

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02122116.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/29 (2006.01)
C07K 14/085 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1268392C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/12 (2006.01)

[22] 申请日 2002.5.30 [21] 申请号 02122116.2

[71] 专利权人 北京迪威华宇生物技术有限公司
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12 号 176 信箱

[72] 发明人 王丽颖 孙 蒙 于永利
审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 李 悦

权利要求书 3 页 说明书 38 页 附图 13 页

[54] 发明名称

预防和治疗人丙型肝炎病毒感染的重组蛋白
疫苗及其用途

[57] 摘要

本发明提供了一种重组蛋白疫苗，它是由卡介苗热休克蛋白 65 和多表位丙型肝炎病毒核心抗原融合而形成的融合蛋白；这种蛋白的氨基酸序列和编码这种重组蛋白疫苗的核苷酸序列；含有该核苷酸序列的表达载体；含有该表达载体的宿主细胞；该重组蛋白疫苗的制备方法；含有该重组蛋白的预防和治疗丙型肝炎病毒感染的疫苗制品。本发明还提供了一种用于检测丙型肝炎病毒疫苗诱导丙型肝炎特异性杀伤性 T 淋巴细胞活性的方法及其细胞模型。

1. 一种对丙型肝炎具有预防和治疗作用的重组蛋白，其特征在于它含有如下任一核酸序列编码的氨基酸序列：1) 编码热休克蛋白与丙型肝炎病毒多表位核心抗原融合蛋白的核酸序列，所述多表位核心抗原融合蛋白由 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示的序列的肽段相互连接形成；2) 在严谨杂交条件下与 1) 所述核酸序列杂交的且具有相同功能的核酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述热休克蛋白是热休克蛋白 65。
3. 根据权利要求 2 所述的重组蛋白，其中所述热休克蛋白是卡介苗热休克蛋白 65。
4. 根据权利要求 3 所述重组蛋白，其特征在于卡介苗热休克蛋白 65 位于该融合蛋白的氨基端，多表位丙型肝炎病毒核心抗原位于该融合蛋白的羧基端。
5. 根据权利要求 1 所述重组蛋白，其特征在于它含有 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列。
6. 根据权利要求 5 所述重组蛋白，其中 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列由 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列编码。
7. 根据权利要求 1 所述重组蛋白，其特征在于该重组蛋白为 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 7 所述重组蛋白，其中 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列由 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列编码。
9. 根据权利要求 1-8 任一所述重组蛋白，其特征在于多表位丙型肝炎病毒核心抗原至少含有一个拷贝。

10. 根据权利要求 9 所述重组蛋白，其特征在于多表位丙型肝炎病毒核心抗原含有 1-5 个拷贝。
11. 一种重组蛋白疫苗，其特征在于含有权利要求 1-10 任一所述重组蛋白。
12. 根据权利要求 11 所述重组蛋白疫苗，它含有载体或赋形剂。
13. 编码权利要求 1-10 任一所述重组蛋白的核酸序列。
14. 含有权利要求 13 所述核酸序列的表达载体。
15. 含有权利要求 14 所述表达载体的宿主细胞。
16. 根据权利要求 15 所述的宿主细胞，其特征在于该宿主细胞是原核细胞或真核细胞。
17. 根据权利要求 16 所述的宿主细胞，其中所述原核细胞是大肠杆菌。
18. 根据权利要求 16 所述的宿主细胞，其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。
19. 一种制备权利要求 1-10 任一所述重组蛋白的方法，其特征在于包括表达权利要求 14 所述表达载体中的重组蛋白的步骤或培养权利要求 15-18 所述宿主细胞的步骤。
20. 一种制备权利要求 11-12 任一所述重组蛋白疫苗的方法，其特征在于包括表达权利要求 14 所述表达载体中的重组蛋白的步骤或培养权利要求 15-18 所述宿主细胞的步骤。
21. 权利要求 1-10 中任一项所述的重组蛋白在制备用于预防和治疗丙型肝炎病毒感染的重组蛋白疫苗中的用途。
22. 根据权利要求 21 所述的用途，其中的丙型肝炎病毒感染引起丙型肝炎。

-
23. 权利要求 15-18 中任一所述的宿主细胞在制备用于预防和治疗丙型肝炎病毒感染的重组蛋白疫苗中的用途。
 24. 根据权利要求 23 所述的用途，其中的丙型肝炎病毒感染引起丙型肝炎。
 25. 权利要求 11-12 任一所述重组蛋白疫苗在制备预防和治疗丙型肝炎病毒感染的药物中的用途。
 26. 根据权利要求 25 所述的用途，其中的丙型肝炎病毒感染引起丙型肝炎。

预防和治疗人丙型肝炎病毒感染的重组蛋白疫苗及其用途

5

发明领域

本发明涉及一种基因工程领域，具体地涉及基因工程重组蛋白疫苗（下文有时也称为“基因工程重组蛋白”），特别是涉及一种预防和治疗人丙型肝炎病毒感染的重组蛋白疫苗；这种重组蛋白的氨基酸序列；编码这种重组蛋白疫苗的核苷酸序列（下文有时也称为“基因”）；含有该核苷酸序列的表达载体；含有该表达载体的宿主细胞，以及该重组蛋白疫苗的制备方法；本发明还涉及该基因工程重组蛋白在制备用于预防和治疗人丙型肝炎病毒感染的疫苗制品中的用途以及含有该基因工程重组蛋白的疫苗制品；用装载丙型肝炎病毒特异性多肽的肿瘤细胞检测丙型肝炎病毒特异性杀伤性 T 淋巴细胞的方法。

15

发明背景

目前，在全世界，大约有 1 亿七千万人感染了丙型肝炎病毒（HCV），其感染者是人类免疫缺陷病病毒（HIV）感染者的 4 倍。在今后几年中，每年死于由 HCV 感染引起的肝癌，肝硬化等肝脏损害的人数有可能超过因 HIV 感染而死于 AIDS 的人数。

20

在世界范围内，采用 α -干扰素和病毒唑对病人进行联合药物是治疗丙型肝炎病毒感染的唯一方法，其有效率最高只有 40% [Jon Cohen. 丙型肝炎的科学挑战 (The Scientific Challenge of Hepatitis C). 科学 (Science), 1999, 285: 26-30]。

25

采用有效的疫苗控制和治疗丙型肝炎病毒感染是预防和治疗丙型肝炎病毒感染的理想途径，在这方面，科学家一直在进行不懈的探索。迄今为止，在世界上尚未研制出有效的丙型肝炎丙型肝炎病毒疫苗。

对于一些病毒，例如 A 型流感病毒 (influenza A)，乙型肝炎病毒 (HBV) 等，诱导中和抗体似乎足以抵御感染；但对另外许多病毒，必须产生有效

30

的特异性杀伤性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应才能清除病原体 [Isabelle P. Hunziker, Rinaldo Zurbriggen, Reinhard Glueck et. al. 展望: 对于一种针对丙型肝炎病毒的多肽疫苗 (Perspectives: towards a peptide-based vaccine against hepatitis C virus) 分子免疫 (Molecular Immunology) 2001 38, 475-484]。近年的研究表明, CD8+ 杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)也能有效地预防和清除 HCV 感染 [Cooper S; Erickson AL; Adams EJ 等, 成功的抗丙型肝炎病毒的免疫反应的分析 (Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus). 免疫 (Immunity) 1999 Apr; 10 (4): 439-449]。Cerny 等的工作表明, HCV 保守区域的 HLA-A2.1 结合表位可诱导丙型肝炎病毒特异性的 CTL 反应 [Cerny A, McHutchison JG, Pasquinelli C 等, 对丙型肝炎病毒来源的含有结合基序的多肽的细胞毒性 T 淋巴细胞反应 (Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the binding motif.) 临床研究杂志 (J Clin Invest), 1995, 95: 521-530]。作为 HCV 保守区域的蛋白成分, 核心蛋白含有若干不同 MHC- I 类分子限制的 T 细胞表位, 根据这些表位的序列可能研制出对丙型肝炎病毒感染有预防和治疗作用的疫苗, 在研制的此类疫苗中有 DNA 疫苗、病毒载体疫苗和合成肽疫苗等。

研究表明, 外源性的蛋白类抗原在免疫人体后, 通常被抗原提呈细胞摄取、加工, 进入 MHC II 类提呈途径, 能激发体液免疫反应 (Heikema A, Agsteribbe E, Wilschut J, Huckriede A. 通过胞内装载 gp96 抗原肽产生基于热休克蛋白的疫苗 (Generation of heat shock protein-based vaccines by intracellular loading of gp96 with antigenic peptides). 免疫学通讯 (Immunol Lett) 1997 Jun 1; 57 (1-3): 69-74), 但不能有效激活特异性的 CTL 的产生。因此, 赋予 HCV 核心抗原以能特异性激活 CTL 的性质就成为研究以 HCV 核心抗原疫苗的一个技术关键。

热休克蛋白 (heat shock protein, 下文有时简称为 “HSP”) 是存在于多种生物体内的一个分子伴侣蛋白质家族。在免疫应答的过程中, 热休克蛋白可表现如下三种基本的功能: 1、协助抗原性物质进入包括树突状细胞在内的抗原提呈细胞; 2、在抗原提呈细胞中和加工处理的抗原物质

相互作用使之进入 MHC I 类抗原提呈途径, 进而激活抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL); 3、刺激树突状细胞表达协同刺激分子 (如 B7 等) 和分泌细胞因子 (Suzue K, Zhou X, Eisen HN, Young RA. 热休克蛋白融合蛋白作为载体将抗原带入主要组织相容性复合体 I 类分子提呈途径 (Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997 Nov 25; 94 (24): 13146-13151)。

10 发明内容

本发明的一方面是提供一种重组蛋白疫苗, 它是将卡介苗热休克蛋白 65 (HSP65) 和多表位 HCV 核心抗原融合在一起而生产的、对丙型肝炎有预防和治疗作用的基因工程重组蛋白疫苗。

本发明的另一方面是提供这种重组蛋白的氨基酸序列。

15 本发明的另一方面是提供一种编码这种重组蛋白的核苷酸序列。

本发明的另一方面是提供一种含有该核苷酸序列的表达载体。

本发明的另一方面是提供一种含有含有该表达载体的宿主细胞。

本发明的另一方面是提供一种制备该重组蛋白疫苗的方法。

20 本发明的另一方面涉及该基因工程重组蛋白在制备用于预防和治疗丙型肝炎的疫苗制品中的用途。

本发明的另一方面涉及用装载丙型肝炎病毒特异性多肽的肿瘤细胞检测丙型肝炎病毒特异性杀伤性 T 淋巴细胞的方法。

本发明的又一方面涉及含有该基因工程重组蛋白的疫苗制品。

25 因此, 正是本发明人经过长期的大量的研究, 解决了现有技术中的技术难题, 首次开拓性地将卡介苗热休克蛋白 65 与多表位 HCV 核心抗原相连形成了全新的基因工程重组蛋白, 从而赋予 HCV 核心抗原以能特异性激活 CTL 的性质, 实现了对丙型肝炎的有效的预防和治疗。

30 另外, 需要指出的是, 在本申请的上下文的公开内容的基础上, 本发明的其它具有实质性特点的方面及其创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

附图简要说明

图1是描述本发明的重组蛋白疫苗的制备过程流程图解。

图2是以卡介苗基因组为模板用热休克蛋白65（HSP65）特异性引物进行PCR所得到的PCR产物的电泳图，其中泳道1为DNA marker，泳道2箭头所示为PCR产物。

图3所示的是为合成单拷贝多表位HCV核心抗原基因而进行的第一轮PCR产物的琼脂糖凝胶电泳照片，其中箭头所示为PCR产物。

图4所示的是为合成单拷贝多表位HCV核心抗原基因而进行第二轮PCR产物的琼脂糖凝胶电泳照片，其中箭头所示为PCR产物。

图5所示的是酶切鉴定pMD-18T-多表位HCV核心抗原重组质粒的琼脂糖凝胶电泳照片，其中：泳道1为DNA marker，泳道2为未经酶切的pMD-18T-多表位HCV核心抗原重组质粒，泳道3为EcoRI和HindIII双酶切后的pMD-18T-多表位HCV核心抗原重组质粒。

图6所示的是PET28a-Hsp65重组质粒酶切鉴定电泳照片，其中：泳道1为DNA marker，泳道2为经NcoI和EcoRI双酶切后的PET28a-Hsp65重组质粒，箭头所示为释放的DNA片段。

图7所示的是PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒酶切鉴定电泳照片，其中：泳道1为DNA marker，泳道2为经EcoRI和HindIII双酶切后的PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒，箭头所示为释放的DNA片段（多表位HCV核心抗原）。

图8所示的是PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒结构示意图。

图9为纯化后的含有PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒的大肠杆菌表达产物（卡介苗HSP-65和多表位HCV核心抗原基因融合蛋白）的SDS-PAGE分析，其中：泳道1为纯化后的表达产物，泳道2为纯化后经过除盐的表达产物，泳道3为蛋白质分子量标志。可以看到目的蛋白分子量为80kDa左右，与理论计算值相符。

图10所示的是酶切鉴定PET26b-8R-多拷贝多表位HCV核心蛋白重组质粒的电泳照片，其中：泳道1和2是经BamHI和XhoI双酶切后的

PET26b-8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白重组质粒，箭头所示为释放出的 DNA 片段（多拷贝多表位 HCV 核心抗原），泳道 3 是 DNA marker。

图 11 所示的是大肠杆菌中表达的 8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白融合蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析，其中：泳道 1 为纯化的 8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白融合蛋白，泳道 3 为纯化后经过除盐的 8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白融合蛋白，泳道 4 为蛋白质分子量标志，可以看到目的蛋白分子量为 35kDa 左右，与理论计算值相符。

图 12 所示为疫苗组和对照组小鼠肿瘤形成状况的对比照片。

图 13 所示为表达 HCV 核心抗原表位的 B16 细胞的体外特异性杀伤实验结果。

具体实施方式

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地，下列术语具有如下的含义：

“重组蛋白疫苗”：利用基因工程技术，将具有较强免疫原性的一个或多个基因片段以克隆到原核或真核细胞的表达载体上，将表达载体转入细菌或真核细胞（酵母细胞或哺乳动物细胞），利用此细菌或真核细胞生产的由具有较强免疫原性的一个或多个基因片段编码的蛋白质为重组蛋白疫苗。这种疫苗在应用于机体后可诱导机体产生抗原特异性的记忆性淋巴细胞（T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞），这些记忆性的淋巴细胞在接触到相应的病原体后可迅速增殖、反应，通过产生抗体的方式或特异性杀伤细胞的方式抑制或该杀伤病原体或杀伤病毒感染细胞。

“卡介苗热休克蛋白 65”是指来源于卡介苗的分子量为 65kDa 的热休克蛋白，其氨基酸序列优选地如实施例 1 中所示。

“多表位 HCV 核心抗原”是指来源于丙型肝炎病毒核心蛋白的 5 个表位相连接而形成的多肽，其氨基酸序列优选地如 SEQ ID NO: 9 所示，其编码核苷酸序列优选地如 SEQ ID NO: 8 所示。

“人丙型肝炎病毒感染”是指丙型肝炎病毒通过某种途径进入人体并感染肝细胞的状态，包括急性感染和慢性感染以及无症状携带状态，包括，但不限于表现出肝病临床症状或有生化指标改变的状态。

“严紧的杂交条件”是指为避免反应体系中非同源性或部分同源性的核酸序列形成杂交复合物而采用的杂交条件，如较高的反应温度和低离子强度。

"治疗"或"预防"包括：

5 (1) 预防疾病，也就是使疾病的临床症状不会在哺乳动物中发展，所述的哺乳动物可能与该疾病的病原体接触或易患有该疾病但不曾经历或显现出疾病的该症状，

(2) 抑制疾病，也就是阻止或减轻该疾病或其临床症状的发展，或

(3) 缓解疾病，也就是引起疾病或其临床症状的退化。

10 丙型肝炎病毒的基因型和我们采用的丙型肝炎病毒基因序列：

丙型肝炎病毒基因组具有显著异源性，而且具有一定的地域和人群分布特征。目前将已发现的100多种丙肝毒株分为6种主要基因型 [Simmonds P. 丙型肝炎病毒的异源性(Viral heterogeneity of the hepatitis C virus). 1999 J. 肝脏病学 (Hepatology) 31: 54-60]。欧美国家主要流行株为I型，
15 亚洲及我国流行株属于II型。本发明中所依据的基因序列来自HCV type Ib，即为II型中的一株。

本发明提供了一种重组蛋白疫苗，它是由卡介苗热休克蛋白 65 和多表位 HCV 核心抗原融合而形成的融合蛋白，其中，所述的单拷贝多表位 HCV 核心抗原由如 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示的序列的多肽相互连接形成(按照 1-5 的顺序连接)：

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Glu Ile *Asp Asp*
(SEQ ID NO: 1) ;

25 Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu *Glu Asp*
Ser Glu
(SEQ ID NO: 2);

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
30 *Glu Asn Asp Glu Ile Glu*

(SEQ ID NO: 3);

Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg *Asn Asp*
Glu

5 (SEQ ID NO: 4);

Leu Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln *Glu Ile*
Asp Asn Glu

(SEQ ID NO: 5)。该单拷贝多表位 HCV 核心抗原的序列优选地如 SEQ ID NO:
10 9 所示或其功能等价物，而所述的单拷贝 HCV 核心抗原多表位的表达基因的序列优选地具有 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。

本发明的重组蛋白疫苗中，卡介苗热休克蛋白 65 可以位于该融合蛋白的氨基端，单拷贝多表位 HCV 核心抗原位于该融合蛋白的羧基端。

将单拷贝多表位 HCV 核心抗原和卡介苗热休克蛋白 65 的基因融合可
15 表达出多表位 HCV 核心抗原和卡介苗热休克蛋白 65 融合蛋白（序列优选地如 SEQ ID NO: 7 所示）。此蛋白在应用于人体后可在包括树突状细胞在内的抗原提呈细胞内进入 MHC I 类途径加工提呈，诱生丙型肝炎病毒特异性 CTL。此 CTL 可杀伤丙型肝炎病毒感染的细胞并失活丙型肝炎病毒因而对丙型肝炎病毒感染有预防和治疗的作用。

20 因此，本发明的重组蛋白疫苗具有选自如下的任一氨基酸序列：

1) SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列；和

2) 由在严紧的杂交条件下与编码1)的氨基酸序列的核苷酸序列杂交的核苷酸序列所编码的氨基酸序列。

本发明还提供了编码本发明的重组蛋白疫苗的核苷酸序列，该核苷酸
25 序列可以具有选自如下的任一序列：

1) SEQ ID NO: 6所示的核苷酸序列；和

2) 由在严紧的杂交条件下与 1) 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

我们将这五个肽段的编码基因相连在一起，合成了一种新的基因，这一基因编码的多肽即为单拷贝多表位 HCV 核心抗原。将单拷贝多表位 HCV
30 核心抗原和卡介苗热休克蛋白 65 融合形成的融合蛋白，可刺激人体的细

胞毒性 T 细胞 (CTL) 攻击和杀伤表达 HCV 核心抗原的靶细胞, 因而对丙
型肝炎预防和治疗的作用。将单拷贝多表位 HCV 核心抗原相连接获得的 2-
5 个拷贝的多拷贝单拷贝多表位 HCV 核心抗原和卡介苗热休克蛋白 65 融合
形成的融合蛋白也可刺激人体的细胞毒性 T 细胞(CTL)攻击和杀伤表达 HCV
核心抗原的靶细胞, 因而对丙型肝炎预防和治疗的作用。

卡介苗热休克蛋白65是一种来源于卡介苗的蛋白质, 它在和多表位HCV
核心抗原形成融合蛋白后, 可以协助多表位HCV核心抗原进入包括树突状
细胞在内的抗原提呈细胞, 并进入MHC I类途径加工提呈, 进而激活抗原
特异性细胞毒性T淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 对表达HCV
核心抗原的细胞进行攻击和杀伤。此外, 卡介苗热休克蛋白65还可刺激
包括树突状细胞在内的抗原提呈细胞表达协同刺激分子 (如B7等) 和分泌
细胞因子, 这些协同刺激分子 (如B7等) 和细胞因子可激活细胞毒性T淋
巴细胞的肿瘤细胞杀伤能力。

本发明的重组蛋白疫苗可通过本领域已知的方法, 例如按照文献
(Brennan, W. A. and Lin, S. H. 蛋白质纯化策略及实验规程 (“Strategies
for Protein Purification and Characterization, A Laboratory
Manual”), 冷泉港实验室出版, 1996 Cold Spring Harbor Laboratory
Press.) 所述进行生产, 以下的实施例详细地例举了一种生产本发明的重
组蛋白疫苗的方法。

因此, 本发明还提供了含有上述编码本发明的重组蛋白疫苗的核苷酸
序列的表达载体; 含有该表达载体的宿主细胞, 其可以为本领域常规的各
种原核细胞, 真核细胞或哺乳动物细胞; 以及该重组蛋白疫苗的基因工程
制备方法。

另外, 本发明还涉及该基因工程重组蛋白在制备用于预防和治疗人丙
型肝炎的疫苗制品中的用途以及含有该基因工程重组蛋白的疫苗制品。本
领域技术人员可以理解的是, 这些疫苗制品可用本领域周知的各种常规方
法制备。

本发明的重组蛋白疫苗可通过皮下注射的方式给人接种, 接种的剂量
为100-500 μ g。为了加强效果, 可进行2-3次的加强免疫。时间间隔可为2
周-2月。

为了弥补因无丙型肝炎病毒细胞模型和动物模型的不足，本发明创立了一种研究丙型肝炎病毒疫苗激发特异性CTL并产生保护作用的新方法，即提供了一种检测丙型肝炎病毒疫苗活性的一种方法。

动物模型构建原理：八聚精氨酸（8R）能有效地将其 C 末端的融合蛋白带
5 入细胞内并进入 MHC-I 类途径 [Park J, Ryu J, Kim KA, et al. 携带外
源性蛋白进入哺乳动物细胞所必须的 I 型人免疫缺陷病毒 Tat 蛋白转导区
域的变异分析 (Mutational analysis of a human immunodeficiency virus
type 1 Tat protein transduction domain which is required for
delivery of an exogenous protein into mammalian cells) 普通病
10 毒学杂志 (J Gen Virol) 2002 May; 83 (Pt 5): 1173-81]。我们利用 8R
的这一特性，构建 8R-多拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白，并将其转染
来源于 C57 小鼠的黑色素瘤细胞 B16。这样的 B16 细胞表面将表达 HCV 核
心抗原表位，可以被 HCV 核心抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀
15 伤。将这种 B16 细胞注射入接种 HCV 疫苗的 C57 小鼠体内，观察肿瘤生长
状况，并与未接种疫苗的小鼠进行对比，可作为一种检测丙型肝炎病毒疫
苗活性的方法。

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例，并参照附图进一步
详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非
以任何方式限制本发明的范围。

20

实施例

在如下实施例中，如附图 1 所示制备本发明的重组蛋白疫苗。其中
未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法，例如
25 Molecular Cloning 一书 (J. Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory
Press, Molecular cloning, 1989) 所述的方法。

实施例 1

获取卡介苗 65KD 热休克蛋白 (HSP65) 的编码基因

30 卡介苗来源于长春生物制品研究所。采用苏通马铃薯培养基 (Starch

Potato Code No: C250-1,

Sigma 分装 北京鼎国生物) 培养的温度为 37-39°C, 生长出的卡介苗呈现干皱浅黄色的菌膜。收集菌膜, 从中提取卡介苗基因组 DNA。

提取卡介苗基因组 DNA 的方法参照 Molecular Cloning 一书 (J. Sambrook, 从哺乳动物分离高分子量 DNA (Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells), 9.16-9.22, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Molecular cloning, 1989)。

采用 PCR 方法自卡介苗分离热休克蛋白 65 (HSP65) 结构基因。采用的 5' 端引物序列为 5' CCATG GCC AAG ACA ATT GCG3' (SEQ ID NO: 21), 3' 端引物序列为 5' ACC GAA TTC GCT AGC CAT ATG GAA ATC CAT GCC ACC CAT 3' (SEQ ID NO: 22)。

所述 PCR 操作程序是: 在一 500 μ l 微量离心管中加入下列试剂:

模板 cDNA 5 μ l (10mmol/L)

10 \times PCR 缓冲液 (67 mmol/L Tris-Cl pH8.8, 50mmol/L KCl, 15 15mmol/L MgCl, 10mmol/L DMSO) 5 μ l

dNTPs (10mmol/L) 1 μ l

5' 端和 3' 端引物 (0.01 mmol/L) 各 0.5 μ l

Taq DNA 聚合酶 (5u/ μ l) 0.25 μ l

加去离子水至终体积 50 μ l

20 混合后加入矿物油 3 滴

反应条件: 94°C, 30"; 55°C, 1'; 72°C, 2', 30 个循环周期后, 72°C 延伸 10 分钟。

采用 TA 克隆方法克隆 PCR 产物, 方法见文献 (于永利, 麻彤辉, 杨贵贞. TA 克隆及双链 DNA 测序: 介绍一种快速克隆及分析 PCR 产物的方法. 25 中国免疫学杂志, 1994, 10 (1): 5)。

按常规方法 (J. Sambrook, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis) 1.21-1.32, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Molecular cloning, 1989) 提取质粒, DNA 序列分析仪测序。所获 PCR 产物的序列是

cc atg gcc aag aca att gcg tac gac gaa gag gcc cgt cgc ggc ctc gag
cgg ggc ttg aac gcc ctc gcc gat gcg gta aag gtg aca ttg ggc ccc aag
ggc cgc aac gtc gtc ctg gaa aag aag tgg ggt gcc ccc acg atc acc aac
gat ggt gtg tcc atc gcc aag gag atc gag ctg gag gat ccg tac gag aag
5 atc ggc gcc gag ctg gtc aaa gag gta gcc aag aag acc gat gac gtc gcc
ggt gac ggc acc acg acg gcc acc gtg ctg gcc cag gcg ttg gtt cgc gag
ggc ctg cgc aac gtc gcg gcc ggc gcc aac ccg ctc ggt ctc aaa cgc ggc
atc gaa aag gcc gtg gag aag gtc acc gag acc ctg ctc aag ggc gcc aag
gag gtc gag acc aag gag cag att gcg gcc acc gca gcg att tcg gcg ggt
10 gac cag tcc atc ggt gac ctg atc gcc gag gcg atg gac aag gtg ggc aac
gag ggc gtc atc acc gtc gag gag tcc aac acc ttt ggg ctg cag ctc gag
ctc acc gag ggt atg cgg cag gag gcg gtc ctg gag gac ccc tac atc ctg
ctg gtc agc tcc aag ctg tcc acc ctg gtc gtc aac aag atc cgc ggc acc
ttc aag tcg gtg gcg gtc aag gct ccc ggc ttc ggc gac cgc cgc aag gcg
15 atg ctg cag gat atg gcc att ctc acc ggt ggt cag gtg atc agc gaa gag
gtc ggc ctg acg ctg gag aac gcc gac ctg tcg ctg cta ggc aag gcc cgc
aag gtc gtg gtc acc aag gac gag acc acc atc gtc gag ggc gcc ggt gac
acc gac gcc atc gcc gga cga gtg gcc cag atc cgc cag gag atc gag aac
agc gac tcc gac tac gac cgt gag aag ctg cag gag cgg ctg gcc aag ctg
20 gcc ggt ggt gtc gcg gtc atc aag gcc ggt gcc gcc acc gac gtc gaa ctc
aag gag cgc aag cac cgc atc gag gat gcg gtt cgc aat gcc aag gcc gcc
gtc gag gag ggc atc gtc gcc ggt ggg ggt gtg acg ctg ttg caa gcg gcc
ccg acc ctg gac gag ctg aag ctc gaa ggc gac gag gcg acc ggc gcc aac
atc gtg aag gtg gcg ctg gag gcc ccg ctg aag cag atc gcc ttc aac tcc
25 ggg ctg gag ccg ggc gtg gtg gcc gag aag gtg cgc aac ctg ccg gct ggc
cac gga ctg aac gct cag acc ggt gtc tac gag gat ctg ctc gct gcc ggc
ggt gct gac ccg gtc aag gtg acc cgt tcg gcg ctg cag aat gcg gcg tcc
atc gcg ggg ctg ttc ctg acc acc gag gcc gtc gtt gcc gac aag ccg gaa
aag gag aag gct tcc gtt ccc ggt ggc ggc gac atg ggt ggc atg gat ttc
30 cat atg gct agc gaa ttc

另外，图2给出了以卡介苗基因组为模板用热休克蛋白65（HSP65）特异性引物进行PCR所得到的PCR产物的电泳图。

5 实施例 2.

合成单拷贝多表位 HCV 核心抗原基因

采用两轮 PCR 合成合成单拷贝多表位 HCV 核心抗原基因。

1) 第一轮 PCR (两条引物互为模板进行扩增)

引物 1 的序列为:

10 5' ATGGGTTACATCCCGCTGGTTGGTGCTCCGCTGGAAGACTCT
GAAGGTGTTTACCTGCTGCCGCGTCGTGGGCCGCGCCTGGGCGTTCGC 3' (SEQ ID NO:
10)

引物 1'的序列为:

15 5' GTCGTTACGTTTCAGAAGTTTTACGAGTAGCACGAACACCCAG
ACGCGGACCTTCGATTTTCGTCGTTTTTCAGCGGAACGCCCAGGCGCGG 3' (SEQ ID NO:
11)

所述 PCR 操作程序是: 在一 500 μ l 微量离心管中加入下列试剂:

引物 1 和引物 1'各 2 μ l
20 10 \times PCR 缓冲液(北京鼎国公司 成分见产品说明) 5 μ l
dNTPs (10mmol/L) 1 μ l
Taq DNA 聚合酶(2u/ μ l) 1 μ l
加去离子水至终体积 50 μ l
混合后加入矿物油 2 滴

25 PCR 的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C , 1'; 60 $^{\circ}$ C, 1' ; 72 $^{\circ}$ C, 2' , 3 个循环周期
后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟

第一轮 PCR 合成的产物的序列是:

30 5' ATGGGTTACA TCCCGCTGGT TGGTGCTCCG CTGGAAGACT CTGAAGGTGT
TTACCTGCTG CCGCGTCGTG GCCCGCGCCT GGGCGTTCGC GCTGAAAACG

ACGAAATCGA AGGTCCGCGT CTGGGTGTTT GTGCTACTCG TAAACTTCT GAACGTAACG
AC 3' (SEQ ID NO: 12), 其电泳图如图 3 所示。

2) 以第一轮 PCR 产物为模板进行第二轮 PCR

5 引物 2 的序列是:

5' GAATTCATGTCTACTAACCCGAAACCGCAGCGTAAACTAAA

GAAATCGACGACTTCGCTGACCTGATGGGTTACATCCCGCTG 3' (SEQ ID NO: 13)

引物 2' 的序列是

5' AAGCTTTTCGTTGTCGATTTCTGACGACGACCACGCGGCTG

10 AGAACGTTTCGGAGGTTTTACGCAGTTCGTCGTTACGTTTCAGAA GT 3' (SEQ ID NO: 14)

所述 PCR 操作程序是: 在一 500 μ l 微量离心管中加入下列试剂:

引物 2 和引物 2' 各 1 μ l

10 \times PCR 缓冲液(北京鼎国公司 成分见产品说明) 5 μ l

dNTPs (10mmol/L) 1 μ l

15 Taq DNA 聚合酶 (2u/ μ l) 1 μ l

加去离子水至终体积 50 μ l

混合后加入矿物油 2 滴

PCR 的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 1'; 60 $^{\circ}$ C, 1'; 72 $^{\circ}$ C, 2', 30 个循环周期
后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

20 产物的序列是:

5' ATGTCTACTA ACCCGAAACC GCAGCGTAAA ACTAAAGAAA TCGACGACTT

CGCTGACCTG ATGGGTTACA TCCCGCTGGT TGGTGCTCCG CTGGAAGACT CTGAAGGTGT

TTACCTGCTG CCGCGTCGTG GCCCGCGCCT GGGCGTTCGC GCTGAAAACG

ACGAAATCGA AGGTCCGCGT CTGGGTGTTT GTGCTACTCG TAAACTTCT GAACGTAACG

25 ACGAACTGCG TAAACCTCC GAACGTTCTC AGCCGCGTGG TCGTCGTCAG GAAATCGACA

ACGAA3' (SEQ ID NO: 15), 其电泳图如图 4 所示。

3) 将 PCR 产物克隆入载体质粒 pMD-18T (Takara)。

操作过程:

30 1 回收 PCR 产物: 将目的 DNA 区带的琼脂糖凝胶切下, 置 1.5ml Ep

管中,用 DNA 快速回收试剂盒(北京鼎国公司)回收目的 DNA 片段(操作步骤见产品说明)

2 连接反应:载体质粒 pMD-18T (50ng/ μ l) 0.5 μ l

PCR 产物(10ng/ μ l) 4.5 μ l

5 Ligation Solution I(Takara, 成分见产品说明)5 μ l

16°C 反应 2 小时

3 转化大肠杆菌 JM109:

感受态细胞的制备:

10 a、将大肠杆菌 JM109(本室保存)在 LB 琼脂培养基上划线,37°C 培养 12-16 小时;

b、次日从琼脂平板上取一单菌落于 2ml LB 培养基中,37°C 以 225rpm 速度震荡培养 12-16 小时;

15 c、取 1ml 上述培养物接种于 100ml LB 培养基中,37°C 以 225rpm 的速度震荡培养直至 OD 值为 0.5 左右(大约 3 小时);

d、将菌液冰浴 2 小时,然后 2,500 Xg,4°C 离心 20 分钟收集菌体;

e、加入 100ml 冰冷的 Trituration 缓冲液(100mmol/L CaCl₂, 70mmol/L MgCl₂, 40mmol/L 醋酸钠, pH5.5),混匀,置冰上 45 分钟;

20 f、1,800 Xg,4°C 离心 10 分钟,弃上清,加入 10ml 冰冷的 Trituration 缓冲液悬浮细胞;

g. 按每份 200ul 分装,4°C 可保存 1-2 周。若需长期保存,可加甘油至终浓度为 15%,置-70°C 备用。

转化方法:

25 a、将 200ul 感受态细胞置冰上融化,然后加入 3ul DMSO 或 β -巯基乙醇,混合后,加入 3-5 μ l 连接反应液(含重组质粒),温和混匀,置冰上 30 分钟;

b、42°C 45 秒,然后迅速放回冰中 1-2 分钟;

c、加入 2ml LB 培养液,37°C 以 225rpm 的速度摇荡培养 1 小时;

30 d、4,000 X g 离心 10 秒钟,弃上清,用 200ul LB 培养液重悬菌体;

e、将菌液铺于含有 Ampicillin(100ug/ml)的 LB 琼脂培养板上,涂匀,室温放置 20-30 分钟,倒置于 37℃孵箱中培养 12-16 小时。用限制性内切酶消化的方法鉴定重组克隆。

f、质粒和菌株的保存: 质粒冰冻保存于-20℃。菌株在含 20-50%甘油培养液中保存于-20℃ 或-70℃。图 5 所示的是酶切鉴定 pMD-18T-多表位 HCV 核心抗原重组质粒的琼脂糖凝胶电泳照片,其中:泳道 1 为 DNA marker,泳道 2 为未经酶切的 pMD-18T-多表位 HCV 核心抗原重组质粒,泳道 3 为 EcoRI 和 HindIII 双酶切后的 pMD-18T-多表位 HCV 核心抗原重组质粒。

10

实施例 3.

卡介苗 HSP-65 基因的克隆

用 NcoI (Takara) 和 EcoRI (Takara) 在 37℃消化得自实施例 1 的质粒, 时间为 2 小时。消化产物琼脂糖凝胶电泳分离。电泳的条件是: 1%琼脂糖凝胶, 1×TAE 缓冲液, 150-200mA, 电泳 0.5-1 小时。20×TAE 缓冲液: 0.8mol/L Tris base, 0.4mol/L NaOAc, 0.04mol/L Na₂EDTA, 用冰醋酸调 pH 8.3。

在紫外灯下观察并切下琼脂糖凝胶上的 DNA 电泳带。将含 DNA 区带的琼脂糖凝胶切下, 置-70℃冷冻 15 分钟; 室温融化后, 12,000 rpm 离心 5 分钟, 将上层液相移至另一管中, 用 2 - 2.5 倍乙醇沉淀、洗涤和干燥 DNA。

将回收的 DNA 片段克隆入经限制性内切酶 NcoI (Takara) 和 EcoRI (Takara) 消化的原核细胞表达载体 pET-28a(+) 质粒 (美国 Novagen 公司) 的 6 聚组氨酸 (histidine) 密码子的上游。

25

质粒 DNA 的消化反应:

1 μg 质粒 DNA

1 μl 10× 缓冲液 (见 Promega Corporation 产品说明书)。

1 μl 限制性内切酶 NcoI (10 单位/μl)

1 μl 限制性内切酶 EcoRI (10 单位/μl)

30

用双蒸水补齐至 10 μl

混合后 37°C 温育 30-120 分钟。

连接反应：

质粒 DNA (0.5 μ g/ μ l) 2 μ l

DNA 插入片段 (即卡介苗 HSP-65 基因) (300ng/ μ l) 5 μ l

5 10 \times 连接缓冲液 (见 Protocols and Applications Guide, p57, Promega Corporation, Second Edition, 1991) 1 μ l

T4 DNA 连接酶 1 μ l

用双蒸水补齐至 10 μ l

混合后置 14-16°C 水浴 6-12 小时。

10 将含卡介苗 HSP-65 基因的重组 pET-28a (+) 质粒转化大肠杆菌。

转化方法同上。酶切鉴定阳性重组质粒。图6 所示的是PET28a-Hsp65重组质粒酶切鉴定电泳照片, 其中: 泳道1为DNA marker, 泳道2为经NcoI和EcoRI双酶切后的PET28a-Hsp65重组质粒, 箭头所示为释放的DNA片段。

15 实施例 4

构建卡介苗 HSP-65 和多表位 HCV 核心抗原基因融合基因

将卡介苗 65KD 热休克蛋白 (HSP65) 的编码基因的重组 PET28a 质粒以及含有多表位 HCV 核心抗原基因的重组 PMD18-T 质粒分别用 EcoRI 和 HindIII (Takara) 消化, 37°C, 2 小时。采用琼脂糖凝胶电泳分离消化产物。电泳的条件是: 1%琼脂糖凝胶, 1 \times TAE 缓冲液, 150-200mA, 电泳 0.5-1 小时。

20 \times TAE 缓冲液: 0.8mol/L Tris base

0.4mol/L NaOAc

0.04mol/L Na₂ EDTA

25 用冰醋酸调 pH 8.3。

在紫外灯下观察并切下琼脂糖凝胶上的 DNA 电泳带。将含目的 DNA 区带的琼脂糖凝胶切下, 置 Ep 管中, 用 DNA 快速回收试剂盒 (北京鼎国公司) 回收目的 DNA 片段及线性化质粒。

30 将经EcoRI/HindIII消化的PET28a-HSP65 重组质粒和多表位HCV核心抗原基因用T4 DNA连接酶(Takara)连接。连接物转化感受态细胞JM109, 用限

制性内切酶消化的方法鉴定重组克隆。（具体序列参见SEQ ID No: 6）。重组质粒冰冻保存于-20°C。菌株在含20-50%甘油培养液中保存于-20°C或-70°C。图7所示的是PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒酶切鉴定电泳，其中：泳道1为DNA marker，泳道2为经EcoRI和HindIII双酶切后的PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒；箭头所示为释放的DNA片段（多表位HCV核心抗原）。图8所示的是PET28a-Hsp65-多表位HCV核心抗原重组质粒结构示意图。

实施例 5

10 卡介苗 HSP-65 和多表位 HCV 核心抗原基因融合基因的表达

将单菌落接种于 1000 ml LB 培养基中。37°C 水浴震荡培养至 OD600 为 0.6。加入 IPTG 使其终浓度为 1 mM，37°C 水浴震荡培养 2-3 小时。三角烧瓶于冰上 5 分钟，4°C 离心 5 分钟（5000 x g）。吸弃上清，收集细菌，立即使用或冻存。

15

实施例 6

卡介苗 HSP-65 和多表位 HCV 核心抗原融合蛋白的纯化

将大肠杆菌细胞于室温下解冻。每克菌（湿重）重悬于 10ml 裂解缓冲液。

20 裂解缓冲液：

20mM Tris.HCL (pH7.9)

5 mM imidazole

0.5M NaCl

0.1mM PMSF

25 每毫升裂解缓冲液加 1M MgSO₄ 10ul, 10 ug/ml DNase I 10ul。冰上放置 30min。12,000 rpm, 4 °C 离心 15 min。弃上清。每克菌加 1.5ml 结合缓冲液。

结合缓冲液：

20mM Tris.HCL (pH7.9)

30 5 mM imidazole

0.5M NaCl

6M urea

冰上放置 2h。12,000 rpm, 4 °C 离心 15 min。留取上清, 做 Ni²⁺-Saphrose-4-B 层析 (层析介质购自 Pharmacia 公司), 分离 HSP-5 65 和多表位 HCV 核心抗原融合蛋白。

洗脱的目的蛋白进行苯基 Sepharose 疏水层析 (层析介质购自 Pharmacia 公司) 去除内毒素。

采用葡聚糖凝胶 Sephadex-G-25 离子交换层析 (层析介质购自 Pharmacia 公司) 去除目的蛋白中的盐类。

10 采用常规的 SDS-PAGE 方法 (J. Sambrook, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis) 6.36-6.49, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Molecular cloning, 1989)。鉴定 HSP-65 和 HCV 核心抗原多表位基因融合蛋白纯度为: 95%。图 9 为纯化后的含有 PET28a-Hsp65-多表位 HCV 核心抗原重组质粒的大肠杆菌表达产物 (卡介苗 HSP-65 和多表位 HCV 核心抗原基因融合蛋白) 的 SDS-PAGE 分析, 其中: 泳道 1 为纯化后的表达产物, 泳道 2 为纯化后经过除盐的表达产物, 泳道 3 为蛋白质分子量标志。可以看到目的蛋白分子量为 80kDa 左右, 与理论计算值相符。

20 实施例 7: 八聚精氨酸 (8R)-多拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白的表达和纯化

8R 即八聚精氨酸, 是一段由 8 个精氨酸残基连接而成短肽, 它能有效地将其 C 末端的融合蛋白带入细胞内并进入 MHC-I 类途径。我们利用 8R 的这一特性, 构建 8R-多拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白, 用于转染细胞。

25 实验过程:

(a) PCR 获取 HCV core multiple epitopes DNA

为构建多拷贝多表位 HCV 核心抗原, 设计一对引物:

primer 3 AAG CTT A CCA TGG TT GGA TCC ATGTCTACTA ACCCGAAACC

30 (SEQ ID NO: 18)

primer 3' GAA TTC TTA CTC GAG AGA TCT TTCGTTGTCG ATTCCTGAC
(SEQ ID NO: 19)。为构建多聚体,引物两端分别设计 BamH I、Bgl II
酶切位点,以序列正确的 pMD-18T- HCVcore multiple epitope 重
组质粒为模板进行 PCR: primer 3、primer3' 各 1 μ l(0.01mM),模
5 板质粒 1 μ l,10mM dNTP 2 μ l, 10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液 10 μ l(北
京鼎国公司,成分见产品说明),Taq DNA 聚合酶(20u/ μ l) 1 μ
l, 84 μ l ddH₂O。混匀后加一滴矿物油。按下列程序在 PCR 仪中扩
增: 94 $^{\circ}$ C 30sec, 55 $^{\circ}$ C 60sec, 72 $^{\circ}$ C 90sec, 共 30 个循环。循环
结束后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。反应结束后取 PCR 产物 10 μ l 做 2%琼
10 脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果。特异性 DNA 片段(HCVcore
multiple epitope)的回收及 TA 克隆方法同前。

(b) pMD-18T-poly3 HCVcore multiple epitope 重组质粒的构建

取 2 个 0.5ml Ep 管(1 和 2),每管加入 pMD-18T-HCV'重组质粒
15 16 μ l。管 1 中加 10xBuffer K (Takara) 2 μ l,限制酶 BamH I、Pst I
(Takara) 各 1 μ l;管 2 中加 10xBuffer H (Takara) 2 μ l,限制酶
Bgl II、Pst I (Takara) 各 1 μ l。37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时,2%琼脂糖凝
胶电泳。回收管 1 中释放出的特异性片段(multiple HCVcore
epitope)和管 2 中的线性化质粒(pMD-18T- multiple HCVcore
20 epitope)。连接,转化,酶切鉴定(方法同前)。得到的阳性重组质粒
为 pMD-18T-poly2 multiple HCVcore epitope。

取 pMD-18T-poly2 multiple HCVcore epitope 重组质粒 16 μ l,
加 10xBuffer H 2 μ l,限制酶 Bgl II、Pst I 各 1 μ l。37 $^{\circ}$ C 孵育 2
小时,2%琼脂糖凝胶电泳。回收线性化质粒,与上述 HCVcore multiple
25 epitope 连接,转化 JM109 感受态细胞。提取质粒酶切鉴定,所得阳
性重组质粒为 pMD-18T-poly3 multiple HCVcore epitope。

(c) PET26b-8R-poly3 HCVcore multiple epitope 表达质粒的构建

质粒 PET26b-8R 用 BamH I 和 Xho I (Takara) 消化,回收线
30 性化载体;pMD-18T-poly3 multiple HCVcore epitope 重组质粒同

样用 BamH I 和 Xho I 消化, 回收 DNA 片段 poly3 multiple HCVcore epitope。将二者连接, 转化感受态菌 JM109。提取阳性重组质粒备用。
(方法同前)

- 5 (d) PET26b-8R-poly3 HCVcore multiple epitope 的表达和纯化(方法同前)。

图 10 所示的是酶切鉴定 PET26b-8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白重组质粒的电泳照片, 其中: 泳道 1 和 2 是经 BamH I 和 Xho I 双酶切后的 PET26b-8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白重组质粒, 箭头所示为释放出的
10 DNA 片段(多拷贝多表位 HCV 核心抗原), 泳道 3 是 DNA marker。图 11 所示的是大肠杆菌中表达的 8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白融合蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析, 其中: 泳道 1 为纯化的 8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白融合蛋白, 泳道 3 为纯化后经过除盐的 8R-多拷贝多表位 HCV 核心蛋白融合蛋白, 泳道 4 为蛋白质分子量标志, 可以看到目的蛋白分子量为
15 35kDa1 左右, 与理论计算值相符。

实施例 8

表达 HCV 核心抗原表位的 B16 细胞在小鼠体内的生长抑制实验

为了弥补因无丙型肝炎病毒细胞模型和动物模型的不足, 创立了一种
20 研究丙型肝炎病毒疫苗激发特异性 CTL 并产生保护作用的新方法:

1、材料

8R-多拷贝多表位丙型肝炎病毒核心抗原融合蛋白 (8R-polyHCVcore multiple epitope):

8R 即八聚精氨酸, 是由 8 个精氨酸残基连接而成的氨基酸序列, 它能
25 有效地将其 C 末端的融合蛋白带入细胞内并进入 MHC-I 类途径。用 8R-多拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白转染细胞, 将使被转染细胞表面表达 HCV 核心抗原表位, 可用来作实验中的靶细胞。

B16 细胞:

B16 细胞是来源于 C57 小鼠的黑色素瘤细胞, 其 MHC 的型为 H-2^b。可
30 在小鼠形成原位实体肿瘤。

将 8R-多拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白转染 B16 细胞。这样的 B16 细胞表面将表达 HCV 核心抗原表位。将这种 B16 细胞注射入接种 HCV 疫苗的 C57 小鼠体内，观察其生长状况，并与未接种疫苗的小鼠进行对比，可作为一种检测丙型肝炎病毒疫苗活性的方法。

- 5 2、实验动物：7 周的雄性 C57 小鼠（购自中国军事医学科学院），疫苗组 11 只；对照组 4 只。

3、实验方法

接种疫苗

- 10 在试验的第 1 天，14 天和 21 天：即接种肿瘤前的第 28 天，14 天和 7 天，疫苗组分别四肢皮下注射 20 μ g 卡介苗热休克蛋白 65 和多表位 HCV 核心抗原融合蛋白重组蛋白疫苗；对照组分别四肢皮下注射同疫苗组同体积生理盐水。

培养 B-16 细胞

- 15 采用含 10%的灭活胎牛血清的 IMDM 培养基培养（购自 GIBCO 公司）B16 细胞。在注射之前，在培养基中加入 10% 条件培养基培养 24 小时。

条件培养基制备方法：

1. 将 C57 小鼠脱颈处死后，在 75% 乙醇中浸泡 1-2 分钟。
2. 无菌状态下取小鼠脾脏，置于装有 2ml 10% FBS IMDM 的无菌平皿里。
- 20 3. 用无菌毛玻璃片将脾脏磨碎，用 1ml 加样器反复吹打将毛玻璃片上的残余细胞冲洗至平皿中。
4. 将细胞悬液经 200 目尼龙网滤至 10ml 玻璃试管内。
5. 加入 2ml 0.83% NH_4Cl ，室温放置 10 分钟以破裂红细胞。
- 25 6. 1000rpm 离心 5 分钟，弃上清。
7. 用 2ml 10% FBS IMDM 重悬细胞，将细胞移入一 50ml 细胞培养瓶中，补加 4ml 10% FBS IMDM。
8. 加入 ConA 至终浓度 5mg/ml。37°C，5% CO_2 培养 24 小时。
- 30 9. 培养 12-24h 期间观察脾细胞的变化，高倍镜下可观察到部分细胞变大，变圆，并可见核分裂相。

10. 将细胞悬液移至一个无菌 10ml 管, 2000rpm 离心 5-10 分钟, 将上清分装至 1.5ml 管中。

装载 8R-polyHCV 核心抗原多表位蛋白

- 5 将 200ug 8R-polyHCV 核心抗原多表位蛋白与 10ul Lipotectin 混匀后加入细胞培养基中孵育 4 小时。

接种肿瘤

- 10 取 7 只免疫鼠每只小鼠注射 1×10^5 个转染 8R-polyHCV 核心多表位的 B16 细胞; 对照组 4 只, 每只小鼠注射 1×10^5 个转染转染 8R-polyHCV 核心多表位的 B16 细胞。注射部位是小鼠右后肢腹侧皮下。在接种肿瘤后的第 15 天, 杀鼠取瘤, 测量小鼠肿瘤块大小及重量。

4、实验结果及结论

- 15 动物肿瘤重量平均值: 注射转染 8R-polyHCV 核心多表位的 B16 细胞的疫苗组为 1.59g, 对照组为 3.28g, 对照组与疫苗组差异明显 ($p < 0.01$)。图 12 所示为疫苗组和对照组小鼠肿瘤形成状况的对比照片。

- 20 由于疫苗组和对照组小鼠接种的肿瘤细胞来源及数量完全相同, 疫苗组小鼠肿瘤重量明显低于对照组, 说明疫苗组小鼠接种的肿瘤细胞受到一定程度的特异性杀伤。造成这一现象的原因是疫苗组小鼠体内存在针对 HCV 核心抗原表位的 CTL, 能特异性杀伤表达 HCV 核心抗原表位的靶细胞。结论是此卡介苗热休克蛋白 65 和多表位 HCV 核心抗原融合蛋白重组蛋白疫苗能激活丙型肝炎病毒特异性 CTL, 这种 CTL 能以 MHC 限制的方式杀伤和抑制表达 HCV 核心抗原表位的靶细胞。

25 实施例 9

体外特异性 CTL 杀伤试验

1 材料: 8R-polyHCV 核心抗原多表位蛋白、B16 细胞。

2、实验动物: 7 周的雄性 C57 小鼠 (购自中国军事医学科学院), 疫苗组 4 只; 对照组 4 只。

30 3、实验方法

接种疫苗

在试验的第1天, 14天和21天, 疫苗组分别四肢皮下注射 20 μg 卡介苗热休克蛋白 65 和多表位 HCV 核心抗原融合蛋白重组蛋白疫苗; 对照组分别四肢皮下注射同疫苗组同体积生理盐水。

5

实验步骤:

a. 靶细胞的制备:

1. B16 细胞培养至覆盖 100ml 细胞培养瓶底 30—40% (约 1×10^6 个细胞), 弃培养液, 加入 8ml 无血清 IMDM 和 1ml 条件培养基。37°C, 5% CO_2 培养 12-24 小时。
10
2. 弃掉培养液, 用 0.25% 胰酶消化细胞 3 分钟, 吸弃胰酶, 用 4ml 10% FBS IMDM 重悬细胞。
3. 将 100-200pmol 的 8R-多表位 HCV 核心抗原多聚体蛋白 (8R-polyHCV) 与 5-7 μl 的 Lipofectin 混合, 室温放置 10 分钟后加入细胞悬液, 轻轻混匀, 37°C, 5% CO_2 培养 3 — 4 小时。
15
4. 用吸管吹吸、重悬细胞, 1000rpm 离心 5 分钟, 弃上清。用 110 μl 10% FBS IMDM 重悬细胞, 置于同位素标记管中。取 10 μl 稀释 100 倍计数, 记录。
5. 加入 100 μl ^{51}Cr (0.2mCi), 37°C, 5% CO_2 培养 1 小时。
20
6. 用含 10% FBS 的 IMDM 冲洗细胞四次, 每次 2ml。
7. 用 5ml 含 10% FBS 及 10% 条件培养基的 IMDM 重悬细胞, 均匀铺于 96 孔板, 每孔加入 100 μl 细胞悬液, 含 1×10^4 个细胞。

b. 效应细胞的制备:

1. 将免疫三次后的 C57 小鼠脱颈处死, 在 75% 乙醇里浸泡 1-2 分钟。
25
2. 在超净台中无菌取小鼠脾脏, 置于装有 2ml 10% FBS IMDM 的无菌平皿里。
3. 用无菌毛玻璃片将脾脏磨碎, 用 1ml 加样器反复吹洗毛玻璃片上的细胞。
4. 将细胞悬液经 200 目尼龙网滤至 10ml 试管内。
30

- 5 加入 2ml 0.83%氯化氨 (NH₄Cl), 室温放置 10 分钟。
6. 1000rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清。
7. 用 2ml 10% FBS IMDM 重悬细胞, 将细胞移入一 50ml 培养瓶中, 补加 4ml 10% FBS IMDM。
- 5 8. 加入 10% 条件培养基及 200ug 的疫苗 (卡介苗 Hsp65-单拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白)。37°C, 5% CO₂ 培养三天后, 补加 10% 条件培养基及 200ug 的疫苗。继续培养四天。
9. 取同一只小鼠的淋巴结共 9 个, 置于一无菌平皿中, 加入 2ml 10%FBS IMDM, , 用无菌毛玻璃片将淋巴结研碎, 用 1ml 加样器反复吹洗毛玻璃片上的细胞至培养液中。
- 10 10. 将细胞悬液经 200 目无菌尼龙网滤至 50ml 培养瓶中, 加入 3ml 10%FBS IMDM。
11. 加入 10% 条件培养基及 200ug 的疫苗 (卡介苗 Hsp65-单拷贝多表位 HCV 核心抗原融合蛋白)。37°C, 5% CO₂ 培养三天后, 补加 10% 条件培养基及 200ug 的疫苗。继续培养四天。
- 15 12. 将培养了 7 天的脾细胞及淋巴结细胞取出, 计数, 调整细胞浓度。按不同效靶比 (200: 1, 100: 1 50: 1) 将效应细胞加入已铺好靶细胞的 96 孔板, 每孔加 100ul, 每个效靶比设三复孔。
13. 轻轻敲击 96 孔板板的四周以使细胞更好的混匀, 置于平板离心机
- 20 200rpm 离心 1-2 分钟。37°C, 5% CO₂ 培养 12 小时。
- 14 . 离心 96 孔板, 3000rpm , 5 分钟。每孔吸出 100ul 上清, 测放射性。

特异杀伤率 (%) = $\frac{\text{实验孔 rpm} - \text{自发释放 rpm}}{\text{最大释放 rpm} - \text{自发释放 rpm}}$

25

实验结果如表 1 和图 13 所示: 对照组特异杀伤率在三种效靶比中无明显差别, 为 0%-1.1%

疫苗组特异杀伤率: 效靶比 50: 1 为 $\bar{}$ 10%

效靶比 100: 1 为 $\bar{}$ 24%

效靶比 200: 1 为 $\bar{}$ 56%

30

结论是经卡介苗热休克蛋白 65-多表位 HCV 核心抗原融合蛋白重组蛋白疫苗免疫的小鼠体内分离的淋巴细胞能特异性地杀伤表达 HCV 核心抗原表位的 B16 细胞。说明此卡介苗热休克蛋白 65 和多表位 HCV 核心抗原融合蛋白重组蛋白疫苗能激活丙型肝炎病毒特异性 CTL，这种 CTL 能以 MHC 限制的方式杀伤表达 HCV 核心抗原表位的靶细胞。

表 1

效应细胞来源		特异性杀伤率 (%)				平均值
		鼠 1	鼠 2	鼠 3	鼠 4	
		效靶比 50:1				
PBS 组 脾		-1.1	0.6	1.2	-0.8	-0.025
	淋巴结	-0.4	0.3	1.6	0.4	0.45
疫苗组 脾		8.2	7.8	6.4	7.4	4.45
	淋巴结	9.3	11.4	8.6	9.7	9.75
		效靶比 100:1				
PBS 组 脾		0.5	1.1	-0.2	-0.6	0.2
	淋巴结	0.8	1.3	0.7	1.2	1
疫苗组 脾		18.6	19.4	23.8	23.6	21.35
	淋巴结	23.3	26.7	25.9	29.2	26.13
		效靶比 200:1				
PBS 组 脾		0.6	1.3	-0.1	0.9	0.65
	淋巴结	-0.2	1.8	0.9	1.7	1.05
疫苗组 脾		48.9	51.2	53.4	46.3	49.95
	淋巴结	59.4	63.8	62.7	57.6	60.85

序列表

<110> 北京迪威华宇生物技术有限公司

<120> 预防和治疗人丙型肝炎病毒感染的重组疫苗及其用途

<130> I020106

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Glu Ile Asp Asp
1 5 10 15

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Glu
1 5 10 15

Asp Ser

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 3

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
1 5 10 15

Glu Asn Asp Glu Ile Glu
20

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 4

Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Asn
1 5 10 15

Asp Glu

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 5

Leu Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Glu
1 5 10 15

Ile Asp Asn Glu
20

<210> 6
<211> 1965
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1965)
<223>

<400> 6

atg gcc aag aca att gcg tac gac gaa gag gcc cgt cgc ggc ctc gag
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
1 5 10 15

48

cgg ggc ttg aac gcc ctc gcc gat gcg gta aag gtg aca ttg ggc ccc Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro 20 25 30	96
aag ggc cgc aac gtc gtc ctg gaa aag aag tgg ggt gcc ccc acg atc Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile 35 40 45	144
acc aac gat ggt gtg tcc atc gcc aag gag atc gag ctg gag gat ccg Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro 50 55 60	192
tac gag aag atc ggc gcc gag ctg gtc aaa gag gta gcc aag aag acc Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr 65 70 75 80	240
gat gac gtc gcc ggt gac ggc acc acg acg gcc acc gtg ctg gcc cag Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln 85 90 95	288
gcg ttg gtt cgc gag ggc ctg cgc aac gtc gcg gcc ggc gcc aac ccg Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro 100 105 110	336
ctc ggt ctc aaa cgc ggc atc gaa aag gcc gtg gag aag gtc acc gag Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Lys Val Thr Glu 115 120 125	384
acc ctg ctc aag ggc gcc aag gag gtc gag acc aag gag cag att gcg Thr Leu Leu Lys Gly Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Glu Gln Ile Ala 130 135 140	432
gcc acc gca gcg att tcg gcg ggt gac cag tcc atc ggt gac ctg atc Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile 145 150 155 160	480
gcc gag gcg atg gac aag gtg ggc aac gag ggc gtc atc acc gtc gag Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu 165 170 175	528
gag tcc aac acc ttt ggg ctg cag ctc gag ctc acc gag ggt atg cgg Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg 180 185 190	576
ttc gac aag ggc tac atc tcg ggg tac ttc gtg acc gac ccg gag cgt Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Pro Glu Arg 195 200 205	624

cag gag gcg gtc ctg gag gac ccc tac atc ctg ctg gtc agc tcc aag Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys 210 215 220	672
gtg tcc act gtc aag gat ctg ctg ccg ctg ctc gag aag gtc atc gga Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gly 225 230 235 240	720
gcc ggt aag ccg ctg ctg atc atc gcc gag gac gtc gag ggc gag gcg Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala 245 250 255	768
ctg tcc acc ctg gtc gtc aac aag atc cgc ggc acc ttc aag tcg gtg Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val 260 265 270	816
gcg gtc aag gct ccc ggc ttc ggc gac cgc cgc aag gcg atg ctg cag Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu Gln 275 280 285	864
gat atg gcc att ctc acc ggt ggt cag gtg atc agc gaa gag gtc ggc Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser Glu Glu Val Gly 290 295 300	912
ctg acg ctg gag aac gcc gac ctg tcc ctg cta ggc aag gcc cgc aag Leu Thr Leu Glu Asn Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gly Lys Ala Arg Lys 305 310 315 320	960
gtc gtg gtc acc aag gac gag acc acc atc gtc gag ggc gcc ggt gac Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu Gly Ala Gly Asp 325 330 335	1008
acc gac gcc atc gcc gga cga gtg gcc cag atc cgc cag gag atc gag Thr Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Gln Glu Ile Glu 340 345 350	1056
aac agc gac tcc gac tac gac cgt gag aag ctg cag gag cgg ctg gcc Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala 355 360 365	1104
aag ctg gcc ggt ggt gtc gcg gtc atc aag gcc ggt gcc gcc acc gac Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly Ala Ala Thr Asp 370 375 380	1152
gtc gaa ctc aag gag cgc aag cac cgc atc gag gat gcg gtt cgc aat Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn 385 390 395 400	1200
gcc aag gcc gcc gtc gag gag ggc atc gtc gcc ggt ggg ggt gtg acg	1248

Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly Val Thr	405	410	415	
ctg ttg caa gcg gcc ccg acc ctg gac gag ctg aag ctc gaa ggc gac				1296
Leu Leu Gln Ala Ala Pro Thr Leu Asp Glu Leu Lys Leu Glu Gly Asp	420	425	430	
gag gcg acc ggc gcc aac atc gtg aag gtg gcg ctg gag gcc ccg ctg				1344
Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Lys Val Ala Leu Glu Ala Pro Leu	435	440	445	
aag cag atc gcc ttc aac tcc ggg ctg gag ccg ggc gtg gtg gcc gag				1392
Lys Gln Ile Ala Phe Asn Ser Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu	450	455	460	
aag gtg cgc aac ctg ccg gct ggc cac gga ctg aac gct cag acc ggt				1440
Lys Val Arg Asn Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Ala Gln Thr Gly	465	470	475	480
gtc tac gag gat ctg ctc gct gcc ggc gtt gct gac ccg gtc aag gtg				1488
Val Tyr Glu Asp Leu Leu Ala Ala Gly Val Ala Asp Pro Val Lys Val	485	490	495	
acc cgt tcg gcg ctg cag aat gcg gcg tcc atc gcg ggg ctg ttc ctg				1536
Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Gly Leu Phe Leu	500	505	510	
acc acc gag gcc gtc gtt gcc gac aag ccg gaa aag gag aag gct tcc				1584
Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys Glu Lys Ala Ser	515	520	525	
gtt ccc ggt ggc ggc gac atg ggt ggc atg gat ttc cat atg gct agc				1632
Val Pro Gly Gly Gly Asp Met Gly Gly Met Asp Phe His Met Ala Ser	530	535	540	
gaa ttc atg tct act aac ccg aaa ccg cag cgt aaa act aaa gaa atc				1680
Glu Phe Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Glu Ile	545	550	555	560
gac gac ttc gct gac ctg atg ggt tac atc ccg ctg gtt ggt gct ccg				1728
Asp Asp Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro	565	570	575	
ctg gaa gac tct gaa ggt gtt tac ctg ctg ccg cgt cgt ggc ccg cgc				1776
Leu Glu Asp Ser Glu Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg	580	585	590	
ctg ggc gtt cgc gct gaa aac gac gaa atc gaa ggt ccg cgt ctg ggt				1824
Leu Gly Val Arg Ala Glu Asn Asp Glu Ile Glu Gly Pro Arg Leu Gly				

595	600	605	
gtt cgt gct act cgt aaa act tct gaa cgt aac gac gaa ctg cgt aaa			1872
Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Asn Asp Glu Leu Arg Lys			
610	615	620	
acc tcc gaa cgt tct cag ccg cgt ggt cgt cgt cag gaa atc gac aac			1920
Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Glu Ile Asp Asn			
625	630	635	640
gaa aag ctt gcg gcc gca ctc gag cac cac cac cac cac tga			1965
Glu Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His			
645	650		
<210> 7			
<211> 654			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<400> 7			
Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu			
1	5	10	15
Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro			
	20	25	30
Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile			
	35	40	45
Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro			
	50	55	60
Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr			
65	70	75	80
Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln			
	85	90	95
Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro			
	100	105	110

Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Lys Val Thr Glu
 115 120 125

Thr Leu Leu Lys Gly Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Glu Gln Ile Ala
 130 135 140

Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile
 145 150 155 160

Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu
 165 170 175

Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg
 180 185 190

Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Pro Glu Arg
 195 200 205

Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys
 210 215 220

Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gly
 225 230 235 240

Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala
 245 250 255

Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val
 260 265 270

Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu Gln
 275 280 285

Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser Glu Glu Val Gly
 290 295 300

Leu Thr Leu Glu Asn Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gly Lys Ala Arg Lys
305 310 315 320

Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu Gly Ala Gly Asp
325 330 335

Thr Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Gln Glu Ile Glu
340 345 350

Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala
355 360 365

Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly Ala Ala Thr Asp
370 375 380

Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn
385 390 395 400

Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly Val Thr
405 410 415

Leu Leu Gln Ala Ala Pro Thr Leu Asp Glu Leu Lys Leu Glu Gly Asp
420 425 430

Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Lys Val Ala Leu Glu Ala Pro Leu
435 440 445

Lys Gln Ile Ala Phe Asn Ser Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu
450 455 460

Lys Val Arg Asn Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Ala Gln Thr Gly
465 470 475 480

Val Tyr Glu Asp Leu Leu Ala Ala Gly Val Ala Asp Pro Val Lys Val
485 490 495

Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Gly Leu Phe Leu

500				505				510							
Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Val	Ala	Asp	Lys	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Ala	Ser
		515					520					525			
Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Gly	Gly	Met	Asp	Phe	His	Met	Ala	Ser
	530					535					540				
Glu	Phe	Met	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Arg	Lys	Thr	Lys	Glu	Ile
545					550					555					560
Asp	Asp	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Pro
				565					570					575	
Leu	Glu	Asp	Ser	Glu	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg
			580						585				590		
Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Glu	Asn	Asp	Glu	Ile	Glu	Gly	Pro	Arg	Leu	Gly
		595					600					605			
Val	Arg	Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Glu	Arg	Asn	Asp	Glu	Leu	Arg	Lys
	610					615					620				
Thr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Glu	Ile	Asp	Asn
625					630					635					640
Glu	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	His	His
				645					650						

<210> 8
 <211> 285
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (285)
 <223>

<400> 8

atg tct act aac ccg aaa ccg cag cgt aaa act aaa gaa atc gac gac 48
 Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Glu Ile Asp Asp
 1 5 10 15

ttc gct gac ctg atg ggt tac atc ccg ctg gtt ggt gct ccg ctg gaa 96
 Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Glu
 20 25 30

gac tct gaa ggt gtt tac ctg ctg ccg cgt cgt ggc ccg cgc ctg ggc 144
 Asp Ser Glu Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly
 35 40 45

gtt cgc gct gaa aac gac gaa atc gaa ggt ccg cgt ctg ggt gtt cgt 192
 Val Arg Ala Glu Asn Asp Glu Ile Glu Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
 50 55 60

gct act cgt aaa act tct gaa cgt aac gac gaa ctg cgt aaa acc tcc 240
 Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Asn Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ser
 65 70 75 80

gaa cgt tct cag ccg cgt ggt cgt cgt cag gaa atc gac aac gaa 285
 Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Glu Ile Asp Asn Glu
 85 90 95

<210> 9

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 9

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Glu Ile Asp Asp
 1 5 10 15

Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Glu
 20 25 30

Asp Ser Glu Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly
 35 40 45

Val Arg Ala Glu Asn Asp Glu Ile Glu Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
 50 55 60

<400> 13
 gaattcatgt ctactaaccg gaaaccgcag cgtaaaacta aagaaatcga cgacttcgct 60
 gacctgatgg gttacatccc gctg 84

<210> 14
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 14
 aagctttttcg ttgtcgattt cctgacgacg accacgcggc tgagaacgtt cggaggtttt 60
 acgcagttcg tcgttacgtt cagaagt 87

<210> 15
 <211> 297
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 15
 gaattcatgt ctactaaccg gaaaccgcag cgtaaaacta aagaaatcga cgacttcgct 60
 gacctgatgg gttacatccc gctggttggt gctccgctgg aagactctga aggtgtttac 120
 ctgctgccgc gtcgtggccc gcgcctgggc gttcgcgctg aaaacgacga aatcgaaggt 180
 ccgcgtctgg gtgttcgtgc tactcgtaaa acttctgaac gtaacgacga actgcgtaaa 240
 acctccgaac gttctcagcc gcgtggctcgt cgtcaggaaa tcgacaacga aaagctt 297

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 16
 ccatggccaa gacaattgcg 20

<210> 17
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 17

accgaattcg ctagccatat ggaaatccat gccacccat

39

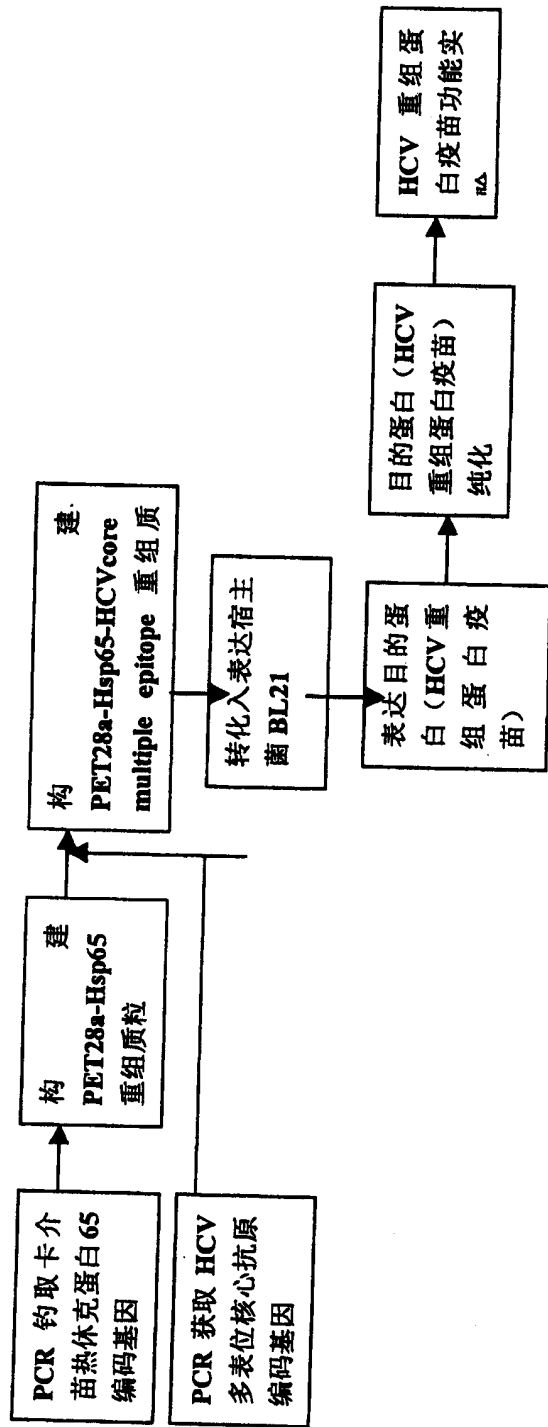


图1

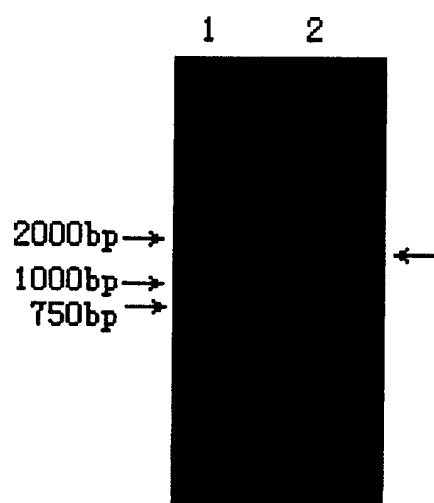


图 2

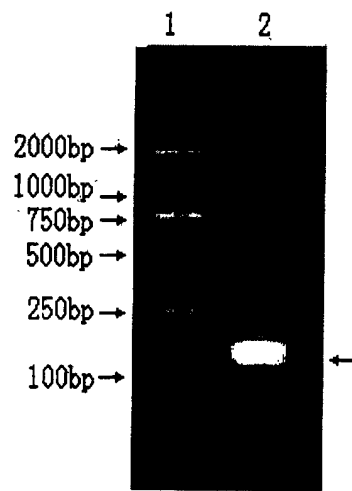


图 3

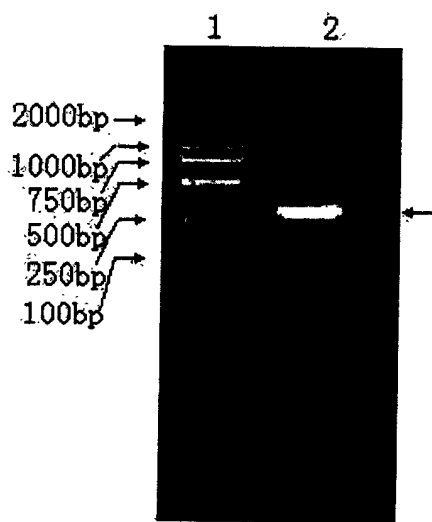


图 4

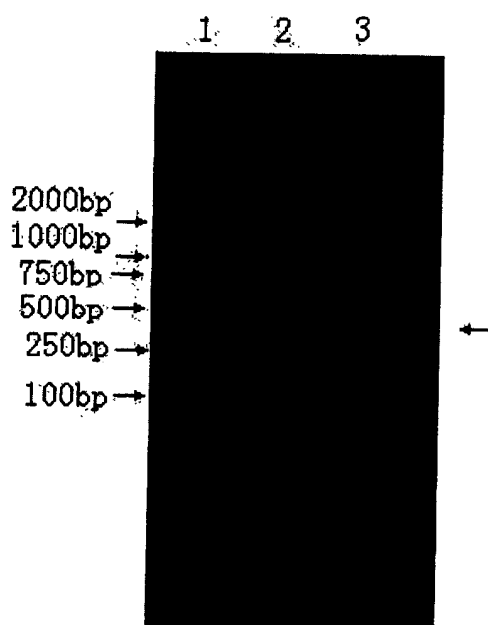


图 5

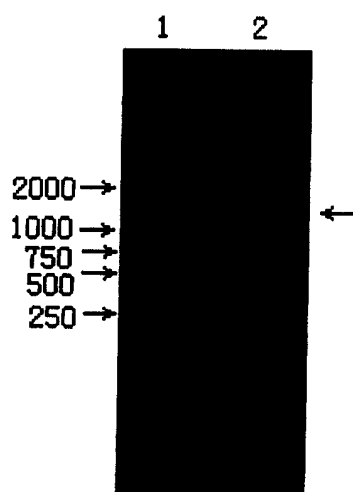


图 6

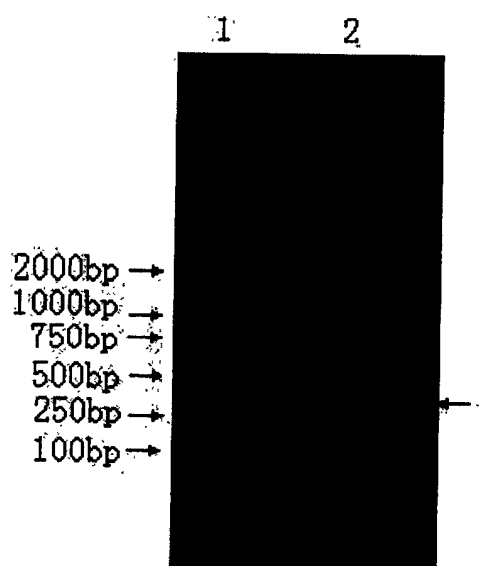


图 7

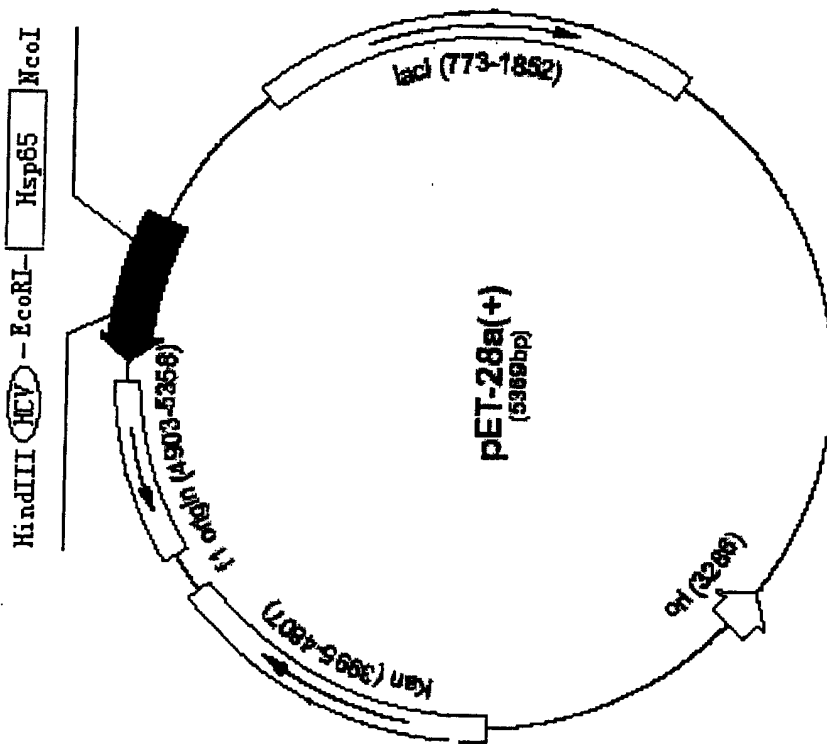


图 8

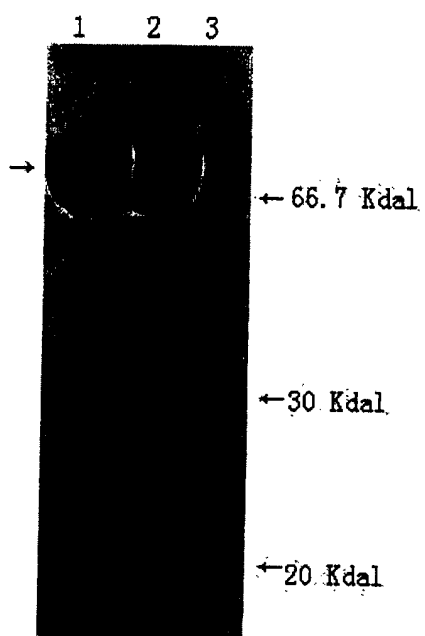


图 9



图 10

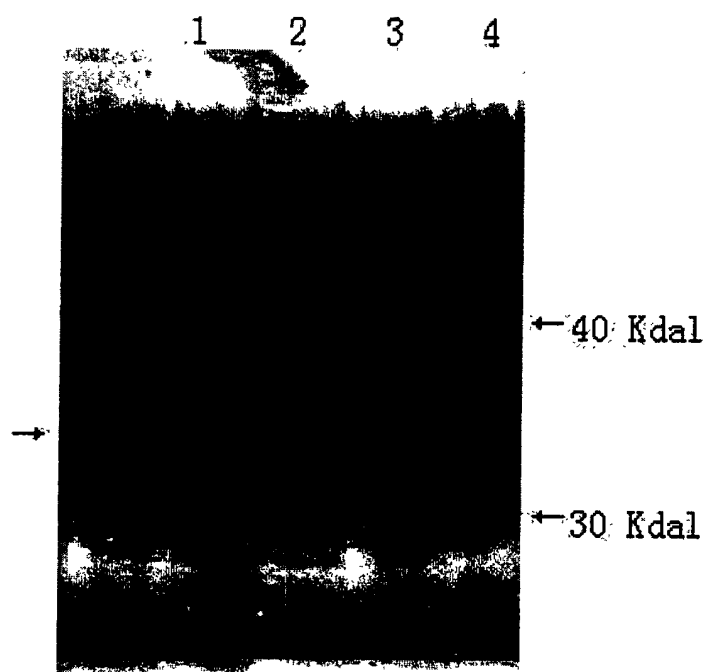


图 11

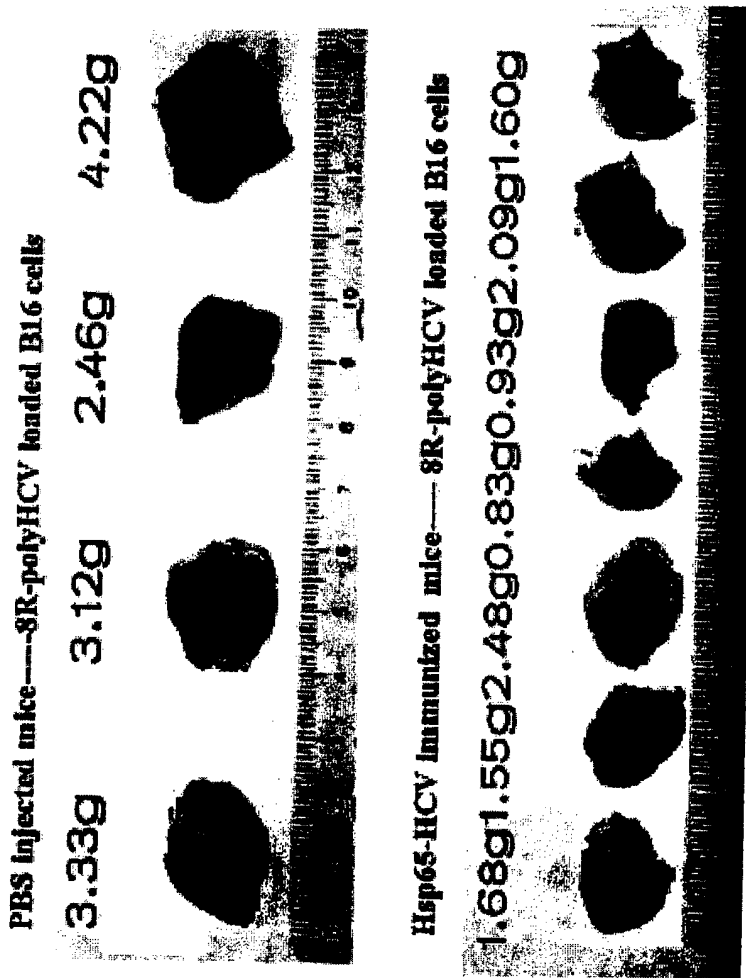


图 12

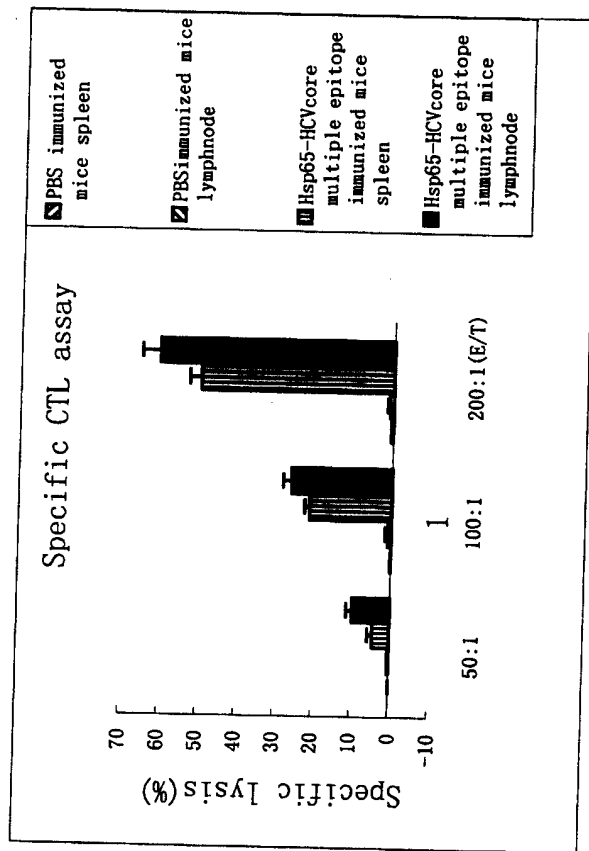


图 13