



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102596241 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080048304. 5

(22) 申请日 2010. 08. 26

(30) 优先权数据

09168765. 7 2009. 08. 26 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/062481 2010. 08. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02011/023764 EN 2011. 03. 03

(71) 申请人 汉诺威医学院

地址 德国汉诺威

(72) 发明人 丽塔·热拉尔迪沙恩

马丁纳·米伦霍夫 安德烈亚·贝特

卡塔琳娜·斯图梅尔

弗里德里希·弗赖贝格尔

塞巴斯蒂安·达梅罗

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

A61K 39/095 (2006. 01)

C12P 19/18 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 48 页

序列表 48 页 附图 19 页

(54) 发明名称

生产脑膜炎奈瑟氏菌的人工荚膜多糖的方式和方法

(57) 摘要

本发明提供了生产脑膜炎奈瑟氏菌的荚膜多糖的体外方法。本发明也提供了可通过本文描述的方法获得的荚膜多糖。该荚膜多糖包含对脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135、Y、X 和 A 有异特性的荚膜多糖。也包括这样的嵌合荚膜多糖,其包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y、C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的 CPS,或者由它们组成。本发明也提供了这些荚膜多糖作为药物,特别是作为疫苗和 / 或诊断剂的应用。

1. 生产脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) 的荚膜多糖 (CPS) 的体外方法, 所述方法包括以下步骤:

- (a) 使至少一种供体碳水化合物与至少一种荚膜聚合酶 (CP) 接触;
- (b) 将所述碳水化合物与所述荚膜聚合酶温育; 和
- (c) 分离得到的荚膜多糖,

其中, 所得荚膜多糖是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135、Y、A 或 X 特异性荚膜多糖的合成或人工荚膜多糖, 或者其中, 所得荚膜多糖是人工嵌合荚膜多糖, 所述人工嵌合荚膜多糖包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y、C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的荚膜多糖或荚膜多糖亚基。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述嵌合荚膜多糖包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 和 Y 的荚膜多糖或荚膜多糖亚基。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 在步骤 (a) 中使所述至少一种供体碳水化合物和所述至少一种荚膜聚合酶进一步与受体碳水化合物接触。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法, 其中, 活化所述至少一种供体碳水化合物。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 所述至少一种供体碳水化合物通过活化核苷酸的键连而活化。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中, 所述活化核苷酸选自 CMP、UDP、TDP 和 AMP 组成的组。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中, 所述荚膜聚合酶是 CP-W-135。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物是 CMP-Neu5Ac, 且至少一种供体碳水化合物是 UDP-Gal。

9. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中, 所述荚膜聚合酶是 CP-Y。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物是 CMP-Neu5Ac, 且至少一种供体碳水化合物是 UDP-Glc。

11. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中, 所述荚膜聚合酶是 CP-X。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物是 UDP-GlcNAc。

13. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法, 其中, 所述荚膜聚合酶是 CP-A。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物是 UDP-ManNAc。

15. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物选自 Gal-1-P 和唾液酸组成的组。

16. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物选自 Glc-1-P 和唾液酸组成的组。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法, 其中, 所述唾液酸是 Neu5Ac。

18. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物是 GlcNAc-1-P。

19. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物是 ManNAc-1-P。

20. 根据权利要求 15 至 19 中任一项所述的方法, 其中, 至少一种供体碳水化合物在权利要求 1 的步骤 (a) 期间与活化酶接触并在权利要求 1 的步骤 (b) 期间进行活化。

21. 编码焦磷酸化酶或其片段的核酸分子, 所述核酸分子包含选自以下组成的组中的

核酸分子：

- (a) 具有 SEQ ID NO :9 的核苷酸序列的核酸分子；
 - (b) 编码包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列的多肽的核酸分子；
 - (c) 具有 SEQ ID NO :9 的核苷酸序列的核酸分子，其中，添加、删除或替换一个或多个核苷酸；
 - (d) 编码包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列的多肽的核酸分子，其中，添加、删除或替换一个或多个氨基酸残基；
 - (e) 与 SEQ ID NO :9 的核苷酸序列具有至少 45% 的同一性的核酸分子；
 - (f) 编码包含与 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列具有至少 45% 同一性的氨基酸序列的多肽的核酸分子；
 - (g) 与 (a) ~ (f) 中任一项的核酸分子互补的核酸分子；
 - (h) 在严格条件下与 (a) ~ (g) 的核酸分子中任一种杂交的核酸分子；
 - (i) 由于遗传密码简并性而与 (a) ~ (h) 中任一项的核酸分子序列不同的核酸分子；
- 以及

- (j) (a) ~ (i) 核酸分子的功能片段。
22. 包含权利要求 21 所述的核酸分子的载体。
23. 包含权利要求 22 所述的载体的宿主细胞。
24. 由权利要求 21 所述的核酸分子或其功能片段编码的多肽。
25. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法，其中，Gal-1-P 或 Glc-1-P 在权利要求 1 的步骤 (a) 期间与根据权利要求 21 所述的核酸分子或其功能片段或根据权利要求 24 所述的多肽或其功能片段接触，并在权利要求 1 的步骤 (b) 期间进行活化。
26. 根据权利要求 20 或 25 所述的方法，其中，在步骤 (a) 中，至少一种供体碳水化合物进一步与 PEP 和 / 或至少一种核苷酸接触。
27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中，所述至少一种核苷酸选自 CMP、CDP、CTP、UMP、UDP 和 UTP 组成的组。
28. 根据权利要求 7 ~ 10、15 ~ 17、20 和 25 ~ 27 中任一项所述的方法，其中，所述受体是寡聚或多聚的 W-135 荚膜多糖、寡聚或多聚的 Y 荚膜多糖、寡聚或多聚的 α 2,8- 连接的唾液酸和 / 或寡聚或多聚的 α 2,9- 连接的唾液酸。
29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中，所述受体在其还原端带有一个或多个另外的官能团。
30. 根据权利要求 11 ~ 14、18 ~ 20、26 或 27 中任一项所述的方法，其中，所述受体是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 或 X 的荚膜多糖或者含有末端 GlcNAc 残基的碳水化合物结构。
31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中，所述包含末端 GlcNAc 残基的碳水化合物结构选自透明质酸、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素或蛋白质连接的低聚糖组成的组。
32. 根据权利要求 28 至 31 中任一项所述的方法，其中，对所述受体荚膜多糖进行纯化。
33. 根据权利要求 28 至 32 中任一项所述的方法，其中，使所述受体荚膜多糖水解。
34. 一种可通过根据权利要求 1 至 20 和 25 至 33 中任一项所述的方法获得的脑膜炎奈瑟氏菌的嵌合荚膜多糖。
35. 一种包含权利要求 34 所述的嵌合荚膜多糖的药物组合物，其可选地进一步包含可

接受的药物载体。

36. 一种包含权利要求 34 所述的嵌合荚膜多糖或权利要求 35 所述的药物组合物的复合物,其用于主体的疫苗接种。

37. 包含根据权利要求 34 所述的嵌合荚膜多糖或根据权利要求 35 所述的药物组合物的复合物在制备待给予主体的疫苗中的应用。

38. 根据权利要求 36 所述的复合物或根据权利要求 37 所述的应用,其中,所述主体是人。

39. 根据权利要求 36 或 38 所述的复合物或者根据权利要求 37 或 38 所述的应用,其中,所述疫苗接种用于抵抗由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 或 Y 引起的脑膜炎球菌性脑膜炎。

40. 权利要求 21 所述的核酸分子或其功能片段、权利要求 22 所述的载体、权利要求 23 所述的宿主细胞,或权利要求 24 所述的多肽或其功能片段在将己糖 -1- 磷酸和 / 或戊糖 -1- 磷酸活化成核苷酸糖中的体外应用。

41. 根据权利要求 40 所述的应用,其中,所述己糖 -1- 磷酸选自 Glc-1P 和 Gal-1-P 组成的组,且所述戊糖 -1- 磷酸选自木糖 -1-P 和阿拉伯糖 -1-P 组成的组。

生产脑膜炎奈瑟氏菌的人工荚膜多糖的方式和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生产脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) 的合成和人工荚膜多糖的方式 (装置, means) 和方法。本发明也涉及可通过本发明方法获得的荚膜多糖。还提供了用作药物, 特别用作疫苗和 / 或诊断剂 (diagnostics) 的脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖。

背景技术

[0002] 细菌性脑膜炎仍然是对全球健康的严重威胁, 估计全世界每年有 17 万人因此而死亡 (WHO, <http://www.who.int/nuvi/meningitidis/en/>)。尽管可利用强有力的抗微生物药剂, 但病死率仍然很高 (10-40%), 而且幸存者经常遭受后遗症, 如神经残疾或肢体缺失和耳聋 (Van Deuren 等人, Clin Microbiol Rev 2000;13(1):144-166; Kaper 等人, Nat Rev Microbiol 2004, 2(2):123-140)。脑膜炎奈瑟氏菌 (Nm) 是细菌性脑膜炎的最重要致病物之一, 因为它具有在流行波中传播的潜力 (Kaper 等人, Nat Rev Microbiol 2004, 2(2):123-140; Rosenstein 等人, N Eng J Med 2001, 344(18):1378-1388)。产生 Nm 物种的疾病的关键毒力决定因素是它们的细胞外多糖荚膜, 该多糖荚膜对人血清中脑膜炎球菌的生成是至关重要的 (Vogel 等人, Infect Immun 1997, 65(10):4022-4029)。基于这些多糖的抗原变异, 已鉴定出 Nm 的至少十二种不同的血清组 (血清群, serogroup) (A、B、C、E29、H、I、K、L、W-135、X、Y 和 Z), 但仅六种 (A、B、C、W-135、Y 和 X) 导致几乎所有的病例; 还可参见 Handbook of Meningococcal Disease. Frosch, M., Maiden, M. C. J. (eds). Weinheim: Wiley-VCH 中的 Frosch, M., VOGEL, U. (2006) "Structure and genetics of the meningococcal capsule."。

[0003] 血清组 A (NmA) 和 C (NmC) 是撒哈拉沙漠以南的非洲脑膜炎球菌性脑膜炎 (meningococcal meningitidis) 的主要原因, 而血清组 B (NmB) 和 C 是工业化国家主要的致病菌株。然而, 血清组 W-135 (NmW-135) 和 Y (NmY) 正变得越来越流行。对于 NmW-135, 最明确的证明就是 2002 年布基纳法索的流行病, 此流行病感染病例超过 13,000 例, 死亡人数超过 1,400 人 (Connolly 等人, Lancet 2004, 364(9449):1974-1983; WHO, Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR) 2008)。相比之下, NmY 在美国得到重视, 它在美国的流行程度已从 1989-1991 期间的 2% 增加到 1997-2002 期间的 37% (Pollard 等人, J Paediatr Child Health 2001, 37(5):S20-S27)。最近, 以前只是零星发现的血清组 X (NmX) 在尼日尔出现高发病率, 并暴发于肯尼亚和乌干达 (Biosier 等人, Clin Infect Dis 2007, 44(5):657-663; Lewis, WHO Health Action in Crisis 1, 62006)。

[0004] 血清组 A、B、C、29E、H、I、K、L、W-135、X、Y 和 Z 是本领域众所周知的, 并描述在 Frosch, M., VOGEL, U. (2006), 同前文献中。所有血清组的荚膜多糖 (CPS) 都是带负电的线性聚合物。血清组 B 和 C 包裹在由通过血清组 B 中 α -2 $\rightarrow$ 8 糖苷键或血清组 C 中的 α -2 $\rightarrow$ 9 键连接的唾液酸 (Neu5Ac) 部分组成的均聚 CPS 中 (Bhattacharjee 等人, J Biol Chem 1975, 250(5):1926-1932)。血清组 W-135 和 Y 都是杂聚物。它们由血清组 W-135 中半乳糖 / Neu5Ac 重复单元 $[\rightarrow 6)-\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$)]_n, 或血清组 Y 中葡萄

糖/Neu5Ac 重复单元 $[\rightarrow 6)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow 4)-\alpha-Neu5Ac-(2\rightarrow)]_n$ 组成 (Bhattacharjee 等人, Can J Biochem 1976, 54(1):1-8)。NmA 和 NmX 的 CPS 不包含 Neu5Ac 部分, 而是分别由 N-乙酰基-甘露糖胺 1-磷酸 $[\rightarrow 6)-\alpha-D-ManpNAc-(1\rightarrow OPO_3\rightarrow)]_n$ 或 N-乙酰基-葡萄糖胺 1-磷酸 $[\rightarrow 6)-\alpha-D-GlcpNAc-(1\rightarrow OPO_3\rightarrow)]_n$ 重复单元构造而成的 (Bundle 等人, Carbohydr Res 1973, 26(1):268-270; Bundle 等人, J Biol Chem 1974, 249(15):4797-4801; Bundle 等人, J Biol Chem 1974, 249(7):2275-2281; Jennings 等人, J Infect Dis 1977, 136 Suppl:S78-S83)。

[0005] 产生 Nm 的疾病的 CPS 是吸引人的候选疫苗, 且对于血清组 A、C、Y、W-135, 可用多糖或多糖结合物 (conjugate) 疫苗 (Broker 等人, Minerva Med 2007, 98(5):575-589)。对于血清组 B 和 X, 当前无疫苗可用。仅血清组 B 的荚膜多糖具有不良免疫原性, 因为它在结构和化学上与在人中发现的多糖 (多碳水化合物) (polySia) 相同。然而, NmX 的大暴发仅发生在 2006 年, 因此还未研制出任何疫苗。

[0006] CPS 生物合成中的关键酶是膜相关性荚膜聚合酶 (capsule polymerase)。已为所有六种致病血清组鉴定出候选基因 (Frosch 等人, Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86(5):1669-1673; Claus 等人, Mol Gen Genet 1997, 257(1):28-34; Tzeng 等人, Infect Immun 2003, 71(2):6712-6720)。然而, 我们对那些重要酶的酶学或结构功能关系的了解仍然非常有限。虽然已为使用粗膜 (crude membrane) 组分作为酶源的 NmB 和 NmC 酶报道了一些数据 (Steenbergen 等人, J Biol Chem 2003, 278(17):15349-15359), 但最近才可以纯化出活跃 NmB 聚合酶, 且只进行了初步结构功能分析 (Freiberger 等人, Mol Microbiol 2007, 65(5):1258-1275)。在最新的研究中, 还对从血清组 NmW-135 和 NmY 克隆的荚膜聚合酶进行纯化和初步表征 (Claus 等人, Mol Microbiol 2009, 71(4):960-971)。这些蛋白质是双官能 (bifunctional) 糖基转移酶, 其可以单独地合成 NmW-135 和 NmY 的各个杂聚 CPS。

[0007] 然而, 直到现在, 用于奈瑟氏菌属疫苗的多糖生产仍需要脑膜炎奈瑟氏菌的发酵, 以及随后针对培养基中多糖的多步纯化。这些生产工艺既是成本密集型的 (cost intensive), 也总是存在被奈瑟氏菌属毒素、培养基组分或随后纯化操作过程所需的化学物污染的风险。而且, 所得多糖批次通常是异质的 (heterogeneous), 很难表征。

[0008] 将在下面描述的体外生产脑膜炎奈瑟氏菌的合成和人工荚膜多糖的本发明方法已克服这些技术问题。

发明内容

[0009] 本发明提供了生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖 (capsular polysaccharides, CPS) 的体外方法, 所述方法包括以下步骤:

[0010] (a) 使至少一种供体 (donor) 碳水化合物与至少一种纯化的荚膜聚合酶 (CP) 接触;

[0011] (b) 将所述碳水化合物与所述荚膜聚合酶温育; 和

[0012] (c) 分离产生的荚膜多糖,

[0013] 其中所得荚膜多糖是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135、Y、A 或 X 特异性荚膜多糖的合成或人工荚膜多糖, 或者其中所得荚膜多糖是人工嵌合荚膜多糖, 该人工嵌合荚膜多糖包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/

W-135、B/W-135/Y、C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的荚膜多糖或荚膜多糖亚基 (subunit)。

[0014] 根据本发明,惊人地发现脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135、Y、A 和 X 的荚膜多糖 (CPS) 可以通过合成生产,即体外生产。因此,可以避免以前使用的成本和时间密集型生产工艺。此外,发现包含不同脑膜炎奈瑟氏菌血清组的 CPS 或其亚基的人工嵌合 CPS 可以通过本文描述和列举的体外方法生产。可通过本文描述的体外方法获得的嵌合 CPS 可以包括脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 和 / 或 Y 的两个或更多个 CPS 亚基或者含有脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 和 / 或 Y 的不同 CPS 的一个或多个衍生化 (derivatized) 结构单元 (building blocks) 的 CPS,或者由它们组成。此种衍生化结构单元的实例在图 1 ~ 5 中示出。可通过本文描述的方法获得的嵌合 CPS 可以包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y、C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的 CPS 或 CPS 亚基,或者由它们组成。在所述嵌合 CPS 内,CPS 亚基的一个或多个结构单元可以衍生化,如图 1 ~ 5 中示例性示出的。可通过上文陈述的本发明方法获得的嵌合 CPS 可以包含一种或多种各包含 CPS 亚基的碳水化合物。可通过本文所述的方法获得的嵌合 CPS 的 CPS 亚基,或包含在这些嵌合 CPS 中的衍生化结构单元的序列可以是任何顺序的。可通过上文陈述的体外方法获得的嵌合 CPS 实例在图 6 中示出。

[0015] 可通过上文描述的体外方法获得的嵌合 CPS 也可以用作药物,例如用作疫苗。特别地,本文描述的嵌合 CPS 作为由脑膜炎奈瑟氏菌引起的疾病预防和治疗疫苗,如脑膜炎奈瑟氏菌疫苗是有利的。通过本文描述的体外方法获得的嵌合 CPS 可以用作对抗不同脑膜炎奈瑟氏菌血清组的疫苗。这些含有不同 CPS 亚基的嵌合 CPS 可以用来对抗其 CPS 亚基包含在所述嵌合 CPS 中的脑膜炎奈瑟氏菌血清组。例如,根据本发明,含有脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 的 CPS 亚基和脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 的 CPS 亚基的嵌合 CPS 可以用作对抗脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 和脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 的疫苗。本发明体外方法也可以获得多聚嵌合 CPS。此种嵌合 CPS 可以包含不同脑膜炎奈瑟氏菌血清组的两个、三个或更多个不同 CPS 亚基,或者由它们组成。例如,可通过本文陈述的体外方法获得的嵌合 CPS 可以包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135、Y 和 C 的 CPS 亚基或者由它们组成。而且,此种嵌合 CPS 以及针对它的抗体可用于诊断目的。

[0016] 在本文描述和列举的体外方法的一个实施方式中,人工嵌合 CPS 包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 和 Y 的 CPS。

[0017] 在本文陈述的方法的进一步实施方式中,使该至少一种供体碳水化合物和至少一种荚膜聚合酶 (CP) 进一步与受体碳水化合物接触。

[0018] 根据本发明体外方法,可以在步骤 (b) 期间进一步活化与至少一种纯化的荚膜聚合酶 (CP) 接触的供体碳水化合物。优选地,该活化通过活化核苷酸如 CMP、UDP、TDP 或 AMP 的键连 (连键、连接, linkage) 介导。更优选地,该活化核苷酸是 CMP 或 UDP。核苷酸键连对碳水化合物的活化可以通过本领域已知的数种活化酶催化。可以在本文提供的体外方法的步骤 (a) 期间使此种活化酶与该至少一种供体碳水化合物和至少一种 CP 接触。例如,在本文陈述的体外方法的步骤 (a) 期间,使硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*) 的 UDP-糖焦磷酸化酶 (USP) (USP-LM) 与至少一种供体碳水化合物和至少一种 CP 接触。USP-LM 催化 Gal-1-磷酸和 Glc-1-磷酸分别活化成核苷酸糖 UDP-Gal 和 UDP-Glc。USP-LM 的核苷酸序列在 SEQ ID NO:9 中示出。USP-LM 的多肽序列在 SEQ ID NO:10 中示出。为了活化

Neu5Ac, 优选使用 CMP-NeuNAc 合成酶 (CSS) (Ganguli 等人, J Bacteriol (1994), 176(15) : 4583-4589)。UDP-ManNAc 优选从 UDP-GlcNAc 使用酶 UDP-GlcNAc- 差向异构酶合成。在 SEQ ID NO :11 中, 示出从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的 UDP-GlcNAc- 差向异构酶的核苷酸序列, UDP-GlcNAc- 差向异构酶的相应多肽序列在 SEQ ID NO :12 中示出。

[0019] 根据本文陈述的方法, 可以使该至少一种供体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 进一步与受体碳水化合物接触。

[0020] 在本文陈述的体外方法的一个实施方式中, 与至少一种供体碳水化合物接触的荚膜聚合酶 (CP) 专用于 (specific for) 合成脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 的 CPS。具体地, 与至少一种供体碳水化合物接触的 CP 是 CP-W-135 或其功能衍生物。编码 CP-W-135 的核苷酸序列在 SEQ ID NO :1 中示出。CP-W-135 的氨基酸序列在 SEQ ID NO :2 中示出。CP-W-135 功能衍生物是能够合成血清组 W-135 和血清组 Y CPS 的荚膜多糖 (CPS) 的酶 (Claus 等人, Mol Microbiol 2009, 71(4) :960-971)。优选地, CP-W-135 功能衍生物的核苷酸序列与 SEQ ID NO :1 具有至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95% 的序列同一性, 且 CP-W-135 功能衍生物的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 具有至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 更优选至少 95%, 最优选至少 99% 的序列同一性。功能衍生物也可以包含维持生物活性的功能片段。所以, 如本文结合核苷酸序列或多肽使用的术语“其功能衍生物”是指, 与本文定义的核苷酸序列或可被本发明核酸序列 (例如 SEQ ID NO :1) 编码的多肽 (例如, SEQ ID NO :2 所示的) 具有基本相同的 (生物) 活性的功能片段。该 (生物) 功能尤其可以通过 Claus 等人, Mol Microbiol 2009, 71(4) :960-971 中描述的方法以及本文提供的本发明中 (的方法) 评估。

[0021] 根据本发明, 核苷酸或氨基酸序列的同一性水平分别指的是 SEQ ID NO :1 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO :2 所述多肽序列的整个长度 (全长), 并且成对地 (pair-wise) 评估, 其中每个空位 (空隙, gap) 都被记为一个不匹配。如本文使用的术语“同一性”与术语“同源性”等效。例如, 术语同一性和同源性在本文结合分别与 SEQ ID NO :1 或 2, 优选在整个长度内具有至少 80% 的同一性或同源性的核酸或多肽 / 氨基酸序列使用。

[0022] 因此, 本发明涉及多肽 (为 CP-W-135 或其片段) 在本发明方法中的应用, 其中该多肽与 SEQ ID NO :2 中所示的多肽具有至少 80% 的同一性 / 同源性。

[0023] 如果例如通过例如序列比较进行比较的两个核酸序列同一性不同, 则术语“同一性”或“同源性”指的是较短序列和与所述较短序列匹配的较长序列的部分。因此, 当所比较的序列长度不相同, 同一性程度是指与较长序列中核苷酸残基相同的较短序列中核苷酸残基的百分比, 或者与较短序列中核苷酸序列相同的较长序列中核苷酸的百分比。在这种情况下, 技术人员能够容易地确定与较短序列“匹配”的较长序列的部分。而且, 针对序列比较 (例如, “同一性”或“同源性”值的确定) 的这些定义将应用于本文描述和公开的所有序列。

[0024] 此外, 同一性意味着相应核苷酸序列或多肽 (例如, 由此编码的多肽) 之间存在功能和 / 或结构等效性 (等同性, equivalence)。与本文描述的特定核酸 / 氨基酸序列具有给定水平的同一性的核酸 / 氨基酸序列可以代表这些序列的衍生物 / 变体, 所述衍生物 / 变体优选具有相同的生物功能。它们可以是天然存在的变异形式 (variations), 例如来自其它种类 (varieties)、物种等的序列, 或者突变形式 (mutations), 且所述突变形式可以

天然形成或者可以通过预订 (deliberate) 诱变产生。此外,该变异形式可以是合成产生的序列。该等位基因变体可以是天然存在的变体或合成产生的变体或通过重组 DNA 技术产生的变体。与上述核酸序列的偏离 (deviation) 可以通过,例如删除、替换、添加、插入和 / 或重组产生。术语“添加”是指在给定序列末端添加至少一个核酸残基 / 氨基酸,而“插入”是指在给定序列内插入至少一个核酸残基 / 氨基酸。术语“删除”是指在给定序列内删除或除去至少一个核酸残基 / 氨基酸残基。术语“替换”是指替换给定序列内至少一个核酸残基 / 氨基酸残基。再次,如本文使用的这些定义,加上适当的变更,可以适用于本文提供和描述的所有序列。

[0025] 变体多肽,特别是根据本文描述的本发明体外方法使用的核酸序列的不同变体编码的多肽优选表现出它们共同具有的特定特性。这些包括,例如,生物活性、分子量、免疫反应性、构象等,以及物理性质,如凝胶电泳迁移行为、色谱行为、沉降系数、溶解度、光谱特性、稳定性、最适 pH、最适温度等。

[0026] 在上面描述的体外方法的进一步实施方式中,该荚膜聚合酶 (CP) 是 CP-W-135 或其功能衍生物,且与 CP 接触的至少一种供体碳水化合物是 CMP-Neu5Ac 或其衍生物,且至少一种供体碳水化合物是 UDP-Gal 或其衍生物。CMP-Neu5Ac 和 UDP-Gal 衍生物的实例分别在图 1D 和 1B 中示出。

[0027] 在本文陈述的体外方法的另一个实施方式中,CP 是 CP-W-135 或其功能衍生物,且至少一种供体碳水化合物是 Gal-1- 磷酸或其衍生物,且至少一种供体碳水化合物是唾液酸或其衍生物。Gal-1- 磷酸和唾液酸衍生物的实例分别在图 4B 和 4D 中示出。优选地,根据本文描述的体外方法,该唾液酸是 Neu5Ac。在上文描述的体外方法中,当与 CP 接触时,Gal-1- 磷酸和唾液酸可以进一步与至少一种核苷酸和 / 或磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 及辅助酶 (辅酶) 接触。此种核苷酸可以是 CMP、CDP、CTP、UMP、UDP 和 UTP。在本文陈述的体外方法中,供体碳水化合物 Gal-1- 磷酸和唾液酸中的至少一种可以在与 CP 一起温育期间进行活化,从而产生活化的糖核苷酸 UDP-Gal 和 / 或 CMP-Neu5Ac。

[0028] 根据上文描述和列举的体外方法中,CP-W-135 或其功能衍生物以及至少一种供体碳水化合物可以进一步与受体碳水化合物在接触步骤期间接触。所述受体碳水化合物可以是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 的寡聚或多聚的 CPS (W-135CPS)、脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 的寡聚或多聚的 CPS (Y CPS)、脑膜炎奈瑟氏菌血清组 B 的寡聚或多聚的 CPS (B CPS, α 2, 8- 连接的唾液酸),和 / 或脑膜炎奈瑟氏菌血清组 C 的寡聚或多聚的 CPS (C CPS, α 2, 9- 连接的唾液酸)。所述受体碳水化合物也可以在它的还原端带有一个或多个另外的官能团,如图 5 图例中列举的。因此,可以合成可通过本文描述的体外方法获得的,包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y 或 C/W-135/Y 的 CPS 或 CPS 亚基,或者由它们组成的人工嵌合 CPS。例如,在本发明体外方法中,使 CP-W-135 与作为供体碳水化合物的 CMP-Neu5Ac 和 UDP-Gal,以及作为受体碳水化合物的 α 2, 8- 连接的唾液酸三聚体 (B CPS 三聚体) 接触,从而合成包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 B/W-135 的 CPS 亚基或者由它们组成的人工嵌合 CPS。

[0029] 在可通过上文描述的本发明方法获得的嵌合 CPS 当中,CPS 亚基的一种或多种碳水化合物可以衍生化,并且可以包含例如,另外的官能团如氨基、烷基、羟基、羧酸、叠氮

化物 (azides)、酰胺、乙酰基或卤素原子;也可参见“Carbohydrate chemistry”卷 1-34: monosaccharides, disaccharides, and specific oligosaccharides, 1967-2000 年出版的文献的综述, Cambridge (England), Royal Society of Chemistry。可通过本文陈述的体外方法获得的嵌合 CPS 可以包含一种或多种各包含 CPS 亚基的碳水化合物。所述嵌合 CPS 的 CPS 亚基的序列可以是任何顺序的。

[0030] 作为实例, 生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖 (CPS) 的体外方法包括以下步骤:

[0031] (a) 使 CMP-Neu5Ac、UDP-Gal 和水解的 Y CPS 与 CP-W-135 接触;

[0032] (b) 将 CMP-Neu5Ac、UDP-Gal 和水解的 Y CPS 与 CP-W-135 一起温育; 和

[0033] (c) 分离出由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135 荚膜多糖亚基组成的人工嵌合 CPS。

[0034] 技术人员容易理解, 还可以应用如本文描述的活化或未活化供体碳水化合物、受体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 的其它组合。此种其它组合和其它修改并没有违背本发明的主旨。

[0035] 例如, 本发明的另一个示例体外方法涉及包含以下步骤的生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖 (CPS) 的方法:

[0036] (a) 使 Neu5Ac、Gal-1-P、CTP、UTP 和水解的 Y CPS 与 CP-W-135、USP-LM 和 CSS 接触;

[0037] (b) 将 Neu5Ac、Gal-1-P、CTP、UTP 和水解的 Y CPS 与 CP-W-135、USP-LM 和 CSS 一起温育, 其中将 Neu5Ac 活化成 CMP-Neu5Ac 且将 Glc-1-P 活化成 UDP-Glc; 和

[0038] (c) 分离出由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135 荚膜多糖亚基组成的人工嵌合 CPS。

[0039] 技术人员容易理解, 还可以应用如本文描述的活化或未活化供体碳水化合物、受体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 的其它组合。此种其它组合和其它修改并没有违背本发明的主旨。

[0040] 在本文陈述的体外方法的另一个实施方式中, 与至少一种供体碳水化合物接触的荚膜多糖 (CP) 专用于合成脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 的 CPS。具体地, 与至少一种供体碳水化合物接触的 CP 是 CP-Y 或其功能衍生物。编码 CP-Y 的核苷酸序列在 SEQ ID NO:3 中示出。CP-Y 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:4 中示出。CP-Y 功能衍生物是能够合成血清组 W-135 和血清组 Y CPS 的荚膜多糖的酶 (Claus 等人, Mol Microbiol 2009, 71(4):960-971)。优选地, CP-Y 功能衍生物的核苷酸序列与 SEQ ID NO:3 具有至少 40%, 至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95% 的序列同一性, 且 CP-Y 功能衍生物的氨基酸序列与 SEQ ID NO:4 具有至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 更优选至少 95%, 最优选至少 99% 的序列同一性。功能衍生物也可以包含维持生物活性的功能片段。因此, 如本文结合核苷酸序列或多肽使用的术语“其功能衍生物”是指, 与可被本发明核酸序列 (例如 SEQ ID NO:3) 编码的本文定义的核苷酸序列或多肽 (例如, 如 SEQ ID NO:4 中所示的) 具有基本相同的 (生物) 活性的功能片段。该 (生物) 功能尤其可以通过 Claus 等人, Mol Microbiol 2009, 71(4):960-971 中描述的方法以及本文提供的方法评估。

[0041] 根据本发明, 核苷酸或氨基酸序列的同一性水平分别指的是 SEQ ID NO:3 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO:4 所示多肽序列的整个长度, 并且成对地评估, 其中每个空位都被记为一个不匹配。如本文使用的术语“同一性”与术语“同源性”等效。例如, 术语同一性和同源性在本文结合分别与 SEQ ID NO:3 或 4, 优选在整个长度内具有至少 80% 的同一性或

同源性的核酸或多肽 / 氨基酸序列使用。

[0042] 因此,本发明涉及多肽(为 CP-Y 或其片段)在本发明方法中的应用,其中该多肽与 SEQ ID NO:4 中所示的多肽具有至少 80% 的同一性 / 同源性。

[0043] 如果例如通过例如序列比较进行比较的两个核酸序列同一性不同,则术语“同一性”或“同源性”指的是较短序列和与所述较短序列匹配的较长序列的部分。因此,当所比较的序列长度不相同,同一性程度优选指与较长序列中核苷酸残基相同的较短序列中核苷酸残基的百分比,或者与较短序列中核苷酸序列相同的较长序列中核苷酸的百分比。在这种情况下,技术人员能够容易地确定与较短序列“匹配”的较长序列的部分。而且,针对序列比较(例如,“同一性”或“同源性”值的确定)的这些定义将应用于本文描述和公开的所有序列。术语“同一性”和“同源性”在上文中有进一步描述,该定义和解释尤其适用于 CP-Y 及其功能片段。

[0044] 在本发明体外方法的具体实施方式中,CP 是 CP-Y 或其功能衍生物,且至少一种供体碳水化合物是 CMP-Neu5Ac 或其衍生物,且至少一种供体碳水化合物是 UDP-Glc 或其衍生物。CMP-Neu5Ac 和 UDP-Glc 衍生物的实例分别在图 1D 和 2B 中示出。再次,根据本发明的术语衍生物或功能片段涉及具有生物活性的衍生物或片段。此种“生物”功能可以在如后附实例中提供的或如 Claus (2009),同前文献中描述的试验中进行测试。

[0045] 在本文陈述的体外方法的进一步实施方式中,荚膜聚合酶 (CP) 是 CP-Y 或其功能衍生物,且至少一种供体碳水化合物是 Glc-1- 磷酸或其衍生物,且至少一种供体碳水化合物是唾液酸或其衍生物。唾液酸衍生物的实例在图 4D 中示出, Glc-1- 磷酸衍生物的实例在图 15 中示出。在优选实施方式中,所述唾液酸是 Neu5Ac。根据本文描述的体外方法,当与 CP 接触时, Gal-1- 磷酸和唾液酸可以进一步与至少一种核苷酸和 / 或磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 及辅助酶接触。此种核苷酸可以是 CMP、CDP、CTP、UMP、UDP 和 UTP。在本文陈述的体外方法中,供体碳水化合物 Gal-1- 磷酸和唾液酸中的至少一种可以在与 CP 一起温育期间进行活化,从而产生活化的糖核苷酸 UDP-Glc 和 / 或 CMP-Neu5Ac。

[0046] CP-Y 或其功能衍生物以及至少一种供体碳水化合物可以进一步与受体碳水化合物在本文所述的体外方法的接触步骤期间接触。所述受体碳水化合物可以是寡聚或多聚的 W-135CPS、寡聚或多聚的 Y CPS、寡聚或多聚的 B CPS,和 / 或寡聚或多聚的 C CPS。所述受体碳水化合物也可以在它的还原端带有一个或多个另外的官能团(见图例 5)。因此,可以合成可通过本发明体外方法获得的,包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y 或 C/W-135/Y 的 CPS 或 CPS 亚基或者由它们组成的嵌合 CPS。例如,使 CP-Y 与供体碳水化合物 CMP-Neu5Ac 和 UDP-Gal,以及作为受体的寡聚 W-135CPS 接触,从而合成包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135/Y 的 CPS 亚基或者由它们组成的人工嵌合 CPS。在这种情况下,术语“功能衍生物”也可以包含“功能片段”。

[0047] 在可通过本文陈述的体外方法获得的嵌合 CPS 当中, CPS 亚基的一种或多种碳水化合物可以衍生化,并且可以包含例如,另外的官能团如氨基、烷基、羟基、羧酸、叠氮化物、酰胺、乙酰基或卤素原子;也可参见例如“Carbohydrate chemistry”卷 1-34 Cambridge [England], Royal Society of Chemistry,同前文献。所述嵌合 CPS 可以包含一种或多种各包含 CPS 亚基的碳水化合物。可通过本文面描述的体外方法获得的嵌合

CPS 的 CPS 亚基的序列可以是任何顺序的。

[0048] 作为本发明的实例,生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖 (CPS) 的体外方法包括以下步骤:

[0049] (a) 使 CMP-Neu5Ac、UDP-Glc 和水解的 W-135CPS 与 CP-Y 接触;

[0050] (b) 将 CMP-Neu5Ac、UDP-Glc 和水解的 W-135CPS 与 CP-Y 一起温育;和

[0051] (c) 分离出由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135/Y 的荚膜多糖亚基组成的人工嵌合 CPS。

[0052] 如上所述,技术人员容易理解,还可以应用如本文描述的活化或未活化供体碳水化合物、受体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 的其它组合。此种其它组合和其它修改并没有违背本发明的主旨。

[0053] 本发明的另一个示例体外方法涉及包含以下步骤的生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖 (CPS) 的方法:

[0054] (a) 使 Neu5Ac、Glc-1-P、CTP、UTP 和水解的 W-135CPS 与 CP-Y、USP-LM 和 CSS 接触;

[0055] (b) 将 Neu5Ac、Glc-1-P、CDP、UDP、PEP 和水解的 W-135CPS 与 CP-Y、USP-LM 和 CSS 与一起温育,其中将 Neu5Ac 活化成 CMP-Neu5Ac,且将 Glc-1-P 活化成 UDP-Glc;和

[0056] (c) 分离出由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135 的荚膜多糖亚基组成的人工嵌合 CPS。

[0057] 再次,还可以应用如本文描述的活化或未活化供体碳水化合物、受体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 的其它组合。此种其它组合和其它修改并没有违背本发明的主旨。

[0058] 本发明也涉及这样的体外方法,其中与至少一种供体碳水化合物接触的荚膜聚合酶 (CP) 专用于合成脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 的 CPS。具体地,与至少一种供体碳水化合物接触的 CP 是 CP-X 或其功能衍生物。编码 CP-X 的核苷酸序列在 SEQ ID NO:5 中示出。CP-X 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:6 中示出。CP-X 功能衍生物是能够合成血清组 X 的荚膜多糖的酶 (Tzeng 等人, *Infect Immun* 2003, 71(2):6712-6720)。优选地,CP-X 功能衍生物的核苷酸序列与 SEQ ID NO:5 具有至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,最优选至少 95% 的序列同一性,且 CP-X 功能衍生物的氨基酸序列与 SEQ ID NO:6 具有至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,更优选至少 95%,最优选至少 99 的序列同一性。功能衍生物也可以包含维持生物活性的功能片段。所以,如本文结合核苷酸序列或多肽使用的术语“其功能衍生物”是指,与本文定义的核苷酸序列或可被本发明核酸序列 (例如 SEQ ID NO:5) 编码的多肽 (例如,如 SEQ ID NO:6 中所示的) 具有基本相同的 (生物) 活性的功能片段。再次,功能片段包括在术语“功能衍生物”中。该 (生物) 功能尤其可以通过 Tzeng 等人, *Infect Immun* 2003, 71(2):6712-6720 中描述的方法以及本文提供的方法评估。

[0059] 根据本发明,核苷酸或氨基酸序列的同一性水平分别指的是 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO:6 所示多肽序列的整个长度,并且成对地评估,其中每个空位都被记为一个不匹配。如本文使用的术语“同一性”与术语“同源性”等效。例如,术语同一性和同源性在本文结合分别与 SEQ ID NO:5 或 6,优选在整个长度内具有至少 80% 的同一性或同源性的核酸或多肽 / 氨基酸序列使用。

[0060] 因此,本发明涉及多肽 (为 CP-X 或其片段) 在本发明方法中的应用,其中该多肽

与 SEQ ID NO :6 中所示的多肽具有至少 80% 的同一性 / 同源性。

[0061] 如果例如通过例如序列比较进行比较的两个核酸序列同一性不同,则术语“同一性”或“同源性”指的是较短序列和与所述较短序列匹配的较长序列的部分。因此,当所比较的序列长度不相同,同一性程度优选指与较长序列中核苷酸残基相同的较短序列中核苷酸残基的百分比,或者与较短序列中核苷酸序列相同的较长序列中核苷酸的百分比。在这种情况下,技术人员能够容易地确定与较短序列“匹配”的较长序列的部分。而且,针对序列比较(例如,“同一性”或“同源性”值的确定)的这些定义将应用于本文描述和公开的所有序列。再次,术语“同一性”和“同源性”在上文中有进一步描述,该定义和解释尤其适用于 CP-X 及其功能片段。

[0062] 应用于本文描述的方式和方法中的 CP 可以是 CP-X 或其功能衍生物,且至少一种供体碳水化合物可以是 UDP-GlcNAc 或其功能衍生物。UDP-GlcNAc 衍生物的实例可以是烷基化或羟基化或者包含另外官能团如羧酸、叠氮化物、酰胺、乙酰基或卤素原子的化合物,如还在图 3B 中示出的;还可参见“Carbohydrate chemistry”卷 1-34, Cambridge[England], Royal Society of Chemistry, 同前文献。

[0063] 在本发明体外方法的另一个实施方式中,荚膜聚合酶(CP)可以是 CP-X 或其功能衍生物,且至少一种供体碳水化合物可以是 GlcNAc-1- 磷酸或其功能衍生物。GlcNAc-1- 磷酸衍生物的实例在图 16 中示出。当与 CP 接触时,所述供体碳水化合物 GlcNAc-1- 磷酸可以进一步与至少一种核苷酸和 / 或磷酸烯醇丙酮酸(PEP)及辅助酶接触。所述核苷酸可以是 UMP、UDP 和 UTP。所述供体碳水化合物 GlcNAc-1- 磷酸可以在与 CP 一起温育期间进行活化。根据本文陈述的体外方法,这种活化可以产生活化的糖核苷酸 UDP-GlcNAc。

[0064] 一般地,在本发明的背景下,本文描述的糖衍生物也可以是这些糖的标记形式。例如,对于本文描述的糖衍生物,该糖可以是放射性标记的,如 [^{14}C] 或 [^3H]。此种标记尤其对本文描述的糖的诊断应用和使用有用。此种诊断应用和使用将在下面进一步描述。

[0065] 根据本发明方法,CP-X(或其功能衍生物)以及至少一种供体碳水化合物可以进一步与受体碳水化合物在本文描述的体外方法的接触步骤期间进行接触。所述受体碳水化合物可以是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 的寡聚或多聚的 CPS(X CPS)、脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 的寡聚或多聚的 CPS(CPS A),和 / 或含有末端 GlcNAc 残基的碳水化合物结构,如透明质酸、肝素、硫酸肝素或蛋白质连接的低聚糖。例如,可以合成可通过本发明体外方法获得的,包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A/X 或 X/A 的 CPS 或 CPS 亚基或者由它们组成的嵌合 CPS。所述包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组的 CPS 或 CPS 亚基或者由它们组成的嵌合 CPS,如果用作受体,可以包含含有末端 GlcNAc 残基的碳水化合物结构,如透明质酸、肝素、硫酸肝素或蛋白质连接的低聚糖。

[0066] 在可通过本发明体外方法获得的嵌合 CPS 当中,CPS 亚基的一种或多种碳水化合物可以衍生化,并且可以包含,例如,另外的官能团如氨基、烷基、羟基、羧酸、叠氮化物、酰胺、乙酰基或卤素原子;还可以参见“Carbohydrate chemistry”卷 1-34 Cambridge(England), Royal Society of Chemistry, 同前文献。嵌合 CPS 可以包含一种或多种各包含 CPS 亚基的碳水化合物。嵌合 CPS 的 CPS 亚基的序列可以是任何顺序的。

[0067] 作为本发明的实例,生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖(CPS)的体外方法包括以下步骤:

[0068] (a) 使 UDP-GlcNAc 和水解的 A CPS 与 CP-X 接触；

[0069] (b) 将 UDP-GlcNAc 和水解的 A CPS 与 CP-X 一起温育；和

[0070] (c) 分离出由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A/X 的荚膜多糖亚基组成的人工嵌合 CPS。

[0071] 如上所述，还可以应用如本文描述的活化或未活化供体碳水化合物、受体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 的其它组合。此种其它组合和其它修改并没有违背本发明的主旨。

[0072] 在本文陈述的体外方法的另一个实施方式中，与至少一种供体碳水化合物接触的荚膜聚合酶 (CP) 专用于合成脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 的 CPS。具体地，与至少一种供体碳水化合物接触的 CP 是 CP-A 或其功能衍生物。编码 CP-A 的核苷酸序列在 SEQ ID NO :7 中示出。CP-A 的氨基酸序列在 SEQ ID NO :8 中示出。CP-A 功能衍生物是能够合成血清组 A 的荚膜多糖的酶 (Swartley 等人, J Bacteriol (1998), 180 (6) :1533-1539)。优选地，根据本发明，CP-A 功能衍生物的核苷酸序列与 SEQ ID NO :7 具有至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，最优选至少 95% 的序列同一性，且 CP-A 功能衍生物的氨基酸序列与 SEQ ID NO :8 具有至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，最优选至少 99% 的序列同一性。功能衍生物也可以包含维持生物活性的功能片段。所以，如本文结合核苷酸序列或多肽使用的术语“其功能衍生物”是指，与本文定义的核苷酸序列或可被本发明核酸序列（例如 SEQ ID NO :7）编码的多肽（例如，如 SEQ ID NO :8 中所示的）具有基本相同的（生物）活性的功能片段。该（生物）功能尤其可以通过 Swartley 等人, J Bacteriol (1998), 180 (6) :1533-1539 中描述的方法以及本文提供的方法评估。

[0073] 如本文结合核苷酸序列或多肽使用的术语“其功能衍生物”是指，与本文定义的核苷酸序列或可被本发明核酸序列（例如 SEQ ID NO :7）编码的多肽（例如，如 SEQ ID NO :8 中所示的）具有基本相同的（生物）活性的功能片段。生物活性可以通过本文提供的和本领域中已知的方法评估；参见，例如，Swartley (1998)，同前文献。此种功能衍生物也包含功能片段。

[0074] 根据本发明，核苷酸或氨基酸序列的同一性水平分别指的是 SEQ ID NO :7 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO :8 所示多肽序列的整个长度，并且成对地评估，其中每个空位都被记为一个不匹配。如本文使用的术语“同一性”与术语“同源性”等效。例如，术语同一性和同源性在本文结合分别与 SEQ ID NO :7 或 8，优选在整个长度内具有至少 80% 的同一性或同源性的核酸或多肽 / 氨基酸序列使用。

[0075] 因此，本发明涉及多肽（为 CP-A 或其片段）在本发明方法中的应用，其中该多肽与 SEQ ID NO :8 中所示的多肽具有至少 80% 的同一性 / 同源性。

[0076] 如果例如通过例如序列比较进行比较的两个核酸序列同一性不同，则术语“同一性”或“同源性”指的是较短序列和与所述较短序列匹配的较长序列的部分。因此，当所比较的序列长度不相同，同一性程度是指与较长序列中核苷酸残基相同的较短序列中核苷酸残基的百分比，或者与较短序列中核苷酸序列相同的较长序列中核苷酸的百分比。在这种情况下，技术人员能够容易地确定与较短序列“匹配”的较长序列的部分。而且，针对序列比较（例如，“同一性”或“同源性”值的确定）的这些定义将应用于本文描述和公开的所有序列。术语“同一性”和“同源性”在上文中有进一步描述，该定义和解释尤其适用于 CP-A 及其功能片段。

[0077] 在本发明体外方法的一个实施方式中，所使用的 CP 是 CP-A 或其功能衍生物，

且至少一种供体碳水化合物可以是 UDP-ManNAc 或其衍生物。UDP-ManNAc 衍生物的实例可以是烷基化或羟基化或者包含另外官能团如羧酸、叠氮化合物、酰胺、乙酰基或卤素原子的化合物,如还在图 17B 中示出的;还可参见“Carbohydrate chemistry”卷 1-34: monosaccharides, disaccharides, and specific oligosaccharides, 1967-2000 年出版的文献的综述, Cambridge (England), Royal Society of Chemistry。

[0078] 在本文描述的体外方法的另一个实施方式中,荚膜聚合酶 (CP) 是 CP-A 或其功能衍生物,且至少一种供体碳水化合物是 ManNAc-1- 磷酸或其衍生物。ManNAc-1- 磷酸和唾液酸衍生物的实例在图 18 中示出。当与 CP 接触时,所述供体碳水化合物 ManNAc-1- 磷酸可以与至少一种核苷酸和 / 或磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 及辅助酶接触。所述核苷酸可以是 UMP、UDP 和 UTP。所述供体碳水化合物 ManNAc-1- 磷酸可以在与 CP 一起温育期间进行活化。根据本文陈述的体外方法中,这种活化可以产生活化的糖核苷酸 UDP-ManNAc, 或其衍生物。

[0079] CP-A 或其功能衍生物以及至少一种供体碳水化合物可以进一步与受体碳水化合物在本发明体外方法的接触步骤期间接触。根据本文陈述的本发明体外方法,受体碳水化合物可以是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 的寡聚或多聚的 CPS (X CPS)、脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 的寡聚或多聚的 CPS (CPSA), 和 / 或包含末端 GlcNAc 或 ManNAc 残基的碳水化合物结构,如透明质酸、肝素、硫酸肝素或蛋白质连接的低聚糖。例如,可以通过本文陈述的体外方法合成包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A/X 或 X/A 的 CPS 或 CPS 亚基或者由它们组成的嵌合 CPS。可通过陈述的体外方法获得的,包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组的 CPS 或 CPS 亚基或者由它们组成的嵌合 CPS,如果用作受体,可以包含含有末端 GlcNAc 残基的碳水化合物结构,如透明质酸、肝素、硫酸肝素或蛋白质连接的低聚糖。

[0080] 在可通过本发明体外方法获得的嵌合 CPS 当中, CPS 亚基的一种或多种碳水化合物可以衍生化,并且可以包含,例如,另外的官能团,如氨基、烷基、羟基、羧酸、叠氮化合物、酰胺、乙酰基或卤素原子;也可参见“Carbohydrate chemistry” Volumes 1-34 Cambridge (England), Royal Society of Chemistry, 同前文献。这些嵌合 CPS 可以包含一种或多种各包含 CPS 亚基的碳水化合物。可通过本文描述的体外方法获得的嵌合 CPS 的 CPS 亚基的序列可以是任何顺序的。

[0081] 作为本发明的实例,生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖 (CPS) 的体外方法包括以下步骤:

[0082] (a) 使 UDP-ManNAc 和水解的 X CPS 与 CP-A 接触;

[0083] (b) 将 UDP-ManNAc 和水解的 X CPS 与 CP-A 一起温育;和

[0084] (c) 分离出由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X/A 的荚膜多糖亚基组成的人工嵌合 CPS。

[0085] 再次,技术人员容易理解,还可以应用如本文描述的活化或未活化供体碳水化合物、受体碳水化合物和荚膜聚合酶 (CP) 的其它组合。此种其它组合和其它修改并没有违背本发明的主旨。

[0086] 与供体碳水化合物和 CP 接触的受体碳水化合物可以根据本文描述的体外方法进行纯化。如果所述受体碳水化合物是脑膜炎奈瑟氏菌的寡聚或多聚的 CPS,则可以对它进行水解。

[0087] 与至少一种供体碳水化合物接触的荚膜聚合酶 (CP) 可以在陈述的体外方法中进行纯化。所述 CP 可以从脑膜炎奈瑟氏菌裂解液中分离的或通过重组产生的。

[0088] 本发明也涉及可通过本文描述的体外方法获得的人工嵌合 CPS。此种 CPS 可以是脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135、Y、A 或 X 的合成或人工嵌合 CPS, 或者包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y、C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的 CPS 或 CPS 亚基或由它们组成的人工嵌合 CPS。

[0089] 可通过本发明体外方法获得的人工嵌合 CPS 可以用作疫苗。在本发明优选实施方式中, 它们用于人主体的疫苗接种 (vaccination)。还公开了可通过本发明体外方法获得的嵌合 CPS 在制备疫苗中的应用。在本发明具体实施方式中, 可通过本文描述的体外方法获得的嵌合 CPS 用作对抗由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 或 Y 引起的脑膜炎球菌性脑膜炎的疫苗。可通过该体外方法获得的嵌合 CPS 也可以用于诊断由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 或 Y 引起的脑膜炎球菌性脑膜炎或与其相关的疾病。可通过该体外方法获得的嵌合 CPS 也可以用于分析操作程序中。例如, 此种嵌合 CPS 可以用作规定的标准碳水化合物从而使得与样本碳水化合物的比较能被分析。

[0090] 本发明进一步涉及结合到可通过本文描述的体外方法获得的人工嵌合 CPS 上的抗体。优选地, 这些抗体特异性地结合到人工嵌合 CPS 上。本文中的术语“抗体”在广义上使用且具体包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整的抗体形成的多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体), 以及抗体片段, 只要它们表现出期望的生物活性即可。也包括人和人化 (humanized) 抗体以及 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibodies)。

[0091] 如本文使用的术语“单克隆抗体”是指从基本均质性 (homogeneous) 抗体的群体中获得的抗体, 即, 包含除了少量存在的可能的天然发生的突变之外相同的群体的各种抗体。单克隆抗体具有高度的特异性, 针对单一抗原表位 (抗原位点, antigenic site)。此外, 与包括针对不同决定簇 (决定子, determinant) (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂相比, 每种单克隆抗体均针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外, 单克隆抗体还具有可在不被其它抗体污染的情况下合成的优点。修饰词“单克隆”是指该抗体的特征为它是从基本均质性的抗体群体获得的, 而不应解读为该抗体需要通过任何特定方法生产。例如, 根据本发明方法使用的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法生产, 这种方法首次由 Kohler, G. 等人, Nature 256 (1975) 495 描述, 或者可以通过重组 DNA 方法制备 (参见, 例如, 美国专利 No. 4, 816, 567)。“抗体片段”包含完整抗体的一部分。在本发明背景下, 抗体特异性地识别可通过本文描述的体外方法获得的 CPS 或人工嵌合 CPS。如本文描述的抗体或其片段也可以用于药物和医疗环境, 如疫苗接种 / 免疫, 特别是被动 (passive) 疫苗接种 / 免疫。

[0092] 本发明抗体也可以用于治疗 and / 或诊断由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 或 Y 引起的脑膜炎球菌性脑膜炎。

[0093] 本发明进一步涉及焦磷酸化酶, 特别是硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*) 的 UDP- 糖 磷酸化酶 (USP-LM) (Damerow 等人, J Biol Chem (2010), 285 (2) :878-887)。USP-LM 的核苷酸序列在 SEQ ID NO :9 中示出。USP-LM 的多肽序列在 SEQ ID NO :10 中示出。所述 USP-LM 可以将己糖 -1- 磷酸 (hexose-1-phosphate) 和 / 或戊糖 -1- 磷酸 (pentose-1-phosphate) 活化为核苷酸糖。例如, USP-LM 将半乳糖 -1- 磷酸 (Gal-1-P) 活化为 UDP- 半乳糖 (UDP-Gal) 并将葡萄糖 -1- 磷酸 (Glc-1-P) 活化为 UDP- 葡萄糖 (UDP-Glc)。该活化可以是可逆的。USP-LM 进一步可以作用于并活化多种己糖 -1- 磷酸以及戊糖 -1- 磷酸, 且因此呈现出宽广的体外特异性。戊糖 -1- 磷酸的实例有木糖 -1- 磷酸、阿拉伯

糖 -1- 磷酸、葡萄糖醛酸 -1- 磷酸, 而且对 GlcNAc-1P 具有非常弱的活性。

[0094] 本文也描述了编码焦磷酸化酶或其片段的核酸分子。此种核酸分子可以是 DNA 分子、RNA 分子、硫代磷酸寡核苷酸 (oligonucleotide thiophosphates)、取代 (substituted) 的核糖寡核苷酸或 PNA 分子。此外, 术语“核酸分子”可以指 DNA 或 RNA 或其杂合体 (hybrids) 或其在本领域中已知的任何修饰 (参见, 例如关于修饰的 US 5525711、US 4711955、US 5792608 或 EP 302175)。该多核苷酸序列可以是单链或多链的、线性或环形的、天然或合成的, 且没有任何尺寸限制。例如, 该多核苷酸序列可以是基因组 DNA、cDNA、mRNA、反义 RNA、核酶 (ribozymal) 或编码此种 RNA 或嵌合修复体 (chimeroplasts) 的 DNA (Gamper, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 4332-4339)。所述多核苷酸序列可以是质粒形式或者病毒 DNA 或 RNA 形式。特别地, 本发明涉及具有 SEQ ID NO :9 所示核苷酸序列的核酸分子。本发明也包括包含 SEQ ID NO :9 所示核酸分子的核酸分子, 其中添加、删除或替换一个、两个、三个或更多个核苷酸。此种核酸分子可以编码具有焦磷酸化酶活性的多肽。如本文使用的术语“活性”特别指多肽或其片段将糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖的能力。在本发明具体实施方式中, 本文描述的核酸分子编码可将己糖 -1- 磷酸和 / 或戊糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖, 特别将半乳糖 -1- 磷酸 (Gal-1-P) 活化为 UDP- 半乳糖 (UDP-Gal) 和将葡萄糖 -1- 磷酸 (Glc-1-P) 活化为 UDP- 葡萄糖 (UDP-Glc) 的多肽。该活化可以是可逆的。本领域技术人员可以容易地测定多肽将糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖的活性。由相应的糖 -1- 磷酸和 UTP 合成 UDP-Glc、UDP-Gal 或其它 UDP- 糖的反应 (正反应) 产生副产物焦磷酸盐, 其可以利用例如 Enz-Chek Pyrophosphate Kit (Invitrogen) 监测。替换地, 按照形成的 UTP 分析从核苷酸糖和焦磷酸盐合成的糖 -1- 磷酸 (逆反应)。在这个试验中, 可利用大肠杆菌 CTP 合成酶 (31) 从 UTP 产生游离的无机磷酸盐, 其可以再次利用 Enz-Chek Pyrophosphate Kit (Invitrogen) 或 Enz-Chek Phosphate Kit (Invitrogen) 监测。细节在实施例 11 中示意性地给出。优选地, 本发明描述的核酸分子与 SEQ ID NO :9 具有至少 45%, 更优选至少 50%, 更优选至少 55%, 更优选至少 60%, 更优选至少 65%, 更优选至少 70%, 更优选至少 75%, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90%, 更优选至少 95%, 更优选至少 96%, 更优选至少 97%, 更优选至少 98%, 且最优选至少 99% 的同一性。这种核酸分子优选编码可将己糖 -1- 磷酸和 / 或戊糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖, 特别将半乳糖 -1- 磷酸 (Gal-1-P) 活化为 UDP- 半乳糖 (UDP-Gal) 和将葡萄糖 -1- 磷酸 (Glc-1-P) 活化为 UDP- 葡萄糖 (UDP-Glc) 的多肽。该活化可以是可逆的。

[0095] 本发明进一步涉及与上述核酸分子互补的核酸分子。还包括可以与本文描述的核酸分子杂交的核酸分子。本发明核酸分子也可以是本文描述的核酸分子的片段。特别地, 此种片段是功能片段。此种功能片段的实例是用作引物的核酸分子。

[0096] 如本文结合核酸分子 /DNA 序列使用的术语“杂交 (hybridization)”或“杂交 (hybridize)”可以涉及在严格条件或非严格条件下的杂交。如果没有进一步说明, 该条件优选为非严格条件。所述杂交条件可以根据例如下面文献中描述的常规方案确立: Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), 或 Higgins and Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press

Oxford, Washington DC, (1985)。条件的设置完全在技术人员的技术范围内且可以根据本领域中描述的方案确定。因而,对仅特异性杂交的序列的检测通常要求严格的杂交和洗涤条件,如 65℃下 0.1x SSC,0.1% SDS。检测同源或不完全互补 (exactly complementary) 的序列的非严格杂交条件可以设置为 65℃下 6xSSC,1% SDS。众所周知,探针的长度和待确定核酸的组成构成杂交条件的进一步参数。上述条件的改变可以通过添加和 / 或替换用于抑制杂交实验中背景的替换封闭剂 (blocking reagent) 完成。典型的封闭剂包括 Denhardt' s 试剂 (Denhardt' s reagent)、BLOTTO、肝素、变性鲑鱼精子 DNA,和市售的专利配方 (proprietary formulations)。由于相容性问题,特定封闭剂的添加可能要求修改上述杂交条件。

[0097] 根据本文描述的本发明,可以将检测同源性或不完全互补的序列的低度严格杂交条件设置为,例如 65℃下 6x SSC,1% SDS。众所周知,探针的长度和待确定核酸的组成构成杂交条件的进一步参数。

[0098] 杂交核酸分子也包含上述分子的片段。此种片段可以代表可用作引物、为如上所述的功能焦磷酸化酶或其功能片段编码的核酸分子。此外,与前述核酸分子中任一种杂交的核酸分子也包括这些分子的互补片段、衍生物和等位基因变体。另外,杂交复合体是指依靠互补的 G 和 C 碱基以及互补的 A 和 T 碱基之间形成氢键 (连接) 的两个核酸序列的复合体;这些氢键可以由碱基堆积相互作用 (base stacking interactions) 加以进一步稳定。这两个互补的核酸序列氢键处于反平行构型中。杂交复合体可以在溶液中形成 (例如,Cot 或 Rot 分析),或者可以在存在于溶液中的一个核酸序列和固定在固体载体 (例如,细胞已固定在其上的膜、过滤器、芯片、销钉 (pin) 或玻片) 上的另一个核酸序列之间形成。术语互补的或互补是指多肽在许可的盐和温度条件下通过碱基配对自然结合 (的特性)。例如,序列“A-G-T”结合到互补序列“T-C-A”上。两个单链分子之间的互补可以是其中仅一些核酸结合的“部分” (互补),或者当单链分子之间存在总体互补时,它可以是完全 (互补)。核酸链之间的互补度对核酸链之间的杂交效率和强度具有重要的影响。这在扩增反应中特别重要,扩增反应取决于核酸链之间的结合。

[0099] 术语“杂交序列”优选指,与如上面所述的编码焦磷酸化酶的核酸序列具有至少 45%,更优选至少 50%,更优选至少 55%,更优选至少 60%,更优选至少 65%,更优选至少 70%,更优选至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,更优选至少 95%,更优选至少 96%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,且最优选至少 99% 的序列同一性的序列。而且,术语“杂交序列”优选指,编码如本文所述的焦磷酸化酶,与 SEQ ID NO:10 具有至少 45%,更优选至少 50%,更优选至少 55%,更优选至少 60%,更优选至少 65%,更优选至少 70%,更优选至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,更优选至少 95%,更优选至少 96%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,最优选至少 99% 的序列同一性的序列。本发明进一步涉及包含编码焦磷酸化酶的本发明核酸分子的载体。本发明也涉及包含编码本文所述的焦磷酸化酶的核酸构建体的载体。如本文使用的术语“载体”特别是指质粒、粘粒、病毒、噬菌体以及基因工程中常用的其它载体。在优选实施方式中,本发明载体适合于转化细胞,如真菌细胞、微生物细胞如酵母或原核细胞。在特别优选的实施方式中,此种载体适合于稳定转化细菌细胞,例如从而表达本发明的焦磷酸化酶。

[0100] 因此,在本发明一个方面,所提供的载体是表达载体。一般地,表达载体在文献中

有详尽的描述。一般说来,它们可以不但包含选择标记基因和确保所选宿主中的复制的复制起点,而且还包含启动子,且在大多数情况下包含转录终止信号。启动子和终止信号之间优选存在至少一个限制位点,或使得期望被表达的核酸序列 / 分子能被插入的多接头 (polylinker)。

[0101] 应理解,当通过利用现有技术中已知的、已包含适用于本发明背景的启动子,例如表达如本文上面描述的焦磷酸化酶的表达载体制取本文提供的载体时,以使得到的载体仅包含一种适用于本发明背景的启动子的方式将核酸构建体插入到那个载体中。技术人员知道此种插入如何进行。例如,在连接之前从该核酸构建体或从该表达载体中切除启动子。

[0102] 本发明载体的非限制性实例为包含本发明核酸构建体的质粒载体 pET22b。适合于包含本发明核酸构建体从而形成本发明载体的载体的进一步实例在本领域中是已知的且为,例如细菌表达系统用的其它载体,如 pET 系列 (Novagen) 的载体或者 pQE 载体 (Qiagen)。

[0103] 在另外的实施方式中,本发明涉及包含本发明核酸构建体和 / 或载体的宿主细胞。优选地,本发明宿主细胞可以是原核细胞,例如细菌细胞。作为非限制性实例,本发明宿主细胞可以是大肠杆菌。本文提供的宿主细胞对产生本发明焦磷酸化酶特别有用。

[0104] 一般地,本发明宿主细胞可以是包含本发明核酸构建体或载体的原核细胞或真核细胞,或者源自此种细胞并包含本发明核酸构建体或载体的细胞。在优选实施方式中,该宿主细胞包含本发明核酸构建体或载体,即,以使得它包含整合到基因组中的本发明核酸构建体的方式利用本发明核酸构建体或载体进行基因修饰。例如,本发明的此种宿主细胞,以及本发明的一般宿主细胞可以是细菌、酵母或真菌细胞。

[0105] 在一个特定方面,本发明宿主细胞能够表达或表达如本文定义的和如 SEQ ID NO:10 中示例性地描述的焦磷酸化酶。用于产生本发明宿主细胞,例如这种特别的宿主细胞的不同相应表达系统的实例综述,例如包含在下面文献中:Methods in Enzymology 153(1987),385-516;Bitter 等人 (Methods in Enzymology 153(1987), 516-544);Sawers 等人 (Applied Microbiology and Biotechnology 46(1996),1-9);Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7(1996),500-4);Hockney (Trends in Biotechnology 12(1994),456-463);和 Griffiths 等人 (Methods in Molecular Biology 75(1997),427-440)。

[0106] 利用根据本发明的核酸构建体或载体对宿主细胞进行的转化或基因工程可以通过标准方法进行,如下面文献中描述的:Sambrook and Russell(2001),Molecular Cloning:A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA;Methods in Yeast Genetics,A Laboratory Course Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990。

[0107] 本文进一步描述了包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列的多肽,其中添加、删除或替换了一个、两个、三个或更多个氨基酸残基。该多肽可以具有焦磷酸化酶功能。优选地,该多肽可以将己糖 -1- 磷酸和 / 或戊糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖,特别将半乳糖 -1- 磷酸 (Gal-1-P) 活化为 UDP- 半乳糖 (UDP-Gal) 和将葡萄糖 -1- 磷酸 (Glc-1-P) 活化为 UDP- 葡萄糖 (UDP-Glc)。该活化可以是可逆的。该多肽的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO:10 具有至少 45%,更优选至少 50%,更优选至少 55%,更优选至少 60%,更优选至少 65%,更优选

至少 70%，更优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 96%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，且最优选至少 99% 的同一性。优选地，该多肽可以将己糖 -1- 磷酸和 / 或戊糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖，特别将半乳糖 -1- 磷酸 (Gal-1-P) 活化为 UDP- 半乳糖 (UDP-Gal) 和将葡萄糖 -1- 磷酸 (Glc-1-P) 活化为 UDP- 葡萄糖 (UDP-Glc)。该活化可以是可逆的。还包括本文描述的多肽的功能片段。这些多肽的功能片段表现出焦磷酸化酶功能。优选地，这些功能片段可以将己糖 -1- 磷酸和 / 或戊糖 -1- 磷酸活化为核苷酸糖，特别将半乳糖 -1- 磷酸 (Gal-1-P) 活化为 UDP- 半乳糖 (UDP-Gal) 和将葡萄糖 -1- 磷酸 (Glc-1-P) 活化为 UDP- 葡萄糖 (UDP-Glc)。该活化可以是可逆的。

[0108] 本文描述的核酸分子或其片段以及载体、宿主细胞和多肽或其片段可以进一步用于活化己糖 -1-P 和 / 或戊糖 -1-P。根据本发明，此种应用可以是体外应用。己糖 -1-P 的实例为 Glc-1-P 或 Gal-1-P。戊糖 -1-P 的实例为木糖 -1-P 或阿拉伯糖 -1-P。

[0109] 核苷酸或氨基酸序列的同一性水平是指 SEQ ID NO :9 所示核苷酸序列或 SEQ ID NO :10 所示多肽序列的整个长度，并且成对地评估，其中每个空位都被记为一个不匹配。如本文使用的术语“同一性”与术语“同源性”等效。例如，这个术语结合与另一个，优选整个核酸序列具有至少 45%，更优选至少 50%，更优选至少 55%，更优选至少 60%，更优选至少 65%，更优选至少 70%，更优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 96%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，且最优选至少 99% 的同源性，即序列同一性的核酸序列使用。

[0110] 关于氨基酸 / 多肽序列或其片段，这个术语在本文结合与另一个，优选整个氨基酸 / 多肽序列具有至少 45%，更优选至少 50%，更优选至少 55%，更优选至少 60%，更优选至少 65%，更优选至少 70%，更优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 96%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，且最优选至少 99% 的同源性，即，序列同一性的氨基酸 / 多肽序列或其片段使用。

[0111] 因此，本发明涉及与 SEQ ID NO :10 所示的多肽具有至少 45%，更优选至少 50%，更优选至少 55%，更优选至少 60%，更优选至少 65%，更优选至少 70%，更优选至少 75%，更优选至少 80%，更优选至少 85%，更优选至少 90%，更优选至少 95%，更优选至少 96%，更优选至少 97%，更优选至少 98%，且最优选至少 99% 的同一性 / 同源性的焦磷酸化酶或其片段。

[0112] 同样，在涉及本文公开的焦磷酸化酶（或其功能片段）的这个实施方式的背景下，如果例如通过例如序列比较进行比较的两个核酸序列同一性不同，则术语“同一性”或“同源性”指的是较短序列和与所述较短序列匹配的较长序列的部分。因此，当所比较的序列长度不相同，同一性程度是指与较长序列中核苷酸残基相同的较短序列中核苷酸残基的百分比，或者与较短序列中核苷酸序列相同的较长序列中核苷酸的百分比。在这种情况下，技术人员能够容易地确定与较短序列“匹配”的较长序列的部分。而且，针对序列比较（例如，“同一性”或“同源性”值的确定）的这些定义将应用于本文描述和公开的所有序列。

[0113] 同样，在本文陈述的新焦磷酸化酶背景下，同一性意味着相应核苷酸序列或多肽（例如，由此编码的多肽）之间存在功能和 / 或结构等效性。与本文描述的特定核酸 / 氨基酸序列具有给定水平的同一性的核酸 / 氨基酸序列可以代表这些序列的衍生物 / 变体，所

述衍生物 / 变体优选具有相同的生物功能。它们可以是天然存在的变异形式,例如来自其它种类、物种等的序列,或者突变形式,且所述突变形式可以天然形成或者可以通过预订诱变产生。此外,该变异形式可以是合成产生的序列。本文公开的焦磷酸化酶的等位基因变体可以是天然存在的变体或合成产生的变体或通过重组 DNA 技术产生的变体。与上述核酸序列的偏离可以通过,例如删除、替换、添加、插入和 / 或重组产生。术语“添加”是指在给定序列末端添加至少一个核酸残基 / 氨基酸,而“插入”是指在给定序列内插入至少一个核酸残基 / 氨基酸。术语“删除”是指在给定序列内删除或除去至少一个核酸残基 / 氨基酸残基。术语“替换”是指替换给定序列内至少一个核酸残基 / 氨基酸残基。

[0114] 本文公开的焦磷酸化酶的变体多肽,特别是本发明核酸序列的不同变体编码的多肽优选表现出它们共同具有的特性。这些包括,例如,生物活性、分子量、免疫反应性、构象等,以及物理性质,如凝胶电泳迁移行为、色谱行为、沉降系数、溶解度、光谱特性、稳定性、最适 pH、最适温度等。

[0115] 如本文使用的术语“合成的”描述了体外合成的 CPS 结构,且其中该 CPS 的结构与在脑膜炎奈瑟氏菌的天然 CPS 中发现的结构相同。

[0116] 如本文使用的术语“人工的”描述了体外合成的且与在脑膜炎奈瑟氏菌的天然 CPS 中发现的结构不同的 CPS 结构。例如,人工 CPS 是这样的嵌合 CPS,其包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 和 / 或 Y 的两个或更多个 CPS 亚基或者含有脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 和 / 或 Y 的不同 CPS 的一个或多个衍生化结构单元的 CPS,或者由它们组成。此种衍生化结构单元的实例在图 1 ~ 5 中示出。嵌合 CPS 可以包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y、C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的 CPS 或 CPS 亚基,或者由它们组成。在嵌合 CPS 内,CPS 亚基的一个或多个结构单元可以衍生化,如图 1 ~ 5 中示例性示出的。嵌合 CPS 可以包含一种或多种各包含 CPS 亚基的碳水化合物。嵌合 CPS 的 CPS 亚基的序列可以是任何顺序的。嵌合 CPS 实例在图 6 中示出。

[0117] 如本文使用的术语“碳水化合物”包含结构单元如任何形式的糖 (saccharides) 和糖 (sugars) 以及添加有数个羟基的醛和酮。碳水化合物可以包含经由共价键如糖苷键连接的一个或多个所述结构单元。碳水化合物可以具有任何长度,即,它可以是单体、二聚体、三聚体或多聚体。碳水化合物也可以包含一个或多个结构单元作为经由共价键连接到主链上的侧链。碳水化合物还可以包含一个或多个活化糖,如核苷酸糖。核苷酸糖的实例为 UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcNAc、UDP-GlcUA、UDP-Xyl、GDP-Man、GDP-Fuc、CMP-Neu5Ac 和 CMP-NeuNAc。

[0118] 如本文使用的术语“CPS 亚基”描述了对脑膜炎奈瑟氏菌血清组各种 CPS 有特异性的一种或多种碳水化合物。在 CPS 亚基内,一种或多种碳水化合物可以衍生化。如果一个特定 CPS 亚基中存在两种或更多种碳水化合物,则它们通过对各种脑膜炎奈瑟氏菌血清组的 CPS 有特异性的连键连接。

[0119] 从上面明显可以看出,本发明提供了生产合成荚膜多糖,特别是人工嵌合荚膜多糖的方式和方法。因此,本发明还涉及通过或可通过本文提供的方法获得的嵌合荚膜多糖,特别是脑膜炎奈瑟氏菌的嵌合荚膜多糖。此种嵌合荚膜多糖尤其是,包含脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y/W-135、W-135/Y、B/Y、C/Y、B/W-135、C/W-135、B/Y/W-135、C/Y/W-135、B/W-135/Y、

C/W-135/Y、X/A 或 A/X 的荚膜多糖或荚膜多糖亚基的嵌合荚膜多糖。

[0120] 如本文提供的此种荚膜多糖不仅作为科学工具有用处,而且在医学环境中非常有价值,例如作为药物组合物。此种药物组合物可以包含疫苗。因此,本发明也涉及包含本文描述的嵌合荚膜多糖的药物组合物。所述荚膜多糖可以是分离的,但也设想了这些嵌合荚膜多糖结合其它结构例如多肽等使用。此种多肽,尤其可以用作本文描述的本发明嵌合荚膜多糖的载体或骨架。已开发将低聚糖共价连接到蛋白质上的许多方法(文献(Lit)): (a) Vince Pozsgay, Oligosaccharide-protein conjugates as vaccine candidates against bacteria, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, 2000, 卷 56, 153-199 页, (b) Jennings, H. J., R. K. Sood (1994) *Synthetic glycoconjugates as human vaccines*; Lee, Y. C. R. T. Lee (eds): *Neoglycoconjugates. Preparation and Applications*. San Diego, Academic Press, pp 325-371, (c) Pozsgay, V.; Kubler-Kielb, J., *Conjugation Methods toward Synthetic Vaccines, Carbohydrate-Based Vaccines*, American Chemical Society, July 2, 2008, 36-70; (D) Carl E. Frasch, *Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: Analytical and manufacturing challenges*, *Vaccine*, In Press, Corrected Proof, 网上公布于 2009 年 6 月 24 日, ISSN 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.013。一个实例是本文描述的合成或人工 CPS 分子与蛋白质氨基通过还原胺化共价偶联。

[0121] 因此,本发明也包括包含如本文描述的嵌合荚膜多糖的复合物(化合物, compound)。此种复合物具有特定的科学应用和医学应用。其中的一个此种应用是作为疫苗的应用,即,本文提供的复合物可以用于主体的疫苗接种。此种主体可以是哺乳动物,且在特定实施方式中,可以是人。本文提供的疫苗对于奈瑟氏菌的疫苗接种特别有用。根据上面,本发明也提供了包含本文公开的嵌合荚膜多糖的复合物在制备待给予主体,优选给予哺乳动物,最优选给予人的疫苗中的应用。此种医学应用特别涉及关于疾病的医学应用或干预,如脑膜炎疫苗接种,特别是对抗由脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A、B、C、W-135、X 或 Y 引起的脑膜炎球菌性脑膜炎的疫苗接种。

[0122] 然而,如上面提到的和如后附实例中说明的,本发明也涉及新焦磷酸化酶(Damerow 等人, *Biol Chem* (2010), 285(2): 878-887)。因此,本发明也提供了本文定义的焦磷酸化酶在科学研究、工业环境以及医学环境中的应用。因此,本发明也涉及为本文定义的焦磷酸化酶(或其功能片段)编码的核酸分子、包含此种核酸分子的载体、包含此种核酸分子或此种载体的宿主细胞,或本文定义的焦磷酸化酶(或其功能片段)自身在将己糖-1-磷酸和/或戊糖-1-磷酸活化为核苷酸糖中的应用。所述己糖-1-磷酸尤其可以选自 Glc-1P 和 Gal-1-P 构成的组,且所述戊糖-1-磷酸尤其可以选自木糖-1-P 和阿拉伯糖-1-P 构成的组。

[0123] 本文公开的焦磷酸化酶此种应用可以是体外应用。特别设想在如本文公开的,例如用于生产合成多糖,如嵌合荚膜多糖的(生物)化学过程和方法中应用如本文描述的焦磷酸化酶。本文描述的焦磷酸化酶也可以用于生产活化的核苷酸糖如 UDP-Gal、UDP-Glc、UDP-Xyl、UDP-GalA 或 UDP-Ara。

[0124] 本文提供的组合物可以包含如本文描述的合成和/或嵌合多糖(CPS)。此种组合物,尤其对医学和诊断目的有用,特别对药物和疫苗接种目的有用,即,对于奈瑟氏菌诱导

的疾病治疗或诊断检测或对抗这些病原体的疫苗接种有用。因此,本发明也涉及如本文定义的组合物,该组合物是进一步包含可选的药物可接受载体的药物组合物。

[0125] 本发明药物组合物可以包含本发明 CPS。该药物组合物可以进一步包含特异性针对本发明这些 CPS 的抗体,例如针对本文公开的这些合成 CPS 或者针对这些 CPS 产生的本发明抗体(或其片段或衍生物)。此种 CPS 以及针对此种 CPS 的抗体可以单独或结合用于尤其是疫苗接种方案。因此,包含本发明 CPS 或针对本发明 CPS 的抗体的本发明药物组合物可以用于制药目的,如受感染人和动物的有效治疗和/或用于疫苗接种目的。因此,本发明涉及包含如本文描述的 CPS 和/或针对如本文描述的 CPS 的抗体或抗体片段,和可选的药物可接受载体的药物组合物。在本发明背景下,本文描述的药物组合物尤其可以用于治疗、预防和/或诊断奈瑟氏菌诱导的疾病和/或感染。优选地,该药物组合物用作疫苗,如本文在下面将进一步描述的。

[0126] 本发明药物组合物可以进一步包含药物可接受载体、赋形剂和/或稀释剂。合适的药物载体的实例在本领域中是众所周知的,且包括磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液,如油/水乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。包含此种载体的组合物可以通过众所周知的常规方法调配。这些药物组合物可以以合适的剂量给予主体。合适的组合物的给予可以通过不同方式实施,如通过静脉内、腹膜内、皮下、肌内、外用、真皮内、鼻内或支气管内给予。给药方案将由主治医师和临床因素决定。如医学领域众所周知的,针对任何一名患者的剂量取决于许多因素,包括患者体型(size)、体表面积、年龄、待给予的特定化合物(复合物)、性别、给予时间和途径、一般健康状况,和并行给予的其它药物。本发明药物组合物,特别在用于疫苗接种目的时,可按每剂(剂量, dose)约 $0.01 \mu\text{g} \sim 1\text{g}$ CPS,或每剂约 $0.5 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$,或每剂约 $1 \mu\text{g} \sim 300 \mu\text{g}$ CPS 使用。然而,设想了低于或高于这个示例范围的剂量,尤其在考虑到前述因素时。合适的组合物的给予可以通过不同方式实施,如通过静脉内、腹膜内、皮下、肌内、外用或真皮内给予。然而,特别在本发明的药物干预中,奈瑟氏菌感染可能要求给予在感染侧,如脑。可以通过定期评估监测进展。本发明组合物可以局部或全身给予。给予一般是肠胃外,例如静脉内给予。本发明组合物也可以直接给予到靶位,例如通过基因枪(biolistic)递送到内部或外部靶位或者通过导管递送至动脉内的部位。用于肠胃外给予的制剂包括无菌水溶液或无菌非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的实例为,丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,和注射用有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇溶液/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒剂(vehicle)包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液,或固定油。静脉内媒剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(如基于林格氏右旋糖的那些)等。还可以存在防腐剂和/或其它添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。此外,本发明药物组合物可以包含此外的物质如白细胞介素和/或干扰素,这取决于该药物组合物的预期用途。

[0127] 在本发明的优选实施方式中,如本文定义的药物组合物是疫苗。

[0128] 疫苗尤其可以由如本文描述的一种或多种 CPS,或由一种或多种抗体、所述抗体的片段或本发明抗体,即,针对如本文公开的 CPS 的抗体的衍生物制备。因此,在本发明背景下,疫苗可以包含如本文描述的一种或多种 CPS 和/或一种或多种抗体、所述抗体的片段或本发明抗体,即,针对如本文公开的 CPS 的抗体的衍生物。

[0129] 用在作为疫苗的药物组合物中的本发明 CPS 或抗体、所述抗体的片段或衍生物可

以调配为,例如中性或盐形式。药物可接受盐,如酸加成盐,和其它盐在本领域中是已知的。疫苗尤其可用于治疗和 / 或预防病原体如奈瑟氏菌的感染,并以与调配方法相容的剂量,和以此种对预防或治疗性处理药理学有效的量给予。

[0130] 疫苗接种方案可以包含主动或被动免疫,其中主动免疫需要向宿主 / 患者给予一种抗原或多种抗原(如本发明嵌合多糖或抗体、所述抗体的片段或针对这些 CPS 的抗体的衍生物),试图引出保护性免疫反应。被动免疫需要将预先形成的免疫球蛋白或其衍生物或片段(例如,本发明抗体,其衍生物或片段,即,针对本发明嵌合 CPS 和如通过本文提供的方式和方法获得的特异性抗体)转移到宿主 / 患者中。疫苗接种的原理和实践以及疫苗是技术人员已知的,参见,例如,Paul, "Fundamental Immunology" Raven Press, New York(1989) or Morein, "Concepts in Vaccine Development", ed: S. H. E. Kaufmann, Walter de Gruyter, Berlin, New York(1996), 243-264; Dimitriu S, editor. "Polysaccharides in medicinal application"; New York: Marcel Dekker, pp 575-602。典型地,疫苗被制备成注射型液体溶液或悬浮液,也可以制备适合于在注射之前溶解或悬浮在液体中的固体剂型。该制剂可以乳化或者该蛋白质可以包裹在脂质体中。通常将活性免疫原性成分与可与该活性成分相容的药物学可接受赋形剂混合。合适的赋形剂包括,但不局限于水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等;也可以使用各种量的这些赋形剂的组合。该疫苗也可以包含少量辅助物质如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂,和 / 或增强该疫苗有效性的佐剂。例如,此种佐剂可以包括铝组合物(aluminum compositions),如氢氧化铝、磷酸铝或磷酸氢氧化铝(aluminum phosphohydroxide)(如"Gen H-B-Vax®"或"DPT-Impfstoff Behring"中使用的)、N-乙酰基-胞壁酰基(muramyl)-L-苏氨酸(threonyl)-D-异谷酰胺(thr-DMP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰基(nornuramyl)-L-丙氨酸-L-异谷酰胺(CGP 11687,也称为nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1' 2' -二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 19835A,也称为MTP-PE)、2%鲨烯 / 吐温-80®乳液中的MF59和RIBI(MPL+TDM+CWS)。

[0131] 该疫苗通常通过静脉内或肌肉注射给予。适合于其它给予模式的另外制剂包括栓剂,且在一些情况下包括口服制剂。对于栓剂,传统粘合剂和载体可以包括但不限于,聚亚烷基二醇(polyalkylene glycol)或甘油三酯。口服制剂包括此种通常采用的赋形剂,如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠(sodium saccharine)、纤维素、碳酸镁等。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末形式,且包含约10%~约95%的活性成分,优选约25%~约70%。

[0132] 疫苗以与剂量配方(dosage formulation)相容的方式,以预防和 / 或治疗有效的量给予。待给予的量一般在每剂约0.01 μ g ~ 1g 抗原,或每剂约0.5 μ g ~ 500 μ g 抗原,或每剂约1 μ g ~ 300 μ g 抗原(在当前情况下,CPS是抗原)的范围内,且取决于待给药的主体、主体免疫系统合成抗体的能力,和期待的保护程度。需要给予的活性成分的精确量也取决于医生的判断,而且对于每个主体可能是独特的。该疫苗可以单剂量或多剂量给药方式给予。多剂量是这样的,即,可以在疫苗接种的初始时程使用1~10种单独的剂量,接着在维持和 / 或加强免疫反应所需的后续时间间隔给予其它剂量,例如,在1~4个月给予第2剂量,且如果个体需要,在几个月后给予一种(或多种)后续剂量。该给药方案也至少部分地由个体需要确定,且取决于医生的判断。考虑到,包含本发明免疫原性复合物(化合物)

的疫苗可以联合其它免疫调节剂,例如,联合免疫球蛋白,联合细胞因子或联合可优化抗原处理的分子,如李斯特菌溶胞素 (listeriolysin) 给予。

[0133] 对于临床和 / 或科学标本中如奈瑟氏菌的病原体、病原片段、其衍生物、其 (多) 肽 (蛋白质)、其多核苷酸等的诊断和量化,已开发出多种免疫学方法以及分子生物学方法,如核酸杂交测定、PCR 测定或 DNA 酶免疫测定 (DEIA; Mantero 等人, *Clinical Chemistry* 37 (1991), 422-429), 它们在本领域中是众所周知的。在这种情况下,应注意本发明核酸分子还可以包含 PNA、含有酰胺骨架连键的修饰 DNA 类似物。此种 PNA 尤其作为 DNA/RNA 杂交的探针有用。本发明蛋白质尤其对受感染个体生物测试样品中的抗病原 (如,例如抗细菌或抗病毒) 抗体的检测有用。还考虑了,抗体和包含本发明此种抗体的组合物对区分急性与非急性感染有用。如本文提供的 CPS 也可以用于诊断环境中,例如作为例如色谱方法中的“标准”。因此,本发明 CPS 可以用于比较分析,且可以单独或结合用于本领域已知的诊断方法。

[0134] 该诊断组合物可选地包含合适的检测方式 (装置, means)。如本文公开和描述的 CPS 以及针对或特异性对抗这些嵌合多糖而产生的特异性抗体或其片段或衍生物,例如适用于免疫分析,其中它们可以液相利用或结合到固相载体上。固相载体在本领域中是已知的,且可以包含聚苯乙烯珠、乳胶珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和 / 或硅芯片和表面、硝基纤维素条 (nitrocellulose strips)、膜、片、动物红细胞,或红细胞影泡 (血影, ghosts)、硬膜细胞 (duracytes) 和反应盘的壁和孔、塑料管或其它测试管。将核酸、(多) 肽、蛋白质、抗体、微生物等固定在固相上的合适的方法包括但不限于,离子、疏水、共价相互作用等。可利用所述蛋白质、抗原片段、融合蛋白、本发明抗体或所述抗体的片段或衍生物的免疫分析实例为直接或间接方式的竞争性和非竞争性免疫分析。常用的检测分析可以包含,放射性同位素或非放射性同位素方法。此种免疫分析的实例为放射免疫分析 (RIA)、三明治型 (免疫测定分析 (immunometric assay)) 和 Western 印迹分析。此外,这些检测方法包括,尤其 IRMA (免疫放射免疫测定分析)、EIA (酶免疫分析)、ELISA (酶联免疫分析)、FIA (荧光免疫分析),和 CLIA (化学发光免疫分析)。本领域中使用的其它检测方法是未利用示踪分子的那些。这些方法的一种原型是基于给定分子桥接至少两种颗粒的特性的凝集反应 (agglutination) 分析。

[0135] 本发明 CPS 可以结合到许多不同载体上。众所周知的载体实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉 (amyloses)、天然和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖,和磁铁矿。对于本发明目的,该载体的性质可以是可溶性或不可溶性的。

[0136] 可用于标记生物分子的多种技术是本领域技术人员众所周知的,被认为在本发明的范围之内,且包含,尤其,酶或生物素基 (biotinyl group) 的共价偶联、碘化、磷酸化、生物素化、随机引物法、缺口平移法 (nick-translations)、碳水化合物化合物的加尾 (利用末端转移酶) 或标记。此种技术,例如描述在下列文献中: Tijssen, "Practice and theory of enzyme immuno assays", Burden, RH and von Knippenburg (Eds), 卷 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dimer MD; Battey Elsevier (1990), Mayer 等人, (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987), 或 "Methods in Enzymology" 系列, Academic

Press, Inc., 或 Fotini N. Lamari, Reinhard Kuhn, Nikos K. Karamanos, “Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis”, Journal of Chromatography B, 卷 793, 1 期, Derivatization of Large Biomolecules, (2003), 第 15-36 页。

[0137] 检测方法包括,但不局限于,自体放射照相术 (autoradiography)、荧光显微镜术、直接和间接的酶促反应,等等。

[0138] 本文描述的嵌合 CPS 可以通过本领域中已知的以及本文描述和列举的方法检测。例如,本文描述的基于 ELISA (酶联免疫吸附分析) 的方法可以用于检测和量化本文描述的嵌合 CPS。在这种情况下,本文描述的嵌合 CPS 可以通过与该嵌合 CPS 的一部分或结构单元接触的抗体或其它结合分子,如卵磷脂 (lectine) 或类似物固定化。本文描述的嵌合 CPS 的第二部分或结构单元的检测可以通过,例如与标记用于进一步检测的如本文描述的抗体或其它结合分子接触,或者与标记用于进一步检测的如本文描述的第二抗体 (二抗) 或其它结合分子接触实现。本文在上面和下面描述和列举了适合于这个目的标记分子。用于检测本文描述的和可通过本文提供的方法获得的嵌合 CPS 的实例在图 19 中示出或描述下面的实例,特别是实施例 14 和 15 中。

[0139] 本发明涉及生产对抗奈瑟氏菌属的疫苗的方法,包含以下步骤:

[0140] (a) 合成或体外生产如上面定义的一种多糖 (或多种多糖);和

[0141] (b) 将所述一种多糖 (或多种多糖) 与药物可接受载体结合。

[0142] 在用于生产疫苗的这个方法的优选实施方式中,所述“一种多糖 (或多种多糖)”是如本文公开的嵌合 CPS。

[0143] 此外,本发明涉及生产抗奈瑟氏菌属的一种菌株或多种菌株,特别是脑膜炎奈瑟氏菌的疫苗的方法,该方法通过 (a) 将本发明一种多糖 (或多种多糖) (优选一种嵌合多糖 (或多种嵌合多糖) 与生物可接受载体结合 (而完成)。

附图说明

[0144] 图 1:UDP-Gal、CMP-Neu5Ac 及其可能的衍生物的示意图。A) UDP- 半乳糖 ;B) UDP- 半乳糖衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$; C) CMP- 唾液酸 ;D) CMP- 唾液酸衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 表示。 R_{1-5} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0145] 图 2:UDP-Glc 及其可能的衍生物的示意图。A) UDP- 葡萄糖 ;B) UDP- 葡萄糖衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0146] 图 3:UDP-GlcNAc 及其可能的衍生物的示意图。A) UDP-GlcNAc ;B) UDP-GlcNAc 衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0147] 图 4:Gal-1-P、唾液酸及其可能的衍生物的示意图。A) 半乳糖-1-磷酸;B) Gal-1-P 衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为: $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$;C) N-乙酰基神经氨酸;D) N-乙酰基神经氨酸衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为: $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0148] 图 5:受体衍生物的示意图。A) 在带有附接到异头碳(anomeric carbon)C2 上的官能团的寡聚/多聚的血清组 W-135 或 Y 荚膜多糖还原端的末端糖(terminal sugar)。 $R_1 = OH$, $R_1 = [\rightarrow 2)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(8 \rightarrow]_x$, $R_1 = [\rightarrow 2)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(9 \rightarrow]_x$, $R_1 = [\rightarrow 1)-\alpha\text{-D-Glc}-(6 \rightarrow 2)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(4 \rightarrow]_x$, $R_1 = [\rightarrow 1)-\alpha\text{-D-Gal}-(6 \rightarrow 2)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(4 \rightarrow]_x$;B) 在带有附接到异头碳 C2 上的官能团的寡聚/多聚的血清组 B 荚膜多糖还原端的末端糖。 $R_2 = OH$, $R_2 = [\rightarrow 2)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(8 \rightarrow]_x$;C) 在带有附接到异头碳 C2 上的官能团的寡聚/多聚的血清组 C 荚膜多糖还原端的末端糖。 $R_3 = OH$, $R_3 = [\rightarrow 2)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(9 \rightarrow]_x$ 。 $R = \text{FITC-乳糖}$, $R = \text{FCHASE-乳糖}$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$ (对于图 A、B 和 C)。

[0149] 图 6:野生型和嵌合脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖的示意图。NmW-135:NmW-135[$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Galp}-(1 \rightarrow 4)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(2 \rightarrow]_n$ 荚膜多糖, NmY:NmY[$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1 \rightarrow 4)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(2 \rightarrow]_n$ 荚膜多糖, NmB/C:NmB[$\rightarrow 8)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(2 \rightarrow]_n$ 荚膜多糖或 NmC[$\rightarrow 9)-\alpha\text{-Neu5Ac}-(2 \rightarrow]_n$ 荚膜多糖, NmX:NmX[$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-GlcpNAc}-(1 \rightarrow OPO_3 \rightarrow]_n$ 荚膜多糖, NmA:NmA[$\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-ManpNAc}-(1 \rightarrow OPO_3 \rightarrow]_n$ 荚膜多糖。嵌合 CPS 可以包含指示的 CPS 结构的一个或多个结构单元。该结构单元可以具有可变的长度。

[0150] 图 7:CP-W135:荚膜聚合酶 NmW-135。MK:肌球蛋白激酶(Sigma-Aldrich), PK:丙酮酸激酶(Sigma-Aldrich)。CSS:来自 NmB 的 CMP-Neu5Ac 合成酶。IPP:无机焦磷酸酶(Molecular Probes)。USP:来自硕大利什曼原虫的 UDP-糖-焦磷酸化酶(Damerow 等人, J Biol Chem(2010), 285(2):878-887)。PEP:磷酸烯醇丙酮酸。Gal-1P:半乳糖-1-磷酸。

[0151] 图 8:在一锅(one-pot)/六酶反应中从简单原料(半乳糖-1P、磷酸烯醇丙酮酸和唾液酸)体外合成 W-135CPS。双循环反应的产物形成通过以下进行分析:A) 使用抗-W-135CPS 特异性抗体 mAb MNW1-3 的点印迹分析。B 和 C) 多糖 PAGE 分析。B) 在指示的时间步长(time step)(0h、3h、24h 和 47h)之后取出反应样品,将其与 2M 蔗糖以 1:1 混合之后施加到凝胶中。为了增加单一条带 1s 的分辨率,还施加了稀释液(1:10)。C) 稀释系列的 5~50 μg W-135CPS 标准物使得人们可以评价该循环反应(反应 1:10[h])形成的,纯化(纯化反应)之后的多糖产物。对 2、3 和 8 泳道进行比较,可以粗略评价加入的多糖和由此形成的产物量,所形成的产物量接近 2mg/200 μL 反应体积。这相当于理论最大产率的 80~90%。所有样品都通过 25% PAGE 分离,且在随后的阿尔辛蓝(Alcian blue)/银染色中检测到糖结构。

[0152] 图 9:重组 CP-W135 和 CP-Y 的纯化。A) 在大肠杆菌中进行 C-端 6xHis 标记的酶的表达,并通过两步操作程序中的 IMAC 和尺寸排阻色谱纯化。整个纯化过程获得的蛋白质组分通过如所示的考马斯染色的 SDS-PAGE(10%)分析;B-C) CP-W-135 和 CP-Y 的低聚状

态。纯化的 CP-W-135 和 CP-Y 的四级结构通过尺寸排阻色谱分析。标准蛋白质的洗脱体积由箭头指示 (B), 主要峰组分 (peak fraction) 随后通过针对 6xHis- 表位标签的 Western 印迹分析进行分析 (C)。

[0153] 图 10: 重组 CP-X 的纯化。使 C- 端 6xHis 标记的酶在 N 端融合到 MBP 上, 在大肠杆菌中进行表达, 并通过 MBP 亲和色谱和尺寸排阻色谱纯化。细菌裂解液、流过液 (flow through)、洗涤液、亲和层析汇集物 (pool)、凝胶过滤汇集物和 80°C 储存的蛋白质组分 (级分、流分, fractions) 通过考马斯染色的 SDS-Page (A) 和通过针对 6x His- 标签 (B) 和 MBP- 标签 (C), 以抗 -His mAb (抗 -5His (anti-PentaHis), Qiagen) 和抗 MBP mAb HRP 结合的 (NEB) 为探针的 Western 印迹分析进行分析。(D) 使 C- 端 6xHis 标记的酶在 N 端融合到 MBP 上, 在大肠杆菌中进行表达, 并通过 MBP 亲和色谱纯化。细菌裂解液和亲和纯化的蛋白质组分通过考马斯染色的 SDS-PAGE (左侧) 和以抗 -His mAb (抗 -5His, Qiagen) 为探针的 Western 印迹分析 (右侧) 进行分析。

[0154] 图 11: 长血清组 W-135 和 Y 聚合物链的体外合成。A) CP-W-135 和 CP-Y 合成产物的多糖 PAGE 分析。为了获得低聚糖受体底物, 使纯化的血清组 W-135CPS (泳道 2) 水解 (CPS_{水解}, 泳道 3), 随后用作体外聚合的引物材料。反应混合物包含纯化的酶催化剂、各种供体糖 CMP-Neu5Ac/UDP-Gal (泳道 4) 和 CMP-Neu5Ac/UDP-Glc (泳道 5) 以及受体结构 CPS_{水解} (CPS_{Hydro})。所有样品都通过 25% PAGE 分离, 并在随后的阿尔辛蓝 / 银染色中检测到糖结构; B) A (泳道 4-5) 中合成的多糖利用抗 -CPS-W-135 (mAb MNW1-3) 和抗 -CPS-Y (mAb MNY4-1) 特异性抗体进行免疫染色。在 1min 和 30min 反应时间之后将该反应混合物的 5 μl 等分试样点到 Hybond 膜上。利用等量的受体结构 CPS_{水解} (无酶) 作为阴性对照。

[0155] 图 12: 血清组 X CPS 的体外合成。A) 在 UDP-[6-³H]-GlcNAc (2mCi/mmol, Perkin Elmer) 的存在下利用纯化的 CP-X 作为催化剂以放射化学分析法分析聚合物合成。不添加受体 (oA), 或添加完整的 NmX- 裂解液。在 0、10 和 30min 反应时间之后分析 5 μl 等分试样。通过下行纸 (descending paper) 色谱分离样品, 并通过闪烁计数测量。B) 另外, 通过 PAGE (25%) 分析反射性标记的反应产物。将含有和不含有 CP-X 酶的样品在反射性标记的供体糖 UDP-[6-³H]-GlcNAc (2mCi/mmol, Perkin Elmer) 和完整 NmX- 裂解液的存在下温育。

[0156] 图 13: 以定义的低聚糖受体为原料合成血清组 W-135 和 Y CPS。利用纯化的 CP-W-135 (A) 和 CP-Y (B) 酶催化剂延伸人工受体。在 CMP-[¹⁴C]Neu5Ac 的存在下以放射化学分析法分析聚合物合成。反应混合物另外包含需要的 UDP- 己糖供体底物 (对于 CP-W-135 为 UDP-Gal, 对于 CP-Y 为 UDP-Glc) 和如指示的人工受体底物。通过下行纸色谱分离样品, 并通过闪烁计数分析。oA: 没有添加受体, DP1: 唾液酸单体, DP2: α 2,8- 连接的唾液酸二聚体, DP3: α 2,8- 连接的唾液酸三聚体, cps NmW: 纯化的 NmW-135CPS, cps NmY: 纯化的 NmY-135CPS。

[0157] 图 14: 嵌合 W135/Y- 聚合物的体外合成。A) 在 W-135 或 Y CPS 存在下, 以如图 13 描述的放射化学分析法分析纯化的 CP-W-135 和 CP-Y 的产物形成, 与在没有任何 CPS 受体存在的情况下的反应相比较; B) 在平行分析中, 分析 CPS 特异性抗体对合成的多糖的识别从而证实双表位 CPS 分子的合成。用纯化的血清组 W-135CPS 长链 (CPS (W-135)) 或水解 (CPS (W-135) 水解) 组分作为体外 CPS 合成的引物材料。将该反应液的 5 μl 等分试样点到 Hybond 膜上, 随后通过使用抗 -CPS-W-135 (mAb MNW1-3, (25)) 和抗 -CPS-Y (mAb MNY4-1,

(25)) 特异性抗体进行的免疫染色以及随后的显色反应检测结合的 CPS。

[0158] 图 15 :Glc-1-P 及其可能的衍生物的示意图。A) 葡萄糖 -1- 磷酸 ;B) Glc-1-P 衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0159] 图 16 :GlcNAc-1-P 及其可能的衍生物的示意图。A) N- 乙酰葡萄糖胺 -1- 磷酸 ;B) GlcNAc-1-P 衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0160] 图 17 :UDP-ManNAc 及其可能的衍生物的示意图。A) UDP-N- 乙酰甘露糖胺 ;B) UDP-ManNAc 衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0161] 图 18 :ManNAc-1-P 及其可能的衍生物的示意图。A) N- 乙酰甘露糖胺 -1- 磷酸 ;B) ManNAc-1-P 衍生化的潜在靶位用 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 表示。 R_{1-4} 的实例为 : $R = H$, $R = OH$, $R = N_3$, $R = F$, $R = (CH_2)_x N_3$, $R = COOH$, $R = (CH_2)_x COOH$, $R = NH(CO)CH_3$, $R = NH(CO)(CH_2)_x CH_3$, $R = O(CO)CH_3$, $R = O(CO)(CH_2)_x CH_3$ 。

[0162] 图 19 :用于证实嵌合荚膜多糖 B/W-135CPS 和 B/Y CPS 的形成的基于 ELISA 的分析。

[0163] A) 对照样品 :DP50 (由 α -2,8 连接的多聚 Sia (polySia) 组成的 50 个单元 (unit) 的链长) W-135CPS (从细菌收获的 NmW-135 荚膜多糖) W-135CPS hyd (从细菌收获的水解的 NmW-135 荚膜多糖 (W-135CPS)) 样品 :在存在 (+) 和不存在 (-) 聚合酶 NmW-135 (CP-W-135) 和 DP50 的情况下进行反应从而证明嵌合 CPS 的形成。样品分一式两份进行。B) 对照样品 :DP50 (由 α -2,8 连接的多聚 Sia 组成的 50 个单元的链长) Y CPS (从细菌收获的 NmY 荚膜多糖) 样品 :在存在 (+) 和不存在 (-) 聚合酶 NmY (CP-Y) 和 DP50 的情况下进行反应从而证明嵌合 CPS 的形成。样品分一式两份完成。

[0164] 图 20 :重组 UDP-GlcNAc 差向异构酶和 CP-A 的纯化。

[0165] 荚膜聚合酶 (CP-A) 以及 NmA UDP-GlcNAc 差向异构酶 (NmA 差向异构酶) 的纯化。对这两种酶进行表达,并纯化带有 N- 末端 Strep 和 C- 末端六组氨酸标签的融合构建体。通过 IMAC 纯化该酶,并通过考马斯染色的 SDS-PAGE (COO) 和通过以抗 -His mAb (抗 -PentaHis, Qiagen) 为探针的 Western 印迹 (WB) 分析来分析蛋白质组分。

[0166] 图 21 :血清组 A CPS 的体外合成。

[0167] A) 在 UDP- $[^{14}C]$ -GlcNAc 的存在下利用纯化的 CP-A 和纯化的 UDP-GlcNAc 差向异构酶作为酶催化剂以放射化学分析法分析聚合物合成。不添加受体 (w/o) 或添加从细菌细胞收获的 A CPS。在 0、10 和 30min 反应时间之后分析 5 μ l 等分试样。通过下行纸色谱分离样品,并通过闪烁计数测量。B) 将温育 0min 和 60min 之后的反应样品施加到 PAGE 中,并通过阿辛蓝银染色显色。进行包含或不包含 NmA 荚膜多糖 (A CPS) 的反应,表明聚合酶可以在无受体的情况下运作 (重新)。

具体实施方式

[0168] 实施例说明本发明。

[0169] 实施例 1 :质粒

[0170] 分别利用寡核苷酸 KS272(GC GGA TCC GCT GTT ATT ATA TTT GTT AACG) 和 KS273(CCG CTC GAG_TTT TTC TTG GCC AAA AAA CTG),通过 PCR 从质粒 pHC4 和 pHC5(Claus 等人, *Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of Neisseria meningitidis expressing polysialic acid capsules*, *Mol Gen Genet*(1997),257(1):28-34) 中扩增出 CP-W-135 酶(荚膜聚合酶 W-135)和 CP-Y 酶(荚膜聚合酶 Y)。将 PCR 产物连接在源自 pET-22b(Novagen) 的表达载体 pET22b-Strep(Schwarzer 等人, *Characterization of a novel intramolecular chaperone domain conserved in endosialidases and other bacteriophage tail spike and fiber proteins*, *J Biol Chem*(2007),282(5):2821-2831) 的 BamHI 和 XhoI 位点之间。所得构建体(pET22b-Strep-NmW135 和 pET22b-Strep-NmY) 带有 N-端 Strep- 标签 II(其后为凝血酶切割位点),和 C-端 His-6- 标签。通过测序证实所有构建体的序列同一性。利用寡核苷酸 KS422(GC ATCT CAT ATG GCT GTT ATT ATA TTT GTT AAC G) 和 KS273(CCG CTC GAG TTT TTC TTG GCC AAA AAA CTG),从 pHC4 和 pHC5(Claus 等人, *Molecular divergence of the sia locus in different serogroups of Neisseria meningitidis expressing polysialic acid capsules*, *Mol Gen Genet*(1997),257(1):28-34) 中扩增出缺少 N-端 Strep-II- 标签的表达构建体。将 PCR 产物连接在表达载体 pET22b(Novagen) 的 NdeI 和 XhoI 位点之间。利用引物对 KS423(GC GGA TCC ATT ATG AGC AAAATT AGC AAA TTG) 和 KS424(CCG CTC GAG TTG TCC ACT AGG CTG TGA TG),通过 PCR 从基因组血清组 X 奈瑟氏菌 DNA 中扩增出 CP-X 酶(荚膜聚合酶 X)。将 PCR 产物连接到表达载体 pMBP-Strep-NmB- 多聚(poly)ST(Freiburger 等人, *Biochemical characterization of a Neisseria meningitidis polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases*, *Mol Microbiol*(2007),65(5):1258-1275) 的 BamHI 和 XhoI 位点之间,形成质粒 pMBP-XcbA-His。

[0171] 另外,利用引物对 AB20(GCA GAT CTT TTA TAC TTA ATA ACA GAA AAT GGC) 和 AB21(CCG CTC GAG TTT CTCAAATGATGATGG TAA TG),通过 PCR 从基因组血清组 A 奈瑟氏菌 DNA 中扩增出 CP-A(荚膜聚合酶 A)。将 PCR 产物连接在源自 pET-22b(Novagen) 的表达载体 pET22b-Strep(Schwarzer 等人, *J Biol Chem*(2007),282(5):2821-2831) 的 BamHI 和 XhoI 位点之间。所得构建体(pET22b-Strep-NmA) 带有 N-端 Strep- 标签 II(其后为凝血酶切割位点),和 C-端 His-6- 标签。通过测序证实序列同一性。利用引物对 AB22(GCG GAT CCA AAG TCT TAA CCG TCT TTG GC) 和 AB23(CCG CTC GAG TCT ATT CTT TAA TAAAGT TTC TAC A),通过 PCR 从基因组血清组 A 奈瑟氏菌 DNA 中扩增出 UDP-GlcNAc-UDP-ManNAc 差向异构酶(NmA- 差向异构酶)。将 PCR 产物连接在源自 pET-22b(Novagen) 的表达载体 pET22b-Strep(Schwarzer 等人, *J Biol Chem*(2007),282(5):2821-2831) 的 BamHI 和 XhoI 位点之间。所得构建体(pET22b-Strep-NmA 差向异构酶) 带有位于 N-端 Strep- 标签 II(其后为凝血酶切割位点),和 C-端 His-6- 标签。通过测序证实序列同一性。

[0172] 实施例 2 :CP-W-135 和 CP-Y 酶的表达和纯化

[0173] 在 15℃ 和 225rpm 下在含有 100 μ g/ml 羧苄青霉素的自诱导 ZYM-5052 培养基 (Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, Protein Expr Purif(2005), 41(1):207-234) 中培育新转化的大肠杆菌 BL21(DE3) (用 pET22b-Strep-NmW135 或 pET22b-Strep-NmY 转化的)。78h(6000x g, 15min, 4℃) 后收获细胞, 用 PBS 洗涤一次, 存放在 -20℃ 下。将来自 250ml 培养液的细菌颗粒重悬在添加有蛋白酶抑制剂 (40mg/ml 抑氨肽酶 (Bestatin)、1 μ g/ml 胃酶抑素 (Pepstatin) 和 1mM PMSF) 的结合缓冲液 (50mM Tris/HCl pH 8.0, 300mM NaCl) 中, 从而使最终体积为 15ml。通过超声处理破碎细胞, 并对样品进行离心 (16000x g; 30min, 4℃)。过滤 (Sartorius Minisart 0.8 μ m) 裂解液, 并使重组蛋白质结合到 1ml HisTrap 亲和柱 (GE Healthcare) 上。在用 10 个柱体积洗涤缓冲液 (50mM Tris/HCl, pH 8.0, 300mM NaCl, 50mM 咪唑) 洗涤之后, 洗脱 (50mM Tris/HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 150mM 咪唑) 结合的蛋白质。汇集含有重组蛋白质的组分 (流分), 过滤 (Millipore Ultrafree MC 0.2 μ m) 并将其施加到 Superdex 20010/300GL 柱 (GE Healthcare) 上以便进一步通过尺寸排阻色谱纯化。以 0.5ml/min 的流速, 用 50mM Tris/HCl, pH 8.0, 300mM NaCl, 2mM DTT 洗脱蛋白质。利用 Amicon 超离心设备 (Millipore; 50KDa MWC0) 将获得的蛋白质样品浓缩至 2mg/ml, 速冻于液氮中并存放在 -80℃ 下。结果在图 9 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的, 带有 N-端 StrepII 和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO:13 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO:14 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 克隆的, 带有 N-端 StrepII 和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO:15 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO:16 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的, 带有 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO:17 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO:18 中示出。

[0174] 实施例 3A: CP-X 酶的表达和纯化

[0175] 在 15℃ 和 225rpm 下在含有 100 μ g/ml 羧苄青霉素的自诱导 ZYM-5052 培养基 (Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, Protein Expr Purif(2005), 41(1):207-234) 中培育新转化的大肠杆菌 BL21(DE3) (pMBP-XcbA-His)。78h(6000x g, 15min, 4℃) 后收获细胞, 用 PBS 洗涤一次, 存放在 -20℃ 下。将来自 50ml 培养液的细菌颗粒重悬在添加有蛋白酶抑制剂 (40mg/ml 抑氨肽酶、1 μ g/ml 胃酶抑素和 1mM PMSF) 的 5ml 结合缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM DTT) 中。通过超声处理破碎细胞, 并对样品进行离心 (16000x g; 30min, 4℃)。过滤 (Sartorius Minisart 0.8 μ m) 裂解液, 并在室温下使重组蛋白质结合到 1ml 直链淀粉树脂 (New England Biolabs) 上 1h。在用 10 个柱体积结合缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM DTT) 洗涤之后, 洗脱 (20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM DTT, 10mM 麦芽糖) 结合的蛋白质。汇集含有重组蛋白质的组分, 利用 Amicon 超离心设备 (Millipore; 50KDa MWC0) 浓缩至 2mg/ml, 速冻于液氮中并存放在 -80℃ 下。结果在图 10D 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 克隆的, 带有 N-端 MBP 和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO:19 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO:20 中示出。

[0176] 实施例 3B: 通过亲和色谱和尺寸排阻色谱对 CP-X 酶的扩展纯化 (extended purification)

[0177] 对 CP-X 酶进行表达, 按实施例 3 中描述的方式存放。将来自 50ml 培养液的细菌

颗粒重悬在添加有蛋白酶抑制剂 (40mg/ml 抑氨肽酶、1 μ g/ml 胃酶抑素和 1mM PMSF) 的 5ml 结合缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM DTT) 中。通过超声处理破碎细胞, 并对样品进行离心 (16000x g; 30min, 4°C)。过滤 (Sartorius Minisart 0.8 μ m) 裂解液, 并在室温下使重组蛋白质结合到 1ml 直链淀粉树脂 (New England Biolabs) 上 1h。在用 10 个柱体积结合缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM DTT) 洗涤之后, 洗脱 (20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM DTT, 10mM 麦芽糖) 结合的蛋白质。随后汇集含有重组蛋白质的组分, 并将其施加到 Superdex 200 10/300GL 柱上以便进一步通过尺寸排阻色谱纯化。以 1ml/min 的流速, 用 20mM Tris, pH 7.5 完成洗脱。汇集含有重组蛋白质的组分, 利用 Amicon 超离心设备 (Millipore; 50KDa MWC0) 浓缩至 2mg/ml, 速冻于液氮中并存放在 -80°C 下。在整个纯化过程中取出样品, 结果在图 10A-10C 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 克隆的, 带有 N-端 MBP 和 C-端 6xHis-标签的荚膜聚合酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO:19 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO:20 中示出。

[0178] 实施例 4: 血清组 W-135 和血清组 Y CPS 的体外酶促合成

[0179] 在总体积为 37.5 μ l 的情况下, 在反应缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 8.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) 中, 在 1mM CMP-Neu5Ac (GERBU)、2mM UDP-Gal (CP-W-135) 或 UDP-Glc (CP-Y), 以及作为低聚糖受体结构的水解 W-135 CPS (0.16 μ g/ μ l) 存在下分析纯化的酶催化剂 (5-15 μ g)。在室温下温育样品, 按适当的时间间隔加入 1M 蔗糖终止反应。

[0180] 通过 PAGE (25%) 分离合成的产品, 利用联合阿尔辛蓝 / 银染色操作程序进行染色以便证明长 CPS 链的体外合成, 如 (Bergfeld 等人, The polysialic acid-specific O-acetyltransferase OatC from *Neisseria meningitidis* serogroup C evolved apart from other bacterial sialate O-acetyltransferases, J Biol Chem (2009), 284(1): 6-16) 中描述的。简言之, 用 1 体积加样缓冲液 (1M 蔗糖) 稀释样品, 之后将其加到 25% 聚丙烯酰胺凝胶 (89mM Tris, 89mM 硼酸, 2mM EDTA, 25% 聚丙烯酰胺) 上。另外, 施加规定分子大小的标准染料混合物 (0.05% 锥虫蓝 (trypan blue)、0.02% 二甲苯蓝 (Xylene cyanol)、溴酚蓝、溴甲酚紫、酚红), 对该样品进行电泳 (4°C, 23V/cm) 直至酚红带到达凝胶终点。随后固定凝胶 1h (40% EtOH, 5% 乙酸), 并用 0.5% 阿尔新蓝染色 30min。用水除去背景染色, 之后开始 5min 的氧化步骤 (0.7% 高碘酸、40% 乙醇、5% 乙酸)。氧化之后, 凝胶用水洗涤 3 次, 在银染色 (0.6% 硝酸银、20mM NaOH、0.4% NH₄OH) 中温育 10min, 然后再次用水洗涤 3 次。最后将凝胶温育在显色剂 (0.05% 甲醛、240 μ M 柠檬酸) 中, 直至多糖带清晰可见为止。通过在 5% 乙酸溶液中温育中止显色反应。

[0181] 在平行分析中, 分析 CPS 特异性抗体对合成的多糖的识别。在添加蔗糖之前, 将反应液的 5 μ l 等分试样点到 Hybond XL-膜上。干燥膜, 并用干奶粉 (dry-milk) 封闭 (2%, PBS 配制)。通过利用抗 -CPS-W-135 (mAbMNW1-3, (Longworth 等人, O-Acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK, FEMS Immunol Med Microbiol (2002), 32(2): 119-123) 和 抗 -CPS-Y (mAb MNV4-1, (Longworth 等人, O-Acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK, FEMS Immunol Med Microbiol (2002), 32(2): 119-123) 特异性抗体进行的免疫染色, 以及随后的显色反应, 检测结合的 CPS。为了通过红外荧光检测量化, 用 Odyssey 封闭缓冲液 (LI-COR) 封闭膜, 并用

山羊抗小鼠 IR680 (LI-COR) 作为第二抗体 (50ng/ml, 封闭缓冲液中)。然后根据 Odyssey 红外成像系统 (LI-COR) 的指导, 对结合的 CPS 进行量化。结果在图 11 中示出。

[0182] 实施例 5: 血清组 X CPS 体外酶促合成

[0183] 在含有 4mM 氟标记的 UDP-[6-³H]-GlcNAc (2mCi/mmol, Perkin Elmer), 和 2 μ l 完整 NmX 细菌裂解液或无进一步受体的, 总体积为 24 μ l 的反应缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 8.0, 20mM MgCl₂, 2mM DTT) 中, 分析纯化的 CP-X 酶 (5 μ g)。在 37°C 下温育样品, 按适当的时间间隔混合反应溶液的 5 μ l 等分试样与 5 μ l 冷冻乙醇 (96%) 来终止反应。将样品点到 Whatman 3MM CHR 纸上, 并在用 96% 乙醇 / 1M 乙酸铵, pH 7.5 (7 : 3, v/v) 进行下行纸色谱之后通过闪烁计数量化色谱固定氟标记的反应产物。结果在图 12A 中示出。

[0184] 另外, 发现 CP-X 启动聚合物的从头合成。而且, 在将 10 μ l 反应液与 10 μ l 2M 蔗糖混合之后, 还对样品应用 PAGE (25%) 分析, 并在 400V 下电泳 3h。为了显现 [¹⁴C]- 标记的反应产物, 电泳之后立即真空干燥凝胶, 并将其暴露到显像胶片 (成像膜, imaging film) (BioMax, Kodak) 中。结果在图 12B 中示出。

[0185] 实施例 6: 以定义的低聚糖受体为原料体外酶促合成血清组 W-135 和血清组 Y 多糖

[0186] 为了研究 CP-W-135 和 CP-Y 的最小受体底物要求, 测试了一小组定义的低聚糖: α 2,8- 连接的唾液酸单体 (DP1)、二聚体 (DP2) 和三聚体 (DP3) 得自 Nacalai Tesque, W-135CPS 和 Y CPS 由 U. Vogel, Würzburg 赠送。这两种酶 CP-W-135 和 CP-Y 都可以高效地启动以 CPS 受体和定义的 DP3 受体底物为原料的聚合物合成。而且, 还发现 CP-W-135 启动聚合物的从头合成。

[0187] 按所描述 (Vogel 等人, Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B Neisseria meningitidis, Infect Immun 1997, 65(10):4022-4029) 的执行酶分析。在 1mM 放射性碳标记的 CMP-[¹⁴C]Neu5Ac (0.13mCi/mmol, GE Healthcare), 和 2mM UDP-Gal (对于 CP-W-135 而言) 或 UDP-Glc (对于 CP-Y 而言) (这两种碳水化合物都得自 Sigma) 的存在下, 在反应缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 8.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) 中分析纯化的重组蛋白质 (5-15 μ g)。另外, 在 25 μ l 总体积中加入 2mM (低聚) 糖受体或 0.4mg/ml W-135CPS 或 Y CPS。在室温下温育样品, 并按适当的时间间隔混合反应溶液的 5 μ l 等分试样与 5 μ l 冷冻乙醇 (96%) 来测定酶活性。将样品点到 Whatman 3MM CHR 纸上, 并在用 96% 乙醇 / 1M 乙酸铵, pH 7.5 (7 : 3, v/v) 进行下行纸色谱之后通过闪烁计数量化色谱固定 (相中) ¹⁴C 标记的反应产物。结果在图 13 中示出。

[0188] 实施例 7: 嵌合奈瑟氏菌荚膜多糖的体外酶促合成

[0189] 为了合成嵌合多糖, 在总体积为 37.5 μ l 的反应缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 8.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) 中, 在 1mM CMP-Neu5Ac (GERBU)、2mM UDP-Gal (CP-W-135) 或 UDP-Glc (CP-Y), 以及 CPS 受体分子 (0.5-1 μ g/ μ l) 的存在下温育纯化的酶催化剂 (5-15 μ g)。利用下面的酶 / 受体对合成表 1 中指示的嵌合体。

[0190] 表 1

[0191]

嵌合体	荚膜聚合酶	受体
Y/W-135	CP W-135	CPS Y
W-135/Y	CP Y	CPS W-135
B/W135	CP W-135	CPS B
B/Y	CP Y	CPS B
C/W-135	CP W-135	CPS C
C/Y	CP Y	CPS C

[0192] 实施例 8 :一锅 (one-pot)/ 五酶反应的酶 CPS-W-135 合成

[0193] 设计使核苷酸糖汇集物持续再循环的双循环反应。合成 W-135 CPS 的原料是半乳糖 -1P、磷酸烯醇丙酮酸和唾液酸,仅需要催化量的核苷酸。反应路线在图 7 中示出。

[0194] 在反应缓冲液 (200mM Tris/HCl pH 8.5, 20mM MgCl₂, 2mM DTT) 中分析纯化的 CP-W-135 (30 μg), 该反应缓冲液含有 40mM 半乳糖 -1- 磷酸 (GLYCON Biochemicals)、2mM UTP、1mM CTP、20mM 唾液酸 (Neu5Ac, GERBU)、1mM ATP、100mM 磷酸烯醇丙酮酸 (Fluka)、3 μg CMP-Neu5Ac 合成酶 (Gilbert 等人, Biotechnology Letters(1997), 19(5) :417-420)、3U 丙酮酸激酶 (Sigma)、1U 肌球蛋白激酶 (Sigma)、4 μg UDP- 糖磷酸化酶 (Damerow 等人, J Biol Chem(2010), 285(2) :878-887)、2mM DP3 [Neu5Ac-α2→8)-Neu5Ac-α2→8)-Neu5Ac] 和 6mU 无机磷酸酶。在 37℃ 下温育样品, 在适当的时间点通过点印迹分析来分析反应液的 1 μl 等分试样。将该等分试样点到 Hybond XL- 膜上。干燥膜, 并用干奶粉封闭 (2%, PBS 配制)。通过利用抗 -CPS-W-135 (mAb MNW1-3, Longworth 等人, FEMS Immunol Med Microbiol(2002), 32(2) :119-123) 特异性抗体进行的免疫染色, 以及随后的显色反应, 检测结合的 CPS。为了通过红外荧光检测量化, 用 Odyssey 封闭缓冲液 (LI-COR) 封闭膜, 并用山羊抗小鼠 IR680 (LI-COR) 作为第二抗体 (50ng/ml, 封闭缓冲液中)。随后根据 Odyssey 红外成像系统 (LI-COR) 的指导, 对结合的 CPS 进行量化。结果在图 8A 中示出。

[0195] 在另外的分析中, 在反应缓冲液 (250mM Tris/HCl pH 8.0, 40mM MgCl₂, 2mM DTT) 中分析纯化的 CP-W-135 (30 μg), 该反应缓冲液含有 40mM 半乳糖 -1- 磷酸 (GLYCON Biochemicals)、2mM UTP、1mM CTP、20mM 唾液酸 (Neu5Ac, GERBU)、1mM ATP、100mM 磷酸烯醇丙酮酸 (Fluka)、30 μg/ml CMP-Neu5Ac 合成酶 (Gilbert 等人, Biotechnology Letters(1997), 19(5) :417-420)、6U 丙酮酸激酶 (pyruvate kinase) (Sigma)、2.5U 肌球蛋白激酶 (Sigma)、30 μg/ml UDP- 糖磷酸化酶、2mM DP3 [Neu5Ac-α2→8)-Neu5Ac-α2→8)-Neu5Ac] 和 6mU 无机磷酸酶。

[0196] 通过如下面列举的 PAGE 分析样品。为了通过 PAGE (25%) 分析和量化, 分离样品并利用联合阿尔辛蓝 / 银染色操作程序进行染色以便证明长 CPS 链的体外合成, 如 Bergfeld 等人, J Biol Chem(2009), 284(1) :6-16 中描述的。简言之, 用 1 体积加样缓冲液 (1M 蔗

糖) 稀释样品, 之后将其加到 25% 聚丙烯酰胺凝胶 (89mM Tris、89mM 硼酸、2mM EDTA、25% 聚丙烯酰胺) 上。另外, 施加规定分子大小的标准染料混合物 (0.05% 锥虫蓝、0.02% 二甲苯蓝、溴酚蓝、溴甲酚紫、酚红), 对该样品进行电泳 (4℃, 23V/cm) 直至酚红带到达凝胶终点。随后固定凝胶 1h (40% EtOH、5% 乙酸), 并用 0.5% 阿尔新蓝染色 30min。用水除去背景染色, 之后开始 5min 的氧化步骤 (0.7% 高碘酸、40% 乙醇、5% 乙酸)。氧化之后, 凝胶用水洗涤 3 次, 在银染色 (0.6% 硝酸银、20mM NaOH、0.4% NH₄OH) 中温育 10min, 然后再次用水洗涤三次。最后将凝胶温育在显色剂 (0.05% 甲醛、240 μM 柠檬酸) 中, 直至多糖带清晰可见为止。通过在 5% 乙酸溶液中温育中止显色反应。结果在图 8B&C 中示出。为了更好地评价形成的产物量, 在第二轮 PAGE 中加入系列稀释的血清组 W-135CPS。结果在图 8B 和 8C 中示出。

[0197] 实施例 9: His₆- 标记的硕大利什曼原虫 USP 的克隆、表达和纯化

[0198] 利用分别含有 NdeI 和 NotI 的整合限制位点的引物组 ACL115 (CTG ACT CCA TAT GAC GAA CCC GTC CAA CTC C) 和 ACL116 (CTT AGC GGC CGC ATC AAC TTT GCC GGG TCA GCC G) 扩增硕大利什曼原虫焦磷酸化酶 (LmjF17.1160) (Damerow 等人, J Biol Chem (2010), 285(2):878-887) 的整个开放阅读框, 并将其插入到含有 C-端 His₆- 标签的 pET22b 表达载体 (Novagen) 中。为了重组表达, 通过热冲击 (heat shock) 将该载体转化到 Ca²⁺- 感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。于 37℃ 在 Power Broth (AthenaES) 中培育细胞至 OD 为 1.0, 将其转移到 15℃ 下并在 1.2OD 下通过加入 1mM 异丙基-β-D- 硫代半乳糖吡喃糖苷诱导表达。20h 后, 通过离心 (6000x g, 15min, 4℃) 收获细胞, 用磷酸盐缓冲盐水洗涤。

[0199] 将从 500mL Power Broth 溶液中获取的细菌颗粒重悬在 15mL Ni²⁺- 螯合 (捕获, chelating) 缓冲液 A_{Ni} (50mM Tris/HCl pH 7.8, 300mM NaCl) 中, 该螯合缓冲液包含蛋白酶抑制剂 (40 μg/mL 抑氨肽酶 (Sigma)、4 μg/mL 胃酶抑素 (Sigma)、0.5 μg/mL 亮抑酶肽 (Serva) 和 1mM 苯甲基磺酰氟 (Roche Applied Science))。利用微尖端 (microtip) (Branson Sonifier, 50% 占空比, 输出调节 5, 8 个 30s 脉冲, 持续 8min) 通过超声处理裂解细胞, 通过离心 (20,000x g, 15min, 4℃) 除去细胞碎片。将可溶性组分加到 1mL HisTrap HPNi²⁺- 螯合柱 (GE Healthcare) 上。在用 20mL 缓冲液 A_{Ni} (50mM Tris/HCl pH 8, 300mM NaCl) 洗涤之后, 用 20mL 含有 40mM 咪唑的缓冲液 A_{Ni} 洗脱该柱, 接着执行 5mL 含有 300mM 咪唑的缓冲液 A_{Ni} 的最终洗脱步骤。汇集含有硕大利什曼原虫 USP 的组分, 使其通过 HiPrep 26/10 脱盐柱 (GE Healthcare) 从而将缓冲液 A_{Ni} 替换为缓冲液 A_Q (50mM Tris/HCl pH 8.0)。然后将该样品加到 1mL Q- 琼脂糖 (Sephacrose) FF 阴离子交换柱 (GE Healthcare) 上, 接连地用 20mL 缓冲液 A_Q、20mL 含有 100mM NaCl 的缓冲液 A_Q 及最后的 5mL 体积含有 300mM NaCl 的缓冲液 A_Q 洗涤和洗脱该柱。再次, 汇集含有重组硕大利什曼原虫 USP 的组分, 并经由 HiPrep 26/10 柱将其替换为标准缓冲液 (Tris/HCl pH 7.8, 10mM MgCl₂)。将纯化的样品速冻于液氮中, 存放于 -80℃ 下标准缓冲液中。

[0200] 按照先前描述的 (Lamerz 等人, J Biol Chem 2006, 281:16314-16322), 执行大肠杆菌 DEV6galU 突变株的互补 (complementation)。

[0201] 实施例 10: 尺寸排阻色谱

[0202] 在 Superdex 200 10/300GL 柱 (10×300mm) (GE Healthcare) 上进行尺寸排阻色谱, 从而测定重组硕大利什曼原虫 USP 的四级结构 (Damerow 等人., J Biol Chem (2010),

285(2):878-887)。用 50mL 标准缓冲液 (50mM Tris/HCl, pH 7.8, 10mM MgCl₂) 平衡该柱, 在该柱子中加入 100 μL 下列标准蛋白质中的一种: 牛碳酸酐酶 (3mg/mL)、牛血清白蛋白 (10mg/mL)、酵母乙醇脱氢酶 (5mg/mL)、马铃薯-β-淀粉酶 (4mg/mL) 和甲状腺球蛋白 (3mg/mL) (蛋白质标准试剂盒, Sigma), 或者加入纯化的重组 His₆- 标记的硕大利什曼原虫 USP (4mg/mL), 并以 1mL/min 流速洗脱。通过标准曲线确定表观分子量。

[0203] 实施例 11: 体外焦磷酸化酶的酶分析

[0204] 利用 EnzChek® Pyrophosphate Assay Kit (Molecular Probes) 检测正反应中焦磷酸盐的形成。分析培养基含有 50mM Tris/HCl pH 7.8、10mM MgCl₂、1mM DTT、0.2mM 2-氨基-6-巯基-7-甲基嘌呤核糖核苷 (MESG)、0.03 单位的 APP、2.0 单位的 PNP 和 0.5 ~ 3mM 范围内的变化量的糖-1-磷酸和 UTP。酶反应于 25°C 在 100 μL 总体积中执行, 并通过加入硕大利什曼原虫 USP (Damerow 等人, J Biol Chem (2010), 285(2):878-887) 启动。无 USP 的对照用于归一化。

[0205] 在 ATP、L-Gln 和辅助因子 GTP 的存在下通过大肠杆菌胞苷三磷酸 (CTP)- 合成酶将逆反应产生的 UTP 转化成 1 当量的无机磷酸盐。然后利用 EnzChek® Pyrophosphate Assay Kit (Molecular Probes), 但不包括第一偶联酶, 对无机磷酸盐进行量化。对于这些实验, 利用包含 Nde I 和 NotI 限制位点的引物组 (SD13: CTT ACA TAT GCA TCA TCA TCA TCA TCA CGC TAG CGG ATC CAT GAC AAC GAA CTA TAT TTT TGT GAC C, SD14: CTT AGC GGC CGC TTA CTT CGC CTG ACG TTT CTG G), 在 pET22b 表达载体中从大肠杆菌 XL1-Blue 重组克隆 CTP- 合成酶基因。进行 N- 端 His- 标记的 CTP- 合成酶的表达, 并按针对 USP 描述的方法纯化, 但没有进行离子交换色谱处理。逆反应的分析混合物包含 50mM Tris/HCl pH 7.8、10mM MgCl₂、1mM DTT、0.2mM MESG、1mM ATP、1mM L-Gln、0.25mM GTP、3 μg CTP- 合成酶、2.0 单位的 PNP 和 2mM UDP- 糖以及焦磷酸盐, 最终体积为 100 μL。该反应通过加入 USP 启动, 并利用缓冲液对照进行归一化。

[0206] 利用 Power-Wave™ 340KC4 System (Bio-Tek) 在 96- 孔半区 (half-area) 平底微孔板 (Greiner Bio-One) 中进行测量。为了排除交叉反应, 测试偶联酶的所有底物和辅助因子对抗 USP 抑制或竞争的能力, 反之亦然 (未示出)。K_m 和 V_{max} 值利用变化的底物浓度确定, 该底物具有多达 12 种浓度, 一式三份, 而第二底物的浓度设定为恒定饱和浓度。将最初线性速率 (y) 对底物浓度 (x) 作图, 并利用非线性回归 ($y = V_{max} \cdot x / (K_m + x)$) 在 PRISM 中分析 Michaelis-Menten 动力学。

[0207] 实施例 12: SDS-PAGE 分析和免疫印迹

[0208] 根据 Laemmli (Laemmli, Nature 1970, 227:680) 执行 SDS-PAGE。在由 5% 积层凝胶 (stacking gel) 和 10% 分离凝胶组成的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白质样品。通过考马斯亮蓝染色显现蛋白质带。对于 Western 印迹分析, 将蛋白质转移到硝基纤维素膜 (Schleicher & Schüll GmbH) 上。利用浓度为 1 μg/mL 的 5-His 抗体 (Qiagen) 和山羊抗小鼠 Ig 碱性磷酸酶结合物 (Jackson ImmunoResearch) 检测 His₆- 标记的蛋白质。

[0209] 实施例 13: STD-NMR

[0210] 在 298K 下, 在装配有三轴冷冻探针的 Bruker Avance DRX 600MHz 光谱仪上在 50mM 氘化 TRIS 缓冲液, pH 7.8 和 10mM MgCl₂ 中执行所有 STD NMR 实验。利用级联的 40 个持续 50ms 的选择性高斯型脉冲使该蛋白质饱和, 每个脉冲之间延迟 100 μs, 导致总饱和时

间为 ~ 2 s。将共振 (on-resonance) 和偏离共振 (off-resonance) 频率分别设为 0.7ppm 和 40ppm。在典型 STD NMR 实验中,使用 0.5 μ M 重组 UPS,并按 1 : 100 的分子比 (蛋白质 / 配体) 添加所有调查的配体。每个 STD-NMR 实验总共需要 1024 次扫描,利用 WATERGATE 序列抑制残留的 H₂O 信号。施加强度为 5kHz,持续时间为 10ms 的自旋锁滤波器 (spin lock filter) 抑制蛋白质背景。根据等式 $A_{\text{STD}} = (I_0 - I_{\text{sat}}) / I_0 = I_{\text{STD}} / I_0$,通过对 STD-NMR 光谱的信号强度 (I_{STD}) 和参考光谱信号强度 (I_0) 进行比较,计算相对 SET 效应。将强度最高的 STD 信号设为 100%,并相应地计算其它 STD 信号 (Mayer 等人, Journal of the American Chemical Society 2001,123 :6108-6117)。

[0211] 实施例 14 :嵌合荚膜多糖血清组 B/W-135CPS 的检测

[0212] 将 ELISA- 板 (Falcon REF :353911 柔性) 用 20 μ l 10 μ g/ml 在 PBS 中的钝化内切唾液酸酶 (inactive Endosialidase) (Schwarzer 等人, J Biol Chem(2009),284(14) :9465-9474) 预先包被 90min。通过在 4 $^{\circ}$ C 下温育 175 μ l 1% BSA 16 小时,使该板表面饱和。25 $^{\circ}$ C 下将包含血清组 B CPS 作为如实施例 7 中描述的嵌合 CPS 的至少一种组分的反应混合物吸附在该板表面至少 1h。在三个连续的 PBS 洗涤步骤之后,25 $^{\circ}$ C 下将孔与 5 μ g/ml 在 1% BSA/PBS 中的第一抗体 mAb MNW1-3, (Longworth 等人, FEMS Immunol Med Microbiol(2002),32(2) :119-123) 或 mAb 735 (Frosch 等人, Proc Natl Acad Sci U S A(1985),82(4) :1194-1198.) 一起温育 1h。检测 (i)NmW-135CPS(mAb MNW1-3) 或 (ii)NmB CPS(mAb 735)。为了显色,按 20 μ l/ 孔的最终体积,使用推荐浓度的在含有 PBS 的 1% BSA 中的第二抗体抗小鼠 POX (SothornBiotech 1010-05)80min。在每个抗体温育之后,施加三个 PBS 洗涤步骤。通过施加 ABTS (Roche) 完成显色,如它的手册中描述的。这个分析结果在图 19A 中示出。

[0213] 实施例 15 :嵌合荚膜多糖血清组 B/Y CPS 的检测

[0214] 将 ELISA- 板 (Falcon REF :353911 柔性) 用 20 μ l 10 μ g/ml 在 PBS 中的钝化内切唾液酸酶 (Schwarzer 等人, J Biol Chem(2009),284(14) :9465-9474) 预先包被 90min。通过在 4 $^{\circ}$ C 下温育 175 μ l 1% BSA 16 小时,使该板表面饱和。25 $^{\circ}$ C 下将包含血清组 B CPS 作为如实施例 7 中描述的嵌合 CPS 的至少一种组分的反应混合物吸附在该板表面至少 1h。在三个连续的 PBS 洗涤步骤之后,在 25 $^{\circ}$ C 下将孔与 5 μ g/ml 在 1% BSA/PBS 中的第一抗体 mAb MNY4-1, (Longworth 等人, FEMS Immunol Med Microbiol(2002),32(2) :119-123) 或 mAb 735 (Frosch 等人, Proc Natl Acad Sci U S A(1985),82(4) :1194-1198.) 一起温育 1h。检测 (i)NmY CPS(mAb MNY4-1) 或 (ii)NmB CPS(mAb 735)。为了显色,按 20 μ l/ 孔的最终体积,使用推荐浓度的在含有 PBS 的 1% BSA 中的二级抗体抗小鼠 POX (SothornBiotech 1010-05)80min。在每个抗体温育之后,施加三个 PBS 洗涤步骤。通过施加 ABTS (Roche) 完成显色,如它的手册中描述的。这个分析结果在图 19B 中示出。

[0215] 实施例 16 :CP-A 和 NmA- 差向异构酶的表达和纯化

[0216] 在 15 $^{\circ}$ C 和 225rpm 下在含有 100 μ g/ml 羧苄青霉素的 PowerBroth (Athena) 培养基中,培育用 pET22b-Strep-NmA 或 pET22b-Strep-NmA 差向异构酶新转化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 至光密度 OD₆₀₀ 为 1.8,之后才与 0.1mM IPTG 一起温育。24h (6000x g,15min, 4 $^{\circ}$ C) 后收获细胞,用 PBS 洗涤一次,存放在 -20 $^{\circ}$ C 下。将来自 500ml 培养液的细菌颗粒重悬在添加有蛋白酶抑制剂 (40mg/ml 抑氨肽酶、1 μ g/ml 胃酶抑素和 1mM PMSF) 的结合缓冲液

(50mM Tris/HCl pH 8.0, 300mM NaCl) 中, 从而使最终体积为 20ml。通过超声处理破碎细胞, 并对样品进行离心 (16000x g; 30min, 4°C)。过滤 (Sartorius Minisart 0.8 μm) 裂解液, 并使重组蛋白质结合到 1ml HisTrap 亲和柱 (GE Healthcare) 上。在用 10 个柱体积洗涤缓冲液 (50mM Tris/HCl, pH 8.0, 300mM NaCl, 和 50mM 咪唑) 洗涤之后, 洗脱 (50mM Tris/HCl pH 8.0, 300mM NaCl, 150mM 咪唑) 结合的蛋白质。汇集含有重组蛋白质的组分, 过滤 (Millipore Ultrafree MC 0.2 μm) 并将其施加到 Hi Prep 26/10 脱盐柱 (GE Healthcare) 上以便进一步纯化。以 1ml/min 的流速, 用 50mM Tris/HCl, pH 8.0, 50mM NaCl 洗脱蛋白质。利用 Amicon 超离心设备 (Millipore; 30KDa MWC0) 将获得的蛋白质样品浓缩至 6mg/ml, 速冻于液氮中并存放在 -80°C 下。结果在图 20 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的, 带有 N-端 StrepII 和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 21 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO: 22 中示出。从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的, 带有 N-端 StrepII 和 C-端 6xHis- 标签的 UDP-GlcNAc- 差向异构酶的核苷酸序列在 SEQ ID NO: 23 中示出, 相应的多肽序列在 SEQ ID NO: 24 中示出。

[0217] 实施例 17: 血清组 A CPS 的体外酶促合成

[0218] 在总体积为 25 μl 的反应缓冲液 (50mM Tris/HCl pH 8.0, 50mM MgCl₂, 5mM DTT) 中分析纯化的 CP-A (5 μg) 和 NmA UDP-GlcNAc 差向异构酶 (5 μg), 该反应缓冲液含有 2mM [¹⁴C] 标记的 UDP-[¹⁴C]-GlcNAc, (Perkin Elmer), 和 3 μl NmA 荚膜多糖 (由 U. Vogel, Würzburg 赠送) 或无进一步受体。在 37°C 下温育样品, 按适当的时间间隔混合反应溶液的 5 μl 等分试样与 5 μl 冷冻乙醇 (96%) 来终止反应。将样品点到 Whatman 3MM CHR 纸上, 并在用 96% 乙醇 / 1M 乙酸铵, pH 7.5 (7 : 3, v/v) 进行下行纸色谱之后通过闪烁计数量化色谱固定放射性标记的反应产物。结果在图 21A 中示出。而且, 还发现 CP-A 启动聚合物的从头合成。利用非放射性标记的底物进行相同的反应, 并按适当的时间间隔混合反应溶液的 10 μl 等分试样与 10 μl 2M 蔗糖来终止反应。将样品存放在 -20°C。通过 PAGE (25%) 分离样品, 并利用联合阿尔辛蓝 / 银染色操作程序进行染色以便证明长 CPS 链的体外合成, 如 (Bergfeld 等人, J Biol Chem (2009), 284 (1) : 6-16) 中描述的。简言之, 用 1 体积加样缓冲液 (1M 蔗糖) 稀释样品, 之后将其加到 25% 聚丙烯酰胺凝胶 (89mM Tris, 89mM 硼酸、2mM EDTA、25% 聚丙烯酰胺) 上。另外, 施加规定分子大小的标准染料混合物 (0.05% 锥虫蓝、0.02% 二甲苯蓝、溴酚蓝、溴甲酚紫、酚红), 对该样品进行电泳 (4°C, 23V/cm) 直至酚红带到达凝胶终点。随后固定凝胶 1h (40% EtOH, 5% 乙酸), 并用 0.5% 阿尔新蓝染色 30min。用水除去背景染色, 之后开始 5min 的氧化步骤 (0.7% 高碘酸、40% 乙醇、5% 乙酸)。氧化之后, 凝胶用水洗涤 3 次, 在银染色剂 (0.6% 硝酸银、20mM NaOH、0.4% NH₄OH) 中温育 10min, 然后再次用水洗涤三次。最后将凝胶温育在显色剂 (0.05% 甲醛、240 μM 柠檬酸) 中, 直至多糖带清晰可见为止。通过在 5% 乙酸溶液中温育中止显色反应。结果在图 21B 中示出。再次, 发现 CP-A 启动聚合物的从头合成。

[0219] 本说明书中涉及的序列:

[0220] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的荚膜聚合酶, 编码序列]

[0221] >CP_NmW135_cds(Y13970).seq SEQ ID NO: 1

[0222] atggctgttattatattttgttaacggaattcgggctgtaaatggccttgttaaatacatctatcaataact
gcaaacgcttttggctgaagaaggactggatgttcatttaattttgttggaatattactggagcagagcattt

atacccccattccacttacatcccaatgtcaaaacctccagcatcatagattttatttaatgacattccagaaaatg
ttagctgccgaataactcctttttattctattcatcaacaattcttcaaagctgaatatagtgccactataagcat
gttttgatgaaaattgaatctttattatctgcagaagatagcattatcttcactcatcctcttcaactggaaatgta
tcgttttagcgaataatgatatacaagtcaaaagccaaactaatgtacaaattcatggtaattatatggaagaaatcc
ataactatgaaattttggcacgaaatatcgattatgttgactatcttcaaacgggtatctgatgaaatgctggaagaa
atgcattcccattttcaaaatcaaaaaagacaaattagtttttattccaaacatcacttatccatttcattagaaaa
aaaagaagctgatttctttattaaggataatgaagacatcgataatgctcagaaatttaaactgtatctctattgttg
gcgacattcagccaagaaaaaaccaattggatgccattaaaatcatcaataaaattaaaaatgaaaattacatttta
cagatatatggcaaatctattaataaagattactttgaattaattaaaaatatattaaagacaataagttacaaaa
ccgtatcttattcaaaggtgaatcttccgagcaggaaatttatgaaaatacagatatcctgatcatgacatcagaaa
gtgagggatttccatatatatttatggaaggcatgggtgatgatattccaatcggtgtatatgatgttttaatatgga
gcgaatgattacagtaactataatgaaaatgggtgtgtttttaaaactgggtgatatttctggaatggcaaaaaaat
aattgagctattaaataaccagaaaaatataaagaattagttcaatataatcacaatcgcttcttaaaagaatatg
caaaagatgtgggttatggctaaatatcttactattcttccgcgcagctttaataacgtatcattatcgctctgcttcc
agccgaaaagaattggacgaattccaaaatattactttttctattgaagattctaattagctcatatttgga
tttcgagctaaccaatcctgcacaaaatatgaattttttgcttttagttggcaagcgaaaatttccaatggatgctc
atatccaaggaacacagtgtagcattaagatagctcataaaaagacagggaatttatgtcgcttttactaaaaaaa
cgaaatcagttgaatttatcaaggggatataaccttaattgcagaagataatagctatgaaaaatatattggagcaat
atctaataaaggtaactttgaaattattgcaataaaaaagagctcattagttactataaacaagaatccttagagt
tgcatgagattccccatgaactacatcagaataaattactgattgctttacccaacatgcaaacgcctctaaaaatt
actgatgataatttaataacctatccaagcctccataaaattagaaaagattggaaatacttattacctatgtttctt
gccatctggcatatttaataatatctgcttagattacggtgaagaatccaaaattattaatttttagtaaatattctt
ataaatatatctatgactcaattcgctcatattgagcaacatacagatatatcggtatattatcggttgcaatgtttat
tcttggaacttatctgtgcctcagttattgagagccttatggaatttaccggaaaatgggaaaaacactttcagac
ttctcctaaaattgattatcgatttgatcatgaaggtaagcggtcgatggatgatgtcttttcagaagaaacatttta
ttatggaatttccgcgtaaaaaatgggtatagataagaaaacagcagccttccaaaatataccaaacagtattgtaatg
gagtatccgcagaccaatgggttacagtatgcgcagtcattcactgaaaagtaatgtagttgcggcaaaacattttct
tgaaaaattaaataaaattaaggtagatatataatttaaaaaagcatgaccttgcaaacatcaaaaaaatgaatcgaa
ttatttatgagcatttaggcattaacataaatatcgaagcatttctaaaaccacgattagaaaaatttaagcgtgaa
gaaaaatattttcatgatttcttcaaaagaaataattttaaaagaggtaatttttccaagcacttattggaatccagg
tattattttgtgctgcacataaacaaggtatttaaggtatctgatattcaatatgctgccattactccttatcatcctg
cgtat tttaaatcaccaaaatcacattacgttgctgataaattgttcttatgggtctgaatattggaatcatgagctt
ttaccaaatccaacacgagagattgggttctgggtgccgcatattgggtatgcattagatgatgtgagattttcagaaaa
actgaattatgactatatctttctatctcaaagtaggatttcttcgcgcttgcttagttttgcaattgagtttgcat
taaaaaatcctcaactacagctttttattttctaagcatccagatgaaaaatatagatttaaaagaacagaattattcct
gataatcttataatctccacggaatcttctatacaaggcatcaatgaatctcgcgttgctgttaggtgtttattcaac
tagcttattttgaggcattagcatgcggcaaaacaaacttttgggtgtaaatatccgggatatgaaattatgtcaaat
gaaatagattcagggttattctttgcagtagaaaacacctgaagaaatgcttgagaaaacaagccgaattgggtggc
tgtggcagatattgaaaaccagtttttttgccaagaaaaataa

[0223] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的荚膜聚合酶, 氨基酸序列]

[0224] >CP_NmW135_(Y13970).pro SEQ ID NO :2

[0225] MAVIIFVNGIRAVNGLVKSSINTANAFEEGLDVHLINFGVGNITGAEHLYPPFHLHPNVKTSSIIDLFDIPENVSCRNTPFYSIHQFFKAEYSAHYKHVLMKIESLLSAEDSIFTHPLQLEMYRLANNDIKSKAKLIVQIHGNYMEEIHNYEILARNIDYVDYLQTVSDEMLEEMHSHFKIKKDKLVFIPNITYPISLEKKEADFFIKDNEDIDNAQKFKRISIVGSIQPRKNQLDAIKIINKIKNENYILQIYGKSINKDYFELIKKYIKDNKLQNRILFKGESSEQEIYENTDILIMTSESEGFPIYFMEGMVYDIPIVVYDFKYGANDYSNYNENGCVFKTGDISGMAKKIIELLNNPEKYKELVQYNHNRFLKEYAKDVVMKAYFTILPRSFNNVSLSSAFSRKELDEFQNTFSIEDSNDLAHIWNFELTNPAQNMNFFALVGKRKFPMDAHIQGTQCTIKIAHKKTGNLLSLLLKKRNQLNLSRGYTLIAEDNSYEKYIGAISNKGNFEEIANKKSSLVTINKSTLELHEIPHELHQNKLLIALPNMQTPLKITDDNLIPIQASIKLEKIGNTYYPCFLPSGIFNNICLDYGEESKIIINFSKYSYKIYDSIRHIEQHTDISDIIVCNVYSWELIRASVIESLMEFTGKWEKHFQTSPKIDYRFDHEGKRSMDDVFSEETFIMEFPRKNGIDKKTAAAFQNPNSIVMEYPQTNGYSMRSHLSKSNVVAAKHFLEKLNKIKVDIKFKKHDLANIKKMNRITIEHLGININIEAFLKPRLEKFKREEKYFHDFFRNNFKEVIFPSTYWNPGIICAHKQGIKVSQIYAAITPYHPAYFKSPKSHYVADKLFLWSEYWNHELLPNPTREIGSGAAYWYALDDVRFSEKLNQDYIFLSQSRISSRLLSFAIEFALKNPQLQLFSKHPDENIDLKNRIIPDNLIISTESSIQGINESRVAVGVYSTSLFEALACGKQTFVVKYPGYEIMSNEIDSGLFFAVETPEEMLEKTSPNWWAVADIENQFFGQEK

[0226] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 克隆的荚膜聚合酶, 编码序列]

[0227] >CP_NmY_cds(Y13969).seq SEQ ID NO :3

[0228] atggctgttattatatttgttaacggaattcgggctgtaaattggccttgttaaattcatctatcaatactgcaaacgcttttgcgtgaagaaggactggatgttcatttaattatttggcgaatattactggagcagagcatttatccccccattccacttacatcccaatgtcaaaacctccagcatcatagatttatttaattgacattccagaaaaatttagctgccgaaatatccctttttattctatccatcaacaattcttcaaagccgaatacagtgcccactataagcatttttgatgaaaattgaatctttattatctgaagaagatagcattatcttcactcactcctcttcaactggaaatgtatcgtttagcgaataataatattaagtcaaaagccaagctaattgtacaaattcatggtaactatatggaagaaatccataactatgaaatttgggcacgaaatatcgattatgttgattatcttcaaacggtatctgatgaaatgctggaagaaatgcattcccatttcaaaatcaaaaaagacaaattagttttattccaaacatcacttatccatttcattagaaaaaaaagaagctgatttctttattaaggataatgaagacattgataatgctcagaaatttaaagctatctctattgttgagcatttcagccaagaaaaaaccaattggatgccattaaaatcatcaataaaattaaaaatgaaaattacattttacagatatatggcaaatctattaataaagattactttgaattaattaaaaatatattaaagacaataagttacaaaaacgtatcttatttcaaaggtgaatcttccgagcaggaaatttatgagaatacagatatecctaattcatgacatctcaaaagcgaaggctttggttatatatttctagagggtatgggtgtacgatatecctatccttgccctataattttaaatatggagcaatgatttttagcaattataatgaaaacgcttcagtttttaaaactggatatttctggaatggcaaaaaaataattgagctattaaataaccagaaaaatataaagaattagttcaatataatcacatcgcttcttaaagaatatgcaaaagatgtggttatggctaaatatcttactattcttccgcgcagctttaataacgtatcattatcgctctgctttcagccgaaaagaattggacgaattccaaaatattactttttctattgaagattcctaatttagctcatattttggaaatttcgagctaaccaatcctgcacaaaatatgaattttttgcttttagttggcaagcgaaaatttccaatggatgctcatatccaaggaacacagtgtagcattaagatagctcataaaaaagacagggaatttattgtcgcttttactaaaaaaacgaaatcagttgaatttatcaaggggatataaccttaattgcagaagataatagctatgaaaaatatattggagcaatatctaataaaggtaactttgaaattattgcaataaaaaagaactcatttagttactataaacaagaatccttagagt

tgcatgagattccccatgaactacatcagaataaattactgattgctttaccaacatgcaaacgcctctaaaaatt
actgatgataattttaatacctatccaagcctccataaaattagaaaagattggaaatacttattacccatgtttctt
gccatctggcatattttaataatatctgcttagattacgggtgaagaatccaaaattattaatttttagtaaatattctt
ataaatatatctatgactcaattcgtcatattgagcaacatacagatatatcggatattatcgtttgcaatgtttat
tcttggaacttattcgtgcctcagttattgagagccttatggaatttacgggaaaatgggaaaaacactttcagac
ttctcctaaaattgattatcgatttgatcatgaaggtaagcgttcgatggatgatgtcttttcagaagaacatttta
ttatggaatttccgcgtaaaaatgggtatagataagaaaacagcagccttccaaaataaccaaacagtattgtaatg
gagtatccgcagaccaatgggttacagtatgcgcagtcattcactgaaaagtaatgtagttgctggcgaacattttct
tgaaaaattaaataaaattaaggtagatatataaatttaaaaagcatgaccttgcaaacatcaaaaaatgaatcgaa
ttatttatgagcatttaggcattaacataaataatcgaagcatttctaaaaccagattagaaaaatttaagcgtgaa
gaaaaatattttcatgatttcttcaaaagaaataattttaagaggtaatttttccaagcacttattggaatccagg
tattatttgtgctgcacataaacaaggtatttaaggtatctgatattcaatatgctgccattactccttatcatcctg
cgtatttttaaatcaccaaaatcacattacgttgctgataaattgttcttatggctgaatattggaatcatgagctt
ttaccaaatccaacacgagagattgggttctgggtgccgcataattgggtatgcattagatgatgtgagattttcagaaaa
actgaattatgactatatctttctatctcaaagtaggatttcttcgcgcttgcttagttttgcaattgagtttgc
taaaaaatcctcaactacagctttttattttctaagcatctagatgaaaatatagatttaagaacagaattattcct
gataatcttataatctccacggaatcttctatacaaggcatcaatgaatctcgcgttgctgtaggtgtttattcaac
tagcttattttgaggcatttagcatgcggcaaaacaaacttttgttggttaaataatccgggatatgaaattatgtcaaat
gaaatagattcagggttatttcttgcagtagaaacacctgaagaaatgcttgagaaaacaagcccgaaattgggtggc
tgtggcagatatgaaaaccagttttttggccaagaaaaataa

[0229] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 克隆的荚膜聚合酶, 氨基酸序列]

[0230] >CP_NmY_(Y13969).pro SEQ ID NO:4

[0231] MAVIIFVNGIRAVNGLVKSSINTANAFEEGLDVHLINFGVNGITGAEHLSPPFHLHPNVKTSSIIDLFN
DIPENVSCRNIPFYSIHQQFFKAEYSAHYKHVLMKIESLLSEEDSIIFTHPLQLEMYRLANNNIKSKAKLIVQIHGN
YMEEIHNYEIWARNIDYVDYLQTVSDEMLEEMHSHFKIKKDKLVFIPNITYPISLEKKEADFFIKDNEDIDNAQKFK
RISIVGSIQPRKNQLDAIKIINKIKNENYILQIYGKSINKDYFELIKKYIKDNKLQNRILFKGESSEQEIYENTDIL
IMTSQSEFGYIFLEGMVYDIPILAYNFKYGANDFSNYNENASVFKTGDISGMAKKIIELLNNPEKYKELVQYNHNR
FLKEYAKDVVMKYFTILPRSFNNVSLSSAFSRKELDEFQNI TFSIEDSNDLAHIWNFELTNPAQNMNFFALVGKRK
FPMDAHIQGTQCTIKIAHKKTGNLLSLLLKRNQLNLSRGYTLIAEDNSYEKYIGAISNKGNF E IANKKNSLVTIN
KSTLELHEIPHELHQNKLLIALPNMQTPLKITDDNLIPIQASIKLEKIGNTYYP C FLPSGIFNNICLDYGEESKIIN
FSKYSYKYIYDSIRHIEQHTDISDIIVCNVYSWELIRASVIESLMEFTGKWEKHFQTSPKIDYRFDHEGKRSMDDVF
SEETFIMEFPRKNGIDKKTA AFQNI P NSIVMEYPQTNGYSMRSHSLKSNVVA AKHFLEKLNKIKVDIKFKKHDLANI
KKMNRIIYEHLGININIEAFLKPRLEKFKREEKYFHDFFRNNFKEVIFPSTYWNPGIICA AHKQG I KVS DIQYAAI
TPYHPAYFKSPKSHYVADKLFLWSEYWNHELLPNPTREIGSGAAYWYALDDVRFSEKLN DYDI FLSQSRISSRLLSF
AIEFALKNPQLQLLSKHLDENIDLKNRIIPDNLII STESSI QGINESRVAVGVYSTSLFEALACGKQTFVVKYPGY
EIMSNEIDSGLFFAVETPEEMLEKTS PNWVAVADIENQFFGQEK。

[0232] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 克隆的荚膜聚合酶, 编码序列]

[0233] >CP_NmX_cds(AAP44500).seq SEQ ID NO:5

[0234] atgattatgagcaaaattagcaaattggtaaccacccaaaccttttctttcgagattattttcttaaaa

aaagcacccgttaaattatggcgaaaatattaaacctttaccagtcgaaacctcttctcatagcaaaaaaatacagc
ccataaaacacccgtatcatccgaccaaccaattgaagatccataccagtaacatttccaattgatgtagtttata
cttgggtagattcagatgatgaaaaattcaatgaagaacgcctaaagtttcaaaattcaagcacatctgagactcta
caaggcaaagcagaaagcaccgatattgcaagattccaatcacgcgacgaattaaaatttcgattcgaagcctgat
gaagtatgccccatgggtaaatcatattttacattgtaacaaatgggtcaaataccaaaatgggttagataccaacaata
caaaggtaacgattatccctcactcaactattatcgacagtcgaatttctccctacttttaattctcagtcattgaa
tcctctctatataaaaatccaggattatcagagcattacatttatttcaatgatgatgtcatgctagctagagattt
aagcccatcttatttctttacaagcagcggattagcaaaactgtttattaccaactctcgtctaccaaatggctata
agaatgtgaaagacacaccaaccaatgggcctcaaaaaattcccgtgagcttttacatgcagaaacaggattttgg
gctgaagccatgtttgcacatacttttcatccacaacgtaaaagtgtacatgaatctattgaacacctatggcatga
acaattaaatgtttgtcgtcaaaaccgtttccgtgataatttcagatattaacatggcgacattcctgcaccaccatt
ttgccattttgacaggccaagctcttgctacacgcactaaatgtattttactttaacgttcgctctcctcaagcagct
cagcattacaaaacattatttagctcgaaaaggaagcgaatacagcccacattctatctgcttaaattgatcatacatc
gagcaataaaaaatattttatctaattacgaagccaaattacaaagcttttttagaaacatactatccagatgtatcag
aagcagaaattctccttctactaaatctgaagtagctgaattagttaaacataaagattatttaactgtatatact
aaattattacctattatcaataagcagctgggtcaataaataataaaaccttattcatatcttttctattatttagg
tttatctgcccggtttttatttgaagaaacgcaacaagaacactaccgggaaactgctgaagaaaatttacaaatct
tttgtggcctaaacccaaaacatacactagccctcaaatacttagcggatgtcacccctcatcagccttagtgga
caataa。

[0235] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 克隆的荚膜聚合酶, 氨基酸序列]

[0236] >CP_NmX_(AAP44500).pro SEQ ID NO :6

[0237] MIMSKISKLVTHPNLFFRDYFLKKAPLNYGENIKPLPVETSSHSKNTAHKTPVSSDQPIEDPYPVTFP
IDVVYTWVDSDEKFNELKFKQNSSTSETLQGKAESTDIARFQSRDELKYSIRSLMKYAPWVNHIYIVTNGQIPKW
LDTNNTKVTIIPHSTIIDSQFLPTFNSHVISSLYKIPGLSEHYIYFNDDVMLARDLSPSYFFTSSGLAKLFITNSR
LPNGYKNVKDPTPTQWASKNSRELLHAETGFWAEAMFAHTFHPQRKSVHESIEHLWHEQLNVCRQNRFRDISDINMAT
FLHHHFAILTGQALATRTKCIYFNVRSPQAAQHYKTLLARKGSEYSPHSICLNDHTSSNKNILSNYEAKLQSFLETY
YPDVSEAEILLPTKSEVAELVKHKDYLTVYTKLLPIINKQLVNKYNKPYSYLFYYLGLSARFLFEETQQEHYRETAE
ENLQIFCGLNPKHTLALKYLADVTLTSQPSGQ。

[0238] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的荚膜聚合酶, 编码序列]

[0239] >CP-NmA(NC_003116 REGION:183321..184958) SEQ ID NO :7

[0240] atgtttatacttaataacagaaaatggcgtaaaacttaaaagagaccctagcgctttctttcgagatagt
aaatttaactttttaagatatttttctgctaaaaaatttgcaaagaattttaaaaattcatcacatatccataaaac
taatataagtaaagctcaatcaaatattttctcaaccttaaaacaaaatcggaacaaagatatgttaattcctatta
atttttttaattttgaatatatagttaaaaaacttaacaatcaaaacgcaataggtgtatatattcttcttctaat
cttactcttaagcctgcattatgtattctagaatcacataaagaagacttttttaataaatttcttcttactatttc
ctctgaaaatttaagcttcaatacaaatttaatggacaaaataaaaaatcctaagtcgtaaatgaaatttgacag
atatttttagcattgctcatgttgacatgaaactcagcacagatagaactttaagttcatctatatctcaattttgg
ttcagattagagttctgtaaagaagataaggattttatcttatttcttacagtaacagatattctagaaaactttg
gaagcactctattaaaaataatcaattattttaagaaggcatacgaactattcagaaatatcttcattaccctatg

aagaagatcataatTTTtgatattgatttagtatttacttgggtcaactcagaagataagaattggcaagagttatat
aaaaaatataagccccgactTTtaatagcgatgcaaccagtacatcaagattccttagtagagatgaattaaaattcg
attacgctcttgggaatgaatggatccttcattcgaaaaatTTTtattgtctctaattgtgctccccagcatggc
tagatttaataaacctaaaattcaatgggtatatcacgaagaaattatgccacaaagtgcccttccctactTTtagc
tcacatgctattgaaaccagcttgcaccatataccaggaattagtaactatTTTtatttacagcaatgacgacttcc
attaactaaaccattgaataaagacaatttcttctattcgaatgggtattgcaaagttaagattagaagcatggggaa
atgttaatgggtgaatgtactgaaggagaacctgactacttaaatgggtgctcgcaatgcaacactctcttagaaaag
gaatttaaaaaatTTTactactaaactacatactcactcccccaatccatgagaactgatattTTTtatttgagatgga
aaaaaatatccagaagagTTtaatagaacactacataataaatccgatctttagatgatattgcagtaacgggct
atctctatcatcattatgcctactctctggacgagcactacaaagtTctgacaagacggaacttgtagcgggct
catgatttcaaaaagaactaaataatgtagtgaccttaactaaagaaaggaattTTTgacaaacttccTTTgagcgt
atgtatcaacgatgggtgctgatagtcacttgaatgaagaatggatgttcaagttattaagttcttagaaactcttt
tcccattaccatcatcatttgagaaataa。

[0241] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的荚膜聚合酶, 氨基酸序列]

[0242] >CP-NmA (YP_002341743).pro SEQ ID NO :8

[0243] Mfilnnrkwrklkrdpsaffrdsknflryfsakkfaknfknsshiktniskaqsnisstlkqnkrkd
mlipinffnfeyivkklennqnaigvyilpsnltpalcileshkedflnkflttissenlklqykfngqiknpksv
neiwtldfsiahvdmklstdrtlsssisqfwrlefckedkdfilfptanrysrlklwksiknnqlfkegirnysei
sslppeedhnfddldlvtwvnsedknwqelykkykpdfnsdatstsrlsrdelkfalrswemngsfirkifivsn
appawldlnnpkiqwvyheeimpqsalptfsshaietslhipgisnyfiysnddfltkplnkdnffysngiaklr
leawgnvngectegepdylngarnantllekefkfktklhthspqsmrtdilfemekkypeefnrthlnkfrsldd
iavtgylyhhyallsgralqssdktelvqqnhdfkkklennvvtltkernfdklplsvcindgadshlneewnqvik
fletlflplpssfek。

[0244] [从硕大利什曼原虫克隆的 UDP- 糖磷酸化酶, 编码序列]

[0245] >利什曼原虫_USP.seq SEQ ID NO :9

[0246] ATGACGAACCCGTCCAACCTCCAACCTGCAGGCCCTGCGCGAGGAGCTCTGCACGCCTGGCCTGGATCAG
GGTCACCTCTTCGAGGGATGGCCGAGACTGTGGATGAGTGCAACGAGAGGCAGATCGCCCTCCTCACAGATTTGTA
CATGTTTTCCAACATGTATCCCGGCGGCGTTGCTCAGTACATCCGCAACGGGCACGAGCTGCTGGCGCGTGAGAGCG
AAGAGGTGGACTTTGCAGCGCTGGAGATGCCCCCTCTCATCTTCGAGGGCGCGCTCGCTGCACCGGCGCACGGCTGAG
AGGACGGCGCTGGAGAACGCCGAACCGCGATGCTGTGCAAGACGGTGTTTCGTGCTGGTTGCTGGCGGTCTGGGCGA
ACGTCTGGGCTACTCGAGCATCAAGGTGAGCCTGCCGGTGGAGACGGCGACGAACACAACGTATCTCGCCTACTACC
TCCGGTGGGCCCAGCGGGTGGGGGGGAAGGAGGTACCATTTGTGATAATGACCTCTGACGACACGCACGACCGCACG
CTGCAGCTCCTGCGCGAGCTGCAGTTGGAGGTGCCAACTTGCATGTGCTCAAGCAGGGGCGAGGTCTTCTGTTTTGC
CGACAGCGCCGCGCACCTCGCCCTGGACGAGACAGGGAAGCTGCTGCGCAAGCCACACGGTCACGGCGACGTGCACT
CCCTCATCTACAACGCGACTGTGAAGAGAGACGTGGTGCCGACTCCGGCGACGGTACCGCGACGGCGAGCCACTC
GTGAACGACTGGCTGGCGGCCGGCTACGAGTCCATTGTCTTCATCCAGGACACCAACGCCGGCGCGACGATCACAAT
CCCCATCAGCCTCGCCTTGAGTGCCGAGCACTCGCTCGACATGAACTTCACCTGCATCCCTCGTGTGCCGAAGGAGC
CGATCGGGCTGCTATGCCGAACCAAGAAGAATAGCGGCGACCCGTGGCTGGTCGCGAACGTGGAGTACAACGTCTTT
GCCGAGGTCTCGCGCGCTTAACAAGGATGGTGGCGATGAAGTCAGTGACCCCACTGGCTTCTCCCCGTTCCCTGG

CAGCGTCAACACCCTCGTGTTCAAGCTCTCCAGCTACGTGGACCGGCTGCGGGAGTCGCACGGTATCGTGCCGGAGT
TCATCAATCCCAAGTACTCGGACGAGACGCGCCGCTCCTTCAAGAAGCCCGCACGCATCGAGTCCCTGATGCAGGAC
ATCGCGCTGCTCTTCTCCGAGGATGACTACCGTGTGCGCGGTACCGTCTTTGAGCGATTCTCGTACCAGCCAGTGAA
GAACTCGCTAGAGGAGGCGGCAGGGCTTGTGGCGCAGGGCAACGGCGCCTACTGCGCCGCCACGGGAGAGGCTGCCT
TCTACGAGCTGCAGCGGCGCCGTCTCAAGGCCATCGGGCTGCCGCTCTTCTACAGCTCGCAGCCGAGGTGACGGTG
GCGAAGGACGCCTTTGGCGTGCGTCTTCCCGATAATCGTGCTGGATACGATGTGCGCGTCAAGCGGATCCCTCGA
CGACCTTGCGCGCGTCTTTCCGACGCCGAAAAAGGTGCACATCGATCAGCACAGCACCTTGATTGTTGAGGGCCGTG
TCATCATCGAGAGCCTGGAGCTATACGGTGCACCTCACGATTCGCGGCCCCGACAGACTCGATGGCGCTGCCGCACGTA
GTACGAAACGCTGTGGTGCGCAATGCCGGCTGGTCCGTACACGCGATCTTGTCTCTCTGCGCTGGGCGCGATAGCAG
GCTGTCCGAGGTGGACCGCATCCGCGGGTTTGTGCTGAAGAAGACAGCCATGGCGGTGATGGACTGCAATACGAAGG
GCGAGTCCGAGGCCGGTGCACCGTCTGGTGGCGCTGACCCGGCAAAAGTTGTAG。

[0247] [从硕大利什曼原虫克隆的 UDP-糖磷酸化酶,氨基酸序列]

[0248] >利什曼原虫_USP.pro SEQ ID NO:10

[0249] MTNPSNSNLQALREELCTPGLDQGHLEFEGWPETVDECNERQIALLLDLYMFSNMYPGGVAQYIRNGHEL
LARESEEVDFAALEMPPLIFEAPSLHRRTAERTALENAGTAMLCKTVFVLVAGGLGERLGYSYIKVSLPVETATNTT
YLAYYLRWAQRVGGKEVPFVIMTSDDTHDRTLQLLRELQLEVPNLHVLKQGQVFCFADSAHLALDETGKLLRKPHG
HGDVHSLIYNATVKRDVVPDSGDGTATAQPLVNDWLAAGYESIVFIQDTNAGATITIPISLALSAEHSMDMFTCIP
RVPKEPIGLLCRTKKNSGDPWLVANVEYNVFAEVSRLNKGDEVSDDPTGFSPPGVSNTLVFKLSSYVDRLRESH
GIVPEFINPKYSDETRRSFKKPARIESLMQDIALLFSEDDYRVGGTVFERFSYQPVKNSLEEAAGLVAQNGAYCAA
TGAAAFYELQRRRLKAIGLPLFYSSQPEVTAKDAFGVRLFPPIIVLDTMCASSGSLDDLARVFPTPEKVHIDQHSTL
IVEGRVIESLELYGALTIRGPTDSMALPHVVRNAVVRNAGWSVHAILSLCAGRDSRLSEVDRIIRGFVLKKTAMAVM
DCNTKGESEAGAPSGAADPAKL

[0250] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的 UDP-GlcNAc-差向异构酶 (NmA), 编码序列]

[0251] >UDP-GlcNAc-差向异构酶-NmA (AF019760 REGION:479..1597) SEQ ID NO:11

[0252] Atgaaagtcttaaccgtctttggcactcgccctgaagctattaaaatggcgccctgtaattctagagtta
caaaaacataacacaattacttcaaaagtttgcaattactgcacagcatcgtaaatgctagatcaggttttgagcct
attcgaaatcaaagctgattatgatttaaataatcatgaaacccaaccagagcctacaagaaatcacaacaatatca
tctcaagccttaccgatgttcttgaagatttcaaacctgactgcgctccttgcacggagacaccacaacaactttt
gcagctagccttgctgcattctatcaaaaaataacctgttggccacattgaagcaggcctgagaacttataattttata
ctctccttggccagaggaagcaaataggcgcttaacaagcgttctaagccagtggcattttgcacctactgaagatt
ctaaaaataacttactatctgaatcaataaccttctgacaaagtattgttactggaaatactgtcatagatgcacta
atggtatctctagaaaaactaaaaataactacaattaaaaaacaaatggaacaagcttttccattttattcaggacaa
ctctaaagtaatttttaattaccgctcatagaagagaaaatcatggggaaggtattaaaaatattggactttctatct
tagaattagctaaaaaatacccaacattctcttttgtgattccgctccatttaaatcctaacgttagaaaaccaatt
caagattttattatcctctgtgcacaatgttcatcttattgagccacaagaatacttaccattcgtatattttaatgtc
taaaagccatataatattaagtgattcaggcgccatacaagaagaagctccatccctagggaaaccagttcttgtat
taagagatactacagaacgtcctgaagctgtagctgcaggaactgtaaaattagtaggttctgaaactcaaaatatt
attgagagctttacacaactaattgaataacctgaatattatgaaaaaatggctaatttgaaaaccttacgggat
aggtaatgcctcaaaaatcattgtagaaactttattaaagaatagataa。

[0253] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的 UDP-GlcNAc- 差向异构酶 (NmA), 氨基酸序列]

[0254] >UDP-GlcNAc- 差向异构酶 -NmA(AAC38285).pro SEQ ID NO :12

[0255] mkvltvfgrpeaikmapvilelqkhtitskvcitaqhremldqvlslfeikadydlnimkpnqslqe
ittniissltdvledfkpdcvlahgdttttfaaslaafyqkipvgheaglrtnlyspwpeeanrrltsvlsqwhf
aptedsknnllsesipsdkviltgntvidalmvsleklkittikkqmeqafpfidnsvilitahrrenhgegikn
iglsilelakkyptfsfviplhlnpnvrkpiqdlssvhnvhliepqeypfvymskshiilsdsggiqeeapslg
kpvlvlrdtterpeavaagtvklvgsetqniiesftqlieypeyekmanienpygignaskiivetllknr

[0256] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的, 带有 N- 端 StrepII 和 C- 端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶, 编码序列]

[0257] >Strep_CP_NmW135_His_cds(Y13970).seq SEQ ID NO :13

[0258] ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCACTTCGAAAAAGGCGCCCTGGTCCGCGTGGATCCgctgttattata
tttggttaacggaattcgggctgtaaatggccttggttaaatcatctatcaatactgcaaacgcttttgctgaagaagg
actggatgttcatttaattattttgttggcaatattactggagcagagcatttataccccccattccacttacatc
ccaatgtcaaaacctccagcatcatagattttatttaattgacattccagaaaatgtagctgccgaaatactcctttt
tattctattcatcaacaattcttcaaagctgaatatagtgcccactataagcatgttttgatgaaaattgaatcttt
attatctgcagaagatagcattatcttcaactcatcctcttcaactggaaatgtatcgtttagcgaataatgatatca
agtcaaaagccaaactaattgtacaaattcatggtaattatattggaagaaatccataactatgaaattttggcacga
aatatcgattatgttgactatcttcaaacggtatctgatgaaatgctggaagaaatgcattcccatttcaaaatcaa
aaaagacaaatttagtttttattccaaacatcacttatcccatttcattagaaaaaaaagaagctgatttctttatta
aggataatgaagacatcgataatgctcagaaatttaaactgtatctctattgttggcagcattcagccaagaaaaaac
caattggatgccattaaaatcatcaataaaattaaaaatgaaaattacattttacagatatatggcaaactctattaa
taaagattactttgaattaattaaaaaatatattaaagacaataagttacaaaaccgtatcttattcaaaggtgaat
cttccgagcaggaaatttatgaaaatacagatatcctgatcatgacatcagaaagttagggatttccatataatatt
atggaaggcatggtgtatgatattccaatcggtgtatattgttttaaatatggagcgaatgattacagtaactataa
tgaaaatggttggtgttttttaaactggtgatatttctggaatggcaaaaaaataattgagctattaaataaccag
aaaaatataaagaattagttcaatataatcacaaatcgcttcttaaagaatatgcaaaagatgtggttatggctaaa
tatttcactattcttccgcgcagctttaataacgtatcattatcgctgctttcagccgaaaagaattggacgaatt
ccaaaatattactttttctattgaagattctaattgatttagctcatatttggaaatttcagactaaccaatcctgcac
aaaatatgaattttttgccttagttggcaagcgaaaatttccaatggatgctcatatccaaggaacacagtgtagc
attaagatagctcataaaaagacagggaatttattgtcgcttttactaaaaaaacgaaatcagttgaatttatcaag
gggatataccttaattgcagaagataatagctatgaaaaatataattggagcaatatctaataaaggtaactttgaaa
ttattgcaaaataaaaagagctcattagttactataaacaacaaagtagcttagagttgcatgagattccccatgaacta
catcagaataaattactgattgctttacccaacatgcaaacgcctctaaaaattactgatgataatttaataacctat
ccaagcctccataaaaatagaaaaagatttgaaaatacttattacccatgtttcttgccatctggcatatttaataata
tctgcttagattacgggtgaagaatccaaaattatttaatttttagtaaatattcttataaatatatctatgactcaatt
cgctcatattgagcaacatacagatatatcggatattatcggttgcaatgtttattcttgggaacttattcgtgcctc
agttattgagagccttatggaatttaccggaaaatgggaaaaaacactttcagacttctcctaaaattgattatcgat
ttgatcatgaaggtaagcgttcgatggatgatgtcttttcagaagaaacatttattatggaatttccgcgtaaaaat

ggtatagataagaaaacagcagccttccaaaatataccaaacagtattgtaatggagtatccgcagaccaatggtta
cagtatgcgcagtcattcactgaaaagtaatgtagttgcggcaaacatttttcttgaaaaattaaataaaattaagg
tagatattaaattttaaaaagcatgaccttgcaaacaatcaaaaaatgaatcgaattatttatgagcatttaggcatt
aacataaatatcgaagcatttctaaaaccacgattagaaaaatttaagcgtgaagaaaaatattttcatgatttctt
caaaagaaataattttaagaggtaatttttccaagcacttattggaatccaggtattatttgtgctgcacataaac
aaggtattaaaggtatctgatattcaatatgctgccattactccttatcatcctgcgtatttttaaatcaccaaaatca
cattacgttgctgataaattgttcttatggctctgaatattggaatcatgagcttttaccaatccaacacgagagat
tggttctggctgcccatattgggtatgcatttagatgatgtgagattttcagaaaaactgaattatgactatatctttc
tatctcaaagtaggatttcttctgcgcttgcttagttttgcaattgagtttgcattaaaaaatcctcaactacagctt
ttatttttctaagcatccagatgaaaatatagatttaaagaacagaattattcctgataatcttataatctccacgga
atcttctataacaaggcatcaatgaatctcgcgttgctgttaggtgtttattcaactagcttatttgaggcatttagca
tgcggaacaaacttttgttggttaatatccgggatatgaaattatgtcaaatgaaatagattcagggttatttctt
tgtagtagaaacacctgaagaaatgcttgagaaaacaagcccggaattgggtggctgtggcagatattgaaaaccagt
tttttggccaagaaaaaCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[0259] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的,带有 N-端 StrepII 和 C-端 6xHis-标签的荚膜聚合酶,氨基酸序列]

[0260] >Strep_CP_NmW135_His(Y13970).pro SEQ ID NO:14

[0261] MASWSHPQFEKGALVPRGSAVIFVNGIRAVNGLVKSSINTANAFEEGLDVHLINFGVNGITGAEHLYP
PFHLHPNVKTSSIIDLFNDIPENVSCRNTPFYSIHQFFKAEYSAHYKHVLMKIESLLSAEDSIIIFTHPLQLEMYRL
ANNDIKSKAKLIVQIHGNYMEEIHNYEILARNIDYVDYLQTVSDEMLEEMHSHFKIKKDKLVFIPNITYPISLEKKE
ADFFIKDNEDIDNAQKFKRISIVGSIQPRKNQLDAIKIINKIKNENYILQIYGKSINKDYFELIKKYIKDNKLQNR
LFGGESSEQEIYENTDILIMTSESEGFPIFMEGMVYDIPIVVYDFKYGANDYSNYNENGCVFKTGDISGMAKKIIE
LLNPEKYKELVQYNHNRFLKEYAKDVVMAYFTILPRSFNNVSLSSAFSRKELDEFQNI TFSIEDSNDLAHIWNFE
LTNPAQNMNFALVGKRKFPMDAHIQGTQCTIKIAHKKTGNLLSLLKKRNQLNLSRGYTLIAEDNSYEKYIGAISN
KGNFEI IANKKSSLVTINKSTLELHEIPHELHQNKLLIALPNMQTPLKITDDNLIPIQASIKLEKIGNTYPCFLPS
GIFNNICLDYGEESKIINFSKYSYKYIYDSIRHIEQHTDISDIIVCNVYSWELIRASVIESLMEFTGKWEKHFQTSP
KIDYRFDHEGKRSMDDVFSEETFIMEFPRKNGIDKKTAAFQNPNSIVMEYPQTNGYSMRSHLSKNVVAACHFLEK
LNKIKVDIKFKKHDLANIKKMNR IYEHLGININIEAFLKPRLEKFKREEKYFHDFFKRNNFKEVIFPSTYWNPGII
CAAHKQGIKVS DIQYAAITPYHPAYFKSPKSHYVADKFLWSEYWNHELLPNPTREIGSGAAYWYALDDVRFSEKLN
YDYIFLSQSRISSRLLSFAIEFALKNPQLQLLFSKHPDENIDLKNRIIPDNLIISTESSIQGINESRVAVGVYSTSL
FEALACGKQTFVVKYPGYEIMSNEIDSGLFFAVETPEEMLEKTPSNWVAVADIENQFFGQEKLEHHHHHHH

[0262] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 克隆的,带有 N-端 StrepII 和 C-端 6xHis-标签的荚膜聚合酶,编码序列]

[0263] >Strep_CP_NmY_His_cds(Y13969).seq SEQ ID NO:15

[0264] ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAAGCGCCCTGGTTCCGCGTGGATCCgctgttattata
tttgttaacggaattcgggctgtaaattggccttgttaaatcatctatcaatactgcaaacgcttttgcgtgaagaagg
actggatgttcatttaattaattttgttggcaatattactggagcagagcatttatccccccattccacttacatc
ccaatgtcaaaacctccagcatcatagatttatattaatgacattccagaaaatgttagctgccgaaatattcctttt
tattctatccatcaacaattcttcaaagccgaatacagtgccactataagcatgttttgatgaaaattgaatcttt

attatctgaagaagatagcattatcttcactcatcctcttcaactggaaatgtatcggttagcgaataataatatta
agtcaaaagccaagctaattgtacaaattcatggtaactatatggaagaaatccataactatgaaatttgggcacga
aatatcgattatgttgattatcttcaaacgggtatctgatgaaatgctggaagaaatgcattcccatttcaaaatcaa
aaaagacaaatttagttttttatccaaacatcacttatcccatttcatttagaaaaaaaagaagctgatttctttatta
aggataatgaagacattgataatgctcagaaatttaaacgtatctctattgttggcagttatcagccaagaaaaaac
caattggatgccattaaaatcatcaataaaaattaaaaatgaaaattacattttacagatatatggcaaatctatttaa
taaagattactttgaattaattaaaaatatattaaagacaataagttacaaaaccgtatcttattcaaagggtgaat
cttccgagcaggaaatttatgagaatacagatatccataatcatgacatctcaaagcgaaggctttgggtatataattt
ctagagggtatgggtgtacgatatccctatccttgcctataattttaaatatggagcgaatgatttttagcaattataa
tgaaaacgcttcagtttttaaaactgggtgataatttctggaatggcaaaaaaataattgagctattaaataaccag
aaaaatataaagaatttagttcaatataatcacaaatcgcttcttaaaagaatatgcaaaagatgtggttatggctaaa
tatttcactattcttccgcgcagctttaataacgtatcattatcgctctgctttcagccgaaaagaattggacgaatt
ccaaaatattactttttctattgaagattctaattgatttagctcatatttggaaatttcagactaaccaatcctgcac
aaaatatgaatttttttgccttagttggcaagcgaaaatttccaatggatgctcatatccaaggaacacagtgtagc
attaagatagctcataaaaagacagggaaatttattgtcgcttttactaaaaaacgaaatcagttgaatttatcaag
gggatataccttaattgcagaagataatagctatgaaaaatatattggagcaatatctaataaaggtaactttgaaa
ttattgcaaataaaaagaactcattagttactataaaacaaaagtaccttagagttgcatgagattccccatgaacta
catcagaataaattactgattgtcttaccacaacatgcaaacgcctctaaaaattactgatgataatttaatacctat
ccaagcctccataaaaattagaaaagattggaaatacttattacccatgtttcttgccatctggcatatttaataata
tctgcttagattacgggtgaagaatccaaaattattaatttttagtaaatattcttataaatatatctatgactcaatt
cgtcatattgagcaacatacagatatatcggtatattatcggttgcaatgtttattcttgggaacttattcgtgcctc
agttattgagagccttatggaatttaccggaaaatgggaaaaacactttcagacttctcctaaaaattgattatcgat
ttgatcatgaaggtaagcgttcgatggatgatgtcttttcagaagaacattttattatggaatttccgcgtaaaaat
ggtatagataagaaaacagcagccttccaaaatataccaaacagttattgtaatggagtatccgcagaccaatggtta
cagtatgcgcagtcattcactgaaaagtaatgtagttgcggcaaaacattttcttgaaaaattaaataaaattaagg
tagatattaaattttaaaagcatgaccttgcaaacatcaaaaaaatgaatcgaatttttatgagcatttaggcatt
aacataaatatcgaagcatttctaaaaccacgattagaaaaatttaagcgtgaagaaaaatattttcatgatttctt
caaaagaaataatttttaagaggtaatttttccaagcacttattggaatccaggtattatttgtgctgcacataaac
aagggtattaagggtatctgatattcaatatgctgccattactccttatcatcctgcgtatttttaaatcaccaaaatca
cattacgttgctgataaattgttcttatgggtctgaatattggaatcatgagcttttaccaaatccaacacgagagat
tggttctggtgccgcatattggtatgcattagatgatgtgagattttcagaaaaactgaattatgactatatctttc
tatctcaaagtaggatttcttccgcgcttgcttagttttgcaattgagtttgcattaaaaaatcctcaactacagctt
ttattttctaaagcatctagatgaaaatatagatttaaagaacagaattattcctgataatcttataatctccacgga
atcttctatacaaggcatcaatgaatctcgcgttgctgttaggtgtttattcaactagcttatttgaggcatttagca
tgccggcaaacaaacttttgttggttaaataatccgggatatgaaattatgtcaaatgaaatagatttcagggttattctt
tgccagtagaaacacctgaagaaatgcttgagaaaacaagcccgaattgggtggctgtggcagatattgaaaaccagt
tttttgcccaagaaaaaCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[0265] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 Y 克隆的, 带有 N- 端 StrepII 和 C- 端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶, 氨基酸序列]

[0266] >Strep_CP_NmY_His(Y13969).pro SEQ ID NO :16

[0267] MASWSHPQFEKGALVPRGSAVIFVNGIRAVNGLVKSSINTANAFEEGLDVHLINFGVGNITGAEHLSP
PFHLHPNVKTSSIIDLFNDIPENVSCRNIPFYSIHQQFFKAEYSAHYKHVLMKIESLLSEEDSIIFTHPLQLEMYRL
ANNNIKSKAKLIVQIHGNYMEEIHNYEIWARNIDYVDYLQTVSDEMLEEMHSHFKIKKDKLVIPNITYPISLEKKE
ADFFIKDNEDIDNAQKFKRISIVGSIQPRKNQLDAIKIINKIKNENYILQIYGKSINKDYFELIKKYIKDNKLQNRIL
LFKGESSEQEIYENTDILIMTSQSEFGYIFLEGMVYDIPILAYNFKYGANDFSNYNENASVFKTGDISGMAKKIIE
LLNNPEKYKELVQYNHNRFLKEYAKDVVMAKYFTILPRSFNNVSLSSAFSRKELDEFQNITFSIEDSNDLAHIWNFE
LTNPAQNMNFALVGKRKFPMDAHIQGTQCTIKIAHKKTGNLLSLLKKRNQLNLSRGYTLIAEDNSYKYIGAISN
KGNFEIIANKKNSLVTINKSTLELHEIPHELHQNKLLIALPNMQTPLKITDDNLIPIQASIKLEKIGNTYPCFLPS
GIFNNICLDYGEESKIIINFSKYSYKYIYDSIRHIEQHTDISDIIVCNVYSWELIRASVIESLMEFTGKWEKHFQTSP
KIDYRFDHEGKRSMDDVFSEETFIMEFPRKNGIDKKTAAFQNIPIVMEYPQTNGYSMRSHSLKSNVVAAKHFLEK
LNKIKVDIKFKKHDLANIKKMNRIIYEHLGININIEAFLKPRLEKFKREEKYFHDFFKRNNFKEVIFPSTYWNPGII
CAAHKQGKIKVSDIQYAAITPYHPAYFKSPKSHYVADKFLWSEYWNHELLPNPTREIGSGAAYWYALDDVRFSEKLN
YDYIFLSQSRISSRLSFAIEFALKNPQLQLFSKHLDENIDLKNRIIPDNLIISTESSIQGINESRVAVGVYSTSL
FEALACGKQTFVVKYPGYEIMSNEIDSGLFFAVETPEEMLEKTSNWNVAVADIENQFFGQEKLEHHHHHHH

[0268] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的,带有 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶, 编码序列]

[0269] >CP_NmW135_His_cds(Y13970).seq SEQ ID NO :17

[0270] atggctgttattatatttgttaacggaattcgggctgtaaattggccttgtaaattcatctatcaatact
gcaaacgcttttgcgtgaagaaggactggatgttcatttaattatttggcgaatattactggagcagagcattt
ataccccccattccacttacatcccaatgtcaaaacctccagcatcatagatttatttaattgacattccagaaaaatg
ttagctgccgaaatactcctttttattctattcatcaacaattcttcaaagctgaatatagtgccactataagcat
gttttgatgaaaattgaatctttattatctgcagaagatagcattatcttcactcactcctcttcaactggaaatgta
tcgttttagcgaataatgatatacaagtcaaaagccaaactaattgtacaaattcatggtaattatatggaagaaatcc
ataactatgaaattttggcacgaaatatcgattatgttgactatcttcaaacggtatctgatgaaatgctggaagaa
atgcattcccattttcaaaatcaaaaaagacaaattagtttttattccaaacatcacttatccatttcattagaaaa
aaaagaagctgattttctttattaaggataatgaagacatcgataatgctcagaaatttaaactgtatctctattgttg
gcagcattcagccaagaaaaaaccaattggatgccattaaaatcatcaataaaattaaaaatgaaaattacattttta
cagatatatggcaaatctattaataaagattactttgaattaattaaaaaatatattaaagacaataagttacaaaa
ccgtatcttatttcaaaggtgaatcttccgagcaggaaatttatgaaaatacagatatcctgatcatgacatcagaaa
gtgagggattttccatatatatttatggaaggcatgggtgatgatattccaatcggtgtatgatgttttaaatatgga
gcgaatgattacagtaactataatgaaaatgggtgtgtttttaaaactgggtgatatttctggaatggcaaaaaaat
aattgagctattaaataaccagaaaaatataaagaattagttcaatataatcacaatcgcttcttaaaagaatatg
caaaagatgtggttatggctaaatatcttactattcttccgcgcagctttaataacgtatcattatcgctctgctttc
agccgaaaagaattggacgaattccaaaatattactttttctattgaagattcctaattgatttagctcatattttggaa
tttcgagctaaccaatcctgcacaaaatatgaattttttgcttttagttggcaagcgaaaatttccaatggatgctc
atatccaaggaacacagtgtacgattaagatagctcataaaaaagacagggaattttattgtcgcttttactaaaaaaa
cgaaatcagttgaatttatcaaggggatataaccttaattgcagaagataatagctatgaaaaatatattggagcaat
atctaataaaggtaactttgaaattattgcaataaaaaagagctcatttagttactataaacaagaatgaccttagagt

tgcatgagattccccatgaactacatcagaataaattactgattgctttacccaacatgcaaacgcctctaaaaatt
actgatgataatTTAATACCTATCCAAGCCTCCATAAAATTAGAAAAGATTGGAAATACTTATTACCATGTTTTCTT
GCCATCTGGCATATTTAATAATATCTGCTTAGATTACGGTGAAGAAATCCAAAATTATTAATTTTAGTAAATATTCTT
ATAAATATATCTATGACTCAATTCGTCATATTGAGCAACATACAGATATATCGGATATTATCGTTTGCAATGTTTAT
TCTTGGAACCTATTTCGTGCCTCAGTTATTGAGAGCCTTATGGAATTTACCGGAAAATGGGAAAACACTTTCAGAC
TTCTCCTAAAATTGATTATCGATTTGATCATGAAGGTAAGCGTTCGATGGATGATGTCTTTTCAGAAGAAACATTTA
TTATGGAATTTCCGCGTAAAAATGGTATAGATAAGAAAACAGCAGCCTTCCAAAATATACCAACAGTATTGTAATG
GAGTATCCGCAGACCAATGGTTACAGTATGCGCAGTCATTCCTGAAAAGTAATGTAGTTGCGGCAAAACATTTTCT
TGAAAAATTAAATAAAATTAAGGTAGATATTAAATTTAAAAAGCATGACCTTGCAAACATCAAAAAATGAATCGAA
TTATTTATGAGCATTTAGGCATTAACATAAATATCGAAGCATTTCTAAAACCAGATTAGAAAAATTTAAGCGTGAA
GAAAAATATTTTCATGATTTCTTCAAAAGAAATAATTTTAAAGAGGTAATTTTCCAAGCACTTATTGGAATCCAGG
TATTATTTGTGCTGCACATAAACAAGGTATTAAGGTATCTGATATTCATATGCTGCCATTACTCCTTATCATCCTG
CGTATTTTAAATCACCAAAATCACATTACGTTGCTGATAAATTGTTCTTATGGTCTGAATATTGGAATCATGAGCTT
TTACCAAATCCAACACGAGAGATTGGTTCTGGTGCCGCATATTGGTATGCATTAGATGATGTGAGATTTTCAGAAAA
ACTGAATTATGACTATATCTTTCTATCTCAAAGTAGGATTTCTTCGCGCTTGCTTAGTTTTGCAATTGAGTTTGCAT
TAAAAATCCTCAACTACAGCTTTTATTTTCTAAGCATCCAGATGAAAATATAGATTTAAGAACAGAATTATTCCT
GATAATCTTATAATCTCCACGGAATCTTCTATACAAGGCATCAATGAATCTCGCGTTGCTGTAGGTGTTTATTCAAC
TAGCTTATTTGAGGCATTAGCATGCGGCAACAAAACCTTTTGTTGTAAATATCCGGGATATGAAATTATGTCAAAT
GAAATAGATTCAGGGTATTCTTTGCAAGTAGAAACACCTGAAGAAATGCTTGAGAAAACAAGCCCGAATTGGGTGGC
TGTGGCAGATATTGAAAACCAGTTTTTTGGCCAAGAAAACTCAGACCAACCACCACCACCACCACTGA

[0271] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 W-135 克隆的,带有 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶,氨基酸序列]

[0272] >CP_NmW135_His(Y13970).pro SEQ ID NO :18

[0273] MAVIIFVNGIRAVNGLVKSSINTANAFEEGLDVHLINFGVGNITGAEHLYPPFHLHPNVKTSSIIDLFN
DIPENVSCRNTPFYSIHQFFKAEYSAHYKHVLMKIESLLSAEDSIFTHPLQLEMYRLANNDIKSKAKLIVQIHGN
YMEEIHNYEILARNIDYVDYLQTVSDEMLEEMHSHFKIKKDKLVFIPNITYPISLEKKEADFFIKDNEDIDNAQKFK
RISIVGSIQPRKNQLDAIKIINKIKNENYILQIYGKSINKDYFELIKKYIKDNKLQNRILFKGESSEQEIYENTDIL
IMTSESEGFPIFMEGMVYDIPIVVYDFKYGANDYSNYNENGCVFKTGDISGMAKKIIELLNNPEKYKELVQYNHNR
FLKEYAKDVVMKYFTILPRSFNNVSLSSAFSRKELDEFQNTFSTIEDSNDLAHIWNFELTNPAQNMNFFALVGKRK
FPMDAHIQGTQCTIKIAHKKTGNLLSLLLKRNQLNLSRGYTLIAEDNSYEKYIGAISNKGNFEEIANKKSSLVTIN
KSTLELHEIPHELHQNKLLIALPNMQTPLKITDDNLIPIQASIKLEKIGNTYPCFLPSGIFNNICLDYGEESKIIIN
FSKYSYKYIYDSIRHIEQHTDISDIIVCNVYSWELIRASVIESLMEFTGKWEKHFQTSFKIDYRFDHEGKRSMDDVF
SEETFIMEFPRKNGIDKKTAAFQNPNSIVMEYPQTNGYSMRSHSLKSNVVAAKHFLEKLNKIKVDIKFKKHDLANI
KKMNRIIYEHLGININIEAFLKPRLEKFKREEKYFHDFFRNNFKEVIFPSTYWNPGIICAHKQGKIKVSDIQYAAI
TPYHPAYFKSPKSHYVADKLFLWSEYWNHELLPNPTREIGSGAAYWYALDDVRFSEKLNLDYIFLSQSRISSRLLSF
AIEFALKNPQLQLLSKHPDENIDLKNRIIPDNLIISTESSIQGINESRVAVGVYSTSLFEALACGKQTFVVKYPGY
EIMSNEIDSGLFFAVETPEEMLEKTSNWWAVADIENQFFGQEKLEHHHHHHH

[0274] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 克隆的,带有 N-端 MBP 和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶,编码序列]

[0275] >MBP_CP_NmX_His_cds(AAP44500).seq SEQ ID NO :19

[0276] ATGAAACTGAAGAAGGTAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCTCGCTGAA
GTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGATAAACTGGAAGAGAAATTTCC
ACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTG
GCCTGTTGGCTGAAATCACCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTAC
AACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAGATCTGCTGCCGAACCC
GCCAAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGAGCGCGCTGATGTTCAACC
TGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTAC
GACATTAAAGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTTGACCTGATTAACAAACAA
ACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAACAGCGATGACCATCAACG
GCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAA
CCATCCAAACCGTTTCGTTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCGAAAGAGTT
CCTCGAAAACCTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGCTGA
AGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACCATGGAAAACGCCCAGAAAGGTGAAATCATG
CCGAACATCCCGCAGATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTGCTCAGAC
TGTCGATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTCGGTACCCGGCCGGGGATCCattatgagcaaaatta
gcaaatggtaaccacccaaaccttttctttcgagattatttcttaaaaaagcaccgtaaattatggcgaaaat
attaaacctttaccagtcgaacctcttctcatagcaaaaaataacagccataaaacacccgtatcatccgacca
accaattgaagatccataccagtaacatttccaattgatgtagtttatacttgggtagattcagatgatgaaaaat
tcaatgaagaacgcctaaagtttcaaaattcaagcacatctgagactctacaaggcaaagcagaaagcacccgatatt
gcaagattccaatcacgcgacgaattaaaatattcgattcgaagcctgatgaagtatgccccatgggtaaatcatat
ttacattgtaacaaatgggtcaaataccaaaatgggttagataccaacaatacaaaggtaacgattatccctcactcaa
ctattatcgacagtcattttctccctacttttaattctcacgtcattgaatcctctctatataaaatcccaggatta
tcagagcattacattttatttcaatgatgatgtcatgctagctagagatttaagcccatcttattttctttacaagcag
cggatttagcaaaactgtttattaccaactctcgctaccaaaatggctataagaatgtgaaagacacaccaaccaat
gggcctcaaaaaattcccgtgagcttttacatgcgaaacaggattttgggctgaagccatgtttgcacatactttt
catccacaacgtaaaagtgtacatgaatctattgaacacctatggcatgaacaattaaatgtttgtcgtaaaaccg
tttccgtgatattttcagatattaacatggcgacattcctgcaccaccattttgccattttgacaggccaagctcttg
ctacacgcactaaatgtattttactttaacgttcgctctcctcaagcagctcagcattacaaaacattattagctcga
aaaggaagcgaatacagccacattctatctgcttaaattgatcatacatcgagcaataaaaaatattttatctaatta
cgaagccaaattacaaagcttttttagaaacatactatccagatgtatcagaagcagaaattctccttccctactaaat
ctgaagtagctgaattagttaaacataaagattatttaactgtatataactaaattattacctattatcaataagcag
ctgggtcaataaatataataaaccttattcatatcttttctattatttaggtttatctgcccggttttttatttgaaga
aacgcaacaagaacactaccgggaaactgctgaagaaaatttacaaatcttttgtggcctaaacccaaaacatacac
tagccctcaataacttagcggtatgtaccctcacatcacagcctagtgagacaaCTCGAGCACCACCACCACCAC

[0277] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 X 克隆的,带有 N-端 MBP 和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶,氨基酸序列]

[0278] >MBP_CP_NmX_His_(AAP44500).pro SEQ ID NO :20

[0279] MKTEEGKLVIIWINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFG

GYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKS
ALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKKNHMNADTDYSIAEAAFNKGET
AMTINGPWAWSNIDTSKVNIGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPL
GAVALKSYYEELAKDPRIAATMENAKQGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSVPGRGS
IMSKISKLVTHPNLFFRDYFLKKAPLNYGENIKPLPVETSSHSKNTAHKTPVSSDQPIEDPYPVTFPIDVVYTWVD
SDDEKFNEERLKFQNSSTSETLQGKAESTDIARFQSRDELKYSIRSLMKYAPWVNHIIYIVTNGQIPKWLDTNNTKVT
IIPHSTIIDSQFLPTFNHVISSLYKIPGLSEHYIYFNDDVMLARDLSPSYFFTSSGLAKLFITNSRLPNGYKNVK
DTPTQWASKNSRELLHAETGFWAEAMFAHTFHPQRKSVHESIEHLWHEQLNVCRQNRFRDISDINMATFLHHHFAIL
TGQALATRTKCIYFNVRSPQAAQHYKTLLARKGSEYSPHSICLNDHTSSKNILSNYEAKLQSFLEYYPDVSEAEI
LLPTKSEVAELVKHKDYLTVYTKLLPIINKQLVNKYNKPYSYLFYYLGLSARFLFEETQQEHYRETAENLQIFCGL
NPKHTLALKYLADVTLSQPSGQLEHHHHHH

[0280] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的,带有 N-端 Strep- 标签和 C-端 6xHis- 标签的荚膜聚合酶,编码序列]

[0281] >Strep_CP_NmA_His_cds(NC_003116 REGION:183321..184958).seq SEQ ID NO: 21

[0282] atggctagctggagccacccgcagttcgaaaaaggcgccctggttccgctggatcttttataacttaataacagaaaatggcgtaaacttaaaagagaccctagcgtttctttcgagatagtaaatttaactttttaagatatatttcttgctaaaaaatttgcaagaattttaaaattcatcacatatccataaaactaatataagtaaagctcaatcaaatatttcttcaaccttaaaacaaaatcggaacaagatatgttaattcctattatttttttaattttgaatatatagttaaaaaacttaacaatcaaaacgcaataggtgtatatatttcttcttacttacttactttagcctgcattatgtattctagaatcacataaagaagactttttaataaaatttcttcttactatttctctgaaaatttaaagcttcaatacaaaatttaattggacaaataaaaaatcctaagtcgcgtaaatgaaatttgacagatttatttagcattgctcatgttgacatgaaactcagcacagatagaactttaagttcatctatatctcaatttttggttcagattagagttctgtaaagaagataaggattttatcttatttcttacagctaacagatatcttagaaaactttggaagcactctattaaaaataataaattattttaagaaggcatacgaactattcagaaatatcttcattaccctatgaagaagatcataattttgatattgatttagtattttacttgggtcaactcagaagataagaattggcaagagttatataaaaaatataagcccgactttaatagcgatgaaccagtacatcaagattccttagtagagatgaattaaaattcgcttactgcttgggaaatgaatgataccttcattcgaaaaattttattgtctctaattgtgctccccagcatggctagatttaaataaccctaaaattcaatgggtatatcacgaagaattatgccacaaagtgcccttctacttttagctcacatgctattgaaaccagcttgcacatataccaggaattagtaactattttattttacagcaatgacgacttctatttaactaaaccattgaataaagacaatttcttctatttcgaatgggtatttgcaaagttaagattagaagcatggggaaatgttaatgggtgaatgtactgaaggagaacctgactacttaaatgggtgctcgcaatgcgaacactctcttagaaaaggaatttaaaaaatttactactaaactacatactcactccccctcaatccatgagaactgatattttatttgagatggaaaaaaaatatccagaagagtttaatagaacactacataataaaattccgatcttttagatgatattgcagtaacgggctatctctatcatcattatgccctactctctggacgagcactacaaagttctgacaagacggaacttgtacagcaaaatcatgatttcaaaaagaaactaaataatgtagtgaccttaactaaagaaaggaattttgacaaacttctttgagcgtatgtatcaacgatgggtgctgatagtcacttgaatgaagaatggaatgttcaagttattaagttcttagaaaactttttccattaccatcatcatttgagaaactcgagcaccaccaccaccactga

[0283] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的,带有 N-端 Strep- 标签和 C-端 6xHis- 标签

的荚膜聚合酶,氨基酸序列]

[0284] >Strep_CP_NmA_His_(YP_002341743).pro SEQ ID NO :22

[0285] MASWSHPQFEKGALVPRGSFILNNRKWRKLKRDPSAFFRDSKFNFLRYFSAKKFAKNFKNSSHIHKTNI
SKAQSNISSTLKQNRKQDMLIPINFFNFEYIVKKLNNQNAIGVYILPSNLTLPALCILESHKEDFLNKFLTTISSE
NLKLQYKFNGQIKNPKSVNEIWTDLFSIAHVDMKLSTDRTLSSSISQFWFRLEFCKEDKDFILFPTANRYSRKLWKH
SIKNNQLFKEGIRNYSEISSLPYEEDHNFIDLVFTWVNSEDKNWQELYKKYKPDFNSDATSTSRFLSRDELKFALR
SWEMNGSFIRKIFIVSNCAPPAWLDLNNPKIQWVYHEEIMPQSALPTFSSHA IETSLHHIPGISNYFIYSNDDFLLT
KPLNKDNFFYSNGIAKLRLAAGWNVNGECTEGEPDYLNGARNANTLLEKEFKKFTTKLHHTSPQSMRTDILFEMEKK
YPEEFNRTLHNKFRSLDDIAVTGYLYHHYALLSGRALQSSDKTELVQQNHDFKKKLNNVVTLT KERNFDKLPLSVCI
NDGADSHLNEEWNVQVIKLETLPSSFEKLEHHHHHHH

[0286] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的,带有 N-端 Strep- 标签和 C-端 6xHis- 标签的 UDP-GlcNAc- 差向异构酶,编码序列]

[0287] >Strep UDP-GlcNAc- 差向异构酶 -NmA His(AF019760 REGION :479..1597).seq
SEQ ID NO :23

[0288] atggctagctggagccacccgcagttcgaaaaaggcgccctggttccgcgtggatccaaagtcttaacc
gtcttttggcactcgccctgaagctattaaaatggcgccctgtaattctagagttacaaaaacataacacaattacttc
aaaagtttgcattactgcacagcatcgtagaatgctagatcaggttttgagcctattcgaaatcaaagctgattatg
atttaaataatcatgaaacccaaccagagcctacaagaaatcacacaaatatcatctcaagccttaccgatgttctt
gaagatttcaaacctgactgcgctccttgctcacggagacaccacaacaacttttgcagctagccttgctgcattcta
tcaaaaaataacctgtttggccacattgaagcaggcctgagaacttataatttatactctccttggccagaggaagcaa
ataggcgtttaacaagcgttctaagccagtggcattttgcacctactgaagattctaaaaataacttactatctgaa
tcaataccttctgacaaagttattgttactggaaatactgtcatagatgcactaatgggtatctctagaaaaactaaa
aataactacaattaaaaaacaatggaacaagcttttccatttattcaggacaactctaaagtaattttaattaccg
ctcatagaagagaaaaatcatggggaaggtattaaaaatattggactttctatcttagaatttagctaaaaaatacca
acattctcttttgtgattccgctccatttaaactcctaacgtagaaaaccaattcaagatttattatcctctgtgca
caatgttcatcttattgagccacaagaatacttaccattcgatatatttaagtgtctaaaagccatataatattaagtg
attcaggcggcatacaagaagaagctccatccctaggaaccagttcttgatttaagagatactacagaacgtcct
gaagctgtagctgcaggaactgtaaaattagtaggttctgaaactcaaaatattattgagagctttacacaactaat
tgaataccctgaatattatgaaaaaatggctaattattgaaaacccttacgggataggtaatgcctcaaaaatcattg
tagaaactttattaaagaatagactcgagcaccaccaccaccactga

[0289] [从脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A 克隆的,带有 N-端 Strep- 标签和 C-端 6xHis- 标签的 UDP-GlcNAc- 差向异构酶,氨基酸序列]

[0290] >Strep_UDP-GlcNAc- 差向异构酶 -NmA His(AAC38285).pro SEQ ID NO :24

[0291] MASWSHPQFEKGALVPRGSKVLTVFGTRPEAIKMAPVILELQKHNTITSKVCITAQHREMLDQVLSLFE
IKADYDLNIMKPNQSLQEITTTNISSSLTDVLEDFKPCDVLAHGDTTTF AASLAIFYQKIPVGHIEAGLRTYNLYSP
WPPEANRRLTSVLSQWHFAPTEDSKNNLLSESIPSDKVIIVTGNTVIDALMVSLEKLKITTIKKQMEQAFPF IQDNSK
VILITAHRRNHGEGIKNIGLSILELAKKYPTFSFVIPLHLNPNVRKPIQDLLSSVHNVHLIEPQEYLPFVYLMSSK
HIILSDSGGIQEEAPSLGKPVVLVRDTERPEAVAAGTVKLVGSETQNIIESFTQLIEYPEYYEKMANIENPYGIGN
ASKIIVETLLKNRLEHHHHHHH。

[0001]

序列表

<110> 汉诺威医学院 (Medizinische Hochschule Hannover)

<120> 生产脑膜炎奈瑟氏菌的人工荚膜多糖的方式和方法

<130> R2067 PCT S3

<150> EP 09 16 8765.7

<151> 2009-08-26

<160> 37

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3114

<212> DNA

<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 1

```

atggctgtta ttatatttgt taacggaatt cgggctgttaa atggccttgt taaatcatct    60
atcaatactg caaacgcttt tgctgaagaa ggactggatg ttcatttaat taattttggt    120
ggcaatatta ctggagcaga gcatttatac ccccatctcc acttacatcc caatgtcaaa    180
acctccagca tcatagattt atttaatgac attccagaaa atgttagctg ccgaaatact    240
cctttttatt ctattcatca acaattcttc aaagctgaat atagtgccca ctataagcat    300
gttttgatga aaattgaatc tttattatct gcagaagata gcattatctt cactcactct    360
cttcaactgg aaatgtatcg tttagcgaat aatgatatca agtcaaaagc caaactaatt    420
gtacaaattc atggtaatta tatggaagaa atccataact atgaaatatt ggcacgaaat    480
atcgattatg ttgactatct tcaaacggtg tctgatgaaa tgctggaaga aatgcattcc    540
catttcaaaa tcaaaaaaga caaattagtt tttattccaa acatcactta tcccatttca    600
ttagaaaaaa aagaagctga tttctttatt aaggataatg aagacatcga taatgctcag    660
aaatttaaac gtatctctat tgttggcagc attcagccaa gaaaaaacca attggatgcc    720
attaataatc tcaataaaat taaaaatgaa aattacattt tacagatata tggcaaatct    780
attaataaag attactttga attaattaaa aaatatatta aagacaataa gttacaaaac    840
cgtatcttat tcaaagtgta atcttccgag caggaaattt atgaaaatac agatatacctg    900
atcatgacat cagaaagtga gggatttcca tataatatta tggaaggcat ggtgtatgat    960
attccaatcg ttgtatatga ttttaaatat ggagcgaatg attacagtaa ctataatgaa   1020
aatggttggt tttttaaaac tggatgattt tctggaatgg caaaaaaat aattgagcta   1080
ttaaataacc cagaaaaata taaagaatta gttcaatata atcacaaatcg cttcttaaaa   1140
gaatatgcaa aagatgtggt tatggctaaa tatttacta tttctccgcg cagctttaat   1200
aacgtatcat tategtctgc tttcagccga aaagaattgg acgaattcca aaatattact   1260
ttttctattg aagattctaa tgatttagct catatttgga atttcagct aaccaatcct   1320
gcacaaaata tgaatTTTTT tgetttagtt ggcaagcgaa aatttccaat ggatgctcat   1380
atccaaggaa cacagtgtac gattaagata gctcataaaa agacagggaa tttattgtcg   1440
cttttactaa aaaaacgaaa tcagtgaat ttatcaaggg gatataacctt aattgcagaa   1500
gataatagct atgaaaaata tattggagca atatctaata aaggtaactt tgaattattt   1560
gcaaataaaa agagctcatt agttactata aacaaaagta ccttagagtt gcatgagatt   1620

```

[0002]

```

ccccatgaac tacatcagaa taaattactg attgctttac ccaacatgca aacgcctcta 1680
aaaattactg atgataattt aatacctatc caagcctcca taaaattaga aaagattgga 1740
aatacttatt acccatgttt ctgccatctt ggcataattt ataatatctg cttagattac 1800
ggtgaagaat ccaaaattat taattttagt aaatattctt ataaatatat ctatgactca 1860
attcgtcata ttgagcaaca tacagatata tcggatatta tcgtttgcaa tgtttattct 1920
tggaactta ttcgtgcctc agttattgag agccttatgg aatttaccgg aaaatgggaa 1980
aaacactttc agacttctcc taaaattgat tatcgatttg atcatgaagg taagcgttcg 2040
atggatgatg tcttttcaga agaaacattt attatggaat ttccgcgtaa aaatgtata 2100
gataagaaaa cagcagcctt ccaaaatata ccaaacagta ttgtaatgga gtatccgcag 2160
accaatgggt acagtatgcg cagtcattca ctgaaaagta atgtagttgc ggcaaacat 2220
tttcttgaaa aattaaataa aattaaggta gatattaaat ttaaaaagca tgaccttgca 2280
aacatcaaaa aaatgaatcg aattatttat gagcatttag gcattaacat aaatatcgaa 2340
gcatttctaa aaccacgatt agaaaaattt aagcgtgaag aaaaatattt tcatgatttc 2400
ttcaaaagaa ataattttta agaggtaatt ttccaagca ctatttgga tccaggattt 2460
atgtgtgetg cacataaaca aggtattaag gtatctgata ttcaatatgc tgccattact 2520
ccttatcatc ctgcgtattt taaatcacca aaatcacatt acgttgctga taaattgttc 2580
ttatggtctg aatattggaa tcatgagctt ttaccaaate caacacgaga gattggttct 2640
ggtgccgcat attggtatgc attagatgat gtgagatttt cagaaaaact gaattatgac 2700
tatatctttc tatctcaaag taggatttct tcgcgttgc ttagttttgc aattgagttt 2760
gcattaaaaa atcctcaact acagctttta ttttctaagc atccagatga aaatatagat 2820
ttaaagaaca gaattattcc tgataatctt ataactctca cggaattctt tatacaaggc 2880
atcaatgaat ctgcgttgc ttaggtgttt tattcaacta gcttatttga ggcattagca 2940
tgccgcaaac aaacttttgt tgttaaatat ccgggatatg aaattatgtc aaatgaaata 3000
gattcagggt tattctttgc agtagaaaca cctgaagaaa tgcttgagaa aacaagcccg 3060
aattgggtgg ctgtggcaga tattgaaaac cagttttttg gccaaagaaa ataa 3114

```

<210> 2
 <211> 1037
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 2

Met Ala Val Ile Ile Phe Val Asn Gly Ile Arg Ala Val Asn Gly Leu
1 5 10 15

Val Lys Ser Ser Ile Asn Thr Ala Asn Ala Phe Ala Glu Glu Gly Leu
20 25 30

Asp Val His Leu Ile Asn Phe Val Gly Asn Ile Thr Gly Ala Glu His
35 40 45

Leu Tyr Pro Pro Phe His Leu His Pro Asn Val Lys Thr Ser Ser Ile
50 55 60

Ile Asp Leu Phe Asn Asp Ile Pro Glu Asn Val Ser Cys Arg Asn Thr

[0003]

65	70	75	80
Pro Phe Tyr Ser Ile His Gln Gln Phe Phe Lys Ala Glu Tyr Ser Ala	85	90	95
His Tyr Lys His Val Leu Met Lys Ile Glu Ser Leu Leu Ser Ala Glu	100	105	110
Asp Ser Ile Ile Phe Thr His Pro Leu Gln Leu Glu Met Tyr Arg Leu	115	120	125
Ala Asn Asn Asp Ile Lys Ser Lys Ala Lys Leu Ile Val Gln Ile His	130	135	140
Gly Asn Tyr Met Glu Glu Ile His Asn Tyr Glu Ile Leu Ala Arg Asn	145	150	155
Ile Asp Tyr Val Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ser Asp Glu Met Leu Glu	165	170	175
Glu Met His Ser His Phe Lys Ile Lys Lys Asp Lys Leu Val Phe Ile	180	185	190
Pro Asn Ile Thr Tyr Pro Ile Ser Leu Glu Lys Lys Glu Ala Asp Phe	195	200	205
Phe Ile Lys Asp Asn Glu Asp Ile Asp Asn Ala Gln Lys Phe Lys Arg	210	215	220
Ile Ser Ile Val Gly Ser Ile Gln Pro Arg Lys Asn Gln Leu Asp Ala	225	230	235
Ile Lys Ile Ile Asn Lys Ile Lys Asn Glu Asn Tyr Ile Leu Gln Ile	245	250	255
Tyr Gly Lys Ser Ile Asn Lys Asp Tyr Phe Glu Leu Ile Lys Lys Tyr	260	265	270
Ile Lys Asp Asn Lys Leu Gln Asn Arg Ile Leu Phe Lys Gly Glu Ser	275	280	285
Ser Glu Gln Glu Ile Tyr Glu Asn Thr Asp Ile Leu Ile Met Thr Ser	290	295	300
Glu Ser Glu Gly Phe Pro Tyr Ile Phe Met Glu Gly Met Val Tyr Asp	305	310	315
Ile Pro Ile Val Val Tyr Asp Phe Lys Tyr Gly Ala Asn Asp Tyr Ser	325	330	335
Asn Tyr Asn Glu Asn Gly Cys Val Phe Lys Thr Gly Asp Ile Ser Gly	340	345	350
Met Ala Lys Lys Ile Ile Glu Leu Leu Asn Asn Pro Glu Lys Tyr Lys	355	360	365

[0004]

Glu	Leu	Val	Gln	Tyr	Asn	His	Asn	Arg	Phe	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ala	Lys	370	375	380
Asp	Val	Val	Met	Ala	Lys	Tyr	Phe	Thr	Ile	Leu	Pro	Arg	Ser	Phe	Asn	385	390	395
Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Glu	Phe	405	410	415
Gln	Asn	Ile	Thr	Phe	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Asn	Asp	Leu	Ala	His	Ile	420	425	430
Trp	Asn	Phe	Glu	Leu	Thr	Asn	Pro	Ala	Gln	Asn	Met	Asn	Phe	Phe	Ala	435	440	445
Leu	Val	Gly	Lys	Arg	Lys	Phe	Pro	Met	Asp	Ala	His	Ile	Gln	Gly	Thr	450	455	460
Gln	Cys	Thr	Ile	Lys	Ile	Ala	His	Lys	Lys	Thr	Gly	Asn	Leu	Leu	Ser	465	470	475
Leu	Leu	Leu	Lys	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	485	490	495
Leu	Ile	Ala	Glu	Asp	Asn	Ser	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Ile	Gly	Ala	Ile	Ser	500	505	510
Asn	Lys	Gly	Asn	Phe	Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Lys	Lys	Ser	Ser	Leu	Val	515	520	525
Thr	Ile	Asn	Lys	Ser	Thr	Leu	Glu	Leu	His	Glu	Ile	Pro	His	Glu	Leu	530	535	540
His	Gln	Asn	Lys	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Pro	Asn	Met	Gln	Thr	Pro	Leu	545	550	555
Lys	Ile	Thr	Asp	Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ile	Gln	Ala	Ser	Ile	Lys	Leu	565	570	575
Glu	Lys	Ile	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Cys	Phe	Leu	Pro	Ser	Gly	Ile	580	585	590
Phe	Asn	Asn	Ile	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gly	Glu	Glu	Ser	Lys	Ile	Ile	Asn	595	600	605
Phe	Ser	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Ser	Ile	Arg	His	Ile	610	615	620
Glu	Gln	His	Thr	Asp	Ile	Ser	Asp	Ile	Ile	Val	Cys	Asn	Val	Tyr	Ser	625	630	635
Trp	Glu	Leu	Ile	Arg	Ala	Ser	Val	Ile	Glu	Ser	Leu	Met	Glu	Phe	Thr	645	650	655
Gly	Lys	Trp	Glu	Lys	His	Phe	Gln	Thr	Ser	Pro	Lys	Ile	Asp	Tyr	Arg	660	665	670

[0005]

Phe	Asp	His	Glu	Gly	Lys	Arg	Ser	Met	Asp	Asp	Val	Phe	Ser	Glu	Glu
		675					680					685			
Thr	Phe	Ile	Met	Glu	Phe	Pro	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Thr
	690					695					700				
Ala	Ala	Phe	Gln	Asn	Ile	Pro	Asn	Ser	Ile	Val	Met	Glu	Tyr	Pro	Gln
705					710					715					720
Thr	Asn	Gly	Tyr	Ser	Met	Arg	Ser	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Asn	Val	Val
			725						730					735	
Ala	Ala	Lys	His	Phe	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Lys	Ile	Lys	Val	Asp	Ile
			740					745					750		
Lys	Phe	Lys	Lys	His	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Lys	Met	Asn	Arg	Ile
		755					760					765			
Ile	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Ile	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Phe	Leu	Lys
	770					775					780				
Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Tyr	Phe	His	Asp	Phe
785					790					795					800
Phe	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Glu	Val	Ile	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Trp
			805						810					815	
Asn	Pro	Gly	Ile	Ile	Cys	Ala	Ala	His	Lys	Gln	Gly	Ile	Lys	Val	Ser
			820					825					830		
Asp	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Tyr	His	Pro	Ala	Tyr	Phe	Lys
		835					840					845			
Ser	Pro	Lys	Ser	His	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	Trp	Ser	Glu
	850					855					860				
Tyr	Trp	Asn	His	Glu	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Glu	Ile	Gly	Ser
865					870					875					880
Gly	Ala	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Glu	Lys
				885					890					895	
Leu	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Ile	Ser	Ser	Arg
			900					905					910		
Leu	Leu	Ser	Phe	Ala	Ile	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Gln
		915					920					925			
Leu	Leu	Phe	Ser	Lys	His	Pro	Asp	Glu	Asn	Ile	Asp	Leu	Lys	Asn	Arg
		930				935					940				
Ile	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	Gln	Gly
945					950					955					960
Ile	Asn	Glu	Ser	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Phe
				965					970					975	

[0006]

Glu Ala Leu Ala Cys Gly Lys Gln Thr Phe Val Val Lys Tyr Pro Gly
980 985 990

Tyr Glu Ile Met Ser Asn Glu Ile Asp Ser Gly Leu Phe Phe Ala Val
995 1000 1005

Glu Thr Pro Glu Glu Met Leu Glu Lys Thr Ser Pro Asn Trp Val
1010 1015 1020

Ala Val Ala Asp Ile Glu Asn Gln Phe Phe Gly Gln Glu Lys
1025 1030 1035

<210> 3
<211> 3114
<212> DNA
<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 3
atggctgtta ttatatttgt taacggaatt cgggctgtaa atggccttgt taaatcatct 60
atcaatactg caaacgettt tgctgaagaa ggactggatg ttcatttaat taattttgtt 120
ggcaatatta ctggagcaga gcatttatcc cccccattcc acttacatcc caatgtcaaa 180
acctccagca tcatagattt atttaatgac attccagaaa atgttagctg ccgaaatatt 240
cctttttatt ctatccatca acaattcttc aaagccgaat acagtgccca ctataagcat 300
gttttgatga aaattgaate tttattatct gaagaagata gcattatctt cactcatcct 360
cttcaactgg aaatgtatcg tttagcgaat aataatatta agtcaaaagc caagctaatt 420
gtacaaatc atggtaacta tatggaagaa atccataact atgaaatttg ggcacgaaat 480
atcgattatg ttgattatct tcaaacggta tctgatgaaa tgctggaaga aatgcattcc 540
catttcaaaa tcaaaaaaga caaattagtt tttattccaa acatcactta tcccatttca 600
ttagaaaaaa aagaagctga tttctttatt aaggataatg aagacattga taatgctcag 660
aaattttaa acgtatctctat tgttggcagt attcagccaa gaaaaaacca attggatgcc 720
attaaaaatca tcaataaaat taaaaatgaa aattacattt tacagatata tggcaaatct 780
attaataaag attactttga attaatataa aaatatatta aagacaataa gttacaaaac 840
cgtatcttat tcaaaggatga atcttccgag caggaaattt atgagaatac agatataccta 900
atcatgacat ctcaaagcga aggettttgt tatatatattc tagagggtat ggtgtacgat 960
atccctatcc ttgectataa ttttaaatat ggagcgaatg atttttagcaa ttataatgaa 1020
aacgcttcag tttttaaaac tggatgatatt tctggaatgg caaaaaaat aattgagcta 1080
ttaaataacc cagaaaaata taaagaatta gttaaatata atcacaatcg cttcttaaaa 1140
gaatatgcaa aagatgttgt tatggctaaa tatttacta ttcttccgag cagctttaat 1200
aacgtatcat tatcgtctgc tttcagccga aaagaattgg acgaattcca aaatattact 1260
ttttctattg aagattctaa tgatttagct catatttgga atttcagct aaccaatcct 1320
gcacaaaata tgaatttttt tgcttttagtt ggcaagcgaa aatttccaat ggatgctcat 1380
atccaaggaa cacagtgtac gattaagata gctcataaaa agacaggga tttattgtcg 1440
cttttactaa aaaaacgaaa tcagttgaat ttatcaaggg gatatacctt aattgcagaa 1500
gataatagct atgaaaaata tattggagca atatctaata aaggtaactt tgaaattatt 1560

[0007]

gcaataaaaa agaactcatt agttactata aacaaaagta ccttagagtt gcatgagatt 1620
 ccccatgaac tacatcagaa taaattactg attgctttac ccaacatgca aacgcctcta 1680
 aaaattactg atgataattt aataacctatc caagcctcca taaaattaga aaagattgga 1740
 aatacttatt acccatgttt cttgccatct ggcatattta ataatatctg cttagattac 1800
 ggtgaagaat ccaaaattat taatttttagt aaatattctt ataaatatat ctatgactca 1860
 attcgtcata ttgagcaaca tacagatata tcggatatta tcgtttgcaa tgtttattct 1920
 tgggaactta ttcgtgcctc agttattgag agccttatgg aattttaccgg aaaatgggaa 1980
 aaacactttc agacttctcc taaaattgat tatcgatttg atcatgaagg taagcgttcg 2040
 atggatgatg tcttttcaga agaaacattt attatggaat ttccgcgtaa aaatggata 2100
 gataagaaaa cagcagcctt ccaaaatata ccaaacagta ttgtaatgga gtatccgcag 2160
 accaatgggt acagtatcg cagtcattca ctgaaaagta atgtagttgc ggcaaaacat 2220
 tttcttgaaa aattaaataa aattaaggta gatattaaat ttaaaaagca tgaccttgca 2280
 aacatcaaaa aatgaatcg aattatttat gagcatttag gcattaacat aaatatcgaa 2340
 gcatttctaa aaccacgatt agaaaaattt aagcgtgaag aaaaatattt tcatgatttc 2400
 ttcaaaagaa ataattttaa agaggtaatt ttccaagca cttattggaa tccaggtatt 2460
 atttgtctg cacataaaca aggtattaag gtatctgata ttcaatatgc tgccattact 2520
 ccttatcctc ctgcgtattt taaatcacca aaatcacatt acgttgctga taaattgttc 2580
 ttatggtctg aattattgaa tcatgagctt ttaccaaatc caacacgaga gattggttct 2640
 ggtgcccat attggtatgc attagatgat gtgagatttt cagaaaaact gaattatgac 2700
 tatatctttc tatctcaaag taggatttct tcgcgttgcc ttagttttgc aattgagttt 2760
 gcattaaaaa atcctcaact acagctttta ttttctaagc atctagatga aaatatagat 2820
 ttaaagaaca gaattattcc tgataatctt ataatctcca cggaatcttc tatacaaggc 2880
 atcaatgaat ctgcggttgc tgtaggtgtt tattcaacta gcttatttga ggcattagca 2940
 tgcggcaaac aaacttttgt tgttaaatat ccgggatatg aaattatgtc aaatgaaata 3000
 gattcagggt tattctttgc agtagaaaca cctgaagaaa tgcttgagaa aacaagcccg 3060
 aattgggtgg ctgtggcaga tattgaaaac cagttttttg gccaaagaaa ataa 3114

<210> 4
 <211> 1037
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 4

Met Ala Val Ile Ile Phe Val Asn Gly Ile Arg Ala Val Asn Gly Leu
1 5 10 15

Val Lys Ser Ser Ile Asn Thr Ala Asn Ala Phe Ala Glu Glu Gly Leu
20 25 30

Asp Val His Leu Ile Asn Phe Val Gly Asn Ile Thr Gly Ala Glu His
35 40 45

Leu Ser Pro Pro Phe His Leu His Pro Asn Val Lys Thr Ser Ser Ile
50 55 60

[0008]

Ile	Asp	Leu	Phe	Asn	Asp	Ile	Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Ile	
65					70					75					80	
Pro	Phe	Tyr	Ser	Ile	His	Gln	Gln	Phe	Phe	Lys	Ala	Glu	Tyr	Ser	Ala	
				85					90						95	
His	Tyr	Lys	His	Val	Leu	Met	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Glu	
			100					105					110			
Asp	Ser	Ile	Ile	Phe	Thr	His	Pro	Leu	Gln	Leu	Glu	Met	Tyr	Arg	Leu	
		115					120					125				
Ala	Asn	Asn	Asn	Ile	Lys	Ser	Lys	Ala	Lys	Leu	Ile	Val	Gln	Ile	His	
	130					135					140					
Gly	Asn	Tyr	Met	Glu	Glu	Ile	His	Asn	Tyr	Glu	Ile	Trp	Ala	Arg	Asn	
145				150					155						160	
Ile	Asp	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Gln	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	Met	Leu	Glu	
			165					170						175		
Glu	Met	His	Ser	His	Phe	Lys	Ile	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	Phe	Ile	
			180					185					190			
Pro	Asn	Ile	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Leu	Glu	Lys	Lys	Glu	Ala	Asp	Phe	
		195					200					205				
Phe	Ile	Lys	Asp	Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Asn	Ala	Gln	Lys	Phe	Lys	Arg	
	210				215					220						
Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Pro	Arg	Lys	Asn	Gln	Leu	Asp	Ala	
225				230						235					240	
Ile	Lys	Ile	Ile	Asn	Lys	Ile	Lys	Asn	Glu	Asn	Tyr	Ile	Leu	Gln	Ile	
			245					250					255			
Tyr	Gly	Lys	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Tyr	Phe	Glu	Leu	Ile	Lys	Lys	Tyr	
			260				265						270			
Ile	Lys	Asp	Asn	Lys	Leu	Gln	Asn	Arg	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	Glu	Ser	
		275				280						285				
Ser	Glu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Glu	Asn	Thr	Asp	Ile	Leu	Ile	Met	Thr	Ser	
	290					295					300					
Gln	Ser	Glu	Gly	Phe	Gly	Tyr	Ile	Phe	Leu	Glu	Gly	Met	Val	Tyr	Asp	
305				310						315					320	
Ile	Pro	Ile	Leu	Ala	Tyr	Asn	Phe	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Ser	
			325					330						335		
Asn	Tyr	Asn	Glu	Asn	Ala	Ser	Val	Phe	Lys	Thr	Gly	Asp	Ile	Ser	Gly	
		340						345					350			
Met	Ala	Lys	Lys	Ile	Ile	Glu	Leu	Leu	Asn	Asn	Pro	Glu	Lys	Tyr	Lys	

[0009]

355	360	365
Glu Leu Val Gln Tyr Asn His Asn Arg Phe Leu Lys Glu Tyr Ala Lys 370 375 380		
Asp Val Val Met Ala Lys Tyr Phe Thr Ile Leu Pro Arg Ser Phe Asn 385 390 395 400		
Asn Val Ser Leu Ser Ser Ala Phe Ser Arg Lys Glu Leu Asp Glu Phe 405 410 415		
Gln Asn Ile Thr Phe Ser Ile Glu Asp Ser Asn Asp Leu Ala His Ile 420 425 430		
Trp Asn Phe Glu Leu Thr Asn Pro Ala Gln Asn Met Asn Phe Phe Ala 435 440 445		
Leu Val Gly Lys Arg Lys Phe Pro Met Asp Ala His Ile Gln Gly Thr 450 455 460		
Gln Cys Thr Ile Lys Ile Ala His Lys Lys Thr Gly Asn Leu Leu Ser 465 470 475 480		
Leu Leu Leu Lys Lys Arg Asn Gln Leu Asn Leu Ser Arg Gly Tyr Thr 485 490 495		
Leu Ile Ala Glu Asp Asn Ser Tyr Glu Lys Tyr Ile Gly Ala Ile Ser 500 505 510		
Asn Lys Gly Asn Phe Glu Ile Ile Ala Asn Lys Lys Asn Ser Leu Val 515 520 525		
Thr Ile Asn Lys Ser Thr Leu Glu Leu His Glu Ile Pro His Glu Leu 530 535 540		
His Gln Asn Lys Leu Leu Ile Ala Leu Pro Asn Met Gln Thr Pro Leu 545 550 555 560		
Lys Ile Thr Asp Asp Asn Leu Ile Pro Ile Gln Ala Ser Ile Lys Leu 565 570 575		
Glu Lys Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Cys Phe Leu Pro Ser Gly Ile 580 585 590		
Phe Asn Asn Ile Cys Leu Asp Tyr Gly Glu Glu Ser Lys Ile Ile Asn 595 600 605		
Phe Ser Lys Tyr Ser Tyr Lys Tyr Ile Tyr Asp Ser Ile Arg His Ile 610 615 620		
Glu Gln His Thr Asp Ile Ser Asp Ile Ile Val Cys Asn Val Tyr Ser 625 630 635 640		
Trp Glu Leu Ile Arg Ala Ser Val Ile Glu Ser Leu Met Glu Phe Thr 645 650 655		

[0010]

Gly	Lys	Trp	Glu	Lys	His	Phe	Gln	Thr	Ser	Pro	Lys	Ile	Asp	Tyr	Arg	660	665	670
Phe	Asp	His	Glu	Gly	Lys	Arg	Ser	Met	Asp	Asp	Val	Phe	Ser	Glu	Glu	675	680	685
Thr	Phe	Ile	Met	Glu	Phe	Pro	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Thr	690	695	700
Ala	Ala	Phe	Gln	Asn	Ile	Pro	Asn	Ser	Ile	Val	Met	Glu	Tyr	Pro	Gln	705	710	715
Thr	Asn	Gly	Tyr	Ser	Met	Arg	Ser	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Asn	Val	Val	725	730	735
Ala	Ala	Lys	His	Phe	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Lys	Ile	Lys	Val	Asp	Ile	740	745	750
Lys	Phe	Lys	Lys	His	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Lys	Met	Asn	Arg	Ile	755	760	765
Ile	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Ile	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Phe	Leu	Lys	770	775	780
Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Tyr	Phe	His	Asp	Phe	785	790	795
Phe	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Glu	Val	Ile	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Trp	805	810	815
Asn	Pro	Gly	Ile	Ile	Cys	Ala	Ala	His	Lys	Gln	Gly	Ile	Lys	Val	Ser	820	825	830
Asp	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Tyr	His	Pro	Ala	Tyr	Phe	Lys	835	840	845
Ser	Pro	Lys	Ser	His	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	Trp	Ser	Glu	850	855	860
Tyr	Trp	Asn	His	Glu	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Glu	Ile	Gly	Ser	865	870	875
Gly	Ala	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Glu	Lys	885	890	895
Leu	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Ile	Ser	Ser	Arg	900	905	910
Leu	Leu	Ser	Phe	Ala	Ile	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Gln	915	920	925
Leu	Leu	Phe	Ser	Lys	His	Leu	Asp	Glu	Asn	Ile	Asp	Leu	Lys	Asn	Arg	930	935	940
Ile	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	Gln	Gly	945	950	955

[0011]

Ile Asn Glu Ser Arg Val Ala Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser Leu Phe
965 970 975

Glu Ala Leu Ala Cys Gly Lys Gln Thr Phe Val Val Lys Tyr Pro Gly
980 985 990

Tyr Glu Ile Met Ser Asn Glu Ile Asp Ser Gly Leu Phe Phe Ala Val
995 1000 1005

Glu Thr Pro Glu Glu Met Leu Glu Lys Thr Ser Pro Asn Trp Val
1010 1015 1020

Ala Val Ala Asp Ile Glu Asn Gln Phe Phe Gly Gln Glu Lys
1025 1030 1035

<210> 5
<211> 1461
<212> DNA
<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 5
atgattatga gcaaaattag caaattggta acccacccaa accttttctt tcgagattat 60
ttcttaaaaa aagcaccgtt aaattatggc gaaaatatta aacctttacc agtcgaaacc 120
tcttctcata gcaaaaaaaaa tacagcccat aaaacaccgg tatcatccga ccaaccaatt 180
gaagatccat acccagtaac atttccaatt gatgtagttt atacttgggt agattcagat 240
gatgaaaaat tcaatgaaga acgcctaaag ttctaaaatt caagcacatc tgagactcta 300
caaggcaaag cagaaagcac cgatattgca agattccaat cagcgcacga attaaaatat 360
tcgattcgaa gcctgatgaa gtatgcecca tgggtaaatc atatttacat tgtaacaaat 420
ggtcaaatc caaaatggtt agataccaac aatacaaagg taacgattat cctcactca 480
actattatcg acagtcaatt tctcctact tttaattctc acgtcattga atcctctcta 540
tataaaatcc caggattatc agagcattac atttatttca atgatgatgt catgctagct 600
agagatttaa gcccatctta tttctttaca agcagcggat tagcaaaact gtttattacc 660
aactctctgc taccaaatgg ctataagaat gtgaaagaca caccaacca atgggcctca 720
aaaaattccc gtgagctttt acatgcagaa acaggatttt gggetgaagc catgtttgca 780
catacttttc atccacaacg taaaagtgt catgaatcta ttgaacacct atggcatgaa 840
caattaaatg tttgtcgta aaaccgttgc cgtgatattt cagatattaa catggcgaca 900
ttcctgcacc accattttgc cattttgaca ggccaagctc ttgtacacg cactaaatgt 960
atttacttta acgttcgctc tcctcaagca gctcagcatt acaaaacatt attagctcga 1020
aaaggaagcg aatacagccc acattctatc tgettaaatg atcatacatc gagcaataaa 1080
aatattttat ctaattacga agccaaatta caaagctttt tagaaacata ctatccagat 1140
gtatcagaag cagaaattct ccttctact aaatctgaag tagctgaatt agttaaacat 1200
aaagattatt taactgtata tactaaatta ttacctatta tcaataagca gctgggtcaat 1260
aaatataata aaccttatc atatcttttc tattatttag gtttatctgc ccggttttta 1320
tttgaagaaa cgcaacaaga aactaccgg gaaactgctg aagaaaattt acaaatcttt 1380
tgtggcctaa acccaaaaca tacactagcc ctcaaatact tagcggatgt caccctcaca 1440

[0012]

tcacagccta gtggacaata a 1461

<210> 6
<211> 486
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 6

Met Ile Met Ser Lys Ile Ser Lys Leu Val Thr His Pro Asn Leu Phe
1 5 10 15

Phe Arg Asp Tyr Phe Leu Lys Lys Ala Pro Leu Asn Tyr Gly Glu Asn
20 25 30

Ile Lys Pro Leu Pro Val Glu Thr Ser Ser His Ser Lys Lys Asn Thr
35 40 45

Ala His Lys Thr Pro Val Ser Ser Asp Gln Pro Ile Glu Asp Pro Tyr
50 55 60

Pro Val Thr Phe Pro Ile Asp Val Val Tyr Thr Trp Val Asp Ser Asp
65 70 75 80

Asp Glu Lys Phe Asn Glu Glu Arg Leu Lys Phe Gln Asn Ser Ser Thr
85 90 95

Ser Glu Thr Leu Gln Gly Lys Ala Glu Ser Thr Asp Ile Ala Arg Phe
100 105 110

Gln Ser Arg Asp Glu Leu Lys Tyr Ser Ile Arg Ser Leu Met Lys Tyr
115 120 125

Ala Pro Trp Val Asn His Ile Tyr Ile Val Thr Asn Gly Gln Ile Pro
130 135 140

Lys Trp Leu Asp Thr Asn Asn Thr Lys Val Thr Ile Ile Pro His Ser
145 150 155 160

Thr Ile Ile Asp Ser Gln Phe Leu Pro Thr Phe Asn Ser His Val Ile
165 170 175

Glu Ser Ser Leu Tyr Lys Ile Pro Gly Leu Ser Glu His Tyr Ile Tyr
180 185 190

Phe Asn Asp Asp Val Met Leu Ala Arg Asp Leu Ser Pro Ser Tyr Phe
195 200 205

Phe Thr Ser Ser Gly Leu Ala Lys Leu Phe Ile Thr Asn Ser Arg Leu
210 215 220

Pro Asn Gly Tyr Lys Asn Val Lys Asp Thr Pro Thr Gln Trp Ala Ser
225 230 235 240

Lys Asn Ser Arg Glu Leu Leu His Ala Glu Thr Gly Phe Trp Ala Glu
245 250 255

Ala Met Phe Ala His Thr Phe His Pro Gln Arg Lys Ser Val His Glu

[0013]

260	265	270
Ser Ile Glu His Leu Trp His Glu Gln Leu Asn Val Cys Arg Gln Asn 275 280 285		
Arg Phe Arg Asp Ile Ser Asp Ile Asn Met Ala Thr Phe Leu His His 290 295 300		
His Phe Ala Ile Leu Thr Gly Gln Ala Leu Ala Thr Arg Thr Lys Cys 305 310 315 320		
Ile Tyr Phe Asn Val Arg Ser Pro Gln Ala Ala Gln His Tyr Lys Thr 325 330 335		
Leu Leu Ala Arg Lys Gly Ser Glu Tyr Ser Pro His Ser Ile Cys Leu 340 345 350		
Asn Asp His Thr Ser Ser Asn Lys Asn Ile Leu Ser Asn Tyr Glu Ala 355 360 365		
Lys Leu Gln Ser Phe Leu Glu Thr Tyr Tyr Pro Asp Val Ser Glu Ala 370 375 380		
Glu Ile Leu Leu Pro Thr Lys Ser Glu Val Ala Glu Leu Val Lys His 385 390 395 400		
Lys Asp Tyr Leu Thr Val Tyr Thr Lys Leu Leu Pro Ile Ile Asn Lys 405 410 415		
Gln Leu Val Asn Lys Tyr Asn Lys Pro Tyr Ser Tyr Leu Phe Tyr Tyr 420 425 430		
Leu Gly Leu Ser Ala Arg Phe Leu Phe Glu Glu Thr Gln Gln Glu His 435 440 445		
Tyr Arg Glu Thr Ala Glu Glu Asn Leu Gln Ile Phe Cys Gly Leu Asn 450 455 460		
Pro Lys His Thr Leu Ala Leu Lys Tyr Leu Ala Asp Val Thr Leu Thr 465 470 475 480		
Ser Gln Pro Ser Gly Gln 485		

<210> 7
 <211> 1638
 <212> DNA
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

 <400> 7
 atgtttatac ttaataacag aaaatggcgt aaacttaaaa gagaccctag cgctttcttt 60
 cgagatagta aatttaactt ttttaagatat ttttctgcta aaaaatttgc aaagaatttt 120
 aaaaattcat cacatatcca taaaactaat ataagtaaag ctcaatcaaa tattttctca 180
 accttaaac aaaatcgga acaagatatg ttaattccta ttaatttttt taattttgaa 240
 tatatagtta aaaaacttaa caatcaaac gcaataggtg tatatatctt tctttcta 300

[0014]

```

cttactctta agcctgcatt atgtattcta gaatcacata aagaagactt tttaaataaa 360
ttttctctta ctatttctct tgaaaattta aagcttcaat acaaatttaa tggacaaata 420
aaaaatccta agtcctgtaa tgaaatttgg acagatttat ttagcattgc tcatgttgac 480
atgaaactca gcacagatag aactttaagt tcatctatat ctcaattttg gttcagatta 540
gagttctgta aagaagataa ggattttatc ttatttccta cagetaacag atattctaga 600
aaactttgga agcactctat taaaaataat caattattta aagaaggcat acgaaactat 660
tcagaaatat cttcattacc ctatgaagaa gatcataatt ttgatattga tttagtattt 720
acttgggtca actcagaaga taagaattgg caagagttaa ataaaaata taagcccgac 780
tttaatagcg atgcaaccag tacatcaaga ttccttagta gagatgaatt aaaattcgca 840
ttacgctctt gggaaatgaa tggatccttc attcgaaaaa tttttattgt ctctaattgt 900
gctcccccag catggctaga tttaaataac cctaaaattc aatgggtata tcacgaagaa 960
attatgccac aaagtgcctt tcctactttt agctcacatg ctattgaaac cagcttgac 1020
catataccag gaattagtaa ctattttatt tacagcaatg acgacttctt attaactaaa 1080
ccattgaata aagacaattt cttctattcg aatggtattg caaagttaag attagaagca 1140
tggggaaatg ttaatggtga atgtactgaa ggagaacctg actacttaaa tgggtctcgc 1200
aatgcgaaca ctctcttaga aaaggaattt aaaaaattta ctactaaact acatactcac 1260
tcccccaat ccatgagaac tgatatttta ttgagatgg aaaaaaata tccagaagag 1320
tttaatagaa cactacataa taaattccga tctttagatg atattgcagt aacgggctat 1380
ctctatcatc attatgccct actctctgga cgagcactac aaagttctga caagacggaa 1440
cttgtacagc aaaatcatga tttcaaaaag aaactaaata atgtagtgac cttaactaaa 1500
gaaaggaatt ttgacaaact tcctttgagc gtatgtatca acgatgggtc tgatagtcac 1560
ttgaatgaag aatggaatgt tcaagttatt aagttcttag aaactctttt cccattacca 1620
tcatcatttg agaaataa 1638

```

<210> 8
 <211> 545
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌
 <400> 8

Met Phe Ile Leu Asn Asn Arg Lys Trp Arg Lys Leu Lys Arg Asp Pro
1 5 10 15

Ser Ala Phe Phe Arg Asp Ser Lys Phe Asn Phe Leu Arg Tyr Phe Ser
20 25 30

Ala Lys Lys Phe Ala Lys Asn Phe Lys Asn Ser Ser His Ile His Lys
35 40 45

Thr Asn Ile Ser Lys Ala Gln Ser Asn Ile Ser Ser Thr Leu Lys Gln
50 55 60

Asn Arg Lys Gln Asp Met Leu Ile Pro Ile Asn Phe Phe Asn Phe Glu
65 70 75 80

Tyr Ile Val Lys Lys Leu Asn Asn Gln Asn Ala Ile Gly Val Tyr Ile

[0015]

85	90	95
Leu Pro Ser Asn Leu Thr Leu Lys Pro Ala Leu Cys Ile Leu Glu Ser 100 105 110		
His Lys Glu Asp Phe Leu Asn Lys Phe Leu Leu Thr Ile Ser Ser Glu 115 120 125		
Asn Leu Lys Leu Gln Tyr Lys Phe Asn Gly Gln Ile Lys Asn Pro Lys 130 135 140		
Ser Val Asn Glu Ile Trp Thr Asp Leu Phe Ser Ile Ala His Val Asp 145 150 155 160		
Met Lys Leu Ser Thr Asp Arg Thr Leu Ser Ser Ser Ile Ser Gln Phe 165 170 175		
Trp Phe Arg Leu Glu Phe Cys Lys Glu Asp Lys Asp Phe Ile Leu Phe 180 185 190		
Pro Thr Ala Asn Arg Tyr Ser Arg Lys Leu Trp Lys His Ser Ile Lys 195 200 205		
Asn Asn Gln Leu Phe Lys Glu Gly Ile Arg Asn Tyr Ser Glu Ile Ser 210 215 220		
Ser Leu Pro Tyr Glu Glu Asp His Asn Phe Asp Ile Asp Leu Val Phe 225 230 235 240		
Thr Trp Val Asn Ser Glu Asp Lys Asn Trp Gln Glu Leu Tyr Lys Lys 245 250 255		
Tyr Lys Pro Asp Phe Asn Ser Asp Ala Thr Ser Thr Ser Arg Phe Leu 260 265 270		
Ser Arg Asp Glu Leu Lys Phe Ala Leu Arg Ser Trp Glu Met Asn Gly 275 280 285		
Ser Phe Ile Arg Lys Ile Phe Ile Val Ser Asn Cys Ala Pro Pro Ala 290 295 300		
Trp Leu Asp Leu Asn Asn Pro Lys Ile Gln Trp Val Tyr His Glu Glu 305 310 315 320		
Ile Met Pro Gln Ser Ala Leu Pro Thr Phe Ser Ser His Ala Ile Glu 325 330 335		
Thr Ser Leu His His Ile Pro Gly Ile Ser Asn Tyr Phe Ile Tyr Ser 340 345 350		
Asn Asp Asp Phe Leu Leu Thr Lys Pro Leu Asn Lys Asp Asn Phe Phe 355 360 365		
Tyr Ser Asn Gly Ile Ala Lys Leu Arg Leu Glu Ala Trp Gly Asn Val 370 375 380		

[0016]

Asn Gly Glu Cys Thr Glu Gly Glu Pro Asp Tyr Leu Asn Gly Ala Arg
 385 390 395 400
 Asn Ala Asn Thr Leu Leu Glu Lys Glu Phe Lys Lys Phe Thr Thr Lys
 405 410 415
 Leu His Thr His Ser Pro Gln Ser Met Arg Thr Asp Ile Leu Phe Glu
 420 425 430
 Met Glu Lys Lys Tyr Pro Glu Glu Phe Asn Arg Thr Leu His Asn Lys
 435 440 445
 Phe Arg Ser Leu Asp Asp Ile Ala Val Thr Gly Tyr Leu Tyr His His
 450 455 460
 Tyr Ala Leu Leu Ser Gly Arg Ala Leu Gln Ser Ser Asp Lys Thr Glu
 465 470 475 480
 Leu Val Gln Gln Asn His Asp Phe Lys Lys Lys Leu Asn Asn Val Val
 485 490 495
 Thr Leu Thr Lys Glu Arg Asn Phe Asp Lys Leu Pro Leu Ser Val Cys
 500 505 510
 Ile Asn Asp Gly Ala Asp Ser His Leu Asn Glu Glu Trp Asn Val Gln
 515 520 525
 Val Ile Lys Phe Leu Glu Thr Leu Phe Pro Leu Pro Ser Ser Phe Glu
 530 535 540
 Lys
 545

<210> 9
 <211> 1893
 <212> DNA
 <213> 硕大利什曼原虫

<400> 9
 atgacgaacc cgtccaactc caacctgcag gccttgcgcg aggagctctg caccgctggc 60
 ctggatcagg gtcacctctt cgagggatgg ccggagactg tggatgagtg caacgagagg 120
 cagatcgecc tcttcacaga tttgtacatg ttttccaaca tgtatcccgg cggcgttgct 180
 cagtacatcc gcaacgggca cgagctgctg gcgcgtgaga gcgaagaggt ggactttgca 240
 gcgctggaga tgccccctct catcttcgag gcgcgctcgc tgcaccggcg caccgctgag 300
 aggaacggcg tggagaacgc cggaaccgcg atgctgtgca agacggtgtt cgtgctggtt 360
 gctggcggtc tgggcgaacg tctgggctac tcgagcatca aggtgagcct gccggtggag 420
 acggcgacga acacaacgta tctgcctac tacctccggt gggcccagcg ggtggggggg 480
 aaggaggtac catttgtgat aatgacctct gacgacaacg acgaccgcac gctgcagctc 540
 ctgcgcgagc tgcagttgga ggtgccaac ttgcatgtgc tcaagcaggg gcaggctctc 600
 tgttttgccg acagcgccgc gcacctcgcc ctggacgaga cagggaagct gctgcgcaag 660
 ccacacggtc acggcgacgt gcactccctc atclacaacg cgactglgaa gagagacgtg 720
 gtgccggact ccggcgacgg taccgcgacg gcgcagccac tegtgaacga ctggtggcg 780

[0017]

```

gccggetacg agtccattgt cttcatccag gacaccaacg ccggecgac gatcacaatc 840
cccatcagcc tcgccttgag tgccgagcac tcgctcgaca tgaacttcac ctgcatccct 900
cgtgtgccga aggagccgat cgggctgcta tgccgaacca agaagaatag cggecgaccg 960
tggttggtcg cgaacgtgga gtacaacgtc ttgtccgagg tctcgcgcg cgttaacaag 1020
gatgtggcg atgaagtcag tgaccccaact ggcttctccc cgttccctgg cagegtcaac 1080
accctcgtgt tcaagctctc cagctacgtg gaccggctgc gggagtcgca cggtatcgtg 1140
ccggagttca tcaatcccaa gtactcggac gagacgcgcc gctccttcaa gaagcccgca 1200
cgcatcgagt ccctgatgca ggacatcgcg ctgctcttct ccgaggatga ctaccgtgtc 1260
ggcggtaccg tctttgagcg attctcgtac cagecagtga agaactcgct agaggaggcg 1320
gcagggcttg tggcgcaggg caacggcgcc tactgcgccg ccacgggaga ggctgccttc 1380
tacgagctgc agcggcgccg tctcaaggcc atcgggctgc cgtctcttcta cagctcgcag 1440
ccggaggtga cgggtggcgaa ggacgccttt ggctgtcgctc tcttccgat aatcgtgtg 1500
gatacgatgt gcgcgtcaag cggatccctc gacgaccttg cgcgcgtctt tccgacgcgg 1560
gaaaaggtgc acatcgatca gcacagcacc ttgattgttg agggccgtgt catcatcgag 1620
agcctggagc tatacgtgc actcacgatt cgcggcccgca cagactcgat ggcgtgcgg 1680
cacgtagtac gaaacgtgt ggtgcgcaat gccgctggt cggtacacgc gatcttgtct 1740
ctctgcgctg ggcgcatag cagctgtcc gaggtggacc gcacccgagg gtttgtgtg 1800
aagaagacag ccatggcggg gatggactgc aatacgaagg gcgagtcgga ggccggtgca 1860
ccgtctggtg cggtgaccc ggcaaagttg tag 1893

```

<210> 10
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> 硕大利什曼原虫
 <400> 10

Met Thr Asn Pro Ser Asn Ser Asn Leu Gln Ala Leu Arg Glu Glu Leu
1 5 10 15

Cys Thr Pro Gly Leu Asp Gln Gly His Leu Phe Glu Gly Trp Pro Glu
20 25 30

Thr Val Asp Glu Cys Asn Glu Arg Gln Ile Ala Leu Leu Thr Asp Leu
35 40 45

Tyr Met Phe Ser Asn Met Tyr Pro Gly Gly Val Ala Gln Tyr Ile Arg
50 55 60

Asn Gly His Glu Leu Leu Ala Arg Glu Ser Glu Glu Val Asp Phe Ala
65 70 75 80

Ala Leu Glu Met Pro Pro Leu Ile Phe Glu Ala Pro Ser Leu His Arg
85 90 95

Arg Thr Ala Glu Arg Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Thr Ala Met Leu
100 105 110

[0018]

Cys 115	Lys	Thr	Val	Phe	Val	Leu	Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu
Gly 130	Tyr	Ser	Ser	Ile	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Val	Glu	Thr	Ala	Thr	Asn
Thr 145	Thr	Tyr	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Trp	Ala	Gln	Arg	Val	Gly	Gly
Lys	Glu	Val	Pro	Phe 165	Val	Ile	Met	Thr	Ser 170	Asp	Asp	Thr	His	Asp 175	Arg
Thr	Leu	Gln	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln 185	Leu	Glu	Val	Pro	Asn 190	Leu	His
Val	Leu	Lys 195	Gln	Gly	Gln	Val	Phe 200	Cys	Phe	Ala	Asp	Ser 205	Ala	Ala	His
Leu	Ala	Leu	Asp	Glu	Thr	Gly 215	Lys	Leu	Leu	Arg	Lys 220	Pro	His	Gly	His
Gly 225	Asp	Val	His	Ser	Leu 230	Ile	Tyr	Asn	Ala	Thr 235	Val	Lys	Arg	Asp	Val 240
Val	Pro	Asp	Ser	Gly 245	Asp	Gly	Thr	Ala	Thr 250	Ala	Gln	Pro	Leu	Val 255	Asn
Asp	Trp	Leu	Ala 260	Ala	Gly	Tyr	Glu 265	Ser	Ile	Val	Phe	Ile	Gln 270	Asp	Thr
Asn	Ala	Gly 275	Ala	Thr	Ile	Thr	Ile 280	Pro	Ile	Ser	Leu	Ala 285	Leu	Ser	Ala
Glu 290	His	Ser	Leu	Asp	Met	Asn 295	Phe	Thr	Cys	Ile	Pro 300	Arg	Val	Pro	Lys
Glu 305	Pro	Ile	Gly	Leu 310	Leu	Cys	Arg	Thr	Lys	Lys 315	Asn	Ser	Gly	Asp	Pro 320
Trp	Leu	Val	Ala	Asn 325	Val	Glu	Tyr	Asn	Val 330	Phe	Ala	Glu	Val	Ser 335	Arg
Ala	Leu	Asn 340	Lys	Asp	Gly	Gly	Asp 345	Glu	Val	Ser	Asp	Pro	Thr 350	Gly	Phe
Ser	Pro	Phe 355	Pro	Gly	Ser	Val	Asn 360	Thr	Leu	Val	Phe	Lys 365	Leu	Ser	Ser
Tyr 370	Val	Asp	Arg	Leu	Arg	Glu 375	Ser	His	Gly	Ile	Val 380	Pro	Glu	Phe	Ile
Asn 385	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asp 390	Glu	Thr	Arg	Arg	Ser 395	Phe	Lys	Lys	Pro	Ala 400
Arg	Ile	Glu	Ser	Leu 405	Met	Gln	Asp	Ile	Ala 410	Leu	Leu	Phe	Ser	Glu 415	Asp

[0019]

Asp Tyr Arg Val Gly Gly Thr Val Phe Glu Arg Phe Ser Tyr Gln Pro
 420 425 430
 Val Lys Asn Ser Leu Glu Glu Ala Ala Gly Leu Val Ala Gln Gly Asn
 435 440 445
 Gly Ala Tyr Cys Ala Ala Thr Gly Glu Ala Ala Phe Tyr Glu Leu Gln
 450 455 460
 Arg Arg Arg Leu Lys Ala Ile Gly Leu Pro Leu Phe Tyr Ser Ser Gln
 465 470 475 480
 Pro Glu Val Thr Val Ala Lys Asp Ala Phe Gly Val Arg Leu Phe Pro
 485 490 495
 Ile Ile Val Leu Asp Thr Met Cys Ala Ser Ser Gly Ser Leu Asp Asp
 500 505 510
 Leu Ala Arg Val Phe Pro Thr Pro Glu Lys Val His Ile Asp Gln His
 515 520 525
 Ser Thr Leu Ile Val Glu Gly Arg Val Ile Ile Glu Ser Leu Glu Leu
 530 535 540
 Tyr Gly Ala Leu Thr Ile Arg Gly Pro Thr Asp Ser Met Ala Leu Pro
 545 550 555 560
 His Val Val Arg Asn Ala Val Val Arg Asn Ala Gly Trp Ser Val His
 565 570 575
 Ala Ile Leu Ser Leu Cys Ala Gly Arg Asp Ser Arg Leu Ser Glu Val
 580 585 590
 Asp Arg Ile Arg Gly Phe Val Leu Lys Lys Thr Ala Met Ala Val Met
 595 600 605
 Asp Cys Asn Thr Lys Gly Glu Ser Glu Ala Gly Ala Pro Ser Gly Ala
 610 615 620
 Ala Asp Pro Ala Lys Leu
 625 630

<210> 11
 <211> 1119
 <212> DNA
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 11
 atgaaagtct taaccgtctt tggcactcgc cctgaagcta ttaaaatggc gcctgtaatt 60
 ctagagttac aaaaacataa cacaattact tcaaaagttt gcattactgc acagcatcgt 120
 gaaatgctag atcaggtttt gagcctattc gaaatcaaag ctgattatga tttaaataac 180
 atgaaaccca accagagcct acaagaaatc acaacaaata tcattctcaag ccttaccgat 240
 gttcttgaag atttcaaacc tgactgcgtc cttgctcagc gagacaccac aacaactttt 300
 gcagctagcc ttgctgcatt ctatcaaaaa atacctgttg gccacattga agcaggcctg 360

[0020]

```

agaacttata atttatactc tccttggcca gaggaagcaa ataggcggtt aacaagcggt 420
ctaagccagt ggcattttgc acctactgaa gattctaaaa ataacttact atctgaatca 480
ataccttctg acaaagttat tgttactgga aatactgtca tagatgcact aatggtatct 540
ctagaaaaac taaaaataac tacaattaaa aaacaaatgg aacaagcttt tccatttatt 600
caggacaact ctaaagtaat tttaattacc gctcatagaa gagaaaatca tggggaaggt 660
attaaaaata ttggactttc tatcttagaa ttagctaaaa aatacccaac attctctttt 720
gtgatccgcg tccattttaa tcctaacgtt agaaaaccaa ttcaagattt attatcctct 780
gtgcacaatg ttcattttat tgagccacaa gaatacttac cattcgtata tttaatgtct 840
aaaagccata taatattaag tgattcaggc ggcatacaag aagaagctcc atccctagga 900
aaaccagttc ttgtattaag agatactaca gaacgtcctg aagctgtagc tgcaggaact 960
gtaaaattag taggttctga aactcaaaat attattgaga gctttacaca actaattgaa 1020
taccctgaat attatgaaaa aatggctaatt attgaaaacc cttacgggat aggtaatgcc 1080
tcaaaaaatca ttgtagaac ttatttaaag aatagataa 1119

```

<210> 12
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 12

```

Met Lys Val Leu Thr Val Phe Gly Thr Arg Pro Glu Ala Ile Lys Met
1           5           10          15

```

```

Ala Pro Val Ile Leu Glu Leu Gln Lys His Asn Thr Ile Thr Ser Lys
          20          25          30

```

```

Val Cys Ile Thr Ala Gln His Arg Glu Met Leu Asp Gln Val Leu Ser
          35          40          45

```

```

Leu Phe Glu Ile Lys Ala Asp Tyr Asp Leu Asn Ile Met Lys Pro Asn
          50          55          60

```

```

Gln Ser Leu Gln Glu Ile Thr Thr Asn Ile Ile Ser Ser Leu Thr Asp
65          70          75          80

```

```

Val Leu Glu Asp Phe Lys Pro Asp Cys Val Leu Ala His Gly Asp Thr
          85          90          95

```

```

Thr Thr Thr Phe Ala Ala Ser Leu Ala Ala Phe Tyr Gln Lys Ile Pro
          100          105          110

```

```

Val Gly His Ile Glu Ala Gly Leu Arg Thr Tyr Asn Leu Tyr Ser Pro
          115          120          125

```

```

Trp Pro Glu Glu Ala Asn Arg Arg Leu Thr Ser Val Leu Ser Gln Trp
          130          135          140

```

```

His Phe Ala Pro Thr Glu Asp Ser Lys Asn Asn Leu Leu Ser Glu Ser
          145          150          155          160

```

```

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

```

[0021]

165	170	175
Leu Met Val Ser Leu Glu Lys Leu Lys Ile Thr Thr Ile Lys Lys Gln 180 185 190		
Met Glu Gln Ala Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ser Lys Val Ile Leu 195 200 205		
Ile Thr Ala His Arg Arg Glu Asn His Gly Glu Gly Ile Lys Asn Ile 210 215 220		
Gly Leu Ser Ile Leu Glu Leu Ala Lys Lys Tyr Pro Thr Phe Ser Phe 225 230 235 240		
Val Ile Pro Leu His Leu Asn Pro Asn Val Arg Lys Pro Ile Gln Asp 245 250 255		
Leu Leu Ser Ser Val His Asn Val His Leu Ile Glu Pro Gln Glu Tyr 260 265 270		
Leu Pro Phe Val Tyr Leu Met Ser Lys Ser His Ile Ile Leu Ser Asp 275 280 285		
Ser Gly Gly Ile Gln Glu Glu Ala Pro Ser Leu Gly Lys Pro Val Leu 290 295 300		
Val Leu Arg Asp Thr Thr Glu Arg Pro Glu Ala Val Ala Ala Gly Thr 305 310 315 320		
Val Lys Leu Val Gly Ser Glu Thr Gln Asn Ile Ile Glu Ser Phe Thr 325 330 335		
Gln Leu Ile Glu Tyr Pro Glu Tyr Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ile Glu 340 345 350		
Asn Pro Tyr Gly Ile Gly Asn Ala Ser Lys Ile Ile Val Glu Thr Leu 355 360 365		
Leu Lys Asn Arg 370		

<210> 13
 <211> 3192
 <212> DNA
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 13
 atggctagct ggagccaccc gcagttcgaa aaaggcgccc tggttccgcg tggatccgct 60
 gttattatat ttgttaacgg aattcgggct gtaaatggcc ttgttaaadc atctatcaat 120
 actgcaaacg cttttgctga agaaggactg gatgttcatt taattaattt tgttggcaat 180
 attactggag cagagcattt atacccccc ttccacttac atcccattgt caaaacctcc 240
 agcatcatag attattttaa tgacattcca gaaaatgtta gctgccgaaa tactctttt 300
 tattctattc atcaacaatt cttcaaagct gaatatagtg cccactataa gcattgtttg 360
 atgaaaattg aatctttatt atctgcagaa gatagcatta tcttactca tctcttcaa 420

[0022]

ctggaaatgt atcgtttagc gaataatgat atcaagtcaa aagccaaact aattgtacaa	480
attcatggta attatatgga agaaatccat aactatgaaa ttttggcacg aaatategat	540
tatgttgact atcttcaaac ggtatctgat gaaatgctgg aagaaatgca ttcccatitc	600
aaaaacaaaa aagacaaatt agtttttatt ccaaacatca cttatcccat ttcattagaa	660
aaaaaagaag ctgattttctt tattaaggat aatgaagaca tcgataatgc tcagaaatit	720
aaacgtatct ctattgttgg cagcattcag ccaagaaaaa accaattgga tgccattaaa	780
atcatcaata aaattaaaaa tgaaaattac attttacaga tatatggcaa atctattaat	840
aaagattact ttgaattaat taaaaaatat attaaagaca ataagttaca aaaccgtatc	900
ttattcaaa ggtgaattctt cgagcaggaa atttatgaaa atacagatat cctgatcatg	960
acatcagaaa gtgagggatt tccatatata tttatggaag gcatgggtga tgatattcca	1020
atcgttgtat atgattttta atatggagcg aatgattaca gtaactataa tgaaaaatgg	1080
tggtttttta aaactgggtga tatttctgga atggcaaaaa aaataattga gctattaaat	1140
aaccagaaa aatataaaga attagttcaa tataalcaca atcgcttctt aaaagaatat	1200
gcaaaagatg tggttatggc taaatatctt actattcttc cgcgcagctt taataacgta	1260
tcattatcgt ctgctttcag ccgaaaagaa ttggacgaat tccaaaatat tactttttct	1320
attgaagatt ctaatgattt agctcatatt tggaatttcg agctaacca tctgcacaa	1380
aatatgaatt tttttgcttt agttggcaag cgaaaatttc caatggatgc tcatatccaa	1440
ggaacacagt gtacgattaa gatagctcat aaaaagacag ggaatttatt gtcgctttta	1500
ctaaaaaac gaaatcagtt gaatttatca aggggatata ccttaattgc agaagataat	1560
agctatgaaa aatatattgg agcaatatct aataaaggta actttgaaat tattgcaaat	1620
aaaaagagct cattagttac tataaacaaa agtacccttag agttgcatga gattcccat	1680
gaactacatc agaataaatt actgattgct ttaccaaca tgcaaacgcc tctaaaaatt	1740
actgatgata atttaatacc tatccaagcc tccataaaat tagaaaagat tggaaatact	1800
tattacccat gtttcttgcc atctggcata tttaataata tctgcttaga ttacggtgaa	1860
gaatccaaaa ttattaattt tagtaaatat tcttataaat atatctatga ctcaattcgt	1920
catattgagc aacatacaga tatatcggat attatcgttt gcaatgttta ttcttgggaa	1980
cttattcgtg cctcagttat tgagagcctt atggaattta ccggaaaatg ggaaaaacac	2040
tttcagaactt ctctaaaaat tgattatcga ttgatcatg aaggtaagcg ttgatggat	2100
gatgtctttt cagaagaac atttattatg gaatttccgc gtaaaaatgg tatagataag	2160
aaaacagcag ccttccaaaa tataccaaac agtattgtaa tggagtatcc gcagaccaat	2220
ggttacagta tgcgcagtea ttactgaaa agtaatgtag ttgcggcaaa acattttctt	2280
gaaaaattaa ataaaaattaa ggtagatatt aaatttaaaa agcatgacct tgcaaacatc	2340
aaaaaaatga atcgaattat ttatgagcat ttaggcatta acataaatat cgaagcattt	2400
ctaaaaccac gattagaaaa atttaagcgt gaagaaaaat attttcatga ttctttcaaa	2460
agaaataatt ttaaagaggt aatttttcca agcacttatt ggaatccagg tattatttgt	2520
gctgcacata aacaaggat taaggatat gatattcaat atgctgcat tactccttat	2580
catcctgcgt attttaaat accaaaatca cattacgttg ctgataaatt gttcttatgg	2640
tctgaatatt ggaatcatga gcttttacca aatccaacac gagagattgg ttctgggtgc	2700

[0023]

```

gcatattggt atgcattaga tgatgtgaga ttttcagaaa aactgaatta tgactatata 2760
tttctatctc aaagtaggat ttcttcgcgc ttgcttagtt ttgcaattga gtttgatta 2820
aaaaatcctc aactacagct tttattttct aagcatccag atgaaaatat agatttaaag 2880
aacagaatta ttctgataa tcttataatc tccacggaat cttctataca aggcataaat 2940
gaatctcgcg ttgctgtagg tgtttattca actagcttat ttgaggcatt agcatgcggc 3000
aaacaaactt ttgttgtaa atatccggga tatgaaatta tgtcaaatga aatagattca 3060
gggtttattct ttgcagtaga aacacctgaa gaaatgcttg agaaaacaag cccgaattgg 3120
gtggctgtgg cagatatga aaaccagttt ttggccaag aaaaactcga gcaccaccac 3180
caccaccact ga 3192

```

<210> 14
 <211> 1063
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 14

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser Ala Val Ile Ile Phe Val Asn Gly Ile Arg Ala Val Asn
20 25 30

Gly Leu Val Lys Ser Ser Ile Asn Thr Ala Asn Ala Phe Ala Glu Glu
35 40 45

Gly Leu Asp Val His Leu Ile Asn Phe Val Gly Asn Ile Thr Gly Ala
50 55 60

Glu His Leu Tyr Pro Pro Phe His Leu His Pro Asn Val Lys Thr Ser
65 70 75 80

Ser Ile Ile Asp Leu Phe Asn Asp Ile Pro Glu Asn Val Ser Cys Arg
85 90 95

Asn Thr Pro Phe Tyr Ser Ile His Gln Gln Phe Phe Lys Ala Glu Tyr
100 105 110

Ser Ala His Tyr Lys His Val Leu Met Lys Ile Glu Ser Leu Leu Ser
115 120 125

Ala Glu Asp Ser Ile Ile Phe Thr His Pro Leu Gln Leu Glu Met Tyr
130 135 140

Arg Leu Ala Asn Asn Asp Ile Lys Ser Lys Ala Lys Leu Ile Val Gln
145 150 155 160

Ile His Gly Asn Tyr Met Glu Glu Ile His Asn Tyr Glu Ile Leu Ala
165 170 175

Arg Asn Ile Asp Tyr Val Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ser Asp Glu Met
180 185 190

[0024]

Leu	Glu	Glu	Met	His	Ser	His	Phe	Lys	Ile	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	195	200	205
Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Leu	Glu	Lys	Lys	Glu	Ala	210	215	220
Asp	Phe	Phe	Ile	Lys	Asp	Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Asn	Ala	Gln	Lys	Phe	225	230	235
Lys	Arg	Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Pro	Arg	Lys	Asn	Gln	Leu	245	250	255
Asp	Ala	Ile	Lys	Ile	Ile	Asn	Lys	Ile	Lys	Asn	Glu	Asn	Tyr	Ile	Leu	260	265	270
Gln	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Tyr	Phe	Glu	Leu	Ile	Lys	275	280	285
Lys	Tyr	Ile	Lys	Asp	Asn	Lys	Leu	Gln	Asn	Arg	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	290	295	300
Glu	Ser	Ser	Glu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Glu	Asn	Thr	Asp	Ile	Leu	Ile	Met	305	310	315
Thr	Ser	Glu	Ser	Glu	Gly	Phe	Pro	Tyr	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Met	Val	325	330	335
Tyr	Asp	Ile	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp	Phe	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Asp	340	345	350
Tyr	Ser	Asn	Tyr	Asn	Glu	Asn	Gly	Cys	Val	Phe	Lys	Thr	Gly	Asp	Ile	355	360	365
Ser	Gly	Met	Ala	Lys	Lys	Ile	Ile	Glu	Leu	Leu	Asn	Asn	Pro	Glu	Lys	370	375	380
Tyr	Lys	Glu	Leu	Val	Gln	Tyr	Asn	His	Asn	Arg	Phe	Leu	Lys	Glu	Tyr	385	390	395
Ala	Lys	Asp	Val	Val	Met	Ala	Lys	Tyr	Phe	Thr	Ile	Leu	Pro	Arg	Ser	405	410	415
Phe	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	420	425	430
Glu	Phe	Gln	Asn	Ile	Thr	Phe	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Asn	Asp	Leu	Ala	435	440	445
His	Ile	Trp	Asn	Phe	Glu	Leu	Thr	Asn	Pro	Ala	Gln	Asn	Met	Asn	Phe	450	455	460
Phe	Ala	Leu	Val	Gly	Lys	Arg	Lys	Phe	Pro	Met	Asp	Ala	His	Ile	Gln	465	470	475
Gly	Thr	Gln	Cys	Thr	Ile	Lys	Ile	Ala	His	Lys	Lys	Thr	Gly	Asn	Leu	485	490	495

[0025]

Leu Ser Leu Leu Leu Lys Lys Arg Asn Gln Leu Asn Leu Ser Arg Gly
 500 505 510

Tyr Thr Leu Ile Ala Glu Asp Asn Ser Tyr Glu Lys Tyr Ile Gly Ala
 515 520 525

Ile Ser Asn Lys Gly Asn Phe Glu Ile Ile Ala Asn Lys Lys Ser Ser
 530 535 540

Leu Val Thr Ile Asn Lys Ser Thr Leu Glu Leu His Glu Ile Pro His
 545 550 555 560

Glu Leu His Gln Asn Lys Leu Leu Ile Ala Leu Pro Asn Met Gln Thr
 565 570 575

Pro Leu Lys Ile Thr Asp Asp Asn Leu Ile Pro Ile Gln Ala Ser Ile
 580 585 590

Lys Leu Glu Lys Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Cys Phe Leu Pro Ser
 595 600 605

Gly Ile Phe Asn Asn Ile Cys Leu Asp Tyr Gly Glu Glu Ser Lys Ile
 610 615 620

Ile Asn Phe Ser Lys Tyr Ser Tyr Lys Tyr Ile Tyr Asp Ser Ile Arg
 625 630 635 640

His Ile Glu Gln His Thr Asp Ile Ser Asp Ile Ile Val Cys Asn Val
 645 650 655

Tyr Ser Trp Glu Leu Ile Arg Ala Ser Val Ile Glu Ser Leu Met Glu
 660 665 670

Phe Thr Gly Lys Trp Glu Lys His Phe Gln Thr Ser Pro Lys Ile Asp
 675 680 685

Tyr Arg Phe Asp His Glu Gly Lys Arg Ser Met Asp Asp Val Phe Ser
 690 695 700

Glu Glu Thr Phe Ile Met Glu Phe Pro Arg Lys Asn Gly Ile Asp Lys
 705 710 715 720

Lys Thr Ala Ala Phe Gln Asn Ile Pro Asn Ser Ile Val Met Glu Tyr
 725 730 735

Pro Gln Thr Asn Gly Tyr Ser Met Arg Ser His Ser Leu Lys Ser Asn
 740 745 750

Val Val Ala Ala Lys His Phe Leu Glu Lys Leu Asn Lys Ile Lys Val
 755 760 765

Asp Ile Lys Phe Lys Lys His Asp Leu Ala Asn Ile Lys Lys Met Asn
 770 775 780

Arg Ile Ile Tyr Glu His Leu Gly Ile Asn Ile Asn Ile Glu Ala Phe
 785 790 795 800

[0026]

Leu Lys Pro Arg Leu Glu Lys Phe Lys Arg Glu Glu Lys Tyr Phe His
 805 810 815

Asp Phe Phe Lys Arg Asn Asn Phe Lys Glu Val Ile Phe Pro Ser Thr
 820 825 830

Tyr Trp Asn Pro Gly Ile Ile Cys Ala Ala His Lys Gln Gly Ile Lys
 835 840 845

Val Ser Asp Ile Gln Tyr Ala Ala Ile Thr Pro Tyr His Pro Ala Tyr
 850 855 860

Phe Lys Ser Pro Lys Ser His Tyr Val Ala Asp Lys Leu Phe Leu Trp
 865 870 875 880

Ser Glu Tyr Trp Asn His Glu Leu Leu Pro Asn Pro Thr Arg Glu Ile
 885 890 895

Gly Ser Gly Ala Ala Tyr Trp Tyr Ala Leu Asp Asp Val Arg Phe Ser
 900 905 910

Glu Lys Leu Asn Tyr Asp Tyr Ile Phe Leu Ser Gln Ser Arg Ile Ser
 915 920 925

Ser Arg Leu Leu Ser Phe Ala Ile Glu Phe Ala Leu Lys Asn Pro Gln
 930 935 940

Leu Gln Leu Leu Phe Ser Lys His Pro Asp Glu Asn Ile Asp Leu Lys
 945 950 955 960

Asn Arg Ile Ile Pro Asp Asn Leu Ile Ile Ser Thr Glu Ser Ser Ile
 965 970 975

Gln Gly Ile Asn Glu Ser Arg Val Ala Val Gly Val Tyr Ser Thr Ser
 980 985 990

Leu Phe Glu Ala Leu Ala Cys Gly Lys Gln Thr Phe Val Val Lys Tyr
 995 1000 1005

Pro Gly Tyr Glu Ile Met Ser Asn Glu Ile Asp Ser Gly Leu Phe
 1010 1015 1020

Phe Ala Val Glu Thr Pro Glu Glu Met Leu Glu Lys Thr Ser Pro
 1025 1030 1035

Asn Trp Val Ala Val Ala Asp Ile Glu Asn Gln Phe Phe Gly Gln
 1040 1045 1050

Glu Lys Leu Glu His His His His His His
 1055 1060

<210> 15
 <211> 3192
 <212> DNA
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

[0027]

```

<400> 15
atggctagct ggagccaccc gcagttcgaa aaaggcgccc tggttccgcg tggatccgct 60
gttattatat ttgttaacgg aattcgggct gtaaatggcc ttgttaaate atctatcaat 120
actgcaaacg cttttgctga agaaggactg gatgttcatt taattaatth tgttggcaat 180
attactggag cagagcattt atcccccca ttccacttac atcccaatgt caaacctcc 240
agcatcatag atttatttaa tgacattcca gaaaatgtta gctgccgaaa ttttcctttt 300
tattctatcc atcaacaatt cttcaaagcc gaatacagtg cccactataa gcatgttttg 360
atgaaaattg aatcttttatt atctgaagaa gatagcatta tcttcaacta tctcttcaa 420
ctggaaatgt atcgtttagc gaataataat attaatgcaa aagccaagct aattgtacaa 480
attcatggta actatatgga agaaatccat aactatgaaa ttggggcacg aaatatcgat 540
tatgttgatt atcttcaaac ggtatctgat gaaatgctgg aagaaatgca ttcccatttc 600
aaaatcaaaa aagacaaatt agtttttatt ccaaacaatca cttatcccat ttcattagaa 660
aaaaaagaag ctgatttctt tattaaggat aatgaagaca ttgataatgc tcagaaatth 720
aaacgtatct ctattgttgg cagtattcag ccaagaaaaa accaattgga tgccattaaa 780
atcatcaata aaattaaaaa tgaaaattac attttacaga tatatggcaa atctattaat 840
aaagattact ttgaattaat taaaaaatat attaaagaca ataagttaca aaaccgtatc 900
ttattcaaa gtagaatctc cgagcaggaa atttatgaga atacagatat cctaactatg 960
acatctcaaa gcaagagctt tggttatata tttctagagg gtatggtgta cgatatccct 1020
atccttgctt ataattttta atatggagcg aatgatttta gcaattataa tgaaaacgct 1080
tcagttttta aaactggtga ttttcttgga atggcaaaaa aaataattga gctattaaat 1140
aaccagaaa aatataaaga attagttcaa tataatcaca atcgcttctt aaaagaatat 1200
gcaaaagatg tggttatggc taaatatttc actattcttc cgcgcagctt taataacgta 1260
tcattatcgt ctgctttcag ccgaaaagaa ttggacgaat tccaaaatat tactttttct 1320
attgaagatt ctaatgattt agctcatatt tggaatttcg agctaacca tctgcacaa 1380
aatatgaatt ttttgcttt agttggcaag gaaaaatttc caatggatgc tcatatccaa 1440
ggaacacagt gtacgattaa gatagctcat aaaaagacag ggaatttatt gtcgctttta 1500
ctaaaaaac gaaatcagtt gaatttatca aggggatata ccttaattgc agaagataat 1560
agctatgaaa aatatattgg agcaatatct aataaaggta actttgaaat tattgcaaat 1620
aaaaagaact cattagttac tataaacaag agtaccttag agttgcatga gattccccat 1680
gaactacatc agaataaatt actgattgct ttaccaaca tgcaaacgcc tctaaaaatt 1740
actgatgata attaatacc tatccaagcc tccataaaat tagaaaagat tggaaatact 1800
tattacccat gtttcttgcc atctggcata tttaataata tctgcttaga ttacggtgaa 1860
gaatccaaaa ttattaatth tagtaaatat tcttataaat atatctatga ctcaattcgt 1920
catattgagc aacatacaga tatatcggt attatcgttt gcaatgttta ttttgggaa 1980
cttatcgtg cctcagttat tgagagcctt atggaattta ccggaaaatg ggaaaaacac 2040
tttcagactt ctctaaaaat tgattatcga ttgatcatg aaggtaaagc ttcatggat 2100
gatgtctttt cagaagaaac atttattatg gaatttcgc gtaaaaatgg tatagataag 2160
aaaacagcag ctttcaaaa tatacacaac agtattgtaa tggagtatcc gcagaccaat 2220

```

[0028]

```

ggttacagta tgcgcagtea ttcaactgaaa agtaatgtag ttgcggcaaa acattttctt 2280
gaaaaattaa ataaaaattaa ggtagatatt aaatttaaaa agcatgacct tgcaaacatc 2340
aaaaaaatga atcgaattat ttatgagcat ttaggcatta acataaatat cgaagcattt 2400
ctaaaaccac gattagaaaa atttaagcgt gaagaaaaat attttcatga tttcttcaaa 2460
agaataatt ttaaagaggt aatttttcca agcacttatt ggaatccagg tattatttgt 2520
gctgcacata aacaaggtat taaggatatc gatattcaat atgctgcat tactccttat 2580
cactctgcgt attttaaat accaaaaatca cattacgttg ctgataaatt gttcttatgg 2640
tctgaatatt ggaatcatga gcttttacca aatccaacac gagagattgg ttctgggtgc 2700
gcatattggt atgcattaga tgatgtgaga ttttcagaaa aactgaatta tgactatata 2760
ttctatctc aaagtaggat ttcttcgcgc ttgcttagtt ttgcaattga gtttgcatta 2820
aaaaatctc aactacagct tttattttct aagcatctag atgaaaatat agatttaaag 2880
aacagaatta ttctgataa tcttataatc tccacggaat cttctataca aggcatcaat 2940
gaatctcgcg ttgctgtagg tgtttattca actagcttat ttgaggcatt agcatgcggc 3000
aaacaaaact ttgttggtta atatecggga tatgaaatta tgtcaaatga aatagattca 3060
gggttattct ttgcagtaga aacacctgaa gaaatgcttg agaaaacaag ccgaattgg 3120
gtggctgtgg cagatattga aaaccagttt ttggccaag aaaaactga gcaccaccac 3180
caccaccact ga 3192

```

<210> 16
 <211> 1063
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 16

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser Ala Val Ile Ile Phe Val Asn Gly Ile Arg Ala Val Asn
 20 25 30

Gly Leu Val Lys Ser Ser Ile Asn Thr Ala Asn Ala Phe Ala Glu Glu
 35 40 45

Gly Leu Asp Val His Leu Ile Asn Phe Val Gly Asn Ile Thr Gly Ala
 50 55 60

Glu His Leu Ser Pro Pro Phe His Leu His Pro Asn Val Lys Thr Ser
 65 70 75 80

Ser Ile Ile Asp Leu Phe Asn Asp Ile Pro Glu Asn Val Ser Cys Arg
 85 90 95

Asn Ile Pro Phe Tyr Ser Ile His Gln Gln Phe Phe Lys Ala Glu Tyr
 100 105 110

Ser Ala His Tyr Lys His Val Leu Met Lys Ile Glu Ser Leu Leu Ser
 115 120 125

Glu Glu Asp Ser Ile Ile Phe Thr His Pro Leu Gln Leu Glu Met Tyr

[0029]

130	135	140
Arg Leu Ala Asn Asn Asn Ile Lys Ser Lys Ala Lys Leu Ile Val Gln 145	150	155 160
Ile His Gly Asn Tyr Met Glu Glu Ile His Asn Tyr Glu Ile Trp Ala 165	170	175
Arg Asn Ile Asp Tyr Val Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ser Asp Glu Met 180	185	190
Leu Glu Glu Met His Ser His Phe Lys Ile Lys Lys Asp Lys Leu Val 195	200	205
Phe Ile Pro Asn Ile Thr Tyr Pro Ile Ser Leu Glu Lys Lys Glu Ala 210	215	220
Asp Phe Phe Ile Lys Asp Asn Glu Asp Ile Asp Asn Ala Gln Lys Phe 225	230	235 240
Lys Arg Ile Ser Ile Val Gly Ser Ile Gln Pro Arg Lys Asn Gln Leu 245	250	255
Asp Ala Ile Lys Ile Ile Asn Lys Ile Lys Asn Glu Asn Tyr Ile Leu 260	265	270
Gln Ile Tyr Gly Lys Ser Ile Asn Lys Asp Tyr Phe Glu Leu Ile Lys 275	280	285
Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Lys Leu Gln Asn Arg Ile Leu Phe Lys Gly 290	295	300
Glu Ser Ser Glu Gln Glu Ile Tyr Glu Asn Thr Asp Ile Leu Ile Met 305	310	315 320
Thr Ser Gln Ser Glu Gly Phe Gly Tyr Ile Phe Leu Glu Gly Met Val 325	330	335
Tyr Asp Ile Pro Ile Leu Ala Tyr Asn Phe Lys Tyr Gly Ala Asn Asp 340	345	350
Phe Ser Asn Tyr Asn Glu Asn Ala Ser Val Phe Lys Thr Gly Asp Ile 355	360	365
Ser Gly Met Ala Lys Lys Ile Ile Glu Leu Leu Asn Asn Pro Glu Lys 370	375	380
Tyr Lys Glu Leu Val Gln Tyr Asn His Asn Arg Phe Leu Lys Glu Tyr 385	390	395 400
Ala Lys Asp Val Val Met Ala Lys Tyr Phe Thr Ile Leu Pro Arg Ser 405	410	415
Phe Asn Asn Val Ser Leu Ser Ser Ala Phe Ser Arg Lys Glu Leu Asp 420	425	430

[0030]

Glu Phe Gln Asn Ile Thr Phe Ser Ile Glu Asp Ser Asn Asp Leu Ala	435	440	445
His Ile Trp Asn Phe Glu Leu Thr Asn Pro Ala Gln Asn Met Asn Phe	450	455	460
Phe Ala Leu Val Gly Lys Arg Lys Phe Pro Met Asp Ala His Ile Gln	465	470	475
Gly Thr Gln Cys Thr Ile Lys Ile Ala His Lys Lys Thr Gly Asn Leu	485	490	495
Leu Ser Leu Leu Leu Lys Lys Arg Asn Gln Leu Asn Leu Ser Arg Gly	500	505	510
Tyr Thr Leu Ile Ala Glu Asp Asn Ser Tyr Glu Lys Tyr Ile Gly Ala	515	520	525
Ile Ser Asn Lys Gly Asn Phe Glu Ile Ile Ala Asn Lys Lys Asn Ser	530	535	540
Leu Val Thr Ile Asn Lys Ser Thr Leu Glu Leu His Glu Ile Pro His	545	550	555
Glu Leu His Gln Asn Lys Leu Leu Ile Ala Leu Pro Asn Met Gln Thr	565	570	575
Pro Leu Lys Ile Thr Asp Asp Asn Leu Ile Pro Ile Gln Ala Ser Ile	580	585	590
Lys Leu Glu Lys Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Cys Phe Leu Pro Ser	595	600	605
Gly Ile Phe Asn Asn Ile Cys Leu Asp Tyr Gly Glu Glu Ser Lys Ile	610	615	620
Ile Asn Phe Ser Lys Tyr Ser Tyr Lys Tyr Ile Tyr Asp Ser Ile Arg	625	630	635
His Ile Glu Gln His Thr Asp Ile Ser Asp Ile Ile Val Cys Asn Val	645	650	655
Tyr Ser Trp Glu Leu Ile Arg Ala Ser Val Ile Glu Ser Leu Met Glu	660	665	670
Phe Thr Gly Lys Trp Glu Lys His Phe Gln Thr Ser Pro Lys Ile Asp	675	680	685
Tyr Arg Phe Asp His Glu Gly Lys Arg Ser Met Asp Asp Val Phe Ser	690	695	700
Glu Glu Thr Phe Ile Met Glu Phe Pro Arg Lys Asn Gly Ile Asp Lys	705	710	715
Lys Thr Ala Ala Phe Gln Asn Ile Pro Asn Ser Ile Val Met Glu Tyr	725	730	735

[0031]

Pro	Gln	Thr	Asn	Gly	Tyr	Ser	Met	Arg	Ser	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Asn	
			740					745					750			
Val	Val	Ala	Ala	Lys	His	Phe	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Lys	Ile	Lys	Val	
		755					760					765				
Asp	Ile	Lys	Phe	Lys	Lys	His	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Lys	Met	Asn	
	770					775					780					
Arg	Ile	Ile	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Ile	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Phe	
	785				790					795					800	
Leu	Lys	Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Tyr	Phe	His	
			805						810					815		
Asp	Phe	Phe	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Glu	Val	Ile	Phe	Pro	Ser	Thr	
			820					825					830			
Tyr	Trp	Asn	Pro	Gly	Ile	Ile	Cys	Ala	Ala	His	Lys	Gln	Gly	Ile	Lys	
		835					840					845				
Val	Ser	Asp	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Tyr	His	Pro	Ala	Tyr	
	850					855					860					
Phe	Lys	Ser	Pro	Lys	Ser	His	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	Trp	
	865				870					875					880	
Ser	Glu	Tyr	Trp	Asn	His	Glu	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Glu	Ile	
			885						890					895		
Gly	Ser	Gly	Ala	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	
			900					905					910			
Glu	Lys	Leu	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Ile	Ser	
		915					920					925				
Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	Phe	Ala	Ile	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	
	930					935					940					
Leu	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Lys	His	Leu	Asp	Glu	Asn	Ile	Asp	Leu	Lys	
	945				950					955					960	
Asn	Arg	Ile	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	
			965						970						975	
Gln	Gly	Ile	Asn	Glu	Ser	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Ser	Thr	Ser	
			980					985					990			
Leu	Phe	Glu	Ala	Leu	Ala	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Phe	Val	Val	Lys	Tyr	
		995					1000					1005				
Pro	Gly	Tyr	Glu	Ile	Met	Ser	Asn	Glu	Ile	Asp	Ser	Gly	Leu	Phe		
	1010					1015						1020				
Phe	Ala	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Lys	Thr	Ser	Pro		
	1025					1030						1035				

[0032]

Asn Trp Val Ala Val Ala Asp Ile Glu Asn Gln Phe Phe Gly Gln
 1040 1045 1050

Glu Lys Leu Glu His His His His His His
 1055 1060

<210> 17
 <211> 3138
 <212> DNA
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 17
 atggctgtta ttatatttgt taacggaatt cgggctgtaa atggccttgt taaatcatct 60
 atcaatactg caaacgcttt tgctgaagaa ggactggatg ttcatttaat taattttgtt 120
 ggcaatatta ctggagcaga gcatttatac cccccattcc acttacatcc caatgtcaaa 180
 acctccagca tcatagattt atttaatgac attccagaaa atgttagctg ccgaaatact 240
 cctttttatt ctattcatca acaattcttc aaagctgaat atagtgccca ctataagcat 300
 gttttgatga aaattgaate tttattatct gcagaagata gcattatctt cactcactct 360
 ctccaactgg aaatgtatcg tttagcgaat aatgatatca agtcaaaaagc caaactaatt 420
 gtacaaaatc atggtaatta tatggaagaa atccataact atgaaatttt ggcacgaaat 480
 atcgattatg ttgactatct tcaaacggta tctgatgaaa tgctggaaga aatgcattcc 540
 catttcaaaa tcaaaaaaga caaattagt tttattccaa acatcactta tcccatttca 600
 ttagaaaaaa aagaagctga tttctttatt aaggataatg aagacatcga taatgctcag 660
 aaattttaa cgtatctctat tggtggcagc attcagccaa gaaaaaacca attggatgcc 720
 attaaaaatca tcaataaaaat taaaaatgaa aattacattt tacagatata tggcaaatct 780
 attaataaag attactttga attaattaaa aaatatatta aagacaataa gttacaaaac 840
 cgtatcttat tcaaagtgta atcttccgag caggaaattt atgaaaatac agatatcctg 900
 atcatgacat cagaaagtga gggatttcca tatatattta tggaaggcat ggtgtatgat 960
 attccaatcg ttgtatatga ttttaaatat ggagcgaatg attacagtaa ctataatgaa 1020
 aatggttgtg tttttaaaac tggtgatatt tctggaatgg caaaaaaat aattgagcta 1080
 ttaaataacc cagaaaaata taaagaatta gttcaatata atcacaatcg cttcttaaaa 1140
 gaatatgcaa aagatgtggt tatggctaaa tatttacta ttcttccgag cagctttaat 1200
 aacgtatcat tctgtctgc tttcagccga aaagaattgg acgaattcca aaatattact 1260
 ttttctattg aagattctaa tgatttagct catatttgga atttcagct aaccaatcct 1320
 gcacaaaata tgaatttttt tgcttttagt ggcaagcgaa aatttccaat ggatgctcat 1380
 atccaaggaa cacagtgtac gattaagata gctcataaaa agacaggga tttattgtcg 1440
 cttttactaa aaaaacgaaa tcagttgaat ttatcaaggg gatatacctt aattgcagaa 1500
 gataatagct atgaaaaata tattggagca atatctaata aaggtaactt tgaattatt 1560
 gcaataaaaa agagctcatt agttactata aacaaaagta ccttagagtt gcatgagatt 1620
 cccatgaac tacatcagaa taaattactg attgctttac ccaacatgca aacgctcta 1680
 aaaattactg atgataattt aatacctatc caagcctcca taaaattaga aaagattgga 1740
 aatacttatt acctatgttt cttgccatct ggcatattta ataatatctg cttagattac 1800

[0033]

```

ggatgaagaat ccaaaattat taatttttagt aaatatcttt ataaatatat ctatgactca 1860
attcgtcata ttgagcaaca tacagatata tcggatatta tcgtttgcaa tgtttattct 1920
tgggaactta ttcgtgcctc agttattgag agccttatgg aattttaccgg aaaatgggaa 1980
aaacactttc agacttctcc taaaattgat tatcgatttg atcatgaagg taagcgttcg 2040
atggatgatg tcttttcaga agaaacattt attatggaat ttccgcgtaa aaatggtata 2100
gataagaaaa cagcagcctt ccaaaatata ccaaacagta ttgtaatgga gtatccgcag 2160
accaatggtt acagtatgcg cagtcattca ctgaaaagta atgtagttgc ggcaaaacat 2220
tttcttgaaa aattaataaa aattaaggta gatattaaat ttaaaaagca tgaccttgca 2280
aacatcaaaa aaatgaatcg aattatttat gagcatttag gcattaacat aaatatcgaa 2340
gcatttctaa aaccacgatt agaaaaattt aagcgtgaag aaaaatattt tcatgatttc 2400
ttcaaaagaa ataattttta agaggttaatt ttccaagca ctatttgga tccaggtatt 2460
atgtgtgctg cacataaaca aggtattaag gtatctgata ttcaatatgc tgccattact 2520
ccttatcctc ctgcgtattt taaatcacca aaatcacatt acgttgctga taaattgttc 2580
ttatggtctg aatattggaa tcatgagctt ttaccaaac caacacgaga gattggttct 2640
gggtgccgcat attggtatgc attagatgat gtgagatttt cagaaaaact gaattatgac 2700
tatatctttc tatctcaaag taggatttct tcgcgttgc ttagttttgc aattgagttt 2760
gcattaaaaa atctcact acagctttta ttttctaage atccagatga aaatatagat 2820
ttaaagaaca gaattattcc tgataatctt ataatctcca cggaatcttc tatacaaggc 2880
atcaatgaat ctgcgttgc ttaggtgtt tattcaacta gcttatttga ggcattagca 2940
tgcggcaaac aaacttttgt tgttaaatat ccgggatatg aaattatgtc aaatgaaata 3000
gattcagggt tattctttgc agtagaaaca cctgaagaaa tgcttgagaa aacaagcccg 3060
aattgggtgg ctgtgcaga tattgaaaac cagttttttg gccaagaaaa actcgagcac 3120
caccaccacc accactga 3138

```

<210> 18
 <211> 1045
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌
 <400> 18

Met Ala Val Ile Ile Phe Val Asn Gly Ile Arg Ala Val Asn Gly Leu
1 5 10 15

Val Lys Ser Ser Ile Asn Thr Ala Asn Ala Phe Ala Glu Glu Gly Leu
20 25 30

Asp Val His Leu Ile Asn Phe Val Gly Asn Ile Thr Gly Ala Glu His
35 40 45

Leu Tyr Pro Pro Phe His Leu His Pro Asn Val Lys Thr Ser Ser Ile
50 55 60

Ile Asp Leu Phe Asn Asp Ile Pro Glu Asn Val Ser Cys Arg Asn Thr
65 70 75 80

[0034]

Pro	Phe	Tyr	Ser	Ile	His	Gln	Gln	Phe	Phe	Lys	Ala	Glu	Tyr	Ser	Ala	85	90	95
His	Tyr	Lys	His	Val	Leu	Met	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	100	105	110
Asp	Ser	Ile	Ile	Phe	Thr	His	Pro	Leu	Gln	Leu	Glu	Met	Tyr	Arg	Leu	115	120	125
Ala	Asn	Asn	Asp	Ile	Lys	Ser	Lys	Ala	Lys	Leu	Ile	Val	Gln	Ile	His	130	135	140
Gly	Asn	Tyr	Met	Glu	Glu	Ile	His	Asn	Tyr	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Asn	145	150	155
Ile	Asp	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Gln	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	Met	Leu	Glu	165	170	175
Glu	Met	His	Ser	His	Phe	Lys	Ile	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	Val	Phe	Ile	180	185	190
Pro	Asn	Ile	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Leu	Glu	Lys	Lys	Glu	Ala	Asp	Phe	195	200	205
Phe	Ile	Lys	Asp	Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Asn	Ala	Gln	Lys	Phe	Lys	Arg	210	215	220
Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Ile	Gln	Pro	Arg	Lys	Asn	Gln	Leu	Asp	Ala	225	230	235
Ile	Lys	Ile	Ile	Asn	Lys	Ile	Lys	Asn	Glu	Asn	Tyr	Ile	Leu	Gln	Ile	245	250	255
Tyr	Gly	Lys	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Tyr	Phe	Glu	Leu	Ile	Lys	Lys	Tyr	260	265	270
Ile	Lys	Asp	Asn	Lys	Leu	Gln	Asn	Arg	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	Glu	Ser	275	280	285
Ser	Glu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Glu	Asn	Thr	Asp	Ile	Leu	Ile	Met	Thr	Ser	290	295	300
Glu	Ser	Glu	Gly	Phe	Pro	Tyr	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Met	Val	Tyr	Asp	305	310	315
Ile	Pro	Ile	Val	Val	Tyr	Asp	Phe	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asn	Asp	Tyr	Ser	325	330	335
Asn	Tyr	Asn	Glu	Asn	Gly	Cys	Val	Phe	Lys	Thr	Gly	Asp	Ile	Ser	Gly	340	345	350
Met	Ala	Lys	Lys	Ile	Ile	Glu	Leu	Leu	Asn	Asn	Pro	Glu	Lys	Tyr	Lys	355	360	365
Glu	Leu	Val	Gln	Tyr	Asn	His	Asn	Arg	Phe	Leu	Lys	Glu	Tyr	Ala	Lys	370	375	380

[0035]

Asp Val Val Met Ala Lys Tyr Phe Thr Ile Leu Pro Arg Ser Phe Asn
 385 390 395 400
 Asn Val Ser Leu Ser Ser Ala Phe Ser Arg Lys Glu Leu Asp Glu Phe
 405 410 415
 Gln Asn Ile Thr Phe Ser Ile Glu Asp Ser Asn Asp Leu Ala His Ile
 420 425 430
 Trp Asn Phe Glu Leu Thr Asn Pro Ala Gln Asn Met Asn Phe Phe Ala
 435 440 445
 Leu Val Gly Lys Arg Lys Phe Pro Met Asp Ala His Ile Gln Gly Thr
 450 455 460
 Gln Cys Thr Ile Lys Ile Ala His Lys Lys Thr Gly Asn Leu Leu Ser
 465 470 475 480
 Leu Leu Leu Lys Lys Arg Asn Gln Leu Asn Leu Ser Arg Gly Tyr Thr
 485 490 495
 Leu Ile Ala Glu Asp Asn Ser Tyr Glu Lys Tyr Ile Gly Ala Ile Ser
 500 505 510
 Asn Lys Gly Asn Phe Glu Ile Ile Ala Asn Lys Lys Ser Ser Leu Val
 515 520 525
 Thr Ile Asn Lys Ser Thr Leu Glu Leu His Glu Ile Pro His Glu Leu
 530 535 540
 His Gln Asn Lys Leu Leu Ile Ala Leu Pro Asn Met Gln Thr Pro Leu
 545 550 555 560
 Lys Ile Thr Asp Asp Asn Leu Ile Pro Ile Gln Ala Ser Ile Lys Leu
 565 570 575
 Glu Lys Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Cys Phe Leu Pro Ser Gly Ile
 580 585 590
 Phe Asn Asn Ile Cys Leu Asp Tyr Gly Glu Glu Ser Lys Ile Ile Asn
 595 600 605
 Phe Ser Lys Tyr Ser Tyr Lys Tyr Ile Tyr Asp Ser Ile Arg His Ile
 610 615 620
 Glu Gln His Thr Asp Ile Ser Asp Ile Ile Val Cys Asn Val Tyr Ser
 625 630 635 640
 Trp Glu Leu Ile Arg Ala Ser Val Ile Glu Ser Leu Met Glu Phe Thr
 645 650 655
 Gly Lys Trp Glu Lys His Phe Gln Thr Ser Pro Lys Ile Asp Tyr Arg
 660 665 670
 Phe Asp His Glu Gly Lys Arg Ser Met Asp Asp Val Phe Ser Glu Glu
 675 680 685

[0036]

Thr	Phe	Ile	Met	Glu	Phe	Pro	Arg	Lys	Asn	Gly	Ile	Asp	Lys	Lys	Thr
690						695					700				
Ala	Ala	Phe	Gln	Asn	Ile	Pro	Asn	Ser	Ile	Val	Met	Glu	Tyr	Pro	Gln
705					710					715					720
Thr	Asn	Gly	Tyr	Ser	Met	Arg	Ser	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Asn	Val	Val
				725					730					735	
Ala	Ala	Lys	His	Phe	Leu	Glu	Lys	Leu	Asn	Lys	Ile	Lys	Val	Asp	Ile
			740					745					750		
Lys	Phe	Lys	Lys	His	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Lys	Lys	Met	Asn	Arg	Ile
		755					760					765			
Ile	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Ile	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Phe	Leu	Lys
	770					775					780				
Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Phe	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Tyr	Phe	His	Asp	Phe
785					790					795					800
Phe	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Lys	Glu	Val	Ile	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Trp
			805						810					815	
Asn	Pro	Gly	Ile	Ile	Cys	Ala	Ala	His	Lys	Gln	Gly	Ile	Lys	Val	Ser
			820					825					830		
Asp	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Tyr	His	Pro	Ala	Tyr	Phe	Lys
		835					840					845			
Ser	Pro	Lys	Ser	His	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Phe	Leu	Trp	Ser	Glu
		850				855					860				
Tyr	Trp	Asn	His	Glu	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Thr	Arg	Glu	Ile	Gly	Ser
865					870					875				880	
Gly	Ala	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Asp	Val	Arg	Phe	Ser	Glu	Lys
				885					890					895	
Leu	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ser	Gln	Ser	Arg	Ile	Ser	Ser	Arg
			900					905					910		
Leu	Leu	Ser	Phe	Ala	Ile	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Gln
		915					920					925			
Leu	Leu	Phe	Ser	Lys	His	Pro	Asp	Glu	Asn	Ile	Asp	Leu	Lys	Asn	Arg
		930				935					940				
Ile	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Ser	Thr	Glu	Ser	Ser	Ile	Gln	Gly
945					950					955				960	
Ile	Asn	Glu	Ser	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Phe
				965					970					975	
Glu	Ala	Leu	Ala	Cys	Gly	Lys	Gln	Thr	Phe	Val	Val	Lys	Tyr	Pro	Gly

[0037]

980	985	990
Tyr Glu Ile Met Ser Asn Glu Ile	Asp Ser Gly Leu Phe	Phe Ala Val
995	1000	1005
Glu Thr Pro Glu Glu Met Leu	Glu Lys Thr Ser Pro	Asn Trp Val
1010	1015	1020
Ala Val Ala Asp Ile Glu Asn	Gln Phe Phe Gly Gln	Glu Lys Leu
1025	1030	1035
Glu His His His His His His		
1040	1045	
<210> 19		
<211> 2610		
<212> DNA		
<213> 脑膜炎奈瑟氏菌		
<400> 19		
atgaaaactg aagaaggtaa actggtaatc tggattaacg gcgataaagg ctataacggt	60	
ctcgtctaag tcgtaagaa attcgagaaa gataccggaa ttaaagtcac cgttgagcat	120	
ccggataaac tggaagagaa attccacacag gttagcgcaa ctggcgatgg ccttgacatt	180	
atcttctggg cacacgaccg ctttgggtggc tacgctcaat ctggcctggt ggctgaaatc	240	
accccgaca aagcgttcca ggacaagctg tatecgttta cctgggatgc cgtacgttac	300	
aacggcaagc tgattgctta cccgatcgct gttgaagcgt tatecgtgat ttataacaaa	360	
gatctgctgc cgaaccgcc aaaaacctgg gaagagatcc cggcgtgga taaagaactg	420	
aaagcgaaag gtaagagcgc gctgatgttc aacctgcaag aaccgtactt cacctggcgg	480	
ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa	540	
gacgtggggc tggataacgc tggcgcgaaa gcgggtctga ccttctggt tgacctgatt	600	
aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat tactccatcg cagaagctgc ctttaataaa	660	
ggcgaaacag cgatgaccat caacggcccg tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa	720	
gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc ttcaagggtc aaccatccaa accgttcggt	780	
ggcgtgctga gcgcaggtat taacgccgc agtccgaaca aagagctggc gaaagagttc	840	
ctcgaaaact atctgctgac tgatgaaggt ctggaagcgg ttaataaaga caaacgctg	900	
ggtgccgtag cgctgaagtc ttacaggaa gagttggcga aagatccacg tattgccgcc	960	
accatggaaa acgcccagaa aggtgaaatc atgccgaaca tcccgcagat gtccgctttc	1020	
tggtatgcgg tgcgtactgc ggtgatcaac gccgccagcg gtcgtcagac tgcgatgaa	1080	
gcctgaaag acgcgcagac taattcgagc tcggtacccg gccggggatc cattatgagc	1140	
aaaattagca aattggtaac ccacccaaac cttttctttc gagattattt cttaaaaaaa	1200	
gcaccgttaa attatggcga aaatattaaa cttttaccag tcgaaacctc ttctcatagc	1260	
aaaaaaaata cagcccataa aacacccgta tcatccgacc aaccaattga agatccatac	1320	
ccagtaacat ttccaattga tgtagtttat acttgggtag attcagatga tgaaaaattc	1380	
aatgaagaac gcctaaagtt tcaaaattca agcacatctg agactctaca aggcaaagca	1440	
gaaagcaccg atattgcaag attccaatca cgcgacgaat taaaatattc gattcgaagc	1500	

[0038]

```

ctgatgaagt atgccccatg ggtaaatcat atttacattg taacaaatgg tcaaatacca 1560
aaatggttag ataccaacaa tacaaaggta acgattatcc ctactcaac tattatcgac 1620
agtcaatttc tccctacttt taattctcac gtcattgaat cctctctata taaaatccca 1680
ggattatcag agcattacat ttatttcaat gatgatgtca tgctagctag agatttaage 1740
ccatcttatt tctttacaag cagcggatta gcaaaactgt ttattacca cctctgtcta 1800
ccaatggct ataagaatgt gaaagacaca ccaacceaat ggccctcaaa aaattcccg 1860
gagcttttac atgcagaac aggattttgg gctgaagcca tgtttgaca tacttttcat 1920
ccacaacgta aaagtgtaca tgaatctatt gaacacctat ggcatgaaca attaaatgtt 1980
tgtcgtcaaa accgtttccg tgatatttca gatattaaca tggcgacatt cctgcaccac 2040
cattttgcca ttttgacagg ccaagctctt gctacacgca ctaaagtgtat ttactttaac 2100
gttcgctctc ctcaagcagc tcagcattac aaaacattat tagctcgaaa aggaagcgaa 2160
tacagccac attctatctg cttaaatgat catacatga gcaataaaaa tattttatct 2220
aattacgaag ccaaattaca aagcttttta gaaacatact atccagatgt atcagaagca 2280
gaaattctec ttctactaa atctgaagta gctgaattag ttaaacataa agattattta 2340
actgtatata ctaaattatt acctattatc aataagcagc tggtaataa atataataaa 2400
ccttattcat atcttttcta ttatttaggt ttatctgecc ggtttttatt tgaagaaacg 2460
caacaagaac actaccggga aactgctgaa gaaaatttac aaatcttttg tggcctaaac 2520
ccaaacata cactagccct caaatactta gcggatgtca cctcacatc acagcctagt 2580
ggacaactcg agcaccacca ccaccaccac 2610

```

<210> 20
 <211> 870
 <212> PRT
 <213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 20

Met Lys Thr Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
 1 5 10 15

Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
 20 25 30

Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
 35 40 45

Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
 50 55 60

His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
 65 70 75 80

Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
 85 90 95

Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu
 100 105 110

Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys

[0039]

115	120	125
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly 130 135 140		
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro 145 150 155 160		
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys 165 170 175		
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly 180 185 190		
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp 195 200 205		
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala 210 215 220		
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys 225 230 235 240		
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser 245 250 255		
Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro 260 265 270		
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp 275 280 285		
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala 290 295 300		
Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala 305 310 315 320		
Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln 325 330 335		
Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala 340 345 350		
Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn 355 360 365		
Ser Ser Ser Val Pro Gly Arg Gly Ser Ile Met Ser Lys Ile Ser Lys 370 375 380		
Leu Val Thr His Pro Asn Leu Phe Phe Arg Asp Tyr Phe Leu Lys Lys 385 390 395 400		
Ala Pro Leu Asn Tyr Gly Glu Asn Ile Lys Pro Leu Pro Val Glu Thr 405 410 415		

[0040]

Ser	Ser	His	Ser	Lys	Lys	Asn	Thr	Ala	His	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Ser	420	425	430	
Asp	Gln	Pro	Ile	Glu	Asp	Pro	Tyr	Pro	Val	Thr	Phe	Pro	Ile	Asp	Val	435	440	445	
Val	Tyr	Thr	Trp	Val	Asp	Ser	Asp	Asp	Glu	Lys	Phe	Asn	Glu	Glu	Arg	450	455	460	
Leu	Lys	Phe	Gln	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Leu	Gln	Gly	Lys	Ala	465	470	475	480
Glu	Ser	Thr	Asp	Ile	Ala	Arg	Phe	Gln	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Lys	Tyr	485	490	495	
Ser	Ile	Arg	Ser	Leu	Met	Lys	Tyr	Ala	Pro	Trp	Val	Asn	His	Ile	Tyr	500	505	510	
Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Gln	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Asp	Thr	Asn	Asn	Thr	515	520	525	
Lys	Val	Thr	Ile	Ile	Pro	His	Ser	Thr	Ile	Ile	Asp	Ser	Gln	Phe	Leu	530	535	540	
Pro	Thr	Phe	Asn	Ser	His	Val	Ile	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Lys	Ile	Pro	545	550	555	560
Gly	Leu	Ser	Glu	His	Tyr	Ile	Tyr	Phe	Asn	Asp	Asp	Val	Met	Leu	Ala	565	570	575	
Arg	Asp	Leu	Ser	Pro	Ser	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Ala	Lys	580	585	590	
Leu	Phe	Ile	Thr	Asn	Ser	Arg	Leu	Pro	Asn	Gly	Tyr	Lys	Asn	Val	Lys	595	600	605	
Asp	Thr	Pro	Thr	Gln	Trp	Ala	Ser	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Leu	Leu	His	610	615	620	
Ala	Glu	Thr	Gly	Phe	Trp	Ala	Glu	Ala	Met	Phe	Ala	His	Thr	Phe	His	625	630	635	640
Pro	Gln	Arg	Lys	Ser	Val	His	Glu	Ser	Ile	Glu	His	Leu	Trp	His	Glu	645	650	655	
Gln	Leu	Asn	Val	Cys	Arg	Gln	Asn	Arg	Phe	Arg	Asp	Ile	Ser	Asp	Ile	660	665	670	
Asn	Met	Ala	Thr	Phe	Leu	His	His	His	Phe	Ala	Ile	Leu	Thr	Gly	Gln	675	680	685	
Ala	Leu	Ala	Thr	Arg	Thr	Lys	Cys	Ile	Tyr	Phe	Asn	Val	Arg	Ser	Pro	690	695	700	
Gln	Ala	Ala	Gln	His	Tyr	Lys	Thr	Leu	Leu	Ala	Arg	Lys	Gly	Ser	Glu	705	710	715	720

[0041]

Tyr Ser Pro His Ser Ile Cys Leu Asn Asp His Thr Ser Ser Asn Lys
725 730 735

Asn Ile Leu Ser Asn Tyr Glu Ala Lys Leu Gln Ser Phe Leu Glu Thr
740 745 750

Tyr Tyr Pro Asp Val Ser Glu Ala Glu Ile Leu Leu Pro Thr Lys Ser
755 760 765

Glu Val Ala Glu Leu Val Lys His Lys Asp Tyr Leu Thr Val Tyr Thr
770 775 780

Lys Leu Leu Pro Ile Ile Asn Lys Gln Leu Val Asn Lys Tyr Asn Lys
785 790 795 800

Pro Tyr Ser Tyr Leu Phe Tyr Tyr Leu Gly Leu Ser Ala Arg Phe Leu
805 810 815

Phe Glu Glu Thr Gln Gln Glu His Tyr Arg Glu Thr Ala Glu Glu Asn
820 825 830

Leu Gln Ile Phe Cys Gly Leu Asn Pro Lys His Thr Leu Ala Leu Lys
835 840 845

Tyr Leu Ala Asp Val Thr Leu Thr Ser Gln Pro Ser Gly Gln Leu Glu
850 855 860

His His His His His His
865 870

<210> 21
<211> 1716
<212> DNA
<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 21
atggctagct ggagccaccc gcagttcgaa aaaggcgccc tggttccgcg tggatctttt 60
atacttaata acagaaaatg gcgtaaactt aaaagagacc ctagecgttt ctttcgagat 120
agtaaattta actttttaag atatttttct gctaaaaaat ttgcaaagaa ttttaaaaaat 180
tcatcacata tccataaaac taatataagt aaagctcaat caaatatttc ttcaacctta 240
aaacaaaatc ggaacaaga tatgttaatt cctattaatt tttttaattt tgaatatata 300
gttaaaaaac ttaacaatca aaacgaata ggtgtatata ttcttccttc taatcttact 360
cttaagcctg cattatgtat tctagaatca cataaagaag actttttaaa taaatttctt 420
cttactattt cctctgaaaa tttaaagctt caatacaaat ttaatggaca aataaaaaat 480
cctaagtcg taaatgaaat ttggacagat ttatttagca ttgctcatgt tgacatgaaa 540
ctcagcacag atagaacttt aagttcatct atatctcaat tttggttcag attagagttc 600
tgtaaagaag ataaggattt tatcttattt cctacagcta acagatatc tagaaaactt 660
tggaagcact ctattaaaaa taatcaatta tttaaagaag gcatacgaaa ctattcagaa 720
atatcttcat taccctatga agaagatcat aattttgata ttgatttagt atttacttgg 780
gtcaactcag aagataagaa ttggcaagag ttatataaaa aatataagcc cgactttaat 840

[0042]

```

agcgatgcaa ccagtacatc aagattcctt agtagagatg aattaaaatt cgcattacgc 900
tcttgggaaa tgaatggatc cttcattcga aaaattttta ttgtctctaa ttgtgtcccc 960
ccagcatggc tagattttaa taacctataa attcaatggg tatatcacga agaaattatg 1020
ccacaaagtg cccctcctac ttttagctca catgctattg aaaccagctt gcaccatata 1080
ccaggaatta gtaactatct tatttacagc aatgaagact tcctattaac taaaccattg 1140
aataaagaca atttcttcta ttcgaatggg attgcaaagt taagattaga agcatgggga 1200
aatgttaatg gtgaatgtac tgaaggagaa cctgactact taaatgggtgc tcgcaatgcg 1260
aacactctct tagaaaagga atttaaaaaa ttactacta aactacatac tcactccctt 1320
caatccatga gaactgatat tttatttgag atggaaaaaa aatatccaga agagtttaat 1380
agaacactac ataataaatt ccgatcttta gatgatattg cagtaacggg ctatctctat 1440
catcattatg cctactcttc tggacgagca ctacaaagtt ctgacaagac ggaacttgta 1500
cagcaaaatc atgatttcaa aaagaaacta aataatgtag tgaccttaac taaagaaagg 1560
aattttgaca aacttccctt gagcgtatgt atcaacgatg glgctgatag tcacttgaat 1620
gaagaatgga atgttcaagt tattaagtgc ttagaaactc ttttccatt accatcatca 1680
tttgagaaac tcgagcacca ccaccaccac cactga 1716

```

<210> 22

<211> 571

<212> PRT

<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 22

```

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Leu Val Pro
1           5           10          15

```

```

Arg Gly Ser Phe Ile Leu Asn Asn Arg Lys Trp Arg Lys Leu Lys Arg
20          25          30

```

```

Asp Pro Ser Ala Phe Phe Arg Asp Ser Lys Phe Asn Phe Leu Arg Tyr
35          40          45

```

```

Phe Ser Ala Lys Lys Phe Ala Lys Asn Phe Lys Asn Ser Ser His Ile
50          55          60

```

```

His Lys Thr Asn Ile Ser Lys Ala Gln Ser Asn Ile Ser Ser Thr Leu
65          70          75          80

```

```

Lys Gln Asn Arg Lys Gln Asp Met Leu Ile Pro Ile Asn Phe Phe Asn
85          90          95

```

```

Phe Glu Tyr Ile Val Lys Lys Leu Asn Asn Gln Asn Ala Ile Gly Val
100         105         110

```

```

Tyr Ile Leu Pro Ser Asn Leu Thr Leu Lys Pro Ala Leu Cys Ile Leu
115        120        125

```

```

Glu Ser His Lys Glu Asp Phe Leu Asn Lys Phe Leu Leu Thr Ile Ser
130        135        140

```

```

Ser Glu Asn Leu Lys Leu Gln Tyr Lys Phe Asn Gly Gln Ile Lys Asn

```

[0043]

145	150	155	160
Pro Lys Ser Val	Asn Glu Ile Trp Thr	Asp Leu Phe Ser Ile	Ala His
	165	170	175
Val Asp Met	Lys Leu Ser Thr Asp Arg	Thr Leu Ser Ser	Ser Ile Ser
	180	185	190
Gln Phe Trp Phe	Arg Leu Glu Phe Cys Lys Glu	Asp Lys Asp Phe	Ile
	195	200	205
Leu Phe Pro Thr	Ala Asn Arg Tyr Ser Arg	Lys Leu Trp Lys	His Ser
	210	215	220
Ile Lys Asn Asn	Gln Leu Phe Lys Glu Gly	Ile Arg Asn Tyr	Ser Glu
	225	230	235
Ile Ser Ser Leu	Pro Tyr Glu Glu Asp	His Asn Phe Asp	Ile Asp Leu
	245	250	255
Val Phe Thr Trp	Val Asn Ser Glu Asp	Lys Asn Trp Gln	Glu Leu Tyr
	260	265	270
Lys Lys Tyr Lys	Pro Asp Phe Asn Ser Asp	Ala Thr Ser Thr	Ser Arg
	275	280	285
Phe Leu Ser Arg	Asp Glu Leu Lys Phe	Ala Leu Arg Ser	Trp Glu Met
	290	295	300
Asn Gly Ser Phe	Ile Arg Lys Ile Phe	Ile Val Ser Asn	Cys Ala Pro
	305	310	315
Pro Ala Trp Leu	Asp Leu Asn Asn Pro	Lys Ile Gln Trp	Val Tyr His
	325	330	335
Glu Glu Ile Met	Pro Gln Ser Ala Leu	Pro Thr Phe Ser	Ser His Ala
	340	345	350
Ile Glu Thr Ser	Leu His His Ile Pro	Gly Ile Ser Asn	Tyr Phe Ile
	355	360	365
Tyr Ser Asn Asp	Asp Phe Leu Leu Thr	Lys Pro Leu Asn	Lys Asp Asn
	370	375	380
Phe Phe Tyr Ser	Asn Gly Ile Ala Lys	Leu Arg Leu Glu	Ala Trp Gly
	385	390	395
Asn Val Asn Gly	Glu Cys Thr Glu Gly	Glu Pro Asp Tyr	Leu Asn Gly
	405	410	415
Ala Arg Asn Ala	Asn Thr Leu Leu Glu	Lys Glu Phe Lys	Lys Phe Thr
	420	425	430
Thr Lys Leu His	Thr His Ser Pro Gln	Ser Met Arg Thr	Asp Ile Leu
	435	440	445

[0044]

Phe Glu Met Glu Lys Lys Tyr Pro Glu Glu Phe Asn Arg Thr Leu His
 450 455 460
 Asn Lys Phe Arg Ser Leu Asp Asp Ile Ala Val Thr Gly Tyr Leu Tyr
 465 470 475 480
 His His Tyr Ala Leu Leu Ser Gly Arg Ala Leu Gln Ser Ser Asp Lys
 485 490 495
 Thr Glu Leu Val Gln Gln Asn His Asp Phe Lys Lys Lys Leu Asn Asn
 500 505 510
 Val Val Thr Leu Thr Lys Glu Arg Asn Phe Asp Lys Leu Pro Leu Ser
 515 520 525
 Val Cys Ile Asn Asp Gly Ala Asp Ser His Leu Asn Glu Glu Trp Asn
 530 535 540
 Val Gln Val Ile Lys Phe Leu Glu Thr Leu Phe Pro Leu Pro Ser Ser
 545 550 555 560
 Phe Glu Lys Leu Glu His His His His His His
 565 570

<210> 23

<211> 1197

<212> DNA

<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 23

atggctagct ggagccaccc gcagttcgaa aaaggcgccc tggttccgcg tggatccaaa 60
 gtcttaaccg tctttggcac tcgcctgaa gctattaaaa tggegcctgt aattctagag 120
 ttacaaaaac ataacacaat tacttcaaaa gtttgcatta ctgcacagca tcgtgaaatg 180
 ctagatcagg ttttgagcct attcgaaatc aaagctgatt atgatttaaa tatcatgaaa 240
 cccaaccaga gcctacaaga aatcacaaca aatatcatct caagcettac cgatgttctt 300
 gaagatttca aacctgactg cgtccttgcg cacggagaca ccacaacaac ttttgcagct 360
 agccttgcgt cattctatca aaaaatacct gttggccaca ttgaagcagg cctgagaact 420
 tataatttat actctccttg gccagaggaa gcaaataggc gtttaacaag cgttctaagc 480
 cagtggcatt ttgcacctac tgaagattct aaaaataact tactatctga atcaatacct 540
 tctgacaaag ttattgttac tggaaatact gtcatagatg cactaatggt atctctagaa 600
 aaactaaaaa taactacaat taaaaaaca atggaacaag cttttccatt tttcaggac 660
 aactetaaag taattttaat taccgctcat agaagagaaa atcatgggga aggtattaaa 720
 aatattggac tttctatctt agaattagct aaaaaatacc caacattctc ttttgtgatt 780
 ccgctccatt taaatcctaa cgttagaaaa ccaattcaag atttattatc ctctgtgcac 840
 aatgttcatc ttattgagcc acaagaatac ttaccattcg tatatttaat gtctaaaagc 900
 catataatat taagtgttcc aggcggcata caagaagaag ctccatccct aggaaaacca 960
 gttcttgtat taagagatac tacagaacgt cctgaagctg tagctgcagg aactgtaaaa 1020
 ttagtaggtt ctgaaacitca aaatattatt gagagcttta cacaactaat tgaataccct 1080
 gaatattatg aaaaaatggc taattattgaa aacccttaag ggataggtaa tgccctcaaaa 1140

[0045]

atcattgtag aaactttatt aaagaataga ctcgagcacc accaccacca ccaactga 1197

<210> 24
<211> 398
<212> PRT
<213> 脑膜炎奈瑟氏菌

<400> 24

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser Lys Val Leu Thr Val Phe Gly Thr Arg Pro Glu Ala Ile
20 25 30

Lys Met Ala Pro Val Ile Leu Glu Leu Gln Lys His Asn Thr Ile Thr
35 40 45

Ser Lys Val Cys Ile Thr Ala Gln His Arg Glu Met Leu Asp Gln Val
50 55 60

Leu Ser Leu Phe Glu Ile Lys Ala Asp Tyr Asp Leu Asn Ile Met Lys
65 70 75 80

Pro Asn Gln Ser Leu Gln Glu Ile Thr Thr Asn Ile Ile Ser Ser Leu
85 90 95

Thr Asp Val Leu Glu Asp Phe Lys Pro Asp Cys Val Leu Ala His Gly
100 105 110

Asp Thr Thr Thr Thr Phe Ala Ala Ser Leu Ala Ala Phe Tyr Gln Lys
115 120 125

Ile Pro Val Gly His Ile Glu Ala Gly Leu Arg Thr Tyr Asn Leu Tyr
130 135 140

Ser Pro Trp Pro Glu Glu Ala Asn Arg Arg Leu Thr Ser Val Leu Ser
145 150 155 160

Gln Trp His Phe Ala Pro Thr Glu Asp Ser Lys Asn Asn Leu Leu Ser
165 170 175

Glu Ser Ile Pro Ser Asp Lys Val Ile Val Thr Gly Asn Thr Val Ile
180 185 190

Asp Ala Leu Met Val Ser Leu Glu Lys Leu Lys Ile Thr Thr Ile Lys
195 200 205

Lys Gln Met Glu Gln Ala Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ser Lys Val
210 215 220

Ile Leu Ile Thr Ala His Arg Arg Glu Asn His Gly Glu Gly Ile Lys
225 230 235 240

Asn Ile Gly Leu Ser Ile Leu Glu Leu Ala Lys Lys Tyr Pro Thr Phe
245 250 255

[0046]

Ser Phe Val Ile Pro Leu His Leu Asn Pro Asn Val Arg Lys Pro Ile
 260 265 270

Gln Asp Leu Leu Ser Ser Val His Asn Val His Leu Ile Glu Pro Gln
 275 280 285

Glu Tyr Leu Pro Phe Val Tyr Leu Met Ser Lys Ser His Ile Ile Leu
 290 295 300

Ser Asp Ser Gly Gly Ile Gln Glu Glu Ala Pro Ser Leu Gly Lys Pro
 305 310 315 320

Val Leu Val Leu Arg Asp Thr Thr Glu Arg Pro Glu Ala Val Ala Ala
 325 330 335

Gly Thr Val Lys Leu Val Gly Ser Glu Thr Gln Asn Ile Ile Glu Ser
 340 345 350

Phe Thr Gln Leu Ile Glu Tyr Pro Glu Tyr Tyr Glu Lys Met Ala Asn
 355 360 365

Ile Glu Asn Pro Tyr Gly Ile Gly Asn Ala Ser Lys Ile Ile Val Glu
 370 375 380

Thr Leu Leu Lys Asn Arg Leu Glu His His His His His His
 385 390 395

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: oligonucleotide"

<400> 25
 gcggatccgc tgttattata tttgttaacg 30

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: oligonucleotide"

<400> 26
 ccgctcgagt ttttcttggc caaaaaactg 30

<210> 27
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: oligonucleotide"

<400> 27
 gcattctcata tggctgttat tatatttggtt aacg 34

[0047]

<210>	28	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 引物"	
<400>	28	
	gcggatccat tatgagcaaa attagcaaat tg	32
<210>	29	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 引物"	
<400>	29	
	ccgctcgagt tgtccactag gctgtgatg	29
<210>	30	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 引物"	
<400>	30	
	ctgactccat atgacgaacc cgtccaactc c	31
<210>	31	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 引物"	
<400>	31	
	cttagcggcc gcatacaatt tgccgggtca gccg	34
<210>	32	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 引物"	
<400>	32	
	cttacatatg catcatcatc atcatcacgc tagcggatcc atgacaacga actatatattt	60
	tgtgacc	67
<210>	33	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<221>	来源	
<223>	/注释="人工序列的描述: 引物"	

[0048]

<400> 33 cttagcggcc gcttacttcg cctgacgttt ctgg	34
<210> 34 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 引物"	
<400> 34 gcagatcttt tatacttaat aacagaaaat ggc	33
<210> 35 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 引物"	
<400> 35 ccgctcgagt ttctcaaag atgatggtta tg	32
<210> 36 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 引物"	
<400> 36 gcggatccaa agtcttaacc gtctttggc	29
<210> 37 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 引物"	
<400> 37 ccgctcgagt ctattcttta ataaagtttc taca	34

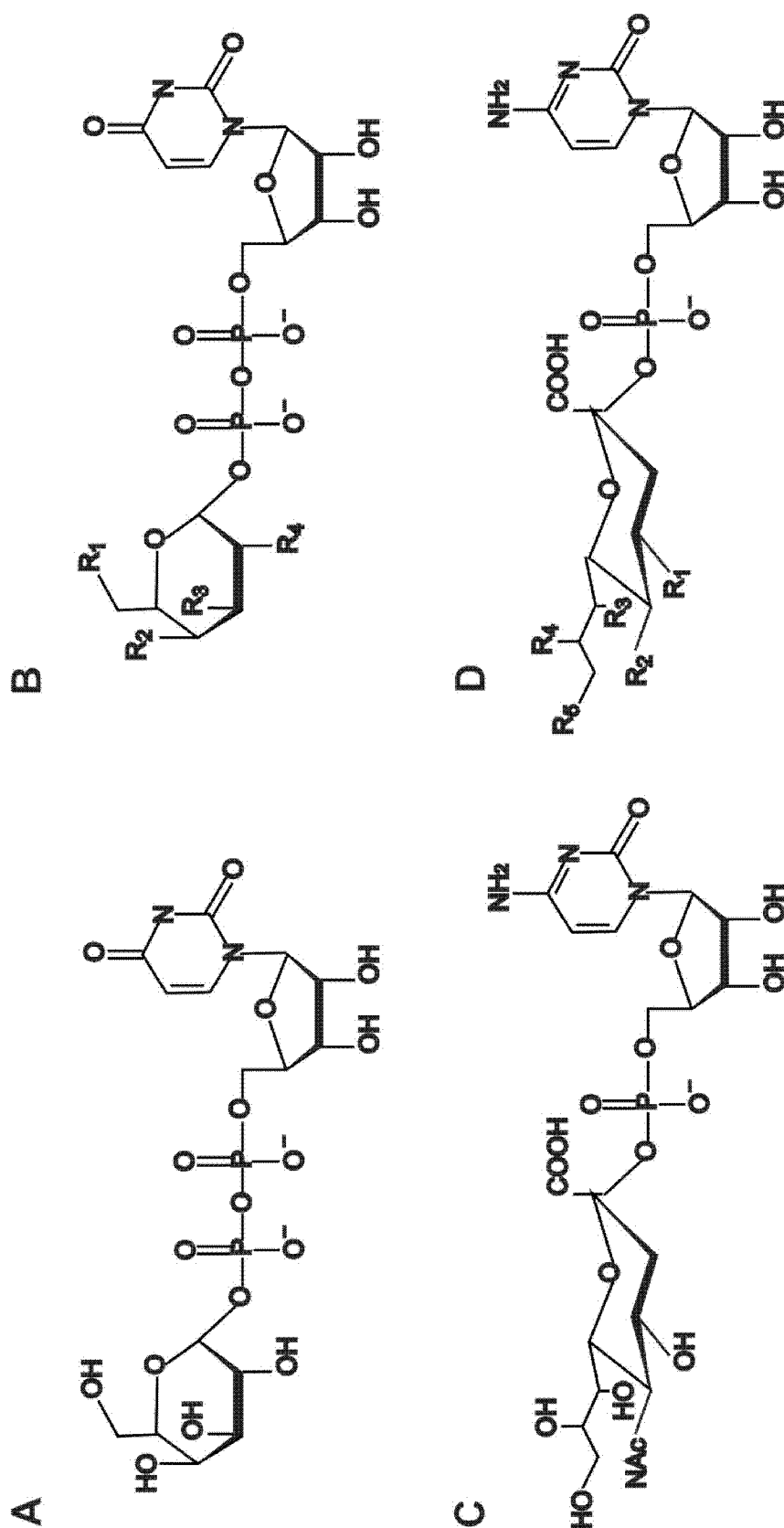


图 1

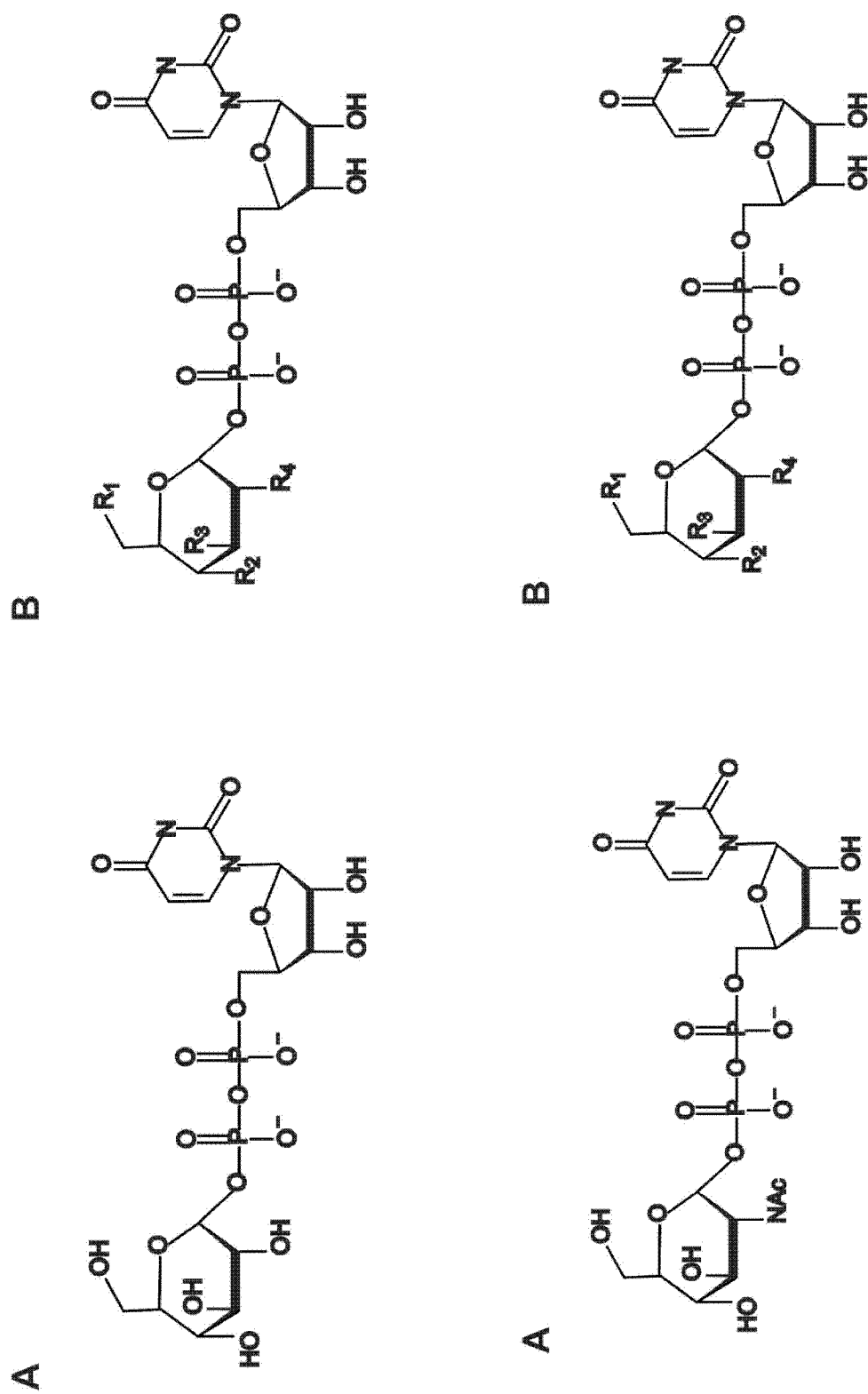


图 2

图 3

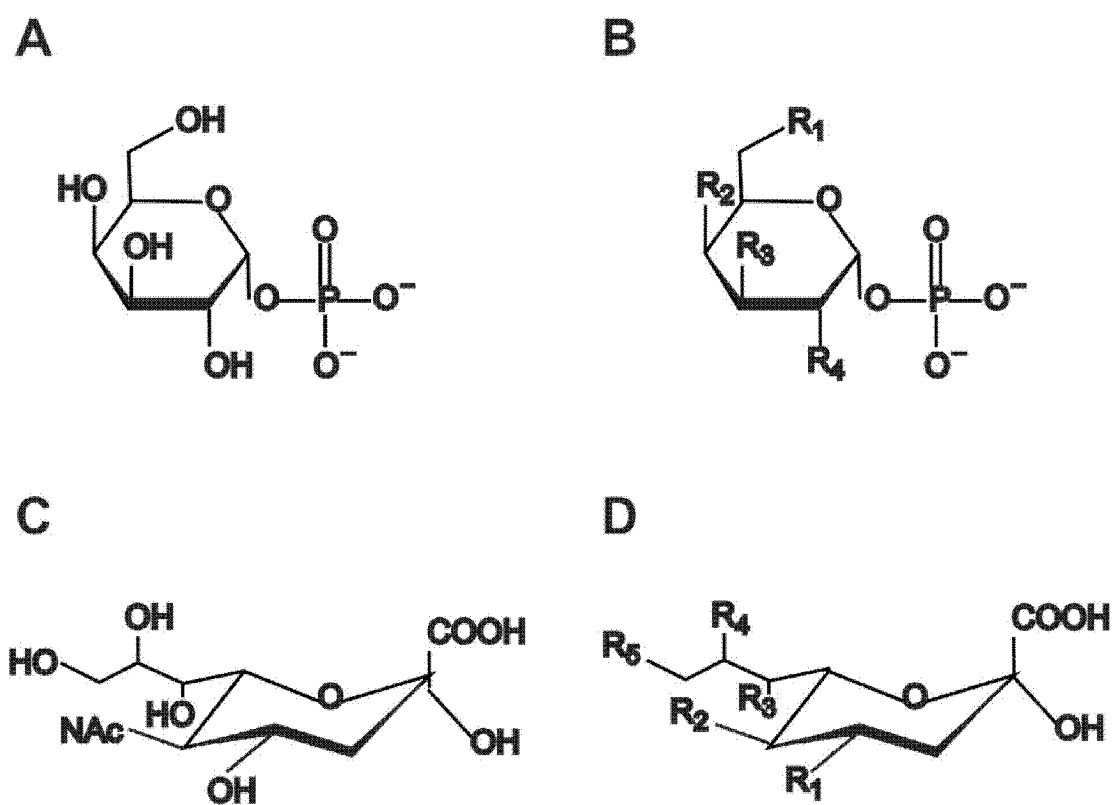


图 4

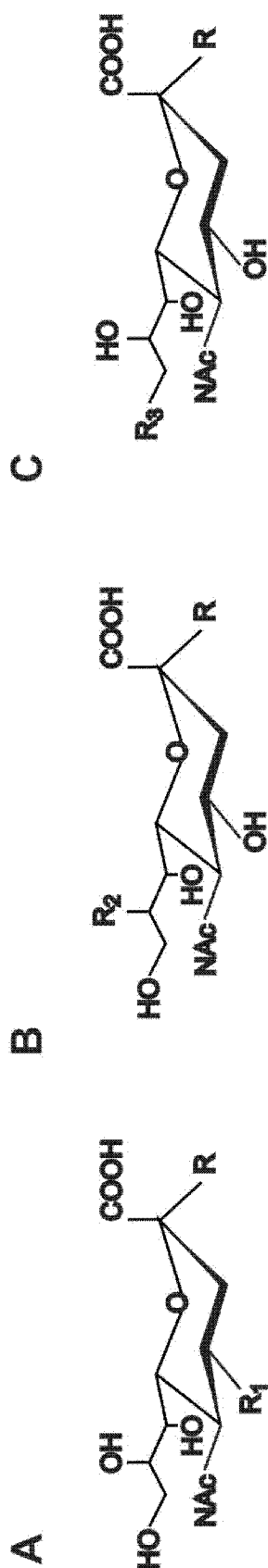


图 5

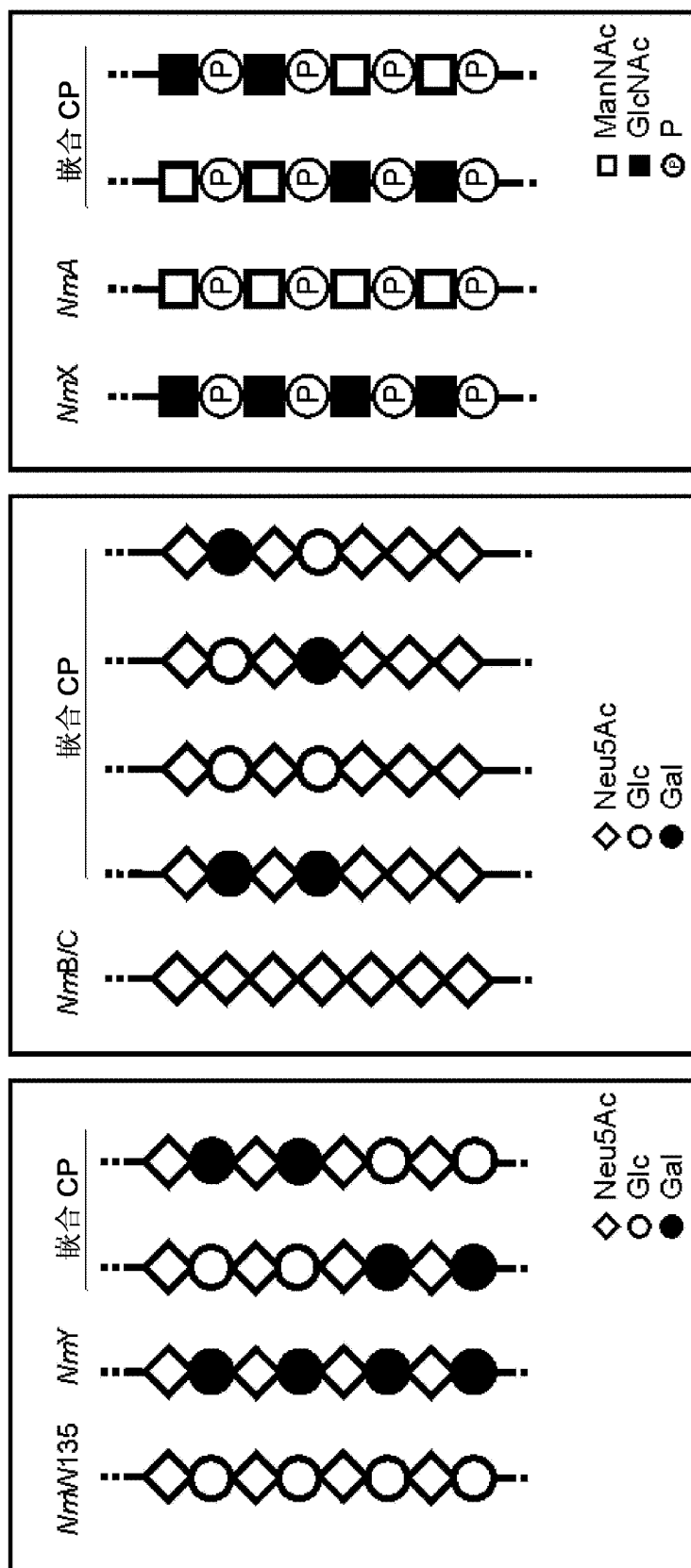


图 6

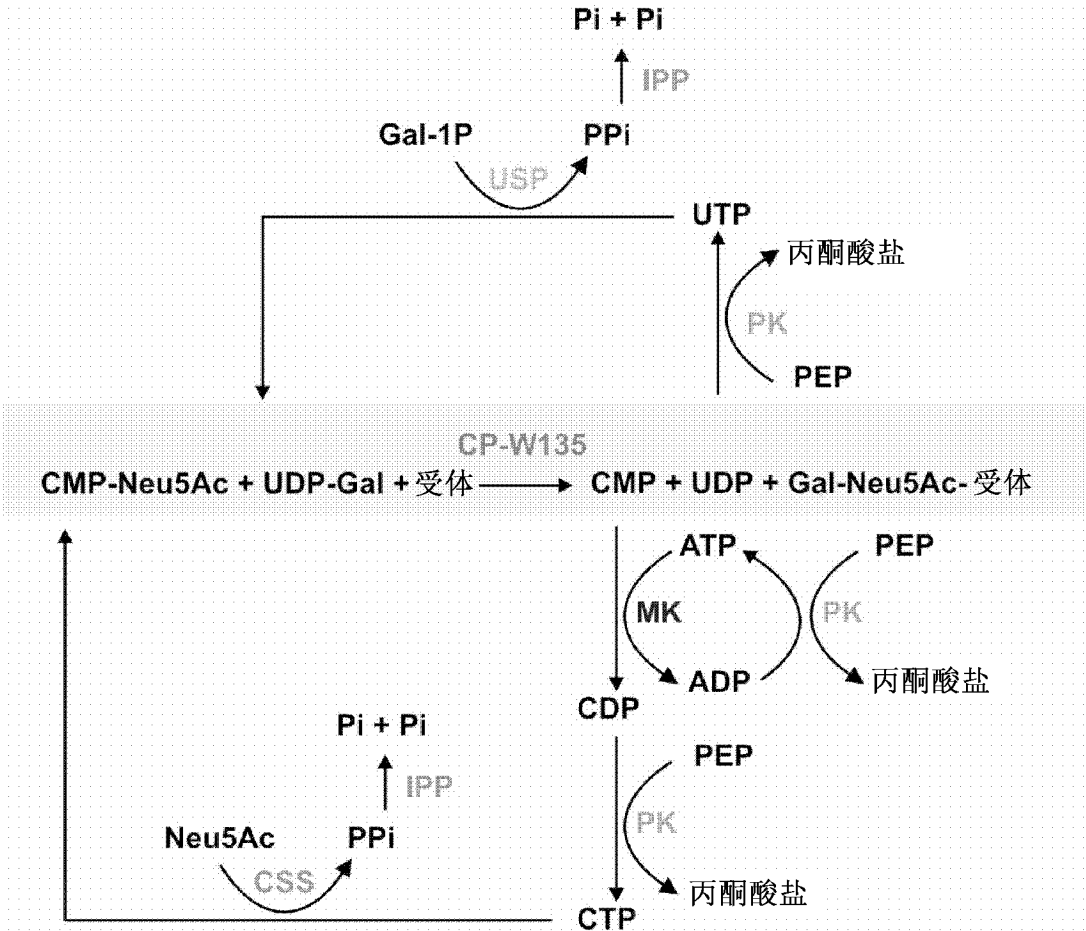


图 7

A

1 min	10 min	反应时间
		合成反应
		无 CP-W135 的 阴性对照

抗CPS (W135)

图 8

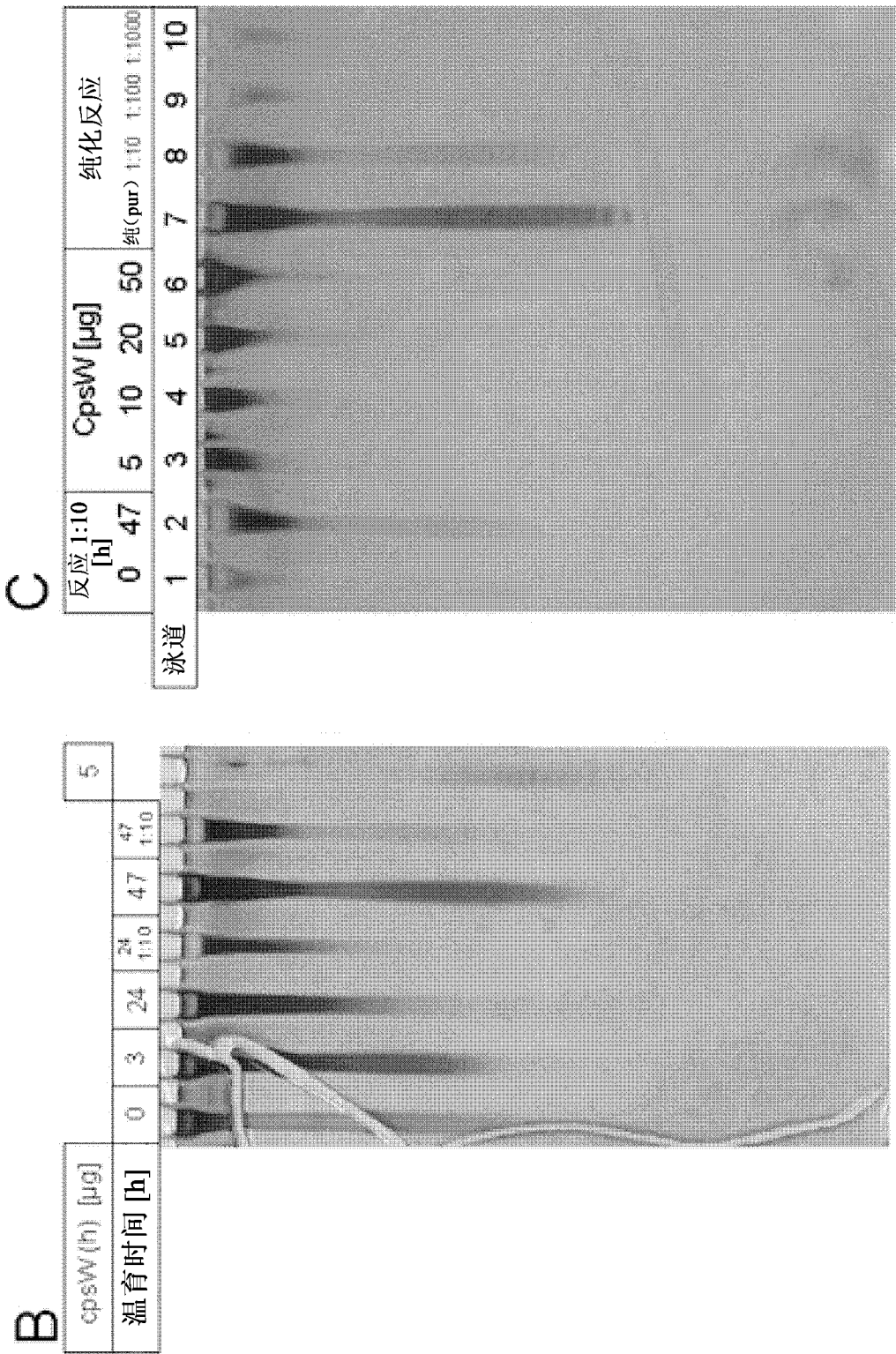


图 8

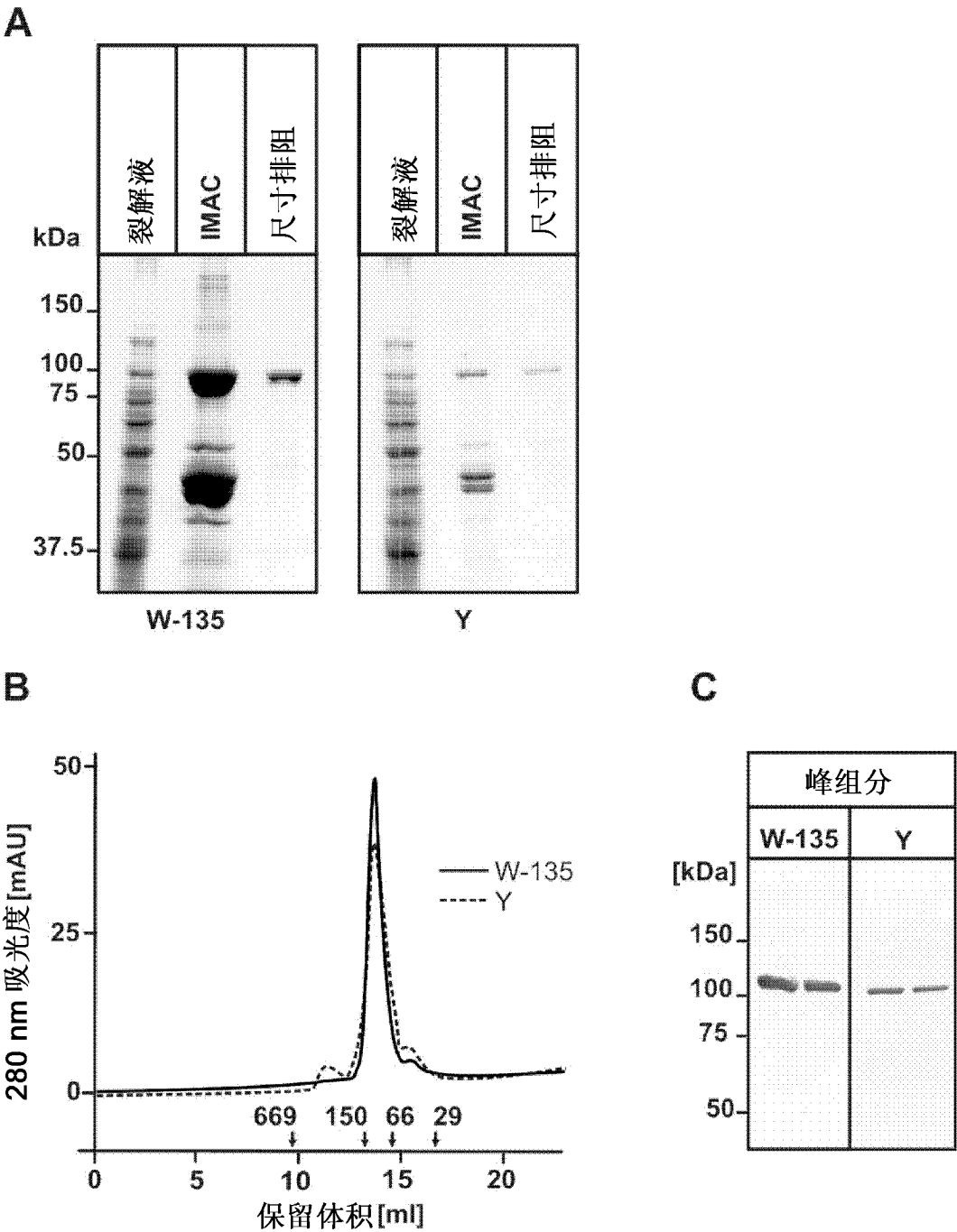


图 9

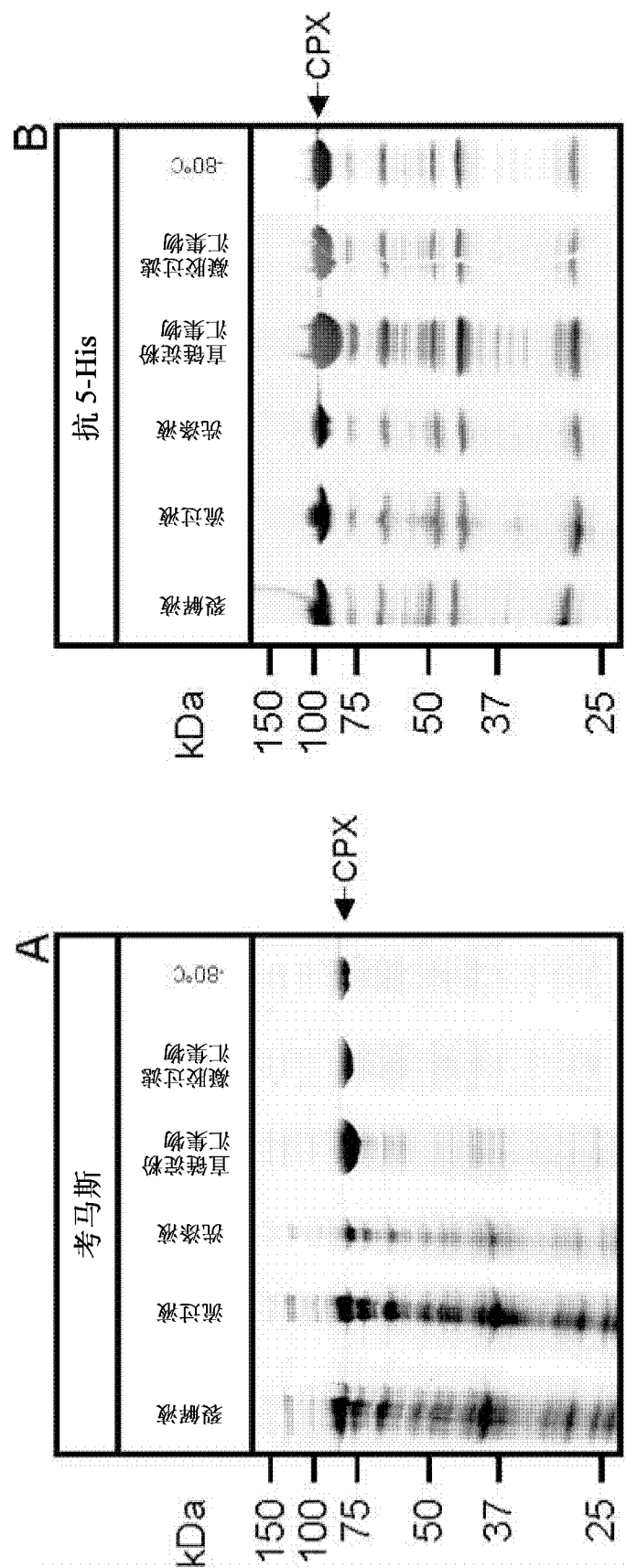


图 10

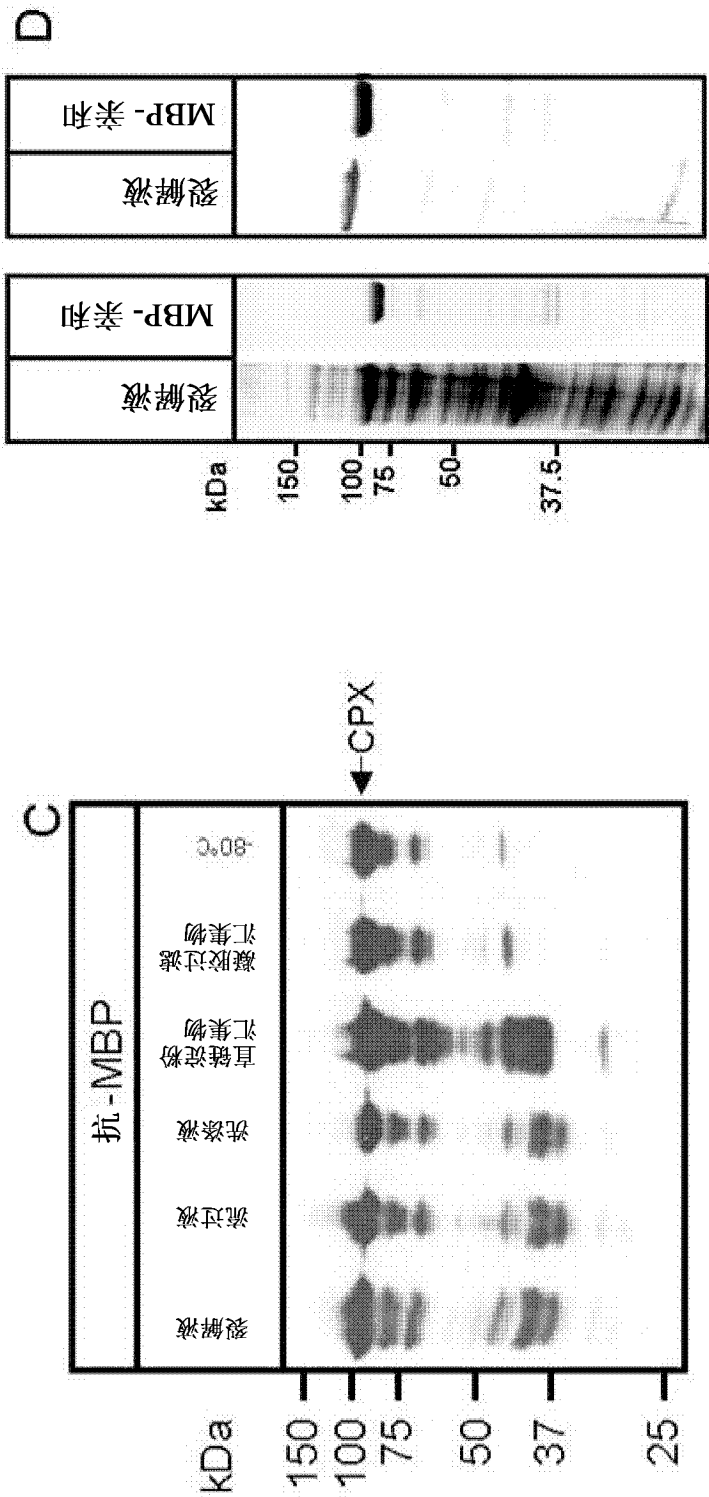


图 10

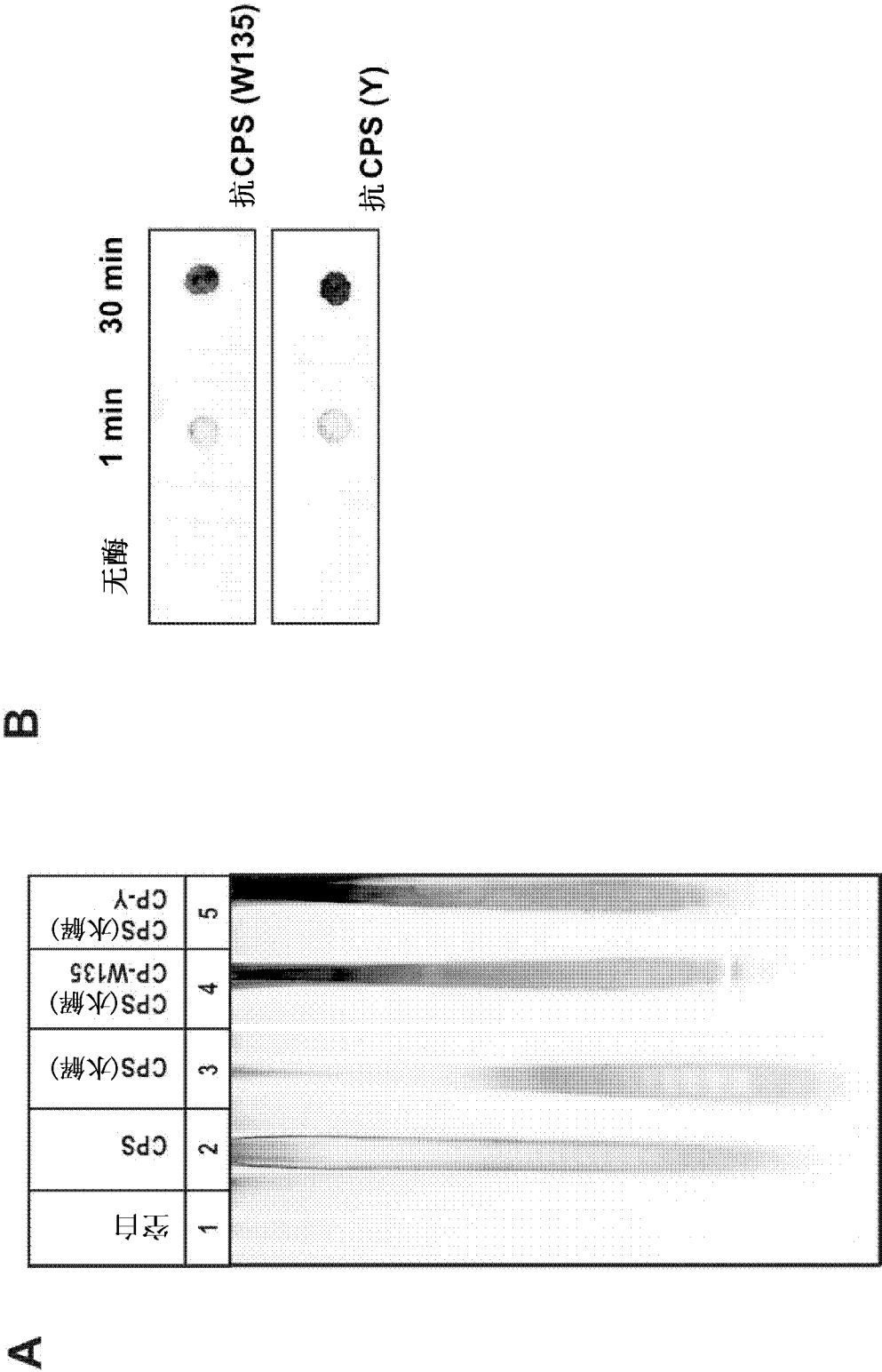


图 11

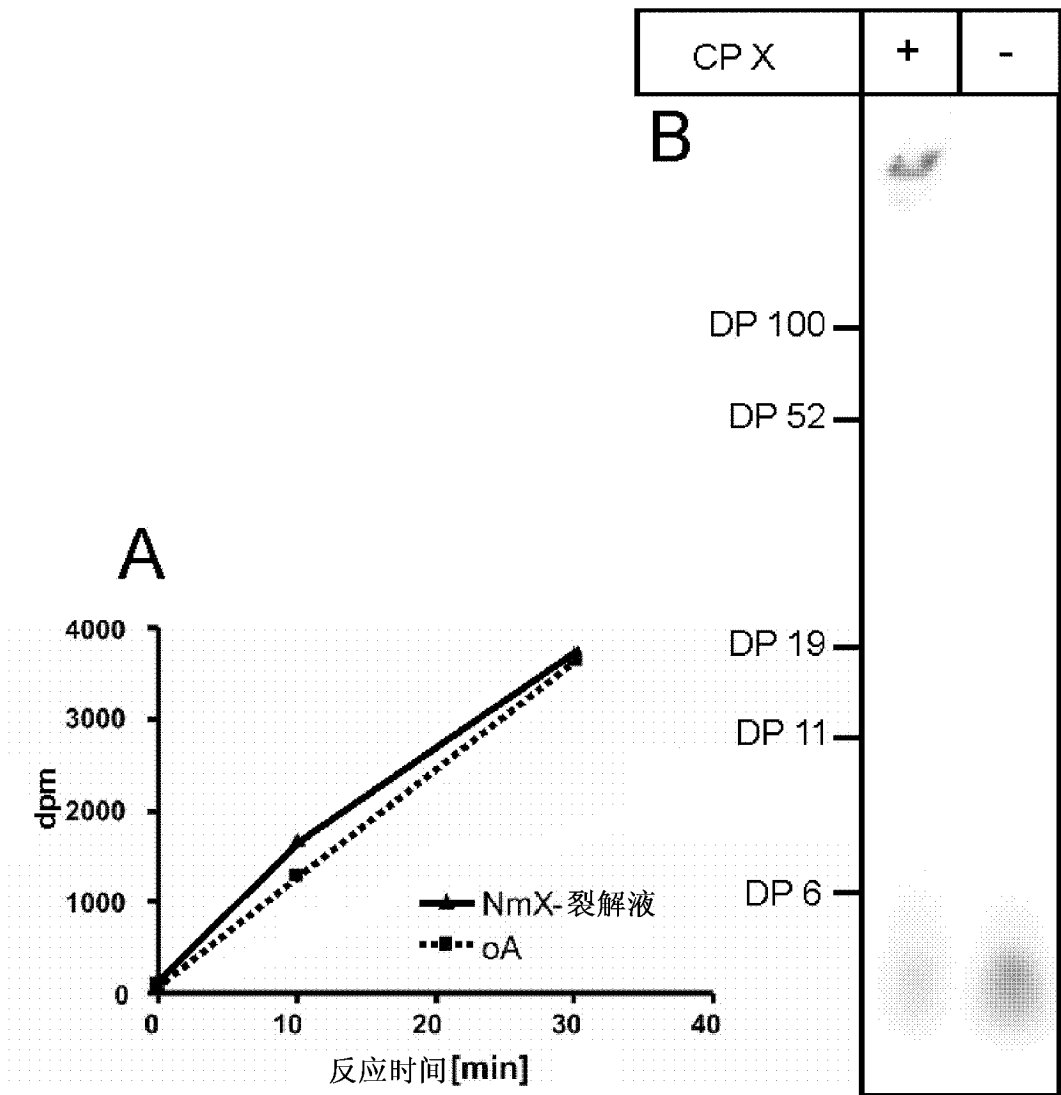


图 12

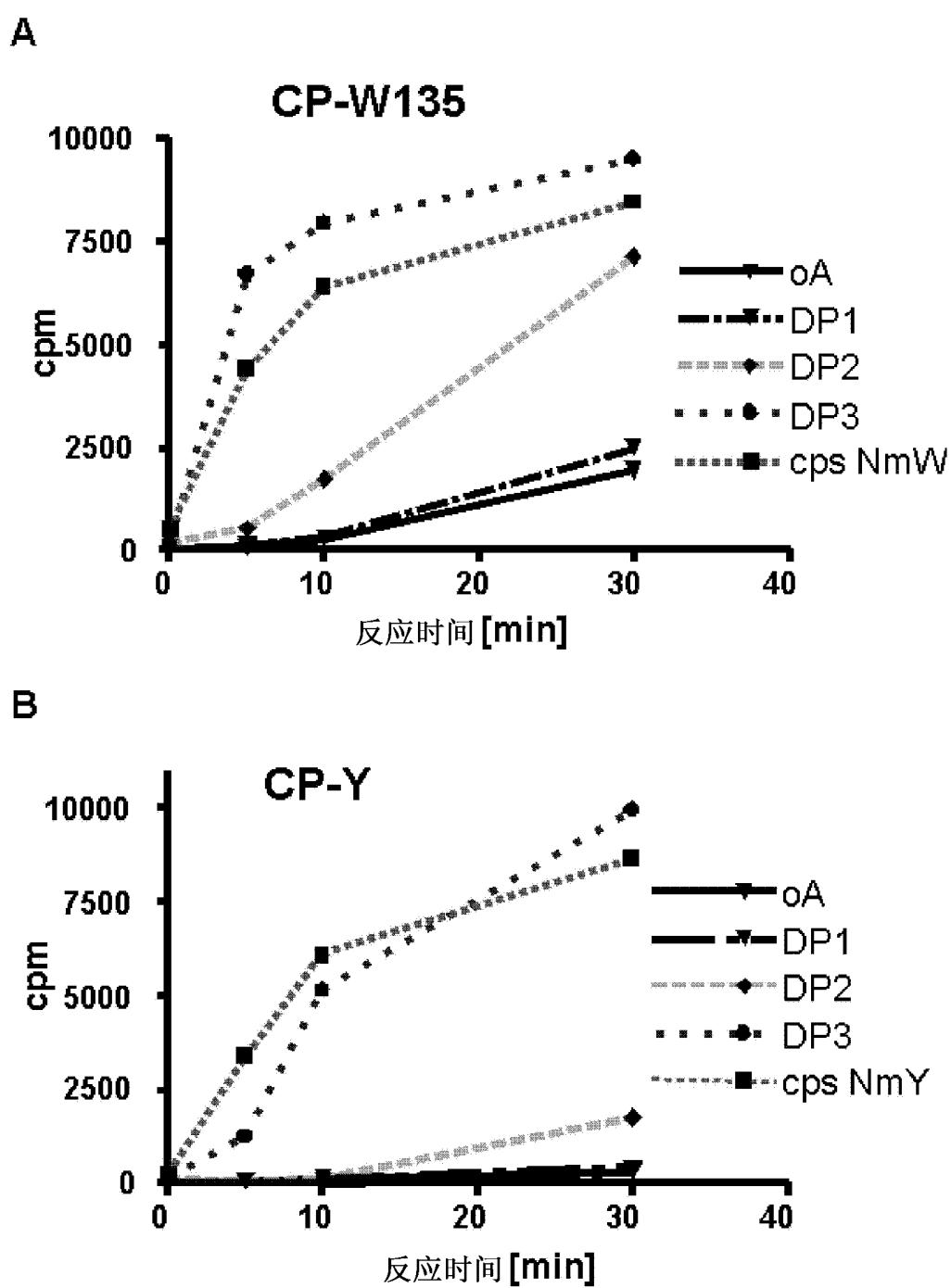


图 13

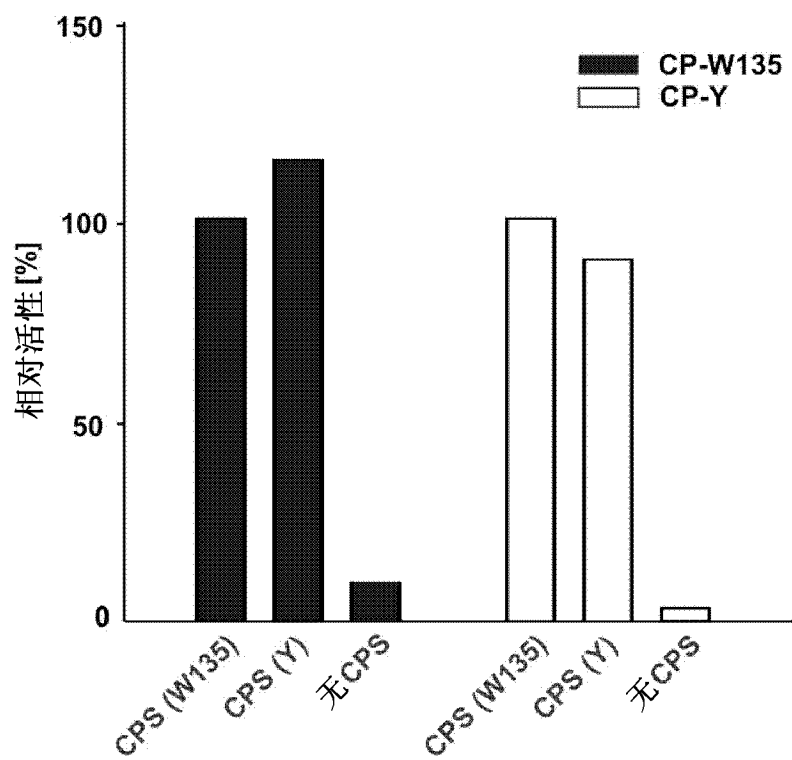
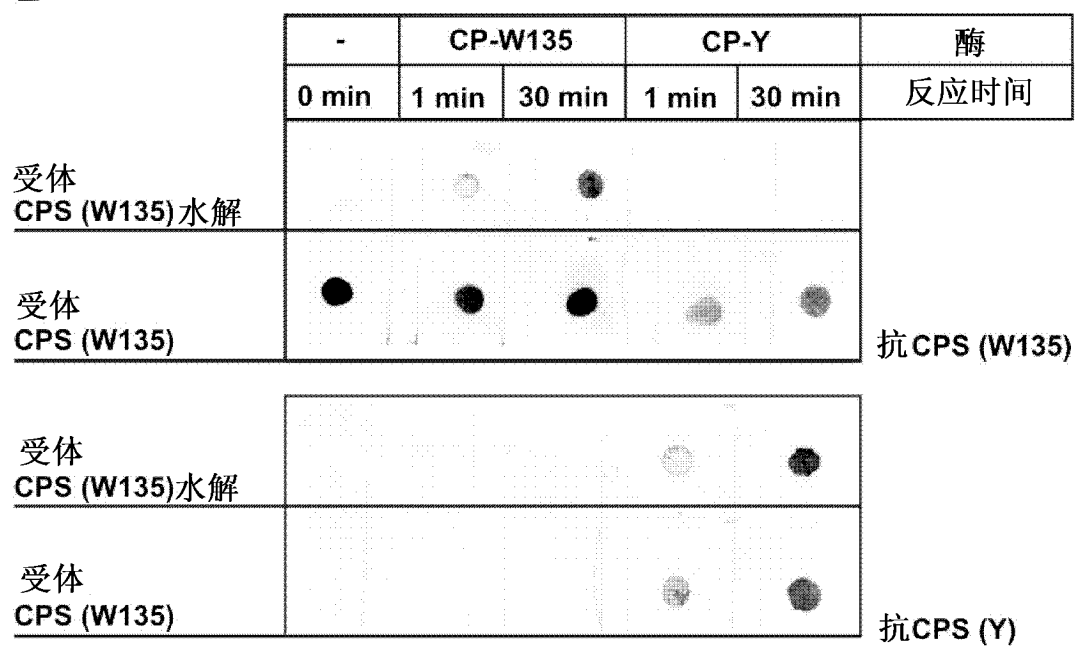
A**B**

图 14

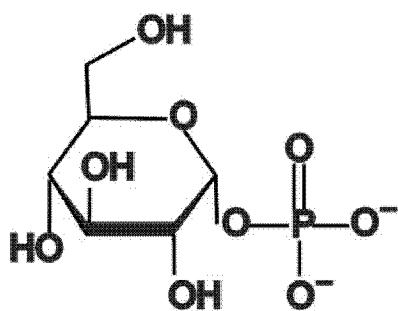
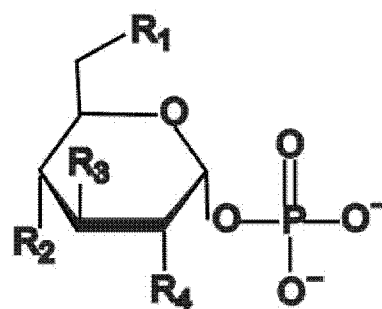
A**B**

图 15

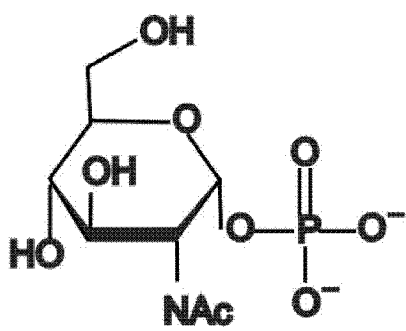
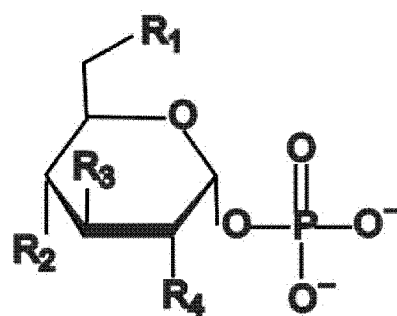
A**B**

图 16

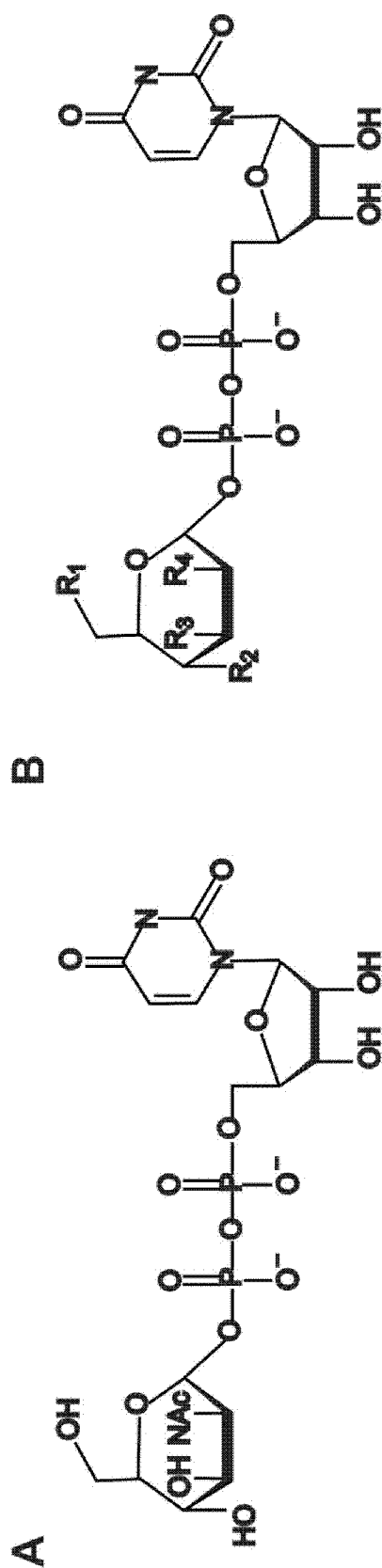


图 17

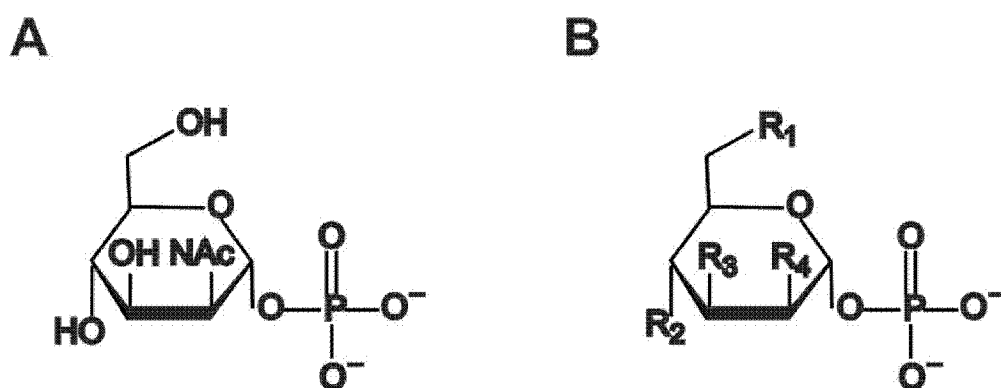


图 18

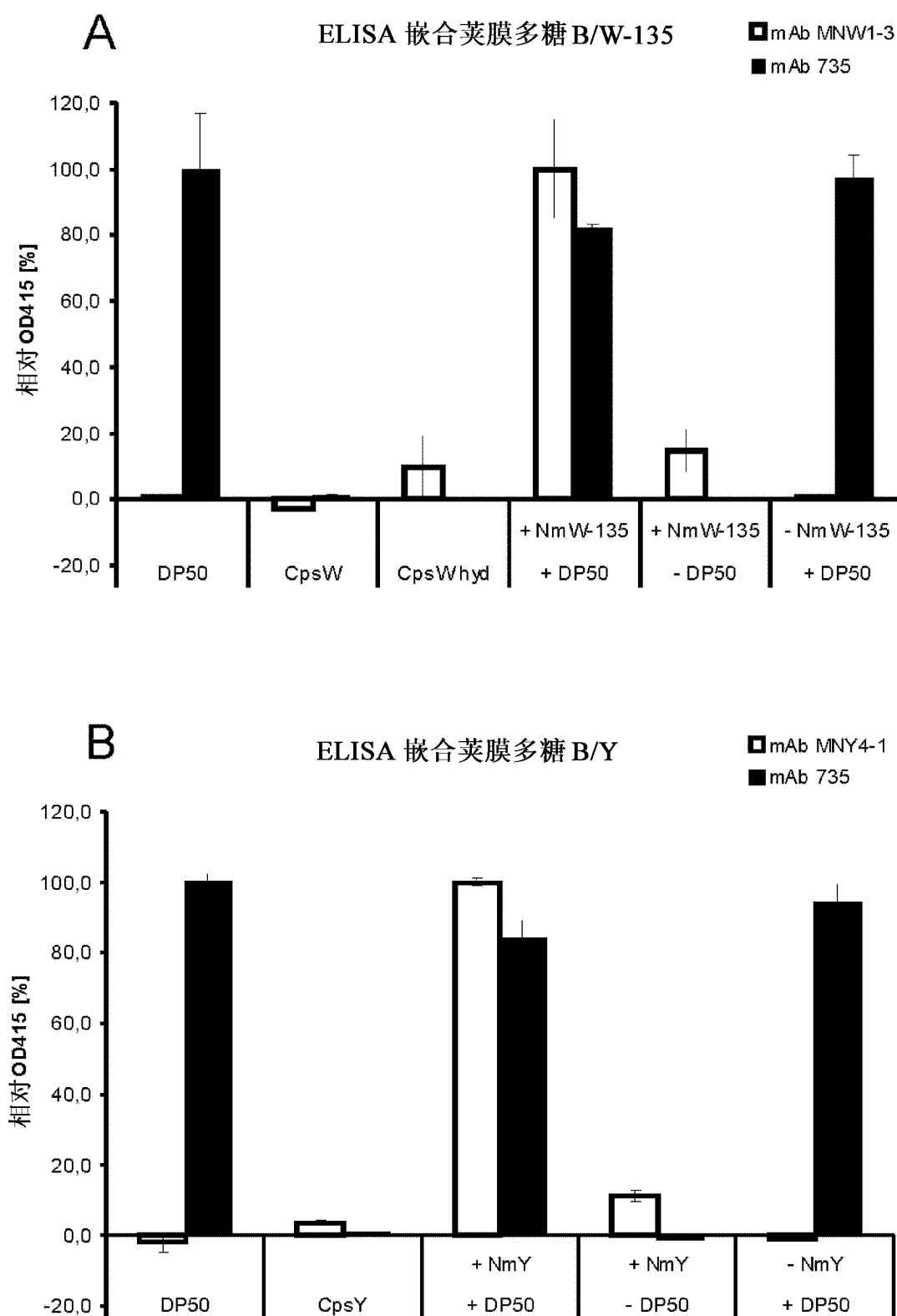


图 19

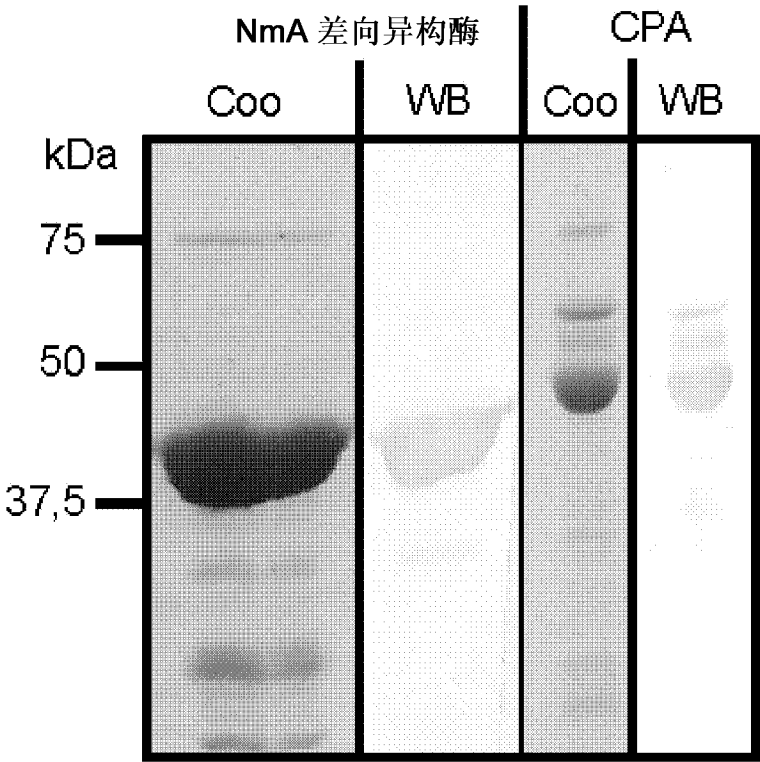


图 20

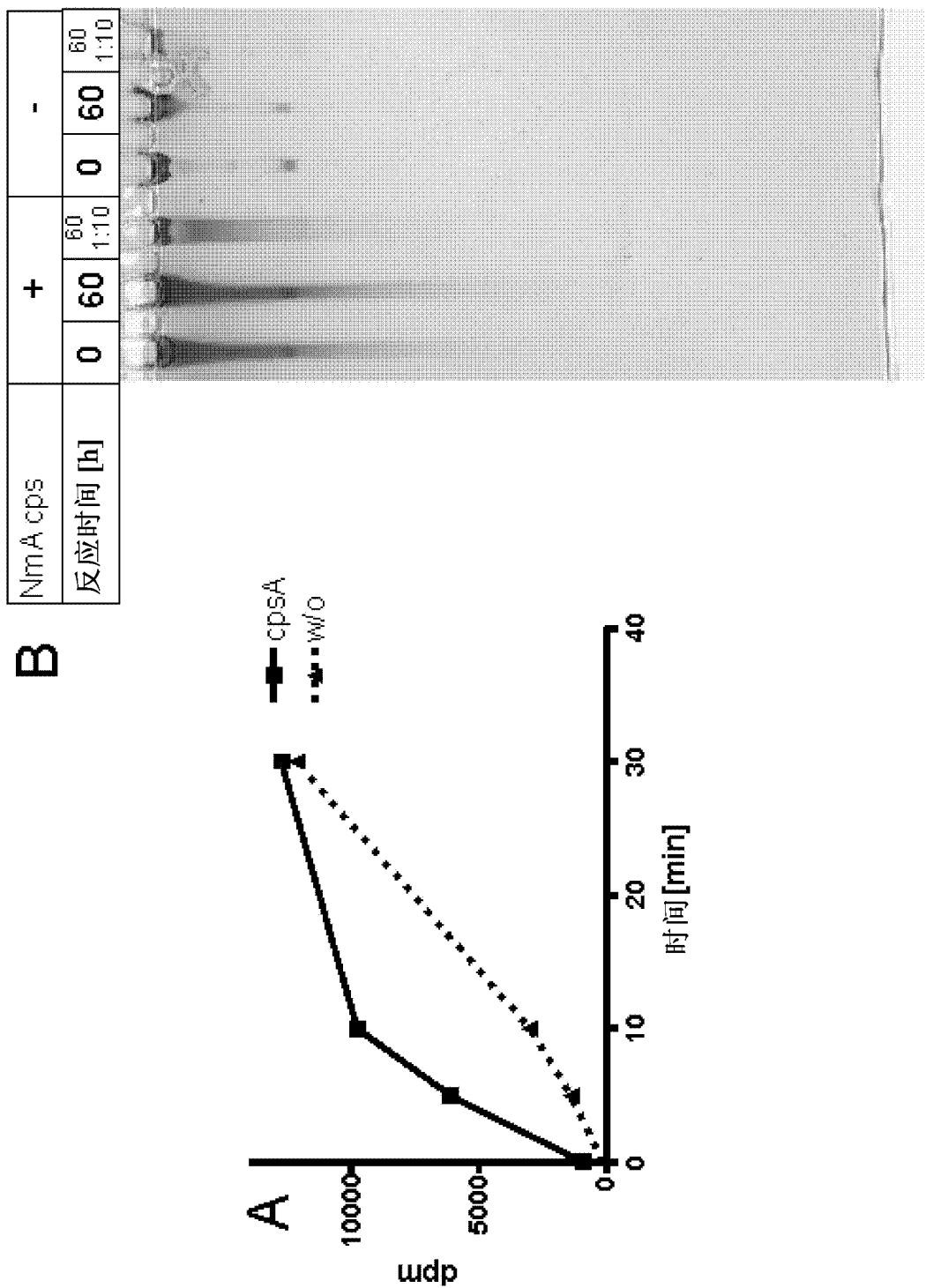


图 21