

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：反向疫苗学精准设计肺炎克雷伯菌疫苗

姓 名：李昌澄 学 号：19307110228

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：黄建东 职 称：教授

单 位：中国科学院深圳先进技术研究院

完成日期： 2023 年 5 月 1 日

反向疫苗学精准设计肺炎克雷伯菌 疫苗

完成人

李昌澄

指导小组成员

黄建东 教授

张宝中 副教授

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究背景	1
1.1 立题依据	1
1.3 主要研究内容	2
二、材料与amp;方法	3
2.1 材料	3
2.1.1 病原菌株	3
2.1.2 载体与宿主菌	3
2.1.3 实验动物	3
2.1.4 耗材	3
2.2 试剂和仪器	3
2.2.1 培养基	3
2.2.2 缓冲液	4
2.2.3 商业化试剂与试剂盒	5
2.3 实验方法	6
2.3.1 分子克隆	6
2.3.2 蛋白纯化	9
2.3.3 小鼠的免疫接种	11
2.4 数据分析	12

2.5 动物伦理	12
三、研究结果	13
3.1 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的识别	13
3.2 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的克隆	14
3.3 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的原核表达与纯化	14
3.4 利用小鼠模型检测候选抗原蛋白的免疫原性	15
四、讨 论	16
4.1 成果的科学意义	16
4.2 局限性	16
4.3 研究展望	17
参考文献	19
致谢	20

摘 要

肺炎克雷伯菌是一种存在于人体肠道菌群中的条件致病菌，其对多种抗生素都具有耐药性，主要引发院内感染。迄今为止，有关肺炎克雷伯菌疫苗的研究依然不够成熟，没有商业化的产品问世。本研究旨在通过反向疫苗学的方法指导设计肺炎克雷伯菌的蛋白疫苗，即通过生物信息分析得到一系列的候选蛋白，而后利用小鼠模型从中筛选出良好的疫苗靶点。我们总共识别出了 60 个在不同肺炎克雷伯菌株间相对保守的编码表面蛋白的基因，基本完成了上述基因表达载体的构建，纯化得到了其中的 2 个蛋白并对小鼠进行了免疫接种。三轮免疫过后，小鼠体内产生了高滴度的特异性抗体，说明候选蛋白能够有效引发体液免疫反应，具备进一步开发为疫苗的潜力。本研究的成果可为针对肺炎克雷伯菌研发高效、低毒、广谱的疫苗提供理论和实践上的参考，为缓解细菌耐药性增强的问题和节约公共医疗资源作出贡献。

关键词： 肺炎克雷伯菌，表面抗原，蛋白质疫苗

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a conditioned pathogen which exists in our natural intestinal flora. It is resistant to multiple common antibiotics and usually causes hospital-acquired infections. To date, research on vaccines against *K. pneumoniae* remains rudimentary, with no commercialized ones available. The aim of this study is to design protein vaccines against *K. pneumoniae* by reverse vaccinology, which is to firstly identify candidate protein antigens through bioinformatic analyses, and then use murine model to screen out potent vaccine targets. In total, we identified 60 genes encoding surface proteins which are highly conserved among different *K. pneumoniae* strains, constructed expression vectors, purified 2 candidate proteins and immunized the mice. Mice generated high-titer antibodies after three doses of immunization, suggesting that the two proteins can effectively induce antibody-mediated responses and have the potential to be further developed into vaccines. Our results may provide theoretical and practical guidance for the development of strongly immunogenic, non-toxic, and serotype-independent vaccines against *K. pneumoniae*, which contributes to the alleviation of antibiotic resistance and the conservation of public healthcare resources.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, surface antigens, protein vaccines

一、前言

1.1 研究背景

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一种革兰氏阴性杆菌, 存在于正常人体的消化道中, 可以造成肺炎、尿路感染和肝脓肿等多种疾病, 主要引发院内感染, 也有可能在免疫缺陷的人群中引发社区获得性感染^{[1][2]}。肺炎克雷伯菌是引发院内呼吸道感染的最常见原因, 也是造成革兰氏阴性杆菌败血症的第二大原因^[3]。目前应对肺炎克雷伯菌感染的方法依然较为有限, 在临床上一般选用敏感抗生素进行治疗。然而, 世界卫生组织已将肺炎克雷伯菌列为耐碳青霉烯类肠杆菌科的一员, 并将超广谱 β -内酰胺酶 (ESBL) 耐药菌株列为严重威胁, 产碳青霉烯酶 (CPE) 和 ESBL 的肺炎克雷伯菌菌株也均已在全世界范围内出现^[4]。因此, 传统的抗生素疗法正面临着越来越大的挑战, 且有可能进一步加重全世界范围内的细菌耐药性问题。直至今日, 我们仍迫切地需要找到其它方法来解决上述问题。

在现存的各种可能性中, 研发针对肺炎克雷伯菌的疫苗并对易感人群进行预防接种无疑是一种相对节约且有效的方案, 但是相关研究目前正面临着一个很大的瓶颈, 即难以找到合适的疫苗靶点。例如, 迄今为止研究最深入的 O 抗原 (菌体抗原) 和 K 抗原 (荚膜抗原) 都各有其局限性, 前者在免疫接种时有较强的毒副作用, 后者则在不同致病菌株间有较大变异, 以至于一支疫苗至少需要同时包含 24 种主要的 K 抗原才能够覆盖 70% 的肺炎克雷伯菌菌株^[5]。如何寻找一个具有强免疫原性、低毒性且在不同菌株间高度保守的抗原靶点是我们目前面对的首要问题。

1.2 立题依据

对病原体而言, 细胞表面蛋白是其与宿主间发生相互作用的重要分子, 这些蛋白在感染的发生发展中往往具有十分重要又相对保守的功能, 如病原体在组织和器官表面的粘附和侵入、毒性因子的分泌和免疫逃避的实现等, 因而倾向于在同一病原体的不同血清型间保守。同时, 由于表面蛋白直接暴露于外界环境中, 它们也最有可能被宿主的免疫系统识别为抗原, 引发宿主的免疫反应^{[6][7]}。就肺

肺炎克雷伯菌而言，本课题组在此前发表的研究中曾利用细胞表面剔除结合第二代蛋白质组学技术识别出了 5 个高度保守的胞外表面蛋白，其中 3 个蛋白可以有效诱导小鼠产生保护性免疫反应，大大降低接种后小鼠在面对肺炎克雷伯菌感染时的死亡率，表明胞外表面蛋白是潜在的多价肺炎克雷伯菌疫苗靶点^[8]。考虑到因受蛋白酶识别位点和表面蛋白暴露程度所限，表面剔除技术往往不能降解细菌的全部表面蛋白，造成许多蛋白的遗漏^[9]，我们猜测可能仍有一些合适的疫苗靶点隐藏在未被识别和测试过的表面蛋白中，继续通过反向疫苗技术筛选肺炎克雷伯菌的表面蛋白或许有助于我们找到更多的重组蛋白疫苗靶点。

1.3 主要研究内容

本文主要是在此前研究的基础上进一步通过反向疫苗技术筛选肺炎克雷伯菌的重组蛋白疫苗靶点。我们通过生物信息技术识别出了一系列的在不同肺炎克雷伯菌株间保守的表面蛋白作为候选抗原，对编码相应蛋白的基因进行了克隆，构建了能够高效表达重组蛋白的大肠杆菌工程菌株并利用小鼠模型初步检验了部分候选抗原蛋白的免疫原性，证明了上述表面蛋白在未来被开发为商业化肺炎克雷伯菌疫苗靶点的潜力。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 病原菌株

肺炎克雷伯菌 *K. pneumoniae* 260 菌株，香港大学赠送。

2.1.2 载体与宿主菌

载体

pET-28a(+)质粒载体

宿主菌

E. coli DH5 α 菌株

E. coli BL21(DE3) 菌株

2.1.3 实验动物

BALB/c 小鼠，购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。

2.1.4 耗材

表 2.2.3 本研究中所用各种主要商业化耗材

耗材名称	公司	产品目录号
FuturePAGE™蛋白预制胶	ACE	ET12420LGel
透析袋	Sigma	D6066-25EA
Nalgene™ Oak Ridge 高速聚碳酸酯离心管	Thermo	3118-0050
不可拆式 96 孔酶标板	NEST	514201
Amicon® Ultra-15 离心过滤装置	Merck	UFC9010

2.2 试剂和仪器

2.2.1 培养基

2.2.1.1 LB 培养基

表 2.2.1.1 LB 液体培养基和固体培养基

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g

Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
灭菌条件：121℃，高压湿热，20 min。		

2.2.1.2 2YT 培养基

表 2.2.1.2 2YT 液体培养基和固体培养基

组成	2YT 液体培养基（1 L）	2YT 固体培养基（1 L）
Tryptone	16 g	16 g
Yeast Extract	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
灭菌条件：121℃，高压湿热，20 min。		

2.2.2 缓冲液

表 2.2.2 本研究中所用各种缓冲液及其组分

缓冲液名称	组分
裂解缓冲液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 9.0
包涵体洗涤缓冲液	2 M 尿素, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5
包涵体溶解缓冲液	8 M 尿素, 0.1 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-2Na, pH 8.0
镍离子螯合柱脱镍缓冲液	20 mM Na ₃ PO ₄ , 0.5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.4
镍离子螯合柱挂镍溶液	0.1 M NiSO ₄
镍离子螯合柱洗涤液 I	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole
镍离子螯合柱洗涤液 II	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 50 mM Imidazole
镍离子螯合柱洗脱液	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole
考马斯亮蓝 R250 染色液	25g 考马斯亮蓝 R250, 45mL 甲醇, 10mL 冰醋酸, 45mL ddH ₂ O
考马斯亮蓝脱色液	25% 甲醇, 8%冰醋酸
PBST	2%TWEEN 20 溶于 DPBS
ELISA 包被缓冲液	15 mM Na ₂ CO ₃ , 35 mM NaHCO ₃ , pH 9.6
ELISA 封闭液	含 5 g/mL 奶粉的 PBST
TMB A 液	0.33 M NaAc, 12.4 mM 柠檬酸钠, 1.8% H ₂ O ₂

TMB B 液

1.07 mM EDTA-2Na, 7.36 mM 柠檬酸钠, 10%甘油,
4% 10 mg/mL TMB 的 DMSO 溶液

2.2.3 商业化试剂与试剂盒

表 2.2.3 本研究中所用各种主要商业化试剂与试剂盒

试剂或试剂盒名称	公司	产品目录号
TIANamp Bacteria DNA Kit	TIANGEN	DP302-02
FastPure Plasmid Mini Kit	Vazyme	DC201-01
FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit	Vazyme	DC301-01
ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit	Vazyme	C115-01
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo	23225
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	Takara	R045B
DPBS	GIBCO	14190136
EcoRI-HF®	NEB	R3101S
BamHI-HF®	NEB	R3136S
Agarose	ABCONE	A47902
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Thermo	S33102
IPTG	Sigma	I6758-1G
180 kDa Prestained Protein Marker	Vazyme	MP102-01
TWEEN® 20	Sigma	P1379-1L
Ni Sepharose 6 Fast Flow	GE healthcare	17-5318-01
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody	Thermo	31430
3,3',5,5' -Tetramethylbenzidine	Merck	860336-5G

2.2.4 仪器

表 2.2.2 本研究中所用各种主要仪器

仪器名称	公司	产品目录号
NanoDrop™ 2000 分光光度计	Thermo	N/A
Biometra TRIO 48, 230 V PCR 仪	Jena	846-2-070-723
Optima XE-90 超速离心机	Beckman	A94471
Sorvall™ ST 40R 台式冷冻离心机	Thermo	N/A

Sorvall™ ST 8 小型台式离心机	Thermo	75007201
Synergy H1 多功能微孔板检测仪	BioTek	N/A
FB-110X55 超高压细胞破壁均质机	励途	N/A
HX-650E 超声细胞破碎仪	沪析	N/A
PowerPac Universal Power Supply	Bio-Rad	1645070
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical	Bio-Rad	1658005
Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels		

2.3 实验方法

2.3.1 分子克隆

2.3.1.1 肺炎克雷伯菌 *K. pneumoniae* 260 菌株基因组的抽提

取甘油冻存的 *K. pneumoniae* 260 菌株在无抗性 LB 平板上划线复苏，挑取单菌落在无抗性 LB 液体培养基中过夜震荡培养，之后收集菌体并使用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacteria DNA Kit 抽提得到 *K. pneumoniae* 260 菌株基因组 DNA，所有操作均按产品说明进行，结束后使用 NanoDrop™ 2000 分光光度计测定产物浓度，以便后续以此为模板进行 PCR 扩增。

2.3.1.2 PCR 扩增目的基因与重组载体的构建

使用 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 进行 PCR 反应从 *K. pneumoniae* 260 菌株基因组中扩增编码候选蛋白的目的基因序列，琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果，而后使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 凝胶回收试剂盒回收目的基因片段并测定回收产物浓度，PCR 所用全部引物序列见表 2.3.1，所有引物均订购自广州艾基生物技术有限公司。

待克隆的 pET-28a(+)质粒载体首先经限制酶 EcoRI-HF®和 BamHI-HF®双酶切线性化处理，然后使用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 重组克隆试剂盒将凝胶回收后的目的基因片段克隆至线性化载体中，重组反应时间和 DNA 总量均按产品说明执行，目的基因片段与线性化载体的物质的量之比为 1:1。

2.3.1.3 重组载体的序列测定与验证

所有重组载体在构建完毕后均交付生工生物工程（上海）股份有限公司进行序列测定，其中开放阅读框编码的蛋白序列均与 NCBI 数据库中提供的相应蛋白序列进行比对验证，以确保氨基酸编码序列中不存在错义突变。

表 2.3.1 本研究中克隆所用全部引物序列

名称	序列
1CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCTTCAGGACCTTATTAATCTCACCGCA
1CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCTTACAGCGATGAGGAATAGAGCGAC
2CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAATCATCGCATCAGGGGTAC
2CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCGTTATAAGTCACCACGAAGGTCTGC
3CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCAGTGTATAAAGCGGCTTTTATCC
3CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCGCTAAACGTCTGCACAGCGC
4CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCTATTTTTATTCTGAGGTCAGCATGAAGCG
4CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCTTTAACGGCCACTTTCACTG
5CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCAGAACACTGCAGTATCTGCTGG
5CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCTTACTGAAATTCCAGGGTGAATGTCTG
6CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAATCAAAACACTGGCAATGAT
6CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCTCGTACTGCACTTTGAACGTG
7CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCATCGTCATTTTCGCCTG
7CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCGTGCTTGTCCAGCCAC
8CEF	CAAATGGGTCGCGGATCCATGTTTCAAGTTAAACCCTTTTATCCGG
8CER	TGTCGACGGAGCTCGAATTCTGTCTGTCGACATTATTCTGGAAGG
9CEF	CAAATGGGTCGCGGATCCATGAAATACACGTCTCACTTCCC
9CER	TGTCGACGGAGCTCGAATTCGAAATGAGTATTAACGCTCATAAAGAAGG
10CEF	CAAATGGGTCGCGGATCCATGAATAACAGGATCAAATCCCTGGC
10CER	TGTCGACGGAGCTCGAATTCGAAGTGGGTGTTGACGCTCAG
11CEF	CAAATGGGTCGCGGATCCATGCGCTCAATACAGCTACTTACC
11CER	TGTCGACGGAGCTCGAATTCTTCCATCCAGCCGCCG
12CEF	CAAATGGGTCGCGGATCCATGATAATTGTTATCATTAATATTCTCGATCT
12CER	TGTCGACGGAGCTCGAATTCGAAGGAGAGGGTAACGCC
13CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATCGACGTTCTGCGCAC
13CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCGAAGCGATAATCCACCGCC
14CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGATCCGCCCGGTCTG
14CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCGCTCCCTGATGAGTCAGACCAG
15CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAATTGATATTAATAAAAAGCGTGCTGGC
15CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCCTTCACCGTCTGGTGGTAGC
16CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGATGATCCTTCCTTTCTCCGC
16CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCCTGCCCTCGATAGCCGC
17CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGTTTCGTTTAAGTTTTATGTTTATCGCG
17CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCCAGCGACTGCCAGAGGG
18CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGATTAAAAAAGCTTCGCTGATGACG
18CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCGAAGGTGTAGCTGCCAGACAAG
19CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAGATATCCTTTTTTTTGGCATCGGT
19CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCCTGAATGATAGCGGTATATTTCTTCCCT
20CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCGTTTAAAACCGATAGTCACCG
20CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCCTTTCACGGTCCAGCCTTTGTAAG
21CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAGAAAAGTCCTCACCGTCC
21CER	GCTTGTCTGACGGAGCTCGAATTCCCTTTAAACCACTTCTGCTGCATCTGC

22CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCGATAGCTGCCCC
 22CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGAGCCCATATTTTCTTCTTCTAACTCTTC
 23CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCCTGTCGCTCGTCAT
 23CER CTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGGGTTGGGCGGATATCACC
 24CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGTGAACCATAACCGAGATATCCCC
 24CER CTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTATTGTCAGATATTGATCTGCTTTGCG
 25CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGACCAGACTAAAGAATGCCAATATGT
 25CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTAACGCTAAGATCGTTGCGCA
 26CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCTTAGTTGCTCAGAAATTTTAACATACGCACT
 26CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAGAACTGGAACGCTGC
 26CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGTTGCTCAGAAATTTTAACATACGCACT
 27CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGCTGCCGCGGTAGGTAGA
 28CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCGGCGTATGGTTCTG
 28CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTGAGGATAATTATGATTCCTACCGCG
 29CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAATATTAAGAAAACGATTGTTGCCTCT
 29CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTTCTGATTACGGTTGGTAAATTCAGCC
 30CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAATCACTGTTGCTATGGCT
 30CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGTCCCGGAATAAACATCAAAGCT
 31CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGACCAAAAACTGTTGCCTTTACTG
 31CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTGGTCACGTTATCGTACCAGAC
 32CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAATTACGTATAACCTTTTAACCGC
 32CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGGACTTAATGTTGAAATCCTGGACTTTATCG
 33CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGACCGTTAAAGTTATCGTCACCG
 33CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGGTTATCGAGGACGGCC
 34CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGACACAACCTGTTTCACGCA
 34CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGGCGTCAGGTCCGC
 35CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAGTTAGTTCTGGCTGCATTG
 35CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTCCGGGAACCACTGGTTG
 36CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAGTACTGATTGCCGCC
 36CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTCTGGAACCATTTGTTATAGATGGTCT
 37CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCTGGCTATGAGCGGC
 37CER CTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTACGCCCATCGCCGC
 38CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGATGAAGAACTCACTGCACTGTT
 38CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTACGAGGTGCAGGCATTTTAC
 39CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCGCCTGAAATTGTCATCTC
 39CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTAGCGGTAGGCCTGCAGC
 40CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAGTATCCTGTCGCTTTGACAT
 40CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGTGCTTACGATATACATGGTACGG
 41CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAGTATTAGCTCTGGTCGTTG
 41CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGCTGCCGGCTGTGCA
 42CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAGAACTGTTGATCGCGC
 42CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTGCGCCGAGGCTGG
 43CEF ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCCAGCATCAGCCA
 43CER GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCTTAGGCGACTGCTTGAGCAG

44CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCAAGTTCAACAGCAACAAATTCTTCAAAC
44CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCATTGCTTCGCTTTGGAAAAATCG
45CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGTCTACAGGGAAAACACGC
45CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCCCCCCTGACGCAGAGTAAAG
46CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAAGTATTAGCTCTGGTCGTTG
46CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTGCCGCCGTTTAACCG
47CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGTCAAGAATTTGCTCAAAGTGTG
47CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTTGCGCTGGCAGCGT
48CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGACCATCATCACTAAAAAGCGTTT
48CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCATTGTTTGATAACGTAGAGGTCTTTGGT
49CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAGCACTGTAAAATCATCTGTTAG
49CER	CTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCATTGACTCTTTTCCACATAGGTCTGC
50CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCGACTTCTTGCTGGACG
50CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCCTTACGCTAAAGGTATATTGCCCT
51CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAATTAGCACTTCTGGGTGCTC
51CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTTTCTGTCACGTCACGCGC
52CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAACCTCCTTACTGGGAGC
52CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTCCTTTCTCTCCTTCGCGGAC
53CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAACTGGCGTTGTCTCTCTC
53CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTTCGCCGTATACGTTAAAATCGAAAT
54CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAGAAGACGATTCTGGCTCTC
54CER	CTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCGTCGCCGTACACGTTAAAATCGA
55CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAATGGTTCAAAGCAATACCTGC
55CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTTTAATACGCAGATCGTTCTCGACC
56CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAAAAAAGGTTTATTGATGTTACCCCTG
56CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCGTTACCGCTTGTCTGTTTTTTGTGC
57CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGATACGTTTCGCAGTTGTTGGC
57CER	CTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCCGCCAGCGGCTGCGTA
58CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCTCTATTATCCGCCTCACCCCTGC
58CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTGGCGTTACCGGGGTAATCT
59CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGCTGAAGCTTGGTCTGAGC
59CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCTTCGACAGAGACGTTATCGAAGTGG
60CEF	ACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGTATCAAACATTATTTTCCGTTCCGC
60CER	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCCCCAGTTCACTCTTTTTATGGAAACCGTC

2.3.2 蛋白纯化

2.3.2.1 小量诱导表达候选抗原蛋白

将测序验证正确的重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)菌株中,挑取单菌落在 2 mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中过夜震荡培养,然后取出 50 μ L 接种到 5 mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中扩增震荡培养 4 h,最后使用终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h,离心收集菌体并用 5 mL 裂解缓冲液重悬,然后 60 kHz

超声 15 min 裂菌。待菌体完全裂解后，离心分离上清液和沉淀，分别取样并用 SDS-PAGE 电泳检测其中的候选抗原蛋白含量。

2.3.2.2 代表性抗原蛋白的诱导表达

挑取选定蛋白（Kpn037 和 Kpn049）的 *E. coli* BL21(DE3)工程菌株单菌落在 5 mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中过夜震荡培养，然后接种到 500 mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中扩增震荡培养 4 h，最后使用终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 37 °C 诱导 4 h，使用 Optima XE-90 超速离心机 7000 rpm 离心 30 min 收集得到菌体。

2.3.2.3 包涵体的收集和洗涤

使用裂解缓冲液重悬收集的菌体，经高压均质机在 100 Mpa 充分裂解 15 min 后，12000 g 离心 30 min 收集包涵体。弃上清液，再使用包涵体洗涤液将收集得到的包涵体充分重悬，40 kHz 超声清洗包涵体 10 min 以除去附着在包涵体上的其它杂质，使用 Sorvall™ ST 40R 台式冷冻离心机 12000 g 离心 30 min 收集包涵体，重复弃上清液和超声洗涤操作，反复 4 次以充分去除黏附的脂质和糖类物质。

2.3.2.4 包涵体的溶解和蛋白复性

洗涤完成后，离心收集包涵体并弃上清，使用包涵体溶解液将包涵体充分重悬，4°C 静置过夜溶解包涵体。待包涵体完全溶解后，采用梯度透析的方法去除尿素以使目的蛋白复性：将溶有变性蛋白的溶解液注入透析袋，置于 1 L 尿素浓度为 6 M 且其它成分不变的包涵体溶解液中 4°C 过夜透析，次日弃去 300 mL 外液，加入等量不含尿素且其它成分不变的包涵体溶解液对其进行稀释，再过夜透析，如此反复梯度稀释外液和过夜透析，最终去除蛋白溶液中的尿素，使蛋白彻底复性。每次过夜透析后均先离心去除透析袋中产生的沉淀以防蛋白变性，最后一次透析直接使用裂解缓冲液作为外液以便后续的上样操作。

2.3.2.5 复性蛋白的纯化

取约 1.5 mL 的 Ni Sepharose 6 Fast Flow 镍离子螯合柱填料装柱，将复性后的蛋白上样至柱中，收集流穿液。先使用 500 mL 洗涤液 I 清洗以洗脱杂蛋白，同理再用等量洗涤液 II 洗脱杂蛋白，均收集流穿液。最后使用洗脱液进行彻底洗脱并用样品管以每管 1 mL 的量收集目的蛋白，SDS-PAGE 电泳检测所有流穿

液和各样品管中的产品。取纯度最高的样品管合并，注入到透析袋中，以 DPBS 缓冲液作为外液进行过夜透析，得到溶于 DPBS 中的蛋白产物。

2.3.2.6 蛋白产物的浓缩和浓度测定

使用 Amicon® Ultra-15 离心过滤装置对得到的蛋白产物进行浓缩，4 °C 4000 rpm 离心 30 min。然后使用 Pierce™ BCA Protein Assay Kit 测定浓缩后终产物的浓度，共设立 5 个标准品梯度（2 mg/mL – 0 mg/mL），每个标准品和样品都设立 3 个技术重复。

2.3.3 小鼠的免疫接种

2.3.3.1 重组蛋白疫苗的配制

取 200 µg 溶解在 DPBS 中的候选蛋白与 0.8 mg 氢氧化铝凝胶（明矾）佐剂混合，用 DPBS 补齐至 800 µL，制成重组蛋白疫苗，共配制 2 个候选蛋白。对照溶液为等体积的含有等量佐剂的 DPBS。

2.3.3.2 免疫接种和采血

将两支候选重组蛋白疫苗和对照溶液分别经皮下注射到 3 组 BALB/c 实验小鼠（每组 8 只）中，每只小鼠免疫 100 µL（即 25 µg 蛋白和 0.1 mg 佐剂）。每 10 日对小鼠进行一次加强免疫接种，共两次。每轮免疫后的第 5 日用割尾采血的方式收集小鼠血样，3000 rpm 离心 5 min 分离得到上层血清。每次免疫和采血后均测定和记录小鼠体重。

2.3.3.3 酶联免疫吸附试验（ELISA）检测小鼠血清抗体滴度

向 ELISA 包被缓冲液中添加候选蛋白使后者终浓度为 1 µg/mL，过夜包被 NEST 96 孔酶标板，每孔用量 100 µL。次日，弃去包被液并用清水冲洗 3 次，每孔加入 100 µL ELISA 封闭液，室温封闭 3 h 后弃去。向酶标板中加入新的封闭液，其中首排的 8 个孔中加入 148.5 µL，其余孔中加入 100 µL，然后将每组 8 只小鼠的血清样本各取 1.5 µL 加入到首排的 8 个孔中，充分混匀后从中取出 50 µL 加入到下一排，充分混匀，以此类推至第 12 排，以此逐级梯度稀释血清样品。常温静置 2 h 后，弃去各孔样品，每孔 200 µL PBST 清洗 3 次，加入 100 µL 1:20000 PBST 稀释的第二抗体。常温孵育 1 h 后，弃去各孔抗体，每孔 200 µL PBST 清洗 6 次，加入 100 µL 按 TMB A 液：TMB B 液 = 1:1 新鲜混合的 TMB 溶液反应 15 min 后用 50 µL 2 M 硫酸中止反应，将板置于酶标仪中测定波长 450 nm

处的吸光度。免疫小鼠的血清特异性抗体滴度采用 AUC (Area Under Curve) 法计算，即对每只小鼠的每个血清样本，拟合其在全部 12 个梯度稀释孔中的吸光值形成曲线，而后计算曲线下面积，作为样本的特异性抗体滴度。

2.4 数据分析

使用 GraphPad prism 8.0 和 Microsoft PowerPoint 2019 进行数据可视化和分析，各个实验所得数据的所有统计细节都在各自的图例中说明。

2.5 动物伦理

所有动物实验均由中国科学院深圳先进技术研究院实验动物管理与使用委员会 (IACUC) 批准。

三、研究结果

3.1 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的识别

由课题组其它成员完成，通过生物信息方法共识别出 60 个在不同肺炎克雷伯菌菌株间保守的表面蛋白，作为肺炎克雷伯菌疫苗的候选抗原蛋白（表 3.1.1）。

表 3.1.1 肺炎克雷伯菌疫苗的候选抗原蛋白名单

序号	蛋白编号	序号	蛋白编号	序号	蛋白编号
Kpn001	YP_005224688.1	Kpn021	YP_005224707.1	Kpn041	YP_005226780.1
Kpn002	YP_005225603.1	Kpn022	YP_005224764.1	Kpn042	YP_005227015.1
Kpn003	YP_005226907.1	Kpn023	YP_005224786.1	Kpn043	YP_005227097.1
Kpn004	YP_005228646.1	Kpn024	YP_005224916.1	Kpn044	YP_005227190.1
Kpn005	YP_005228659.1	Kpn025	YP_005224985.1	Kpn045	YP_005227191.1
Kpn006	YP_005228655.1	Kpn026	YP_005225062.1	Kpn046	YP_005227283.1
Kpn007	YP_005227124.1	Kpn027	YP_005225594.1	Kpn047	YP_005227380.1
Kpn008	YP_005227957.1	Kpn028	YP_005225601.1	Kpn048	YP_005227491.1
Kpn009	YP_005224586.1	Kpn029	YP_005225618.1	Kpn049	YP_005227544.1
Kpn010	YP_005225737.1	Kpn030	YP_005225641.1	Kpn050	YP_005227675.1
Kpn011	YP_005224884.1	Kpn031	YP_005225713.1	Kpn051	YP_005227739.1
Kpn012	YP_005226444.1	Kpn032	YP_005225731.1	Kpn052	YP_005227898.1
Kpn013	YP_005227956.1	Kpn033	YP_005225990.1	Kpn053	YP_005228067.1
Kpn014	YP_005226686.1	Kpn034	YP_005225997.1	Kpn054	YP_005228068.1
Kpn015	YP_005227938.1	Kpn035	YP_005226070.1	Kpn055	YP_005228397.1
Kpn016	YP_005228668.1	Kpn036	YP_005226073.1	Kpn056	YP_005228689.1
Kpn017	YP_005229510.1	Kpn037	YP_005226180.1	Kpn057	YP_005228948.1
Kpn018	YP_005224408.1	Kpn038	YP_005226424.1	Kpn058	YP_005229305.1
Kpn019	YP_005224612.1	Kpn039	YP_005226502.1	Kpn059	YP_005229358.1
Kpn020	YP_005224629.1	Kpn040	YP_005226523.1	Kpn060	YP_005229389.1

蛋白编号用黑色字体代表已完成克隆，用红色字体代表未完成克隆，用绿色字体代表已完成克隆、纯化和小鼠的免疫接种。

3.2 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的克隆

3.2.1 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的扩增为了获得编码候选抗原蛋白的基因，我选用临床上分离得到的致病肺炎克雷伯菌菌株 *K. pneumoniae* 260 作为目的菌株，提取了其基因组 DNA，而后通过 PCR 手段对编码候选蛋白的基因进行了扩增，最后成功得到 51 个基因的 PCR 产物。

3.2.2 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因表达载体的构建

为了使候选抗原蛋白基因可以在 *E. coli* BL21(DE3)工程菌株中高效表达，我选用 pET-28a(+)质粒作为表达载体，完成了 51 个基因 PCR 产物的克隆。所有克隆中目的基因的开放阅读框均通过测序检验，以确保目的基因的正确插入和其编码的蛋白质序列与分析得到的保守序列相一致。

3.3 肺炎克雷伯菌疫苗候选抗原蛋白基因的原核表达与纯化

3.3.1 小量诱导表达检测候选抗原蛋白表达情况

为了确定不同候选抗原蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)工程菌株中的表达情况，我用小量诱导表达的方法对最先克隆得到的 20 个表达载体进行了检测，发现除少量不表达和表达不稳定的蛋白外，其余所有候选蛋白均以包涵体的形式表达，其中 Kpn037 和 Kpn049 的表达量最高且较为稳定（数据未呈现）。因此，我选择以这 2 个蛋白为代表来检测其诱导小鼠产生免疫反应的能力。

3.3.2 Kpn037 和 Kpn049 候选抗原蛋白的表达与纯化

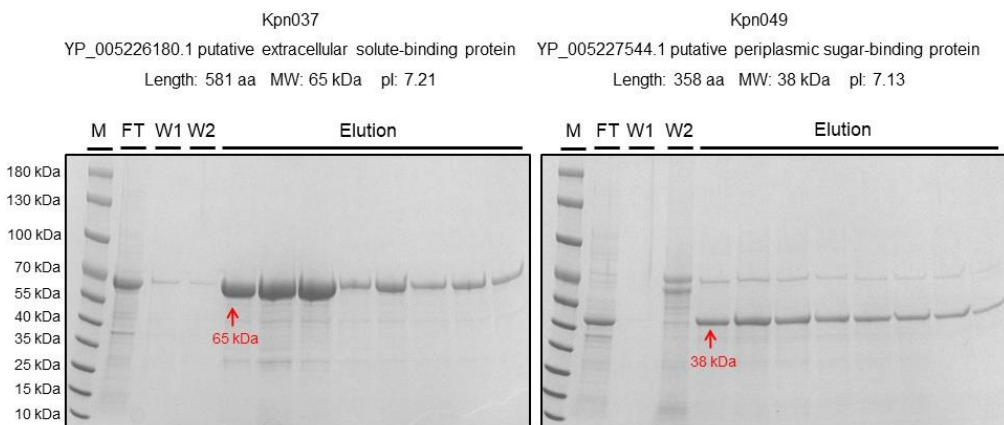


图 3.3.1 镍离子螯合柱纯化复性后的候选抗原蛋白

M，蛋白质 marker，各条带分子量如图所示；FT，镍离子螯合柱流穿液；W1，镍离子螯合柱洗涤液 I 清洗流穿；W2，镍离子螯合柱洗涤液 II 清洗流穿；Elution，洗脱液洗脱产物；红色箭头标注的是目的蛋白条带，蛋白质的名称和基本理化性质均在最上方标出

为了获得选定的 2 个抗原蛋白,我首先换用了更大的培养体系来扩增培养相应的 *E. coli* BL21(DE3)工程菌株。经 IPTG 诱导表达后,我对形成的包涵体颗粒进行了分离、洗涤、溶解和复性。由于洗涤过程并不能完全去除存在于包涵体表面和内部的杂质,我又将复性得到的蛋白上样到镍离子螯合柱中进行了纯化,以除去剩余的杂蛋白和多糖、脂质等非蛋白杂质,并利用 SDS-PAGE 电泳检测了纯化效果。如图 3.3.1 所示,上样后的流穿液中仅有少量不明显的杂蛋白条带,说明经反复洗涤后我已经去除了绝大多数的杂蛋白。洗脱后终产物中已基本不存在其它杂质,可用于配制疫苗和后续的小鼠免疫操作。

3.4 利用小鼠模型检测候选抗原蛋白的免疫原性

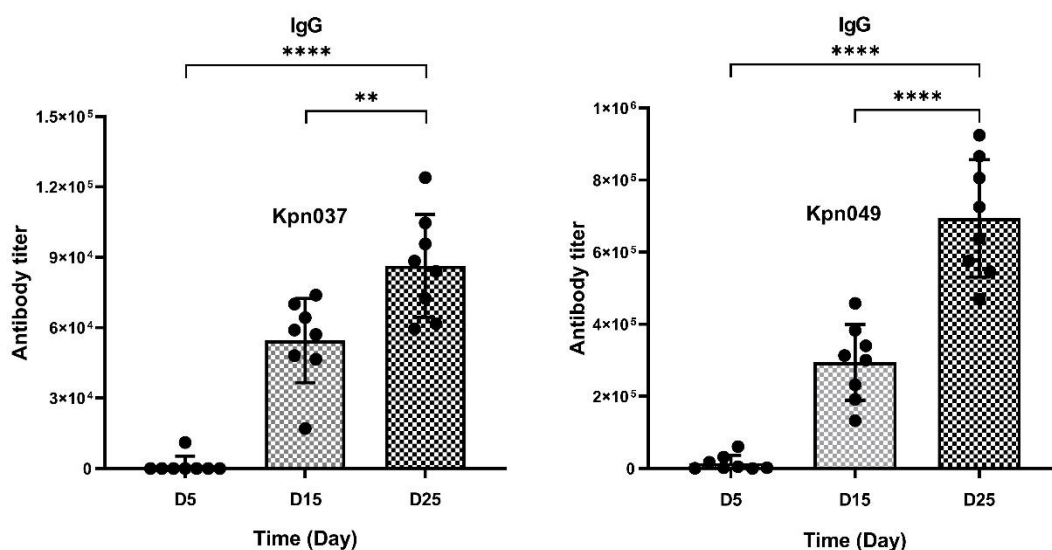


图 3.4.1 ELISA 检测免疫小鼠的体液免疫反应

$n = 8$ 只小鼠每组; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$; 使用单因素方差分析检验血清抗体滴度差异的显著性, 通过 Dunnett 多重比较检验法确定不同时间点采集血样中血清特异性抗体滴度差别

为了检测纯化得到的 2 个候选抗原蛋白诱导小鼠产生免疫反应的能力,我将其分别与铝佐剂配制成重组蛋白疫苗并对小鼠进行了免疫接种。为了增强免疫效果,我采取了三轮免疫的方案,即在第一次免疫后每隔 10 天进行一次加强免疫接种,共 2 次,每次免疫后的第 5 天采集小鼠血样并通过 ELSIA 检测特异性 IgG 抗体水平。如图 3.4.1 所示,可见在每一次加强免疫接种后,实验组小鼠血清中的特异性抗体滴度都会显著提升,其中 Kpn049 的免疫原性更强,能诱导小鼠产生更高滴度的抗体。因此,选定的 2 个候选抗原蛋白可以有效诱导小鼠的体液免疫反应,使其产生大量特异性抗体。

四、讨 论

4.1 成果的科学意义

肺炎克雷伯菌是临床上常见的多重耐药菌，也是临床抗感染治疗中的一大难题。相较于使用敏感抗生素和被动免疫疗法而言，接种疫苗对于预防耐药菌感染而言往往是更为经济有效的方法。本研究中，我们利用生物信息方法识别出了一系列高度保守的胞外表面蛋白作为肺炎克雷伯菌疫苗的候选靶点，完成了相应基因的克隆并初步评估了其中 2 个候选蛋白的免疫原性，证明其可以有效诱导小鼠的体液免疫反应，使其产生高滴度的特异性抗体。本研究的成果再次预示了表面蛋白作为肺炎克雷伯菌疫苗靶点的良好发展前景，为有关蛋白质疫苗的研发提供了一定的理论依据和实践经验，也有望为其它替代疗法，如单克隆抗体的研发提供帮助。

4.2 局限性

本研究也有许多局限之处：

首先，本研究是采用小鼠模型来检测候选抗原蛋白的免疫原性且仅检测了经抗原接种后小鼠产生的体液免疫反应，而没有对其它类型的免疫应答进行更深入的探索。考虑到哺乳动物的免疫系统和免疫反应是高度复杂的，因此尽管本研究中小鼠在三轮免疫后产生了高滴度的抗体，但是抗体的存在并不意味着小鼠对肺炎克雷伯菌已经具有了足够强的免疫力。只有进一步开展攻毒实验并统计肺炎克雷伯菌感染后小鼠的存活率，我们才能直接检验接种候选重组蛋白疫苗对肺炎克雷伯菌感染的保护作用。

其次，细菌的许多胞外表面蛋白，尤其是外膜蛋白，都具有疏水结构域，使它们在诱导表达时倾向于形成包涵体结构。相较于可溶性表达的蛋白而言，包涵体蛋白的纯化工艺一般都更为复杂，纯化所需的周期较长、成本较高，相对而言难以快速批量生产，而且蛋白产物一般稳定性差，容易发生降解，难以进行保存和运输，这些都会对蛋白质疫苗的实际生产和应用造成不利影响。同时，受条件限制，尽管我对分离得到的包涵体进行了反复的洗涤并且用镍离子螯合柱对复性后的蛋白进行了二次纯化，最后得到的目的蛋白产物中依然有少量杂蛋白存在，

这些杂质可能会对后续的免疫接种和小鼠的免疫反应产生未知的影响，造成测得的血清特异性抗体滴度不够准确。

4.3 研究展望

基于目前得到的结果，我认为未来的工作可以集中在如下几个方面：

第一，继续表达和纯化剩余的候选蛋白，并对小鼠进行免疫接种。由于本研究中已测试的 2 个代表性抗原蛋白均能有效诱导小鼠产生特异性抗体，因此我们有理由相信剩余的表面抗原蛋白也具有良好的开发潜力，可以继续测试它们作为肺炎克雷伯菌疫苗抗原的有效性。同时，我们需要采用更多手段检测接种后小鼠产生的免疫反应，包括但不限于利用酶联免疫斑点技术（ELISPOT）检测免疫接种后小鼠脾 T 细胞分泌细胞因子的能力，以评估候选抗原蛋白能否有效诱导细胞免疫反应；利用调理吞噬杀菌实验检测血清抗体的调理作用，以检测抗血清是否能够有效促进调理吞噬作用；以及利用攻毒试验来测试重组蛋白疫苗对肺炎克雷伯菌感染的总体保护效应。为了验证候选抗原的保守性，在攻毒实验时应注意选用多个代表性的肺炎克雷伯菌毒株感染小鼠，以确保重组疫苗有较高的血清型覆盖率。

第二，针对候选抗原蛋白的表达和纯化工艺进行优化，缩短抗原蛋白的生产周期，降低纯化成本。例如，可以在分子克隆时去除蛋白中的疏水性跨膜结构域，或者添加与抗原蛋白融合表达的促溶标签^[10]，从而降低外源蛋白在大肠杆菌工程菌株中表达时形成包涵体的可能，使其以可溶形式表达以便于直接通过亲和层析柱纯化；增加其它的纯化步骤以提高蛋白产物的品质，如使用分子筛纯化以进一步去除其余杂蛋白以及使用离子交换树脂去除残留的内毒素，防止对后续的免疫接种造成干扰。

第三，考虑到疫苗生产成本和产品稳定性的问题，我们可以尝试寻找候选蛋白中有效的线性表位序列，去除无免疫原性的序列，仅纯化部分肽段作为多肽抗原。与重组蛋白抗原相比，多肽抗原可以直接通过化学方法合成且在水中的溶解度较高，易于储存，因而其在生产成本和可重复性等方面都具有明显的优越性^{[11][12]}。在设计多肽抗原时，我们往往需要借助一些抗原表位识别工具来预测蛋白中的 B 细胞和 T 细胞抗原表位^{[13][14]}，将不同类型的抗原表位融合表达或合成，以提高多肽抗原的免疫原性，使其可以同时诱导多种类型的免疫应答，增强其对

肺炎克雷伯菌感染的保护作用。不仅如此，在识别出多种抗原表位序列后，我们还可以借助 Ala 扫描或组合方法来研究每个氨基酸残基在抗原抗体识别中的作用，然后通过缝合插入获得线性侧翼修饰的表位或环状表位^{[14][15]}，同样可以提高多肽抗原的免疫原性。这样设计和合成得到的多肽抗原可以被包裹在病毒样颗粒、脂质体、聚合物微米/纳米颗粒或树枝状大分子等特定的递送载体中进行接种^[16]，以保护其免于被降解，从而最大限度地发挥其作用。

参考文献

1. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella Pneumoniae*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018,8(4).
2. Jun JB. *Klebsiella Pneumoniae* Liver Abscess[J]. *Infect Chemother*, 2018,50(3):210-218.
3. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella Pneumoniae* Infection Biology: Living to Counteract Host Defences[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43(2):123-144.
4. Govindaraj Vaithinathan A, Vanitha A. WHO Global Priority Pathogens List on Antibiotic Resistance: An Urgent Need for Action to Integrate One Health Data[J]. *Perspect Public Health*, 2018,138(2):87-88.
5. Follador R, Heinz E, Wyres KL, et al. The Diversity of *Klebsiella Pneumoniae* Surface Polysaccharides[J]. *Microb Genom*, 2016, 2(8):e000073.
6. Dreisbach A, van Dijk JM, Buist G. The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*[J]. *Proteomics*, 2011,11(15):3154-3168.
7. Grandi G. Genomics and proteomics in reverse vaccines[J]. *Methods Biochem Anal*, 2006,49:379–393.
8. Zhang BZ, Hu D, Dou Y, et al. Identification and Evaluation of Recombinant Outer Membrane Proteins as Vaccine Candidates Against *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Frontiers in immunology*, 2021,12:730116.
9. Olaya-Abril A, Jiménez-Munguía I, Gómez-Gascón L, et al. Surfomics: shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins[J]. *J Proteomics*, 2014,97:164-176.
10. Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2006,17(4):353-358.
11. Tizzano B, Palladino P, De Capua A, et al. The human prion protein $\alpha 2$ helix: a thermodynamic study of its conformational preferences[J]. *Proteins*, 2005,59(1):72–79.
12. Li W, Joshi MD, Singhanian S, Ramsey KH, et al. Peptide vaccine: progress and challenges[J]. *Vaccines*, 2014,2(3):515-536.
13. Hager-Braun C, Tomer KB. Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry[J]. *Expet Rev. Proteonomics*, 2005,2(5):745-756.
14. Lau YH, de Andrade P, Wu Y, et al. Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries[J]. *Chem. Soc. Rev*, 2015,44(1):91-102.
15. Gödel P, Windmann S, Dietze KK, et al. Modification of one epitope-flanking amino acid allows for the induction of friend retrovirus-specific CD8⁺ T cells by adenovirus-based immunization[J]. *J Virol*, 2012,86(22):12422-12425.
16. AAllahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2016,12(3):806-828.

致 谢

感谢香港大学与中国科学院深圳先进技术研究院黄建东和张宝中老师在百忙中抽出时间指导我完成本次毕业设计，从论文选题到查阅文献，再到具体的实验细节和课题规划，他们都给出了许多宝贵的建议，进行了细致入微的指导，没有他们的关心和鼓励，就没有我论文的顺利完成。感谢我在深圳先进院的各位同学同事，他们在我开展实验的过程中为我提供了很多的帮助，并在我遭遇困难时给予了安慰与鼓励，为我提供了源源不断的动力。

感谢我在复旦大学生命科学学院的导师蔡亮老师，他是我在学术道路上的启蒙者，我在蔡老师的实验室进行了长达两年的研究，积累了大量的研究经验，为进行本论文的研究打好了基础。同时也要感谢蔡老师实验室的各位学长，我从他们那里学到了许多实践上的经验和对未来道路的规划。尤其是胡叶凡学长，是他为我介绍了此次深圳之行的机会，没有他的帮助就没有本论文的产生。