

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580023509.7

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 31/739 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 8 日

[11] 公开号 CN 101014698A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/04 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C07H 13/04 (2006.01)

[22] 申请日 2005.5.16

[21] 申请号 200580023509.7

[30] 优先权

[32] 2004.5.14 [33] CA [31] 2,467,329

[32] 2004.5.17 [33] US [31] 60/571,489

[86] 国际申请 PCT/CA2005/000745 2005.5.16

[87] 国际公布 WO2005/111196 英 2005.11.24

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.12

[71] 申请人 加拿大国家研究委员会

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 安德鲁·考克斯

詹姆斯·C·理查兹

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 高龙鑫

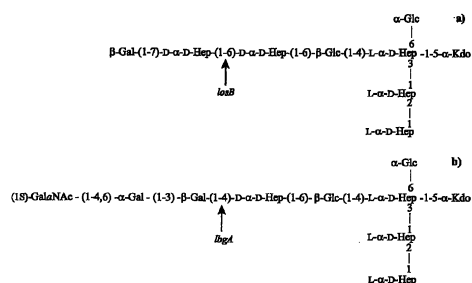
权利要求书 8 页 说明书 131 页 序列表 2 页
附图 58 页

[54] 发明名称

作为多种疫苗候选物的保守性内核脂多糖表位

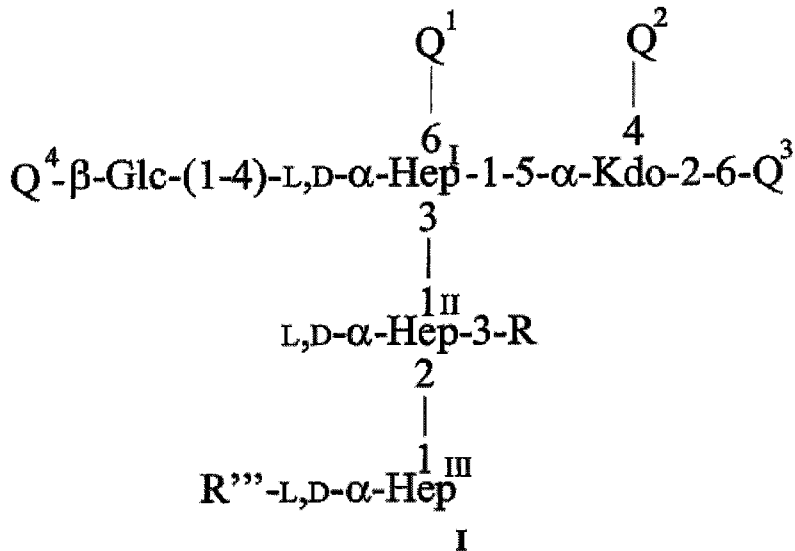
[57] 摘要

本发明公开了在一定范围的致病性病原菌分离株的脂多糖(LPS)上表达的保守性内核寡糖表位,所述分离株包括胸膜肺炎放线杆菌(Ap)、溶血性曼氏杆菌(Mh)和多杀性巴氏杆菌(Pm)。构建了只以末端暴露结构的形式表达保守性内核 OS 表位的突变菌株,这使得能够识别、制备和分离这三种生物共有的内核 LPS。进一步提供了相关的疫苗、针对该保守性 LPS 内核产生的抗体以及糖结合物,所述糖结合物包括与免疫原性载体连接的 LPS 内核。

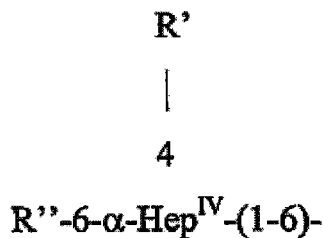


1. 一种分离的脂多糖部分，基本上由不含可变的外核寡糖链延伸的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核部分组成。

2. 一种分离的脂多糖部分，基本上由通式 I 的葡糖基-庚糖基内核部分组成：

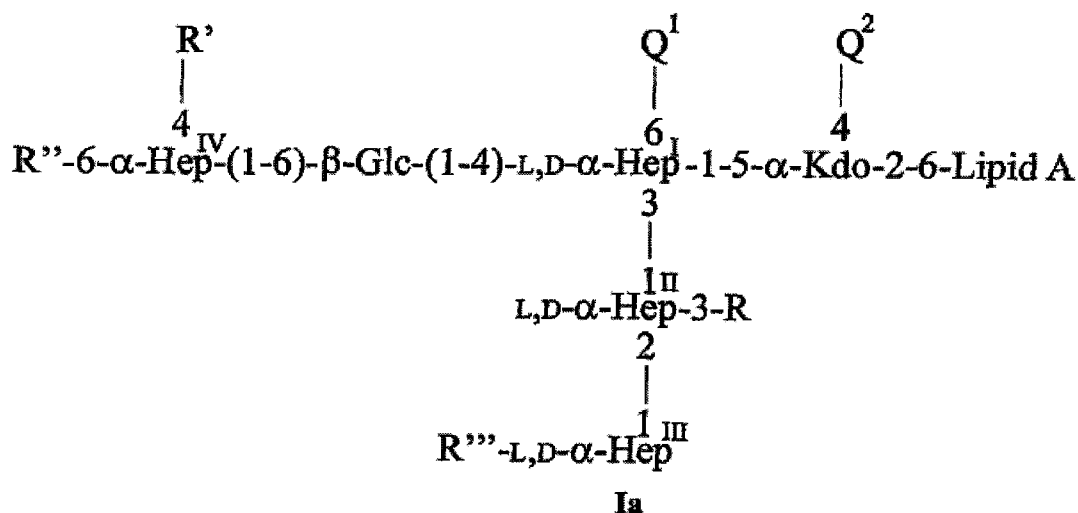


其中，Glc 是葡萄糖；Hep 是庚糖；R 是 H 或者磷酸乙醇胺；R'' 是 H 或者胸膜肺炎放线杆菌中的 O-抗原；Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸；Q¹ 是 H 或者 α-Glc；Q² 是 H、Kdo 或者 -P-R，其中 P 是磷酸酯，R 是 H 或者磷酸乙醇胺；Q³ 是 H 或者去毒的脂质 A；Q⁴ 是 H 或者



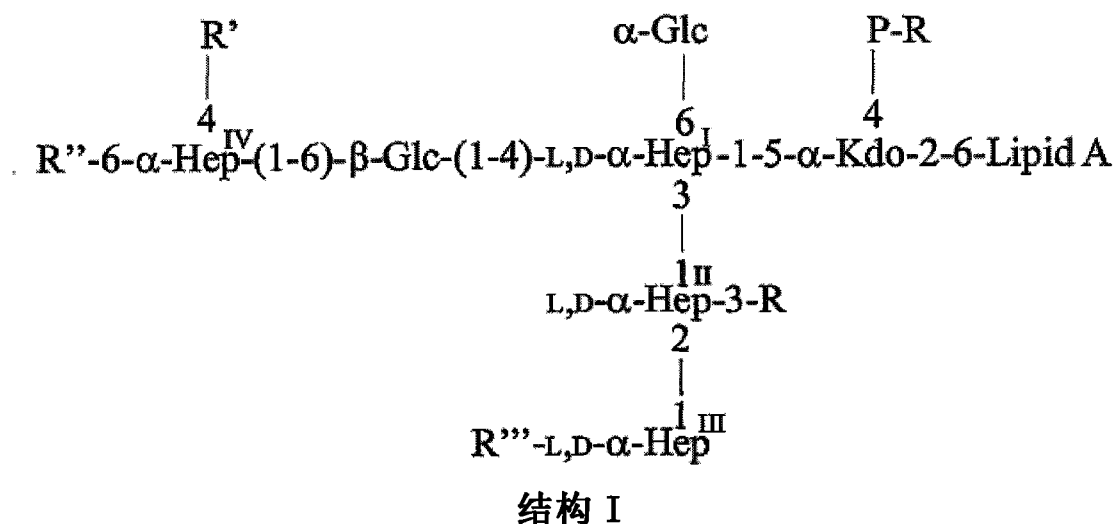
其中，R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸，条件是如果 R'' 是 H，且 Q² 是 -P-R，其中 R 是 H 或者磷酸乙醇胺，那么 Q¹ 是 α-Glc。

3. 一种分离的脂多糖部分，基本上由通式 Ia 的葡糖基-庚糖基内核部分组成：



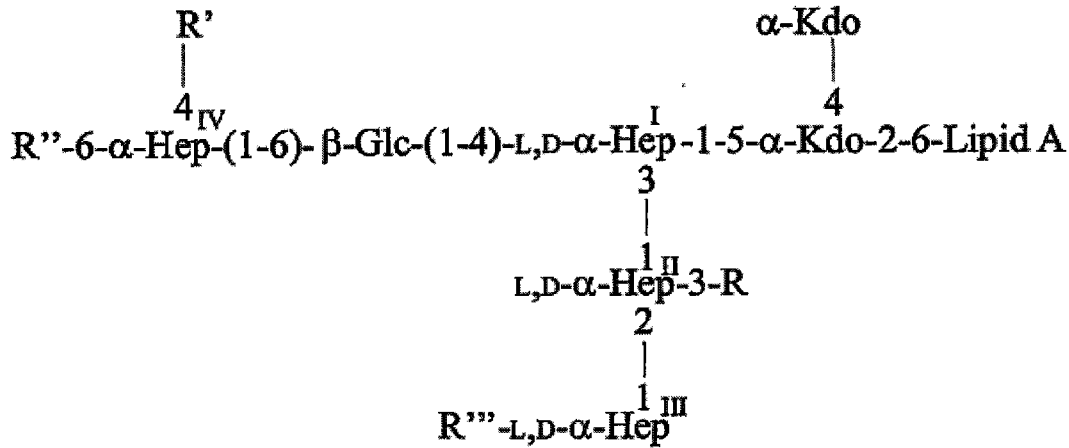
其中, Glc 是葡萄糖; Hep 是庚糖; R 是 H 或者磷酸乙醇胺; R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸; R''' 是 H 或者胸膜肺炎放线杆菌中的 O-抗原; Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸; Q¹ 是 H 或者 α -Glc; Q² 是 H、Kdo 或者 -P-R, 其中 P 是磷酸酯, R 是 H 或者磷酸乙醇胺; 脂质 A 是去毒的, 条件是如果 R''' 是 H, 且 Q² 是 -P-R, 其中 R 是 H 或者磷酸乙醇胺, 那么 Q¹ 是 α -Glc。

4. 一种分离的脂多糖部分, 基本上由具有结构 I 的二-葡糖基-四-庚糖基内核部分组成:



其中, Glc 是葡萄糖; Hep 是庚糖; P 是磷酸酯; R 是 H 或者磷酸乙醇胺; R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸; R''' 是 H 或者胸膜肺炎放线杆菌中的 O-抗原; Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸; 脂质 A 是去毒的。

5. 一种分离的脂多糖部分, 基本上由具有结构 II 的葡糖基-四-庚糖基内核部分组成:



结构 II

其中，Glc 是葡萄糖；Hep 是庚糖；R 是 H 或者磷酸乙醇胺；R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸；R''' 是 H 或者胸膜肺炎放线杆菌中的 O-抗原；Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸；脂质 A 是去毒的。

6. 权利要求 1 至 5 任一项的脂多糖部分，其中在内核部分中 O-连接的基团在任意位置被取代。

7. 一种药物组合物，包括权利要求 1 至 6 任一项的脂多糖部分，以及制药上可接受的载体。

8. 权利要求 7 的药物组合物，其中制药上可接受的载体具有免疫原性。

9. 一种功能性抗体，所述抗体针对溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌以及多杀性巴氏杆菌可发生交叉反应，并且所述抗体可结合权利要求 1 至 6 任一项的脂多糖部分中的表位。

10. 一种制备和获得针对溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌以及多杀性巴氏杆菌的功能性交叉反应抗体的方法，该方法包括：

(a) 产生针对权利要求 1 至 6 任一项的脂多糖部分的抗体；

(b) 将从步骤 (a) 获得的抗体针对溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌以及多杀性巴氏杆菌的多种菌株进行测试；

(c) 选择与溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌以及多杀性巴氏杆菌的所有菌株都发生交叉反应的抗体。

11. 权利要求 7 或 8 的组合物在制备治疗由巴斯德菌科的细菌感染所导致的疾病的药物中的应用，所述细菌具有该保守性内核结构。

12. 权利要求 7 或 8 的组合物在制备治疗由曼氏杆菌、放线杆菌或巴氏杆菌属的细菌感染所导致的疾病的药物中的应用，所述细菌具有该保守

性内核结构。

13. 权利要求 7 或 8 的组合物在制备治疗由溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌或多杀性巴氏杆菌菌种的细菌感染所导致的疾病的药物中的应用，所述细菌具有该保守性内核结构。

14. 根据权利要求 11 至 13 任一项的应用，其中所述疾病选自猪纤维蛋白出血性坏死性胸膜肺炎、禽霍乱、牛出血性败血症、猪萎缩性鼻炎、羊和牛肺炎巴斯德氏菌病（船运热）和羊败血症。

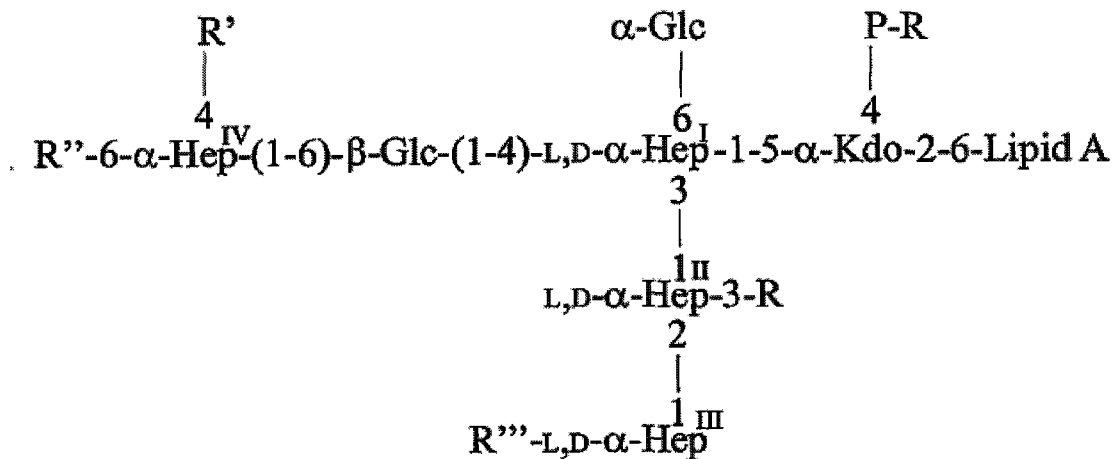
15. 溶血性曼氏杆菌菌株 A1 *losB* (IDAC 040505-01)。

16. 一种减毒疫苗，包括巴斯德菌科的细菌菌株，所述细菌菌株缺少致病能力，并呈现来自保守性内核结构的脂多糖表位。

17. 根据权利要求 16 的减毒菌株，其中所述细菌菌株选自曼氏杆菌、放线杆菌或巴氏杆菌属。

18. 一种减毒疫苗，其包括在白细胞毒素基因上有突变的溶血性曼氏杆菌菌株 A1 *losB*。

19. 一种制备脂多糖部分的方法，所述脂多糖部分基本上由具有结构 I 的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核部分组成：



结构 I

其中，Glc 是葡萄糖；Hep 是庚糖；P 是磷酸酯；R 是 H 或者磷酸乙醇胺；R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸；R''' 是 H 或者胸膜肺炎放线杆菌中的 O-抗原；Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸；脂质 A 是去毒的；所述方法包括：

(a) 从溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌或多杀性巴氏杆菌菌种中分离糖基转移酶基因失活的突变株，以使脂多糖部分以末端单元的形式

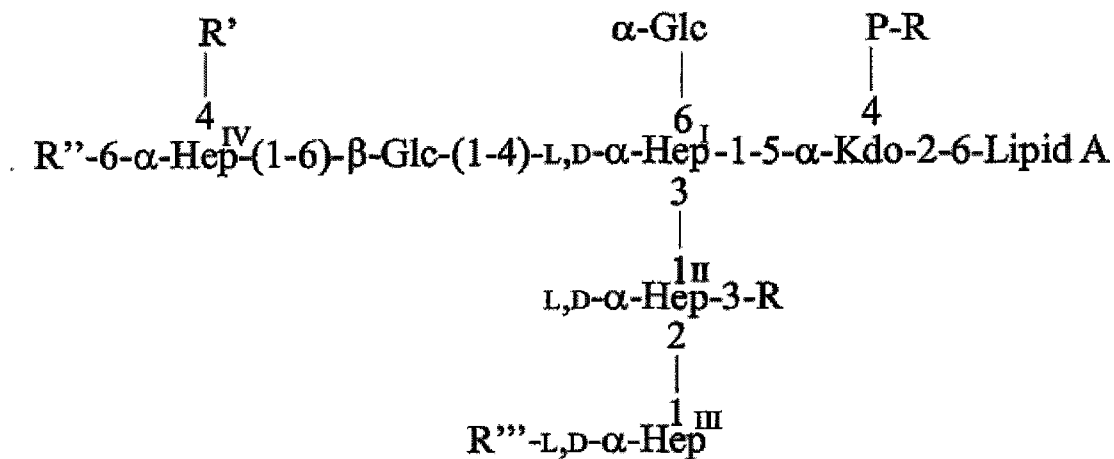
呈现；

(b) 在适于表达脂多糖部分的条件下，培养从步骤 (a) 中获得的溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌或多杀性巴氏杆菌的突变菌株；

(c) 分离和鉴定得到的脂多糖部分；和

(d) 使脂多糖部分的脂质 A 部分去毒。

20. 一种制备脂多糖部分的方法，所述脂多糖部分基本上由具有结构 I 的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核部分组成：



结构 I

其中，Glc 是葡萄糖；Hep 是庚糖；P 是磷酸酯；R 是 H 或者磷酸乙醇胺；R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸；R''' 是 H；Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸；脂质 A 是去毒的；所述方法包括：

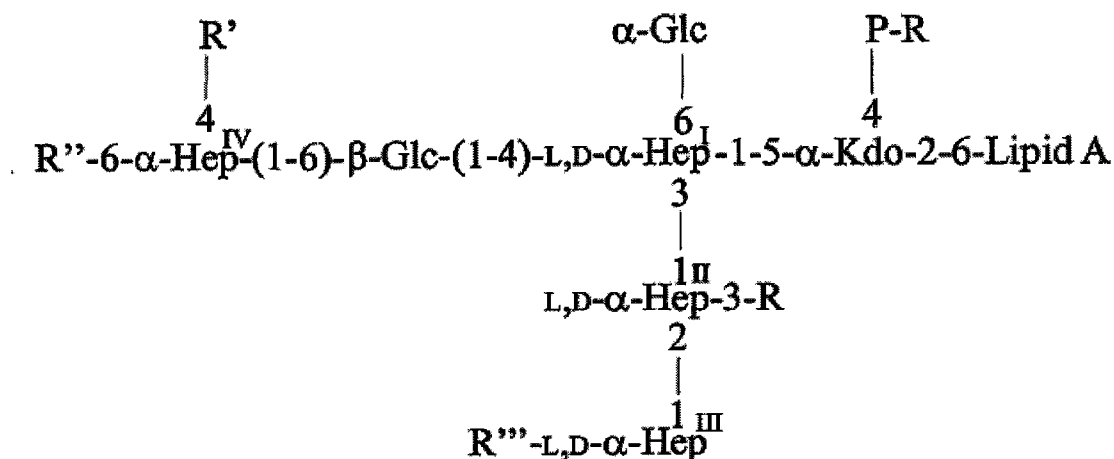
(a) 从溶血性曼氏杆菌菌种中分离 *losB* 基因失活的突变株；

(b) 在适于表达脂多糖部分的条件下，培养从步骤 (a) 中获得的溶血性曼氏杆菌突变菌株；

(c) 分离和鉴定得到的脂多糖部分；

(d) 使脂多糖部分的脂质 A 部分去毒。

21. 一种制备脂多糖部分的方法，所述脂多糖部分基本上由具有结构 I 的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核部分组成：



结构 I

其中，Glc 是葡萄糖；Hep 是庚糖；P 是磷酸酯；R 是 H 或者磷酸乙醇胺；R' 和 R'' 各自是 H 或者寡糖延伸；R''' 是 H 或者胸膜肺炎放线杆菌中的 O-抗原；Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸；脂质 A 是去毒的；所述方法包括：

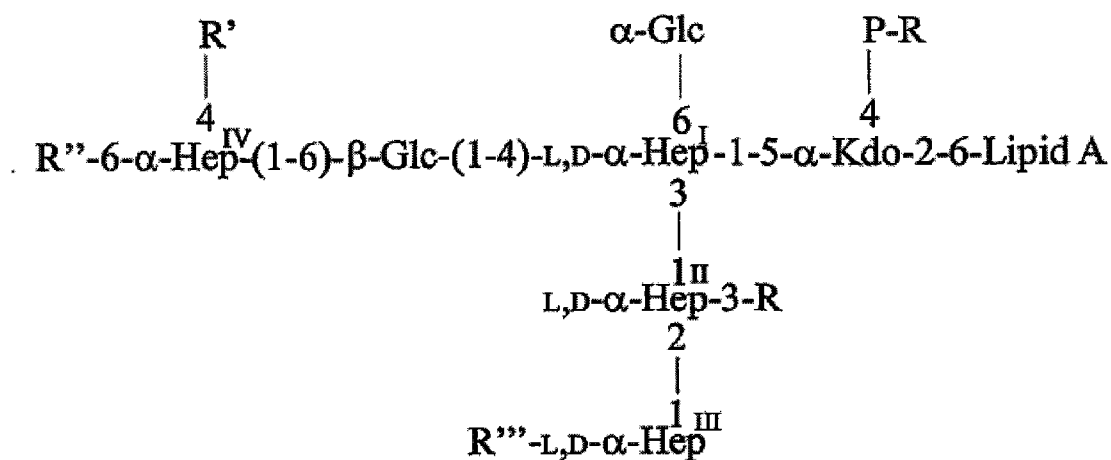
(a) 从胸膜肺炎放线杆菌血清型 1 菌株中分离 *lbgA* 或 *rfbP* 基因失活的突变株；

(b) 在适于表达脂多糖部分的条件下，培养从步骤 (a) 中获得的胸膜肺炎放线杆菌突变菌株；

(c) 分离和鉴定得到的脂多糖部分；

(d) 使脂多糖部分的脂质 A 部分去毒。

22. 一种制备脂多糖部分的方法，所述脂多糖部分基本上由具有结构 I 的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核部分组成：



结构 I

其中，Glc 是葡萄糖；Hep 是庚糖；P 是磷酸酯；R 是 H 或者磷酸乙醇

胺；R'和R''各自是H或者寡糖延伸；R''是H；Kdo是3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸；脂质A是去毒的；所述方法包括：

(a) 从多杀性巴氏杆菌菌株 *Pm70* 中分离 PM0223 或 PM1143 基因失活的突变株；

(b) 在适于表达脂多糖部分的条件下，培养从步骤 (a) 中获得的多杀性巴氏杆菌突变菌株；

(c) 分离和鉴定得到的脂多糖部分；

(d) 使脂多糖部分的脂质 A 部分去毒。

23. 一种单克隆抗体，其可与权利要求 1 至 6 任一项所定义的脂多糖部分中的表位相结合。

24. 权利要求 19 至 22 任一项的方法，其进一步包括将所述脂多糖部分与所述内核脂多糖部分中包含的表位的特异性单克隆抗体接触，来识别该脂多糖部分。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述单克隆抗体如权利要求 23 所定义。

26. 一种糖结合物，其包括与免疫原性载体相连接的、权利要求 1 至 6 任一项所定义的脂多糖部分。

27. 根据权利要求 26 的糖结合物，其中脂多糖部分与免疫原性载体通过接头分子相连接。

28. 权利要求 26 或 27 的糖结合物，其中所述接头分子选自 squarate、胱胺、己二酸二酰肼、 ϵ -氨基己酸、氯己醇二甲基缩醛、D-葡糖醛酸内酯和对硝基苯胺。

29. 权利要求 26 至 28 任一项的糖结合物，其中所述的载体选自去毒绿脓杆菌毒素 A、霍乱毒素/类毒素、百日咳毒素/类毒素、产气荚膜梭菌外毒素/类毒素、乙肝表面抗原、乙肝核心抗原、轮状病毒 VP7 蛋白、呼吸道合胞体病毒 F 和 G 蛋白、白喉类毒素 CRM₁₉₇、破伤风类毒素 TT、人血清白蛋白 (HSA)、溶血性曼氏杆菌白细胞毒素类毒素、溶血性曼氏杆菌 PlpE 脂蛋白、胸膜肺炎放线杆菌 OmlA、溶血性曼氏杆菌或者胸膜肺炎放线杆菌 TbpA 和 B (转运结合蛋白)、溶血性曼氏杆菌唾液酸糖蛋白酶、胸膜肺炎放线杆菌选自 Apx I 到 IV 的 Apx 外类毒素、胸膜肺炎放线杆菌或者多杀性巴氏杆菌 Plp-40 脂蛋白、多杀性巴氏杆菌 Omp28 主要外膜蛋白、多杀性巴氏杆菌 39kDa 荚膜蛋白以及多杀性巴氏杆菌 PlpB (39kDa 交叉防护脂蛋白)。

30. 一种疫苗组合物，其包括权利要求 26 至 29 任一项的糖结合物以

及佐剂。

31. 权利要求 30 的疫苗组合物，其中所述疫苗制成脂质体、古生菌体（archaeosome）或者来自古生菌脂质（archaeolipid）。

32. 权利要求 30 或 31 的疫苗组合物，所述组合物在对哺乳动物进行免疫接种后，可诱导能与巴斯德菌科的细菌的全细胞发生交叉反应的抗血清。

33. 一种多价疫苗组合物，其包括权利要求 26 至 29 任一项所定义的糖结合物以及佐剂的混合物。

作为多种疫苗候选物的保守性内核脂多糖表位

技术领域

本发明涉及兽类细菌性病原体脂多糖（LPS），其包括所述 LPS 的内核寡糖部分的一个或多个表位。本发明鉴别出在兽类细菌性病原体的一些致病分离株的 LPS 上表达的保守性表位，所述致病分离株包括但不限于胸膜肺炎放线杆菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae, Ap*）、溶血性曼氏杆菌（*Mannheimia haemolytica, Mh*）和多杀性巴氏杆菌（*Pasteurella multocida, Pm*）。

背景技术

细菌性病原体是商业农场运作中经济损失的很大原因，也是极大范围的动物群体（包括人类）的健康问题的很大原因。与兽类疾病有关的三种最常见的细菌性病原体为溶血性曼氏杆菌（溶血性巴氏杆菌，*Mh*）、胸膜肺炎放线杆菌（*Ap*）和多杀性巴氏杆菌（*Pm*）。*Mh* 主要是牛和羊的病原体，*Ap* 是猪病原体，*Pm* 是多个物种包括家禽、家畜和猪的病原体，同时也是狗和猫咬伤人类导致感染的致病因子。总之，它们可引发疾病，导致动物饲养业的极大经济损失。

当前的措施包括使用菌苗或者简单修饰的活菌株作为疫苗。由于效果不够好，并且不良作用出现几率较高，这些方法并不完全令人满意。

目前没有哪一种疫苗可以提供针对这三个菌种——*Mh*、*Ap* 和 *Pm* 导致的感染的跨菌种保护。针对这些致病菌的疫苗极有用处。对付由 *Mh* 引起的疾病的疫苗方法仍然主要是基于菌苗和活减毒株。最近的活疫苗中引入了分泌或者提取的 *Mh* 抗原，如神经氨酸酶、白细胞毒素、唾液糖蛋白酶、外膜以及未识别的蛋白。白细胞毒素在常规上一直是主要的亚单位疫苗候选物，但使用表达非毒性白细胞毒素的突变株进行免疫接种在小牛激发模型（calf challenge model）中仍然部分有毒，并且白细胞毒素与荚膜多糖联合使用时不能产生防护性免疫应答。相比而言，LPS 已显示出可稳定白

细胞溶解活性,所以基于 LPS 和去毒白细胞毒素的联合疫苗可带来希望[Li, J., and K. D. Clinkenbeard. 1999. *Infect. Immun.* 67: 2920-2927]。

目前对付由 *Ap* 引起的疾病的疫苗方法是基于活减毒株,它们中含有高度不稳定的 Apx 毒素,该毒素可诱导防护所需的中和抗体。这些 Apx 毒素形成了针对 *Ap* 的主要亚单位疫苗的基础,但似乎只能诱导部分临床防护。有人提出将粘附素(包括 LPS 的核心 OS)作为改善的疫苗候选物[Van Overbeke I., et al. 2003. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 50:289-293]。目前预防猪 *Pm* 病的疫苗由类毒素和体细胞抗原如荚膜和外膜蛋白组成。巴斯德(Pasteur)首先表明 *Pm* 可引起鸡的禽霍乱,目前对该病的防护手段是利用 *Pm* 减毒株。然而一般来说,由于该免疫应答仍然是血清型限制的,不能提供对其他血清型的交叉保护,所以这种手段受到极大限制。然而已经表明 *Pm* 的 LPS 在感染的免疫中起部分作用。

已经积累了相当的证据表明来自这些生物中每一种的 LPS 都可能是亚单位疫苗设计的良好候选物。已经显示 LPS 是 *Mh* 表面上可见的和主要的抗原决定簇,由 A1 LPS 诱导的 mAb 有助于吞噬作用而无助于补体介导的体外杀伤[Wilson, C. F., et al. 1992. *Vet. Microbiol.* 31: 161-168]。

对于 *Pm*, 核糖体-LPS 疫苗保护鸡类免受由同源 *Pm* 菌株引起的禽霍乱感染[Phillips, M., and R. B. Rimler. 1984. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1785-1789]。另外,使用 LPS-蛋白复合物对小鼠进行免疫接种,当使用同源菌株攻击小鼠时该免疫接种可提供 100% 的保护,然而当分开使用时,该复合物的单一组分无法提供保护。来自 *Pm* 的 LPS 诱导的 MAb 在小鼠模型中只能提供部分保护,尽管它们具有调理吞噬作用,但在补体存在下不具有杀菌作用。然而在另一项实验中,针对 *Pm* LPS 的 mAb 可完全保护小鼠免受同源攻击,并且具有杀菌作用[Wijewardana, T. G., et al. 1990. *J. Med. Microbiol.* 33: 217-222]。一种模拟来自 A 型的 LPS 的抗独特型疫苗在小鼠模型中当其受到同源生物攻击时可起到保护作用。

在 *Ap* 中, LPS, 更具体地说是 LPS 的核区与该细菌的粘附能力有关。BSA 与 *Ap* 血清型 1 LPS 连接的联合疫苗可在同源攻击而不能在异源攻击后保护小鼠,来自血清型 5 和 1 的光滑型和粗糙型 *Ap* LPS 的联合疫苗表明 *Ap* 细胞壁的糖部分在猪免疫应答中起重要作用[Fenwick, B., and B. I.

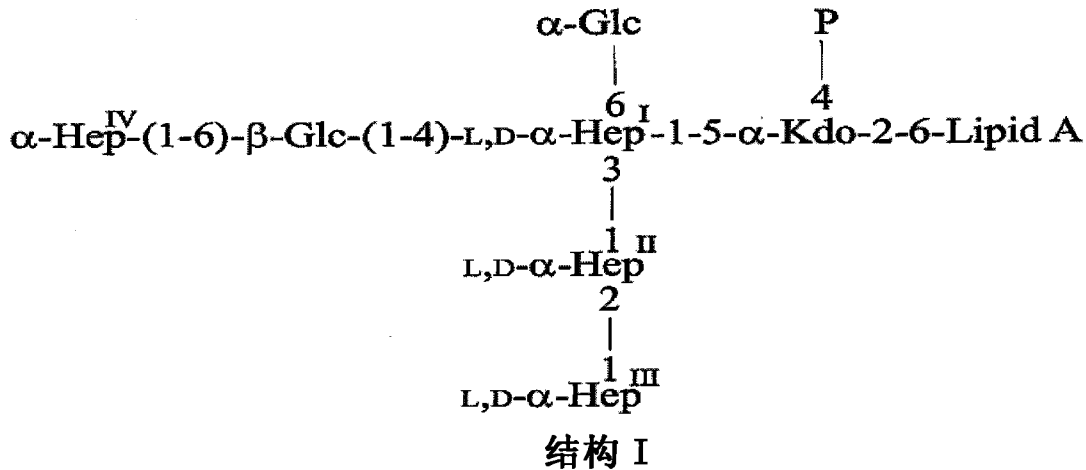
Osburn. 1986. Infect. Immun. 54: 583-586]。

在此背景下，所感兴趣的兽医上的生物包括表面暴露的糖部分，并可考虑作为疫苗候选物。这些糖部分包括 LPS 和荚膜多糖。荚膜多糖是几种糖类残基的重复单元，并与细菌表面直接连接，而 LPS 由以下三个区构成：脂质 A 区，它通过脂肪酸残基将 LPS 分子与细菌表面相连；相对保守的核寡糖区，它将脂质 A 区与第三区即可变多糖抗原（O-抗原）相连。荚膜和 O-抗原多糖的菌株间异质性通常可将它们从经济可行的疫苗候选物中排除，因为它们只对同源菌株有效。分子遗传学、分子结构分析以及免疫化学的最新进展提供了强有力的工具，使得我们能够识别可作为候选物疫苗抗原的糖结构。

脂多糖（LPS）是 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 中重要的并很有特点的表面暴露抗原。（如上所讨论，本文使用的术语“脂多糖”和“LPS”涵盖短链脂多糖和脂寡糖（LOS））。*Pm* 菌株表达多组异质性低分子量 LPS，这些 LPS 在多个寡糖表位上显示广泛的抗原多样性，而 *Mh* 和 *Ap* 菌株既产生低分子量 LPS，也产生带有 O-抗原聚合物的常规 LPS。申请人在此描述的 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 的 LPS 糖结构当以合适的形式（例如作为蛋白缀合物）呈递给宿主免疫系统时，可提供一种保护性抗原的来源。在申请人的研究中，LPS 被证实可用作疫苗候选物，这是因为意外地识别出这样一种表面表达的糖抗原，它们具有的寡糖表位在遗传上和生理上稳定，在此范围的菌株中保守，在三个菌种 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 中可进入宿主的清除机制。

Mh、*Ap* 和 *Pm* 的 LPS 分子的糖区为宿主免疫系统进行识别提供了靶标。确定其结构对于理解 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 的 LPS 的生物学及其在细菌毒力中的作用是很关键的。*Mh*、*Ap* 和 *Pm* 的 LPS 包括分子的异质性混合物，所述分子由可变的寡糖部分、膜锚定的脂质 A 部分以及在某些 *Mh* 和 *Ap* 菌株的情况下还有聚合的 O-抗原构成。基于本文所描述的实验，开发了 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 的 LPS 的结构模型，该结构模型由保守的四-庚糖基-二-葡糖基内核部分组成，该部分通过磷酸化酮脱氧辛酸残基（Kdo）附着于脂质 A 部分，并且发现它在目前所研究过的每一菌株中均存在并且是保守的。

从结构分析中明显看出，这三个菌种中绝对保守的最大结构如以下结构 I 所示。



其中 Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸，Hep 是庚糖，Glc 是葡萄糖，P 是磷酸酯，脂质 A (Lipid A) 是去毒的。

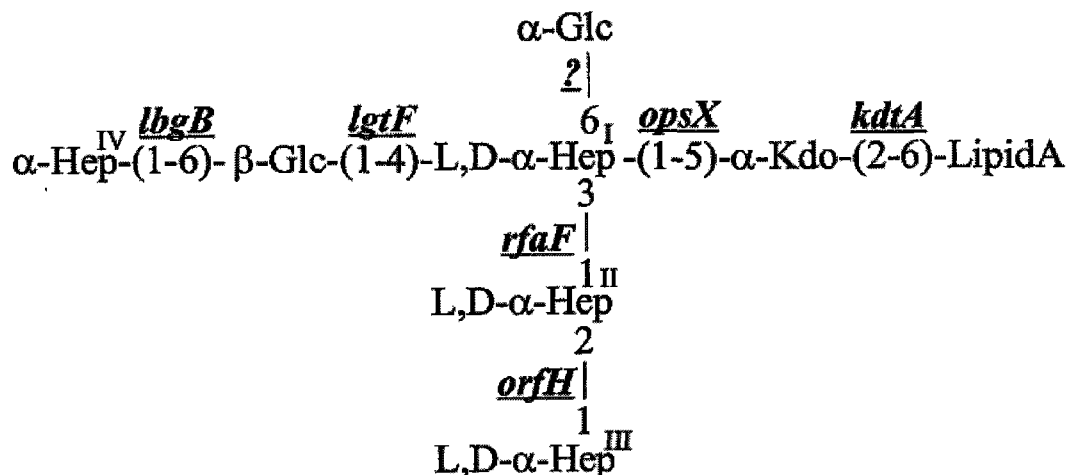
为了将抗原用作疫苗开发，必须满足四条重要的标准。即候选抗原的免疫原性表位一定要：

- i) 遗传上稳定；
- ii) 在这些菌种的所有临床上相关的菌株中均保守；
- iii) 可进入（体外及体内）宿主免疫机制；以及
- iv) 能够在体内诱导保护性抗体。

本发明已经鉴别出显示满足大部分这些标准的保守性 LPS 糖表位。

i) 遗传稳定性：在三个菌种的基因组菌株（两个 *Pm* 株，一个 *Mh* 株，两个 *Ap* 株）中，已鉴别出涉及保守性内核寡糖生物合成的基因。这些菌种显示的外核变异所涉及的基因已被发现是变化地存在的，这些数据已经使用每一菌种的基因组菌株和其他菌株的结构数据确证。然而结构和遗传分析（见表 A）均表明内核结构在结构上是保守的，这是由于总是存在已知负责内核生物合成的基因。

表 A. 兽类病原体的保守性内核 LPS 的糖基转移酶



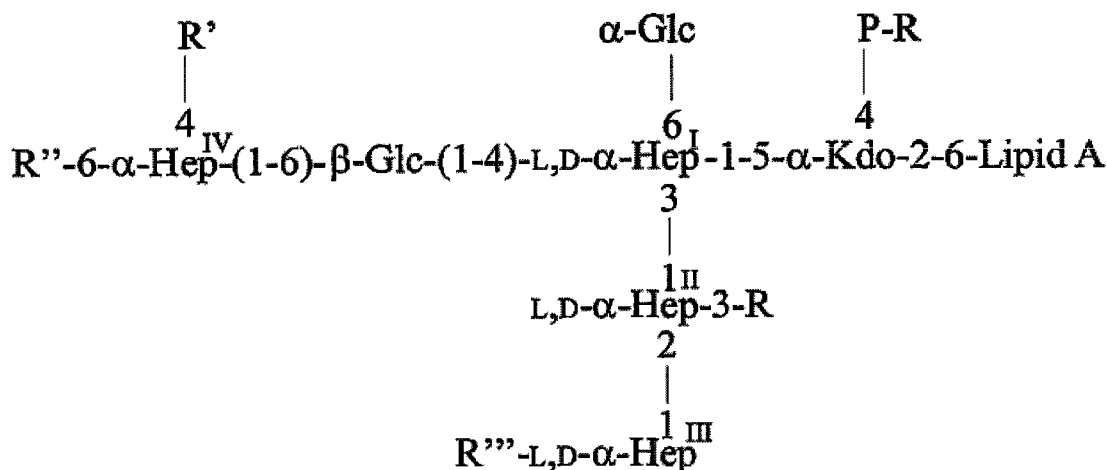
兽类病原体基因组菌株中的保守性内核糖基转移酶

基因	<i>Pm-3480</i>	<i>Pm70</i>	<i>Ap_1</i>	<i>Ap_5</i>	<i>Mh</i>
<i>kdtA</i>	Contig49 e ^{-155*}	PM1305 e ⁻¹⁵⁵	Contig25 e ⁻¹²⁹	ap93i1204 e ⁻¹²⁸	Contig164 e ⁻¹²⁶
<i>opsX</i>	Contig49 e ⁻¹⁴⁵	PM1302 e ⁻¹⁵²	Contig24 e ⁻¹¹¹	ap93i0300 e ⁻¹⁰⁸	Contig165 e ⁻¹¹⁶
<i>rfaF</i>	Contig68 e ⁻¹⁶⁵	PM1844 e ⁻¹⁶⁵	Contig25 e ⁻¹⁵³	ap93i0451 e ⁻¹⁵⁴	Contig81 e ⁻¹⁵⁵
<i>orfH</i>	Contig28 e ⁻¹³²	PM1294 e ⁻¹³²	Contig24 e ⁻⁸³	ap93i0686 e ⁻¹²⁰	Contig109 e ⁻¹³²
<i>lgtF</i>	Contig49 e ⁻¹¹⁰	PM1306 e ⁻¹¹⁰	Contig24 e ⁻¹¹⁰	ap93i0684 e ⁻¹¹⁴	Contig109 e ⁻¹¹⁶
<i>lbgB</i>	Contig59 e ^{-inf}	PM1144 e ^{-inf}	Contig29 e ⁻⁹⁸	ap93i1369 e ⁻⁹⁸	Contig147 e ⁻⁸⁹

*使用来自流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 菌株 WK-20 (Rd) 的内核 LPS 糖基转移酶对兽类病原体基因组进行 Blast 运算后获得的 e 值, 其中除了 *lbgB* 使用的是来自 *Pm70* 基因组的 PM1144。

基因组数据获自: Baylor College of Medicine, Houston (Mh); Department of Microbiology and Immunology, Laboratory for Genomics and Bioinformatics, Oklahoma University Health Sciences Center (Pm-3480 and Ap1); Institute for Biological Sciences, National Research Council, Ottawa, Canada (Ap5); Computational Biology Centre, University of Minnesota (Pm70).

ii) 结构保守性: 到目前为止申请人所研究的每个菌株中, 此四-庚糖基-二-葡糖基部分总是包含于下列结构元件 (结构 II) 中:



结构 II

其中：-R 是 H 或者磷酸乙醇胺 (PEtn)，P 是磷酸酯，R' 和 R'' 是 H 或者寡糖链延伸，优选不包括 $\beta\text{-D-Galp}_p\text{(1-7)-D-}\alpha\text{-D-Hep}_p\text{(1-6)}$ ，R''' 是 *Ap* 中可变的 O-抗原，Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸，脂质 A (Lipid A) 是去毒的。

表 B: 兽类病原体溶血性曼氏杆菌 (*Mh*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Ap*) 和多杀性巴氏杆菌 (*Pm*) 的 LPS 的核寡糖中保守区和可变区的结构。

菌种	菌株/血清型	R'	R''	R
<i>Mh</i>	A1	H	$\beta\text{-D-Galp-(1-7)-D-}\alpha\text{-D-Hep}^{\text{V}}_p\text{(1-}$	H
	A8	H	$\text{D-}\alpha\text{-D-Hep}^{\text{V}}_p\text{(1-}$	H
	SH1217	H	$\beta\text{-D-Galp-(1-7)-D-}\alpha\text{-D-Hep}^{\text{V}}_p\text{(1-}$	H
<i>Ap</i>	1	(1S)-GalaNAc-(1-4,6)- $\alpha\text{-D-Gal-(1-3)-}\beta\text{-D-Gal-(1-}$	H	H
	2	$\beta\text{-D-Glc-(1-}$	$\text{D-}\alpha\text{-D-Hep}^{\text{V}}\text{(1-}$	H
	5a	H	$\text{D-}\alpha\text{-D-Hep}^{\text{V}}\text{(1-}$	H
	5b	H	$\text{D-}\alpha\text{-D-Hep}^{\text{V}}\text{(1-}$	H
	<i>Pm</i>	Pm70	$\beta\text{-D-Glc-(1-}$	$\alpha\text{-D-GalpNAc-(1-3)-}\beta\text{-D-GalpNAc-(1-3)-}\alpha\text{-D-Gal-(1-4)-}\beta\text{-D-Gal-(1-4)-}\beta\text{-D-Glc-(1-}$
	VP161	$\text{PCho-3-}\beta\text{-D-Gal-(1-}$	$\text{PCho-3-}\beta\text{-D-Gal-(1-}$	H
	X73	$(\text{PEtn-6)-PCho-3-}\beta\text{-D-Gal-(1-}$	$(\text{PEtn-6)-PCho-3-}\beta\text{-D-Gal-(1-}$	H

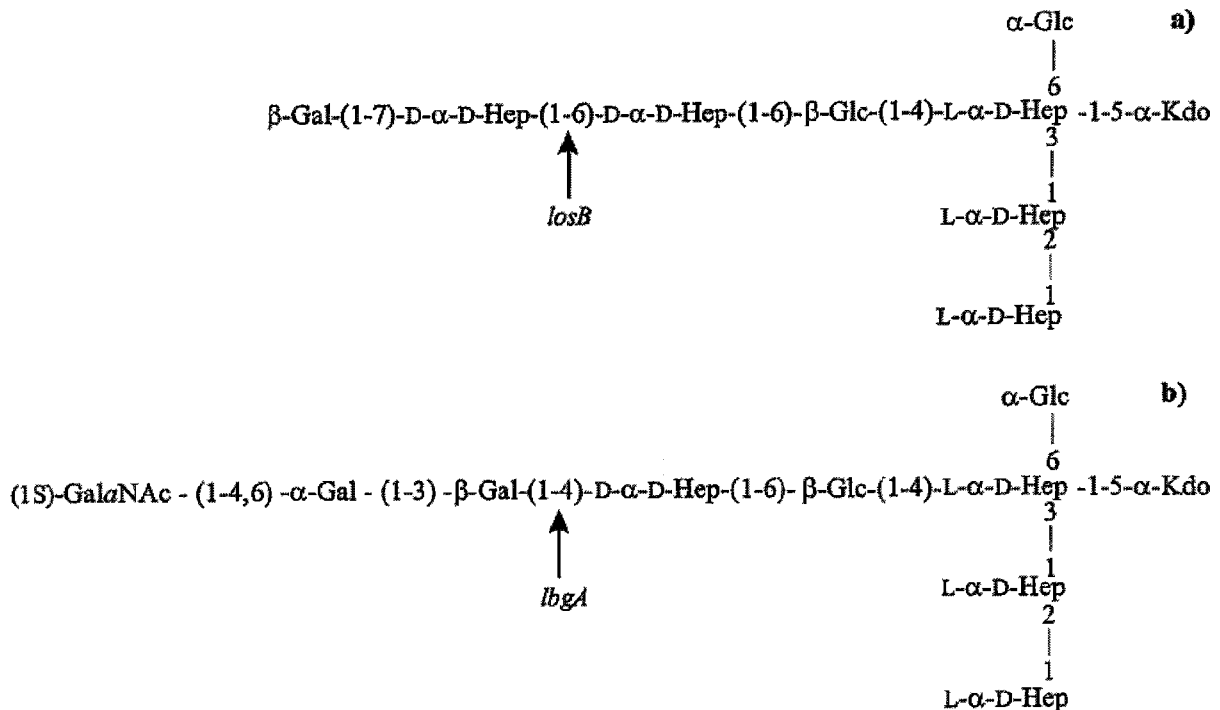
对于 *Pm* 来说，庚糖残基 Hep^{IV} 是 L- $\alpha\text{-D}$ 构型。同样在 *Pm* 中， Hep^{I} 的 6 位的 $\alpha\text{-葡萄糖}$ 残基在少数糖型中缺失，同时伴随有 Kdo 残基的结构不同，此时 Kdo 的 4 位上不是 P-R，而是第二个 Kdo 残基。

第一个庚糖残基 (Hep^{I}) 是唯一一个在所有三个菌种 *Ap*、*Mh* 和 *Pm* 中显示从该残基发生核寡糖延伸的庚糖残基。外核延伸从 Hep^{IV} 残基进一步伸

长。在所有菌种中均未观察到从 Hep^{II} 或 Hep^{III} 的核寡糖延伸。在 *Ap* 血清型 5 中发现了从 Hep^{III} 残基发生的 O-抗原延伸 [St. Michael, F. et al. 2004, Carbohydr. Res., 339: 1973-1984], 未显示出 *Mh* 中 O-抗原附着于核心 OS 的位置。*Pm* 中未观察到抗原聚合物重复单元。已经显示四个基因涉及 *Ap* 血清型 1 中的 O-抗原的生物合成, 包括 *rfbP* 和 *rfbU*, 它们的突变会产生没有 O-抗原的 *Ap* 菌株 [Labrie, J. et al. 2002, J. Endotox. Res., 8: 27-38]。所有三个菌种的内核均可被磷酸乙醇胺残基进一步取代, 可以在 *Pm* 菌株 *Pm70* 的 Hep^{II} 残基的 3 位, 也可以在所有菌种 *Ap*、*Mh* 和 *Pm* 中的 Kdo-P 残基。在 *Pm* 中, 少数种类 LPS 糖型显示出具有两个 Kdo 残基而不是 Kdo-P 或者 Kdo-P-PEtn 部分, 第二个 Kdo 残基的存在同时伴有内核 α -Glc 残基的缺失。在所研究的三个菌种的内部和它们之间都观察到外核变异。在 *Ap* 血清型 1 中, 使用 NMR 对外核延伸进行完全地结构表征, 显示寡糖延伸 (1S)-GalNAc-(1-4, 6)- α -Gal-(1-3)- β -Gal 的末端含有少见的开链 N-乙酰半乳糖胺。该结构还可从血清型 9 和 11 的质谱中推知。在 *Ap* 血清型 2 中, 发现 Hep^{IV} 残基在 4 位被 β -Glc 残基二取代, 在 6 位被 D, D- α -Hep^V 残基二取代。在 *Ap* 血清型 5 中, 只有 D, D- α -Hep^V 残基取代 Hep^{IV}。在 *Mh* 中观察到与在 *Ap* 血清型 5 中所发现的相似的外核延伸, 其中第二个 D, D- α -Hep^V 残基本身在 7 位被 β -Gal 残基取代。在 *Pm* 中, 对两个血清型 1 菌株 VP 161 和 X73 的研究揭示了异常的外核延伸, 其中 Hep^{IV} 残基在 4 和 6 位被 β -Gal 残基对称取代, 它们本身又在 3 位被磷酸胆碱部分单取代, 或者除了磷酸胆碱残基, 在 β -Gal 残基的 6 位还具有磷酸乙醇胺残基 (X73)。对基因组测序菌株 *Pm70* 的另一项研究再一次表明 Hep^{IV} 残基在 4 和 6 位被二取代。在 4 位被 β -葡萄糖残基取代, 在 6 位被不常见的戊多糖 α -GalNAc-(1-3)- β -GalNAc-(1-3)- α -Gal-(1-4)- β -Gal-(1-4)- β -Glc 取代。

iii) 可达性: 既然该内核结构在这三个菌种中总是表达, 所以弄清以下问题非常重要, 即是否该内核结构表位总是可接近的并且在构象上是保守的, 而不管外核、O-抗原和其他细胞表面结构如何变异。为实现此目的, 该保守性结构需要被加工成末端结构, 并将糖基转移酶靶向该末端, 以暴露该结构。利用 *Pm* 菌株 *Pm70* 的完全基因组序列以及对该菌株 LPS 结构的完全的了解 (见实施例 3), 可帮助实验中识别负责 *Pm70* LPS 结构的

生物合成的糖基转移酶。也包括第二个 *Pm* 菌株 (P-3480)、两个 *Ap* 菌株 (血清型 1 和 5) 和一个 *Mh* 菌株 (血清型 A1) 这些其他基因组序列, 并利用生物信息学方法识别发生诱变的靶基因。选择 *Mh* 菌株 A1 进行诱变研究, 这是由于在该生物中存在的 O-抗原的量与 *Ap* 相比较低, 因而不会干扰随后的免疫研究。如下所示, 在 a) *Mh* 菌株 A1 和 b) *Ap* 血清型 1 中均鉴别出候选糖基转移酶。



杜克雷嗜血杆菌 (*H. ducreyi*) *lbgA* 半乳糖转移酶基因的同源物 [Tullius, M. V. et al 2002, Infect. Immun. 70: 2853-2861] 已通过 mini-Tn10 转座子发生诱变在 *Ap* 中识别, 它位于涉及核寡糖生物合成的两个基因之间 [Galarneau, C. et al 2000, Pathogenesis, 1: 253-264]。 *Ap* 中相邻的基因 *lbgB* 显示出与来自杜克雷嗜血杆菌的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶的相当大的同源性。使用 *Ap* 的 *lbgB* 基因序列对 *Mh* 基因组序列 (Baylor College, Houston) 进行 Blast 分析, 揭示出在 *Mh* 基因组序列中有两个相邻的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶的同源物。所识别的最佳 *lbgB* 同源物据推测为负责在第一个 L-甘油-D-甘露-庚糖残基 (Hep^I) 的延伸上添加第一个 D-甘油-D-甘露-庚糖残基 (Hep^{IV}) 的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶, 因此我们推测, 第二个同源物 (我们称为 *losB*) 是负责添加第二个 D-甘油-D-甘露-庚糖残基 (Hep^V) 的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶。

利用标准的分子生物学技术使该基因发生突变, 突变株产生的 LPS 经

过结构鉴定显示，已经获得了所靶向的保守性内核结构（见实施例 7）。诱导针对此内核 LPS 结构的 mAb 和 pAb，以检验在这些兽类病原体的一定范围的菌株中此结构的保守性和可达性的程度。所获得的多克隆血清可与这三个菌种 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 中每一种的 LPS 和全细胞发生交叉反应。从一个融合物获得了四种 mAb（G3、G8、E8 和 D8），它们特异性针对 *Mh* 全细胞上所呈现的内核构象。从另一个融合物中获得了三种 mAb（3-4、3-5 和 3-16），它们能够与 *Ap*、*Pm* 和 *Mh* 的所有研究过的菌株的 LPS 发生交叉反应，因而建立了这三种重要的兽类病原体之间共有的保守性交叉反应性 LPS 表位的可能性。由这些 mAb 中的四种（G3、G8、3-5 和 3-16）产生腹水，使用全细胞 ELISA 进行检测，显示由这些 mAb 识别的 LPS 表位在全细胞上是可接近的，从而证明该保守性内核表位在细胞表面上是可接近的。而且，mAb G3 和 G8 在有助于被动保护，表明在体内可接近此内核结构。

iv) 功能性抗体：含有可与所研究的菌种的 LPS 交叉反应的抗体的多克隆血清，以及 mAb G8 和 G3 能够帮助补体介导的 *Mh* 细胞的溶解。在完善的 *Mh* 感染的小鼠模型中进行被动保护研究，显示提供特异性针对 *Mh* 中此保守性内核 LPS 结构的 mAb（G3 和 G8）能够预防疾病。最后，制备了将该保守性糖结构与载体蛋白 HSA 连接的联合疫苗，使用该联合疫苗进行免疫接种后收集小鼠血清，发现该血清可与所研究的这三个菌种的 LPS 和全细胞发生交叉反应。

发明内容

本发明提供适于提供免疫力的疫苗、疫苗组分及其应用，所述免疫力涉及来自兽类细菌性病原体脂多糖（LPS）的 B 细胞活化分子，所述分子包括该脂多糖的内核寡糖部分的一个或多个表位。本文公开的内容识别和表征了兽类细菌性病原体的一定范围的致病分离株的 LPS 上表达的表位，所述致病分离株包括但不必限于胸膜肺炎放线杆菌（*Ap*）、溶血性曼氏杆菌（*Mh*）和多杀性巴氏杆菌（*Pm*）。本文识别了适用于制备疫苗的确定的亚单位抗原。作为疫苗候选物的抗原优选以其自然状态呈现于细菌表面，以使针对该疫苗抗原的免疫应答随后可靶向活生物体。

我们已经发现并制备出所有三种生物体共有的内核 LPS。已显示 LPS 在对这些兽类病原体的每一种都具有免疫力作用，如果 LPS 抗原在构象上保守，那么免疫应答可能会识别同源和异源菌株甚至菌种。

结构分析数据表明，所有这些兽类病原体都有一个共同的保守性内核 OS 结构。因此决定探索基于 LPS 的疫苗的可能性。

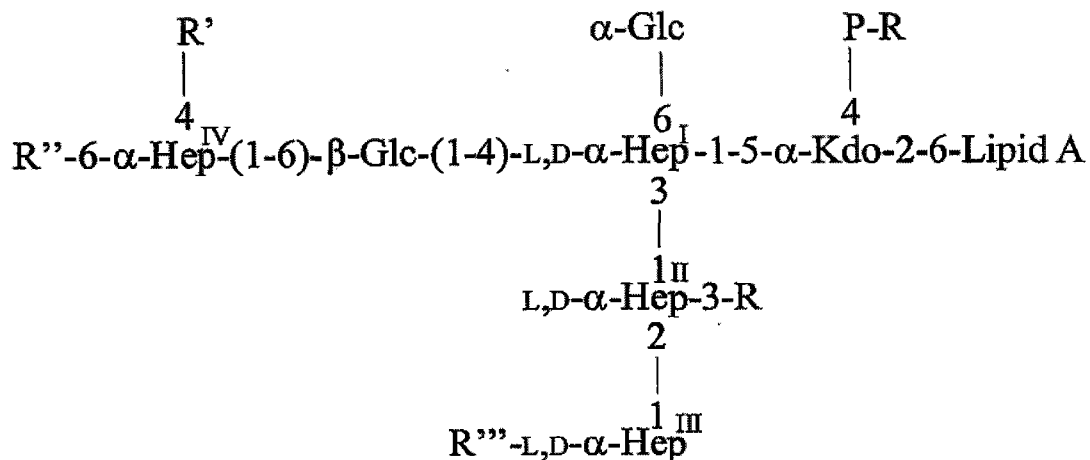
该过程的第一步是构建以末端暴露结构的形式只表达保守性内核 OS 表位的突变株。该研究已经从 *Mh* 菌株 A1 产生 α -1,6-D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶基因的突变体，以便以末端暴露部分的形式呈现保守性内核表位。

诱导针对此内核 LPS 结构的 mAb 和 pAb，以检验在这些兽类病原体的一定范围的菌株中此结构的保守性和可达性的程度。获得了三种 mAb，它们能够与 *Ap*、*Pm* 和 *Mh* 的所有研究过的菌株的 LPS 发生交叉反应，因而建立了这三种重要的兽类病原体之间共有的保守性交叉反应性 LPS 表位的可能性。

全细胞 ELISA 分析显示，这些 LPS 表位可由 mAb 在全细胞上识别，从而证明该内核表位在细胞表面上是可接近的。识别内核寡糖的 mAb 能够帮助补体介导的 *Mh* 细胞的杀菌性溶解。在完善的 *Mh* 感染的小鼠模型中进行被动保护研究，显示提供特异性针对此保守性内核 LPS 结构的 mAb 能够预防疾病。最后，制备了将该保守性糖结构与载体蛋白 HSA 连接的联合疫苗，使用该联合疫苗进行免疫接种后收集小鼠血清，发现该血清可与所研究的这三个菌种发生交叉反应。

一方面，本发明提供一种脂多糖部分，包括不含可变的外核寡糖链延伸的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核。

另一方面，本发明提供一种脂多糖部分，包括具有下列结构 II 的保守性二-葡糖基-四-庚糖基内核部分。



结构 II

其中：-R 是 H 或者磷酸乙醇胺 (PEtn)，P 是磷酸酯，R' 和 R'' 是 H 或者寡糖链延伸，优选不包括 β -D-Galp-(1-7)-D- α -D-Hep-(1-6)，R''' 是

Ap 中可变的 O-抗原, Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸, 脂质 A (Lipid A) 是去毒的。

另一方面, 本发明提供一种为动物宿主提供针对由 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 引起的疾病的保护的免疫原性组合物, 包括上述的脂多糖部分中的一种。

另一方面, 本发明提供 LPS 生物合成途径中至少一种基因在制备 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 的脂多糖中的应用, 用以获得包含上述脂多糖部分中的一种的突变株。

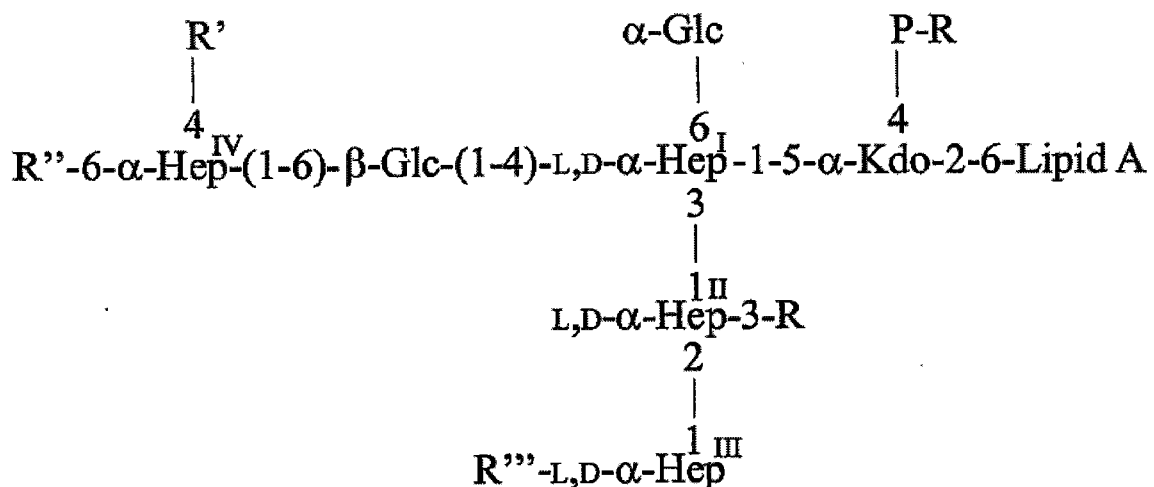
另一方面, 本发明提供至少一种免疫原性表位在诱导针对 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 的功能性交叉反应抗体中的应用, 其中所述表位包括上述脂多糖部分中的一种。

另一方面, 本发明提供一种功能性抗体, 该抗体针对 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 可发生交叉反应, 并且该抗体是由上述的脂多糖部分中的一种诱导的。

另一方面, 本发明提供一种制备针对 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 的功能性交叉反应抗体的方法, 该方法包括: (a) 产生针对上述的脂多糖部分中的一种的抗体, (b) 将抗体针对多种 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 菌株进行测试, (c) 选择可交叉反应的抗体。

另一方面, 本发明提供一种针对由 *Mh*、*Ap* 或 *Pm* 感染导致的疾病对宿主进行免疫接种的方法, 该方法包括将免疫有效量的上述免疫原性组合物给予宿主。

以下保守性内核 LPS 结构已经在 *Mh*、*Ap* 和 *Pm* 中识别。该结构可用作对所有菌株有效的疫苗候选物。所有三个菌种都具有此相同的结构单位这一意外发现, 使得能够基于该保守性结构制备多菌种疫苗。



其中: -R 是 H 或者磷酸乙醇胺 (PEtn), P 是磷酸, R' 和 R'' 是 H 或者

寡糖链延伸, 优选不包括 β -D-Galp-(1-7)-D- α -D-Hep_p-(1-6), R' 是 *Ap* 中可变的 O-抗原, Kdo 是 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸, 脂质 A (Lipid A) 是去毒的。

为了表征各菌种中这些保守性结构而进行的结构分析在实施例 1 (*Mh*)、实施例 2 (*Ap*) 和实施例 3~5 (*Pm*) 中详细叙述。实施例 1 描述了溶血性巴氏杆菌的血清型 A1 LPS 的结构分析。实施例 2 描述了来自几种 *Ap* 血清型的 LPS 的结构分析, 由此首先识别出 *Mh* 和 *Ap* 的内核分子在结构上的亲缘关系。实施例 3 描述了来自 *Pm* 的基因组菌株的 LPS 的结构分析, 由此首先识别了所有三个菌种的内核分子的结构保守性。实施例 4 描述了 *Pm* 菌株 VP161 的 LPS 的结构分析。实施例 5 描述了 *Pm* 菌株 X73 的核寡糖的结构分析。实施例 6 描述了 *Pm* 的 *orfH* 基因、Hep III 到 Hep II 庚糖转移酶的识别。实施例 7 描述了显示出兽类病原体特异性的保守的 LPS 结构的、溶血性曼氏杆菌的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶突变型的产生, 以及针对此 LPS 结构的抗体的开发及其交叉反应性。实施例 8 描述了利用该保守性内核 LPS 分子作为糖部分的糖联合疫苗的产生和研究。实施例 9 描述了使用内核特异性单克隆抗体和多克隆血清获得的杀菌实验数据。实施例 10 描述了使用内核特异性单克隆抗体获得的被动保护实验数据。总的来说, 这些实施例表明, 这些内核脂多糖表位可作为疫苗候选物, 用以预防由 LPS 分子中包含该内核结构的菌种引起的疾病。

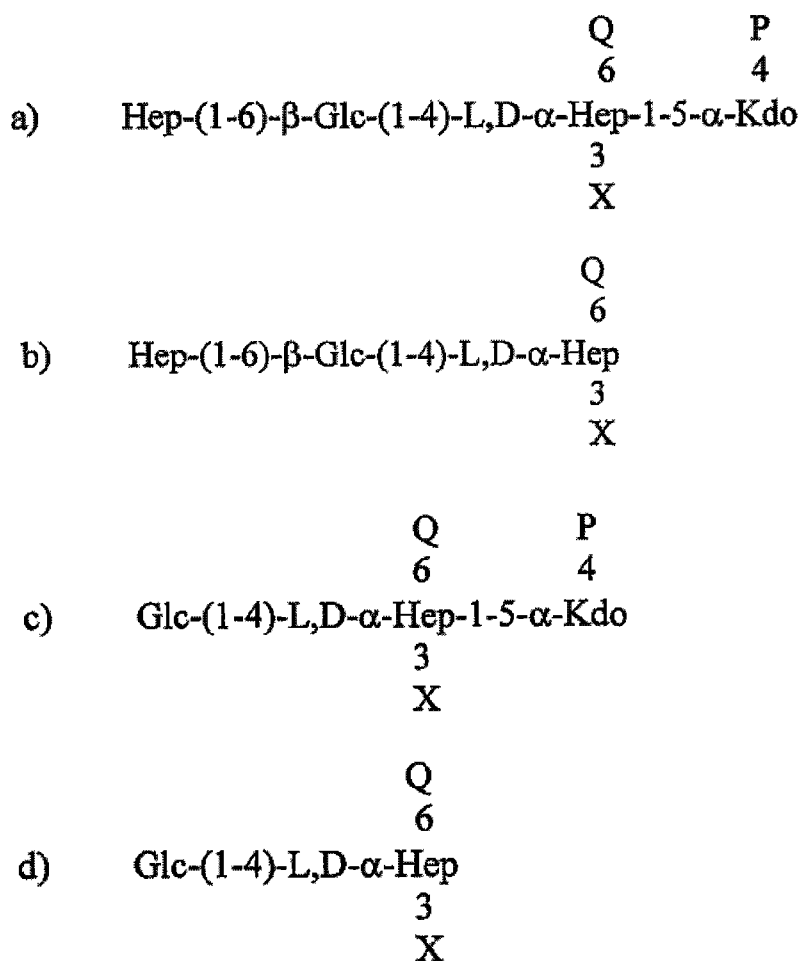
由荚膜多糖构成的疫苗可有效预防由同源的有荚膜细菌引起的人类疾病。由于缺少 T 细胞依赖性应答, 这些糖抗原在人体中的免疫原性通常较差。然而, 通过将特异性多糖抗原与适当的蛋白载体联合, 糖抗原的免疫原性相对于多糖本身可有极大提高。基于 b 型流感嗜血杆菌 (*Hib*) 和 c 型脑膜炎双球菌 (*Neisseria meningitidis*) 的糖联合疫苗 (例如: ProHiBit, MenC) 已经证实可成功控制侵入性 *Hib* 和脑膜炎球菌病。

通常的做法是将保守性内核 LPS 分子以适当的方式与适当的载体分子联合, 以便在对宿主进行免疫接种后诱发期望的免疫应答。

免疫原性载体蛋白优选地选自破伤风毒素/类毒素、白喉毒素/类毒素 (CRM₁₉₇)、去毒的绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*) 毒素 A、霍乱毒素/类毒素、百日咳毒素/类毒素、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 外毒素/类毒素、乙型肝炎表面抗原、乙型肝炎核心抗原、轮状病毒 VP 7 蛋白、呼吸道合胞体病毒 F 和 G 蛋白或者其他适当的载体。

佐剂优选地选自弗氏佐剂、明矾和 Ribi, 或者其他任何制药上可接受的佐剂。

在本发明的一个实施方案中, 提供了一种诱导或增强动物、鱼类或鸟类针对细菌性病原体的免疫力的方法, 包括给予保守性内核 LPS 分子。在一些情况下, 所述细菌性病原体为曼氏杆菌 (*Mannheimia*)、放线杆菌 (*Actinobacillus*) 或者巴氏杆菌 (*Pasteurella*)。在一些实例中, 所述细菌性病原体为感兴趣的兽医中的生物体。给药可通过任何适当的途径进行, 包括注射、施用于粘膜、经皮施用、口服 (优选适当地包衣) 等等。在一些实例中, 内核 LPS 分子与适当的载体分子连接或结合。在一些实例中, 还使用适当的佐剂。在一些实例中, 内核 LPS 与抗菌药或其他免疫激发物共同给药。在一些实例中, 保守性内核 LPS 分子是结构 I 的内核 LPS。在一些实例中, 保守性内核 LPS 分子是结构 II 的内核 LPS, 但没有本文所定义的一个或两个 R 和 R¹。在一些实例中, 保守性内核 LPS 为至少下述一种:



组分标示以 f' 。Hep_I、Hep_{II} 和 Hep_{III} 是 D-D-庚糖。其他残基具有 D-构型。

图 2 显示 A1 的 2D NMR 实验，显示端基异构体区的 HMQC 光谱 (a)，以及端基异构体区和环区的 COSY (b) 和 NOESY (c) 光谱。箭头指示观察到的位于 k5 附近的 b2 共振的位置。

图 3 显示从 A1 的异核 ^1H - ^{13}C 2D NMR 光谱中选出的图。(a) 在环区的 HMQC 光谱中，在可能的地方标出了一些归属。(b) 在 HMQC-TOCSY 光谱中，标出了 C7-H7s-C6-H6、C4-H4-C5-H5 TOCSY 的相关性以及 b2 的相关性。(c) 在 HMBC 光谱中，显示了端基异构体质子共振的 H1-C1-O1-Cx 糖苷间相关性以及残基内相关性。

图 4 显示了识别 A1 中非庚糖残基的 1D 选择实验。(a) 1D TOCSY (a1, 180ms); (b) 1D TOCSY (h1, 180ms); (c) 1D TOCSY (i1 k4, 180ms); (d) 1D NOESY-TOCSY (i1 k4, 400ms; k6 180ms); (e) 1D NOESY-TOCSY (de1, 400ms; g3 k7, 180ms); (f) 1D TOCSY (c1, 180ms); (g) 1D TOCSY j1, 180ms); (h) 1D TOCSY-NOESY (j1, 180ms; j4, 400ms)。由于异质性导致的 f 和 h 的微量组分分别表示为 f' 和 h' 。可用时，第一选择步骤的共振以下划线标出，第二选择步骤的共振以双下划线标出。所选的端基异构体区的共振在光谱左侧标出。

图 5 显示检测 A1 中偶极相互作用的 1D 选择实验。(a)-(f) 分别为 b1、c1、de1、f1、g1 和 i1/k4 的 200ms 混合时间的端基异构体区共振的 1D NOESY 光谱，(g) 为 j1 的 1D ROESY (f1, 500ms)。所选的端基异构体区共振在光谱的左侧标出。

图 6 显示庚糖单糖的质子光谱。D₂O、300K 条件下在 600MHz 的提高分辨率的 D-L-庚糖光谱(a)，及其 α (b) 和 β 形式(c) 的增强光谱。D₂O、300K 条件下在 600MHz 的提高分辨率的 D-D-庚糖光谱(d)，及其 α (e) 和 β 形式(f) 的自旋模拟光谱。端基异构体和 H5- β 共振未知。注意到 H-3、H-4 共振的强耦合和 H-5 共振的虚拟耦合在(b)中可正确地重现。

图 7 显示识别 A1 中庚糖残基的 1D 选择实验。(a) 1D TOCSY-TOCSY (b1, 75ms; b2, 75ms) 以检测 b3、b4 和 b5; (b) 1D TOCSY-NOESY (b2, 150ms; b5, 400ms) 以检测 b5-b6 和 b5-b3 NOE。还要注意由于 b(1-3)d 键引起的强 b5-d2 NOE; (c) 1d TOCSY-TOCSY (de1, 75ms; e2, 75ms) 以检测 e3、

e4 和 e5; (d) 1D TOCSY-TOCSY (d1, 75ms; d2, 75ms)以检测 d3、d4 和 d5; (e) 1d TOCSY-TOCSY (g1, 90ms; g2, 150ms)以检测 g3 到 g5; (f) 1D TOCSY-NOESY (g2, 150ms; g5, 400ms)显示根据 g(1-6)I 键的 g5-g6 和 g5-g3 NOE 以及 g5-i6 NOE; (g) 1D NOESY-TOCSY (f1, 400ms; g6, 180ms)以检测根据 f(1-6)g 键的来自 f1-g6 糖苷间 NOE 的 g7 共振; (h) 1D TOCSY-TOCSY (f1, 90ms; f2, 150ms)以检测直到 H-6 的 f 和 f' 共振。注意 f5 和 f' 5 的清晰的多重峰图谱; (i) 1D TOCSY (f6, 40ms)以检测只是由于较短的自旋锁定时间而导致的 f7 共振。可用时, 第一选择步骤的共振以下划线标出, 第二选择步骤的共振以双下划线标出。所选的端基异构体区共振在光谱左侧标出。

图 8 显示对 A1 的内核庚糖进行 MMC 计算所得的最小能量的构象异构体的分子模型。氧绘成较大的球, 并且去掉了羟基质子。有关的质子被标出。注意观察到了 e-b 分支和 g-i 分支相紧邻, 以及残基 e 的外环链和残基 b 的端基异构体质子相紧邻与远程 NOE 相一致。同时注意到 L-D-庚糖(残基 d、b、e) 和 D-D-庚糖(残基 g) 之间外环链方向的不同。

图 9 显示通过对 A1 的内核庚糖进行 MMC 计算得出的质子间距离^⑥与宏观运动(macro move)的变化, 其中(a)-(g)分别对应 b1-e5、b1-e7、e1-i4、e1-g2、g1-b2、g1-b3。质子间距离出现在 2-4Å 范围内与所观察到的远程 b-e、e-i 和 e-g NOE 相一致。

图 10 显示使用脂质 A 构建的溶血性曼氏杆菌 LPS 的分子模型, 其中所述脂质 A 具有能报道流感嗜血杆菌 LPS 的脂肪酰取代型式。脂质 A 部分和 Kdo 标成灰色, 庚糖标成红色或紫色, 葡萄糖标成绿色, 半乳糖标成蓝色。PO₄基因是黄色。已经去掉了羟基质子。

图 11. Ap 血清型 5a 核心 OS 的阴离子电喷射质谱图。

图 12. Ap 血清型 a) 5a; b) 5b; c) 2; d) 1 的核心 OS 的 ¹H-NMR 光谱的端基异构体区。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录。

图 13. Ap 血清型 5 残基 a) Hep I; b) Hep II; c) Hep III; d) Hep IV; e) Hep V; f) Glc II; g) Glc I; h) Gal I 的核心 OS 的选择性 1D-TOCSY NMR 光谱的环区。字母代表的各残基如实施例 2 的表 2 中所示。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录, 庚糖残基的混合时间是 150ms, 己糖残基的

混合时间是 90ms。

图 14. Ap 血清型 5a 残基 a) Hep III; b) Hep II; c) Glc I; d) Glc II; e) Hep IV; f) Hep V 的核心 OS 的选择性 1D- NOESY NMR 光谱的环区。字母代表的各残基如实施例 2 的表 2 中所示。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25 °C 下记录，混合时间是 400ms。

图 15. 确定 Ap 血清型 5a 的核心 OS 的 O-链 Gal I 残基的位置。a) Gal I 的端基异构体 ¹H-共振的 1D-NOESY NMR 光谱；b) NOESY 步骤中 Gal I 残基的端基异构体 ¹H-共振和 TOCSY 步骤中 Hep III 残基的 H-7 ¹H-共振的 1D-NOESY-TOCSY 光谱；c) TOCSY 步骤中 Hep III 残基的端基异构体 ¹H-共振和 NOESY 步骤中 Hep III 残基的 H-4/H-5 ¹H-共振的 1D -TOCSY-NOESY 光谱。d) ¹³C-¹H-HMBC NMR 光谱的区域，显示 Gal I 和 Glc I 的端基异构体 ¹H-共振的 HMBC。e) ¹³C-¹H-HSQC NMR 光谱的区域，显示 Hep III 的 H-7 ¹H-共振、Hep V 的 H-2 ¹H-共振和 Hep II 的 H-3 ¹H-共振的 ¹³C 交叠峰。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25 °C 下记录。

图 16. Ap 血清型 1 的核心 OS 的阳离子毛细管电泳-电喷射质谱图。产物离子谱来自 m/z 930²⁺。

图 17. 识别 Ap 血清型 1 的核心 OS 的开链 N-乙酰半乳糖胺残基。a) Ap 血清型 1 的核心 OS 的 2D-¹³C-¹H-HSQC NMR 光谱的环区。b) Ap 血清型 1 的核心 OS 的 ¹H-NMR 光谱的环区。c) GalNAc 残基的 H-1 ¹H-共振的 1-D NOESY 光谱。d) GalNAc 残基的 H-4 ¹H-共振的 1-D NOESY 光谱。e) GalNAc 残基的 H-2 ¹H-共振的 1-D NOESY 光谱。f) HexNAc 残基的 H-4 ¹H-共振的 1-D NOESY 光谱。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25 °C 下记录。识别的共振如标注所示(i, GalNAc; j, Gal II)。

图 18. Ap 血清型 1、2、5a 和 5b 的核心寡糖的一个实施方案的结构示意图。对于血清型 1; R 是 α-GalNAc-(1-4, 6)-β-Gal II-(1-3)-β-Gal I, R' 是 H, 其中 o 代表开链构型。对于血清型 2; R 是 β-Glc III, R' 是 D-α-D-Hep V。对于血清型 5a 和 5b; R 是 H, R' 是 D-α-D-Hep V。

图 19. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心 OS 的阴离子电喷射质谱图。

图 20. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心 OS m/z 1246.5²⁺ 的 MS/MS 的阳离子毛细管电泳-电喷射质谱图。

图 21. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心 OS m/z 316⁺的先驱离子扫描的阳离子毛细管电泳—电喷射质谱图。

图 22. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 的完全脱酰 LPS 的 ¹H-NMR 光谱的端基异构体区。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录。残基如实施例 3 表 2 所示标注。

图 23. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心 OS 的 TOCSY 光谱的端基异构体区的一部分。该光谱在 D₂O 中 25°C 下记录。

图 24. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心 OS 的 NOESY 光谱的端基异构体区的一部分。该光谱在 D₂O 中 25°C 下记录。

图 25. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心 OS 的 ¹H-¹³C-HMBC NMR 光谱的端基异构体区。嵌入物 (inset) 是显示 N-乙酰-氨基糖的诊断信号的光谱区。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录。

图 26. 多杀性巴氏杆菌菌株 Pm70 核心寡糖的结构, 显示推测的糖基转移酶。

图 27. *Pm* 菌株 VP161 的 LPS-OH 的阴离子毛细管电泳—电喷射质谱图。a) m/z 992³⁻的产物离子光谱, b) m/z 999³⁻的产物离子光谱, c) m/z 1040³⁻的产物离子光谱。

图 28. *Pm* 菌株 VP161 的核心 OS 的阳离子毛细管电泳—电喷射质谱图。a) m/z 903²⁺的产物离子光谱, b) m/z 984²⁺的产物离子光谱, c) 利用高口压 (orifice voltage) 的 m/z 4242⁺的产物离子光谱。

图 29. *Pm* 菌株 VP161 核心 OS 的 2D-NOESY NMR 光谱区域。字母代表的各残基如实施例 4 的表 2 中所示。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录, 混合时间为 400 ms。

图 30. *Pm* 菌株 VP161 核心 OS 的 2D-¹³C-¹H-HMBC NMR 光谱区域, 显示端基异构体 ¹H-共振 (小写字母) 和环 ¹³C-共振 (大写字母) 的相关性。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录。

图 31. *Pm* 菌株 VP161 核心 OS 的 2D-³¹P-¹H-HSQC-TOCSY NMR 光谱区域, 显示标以 g-1 到 g-4 和 h-1 到 h-4 的半乳糖残基和胆碱共振的 ³¹P-共振 (X-轴) 和 ¹H-共振 (Y-轴) 的相关性。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录。

图 32. *Pm* 菌株 VP161 的完全脱酰 LPS 的 ¹H-NMR 光谱。a) 含一个 Kdo

残基的糖型；b) 含两个 Kdo 残基的糖型。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25℃ 下记录。字母代表的各残基如实施例 4 表 2 所示。* Gal I (g) 和 Gal II (h) 的 H-4 质子共振的低区移位是由于 KOH 处理过程中 PCho 残基的水解和迁移造成的。

图 33. *Pm* 菌株 X73 核心 OS 的阳离子毛细管电泳—电喷射质谱图。a) m/z 1108²⁺ 的产物离子光谱，b) 利用高口压的 m/z 451.5⁺ 的产物离子光谱。

图 34. *Pm* 菌株 X73 核心 OS 的 2D-³¹P-¹H-HMQC-TOCSY NMR 光谱区域，显示 PEtn 和半乳糖残基之间 ³¹P-¹H 耦合当混合时间优化为 10 Hz 时 ³¹P-共振 (X-轴) 和 ¹H-共振之间的相关性。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25℃ 下记录。

图 35. *Pm* 菌株 X73 核心 OS 的 2D-¹³C-¹H-HSQC-TOCSY NMR 光谱区域，显示 ¹³C-共振 (Y-轴) 和 ¹H-共振之间的相关性，表明半乳糖残基的 C-5、C-6、H-5 和 H-6 共振的相关性。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25℃ 下记录。

图 36. 通过对全细胞裂解物进行 SDS-PAGE 和银染色，分析多杀性巴氏杆菌的 LPS。(A) 多杀性巴氏杆菌 LPS 图样的比较：野生型 VP161 (泳道 1)；庚糖基转移酶突变体 AL251 (泳道 2)；对照菌株 AL438 (含有载体质粒 pAL99 的 AL251) (泳道 3) 以及互补的突变株 AL298 (泳道 4)。

(B) 多杀性巴氏杆菌 LPS 图样的比较：糖基转移酶突变体 AL251 (泳道 1)；野生型 VP161 (泳道 2) 以及从 AL251 接种的三只不同的鸡中分离的多杀性巴氏杆菌野生型回复体 (泳道 3、4 和 5)。

图 37. 多杀性巴氏杆菌核心 OS 的阴离子毛细管电泳—电喷射质谱图。(A) 亲株 VP161 核心 OS 的双电荷区域；(B) 突变株 AL251 核心 OS 的单电荷区域。

图 38. 来自 (A) 多杀性巴氏杆菌亲株 VP161 和 (B) 多杀性巴氏杆菌突变株 AL251 的 LPS 核心 OS 的 ¹H-NMR 光谱区域。该光谱在 25℃ 下记录，并以内丙酮在 2.225 ppm 下作为参考基准。

图 39. 多杀性巴氏杆菌 VP 161 核心 OS 的 NOESY 光谱区域。NOE 连接性如图所示。嵌入物：VP 161 内核 OS 结构。该光谱在 25℃ 下记录，并以内丙酮在 2.225 ppm 下作为参考基准。

图 40. 来自 (A) 亲株 VP161 和 (B) 突变株 AL251 的多杀性巴氏杆菌内核

LPS 的推测的结构, 其中 R 是 Glc 上的寡糖链延伸。

图 41. a) 溶血性曼氏杆菌菌株 A1, b) 胸膜肺炎放线杆菌血清型 1 的核心寡糖的结构示意图。表示出外核修饰的第一阶段中起作用的糖基转移酶。

图 42. a) 溶血性曼氏杆菌突变株 *losB* 的 O-脱酰 LPS, 和 b) 使用含 *losB* 基因的 pNF 2176AA*losB* 反向互补的溶血性曼氏杆菌突变株 *losB* 的 O-脱酰 LPS 的阴离子毛细管电泳-电喷射电离质谱图。

图 43. 野生型溶血性曼氏杆菌菌株 A1 和突变株 *losB* 的完全脱酰 LPS 的 2D-TOCSY NMR 光谱区域。各残基的表示如图所示, 并将 *losB* 突变株缺少的外核残基圈出。该光谱在 pH 7.0 的 D₂O 中 25°C 下记录, 混合时间为 400ms。

图 44. 小鼠#1-5 的 D42 多克隆血清的 ELISA (OD₄₀₅) 实验的结果, 该实验针对菌株 *Mh losB* (▲) 和 wt (■) 的纯化的 LPS。小鼠标号如图所示。所有血清稀释液如图所示。

图 45. 九种内核 LPS mAb 的 ELISA (OD₄₀₅) 实验的结果, 该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt, App 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 的 LPS, 以及 *Mh* 和 *Pm* 菌株的 LPS-OH。mAb 标号和稀释液如图所示。

图 46. 小鼠#1、小鼠#2+3、小鼠#4 和小鼠#5 的 D42 多克隆血清的 ELISA (OD₄₀₅) 实验的结果, 该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、App 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP 161 和 X73 的 LPS。小鼠标号如图所示。所有血清以 1:50 的稀释度使用。

图 47. 小鼠#5 的 D152 多克隆血清的 ELISA (OD₄₀₅) 实验的结果, 该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、App 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP 161 和 X73 的 LPS。稀释度如图所示。

图 48. 两种代表性内核 LPS mAb 的废上清液 (spent supernatant) 的 ELISA (OD₄₀₅) 实验的结果, 该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、Ap 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP 161 和 X73 的 LPS。MAb 标号和稀释度如图所示。

图 49. 使用 *Mh losB* KOH 处理的 LPS 的阴离子毛细管电泳-电喷射质谱图。

图 50. *Mh losB*-HAS 结合物的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析。在 12.5%

SDS-PAGE 凝胶上进行电泳，并用稀释度为 $1:10^6$ 的糖特异性 mAb G8 进行印迹和筛选。

图 51. 对 a) HSA; b) HSA-*Mh losB* 糖结合物的 CE-ES-MS 分析。

图 52. 已接种小鼠# V1-V5 和对照小鼠 C6、C8 和 C9 的 D23 多克隆血清的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 的 LPS，该实验用来筛选 IgG 应答 (▲) 和 IgM 应答 (■)。小鼠标号如图所示。所有血清的稀释度如图所示。

图 53. 已接种小鼠# V1-V5 和对照小鼠 C6、C8 和 C9 的 D45 多克隆血清的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 的 LPS，该实验用来筛选 IgG 应答 (▲) 和 IgM 应答 (■)。小鼠标号如图所示。所有血清的稀释度如图所示。

图 54. 多克隆血清 V2 (1:25 diln) 的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、*Ap* 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 的 LPS。

图 55. 多克隆血清 V2 (1:25 diln) 的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、*Ap* 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 的全细胞。

图 56. 多克隆血清 Mh #1 (1:100 diln) 的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、*Ap* 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 的全细胞。

图 57. 多克隆血清 Mh #1 (1:100 diln) 的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt、*Ap* 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 的 LPS。

图 58. 来自 a) mAb G3 和 b) mAb G8 的腹水的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt 的 LPS。

图 59. 来自 a) mAb G3 和 b) mAb G8 的腹水的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh losB* 和 wt; *Ap* 血清型 1 和 5a; *Pm* 菌株 VP161、X73 和 Pm70 的全细胞。

图 60. 来自 a) mAb 3-5 和 b) mAb 3-16 的腹水的 ELISA (OD_{405}) 实验的结果，该实验针对菌株 *Mh wt* 和 *Pm* 菌株 VP161 的 LPS。

图 61. 来自 a) mAb 3-5 和 b) mAb 3-16 的腹水的 ELISA (OD₄₀₅) 实验的结果, 该实验针对菌株 *Mh* wt 和 *losB*; *Ap* 血清型 1 和 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 以及脑膜炎双球菌菌株 L2 *galE* 的全细胞。

图 62. 使用来自 mAb G3 和相应的补体缺陷对照的免疫血清稀释液进行的血清杀菌试验; 其中存活百分率 = [试验的平均#CFU T30 / 只有 *Mh* 的平均# CFU T30] x 100%。

图 63. 使用来自 mAb G8 和相应的补体缺陷对照的免疫血清稀释液进行的血清杀菌试验; 其中存活百分率 = [试验的平均#CFU T30 / 只有 *Mh* 的平均# CFU T30] x 100%。

图 64. 使用来自 *Mh losB* 全细胞免疫的小鼠 (*Mh* #1 D140) 和相应的补体缺陷对照的多克隆血清稀释液进行的血清杀菌试验; 其中存活百分率 = [试验的平均#CFU T30 / 只有 *Mh* 的平均# CFU T30] x 100%。

图 65. 对 a) mAb G3 和 b) mAbG8 腹水进行蛋白 A 柱纯化, 对上柱前后的腹水针对 *Mh* wt 菌株的 LPS 进行 ELISA (OD₄₀₅) 检测。

图 66. 接种后 3 天 (dpi 3) 杀死的 B 组小鼠的肺, 显示在中等大小的支气管管腔中存在中等数量的嗜中性粒细胞。

图 67. 接种后 3 天杀死的 C 组小鼠的肺, 显示可分辨出支气管肺炎, 并在某些区域存在少量的淋巴样细胞。

具体实施方式

实施例 1

本实施例形成了 Can. J. Chem. 80, 1715 (2002) 中出版物的基础。研究溶血性曼氏杆菌血清型 A1。对溶血性曼氏杆菌血清型 A1 的 LPS 的分析表明了 Hex₃Hep₅Kdo 为主要的核心寡糖组分。这是通过以下方法测定的: 对 LPS 样品进行弱酸水解 (1% HOAc, 100°C, 3 h), 对获得的寡糖组分进行 1D 1H NMR 和 FAB-MS 分析。对核心寡糖的糖醇乙酸酯和 2-丁基苷衍生物进行 GLC-MS 分析表明, 在核心寡糖的主要成分中含有 D-葡萄糖、D-半乳糖、L-D-庚糖和 DD-庚糖, 其摩尔比为 2:1:3:2。从甲基化分析中发现 D-Gal 残基为末端非还原性部分, 并且在具有 Hex₂Hep₅Kdo 组成的核心寡糖组分的少数成分中缺失。通过比色分析确定了 Kdo 存在于 LPS 中。

溶血性曼氏杆菌 LPS 先使用无水胼再使用强碱处理, 可生成水溶性脱

酰 LPS 寡糖。脱酰 LPS 样品代表包含核心和脂质 A 寡糖部分的天然材料的完整的主链寡糖。这通过电喷射电离 ESI-MS 证实，该实验给出与 $\text{Hex}_3\text{Hep}_5\text{Kdo}_1\text{HexN}_2 (\text{H}_2\text{PO}_3)$ 对应的分子离子作为主要的寡糖组分（见实验部分）。

在质子光谱（图 1）以及 HMQC 和 COSY 光谱（图 2）中，观察到 10 个端基异构体 ^1H NMR 共振和亚甲基质子共振。对端基异构体共振，按其 ^1H NMR 化学位移的降序标以 a-j，Kdo 的亚甲基质子标以 $k3_{\alpha}$ 和 $k3_{\beta}$ 。b1 和 de1 和 j1 端基异构体峰的积分比其他端基异构体共振峰的积分少 40%，证实了在该样品中的异质性。在 h1 附近 4.91 ppm 处出现了低磁场双峰（downfield doublet），说明在 h1 也有一些异质性。

进行了标准的同核和异核 2D-NMR 分析。从图 2 的 COSY 光谱中可确定 H-2 共振的位置。认识到对于残基 b、d、e、f 和 g 来说， $J_{1,2}$ 很小，具有甘露-庚糖的特点，2D-TOCSY 不可能用于从 H-1 经 H-2 转移磁化。从图 3 的 HMQC 光谱中看出，庚糖残基的 H-2 与其他共振重叠，使得 2D-TOCSY 难以对这些残基进行分析。2D-NOESY 光谱还显示 NOE 数异常高，特别是对于 b1、de1 共振。在端基异构体区也有几个共振相互重叠。因此，由于光谱的复杂性和该样品的异质性，使用 1D 选择方法来提取光谱参数，该光谱参数无法使用标准的 2D 方法获取，从而能够对结构和构象分析进行解析。HMQCTOCSY 和 HMBC 实验对于进行完全识别，特别是庚糖单元的完全识别也非常重要。使用该方法，就可能对较大的主链寡糖（A1）的 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学位移进行完全识别（实施例 1，表 1）。

从以前的研究中已经知道了 Kdo-GlcN_{II}-GlcN_I 序列和部分识别，并与此处所做的识别相一致。对残基 a 和 h 进行 1D-TOCSY 使得能够识别共振，测量质子耦合常数（图 4a, 4b）。磷酸酯基的位置通过以前做的 ^{31}P HMQC 实验验证。然后从 HMQC、HMQC-TOCSY 和 HMBC 光谱中识别 ^{13}C NMR 化学位移。该信息使得可将残基 a 和 h 确定为脂质 A 部分的 α -D-GlcN 和 β -D-GlcN 吡喃糖基单元。多数质子、 ^{31}P 和 ^{13}C NMR 化学位移与先前在相似的结构元件中报道的类似。在 h1 的 1D-TOCSY 中，3.62 ppm 处的 h'5 峰是由于 Kdo-(2-6)- β -D-GlcN_{II} 糖苷键的水解导致的。在溶液中几个月后，该键完全水解，分别在 3.82 和 3.92 ppm 处出现 h'6 和 h'6。还发现 3.91 ppm 处

清晰的端基异构体信号是由该二糖的 h' 1 导致的。

对于 Kdo, H-4 和 H-5 共振从选择激发 H-3_{eq} 或 H-3_{ax} 的 1D-TOCSY 实验中识别。由于在 C-4 处有一个磷酸酯基, H-4 共振向低磁场区位移, 这通过 ³¹P HMQC 验证。较小的 $J_{5,6} < 1$ Hz 阻止了 TOCSY 经 H-5 转移 (图 4c)。然而, 在图 2c 的 k4 和 k6 之间观察到强 NOE, 这与 Kdo 的 X 射线结构一致。使用 1D NOESY-TOCSY (k4, k6) 完成识别 (图 4d)。如后所示, 对于 HepI-(1-5)-Kdo 键, 还观察到 d1-k7 NOE, 这是 Kdo 在 C-5 处被取代的特点。使用该 NOE, 从 1D-NOESY-TOCSY (d1, k7) 中检测到的 Kdo 共振 (图 4e) 具有与前面实验中所发现的相同的化学位移和相似的多重峰图样, 因而证实了 Kdo ¹H NMR 识别。然后从 HMQC 光谱中得到 Kdo 的 ¹³C NMR 识别, 并从 HMQC-TOCSY 光谱中验证。

残基 i 确定为 6-取代的 β-D-葡萄糖, 记为 Glc_I。残基 i 的端基异构体共振与 Kdo 的 H-4 共振重叠。在这两个重叠共振的 1D-TOCSY 中可以区分出残基 i 的共振, 因为 Kdo 的 $J_{5,6}$ 耦合常数很小 (图 4c)。可以检测高达 H-6 的所有共振, 并且可以测量这些多重峰的耦合常数。由于其 β-D 构型, i1-i3 和 i1-i5 NOE 也在 NOESY 光谱中被观察到 (图 2 和图 5f)。然后从 HMQC 光谱中获得了 Glc_I 的 ¹³C NMR 识别, 并使用 HMQC-TOCSY 光谱验证。通过与末端葡萄糖的化学位移相比, 对于 C-6 共振观察到 3.7 ppm 的背化低磁场区位移, 表明它在该位置被取代。对于 C-5 也观察到 -2.2 ppm 的明显位移。关于 C-5-C-6 键的旋转异构体分布可从图 5f 中 i1-i5 NOE 中所观察到的 H-5 多重峰确定。很明显, $J_{5,6}$ 和 $J_{5,6'}$ 都有 <2 Hz 的较小的值, 因为 H-5 多重峰似乎是由 10 Hz 的较大的 $J_{4,5}$ 耦合主导的双峰。这表明 H-6 和 H-6.' 都与 H-5 邻位交叉, 06-C6-C5-O5=-60° 的旋转异构体优选在溶液中。

残基 c 确定为末端 α-D-葡萄糖, 记为 Glc_{II}。从 c1 的 1D-TOCSY (图 4f) 中, 可检测到高达 H-5 的共振, 基于测量的质子耦合常数, 表明残基 c 为 α-葡萄糖。从 HMQC 光谱以及与末端葡萄糖模型化合物的化学位移相比, 可完成所有的 ¹H 和 ¹³C NMR 识别。

从 j1 的 1D-TOCSY 中分辨出末端半乳糖, 残基 j, 记为 Gal, 并且观察到高达 H-4 的共振 (图 4j)。为了通过较小的 $J_{4,5}$ 耦合常数并且分辨出 H-5, 进行了 1D-TOCSY-NOESY (j1, j4) (图 4h)。从 HMQC 光谱以及与末

端半乳糖模型化合物的化学位移相比，可完成所有的 ^1H 和 ^{13}C NMR 识别。

为了归属庚糖残基，合成了模型化合物以获得准确的 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学位移和 $J_{\text{H,H}}$ 值。这些对于通过化学位移比较而归属末端庚糖单元来说非常重要。而且，一旦苷化，取代碳的 ^{13}C NMR 共振会有显著的低磁场苷化位移。D-D-庚糖和 D-L-庚糖的质子光谱示于图 6。在溶液中，每种化合物都存在 α 和 β 形式。使用 1D-TOCSY 实验识别它们的 ^1H NMR 光谱。为获得准确的耦合常数和化学位移，进行了质子光谱的自旋模拟。模拟的光谱示于图 6。模拟的光谱精确再现了所观察到的光谱，特别是 D- α -L-庚糖中 H-3-H-的强耦合（图 6b）。使用 HMQC 识别 ^{13}C NMR 化学位移。庚糖单糖的 NMR 数据在实施例 1，表 2 中给出。L-D-庚糖的化学位移与 D-L-庚糖相同，因为它们互为对映异构体。

在 TOCSY 实验中，从 A1 中残基 b、d、e、f 和 g 的较窄的端基异构体共振中可将它们识别为庚糖，这是由于 $J_{1,2}$ 耦合较小，并且缺乏磁化从 H-1 向 H-2 的转移。A1 中所有的庚糖具有 α -D 构型，因为唯一的来自 H-1 的残基内 NOE 是到 H-2 的（图 2）。使用 1D-TOCSY-TOCSY (H-1, H-2) 来识别所有的庚糖残基。由于 1.8 Hz 的较小的 $J_{1,2}$ 值，因而阻碍了磁化从 H-1 转移至 H-2 并进一步转移的第一个 TOCSY 步骤。然而，由于 3 Hz 的较大的 $J_{2,3}$ 值，在 H-2 上的第二步可将磁化进一步转移至更高的自旋上。然而，对于 L-D-庚糖，磁化转移停留在 H-5，这是由于 1.6 Hz 的较小的 $J_{5,6}$ 值。对于 D-D-庚糖，磁化转移阻碍较小，这是由于 3.2 Hz 的较大的 $J_{5,6}$ 值。然而，松弛效应也可阻碍磁化转移，不能使用缺少 H-5 上的转移作为 L-D-庚糖识别的证据。

残基 b 确定为 2-取代的 L- α -D-庚糖，记为 Hep_{II}。1D-TOCSY-TOCSY (b1, b2) 辨别出 3.64 ppm 和 3.9 ppm 处的共振（图 7a）。3.64 ppm 处的多重峰图样是 H-5 共振的指示，而在 3.9 ppm 处的多重峰图样与单糖中观察到的强耦合的 H-3 和 H-4 共振相似（图 6b）。为了辨别 H-6，进行了 1D-TOCSYNOESY (b2, b5)（图 7b）。在 b2 的第一个 TOCSY 步骤中，a6 共振也被照射，但第二步只选择 b5 共振。b2 的 NOE 在 b3 和 b6 上，以及在 d2 上的残基间 NOE 中也被观察到。一旦 b6 位置确定后，使用 C-7-H-7_s-C-6-H-6 的 HMQC-TOCSY 来识别 H-7 和 H-7.' 共振（图 3b）。然后从 HMQC 光谱中获得其他共振的识

别, 并从 HMQC-TOCSY 和 HMBC 光谱验证 (图 3)。将化学位移与 L- α -D-庚糖的化学位移相比, 表明 C-2 有 9 ppm 的低磁场位移, C-3 有 -0.8 ppm 的高磁场位移, 表明在 C-2 处有取代。C-4 到 C-7 的化学位移在单糖化学位移的 0.6 ppm 之内。

残基 e 确定为末端 L- α -D-庚糖, 记为 Hep_{III}。虽然 d1 和 e1 共振重叠, 但是由于它们的 H-2 共振不重叠, 所以没有关系。1D-TOCSY-TOCSY (de1, e2) 辨别出 e3、e4 和 e5 自旋 (图 7c)。在图 5a 中的 b1 NOE 中, 还观察到 e5 共振。1D 选择实验的高数字分辨率使得能够由观察到它们的多重峰图样而将不同实验中的共振准确匹配。图 5a 中还观察到 b1-e7 和 b1-e7.' NOE。如后文所示, 这些 NOE 是由 b1 质子与 e5 以及 e7 和 e7' 质子紧邻所导致。在 C-7-H-7s-C-6-H-6 的 HMQC-TOCSY 中可确定 H-6 共振的位置。¹H 和 ¹³C NMR 识别可使用 HMQC 和 HMQCTOCSY 完成。残基 e 的 ¹H 和 ¹³C NMR 化学位移与 L- α -D-庚糖相似。

残基 d 确定为 3, 4, 6-三取代的 L- α -D-庚糖, 记为 Hep_I。1D-TOCSY-TOCSY (de1, d2) 在 4.17 ppm 处辨别出窄多重峰, 在 4.01 ppm 处辨别出较宽的多重峰 (图 7d)。4.01 ppm 和 4.17 ppm 处的多重峰 (d2) 在 b1 的 1D-NOESY 中也被观察到 (图 5a)。4.17 ppm 处的共振在 i1 的 1D-NOESY 中也被观察到 (图 5f)。在 HMQC 光谱中, 在 (δ_c , δ_h) (74.9, 4.17), (72.5, 4.17) 处辨别出两个窄交叉峰, 在 (75.3, 4.01) 处辨别出一个宽交叉峰。HMQC-TOCSY 相关性在这些交叉峰之间也可观察到。将 ¹³C NMR 化学位移与实施例 1, 表 2 中的 α -D-庚糖吡喃糖的化学位移相比, 可明显看出 (74.9, 4.17) 和 (75.3, 4.01) 处的交叉峰经历了 ¹³C NMR 低磁场苷化位移。由于这三个交叉峰来自 d3、d4 或 d5, 只有 d5 交叉峰不会经历大的苷化位移, 因为庚糖上的取代不会发生在 C-5 处。因此, (72.5, 4.17) 处的交叉峰被识别为 (C-5, H-5)。基于 HMBC (d3, d1) 和 (d3, b1) 的相关性, (75.3, 4.01) 处的交叉峰被识别为 (C-3, H-3)。因此 (74.9, 4.01) 处的交叉峰被识别为 (d4, d1), 与所观察到的 HMBC (d4, i1) 相关性和 (i1, d4) NOE 相一致 (图 3 和图 5f)。从 i1 的 1D-NOESY 可识别 d6 共振, 这是因为只有残基 d 是 L-D-庚糖时, 对于 GlcI-(1-4)-HepI 键, 也可以预期观察到对 H-6 的强 NOE。d6 共振在 c1 的 1D-NOESY 中也可观察到 (图 5b)。从 HMQCTOCSY

(C-7, H-6)交叉峰(图3)和1DNOESY-TOCSY (i1, d6) (未显示), 确定 H-7 和 H-7.' 共振的位置。将化学位移与 L- α -D-庚糖的化学位移相比, 表明 C-3、C-4 和 C-6 分别有 3.9、7.9 和 11.6 ppm 的低磁场苷化位移。

如下所示, 由于分支庚糖的异质性(图1), 应该存在 4,6-二取代的 L- α -D-庚糖(d')。从端基异构体区的 HMQC 和 COSY 光谱中, 由于与其他共振重叠, 不能观察到 H-1 或 H-2 的单独的信号。据推测, d' 1 的质子化学位移与 d1 的相同, d' 2 的化学位移与 e2 的相似。

残基 g 确定为 6-取代的 D- α -D-庚糖, 记为 Hep_{IV}。1D-TOCSY-TOCSY (g1, g2) 识别出 g3、g4 和 g5 自旋(图7e)。3.94 处的多重峰图样是 H-5 共振的标志。为了辨别 H-6, 获得了 1D-TOCSY-NOESY (g2, g5) (图7f)。来自 g2 的 NOE 在 g3 和 g6 上, 以及在 i6 上推测的残基间 NOE 上被观察到。一旦确定 g6 的位置, 就可使用 C-7-H-7s-C-6-H-6 的 HMQC-TOCSY (图3b) 和 1D-NOESY-TOCSY (f1, g6) (图7g) 来识别 H-7 和 H-7.' 共振。然后, 对其他共振的识别可从 HMQC 光谱获得, 并使用 HMQC-TOCSY 光谱验证(图3)。在 1D-NOESY (f1) 中, 观察到 g6 和 g5 共振(图5d)。从分子模型研究中可得, 只有当残基 g 是 D-D-庚糖时 NOE f1-g5 NOE 才有可能(见下文)。将化学位移与 D- α -D-庚糖的化学位移相比, 表明 C-6 具有 4.3 ppm 的低磁场位移。

残基 f 确定为 7-取代的 D- α -D-庚糖, 记为 Hep_V。1D-TOCSY-TOCSY (f1, f2) 识别出高达 f6 的自旋, 表明残基 f 为 D-D-庚糖。f5 多重峰图样相当清晰。从 f6 开始的 1D-TOCSY 中辨别出 f7 和 f7' 共振。然后, 从 HMQC 光谱中获得了 ¹³C NMR 识别, 并使用 HMQCTOCSY 光谱验证。将化学位移与 α -D-D-庚糖的化学位移相比, 表明 C-7 具有 8.8 ppm 的低磁场位移。只检测到末端 D- α -D-庚糖(记为 f'), 这是由于在该键位置的异质性所导致的。如在 1D-TOCSY-TOCSY (f1, f2) 中所示, 可检测到 f' 5 和 f' 6 共振, 以及 HMQC 和 HMQC-TOCSY 光谱中的交叉峰, 该交叉峰对应于末端 D- α -D-庚糖的交叉峰, 后者又与实施例 1, 表 2 中的 D- α -D-庚糖的交叉峰相似。

从图 5 所示的端基异构体共振的 1D-NOESY 光谱以及端基异构体质子共振的 HMBC 光谱(图3c), 可建立核心寡糖的序列。残基间 NOE 也在图 7b 和 7f 所示的 1D-TOCSY-NOESY 实验中观察到。结果列于实施例 1, 表 3

中, 结构显示于图 1 中。从端基异构体共振的整合和新共振随时间的出现, 可确定存在异质性的键位置。k(2-6)h 和 b(1-3)d 键在 pH 为 3 的溶液中经历数月可水解, 而 j(1-7)f 键是稳定的。

观察到异常多的远程 NOE, 跨越多达五个连续的残基。对于 α -D 糖, 预期 H-1-H-2 残基内 NOE。对于 β -D-糖, 预期 H-1-H-3 和 H-1-H-5 残基内 NOE。对于 (1-x) 键, 预期 H-1-C-1-O-1-C-x-H-x 糖苷间 NOE。还可出现在 H-x \pm 1 和 H-x \pm 2 上的两个键接的糖之间的残基间端基异构体 NOE。其他不靠近糖苷键的残基间 NOE 被认为是远程 NOE, 如实施例 1, 表 3 所列。

为了解释大量的远程 NOE, 使用 Metropolis Monte Carlo (MMC) 方法进行构象分析, 以改变糖苷键角度, 对分子的多重构象进行取样。使用该方法, 对于在还原性末端具有 Kdo 的内核寡糖来说, 发现所有观察到的远程 NOE 可解释为 e-b 分支与 g-i 分支的紧邻。这些远程 NOE 可能是由于 Hep_I 上三个分支点带来的内核残基的限制导致的。

通过计算获得的最小能量构象异构体示于图 8。从这些坐标测得的各种质子间距离在实施例 1, 表 3 中给出。如所观察到的那样, 多数 NOE 的存在可解释为较短的质子间距离。g1-b2 和 g1-b3 的远程 NOE 与图 8 所绘分子模型中获得的距离不一致。尽管有 (3, 4, 6)-Hep_I 取代模式的限制, 但是糖苷键也有柔性, 这一点必须考虑。如图 9 所示, 对于 g1-b2 和 g1-b3 距离, 选取了与观察到的 NOE 相一致的具有短质子间距离的多种构象。相同的情况可应用于所有其他远程和残基间 NOE。g1-b2 和 g1-b3 和 e1-i4 的远程 NOE 跨越四个残基, 具有约三个糖苷 (ϕ , ψ) 角总共 6 df 的移动性。e1-g2 和 e1-g3 之间跨越五个残基(e-b-d-i-g)的远程 NOE 变化程度更大, 这是由于具有 8 df 的糖苷角, 还没有考虑 g(1-6)i 键中的 C-5-C-6 键可能的柔性。b1-e5、b1-e7 和 b1-e7.' 取决于 e(1-2)b 糖苷键的移动性和残基 e 的 C-6-C-7 的旋转。在所有情况下, 具有短质子间距离的多重构象的出现与所观察到的残基间和远程 NOE 是一致的。

本研究中已经证实, 溶血性曼氏杆菌 A1 LPS 分子的脂质 A 区含有双-4, 4'-磷酸化 β -1, 6 连接的 D-葡糖胺二糖部分。与该二糖相连的脂肪酰基的性质和取代型式未见报道。完全酰化的 LPS 分子组成了细菌膜外层的多数小叶, 在保持膜完整性方面起重要作用。该分子的单糖部分通常向外延

伸，离开细菌膜所确定的平面。LPS 寡糖部分在毒力方面起重要作用，并参与诱导宿主免疫应答。为了获得该 LPS 分子的核心寡糖和膜锚定的脂质 A 区的相对大小和方向的直观印象，使用在相关生物即流感嗜血杆菌中发现的脂质 A 脂肪酸取代型式构建了分子模型。该模型示于图 10 中。据报道，流感嗜血杆菌脂质 A 具有六个脂肪酰基，其中还原性葡糖胺残基的酰胺基 (C-2) 和 C-3 羟基被 3-羟基十四烷酸酰化，而非还原性残基的 C-2.' 酰胺和 C-3.' 羟基被 3-十四酰氧十四烷酸酰化。如图 10 所示，由于内核提供了相当刚性的结构，单糖部分从确定细菌膜平面的脂质 A 部分伸出。末端残基特别是末端 Gal 残基可观察到更大的移动性。在图 2 的 NOESY 光谱中，没有观察到与该残基的移动性增加相一致的端基异构体共振 NOE。

已发现几种 LPS 的核心结构为高度分支的，这可以导致该内核的清晰的构象。在先前的研究中，发现卡他莫拉菌 (*Moraxella catharrhalis*) 的 LPS 采用了异常的构象，其中可观察到非常罕见的反构象异构体 (anti conformer)。对于该 LPS 分子中高度分支的 3, 4, 6-三取代的 D-葡萄糖残基，检测到 β -D-Glcp-(1-4)-DGlcp 与分支的葡萄糖单元键接的双面角 (C-1'-O-1'-C-4-H-4) 接近 180° 。

本研究结果提供了溶血性曼氏杆菌血清型 A1 的 LPS 核心寡糖区结构的详细图示。我们在前面已经说明，溶血性曼氏杆菌 LPS 的寡糖区在小鼠、绵羊和牛中均有免疫原性，并且 12 种溶血性曼氏杆菌血清型中的 8 种 (即血清型 A1、A5、A6、A7、A8、A12、A14 和 A16) 具有相同的核心寡糖决定簇。血清型 A1 和 A8 的核心寡糖显示几乎相同的 ^1H NMR 光谱，证明存在共有的基本结构。从本研究结果可明显看出，由溶血性曼氏杆菌血清型 A8 产生的 O-链缺陷型 LPS 在核心寡糖中缺少末端 Gal 单元，该残基可能为 O-链附着提供位点。对溶血性曼氏杆菌血清型之间 LPS 结构差异的理解可提供针对溶血性曼氏杆菌牛巴氏杆菌病 (pasturellosis) 的疫苗的基础。血清型 A1 是导致该病的主要微生物，占全球牲畜总死亡数的 30%。在疫苗制剂中使用毒力弱的血清型或其抗原可提供有效的疾病治疗手段。

实施例 1 的实验

从溶血性曼氏杆菌制备 LPS

从 Veterinary Infectious Diseases Organization (VIDO),

Saskatoon, SK, Canada 获得溶血性巴氏杆菌（溶血性曼氏杆菌）血清型 A1 (NRCC 4212)。从发酵罐培养的细菌培养物中通过热酚溶液法 (Severn et al. Carbohydr. Res. 240, 277 (1993)) 提取和纯化 LPS。

LPS 脱酰产生主链寡糖

如先前在 Severn et al. J. Bacteriol. 178, 1731 (1996) 中所述, 通过修改 Holst et al 的脱酰方法, 制备主链寡糖。在环境温度下使用无水肼处理 (20 mL, 37°C, 30 min) 样品 (400 mg), 从 LPS 的脂质 A 除去酯结合的脂肪酸。向冷却的反应混合物 (0°C) 中加入丙酮 (三倍体积) 破坏多余的肼。离心 (5000 rpm, 10 min) 分离沉淀的 O-脱酰 LPS 产物, 用丙酮洗涤, 并冻干水分。在 KOH 水溶液 (4 M, 10 mL) 中加热 O-脱酰样品 (200 mg), 100°C 持续 20 h, 除去 N-酰基。将反应混合物冷却 (0°C), 使用 4 M HCl 中和, 离心 (12 000×g, 30 min) 除去沉淀的脂肪酸。上清液在具有 500 分子量截留膜的 Amicon 浓缩室 (concentration cell) (Amicon; YC05) 中过滤, 并使用去离子水洗涤, 直到洗脱液中不含氯离子 (使用 AgNO₃ 溶液测量)。将透析材料冻干, 得到脱酰 LPS (约 80 mg)。在 DEAE A-25 上通过阴离子交换色谱纯化寡糖。主链寡糖组分 (约 50 mg) 在阳离子 ESI-MS 中显示为 m/z 1124.8 的双电荷离子, 并作为与 Hex₃Hep₅Kdo HexN₂(H₂PO₃)₃ (M, 2246.9) 组合物相对应的主要离子。双电荷离子的 MS-MS 在 m/z 500 (HexN₂(H₂PO₃)₂) 和 801 (KdoHexN₂(H₂PO₃)₂) 处产生特征性片段, 它们分别对应于脱酰脂质 A 和 Kdo-P 取代单元。

D-甘油-L-甘露-庚糖

在碱性乙醇 (alkaline methanol) 中使用硝基甲烷缩合 D-半乳糖, 制备庚糖。将从去离子产物 (mp 158°C, 产率 21%) 的水溶液中获得的结晶 1-脱氧-1-硝基-D-甘油-L-甘露-庚醇转化为其钠盐。该溶液使用稀硫酸 (35°C) 处理后, 再使用 Rexyn 101 (H⁺) 和 Amberlite A4(OH⁻) 离子交换树脂去离子化, 然后冻干生成糖浆形式的庚糖 (产率 80%)。通过纤维素柱色谱分级产物, 以丁-1-醇-水 (1:10 v/v) 作为洗脱剂。含庚糖的组分减压浓缩干燥。具有 [α]_D-14° (c 0.2, 水) 的 D-甘油-L-甘露-庚糖通过纸色谱法纯化, 其在 GLC 上的还原 (NaBH₄) 和乙酰化产物具有单峰, 保留时间与真正的庚-O-酰基-D-甘油-L-甘露-庚醇相对应, 由此确定其纯度。

D-甘油-D-甘露-庚糖

从 D-阿卓糖制备庚糖，使用硝基甲烷缩合，生成 1-脱氧-1-硝基-D-甘油-D 甘露-庚醇 (mp 109°C, $[\alpha]_D -7.0^\circ$ (c 1.1, EtOH), 产率 27%)，其钠盐水溶液缓慢滴加至保持在 0°C 并不断搅拌的 20% (v/v) 硫酸中，转化为 D-甘油-D-甘露-庚糖。反应混合物使用饱和 Ba(OH)₂ 中和，过滤，经过 Rexyn 101 (H⁺) 和 Duolite A4 (OH⁻) 树脂除去残留的离子物质，浓缩成糖浆 (产率 92%)。纸色谱显示，庚糖产物中混有阿卓糖和未变化的 1-脱氧-1-硝基-D-甘油-D-甘露-庚醇 (约 2 到 3%)。该产物通过纤维素柱层析纯化，使用丁-1-醇-水 (1:10 v/v) 作为流动相。D-甘油-D-甘露-庚糖具有 $[\alpha]_D +22^\circ$ (c 2, MeOH)。在 GLC 上还原 (NaBH₄) 和乙酰化的样品产生单峰，对于真正的庚-0-酰基-D-甘油-D-甘露-庚醇，表明了合成庚糖的身份和纯度。

电喷射质谱

在装有电喷射离子源的 VG Quattro 三级四极质谱计 (Micromass, Manchester, U. K.) 上分析样品。主链寡糖溶于含 0.5% 乙酸的乙腈-水 (约 1:2 v/v) 中。注入体积为 10 μ L, 流速设置为 4 mL min⁻¹。电喷射的触点电压 (tip voltage) 通常为 2.7 kV, 质谱计从 m/z 50 到 2500 进行扫描, 扫描时间为 10 s。对于 MS-MS 实验, 使用第一级四极选择先驱离子, 在只有 RF 的四极室中使用氩碰撞活化的碎片离子通过扫描第三级四极进行质谱分析。碰撞能量通常为 60 eV (参考实验框架)。

核磁共振

使用标准软件, 在 Bruker AMX 600、AMX 500 或者 Varian Inova 600 光谱仪上生成 NMR 光谱。所有的测量均在 300 K 和 pH 3 下进行, 包括 10 mg 样品, 溶于 0.6 mL D₂O 中。测量在 pH 3 下进行是为了提高质子光谱的分辨率, 如先前的做法 (Cox, 1996)。

丙酮在 2.225 ppm 用作 ¹H 光谱、在 31.07 ppm 用作 ¹³C 光谱的内标或外标。标准的同核和异核相关的 2D 技术被用于核心寡糖的常规识别: COSY、TOCSY、NOESY、三级量子同核相关实验、HMQC、HMQC-TOCSY 以及 HMBC 和 ³¹P HMQC。使用标准的 Varian 软件进行庚糖单糖的自旋模拟。从用于进行自旋模拟的参数而不是从光谱的峰值列表中获得准确的化学位移和耦合常

数。

进行选择性的 1D-TOCSY、1D-NOESY、1D-TOCSY-TOCSY、1D-TOCSY-NOESY 和 1D-NOESY-TOCSY 实验来进行完全的残基识别以及确定 f 残基间 ^1H - ^1H 核 Overhauser 增强。用于描述 1D 选择序列的应用的术语是 1D EXP (自旋, 混合时间) 和 1D EXP1-EXP2 (自旋 1, 混合时间; 自旋 2, 混合时间), 其中 EXP、EXP1 和 EXP2 代表 TOCSY 或 NOESY。另外, 在图中, 所选共振用下划线标出。标有双下划线的共振表示该共振被选为第二选择步骤。如图 1 所示, 所有的残基标以字母, 自旋标以原子数, 所以 a1 是指残基 a 的 H-1 共振。

在 AMX 光谱仪上, 通过半高斯脉冲实现选择激发。用于 TOCSY 的混合时间取决于自旋系统。通常 30 到 180 ms 范围的混合时间 (自旋锁定时间) 可用于识别该自旋系统。1D-NOESY 的混合时间取决于糖苷键的分子和内部运动的相关时间。NOESY 混合时间在 150 到 400 ms 范围内。为检测末端 Gal 残基的残基间 NOE, 以 500 ms 的混合时间进行 1D-ROESY 实验。对于双重选择实验, 选择脉冲要尽可能短, 以避免由于松弛效应而导致的信号强度损失。每部分一次优化一个。1D-TOCSY 可进行几分钟左右。1D-NOESY 花费几分钟到几小时, 这取决于 NOE 的大小。某些双重选择实验要花费高达 12 h。1D-TOCSY-TOCSY 和 1D-TOCSY-NOESY 最有效。由于样品随时间而降解, 有些实验还在 Inova 600 光谱仪上进行以利用脉冲场梯度。

分子模型

使用先前所述的 Metropolis Monte Carlo 方法 (Peters et al. *Carbohydr. Res.* 238, 49 (1993)) 进行构象分析。使用 PFOS 电势。使用来自量子化学程序性交换 (Quantum Chemistry Program Exchange, QCPE) 的 MM3 获得单糖的最小化坐标。使用每种二糖的最小能量构象作为起始构象。从还原端的 Kdo 开始, 对各种寡糖进行计算, 一直到完整的结构。对于内核辛糖, 使用 5×10^4 的宏运动 (macro move), 糖苷键的步长为 5, 温度为 1×10^3 K, 导致接收比为 0.36。使用最小能量构象异构体生成内核辛糖的分子模型。从每一种宏运动所保存的坐标中提取距离。使用脂质 A 结构和 Kdo 键的最小能量构象异构体生成带有脂质 A 的完整 LPS。使用 E. Keeler, University of Freiburg, Germany 的 Schakal97 来完成分子图。

表1. 溶血性曼氏杆菌（溶血性巴氏杆菌）血清型A1 LPS的核心寡糖组分的NMR化学位移 (ppm)

残基	δ_c δ_H	C-3		C-2 H-2		C-4		C-5		C-6		C-7		C-8	
		H-3	H-3'	C-1 H-1	C-2 H-2	H-4	H-4'	H-5	H-5'	H-6	H-6'	H-7	H-7'	H-8	H-8'
Hep _D	100.3 5.17	75.3 4.01	71.1 4.13	74.9 4.17	72.5 4.17	81.2 4.11	63.5 4.02								
Hep _B	100.7 5.57	70.6 3.89	80.5 4.26	67.6 3.90	72.2 3.64	69.6 4.05	64.1 3.70								
Hep _E	102.5 5.16	71.5 3.87	71.5 4.01	67.0 3.83	72.4 3.78	70.2 4.04	64.5 3.83								
Hep _G	99.8 4.95	71.7 3.81	70.5 4.08	67.9 3.78	71.8 3.94	77.0 4.14	61.2 3.91								
Hep _F	99.0 5.04	71.5 3.85	70.8 3.93	68.1 3.82	73.7 3.99	71.7 4.22	61.6 3.85								
Hep _f	99.0 5.04	71.5 3.85	70.8 3.93	68.3 3.77	73.7 3.97	72.8 4.05	62.9 3.79								
Glc _l	104.0 4.64	77.7 3.45	74.2 3.51	70.2 3.64	74.6 3.54	65.5 4.06	40.6 3.69								
Glc _C	102.4 5.22	73.9 3.83	72.9 3.58	69.3 3.58	72.4 3.95	60.3 3.96	37.6 3.76								
Gal _J	104.3 4.46	73.5 3.67	71.7 3.56	69.5 3.93	76.0 3.71	61.8 3.80	37.6 3.76								
Glc _{N1} _A	92.6 5.75	70.2 3.93	54.8 3.45	70.5 3.51	73.4 4.13	69.7 4.28	37.6 3.89								
Glc _{N1} _H	99.7 4.88	72.2 3.90	56.3 3.17	75.0 3.94	74.6 3.78	63.4 3.81	37.6 3.64								
Kdo _K	99.7	34.5 2.37 2.13	99.7	70.8 4.61	72.7 4.32	73.2 3.87	64.2 3.94 3.73								

说明：在25°C、pH 3和D2O中，在600 MHz (1H) 从HMQC和HMBC数据测量，其中外部丙酮的CH3信号对于1H NMR设置为2.225 ppm，对于13C NMR设置为31.07 ppm。 δ C平均误差为 ± 0.2 ppm， δ H平均误差为 ± 0.02 ppm。由于异质性而导致的f的较小分标为f'。CH2自旋系统(H, H')按化学位移的降序排列。对于Kdo, H-3和H-3' 归属为H-3eq和H-3ax。

表2. D-L-庚糖和D-D-庚糖单糖的NMR数据

庚糖	C-1		C-2		C-3		C-4		C-5		C-6		C-7	
	δ_{H}	$J_{1,2}$	δ_{H}	$J_{2,3}$	δ_{H}	$J_{3,4}$	δ_{H}	$J_{4,5}$	δ_{H}	$J_{5,6}$	δ_{H}	$J_{6,7}$	δ_{H}	$J_{7,7}$
D- α -L-	95.00 ^a	71.36	71.45	71.36	67.05	71.81	69.63	63.84	3.749	4.024	3.689	3.652		
	5.166	3.838	3.914	3.838	3.845	3.749	4.024	3.689	1.6	7.3	5.5	-11.7		
	1.8	10.0	3.1	10.0	9.7	1.6	7.3	5.5	75.43	69.53	63.57	3.695		
D- β -L-	94.74 ^b	74.09	72.02	74.09	66.69	3.329	3.713	3.695	3.788	3.329	3.98	3.713		
	4.866	3.649	3.927	3.649	3.788	3.329	3.713	3.695	1.8	7.5	5.8	-11.7		
	1.0	10.0	3.2	10.0	9.8	1.8	7.5	5.8	73.42	72.72	62.75	3.708		
D- α -D-	94.86 ^a	71.38	71.32	71.38	68.35	73.42	72.72	62.75	3.865	4.018	3.797	3.708		
	5.151	3.812	3.905	3.812	3.756	3.865	4.018	3.797	3.2	3.3	7.6	-12.0		
	1.8	9.4	3.4	9.4	10.1	3.2	3.3	7.6	77.22	72.623	62.58	3.788		
D- β -D-	94.79 ^b	74.11	71.84	74.11	68.16	3.423	3.788	3.725	3.682	4.025	3.788	3.725		
	4.851	3.622	3.921	3.622	3.682	3.423	3.788	3.725	3.4	3.4	7.4	-12.0		
	1.1	9.5	3.3	9.5	9.9	3.3	7.4	-12.0						

说明: 在25°C的D₂O中, 在600 MHz (1H) 从1H自旋模拟和13C光谱 (150 MHz) 测量, 其中丙酮的CH₃信号对于1H NMR设置为2.225 ppm, 对于13C NMR设置为31.07 ppm。
 δ C和 δ H的单位是ppm, δ C平均误差为 ± 0.005 ppm, δ H平均误差为 ± 0.003 ppm。
 J_{H} , H值单位是Hz, 平均误差为 ± 0.2 Hz。H-7和H-7' 按化学位移的降序排列。

^a $J_{\text{C},\text{H}}=171 \pm 1$ Hz

^b $J_{\text{C},\text{H}}=160 \pm 1$ Hz, 从未去耦合的¹³C NMR 光谱测量。

表3. A1的HMBC和NOE数据, 以及与图8所示的核心庚糖的最小能量构象异构体的距离

键	HMBC		残基内		残基间		远程	
	H-1-C-x	NOE	r (Å)	NOE	r (Å)	NOE	r (Å)	
b(1-3)d	b1-d3	b1-b2 b5-b3 b5-b6	2.6 2.5 2.4	b1-b3 b1-b4 b5-b2	2.6 3.7 2.3	b1-e5 b1-e7 b1-e7	3.3 2.9 2.6	
c(1-6)d	c1-d6	c1-c2 d1-d2	2.4 2.6	k3ax-d5 c1-d6 d1-k5 d1-k7	3.2 2.0 2.2 2.9	b1-i2 c1-i1	2.2 2.4	
e(1-2)b	e1-b2	e1-e2	2.6	e1-b2 e1-b1	2.1 2.8	e1-g2 e1-g3 e1-f4	4.2 2.3 2.0	
f(1-6)g	f1-g6	f1-f2	2.6	f1-g6 f1-g5	2.5 2.6			
g(1-6)i	g1-i6	g1-g2 g5-g3 g5-g6	2.6 2.6 2.5	g1-i6 g1-i6 g5-i6	2.6 2.6 3.0	g1-b2 g1-b3	4.2 4.9	
i(1-4)d	i1-d4	i1-i3 i1-i5	2.6 2.4	i1-d4 i1-d6	2.8 2.1	i1-e1	2.4	
j(1-7)f	j1-f7	j1-j2 j1-f3 j1-f5	3.1 2.7 2.4	j1-f7 j1-f7	2.7 2.5			

a对于Gal-(1-7)-HepV-(1-6)-HepIV序列(j-f-g)中的j和f残基, 给出从MMC计算得到的平均距离。

实施例 2

本实施例形成了 Carbohydr. Res. 339: 1973 (2004) 中出版物的基础。研究胸膜肺炎放线杆菌血清型 5a、b、2 和 1。

对柱分级的 LPS 进行糖分析表明，葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、N-乙酰-葡糖胺(GlcNAc)、D-甘油-D-甘露-庚糖(DD-Hep)和 L-甘油-D-甘露-庚糖(LD-Hep)各自的比例大约为 2 : 1.5 : 1 : 2 : 3。如在材料和方法中所述，将酸水解产物进行凝胶过滤色谱分离来纯化核心 OS，获得富含核心 OS 和相对不含 O-抗原的组分，并进行糖分析，该分析显示；Glc、Gal、DD-Hep 和 LD-Hep 各自比例为 2 : 1 : 2 : 3。由于血清型 5b 的荚膜多糖含有 N-乙酰-D-葡糖胺和酮糖残基，我们怀疑 LPS 有一些荚膜(CPS)掺杂，之所以分级的核心 OS 样品中没有 CPS，是因为 CPS 中的酮糖键(ketosidic bond)对为获得核心 OS 而采用的酸水解条件敏感。另外，较少量的半乳糖(唯一的 O-抗原残基)表明所检测的组分主要是核心 OS，没有明显的 O-抗原延伸。

制备 LPS-OH 并通过凝胶过滤色谱分级。对与含有低比例 O-抗原相一致的体积时洗脱的组分，通过 CE-ES-MS 进行分析(实施例 2, 表 1)。观察到一种简单的质谱，该质谱对应于与组成 2Hex、5Hep、Kdo、P、脂质 A-OH 相一致的 2537 amu 的分子。对双电荷离子 m/z 1268 进行 CE-MS/MS 分析(数据未给出)在 m/z 951 和 1584 产生两个单电荷峰，证实了 O-脱酰脂质 A 的大小为 952 amu，核心 OS 的大小为 1584。O-脱酰脂质 A 种类(952 amu)由 N-乙酰化(3-OH C 14: 0)葡糖胺残基的二糖组成，每个残基被磷酸分子取代。对分级的 OS 样品的 ES-MS 和 CE-ES-MS 分析显示其质量为 1505 Da，与组成 2Hex、5Hep、Kdo 一致(实施例 2, 表 1)(图 11)。更晚洗脱的核心 OS 组分的 CE-ES-MS 光谱具有 1562 的质量，比主要糖型高 57 amu(实施例 2, 表 1)。该质量对应于氨基酸甘氨酸，这最近已经在脑膜炎双球菌和流感嗜血杆菌的 LPS 中观察到。CE-ES-MS/MS 分析将该甘氨酸残基定位于 Kdo 分子的第二个庚糖残基(Hep II)上(数据未给出)。

在核心 OS 上进行甲基化分析，以确定该分子的连接型式。仅对对应

于核心 OS 的组分进行分析表明,存在大约等摩尔量的末端 Glc、6-取代的 Glc、末端 DD-Hep、末端 LD-Hep、6-取代的 DD-Hep、2-取代的 LD-Hep 和 3,4,6-三取代的 LD-Hep。对主要含有 O-抗原的更早的 OS 组分进行分析表明,存在 6-取代的 Gal (O-抗原组分),证实了 O-抗原的连接型式。

为了阐明 OS 的准确位置和连接型式,对不含 O-抗原的收集 OS 组分进行 NMR 研究(图 12a)。通过 COSY 和 TOCSY 实验实现对 OS 的 ^1H 共振的识别。图 13 显示从 OS 中每个残基的端基异构体 ^1H 共振的一系列选择性 1D-TOCSY 实验。在 NMR 分析的过程中,很明显 *Ap* 5a OS 在结构上与溶血性曼氏杆菌核心 OS 的结构相关,*Ap* 5a OS 光谱的识别可参考该 ^1H NMR 数据来帮助进行(实施例 2,表 2)。

在 *Ap* 5a OS 的选择光谱中,从庚糖残基(Hep I, (图 13a), Hep II, (图 13b), Hep III, (图 13c), Hep IV (图 13d)和 Hep V, (图 13e))产生的自旋系统很容易从 5.11 (Hep I)、5.70 (Hep II)、5.17 (Hep III)、4.96 (Hep IV)和 5.03 (Hep V) ppm 处的端基异构体 ^1H 共振辨别,所述共振与指向甘露-吡喃糖基环系统的自旋系统的形态相耦合。Hep I 和 Hep II 的端基异构体质子中观察到的异质性(图 12a)是由于 Kdo 残基在酸水解时重排造成的。基于自旋系统的形态(图 13f), 5.21 ppm (Glc II)处的 α -端基异构体区中的其他残基确定为吡喃型葡萄糖。该光谱低磁场区(4.45-6.00 ppm)的其余端基异构体共振都可归因于 β -连接的残基,这是由于它们的端基异构体 ^1H 共振以及,在残基已经解析的情形下,它们较高的 $J_{1,2}$ (约 8 Hz)耦合常数。从自旋系统的形态(图 13g), 在 4.66 ppm (Glc I)处的一个共振被识别为葡糖-构型。从 TOCSY 实验中的 H-4 共振的特征性自旋系统的形态(图 13h), 将低磁场区中的 4.49 (Gal I) ppm 处的剩余共振识别为半乳糖-吡喃糖基残基。该实验还涉及 Kdo 自旋系统,因为 4.48 ppm 处的 Kdo H-6 ^1H 共振也被照射,并显示在 4.10 和 4.21 ppm 分别有 H-4 和 H-5 ^1H 共振。然而, Kdo 自旋系统难以完全确定,这是因为 Kdo 残基在核心水解时重排,以及可能由于氘交换而导致的亚甲基 H-3 质子的强度水平极低。然而,在另一个 1-D TOCSY 实验中,从 1.92 ppm 的 H-3 中轴进一步识别该自旋系统,显示 2.08 ppm 处的赤道质子和 4.10 ppm 处的 H-4 质子的 ^1H 共振(数据未给出)。

邻近的糖基残基上的端基异构体和苷元质子之间的残基间 ^1H - ^1H NOE 测量可确定 OS 中糖基残基的序列, 并证实和扩展甲基化分析数据。用这种方法确定了 Ap 5a OS 的连接型式 (图 14) (实施例 2, 表 2)。因此质子对 Hep III H-1 和 Hep II H-2 (图 14a) 以及 Hep II H-1 和 Hep I H-3 (图 14b) 之间强烈的跨糖苷 NOE 连接性的出现, 确立了三个 LD-庚糖残基的序列和附着点。这种连接型式在溶血性曼氏杆菌和流感嗜血杆菌的内核 OS 中经常遇到。而且, 端基异构体质子 Hep III H-1 和 Hep II H-1 之间的残基间 NOE 验证了 1,2-键接。从 Glc I 的 H-1 检查 NOE 的连接性表明, 该葡萄糖残基与 4-位的 Hep I 连接, 这是根据 Hep I H-4 和 Hep I H-6 的残基间 NOE (图 14c) 得出的。H-6 的残基间 NOE 的形态对于 4-取代的庚糖残基来说经常出现。Glc I 的 H-1 和 Glc II 的 H-1 之间出现远程 NOE 连接性表明, α -构型的葡萄糖残基 (Glc II) 在 6-位取代 Hep I, 这在溶血性曼氏杆菌 OS 中已经观察到。检查 Glc II 的 H-1 的 NOE 连接性证实, 该葡萄糖残基在 6-位与 Hep I 连接, 这是根据 Hep I H-6 的残基间 NOE (图 14d) 得出的。类似地, 对于 Glc I, 在 Glc I 和 Glc II 的端基异构体 ^1H 共振之间观察到远程 NOE 连接性。其他庚糖残基 (Hep IV 和 Hep V) 的连接位置按如下方法导出。检查 Hep IV 的 H-1 的 NOE 连接性表明, 该庚糖残基在 6-位与 Glc I 连接, 这是根据 Glc I H-6 和 H-6' 的残基间 NOE (图 14e) 得出的。最后, 确定 Hep V 在 6-位取代了 Hep IV, 这是根据从 Hep V H-1 到 Hep IV H-6 的 NOE 连接性 (图 14f) 得出的。另外, 对血清型 5a 的 OS 进行 NMR 分析使得能够辨别 O-链半乳糖残基的附着点。只含有一种半乳糖残基的组分用于该目的。端基异构体 ^1H 共振的 NOE 连接性包括 3.68 和 3.93 ppm 处的 H-3 和 H-5 的内部连接性, 以及 3.93 ppm 处之间连接性 (图 15a)。然后将选择性 1-D 实验用于辨别 3.93 ppm 处的质子共振的自旋系统。在 NOESY 步骤中, 进行 Gal 的 H-1 质子的 1D NOESY-TOCSY 实验, 然后在 TOCSY 步骤中, 在 3.93 ppm 处进行共振的选择激发, 证实了 3.93 ppm 处的共振和 4.06 ppm 处的共振的连接性 (图 15b)。使用 150 ms 的混合时间, 在 5.16 ppm 进行 Hep III 残基的端基异构体质子共振的 1-D TOCSY 实验显示了在 3.82 ppm 处该自旋系统的 H-4 和 H-5 质子共振 (图 13c)。然后在 NOESY 步骤中该共振被选择性照射, 显示出 4.06 ppm 处的 Hep III H-6 共振, 从而证实了

Hep III 残基的 7-位是 O-链的附着点(图 15c)。从 ^{13}C - ^1H HMBC 实验获得验证性数据, 该实验辨别出 4.48 ppm 处的 O-链半乳糖残基的端基异构体 ^1H 共振的交叉峰, 该交叉峰与 70.3 ppm 处的 ^{13}C 共振相关(图 15d), 在 ^{13}C - ^1H HSQC 实验中该交叉峰被发现与 3.93 ppm 处的质子共振相关(图 15e), 在 ^{13}C - ^1H HSQC 光谱中该交叉峰显示为具有 $-\text{CH}_2-$ 基特征的正峰, 证实了庚糖残基的 7-位是 O-链的附着点。该结论通过在只含有一种半乳糖残基的组分上进行甲基化分析来证实, 表明存在 7-取代的 LD-Hep 残基; 在对没有 O-链的核心 OS 组分进行甲基化分析时没有观察到这种过甲基化醛醇醋酸酯衍生物。

研究胸膜肺炎放线杆菌血清型 5b

对血清型 5b 的 LPS、LPS-OH 和 OS 所做的所有分析都与前面在血清型 5a 中描述的分析相同或极其相似(实施例 2, 表 1 和 2; 图 12b)。

研究胸膜肺炎放线杆菌血清型 2

对完整 LPS 的糖分析表明存在 Glc、DD-Hep、LD-Hep、Rha、Gal、GlcNAc 和 GalNAc, 其比例大约为 8 : 2 : 2 : 1 : 2 : 1 : 2, 与该材料中存在 O-抗原和荚膜多糖相一致。对分级的酸水解产物进行糖分析, 表明在较早的洗涤组分中存在 Glc、Rha、Gal 和 GalNAc, 其比例大约为 2 : 1 : 1 : 1, 与富含 O-抗原的组分一致。缺少 O-抗原的较晚的组分显示只存在 Glc、DD-Hep 和 LD-Hep, 其比例大约为 3 : 2 : 3, 与该核心 OS 组分中缺少 O-抗原一致。

制备 LPS-OH 并通过凝胶过滤色谱分级。对与含有低比例 O-抗原相一致的体积时洗脱的组分, 通过 CE-ES-MS 以阴离子模式进行分析(实施例 2, 表 1)。观察到一种简单的质谱, 该质谱对应的分子是 2700 amu, 与组成 3Hex、5Hep、Kdo、P、脂质 A-OH 相一致, 还有少量质量小于 80 amu 的第二种分子, 其与缺失磷酸酯基相吻合。对三电荷离子 m/z 899 进行 CE-MS/MS 分析(数据未给出)在 m/z 951 产生一个单电荷峰, 证实了 O-脱酰脂质 A 的大小为 952 amu, 较大分子的质量为 2700 amu。对缺少 O-抗原的分级的核心 OS 样品的 CE-ES-MS 分析显示其质量为 1667 Da, 与组成 3Hex、5Hep、Kdo 一致(实施例 2, 表 1)。因而质谱分析表明, 血清型 2 的核心 OS 与血清型 5a 和 5b 的 OS 相比, 多包含一个葡萄糖残基。

对缺少 O-抗原的核心 OS 组分进行甲基化分析, 表明存在末端 Glc、6-取代的 Glc、末端 DD-Hep、末端 LD-Hep、2-取代的 DD-Hep、2-取代的 LD-Hep、4, 6-二取代的 DD-Hep 和 3, 4, 6-三取代的 LD-Hep, 其比例大约为 6 : 3 : 3 : 2 : 1 : 2 : 3 : 2。血清型 2 和 5b OS 的甲基化数据之间的主要差异在于单-6-取代的 DD-Hep 被 4, 6-二取代的 DD-Hep 替换, 实验性地证实了内部 DD-Hep 残基的 4-位是附加的葡萄糖残基的附着点。通过甲基化分析辨别的血清型 2 和 5b 之间的末端葡萄糖残基的比例, 也与在血清型 2 核心 OS 中存在附加的末端葡萄糖残基这一结论一致。

$^1\text{H-NMR}$ 数据 (实施例 2, 表 2 (图 12c)) 确证了质谱和甲基化分析数据, 证实了血清型 2 的核心 OS 与血清型 5b 的相同, 但是多辨别出一个末端 α -构型的葡萄糖残基 (Glc III)。NOE 数据可确定 Glc III 的附着点在 Hep IV 的 4-位, 这是根据从 4.53 ppm 处的 Glc III 的端基异构体质子的 ^1H 共振到 3.96 ppm 处的 Hep IV 的 4 位的 ^1H 共振的之间 NOE 连接性 (数据未给出) 得出的。对 Hep IV 的 6-位也观察到 NOE 连接性, 这先前在 4-取代的庚糖残基中也已经观察到。

研究胸膜肺炎放线杆菌血清型 1

对柱分级的 LPS 进行糖分析显示存在 Rha、Glc、Gal、GlcNAc、DD-Hep 和 LD-Hep, 比例大约为 1 : 3 : 1 : 0.5 : 1 : 3。辨别出 Rha 和 GlcNAc 表明在该组分中仍然存在一些 O-抗原组分。对缺少 O-抗原的核心 OS 组分进行糖分析表明, Glc、Gal、DD-Hep 和 LD-Hep 的比例为 2 : 1.5 : 1 : 3。对含有全长 O-抗原的较早的组分进行糖分析显示 Rha、Glc 和 GlcNAc 的比例大约为 2 : 1 : 1, 与已经公开的该血清型 O-抗原的结构一致。

制备 LPS-OH 并通过凝胶过滤色谱分级。对与含有低比例 O-抗原相一致的体积时洗脱的组分, 通过 ES-MS 和 CE-ES-MS 以阴离子模式进行分析 (实施例 2, 表 1)。观察到一种简单的质谱, 该质谱对应的分子是 2874 amu, 其与组成 4Hex、HexNAc、4Hep、Kdo、P、脂质 A-OH 相一致, 还有少量质量大于 123 amu 的第二种分子 (与另外存在的磷酸乙醇胺残基一致) 和质量小于 80 amu 的第三种分子 (与缺失磷酸残基相吻合)。对三电荷离子 m/z 957 进行 CE-MS/MS 分析 (数据未给出) 在 m/z 951 产生一个单电荷峰, 证实了 O-脱酰脂质 A 的大小为 952 amu, 较大分子的质量为 2874 amu, 并

且在 m/z 959 产生一个双电荷峰，对应于核心 OS。对缺少 O-抗原的几种核心 OS 组分的 ES-MS 和 CE-ES-MS 分析显示其质量为 1840 Da，与组成 4Hex、HexNAc、4Hep、Kdo 一致（实施例 2，表 1）。对 m/z 930 的双电荷离子以阳离子模式进行 CE-MS/MS 分析显示出单电荷离子，这与血清型 1 核心 OS 中存在下列残基一致，包括 HexNAc m/z 204、Hex-Hex-HexNAc m/z 528、Hep-Hex-Hex-HexNAc m/z 720（图 16）。因此，质谱分析表明血清型 1 核心 OS 比血清型 5a 和 5b 核心 OS 少含有一个 DD-Hep 残基，但是多含有两个 Hex 和一个 HexNAc 残基。然而，在对缺少 O-抗原的核心 OS 进行糖分析中，缺少 HexNAc 的证据开始让人费解。

对缺少 O-抗原的核心 OS 组分进行甲基化分析显示存在大约等摩尔量的末端 Glc、6-取代的 Glc、3-取代的 Gal、末端 LD-Hep、4, 6-二取代的 Gal、4-取代的 DD-Hep、2-取代的 LD-Hep 和 3, 4, 6-三取代的 LD-Hep。缺少 HexNAc 的任何证据仍然让人困惑。

因此，质谱、糖和甲基化分析数据与血清型 2、5a 和 5b 中所观察到的内核结构一致， ^1H NMR 数据确证了这些推断（图 12d）（实施例 2，表 2）。 ^1H NMR 数据还使得能够辨别在血清型 2、5a 和 5b 的核心 OS 中不存在的其他的核心 OS 残基。根据在 TOCSY 实验中 H-4 ^1H 共振的特征性自旋系统，在 5.18 ppm 处识别了 α -构型半乳糖残基 (Gal II)。根据其端基异构体质子的 ^1H 共振和其特性自旋系统的形态，在 4.55 ppm 处识别了 β -构型半乳糖残基 (Gal I)。根据 4.34 ppm 处 H-2 质子的 ^1H 共振（与 ^{13}C - ^1H HSQC 实验中 52.6 ppm 的 ^{13}C 化学位移相关（图 17a）），在 4.88 ppm 处识别了 α -构型 N-乙酰己糖胺残基 (HexNAc)。 ^{13}C 化学位移与氮取代的碳原子一致。然而，很难接近 H-2 质子上该 HexNAc 残基的自旋系统，H-2 质子的化学位移似乎位于相当低的磁场。残基间 NOE 连接性建立了 4.55 ppm 处 Gal I 残基的端基异构体质子和 3.94 ppm 处 Hep IV 的 4 位的连接型式。类似地，5.18 ppm 处的 Gal II 端基异构体质子和 3.79 ppm 处的 Gal I 残基的 3 位的 NOE 连接性建立了该连接。然而，4.88 ppm 处的 HexNAc 残基的端基异构体质子和 4.25 ppm 处的 Gal II 残基的 4 位，以及 4.12 和 4.01 ppm 处的该残基的 6 位之间的残基间 NOE 连接性表明了 HexNAc 残基在 4 位和 6 位取代了 Gal II 残基，这与甲基化分析数据一致，但仍然令人困惑（图

17c)。甲基化 OS 的 FAB-MS 使得对 OS 的该部分的糖序列有了进一步的了解。所观察到的 A 型主要糖基氧鎓离子和次要离子(缺少甲醇)如下: 464→432 (Hex, HexNAc)⁺, 668→636 (Hex₂, HexNAc)⁺, 916→884 (Hex₂, HexNAc, Hep)⁺, 1120→1088 (Hex₃, HexNAc, Hep)⁺, 1368 (Hex₃, HexNAc, Hep₂)⁺, 1572→1540 (Hex₄, HexNAc, Hep₂)⁺, 以及 1865→1833 (Hex₃, HexNAc, Hep₄)⁺。该 FAB 数据与 NOE 和阳离子 CE-ES-MS/MS 数据一致, 但缺少末端 HexNAc 残基的证据让人困惑, 但是与糖分析和甲基化分析数据一致。缺少 HexNAc 残基的确切数据使得我们进行更加复杂的 NMR 研究, 以试图阐明推测的 HexNAc 残基的本质, 确定血清型 1 的核心 OS 的该区域的连接型式。

由 4.88 ppm 处、混合时间的范围从 30 到 150 ms 的 HexNAc 残基的 H-1 ¹H-共振的一系列选择性 1D 实验显示出 4.34 ppm 处的 H-2 ¹H-共振和识别为 4.13 ppm 处 H-3 和 3.36 ppm 处 H-4 的弱信号。为了验证这些推论, 完成该 HexNAc 残基的识别, 进行了其他的选择实验。从 3.36 ppm 处的 H-4 ¹H-共振获得 1-D TOCSY 实验, 验证了 H-2 和 H-3 识别, 分别在 3.93、3.66 和 3.64 ppm 处分辨出 H-5 和 H-6、6' 共振(图 17d)。从 4.34 ppm 处的 H-2 ¹H-共振获得 1-D TOCSY 实验, 验证了 H-3 和 H-4 识别(图 17e)。从 3.36 ppm 处的 H-4 ¹H-共振获得 1-D NOESY 实验, 验证了 H-2、H-3、H-5 和 H-6、6' 识别(图 17f)。从这些实验测定耦合常数, 得到 $J_{1,2}$ 4.8 Hz, $J_{2,3}$ 1.0 Hz, $J_{3,4}$ 9.7 Hz, $J_{4,5}$ 1.4 Hz, $J_{5,6}$ 6.5 Hz, $J_{5,6'}$ 6.5 Hz, $J_{6,6'}$ -12 Hz。进行了 2D-¹³C-¹H-HSQC NMR 光谱(图 17e), 辨别出 HexNAc 分子的 C-1 到 C-6 位的 ¹³C-化学位移分别为 101.1 ppm, 52.6 ppm, 68.5 ppm, 70.0 ppm, 70.7 ppm 和 64.1 ppm。该数据最初令人困惑, 然而对本实验室的糖数据库进行的检索发现了变形菌 (*Proteus*) 菌种的核心 OS 中的开链 N-乙酰半乳糖胺残基的一组类似数据。发现开链残基尽管出人意料, 却与糖、甲基化和 FAB 分析数据一致, 这是因为此残基对糖和甲基化分析中所采用的水解条件敏感, 在 FAB 分析中该末端残基的糖基氧鎓离子的形成会被该残基的开链构型所阻碍。

因此, 血清型 1、2、5a 和 5b 的核心 OS 的结构分析已经完成, 在所有菌株中辨别出保守性内核结构, 在该保守性结构上具有不同的修饰, 如图 18 所示。

对血清型 1、2、5a 和 5b 的核心寡糖（代表核心类型 I、II、II 和 II）的结构分析显示出相对保守的结构。每条链的内核 OS 均相同，由与 Kdo 残基连接的三糖 L-甘油-D-甘露-庚糖残基组成。每种血清型中，邻近的庚糖残基(Hep I)在 3 位被 L-甘油-D-甘露-庚糖三糖的第二个 L-甘油-D-甘露-庚糖残基(Hep II)取代，在 4 位被 β -葡萄糖残基(Glc I)取代，在 6 位被 α -葡萄糖残基(Glc II)取代。在每条链中 Glc I 残基的 6 位都发现有一个 D-甘油-D-甘露-庚糖残基(Hep IV)。在血清型 2、5a 和 5b 中，第二个 D-甘油-D-甘露-庚糖残基(Hep V)取代了 6 位的 Hep IV。血清型 2 和 5a、5b 之间的唯一区别是，在血清型 2 中，在 Hep IV 残基的 4 位多连接有一个葡萄糖残基。在这些 OS 结构和前面发现的溶血性曼氏杆菌血清型 A1 的 OS 结构之间存在着惊人的相似性。5b、5a OS 结构和溶血性曼氏杆菌血清型 A1 核心 OS 之间唯一的区别是，在溶血性曼氏杆菌 A1 OS 的 Hep V 中缺少另外的末端半乳糖残基。在血清型 1 中没有 Hep V 残基，Hep IV 在 4 位被三糖 α -GalNAc-(1-4,6)- α -Gal-(1-3)- β -Gal- 取代，其中，HexNAc 残基为罕见的开链构型。在血清型 1 中，被识别为从 Hep I 的最初的三糖延伸的结构排布与先前在杜克雷嗜血杆菌菌株 2665 LPS 中发现的相同，然而与在杜克雷嗜血杆菌中发现的 DD-Hep 间断的乳糖-N-新四糖结构相比，血清型 1 LPS 在 Gal I 残基上有不同的延伸。

因而，对于在 SDS-PAGE 中观察到的 Ap LPS 的两种核心类型，获得了结构上的解释。核心类型 II 的血清型 2、5a 和 5b 具有非常相似的 LPS 结构，区别仅在于血清型 2 中多有一个葡萄糖残基。然而核心类型 I 的血清型 1 缺少 DD-Hep 残基，但是有两个己糖和一个新的开链 HexNAc 残基。为了研究该新的开链 HexNAc 残基是否在其他的核心类型 I 血清型中存在，检查了来自血清型 6、9 和 11 的 LPS。开链 HexNAc 的证据在血清型 9 和 11 中的 MS 和 NMR 实验（数据未给出）中均被发现，但在血清型 6 中没有发现。对用于对核心类型进行分类的 SDS-PAGE 图样进一步研究显示，血清型 6 具有两种核心类型的 LPS 迁移模式，因此有可能我们检查的血清型 6 菌株只有核心类型 II 图样。

在 Ap 的 LPS 生物合成的遗传控制中可用的数据很少。最近 Galarneau 等人的一篇论文辨别了转座子诱变的三个基因，似乎涉及 Ap 血清型 1 LPS

的核心 OS 区的生物合成。基于与其他糖基转移酶的同源性, 这些基因被暂时辨别为糖基转移酶。据推测, 这三个基因为 *IbgB*, α -1,6-DD-庚糖基转移酶, *IbgA*, β -1,4-半乳糖基转移酶, 以及己糖或 N-乙酰-己糖胺转移酶。前两个基因, *IbgAB*, 与本文在血清型 1 核心 OS 中辨别到的结构一致, 具有与杜克雷嗜血杆菌 LPS 相同的基因座排布。Rioux 等人的另一篇论文辨别了基因 *galU*, UTP- α -D-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的结构基因。从血清型 1 *Ap galU* 突变株分离的 LPS 的 SDS-PAGE 具有不同的核心-脂质 A 区的迁移模式, 该突变株对猪气管细胞的粘附性较弱, 对猪的毒力较弱, 说明核心 OS 区本质或呈现的改变对该动物病原体的毒力有影响。

辨别出新的开链 HexNAc 残基很令人感兴趣。该结构以前只在两种变形菌菌种、最近在沙雷菌 (*Shewanella oneidensis*) 中辨别出来, 其意义还不清楚。如同现有文献中已经发现的那样, 本文中辨别的开链残基被发现同时在 4 和 6 位双取代相邻的残基, 所以这可能是此类残基共有的排布方式。

前面, 在几种菌株包括溶血性曼氏杆菌、杜克雷嗜血杆菌和非典型性流感嗜血杆菌中, 已经观察到从 Hep I 的寡糖延伸中的 DD-Hep 残基的辨别。在溶血性曼氏杆菌中, 观察到两个 DD-Hep 残基, 而在杜克雷嗜血杆菌和流感嗜血杆菌中, 只发现一个 DD-Hep 残基。在 *Ap* 中存在两种情况: 在从 Hep I 的寡糖延伸中血清型 2 和 5a、5b 具有两个 DD-Hep 残基, 血清型 1 只有一个 DD-Hep 残基。前面在溶血性曼氏杆菌、杜克雷嗜血杆菌和流感嗜血杆菌中还观察到三-LD-庚糖基内核基团。这里在所有研究过的 *App* 菌株中发现的 3,4,6-三取代的 Hep I 残基以前在溶血性曼氏杆菌 LPS 中都已经观察到, 然而杜克雷嗜血杆菌 LPS 只具有与在流感嗜血杆菌中发现的相同的 3,4-二取代的 Hep I 残基。

辨别出 Hep III 残基的 7 位为血清型 5a 的 O-抗原半乳糖残基的附着点是令人非常感兴趣的, 并与所观察到的血清型 1 的三种不同截短型的核心寡糖突变体中仍然具有 O-抗原这一现象相一致, 这是由于这三种截短型基因产物的预期功能不会干扰内核 LD-庚糖基三糖单元的生物合成, 从而 O-抗原附着的受体仍然在突变型 LPS 核心寡糖中存在。

该研究从结构上表征了几种 *Ap* 菌株 (代表两种核心类型) 的核心寡

糖区域, 辨别出保守性内核结构和新的外核组成。已知该区域涉及 Ap 的粘附性, 从而涉及到毒力。因此, 该研究能够促进对 Ap LPS 的核心寡糖区域的结构和该生物潜在毒力的相关性的进一步研究。

材料和方法—实施例 2

培养基和培养条件

将 Ap 血清型 1 (菌株 4074)、2 (菌株 4226)、5a (菌株 K17) 和 5b (菌株 L20) 首先在巧克力琼脂平板上 37°C 下培养过夜, 培养物用于接种 1 L 脑心浸液(BHI)培养基, 该培养基添加有终浓度为 5 ug/ml 的 β NAD (Sigma N-7004)、终浓度为 5 ug/ml 的氯化血红素(haemin, Sigma H-2250)以及 1%葡萄糖 glucose (10g)。然后将培养物在 37°C 下以 200 rpm 温育 6 小时, 并用于接种在 28 L NBS 发酵罐中的 23 L BHI 培养基(添加成分同上)。然后将该培养物在 37°C、24 lmin⁻¹通气 200 rpm 搅拌下培养 18 小时。杀死细胞(2%苯酚 w/v, 4 小时), 使用 Sharples 连续离心机收获(约 40g 湿重)。

分离和纯化脂多糖

通过下述方法从血清型 5a 和 5b 的干细胞群中分离脂多糖(LPS): 在用有机溶剂洗涤干细胞群后, 再使用热水/酚法。将水相使用水透析, 冻干, 若为血清型 2, LPS 从充分透析的酚相中分离。将干燥的样品溶于水中, 生成 1-2%的溶液(w/v), 使用脱氧核糖核酸酶 I (DNase) (0.01 mg/ml) 和核糖核酸酶(RNase) (0.01 mg/ml) 在 37°C 下处理 3 小时, 然后使用蛋白酶 K (0.01mg/ml) 处理 3 小时。将透析、干燥的样品溶于水中, 生成 1%的溶液, 超速离心(5 小时, 100,000 g)。将 LPS 沉淀重新溶于水中, 冻干, 在 Bio-Gel P-2 (1 cm X 100 cm) 柱上通过凝胶过滤纯化, 以水作为洗脱液, 收集含有糖的组分, 冻干。使用无水胍在 37°C、搅拌下处理纯化的 LPS 一小时, 制备 O-脱酰 LPS (LPS-OH)。将反应在冰浴上冷却, 缓慢加入冷丙酮(-70 C, 5 倍体积), 以破坏过量的胍, 沉淀的 LPS-OH 通过离心分离。然后将样品如上所述过 Bio-Gel P-2 柱纯化。核心寡糖(OS) 通过下述方法分离: 使用 1%乙酸处理(10mgml⁻¹, 100°C, 1.5 小时)纯化的 LPS, 然后通过离心(5000 g)去除不溶性脂质 A。冻干的 OS 以冻干的各组分通过 Bio-Gel P-2 柱进一步纯化。

分析方法

糖以其糖醇乙酸酯衍生物的形式通过 GLC-MS 测定。将样品使用 4 M 三氟乙酸在 100℃ 下水解 4 小时。将水解产物在 H₂O 中还原 (NaBD₄) 过夜, 以残留的乙酸钠作为催化剂, 使用乙酸酐在 100℃ 乙酰化 2 小时。在 GLC-MS 上装上 30 M DB-17 毛细管柱 (180℃ 到 260℃, 3.5℃/min), Varian Saturn II 质谱仪上以电子碰撞模式进行 MS。甲基化分析通过 NaOH/DMSO/甲基碘方法进行, 并通过如上的 GLC-MS 分析。

质谱测定

在 VG Quattro 质谱仪 (Micromass, Manchester, U. K.) 上以阴离子模式进行 ESI-MS, 直接将样品注入含 0.5% 乙酸的 25% 乙腈水溶液中。在 crystal Model 310 (CE) 设备 (AYI Unicam) 上进行毛细管电泳 (CE)-ESI-MS, 该设备通过微型离子喷射接口与 API 3000 质谱仪 (Perkin-Elmer/Sciex) 连接。将保护液 (sheath solution) (异丙醇-甲醇, 2:1) 以 1 L/min 的流速输给较低的死体积三通管 (tee) (250 μ m i. d., Chromatographic Specialties)。所有的水溶液在使用前通过 0.45-μ m 滤器 (Millipore) 过滤。将电喷射不锈钢针 (27 号) 与较低的死体积三通管对接, 以使保护液能够流到毛细管柱的端头。使用 10 mM 乙酸铵/氢氧化铵的去离子水溶液 (pH 9.0, 含 5% 甲醇), 在约 90 cm 长的裸熔融石英毛细管上获得分离物。注射时一般应用 20 kV 的电压。使用激光钳 (Sutter Instruments) 将毛细管的出口拉细至大约 15 μ m i. d.。以采样时间 3.0 ms、每步 1 m/z 单位、全质量扫描方式获得质谱。以采样时间 1.0 ms、每步 1 m/z 单位获得 MS/MS 数据。在只有 RF 的四极碰撞室中, 由氮与所选先驱离子碰撞活化所形成的片段离子, 通过扫描第三级四极来进行质谱分析。

核磁共振

使用 5mm 或 3mm 三重共振 (¹H, ¹³C, ³¹P) 探针, 在 Varian Inova 400、500 和 600 MHz 光谱仪上进行 NMR 实验。将冻干的糖样品溶于 600 L (5mm) 或 140 L (3mm) 99% 的 D₂O 中。该实验在 25℃ 下进行, 同时 HOD (氘化 H₂O) 在 4.78 ppm 处的信号受到抑制。丙酮的甲基共振用作内部标准, 2.225 ppm 对应 ¹H 光谱, 31.07 ppm 对应 ¹³C 光谱。将来自 Varian、COSY、TOCSY、NOESY、¹³C-¹H HSQC、¹³C-¹H HSQC-TOCSY 和 ¹³C-¹H HMBC 的与标准的同核和异核有关的 2D 脉冲序列用于常规识别。进行带有 Z 滤光片和选择性 1D-TOCSY 和

1D-NOESY 实验，以及 3-D NOESY-TOCSY 和 TOCSY-NOESY 实验的 1-D 类似实验来完成残基识别，并确定 ^1H - ^1H 核的 Overhauser 增强。选择性脉冲的脉冲宽度为 30-80 Hz。将 30-150 ms 的混合时间用于 1D-TOCSY 实验。将 400-800 ms 的混合时间用于 1D-NOESY 实验。

实施例2, 表1: 胸膜肺炎放线杆菌血清型1、2、5a和5b的O-脱酰LPS和核心寡糖的阴离子ES-MS和CE-ES-MS数据以及推测的组成。平均质量单位用于计算基于如下推测的组成的分子量: Hex, 162.15; HexNAc, 203.19; Hep, 192.17; Kdo, 220.18; P, 79.98; PEtn, 123.05; Gly, 57.05。O-脱酰脂质A (脂质A-OH) 为952.00。

血清型	观察到的离子(m/z)		分子质量(Da)		推测的组成
	(M-2H) ²⁻	(M-3H) ³⁻	观察值	计算值	
1	1396	930	2794	2792.7	HexNAc, 4Hex, 4Hep, Kdo, 脂质 A-OH
0-脱酰	1436	957	2874	2872.6	HexNAc, 4Hex, 4Hep, Kdo, P, 脂质 A-OH
	1497	998	2997	2995.7	HexNAc, 4Hex, 4Hep, Kdo, P, PEtn, 脂质 A-OH
核心OS	919	-	1840	1840.7	HexNAc, 4Hex, 4Hep, aKdo ^o
	928	-	1858	1858.7	HexNAc, 4Hex, 4Hep, Kdo
2	1309	872	2620	2620.5	3Hex, 5Hep, Kdo, 脂质 A-OH
0-脱酰	1349	899	2700	2699.5	3Hex, 5Hep, Kdo, P, 脂质 A-OH
核心OS	832	-	1667	1667.5	3Hex, 5Hep, Kdo
5a	1268	845	2537	2537.4	2Hex, 5Hep, Kdo, P, 脂质 A-OH
0-脱酰					

血清型	观察到的离子(m/z)		分子质量(Da)		推测的组成
	(M-2H) ²⁺ 3H) ³⁺	(M- 3H) ³⁺	观察值	计算值	
核心OS	752	1505	1505.3	1505.3	2Hex, 5Hep, Kdo
	780	1562	1562.3	1562.3	2Hex, 5Hep, Kdo, Gly
5b	1268	845	2537	2537.4	2Hex, 5Hep, Kdo, P, Lipid A-OH
O-脱酰					
核心OS	752	1505	1505.3	1505.3	2Hex, 5Hep, Kdo
	780	1562	1562.3	1562.3	2Hex, 5Hep, Kdo, Gly

^a多数离子对应于分子离子-18 (失去H₂O)。

实施例2, 表2: 胸膜肺炎放线杆菌血清型1、2、5a和5b的核心OS的¹H-和¹³C-NMR化学位移。

内核 ^a 血清型	NOE's							内部	之间	远程
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7			
1, 2, 5a, 5b										
Kdo (k)	-	-	2.08	4.10	4.21	4.48	nd			
			1.92							
Hep-I (a)	5.11 (98.9)	4.01 (71.2)	3.97 (73.7)	4.21 (74.7)	3.79 (72.6)	4.13 (80.3)	3.88 (62.9)	4.20 Kdo H-5		4.01 H-2
Hep-I (A)	5.37 (101.3)	4.08 (71.2)	3.95 (73.5)	4.22 (74.6)	3.78 (72.6)	4.13 (80.3)	3.88 (62.9)	nd		4.00 H-2

<u>Hep-II</u> (b)	5.70	4.19	3.87	3.89	3.55	4.04	3.76	5.15 Hep III H-1	4.19 H-2	3.79 Hep I H-5
	(100.2)	(80.5)	(70.7)	(67.5)	(72.7)	(70.3)	3.74	3.97 Hep I H-3	3.87 H-3	3.82 Hep III H-5
						(64.2)				3.77 Hep III H-7a
										3.56 Glc I H-2
<u>Hep-III^b</u> (c)	5.17	4.00	3.88	3.82	3.82	4.06	3.93	5.70 Hep II H-1	4.00 H-2	4.08 Hep IV H-2
	(102.3)	(71.5)	(71.6)	(67.1)	(72.4)	(70.2)	3.93	4.19 Hep II H-2		3.80 Hep IV H-3
						(70.3)				3.63 Glc I H-4
<u>Hep-III^c</u> (c)	5.17	4.00	3.88	3.82	3.82	4.04	3.77	5.70 Hep II H-1	4.00 H-2	4.08 Hep IV H-2
	(102.3)	(71.5)	(71.6)	(67.1)	(72.4)	(70.2)	3.62	4.19 Hep II H-2		3.80 Hep IV H-3
						(64.6)				3.63 Glc I H-4
<u>β-Glc (Glc-I)</u> (d)	4.66	3.56	3.43	3.63	3.54	4.06	-	4.21 Hep I H-4	3.54 H-5	5.21 Glc II H-1
	(104.0)	(74.1)	(77.8)	(70.3)	(74.5)	3.70		4.13 Hep I H-6	3.43 H-3	
						(65.5)				
<u>α-Glc (Glc-II)</u> (e)	5.21	3.58	3.81	3.59	3.92	3.96	-	4.13 Hep I H-6	3.58 H-2	4.66 Glc I H-1
	(102.6)	(72.8)	(73.8)	(69.3)	(72.4)	3.76				
						(60.2)				

外核血清型 5a, 5b

<u>Hep-IV</u>	4.96	4.08	3.80	3.78	3.93	4.13	3.90	4.06 Glc IH-6a	4.08 H-2
(f)	(99.8)	(70.5)	(71.7)	(68.1)	(71.9)	(77.0)	3.80	3.70 Glc IH-6b	
							(61.2)		
<u>Hep-V</u>	5.03	3.92	3.84	3.79	3.97	4.02	3.79	4.13 Hep IV H-6	4.19 Hep II H-2
(g)	(99.0)	(70.8)	(71.5)	(68.2)	(73.7)	(73.1)	3.74	3.93 Hep IV H-5	4.04 Hep II H-6
							(63.0)		3.93 Hep IV H-5
<u>β-Gal(Gal-I)</u>	4.49	3.55	3.68	3.97	3.93	3.75	-	3.93 Hep III H-7a	3.68 H-3
(h)	(104.2)	(71.6)	(73.4)	(69.5)	(74.5)	3.61	(65.7)	3.93 Hep III H-7b	3.93 H-5

血清型 2

<u>Hep-IV</u>	4.96	4.13	3.90	3.96	4.05	4.30	3.97	4.06 Glc IH-6a	4.14 H-2
---------------	------	------	------	------	------	------	------	----------------	----------

(99.5) (70.3) (70.6) (78.0) (70.3) (75.4) 3.82
(60.9) 3.70 Glc IH-6b

Hep-V 5.02 3.88 3.82 3.78 3.97 4.00 3.80 3.88 H-2
(98.6) (70.7) (71.5) (68.1) (73.9) (73.0) 3.74
(62.8) 4.30 Hep IV H-6
4.05 Hep IV H-5

β-Glc (Glc III) 4.53 3.33 3.51 3.41 3.51 3.95 - 3.51 H-3
(103.4) (74.0) (76.4) (70.4) (77.0) 3.74 3.52 H-5
(61.6) 4.05 Hep IV H-5

血清型 I

Hep-IV^d 4.95 4.13 3.94 3.94 3.94 4.17 3.83 4.13 H-2
(99.7) (70.2) (70.7) (79.5) (72.9) (66.9) 3.80
(61.9) 4.15 Glc IH-6a
3.74 Glc IH-6b

β -Gal(Gal-I)	4.55	3.67	3.79	4.17	4.17	3.87	-	3.94 Hep IV H-4	3.79 H-3
	(103.9)	(70.3)	(78.4)	(65.9)	(71.6)	3.75			4.17 H-5
						(62.4)			
α -Gal(Gal-II)	5.18	3.97	4.06	4.25	4.13	4.12	-	3.79 Gal I H-3	3.97 H-2
(i)	(97.3)	(68.8)	(68.7)	(76.7)	(64.2)	4.01			
						(69.5)			
α -GalNAc	4.88	4.34	4.13	3.36	3.93	3.66	-	4.25 Gal II H-4	4.34 H-2
开链	(101.1)	(52.6)	(68.5)	(70.0)	(70.7)	3.64		4.12 Gal II H-6a	
(i)						(64.1)		4.01 Gal II H-6b	

^a; 内核数据来源于血清型5a; 残基的字母标号如括号中所示。来自其他血清型内核残基的化学位移实质上相同

^b; 血清型5a和5b的取代的Hep III残基的数据

^c; 血清型1和2的末端Hep III残基的数据

^d; 对于血清型1的1H-共振, Glc I H-6a和H-6b分别为4.15和3.74 ppm。

实施例 3 本实施例形成了 *Glycobiology* 15: 323 (2005) 中一篇出版物的基础。研究多杀性巴氏杆菌菌株 *Pm70*

对纯化的 LPS 进行糖分析表明葡萄糖 (Glc), 半乳糖 (Gal) 和 L-甘油-D-甘露-庚糖 (LD-Hep) 的各自的比例大约为 4: 2:3。还识别到少量的 N-乙酰-葡萄糖胺 (GlcNAc) 和 N-乙酰-半乳糖胺 (GalNAc), 并且, 与最近所研究的其他兽类的病原体相比, 没有识别到 D-甘油-D-甘露-庚糖

(DD-Hep) (Brisson, et al, 2002; St. Michael et al, 2004)。核心寡糖 (OS) 衍生的丁基-糖苷的 GLC 分析表明, Glc、Gal 和 GalNAc 残基以它们的 D-异构体形式存在。

制备 O-脱酰 LPS (LPS-OH), 并用凝胶过滤色谱分级, 以及用 CE-MS 分析 (实施例 3, 表 1)。在 CE-MS 分析中, 观察到简单质谱, 主峰为 m/z 1173.8 的三电荷离子, 该峰对应于与组成 HexNAc2, Hep4, Hex6, PEtn, Kdo, P, Lipid A-OH 相一致的 3525amu 的分子, 还有少量由 m/z 1132.9³⁺ 和 1215.2³⁺ 表征的从主要碎片中失去或者得到一个 PEtn 残基的离子峰。对三电荷离子 m/z 1173.8 的 CE-MS 分析 (未显示数据) 得到一个 m/z 951 的单电荷峰和一个 m/z 1236.5 的双电荷离子, 从而确定 O-脱酰脂质 A 的大小为 952amu, 核心 OS 的大小为 2475amu。O-脱酰脂质 A 的主要种类 (952 amu) 由 N-酰 (3-OH C 14: 0) 葡糖胺残基二糖组成, 每一残基由一个磷酸分子取代。有趣的是, 对应于缺少己糖和磷酸分子, 同时增加 Kdo 分子的少量糖型, 由 m/z 1125.7³⁺ 和 1166.7³⁺ 表征, 这暗示分子的 Kdo 区域存在两种截然不同的排布 (实施例 3, 表 1), 即 Kdo-P 或 Kdo-Kdo 排布。在 KOH 处理的 LPS 的 CE-MS 光谱中观察到含有一个和两个 Kdo 残基糖型的一种类似混合 (实施例 3, 表 1)。ES-MS 和 CE-MS 分析发现经分级的核心 OS 样品具有 2492Da, 这与 HexNAc2, Hep4, Hex6, PEtn, Kdo 的组成一致 (实施例 3, 表 1) (图 19)。对核心 OS 用阳离子模式进行 CE-MS/MS 分析, 以获得 OS 分子中的一些官能团的定位信息。对 m/z 1246.5²⁺ 的双电荷离子的 MS/MS 分析表明了几种产物离子 (图 20)。一种与 203.5⁺ 的 HexNAc 残基和两种 407.5⁺ 的 HexNAc 残基对应的单电荷离子占优势。还识别出对应图 20 中所示组成的其他产物离子。在对 m/z 316 (对应 Hep-PEtn 基团) 的先驱离子的扫描中, 根据对 m/z 817.52⁺ (Hex3, Hep4, Kdo, PEtn)、898.52⁺

(Hex4, Hep4, Kdo, PEtn)、979.52⁺ (Hex5, Hep4, Kdo, PEtn)、1059.52⁺ (Hex6, Hep4, Kdo, PEtn) 和 1263.52⁺ (HexNAc2, Hex6, Hep4, Kdo, PEtn) (图 21) 的水合双电荷离子的识别, 将核心 OS 的 PEtn 区定位于内核的一个庚糖残基 (Hep)。通过对 m/z 893⁺ (对应 HexNAc-HexNA 基团) 的先驱离子的扫描, 揭示了 893⁺ 的单电荷离子, 该单电荷离子对应于 Hex3, HexNAc2 (未显示数据) 组成。因此, 这两种先驱离子扫描实验表明了内核组成 Hex3、Hep4、Kdo 和 PEtn, 并带有一 3Hex 和 2HexNAc 残基的外核延伸。

为确定分子的连接模式而对核心 OS 进行的甲基化分析显示末端 Glc, 6-取代的 Glc, 4-取代的 Glc, 4-取代的 Gal, 3-取代的 Gal 和末端 LD-Hep 以摩尔比约为 2:1:1:1:1:1:1 的比率存在, 并观察到有较少的末端 Gal, 2-取代的 LD-Hep, 3,4-二取代的 LD-Hep 和 3,4,6-三取代的 LD-Hep。另外, 通过比较来自胸膜肺炎放线杆菌 (Ap) 血清型 2 的过甲基化糖醇乙酸酯, 将 4,6 二-取代的 LD-Hep 残基的保留时间与 4,6 二-取代 DD-Hep 残基区分开来, 确定了其归属, 并且与 *Pm* LPS 中无 DD-Hep 一致。

为了阐明 OS 的确切位置及连接模式, 对 OS 组分以及完全脱酰 (KOH 处理) 的样品 (图 22) 进行了 NMR 研究, 其中对 OS 组分提供了最清楚, 最均一的谱图。通过 COSY 和 TOCSY (图 5a) 实验识别了 OS 和 KOH 处理的 LPS 的 ¹H 共振, 同时参照了溶血性曼氏杆菌 (*Mh*) 和 Ap 的结构上相关的核心 OS (Brisson, et al, 2002; St. Michael et al, 2004) (实施例 3, 表 2)。

在 *Pm70* OS 和 KOH 处理的 LPS 的 ¹H-NMR 谱图中, 从庚糖残基 (Hep I (E), Hep II (F), Hep III (G) 和 Hep IV (J)) 在 5.10_{os} (OS 样品) / 5.19_{KOH} (KOH 处理样品) (Hep I, E), 5.87_{os} / 5.74_{KOH} (Hep II, F), 5.23_{os&KOH} (Hep III, G) 和 5.12_{os&KOH} (Hep IV, J) ppm 的端基异构体 ¹H 共振中识别到源于上述庚糖残基的自旋系统, 结合这些自旋系统的形态, 将上述自旋系统确定为甘露-吡喃糖基环系统。由于相邻 Kdo 分子在酸水解后的多种重排产物的存在, 观察到在 OS 样品中有 Hep I 端基异构体质子的异质性 (详述 OS 样品中较多 Hep I 信号的识别)。仅从残基内 NOE's 在 H1 和 H2 共振之间的出现, 能显而易见的确定庚糖残基的 α -构型。5.22_{os&KOH} ppm (Glc II, H) 和 5.09_{os} / 5.53_{KOH} ppm (GalNAc II/ GALN II, P) 的

α -端基异构体区的两个残基,根据其自旋系统的形态分别被确定为葡萄糖-吡喃糖和半乳糖-吡喃糖。半乳糖-构型残基在 5.09_{os} / 5.53_{KOH} ppm 下被确定为氨基糖,这是根据其在 4.24_{os} / 3.65_{KOH} ppm 下的 H-2 质子的 ^1H 共振而确定的,在 ^{13}C - ^1H HSQC 实验中,其与 50.4_{os} / 51.5_{KOH} ppm 的 ^{13}C 化学位移有关。该 ^{13}C 化学位移与氮取代的碳原子一致。在 TOCSY 实验中,在 4.95_{os} / 4.99_{KOH} ppm (Gal II, N) 下,根据其特性自旋系统出现在 H-4 共振,将 α -端基异构体区剩余残基确定为半乳糖-吡喃糖(图 23)。在光谱的低磁场区(4.45 - 6.00 ppm)的剩余的端基异构体共振,根据他们的异头 ^1H 共振的化学位移和在该残基已经解析情况下的高 $J_{1,2}$ (~ 8 Hz) 耦合常数,归因于 β -连接残基。在 4.65_{os&KOH} ppm (Glc I, I), 4.70_{os&KOH} ppm (Glc III, K) 和 4.69_{os&KOH} ppm (Glc IV, L) 下的共振,根据他们的自旋系统的形态,将其确定为葡萄糖-构型。在 TOCSY 实验中,在低磁场区 4.53_{os&KOH} ppm (Gal I, M) 和 4.73_{os} / 5.01_{KOH} ppm (GalNAc I/ GalNI, O) 下,根据 H-4 共振的特性自旋系统出现在,将剩余共振确定为半乳糖-吡喃糖残基。在 4.73_{os} / 5.01_{KOH} ppm 下,根据半乳糖-构型残基在 4.12/ 3.53 ppm 下, H-2 质子的 ^1H 共振,将其确定为一个氨基糖,其与在 ^{13}C - ^1H HSQC 实验中、51.9_{os} / 53.1_{KOH} ppm 的 ^{13}C 化学位移有关。该 ^{13}C 化学位移与氮取代的碳原子一致。在 3.27 和 4.16 ppm 下的 OS 样品中,观察到 PEtn 部分的 CH_2 质子信号,其分别与 ^{13}C - ^1H HSQC 实验中、在 40.1 和 62.2 ppm 下的特性 ^{13}C 化学位移相关。另外,在 2.06 和 2.04 ppm 下的 OS 样品中,观察到氨基糖的乙酰基特性信号,其分别与 ^{13}C - ^1H HSQC 实验中、在 22.4 和 22.1 ppm 下的 ^{13}C 化学位移相关。

通过残基间 ^1H - ^1H NOE 测定法,将 OS 中糖基残基的顺序确定在相邻的糖基残基的端基异构体质子和苷元质子之间,并且确定和扩充了甲基化作用的分析数据。使用这种方式确定了 *Pm70* 脱酰寡糖的连接模式(图 24)

(实施例 3, 表 2)。这样,就如同常观察到的三-庚糖基部分一样,在质子对 Hep III (G) H-1 和 Hep II (F) H-2, Hep II (F) H-1 和 Hep I (E) H-3 和 Hep I (E) H-1 和 Kdo (C) H-5 之间出现与糖苷强的 NOE 连接关系,建立起这三种 LD-庚糖残基的顺序和附着点,这种连接模式经常在流感嗜血杆菌 (Hi) 和 *Mh* 的内核 OS 中遇到 (Cox et al, 2001 a; Brisson et al,

2002)。而且,在 Hep III (G) H-1 和 Hep II (F) H-1 之间的端基异构体质子的残基间 NOE' s 为 1,2-连接键提供了确认(Romanowska et al, 1988)。对 Glc I (I) H-1 的 NOE 连接性考察,通过 Hep I (E) H-4 和 Hep I (E) H-6 的残基间 NOE,说明该葡萄糖残基与 Hep I (E) 在 4-位连接。一个 H-6 的残基间 NOE 对 4-取代庚糖残基来说经常发生(Backman et al, 1988)。如在前面 *Mh* 和 *Ap* 的 OS 中所观察到的,在 Glc I (I) H-1 和 Glc II (H) H-1 之间的远程 NOE 连接性的出现表明 α -构型葡萄糖残基(Glc II (H)) 在 6-位取代 Hep I (Brisson, et al, 2002; St. Michael et al, 2004)。对 Glc II (H) H-1 的 NOE 连接性考察,通过 Hep I (E) H-4 的残基间 NOE,确定这个葡萄糖残基与 Hep I (E) 在 6-位连接。类似 Glc I (I), 在 Glc I (I) 和 Glc II (H) 端基异构体 ^1H 共振之间观察到一个远程 NOE 连接性。通过 Glc I (I) H-6a 和 H-6b 的残基间 NOE,对 Hep IV (J) H-1 的 NOE 连接性进行考察,揭示出这个庚糖残基与 Glc I (I) 在 6-位连接。在之前的 *Mh* 和 *Ap* 中观察到内核单糖结构 Hep IV 残基(J)是 D-甘油-D-甘露构型,而这里的 Hep IV 残基(J)是 L-甘油-D-甘露构型,这是因为在糖分析中识别到的庚糖残基的唯一构型。根据 NOE 连接性和 ^{13}C - ^1H -HMBC 证据,以及甲基化作用分析数据推断出外核残基的连接模式。两个葡糖构型残基(K&L),它们的端基异构体质子在 4.70_{OS&KOH} / 4.69_{OS&KOH} ppm 下的共振表明在 4.15_{OS&KOH} 和 4.31_{OS&KOH} ppm 下 Hep IV 残基(J) H-4 和 H-6 质子共振的 NOE 连接性,与甲基化分析中观察到的 4,6-二取代 LD-庚糖残基一致,并且与前面在 *Ap* 血清型 2 中观察到的 DD-HepIV 排布相似(St. Michael et al, 2004)。通过 ^1H - ^{13}C HMBC 实验(图 25)可以确定, Glc III (K) 在 4 位上连接于 HepIV (J), Glc IV (L) 在 6 位上连接于 HepIV (J)。从 Gal I (M) 在 4.53_{OS&KOH} ppm 下的端基异构体质子共振到 Glc IV (L) 的 H-4 质子共振 NOE 间的连接性显示, Gal I (M) 在 4-位上取代 Glc IV (L)。从 Gal II (N) 的端基异构体质子共振到 Gal I (M) 的 H-4 质子共振 NOE 间的连接性显示, Gal II (N) 在 4-位上取代 Gal I (M), 与甲基化分析数据所确定的两个 4-连接己糖残基,即一个 4-连接葡萄糖和一个 4-连接半乳糖残基相一致。从 GalNAc I / GALN I (O) 的端基异构体质子共振到 Glc II (N) 的 H-3 质子共振 NOE 间的连接性显示, GalNAc I / GALN I (O) 在 3-位上取代 Glc

II (N) , 又通过甲基化分析确认到一个 3-连接己糖残基而确定。最后, 从 GalNAc II / GalN II (P) 的端基异构体质子共振到 GalNAc I/ GalN I (O) 的 H-3 质子共振 NOE 间的连接性显示, GalNAc II / GalN II (P) 在 3-位上取代 GalNAc I/ GalN I (O) , 与 MS/MS 确认的一个 HexNAc-HexNAc 二糖相一致。通过以 OS 样品的 ^{31}P - ^1H -HSQC 和 ^{31}P - ^1H -HSQC-TOCSY 实验确认 Hep II (F) 的 3-位为 PEtn 的取代位置。HSQC 实验识别到一个从磷信号到 4.41 ppm 处的质子共振的交叉峰, 该交叉峰归属于 Hep II 残基 (F) 的 3 位, 这在 HSQC-TOCSY 实验中被进一步确认和扩充, 该 HSQC-TOCSY 实验显示 Hep II (F) 的 H-2 和 H-1 质子共振分别位于 4.31 和 5.87 ppm (未显示数据)。

通过对经 KOH 处理的 LPS 的分析确定了 Hep I-Kdo-脂质 A 区 (E-C-B-A) 的连接为 L- α -D-Hep I-(1-5)- α -Kdo4P-(2-6)- β -GlcN4P-(1-6)- α -GlcN1P (实施例 3, 表 2)。通过色谱分离和 MS 识别得到含有两种 Kdo 的组分, 但其量不足以用于 NMR 分析。

Pm70 菌株基因组序列的利用 (May et al, 200) 连同对 OS 结构的全面的认知, 加上糖基转移酶信息, 使几种用于 *Pm70* OS 生物合成的候选糖基转移酶被确认 (图 26), 所述糖基转移酶将在结构上和分类学上相关的种类联系起来, 在 *Pm70* 基因组序列中确认了几种推测的庚糖转移酶, 包括一个 Hep III Tase PM1294, 一个 Hep II Tase PM1844, 两个 Hep I Tases PM1302 和 PM1843 以及一个 Hep IV Tase PM1144。在实施例 3, 表 3 中详细描述了这些基因中的每一个在数据库中的最佳同源物, 这种高度同源性显示候选 PM 基因会有所示的功能。前面我们小组和合作者曾表明, PM1294 在另一 *Pm* 菌株 VP161 中是 Hep III Tase (Harper et al, 2004)。将 α -葡萄糖 (H) 加到 Hep I (E) 的 6-位的基因不是公知的, 但对 β -葡萄糖基转移酶 (其在 4-位取代 Hep I (E)), 有一个很好的同源物 PM1306。由于 Kdo 转移酶有广泛数目的极好的同源物, 因而其已很容易地被识别是 PM1305, 然而, 在 *Pm* 基因组中只识别到一个 Kdo 转移酶同源物。有趣的是, 几个与 Kdo (C), Hep I (E), Glc I (I) 的生物合成相关的基因成簇地存在于在该条染色体的这个区域。外核区推测的糖基转移酶似乎也成簇出现在从 PM1138 到 PM1144 的染色体的某一区域。在这种菌属中并不总

是能观察到这种糖基转移酶基因簇，实际上，*Hi* OS 的糖基转移酶广泛地分散于整个基因组。在 *Pm* (从 PM0506 到 PM0512) 基因组的另一区域，可以找到另一个推测的糖基转移酶基因座。在 *Hi* 和杜克雷嗜血杆菌 (*Hd*) 中，这种基因座都与所谓的 *lsg* 基因座很好地排布在一起。这种未被指定任何具体作用的基因座在 *Hi* OS 生物合成中的作用是文献 (Phillips et al, 1996, 2000; Cox et al, 2001b) 中的一个讨论问题。但在这个 *Pm70* 基因座中间是一个唾液酸转移酶同源物 (PM0508)，该同源物是 *Pm70* (也是 PM0188 和 PM1174) 基因组中三个唾液酸转移酶同源物之一，并且在我们的实验室，结构研究仍在进行以考察在适当的生长条件下，*Pm70* 是否可能唾液酸化。在实施例 3，表 3 中，还详述了被激活的核苷酸糖供体候选基因。

讨论

对 *Pm* 菌株的 *Pm70* 基因组的寡糖结构分析显示出一种结构，该结构类似于之前所确定的相关菌种 *Mh* (Brisson et al, 2000)，*Ap* (St. Michael et al, 2004)，*Hd* (Schweda et al, 1994) 和 *Hi* (Cox et al, 2001a) 的 LPS 核心寡糖结构。在每种情况下，核心 OS 包含连接在 Kdo 残基上的一个等同连接的三-庚糖基单元。有趣的是，在多数情况下，在 *Pm* 中 3-位的 HepII 残基被 PEtn 残基替代，而 *Ap*，*Hd* 和 *Mh* 不包含 PEtn 残基，*Hi* 在 HepII 的 6-位有一个 PEtn 残基。*Pm* 的 Hep I 残基的取代模式与在兽类病原体 *Ap* 和 *Mh* 中发现的相同，在 4-位和 6-位有两个葡萄糖残基，而在 *Hi* 和 *Hd* 的 Hep I 残基中，只有 4-位被取代。另外，在三种兽类病原体、*Hd* 以及 *Hi* 的一些菌株中，在 Hep I 4-位的葡萄糖残基总是被一个庚糖残基在 6-位取代。然而，与在 *Ap*、*Hd*、*Mh* 和一些 *Hi* 菌株中的 D-甘油-D-甘露构型的庚糖残基相比，在 *Pm* (和一些 *Hi* 菌株) 中取代葡萄糖残基的庚糖残基是 L-甘油-D-甘露构型。在这些菌株中，庚糖残基的取代模式多种多样，在 OS 结构的这一方面，在多种菌株之间保守内核结构相似性终止。在 *Pm* 中庚糖残基在 4-和 6-位被两个葡萄糖残基二-取代，与在 *Ap* 血清型 2 中庚糖残基在相同位置被二-取代相似，但在 4-位是被另一庚糖残基而不是被葡萄糖残基取代。*Mh* 在 4-位也有另一个 D, D-庚糖残基，而在 *Ap* 血清型 1、*Hd* 和 *Hi* 中也有来自于第四个庚糖残基进一步的己糖延伸，但是在这里没有观察到在新的 GalNAc-GalNAc 二糖单元终止的延伸。

在 *Pm70* 基因组中，基于 *Pm70* OS 结构识别到有相似特异性的关于糖基转移酶的同源物 *Pm*。考虑到依赖于一个或两个 Kdo 残基的存在两个 LPS 成员的新发现，会有趣地注意到在 *Pm* 基因组中只识别到一个关于 Kdo 残基转移酶的同源物。这并不令人惊讶，因为 Kdo 转移酶的多效性本质已被充分证明，例如相同的 Kdo 转移酶能够转移一个 Kdo 残基到脂质 A 而将第二个 Kdo 残基转移到初始的 Kdo 残基。*Pm* LPS 的新特征虽然是有两个已被公开的 Kdo 残基的成员，但就我们所知，在之前没有被识别到过。但是，在 *Pm70* 基因组中观察到两个很好的 Hep I (E) 到 Kdo (C) (α -1,5 庚糖转移酶) 的转移酶的同源物。一个转移酶对 *Hi* 的 HI 0261 (OpsX) 有最高同源性，其中 LPS 结构中包含一个 Kdo 残基；第二个转移酶对来自大肠杆菌和肺炎克雷伯氏杆菌的 WaaC 具有最高同源性，所述大肠杆菌和肺炎克雷伯氏杆菌中 LPS 结构中有两个 Kdo 残基。因此，两个 Hep I 转移酶的识别与 *Pm70* LPS 的 Kdo 区域中两种结构排布的出现相符，并且理解这种生物体 Kdo 转移酶的规律是非常有趣的。

这项研究从结构上表征了 *Pm* 基因组菌株的核心 OS 区域，确认出用于核心 OS 的完全生物合成的推定的糖基转移酶。

材料、方法

培养基和生长条件

Pm 菌株 *Pm70* (NRCC # 6232) 先在巧克力琼脂平板上于 37°C 培养过夜，将培养物接种到 1L 脑-心浸液 (BHI) 培养基，该培养基添加有，终浓度为 5ug/ml 的 β NAD (Sigma N-7004)，终浓度 5ug/ml 的氯化血红素 (Sigma H-2250)，和 1% 葡萄糖 (10g)。然后将培养物在 37°C，200rpm 下培养 6 小时，接种到一个 28L NBS 发酵罐中的 24L BHI 培养基 (添加同上)。再将培养物于 37°C，每分钟通气 24 次，转速在 200rpm，20% O₂ 饱和下培养 18 小时。接着用透明质酸酶 (1g, Sigma,) 处理，杀死细胞 (2% 苯酚 w/v, 4 小时)，用 Sharples 连续式离心机收集 (~240g 湿重)。

脂多糖的分离纯化

接下来用有机溶剂洗涤冻干细胞块 (~70g) 得到 ~50g，从用热水、苯酚方法清洗的 10g 冻干细胞块中分离出脂多糖 (LPS) (Westphal and Jann, 1965)。将水相除水透析并冻干。将干样品溶于水中得到 1-2% 的溶液

(w/v), 用脱氧核糖酸酶 I (DNase) (0.01mg/ml) 和核糖核酸酶 (RNase) (0.01mg/ml) 于 37°C 处理 3 小时, 然后用蛋白酶 K (0.01mg/ml) 消化 3 小时。将透析、干燥样品溶解于水中制得 1% 的溶液, 于 8K 低速离心去除不溶物质 (124g) 后于 45K 超速离心。45K 离心而得的 LPS 沉淀用水再溶解并冻干 (180g)。纯化的 LPS (75g) 用无水肼于 37°C 摇动处理 1 小时以制备 O-脱酰 LPS (LPS-OH)。反应于冰浴中冷却, 并逐渐加入低温丙酮 (-70°C, 5 倍体积) 以破坏剩余的肼, 离心分离出沉淀的 LPS-OH (60 mg)。如上面所述, 将该样品通过 Bio-Gel P-2 柱纯化。通过用 1% 乙酸 (10mg/ml^{-1} , 100°C, 1.5 小时) 处理纯化的 LPS (100mg), 随后离心 (5000g) 除去不溶的脂质 A 以分离出核心寡糖。用冻干的各组分通过 Bio-Gel P-2 柱进一步纯化冻干的 OS (50mg)。将 LPS-OH (20mg) 用 4N KOH 在 125°C 处理 16 小时, 中和后用前面所述的阴离子交换液相色谱分级, 分离出完全脱酰的 LPS (Vinogradov, E and Bock, K. 1999)。

分析方法

通过 GLC-MS 糖被确认为是其糖醇乙酸酯衍生物 (Sawardeker et al, 1965)。将样品用 4M 三氟乙酸于 100°C 水解 4 小时, 然后在水中还原 (NaBD₄) 过夜, 并以残留乙酸钠为催化剂用醋酸酐于 100°C 乙酰化 2 小时。GLC-MS 配备有一个 30 M DB 毛细管柱 (180°C 到 260°C, 以 3.5°C/min), MS 在 Varian Saturn II 型质谱仪上以电子碰撞模式进行。通过 NaOH/ DMSO/ 甲基碘方法 (Ciucanu and Kerek, 1994) 进行甲基化分析, 并通过上述的 GLC-MS 进行分析。绝对构型由丁基糖苷衍生物的 GLC 分析决定 (St. Michael et al, 2004)。

质谱法

ESI-MS 用 VG Quattro 质谱仪 (Micromass, Manchester, U. K.) 以阴离子模式进行, 直接注入含 0.5% 乙酸的 25% 乙腈水溶液中的样品。毛细管电泳 (CE) -MS 在 Prince CE 系统 (Prince Technologies, The Netherlands) 上进行, 该系统经由一个微型喷雾接口结合 API 3000 质谱仪 (Applied Biosystem/ Sciex, Concord, Canada)。以 1pL/min 的流速递送保护液 (异丙醇-甲醇, 2:1) 到具有低死体积的三通管 (250 μm i. d., Chromatographic Specialties) 中。所有水溶液在使用之前用 0.45 μm

滤膜 (Millipore) 过滤。用一个电喷射不锈钢针 (27 号) 邻接低死体积的三通管以使保护液的递送到毛细管柱的末端。用 10mM 乙酸铵/氢氧化铵、pH9.0、含有 5% 甲醇的去离子水溶液在约 90cm 长的空融硅毛细管上完成分离。在注射部位一般施用 20 kV 的电压。使用一个激光钳 (Sutter Instruments) 使毛细管的出口渐缩为约 15 μm i. d. 在全质量扫描模式下, 每 m/z 单元步骤的驻留时间为 3.0ms, 即可获得质谱光谱。每 m/z 单元驻留时间为 1.0ms, 得到 MS/MS 数据。在只有 RF 的四极碰撞室中, 所选择的先驱离子与氮气碰撞活化形成碎片离子, 通过扫描第三级四极对碎片离子进行质谱分析。

核磁共振

NMR 实验使用 5 mm 或 3mm 三重共振(^1H , ^{13}C , ^{31}P)探针, 在 Varian Inova 400, 500 和 600 MHz 光谱仪上完成。将冻干糖样品溶解于 600 μL (5mm) 或 140 μL (3mm) 的 99% 的 D_2O 中。上述实验在 25 $^\circ\text{C}$ 下进行, 以抑制 4.78 ppm HOD (氘化水) 信号。丙酮的甲基共振作为在 2.225 ppm 的 ^1H 光谱和 31.07 ppm 的 ^{13}C 光谱的内部参数。来自 Varian, COSY, TOCSY, NOESY, ^{13}C - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HSQC-TOCSY 和 ^{13}C - ^1H HMBC 的与标准同核和异核相关的 2D 脉冲序列被用于一般性归属。2D ^1H - ^{31}P HSQC 实验在 Varian Inova 400 光谱仪上进行 6 小时完成。通过系列 1D-HSQC 实验在 12 Hz 优化耦合常数。F2 (^1H) 维的扫描宽度为 6.0ppm, F1 (^{31}P) 维的扫描宽度为 16.2ppm。在松弛延迟期, 水预饱和延迟是 1.5s, t_2 的取数时间是 0.21s, 在每隔 180 (HMQC) 扫描的模式下, 可获得 32 格。2D ^1H - ^{31}P HSQC-TOCSY 实验与 HSQC 实验采用相同的参数在 Varian Inova 400 光谱仪上进行 8 小时, TOCSY 混合时间为 80ms。

实施例3, 表1: 来自于多杀性巴氏杆菌菌株Pm70的核心0S、O-脱酰和KOH处理的LPS的阴离子CE-MS和推测的组成。平均质量单位根据如下推测组成用于计算分子量: Hex, 162.15; Hep, 192.17; Kdo, 220.18; HexNAc, 203.19; HexN, 161.15; PEtn, 123.05。

菌株	$[M-3H]^+$	$[M-2H]^+$	观察到的分子离子	计算的分子离子	相对强度	推测组成
Pm70 核心0S	-	1111.2	2224.4	2224.0	0.1	2HexNAc, 4Hep, 5Hex, Kdo
	-	1173.1	2348.2	2347.0	0.2	2HexNAc, 4Hep, 5Hex, PEtn, Kdo
	829.8	1245.3	2492.5	2491.2	1.0	2HexNAc, 4Hep, 6Hex, PEtn, aKdo
Pm70 O-脱酰	1125.7	1689.3	3380.3	3378.2	0.1	2HexNAc, 4Hep, 5Hex, 2Kdo, 脂质 A-OH
	1132.9	1700.7	3402.5	3400.1	0.3	2HexNAc, 4Hep, 6Hex, Kdo, P, 脂质 A-OH
	1166.7	1750.4	3502.9	3501.2	0.2	2HexNAc, 4Hep, 5Hex, PEtn, 2Kdo, 脂质 A-OH
	1173.8	1761.4	3524.6	3523.1	1.0	2HexNAc, 4Hep, 6Hex, PEtn, Kdo, P, 脂质 A-OH
	1215.2	-	3648.6	3646.2	0.2	2HexNAc, 4Hep, 6Hex, 2PEtn, Kdo, P, 脂质 A-OH
Pm70 KOH	980.3	1471.3	2944.3	2944.2	1.0	6Hex, 4HexN, 4Hep, Kdo, 4P
	973.3	-	2922.9	2922.8	0.2	5Hex, 4HexN, 4Hep, 2Kdo, 3P

实施例3, 表2: 对于来自于多杀性巴氏杆菌Pm70的完全脱酰 (KOH处理的) LPS^a和核心OS^b的¹H-和¹³C-NMR化学位移。

	<u>H-1</u>	<u>H-2</u>	<u>H-3</u>	<u>H-4</u>	<u>H-5</u>	<u>H-6</u>	<u>H-7</u>	<u>H-8</u>	NOE's 内部	NOE's 之间	NOE's 远程
<u>α-GlcN^a</u> (A)	5.74 (92.5)	3.46 (55.0)	3.93 (70.3)	3.52 (70.6)	4.14 (73.4)	4.31 (70.1)			3.46 H-2		
<u>β-GlcN^a</u> (B)	4.89 (99.9)	3.17 (56.4)	3.91 (72.6)	3.92 (75.2)	3.78 (74.7)	3.72 (63.2)			3.91 H-3 3.78 H-5	4.31 α-GlcN H-6 3.89 α-GlcN H-6	
<u>Kdo^a</u> (C)	-	-	2.37 (35.0)	4.62 (71.1)	4.28 (72.7)	3.83 (73.0)	3.77 (70.1)	3.97 (64.5)		3.72 β-GlcN H-6 3.57 β-GlcN H-6	
<u>Hep I^a</u> (E)	5.19 (100.1)	4.15 (71.0)	4.03 (74.1)	4.20 (75.0)	4.20 (72.4)	4.08 (81.4)	4.08 (63.7)			4.28 Kdo H-5 3.77 Kdo H-7	4.15 H-2
<u>Hep I^b</u> (E)	5.10 (99.4)	4.02 (70.6)	3.99 (nd)	4.22 (73.9)	nd (nd)	4.11 (79.5)	3.86 (62.1)			nd nd	4.02 H-2
<u>Hep II^a</u> (F)	5.74 (99.8)	4.34 (79.8)	4.47 (75.3)	4.09 (66.6)	3.67 (72.8)	4.09 (69.4)	3.71 (64.1)			5.23 Hep III H-1 4.03 Hep LH-3	4.34 H-2

<u>Hep II^b</u> (F)	5.87	4.31	4.41	4.09	3.67	4.09	nd	5.23 Hep III H-1	4.31 H-2
	(99.4)	(80.6)	(76.3)	(66.2)	(72.3)	(69.7)	nd	3.99 Hep I H-3	
<u>Hep III^{ab}</u> (G)	5.23	4.06	3.90	3.87	3.88	4.06	3.80	5.87 Hep II H-1	4.06 H-2
	(102.0)	(71.7)	(71.8)	(67.2)	(72.7)	(70.6)	3.76	4.31 Hep II H-2	
							(64.6)		
<u>β-Glc(Glc I)^{ab}</u> (I)	4.65 ^c	3.56	3.41	3.63	3.53	4.11	-	4.22 Hep I H-4	3.53 H-5
	(104.2)	(74.4)	(78.2)	(70.6)	(74.9)	3.75	(65.8)	4.11 Hep I H-6	3.41 H-3
<u>α-Glc(Glc II)^{ab}</u> (H)	5.22	3.60	3.83	3.61	3.93	3.97	-	4.11 Hep I H-6	3.60 H-2
	(101.9)	(72.3)	(73.1)	(68.7)	(71.7)	3.77	(60.6)		4.65 Glc I H-1
<u>Hep IV^{ab}</u> (J)	5.12	4.01 ^d	4.00	4.15	3.94	4.31	nd	4.11 Glc I H-6	4.01 H-2
	(100.2)	(70.1)	(69.8)	(78.0)	(71.1)	(80.1)	nd	3.75 Glc I H-6	
							(nd)		
<u>β-Glc(Glc III)^{ab}</u> (K)	4.70	3.36	3.55	3.44	3.58	3.96		4.15 Hep IV H-4	3.55 H-3
	(103.5)	(74.3)	(76.6)	(70.6)	(76.9)	3.76	(61.7)		3.58 H-5
<u>β-Glc(Glc IV)^{ab}</u> (L)	4.69	3.46	3.71	3.71	3.70	4.02		4.31 Hep IV H-6	3.71 H-3
	(104.4)	(74.1)	(75.2)	(79.8)	(75.7)	3.84	(61.1)	4.15 Hep IV H-4	3.70 H-5

β -Gal (Gal I) ^{ab} (M)	4.53 (104.3)	3.61 (71.8)	3.77 (73.2)	4.07 (78.4)	3.81 (76.4)	3.93 (86)	3.71 Glc IV H-4	3.77 H-3 3.81 H-5
α -Gal (Gal II) ^a (N)	4.99 (101.2)	4.07 (68.8)	4.17 (79.9)	4.32 (69.9)	4.42 (71.4)	3.72 (61.2)	4.07 Gal I H-4	4.07 H-2 3.81 Gal I H-5
α -Gal (Gal II) ^b (N)	4.95 (101.4)	3.93 (68.7)	4.02 (79.9)	4.29 (69.9)	4.41 (71.3)	3.71 (61.4)	4.07 Gal I H-4	3.93 H-2 3.81 Gal I H-5
β -GalNAc I ^a (O)	5.01 (101.3)	3.53 (53.1)	4.20 (74.3)	4.40 (63.9)	3.80 (76.2)	nd (nd)	4.17 Gal II H-3	4.20 H-3 3.80 H-5
β -GalNAc I ^b (O)	4.73 (103.7)	4.12 (51.9)	3.84 (75.7)	4.13 (64.7)	3.67 (75.9)	nd (nd)	4.02 Gal II H-3	3.84 H-3 3.67 H-5
α -GalNAc II ^a (P)	5.53 (92.6)	3.65 (51.5)	4.23 (67.0)	4.07 (68.8)	4.01 (73.4)	3.82 (62.1)	4.20 GalNAc I H-3	3.65 H-2
α -GalNAc II ^b (P)	5.09 (94.5)	4.24 (50.4)	3.82 (68.7)	4.03 (69.3)	3.89 (72.5)	3.82 (61.8)	3.84 GalNAc I H-3	4.24 H-2 4.12 GalNAc I H-2

<u>PEtm^b</u>	3.26 (40.1)	4.16 (62.2)
<u>CH₃C=O^b</u>	2.06 (22.4)	
<u>CH₃C=O^b</u>	2.04 (22.1)	

^a来自KOH处理的LPS数据；^b来自核心OS样品的数据；^{ab}来自KOH处理的LPS和OS样品的数据，归属一致；除了来自KOH处理的LPS的残基I的¹H-1化学位移是4.60 ppm和来自KOH处理的LPS的残基J的¹H-2化学位移是4.11 ppm。

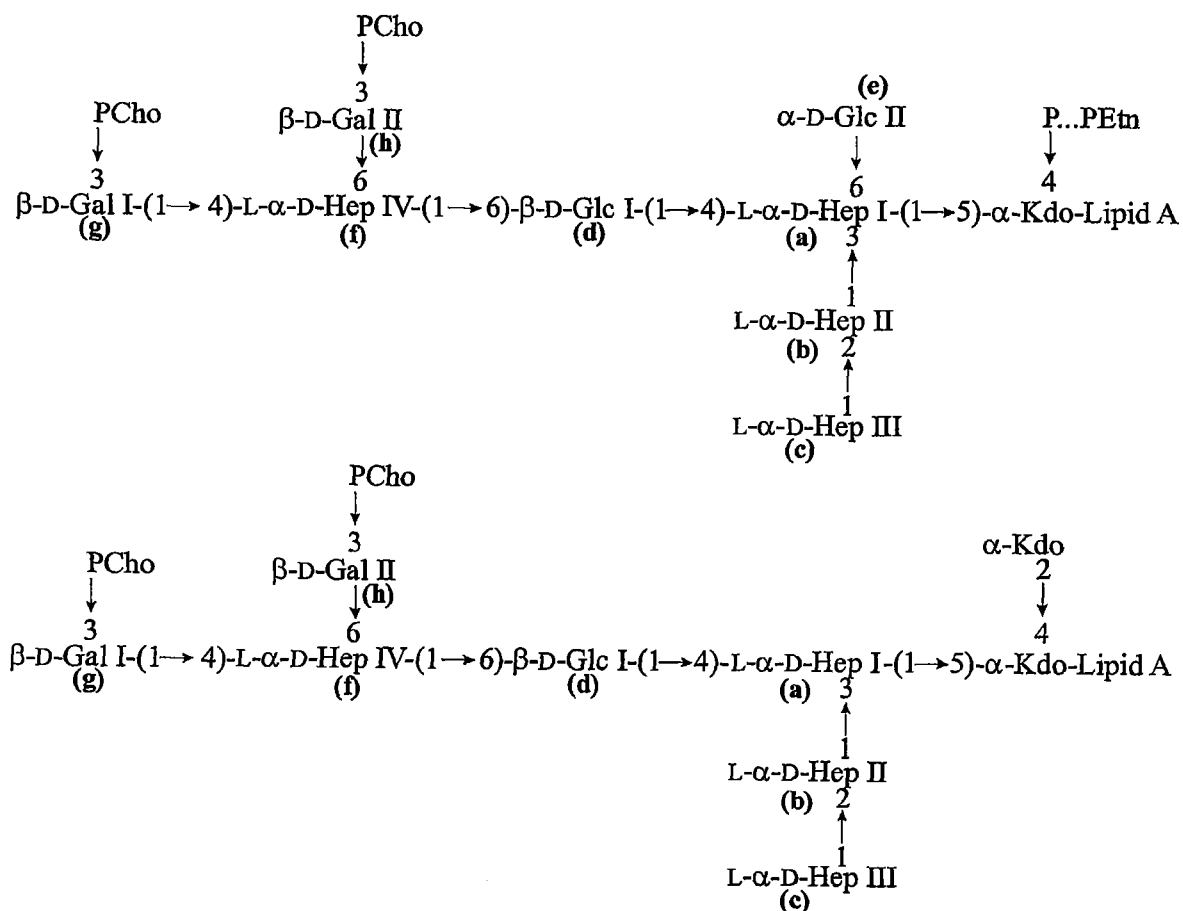
实例例3, 表3. 在多杀性巴氏杆菌基因组菌株Pm70中, LPS核生物合成的推定糖基转移酶。

多杀性巴氏杆菌基因	推定功能	最佳同源体	e-value
M1305	Kdo to lipid A α-2,6 Kdo 转移酶	KdtA <i>Hi</i> (HI0652) KdtA <i>Hd</i> (HD0454)	e ⁻¹⁵² e ⁻¹²⁰
M 1843	Hep I to Kdo α-1,5 庚糖基转移酶	WaaC <i>Kp</i> WaaC <i>Ec</i>	e ⁻⁹⁶ e ⁻⁹⁴
M 1302	Hep I to Kdo α-1,5 庚糖基转移酶	OpsX <i>Hi</i> (HI 0261)	e ⁻¹⁴⁹
M 1844	Hep II to Hep I α-1,3 庚糖基转移酶	RfaF <i>Hi</i> (HI 1105) RfaF <i>Hd</i>	e ⁻¹⁶⁴ e ⁻¹³⁹
M 1294	Hep III to Hep II α-1,2 庚糖基转移酶	OrfH <i>Hi</i> (HI 0523)	e ⁻¹²⁷
M 0223	PEtm to Hep II	Lpt3 <i>Nm</i> (NMB 2010)	e ⁻¹⁵⁴
M 1306	Glc I to Hep I β-1,4 葡萄糖基转移酶	LgtF <i>Hi</i> (HI 0653)	e ⁻¹⁰⁸
M 1144	Hep IV to Glc I α-1,6 庚糖基转移酶	LbgB <i>App</i> LbgB <i>Hd</i> (HD 1720)	e ⁻⁹³ e ⁻⁸⁷
M 1143	Glc IV to Hep IV β-1,6 葡萄糖基转移酶	LbgA <i>Hd</i> (HD 1721) LbgA <i>App</i>	e ⁻⁷⁴ e ⁻⁷³
M 1141	Gal I to Glc IV β-1,4 半乳糖基转移酶	Lic2a <i>Hi</i> (HI 0550)	e ⁻³⁸
M 1139	Gal II to Gal I α-1,4 半乳糖基转移酶	LgtC <i>Hi</i> (HI 0258) LgtC <i>Nm</i>	e ⁻⁶² e ⁻⁵⁹
M 1140	GalNAc I to Gal II α-1,3 N-乙酰半乳糖基转移酶	LgtD <i>Hi</i> (HI 1578)	e ⁻⁸³

M 1138	GalNAc II to GalNAc I β-1,3-N-乙酰葡萄糖氨转移酶	GTase App	e ⁻⁶²
M 0858	CMP-Kdo 合成酶	HI0058	e ⁻¹⁰³
M 0884	ADP-Hep 焦磷酸化酶	HI1526	0
M 1289	UDP-Glc 焦磷酸化酶(galU)	HI0812	e ⁻¹⁴³
M 0286	UDP-Glc-4-异构酶(galE)	HI0351	e ⁻¹⁷³
M 1030	UDP-N-乙酰葡萄糖氨异构酶	HI0873	e ⁻¹²²

实施例 4 本实施例形成了在“Carbohydrate Research 340, 59 (2005)”中一篇文献的基础。多杀性巴氏杆菌菌株 VP161 的脂多糖结构分析。

本实施例阐明了来源于多杀性巴氏杆菌菌株 VP161 的脂多糖结构。该脂多糖易于受到多种降解过程的影响。通过单糖和甲基化分析、NMR 光谱及质谱建立起纯化产物的结构。如下的脂多糖结构是在这些实验的结合数据的基础上确定的，



其中，根据 NMR 数据，所有的糖都以吡喃糖环形式存在，Kdo 代表 2-酮-3-脱氧-辛酮糖酸，L- α -D-Hep 代表 L-甘油-D-甘露-庚糖，PPEtn 代表焦磷酸乙醇胺，PCho 代表磷酸胆碱。有趣的是，当检测 O-完全脱乙酰基的 LPS 时，很明显，在该分子的 Kdo 区域的排布中存在变化性。发现带有一个 Kdo-P 部分的糖型，以及具有 Kdo-Kdo 基团的糖型。此外，当存在两个 Kdo 残基时，Glc II 残基没有连接到 Hep I 上，但是当 Kdo-P 排布很复杂时，Glc II 残基则是连接到 Hep I 上的，这揭示出一种生化合成的不相

容性，这种不相容性归结于空间位阻作用或者不合适的受体构象。在包括基因组株 *Pm70* 在内的，其他被研究的多杀性巴氏杆菌菌株中 LPS 的 Kdo 区也发现了这种变化。

多杀性巴氏杆菌 (*Pm*) 是革兰氏阴性菌，也是多个物种的病原体，会在可食用动物和人类中产生很严重的疾病。*Pm* 菌是鸡或火鸡的禽霍乱，牛的出血败血症，猪的萎缩性鼻炎以及人的猫狗咬伤传染病的致病媒介。之前就已经识别出了一些 *Pm* 毒性因子，这些毒性因子包括血清组 A 和 B 的荚膜及 LPS。然而，关于从 *Pm* 分离出来的 LPS 的内毒素性质，存在有互相矛盾的报告。从血清组 B: 2 株分离出的被证明是内毒性的 LPS，静脉注入 LPS 能在美洲野牛中产生出血性败血症的临床症状。但是，发现火鸡幼禽能相对抵抗从 *Pm* 血清组 A 株中分离的 LPS 的致死作用，尽管其炎症反应和显微镜观测的肝损伤与在哺乳动物宿主中所观察到的相似。与之相反的，发现鸡胚胎和小鼠对于 *Pm* LPS 的毒性作用高度敏感。

基于对 LPS 的抗体应答，*Pm* 菌株可归类于 Heddleston 血清型，同时，针对热灭活 *Pm* 疫苗而产生的抗体主要用于抵抗 LPS，并保护宿主抵抗具有相同血清型的菌株。早期研究表明，采用热酚 / 水方法纯化并被注射到小鼠和兔子体的 LPS 产生很弱的抗体应答，并且不产生抵抗 *Pm* 感染的保护作用，然而，相同的 LPS 注射到鸡体内，则诱导出很好的抗体应答，这种抗体应答能被动地保护接种者抵抗疾病。由血清型 A 菌株的 LPS 产生的单克隆抗体显示出具有杀菌性，并能够完全保护小鼠抵抗同源攻击。此外，抗 *Pm* 血清型 B 菌株 LPS 的调理性单克隆抗体，表现出能够部分保护小鼠抵抗 *Pm* 感染。

经过修饰的 LPS 结构无疑会影响 *Pm* 在生物体内的生存力。最近，辨别出了三株被大幅度减毒的 *Pm* 菌株 VP161 的突变体，每一个突变体在基因 *pm1294* (命名为 *waaQpm*) 处都有一个单转座子插入。该基因 *pm1294* 随后被证明用于编码庚糖基转移酶，该基因的突变产生高度截短的 LPS 结构。此外，*Pm galE* 突变体之前就已经被构建出来，并在小鼠体内减毒，但没有其 LPS 结构分析被报导过。采用被荚膜抗原敏化的红血球进行的被动血球凝集试验，根据 *Pm* 荚膜抗原，将其分离株按血清型分组为 5 种血清型组 A、B、D-F。血清组 A (透明质酸)，D (肝素) 和 F (软骨素) 的荚膜的

结构信息是可获得的，所述透明质酸、肝磷脂和软骨素中的每一种都是已经被充分研究的粘多糖。体细胞（LPS）类型也可以用来鉴定细胞株，这里有两种主要报道过的系统。Namioka 系统基于试管凝集实验，能够识别 11 种血清型；而 Heddleston 体系应用凝胶扩散沉淀反应，能够识别 16 种血清型，是目前的优选方法。

1981 年，开始推荐使用一种鉴定多杀性巴氏杆菌血清型的标准系统，该系统利用字母 A、D、E 和 F 辨别 Carter 荚膜类型，同时利用数字辨别 Heddleston 体细胞类型。*Pm* 表达不具有多聚体 O-抗原的 LPS 分子，即所谓的粗糙型 LPS。近来，我们分析了基因组菌株 *Pm70* 的 LPS 结构，该 LPS 结构展示出粗糙型 LPS 结构。该项研究也在另一种 *Pm* 菌株，即 VP161（一种高毒性的血清型 A:1 菌株）上进行，以获得对 *Pm* LPS 结构的启示，以及研究在菌株中的 Kdo 区域是否存在变异。之前，我们已经表征出 VP161 的庚糖基转移酶突变体的核心 OS，这里我们报道 LPS 的完整结构，包括在 LPS 分子的 Kdo 区域的新型排布。

实验

培养基和培养条件

多杀性巴氏杆菌 VP161 在巧克力琼脂平板上于 37℃ 初始生长 16h，然后将培养物接种到 1L 脑心浸液（BHI）培养基，该脑心浸液（BHI）培养基添加有终浓度为 5 ug/ml 的 β -NAD（Sigma N-7400），终浓度为 5 ug/ml 的氯化血红素（Sigma H-2250）和 1% 葡萄糖（10g）。然后，将培养物在 37℃、200rpm 温育 6h 后，接种到发酵罐。然后，多杀性巴氏杆菌 VP161 在 28L 发酵罐内，在 24L BHI 肉汤中，在 37℃、20% DO 值条件下培养 18h。加入苯酚到 2% 来杀死细胞，加入苯酚 3h 后加入 1g 透明质酸酶（Roche Chemicals）并搅拌 1h；之后，使用 Sharples 连续离心机（~210g）收获细胞。

脂多糖的分离、纯化和降解

将多杀性巴氏杆菌细胞（湿重约 210g）冻干，得到约 56g 冻干细胞。为了提高 LPS 萃取效率，将冻干细胞用有机溶剂洗涤（1 倍乙醇，2 倍丙酮，2 倍轻石油醚）去除脂质和其他亲脂性成分。洗涤后的细胞（从约 42g 得到 10g）采用热酚 / 水方法进行萃取，水相合并并相对流水透析 48h。将渗

余物冻干，得到约 1.6g，配制为 2%水溶液，用 DNA 酶和 RNA 酶在 37℃处理 4h，接下来用蛋白酶 K 在 37℃处理 4h。透析除去小肽。冻干后，将透析物（约 0.2g）配制为 2%水溶液，8000g 下离心 15 分钟（得约 85mg 的 8K 沉淀），接着将上清液在 100,000g 下进一步离心 5h。将含有纯化的 LPS 的沉淀重新溶解、冻干（得约 17mg）。为了制备 O-脱乙酰基 LPS (LPS-OH)，将 8K 沉淀材料（约 40mg）以无水肼在 37℃搅拌处理 1h。上述反应冰浴冷却，然后，逐步地，加入冷丙酮（-70℃，5 倍体积）破坏过量的肼，通过将重新溶解的沉淀（约 35mg）离心、冻干分离得到沉淀的 LPS-OH。然后，样品以冻干的各组分通过 Bio-Gel P-2 柱进行纯化。以 1%冰醋酸（10mg/ml，100℃，1.5h）分别处理 8K 沉淀材料（约 45mg）和 LPS（约 17mg），随后通过离心（5,000g）去除不溶的脂质 A，分离得到核心寡糖（OS）。接着，采用与上述相同的过程，将来自 8K 沉淀的冻干 OS 样品通过 Bio-Gel P-2 柱进行进一步纯化。以 4N KOH 在 125℃处理 LPS-OH（约 12mg）16h，可将完全脱酰的 LPS 分离出来；随后的中和产物可通过阴离子交换液相色谱分离。

分析方法

可通过 GLC-MS 以其糖醇乙酸酯衍生物的形式测定糖。在 100℃用 4M 三氟乙酸水解样品 4h，水解产物在水中用 NaBD₄ 还原 16h；然后，以残留的乙酸钠为催化剂，用乙酸酐在 100℃乙酰化 2h。GLC-MS 仪装备有 30M DB-17 毛细管柱（以 3.5℃/min 的速度从 180℃升温到 260℃），MS 在 Varian Saturn II 质谱仪的电子撞击模式下进行。通过 NaOH/DMSO/甲基碘方法进行甲基化分析，并应用 GLC-MS 进行分析。绝对构象可通过丁基糖苷衍生物的 GLC 分析来确定。

质谱分析

直接将样品分散到含有 0.5%乙酸的 25%乙腈水溶液中，在 VG Quattro 质谱分析仪（Micromass, Manchester, U.K.）的阴离子模式下进行 ESIMS 分析。毛细管电泳(CE)-MS 在 Prince CE 系统（Prince Technologies, The Netherlands）中进行，该 Prince CE 系统通过一微喷雾接口与 API 3000 质谱分析仪（Applied Biosystem/Sciex, Concord, Canada）连接。保护液（异丙醇-甲醇，2:1）以 1μL/min 的速度输送到

一个具有低死体积的三通管 (250 μm i. d., Chromatographic Specialties) 中。所有的水溶液在使用前经过 0.45- μm 滤膜 (Millipore) 过滤。一个不锈钢电子喷射针头 (27 号) 邻接该低死体积的三通管, 使保护液能够输送到毛细管柱的末端。使用 pH9.0, 含有 5% 甲醇的 10mM 乙酸铵 / 氢氧化铵的去离子水溶液作为洗脱液, 在长约 90cm 的空融硅毛细管中完成分离。在注射部位一般使用 20kV 电压。使用激光钳 (Sutter Instruments) 将毛细管的出口渐缩为 15 μm i. d. 在全质量扫描模式下, 每 1m/z 单元步骤的驻留时间设置为 3.0ms, 即可获得质谱光谱。每 1m/z 单元驻留时间设置为 1.0ms, 得到 MS/MS 数据。在只有 RF 的四极碰撞室中, 所选择的先驱离子与氮气碰撞活化形成碎片离子, 通过扫描第三级四极对碎片离子进行质谱分析。

核磁共振

NMR 实验在使用一个 5mm 或 3mm 三重共振 (^1H , ^{13}C , ^{31}P) 探针, 在 Varian Inova 400, 500 和 600MHz 光谱仪上进行。冻干的糖样品溶解于 600 μL (5mm) 或者 140 μL (3mm) 的 99%D₂O 中。该 NMR 实验在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 以抑制在 4.78ppm 处的 HOD (氘化 H₂O) 信号。丙酮在 2.225ppm 的 ^1H 光谱和 31.07 ppm 的 ^{13}C 光谱的甲基共振作为内部基准。来自 Varian, COSY, TOCSY, NOESY, ^{13}C - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HSOC-TOCSY 和 ^{13}C - ^1H HMBC, 与标准同核和异核的相关的 2D 脉冲序列被用于一般性归属。1D ^{31}P 实验在一台扫描宽度为 40ppm, 20000transient, 采集时间 1.6s 的 Varian Inova 200 光谱仪中进行。2D ^1H - ^{31}P HSQC 实验在 Varian Inova 400 光谱仪上进行 6h。在 10Hz 通过进行一系列 1D-HSQC 实验来优化耦合常数。F2(^1H) 维的扫描宽度为 6.0ppm, F1(^{31}P) 维的扫描宽度为 16.2ppm。松弛延迟期的水预饱和时间为 1.5s, t₂ 采集时间为 0.21s, 在每格 180 (HMQC) 扫描的模式下, 可获得 32 格。采用与 HSQC 实验相同的参数, 2D ^1H - ^{31}P HSQC-TOCSY 实验在 Varian Inova 400 光谱仪下进行 8h, 其中 TOCSY 混合时间为 150ms。

结果与分析

多杀性巴氏杆菌菌株 VP161 的研究

纯化的 LPS 和 8K 沉淀材料的糖分析结果显示, 葡萄糖 (Glc), 半乳糖 (Gal) 和 L-甘油-D-甘露-庚糖 (LD-Hep) 的比例分别约为 2: 1: 4。同

时,也鉴定出少量 N-乙酰-葡糖胺 (GlcNAc)。丁基-糖苷衍生的核心寡糖的 GLC 分析结果表明 Glc 和 Gal 均是 D-型异构体。

LPS-OH 可由发酵罐培养细胞的 LPS 制备得到,然后应用 CE-MS 对其进行分析(实施例 4 表 1)。在 m/z 为 992.0, 999.0 和 1040.0 处观察到三价离子,对最小分子来说,这些三价离子对应于 2PCho, 4Hep, 3Hex, 2Kdo 和羟基脂质 A 的组成。如下面所显示的那样,较大的糖型对应于这样的分子,该分子中磷酸分子替代第二个 Kdo 残基,在核寡糖上有多于一个的己糖残基;对于最大的糖型 (m/z 1040.0),则对应于在 Kdo-P 处有附加的 PEtn 残基。经巧克力琼脂平板培养之后,另外的糖型可通过 m/z 为 1033.0 和 1081.0 的三价离子显示出来(实施例 4 表 1)。MS/MS 分析结果显示,在糖型混合物中,发现了两种不同的羟基脂质 A-OH 类型,其是分子质量为 952 amu 的基础类型,可根据 MS/MS 的 m/z 为 475.5 和 951.5 的二价和一价离子显示出来;另一种含有附加 PEtn 残基的类型,根据 MS/MS 的 m/z 为 536.5 的二价离子而被显示出来(图 27C)。O-脱酰脂质 A 的基础类型(952amu)包括 N-乙酰(3-OH C 14:0)葡糖胺残基的二糖,每一个残基都用一个磷酸分子取代。由于 m/z 为 1033.0, 1040.0 和 1081.0 的三价离子的存在,较大的脂质 A 类型只有在平板生长细胞中才能观察得到。此外,根据糖型的 MS/MS 找到了存在一部分 P-PEtn 的证据,此与借助单价离子 (m/z 为 219.5) 的三价离子 m/z 1040.0 和 1081.0 的相对应(图 27c)。根据 m/z 为 992.0, 999.0 和 1033.0 的三价离子的 MS/MS 没有发现这个离子。进一步的 MS/MS 试验显示了核心 OS 分子的大小。对于 m/z 为 992.0 的三价离子,如 m/z 为 1012.5 的二价离子所表明的那样,核心 OS 为 2027amu(图 27a)。这对应于 2Kdo、2PCho、4Hep 和 3Hex 的组成。对于 m/z 为 999.0 的三价离子,如 m/z 为 1023.5 的二价离子所表明的那样,核心 OS 为 2049amu(图 27b)。这对应于 Kdo, P, 2PCho, 4Hep, 3Hex 的组合。对于 m/z 为 1040.0 的三价离子,如 m/z 为 1084.5 的二价离子所表明的那样,发现核心 OS 为 2172amu,或者,如 m/z 为 536.5 的二价离子所表明的那样,推测核心 OS 为 2049amu,其对应于带有附加 PEtn 残基的基础脂质 A 类型(图 27C)。因此,如那两个用于识别 m/z 为 475.5 和 536.5 的两种脂质 A 类型的特征二价离子所证实的那样, m/z 为 1040.0 的离子对应于异构糖型,该异构糖

型在 Kdo 上具有部分 P-PEtn 或在脂质 A 上具有附加 PEtn。在 MS/MS 分析中也观察到了从 Kdo 失去 CO₂ 的证据，通常情况下均如此。

对核心寡糖（来源于 LPS 和 8K 沉淀材料，产生相同的光谱）单独进行的 MS 分析，显示出来源于 m/z 903.0 和 984.0 的二价正离子的不同碎片形式，这些二价正离子对应于实施例 4 表 1 中在 m/z 为 902.0 和 983.0 的二价负离子，这与最接近 Kdo 的庚糖残基（Hep I）上己糖残基的存在与缺失相一致。 m/z 903 的二价离子（图 28a）的 MS/MS 显示了与在 Hep I 上缺失 Hex 残基相一致的碎片形式。 m/z 984 的二价离子（图 28b）的 MS/MS 显示，与前者相比，较大的 OS 有附加己糖残基，该己糖残基位于 Hep I 残基上，这一点可通过 m/z 682.0 的二价离子的存在，并且根据 m/z 903.0 的二价离子的 MS/MS 的该信号的消失但 m/z 697.0 的二价离子的出现来确定（图 28a）。这些数据综合起来表明 VP161 LPS 产生了一组新糖型，一些糖型包含一个带有磷酸或者连接有焦磷酸乙醇胺部分的一种 Kdo 类型，以及包含两个 Kdo 分子的另一类。在包含两个 Kdo 分子的种类中，在核心 OS 最接近的庚糖残基上不存在己糖残基，这表明这种排布的生物合成是不可能的。PCho 残基的位置也可通过这些在正离子模式下的 MS/MS 试验来确定。 m/z 为 424.5 的二价离子发现对应于 2PCho、2Hex 和 Hep 的组成，该二价离子的后继 MS/MS/MS 显示出分别与 PCho-Hex 和 PCho-Hex-Hep 相对应的 m/z 为 328.5 和 520.5 的一价离子，这表明两个 PCho-Hex 部分连接于 Hep 残基（图 28c）。

为了确定分子的连接方式，对 0-脱酰 LPS (LPS-OH) 进行了甲基化分析，结果显示末端 Glc, 6-取代的 Glc, 末端 LD-Hep, 2-取代的 LD-Hep 和 4, 6-二取代的 LD-Hep 以摩尔比约为 1: 1: 1: 1 的比例存在，同时，也发现了极少量的末端 Gal, 3, 4-二取代的 LD-Hep 和 3, 4, 6-三取代的 LD-Hep。在为除去磷酸残基的 HF 处理过程之后（这些磷酸残基会在水解过程中阻碍磷酸化糖的最优释放），重复进行甲基化分析，结果显示，除 t-Gal 残基之外，相同的糖以相同的比例存在，该 t-Gal 残基现在两倍于其他成分的量，这表明 PCho 残基取代了 Gal 糖基。

为了阐明 OS 的确切位置和连接方式，对那些能发出最具决定的和均一的光谱的 OS 部分进行了 NMR 研究。以那些结构相关的核心 OS 作为参考，

所述核心 OS 来源于多杀性巴氏杆菌株 *Pm70* 以及相关的菌种（溶血性曼氏杆菌和胸膜肺炎放线杆菌），通过 COSY 和 TOCSY 实验获得了 OS 样品的 ¹H 共振信号的归属（实施例 4 表 2）。从最近公开的多杀性巴氏杆菌株 *Pm70* 来看，内核残基（Hep IV (f/f')）丝毫不差地连接于内核上，实施例 4 表 2 所列出的归属也与之相一致。然而，在 VP161 核心 OS 的 Hep II (b) 的 3-位没有 PEtn 残基。对于核心 OS 样品来说，有趣的是，在 Hep I (a) 上 GlcII 残基 (e) 的存在与缺失会对余下的内核残基导致两组信号的辨别（图 29）。如上所述，在 4.64 (d) 和 4.51 (d') ppm 的两个 Glc I 信号可通过连接到 Hep I (a) 的 4-位和 6-位的 NOE 识别出来，然而，当 Glc II 缺失时，在 GlcII(e) 和在 4.51ppm 处 GlcI 残基 (d') 的端基异构体质子共振之间的 NOE 连接的消失鉴定出该 GlcI (d') 残基的自旋系统。反之，当 Glc II 存在时，GlcII(e) 和在 4.64ppm 处 GlcI 残基 (d) 的端基异构体质子共振的 NOE 间连接的存在，则表征出该 GlcI (d) 残基的自旋系统（图 29），先前就已经在 *Pm70* 和相关物种溶血性曼氏杆菌和胸膜肺炎放线杆菌的 LPS 中观察到了这种端基异构体 NOE 间的连接。采用这种方式，基于 GlcII (e) 的存在与缺失，归属余下的内核残基就成为了可能。在 Hep IV (f/f') 上的己糖残基的位置与鉴定仍然还需要阐明。MS 分析显示，两个己糖残基都取代有 PCho 残基，并且都取代到 HepIV(f/f') 上。在 HF 处理之后进行的甲基分析中所确定的 t-Gal 量的增加证实了这一点，这表明支撑 PCho 的己糖残基都是 Gal 糖基。两个 β 构型的 Gal 残基 (Gal I 和 Gal II)，依靠它们的耦合常数以及 H-4 的特定旋转系统，分别在 4.70 (g) 和 4.66 (h) ppm 处的核心 OS 样品中被识别出来。Gal I (g) 和 Gal II (h) 在 Hep IV (f/f') 上的连接位置可以通过 NOESY 实验推测出来，该 NOESY 实验显示 Gal I 残基 (g) 连接在 Hep IV (f) 的 4-位，Gal II 残基 连接到 Hep IV (f/f') 的 6-位（图 29）。这种推测可以通过 ¹³C-¹H-HMBC 实验得到证实，该 ¹³C-¹H-HMBC 实验同时也证实在核心 OS 上的其他连接关系（图 30）。为了确定两个 PCho 残基的位置，进行了 ³¹P-¹H- HSQC 和 ³¹P-¹H-HSQC-TOCSY 实验，结果确认事先归属的每一 Gal 残基的 3-位是每一 PCho 残基的连接位置（图 31）。这可以通过 ¹³C-¹H-HMQC 实验得到证实，该实验确认每一在低磁场区（约 78ppm）Gal 残基的 C-3 原子的化学位移与

磷酸化相一致。

为了进一步探索在分子的 Kdo 区域的新排布,对经 KOH 处理之后的脱乙酰基样品进行了测试。将含有一个和两个 Kdo 残基的完全脱乙酰基的 LPS 部分分离出来,这是能够做到的(图 32a 和 b)。图 32 清楚无误地显现存在有含糖型的一个和两个 Kdo 残基,与在图 32b 中两组横轴和纵轴质子信号(z_{3e} , z_{3a} 、 z'_{3e} 和 z'_{3a})相比,对于图 32a 中 Kdo 的 H-3 质子只有一组横轴和纵轴信号是可见的。对于包含样品的一个 Kdo 残基来说,完整的归属是可能的,但是,由于只能获得极少量的这种糖基,导致很微弱的光谱信号,对于包含样品的两个 Kdo 残基来说,仅仅部分归属是可能的。然而,这两个光谱信号端基异构体区域的基础研究(rudimentary examination)明白无误地显示,在图 32a 中,存在 Glc II 残基(e)信号(这里,仅存在在一个 Kdo 残基);在图 32b 中,不存在 Glc II 残基(e)的信号(这里,存在两个 Kdo 残基)。正如核心 OS 数据所显示的那样, Glc II 残基的存在或缺失会影响几个其他端基异构体质子共振的化学位移,特别是, Hep I (a), Hep II (b) 和 Glc I (d) 信号的化学位移,这与对内核分子构象的影响相吻合。含糖型的一个 Kdo 残基的归属列于实施例 4 表 2,这确认了基于核心 OS 样品的归属,并且可以将其扩展到包括含有一个 Kdo 残基的含糖型的 Kdo-脂质 A 区域在内的归属。

多杀性巴氏杆菌(*Pm*) VP161 株寡糖的结构分析显示了一种与之前已确定的 LPS 核心寡糖结构具有相似性和差异性的结构,这些核心寡糖结构是针对 *Pm* 的基因组菌株 *Pm70* 和其他相关物种溶血性曼氏杆菌(*Mh*),胸膜肺炎放线杆菌(*Ap*)的。在每种情况下,核心 OS 包含一个连接到 Kdo 残基上的等同连接的三庚糖单元。有趣的是,在 *Pm70* 中, Hep II 残基的 3-位多数情况都被 PEtn 残基所取代,而在 VP161 菌株和其他相关物种 *App* 和 *Mh* 中,则没有发现内核 PEtn 残基。排除以 PEtn 取代 HepII 这点变化, *Pm* 菌株与相关的家畜物种 *Mh* 和 *App* 享有一个相对保守的内核结构。*Pm* 内核结构的仅有的其他区别是,与在 *App* 和 *Mh* 中所遇到的 D-甘油-D-甘露构型的庚糖残基相比, L-甘油-D-甘露构型的庚糖残基位于 HepI 的 GlcI 残基的延伸,以及 *Pm* 内核 GlcII 残基的存在是可变的,很显然这是由分子 Kdo 区域的变化性造成的 *Pm*。在 *App* 和 *Mh* 的内核 LPS 中化学定量地发现了该

Glc II 残基。在 VP161 菌株中发现了在该保守内核区域的不同延伸，由此，HepIV 残基被在 4-位和 6-位的 PCho-Gal 的部分双取代。据我们所知，以前还没有观察到这种结构排布。在同一 LPS 分子中碰到两个 PCho 残基，这是很少见的；非典型 Hi 携带菌株 11 和 16 是这种排布的仅有的文献记载例子。PCho 残基的存在可能关系到 *Pm* 生物体的毒性，文献已经报道了 PCho 在呼吸道中的附着和集群作用。同时也发现，菌株 VP161 的突变体在小鼠模型和鸡中都被减毒，该突变体呈现出缺失两个 PCho 残基的被截短的 LPS 结构。其他作者的早期研究也发现了在 *Pm* 血清型 D 菌株的 galE 突变体毒性上的降低，可能由于 LPS 结构的改变所造成的。然而，VP161 LPS 结构最吸引人的地方就是所发现的 Kdo 区域变异，在该 Kdo 区域已经发现到了包含一个 Kdo 和两个 Kdo 的糖型。此外，由 Kdo 区域排布变化所导致的对内核结构的影响，即 HepI 上 Glc II 的存在或者缺失，是令人感兴趣的。负责 GlcII 向 Hep I 残基转移的 α -1, 6 葡糖基转移酶目前并不为人所知。需要指出的是，在 *Pm* 基因组菌株 *Pm70* 中仅识别出 Kdo 转移酶的唯一同源物，该 *Pm* 菌株的 LPS 同样包含带有一个和两个 Kdo 的种类的群组。有趣的是，通过比较来源于 *Pm*、*App* 和 *Mh* 的 Kdo 转移酶的基因序列，以探究任何序列上的差异以及探究其它的调控因子涉及所述的变异，上述序列上的差异可归因于 *Pm* 转移酶的双官能特性 *PmPmMh*。本研究确定了第二种 *Pm* 菌株的 LPS 结构，这两种菌株具有相似的内核结构以及可变的外核修饰，并且都在分子的 Kdo 区域展示出有趣的变异，这种变异的重要性需要进一步研究。

实施例4, 表1: 来自多杀性巴氏杆菌菌株VP161的O-脱酰LPS (LPS-OH) 和核心OS的阴离子CE-MS数据和推测组成。平均质量单位根据如下推测组成用于计算分子量: Hep, 162.15; Hex, 192.17; Kdo, 220.18; PEtn, 123.05; Lipid A-OH, 952.00。

菌株	[M-3H] ³⁺	[M-4H] ⁴⁺	观察到的分子离子	计算的分子离子	脂质 A 大小	核心 OS 大小	推测组成
VP161	992.0	744.0	2979.5	2977.6	952	2025.6	2PCho, 3Hex, 4Hep, 2Kdo, 脂质 A-OH
LPS-OH	999.0	749.0	2999.5	2999.5	952	2047.5	2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P, 脂质 A-OH
	1033.0	774.0	3101.0	3100.7	1075	2025.7	2PCho, 3Hex, 4Hep, 2Kdo, 脂质 A-OH
	1040.0	780.0	3123.5	3122.6	952	2170.6	2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P-PEtn, 脂质 A-OH
	1040.0	780.0	3123.5	3122.6	1075	2047.6	2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P, 脂质 A-OH
	1081.0	810.0	3245.0	3245.6	1075	2170.6	2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P-PEtn, 脂质 A-OH
							[M+2H] ²⁺
VP161		901.8	1805.6	1805.4	-		2PCho, 3Hex, 4Hep, Kdo
核心 OS		982.9	1967.8	1967.6	-		2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo

实施例4, 表2: 对于来自于多杀性巴氏杆菌VP161的核心OS和完全脱酰 (KOH处理的) LPS的¹H-和¹³C-NMR化学位移。
^aKOH处理的LPS 数据是来自包含Kdo残基的糖型; ^b核心OS样品的数据; ^cKOH处理的LPS和OS样品的数据, 归属一致。
 由于Pcho残基的水解和迁移引入的相当大的异源性, 因而不包括来自Gal-I和Gal-II的KOH处理的LPS的数据。

	<u>NOE's</u>								
	<u>H-1</u>	<u>H-2</u>	<u>H-3</u>	<u>H-4</u>	<u>H-5</u>	<u>H-6</u>	<u>H-7</u>	<u>H-8</u>	
	之间				内部				远程
α -GlcN ^a	5.75	3.47	3.93	3.53	4.13	4.31			
(x)	(92.7)	(55.1)	(70.5)	(70.7)	(73.7)	3.90			(70.2)
β -GlcN ^a	4.88	3.17	3.92	3.94	3.78	3.75			
(y)	(100.0)	(56.6)	(72.8)	(75.3)	(74.9)	3.59			(63.4)
Kdo ^a	-	-	2.37	4.62	4.29	3.84	3.77	3.96	
(z)			2.06	(71.2)	(72.9)	(nd)	(70.3)	3.72	(64.6)
			(35.0)						

Hep-I ^a (a)	5.18	4.13	4.01	4.19	4.19	4.11	nd	4.29 Kdo H-5	4.09 H-2
	(100.4)	(71.3)	(75.2)	(75.2)	(72.8)	(81.5)	nd		
Hep-I ^b (a)	5.07	4.09	3.96	4.20	3.78	4.13	3.88	nd	4.09 H-2
	(101.9)	(71.3)	(73.9)	(74.7)	(72.9)	(80.3)	3.75 (62.9)		
Hep-I ^b (a')	5.01	4.15	4.04	4.26	nd	4.05	nd	nd	4.15 H-2
	(101.4)	(71.3)	(73.9)	(74.2)	(nd)	(nd)	nd (64.2)		
Hep-II ^a (b)	5.62	4.26	3.90	3.90	3.63	4.07	3.72	5.14 Hep III H-1 3.96 Hep IH-3	4.19 H-2
	(100.7)	(80.8)	(70.9)	(67.8)	(72.4)	(69.7)	3.62 (64.6)		
Hep-II ^b (b)	5.70	4.19	3.86	3.84	3.55	4.05	3.76	5.14 Hep III H-1 3.96 Hep IH-3	4.19 H-2
	(100.1)	(80.5)	(70.7)	(67.6)	(72.8)	(70.3)	3.65 (64.5)		
									3.75 Hep IH-5

<u>Hep-III^b</u> (b')	5.76	4.17	3.85	3.83	3.60	4.05	3.76	5.11 Hep III H-1	4.17 H-2	3.76 Hep I H-5
	(99.7)	(80.5)	(70.7)	(67.6)	(72.8)	(70.3)	3.65	4.04 Hep I H-3		
							(64.5)			
<u>Hep-III^{ab}</u> (c)	5.11	4.01	3.87	3.83	3.78	4.05	3.77	5.76 Hep II H-1	4.01 H-2	3.94 Hep IV H-3
	(102.4)	(71.4)	(70.8)	(67.0)	(71.6)	(70.3)	3.65	4.17 Hep II H-2		3.59 Glc I H-4
							(64.9)			
<u>Hep-III^b</u> (c')	5.14	4.02	3.87	3.83	3.78	4.05	3.77	5.70 Hep II H-1	4.02 H-2	3.94 Hep IV H-3
	(102.4)	(71.4)	(70.8)	(67.0)	(71.6)	(70.3)	3.65	4.19 Hep II H-2		3.57 Glc I H-4
							(64.9)			
<u>β-Glc-I^{ab}</u> (d)	4.64	3.54	3.40	3.59	3.51	4.09	-	4.20 Hep I H-4	3.51 H-5	5.20 Glc II H-1
	(104.3)	(74.2)	(77.6)	(70.5)	(74.6)	3.76		4.13 Hep I H-6	3.40 H-3	
							(65.8)			
<u>β-Glc-I^b</u> (d')	4.51	3.53	3.42	3.57	3.57	4.05	-	4.26 Hep I H-4	3.57 H-5	

	(104.2)(74.2) (77.7) (70.5) (74.7) 3.83	4.05 Hep IH-6	3.42 H-3
	(65.6)		
<u>α-Glc-II^{ab}</u> (e)	5.20 3.58 3.81 3.58 3.91 3.93 -	4.13 Hep IH-6	3.58 H-2
	(102.6)(72.8) (73.8) (69.4) (72.4) 3.74		4.64 Glc IH-1
	(60.4)		
<u>Hep-IV^{ab}</u> (f)	4.95 4.17 3.93 4.19 3.91 4.32 3.97	4.09 Glc IH-6	4.17 H-2
	(99.9) (70.1) (71.0) (77.2) (70.3) (79.9) 3.75	3.77 Glc IH-6	
	(64.0)		
<u>Hep-IV^b</u> (f)	4.93 4.16 3.93 4.19 3.91 4.32 3.97	4.04 Glc IH-6	4.16 H-2
	(99.9) (70.1) (71.0) (77.2) (70.3) (79.9) 3.75	3.83 Glc IH-6	
	(64.0)		
<u>β-Gal-I^b</u> (g)	4.70 3.69 4.19 4.12 3.80 nd	4.19 Hep IV H-4	4.19 H-3
	(103.2)(71.0) (78.5) (68.6) (75.7) nd		3.80 H-5
	(nd)		

β -Gal-IV ^b (h)	4.66	3.73	4.18	4.11	3.76	nd	4.32 Hep IV H-6	4.18 H-3
	(104.5)	(71.0)	(78.5)	(68.6)	(75.5)	nd		3.76 H-5
PCho-I	4.38	3.68	3.22			(nd)		
	(60.4)	(66.8)	(54.7)					
PCho-II	4.38	3.68	3.21					
	(60.4)	(66.8)	(54.7)					

三价离子，与来自 VP161 LPS-OH 的多数种类 (m/z 999.0) 相比，它对应于另外两个 PEtn 残基。MS/MS 分析显示出所有脂质 A 分子是基础种类，包括一个 N-酰化 (3-OH C 14:0) 葡萄糖胺残基的二糖，每一个残基被磷酸分子所取代，通过 m/z 475.5 和 951.5 的二价和一价离子确定该磷酸分子的分子量为 952 amu。所以该 MS/MS 分析表明了菌株 X73 的额外 PEtn 残基位于 LPS 分子的核心 OS 区域中，核心 OS 分子的推测的质谱表示在实施例 5 的表 1。

对核心寡糖单独进行 MS 分析，显示了一系列的离子与从 LPS-OH 数据推测得到的组成相一致，在与菌株 VP161 比较时显示存在额外的 PEtn 残基。采用阳离子模式从 MS/MS 实验可确定 PEtn 残基的位置。与最大糖型相应的二价离子 m/z 1108 的破碎产生的离子，包括 m/z 183.5⁺ (Pcho)，450.5⁺ (Pcho-Hex-PEtn)，547.5²⁺ (2Pcho, 2PEtn, 2Hex, Hep) 和 916.5²⁺ (M-Kdo-Hex)。在 m/z 547.5²⁺ 处的二价离子在与菌株 VP161 中 m/z 424²⁺ 二价离子作比较时有特别之处，因为它显示出一个具有较高质量 246amu 的糖型，与两个 PEtn 残基的存在一致。对 m/z 916.5²⁺ 二价离子进行 MS/MS/MS 分析，显示产物离子光谱示于图 33a。图 33a 中的破碎模式 PEtn 残基定位于 HepIV 残基上的末端 HEX-Pcho 部分，后续的破碎 m/z 450.5 离子的 MS/MS/MS 实验中(图 33b)，证实该离子与最初推断的 Pcho-Hex-PEtn 部分相一致。

为了证实和扩展这些推测，对分级的核心 OS 样品进行 NMR 实验，该样品包含有两种 PEtn 残基（由未显示的 MS 数据确定）。除了两个末端半乳糖残基外，所有归属与在菌株 VP161 的核心 OS 获得的相同。观察到 VP161 样品的半乳糖残基的 H-1 和 H-2 共振的化学位移，但是 H-3 和 H-4 共振向低场区轻微漂移，分别从 4.17 和 4.12 漂移到 4.21 和 4.17ppm。之前观察到从半乳糖残基的 NOE 间连接，尽管现在在 3.94ppm 处观察到至 H-5 残基的 NOE 内连接（与菌株 VP161 的 3.80 和 3.76ppm 相反）（实施例 5 表 2）。为了证实这两个 PEtn 残基的位置，可通过一个 ³¹P-¹H-HSQC 实验来完成，证实在 4.07ppm 处有一共振作为每一 PEtn 残基的附着点，后续的 ³¹P-¹H-HSQC-TOCSY 实验证实在 3.94ppm 处半乳糖残基的 H-5 共振（图 34）。4.07ppm 归属半乳糖残基 H-6 共振是通过 ¹³C-¹H-HMQC 实验被确认，这表明

作为 α -CH₂ 部分的一个特征正峰，在低区值 (~ 65 ppm) 的每个 Gal 残基的 C-6 原子的低磁场化学位移与磷酸化一致。最后，³¹P-¹H-HSQC-TOCSY 实验证实在 C-6 和 H-5 共振 (也可以说是 H-5 和 C-6 共振) 的交叉峰，证实两个半乳糖残基的 6 位作为在菌株 X73 核心 OS 发现的额外两个 PEtn 部分的附着点 (图 35)。

所以这项研究证实了来自又一个血清型 A 菌株的 LPS 中的相似核心 OS 结构。进一步研究将扩展 LPS 结构分析到另外的血清型，来检验这异常的终端结构是否存在与其它血清型中。在六碳糖的 6 位上 PEtn 的证实多少不寻常。PEtn 通常在脑膜炎双球菌和流感杆菌的庚糖残基 6 位上发现。我们实验室最近的研究已经证实 PEtn 在许多流感杆菌菌株的终端 GalNAc 残基的 6 位处，新近的报道也发现在柠檬酸细菌属样品的 3-连接位的半乳糖分子的 6 位上的 PEtn 残基。在这里观察到带有相似化学位移的 PCM1443(血清型 039)。

1、实验

1.1 细菌的培养，LPS 的分离和分级

多杀性巴氏杆菌菌株 X73 (NRCC#6235) 培养并分离。简言之，将多杀性巴氏杆菌细胞 (~ 210 g 湿重) 冻干，得到 ~ 65 g。冻干细胞用有机溶剂 (1 \times 乙醇，2 \times 丙酮，2 \times 轻石油醚) 清洗以除去类脂和其它亲脂成分，增强 LPS 提取效率。洗过的细胞 (从 ~ 42 g 中取 10g) 通过热酚/水方法提取，并将水相合并，相对流水透析 48 小时。渗余物冻干得到 ~ 0.57 g，制成约 2% 的水溶液，在 37 $^{\circ}$ C 用 DNA 酶和 RNA 酶处理 4 小时，接着用蛋白酶 K 在 37 $^{\circ}$ C 处理 4 小时。小肽经透析除掉。冻干后，渗余物 (~ 0.42 g) 制成约 2% 的水溶液，在 8000g 离心 15 分钟 (得到一种约 ~ 265 mg 的“8K 沉淀”)，接着对上清进一步在 100,000g 离心 5h。包含有纯化过的 LPS 的沉淀重新溶解和冻干 (得到 ~ 3 mg)。分离和分级出 LPS-OH 和核心 OS。简言之，8K 沉淀原料 (~ 15 mg) 和 LPS (~ 3 mg) 在 37 $^{\circ}$ C 搅拌下用无水胍处理 1h，制备 LPS-OH，从 8K 制备物中得到 ~ 10 mg，从 LPS 中为 ~ 1 mg。用 1% 乙酸 (10mg/ml, 100 $^{\circ}$ C, 1.5h) 处理 8K 沉淀原料 (~ 115 mg)，后经离心 (5,000 x g) 去除不溶类脂 A，分离出核心 OS。随后将冻干的上清液以各冻干组分用 Bio-Gel P-2 柱进一步纯化，得到 ~ 40 mg。

1.2 分析方法

糖以其糖醇乙酸酯衍生物的形式通过 GLC-MS 测定。甲基化分析通过 NaOH/ DMSO / 甲基碘方法进行，并用 GLC-MS 来分析。

1.3 质谱和 NMR 光谱学

所有质谱和 NMR 实验按上面的描述完成。

实施例5, 表1: 来自多杀性巴氏杆菌菌株X73的O-脱酰LPS (LPS-OH) 和核心OS的阴离子CE-MS数据和推测的组成。平均质量单位根据如下推测组成用于计算分子量: Hex, 162.15; Hep, 192.17; Kdo, 220.18; PEtn, 123.05; Pcho, 165.05; 脂质 A-OH, 952.00。相对强度表示为相对于LPS-OH分子光谱中最大的三价离子的强度。

菌株	[M-3H] ³⁻		[M-4H] ⁴⁻		观察到的分子离子	计算的分子离子	相对强度	脂质		核心		推测组成
	992.0	1033.0	744.0	774.0				A	OS			
X73	992.0	1033.0	744.0	774.0	2979.5	2977.6	0.1	952	2025.6	2PCho, 3Hex, 4Hep, 2Kdo,	脂质A-OH	
LPS-OH	999.0	1040.0	749.0	780.0	2999.5	3100.7	0.2	952	2047.5	2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P,	脂质A-OH	
		1074.0		805.0	3123.5	3122.6	0.2	952	2148.7	PEtn, 2PCho, 3Hex, 4Hep, 2Kdo,	脂质A-OH	
		1081.0		810.0	3224.1	3223.7	0.4	952	2170.6	PEtn, 2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P,	脂质A-OH	
		1122.0		841.0	3245.0	3245.6	0.3	952	2271.7	2PEtn, 2PCho, 3Hex, 4Hep, 2Kdo,	脂质A-OH	
					3368.5	3368.7	1.0	952	2293.7	2PEtn, 2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P,	脂质A-OH	
							0.2	952	2416.7	3PEtn, 2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo-P,	脂质A-OH	
X73	[M-3H] ³⁻		[M-2H] ²⁻									
核心 OS												

-	901.3	1804.6	1805.2	-	-	2PCho, 3Hex, 4Hep, Kdo
-	962.8	1927.6	1928.2	-	-	PEtn, 2PCho, 3Hex, 4Hep, Kdo
-	982.8	1967.6	1967.6	-	-	2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo
-	1024.3	2050.3	2051.3	-	-	2PEtn, 2PCho, 3Hex, 4Hep, Kdo
-	1044.3	2090.6	2090.6	-	-	PEtn, 2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo
736.8	1106.3	2214.0	2213.7	-	-	2PEtn, 2PCho, 4Hex, 4Hep, Kdo

实施例5, 表2: 来自多杀性巴氏杆菌菌株X73的核心OS的末端区域的¹H-和¹³C-NMR化学位移: 所有其他残基具有与菌株VP161相同的化学位移。

残基	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	NOE 连接性	
								之间	内部
Hep ^{IV}	4.95	4.18	3.96	4.18	3.93	4.32	3.97	4.09 Glc ^I H-6	4.18 H-2
	(99.9)	(70.0)	(70.9)	(77.4)	(70.2)	(79.9)	3.75	3.77 Glc ^I H-6	
							(63.5)		

<u>β-Gal^I</u>	4.72	3.70	4.20	4.17	3.94	4.07	-	4.18 Hep ^{IV} H-4	4.20 H-3
	(103.4)	(70.7)	(78.2)	(68.2)	(74.0)	4.07	(65.4)		3.93 H-5
<u>β-Gal^{II}</u>	4.70	3.73	4.21	4.17	3.94	4.07	-	4.32 Hep ^{IV} H-6	4.21 H-3
	(104.5)	(70.7)	(78.1)	(68.2)	(74.0)	4.07	(65.4)		3.93 H-5
<u>PEtn^I</u>	4.13	3.31							
	(62.7)	(40.8)							
<u>PEtn^{II}</u>	4.13	3.31							
	(62.7)	(40.8)							
<u>PCho^I</u>	4.38	3.68	3.22						
	(60.4)	(66.8)	(54.7)						
<u>PCho^{II}</u>	4.38	3.68	3.21						
	(60.4)	(66.8)	(54.7)						

实施例 6 本实施例形成了 *Infect. Immun.* 72: 3436 (2004) 中一篇文献的基础。一种多杀性巴氏杆菌的庚糖转移酶突变株产生一个截短的脂多糖 (LPS) 结构, 并且其毒性减弱。

对多杀性巴氏杆菌 VP161 的野生型 LPS 分析表明一个“粗糙型” LPS, 与从流感杆菌、杜克雷嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌以及 *N. Gonorrhoeae* 等革兰氏阴性粘膜性病原体分离出的 LPS 或脂寡糖相似, 只有一个短的非重复多糖单元与脂质 A 相连。多杀性巴氏杆菌 LPS 的内核结构与流感杆菌、溶血性曼氏杆菌、杜克雷嗜血杆菌相似, 并具有一个经由一个 KDO 残基与脂质 A 相连的三庚糖单元 (图 30)。在 AL251 突变株中, *waaQpm* 的失活导致 LPS 表达为在内核区缺乏第三庚糖分子 (Hep III) 的高度截短的 LPS。突变株中含量最高的 LPS 糖型同样缺少第一个庚糖远侧的所有糖, 表明 *waaQPM* 的失活阻止了糖的进一步添加。因此很可能由于第三庚糖的缺失导致的 LPS 中间体的构像改变大大阻碍了后续转移酶的活性。

材料和方法

菌株, 质粒, 培养基与培养条件。 本研究中使用的菌株与质粒见实施例 6, 表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 采用常规 Luria-Bertani 培养基培养。多杀性巴氏杆菌菌株采用脑心浸液 (BHI) 或营养肉汤 (NB) 培养基 (加入 3% 酵母抽提物) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) 的营养培养基培养。添加 1.5% 琼脂制备固体培养基。需要时, 向培养基中加入 2.5 μ g/ml 浓度的四环素。在结构研究中, 多杀性巴氏杆菌菌株 VP161 和 AL251 培养于 28 升发酵罐中 24L 的 BHI 培养基中, 37°C 下, 20% 的 DO 饱和度下培养 18h。添加苯酚到 2% 以杀灭细胞, 维持 3h 后加入 1 克透明质酸酶 (Roche Chemicals), 搅拌 1h, 然后采用 Sharples 连续流离心机收获细胞。

转座子稳定性研究。 多杀性巴氏杆菌菌株 AL251 于培养 10ml NB 中, 37°C 震荡。在培养大约 10, 34, 58 代后, 取出培养样品, 适当稀释, 接种于 NB 琼脂上。温育过夜后, 100 个克隆转接于含四环素的 NB 上, 37°C 温育过夜。转座子丢失由四环素敏感克隆的百分比来表示。

SDS-PAGE 与银染。 LPS 的分析采用 Bio-Rad 小型蛋白凝胶装置, 按照在 Laemmli, *Nature* 227, 680 (1970) 文中描述的 SDS-PAGE 进行。通过

银染后可见 LPS。

DNA 操作。限制性消化，连接和聚合酶反应按照厂商 NEB (Beverley, MA) 或 Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) 提供的酶操作者手册进行。质粒 DNA 采用碱解法制备，使用 Qiagen 柱(QIAGEN GmbH, Germany) 或 PEG 沉淀法 (Ausubel, 1995) 进行纯化。基因组 DNA 采用 CTAB 方法制备。DNA 的 PCR 扩增使用 Taq DNA 聚合酶或 Expand High Fidelity PCR 系统 (Roche Diagnostics)，使用 Qiagen PCR 纯化试剂盒纯化。研究中使用的寡核苷酸列于实施例 6，表 1。DNA 序列采用 373 A 型 DNA 测序仪 (Applied Biosystems) 测定，使用 Sequencher Version 3.1.1 (GenCodes, Ann Arbor, MI) 软件分析。

waaQ_μ 的反向互补。从多杀性巴氏杆菌 VP161 的基因组 DNA 中使用寡核苷酸片段 BAP2146 和 BAP2147 (实施例 6，表 1) 扩增完整的 *waaQ_μ* 基因。扩增后的 1.1kb 的 DNA 片段连接 *Sai*I 和 *Bam*HI-消化的质粒载体 pAL99 (实施例 6，表 1)，所以转录可被多杀性巴氏杆菌 *tpiA* 启动子驱动，筛选出存在正确质粒的 *E. Coli* 转化株，同时，指定的 pAL170 质粒被用于转化多杀性巴氏杆菌 AL251 菌株，产生菌株 AL298。pAL99 质粒载体被单独转化 AL251 产生菌株 AL438 用作对照 (实施例 6，表 1)。

竞争性生长分析。竞争性生长分析按照 Harper (2003) 描述的方法进行并定量多杀性巴氏杆菌 LPS 突变株 AL251 和互补突变株 AL298 的相对生长速率。从输出培养 (output culture) 获得的 (在体外或在体内) 四环素抗性克隆百分比除以从输入培养 (input culture) 获得的四环素克隆百分比确定竞争因子 (CI)。衡量体内生长与体外生长差异的相对竞争因子 (rCI)，由体内 CI 除以体外 CI 确定。通过使用单边 z-test (one sided z-test) ($p < 0.05$) 统计分析，如果 rCI 值显著小于 1.0，则突变株被确定为减毒突变株。

毒性试验。一组十只 12 周龄的购得的 Leghorn-cross 鸡使用多杀性巴氏杆菌 VP161 或 AL251，以两个不同剂量胸肌注射 100 μ l 进行感染。在感染 AL251 后的不同时间点取血样，并依照动物伦理道德要求对被认为不能存活的鸡实施安乐死。血样用含肝素的 BHI 稀释两倍并涂布 BHI 平板。从血中分离的多杀性巴氏杆菌克隆涂布于 NB 琼脂平板和含四环素的 NB 琼

脂平板。

血清敏感性分析。多杀性巴氏杆菌和 *E. coli* 对新鲜鸡血清的敏感性采用 Chung et al 于 Infect. Immun. 69, 2487(2001)中所述的方法测定。

LPS 的纯化。多杀性巴氏杆菌细胞 (210g, VP161; 254g of AL251) 冻干, 得 56g 的 VP161 和 52g 的 AL251。用有机溶剂洗涤冻干菌体细胞除去脂类或其他亲脂类成分以提高 LPS 的抽提效率。洗涤后的细胞 (42g, VP161; 50g, AL251) 用热酚/水法抽提并相对流水透析 48 h。渗余物冻干, 配成 2% 水溶液后, 用 DNA 酶和 RNA 酶在 37°C 条件下处理 4 小时后, 加入蛋白酶 K 并在 37°C 下处理 4 小时。透析除去小肽。冻干后, 渗余物配成 2% 水溶液, 8000g 离心 15 分钟后, 取上清, 100,000g 离心 5 小时。含纯化 LPS 的沉淀, 重溶并冻干。用 1% 乙酸 (10 mg/ml, 100°C, 1.5 h) 处理纯化的 LPS, 然后 5000g 离心除去不溶的脂质 A 分离得到核心寡糖 (OS)。

分析方法。糖通过它们的糖醇乙酸酯衍生物的 GLC-MS 被确定。LPS 用 4M 三氟乙酸在 100°C 水解 4 小时, 用 NaBD₄ 水溶液还原过夜, 然后用乙酸酐在残余的乙酸钠催化下 100°C 乙酰化 2 小时。GLC-MS 采用 30 M DB-17 毛细管柱 (以 3.5°C/min, 180°C 到 260°C), 质谱使用 Varian Saturn II 质谱仪电子撞击模式。甲基化分析采用 NaOH/ DMSO / 甲基碘方法, 并用上述的 GLC-MS 分析。

MS 分析。毛细管电泳-电喷射离子 MS (CE-ESI-MS) 采用晶体 Model 310 毛细管电泳 (CE) 设备 (AYI Unicam) 进行, 该设备经由一个微喷雾接口偶联到 API 3000 质谱仪 (Perkin-Ehner/Sciex)。保护液 (异丙醇-甲醇, 2:1), 以 1L/min 流速加入到一低死体积三通管 (250 μ m i. d., Chromatographic Specialties)。所有水溶液用前经 0.45- μ m (Millipore) 过滤器过滤。

核磁共振。使用 3mm 三重共振 (¹H, ¹³C, ³¹P) 探针, 在 Varian Inova 500 MHz 光谱仪上获得 NMR 谱。亲脂性的糖样品溶解在 140 μ L (3mm) 99% D₂O 中。实验在 25°C 下进行, 以抑制在 4.78 ppm 处的 HOD (氘化 H₂O) 信号。丙酮的甲基共振作为在 2.225ppm 的 ¹H 光谱和 31.07 ppm 的 ¹³C 光谱的内部或外部基准。来自 Varian、COSY、TOCSY、NOESY、¹³C-¹H HSQC、¹³C-¹H HSQC-TOCSY 和 ¹³C-¹H HMBC 的、与标准的同核和异核相关的 2D 脉冲序列,

用于一般性归属。

结果

减毒的多杀性巴氏杆菌 STM 突变株产生截短的 LPS，该 LPS 通过与功能性 *waaQ_{PM}* 基因互补可恢复产生全长的 LPS。标记标签的突变株 (STM) 被用于鉴定减毒突变株，以便用于在小鼠和鸡中培养。在前述的分析中一个突变株被鉴定 (命名为 AL251)，它在鸡和小鼠中都表现为弱毒性。突变株的序列分析表明单个转座子插入在 *waaQ_{PM}* 基因中，该 *waaQ_{PM}* 基因被预言负责编码所推测的庚糖基转移酶和一种负责添加庚糖到 LPS 上的糖基转移酶。

我们使用聚丙烯酰胺凝胶电泳然后银染的方法比较了来自菌株 AL251、AL251 的野生型亲本 VP161 以及互补突变株 AL298 的 LPS 结构。来自 AL251 的 LPS 在凝胶中相对于野生型 LPS 迁移更远，这表明由突变株产生的 LPS 被显著缩短 (图 36a)。而且，来自互补突变株 AL298 的 LPS，与野生型 LPS 迁移速度相同表明突变株 AL251 与一个完整的 *waaQ_{PM}* 基因互补能恢复野生型 LPS 的合成 (图 36a)。

与 *waaQ_{PM}* 互补的 AL251 菌株的体内生长恢复到野生型水平。由于 *waaQ_{PM}* 基因的互补，AL251 菌株恢复产生野生型 LPS，因此我们想确定是否互补失活的 *waaQ_{PM}* 也能在体内恢复 AL251 突变株的到野生型生长水平。关于互补突变株 AL298 的前期研究表明，一旦去除对该互补质粒 pAL170 的抗生素选择，该质粒就会显著减少 (6 小时后剩余 44%)。因此，选择小鼠代替鸡进行竞争性生长分析，如之前研究所阐述的，从所需感染时间到收获菌体只要 6 小时而鸡感染则要超过 12 小时。三只小鼠被注射等量的 VP161 与互补株 AL298 的混合物。作为对照，两只小鼠被注射等量的野生菌株 VP161 与对照菌株 AL438 (AL251 带有载体质粒 pAL99) 的混合物。互补突变株 AL298 的平均 rCI 为 1.0，能与野生型菌株 VP161 平等竞争，而对照菌株 AL438 的平均 rCI 值为 0.57 ($p = 0.03$)，与前面报道的 AL251 在小鼠中的 rCI 值相似。这些结果表明 *waaQ_{PM}* 不仅为产生全长的 LPS 而且为感染过程中的正常生长所必需。

多杀性巴氏杆菌的 *waaQ_{PM}* 突变株不会在鸡中致病。菌株 AL251 在鸡中显示了一个极度减缓的生长速率。希望确定它在这些宿主中是否仍然能

够致病。鸡被两种不同剂量的 VP161 或 AL251 测试（实施例 6，表 2）。所有注射了野生型 VP161 的鸡都在 20 小时内死亡。与此相反，大部分用 AL251 测试的鸡在开始 20 小时内保持健康，但在 4 天内，不论何种剂量接种了 AL251 的鸡，都病死于禽霍乱感染。从疾病的后期或末期的 AL251-感染鸡的血液中分离出多杀性巴氏杆菌，发现所有分离得到的多杀性巴氏杆菌克隆都具有四环素敏感性，这表明转座子已经不再在细菌中存在。恢复克隆的 *waaQPM* 基因的序列分析表明在所有克隆中转座子已被敲除，因此重建了一个功能性 *waaQPM* 基因。有趣的是，除了一个分离体外，序列分析也表明在转座子敲除点的核苷酸替代导致在 *waaQPM* 中的两个氨基酸改变（amino acids 88, 89; Ser to Leu, and Asp to Cys）。这些氨基酸改变不影响 *waaQPM* 的功能，因为用 AL251 测试的鸡得到的多杀性巴氏杆菌的分离株中 LPS 的结构都与野生型菌株相同（图 36b）。综上所述，这些结论表明接种 AL251 的鸡中观察到禽霍乱的晚期攻击完全是由于 AL251 的野生型回复突变，因而具有一个失活的 *waaQPM* 基因的菌株不能致病。

waaQPM 突变株对鸡的毒性减弱不是由于增加了对鸡血清的敏感性。为了确定野生型多杀性巴氏杆菌菌株 VP161 和 LPS 突变株 AL251 对补体介导的杀伤的相对敏感性，用每个菌株和对照菌株 *E. coli* DH5 α 的对数生长期细胞，在常规或热处理的鸡血清中培育 3 小时。野生型多杀性巴氏杆菌菌株 VP161，在加热的或是未加热的血清中，以相同速率生长，表明它是完全血清抗性的，这与以前报导的其它多杀性巴氏杆菌血清型 A 菌株相似。鸡血清的细菌活性用 *E. coli* 对照菌株证实，在热处理的血清中增殖 19 倍而在未处理的血清中细菌活性则减少大约 9 倍。有趣的是，对于 AL251 突变株，在热处理的血清与普通血清中的生长并无差异，都大约有 160 倍的增殖。这些结果表明在鸡的 LPS 突变株中观察到的毒性减弱不是由于对补体增加了的敏感性所致。

来自多杀性巴氏杆菌 VP161 和 AL251 的 LPS 的结构分析。来自亲株 VP161 的糖结构分析表明有葡萄糖 (Glc)，半乳糖 (Gal)，N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)，L-甘油-D-甘露-庚糖 (LD-Hep)，其各自的比例为 2 : 1 : 1 : 3。相反，来自突变株 VP251 的 LPS 分析表明仅有葡萄糖 (Glc)，L-甘油-D-甘露糖-庚糖 (LD-Hep)，其各自的比例为 1 : 3，以及痕量的半

乳糖 (Gal), N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)。GlcNAc 的存在可能取决于除了每个 LPS 分子的脂质 A 区域中预期的两个残基外, 已知的本血清组透明质酸荚膜的残基数量。来自亲本 VP161 LPS 的核心 OS 样品的 CE-ES-MS 分析显示了一个简单质谱 (图 37a), 其与分子量 1805 与 1967 Da 的糖型相符, 其中较小的糖型与 2PCho, 3Hex, 4Hep, Kdo 的组成一致, Kdo 是独有的 LPS 糖 2-酮-3-脱氧-辛酮糖酸, PCho 是磷酸酯部分磷酸胆碱。其中较大的糖型含有一个额外的庚糖种类 (实施例 6, 表 3, 图 37a)。与突变株 AL251 LPS 的 SDS-PAGE 分析一致, 其核心 OS 样品的 CE-ES-MS 分析显示出一个高度截短的分子量 605Da 的分子的简单质谱 (实施例 6, 表 3, 图 37b)。这一分子量符合 2Hep, 1Kdo 的组成。观察到一个的更大些的糖型, 该糖型符合一个附加的庚糖残基 (767 Da)。观察到痕量的一个多延伸的分子量 1448 Da (PCho, 3Hep, 3Hex, Kdo) 的糖型, 但在被观察到的糖型中没有含有全部亲本的 4 庚糖残基互补物 (实施例 6, 表 3)。为了完整表征突变株在核心 OS 截短的特性, 进行了亲本与突变株核心寡糖的 $^1\text{H-NMR}$ 实验。由于质谱数据表明在突变株中的 OS 中丢失一个庚糖残基, 并且氨基酸同源性对照表明 WaaQpm 是一个庚糖基转移酶, 高度关注分子中庚糖残基的共振。 $^1\text{H-NMR}$ 光谱表明最邻近 Kdo 残基的 Hep 残基的变异性 (常在核心寡聚糖中观察到) 是由于在获得核心 OS 的酸水解条件下 Kdo 残基重排引起 (图 38)。对来自于亲本菌株的核心 OS, 在 ~ 5.7 ppm 识别到 Hep II 的端基异构体质子的化学位移, 与 2-位取代这一残基符合 (图 38a)。然而, 在 AL251 突变株的 OS $^1\text{H-NMR}$ 光谱 (图 38b) 中, Hep II 的端基异构体共振的化学位移向高场偏移为大约 0.5 ppm, 与残基不再在 2-位被取代相一致。如同以前在 *H. somnus* 菌株中观察到的, Hep II 残基成为末端部分, 并且 H-4 共振的化学位移与这种排布相符。通过 2D NOESY 实验获得突变株结构特征的确定性证据 (图 39)。观察到 VP161 核心 OS 在 Hep III 和 Hep II 端基异构体质子间的特征性 NOE, 表明在 Hep III 和 Hep II 残基之间是 α -1-2 连接的 (图 39)。AL251 突变株的核心 OS 的 NOESY 光谱证实 Hep II 残基缺少 2-位取代, 如上所述的特征性 NOE 缺失, 证实在突变株的 OS 中不存在 Hep III 残基。关于亲本 OS 的 Hep II 和 Hep III 残基的化学位移和 NOE 光谱数据以及关于突变株 OS 的 Hep II 残基的化学位移和 NOE 光谱数据总结于实施

例 6, 表 4。结构技术表明突变基因 *waaQ_{PM}* 在 LPS 结构上的效应是阻止 Hep III 添加到 Hep II (图 40), 这种作用与所编码的蛋白和已知的庚糖基转移酶的高度相似性一致。

讨论

使用 STM 首次在小鼠和鸡中识别到的多杀性巴氏杆菌 LPS 突变株 AL251, 显示有一个转座子插入在预测的庚糖转移酶基因 *waaQ_{PM}* 中, 并且在鸡和小鼠中致病毒性显著下降。野生型 VP161 和 AL251 的细胞溶解物的银染聚丙烯酰胺凝胶显示来自突变株的 LPS 显著缩短(图 36A), 这与 *waaQ_{PM}* 编码一个负责将一个庚糖分子添加在 LPS 结构的核心区的庚糖基转移酶相符。

对多杀性巴氏杆菌的 *Pm70* 基因组的分析表明, 基因 *waaQ_{PM}* 可能独立转录, 因此产生缩短的 LPS 结构直接由于 *waaQ_{PM}* 基因的失活而不是下游基因的偶极作用减缓多杀性巴氏杆菌在鸡和小鼠的体内生长。这一点通过互补实验证实, 当导入一个反向野生型 *waaQ_{PM}* 基因不仅恢复 LPS 的结构(图 36A), 而且在小鼠中的生长恢复到野生型水平。

使用 LPS 突变株 AL251 在鸡中的毒性试验导致的禽霍乱症状 (实施例 6, 表 2) 的推迟出现以及具有疾病症状的鸡中分离的多杀性巴氏杆菌对四环素敏感, 说明不再带有转座子。对从感染的鸡中分离的多杀性巴氏杆菌 DNA 的核酸序列数据证实 *waaQ_{PM}* 基因是完整的, 并在多数情况下在原来插入转座子处存在碱基改变, 导致两个氨基酸改变。从 AL251 感染的鸡中获得的分离株的 LPS 显示其为野生型的 LPS, 证实尽管氨基酸变化, 但 *waaQ_{PM}* 基因是有功能的 (图 36B)。综上, 这些数据表明在接种 AL251 的鸡中观察到的感染仅是因为回复突变株丢失转座子插入所致。野生型多杀性巴氏杆菌菌株 VP161 是一种极高毒性微生物, 在鸡中少于 50 个细菌就可导致禽霍乱。我们的研究检测到从 AL251 细胞中转座子的消除速率, 在最初的十代后为 1%, (体外过夜生长) 上升到 58 代后的 4% (未显示数据), 这一消除速率导致在鸡中野生型回复突变体的传代与选择, 是以一个在试验过程中足以产生致死禽霍乱感染的速率。因此, 一个稳定失活的 *waaQ_{PM}* 将导致多杀性巴氏杆菌菌株不能产生禽霍乱。然而, 构建限定的多杀性巴氏杆菌的突变株的可靠方法还未建立。

多杀性巴氏杆菌菌株野生型 LPS 分析显示一个“粗糙型”LPS，与从革兰氏阴性粘膜病原体，如流感杆菌、*H. ducreyi*、脑膜炎奈瑟菌以及 *N. gonorrhoeae* 等分离出的 LPS 或脂寡糖 (LOS) 相似，只有一个短的非重复多糖单元与核心相连。多杀性巴氏杆菌 LPS 的内核结构与在流感杆菌、溶血性曼氏杆菌、杜克雷嗜血杆菌描述的 LPS 结构相似，带有一个三庚糖单元，该单元经由一个 Kdo 残基与脂 A 相连 (图 39)。在 AL251 突变株中，*waaQ_{rw}* 的失活导致表达出在内核区域缺乏第三庚糖分子 (Hep III) 的高度截短的 LPS。突变株中含量最高的 LPS 糖型同样缺少连接在第一个庚糖的所有糖残基，表明 *waaQ_{rw}* 的失活阻止了糖的进一步添加 (实施例 6, 表 3)。因此很可能由于在大部分第三庚糖的缺失导致的 LPS 中间体的构像改变大大阻碍了后续转移酶的活性。

全长 LPS 分子的缺失明显影响突变株 AL251 在小鼠中的生长能力和在鸡中的致病能力。这一毒性减弱的具体原因还不清楚。然而，在野生型多杀性巴氏杆菌 VP161 LPS 中，识别到两个 PCho 基团而突变株 AL251 LPS 中仅在一种非常稀少的糖型中含有一个 PCho 基团 (实施例 6, 表 3)。在 VP161 LPS 中存在一个以上的 PCho 残基是不同寻常的；具有 PCho-修饰的 LPS 的细菌通常只有一个相连的残基，尽管连接到 LPS 结构上的位置多种多样。仅有一种不同细菌，一种非典型流感嗜血杆菌菌株，已知有两个 PCho 残基连接到 LPS。有趣的是，在血清型 A 火鸡分离出 PM70 的 LPS 上没有 PCho 基团，该菌株对鸡类也是无毒的。

PCho 基团经常连接到粘膜病原体表面上的多种细菌结构中，所述病原体如流感嗜血杆菌、伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和奈瑟菌属种 (*Neisseria spp.*)，通过与血小板活化受体 (PAF) 连接，在黏附和入侵上皮和内皮宿主细胞中起关键作用。具有 LPS 的 PCho 阳性糖型的非典型性流感嗜血杆菌经由一系列信号活动可以黏附并侵入人支气管上皮细胞。然而，在流感嗜血杆菌和奈瑟菌属种中，尽管在 LPS 上的 PCho 表达在黏附和侵入人的上皮细胞中是必要的，它的存在减少在某些宿主生态中的存活，因为表达 Pcho 的菌株具有更强的血清敏感性，通过 Pcho 连接到 C-活性蛋白和补体系统的后续激活来调解。有趣的是，现有研究表明

LPS 突变株 AL251 仍对鸡血清补体的细菌活性有高度抗性，说明一个完整的野生型的 LPS 结构并非细菌具有全血清抗性所必需。毫不奇怪，因为多杀性巴氏杆菌血清型 A 菌株的荚膜赋予血清抗性。

总之，一个多杀性巴氏杆菌的 *waaQ_{PV}* 突变株表达一个极度截短的 LPS。野生型多杀性巴氏杆菌的 LPS 分子和 *waaQ_{PV}* 突变分子的内核结构被确定，这表明一个有功能的 *waaQ_{PV}* 基因为添加第三庚糖残基到 LPS 的内核所必需。因此，*waaQ_{PV}* 被鉴定为一个庚糖基转移酶 III 并通过毒性试验表明其活性在多杀性巴氏杆菌对自然宿主鸡的细菌毒性中是必须的。*waaQ_{PV}* 的失活导致在内核中第三庚糖基的完全缺失，即产生完全野生形糖型。从突变株 LPS 中识别到的多数糖型缺乏 PCho 残基，在其他革兰氏阴性粘膜病原体的 LPS 中，该残基在细菌毒性中起关键作用。

实施例6, 表1. 用于本研究的细菌菌株、质粒和寡核苷酸 (oligo)。

菌株、 质粒或者 寡核苷酸	相关描述	来源或者参考文献
菌株		
多杀性巴氏杆菌		
VP161	血清型A:1, 来自鸡的越南分离株	Wilkie et al. Vet. Microbiol. <u>72</u> , 57 (2000).
AL251	VP161 Tn916EΔC <i>waaQ_{PM}</i> 突变株	Harper et al. Infect. Immun. <u>71</u> , 5440 (2003).
AL298	带有质粒pAL170的AL251	本研究
AL438	带有质粒pAL99的AL251	本研究
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- m_k^+), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , (<i>lacZYA-argFV169</i>), $\phi 80lacZ$ ΔM15, F-	Bethesda Research Laboratories
质粒		
pPBA1100	多杀性巴氏杆菌/ 大肠杆菌穿梭载体	Homchampa et al. Vaccine <u>15</u> , 203 (1997).
pAL99	将含有多杀性巴氏杆菌 <i>tpiA</i> 启动子区的240bp EcoRI 片段克隆到ppBA1100 EcoRI 位点	本研究
pAL170	包含 <i>waaQ_{PM}</i> 基因的pAL99	本研究
寡核苷酸		
BAP2146	<i>waaQ_{PM}</i> 扩增的正向引物 有BamHI位点用于克隆 GAGTAGGATCCTGAAACATGTTCCC	本研究
BAP2147	<i>waaQ_{PM}</i> 扩增反向引物 有SalI位点用于克隆 GGTTGGGTCGACCAAGCCACATTACTG	本研究

实施例6, 表2. VP161和AL251在几组鸡(每组10只)中的毒性。

CFU = 菌落形成单位, h = 小时, N. D = 未检测到。

菌株	剂量 (CFU)	死亡的平均时间(h)	范围(h)
VP161	1.5×10^2	<20	ND
	1.5×10^3	<20	ND
AL251	70	65	33-120
	7×10^2	30	23-42

实施例6, 表3. 从多杀性巴氏杆菌菌株VP161 (亲本) 和AL251 (突变株) 的核心OS的阴离子CE-MS 数据和的推测组成。根据如下的推测组成, 平均质量单位被用于分子量计算: Hex, 162.15; Hep, 192.17; Kdo, 220.18; Pcho, 165.05. 相对强度表示为二价或一价离子的相对高度。

菌株	[M-H] ⁻	[M-2H] ⁻	观察到 的分子 离子	计算的 分子离 子	相对 强度	推测组成 ^a
VP161	1804.4	901.8	1805.6	1805.4	0.2	2PCho, 4Hep, 3Hex, aKdo ^b
核心OS	1822.4	910.9	1823.1	1823.4	1.0	2PCho, 4Hep, 3Hex, Kdo
	-	921.8	1845.1	1845.4	0.3	2PCho, 4Hep, 3Hex, Kdo, Na
	1966.3	982.9	1967.8	1967.6	0.9	2PCho, 4Hep, 4Hex, aKdo
	1988.4	993.9	1989.1	1989.6	0.3	2PCho, 4Hep, 4Hex, aKdo, Na
AL251	603.5	-	604.5	604.5	1.0	2Hep, aKdo
核心OS	621.5	-	622.5	622.5	0.9	2Hep, Kdo
	765.5	-	766.5	766.7	0.8	Hex, 2Hep, aKdo
	1447.5	-	1448.5	1448.2	0.1	PCho, 3Hep, 3Hex, aKdo

^a PCho, 磷酸胆碱; Hep, 庚糖; Hex, 己糖; Kdo, 2-酮-3-脱氧辛酮糖酸

^b aKdo指脱水-Kdo衍生物

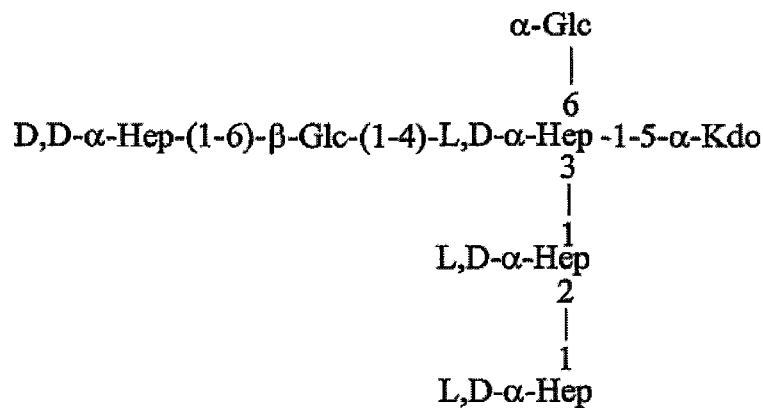
实施例6, 表4. 来自多杀性巴氏杆菌菌株VP161 (亲本) 和AL251 (突变株) 的核心-OS的Hep I I和Hep I I I残基的¹H-NMR化学位移。在D2O中于25°C记录。未确定在2.225 ppm. nd参照内部丙酮的化学位移。由于核水解后Kdo分子的异质性, 对应每一残基观察到两个共振。

	<u>H-1</u>	<u>H-2</u>	<u>H-3</u>	<u>H-4</u>	<u>H-5</u>	<u>H-6</u>	<u>H-7</u>	<u>NOEs</u>	
								之间	内部
<u>VP161</u>									
<u>Hep-II</u>	5.76	4.17	3.85	3.83	3.60	4.05	3.76	5.11 Hep III H-1 4.04 Hep I H-3	4.17 H-2
<u>Hep-II</u>	5.70	4.19	3.86	3.84	3.55	4.05	3.76	5.14 Hep III H-1 3.96 Hep I H-3	4.19 H-2
<u>Hep-III</u>	5.14	4.02	3.87	3.83	3.78	4.05	3.77	5.70 Hep II H-1 4.19 Hep II H-2	4.02 H-2
<u>Hep-III</u>	5.11	4.01	3.87	3.83	3.78	4.05	3.77	5.76 Hep II H-1 4.17 Hep II H-2	4.01 H-2

实施例 7

表现出一种兽类病原体特定的保守 LPS 结构的溶血性曼氏杆菌的 D-甘油-D-甘露-庚糖基转移酶突变株的制备，以及对这种 LPS 结构的抗体的产生和交叉反应。

对来自兽类病原体溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌和多杀性巴氏杆菌的脂多糖的以前的结构研究已经识别出一种保守内核寡糖结构，该结构存在于被研究的所有菌株中。为了考察这种内核结构作为疫苗的潜能，采用一种诱变策略来干扰溶血性曼氏杆菌的 D-甘油-D-甘露庚糖转移酶基因 (*losB*)。这种基因编码的酶负责增加 D-甘油-D-甘露庚糖残基，该残基是保守内核外的第一残基，而且它的失活使保守内核结构暴露作为突变体 LPS 分子上的末端单元。随后的分析确定突变株 LPS 的结构如下，且与 *losB* 的反向互补确定了 *losB* 基因编码一种 α -1, 6-D-甘油-D-甘露庚糖基转移酶。



在小鼠体内产生这种 LPS 结构的多克隆和单克隆抗体，发现这些抗体可识别溶血性曼氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌和多杀性巴氏杆菌三种菌株的 LPS 和全细胞。

菌苗或者简单修饰的活菌株是实践中的传统疫苗，然而，现场试验和实验性研究已经反复证实菌苗无效，实际上经常引起负作用。本工作探索满足有效、准确要求的亚单位疫苗候选物。可以考虑作为疫苗候选物的抗原几乎确定必须处在自然状态下的细菌的表面上，以获得随后靶向活的有机体的疫苗抗原的免疫应答。

在此背景下，包含表面暴露的糖部分的兽类病原体可用作疫苗候选物。该糖部分是脂多糖 (LPS) 和荚膜多糖。荚膜多糖是直接连接于细菌表面的几个糖残基的重复单元，而 LPS 由三个区域组成，一个经由脂肪酸残

基将 LPS 分子连接于细菌表面的脂质 A 区，一个将脂质 A 区连接于第三区的相对保守的核心寡糖区，以及可变多糖抗原（O-抗原）。荚膜和 O-抗原多糖的菌株异质性将这些结构排除作为经济可行的疫苗候选物，因为他们的能力只能覆盖同源菌株或产生相同结构的菌株。另一种情况，如果能识别出一个保守核心 LPS 结构，该结构也许可以利用作为一种对所有菌株提供广泛覆盖的疫苗候选物。

在我们实验室中，之前和现在的对三个菌株，*App*, *Pm* 和 *Mh* 的 LPS 结构的结构分析识别出一个存在于所有考察的菌株（*App*, *Pm* 和 *Mh*）中的保守内核 LPS 结构。为了考察保守内核单元的潜能，必须将该结构暴露成为末端残基，为此采用诱变策略，将编码负责外核生物合成的糖基转移酶基因破坏。这种诱变的结果从而使得保守内核结构被暴露。

本研究描述了来自溶血性曼氏杆菌的庚糖基转移酶基因的识别、克隆和诱变，该庚糖基转移酶在外核修饰中负责第一生物合成步骤。来自突变株的 LPS 结构分析确定，LPS 被适当截短了。然后，将突变菌株用于产生对抗保守 LPS 结构的抗体，并且那些抗体检测三个靶向菌株间的交叉反应。

实验

细菌菌株和培养条件

Mh 菌株 A1 Sh1217 (S. Highlander, Baylor College of Medicine, Houston Texas) 和 A1 菌株 01A ADRI (Perry Fleming, IBS) 于 37°C 在 BHI 平板或 BHI 肉汤上进行常规培养。*E. coli* DH10B (Invitrogen, Carlsbad California) 用于重组质粒的克隆和制备，并在加有适量抗生素的 LB 培养基上培养（氨比西林 100 μ g/ml，氯霉素 25 μ g/ml）。需要时，溶血性曼氏杆菌菌株在加有氨比西林（50 μ g/ml）和氯霉素（5 μ g/ml）的 BHI 培养基上培养。

包括插入到 *losB* 基因的重组质粒的构建。

将来自菌株 01A 的染色体 DNA 的 *losB* 基因使用侧翼引物通过 PCR 扩增。所使用的引物是 *losB*-*kpn* 5' ATATGGTACCTATCAGCGGTAGAGATTC TAAC 和 *losB*-*xba* 5' TGCTC TAGACCGAACCTGCACCAAAAAGATTTAACGC。这些引物扩增出一个 2Kb 的片断，用 *Kpn*/*Xba* 限制性内切酶消化后将该片断克隆到 pBluescript，接着电穿孔到 *E. coli* DH10B。使用如下对应 *losB* 结构基

因的引物 5' CCGCTGCGAGAGATAAGTGGATACTTTATC-3' 和 5' GACATTGGGATCTTTATTTAGATTTCAAACCGAC-3' 进行以该质粒为模板的反向 PCR, 从琼脂糖凝胶上切取产物并用 Qiagen 凝胶提取试剂盒纯化。来自 pNFplpcat 的经修饰的氯霉素乙酰转移酶 (Cat) 盒 (plpCat) 通过 PCR 扩增, 将粘性末端产物连接到上述 PCR 产物制成 pSK losB::cat。限制性酶切图和重组质粒序列确定 Cat 盒被以与 *losB* 基因相同方向插入到 *losB* 结构基因。

losB 菌株的筛选

质粒 pSKlosB::cat 通过电穿孔转化到 *Mh* 细胞中。简言之, 电穿孔后将细胞立即转移到 1ml 的预热的 BHI 肉汤, 于 37°C 培养 1.5h。平板接种到含有 5mg/ml 氯霉素的 BHI 琼脂上以筛选转化株。为确定该转化株不再带有 pSKlosB::cat 质粒克隆, 将其拷贝平板接种到 BHI/Amp 平板上, 氨比西林敏感克隆通过 PCR 检测。倍增重组后 *losB* 基因的插入失活用 PCR 确认。在初始克隆实验中所使用的针对 losB-Kpn 和 losB-Xba 的上游和下游序列的引物, 确定 Cat cassette 插入到 *losB* 基因的染色体拷贝中。

losB 突变株与 *losB* 反向基因的互补

通过使用 Xba 和 Kpn 的限制性内切酶消化从 pSK losB (见上) 上切取 *losB* 基因的野生型拷贝, 克隆到穿梭质粒 pNF2176 中以产生 pNF2176AalosB。然后将该质粒电穿孔到 *Mh* losB 突变株和在 Amp/Cat 上筛选的转化株中。

突变株 LPS 特征描述

使用常规技术从灭活细胞中分离出。如之前所述, 准备糖分析和部分甲基化的糖醇乙酸酯。纯化核心 OS 和 O-脱酰 LPS (LPS-OH)。纯化完全脱酰 LPS。使用质谱检测法和核磁共振光谱检测法。

抗体制备

用福尔马林灭活、PBS 洗涤的 *Mh* losb 0.5ml, 其中有 10^8 细胞, 在天数 (D) 0, 14 和 35 时对 5 只雌性 BALB/c 小鼠进行腹膜内注射 (ip) 免疫。在 D42 进行实验取血, 从每只小鼠的面静脉抽取少量血, 将分离出的血清通过 ELISA 检测与 *Mh losB* 和 *Mh wt* LPS 的交叉反应性。在 D54, 每只小鼠接受重复 ip 免疫接种, 并且小鼠 #2 也接受一次静脉 (iv) 注射 0.2ml,

其中有 4×10^7 细胞。在 D57, 从这些小鼠上切下脾并与一种骨髓瘤细胞系融合。该融合体的初始筛选的抗原是来自 *Mh losB* 和 *Mh wt* 的纯化 LPS。小鼠 #3 和小鼠 #5 在 D90 用 *Mh losB* 全细胞 ($\sim 10^8$) ip。小鼠 #3 在 D131 用 *Mh losB* 细胞 ip 和 iv 加强免疫, 为 D134 的脾细胞融合作准备; 小鼠 #5 在 D152 用来自 *Pm* 菌株 VP161 经福尔马林灭活的全细胞 ip 和 iv 注射加强免疫, 在 D155 将其脾细胞融合。针对小鼠 #3 和小鼠 #5 融合体的初始筛选的抗原是来自 App 血清型 5a 和 *Pm* 菌株 VP161 的纯化 LPS。制备含有单克隆抗体的腹水。

LPS ELISA

纯化的并充分表征的野生型和突变株 LPS 被用于固相间接 ELISA 以确定 mAb 的结合专一性。

全细胞 ELISA

使用酚灭活细胞

结果

候选糖基转移酶的识别。

来自 3 种所感兴趣的菌株 (*Mh*, *App* 和 *Pm*) 的 LPS 表现有相同的内核结构 (实施例 7, 表 1)。为考察这种保守内核结构作为一种有用的疫苗候选物的潜能, 必须去除这个区域外的外核修饰。为帮助完成此事, 采取方法以识别和改变在外核修饰中负责第一个单糖加入的糖基转移酶基因。由于相对于 *App*, *Mh* 中的 O-抗原的数量低, 不会干扰随后的免疫研究, 因而选择 *Mh* 进行诱变研究。*Pm* 菌株 *Pm70* [24] 的基因组序列测定完成, *Pm* (菌株 P-3480)、*App* (血清型 1 和 5b) 和 *Mh* (A1 菌株) 的正在进行。在 *App* 血清型 1 和 *Mh* 菌株 A1 中都识别到如图 41 所示的候选糖基转移酶。Galameau 等人鉴别出 *App* 中的 *lbgA* 基因定位于两个基因中间, 所述两个基因通过 mini-Tn10 转座子诱变发现与核寡糖生物合成相关。相邻基因 *lbgB* 显示与杜克雷嗜血杆菌的一个 D-甘油-D-甘露庚糖基转移酶有相当高的同源性。使用 *App* 的 *lbgB* 基因序列对 *Mh* 基因组序列 (Baylor College, Houston) 进行 Blast 分析, 揭示出在 *Mh* 基因组序列中有两个相邻的 D-甘油-D-甘露-庚糖基转移酶的同源物。所识别的最佳 *lbgB* 同源物据推测为负

责在第一个 L-甘油-D-甘露-庚糖残基的延伸上添加第一个 D-甘油-D-甘露-庚糖残基的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶，因此我们推测，第二个同源物（我们称为 *losB*）是负责添加第二个 D-甘油-D-甘露-庚糖残基的 D-甘油-D-甘露-庚糖转移酶。

Mh 中 *losB* 的诱变

在 *Mh* 中质粒 pSK*losB*::*cat* 不能复制，因此在功能上作为一种自杀性质粒。随后电穿孔（5 μg 质粒 DNA）进入 *Mh* 中，获得 136 个 *cat*^r 转化体，其中 104 个是 *amp*^r。随机选择其中的两个作进一步研究。通过用包含插入位点的引物的 PCR 确认两个突变株都曾有过双交换作用（未显示数据）。为确定对 LPS 结构（见下文）的影响是由 *losB* 基因的失活造成的，我们在穿梭质粒 pNF2176 上用 *losB* 基因的野生型拷贝反向互补突变菌株。

losB 突变株的 LPS 的表征

常规方法分离 LPS。纯化的 LPS 的糖分析揭示，葡萄糖(Glc)、D-甘油-D-甘露-庚糖(DD-Hep)和 L-甘油-D-甘露-庚糖(LD-Hep)各自的比例大约为 2 : 1 : 3，还可观察到痕量的 N-乙酰-葡糖胺(GlcNAc)。这种糖组成与突变株 LPS 的预期结构一致，并且暗示突变的 *losB* 基因，如同源性数据所预示的，是特异性的庚糖转移酶基因，而不是与庚糖生物合成有关的基因，因为四个其他庚糖残基保留在突变株的 LPS 中。常规方法制备 O-脱酰 LPS (LPS-OH)，并用 CE-MS 分析(实施例 7, 表 2)。观察到一个有二价(1172. 3²)，三价(781. 3³)和四价(585. 8⁴)离子的简单质谱(图 42a)，所观察到的离子与预期的 Hex2, Hep4, Kdo-P, 脂质 A-OH 组成一致。还观察到少量带电离子；二价(1065. 3²)，三价(709. 8³)和四价(532. 3⁴)，与多存在一个 Kdo 残基、同时缺少己糖、庚糖和磷酸部分相对应。以前在相关兽类病原体多杀性巴氏杆菌中观察到这种情况。纯化核寡糖(OS)并用 CE-MS 相似地检测(实施例 7, 表 2)，给出一个一价(1312⁻)和二价(655. 6²⁻)离子的质谱，与预期的 Hex4, Hep2, Kdo 组成相一致。为了证明突变株 LPS 的连接模式没有因诱变而改变，在核心 OS 上进行了甲基化分析，显示末端 Glc, 6-取代的 Glc, 末端 LD-Hep, 末端 DD-Hep, 2-取代的 LD-Hep 和 3, 4, 6-三取代 LD-Hep 以大约相等的比例存在，这又与预期的突变株 LPS 结构相一致。在完全脱酰的 LPS 上的 NMR 实验获得了突变株 LPS 的核心 OS 结构的最后确

认, 并与野生型 LPS 光谱 (图 43) 比较发现, 在突变株 LPS 中很明显没有末端 Gal-Hep 二糖。化学位移的排布揭示 (实施例 7, 表 3), 保守核心 OS 的所有连接与野生型 LPS 的相同, 因此已获得想要的结构。从互补突变株获得 LPS-OH, CE-ES-MS 分析确认出带有少量的具有附加 Kdo 残基的糖型的 wt LPS 表形 (实施例 7, 表 2, 图 42b)。

抗体制备

经初始和加强免疫后, 检测 5 只小鼠的血清识别 *Mh losB* 和 *Mh wt* LPS 的能力 (图 44)。由于小鼠 #2 对 wt 菌株有最高的 IgG 滴定率, 选择这种小鼠进行第一次融合实验以产生 mAb。产生九个识别 *Mh losB* 的稳定的杂交瘤, 并检测他们与 *Mh*, *App* 和 *Pm* 的 wt LPS 的交叉反应的能力 (图 45)。然而, 没有 mAb 能识别 *App* 和 *Pm* LPS, 并且只有四个 mAb 能识别 *Mh wt* LPS。D42 多克隆血清的检测揭示, 存在能识别纯化的 *App* 血清型 5a、*Pm* 菌株 VP161 和 X73 LPS 而不能识别 *App* 血清型 1 的 LPS 的抗体 (图 46)。因此, 在小鼠 #3 上制得融合物, 但是没有鉴别到能识别 *App* 血清型 5a 和 *Pm* 菌株 VP161 的纯化 LPS 的杂交瘤。最后, 因为在 D152 时多克隆血清检测显示出与 *Mh losB* 和 wt, *App* 血清型 1 和 5a 以及 *Pm* 菌株 VP161 和 X73 的 LPS 的交叉反应, 所以在小鼠 #5 用 *Pm* 菌株 VP161 的灭活完整细胞最后一次加强免疫后, 制得融合物 (图 47)。获得十四个杂交瘤, 十一个只能识别 *Pm* 菌株 VP161 的纯化 LPS, 三个能识别 *App* 血清型 5a 和 *Pm* 菌株 VP161 的纯化 LPS。随后发现这三个交叉反应杂交瘤能识别 *App* 血清型 1、*Pm* 菌株 X73 以及 *Mh losB* 和 wt 的纯化 LPS, 而上述十一个识别 *Pm* VP161 的杂交瘤, 也是只能识别相关的 *Pm* 菌株 X73 (图 48, 实施例 7, 表 4)。

目前没有有效的疫苗来对抗由兽类病原体 *Mh*, *Pm* 和 *App* 引起的疾病。对抗由 *Mh* 引起的疾病的疫苗方法仍然主要是基于菌苗和活减毒株。最近的活疫苗中引入了分泌或者提取的 *Mh* 抗原, 如神经氨酸酶、白细胞毒素、唾液糖蛋白酶、外膜以及未识别的蛋白。白细胞毒素在常规上一直是主要的亚单位疫苗候选物, 但使用表达非毒性白细胞毒素的突变株进行免疫接种在小牛攻击模型中仍然部分有毒, 并且白细胞毒素与荚膜多糖联合使用时不能产生防护性免疫应答。相比而言, LPS 已显示出可稳定的白细胞溶解活性, 所以基于 LPS 和去毒白细胞毒素的联合疫苗可带来希望。

目前对抗由 *App* 引起的疾病的疫苗方法是基于活减毒株，它们中含有高度不稳定的 *Ap_x* 毒素，该毒素可诱导防护所需的中和抗体。这些 *Ap_x* 毒素形成了针对 *App* 的主要亚单位疫苗的基础，但似乎只能诱导部分临床防护。有人提出将粘附素（包括 LPS 的核心 OS）作为改善的疫苗候选物。

目前预防猪 *Pm* 病的疫苗由类毒素和体细胞抗原如荚膜和外膜蛋白组成。巴斯德（Pasteur）首先表明 *Pm* 可引起鸡的禽霍乱，目前对该病的防护手段是利用 *Pm* 减毒株。然而一般来说，由于该免疫应答仍然是血清型限制的，不能提供对其他血清型的交叉保护，所以这种手段受到极大限制。然而已经表明 *Pm* 的 LPS 在感染的免疫中起部分作用。

最近已经积累了相当的证据表明来自这些生物中每一种的 LPS 都可能是亚单位疫苗设计的良好候选物。已经显示 LPS 是 *Mh* 表面上可见的和主要的抗原决定簇，由 A1 LPS 诱导的 mAb 有助于吞噬作用而无助于补体介导的体外杀伤。

对于 *Pm*，核糖体—LPS 疫苗保护鸡类免受由同源 *Pm* 菌株引起的禽霍乱感染。另外，使用 LPS—蛋白复合物对小鼠进行免疫接种，当使用同源菌株攻击小鼠时该免疫接种可提供 100% 的保护，然而当分开使用时，该复合物的单一组分无法提供保护。来自 *Pm* 的 LPS 诱导的 MAbs 在小鼠模型中只能提供部分保护，尽管它们具有调理吞噬作用，但在补体存在下不具有杀菌作用。然而在另一项实验中，针对 *Pm* LPS 的 mAb 可完全保护小鼠免受同源攻击，并且具有杀菌作用。一种模拟来自 A 型的 LPS 的抗独特型疫苗在小鼠模型中当其受到同源生物攻击时可起到保护作用。

在 *App* 中，LPS，更具体地说是 LPS 的核区与该细菌的粘附能力有关。BSA 与 *App* 血清型 1 LPS 连接的联合疫苗可在同源攻击而不能在异源攻击后保护小鼠，来自血清型 5 和 1 的光滑型和粗糙型 *App* LPS 的联合疫苗表明 *App* 细胞壁的糖部分在猪免疫应答中起重要作用。

因而，我们从事这个研究以制造出一个保守的截短的核心 LPS，该 LPS 是所有三种有机体中都有的。已显示 LPS 在对这些兽类病原体的每一种的免疫力中都起作用，如果能识别到一种保守 LPS 抗原，那么对同源菌株的保护应答或许能延伸到异源菌株甚至菌种。结合结构分析数据表明，所有这些兽类病原体都有一个共同的保守性内核心 OS 结构。因此决定探索基于

LPS 的疫苗的可能性。该过程的第一步是构建突变株，该突变株只表达保守性内核心 OS 表位作为末端暴露结构。

该研究已经从 *Mh* 菌株 A1 获得 α -1,6-D-甘油-D-甘露-庚糖基转移酶基因的突变体，以便以末端暴露部分的形式呈现保守性内核表位。在 *Mh* 中，诱变策略决不是简单的。以前有限数量的研究制备出 *aroA* 基因、*lpp* 基因座、荚膜 *nmaAB* 基因座以及白细胞毒素 *lktCABD* 基因簇的突变株。尽管电穿孔是将外源 DNA 导入 *Mh* 细胞的一种有效方法，但是通过同源重组将外源 DNA 插入到染色体中是很难的，并且出现频率低，而单交换事件频繁发生，导致靶基因的突变株和功能性拷贝的存在。在 *Mh* 中不稳定的质粒（自杀型质粒）已被几个人用于此方法，在当前研究中被成功使用。突变株的 LPS 的结构分析证实了预期的 LPS 表型，互补实验证实所观察到的结果确实是由于这种基因的失活造成的。重新反向导入 *losB* 基因的完整拷贝使 LPS 结构回复为野生型证实，*losB* 基因是 α -1,6-D-甘油-D-甘露-庚糖基转移酶。诱导针对此截短的 LPS 结构的 mAb 和 pAb，以检验在这些兽类病原体的一定范围的菌株中此结构的保守性和可达性的程度。获得了三种 mAb，它们能够与 *Ap*、*Pm* 和 *Mh* 的所有研究过的菌株的 LPS 发生交叉反应，因而建立了这三种重要的兽类病原体之间共有的保守性交叉反应性 LPS 表位的可能性。

5a	H	D- α -D-Hep V-(1-	H
5b	H	D- α -D-Hep V-(1-	H
Pm70	β -D-Glc-(1-	α -D-GalpNAc-(1-3)- β -D-GalpNAc-(1-3)- α - D-Gal-(1-4)- β -D-Gal-(1-4)- β -D-Glc-(1-	PEtm
VP161	PCho-3- β -D-Gal-(1-	PCho-3- β -D-Gal-(1-	H
X73	(PEtm-6)-PCho-3- β -D-Gal-(1-	(PEtm-6)-PCho-3- β -D-Gal-(1-	H

对于多杀性巴氏杆菌，康糖残基Hep IV 是L-□-D构型，在少数糖型中没有葡萄糖残基□-Glc II。

实施例7, 表2: 来自溶血性曼氏杆菌 *losB* 突变株和互补突变株的O-脱酰LPS和核心寡糖的阴离子CE-ESI-MS数据和推测组成。平均质量单位根据如下推测组成用于计算分子量: Hex, 162.15Hep, 192.17; Kdo, 220.18; P, 79.98. O-脱酰脂质A (脂质A-OH) 是952.00。

菌株	观察到的离子(m/z)			分子质量(Da)		推测组成	
	(M-H) ⁻	(M-2H) ²⁻	(M-3H) ³⁻	(M-4H) ⁴⁻	观察值		计算值
O-脱酰							
<i>losB</i>	-	1172.3	781.3	585.8	2347.0	2345.1	2Hex, 4Hep, Kdo-P, 脂质A-OH
	-	1065.3	709.8	532.3	2133.0	2131.0	Hex, 3Hep, 2Kdo, 脂质A-OH
<i>losB</i>	-	1349.3	899.3	674.3	2701.0	2699.4	3Hex, 5Hep, Kdo-P, 脂质A-OH
(comp)	-	1242.3	827.8	620.8	2486.5	2485.3	2Hex, 4Hep, 2Kdo, 脂质A-OH
核心OS							
<i>losB</i>	1312.4	655.6	-	-	1313.3	1313.2	2Hex, 4Hep, Kdo
<i>losB</i>	-	832.8	-	-	1667.6	1667.5	3Hex, 5Hep, Kdo
(comp)							

实施例7, 表3: 来自溶血性曼氏杆菌LosB突变株KOH处理的LPS的¹H-和¹³C-NMR化学位移。

	NOE's								内部	之间	远程
	<u>H-1</u>	<u>H-2</u>	<u>H-3</u>	<u>H-4</u>	<u>H-5</u>	<u>H-6</u>	<u>H-7</u>	<u>H-8</u>			
<u>α-GlcN (x)</u>	5.41	3.89	3.93	3.53	4.13	4.14					
	(94.3)	(54.6)	(70.5)	(70.7)	(73.7)	3.87	(68.9)				
<u>β-GlcN (y)</u>	4.60	3.80	3.92	3.94	3.78	3.75					
	(102.2)	(55.9)	(73.1)	(75.4)	(74.9)	3.59	(64.0)				
<u>Kdo (z)</u>	-	-	2.35	4.59	4.27	-	-	3.96			
			2.02	(71.1)	(72.9)	(nd)	(70.3)	3.72			
			(35.0)				(64.4)				
<u>Hep-I (a)</u>	5.18	4.13	4.03	4.17	-	4.11	nd		4.27 Kdo H-5	4.13 H-2	
	(100.4)	(71.1)	(75.0)	(75.0)	(72.8)	(81.0)	nd				
							(nd)				
<u>Hep-II (b)</u>	5.60	4.24	4.01	-	-	-	3.72		5.16 Hep III H-1	4.24 H-2	3.80 Hep I H-5

	(100.5)(80.5)	(70.9)	(67.8)	(72.4)	(69.7)	3.62	4.03 Hep IH-3		
						(64.6)			
<u>Hep-III(c)</u>	5.16	4.00	3.86	3.81	-	-	5.60 Hep I H-1	4.01 H-2	3.80 Hep IV H-3
	(102.4)(71.4)	(70.8)	(67.0)	(71.6)	(70.3)	-	4.24 Hep II H-2		3.62 Glc IH-4
						(64.9)			
<u>β-Glc-I(d)</u>	4.61	3.50	3.43	3.62	3.51	4.13	4.17 Hep IH-4	3.52 H-5	5.22 Glc II H-1
	(103.9)(74.3)	(77.5)	(70.6)	(74.6)	3.72		4.11 Hep IH-6	3.43 H-3	
						(65.6)			
<u>α-Glc-II(e)</u>	5.22	3.56	3.84	3.54	3.96	-	4.11 Hep IH-6	3.56 H-2	4.62 Glc IH-1
	(102.2)(73.0)	(73.8)	(69.5)	(72.4)	-				
						(60.4)			
<u>Hep-IV(f)</u>	4.94	4.08	3.80	3.76	-	-	4.13 Glc IH-6	4.08 H-2	
	(100.0)(70.5)	(71.0)	(68.3)	(70.3)	(79.9)	-	3.72 Glc IH-6	3.80 H-3	
						(64.0)			

实施例7, 表4. 由小鼠#5融合体制备的mAb的摘要信息

MAb Mh3-	IgG 亚类	操作稀释度:1
1	G3k	500
2	G2ak	200
3	G2aλ	未稀释
4	G2aλ	未稀释
5	G2aλ	未稀释
6	G3k	800
7	G3	200
8	G3k	800
9	G3k	1000
10	G3k	1600
11	G3	1000
12	G3k	1000
13	G3k	2000
14	G3k	1000
15	G2bλ	未稀释
16	G2bλ	未稀释

*: mAb 3-3和3-4以及mAb 3-15和3-16随后显示来自相同的克隆。

实施例 8 用于预防由兽类病原体溶血性曼氏杆菌，胸膜肺炎放线杆菌与多杀性巴氏杆菌所产生疾病的、基于 LPS 的糖结合物的筛选：结合化学以及小鼠免疫之后的免疫反应研究

为了制备糖结合物，LPS 按下述过程进行衍生化。将来源于 *Mh losB* 突变株的 LPS (145mg) 和 8K 沉淀材料溶解于 4N KOH (10mg/ml) 并在 125 °C 搅拌 30h 以脱除乙酰基，该 *Mh losB* 突变株具有目标结构。溶液冷却到室温，并以乙酸酐进行中和，这里乙酸酐用于重新 N-乙酰化由该过程所产生的氨基。离心 (9K, 15 分钟) 除去沉淀盐，上清液上 Sephadex G-25 柱，以水为洗脱剂进行洗脱。收集糖阳性的组分，冻干，得到 20—25% 产率的 KOH' d LPS (25mg 8K 沉淀, 33.3mg LPS)。产物在 0.1M NaOH (10mg/ml) 中室温处理 2h 以脱-O-乙酰基，在水中以 SephadexG-25 柱纯化，然后，冻干，获得约 20% 产率的 KOH' d LPS。

通过 ¹H-NMR 和 ES-MS 分析来进行质量控制。MS 分析显示在 KOH 处理过的 LPS 材料中有一些异质性，所述异质性与末端庚糖残基和葡糖残基的可变缺失相一致。

去磷酸化作用

合并源自 LPS 或 8K 沉淀材料的产物，溶解 (约 10mg/ml) 于含有重组碱性磷酸酶 (Roche) (-140units/mg units alk. P / mg KOH' d LPS) 的 pH8.0 的 0.1M NH₄HCO₃ 缓冲液中，并于 37°C 搅拌 4h 进行去磷酸化作用。上述溶液加热到 100°C 保持 5min，冷却，14K 离心 10min。上清冻干。

产物在水中以 SephadexG-25 柱脱盐，冻干，获得 20% 产率 (48mg) 的 KOH' d alk. P' d LPS。通过 ¹H-NMR 和 CE-ES-MS 分析来进行质量控制，这些分析证实了 KOH 处理的 LPS 的去磷酸化作用。

胺化作用

通过在 600 μl DMSO 中溶解干燥的糖 (48mg)，加入 4800 μl 2M NH₄OAc 甲醇溶液和 120mg 溶解于 1200 μl MeOH 的 NaCNBH₃，在 pH8.3、50°C 下反应 72h，对目标 aldehydo 功能基团进行胺化。在 N₂ 保护下蒸发 MeOH，冻干产物并在水中以 SephadexG-25 柱纯化，冻干，获得约 10% 产率 (32mg) 的 KOH' d alk. P' d 胺化的 LPS。通过 ¹H-NMR 分析来进行质量控制，该 ¹H-NMR 分析证实了 KOH 处理的 LPS 的胺化作用。

接头分子的附着

通过溶解干燥糖 (32mg) 于 4000 μ l H₂O 中, 加入 4000 μ l MeOH, 100 μ l squarate, 在 pH8.2 (以三乙胺 (4 μ l) 调节)、室温下反应 2h, 每间隔 15 分钟检测 pH, 使接头分子 (squarate) 联接到产物氨基上。在 N₂ 保护下蒸发 MeOH, 冻干产物并在水中以 SephadexG-25 柱纯化, 冻干, 获得约 12% 产率 (30 mg) 的 KOH' d alk. P' d 胺化的 squarated LPS。通过 ¹H-NMR、¹³C-¹H-NMR 和 CE-ES-MS 分析进行质量控制, 这些分析证实了 squarate 接头的联接。然而, MS 分析显示只有 50% 材料带有 squarate 接头。

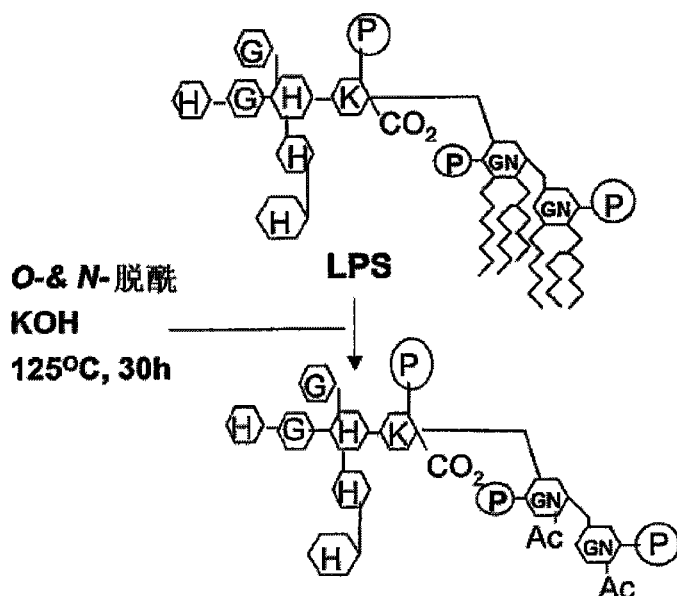
结合到蛋白载体上

通过在 pH9.2 室温下搅拌 24h, 将约 20mg HSA 连接到 25 倍摩尔过量的溶解于 1ml 0.02M 硼酸钠缓冲液中的 squarate 连接糖上, 糖在反应开始时和反应 6h 后加入。24h 后, 取出一份, 并通过 MALDI-MS 和 SDS-PAGE 检测, 以糖特异性单克隆抗体 G8 进行 Western 印迹 (图 50)。最终反应混合物使用 PBS (50mM 磷酸钠, 100mM NaCl, 10mM 柠檬酸钠, pH7.5) 过 Sepharose 6B 柱纯化, 以分离没有结合糖的分离物。与产物峰相对应的组分在 Amicon ultra-15 10K cutoff spin 柱中进行浓缩。对结合物的最终体系进行定量, 通过 BCA 分析定量蛋白含量, 通过 PhOH/H₂SO₄ 方法确定糖含量, 得出糖与蛋白的摩尔比为 4.5: 1。同时, 通过在 1% 乙酸中的纳米-电子-散射质谱分析对最终结合物和载体蛋白 HAS 进行了比较, 结果显示了对应于 HAS 的预期分子量 (图 51a) 以及与载体蛋白各种糖基化相一致的一系列峰 (图 51b)。

连接方案

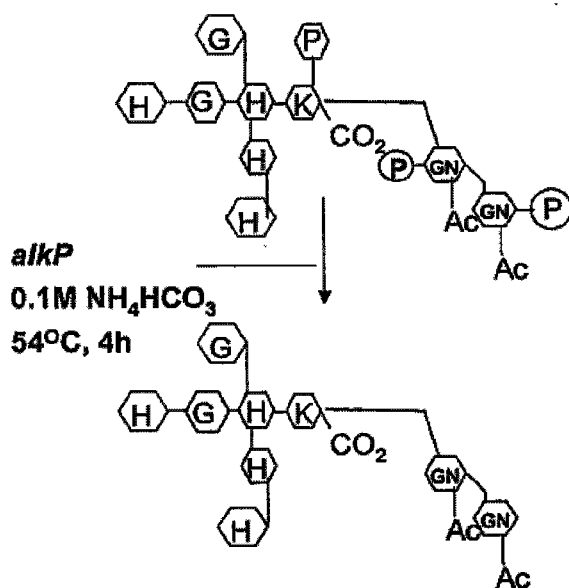
步骤 1

KOH 处理 *Mh losB* LPS



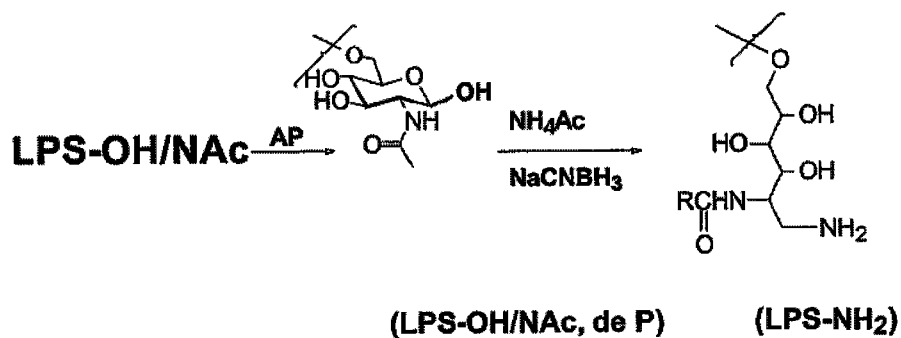
步骤 2

alkP 处理 *Mh losB* KOH' d LPS



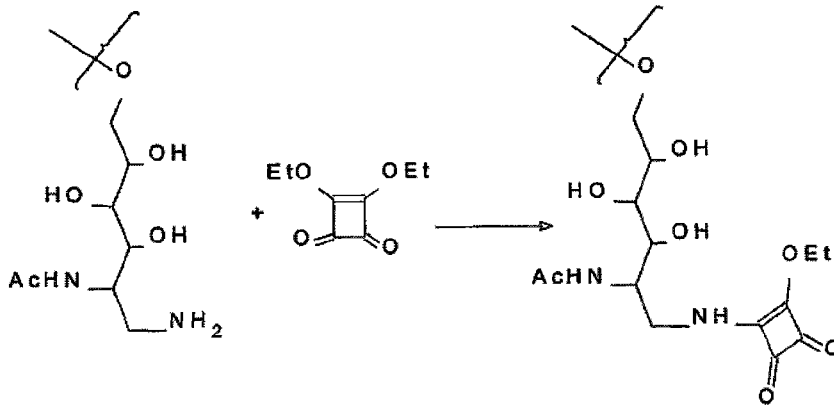
步骤 3

alkP 处理的 *Mh losB* KOH' d LPS 的胺化反应



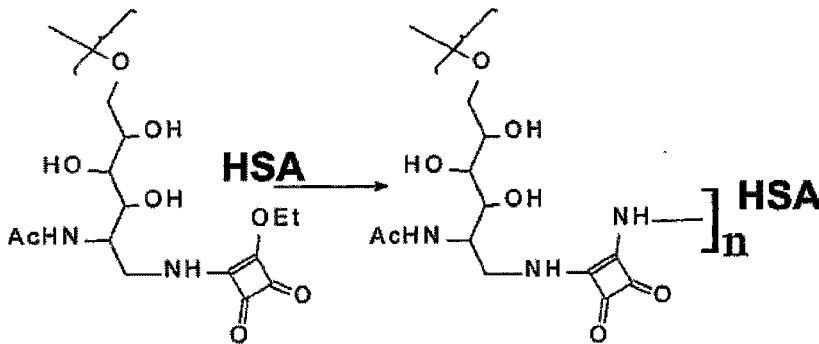
步骤 4

KOH' d alkP' d 胺化的 *Mh losB* LPS 的 squarate 反应

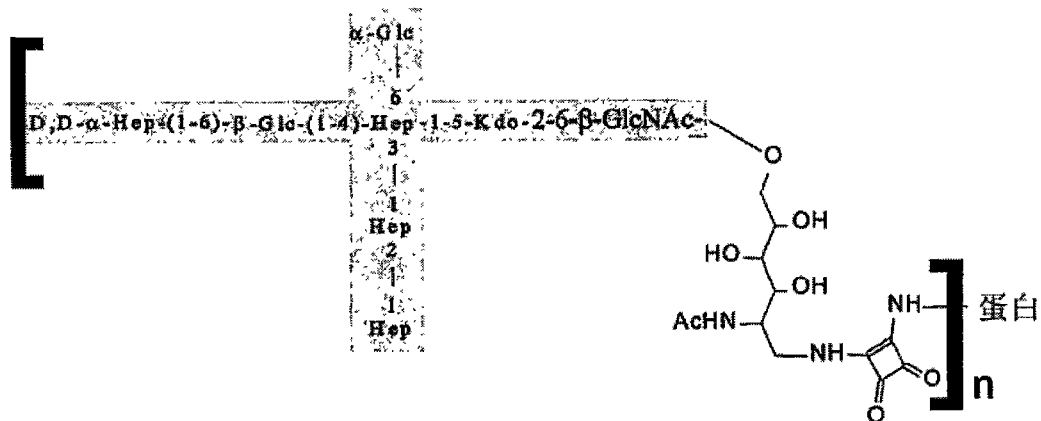


步骤 5

KOH' d alkP' d 胺化的 squarated *Mh losB* LPS 的结合反应



结合物制备:



**- *Mh losB*-HSA (约 4CHO/CRM), 至小鼠
免疫过程**

以结合物对 6 只 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫，作为对照，3 只雌性 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠以混合的糖和 HAS 进行免疫。所有疫苗均溶解于无菌 PBS 溶液，在 Ribi 佐剂中每 0.1ml sc 注射剂加有 10 μg 糖。

小鼠按照如下时间表进行免疫：

- 0 天 预抽血及初始注射
- 14 天 第一次加强免疫
- 23 天 试验性抽血
- 35 天 第二次加强免疫
- 45 天 小鼠抽血

在 23 天的试验性抽血以及在 45 天的最终抽血显示，#V2 号小鼠表现出对糖抗原的 IgG 反应，如抗 *Mh losBLPS* 的 LPS ELISA 所揭示的那样（图 52 和 53）。对来源于进行了三种免疫过程的 #V2 号小鼠的多克隆血清，对其与三种目标物交叉反应能力进行了检测。*Ap*、*Mh* 与 *Pm* 的 LPS 和全细胞都能被该多克隆血清所识别（图 54 与 55）。然而，来源于 *Neisseria meningitides* 株 L3galE 和 L2galE 的 LPS 和全细胞也能够分别在 LPS 和全细胞 ELISA 中所识别。这一现象归功于在 KOH 处理制备结合物的过程中糖抗原的部分降解，这会产生末端庚糖残基和己糖残基的各种形式缺失（见图 49）。这将导致在最终结合物中有一部分这种糖抗原含有抗原决定簇，该抗原决定簇会模拟脑膜炎菌 LPS 区（用于测试多克隆血清 V2），进而导致这种已观察到的交叉反应活性。不过，用这种结合物血清进行免疫的小鼠培养到的血清能够识别来源于兽类病原体 *Ap*、*Pm* 和 *Mh* 的 LPS 和全细胞。

实施例 9 用对保守内核脂多糖特异性的单克隆抗体的杀菌实验

在 D140 时小鼠 #1 的多克隆血清识别 *Mh* 的完整细胞（图 56），并包含对 *Mh* 的内核 LPS 的特异性抗体（图 57），在杀菌实验中 mAb G3, G8, 3-5 和 3-16（图 58-61）腹水连同对照腹水 L2-16 被用作杀菌实验的血清来源。该实验根据 Sutherland A. D. 1988. *Vet. Microbiol.* 16: 263-271 的方法进行。简言之，在 100ml BHI 肉汤中，培养 *Mh* 细胞到 $\sim 5 \times 10^3$ cfu/ml 的生长水平。使用 10ml 的培养物，将其中的细胞在 $5000 \times g$, 4°C 制成小球，并用 D-PBS（含有 Ca 和 Mg [Gibco # 14040-133]）洗涤两次。最终的细胞小球再悬浮于 10ml 的 D-PBS 中。实验血清和腹水样品在 56°C 热灭活 30min，以破坏内源补体。实验建立在 96-孔，组织培养级，平底微量滴定板（NUNC）上，重复三次。每孔加入在 D-PBS 中适度稀释的抗血清 20ul，接着加入细菌悬浮液（100ul），将平板在 RT 培养 15min。每孔加入补体（80ul，幼兔，#CL3441-S, Cedarlane），将平板在 37°C 培养 30min。将平板放置在冰上终止反应，每孔三分样品（50ul）涂板在 BHI 琼脂平板

上，37℃培养过夜。每组实验中还包括只含有细菌悬浮液、有补体的细菌悬浮液和有适量稀释的抗体的细菌悬浮液的对照孔。

计数细菌的生长，计算相对于对照的致死百分数。

如下表和图 62—64 中所见，mAb G3 和 G8 以及多克隆血清都促进 *Mh* A1 wt 细胞的补体介导溶解作用。mAb 3-5 和 3-16 的腹水的失效是由于这些血清的十分低的滴定度（操作稀释度 1: 50 相对于 1: 10⁶）。

mAb G3 和 G8 以及多克隆血清显示的杀菌活性阐明，*Mh* 中对保守内核 LPS 表位特异性的抗体能够识别 *Mh* 全细胞，并且在功能上对 *Mh* 全细胞也是有活性的。

实施例9, 表1. mAb G3和G8对Mh A1细胞的杀菌活性

实验条件	在50 μ l 实验体积中Mh细胞的平均CFU (+/- SE)							
	对照	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁸
Mh 细胞 单独	65+/- 2.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Mh 细胞 + 补体	55+/- 4.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Mh 细胞 + 补体 +G3	-	11+/- 2.8	7+/- 2.8	3+/- 2.3	0	0	4+/- 0.8	48+/- 3.8
Mh 细胞 +G3	-	83+/- 9.5	82+/- 9	61+/- 7.5	75+/- 5.2	75+/- 0.88	78+/- 0.88	71+/- 3
Mh 细胞 + 补体 +G8	-	27+/- 3	8+/- 0.88	3+/- 2.5	0	0	2+/- 0.88	52+/- 2.3
Mh 细胞 +G8	-	69+/- 12	62+/- 11	86+/- 4.9	18+/- 10	68+/- 2.9	75+/- 6	82+/- 11

SE = SD / \sqrt{n} 其中n = 样品容量

实施例9, 表2. D140时多克隆血清Mh # 1对Mh A1细胞的杀菌活性

实验条件	在50 μ l 实验体积中Mh细胞的平均CFU (+/- SE)			
	对照	1:640	1:1280	1:1256
Mh 细胞 单独	87+/- 2.3	NA	NA	NA
Mh 细胞 + 补体	80+/- 6	NA	NA	NA
Mh 细胞 +Mh #1 D140	NA	110+/- 0.6	150+/- 25	126+/- 12
Mh 细胞 + 补体 +Mh #1 D140	NA	2+/- 0.7	2+/- 0.6	0

SE = SD / \sqrt{n} 其中n = 样品容量

实施例 10 使用对保守内核脂多糖特异性的单克隆抗体的被动保护实验

该实验根据 Lopez et al. 1982. Can, J. Comp. Med. 46: 314-316 的方法使用如下所述的方法和改进进行。

小鼠和试剂:

在蛋白 A 柱上纯化 mAb 腹水的 IgG , 无菌过滤 (图 65) 以用于被动保护实验。

试验的 mAb G3 和 G8: G8, IgG2b, 3.8 mg/ ml; G3, IgG2a, 4.7mg/ ml。

对照 mAb: L2-16, IgG2b, 1.9 mg/ ml。

Balb/c 小鼠: 40 只雌性, 6-8 周龄, CRL. 5 只小鼠/组。

溶血性曼氏杆菌 A1: 7.5×10^7 cfu/小鼠。

实验计划和分组

组	处理试剂	处理条件
A	—	—
B	对照 MAB	体外温育
C	G3	体外温育
D	G8	体外温育
E	对照 MAb	体内 1 小时
F	G3	体内 1 小时
G	G8	体内 1 小时

D-1	mAb G3、G8 和 L2-16 的纯化和定量
D-1	在 BHI 琼脂上建造 <i>Mh</i> A1 平板
D0	使用 <i>Mh</i> 接种 BHI 肉汤 在 OD 约 1.2 或者更高时收集 <i>Mh</i> 用于接种 通过存活计数确定接种物 将 mAb IP 给予 E-G 组小鼠 将约 10^8 个 <i>Mh</i> IN 给予 A 组和 E-G 组小鼠 将 <i>Mh</i> 与 mAb 一起体外培养 30min 将约 10^8 个预温育的 <i>Mh</i> 给予 B-D 组小鼠
D1	每天观察小鼠并记录临床迹象至实验结束

D3	<p>结束实验并收集：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 肺的总体发病情况 ● 切除肺以进行组织解剖
----	----------------------------------------------------------------------------------------------------

组	临床症兆 ⁱ		宏观变化 ⁱⁱ	组织学变化 ⁱⁱⁱ
	第2天	第3天		
A	++++ ^{iv}	+++	+++ ^v	+++ ^{vi}
B	++++	++	+++	+++
C	++(2) ^{vii}	-	++	++
D	++(2)	-	++	++
E	++++	++(4)	++	+++
F	+++	-(4)	++	+到++
G	+++	+到++(4)	++	+到++

ⁱ 所有小鼠表现出不同程度的临床症兆，如粗糙的皮毛、脱水 and 不愿在 DPI 2 上移动。然而，C 和 D 组小鼠总体上是健康的，F 和 G 组小鼠尽管有粗糙的皮毛，但是保持活跃。在 DPI 3 上，A 和 B 组小鼠严重脱水，并体重降低，G 组小鼠也有轻微的病状。

^{iⁱ} 所有小鼠表现出不同程度的肺粘连 (lung consolidation)，并未采取尝试以确定涉及的面积大小。

^{iⁱⁱ} 在各组之间的主要区别是，A、B 和 E 组全部小鼠显示在他们的肺中比其他组的小鼠有更多的嗜中性粒细胞。然而，所有的小鼠，无论如何处理，都显示有某种程度的肺炎。

^{i^v} +++++：粗糙皮毛，中度到重度的体重降低，不愿移动；+++：粗糙皮毛，轻度到中度的体重降低和脱水，但保持活跃；++：粗糙皮毛并轻度的体重降低；+：轻度粗糙皮毛。

^v +++：中量面积的粘连；++：小面积的粘连。

^{vi} +++++：中度的支气管肺炎伴随中量到大量的嗜中性粒细胞的出现和血管周围及支气管周围区域的淋巴细胞的显著渗入；++：微度到中度的支气管肺炎伴随少量的嗜中性粒细胞的出现和血管周围及支气管周围区域的淋巴细胞的渗入；+：微度的支气管肺炎伴随少量的嗜中性粒细胞的偶尔出现和血管周围及支气管周围区域的淋巴细胞的微度渗入。

^{vii} 表现临床症状的小鼠数量

基于这个试验性的实验显示，mAb 处理，特别是用溶血性曼氏杆菌的

体外预温育，对临床症状和被感染小鼠的组织病理学上显示出中度影响。

图 66 显示对照小鼠 B 的中等大小的支气管腔中，中量的嗜中性粒细胞的出现，与发病机理相符，但是图 67 显示与图 66 同时杀死的 C 组小鼠的肺的一些区域中，显示出由于少量的淋巴样细胞的存在而引起的肺炎的消退，与通过体外预混合的 mAb G3 和 *Mh* 细胞提供的某种程度的保护一致。

生物保藏

溶血性曼氏杆菌菌株 A1 *losB* 于 2005 年 5 月 4 日在 IDAC 进行保藏。保藏编号为 IDAC 040505-01。

<110> 加拿大国家研究委员会 (National Research Council of Canada)

<120> 作为多物种疫苗候选物的保守性内核脂多糖表位

<130> PAT 2817W-90

<150> CA 2,467,329

<151> 2004-05-14

<150> US 60/571,489

<151> 2004-05-17

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> waaQPM 扩增的正向引物; 具有 BamHI 位点用于克隆

<400> 1

gagtaggatc ctgaaacatg ttccc

25

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> waaQPM 扩增的反向引物, 具有 SalI 位点用于克隆

<400> 2

ggttgggtcg accaagccac attactg

27

<210> 3

<211> 32

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> losB-kpn 引物	
<400> 3	
atatggtacc tatcagcggg agagattcta ac	32
<210> 4	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> losB-xba 引物	
<400> 4	
tgctctagac cgaacctgca ccaaaaagat ttaacgc	37
<210> 5	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 与 losB 结构基因内的序列相对应的引物	
<400> 5	
ccgctgcgag agataagtgg atactttatc	30
<210> 6	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 与 losB 结构基因内的序列相对应的引物	
<400> 6	
gacattggga tctttattta gatttcaaac cgac	34

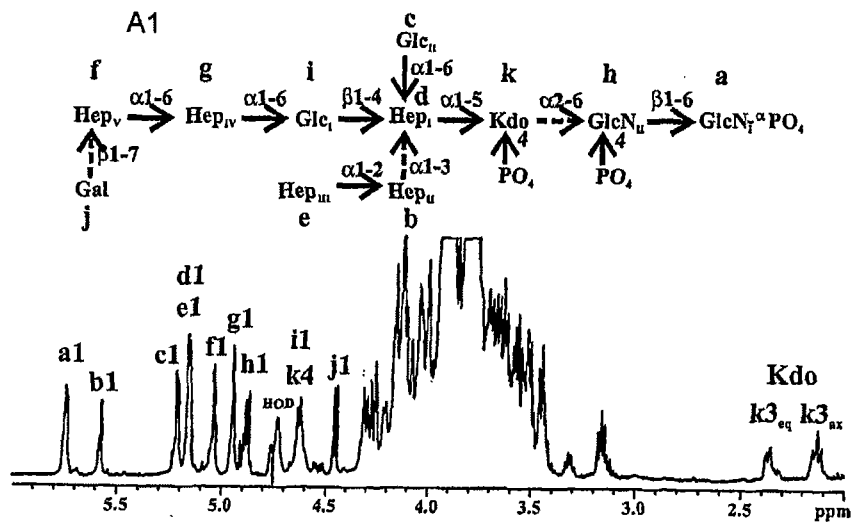


图1

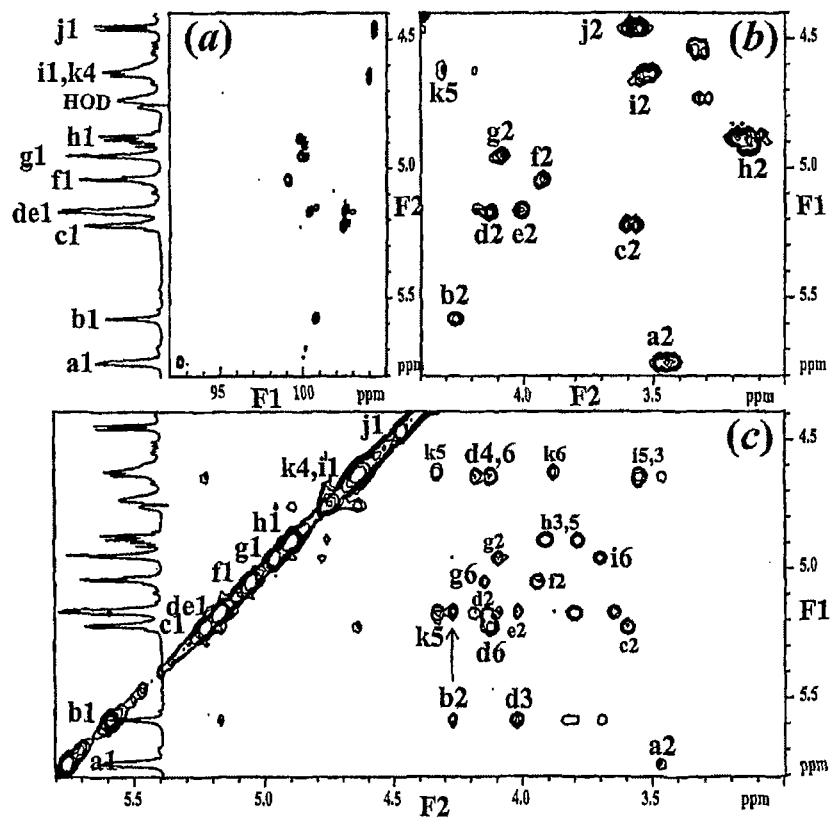


图2

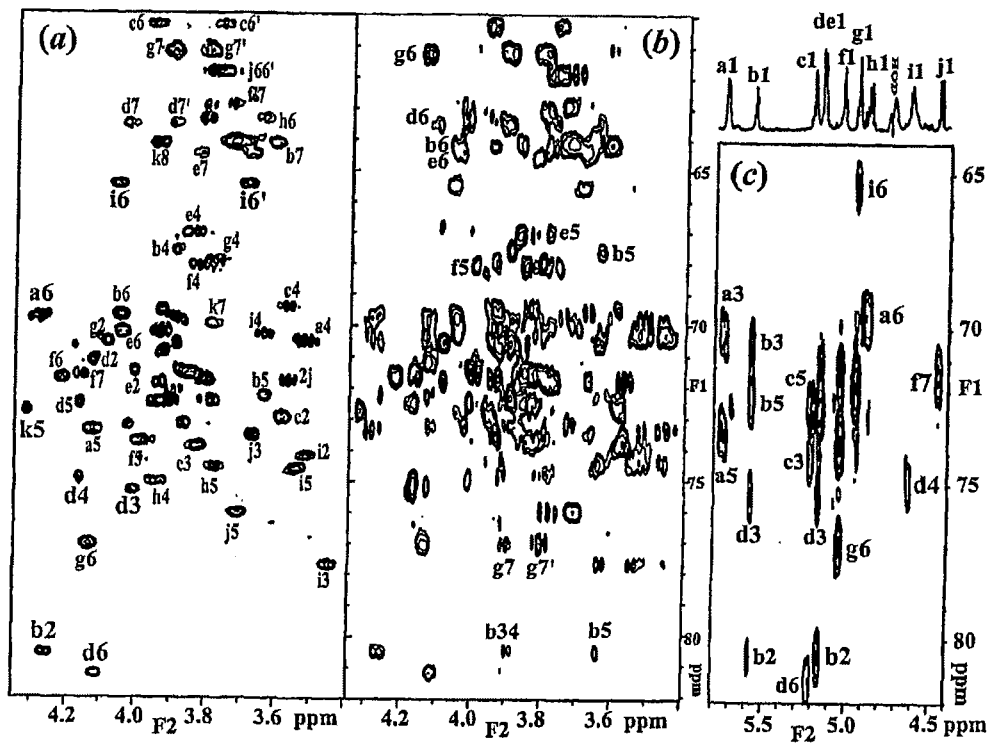


图3

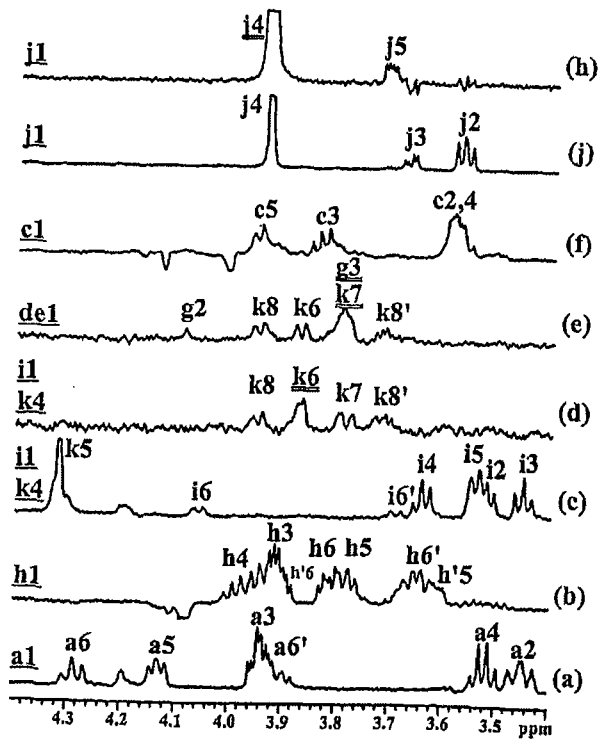


图4

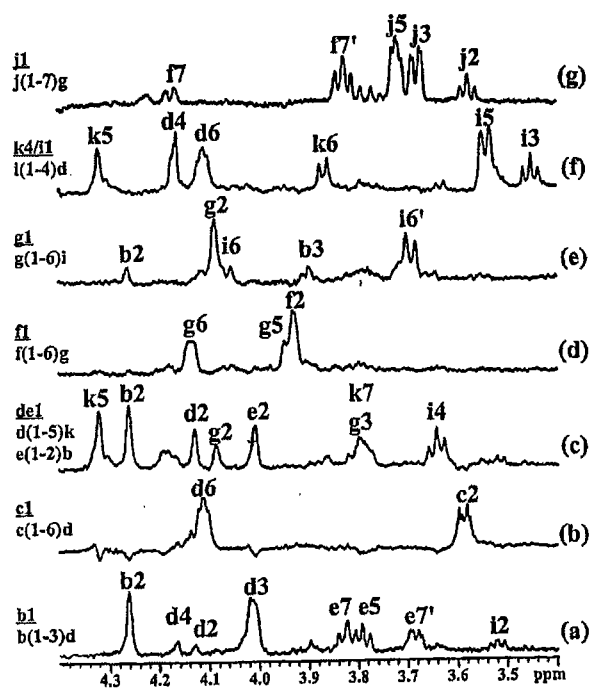


图5

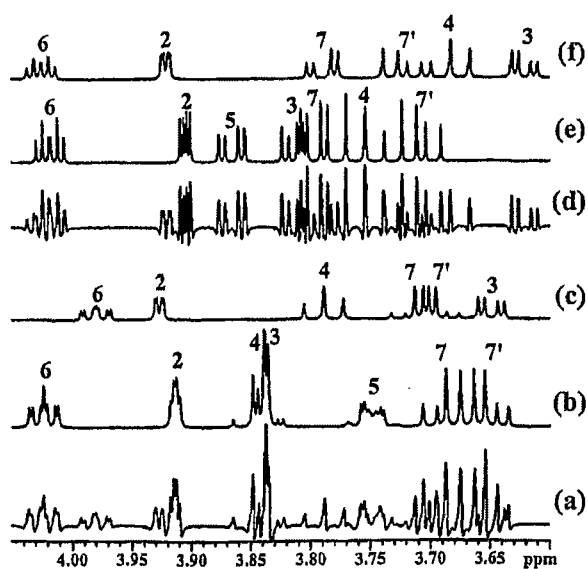


图6

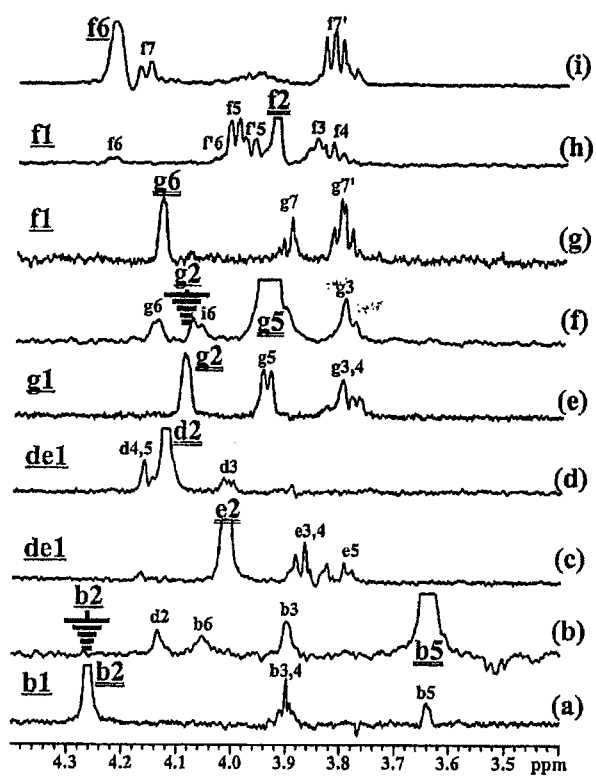


图7

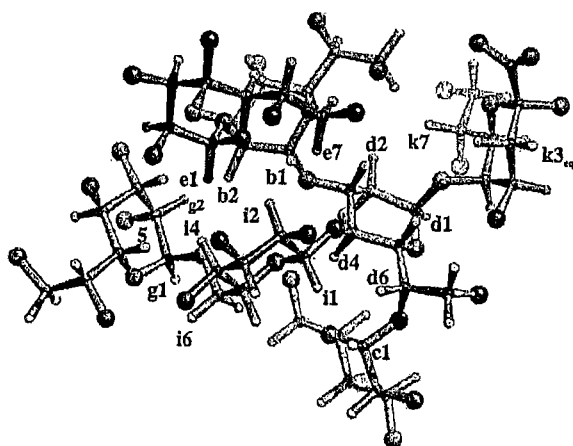


图8

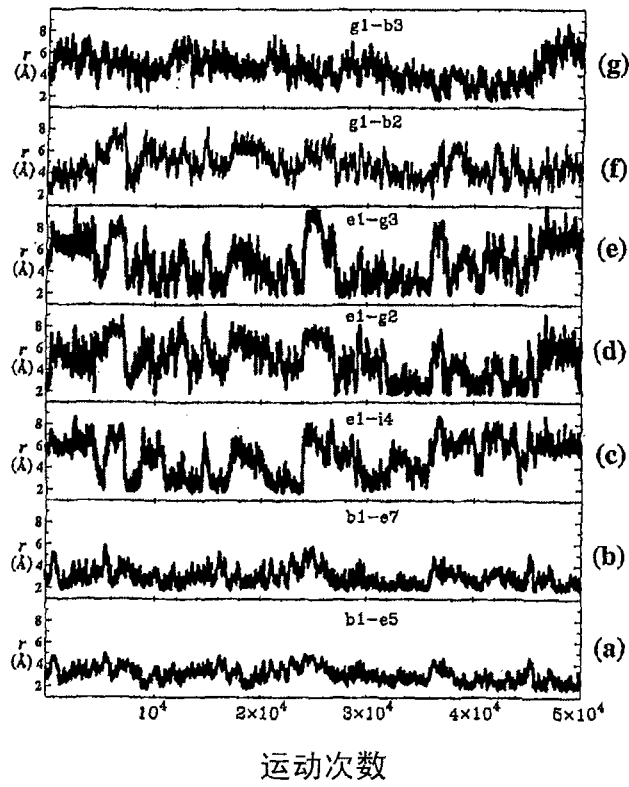


图9

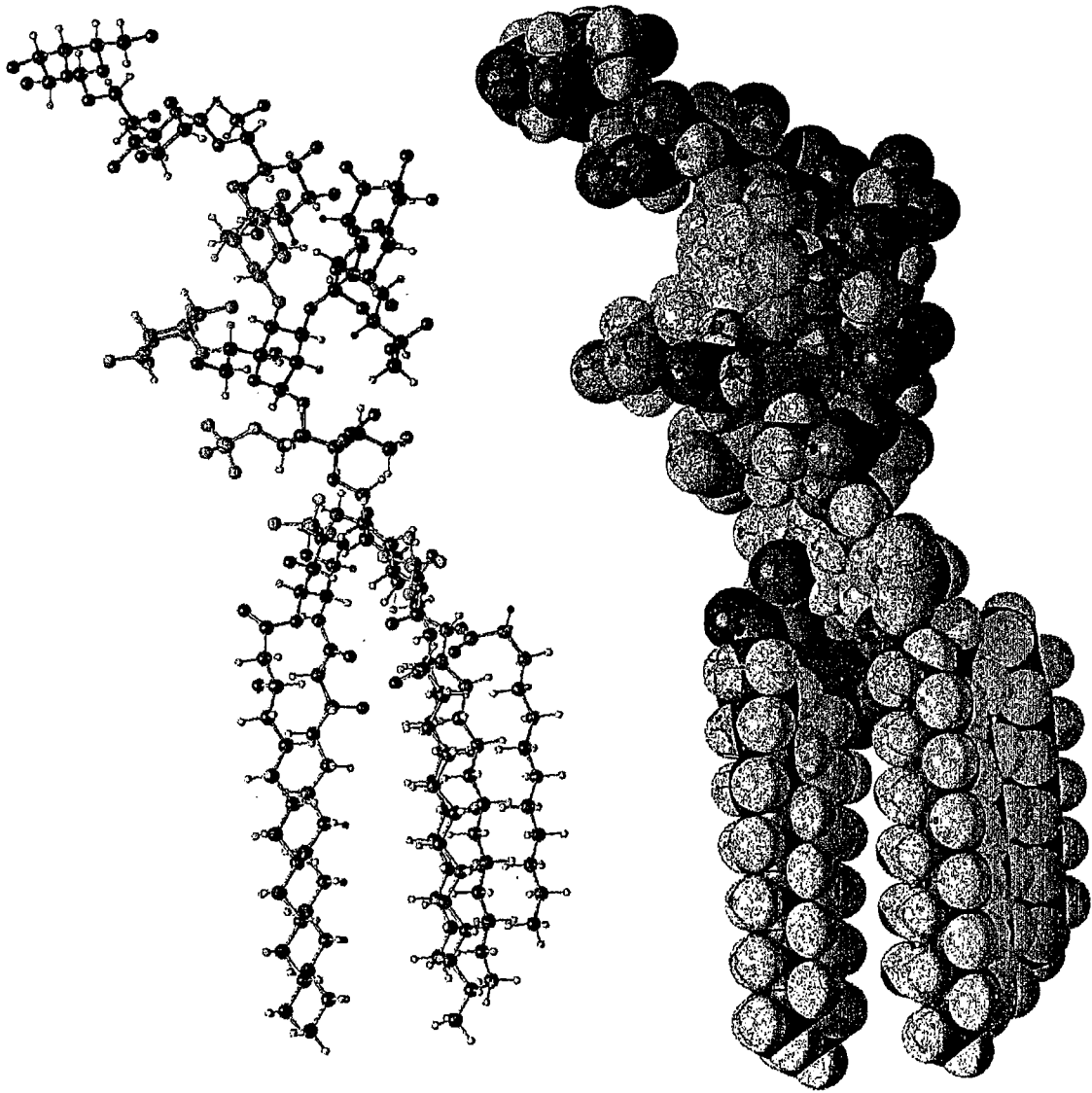


图10

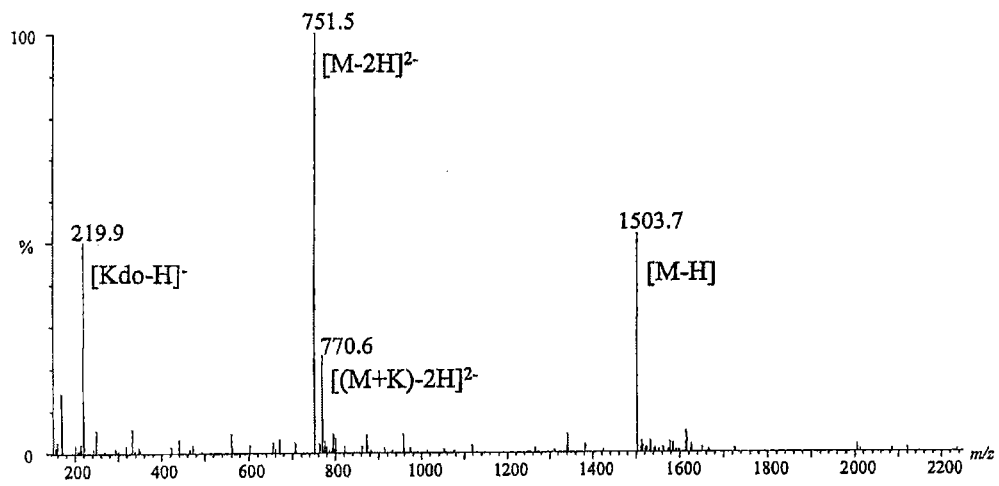


图 11

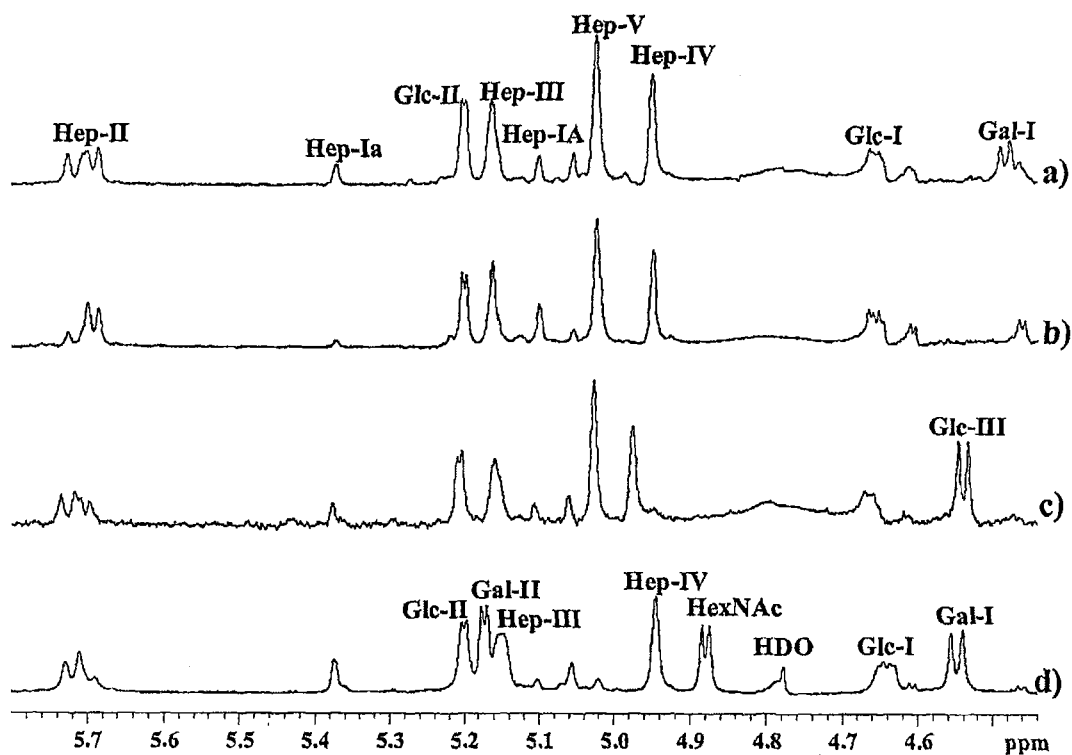


图12

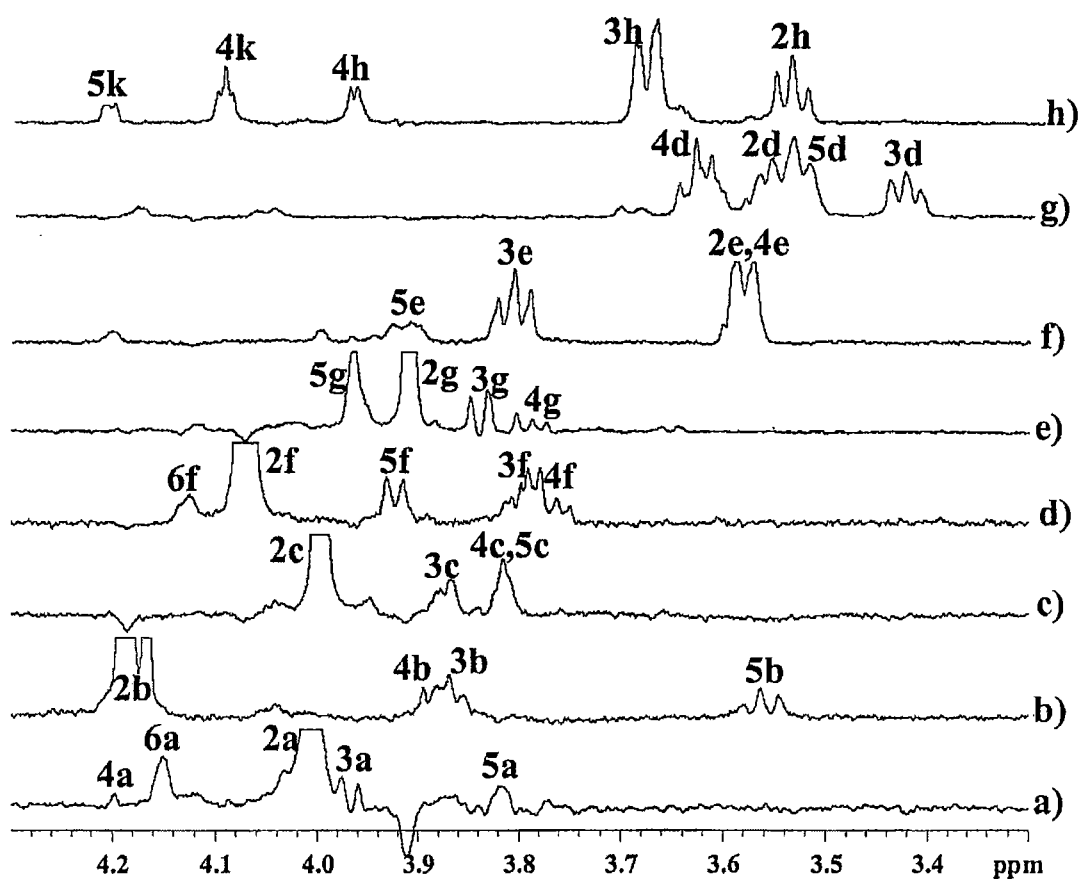


图13

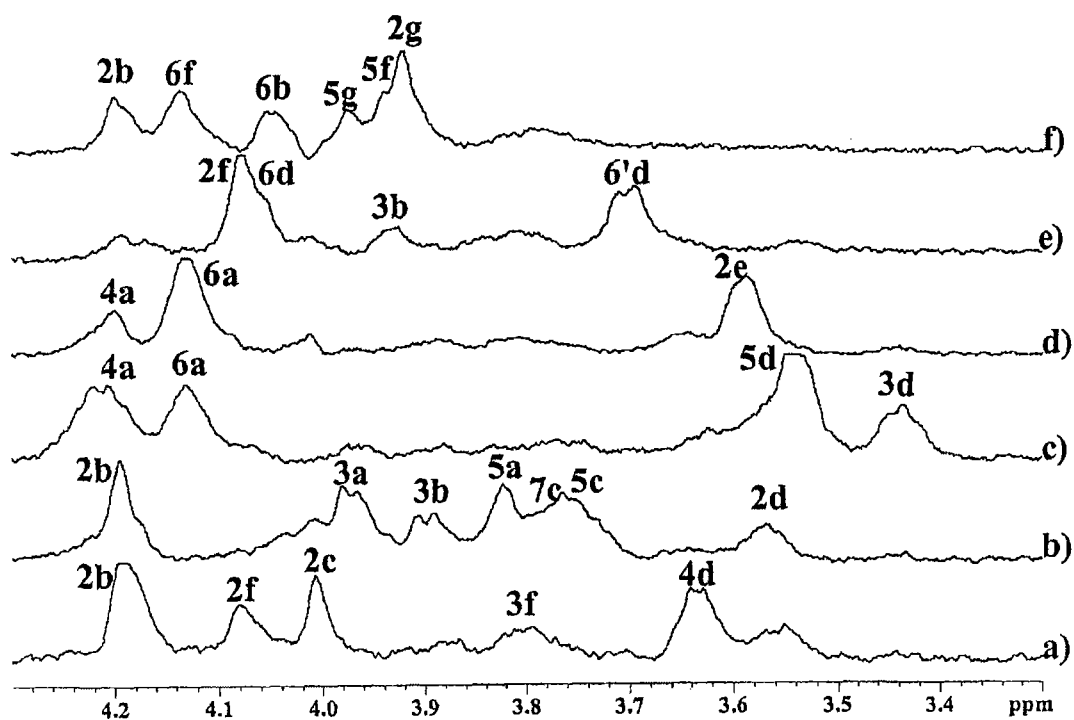


图14

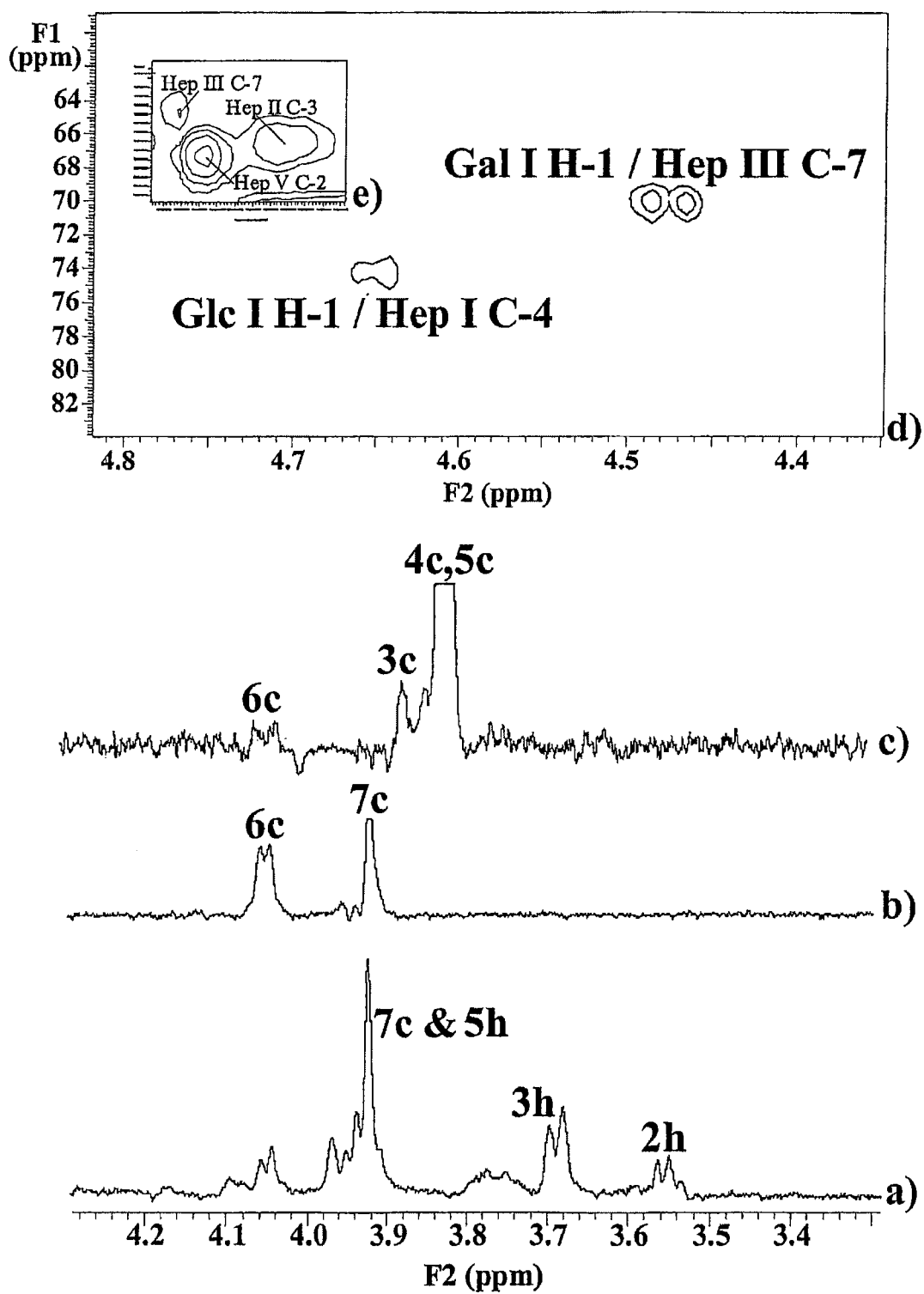


图 15

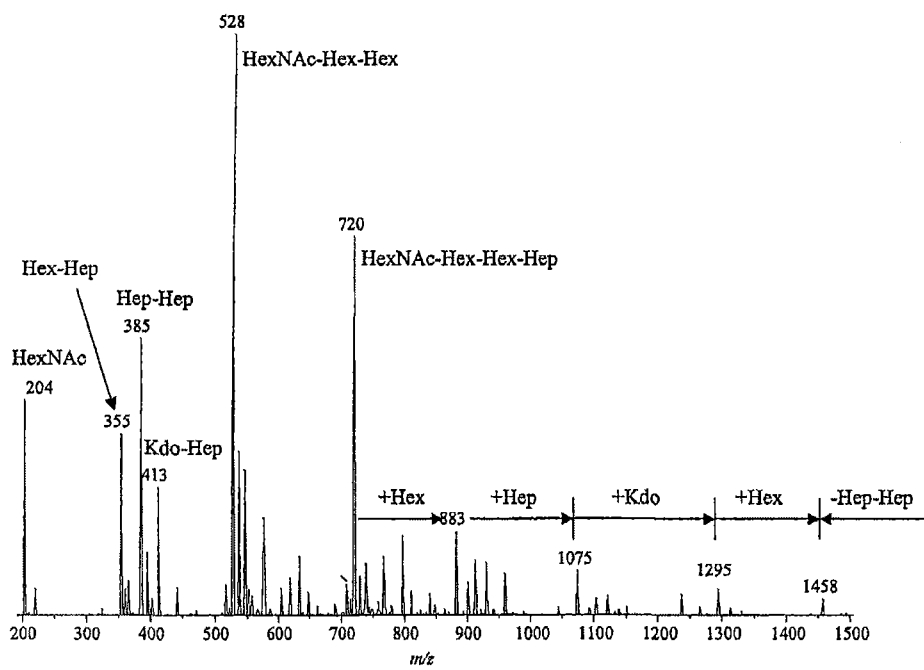


图16

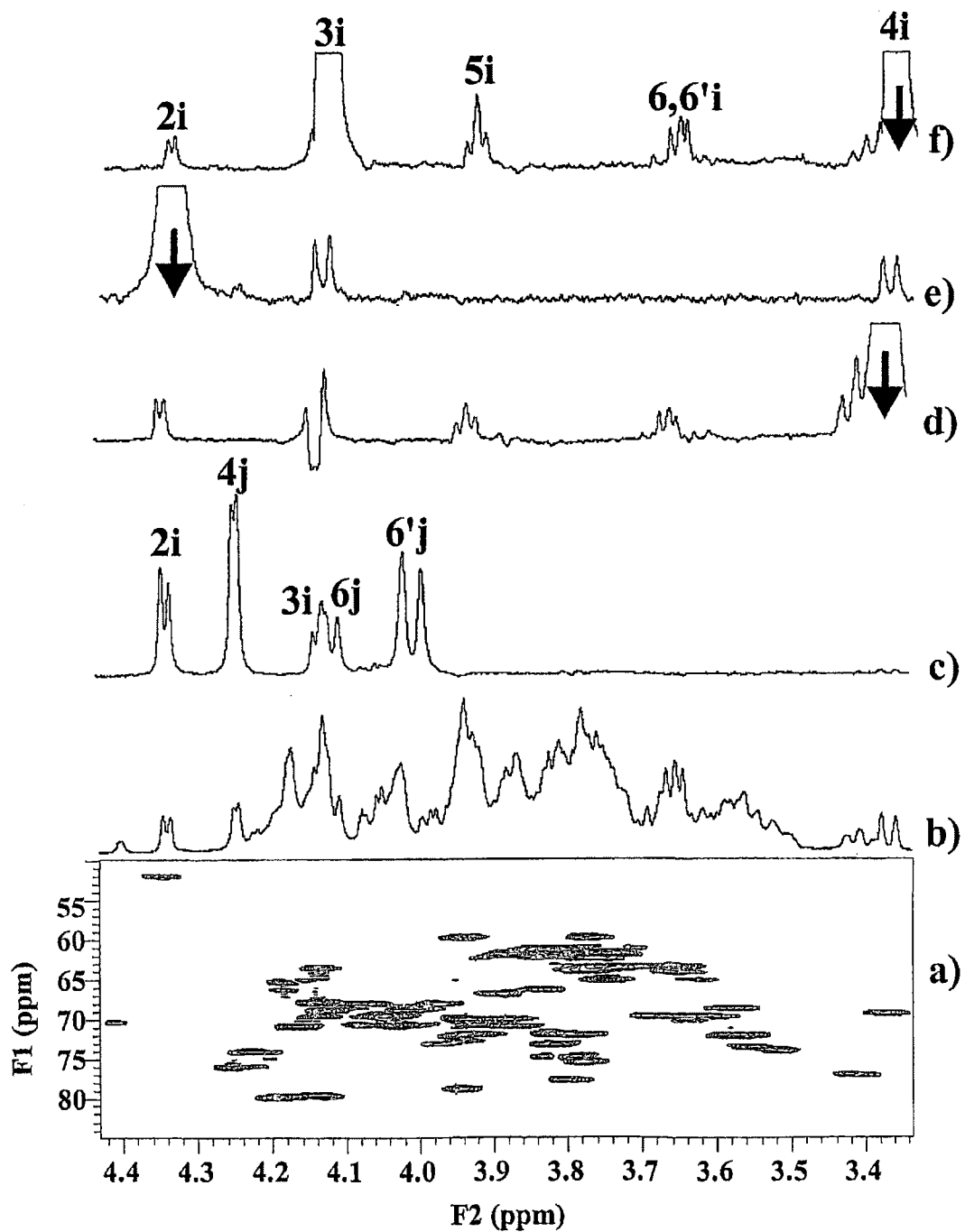


图17

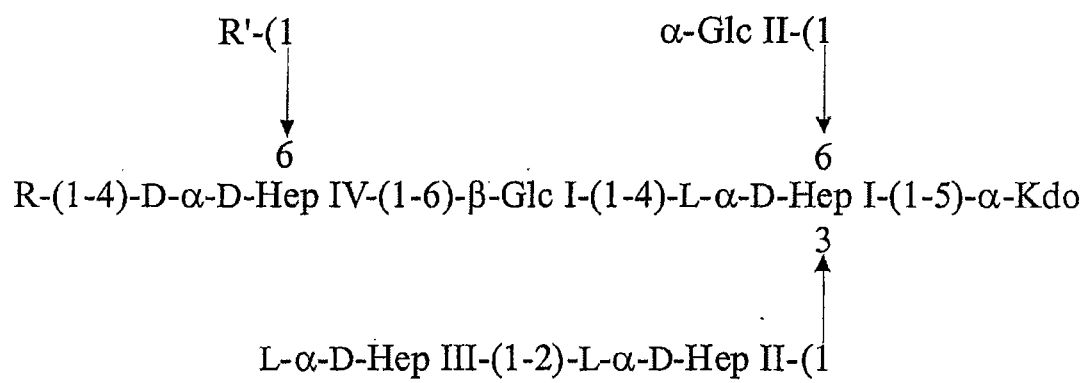


图18

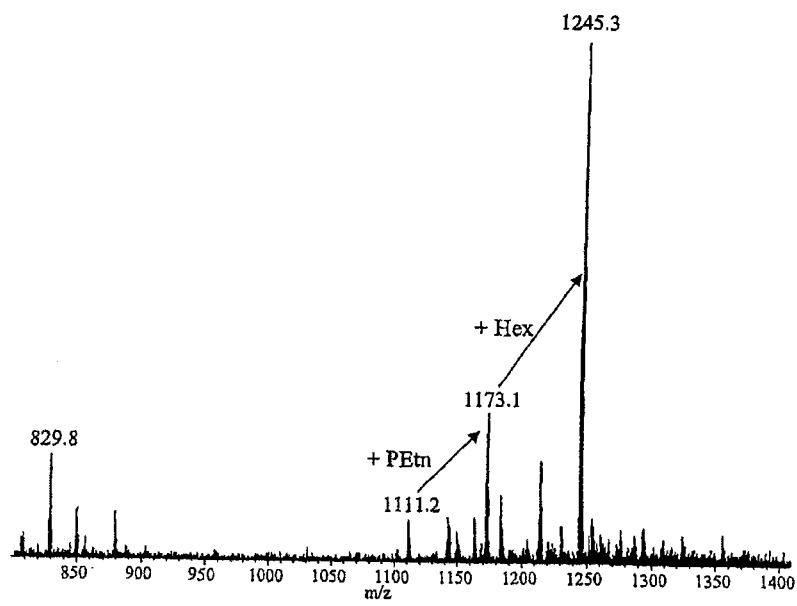


图19

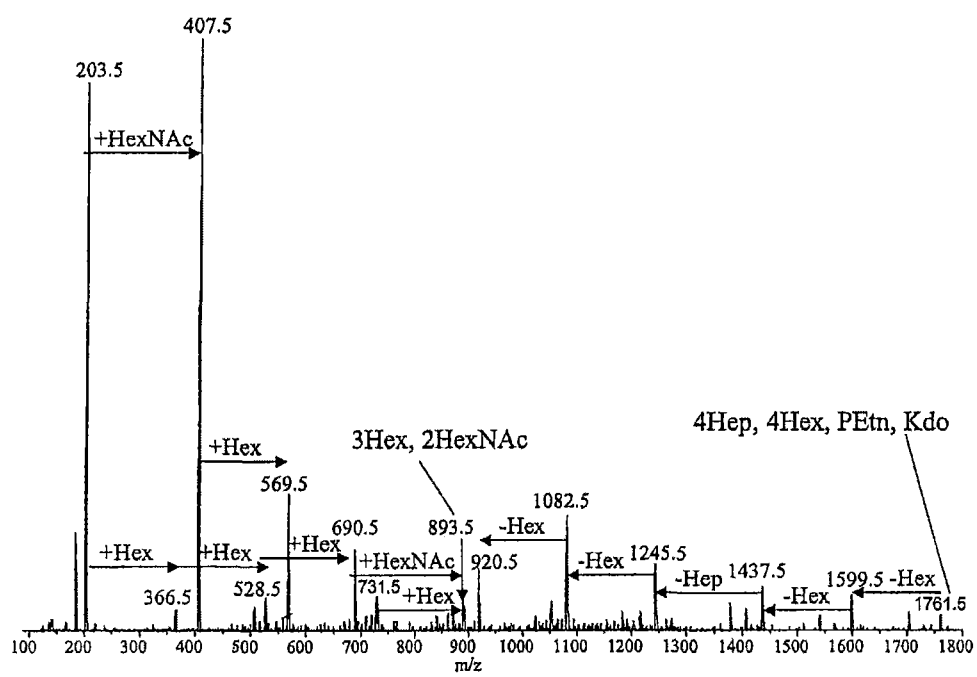


图20

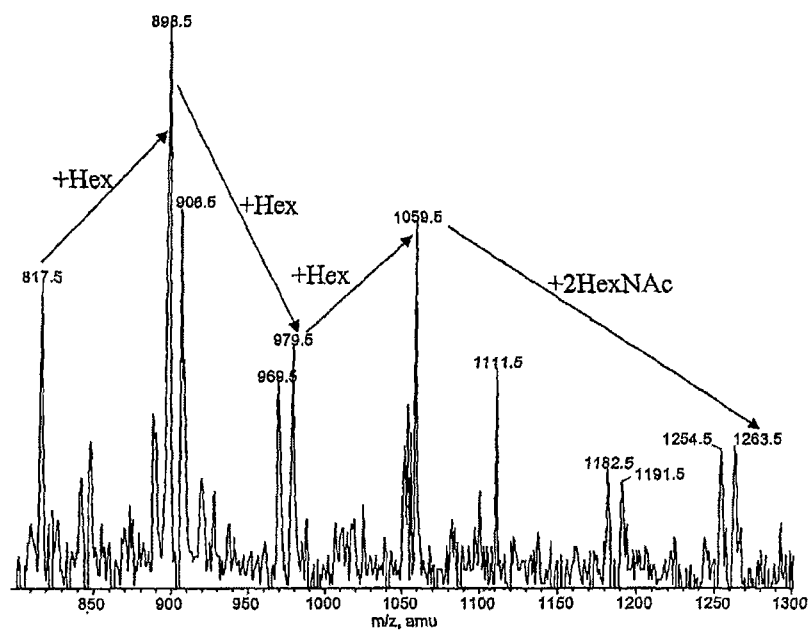


图21

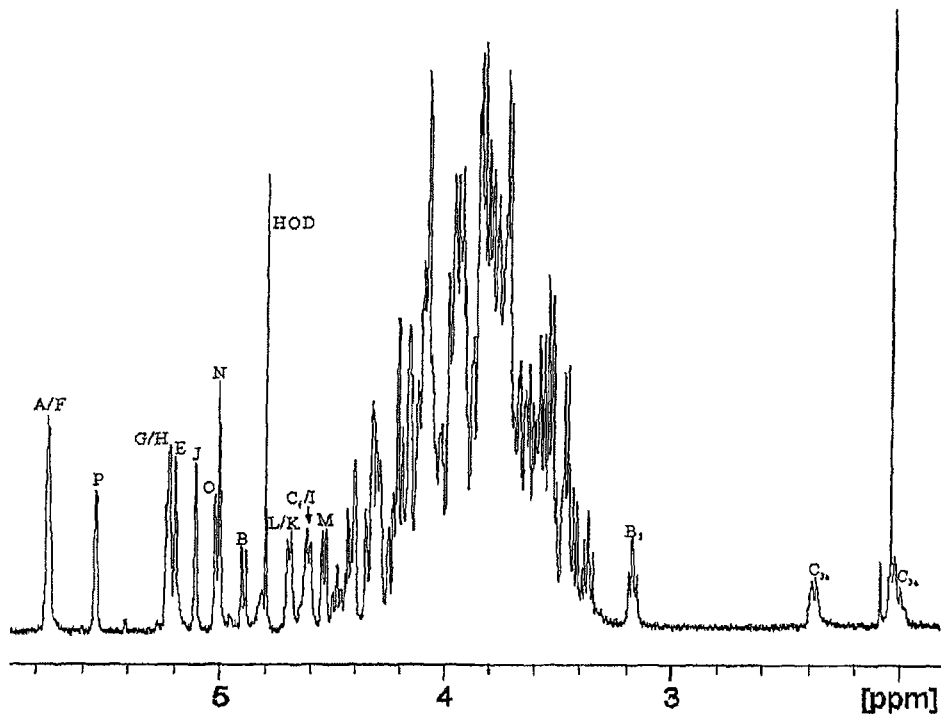


图22

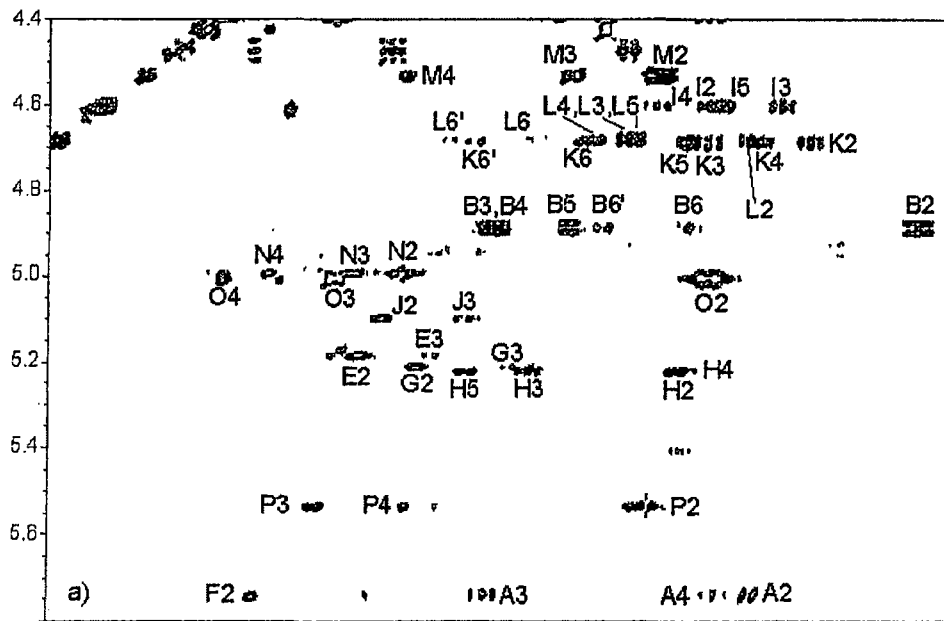


图23

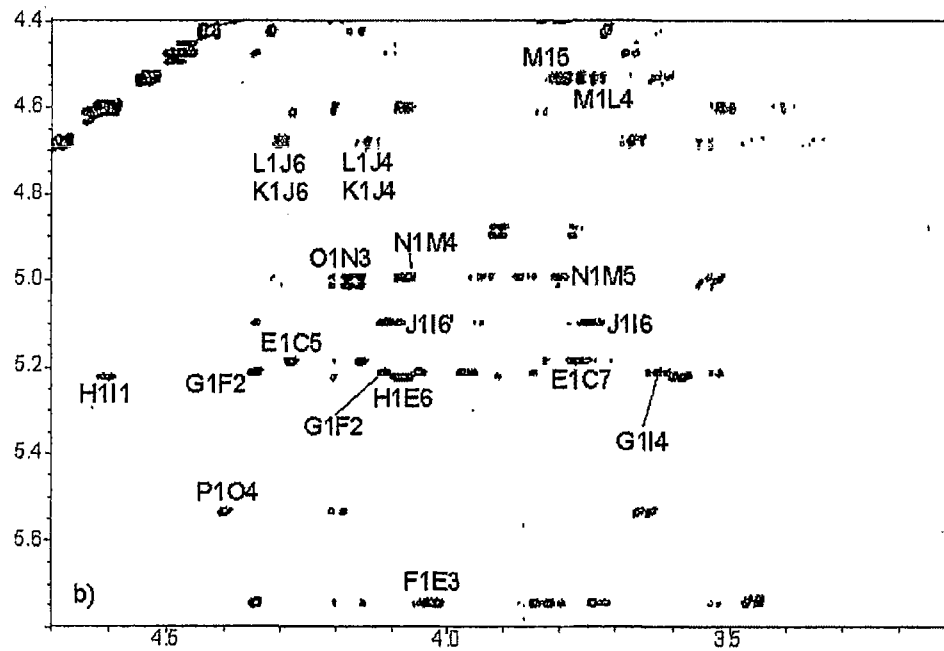


图24

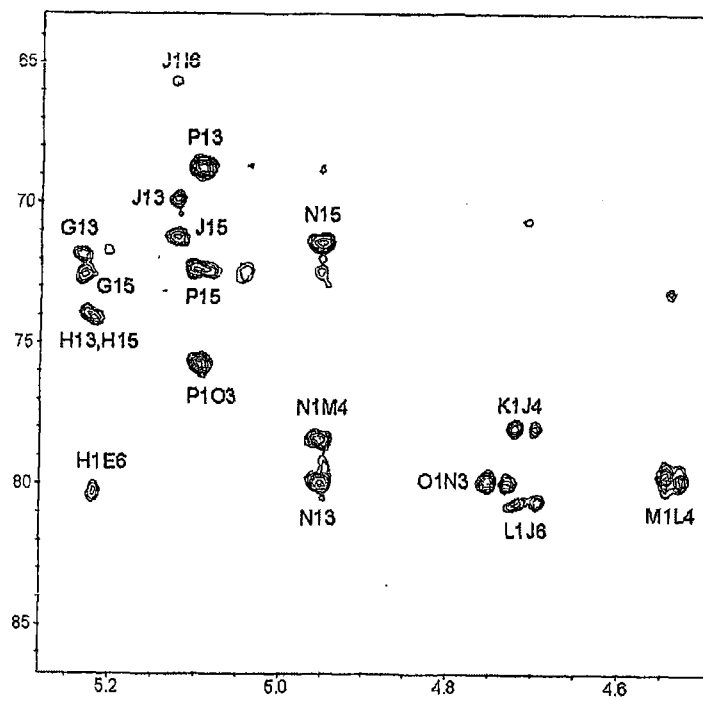


图25

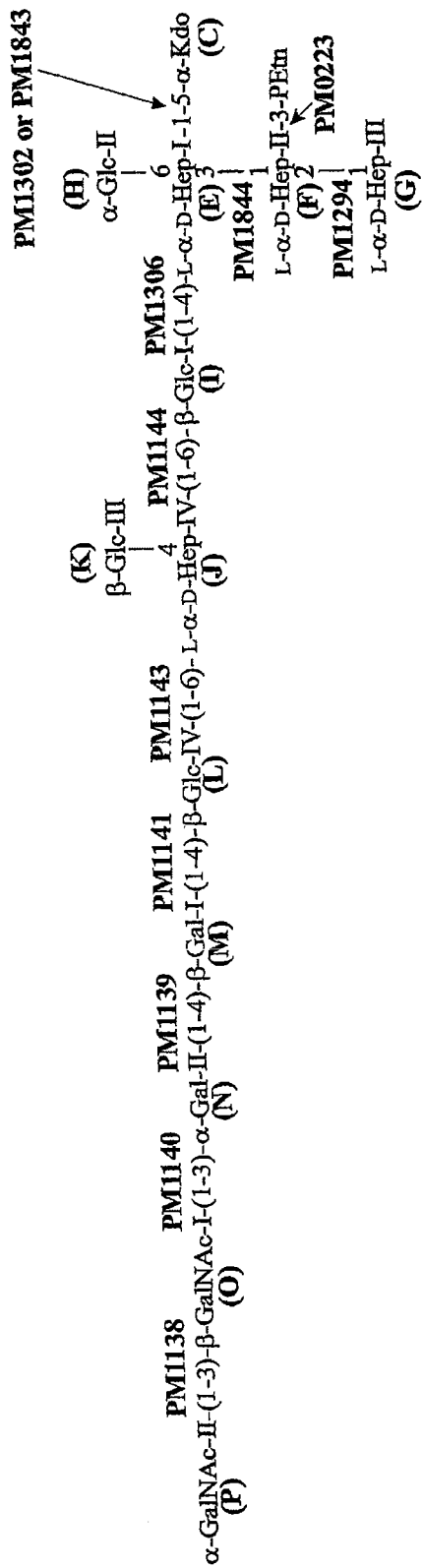


图26

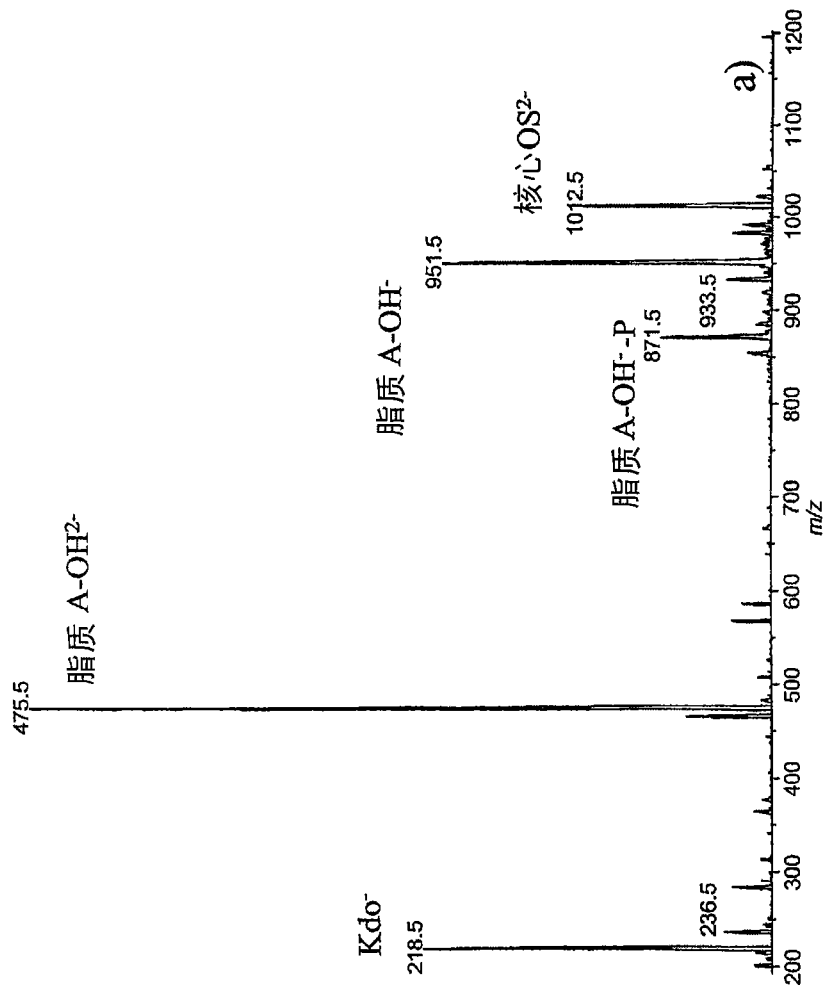


图27a

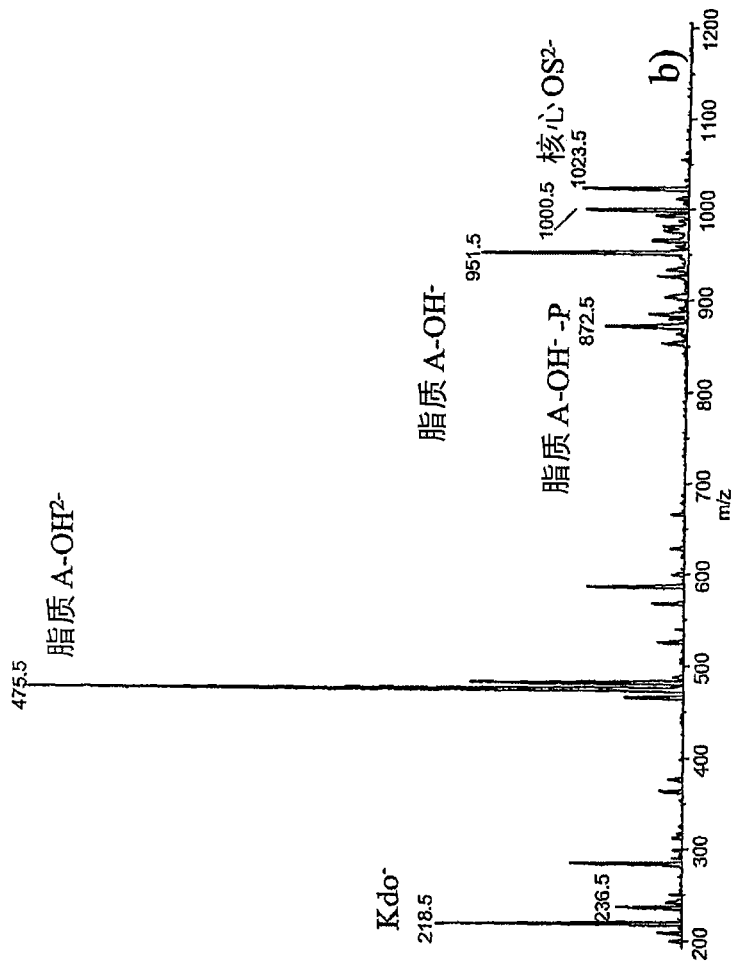


图27b

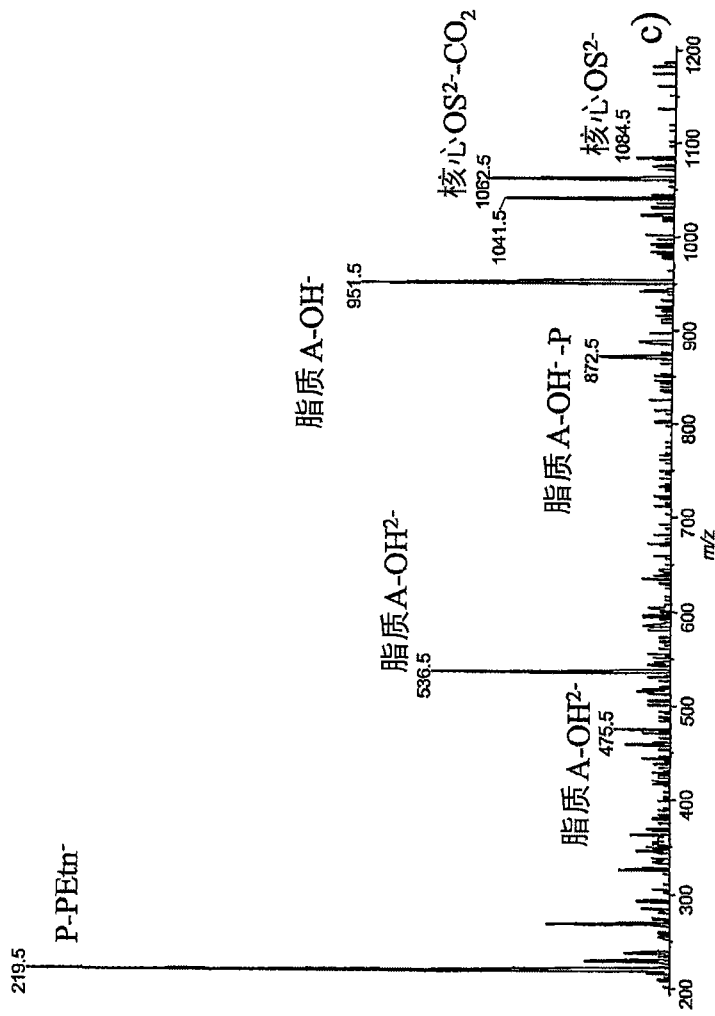


图27c

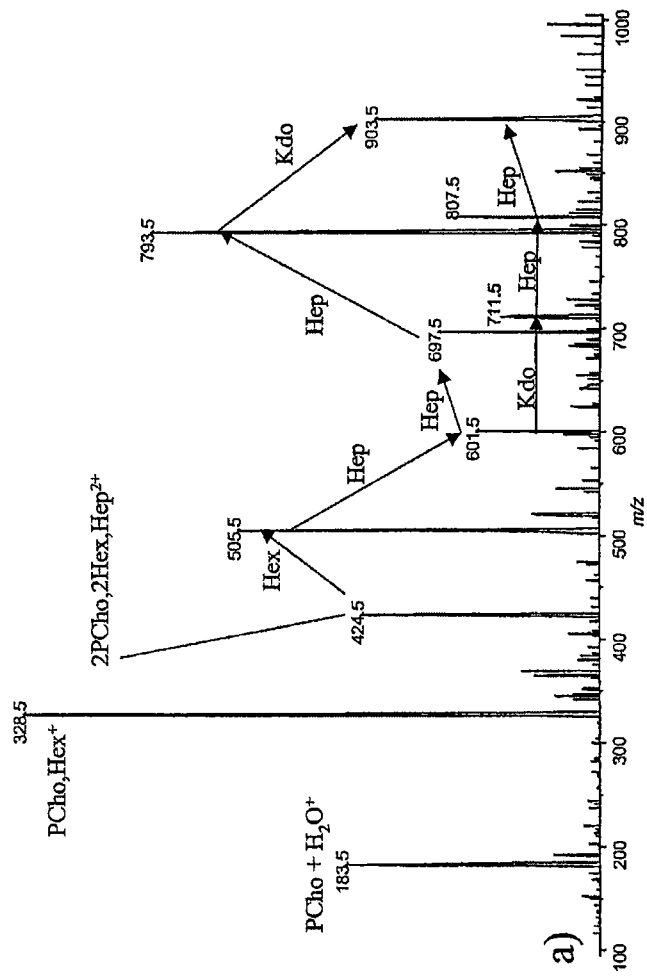


图 28a

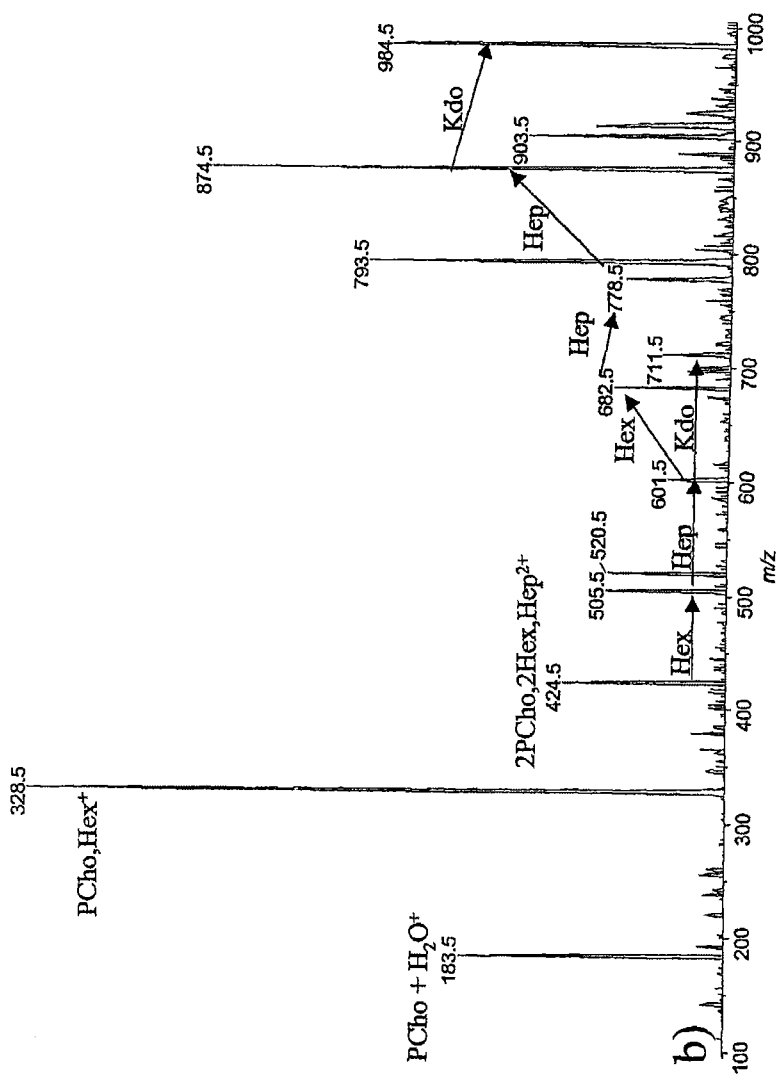


图 28b

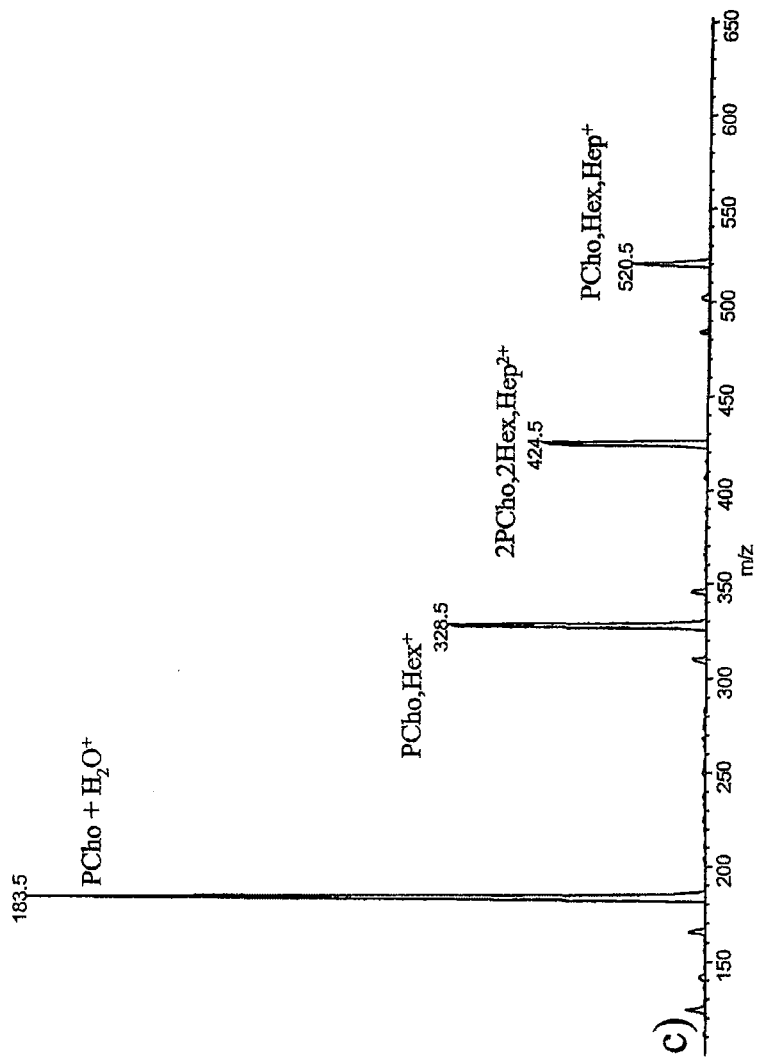


图 28C

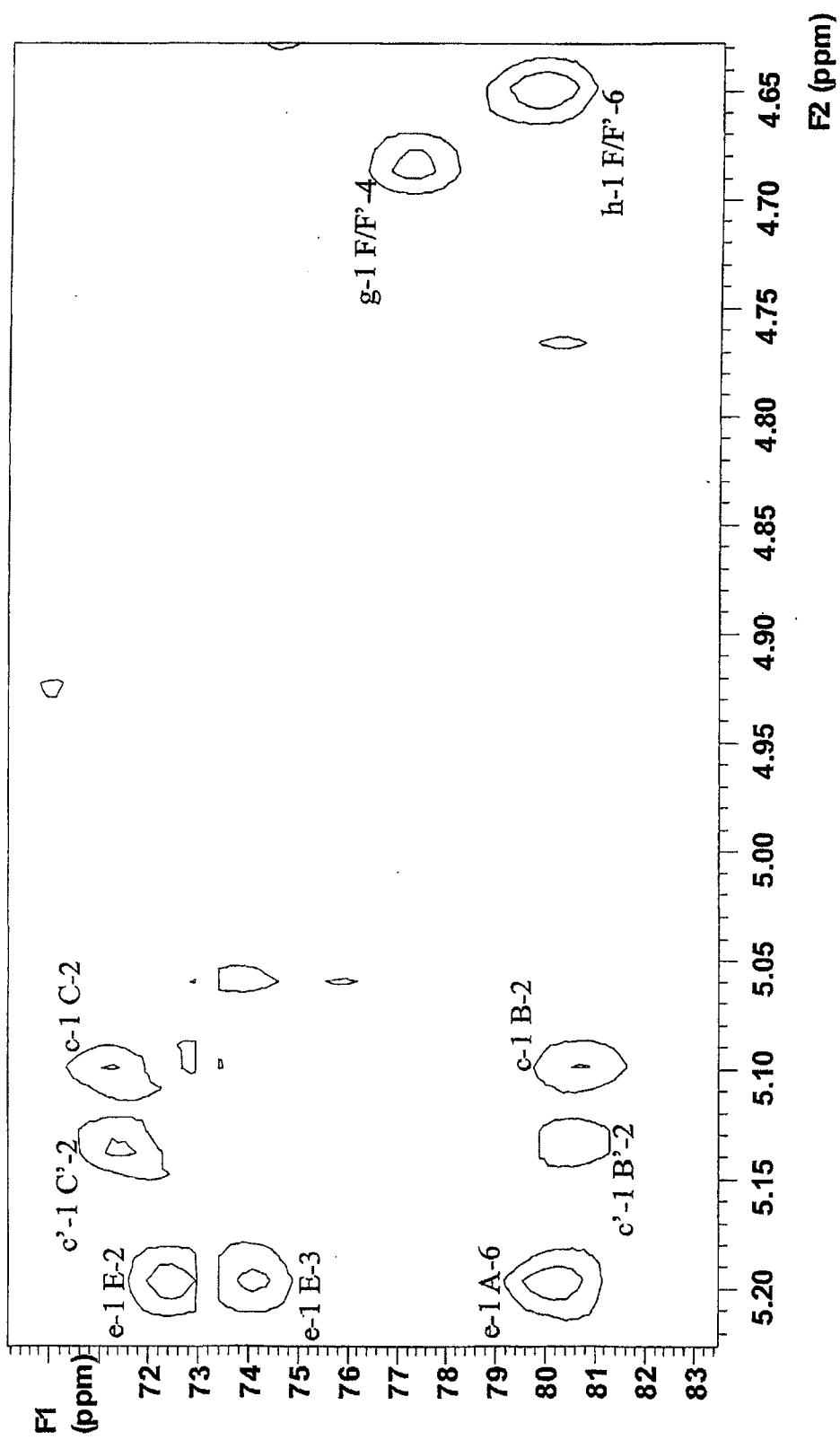


图 30

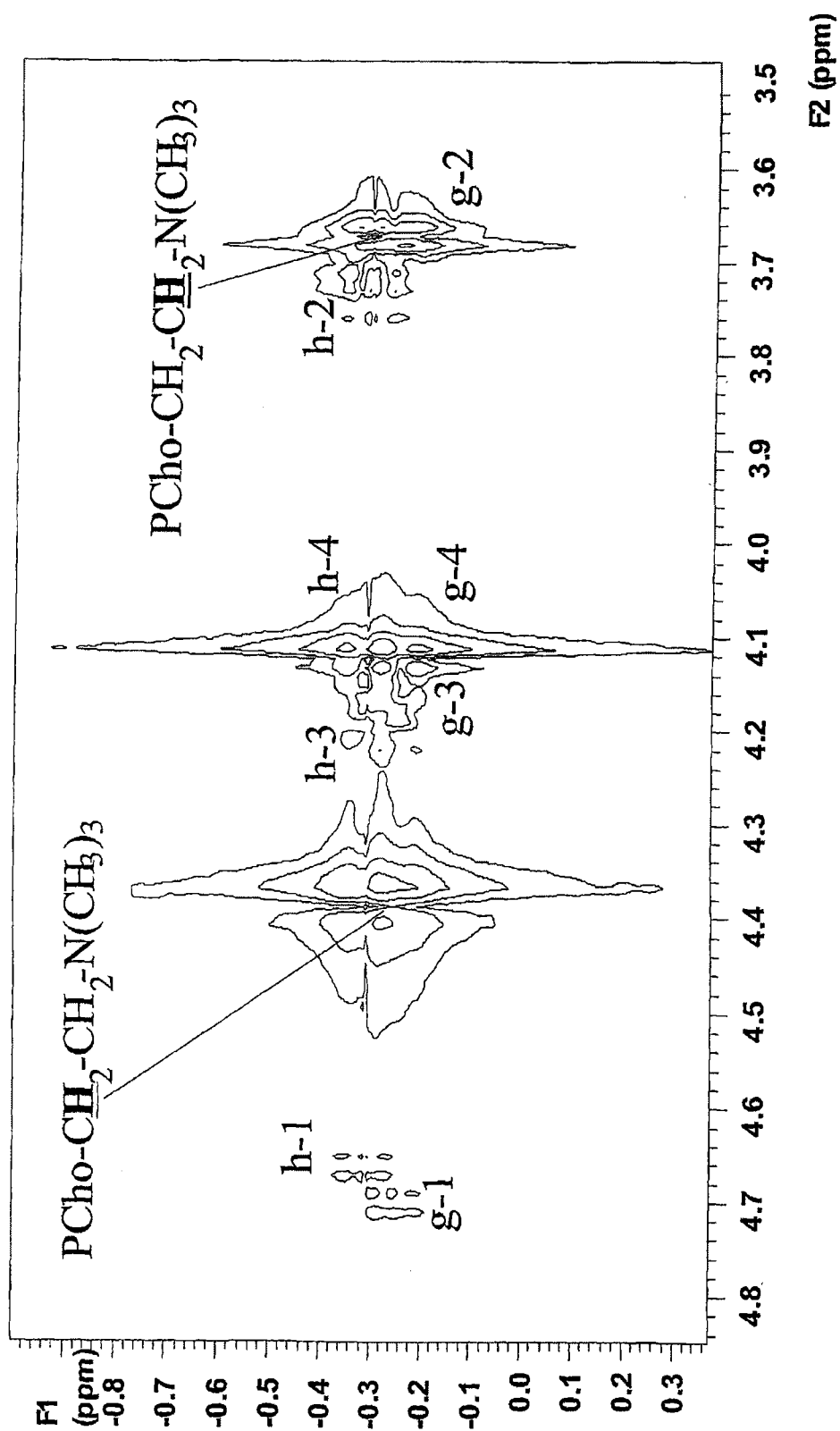


图31

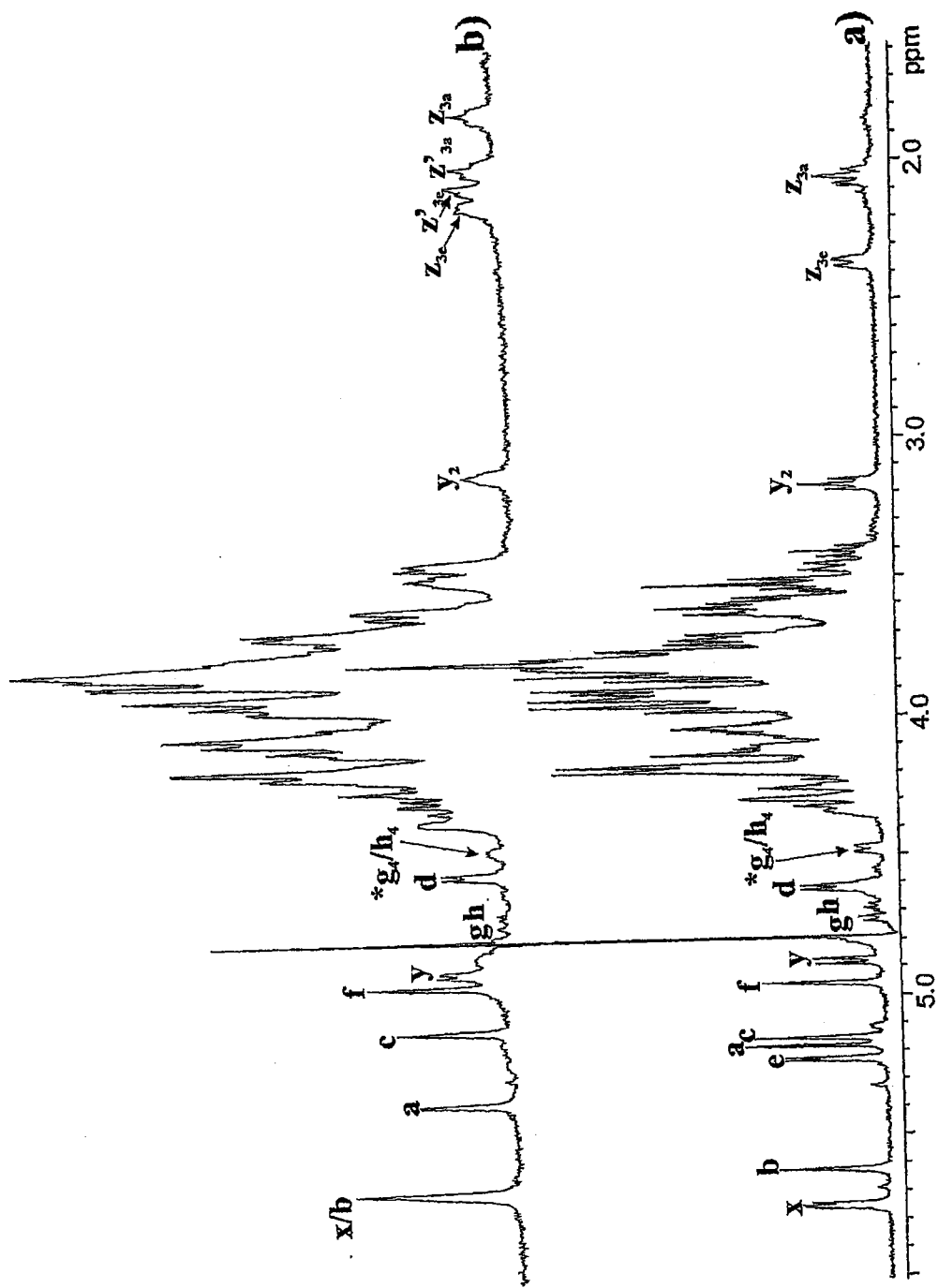


图 32

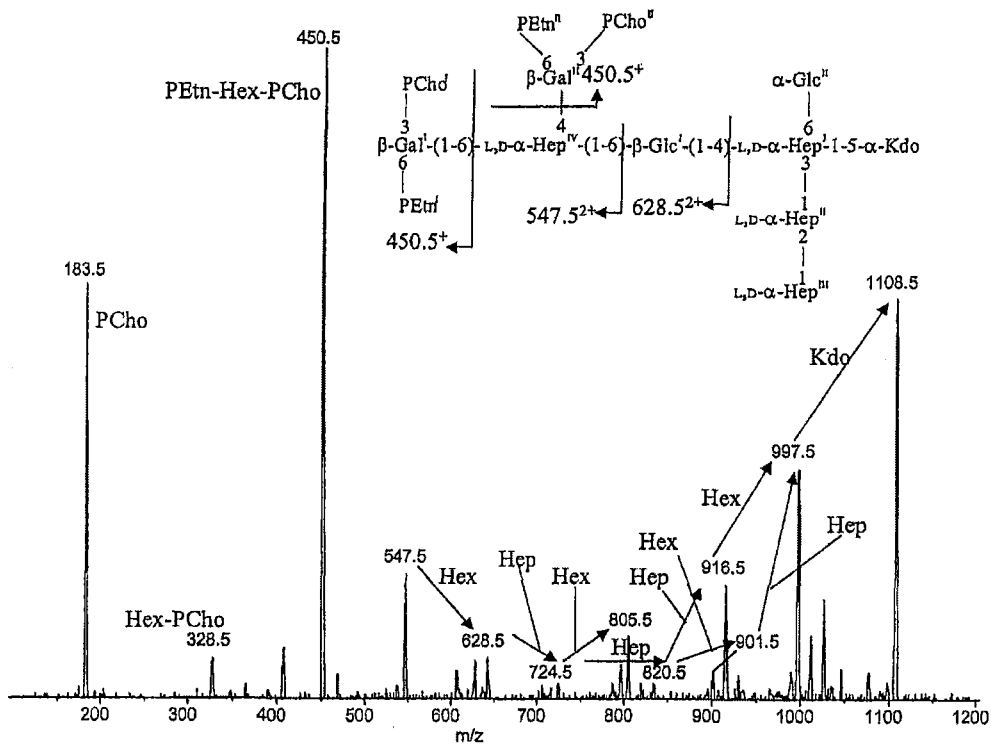


图33a

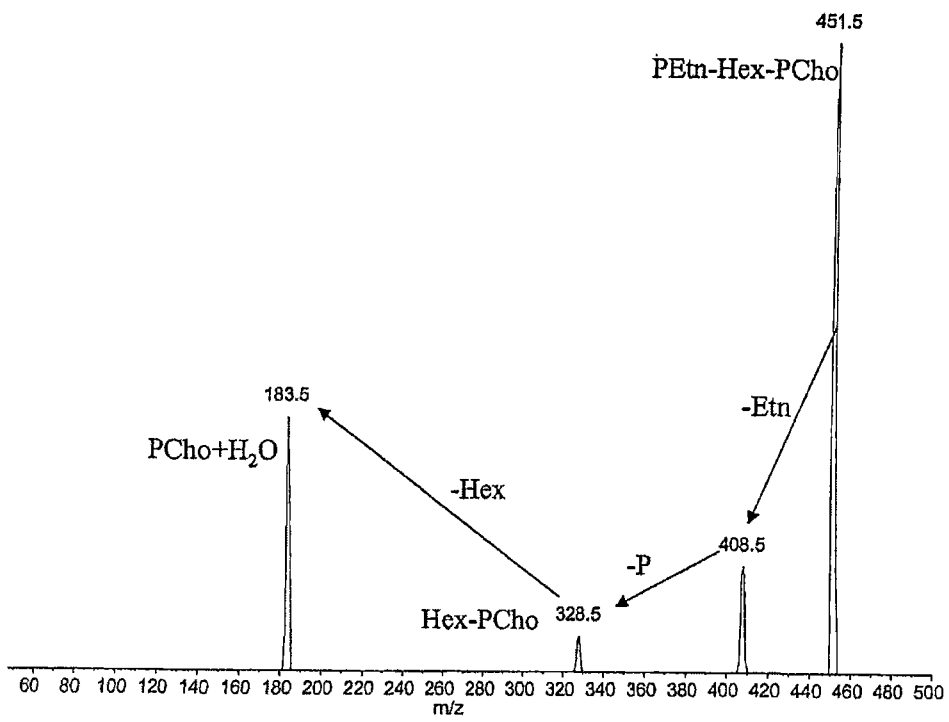


图 33b

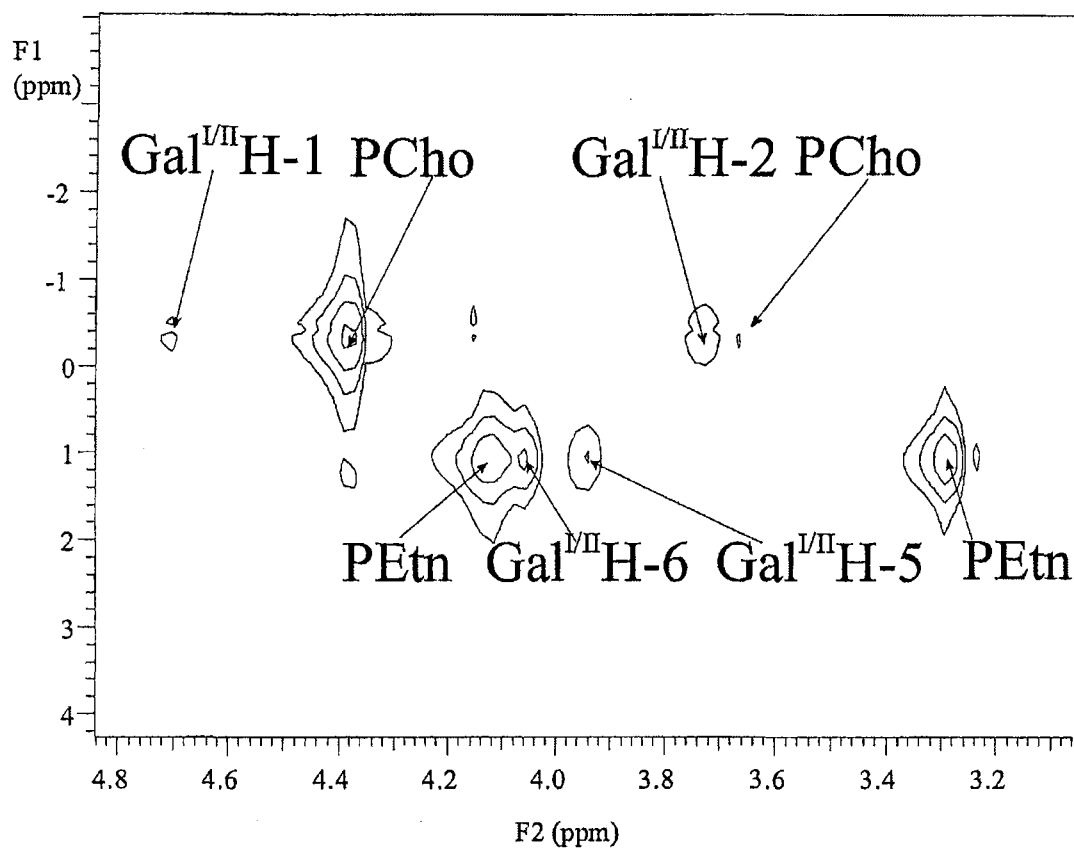


图34

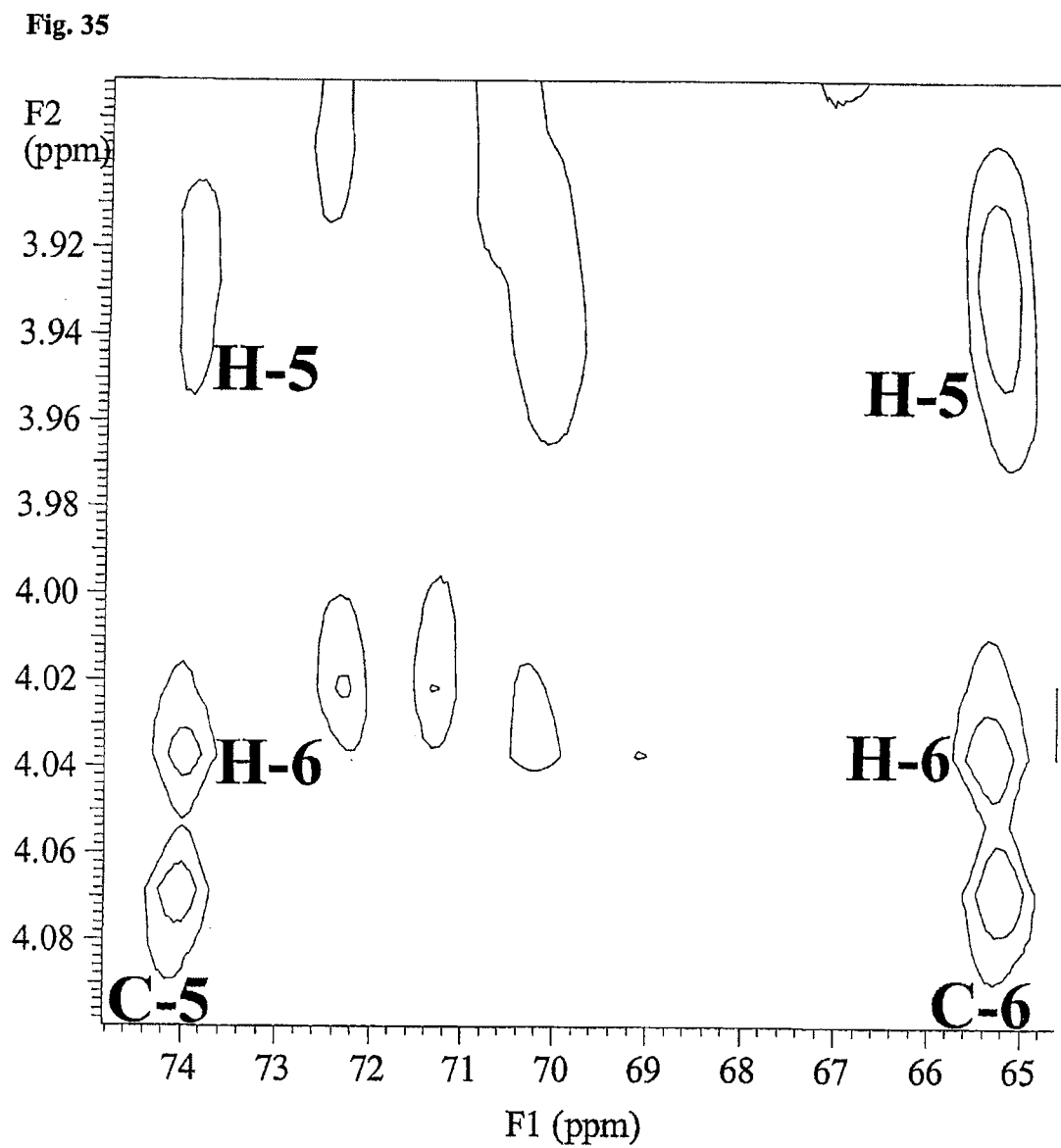


图35

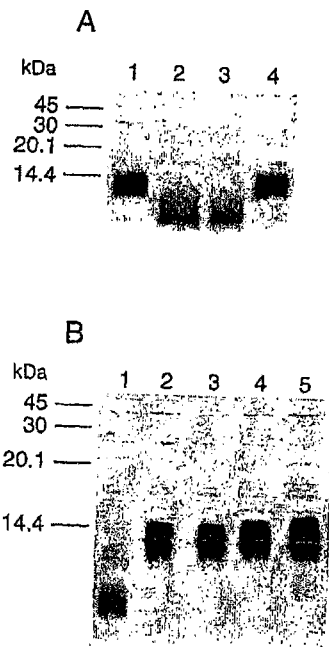


图36

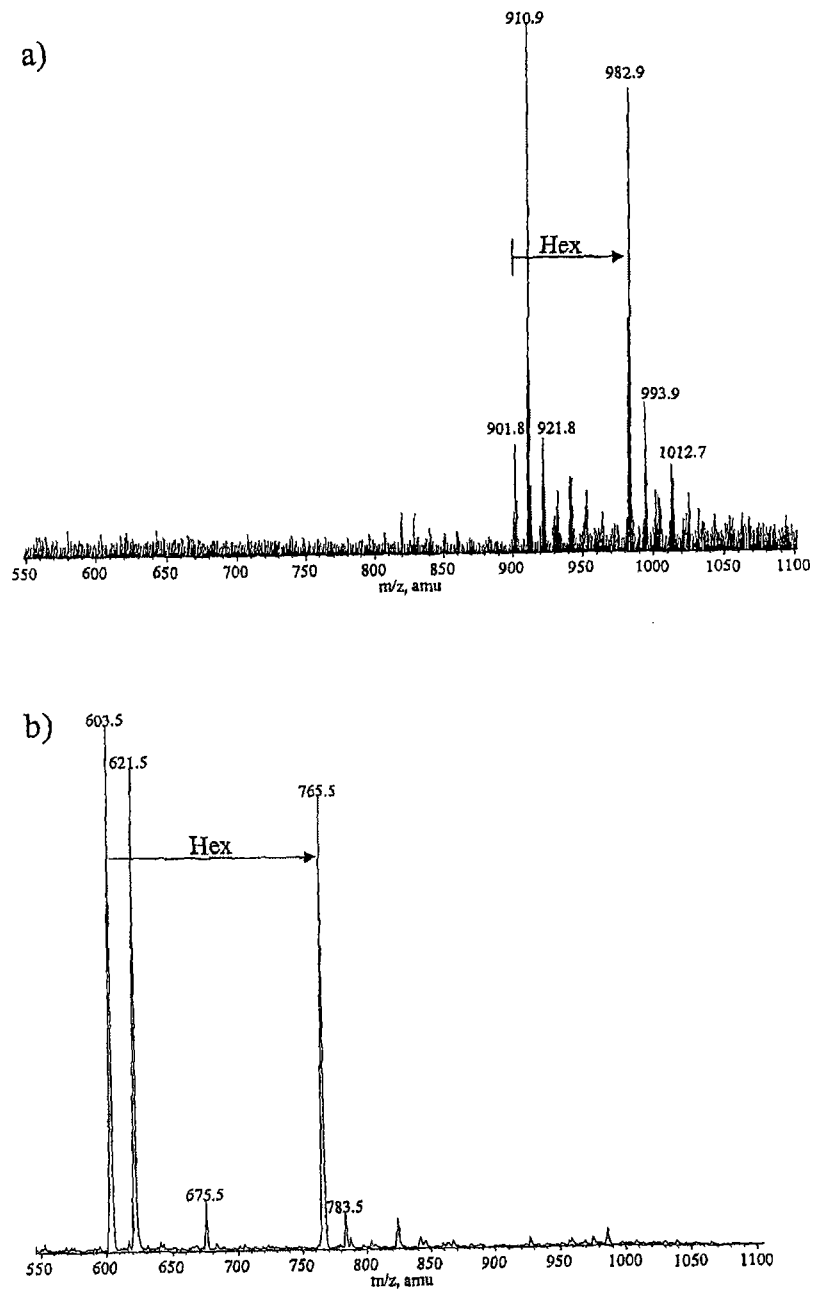


图 37

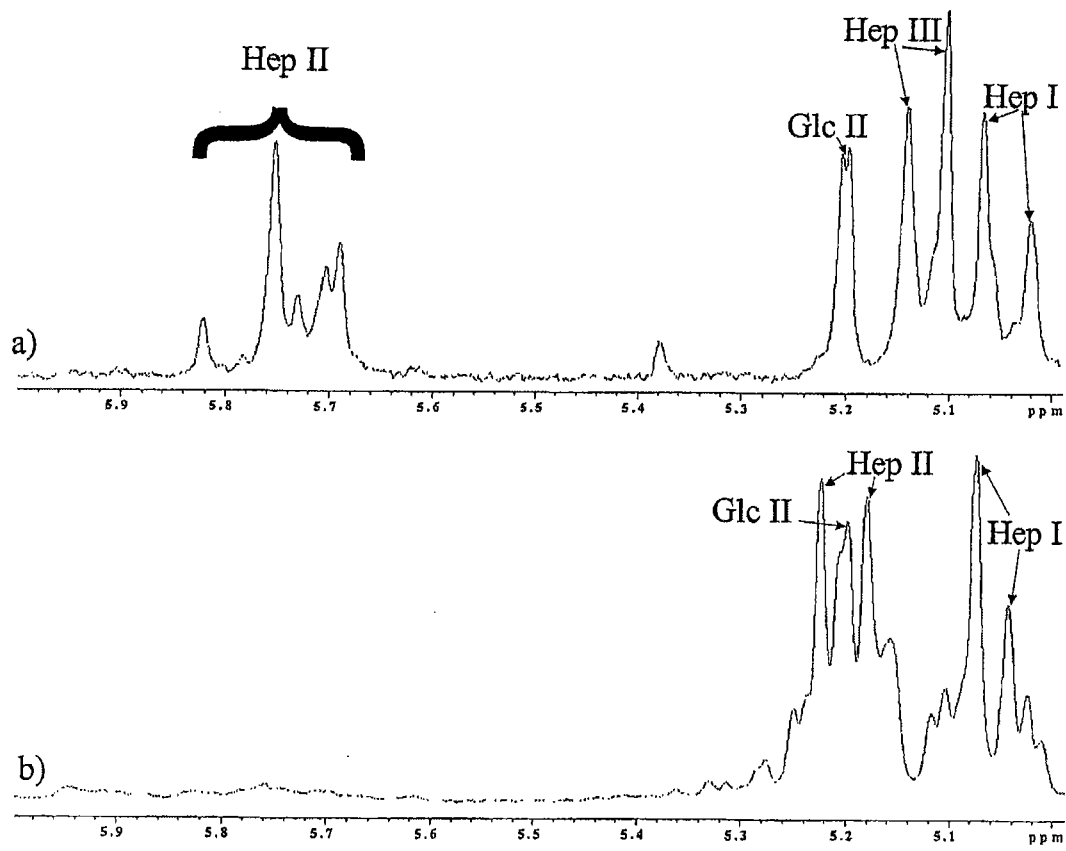


图38

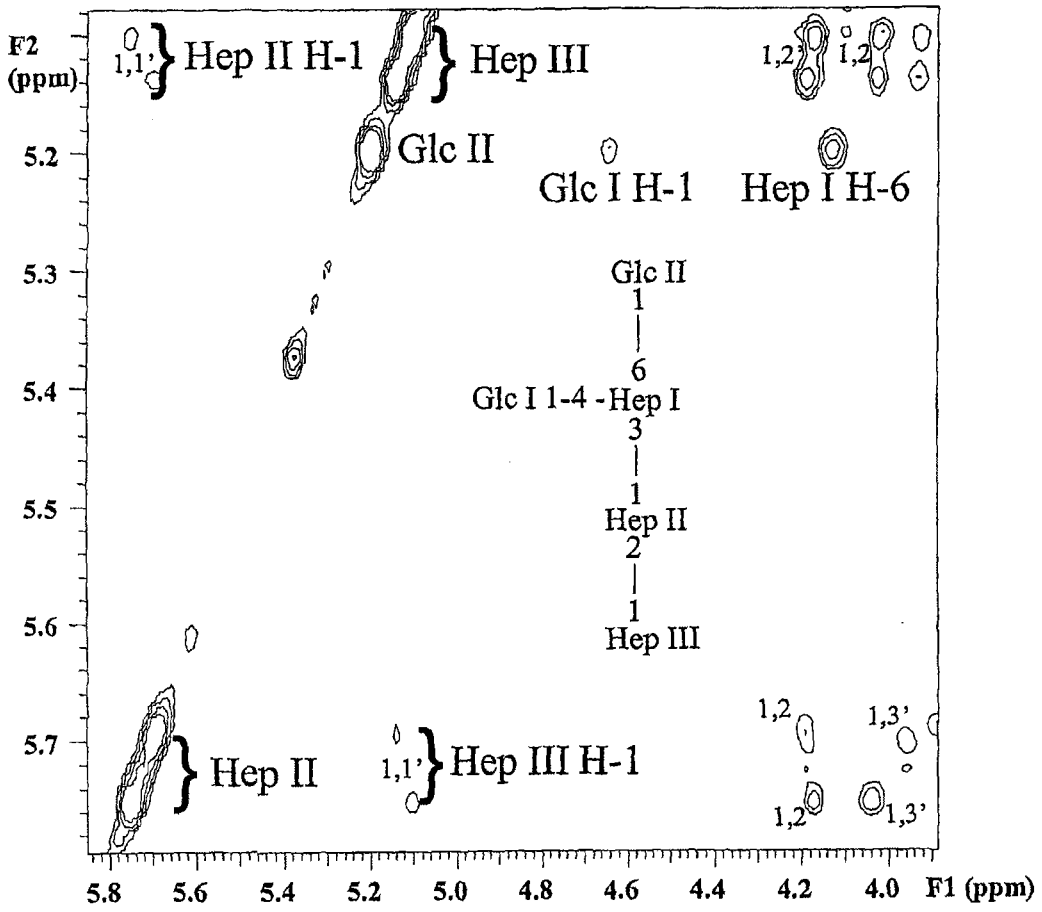


图 39

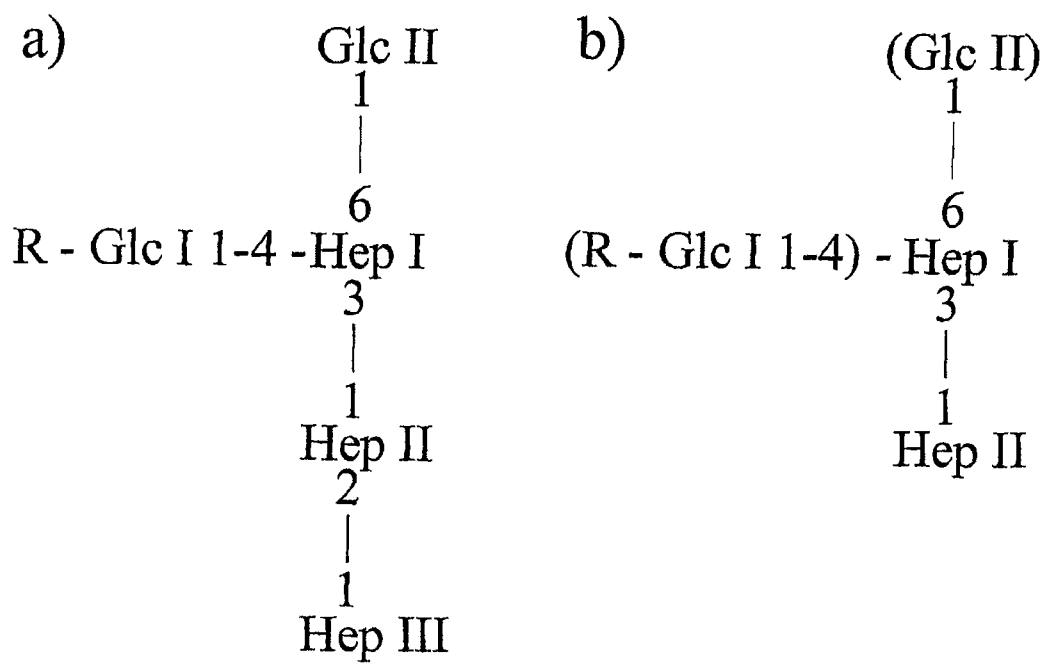


图40

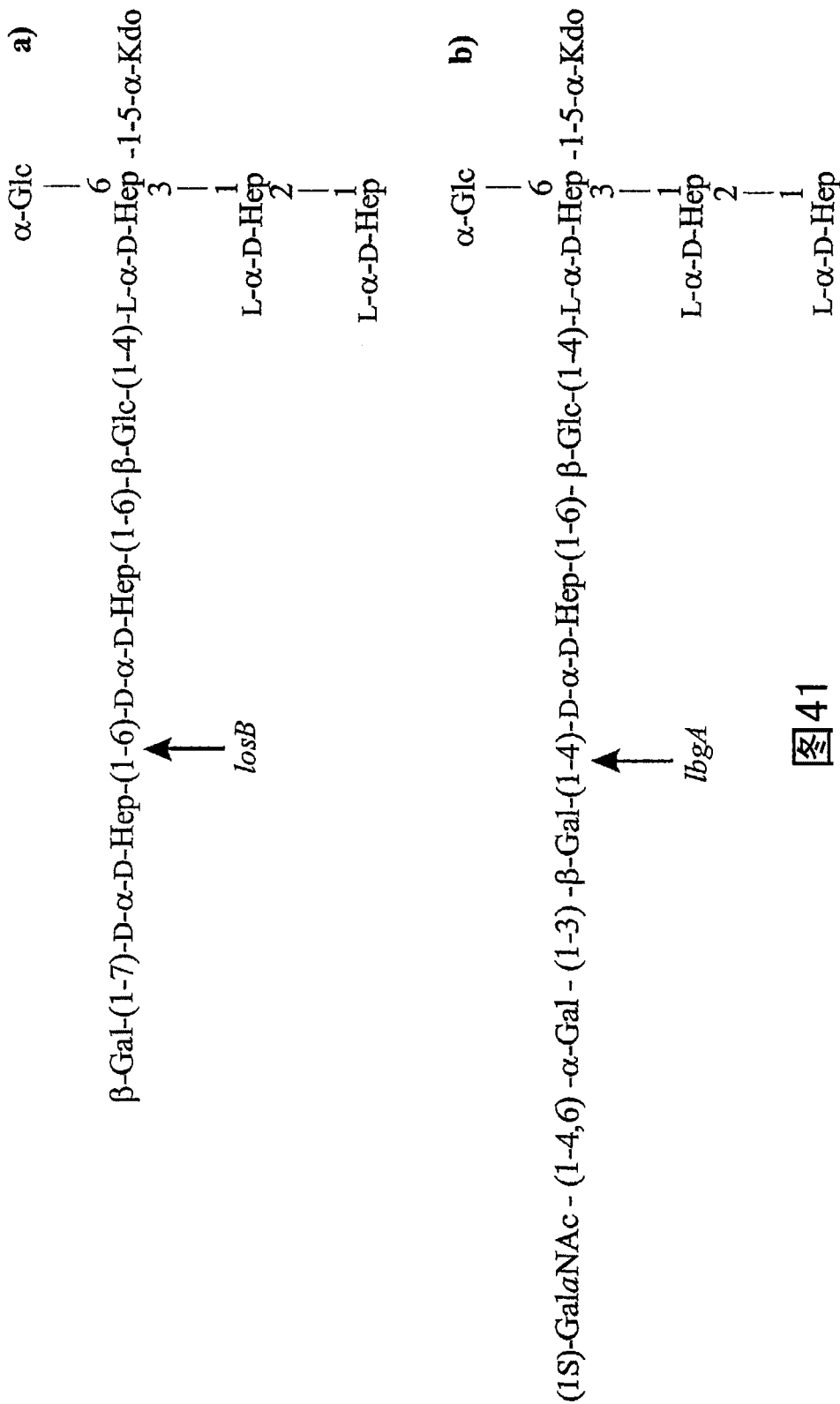


图41

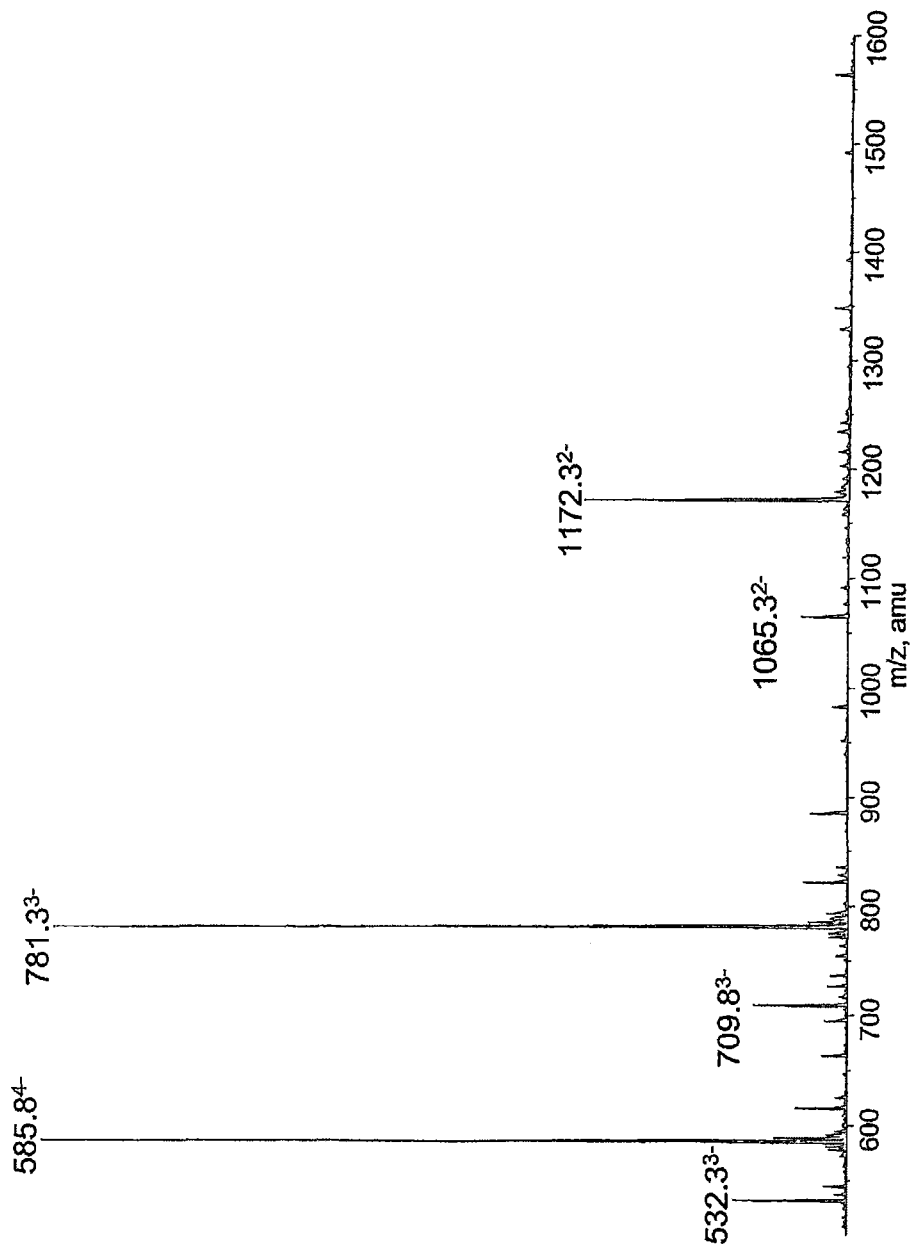


图42a

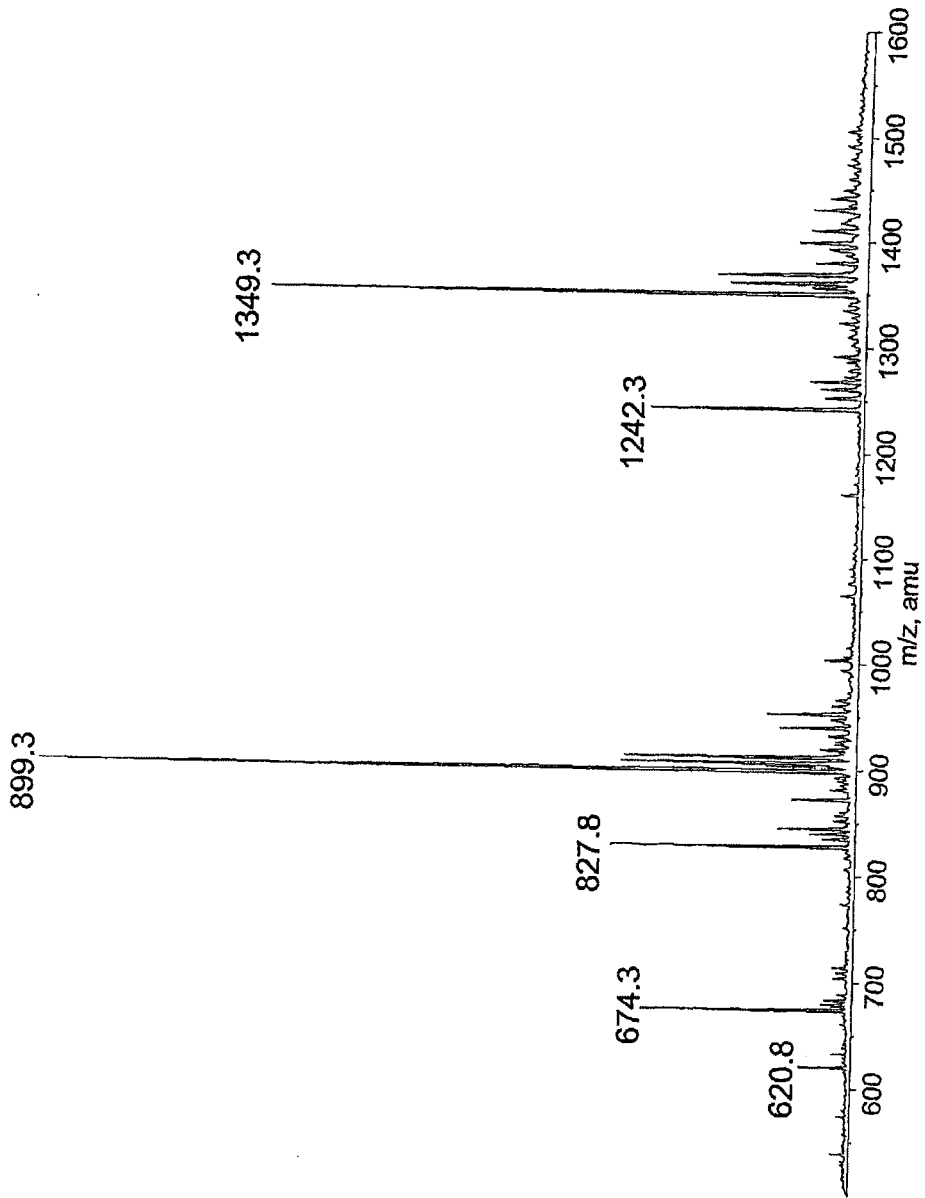


图 42b

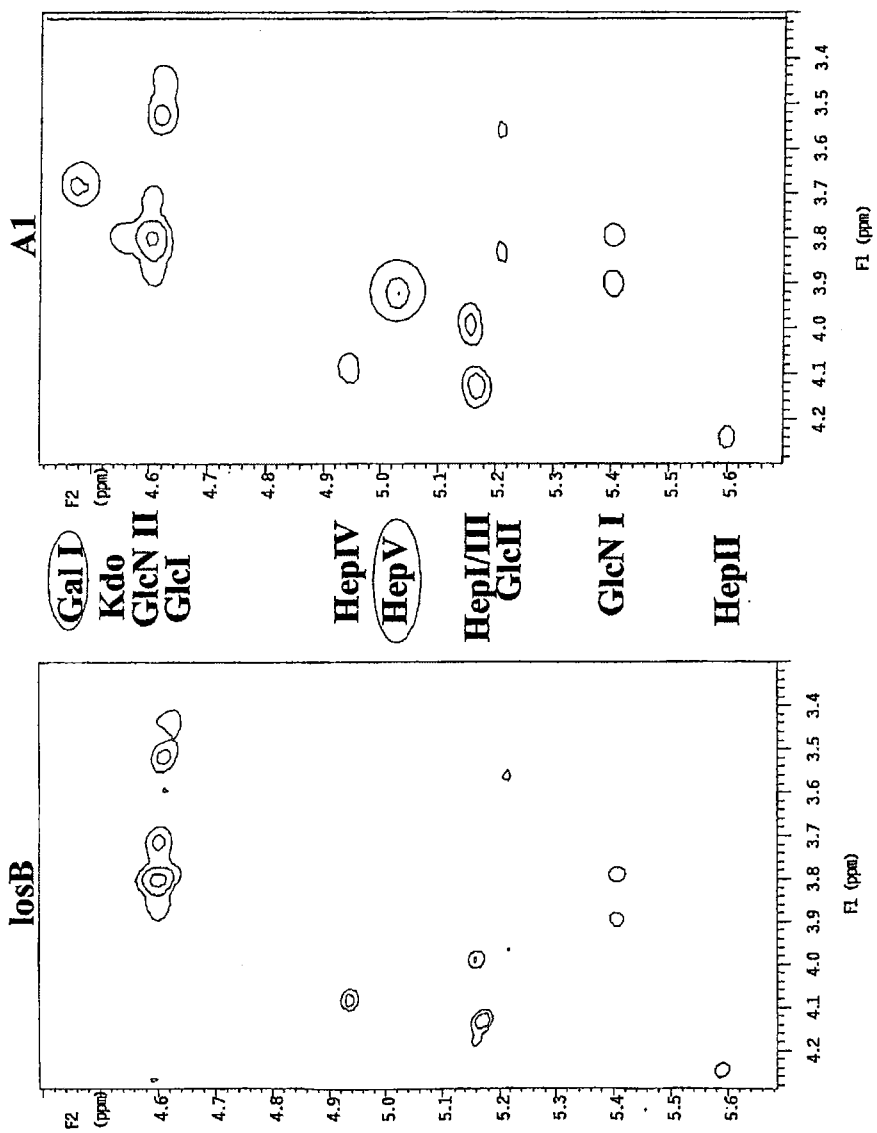


图 43

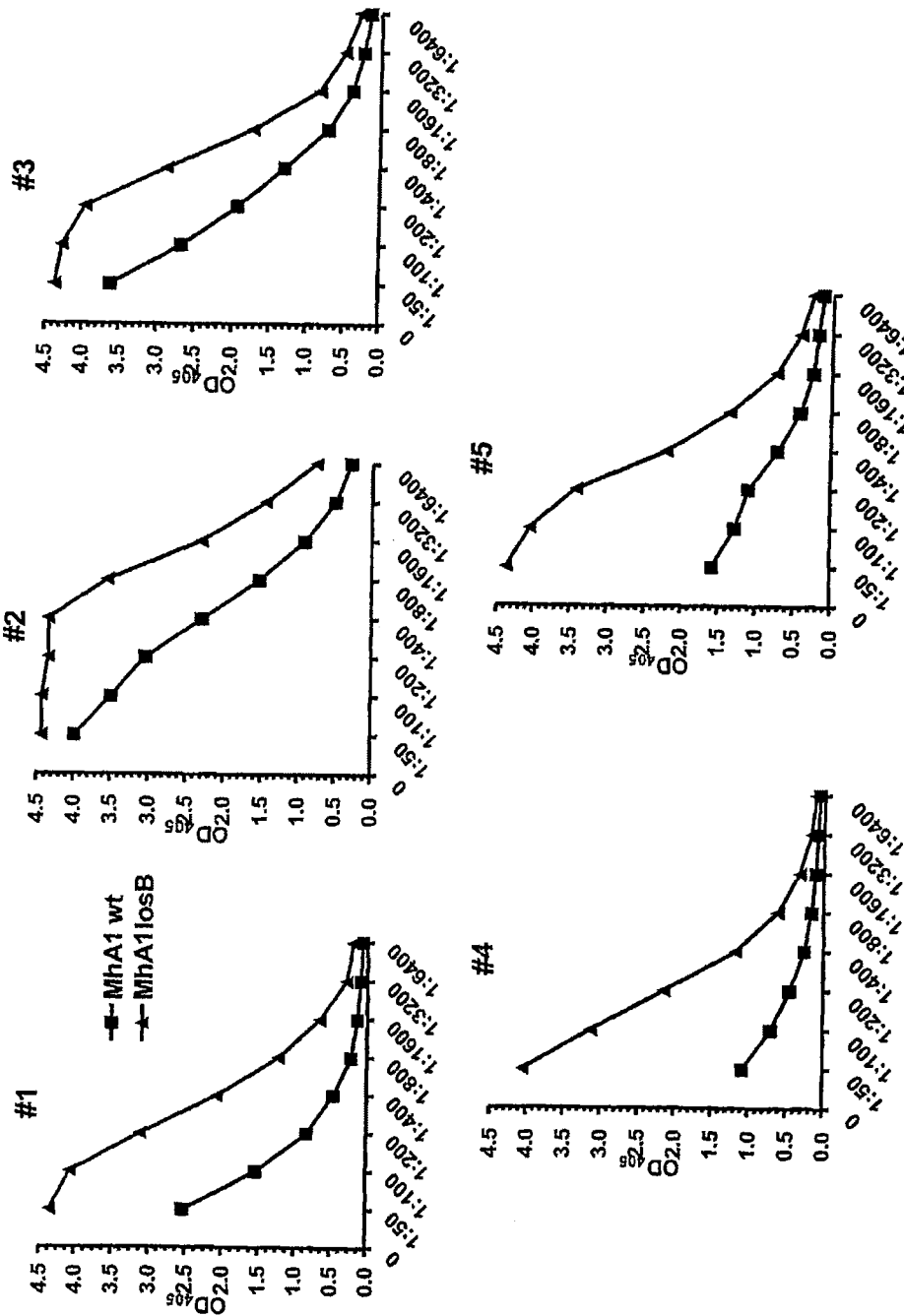


图 44

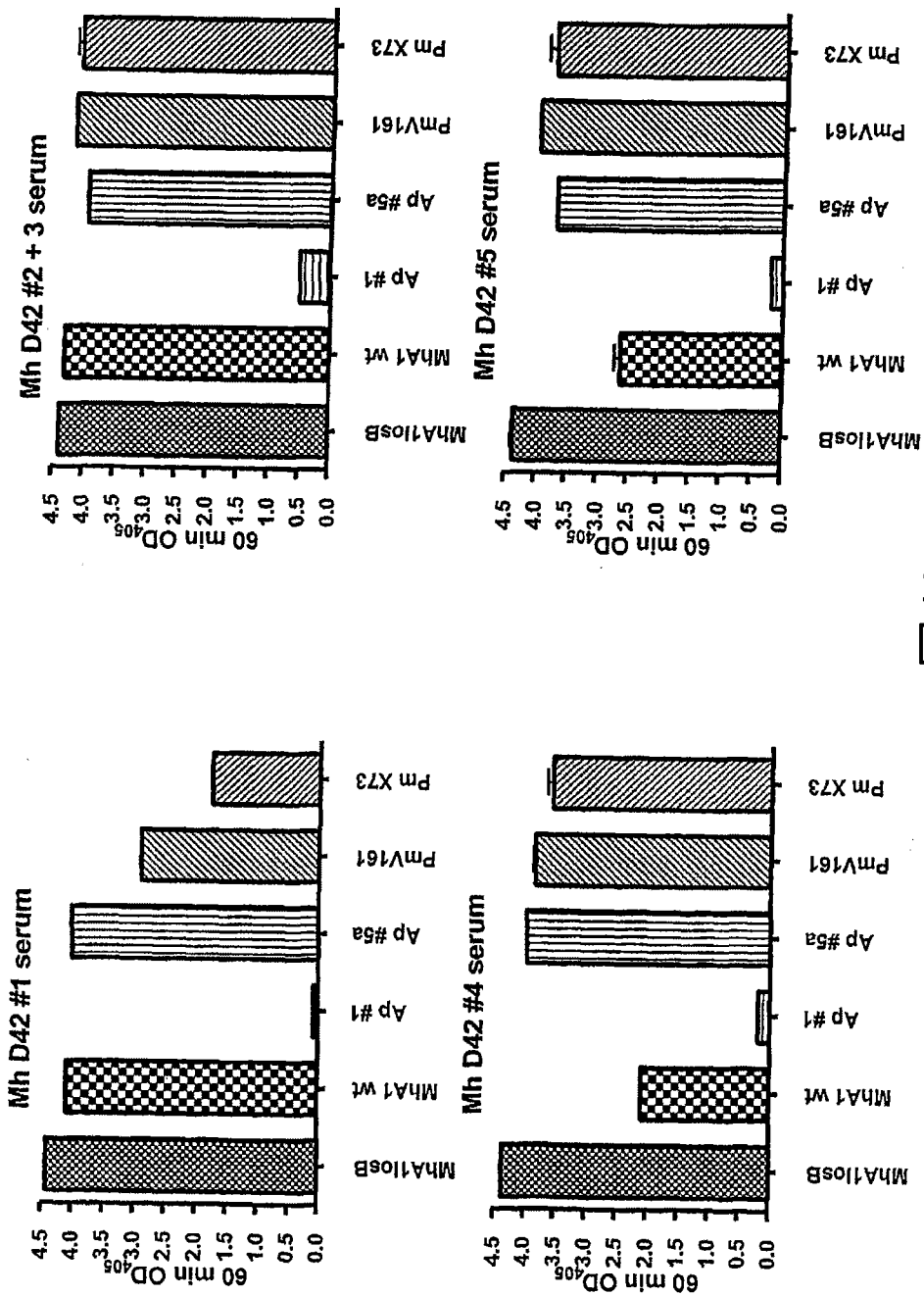


图 46

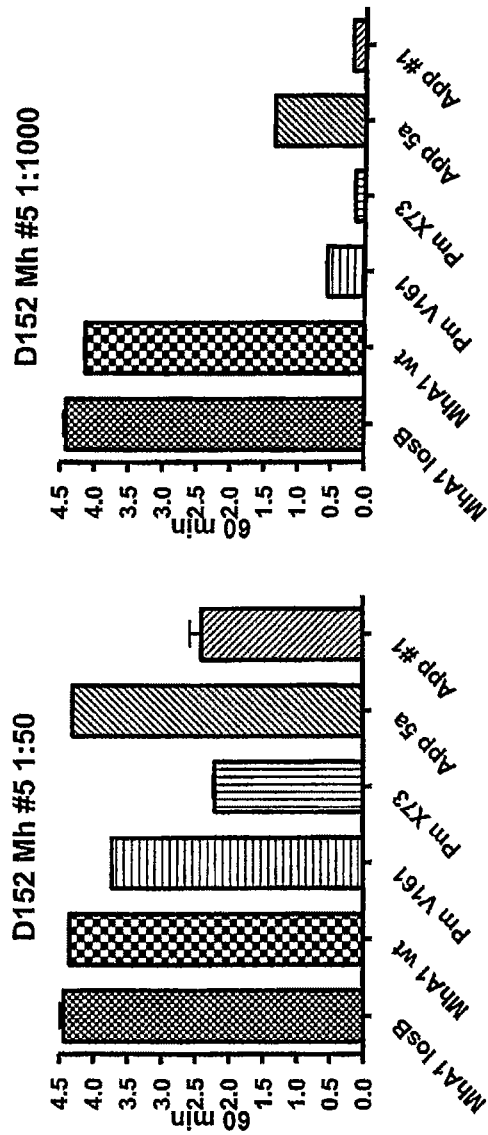


图47

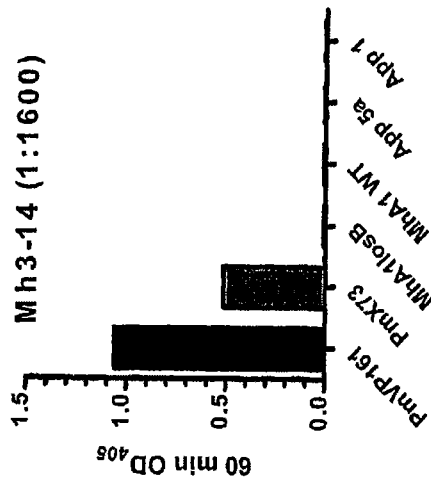
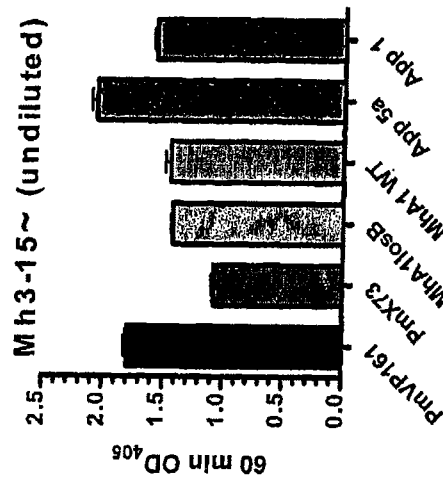


图48

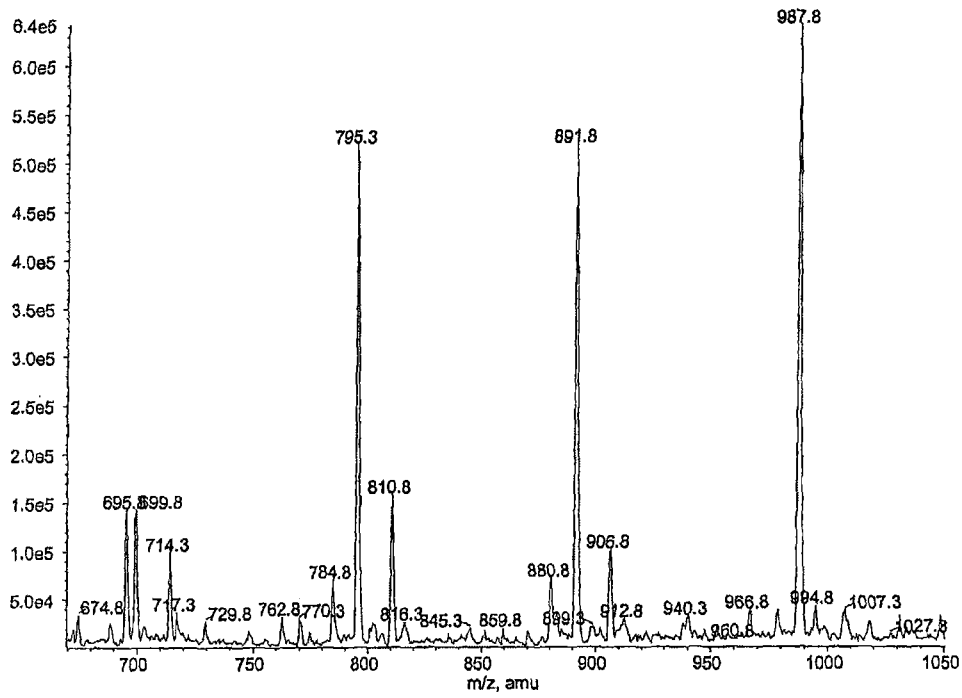


图49

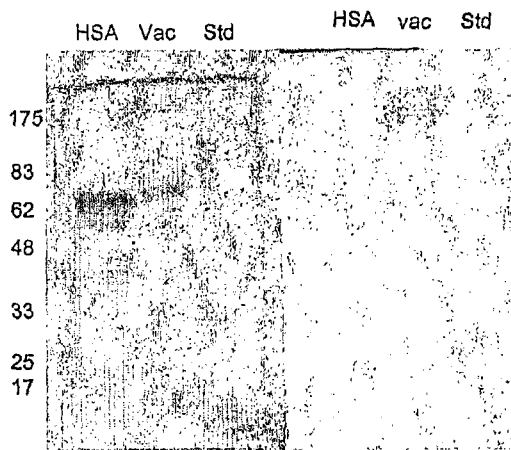


图50

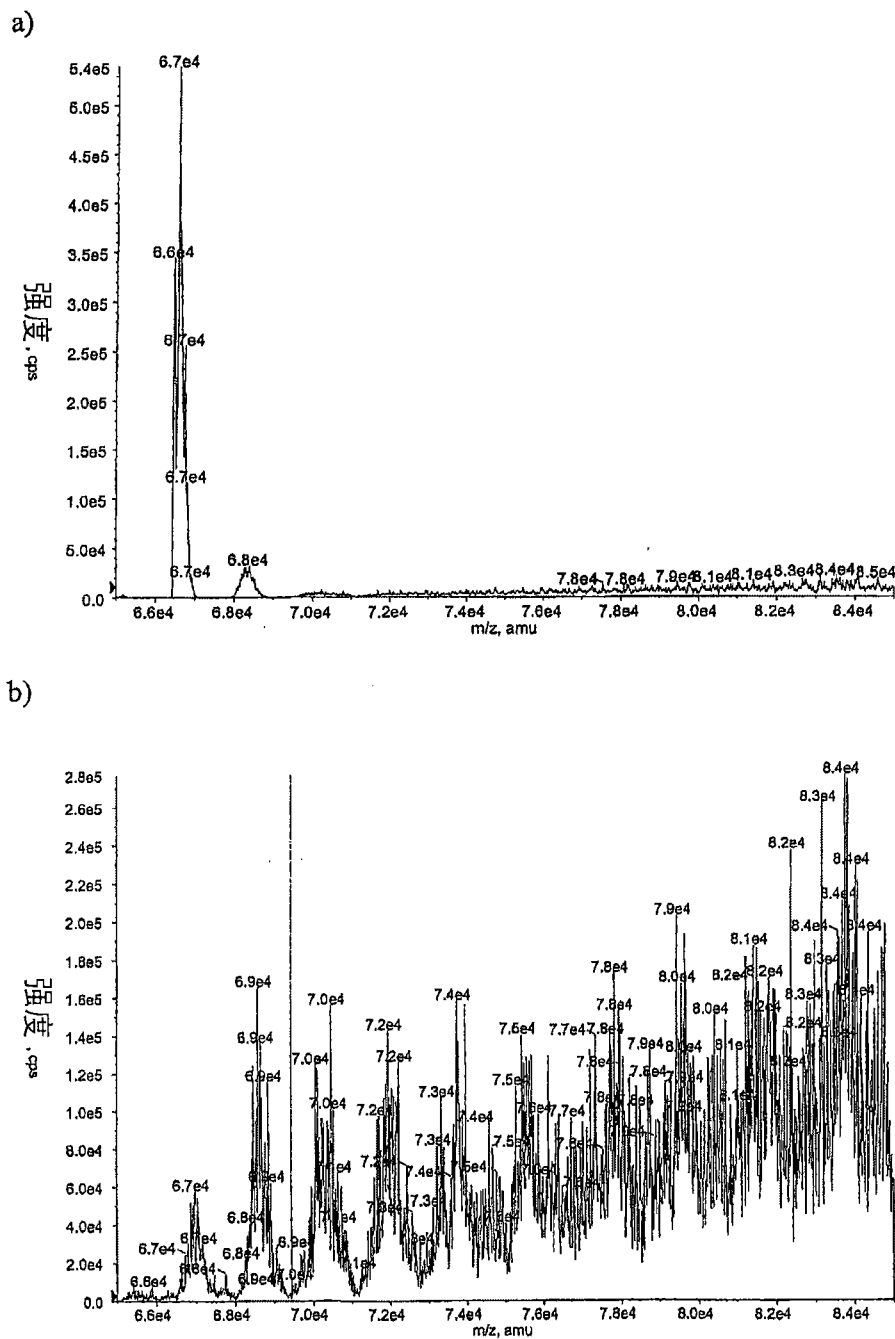


图51

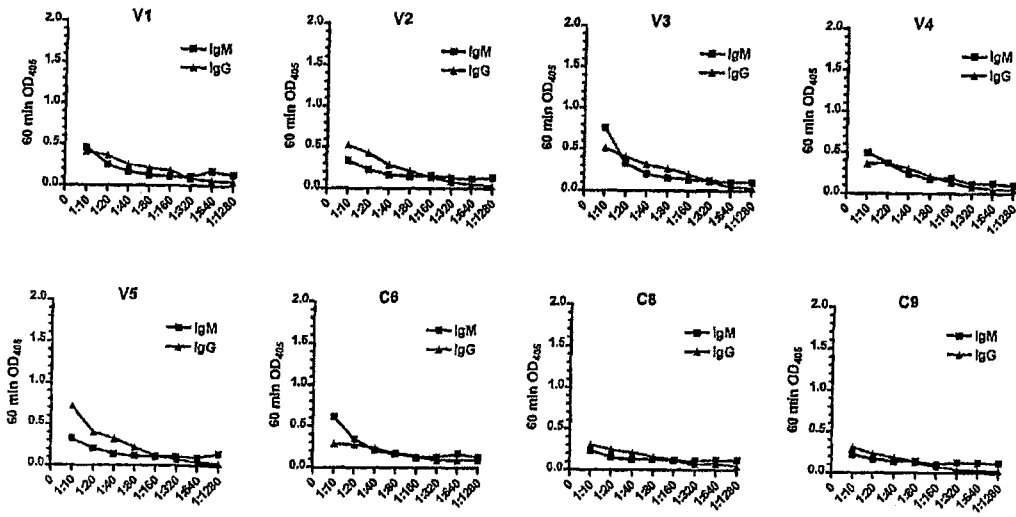


图52

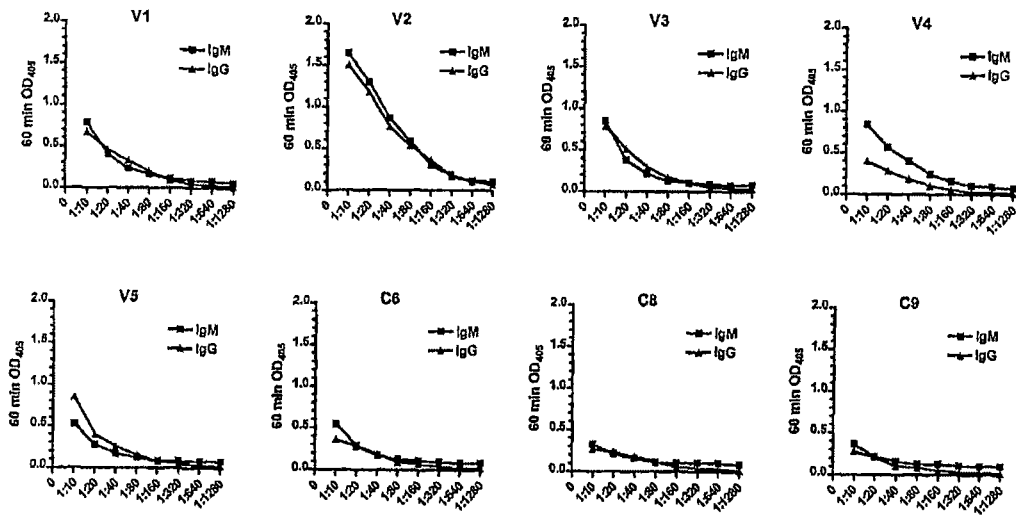


图53

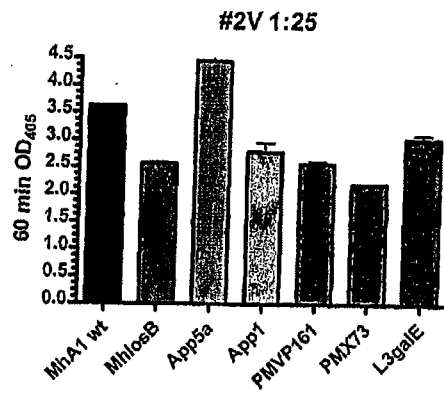


图54

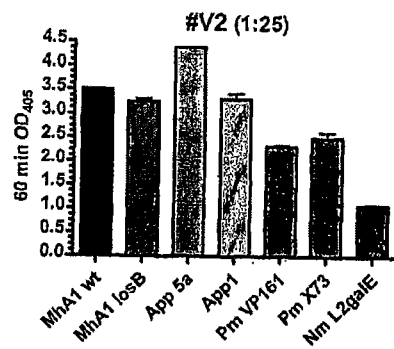


图55

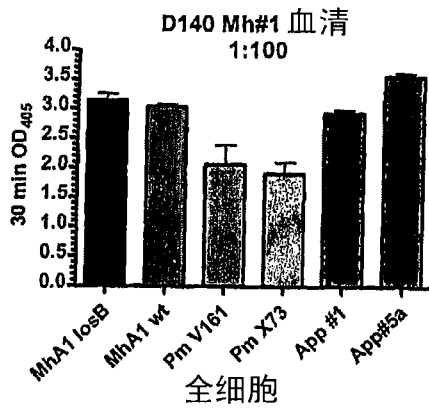


图56

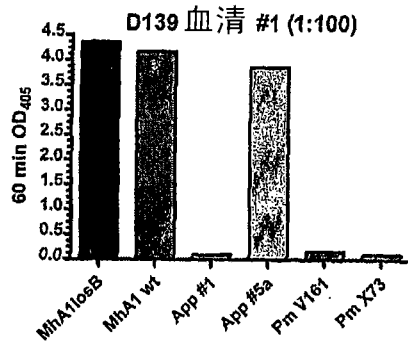


图57

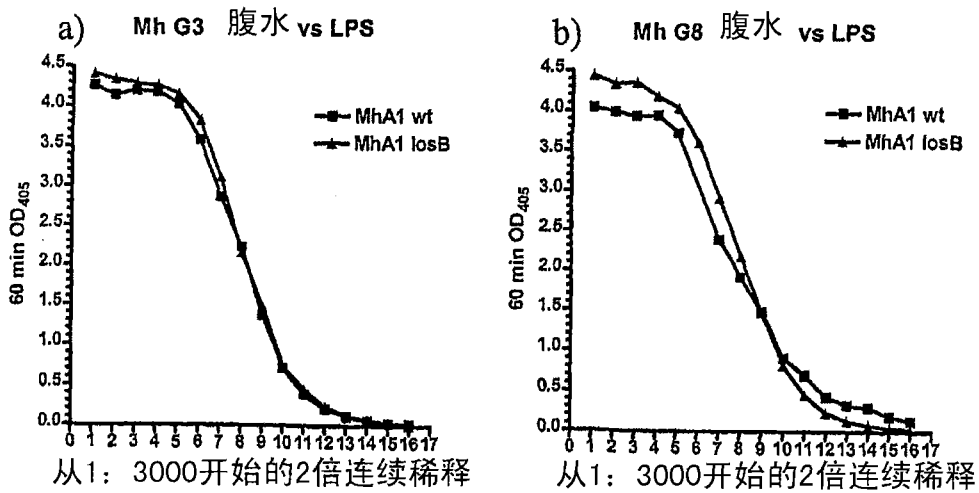


图58

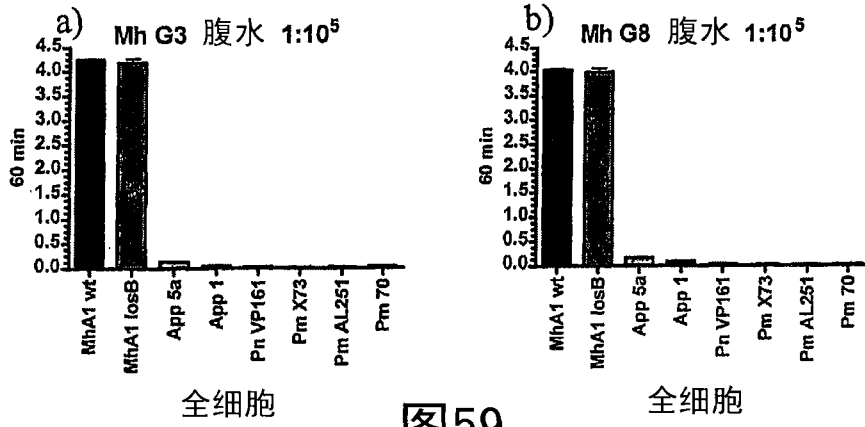


图59

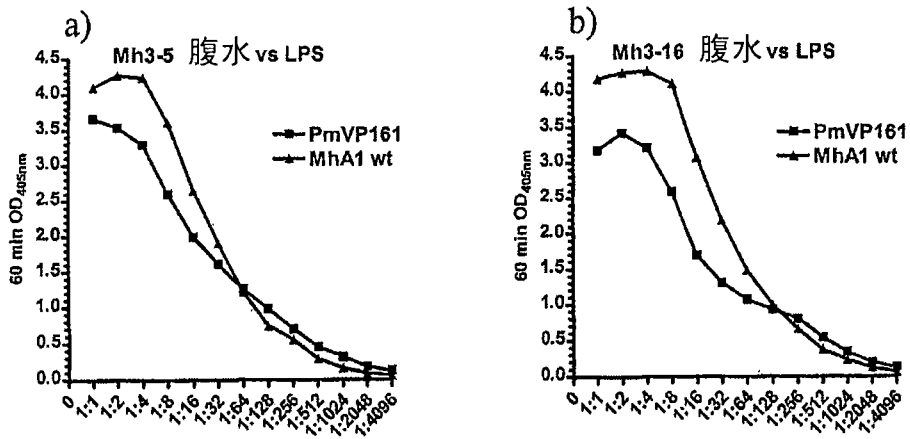


图60

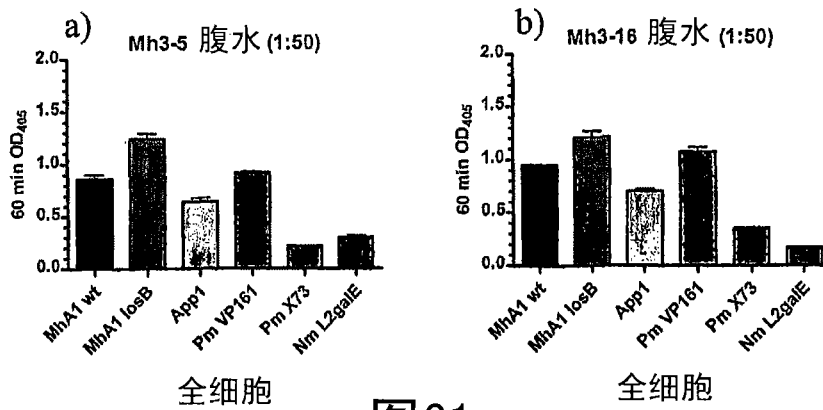


图61

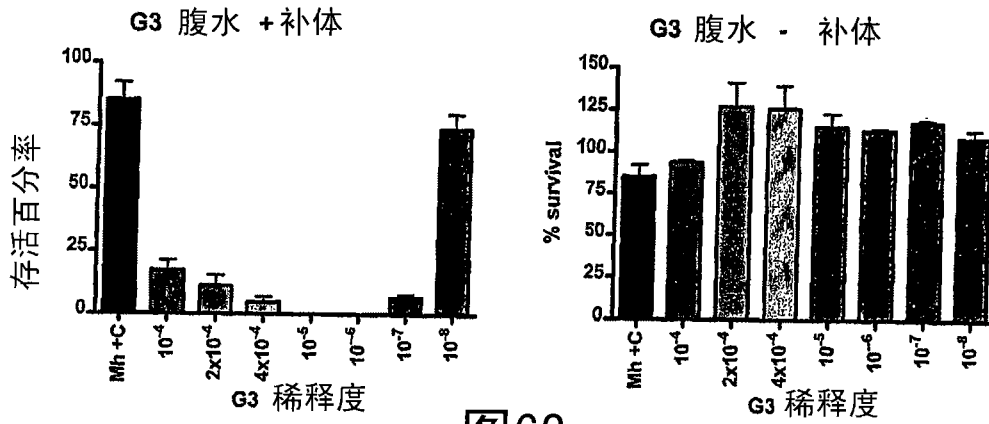


图62

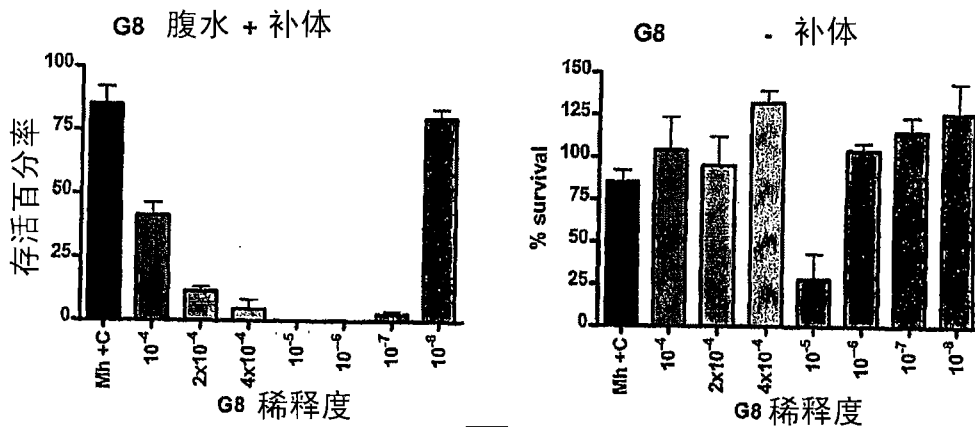


图63

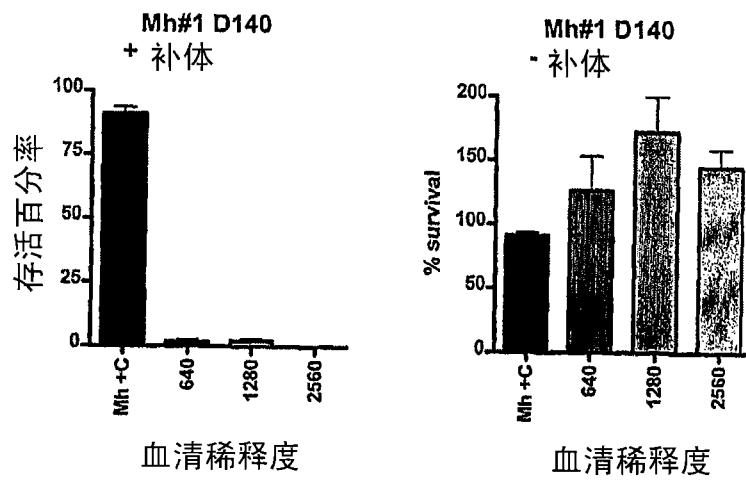


图64

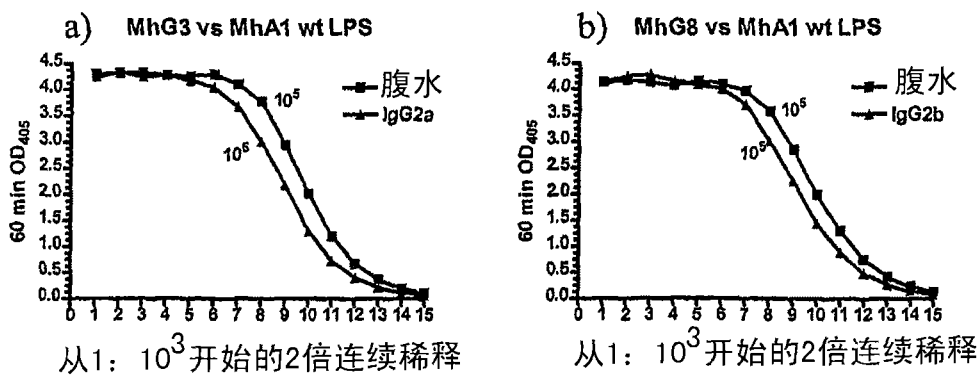


图65

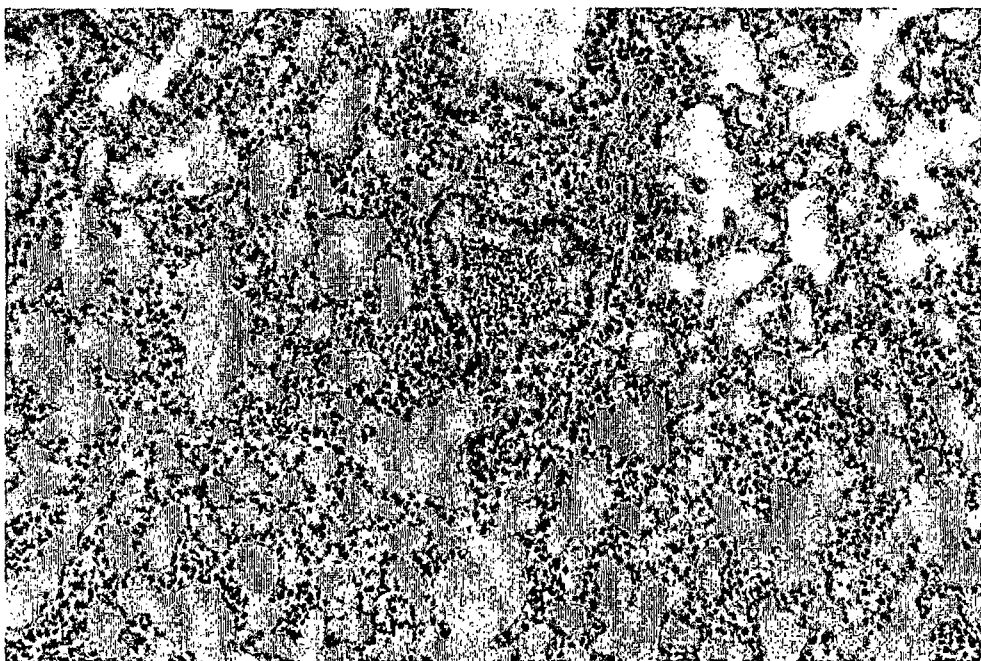


图66

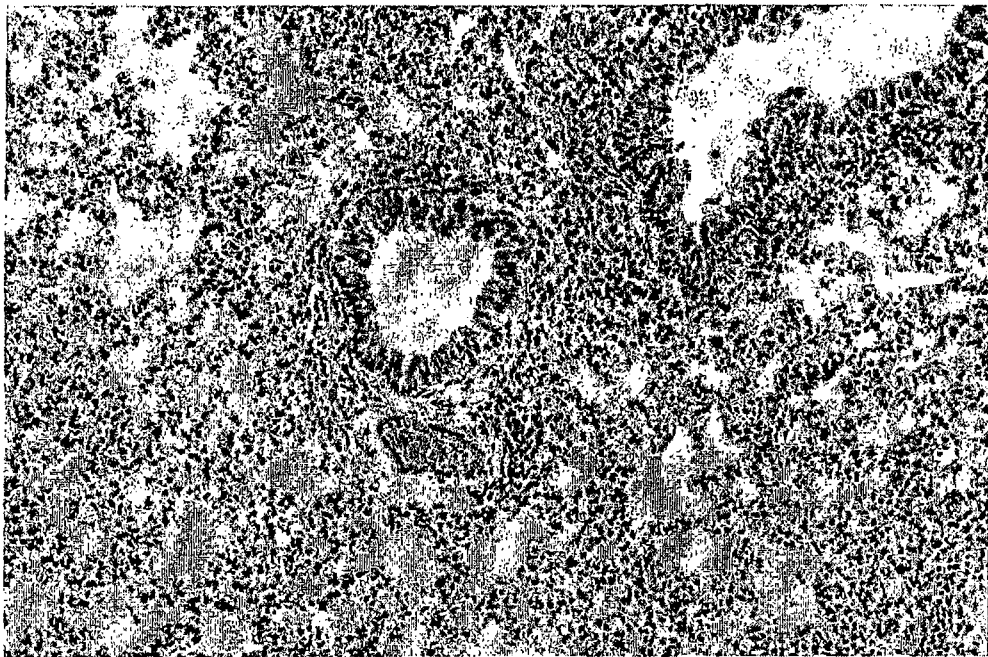


图67