

[51] Int.Cl⁶

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15 / 31
C07K 14 / 20 A61K 39 / 02
G01N 33 / 569

[21] 申请号 95195439.3

[43]公开日 1997 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 1159831A

[22]申请日 95.8.11

[30] 优先权

[32]94.8.17 [33]GB[31]9416667.5

[32]95.2.25 [33]GB[31]9503867.5

[86]国际申请 PCT / EP95 / 03213 95.8.11

[87]国际公布 WO96/05313 英 96.2.22

185|进入国家阶段日期 97.4.2

[71]申请人 马克斯·普朗克促进科学协会

地址 联邦德国慕尼黑

共同申请人 联邦德国肿瘤研究中心

[72]发明人 莱因哈德·沃利克 马库斯·M·西蒙
迈克尔·D·克雷默

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 含有布氏疏螺旋体OSPG的疫苗

[57]摘要

本发明提供了一种新的抗原-OspG, 它来自布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*), 可用于莱姆病的预防和诊断。本发明揭示了这一抗原的克隆、序列和表达。

[illegible]

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种从布氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)中纯化的 OspG, 或其具免疫功能的衍生物。
- 5 2. 一种从布氏疏螺旋体中纯化的 OspG, 其特征为表观分子量 22KDa, 等电点 PI 约 5.2 和含 196 个氨基酸, 或其具免疫功能的衍生物。
3. 一种从布氏疏螺旋体纯化的 OspG, 大致如图 1 所示。
4. 如权利要求 3 的纯化的 OspG, 它与图 1 所示的氨基酸序列至少有 80 % 的同源性。
- 10 5. 此处要求的纯化的 OspG, 应用于医学。
6. 一种疫苗组合物, 含有权利要求 1 - 4 中任意一项所要求的纯化的 OspG。
7. 权利要求 6 的疫苗组合物, 还含有布氏疏螺旋体抗原。
8. 权利要求 6 的疫苗组合物, 其中还含有一种来自疏螺旋体的抗原。
- 15 9. 权利要求 6 - 8 中任意一项的疫苗组合物, 还含有 QS21 或 3D - MPL。
10. 权利要求 1 - 4 中的 OspG 抗原的应用, 以制备对莱姆病患者或该疾病易感者进行免疫预防或免疫治疗的疫苗。
11. 一种治疗莱姆病患者或对该病易感病人的方法, 其中包括服用有效量的如权利要求 6 - 9 的组合物。
- 20 12. 一种分离的 DNA 序列, 它编码如权利要求 1 - 4 中所要求的 OspG 蛋白质或其具免疫功能的衍生物。
13. 一种分离的 DNA 序列, 它编码权利要求 12 所要求的 OspG 蛋白质, 其特征在于与图 1 所示的序列大致相同。
- 25 14. 一种含有权利要求 12 - 13 中所要求的 DNA 序列的表达载体。
15. 一种用权利要求 12 或 13 的 DNA 序列转化的宿主细胞。
16. 一种生产权利要求 1 - 4 所要求的纯化的 OspG 的方法, 包括用权利要求 14 的表达载体转化一种细胞, 分离培养细胞并分离所得的蛋白质。
17. 一种生产含有权利要求 1 - 4 的 OspG 疫苗的方法, 包括将所述的
- 30 OspG 或免疫功能性衍生物与一种药学上可接受的赋形剂相混合。

18. 一种含有来自布氏疏螺旋体的 OspG 的诊断试剂盒。

说明书

含有布氏疏螺旋体 OspG 的疫苗

5 本发明涉及源于布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)的新抗原及其衍生物、制备它们的方法、其在人体和动物医学和诊断中的应用和含有它们的药物组合物。

具体地说, 本发明提供了一种布氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)的新的多形态脂蛋白—OspG 的克隆表达。OspG 以前被人们认为是 lp77。推断出的这一蛋白的氨基酸序列与其它已知的疏螺旋体抗原, 如 OspA、OspB、OspC、OspD、OspE、OspF 和 P27 相比没有明显同源性。这些外层表面蛋白与 OspG 有 41 % - 65 % 的相似性(表 1)。

莱姆病(Lyme disease)是温热气候下最常见的、由媒介动物传播的传染性疾病, 其病原螺旋体中的布氏疏螺旋体造成人体多个系统的疾病, 会影响皮肤、神经系统、关节和心脏(8, 44)。从不同的生物学来源和地理区域中分离到的布氏疏螺旋体菌株具异源性(2, 19, 38, 45, 50), 人们认为疾病表现类型是受螺旋体株抗原的差异影响的。尽管最近已有报道有人尝试用免疫学或分子标准对布氏疏螺旋体进行分类, 但布氏疏螺旋体的分类仍然是一个有争议而又活跃的研究领域。

20 到目前为止, 已有各种布氏疏螺旋体的抗原, 如外层表面蛋白 A(OspA)、OspB、PC 和 p100, 被应用于血清学诊断和作为将来研制疫苗的选择(13, 14, 36, 38, 40, 41)。然而由于它们明显的异质性, 因而仍然缺少明确的尺度, 以判断种特异性诊断标准的形成和研制一种多肽疫苗, 使之能产生抗各亚种的保护作用。

25 本发明的发明者从布氏疏螺旋体中进一步发现了一种脂蛋白, 称为 OspG。该分子的特征为: 表观分子量约 22KDa, 等电点 PI = 5.2 以及含有 196 个氨基酸。成熟蛋白的进一步特征为: 在 OspG 的氨基末端部分有一个约 20 个氨基酸的大的疏水性功能域。这一 N - 末端肽对应于典型原核生物脂蛋白前体的前导信号肽。疏水核心的羧基端是一个可能被布氏疏螺旋体信号肽酶所识别的切割位点。OspG 中这一可能的切割位点位于 19 位丝氨酸和

30

20 位的半胱氨酸之间，OspG 切割位点附近的序列为 L-I-I-S-C。

与 OspA、B、C、D、E、F 和 P27 的基因不同，OspG 基因天然地位于布氏疏螺旋体 ZS7 的 55Kb 质粒上。还注意到 OspG 探针与 45Kb 的质粒有弱的交叉反应。OspG 的氨基酸序列大致如图 1 所示。其进一步的特点为

5 只在感染期间表达，而在体外培养的布氏疏螺旋体中检测不到。

因此，本发明提供了从布氏疏螺旋体中得到的一种分离蛋白，其特征为：采用双向 SDS 凝胶电泳所测定的分子量在 20 - 22KDa 之间，以及等电点在 4.9 - 5.4 之间。

本发明的发明者还提供了一种蛋白，或者是免疫学上或抗体上相当的片段或其衍生物，它们与图 1 所示的氨基酸序列至少有 80 % 的同源性。

10

这一蛋白和其相应的 DNA 和 RNA 序列在疫苗和诊断方面都有用途。

本发明优选提供了与图 1 所描述的蛋白质至少具 85 % 同源性的一种蛋白，更优选的为 90 % 的同源性而最优选的为至少具 95 % 同源性。

本发明的蛋白质可以是一种融合蛋白，这种情况下，其特征为它含有其氨基酸序列或其片段的一部分。优选这一部分与图 1 的蛋白序列相比，至少

15 有 80 % 的同源性，较优选的为 85 %，更优选为 90 %，而最优选为 95 % 的同源性。

优选的蛋白质纯度，用 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定至少在 70 %，最优选为 80 %，较为优选的纯度至少在 90 % 以上。

本发明的蛋白质可以是脂蛋白或者制备成不带脂的蛋白质。当用重组技术制备时，脂蛋白会同信号序列一起表达。切除信号序列，去掉 N 末端的 19 个氨基酸就形成了非脂化的分子。

20

免疫印迹分析显示：OspG 能被预先用完整螺旋体感染过的小鼠血清所识别。这一分析结果表明这种天然蛋白质具免疫原性。

本发明的发明者进一步鉴定和测定了 OspG 基因的序列。因此，本发明提供了编码 OspG 蛋白或其片段或衍生物的 DNA 序列。优选的 DNA 序列大致如图 1 所示。

25

此处所用“大致”一词是指与图 1 序列至少有 70 % 相同，优选为 80 % 相同，更优选为 85 % 以上，最优选为至少 95 % 以上相同。特别地，本发明

30 提供了与图 1 序列大致相同的 DNA 序列，或其片段，或者能与所述序列杂交并编码能显示 OspG 抗原性的一种蛋白质的 DNA 序列。

本发明的 DNA 可以通过 DNA 的酶促聚合反应进行制备,可以在体外合适的缓冲溶液中用 DNA 聚合酶,如 DNA 聚合酶 I (Klenow 片段)来进行。缓冲溶液含所需的核苷三磷酸 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP,温度 10 ° - 37 °C,通常体积为 50 μl 或小于 50 μl。DNA 片段的酶促连接可以用 DNA 连接酶,如 T4 DNA 连接酶,在适当的缓冲液中,如含 0.05M Tris (pH7.4), 0.01M MgCl₂, 0.01M 二硫苏糖醇、1mM 亚精胺、1mM ATP 和 0.1mg/ml 牛血清白蛋白的缓冲液中进行,在 4 °C 环境温度下反应,通常反应体积为 50 μl 或小于 50 μl。DNA 聚合物或片段的化学合成可以通过常规的磷酸三酯、亚磷酸酯或亚磷酰胺化学方法进行,采用固相技术,如“基因片段的化学和酶促合成—实验室手册”(Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments—A Laboratory Manual) (H. G. Gassen 和 A. Lang 编, Verlag Chemie, Weinheim, 1982)所描述的方法,或见于其它的科学文献,如 M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat 和 R. C. Titmas 的“核酸研究”(Nucleic Acids Research), 1982, 10, 6243; B. S. Sproat 和 W. Bannwarth 的“四面体快报”(Tetrahedron Letters), 1983, 24, 5771; M. D. Matteucci 和 M. H. Caruthers 的“四面体快报”(Tetrahedron Letters), 1980, 21, 719; M. D. Matteucci 和 M. H. Caruthers “美国化学协会杂志”(Journal of the American Chemical Society), 1981, 103, 3185; S. P. Adams 等的“美国化学协会杂志”(Journal of the American Chemical Society), 1983, 105, 661; N. D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus 和 H. Koester 的“核酸研究”(Nucleic Acids Research), 1984, 12, 4539; 和 H. W. D. Matthes 等的“欧洲分子生物学协会杂志”(EMBO Journal), 1984, 3, 801。

另一种方法是:用已知的技术(如 mRNA 逆转录产生互补的 cDNA 链)从布氏疏螺旋体 mRNA 和可购得的商品 cDNA 试剂盒获得所述编码序列。

本发明并不限于所公开的特定序列,而是包含了上面所述的编码该蛋白或其具有免疫原性的衍生物的所有分子。

编码本发明蛋白质突变体的 DNA 聚合物可以通过对编码该蛋白质的 cDNA 进行定点诱变的常规方法来制备。该方法披露于 G. Winter 等的“自然”(Nature)1982, 299, 756-758 或 Zoller 和 Smith 1982 的“核酸研究”(Nucl. Acids Res.), 10, 6487-6500。或者通过缺失诱变的方法制备,如由 Chan 和 Smith 在“核酸研究”(Nucl. Acids Res.), 1984, 12, 2407-2419 或 Winter 等在“生物化

学协会学报”(Biochem. Soc. Trans.), 1984, 12, 224-225 中的描述。

一方面, 本发明提供了一种方法, 该方法包括下列步骤:

i)制备一种可复制的或整合一种表达载体, 该载体能在宿主细胞中表达一个 DNA 聚合物, 其中含有一段编码所述 OspG 蛋白质或其具有免疫原性的
5 衍生物的核苷酸序列;

ii)用所述载体转化宿主细胞;

iii)在所述 DNA 聚合物能够表达产生所述蛋白质的条件下, 培养所述的转化后的宿主细胞; 以及

iv)回收所述蛋白。

10 “转化”一词在此指用一种适当的质粒或病毒载体, 将外源 DNA 以转化、转染或感染的方式导入宿主细胞。例如, 用常规的方法, 见“遗传工程”(Genetic Engineering)的描述(S. M. Kingsman 和 A. J. Kingsman 编, 英国牛津 Blackwell Scientific Publications 出版, 1988)。“经转化的”或“转化子”以下用于指含有并表达所需外源基因的所得的宿主细胞。

15 表达载体新颖, 也构成了本发明的一部分。

可复制的表达载体可按本发明的方法进行制备。通过切开与宿主细胞相容的载体, 形成带有完整复制子的线性 DNA 片段, 并且与一个或多个 DNA 分子结合。这些 DNA 分子与所述能编码所需产物的线性片段结合, 如编码 OspG 蛋白的 DNA 聚合物或其片段在连接条件下连接。

20 这样, DNA 聚合物就可以在载体构建中按需要进行制备或合成。

载体的选择一部分取决于宿主细胞, 这些宿主细胞可以是原核或真核生物。合适的载体包括质粒、噬菌体、粘粒和重组病毒。

25 可复制的表达载体的制备可以通过常规的方法, 用适当的酶进行 DNA 的限制性酶切、聚合反应和连接。例如按上面所引用的 Maniatis 等的方法进行。

按照本发明, 重组宿主细胞的制备是在转化条件下, 用本发明中可复制的表达载体转化宿主细胞而实现的。合适的转化条件为常规条件, 如见上述所引用的 Maniatis 等描述的方法, 或“DNA 克隆”(DNA Cloning) (Vol. II, D. M. Glover 编, IRL 出版公司, 1985)。

30 转化条件的选择取决于宿主细胞。对细菌宿主, 如大肠杆菌(*E. coli*)可以用 CaCl_2 溶液进行处理(Cohen 等, “美国全国科学院学报”(Proc. Nat. Acad.

Sci.), 1973, 69, 2110)或用含 RbCl、MnCl₂、乙酸钾和甘油的混合液处理, 然后再用 3 - [N - 吗啉代] - 丙烷 - 磺酸、RbCl 和甘油处理。培养的哺乳动物细胞可以通过钙共沉淀法将载体 DNA 转化到细胞上。本发明还扩展到用本发明的可复制的表达载体转化的一种宿主细胞。

5 在所述 DNA 聚合物能够表达的条件下, 培养转化了的宿主细胞, 方法按常规的, 如 Maniatis 等所述或上述所引用的“DNA 克隆”(DNA Cloning)中的方法进行。这样, 优选为给细胞提供营养物质, 并在 45 °C 以下培养。

10 产物的回收是根据宿主细胞而按常规方法进行。当宿主细胞为细菌时, 如大肠杆菌, 可以用化学或酶法裂解, 并将蛋白质产物从所得的裂解液或上清液中分离出来。当宿主细胞是哺乳动物细胞时, 产物通常可以从营养培养基或不含细胞的抽提物中分离出来。常规的蛋白质分离技术包括: 选择性沉淀、吸收层析和包括单克隆抗体亲和柱在内的亲和层析。

15 另一种方法是, 表达可以用一种合适的载体, 如杆状病毒, 在昆虫细胞中进行。在本发明的一个特殊方面, 所述蛋白质在鳞翅目昆虫细胞中表达, 以便产生具免疫原性的多肽。对于在鳞翅目昆虫细胞中蛋白质的表达, 优选为使用杆状病毒表达系统。在这种系统中, 含有蛋白质编码序列、并有效连接到杆状病毒启动子上的表达盒, 典型地位于穿梭载体内。这种载体含有足够数量的细菌 DNA, 能在大肠杆菌或其它合适的原核生物宿主中增殖穿梭载体。这种穿梭载体也含有足够量的杆状病毒 DNA, 位于所需的蛋白编码序列旁侧, 使野生型杆状病毒和异源基因之间能进行重组。重组的载体然后与野生型杆状病毒 DNA 一起, 通过共转染进入鳞翅目昆虫细胞。接着对由同源重组产生的重组杆状病毒按标准方法进行选择和噬斑纯化。见 Summers 等“德克萨斯农业实验站公报”(Texas Agricultural Experimental Station Bulletin, TAES Bull), NR 1555, 1987 年 5 月。

25 在昆虫细胞中表达环孢子蛋白(CS)的方法详细描述在 Smith Kline RIT(WO/US 89/05550)的 USSN 287,934 中。

30 在昆虫细胞中进行制备也可以通过感染昆虫幼虫的方法而实现。例如, 可以在烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)的幼虫中获取这种蛋白, 即用本发明的重组杆状病毒和微量的野生型杆状病毒一起喂饲幼虫, 约 2 天后从血淋巴中提取该蛋白。如见 Miller 等的 PCT/WO88/02030。

本发明的新的蛋白质也可以在酵母细胞中表达, 如同在 EP-A-0278941

中 CS 蛋白的表达一样。

本发明也涉及到包含 OspG 或其片段或衍生物的疫苗组合物。

本发明的疫苗可以直接用蛋白质的水溶液。或者，经冷冻干燥或未经冷冻干燥的蛋白质，与任何已知的佐剂混合或用佐剂吸收。这些佐剂包括、但不
 5 限于氢氧化铝、胞壁酰二肽和皂苷(如 Quil A)。特别优选的佐剂为单磷酸脂 A(MPL) (monophosphoryl lipid A)和 3-脱-O-酰化单磷酸脂 A (3D-MPL) (3De-O-acylated monophosphoryl lipid A)。优选的佐剂还有 QS21。3D-MPL 可从 Ribi 免疫化学公司得到或按英国专利 No. 2220211 所公开的方法制得；QS21 可从剑桥生物技术公司得到或按美国专利 No. 5,057,540 所公开方法制
 10 得。作为另一种范例的方法是将蛋白质装入微颗粒，如脂质体的胶囊中，或者在水乳剂中与油混合。还有另一种作为例证的方法是将蛋白质缀合到一种具免疫刺激性的大分子上，如灭活的包特菌(*Bordetella*)或破伤风类毒素。在本发明的优选实施例中，本发明的抗原包含其它疏螺旋体的抗原，特别是 OspA。

15 本发明的蛋白质可以用活载体，如卡价菌(*BCG*)、李斯特菌(*Listeria*)或沙门氏菌(*Salmonella*)来表达，并用这些载体制成活疫苗。

疫苗的制备基本描述在“疫苗新的趋势和研制”(New Trends and Developments in Vaccines, Voller 等编，马里兰巴尔的摩 University Park Press 出版，1978)。装入脂质体胶囊的方法描述见 Fullerton 的美国专利
 20 4,235,877。蛋白质缀合到大分子上的描述见 Likhite 的美国专利 4,372,945 和 Armor 等的美国专利 4,474,757。

Quil A 的使用见 Dalsgaard 等在“斯堪的纳维亚兽医学报”(Acta Vet Scand), 18: 349 (1977)中的描述。

在每一疫苗剂量中，本发明蛋白质的含量是根据在典型疫苗中该含量能
 25 诱导免疫保护反应，但又无明显的不利副作用而选定的。这一量的不同取决于所采用的特定免疫原和这一疫苗是否与佐剂结合。通常每一剂量中含 1 - 1000 μ g 的蛋白质，优选为 1 - 200 μ g。对某一特定疫苗的最适量可以通过标准方法，包括观察抗体滴度和实验对象的其它反应来确定。在初始接种疫苗之后，可以对实验对象再施用疫苗以增强其免疫反应。

30 本发明也涉及抗体，优选为针对 OspG 特异的单克隆抗体。这种单克隆抗体可用于莱姆病的诊断和预防。

在另一个实施例中，本发明提供一种含有 OspG 抗原的诊断试剂盒。

1 材料和方法

1.1 疏螺旋体(*Borrelia*)菌株

5 本研究中所用的布氏疏螺旋体(*B. Burgdorferi*)菌株描述在其它文献(45)中。将疏螺旋体在 33 °C 下生长于改进的 Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK II) 培养基上。4 °C 下 10,000g 离心 20 分钟收获螺旋体，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两遍，在暗视野显微镜下计数。

10 制备和筛选布氏疏螺旋体的表达文库

布氏疏螺旋体 ZS7 株基因组 DNA 的制备是用溶菌酶/SDS 方法，DNA 片段通过超声波处理而产生。用衔接头克隆法(7, 31)将平末端 DNA 插入 pUEX1 载体。连接后的 DNA 转化到大肠杆菌 MC1061 中，然后用取自 DBA/2 小鼠的免疫血清进行表达筛选，小鼠预先已接种过 104 个(或少于此数)的布氏疏螺旋体(ZS7)细菌。

1.2 DNA 印迹杂交

按前述方法(32)，从疏螺旋体生物中提取总基因组 DNA。将约 5 μg DNA 用 100U 的限制性内切酶(Hind III)进行消化，按生产厂家(Boehringer, Mannheim)推荐的方法进行。样品用 0.7 % 的琼脂糖凝胶电泳。把 DNA 片段转移到 Hybond™-N 尼龙膜(Amersham)上，然后进行紫外交联和杂交。简要说，即 65 °C 下在含 0.5M NaHPO₄ / 7 % NaDodSO₄，pH7.2 溶液用 ³²P 标记的探针杂交过夜。室温下在 40nM NaHPO₄ / 1 % NaDodSO₄，pH7.2 中洗膜 30 分钟，干燥后的膜在用增感屏条件下用柯达 XAR-5 胶片于 - 80 °C 放射自显影 1 - 12 小时。杂交探针是用含 LA7 编码区的 500bp 的 DNA 片段。所需的基因片段用低熔点琼脂糖凝胶回收，用乙醇处理使其沉淀，并用上述的随机引物反应进行放射性标记。

1.5 凝胶电泳

30 按照 Laemmli(21)的方法，在单向 SDS/PAGE 板凝胶上进行电泳，从每份裂解液取 40 μl(约相当于 10⁸ 生物体)同 10 μl 5×的还原性样品缓冲液混

合。

双向聚丙烯酰胺凝胶电泳按 O'Farrel(29)所述方法进行,在第一向电泳中用等电聚焦(Pharmacia/LKB 两性电解质: 1.45 % pH3.5 - 10, 0.1 % pH2.5 - 4.0, 0.2 % pH4 - 6, 0.2 % pH9 - 11)。取与单向凝胶电泳相同量的裂解液进行电泳。凝胶用银染色或进行蛋白质印迹(15)。

表面蛋白酶解按 Barbour 等的方法(20), 用蛋白酶 K (Boehringer, Mannheim, 德国)进行处理。然后用 SDS - PAGE 分离蛋白质, 各抗原用免疫印迹进行鉴定。

10 1.6 蛋白质印迹(Western blotting)

双向 SDS - PAGE 电泳后,按生产厂家的推荐,在半干燥的电印迹盒(BIO - RAD, 德国慕尼黑)中,将蛋白质以恒定的电流(60mA)在 Hybond C 硝酸纤维素膜(Amersham)上电印迹 1 小时。在封闭缓冲液(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5 % 脱脂干奶)中温育过夜后,将免疫印迹置于含 1:100(v/v)稀释的小鼠和人抗血清的 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1 % 干奶、0.2 % Tween 20 的溶液或小鼠单克隆抗体(LA7)培养物上清中,室温下保温 2 小时。硝酸纤维素滤膜在稀释缓冲液中洗 5 次,再与碱性磷酸酶缀合的羊抗兔抗血清(德国汉堡, Dianova, 1:400 v/v)一起温育 1 小时。印迹在上述缓冲液中洗 4 遍,再在 TBS 中洗 2 遍,然后加入 20mlDEA 缓冲液[0.1M 二乙醇胺(Sigma), 0.02 % NaN_3 , 5mM MgCl_2 , pH9.0],其中补充了 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(BCIP, Sigma; 165 $\mu\text{g/ml}$)和氮蓝四唑(NBT, Sigma; 330 $\mu\text{g/ml}$)作为底物,使免疫反应带显色。在 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl、5mM EDTA 中洗膜以终止反应。

25 1.7 DNA 序列

克隆到 pUEX1 质粒(Amersham)的布氏疏螺旋体基因组 DNA 片段,用 T7 测序试剂盒(Pharmacia),按照厂家推荐方法测序。

1.8 氨基酸序列分析

30 用 HUSAR 软件同时进行蛋白质序列对比和系统树的构建。

1.9 免疫荧光

将布氏疏螺旋体在 PBS 中洗两遍，转到粘附玻片上(德国 Bad Mergentheim, Superior) (1×10^5 螺旋体/反应区)，用无水酒精(2 分钟， -20°C)固定并风干。固定的螺旋体与各稀释后的单抗温育，螺旋体再在异硫氰荧光素湿盒中保温 30 分钟。在 PBS 中洗三遍后，用荧光显微镜镜检，并用 400ASA 的黑白胶卷(HP5；英国 Illford)拍摄记录。

1.10 免疫荧光

将布氏疏螺旋体在 PBS 中洗两遍，转到粘附玻片上(德国 Bad Mergentheim, Superior) (10^5 螺旋体/每反应区)，用无水酒精固定(2 分钟， -20°C)，风干。固定的螺旋体与在 PBS 中稀释的单抗一起在湿盒中温育 30 分钟。用 PBS 洗三遍后，将螺旋体与异硫氰荧光素标记的羊抗小鼠免疫球蛋白抗血清(Medac，德国汉堡)一起，在暗的湿盒中温育 30 分钟。经 PBS 中三次洗涤，将制备物在荧光显微镜下镜检，并用 400ASA 的黑白胶卷(HP5；英国 Illford)照相记录。

ELISA 布氏疏螺旋体特异性抗体的测定采用如前面所述方法(15)，在固相 ELISA 系统中用布氏疏螺旋体 B31 抗原进行测定。

2.1 一部分 ospG 基因的 PCR 扩增

缺少编码疏水性前导肽的 ospG 基因，用寡核苷酸引物：5'-GTGGATCCAAGATTGATGCGAGTAGTG-3'(对应于第 61 位至 79 位核苷酸)和 5'-GTGAATTCTATTTTTTATCTTCTATATTTTGAGGCTCTG-3'(对应于第 560 位至 590 位核苷酸)进行 PCR 扩增。pZS7 质粒 DNA 在 DNA 热循环仪(Bio-Med 60)上进行 30 个循环的 PCR 扩增。变性用 94°C 60 秒，退火 48°C 90 秒，延伸 72°C 90 秒。扩增后片段经 BamHI 和 EcoRI 消化，连接到谷胱甘肽 S-转移酶(GST)基因的框架并转入 pGEX-2T 载体，将其用于转化 DH5 α 宿主细胞。

2.2 重组 OspG 的表达和纯化

在大肠杆菌 DH5 α 菌株中表达谷胱甘肽 S-转移酶-OspG 融合蛋白。亲和纯化和用内切蛋白酶凝血酶酶切融合蛋白的方法，均按生产厂家

(Pharmacia)的推荐方法进行。

2.3 [³H]棕榈酸标记和 TritonX-100 相分配

5 将用带有截短的全长 ospG 基因(pOspG)的质粒(pZS77)转化后的大肠杆菌，培养在含有[9, 10-(n)-³H]棕榈酸(比活 ≈ 50 Ci/mmol, Amersham)的培养液中。放射性标记的脂蛋白按前述方法(46)用 Triton X-114 相分配法提取。

2.4 免疫血清的生成和血清学

10 免疫血清取自小鼠，它们事先在尾巴中接种 10⁸(C.B-17；免疫血清(IS)抗-10⁸)或 10³(DBA/2；免疫血清抗-10³)活的布氏疏螺旋体 ZS7 株，或者先用 5 - 10 μg 脂化的 OspA (lipOspA) (BALB/c；免疫血清抗 lipOspA)或含佐剂 (ABMZ；德国 Aidenbach Sebac)的重组(rec)recOspG (BALB/c，免疫血清抗-recOspG)皮下注射(s.c.)，10 - 20 天后再加强剂量。所有血清如前所述用 ELISA 法对总的螺旋体裂解液(B.b Ig)或重组 OspA(OspA Ig)或重组
15 OspG(OspG Ig)中的螺旋体特异性免疫球蛋白的(Ig)的量进行分析。

2.5 保护实验

重度联合免疫缺陷病(SCID)小鼠不经处理，或用正常小鼠血清(NMS)或混合免疫血清(IS)重建。用个体 IS 转移的螺旋体特异性免疫球蛋白(IG)的量
20 (ELISA 测定总布氏螺旋体细胞裂解液)如下：IS 抗-10⁸，4.4 μg Ig/小鼠；IS 抗-10³，4.5 μg/小鼠；IS 抗-lipOspA，5 μg/小鼠；IS 抗-重组 OspG (recOspG)，72ng/小鼠。当对 recOspG 试验时，IS 抗-recOspG 中特异性 Ig 量比 IS 抗-10³ 中约高 10 - 20 倍。腹膜注射(i.p.) IS，一小时以后用 10⁵ 螺旋体(布氏螺旋体 ZS7 株)皮下注射感染接受 IS 的小鼠。观察小鼠在蒙蔽条件下
25 其临床关节炎的发病，和按前面所述(37, 40)的 BSK 培养基上培养耳的活组织方法观察螺旋体的存在。

2.6 病理学

30 胫跗关节部位关节炎的发病在如前所述(37, 40)的蒙蔽条件下进行监测。分级标准如下，++ 严重；+ 较严重；(+)中度；+/-，轻度肿胀；(+/-)微红肿；- 无关节炎临床症状。

结 果

OspG 的克隆和重组结构的分析

布氏疏螺旋体菌株 ZS7 的基因组 DNA 表达文库，用事先感染 10^3 螺旋体 (IS 抗- 10^3) 的小鼠免疫血清进行筛选。这一 IS 以前显示出缺少对 OspA 和

5 OspB 的抗体，但能在 SCID 小鼠中保护其免受后来的感染(35)。而且，这一 IS 在免疫印迹试验中，能识别 4 种不同的相对分子量 19 - 20KDa 的蛋白质，和 2 种分子量约 40KDa 的蛋白质。这些蛋白来自 ZS7 株全细胞裂解液，通过双向凝胶电泳进行分离。鉴定了约 20 个克隆，其中一个定名为 pZS77 的具有特殊的反应性。对这一重组的 pZS77 质粒进行限制性酶切分析、亚克隆和

10 测序。ospG 的核苷酸序列及推断的 OspG 的氨基酸序列如图 1 所示。共有的核糖体结合位点(GGAG)位于 ospG 基因的 ATG 起始密码子上游 10bp 的位置。这一翻译起始序列的再上游是 - 70 至 - 64 位的 - 10 区(TATATT)和 - 105 至 - 100 位的 - 35 区(TTGTTA)。位于 - 118 至 - 49 位的这一上游区含有 2 个短的反向重复序列 ATATTT 和 TTACATTT。在 + 1 位的 ospG 基因的

15 ATG 起始密码子后，是一个 588 个核苷酸的可读框，对应于 196 个氨基酸的蛋白质，其计算的分子量为 22,049Da。确定在 620 位和 656 位之间可能有一个不依赖于 ρ 的终止子。将 ospG 基因的 ATG 起始密码子上游的 DNA 序列，与最近报导的 ospE - ospF 操纵子的启动子区序列比较，用 GAP 公式计算的相似性为 94 %。还发现 ospG 启动子含有 2 个高度保守的八聚体 DNA 基序：

20 ATGTATTT(在 - 187 位至 - 180 位)和 AATTACAT(在 - 120 位至 - 113 位)，这两个基序以前的研究表明是与称为 MAT α 2 的负调节分子的蛋白结合位点有关，以及在酵母分化过程中调节基因表达(5,25)。这两个基序在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的两个基因 MF α 2 和 BAR1 中分别得到了鉴定，并且它们还包含了与免疫球蛋白八聚体基序 ATTTGCAT 相似的不完整反向

25 重复基序。最有趣的是，在两个类酿酒酵母基序之间，还含有免疫球蛋白八聚体的类似序列 ATTTGCAA(位于 - 154 至 - 147 之间)，它与免疫球蛋白八聚体基序的差别仅仅为一个碱基的转换替代。

OspG 氨基酸序列分析

30 OspG 的亲水性分布图提示这一蛋白质主要为亲水性，但在氨基末端部分有一个约 20 个氨基酸的疏水区域。这一 N 末端区表现出与典型原核生物

脂蛋白中前导信号肽有相似性(51, 52)。在信号序列的羧基末端是一个推定的信号肽酶 II 识别基序 Leu-X-Y-Cys(图 3a)。OspG 中潜在的切割位点位于第 19 位的丝氨酸和第 20 位的半胱氨酸之间。计算出的等电点 $PI = 5.2$ 。将 OspG 的氨基酸序列与所有已知的布氏疏螺旋体的外层表面蛋白 OspA - OspF 和 P27 比较, 结果显示 OspG 与 OspF 同源性最高(65 %)(表 1)。而且, OspG 的基本 N - 末端肽基序 M-N-K-K-M 与 OspE 和 OspF 中观察到的一致。

OspG 作图

几种布氏疏螺旋体株的质粒和染色体 DNA 通过脉冲电场凝胶电泳进行分离, 并与 ospA 和 ospG 特异性探针杂交。我们估算德国布氏疏螺旋体的分离株 ZS7 中含有 ospA 的质粒大小为 53Kb。由于在凝胶上所加的 DNA 量少, ACA-1 菌株中含 ospA 的质粒电泳后勉强可见, 但延长曝光时间后可以看出来(数据未显示)。用 ospG 探针看到一条明显的带, 约为 48Kb 的线性质粒, 还有一条较弱的带为 ZS7 株 45Kb 的质粒。与之形成对照的是, 在美国 B31 菌株中, 大小为 45Kb 和约 35Kb 的两个质粒与 ospG 基因探针杂交。还发现当采用嘎氏疏螺旋体(*B. garinii*)ZQ1 株、20047 株和日本疏螺旋体(*B. japonica*)HO14 株时, 未观察到杂交现象。在对照实验中, 用来自 ZS7 株的 ospE - ospF 探针进行测定, 以观察用这些基因组 DNA 时是否能观察到不同的带。这一实验表明了 ZS7、B31、20047 和 21038 株含 45Kb 和 35Kb 的两种质粒。从其它种的疏螺旋体, 如革质疏螺旋体(*B. coriaceae*)Co53、美西部回归热赫氏疏螺旋体(*B. hermsii*)、特里婢疏螺旋体(*B. turicatae*)和从梅毒密螺旋体(*Treponema pallidum*)分离的 DNA 不与 ospG 探针杂交, 表明了 ospG 对布氏疏螺旋体的特异性。

ospG 基因的限制性片段长度多态性(RFLP)

用核酸内切酶 Hind III 对 ospG 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析, 结果显示, 在所试验的 20 个布氏疏螺旋体的分离株中至少有 7 种不同的杂交带型: 大多数狭义上的布氏疏螺旋体分离株的特征是含有 1.8Kb 和 3.8Kb 的两个杂交片段(图 6, 1 泳道); 所试的 6 个嘎氏疏螺旋体分离株中的 3 株不与 ospG 探针杂交, 而嘎氏疏螺旋体 20047 株和 S90 株分别出现 1.8Kb 片段和 1.7、3Kb 片段(数据未显示); 在阿氏疏螺旋体的菌株中, 至少可观察到

三种不同的杂交型：ACA-1(电泳泳道 3)菌株有一条 2.4Kb 的带，MMS 菌株(电泳泳道 4)有 1.9 和 2Kb 的两条带，NE40 菌株(电泳泳道 5)有 2kb 和 5kb 的带。

5 大肠杆菌中 OspG 重组蛋白的表达

为了用 PCR 扩增 OspG，引物选择是根据这样一条原则：即使得最终的重组产物缺少组成前导肽的 20 个氨基酸残基(46)。扩增后的 OspG 编码产物插入表达载体 pGEX-2T(Pharmacia，德国 Freiburg)的载体蛋白框架中，经过异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导，得到约 44KDa 的 GST-OspG 融合蛋白。采用谷胱甘肽-琼脂糖小珠，然后用位点特异性蛋白酶消化结合态的 GST-OspG 融合蛋白的方法，从大肠杆菌裂解液中富集 GST-OspG 融合蛋白。

[^3H]棕榈酸标记

为测定 OspG 在大肠杆菌 DH5 α 株中是否表达为脂蛋白，将细胞用 pZS77 或 pOspG 质粒进行转化，并用 [^3H]棕榈酸标记(图 8)。质粒 pZS77 编码带有正常 N 末端信号序列的 OspG 前体蛋白的全长，而 pOspG 编码的蛋白质，其 OspG 前体的前面 21 个残基被 Met - Lys 序列所替代。经过除垢剂-相分配抽提和用 SDS - PAGE 分离，放射性产物通过荧光显影而显现。含有 ospG 基因(pZS77 质粒)全长的大肠杆菌细胞表达 20kDa 的脂蛋白，该脂蛋白分配到除垢剂相中。而在含有截短的 ospG 基因的 DH5 α 细胞中观察不到脂蛋白。

OspG 的亚细胞定位

为确定 OspG 在完整生物体中的亚细胞定位，用蛋白酶 K 处理螺旋体。随后用免疫印迹进行分析。所用的抗-10³ 血清为用于从表达文库中分离 ospG 的血清。抗-10³ 免疫血清检测到 4 种低分子量的蛋白质，它们经蛋白酶解后部分消失，而分子量约为 40kDa 的两种结构不受蛋白酶处理的影响(17)。用蛋白质印迹测定 rOspG 是否被抗-10³ 血清所识别。rOspG 吸收抗-10³ 血清后，能识别同样大小的一些主要蛋白质(图 7A)，这一结果提示：在体外培养的 ZS7 菌株裂解液所含的低分子量蛋白质中可能没有 OspG，或者发生了 OspG 的蛋白酶解。为了证实 OspG 的身份以及它是否能够在体外培养的布氏

疏螺旋体 ZS7 菌株中表达, 超免疫的鼠抗-rOspG 血清不能从 10^9 的体外培养的 ZS7 菌株中检测到 OspG。在一些实验中, 可以观察到 40KDa 多肽具有意想不到的弱活性, 这可能是 OspG 的变体或表明了与 OspG 有一些共同抗原表位的布氏疏螺旋体的蛋白质。为测定从体外培养的布氏疏螺旋体 ZS7 菌株

5 中 ospG 基因的表达, 将总 RNA 分离出来, 并用 RNA 印迹杂交法分析 ospG 转录物的存在。用 ospA 基因探针检测硝酸纤维素膜, 作为体外表达和 RNA 降解的对照。与 ospA 探针能与单个约 2kb 的转录物相结合形成对照的是, ospG 探针检测不到 ospG 转录产物。这些结果提示, 体外培养中 OspG 的表达缺陷似乎是因 ospG 在转录水平的 mRNA 稳定性所致。在体外培养的布氏

10 疏螺旋体 ZS7 菌株的裂解液中, OspG 是检测不到的, 而在哺乳动物宿主的生长过程中, OspG 表达可能有差异。用代表性的莱姆病患者和实验感染的小鼠的血清样品进行免疫印迹分析, 结果表明其中出现对 OspG 特异性的抗体。从已证实的莱姆疏螺旋体病患者 13 个血清标本中, 发现其中 6 个含有抗-OspG 的抗体。相反, 所有健康的献血者($n = 8$)的血清中都不含有识别 rOspG

15 的抗体(数据未显示)。这些发现提示了 OspG 只在感染过程中表达。

用抗-OspG 免疫血清部分地保护 SCID 小鼠

为测定抗-OspG 免疫血清的保护能力, 用以下量的、来自混合免疫血清 (IS) 制备物的布氏疏螺旋体的特异性免疫球蛋白(Ig)处理 SCID 小鼠: C.B-17

20 IS 抗- 10^8 ($4.4 \mu\text{g B.b Ig/小鼠}$), DBA/2 IS 抗- 10^3 ($4.5 \mu\text{g B.b Ig/小鼠}$), BALB/c IS 抗-lipOspA ($5 \mu\text{g B.b Ig/小鼠}$) 和 BALB/c IS 抗-recOspG (72ng B.b Ig/小鼠)。但抗-recOspG 免疫血清与抗- 10^3 免疫血清相比, 所含的抗-recOspG 抗体量前者比后者多 10 倍以上。SCID 小鼠用所述任何一种 IS 腹膜内注射, 随后用 10^5 量的布氏疏螺旋体进行感染试验。观察临床关节炎的发病和耳组

25 织活检中螺旋体的出现。接种了螺旋体而未作其它处理的或 NMS(正常小鼠血清)-处理的 SCID 小鼠, 从感染后第 6 天起出现关节炎, 而到第 13 天至第 24 天(终止时间), 胫跗关节出现严重的肿胀。如前所述, 用抗- 10^8 或抗- 10^3 和抗 lipOspA 免疫血清被动免疫的 SCID 小鼠, 不出现或只出现轻微的临床关节炎的症状。而与之对照的用抗-recOspG 被动免疫的 SCID 小鼠, 根据其在第 6 天至第 18 天出现的轻度肿胀, 表明只是推迟了关节炎的发病。在晚些

30 时候, 这些小鼠出现了更加严重的关节炎症状, 表明了这一免疫血清与其它

免疫血清相比控制感染的效果较差。抗 recOspG 免疫血清比抗-10³ 免疫血清所含的针对 recOspG 的抗体多 10 倍以上，但保护作用却差得多，这表明在抗-10³ 免疫血清中，另有专一性物质在控制感染中发挥着作用。

表 1：布氏疏螺旋体外层表面脂蛋白

名称	来源 (菌株)	长度 (aa)	分子 量 (KDa)	等电 点 (PI)	质粒位置	与 OspG 相似性 (%)	参考 文献
OspA	ZS7	273	29.3	8.9	49 kb 线状	48.4	(47)
OspB	B31	296	31.8	9.9	49 kb 线状	43.1	(4)
OspC	B31	210	22.3	8.6	26 kb 环状	41.8	(30)
OspD	B31	257	28.4	5.2	38 kb 线状	45.6	(28)
OspE	N40	171	19.2	8.1	45 kb	52.9	(22)
OspF	N40	230	26.1	5.3	45 kb	64.9	(22)
OspG	ZS7	196	22	5.2	55 kb		本研究
P27	B29	248	28.9	8.6	49 kb 线状	45.2	(32)

表 2: 未注射免疫血清或用所指的免疫血清预先腹膜注射后再接种 1×10^5 布氏疏螺旋体 ZS7 菌株的 SCID 小鼠临床关节炎的发病情况

转移的 血清	小鼠数量	感染后临床关节炎的程度					再培养(耳部)
		6	13	18	20	27	
无	1	-	+/+	++/++	++/++	++/++	+
	2	(±)/(±)	+/+	++/++	++/++	++/++	+
NMS [5 µg/小鼠]	1	(±)/±	+/+	++/++	++/++	++/++	+
	2	±/(±)	+/+	++/++	++/++	++/++	+
	3	(±)/(±)	+/+	++/++	++/++	++/++	+
IS 抗- 10^3 (DBA/2) [4.5 µg 样本 lg/小鼠]	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	±/±	-	-	-	±/(±)	-
	4	-	-	-	(±)/-	±/-	-
IS 抗- 10^8 (C.B-17) [4.4 µg 样本 lg/小鼠]	1	±/-	±/-	-	-	-	-
	2	-	-/±	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	±/±	-/±	-	-	±/-	-
IS 抗- lipOspA (BALB/c) [5 µg 样本 lg/小鼠]	1	(±)/(±)	-	-	-	(±)/-	-
	2	±/±	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-/(±)	-	-
IS 抗- recOspG (BALB/c) [72 ng 样本 lg/小鼠]	1	-	(+)/(+)	±/-	+/++	++/++	+
	2	-	(+)/(+)	±/±	(+)/(+)	++/++	+
	3	-	(+)/(+)	±/±	++/++	++/++	+
	4	-	(+)/(+)	(+)/+	++/++	++/++	+
mAb LA 10* [5 µg 样本 lg/小鼠]	1	-	-	-	(±)/±	(+)/(+)	+
	2	-	(+)/(+)	+/+	++/++	++/++	+
	3	-	(+)/(+)	+/+	++/++	++/(+)	+
	4	-	(+)/(+)	++/++	++/++	++/++	+
mAB LA2* [5 µg 样本 lg/小鼠]	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	±/-	(±)/-	-	-	-
	3	-	±/-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-

o 评定标准: ++ 严重; + 较严重; (+) 中度; ± 轻度肿胀; (±) 微红肿; - 左右跗跖关节无临床症状。

* mAB 前面有描述(20, 35, 39)

参考文献

1. Aron, L., M. Alekshun, L. Perlee, I. Schwartz, H.P. Godfrey 和 F. C. Cabello. 1994。 “ bmpC——一个编码布氏疏螺旋体的潜在膜脂蛋白基因的克隆和 DNA 序列分析”(Cloning and DNA sequence analysis of bmpC, a gene encoding a potential membrane lipoprotein of *Borrelia burgdorferi*)。 “欧洲微生物学会联合会微生物学快报” (FEMS Microbiol. Lett.) 123: 75-82。
2. Barbour, A.G., S.L. Tessier 和 S.F. Hayes. 1984。 “莱姆病螺旋体主要表面蛋白的变异” (Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes)。 “感染与免疫” (Infect. Immun.) 45: 94-100。
3. Barbour, A.G.和 H.G. Stoenner. 1985。 “美西部回归热赫氏疏螺旋体抗原的变异” (Antigenic variation of *Borrelia hermsii*)。 “加州洛杉矶大学分子细胞生物学新系列论文集” (UCLA Symp. Molcell. Biol. New Ser.) 20: 123-125。
4. Bergstrom, S., V.G. Bundoc 和 A.G. Barbour. 1989。 “莱姆病螺旋体布氏疏螺旋体的线性质粒编码的主要表面蛋白 OspA 和 OspB 的分子分析” (Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*)。 “分子微生物学” (Mol. Microbiol.) 3: 479-486。
5. Borst, P 和 D.R. Greaves. 1987。 “改变基因表达的程序性基因重排” (Programmed gene rearrangements altering gene expression)。 “科学”(Science) 235: 658-667。
6. Brandt, M.E., B.S. Riley, J.D. Radolf 和 M.V. Norgard. 1990。 “布氏疏螺旋体的免疫原性的整合膜蛋白为脂蛋白”(Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins)。 “感染与免疫” (Infect. Immun.) 58: 983-991。
7. Bressan, G.M.和 K.K. Stanley. 1987。 “相关于 pEX 具广泛宿主特异性的细菌表达载体——pUEX ” (pUEX, a bacterial expression vector related to pEX with universal host specificity)。 “核酸研究” (Nucl. Acids Res.) 15: 10056。
8. Burgdorfer, W., A.G. Barbour, S.F. Hayes, J.L. Benach, E. Grunwaldt 和 J.P. Davis. 1982。 “莱姆病——一种蜱传播的螺旋体病?” (Lyme disease - a tick-borne spirochestosis?) “科学” (Science) 216: 1317-1319。

9. Champion, C.I., D.R. Blanco, J.T. Skare, D.A. Haake, M.Giladi, D. Foley, J.N. Miller, and M.A. Lovett. 1994. “布氏疏螺旋体的一个 9.0kb 碱基对的环状质粒编码一种输出蛋白: 只在感染期间表达的证据” (A 9.0-kilobase-pair circular plasmid of *Borrelia burgdorferi* encodes an exported protein: Evidence for expression only during infection). “感染与免疫” (Infect. Immun.) 62: 2653-2661.
10. Church, G.M. 和 W. Gilbert. 1984. “基因组测序” (Genomic sequencing). “美国全国科学院学报” (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 81: 1991-1995.
11. Craft, J.E., D.K. Fischer, G.T. Shimamoto 和 A.C. Steere. 1986. “莱姆病期间被识别的布氏疏螺旋体抗原” (Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognised during Lyme disease). “临床研究杂志” (J. Clin. Invest.) 78: 934-939.
12. Dattwyler, R.J., D.J. Volkman, J.J. Halperin, B.J. Luft, J. Thomas 和 M.G. Golightly. 1988. “莱姆疏螺旋体病中特异性免疫反应” (Specific immune responses in Lyme borreliosis) “纽约科学院年鉴” (Ann. NY Acad. Sci. USA) 539: 93-102.
13. Fikrig, E., S.W. Barthold, F.S. Kantor 和 R.A. Flavell. 1992. “用 OspA 接种以长期保护小鼠免疫莱姆病” (Long-term protection of mice from Lyme disease by vaccination with OspA) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 60: 773-777.
14. Fikrig, E., S.W. Barthold, N. Marcantonio, K. Deonte, F.S. Kantor 和 R.A. Flavell. 1992. “OspA、OspB 和鞭毛蛋白在实验室小鼠莱姆疏螺旋体病中保护性免疫的作用” (Roles of OspA, OspB, and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 60: 657-661.
15. Fikrig, E., H. Tao, F.S. Kantor, S.W. Bathold 和 R.A. Flavell. 1993. “通过截短外层表面蛋白 B 避开布氏疏螺旋体的保护性免疫” (Evasion of protective immunity by *Borrelia burgdorferi* by truncation of outer surface protein B) “美国全国科学院学报” (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90: 4092-4096.
16. Fuchs, H., R. Wallich, M.D. Kramer 和 M.M. Simon. 1994. “布氏疏螺旋体的外层表面蛋白是纤溶酶结合蛋白” (The outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) binding protein) “美国全国科学院学报”

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91: 12594-12598。

17. Gern, L., U.E. Schaible 和 M.M. Simon. 1993。“莱姆病病原布氏疏螺旋体的接种模式影响近亲交配小鼠品系的感染和免疫反应”(Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice)“传染病杂志”(J. Infect. Dis.) 167: 971-975。

18. Hughes, C.A.N., S.M. Engstrom, L.A. Coleman, C.B. Kodner 和 R.C. Johnson. 1993。“用缺少 OspA 和 OspB 的布氏疏螺旋体突变体诱导保护性免疫”(Protective immunity is induced by a *Borrelia burgdorferi* mutant that lacks OspA and OspB)“感染与免疫”(Infect. Immun.) 61: 5115-5122。

19. Jonsson, M., L. Noppa, A.G. Barbour 和 S. Bergstrom. 1992。“布氏疏螺旋体外膜蛋白的异质性三个不同地理起源分离株的 osp 操纵子的比较”(Heterogeneity of outer membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*: Comparison of osp operons of three isolates of different geographic origins)“感染与免疫”(Infect. Immun.) 60: 1845-1853。

20. Kurashige, S., M. Bissett 和 L. Oshiro. 1990。“从蜱中分离的含有一种主要的低分子量表面蛋白的布氏疏螺旋体的鉴定”(Characterisation of a tick isolate of *Borrelia burgdorferi* that possesses a major low-molecular-weight surface protein)“临床微生物学杂志”(J. Clin. Microbiol.) 28: 1362-1366。

21. Laemmli, U.K. 1970。“T4 噬菌体头部装配过程中结构蛋白的切割”(Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4)“自然”(Nature) 227: 680-685。

22. Lam, T.T., T.-P.K. Nguyen, R.R. Montgomery, F.S. Kantor, E. Fikrig 和 R.A. Flavell. 1994。“布氏疏螺旋体的外层表面层蛋白 E 和 F——莱姆病的病原”(Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease)“感染与免疫”(Infect. Immun.) 62: 290-298。

23. Margolis, N 和 P.A. Rosa. 1993。“布氏疏螺旋体中主要的外层表面蛋白表达的调节”(Regulation of expression of major outer surface proteins in *Borrelia burgdorferi*)“感染与免疫”(Infect. Immun.) 61: 2207-2210。

24. Masuzawa, T., H. Kawabata, Y. Beppu, K. Miyamoto, M. Nakao, N. Sato, K. Muramatsu, R.C. Johnson 和 Y. Yanagihara. 1994。“鉴定从卵形硬蜱(*Ixodes*

ovatus)中分离到的日本疏螺旋体(*Borrelia japonica*)的单克隆抗体的特性”(Characterisation of monoclonal antibodies for identification of *Borrelia japonica*, isolates from *Ixodes ovatus*)“微生物与免疫学”(Microbiol. Immunol.) 38: 393-398。

- 5 25. Miller, A.M., V.L. Mackay 和 K.A. Nasmyth. 1985。“酵母中能使细胞型特异性转录进行的两个序列要素的鉴定和比较”(Identification and comparison of two sequence elements that confer cell-type specific transcription in yeast)。“自然”(Nature) 314: 598-603。

10 25a. Miller, J.F., J.J. Mekalanos 和 S. Falkow. 1989。“细菌毒力控制中的协同调节和感觉转导”(Co-ordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence)。“科学”(Science) 243: 916-922。

15 26. Needleman, S.B., and C.D. Wunsch. 1970。“一种可应用于查找两个蛋白质氨基酸序列相似性的一般性方法”(A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins)“分子生物学杂志”(J. Mol. Biol.) 48: 443-453。

20 27. Nguyen, T.-P.K., T.T. Lam, S.W. Barthold, S.R. Telford, III, R.A. Flavell 和 E. Fikrig. 1994。“布氏疏螺旋体在吸足免疫过 OspE 和 OspF 小鼠血液的蜱体内的部分被毁”(Partial destruction of *Borrelia burgdorferi* within ticks that engorged on OspE- or OspF- immunised mice)“感染与免疫”(Infect. Immun.) 62: 2079-2084。

25 28. Norris, S.J., C.J. Carter, J.K. Howell 和 A.G. Barbour. 1992。“布氏疏螺旋体的 B31 菌株中与低传代相关的蛋白质: 一种表面暴露的由质粒编码的脂蛋白 OspD 的特性和分子克隆”(Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: Characterisation and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein)“感染与免疫”(Infect. Immun.) 60: 4662-4672。

29. O'Farrel, P.H. 1975。“高分辨的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳”(High resolution two-dimensional poly-acrylamide gel electrophoresis)“生物化学杂志”(J. Biol. Chem.) 250: 4007-4021。

30 30. Padula, S.J., A. Sampieri, F. Dias, A. Szczepanski 和 R.W. Ryan. 1993。“来源于布氏疏螺旋体北美株的 p23 (OspC)的分子特征和表达”(Molecular

characterisation and expression of p23 (OspC) from a North American strain of *Borrelia burgdorferi*) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 61: 5097-5105。

31. Preac-Mursic, V., B. Wilske, E. Patsouris, S. Jauris, G. Will, E. Soutschek, S. Rainhardt, G. Lehnert, U. Klockmann 和 P. Mehraein. 1992。“用布氏疏螺旋体的 pC 蛋白活性免疫保护沙土鼠免疫布氏疏螺旋体感染” (Active immunisation with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection) “感染” (Infection) 20: 324-349。

32. Reindl, M., B. Redl 和 G. Stoffler. 1993。“布氏疏螺旋体 B29 株中编码 27KDa 表面脂蛋白(P27)的位于线性质粒上的基因的分离和分析以及在大肠杆菌中的超表达” (Isolation and analysis of a linear plasmid-located gene of *Borrelia burgdorferi* B29 encoding a 27KDa surface lipoprotein (P27) and its overexpression in *Escherichia coli*) “分子微生物学” (Mol. Microbiol.) 8: 1115-1124。

33. Reindl, M., B. Redl 和 G. Stoffler. 1994。“含有嘎氏疏螺旋体 B29 (*Borrelia garinii* B29)线性质粒的 ospAB 操纵子的限制性酶谱” (A restriction map of the ospAB operon containing linear plasmid of *Borrelia garinii* B29), p.57-60, 参见 R. Cevenini, V. Sambri, M. Placa(编) “莱姆疏螺旋体病研究进展” (Advances in Lyme Borreliosis research), “第五届国际莱姆疏螺旋体病会议文集” (Proc. of the VI Int. Conf. on Lyme Borreliosis)意大利 Bologna。

34. Sadziene, A., B. Wilske, M.S. Ferdows 和 A.G. Barbour. 1993。“布氏疏螺旋体 B31 株的隐蔽性 OspC 基因位于环状质粒上” (The cryptic ospC gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 61: 2192-2195。

35. Schaible, U.E., L. Gern, R. Wallich, M.D. Kramer, M. Prester 和 M.M. Simon. 1993。“实验接种大剂量和小剂量抗原的小鼠中不同类型抗布氏疏螺旋体的保护性抗体的产生” (Distinct patterns of protective antibodies are generated against *Borrelia burgdorferi* in mice experimentally inoculated with high and low doses of antigen) “免疫学快报” (Immunol. Lett.) 36: 219-226。

36. Schaible, U.E., M.D. Kramer, K. Eichmann, M. Modolell, C. Museteanu 和 M.M. Simon. 1990。“对布氏疏螺旋体的外层表面蛋白 A(OspA)具特异性的单克隆抗体预防重度联合免疫缺陷病(SCID)小鼠的莱姆疏螺旋体病”

(Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice) “美国全国科学院学报” (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87: 3768-3772。

37. Schaible, U.E., M.D. Kramer, C. Museteanu, G. Zimmer, H. Mossmann
5 和 M.M.Simon. 1989。“重度联合免疫缺陷病小鼠——一个分析莱姆关节炎和
心脏炎的实验室模型” (The severe combined immunodeficiency (scid) mouse. A
laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis) “实验医学杂志”
(J. Exp. Med.) 170: 1427-1432。

38. Schaible, U.E., R. Wallich, M.D. Kramer, L. Grem, J.F. Anderson, C.
10 Museteanu 和 M.M. Simon. 1993。“针对个体布氏疏螺旋体分离株或其重组
OspA 的免疫血清保护 SCID 小鼠免受同源菌株的感染，但对不同的
OspA/OspB 基因型只有部分保护作用甚至完全没有作用” (Immune sera to
individual *Borrelia burgdorferi* isolates or recombinant OspA thereof protect SCID
mice against infection with homologous strains but only partially or not at all
15 against those of different OspA/OspB genotype) “疫苗” (Vaccine) 11: 1049-
1054。

39. Schouls, L.M., H.G.J. van der Heide 和 J.D.A. van Embden. 1991。“苍
白密螺旋体苍白亚种的 35KDa 的重组脂蛋白 TmpC 的特性以及对脂化和非脂
化的苍白密螺旋体抗原的抗体反应” (Characterisation of the 35-kilodalton
20 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* recombinant lipoprotein TmpC and antibody
response to lipidated and nonlipidated *T. pallidum* antigens) “感染与免疫” (Infect.
Immun.) 59: 3536-3546。

40. Simon, M.M., U.E. Schaible, M.D. Kramer, C. Eckerskorn, C.
Museteanu, H.K. Muller-Hermelink 和 R. Wallich. 1991。“布氏疏螺旋体的重组
25 外层表面蛋白 A 诱导抗小鼠螺旋体感染的保护抗体” (Recombinant outer
surface protein A from *Borrelia burgdorferi* induces antibodies protective against
spirochetal infection in mice) “传染病杂志” (J. Infect. Dis.) 164: 123-132。

41. Simon, M.M., U.E. Schaible, R. Wallich 和 M.D. Kramer. 1991。“用于
布氏疏螺旋体感染的小鼠模型：走近抗莱姆病疫苗” (A mouse model for
30 *Borrelia burgdorferi* infection: Approach to a vaccine against Lyme disease) “今日
免疫学” (Immunol. Today) 12: 11-16。

42. Simpson, W.J., W. Burgdorfer, M.E. Schrupf, R.H. Karstens 和 T.G. Schwan. 1991。 “39KDa 的布氏疏螺旋体抗原(P39)的抗体作为实验性和天然接种动物感染的标志” (Antibody to a 39-kilodalton *Borrelia burgdorferi* antigen (P39) as a mark for infection in experimentally and naturally inoculated animals)
- 5 “临床微生物学杂志” (J. Clin. Microbiol.) 29: 236-243。
43. Simpson, W.J., W. Cieplak, M.E. Schrupf, A.G. Barbour 和 T.G. Schwan. 1994。 “布氏疏螺旋体中编码具免疫原性的 P39 抗原的基因的核苷酸序列及其分析” (Nucleotide sequence and analysis of the gene in *Borrelia burgdorferi* encoding the immunogenic P39 antigen) “欧洲微生物学会联合会微生物学快报” (FEMS Microbiol. Lett.) 119: 381-388。
- 10 44. Steere, A.C. 1989。 “莱姆病” (Lyme disease) “新英格兰医学杂志” (N. Engl. J. Med.) 321: 586-596。
45. Wallich, R., C. Helmes, U.E. Schaible, Y. Lobet, S.E. Moter, M.D. Kramer 和 M.M. Simon. 1992。 “用 OspA、 fla、 HSP60 和 HSP70 基因探针
- 15 评定布氏疏螺旋体菌株的遗传趋异” (Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of OspA, fla, HSP60, and HSP70 gene probes) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 60: 4856-4866。
46. Wallich, R., S.E. Moter, M.M. Simon, K. Ebnet, A. Heiberger 和 M.D. kramer. 1990。 “布氏疏螺旋体鞭毛相关联的 41KDa 抗原(鞭毛蛋白): 基因的
- 20 分子克隆、表达和扩增” (The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): Molecular cloning, expression, and amplification of the gene) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 58: 1711-1719。
47. Wallich, R., U.E. Schaible, M.M. Simon, A. Heiberger 和 M.D. Kramer. 1989。 “一株布氏疏螺旋体欧洲分离株的外层表面蛋白 A (OspA) 基因的克隆
- 25 和测序” (Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of a European *Borrelia burgdorferi* isolate) “核酸研究” (Nucleic Acids Res.) 17: 8864。
48. Wallich, R., M.M. Simon, H. Hofmann, S.E. Moter, U.E. Schaible 和 M.D. Kramer. 1993。 “布氏疏螺旋体新的多型脂蛋白的分子和免疫学特征”
- 30 (Molecular and immunological characterisation of novel polymorphic lipoprotein of *Borrelia burgdorferi*) “感染与免疫” (Infect. Immun.) 61: 4158-4166。

49. Wallich, R.等。未发表资料。

50. Wilske, B., A.G. Barbour, S. Bergstrom, N. Burman, B.I. Restrepo, P.A. Rosa, T. Schwan, E. Soutschek 和 R. Wallich. 1992。“疏螺旋体抗原的变异和菌株的异质性”(Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp.)“微生物学研究”(Res. Microbiol.) 143: 583-596。

51. Wu, H.C. 1987。“细胞膜蛋白的翻译后修饰和加工”(Post translational modification and processing of membrane proteins in bacteria), p.37-74; 参见: M. Inouye(编)“作为模型系统的细菌外膜”(Bacterial outer membranes as model systems), John Wley & Sons, Inc., New York。

52. Wu, H.C.和 M. Tokunaga. 1986。“细菌中脂蛋白的生物起源”(Biogenesis of lipoproteins in bacteria)“当今微生物学与免疫学论题”(Curr. Top. Microbiol. Immunol.) 125: 127-157。

序列表

(1)一般资料

(i)申请人

5 (A)名称: Max Planck 公司(Max Planck Gesellschaft zur Forderung
der Wissenschaft eV)

(B)街道: Busenstrasse 10 号

(C)城市: Gottingen

(E)国家: 德国

10 (F)邮编(zip): D - 3400

(A)名称: 德国癌症研究中心(Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiting des offentilichen Rechts)

(B)街道: Neuenheimer 区 280 号

(C)城市: Heildelberg 海德堡

15 (E)国家: 德国

(F)邮编(zip): D - 6900

(ii)发明名称: 疫苗

(iii)序列数目: 2

(iv)计算机可读形式:

20 (A)媒介类型: 软盘

(B)计算机: IBM PC 兼容

(C)操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D)软件: PatentIn Release # 1.0 , # 1.30 版本(EPO)

(2)序列 1 资料:

25 (i)序列特征:

(A)长度: 196 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单股

(D)拓扑结构: 线性

30 (ii)分子类型: 蛋白质

(iii)假拟结构: 无

(iv)反义链: 无

(vi)来源

(A)生物体: 布氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)

(C)个体分离物: OspG

5 (xi)序列描述: 序列 1:

Met Asn Lys Lys Met Lys Asn Leu Ile Ile Cys Ala Val Phe Val Leu
1 5 10 15

Ile Ile Ser Cys Lys Ile Asp Ala Ser Ser Glu Asp Leu Lys Gln Asn
20 25 30

10 Val Lys Glu Lys Val Glu Gly Phe Leu Asp Lys Glu Leu Met Gln Gly
35 40 45

Asp Asp Pro Asn Asn Ser Leu Phe Asn Pro Pro Pro Val Leu Pro Ala
50 55 60

15 Ser Ser His Asp Asn Thr Pro Val Leu Lys Ala Val Gln Ala Lys Asp
65 70 75 80

Gly Gly Gln Gln Glu Gly Lys Glu Glu Lys Glu Lys Glu Ile Gln Glu
85 90 95

Leu Lys Asp Lys Ile Asp Lys Arg Lys Lys Glu Leu Glu Glu Ala Arg
100 105 110

20 Lys Lys Phe Gln Glu Phe Lys Glu Gln Val Glu Ser Ala Thr Gly Glu
115 120 125

Ser Thr Glu Lys Val Lys Lys Gln Gly Asn Ile Gly Gln Lys Ala Leu
130 135 140

25 Lys Tyr Ala Lys Glu Leu Gly Val Asn Gly Ser Tyr Ser Val Asn Asp
145 150 155 160

Gly Thr Asn Thr Asn Asp Phe Val Lys Lys Val Ile Asp Asp Ala Leu
165 170 175

Lys Asn Ile Glu Glu Glu Leu Glu Lys Leu Ala Glu Pro Gln Asn Ile
180 185 190

30 Glu Asp Lys Lys
195

(2)序列 2 资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 591 碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单股

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(iii)假拟结构: 无

(iv)反义链: 无

10 (vi)来源:

(A)生物体: 布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)

(B)菌株: ZS7

(vii)直接来源:

(B)克隆: ospG

15 (xi)序列描述: 序列 2:

ATGAATAAGA AAATGAAAAA TTTAATTATT TGTGCAGTTT TTGTTTGTAT AATTTCTTGC
60

AAGATTGATG CGAGTAGTGA AGATTTAAAA CAAATGTAA AAGAAAAAGT TGAAGGATTT
120

TTAGATAAAG AGTTAATGCA AGGTGACGAT CCTAATAACA GTCTGTTTAA TCCACCACCA
180

GTATTGCCGG CAAGTTCCCA CGATAACACA CCCGTATTAA AAGCGGTGCA AGCAAAAGAT
240

GGTGGTCAAC AAGAAGGAAA AGAAGAGAAA GAAAAAGAAA TTCAAGAATT AAAGGATAAA
300

ATAGATAAAA GAAAAAAGA ATTAGAAGAG GCTAGAAAGA AATTTCAAGA ATTTAAAGAA
360

CAAGTTGAAT CTGCAACTGG AGAAAGTACT GAGAAAGTTA AAAACAAGG AAATATTGGA
420

CAAAAAGCTT TAAAGTATGC TAAAGAATTG GGTGTAAATG GAAGTTATTC TGTTAATGAT
480

GGTACTAATA CTAATGATTT TGTAAAAAAG GTTATAGATG ATGCTCTTAA AAATATTGAG
540

GAAGAACTTG AAAAGCTAGC AGAGCCTCAA AATATAGAAG ATAAAAAATA A
591

说明书附图

图 1

BP

[α2] [Ig]

gtatctatcttataatctcttctgtaacgagtagagcatttccaatggagagatctctggcga -130

[α2] [-35]

gttgggttaaaattacattctgtcttcttcttaaaattgtaacagctgaattgaacaaaattat -70

[-10]

atattttaaattctctgaaatattgcaactattctgggtgttctgtgaattatttagtacctttatg -10

RBS +1 (pG)

gagtaaccttatgaataagaaaaatgaaaaatttaattattttgtgcagttctctgtcttgata 51
H N K K M K N L I I C A V F V L...I

atctctctgcaagattgatgcgagtagtgaagatttaaaaacaaaattgtaaaagaaaaagtt 111
I...S...C K I D A S S E D L K Q N V K E K V

gaaggattcttagataaaagagttaatgcaagggtgacgatccctaatcaacagttctgttttaac 171
E G F L D K E L M Q G D D P N N S L F N

ccaccaccagttattgccgggcaagttccccacgataaacacaccccgatttcaaaagcgggtgcaa 231
P P P V L F A S S H D N T P V L K A V Q

gcaaaagatcgttgggtcaacaagaaggaaaaagaagagaaaaagaaaaaattcaagaatta 291
A K D G G Q Q E G K E E K E K E I Q E L

aaggataaaaatagataaaaagaaaaaaagaattagaagaggctagaagaaaatttcaagaa 351
K D K I D K R K K E L E E A R K K F Q E

tttaaagaacaagttgaattctgcaactggagaaaagtactgagaaaagttaaaaaaacaagga 411
F K E Q V E S A T G E S T E K V K K Q G

aatattcgacaaaaagcttttaaagtatgctaaagaattgggtgtaaatggaagttattctt 471
N I G Q K A L K Y A K E L G V N G S Y S

gttaattgatcgttactaataactaatgattttgtaaaaaaagggttatagatgatgctctttaa 531
V N D G T N T N D F V K K V I D D A L K

aatattcgaggagaacttgaaaagctagcagagcctcaaaaatatagaagataaaaaataa 591
N I E E E L E K L A E P Q N I E D K K *