



国外优秀科技著作出版专项基金资助

GENOMICS PROTEOMICS
and VACCINES



基因组学、 蛋白质组学与疫苗

[意] 圭多·格兰迪 (Guido Grandi) 主编

马贤凯 王嘉玺 梁龙 岳俊杰 译



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心



国外优秀科技著作出版专项基金资助

GENOMICS PROTEOMICS
and VACCINES

基因组学、 蛋白质组学与疫苗

[意] 圭多·格兰迪 (Guido Grandi) 主编
马贤凯 王嘉玺 梁龙 岳俊杰 译



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

基因组学、蛋白质组学与疫苗/[意] 格兰迪 (Grandi, G.) 主编; 马贤凯等译. —北京: 化学工业出版社, 2006. 6

书名原文: Genomics Proteomics and Vaccines

ISBN 7-5025-8488-9

I. 基… II. ①格…②马… III. ①基因组-应用-疫苗-研制-研究②蛋白质-基因组-应用-疫苗-研制-研究 IV. R979. 9

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 029334 号

Genomics Proteomics and Vaccines/by Guido Grandi

ISBN 0-470-85616-5

Copyright © 2004 by John Wiley & Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO198SQ, English. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by John Wiley & Sons, Ltd.

本书中文简体字版由 John Wiley & Sons, Ltd. 授权化学工业出版社独家出版发行。未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2005-2462

基因组学、蛋白质组学与疫苗

[意] 圭多·格兰迪 主编

马贤凯 王嘉玺 梁龙 岳俊杰 译

责任编辑: 梁静丽 叶露

文字编辑: 周 侗

责任校对: 于志岩

封面设计: 胡艳玮

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印装

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 16¼ 字数 280 千字

2006年7月第1版 2006年7月北京第1次印刷

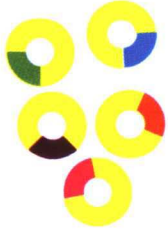
ISBN 7-5025-8488-9

定 价: 40.00 元

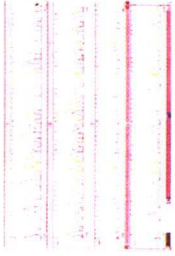
版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

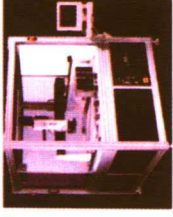
1. 建库



10. 编辑



2. 挑选克隆



3. 制备模板



8. 确定重复片段



4. 测序反应



7. 拼接



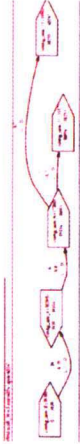
5. 电泳



6. 识别碱基



9. 搭建框架，填补空白



11. 注释和分析

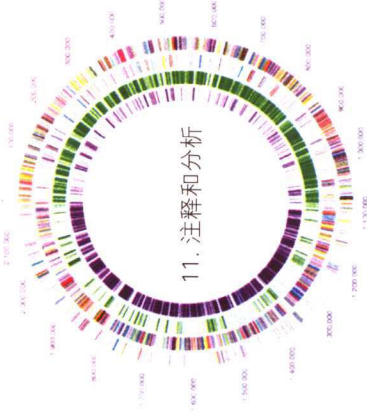


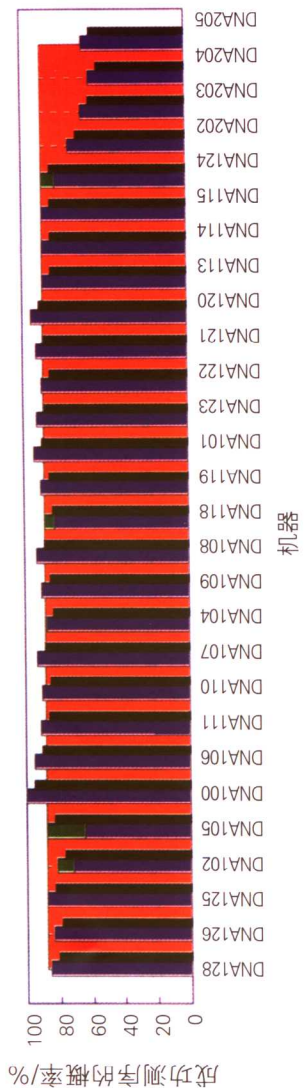
图 3.1 细菌病原体全基因组鸟枪法测序的主要步骤和基因组信息分析

Graph/top navigation

- machine
- catalyst
- db
- gel_run_pin
- rxn_run_pin
- rxn_lot
- primer_lot

Data navigation

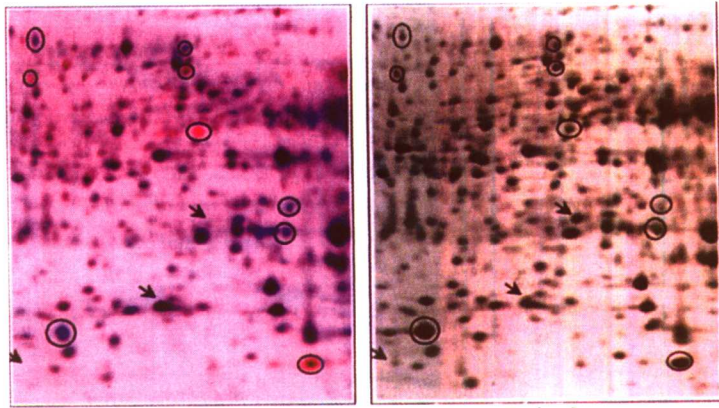
- machine
- catalyst
- db
- gel_run_pin
- rxn_run_pin
- rxn_lot
- primer_lot
- bad gels
- group gels



数据自2002年5月28~29日

数据库	总良好数	总测序数	成功率/%	VEIR	VEIR 所占比例/%	平均编辑序列速长	平均质量
<u>gra</u>	226	288	78.5 -9.4	2	0.7	647 -37	31.7 +0.1
<u>gtd</u>	8	12	66.7 -21.2	0	0.0	634 -50	27.9 -3.7
<u>mbb</u>	6	6	100.0 +12.1	0	0.0	1278 +594	30.4 -1.2
<u>osg</u>	533	626	85.1 -2.8	29	4.6	747 +63	32.5 +0.9
<u>pvg</u>	3725	4128	90.2 +2.3	31	0.8	667 -17	31.5 -0.1
<u>rbe</u>	173	192	90.1 +2.2	0	0.0	718 +34	31.6 -0.1
<u>research</u>	186	192	96.9 +9.0	0	0.0	632 -52	30.8 -0.8
<u>tbg</u>	16	24	66.7 -21.2	0	0.0	562 -122	30.7 -0.9
<u>tcrg</u>	2228	2398	92.9 +5.0	3	0.1	738 +54	32.4 +0.8
<u>tgq</u>	1327	1440	92.2 +4.3	0	0.0	718 +34	32.4 +0.8
Totals	12435 (avg: 444)	14154 (avg: 506)	87.9	128	0.9	684	31.6

图 3.3 高通量测序设施所产生的序列的质控控制



Cy染色图像

SyproRuby 图像

图 5.4 乳腺癌ErbB 2转化细胞经Cy3和Cy5染色(DIGE技术)的N-琥珀酰亚胺酯差异标记(经允许引自: Gharbi等, 2002)

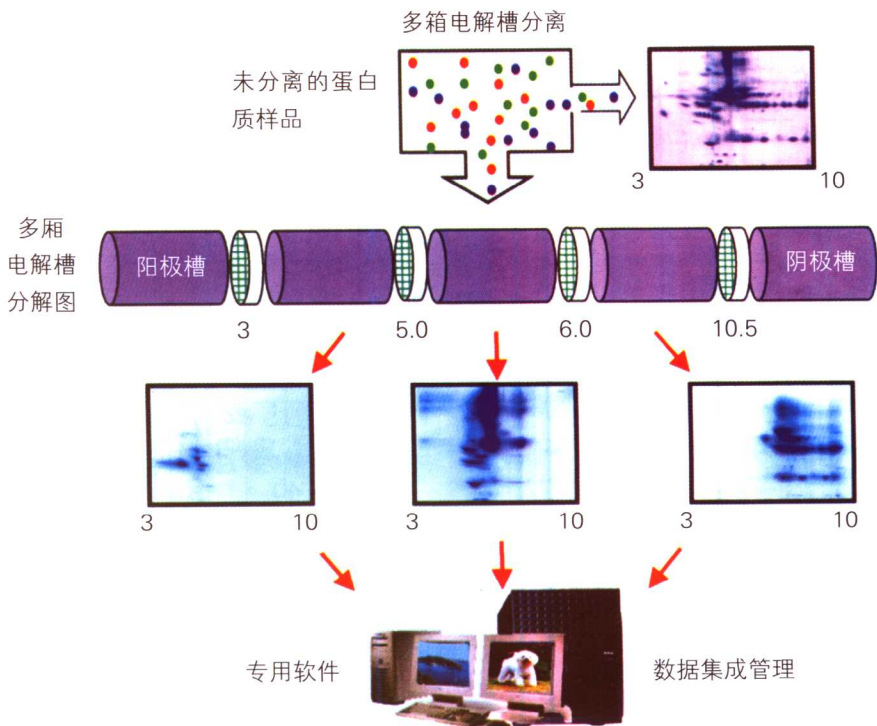


图 5.5 基于多槽电解仪的样品预分离示意

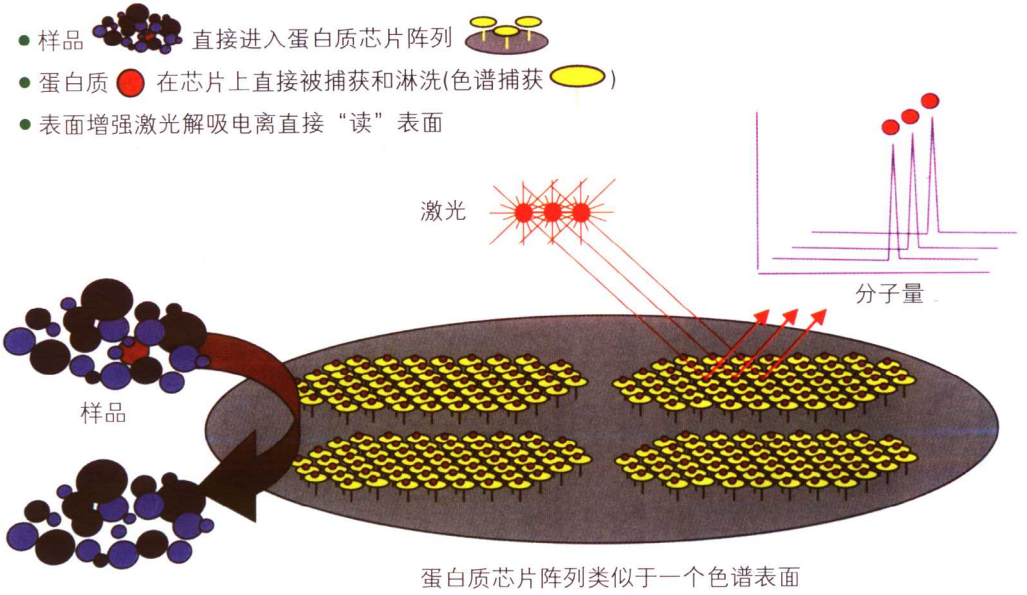


图 5.9 不同化学表面捕获（色谱吸附）的不同蛋白质种类的检测和处理示意（经CIPHERGEN 允许）

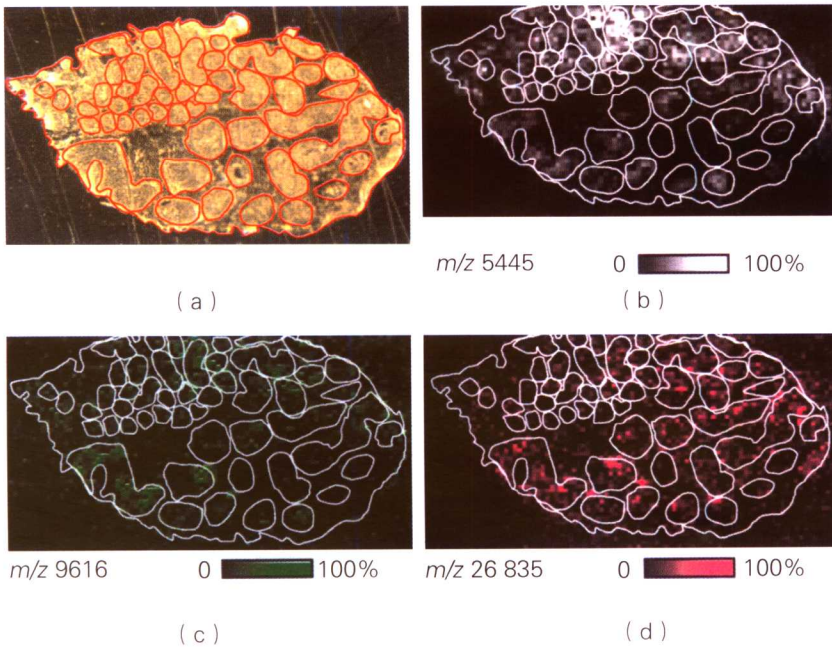


图 5.10 质谱成像

国外优秀科技著作出版专项基金

FUND FOR FOREIGN BOOKS OF
EXCELLENCE ON SCIENCE AND TECHNOLOGY
(FFBEST)

管理委员会名单

名誉主任：成思危 全国人大常委会副委员长
主任委员：谭竹洲 中国石油和化学工业协会名誉会长
副主任委员：李学勇 王心芳 阎三忠 曹湘洪
潘德润 朱静华 王印海 龚七一
俸培宗 魏 然

委 员(按姓氏笔画顺序排列)：

王子镐	王心芳	王印海	王光建	王行愚
申长雨	冯 霄	冯孝庭	朱家骅	朱静华
刘振武	杨晋庆	李 彬	李伯耿	李学勇
李静海	吴剑华	辛华基	汪世宏	欧阳平凯
赵学明	洪定一	俸培宗	徐 宇	徐静安
黄少烈	曹 光	曹湘洪	龚七一	盛连喜
阎三忠	葛 雄	焦 奎	曾宝强	谭竹洲
潘德润	戴猷元	魏 然		

秘书长：魏 然

副秘书长：徐 宇

译者名单

- 马贤凯 军事医学科学院基础医学研究所
(前言, 第1章, 第2章, 第11~13章)
- 王嘉玺 军事医学科学院基础医学研究所 (第8~10章)
- 梁 龙 军事医学科学院生物工程研究所 (第3章, 第4章)
- 岳俊杰 军事医学科学院生物工程研究所 (第5~7章)

中文版序言

疫苗免疫接种可使受种者产生针对相应病原体的免疫力，是预防与控制传染病的有效措施。如全球通过普遍种痘消灭了天花，强化小儿麻痹疫苗接种在许多国家和地区消除了小儿麻痹症；我国自开展计划免疫以来，麻疹、白喉等的发病率大幅度地下降，并已进入消除麻疹时代。但也有些新现和再现传染病，其病原体能逃逸机体的免疫反应，或通过在不同宿主间的传播而发生变异，采用现有的疫苗设计策略研发针对这类疾病的疫苗已难奏效。新疫苗的研制面临挑战。

随着基因组学和蛋白质组学技术的发展和运用，一个崭新的疫苗设计策略已经形成，即以基因组序列为基础的“反向疫苗学”。通过对某一病原体的基因组测序和计算机预测，筛选可能编码疫苗抗原的基因，通过高通量克隆、表达和纯化技术，即可进行保护力的测定。这种疫苗设计策略可缩短筛选、鉴定候选疫苗的时间并提高成功概率。

“反向疫苗学”的疫苗设计思路，已应用于 B 群脑膜炎球菌疫苗的开发。B 群脑膜炎球菌与 A 群脑膜炎球菌和 C 群脑膜炎球菌不同，其多糖的免疫原性极弱，即使与蛋白质偶联后也不能增强其免疫原性；其外膜蛋白则可诱生杀菌抗体，但有严格的型和亚型特异性。采用反向疫苗设计策略，已筛选到一些蛋白抗原，能诱发对绝大多数临床分离株的杀菌力。这种反向疫苗设计思路亦已应用于链球菌、肺炎衣原体和铜绿假单胞菌等疫苗的研发。

常规的疫苗设计基于保护性免疫是由结构蛋白所激发的原理，而反向疫苗设计是基于将所有的蛋白质看做是潜在的具免疫性抗原的思路。如 HIV 疫苗的研究，耗时 20 年，只研究了表达病毒的包膜蛋白（如 gp120、gp140 或 gp160）以及这些抗原的结构域。而近期研究发现，病毒基因组可提供一些非结构蛋白抗原，这些抗原在病毒生活周期中含量少且短暂，是 HIV 的早期蛋白，比如使用 Tat、Rev、Pol 等抗原进行实验研究已获得一定结果。提

示反向疫苗设计策略应用于针对高变异率的 HIV、HCV 等病毒疫苗的研发也具有实际意义。但是这种以基因组序列为基础的反向疫苗设计策略也有其局限性，不能适用于非蛋白抗原（如多糖抗原）的选择。

本书由分子生物学家马贤凯教授主译。中文版《基因组学、蛋白质组学与疫苗》译者遵循原著，系统介绍了一种综合应用基因组学、蛋白质组学和生物信息学等技术组成的研制疫苗的技术平台，形成一个新的疫苗设计策略；相关技术章节包括基因组测序和分析、DNA 微阵列、质谱分析及高通量蛋白质表达和纯化技术等。采用反向疫苗设计策略研制新疫苗，给我们带来了新的观念和认识，对促进我国疫苗学研究有重要意义。

本书是疫苗工程最新进展的专著，内容新颖、实用性强，为从事疫苗研究和开发的科技人员提供了一部既有基础理论又能指导实践的案头书，医药院校、科研院所从事相关专业的科技人员阅读后也会受到启迪。

赵铠

中国工程院院士

2006年4月28日

前 言

我一直对自公元前 11 000 年（地质学家称之为新生代农业定居社会的开始）有关人类文化和文明兴衰的历史入迷。

用数学术语来讲，描述特定社会繁荣随时间变化的复值函数取决于几个常互相联系的变数。这些变数包括：可种植或驯养的动植物品种（是从狩猎到农垦时代的过渡所必不可缺的）、气候、所占土地的肥沃程度以及出现的性格坚强和具备领导能力的个人。另外一个重要的变数——即使在历史教科书中也是经常出乎意料地被忽视的——就是人类对微生物和传染病的易感性。事实上，人类历史上重要的变迁不能说是由一系列病原体引起的流行病造成的，但常是与之有联系的。著名细菌学家汉斯·秦瑟（Zinsser）曾写道：“士兵很少赢得战争。他们更多的是遭遇了瘟疫的阻拦而溃灭。斑疹伤寒、鼠疫、霍乱、伤寒、痢疾较凯撒、汉尼拔和拿破仑更多地左右了战役的结果。”有几个被很好地纪录下来的实例支持汉斯·秦瑟的观点，突显人类命运常受疾病的影响。

公元前 430 年，斯巴达（Sparta）和伯罗奔尼撒（Peloponnesian）联盟向当时处于文化和权力之巅的雅典人开战。斯巴达人迫使无数村民进入雅典城墙内避难，城市拥挤不堪，瘟疫接踵而来，使大批雅典人死亡。瘟疫使雅典变得如此衰弱，以致其虽拥有强大的海军队伍，但还是花费了 30 多年的时间才打败了斯巴达；同时，为之付出的代价是这一城市再也不能恢复其政治和文化上的盛世光景。

罗马帝国的解体总被认为是由于异教徒的颓废生活方式所导致的，人民因此而沉湎于纵乐而不去保卫帝国边疆、防止夷蛮入侵。但是历史学家很少注意到在第二世纪后，欧洲日益频繁出现的新的危害性疾病。3 次有名的瘟疫和伴随而来的饥荒使罗马帝国的人口锐减、士气低落。公元 452 年，凶猛不可一世的匈奴王兵临罗马城下，但没有进城，反而裹足、后撤。撤兵曾被认为是由于教皇里奥一世（Pope Leo I）的劝说有力，事实上罗马城当

时瘟疫（很像天花）肆虐，流行几次以后人口仅有数千。西罗马帝国于公元476年崩溃。

接着，6世纪东罗马帝国皇帝重新征服西部领土。公元542年他几乎收复了北非、西西里和西班牙的一部分领地。但是在他光辉的战役中，第一次确切记载了腺鼠疫的暴发，即人类历史上最惨重的瘟疫之一。拜占廷（Byzantine）史学家将之描述为“是一次人类几近灭绝的瘟疫”。疫情过后，40%的君士坦丁堡居民死亡。直到公元590年鼠疫还经常光顾该地，局部地区的暴发又持续了150年，导致很多地区的人口再次减半。东罗马帝国皇帝想重新征服西部领土的梦想永远未能实现。

14世纪的欧洲经历着一个文化增长和扩展的时期。人口增加、十字军东征和商贸来往使欧洲和中东、阿拉伯及中国有所接触，这有利于促进文化教养，也即以后所谓的文艺复兴。后来这种兴旺发展因受到人类历史上最坏的灾难干扰而遭到阻断，即第二次腺鼠疫的大流行——黑死病（black death）。此病在欧洲始于1347年夏，来自克里米亚（Crimean）染有该病的热那亚（Genoese）商贾传入。这些商人曾到过港口城市克法（Kaffa），鞑旦可汗（Janibeg, Khan of Tartars）围攻该城时曾将感染鼠疫的尸首弹射到城墙内，从而引起疾病流行。疾病很快传播到所有欧洲主要城市，估计欧洲、北非和亚洲约有近半数人口死于这次长时间流行的瘟疫。这些致使欧洲人生活的各个方面，从文艺到商贸无不受到严重摧残，而疫后的劳动力缺乏也正是导致欧洲参与奴隶买卖的原因之一。

征服美洲常归结于西班牙入侵者的勇敢和凶残，以及欧洲移民成功地击败了土著居民。但当西班牙Cortés带领300名士兵进攻阿兹台克（Aztec，墨西哥原始居民国首都）时发现，原来有30万人口的城市由于天花的流行而几乎是人民死绝，遍地是印第安人的尸体，几乎无立足之地。天花是由Cortés的一名感染了特殊毒株的非洲奴隶引起的，但西班牙士兵对它有免疫力。在Cortés到达墨西哥不到50年的时间内，3000万土著居民只剩下了300万，其中1800万死于天花。同样，秘鲁（Peru）在西班牙入侵后的200年中也有80%的印加（Inca）居民消失。

在北美，土著居民同样遭受了由欧洲入侵者带来的病菌的威胁：主要是天花和麻疹不断使印第安人死亡，使原有的1亿人口减少了90%。欧洲人成功地实施了所谓的社会生态学的帝国扩张主义，把他们的语言、宗教和政治权力强加给当地人民，从而使原有的生态系统完全被引进的植物和动物品种所欧化了。

直至20世纪中叶，传染病仍是人类第一位的死亡原因，它们继续影响着人类的文化和文明，在使免疫力强的人群得到了增长的同时，易感染、免

疫力弱的人群也为之付出了巨大的代价。

20 世纪下半叶，在延长人的寿命上出现了两场史无前例的革命，即大规模应用抗菌药物和疫苗接种。从而使细菌感染第一次能被有效制止，一些致命的病毒和细菌性疾病如天花、脊髓灰质炎、狂犬病、破伤风和白喉都可以加以预防。在抗生素和疫苗均能充分供应的发达国家，传染病早已从死因首席中让位于癌症和心血管病。疫苗的普遍接种消灭了天花，脊髓灰质炎和麻疹疫苗有望在今后数年内获得相似的结果。

抗生素和疫苗如此有效，使人产生一种幻觉，好像人们很快可以生活在一种健康的没有病菌的环境中。事实上远非如此。经过数百万年的演变，微生物学会了迅速适应急剧变化的环境。相对简单的遗传物质和极大的个体数量允许它们通过自发突变和获取外来遗传物质，以更有效地应对环境的变化。这种机制容易造就耐药菌株的出现。今天的科学家和医生把耐药菌的迅速扩展视为对人类今后健康的严重威胁。

疫苗是防止人类和动物被病菌和病毒感染的非常有效的方法。利用机体的免疫功能，经过初次病菌感染的存活者能对同一病原体产生免疫。疫苗之所以优于抗生素不仅在于其能预防传染病，而且从长远来讲还能消灭传染病（天花就是一个实例）。目前市场上已有针对 25 种病原体的多种剂型的疫苗，如果所有国家的卫生和政治权威机构能够同心协力开展全球疫苗接种运动，就能消除地球上的很多病原体。

但是就像抗生素一样，疫苗也面临着类似于细菌为适应环境发生变异的困境。病原体发展了两类躲过机体免疫监视的方法：一方面很多病原体具有躲避机体免疫反应的能力，如一些胞外细菌产生了针对不同化学物质的外膜保护层；人类免疫缺陷病毒（HIV）则能入侵 CD4⁺ T 淋巴细胞，后者是免疫系统的重要角色，使人类免疫缺陷性疾病如此难对付。另一方面病原体发展了能感染不同种宿主的能力，这也是它们保证生存繁殖的一个妙方；从一个宿主入侵到另一个宿主，使它们获得了用以演变应对其他先前宿主免疫反应手段的时间；一个例证就是流感病毒，由于它能感染多种动物，从鸟类到猪，因此很容易再回来感染人。

由于病原体进化出了这两类抵抗免疫反应的方法，这就是人类为何难以开发出诸如 HIV、丙型肝炎（HCV）、A 群链球菌、葡萄球菌、恶性疟原虫和血吸虫等病原体的疫苗，以致至今尚无可用的疫苗。这也解释了人畜病原体新种的出现，如 HIV 和新近出现的重症急性呼吸综合征（SARS）冠状病毒一般属高感染强毒菌种。无疑，人和家畜密度的指数增长将会加剧今后新的传染病暴发的危险。

总的来说，“我们将生活在没有病原体环境中”的美丽设想是一种乌托

邦空想。更为实际的是，我们自身和子孙后代的健康将取决于我们是否能找到新的、快速的、有效的开发抵御已经存在的和今后不可避免还会出现病原体疫苗的策略。

本书的目的是全面阐述并举例说明一种具有潜在替代现用的寻找疫苗方法的策略。

传统疫苗的开发采用两种技术。第一种技术是将病原体或减毒的非致病生物在合适的人工条件下培养、收集、灭活和配置。此法在 200 年前由爱德华·詹纳 (Edward Jenner) 首先试用，后经巴斯德使之合理化，很有成效，但存在两个主要缺点。第一，有些病原体很难实现人工规模培养（如恶性疟原虫只能在蚊子唾液腺中生长）；第二，现在卫生管理部门对新的疫苗制剂提出了极高的安全和质控要求，基于活的或灭活的微生物所得的新的疫苗品种要获取批准越来越难。

第二种技术是基于利用病原体的某些分离成分，单独用之能引发对整个病原体的保护免疫反应。这种技术的一大优点是安全，即疫苗没有诱发疾病的风险（但脊髓灰质炎疫苗是一种减毒活疫苗，虽非常有效，但百万接种者中会有一个因接种疫苗而得病）。而且如该成分能用基因工程法生产，则可免去培养病原体的程序。此技术的主要缺点是，要在病原体浩瀚的分子库中鉴定出几个保护性成分是非常复杂且耗时的。

本书阐述新的疫苗寻找策略是基于基因组和后基因组技术，以提供缩短鉴定候选疫苗所需时间的方法，并增强成功的概率。

2001 年，人类基因组全序列的公布标志着基因组学和后基因组学技术已面临一个分水岭。这项技术虽然已开始产生出了巨大的科学发现，但广泛将人类基因组序列用于解决实际问题尚需时日。将基因组学和后基因组学技术应用到研究病毒和细菌性病原体方面，不仅从科学的视角看同样重要，而且还有很快转化为有用产品和工艺的潜能。

书中通过实例说明确定了细菌的基因组、转录组和蛋白质组，为从组成某一病原体的浩瀚的分子大海中寻找几个能引发保护性免疫反应的蛋白质提供了机遇。一旦确定，所选定蛋白质即能经高通量克隆、表达、纯化，并进行适当的与保护相关的测定。

此方法第一个成功的例子是由 Pizza 等发表在 2000 年 "Science" 杂志上的方法。他们指出如何从一致病菌——奈瑟脑膜炎球菌基因组序列资料开始，找到了从未报道过的新候选脑膜炎疫苗。根据奈瑟菌范例，正式将此法命名为“反向疫苗学”，专业科学文献报道了其他几个例子，说明用此法寻找细菌疫苗具有通用性。

因此，出版一本详细介绍什么是“反向疫苗学”，它所涉及的最相关的

技术以及几个有意义的成功实例的书是符合时代发展需求的。

本书由三部分组成。第一部分“绪论篇”向读者介绍疫苗学的历史，并提供今后疫苗研发的可能信息。这部分还包括一章详述基因组、转录组和蛋白质组如何在寻找新的疫苗中起到互补作用的内容。

第二部分“技术篇”用于描述相关技术，包括基因组测序和分析、DNA微阵列、双向电泳、双向色谱、质谱及高通量蛋白质表达和纯化技术。各章均附大量参考文献以供读者深入了解每种技术。

第三部分“应用篇”列举几个应用基因组学和后基因组学开发新疫苗的例子，包括以前（至2003年8月）尚未发表的数据。此部分有几章提供了与临床上几个重要的致病细菌有关的生物学和发病机理方面的参考资料。

圭多·格兰迪

于锡耶纳，2003年8月10日

前言中的部分概念及历史资料源自下述4本书，读者可以查阅参考。

Jared Diamond *Guns, Germs and Steel – The Fate of Human Societies*, W. W. Norton & Co. New York, London

Arno Karlen *Man and Microbes – Disease and Plagues in History of Modern Times*, Simon & Schuster

Sheldon Watts *Epidemics and History. Disease, Power and Imperialism*, Yale University Press, New Haven and London

Norman F. Cantor *In the Wake of Plague – The Black Death and the World it Made*, Perennial.

原著作者名单

Pierre F. Baldi 美国加州大学欧文分校、信息和计算机科学学院、基因组学和生物信息学研究所（邮编：CA 92697, USA）

Giuliano Bensi 意大利锡耶纳凯龙疫苗研究所（Via Fiorentina 1, 53100 Siena, Italy）

Pierre-Alain Binz 瑞士日内瓦瑞士生物信息研究所，蛋白质组信息学组（CMU, Michel Servet 1, 1211 Geneva, Switzerland）

Svend Birkelund 丹麦奥尔胡斯大学卫生科学系、医学微生物和免疫学教研室（University Park 240, DK-8000 Aarhus C, Denmark）

Gunna Christiansen 丹麦奥尔胡斯大学卫生科学系、医学微生物和免疫学教研室（University Park 240, DK-8000 Aarhus C, Denmark）

Stuart J. Cordwell 澳大利亚蛋白质组分析实验室（Sydney, Australia 2109）

Tamara Feldblyum 美国基因组研究所（TIGR, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, USA）

Oretta Finco 意大利锡耶纳凯龙疫苗研究所（Via Fiorentina 1, 53100 Siena, Italy）

Guido Grandi 意大利锡耶纳凯龙疫苗研究所（Via Fiorentina 1, 53100 Siena, Italy）

Mahmoud Hamdan 意大利葛兰素史克发现研究所、结构科学计算分析系（Discovery Research, GSK, Via Fleming 4, Verona, Italy）

G.Wesley Hatfield 美国加州大学欧文分校医学院，微生物和分子遗传学系（UC Irvine, CA 92697, USA）

Tamás Henics 奥地利维也纳生物中心园区英特细胞公司（Campus Vienna Biocentre 6, 1030 Vienna, Austria）

She-pin Hung 美国加州大学欧文分校医学院，微生物和分子遗传学