

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/005

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/51 C12N 15/63

A61K 39/29 G01N 33/576

G01N 33/68

[21] 申请号 00130634.0

[43]公开日 2002年4月24日

[11]公开号 CN 1345775A

[22]申请日 2000.9.30 [21]申请号 00130634.0

[71]申请人 养生堂有限公司

地址 570216 海南省海口市金盘工业区金牛路6号

[72]发明人 夏宁邵 张 军 李少伟
葛胜祥 顾 颖 何志强

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书7页 说明书37页 附图页数0页

[54]发明名称 用于预防、诊断及治疗戊型肝炎病毒的多肽,及它们作为诊断试剂和疫苗

[57]摘要

本发明涉及对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体,用于编码 HEV - ORF2 多肽的 DNA 分子,含有该 DNA 分子的表达载体,含有 CDR 多肽的抗体分子,用于编码 CDR 多肽的 DNA 分子,及它们的用途,尤其是在戊型肝炎预防、诊断及治疗方面的用途,如作为戊型肝炎的诊断试剂和疫苗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1. 对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体,其氨基末端位于第一个序列的225位至459位氨基酸之间,羧基末端位于第一个序列的578位氨基酸至610位氨基酸之间。

2. 对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体,其氨基末端位于第一个序列的374位至429位氨基酸之间,其羧基末端位于第一个序列的578位氨基酸至610位氨基酸之间。

3. 对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体,其氨基末端位于第一个序列的394位至429位氨基酸之间,其羧基末端位于第一个序列的578位氨基酸至610位氨基酸之间。

4. 肝炎病毒第二读码框架的多肽,其序列为第二个序列。

第二个序列:

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr
Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His
Asp Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn
Gln His Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro
Phe Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala
Ala Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr
Val Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala
Val Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro

Leu Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu
Arg Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr
Pro Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn
Ala Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly
Ala Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Val

5. 对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第三个序列。

第三个序列:

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr
Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile
Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro
Phe Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala
Ala Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr
Val Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala
Val Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro
Leu Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu
Arg Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr
Pro Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn
Ala Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly
Ala Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

6. 对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第四个序列。

第四个序列:

Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
His Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

7. 对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第五个序列。

第五个序列:

His Asp Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
His Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

8. 权利要求 1 至 7 的多肽，其还包括与其同源性至少 70% 以上的多肽。

9. 权利要求 1 至 7 的多肽，其还包括与其同源性至少 80% 以上的多肽。

10. 权利要求 1 至 7 的多肽，其还包括与其同源性至少 90% 以上的多肽。

11. 权利要求 1 至 7 的多肽，其还包括其衍生多肽。

12. DNA 分子，其序列编码权利要求 1 至 11 之一的戊型肝炎病毒第二读码框架多肽。

13. 重组表达载体，其中包含权利要求 12 的 DNA 分子。

14. 用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含至少一种加在药理学上可接受的佐剂中的权利要求 1 至 11 的多肽。

15. 用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含加在药理学上可接受的佐剂中的权利要求 5 的多肽。

16. 用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含加在药理学上可接受的佐剂中的权利要求 6 的多肽。

17. 用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含加在药理学上可接受的佐剂中的 HEV-ORF2 多肽，其序列如第六个序列。

第六个序列：

Met Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
His Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

18. 用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含至少一种权利要求 12 的 DNA 分子。

19. 一种检测戊型肝炎病毒感染的方法，其包括用一定数量的至少一种权利要求 1 至 11 的多肽，与包含抗体的样本接触。

20. 一种检测戊型肝炎病毒感染的方法，其包括至少一种权利要求 14，权利要求 16，权利要求 17，权利要求 19 的抗体分子或其片段。

说 明 书

用于预防、诊断及治疗戊型肝炎病毒的多肽，及它们作为诊断试剂和疫苗

本发明涉及对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体，用于编码HEV-ORF2多肽的DNA分子，含有该DNA分子的表达载体，含有CDR多肽的抗体分子，用于编码CDR多肽的DNA分子，及它们的用途，尤其是在戊型肝炎预防、诊断及治疗方面的用途，如作为戊型肝炎的诊断试剂和疫苗。

背景技术

戊型肝炎病毒(HEV)是作为一种肠道传染性非甲非乙型肝炎的致病因子而在1983年首先被发现的(Balayan et al., 1983. Intervirology 20:23)。戊型肝炎主要流行于亚洲、非洲、中美洲的发展中国家，发达国家中的病例主要见于外来移民或出国旅行者中，可以以散发形式存在，也可出现大流行。从五十年代到九十年代间，先后有数次由于饮水污染导致的戊型肝炎暴发流行(Visvanathan, 1957. Indian J. Med. Res. (Suppl.). 45:1-30; Wong et al., 1980. Lancet. 2:882-885; Myint et al., 1985. Am J Trop Med Hyg. 34:1183-1189; Belabbes et al., 1985. J Med Virol. 16:257-263; Hau et al., 1999. Am J Trop Med Hyg. 60:277-280)。HEV感染多为自限性过程，少有慢性化，但当孕妇感染戊型肝炎时后果较为严重，病死率可高达17%以上(Tsega et al., 1992. Clin. Infec Dis. 14:961-965; Dilawari et al., 1994. Indian J Gastroenterol. 13:44-48; Hussaini et al., 1997. J Viral Hepat. 4:51-54)。

发展血清HEV抗体检测试剂的必要性早已被广大研究人员所认识，但由于感染者或感染动物的HEV病毒分泌浓度极低而几乎不可能作为血清检测试剂的抗原来源，而迄今HEV的细胞培养的效率仍极低，

同样也无法得到足够量的抗原用于检测试剂。

1991年，研究者首次获得了HEV的全长基因组序列，发现其为单股正链无包膜RNA病毒(Tam et al., 1991. *Virology* 185:120-131)。对HEV基因组的序列分析表明，约7.2kb的病毒基因组含有三个开放读码框架(ORF)。位于5'末端的ORF1编码病毒非结构蛋白，位于3'末端的ORF2编码病毒主要结构蛋白。ORF3的5'端与ORF1的3'端有一个碱基的重叠，3'端与ORF2有339个碱基的重叠。ORF3被认为编码另一个功能尚不明确的结构蛋白。(Tam et al., 1991. *Virology* 185:120-131; Aye et al., 1992. *Nucleic Acids Res.* 20:3512; Aye et al., 1993. *Virus Genes.* 7:95-109; Huang et al., 1992. *Virology.* 191:550-558; Reyes et al., 1993. *Arch Virol Suppl.* 7:15-25)。

过去HEV感染的检测主要依赖于免疫电镜技术(IEM)或免疫荧光技术，然而，这些检测技术十分繁杂，价格昂贵，而且在多数实验室难以完成。在HEV基因组克隆和测序完成之后，发展出了更灵敏的检测技术如酶联免疫吸附试验(ELISA)、蛋白印迹试验(Western blot)和聚合酶链反应(PCR)等，用于HEV感染相关标志物的检测。

ELISA技术使用HEV重组蛋白或合成多肽作为抗原检测HEV相关抗原/抗体的存在。重组蛋白多选自HEV-ORF2和HEV-ORF3的羧基端，合成多肽选用的多为HEV-ORF2上的几个线性表位。

最近的研究已发现源于HEV-ORF2的氨基端和羧基端的重组多肽片段可以自组装成病毒样颗粒(VLP)(Li et al., 1997. *J Virol* 71:7207-7213)。虽然颗粒较小，但这些病毒样颗粒在形态上和抗原性上与感染性病毒的衣壳蛋白均相近(Li et al., 1997. *J Virol* 71:7207-7213; Xing et al., 1999. *Virology* 265:35-45)。基于这些发现，看来重组多肽组装成病毒样颗粒的基本要素与全长HEV结构蛋白组装成感染性病毒颗粒的衣壳基本相同。值得注意的是，这些发现提示ORF2编码的结构蛋白本身就已足够组装出病毒衣壳。进一步看，衣壳蛋白的形成本身可能出现在全长ORF2蛋白的从112位氨基酸

到 608 位氨基酸的结构域的相互作用之下 (Xing et al., 1999. *Virology* 265:35-45)。而 ORF2 氨基端的 111 氨基酸可能主要与病毒核酸进入衣壳有关, 然而这一区域显然并不直接参与病毒衣壳的形成本身。

本发明的目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其氨基末端位于第一个序列 (其来源于戊型肝炎病毒第二读码框架且序列如后面所示) 的 225 位至 459 位氨基酸之间, 其羧基末端位于第一个序列的 578 位氨基酸至 610 位氨基酸之间。

本发明的再一目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其氨基末端位于第一个序列的 374 位至 429 位氨基酸之间, 其羧基末端位于第一个序列的 578 位氨基酸至 610 位氨基酸之间。

本发明的另一目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其氨基末端位于第一个序列的 394 位至 429 位氨基酸之间, 其羧基末端位于第一个序列的 578 位氨基酸至 610 位氨基酸之间。

本发明的另一目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第二个序列。

本发明的另一目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第三个序列。

本发明的另一目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第四个序列。

本发明的另一目的是提供对戊型肝炎病毒 (HEV) 有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体, 其序列为第五个序列。

本发明同时还涉及上述多肽的同源多肽和/或衍生多肽。

本发明的另一目的是提供 DNA 分子, 其序列编码上述之一的戊型

肝炎病毒第二读码框架多肽。

本发明的另一目的是提供重组表达载体，其中包含上述 DNA 分子。

本发明的另一目的是提供单克隆抗体，HE1F6，或其片段，特异性地与上述 HEV-ORF2 多肽结合，所述单克隆抗体由杂交瘤细胞系 1F6 分泌，所述杂交瘤细胞系的细胞保藏号为_____

本发明的另一目的是提供杂交瘤细胞系，分泌一种单克隆抗体 HE1F6，该单克隆抗体可特异性地与上述 HEV-ORF2 多肽结合，细胞保藏号为_____

本发明的另一目的是提供上述单克隆抗体 HE1F6 的互补性决定区 (CDR) 的多肽，及含有所述 CDR 多肽的抗体分子或其片段。

本发明的另一目的是提供用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含至少一种加在药物学上可接受的佐剂中的上述重组蛋白质。

本发明的另一目的是提供用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含至少一种加在药物学上可接受的佐剂中的序列为第六个序列的多肽。

本发明的另一目的是提供用于免疫个体免受戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，包含至少一种上述 DNA 分子。

本发明的另一目的是提供一种检测戊型肝炎病毒感染的方法，其包括用一定数量的至少一种上述多肽，与包含抗体的样本接触。

本发明的另一目的是提供一种检测戊型肝炎病毒感染的方法，其包括至少一种上述抗体分子或其片段。

本发明人经研究发现，氨基端位于第一个序列的 225 位至 459 位氨基酸之间，其羧基末端位于第一个序列的 578 位氨基酸至 610 位氨

氨基酸之间的 HEV-ORF2 多肽；更好是氨基末端位于第一个序列的 374 位至 429 位氨基酸之间，羧基末端位于第一个序列的 578 位氨基酸至 610 位氨基酸之间的 HEV-ORF2 多肽；更好是氨基末端位于第一个序列的 394 位至 429 位氨基酸之间，羧基末端位于第一个序列的 578 位氨基酸至 610 位氨基酸之间的 HEV-ORF2 多肽；更好是序列为第二个序列的 HEV-ORF2 多肽；更好是序列为第三个序列的 HEV-ORF2 多肽；更好是序列为第四个序列的 HEV-ORF2 多肽；更好是序列为第五个序列的 HEV-ORF2 多肽；更好是序列为第六个序列的 HEV-ORF2 多肽，通过合适的原核表达载体在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达出的这些 HEV-ORF2 多肽，去除了全长 HEV-ORF2 的 N 端部分氨基酸，同时去除了 HEV-ORF2 的 C 端部分氨基酸，从而在 *E. coli* 中表达出的重组蛋白能形成病毒样颗粒，具有高度免疫活性，并均暴露出一个与感染性病毒表面天然构相相近的构相型抗原表位，该表位可与一个识别构相表位的单克隆抗体所特异结合，这一表位的相应抗体在 HEV 感染的早期即可出现，因此可以作为 HEV 疫苗及 HEV 感染检测试剂。

本发明同时还利用表达出的上述重组蛋白免疫小鼠，制备出了几株 HEV-ORF2 特异的单克隆抗体。单克隆抗体 HE3F5 特异识别上述 HEV-ORF2 多肽上的一个线性表位，而单克隆抗体 HE1F6 特异识别 HEV-ORF2 多肽上的一个构相型表位。

本发明同时提供了一种疫苗组合物，包含序列为第六个序列的 HEV 重组蛋白，以氢氧化铝作为佐剂，免疫动物可产生良好抗体反应，可保护实验动物免受 HEV 感染。

本发明同时还提供了一个 HEV 抗体检测药盒，以上述重组蛋白作为抗原，检测标本中的 HEV 抗体。另外还使用上述单克隆抗体提供了一个 HEV 近期感染检测药盒。

术语解释

除非另外定义，这里所用的所有技术和科学名词都表达的是在本

发明涉及领域里的熟练技术人员所理解的通常含义。这里所用的命名和在细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。在本发明中，除另外指出，以下名词的含义应为：

“戊型肝炎病毒”；或“HEV”，是指一种病毒，病毒类型，或病毒类别，（I）它引起来源于水的传染性肝炎；（II）它在血清学特性上不同于甲型肝炎病毒（HAV）、乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）、和丁型肝炎病毒（HDV）；（III）该病毒含有一个同源于插入 pTZKF1(ET1.1) 中之 1.33kb cDNA 的基因组区域，所述质粒由 ATCC 寄存登记号 67717 的大肠杆菌菌株 BB4 携带。

如果使用有突变缺口矩阵和缺口障碍数为 6 或更大的 ALIGN 程序，得出两个氨基酸序列或两个核苷酸序列具有调准比数大于 5（标准偏差单位），则可认为他们是同源的（参见 Dayhoff, M.O., Atlas of protein sequence and structure (1972) Vol.5. National Biomedical Research Foundation, pp101-110, 以及该卷增刊 2. pp. 1-10）。用上文所述的 ALIGN 程序进行最大调准时如果两个序列）或它们的一部分，最好至少有 30 个氨基酸长）的氨基酸大于或相当于有 50% 相同，则它们有更好的同源性。

如果一个多肽序列包含有权利要求 1 至 7 所述多肽序列，但其 N 端和/或 C 端带有其他非所述多肽本身的相邻序列的其他氨基酸，而得到的多肽的抗原性、免疫原性等生物学性质仍然类似，则称该多肽为权利要求 1 至 7 所述多肽的衍生多肽，其相应的 DNA 分子称为衍生 DNA。如为利于表达而在权利要求 1 至 7 所述多肽序列的 N 端加上起始氨基酸甲硫氨酸或其他引导肽和/或信号肽，或在 C 端加上几个组氨酸以利于纯化等。

本发明所述的第一序列为：

第一个序列

1 Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Met Phe

Leu Pro Met 16
 17 Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg
 Arg Gly Arg 32
 33 Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg
 Val Asp Ser 48
 49 Gln Pro Phe Ala Ile Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn Pro
 Phe Ala Pro 64
 65 Asp Val Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Arg Val Arg
 Gln Pro Ala 80
 81 Arg Pro Leu Gly Ser Ala Trp Arg Asp Gln Ala Gln Arg
 Pro Ala Ala 96
 97 Ala Ser Arg Arg Arg Pro Thr Thr Ala Gly Ala Ala Pro
 Leu Thr Ala 112
 113 Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val
 Asp Ser Arg 128
 129 Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser
 Pro Leu Thr 144
 145 Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala
 Ala Pro Leu 160
 161 Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His
 Ile Met Ala 176
 177 Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg
 Ala Thr Ile 192
 193 Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr
 Ala Ile Ser 208
 209 Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser
 Val Asp Met 224
 225 Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln
 Pro Gly Ile 240

241 Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr
 Arg Asn Gln 256
 257 Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu
 Glu Ala Thr 272
 273 Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val
 Asn Ser Tyr 288
 289 Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp
 Phe Ala Leu 304
 305 Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn
 Thr Arg Val 320
 321 Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg
 Gly Ala Asp 336
 337 Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe
 Met Lys Asp 352
 353 Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly
 Arg Gly Ile 368
 369 Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly
 Gly Leu Pro 384
 385 Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr
 Ser Arg Pro 400
 401 Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr
 Thr Ser Val 416
 417 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His
 Asp Ile Asp 432
 433 Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn
 Gln His Glu 448
 449 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro
 Phe Ser Val 464
 465 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala

Ala Glu Tyr 480
 481 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr
 Val Ser Asp 496
 497 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala
 Val Ala Arg 512
 513 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro
 Leu Ser Thr 528
 529 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu
 Arg Gly Lys 544
 545 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr
 Pro Tyr Asn 560
 561 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn
 Ala Ala Gly 576
 577 His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly
 Ala Gly Pro 592
 593 Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser
 Val Leu Ala 608
 609 Leu Leu Glu Asp Thr Met Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His
 Thr Phe Asp 624
 625 Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly
 Cys Ala Phe 640
 641 Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys
 Val Gly Lys 656
 657 Thr Arg Glu Leu ***
 661

HEV 重组蛋白

HEV 重组多肽

多肽 414-603, 序列为第四个序列, 位于第一个序列的 414 位氮

基酸至 603 位氨基酸。

第四个序列:

Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile
Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser
Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser
Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala
Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly
Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

多肽 459-603, 序列为第七个序列, 位于第一个序列的 459 位氨基酸至 603 位氨基酸。

第七个序列:

Ser Arg Pro Phe Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser
Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser
Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala
Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly
Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

多肽 429-603, 序列为第五个序列, 位于第一个序列的 429 位氨基酸至 603 位氨基酸。

第五个序列:

His Asp Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser

Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser
Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser
Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala
Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly
Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

多肽 394-603，序列为第三个序列，位于第一个序列的 394 位氨基酸至 603 位氨基酸。

第三个序列：

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr
Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln

His Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

多肽 374-603, 序列为第八个序列, 位于第一个序列的 374 位氨基酸至 603 位氨基酸。

第八个序列:

Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro

Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser
Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr

Ser Val
 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
 Ile Asp
 Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
 His Glu
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 Ser Val
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
 Glu Tyr
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
 Ser Asp
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
 Ala Arg
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
 Ser Thr
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
 Gly Lys
 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
 Tyr Asn
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
 Ala Gly
 His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
 Gly Pro
 Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

多肽 225-603, 序列为第九个序列, 位于第一个序列的 225 位氨基酸至 603 位氨基酸。

第九个序列:

Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro
Gly Ile
Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg
Asn Gln
Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu
Ala Thr
Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn
Ser Tyr
Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe
Ala Leu
Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr
Arg Val
Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly
Ala Asp
Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met
Lys Asp
Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg
Gly Ile
Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly
Leu Pro
Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser
Arg Pro
Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr
Ser Val
Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
Ile Asp
Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
His Glu
Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe

Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

多肽 394-606，序列为第二个序列，位于第一个序列的 394 位氨基酸至 606 位氨基酸。

第二个序列：

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr
Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln

His Glu
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 Ser Val
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
 Glu Tyr
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
 Ser Asp
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
 Ala Arg
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
 Ser Thr
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
 Gly Lys
 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
 Tyr Asn
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
 Ala Gly
 His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
 Gly Pro
 Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Val

多肽 394-610, 序列为第十个序列, 位于第一个序列的 394 位氨基酸至 610 位氨基酸。

第十个序列:

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro
 Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr
 Ser Val
 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
 Ile Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
 His Glu
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 Ser Val
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
 Glu Tyr
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
 Ser Asp
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
 Ala Arg
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
 Ser Thr
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
 Gly Lys
 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
 Tyr Asn
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
 Ala Gly
 His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
 Gly Pro
 Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Val
 Leu Ala
 Leu Leu

多肽 394-593, 序列为第十一个序列, 位于第一个序列的 394 位氨基酸至 593 位氨基酸。

第十一个序列:

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr

Ser Val
 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
 Ile Asp
 Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
 His Glu
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 Ser Val
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
 Glu Tyr
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
 Ser Asp
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
 Ala Arg
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
 Ser Thr
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
 Gly Lys
 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
 Tyr Asn
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
 Ala Gly
 His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala
 Gly Pro
 Val

多肽 394-583, 序列为第十二个序列, 位于第一个序列的 394 位氨基酸至 583 位氨基酸。

第十二个序列:

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr
 Ser Val
 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
 Ile Asp
 Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
 His Glu
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 Ser Val
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
 Glu Tyr
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
 Ser Asp
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
 Ala Arg
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
 Ser Thr
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
 Gly Lys
 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
 Tyr Asn
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
 Ala Gly
 His Arg Val Ala Ile Ser Thr

多肽 394-578, 序列为第十三个序列, 位于第一个序列的 394 位氨基酸至 578 位氨基酸。

第十三个序列:

Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr

Ser Val
 Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp
 Ile Asp
 Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln
 His Glu
 Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe
 Ser Val
 Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala
 Glu Tyr
 Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val
 Ser Asp
 Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val
 Ala Arg
 Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu
 Ser Thr
 Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg
 Gly Lys
 Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro
 Tyr Asn
 Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala
 Ala Gly
 His Arg

多肽 193C, 序列为第六个序列, 其第一位氨基酸为甲硫氨酸, 其后为第一个序列的 394 位氨基酸至 578 位氨基酸的多肽。

第六个序列:

Met Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile

Asp

Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His
Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser
Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu
Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser
Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala
Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser
Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly
Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala
Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly
Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro

本发明同样也涉及上述多肽的同源多肽及衍生多肽。

编码多肽的 DNA 分子是通过 PCR 方法从质粒 pGEX-ORF2 中扩增出来。质粒 pGEX-ORF2 中带有 HEV-ORF2 的全长编码基因。用 5'端带有 Nde I 位点, 3'端带有 EcoR I 位点的相应引物扩增出相应片段, 插入原核表达质粒 pTO-T7 的 Nde I/EcoR I 位点中, 并在大肠杆菌表达系统中进行表达。表达出的重组蛋白在 N 端首先是一个甲硫氨酸, 其后

为相应多肽序列。参见实施例 1 至 11。

上述产生重组多肽的编码顺序也可从其他携带 HEV-ORF2 基因的克隆载体而来，或通过拉链 PCR 的方法直接人工合成而得，或是通过其他本领域内技术人员可以想见的其他方法得到。

HEV 重组蛋白疫苗制备

上述 HEV 重组蛋白依照通常的方法制备成疫苗组合物，以提高蛋白的免疫原性。例如，在其中一个组合物，多肽 193C（序列为第六个序列）吸附于氢氧化铝佐剂；在另一个组合物，多肽 194-603 吸附于氢氧化铝佐剂。

重组蛋白疫苗免疫方法

在一个方面，本发明提供了一种使个体免受 HEV 感染的方法，即给个体注入本发明的疫苗组合物，例如肌肉注射，或是皮下注射。

在该方法中使用的更好的疫苗组合物是包含 HEV 抗原，其序列为：N 端为一个甲硫氨酸，自第二个氨基酸开始序列为：第二个序列，或第三个序列，或第四个序列，或第五个序列，或第六个序列，或第七个序列，或第八个序列，或第九个序列，或第十个序列，或第十一个序列，或第十二个序列，或上述序列的同源序列或衍生序列。

更好的，上述疫苗组合物通过系列肌肉注射给药，例如，在 0 天，10 天，30 天给予 3 个剂量，或在 0 天，28 天给予两个剂量。每个剂量可以从 2 μ g 重组蛋白到 100 μ g 重组蛋白，更好地是每个剂量 5 μ g ~ 10 μ g 重组蛋白。

在细节如实施例 12 的方法中，用加入铝佐剂的抗原多肽 414-603（N 端带一甲硫氨酸）肌肉注射免疫恒河猴。三只恒河猴按 0，10，30 天间隔接受的 3 个剂量的免疫，每个剂量含 10 μ g 重组多肽 414-603。通过 EIA 实验，在第 2 周时，三只猴子中的两只血清中均已可检测到

明显抗体产生，另 7 一只在第 3 周也已产生抗体，在第 5 周时，三只猴子的血清抗体滴度均达高峰。

在第 6 周时，猴血清抗体滴度在 $1:10^4 \sim 1:10^5$ ，此时用猴 HEV 感染性胆汁静脉注射攻击，该感染性胆汁携带大量感染性 HEV 病毒颗粒。攻击后定期收集血清和粪便，检测血清 ALT（转氨酶）水平，检测粪便标本中排毒情况。结果连续观察 2 月，免疫组始终未见血清 ALT 水平的异常，也未检出粪便排毒。而 3 只未免疫对照组在攻毒 30 天内先后出现 ALT 的明显升高，黄疸，粪便排毒持续 5~8 周。详见实施例 12。

单克隆抗体 HE1F6

在细节如实施例 13 的方法中，以重组多肽 414-603 为抗原，通过本领域研究人员熟知的常规单克隆抗体制备方法，筛选出了小鼠杂交瘤细胞系 HE1F6 及其分泌的单克隆抗体 HE1F6。该单克隆抗体特异性识别 HEV-ORF2 多肽上一个天然构相型表位。其证据如下：（I）用所述单克隆抗体对重组多肽 414-603 进行蛋白印迹实验，结果未煮沸样品见重组蛋白多聚体位置显色明显，单体部分显色微弱；而煮沸样品未见显色，说明该单克隆抗体识别表位为构相依赖型表位；（II）用所述单克隆抗体对急性期人 HEV 血清或猴 HEV 血清进行阻断实验，抑制率均在 50% 以上，提示其所识别表位为 HEV 天然表位；（III）以所述单克隆抗体进行免疫捕获 PCR，结果能捕获到标本中的 HEV 病毒颗粒，提示该单克隆抗体识别表位暴露于天然病毒表面。

本发明提供的单克隆抗体 HE1F6 和/或其片段可用于检测标本中 HEV 抗原或抗体或病毒核酸。如用于 EIA 试剂盒或免疫捕获 PCR。

单克隆抗体 HE3F5

在细节如实施例 13 的方法中，以重组多肽 414-603 为抗原，通过本领域研究人员熟知的常规单克隆抗体制备方法，筛选出了小鼠杂交瘤细胞系 HE3F5 及其分泌的单克隆抗体 HE3F5。该单克隆抗体特异性

识别 HEV-ORF2 多肽上一个线性表位。其证据如下：(I) 用所述单克隆抗体对重组多肽 414-603 进行蛋白印迹实验，结果未煮沸样品见重组蛋白单体位置显色明显强于多聚体部分，煮沸样品显色依然未见减弱，说明该单克隆抗体识别表位为线性表位；(II) 用所述单克隆抗体对急性期人 HEV 血清或猴 HEV 血清进行阻断实验，抑制率在 30% 以上，提示其所识别表位为 HEV 天然表位。

本发明提供的单克隆抗体 HE3F5 和/或其片段可用于检测标本中 HEV 抗原或抗体或病毒核酸。如用于 EIA 试剂盒或免疫捕获 PCR。

实施例

实施例 1:

序列为第六个序列的多肽 193C 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因 (香港大学吴文翰教授赠送) 为模板, 用引物 A 和 B, 对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒, 35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收, 经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后, 用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pTO-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG ACA TCT GTA GAG AAT GCT CA-3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA TGC GGA ATG GGG GGC-3'

多肽 193C 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*, 挑取单克隆, 用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0, 用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 190rpm, 6 小时。离心收集菌体, 用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮, 超声破碎菌体, 离心收集包涵体, 用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮, 离心收集包涵体, 再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽, 将其对 100 倍体积的 1XPBS (pH7.45) 在 25℃ 下进行透析复性, 其中换液 3 次。离心得复性上清

液，再用高效液相分子筛色谱（制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP）进行纯化，色谱条件为：流速 4ml/分钟，1XPBS（pH7.45）洗脱，UV280nm 检测。

实施例 2:

多肽 459-603 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因（香港大学吴教授赠送）为模板，用引物 A 和 B，对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为：94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒，35 个循环（BioMetra T-Gradient）。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收，经过 DNA 纯化柱（华舜公司）纯化后，用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG TCG CGC CCT TTT T-3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA TGC GGA ATG GGG GGC-3'

多肽 459-603 的表达和纯化：将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*，挑取单克隆，用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0，用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导，诱导条件为：25℃，190rpm，6 小时。离心收集菌体，用细菌裂解液（50mM Tris-HCl pH7.2，5mM EDTA，300mM NaCl）悬浮，超声破碎菌体，离心收集包涵体，用含有 2% Triton X-100 的溶液 I（20mM Tris-HCl pH8.5，5mM EDTA，100mM NaCl）悬浮，离心收集包涵体，再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽，将其对 100 倍体积的 1XPBS（pH7.45）在 25℃ 下进行透析复性，其中换液 3 次。离心得复性上清液，再用高效液相分子筛色谱（制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP）进行纯化，色谱条件为：流速 4ml/分钟，1XPBS（pH7.45）洗脱，UV280nm 检测。

实施例 3:

多肽 429-603 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因 (香港大学吴教授赠送) 为模板, 用引物 A 和 B, 对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒, 35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收, 经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后, 用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAT GAC ATC GAC CTC G-3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA TGC GGA ATG GGG GGC-3'

多肽 429-603 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*, 挑取单克隆, 用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0, 用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 190rpm, 6 小时。离心收集菌体, 用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮, 超声破碎菌体, 离心收集包涵体, 用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮, 离心收集包涵体, 再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽, 将其对 100 倍体积的 1XPBS (pH7.45) 在 25℃ 下进行透析复性, 其中换液 3 次。离心得复性上清液, 再用高效液相分子筛色谱 (制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP) 进行纯化, 色谱条件为: 流速 4ml/分钟, 1XPBS (pH7.45) 洗脱, UV280nm 检测。

实施例 4:

多肽 394-603 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因 (香港大学吴教授赠送) 为模板, 用引物 A 和 B, 对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒, 35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收, 经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后, 用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAG CTG TTC TAC TCT CGT C-3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA TGC GGA ATG GGG GGC-3'

多肽 394-603 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli*. ERR2566, 挑取单克隆, 用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0, 用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 190rpm, 6 小时。离心收集菌体, 用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮, 超声破碎菌体, 离心收集包涵体, 用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮, 离心收集包涵体, 再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽, 将其对 100 倍体积的 1XPBS (pH7.45) 在 25℃ 下进行透析复性, 其中换液 3 次。离心得复性上清液, 再用高效液相分子筛色谱 (制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP) 进行纯化, 色谱条件为: 流速 4ml/分钟, 1XPBS (pH7.45) 洗脱, UV280nm 检测。

实施例 5:

多肽 374-603 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因 (香港大学吴教授赠送) 为模板, 用引物 A 和 B, 对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒, 35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收, 经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后, 用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG AAC CTT GCT GAC ACC CTG-3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA TGC GGA ATG GGG GGC-3'

多肽 374-603 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli*. ERR2566, 挑取单克隆, 用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0, 用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 190rpm, 6 小时。离心收集菌体, 用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮, 超声破碎

菌体，离心收集包涵体，用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮，离心收集包涵体，再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽，将其对 100 倍体积的 1XPBS (pH7.45) 在 25℃ 下进行透析复性，其中换液 3 次。离心得复性上清液，再用高效液相分子筛色谱 (制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP) 进行纯化，色谱条件为：流速 4ml/分钟，1XPBS (pH7.45) 洗脱，UV280nm 检测。

实施例 6:

多肽 225-603 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因 (香港大学吴教授赠送) 为模板，用引物 A 和 B，对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为：94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒，35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收，经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后，用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG AAT TCA ATA ACC TCG ACG-3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA TGC GGA ATG GGG GGC-3'

多肽 225-603 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*，挑取单克隆，用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0，用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导，诱导条件为：25℃，190rpm，6 小时。离心收集菌体，用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮，超声破碎菌体，离心收集包涵体，用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮，离心收集包涵体，再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽，将其对 100 倍体积的 1XPBS (pH7.45) 在 25℃ 下进行透析复性，其中换液 3 次。离心得复性上清液，再用高效液相分子筛色谱 (制备型 Beckman System Gold Nouveau

125NMP/166NMP) 进行纯化, 色谱条件为: 流速 4ml/分钟, 1XPBS (pH7.45) 洗脱, UV280nm 检测。

实施例 7:

多肽 394-607 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因(香港大学吴教授赠送)为模板, 用引物 A 和 B, 对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒, 35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收, 经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后, 用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAG CTG TTC TAC TCT CGT C -3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA CAC AGA GTG GGG GGC TAA-3'

多肽 394-606 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *Ecoli. ERR2566*, 挑取单克隆, 用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0, 用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 190rpm, 6 小时。离心收集菌体, 用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮, 超声破碎菌体, 离心收集包涵体, 用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮, 离心收集包涵体, 再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽, 将其对 100 倍体积的 1XPBS (pH7.45) 在 25℃ 下进行透析复性, 其中换液 3 次。离心得复性上清液, 再用高效液相分子筛色谱 (制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP) 进行纯化, 色谱条件为: 流速 4ml/分钟, 1XPBS (pH7.45) 洗脱, UV280nm 检测。

实施例 8:

多肽 394-610 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因(香港大学吴教授赠送)为模板, 用引物 A 和 B,

对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为：94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒，35 个循环（BioMetra T-Gradient）。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收，经过 DNA 纯化柱（华舜公司）纯化后，用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAG CTG TTC TAC TCT CGT C -3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA AAG CAA TGC TAG CAC AGA-3'

多肽 394-610 的表达和纯化：将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*，挑取单克隆，用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0，用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导，诱导条件为：25℃，190rpm，6 小时。离心收集菌体，用细菌裂解液（50mM Tris-HCl pH7.2，5mM EDTA，300mM NaCl）悬浮，超声破碎菌体，离心收集包涵体，用含有 2% Triton X-100 的溶液 I（20mM Tris-HCl pH8.5，5mM EDTA，100mM NaCl）悬浮，离心收集包涵体，再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽，将其对 100 倍体积的 1XPBS（pH7.45）在 25℃ 下进行透析复性，其中换液 3 次。离心得复性上清液，再用高效液相分子筛色谱（制备型 Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP）进行纯化，色谱条件为：流速 4ml/分钟，1XPBS（pH7.45）洗脱，UV280nm 检测。

实施例 9:

多肽 394-593 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因（香港大学吴教授赠送）为模板，用引物 A 和 B，对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为：94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒，35 个循环（BioMetra T-Gradient）。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收，经过 DNA 纯化柱（华舜公司）纯化后，用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAG CTG TTC TAC TCT CGT C -3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA GAC GGG GCC AGC ACC CAG-3'

多肽 394-593 的表达和纯化：将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*，挑取单克隆，用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0，用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导，诱导条件为：25℃，190rpm，6 小时。离心收集菌体，用细菌裂解液（50mM Tris-HCl pH7.2，5mM EDTA，300mM NaCl）悬浮，超声破碎菌体，离心收集包涵体，用含有 2% Triton X-100 的溶液 I（20mM Tris-HCl pH8.5，5mM EDTA，100mM NaCl）悬浮，离心收集包涵体，再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽。

实施例 10:

多肽 394-583 基因的表达质粒构建：

以 HEV-ORF2 基因（香港大学吴教授赠送）为模板，用引物 A 和 B，对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为：94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒，35 个循环（BioMetra T-Gradient）。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收，经过 DNA 纯化柱（华舜公司）纯化后，用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAG CTG TTC TAC TCT CGT C -3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA GGT GGA AAT AGC AAC CCG-3'

多肽 394-583 的表达和纯化：将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli. ERR2566*，挑取单克隆，用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0，用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导，诱导条件为：25℃，190rpm，6 小时。离心收集菌体，用细菌裂解液（50mM Tris-HCl pH7.2，5mM EDTA，300mM NaCl）悬浮，超声破碎菌体，离心收集包涵体，用含有 2% Triton X-100 的溶液 I（20mM Tris-HCl pH8.5，5mM EDTA，100mM NaCl）悬浮，离心收集包涵体，再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽。

实施例 11:

多肽 394-578 基因的表达质粒构建:

以 HEV-ORF2 基因 (香港大学吴教授赠送) 为模板, 用引物 A 和 B, 对多肽 414-603 基因进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 94℃ 1 分钟、57℃ 1 分钟、72℃ 50 秒, 35 个循环 (BioMetra T-Gradient)。上述 PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收, 经过 DNA 纯化柱 (华舜公司) 纯化后, 用 NdeI/EcoRI 克隆入质粒载体 pT0-T7。

引物 A: 5'-CAT ATG CAG CTG TTC TAC TCT CGT C -3'

引物 B: 5'-GAA TTC TTA CCG ATG CCC AGC GGC ATT-3'

多肽 394-578 的表达和纯化: 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli* ERR2566, 挑取单克隆, 用含有 50ug/ml 卡那霉素的 LB 培养基 37℃ 振荡培养过夜至 OD₅₅₀=1.0, 用终浓度为 0.2mM 的 IPTG 进行诱导, 诱导条件为: 25℃, 190rpm, 6 小时。离心收集菌体, 用细菌裂解液 (50mM Tris-HCl pH7.2, 5mM EDTA, 300mM NaCl) 悬浮, 超声破碎菌体, 离心收集包涵体, 用含有 2% Triton X-100 的溶液 I (20mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 100mM NaCl) 悬浮, 离心收集包涵体, 再分别用 2M、4M、8M 的尿素进行分级变性处理。其中 4M 尿素变性上清液含有绝大量高纯度的目的多肽。

实施例 12

重组蛋白 193C (序列为第六个序列) 疫苗免疫恒河猴实验

取 3 只 3-5 岁龄的恒河猴作为疫苗组分别编号为 1、2、3#, 免疫程序为 0.5ml 疫苗 (含 10ug 重组蛋白疫苗 193C、0.75mg Al(OH)₃。用 PBS 调 PH 至 6.5) 按 0、10、30 天三角肌单点注射, 每周采血使用检测重组蛋白 414-606 间接 ELISA 法检测其 IgG 抗体产生情况 (表 1), 如表 1 所示, 恒河猴大多在第二周产生 IgG 抗体, 第五周达高峰。

表 1 重组多肽 193C 免疫恒河猴的血清抗体反应

	0	1w	2w	3w	4w	5w	6w
1 #	-	-	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵
2 #	-	-	-	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
3 #	-	-	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴

HEV 攻击保护实验

在疫苗组注射重组蛋白 193C 疫苗 6 周后, 再取 3 只 3-5 岁龄的恒河猴作为对照组分别编号为 4、5、6 #, 病毒攻击程序为每只恒河猴静脉注射 0.5ml 胆汁(感染 HEV 的恒河猴胆汁 1:8 稀释, 免疫 RT-PCR 半定量检测 HEV-RNA 达每 ml 病毒量在 10⁸ 左右), 在注射含 HEV 的胆汁后 4 天开始, 每天收集粪便免疫 RT-PCR 检测 HEV-RNA, 每周 2 次(周一、五)采血检测血清抗 HEV IgG 抗体(2 种试剂检测, 1 种是用重组蛋白 193C 包被自己建立的间接 ELISA 试剂盒(193C), 另一种试剂是已通过中国药品生物制品检定所的质控血清的厦门新创科技有限公司(新创)的试剂盒, 其抗原为西班牙 YES 公司的包括 ORF2 和 ORF3 的人工合成多肽抗原)、谷丙转氨酶(ALT)和 HEV-RNA。病毒攻击观察 2 个月, 在这期间疫苗组 3 只恒河猴粪便均未见有排毒, 血清 ALT 未见升高, 新创试剂盒检测抗 HEV IgG 抗体阴性, 而 193C 试剂盒检测抗 HEV IgG 抗体为持续阳性, 抗体滴度维持无明显变化, 说明由 193C 疫苗免疫产生的抗体能够很好的中和阻断 HEV 的感染; 而对照组 4 # 恒河猴在攻毒后第 4 天开始粪便排毒, 并持续至第 50 天才停止, 血清 ALT 从第 27 天开始升高(90u), 第 35 天达到高峰(>400u), 第 45 天下降至正常未再升高, 血清抗 HEV IgG 抗体: 新创试剂盒检测结果为第 31 天开始检出, 第 35 天即达高峰并持续, 193C 试剂盒则从第 21 天开始检出, 第 28 天即达高峰, 第 38 天开始有下降趋势; 对照组 5 # 恒河猴在攻毒后第 4 天开始粪便排毒, 并持续至第 50 天才停止, 血清 ALT 从第 27 天开始升高(56u), 第 35 天达到高峰(>400u), 第 45 天下降

至正常未再升高，血清抗 HEV IgG 抗体：新创试剂盒检测结果为第 28 天开始检出即达高峰并持续，193C 试剂盒则从第 17 天开始检出，呈缓慢持续升高趋势；对照组 6# 恒河猴在攻毒后第 4 天开始粪便排毒，并持续至第 34 天才停止，血清 ALT 从第 7 天开始升高(67u)，反复轻度升高至第 24 天即下降至正常未再升高，血清抗 HEV IgG 抗体：新创试剂盒检测结果为第 31 天开始检出，第 36 天即达高峰并持续，193C 试剂盒则从第 21 天开始检出，第 28 天即达高峰。

实施例 13：单克隆抗体的制备

杂交瘤细胞系的产生

取 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠，初次免疫每只小鼠肌肉注射用福氏完全佐剂乳化的 5 μ g 414-603 重组抗原（总体积 50 μ l）。15 天后，进行二次基础免疫取相同量的抗原用福氏不完全佐剂乳化，肌肉注射。30 天后，尾静脉加强注射 5 μ g 不加佐剂的抗原，并于加强免疫后 72~96 小时，杀死小鼠，收集血液，取脾制备脾细胞悬液（悬于 RPMI 1640 培养基中），细胞记数板细胞记数。按 1/6 于脾细胞的数量取培养的 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞，混合后离心，利用聚乙二醇（PEG 1500）使脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合。将细胞悬液与等体积的饲养细胞混合后，分置于 96 孔细胞培养板中（200 μ l/孔）。3 天后，用 HT 培养基半保留换液。7 天后，用 414-603 重组抗原包被板进行 ELISA 检测 96 孔细胞培养板中杂交瘤细胞上清培养液。对于 EIA 检测为阳性的细胞克隆，利用有限稀释法进行克隆化。

ELISA 检测法

于 37 $^{\circ}$ C 下使 100 μ l 414-603 重组抗原（经 HPLC 纯化，溶解于 0.05mol/L 碳酸包被缓冲液中，浓度约为 0.3 μ g/ml），在 12K 辐射的 96 聚乙烯微量滴定板的各孔表面上吸附 2 小时，再置于 4 $^{\circ}$ C 过夜（0.05mol/L 碳酸缓冲液的组成为：20.02g Na₂CO₃、2.52g NaHCO₃ 加去离子水至 1 升，pH 为 9.5）。用 PBS-吐温（PBS-吐温的组成为：8.0g

NaCl、0.2g KH_2PO_4 、2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g KCl 和 0.5ml 吐温 20, 加去离子水至 1 升, pH 为 7.4) 洗滴定板以除去未结合的抗原蛋白。然后用 200 μl /孔的封闭液 (封闭液的成分: 于 PBS 溶液中加入 2% 明胶、0.2% 酪蛋白和 2% 蔗糖) 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 2 小时。甩净、拍干后真空封闭, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

检测时, 于每孔中加入 100 μl 细胞培养液上清; 每块 96 孔微量滴定板设一阳性对照, 加入 100 μl 小鼠多抗血清 (1:100 稀释使用); 另设一阴性对照, 加入 100 μl HT 细胞培养液。37 $^\circ\text{C}$ 温浴 30 分钟, 用 PBS-吐温洗 5 遍, 拍干后加入过氧化物酶结合的羊抗鼠免疫球蛋白 (HRP-GAM IgG), 37 $^\circ\text{C}$ 温浴 30 分钟, 取出后用 PBS-吐温洗 5 遍, 拍干后先后加入底物液 A、B 各 50 μl (底物液 A 成分为: 13.4g $\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、4.2g 柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和 0.3g 过氧化氢, 用去离子水中调节体积为 700ml; 底物液 B 成分为: 0.2g 四甲基联苯胺、20ml 二甲基甲酰胺用去离子水中调节体积为 700ml), 37 $^\circ\text{C}$ 显色 10 分钟, 加入 50 μl 终止液 (2M H_2SO_4 去离子水定容至 700ml) 终止反应, 并于酶标仪上检测各孔的 OD_{450} , 通常 OD_{450} 值高于阴性对照 2 倍以上者可视为阳性。

单克隆抗体腹水的获得及纯化

取 10 周龄的健康 Balb/c 小鼠, 腹腔注射福氏不完全佐剂, 每只 0.5ml。2~7 天后, 收集克隆化的杂交瘤细胞, 离心去上清, 加入不含血清的培养基, 调节细胞密度至 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml, 每只小鼠注射 0.5ml。7~10 天后小鼠腹部增大, 开始收集腹水。3000rpm 离心 15 分钟, 吸取中间澄清部分的液体, 一 0.45 μm 的小孔滤膜过滤除菌, 分装后 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。

将处理好的腹水用 0.02mol/L、Ph 7.4 的 PBS (81ml 0.2mol/L Na_2HPO_4 , 19ml 0.2mol/L NaH_2PO_4 , 加生理盐水至 100ml) 对倍稀释, 搅拌下逐滴缓慢加入 ASA (硫酸铵浓度达到 50% 饱和度), 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。4 $^\circ\text{C}$, 12000rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 将沉淀溶于原腹水体积 2 倍的 PBS 中。搅拌下逐滴缓慢加入 ASA 使硫酸铵浓度达到 33% 饱和度, 4 $^\circ\text{C}$

静置过夜。4℃，12000rpm 离心 15 分钟，弃上清，将沉淀溶于原腹水体积 2 倍的 PBS 中。搅拌下逐滴缓慢加入 ASA（硫酸铵浓度达到 50% 饱和度），4℃ 过夜。4℃，12000rpm 离心 15 分钟，弃上清。将沉淀溶于适量的 PBS 中，装入透析带中，放入 50~100 倍含 20mmol/L NaCl，pH 7.8 的 120mmol/L Tris-HCl 缓冲液中 4℃ 搅拌下脱盐 12 小时左右，期间更换 3 次以上透析液。取出后分装-20℃ 保存。

专利名称(译)	用于预防、诊断及治疗戊型肝炎病毒的多肽,及它们作为诊断试剂和疫苗		
公开(公告)号	CN1345775A	公开(公告)日	2002-04-24
申请号	CN00130634.0	申请日	2000-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	养生堂有限公司		
申请(专利权)人(译)	养生堂有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	养生堂有限公司		
[标]发明人	夏宁邵 张军 李少伟 葛胜祥 顾颖 何志强		
发明人	夏宁邵 张军 李少伟 葛胜祥 顾颖 何志强		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/29 A61K39/295 A61P1/16 A61P31/12 C07K14/08 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/51 G01N33/543 G01N33 /566 G01N33/576 G01N33/577 C07K14/005 C12N15/63 G01N33/68		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K16/10 C12N2760/16022 C12N2770/28171 A61K2039/6075 C07K14/005 G01N33 /576 A61K2039/55505 A61K39/29 A61K39/295 A61K38/00 C12N2770/28134 A61K2039/55566 C12N2770/28122 A61K39/12 A61K2039/57 A61P1/16		
代理人(译)	唐伟杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及对戊型肝炎病毒(HEV)有高度免疫活性的多肽或其二聚体或三聚体,用于编码HEV - ORF2多肽的DNA分子,含有该DNA分子的表达载体,含有CDR多肽的抗体分子,用于编码CDR多肽的DNA分子,及它们的用途,尤其是在戊型肝炎预防、诊断及治疗方面的用途,如作为戊型肝炎的诊断试剂和疫苗。