



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101173290 B

(45) 授权公告日 2010. 10. 27

(21) 申请号 200710133894. 1

(22) 申请日 2007. 10. 24

(73) 专利权人 李越希

地址 210002 江苏省南京市玄武区中山东路  
293 号南京军区军事医学研究所

(72) 发明人 李越希 吕敏 潘明洁 杨华凤  
戚菁 王正茂

(74) 专利代理机构 南京君陶专利商标代理有限公司 32215

代理人 奚胜元

(51) Int. Cl.

C12N 15/38 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C07K 14/035 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1651081 A, 2005. 08. 10, 全文.

CN 1472321 A, 2004. 02. 04, 全文.

冯非. 单纯疱疹病毒 1 型糖蛋白 B 截短基因疫苗的构建及初步免疫学研究. 《吉林大学硕士学位论文》. 2005, 全文.

SANCHEZPESCADOR L. EPITOPES OF HERPES-SIMPLEX VIRUS TYPE-1 GLYCOPROTEIN-B THAT BIND TYPE-COMMON NEUTRALIZING ANTIBODIES ELICIT TYPE-SPECIFIC ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY. 《JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES》. 1992, 第 166 卷 (第 3 期), 全文.

审查员 李振鹏

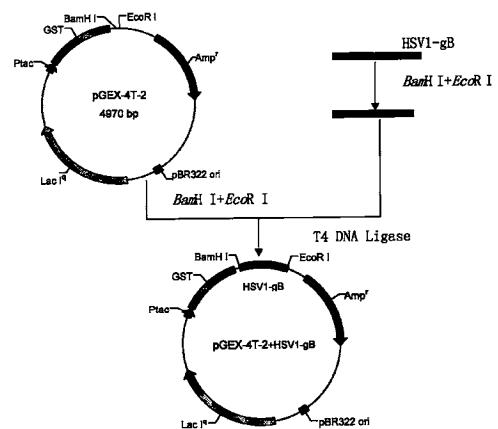
权利要求书 4 页 说明书 21 页 附图 2 页

(54) 发明名称

化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用

(57) 摘要

本发明化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用涉及基因工程技术、疫苗和诊断试剂领域。本发明是通过计算机分析, 筛选出 HSV1 病毒 gB 糖蛋白内的强抗原表位, 第 1 个氨基酸至第 696 个氨基酸, 共 696 个氨基酸, 选择真核和原核生物均偏爱的密码子, 化学合成抗原表位的全新基因序列, 利用基因工程技术, 表达该基因片段、制备 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的强抗原表位片段。表达的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的强抗原表位片段可用于疫苗、HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。



1. 一种化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的胞外区基因片段,该基因片段编码含强抗原表位的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区片段,即第 1 个氨基酸至第 696 个氨基酸,共 696 个氨基酸,在该基因片段的 5' 端增加了 BamHI 酶切位点及两个保护碱基 GC,在 3' 端增加了终止密码子 TGA 和 EcoRI 酶切位点及两个保护碱基 GC,化学合成的基因序列全长 2107bp,序列如下:

```
GCGGATCC CCT ACC TCT CCT GGT ACT CCT GGT GTG GCT GCC GCT ACC CAG GCC GCT
AAC GGT GGT CCT GCC ACT CCT GCT CCT CCT CCT CTG GGT GCC GCT CCT ACT GGT
GAC CCT AAG CCT AAG AAG AAC AAG AAG CCT AAG AAC CCT ACT CCT CCT AGG CCT
GCT GGT GAC AAC GCC ACC GTG GCC GCT GGC CAC GCC ACT CTG AGA GAG CAC CTG
AGA GAC ATC AAG GCT GAG AAC ACC GAC GCT AAC TTC TAC GTG TGT CCT CCT CCT
ACT GGT GCC ACC GTG GTG CAG TTC GAG CAG CCT CGC AGG TGC CCT ACC AGG CCT
GAA GGT CAG AAC TAC ACC GAA GGC ATC GCC GTG GTG TTC AAG GAG AAC ATC GCT
CCT TAC AAG TTC AAG GCC ACC ATG TAC TAC AAG GAC GTG ACC GTG AGC CAG GTG
TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG TTC ATG GGC ATC TTC GAG GAC CGC GCT CCT
GTG CCT TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG ATC AAC GCC AAG GGT GTG TGT AGG TCC
ACC GCT AAG TAC GTG CGC AAC AAC CTG GAG ACC ACT GCT TTC CAC AGA GAC GAT
CAC GAG ACC GAC ATG GAG CTG AAG CCT GCC AAC GCC GCT ACT CGC ACC AGC AGA
GGC TGG CAC ACC ACT GAC CTG AAG TAC AAC CCT AGC AGA GTG GAG GCC TTC CAC
AGG TAC GGC ACC ACC GTG AAC TGC ATC GTG GAG GAG GTG GAC GCT CGC AGC GTG
TAC CCT TAC GAC GAG TTC GTG CTG GCC ACT GGT GAC TTC GTG TAC ATG TCT CCT
TTC TAC GGC TAC AGA GAA GGT AGC CAC ACC GAG CAC ACT ACC TAC GCT GCT GAC
AGG TTC AAG CAG GTG GAC GGC TTC TAC GCT CGC GAC CTG ACC ACC AAG GCT AGA
GCC ACT GCT CCT ACC ACT AGG AAC CTG CTG ACC ACT CCT AAG TTC ACC GTG GCT
TGG GAC TGG GTG CCT AAG CGC CCT AGC GTG TGC ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAG
GTG GAC GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGT TCC TTC AGG TTC TCC TCT GAC
GCT ATC TCC ACT ACC TTC ACT ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCT CTG TCC AGA GTG
GAC CTG GGT GAC TGC ATC GGT AAG GAC GCT CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC
GCT CGC AGG TAC AAC GCT ACT CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCT CAG TAC TAC CAG
GCC AAC GGT GGT TTC CTG ATC GCC TAC CAG CCT CTG CTG AGC AAC ACT CTG GCT
GAG CTG TAC GTG AGA GAG CAC CTG AGA GAG CAG AGC CGC AAG CCT CCT AAC CCT
ACG CCT CCT CCT CCC GGT GCT AGC GCC AAC GCT TCC GTG GAG CGC ATC AAG ACT
ACC TCT AGC ATC GAG TTC GCC AGG CTG CAG TTC ACC TAC AAC CAC ATC CAG CGC
CAC GTG AAC GAC ATG CTG GGT CGC GTG GCT ATC GCT TGG TGC GAG CTG CAG AAC
CAC GAG CTG ACT CTG TGG AAC GAG GCT CGC AAG CTG AAC CCT AAC GCT ATC GCC
AGC GTG ACC GTG GGC AGG AGA GTG AGC GCT AGA ATG CTG GGC GAC GTG ATG GCC
GTG TCC ACC TGC GTG CCT GTG GCT GCT GAC AAC GTG ATC GTG CAG AAC AGC ATG
CGC ATC AGC TCC AGA CCT GGT GCC TGC TAC AGC AGA CCT CTG GTG AGC TTC AGG
TAC GAG GAC CAA GGT CCT CTG GTG GAA GGT CAG CTG GGT GAG AAC AAC GAG CTG
AGG CTG ACT CGC GAC GCT ATC GAG CCT TGC ACC GTC GGT CAC AGA CGC TAC TTC
```

ACC TTC GGT GGC GGT TAC GTG TAC TTC GAG GAG TAC GCT TAC TCT CAC CAG CTG  
 AGC CGC GCT GAC ATC ACT ACC GTG AGC ACC TTC ATC GAC CTG AAC ATC ACC ATG  
 CTG GAG GAC CAC GAG TTC GTG CCT CTG GAG GTG TAC ACC CGC CAC GAG ATC AAG  
 GAC AGC GGC CTG CTG GAC TAC ACC GAG GTG CAG CGC CGC AAC CAG CTG CAC GAC  
 CTG CGC TTC GCT GAC ATC GAC ACC GTG ATC CAC GCC GAC GCC TGA GAATTCGC

2. 权利要求 1 所述的基因片段编码的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区片段的纯化表达方法,其特征在于采用基因工程技术表达该基因序列编码的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区片段,纯化表达的蛋白片段,具体方法如下:

表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段重组质粒的构建:

用 Bam HI 和 EcoR I 双酶切质粒 pGEX4T-2 和化学合成的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段,电泳回收后,用 T4DNA 连接酶连接,使 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段插入到载体 pGEX4T-2 内的 BamH I 和 EcoR I 位点之间,与载体上的起始密码子翻译框架一致,表达一个融合蛋白,全长 934 个氨基酸,该融合蛋白 N 端融合了载体上的 238 个氨基酸,C 端包含 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白内的第 1 个氨基酸至第 696 个氨基酸,全长氨基酸序列如下:

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

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

表达融合蛋白工程菌的筛选鉴定：

将重组质粒转化大肠杆菌 TG1, 涂布含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板, 置 37 $^{\circ}$ C 过夜, 次日随机挑取转化菌落和含质粒 pGEX4T-2 的对照菌, 提取质粒, 以提取的质粒为模板, PCR 扩增 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段, 含 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段的阳性重组质粒, 应扩增出长约 2107bp 的基因片段, 将含有重组质粒的阳性转化子, 接种至含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml 的 LB 培养基内, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3h, 加 IPTG 至终浓度 0.5 ~ 1.0mmol/L, 继续振荡培养诱导 4 ~ 6h, 离心收集菌体进行 SDS-PAGE 检测, 重组子表达相对分子量约为 96kD 的 HSV 病毒 gB 糖蛋白, 表达量约为 30%, 而对照菌 TG1 无此蛋白带；

表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的纯化：

将诱导表达融合蛋白的工程菌离心收菌, 菌体重悬于裂解液内, 裂解液为 50mmol/L Tris-HCl pH8.0、10mmol/L EDTA、10mmol/L DTT, 超声破菌 10min, 离心收集上清, 上清溶液加已经平衡的 Glutathione Sepharose 4B 凝胶 3ml, 室温结合 60min, 上样, 收集穿透液；

用十倍柱床体积的 1×PBS 洗涤柱子,接着用 15ml 高浓度的 GSH 洗脱液,洗脱液为 50mmol/L Tris-HCL pH8.0+10mmol/L GST,分三次洗脱目的蛋白,即为纯化的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段。

3. 权利要求 1 所述的基因片段编码的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区片段的纯化表达方法,其特征在于利用细菌进行重组表达、制备。

4. 权利要求 2 或 3 所述方法制备的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段在制备 HSV1 病毒亚单位疫苗中的应用。

## 化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种化学合成的单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex virus 1, HSV1) 糖蛋白 B (glycoprotein B, gB 糖蛋白) 胞外区的全新基因片段, 利用基因工程技术, 制备重组 HSV1 病毒 gB 糖蛋白。通过计算机分析, 筛选出含强抗原表位的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区片段, 选择真核和原核生物均偏爱的密码子, 化学合成全新的基因序列, 利用基因工程技术表达, 表达的蛋白可用于疫苗及 HSV1 病毒抗体或抗原的检测等, 本发明涉及基因工程技术、疫苗和诊断试剂领域。

### 背景技术

[0002] 单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 是危害人类健康的常见病原体, 容易导致复发性感染和潜伏感染, 对人体危害严重, 分为 HSV-1 及 HSV-2 两型。1 型单纯疱疹病毒主要引起口面部感染、眼部感染和疱疹性脑炎等; 而 2 型主要引起生殖器感染, 并且和女性宫颈癌的发生密切相关。近年 HSV1 的感染显著增多, 约占该病的 10%~40%。目前药物治疗 HSV 感染时常出现相应耐药性, 所以研制疫苗是切实可行的有效方法, 它能使机体在抗 HSV 感染免疫中, 发挥体液免疫和细胞免疫功能来消除 HSV 感染。至今已研制了多种 HSV 疫苗, 已有两种 HSV 糖蛋白疫苗进入 III 期临床试验, 即 Chiron 公司研制的重组 gD2/gB2 糖蛋白与 MF59 佐剂配伍而成的疫苗以及 Glaxo SmithKline (GSK) 公司开发的重组 gD2 糖蛋白与另一佐剂 (3-de-O- 酰化单磷酸类脂 A 和明矾) 配伍而成的疫苗, 这两种疫苗均有一定的保护作用, 但临床效果有限。国内目前对 HSV 疫苗的研究, 主要集中在 DNA 核酸疫苗的探索研究方面。

[0003] HSV 包膜糖蛋白在病毒的吸附、入侵和刺激机体产生免疫应答及疫苗研制中具有重要地位。目前正式命名的 HSV 包膜糖蛋白有 12 种, 其中 gB 糖蛋白在感染的细胞中含量最多, 是疱疹病毒家族中高度保守的蛋白, 各毒株间差异较小, 且与所有的疱疹类病毒亚群有较大的同源性, 同时 gB 蛋白具有较强的免疫原性, 可诱导机体产生中和抗体和细胞免疫反应, 因此 HSV1gB 糖蛋白是构建 HSV 疫苗理想的目的基因。

[0004] HSV1gB 糖蛋白基因全长 2712bp, 编码 29 个氨基酸序列的信号肽、696 氨基酸序列的胞外区、69 氨基酸序列的跨膜区、109 氨基酸序列的胞内区。去除部分信号肽序列不影响其在原核细胞中的分泌表达。研究表明, 为增强编码抗原蛋白的免疫原性, 可去除其部分功能性编码序列, 特别在完整抗原蛋白对宿主具有毒性或免疫抑制作用的情况下, 对抗原蛋白进行截短表达就尤其重要。而截短后的 gB 基因构建的疫苗, 与用完整 gB 基因构建的疫苗对 HSV-1 病毒攻击具有相同的保护作用。目前应用的 HSV1 病毒抗体的酶联免疫检测试剂盒, 其使用的抗原是全病毒抗原, 具有生产较危险、成本高、与其它病毒有交叉反应等缺点。目前缺乏 HSV1 病毒疫苗。灭活疫苗的研究取得了较大进展, 但是生产成本高、危险大。

### 发明内容

[0005] 本发明目的是针对上述不足之处提供一种化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区

的全新基因片段,利用基因工程技术,制备重组 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段。通过计算机分析,筛选出含强抗原表位的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段,第 1 个氨基酸-第 696 个氨基酸,共 696 个氨基酸,选择真核和原核生物均偏爱的密码子,化学合成全新的基因序列,利用基因工程技术表达该基因。表达的蛋白可用于疫苗、HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。

[0006] 化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用是采取以下方案实现的:

[0007] 1. HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区抗原表位的筛选及其基因片段的化学合成:

[0008] 利用 ANTHEWIN 等软件,通过计算机分析 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的氨基酸序列,筛选出 gB 糖蛋白的 N 端(第 1 氨基酸-第 696 氨基酸)含有较强的抗原决定簇。选择真核和原核生物均偏爱的密码子,化学合成全新的基因序列,并且在 5' 端增加了 BamHI 酶切位点(下画线部分)及两个保护碱基(GC),在 3' 端增加了终止密码子(TGA)和 EcoRI 酶切位点(下画线部分)及两个保护碱基(GC),使该基因片段易于克隆至质粒 pGEX4T-2 内的 BamHI 和 EcoRI 酶切位点内。

[0009] 筛选的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白内的抗原表位氨基酸序列(第 1 个 aa-第 696 个 aa):

[0010] Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn Gly

[0011] Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr Gly Asp Pro

[0012] Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ala Gly

[0013] Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Glu His Leu Arg Asp

[0014] Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly

[0015] Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly

[0016] Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr

[0017] Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe

[0018] Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro

[0019] Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala

[0020] Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu

[0021] Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp

[0022] His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr

[0023] Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro

[0024] Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr

[0025] Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe

[0026] Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr

[0027] Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp

[0028] Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp

[0029] Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile

[0030] Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu

[0031] Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg

[0032] Arg Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn

[0033] Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu

[0034] Tyr Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Pro Lys Pro Pro Asn Pro Thr Pro  
 [0035] Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser  
 [0036] Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln Asn His Val  
 [0037] Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn His Glu  
 [0038] Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Ala  
 [0039] Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser  
 [0040] Thr Cys Val Pro Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile  
 [0041] Ser Ser Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu  
 [0042] Asp Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu  
 [0043] Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe Thr Phe  
 [0044] Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Ser Ala Tyr Ser His Gln Leu Ser Arg  
 [0045] Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu  
 [0046] Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser  
 [0047] Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg  
 [0048] Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala

[0049] 化学合成的含 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区抗原表位基因的 DNA 序列 (2107bp) :

[0050] GCGGATCC CCT ACC TCT CCT GGT ACT CCT GGT GTG GCT GCC GCT ACC CAG GCC GCT AAC  
 [0051] GGT GGT CCT GCC ACT CCT GCT CCT CCT CTG GGT GCC GCT CCT ACT GGT GAC CCT  
 [0052] AAG CCT AAG AAG AAC AAG AAG CCT AAG AAC CCT ACT CCT CCT AGG CCT GCT GGT GAC  
 [0053] AAC GCC ACC GTG GCC GCT GGC CAC GCC ACT CTG AGA GAG CAC CTG AGA GAC ATC AAG  
 [0054] GCT GAG AAC ACC GAC GCT AAC TTC TAC GTG TGT CCT CCT CCT ACT GGT GCC ACC GTG  
 [0055] GTG CAG TTC GAG CAG CCT CGC AGG TGC CCT ACC AGG CCT GAA GGT CAG AAC TAC ACC  
 [0056] GAA GGC ATC GCC GTG GTG TTC AAG GAG AAC ATC GCT CCT TAC AAG TTC AAG GCC ACC  
 [0057] ATG TAC TAC AAG GAC GTG ACC GTG AGC CAG GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG  
 [0058] TTC ATG GGC ATC TTC GAG GAC CGC GCT CCT GTG CCT TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG  
 [0059] ATC AAC GCC AAG GGT GTG TGT AGG TCC ACC GCT AAG TAC GTG CGC AAC AAC CTG GAG  
 [0060] ACC ACT GCT TTC CAC AGA GAC GAT CAC GAG ACC GAC ATG GAG CTG AAG CCT GCC AAC  
 [0061] GCC GCT ACT CGC ACC AGC AGA GGC TGG CAC ACC ACT GAC CTG AAG TAC AAC CCT AGC  
 [0062] AGA GTG GAG GCC TTC CAC AGG TAC GGC ACC ACC GTG AAC TGC ATC GTG GAG GAG GTG  
 [0063] GAC GCT CGC AGC GTG TAC CCT TAC GAC GAG TTC GTG CTG GCC ACT GGT GAC TTC GTG  
 [0064] TAC ATG TCT CCT TTC TAC GGC TAC AGA GAA GGT AGC CAC ACC GAG CAC ACT ACC TAC  
 [0065] GCT GCT GAC AGG TTC AAG CAG GTG GAC GGC TTC TAC GCT CGC GAC CTG ACC ACC AAG  
 [0066] GCT AGA GCC ACT GCT CCT ACC ACT AGG AAC CTG CTG ACC ACT CCT AAG TTC ACC GTG  
 [0067] GCT TGG GAC TGG GTG CCT AAG CGC CCT AGC GTG TGC ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAG  
 [0068] GTG GAC GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGT TCC TTC AGG TTC TCC TCT GAC GCT  
 [0069] ATC TCC ACT ACC TTC ACT ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCT CTG TCC AGA GTG GAC CTG  
 [0070] GGT GAC TGC ATC GGT AAG GAC GCT CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC GCT CGC AGG  
 [0071] TAC AAC GCT ACT CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCT CAG TAC TAC CAG GCC AAC GGT GGT  
 [0072] TTC CTG ATC GCC TAC CAG CCT CTG CTG AGC AAC ACT CTG GCT GAG CTG TAC GTG AGA

[0073] GAG CAC CTG AGA GAG CAG AGC CGC AAG CCT CCT AAC CCT ACG CCT CCT CCT CCC GGT  
 [0074] GCT AGC GCC AAC GCT TCC GTG GAG CGC ATC AAG ACT ACC TCT AGC ATC GAG TTC GCC  
 [0075] AGG CTG CAG TTC ACC TAC AAC CAC ATC CAG CGC CAC GTG AAC GAC ATG CTG GGT CGC  
 [0076] GTG GCT ATC GCT TGG TGC GAG CTG CAG AAC CAC GAG CTG ACT CTG TGG AAC GAG GCT  
 [0077] CGC AAG CTG AAC CCT AAC GCT ATC GCC AGC GTG ACC GTG GGC AGG AGA GTG AGC GCT  
 [0078] AGA ATG CTG GGC GAC GTG ATG GCC GTG TCC ACC TGC GTG CCT GTG GCT GCT GAC AAC  
 [0079] GTG ATC GTG CAG AAC AGC ATG CGC ATC AGC TCC AGA CCT GGT GCC TGC TAC AGC AGA  
 [0080] CCT CTG GTG AGC TTC AGG TAC GAG GAC CAA GGT CCT CTG GTG GAA GGT CAG CTG GGT  
 [0081] GAG AAC AAC GAG CTG AGG CTG ACT CGC GAC GCT ATC GAG CCT TGC ACC GTC GGT CAC  
 [0082] AGA CGC TAC TTC ACC TTC GGT GGC GGT TAC GTG TAC TTC GAG GAG TAC GCT TAC TCT  
 [0083] CAC CAG CTG AGC CGC GCT GAC ATC ACT ACC GTG AGC ACC TTC ATC GAC CTG AAC ATC  
 [0084] ACC ATG CTG GAG GAC CAC GAG TTC GTG CCT CTG GAG GTG TAC ACC CGC CAC GAG ATC  
 [0085] AAG GAC AGC GGC CTG CTG GAC TAC ACC GAG GTG CAG CGC CGC AAC CAG CTG CAC GAC  
 [0086] CTG CGC TTC GCT GAC ATC GAC ACC GTG ATC CAC GCC GAC GCC TAA GAATTCGC

[0087] 2. 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段重组质粒的构建：

[0088] 提取质粒 pGEX4T-2, 用 Bam H I 和 EcoRI 双酶切, 电泳后回收酶切的质粒大片段, 溶于去离子水内。同样用 BamHI 和 EcoR I 双酶切化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因片段, 电泳回收后, 溶于去离子水内。

[0089] 取等摩尔浓度的上述两种酶切后 DNA 片段, 在同一离心管内用 T4 DNA 连接酶连接, 使 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因片段插入到载体 pGEX4T-2 内的 BamH I 和 EcoR I 位点之间, 与载体上的起始密码子翻译框架一致, 表达一个融合蛋白。

[0090] 3. 重组质粒的筛选与鉴定：

[0091] 将重组质粒转化大肠杆菌 TG1, 涂布含氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/ml) LB 平板, 置 37 $^{\circ}$ C 过夜。次日随机挑取转化菌落和 1 个对照菌 (质粒 pGEX4T-2 转化菌), 分别提取质粒, 以提取的质粒为模板, PCR 扩增 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段, 含 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段的阳性重组质粒, 应扩增出长约 2107bp 的基因片段。将含有外源基因的质粒进行 DNA 序列分析, 序列分析证实重组质粒含有合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因片段, 序列完全正确：

[0092] CCT ACC TCT CCT GGT ACT CCT GGT GTG GCT GCC GCT ACC CAG GCC GCT AAC GGT GGT  
 [0093] CCT GCC ACT CCT GCT CCT CCT CCT CTG GGT GCC GCT CCT ACT GGT GAC CCT AAG CCT  
 [0094] AAG AAG AAC AAG AAG CCT AAG AAC CCT ACT CCT CCT AGG CCT GCT GGT GAC AAC GCC  
 [0095] ACC GTG GCC GCT GGC CAC GCC ACT CTG AGA GAG CAC CTG AGA GAC ATC AAG GCT GAG  
 [0096] AAC ACC GAC GCT AAC TTC TAC GTG TGT CCT CCT CCT ACT GGT GCC ACC GTG GTG CAG  
 [0097] TTC GAG CAG CCT CGC AGG TGC CCT ACC AGG CCT GAA GGT CAG AAC TAC ACC GAA GGC  
 [0098] ATC GCC GTG GTG TTC AAG GAG AAC ATC GCT CCT TAC AAG TTC AAG GCC ACC ATG TAC  
 [0099] TAC AAG GAC GTG ACC GTG AGC CAG GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG TTC ATG  
 [0100] GGC ATC TTC GAG GAC CGC GCT CCT GTG CCT TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG ATC AAC  
 [0101] GCC AAG GGT GTG TGT AGG TCC ACC GCT AAG TAC GTG CGC AAC AAC CTG GAG ACC ACT  
 [0102] GCT TTC CAC AGA GAC GAT CAC GAG ACC GAC ATG GAG CTG AAG CCT GCC AAC GCC GCT

[0103] ACT CGC ACC AGC AGA GGC TGG CAC ACC ACT GAC CTG AAG TAC AAC CCT AGC AGA GTG  
[0104] GAG GCC TTC CAC AGG TAC GGC ACC ACC GTG AAC TGC ATC GTG GAG GAG GTG GAC GCT  
[0105] CGC AGC GTG TAC CCT TAC GAC GAG TTC GTG CTG GCC ACT GGT GAC TTC GTG TAC ATG  
[0106] TCT CCT TTC TAC GGC TAC AGA GAA GGT AGC CAC ACC GAG CAC ACT ACC TAC GCT GCT  
[0107] GAC AGG TTC AAG CAG GTG GAC GGC TTC TAC GCT CGC GAC CTG ACC ACC AAG GCT AGA  
[0108] GCC ACT GCT CCT ACC ACT AGG AAC CTG CTG ACC ACT CCT AAG TTC ACC GTG GCT TGG  
[0109] GAC TGG GTG CCT AAG CGC CCT AGC GTG TGC ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAG GTG GAC  
[0110] GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGT TCC TTC AGG TTC TCC TCT GAC GCT ATC TCC  
[0111] ACT ACC TTC ACT ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCT CTG TCC AGA GTG GAC CTG GGT GAC  
[0112] TGC ATC GGT AAG GAC GCT CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC GCT CGC AGG TAC AAC  
[0113] GCT ACT CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCT CAG TAC TAC CAG GCC AAC GGT GGT TTC CTG  
[0114] ATC GCC TAC CAG CCT CTG CTG AGC AAC ACT CTG GCT GAG CTG TAC GTG AGA GAG CAC  
[0115] CTG AGA GAG CAG AGC CGC AAG CCT CCT AAC CCT ACG CCT CCT CCT CCC GGT GCT AGC  
[0116] GCC AAC GCT TCC GTG GAG CGC ATC AAG ACT ACC TCT AGC ATC GAG TTC GCC AGG CTG  
[0117] CAG TTC ACC TAC AAC CAC ATC CAG CGC CAC GTG AAC GAC ATG CTG GGT CGC GTG GCT  
[0118] ATC GCT TGG TGC GAG CTG CAG AAC CAC GAG CTG ACT CTG TGG AAC GAG GCT CGC AAG  
[0119] CTG AAC CCT AAC GCT ATC GCC AGC GTG ACC GTG GGC AGG AGA GTG AGC GCT AGA ATG  
[0120] CTG GGC GAC GTG ATG GCC GTG TCC ACC TGC GTG CCT GTG GCT GCT GAC AAC GTG ATC  
[0121] GTG CAG AAC AGC ATG CGC ATC AGC TCC AGA CCT GGT GCC TGC TAC AGC AGA CCT CTG  
[0122] GTG AGC TTC AGG TAC GAG GAC CAA GGT CCT CTG GTG GAA GGT CAG CTG GGT GAG AAC  
[0123] AAC GAG CTG AGG CTG ACT CGC GAC GCT ATC GAG CCT TGC ACC GTC GGT CAC AGA CGC  
[0124] TAC TTC ACC TTC GGT GGC GGT TAC GTG TAC TTC GAG GAG TAC GCT TAC TCT CAC CAG  
[0125] CTG AGC CGC GCT GAC ATC ACT ACC GTG AGC ACC TTC ATC GAC CTG AAC ATC ACC ATG  
[0126] CTG GAG GAC CAC GAG TTC GTG CCT CTG GAG GTG TAC ACC CGC CAC GAG ATC AAG GAC  
[0127] AGC GGC CTG CTG GAC TAC ACC GAG GTG CAG CGC CGC AAC CAG CTG CAC GAC CTG CGC  
[0128] TTC GCT GAC ATC GAC ACC GTG ATC CAC GCC GAC GCC TGA

[0129] 构建的重组质粒表达 HSV1 的病毒 gB 糖蛋白胞外区片段 (696 个氨基酸), 在其 N 端融合了载体上的 238 个氨基酸, 全长 934 个氨基酸, 其氨基酸序列如下:

[0130] Met Pro Met Ile Leu Gly Tyr Trp Asp Ile Arg Gly Leu Ala His Ala Ile Arg  
[0131] Leu Leu Leu Glu Tyr Thr Asp Ser Ser Tyr Glu Glu Lys Lys Tyr Thr Met Gly  
[0132] Gly Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Ser Gln Trp Leu Asn Glu Lys Phe Lys Leu Gly  
[0133] Leu Asp Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ala His Lys Ile Thr Gln  
[0134] Ser Asn Ala Ile Leu Cys Tyr Ile Ala Arg Lys His Asn Leu Cys Gly Glu Thr  
[0135] Glu Glu Glu Lys Ile Arg Val Asp Ile Leu Glu Asn Gln Ala Met Asp Val Ser  
[0136] Asn Gln Leu Ala Arg Val Cys Tyr Ser Pro Asp Phe Glu Lys Leu Lys Pro Glu  
[0137] Tyr Leu Glu Glu Leu Pro Thr Met Met Gln His Phe Ser Gln Phe Leu Gly Lys  
[0138] Arg Pro Trp Phe Val Gly Asp Lys Ile Thr Phe Val Asp Phe Leu Ala Tyr Asp  
[0139] Val Leu Asp Leu His Arg Ile Phe Glu Pro Asn Cys Leu Asp Ala Phe Pro Asn  
[0140] Leu Lys Asp Phe Ile Ser Arg Phe Glu Gly Leu Glu Lys Ile Ser Ala Tyr Met

[0141] Lys Ser Ser Arg Phe Leu Pro Lys Pro Leu Tyr Thr Arg Met Ala Val Trp Gly  
[0142] Asn Lys Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala  
[0143] Asn Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr Gly  
[0144] Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro Pro Arg Pro  
[0145] Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Glu His Leu  
[0146] Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro  
[0147] Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro  
[0148] Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala  
[0149] Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val  
[0150] Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro  
[0151] Val Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser  
[0152] Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp  
[0153] His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala Thr Arg Thr Ser Arg  
[0154] Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His  
[0155] Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val  
[0156] Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr GLY Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro  
[0157] Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp  
[0158] Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg  
[0159] Ala Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala  
[0160] Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu  
[0161] Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp  
[0162] Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val  
[0163] Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe  
[0164] Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu  
[0165] Ala Asn Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala  
[0166] Glu Leu Tyr Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Pro Lys Pro Pro Asn Pro  
[0167] Thr Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr  
[0168] Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln Asn  
[0169] His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn  
[0170] His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala  
[0171] Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala  
[0172] Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met  
[0173] Arg Ile Ser Ser Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg  
[0174] Tyr Glu Asp Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu  
[0175] Arg Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val GLY His Arg Arg Tyr Phe  
[0176] Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Ser Ala Tyr Ser His Gln Leu  
[0177] Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile Thr Met  
[0178] Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys  
[0179] Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp

[0180] Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala

[0181] 4. 表达融合蛋白工程菌的筛选鉴定：

[0182] 将重组质粒转化大肠杆菌 TG1, 涂布含  $100 \mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素的 LB 平板, 置  $37^\circ\text{C}$  过夜, 次日随机挑取转化菌落和含质粒 pGEX4T-2 的对照菌, 提取质粒, 以提取的质粒为模板, PCR 扩增 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段, 含 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区基因片段的阳性重组质粒, 应扩增出长约 2107bp 的基因片段, 将含有重组质粒的阳性转化子, 接种至含氨苄青霉素  $100 \mu\text{g/ml}$  的 LB 培养基内,  $37^\circ\text{C}$  振荡培养 3h, 加 IPTG 至终浓度  $0.5 \sim 1.0 \text{mmol/L}$ , 继续振荡培养诱导  $4 \sim 6\text{h}$ , 离心收集菌体进行 SDS-PAGE 检测, 重组子表达相对分子量约为 96kD 的 HSV 病毒 gB 糖蛋白, 表达量约为 30%, 而对照菌 TG1 无此蛋白带；

[0183] 5. 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的纯化：

[0184] 1) 表达 HSV1 病毒 GB 糖蛋白工程菌的超声裂解

[0185] 将诱导表达融合蛋白的工程菌离心 ( $8000\text{rpm}$ 、 $20\text{min}$ 、 $4^\circ\text{C}$ ) 收菌, 菌体重悬于原培养液 1/10 体积的裂解液内, 裂解液为  $50\text{mmol/L}$  Tris-HCl pH8.0、 $10\text{mmol/L}$  EDTA、 $10\text{mmol/L}$  DTT, 冰浴超声破菌  $10\text{min}$ , 离心 ( $8000\text{rpm}$ 、 $20\text{min}$ 、 $4^\circ\text{C}$ ) 收集上清, 弃沉淀。收集的上清用于下一步的亲亲和层析纯化。

[0186] 2) 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的纯化

[0187] 上清溶液加已经平衡的 Glutathione Sepharose 4B 凝胶  $3\text{ml}$ , 室温结合  $60\text{min}$ , 上样, 收集穿透液。用十倍柱床体积的  $1\times\text{PBS}$  洗涤柱子, 接着用  $15\text{ml}$  高浓度的 GSH 洗脱液, 洗脱液为  $50\text{mmol/L}$  Tris-HCL pH8.0 +  $10\text{mmol/L}$  LGST, 分三次洗脱目的蛋白, 即为纯化的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段。

[0188] 6. 纯化的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的 ELISA 检测：

[0189] 将初步纯化获得的融合蛋白按  $1 : 1000 \sim 1 : 32000$  倍比稀释, 并将阴性对照以同样浓度倍比稀释, 用 Human HSV-1 ELISA 试剂盒检测表达蛋白的抗原性 (具体操作方法见试剂盒说明书)。结果显示 (表 1) 此融合表达蛋白具有较好的抗原性和特异性。

[0190] 7. 将表达的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白片段, 用于疫苗、HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。

[0191] 8. 将合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因片段与其它基因片段连接, 以融合蛋白的形式进行表达、制备。

[0192] 上述方法制备的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段在制备 HSV1 病毒亚单位疫苗中的应用。

[0193] 化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段, 可利用细菌、酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞及转基因动植物进行重组表达、制备。

[0194] 本发明与现有技术相比具有的优点：

[0195] 本发明表达的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白片段, 有较多优点：

[0196] 1. 本发明表达的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段用作抗原制备 HSV1 病毒抗体的酶联免疫检测试剂盒, 具有生产较安全、成本低、与其它病毒交叉反应少等优点。

[0197] 2. HSV1 病毒的 gB 糖蛋白在感染的细胞中含量最多, 是疱疹病毒家族中高度保守的蛋白, 各毒株间差异较小, 且与所有的疱疹类病毒亚群有较大的同源性, 同时 gB 蛋白具有较强的免疫原性, 可诱导机体产生中和抗体和细胞免疫反应, 因此 HSV1gB 糖蛋白是构建

HSV 疫苗理想的目的基因。本发明选择了其强抗原表位,利用基因工程技术表达制备,为研制基因工程疫苗奠定基础。基因工程疫苗安全、成本低。

[0198] 3. 本发明根据筛选出的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白胞外区片段氨基酸序列,选择真核和原核生物均偏爱的密码子,化学合成全新的基因序列,该基因适宜在真核和原核细胞内高表达。

[0199] 4. 本发明构建的表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的工程菌,表达量可达菌体蛋白的 30%,易于纯化,可大量纯化制备该蛋白。

## 附图说明

[0200] 以下将结合附图对本发明作进一步说明。

[0201] 图 1 是本发明表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的重组质粒构建流程图。

[0202] 图 2 是本发明 PCR 扩增 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片断的电泳图。

[0203] 图 3 是本发明用 1.0% 的 Agarose 凝胶检测 5 个重组子的 PCR 扩增产物。附图 3 中 M:低分子量 DNA 标准 (TaKaRa, 500bp); 1 ~ 5 : 5 个转化子均扩增出 2107bp 的目的基因片段。

[0204] 图 4 是本发明表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白重组菌的 SDS-PAGE 分析结果。附图 4 中 M:低分子量蛋白标准 (Pharmacia); 7:对照菌 E. coli TG1; 1 ~ 6 表示 1 ~ 6 号重组菌, 2 号、5 号 2 个重组子表达相对分子量约为 96000 的融合蛋白, 1、3、4、6 号 4 个转化子无此蛋白带。

[0205] 图 5 是本发明表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白纯化前后的 SDS-PAGE 分析结果。附图 5 中 M:低分子量蛋白标准 (Pharmacia); 1:对照菌 TG1; 2:表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的工程菌; 3:HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的包涵体; 4:HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的纯化过程中的穿过峰; 5:Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化后的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白; 6:HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的纯化过程中的上清。

## 具体实施方式

[0206] 本发明实施方式的详细说明:

[0207] HSV1 病毒的 gB 糖蛋白抗原表位的分析、基因合成及表达

[0208] 通过计算机分析 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的全部氨基酸序列,筛选出 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白内的强抗原表位,选用细菌偏爱的密码子,化学合成 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白强抗原表位的全新基因片段。将基因片段克隆至质粒 pGEX4T-2 内的 BamHI/EcoRI 位点,与载体上的起始密码子的翻译框架一致,可表达一个融合蛋白。将重组质粒转化大肠杆菌 TG1,筛选获得了高效表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的工程菌,表达的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白约占菌体蛋白总量的 30%左右。

[0209] 材料与amp;方法

[0210] 1. 菌种与质粒:宿主菌 TG1 及表达载体 pGEX4T-2 为实验室保存。

[0211] 2. 分子生物学试剂:限制性内切酶 BamHI、EcoRI、及 T4 DNA 连接酶为市售 TaKaRa 公司产品。质粒纯化试剂盒及从琼脂糖凝胶内回收 DNA 片段的试剂盒为市售 TaKaRa 公司产品。DTT 及 IPTG 为市售 Promega 公司产品。其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

[0212] 3. 基因片段的合成 :由公司按设计合成。

[0213] 4. 基因克隆方法 :DNA 的酶切、连接、电泳 ;质粒的提取、转化 ;蛋白的 SDS-PAGE 分析等一般分子克隆方法按常规方法进行。其它试剂盒按说明书进行操作。

[0214] 5. DNA 序列分析 :用 QIAGEN 公司质粒纯化试剂盒纯化质粒,用 DNA 全自动测序仪测序。

[0215] 实施方式

[0216] 1. HSV1 病毒的 gB 糖蛋白抗原表位筛选及基因片段的合成 :

[0217] 利用 ANTHEWIN 等软件,通过计算机分析 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的全部氨基酸序列 (GeneBank, 接通号 :AY278488), 筛选出 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白内的强抗原表位 (图 1), 即从第 1 个氨基酸到第 696 个氨基酸, 其氨基酸序列如下 :

[0218] Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro GIY Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn Gly

[0219] Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu GIY Ala Ala Pro Thr GLY Asp Pro

[0220] Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ala Gly

[0221] Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Glu His Leu Arg Asp

[0222] Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly

[0223] Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly

[0224] Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr

[0225] Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe

[0226] Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro Val Pro

[0227] Phe Glu Glu Val Ile Asp LYS Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala

[0228] Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu

[0229] Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp

[0230] His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr

[0231] Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro

[0232] Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr

[0233] Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe

[0234] Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg Ala Thr

[0235] Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala Trp Asp

[0236] Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu Val Asp

[0237] Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile

[0238] Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu

[0239] Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg

[0240] Arg Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn

[0241] Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu

[0242] Tyr Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Pro Lys Pro Pro Asn Pro Thr Pro

[0243] Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser

[0244] Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln Asn His Val

[0245] Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn His Glu

[0246] Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Ala

[0247] Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser  
 [0248] Thr Cys Val Pro Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile  
 [0249] Ser Ser Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu  
 [0250] Asp Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu  
 [0251] Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe Thr Phe  
 [0252] Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Ser Ala Tyr Ser His Gln Leu Ser Arg  
 [0253] Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu  
 [0254] Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser  
 [0255] Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg  
 [0256] Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala

[0257] 根据筛选的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白内的抗原表位氨基酸序列,选择真核和原核生物均偏爱的密码子,化学合成全新的基因序列,并且在 5' 端增加了 BamHI 酶切位点(下画线部分)及两个保护碱基(GC),在 3' 端增加了终止密码子(TGA)和 EcoRI 酶切位点(下画线部分)及两个保护碱基(GC),使该基因片段易于克隆至质粒 pGEX4T-2 内的 BamHI 和 EcoRI 酶切位点内。化学合成的含 HSV1 病毒 gB 糖蛋白抗原表位基因的 DNA 序列(2107bp)如下:

[0258] GCGGATCC CCT ACC TCT CCT GGT ACT CCT GGT GTG GCT GCC GCT ACC CAG GCC GCT AAC  
 [0259] GGT GGT CCT GCC ACT CCT GCT CCT CCT CTG GGT GCC GCT CCT ACT GGT GAC CCT  
 [0260] AAG CCT AAG AAG AAC AAG AAG CCT AAG AAC CCT ACT CCT CCT AGG CCT GCT GGT GAC  
 [0261] AAC GCC ACC GTG GCC GCT GGC CAC GCC ACT CTG AGA GAG CAC CTG AGA GAC ATC AAG  
 [0262] GCT GAG AAC ACC GAC GCT AAC TTC TAC GTG TGT CCT CCT CCT ACT GGT GCC ACC GTG  
 [0263] GTG CAG TTC GAG CAG CCT CGC AGG TGC CCT ACC AGG CCT GAA GGT CAG AAC TAC ACC  
 [0264] GAA GGC ATC GCC GTG GTG TTC AAG GAG AAC ATC GCT CCT TAC AAG TTC AAG GCC ACC  
 [0265] ATG TAC TAC AAG GAC GTG ACC GTG AGC CAG GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG  
 [0266] TTC ATG GGC ATC TTC GAG GAC CGC GCT CCT GTG CCT TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG  
 [0267] ATC AAC GCC AAG GGT GTG TGT AGG TCC ACC GCT AAG TAC GTG CGC AAC AAC CTG GAG  
 [0268] ACC ACT GCT TTC CAC AGA GAC GAT CAC GAG ACC GAC ATG GAG CTG AAG CCT GCC AAC  
 [0269] GCC GCT ACT CGC ACC AGC AGA GGC TGG CAC ACC ACT GAC CTG AAG TAC AAC CCT AGC  
 [0270] AGA GTG GAG GCC TTC CAC AGG TAC GGC ACC ACC GTG AAC TGC ATC GTG GAG GAG GTG  
 [0271] GAC GCT CGC AGC GTG TAC CCT TAC GAC GAG TTC GTG CTG GCC ACT GGT GAC TTC GTG  
 [0272] TAC ATG TCT CCT TTC TAC GGC TAC AGA GAA GGT AGC CAC ACC GAG CAC ACT ACC TAC  
 [0273] GCT GCT GAC AGG TTC AAG CAG GTG GAC GGC TTC TAC GCT CGC GAC CTG ACC ACC AAG  
 [0274] GCT AGA GCC ACT GCT CCT ACC ACT AGG AAC CTG CTG ACC ACT CCT AAG TTC ACC GTG  
 [0275] GCT TGG GAC TGG GTG CCT AAG CGC CCT AGC GTG TGC ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAG  
 [0276] GTG GAC GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGT TCC TTC AGG TTC TCC TCT GAC GCT  
 [0277] ATC TCC ACT ACC TTC ACT ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCT CTG TCC AGA GTG GAC CTG  
 [0278] GGT GAC TGC ATC GGT AAG GAC GCT CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC GCT CGC AGG  
 [0279] TAC AAC GCT ACT CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCT CAG TAC TAC CAG GCC AAC GGT GGT  
 [0280] TTC CTG ATC GCC TAC CAG CCT CTG CTG AGC AAC ACT CTG GCT GAG CTG TAC GTG AGA  
 [0281] GAG CAC CTG AGA GAG CAG AGC CGC AAG CCT CCT AAC CCT ACG CCT CCT CCT CCC GGT

[0282] GCT AGC GCC AAC GCT TCC GTG GAG CGC ATC AAG ACT ACC TCT AGC ATC GAG TTC GCC  
 [0283] AGG CTG CAG TTC ACC TAC AAC CAC ATC CAG CGC CAC GTG AAC GAC ATG CTG GGT CGC  
 [0284] GTG GCT ATC GCT TGG TGC GAG CTG CAG AAC CAC GAG CTG ACT CTG TGG AAC GAG GCT  
 [0285] CGC AAG CTG AAC CCT AAC GCT ATC GCC AGC GTG ACC GTG GGC AGG AGA GTG AGC GCT  
 [0286] AGA ATG CTG GGC GAC GTG ATG GCC GTG TCC ACC TGC GTG CCT GTG GCT GCT GAC AAC  
 [0287] GTG ATC GTG CAG AAC AGC ATG CGC ATC AGC TCC AGA CCT GGT GCC TGC TAC AGC AGA  
 [0288] CCT CTG GTG AGC TTC AGG TAC GAG GAC CAA GGT CCT CTG GTG GAA GGT CAG CTG GGT  
 [0289] GAG AAC AAC GAG CTG AGG CTG ACT CGC GAC GCT ATC GAG CCT TGC ACC GTC GGT CAC  
 [0290] AGA CGC TAC TTC ACC TTC GGT GGC GGT TAC GTG TAC TTC GAG GAG TAC GCT TAC TCT  
 [0291] CAC CAG CTG AGC CGC GCT GAC ATC ACT ACC GTG AGC ACC TTC ATC GAC CTG AAC ATC  
 [0292] ACC ATG CTG GAG GAC CAC GAG TTC GTG CCT CTG GAG GTG TAC ACC CGC CAC GAG ATC  
 [0293] AAG GAC AGC GGC CTG CTG GAC TAC ACC GAG GTG CAG CGC CGC AAC CAG CTG CAC GAC  
 [0294] CTG CGC TTC GCT GAC ATC GAC ACC GTG ATC CAC GCC GAC GCC TGA GAATTCGC

[0295] 2. 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段重组质粒的构建：

[0296] 提取质粒 pGEX4T-2, 用 Bam H I 和 EcoRI 双酶切, 电泳后回收酶切的质粒大片段, 溶于去离子水内。同样用 BamH I 和 EcoR I 双酶切化学合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段, 电泳回收后, 溶于去离子水内。

[0297] 取等摩尔浓度的上述两种酶切后 DNA 片段, 在同一离心管内用 T4 DNA 连接酶连接, 使 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段插入到载体 pGEX4T-2 内的 BamH I 和 EcoRI 位点之间, 与载体上的起始密码子翻译框架一致, 表达一个融合蛋白 (构建流程见图 2)。

[0298] 3. 重组质粒的筛选与鉴定：

[0299] 将上步连接的重组质粒转化到大肠杆菌 TG1, 将转化产物涂布含氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/ml) 的固体 LB 培养基上, 置 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日随机挑选 5 个转化子菌落 (分别标记为 1-5 号) 和 1 个对照菌 (质粒 pGEX4T-2 转化菌), 分别接种到含 3ml 液体 LB 培养基 (含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml) 的试管内, 置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 5h, 取菌液 1ml, 离心收菌。分别用 50  $\mu$ l 去离子水悬浮菌体, 沸水煮 5min, 离心 (4 $^{\circ}$ C, 12000rpm) 5min, 取上清 (内有质粒) 2  $\mu$ l 用作 PCR 模板, PCR 扩增插入载体内的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段, PCR 反应浓度为: 质粒模板 2  $\mu$ l、HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区基因片段的正链 P1 (GCGGATCCCCTACCTCTCCTGGTACTC) 和负链引物 P2 (GCGAATTCTTAGGCGTCGGC) 各 1  $\mu$ l、10 $\times$ pyrobest buffer 5.0  $\mu$ l、2.5mmol/L dNTP 4.0  $\mu$ l、Pyrobest DNA Taq 酶 0.5  $\mu$ l (2.5U)、去离子水 36.5  $\mu$ l, 总体积 50  $\mu$ l。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 4 分钟, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟。取 PCR 扩增产物 5  $\mu$ l, 用 1.0% 的 Agarose 凝胶检测, 结果, 5 个转化子均扩增出 2107bp 的目的基因片段 (见图 3), 而含质粒 pGEX4T-2 的对照菌没有扩增出该基因片段。初步证实, 这 5 个转化子均含有 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因片段。

[0300] 提取 1 号重组子的质粒, 测定质粒内的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因序列, DNA 序列分析证实, 重组质粒含有合成的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白基因片段, 序列完全正确：

[0301] CCT ACC TCT CCT GGT ACT CCT GGT GTG GCT GCC GCT ACC CAG GCC GCT AAC GGT GGT

[0302] CCT GCC ACT CCT GCT CCT CCT CCT CTG GGT GCC GCT CCT ACT GGT GAC CCT AAG CCT

[0303] AAG AAG AAC AAG AAG CCT AAG AAC CCT ACT CCT CCT AGG CCT GCT GGT GAC AAC GCC  
[0304] ACC GTG GCC GCT GGC CAC GCC ACT CTG AGA GAG CAC CTG AGA GAC ATC AAG GCT GAG  
[0305] AAC ACC GAC GCT AAC TTC TAC GTG TGT CCT CCT CCT ACT GGT GCC ACC GTG GTG CAG  
[0306] TTC GAG CAG CCT CGC AGG TGC CCT ACC AGG CCT GAA GGT CAG AAC TAC ACC GAA GGC  
[0307] ATC GCC GTG GTG TTC AAG GAG AAC ATC GCT CCT TAC AAG TTC AAG GCC ACC ATG TAC  
[0308] TAC AAG GAC GTG ACC GTG AGC CAG GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG TTC ATG  
[0309] GGC ATC TTC GAG GAC CGC GCT CCT GTG CCT TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG ATC AAC  
[0310] GCC AAG GGT GTG TGT AGG TCC ACC GCT AAG TAC GTG CGC AAC AAC CTG GAG ACC ACT  
[0311] GCT TTC CAC AGA GAC GAT CAC GAG ACC GAC ATG GAG CTG AAG CCT GCC AAC GCC GCT  
[0312] ACT CGC ACC AGC AGA GGC TGG CAC ACC ACT GAC CTG AAG TAC AAC CCT AGC AGA GTG  
[0313] GAG GCC TTC CAC AGG TAC GGC ACC ACC GTG AAC TGC ATC GTG GAG GAG GTG GAC GCT  
[0314] CGC AGC GTG TAC CCT TAC GAC GAG TTC GTG CTG GCC ACT GGT GAC TTC GTG TAC ATG  
[0315] TCT CCT TTC TAC GGC TAC AGA GAA GGT AGC CAC ACC GAG CAC ACT ACC TAC GCT GCT  
[0316] GAC AGG TTC AAG CAG GTG GAC GGC TTC TAC GCT CGC GAC CTG ACC ACC AAG GCT AGA  
[0317] GCC ACT GCT CCT ACC ACT AGG AAC CTG CTG ACC ACT CCT AAG TTC ACC GTG GCT TGG  
[0318] GAC TGG GTG CCT AAG CGC CCT AGC GTG TGC ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAG GTG GAC  
[0319] GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGT TCC TTC AGG TTC TCC TCT GAC GCT ATC TCC  
[0320] ACT ACC TTC ACT ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCT CTG TCC AGA GTG GAC CTG GGT GAC  
[0321] TGC ATC GGT AAG GAC GCT CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC GCT CGC AGG TAC AAC  
[0322] GCT ACT CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCT CAG TAC TAC CAG GCC AAC GGT GGT TTC CTG  
[0323] ATC GCC TAC CAG CCT CTG CTG AGC AAC ACT CTG GCT GAG CTG TAC GTG AGA GAG CAC  
[0324] CTG AGA GAG CAG AGC CGC AAG CCT CCT AAC CCT ACG CCT CCT CCT CCC GGT GCT AGC  
[0325] GCC AAC GCT TCC GTG GAG CGC ATC AAG ACT ACC TCT AGC ATC GAG TTC GCC AGG CTG  
[0326] CAG TTC ACC TAC AAC CAC ATC CAG CGC CAC GTG AAC GAC ATG CTG GGT CGC GTG GCT  
[0327] ATC GCT TGG TGC GAG CTG CAG AAC CAC GAG CTG ACT CTG TGG AAC GAG GCT CGC AAG  
[0328] CTG AAC CCT AAC GCT ATC GCC AGC GTG ACC GTG GGC AGG AGA GTG AGC GCT AGA ATG  
[0329] CTG GGC GAC GTG ATG GCC GTG TCC ACC TGC GTG CCT GTG GCT GCT GAC AAC GTG ATC  
[0330] GTG CAG AAC AGC ATG CGC ATC AGC TCC AGA CCT GGT GCC TGC TAC AGC AGA CCT CTG  
[0331] GTG AGC TTC AGG TAC GAG GAC CAA GGT CCT CTG GTG GAA GGT CAG CTG GGT GAG AAC  
[0332] AAC GAG CTG AGG CTG ACT CGC GAC GCT ATC GAG CCT TGC ACC GTC GGT CAC AGA CGC  
[0333] TAC TTC ACC TTC GGT GGC GGT TAC GTG TAC TTC GAG GAG TAC GCT TAC TCT CAC CAG  
[0334] CTG AGC CGC GCT GAC ATC ACT ACC GTG AGC ACC TTC ATC GAC CTG AAC ATC ACC ATG  
[0335] CTG GAG GAC CAC GAG TTC GTG CCT CTG GAG GTG TAC ACC CGC CAC GAG ATC AAG GAC  
[0336] AGC GGC CTG CTG GAC TAC ACC GAG GTG CAG CGC CGC AAC CAG CTG CAC GAC CTG CGC  
[0337] TTC GCT GAC ATC GAC ACC GTG ATC CAC GCC GAC GCC TGA

[0338] 构建的重组质粒表达 HSV1 的病毒 gB 糖蛋白片段 (696 个氨基酸), 在其 N 端融合了载体上的 238 个氨基酸, 全长 934 个氨基酸, 其氨基酸序列如下:

[0339] Met Pro Met Ile Leu Gly Tyr Trp Asp Ile Arg Gly Leu Ala His Ala Ile Arg

[0340] Leu Leu Leu Glu Tyr Thr Asp Ser Ser Tyr Glu Glu Lys Lys Tyr Thr Met Gly

[0341] Gly Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Ser Gln Trp Leu Asn Glu Lys Phe Lys Leu Gly  
[0342] Leu Asp Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Ile Asp Gly Ala His Lys Ile Thr Gln  
[0343] Ser Asn Ala Ile Leu Cys Tyr Ile Ala Arg Lys His Asn Leu Cys Gly Glu Thr  
[0344] Glu Glu Glu Lys Ile Arg Val Asp Ile Leu Glu Asn Gln Ala Met Asp Val Ser  
[0345] Asn Gln Leu Ala Arg Val Cys Tyr Ser Pro Asp Phe Glu Lys Leu Lys Pro Glu  
[0346] Tyr Leu Glu Glu Leu Pro Thr Met Met Gln His Phe Ser Gln Phe Leu Gly Lys  
[0347] Arg Pro Trp Phe Val Gly Asp Lys Ile Thr Phe Val Asp Phe Leu Ala Tyr Asp  
[0348] Val Leu Asp Leu His Arg Ile Phe Glu Pro Asn Cys Leu Asp Ala Phe Pro Asn  
[0349] Leu Lys Asp Phe Ile Ser Arg Phe Glu Gly Leu Glu Lys Ile Ser Ala Tyr Met  
[0350] Lys Ser Ser Arg Phe Leu Pro Lys Pro Leu Tyr Thr Arg Met Ala Val Trp Gly  
[0351] Asn Lys Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala  
[0352] Asn Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr Gly  
[0353] Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro Pro Arg Pro  
[0354] Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Glu His Leu  
[0355] Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala Asn Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro  
[0356] Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro  
[0357] Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala  
[0358] Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val  
[0359] Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro  
[0360] Val Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser  
[0361] Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp  
[0362] His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala Thr Arg Thr Ser Arg  
[0363] Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His  
[0364] Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val  
[0365] Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro  
[0366] Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp  
[0367] Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg  
[0368] Ala Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr Val Ala  
[0369] Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu  
[0370] Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp  
[0371] Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val  
[0372] Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe  
[0373] Ala Arg Arg Tyr Asn Ala Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu  
[0374] Ala Asn Gly Gly Phe Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala  
[0375] Glu Leu Tyr Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Pro Lys Pro Pro Asn Pro  
[0376] Thr Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile Lys Thr  
[0377] Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn His Ile Gln Asn  
[0378] His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn  
[0379] His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala

[0380] Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala  
[0381] Val Ser Thr Cys Val Pro Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met  
[0382] Arg Ile Ser Ser Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg  
[0383] Tyr Glu Asp Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu  
[0384] Arg Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe  
[0385] Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Ser Ala Tyr Ser His Gln Leu  
[0386] Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile Asp Leu Asn Ile Thr Met  
[0387] Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys  
[0388] Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp  
[0389] Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala

[0390] 4. 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白工程菌的筛选鉴定：

[0391] 将含有重组质粒的 5 个阳性转化子和 1 个对照菌（质粒 pGEX4T-2 转化菌），接种至含 3ml LB 培养基（含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml）的试管内，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3h，加 IPTG 至终浓度 1.0mmol/L，继续振荡培养诱导 5h，离心收集菌体进行 SDS-PAGE 检测，重组子表达相对分子量约为 96kD 的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白，表达量约为 30%，而对照菌 TG1 无此蛋白带（图 4）。

[0392] 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的纯化

[0393] 根据表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的氨基酸序列，分析其理化特性，确定适当的纯化方法。我们所表达的 HSV1gB 糖蛋白融合有载体上的 GST 蛋白，GST 融合蛋白在表达时同时表达了谷胱甘肽 s 转酶，可很方便用 GST 琼脂糖凝胶 FF 分离，因此我们决定采用亲和层析法，用 Glutathione Sepharose 4B 凝胶进行纯化。具体步骤如下：

[0394] 材料和方法

[0395] 1. 主要试剂：

[0396] Glutathione Sepharose 4B 凝胶为 GE Healthcare 公司产品，IPTG、DTT 为 Promega 公司产品。其它试剂为国产或进口分析纯试剂。

[0397] 2. 表达 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的超声裂解：

[0398] 将培养的 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的工程菌离心（8000rpm, 20mins, 4 $^{\circ}$ C），弃上清，菌体重悬于原培养液 1/10 体积的裂解液（50mmol/L Tris-HCl pH8.0、10mmol/L EDTA、10mmol/L DTT）内，冰浴超声破菌 10mins，离心（8000rpm、20mins、4 $^{\circ}$ C）收集上清，弃沉淀。收集的上清用于下一步的亲和层析纯化。

[0399] 3. 表达 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的纯化：

[0400] 上清溶液加已经平衡的 Glutathione Sepharose 4B 凝胶 3ml 室温结合 60min，上样，收集穿透液。用十倍柱床体积的 1 $\times$ PBS 洗涤柱子，接着用 15ml 高浓度的 GSH 洗脱液（50mmol/L Tris-HCl pH8.0+10mmol/L GST）分三次洗脱目的蛋白，即为纯化的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白胞外区片段。

[0401] 结果：

[0402] 将从 Glutathione Sepharose 4B 凝胶柱上洗脱的蛋白进行 SDS-PAGE 分析，结果显示（见图 5），经诱导明显表达出 HSV1gB/GST 融合蛋白，表达产物主要存在于上清液中。SDS-PAGE 显示表达产物约 96kDa。

[0403] 纯化 HSV1 病毒的 gB 糖蛋白的鉴定及应用

[0404] 将纯化的重组 HSV1 病毒 gB 糖蛋白抗原,通过双抗体夹心 ELISA 试验方法检测,以鉴定表达的 HSV1 病毒 gB 糖蛋白的抗原性和特异性。实验结果显示,该重组蛋白有很好的抗原性和特异性。

[0405] 材料和方法

[0406] 1. 酶联反应试剂盒 :Human HSV-1 ELISA 试剂盒为美国 Uscnlife 公司产品。

[0407] 2. ELISA 试验 :将初步纯化获得的融合蛋白按 1 : 1000 ~ 1 : 32000 倍比稀释,并将阴性对照以同样浓度倍比稀释,用 Human HSV-1 ELISA 试剂盒检测表达蛋白的抗原性(具体操作方法见试剂盒说明书)。

[0408] 结果

[0409] HSV1gB 蛋白的 ELISA 检测

[0410] 将初步纯化获得的融合蛋白按 1 : 1000 ~ 1 : 32000 倍比稀释,并将阴性对照以同样浓度倍比稀释,用 Human HSV-1 ELISA 试剂盒检测表达蛋白的抗原性。结果显示(表 1) 此融合表达蛋白具有较好的抗原性和特异性。

[0411] 表 1 表达蛋白的 ELISA 实验结果

[0412] Table1.ELISA results of the expressed protein

[0413]

蛋白稀 释浓度	1 : 1000	1 : 2000	1 : 4000	1 : 8000	1 : 16000	1 : 32000
HSV1gB	0.814	0.539	0.428	0.400	0.396	0.129
Control	0.021	0.019	0.025	0.011	0.003	0.007

[0414] 化学合成的 HSV 病毒 gB 蛋白胞外区基因片段序列表

[0415] <110> 李越希

[0416] <120> 化学合成的 HSV 病毒 gB 蛋白胞外区基因片段及其表达、应用

[0417] <160>2

[0418] <210>1

[0419] <211>696

[0420] <212>PRT

[0421] <213>HSV 病毒 gB 蛋白胞外区片段

[0422] <220>

[0423] <223> 含强抗原表位的 HSV 病毒 gB 蛋白胞外区片段,第 1 个氨基酸 - 第 696 个氨基酸,共 696 个氨基酸。

[0424] <400>1

[0425] Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala

[0426] 1 5 10 15

[0427] Asn Gly Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro

[0428] 20 25 30

[0429] Thr Gly Asp Pro Lys Pro Lys Lys Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr

[0430]	35	40	45	
[0431]	Pro Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala Ala Gly His Ala			
[0432]	50	55	60	
[0433]	Thr Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala			
[0434]	65	70	75	80
[0435]	Asn Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe			
[0436]	85	90	95	
[0437]	Glu Gln Pro Arg Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr			
[0438]	100	105	110	
[0439]	Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe			
[0440]	115	120	125	
[0441]	Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser Gln Val Trp Phe			
[0442]	130	135	140	
[0443]	Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro			
[0444]	145	150	155	160
[0445]	Val Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys			
[0446]	165	170	175	
[0447]	Arg Ser Thr Ala Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe			
[0448]	180	185	190	
[0449]	His Arg Asp Asp His Glu Thr Asp Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala			
[0450]	195	200	205	
[0451]	Ala Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp Leu Lys Tyr Asn			
[0452]	210	215	220	
[0453]	Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys			
[0454]	225	230	235	240
[0455]	Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe			
[0456]	245	250	255	
[0457]	Val Leu Ala Thr Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr			
[0458]	260	265	270	
[0459]	Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe			
[0460]	275	280	285	
[0461]	Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr Thr Lys Ala Arg			
[0462]	290	295	300	
[0463]	Ala Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr			
[0464]	305	310	315	320
[0465]	Val Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr			
[0466]	325	330	335	
[0467]	Lys Trp Gln Glu Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser			
[0468]	340	345	350	

[0469]	Phe Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu
[0470]	355 360 365
[0471]	Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp Cys Ile Gly Lys
[0472]	370 375 380
[0473]	Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Asn Ala
[0474]	385 390 395 400
[0475]	Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn Gly Gly
[0476]	405 410 415
[0477]	Phe Leu Ile Ala Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu
[0478]	420 425 430
[0479]	Tyr Val Arg Glu His Leu Arg Glu Gln Ser Pro Lys Pro Pro Asn Pro
[0480]	435 440 445
[0481]	Thr Pro Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser Val Glu Arg Ile
[0482]	450 455 460
[0483]	Lys Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn
[0484]	465 470 475 480
[0485]	His Ile Gln Asn His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala
[0486]	485 490 495
[0487]	Trp Cys Glu Leu Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg
[0488]	500 505 510
[0489]	Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val
[0490]	515 520 525
[0491]	Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser Thr Cys Val Pro
[0492]	530 535 540
[0493]	Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser
[0494]	545 550 555 560
[0495]	Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu
[0496]	565 570 575
[0497]	Asp Gln Gly Pro Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu
[0498]	580 585 590
[0499]	Arg Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg
[0500]	595 600 605
[0501]	Tyr Phe Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu Glu Ser Ala Tyr
[0502]	610 615 620
[0503]	Ser His Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile
[0504]	625 630 635 640
[0505]	Asp Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu
[0506]	645 650 655
[0507]	Val Tyr Thr Arg His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr

[0508] 660 665 670

[0509] Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile

[0510] 675 680 685

[0511] Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala

[0512] 690 695

[0513] <210>2

[0514] <211>2107

[0515] <212>DNA

[0516] <213>人工序列

[0517] <220>

[0518] <221>CDS

[0519] <222>(1)... (2104)

[0520] <223>人工合成的全新基因片段,编码 HSV 病毒 gB 蛋白胞外区片段。

[0521] <220>

[0522] <221>mis-feature

[0523] <222>(2105)... (2107)

[0524] <223>合成基因时增加的终止密码子。

[0525] <400>2

[0526] CCT ACC TCT CCT GGT ACT CCT GGT GTG GCT GCC GCT ACC CAG GCC GCT AAC GGT  
GGT CCT 60

[0527] Pro Ser Ser Pro Gly Thr Pro Gly Val Ala Ala Ala Thr Gln Ala Ala Asn Gly Gly Pro

[0528] 1 5 10 15 20

[0529] GCC ACT CCT GCT CCT CCT CCT CTG GGT GCC GCT CCT ACT GGT GAC CCT AAG CCT AAG AAG 120

[0530] Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Ala Ala Pro Thr Gly Asp Pro Lys Pro Lys Lys

[0531] 25 30 35 40

[0532] AAC AAG AAG CCT AAG AAC CCT ACT CCT CCT AGG CCT GCT GGT GAC AAC GCC ACC GTG GCC 180

[0533] Asn Lys Lys Pro Lys Asn Pro Thr Pro Pro Arg Pro Ala Gly Asp Asn Ala Thr Val Ala

[0534] 45 50 55 60

[0535] GCT GGC CAC GCC ACT CTG AGA GAG CAC CTG AGA GAC ATC AAG GCT GAG AAC ACC GAC GCT 240

[0536] Ala Gly His Ala Thr Leu Arg Glu His Leu Arg Asp Ile Lys Ala Glu Asn Thr Asp Ala

[0537] 65 70 75 80

[0538] AAC TTC TAC GTG TGT CCT CCT CCT ACT GGT GCC ACC GTG GTG CAG TTC GAG CAG CCT CGC 300

[0539] Asn Phe Tyr Val Cys Pro Pro Pro Thr Gly Ala Thr Val Val Gln Phe Glu Gln Pro Arg

[0540] 85 90 95 100

[0541] AGG TGC CCT ACC AGG CCT GAA GGT CAG AAC TAC ACC GAA GGC ATC GCC GTG GTG TTC AAG 360

[0542] Arg Cys Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gln Asn Tyr Thr Glu Gly Ile Ala Val Val Phe Lys

[0543] 105 110 115 120

[0544] GAG AAC ATC GCT CCT TAC AAG TTC AAG GCC ACC ATG TAC TAC AAG GAC GTG ACC GTG AGC 420

[0545] Glu Asn Ile Ala Pro Tyr Lys Phe Lys Ala Thr Met Tyr Tyr Lys Asp Val Thr Val Ser

[0546]	125	130	135	140
[0547]	CAG GTG TGG TTC GGC CAC CGC TAC TCC CAG TTC ATG GGC ATC TTC GAG GAC CGC GCT CCT	480		
[0548]	Gln Val Trp Phe Gly His Arg Tyr Ser Gln Phe Met Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ala Pro			
[0549]	145	150	155	160
[0550]	GTG CCT TTC GAG GAG GTG ATC GAC AAG ATC AAC GCC AAG GGT GTG TGT AGG TCC ACC GCT	540		
[0551]	Val Pro Phe Glu Glu Val Ile Asp Lys Ile Asn Ala Lys Gly Val Cys Arg Ser Thr Ala			
[0552]	165	170	175	180
[0553]	AAG TAC GTG CGC AAC AAC CTG GAG ACC ACT GCT TTC CAC AGA GAC GAT CAC GAG ACC GAC	600		
[0554]	Lys Tyr Val Arg Asn Asn Leu Glu Thr Thr Ala Phe His Arg Asp Asp His Glu Thr Asp			
[0555]	185	190	195	200
[0556]	ATG GAG CTG AAG CCT GCC AAC GCC GCT ACT CGC ACC AGC AGA GGC TGG CAC ACC ACT GAC	660		
[0557]	Met Glu Leu Lys Pro Ala Asn Ala Ala Thr Arg Thr Ser Arg Gly Trp His Thr Thr Asp			
[0558]	205	210	215	220
[0559]	CTG AAG TAC AAC CCT AGC AGA GTG GAG GCC TTC CAC AGG TAC GGC ACC ACC GTG AAC TGC	720		
[0560]	Leu Lys Tyr Asn Pro Ser Arg Val Glu Ala Phe His Arg Tyr Gly Thr Thr Val Asn Cys			
[0561]	225	230	235	240
[0562]	ATC GTG GAG GAG GTG GAC GCT CGC AGC GTG TAC CCT TAC GAC GAG TTC GTG CTG GCC ACT	780		
[0563]	Ile Val Glu Glu Val Asp Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Glu Phe Val Leu Ala Thr			
[0564]	245	250	255	260
[0565]	GGT GAC TTC GTG TAC ATG TCT CCT TTC TAC GGC TAC AGA GAA GGT AGC CAC ACC GAG CAC	840		
[0566]	Gly Asp Phe Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Tyr Arg Glu Gly Ser His Thr Glu His			
[0567]	265	270	275	280
[0568]	ACT ACC TAC GCT GCT GAC AGG TTC AAG CAG GTG GAC GGC TTC TAC GCT CGC GAC CTG ACC	900		
[0569]	Thr Ser Tyr Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gln Val Asp Gly Phe Tyr Ala Arg Asp Leu Thr			
[0570]	285	290	295	300
[0571]	ACC AAG GCT AGA GCC ACT GCT CCT ACC ACT AGG AAC CTG CTG ACC ACT CCT AAG TTC ACC	960		
[0572]	Thr Lys Ala Arg Ala Thr Ala Pro Thr Thr Arg Asn Leu Leu Thr Thr Pro Lys Phe Thr			
[0573]	305	310	315	320
[0574]	GTG GCT TGG GAC TGG GTG CCT AAG CGC CCT AGC GTG TGC ACC ATG ACC AAG TGG CAG GAG	1020		
[0575]	Val Ala Trp Asp Trp Val Pro Lys Arg Pro Ser Val Cys Thr Met Thr Lys Trp Gln Glu			
[0576]	325	330	335	340
[0577]	GTG GAC GAG ATG CTG CGC TCC GAG TAC GGC GGT TCC TTC AGG TTC TCC TCT GAC GCT ATC	1080		
[0578]	Val Asp Glu Met Leu Arg Ser Glu Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Phe Ser Ser Asp Ala Ile			
[0579]	345	350	355	360
[0580]	TCC ACT ACC TTC ACT ACC AAC CTG ACC GAG TAC CCT CTG TCC AGA GTG GAC CTG GGT GAC	1140		
[0581]	Ser Thr Thr Phe Thr Thr Asn Leu Thr Glu Tyr Pro Leu Ser Arg Val Asp Leu Gly Asp			
[0582]	365	370	375	380
[0583]	TGC ATC GGT AAG GAC GCT CGC GAC GCC ATG GAC CGC ATC TTC GCT CGC AGG TAC AAC GCT	1200		
[0584]	Cys Ile Gly Lys Asp Ala Arg Asp Ala Met Asp Arg Ile Phe Ala Arg Arg Tyr Ash Ala			

[0585]	385	390	395	400
[0586]	ACT CAC ATC AAG GTG GGC CAG CCT CAG TAC TAC CAG GCC AAC GGT GGT TTC CTG ATC GCC	1260		
[0587]	Thr His Ile Lys Val Gly Gln Pro Gln Tyr Tyr Leu Ala Asn GLY Gly Phe Leu Ile Ala			
[0588]	405	410	415	420
[0589]	TAC CAG CCT CTG CTG AGC AAC ACT CTG GCT GAG CTG TAC GTG AGA GAG CAC CTG AGA GAG	1320		
[0590]	Tyr Gln Pro Leu Leu Ser Asn Thr Leu Ala Glu Leu Tyr Val Arg Glu His Leu Arg Glu			
[0591]	425	430	435	440
[0592]	CAG AGC CGC AAG CCT CCT AAC CCT ACG CCT CCT CCT CCC GGT GCT AGC GCC AAC GCT TCC	1380		
[0593]	Gln Ser Pro Lys Pro Pro Asn Pro Thr Pro Pro Pro Gly Ala Ser Ala Asn Ala Ser			
[0594]	445	450	455	460
[0595]	GTG GAG CGC ATC AAG ACT ACC TCT AGC ATC GAG TTC GCC AGG CTG CAG TTC ACC TAC AAC	1440		
[0596]	Val Glu Arg Ile Lys Thr Thr Ser Ser Ile Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asn			
[0597]	465	470	475	480
[0598]	CAC ATC CAG CGC CAC GTG AAC GAC ATG CTG GGT CGC GTG GCT ATC GCT TGG TGC GAG CTG	1500		
[0599]	His Ile Gln Asn His Val Asn Asp Met Leu Gly Arg Val Ala Ile Ala Trp Cys Glu Leu			
[0600]	485	490	495	500
[0601]	CAG AAC CAC GAG CTG ACT CTG TGG AAC GAG GCT CGC AAG CTG AAC CCT AAC GCT ATC GCC	1560		
[0602]	Gln Asn His Glu Leu Thr Leu Trp Asn Glu Ala Arg Lys Leu Asn Pro Asn Ala Ile Ala			
[0603]	505	510	515	520
[0604]	AGC GTG ACC GTG GGC AGG AGA GTG AGC GCT AGA ATG CTG GGC GAC GTG ATG GCC GTG TCC	1620		
[0605]	Ser Ala Thr Val Gly Arg Arg Val Ser Ala Arg Met Leu Gly Asp Val Met Ala Val Ser			
[0606]	525	530	535	540
[0607]	ACC TGC GTG CCT GTG GCT GCT GAC AAC GTG ATC GTG CAG AAC AGC ATG CGC ATC AGC TCC	1680		
[0608]	Thr Cys Val Pro Val Ala Ala Asp Asn Val Ile Val Gln Asn Ser Met Arg Ile Ser Ser			
[0609]	545	550	555	560
[0610]	AGA CCT GGT GCC TGC TAC AGC AGA CCT CTG GTG AGC TTC AGG TAC GAG GAC CAA GGT CCT	1740		
[0611]	Arg Pro Gly Ala Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Ser Phe Arg Tyr Glu Asp Gln Gly Pro			
[0612]	565	570	575	580
[0613]	CTG GTG GAA GGT CAG CTG GGT GAG AAC AAC GAG CTG AGG CTG ACT CGC GAC GCT ATC GAG	1800		
[0614]	Leu Val Glu Gly Gln Leu Gly Glu Asn Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg Asp Ala Ile Glu			
[0615]	585	590	595	600
[0616]	CCT TGC ACC GTC GGT CAC AGA CGC TAC TTC ACC TTC GGT GGC GGT TAC GTG TAC TTC GAG	1860		
[0617]	Pro Cys Thr Val Gly His Arg Arg Tyr Phe Thr Phe Gly Gly Gly Tyr Val Tyr Phe Glu			
[0618]	605	610	615	620
[0619]	GAG TAC GCT TAC TCT CAC CAG CTG AGC CGC GCT GAC ATC ACT ACC GTG AGC ACC TTC ATC	1920		
[0620]	Glu Ser Ala Tyr Ser His Gln Leu Ser Arg Ala Asp Ile Thr Thr Val Ser Thr Phe Ile			
[0621]	625	630	635	640
[0622]	GAC CTG AAC ATC ACC ATG CTG GAG GAC CAC GAG TTC GTG CCT CTG GAG GTG TAC ACC CGC	1980		
[0623]	Asp Leu Asn Ile Thr Met Leu Glu Asp His Glu Phe Val Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg			

---

[0624]	645	650	655	660
[0625]	CAC GAG ATC AAG GAC AGC GGC CTG CTG GAC TAC ACC GAG GTG CAG CGC CGC AAC CAG CTG 2040			
[0626]	His Glu Ile Lys Asp Ser Gly Leu Leu Asp Tyr Thr Glu Val Gln Arg Arg Asn Gln Leu			
[0627]	665	670	675	680
[0628]	CAC GAC CTG CGC TTC GCT GAC ATC GAC ACC GTG ATC CAC GCC GAC GCC TAA 2100			
[0629]	His Asp Leu Arg Phe Ala Asp Ile Asp Thr Val Ile His Ala Asp Ala			
[0630]	685	690	695	

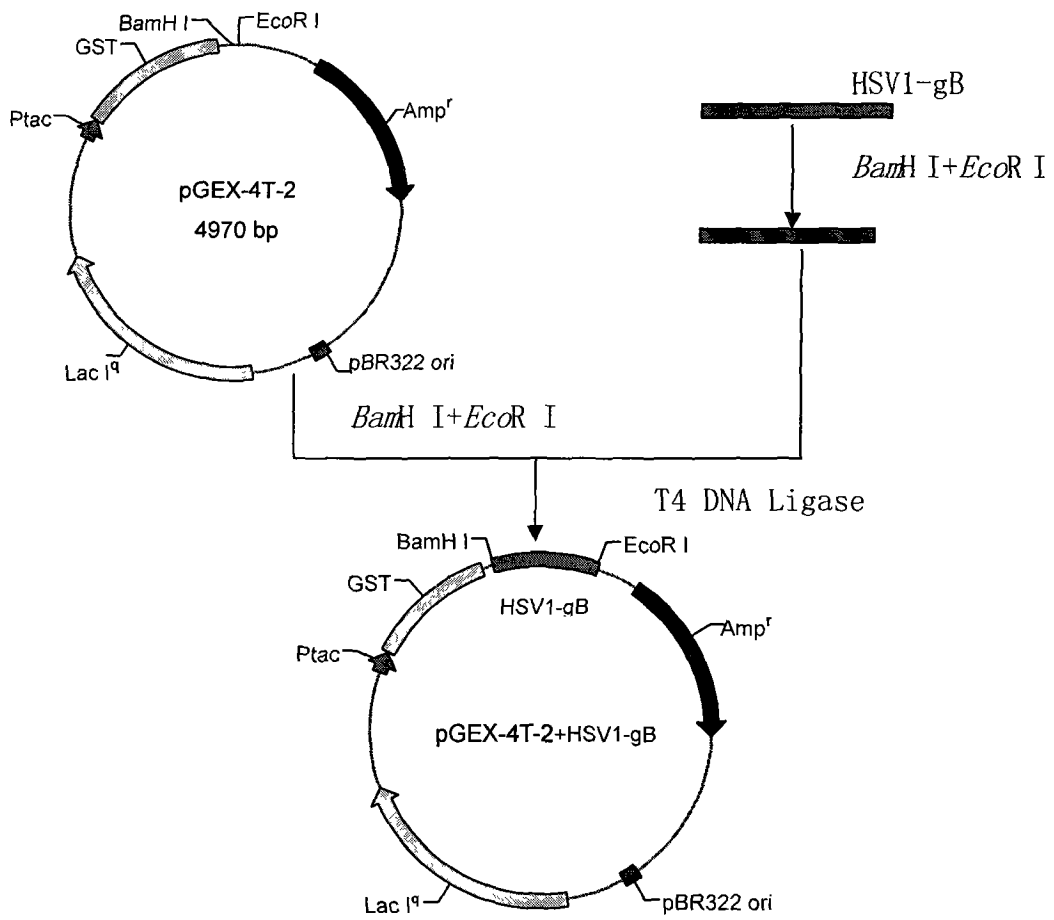


图 1

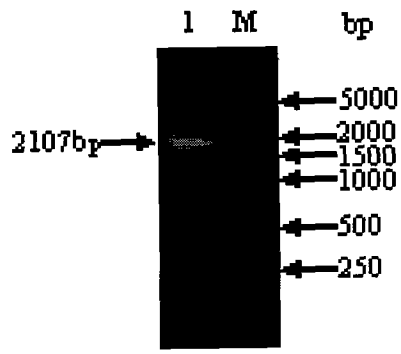


图 2

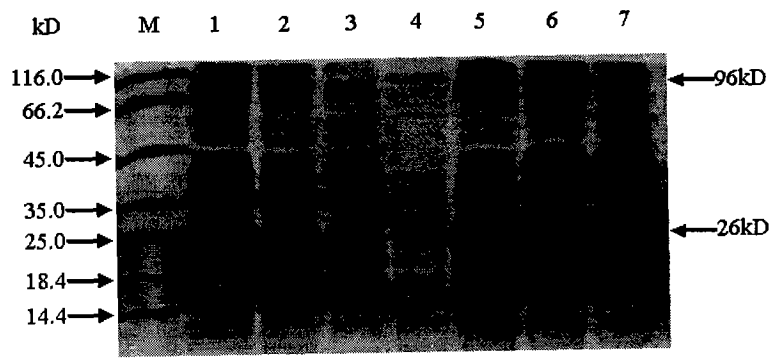


图 4

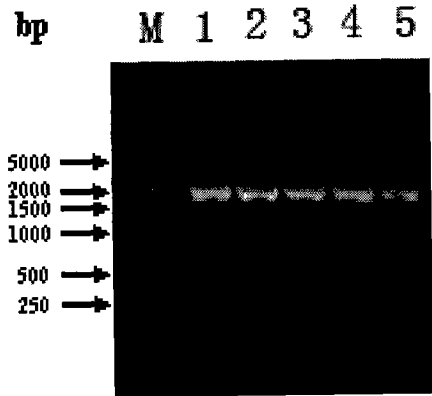


图 3

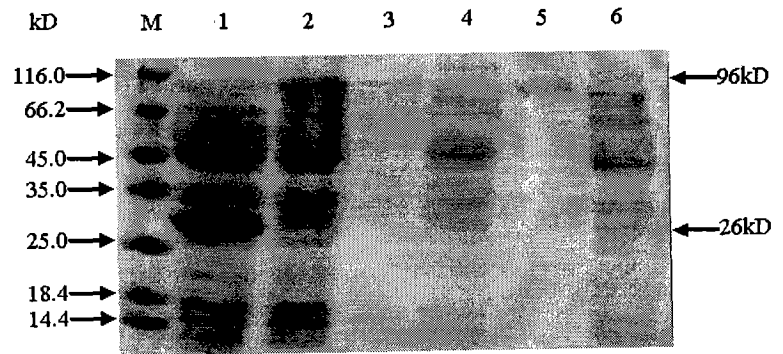


图 5

专利名称(译)	化学合成的HSV1病毒gB糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101173290B</a>	公开(公告)日	2010-10-27
申请号	CN200710133894.1	申请日	2007-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	李越希		
申请(专利权)人(译)	李越希		
当前申请(专利权)人(译)	李越希		
[标]发明人	李越希 吕敏 潘明洁 杨华凤 戚菁 王正茂		
发明人	李越希 吕敏 潘明洁 杨华凤 戚菁 王正茂		
IPC分类号	C12N15/38 C12N15/70 C07K14/035 C07K16/28 A61K48/00 G01N33/53 G01N33/569		
审查员(译)	李振鹏		
其他公开文献	CN101173290A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明化学合成的HSV1病毒gB糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用涉及基因工程技术、疫苗和诊断试剂领域。本发明是通过计算机分析，筛选出HSV1病毒gB糖蛋白内的强抗原表位，第1个氨基酸至第696个氨基酸，共696个氨基酸，选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成抗原表位的全新基因序列，利用基因工程技术，表达该基因片段、制备HSV1病毒gB糖蛋白的强抗原表位片段。表达的HSV1病毒gB糖蛋白的强抗原表位片段可用于疫苗、HSV1病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗HSV1病毒单抗和多抗等。

