

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02815767.2

[51] Int. Cl.

C12N 1/00 (2006.01)
C07K 14/335 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月15日

[11] 授权公告号 CN 100513548C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/554 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

[22] 申请日 2002.6.11 [21] 申请号 02815767.2

[30] 优先权

[32] 2001.6.11 [33] EP [31] 01202239.8

[86] 国际申请 PCT/NL2002/000383 2002.6.11

[87] 国际公布 WO2002/101026 英 2002.12.19

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.11

[73] 专利权人 应用超微系统股份有限公司

地址 荷兰格罗宁根

[72] 发明人 科内利斯·约翰内斯·利恩豪茨

兰詹·拉玛萨米 安东·斯滕

扬·科克 吉尔布·比伊斯特

奥斯卡·保罗·科伊伯斯

[56] 参考文献

EP0545352A 1993.6.9

WO9925836A1 1999.5.27

审查员 滕 蕾

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 28 页

[54] 发明名称

将 AcmA 型蛋白质锚融合体与微生物细胞壁材料进行结合的改良方法

[57] 摘要

本发明提供了增强蛋白质物质和革兰氏阳性细菌细胞壁材料的结合的方法，所述蛋白质物质包含 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物，所述方法包含用可以从所述细胞壁材料中除去细胞壁组分(如蛋白质、(脂)磷壁酸或碳水化合物)的溶液处理所述细胞并使所述蛋白质物质和所述细胞壁材料接触。

1、 获得具有增强的与蛋白质物质的结合能力的革兰氏阳性细菌的细胞壁材料的方法，所述蛋白质物质包含与所述细胞壁材料结合的AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物，所述方法包括用一种酸溶液处理全细胞材料，以从所述细胞壁材料中除去细胞壁组分，所述组分为蛋白质、磷壁酸、脂磷壁酸或碳水化合物，从而生成球形肽聚糖微粒体。

2、 权利要求 1 的方法，其中所述酸溶液含有一种选自以下一组的酸：乙酸（HAc）、盐酸（HCl）、硫酸（H₂SO₄）、三氯乙酸（TCA）、三氟乙酸（TFA）和一氯乙酸（MCA）。

3、 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述细胞壁材料来源于乳球菌、乳杆菌、芽孢杆菌或分枝杆菌。

4、 权利要求 1 或 2 的方法，进一步包括加热所述溶液中的所述细胞壁材料。

5、 由权利要求 1 至 4 中任一项的方法获得的革兰氏阳性细菌的细胞壁材料。

6、 权利要求 5 的细胞壁材料，进一步包括一种附着到所述细胞壁材料上的蛋白质物质，所述蛋白质物质包括与所述细胞壁材料结合的AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物。

7、 权利要求 6 的细胞壁材料，其中所述蛋白质物质还包括一反应性基团。

8、 权利要求 7 的细胞壁材料，其中所述反应性基团是免疫原决定簇、酶或抗体、抗生素、激素、芳香物质，无机颗粒或报道分子。

9、 权利要求 8 的细胞壁材料，其中所述免疫原决定簇是病原体来源的。

10、 权利要求 9 的细胞壁材料，其中所述病原体是恶性疟原虫。

11、 权利要求 10 的细胞壁材料，其中所述免疫原决定簇是疟疾抗原 MSA2。

12、 权利要求 9 的细胞壁材料，其中所述病原体是肺炎链球菌。

13、 权利要求 12 的细胞壁材料，其中所述免疫原决定簇是链球菌 PpmA 抗原。

14、 一种药物组合物，其包含权利要求 6-13 中任一项的组合物作为活性成分。

15、 权利要求 14 的药物组合物，其中所述组合物是一种疫苗。

16、 权利要求 15 的药物组合物，其中所述疫苗是用于粘膜免疫的疫苗。

17、 权利要求 16 的药物组合物，其中所述疫苗是用于口腔或鼻内免疫的疫苗。

18、 权利要求 5-13 中任一项的组合物在制备生物催化剂中的用途。

19、 将蛋白质物质与革兰氏阳性细菌细胞壁材料进行结合的方法，所述方法包括：

用一种酸溶液处理所述细胞壁材料以从所述细胞壁材料中除去细胞壁组分，所述组分为蛋白质、磷壁酸、脂磷壁酸或碳水化合物，从而生成球形肽聚糖微粒体；和

使所述球形肽聚糖微粒体与一种蛋白质物质接触，其中所述蛋白质物质包含与所述经处理的细胞壁材料结合的 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物。

20、 权利要求 19 的方法，其中所述蛋白质物质在一 pH 值下与所述经处理的细胞壁材料接触，该 pH 值低于所述 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物的 pI 计算值。

将 AcmA 型蛋白质锚融合体与微生物细胞壁材料进行结合的改良方法

近年来,已经可以通过异源蛋白质的定位和锚定到宿主细胞如酵母、真菌、哺乳动物和植物细胞和细菌的外表面或细胞壁,在重组微生物中进行蛋白质的异源性表面展示(Stahl 和 Uhlen, TIBTECH May 1997, 15,185-192)。在这些细胞的表面的异源蛋白质的展示具有多种形式,这些各不相同的反应性基团的表达形式例如为抗原决定簇、异源酶、(单链)抗体、聚组氨酸标签、肽和其它化合物。异源性表面展示在微生物学、分子生物学、疫苗学和生物技术中被用作应用和基础研究的工具。而另一个细菌表面展示的应用是发展活的细菌疫苗转运系统。异源抗原决定簇的细胞表面展示被认为在使用活的重组细胞进行免疫时,对诱导抗原特异的免疫反应有优势。另一个应用是使用细菌表面展示产生用于环境目的、微生物催化剂和诊断工具的全细胞生物吸附剂或生物过滤器。

总之,已经开始使用由对使用的重组生物体具有特异性和选择性的锚定或定位部分组成的嵌合蛋白质,并且这个部分和包含上述的反应性基团结合。一个熟知的锚定部分例如是包含所谓的 LPXTG 盒,其共价结合葡萄球菌表面,即以完整整合的膜蛋白质的形式。这种方法中,嵌合蛋白质由通过正常肽键结合的至少两条不同遗传起源的(多)肽组成。例如,在涉及从复杂的混合物中分离化合物和制备固定化的配体(生物吸附剂)的专利申请 WO 94/18330 中,要求保护获得这样一个配体的方法,该方法包含将一种结合蛋白质锚定在重组细胞的细胞壁中或外表面。所述结合蛋白质基本上是一个由所述重组细胞产生的嵌合蛋白质,其组成为:一个可以结合特异性化合物的 N 末端(例如来源于一个抗体)部分和与其偶联的 C 末端锚定部分,该锚定部分源于特意选择的在选定的

特异细胞中具有功能的锚定蛋白质。在 WO97/08553 中提供了一个将蛋白质选择性只定位于葡萄球菌细胞壁的方法，作为锚定蛋白质，该方法使用至少 80-90 氨基酸长的长区氨基酸细胞壁定位信号，其源于编码选择性结合葡萄球菌细胞壁组成物的蛋白质的溶葡萄球菌素基因或酰胺酶基因。

现在正在广泛开发以表达独特抗原决定簇的、减毒的细菌载体株进行疫苗输送或免疫以对抗多种疾病。近期，用这些载体进行粘膜（例如鼻或口）免疫受到了很大重视。例如，口腔接种基因工程化的、表面表达所述抗原决定簇的人口腔共生格氏链球菌（*Streptococcus gordonii*）的小鼠中发现了抗大黄蜂毒液抗原决定簇的系统及粘膜抗体反应（(Medaglini 等, PNAS 1995,2;6868-6872)）。并且，保护性免疫反应可通过口腔接种重组细菌疫苗引发，其中破伤风毒素片段 C 在乳酸乳球菌中组成型表达(Robinson 等, Nature Biotechnology 1997, 15; 653-657)。特别的，粘膜免疫作为诱导抗粘膜表面特异病原体的 IgG 和分泌性 IgA 抗体的方法被认为是一种有效的疫苗接种途径。细菌载体表达的免疫原以颗粒形式呈递给免疫系统的抗原呈递细胞（例如 M 细胞），所以不会似可溶性抗原引起耐受。另外，共同粘膜免疫系统(common mucosal immune system)的存在允许在一个特异的粘膜表面免疫引起抗原特异的 IgA 的分泌和在远端粘膜位点的其它免疫反应。这个方法的缺点是细菌株自身可能引起炎症和疾病，有可能导致发热和菌血症。一个可选择的方法是避免使用可能自身成为病原的减毒细菌株而选择重组共生细菌作为疫苗载体，如葡萄球菌和乳酸乳球菌。

然而，使用这个重组生物体的潜在问题是他们可能定殖在粘膜表面，因而长期暴露于这些重组微生物表达和释放的目标抗原。这样的长期暴露会引起免疫耐受。另外，仅仅这个生物体是遗传修饰的并包含重组核酸的单独事实也会遇到来自（外行）公众总体上相当大的反对，阻碍来

自于对包含重组 DNA 或 RNA 产品低水平的总体接受性。对使用（即使是减毒的）病原天然株或源于病原株的蛋白质或其部分也存在相似的反对。然而，如上解释，目前的蛋白质的异源性表面展示技术总体上需要使用对一些限定的微生物特异性和选择性的锚定或定位蛋白质，所述微生物总体上是重组的或病原性的，因而极大的限制它们的潜在应用。

乳酸乳球菌 (*L. lactis*) 的蛋白质锚，AcmA (cA)，它的同源物和功能衍生物 (WO 99/25836) 以非共价的形式结合很多革兰氏阳性细菌。也结合分离的细胞壁材料。这些细胞壁中的结合配体目前还不知道。使用革兰氏阳性、食品级细菌，如乳酸乳球菌，提供了比使用其它细菌，如沙门氏菌属明显有利的疫苗输送工具。乳酸乳球菌不能在人体组织里复制或入侵并且报道具有低内在性的免疫性 (Norton 等, 1994)。表达破伤风毒素片段 C 的乳酸乳球菌显示在粘膜输送后诱导抗体保护小鼠不受破伤风毒素的致命攻击，即使载体细菌在服用前已被杀死 (Robinson 等, 1997)。然而，这些细菌仍包含可传播到环境中的重组 DNA，特别是大范围口腔免疫计划时。这种不可控制的重组 DNA 扩散到环境中去可能产生其它细菌或其它（微）生物摄入基因的危险。

本发明提供了提高蛋白质物质和革兰氏阳性细菌细胞壁材料结合的方法，所述蛋白质物质包含至少一个重复的，但优选为两个或三个重复的 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物的序列，所述方法包含用可以从所述细胞壁材料中除去细胞壁组分（如蛋白质、（脂）磷壁酸或碳水化合物）的溶液处理所述细胞壁材料和使所述物质和所述处理过的细胞壁材料接触。在所述方法中获得了提高了的结合，该方法通过用可以除去细胞壁组分的溶液处理所述细胞壁材料，然后任选地保存获得的细胞壁材料直至为其提供所需的（融合）蛋白质，这是通过将 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物提供给该蛋白质并

将细胞壁材料与该蛋白质相接触。通过应用本发明的方法，可获得细胞壁材料，其有增强了的结合蛋白质物质的能力，该蛋白质物质含有 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物。

如述，本发明提供了一种从细菌细胞壁除去组分的方法，其包含用可以从所述细胞壁材料中除去细胞壁组分如蛋白质、(脂)磷壁酸或碳水化合物的溶液处理全细胞。通过本发明获得的细胞壁材料基本上产生了具有至少 20%，更好为 30%，最好 40%或优选为 50%的相对空的但完整的基本由惰性球形微颗粒组成的细胞包膜，进一步称为为细菌“菌蜕(ghost)”。菌蜕反映了他们来源的细菌的大小和形状。

优选的，本发明提供了获得革兰氏阳性细菌细胞壁材料的方法，该细菌具有增强了的和含有 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物的蛋白质物质结合的能力，所述方法包含用可以从所述细胞壁材料除去细胞壁组分如蛋白质、(脂)磷壁酸或碳水化合物的溶液处理所述细胞壁材料，其中所述细胞壁材料基本上包含此处提及为“菌蜕”的球形肽聚糖微颗粒。

用溶液提取细菌细胞壁材料的方法在例如 EP 0 545 352A 中有描述，而且 Brown 等提出了通过暴露于 TCA 从细菌中获得纯化的可溶性肽聚糖的方法。这些出版物描述了步骤，其中细胞首先机械裂解，所得细胞片段随后用 TCA 处理从而从细胞壁中提取肽聚糖。然而，引用的方法提供了肽聚糖的制备方法和从细胞壁组分已被除去的裂解的，随机片段化的细胞壁制备方法。很清楚所述方法不产生“菌蜕”。而且，所述方法基本上不允许和含有 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能同源物的蛋白质物质定位。相反，本发明方法的优选的目的是产生细胞壁组分被除去的“菌蜕”。无论如何，用“菌蜕”进行蛋白质物质展示比用裂解的细胞壁材料有优点。例如，蛋白质物质和细菌“菌蜕”的结合导致比该物质和机械裂解的细胞壁材料的结合更高的包装密度。在工业过程应

用中，蛋白质的高密度表面展示是有利的。在一个优选的实施方式中，本发明提供了不涉及细胞壁材料裂解的方法。

使用通过涉及机械裂解方法获得的细胞壁材料具有几个实用方面的缺点。因为细胞被完全裂解，所有胞内物质都被释放，细胞壁片段必须从蛋白质，核酸和其它细胞组分的复杂的混合物中分离出来。释放的核酸会增加溶液的粘度和使后续步骤复杂化，特别是色谱。机械裂解产生的细胞碎片常由小细胞片段组成。这些难于除去。这个问题在使用“菌蛻”时被克服了。菌蛻制备时关于颗粒大小和形状的一致成分提供了随后的纯化和分离步骤更有利的条件。优选的，本发明提供了通过不涉及裂解细胞壁的方法获得细胞壁材料，其中所述细胞壁材料包含菌蛻。

细菌菌蛻经常优选的使用裂解细胞壁的细菌进行免疫原决定簇的表面展示。与裂解步骤相比，菌蛻在过程中是失活的，而保持了很多细菌的天然球形结构。细菌菌蛻因而能更好的结合到和/或更容易的被特异的细胞或组织吸收。细菌菌蛻定位巨噬细胞或树突状细胞的能力提高了它们的功能效力。因此，本发明提供的非重组非活的菌蛻系统特别适于作为疫苗输送工具。本发明因而提供了获得具有增强的与蛋白质物质的结合能力和增强的诱导细胞免疫反应的菌蛻的方法。本发明提供了蛋白质物质和革兰氏阳性细菌细胞壁材料结合的方法，所述物质包含 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物，所述方法包含用可以从所述细胞壁材料中除去细胞壁组分如蛋白质、(脂)磷壁酸或碳水化合物的溶液处理所述细胞壁材料和使所述物质与所述细胞壁材料接触，其中所述细胞壁材料包含通过不涉及裂解细菌细胞壁的方法获得的菌蛻。

在一个优选的实施方式中，所述溶液的 pH 低于计算得到的所述 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物的 P_i 值，特别是其中所述溶液包含酸。这个酸优选的选自于乙酸 (HAc)，盐酸 (HCl)，硫酸 (H_2SO_4)，三氯酸 (trichloric acid, TCA)，三氟酸 (trifluoric acid,

TFA), 和一氯酸 (monochloric acid, MCA)。在所述溶液中所述酸的浓度依赖于所需到达的 pH 值, pH 值大多是通过适当的计算决定, 例如可用计算机程序如 DNA star 或 Clone Manager。当计算的 pI 是例如 >8, 6-4 的 pH 值对产生适当的结合是足够的; 当 pI 值更低时, 例如在 6 左右, 优选的选择 pH 值在 3-4。结构域具有 8-12 范围的 pI 值时, 所述溶液例如含有 0.06 M 到 1.2 M TCA 或相当的酸就足够了。

优选的进一步通过在所述溶液里加热所述细胞壁材料实现结合的增强, 尽管, 同样, 所述加热的准确要求不需要规定。加热例如在沸点温度 (100°C) 5-25 分钟一般可产生所需的具有进一步增强的结合能力的细胞壁材料。所述物质可以方便的洗涤和从所述处理溶液中沉淀 (例如通过离心), 如果需要, 可以方便的储存 (例如通过冷冻) 或冷冻干燥和储存至进一步使用。这个细胞壁材料基本上包含球形肽聚糖微颗粒, 其反映其来源的细菌的大小和形状。

在一个优选的实施方式中, 这个细胞壁材料来源于乳酸乳球菌、乳杆菌、芽孢杆菌或分枝杆菌。革兰氏阳性细菌的细胞壁由肽聚糖层, 蛋白质, (脂) 磷壁酸和其它 (修饰的) 碳水化合物的复杂网络组成。一般, 化学处理细胞壁材料用于除去细胞壁组分, 像蛋白质, (脂) 磷壁酸和碳水化合物而产生纯化的肽聚糖 (Morata de Ambrosini 等, 1998)。十二烷基磺酸钠 (SDS) 常用来除去蛋白质。三氯酸 (TCA) 已知可从细胞壁分离物中特异除去脂磷壁酸和碳水化合物。苯酚, 甲酰胺和氯仿与甲醇的混合物是用来提高肽聚糖纯化的其它有机溶液。

这里我们研究了用这些和其它化学物预处理革兰氏阳性细菌全细胞对结合技术的作用, 这提供了赋予细菌菌蜕或源于所述细菌的细胞壁材料以新的特性的可能性, 而不用导入重组 DNA。

在一个优选的实施方式中, 本发明提供了具有增强的与 AcmA 锚的结合能力的所述细胞壁材料在制备一种组合物状的用途, 例如药物组合

物，其具有含有 AcmA 型锚的蛋白质物质。反应性基团如抗原决定簇，异源酶，（单链）抗体，聚组氨酸标签，肽，和其它化合物能容易的结合到此处提供的细胞壁材料，这通过提供具有 AcmA 型锚的所述基团和与具有增强的结合能力的细胞壁材料的接触而实现。其它反应性基团是，荧光蛋白，荧光素酶，结合蛋白质或肽，或其它物质如抗生素，激素，非肽抗原决定簇，碳水化合物，脂肪酸，芳香物质和报道分子。

在另一个优选的实施方式中，本发明提供了使用此处提供的细胞壁材料产生用于环境目的，微生物催化剂和诊断工具的生物吸附剂或生物过滤器。例如，食品，药品和化学工业中固定化生物催化剂（酶或全微生物细胞）的使用在过去十年里一直在稳步增加。固定化的生物催化剂一般比它们的游离形式更稳定，易于操纵，更重要的是工业工程中它们能被反复利用。目前，酶的固定化常需要偶联酶到不溶性支持物的化学步骤。然而，化学处理可能对酶产生负面影响。或者，酶通过加入到胶中而固定化，其具有一个明显的缺点，底物扩散到胶中减慢了程序。

此处提供的一个可选方法是本发明提供的在革兰氏阳性细胞或细胞壁材料上的蛋白质表面展示用于有效的大规模的具有酶活性的蛋白质的固定化。此处，在乳酸乳球菌中证明了含有融合进 AcmA 蛋白质锚结构域中的 α -淀粉酶或 β -内酰胺酶的融合蛋白质的固定化。AcmA 锚融合蛋白质的加入导致了异源蛋白质在乳酸乳球菌和其它革兰氏阳性细菌表面的稳定附着。进而，在本发明中描述，酸性预处理乳酸乳球菌和其它革兰氏阳性细胞，导致异源蛋白质的高密度表面展示，这是工业过程应用的前提。而且，载体，例如革兰氏阳性细胞，能被高产量获得且是非重组的。因而，此处提供的方法可以经济的生产固定化酶并使 AcmA 蛋白质锚成为在革兰氏阳性细胞上酶表面展示的有用途径。

另一个固定化酶的代表性工业应用是在高果糖玉米糖浆生产中的通过葡萄糖异构酶催化的葡萄糖异构化。通过固定化这个酶可使这个过程

经济可行。如此处提供的，通过固定化到微生物细胞或细胞壁材料来提高在有机溶液中环氧化物水解酶的稳定性而增加这个酶的生产能力。固定化酶也能用于处理废水或工业污水。例如，处理合成日用品化学物环氧氯丙烷和环氧丙烷的过程中产生的含有低价值化学物的工业污水。固定化的卤代烷脱卤素酶（haloalkane dehalogenase）被用于把这些低价值产物循环回生产过程。

本发明也提供了用于制备本发明的组合物的嵌合和杂合 AcmA 型锚，其具有新的结合特性。基于 AcmA 型锚的 pI，它们可被分为两组杂合物（表 3）：pI 高于 8 但小于 10 的一个大组和具有相对低 pI (<5) 的较小的一组。首选的杂合 AcmA 型锚是具有至少一个有相对高计算值的 pI 的 AcmA 型结构域与一个具有相对较低计算值的 pI 的 AcmA 型结构域。所得的锚具有中间计算值的 pI，其例如在高 pH 时预期释放结合的蛋白质物质是有用的，这例如将本发明中的嵌合锚提供给包含本发明中的细胞壁材料的组合物。这个组合物可以通过相对低 pH 的胃并在到达肠时更容易的释放它的锚结合反应性基团。

本发明因此提供了包含 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物的蛋白质物质，其中所述结构域是至少两个不同的 AcmA 型细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物的杂合体。优选的，本发明提供了包含 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能性衍生物的蛋白质物质，其中所述结构域是至少两个不同的 AcmA 重复序列的杂合体，其中所述杂合体具有低于 10 的 pI 计算值。例如，本发明提供了由 AcmA 的 A1 和 A2 重复序列与 AcmD 的 D1 重复序列组成的杂合蛋白质锚。优选的这个杂合结构域包含至少一个具有相对高计算值 pI 的 AcmA 型结构域与一个有相对低计算值的 pI 的结构域。对有相对高 pI 的结构域，优选的选择至少一个来源于乳酸乳球菌细胞壁水解酶 AcmA 的 AcmA 型结构域的结构域或功能等价物，但已知有高 pI 的许多其它结

构域，例如表 3 所示。对有相对低 pI 的结构域，优选的选择至少一个来源于乳酸乳球菌细胞壁水解酶 AcmD 的 AcmA 型结构域的结构域或功能等价物，但已知有相对低 pI 的许多其它结构域，例如表 3 所示。本发明提供了包含杂合结构域的蛋白质物质，其中至少两条氨基酸链互相位于附近，每个对应一个结构域重复序列，可能被一个或多个氨基酸残基分开。所述氨基酸链或重复可能被短距离分开，例如 3-6 个到 10-15 个氨基酸间隔，或中等距离 15-100 个氨基酸间隔，或长距离 (>100 个氨基酸残基间隔)。

在一个优选的实施方式中，本发明提供了具有杂合 AcmA 结构域的蛋白质物质，其还多包含了反应性基团。例如，本发明提供了包含反应性基团的蛋白质物质，基团包括如抗原决定簇，异源酶，(单链) 抗体或其片段，聚组氨酸标签，荧光蛋白，荧光酶，结合蛋白质或肽，或其它物质如抗生素，激素，非肽抗原决定簇，碳水化合物，脂肪酸，芳香物质，无机颗粒如乳胶，或报道分子，和 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物，其中所述结构域是至少两个不同 AcmA 细胞壁结合结构域或其同源物或其功能衍生物的杂合体，(此处也称为杂合 AcmA 结构域) 在异源性表面展示时有用，其广泛的和大范围的微生物的细胞壁组分反应。

例如，本发明提供了一种物质，其中所述反应性基团是非蛋白质的半族 (moiety)，例如选自抗生素，激素，芳香物质，无机颗粒，和报道分子。所述物质通过把例如抗生素，如青霉素或四环素，但其它多种抗生素也可使用，或激素，如胆固醇激素，或其它任何化合物结合到本发明提供的结合结构域来构建。这个结合可通过本领域多种熟知的技术完成，因此可以标注或标记结合结构域。一个优选的实施例是结合结构域结合一个报道分子，如荧光纳米颗粒，FITC 或 HRPO，据此可以产生用于诊断分析的工具并检测具有肽聚糖的微生物。相似的，有抗生素结合

的结合结构域可被用来体内例如非肠胃给药到人或动物的血流或体外结合这个有肽聚糖的微生物，因而提高所述生物体周围的抗生素浓度，从而通过抗生素作用杀死该生物体。

本发明提供了一种物质，其中所述反应性基团是蛋白质半族，例如选自于抗原决定簇，酶，（单链）抗体或其片段，聚组氨酸标签，荧光蛋白，结合蛋白质或肽。例如，本发明提供了一个蛋白质，其包含作为反应性基团的蛋白质或（多）肽。并且，本发明提供了一个核酸分子，其编码本发明提供的蛋白质。这个核酸分子（是单或双股 DNA，RNA 或 DNA/RNA）至少包含特异编码杂合结合结构域的核酸序列，而且还包含特异编码反应性基团多肽的核酸序列，但可以另外也包含其它核酸序列，例如编码信号肽，或包含例如启动子和/或调节核酸序列。本发明也提供了包含核酸分子的载体，该核酸分子编码本发明提供的蛋白质物质。本发明也提供了包含核酸分子的载体，该核酸分子编码本发明提供的蛋白质物质。这个载体可以例如是质粒，噬菌体，或病毒，而且可以使用本发明提供的核酸和本领域的常规方法构建。这个载体的实例可在本说明书的实验部分找到，其它实例是杆状病毒载体，或相应的载体病毒，通过它本发明提供的蛋白质可以在（昆虫）细胞表达或生产。本发明也提供了本发明的核酸分子或载体的宿主细胞或表达系统。本发明提供的这个表达蛋白质的宿主细胞自身是本发明提供的蛋白质的附着微生物。这个宿主细胞或表达系统可以例如是革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌，或酵母细胞或昆虫细胞或植物或哺乳动物细胞，或甚至是无细胞的表达系统如网织红细胞裂解物，并且现在可通过使用本发明提供的核酸或载体及本领域的常规技术构建或获得。这个宿主细胞或表达系统的实例可在本说明书的实验部分找到，其它实例可通过使用本发明提供的核酸或载体及本领域的常规技术获得。

在一个更优选的实施方式中，本发明提供了一个包含所述具有增强

的结合能力和结合了免疫原的细胞壁材料的药物组合物，该免疫原对接种目的有用，如疫苗。特别的，本发明提供了可引发对病原体如疟疾免疫的疫苗，其在细胞里而不是在血液里进行生命循环的各阶段。

输送到粘膜表面的疫苗有时优选为注射疫苗。它们可以更容易的和更安全的给药。对粘膜接种，乳酸乳球菌衍生的细胞壁材料可以方便的使用，鉴于这个细菌是肠源性的并且通常预期没有明显的不利免疫反应。然而，对每次注射使用本发明提供的疫苗，鉴于分枝杆菌细胞壁制备的有益辅助特性，考虑源于分枝杆菌的细胞壁材料，和提供给疫苗了携带用作疫苗的必需免疫原决定簇的蛋白质物质，这是有益的。

特别的当考虑应用本发明提供的方法，本发明的细胞壁材料是至少部分的去除了不必要免疫原，该免疫原可以引起不需要的抗细菌细胞壁组分的免疫反应，这个疫苗载体产生不需要的抗细胞壁组分的免疫反应的危险性降低了。

附图说明

图 1. 编码报道蛋白质 MSA2::cA 的质粒 pNG3041 的示意图，MSA2::cA 分泌后是使用乳酸乳球菌 PrtP 信号的蛋白质原和序列原 (PrtP:sspro)；Pnis: nisA 基因的乳酸链球菌肽诱导的启动子。T: 转录终止子。CmR: 氯霉素抗性基因。repC 和 repA: 涉及质粒复制的基因。

图 2. 外部结合了 MSA2::cA 的细菌细胞的荧光显微镜图象。A. 弯曲乳杆菌 (*Lb.curvatis*)，清酒乳杆菌 (*Lb.sake*) 和乳酸乳球菌细胞在结合前没有预处理。B. 乳酸乳球菌细胞在结合前用 TCA 预处理。浅颜色区域指示报道蛋白质 MSA2::cA 结合位点。没有用 TCA 预处理的 (A) 和用 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞的 (B) 区别明显。

图 3. 化学物处理的乳酸乳球菌细胞，随后洗细胞，再和 MSA2::cA 孵育进行结合的 western 印迹。没结合的 MSA2::cA 被洗掉了。本

图显示 MSA2::cA 结合了化学物预处理的细胞，使用 MSA2 的特异抗体检测。不同的预处理在泳道上方指明。MSA2::cA 是生产细胞产生的蛋白质原：proMSA2::cA，一些这个蛋白质存在于培养基中用于结合并且它也结合（箭头指示）。生产细胞的膜结合蛋白质酶，HtrA 切序列原产生成熟的 MSA2::cA，其结合预处理的细胞（星号指示）。HtrA 也切 cA 锚的重复序列。因为有三个重复，几个大小的 MSA2 蛋白质存在于生产者的培养基中。只要多于一个重复存在，就能发生结合。双星号指向一个或两个重复被切掉的 MSA2::cA。M：分子量标准（分子量指示在左侧页边）。两个印迹在信号强度上不同。作为参考，他们都包含一样 TCA 预处理的样品。信号强度的不同是因为染色时间不同。可以清楚的看见 TCA 和其它酸预处理对随后的 MSA2::cA 的结合有最显著的影响。

对所有化学物预处理的结论总结于表 1。

图 4. 化学预处理的乳酸乳球菌细胞的考马氏染色的 SDS-PAGE 胶。

预处理：

- 1、未处理
- 2、HCl
- 3、H₂SO₄
- 4、HAc
- 5、TFA
- 6、TCA

明显的用 HCl, H₂SO₄, TFA 或 TCA 处理细胞从细胞中除去了大量蛋白质。

图 5. 用不同 TCA 浓度预处理乳酸乳球菌细胞并外部结合 MSA2::cA 的 western 印迹。箭头和星号：见图 3。

预处理：

- 1、未用 TCA 处理。

- 2、1% TCA。
- 3、5% TCA。
- 4、10% TCA。
- 5、20% TCA。

图中显示随预处理时 TCA 的量的升高, MSA2::cA 的结合也升高。

图 6. cA 重复和 cD 重复的序列对比。图底部显示的和共有序列一致的氨基酸加了下划线。星号指出在两个重复中一样的残基。

图 7. 有和没有 TCA 预处理时不同锚融合蛋白质与乳酸乳球菌的结合。原则和图 3 一样。MSA2 融合体的不同加工形式产生了一条泳道的多条条带。

- 1、未处理的乳酸乳球菌+MSA2::cA
- 2、未处理的乳酸乳球菌+MSA2::cD
- 3、未处理的乳酸乳球菌+MSA2
- 4、TCA 预处理的乳酸乳球菌+MSA2::cA
- 5、TCA 预处理的乳酸乳球菌+MSA2::cD
- 6、TCA 预处理的乳酸乳球菌+MSA2

TCA 预处理对 MSA2::cA 结合的影响是明显的(比较泳道 1 和 4)。似乎对 MSA2::cD 有一些提高, 而没有锚的 MSA2 没有提高。对没有锚的 MSA2 存在信号说明 MSA2 自身具有对细菌细胞壁微弱的亲和力。然而, 用荧光和电子显微镜不能检测到 MSA2::cD 或 MSA2 结合预处理过的细胞(见正文)。这个不同很可能是由于这些技术灵敏度的不同。

图 8. TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞和 MSA2::cA 或 MSA2::cD 孵育的荧光显微镜照片。浅色区域指示报道融合蛋白质结合的位点。明显的只和 MSA2::cA 发生结合, 而不和 MSA2::cD。

图 9. 乳酸乳球菌细胞和不同 MSA2 构建体孵育的电子显微镜照片。黑点代表结合了 MSA2(融合)蛋白质的位置。

- A. 未预处理的细胞和 MSA2:: cA 孵育
- B. TCA 预处理的细胞和 MSA2:: cA 孵育
- C. TCA 预处理的细胞和 MSA2:: cD 孵育
- D. TCA 预处理的细胞和 MSA2 孵育

显著的结合（黑点）只在 TCA 预处理的细胞和 MSA2:: cA (B) 中可见。

图 10. 不同的锚融合蛋白质与经过和未经过 TCA 预处理的枯草芽孢杆菌的结合。这张图是和图 3 和 7 相似的 western 印迹。

- 1、未预处理的细胞+MSA2:: cA
- 2、未预处理的细胞+MSA2:: cD
- 3、未预处理的细胞+MSA2
- 4、TCA 预处理的细胞+MSA2:: cA
- 5、TCA 预处理的细胞+MSA2:: cD
- 6、TCA 预处理的细胞+MSA2
- 7、未预处理枯草芽孢杆菌（阴性对照）

从这张图，明显 TCA 预处理提高了 MSA2:: cA（比较泳道 1 和 4）的结合，和乳酸乳球菌相似。对 MSA2:: cD 和没有锚的 MSA2，只观察到一些背景结合。

图 11. MSA2:: cA 结合经过和未经过 TCA 预处理的干酪乳杆菌的荧光显微镜照片。浅色区域代表结合了 MSA2:: cA。明显的对干酪乳杆菌，TCA 预处理提高了 MSA2:: cA 的结合。

图 12. MSA2:: cA 和 MSA2:: cD 结合 TCA 预处理的耻垢分枝杆菌的荧光显微镜照片。浅色区域代表结合了 MSA2 融合蛋白质。明显可见在这种情况下只有 MSA2:: cA 结合。

图 13. 外部结合了 MSA2:: cA 的乳酸乳球菌用 LiCl 处理或储存在不同条件下的 western 印迹。不同泳道中的条带代表结合 TCA 处理过的

细胞的 MSA2::cA 的量。箭头和星号如图 3。

- 1、标准
- 2、未预处理的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育
- 3、未预处理的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育
- 4、TCA 预处理过的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育
- 5、TCA 预处理过的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育, 随后用 8M LiCl 洗
- 6、TCA 预处理过的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育, 随后 4°C 储存在水中 3 星期
- 7、TCA 预处理过的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育, 随后-80°C 储存在 10%甘油中 3 星期
- 8、TCA 预处理过的乳酸乳球菌和 MSA2::cA 孵育, 随后-80°C 储存在水中 3 星期

这张图再次显示 TCA 预处理对 MSA2::cA 结合乳酸乳球菌细胞的有利影响（比较泳道 3 和 4）。也明显可见用 8M LiCl 洗和 4°C 储存在水中 3 星期对结合了的 MSA2::cA 只有微小影响（比较泳道 4 和 5 及 6）。储存在-80°C 对结合了的 MSA2::cA 没有影响（比较泳道 4 和 7 及 8）。

图 14. 分别在重组株 NZ9000 (pNG3041) 和 NZ9000 (pNG3043) 中 (A) MSA2::cA 和 (B) MSA2::cP 表面表达的荧光显微镜照片。(C) 结合 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞的 MSA2::cA。浅色区域指示 MSA2 融合蛋白质的位置。生产 MSA2::cA 的重组株只在一些特别的位点表面有蛋白质 (A)。生产 MSA2::cP 的重组株在一些区域的有组织的表面上有更多的蛋白质 (B), 结合了的 MSA2::cA 的 TCA 预处理的非重组乳酸乳球菌的表面明显完全被蛋白质覆盖了 (C)。

图 15. 乳酸乳球菌全蛋白质提取物和兔免疫血清反应的 western 印迹。血清稀释度 1: 100。

0: 免疫前血清。 2 和 3: 分别为二次和三次免疫后的血清。

A1: 用 NZ9000 Δ acmA [pNG3041]细胞 (重组株, MSA2::*cA* 表面锚定) 皮下免疫兔

B1: 用 NZ9000 Δ acmA (阴性对照) 皮下免疫兔

C2: 用 NZ9000 Δ acmA [pNG3043]细胞 (重组株, MSA2::*cP* 表面锚定) 口腔免疫兔

E1: 用 TCA 预处理过的已外部结合 MSA2::*cA* 的 NZ9000 Δ acmA (非重组株, MSA2::*cA* 表面锚定) 口腔免疫兔

泳道中的染色带意味着那些乳酸乳球菌蛋白质和指示的兔抗血清反应。清楚可见非重组的 TCA 预处理的已结合了 MSA2::*cA* (E1) 的菌株引发了对乳酸乳球菌蛋白质最小的反应, 意味着对载体的反应减少了而对疟疾抗原的反应没有负面影响 (见表 2)。

图 16. AcmA 和 AcmD 中结构域的示意表示。SS: 信号序列。两个酶都有细胞壁结合结构域, 其由 3 个重复组成, 表示为 A1, 2, 3 和 D1, 2, 3 (这些重复的序列比较在图 6 中给出)。另外, 给出了表 5 描述的一个杂合蛋白质锚的实例。

图 17. western 印迹显示 pH 上清对 MSA2::*cD* 和 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞结合的影响。如前, western 印迹显示了被细胞结合了的 MSA2::*cD* 的量。另外, 结合后未被结合的留在培养基中的 MSA2::*cD* 的量也显示出来了。箭头指示 pro-MSA2::*cD* 的预期位置, 星号指示成熟的 MSA2::*cD* 的位置。

- 1、结合时 pH 为 6.2, 细胞
- 2、结合时 pH 为 6.2, 结合后的上清
- 3、结合时 pH 为 3.2, 细胞
- 4、结合时 pH 为 3.2, 结合后的上清
- 5、阳性对照: 乳酸乳球菌, TCA 预处理的在 pH 6.2 时已结合了

MSA2:: cA

清楚可见 MSA2:: cD 在 pH 3.2 时比在 pH 6.2 时结合的好（比较泳道 1 和 3）。

图 18. 在指定的 pH 结合菌蛻细胞后培养基上清 (S) 和具有结合的蛋白质锚的菌蛻 (G) 的 western 印迹。泳道 1 和 2, 在 pH 3 结合; 泳道 3 和 4, 在 pH 5 结合; 泳道 5 和 6, 在 pH 7 结合。本图显示在 pH 5 仍有相当的结合。在这个 pH 天然 cD 锚 (D1D2D3) 显示几乎没有结合。加入 A3 重复, 其有高 pI 值, 导致了在 pH 5 时结合升高。

图 19. 免疫进度。小鼠在第一天开始免疫, 在 14 和 28 天重复。在最后一次口腔免疫的 14 天后给予致命的肺炎链球菌鼻腔攻击。S.c.: 皮下免疫。

图 20. 血清抗体反应。平均抗-PpmA 血清抗体滴度。OV: 口腔免疫的; IN: 鼻内免疫的; SC: 皮下免疫的。福氏 PpmA:可溶性 PpmA 和福氏完全佐剂共同皮下注射。鼻内和皮下注射菌蛻-PpmA:: cA 获得了高滴度。

图 21. 存活时间。口腔接种疫苗的小鼠用致命剂量的肺炎链球菌攻击。单独用可溶性 PpmA 或菌蛻疫苗的小鼠在 72 小时内死亡。用菌蛻-PpmA:: cA 免疫的小鼠有 40%在攻击后存活, 因而它们受到了接种保护。

图 22.是表 1。

图 23.是表 2。

图 24.是表 3。

图 25.是表 4。

图 26.是表 5。

具体实施方式

实施例 1

酸预处理革兰氏阳性细菌增强 AcmA 蛋白质锚融合体的结合

材料和方法

细菌株和生长条件。使用乳酸乳球菌 MG1363 株(Gasson1983)或其衍生物如 MG1363 Δ acmA(Buist 等, 1995)或 NZ9000 Δ acmA 作为报道融合蛋白质结合的受体,然而,使用携带有一个报道质粒的 NZ9000(Kuipers 等, 1997)作为生产株。乳酸乳球菌株在添加 0.5%葡萄糖的 M17 肉汤(Oxoid)标准培养基中, 30°C 培养。适当的时候, 在 M17 培养基中添加终浓度为 5 μ g/ml 的氯霉素。将产生乳酸乳球菌 NZ9700 株的含乳酸链球菌肽的培养基上清加入对数生长中期细菌中, 2 小时诱导表达, 如 Kuipers 等所描(1997)。干酪乳杆菌 ATCC393 株在 MRS 肉汤(Oxoid)标准培养基中, 30°C 生长。耻垢分枝杆菌 ATCC700084 在 Middlebrook 培养基(Oxoid)中生长, 37°C, 通二氧化碳气。枯草芽孢杆菌 168 在 TY 肉汤(每升: 10g 胰蛋白质胨, 5g 酵母提取物, 5g 氯化钠, pH7.4) 中生长, 37°C, 通二氧化碳气。

报道质粒的构建。使用融合了 3 个重复 AcmA(MSA2::cA)序列的疟原虫 3D7 株的裂殖子表面抗原 2 (MSA2) (Ramasamy 等, 1999)作为报道锚蛋白质。这个报道蛋白质被质粒 pNG3041 编码, 该质粒基于乳酸链球菌肽可诱导的表达载体 pNZ8048(Kuipers 等, 1997)和包含一个修饰的克隆杂合报道基因的多克隆位点。在乳酸乳球菌 5'末端的 PrtP 信号和正向序列和 AcmA 蛋白质锚序列的 3'末端形成这个报道子的融合体。包含在构建体中的 MSA2 基因序列相对应于 Genbank 中的编号为 A06129 的 61 到 708 位核苷酸。使用引物 MSA2.1(5'-ACCATGGCAAAAAATGAAAGTAAATATAGC)和 MSA2.4(5'-CGGTCTCTAGCTTATAAGCTTAGAATTCGGGATGTTGCTGCTCCA CAG)扩增 MSA2 基因, 引物包含用于克隆的限制性内切酶识别位点标记

(下 划 线) 。 使 用 引 物 PrtP.sspro.fw(5'-CCGTCTCCCATGCAAAGGAAAAAAGAAAGGGC) 和 PrtP.sspro.rev(AAAAAAAGCTTGAATTCCCATGGCAGTCGGATAATAA ACTTTCGCC)克隆 PrtP 信号和正向序列(1206 至 1766 位核苷酸, Kok 等, 1988)。下划线表示用于克隆的限制性位点。从质粒 pAL01 (Buist 等, 1995) 亚克隆 PvuII- HindIII 片段可获得 AcmA 蛋白质锚基因片段(833to1875 核苷酸)。依据提供商 Roche 的说明书使用限制性内切酶和扩展高包真 PCR 聚合酶。最后的表达载体命名为 pNG3041 (图 1)。

将一个终止密码子引入到 pNG3041 内的 MSA2 序列之后构建体命名为 pNG304。因此, 使用这种构建体分泌的蛋白质与 pNG3041 质粒来源的蛋白质相同, 只是它不含 AcmA 锚蛋白质。在结合分析实验中, 它作为阴性对照。另外, 构建一个 AcmA 蛋白质锚与另一个蛋白质锚交换的载体。为此, 使用引物 pACMB2 (5'CGCAAGCTTCTGCAGAGCTCTTAGATTCTAATTGTTTGTCTG) 和 pACMB3(5'-CGGAATTCAAGGAGGAGAAATATCAGGAGG)克隆推定的乳酸乳球菌 AcmD(Bolotin 等, 2001)的细胞壁结合结构域(Genbank 检索序列号为 AE006288 的 1796 至 2371 核苷酸)。生成质粒 pNG3042, 在 MSA2 和 AcmD (MSA2::cD)锚蛋白质之间包含一个框架内融合, 仅仅在编码质粒 pNG3041 的蛋白质锚的基因片段上不同。

预处理细胞和结合条件。如下常规使用 10%TCA(0.6M)化学预处理乳酸乳球菌 NZ9000 Δ acmA: 0.5ml 稳定生长期培养物离心沉淀细胞, 用 2 倍体积的除盐水洗细胞一次。用 1 倍体积 10%TCA 溶液重悬细胞, 将反应管放入沸水中孵育 15 分钟。随后, 用 2 倍体积 PBS(58mM Na₂HPO₄ 2H₂O, 17mM NaH₂PO₄ H₂O, 68mM NaCl; pH7.2)洗细胞一次, 用 2 倍体积的除盐水洗细胞三次。这样制备的细胞可直接用于结合实验或贮存备用(见下段)。使用以下化学药品和条件检测不同化学药品对乳酸乳球菌细胞与

AcmA-型蛋白质锚融合的结合能力的影响：乙酸(HAc)，盐酸(HCl),硫酸(H₂SO₄), TCA, 三氟酸(TFA), 一氯酸(MCA), 所有试剂终浓度为 0.6M, 在沸水中孵育 15 分钟。SDS, 二甲基甲酰胺(DMF)和二甲基亚砜(DMSO)的使用浓度为 10%, 并且 SDS 预处理后在沸水中孵育 15 分钟, DMF 和 DMSO 处理后在室温孵育 15 分钟。用苯酚(Tris 缓冲液饱和)预处理细胞, 55℃孵育 15 分钟。其他化学试剂用后面的温度孵育: 4M 盐酸胍(GnHCl), 37%甲醛, 氯仿: 甲醇(CHCl₃:CH₃OH[2:1])和 0.1%次氯酸钠(NaOCl)。另外, 分析用 25mM 二硫苏糖醇(DTT)37℃、30 分钟孵育和正己烷(100%)预处理细胞。也检测了用溶菌酶酶促预处理细胞的影响。为此, 细胞重悬在有溶菌酶(2mg/ml)的缓冲液中(20%蔗糖,10mM Tris pH8.1,10m MEDTA,50 mM NaCl)中, 然后 55℃孵育 15 分钟。化学试剂和酶促预处理后, 洗细胞的步骤与 TCA 处理细胞后相同。

按照对乳酸乳球菌的描述, 用 TCA 预处理枯草芽孢杆菌, 干酪乳杆菌和耻垢分枝杆菌。含有 MSA2::cA,MSA2::cD 或无锚的 MSA2 的无细胞培养基上清液以 4 倍量与(预处理)细胞室温孵育 10 分钟(例如 0.5ml 培养细胞与 2.0ml 培养上清孵育)。结合后, 离心沉淀细胞, 以 2 倍体积除盐水洗细胞 2 次, 以 SDS 变性缓冲液重悬, 98℃加热 5 分钟, 并进行 SDS-PAGE 电泳和其后的免疫印迹分析。

贮存条件: 含有 MSA2::cA,MSA2::cD 或 MSA2 的无细胞上清液, 在结合前, 在-20℃保存, 含或不含 10%甘油。TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞结合前,-80℃冻存在 10%甘油中。TCA 预处理的已结合了 MSA2::cA 的乳酸乳球菌细胞, 4℃或-80℃贮存, 含或不含 10%甘油。贮存在 10%甘油中的细胞在结合前用 1 倍除盐水洗一次。

将 TCA 预处理的已结合或未结合 MSA2::cA 的乳酸乳球菌细胞沉淀(在除盐水中)通过放入小管与液氮接触冷冻, 随后以冻干法去除水分。另一方法, 未冻的细胞沉淀在结合前于 30℃真空干燥 2 小时。

western 印迹实验。检测 MSA2 蛋白质，500 μ l 培养物的细胞沉淀用 50 μ l SDS 变性缓冲液重悬。用酚-醚沉淀浓缩(Sauve 等, 1995)无细胞培养基上清 (1ml)，真空干燥并重悬在 50 μ l SDS 变性缓冲液中。使用标准 SDS-PAGE 技术分离蛋白质。分离后，蛋白质被电转到 PVDF 膜上 (Roche)。在免疫印迹实验中，以 1:10,000 稀释的兔 MSA2 特异性抗血清 (Ramasamy 等, 1999)和 1:5000 稀释的抗兔 IgG-偶联碱性磷酸酶(Roche)，采用标准步骤检测 MSA2 蛋白质。

荧光显微镜方法。100 μ l 细胞悬液与 MSA2::cA,MSA2::cD 或 MSA2 融合蛋白质孵育，以除盐水洗 2 次，以相同体积的含 1%BSA 和 1:200 稀释的 MSA2-特异性兔抗血清的 PBS 重悬。室温孵育 20 分钟，用 2 倍体积 PBS 洗细胞 3 次。随后，细胞用 1 倍体积的含 1%BSA 和 1:100 稀释 Oregon 绿色标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (分子探针) 的 PBS 孵育 20 分钟。用 2 倍体积 PBS 洗细胞 1 次和 2 倍体积除盐水洗细胞 2 次，以 100 μ l 除盐水重悬细胞。取 10 μ l 滴度的细胞悬液滴加到 Polysin 显微镜载玻片(Menzel-Glaser)上，风干，荧光显微镜(Zeiss)下检测。

电子显微镜方法。按如上方法，将 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞与 MSA2::cA,MSA2::cD 或 MSA2 孵育，收集和洗细胞。用戊二醛固定制备大量细胞，在聚乙烯-碳镊网上完成免疫金标实验，使用 Auroprobe 的 15nm 山羊抗兔 IgG 金标准分子量(Amersham)。以 PBS-甘氨酸缓冲液 1:1000 稀释抗 MSA2 的初级抗体。随后，标记的样品用 0.1%乙酸铀酰染色 (W/V 水溶液)，用飞利浦 CM10 发射电子显微镜在 100kV 检测。

使用不同化学试剂预处理乳酸乳球菌细胞。使用乳酸乳球菌 AcmA 的 cA 蛋白质锚结合广泛多样的革兰氏阳性细菌的融合蛋白质。但是，在这类细菌中，融合蛋白质的结合数量存在极大的不同。我们观察到，MSA2::cA 的结合完全覆盖了一些乳酸菌细胞表面，然而其它细菌如乳酸乳球菌显示仅仅是有限部位结合 (图.2A)。这个现象的一种解释可能是，

虽然其他的解释也可能,一些细菌种类的细胞壁包含干扰 cA 锚结合的成分。化学试剂如 SDS, TCA, 氯仿/甲醇和其他试剂可将这些成分从分离的细菌细胞壁中除去(Morata de Ambrosini 等, 1998)。因此,我们研究了去除乳酸乳球菌全细胞的细胞壁成分后对与报道融合蛋白质 MSA2::cA 结合的影响。按照材料与方法里的描述,使用不同的化学试剂或溶菌酶预处理乳酸乳球菌细胞。图 3 显示,预处理已结合 MSA2::cA 的全细胞后的典型免疫印迹实验结果。成熟的 MSA2::cA 泳动到 75kDa 蛋白质大小的位置(星号指出)。箭头表示仍带有 PrtP 正向序列的 MSA2::cA。双星号表示去除 1-2 个重复序列的 MSA2::cA。一个细胞膜锚定的蛋白质酶 HtrA 显示涉及加工前体蛋白质和从 AcmA(Poquet 等, 2000)中去除重复序列。从图 3 可得出结论,使用 TCA (泳道 8 和 16 为相同样品,因为染色显影时间不同而使信号强度不同), HCl, H₂SO₄ 和 HAc 预处理细胞,可充分改善随后的 MSA2::cA 的结合(与泳道 15 的阴性对照比较)。对其他酸进行实验, TFA 和 MCA 有相同的结果(未显示)。苯酚, 盐酸胍, 甲酰胺和氯仿/甲醇预处理后显示结合改善缓和(分别是泳道 4, 5, 6, 7)。使用 SDS, DMF, DMSO 和 DTT 预处理后,可观察到结合稍微改善。在表格 1 里总结了所有结果。我们得出结论,酸 TCA, TFA, MCA, HCl, H₂SO₄ 和 HAc 预处理乳酸乳球菌细胞,可最有效的改善 cA 锚融合蛋白质与乳酸菌细胞的结合。已知酸如 TCA 可从细胞壁中去除(脂)磷壁酸。我们也分析是否这些酸处理会从细胞壁中去除蛋白质。图 4 显示裂解了的预处理细胞的凝胶的考马氏染色。除了 HAc 的大多数酸处理可从乳酸乳球菌细胞去除大量的蛋白质。因为 HAc 只能去除微量的蛋白质(比较泳道 1 和 4)和 SDS 预处理(已知它可将细胞壁蛋白质去除)显示 MSA2::cA 结合仅有少量改善(图 3, 泳道 1),我们得出结论,去除细胞壁中的蛋白质对改良 cA 锚融合体的结合不是重要的。很可能是,脂磷壁酸或碳水化合物占据了乳酸乳球菌细胞壁上的位

点而干扰了有效的结合。或者，酸预处理导致肽聚糖链紧密性发生改变，从而使 cA 结合位点更容易获得。

在所有的其他实验中使用 TCA 预处理。然后，我们决定在沸腾步骤时的最佳 TCA 浓度。对 1%，5%，10%和 20%TCA 进行实验。虽然，1%TCA 的预处理显示 MSA2::cA 的结合已具有显著的改善和 5%TCA 的预处理显示更进一步的改善，但当浓度高于 10%（图 5）时没有观察到更进一步的改善。因此在沸腾步骤，我们选择 10%TCA 作为所有更进一步实验的标准步骤。

随后，我们分析在 MSA2 融合体中的乳酸乳球菌 cA 的同源物 cD 在使用标准 TCA 预处理步骤时的结合特性。2/3 的 AcnD 重复序列与 AcnA 的高度同源，图 6 给出序列比较。在这些实验中包括一个阴性对照，无锚结构域的分泌性 MSA2。在 western 印迹实验中，TCA 预处理对 MSA2::cA 结合的影响是显著的（图 7，比较泳道 1 和 4）。这同样使用荧光显微镜（图 2，比较 A 和 B 的乳酸乳球菌；图 8）和电子显微镜（图 9，比较 A 和 B）进行研究。不依赖于使用的技术，可清楚地检测到 TCA 预处理对 MSA2::cA 结合的影响。在免疫印迹实验中，MSA2::cD 与未经 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞的结合很低（图 7，泳道 2），而且用荧光显微镜和电子显微镜时未检测到（图 9A）。在免疫印迹实验中，TCA 预处理对于 MSA2::cD 信号强度仅有很小的影响（图 7，泳道 5）。同时，荧光显微镜没有观察到与预处理细胞相关的 MSA2::cD 特异性信号（图 8）并且电子显微镜仅观察到低水平的标记率（图 9C）。令人惊讶的是，在未经 TCA 预处理和 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞中，对于无锚结构域的 MSA2 观察到一些细胞相关信号（图 7，分别是泳道 3 和 6）。但是，至于 MSA2::cD，荧光显微镜没有看到，并且电子显微镜仅发现少量的标记信号（图 9D）。总之，我们得出结论：(i)在免疫印迹实验中，可检测到的报道蛋白质 MSA2 与细菌细胞壁存在低度亲和力；(ii)cA 锚结构域

特异性刺激报道融合体与非预处理细胞的结合；(iii)化学预处理，特别是酸，增强了这种结合；(iv)在应用的条件下，cD 锚结构域没有促进融合蛋白质的结合。

TCA 预处理乳酸乳球菌细胞的荧光和电子显微镜图象(图.2, 8 和 9)清晰的显示预处理可保持细胞完整性。但是，细胞不再存活(贴壁率为 0)而因此被认为是直径大约 $1\ \mu\text{m}$ 的惰性球形肽聚糖微粒体(菌蛻细胞)。

结合其他革兰氏阳性菌。分析了 MSA2::cA,MSA2::cD 和无锚结构域的 MSA2 与革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌，干酪乳杆菌和耻垢分枝杆菌的结合。图 10 显示了总结无 TCA 和 TCA 预处理的枯草芽孢杆菌细胞结合的免疫印迹实验。至于乳酸乳球菌，可观察到对 MSA2::cA 的结合有一个明显的增加。荧光显微镜下在未预处理的枯草芽孢杆菌细胞中可见 MSA::cA 特异性的信号，但是 TCA 预处理的细胞有一个大大改善的信号(未显示)。通过荧光显微镜观察，不能证明 MSA2::cD 和 MSA2 与未预处理或 TCA 预处理细胞的结合(未显示)。

在干酪乳杆菌和耻垢分枝杆菌中获得相似的结果。图 11 显示 MSA2::cA 与 TCA 预处理的干酪乳杆菌细胞结合的改善。对于 MSA2::cD 和 MSA2 未检测到荧光信号(未显示)。耻垢分枝杆菌的 TCA 预处理对 MSA2::cA 的结合也有正面影响，然而没有观察到 MSA2::cD 或 MSA2 的结合(图 12)。

总之，我们得出结论，酸预处理，如 TCA，可改善 cA 锚蛋白质融合体与革兰氏阳性细菌细胞表面的结合。

结合力和贮存条件。分析 MSA2::cA 与 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞的结合力，结合后用 LiCl 处理。LiCl 通常用来去除细菌细胞壁的蛋白质。从图 13 免疫印迹实验，可得出结论，8M LiCl 仅仅部分去除乳酸乳球菌细胞的 MSA2::cA(比较泳道 4 和 5)。因此，虽然 MSA2::cA 与细胞壁非共价结合，结合的相互作用是非常强的。

含 MSA2::cA 的无细胞培养物上清-20℃贮存，含或不含 10%甘油。以这种方法贮存 MSA2::cA 几个星期，仍具有同样的与 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞结合的能力（未显示）。

已结合 MSA2::cA 的 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞，40℃除盐水中可贮存 3 个星期或-80℃贮存在含或不含 10%甘油的除盐水中。样品都采用免疫印迹方法分析。已结合 MSA2::cA 的预处理细胞 40℃水中贮存 3 个星期，结果仅丢失约 50%的信号（图 13，比较泳道 4 和 6）。不能确定是否这个信号的丢失是因为蛋白质降解或释放到水中。含或不含 10%甘油-80℃贮存对于结合没有影响（图 13，比较泳道 4，7 和 8）。

另外，我们研究烘干和冻干法对 MSA2::cA 与 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞结合的影响。烘干预处理细胞对于其后 MSA2::cA 的结合没有负面影响。烘干已结合 MSA2::cA 的预处理细胞，可以用水重悬不会丢失已结合的融合蛋白质。在冻干已结合 MSA2::cA 的细胞时也产生同样的结果。冻干结合前的 TCA 预处理细胞将导致与 MSA2::cA 结合能力的丢失（未显示）。从这些数据我们得出结论：(i)尽管 cA 锚与细胞壁结合具有非共价特性，这个结合力是非常强的。(ii)无细胞的培养基上清在-20℃可安全贮存和，(iii)烘干 TCA 预处理细胞为这种结合或未结合 cA 锚融合体的细胞的贮存提供一个有效和简便的方法。

实施例 2

用预载融合到乳酸乳球菌 AcmA 锚蛋白质的疟原虫疟疾抗原 MSA2 的非重组乳酸乳球菌口腔免疫兔子

实施例 1 描述的技术，通过 AcmA-型蛋白质锚，当外加时，可有效的结合蛋白质杂合体到非重组革兰氏阳性细菌的细胞表面。因此，这个技术为细菌和细菌细胞壁不需引入重组 DNA 而具有新的特性提供了可能性。在此，我们研究了在兔中疟原虫裂殖子表面蛋白质，3D7 株 MSA2

(Ramasamy et al. 1999)的免疫原性, 其作为一个 AcmA 锚融合蛋白质在非重组的非活的乳酸乳球菌细胞表面呈现。

材料和方法

细菌株和生长条件。生成 MSA2::cA 的乳酸乳球菌, 它的生长条件, 表达诱导, TCA 预处理乳酸乳球菌受体细胞和 MSA2::cA 与这些细胞的结合方法在实施例 1 中描述, 并有以下修改: 按 1(TCA-预处理细胞)比 5(含 MSA2::cA 的无细胞培养基上清液)比例结合。在免疫接种实验中, 带有质粒 pNG3043 的乳酸乳球菌 NZ9000 株作为阳性对照 (在先前未发表的实验中是阳性)。这个质粒编码一个 MSA2 杂合蛋白质, 其在 C' 末端包含乳酸乳球菌 PrtP 细胞壁锚结构域(MSA2::cP)而不是 AcmA 蛋白质锚。PrtP 细胞壁锚结构域包含 LPXTG 启动子, 它可作用于一个膜连接分选酶将蛋白质以共价键连接到细胞壁(Navarre 和 Schneewind 1994)。用于 pNG3043 构建体的 cP 结构域对应于 Kok 等 (1988) 的 6539 到 6914 位核苷酸。使用引物 PrtP.cwa.fw3(5ATATAAAGCTTGCAAAGTCTGAAAACGAAGG) 和引物 PrtP.cwa.rev(5'CCGTCTCAAGCTCACTATTCTTCACGTTGTTTCCG) 扩增这个片段。下划线表示用于克隆的限制性内切酶识别位点。质粒 pNG3043 与质粒 pNG3041 的不同仅仅存在于细胞壁结合结构域。NZ9000 Δ acmA 株 [pNG3043] 的生长条件和表达诱导与 NZ9000 Δ acmA 株[pNG3041]相同。

兔免疫。从 Harlan 实验室获得 10 只已建立屏障的新西兰白兔, 将新西兰白兔分为 2 组进行免疫试验。依据 WHO 指导管理和使用动物 (WHO/LAB/88.1)。免疫前, 兔子从耳部放血以获得免疫前血清。兔和免疫原的详细资料如下:

兔 A1 和 A2, 皮下免疫 NZ9000 Δ acmA[pNG3041]细胞 (重组体, 部

分表面锚定的 MSA2::cA)

兔 B1 和 B2, 皮下免疫 NZ9000 Δ acmA (阴性对照)。

兔 C1 和 C2, 口腔免疫 NZ9000 Δ acmA[pNG3043]细胞 (重组体, 表面锚定的 MSA2::cP)。

兔 D1 和 D2, 口腔免疫 NZ9000 Δ acmA[pNG3041]细胞 (重组体, 表面锚定的 MSA2::cA)。

兔 E1 和 E2, 口腔免疫 NZ9000 Δ acmA [pNG3041]培养基上清液的 TCA 预处理的结合了 MSA2::cA 的 NZ9000 Δ acmA (非重组体, 表面锚定的 MSA2::cA)。

表面表达 MSA2::cP 的 NZ9000 Δ acmA[pNG3043]贮存在-80℃含 10% 甘油的生长培养基, 10^{11} 整数倍细胞密度。在此条件下, 细胞可存活并已经免疫荧光法证明可保持表面的 MSA2 (未显示)。以新鲜生成的细菌进行首次免疫。随后的免疫, 使用新鲜解冻的细菌, 在缓冲液中洗细胞和重悬细胞, 以适当浓度免疫。另一方面, 每天从新鲜培养细菌中制备外部结合了 MSA2::cA 的未预处理的 NZ9000 Δ acmA (阴性对照), 未预处理的 NZ9000 Δ acmA[pNG3041]和 TCA 预处理的 NZ9000 Δ acmA。

脊椎骨两测的任意一测皮下注射重悬于无任何佐剂的 100 μ l PBS 中总量为 5×10^9 的细胞。间隔 3 个星期, 再重复 2 次皮下注射。口腔免疫前, 兔禁食水和食物 2-4 小时。然后, 它们进食重悬于 1ml 0.5%蔗糖中的 5×10^{10} 细胞, 每个剂量连续重复 3 天以获得可再生的口腔免疫。间隔 3 个星期, 一共给予 3 个连续的口腔免疫。没有观察到对免疫产生不利的随后影响, 包括皮下注射部位的肉芽肿等, 表明动物对乳酸乳球菌有很好的耐受性。

血清抗体反应。每次免疫 2 周后, 兔从耳部放血以取得血清进行抗体分析。血清储存于-20℃至使用。血清在含 2%BSA 的 PBS 中以 10 倍连续稀释, 用于免疫荧光分析 (IFA) 以决定抗体抗疟原虫裂殖子 3D7

的表面 MSA2 的滴度。IFA 在固定了晚期如前所述 3D7 疟原虫的丙酮-甲醇上进行，如前所述 (Ramasamy 1987)。为了检测到所有抗体异构体，Oregon 绿色偶联的山羊抗兔 Ig (分子探针) 作为二抗。对只检测 IgG 抗体，使用荧光素偶联的，亲和纯化的，特异抗兔链的小鼠单克隆抗体。

结果和讨论

不同乳酸乳球菌株的 MSA2 的表面表达。用考马氏染色 SDS-PAGE 凝胶和荧光显微镜方法半定量的决定重组乳酸乳球菌株和非重组的 TCA 预处理的 MSA2::cA 从外部结合的乳酸乳球菌细胞表达的 MSA2 分子和暴露表面的数量，其中重组乳酸乳球菌株携带分别产生 MSA2::cA 或 MSA2::cP 的质粒 pNG3041 或 pNG3043。我们估计重组株产生大约 1.4×10^5 分子的 MSA2::cA 或 MSA2::cP。MSA2::cA 和 MSA2::cP 的表面暴露如图 14 的荧光显微镜显示差别很大。具有 MSA2::cA 结合的非重组 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞显示在整个细胞表面均一的染色。然而，半定量 SDS-PAGE 分析表明这代表大约每个细胞有 1×10^4 分子的 MSA2::cA。因而，我们得出结论，重组乳酸乳球菌株的表面暴露的 MSA2::cA 和 MSA2::cP 的数量少于这些株产生的分子总数的 10%。其它分子很可能受限制在膜或细胞壁里。Norton 等也观察到融合到 cP 细胞壁锚结构域的 TTFC 的表达具有相似现象 (1996)。在那个研究中，只有膜或细胞壁相关的但没有表面暴露的 TTFC::cP 可被证明。因而可能对乳酸乳球菌细胞上的表面暴露蛋白质，从外部结合 TCA 预处理的细胞是更有效的方法。

口腔免疫兔的抗 MSA2 抗体反应。抗 MSA2 抗体的免疫反应的特性总结于表 2。口腔免疫产生 MSA2::cP (兔 C1 和 C2) 的重组乳酸乳球菌以前做过 (未发表结果) 在此做为正对照。以前的实验中，发现的相似的抗体反应。现在的实验显示 A, D 和 E 组兔两次免疫后，可观察到

抗近天然 MSA2 的特异抗体反应，而且第三次免疫后抗体滴度升高，所有情况中，三次免疫后，无论皮下或口腔途径，IgG 抗体都是主要的。用乳酸乳球菌细胞单独三次对照皮下免疫后，观察到相对弱的抗-MSA2 的表面 IFA，这归因于产生抗体交叉反应（见下）。

总结这些结果，我们得出结论：(i) 乳酸乳球菌细胞产生的 MSA2 引起了识别天然疟原虫 MSA2 的血清抗体，(ii) 在粘膜免疫中，由于可被升高的系统 IgG 抗体（表 2）的存在，MSA2 特异的 Th 细胞被激活，和 (iii) 口腔免疫结合了非重组非活的 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞的 MSA2::cA 在引起特异血清抗体反应上效力与皮下或口腔施用产生 MSA2::cA 的活的重组株，或口腔接种 MSA2 共价结合其细胞壁的产生 MSA2::cP 的活的重组株一样。

抗乳酸乳球菌抗体反应。免疫印迹（图 15）证明兔二次和三次免疫后有显著的抗乳酸乳球菌抗原的抗体反应。该反应皮下免疫（A 和 B 组兔）比口腔免疫（C 组兔）乳酸乳球菌明显变强。与口腔免疫活的乳酸乳球菌细胞相比，口腔免疫 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞（E 组兔）引发了可以和更少的乳酸乳球菌抗原在更低的强度下反应的抗体。很可能，这是由于 TCA 预处理从乳酸乳球菌细胞上除去了蛋白质的事实（见实施例 1）。对 TCA 预处理（非重组）的细胞观察到较低的抗载体反应使这种类型的输送工具比它的相应物（重组体）更适合反复免疫策略。

实施例 3

AcmA 蛋白质锚同源物和杂合体 pH 依赖性结合细胞壁

乳酸乳球菌细胞壁水解酶 AcmA 的细胞壁结合结构域或锚由具有高度同源性的 45 个氨基酸的三个重复序列组成。（Buist 等 1995）。这些重复序列属于与专利申请 WO 99/25836 定义的共有序列吻合的结构域家族而且可在广泛的生物中的许多表面定位的蛋白质中发现。大部分这些结

构域共有的另一个特征是他们的计算的 pI 值高：大约 8 或更高（表 3）。我们在以前的和 MSA2::cA 的结合实验（实施例 1 和 2）中使用的 pH 值大约 6, 意味着结合结构域带正电。乳酸乳球菌细胞壁水解酶 AcmD[cD]（Bolotin 等 2001）的 AcmA 蛋白质锚同源物也由三个重复序列组成（图 16），其计算的 pI 值（大约 pI 3.8）比 cA 结构域的低很多（表 4）。因而，在实施例 1 中使用的结合条件下，cD 锚带负电。我们已经证明在这些条件下没有发生 MSA2::cD 报道蛋白质的结合。因此，我们这里研究了在 cD 融合蛋白质（MSA2::cD）的结合过程中 pH 的影响。进而，我们构建了三个 cD 重复序列和一个 cA 重复序列组成的杂合蛋白质锚，其中 cA 的计算的 pI 值比单独 cD 的重复序列的高，表明 AcmA 型蛋白质锚的 pH 结合范围可通过使用杂合体中单个重复序列的 pI 值来操纵。

材料和方法

细菌菌株，生长和诱导条件，乳酸乳球菌细胞的 TCA 预处理，对 TCA 预处理细胞的 MSA2 蛋白质锚融合蛋白质的诱导，洗涤条件，蛋白质电泳，免疫印迹和免疫检测与实施例 1 中描述的相同。在使用的条件下，含有 MSA2::cA, MSA2::cD 或 A3D1D2D3 的无细胞培养物上清 pH 大约 6.2。检测 pH 的影响，培养基的 pH 用 HCl 或 NaOH 调节来获得所需的 pH。

质粒构建。表达 MSA2::cD 融合体的质粒已在实施例 1 中描述。质粒 pPA43 基于一样的表达质粒并包含了框架内融合的 Usp45 的乳酸乳球菌信号序列（ssUsp; van Asseldonk 等 1990, Gene 95: 155-160），为检测目的的 c-myc 表位，A3 cA 重复序列和 cD 的重复序列 D1, D2 和 D3。用来克隆 A3 的引物是 cArepeat3.fw（CCG TCT CCA ATT CAA TCT GCT GCT GCT TCA AAT CC）和 cArepeat3.rev（TAA TAA GCT TAA AGG TCT CCA ATT CCT TTT ATT CGT AGA TAC TGA CCA ATT

AAA ATAG) [黑体为 A3 特异序列]。用于克隆三个 cD 重复序列的引物是 cDrepeat1.fw (CCGTCTCCAATTT**CAGGAGGAACTGCTGTTACA**ACTAG) 和 repeat3.rev (TAATAAGCTTAAAGGTCTCCAATT**CCAGCAACTTGCAAACTTCTCCTAC**) [黑体为 cD 特异序列]。

结果和讨论。

在低 pH 时 MSA2::cD 的结合。因为比在 cD 结构域的计算的 pI (pI 3.85) 高的 pH (生长和诱导后培养基的 pH 大约 6.2) 下没有观察到 MSA2::cD 的结合, 我们研究了培养基 pH 调整至 pH3.2 时的结合。TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞用于结合底物并且用免疫印迹分析了结合的 MSA2::cD 的相对量。还分析了结合后遗留在培养物上清中未结合的报道蛋白质的量。图 17 显示在 pH3.2 进行结合时结合的 MSA2::cD 有明显的升高 (比较泳道 1 和 3)。同时较少的未结合的报道蛋白质遗留在上清中 (比较泳道 2 和 4)。这个结果表正电对 cA 型锚结构域的结合很重要。

cAcD 杂合锚的结合。表 3 中 cA 同源物的 pI 值的分析表明两类重复序列可被区别: 具有高 pI 值 (>8) 的同源物的主要部分 (148 中有 99) 和另一组 pI 值低于 6 (148 中有 33), 其中 cD 是代表。基于我们的实验结果, 显示在低于其 pI 的 pH 下, 这些类型的锚结构域只结合细菌细胞壁。明显的, 多数细胞壁结合结构域同源物只由重复序列组成, 该重复序列具有代表两组之一的 pI 值, 即具有高或低 pI 的重复序列。有意思的是, 具有细胞壁结合结构域的一些蛋白质, 如 *Trepanoma pallidum* 的 DniR 和 *Borrelia burgdorferi* 的酰胺酶, 由有高和低 pI 的重复序列组成。因为这些“天然杂合体”细胞壁结合结构域的结合 pH 低于结构域中总重复序列的中间 pI 值, 我们用我们能获得的 cA 和 cD 重复序列构建了具有中

间 pI 值的杂合细胞壁蛋白质锚。表 5 列出了天然 AcmA 和一些 Ca/cD 杂合体的 Ac_mD 锚。构建的杂合蛋白质锚 (A3D1D2D3) 具有大约 5.1 的 pI 计算值。只有 D1D2D3 组成的蛋白质锚显示在高于它计算 pI 的 pH 下的结合几乎没有 (见上)。A3 (pI10) 结构域在 pH5 和 pH7 显示相似的结合。

检测了杂合锚 A3D1D2D3 在 pH3, pH5 和 pH7 下的结合。在 pH3 几乎所有蛋白质都结合菌蛻细胞 (图 18)。在 pH5 仍存在相当量的结合 (+/-40%), 然而在 pH7 只有少量的结合 (+/-20%)。这个结果显示, 通过加入一个 cA 重复序列 (A3) 引起了 pI 计算值从 3.8 移到 5.1, 这使对 cD 重复序列结合的 pH 范围移到更高的 pH 值。在 pH5 对 A3D1D2D3 杂合体的结合升高不能归因于只是 A3 重复序列的结合。如果是这样, 在 pH7 发生的结合水平应该一样, 因为在这些 pH 下 A 重复序列显示同样的结合。另外, 在 pH5 结合升高不是加和结果, 即意味着额外的结合结构域导致了结合升高。在一个重复序列加入 cA 锚之前显示没有产生结合升高。与单独 D1D2D3 重复序列的结合比较, 在高 pH 值下 A3D1D2D3 重复序列的结合是由于杂合 cA/cD 锚的计算 pI 值的升高。

这清楚证明了这些类型蛋白质锚的 pH 结合特性可基于存在于杂合体的单独的重复序列的 pI 值来操纵。

实施例 4

口腔免疫显示融合到乳酸乳球菌 AcmA 蛋白质锚的疟原虫抗原 MSA2 的乳酸乳球菌 菌蛻后, 在小鼠中细胞免疫反应的诱导

预载了融合到 AcmA 蛋白质锚的疟原虫 MSA2 抗原 (MSA2:: cA) 的非遗传修饰的非活的乳酸乳球菌细胞 (菌蛻) 用于口腔免疫小鼠, 与实施例 2 方法相似。这个实验中, 我们特别的提出是否通过口腔途径免疫在表面携带 MSA2:: cA 的非重组非活的菌蛻可以引起典型的 Th1-型

免疫反应，如在脾中的 IgG2 抗体和 γ -干扰素 (γ IFN) 产生 T 细胞。这些类型的反应特别的与获得对抗原的免疫性有关，如疟疾，其隐藏在细胞里而不是血液中进行生命循环的各个阶段。

材料和方法

不同种系的每组 5 个小鼠用于免疫。使用的种系是 Balb/c[具有 H2d 主要组织相容性基因座同种异型]，C57Black[H2b]，C3H[H2k]和 ICR[远系繁殖，即多种 H2 型]。口腔免疫间隔三周。用 MSA2::cA 吸附在表面的 TCA 预处理的乳酸乳球菌细胞（菌蛻-MSA2::cA）或如实施例 2 描述用通过使用共价偶联的细胞壁锚在表面显示 MSA2 的重组乳酸乳球菌（乳酸乳球菌[MSA2::cP]）进行免疫。第二次，第三次和第四次免疫两周后，小鼠进行尾部防血来获得血清样本。收集提取排泄物以检查肠 IgA 抗体的产生。每次实验处死小鼠，取出脾用 ELISPOT 检测 T 细胞反应。E.coli 产生的 MSA2-his 标签在 ELISA 和 ELISPOT 分析中用做抗原。

细菌株的生长，菌蛻细胞的制备如实施例 2 所描述。

结果和讨论

口腔免疫产生的血清 IgG 抗体的动力学和异构型。

在不同的小鼠种系中观察到抗体反应动力学和异构型分布的不同。重要的是，用活的重组乳酸乳球菌[MSA2::cP]或菌蛻-MSA2::cA 做免疫原时，抗体反应也是不同的。对菌蛻-MSA2::cA，两次免疫后，在 C3H 小鼠中检测到高血清抗体水平。在所有 4 个小鼠种系中三次和四次免疫后都观察到 IgG 抗体。在 C3H 小鼠中抗体滴度最高。使用荧光显微镜 (IFA) 检测了免疫小鼠血清中和寄生虫天然 MSA2 反应的 IgG 抗体，证实蛋白质的不敏感处理形式引起了生物学相关抗体。对照免疫只用菌蛻进行。在这种情况下没有引起 MSA2 特异抗体。在 MSA2cP 作为免疫

原的平行实验中，二次免疫后，只在 Balb/c 小鼠中看见高血清 IgG 抗体水平。三次和四次免疫后，在 C3H 小鼠中也引起了有益的抗体反应。在 Balb/c 小鼠中抗体滴度最高。

相应于菌蛻 MSA2::cA 免疫引起的血清 IgG 抗体的异构型在种系间存在显著不同。Balb/c 小鼠显示高水平的 IgG2a 和 IgG2b 抗体，一些 IgG3 抗体和可忽略的 IgG1。这证明可能的 Th1 倾向性。另一方面，C57 Black 和 C3H 小鼠对 MSA2 有高 IgG1，IgG2a 及 IgG2b 和较低的 IgG3 抗体。这是更典型的混合 Th1 和 Th2 反应。ICR 小鼠，如预期，显示了一系列反应。一些 ICR 小鼠有 Balb/c 而其它有 C3H/C57Black 的 IgG 异构型的模式。

粘膜抗体的形成。用活的重组乳酸乳球菌 (MSA2::cP) 或菌蛻 -MSA2::cA 进行免疫，使用 ELISA，在 ICR 和 Balb/c 小鼠的排泄物中检测到 IgA 抗体，但 C3H 或 C57Black 小鼠中没有。

T 细胞反应。在每次免疫用菌蛻-MSA2::cA 免疫的小鼠中见到 IgG ELISA 反应的强度增加证明发生了加强和在这些动物中存在 Th 依赖的抗体反应。IgG 异构型的分布进一步证实了这个结论。因此，在 ICR，Balb/c，C57Black 和 C3H 小鼠中产生了 Th 细胞。

检测 γ 干扰素 (γ IFN) 产生细胞的 ELISPOT 分析主要检测到 CD8+Tc 细胞。这个细胞是对许多病原的免疫反应的重要成分，包括疟原虫。E.coli 产生的 His-标签 MSA2 在分析中用作抗原。MSA2 特异的 γ IFN 产生细胞在用菌蛻-MSA2::cA 免疫了的 Balb/c，C57Black 和 C3H 的脾中可被证明。MSA2 特异的 γ IFN 产生细胞在用菌蛻单独或用活的重组乳酸乳球菌 (MSA2-cP) 免疫的对照小鼠的脾中没有观察到。后一组显示了高水平的非特异性 γ IFN 产生细胞。高背景的原因可能是正在发生的炎症。

携带外源蛋白质的非重组的非活的乳酸乳球菌 菌蛻-系统免疫后的

脾中 MSA2 特异的 Tc 细胞的敏感性是一个新发现。它可应用于疟疾因为抗孢子体感染的保护和脾中产生的 γ IFN 产生细胞有关。

总之，非重组非活的菌蛻系统可用口腔免疫以引起典型的 Th1 型免疫反应。这些类型反应与获得对那些隐藏在细胞内而不是在血液中进行生命循环的各个阶段的病原的免疫性特别相关。这反应对菌蛻系统比对活的重组系统更显著和特异。菌蛻系统具有免除了扩散重组 DNA 到环境中去危险性的额外优点。

实施例 5

用有预载了融合到乳酸乳球菌 AcmA 蛋白质锚的 PpmA 抗原的乳酸乳球菌 菌蛻口腔免疫后，保护小鼠受致命肺炎链球菌攻击

肺炎链球菌是严重感染的最主要的病原物质，如败血病，脑膜炎，肺炎，和中耳炎。近期对肺炎链球菌的分子传染病学和病原学研究鉴定了具有免疫能力的肺炎球菌蛋白质。这些蛋白质之一，蛋白质酶成熟蛋白质 PpmA，显示在小鼠肺炎模型中可以引起免疫保护潜力。

非遗传修饰的乳酸乳球菌 菌蛻已被显示是一个在兔和小鼠的口腔免疫中有效的载体，可以引起强的抗疟疾免疫反应。这里描述了在表面显示了融合到乳酸乳球菌 AcmA 细胞壁结合结构域的乳酸乳球菌 菌蛻的构建而且我们研究了这些菌蛻保护口腔免疫的小鼠免受致命鼻腔剂量的肺炎链球菌攻击的能力。

材料和方法

细菌株和生长条件。如实施例 1 描述生长乳酸乳球菌和制备菌蛻细胞。如前描述生长肺炎链球菌（Gingles 等 2001.Infect Immun 69:426-434）。

构建 ppmA 蛋白质锚融合体表达质粒。ppmA 蛋白质锚融合体

(PpmA::cA) 的表达质粒与实施例 2 中描述的 MSA2 蛋白质锚融合体表达质粒基本相似。为了分泌 PpmA::cA, 使用了乳酸乳球菌的 Usp45 蛋白质 (ssUsp) 的分泌信号序列 (van Assseldonk 等 1990 Gene 95:155-160)。使用引物 ppmA.1 (CGGTCTCACATGTCGAAAGGGTCAGAAGGTGCAGACC) 和 ppmA.2(CGGTCTCGAATTGCTTCGTTTGATGTACTACTGCTTGAG) 通过 PCR 克隆 PpmA 基因, 产生了包含作为 ssUsp45 和蛋白质锚框架内融合体 (ssUsp::ppmA::cA) ppmA 的 pPA32 质粒。融合基因的表达产生了分泌性产物 PpmA::cA。引物中下划线的序列表明用于消化 PCR 片段的 Eco31I 限制性酶识别位点。这个限制反应产生了 NcoI 和 EcoRI 粘性末端, 可用于克隆。黑体是 ppmA 序列。肺炎链球菌株 D39 的染色体 DNA 用做模板。

制备疫苗。乳酸乳球菌[pPA32]生长和诱导表达后, 获得的有 PpmA::cA 的 3 升 M17 培养基离心, 无菌过滤 (0.2um) 除去所有生产细胞。用 0.5 升乳酸乳球菌 NZ9000(Δ acmA)制备菌蛻细胞。菌蛻细胞和 PpmA::cA 结合后 (菌蛻-PpmA::cA), 离心分离, 用 PBS 洗。最后在 -80°C, 以 2.5×10^{10} 菌蛻/ml 保存在 PBS 中。两个对照组包括: (i) 未结合 PpmA::cA 的菌蛻。对样品制备, 用同样量的菌蛻细胞和进行同样的离心和洗涤的步骤, 但没有结合步骤; (ii) 可溶的 PpmA, 其分离为 his-标签融合体。

小鼠免疫。每组 10 只小鼠用于免疫。口腔接种剂量为有或没有 PpmA::cA (50, μ g) 的 5×10^9 菌蛻或溶解在 PBS 中的 50 μ g 可溶 PpmA。鼻腔剂量为含有或不含有 PpmA::cA (5 μ g) 的 5×10^8 菌蛻或 5 μ g 可溶 PpmA。皮下注射 10^8 菌蛻-PpmA::cA (1 μ g)。对鼻内免疫, 小鼠用异氟烷轻微麻醉。

鼻内攻击。口腔免疫组小鼠用 106 集落形成单位 (CFU) 的肺炎链球菌 D39 最后加强免疫 14 天后进行鼻内攻击, 如前所述 (Kadioglu 等

2000 Infect Immun 68: 492-501)。攻击后，监视小鼠的可见临床症状 7 天，然后实验结束。在这时还存活的小鼠认为在肺炎球菌攻击下幸存；在 7 天中垂死的小鼠判定为达到分析的终点，动物断颈处死。

ELISA 分析。从每个肺炎球菌攻击幸存的小鼠提取血清样本，用前储存在-20℃。酶标板用含 100 μg PpmA/ml 的 0.05 碳酸盐缓冲液包被。每组的总血清以 10 倍梯度稀释和板孵育，如前所述 (Gingles 等 2001 Infect Immun 69: 426-434)。抗-小鼠免疫球蛋白-马-辣根过氧化物酶偶联物用于检测并在 492nm 测量吸收。

结果和讨论

血清抗体反应。小鼠如图 19 的示意图进行口腔，鼻腔和皮下免疫。用 ELISA 分析决定每组血液血清中抗 PpmA 抗体的滴度。结果在图 20 中给出。单独口腔或鼻腔注射菌蛻 (OV 菌蛻和 IN 菌蛻) 不能预期引起抗 PpmA 抗体。鼻腔途径给的可溶 PpmA 只产生了低的抗 PpmA 抗体滴度，其和可溶抗原在粘膜途径给予时不是非常免疫源性的发现一致。口腔途径提供的菌蛻 PpmA::cA (OV PpmA+菌蛻) 也只引起了低水平的抗 PpmA 血清抗体。这与实施例 2 中描述的用 MSA2::cA 口腔免疫的结果相反。然而，这可能是抗原型相关的。鼻内施用菌蛻 PpmA::cA 产生高滴度的抗 PpmA 抗体 (IN PpmA+菌蛻)。并且皮下施用菌蛻 -PpmA::cA 获得了高滴度。与和强的福氏完全佐剂共同皮下施用的可溶 PpmA 比较，这些滴度只低 5 至 10 个因子 (Peter Adrian, Erasmus university Rotterdam, 荷兰, 未发表结果)。另外，福氏 PpmA 疫苗每剂量含有 50PpmA，然而鼻内施用的菌蛻-PpmA::cA 只含有 5 μg/剂量及皮下菌蛻-PpmA::cA 疫苗只有 1 μg PpmA/剂量。这个结果清楚证明了菌蛻细胞的佐剂作用。没有观察到口腔，鼻腔或皮下施用菌蛻的副作用，这与使用福氏佐剂常见到严重的副作用相反。

这个结果证明可通过粘膜途径施用获得高滴度血清抗体。而且，这些数据显示菌蛻细胞可以和传统佐剂安全使用而引起高滴度血清抗体，没有副作用。

抗攻击保护。用单独可溶 PpmA，菌蛻或菌蛻-PpmA:: cA 口腔免疫的小鼠在免疫 14 天后用致命鼻内剂量的肺炎链球菌攻击。单独用可溶 PpmA 或菌蛻免疫的小鼠攻击后 72 小时内死亡。用菌蛻-PpmA:: cA 免疫的组显示有 40%的存活率（图 21）。这个结果显示用菌蛻-PpmA 粘膜免疫小鼠可以引发对致命的肺炎链球菌攻击的保护性免疫。总之，非重组非活的菌蛻系统可被用来引起高滴度血清抗体并且粘膜施用途径用来获得抗粘膜获得的病原的保护性免疫。

参考文献：

- Bolotin et al. (2001) *Genome Res.* 11: 731-753.
- Buist et al. (1995) *J. Bacteriol.* 177: 1554-1563.
- Gasson (1983) *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Kok et al.(1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 231-238.
- Kuipers et al. (1997)*Tibtech.* 15: 135-140.
- Morata de Ambrosini et al. (1998) *J. Food Prot.* 61: 557-562.
- Navarre and Schneewind (1994) *Mol. Microbiol.* 14: 115-121.
- Norton et al. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 249-256.
- Norton et al. (1996) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14 : 167-177.
- Poquet et al. (2000) *Mol. Microbiol.* 35: 1042-1051.
- Ramasamy(1987) *Immunol. Cell Biol.* 65: 419-424.
- Ramasamy et al. (1999) *Parasite Immunol.* 21: 397-407.
- Robinson et al. (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 653-657.
- Sauve et al. (1995) *Anal. Biochem.* 226: 382-283.

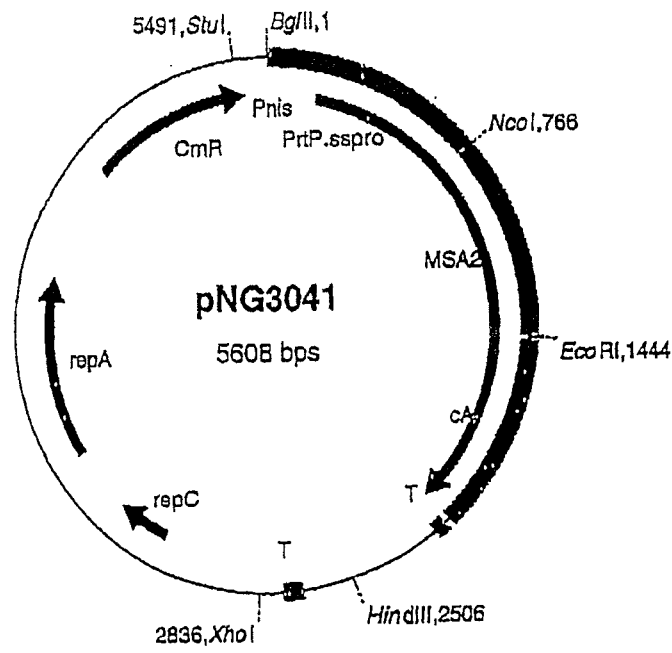


图1

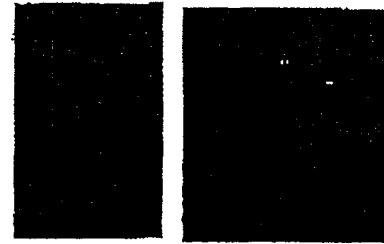
A



弯曲乳杆菌
NCFB2739

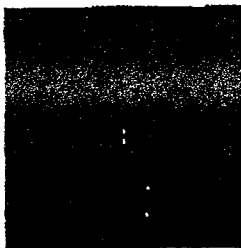


清酒乳杆菌
NCFB2714



乳酸乳球菌

B



乳酸乳球菌
TCA 预处理

图2

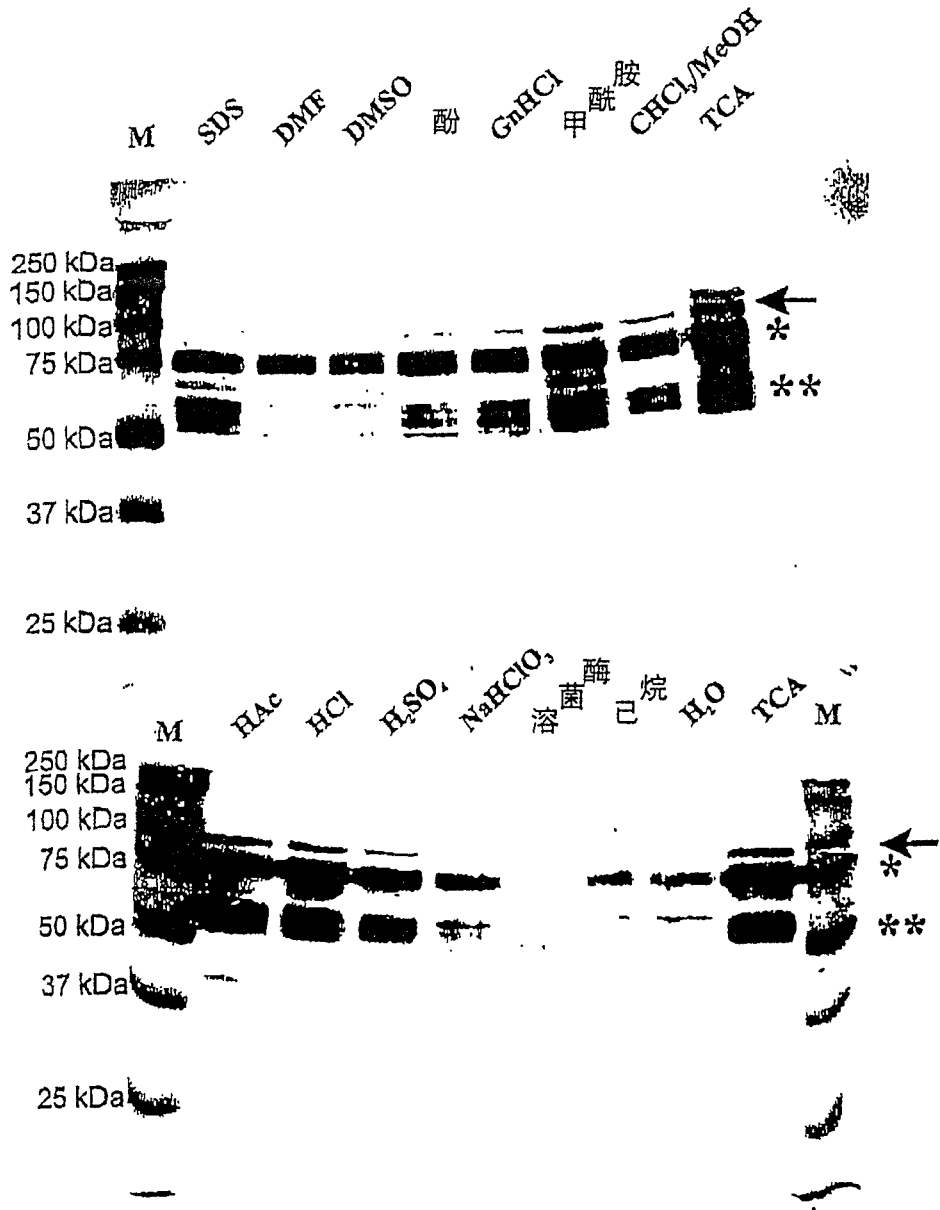


图3

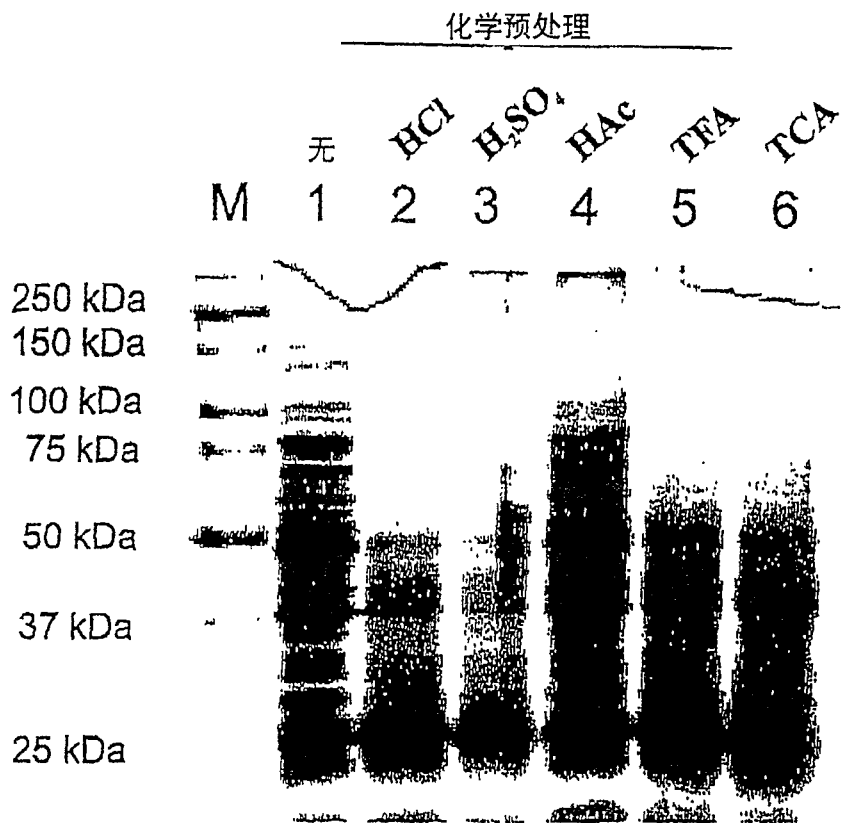


图4

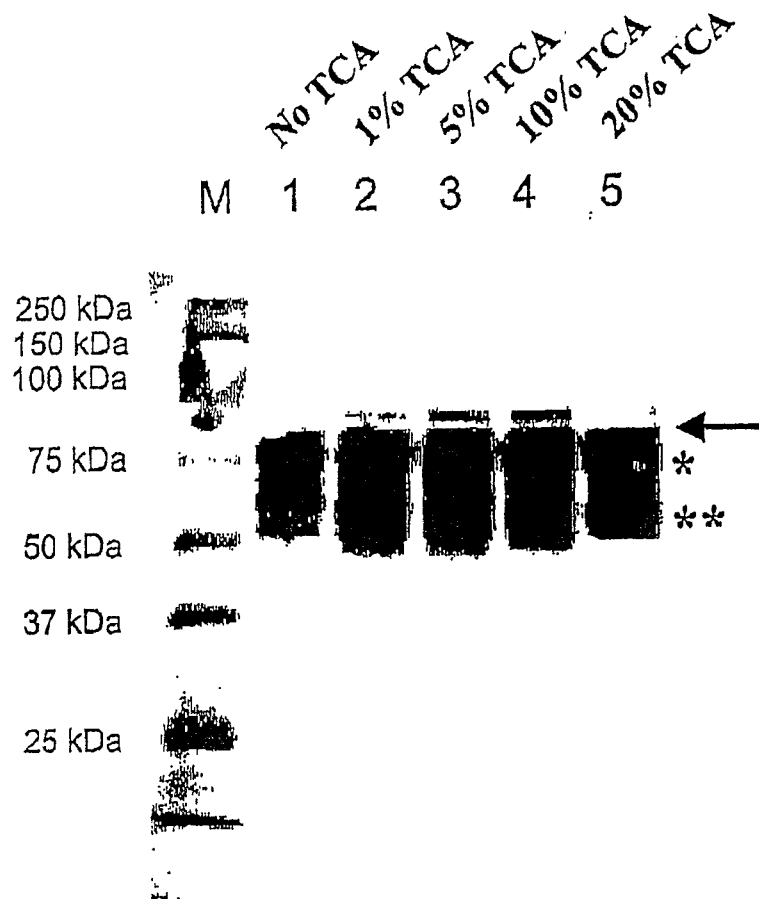


图5

```

AcmA (A1)      YTVKSGDTLWGLSQRYGISVAQIQSANN-LKSTI-IYIGQKLVLT
AcmD (D1)      YKVQEGDLSATAAQYGTVDALVSANS-LENANDIHVGEVLQVA
                * * * * * * * * * * * * * * *
AcmA (A2)      VKVKS GDTLWALS VKYKTSIAQLKSWNH-LSSDT-IYIGQNLIVS
AcmD (D2)      YTVKSGDSLVSIAEQYGMTVSSLSANGIYDVNSMLQVGVQLQVTV
                ***** * * * * *
AcmA (A3)      HKVVKGDTLWGLSQKSGSPIASIKAWN-HLSSDT-ILIGQVLRK
AcmD (D3)      YTIQNGDSIYSIATANGMTADQLAALNGFGINDM-IHPGQTRIL
                ** * * * * **
Consensus
repeat        YxVKxGDTLxxIAXxxxxxxxxLxxxNxxLxxxxLxxGQxLxVx
H IR  ESV  LS          I          I          L          LI
L    I  V                    *          *          V          VL
    
```

图6

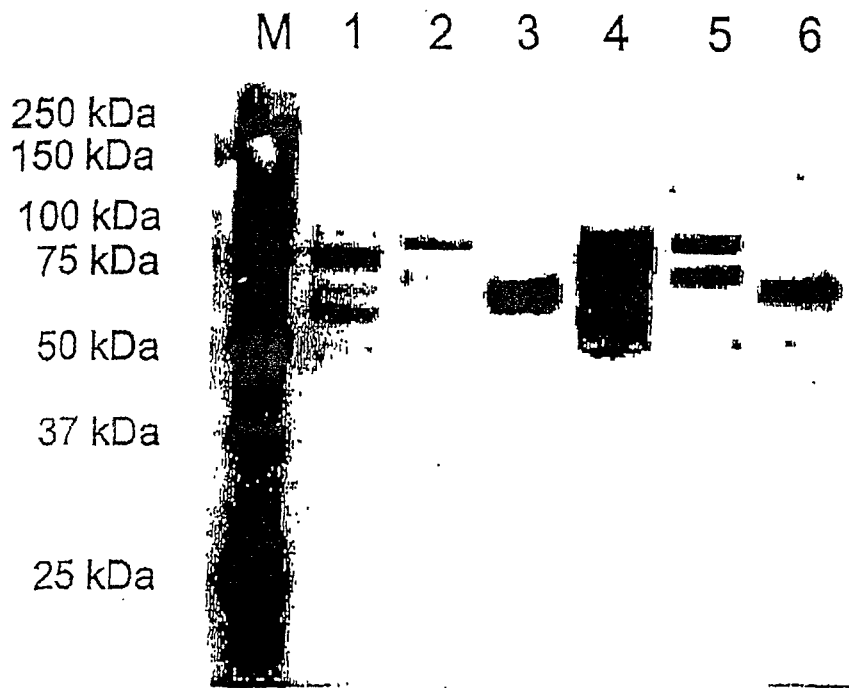


图7

TCA- 预处理的乳酸乳球菌



图8

TCA预处理对乳酸乳球菌及其与MSA2: : cA结合的影响

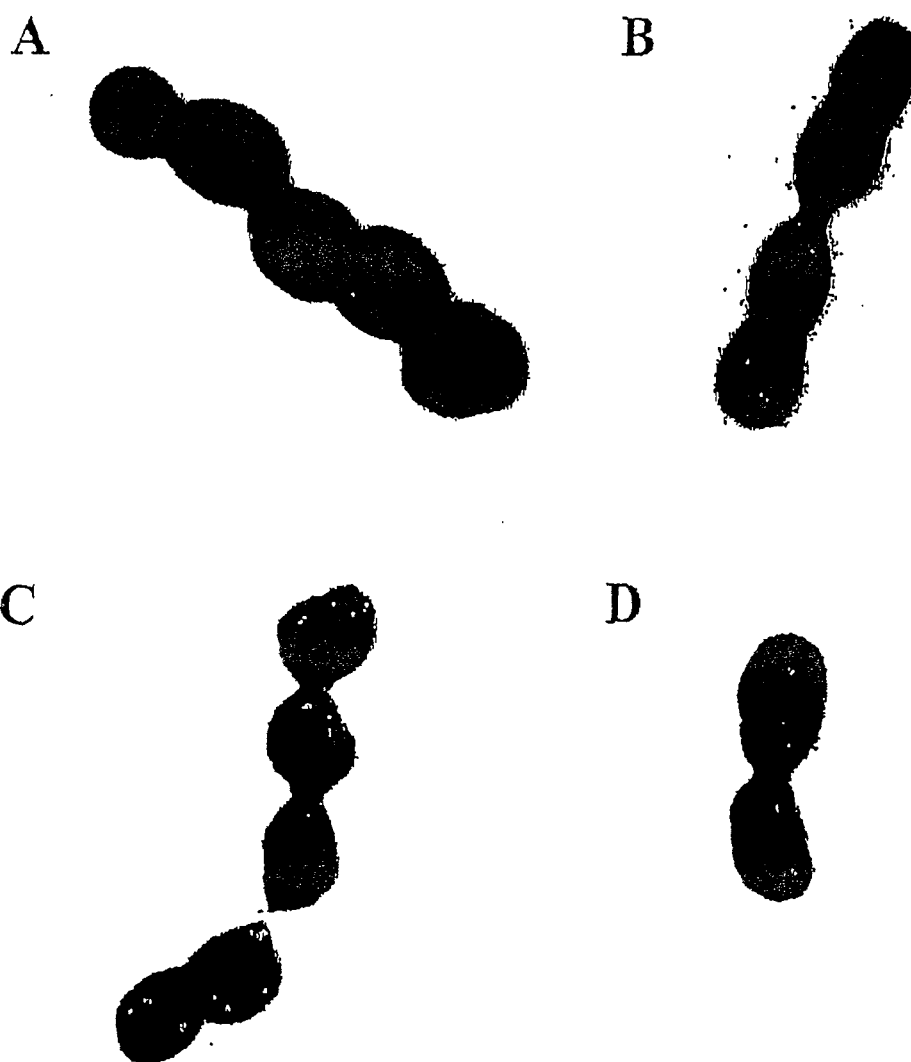


图9

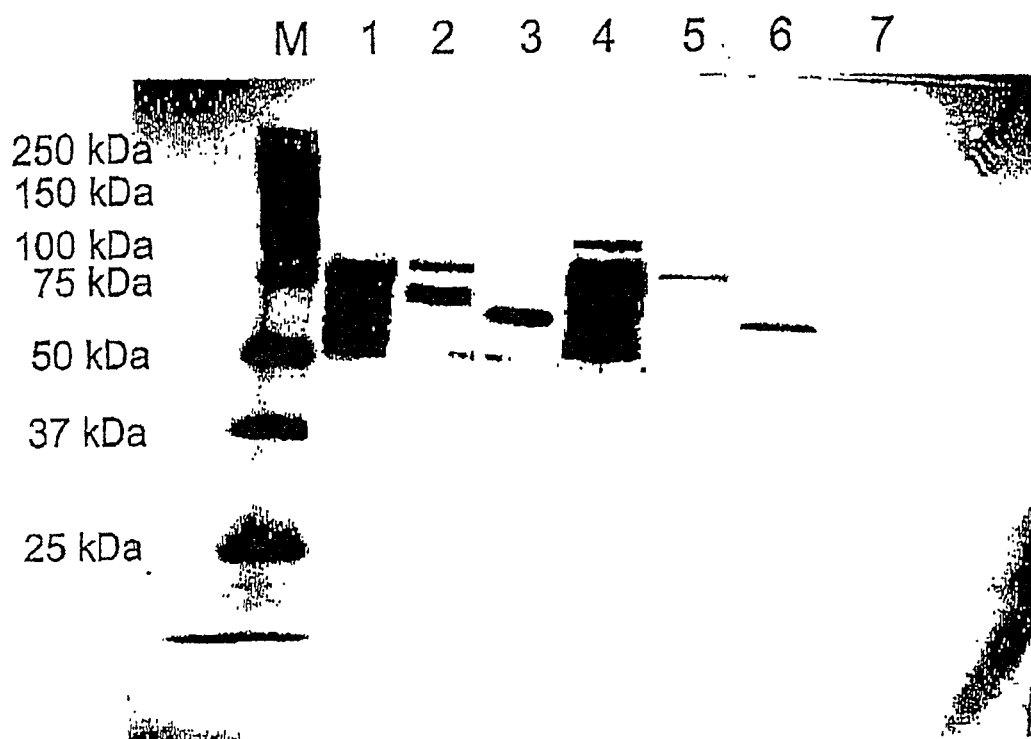
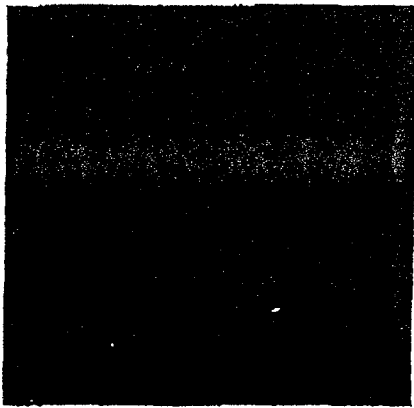
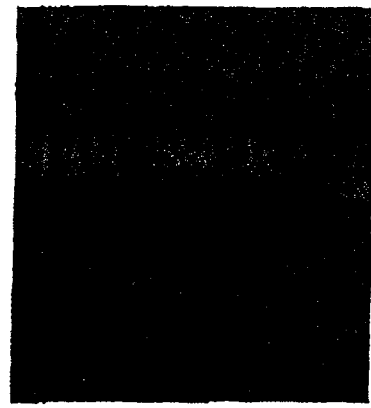


图10

干酪乳杆菌
ATCC393



无-TCA 预处理



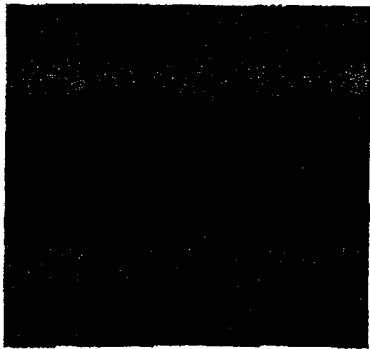
TCA 预处理

图11

与TCA预处理的耻垢分枝杆菌的结合



MSA2::cA



MSA2::cD

图12

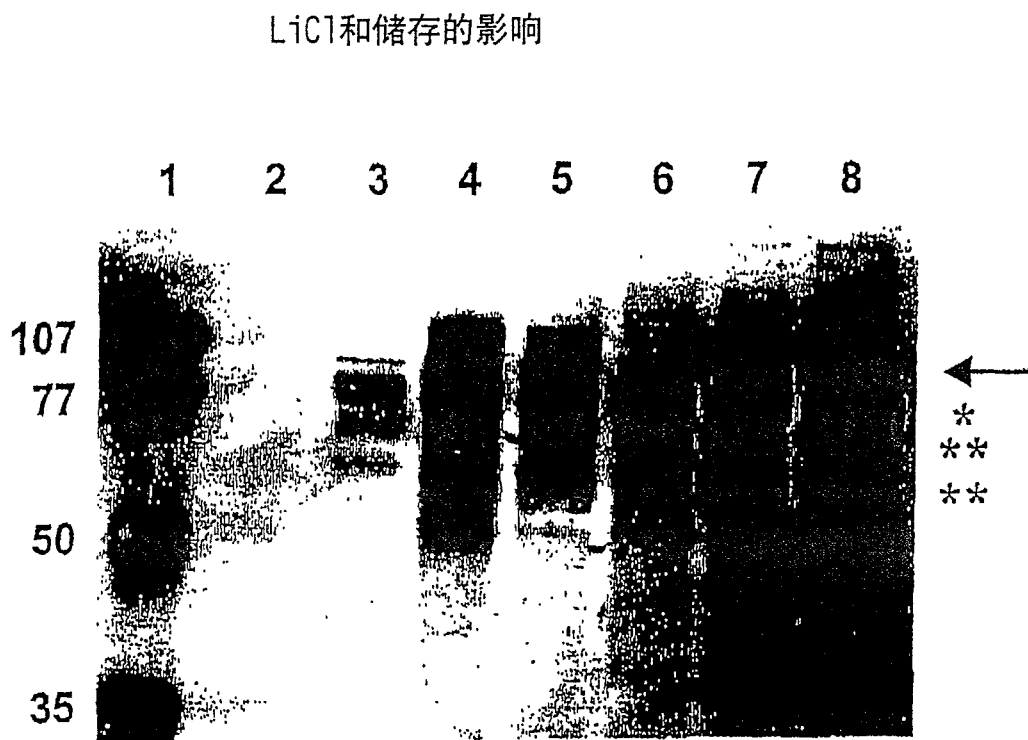


图13

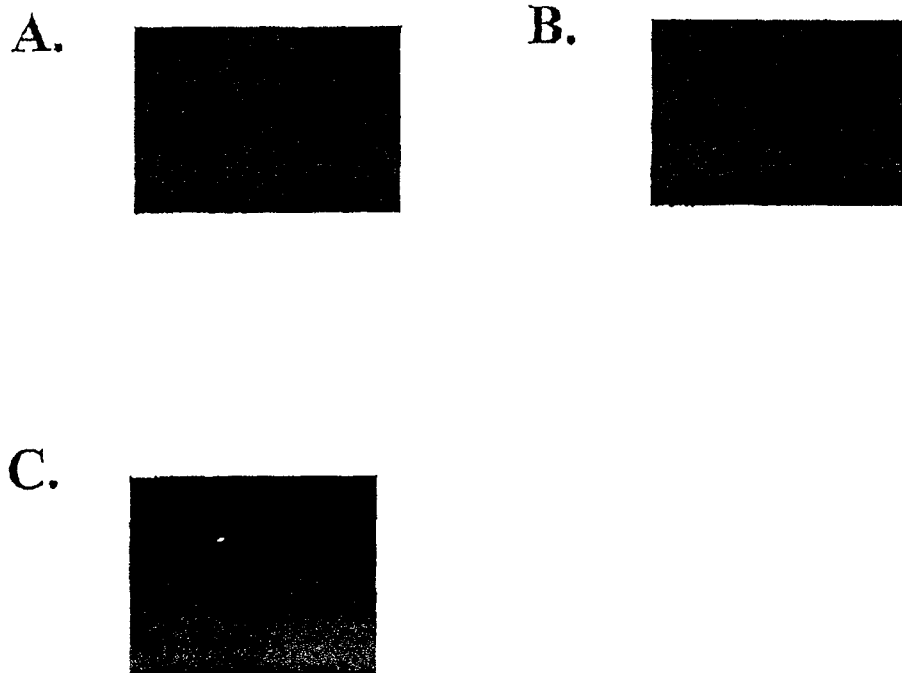


图14

兔血清与乳酸乳球菌的反应

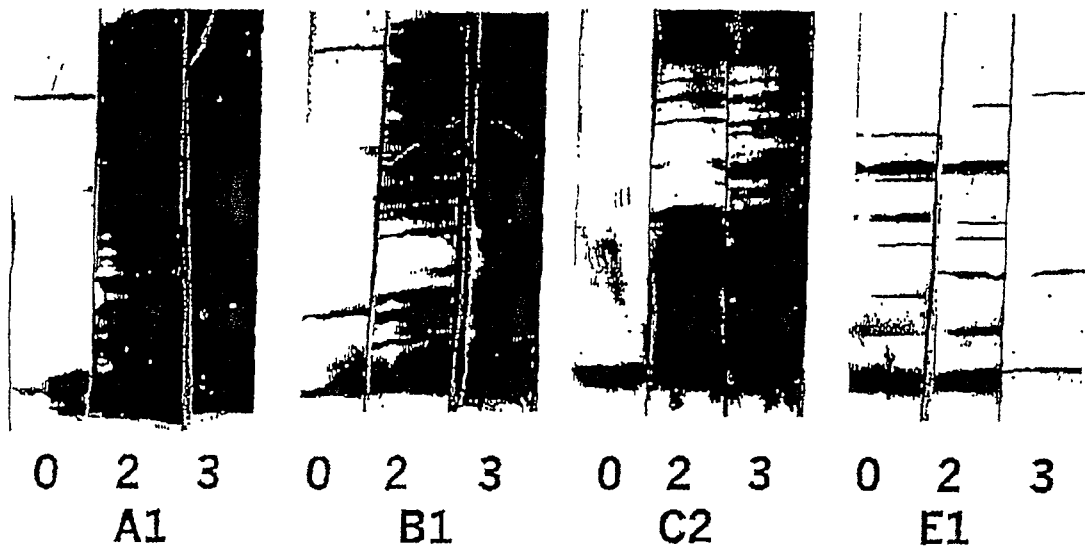


图15

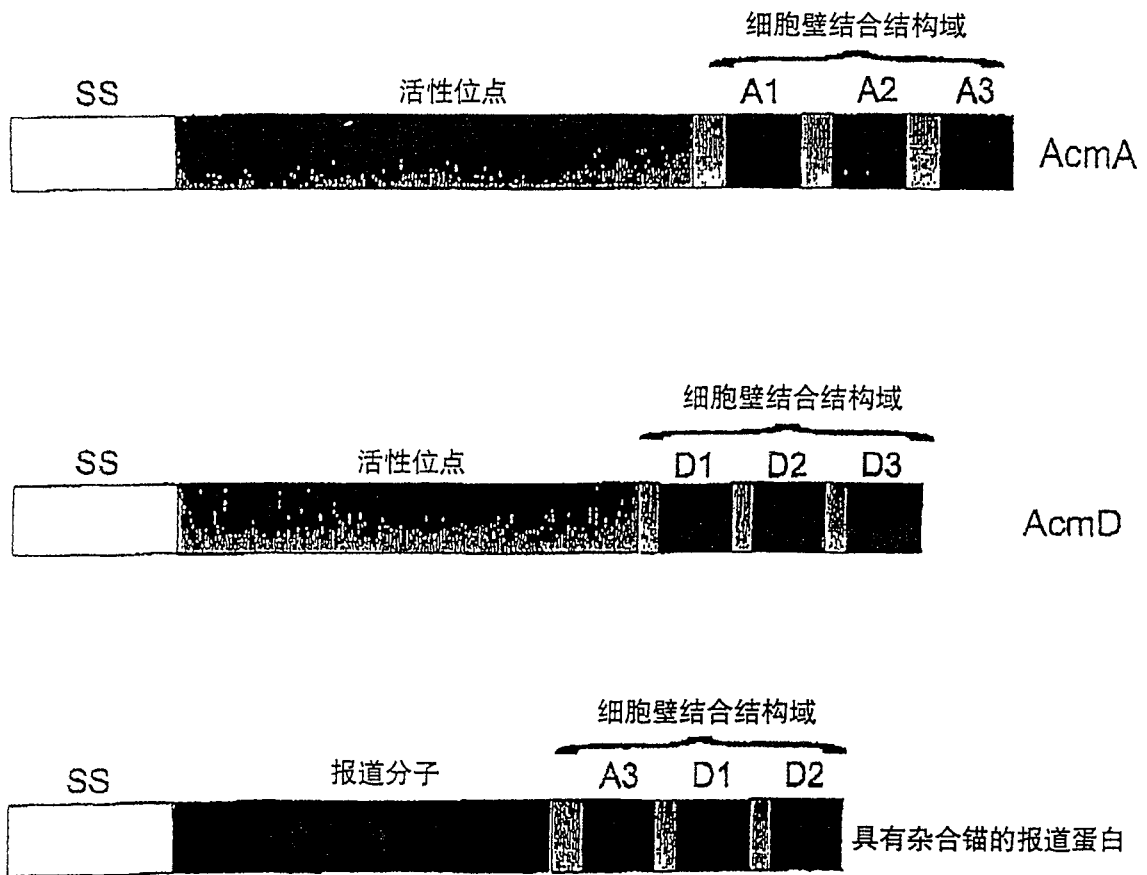


图16

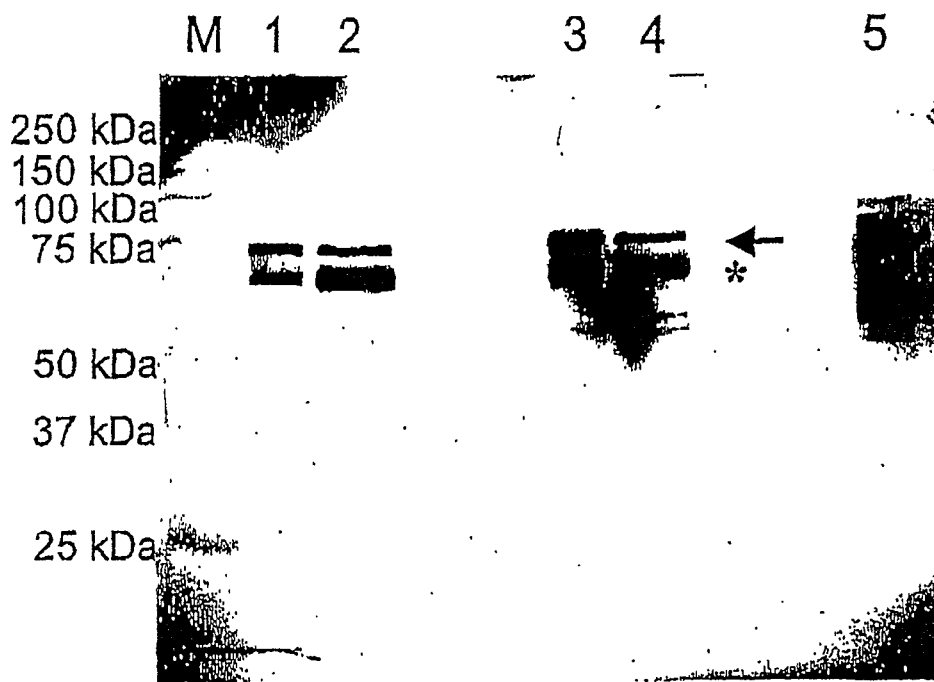


图17

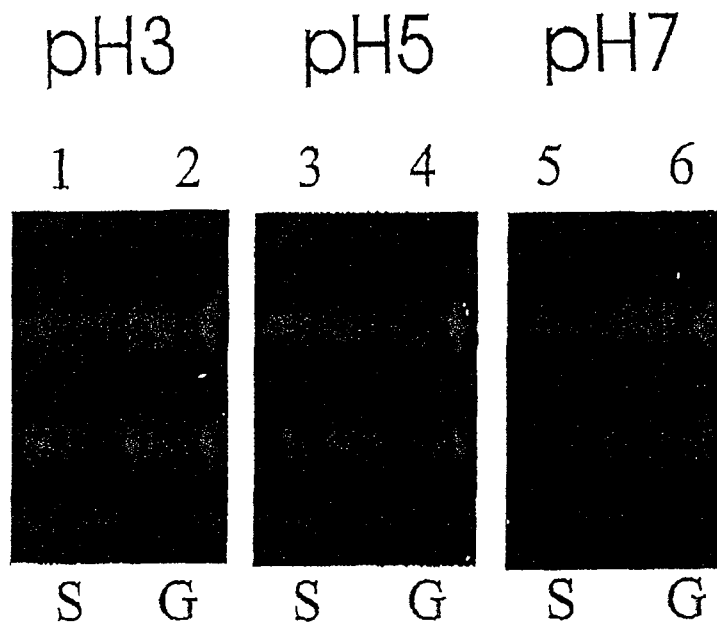


图18

肺炎链球菌疫苗

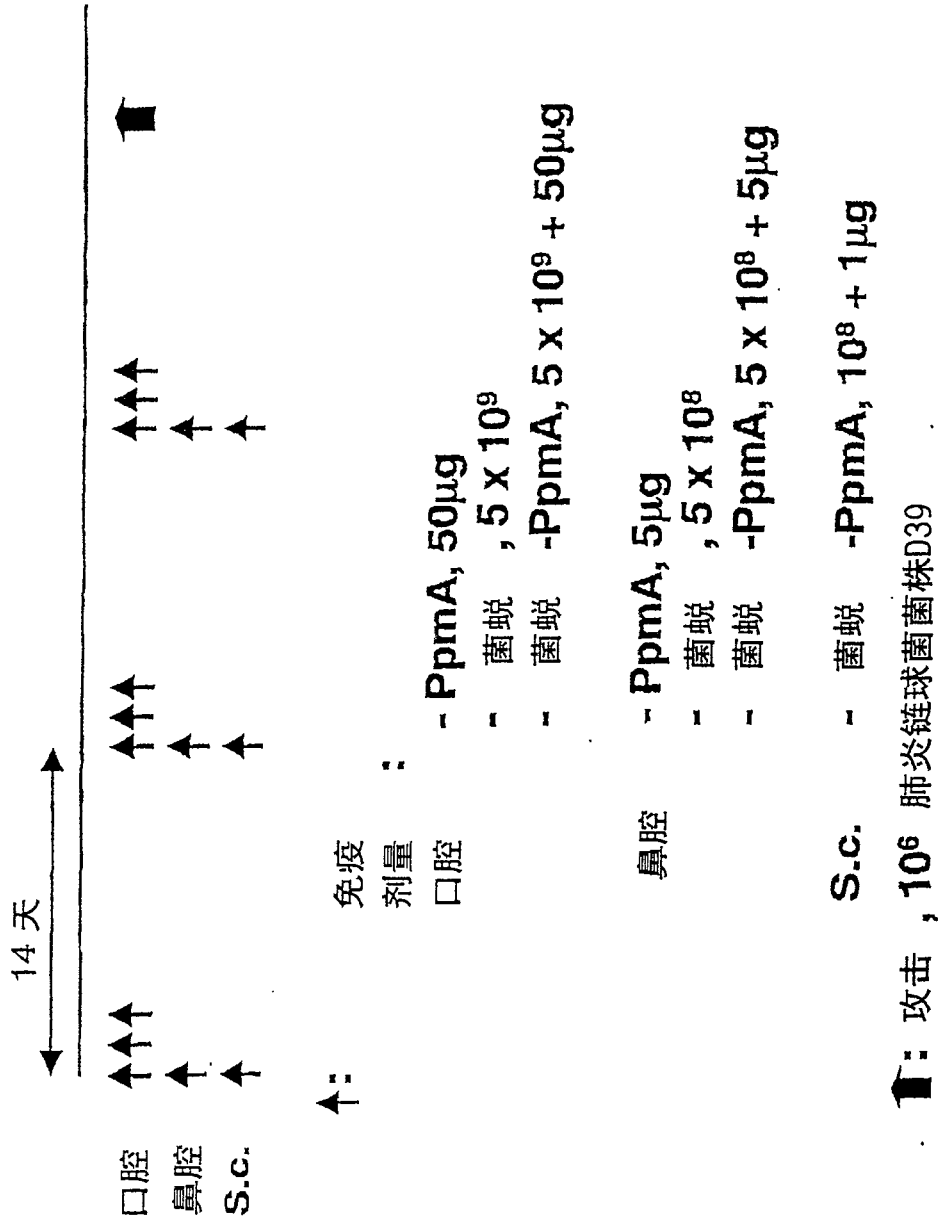


图19

血清抗体反应

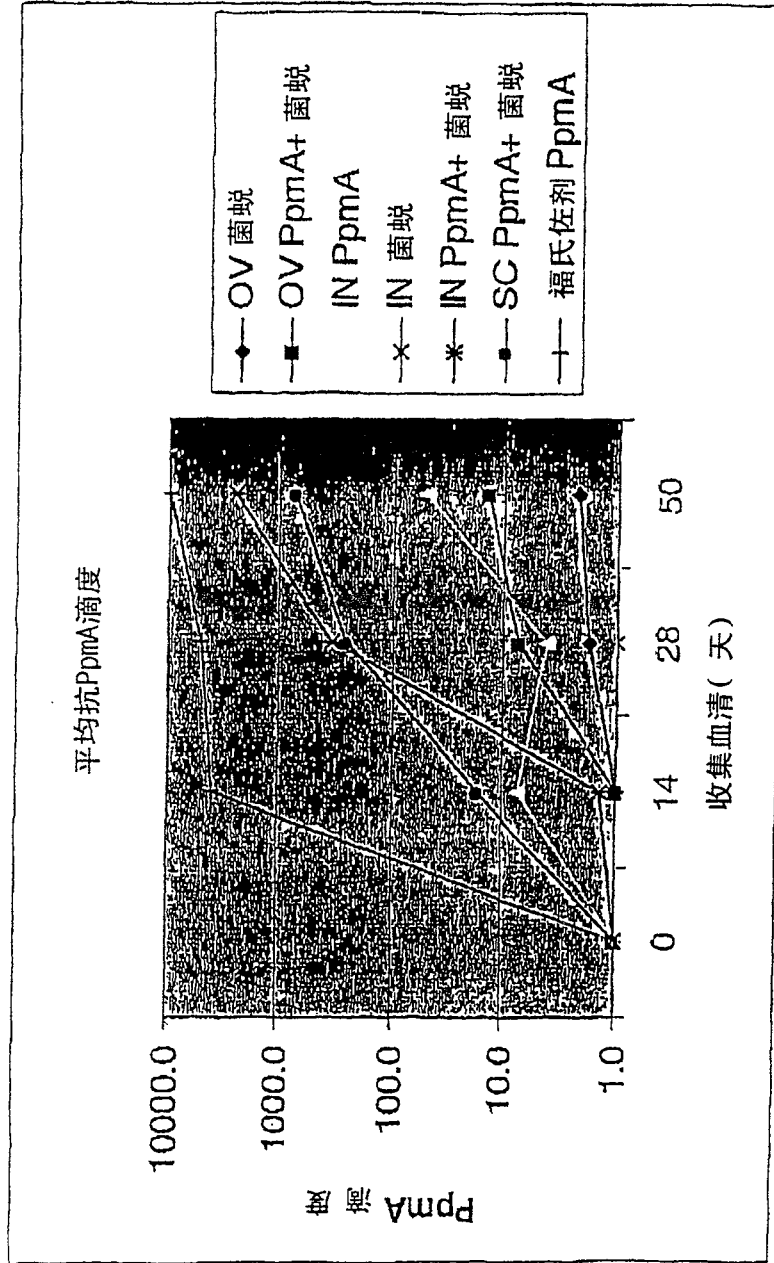


图20

存活

使用PpmA+乳球菌的乳球菌口腔接种实验提高了
鼻内感染肺炎链球菌D39后的CD-1小鼠的存活时间。

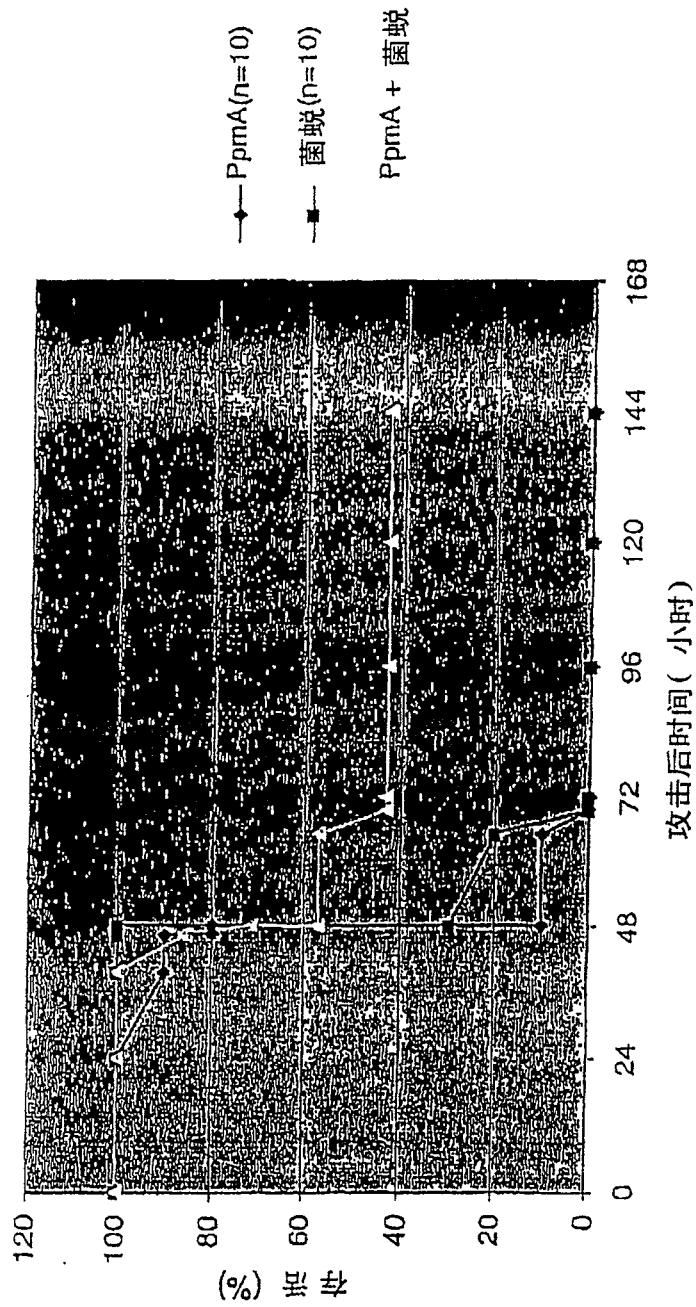


图21

表1. 乳酸乳球菌的不同预处理对MSA2: : cA的结合的影响

处理	印迹上的信号
H ₂ O	-
10% TCA (0.6 M)	++++
0.6 M HAc	++++
0.6 M HCl	++++
0.6 M H ₂ SO ₄	++++
0.6 M TFA	++++
0.6 M MCA	++++
酚	++
4 M GnHCl	++
37% 甲醛	++
CHCl ₃ /MeOH	++
10% SDS	+
10% DMF	+
10% DMSO	+
25 mM DTT	+
0.1% NaHClO ₄ *	-
己烷	-
溶菌酶 *	-

* 在处理或洗涤步骤过程中发生细胞裂解。

图22

表2. 由IFA测定的恶性疟原虫3D7无性生殖阶段寄生虫的兔血清MSA2抗体滴度

兔血清	免疫原	免疫			
		P	2 nd	3 rd	3 rd
A1	皮下/乳酸乳球菌 [MSA2::cA]	0	2	4	4
A2	皮下/乳酸乳球菌 [MSA2::cA]	0	2	5	5
B1	皮下/乳酸乳球菌	0	0	1	n.d.
B2	皮下/乳酸乳球菌	0	0	1	n.d.
C1	口腔/乳酸乳球菌 [MSA2::cP]	0	3	5	5
C2	口腔/乳酸乳球菌 [MSA2::cP]	0	2	5	5
D1	口腔/乳酸乳球菌 [MSA2::cA]	0	2	4	5
D2	口腔/乳酸乳球菌 [MSA2::cA]	0	2	4	5
E1	口腔/TCA乳酸乳球菌 +MSA2::cA	0	2	5	5
E2	口腔/TCA乳酸乳球菌 +MSA2::cA	0	2	5	4

使用的乳酸乳球菌菌株: NZ9000 Δ acmA (缺乏细胞壁水解酶AacmA的乳球菌细胞)。乳酸乳球菌[MSA2::cA]和乳酸乳球菌[MSA2::cP]是表面表达MSA2的重组菌株,分别通过非共价AacmA结合结构域(cA)或共价PrtP锚定结构域(cP)锚定在细胞壁上。TCA乳酸乳球菌+MSA2::cA为非重组TCA预处理的乳球菌细胞,期外部结合了MSA2::cA。

P: 免疫前血清

S.C. 皮下注射

滴度以产生可检测的裂殖子表面反应的最低血清稀释倍数(10的倍数)的负对数表示。末栏代表抗体反应的IgG成分。

0: 表示血清以1:10稀释时未检测到反应。

n.d.: 未做。

图23

表3: AcMA细胞壁结合结构域同源物及其计算的dI值 (dI值直接显示于氨基酸序列后)

乳酸乳杆菌 · acma	YTVKSGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKST	IYVIGQKLVLI	9.75	245-287(33)	437	U17696	muramidase
	VKVKSGDTLALSVKRYKTSIAQLKSN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.64	321-363(31)			
	HRVVKSGDTLWGLSKQSGPISAKIMN	HLSSD	TILIGQYLAIK	10.06	395-437			
	YVQVQSDLSIAAQYGTVDALVSN	SLFNAND	HVGEVLQVA	4.15	194-237		Q8C125	
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	3.78	258-303			
	YTIHQSDSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	4.15	319-361			
ØTuc2009	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	6.31	332-375(10)	428	L31364	glycosidase (muramidase)
Ø-LC3	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	3.45	386-428			
粪肠球菌 · lysB	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	6.31	333-376(10)	429	U04309	muramidase
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	8.79	387-429			
粪肠球菌 · 自溶酶	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.74	363-405(25)	671	P37710	muramidase
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.74	431-473(25)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.74	499-541(25)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.85	567-609(19)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.35	629-671			
小肠肠球菌 · mur2	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.35	257-299(38)	666	P39046	muramidase
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	7.14	338-380(33)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.91	414-456(32)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.64	489-531(33)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	7.31	565-607(15)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	7.15	623-665			
单核细胞增生利斯特氏菌 · P60	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKST	IYVIGQKLVLI	8.61	30-72(130)	484	P21171	adherence and invasion protein P60
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.35	203-245			
无害利斯特氏菌 · P60	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKST	IYVIGQKLVLI	8.61	30-72(129)	481	Q01836	adherence and invasion protein P60
伊氏利斯特氏菌 · P60	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKST	IYVIGQKLVLI	8.35	201-243			
斯氏利斯特氏菌 · P60	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKST	IYVIGQKLVLI	6.35	30-72(125)	524	Q01837	adherence and invasion protein P60
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.37	198-240(73)			
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.89	314-356			
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	6.35	30-72(127)			
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	8.64	200-242(77)			
威氏利斯特氏菌 · P60	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.62	320-362			
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	8.61	30-72(125)			
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.35	198-240(75)			
格氏利斯特氏菌 · P60	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.42	30-72(104)	511	Q01835	adherence and invasion protein P60
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	9.57	177-219(79)			
	VVVEAGDTLNGISQRVYGSVAQIQSAN	HLKSD	TIYIGQNLVS	8.59	299-342			
流感嗜血菌 · amfB	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.11	294-336	432	P44493	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.49	387-430			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	3.87	131-174			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	6.40	147-190			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	8.56	120-164			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.02	319-361			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.06	69-113			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.77	44-87			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.27	166-209			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	4.38	87-130			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	5.41	4-47			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.08	26-70(24)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.95	95-137(37)			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	12.11	174-216			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.03	42-85			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	9.03	106-149			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	5.58	431-474			
	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.03	177-220			
Aquifex. aeolicus · nlpD1	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	5.41	4-47	309	AF058716	chitinase
Volvox carterii · f. redbrightii	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.08	26-70(24)	524	A04512	protein A
f. redbrightii	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.95	95-137(37)	524	A04512	autolysin homolog
金黄色葡萄球菌 · ProA	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.03	177-220	383	AF106851	
LycN	YTVKSGDLSYIAEQYGHVSLKRN	GIYVNSKIQ	GVQGVLTVV	10.03	177-220			



表3. 续

Colletotrichum f. indemichianum Chlamydomyces Pneumoniae	cf. h1 amiB CPN0593 NlpD	4.76 185-228 9.46 159-201 10.01 316-358 10.17 124-166 8.64 188-233 9.99 138-180 10.00 200-245 9.89 155-197 10.72 266-309 9.23 335-378 9.66 389-432	230	AJ001441	glycoprotein
砂梨衣原体	mipD	110-153(31)	245	AE001348	muramidase
中间葡萄活氏菌	pepQ	9.89	200	AE001330	hemagglutinin
葡萄酒球菌	phg	10.72	309	AF017417	endolysin
葡萄酒球菌	lvs44	9.58	432	AF047001	lysine
海热热杆菌	7M0409	9.95	271	AE001720	
御白密螺旋体	7M1686	9.73	395	AE001809	membrane-bound lytic murein transglycosylase D
	dmr1	10.58	775	AE001237	
	TP0155	4.81	371	AE001200	
	TP0444	9.58	342	AE001221	
	B80262	9.72	417	AE001137	Hypothetical protein
布氏疏螺旋体	B80625	10.02	697	AE001164	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
乳杆菌	B80761	9.34	295	AE001176	lysine
鹿茸芽孢杆菌	lysE	9.83	442	AE001111	D-Glutamate-N-diaminopimilate endopeptidase
	spov1D	9.55	334	U38819.1	
	yaaH	10.16	575	P37963	stage VI sporulation protein D
	yhdD	10.03	427	P37531	Hypothetical protein
	yojL	10.03	488	Y14079	Hypothetical protein
	yoch	9.89	414	Z99114	similar to cell wall binding protein
	yKvP	9.56	287	AF027868	similar to papQ
	yLp8	10.32	399	Z99111	Hypothetical protein
	yDd	9.72	317	Z99110	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
	yDd	8.51	387	Z99118	similar to spore coat protein
	yDd	5.49	439	Z99107	
	* xlyA	6.10	164	Z99111	
	* orf15	4.65	297	P39800	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
	* orf15	10.23	258	P11187	lysozyme
	* orf15	10.17	263	P07540	lysozyme
	* Pep 1	10.11	263	X99260	carboxypeptidase I
新柏林沙门氏菌	nlpD	10.61	396	X69507	
大肠杆菌	* yeaA	8.86	377	AJ006131	homologous to endopeptidase of Staphylococcus
	mitD	7.15	419	Z42404	MEMBRANE-BOUND LYTIC MUREIN TRANSGLYCOSYLASE D PRECURSOR
		8.64	452	P21931	
		121-164			
		121-164			
		343-385(16)			
		402-443			

图24续

表 4. AcmA 和 AcmD 蛋白锚的各个重复序列的计算的 pI 值

AcmA 锚结构域		AcmD 锚结构域	
重复序列	计算的 pI 值	重复序列	计算的 pI 值
A1	9.75	D1	4.15
A2	9.81	D2	3.78
A3	10.02	D3	4.15
A1A2A3	10.03	D1D2D3	3.85

图 25

表 5. 由不同的 AcmA 和 AcmD 重复序列组成的杂合蛋白锚及其计算的 pI 值

组合物		
AcmA 重复序列	AcmD 重复序列	计算的 pI 值
A1A2A3	-	10.03
A1A2	D1	9.53
A1A2A3	D1D2D3	8.66
A1	D2	8.45
A3	D1D2	7.39
A1A2	D1D2D3	6.08
A3	D1D2D3	5.07
A1	D1D2D3	4.37
-	D1D2D3	3.85

图 26