



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116041543 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 02

(21) 申请号 202211567096.0

A61K 39/04 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.07

A61P 31/06 (2006.01)

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

地址 102206 北京市昌平区昌百路155号

申请人 罗益(无锡)生物制药有限公司

(72) 发明人 万康林 陈宣洪 刘海灿 范雪亭  
李马超 蒋毅

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

专利代理师 李正

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

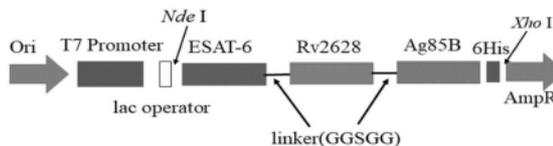
权利要求书1页 说明书12页  
序列表(电子公布) 附图5页

## (54) 发明名称

结核分枝杆菌多抗原融合蛋白及其编码基因和应用

## (57) 摘要

本发明涉及生物医药技术领域,尤其涉及一种结核分枝杆菌多抗原融合蛋白及其编码基因和应用。所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原。经过小鼠免疫试验证实,本发明提供的结核分枝杆菌三个蛋白的融合蛋白抗原具有较强的免疫原性,能刺激机体产生有效的体液免疫和细胞免疫反应,可用作结核病疫苗。



1. 结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,其特征在于,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原。

2. 根据权利要求1所述的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,其特征在于,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的氨基酸序列包括SEQ ID NO.2;

或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

3. 权利要求1所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的编码基因,其特征在于,所述编码基因包括Rv3875基因、Rv2628基因和Rv1886c基因;所述Rv3875基因、Rv2628基因和Rv1886c基因顺次串连。

4. 根据权利要求3所述的编码基因,其特征在于,所述编码基因的核苷酸序列包括SEQ ID NO.1;

或SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经替换、缺失或添加一个或几个核苷酸形成的具有同等功能的核苷酸序列。

5. 用于表达权利要求1所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的生物材料,所述生物材料包括表达载体、工程菌,其特征在于,所述生物材料包括权利要求3或4所述编码基因。

6. 结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,其特征在于,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原;

或包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原、Rv1886c蛋白抗原和权利要求1或2所述的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。

7. 权利要求1或2所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白或其编码基因,或权利要求5所述的生物材料,或权利要求6所述的结核分枝杆菌抗原蛋白混合物在制备结核分枝杆菌疫苗中的应用。

8. 结核分枝杆菌疫苗,其特征在于,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分包括权利要求1或2所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者权利要求3或4所述编码基因,或者权利要求5所述生物材料,或者权利要求6所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物。

9. 根据权利要求8所述的结核分枝杆菌疫苗,其特征在于,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分还包括铝盐佐剂。

10. 权利要求1或2所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者权利要求3或4所述编码基因,或者权利要求5所述生物材料,或者权利要求6所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物在制备结核分枝杆菌检测试剂或者治疗结核分枝杆菌疾病的药物中的应用。

## 结核分枝杆菌多抗原融合蛋白及其编码基因和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,尤其涉及一种结核分枝杆菌多抗原融合蛋白及其编码基因和应用。

### 背景技术

[0002] 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)是引起结核病的病原体,它是一种胞内寄生菌,可以在巨噬细胞内生存数年,对人类的健康造成巨大的威胁。随着耐药结核日益严重以及HIV-结核共感染情况的加剧,导致结核病的预防与控制面临极大的挑战。目前结核病的预防与控制主要涉及预防、诊断以及治疗三个方面,其中预防尤为重要,而对于传染性疾病预防最有效的预防途径即接种疫苗。牛分枝杆菌减毒活疫苗-卡介苗(BCG)是目前全世界唯一应用于人类结核病预防的疫苗。虽然有大量研究显示接种BCG可以有效预防儿童结核,同时也可以为麻风病患者提供结核病保护。但是,BCG的保护效果持续时效有限,大约可以持续5-10年。同时,BCG对于预防成人结核分枝杆菌的感染的效果具有较大差异,从0-80%不等,以致认为无保护效果。另外,BCG的接种不利于结核分枝杆菌感染的检测。基于BCG存在的上述保护时间有限、保护效果不稳定等问题,研究更为有效的新型结核病疫苗迫在眉睫。

[0003] 近年来结核病新型疫苗的研究已经成为结核病研究领域的热点,据统计目前共有16种不同的候选疫苗进入临床试验,主要包括重组BCG、亚单位疫苗、病毒载体疫苗、DNA疫苗和RNA疫苗等。亚单位疫苗因具有安全、生产质量可控、成本低、运输方便以及易于大规模生产等优点,已成为新型结核病疫苗的研究热点。目前结核病重组亚单位疫苗的候选抗原主要为分泌蛋白和细胞壁蛋白,例如热休克蛋白HspX,早期分泌蛋白ESAT-6,滤液蛋白CFP-10等。ESAT-6是结核分枝杆菌的一种毒力因子,可以单独或与CFP-10结合调节宿主免疫反应,有研究证实当疫苗中包含ESAT-6可以刺激机体产生较强的免疫反应、提供较好的保护效果。Ag85复合物是一组具有较强细胞免疫及体液免疫活性的分枝杆菌分泌性蛋白,包括Ag85A、Ag85B和Ag85C,有研究证实Ag85复合物可以诱导实验动物产生细胞免疫和特异性抗体,增强抗结核能力,因此该复合物也是目前疫苗研究热点。

[0004] 目前进入临床试验阶段以及研究阶段的预防性疫苗多数为活疫苗或者病毒载体疫苗,活疫苗对于免疫力低下的人群具有一定的风险,而病毒载体疫苗成本较高,且构建和纯化工艺较为复杂。此外,还有一些研究虽然选用了多阶段表达的多种抗原,但是制剂中涉及至少两种以上的抗原的表达与纯化,且使用的佐剂也多为非单一成分,导致制剂配制工艺复杂。中国专利,申请号CN201310273393.9,公开日期2017-02-08,一种联合佐剂的结核亚单位疫苗,其公开了一种疫苗,该疫苗含Ag85b蛋白、ESAT6-CFP10融合蛋白为抗原成分,以铝和PolyIC为复合佐剂。中国专利,申请号CN201410194559.2,公开日2014-05-09,一种增强型结核亚单位疫苗,公开了一种疫苗,包含Ag85b蛋白、ESAT6-CFP10融合蛋白、铝佐剂、BCG-CpG佐剂以及PolyIC佐剂。中国专利,申请号CN201810902885.2,公开日2018-12-25,一种预防结核病的疫苗及联合用药物和制备方法、应用,其公开了一种含有分枝杆菌类微生

物复合佐剂的预防结核病疫苗,其包含Ag85b蛋白、ESAT6 CFP10蛋白和母牛分枝杆菌菌体提取物。以上3个专利虽然公开了ESAT-6以及Ag85B抗原,但其抗原成分为混合物、即多种抗原混合,会涉及多个抗原的表达以及纯化,增加了成本和工作量;同时,专利CN201310273393.9和CN201410194559.2中使用了两种以及两种以上的佐剂,疫苗配方复杂,治疗周期长。

## 发明内容

[0005] 鉴于背景技术中存在的技术问题,本发明提供了一种方便表达纯化的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白具有较强的免疫原性,能刺激机体产生有效的体液免疫和细胞免疫反应,可用作结核病疫苗。

[0006] 本发明提供了一种结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原。

[0007] 优选的,所述Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原顺次串连。

[0008] 优选的,所述Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原通过linker顺次串连,所述linker包括柔性连接臂,所述柔性连接臂的序列包括SEQ ID NO.3。

[0009] 优选的,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的氨基酸序列包括SEQ ID NO.2

[0010] 或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

[0011] 本发明提供了所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的编码基因,所述编码基因包括Rv3875基因、Rv2628基因和Rv1886c基因;所述Rv3875基因、Rv2628基因和Rv1886c基因顺次串连。

[0012] 优选的,所述编码基因的核苷酸序列包括SEQ ID NO.1;

[0013] 或SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经替换、缺失或添加一个或几个核苷酸形成的具有同等功能的核苷酸序列。

[0014] 本发明提供了用于表达所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的生物材料,所述生物材料包括表达载体、工程菌,所述生物材料包括所述编码基因。

[0015] 优选的,所述表达载体的基础载体包括pET43.1a、pET32a和pET28a中的一种。

[0016] 本发明提供了结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原;

[0017] 或包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原、Rv1886c蛋白抗原和所述的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。

[0018] 本发明提供了所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白或其编码基因,或所述的生物材料,或所述的结核分枝杆菌抗原蛋白混合物在制备结核分枝杆菌疫苗中的应用。

[0019] 本发明提供了一种结核分枝杆菌疫苗,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分包括所述的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述的编码基因,或者所述表达载体表达得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述工程菌制备得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物。

[0020] 优选的,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分还包括铝盐佐剂。

[0021] 本发明还提供了所述的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述的编码基因,或

者所述生物材料在制备结核分枝杆菌检测试剂或者治疗结核分枝杆菌疾病的药物中的应用。

[0022] 有益效果:

[0023] 本发明选择结核分枝杆菌的3种抗原Rv3875 (ESAT-6)、Rv2628以及Rv1886c (Ag85B),形成了一个的新的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白。经过小鼠免疫试验证实,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白具有较强的免疫原性,可以刺激机体产生有效的体液免疫和细胞免疫反应,尤其是针对清除结核分枝杆菌发挥重要作用的Th-1类免疫反应,说明本发明提供的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白可以作为结核病疫苗使用。体外感染试验证实,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白可以有效抑制结核分枝杆菌H37Rv的生长与繁殖,产生较好的保护效果。同时,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白在结核病的诊断中也能发挥重要作用。

## 附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图进行说明。

[0025] 图1是本发明实施例1所述重组质粒中ERA005f的结构示意图;

[0026] 图2是本发明实施例2和实施例3中蛋白复性后的SDS-PAGE结果图;图2中A图为多抗原融合表达蛋白ERA005f的纯化鉴定结果,其中,M代表蛋白标准分子质量,1代表ERA005f;图2中B图为3种单抗原的表达纯化鉴定结果,其中,M代表蛋白质质量标准,1代表Rv3875,2代表Rv2628,3代表Rv1886c;图2中C图为多抗原融合表达蛋白ERA005f的表达鉴定结果,其中,M代表蛋白质质量标准,1代表全菌表达产物,2代表可溶性表达蛋白,3代表包涵体表达蛋白。

[0027] 图3表示本发明实施例4免疫后血清中IgG抗体以及IgG亚型抗体滴度;图3中A图为IgG抗体滴度(横坐标为免疫组别,纵坐标为抗体滴度 $\log_2$ ),图3中B图为IgG亚型抗体滴度(纵坐标为免疫组别,横坐标为抗体滴度 $\log_2$ );

[0028] 图4表示本发明实施例4脾脏中淋巴细胞中Th-1类细胞因子表达水平,其中,图4中A图为CM-GSF,图4中B图为TNF- $\alpha$ ,图4中C图为IL-12,图4中D图为IFN- $\gamma$ ;

[0029] 图5表示本发明实施例4脾脏中淋巴细胞中Th-2类细胞因子表达水平,其中,图5中A图为IL-4,图5中B图为IL-10;

[0030] 图6表示本发明实施例4脾脏中淋巴细胞中Th-17类细胞因子表达水平,其中,图6中A图为IL-17,图6中B图为IL-6;

[0031] 图7是本发明实施例4脾脏淋巴细胞的ELISPOT结果图,其中,图7中A图为IFN- $\gamma$ ,图7中B图为IL-4;

[0032] 图8是本发明实施例5所述结核分枝杆菌生长抑制实验的体外攻毒实验结果图。

[0033] 图9是本发明实施例6所述脾脏淋巴细胞Th1类细胞因子分泌量,其中,图9中A图为IFN- $\gamma$ ,图9中B图为TNF- $\alpha$ ,图9中C图为IL-12。

## 具体实施方式

[0034] 本发明提供了一种结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,所述结核分枝杆菌多抗原融合

蛋白包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原。在本发明中,所述Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原优选通过linker顺次串连,所述linker优选包括柔性连接臂,所述柔性连接臂的序列优选包括GGSGG (SEQ ID NO.3)。为了更加方便地检测和纯化,本发明优选在所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的C末端添加6His。在本发明更优选的具体实施方案中,所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白为ERA005f,其氨基酸序列包括:

[0035] MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNA LQNLARTISEAGQAMASTE GNTGMFAGGSGGSTQRPRHSGIRAVGPYAWAGRCGRIGRWGVHQEAMMNLAIWHPR KVQSATIIYQVTD RSHDGR TARVPGDEITSTVSGWLSELGTQSPLADELARAVRIGDWPAAYAIGEHL SVEIAVAVG GSGGTDVSRKIRAWGRRLMIGTAAAVVLPGLVGLAGGAATAGAFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNS PAVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYSDWYSPACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWL SANRAVKPTGSA AIGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMGPSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSD PAWERNDPTQQIPKLVANTRLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPNGT HSWEYWAQLNAMKGD LQSSLGAGGGHHHHHHH\*(SEQ ID NO.2)。

[0036] 由于人工串联的蛋白片段普遍存在空间构象问题,无法完整表达,或者无法达到预期的生物学效果,因此,虽然Rv3875 (ESAT-6) 和Rv1886c (Ag85B) 是目前已知具有较强免疫原性的抗原,Rv2628是本发明前期研究发现的具有较强免疫原性的抗原。但现阶段并未发现将Rv3875 (ESAT-6)、Rv2628和Rv1886c (Ag85B) 进行融合用于结核疫苗研发的报道。本发明将Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原顺次串连,表达得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,相较于以上三种单独的抗原及其混合物,可以显著提高小鼠的体液免疫水平和细胞免疫水平;尤其是显著提高Th-1类细胞因子的表达,在清除结核分枝杆菌的过程中发挥重要作用;且可以显著抑制结核分枝杆菌H37Rv在小鼠巨噬细胞内的生长以及增殖。

[0037] 本发明提供了所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的编码基因,所述编码基因包括Rv3875基因、Rv2628基因和Rv1886c基因。在本发明中,所述Rv3875基因、Rv2628基因和Rv1886c基因优选经顺次串连。在本发明更优选的具体实施方案中,所述编码基因的核苷酸序列包括:

[0038] ATGACCGAACAGCAGTGG AATTTTGCCGGTATTGAAGCAGCCGCCAGTGAATTCAGGGCAATGTTAC CAGCATT CATAGCCTGCTGGATGAAGGCAAACAGAGCCTGACCAA ACTGGCAGCCGCATGGGGTGGTAGCGGCAGC GAAGCATATCAGGGTGTGCAGCAGAAATGGGATGCCACCGCCACCGAACTGAATAATGACTGCAGAATCTGGCCC GCACCAT TAGTGAAGCCGGCCAGGCAATGGCAAGTACCGAAGGCAATGTTACAGGCATGTTTGCAGGCGGCAGCGG CGGTAGTACCCAGCGTCTCGTCATAGTGGCATTTCGCGCAGTTGGCCCGTATGCCTGGGCAGGTCGCTGTGGCCGC ATTGGTCGCTGGGGCGTGCATCAGGAAGCAATGATGAATCTGGCCATTTGGCATCCGCGTAAAGTGCAGAGTGCAA CCATCTATCAGGTGACCGATCGCAGTCATGATGGCCGTACCGCCCGTGTCCGGGTGACGAAATTACCAGCACCGT GAGCGGCTGGCTGAGTGA ACTGGGTACCCAGAGCCCCTGGCAGATGAACTGGCCCGCGCCGTTTCGTATTGGTGAC TGGCCGGCAGCCTATGCAATTGGCGAACATCTGAGCGTTGAAATTGCCGTTGCAGTGGGTGGCAGTGGCGGCACCG ATGTGAGTCGTA AAAATTCGTGCATGGGGTCGTCGCTGATGATTGGTACCGCCCGCAGTTGTTCTGCCGGGTCT GGTGGCCTGGCCGGTGGTGCTGCAACCGCAGGTGCATTTTCTCGTCCGGGCTGCCGGTTGAATATCTGCAGGTG CCGAGTCCGAGTATGGGCCGTGATATTAAGTTTCAGTTTCAGAGTGGTGGTAATAATAGCCCGCCGTGTATCTGC

TGGATGGTCTGCGCGCACAGGATGATTATAATGGTTGGGATATTAATACCCCGGCCTTTGAATGGTATTATCAGAG  
CGGTCTGAGCATTGTGATGCCGGTGGGCGGCCAGAGCAGTTTTTATAGTGATTGGTATAGTCCGGCATGTGGTAAA  
GCAGGTTGTCAGACCTATAAATGGGAAACCTTTCTGACCAGCGAACTGCCGCAGTGGCTGAGTGCAAATCGTGCCG  
TTAAACCGACCGGTAGTGCCGCCATTGGTCTGAGCATGGCCGGCAGTAGCGCCATGATTCTGGCCGCATATCATCC  
GCAGCAGTTTATCTATGCAGGCAGTCTGAGTGCCCTGCTGGATCCGAGCCAGGGCATGGGCCGAGCCTGATTGGT  
CTGGCAATGGGTGACGCAGGCGTTATAAAGCCGCAGATATGTGGGGCCCGAGTAGTGATCCGGCCTGGGAACGCA  
ATGATCCGACCCAGCAGATTCGGAAACTGGTGGCAAATAATACCCGCTGTGGGTGTATTGCGGCAATGGCACCCC  
GAATGAACTGGGTGGCGCCAATATTCGGCCGAATTTCTGGAAAATTTGTTCGCAGCAGCAATCTGAAATTTTCAG  
GATGCCTATAATGCCGAGGTGGTCATAATGCAGTTTTTAATTTTCGCCGAATGGCACCCATAGCTGGGAATATT  
GGGGTGGCCAGCTGAATGCAATGAAAGGCGATCTGCAGAGTAGCCTGGGTGCCGGTGGCGGTCATCATCATCA  
CCATTAA (SEQ ID NO.1)。

[0039] 本发明从结核分枝杆菌H37Rv基因组中获得Rv3875、Rv2628和Rv1886c的基因序列,经过密码子优化后,在C末端添加6His标签,按照Rv3875-linker-Rv2628-linker-Rv1886c-6His(linker选用柔性连接臂“GGSGG”)合成序列SEQ ID NO.1;密码子优化后的SEQ ID NO.1在融合蛋白的表达过程中,可以获得更高的表达量。

[0040] 本发明提供了用于表达所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白的生物材料,所述生物材料包括表达载体、工程菌,所述生物材料包括所述编码基因。在本发明中,所述表达载体的基础载体优选包括pET43.1a、pET32a和pET28a中的一种。在本发明优选的具体实施方式中,所述表达载体包括pET43.1a-ERA005f,所述pET43.1a-ERA005f由包括所述编码基因的核苷酸序列连接到pET43.1a载体中得到。在本发明更优选的具体实施方式中,本发明通过NdeI和XhoI将SEQ IDNO.1插入表达载体pET43.1a中,得到pET43.1a-ERA005f重组质粒。

[0041] 在本发明中,所述工程菌包括所述编码基因。在本发明更优选的具体实施方式中,本发明将所述pET43.1a-ERA005f重组质粒转至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,得到ERA005f工程菌,所述ERA005f工程菌在37℃温度条件下,经IPTG诱导后,可获得大量的包涵体融合蛋白ERA005f,经纯化复性后,可获得具有活性的ERA005f蛋白。

[0042] 本发明提供了结核分枝杆菌蛋白抗原混合物,所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物包括Rv3875蛋白抗原、Rv2628蛋白抗原和Rv1886c蛋白抗原。在以往研究的基础上,本发明经试探性筛选,最终获得了包括以上3种蛋白抗原的结核分枝杆菌蛋白抗原混合物。本发明所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物相较于以上三种单独的抗原,免疫强度高,能更好的帮助机体抵抗结核分枝杆菌的感染。

[0043] 本发明提供了一种结核分枝杆菌疫苗,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分包括所述结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述编码基因,或者所述表达载体表达得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述工程菌制备得到的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物。

[0044] 在本发明中,所述结核分枝杆菌疫苗的有效成分优选还包括铝盐佐剂;所述铝盐佐剂优选包括氢氧化铝佐剂。

[0045] 本发明突破了传统亚单位疫苗中采用单抗原作为候选疫苗的方式,采用多抗原共表达的形式来筛选新型结核病疫苗,同时选取在结核分枝杆菌生长不同时期表达的蛋白抗原,进而提高多抗原融合蛋白的免疫原性。在铝盐作为佐剂的条件下,ERA005f蛋白的免疫

原性明显高于单抗原混合物,其显著提高了IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 和IL-12等Th-1类细胞因子的表达。另外,本发明证实:与单抗原混合物相比,ERA005f还显著提高了Th-17类细胞因子IL-17和IL-6的表达。Th-1和Th-17类细胞因子在抗结核感染中发挥重要作用,同时也是机体产生针对结核分枝杆菌保护性免疫应答的标志。同时,体外攻毒实验结果证实免疫ERA005f后可以有效抑制结核分枝杆菌H37Rv的生长和增殖。

[0046] 本发明还提供了所述的结核分枝杆菌多抗原融合蛋白,或者所述的编码基因,或者所述表达载体,或者所述工程菌,或者所述结核分枝杆菌蛋白抗原混合物在制备结核分枝杆菌检测试剂或者治疗结核分枝杆菌疾病的药物中的应用。

[0047] 本发明提供的融合蛋白可以提高机体的Th1类细胞免疫,因此本发明中涉及的抗原可以帮助结核病人提高针对结核分枝杆菌的特异性免疫反应,对于结核分枝杆菌的清除具有重要作用。

[0048] 结核分枝杆菌是一种胞内寄生菌,其侵入机体后,主要导致细胞免疫反应。即机体对结核分枝杆菌的清理作用主要通过分泌细胞因子参与免疫调节或调理吞噬等过程实现,因此在整个免疫反应过程中细胞因子表达谱的范围及强度对免疫保护效果的作用至关重要。目前的研究发现,结核分枝杆菌感染人体后主要分泌的细胞因子包括IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-17等。 $\gamma$ 干扰素释放试验是目前公认的诊断结核感染的高灵敏度、高特异性的检测方法;经结核分枝杆菌特异抗原刺激的T淋巴细胞释放 $\gamma$ 干扰素,通过检测其释放强度来判断是否感染。经本发明提供的抗原刺激后,样本释放 $\gamma$ 干扰素的能力及强度明显高于对照组。因此,本发明提供的抗原具备作为检测试剂的潜力。同理所述,目前多种细胞因子分泌水平的检测,如IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-12、IL-17等,均已纳入结核感染检测的分子标记物评估范围。经本发明提供的抗原刺激后,上述细胞因子的分泌水平与对照组比较均呈现明显变化,提示可用作潜在的分子检测标志物。保护性细胞因子的分泌水平是细胞免疫能力的最直接体现;经本发明所述抗原免疫后,无论是细胞因子分泌的水平、还是细胞因子分泌的种类,与对照组相比均有显著升高或不低于BCG组。研究结果提示,当机体应用相应抗原制备的药物后,机体能够分泌强度较高、更为广泛保护性细胞因子,或辅助免疫系统、调节免疫网络及细胞因子分泌,帮助结核感染病人建立应对病原菌感染的免疫应答。因此,基于本发明提供的抗原制备的生物制剂具备成为治疗结核感染药物的潜力。

[0049] 本发明采用原核表达系统表达蛋白,适合大规模商业化生产,且成本较低。基于本发明的检测试剂可广泛用于结核病的辅助诊断、流行病学监测与感染筛查等相关领域,为抗结核新疫苗的研制提供了新思路。

[0050] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细说明,但是不能把它们理解为本发明保护范围的限定。若未特别指明,实施例中所使用的实验方法均为常规方法;所用的材料、试剂等均可从商业途径得到。

[0051] 实施例1融合蛋白ERA005f的构建

[0052] 在NCBI上下载Rv3875、Rv2628以及Rv1886c的基因序列,并将密码子优化为大肠杆菌偏好密码子。按照Rv3875-linker-Rv2628-linker-Rv1886c-6His(linker为GGSGG)编辑序列后,交由通用生物(安徽)股份有限公司合成基因并将目的基因插入表达载体pET43.1a,命名为pET43.1a-ERA005f。重组质粒中ERA005f的结构参见示意图1。合成后对基

因进行测序,基因测序成功后,用于后续实验。

[0053] 实施例2融合蛋白ERA005f的表达

[0054] 1、融合蛋白ERA005f的转化

[0055] 将合成的重组质粒pET43.1a-ERA005f干粉12000rpm/min离心2min,加入50 $\mu$ l去离子水溶解后,取5 $\mu$ l重组质粒加入大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞(北京全式金生物)中,冰上放置30min,42 $^{\circ}$ C热激90s,冰浴2min,加入900 $\mu$ l LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养1h,4000rpm离心1min,弃掉600 $\mu$ l上清,然后轻轻吹打混匀,取200 $\mu$ l菌液涂布在含有氨苄青霉素的LB固体平板,37 $^{\circ}$ C培养16h。挑取单菌落于5ml含氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养12h后送北京擎科生物有限公司测序。测序成功的菌种进行扩大培养提取质粒保存-70 $^{\circ}$ C用于后续实验。

[0056] 2、融合蛋白ERA005f的表达

[0057] (1)分别将上一步骤中转化鉴定的BL21 (DE3)工程菌在含有氨苄青霉素的LB固体培养基划线,37 $^{\circ}$ C倒置培养16-20h;

[0058] (2)挑取单菌落于5ml含氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,180rpm/min震荡培养过夜;

[0059] (3)将培养过夜的菌液加入300ml含有氨苄青霉素(北京索莱宝科技有限公司)的LB液体培养基中,培养至菌液OD值0.6-0.8时,加入终浓度为1mmol/L的异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),37 $^{\circ}$ C诱导表达4h;

[0060] (4)将菌液4000rpm离心10min收集菌体,用含0.5% Triton-X100的10mmol/L pH8.0 Tris-HCl溶液重悬菌体,超声破碎(220W,超声15s,间隔20s,10min);

[0061] (5)取100 $\mu$ l超声后菌悬液,12000rpm离心1min,上清取出,沉淀用100 $\mu$ l去离子水重悬,进行SDS-PAGE电泳检测重组蛋白表达情况。结果参见图2中图C;结果显示,该蛋白主要以包涵体形式表达。

[0062] 实施例3融合蛋白ERA005f的纯化与复性

[0063] 1、Ni亲和层析法纯化

[0064] a.将超声破碎离心后沉淀用6M盐酸胍(北京国药)重悬,加入咪唑至终浓度为5mmol/L;

[0065] b.取25ml GE Healthcare streamline chelating Ni NTA填料(GE healthcare)装入GE 26 $\times$ 16柱子中;

[0066] c.向填料中泵入2-5倍柱体积的10mmol/L pH8.0 Tris-HCl,至流出液体pH为8.0;

[0067] d.向填料中泵入40ml 1mmol/L NiSO<sub>4</sub>溶液,然后继续泵入10mmol/L pH8.0 Tris-HCl,至流出液体pH为8.0;

[0068] e.泵入基液(6M盐酸胍+5mmol/L咪唑)调零;

[0069] f.将处理后的样品泵入填料中,观察OD值变化,收集液体;

[0070] g.泵入8M尿素+5mmol/L咪唑至OD值不改变;

[0071] h.分别用含30mmol/L、60mmol/L和300mmol/L咪唑的8M尿素洗脱,同时,收集洗脱的各个峰值的液体;

[0072] i.泵入3-5柱体积的纯水,并将收集的样品进行SDS-PAGE电泳,鉴定ERA005f蛋白主要在60mmol/L咪唑洗脱,但含有杂带。

[0073] 2、DEAE阴离子交换法纯化

[0074] a.将DEAE Stremline层析填料装好,泵入10mmol/L pH8.0Tris-HCl 3-5个柱体积;

[0075] b.泵入40ml 0.2mol/L NaOH溶液,然后继续泵入10mmol/L pH8.0Tris-HCl至流出液体pH=8.0;

[0076] c.泵入8mol/L尿素至蛋白检测仪数值不在变化,调零;

[0077] d.泵入Ni亲和层析收集样品,观察OD值变化收集样品;

[0078] e.采用不同浓度的NaCl进行洗脱(100mmol/L、200mmol/L以及400mmol/L)

[0079] f.收集洗脱的峰值,进行SDS-PAGE电泳检测。检测结果参见图2。图2中A图为多抗原融合表达蛋白ERA005f的表达纯化鉴定结果。本发明得到了纯度较高的融合蛋白,可用于后续实验。

[0080] 3、蛋白复性

[0081] 将纯化后的ERA005f蛋白装入处理好的透析袋中,利用梯度降低尿素浓度法透析复性。复性后样品经0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌后利用BCA法测蛋白浓度,分装并保存于-20 $^{\circ}$ C用于后续实验。本发明中还使用了Rv3875、Rv2628以及Rv1886c这三种抗原(可根据NCBI上下载的基因序列自主合成),纯化后样本经SDS-PAGE电泳检测,结果参见图2。图2-B为对应3种单抗原的表达纯化鉴定结果(M:蛋白质质量标准,1:Rv3875,2:Rv2628,3:Rv1886c)。

[0082] 根据图2可以看出,ERA005f、Rv3875、Rv2628和Rv1886c的纯化蛋白大小分别为57.8kDa、30kDa、33kDa和56kDa,与预期分子量大小一致。该部分结果表明本发明获得了高纯度的ERA005f蛋白以及对应的3种单抗原蛋白。

[0083] 实施例4 ERA005f蛋白的免疫原性评价

[0084] 本发明利用SPF级BABL/c小鼠评价ERA005f蛋白的免疫原性,实验采用皮下多点免疫的方式,完成免疫后分离小鼠脾脏淋巴细胞检测多细胞因子表达水平以及ELISPOT实验评价刺激的T细胞反应类型,同时检测血清中抗体滴度评价体液免疫水平。

[0085] 1、免疫动物

[0086] 实验选用SPF级6-8周龄的BABL/c雌性小鼠(斯贝福(北京)生物技术有限公司),随机将20只小鼠分成4组,每组5只小鼠,分别为PBS对照组、单独佐剂组(氢氧化铝佐剂)、ERA005f蛋白(50 $\mu$ g)混合氢氧化铝佐剂组(抗原与佐剂体积比3:1)、Rv3875、Rv2628和Rv1886c混合物(按照摩尔质量比为1:1:1,总量为50 $\mu$ g)混合佐剂组,具体分组见表1。

[0087] 表1动物免疫分组

组别	佐剂	抗原	免疫剂量	免疫途径
A	-	PBS	200 $\mu$ l	皮下免疫
B	氢氧化铝佐剂	-	200ul	皮下免疫
C	氢氧化铝佐剂	ERA005f	200ul (含 50ug抗原)	皮下免疫
D	氢氧化铝佐剂	Rv3875 、 Rv2628 、 Rv1886c	200ul (含 50ug抗原)	皮下免疫

[0088] 本发明采用皮下多点免疫方式免疫3次,间隔周期为10天,第3次免疫结束后一周处死小鼠采集样本。

[0090] 2、样本收集

[0091] 初次免疫前以及小鼠处死前通过眼眶采血法采血,37 $^{\circ}$ C静置2h,4000rpm离心10min,分离血清,分装后存放于-20 $^{\circ}$ C备用。同时,收集免疫后小鼠脾脏,用于后续实验。

[0092] 3、血清抗体滴度检测

[0093] 检测小鼠血清中特异性IgG、IgG1以及IgG2a滴度:

[0094] a. 分别用ERA005f蛋白以及ESAT-6、Rv2628和Ag85B混合抗原包被酶标板,将抗原稀释到2 $\mu$ g/ml每孔加入100 $\mu$ l,封膜盖好后放4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0095] b. 将包被液倒掉,PBST洗板5次后每孔加入100 $\mu$ l封闭液(PBST+0.5%脱脂奶粉),37 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0096] c. 封闭液弃除,PBST洗板5次,最后一次结束一定将残余液体去除干净;

[0097] d. 每孔加入100 $\mu$ l稀释后的血清(血清稀释按照2的倍数稀释),37 $^{\circ}$ C孵育2h;

[0098] e. 将样品弃掉,PBST洗板6次并且将残余液体去除干净;

[0099] f. 每孔加入100 $\mu$ l HRP标记的羊抗鼠IgG、IgG1以及IgG2a抗体(1:10000稀释,抗体购自苏州博奥龙科技有限公司),37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0100] g. 洗板6次并将残余液体去除;

[0101] h. 每孔中加入50 $\mu$ l TMB显色液的A液以及50 $\mu$ l B液,然后再震荡器震荡10s混匀,37 $^{\circ}$ C孵育15min;

[0102] i. 加入50 $\mu$ l 2M H2SO4终止反应;

[0103] j. 酶标仪检测450nm吸光值,记录数据;

[0104] k. 抗体滴度值判别方法:某一稀释样品OD/阴性对照OD $\geq$ 2.1,下一稀释倍数OD/阴性对照OD $<$ 2.1则该稀释倍数为该样品对应抗体滴度(注意如果阴性样品OD $<$ 0.05则按照0.05计算);

[0105] 4、细胞免疫反应检测

[0106] (1) 小鼠脾脏淋巴细胞的分离(最后一次免疫后一周处死小鼠后取脾脏)

[0107] a. 利用戊巴比妥钠麻醉小鼠至死亡,用75%医用酒精浸泡小鼠消毒,将小鼠解剖

取出脾脏,放入RPMI1640中,1h之内分离淋巴细胞;

[0108] b.利用北京达科为生物技术有限公司的小鼠淋巴细胞分离也分离淋巴细胞,具体步骤按照说明书进行;

[0109] c.分离淋巴细胞后测定淋巴细胞浓度,并调整至浓度为 $1-2 \times 10^6$  cells/ml用于后续实验。

[0110] (2)ELISPOT检测T淋巴细胞中IL-4和IFN- $\gamma$ 分泌情况

[0111] 使用达科为生物技术有限公司公司的小鼠ELISPOT预包被IL-4和IFN- $\gamma$ 试剂盒,具体步骤如下:

[0112] a.将试剂盒于生物安全柜中打开,每孔加入200 $\mu$ l的RPMI-1640或者无血清培养基,室温放置5-10min后将其扣除;

[0113] b.加入细胞悬液100 $\mu$ l/孔( $1-2 \times 10^5$  cells),同一样本需要设置正对照即加入5 $\mu$ l阳性刺激物刀豆蛋白,负对照不加刺激物,实验组加入免疫的抗原10 $\mu$ l/10 $\mu$ g;

[0114] c.放置37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>培养箱静置培养18h;

[0115] d.将培养基倾倒后,加入遇冷的去离子水200 $\mu$ l/孔,4 $^{\circ}$ C放置10min;

[0116] e.倾倒液体,1 $\times$ wash buffer 200 $\mu$ l/孔,洗涤5次,最后一次洗涤结束后拍干洗涤液;

[0117] f.每孔加入100 $\mu$ l稀释好的生物素标记抗体,37 $^{\circ}$ C,1h;

[0118] g.倾倒孔内液体,1 $\times$ wash buffer 200 $\mu$ l/孔,洗涤5次,最后一次洗涤结束后拍干洗涤液;

[0119] h.每孔加入100 $\mu$ l稀释好的酶标亲和素,37 $^{\circ}$ C,1h;

[0120] i.倾倒孔内液体,1 $\times$ wash buffer 200 $\mu$ l/孔,洗涤5次,最后一次洗涤结束后拍干洗涤液;

[0121] j.将现配的AEC显色液加入各实验孔,100 $\mu$ l/孔,室温避光静置20-30min(期间一直观察变化,当孔中出现较多斑点时,停止染色);

[0122] k.倾倒孔内液体,并揭开板底座,用去离子水反复冲洗正反面,将其晾在通风地方,待膜晾干后使用自动读板仪进行斑点计数,结果参见图7。根据图7所示:ERA005f蛋白以及ESAT-6、Rv2628和Ag85B混合物都可以提高分泌IFN- $\gamma$ 以及IL-4的T淋巴细胞,且ERA005f优于抗原混合物;同时,该部分结果也显示出两种疫苗制剂免疫后,分泌IFN- $\gamma$ 这一Th1类细胞因子的细胞数目显著高于分泌Th2类细胞因子IL-4的细胞,说明两种制剂都倾向于刺激Th1类细胞免疫。

[0123] (3)Luminex多因子检测

[0124] 采用上海优宁维生物技术有限公司的luminex液相芯片检测,具体操作步骤如下:

[0125] a.将分离的淋巴细胞加入96孔细胞培养板中,每孔100 $\mu$ l( $2 \times 10^5$  cells),加入50 $\mu$ l刺激抗原(10 $\mu$ g,RPMI-1640稀释),37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱静置培养18h;

[0126] b.收集样本,4000rpm离心2min后,收集上清;

[0127] c.试剂准备准备工作,从冰箱中取出试剂盒,室温平衡30min;

[0128] 标准品准备:标准品共1瓶,按照COA提供的稀释方式稀释,稀释液为RD6-52充分混匀后,室温静置15-20min,每种标准品中取100 $\mu$ l到同一个EP管里,并用RD6-52补足1ml体积,作为标准曲线最高浓度。依次做3倍稀释,7个标准品+1个Blank;

[0129] Beads准备:充分混匀预混beads混合物,按照比例吸取相应体积,96个孔---吸取500ul beads体积,加入5ml稀释液RD1W,充分混匀,待用;

[0130] 检测抗体准备:充分混匀预混检测抗体混合物,按照比例吸取相应体积,96个孔---吸取500ul检测抗体体积,加入5ml稀释液RD1W,充分混匀,待用;

[0131] PE-链霉亲和素准备:充分混匀PE-链霉亲和素试剂,按照比例吸取相应体积,96个孔---吸取220ul PE-链霉亲和素体积,加入5.35ml清洗液,充分混匀,待用;

[0132] 清洗液准备:20ml 25\*清洗液+480ml去离子水;

[0133] d.重悬beads后,向每孔加入50ul的已稀释的beads,按照实验之前的排布,分别每孔对应加入50ul的标准品和样本,摇床室温下2h;

[0134] e.将微孔板放置于磁力架上至少1min时间,确保beads被吸附住,用清洗液清洗,100ul每孔,清洗3次;

[0135] f.每孔加入50ul稀释后的生物素标记的检测抗体复合物,同样室温下1h;

[0136] g.重复e;

[0137] h.每孔加入50ul稀释后的链霉亲和素标记的PE,同样室温下0.5h;

[0138] i.重复e;

[0139] j.用100ul清洗液重悬beads,孵育2min,上机检测。

[0140] 5、统计学分析

[0141] 采用GraphPad Prim 5.0中的Tukey的多重比较检验的单因素方差分析进行结果数据统计学分析, $P < 0.05$ 为结果差异有统计学意义。

[0142] 6、结果分析

[0143] (1)ERA005f显著提高小鼠体内抗原特异性IgG抗体滴度

[0144] 将3次免疫后一周的血清利用ELISA法检测抗体,结果参见图3。根据图3所示:ERA005f以及3种抗原的混合物联合氢氧化铝佐剂增强免疫小鼠血清中特异性IgG抗体滴度,且3种抗原混合组显著高于ERA005f组( $P < 0.0001$ ,图3A)。另外,本发明中ERA005f以及3种抗原混合物联合氢氧化铝佐剂组都提高了IgG1/IgG2a的比值,且ERA005f联合氢氧化铝佐剂组比值最高(图3B),说明该融合蛋白联合氢氧化铝佐剂可以促进Th-1类免疫反应。

[0145] (2)ERA005f促进Th-1类和Th-17类细胞因子分泌

[0146] 3次免疫后一周收集小鼠的脾脏,并分离淋巴细胞,利用ELISpot技术检测免疫抗原刺激后,淋巴细胞IFN- $\gamma$ 以及IL-4的分泌。结果参见图4。根据图4所示:与单抗原混合物相比,ERA005f促进了IFN- $\gamma$ 以及IL-4的分泌,且IFN- $\gamma$ 的分泌水平高于IL-4,这一结果表明ERA005f倾向于促进Th-1类免疫反应。

[0147] 另外,本发明还利用luminex液相芯片检测Th-1类细胞因子(GM-CSF、IFN- $\alpha$ 、IL-12、IFN- $\gamma$ )、Th-2类细胞因子(IL-4和IL-10)以及Th17类细胞因子(IL-6和IL-17),结果分别参见图4、图5和图6。结果显示:Th-1类细胞因子中,除GM-CSF外,ERA005f联合氢氧化铝佐剂显著提高了其他3种细胞因子的表达,且具有统计学差异( $P < 0.05$ ),尤其是TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 是单抗原混合组的3倍(图4)。与单抗原混合组相比,ERA005f组刺激机体淋巴细胞分泌的Th-类细胞因子IL-4以及IL-10无明显差异(图5)。ERA005f联合氢氧化铝佐剂经皮下免疫小鼠后,可以显著的提高IL-17和IL-6的表达,尤其是IL-6高达5000pg/ml,是单抗原混合组(2200pg/ml)的2倍还要多(图6)。

[0148] 以上结果证实:ERA005f这一多抗原融合蛋白可以显著提高Th-1类以及Th-17类免疫反应,促进Th-1类和Th-17类细胞因子分泌,尤其是Th-1类细胞因子。

[0149] 实施例5结核分枝杆菌生长抑制实验 (Mycobacterial Growth Inhibition Assays, MGIA)

[0150] 为了评价ERA005f蛋白作为结核疫苗抵抗结核分枝杆菌感染能力,本发明将免疫后小鼠的脾脏淋巴细胞与结核分枝杆菌共培养:

[0151] 将细胞加入24孔板中,每孔200 $\mu$ l ( $2 \times 10^5$ 细胞),加入50CFU结核分枝杆菌H37Rv,混匀后37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>培养96h。将上清弃掉,加入500 $\mu$ l预冷的去离子水裂解10min,4000rpm离心5min后收集上清。将上清10倍梯度稀释后,分别取50 $\mu$ l原液、10倍稀释液以及100倍稀释液涂布于7H10固体平板。37 $^{\circ}$ C培养3周左右观察平板中单菌落生长状态,并记录,结果参见图8。根据图8所示:ERA005f以及单抗原混合物联合氢氧化铝佐剂后,都明显抑制结核分枝杆菌H37Rv的生长及繁殖,且具有统计学差异 ( $P < 0.001$ ),但两组之间无统计学差异 ( $P > 0.5$ )。这一体外攻毒实验结果表明:ERA005f和单抗原混合物联合氢氧化铝佐剂都可以提供有效的保护效果,进而免受结核分枝杆菌的感染。

[0152] 实施例6ERA005f蛋白、抗原混合物以及ESAT-6、Rv2628和Ag85B Th1类细胞因子表达比较

[0153] 本发明为验证ERA005以及三种抗原混合免疫效果优于单一抗原的免疫效果,分别免疫小鼠,分离脾脏淋巴细胞比较Th1类细胞因子 (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 以及IL-12)的表达,免疫方式及周期同实施例4。结果见图9。

[0154] 结果显示,ERA005f以及三种抗原混合物刺激机体分泌的IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 以及IL-12都高于ESAT-6、Rv2628和Ag85B单抗原免疫组,表明ERA005f以及三种抗原混合物刺激机体的Th1类细胞免疫强于单一抗原免疫,可以更好的帮助机体抵抗结核分枝杆菌的感染。

[0155] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,便于具体和详细地理解本发明的技术方案,但并不能因此而理解为对发明专利保护专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

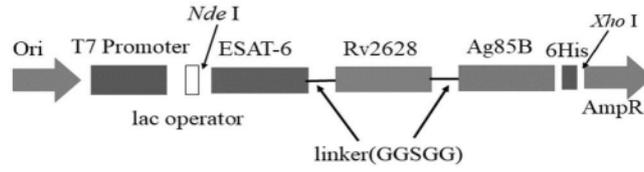


图1

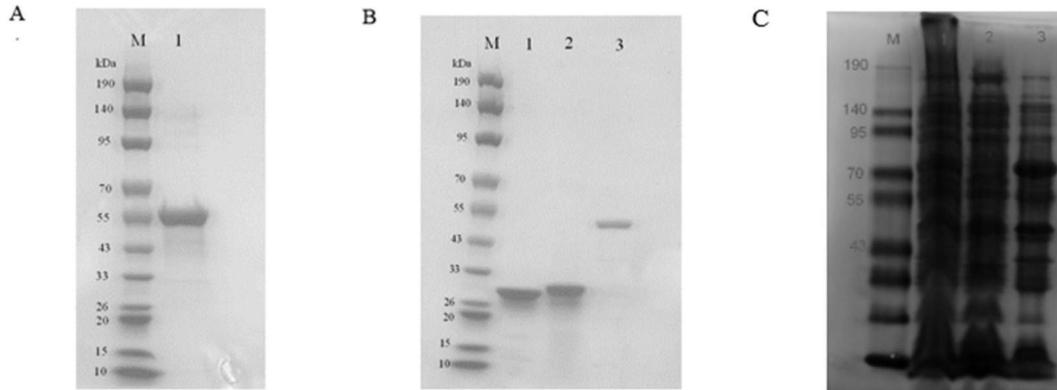


图2

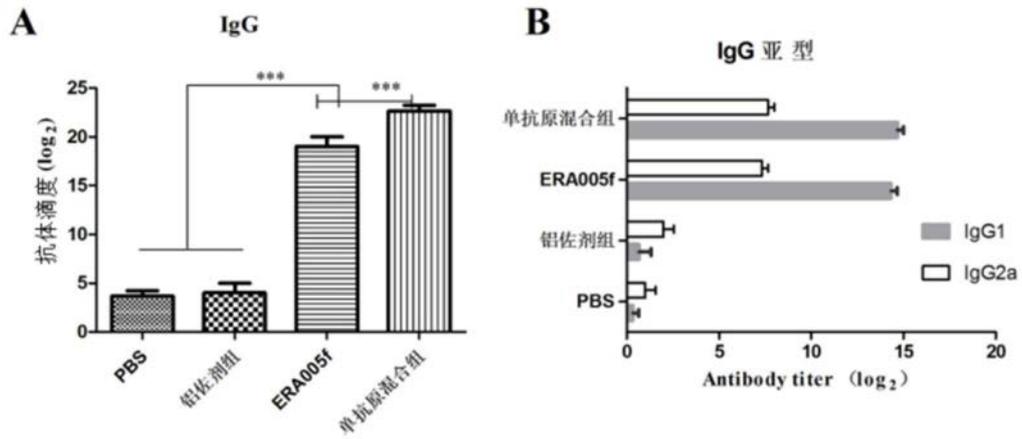


图3

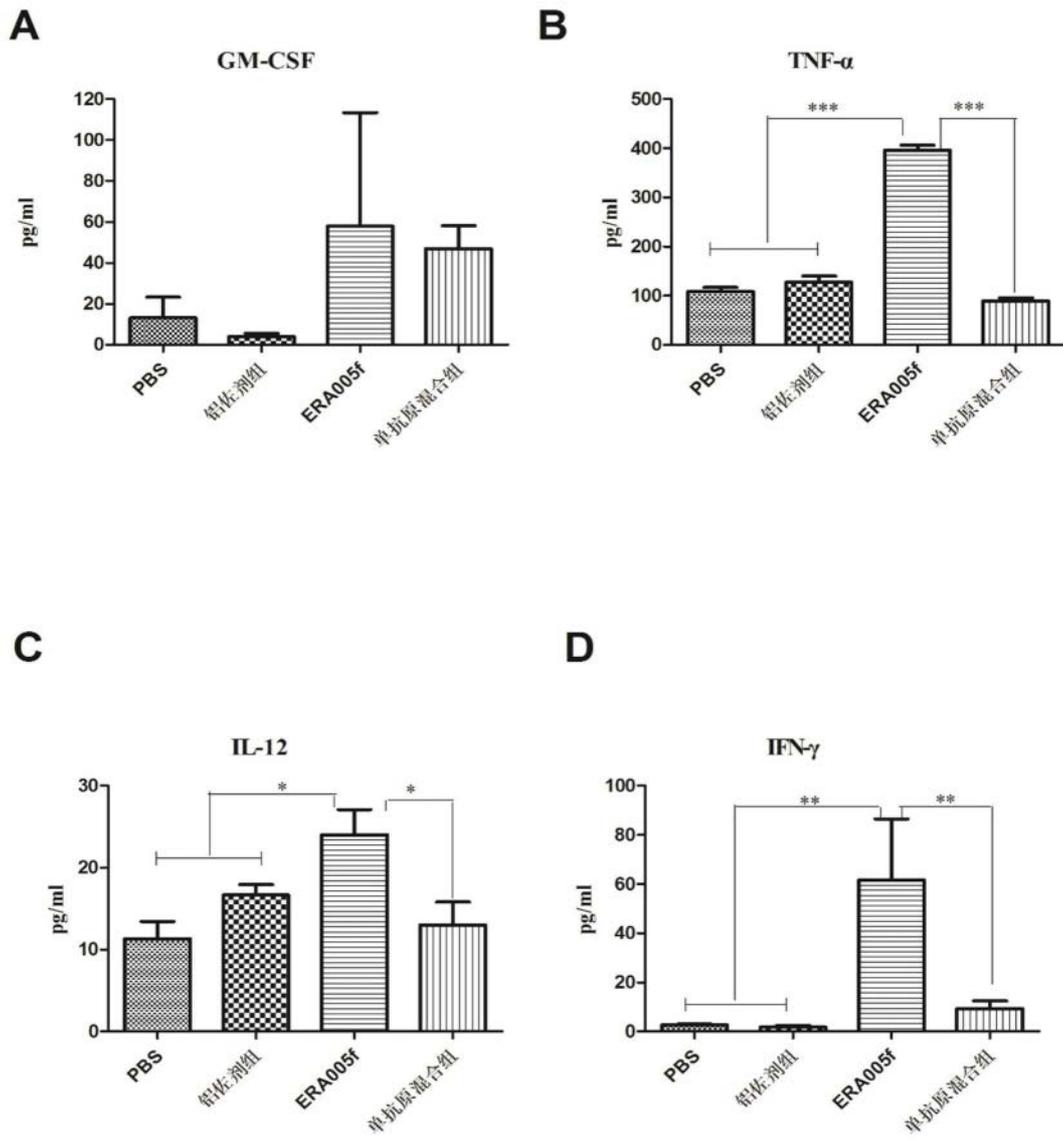


图4

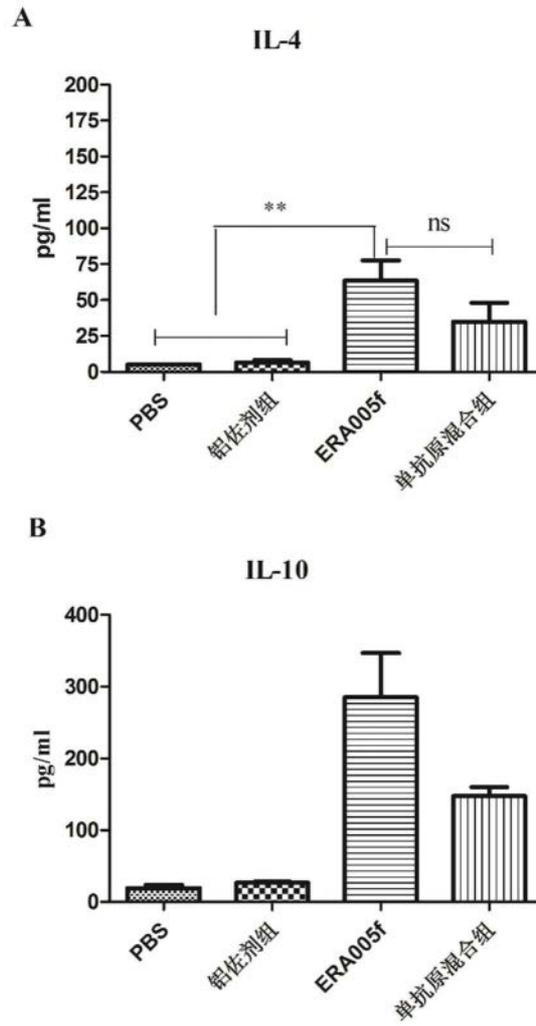


图5

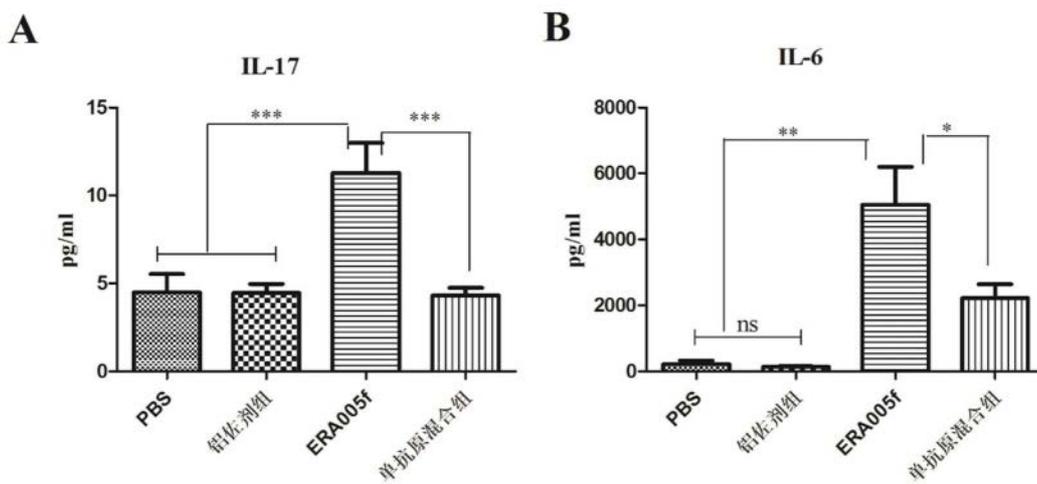


图6

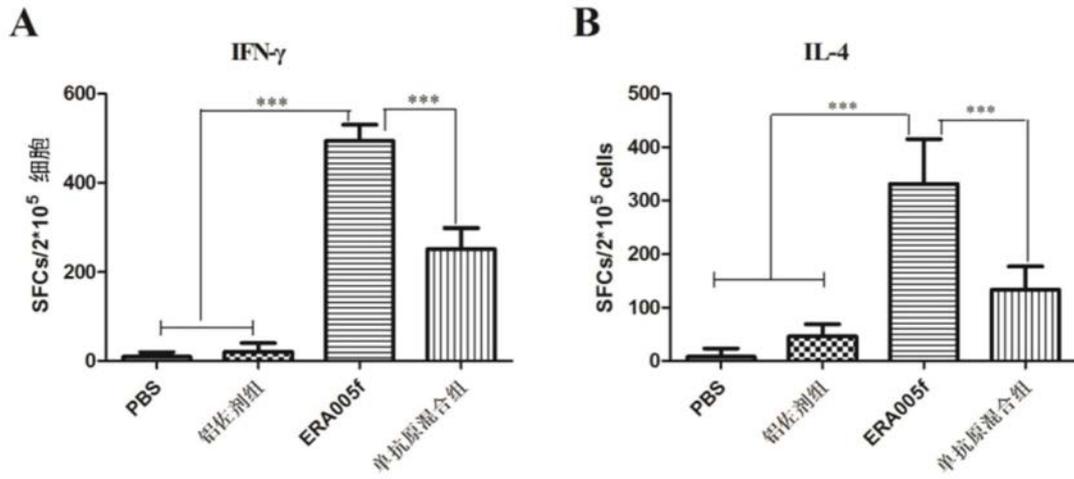


图7

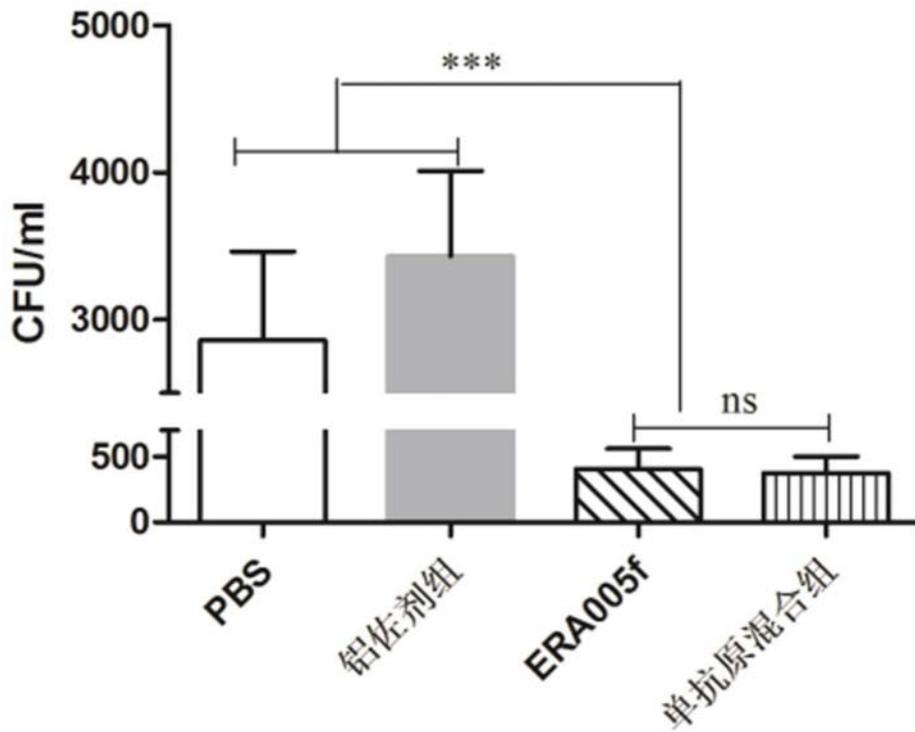


图8

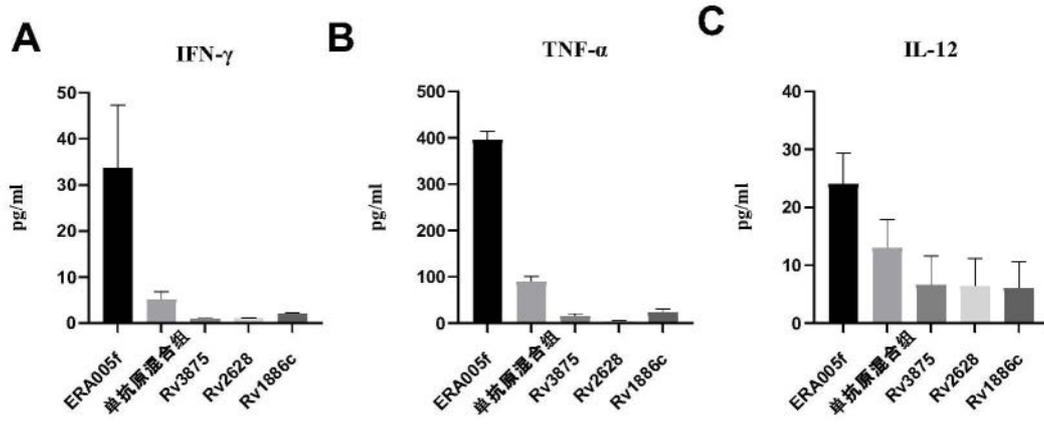


图9