

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2003年5月15日(15.05.2003)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/040356 A1

- (51) 国际分类号: C12N 7/01
- (21) 国际申请号: PCT/CN02/00536
- (22) 国际申请日: 2002年8月5日(05.08.2002)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
CN01124001.6 2001年8月6日(06.08.2001) CN
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 杨凌岱鹰生物工程股份有限公司(YANGLING DAIYING BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD) [CN/CN]; 中国陕西省杨凌示范区纬一路16号创业大厦北三楼, Shanxi 712100 (CN).
- (72) 发明人;及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 唐恒立(TANG, Hengli) [CN/CN]; 楚雍烈(CHU, Yonglie) [CN/CN]; 张树林(ZHANG, Shulin) [CN/CN]; 郭文侠(GUO, Wenxia) [CN/CN]; 中国陕西省杨凌示范区纬一路16号创业大厦北三楼, Shanxi 712100 (CN).
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN).
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 根据细则4.17的声明:
— 关于申请人在国际申请日有权要求该在先申请的优先权(细则4.17(iii))对除美国以外的所有指定国
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE INTACT HEPATITIS C VIRUS AND THE METHOD FOR CULTURING IT IN A VITRO CELL CULTURE

(54) 发明名称: 丙型肝炎全病毒及其体外细胞培养方法

(57) Abstract: An in vitro system for culturing whole virus has been established using molecular biology and gene recombinant technology, the intact HCV proliferating virus can be produced by the system. The whole genome containing 98 nucleotide behind 3' PolyA can be amplified from the serum of the patient of HEPATITIS C in the system. The method comprises: the NS5A and NA5B of the HCV genome are site-directed mutated; the expressing cassette of mark gene IRES-GFP is inserted in the NSSB 3' end of mutant HCV genome; cell is transfected with it; the progeny HCV virus of infective activity is obtained by culture.

(57) 摘要

本发明是运用分子生物学和基因重组技术建立一种可培养出完整的 HCV 增殖病毒的丙型肝炎全病毒体外培养系统。它是从丙型肝炎患者血清中扩增包括 3' PolyA 后边 98 个核苷酸的全长基因组; 对 HCV 基因组中的 NS5A 和 NS5B 进行人工定点突变; 在突变后的 HCV 基因组中的 NS5B 3' 末端插入标志基因 IRES-GFP 表达盒; 转染敏感细胞, 经培养获得有感染活性的 HCV 子代病毒。



WO 03/040356 A1

丙型肝炎全病毒及其体外细胞培养方法

技术领域

本发明涉及运用分子生物学和基因重组技术，构建完整的、经过适宜突变的丙型肝炎病毒（HCV）基因组，经转染敏感细胞，建立丙型肝炎全病毒体外培养系统。

背景技术

人类丙型肝炎是由丙型肝炎病毒（以下称 HCV）引起的传染性疾病。HCV 感染易感者后，不仅可引起急性感染，而且更易形成慢性感染，导致肝维化、肝硬化，甚至肝癌的发生，严重危害人类健康。更为重要的是由于目前缺乏有效的防治措施，HCV 感染仍在世界流行。据不完全统计，全世界约 1 亿 7 千万人感染 HCV，而且每年还增加数百万感染者。我国也有近 2.5% 人口（约 3 千万）受到感染，属 HCV 感染的高发区，是我国重点防治的人类疾病，也是研究的热点。

HCV、乙肝病毒（HBV）和艾滋病毒（HIV）并列为三个最危险的血液传播病毒。1978 年人们就认识到在甲型、乙型肝炎病毒以外，存在一种新的致肝炎病原因子，但用常规方法不能分离培养成功，也未能鉴定出新病原的存在。直到 1989 年 Choo 等运用分子生物学技术克隆到该病原的 cDNA，依据其基因组结构和核酸序列，将其划归黄病毒科，定名丙型肝炎病毒。丙型肝炎病毒的发现，是现代分子生物学技术在病原体研究中的巨大成功，但 HCV 是第一个没有经人工分离培养而又没有看到病毒颗粒条件下被确认的人类病毒。当前，人们能直接得到并用于分析和研究的只有 HCV 基因组，其分子生物学和 HCV 其他许多特性均基于 HCV 基因组分析和推测出来。

HCV 的基因组是一单股正链 RNA 分子，全长约 9400 多个核苷酸，只有一个读码框架，可编码 3000 多个氨基酸的前体多肽，在基因组 5' 和 3' 端各有一段非编码序列（UTR 或 NTR），由于 HCV 基因组易变异，依据基因序列 HCV 可分为 6 个基因型别和至少 30 个基因亚型。HCV 基因组编码的前体功能蛋白在确点位点酶解后，形成近 10 种功能性多肽，分别为 C、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 等。5' UTR 区与病毒的复制、转录和调控有关，其序列高度保守。3' UTR 区与病毒的复制和装配关系密切，但值得提出的是，目前在 GenBank 中的 HCV 基因组序列中 3' 末端一般在 polyA 为止，研究者在构建 HCV 基因组 cDNA 时，都没有考虑到后边的 98 个保守的核苷酸序列。本申请人认为，这是以往不能成功培养出 HCV 全病毒的原因之一。

HCV 在感染者体内的肝脏中寄生，患者血中病毒含量低，病毒抗原量很少，并且至今

没能建立起 HCV 病毒体外培养系统, 未能得到完整的 HCV 全病毒, 而使得对 HCV 生物学特性、免疫学特性、致病性、诊断与防治研究进展缓慢, 成为制约 HCV 研究的瓶颈, 也是国内外学者研究的热点和重要课题。

据本申请人所知, 以往建立 HCV 体外培养系统, 首先是选择敏感的传代细胞株或用原代肝细胞作为分离 HCV 的细胞, 然后用含有高滴度 HCV 的病人血清直接分离培养, 或者用克隆的 HCV 基因组去转染细胞获得增殖的 HCV。但遗憾的是这些方法均未获得成功, 没有得到增殖性的 HCV。虽然有少量报道 (Dash et al 1997, Am J Pathology 151: 363; Yoo et al 1995, J Virol 69: 32) 用 HCV 的基因组转染人肝癌细胞株 Huh-7 或 Hep G2 后, 可以检测到 HCV 的复制 (用套式 PCR 检测核酸), 但均不能证实细胞中有感染性的病毒颗粒产生, 也不能保证 HCV 在被转染细胞中长时间的存在和高水平的表达。所以, 至今还未有建立稳定而有效的传代细胞 HCV 体外培养系统和实验模型的文献报道, 也没有体外培养 HCV 完整病毒进行科学研究的报告和相关系统产品的出售。

发明内容

本发明的目的是提供一种能在体外增殖、并且有感染活性的丙型肝炎病毒, 以及提供一种可培养出完整的 HCV 增殖病毒的丙型肝炎全病毒体外细胞培养方法, 为深入研究 HCV 生物学、免疫学特性及致病性提供必不可少的病原材料, 为丙型肝炎的诊断、药物筛选与评价和疫苗的研究提供有效的体外实验模型。

本发明所提供的丙型肝炎全病毒 HCV DY 株, 已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏号 CGMCC No. 0588。HCV DY 株能在体外细胞培养, 培养上清中未经浓缩的病毒滴度达 10^6 - 10^7 基因组拷贝/ml, 病毒在 -80°C 冰箱保存 6-8 个月生物活性不变, 仍能感染人肝癌细胞 (Huh-7) 株, 在体外可连续传代到 5 代以上。

本发明所提供的丙型肝炎全病毒体外细胞培养方法包括:

- 1) 从丙型肝炎患者血清中扩增包括 HCV 基因组 3' PolyA 后边 98 个核苷酸的全长基因组;
- 2) 对 HCV 基因组中的 NS5A 和 NS5B 进行人工定点突变, 把 NS5A 区的 1979 位的丝氨酸突变为异亮氨酸, 把 NS5B 区的 2884 位的精氨酸突变为甘氨酸;
- 3) 在突变后的 HCV 基因组中的 NS5B 3' 末端插入标志基因 IRBS-GFP 表达盒;
- 4) 用带有定点突变、具有全长 HCV 基因组转染敏感细胞、体外培养获得 HCV 具有感染活性的子代病毒。

首先从临床确诊为丙型肝炎患者抽取血清标本, 运用超速离心技术浓缩从病人血清

中提取的 HCV 病毒，然后将病毒浓缩并重悬在小体积的不含 FBS 的 DEME 中，用标准 RNA 提取方法或者商售试剂盒从浓缩病毒颗粒中提取 RNA，空气干燥 RNA 沉淀，然后用无 RNA 酶水溶解沉淀。依据 HCV 序列设计 PCR 引物，从患者血中扩增出 HCV 全长的基因组序列。由于 HCV 基因组长达 9.6 千碱基对，一次扩增难以完成，因而我们设计了多对 PCR 引物(如图 1 所示)。采用 RT-PCR 获得基因组的 cDNA，把覆盖完整基因组全长的多个扩增片段，用限制性内切酶位点拼接在一起，成为 HCV 基因组全长 cDNA，然后将 HCV 全长 cDNA 克隆到高效转录的 pSP72 表达载体质粒 DNA 中，使之位于高效转录启动子控制下，使其容易在体外转录出全长 HCV 基因组 RNA。特别指出的是，本发明为了保证 HCV 基因组高效转录，我们特别保证 3' 末端 polyA 后边的 98 个核苷酸的扩增，使之在体外高效转录出 HCV 的 RNA。

本发明为了保证 HCV 能在体外培养系统中有效地复制、转录和蛋白合成，我们运用人工定点突变技术，在基因组的 NS5A 和 NS5B 中造成特异突变，特异突变的氨基酸位点是 NS5A 区的 1979 位的丝氨酸和 NS5B 区的 2884 位的精氨酸。设计的突变方法如图 2 所示。体外扩增重组质粒 DNA，用核酸限制性内切酶消化法，把 HCV 基因组中的 NS5A 和 NS5B 基因切下并克隆到小的克隆载体 pUC19 中，接着再用 Quickchang™ XL 定向突变试剂盒 (stratagene) 使 NS5A 或 NS5B 编码序列产生定向特异点突变，最后利用同源重组技术把突变序列重组到 HCV 全长的基因组中。

本发明为了有效筛选和鉴定 HCV 在细胞中复制、增殖，设计并构建了一个可选择的 HCV 基因组，即构建的 HCV 基因组不但含有人工适宜突变的基因，而且加入了一个选择标志基因。在 NS5B 编码区 3' 末端加入绿色荧光蛋白基因 (GFP) 和一个内部核糖体进入位点 (IRES) 融合序列，通过筛选 GFP 阳性细胞来初步鉴定 HCV 的复制。

通过上述方法构建了一个含有 HCV 全长基因组、并有适宜点突变的和带有选择标志基因的重组高效表达质粒，用酚/氯仿抽提、乙醇沉淀法提取高效表达质粒 DNA。用市售体外高效转录试剂盒 (Ambion 公司 MEGAscript™ 试剂盒，订购号 No: 1334) 转录出 HCV 基因组 RNA。通过实验筛选出支持 HCV 复制最好的细胞系肝癌细胞株 Huh-7，培养细胞接近长成单层。用基因枪将 HCV RNA 转入到 Huh-7 细胞中，培养细胞并检查培养液中 HCV 病毒滴度达 10^6 - 10^7 基因拷贝/ml 时，收获病毒，低温保存。

检测 HCV 在体外培养系统中增殖，用以下方法确证：①设计 HCV PCR 引物，检测培养液中的 HCV 基因组，包括基因组正链和负链 RNA；②用 HCV RNA 探针细胞原位杂交法证实感染细胞中含有 HCV 基因组 RNA；③用免疫荧光检测培养细胞中的 HCV 蛋白多肽；④测定子代病毒的滴度和感染性。

经过检测，证实了本发明构建的 HCV 基因组可在培养系统中复制和增殖。培养上清

中的 HCV 的浓度可达 1.9×10^6 基因拷贝/ml (参见图 4), 并在 -80°C 中保存 8 个月其滴度不降低。该 HCV 病毒株命名为 DY 株 (岱鹰株), 已送交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏, 保藏编号: 0588。

本发明的 HCV 全病毒培养系统可进行 HCV 的生物学特性和免疫学特性的研究; 进行抗 HCV 药物筛选和鉴定; 用于 HCV 基因治疗的体外模型。该培养系统所产生的病毒可作为抗原进行 HCV 感染诊断; 可制备多克隆或单克隆抗体; 可进行疫苗制备及疫苗检测。

本发明为丙肝病毒 (HCV) 的体外分离培养开辟了新途径, 首次建立了 HCV 体外细胞培养系统, 成功地培养出了 HCV 全病毒, 培养液中 HCV 滴度达 10^7 基因拷贝/ml 水平, 病毒在 -80°C 下保存 8 个月仍具活性, 为 HCV 的基础理论研究、药物开发、疫苗研制提供全病毒资源, 为人类控制 HCV 感染打下了良好基础。

附图说明

图 1 是 HCV 基因组和多对 PCR 引物设计示意图。

图 2 是人工诱发 HCV 基因组特定基因产生适宜突变示意图。

图 3 是建立 HCV 全病毒体外培养系统技术路线示意图。

图 4 是定量 RT-PCR 检测培养上清 HCV 滴度的电泳图。图中 M 表示核酸分子量标志, 数字 0-9 表示阳性对照物不同浓度 (10^0 - 10^9 基因拷贝/ml), N 为阴性对照, S 为培养上清, 箭头表示扩增的目的片段。

图 5 是用特异性引物检测培养细胞中 HCV 负链 RNA 中间体的存在, 即 RT-PCR 结果电泳图。图中 M 表示分子量标志, S 为培养细胞裂解物 RNA, N 为阴性对照, 箭头表示扩增的负链 RNA 产物。

图 6 是 RT-PCR 检测培养上清 HCV RNA 结果电泳图。图中 M 表示分子量标志, 1 为阴性对照, 2 为培养上清, 箭头表示扩增的 HCV 目的片段。

图 7 是用 HCV 探针细胞原位杂交图, 表示细胞浆中有大量 HCV RND。

图 8 是免疫荧光技术检测感染细胞中 HCV 蛋白多肽表达结果照片。其中 8-1、8-3 为相差显微镜观察照片; 8-2、8-4 是与 8-1、8-3 相对应的彩色照片, 表示感染细胞浆中有大量绿色荧光蛋白。

具体的实施方式

本实施方式的技术路线如图 3 所示, 其总体过程如前所述, 其中:

HCV 全长基因组扩增过程, 首先依据 HCV 1b 的保守序列、克隆载体上及 HCV 基因组

特定片段上酶切位点设计 8 条 PCR 扩增引物, 采用重迭 RT-PCR 方法, 逐步扩增 9.6Kb 长的全长基因组。人工合成的 8 条引物, 其 5' 端均带有供克隆连接用的酶切位点, 其位置保证将获得 HCV 基因组的各个片段, 能按顺序连接成为完整的 HCV 全长基因组, 特别是包含了 3' PolyA 后的一段核苷酸序列。

5 8 条引物的序列如下:

引物 1:

GCC GAA TTC GCC AGC CCC CTG ATG GGG GC (SEQ ID NO: 1)

EcoR 1

引物 2:

10 GGG CCA AGG GTA CCC GGG CTG (SEQ ID NO: 2)

Kpn 1

引物 3:

CTC AGC CCG GGT ACC CTT GGC CCC TC (SEQ ID NO: 3)

Kpn 1

15 引物 4:

CAA AAG AGT CTA GAA TTA CTA TCT TG (SEQ ID NO: 4)

Xba I

引物 5:

AAG ATA GTA ATT CTA GAC TCT TT GAA C (SEQ ID NO: 5)

20

Xba I

引物 6:

GCC AAG CTT AAA AAA AAA AAA GGG GGA TGG CCT ATT GGC C (SEQ ID NO: 6)

HindIII

引物 7:

25 CGC CAT CCC CCT TTT TTT TTT TTA AGC TTT TTT TTT TTT T (SEQ ID NO: 7)

HindIII

引物 8:

GCC AAG CTT ACA TGA TCT GCA GAG AGG (SEQ ID NO: 8)

HindIII

30

引物: 方向 5' → 3' , 扩增时引物应用 1+2; 3+4; 5+6; 7+8

提取丙肝患者血清中总 RNA, 以此为扩增模板, 采用常规 RT-PCR 技术, 运用合成的 8

条扩增引物, 分别进行 4 次扩增反应: ①用引物 1 和引物 2 扩增出 0.6Kb 长的 HCV 基因组 5' 端序列片段; ②用引物 3 和引物 4 扩增 6.5Kb 长的 HCV 基因组大片段; ③用引物 5 和引物 6 扩增出的邻近 HCV 基因组中 3' 端的 2Kb 片段; ④用引物 7 和引物 8 扩增出 HCV 基因组 3' 端的 0.4Kb 小片段。

5 分别采用 RT-PCR 扩增 HCV 的目的片段 (如图 1) 结合进行逐步克隆、连接到高效转录载体的 pSP72 中的策略, 最终获得了含有全长 HCV 基因组 DNA 的克隆。具体过程是: ①以 EcoRI/KpnI 为工具酶, 对 0.6Kb 长的扩增片段酶切, 然后将其克隆到 pSP72 质粒 DNA 中 EcoRI/KpnI 位点上, 构建了重组质粒 pSP72-1。②把第二次扩增的 6.5Kb 长的 HCV 基因组大片段, 用工具酶 KpnI/XbaI 把该片段酶解, 克隆到 pSP72-1 的 KpnI/XbaI 位点上, 10 把 6.5Kb 片段连于 HCV 基因组 5' 端 0.6Kb 片段之后, 构建了重组质粒 pSP72-2。③以 XbaI/HindIII 为工具酶, 对第三次扩增的 2Kb 长 HCV 基因组片段酶解, 将其克隆到 pSP72-2 上的 XbaI/HindIII 位点上, 连接到 HCV 基因组 0.6-6.5 片段之后, 构建了重组质粒 pSP72-3。④以 HindIII 为工具酶, 消化第 4 次扩增的 HCV 基因组 3' 末端的 0.4Kb, 将其克隆到 pSP72-3 的 HindIII 位点上, 正向连接于 HCV 2Kb 片段之后, 构建了重组质粒 pSP72-HCV。这样, 采
15 用多次重迭 RT-PCR 扩增, 分步克隆方法, 获得了 HCV 全长基因组, 并成功地克隆到 pSP72 质粒 DNA 的 EcoRI 和 HindIII 酶切位点之间。采用核酸限制性内切酶分析、PCR 扩增以及序列分析获得一致结果, 证明获得了 HCV 全长基因组。

运用人工定点突变技术对已克隆的 HCV 基因组的特定序列位点进行人工基因突变, 以有利于 HCV 在培养细胞中的有效生化合成和培养。技术路线如图 2 所示, 具体是选择了
20 HCV 基因组的 NS5A 和 NS5B 为靶基因进行操作。首先, 制备 pSP72-HCV 的 DNA, 从所含 HCV 基因组序列中, 分别分离出 NS5A 和 NS5B 基因, 并分别将其克隆到载体质粒 pUC19 DNA 中, 选用 Quickchang™XL 定向突变试剂盒 (Stratagene 公司产) 使 NS5A 区的 1979 位的丝氨酸定向突变为异亮氨酸, 使 NS5B 区的 2884 位的精氨酸突变为甘氨酸; 从而使 HCV 基因组中 NS5A、NS5B 基因的编码序列产生了适宜的定向点突变。利用 DNA 重源同组技术,
25 把突变的 HCV 序列重组到 HCV 全长基因组中, 从而获得带有特定序列适宜突变的 HCV 全长基因组。

制备足量纯度高的含有 HCV 全长基因组高效表达质粒 DNA, 利用美国 Ambion 公司 MEGAscript™ 体外高效转录试剂盒, 获得大量的 HCV 基因组 RNA, 用基因枪将 HCV 基因组 RNA 转染到人肝癌细胞株 Huh-7 中, 培养转细胞, 检查培养上清, 有高滴度 HCV 时收获上清, -80℃ 保存。也可运用常规方法把高效表达重组质粒 DNA 转染 Huh-7 细胞, 获得 HCV
30 子代病毒。

对应用上述培养方法获得的 HCV 病毒进行以下系统鉴定：①运用 RT-PCR 检查培养上清中有 HCV 的 RNA (定性) (参见图 6)；②用设计特异引物 RT-PCR 扩增 HCV 复制中间体负链 RNA 的存在，确认 HCV 在细胞中复制 (参见图 5)；③用 HCV 基因组 RNA 探针对 HCV 感染细胞原位杂交，证实感染细胞中有大量 HCV 基因组存在 (参见图 7)；④用标记有荧光素的 NS5B 抗体，对感染细胞进行免疫荧光检测，感染细胞有特异荧光呈现 (参见图 8) 显示感染细胞中有 HCV 病毒蛋白合成；⑤将获得的 HCV 第一代病毒 (培养上清) 进行定量 RT-PCR 证明其未浓缩上清中 HCV 滴度高达 10^7 基因组拷贝/ml；⑥将第一代 HCV 病毒连续在 Huh-7 细胞上传代，第 4 代培养上清病毒滴仍达 10^6 基因组拷贝/ml。总之，从检测 HCV 基因组的扩增、复制中间体的存在，病毒蛋白表达、子代病毒生物活性及感染性等方面对培养上清的子代 HCV 进行了不同层次的定性和定量鉴定。

申请人或代理人档案号 024133	国际申请号
-------------------	-------

关于微生物保藏的说明

(细则13之二)

A. 对说明书第 <u>2</u> 页, 第 <u>20</u> 行所述的微生物的说明。	
B. 保藏事项	丙型肝炎病毒 其他保藏在补充页中 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名)	中国, 北京, 中关村 邮编: 100080
保藏日期	2001年6月11日
保藏编号	CGMCC NO. 0588
C. 补充说明 (必要时)	本栏内容有补充页 <input type="checkbox"/>
D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明 (必要时)	
下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如:“保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
受权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期:
受权官员

权利要求

- 1、一种丙型肝炎全病毒 (HCV), 其基因型为 HCV 1b, 被命名为 HCV 1b 岱鹰株 (DY 株), 该 HCV DY 株已在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心收藏保管和登记入册, 保藏号 0588。
- 2、一种如权利要求 1 所述丙型肝炎全病毒的体外细胞培养方法, 包括:
- 1) 从丙型肝炎患者血清中扩增包括 HCV 基因组 3' PolyA 后边 98 个核苷酸的全长基因组;
 - 2) 对 HCV 基因组中的 NS5A 和 NS5B 进行人工定点突变, 把 NS5A 区的 1979 位的丝氨酸突变为异亮氨酸, 把 NS5B 区的 2884 位的精氨酸突变为甘氨酸;
 - 3) 在突变后的 HCV 基因组中的 NS5B 3' 末端插入标志基因 IRBS-GFP 表达盒;
 - 4) 用带有定点突变、具有全长 HCV 基因组转染敏感细胞、体外培养获得 HCV 具有感染活性的子代病毒。
- 3、权利要求 1 所述的病毒作为抗原在 HCV 生物学特性和免疫学特性的研究、HCV 感染诊断、HCV 多克隆抗体和单克隆抗体的制备、HCV 基因治疗和抗 HCV 药物筛选的模型、疫苗的制备及疫苗的检测中的应用。

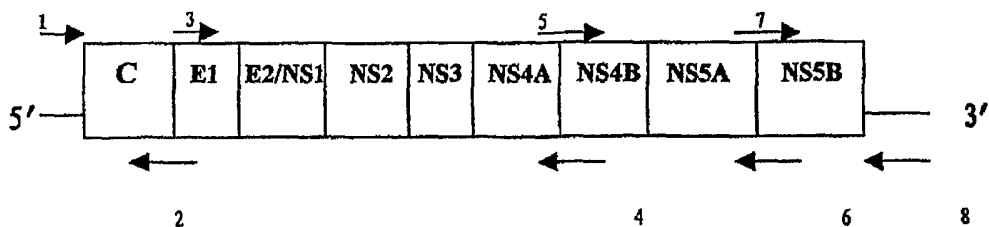
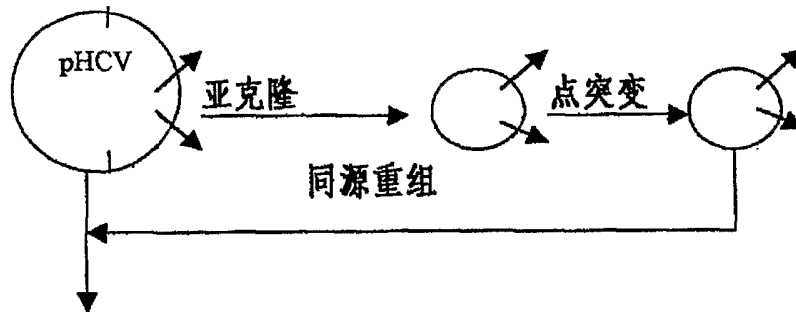


图 1

含 HCV 基因组全长

克隆质粒 pHCV



含突变 HCV 基因组全长

的体外转录质粒

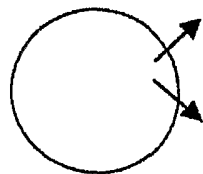


图 2

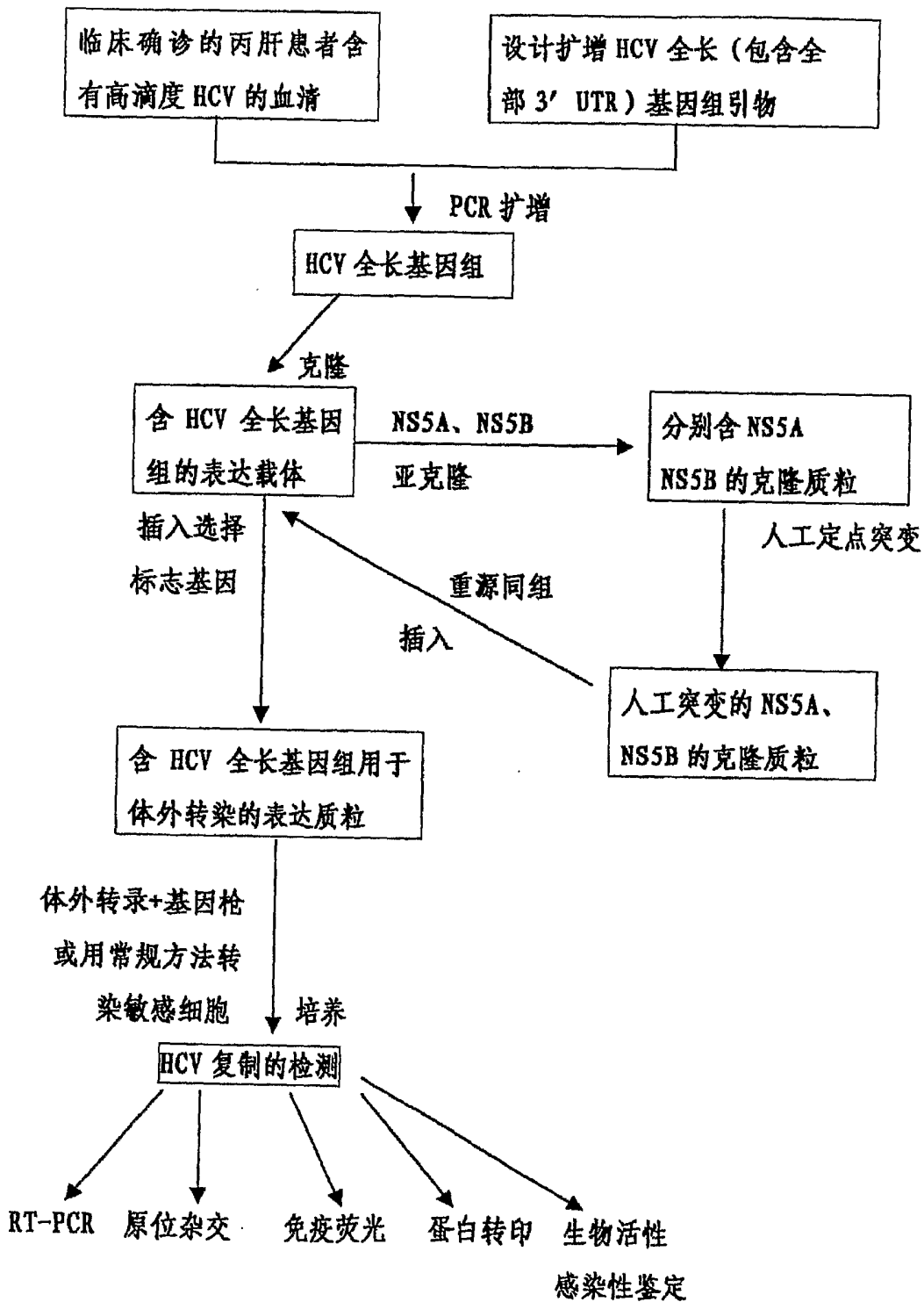


图 3

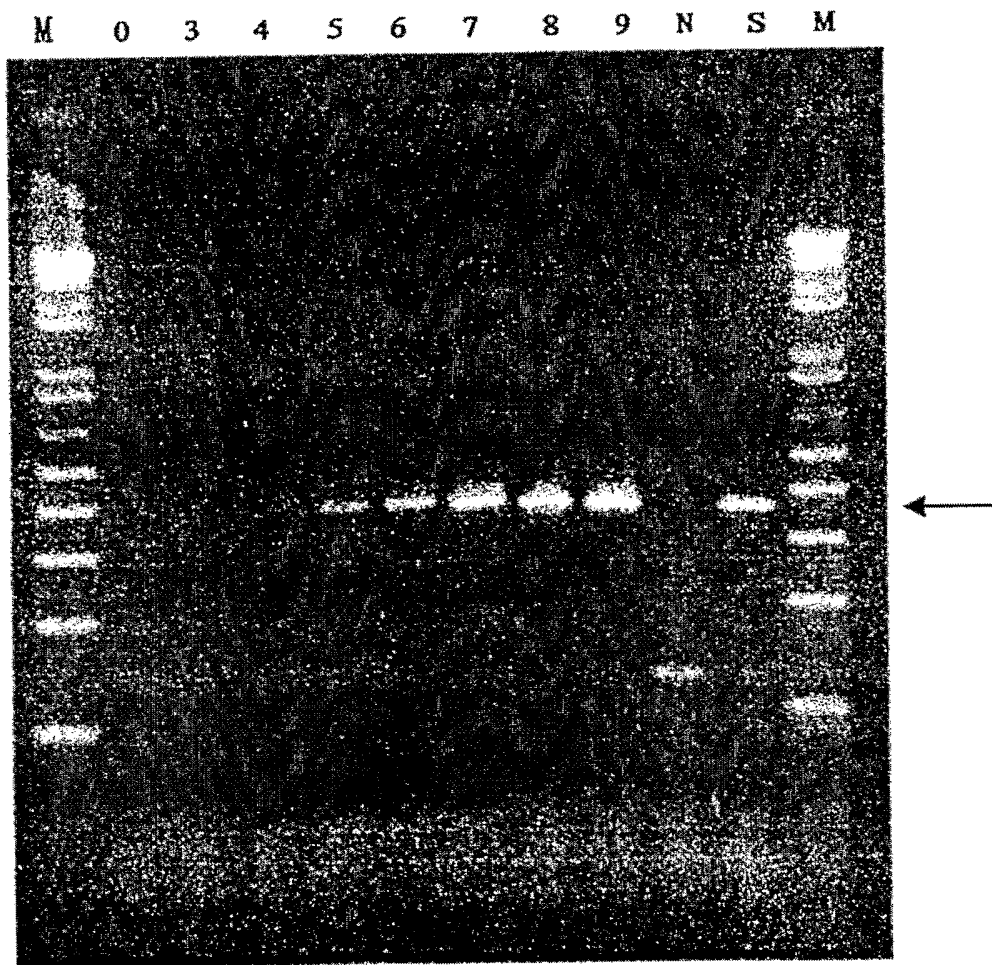


图 4

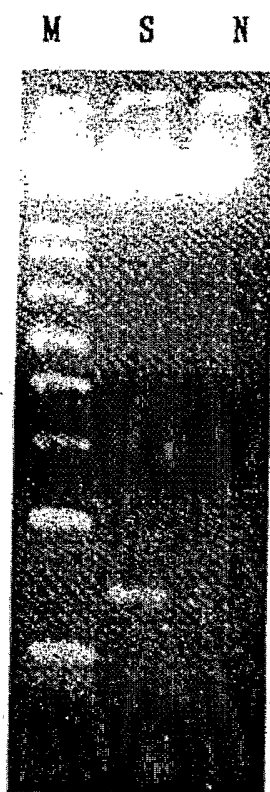


图 5

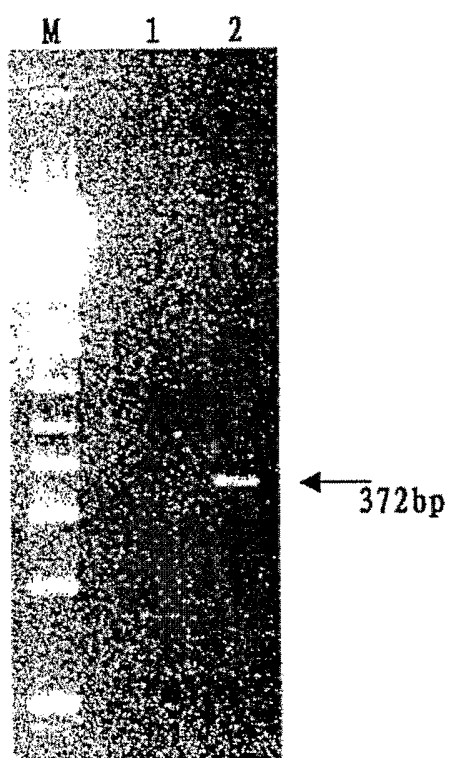


图 6

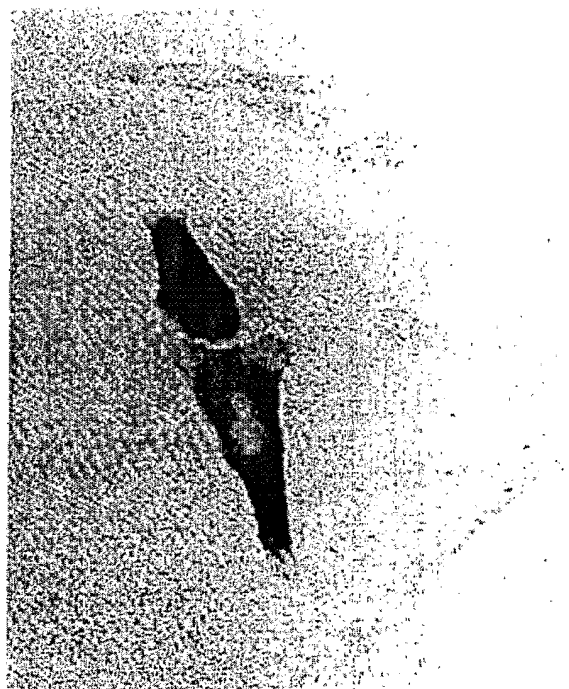
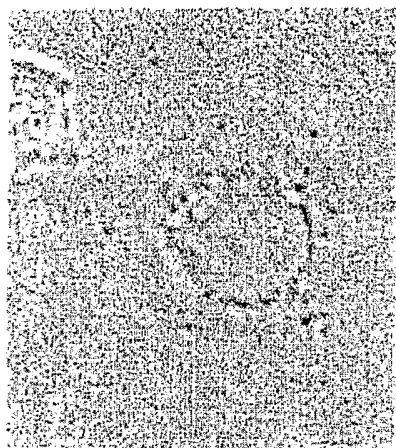
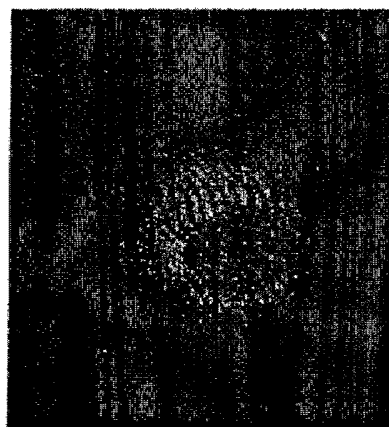


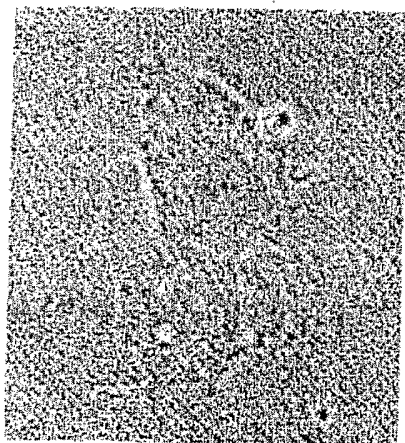
图 7



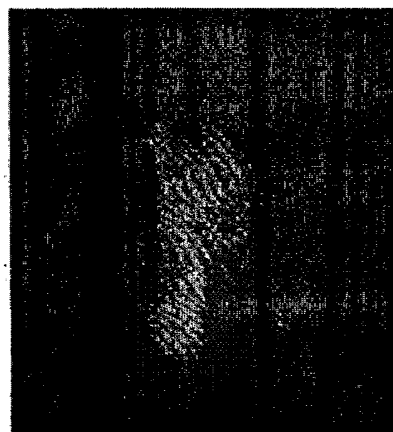
8-1



8-2



8-3



8-4

图 8

序列表

- <110> 杨凌岱鹰生物工程股份有限公司
- 5 <120> 丙型肝炎全病毒及其体外细胞培养方法
- <130> 024133
- <150> CN01124001.6
- 10 <151> 2001-08-06
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.1
- 15 <210> 1
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <223> 引物
- 25 <400> 1
- gccgaattcg ccagccccct gatgggggc 29
- <210> 2
- <211> 21
- 30 <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <221> misc_feature
- 35 <223> 引物
- <400> 2
- ggccaaggg taccgggct g 21
- 40 <210> 3
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- 45 <220>
- <221> misc_feature
- <223> 引物
- 50 <400> 3
- ctcagcccgg gtacccttgg ccctc 26
- <210> 4
- <211> 26
- 55 <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 5
 <400> 4
 caaaagagtc tagaattact atcttg 26
 <210> 5
 10 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <223> 引物
 <400> 5
 aagatagtaa ttctagactc tttgaac 27
 20 <210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 30 <400> 6
 gccaaagctta aaaaaaaaaa aggggatgg cctattggcc 40
 <210> 7
 35 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <223> 引物
 <400> 7
 45 cgccatcccc cttttttttt ttttaagcttt tttttttttt 40
 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 引物
 55 <400> 8
 gccaaagctta catgatctgc agagagg 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/CN02/00536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N7/01

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12N7/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	WO, A1, 9916891 (UNIV OREGON HEALTH SCI et al) 08.April 1999, See the whole document	1-3
A	WO, A1, 9115573 (SOUTHWEST FOUND BIOMEDICAL RES et al) 17.October 1991, See the whole document	1-3

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A"document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"earlier document but published on or after the international filing date

"L"document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O"document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 2002(16.12.02)

Date of mailing of the international search report

13 MAR 2003 (13.03.03)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

PAN, aqun

Telephone No. 86-10-62093906



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/CN02/00536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A1-9916891	08-04-99	EP-A1-1023451	02-08-00
WO-A1-9115573	17-10-91	EP-A1-0527814	24-02-93

A. 主题的分类

Int.Cl⁷: C12N7/01

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

Int.Cl⁷: C12N7/01

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,CNPT, BIOSIS,CA

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	WO, A1, 9916891 A1 (OREGON 健康科学大学等) 08.4 月 1999, 参见全文	1-3
A	WO,A1, 9115573 (SOUTHWEST FOUND 生化医学研究院等) 17.10 月 1991, 参见全文	1-3

其余文件在 C 栏的续页中列出。

见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

- “A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件
- “E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的
- “L”对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)
- “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件
- “P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

- “T”在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
- “X”特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性
- “Y”特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性
- “&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

16.12 月 2002(16.12.02)

国际检索报告邮寄日期

13. 3月 2003(13.03.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员:

潘爱群

电话号码: 86-10-62093906



国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN02/00536

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A1-9916891	08-04-99	EP-A1-1023451	02-08-00
WO-A1-9115573	17-10-91	EP-A1-0527814	24-02-93