始信号。如果需要，可通过和溴化氰体外培育，从成熟蛋白上切下 N 端甲硫氨酸。

另外，通过产生嵌合的 DNA 分子将非天然分泌的重组聚蛋白或蛋白从昆虫细胞中分泌出来，该嵌合的 DNA 分子所编码的融合蛋白包含一前导序列片段，该片段提供了从昆虫中分泌外源蛋白的作用。该前导序列片段通常编码一种信号肽，该信号肽包含的疏水性氨基酸引导蛋白质转移到内质网中。

在插入了编码该蛋白表达产物前体的 DNA 序列和/或基因后，用转移载体的异源 DNA 和野生型杆状病毒的基因组 DNA 共同转化(通常是共转染)昆虫细胞宿主。此构建物的启动子和转录终止序列通常包含杆状病毒基因组 2-5kb 片段。将异源 DNA 引入杆状病毒中所需位点内的方法是本领域所知的。(见 Summers 和 Smith 的文章，同上；Ju 等人(1987)；Smith 等人，Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156；和 Luckow 和 Summers(1989))。例如，插入可以是通过同源双交换重组来插入一个基因如多角体蛋白基因中；插入还可以是插入构建的所需杆状病毒基因内的限制性酶切位点中。Miller 等人(1989)，Bioessays 4:91。当 DNA 序列被克隆在表达载体多角体蛋白基因位置中时，其 5'和 3'均侧接了多角体蛋白特异性序列，并位于多角体蛋白启动子的下游。

随后将新形成的杆状病毒表达载体包装到感染性重组杆状病毒中。发生频率很低(在约 1%和 5%之间)的同源重组；因此，共转染后产生的大多数病毒仍是野生型病毒。因此，需要用一种方法来鉴别重组病毒。该表达系统的一个优点是肉眼筛选能区分重组病毒。在病毒感染后期，天然病毒产生的多角体蛋白在受其感染细胞的胞核中产生的水平非常高。累积的多角体蛋白形成的包涵体，其还含有包埋颗粒。这些大小至多为 15 微米的包涵体具有高度的折光性，从而使它们呈现明亮的发光外观，在光学显微镜下很容易观察。感染了重组病毒的细胞缺少包涵体。为了区分重组病毒和野生型病毒，用本领域已知的技术将转染上清接种到单层昆虫细胞上形成噬斑。即，在光学显微镜下筛选存在(表明是野生型病毒)或不存在(表明是重组病毒)包涵体的噬斑。“当代微生物学方

法”第 2 卷(Ausubel 等人编辑)，16.8(增补 10，1990)；Summers 和 Smith 的文章，同上；Miller 等人(1989)。

已经开发出感染进入几种昆虫细胞的重组杆状病毒表达载体。例如，已经开发出用于感染以下昆虫细胞的重组杆状病毒：埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、苜蓿丫纹夜蛾(*Autographa californica*)、家蚕(*Bombyx mori*)、黑尾果蝇(*Drosophila melanogaster*)、草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)和粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)(WO 89/046699；Carbonell 等人(1985)J. Virol. 56:153；Wright(1986) Nature 321:718；Smith 等人(1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156;综述见 Fraser 等人(1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225)。

可以购得细胞和细胞培养基用于在杆状病毒/表达系统中直接表达和融合表达异源多肽；细胞培养技术是本领域技术人员通常所知的。参见 Summers 和 Smith 的文章，同上。

然后，经修饰的昆虫细胞可以生长在合适的营养培养基中，该培养基能稳定地保持该质粒于修饰的昆虫宿主中。当表达产物的基因处于可诱导的控制下时，可以使宿主生长至高密度，并诱导表达。另外，当表达是组成型时，产物将被连续表达到培养基中，营养性培养基必需不断循环，取出感兴趣的产物同时补充消耗的营养物。产物可用以下这些技术来纯化：例如层析，如 HPLC、亲和层析、离子交换层析等；电泳；密度梯度离心；溶剂抽提等。产物可按需作进一步纯化，以基本上除去所有也分泌到培养基中或由昆虫细胞裂解而产生的昆虫蛋白，以提供一种至少基本上不含宿主碎片如蛋白质、脂质和多糖的产物。

为了获得蛋白质的表达，将从转化子衍生获得的重组宿主细胞培育在允许重组蛋白的编码序列表达的条件下。这些条件将随所选定的宿主细胞而变。然而，本领域技术人员容易根据本领域已知的知识来确定该条件。

iii. 植物系统

本领域已知有许多植物细胞培养系统和全植物遗传表达系统。典型的植物细胞基因表达系统包括在以下专利中描述的那些，如：US 5,693,506；US 5,659,122；和 US 5,608,143。Zenk，Phytochemistry 30:3861-3863(1991)中描述了在植物细胞培养物中遗传表达的其它例子。除上述参考文献外，关于植物蛋白信号肽的描述还可在下列文献中找到：Vaulcombe 等人，Mol. Gen. Genet.

209:33-40(1987)；Chandler 等人，Plant Molecular Biology 3:407-418(1984)；Rogers，J. Biol. Chem. 260:3731-3738(1985)；Rothstein 等人,Gene 55:353-356(1987)；Whittier 等人，Nucleic Acids Research 15:2515-2535(1987)；Wirsel 等人，Molecular Microbiology 3:3-14(1989)；Yu 等人，Gene 122:247-253(1992)。关于用植物激素、赤霉素酸和赤霉素酸诱导分泌的酶调节植物基因表达的描述可在 R.L. Jones 和 J. MacMillin，Gibberellins，《植物生理学进展》，Malcolm B. Wilkins 编辑，1984 Pitman Publishing Limited，London，21-52 页中找到。描述其它调节代谢的基因的参考文献参见：Sheen，Plant Cell，2:1027-1038(1990)；Maas 等人，欧洲分子生物学协会杂志(EMBO J.) 9:3447-3452(1990)；Benkel 和 Hickey，美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci.). 84:1337-1339(1987)。

通常，利用本领域已知的技术，将所需的多核苷酸序列插入一表达盒中，该表达盒含有为在植物中操作而设计的基因调控元件。将该表达盒插入所需的表达载体中，表达盒的上游和下游有适合在植物宿主中表达的伴随序列。这些伴随序列可来自质粒或病毒，并为载体提供所需的性能，以允许载体将 DNA 从起初的克隆宿主(如细菌)中移动到所需植物宿主中。基础的细菌/植物载体构建物最好能提供宽的宿主范围原核复制起点；原核可选择的标记；以及，对于农杆菌转化而言，宜提供 T DNA 序列用于农杆菌介导的转移至植物染色体。当异源基因不易检测时，该构建物最好还具有一个适用于确定植物细胞是否已经转化的可选择标记基因。关于合适标记(例如对于禾草类家族成员)的综述可在 Wilmink 和 Dons，1993，Plant Mol. Biol. Reptr，11(2):165-185 中找到。

还建议采用适合将异源序列整合到植物基因组中的序列。这些序列可能包括用于同源重组的转座子序列以及允许将异源表达盒随机插入植物基因组中的 Ti 序列。合适的原核可选择标记包括抗生素(如氨苄青霉素或四环素)抗性标记。编码其它功能的其它 DNA 序列也可存在于载体中，这是本领域所知的。

本发明的核酸分子可包括在一个表达盒中来表达感兴趣的蛋白质。通常只要一个表达盒，但是两个或多个表达盒也是可行的。除了编码异源蛋白的序列外，重组表达盒还含有下列元件：启动子区域、植物 5'非翻译序列、起始密码子(根据结构基因原来是否具有而定)、以及转录和翻译终止序列。表达盒 5'和 3'端的独特限制性酶位点能使表达盒方便地插入预先存在的载体中。

异源编码序列可以用于任何与本发明有关的蛋白。编码感兴趣的蛋白的序列将编码出一个信号肽，该信号肽能适当地加工和转运蛋白质，并且通常缺少可能会导致本发明的所需蛋白与膜结合的序列。由于对于大部分来说，转录起

始区将针对发芽期间表达和转运的基因，采用提供转运的信号肽，也可提供转运感兴趣的蛋白质。通过这种方式，感兴趣的蛋白将从表达该蛋白的细胞中转运出来，并能被有效地收获。通常，种子中的分泌是通过糊粉或小盾体上皮层进入种子的胚乳。尽管不需要使蛋白从产生该蛋白的细胞中分泌出来，但是这种分泌有利于重组蛋白的分离和纯化。

由于所需基因产物的最终表达将在真核细胞中进行，因此需要确定克隆的基因部分是否含有作为内含子被宿主剪接体机制加工的序列。如果是这样，需要对“内含子”区进行定点诱变，以防止一部分遗传信息作为错误的内含子密码而丧失，Reed 和 Maniatis，Cell 41:95-105，1985。

可用微量移液管以机械方式转移重组 DNA，将载体直接显微注射到植物细胞中。Crossway，Mol. Gen. Genet，202:179-185。还可用聚乙二醇将遗传物质转移到植物细胞中，Krens 等人，Nature，296，72-74，1982。导入核酸片段的另一种方法是用小颗粒进行高速弹道贯穿，在这些小珠或颗粒的基质中或表面上带有核酸，Klein 等人，Nature，327，70-73，1987，Knudsen 和 Muller，1991，Planta，185:330-336 提出用颗粒轰击大麦胚乳以产生转基因大麦。还有一种导入方法是使原生质体和其它实体(微细胞(minicell)、细胞、溶酶体或其它可融合的脂质表面体)融合，Fraley 等人，美国科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)，79，1859-1863，1982。

载体也可通过电穿孔导入植物细胞中。(Fromm 等人，PNAS 82：5824，1958)。在该技术中，在含有基因构建物的质粒存在下电穿孔植物原生质体。高电场强度的电脉冲使生物膜可逆地被通透，从而允许导入质粒。电穿孔的植物原生质体重新形成细胞壁，分裂并形成植物愈伤组织。

能分离出原生质体并能培育成全再生植物的所有植物，都能用本发明进行转化，从而回收得到含有转基因的全植物。已经知道实际上可以从培育的细胞或组织再生所有的植物，其包括但不局限于，甘蔗、甜菜、棉花、果实和其它树、豆科植物和蔬菜的所有主要种类。一些合适的植物包括，例如，草莓属、莲花属、苜蓿属、驴食豆属、三叶草属、胡卢巴属、豇豆属、柑橘属、亚麻属、老鹳草属、木薯属(*Manihot*)、胡萝卜属(*Daucus*)、鼠耳芥属、芸苔属、萝卜属、白芥属、颠茄属、辣椒属、曼陀罗属、天仙子属、番茄属、烟草属、茄属、碧冬茄属、毛地黄属、*Majorana*、菊苣属、向日葵属、莴苣属、雀麦属、天门冬属、金鱼草属、龙骨角属、龙面花属(*Nemesia*)、天竺葵属、稷属、狼尾草属、毛茛属、千里光属、蛾蝶花属(*Salpiglossis*)、香瓜属、*Browaalia*、大豆属、黑

麦草属、玉蜀黍属、小麦属、蜀黍属和曼陀罗属各种类。

再生方式随各种植物而有所不同，但是通常是首先提供含有异源基因拷贝的转化的原生质体悬液。形成愈伤组织，从愈伤组织中诱生出枝条，随后是根。另外，从原生质体悬液可以诱生形成胚。这些胚象天然的胚那样发芽形成植物。培养基通常含有各种氨基酸和激素，如植物生长素和细胞分裂素。尤其是对于玉米和苜蓿属来说，在培养基中加入谷氨酸和脯氨酸也是很有利的。枝条和根通常同时发育。有效的再生取决于培养基、基因型以及培养史。如果控制了这三个变量，那么再生能完全再现和重复。

在一些植物细胞培养系统中，本发明所需的蛋白可能被分泌出来，或者蛋白可从全植物中提取出来。当本发明所需的蛋白被分泌到培养基中后，就可进行收集。或者，可以用机械方式破碎胚以及无胚-半种子或其它植物组织，以释放出分泌到细胞和组织之间的蛋白。将该混合物悬于缓冲液中，以收回可溶性蛋白。然后用常规的蛋白分离和纯化方法纯化重组蛋白。用常规方法调节时间、温度、pH、氧和体积等参数，以优化异源蛋白的表达和回收。

iv. 细菌系统

细菌表达技术是本领域已知的。细菌启动子是能结合细菌 RNA 聚合酶并启动下游(3')编码序列(如结构基因)转录成 mRNA 的 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区，其通常位于编码序列的 5'端附近。该转录起始区通常包括 RNA 聚合酶结合位点以及一个转录起始位点。细菌启动子可能还有第二个功能区域称为操纵子，它可能与毗邻的 RNA 合成开始的 RNA 聚合酶结合位点重叠。该操纵子允许负调节(可诱导)的转录，因为基因阻遏蛋白可能结合操纵子并因而抑制特定基因的转录。在负调节元件(如操纵子)不存在时，可能发生组成型表达。另外，正调节可通过基因激活蛋白结合序列来实现，如果有的话，该结合序列通常邻近 RNA 聚合酶结合序列的(5')。基因激活蛋白的例子是分解代谢物激活剂蛋白(CAP)，它帮助启动大肠杆菌(E. coli)中的 lac 操纵子的转录[Raibaud 等人(1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]。因此，表达的调控可能是正作用或负作用，从而增强或减弱转录。

编码代谢途径中的酶的序列提供了特别有用的启动子序列。例子包括衍生自糖(如半乳糖、乳糖(lac)[Chang 等人(1977) Nature 198:1056]和麦芽糖)代谢酶的启动子序列。其它例子包括衍生自生物合成酶(如色氨酸(trp))[Goeddel 等人(1980) Nuc. Acids Res. 8:4057；Yelverton 等人(1981) Nucl. Acids Res. 9:731；美

国专利 4,738,921；EP-A-0036776 和 EP-A-0121775]的启动子序列。β-内酰胺酶(bla)启动子系统[Weissmann(1981) "干扰素的克隆和其它错误" 《干扰素 3》(I. Gresser 编辑)]，λ噬菌体 PL[Shimatake 等人(1981) Nature 292:128]和 T5[美国专利 4,689,406]启动子系统也提供了有用的启动子序列。

另外，非天然存在的合成的启动子也可象细菌启动子一样起作用。例如，一种细菌或噬菌体启动子的转录激活序列可以和另一种细菌或噬菌体启动子的操纵子序列连接在一起，形成合成的杂交启动子[美国专利 4,551,433]。例如，tac 启动子是杂合的 trp-lac 启动子，它由 trp 启动子以及受 lac 阻遏蛋白调节的 lac 操纵子序列组成[Amann 等人(1983) Gene 25:167；de Boer 等人，(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:21]。另外，细菌启动子可包括非细菌来源但能结合细菌 RNA 聚合酶并启动转录的天然存在的启动子。天然存在的非细菌来源的启动子还能和相容的 RNA 聚合酶偶联在一起，从而在原核细胞中高水平地表达某些基因。噬菌体 T7 RNA 聚合酶/启动子系统就是一种偶联的启动子系统[Studier 等人(1986) J. Mol. Biol. 189:113；Tabor 等人(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1074]。另外，杂合的启动子还可由噬菌体启动子以及大肠杆菌操纵子区域组成(EP-A-0267 851)。

除了有功能的启动子序列外，有效的核糖体结合位点对于外来基因在原核细胞中的表达也是有用的。在大肠杆菌中，核糖体结合位点称为 Shine-Dalgarno(SD)序列，其包括起始密码子(ATG)以及在起始密码子上游 3-11 个核苷酸处的长度为 3-9 个核苷酸的序列[Shine 等人(1975) Nature 254:34]。认为 SD 序列是通过 SD 序列和大肠杆菌 16S rRNA 的 3'端之间碱基配对来促进 mRNA 与核糖体结合的[Steitz 等人(1979)"信使 RNA 中的遗传信号和核苷酸序列" 生物学调节和发育：基因表达"(编者 R.F. Goldberger)]。为了表达具有弱的核糖体结合位点的原核基因和真核基因[Sambrook 等人(1989)"克隆基因在大肠杆菌中的表达"《分子克隆实验手册》]。

DNA 分子可以在胞内表达。启动子序列可以直接与 DNA 分子相连，在这种情况下，N 端的第一个氨基酸始终是甲硫氨酸，其由 ATG 起始密码子编码。如果需要，可通过和溴化氰体外培育或通过和细菌甲硫氨酸 N-端肽酶体内或体外培育，将 N 端的甲硫氨酸从蛋白质上切下(EP-A-0219 237)。

融合蛋白为直接表达提供了另一种方法。通常，将编码内源细菌蛋白或其它稳定的蛋白之 N 端部分的 DNA 序列与异源编码序列的 5'端融合。在表达时，该构建物将提供这两个氨基酸序列的融合物。例如，λ噬菌体细胞基因可以和

外源基因的 5'端相连并在细菌中表达。所得融合蛋白宜保留一个酶(因子 Xa)加工位点，以便将噬菌体蛋白与外源基因切开[Nagai 等人(1984) Nature 309:810]。融合蛋白也可用 lacZ[Jia 等人(1987) Gene 60:197]，trpE[Allen 等人(1987) J. Biotechnol. 5:93；Makoff 等人(1989)，J. Gen. Microbiol. 135:11]以及 Chey[EP-A-0324 647]基因的序列组成。两个氨基酸序列连接处的 DNA 序列可以编码或不编码一可切割的位点。另一个例子是遍在蛋白融合蛋白。这种融合蛋白由遍在蛋白区域组成，该区域宜保留一个酶(例如遍在蛋白特异性加工蛋白酶)加工位点，以便将外源蛋白和遍在蛋白切开。通过这种方法，可以分离获得天然的外源蛋白[Miller 等人(1989)Bio/Technology 7:698]。

另外，还可通过产生嵌合的 DNA 分子来将外源蛋白分泌出细胞，该嵌合的 DNA 分子编码的融合蛋白含有一个信号肽序列片段，该序列片段能使细菌中的外源蛋白分泌出来[美国专利 4,336,336]。信号序列片段通常编码一个信号肽，该信号肽含有疏水性氨基酸，能指引蛋白分泌出细胞。蛋白质被分泌到生长培养基(革兰阳性菌)中或细胞内膜和外膜之间的周质间隙内(革兰阴性菌)。在编码的信号肽片段和外源基因之间宜具有能在体内或体外切割的加工位点。

编码合适信号序列的 DNA 可以从分泌性细菌蛋白的基因衍生获得，这些基因例如是大肠杆菌外膜蛋白基因(ompA)[Masui 等人(1983)，《基因表达的实验操作》；Ghrayeb 等人(1984) EMBO J. 3:2437]以及大肠杆菌碱性磷酸酶信号序列(phoA)[Oka 等人(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. 82：7212]。另一个例子是，可采用各种芽孢杆菌菌株的α淀粉酶基因的信号序列将异源蛋白分泌出枯草芽孢杆菌[Palva 等人(1982)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79：5582；EP-A-0244 042]。

通常，细菌所识别的转录终止序列是位于翻译终止密码子 3'的调控区，它和启动子一起侧接在编码序列的两侧。这些序列指导 mRNA 的转录，而 mRNA 能被翻译成该 DNA 所编码的多肽。转录终止序列通常包括约 50 个核苷酸的 DNA 序列，该序列能形成帮助终止转录的茎环结构。例子包括衍生自具有强启动子的基因(如大肠杆菌中的 trp 基因以及其它生物合成的基因)的转录终止序列。

上述组件，包括启动子、信号序列(如果需要)、感兴趣的编码序列以及转录终止序列通常一起被放在表达构建物中。表达构建物通常以复制子的形式维持，例如能在宿主(如细菌)中稳定维持的染色体外元件(如质粒)。复制子具有一个复制系统，从而允许其维持在原核宿主中或进行表达或进行克隆和扩增。另外，复制子可以是高拷贝数或低拷贝数的质粒。高拷贝数质粒的拷贝数大致在

约 5 至 200 之间，通常在约 10 至 150 之间。含有高拷贝数质粒的宿主宜含有至少约 10 个质粒，更佳的含有至少约 20 个质粒。根据载体以及外源蛋白对宿主的影响，可以选择高拷贝数或低拷贝数的载体。

另外，表达构建物可以和一个整合载体一起整合入细菌基因组中。整合载体通常含有至少一个序列与细菌染色体同源，从而允许该载体整合。整合看来是载体和细菌染色体中的同源 DNA 之间重组的结果。例如，用不同芽孢杆菌菌株的 DNA 构建的整合载体整合到芽孢杆菌染色体中(EP-A-0127 328)。整合载体还可包含噬菌体或转座子序列。

通常，染色体外构建物以及整合的表达构建物可含有可选择的标记，以便选择已经转化的菌株。可选择标记可在细菌宿主中表达，其包括赋予细菌对药物(如氨苄青霉素、氯霉素、红霉素、卡那霉素(新霉素)和四环素)抗性的基因[Davies 等人(1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469]。可选择标记还可包括生物合成性基因，如在组氨酸、色氨酸以及亮氨酸生物合成途径中的那些基因。

另外，上述某些组件可以一起放在转化载体中。转化载体通常包含一个可选择标记，如上所述，该载体以复制子形式维持或发展成一个整合载体。

已经开发出了用于转化到许多细菌中的表达和转化载体(无论是染色体外复制子还是整合载体)。例如，已经开发出了用于下列细菌的表达载体：枯草芽孢杆菌[Palva 等人，(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582；EP-A-0036 259 和 063 953；WO 84/04541]，大肠杆菌[Shimatake 等人，(1981) Nature 292:128；Amann 等人，(1985) Gene 40:183；Studier 等人，(1986) J. Mol. Biol. 189:113；EP-A-0036 776、136 829 和 136 907]，酪链球菌[Powell 等人，(1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]；浅青紫链球菌[Powell 等人,(1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655]，浅青紫链霉菌[美国专利 4,745,056]。

将外源 DNA 导入细菌宿主的方法是本领域熟知的，通常包括用氯化钙或其它试剂(如二价阳离子和二甲亚砜)处理对细菌进行转化。DNA 还可通过电穿孔方法导入细菌细胞。转化程序通常因待转化的细菌种类而不同。[例如参见，例如使用杆菌：Masson 等人，(1989) *FEMS Microbiol. Lett. 60*:273；Palva 等人，(1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79*:5582；EP-A-0036 259 和 063 953；WO 84/04541；使用弯曲杆菌：Miller 等人，(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. 85*:856；和 Wang 等人，(1990) *J. Bacteriol. 172*:949；使用埃希氏大肠杆菌：Cohen 等人，(1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. 69*:2110；Dower 等人，(1988) *Nucleic Acids Res. 16*:6127；Kushner (1978) "用 ColE1-衍生质粒转化大肠杆菌的改进方法" *Genetic*

Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (H.W. Boyer 和 S. Nicosia 编辑); Mandel 等人, (1970) *J. Mol. Biol. 53*:159; Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta 949*:318; 使用乳酸杆菌: Chassy 等人, (1987) *FEMS Microbiol. Lett. 44*:173; 使用假单胞菌: Fiedler 等人, (1988) *Anal. Biochem 170*:38; 使用葡萄球菌: Augustin 等人, (1990) *FEMS Microbiol. Lett. 66*:203; 使用链球菌: Barany 等人, (1980) *J. Bacteriol. 144*:698; Harlander (1987) "用电穿孔转化链球菌产乳酸微生物" *Streptococcal Genetics* (J. Ferretti 和 R. Curtiss III 编辑); Perry 等人, (1981) *Infect. Immun. 32*:1295; Powell 等人, (1988) *Appl. Environ. Microbiol. 54*:655; Somkuti 等人, (1987) *Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1*:412]。

v. 酵母表达

酵母表达系统也是本领域技术人员所知的。酵母启动子是能结合酵母 RNA 聚合酶并启动下游(3')编码序列(如结构基因)转录成 mRNA 的 DNA 序列。启动子具有一个转录起始区，它通常位于编码序列的 5'端附近。该转录起始区通常包括 RNA 聚合酶结合位点("TATA 盒")以及一个转录起始位点。酵母启动子可能还有第二个功能区域称为上游激活序列(UAS)，如果存在的话，它通常远离结构基因。UAS 允许调节(可诱导)的表达。在 UAS 不存在时，发生组成型表达。表达的调控可能是正作用或负作用的，从而增强或减弱转录。

酵母是一种发酵生物体，具有活泼的代谢途径，因此编码代谢途径中的酶的序列提供了特别有用的启动子序列。例子包括醇脱氢酶(ADH)(EP-A-0284 044)、烯醇酶、葡萄糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、甘油醛-3-磷酸-脱氢酶(GAP 或 GAPDH)、己糖激酶、磷酸果糖激酶、3-磷酸甘油酸变位酶、以及丙酮酸激酶(PyK)(EP-A-0329 203)。编码酸性磷酸酶的酵母 PHO5 基因也提供了有用的启动子序列[Myanohara 等人(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1]。

另外，非天然存在的合成的启动子也可象酵母启动子一样起作用。例如，一种酵母启动子的 UAS 序列可以和另一种酵母启动子的转录激活区连接在一起，形成合成的杂合启动子。这种杂合启动子的例子包括与 GAP 转录激活区相连的 ADH 调控序列(美国专利 No. 4,876,197 和 4,880,734)。杂合启动子的其它例子包括由 ADH2、GAL4、GAL10 或 PHO5 基因的调控序列组成的启动子与糖酵解酶基因如 GAP 或 PyK 的转录激活区的组合(EP-A-0164 556)。另外，酵母启动子可包括非酵母来源但能结合酵母 RNA 聚合酶并启动转录的天然存

在的启动子。这些启动子的例子包括，尤其是，[Cohen 等人，(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77*:1078；Henikoff 等人，(1981) *Nature 283*:835；Hollenberg 等人，(1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96*:119；Hollenberg 等人，(1979) "细菌抗生素抗性基因在酿酒酵母中的表达" *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (K.N. Timmis 和 A. Puhler 编辑)；Mercerau-Puigalon 等人，(1980) *Gene 11*:163；Panthier 等人，(1980) *Curr. Genet. 2*:109]。

DNA 分子可以在酵母菌胞内表达。启动子序列可以直接与 DNA 分子相连，在这种情况下，重组蛋白 N 端的第一个氨基酸始终是甲硫氨酸，其由 ATG 起始密码子编码。如果需要，可通过和溴化氰体外培育将 N 端的甲硫氨酸从蛋白质上切下。

象在哺乳动物、杆状病毒以及细菌表达系统中一样，融合蛋白为酵母表达系统提供了另一种方法。通常，将编码内源酵母蛋白或其它稳定的蛋白之 N 端部分的 DNA 序列与异源编码序列的 5'端融合。在表达时，该构建物将提供这两个氨基酸序列的融合物。例如，酵母或人超氧化物歧化酶(SOD)基因可以和外源基因 5'端相连并在酵母中表达。两个氨基酸序列连接处的 DNA 序列可以编码或不编码可切割的位点。例如参见 EP-A-0196 056。另一个例子是遍在蛋白融合蛋白。这种融合蛋白由遍在蛋白区域组成，该区域宜保留一个酶(例如遍在蛋白特异性加工蛋白酶)加工位点，以便将外源蛋白和遍在蛋白切开。因此，通过这种方法，可以分离获得天然的外源蛋白(例如 WO88/024066)。

另外，还可通过产生嵌合的 DNA 分子来将外源蛋白从细胞分泌到生长培养基中，该嵌合的 DNA 分子编码的融合蛋白含有一个前导序列片段，该前导序列片段能使酵母中的外源蛋白分泌出来。较佳的，在编码的前导片段和外来基因之间宜具有能在体内或体外切割的加工位点。该前导序列片段通常编码了含有疏水性氨基酸的信号肽，其引导蛋白从细胞分泌出来。

编码合适信号序列的 DNA 可以从分泌性酵母蛋白的基因衍生获得，这些基因例如有酵母转化酶基因(EP-A-0012 873；JPO 62:096,086)以及 A-因子基因(美国专利 4,588,684)。另外，非酵母来源的前导序列(如干扰素前导序列)的存在也能提供分泌出酵母的作用(EP-A-0060 057)。

较佳的一类分泌前导序列采用了酵母α-因子基因的片段，其含有"pre"信号序列和"pro"区。可采用的α因子片段的类型包括全长 pre-pro α因子前导序列(约 83 个氨基酸残基)以及截短的α-因子前导序列(通常约 25 至 50 个氨基酸残基)(美国专利 4,546,083 和 4,870,008；EP-A-0324 274)。采用α-因子前导片段提供分泌

作用的其它前导序列包括杂合的α-因子前导序列，其由第一个酵母的 pre 序列以及第二个酵母α因子的 pro 区域组成(例如见 WO 89/02463)。

通常，酵母识别的转录终止序列是位于翻译终止密码子 3'的调控区，其和启动子一起侧接在编码序列的两侧。这些序列指导 mRNA 的转录，而 mRNA 能被翻译成该 DNA 所编码的多肽。转录终止序列和其它酵母识别的终止序列的例子是编码糖酵解酶的那些转录终止序列。

上述组件，包括启动子、前导序列(如果需要时)、感兴趣的编码序列以及转录终止序列，通常被一起放在表达构建物中。表达构建物通常以复制子的形式保持，例如能在宿主(如酵母或细菌)中稳定保持的染色体外元件(如质粒)。复制子可能具有两个复制系统，从而允许其能维持在例如酵母中进行表达，并能维持在原核宿主进行克隆和扩增。这些酵母-细菌穿梭载体的例子包括 YEp24[Botstein 等人(1979) Gene 8:17-24]，pCL/1[Brake 等人,(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642-4646]和 YRp17[Stinchcomb 等人(1982) J. Mol. Biol. 158:157]。另外，复制子可以是高拷贝数或低拷贝数的质粒。高拷贝数质粒的拷贝数大致在约 5 至 200 之间，通常在约 10 至 150 之间。含有高拷贝数质粒的宿主宜含有至少约 10 个质粒，更佳的含有至少约 20 个质粒。根据载体以及外源蛋白对宿主的影响，可以选择高拷贝数或低拷贝数的载体。例如参见 Brake 等人，同上。

另外，表达构建物可以和一个整合载体一起整合入酵母基因组中。整合载体通常含有至少一个序列与酵母染色体同源，从而允许该载体整合，最好含有两个同源序列侧接该表达构建物。整合看来是载体和酵母染色体中同源 DNA 之间重组的结果[Orr-Weaver 等人(1983)Methods in Enzymol. 101:228-245]。通过选择合适的同源序列插入载体中，可将整合载体导入酵母中某一特定的基因座。见 Orr-Weaver 等人，同上。可以整合入一个或多个表达构建物，这可能会影响重组蛋白产生的水平[Rine 等人(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750]。载体中的染色体序列可以载体中的单个片段形式存在(从而导致整个载体的整合)，或是与染色体中的相邻片段同源的两个片段，这两个片段在载体中侧接在表达构建物两侧，从而可导致仅表达构建物的稳定性整合。

通常，染色体外构建物以及整合的表达可建物均含有可选择的标记，以便选择已经转化的酵母菌株。可选择标记可包括能在酵母宿主中表达的生物合成基因(如 ADE2、HIS4、LEU2、TRP1 和 ALG7 以及 G418 抗性基因)，这些基因分别赋予酵母细胞对衣霉素以及 G418 的抗性。另外，合适的可选择标记还可

能为酵母在毒性化合物(如金属)存在下提供生长能力。例如，CUP1 的存在使酵母能在铜离子存在下生长[Butt 等人，(1987) Microbiol，Rev. 51:351]。

另外，上述某些组件可以一起放在转化载体中。转化载体通常包含一个可选择标记，如上所述，该载体以复制子形式维持或发展成一个整合载体。

已经开发出了用于转化入许多酵母中的表达和转化载体(无论是染色体外复制子还是整合载体)。例如，已经开发出用于下列酵母菌的表达载体：白色念珠菌[Kurtz，等人，(1986) *Mol. Cell. Biol. 6*:142]，麦芽糖念珠菌[Kunze，等人，(1985) *J. Basic Microbiol. 25*:141]，多形汉逊酵母[Gleeson，等人，(1986) *J. Gen. Microbiol. 132*:3459；Roggenkamp 等人，(1986) *Mol. Gen. Genet. 202*:302]，脆壁克鲁维酵母[Das，等人，(1984) *J. Bacteriol. 158*:1165]，乳酸克鲁维酵母[De Louvencourt 等人，(1983) *J. Bacteriol. 154*:737；Van den Berg 等人，(1990) *Bio/Technology 8*:135]，季也蒙毕赤酵母[Kunze 等人，(1985) *J. Basic Microbiol. 25*:141]，巴斯德毕赤酵母[Cregg，等人，(1985) *Mol. Cell. Biol. 5*:3376；美国专利 No.4,837,148 和 4,929,555]，酿酒酵母[Hinnen 等人，(1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75*:1929；Ito 等人，(1983) *J. Bacteriol. 153*:163]，栗酒裂植酵母[Beach 和 Nurse (1981) *Nature 300*:706]，以及 *Yarrowia lipolytica* [Davidow，等人，(1985) *Curr. Genet. 10*:380471 Gaillardin，等人，(1985) *Curr. Genet. 10*:49]。

将外源 DNA 导入酵母宿主的方法是本领域熟知的，通常包括用碱阳离子处理转化原生质球或完整酵母细胞。转化程序通常因待转化的酵母种类而不同。例如参见，[Kurtz 等人，(1986) *Mol. Cell. Biol. 6*:142；Kunze 等人，(1985) *J. Basic Microbiol. 25*:141；念珠菌]；[Gleeson 等人，(1986) *J. Gen. Microbiol. 132*:3459；Roggenkamp 等人，(1986) *Mol. Gen. Genet. 202*:302；汉逊酵母]；[Das 等人，(1984) *J. Bacteriol. 158*:1165；De Louvencourt 等人，(1983) *J. Bacteriol. 154*:1165；Van den Berg 等人，(1990) *Bio/Technology 8*:135；克鲁维酵母]；[Cregg 等人，(1985) *Mol. Cell. Biol. 5*:3376；Kunze 等人，(1985) *J. Basic Microbiol. 25*:141；美国专利 No.4,837,148 和 4,929,555；毕赤酵母]；[Hinnen 等人，(1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75*;1929；Ito 等人，(1983) *J. Bacteriol. 153*:163 酿酒酵母]；[Beach 和 Nurse (1981) *Nature 300*:706;裂殖酵母]；[Davidow 等人，(1985) *Curr. Genet. 10*:39；Gaillardin 等人，(1985) *Curr. Genet. 10*:49；Yarrowia]。

抗体

本文所用的术语“抗体”指由至少一个抗体结合位点组成的一个或一组多

肽。“抗体结合位点”是一个三维结合空间，其内表面形状和电荷分布与抗原表位的特征互补，从而使抗体与抗原结合。“抗体”例如包括，脊椎动物抗体、杂合抗体、嵌合抗体、人源化抗体、经修饰的抗体、单价抗体、Fab 蛋白以及单结构域抗体。

针对本发明蛋白的抗体可用于亲和层析、免疫试验以及区别/鉴定奈瑟球菌蛋白。

针对本发明蛋白的多克隆和单克隆抗体可用常规方法制得。通常，首先用蛋白来免疫合适的动物，较佳的是小鼠、大鼠、家兔或山羊。由于可获得的血清体积多，能获得标记的抗家兔和抗山羊抗体，因此对于制备多克隆抗血清来说，家兔和山羊是较佳的。免疫通常这样进行：将蛋白以盐水(较佳的以佐剂如弗氏完全佐剂) 混合或乳化，然后肠胃外(通常是皮下或肌内)注射该混合物或乳剂。每次注射 50-200 微克的剂量就足够了。2-6 周后用盐水(较佳的是用弗氏不完全佐剂)配的蛋白质注射一次或多次以强化免疫。另外可以用本领域已知的方法进行体外免疫来产生抗体，从本发明的目的来看，认为其与体内免疫等效。将免疫后的动物血液抽取到玻璃或塑料容器中，25℃培育该血液 1 小时，然后 4℃培育 2-18 小时，获得多克隆抗血清。离心(例如 1000g 10 分钟)回收血清。家兔每次取血可获得约 20-50 毫升。

用 Kohler 和 Milstein 的标准方法[Nature(1975) 256:495-96]或其改进方法制得单克隆抗体。通常，如上所述对小鼠或大鼠免疫。然而，并非是对动物取血然后抽提血清，而是取出脾脏(以及任选地取出几个大的淋巴结)，将其分散成单细胞。如果需要，可将细胞悬液(在除去非特异性粘附的细胞后)加入包被了蛋白质抗原的板或孔中，对脾细胞进行筛选。表达抗原特异性的膜结合免疫球蛋白的 B 细胞结合到板上，不象悬液其它物质那样被洗去。然后对所得 B 细胞或所有解离的脾细胞进行诱导，使其与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤，培养在选择性培养基(如次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基，“HAT”)中。通过有限稀释接种所得杂交瘤，并测定特异性结合免疫抗原(且不结合无关抗原)的抗体的产生。然后，体外(例如在组织培养瓶或中空纤维反应器中)或体内(如小鼠腹水中)培养所选的分泌单克隆抗体的杂交瘤。

如果需要，抗体(无论是多克隆还是单克隆抗体)可用常规技术来标记。合适的标记包括荧光团、发色团、放射活性原子(尤其是 ^{32}P 和 ^{125}I)、密电子试剂、酶、以及具有特异性结合配偶的配体。酶通常靠其活性来检测。例如，辣根过氧化物酶通常是检测其将 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)转变成蓝色的能力，可

用分光光度计定量测定。“特异性结合配偶”指能以高特异性结合配体分子的蛋白质，例如抗原以及对其有特异性的单克隆抗体。其它特异性结合配偶包括生物素和亲和素或链亲和素，IgG 和蛋白 A，以及本领域已知的许多受体-配体对。应理解，上述内容并非要将各种标记分成不同的类，因为同一标记可在几种不同的模型中起作用。例如，^{125}I 可作为放射活性标记，或作为密电子试剂。HRP 可作为酶或单抗的抗原。另外，一种物质可以和各种标记组合以获得所需的效果。例如，在实施本发明中，单抗和亲和素也需要标记，因此，可以用生物素标记单抗，并用标记了 ^{125}I 的亲和素检测其存在，或用标记 HRP 的抗生物素单抗检测其存在。其它替换和可能性对于本领域普通技术人员来说是显而易见的，所以应认作属于本发明范围内的等价物。

药物组合物

药物组合物可包含本发明的多肽、抗体或核酸。该药物组合物将包含治疗有效量的本发明的多肽、抗体或多核苷酸。

本文所用的术语“治疗有效量”指治疗剂治疗、缓解或预防目标疾病或状况的量，或是表现出可检测的治疗或预防效果的量。该效果例如可通过化学标记或抗原水平来检测。治疗效果也包括生理性症状的减轻，例如导致体温降低。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。因此，预先指定准确的有效量是没用的。然而，对于某给定的症状而言，可以用常规实验来确定该有效量，临床医师是能够判断出来的。

为了本发明的目的，有效的剂量为给予个体约 0.01 毫克/千克至 50 毫克/千克或 0.05 毫克/千克至 10 毫克/千克的 DNA 构建物。

药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂(例如抗体、多肽、基因或其它治疗剂)给药的载体。该术语指这样一些药剂载体：它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体，且给药后没有过分的毒性。合适的载体可能是大的、代谢缓慢的大分子，如蛋白质、多糖、聚乳酸(polylactic acid)、聚乙醇酸、氨基酸聚合物、氨基酸共聚物以及无活性的病毒颗粒。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。

本文可用的药学上可接受的盐例如有：无机酸盐，如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等；以及有机酸盐，如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。在 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co.，N.J. 1991)中可找到

关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。

治疗性组合物中药学上可接受的载体可含有液体，如水、盐水、甘油和乙醇。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。通常，可将治疗性组合物制成可注射剂，例如液体溶液或悬浮液；还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。脂质体也包括在药学上可接受的载体的定义中。

给药方法

一旦配成本发明的组合物，可将其直接给予对象。待治疗的对象可以是动物；尤其可以治疗人对象。

直接输送该组合物通常可通过皮下、腹膜内、静脉内或肌内注射或输送至组织间隙来实现。组合物也可输送至病灶区。其它给药方式包括口服和肺给药、栓剂和透皮或经皮肤施用(参见例如 WO98/20734)、用针、基因枪或手持无针注射器(hypospray)。治疗剂量方案可以是单剂方案或多剂方案。

疫苗

疫苗包含免疫性抗原、免疫原、多肽、蛋白或核酸，通常与“药学上可接受的载体”组合，这些载体包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何载体。合适的载体通常是大的、代谢缓慢的大分子，如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、氨基酸聚合物、氨基酸共聚物、脂质凝集物(如油滴或脂质体)以及无活性的病毒颗粒。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。另外，这些载体可起免疫刺激剂(“佐剂”)作用。另外，抗原或免疫原可以和细菌类毒素(如白喉、破伤风、霍乱、幽门螺杆菌等病原体的类毒素)偶联。

增强组合物效果的较佳的佐剂包括但不局限于：(1)铝盐(alum)，如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等；(2)水包油型乳剂配方(有或没有其它特异性的免疫刺激剂，如胞壁酰肽(见下文)或细菌细胞壁成分)，例如，(a)MF59™(WO 90/14837；第 10 章“疫苗设计：亚基和佐剂方法”，Powell 和 Newman 编, Plenum Press, 1995)，其含有 5%鲨烯、0.5%吐温 80 和 0.5%Span 85(任选地含有不同量的 MTP-PE(见下文)，虽然并不需要)，用微量流化器(如 110Y 型微量流化器(Microfluidics，Newton，MA))制成亚微米级颗粒；(b)SAF，其含有 10%鲨烯、0.4%吐温 80、5%普卢兰尼克(pluronic)嵌段聚合物 L121 以及 thr-MDP(见下文)，微量流化成亚微米级乳剂或涡流振荡产生粒径较大的乳剂，和(c)Ribi™佐剂系

统(RAS)(Ribi Immunochem，Hamilton，MT)，其含有 2%鲨烯、0.2%吐温 80 以及选自单磷酰脂 A(MPL)、二霉菌酸海藻糖酯(TDM)、和细胞壁骨架(CWS)的一种或多种细菌细胞壁组分，较佳的是 MPL+CWS(Detox™)；(3)皂素佐剂，例如可采用 Stimulon™(Cambridge Bioscience，Worcester，MA)或从其产生的颗粒，如 ISCOM(免疫刺激性复合物)；(4)弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂(IFA)；(5)细胞因子，如白介素(如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 等)、干扰素(如γ干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CFS)、肿瘤坏死因子(TNF)等；以及(6)作为免疫刺激剂来增强组合物效果的其它物质。Alum 和 MF59™是较佳的。

如上所述，胞壁酰肽包括但不局限于，N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-去甲基胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰氨酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-*sn*-甘油-3-羟基磷酰氧)-乙胺(MTP-PE)等。

免疫原性组合物(如用于免疫的抗原/免疫原/多肽/蛋白/核酸，药学上可接受的载体以及佐剂)，通常含有稀释剂，如水，盐水，甘油，乙醇等。另外，辅助性物质，如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等可存在于这类运载体中。

通常，可将免疫原性组合物制成可注射剂，例如液体溶液或悬液；还可制成在注射前适合配入溶液或悬液、液体赋形剂的固体形式。该制剂还可乳化或包封在脂质体中，在上述药学上可接受的载体下增强佐剂效果。

用作疫苗的免疫原性组合物，包含免疫学有效量的抗原性或免疫原性多肽以及上述其它所需的组分。“免疫学有效量”指以单剂或连续剂一部分给予个体的量对治疗或预防是有效的。该用量根据所治疗个体的健康状况和生理状况、所治疗个体的类别(如非人灵长类、灵长类等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗的配制、治疗医师对医疗状况的评估、及其它的相关因素而定。预计该用量将在相对较宽的范围内，可通过常规实验来确定。

常规方法是从肠胃外途径通过注射给予免疫原性组合物，例如皮下、肌内或透皮给药(例如 WO98/20734)。适合其它给药方式的其它配方包括口服和肺制剂、栓剂和透皮施药。治疗剂量可以是单剂方案或多剂方案。疫苗可以结合其它免疫调节剂一起给予。

作为以蛋白质为基础的疫苗的一种替代方案是，可以采用 DNA 疫苗接种[例如，Robinson 和 Torres(1997) Seminars in Immunology 9:271-283；Donnelly 等人(1997) Annu Rev. Immunol 15:617-648；见下文]。

多核苷酸和多肽药物组合物

除了上述的药学上可接受的载体和盐外，多核苷酸和多肽组合物中还可采用下列附加试剂。

A. 多肽

一个例子是多肽，其包括但不局限于：脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)；运铁蛋白；脱唾液酸糖蛋白；抗体；抗体片段；铁蛋白；白介素；干扰素；粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)；粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、干细胞因子和促红细胞生成素。还可使用病毒抗原，如包膜蛋白。另外，可用来自其它侵袭性生物的蛋白，例如疟原虫恶性疟疾的环孢子蛋白的 17 个氨基酸的肽(称为 RII)。

B. 激素，维生素等

其它可包括的种类例如是：激素、类固醇、雄激素、雌激素、甲状腺激素或维生素、叶酸。

C. 聚亚烷基、多糖等

另外，聚(亚烷基)二醇可以和所需的多核苷酸或多肽组合在一起。在一个较佳的实施方案中，聚(亚烷基)二醇是聚乙二醇。另外，可以加入单糖、二糖或多糖。在此方面的一个较佳实施方案中，多糖是葡聚糖或 DEAE-葡聚糖。另外有脱乙酰壳多糖和聚交酯-聚乙醇酸内酯共聚物。

D. 脂质和脂质体

所需的多核苷酸或多肽还可在输送给对象或对象衍生的细胞之前包裹在脂质中或包裹在脂质体中。

脂质包裹通常用能稳定结合或捕获并保留核酸的脂质体来实现。浓缩的多核苷酸与脂质制剂之比可以不同，但是通常在约 1：1(毫克 DNA：微摩尔脂质)之间，或脂质更多。关于脂质体作为输送核酸的载体的综述参见 Hug 和 Sleight(1991) Biochim. Biophys. Acta. 1097:1-17； Straubinger(1983) Meth. Enzymol. 101:512-527。

用于本发明的脂质体制剂包括阳离子(带正电荷)、阴离子(带负电荷)和中性

制剂。阳离子脂质体已经显示出能以有功能的形式介导质粒 DNA 的胞内输送(Felgner(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416); mRNA (Malone (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6077-6081);和纯化的转录因子的胞内输送(Debs (1990) J. Biol. Chem. 265:10189-10192)。

阳离子脂质体很容易购得。例如，N[1-2,3-二油烯基氧)丙基]-N,N,N-三乙铵(DOTMA)脂质体可以以 Lipofectin 的商标从 GIBCO BRL，Grand Island，NY 购得。(另见 Felgner，同上)。其它商品脂质体包括 transfectace(DDAB/DOPE)和 DOTAP/DOPE(Boerhinger)。其它阳离子脂质体可用本领域熟知的方法从易购得的材料制得。例如参见，Szoka(1978) PNAS USA 75:4194-4198; WO90/11092 关于 DOTAP(1,2-二(油酰基氧)-3-(三甲基铵溶)丙烷)脂质体合成的描述。

同样，阴离子和中性脂质体也是容易获得的，例如购自 Avanti Polar Lipids(birmingham，AL)，或容易用易购得的材料制得。这种材料包括磷脂酰胆碱、胆固醇、磷脂酰乙醇胺、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。这些材料还能以合适比例与 DOTMA 和 DOTAP 原料混合。用这些材料制备脂质体的方法是本领域熟知的。

脂质体可包含多层脂质体(MLV)，小的单层脂质体(SUV)、或大的单层脂质体(LUV)。各种脂质体-核酸复合物可用本领域已知的方法制得。例如参见 Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101:512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394:483; Wilson (1979) *Cell* 17:77); Deamer 和 Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443:629; Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:836; Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3348); Enoch 和 Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:145; Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255:10431; Szoka 和 Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:145; 以及 Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215:166。

E. 脂蛋白

另外，脂蛋白也可加入待输送的多核苷酸或多肽中。采用的脂蛋白的例子包括：乳糜微粒、HDL、IDL、LDL 和 VLDL。还可采用这些蛋白的突变体、片段或融合蛋白。另外，可采用天然存在的脂蛋白的修饰物，例如乙酰化的 LDL。这些脂蛋白能使多核苷酸的输送指向表达脂蛋白受体的细胞。较佳的，如果待输送的多核苷酸中加入了脂蛋白，则组合物中不加入其它寻靶的配体。

天然存在的脂蛋白包含脂质和蛋白部分。蛋白部分称为脱辅基蛋白。目前，已经分离并鉴定出了脱辅基蛋白 A、B、C、D 和 E。其中至少有两个含有几种蛋白，用罗马数字 AI、AII、AIV；CI、CII、CIII 命名。

脂蛋白可包含多个脱辅基蛋白。例如，天然存在的乳糜微粒包含 A、B、C 和 E，随着时间的推移，这些脂蛋白失去 A，得到 C 和 E 脱辅基蛋白。VLDL 包含 A、B、C、和 E 脱辅基蛋白，LDL 包含脱辅基蛋白 B；HDL 包含脱辅基蛋白 A、C 和 E。

这些脱辅基蛋白的氨基酸是已知的，并且在下列文献中有所描述：Breslow (1985) Annu Rev. Biochem 54:699；Law (1986) Adv. Exp Med. Biol. 151:162；Chen (1986) J Biol Chem 261:12918；Kane (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:2465；and Utermann (1984) Hum Genet 65:232。

脂蛋白含有各种脂质，包括甘油三酯、胆固醇(游离的和酯型)以及磷脂。天然存在的脂蛋白中脂质的组成是不同的。例如，乳糜微粒主要含甘油三酯。关于天然存在的脂蛋白的脂质含量更详细的描述可在例如 Meth. Enzymol. 128(1986)中找到。选择脂质的组成，以使脱辅基蛋白的构型有利于受体结合活性。还可选择脂质的组成，以促进与多核苷酸结合分子中的疏水性相互作用和结合。

天然存在的脂蛋白可以用诸如超离心方法从血清中分离出来。这些方法在 Meth. Enzymol. (同上)；Pitas(1980) J. BioChem. 255:5454-5460 以及 Mahey(1979) J Clin. Invest 64:743-750 中有所描述。脂蛋白还可在体外产生，或通过在所需宿主细胞中表达脱辅基蛋白基因的重组方法产生。例如参见 Atkinson(1986) Annu Rev Biophys Chem 15:403 和 Radding(1958) Biochim Biophys Acta 30:443。脂蛋白也可购自商业供应商，如 Biomedical Techniologies，Inc.，Stoughton，Massachusetts，USA。关于脂蛋白的进一步描述可在 Zuckermann 等人的 WO98/06437 中找到。

F. 聚阳离子试剂

聚阳离子试剂可以与或不与脂蛋白一起包括在含所需待输送多核苷酸/多肽的组合物中。

聚阳离子试剂通常在生理性相关的 pH 下表现出净的正电荷，并能中和核酸的电荷，而有助于输送至所需位置。这些试剂具有体外、活体外和体内的用途。聚阳离子试剂可用来将核酸通过肌内或皮下等输送至活的对象。

下面是用作聚阳离子试剂的多肽例子：聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸和鱼精蛋白。其它例子包括组蛋白、鱼精蛋白、人血清白蛋白、DNA 结合蛋白、非组蛋白染色体蛋白、DNA 病毒的外壳蛋白，如(X174，转录因子还含有结合 DNA 的结构域，因此可用作核酸凝聚剂。简言之，转录因子如 C/CEBP、c-jun、c-fos、AP-1、AP-2、AP-3、CPF、Prot-1、Sp-1、Oct-1、Oct-2、CREP、和 TFIID 含有结合 DNA 序列的基本结构域。

聚阳离子有机试剂包括：精胺、亚精胺和腐胺。

从上面的清单可以推出聚阳离子试剂的尺寸和物理性能，以构建其它多肽聚阳离子试剂或产生合成的聚阳离子试剂。

有用的合成聚阳离子试剂例如包括，DEAE-葡聚糖、Polybrene。Lipofectin™和 lipofectAMINE™是与多核苷酸/多肽组合时形成聚阳离子复合物的单体。

核酸杂交

“杂交”指两个核酸序列相互之间通过氢键而结合。通常，一个序列固定于固体载体，另一个将游离于溶液内。然后，在有利于形成氢键的条件下使两个序列相互接触。影响这种结合的因素包括：溶剂的类型和体积；反应温度；杂交时间；搅拌；封闭液相序列与固体载体非特异性结合的试剂(Denhardt's 试剂或 BLOTTO)；各序列的浓度；是否使用化合物来增加序列结合的速度(硫酸葡聚糖或聚乙二醇)；以及杂交后洗涤条件的严谨程度。见 Sambrook 等人[同上]第 2 卷，第 9 章，9.47 至 9.57 页。

“严谨性”指有利于非常相似的序列结合而不利于不同序列结合的杂交反应条件。例如，应选择温度和盐浓度的组合，使温度比所研究的杂交的 Tm 计算值低大约 120 至 200℃。温度和盐浓度常可通过初步实验中凭经验来确定，在初步实验中，固定在滤膜上的基因组 DNA 样品与感兴趣的序列杂交，然后在不同的严谨度条件下洗涤。见 Sambrook 等人第 9.50 页。

在进行例如 Southern 印迹时，要考虑的参数是(1)待印迹的 DNA 的复杂性以及(2)探针与受检测序列之间的同源性。对于高度复杂的真核基因组中的单拷贝基因，待研究片段的总量可以在 10 的一个数量级范围内变化，质粒为 0.1 至 1 微克，或将噬菌体消化至 10^{-9} 至 10^{-8} 克。对于复杂性较低的多核苷酸，可以采用实际上更短的印迹、杂交以及接触时间，更少量的起始多核苷酸，以及比活更低的探针。例如，从 1 微克酵母 DNA 开始，用仅仅 1 小时的接触时间，印迹 2 小时，然后和 10^8cpm/μg 的探针杂交 4-8 小时，就可以检测单拷贝酵母基因。对于单拷贝哺乳动物基因而言，一种保守的方法是从 10 微克 DNA 开始，

印迹过夜，在 10%硫酸葡聚糖存在下用 10^8cpm/μg 以上的探针杂交过夜，导致接触时间约为 24 小时。

有几个因素可能会影响探针与感兴趣片段之间的DNA-DNA杂交物的解链温度(Tm)，因而影响杂交和洗涤的合适条件。在许多情况下，探针并非与待测片段 100%同源。其它常常遇到的变量包括杂交序列的长度和 G+C 总含量，以及杂交缓冲液的离子强度和甲酰胺含量。所有这些因素的作用可近似表示成一个方程式：

$$Tm=81+16.6(\log_{10}Ci)+0.4[\%(G+C)]-0.6(\%甲酰胺)-600/n-1.5(\%错配)$$

其中 Ci 是盐浓度(单价离子)，n 是杂交物碱基对的长度(对 Meinkoth 和 Wahl(1984) Anal. Biochem. 138:267-284 的方法稍作了修改)。

在设计杂交实验时，影响核酸杂交的一些因素可以方便地予以改变。杂交和洗涤时的温度以及洗涤时的盐浓度的调节最为简单。随着杂交温度(即严谨度)的升高，不同源的链之间发生杂交的可能性变得更少，结果背景值降低。如果放射性标记的探针并非与固定的片段完全同源(这在基因家族和种间杂交实验中是常见的)，则必须降低杂交温度，而背景值将会增加。洗涤温度以类似的方式影响杂交带的强度和背景值的程度。洗涤的严谨性也随盐浓度的降低而升高。

通常，在50%甲酰胺存在下的方便的杂交温度是：对于靶片段同源性达95%至 100%的探针而言，是 42℃；对于同源性为 90%至 95%的探针，为 37℃；对于同源性为 85%和 90%的探针，为 32℃。对于较低的同源性，应用上述方程式应相应地降低甲酰胺含量和调节温度。如果探针和靶片段之间的同源性是未知的，则最简单的方法是从非严谨的杂交和洗涤条件开始。如果在放射自显影后发现了非特异性的条带或高背景值，则可在高严谨性下洗涤滤膜，并重新曝光。如果曝光所需时间使得该方法不切实际，则应平行测试几种杂交和/或洗涤严谨性。

本发明实施方式

脑膜炎球菌 80-85kDa 蛋白质的鉴定

已发现从脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 制备的多种外膜小泡制剂含有约 80-85kDa 的成分。用 SDS-PAGE 凝胶纯化该蛋白质并进行 N-端测序(SEQ ID 1)。

制备的抗 SDS-PAGE 纯化蛋白的抗体与 50 种以上的不同血清群和血清型的脑膜炎奈瑟球菌菌株中的当量蛋白质相互反应。还观察到与淋病奈瑟球菌、多糖奈瑟球菌(*N.polysaccharia*)和乳糖奈瑟球菌(N.lactamica)的交叉反应。接受

过疫苗的患者的血清也与该蛋白质反应。

从血清群 B 脑膜炎奈瑟球菌克隆了完整的基因(SEQ ID 2)，并推断其编码的蛋白质(SEQ ID 3)。通过与上述 N-端测序相比较，推断出信号肽(SEQ ID 4)和成熟序列(SEQ ID 5)。

脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 和淋病奈瑟球菌中相应基因的鉴定

在血清群 B 脑膜炎奈瑟球菌序列的基础上，克隆和测序了脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 和淋病奈瑟球菌的相应序列(称为 'ORF21')。

SEQ ID 6 列出了血清群 A 脑膜炎奈瑟球菌的完整基因，SEQ ID 7 列出了其所编码的蛋白质。SEQ ID 8 和 9 是信号肽和成熟序列。

SEQ ID 10 列出了淋病奈瑟球菌的完整序列，SEQ ID 11 列出了其编码的蛋白质。SEQ ID 12 和 13 为信号肽和成熟序列。

序列的比较

将这些蛋白质序列进行比较，发现它们是高度同源的。

脑膜炎奈瑟球菌血清群 B 序列和淋病奈瑟球菌序列显示在 797aa 重叠的片段中有 95.4%相同。

```
                10        20        30        40        50        60
orf21.pep       MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDTYNDTHGSA
                ||||||||||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf2lng.pep     MKLKQIASALMMLGISPLAFADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDTYNDTHGSA
                10        20        30        40        50        60

                70        80        90        100       110       120
orf21.pep       IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf2lng.pep     IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ
                70        80        90        100       110       120
```

```
                130       140       150       160       170       180
orf21.pep       SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE
                130       140       150       160       170       180

                190       200       210       220       230       240
orf21.pep       FEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVTDFYQNNGYFDFRIL
                ||||||||||||||||||||||||||||||::|::||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     FEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSDRFDRQKFAQDMEKVTDFYQNNGYFDFRIL
                190       200       210       220       230       240

                250       260       270       280       290       300
orf21.pep       DTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ
                ||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     DTDIQTNEDKTRQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ
                250       260       270       280       290       300

                310       320       330       340       350       360
orf21.pep       MTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAETKTVDFVLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKT
                |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     MTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAGTKTVDFVLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKT
                310       320       330       340       350       360

                370       380       390       400       410       420
orf21.pep       RDEVVRRELRQMESAPYDTSKLQRSKERVELLGYFDNVQFDAVPLAGTPDKVDLNMSLTE
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     RDEVVRRELRQMESAPYDTSKLQRSKERVELLGYFDNVQFDAVPLAGTPDKVDLNMSLTE
                370       380       390       400       410       420

                430       440       450       460       470       480
orf21.pep       RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFTDPYFTA
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFTDPYFTA
                430       440       450       460       470       480

                490       500       510       520       530       540
orf21.pep       DGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT
                ||||||||:|||||||||||||:|||||||||:|:||::|||||||||||:||||||||
orf21ng.pep     DGVSLGYDIYGKAFDPRKASTSVKQYKTTTAGGGVRMGIPVTEYDRVNFGLAAEHLTVNT
                490       500       510       520       530       540

                550       560       570       580       590       600
orf21.pep       YNKAPKHYADFIKKYGKTDGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDSALWPTRGYLTGVNAEIA
                ||||||:|||||:|||||||:|||||| |||||||||||||| |||||||||||||||
orf21ng.pep     YNKAPKRYADFIRKYGKTDGADGSFKGLLYKGTVGWGRNKTDSASWPTRGYLTGVNAEIA
                550       560       570       580       590       600

                610       620       630       640       650       660
orf21.pep       LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVR
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVR
                610       620       630       640       650       660

                670       680       690       700       710       720
orf21.pep       GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
                670       680       690       700       710       720

                730       740       750       760       770       780
orf21.pep       KTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
                :||    ::| :|  :::|:  |:||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21ng.pep     RTY----TAAENGNNKSVYSE-NAHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
                          730       740       750       760       770

                790
orf21.pep       KPEDEIQRFQFQLGTTF
                |||||||||||||||||
orf21ng.pep     KPEDEIQRFQFQLGTTFX
                780       790
```

脑膜炎奈瑟球菌血清群 A 和 B 序列显示在 797aa 重叠的片段中有 99.9%相同。

```
                10        20        30        40        50        60
orf21.pep       MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDTYNDTHGSA
                ||||||||||:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      MKLKQIASALMVLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYLPVKVGDTYNDTHGSA
                10        20        30        40        50        60

                70        80        90        100       110       120
orf21.pep       IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ
                70        80        90        100       110       120

                130       140       150       160       170       180
orf21.pep       SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE
                130       140       150       160       170       180

                190       200       210       220       230       240
orf21.pep       FEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVTDFYQNNGYFDFRIL
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      FEGNQVYSDRKLMRQMSLTEGGIWTWLTRSNQFNEQKFAQDMEKVTDFYQNNGYFDFRIL
                190       200       210       220       230       240

                250       260       270       280       290       300
orf21.pep       DTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      DTDIQTNEDKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKWYERQQ
                250       260       270       280       290       300

                310       320       330       340       350       360
orf21.pep       MTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAETKTVDFVLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKT
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      MTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQPLPNAETKTVDFVLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKT
                310       320       330       340       350       360

                370       380       390       400       410       420
orf21.pep       RDEVVRRELRQMESAPYDTSKLQRSKERVELLGYFDNVQFDAVPLAGTPDKVDLNMSLTE
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      RDEVVRRELRQMESAPYDTSKLQRSKERVELLGYFDNVQFDAVPLAGTPDKVDLNMSLTE
                370       380       390       400       410       420

                430       440       450       460       470       480
orf21.pep       RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFTDPYFTA
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFTDPYFTA
                430       440       450       460       470       480

                490       500       510       520       530       540
orf21.pep       DGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      DGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT
                490       500       510       520       530       540

                550       560       570       580       590       600
orf21.pep       YNKAPKHYADFIKKYGKTDGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDSALWPTRGYLTGVNAEIA
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep      YNKAPKHYADFIKKYGKTDGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDSALWPTRGYLTGVNAEIA
                550       560       570       580       590       600

                610       620       630       640       650       660
```

AmpliTaq, Boerhingher Mannheim Expand™ Long Template)存在时，用 200ng 2996 或 MC58 菌株的基因组 DNA 或 10ng 从重组克隆得到的质粒 DNA 制备物作为模板。

将全部混合物在 95℃预先培育 3 分钟后，将每份样品进行两步的扩增：用排除引物限制酶拖尾的杂交温度(T_{m1})进行前 5 轮。然后，根据全长寡核苷酸计算的杂交温度(T_{m2})进行 30 轮。在 68℃或 72℃进行的延伸的时间根据要扩增的 Orf 的长度各不相同。对 Orf1 而言，延伸时间从 3 分钟开始，每轮增加 15 秒。循环在 72℃的 10 分钟延伸步骤中完成。

扩增的 DNA 直接加样到 1%琼脂糖凝胶上。按制造商说明，用 Qiagen Gel Extraction Kit 从凝胶纯化相应于正确大小条带的 DNA 片段。

用合适的限制酶消化纯化的相应于扩增的片段的 DNA，从而将其克隆入 pET-21b+或 pET22b+。用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(按制造商说明书)纯化消化的片段，并用 H_2O 或 10mM Tris(pH 8.5)洗脱。用合适的限制酶消化质粒载体，加样到 1.0%琼脂糖凝胶上，并用 Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit 纯化相应于消化的载体的条带。

将预先进行过消化和纯化的相应于各基因的片段连接入 pET21b+或 pET22b+。将摩尔比为 3：1 的片段/载体与 T4 DNA 连接酶在制造商提供的连接缓冲液中一起使用。

通过在冰上培育连接酶反应溶液和细菌 40 分钟，在 37℃培育 3 分钟，将重组的质粒转化入感受态大肠杆菌 DH5 或 HB101。然后添加 800μl LB 肉汤，在 37℃培育 20 分钟。在 Eppendorf 离心机上以最高速度离心这些细胞，重悬浮于约 200μl 上清液中，将它们置于 LB 氨苄青霉素(100mg/ml)琼脂上。

37℃将随机选出的集落在 4.0ml LB 肉汤＋100μg/ml 氨苄青霉素上生长过夜，筛选重组克隆。沉淀细胞，并按制造商的说明书用 Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit 提取质粒 DNA。用合适的内切酶消化约 1μg 各小量制备物，将消化物加样到 1-1.5%琼脂糖凝胶上(根据所需插入片段的尺寸)，与分子量标记物相平行(1kb DNA Ladder, GIOBCO)。按插入片段的尺寸为依据选出阳性克隆。

将各基因克隆入表达载体后，将重组质粒转化入适合重组蛋白表达的大肠杆菌菌株中。用 1μl 各构建物转化上述大肠杆菌 BL21-DE3。将单个重组集落接种到 2ml LB+Amp(100μg/ml)中，在 37℃培育过夜，然后以 1:30 稀释于 100ml 烧瓶内的 20ml LB+Amp(100μg/ml)中，使 OD_{600} 为 0.1 到 0.2 之间。将该烧瓶在 30℃或 37℃的回转式水浴振荡器上培育，直到 OD_{600} 显示已生长到适合表达培

```
orf21.pep     LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVR
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep    LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVR
                     610       620       630       640       650       660

                     670       680       690       700       710       720
orf21.pep     GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep    GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
                     670       680       690       700       710       720

                     730       740       750       760       770       780
orf21.pep     KTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
orf21a.pep    KTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
                     730       740       750       760       770       780

                     790
orf21.pep     KPEDEIQRFQFQLGTTF
              |||||||||||||||||
orf21a.pep    KPEDEIQRFQFQLGTTFX
                     790
```

高度保守表明单种蛋白质可能引发针对多种奈瑟球菌属物种的免疫应答。

克隆、表达和纯化

脑膜炎奈瑟球菌菌株 2996 和 MC58 在 100GC 培养基中生长至指数期，离心收获，并悬浮于 5ml 缓冲液中(20% w/v 蔗糖、50mM Tris-HCl、50mM EDTA，pH 8)。在冰上培育 10 分钟后，添加 10ml 裂解溶液(50mM NaCl、1% Na-Sarkosyl、50μg/ml 蛋白酶 K)裂解这些细菌，悬浮液在 37℃孵育 2 小时。进行二次苯酚抽提(平衡到 pH 8.0)，并进行一次 $CHCl_3$/异戊醇(24：1)提取。加入 0.3M 乙酸钠和 2 体积乙醇以沉淀 DNA，离心收集。用 70%(v/v)乙醇冲洗沉淀物 1 次，将它们再溶解于 4.0ml TE 缓冲液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH 8.0)。通过读取 OD_{260} 测定 DNA 的浓度。

用如下寡核苷酸，通过 PCR 扩增不含编码前导肽序列的 ORF21：

orf21 正向引物〈SEQ ID 105〉(*BamHI-NdeI*)

orf21 反向引物〈SEQ ID 106〉(*XhoI*)

5'引物包括 2 个限制位点(*BamHI-NdeI*)，3'引物包括 XhoI 限制位点，以便将扩增的产品(相应于 ORF21)直接克隆入两个表达载体：克隆 pGEX-KG(用 BamHI-XhoI)，以获得 N-端 GST-融合蛋白；和克隆入 pET21b+(用 *NdeI-XhoI*)，以获得 C-端 His-融合蛋白。

以下为标准 PCR 流程：在 40μM 各寡核苷酸引物、400-800μM dNTP 溶液、1x PCR 缓冲液(包括 1.5mM $MgCl_2$)、2.5 单位 TaqI DNA 聚合酶(用 Perkin-Elmer

育的指数生长期(0.4-0.8OD)。加入 0.1mM IPTG 诱导蛋白质的表达。在 30℃或 37℃培育 3 小时后，测定 OD600 并检验表达。将 1.0ml 各份样品在微型离心机上离心，将沉淀重悬浮于 PBS 中，用 SDS-PAGE 和考马斯蓝染色分析。

GST 融合蛋白被表达，但发现它是不溶的(即不可纯化)。His-融合蛋白被表达成不溶的蛋白质。

对作为 His 融合蛋白纯化的各克隆而言，划线培育单集落，37℃将它们在 LB/Amp(100μg/ml)的琼脂板上培育过夜。将从该板上分离的集落在 20ml LB/Amp(100μg/ml)液体培养基上培育，并在 37℃振荡生长过夜。将此过夜的培养物以 1：30 稀释于 1.0 升 LB/Amp(100μg/ml)液体培养基中，将其在最佳温度(30 或 37℃)生长，直到 OD_{550} 达到 0.6-0.8。加入 IPTG(终浓度为 1.0mM)引发重组蛋白的表达，将此培养物再培育 3 小时。4℃以 8000g 离心 15 分钟收获细菌。将细菌沉淀重悬浮于 7.5ml 缓冲液 B(8M 尿素、10mM Tirs-HCl、100mM 磷酸盐缓冲液，pH 8.8)中。用 450 型 Branson 超声波仪以 40W 在冰上超声处理四次(每次 30 秒)破坏细胞，在 4℃以 13000×g 离心 30 分钟。将沉淀重悬浮于 2.0ml 缓冲液 C(6M 盐酸胍、100mM 磷酸盐缓冲液、10mM Tirs-HCl、pH 7.5)中，并用 Dounce 匀浆器处理 10 次。将匀浆在 13000g 离心 30 分钟，保留上清液。将上清液与 150μl Ni^{2+}-树脂(预先用缓冲液 B 平衡过的)混合，在室温平缓搅拌条件下培育 30 分钟。该树脂是 Chelating Sepharose Fast Flow(Pharmacia)，按制造商的说明书制备的。将分批的制备物在 4℃以 700×g 离心 5 分钟，弃去上清液。用 10ml 缓冲液 B 冲洗树脂两次(分批)10 分钟，重悬浮于 1.0ml 缓冲液 B 中，加样到一次性柱上。在室温下，继续用缓冲液 B 冲洗树脂，直到流出液的 OD_{280} 达到 0.02-0.01。用缓冲液 D(8M 尿素、10mM Tirs-HCl、100mM 磷酸盐缓冲液，pH 6.3)进一步冲洗树脂，直到流出液的 OD_{280} 达到 0.02-0.01。加入 700μl 洗脱缓冲液 B(8M 尿素、10mM Tirs-HCl、100mM 磷酸盐缓冲液，pH 4.5)洗脱 His-融合蛋白，收集组分直到 OD_{280} 显示收集了所有的重组蛋白。用 SDS-PAGE 分析 20μl 每份的各洗脱组分。用 Bradford 分析评估蛋白质浓度。

为了使蛋白质复性，在上述得到的变性组分中加入甘油，使终浓度为 10% v/v。用渗析缓冲液 I(10% v/v 甘油、0.5M 精氨酸、50mM 磷酸盐缓冲液、5.0mM 还原的谷胱甘肽、0.5mM 氧化的谷胱甘肽、2.0M 尿素，pH 8.8)将蛋白质稀释至 200μg/ml，并用相同的缓冲液在 4℃透析 12-14 小时。然后用缓冲液 II(10%v/v 甘油、0.5M 精氨酸、50mM 磷酸盐缓冲液、5.0mM 还原的谷胱甘肽、0.5mM 氧化的谷胱甘肽，pH 8.8)在 4℃透析 12-14 小时。用下式计算蛋白质浓度：

蛋白质(mg/ml)＝(1.55×OD_{280})-(0.76×OD_{260})

为了对 ORF21 进行免疫学定性，在第 0、21 和 35 天用抗原使 Balb/C 小鼠免疫，在第 49 天分析血清。

在如下的 ELISA 分析中 ORF21 得到了阳性结果：将包囊化的 MenB M7 和包囊化的菌株接种于巧克力琼脂平板上，在 37℃、5%CO_2 培育过夜。用无菌 dracon 药签从该琼脂板上收集细菌菌落，并将它们接种到含有 0.25%葡萄糖的 Mueller-Hinton 肉汤(Difco)中。每 30 分钟通过测定 OD_{620} 监测细菌的生长。让细菌继续生长直到 OD 值达到 0.4-0.5。将培养物在 4000rpm 离心 10 分钟。弃去上清液，用 PBS 冲洗这些细菌 2 次，重悬浮于含有 0.025%甲醛的 PBS 中，在 37℃培育 1 小时，然后在 4℃搅拌培育过夜。在 96 孔 Greiner 板的各孔中加入 100μl 细菌细胞，在 4℃培育过夜。然后用 PBT 冲洗缓冲液(0.1%Tween-20 的 PBS 溶液)冲洗这些孔 3 次。将 200μl 饱和缓冲液(2.7%聚乙烯吡咯烷酮 10 的水溶液)加到各孔中，将这些板在 37℃培育 2 小时。用 PBT 冲洗这些孔 3 次。在各孔中加入 200μl 稀释的血清(稀释缓冲液：1%BSA、0.1%Tween-20、0.1% NaN_3 的 PBS 溶液)，将这些平板在 37℃培育 2 小时。用 PBT 冲洗这些孔 3 次。在各孔中加入 100μl HRP-偶联的兔抗小鼠(Dako)血清(用稀释缓冲液作 1：2000 稀释)，将这些平板在 37℃培育 90 分钟。用 PBT 缓冲液冲洗这些孔 3 次。在各孔中加入 100μl HRP 的底物缓冲液(25ml 柠檬酸缓冲液 pH 5、10mg 邻-苯二胺(phenildiamine)和 10μl H_2O_2)，将这些平板置于室温 20 分钟。在各孔中加入 100μl 12.5% H_2SO_4，随后测定 OD_{490}。随意地计算 ELISA 滴定度，作为 OD_{490} 值为 0.4 的、超过免疫前血清的水平的血清的稀释度。当 OD_{490} 为 0.4 的血清的稀释比大于 1：400 时，将 ELISA 视为阳性。

为了评估 ORF21 在细胞内的定位，使用如下 FACS 分析：将包囊化的 MenB M7 菌株接种于巧克力琼脂平板上，在 37℃、5%CO_2 培育过夜。用无菌 dracon 药签从该琼脂板上收集细菌菌落，并将它们接种到 4 支各装有 8ml 包括 0.25%葡萄糖的 Mueller-Hinton 肉汤(Difco)的试管中。每 30 分钟通过测定 OD_{620} 监测细菌的生长。让细菌继续生长直到 OD 值达到 0.35-0.5。将培养物在 4000rpm 离心 10 分钟。弃去上清液，用封阻缓冲液(1%BSA 的 PBS 溶液、0.4%NaN_3)重悬浮沉淀，在 4000rpm 离心 5 分钟。将细胞重悬浮于封阻缓冲液中，使 OD_{620} 达到 0.05。在 Costar 96 孔板的各孔中加入 100μl 细菌细胞。将 100μl 稀释的(1：100、1：200、1：400)血清(用封阻缓冲液稀释)加到各孔中，在 4℃培育 2 小时。将细胞在 4000rpm 离心 5 分钟，抽出上清液，在各孔中加入 200μl/孔封阻缓冲

液冲洗细胞。将 100μl R-藻红蛋白(phicoerytrin)偶联的 $F(ab)_2$ 山羊抗小鼠抗体(以 1：100 稀释)加到各孔中，将这些平板在 4℃培育 1 小时。在 4000rmp 离心 5 分钟，使细胞离心沉降，加入 200μl/孔的封阻缓冲液冲洗。抽出上清液，将细胞重悬浮于 200μl/孔的 PBS，0.25%甲醛中。将样品转移到 FACScan 管中并读数。FACScan(激光功率 15mW)设定的条件如下：FL2 开；FSC-H 临界点：92；FSC PMT 电压：E01；SSC PMT：474；Amp.Gains 6.1; FL-2 PMT:586；补偿值：0。

与 FACS 一样，如下进行 Western 分析来评估细胞内的定位：将来自 MenB 菌株 2996 的纯化的蛋白质(500ng/泳道)、外膜小泡(5μg)和全细胞提取物(25μg)加样到 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上，将它们转移到硝化纤维膜上。该转移用转移缓冲液(0.3%Bris 碱、1.44%甘氨酸、20%(v/v)甲醇)在 4℃、150mA 进行 2 小时。4℃在饱和缓冲液(10%脱脂牛奶、0.1% Triton X100 的 PBS 溶液)中培育过夜，使该膜饱和。用冲洗缓冲液(3%脱脂牛奶、0.1%Triton X100 的 PBS 溶液)冲洗该膜 2 次，与用以 1：200 稀释的小鼠血清，在 37℃培育 2 小时。冲洗该膜 2 次，与用 1：2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 Ig 的稀释液培育 90 分钟。用 0.1% Triton X100 的 PBS 溶液冲洗该膜 2 次，用 Opti-4CN 底物试剂盒(Bio-Rad)显色。加入水终止反应。

如下制备 OMV：37℃、5%CO_2，在 5GC 平板上生长脑膜炎奈瑟球菌菌株 2996，用接种环收获，并重悬浮于 10ml 20mM Tris-HCl pH 7.5、2mM EDTA 中。在 56℃热灭活 45 分钟，在冰上超声处理 5 分钟(50%负载循环(duty cycle)，50%输出，Branson 超声发生器，3mm 微型尖头)破坏细菌。在 5000g 离心 10 分钟，除去未被破坏的细胞，回收含有全细胞包膜成分的上清液，并在 4℃以 50000g 离心过夜。将含膜的沉淀重悬浮于 2%月桂酰肌氨酸钠、20mM Tris-HCl pH 7.5、2mM EDTA 中，并在室温培育 20 分钟以溶解内膜。在 10000g 离心上清液 10 分钟以除去聚集物，将上清液在 50000g 继续离心 3 小时。在 PBS 中冲洗含有外膜的沉淀物，将其重悬浮于相同的缓冲液中。以 BSA 为标准，用 D.C. Bio-Rad 蛋白质分析(改进的 Lowry 法)测定蛋白质的浓度。

如下制备全细胞提取物：将脑膜炎奈瑟球菌菌株 2996 在 GC 平板上生长过夜，用接种环收获，重悬浮于 1ml 20mM Tris-HCl。在 56℃热灭活 30 分钟。

ELISA、FACS 和 Western 分析都显示 ORF21 是表面外露的。

用如下的细菌分析 ORF21 得到良好的结果：37℃、5%CO_2 将脑膜炎奈瑟球菌菌株 2996 在巧克力平板上生长过夜(从冷冻原液开始)。收集菌落，并用 7ml

Mueller-Hinton 肉汤(含有 0.25%葡萄糖)培育，使 OD_{620} 达到 0.05-0.08。37℃振荡培育此培养物约 1.5 小时，直到 OD_{620} 值达到 0.23-0.24。用 50mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.2，含有 10mM $MgCl_2$、10mM $CaCl_2$ 和 0.5%(w/v)BSA)(分析缓冲液)稀释这些细菌，使工作稀释液(working dilution)的浓度为 10^5CFU/ml。终反应混合物的总体积为 50μl，其中 25μl 为顺序两倍稀释的测试血清，12.5μl 工作稀释液的细菌，12.5μl 幼兔补体(终浓度 25%)。对照包括用补体血清培育的细菌、用细菌和在 56℃灭活 30 分钟的补体培育的免疫血清。添加了幼兔补体后，用标题方法立即(时间 0)将 10μl 对照接种 Muller-Hinton 琼脂平板上。将此 96 孔板在 37℃旋转培育 1 小时。将 7μl 各样品点样在 Mueller-Hinton 琼脂平板上，而 10μl 对照用标题方法置于平板上(时间 1)。37℃培育这些琼脂平板 18 小时，计算相应于时间 0 和时间 1 的菌落。

计算机分析

图 1 显示了 ORF21 的序列以及计算机分析的数据。

ORF21 具有如下 AMPHI 区域[Gao 等人,(1989)J. Immunol.143:3007;Robert 等人(1996) AIDS Res Hum Retrovir 12:593;Quakyi 等人(1992)Scand J Immunol suppl.11:9]：SEQ ID 14 到 32。

抗原指数算法确定了如下区域：SEQ ID 33 到 70。

Hopp & Woods 分析表明如下亲水区域：SEQ ID 71 到 104。

SEQ ID 14-104 可用作这些寡肽或较长的多肽的一部分。

图 2 显示了 MenA、MenB 和淋球菌的 ORF21 序列的排列。

疫苗

表达了如上鉴定的三种蛋白质，并将它们用于免疫接种。观察到对这些蛋白质良好的免疫应答。

组合疫苗

此外，将这些蛋白质各与抗其它病原性生物的抗原(如抗血清群 C 脑膜炎的 Chiron 多糖疫苗)相组合，用于免疫接种。观察到联合的免疫应答。

可以理解本发明仅以示例的方式进行了描述，在本发明的范围和精神内还可进行许多改变。

<110> 启龙股份公司(CHIRON SpA)
<110> 国家公共卫生研究所(STATENS INSTITUTT FOR FOLKEHELSE)

<120> 85kDa 奈瑟球菌的抗原

<130> P023527WO

<150> GB-9928197.4
<151> 1999-11-29

<150> GB-0005698.6
<151> 2000-03-09

<160> 106

<170> SeqWin99, 1.02 版本

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 1
Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr
1 5 10 15

<210> 2
<211> 2394
<212> DNA
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 2
atgaaactga aacagattgc ttccgcactg atgatgttgg gcatatcgcc tttggcactt 60
gccgacttca ccatccaaga catccgcgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagtacc 120
gtattcaact acctgcccgt caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttgacgacg tacgcgtcga aactgcggac 240
gggcagctcc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgctcaa catcaccggc 300
gcaaaaatgc tgcaaaacga cgccattaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaat caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
ctcgggcgcg gcaaactcaa tatccaaatc acgcccaaag taaccaaact cgcccgcaac 480
cgcgtcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcaaatgtc cctgaccgaa 600
ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc aaccaattca acgagcagaa atttgcccaa 660
gatatggaaa aagtaaccga cttctaccaa aataacggct acttcgattt ccgtatcctc 720
gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaagcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
gaaggcggac gtttccgttg gggcaaagtc tccatcgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
aaagccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgccagcag 900
atgaccgccg ttttgggtga gattcagaac cgcatgggct cggcaggcta cgcatacagc 960
gaaatcagcg tacagccgct gccgaacgct gaaaccaaaa ccgtcgattt cgtcctgcac 1020
atcgaaccgg gccggaaaat ctacgtcaac gaaatacaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
cgcgacgaag tcgtccgccg tgaattacgc caaatggaat ccgcacctta cgacacctcc 1140
aagctgcaac gttccaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa tgtccagttt 1200
gatgctgtcc cgcttgccgg cacgcccgac aaagtcgatt tgaacatgag tctgaccgaa 1260
cgttccaccg gttccctgga tttgagcgcg ggttgggttc aagataccgg gttggtcatg 1320
tccgcaggcg tttcccaaga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc actgcgcgcc 1380
tccaggagca aaaccacgct taacggctcg ctgtcgttta ctgacccgta cttcacggca 1440
gacggggtca gcctgggcta cgatgtttac ggaaaagcct tcgacccgcg caaagcatcg 1500

accagcatca aacaatataa aaccaccacg gcaggcgcag gcatccgcat gagcgtgcct 1560
gttaccgaat acgaccgcgt gaatttcggt ttggtggcag aacacctgac cgtcaacacc 1620
tacaacaaag cgcccaaaca ctatgccgac tttatcaaga aatacggcaa aaccgacggc 1680
acagacggca gcttcaaagg ctggctgtac aaaggtaccg tcggctgggg gcgcaacaaa 1740
accgacagcg cgttatggcc gacgcgcggc tacctgacgg gcgtgaacgc cgaaatcgcc 1800
ctgcctggca gcaaactgca atactactcc gccacccaca accaaacctg gttcttcccc 1860
ctgagcaaaa ccttcacgct gatgctcggc ggcgaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
agaaccaaag aaatcccctt ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgcgc 1980
ggatacgaaa gcggcacgct cggtccgaaa gtctatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccggcgcg 2100
aaagacgcgc gcaccgtccg cctgagcctg tttgccgacg caggcagcgt gtgggacggc 2160
aaaacctacg acgacaacag cagttccgcg accggcggca gggttcaaaa catttacggc 2220
gccggcaata cccataaatc caccttttacc aacgaattgc gctattccgc cggcggcgcg 2280
gttacctggc tctcgccttt aggcccgatg aaattcagct acgcctaccc gctgaagaaa 2340
aaaccggaag acgaaatcca acgcttccaa ttccaactcg gcacgacgtt ctaa 2394

<210> 3
<211> 797
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 3

Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
20 25 30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
35 40 45

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
50 55 60

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
65 70 75 80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
85 90 95

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
100 105 110

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
115 120 125

Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
130 135 140

Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
145 150 155 160

Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
165 170 175

Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
180 185 190

Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
195 200 205

Arg Ser Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys
210 215 220

Val Thr Asp Phe Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu
225 230 235 240

Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys
245 250 255

Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile
260 265 270

Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu
275 280 285

Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val
290 295 300

Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser
305 310 315 320

Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp
325 330 335

Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile
340 345 350

His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu
355 360 365

Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg
370 375 380

Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe
385 390 395 400

Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met
405 410 415

Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp
420 425 430

Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn
435 440 445

Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys
450 455 460

Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala
465 470 475 480

Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro
485 490 495

Arg Lys Ala Ser Thr Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly

500 505 510

Ala Gly Ile Arg Met Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn
515 520 525

Phe Gly Leu Val Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
530 535 540

Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
545 550 555 560

Thr Asp Gly Ser Phe Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
565 570 575

Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
580 585 590

Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
595 600 605

Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
610 615 620

Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
625 630 635 640

Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
645 650 655

Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
660 665 670

Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
675 680 685

Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
690 695 700

Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
705 710 715 720

Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln
725 730 735

Asn Ile Tyr Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu
740 745 750

Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly
755 760 765

Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp
770 775 780

Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
785 790 795

<210> 4
<211> 21

<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 4
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Leu Ala
20

<210> 5
<211> 776
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 5
Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
1 5 10 15

Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
20 25 30

Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
35 40 45

Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
50 55 60

Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
85 90 95

Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
100 105 110

Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
115 120 125

Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
130 135 140

Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
145 150 155 160

Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
165 170 175

Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asn Gln Phe
180 185 190

Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
195 200 205

Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
210 215 220

```
Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
                245                 250                 255

Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
            260                 265                 270

Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
        275                 280                 285

Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln
    290                 295                 300

Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp Phe Val Leu His Ile
305                 310                 315                 320

Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile His Ile Thr Gly Asn
                325                 330                 335

Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln Met Glu
            340                 345                 350

Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val
        355                 360                 365

Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe Asp Ala Val Pro Leu
    370                 375                 380

Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met Ser Leu Thr Glu Arg
385                 390                 395                 400

Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp Val Gln Asp Thr Gly
                405                 410                 415

Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly
            420                 425                 430

Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu Asn Gly
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala Asp Gly Val Ser Leu
    450                 455                 460

Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr
465                 470                 475                 480

Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Gly Ile Arg Met
                485                 490                 495

Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe Gly Leu Val Ala
            500                 505                 510

Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr Ala
        515                 520                 525

Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Thr Asp Gly Ser Phe
```

530 535 540

Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr
545 550 555 560

Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Val Asn Ala
565 570 575

Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Thr His
580 585 590

Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu
595 600 605

Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
610 615 620

Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
625 630 635 640

Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
645 650 655

Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
660 665 670

Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
675 680 685

Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asp
690 695 700

Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln Asn Ile Tyr Gly Ala
705 710 715 720

Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
725 730 735

Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
740 745 750

Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
755 760 765

Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
770 775

<210> 6
<211> 2379
<212> DNA
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 6
atgaaactga aacagattgc ctccgcactg atgatgttgg gcatatcgcc tttggcattt 60
gccgacttca ccatccaaga catccgtgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagcacc 120
gtattcaact acctgcccgt caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttgacgacg tacgagtcga aactgcggac 240
gggcagcttc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgctcaa catcaccggc 300

gccaaaatgc tgcaaaacga cgccatcaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaac caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
ctcgggcgtg gcaaactcaa tatccaaatc acgcccaaag taaccaaact cgcccgcaac 480
cgcgtcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcagatgtc gctgaccgaa 600
ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc gaccggttcg accgccagaa attcgcccaa 660
gacatggaaa aagtaaccga cttctaccag aacaacggct acttcgattt ccgtatcctc 720
gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaggcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
gaaggcggac gtttccgctg gggcaaagtg tcgattgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
aaggccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgccagcag 900
atgaccgccg ttttgggtga gattcagaac cgcatgggct cggcaggcta cgcatacagc 960
gaaatcagcg tacagccgct gccgaacgcc ggaaccaaaa ccgtcgattt cgtcctgcac 1020
atcgaaccgg gccggaaaat ctacgtcaac gaaatccaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
cgcgacgaag tcgtgcgccg cgaattgcgc caaatggaat ccgcgcctta cgacacctcc 1140
aagctgcaac gctccaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa cgtacagttt 1200
gatgccgtcc cgcttgccgg tacgcccgac aaagtcgatt tgaacatgag cctgaccgaa 1260
cgctccaccg gctcgctcga cttgagcgcg ggctgggttc aggataccgg cttggtcatg 1320
tccgccggcg tatcgcagga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc cctgcgcgcc 1380
tcgcgaagca aaaccacgct caacggctcg ctgtcgttta ccgacccgta cttcacggca 1440
gacggggtca gcctgggcta cgatatttac ggaaaagcct tcgacccgcg caaagcatcg 1500
accagcgtca aacaatataa aaccaccacc gccggcggcg gcgtaaggat gggtatcccc 1560
gttaccgaat acgaccgcgt caatttcggg ctggcggcgg aacacctgac cgtcaacacc 1620
tacaacaaag cacccaaacg ctatgccgac tttatcagga aatacggcaa aaccgacggc 1680
gcagacggca gcttcaaagg cctgctgtac aaaggcaccg tcggctgggg gcgcaacaag 1740
accgacagcg cgtcatggcc gacgcgcggc tacctgaccg gcgtaaatgc cgaaatcgcc 1800
ctgcccggca gcaaactgca atactactcc gccacccaca accaaaacctg gttcttcccc 1860
ttaagcaaaa ccttcacgct gatgctcggc ggcgaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
agaaccaaag aaatcccctt ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgcgc 1980
ggctacgaaa gcggcacgct cggcccgaaa gtgtatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccggtgcg 2100
aaagacgcac gcaccgtccg cctgagcctg tttgccgacg caggcagcgt gtgggacggc 2160
agaacctata ccgccgccga aaacggtaac aacaaatcgg tttactcgga aaacgcgcat 2220
aaatccacct ttaccaacga attgcgctat tccgccggcg gcgcggttac ctggctctcg 2280
cctttgggtc cgatgaaatt cagctacgcc tacccgctga agaaaaaacc ggaagacgaa 2340
atccaacgct tccaatttca gctcggcacg acgttctaa 2379

<210> 7
<211> 792
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 7

```
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1               5                  10                  15

Pro Leu Ala Phe Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
            20                  25                  30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
        35                  40                  45

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
    50                  55                  60

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
65                  70                  75                  80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
```

85 90 95

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
100 105 110

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
115 120 125

Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
130 135 140

Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
145 150 155 160

Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
165 170 175

Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
180 185 190

Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
195 200 205

Arg Ser Asp Arg Phe Asp Arg Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys
210 215 220

Val Thr Asp Phe Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu
225 230 235 240

Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Arg Gln Thr Ile Lys
245 250 255

Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile
260 265 270

Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu
275 280 285

Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val
290 295 300

Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser
305 310 315 320

Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Gly Thr Lys Thr Val Asp
325 330 335

Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile
340 345 350

His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu
355 360 365

Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg
370 375 380

Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe
385 390 395 400

Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met
405 410 415

Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp
420 425 430

Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn
435 440 445

Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys
450 455 460

Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala
465 470 475 480

Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro
485 490 495

Arg Lys Ala Ser Thr Ser Val Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly
500 505 510

Gly Gly Val Arg Met Gly Ile Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn
515 520 525

Phe Gly Leu Ala Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
530 535 540

Pro Lys Arg Tyr Ala Asp Phe Ile Arg Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
545 550 555 560

Ala Asp Gly Ser Phe Lys Gly Leu Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
565 570 575

Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Ser Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
580 585 590

Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
595 600 605

Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
610 615 620

Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
625 630 635 640

Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
645 650 655

Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
660 665 670

Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
675 680 685

Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
690 695 700

Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
705 710 715 720

Arg Thr Tyr Thr Ala Ala Glu Asn Gly Asn Asn Lys Ser Val Tyr Ser
725 730 735

Glu Asn Ala His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
740 745 750

Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
755 760 765

Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
770 775 780

Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
785 790

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 8
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Phe Ala
20

<210> 9
<211> 771
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 9
Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
1 5 10 15

Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
20 25 30

Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
35 40 45

Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
50 55 60

Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
85 90 95

Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
100 105 110

Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln

115 120 125

Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
130 135 140

Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
145 150 155 160

Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
165 170 175

Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asp Arg Phe
180 185 190

Asp Arg Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
195 200 205

Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
210 215 220

Thr Asn Glu Asp Lys Thr Arg Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
225 230 235 240

Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
245 250 255

Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
260 265 270

Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
275 280 285

Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln
290 295 300

Pro Leu Pro Asn Ala Gly Thr Lys Thr Val Asp Phe Val Leu His Ile
305 310 315 320

Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile His Ile Thr Gly Asn
325 330 335

Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln Met Glu
340 345 350

Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val
355 360 365

Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe Asp Ala Val Pro Leu
370 375 380

Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met Ser Leu Thr Glu Arg
385 390 395 400

Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp Val Gln Asp Thr Gly
405 410 415

Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly
420 425 430

```
Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu Asn Gly
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala Asp Gly Val Ser Leu
    450                 455                 460

Gly Tyr Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr
465                 470                 475                 480

Ser Val Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Val Arg Met
                485                 490                 495

Gly Ile Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe Gly Leu Ala Ala
            500                 505                 510

Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys Arg Tyr Ala
        515                 520                 525

Asp Phe Ile Arg Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Ala Asp Gly Ser Phe
    530                 535                 540

Lys Gly Leu Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr
545                 550                 555                 560

Asp Ser Ala Ser Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Val Asn Ala
                565                 570                 575

Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Thr His
            580                 585                 590

Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu
        595                 600                 605

Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
    610                 615                 620

Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
625                 630                 635                 640

Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
                645                 650                 655

Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
            660                 665                 670

Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
        675                 680                 685

Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Arg Thr Tyr Thr Ala
    690                 695                 700

Ala Glu Asn Gly Asn Asn Lys Ser Val Tyr Ser Glu Asn Ala His Lys
705                 710                 715                 720

Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr
                725                 730                 735
```

Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu
740 745 750

Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly
755 760 765

Thr Thr Phe
770

<210> 10
<211> 2394
<212> DNA
<213> 淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 10
atgaaactga aacagattgc ttccgcactg atggtcttgg gcatatcgcc tttggcactt 60
gccgacttca ccatccaaga catccgcgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagtacc 120
gtattcaact acctgcccgt caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttgacgacg tacgcgtcga aactgcggac 240
gggcagctcc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgctcaa catcaccggc 300
gcaaaaatgc tgcaaaacga cgccattaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaat caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
ctcgggcgcg gcaaactcaa tatccaaatc acgcccaaag taaccaaact cgcccgcaac 480
cgcgtcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcagatgtc gctgaccgaa 600
ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc aaccaattca acgagcagaa atttgcccaa 660
gacatggaaa aagtaaccga cttctaccag aacaacggct acttcgattt ccgcatcctc 720
gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaagcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
gaaggcggac gtttccgttg gggcaaagtc tccatcgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
aaagccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgccagcag 900
atgaccgccg ttttgggtga gattcagaac cgcatgggct cggcaggcta cgcatacagc 960
gaaatcagcg tacagccgct gccaaacgcc gaaaccaaaa ccgtcgattt cgtcctgcac 1020
atcgaaccgg gccggaaaat ctacgtcaac gaaatccaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
cgcgacgaag tcgtgcgccg cgaattgcgc caaatggaat ccgcgcctta cgacacctcc 1140
aagctgcaac gctccaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa cgtacagttt 1200
gatgccgtcc cgcttgccgg cacacccgac aaagtcgatt tgaacatgag cctgaccgaa 1260
cgttccaccg gctcgctcga cttgagcgcg ggctgggtac aggataccgg cctggtcatg 1320
tccgcaggcg tttcccaaga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc cctgcgcgcc 1380
tcacgaagca aaaccacgct caacggctcg ctgtcgttta ccgacccgta cttcacggca 1440
gacggggtca gcctgggcta cgatgtttac ggaaaagcct tcgacccgcg caaagcatcg 1500
accagcatca aacaatataa aaccaccacg gcaggcgcag gcatccgcat gagcgtgcct 1560
gttaccgaat acgaccgcgt gaatttcggt ttggtggcag aacacctgac cgtcaacacc 1620
tacaacaaag cgcccaaaca ctatgccgac tttatcaaga aatacggcaa aaccgacggc 1680
acagacggca gcttcaaagg ctggctgtac aaaggtaccg tcggctgggg gcgcaacaaa 1740
accgacagcg cgttatggcc gacgcgcggc tacctgacgg gcgtgaacgc cgaaatcgcc 1800
ctgcccggca gcaaactgca atactactcc gccacccaca accaaacctg gttcttcccc 1860
ttaagcaaaa ccttcacgct gatgctcggc ggcgaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
agaaccaaag aaatcccctt ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgcgc 1980
ggatacgaaa gcggcacgct cggtccgaaa gtgtatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
tacggcggca acaaaaaagc caacgtcttc gccgagctgc tcttcccgat gcccggcgcg 2100
aaagacgcgc gcaccgtccg cctgagcctg tttgccgacg caggcagcgt gtgggacggc 2160
aaaacctacg acgacaacag cagttccgcg accggcggca gggttcaaaa catttacggc 2220
gccggcaata cccataaatc caccttttacc aacgaattgc gctattccgc cggcggcgcg 2280
gttacctggc tctcgccttt aggcccgatg aaattcagct acgcctaccc gctgaagaaa 2340
aaaccggaag acgaaatcca acgcttccaa ttccaactcg gcacgacgtt ctaa 2394

<210> 11
<211> 797

<212> PRT
<213> 淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 11

```
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Gly Ile Ser
1               5                  10                  15

Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
            20                  25                  30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
        35                  40                  45

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
    50                  55                  60

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
65                  70                  75                  80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
                85                  90                  95

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
            100                 105                 110

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
        115                 120                 125

Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
    130                 135                 140

Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
145                 150                 155                 160

Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
                165                 170                 175

Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
            180                 185                 190

Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
        195                 200                 205

Arg Ser Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys
    210                 215                 220

Val Thr Asp Phe Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys
                245                 250                 255

Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile
            260                 265                 270

Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu
        275                 280                 285
```

Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val
290 295 300

Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser
305 310 315 320

Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp
325 330 335

Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile
340 345 350

His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu
355 360 365

Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg
370 375 380

Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe
385 390 395 400

Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met
405 410 415

Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp
420 425 430

Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn
435 440 445

Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys
450 455 460

Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala
465 470 475 480

Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro
485 490 495

Arg Lys Ala Ser Thr Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly
500 505 510

Ala Gly Ile Arg Met Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn
515 520 525

Phe Gly Leu Val Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
530 535 540

Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
545 550 555 560

Thr Asp Gly Ser Phe Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
565 570 575

Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
580 585 590

Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr

595 600 605

Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
610 615 620

Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
625 630 635 640

Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
645 650 655

Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
660 665 670

Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
675 680 685

Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
690 695 700

Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
705 710 715 720

Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln
725 730 735

Asn Ile Tyr Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu
740 745 750

Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly
755 760 765

Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp
770 775 780

Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
785 790 795

<210> 12
<211> 21
<212> PRT
<213> 淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 12
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Leu Ala
20

<210> 13
<211> 776
<212> PRT
<213> 淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)

<400> 13
Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
1 5 10 15

Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
20 25 30

Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
35 40 45

Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
50 55 60

Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
85 90 95

Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
100 105 110

Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
115 120 125

Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
130 135 140

Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
145 150 155 160

Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
165 170 175

Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asn Gln Phe
180 185 190

Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
195 200 205

Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
210 215 220

Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
225 230 235 240

Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
245 250 255

Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
260 265 270

Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
275 280 285

Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln
290 295 300

Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp Phe Val Leu His Ile
305 310 315 320

Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile His Ile Thr Gly Asn
325 330 335

Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln Met Glu
340 345 350

Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val
355 360 365

Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe Asp Ala Val Pro Leu
370 375 380

Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met Ser Leu Thr Glu Arg
385 390 395 400

Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp Val Gln Asp Thr Gly
405 410 415

Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly
420 425 430

Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu Asn Gly
435 440 445

Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala Asp Gly Val Ser Leu
450 455 460

Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr
465 470 475 480

Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Gly Ile Arg Met
485 490 495

Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe Gly Leu Val Ala
500 505 510

Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr Ala
515 520 525

Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Thr Asp Gly Ser Phe
530 535 540

Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr
545 550 555 560

Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Val Asn Ala
565 570 575

Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Thr His
580 585 590

Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu
595 600 605

Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
610 615 620

Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly

625 630 635 640

Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
645 650 655

Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
660 665 670

Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
675 680 685

Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asp
690 695 700

Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln Asn Ile Tyr Gly Ala
705 710 715 720

Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
725 730 735

Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
740 745 750

Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
755 760 765

Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
770 775

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 14
Gly Leu Gln Arg Thr
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 15
Lys Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 16
Phe Phe Asp Asp Val Arg
1 5

<210> 17
<211> 5

<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 17
Gln Ala Val Ala Gly
1 5

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 18
Ala Gly Leu Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 19
Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met
1 5 10

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 20
Pro Gly Lys Trp Tyr
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 21
Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 22
Arg Glu Leu Arg Gln Met
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 23

Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 24
Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln
1 5

<210> 25
<211> 23
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 25
Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile
1 5 10 15

Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp
20

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 26
Gly Ser Phe Lys Gly Trp
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 27
Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 28
Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 29
Gly Arg Val Gln Asn Ile Tyr Gly Ala Gly

1 5 10

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 30
His Lys Ser Thr Phe
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 31
Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 32
Lys Pro Glu Asp Glu
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 33
Met Lys Leu Lys Gln
1 5

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 34
Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 35
Lys Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 10

<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 36
Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly
1 5 10

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 37
Ile Glu Arg Pro Thr Ile
1 5

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 38
Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 39
Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 40
Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile
1 5 10

<210> 41
<211> 29
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 41
Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg
20 25

<210> 42
<211> 19
<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 42
Thr Arg Ser Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu
1 5 10 15

Lys Val Thr

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 43
Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr
1 5

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 44
Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln
1 5 10 15

Thr Ile

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 45
Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp
1 5

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 46
Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys
1 5 10 15

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 47
Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln
1 5 10

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 48
Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 49
Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 50
Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr
1 5

<210> 51
<211> 37
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 51
Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu
1 5 10 15

Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser
20 25 30

Lys Glu Arg Val Glu
35

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 52
Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu
1 5

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 53
Met Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu

1 5 10

<210> 54
<211> 25
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 54
Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu
1 5 10 15

Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu
20 25

<210> 55
<211> 22
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 55
Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr Ser Ile Lys
1 5 10 15

Gln Tyr Lys Thr Thr Thr
20

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 56
Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe
1 5

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 57
Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr
1 5 10

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 58
Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Thr Asp Gly Ser Phe
1 5 10 15

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 59
Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser
1 5 10

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 60
Leu Pro Gly Ser Lys
1 5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 61
Thr His Asn Gln Thr
1 5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 62
Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile Pro
1 5 10

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 63
Phe Tyr Gly Gly Gly
1 5

<210> 64
<211> 33
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 64
Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
1 5 10 15

Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
20 25 30

Val

<210> 65
<211> 10
<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 65
Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg
1 5 10

<210> 66
<211> 25
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 66
Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln Asn
20 25

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 67
Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe
1 5 10

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 68
Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly
1 5

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 69
Ser Pro Leu Gly Pro Met
1 5

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 70
Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln
1 5 10

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 71
Met Lys Leu Lys Gln
1 5

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 72
Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu Pro
1 5 10

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 73
Lys Val Gly Asp Thr Tyr Asn
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 74
Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
1 5

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 75
Ile Glu Arg Pro Thr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 76
Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu
1 5

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 77
Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu
1 5 10

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 78
Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile
1 5 10

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 79
Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
1 5 10 15

Glu Gly

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 80
Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg
1 5

<210> 81
<211> 16
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 81
Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr
1 5 10 15

<210> 82
<211> 18
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 82
Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln
1 5 10 15

Thr Ile

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 89
Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val Glu
1 5 10 15

<210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 90
Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 91
Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly
1 5

<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 92
Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu
1 5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 93
Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr Ser
1 5 10

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 94
Thr Glu Tyr Asp Arg
1 5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 95
Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr
1 5

<400> 83
Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp
1 5

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 84
Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys
1 5 10 15

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 85
Ile Gln Asn Arg Met Gly
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 86
Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr
1 5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 87
Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr
1 5

<210> 88
<211> 18
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 88
Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln
1 5 10 15

Met Glu

<210> 89
<211> 16
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 96
Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Thr Asp Gly Ser Phe
1 5 10 15

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 97
Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser
1 5

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 98
Gly Arg Thr Lys Glu
1 5

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 99
Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
1 5

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 100
Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 101
Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 102
Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser
1 5

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 103
Thr Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)

<400> 104
Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln
1 5 10

<210> 105
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

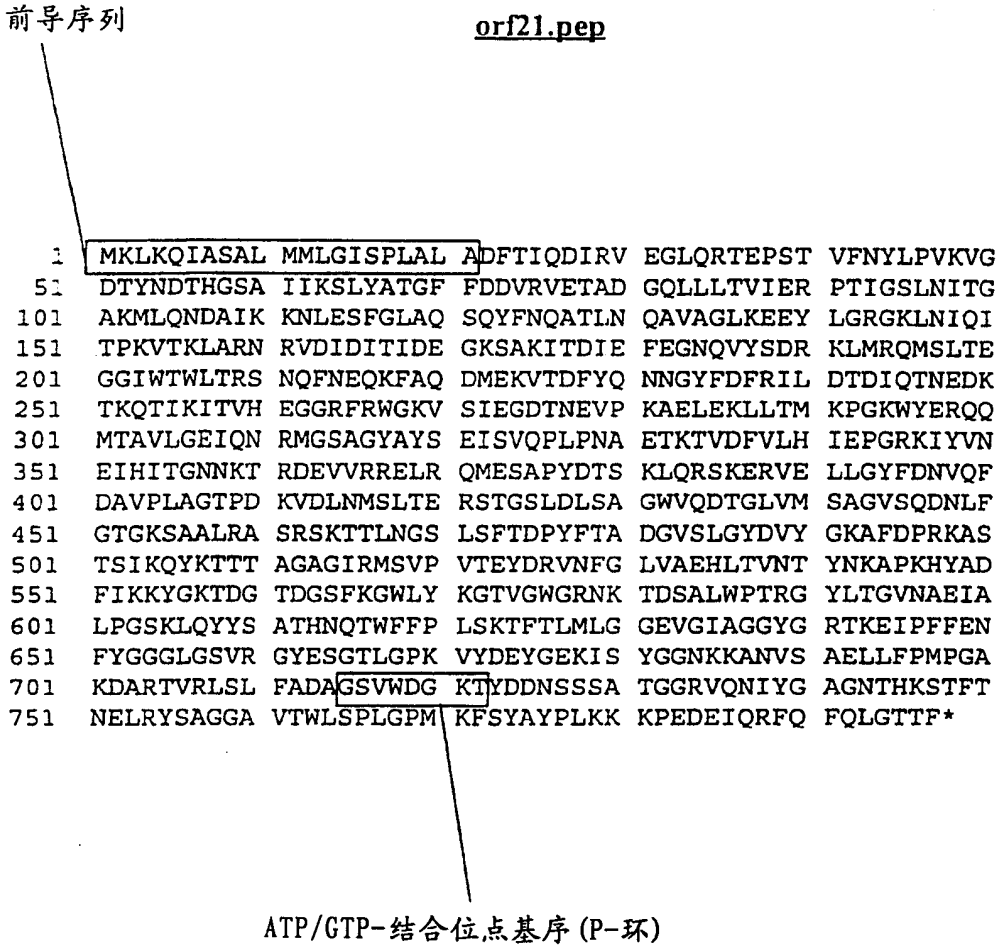
<220>
<223> orf21 正向引物

<400> 105
cgcggatccc atatggactt caccatccaa gac 33

<210> 106
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> orf21 反向引物

<400> 106
cccgctcgag ttagaacgtc gtgccgag 28



等电位 −9.50

分子量 −88.5 kDa

图 1

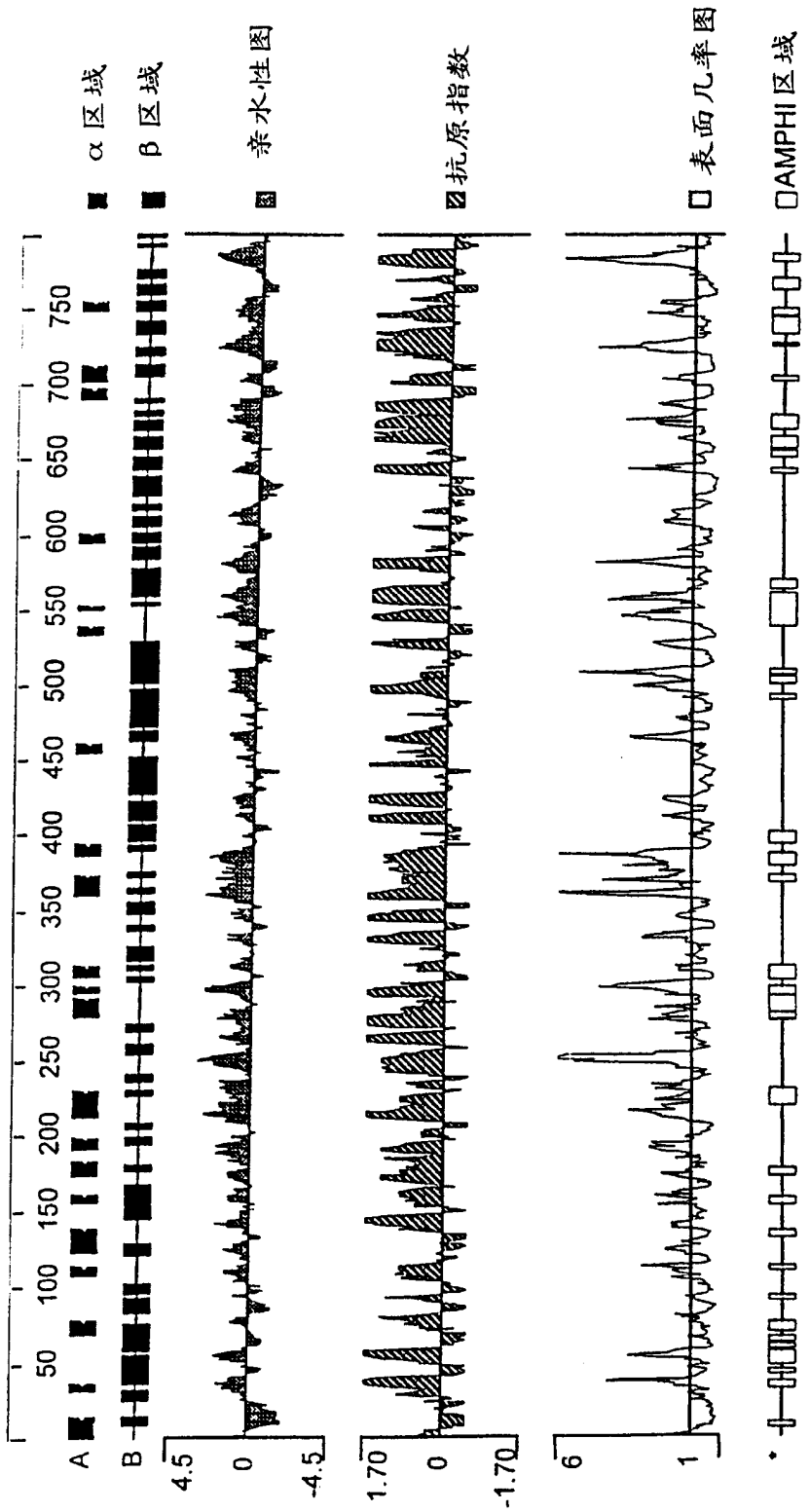

50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
A
B
α 区域
β 区域
亲水性图
4.5
0
-4.5
抗原指数
1.70
0
-1.70
表面几率图
6
1
AMPHI区域

图 1(续)

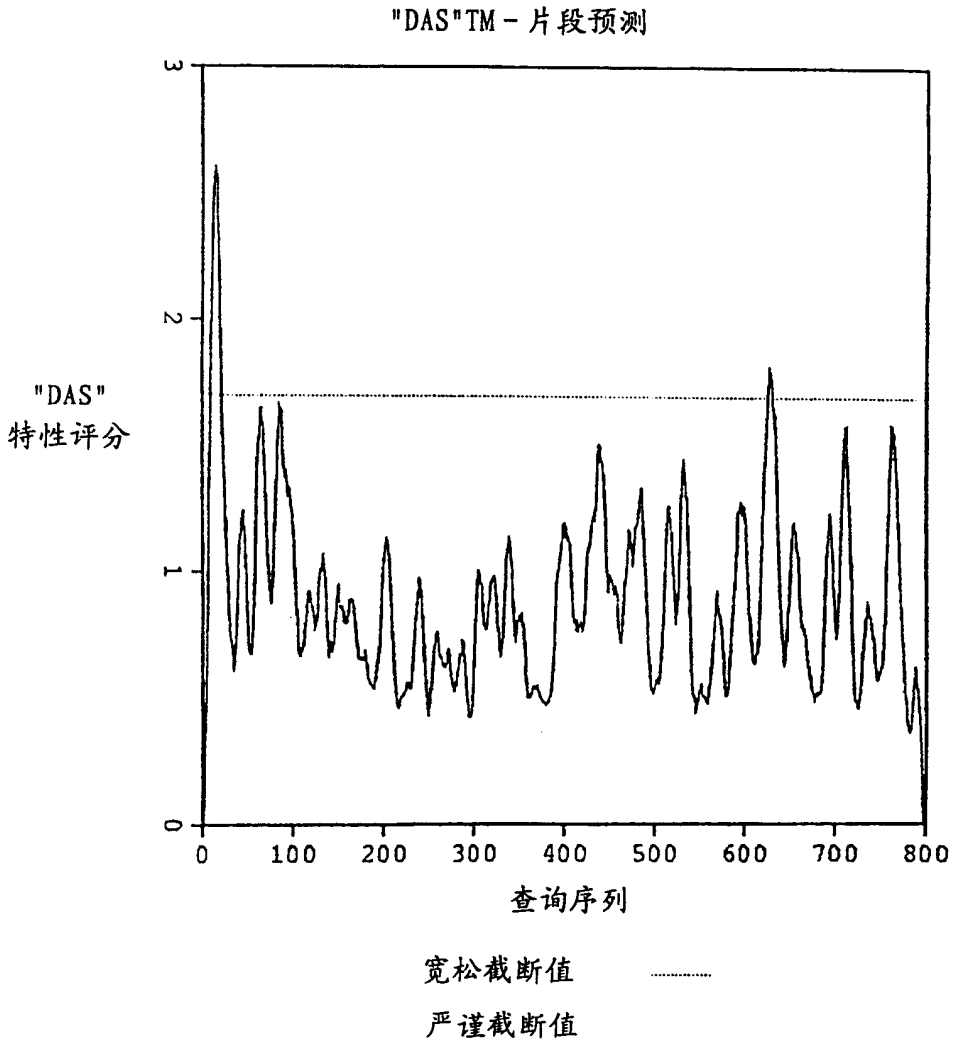

"DAS"TM－片段预测
"DAS"
特性评分
3
2
1
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
查询序列
宽松截断值
严谨截断值

图 1(续)

omp85_neime 1 ATGAAACTGAAACAGATTGCTTCCGCACTGATGATGTTGGGCATATCGCCTTTGGCATTT
orf21_a 1 ATGAAACTGAAACAGATTGCTTCCGCACTGATGGTCTTGGGCATATCGCCTTTGGCACTT
orf21_b 1 ATGAAACTGAAACAGATTGCTTCCGCACTGATGATGTTGGGCATATCGCCTTTGGCACTT
orf21_ng 1 ATGAAACTGAAACAGATTGCCTCCGCACTGATGATGTTGGGCATATCGCCTTTGGCATTT
omp85_neime 61 GCCGACTTCACCATCCAAGACATCCGTGTCGAAGGCTTGCAGCGTACCGAGCCGAGCCACC
orf21_a 61 GCCGACTTCACCATCCAAGACATCCGCGTCGAAGGCTTGCAGCGTACCGAGCCGAGTACC
orf21_b 61 GCCGACTTCACCATCCAAGACATCCGCGTCGAAGGCTTGCAGCGTACCGAGCCGAGTACC
orf21_ng 61 GCCGACTTCACCATCCAAGACATCCGTGTCGAAGGCTTGCAGCGTACCGAGCCGAGCACC
omp85_neime 121 GTATTCAACTACCTGCCCGTCAAAGTCGGCGATACCTACAACGACACACGGCAGTGCC
orf21_a 121 GTATTCAACTACCTGCCCGTCAAAGTCGGCGACACCTACAACGACACACGGCAGTGCC
orf21_b 121 GTATTCAACTACCTGCCCGTCAAAGTCGGCGACACCTACAACGACACACGGCAGTGCC
orf21_ng 121 GTATTCAACTACCTGCCCGTCAAAGTCGGCGACACCTACAACGACACACGGCAGTGCC
omp85_neime 181 ATCATCAAAAGCCTGTACGCCACCGGTTTCTTTGACGACGTACGCGTCGAAACTGCGGAC
orf21_a 181 ATCATCAAAAGCCTGTACGCCACCGGTTTCTTTGACGACGTACGCGTCGAAACTGCGGAC
orf21_b 181 ATCATCAAAAGCCTGTACGCCACCGGTTTCTTTGACGACGTACGCGTCGAAACTGCGGAC
orf21_ng 181 ATCATCAAAAGCCTGTACGCCACCGGTTTCTTTGACGACGTACGAGTCGAAACTGCGGAC
omp85_neime 241 GGGCAGCTCCTGCTGACCGTTATCGAACGCCCCACCATCGGCTCGCTCAACATCACCGGC
orf21_a 241 GGGCAGCTCCTGCTGACCGTTATCGAACGCCCCACCATCGGCTCGCTCAACATCACCGGC
orf21_b 241 GGGCAGCTCCTGCTGACCGTTATCGAACGCCCCACCATCGGCTCGCTCAACATCACCGGC
orf21_ng 241 GGGCAGCTTCTGCTGACCGTTATCGAACGCCCCACCATCGGCTCGCTCAACATCACCGGC
omp85_neime 301 GCAAAAATGCTGCAAAAACGACGCCATTAAGAAAAAACCTCGAATCGTTCGGGCTGGCGCAG
orf21_a 301 GCAAAAATGCTGCAAAAACGACGCCATTAAGAAAAAACCTCGAATCGTTCGGGCTGGCGCAG
orf21_b 301 GCAAAAATGCTGCAAAAACGACGCCATTAAGAAAAAACCTCGAATCGTTCGGGCTGGCGCAG
orf21_ng 301 GCCAAAATGCTGCAAAAACGACGCCATCAAGAAAAAACCTCGAATCGTTCGGGCTGGCGCAG
omp85_neime 361 TCGCAATACTTTAATCAGGCGACACTCAATCAGGCAGTCGCCGGCCTGAAAGAAGAATAC
orf21_a 361 TCGCAATACTTTAATCAGGCGACACTCAATCAGGCAGTCGCCGGCCTGAAAGAAGAATAC
orf21_b 361 TCGCAATACTTTAATCAGGCGACACTCAATCAGGCAGTCGCCGGCCTGAAAGAAGAATAC
orf21_ng 361 TCGCAATACTTTAATCAGGCGACACTCAACCAGGCAGTCGCCGGCCTGAAAGAAGAATAC

图 2

```
omp85_neime  421 CTCGGGCGCGGCAAACTCAATATCCAAATCACGCCCAAAGTAACCAAACTCGCCCGCAAC
orf21_a      421 CTCGGGCGCGGCAAACTCAATATCCAAATCACGCCCAAAGTAACCAAACTCGCCCGCAAC
orf21_b      421 CTCGGGCGCGGCAAACTCAATATCCAAATCACGCCCAAAGTAACCAAACTCGCCCGCAAC
orf21_ng     421 CTCGGGCGCTGGCAAACTCAATATCCAAATCACGCCCAAAGTAACCAAACTCGCCCGCAAC

omp85_neime  481 CGCGTCGACATCGACATCACGATTGACGAGGGCAAATCCGCCAAAATCACCGACATCGAA
orf21_a      481 CGCGTCGACATCGACATCACGATTGACGAGGGCAAATCCGCCAAAATCACCGACATCGAA
orf21_b      481 CGCGTCGACATCGACATCACGATTGACGAGGGCAAATCCGCCAAAATCACCGACATCGAA
orf21_ng     481 CGCGTCGACATCGACATCACGATTGACGAGGGCAAATCCGCCAAAATCACCGACATCGAA

omp85_neime  541 TTTGAAGGCAACCAAGTCTATTCCGACCGCAAACTGATGCGGCAGATGTCGCTGACCGAA
orf21_a      541 TTTGAAGGCAACCAAGTCTATTCCGACCGCAAACTGATGCGGCAGATGTCGCTGACCGAA
orf21_b      541 TTTGAAGGCAACCAAGTCTATTCCGACCGCAAACTGATGCGGCAAATGTCCCTGACCGAA
orf21_ng     541 TTTGAAGGCAACCAAGTCTATTCCGACCGCAAACTGATGCGGCAGATGTCGCTGACCGAA

omp85_neime  601 GGCGGCATTTGGACATGGCTGACACGAAGCAACCAATTCAACGAGCAGAAATTTGCCCAA
orf21_a      601 GGCGGCATTTGGACATGGCTGACACGAAGCAACCAATTCAACGAGCAGAAATTTGCCCAA
orf21_b      601 GGCGGCATTTGGACATGGCTGACACGAAGCAACCAATTCAACGAGCAGAAATTTGCCCAA
orf21_ng     601 GGCGGCATTTGGACATGGCTGACACGAAGCGACCGGTTCGACCGCCAGAAATTCGCCCAA

omp85_neime  661 GACATGGAAAAAGTAACCGACTTCTACCAGAACAACGGCTACTTCGATTTCCGTATCCTC
orf21_a      661 GACATGGAAAAAGTAACCGACTTCTACCAGAACAACGGCTACTTCGATTTCCGCATCCTC
orf21_b      661 GATATGGAAAAAGTAACCGACTTCTACCAAAATAACGGCTACTTCGATTTCCGTATCCTC
orf21_ng     661 GACATGGAAAAAGTAACCGACTTCTACCAGAACAACGGCTACTTCGATTTCCGTATCCTC

omp85_neime  721 GATACCGACATCCAAACCAACGAAGACAAAACCAAGCAGACCATCAAAATCACCGTCCAC
orf21_a      721 GATACCGACATCCAAACCAACGAAGACAAAACCAAGCAGACCATCAAAATCACCGTCCAC
orf21_b      721 GATACCGACATCCAAACCAACGAAGACAAAACCAAGCAGACCATCAAAATCACCGTCCAC
orf21_ng     721 GATACCGACATCCAAACCAACGAAGACAAAACCAGGCAGACCATCAAAATCACCGTCCAC

omp85_neime  781 GAAGGCGGACGTTTCCGTTGGGGCAAAGTCTCCATCGAAGGCGACACCAACGAAGTCCCC
orf21_a      781 GAAGGCGGACGTTTCCGTTGGGGCAAAGTCTCCATCGAAGGCGACACCAACGAAGTCCCC
orf21_b      781 GAAGGCGGACGTTTCCGTTGGGGCAAAGTCTCCATCGAAGGCGACACCAACGAAGTCCCC
orf21_ng     781 GAAGGCGGACGTTTCCGCTGGGGCAAAGTGTCGATTGAAGGCGACACCAACGAAGTCCCC
```

图 2(续)

omp85_neime 841 AAAGCCGAACTGGAAAAACTGCTGACCATGAAGCCCGGCAAATGGTACGAACGCCAGCAG
orf21_a 841 AAAGCCGAACTGGAAAAACTGCTGACCATGAAGCCCGGCAAATGGTACGAACGCCAGCAG
orf21_b 841 AAAGCCGAACTGGAAAAACTGCTGACCATGAAGCCCGGCAAATGGTACGAACGCCAGCAG
orf21_ng 841 AAGGCCGAACTGGCAAAAACTGCTGACCATGAAGCCCGGCAAATGGTACGAACGCCAGCAG
omp85_neime 901 ATGACCGCCGTTTTGGTGACATTCAGAACCGCATGGGCTCGGCAGGCTACGCATACAGC
orf21_a 901 ATGACCGCCGTTTTGGTGACATTCAGAACCGCATGGGCTCGGCAGGCTACGCATACAGC
orf21_b 901 ATGACCGCCGTTTTGGTGACATTCAGAACCGCATGGGCTCGGCAGGCTACGCATACAGC
orf21_ng 901 ATGACCGCCGTTTTGGTGACATTCAGAACCGCATGGGCTCGGCAGGCTACGCATACAGC
omp85_neime 961 GAAATCAGCGGTACAGCCGCTGCCAAACGCCGAAACCAAAACCGTCGATTTCGTCCTGCAC
orf21_a 961 GAAATCAGCGGTACAGCCGCTGCCAAACGCCGAAACCAAAACCGTCGATTTCGTCCTGCAC
orf21_b 961 GAAATCAGCGGTACAGCCGCTGCCGAACGCCGAAACCAAAACCGTCGATTTCGTCCTGCAC
orf21_ng 961 GAAATCAGCGGTACAGCCGCTGCCGAACGCCGAAACCAAAACCGTCGATTTCGTCCTGCAC
omp85_neime 1021 ATCGAACCGGGCCGGAAAATCTACGTCAACGAAATCCACATCACCGGCAACACAAAACC
orf21_a 1021 ATCGAACCGGGCCGGAAAATCTACGTCAACGAAATCCACATCACCGGCAACACAAAACC
orf21_b 1021 ATCGAACCGGGCCGGAAAATCTACGTCAACGAAATACACATCACCGGCAACACAAAACC
orf21_ng 1021 ATCGAACCGGGCCGGAAAATCTACGTCAACGAAATCCACATCACCGGCAACACAAAACC
omp85_neime 1081 CGCGACGAAGTCGTGCGCCGCGAATTGCGCCAAATGGAATCCGCGCCTTACGACACCTCC
orf21_a 1081 CGCGACGAAGTCGTGCGCCGCGAATTGCGCCAAATGGAATCCGCGCCTTACGACACCTCC
orf21_b 1081 CGCGACGAAGTCGTCCGCCGTGAATTACGCCAAATGGAATCCGCACCTTACGACACCTCC
orf21_ng 1081 CGCGACGAAGTCGTGCGCCGCGAATTGCGCCAAATGGAATCCGCGCCTTACGACACCTCC
omp85_neime 1141 AAGCTGCAACGCTCCAAAGAGCGCGTCGAGCTTTTGGGCTACTTCGACAACGTTACAGTTT
orf21_a 1141 AAGCTGCAACGCTCCAAAGAGCGCGTCGAGCTTTTGGGCTACTTCGACAACGTTACAGTTT
orf21_b 1141 AAGCTGCAACGTTCCAAAGAGCGCGTCGAGCTTTTGGGCTACTTCGACAATGTTCAGTTT
orf21_ng 1141 AAGCTGCAACGCTCCAAAGAGCGCGTCGAGCTTTTGGGCTACTTCGACAACGTTACAGTTT
omp85_neime 1201 GATGCCGTCCCGCTTGCCGGCACACCCGACAAAGTCGATTTGAACATGAGCCTGACCGAA
orf21_a 1201 GATGCCGTCCCGCTTGCCGGCACACCCGACAAAGTCGATTTGAACATGAGCCTGACCGAA
orf21_b 1201 GATGCTGTCCCGCTTGCCGGCACGCCCGACAAAGTCGATTTGAACATGAGTCTGACCGAA
orf21_ng 1201 GATGCCGTCCCGCTTGCCGGTACGCCCGACAAAGTCGATTTGAACATGAGCCTGACCGAA

图 2（续）

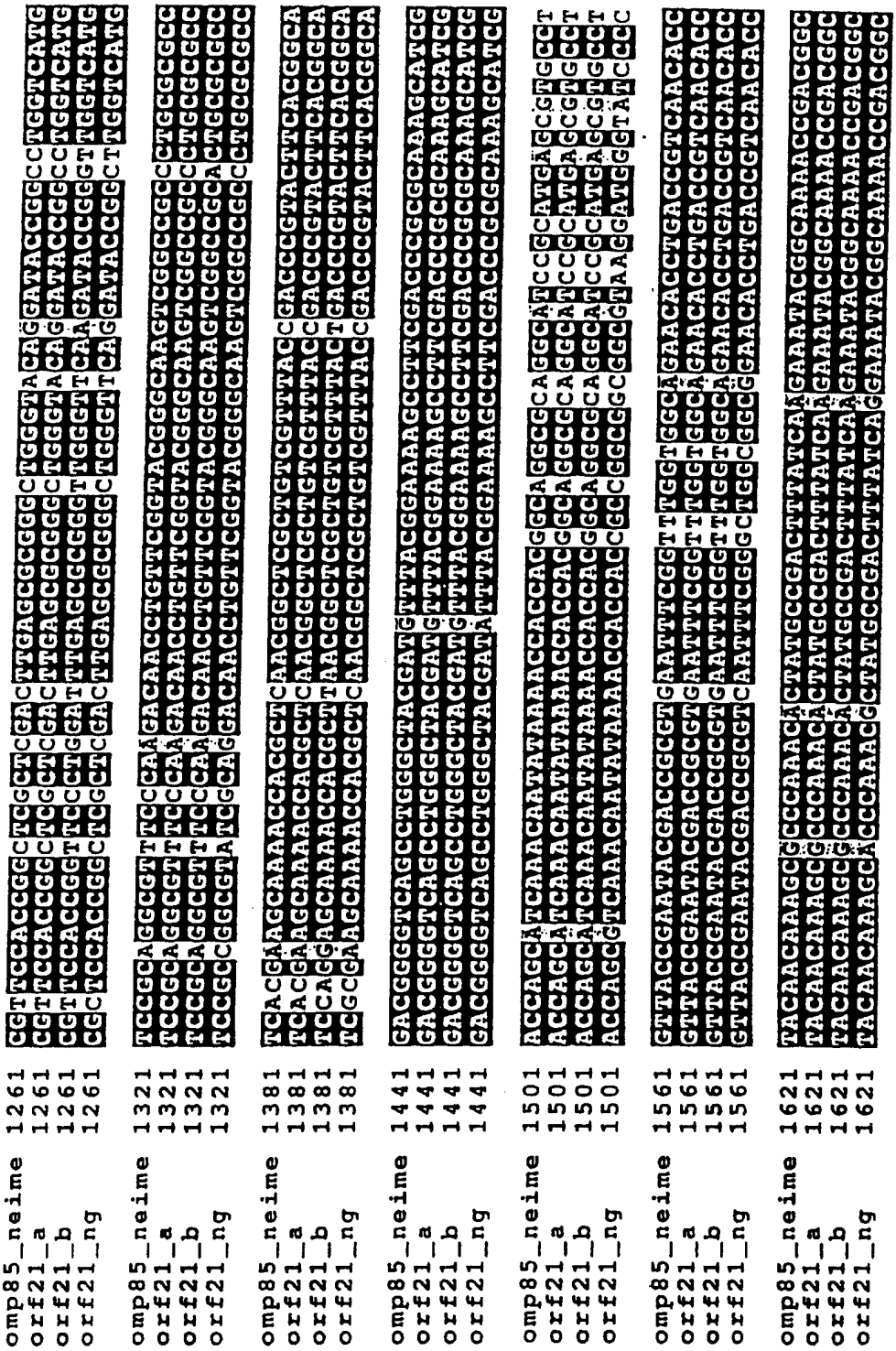

omp85_neime 1261
orf21_a 1261
orf21_b 1261
orf21_ng 1261
omp85_neime 1321
orf21_a 1321
orf21_b 1321
orf21_ng 1321
omp85_neime 1381
orf21_a 1381
orf21_b 1381
orf21_ng 1381
omp85_neime 1441
orf21_a 1441
orf21_b 1441
orf21_ng 1441
omp85_neime 1501
orf21_a 1501
orf21_b 1501
orf21_ng 1501
omp85_neime 1561
orf21_a 1561
orf21_b 1561
orf21_ng 1561
omp85_neime 1621
orf21_a 1621
orf21_b 1621
orf21_ng 1621

图 2(续)

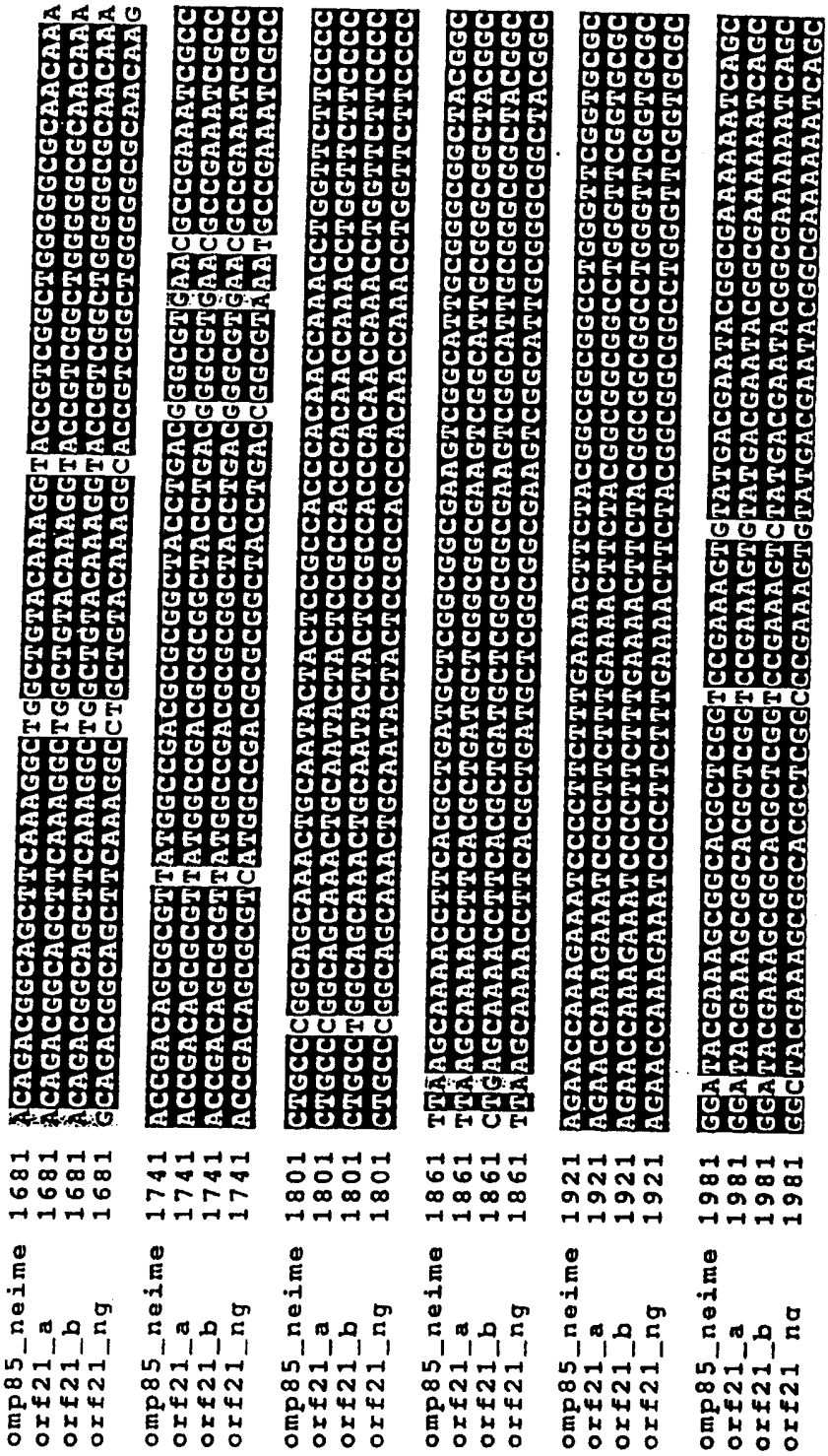

omp85_neime 1681 ACAGACGGCAGCTTCAAAGGCTGGCTGTACAAAGGTACCGTCGGCTGGGGGCGCAACAAA
orf21_a 1681 ACAGACGGCAGCTTCAAAGGCTGGCTGTACAAAGGTACCGTCGGCTGGGGGCGCAACAAA
orf21_b 1681 ACAGACGGCAGCTTCAAAGGCTGGCTGTACAAAGGTACCGTCGGCTGGGGGCGCAACAAA
orf21_ng 1681 GCAGACGGCAGCTTCAAAGGCCTGCTGTACAAAGGCCACCGTCGGCTGGGGGCGCAACAAG
omp85_neime 1741 ACCGACAGCGCGTTATGGCCGACGCGGCGGCTACCTGACGGGCGTGAACGCCGAAATCGCC
orf21_a 1741 ACCGACAGCGCGTTATGGCCGACGCGGCGGCTACCTGACGGGCGTGAACGCCGAAATCGCC
orf21_b 1741 ACCGACAGCGCGTTATGGCCGACGCGGCGGCTACCTGACGGGCGTGAACGCCGAAATCGCC
orf21_ng 1741 ACCGACAGCGCGTCATGGCCGACGCGGCGGCTACCTGACCGGCGTAAATGCCGAAATCGCC
omp85_neime 1801 CTGCCCGGCAGCAAACTGCAAATACTACTCCGCCACCCACAACCAAACCTGGTTCTTCCCC
orf21_a 1801 CTGCCCGGCAGCAAACTGCAAATACTACTCCGCCACCCACAACCAAACCTGGTTCTTCCCC
orf21_b 1801 CTGCCCTGGCAGCAAACTGCAAATACTACTCCGCCACCCACAACCAAACCTGGTTCTTCCCC
orf21_ng 1801 CTGCCCGGCAGCAAACTGCAAATACTACTCCGCCACCCACAACCAAACCTGGTTCTTCCCC
omp85_neime 1861 TTAAGCAAAACCTTCACGCTGATGCTCGGCGGCGCGAAGTCGGCATTGCGGGCGGCTACGGC
orf21_a 1861 TTAAGCAAAACCTTCACGCTGATGCTCGGCGGCGCGAAGTCGGCATTGCGGGCGGCTACGGC
orf21_b 1861 CTGAGCAAAACCTTCACGCTGATGCTCGGCGGCGCGAAGTCGGCATTGCGGGCGGCTACGGC
orf21_ng 1861 TTAAGCAAAACCTTCACGCTGATGCTCGGCGGCGCGAAGTCGGCATTGCGGGCGGCTACGGC
omp85_neime 1921 AGAACCAAAGAAATCCCCTTCTTTGAAAACTTCTACGGCGGCGGCCTGGGTTCGGTGCGC
orf21_a 1921 AGAACCAAAGAAATCCCCTTCTTTGAAAACTTCTACGGCGGCGGCCTGGGTTCGGTGCGC
orf21_b 1921 AGAACCAAAGAAATCCCCTTCTTTGAAAACTTCTACGGCGGCGGCCTGGGTTCGGTGCGC
orf21_ng 1921 AGAACCAAAGAAATCCCCTTCTTTGAAAACTTCTACGGCGGCGGCCTGGGTTCGGTGCGC
omp85_neime 1981 GGATACGAAAGCGGCACGCTCGGTCCGAAAGTGTATGACGAATACGGCGCGAAAAAATCAGC
orf21_a 1981 GGATACGAAAGCGGCACGCTCGGTCCGAAAGTGTATGACGAATACGGCGCGAAAAAATCAGC
orf21_b 1981 GGATACGAAAGCGGCACGCTCGGTCCGAAAGTCTATGACGAATACGGCGCGAAAAAATCAGC
orf21_ng 1981 GGCTACGAAAGCGGCACGCTCGGCCCGAAAGTGTATGACGAATACGGCGCGAAAAAATCAGC

图 2(续)

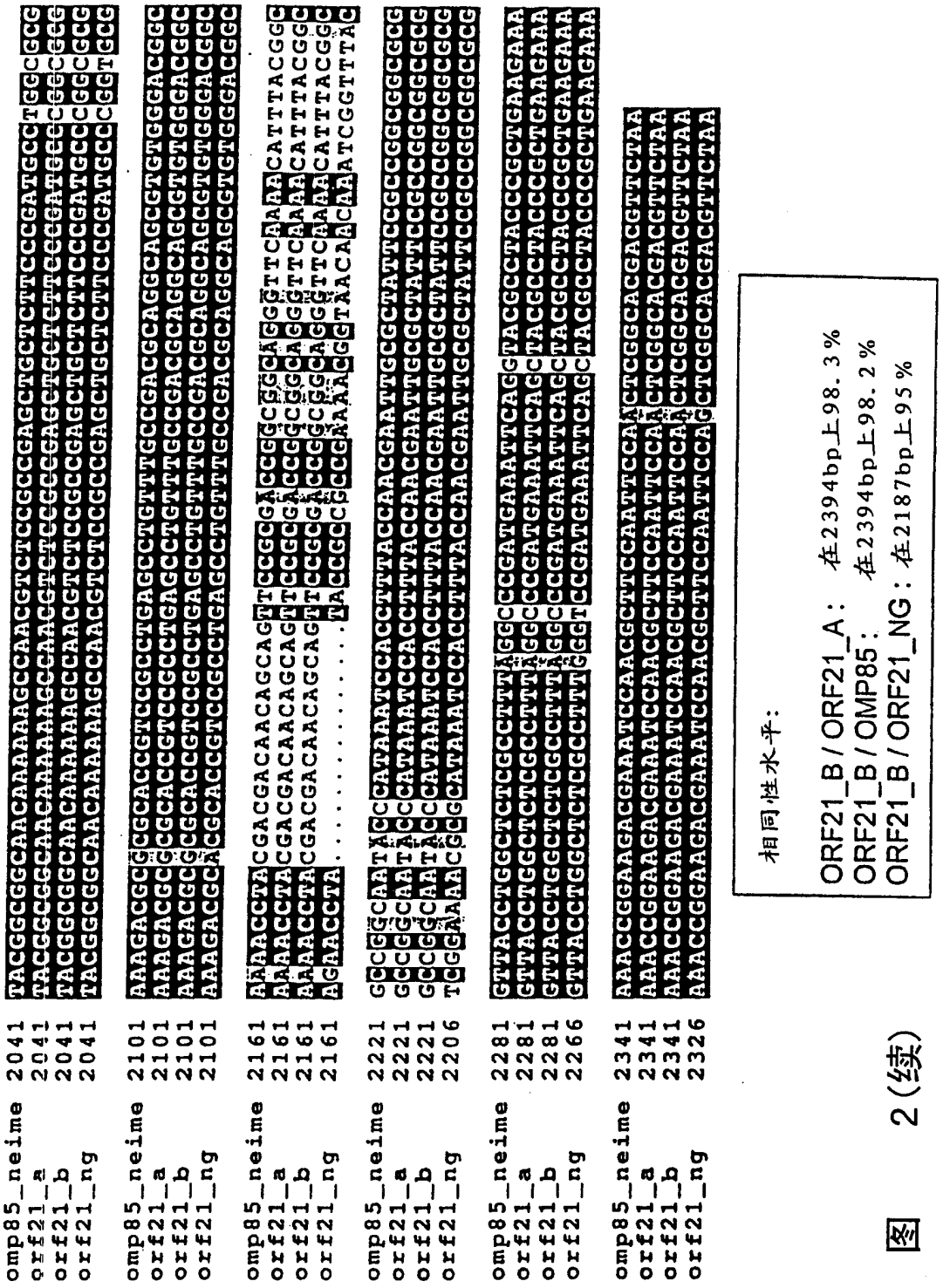

omp85_neime 2041 TACGGCGGCAACAAAAAAGCCAACGTCTCCGCCGAGCTGCTCTTCCCGATGCCTGGCGCG
orf21_a 2041 TACGGCGGCAACAAAAAAGCCAACGTCTCCGCCGAGCTGCTCTTCCCGATGCCCGGCGCG
orf21_b 2041 TACGGCGGCAACAAAAAAGCCAACGTCTCCGCCGAGCTGCTCTTCCCGATGCCCGGCGCG
orf21_ng 2041 TACGGCGGCAACAAAAAAGCCAACGTCTCCGCCGAGCTGCTCTTCCCGATGCCCGGCGCG
omp85_neime 2101 AAAGACGGCGGCACCGTCCGCCTGAGCCTGTTTGCCGACGCAGGCAGCGTGTGGGACGGC
orf21_a 2101 AAAGACGGCGGCACCGTCCGCCTGAGCCTGTTTGCCGACGCAGGCAGCGTGTGGGACGGC
orf21_b 2101 AAAGACGGCGGCACCGTCCGCCTGAGCCTGTTTGCCGACGCAGGCAGCGTGTGGGACGGC
orf21_ng 2101 AAAGACGGCACGGCACCGTCCGCCTGAGCCTGTTTGCCGACGCAGGCAGCGTGTGGGACGGC
omp85_neime 2161 AAAACCTACGACGACAACAGCAGTTCCGCGACCGGCAGGTTCAAAACATTTACGGC
orf21_a 2161 AAAACCTACGACGACAACAGCAGTTCCGCGACCGGCAGGGTTCAAAACATTTACGGC
orf21_b 2161 AAAACCTACGACGACAACAGCAGTTCCGCGACCGGCAGGGTTCAAAACATTTACGGC
orf21_ng 2161 AGAACCTA.....TACCGCCCCGACCGAAACGGTAACAACAAATCGGTTTAC
omp85_neime 2221 GCCGGCAATACCCATAAATCCACCTTACCAACGAATTGCGCTATTCCGCCGGCGGCGCG
orf21_a 2221 GCCGGCAATACCCATAAATCCACCTTACCAACGAATTGCGCTATTCCGCCGGCGGCGCG
orf21_b 2221 GCCGGCAATACCCATAAATCCACCTTACCAACGAATTGCGCTATTCCGCCGGCGGCGCG
orf21_ng 2206 TCGGAAAACGGCATAAATCCACCTTACCAACGAATTGCGCTATTCCGCCGGCGGCGCG
omp85_neime 2281 GTTACCTGGCTCTCGCCTTTAGGCCCGATGAAATTCAGGTACGCCTACCCGCTGAAGAAA
orf21_a 2281 GTTACCTGGCTCTCGCCTTTAGGCCCGATGAAATTCAGCTACGCCTACCCGCTGAAGAAA
orf21_b 2281 GTTACCTGGCTCTCGCCTTTAGGCCCGATGAAATTCAGCTACGCCTACCCGCTGAAGAAA
orf21_ng 2266 GTTACCTGGCTCTCGCCTTTGGGTCCGATGAAATTCAGCTACGCCTACCCGCTGAAGAAA
omp85_neime 2341 AAACCGGAAGACGAAAATCCAACGCTTCCAATTCCAACTCGGCACGACGTTCTAA
orf21_a 2341 AAACCGGAAGACGAAAATCCAACGCTTCCAATTCCAACTCGGCACGACGTTCTAA
orf21_b 2341 AAACCGGAAGACGAAAATCCAACGCTTCCAATTCCAACTCGGCACGACGTTCTAA
orf21_ng 2326 AAACCGGAAGACGAAAATCCAACGCTTCCAATTCCAGCTCGGCACGACGTTCTAA
相同性水平:
ORF21_B / ORF21_A: 在2394bp上98.3%
ORF21_B / OMP85: 在2394bp上98.2%
ORF21_B / ORF21_NG: 在2187bp上95%

图 2(续)