



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94191954.4

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/02

[43]公开日 1996 年 5 月 8 日

[22]申请日 94.4.29

[30]优先权

[32]93.4.30 [33]KR[31]1993 / 7440

[86]国际申请 PCT / KR94 / 00040 94.4.29

[87]国际公布 WO94 / 25486 英 94.11.10

[85]进入国家阶段日期 95.10.30

[71]申请人 株式会社乐喜

地址 韩国汉城

[72]发明人 曹重明 崔德永 金天炯 苏弘璧

梁宰荣 金仁寿 金珠镐

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

C12N 15 / 51 C12N 15 / 74

C12N 1 / 21 C12Q 1 / 70

G01N 33 / 576

权利要求书 6 页 说明书 69 页 附图页数 22 页

[54]发明名称 改进的丙型肝炎诊断试剂

[57]摘要

本发明涉及丙型肝炎病毒核心蛋白和非结构 3 蛋白 (NS3) 的抗原表位, 包膜蛋白的抗原表位, 非结构 4 蛋白的抗原表位, HCV 非结构 5 蛋白的抗原表位以及含有这些表位的重组蛋白; 生产重组蛋白的方法; 一种包含重组蛋白的用于诊断待测血清样品中抗丙型肝炎病毒抗体的试剂; 利用该试剂诊断丙型肝炎的方法。

权 利 要 求 书

1、一种丙型肝炎病毒的抗原蛋白，选自由 KHCV COREEPI, KHCU 518, KHCV NS4E, KHCV E1G, KHCV E2A, KHCV E2E和KHCV NS5-1.2组成的一组，其氨基酸序列如下：

KHCV COREEPI：

MetSerThrAsnProLysProGlnArgLysThrLysArgAsnThrAsnArgArgProGln
AspIleLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyGlyValTyrLeuLeuProArgArg
GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly
ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgAlaTrpAlaGlnProGly
TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyLeuGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro
ArgGly；

KHCV 518：

IleThrThrGlyAlaProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGly
GlySerGlyGlyAlaTyrAspIleIleMetCysAspGluCysHisSerThrAspSerThr
ThrIleTyrGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuVal
ValLeuSerThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisLeuAsnIleGluGlu
ValAlaLeuSerAsnThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProIleGluAla

IleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysLysCysAspGluLeuAla
AlaLysLeuSerGlyLeuGlyLeuAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSer
ValIleProThrSerGlyAspValValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyPhe
ThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCys ;

KHCV NS4E:

IleIleProAspArgGluValLeuTyrGlnGluPheAspGluMetGluGluCysAlaSer
HisLeuProTyrPheGluGlnGlyMetGlnLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeu
GlyLeu ;

KHCV E1G:

ValSerGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisGluThrValGlnAspCysAsnCys
SerIleTyrProGlyArgValSerGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrp
SerProThrThrAlaLeuValValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaValValAsp
MetValThrGlySerHisTrpGlyIleLeuAlaGlyLeuAlaTyrTyrSerMetValGly
AsnTrpAlaLysValLeuIleAlaMetLeuLeuPheAlaGlyValAspGlyThrThrHis
ValThrGly ;

KHCV E2A:

GlyAlaGlnGlyArgAlaAlaSerSerLeuThrSerLeuPheSerProGlyProValGln
HisLeuGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuSerCys
AsnAspSerLeuAsnThrGlyPheValAlaAlaLeuPheTyrLysTyrArgPheAsnAla
SerGlyCysProGluArgLeuAlaThrCysArgProIleAspThrPheAlaGlnGlyTrp ;

KHCV E2E:

ThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeu
LeuSerThrThrGluTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSer
ThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspIleGlnTyrLeuTyrGlyIleGly
SerAlaValValSerPheAlaIleLysTrpGluTyrIleValLeuLeuPheLeuLeuLeu
AlaAspAla; and

KHCV NS5-1.2:

ThrGlyMetThrThrAspAsnValLysCysProCysGlnValProAlaProGluPhePhe
ThrGluValAspGlyValArgLeuHisArgTyrAlaProAlaCysArgProLeuLeuArg
GluGluValValPheGlnValGlyLeuHisGlnTyrLeuValGlySerGlnLeuProCys
GluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThr

AlaGluThrAlaLysArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerLeuAlaSerSerSer
AlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrThrHisHisAspSerPro
AspAlaAspLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThr
ArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuArgAlaGlu
AspAspGluGlyGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgLysPhePro
ProAlaLeuProIleTrpAlaProProAspTyrAsnProProLeuLeuGluSerTrpLys
AspProAspTyrValProProValValHisGlyCysProLeuProProThrLysAlaPro
ProIleProProProArgArgLysArgThrValValLeuThrGluSerThrValSerSer
AlaLeuAlaGluLeuAlaThrLysThrPheGlySerSerGlySerSerAlaIleAspSer
GlyThrAlaThrAlaProProAspGlnAlaSerGlyAspGlyAspArgGluSerAspVal
GluSerPheSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAsp
GlySerTrpSerThrValSerGluGluAlaSerGluAspValValCysCysSerMetSer
TyrThrTrpThrGlyAlaLeuIleThrProCysAlaAlaGluGluSerLysLeuProIle
AsnProLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnMetValTyrAlaThrThrSerArg
SerAlaGlyLeuArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspAspHis
TyrArgAspValLeuLysGluMetLysAlaLysAla.

2、包含一或多种如权利要求1所述的丙型肝炎病毒的抗原蛋白的重组蛋白。

3、如权利要求2所述的重组蛋白，包含 KHCV COREEPI和KHCV 518。

4、如权利要求2所述的重组蛋白，包含KHCV E1G、KHCV E2A和KHCV E2E。

5、如权利要求4所述的重组蛋白，进一步包含 KHCV NS4E。

6、如权利要求2 - 5 任一项所述的重组蛋白，进一步包含遍在蛋白。

7、一种包含编码如权利要求1所述的丙型肝炎病毒的抗原蛋白的核苷酸序列的DNA片段。

8、如权利要求7所述的DNA片段，包含编码KHCV COREEPI和KHCV 518的核苷酸序列。

9、如权利要求7所述的DNA片段，包含编码KHCV NS4E和KHCV 518的核苷酸序列。

10、如权利要求7所述的 DNA 片段，包含编码 KHCV NS4E, KHCV E1G, KHCV E2A和KHCV E2E 的核苷酸序列。

11、如权利要求7所述的 DNA 片段，包含编码 KHCV E1G, KHCV E2A和KHCV E2E的核苷酸序列。

12、一种包含如权利要求7 - 11 任一项所述的DNA片段的表达载体。

13、如权利要求12所述的表达载体，其选自由 ptrpH-UB-CORE 518, ptrpH-UB-NS4E1E2, ptrpH-UB-NS5-1.2, 和ptrpH-UB-E1E2组成的一组。

14、一种用如权利要求12 或13 所述的表达载体转化的大肠杆菌细胞。

1 5 、一种制备丙型肝炎病毒的抗原蛋白的方法，包含培养如权利要求1 4 所述的大肠杆菌转化子以及从培养物中回收所述的抗原蛋白。

1 6 、如权利要求1 5 所述的方法，其中KHCV 518 是采用用ptrpH-UB-CORE 518 转化的大肠杆菌细胞制备的。

1 7 、如权利要求1 5 所述的方法，其中 KHCV NS4E1E2是采用用ptrpH-UB-NS4E1E2转化的大肠杆菌细胞制备的。

1 8 、如权利要求1 5 所述的方法，其中 KHCV NS5-1.2是采用用ptrpH-UB-NS5-1.2转化的大肠杆菌细胞制备的。

1 9 、一种用于检测待测血清样品中抗丙型肝炎病毒抗原的抗体的诊断试剂，包含一或多种选自由 KHCV CORE-518，KHCV NS4E1E2和KHCV NS5-1.2 组成的一组的抗原蛋白。

2 0 、一种采用如权利要求1 9 所述的诊断试剂用于检测待测血清样品中抗丙型肝炎病毒抗原的抗体的诊断方法。

2 1 、如权利要求2 0 所述的诊断方法，其中所述的诊断是通过采用酶联免疫吸附测定（ELISA）而进行的。

改进的丙型肝炎诊断试剂

发明领域

本发明涉及丙型肝炎病毒 (HCV) 特异性表位, 包含一或多个HCV表位的重组蛋白以及用所述重组蛋白检测待测血清样品中丙型肝炎病毒抗体的方法。更具体地, 涉及HCV核心蛋白和非结构3蛋白(NS3)的表位及包含这些表位的重组蛋白, HCV包膜蛋白和非结构4蛋白的表位及包含这些表位的重组蛋白, HCV非结构5蛋白表位及包含这些表位的重组蛋白; 生产这些重组蛋白的方法; 在待测血清样品中诊断丙型肝炎病毒的试剂, 该试剂包含所述的重组蛋白; 以及用所述试剂诊断丙型肝炎的方法。

发明背景

丙型肝炎病毒是渐进性肝硬变或肝细胞癌的主要原因, 据报道大约70~80%由输血引起的肝炎由此病毒引起 (Alter, H. J. 等, Lancet, 2, 838-841(1975); 和Dienstag, J.L. 等, Seminar Liver Dis., 6, 67-81(1986))。所述病毒为其为单链正股RNA病毒, 从所述链的开放读框 (ORF) 编码一多蛋白前体 (Choo, Q.L. 等, Science 244, 359-362(1989); 及 Choo, Q.L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455(1991))。

丙型肝炎病毒基因结构与黄病毒、瘟病毒相似 (Miller, R.H. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2057-2061(1990); 及MuraIso, K. 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 511-516(1991)), 依所述的相关性推测丙型肝炎病毒多蛋白从N-端至C-端为: 核心-包膜蛋白1 (E1) - 包膜蛋白2 / 非结构1蛋白

(E 2 / N S 1) - 非结构2 蛋白 (N S 2) - 非结构3 蛋白 (N S 3) - 非结构4 蛋白 (N S 4) - 非结构5 蛋白 (N S 5) (Choo, Q.L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455(1991); Takamizawa, A. 等, J. Virol., 65, 1105-1113(1991); 及Kato, N. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6524- 6528 (1990))。

丙型肝炎病毒的感染可以通过用聚合酶链反应 (P C R) 直接从血样中检测丙型肝炎病毒R N A 而进行诊断 (H o s o d a , k . 等, H e p a t o l o g y , 1 5 , 7 7 7 - 7 8 1 (1 9 9 2) ; A b e , K . 等, H e p a t o l o g y , 1 5 , 7 7 7 - 7 8 1 (1 9 9 2) ; A b e , K . 等, H e p a t o l o g y , 1 5 , 6 9 0 - 6 9 5 (1 9 9 2) ; A l t e r , H . J . , A n n a l s o f I n t e r n a l M e d i c i n e 1 1 5 , 6 4 4 - 6 4 9 (1 9 9 1)) , 通过这种方法可以很早地检测到病毒R N A , 即在感染后1 到2 星期内即可检测, 然而由于需分析大量的样品, 因此这种方法费用高, 时间长。另一种诊断方法是例如通过使用C 1 0 0 - 3 蛋白的酶联免疫测定检测存在于血清样品中的抗丙型肝炎病毒抗体 (见H o u g h t o n e t a l . , P C T W O 8 9 / 0 4 6 6 9 ; W O 9 0 / 1 1 0 8 9) 。K u o , G . 等在S c i e n c e , 2 4 4 , 3 6 2 - 3 8 4 (1 9 8 9) 中披露了。7 0 % 以上输血后患肝炎病人具有抗C 1 0 0 - 3 蛋白抗体。

然而, C 1 0 0 - 3 抗原作为诊断试剂的活性组分只能与慢性丙型肝炎病人体内抗体反应, 不能和早期急

性丙型肝炎患者体内抗体反应，因为抗体通常在HCV感染后4至6个月上升。所以，在疾病早期常出现假阴性 (Alber, H.J., et al., N. Engl. J. Med., 321, 1494-1500(1989); Myamura, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 983-987(1990)), 而且在由于自身免疫疾病而不是HCV造成的肝炎情况下，通常有相当一部分呈假阳性结果 (McFarlane, I.G., et al. Lancet, 335, 754-757(1990))。

Okamoto等人公开了日本丙型肝炎患者血清中的HCV的cDNA克隆的核苷酸序列，该序列包括5'末端区和编码核心蛋白及包膜蛋白的结构基因，并与美国Chiron公司从黑猩猩血清中分离的HCV序列进行了比较，Okamoto等发现从日本型HCV衍生的一种亚特异性的HCV及抗原的特异性，以制备疫苗和诊断试剂用于抗日本型HCV (Jpn. J. Exp. Med., 60, 167-177(1990))。Harada等人还在《病毒学杂志》(65卷, 3015页, 1991年)报道，当结构基因的5'末端编码的核心蛋白用作抗原诊断可能存在于HCV患者样品中的抗体时，此法比C100-3蛋白早6至8周检查出抗体。

另外，Choo等公开了一种利用核心结构基因表达的核心蛋白和NS3基因表达的C33C蛋白的改进的诊断方法 (英国医学通报46卷, 423-441页, 1990); Okamoto等采用部分核心结构基因核苷酸序列的合成多肽诊断丙型肝炎。美国UBI公司开发了另一种诊断方法，其采用由核心结构基因编码的15至16个氨基酸组成的合成多肽为抗原检测抗HCV抗体 (WANG, C. Y., EP 4 423 94 (

1991) ; H o s e i n , B 等, Proc. Natl. Acad . Sci. USA, 88, 3647-3651(1991)); 另外, 美国 O r t h o D i a g n o s t i c S y s t e m s I n c 报道了第二代更为敏感的 H C V 抗体诊断试剂, 它是将 C 2 2 - 3 核心抗原、N S 3 部分蛋白 C 3 3 C 和 N S 4 部分蛋白 C 2 0 0 加入已有的第一代诊断试剂中而制备的 (M c H u t c h i s o n 等, 《肝脏病学》, 15 卷, 19 ~ 25 页, 1992 年) ; A l t e r 描述了有可能从 H C V 感染 15 至 20 周的患者血清中检测出抗 H C V 抗体 (A n n a l s o f I n t e r n a l M e d i c i n e , 115, 644 - 649 (1991 年)) 。

本发明人也披露一株与美国型或日本型 H C V 不同的韩国型丙型肝炎病毒 (K H C V) 内部基因结构; 由重组酵母或大肠杆菌表达 K H C V C O R E 基因的产物 K H C V U B C O R E 1 4 蛋白, K H C V N S 3 基因的产物 K H C V U B 8 9 7 , K H C V N S 5 基因的产物 K H C V 4 0 3 蛋白和 K H C V 包膜基因产物包膜蛋白; 证实了所述表达蛋白质的免疫特异性; 报道了纯化所述蛋白质的方法; 开发了以 K H C V 抗原蛋白质的酯联免疫吸附试验 (E L I S A) 检测丙型肝炎患者血清中 H C V 抗体的改进的诊断方法 (见韩国专利文献 9 3 - 6 8 3) 。

本发明人致力于开发较所述试剂更为精确、快速的 H C V 诊断试剂, 结果意外地发现几个与 H C V 抗体反应更灵敏、精确的 H C V 抗原表位。

发明概述

因此，本发明的主要目的在于提供具有改进的与HCV抗体反应性的所述抗原表位；以及包含一或多个HCV抗原表位的重组蛋白质。

本发明的另一目的是提供编码所述抗原表位或所述重组蛋白质的核苷酸序列；含有编码所述重组蛋白质的核苷酸序列的重组表达载体，该载体在表达时可以生产含一或多个HCV抗原表位的重组蛋白质；以及用重组表达载体转化的宿主细胞。

本发明的又一目的是提供生产包含一个或多个HCV抗原表位的重组蛋白的方法，该方法包括培养用含编码所述重组蛋白的核苷酸序列的重组表达载体转化的所述宿主细胞。

本发明的再一目的是提供包含一或多种重组蛋白的诊断试剂，所述的重组蛋白含有一或多个HCV抗原表位作为活性组分来检测待测样品中的HCV抗体；以及包含所述试剂的诊断盒。

本发明的另一目的是提供采用所述诊断试剂或试剂盒的更为快速、准确的HCV早期感染诊断方法。

根据本发明的一个方面，提供了HCV抗原表位，包含：KHCV NS4E-HCV非结构4蛋白的抗原表位；KHCV EI G、KHCV E2A和KHCV E2E蛋白-HCV包膜蛋白的抗原表位；KHCV COREEPI蛋白-HCV核心蛋白的抗原表位；KHCV518蛋白-HCV非结构3蛋白的抗原表位；以及，包含非结构5蛋白抗原表位的KHCV NS5-1，2蛋白质；以及包含一个或多个所述抗原表位的重组蛋白。

附图简要说明

本发明的上述或其它目的可由结合以下附图的较佳实施方案的描述而更加清楚，其中：

图1 分别显示编码核心蛋白 (C O R E E P I) 和非结构3 蛋白表位的核苷酸序列及其编码的多肽的氨基酸序列。

图2 分别显示编码NS 4 蛋白表位 (N S 4 E) 和非结构3 蛋白 (E I G , E 2 A 和E 2 E) 表位的核苷酸序列及其编码的多肽氨基酸序列。

图3 描述K H C V N S 5 -1 , 2 蛋白质的核苷酸序列及其编码的多肽的氨基酸序列。

图4 代表以聚合酶链式反应 (P C R) 扩增K H C V 8 9 7 D N A 片段所用的每一引物的位置。

图5 示出用于在大肠杆菌中表达K H C V 8 9 7 D N A 片段的表达载体的构建。

图6 A 代表K H C V 8 9 7 D N A 片段在大肠杆菌细胞中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (S D S -P A G E) 结果；图6 B 显示以丙型肝炎病人血清对图6 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

图7 代表以P C R 扩增包膜蛋白基因不同D N A 片段所用的每一引物的位置。

图8 示出用于在大肠杆菌中表达部分包膜蛋白的D N A 片段的表达载体的构建。

图9 A 显示编码部分包膜蛋白的不同大小D N A 片段在大肠杆菌中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (S D S -P A G E) 结果；图9 B 显示以丙型肝炎病人血清对图9 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

图10 示意性示出表达U B C O R E 5 1 8 蛋白的

表达载体构建过程。

图1 1 A 显示UBCORE518 DNA 片段在大肠杆菌中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS -PAGE) 结果; 图1 1 B 显示以丙型肝炎病人血清对图1 1 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

图1 2 示意性示出用于表达包含遍在蛋白基因和编码非结构4 蛋白 (NS4E 蛋白) 的一个抗原表位的DNA 片段的重组DNA 的表达载体的构建。

图1 3 示意性示出用于表达编码包含遍在蛋白和含包膜蛋白E1G, E2A, E2E 的表位的融合蛋白的UBE1E2 蛋白的重组DNA 的表达载体的构建。

图1 4 A 显示重组UBE1E2 蛋白在大肠杆菌细胞中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS -PAGE) 结果。

图1 4 B 显示以丙型肝炎病人血清对图1 4 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

图1 5 示意性示出用于表达编码包含遍在蛋白, NS4E 蛋白, E1E2 蛋白的UBNS4E1E2 蛋白的重组DNA 的表达载体的构建。

图1 6 A 显示编码UBNS4E1E2 蛋白的重组DNA 在大肠杆菌细胞中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS -PAGE) 结果。

图1 6 B 显示以丙型肝炎患者血清对图1 6 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

图1 7 示意性示出用于表达编码包含遍在蛋白和NS5-1,2 蛋白的USNS5-1,2 蛋白的重组DNA 的表达载体的构建。

图1 8 A 显示UBNS5-1,2 蛋白在大肠杆菌

细胞中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (S D S -P A G E) 结果; 图1 8 B 显示以丙型肝炎病人血清对图1 8 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

图1 9 A 显示K H C V 4 0 3 蛋白和重组U B N S 5 - 1 . 2 蛋白在大肠杆菌细胞中表达后的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (S D S -P A G E) 结果; 图1 9 B 显示以丙型肝炎患者血清对图1 9 A 的凝胶进行蛋白质印迹分析的结果。

发明详述

本文引用的参考文献皆以其全文作为本发明的参考文献。

以下术语将具如下定义:

术语“丙型肝炎病毒”是指引起非甲非乙型肝炎或丙型肝炎的病毒。本文中术语H C V 与丙型肝炎病毒交替使用。

术语“韩国型丙型肝炎病毒”或“K H C V ”指一株新型H C V , 从韩国丙型肝炎患者体内分离得到; 其c D N A 具有一开放读框, 编码的氨基酸序列在第8 4 2 , 8 4 9 和8 5 3 位分别是苯丙氨酸, 亮氨酸和苏氨酸, 或是亮氨酸, 苯丙氨酸和丙氨酸。

术语“抗原表位”是指一种多肽的抗原决定簇, 其能够在免疫活性宿主体内引起免疫反应和/ 或能够自身特异性的与一种互补抗体结合。本发明的抗原表位通常至少由6 个氨基酸组成, 优选由7 或8 个氨基酸组成。

本文中所用的其它术语具有与现有技术所用的相同的和传统的含义。

下文中H C V c D N A 的核苷酸序号或H C V 蛋

白的氨基酸序号是基于韩国专利公开出版物9 3 - 6 8 3 号公开的全K H C V 核苷酸序列或氨基酸序列。

以下将更详细地描述本发明。

1. 抗原表位的确定

H C V, 例如K H C V (K H C V - L B C 1, 于1 9 9 1 年5 月1 4 日保藏在A T C C, 保藏号为A T C C 7 5 0 0 8, 见韩国专利公开出版物9 3 - 6 8 3 号) 的c D N A 核苷酸序列的信息被用于合成聚合酶链反应的引物, 其相应于编码K H C V 8 9 7 蛋白、包膜蛋白或非结构5 蛋白的c D N A 片段的5 ' 和3 ' 末端。

用所述的引物以K H C V 8 9 7 基因 (其在1 9 9 1 年6 月2 7 日被保藏于A T C C, 保藏号为A T C C 6 8 6 4 0)、K H C V 包膜1 基因 (其在1 9 9 1 年1 2 月1 1 日被保藏于A T C C, 保藏号为A T C C 6 8 8 7 8)、K H C V 包膜2 基因 (其在1 9 9 1 年1 2 月1 1 日被保藏于A T C C, 保藏号为A T C C 6 9 8 6 6 和7 4 1 1 7) 以及K H C V N S 5 基因 (见韩国专利公开出版物9 3 - 6 8 3) 为模板进行聚合酶链反应, 以获得K H C V 8 9 7 基因、K H C V 包膜1 和包膜2 基因以及K H C V N S 5 基因的c D N A 片段。将每一c D N A 片段插入一个载体, 用所述的表达载体转化合适的宿主如大肠杆菌。将由转化的宿主细胞生产的多肽进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后使用丙型肝炎患者的血清进行蛋白质印迹分析, 以确定那些特异性地与K H C V 抗体反应的多肽为K H C V 抗原的表位。也检测了被确定的抗原表位在K H C V c D N A 全序

列中的位置。

其结果是，发现K H C V 8 9 7 蛋白的抗原表位存在于K H C V 8 9 7 蛋白的羧基末端，其是从对应于K H C V c D N A 的第4 3 4 8 到4 7 1 3 核苷酸的3 6 6 个碱基对表达的（见图4 所示的K H C V 8 9 7 蛋白的抗原表位的氨基酸和核苷酸的序列）。

对于包膜蛋白，发现表位存在于K H C V 包膜1 蛋白（E 1 G 蛋白）的羧基末端，其是从对应于K H C V c D N A 的第1 2 0 1 到1 5 0 9 核苷酸的3 0 9 个碱基对表达的；以及存在于K H C V 包膜2 蛋白（E 2 A 蛋白）的氨基末端，其是从对应于K H C V c D N A 的第1 5 1 0 到1 7 4 9 核苷酸的2 4 0 个碱基对表达的；以及存在于K H C V 包膜2 蛋白（E 2 E 蛋白）的羧基末端，其是从对应于K H C V c D N A 的第2 2 8 1 到2 5 2 9 核苷酸的2 4 9 个碱基对表达的（见图2 示出的E 1 G、E 2 A 和E 2 E 蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列）。

另外，N S 5 蛋白的抗原表位存在于N S 5 蛋白的氨基末端，其是由对应于包括K H C V 4 0 3 c D N A 片段的第6 6 4 9 到7 2 8 4 核苷酸的1 2 0 0 个碱基对编码的，并以比K H C V 4 0 3 更高的灵敏度特异性地与K H C V 患者的血清反应。

2、包括一或多个H C V 抗原表位的重组蛋白

H C V 抗原的表位对于开发有效和经济的诊断试剂是非常重要的。具体说来，考虑到经济、效果及精确度更优选的是包含一或多个抗原表位的融合蛋白；包含多于一个抗原表位的融合蛋白是最优选的。

作为包含多于一个HCV表位的HCV重组蛋白，优选的是可以包括含有KHCV核心蛋白和NS3蛋白的表位的重组CORE518融合蛋白，以及含有KHCV E1、E2和NS4蛋白的表位的重组NS4E1E2融合蛋白。

这些重组蛋白可以通过含有编码所述的融合蛋白的核苷酸序列的各种表达载体系统进行制备；并且该载体可调控包含所述的融合蛋白和其它可增加蛋白稳定性或促进纯化步骤的特异性蛋白，优选为遍在蛋白的重组融合蛋白的生产。

例如，可通过在细菌如大肠杆菌中表达HCV-cDNA片段和遍在蛋白基因的融合多核苷酸，然后体外用遍在蛋白酶UBP1切下遍在蛋白而获得所需的HCV蛋白(Tobias, J. W. et al., J. Biol. Chem., 266, 12021-12028 (1991))。包含遍在蛋白和KHCV融合蛋白的重组融合蛋白可以用于本发明的用途，只要其含有KHCV蛋白的必要特征例如HCV抗原性即可。

上述的表达体系可以有效地用于所需的蛋白不稳定以及可被宿主细胞的蛋白酶很容易地消化的场合，因为遍在蛋白可保护所需的蛋白不被蛋白酶攻击或稳定所需的蛋白。另外，与遍在蛋白融合的所需重组蛋白的表达可以用抗遍在蛋白抗体确定，并利用遍在蛋白的特性而很容易地被纯化。

为了获得所希望的包含HCV表位的HCV蛋白，用含有编码HCV表位的HCV-cDNA片段的表达载体转化一相容宿主细胞；在允许表达的条件下培养转化后的细胞。

合适宿主的选择受一系列公知因素的影响，这些因素包括，例如与所选择载体的相容性、由重组质粒编码的蛋白的毒性，回收所希望蛋白的容易程度、蛋白质特性、生物安全性及费用。必须均衡考虑这些因素，应该理解的是不是所有的宿主都同等有效地表达特定的重组DNA分子。

本发明中可使用的合适的宿主包括，但不限于，细菌如大肠杆菌和酵母如酿酒酵母。

在宿主细胞中生产的多肽可以通过结合使用传统方法，例如，细胞破碎，离心、透析、盐析、层析、凝胶过滤、电泳和电洗脱来分离和纯化。

本发明的多肽也可以通过合适的方法化学合成，如纯粹固相合成，部分固相方法，片段缩合或经典溶液合成。优选的是由Merri field (J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963))公开的固相合成。

另一方面，已知会发生基本上不会改变生物学和免疫学活性的在蛋白质中的氨基酸取代并由Neurath等人描述于The Proteins, Academic Press, New York (1979)，特别是该书的第14页的图5所示。只要由其产生的蛋白质保持相同的抗原特性，则这种功能上等价的氨基酸取代也包括在本发明范围内。

在本说明书中采用标准的单字母或三字母缩写表示核苷酸和氨基酸。这些缩写的含义可在标准的生物化学教科书如Lehninger, Principles of Biochemistry, Worth Publishers Inc. New York, p

p . 9 6 , 7 9 8 (1 9 8 4) 中找到。

1) C O R E 5 1 8 蛋白的制备

利用K H C V 的c D N A 核苷酸序列 (见韩国专利公开9 3 - 6 8 3) 合成聚合酶链式反应的引物, 该引物对应于编码包含K H C V N S 3 蛋白表位的K H C V 5 1 8 蛋白的K H C V 5 1 8 c D N A 片段的5 ' 端和3 ' 端, 其中一对应于c D N A 5 ' 端的引物在其5 ' 端设计有内切酶位点, 用以连接到编码核心蛋白表位的C O R E E P I 基因的3 ' 端, 另一对应于c D N A 3 ' 端的引物设计有终止密码子和内切酶位点。因此, 所述引物使得表达融合蛋白从遍在蛋白起始密码子开始, 结束于插入的终止密码子, 使得融合基因插入表达载体简化。

而且, 可以适当使用引物序列将所述编码两个表位的基因相反排列, 也可以在两个表位之间插入其它氨基酸序列, 只要蛋白质保持同样的抗原特性。

用所述引物和K H C V 8 9 7 基因 (于1 9 9 1 年6 月2 7 日保藏于A T C C , 保藏号A T C C 6 8 6 4 0) 模板以聚合酶链式反应扩增K H C V 5 1 8 基因, 然后内切酶消化K H C V 5 1 8 基因, 将其插入p t r p - U B - C O R E 1 4 质粒, 代替除去C O R E E P I 基因的部分K H C V C o r e 1 4 基因, 以此构建成表达载体。表达载体转化象大肠杆菌等合适的宿主, 转化宿主细胞产生的多肽由1 5 % 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再以丙型肝炎患者血清进行蛋白质印迹分析, 证实C O R E 5 1 8 蛋白与K H C V 抗体特异性反应。

2) NS 4 E 1 E 2 蛋白的制备

利用K H C V 的c D N A 核苷酸序列 (见韩国专利公开9 3 -6 8 3) 将编码NS 4 蛋白表位 (NS 4 E) 和包膜蛋白表位 (E 1 G , E 2 A , E 2 E) 的核苷酸连接在一起, 例如, 以适当引物进行聚合酶链式反应而连接。首先, P C R 引物在E 1 E 2 蛋白核苷酸序列的5 ' 端和3 ' 端, 编码的包膜蛋白表位如E 1 G , E 2 A , E 2 E , 其中一引物在所述核苷酸序列的5 ' 端, 引物的5 ' 端设计有2 1 个核苷酸, 与NS 4 基因3 ' 端核苷酸相同, 用以连接在NS 4 基因的3 ' 端; 另一引物位于c D N A 的3 ' 端, 设计有终止密码子和内切酶识别位点。因此, 所述引物使得融合蛋白合成开始于遍在蛋白的起始密码子, 结束于插入终止密码子, 简化了融合基因插入表达载体的过程。

而且, 通过适当利用引物, 能够将所述四个基因任意排列, 也可以将其它氨基酸序列插入任意两个表位之间, 只要蛋白质保持原来的抗原特性。

利用所述引物和p t r p H -U B -E 1 E 2 质粒 (见图1 6) 模板进行聚合酶链式反应扩增E 1 E 2 基因。第二聚合酶链式反应以E 1 E 2 和NS 4 基因为模板。得到的NS 4 E 1 E 2 基因以内切酶消化, 插入p t r p -U B -C O R E 1 4 质粒, 替代K H C V C o r e 1 4 基因, 构建成表达载体。然后表达载体转化合适的宿主如大肠杆菌W3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) , 转化的宿主细胞在适于表达的条件下培养。转化的宿主细胞产生的多肽经1 5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 以丙型肝炎患者血清对凝胶进行蛋白质印迹分析, 证实NS 4 E 1 E 2 蛋白能与K H C V 抗体特异性反应。

3) NS 5 -1 .2 蛋白的制备

利用K H C V c D N A 核苷酸序列 (见韩国专利公开9 3 -6 8 3) 合成P C R 引物, 该引物对应于编码NS 5 -1 . 2 蛋白c D N A 片段5 ' 端和3 ' 端。其中一引物于其c D N A 5 ' 端设计有内切酶位点, 连接在遍在蛋白的3 ' 端, 另一c D N A 3 ' 端引物设计有些终止密码子和内切酶位点, 因此, 所述引物使得融合蛋白合成始于遍在蛋白的起始密码子, 止于插入的终止密码子, 简化了融合基因克隆在表达载体中的过程。

由所述引物和K H C V -L B C 1 基因 (于1 9.9 1 年5 月1 4 日保藏于A T C C , 保藏号A T C C 7 5 0 0 8 ; 参见韩国专利公开文献第9 3 -6 8 3 号) 模板进行P C R 扩增NS 5 -1 .2 基因, 用内切酶消化所述的NS 5 -1 .2 基因, 所得基因片段代替K H C V -C o r e 1 4 基因插入p t r p -U B -C O R E 1 4 质粒, 完成表达载体的构建, 表达载体转化大肠杆菌等合适宿主, 转化宿主细胞生产的多肽由1 5 % 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后以丙型肝炎患者血清进行蛋白质印迹分析, 证实NS 5 -1 . 2 蛋白与K H C V 抗体起特异性反应。

3 、 包含混合型H C V 抗原多肽的诊断丙型肝炎的诊断试剂的制备

根据本发明的诊断试剂包含一个或多个H C V 抗原表位, 包括K H C V NS 4 E , K H C V E 1 G , K H C V E 2 A , K H C V E 2 E , C O R E E P I , K H C V 5 1 8 和K H C V NS 5 -1 . 2 ,

和/ 或包含一个或多个所述表位的重组蛋白。

而且，本发明提供了包含完成上述程序所必需试剂的诊断试剂盒，其主要由携带K H C V 一个或多个表位的含K H C V 多肽的诊断试剂组成。

优选的是，所述的诊断试剂包括含K H C V 核心蛋白和NS 3 蛋白表位的重组C O R E 5 1 8 融合蛋白，含K H C V E 1 、E 2 和NS 4 蛋白表位的重组NS 4 E 1 E 2 融合蛋白，和/ 或NS 5 -1 .2 重组蛋白。

当诊断试剂为含H C V 表位的多个重组蛋白混合物时，其蛋白比例可以任意调整，通常每一组分蛋白为相等摩尔数时是优选的。

根据本发明的新的诊断方法包括下列步骤：

(i) 将包含一个或多个K H C V 多肽的诊断试剂加在固体支持物上，例如微量滴定板孔，以使所述K H C V 抗原吸附于微量滴定板孔的表面；

(i i) 将用稀释剂稀释的一种待测样品加到抗原复盖的孔上，若血清中存在H C V 抗体，则会形成抗原-抗体复合体；

(i i i) 向孔中加入一种酶，例如H R P (辣根过氧化物酶) 缀合的抗人I g G，以使抗人I g G -H R P 与在 (i i) 中形成的复合体中的抗体结合；以及

(i v) 向孔中加入酶的底物，例如过氧化物酶的底物邻苯二胺二盐酸 (O P D) 和过氧化氢以出现显色反应。当被测血清中含有H C V 抗体时，由于酶与底物的反应而会出现特定的颜色。

颜色深度可用微孔阅读器测量，以测定结果为基础可确定H C V 抗体的存在。诊断方法所用的固相支持物可以是聚苯乙烯珠或硝酸纤维素滤膜条。

当以本发明的含多个K H C V 表位的重组蛋白制备诊断试剂时，其比用只有一个表位的现存H C V 抗原的诊断更为经济，准确，而且，本发明的包括含K H C V 表位的混合重组蛋白的诊断试剂和试剂盒具有理想的诊断结果。

下列实施例进一步描述而不是限制本发明，实施例中所用的实验方法除另说明外，皆按照下述参考例进行。

另外，除非另有说明，下述的固固混合物的百分比、液液百分比和固液百分比分别以重量/重量、体积/体积和重量/体积为基础。

参考例1：用限制性内切酶酶切DNA

在一灭菌的1.5 ml e p p e n d o r f 管中加入限制性内切酶和反应缓冲液，使反应体积在50 - 100 μ l 之间，反应在37 $^{\circ}$ C进行1 - 2 小时。反应完成后，将反应混合物在65 $^{\circ}$ C热处理15 分钟（或在耐热内切酶情况下用苯酚抽提并用乙醇沉淀）以失活限制性内切酶。

本参考例中所用的限制性酶和反应缓冲液购自NEB (New England Biolabs, J o l l a , MA, U. S. A.)。

用于限制性内切酶反应的10 倍反应缓冲液的组成如下：

10 $\times$ NEB 反应缓冲液1：100 mM b i s
T r i s 丙烷-HCl，100 mM Mg Cl₂，10
mM 二硫苏糖醇 (D T T)，pH 7.0

10 $\times$ NEB 反应缓冲液2：100 mM T r i
s -HCl，100 mM Mg Cl₂，500 mM

NaCl, 10 mM DTT, pH 7.0

10 × NEB 反应缓冲液3: 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7.0

10 × NEB 反应缓冲液4: 200 mM Tris-乙酸, 100 mM 乙酸镁, 500 mM 乙酸钾, 10 mM DTT, pH 7.0

参考例2: 苯酚抽提和乙醇沉淀

酶与DNA反应完成后, 反应混合物用苯酚抽提以失活酶或回收反应混合物中的DNA, 其中所用的苯酚预先用含10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 和1 mM EDTA 的缓冲液平衡。

苯酚抽提是如下进行的: 通过剧烈振荡混合等体积的样品和苯酚; 在15000 rpm 离心混合物5 分钟; 将水相转移至一新管中。重复上述步骤三次。

然后用等体积的氯仿 (氯仿: 异丁醇 = 24 : 1) 抽提上述水相并再分离出水相; 向水相中加入0.1 体积的3 M 乙酸钠和2.5 体积的无水乙醇; 在-70 °C 存放30 分钟或-20 °C 存放12 小时以上后在15000 rpm、4 °C 下离心混合物20 分钟以回收核酸。

参考例3: 连接反应

用购自NEB 的T4 DNA 连接酶和10 × 连接反应缓冲液 (0.5 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M MgCl₂, 0.2 M DTT, 10 mM ATP, 0.5 mg / ml 小牛血清白蛋白 (BSA)) 进行DNA 的连接反应。反应体积通常为20 μl, D

NA 粘性末端连接用10 单位T4 连接酶, DNA 平末端连接用100 单位T4 DNA 连接酶。

反应在16 °C进行5 小时或在4 °C进行14 小时以上, 反应完成后, 将反应混合物在65 °C加热15 分钟以失活T4 DNA 连接酶。

参考例4 转化E. coli

E. coli 菌株 (例如E. coli HB101 (ATCC 33694), E. coli W3110 (ATCC 27325) 或E. coli JM105 (ATCC 47016)) 的转化是采用现有技术中公知的方法, 例如, Maniatis 等人在Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y. (1982) 中所述, 或Cohen 在Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 2110 (1972) 中所述。

参考例5 : 寡核苷酸的合成

使用自动固相亚磷酰胺化学法利用一DNA 合成仪 (Applied Biosystems Inc., 型号: 380B, U. S. A.) 合成寡核苷酸。

用变性聚丙烯酰胺凝胶 (2 M 尿素, 12 % 丙烯酰胺和bis (29 : 1), 50 mM Tris, , 50 mM 硼酸, 1 mM EDTA - Na₂) 电泳和采用乙腈: 水 (50 : 50) 作洗脱剂的C₁₈ SEP-PAK (Waters Inc. U. S. A) 柱色谱

纯化合成的寡核苷酸；通过在260nm测量O.D. 确定核苷酸的量。

参考例6：聚合酶链反应 (PCR)

在10-100ng 模板DNA、10 μ l 10 $\times$ Taq 聚合酶反应缓冲液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) 明胶)、10 μ l dNTP 的混合物 (dGTP、dATP、TTP 和 dCTP 各为10 mM)、2 μ g 每个引物 (通常反应中使用2个引物, 当使用3个引物时位于中间的引物的用量为0.02 μ g) 和0.5 μ l Ampli Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.) 组成的混合物中加入适量的蒸馏水以使总体积为100 μ l, 向其中加入50 μ l 矿物油以保护反应混合物不被蒸发。

采用一种热循环仪 (Perkin Elmer Cetus, U.S.A.) 进行PCR, 热循环被设成重复25次或更多; 所述的循环为: 95 $^{\circ}$ C 1分钟 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 1分钟 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 2分钟, 最后在72 $^{\circ}$ C 反应10分钟。

反应完成后用酚抽提混合物, 用乙醇沉淀回收PCR产物, 并将沉淀物溶于20 μ l TE 缓冲溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)。

参考例7：HRP 缀合的抗人IgG抗体的制备

用人IgG吸附的sepharose CL-4

B 亲和柱和蛋白G 柱 (P h a r m a c i a L K B , S w e d e n) 色谱纯化抗人I g G F c 区 (I m m u n o v i s i o n I n c . , A r i z o n a , U . S . A . , C a t . N o . G H F - 1 0 0 1) 的抗体以使所述抗体的纯度超过9 0 % 。根据N a k a n e 等在J . H i s t o c h e m c y t o c h e m . 2 2 , 1 0 8 4 (1 9 7 4) 中所述的高碘酸钠方法用辣根过氧化物酶标记所获得的抗体, 方法如下:

在溶于1 . 2 m l 蒸馏水 (D W) 的5 m g 辣根过氧化物酶 (B o e h r i n g e r M a n n h e i m , G e r m a n y , C a t . N o . 8 1 4 , 3 9 3) 的溶液中加入0 . 3 m l 溶于1 0 0 m M 磷酸钠缓冲液 (p H 7 . 0) 的0 . 1 M 高碘酸钠溶液, 混合物在室温下反应2 0 分钟。得到的溶液对1 m M 乙酸钠缓冲液透析1 6 小时。

1 . 5 m l 得到的过氧化物酶溶液与以1 0 m g / m l 浓度溶有纯化抗体的1 m l 2 0 m M 碳酸钠溶液 (p H 9 . 5) 混合, 混合物在室温下反应2 小时。随后加入1 0 μ l 溶于D W 的硼酸氢钠溶液 (4 m g / m l) 以通过一还原反应除去未反应的席夫斯碱。由此得到的溶液对磷酸盐缓冲的生理盐水透析过夜, 随后过s e p h a d e x G - 2 0 0 柱以除去自由抗体或过氧化物酶。

实施例1 : 非结构3 蛋白表位的确定

〈步骤1〉部分K H C V 8 9 7 D N A 片段的扩增

(1 - 1) 引物制备

欲扩增编码非结构3 蛋白的部分K H C V 8 9 7
DNA 片段, 并将其克隆入t r p 启动子控制下的含
遍在蛋白基因的表达载体, 需合成下列引物。

引物P 8 9 7 T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGC GGTGGAATTCATACCCGTT-3'

含一个S a c II 位点和K H C V -L B C 1 第3 9 1 6
至3 9 3 6 位核苷酸;

引物P 5 1 8 T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTATCACCACAGGFCGCCCCCTATC-3'

含一个S a c II 位点和K H C V -L B C 1 第4 1 9 5
至4 2 1 6 位核苷酸;

引物P 3 6 5 T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGC G GAGACGGCTGGAGCGCGG-3'

含一个S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 第4 3
4 8 至4 3 6 9 位核苷酸;

引物P 2 5 7 T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGCTAACATTGGAGAGATTCCTTTC-3'

含一个S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 第4 4
4 7 至4 4 6 8 位核苷酸;

引物P 1 5 0 T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTTTGTCCCTCGGAGTCAATGCT-3'

含一个S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 第4 5
6 4 至4 5 8 5 位核苷酸;

引物P 8 9 7 S A L :

5'-GACTGGACTATTAACACGTATTACAGTCGATCAC-3'

含位于K H C V - L B C 1 第4 7 1 2 位核苷酸后的翻译终止密码子和S a l I 识别位点;

引物P 6 5 2 S A L :

5'-GACTGGACTATTACAGCTTTGCAGCGAGCTCGTC-3'

含位于K H C V - L B C 1 第4 5 6 2 位核苷酸后的翻译终止密码子和S a l I 位点;

引物P 5 7 0 S A L :

5'-GACTGGACTATTAGAGGGGGATGGCTTTGCCATA-3'

含位于K H C V - L B C 1 第4 4 8 7 位核苷酸后的翻译终止密码子和S a l I 位点;

引物P 4 3 0 S A L :

5'-GACTGGACTATTATTGGTCCAGGACCGTGCCAAT-3'

含位于K H C V - L B C 1 第4 3 4 6 位核苷酸后的翻译终止密码子和S a l I 位点; 以及

引物P 2 9 0 S A L :

5'-GACTGGACTATTAGGCGCCTGTGGTGATGGTCCT-3'

含位于K H C V - L B C 1 第4 2 0 8 位核苷酸后的翻译终止密码子和S a l I 位点。

(1 - 2) 聚合酶链式反应

准备8 只试管, 每一管装入下列引物:

试管A: 引物P 8 9 7 T 2 2 μ g , 引物P 6 5
2 S A L 2 μ g

试管B: 引物P 8 9 7 T 2 2 μ g , 引物P 5 7
0 S A L 2 μ g

试管C: 引物P 8 9 7 T 2 2 μ g , 引物P 4 3
0 S A L 2 μ g

试管D: 引物P 8 9 7 T 2 2 μ g , 引物P 2 9
0 S A L 2 μ g

试管E: 引物P 1 5 0 T 2 2 μ g , 引物P 8 9
7 S A L 2 μ g

试管F: 引物P 2 5 7 T 2 2 μ g , 引物P 8 9
7 S A L 2 μ g

试管G: 引物P 3 6 5 T 2 2 μ g , 引物P 8 9
7 S A L 2 μ g

试管H: 引物P 5 1 8 T 2 2 μ g , 引物P 8 9
7 S A L 2 μ g

每一试管加入5 0 n g 含K H C V 8 9 7 D N
A 的质粒p t r p -U B -K H C V 8 9 7 (A T C C
6 8 6 4 0) , 1 0 μ l 1 0 $\times$ 聚合酶缓冲液, 1 0 μ
l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M
d A T P , 2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 .
5 单位T a q 聚合酶, 以蒸馏水调至总体积1 0 0 μ l 。

向所述反应混合物中加入5 0 μ l 矿物油以防液体
挥发, 重复1 5 次如参考例6 所述相同的热循环以进行
P C R 。

(1 -3) 分离、纯化P C R 产物

(1 -2) 所得的P C R 产物以5 % 聚丙烯酰胺凝

胶电泳分离，结果为，试管A DNA 约为6 5 0 b p，试管B DNA 约为5 8 0 b p，试管C DNA 约为4 4 0 b p，试管D DNA 约为3 0 0 b p，试管E DNA 约为1 6 0 b p，试管F DNA 约为2 6 0 b p，试管G DNA 约为3 7 0 b p，试管H DNA 约为5 2 0 b p。DNA 通过所述聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化，分别命名为区段6 5 2，区段5 7 0，区段4 3 0，区段2 9 0，区段1 5 0，区段2 5 7，区段3 6 5 和区段5 1 8。图4 指示出每一片段在K H C V 8 9 7 DNA 和所用引物中的位置。

〈步骤2〉表达载体的制备

(2 - 1) 内切酶消化区段和载体DNA

2 μ g < 步骤1 > 所获每一DNA 区段在参考例1 的NEB 缓冲液3 中用S a c II、S a l I 酶完全消化，所得片段分别命名为6 5 2 -T 2 / L，5 7 0 -T 2 / L，4 3 0 -T 2 / L，2 9 0 -T 2 / L。1 5 0 -T 2 / L，2 5 7 -T 2 / L，3 6 5 -T 2 / L，和5 1 8 -T 2 / L。

另一方面，2 μ g 质粒p t r p -UB -CORE 1 4 (A T C C 6 8 6 4 2，见韩国专利公开第9 3 - 6 8 3) 在NEB 缓冲液3 中用S a c II，S a c I 完全消化，再以7 % 琼脂糖凝胶电泳分离2 .7 k b 片段，命名为p t r p H -UB -T 2 / L 片段。

上述片段用于下述连接反应：

连接反应A 管加入1 0 0 n g 6 5 2 -T 2 / L 片段；

连接反应B 管加入1 0 0 n g 5 7 0 -T 2 / L

片段;

连接反应C 管加入1 0 0 n g 4 3 0 -T 2 / L

片段;

连接反应D 管加入1 0 0 n g 2 9 0 -T 2 / L

片段;

连接反应E 管加入1 0 0 n g 1 5 0 -T 2 / L

片段;

连接反应F 管加入1 0 0 n g 2 5 7 -T 2 / L

片段;

连接反应G 管加入1 0 0 n g 3 6 5 -T 2 / L

片段;

连接反应H 管加入1 0 0 n g 5 1 8 -T 2 / L

片段。

每一连接反应管再加入5 0 n g p t r p H -U B -T 2 / L 片段, 2 μ l 1 0 $\times$ 连接缓冲液, 1 0 单位T 4 D N A 连接酶, 以蒸馏水调整终体积2 0 μ l , 于1 6 $^{\circ}$ C 连接1 2 小时。

以连接混合物转化大肠杆菌H B 1 0 1 (A T C C 3 3 6 9 4) , 按参考例4 筛选重组表达载体。

含6 5 2 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 6 5 2 ; 含5 7 0 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 5 7 0 ; 含4 3 0 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 4 3 0 ; 含2 9 0 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 2 9 0 ; 含1 5 0 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 1 5 0 , 含2 5 7 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 2 5 7 , 含3 6 5 片段的载体命名为p t r p H -U B -K H C V 3 6 5 ; 含5 1 8 片段的载体命名

为 p t r p H - U B - K H C V 5 1 8 (见图5)。

〈步骤3〉K H C V 8 9 7 部分DNA片段的表达

用〈步骤2〉制备的每一种载体转化大肠杆菌W3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9)。

转化的大肠杆菌于含50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 氨苄青霉素的液体L u r i a 培养基 (6 % 蛋白胨, 0.5 % 酵母浸出液, 1 % N a C l) 在37 ° C 振荡培养12 小时; 再将3 ml 培养液转入300 毫升M9 培养基中 (40 mM K₂ H P O₄, 22 mM K H₂ P O₄, 8.5 mM N a C l, 18.7 mM N H₄ C l, 1 % 葡萄糖, 0.1 mM M g S O₄, 0.1 mM C a C l₂, 0.4 % 酪蛋白水解氨基酸, 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 维生素B₁, 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 氨苄青霉素); 37 ° C 振荡培养4 小时, 当650 nm O.D. 值达到0.3 时, 加入终浓度为50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的吲哚丙烯酸 (I A A), 5 小时后, 培养液11000 转/ 分离心25 分钟, 收集大肠杆菌沉淀。

〈步骤4〉K H C V 8 9 7 蛋白表位的鉴定

上述〈步骤3〉所得的细胞沉淀按L a e m m l i 法以15 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 (《自然》227 期, 680 页, 1970 年); 以考马斯亮蓝R250 染色确定重组蛋白的表达, 结果见图6 A。

在图6 A 中, 泳道M代表标准分子量标记, 泳道1 指具有不含K H C V DNA 片段质粒的大肠杆菌产物; 泳道2 指转化p t r p H - U B - K H C V 8 9 7 大肠杆菌产物; 泳道3 指转化P t r p H - U B - K H C V

2 9 0 大肠杆菌产物; 泳道4 指转化p t r p H - U B - K H C V 4 3 0 大肠杆菌产物; 泳道5 指转化p t r p H - U B - K H C V 5 7 0 大肠杆菌产物; 泳道6 指转化p t r p H - U B - K H C V 6 5 2 大肠杆菌产物; 泳道7 指转化p t r p H - U B - K H C V 5 1 8 大肠杆菌产物; 泳道8 指转化p t r p H - U B - K H C V 3 6 5 大肠杆菌产物; 泳道9 指转化p t r p H - U B - K H C V 2 5 7 大肠杆菌产物; 泳道1 0 指转化p t r p H - U B - K H C V 1 5 0 大肠杆菌产物。

采用T o w b i n 的方法 (T o w b i n 等, 美国科学院进度, 7 6 期, 4 7 5 0 页, 1 9 7 9 年), 将凝胶中的分离蛋白质转印至硝酸纤维素滤膜 (B i o - R a d L a b, 孔径0 . 2 2 μ m, U . S . A), 滤膜浸入含0 . 5 % 吐温2 0 的P B S 中 (1 0 m M 磷酸盐, p H 7 . 0, 0 . 1 5 M N a C l), 室温轻轻摇动2 小时, 封闭I g G 蛋白质的非特异性结合部位。从K H C V 患者血清中纯化的I g G 溶解于含0 . 5 % 明胶和0 . 0 5 % 吐温2 0 的P B S 中, 配成终浓度为1 6 μ g / ml 的I g G 溶液, 再将所述滤膜浸入其中; 室温轻轻摇动1 小时, 使蛋白质和I g G 反应。然后滤膜以含0 . 2 % 吐温2 0 的P B S 洗涤4 次, 每次5 分钟。山羊抗人I g G 辣根过氧化物酶标抗体 (山羊抗人I g G - H R P, B i o - R a d L a b., C A, U S A) 用5 0 0 倍体积P B S (含0 . 5 % 明胶和0 . 0 5 % 吐温2 0) 稀释, 再将洗涤过的滤膜浸入其中; 室温摇动1 小时, 滤膜以P B S (含0 . 2 % 吐温2 0) 洗涤四次, 每次5 分钟, 再以5 0 m M T r i s 缓冲液 (p H 7 . 0) 洗涤两次。将滤膜浸入含4 0 0 μ g

/ ml 4 - 氯 - 1 - 萘酚和0 . 0 3 %过氧化氢的50 m M T r i s 缓冲液进行显色反应。蛋白质印迹分析结果见图6 B , 在图6 B , 泳道M和泳道1 至1 0 与图6 A 所指一样; 泳道5 至1 0 代表阳性结果, 泳道3 和4 代表阴性结果。

因此, 从图6 A、图6 B 可以看出K H C V 8 9 7 蛋白表位存在于K H C V 8 9 7 蛋白的羧基端 (K H C V 3 6 5 蛋白), 即是由K H C V - L B C 1 第4 3 4 8 至4 7 1 3 核苷酸 (3 6 6 对碱基) 编码。然而, K H C V 3 6 5 蛋白比K H C V 8 9 7 蛋白的免疫反应性低, 基于这一点, 可推测出当K H C V 3 6 5 蛋白的N 端氨基酸从N 端表达时不能作为表位, 因此, 包含K H C V 3 6 5 蛋白和延伸的N 端氨基酸的K H C V 5 1 8 蛋白与K H C V 8 9 7 蛋白具有相似的免疫反应性, 在本文中用作H C V 诊断试剂。

实施例2 H C V 包膜蛋白表位的鉴定

〈步骤1〉部分H C V 包膜蛋白基因的扩增

(1 - 1) 引物的制备

欲将扩增K H C V 包膜基因片段, 并将其克隆入t r p 启动子控制的含遍在蛋白基因的表达载体, 需要合成下列引物。

引物P E 1 T 2 :

5' - TGAGACTCCGCGGTGGTTATGAAGTGGGCAACGCGTCC - 3'

含S a c II 识别位点和K H C V - L B C 1 的第9 1 6 至9 3 7 核苷酸;

引物P E 1 D T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGACTTGCTCGTTGGGGTAGCT-3'

含S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 的第1 1 2 9 至1 1 4 9 核苷酸;

引物P E 1 E G T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGTTTCCCAGCTGTTTCACCTTC-3'

含S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 的第1 2 0 1 至1 2 2 1 核苷酸;

引物P E 1 F T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTACAACAGCCCTAGTGGTATCG-3'

含S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 的第1 3 2 7 至1 3 4 7 核苷酸;

引物P E 1 A X H O :

5'-AAAAAACTCGAGTTAGACATGGCGTCGCAATGTCGT-3'

包含在K H C V -L B C 1 第1 1 2 8 核苷酸后的翻译终止密码子, 和X h o I 位点;

引物P E 1 B X H O :

5'-AAAAAACTCGAGTTAAAGGAAAACAGATCCGCAGAG-3'

包含在K H C V -L B C 1 第1 2 0 0 核苷酸后的翻译终止密码子, 和X h o I 位点;

引物P E 1 C D E X H O :

5'-AAAAAACTCGAGTTAAGGCGACCAGTTCATCATCAT-3'

包含在K H C V -L B C 1 第1 3 2 6 位核苷酸后的翻

译终止密码子, 和X h o I 位点;

引物P E 1 X H O :

5'-AAAAAACTCGAGTTACCCTGTCACGTGGGTGGTTCC-3'

包含在K H C V - L B C 1 第2 8 5 3 位核苷酸后的翻译终止密码子, 和X h o I 位点;

引物P E 2 T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGGGGCGCAAGGTCGGGCCGCT-3'

含S a c II 位点和K H C V - L B C 1 的第1 5 0 9 至1 5 2 9 位核苷酸;

引物P E 2 B T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGGTCCCATCACTTACACTGAG-3'

含S a c II 位点和K H C V - L B C 1 的第1 7 4 9 至1 7 6 9 位核苷酸;

引物P E 2 D F T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTGGCACTGGGTTCACCAAGACA-3'

含S a c II 位点和K H C V - L B C 1 的第2 0 1 0 至2 0 3 0 位核苷酸;

引物P E 2 E T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTACTCGGGGAGAGCGTTGTGAC-3'

含S a c II 位点和K H C V - L B C 1 的第2 2 8 0 至2 3 0 0 位核苷酸;

引物P E 2 A X H O :

5'-AAAAAACTCGAGTTACCACCCCTGCGCGAATGTATC-3'

包含在K H C V - L B C 1 的第1 7 4 8 位核苷酸后的翻译终止密码子, 和X h o I 位点;

引物P E 2 B C X H O:

5'-AAAAAACTCGAGTTAATTCATCCAGGTACAACCGAA-3'

包含在K H C V - L B C 1 的第2 0 0 9 位核苷酸后的翻译终止密码子, 和X h o I 位点;

引物P E 2 D X H O:

5'-AAAAAACTCGAGTTACCAGTTGCATGCGGCGTCGAG-3'

包含在K H C V - L B C 1 的第2 2 7 9 位核苷酸后的翻译终止码, 和X h o I 位点; 以及

引物P E 2 X H O:

5'-AAAAAACTCGAGTTACGCGTCCGCCAGAAGAAGGAAGAG-3'

包含在K H C V - L B C 1 的第2 5 2 8 位核苷酸后的翻译终止密码子和X h o I 位点。

(1 - 2) 聚合酶链式反应

准备1 4 只试管, 分别加入下列引物:

试管A: 引物P E 1 T 2 2 μ g, 引物P E 1 X H O 2 μ g

试管B: 引物P E 1 T 2 2 μ g, 引物P E 1 A X H O 2 μ g

试管C: 引物P E 1 T 2 2 μ g, 引物P E 1 B X H O 2 μ g

试管D: 引物P E 1 T 2 2 μ g, 引物P E 1 C

DE XHO 2 μ g

试管E: 引物PE1DT2 2 μ g, 引物PE1
CDE XHO 2 μ g

试管F: 引物PE1EGT2 2 μ g, 引物PE
1CDE XHO 2 μ g

试管G: 引物PE1FT2 2 μ g, 引物PE1
XHO 2 μ g

试管H: 引物PE1EGT2 2 μ g, 引物PE
1XHO 2 μ g

试管I: 引物PE2T2 2 μ g, 引物PE2A
XHO 2 μ g

试管J: 引物PE2BT2 2 μ g, 引物PE2
BC XHO 2 μ g

试管K: 引物PE2T2 2 μ g, 引物PE2B
C XHO 2 μ g

试管L: 引物PE2DFT2 2 μ g, 引物PE
2DXHO 2 μ g

试管M: 引物PE2T2 2 μ g, 引物PE2X
HO 2 μ g

试管N: 引物PE2DFT2 2 μ g, 引物PE
2XHO 2 μ g

试管A至H加入50 ng 含包膜1基因的p t r p
H-UB-E1载体(ATCC 68878)为模板;
试管I至N加入50 ng 含包膜2基因的p Y L B C -
A/G-UB-E2N和p Y L B C -A/G-UB-
E2C载体(ATCC 69886和74117)为模
板, 10 μ l 10 $\times$ 多聚酶缓冲液, 10 μ l 2 m
M d N T P (2 m M d G T P, 2 m M d A T P,

2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 μ l
1 0 单位的T a q 酶, 以蒸馏水调终体积为1 0 0 μ l 。

每套反应混合物中加入5 0 μ l 矿物油以防液体蒸发; 按参考例6 , P C R 热循环反应2 5 次。

(1 - 3) P C R 产物的分离与纯化

上述 (1 - 2) 所得P C R 产物以5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 结果确认试管A D N A 约6 0 0 b p , 试管B D N A 约2 2 0 b p , 试管C D N A 约3 0 0 b p , 试管D D N A 约4 1 0 b p , 试管E D N A 约2 0 0 b p , 试管F D N A 约1 1 0 b p , 试管G D N A 约1 9 0 b p , 试管H D N A 约3 0 0 b p , 试管I D N A 约2 1 0 b p , 试管J D N A 约3 0 0 b p , 试管K D N A 约5 0 5 b p , 试管L

D N A 约2 9 0 b p , 试管M D N A 约2 4 0 b p , 试管N D N A 约5 2 0 b p 被扩增, D N A 以同样聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 分别命名为区段E 1 , 区段E 1 A , 区段E 1 B , 区段E 1 C , 区段E 1 D , 区段E 1 E , 区段E 1 F , 区段E 1 G , 区段E 2 A , 区段E 2 B , 区段E 2 C , 区段E 2 D , 区段E 2 E , 区段E 2 F 。所用区段和引物在包膜基因中的位置见图7 。

〈步骤2 〉表达载体的制备

取〈步骤1 〉中 (1 - 3) 所得的D N A 片段2 μ g , 以参考例1 的N E B 缓冲液3 和S a c II、X h o I 酶完全消化。

1 4 只连接反应试管, 每一管加入1 0 0 n g 上述消化后的D N A 区段, 再加入实施例1 〈步骤2 〉所得

的50 ng p t r p H - U B - T 2 / L 片段, 2 μ l 10 倍连接反应缓冲液, 10 单位T4 DNA 连接酶, 以蒸馏水调至终体积为20 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接反应12 小时。

分别用14 管大肠杆菌W3110 (ATCC 37339) 进行连接混合物的转化反应。

筛选含区段E1 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1; 筛选含区段E1 A 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 A; 筛选含区段E1 B 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 B; 筛选含区段E1 C 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 C; 筛选含区段E1 D 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 D; 筛选含区段E1 E 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 E; 筛选含区段E1 F 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 F; 筛选含区段E1 G 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 1 G; 筛选含区段E2 A 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 2 A; 筛选含区段E2 B 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 2 B; 筛选含区段E2 C 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 2 C; 筛选含区段E2 D 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 2 D; 筛选含区段E2 E 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 2 E; 筛选含区段E2 F 的载体, 命名为p t r p H - U B - E 2 F (见图8)。

〈步骤3〉包膜基因的表达

以〈步骤2〉制备的含包膜基因片段的质粒转化的大肠杆菌W3110 (ATCC 37339) 以实施例1 < 步骤3〉同样方式培养细菌, 然后离心收集细菌沉

淀。

〈步骤4〉包膜蛋白表位的鉴定

按实施例1 〈步骤4〉相同的方式鉴定上述 〈步骤3〉沉淀菌体中的包膜蛋白表位, 结果见图9, 图9 A 是S D S -P A G E 结果, 图9 B 为蛋白质印迹分析结果。

图9 中, 泳道1 代表具有无包膜基因区段质粒的大肠杆菌产物; 泳道2 指p t r p H -U B -E 1 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道3 指p t r p H -U B -E 1 A 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道4 指p t r p H -U B -E 1 B 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道5 指p t r p H -U B -E 1 C 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道6 指p t r p H -U B -E 1 D 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道7 指p t r p H -U B -E 1 E 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道8 指p t r p H -U B -E 1 F 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道9 指p t r p H -U B -E 1 G 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道1 0 指p t r p H -U B -E 2 A 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道1 1 指p t r p H -U B -E 2 B 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道1 2 指p t r p H -U B -E 2 C 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道1 3 指p t r p H -U B -E 2 D 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道1 4 指p t r p H -U B -E 2 E 质粒转化的大肠杆菌产物; 泳道1 5 指p t r p H -U B -E 2 F 质粒转化的大肠杆菌产物。

以丙型肝炎患者血清进行蛋白质印迹分析, 证实不同包膜基因片段质粒转化的大肠杆菌产物与K H C V 抗体反应的特异性, 结果见下表1 和图9 B 。

表1 K H C V 包膜蛋白片段的蛋白质印迹分析结果

泳道	蛋白片段	位置 (氨基酸序号)	蛋白质印迹分析信号
2	UBE1	E1 1-198	+
3	UBE1A	E1 1-72	-
4	UBE1B	E1 1-99	-
5	UBE1C	E1 1-136	(+)
6	UBE1D	E1 72-136	(+)
7	UBE1E	E1 100-136	((+))
8	UBE1F	E1 136-198	+
9	UBE1G	E1 100-198	+
10	UBE2A	E2 1-67	(+)
11	UBE2B	E2 68-167	-
12	UBE2C	E2 1-167	(+)
13	UBE2D	E2 168-262	-
14	UBE2E	E2 263-340	+
15	UBE2F	E2 168-340	+

* 蛋白质印迹分析信号 +: 阳性
 (+) 弱 ((+)) 很弱
 -: 阴性

从表1 和图9 B 可以看出, 分别代表用含E 1 G、E 2 A、E 2 E 包膜基因区段的质粒转化的大肠杆菌产物的泳道9, 10 和14 显示阳性结果, 而代表含E 1 A、E 1 B、E 2 B、E 2 D 等包膜基因区段的质粒转化的大肠杆菌产物的其它泳道显示阴性结果。

因此, 发现包膜蛋白表位存在于, K H C V 包膜1

蛋白羧基端，从K H C V - L B C 1 的第1 2 0 1 至1 5 0 9 核苷酸 (3 0 9 对碱基) 表达而得 (E 1 G 蛋白)；K H C V 包膜2 蛋白的氨基端，由K H C V - L B C 1 的第1 5 1 0 至1 7 4 9 核苷酸 (2 4 0 对碱基) 表达而得 (E 2 A 蛋白)；K H C V 包膜2 蛋白的羧基端，由K H C V - L B C 1 的第2 2 8 1 至2 5 2 9 核苷酸 (2 4 9 对碱基) 表达而得 (E 2 E 蛋白) (参见图2 所示E 1 G，E 2 A，E 2 E 蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列。)

下面实施例3 至实施例5 显示含一个以上H C V 表位的重组蛋白的制备。

实施例3 K H C V U B C O R E 5 1 8 蛋白的制备

〈步骤1〉K H C V 5 1 8 D N A 的扩增

(1 - 1) 引物制备

为扩增K H C V 5 1 8 D N A (其由K H C V - L B C 1 的第4 1 9 6 - 4 7 1 3 核苷酸区组成) 并将其克隆至一在色氨酸启动子控制下的含遍在蛋白基因的表达载体中，合成下列引物：

P K 5 1 8 T 2 引物：

5' -TGAGACTCCGCGGTGGTGGAGGAGGAGGAGGAATCACCACAG
GCGCCCCCTATC-3'

包含S a c II 识别位点，6 个甘氨酸密码子和K H C V - L B C 1 的第4 1 9 5 - 4 2 1 5 核苷酸；以及

P K 5 1 8 S A L 引物：

5' -AAAAAAGTCGACTATTAACACGTATTACAGTCGATCAC-3'

包含位于K H C V - L B C 1 第4 7 1 3 核苷酸后的翻译终止密码子, 和一个S a l I 识别位点。

(1 - 2) 聚合酶链反应

在一试管中加入2 μ g P K 5 1 8 T 2 引物和2 μ g P K 5 1 8 S A L 引物, 再加入5 0 n g K H C V - L B C 1 DNA (A T C C 7 5 0 0 8), 1 0 μ l 1 0 $\times$ 聚合酶缓冲液, 1 0 μ l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M d A T P , 2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 单位T a q 聚合酶, 加蒸馏水调节总体积为1 0 0 μ l 。

向反应混合物中加入5 0 μ l 矿物油以防止蒸发, 重复2 5 次与参考例6 相同的热循环以进行P C R 。

(1 - 3) 分离和纯化P C R 产物

将上述 (1 - 2) 中获得的P C R 产物进行5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果证实约5 2 0 b p DNA 被扩增。如 (1 - 2) 所述用相同的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化DNA 并命名为G L Y K 5 1 8 片段。

< 步骤2 > 制备表达载体

在参考例1 所述的N E B 缓冲液3 中用S a l I 完全消化2 μ g p t r p H - U B - C O R E 1 4 (A T C C 6 8 6 4 2 , 见韩国专利公开9 3 - 6 8 3) , 然后在相同条件下用S a l I 部分消化, 得到的混合物进行7 % 琼脂糖凝胶电泳以分离3 . 0 k b 片段, 其被命名为p t r p H - U B - C O R E (T 2) / L 片段。

另外, 如参考例1 所述在N E B 缓冲液3 中用S a

c II 和 S a l I 充分消化 2 μ g 上述 < 步骤 1 > 的 (1-3) 中获得的 G L Y K 5 1 8 片段。

在一连接试管中加入 1 0 0 n g 上述得到的 D N A 片段, 同时加入 5 0 n g p t r p H - U B - C O R E (T 2) / L 片段、2 μ l 1 0 $\times$ 连接缓冲液、1 0 单位 T 4 D N A 连接酶, 加入蒸馏水使总体积调至 2 0 μ l, 在 1 6 $^{\circ}$ C 进行连接反应 1 2 小时。

用连接混合物转化 E . c o l i W 3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) 以获得含有包含在一开放读框与遍在蛋白基因和 K H C V C O R E 1 4 D N A 连接的 G L Y K 5 1 8 片段 (图 1 0) 的 p t r p H - U B - N S 4 E 质粒的重组 E . c o l i 细胞 (“C O R E 5 1 8 D N A”)。

< 步骤 3 > 表达 C O R E 5 1 8 D N A

用上述 < 步骤 2 > 制备的质粒 p t r p H - U B - C O R E 5 1 8 转化的 E . c o l i W 3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) 以与实施例 1 < 步骤 3 > 相同的方式培养; 然后离心收集 E . c o l i 细胞沉淀。

以与实施例 1 < 步骤 4 > 相同的方式用丙型肝炎患者的血清确定上述细胞沉淀物中表达的 C O R E 5 1 8 蛋白的反应性; 结果见图 1 1, 图 1 1 A 是 S D S - P A G E 结果, 图 1 1 B 为蛋白质印迹分析结果。

在图 1 1 中, 泳道 1 和 4 显示了不带 p t r p H - U B - C O R E 5 1 8 质粒的 E . c o l i 产物; 泳道 2 和 5 示出了用质粒 p t r p H - U B - C O R E 5 1 8 转化的 E . c o l i 产物; 泳道 3 代表标准分子量标记物, 即从凝胶上部至下依次为 7 0、4 3、2 9、

1 8 和1 4 千道尔顿。

< 步骤4 > 纯化UBCORE5 1 8 蛋白

(4 -1) 破碎细胞及除去可溶性蛋白

将3 g 在上述< 步骤3 > 中得到的E . c o l i 细胞沉淀物悬浮于4 0 m l 缓冲液1 (2 0 m M T r i s , p H 8 . 0 , 1 m M E D T A , 1 0 m M β - 巯基乙醇, 1 m M 苯甲基磺酰氟, 1 μ g / m l 抑胃酶肽A) 中, 向悬浮液中加入溶菌酶使终浓度为0 . 2 m g / m l , 将得到的溶液置于冰上3 0 分钟。得到物在冰浴中用功率输出为8 0 % 和能率循环为5 0 % 的超声处理器 (H E A T S Y S T E M S U L T R A S O N I C S I N C . , W 2 2 5 , U . S . A .) 进行1 5 分钟超声处理以破碎细胞, 得到E . c o l i 细胞匀浆。

将上述得到的细胞匀浆在一离心机 (B e c k m a n J 2 - 2 1 , R o t o r J A 2 0) 中以1 5 0 0 0 r p m 离心2 5 分钟以除去溶解蛋白, 获得不溶性沉淀物。

(4 -2) 不溶性沉淀的洗涤

(4 -1) 所得沉淀悬浮于4 m l 含1 % T r i t o n X - 1 0 0 的缓冲液2 (2 0 m M T r i s , p H 8 . 0 , 1 m M E D T A , 1 0 m M β - 巯基乙醇), 将悬液室温搅拌3 0 分钟, 再1 5 0 0 0 转/ 分离心2 5 分钟 (B e c k m a n J 2 - 2 1 , J A 2 0 转头) 除去可溶性蛋白, 保留不溶性沉淀物。

(4 -3) 不溶性沉淀的溶解

(4 -2) 的沉淀悬浮于1 0 0 ml 含4 M尿素的缓冲液3 (5 0 m M T r i s , p H 9 . 0 , 1 m M E D T A , 1 0 m M β -巯基乙醇), 悬液室温搅拌2 小时, 再离心除去不溶性沉淀, 保留上清。

(4 -4) D E A E -S e p h a r o s e 离子交换层析

将 (4 -3) 中得到的上清以4 ml / 分钟流速通过用上述缓冲液3 平衡的D E A E -S e p h a r o s e 柱 (P h a r m a c i a , 1 . 2 5 c m $\times$ 4 c m) , 以同样缓冲液洗去柱中的游离蛋白质。随后以4 ml / 分钟的流速加入2 0 0 ml 含有浓度梯度为0 -0 . 3 M的N a C l 的缓冲液3 以洗脱结合蛋白, 每2 ml 组分收集洗脱液。将蛋白组分进行1 5 %S D S -P A G E 以收集含U B C O R E 5 1 8 蛋白的组分。

(4 -5) F P L C -M O N O S 层析

(4 -4) 收集的含U B C O R E 5 1 8 蛋白的组分由Y M 1 0 超滤膜 (A m i c o n , U . S . A) 浓缩至2 0 ml , G -2 5 柱 (P h a r m a c i a , 2 . 5 c m $\times$ 9 0 c m) 先用含4 M尿素的缓冲液4 (5 0 m M磷酸盐, p H 6 . 0 , 1 m M E D T A , 1 0 m M β -巯基乙醇) 平衡, 再将浓缩液过柱, 洗脱液依次以流速0 . 7 毫升/ 分钟通过按相同缓冲液平衡的F P L C -M O N O S 柱 (P h a r m a c i a , H R 5 / 5 , 0 . 5 c m $\times$ 5 c m) , 加入相同缓冲液洗去柱内游离蛋白质。然后加入含0 . 2 M N a C l 的相

同缓冲液洗去结合蛋白质。再以200 ml 含0.2至0.4 M NaCl 线性梯度浓度缓冲液5 (10 mM 磷酸盐, pH 7.0) 过柱, 洗去结合蛋白质, 按0.7 ml 每份收集。含UBCORE 518 蛋白的组分由15% SDS-PAGE 收集, 纯度在95%以上, 纯化蛋白的抗原特性由蛋白质印迹分析证实。

实施例4 KHC V UB NS 4 E 1 E 2 蛋白的制备

〈步骤1〉 KHC V NS 4 E DNA 的表达载体

(1-1) 引物制备

欲制备KHC V NS 4 E DNA (由KHC V -LBC 1 的第5422至5547位核苷酸组成), 并将其克隆在trp 启动子控制的含遍在蛋白基因的表达载体, 需合成下列引物:

引物PNS 4 ET 2:

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTATCATCCCCGATAGGGAAGTT-3'

含Sac II 位点和KHC V -LBC 1 的第5422至5422位核苷酸; 以及

引物PNS 4 ESAL:

5'-AAAAAAGTCGACTATTACAACCCGAGCGCCTTCTGTTT-3'

含在KHC V -LBC 1 第5547位核苷酸后的翻译终止密码子, 和Sal I 位点。

(1-2) 聚合酶链式反应

在反应管中加入2 μ g PNS 4 ET 2 引物和2

μg P N S 4 E S A L 引物, 再加 50 ng K H C V - L B C 1 DNA (A T C C 7 5 0 0 8), $10\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ 聚合酶缓冲液, $10\text{ }\mu\text{l}$ 2 mM d N T P (2 mM d G T P, 2 mM d A T P, 2 mM T T P, 2 mM d C T P), 2.5 单位 T a q 聚合酶, 以蒸馏水调至终体积为 $100\text{ }\mu\text{l}$ 。

反应混合物加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ 矿物油以防液体蒸发, P C R 按参考例6 进行 25 次热循环反应。

(1 - 3) P C R 产物的分离和纯化

上述 (1 - 2) 所获 P C R 产物由 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 结果发现扩增的 DNA 为 130 bp , 以同样的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化 DNA, 命名为 N S 4 E 片段。

〈步骤2〉表达载体的制备

上述 (1 - 3) 所获 $2\text{ }\mu\text{g}$ N S 4 E 片段以参考例1 的 N E B 缓冲液3 和 S a c II、S a l I 完全消化。

连接反应管加入 100 ng 上述消化 DNA, 再加入实施例1 〈步骤2〉的 50 ng p t r p H - U B - T 2 / L, $2\text{ }\mu\text{l}$ 10 倍连接缓冲液, 10 单位 T 4 DNA 连接酶, 以蒸馏水调至终体积为 $20\text{ }\mu\text{l}$, $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 连接反应 12 小时。

连接混合物转化大肠杆菌 W 3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9), 筛选包含含 N S 4 E 片段的 p t r p H - U B - N S 4 E 质粒的重组大肠杆菌转化子 (图1 2)。

〈步骤3〉K H C V E 1 E 2 蛋白的制备

(3 - 1) 引物制备

欲扩增编码HCV包膜蛋白表位的KHCV E1 E2 基因, 并将其克隆在trp 启动子控制的含遍在蛋白基因的表达载体, 需合成下列引物:

引物P E 2 E T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTACTCGGGGAGAGCGTTGTGAC-3'

含S a c I I 位点和KHCV -L B C 1 的第2 2 8 1 至2 2 9 8 位核苷酸;

引物P E 2 E G E 1 G :

5'-TTCCTTCTTCTGGCGGACGCGGTTTCCCAGCTGTTACCTTC-3'

含KHCV -L B C 1 第2 5 0 9 至2 5 2 9 位核苷酸, 为E 2 E DNA 的3' 端; 和KHCV -L B C 1 第1 2 0 1 至1 2 2 1 位核苷酸, 是E 1 G 基因的5' 端; 以及

引物P E 2 A X H O :

5'-AAAAAAGTCGAGTTACCACCCCTGCGCGAATGTATC-3'

含在KHCV -L B C 1 第1 7 4 9 位核苷酸后的终止密码子和X h o I 识别位点。

(3 - 2) 聚合酶链式反应

在反应管中加入2 μ g P E 2 E G E 1 G 引物和2 μ g P E 2 A X H O 引物, 再加5 0 n g K H C V -L B C 1 DNA (A T C C 7 5 0 0 8) 为模板, 1 0 μ l 1 0 倍聚合酶缓冲液, 1 0 μ l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M d A T P , 2

m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 单位 T a q 酶, 以蒸馏水调至终体积为 1 0 0 μ l 。

反应混合物中加入 5 0 μ l 矿物油以防液体蒸发, P C R 按参考例 6 进行 2 5 次热循环反应。

(3 - 3) P C R 产物的分离和纯化

上述 (3 - 2) 所获 P C R 产物通过 5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 结果发现扩增的 D N A 片段为 5 5 0 b p , D N A 由相同的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 命名为 G E 1 G E 2 A 片段。

(3 - 4) 第二次聚合酶链式反应

在反应管中加入 2 μ g P E 2 E T 2 引物和 2 μ g P E 2 A X H O 引物, 再加 5 0 n g p Y L B C - A / G - U B E 2 C 质粒 (A T C C 7 4 1 1 7 , 见韩国专利公开第 9 3 - 6 8 3 号) 和上述 (3 - 3) 所获 G E 1 G E 2 A 片段为模板, 1 0 μ l 1 0 $\times$ 聚合酶缓冲液, 1 0 μ l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M d A T P , 2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 单位 T a q 酶, 以蒸馏水调至反应终体积为 1 0 0 μ l 。

反应混合物加入 5 0 μ l 矿物油以防液体蒸发, P C R 按参考例 6 进行 2 5 次热循环反应。

(3 - 5) P C R 产物的分离与纯化

上述 (3 - 4) 所获 P C R 产物通过 5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 结果发现扩增的 D N A 为 8 0 0 b p , 由同样的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化此片段, 命名为 E 1

E 2 片段。

(3 - 6) 表达载体的制备

(3 - 5) 所获2 μ g DNA 片段按参考例1 以缓冲液3 和S a c II、X h o I 完全消化。

反应管中加入上述1 0 0 n g DNA , 加入实施例1 〈步骤2 〉获得的p t r p H - U B - T 2 / L 片段5 0 n g , 2 μ l 1 0 $\times$ 连接缓冲液, 1 0 单位T 4 DNA 连接酶, 以蒸馏水调至总体积为2 0 μ l , 于1 6 $^{\circ}$ C连接反应1 2 小时。

连接混合物转化大肠杆菌W3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) 筛选包含含E 1 E 2 片段的p t r p H - U B - E 1 E 2 质粒的重组大肠杆菌转化子 (图1 3) 。

(3 - 7) E 1 E 2 DNA 的表达

(3 - 6) 制备的p t r p H - U B - E 1 E 2 质粒重组大肠杆菌W3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) 转化子, 按实施例1 〈步骤3 〉同样方法培养, 然后离心收集大肠杆菌沉淀。

(3 - 8) 用丙型肝炎患者血清证实U B E 1 E 2 蛋白的表达及其反应性

按实施例1 〈步骤4 〉同样方法, 用丙型肝炎患者血清对 (3 - 7) 细胞沉淀进行U B E 1 E 2 蛋白的表达鉴定及反应性的鉴定, 结果见图1 4 , 其中A 是S D S - P A G E 结果, B 是蛋白质印迹分析结果。

在图1 4 A 和1 4 B , 泳道1 和4 指不含p t r p H - U B - E 1 E 2 质粒的大肠杆菌产物; 泳道2 和5

指含p t r p H - U B - E 1 E 2 质粒的大肠杆菌产物;
泳道3 指标准分子量, 从凝胶上至下依次为4 3 , 2 9 ,
1 8 和1 4 千道尔顿。

〈步骤4〉K H C V N S 4 E 1 E 2 蛋白的制备

〈步骤4 - A〉N S 4 E 1 E 2 基因的扩增

欲扩增H C V 包膜蛋白表位基因和部分K H C V
N S 4 E D N A , 并将其克隆在t r p 启动子控制的
含遍在蛋白基因的表达载体, 需合成下列引物。

引物P N S 4 E T 2 :

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTATCATCCCCGATAGGGAAGTT-3'

含S a c II 位点和K H C V - L B C 1 的第5 4 2 2 至
5 4 2 2 位核苷酸。

引物P N S 4 E G E 2 C 3 :

5'-CAGAAGGCGCTCGGGTTGCCAGGAGGAGGAGGTGGTA
CTCGGGGAGAGCGTTGT-3'

依次含K H C V - L B C 1 第5 5 3 0 至5 5 4 7 位核
苷酸, 是N S 4 E D N A 的3' 端; 一个脯氨酸密码
子; 6 个甘氨酸密码子; 含K H C V - L B C 1 的第2
2 1 8 至2 2 9 8 位核苷酸, 是E 2 E 基因的5' 端;
以及

引物P E 2 A X H O :

5'-AAAAAAGCTCGAGTTACCACCCCTGCGCGAATGTATC-3'

含在K H C V - L B C 1 第1 7 4 9 位核苷酸后的翻译

终止密码子，和X h o I 识别位点。

(4 - A - 2) 聚合酶链式反应

反应管加入2 μ g P N S 4 E G E 2 C 3 引物和2 μ g P E 2 A X H O 引物，再加5 0 n g p t r p H - U B - E 1 E 2 (< 步骤3 > (3 - 6)) 为模板，1 0 μ l 1 0 倍聚合酶缓冲液，1 0 μ l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M d A T P , 2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 μ g T a q 聚合酶，以蒸馏水调至总体积为1 0 0 μ l 。

混合物覆盖5 0 μ l 矿物油以防液体蒸发，P C R 按参考例6 进行2 5 次热循环反应。

(4 - A - 3) P C R 产物的分离与纯化

上述 (4 - A - 2) 所获P C R 产物以5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，结果发现扩增的D N A 约8 0 0 b p , 用同样的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化D N A , 命名为G E N V E P I - Ⅲ 片段。

(4 - A - 4) 第二次聚合酶链式反应

反应管中加入2 μ g P N S 4 E T 2 引物和2 μ g P E 2 A X H O 引物，加入上述 (步骤1) 所获5 0 n g p t r p H - U B - N S 4 E 质粒为模板，加入上述 (4 - A - 2) 的5 0 n g G E N V E P I - Ⅲ 1 0 μ l 1 0 倍多聚酶缓冲液，1 0 μ l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M d A T P , 2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 单位T a q 酶，以蒸馏水调至总体积为1 0 0 μ l 。

反应混合物覆盖50 μ l 矿物油以防液体蒸发, PCR 按参考例6 进行25 次热循环反应。

(4 - A - 5) PCR 产物的分离与纯化

上述 (4 - A - 4) 所获PCR 产物以5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。结果发现扩增的DNA 约920 bp , 由同样的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化DNA , 命名为NS4E1E2 片段。

< 步骤4 - B > 表达载体的制备

< 步骤4 - A > 的 (4 - A - 5) 所获2 μ g DNA 片段以参考例1 的NEB 缓冲液3 和Sac II、Xho I 完全消化。

反应管中加入上述消化后的DNA 片段100 ng , 加入实施例1 < 步骤2 > 获得的50 ng p t r p H - U B - T 2 / L 片段, 2 μ l 10 倍连接缓冲液, 10 单位T4 DNA 连接酶, 以蒸馏水调至总体积为20 μ l , 于16 $^{\circ}$ C连接反应12 小时。

连接混合物转化大肠菌W3110 (ATCC37339) , 筛选含包含NS4E1E2 片段的p t r p H - U B - NS4E1E2 质粒的大肠杆菌重组子 (图15) 。

< 步骤4 - C > NS4E1E2 DNA 片段的表达

上述< 步骤4 - B > 的p t r p H - U B - E1E2 质粒转化的大肠杆菌W3110 (ATCC37339) 重组子, 按实施例1 < 步骤3 > 同样方法培养, 离心收集大肠杆菌沉淀。

< 步骤4 -D > U B N S 4 E 1 E 2 蛋白的表达鉴定及与丙型肝炎患者血清反应性鉴定

按实施例1 <步骤4 > 同样方法, 鉴定< 步骤4 -C > 大肠杆菌沉淀中U B N S 4 E 1 E 2 蛋白的表达及与丙型肝炎患者血清的反应性, 结果见图1 6 , 1 6 A 是S D S -P A G E 结果, 1 6 B 是蛋白质印迹分析结果。

在图1 6 A 和1 6 B , 泳道1 和4 指示不含p t r p H -U B -N S 4 E 1 E 2 质粒的大肠杆菌产物; 泳道2 和泳道5 指含p t r p H -U B -N S 4 E 1 E 2 质粒的大肠杆菌产物; 泳道3 是标准分子量, 从凝胶上至下依次是9 2 , 7 0 , 4 3 , 2 9 , 1 8 千道尔顿。

<步骤4 -E > U B N S 4 E 1 E 2 蛋白的纯化

(4 -E -1) 细胞破碎和可溶性蛋白的去除

按实施例3 <步骤4 > 之 (4 -1) 处理上述 <步骤4 -C > 所获的2 g 大肠杆菌沉淀, 保留不溶性沉淀物。

(4 -E -2) 不溶性沉淀物的洗涤

按实施例3 的 <步骤4 > 之 (4 -2) 处理上述 (4 -E -1) 所获沉淀, 除去可溶性蛋白, 保留沉淀。

(4 -E -3) 4 M 尿素洗涤

(4 -E -2) 沉淀物悬浮于3 0 m l 含4 M 尿素的缓冲液2 , 室温搅拌2 小时, 再1 5 0 0 0 转/ 分离

心 (B e c k m a n , J 2 - 2 1 , R A 2 0 转头) 除去可溶性蛋白质, 保留沉淀。

(4 - E - 4) 6 M 盐酸胍洗涤

(4 - E - 3) 的沉淀悬浮于3 0 m l 含6 M 盐酸胍的缓冲液2 , 室温搅拌2 小时, 再1 5 0 0 0 转/ 分离心 (B e c k m a n , J 2 - 2 1 , J A 2 0 转头) 除去可溶性蛋白, 保留沉淀。

(4 - E - 5) 1 % S D S 溶解沉淀

(4 - E - 4) 的沉淀悬浮于1 0 m l 含1 % S D S 的P B S (1 0 m M 磷酸盐, p H 7 . 0 , 1 5 0 m M N a C l) , 室温搅拌1 2 小时, 再1 5 0 0 0 转/ 分离心 (B e c k m a n J 2 - 2 1 , J A 2 0 转头) 除去不溶性沉淀, 保留上清。

(4 - E - 6) S - 3 0 0 凝胶过滤层析

(4 - E - 5) 所获1 0 m l 上清由Y M 1 0 超滤膜 (A m i c o n , U . S . A) 浓缩至4 m l , 再1 5 0 0 0 转/ 分离心2 5 分钟 (B e c k m a n J 2 - 2 1 , R A 2 0 转头) 除去不溶性沉淀, 保留上清。S - 3 0 0 凝胶过滤树脂柱 (P h a r m a c i a L K B , 2 . 5 c m × 9 0 c m) 预先以含0 . 1 % S D S 的P B S 平衡, 再将上述所得上清液以4 0 毫升/ 小时过柱, 按每组分2 m l 收集, 通过1 5 % S D S - P A G E 收集含U B N S 4 E 1 E 2 蛋白质的组分, 纯度9 0 % 以上, 由蛋白质印迹分析鉴定提纯蛋白质的抗原性。

实施例5 制备K H C V NS 5 -1 . 2 蛋白

< 步骤1 > 扩增NS 5 -1 . 2 DNA

(1 -1) 制备引物

为了扩增K H C V NS 5 -1 . 2 DNA (其由K H C V -L B C 1 的第6 6 4 9 -7 8 2 4 核苷酸组成) 并将其克隆至一在色氨酸启动子控制下的含遍在蛋白基因的表达载体中, 合成下列引物。

P N S 5 T 2 引物:

5'-TGAGACTCCGCGGTGGTACGGGCATGACCACTGACAAC-3'

包含一个S a c II 识别位点和K H C V -L B C 1 的第6 6 4 9 -6 6 6 9 核苷酸; 以及

P N S 5 -1 . 2 S A L 引物:

5'-AAAAAAGTCGACTATTACGCCTTCCCCTTCATCTCCTT-3'

包含位于K H C V -L B C 1 第7 8 2 4 核苷酸之后的翻译终止密码子, 以及一个S a l I 识别位点。

(1 -2) 聚合酶链反应

在一试管中加入2 μ g P N S 5 T 2 引物和2 μ g P N S 5 -1 . 2 S A L 引物, 同时加入5 0 n g K H C V -L B C 1 DNA (A T C C 7 5 0 0 8) 作为模板, 1 0 μ l 1 0 $\times$ 聚合酶缓冲液, 1 0 μ l 2 m M d N T P (2 m M d G T P , 2 m M d A T P , 2 m M T T P , 2 m M d C T P) , 2 . 5 单位T a q 聚合酶, 加蒸馏水使总体积调至1 0 0 μ l 。

向反应混合物中加入5 0 μ l 矿物油以防止蒸发, 重复2 5 次与参考例6 所述相同的热循环以进行P C R。

(1 - 3) 分离和纯化P C R 产物

将上述 (1 - 2) 中得到的P C R 产物进行5 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果证实有约1 . 3 k b D N A 被扩增。用上述相同的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化该D N A 并命名为N S 5 - 1 . 2 片段。

< 步骤2 > 制备表达载体

根据参考例1 在N E B 缓冲液3 中用S a c II 和S a l I 完全消化2 μ g < 步骤1 > (1 - 3) 中得到的D N A 片段。

在一试管中放入1 0 0 n g 上述得到的D N A 片段, 再加入5 0 n g 在实施例1 的< 步骤2 > 中得到的p t r p H - U B - T 2 / L 片段, 2 μ l 1 0 $\times$ 连接缓冲液, 1 0 单位T 4 D N A 连接酶, 加蒸馏水调整总体积为2 0 μ l , 在1 6 $^{\circ}$ C进行连接反应1 2 小时。

用连接混合物转化E . c o l i W 3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) 获得含有包含N S 5 - 1 . 2 片段的质粒p t r p H - U B - N S 5 - 1 . 2 的重组E . c o l i 细胞 (图1 7) 。

< 步骤3 > 表达N S 5 - 1 . 2 D N A 片段

用上述< 步骤2 > 制备的质粒p t r p H - U B - N S 5 - 1 . 2 转化的E . c o l i W 3 1 1 0 (A T C C 3 7 3 3 9) 细胞以实施例1 < 步骤3 > 相同的方式进行培养, 然后离心收集E . c o l i 细胞沉淀物。

< 步骤4 > 用丙型肝炎患者的血清确定UBNS 5 -1 .
2 蛋白的表达及其反应性

以实施例1 的< 步骤4 > 相同的方式用上述< 步骤3 > 的细胞沉淀物用丙型肝炎患者的血清证实了UBNS 5 -1 . 2 蛋白的表达及其反应性, 结果示于图1 8 , 其中A 是SDS -PAGE 结果, B 是蛋白质印迹分析结果。

在图1 8 A 和B 中, 泳道1 为具有不带任何KHCV DNA 片段的质粒的E . coli 产物; 泳道2 和3 示出用p t r p H -UBNS 5 -1 . 2 转化的E . coli 产物。

< 步骤5 > KHCV UBNS 5 -1 .2 蛋白、KHCV 4 0 3 蛋白与丙型肝炎患者血清反应性的比较

按实施例1 < 步骤4 > 同样的方法鉴定 < 步骤3 > 大肠杆菌沉淀中UBNS 5 -1 . 2 蛋白与丙型肝炎患者血清的反应性, 其结果与一酵母细胞沉淀表达的KHCV 4 0 3 蛋白 (韩国专利公开第9 3 -1 2 0 1 7 号) 和丙型肝炎患者血清的反应性进行比较, 结论见图1 9 , 其中A 指SDS -PAGE 结果, B 指蛋白质印迹分析结果。

在图1 9 A 和1 9 B , 泳道1 指啤酒酵母DCO 4 -UB -KHCV 4 0 3 (ATCC 7 4 7 0 9) 的产物; 泳道2 指p t r p H -UB -NS 5 -1 . 2 大肠杆菌转化子的产物。从结果可以看出, UBNS 5 -1 . 2 蛋白与丙型肝炎患者血清的反应性比KHCV 4 0 3 蛋白强。

< 步骤6 > 纯化UBNS 5 -1 . 2 蛋白

(6 -1) 破碎细胞和除去可溶性蛋白

将3 g 上述< 步骤3 > 中获得的E . c o l i 细胞沉淀物如实施例3 < 步骤4 > (4 -1) 所述进行处理以破碎细胞并从中获得不溶性沉淀物。

(6 -2) 洗涤不溶性沉淀物

如实施例3 的< 步骤4 > (4 -2) 所述处理 (6 -1) 中得到的沉淀物以除去溶解蛋白, 获得不溶性沉淀物。

(6 -3) 溶解不溶性沉淀物

将 (6 -2) 的不溶性沉淀物悬浮于1 0 0 ml 含8 M尿素的缓冲液3 (5 0 mM T r i s , p H 9 . 0 , 1 mM E D T A , 1 0 mM β - 巯基乙醇) 中, 室温搅拌悬浮液1 小时并离心除去不溶性沉淀物, 得到上清。

(6 -4) D E A E - S e p h a r o s e 离子交换层析

(6 -3) 中获得的上清以2 ml / 分钟流速通过用上述缓冲液3 平衡的D E A E - S e p h a r o s e 柱 (P h a r m a c i a , 2 . 5 c m $\times$ 3 c m) , 用同样的缓冲液洗脱存留在柱中的自由蛋白。随后以8 ml / 分钟的流速加入3 0 0 ml 含有浓度梯度为0 -0 . 3 M的N a C l 的缓冲液3 以洗脱结合蛋白, 每4 ml 组分收集洗脱液。将蛋白组分进行1 5 % S D S - P A G E 以收集含UBNS 5 -1 . 2 蛋白的组分。

(6 -5) S -3 0 0 凝胶过滤层析

用Y M1 0 超滤膜 (A m i c o n , U . S . A .) 浓缩 (6 -4) 中收集的蛋白组分至体积为3 ml , 然后以1 0 ml / 小时的流速通过用含8 M尿素的缓冲液3 平衡的S -3 0 0 树脂柱 (P h a r m a c i a , 1 . 2 c m ×1 2 0 c m) , 以0 . 5 ml 组分收集洗脱下来的蛋白并进行1 5 %S D S -P A G E 以收集含高纯度U B N S 5 -1 . 2 蛋白的组分。

(6 -6) F P L C -p h e n y l -s u p e r o s e 层析

将 (6 -5) 中收集的蛋白组分过Y M1 0 超滤膜 (A m i c o n , U . S . A .) 以浓缩其体积至4 ml 。用一透折膜 (S p e c t r u m M e d i c a l I n d u s t r i e s , I n c . M . W . 截断值6 0 0 0 -8 0 0 0) 将浓缩液对P B S (1 0 m M磷酸盐, p H 7 . 0 , 1 5 m M N a C l) 透析以除去尿素。向溶液中加入N a C l 至终浓度为1 . 5 M, 得到物以0 . 7 ml / 分钟的流速通过用相同缓冲液平衡的F P L C -p h e n y l s u p e r o s e 柱 (P h a r m a c i a , H R 5 / 5 , 0 . 5 c m ×5 c m) ; 加入相同的缓冲液以洗脱保留在柱中的自由蛋白。然后加入含线性浓度梯度为1 . 5 M -0 M的N a C l 的P B S 洗脱结合蛋白, 并每0 . 7 ml 为一组收集洗脱物。将蛋白组分进行1 5 %S D S -P A G E 以收集包含纯度至少为9 5 %的U B N S 5 -1 . 2 蛋白的组分; 纯化蛋白的抗原特异性用蛋白质印迹分析得以确证。

实施例6 通过E L I S A (酶联免疫吸附试验) 方法用本发明单个K H C V 蛋白和重组蛋白检测H C V 抗体

用5 0 m M 硼酸钠缓冲液 (p H 9 . 0) 分别稀释K H C V C O R E 1 4 , K H C V 4 0 3 和K H C V N S 5 - 1 . 2 蛋白使其浓度为0 . 3 μ g / ml ; K H C V E 2 C 和K H C V E 1 蛋白以同样缓冲液稀释, 使其浓度分别为0 . 2 μ g / ml 和0 . 1 μ g / ml 。

稀释后蛋白质溶液按每孔2 0 0 μ l 加入微量滴定板孔内 (D y n a t e c h , I m m u l o n 1 型微量滴定板), 3 7 $^{\circ}$ C 孵育2 小时。

滴定板以含0 . 0 5 % (v / v) T w e e n - 2 0 的P B S (p H 7 . 0 , 此后称“洗涤液”) 洗涤一次。将含0 . 1 % (w / v) 明胶的P B S 按2 5 0 μ l / 孔加入滴定板, 3 7 $^{\circ}$ C 孵育1 小时以封闭剩余蛋白位点, 从而阻止非特异性反应的发生, 滴定板孔用洗涤液清洗两次, 每孔加入1 9 0 μ l 含0 . 2 5 % 明胶, 1 . 0 % (v / v) T r i t o n X - 1 0 0 , 1 m M E D T A 和0 . 0 2 % T h i m e r o s a l 的P B S , 然后加入1 0 μ l H C V 患者血清和正常血清, 轻轻混合数秒钟。

3 7 $^{\circ}$ C 孵育1 小时, 再以洗涤液清洗5 次, 每孔加入2 0 0 μ l 辣根过氧化物酶 (H R P) 标抗人I g G 抗体 (B i o - R a d C o m p a n y , R i c h m o n d , C A 9 4 8 0 4 , U . S . A , 0 . 1 m g 蛋白 / ml) , 此酶标抗体以含1 0 % 小牛血清 (v / v) , 1 % F i c o l l (S i g m a , v / v) 、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 和0 . 0 2 % T h i m e r

o s a l 的P B S 稀释成1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。

再37 °C孵育1 小时，以洗涤液清洗5 次。然后每孔加入200 μl 邻苯二胺二盐酸底物溶液。室温避光反应30 分钟。该底物溶液由邻苯二胺二盐酸片 (O P D 片, S i g m a) 以50 m M 柠檬酸盐缓冲液配成10 m g / m l , 用磷酸盐调p H 至5.5 。显色完毕以每孔50 μl 4 N 硫酸终止，每孔的OD 值由M u l t i s c a n t i t e r t e k (F l o w L a b) 在492 n m 波长下测得。

另外，由每毫升含250 n g K H C V C O R E 5 1 8 蛋白、125 n g K H C V N S 4 E 1 E 2 蛋白和125 n g K H C V N S 5 - 1 . 2 蛋白的50 m M 硼酸钠缓冲液 (p H 9 . 0) 的混合抗原溶液也重复了上述E L I S A 检测过程。

上述用单个K H C V 抗原及K H C V 混合抗原检测K H C V 抗体的结果见下表2 。

表2 以本发明K H C V 单抗原及混合抗原检测H C V 抗体

抗原样品	KHCV CORE14	KHCV 897	KHCV 403	KHCV NS5- 1.2	KHCV E1	KHCV E2	混合抗原
1	7.98	7.35	1.28	5.83	6.08	0.50	10.12
2	7.77	7.29	6.43	5.81	4.19	0.84	10.0
3	3.31	6.98	6.77	5.06	0.68	0.18	5.70
4	7.89	7.06	0.86	0.23	5.32	0.83	9.08
5	7.71	7.21	0.96	2.35	4.48	2.19	8.41
阳性对照	7.53	7.35	7.44	5.87	5.95	8.89	8.83
阴性对照	0.25	0.26	0.25	0.41	0.43	0.11	0.17

注：1、每一数字代表吸收/截断值

2、阳性对照：HIV(-)，HBV(-)，HCV(+)

阴性对照：HIV(-)，HBV(-)，HCV(-)

3、阳性及阴性对照血清样品由韩国红十字会血液中心提供。

上述试验的截断值 (c u t o f f) 按下述计算：

按上述诊断方法测试了以R I B A 诊断试剂盒 (O r t h o D i a g n o s t i c S y s t e m, U . S . A) 利用斑点免疫试验确认的509份H C V 阴性血清样品和76份H C V 阳性血清样品，其结果如下表3。

表3

	样品数	OD ₄₉₀ 平均值	标准偏差
阴性样品	509	0.098	0.095
阳性样品	76	1.791	0.809

按下列方程式校正截断值：

$$\text{截断值} = \text{阴性样品平均OD}_{490} + 3 \times \text{阴性样品OD}_{490} \text{的标准偏差}$$

据此，如果算出的截断值为0.383，通过阴性样品OD₄₉₀的分布校正，截断值可达到0.4。

从上表2可以看出，单抗原或混合抗原都可作为HCV抗体的诊断试剂，但是，混合抗原在区别阴性与阳性样品时更为敏感、严格。

实施例7 用含KHCV表位的单个重组蛋白与混合KHCV抗原检测KHCV抗体

KHCV E2E2蛋白和KHCV NS4E1E2蛋白分别以50 mM硼酸钠缓冲液 (pH9.0) 稀释成0.2 μg / ml；KHCV CORE518蛋白、KHCV NS4E1E2蛋白和NS5-1.2蛋白以50 mM硼酸盐缓冲液 (pH9.0) 配成每毫升分别含250 ng、125 ng、和125 ng的抗原溶液。稀释后的蛋白质溶液按每孔200 μl 加入微量滴定板 (Dynatech, Immulon 1 型微量滴定板)，重复实施例6 相同的反应过程，结果见表4：

表4：用混合抗原检测HCV 抗体

抗原样品	KHCV E1E2	KHCV NS4E1E2	混合抗原
1	0.222	0.233	0.180
2	7.834	8.10	8.301
3	4.554	7.067	8.14
4	0.255	0.233	0.190
5	0.573	7.700	7.470
6	0.255	0.300	0.217
7	0.478	0.700	0.640
8	0.446	0.533	0.314
9	0.032	0.067	0.090
10	0.510	0.433	0.303
11	0.478	0.460	0.467
12	0.350	0.667	0.737
13	7.548	7.900	8.755
14	7.675	8.133	8.502
15	0.573	0.060	0.294
16	0.669	0.567	0.377
17	0.414	0.433	0.257
18	0.382	0.460	0.304
阳性对照	7.197	7.510	8.065
阴性对照	0.280	0.250	0.193

注：1、每一数字代表吸收/ 截断值

2、阳性对照：HIV(-)，HBV(-)，HCV(+)

阴性对照：HIV(-)，HBV(-)，HCV(-)

从上表4 可以看出，K H C V N S 4 E 1 E 2 蛋白在检测丙型肝炎患者血清中K H C V 抗体时比K H C V E 1 E 2 蛋白更有效，而混合抗原比K H C V N S 4 E 1 E 2 还有效可能与其含有其它附加抗原有关。

另外，K H C V C O R E E P I，K H C V 5 1 8 和K H C V C O R E 5 1 8 蛋白分别以5 0 m M 硼酸钠缓冲液 (p H 9 . 0) 稀释成每毫升1 2 5 n g，按每孔2 0 0 μ l 加入微量滴定板 (D y n a t e c h，I m m u l o n 1 型微量滴定板)，用1 3 6 份丙型肝炎患者血清 (取自韩国汉城的H y u n d a i 中心医院) 重复实施例6 的反应步骤，其结果与P C R 法比较，见下表5：

表5

KHCV COREEPI	KHCV 518	KHCV CORE518	PCR
119(+)	83(+)	123(+)	123(+)
13(-)	11(-)	12(-)	13(-)

从上表5 可以看出，在用作诊断试剂时K H C V C O R E E P I 和K H C V 5 1 8 蛋白没有包含这两种蛋白表位的K H C V C O R E 5 1 8 敏感。

实施例8 本发明与现有技术诊断方法的比较

定期从输血后人HCV血清转化名簿中取得样品 (Serological Inc., 780 Park North Blvd, Clarkston, GA 30021, USA) 重复实施例6 的过程以检测样品中的HCV 抗体, 并与用Ortho 及Abbott 第一代HCV 诊断试剂盒诊断结果进行比较, 其结果见下表6 :

表6 血清转化样品中HCV抗体的检测

输血后 天数			HCV诊断试剂盒			确证试验
	ALT mU/ml	AST mU/ml	Ortho 第1代	Abbott 第1代	混合抗原	RIBAII
1	11	-	0.29	0.263	0.49	-
11	24	-	0.33	0.253	0.44	-
15	36	-	0.26	0.267	0.45	-
18	36	-	0.27	0.255	0.50	-
22	40	-	0.28	0.251	0.52	-
25	24	-	0.18	0.220	0.45	-
29	32	-	0.16	0.265	0.44	-
32	27	27	0.20	0.259	0.45	-
36	32	-	0.23	0.270	0.50	-
39	78	-	0.14	0.275	0.47	-
43	180	121	0.23	0.303	0.40	-
74	401	352	0.80	0.495	5.32	+
114	72	70	6.21	4.356	6.73	+
127	42	37	6.21	4.356	7.71	+
141	27	24	6.21	4.356	9.24	+
155	68	69	6.21	4.356	9.11	+
175	78	97	6.21	4.356	7.99	+
238	41	39	6.21	4.356	10.15	+
270	119	102	6.21	4.356	8.77	+
297	49	35	6.21	4.356	8.56	+
365	157	128	6.21	4.356	9.72	+
399	46	19	6.21	4.356	9.45	+

注 1、每一数字代表吸收/ 截断值。

2、丙氨酸转氨酶 (A L T) 和天冬氨酸转氨酶 (A S T) 的活性通常为0 ~5 0 mU / ml 。

3、O r t h o 第1 代H C V 诊断试剂盒购自O r t h o D i a g n o s t i c S y s t e m s , U . S . A .

4、A b b o t t 第1 代H C V 诊断试剂盒购自A b b o t t L a b . , U . S . A .

上述结果显示本发明的诊断试剂盒比其它第一代诊断试剂盒更早检测出H C V 抗体 (大约早5 -6 周) , 与R I B A II 试剂盒效果相似, 但是本发明所用的E L I S A 方法比R I B A II 试剂盒的斑点免疫试验更常规。

实施例9 诊断的准确性

为证实本发明诊断结果的准确性, 由O r t h o D i a g n o s t i c S y s t e m 制造与销售的丙型肝炎诊断试剂盒诊断为阳性的1 8 份血清样品, 按实施例7 步骤重新用本发明的试剂盒诊断, 并且以作为H C V 确证试验 (V a n d e r p o e l , C . L . e t a l . , L a n c e t 3 3 7 期, 3 1 7 -3 1 9 页, 1 9 9 1) 的O r t h o 第二代斑点免疫试剂盒 (O r t h o D i a g n o s t i c S y s t e m s , U . S . A . , 产品编号9 3 3 4 9 1) 依厂家说明进行诊断, 其结果列于表7 , 可以看出, 本发明的丙型肝炎诊断试剂盒假阳性错误率比O r t h o 诊断试剂盒低。

表7 本发明的诊断结果与Ortho 第二代诊断试剂盒的比较

样品	Ortho第2代重组免疫印迹试剂盒的抗原						本发明 混合抗原
	5-1-1	C100-3	C33C	C22-3	SOD	判断	
1	+/-	+/-	-	-	-	-	0.180
2	+4	+4	+4	+4	-	+	8.301
3	+1	+4	+4	+4	-	+	8.141
4	-	-	-	-	-	-	0.190
5	+1	+4	+4	+4	-	+	7.470
6	-	-	-	-	-	-	0.217
7	-	-	-	-	-	-	0.640
8	-	-	-	-	-	-	0.314
9	-	-	-	-	-	-	0.090
10	-	-	-	-	-	-	0.303
11	-	-	-	-	-	-	0.467
12	-	-	-	-	-	-	0.737
13	+2	+1	+3	+4	-	+	8.755
14	+/-	+/-	+4	+4	-	+	8.502
15	-	-	-	-	-	-	0.294
16	-	-	-	-	-	-	0.377
17	-	-	-	-	-	-	0.257
18	-	+/-	-	-	-	-	0.304

注：如果在样品中发现除S O D 对照抗原外多于1 个抗原，至少两个抗原者，定为阳性。

实施例10 诊断试剂盒的特异性

为了证实本发明诊断试剂的特异性和敏感性，被L u c k y I (L u c k y 有限公司的诊断试剂盒，韩国专利公开第9 3 -6 8 3 号)、A b b o t t 第二代诊断试剂盒 (A b b o t t II) 和U B I (U B I 公司，U . S) 诊断为丙型肝炎阳性的9 4 份血清样品，由本发明诊断试剂盒按实施例7 方法重新诊断，结果列于表8 。

从表8 可以看出，所有的诊断试剂盒的敏感性相似，但是本发明的试剂盒 (L u c k y II) 比其它诊断试剂盒更具特异性。

表8

确证试验 (RIBA II)		Abbott II	UBI	Lucky I	Lucky II
阳性 51	+	49	50	48	49
	-	2	1	3	2
未定 8	+	6	4	5	2
	-	2	4	3	6
阴性 35	+	6	19	10	2
	-	29	16	25	33

* 由R I B A II 确证试验结果为真阳性、真阴性或假阳性、假阴性。

另外，随机选出由上述四种试剂盒 (A b b o t t II, U B I , L u c k y I , L u c k y II) 的任意一

种诊断为阴性的278份血清样品，计算其平均吸收值 (OD_{490})；同样选择以Lucky I、或Abbott II或UBI诊断为阳性的94份血清样品，计算其平均吸收值。

阳性样品的平均吸收值和阴性样品的平均吸收值分别除以平均截断值，以获得阳性样品与阴性样品的平均信号/截断值 (S/C)，结果列于下表9，从表9可以看出，Lucky II、UBI的阳性样品与阴性样品的 S/C 值差异最大，表示它们比其它诊断试剂盒显示的信号清晰；然而，UBI的 S/C 高并不明显，因为它在某种程度上依赖低的截断值，从而可能出现较高的假阳性率。

表9

	Abbott II	UBI	Lucky I	Lucky II
阳性样品平均吸收值	1.805	1.366	1.344	2.053
阴性样品平均吸收值	0.096	0.021	0.058	0.037
截断值	0.52	0.25	0.44	0.42
阳性样品 S/C	3.471	5.464	3.055	4.888
阴性样品 S/C	0.185	0.084	0.132	0.088

尽管本发明已结合上述具体实施方案加以描述，但应理解的是对于本发明所作出的各种改进和变化对本领域人员来说是显而易见的，并也包含在所附权利要求书限定的范围内。

图 1

KHCV COREEPI

```

      30      60
ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAACCAACCAACCAACCGCCGCCACAG
MetSerThrAsnProLysProGlnArgLysThrLysArgAsnThrAsnArgArgProGln

      90      120
GATATTAAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTACTTGTTGCCGCCAGG
AspIleLysPheProGlyGlyGlyGlnIleValGlyValTyrLeuLeuProArgArg

      150      180
GGCCCCAGGTGGGTGTGCGCGGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCGCAACCTCGTGGA
GlyProArgLeuGlyValArgAlaThrArgLysThrSerGluArgSerGlnProArgGly

      210      240
AGGCGACAGCCTATCCCCAAGGCTCGCCGCCCGAGGCGAGGCGCTGGGCTCAGCCCGGG
ArgArgGlnProIleProLysAlaArgArgProGluGlyArgAlaTrpAlaGlnProGly

      270      300
TACCCTTGCCCCCTCTATGGCAATGAGGCTTGGGTGGGCGAGGATGGCTCCTGTACCCC
TyrProTrpProLeuTyrGlyAsnGluGlyLeuGlyTrpAlaGlyTrpLeuLeuSerPro

CGCGGC
ArgGly

```

图1 (续)

KHCV 518

```

1  ATCACACAGGTGCCCTATCACATACTCCACCTATGGCAAGTTCCCTTGCCGACGGTGGC
   IleThrThrGlyAlaProIleThrTyrSerThrTyrGlyLysPheLeuAlaAspGlyGly

61  GGCTCCGGGGCCCTATGACATCATATGTGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACT
   GlySerGlyGlyAlaTyrAspIleIleMetCysAspGluCysHisSerThrAspSerThr

121  ACCATTATGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTCGTG
   ThrIleTyrGlyIleGlyThrValLeuAspGlnAlaGluThrAlaGlyAlaArgLeuVal

181  GTGCTCTCCACCGCTACGCCCTCCGGGATCGGTCACCGTGCCACACCTCAATATCGAGGAG
   ValLeuSerThrAlaThrProProGlySerValThrValProHisLeuAsnIleGluGlu

241  GTGGCCCTGTCTAATACTCGAGAGATCCCCCTTCTACGGCAAAGCCATTCCCATCGAGGCT
   ValAlaLeuSerAsnThrGlyGluIleProPheTyrGlyLysAlaIleProIleGluAla

301  ATCAAGGGGGGAAGCATCTCATTTTCTGCCATTCCAAGAAAGAGTGACGAACTCGCC
   IleLysGlyGlyArgHisLeuIlePheCysHisSerLysLysCysAspGluLeuAla

361  GCAAAGCTGTCAGGCCTCGGACTCAATGCCGTAGCGTATTACCGGGTCTTGACGTGTCC
   AlaLysLeuSerGlyLeuGlyLeuAsnAlaValAlaTyrTyrArgGlyLeuAspValSer

421  GTCATACCGACCGGAGACGTTGTTGTCGTGGCGACGGACGCTCTAATGACGGGCTTT
   ValIleProThrSerGlyAspValValValAlaThrAspAlaLeuMetThrGlyPhe

481  ACCGGCGACTTTGACTCAGTCGACTGTAAATACGTGT
   ThrGlyAspPheAspSerValIleAspCysAsnThrCys

```

图2

KHCV NS4E

1 ATCATCCCCGATAGGGAAGTTCTCTACCAGGAGTTCGACGAGATGGAGGAGTGTCCTCA
 IleIleProAspArgGluValLeuTyrGlnGluPheAspGluMetGluGluCysAlaSer
 61 CACCTCCCTTACTTCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCCGAGCAATTCAAACAGAGCGCTC
 HisLeuProTyrPheGluGlnGlyMetGlnLeuAlaGluGlnPheLysGlnLysAlaLeu
 121 GGGTTG
 GlyLeu

KHCV E1G

1 GTTCCCAGCTGTTACCTTTTCGCCCTCGCCGGCATGAGACGGTACAGGACTGCAACTGC
 ValSerGlnLeuPheThrPheSerProArgArgHisGluThrValGlnAspCysAsnCys
 61 TCAATCTATCCCGCCGGTATCAGGTCACCCGCATGGCCTGGGATATGATGAACTGG
 SerIleTyrProGlyArgValSerGlyHisArgMetAlaTrpAspMetMetMetAsnTrp
 121 TCGCCTACAAACAGCCCTAGTGGTATCGCAGCTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGAC
 SerProThrThrAlaLeuValValSerGlnLeuLeuArgIleProGlnAlaValValAsp
 181 ATGGTGACAGGTCCCACCTGGGGAATCCTGGCGGCCCTTGCCCTACTATTCCATGGTGGG
 MetValThrGlySerHisTrpGlyIleLeuAlaGlyLeuAlaTyrTyrSerMetValGly
 241 AACTGGGCTAAGGTCTTAATTGCCGATGCTACTCTTTCGCCGGCTTGACGGAACCAACCCAC
 AsnTrpAlaLysValLeuIleAlaMetLeuLeuPheAlaGlyValAspGlyThrThrHis
 301 GTGACAGGG
 ValThrGly

图2 (续)

KHCV E2A

1 GGGCGCAAGTCGGGCGCTAGCTCGCTAACGTCCCTCTTAGCCCTGGGCGGTTTCAG
GlyAlaGlnGlyArgAlaAlaSerSerLeuThrSerLeuPheSerProGlyProValGln
61 CACCTCCAGCTCATAAACACCAACGGCAGCTGGCATATCAACAGACCGCCCTGAGCTGC
HisLeuGlnLeuIleAsnThrAsnGlySerTrpHisIleAsnArgThrAlaLeuSerCys
121 AATGACTCCCTCAACACTGGGTTTGTGGCCGCTGTTCTACAAATACAGGTTCAACGCG
AsnAspSerLeuAsnThrGlyPheValAlaAlaLeuPheTyrLysTyrArgPheAsnAla
181 TCCGGGTGCCCCGAGCGCTTGGCCACGTGGCCGCCCATTCATACATTCGCGCAGGGGTGG
SerGlyCysProGluArgLeuAlaThrCysArgProIleAspThrPheAlaGlnGlyTrp

KHCV E2E

1 ACTCGGGAGAGCGTTGTACCTGGAGGACAGGATAGGTCAGAGCTAGCCCGCTGCTG
ThrArgGlyGluArgCysAspLeuGluAspArgAspArgSerGluLeuSerProLeuLeu
61 CTGTCTACAACAGAGTGGCAGGTACTGCCCTGTTCCTTCACAACCCCTACCGGCTCTGTCC
LeuSerThrThrGluTrpGlnValLeuProCysSerPheThrThrLeuProAlaLeuSer
121 ACTGGTTTGATTCATCTCCATCAGAACATCGTGGACATACAAATACCTGTACGGTATAGGG
ThrGlyLeuIleHisLeuHisGlnAsnIleValAspIleGlnTyrLeuTyrGlyIleGly
181 TCGGCGGTGTCTCCTTTCGGATCAAATGGAGTATATTGTGCTGCTCTTCTTCTTCTG
SerAlaValValSerPheAlaIleLysTrpGluTyrIleValLeuLeuPheLeuLeuLeu
241 GCGGACGCG
AlaAspAla

1 ACGGGCATGACCACTGACAAAGTGTCCATGCCAGGTTCCGGCCCCCGAATCTTC
ThrGlyMetThrThrAspAsnValLysCysProCysGlnValProAlaProGluPhePhe
61 ACGAGGTGGATGGAGTCCGGTTGCCACAGGTACGCTCCGGCGTGACACCTCTCCTACGG
ThrGluValAspGlyValArgLeuHisArgTyrAlaProAlaCysArgProLeuLeuArg
121 GAGAGGTCGTATTCAGGTCGGGCTCCACCAGTACCTGGTCGGGTACAGCTCCCATGC
GluGluValValPheGlnValGlyLeuHisGlnTyrLeuValGlySerGlnLeuProCys
181 GAGCCCGAACCGATGACAGTGTCTCACTTCCATGCTCACTGACCCCTCCACATTACA
GluProGluProAspValAlaValLeuThrSerMetLeuThrAspProSerHisIleThr
241 GCAGACACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGTCTCCCCCTCCTTGCCAGCTCTTCA
AlaGluThrAlaLysArgArgLeuAlaArgGlySerProProSerLeuAlaSerSerSer
301 GCTAGCCAGTTGCTGCGCCTTCCCTTGAAGCGACATGCCACTACCATCATGACTCCCCG
AlaSerGlnLeuSerAlaProSerLeuLysAlaThrCysThrThrHisHisAspSerPro
361 GACGCTGACCTCATTTAGGCCAACCTCTTGTGGCGGCAAGAGATGGGGGGAACATCACC
AspAlaAspLeuIleGluAlaAsnLeuLeuTrpArgGlnGluMetGlyGlyAsnIleThr
421 CCGGTGGAGTCAGAGAATAAGGTGGTAATCCTGGACTCTTTTCGACCCGCTCCGAGCGGAG
ArgValGluSerGluAsnLysValValIleLeuAspSerPheAspProLeuArgAlaGlu
481 GATGATGAGGGGAAATATCCGTTCCGGCGGAGATCCTCGGAAATCCAGGAAATCCCC
AspAspGluGlyGluIleSerValProAlaGluIleLeuArgLysSerArgLysPhePro
541 CCAGCGTCCCCATATGGGCGCGCGGATTACAACCCCTCCGCTGCTAGAGTCTGGAAG
ProAlaLeuProIleTrpAlaProProAspTyrAsnProProLeuLeuGluSerTrpLys

图 3 (续)

601 GACCCGGACTACGTTCCGTTCCGGTACACGGTGCCCGTTGCCGCCACCAAGGCCCT
 AspProAspTyrValProProValValHisGlyCysProLeuProProThrLysAlaPro
 661 CCAATACCACCTCCACGGAGGACGGTTGTCTGACAGAAATCCACCGTGTCTTCT
 ProIleProProProArgArgLysArgThrValValLeuThrGluSerThrValSerSer
 721 GCCTTGGCGGAGCTCGCTACTAAGACCTTCGGCAGCTCCGGATCGTCCGCCATCGACAGC
 AlaLeuAlaGluLeuAlaThrLysThrPheGlySerSerGlySerAlaIleAspSer
 781 GGTACGGCGACCGCCCTCCTGACCAAGCCTCCGGTGACGGCGACAGAGTCCGACGTT
 GlyThrAlaThrAlaProProAspGlnAlaSerGlyAspGlyAspArgGluSerAspVal
 841 GAGTCGTTCTCCTCCATGCCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGACCCGATCTCAGCGAC
 GluSerPheSerSerMetProProLeuGluGlyGluProGlyAspProAspLeuSerAsp
 901 GGATCTTGGTCCACCGTGAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCTGTCTGTTCGATGTCC
 GlySerTrpSerThrValSerGluGluAlaSerGluAspValValCysCysSerMetSer
 961 TACACATGGACAGGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTTGCCCATC
 TyrThrTrpThrGlyAlaLeuIleThrProCysAlaAlaGluGluSerLysLeuProIle
 1021 AACCCGTTGACAAATTTCTTCTACGTCACCACCAACATGGTCTATGCTACAACATCCCGC
 AsnProLeuSerAsnSerLeuLeuArgHisHisAsnMetValTyrAlaThrThrSerArg
 1081 AGCGCAGGCTGCGGCAGAGAAGGTACACCTTTGACAGACTGCAAGTCTTGACGACCCAC
 SerAlaGlyLeuArgGlnLysLysValThrPheAspArgLeuGlnValLeuAspAspHis
 1141 TACCCGGACGTGCTTAAGGAGATGAAGCGGAAGCGG
 TyrArgAspValLeuLysGluMetLysAlaLysAla

图 4

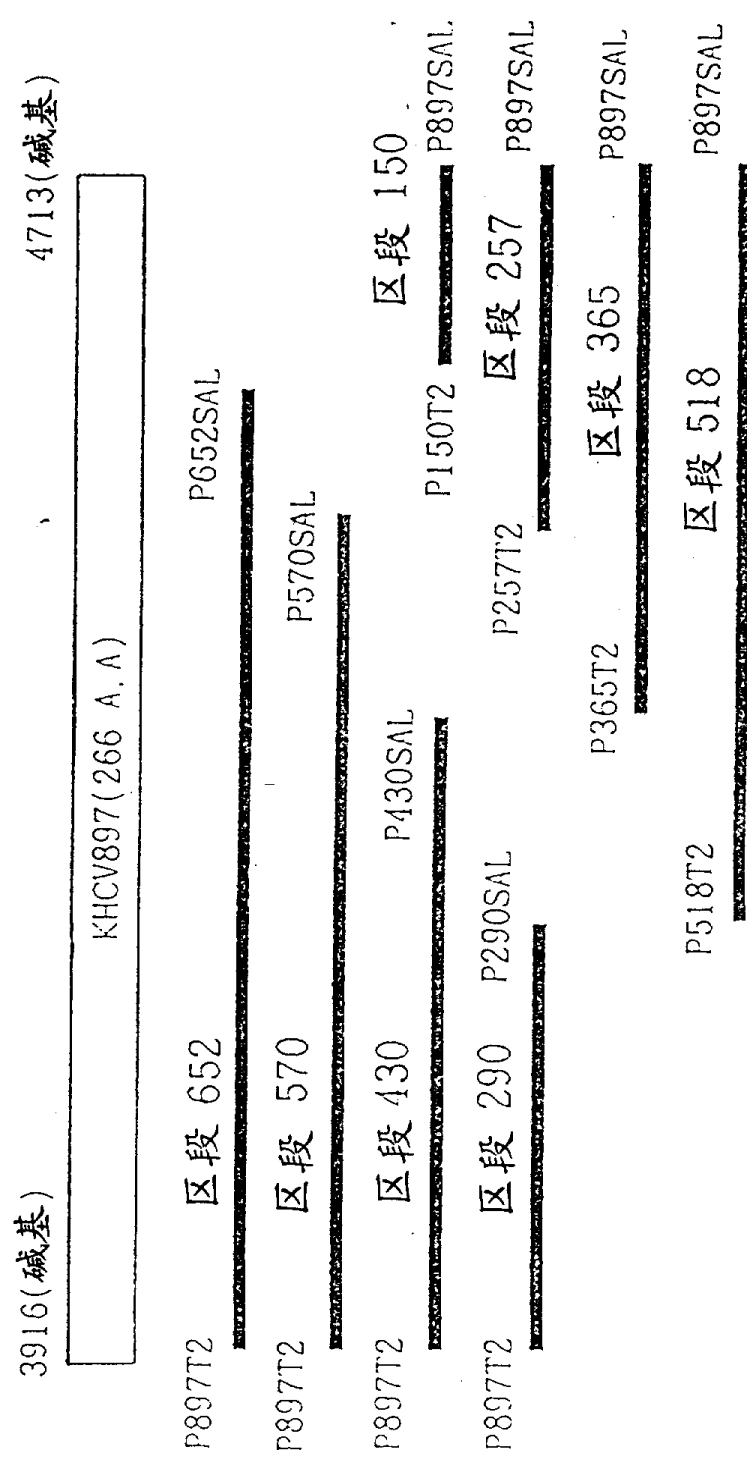


图 5

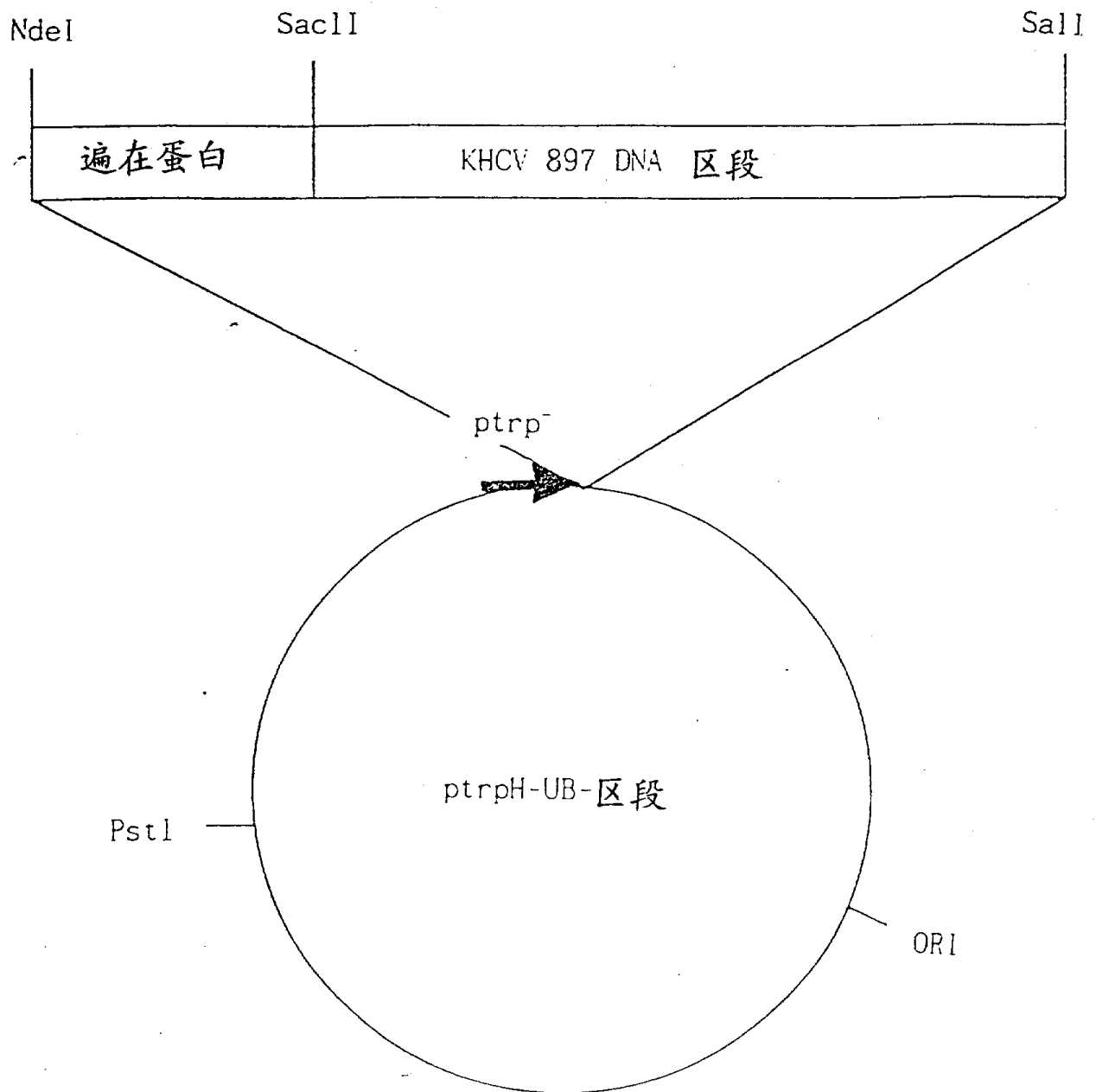


图 6

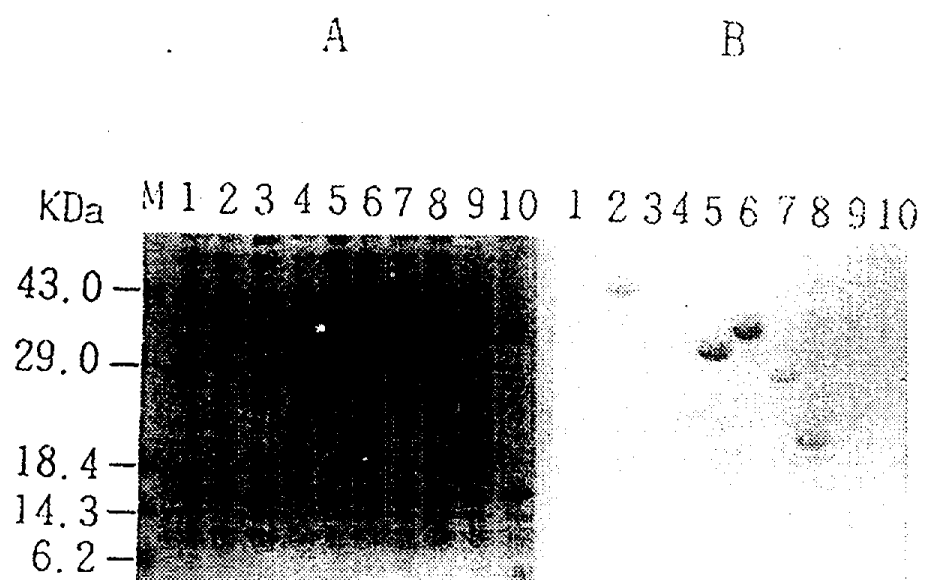


图 7

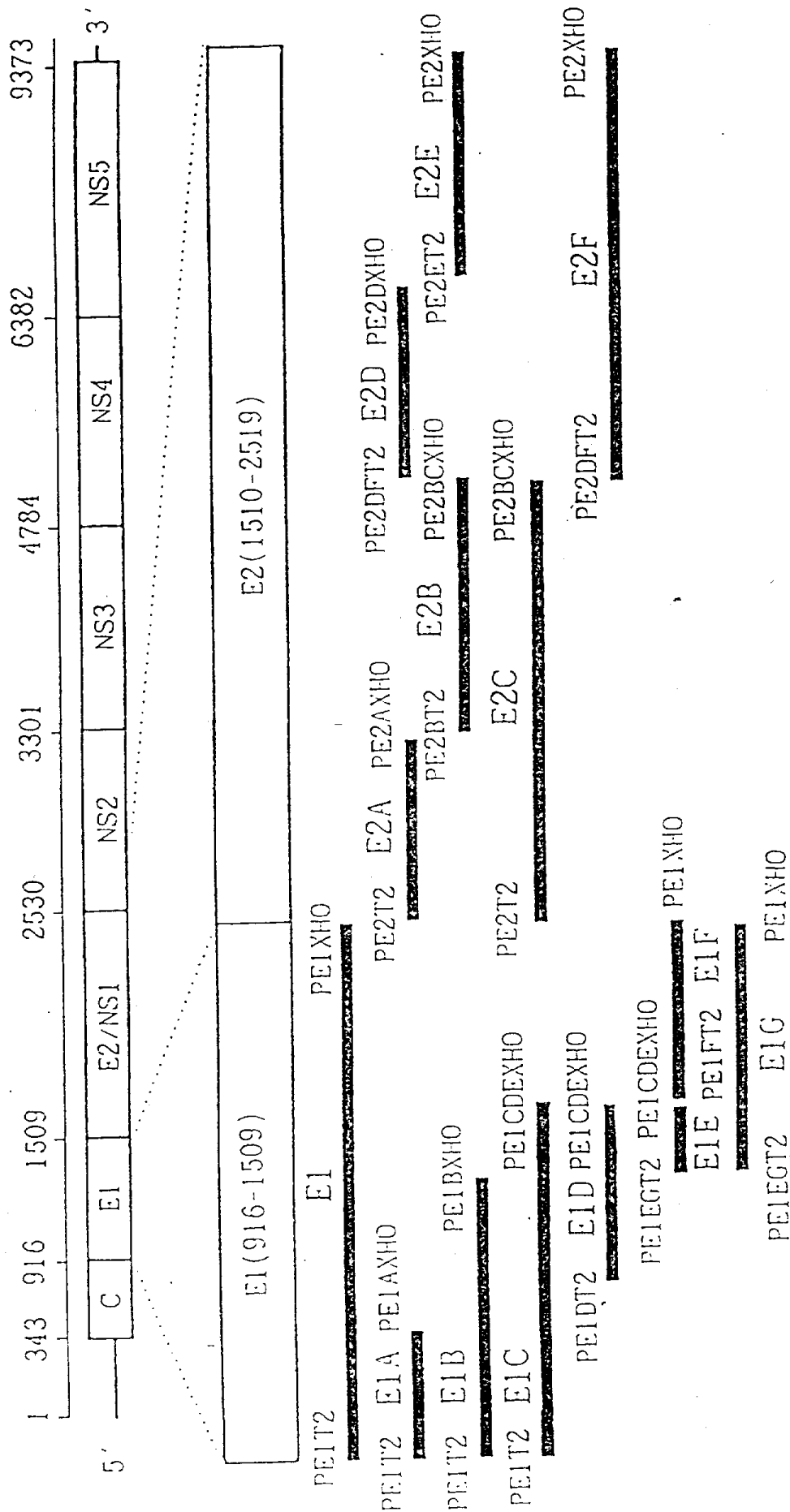


图 8

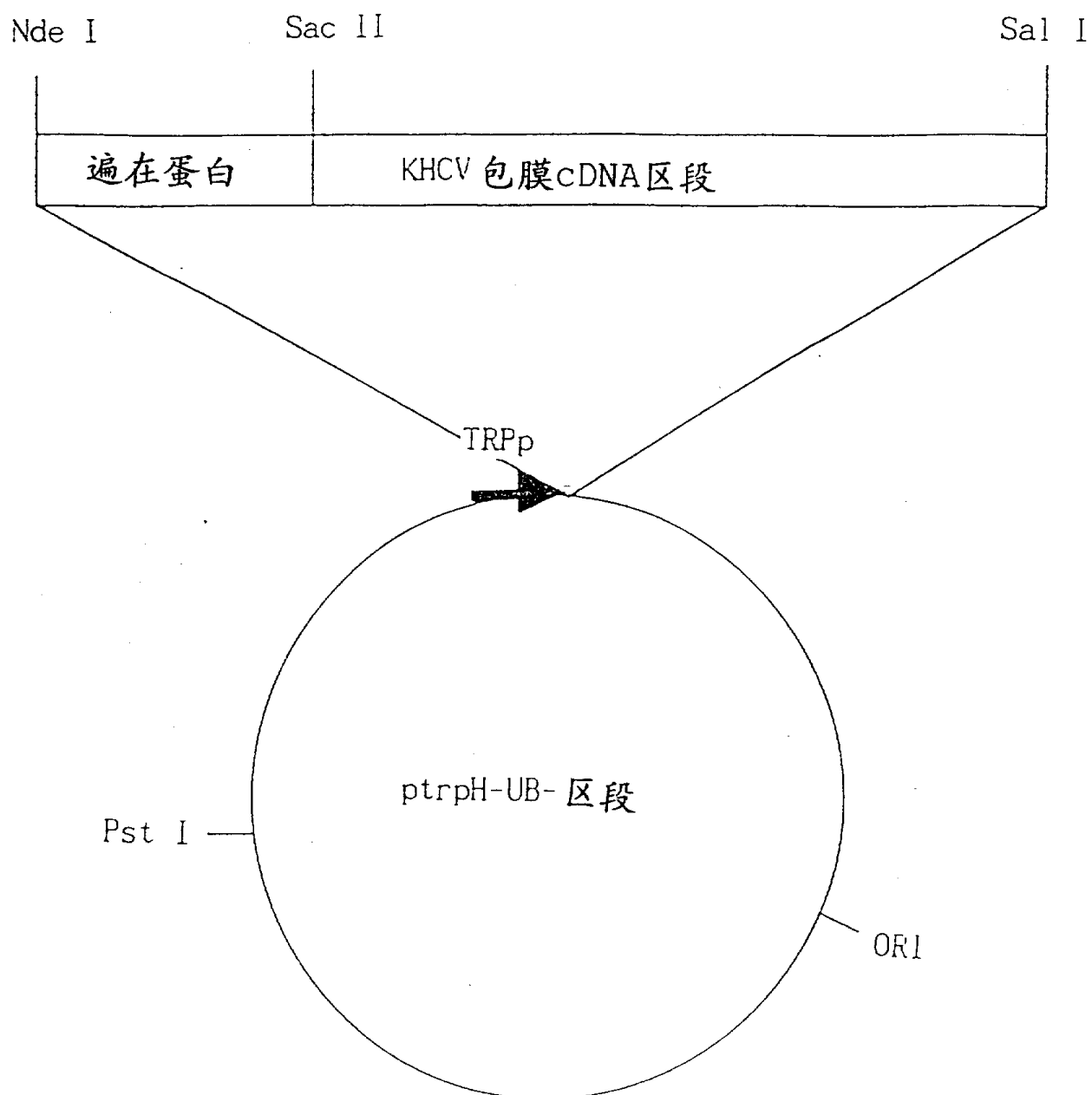
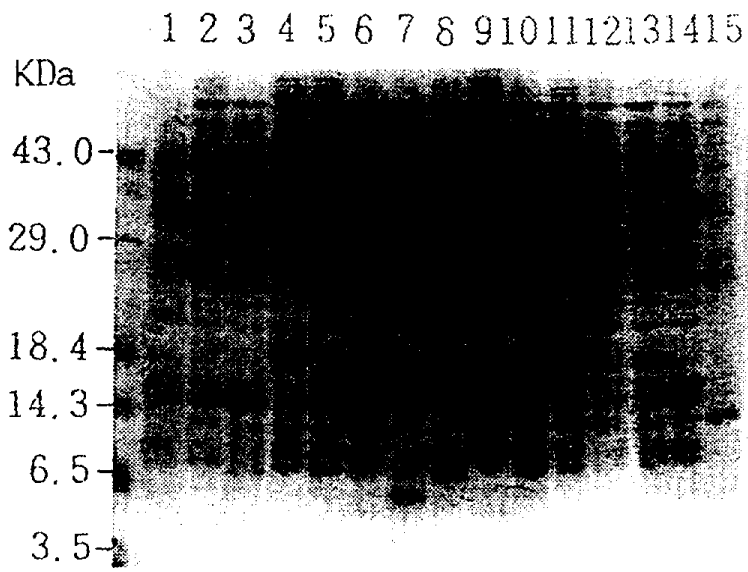


图 9

A



B

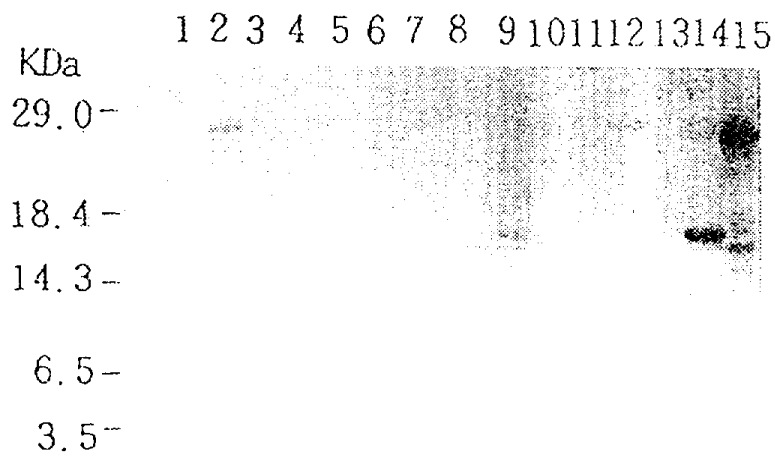


图 10

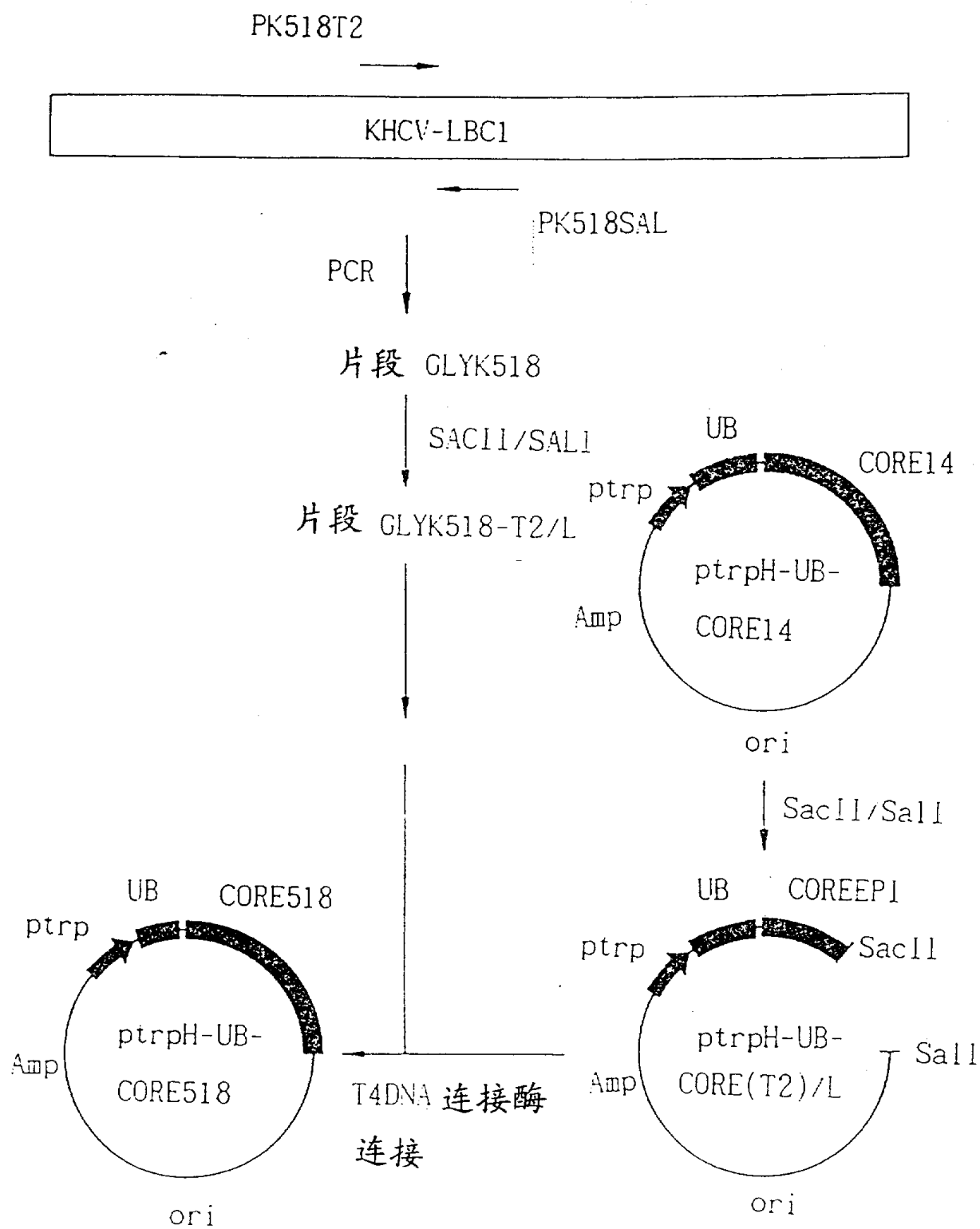


图 11

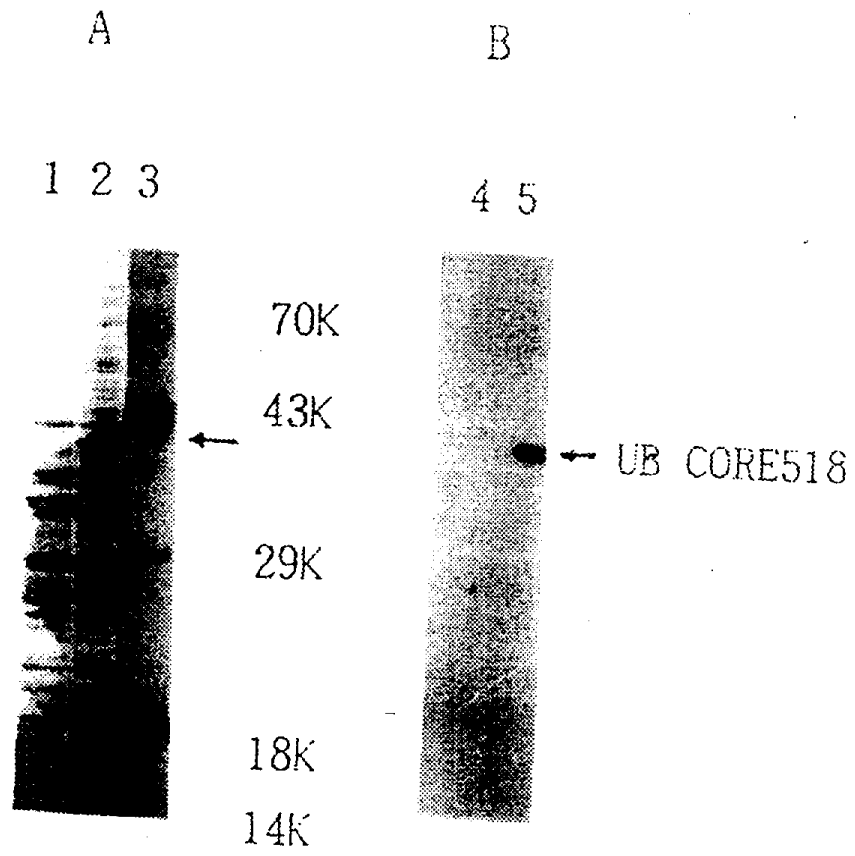


图 12

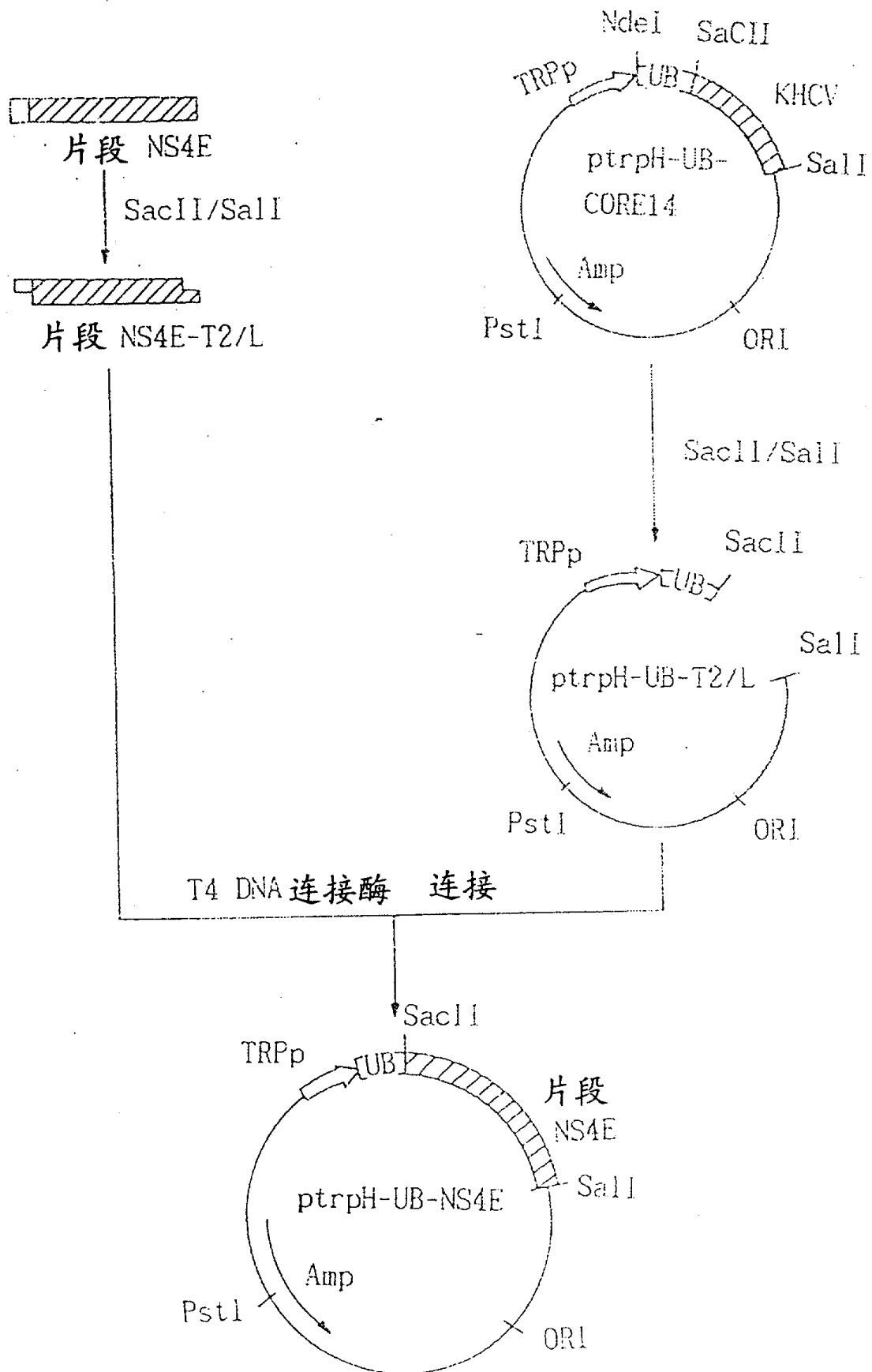


图 13

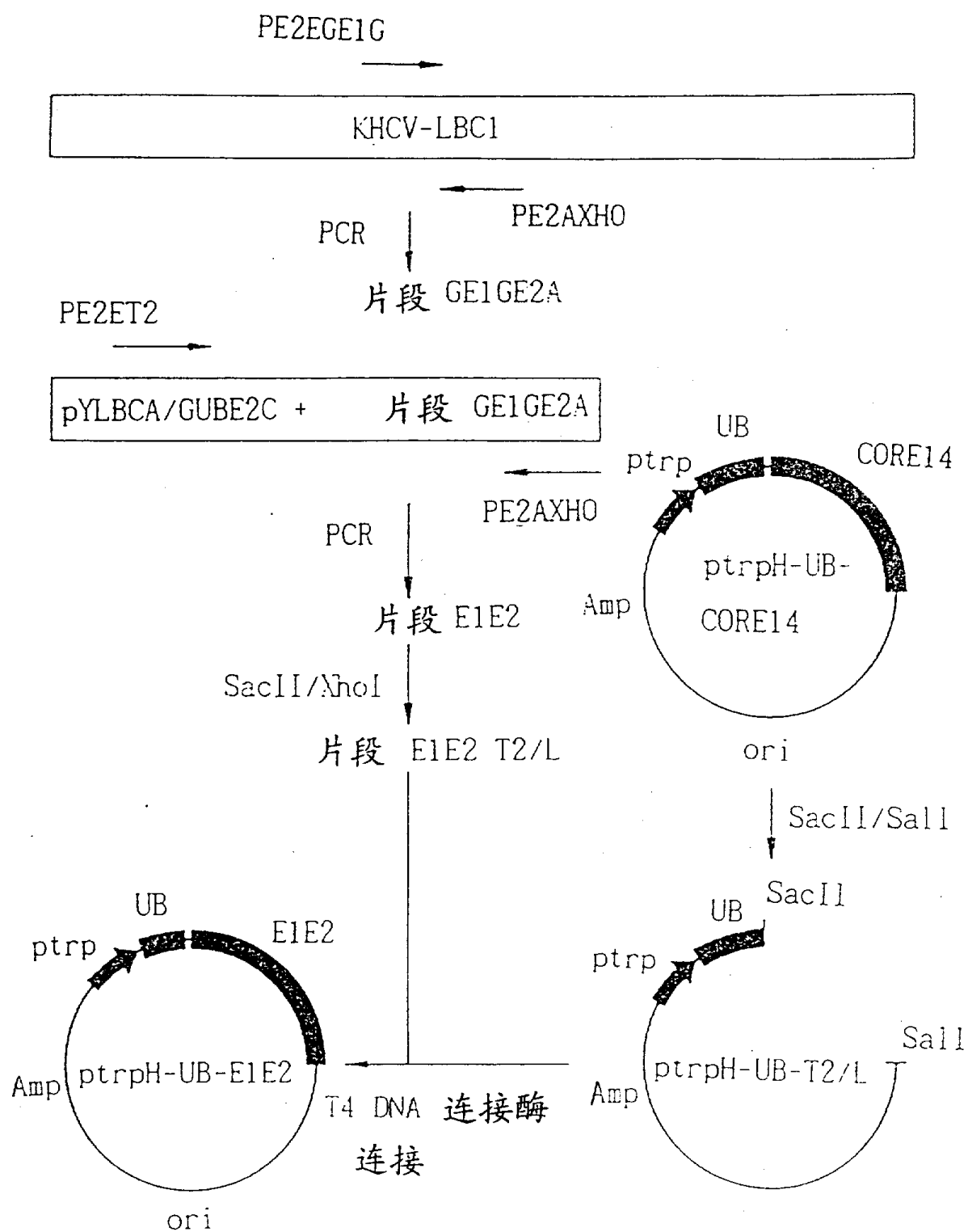


图 14

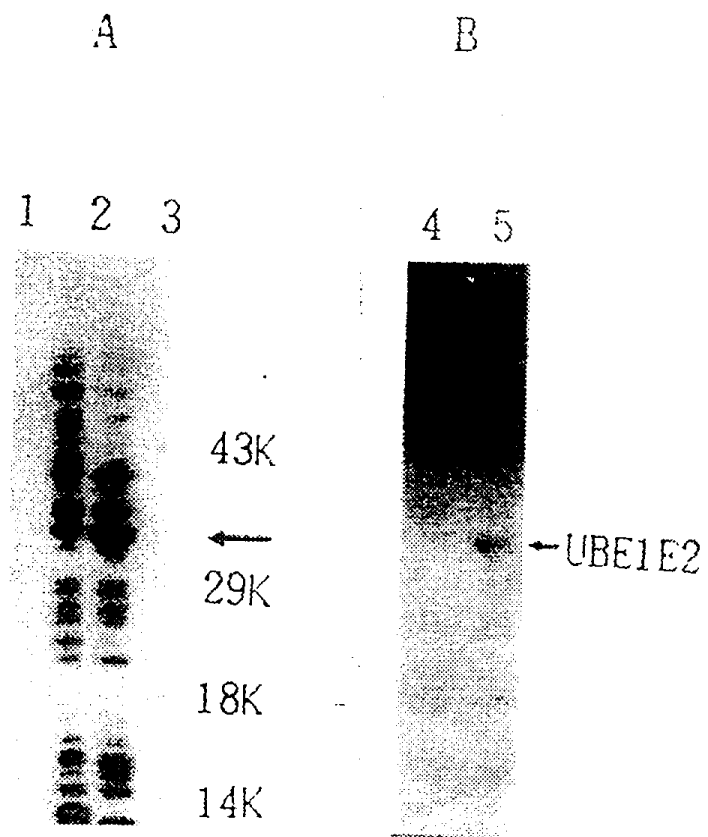


图 15

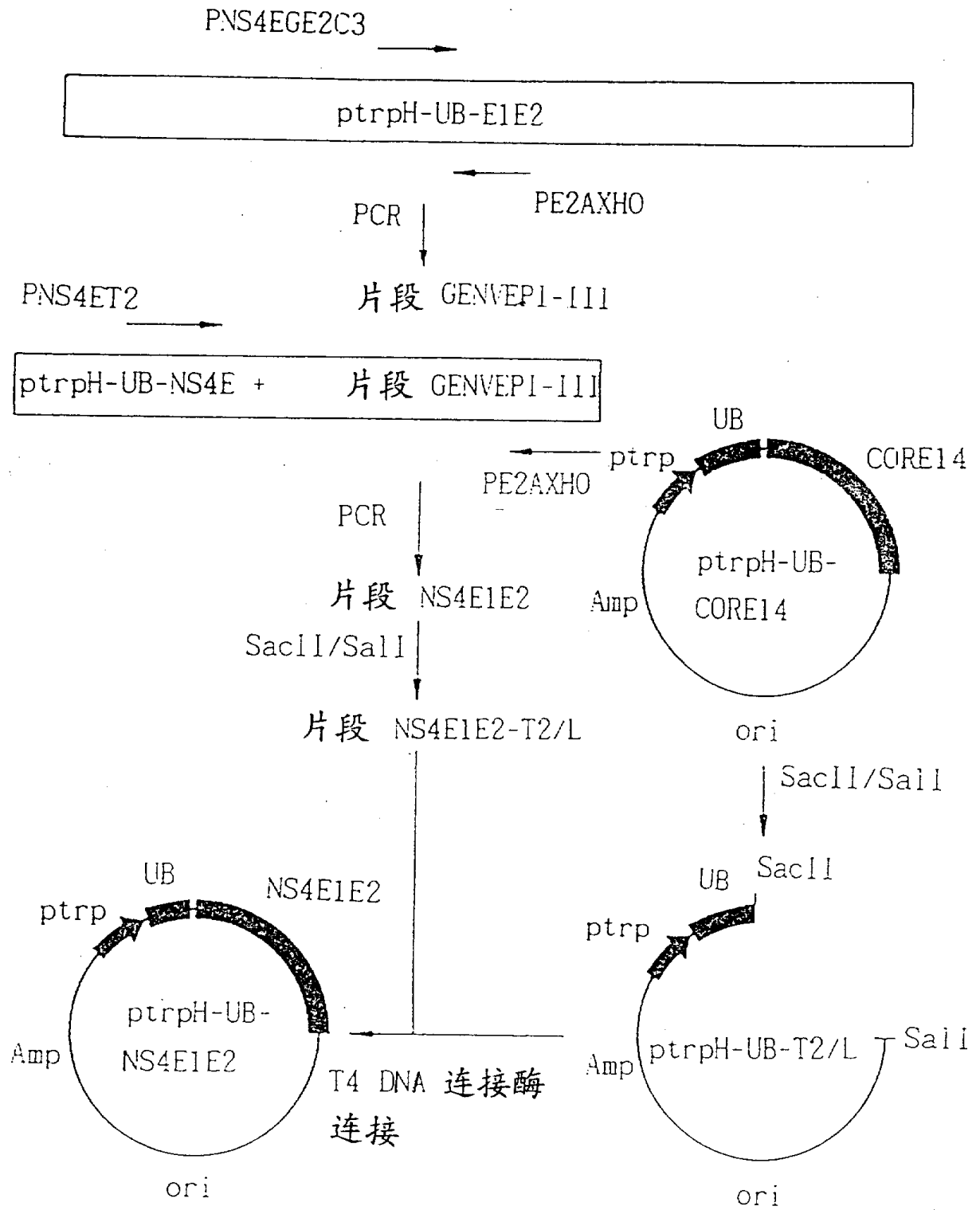


图 16

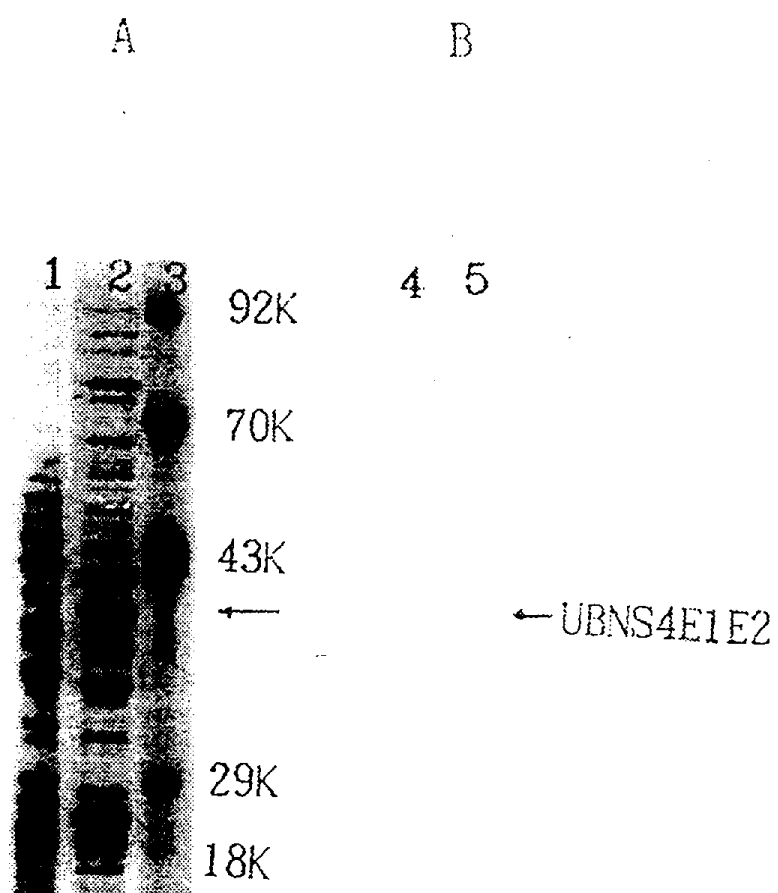


图 17

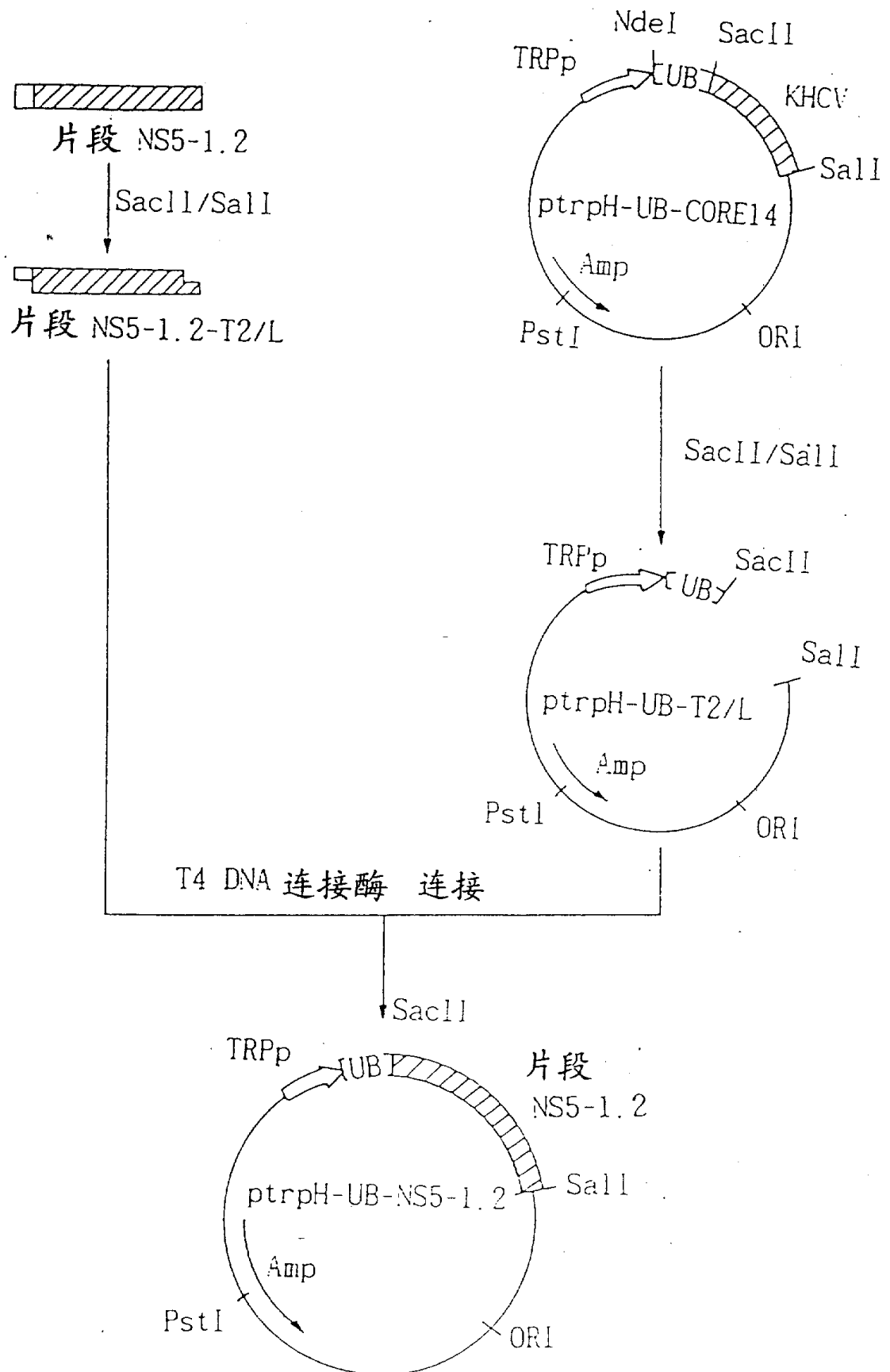


图 18

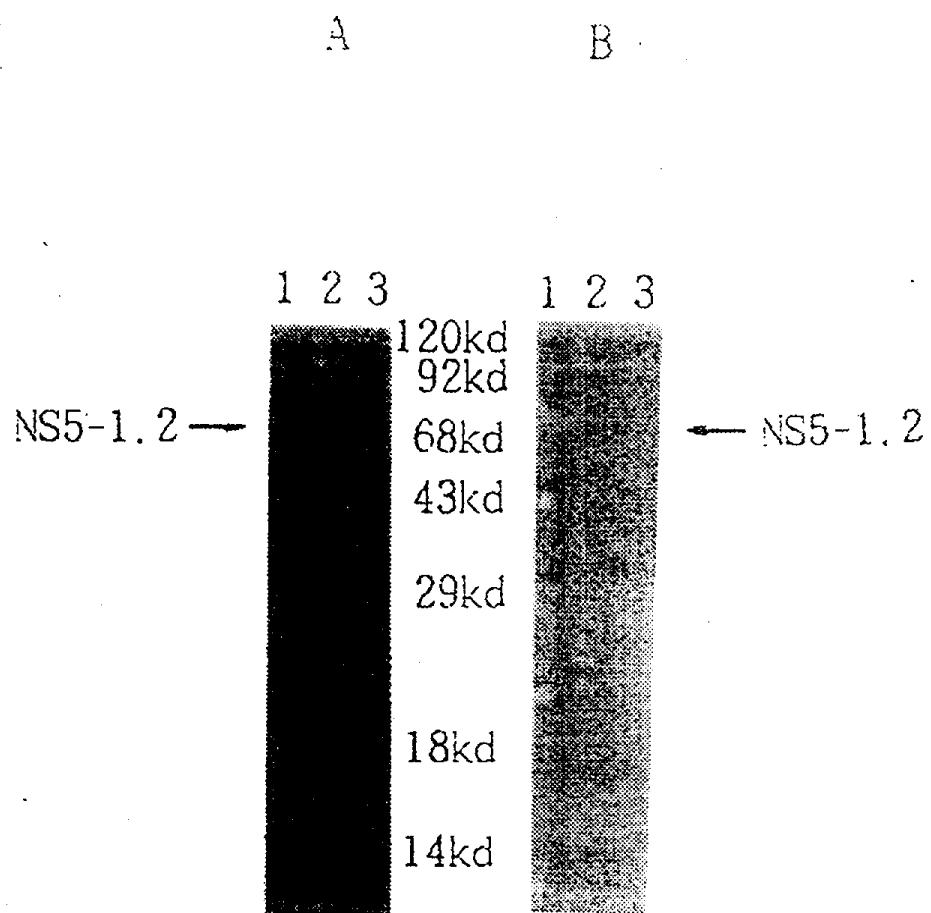


图 19

