

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 39/12

A61K 39/29

A61K 39/385

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 92100242.4

[45]授权公告日 2001 年 5 月 2 日

[11]授权公告号 CN 1065142C

[22] 申请日 1992.1.14 [24] 颁证日 2001.1.27

[21] 申请号 92100242.4

[73] 专利权人 麦迪瓦赫丁公司

地址 荷兰阿姆斯特丹

[72] 发明人 汗斯·A·托马

[56] 参考文献

EP0243913 1987.11.4 A61K39/29

EP0271302 1988.6.15 A61K39/385

WO8810300 1988.12.29 C12N15/00

审查员 黄 赤

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 77 页 附图页数 14 页

[54] 发明名称 组合物用作慢性病毒性肝脏疾病治疗剂
的应用

[57] 摘要

本发明提供了一种结合物,它包括介导一个或多个
抗原决定基的至少一种多肽序列以及能够呈现该多肽
序列的载体,该结合物可用于生产治疗慢性病毒性肝
炎的药物。

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

权 利 要 求 书

1. 一种组合物在生产治疗由肝炎病毒引起的慢性肝炎的药物中的应用, 该组合物包括:

a) 至少一个多肽序列, 它具有该肝炎病毒的一个或多个抗原性 T-细胞激活的抗原决定基和

b) 能够呈现抗原决定基序列 a) 的载体, 其中多肽序列 a) 是通过共价键或疏水键与载体 b) 结合。

2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中所说的多肽序列 a) 为乙型肝炎病毒的多肽。

3. 根据权利要求 2 所述的应用, 其中所说的多肽序列 a) 为一个或多个选自 HB 病毒前 S1、前 S2 和 S 肽及 HB 核心抗原的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1—3 所述的应用, 其中所说的多肽序列 a) 为经过如下修饰的天然多肽序列:

i) 任意缺失, 但保留了包含至少 6 个连续氨基酸残基的抗原决定基,

ii) 一个或数个氨基酸被取代, 或

iii) 有其它氨基酸加到多肽序列 a) 的 N-末端、C-末端或插入到多肽序列(a)中间。

5. 根据权利要求 1—3 之一所述的应用, 其中所说的多肽序列 a) 是十四烷基化的。

6. 根据权利要求 1—3 之一所述的应用, 其中所说的多肽序列 a) 是通过重组 DNA 分子的表达而产生的。

7. 根据权利要求 1—3 之一所述的应用, 其中所说的载体 b) 为具有颗粒形式的多糖、疏水聚合物或无机分子。

8. 根据权利要求 1 所述的应用, 其中所说的载体 b) 为第二种多肽序列。

9. 根据权利要求 8 所述的应用, 其中所说的多肽序列 b) 在分泌后形成直径至少为 10nm 的颗粒。

10. 根据权利要求 9 所述的应用, 其中所说的多肽序列 b) 为选自 HBV S-肽、HBV 核心抗原、HAV 核心抗原及 HIV 核心抗原和脊髓灰质炎病毒、HAV 或 HIV 表面抗原之多肽的全部氨基酸序列。

11. 根据权利要求 10 所述的应用, 其中所说的多肽序列 b) 可受如下修饰:

i) 任意缺失, 但保留了形成颗粒的能力,

ii) 一个或多数氨基酸被取代, 或

iii) 在多肽序列 b) 的 N-末端或 C-末端加上了其它的氨基酸序列, 或在其中间插入了其它的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 11 所述的应用, 其中所说的多肽序列 b) 是

十四烷基化的。

13. 根据权利要求 12 所述的应用,其中所说的多肽序列 b)是通过重组 DNA 分子的表达而产生的。

14. 根据权利要求 1 或 8 所述的应用,其中所说的多肽序列 a)和 b)是通过二硫桥键连接的。

15. 根据权利要求 1 或 8 所述的应用,其中所说的多肽序列 a)和 b)是通过由十四烷酸介导的“疏水结合”连接。

16. 根据权利要求 1 或 8 所述的应用,其中所说的多肽序列 a)和 b)是通过肽键连接,其中 a)和 b)之间插入了一间隔基,该间隔基序列通过肽键与多肽序列 a)和 b)相连接。

17. 根据权利要求 16 所述的应用,其中所说的多肽序列 a)和 b)串联编码在同一 DNA 分子上。

18. 根据权利要求 17 所述的应用,其中所说的多肽序列 a)和 b)是从所说 DNA 分子上的单个开放读码表达的,并可被也在同一单个开放读码上编码的间隔基多肽序列隔开。

19. 根据权利要求 18 所述的应用,其中所说的组合物是通过静脉注射或肌肉注射服用的。

说明书

组合物用作慢性病 毒性肝脏疾病治疗剂的应用

本发明涉及一种包含以 *DNA* 重组技术制备的多肽序列和载体的组合物,以提供治疗慢性病毒性肝脏疾病的治疗剂。本发明还涉及编码所说多肽序列的 *DNA* 序列以及用于表达该 *DNA* 序列的转染的细胞。

至少有 5 种不同的病毒即甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎病毒,能够引发急性肝炎的临床症状。通过肠道转移的甲型和戊型肝炎均能痊愈,而乙型、丙型肝炎(以前称为肠道外非甲非乙型肝炎)和丁型肝炎则能发展成为慢性炎症,进而导致肝硬化和原发性肝癌。

有关丙型和丁型肝炎的诊断和治疗方法以及相应的病毒的资料相对很少。丁型肝炎病毒是一种 *RNA* 病毒,且已知是不完整的。因此,为了在患者体内发育,它需要有一种辅助病毒,并且它仅发现于被 *HBV* 感染的个体中。只是在最近才检测到丙型肝炎病毒,并开发出一种有助于诊断慢性丙型肝炎感染的抗体试验法(抗 *HCV*)。但是,迫切需要有一种治疗该疾病的方法。

对于慢性乙型肝炎同样如此,已从其免疫学鉴定法、其致病病

素、病毒生活史以及 DNA 序列等方面对乙型肝炎进行过深入地研究。病毒 DNA 能在其中存在 10 周以上、HBe 抗原(HBeAg)能够在其中维持 12 周以上或乙型肝炎表面抗原(HBsAg)能够在其中维持 6 个月以上,这样的患者即被看作是慢性乙型肝炎病毒携带者。

全世界约有 3 亿人患有慢性乙型肝炎,其中的大部分生活在远东。

对于这些人来说,被感染的主要危险期是在出生过程中或出生之后不久,因为受到慢性感染的母亲可将病毒转移给其新生儿。90%以这种方式被感染的儿童将在未来的生存中变成慢性感染者。在西方,通常是在少年乃至成年时期主要通过非肠道或性传递的方式遭受感染。在出生后感染乙型肝炎的情况下,只有 5—10%的受感染者变为慢性携带者。但是,转移的病毒并不决定感染者是消除该病毒还是终生在体内保留该病毒。因此,似乎是免疫学状态在决定病人未来的身体条件。

HB 病毒粒子(丹氏颗粒)由不同的结构蛋白、核心蛋白和表面蛋白组成,后者是包括 3 个 S 型区域之编码序列在内的开放读码的翻译产物。其中每一编码序列均起始于能够起始体内翻译过程的 ATG 三联密码子。这三个区域依分子中 5' 至 3' 端的顺序分别称为前 S₁、前 S₂ 和 S 区。该开放读码(ORF)共产物 6 种蛋白产物:仅由 S 区翻译的主要蛋白(gp27 和 p24)的糖基化和非糖基化形式 (226

个氨基酸)、由前 S_2 和 S 区编码且带有 1 个或 2 个多糖侧链的中等蛋白(281 个氨基酸)(分别为 $gp33$ 和 $gp36$),以及由前 S_1 、前 S_2 和 S 翻译形成的大蛋白(389—400 个氨基酸,取决于病毒血清型)的糖基化($gp42$)和非糖基化($p39$)形式。核心蛋白是 $HBcAg$ 和 $HBeAg$,可以想象到后者是 $HBcAg$ 的加工产物。

作为感染性病毒粒子的丹氏颗粒,其包括核心蛋白和表面蛋白,而丝状体包含 6 种表面抗原的混合物。 S 肽单独装配成所谓的 $20nm$ 颗粒,它完全无感染性。

被 HB 病毒感染的患者在被认为是慢性 HBV 感染之前要经过肝炎的几个发展阶段。感染后即直接进入是感染期,其特征是血清中存在 $HBeAg$ 。接下去尽管抑制了 HBV 复制,但仍然出现的 HBs 抗原血症,表明存在整合到了患者细胞基因组中的病毒 DNA 序列。整合的病毒序列并不能保证使宿主细胞合成完整病毒。但是,有整合之 HBV 序列的肝细胞只能够产生 $HBsAg$,而 $HBsAg$ 能够在患者的血清中检测到,并且是慢性乙型肝炎的指征。被转化的肝细胞很可能不会被细胞毒性 T -细胞所溶解,而是繁殖并诱导慢性持续性肝炎(CPH)或慢性活动性肝炎(CAH),进而发展为肝硬化或原发性肝细胞癌,导致患者过早死亡。

最近已证实,慢性 HBV 感染的患者在内源干扰素产生方面存在缺陷(*Abb et al.*, 1985 :*J. Med. virol* 16.171—176)。这就是用 α -干扰素($IFN\alpha$)治疗根据血清中存在 $HBeAg$ 和 HBV —

DNA 而鉴定为慢性乙型肝炎患者的理论基础。对大量患者进行的对照试验表明,与对照组相比较使用 α -干扰素可导致乙型肝炎病毒的显著减少。但是,在出生时或出生前后感染的人在对该治疗法反应中似乎未出现血清转化。这一现象不幸地将约 75% 的携带者排除于 $INF\alpha$ 疗法之外。

有关 α -干扰素对慢性乙型肝炎的确切作用方式目前仍不清楚。其抗病毒活性可能保护了被感染细胞免受感染或减少了病毒在 *HBV* 感染之细胞中的转录、翻译和复制。干扰素还具有激活 *T* 细胞、巨噬细胞和 *NK* 细胞以及减少 *MHC* I 类蛋白表达的免疫调节作用。

治疗慢性乙型肝炎的另一个方法是基于以下想法:抑制病毒的复制,从而修复其防御能力,以使宿主免疫系统足以能够消除病毒。这一想法导致了使用腺嘌呤阿拉伯糖苷和腺嘌呤阿拉伯糖苷单磷酸酯等抗病毒药物治疗慢性 *HBV* 感染之患者的试验。但是只有半数以下的患者对这种治疗有反应,他们可表现有持久的或短暂的血清转化($HBeAg^+$ 变为抗 HBe^+)。这些抗病毒药物的另一个不利方面是它们的免疫抑制性质。

已试验过的用于治疗慢性携带者的其它药物包括 β 和 γ 干扰素、9-(2-羟乙氧甲基)鸟嘌呤(*acyclovir*)、白细胞介素 2、类固醇(如脱氢可地松)及其联合应用。但其中没有任何一种药物能够产生比 α -干扰素疗法更好的效果。只有联合治疗(包括先用类固醇,再

用 αINF)可能会提高某些患者的应答率。

从现有技术中知道,用 $HBsAg$ (与破伤风毒素结合)或用抗 HBs 抗体进行治疗均不能治愈慢性 HBV 感染的黑猩猩。而且,也曾试图用 S 肽免疫慢性 HBV 感染的患者。这一治疗方法甚至未导致这些患者体内抗 HBs 抗体的生成。

另外,根据定义,乙型肝炎病毒慢性携带者的特征是从其血清中检测出 $HBsAg$ 。因此,人们绝对没有预见到根据本发明的包含病毒 S 肽之 T 细胞激活抗原决定基的组合物能够在乙型肝炎病毒慢性携带者体内诱导免疫反应并最终治愈之。

鉴于以上所讨论的现有技术状况,本发明的目的在于提供一种治疗病毒性慢性肝脏疾病的有效治疗剂,它能够导致完全的治疗反应(即持久地抑制 HBV 复制、丢失 HBV DNA 和 DNA 多聚酶以及减少及最终消除患者血清中的 $HBeAg$ 和 $HBsAg$ 。

按照本发明,这一目的是通过组合 $a)$ 至少一种介导一个或多个抗原决定基之抗原性的多肽序列和 $b)$ 一种能够呈现抗原决定基序列 $a)$ 的载体而达到的,其中多肽序列 $a)$ 可通过吸附、任何的化学键合或次合价结合于载体 $b)$ 上。

本发明还涉及该结合物在生产治疗慢性病毒性肝炎的药物方面的应用。

本发明还涉及治疗慢性病毒性肝炎的方法,该方法包括给患者使用上看所述的 $a)$ 至少一种介导一个或多个抗原决定基之抗原性

的多肽序列和 *b*) 一种能够呈现抗原决定基序列 *a*) 的载体的结合物, 其中多肽序列 *a*) 可通过吸附、任何的化学键合或次价结合于载体 *b*) 上。

多肽序列 *a*) (其可以是一种或多种不同多肽) 以直接或间接方式介导 *T* 细胞激活抗原决定基的抗原性这一点很重要。根据本发明, 多肽序列 *a*) 可以是一种多肽或者是任何亚型的乙型肝炎病毒 (尤其是 *adw*、*ayw*、*adr* 和 *ady*) 的两种或多种多肽的结合物。这些来源于乙型肝炎病毒的肽可能是 *HBV* 肽前 *S*₁、前 *S*₂ 或 *HBV* 核心抗原。

另外, 作为多肽序列 *a*), 还可以是被修饰过的上述多肽或两个或多个多肽的结合物, 所说的修饰可以是从多肽序列 *a*) 上删去氨基酸 (但必须保留至少一个包括至少 6 个连续的氨基酸残基的抗原决定基), 或者是向多肽序列 *a*) 的 *N*-末端、*C*-末端加进或插入其它氨基酸。但是, 在所有这些情况下均必须保持其生物活性。

最好是使多肽序列 *a*) 十四烷基化。

为了发挥适当的药理学活性, 必须将本发明的多肽序列 *a*) 的结合物呈现在一种载体上。该载体由特定物质组成, 例如由疏水聚合物颗粒、无机颗粒或多糖颗粒组成。载体 *b*) 最好是分必后形成颗粒的第二个多肽序列, 所说的颗粒的直径最好至少为 10nm。

形成颗粒的多肽序列 *b*) 最好是以下多肽的完整氨基酸序列或其一部分: *HBV S* 肽、*HBV* 核心抗原、*HAV* 核心抗原、*HAV* 表

面抗原、*HIV* 表面抗原、*HIV* 核心抗原以及脊髓灰质炎病毒表面抗原。优选的颗粒形成载体 *b*) 是 *HBV* S 肽和/或核心肽。

当使用上述的多肽作为载体序列 *b*) 时, 可通过以下方式对其进行修饰: 任意删去氨基酸、取代一个或多个氨基酸、在多肽序列 *b*) 的 C 端或 N 端加上一个或多个氨基酸或向其中插入一个或多个氨基酸, 条件是颗粒形成能力得以保留。最好使多肽序列 *b*) 十四烷基化。

如果载体 *b*) 为多肽序列, 则可通过一个或多个以下相互作用来连接序列 *a*) 和 *b*): 疏水结合(由十四烷酸介导)或二硫桥键形成, 或者通过肽键将两个序列连接成融合肽。在后一种情况下, 偶而可将一间隔基序列插入到多肽序列 *a*) 和多肽序列 *b*) 之间, 其中间隔基序列通过肽键与两种多肽相连。

本发明还提供了编码结合物的重组 DNA 分子, 该结合物可用于生产治疗慢性病毒性肝脏疾病的药物。该重组 DNA 分子包括至少一种第一 DNA 序列, 还可选择性地包括第二、第三和/或第四 DNA 序列, 其中

i) 所说的至少一种第一 DNA 序列编码至少一种上面所定义的多肽序列 *a*),

ii) 所说的第二 DNA 序列编码根据上述颗粒形成肽之定义的多肽序列 *b*),

iii) 所说的第三 DNA 序列编码间隔基序列,

iv)所说的第四 DNA 序列编码选择标记。

且其中 DNA 序列受控于表达所必需的 DNA 成分,且它们可以具有共同的读码。

由于许多氨基酸是由一个以上的三联密码子编码的,因此可有几个属于本发明的 DNA 序列用来编码上面所定义的肽序列 a)和 b)。此外,本发明还包括不同于上面所定义的重组 DNA 分子的重组 DNA 分子,其中可以有高达 30%的核苷酸被取代。

本发明的另一个目的是提供一种被重组 DNA 分子转染的宿主细胞,该重组 DNA 分子编码可用于治疗慢性 HBV 感染患者的前述结合物。该宿主细胞可以是哺乳动物、酵母或细菌细胞。为了本发明的目的,该细胞最好不产生除了包括在上述结合物中的多肽之外的任何人血清蛋白或任何灵长类动物血清蛋白。

本文所用的术语“HBV S 肽”是指由 HBV 基因组的整个区域编码的肽。术语“HBV 前 S₂ 肽”是指由 HBV 基因组的整个前 S₂ 区和 S 区编码的肽。术语“HBV S₁ 肽”是指由 HBV 基因组的整个前 S₁、前 S₂ 和 S 区编码的多肽。术语“抗原决定基”是指由指定的基因组区域编码的至少有 6 个连续氨基酸的序列(例如,“HBV 前 S₂ 抗原决定基”指由 HBV 基因组之前 S₂ 区编码的至少 6 个氨基酸的序列)。术语“T 细胞抗原决定基”是指与 T 细胞表面上的受体发生反应以或影响免疫应答的抗原决定基。术语“抗原性”是指引起免疫应答的能力(如起抗原作用)、引起抗体产生的能力(如起抗原作用)和

/或与细胞表面受体反应以增强免疫应答或产生抗体的能力。

术语“**HBV**”是指任何的病毒亚型,尤其是文献中所述的 *adw*、*ayw*、*adr* 和 *ayr* (*P. Valenzuela, Nature Vol. 280, p. 815 (1979); Gerlich, EP-A-85 111 361, Neurath, EP-A-85 102 250*)。构成介导一个或多个抗原决定基抗原性之多肽序列 *a*) 的肽序列实例见序列目录(*SEQ ID No. 17-20, 22*)。

本发明的优选实施方案为以下结合物:

—具有前 *S*₁、前 *S*₂ 和/或核心肽之特定抗原决定基的 **HBS** 抗原颗粒;

—具有前 *S*₁、前 *S*₂、*S* 肽和/或核心抗原之特定抗原决定基的 **HB** 核心抗原颗粒;

—具有乙型肝炎 *S*、前 *S*₁、前 *S*₂ 和/或核心肽之特定抗原决定基的肝炎 **A** 抗原颗粒。

优选用于本发明的重组 **DNA** 分子的特征在于,存在编码多肽序列 *a*) (其可介导一个或多个 *T* 细胞抗原决定基的抗原性) 和编码多肽 *b*) (其可在分泌后形成直径为 10nm 或大于 10nm 的颗粒) 的序列,这两种序列均处于适当启动子的控制之下。编码 *a*) 的序列包括序列目录中 *ID* 序号 1 至 24 的任何序列。编码多肽序列 *b*) 的 **DNA** 序列包括序列目录中 *ID* 序号为 25—27 的任何序列。

序列目录中 24 个序列(*ID* 数 1—24) 中的任何一个均可按 *a*—*b* 或 *b*—*a* 的顺序与 *ID* 序号 25—27 下的任何一个序列结合。

本发明的一个具体的优选实例是抗原决定基序列 **ID28** 号(对应于 **HBV** 之 **S₁** 序列的第 9—28 个氨基酸)与作为颗粒形成体的序列 **ID26** 号和/或 27 号的结合物。

可按下述任何方法形成或分离用于本发明之重组 **DNA** 构建物中的肝炎病毒序列,这些方法包括:分离和连接限制片段、利用合成仪(**Cyclon**, **Biosearch**)进行寡核苷酸的化学合成以及利用 **PCR** 法进行合成(**T. J. White, N. Arnleim, H. E. Erlich**, 1989; *The Polymerase Chain Reaction, Technical Focus* 5(6))。

可通过将人工合成的寡核苷酸连接到来自 **HBV** 基因组 **S** 区的 5' **xba** I — **Bgl** II 片段(**ID27** 号)(该片段衍生于 **Bgl** II — **Bgl** II **HBV** 片段,包括了整个前 **S₁**—前 **S₂**—**S**—区)上或连接至整个 **S**—区上,形成优选的重组 **DNA** 分子。用于制造这类构建物的寡核苷酸总结于下面的表 I 中。

表 I

功 能	定 义	SEQ ID No
core (adw)	aa* 59-87	6
core (adw)	aa 2-28	7
core (adw)	aa -10-28	8
core (adw)	aa 29-58	9
core (adw)	aa 1-87	10
core (adw)	aa -10-87	11
core (adw)	aa 70-110	12
core (adw)	aa 80-125	13
core (adw)	aa 88-120	15
S1 (ayw)	aa 9-28	17
S1 (ayw)	aa 83-103	18
S1 (ayw)	aa 20-40	19
S1 (ayw)	aa 59-94	20
S1 (adw)	aa 94-114	21
S1 (adw)	aa 70-105	22
S2 (ayw)	aa 2-21	23
S2 (ayw)	aa 14-33	24

* a a = 氨基酸

其它优选的 *DNA* 分子是通过将按 *PCR* 法制得并编码 *T* 细胞抗原决定基的核心序列与用作多肽序列 *b*)的 *HBV* 核心序列 (*SEQ ID No25*)相连接而形成的。

表 II —1 给出了用于制备这些构建物的寡核苷酸。

表 II-1

功 能	定 义	SEQ ID NO
核心	完整, b p 1 9 0 1 - 2 5 0 0	1
核心	C-末端缺失, b p 1 9 0 1 - 2 4 0 5	2
核心	C-末端缺失且插入了终止 密码子, b p 1 9 0 1 - 2 4 5 0	3
核心/前核心	1 0 a a 前核心 C-末端缺失, b p 1 8 7 1 - 2 4 0 5	4
"	1 0 a a 前核心 C-末端缺失并插入了终止 密码子, b p 1 8 7 1 - 2 4 0 5	5
核心	氨基酸 (- 1 0 - 1 2 0)	1 6
核心/前核心	1 0 a a 前核心 完整核心, b p 1 8 7 1 - 2 5 0 0	3 5

表 II — 2 显示了几个例子，其中编码 *T*—细胞抗原决定基的 *DNA* 序列已通过对 *HBV* 基因组的限制性片段切割分离出来并已被连接至编码上文限定之多肽序列 *b*) 的 *DNA* 序列上。

表 II - 2

功 能	定 义	SEQ ID NO
核心/前核心	完整, b p 1403-31	**
S2ay/ad		**
S2(K) ay/ad	S2-S, 缺失7个密码子, 起始密码子ATG变为ATA	14

** 序列已由Galibert, F. 等人(1979: Nature 281, 646-650)和Ono, Y. 等人(1983: Nucl. Acid Res. 11(6), 1747-1757)公开。

表II-3列出了特定的重组DNA分子。其构建方法将在实施例中详细叙述。

表 II-3

最终构建物	T 细胞抗原决定基	颗粒形成体	选择基因
MT-核心(-110-120) + SAG +neo	核心(aa-10-120)	S adw/ayw 或 S/XbaI/BglII	neo
MT-S1(aa9-28)-S + egpt	S1(aa-9-28)ay	S adw/ayw 或 S/XbaI/BglII	egpt#
MT-核心-neo	核心/前核心 bp 1403-31	核心adw	neo
MT-核心(1-87) + HBSAG-neo	核心(aa1-87)	S adw/ayw 或 S/XbaI/BglII	neo

egpt = 大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶

优选的本发明重组 *DNA* 分子除包括多肽 *a*) 和 *b*) 的编码区外还包括另一个编码选择标记的 *DNA* 序列。此外,它们还包括表达所必需的所有通用成分,如启动子序列、起始密码子以及多聚腺苷酸化信号。

当使用哺乳动物作为宿主细胞时,合适启动子的例子有金属硫因 (*MT*)、*U2* 和 *H₂K* 启动子。如果使用酵母或细菌细胞作用宿主,则可利用合适的酵母和细菌启动子,如 *GCN4* 和 *GAL1/10* 启动子或原核 *trp* 和 *tac* 启动子。

为了产生本发明的多肽 *a*) 和多肽 *b*) 的结合物,可通过转染(在哺乳细胞的情况下)、转化(在酵母和细菌细胞的情况下)或其它方法将重组 *DNA* 分子插入宿主细胞。可使用能够转录和翻译重组 *DNA* 分子的任何生物体的细胞,如哺乳动物、细菌和酵母细胞作为宿主细胞。

根据本发明,合适的哺乳动物细胞例如有 *VERO* 细胞(猴肾细胞系)、*3T3*—、*C127* 和 *L* 细胞(小鼠成纤维细胞系)和 *CHO*(中国仓鼠卵)细胞,它们在脱氢叶酸还原酶试验中为阳性或阴性。

按照本发明的一具体实施方案,上面所定义的分别编码多肽序列 *a*) 和多肽序列 *b*) 的第一 *DNA* 序列和第二 *DNA* 序列可存在于不同的重组 *DNA* 分子中,在此情况下,须用这两种重组 *DNA* 分子共转染宿主细胞。

表 III

含有针对慢性肝炎携带者之T细胞抗原决定基的颗粒的可选择组合物

最终构建物 ¹	启动子 ²	T细胞抗原决定基			颗粒形成体	选择基因	纯化 ³
		SYN	PCR	GENE			
1	MT/1H2/U2		核心, 无前核心 如 bp1901-2500		核心 (a d w)	neo/egpt	
2	"		核心, 无前核心, C-末端缺失		核心 (a d w)	"	
3	"		如 b p 1901-2405 核心, 无前核心, C-末端和终止信号缺失		"	"	
4	MT-核心-neo		核心和前核心 10M	带有前核心的 核心 即 bp1403-31	"	"	材料和方法

表 III (续)

最终构建物 ¹	启动子 ²	T 细胞抗原决定基			颗粒形成体	选择基因	纯化 ³
		S Y N	P C R				
5	MT/H2/U2		核心和前核心 10AA C—末端缺失 如 bp 1871—2405		核心 (adw)	neo/egpt	
6	"		核心和前核心， C—末端和终止信号缺失 如 bp 1871—2405		"	"	
7	"	核心 (59—87)			整个 S _{adw/ayw} -S _{XbaI/BglII}	"	
8	"	核心 (M2—28)			"	"	
9	"	核心 (M—10— +28)			"	"	
10	"	核心 (M29—58)			"	"	

表 III (续)

	最终构建物 ¹	启动子 ²	T 细胞抗原决定基			颗粒形成体	选择基因	纯化 ³
			S Y N	P C R	GENE			
11	MT核心 (1-87) +HBsAg-neo	MT/H2/U2	核心 (M1-87)			整个 S adw/ayw -S/XbaI/BglII	neo/egpt	
12		"	核心 (AA-10- +87)			"	"	
13		"	核心 (AA70- 110)			"	"	
14		"	核心 (AA80- 125)			"	"	
15		"	核心 (AA88- 120)			"	"	
16		"	核心 (AA-10+ SATG+AA2- 87)			"	"	
17	MT核心 (1-10 +120)+SAG +neo	"		核心 (AA-10-+ 120)		"	"	

表 III (续)

最终构建物 ¹	启动子 ²	T 细胞抗原决定基			颗粒形成体	选择基因	纯化 ³
		S Y N	P C R	GENE			
18 MT-SI(AA9-28) -s + egpt	MT/H2/U2	SI-(AA9-28) (ay)			整个 S adw/ayw S χ baI/BglII	neo/egpt	
19	"	SI-(AA83-103)(ay)			"	"	
20	"	SI-(AA20-40)(ay)			"	"	
21	"	SI-(AA59-94)(ay)			"	"	
22	"	SI-(AA94-114)(ay)			"	"	
23	"	SI-(AA70-105)(ad)			"	"	
24	"	SI-(AA9-28)(ay)			core adw	"	

表 III (续)

最终构建物 ¹	启动子 ²	T 细胞抗原决定基			颗粒形成体	选择基因	纯化 ³
		S Y N	P C R	GENE			
25	MT/H2/U2	S2--(AA2--21) (ay)			整个 sadw/aw SXbal/gIII	neo/egpt	
26	"	S2--(AA14-- 33)(ay)			"	"	
27	"			S2 ayw	S ayw/adw	"	
28	"	连接子		S2-(K)- ayw	"	"	

注: ¹ 见实施例 3

² 任何所述的启动子均适用

³ 见实施例

表Ⅲ概括了如何将合适的 *DNA* 序列结合起来以得到本发明的 *DNA* 构建物。应当指出的是,该表中所公开的任何组分均可被结合以产生适用的 *DNA* 序列,并在转染到宿主细胞中后产生能用作治疗慢性病毒性肝炎之药物的结合物(包括多肽 *a*)和 *b*)。编码 *T* 细胞抗原决定基序列的 *DNA* 序列已通过 *Biosearch Cyclon* 合成仪人工合成法(*SYN*)、*PCR* 法(*PCR*)或病毒基因组的限制性酶切法(*GENE*)制得。

为了治疗慢性病毒性肝炎患者,可将多肽序列 *a*)和 *b*)的结合物配制成任何形式的药用组合物,其中还包括合适的稀释剂或药用载体物质,如缓冲液。

可经胃肠道外途径(如静脉或肌肉内)给药或口服(如利用伤寒细菌细胞包衣活性物质)给药等任何方法给药。

药用制剂中含有足以在用药后诱发应答之浓度的上述结合物。

图 1 显示编码启动子、颗粒形成体序列及选择基因的 *DNA* 构建物(实施例 3/4)。

图 2 显示包含启动子、带有整个 *HB-S-Ag* 的抗原决定基和选择基因的 *DNA*-基因构建物(实施例 3/18)。

图 3 显示呈现启动子、具有颗粒形成体残基的 *T* 细胞抗原决定基和选择基因的 *DNA* 构建物(实施例 3/21)。

图 4 显示在 *Hepa-Care* 期间黑猩猩 1 的 *AST* 值(实施例 10/

1)。

图 5 显示 *Hepa-Care* 治疗期间黑猩猩 1 的抗原值(实施例 10/1)。

图 6 显示用 *Hepa-Care* 加强剂量治疗三次之黑猩猩肝脏 *ALT* 和 *GGT* 酶的值(实施例 10/2)。

图 7 显示 *Hepa-Care* 治疗期间黑猩猩 2 肝脏 *ALT*、*AST* 和 *GGT* 酶的值及抗原值(实施例 10/3)。

图 8 显示所测得的未处理之对照黑猩猩的肝脏酶的值(实施例 10/3)。

图 9 和图 10 分别显示在 *Hepa-Care* 治疗期间患者 1 的抗原和抗体滴度(实施例 11)。

图 11 和图 12 分别显示在 *Hepa-Care* 治疗期间患者 2 的抗原和抗体滴度(实施例 11)。

图 13 和图 14 分别显示在 *Hepa-Care* 治疗期间患者 3 的抗原和抗体滴度(实施例 11)。

下面借助实施例更具体地叙述本发明。

实施例 1

1. 用聚乙二醇(*PEG*)分级沉淀

收集产生 *HBV* 蛋白之培养物的上清液并分装成 2400ml 的等份。向每份中加入 144g *PEG*6000(*serva*), 于室温下搅拌 20

分钟使之溶解,再于4℃下搅拌6小时。于10℃下在GS3转子的500ml瓶中以9000rpm(15000×g)离心分离出沉淀物。收集上清液,加入144g PEG6000,并按上述方法溶解之。在4℃下将溶液搅拌3小时。按上述方法从该溶液中收集沉淀物,所不同的是将离心时间延长至60分钟。

2. 凝胶层析

将PEG沉淀后获得的材料重新溶解于20ml PBS中,并在A-5m(BioRad)上进行凝胶层析。柱子尺寸为25×1000mm,柱床体积为480ml。在一典型分级分离操作中,用1000μg PEG沉淀的HBV蛋白质(10-15ml)上样,并按6滴/分(18ml/h)的流速用PBS洗脱。每管收集3ml。洗脱的HBV蛋白有第一个峰。对所收集的各管进行CsCl梯度离心。

3. 在CsCl梯度中沉降

收集约100ml复盖了A-5m上柱层析中第一个峰且含有预纯化之HBV蛋白的约30管层析洗脱物。用CsCl将该溶液的密度调至1.30g/cc,然后转移到插入SW27/28转子(Beckman)中的晶形塑料试管内。经在下层铺敷密度为1.35g/cc的4ml CsCl溶液、上层铺敷密度为1.25g/cc的4ml CsCl溶液,然后是密度为1.20g/cc的4ml CsCl溶液而形成梯度。将该梯度于10℃以28000rpm的转速离心50小时。之后分级分离该梯度,收集位于1.20g/cc密度层的纯化之HBV蛋白。通过在透析袋中对水透析三次使溶液脱

盐。

实施例 2

HBV 蛋白的定量测定

1. 用放射免疫检测法

在 *AuSRIA* II-125“夹心”(可从 *Abbot* 购得)放射免疫检测法中,将用豚鼠抗乙型肝炎表面抗原的抗体(抗-*HBs*)包被的小珠与血清或血浆或纯化的蛋白和合适的对照物一起保温。所存在的任何 *HBsAg* 均与固相抗体结合。吸出来结合的材料并涤小珠后,加入人¹²⁵I-抗 *HBs* 与小珠上的抗体-抗原复合物反应。然后洗涤小珠以除去未结合的

¹²⁵I-抗 *HBs*。

)-抗 *HBsHBsAg*

)-抗 *HBs* • *HBsAg*¹²⁵I-抗 *HBs*

)-抗 *HBs* • *HBsAg* • ¹²⁵I-抗 *HBs*

2. 用 *ELISA* 法

在 *Enzygnost HBsAg* 微量“夹心”检测法(可从 *Behring* 购得)中,用抗 *HBs* 包被各孔。向各孔内加入血清、血浆或纯化的蛋白和合适的对照物并保温。洗涤后,使过氧化物酶标记的抗 *HBsAg* 抗体与剩余的抗原决定基反应。通过洗涤除去未结合的酶联抗体,并测定固相上的酶活性。加入稀硫酸终止过氯化氢与显色原间的酶

促反应。颜色深度与样品中 *HBsAg* 的浓度成正比,并且是通过将未知样品的颜色深度与阴性和阳性对照血清的色深度进行光度比较而得知。

实施例 3

制备含有启动子、所需抗原序列和选择基因的本发明基因构建物

1. 分离 *MT* 启动子

用核酸内切酶 *Bgl* II 和 *Bam*HI 消化质粒 *pBPV*—342—12 (*ATCC*37224),产生出三个 *DNA* 分子。有用片段含有金属硫因启动子和 *pBR*322 序列(4.5*kb*),并且它易于从其它片段(2.0*kb* 和 7.6*kb*)中检测出来。

反应是在总体积为 200 μ l 的反应缓冲液中进行,其中 *DNA* 的终浓度为 0.5 μ g/ μ l,且包括 100 单位的每种限制酶。37℃保温 3 小时后,于 0.8%琼脂糖凝胶上经琼脂糖凝胶电泳检查是否消化完全。加入 4 μ l 0.5*M* *EDTA* 终止反应。

通过 1.2%琼脂糖的制备性凝胶电泳从其它片段中分离出 4.5*kb* 片段。将该 *DNA* 从琼脂糖凝胶中洗脱到 *DE*—81 *Whatman* 滤纸上,并从滤纸上洗入高盐缓冲液中。通过苯酚—氯仿萃取和两次乙醇沉淀纯化该 *DNA*。

2. 连接编码 *HBV* 核心抗原的 1.8*kb* 片段

从含有 *HBV* 的 *DNA* 中分离出含有 *HBV* 核心编码区的 1.8kb *BamHI*—*BamHI* 片段。将该片段与含有 *MT* 启动子和 *pBR* 残余物的 4.5kb 片段(如 1 中所述)连接。

将 2 μ l 的 1.8kb 片段与 3 μ l 的 4.5kb 片段在总体积为 10 μ l 的连接缓冲液中混合并于 14℃ 过夜连接在一起,其中连接缓冲液含有 2 单位 *T4*—*DNA* 连接酶和 2mM *ATP*。

将该连接混合物加至用于 *DNA* 摄入的 150 μ l 感受态细菌细胞悬浮液中。*DNA* 摄入后,按照 50—300 μ l 细菌悬浮液/平板的量将细菌细胞涂布到含有 50 μ l/ml 氨苄青霉素的 *LB* 琼脂平板上。然后将琼脂平板于 37℃ 保温过夜。从分离出的单个细菌菌落中筛选出含有所需片段的质粒。

3. 筛选含有所需质粒的细菌菌落

用牙签挑起单个菌落并转移至含有 *LB*—氨苄青霉素培养基的试管(5ml)中。将该试管在快速振荡的环境下于 37℃ 培养过夜。从每份生长细菌的悬浮液中制取微小质粒制剂。通过用限制性核酸内切酶 *Bgl* II 消化证明所产生的 *DNA* 是不同的。两个分子(400bp 片段和 5.9kb 片段)是所需要的。经琼脂糖凝胶电泳分析消化产物。从细菌细胞中分离出质粒 *DNA*。

4. 插入新霉素选择标记

通过用限制酶 *EcoRI* 消化使上面(3)中产生的质粒线性化。反应是在 50 μ l 的总体积中进行,且其中质粒 *DNA* 的终浓度为 1 μ g/

μl 。加入 50 单位的 *EcoRI*, 37℃ 保温 3 小时后通过琼脂糖凝胶电泳证明消化是否完成。加入 1 μl 0.5M *EDTA* 终止反应, 并用终浓度为 0.3M 的乙酸钠和 3—4 倍体积的乙醇于 -80℃ 处理 30 分钟以沉淀 DNA。将沉淀出的 DNA 溶于 50 μl 蒸馏水中。

将 2 μl 线性化的质粒与含 *MT* 启动子和新霉素选择基因(通过用核酸内切酶 *EcoRI* 消化后从质粒 *pMT-neo-E* (得自 *ATCC/Exogene*) 中分离出的 3.9kb 片段)的 3 μl DNA 片段混合, 并连接在一起。筛选带有所需质粒的单个细菌菌落。

5. 分离含有 *U2* 启动子序列的片段

用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *ApaI* 消化质粒 *pUC-8-42* (得自 *Exogene*), 产生出两个 DNA 分子。所需的片段含有 *U2* 启动子 (340bp) 且易于从另一片段 (3160bp) 中检测出来。消化在总体积为 200 μl 的反应缓冲液中进行, DNA 的终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 其中包括 100 单位的每种限制酶。消化的完成是于 37℃ 保温 3 小时后通过在 0.7% 琼脂糖凝胶中进行琼脂糖凝胶电泳来检测的。加入 4 μl 0.5M *EDTA* 终止反应。通过使用 1.2% 琼脂糖的制备性凝胶电泳从质粒 DNA 中分离出 340bp 片段。将 DNA 从琼脂糖凝胶中洗脱到 *DE-81 Whatman* 滤纸上, 再将 DNA 从中转移至高盐缓冲液内。经苯酚/氯仿提取和两次乙醇沉淀纯化 DNA。

6. 将含有启动子序列的片段插入多聚连接子质粒中

用限制酶 *EcoRI* 将含有多聚连接子序列的质粒 *pSP165*

(得自 *Promega Biotec*) (含有下列限制位点: *EcoRI*, *SacI*, *SmaI*, *AvaI*, *BamHI*, *Bgl II*, *SalI*, *PstI*, *Hind III*) 切成线性。

反应在 50 μ l 的总体积中进行, 且质粒 DNA 的终浓度为 1 μ g/ μ l。加入 50 单位 *EcoRI*, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 3 小时后通过琼脂糖凝胶电泳证明消化是否完成。加入 1 μ l 0.5M EDTA 终止反应, 并用终浓度为 0.3M 的乙酸钠和 3—4 倍体积的乙醇于 -80 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟以沉淀 DNA。将所沉淀的 DNA 溶解于 50 μ l 蒸馏水中。

将 2 μ l 质粒 DNA 与 10 μ l 含有 U2 启动子序列的片段 DNA 混合, 并在含有 2 单位 T_4 -DNA 连接酶和 2mM ATP 的 25 μ l 总体积连接缓冲液中 14 $^{\circ}$ C 保温过夜, 使之连接在一起。然后, 通过苯酚/氯仿提取和两次乙醇沉淀纯化 DNA, 并溶解于 10 μ l 蒸馏水。所产生的 *EcoRI* 和 *ApaI* 粘性末端必须转变成平端并连接之。粘性末端是按如下方法通过与绿豆核酸酶反应而变为平端的: 将 20 单位的酶加至含 25 μ l DNA 的反应缓冲液 (浓度为 1 μ g/ μ l) 中, 产生 1% 终浓度的甘油, 和 35 μ l 的最终反应体积。于 30 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟后, 经用苯酚/氯仿提取接着用乙醇沉淀两次而纯化 DNA。将所得的 DNA 重新溶于 5 μ l 蒸馏水中。在含有比上述者多 10 倍的 T_4 连接酶和 2mM ATP 的 15 μ l 反应体积中 14 $^{\circ}$ C 保温过夜, 使所得平端 DNA 连接在一起。

将连接混合物加至用于 DNA 摄入的 150 μ l 感受态细菌细胞悬浮液中。DNA 摄入后, 将细菌细胞按每平板 50—300 μ l 细胞悬液的

量涂布在含有 50 $\mu\text{g/ml}$ 的氯苄青霉素的 *LB* 琼脂平板上。使琼脂平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温过夜。筛选携带含所需 *U2* 启动子 片段之质粒的单个细菌菌落。从细菌细胞中分离所产生的质粒,并通过限制酶分析鉴定之。

7. 合成的寡 *DNA*—核苷酸 89(*SEQ ID No:30*)与 *MT* 启动子片段(4.5 kb)连接。

将含有 *MT* 启动子和 *pBR* 残余部分的 4.5 kb 片段(如 1 中所述)与合成的寡核苷酸 89(*SEQ ID No:30*)连接在一起。将连接混合物加至用于 *DNA* 摄入的 150 μl 感受态细菌细胞悬浮液中。筛选其中存在所需质粒的单个细菌菌落。经用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI* 消化证实该新质粒。有两个分子是预期得到的,一个为 2.0 kb ,一个为 2.6 kb 。

8. 将合成的寡核苷酸 101(*SEQ ID No:32*)与质粒(如 7 中所述)连接。

用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 消化如 7 中所述的质粒并除去 13 个核苷酸的片段(如 1 中所述)。将所产生的含有第一寡核苷酸 89(*SEQ ID No:30*)的片段与寡核苷酸 101(*SEQ ID No:32*)(*Bgl* II — *Bam*HI 片段)连接在一起。*DNA* 摄入后,筛选含所需质粒的单个细胞。所产生的新质粒通过用核酸内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI* 或用 *EcoRI* 和 *Bgl* II 消化而加以证实。

9. 将合成的 *DNA*—寡核苷酸 99(*SEQ ID No:31*)与 4.5 kb

片段(如1中所述)连接

将 4.5kb 片段(*Bgl* II —*Bam*HI)与 DNA 寡核苷酸 99 (*SEQ ID No* :31)连接在一起。对含有不同 DNA 的单个细菌菌落进行筛选后,通过用 *Eco*RI 消化后产生两个片段 (1.9kb 和 2.7kb) 并通过用 *Bgl* II 或 *Bam*HI 产生正线性化而鉴定出所需质粒。

然后用 *Pst*I 和 *Bam*HI 消化该新质粒。产生两个预期的分子, 一个为 2kb 片段,它含有 *pBR* 残余部分、*MT* 启动子和寡核苷酸; 另一个为 2.0kb 的 *pBR* 残余部分。分离出 2.6kb 片段。

10. 将 9 中所述质粒的 2.6kb 片段与从 8 中所述质粒分离的片段连接。

用 *Pst*I 和 *Bgl* II 消化含有 DNA 寡核苷酸 89 和 101(分别为 *SEQ ID No*:30 和 32)的质粒(见 8)。共产生两个片段,即含有 *pBR* 残余部分和 *MT* 启动子的 2.5kb 片段以及含有 *pBR* 残留部分和两种寡核苷酸的 2.2kb 片段。

使该 2.2kb 片段与 8 中所述的含有 *pBR* 残余部分、*MT* 启动子和寡核苷酸 99 (*SEQ ID No* :31)的 2.6kb 片段相连接。

筛选出所需质粒后,通过 *Bgl* II —*xba*I 的限制性核酸内切酶消化鉴定该质粒。得到两个预期的片段,即寡 DNA—核苷酸的 270bp 片段以及含 *MT* 启动子和 *pBR* 的 4.5kb 片段。

11. 连接 2.3kb HBV *Bgl* II —*Bgl* II 片段

从含有 HBV 的 DNA 中分离出含 HBV 前 *S*₁、前 *S*₂ 和 *S* 编码

区的 2.3kb *Bgl* II—*Bgl* II 片段。然后将该 2.3kb 片段与含有 *MT* 启动子的 4.5kb 片段(按 1 中所述方法制得)连接在一起。

将 2 μ l 2.3kb 片段与 3 μ l 4.5kb 片段相混合,并在含有 2 单位 *T*₄—DNA 连接酶和 2mM *ATP* 的总体积 10 μ l 的连接缓冲液中于 14℃ 连接过夜。

将所得的连接混合物加到用于 DNA 摄入的 150 μ l 感受态细菌细胞悬浮液中。DNA 摄入后,将细菌细胞按每平板 50—300 μ l 细胞悬液的量涂布到含有 50 μ l/ml 氨苄青霉素的 *LB* 琼脂平板上。平板于 37℃ 培养过夜。筛选其中存在含所需片段之质粒的分离的单个细菌菌落。

12. 用 *HBV* 核心抗原决定基转化部分 *HBV*—基因序列

用核酸内切酶 *Bgl* II 和 *Xba*I 消化上面 11 中产生的质粒,得到两预期的分子,即 550bp 片段和 6.25kb 片段。然后,通过琼脂糖凝胶电泳分离出 6.25kb 片段。

使 6.25kb 片段与编码 *HBV* 核心基因之抗原决定基部分的 270bp 片段(该 270bp 片段是用 *Bgl* II 和 *Xba*I 消化 10 中所述的质粒并按上述方法分离后得到)相连接。

将连接混合物加至用于 DNA 摄入的 150 μ l 感受态细菌细胞悬浮液中。从分离的单个细菌菌落中筛选所需质粒。通过用 *Bam*HI 消化证明该新质粒。得到三个预期的分子,即 950bp、450bp 和 5,150bp 片段。

13. 制备“载体”质粒

用 *EcoRI* 和 *XbaI* 消化 11 中所述的质粒。预期产生一个 2,450bp 片段和一个经凝胶电泳后分离出的 4,350bp 片段。

将该 4,350bp 片段与编码从 *ATG* 至 *XbaI* 位点之 *HBV-S* 基因整个 DNA 序列 (其中 *ATG* 变为 *ATA*) 的寡 DNA-核苷酸 39 (*SEQ ID No:29*) 连接在一起。

14. 完整 *HBV-S* 基因上游核心-抗原决定基

用 *PstI* 和 *XbaI* 消化该“载体”质粒,得到 600bp 质粒残余部分和 3,850bp 片段这两个预期的分子。分离出 3,850bp 片段,并与消化 10 中算术的质粒后分离出的 2,800bp *Pst-XbaI* 片段(2,700bp)相连接。

筛选出所需质粒后,通过 *EcoRI* 和 *XbaI*、*EcoRI* 和 *Bgl II* 以及 *BamHI* 的限制性核酸内切酶消化鉴定该质粒。

15. 插入选择标记

用 *EcoRI* 将 14 中所述的质粒切成线性。反应在 50 μ l 总体积中进行,且质粒 DNA 的终浓度为 1 μ g/ μ l。加入 50 单位 *EcoRI*,并于 37 $^{\circ}$ C 保温 3 小时后通过琼脂糖凝胶电泳证实消化已完成。

加入 1 μ l 0.5M *EDTA* 终止反应。用终浓度 0.3M 的乙酸钠和 3-4 倍体积的乙醇于 -80 $^{\circ}$ C 处理 30 分钟以沉淀出 DNA。将沉淀出的 DNA 溶解于 50 μ l 蒸馏水中。

将 2 μ l 切成线性质粒与 3 μ l 含有 *MT* 启动子和新霉素选择基因

(如 4 中所述)的 *DNA* 片段混合并连接之。筛选带有所需质粒的分离的单个细菌菌落,并从中分离、纯化和鉴定该质粒。

也可用 *U2* 启动子构建上面所述的各基因构建物。从而以用 *EcoRI* 和 *Bgl* II 消化后分离出的含有 *U2* 启动子的 *DNA* 片段取代了同样消化后得到的含 *MT* 启动子的 *DNA* 片段。

16. 分离大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(*cgpt*)选择基因。

用 *Bam*HI 和 *Bgl* II 消化质粒 *pMSG* 后分离出含有 *egpt* 选择基因的片段(1.8kb),并与含有 *MT* 启动子的 4.5kb 片段(*Bgl* II — *Bam*HI, 1 中所述)连接。

筛选所需质粒后,分离、纯化并最后将 *Bam*HI 位点转化为 *EcoRI* 位点。

17. 借助 *PCR* 法分离所需 *DNA* 序列

经凝胶电泳分离出一个 *DNA* 片段(400bp)。它是利用特定的寡核苷酸 131 和 132 (*SEQ ID No* :33 和 34)作引物以 *PCR* 方法(如实施例 5 所述)产生的。

用核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Xba*I 消化该 *DNA* 片段,然后经凝胶电泳纯化之。将分离出的 *PCR* 片段与用 *Bgl* II 和 *Xba*I 消化后从 13 中所述质粒中分离到的 6.25kb 片段相连接。*DNA* 摄入和细菌转化后,筛选含所需质粒的单个细菌菌落。

18. 插入选择标记

通过向 15 中所述的质粒中加入选择基因而完成质粒(17 中所述)的构建。

19. 分离 H_2K 启动子

用 *EcoRI* 和 *Bgl* II 消化质粒 *pSP65H₂*(得自 *Exogenc*),从而分离出 H_2K 启动子(2kb)。

在所述的所有构建物中,所有启动子均可换成 *EcoRI*/*Bgl* II 片段。

20. 转化部分 *HBV* 基因序列

用核酸内切酶 *Bgl* II 和 *XbaI* 消化得自 11)的质粒,得到两个所需分子,其中一个是经琼脂糖凝胶电泳后分离出的 0.250kb 片段。

将此 0.250kb 片段与寡 DNA—核苷酸 23(*SEQ ID No*:28)连接。将连接混合物加到用于 DNA 摄入的 150 μ l 感受态细菌细胞悬液中。从分离出的单个细菌菌落中筛选出所需质粒。经用 *EcoRI* 和 *Bgl* II 核酸内切酶消化证明该新质粒。预期得到两个分子,一个为 1.9kb,另一个为 4.450kb。

21. 插入 *egpt* 选择标记

用 *EcoRI* 将 20 中所述的质粒切成线性。反应在 100 μ l 总体积内进行,且其中质粒 DNA 的终浓度为 0.6 μ g/ μ l。加入 60 单位 *EcoRI*,并于 37 $^{\circ}$ C 保温 3 小时后通过琼脂糖凝胶电泳证实消化已完成。加入 2 μ l 0.5M *EDTA* 终止反应,并于 -80 $^{\circ}$ C 用终浓度为 0.

3M 的乙酸钠和 4 倍体积的乙醇 沉淀 DNA1 小时。将沉淀的 DNA 溶解于 50 μ l 蒸馏水中。

将 2 μ l 线性化的质粒与 3 μ l 用 *EcoRI* 消化后获得的含 MT 启动子和 *egpt* 选择基因 (如 16 中所述) 的 DNA 片段(3.7kb)混合并连接。从单个细菌菌落中筛选出所需质粒。表 III 中所述的各基因构建物均可按上述方法制备。

实施例 4

用本发明的构建物转染哺乳动物细胞

为了实现本发明构建物编码的 HBV 肽的大量分泌,须用本发明的 DNA 构建物转染哺乳动物细胞。共转染可分两步完成(即每一构建物单独转染)或以一步完成(即用两种构建物的制品一次转染)。可利用两种构建物上的不同选择标记或用免疫检测法检测两种构建物之表达产物的分泌来进一步证实共转染。

或者,可将编码本发明 HBV 肽序列的序列和编码完整 S 或核心或 HAV 蛋白的各个序列结合在单个构建物中。

实施例 5

聚合酶链反应(PCR)

聚合酶链反应可在体外将已知基因组序列选择区域的特定 DNA 核苷酸序列扩增一百万倍以上 (Thomas J. White, Nor-

man. Arnheim, Henry A. Erlich 1989: *The polymerase chain reaction, Technical Focus*, Vol. 5. No. 6; S. Kwok and R. Higuchi 1989: *Avoiding false positives with PCR. Nature*, Vol. 399, pp237—238)。

对从细胞分离的 DNA 或质粒 DNA 进行处理以分离其互补链。然后将这些链与过量的两种 DNA 寡核苷酸(每个长 20—25 个碱基对)一起退火,所说的寡核苷酸是通过化学方法合成的,以与由 X 核苷酸(其中 X 一般为 50—2,000bp)分隔开的序列相匹配。

在 DNA 聚合酶催化的体外 DNA 合成中,将这两种寡核苷酸用作特异性引物,该聚合酶是在对应于这两种寡核苷酸的序列间拷贝 DNA。如果这两种引物寡核苷酸含有正确序列,就可能在 5' 和 3' 端产生新的消化位点。

经过多轮反应后,得到大量的具有所需长度的 DNA 片段。通过凝胶电泳进行纯化,并通过限制酶消化和琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。然后将扩增并纯化过的 DNA 片段与其它片段(即质粒)连接。

扩增带平端的 PCR—DNA 片段。为了得到粘性末端(用于连接步骤),必须用所需的核酸内切酶消化该片段并再次纯化之。

PCR 反应共进行 20—30 个循环周期。每一周期分为三个步骤,其反应时间和反应温度均不相同(由 PCR—热循环控制器控制)。第一步骤为基质 DNA 变性(1 分钟/95℃),第二步骤为基质 DNA 和引物杂交(1 分钟/55℃),接着是“聚合”步骤(2 分钟/

72℃)。

每次检测的终体积为 30 μ l ,例如 ,含有以下终浓度:PCR 缓冲液 (IX)、有各 200 μ M 之四种核苷酸的核苷酸混合物、各 200 μ g (30 μ l)的两种引物、每 30 μ l *aquabidest* 含 0.5 单位 *Taq* 聚合酶。

实施例 6

培养转染细胞以分泌蛋白质

于第 1 天向平皿(ϕ 10cm)中的普通生长培养基(DMEM+10% 牛胎血清、葡萄糖和谷氨酰胺)中接种受体细胞(C127 或 CHO 细胞,得自 ATCC)(每平皿接种 1—2 $\times$ 10⁶ 个细胞)。第二天,除去培养基(在向细胞中加入 DNA 沉淀物前 4 小时),用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞两次。然后加入 8ml 无 FCS 的 DMEM。4 小时后向细胞中加入 DNA 沉淀物(按下述方法制备)。再过 4 小时后除去培养基,加入 3ml *Glycerol—Mix* (50ml 2 $\times$ TBS 缓冲液,30ml 甘油,120ml 蒸馏水)。于 37℃保温 3 分钟后立即除去 *Glycerol—Mix*,并用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞。将细胞加于 8ml 含 10%FCS 的 DMEM 中培养过夜。

48 小时后,用胰蛋白酶—EDTA 溶液(0.025%胰蛋白酶+1mM EDTA)处理,以从平皿中回收细胞。然后用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞以除去胰蛋白酶—EDTA,悬浮于加有 10% FCS 的 DMEM 中,并分加到 24 孔平板各孔内(将每一平皿的细胞分加到四个 24

孔平板中)。

当细胞生长良好时,加入选择培养基[(例如,当选择 *eco-gpt* 时其浓度为: $0.5-1\text{mg/ml}$ 的新霉素或黄嘌呤($250\mu\text{g/ml}$)、次黄嘌呤($15\mu\text{g/ml}$)或腺嘌呤($25\mu\text{g/ml}$)、胸腺嘧啶($10\mu\text{g/ml}$)、氨基嘌呤($2\mu\text{g/ml}$)、霉酚酸($25\mu\text{g/ml}$)]。每周更换一次培养基。两周后可看到第一个生长的细胞集落。

向 $10\mu\text{g}$ 质粒 *DNA* 和 $20\mu\text{g}$ 载体-*DNA* (鲑精子 *DNA*, 牛胸腺 *DNA*) 中加入 *TE* 缓冲液(10mM Tris-HCl , 1mM EDTA , $\text{PH}7.05$)至终体积为 $440\mu\text{l}$, 并与 $60\mu\text{l } 2\text{M CaCl}_2$ 混合。然后加入相同量的 $2\times\text{TBS}$ (*Hepes* 50mM , *NaCl* 280mM , Na_2HPO_4 1.5mM , $\text{PH}7.05$)并充分混合。沉淀溶液于 37°C 保温 30 分钟,并直接加到用于转染的细胞中。

实施例 7

制备纯化之颗粒的佐剂

将所需浓度的抗原悬浮于无菌盐水中,然后向其中加入 1:10000 体积的乙基汞硫代水杨酸钠(*Thimerosal*)、1/10 体积过滤除菌的 $0.2\text{M KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。用无菌 1N NaOH 调节 *PH* 至 5.0,并将悬浮液于室温下搅拌 3 小时。 2000rpm 离心 10 分钟以回收铝沉淀的抗原。然后重新悬浮于含有 1:10000 的乙基汞硫代水杨酸钠的无菌生理盐水中,并在无菌条件下分装成若干等份。

实施例 8

纯化乙型肝炎核心抗原

收集分泌 *HB*—核心抗原之细胞的上清液,并超滤浓缩。于 *Beckman SW28* 转子中以 20,000rpm 的转速 4℃离心 15 分钟,以澄清该浓缩物。

在 *Beckman SW28* 转子中,于 4℃以 28,000rpm 的转速进行蔗糖密度梯度离心(0—45%蔗糖),以检验颗粒形成分离梯度,并用 *ELISA* 法分析各部分。

实施例 9

下列各表给出了对下述的本发明免疫原性颗粒进行 *ELISA* 分析的部分结果:

表 IV 显示了利用抗前 *S*₁ 单克隆抗体 *MA18/7* 和抗 *HBs* 单克隆抗体 *G022* 对产生于包括前 *S*₁ 抗原决定基和 *S* 区的本发明任何 *HBV* 序列构建物的纯化之 *HBs*—抗原颗粒进行 *ELISA* 分析的数据。

表 IV 显示经 *CsCl* 密度梯度离心后收集的各部分(21)。

表 N-1

CsCl 梯度 分级分离序号	ELISA 测定 (E=492) 单克隆抗体 18/7
13	0.092
14	0.210
15	0.388
16	1.662
17	2.604
18	0.648
19	0.031

表 N-2

分级分离序号	ELISA测定 (E=492) 多克隆抗体 G022
13	0.136
14	0.426
15	0.822
16	1.970
17	2.954
18	0.967
19	0.076

表 V 显示用抗 *HB* 核心多克隆抗体和抗 *HB-S-Ag* 单克隆抗体 G022 对产生于本发明的任何 *HB*—核心序列构建物的纯化之 *HB*—核心抗原颗粒进行 *ELISA* 分析的数据。

表 V-1

蔗糖梯度 分级分离序号	ELISA测定 (E=492) 多克隆抗体
6	0.25
7	0.922
8	1.423
9	1.5
10	1.5
11	1.28
12	0.466

表 V-2

蔗糖梯度 分级分离序号	ELISA测定 (E=492) 单克隆抗体 GO22
6	0.020
7	0.024
8	0.018
9	0.011
10	0.015
11	0.020
12	0.022

实施例 10

给黑猩猩使用 *Hepa—Care* 的研究

Hepa—Care 是以特定配方(比值为 50 : 50)呈现乙型肝炎表面抗原 (S_1 和 S) 的颗粒,它用于治疗肝炎病毒慢性携带者。

实验 1

于 0、4 和 8 周按每次注射 $18\mu g$ 的剂量用 *Hepa—Care* 对携带乙型肝炎的黑猩猩 1 进行治疗(肌肉内注射)。

监测肝脏酶活性(图 IV)及乙型肝炎抗原水平(图 V)。

实验 2

经过以上处理后,于 30, 34 和 38 周对黑猩猩 1 进行加强剂量注射。其结果示于图 VI 中。

实验 3

用 *Hepa—Care* 处理黑猩猩 2, 与黑猩猩 1 不同的是对黑猩猩 2 进行静脉内注射。剂量为 $2mg$ 。其结果示于图 VII 中。

同时监测对照黑猩猩 3 的肝脏酶,结果示于图 VIII 中。

实施例 11

用 *Hepa—Care* 治疗(其定义见实施例 10):

患者 1(男性,年龄 65 岁,患病两年):

乙型肝炎参数:

<i>HBsAg</i>	阳性
抗— <i>HBs</i>	阴性
<i>HBeAg</i>	阴性
抗— <i>HBe</i>	阳性
抗— <i>HBc</i>	阴性

于第 0、1、6 和 7 个月用 *Hepa—Care* 治疗(*i. m.*)。图 IX 和 X 中给出了抗原和抗体测定的结果。

患者 2(女性,年龄 48 岁,患病 12 年):

乙型肝炎参数:

<i>HBsAg</i>	阳性
<i>HBeAg</i>	阴性
抗— <i>HBs</i>	阴性
抗— <i>HBe</i>	阳性
抗— <i>HBc</i>	阳性

于第 0、1 和 6 个月用 *Hepa—Care* 治疗 (*i. m.*)。抗原和抗体测定的结果示于图 XI 和 XII 中。

患者 3(女性,年龄 41 岁,患病 5 年):

乙型肝炎参数:

<i>HBsAg</i>	阳性
<i>HBeAg</i>	阴性
抗— <i>HBs</i>	阴性
抗— <i>HBe</i>	阳性

于第 0、1、2 和 5 个月用 *Hepa—Care* 进行治疗 (*i. m.*)。 *HBs* 抗原和抗 *HBs* 抗体的测定值示于图 X III 和 X IV 中。

序列目录

SEQ ID NO:	1
序列类型:	核苷酸
序列长度:	558 b p
链 型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV 核心
即时实验来源:	PCR 扩增

ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT	AGA	TCT	CAA	TCG	CCG	CGT	CGC	AGA
AGA	TCT	CAA	TCT	CGG	GAA	TCT	CAA	TGT	TAG	

SEQ ID NO:

2

序列类型:

核苷酸

序列长度:

504 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

PCR 扩增

ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT								

SEQ ID NO:	3
序列类型:	核苷酸
序列长度:	504 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV 核心
即时实验来源:	PCR 扩增

ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT								

SEQ ID NO:

4

序列类型:

核苷酸

序列长度:

534 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

PCR 扩增

TCC	AAC	CTG	TGC	CTT	GGG	TGG	CTT	TGG	GGC	
ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT								

SEQ ID NO:

5

序列类型:

核苷酸

序列长度:

534 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

PCR 扩增

	TCC	AAC	CTG	TGC	CTT	GGG	TGG	CTT	TGG	GGC
ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT								

SEQ ID NO:

6

序列类型:

核苷酸

序列长度:

87 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

ATC CTC TGC TGG GGG GAA TGG ATG ACT CTA GCT
ACC TGG GTG GGC AAT AAT TTG GAA GAT CCA GCA
TCT AGG GAC CTT GTA GTA AAT

SEQ ID NO:

7

序列类型:

核苷酸

序列长度:

81 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

GAC ATT GAC CCT TAT AAA GAA TTT GGA GCT ACT
GTG GAG TTA CTC TCG TTT TTG CCT TCT GAC TTC
TTT CCT TCC GTC AGG

SEQ ID NO:

8

序列类型:

核苷酸

序列长度:

114 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

TCC AAC CTG TGC CTT GGG TGG CTT TGG GGC ATG
GAC ATT GAC CCT TAT AAA GAA TTT GGA GCT ACT
GTG GAG TTA CTC TCG TTT TTG CCT TCT GAC TTC
TTT CCT TCC GTC AGG

SEQ ID NO:

9

序列类型:

核苷酸

序列长度:

90 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

GAT CTC CTA GAC ACC GCC TCA GCT CTG TAT CGA
GAA GCC TTA GAG TCT CCT GAG CTA TGC TCA CCT
CAC CAT ACT GCA CTC AGG CAA GGT

SEQ ID NO:

10

序列类型:

核苷酸

序列长度:

261bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV核心

即时实验来源:

化学合成

ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTC	AGG	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CTA	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GGT	ATC	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TGG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGC	AAT	AAT	TTG	GAA
GAT	CCA	GCA	TCT	AGG	GAC	CTT	GTA	GTA	AAT	

SEQ ID NO:

11

序列类型:

核苷酸

序列长度:

291 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

TCC	AAC	CTG	TGC	CTT	GGG	TGG	CTT	TGG	GGC	
ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTC	AGG	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CTA	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GGT	ATC	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TGG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGC	AAT	AAT	TTG	GAA
GAT	CCA	GCA	TCT	AGG	GAC	CTT	GTA	GTA	AAT	

SEQ ID NO:

12

序列类型:

核苷酸

序列长度:

123bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV核心

即时实验来源:

化学合成

ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA	GAT	CCA	GCA
TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT	GTT	AAT	ACT
AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA	CTA	TTG	TGG
TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT			

SEQ ID NO:

13

序列类型:

核苷酸

序列长度:

138bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV核心

即时实验来源:

化学合成

GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT	GTT	AAT
ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA	CTA	TTG
TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT	GGA	AGA
GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT	TTC	GGA
GTG	TGG									

SEQ ID NO:

14

序列类型:

核苷酸

序列长度:

822bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV S2 ayw/adw

即时实验来源:

HBV DNA

ATG	CAG	TGG	AAT	TCC	AGA	ACC	TTC	CAC	CAA	ACT	CTG
CAA	GAT	CCC	AGA	GTG	AGA	GGC	CTG	TAT	TTC	CCT	GCT
GGT	GGC	TCC	AGT	TCA	GGA	ACA	GTA	AAC	CCT	GTT	CTG
ACT	ACT	GCC	TCT	CCC	TTA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG
ATA	GAG	AAC	ATC	ACA	TCA	GGA	TTC	CTA	GGA	CCC	CTT
CTC	GTG	TTA	CAG	GCG	GGG	TTT	TTC	TTG	TTG	ACA	AGA
ATC	CTC	ACA	ATA	CCG	CAG	AGT	CTA	GAC	TCG	TGG	TGG
ACT	TCT	CTC	AAT	TTT	CTA	GGG	GGA	ACT	ACC	GTG	TGT
CTT	GGC	CAA	AAT	TCG	CAG	TCC	TCA	ACC	TCC	AAT	CAC
TCA	CCA	ACC	TCT	TGT	CCT	CCA	ACT	TGT	CCT	GGT	TAT
CGC	TGG	ATG	TGT	CTG	CGG	CGT	TTT	ATC	ATC	TTC	CTC
TTC	ATC	CTG	CTG	CTA	TGC	CTC	ATC	TTC	TTG	TTG	GTT
CTT	CTG	GAC	TAT	CAA	GGT	ATG	TTG	CCC	GTT	TGT	CCT
CTA	ATT	CCA	GGA	TCC	TCA	ACA	ACC	AGC	ACG	GGA	CCA
TGC	CGG	ACC	TGC	ATG	ACT	ACT	GCT	CAA	GGA	ACC	TCT
ATG	TAT	CCC	TCC	TGT	TGC	TGT	ACC	AAA	CCT	TCG	GAC
GGA	AAT	TGC	ACC	TGT	ATT	CCC	ATC	CCA	TCA	TCC	TGG
GCT	TTC	GGA	AAA	TTC	CTA	TGG	GAG	TGG	GCC	TCA	GCC
CGT	TTC	TCC	TGG	CTC	AGT	TTA	CTA	GTG	CCA	TTT	GTT
CAG	TGG	TTC	GTA	GGG	CTT	TCC	CCC	ACT	GTT	TGG	CTT
TCA	GTT	ATA	TGG	ATG	ATG	TGG	TAT	TGG	GGG	CCA	AGT
CTG	TAC	AGC	ATC	TTG	AGT	CCC	TTT	TTA	CCG	CTG	TTA
CCA	ATT	TTC	TTT	TGT	CTT	TGG	GTA	TAC	ATT		

SEQ ID NO:

15

序列类型:

核苷酸

序列长度:

99 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

TAT	GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG
CAA	CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT
TTT	GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC

SEQ ID NO:

16

序列类型:

核苷酸

序列长度:

390 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV核心

即时实验来源:

PCR扩增

	TCC	AAC	CTG	TGC	CTT	GGG	TGG	CTT	TGG	GGC
ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	

SEQ ID NO

17

序列类型:

核苷酸及对应的蛋白质

序列长度:

60bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV S1 ay

即时实验来源:

化学合成

AAT CCT CTG GGA TTC TTT CCC GAT CAC CAG TTG GAT

CCA GCC TTC AGA GCA AAC ACC GCA

Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp

Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala

S E Q I D N O

18

序列类型:

核苷酸及对应的蛋白质

序列长度:

63bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV S1 ay

即时实验来源:

化学合成

CCT GCC TCC ACC AAT CGC CAG TCA GGA AGG CAG - CCT

ACC CCG CTG TCT CCA CCT TTG AGA AAC

Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro

Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asn

S E Q I D N O

1 9

序列类型:

核苷酸及对应的蛋白质

序列长度:

6 3 b p

链 型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组 D N A

原始来源:

H B V S l a y

即时实验来源:

化学合成

GAT CCA GCC TTC AGA GCA AAC ACC GCA AAT CCA GAT

TGG GAC TTC AAT CCC AAC AAG GAC ACC

Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp

Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr

SEQ ID No

20

序列类型:

核苷酸及对应的蛋白质

序列长度:

108 bp

链 型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV S1 ay

即时实验来源:

化学合成

CCG	CAC	GGA	GGC	CTT	TTG	GGG	TGG	AGC	CCT	CAG	GCT
CAG	GGC	ATA	CTA	CAA	ACT	TTG	CCA	GCA	AAT	CCG	CCT
CCT	GCC	TCC	ACC	AAT	CGC	CAG	TCA	GGA	AGG	CAG	CCT

Pro	His	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln
Ala	Gln	Gly	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Pro	Ala	Asn
Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly
Arg	Gln	Pro								

SEQ ID NO:	21
序列类型:	核苷酸
序列长度:	63 bp
链 型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV S1 ad
即时实验来源:	化学合成

CCT	GCC	TCC	ACC	AAT	CGG	CAG	TCA	GGA	AGG	CAG	CCT
ACT	CCC	ATC	TCT	CCA	CCT	CTA	AGA	GAC	-	X	

SEQ ID NO	22
序列类型:	核苷酸及对应的蛋白质
序列长度:	108 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV S1 ay
即时实验来源:	化学合成

CCA	CAC	GGC	GGT	ATT	TTG	GGG	TGG	AGC	CCT	CAG	GCT
CAG	GGC	ATA	TTG	ACC	ACA	GTG	TCA	ACA	ATT	CCT	CCT
CCT	GCC	TCC	ACC	AAT	CGG	CAG	TCA	GGA	AGG	CAG	CCT

Pro	His	Gly	Gly	Ile	Leu	Gly	Trp	Ser	Pro	Gln
Ala	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ile
Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Thr	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly
Arg	Gln	Pro								

SEQ ID NO:	23
序列类型:	核苷酸
序列长度:	60 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV S2 ay
即时实验来源:	化学合成

CAG TGG AAT TCC AGA ACC TTC CAC CAA ACT CTG
CAA GAT CCC AGA GTG AGA GGC CTG TAT - X

SEQ ID NO:	24
序列类型:	核苷酸
序列长度:	60 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV
即时实验来源:	化学合成

GAT CCC AGA GTG AGA GGC CTG TAT TTC CCT GCT
GGT GGC TCC AGT TCA GGA ACA GTA AAC - X

SEQ ID NO:

25

序列类型:

核苷酸

序列长度:

558 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心 adw

即时实验来源:

PCR 扩增

ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT	AGA	TCT	CAA	TCG	CCG	CGT	CGC	AGA
AGA	TCT	CAA	TCT	CGG	GAA	TCT	CAA	TGT	TAG	

SEQ ID NO:

26

序列类型:

核苷酸

序列长度:

678bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV S adw/ayw

即时实验来源:

HBV DNA

ATA	GAG	AAC	ATC	ACA	TCA	GGA	TTC	CTA	GGA	CCC	CTT	CTC
GTG	TTA	CAG	GCG	GGG	TTT	TTC	TTG	TTG	ACA	AGA	ATC	CTC
ACA	ATA	CCG	CAG	AGT	CTA	GAC	TCG	TGG	TGG	ACT	TCT	CTC
AAT	TTT	CTA	GGG	GGA	ACT	ACC	GTG	TGT	CTT	GGC	CAA	AAT
TCG	CAG	TCC	TCA	ACC	TCC	AAT	CAC	TCA	CCA	ACC	TCT	TGT
CCT	CCA	ACT	TGT	CCT	GGT	TAT	CGC	TGG	ATG	TGT	CTG	CGG
CGT	TTT	ATC	ATC	TTC	CTC	TTC	ATC	CTG	CTG	CTA	TGC	CTC
ATC	TTC	TTG	TTG	GTT	CTT	CTG	GAC	TAT	CAA	GGT	ATG	TTG
CCC	GTT	TGT	CCT	CTA	ATT	CCA	GGA	TCC	TCA	ACA	ACC	AGC
ACG	GGA	CCA	TGC	CGG	ACC	TGC	ATG	ACT	ACT	GCT	CAA	GGA
ACC	TCT	ATG	TAT	CCC	TCC	TGT	TGC	TGT	ACC	AAA	CCT	TCG
GAC	GGA	AAT	TGC	ACC	TGT	ATT	CCC	ATC	CCA	TCA	TCC	TGG
GCT	TTC	GGA	AAA	TTC	CTA	TGG	GAG	TGG	GCC	TCA	GCC	CGT
TTC	TCC	TGG	CTC	AGT	TTA	CTA	GTG	CCA	TTT	GTT	CAG	TGG
TTC	GTA	GGG	CTT	TCC	CCC	ACT	GTT	TGG	CTT	TCA	GTT	ATA
TGG	ATG	ATG	TGG	TAT	TGG	GGG	CCA	AGT	CTG	TAC	AGC	ATC
TTG	AGT	CCC	TTT	TTA	CCG	CTG	TTA	CCA	ATT	TTC	TTT	TGT
CTT	TGG	GTA	TAC	ATT								

SEQ ID NO:

27

序列类型:

核苷酸

序列长度:

585bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV S adw/ayw

即时实验来源:

HBV DNA

CTA	GAC	TCG	TGG	TGG	ACT	TCT	CTC	AAT	TTT	CTA	GGG
GGA	TCT	CCC	GTG	TGT	CTT	GGC	CAA	AAT	TCG	CAG	TCC
CCA	ACC	TCC	AAT	CAC	TCA	CCA	ACC	TCC	TGT	CCT	CCA
ATT	TGT	CCT	GGT	TAT	CGC	TGG	ATG	TGT	CTG	CGG	CGT
TTT	ATC	ATA	TTC	CTC	TTC	ATC	CTG	CTG	CTA	TGC	CTC
ATC	TTC	TTA	TTG	GTT	CTT	CTG	GAT	TAT	CAA	GGT	ATG
TTG	CCC	GTT	TGT	CCT	CTA	ATT	CCA	GGA	TCA	ACA	ACA
ACC	AGT	ACG	GGA	CCA	TGC	AAA	ACC	TGC	ACG	ACT	CCT
GCT	CAA	GGC	AAC	TCT	ATG	TTT	CCC	TCA	TGT	TGC	TGT
ACA	AAA	CCT	ACG	GAT	GGA	AAT	TGC	ACC	TGT	ATT	CCC
ATC	CCA	TCG	TCC	TGG	GCT	TTC	GCA	AAA	TAC	CTA	TGG
GAG	TGG	GCC	TCA	GTC	CGT	TTC	TCT	TGG	CTC	AGT	TTA
CTA	GTG	CCA	TTT	GTT	CAG	TGG	TTC	GTA	GGG	CTT	TCC
CCC	ACT	GTT	TGG	CTT	TCA	GCT	ATA	TGG	ATG	ATG	TGG
TAT	TGG	GGG	CCA	AGT	CTG	TAC	AGC	ATC	GTG	AGT	CCC
TTT	ATA	CCG	CTG	TTA	CCA	ATT	TTC	TTT	TGT	CTC	TGG
GTA	TAC	ATT									

SEQ ID NO:	28
序列类型:	核苷酸
序列长度:	106 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV S1
即时实验来源:	化学合成

5'-GAT-CTT-TAA-CAT-GGA-GAA-CAA-TCC-TCT-G
GG-ATT-CTT-TCC-CGA-TCA-CCA-GTT-GGA-TCC-A
GC-CTT-CAG-AGC-AAA-CAC-CGC-AAA-TCC-AGA-T
TG-GGA-CTT-CAA-TCC-CAG-(T)-3'

SEQ ID NO:	29
序列类型:	核苷酸
序列长度:	115 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV S
即时实验来源:	化学合成

5'-AAT-TCT-AGA-CTC-GAG-TCT-GAA-CAT-AGA-G
AA-CAT-CAC-ATC-AGG-ATT-CCT-AGG-ACC-CCT-T
CT-CGT-GTT-ACA-GGC-GGG-GTT-TTT-CTT-GTT-G
AC-AAG-AAT-CCT-CAC-AAT-ACC-GCA-GAG-(C)-3'

SEQ ID NO:	30
序列类型:	核苷酸
序列长度:	108bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV 核心
即时实验来源:	化学合成

5'-GAT-CTT-TTA-AAG-GGA-TCC-TCT-GCT-GGG-G
GG-AAT-GGA-TGA-CTC-TAG-CTA-CCT-GGG-TGG-G
CA-ATA-ATT-TGG-AAG-ATC-CAG-CAT-CTA-GGG-A
CC-TTG-TAG-TAA-ATC-TAG-AC-(A)-3'

SEQ ID NO:	31
序列类型:	核苷酸
序列长度:	106bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV 核心
即时实验来源:	化学合成

5'-GAT-CTC-CGG-GAA-TTC-CTG-GGG-CAT-GGA-C
AT-TGA-CCC-TTA-TAA-AGA-ATT-TGG-AGC-TAC-T
GT-GGA-GTT-ACT-CTC-GTT-TTT-GCC-TTC-TGA-C
TT-CTT-TCC-TTC-CGT-CAG-(G)-3'

SEQ ID NO:	32
序列类型:	核苷酸
序列长度:	89 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV核心
即时实验来源:	化学合成

5'-GAT-CTC-CTA-GAC-ACC-GCC-TCA-GCT-CTG-T
AT-CGA-SAA-GCC-TTA-GAG-TCT-CCT-GAG-CAT-T
GC-TCA-CCT-CAC-CAT-ACT-GCA-CTC-AGG-CAA-G
-(G)-3'

SEQ ID NO:	33
序列类型:	核苷酸
序列长度:	25 bp
链型:	单链
拓扑结构:	线性
分子类型:	基因组DNA
原始来源:	HBV核心
即时实验来源:	化学合成

5'-TTG-GAT-CCT-CCA-ACC-TGT-GCC-TTG-(G)-3'

SEQ ID NO:

34

序列类型:

核苷酸

序列长度:

25 bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV 核心

即时实验来源:

化学合成

5'-CCT-CTA-GAA-CCA-AAT-ATT-CAA-GTA-(C)-3

SEQ ID NO:

35

序列类型:

核苷酸

序列长度:

588bp

链型:

单链

拓扑结构:

线性

分子类型:

基因组DNA

原始来源:

HBV核心

即时实验来源:

PCR扩增

	TCC	AAC	CTG	TGC	CTT	GGG	TGG	CTT	TGG	GGC
ATG	GAC	ATT	GAC	CCT	TAT	AAA	GAA	TTT	GGA	GCT
ACT	GTG	GAG	TTA	CTC	TCG	TTT	TTG	CCT	TCT	GAC
TTC	TTT	CCT	TCC	GTA	CGA	GAT	CTC	CTA	GAC	ACC
GCC	TCA	GCT	CTG	TAT	CGA	GAA	GCC	TTA	GAG	TCT
CCT	GAG	CAT	TGC	TCA	CCT	CAC	CAT	ACT	GCA	CTC
AGG	CAA	GCC	ATT	CTC	TGC	TGG	GGG	GAA	TTG	ATG
ACT	CTA	GCT	ACC	TGG	GTG	GGT	AAT	AAT	TTG	CAA
GAT	CCA	GCA	TCC	AGA	GAT	CTA	GTA	GTC	AAT	TAT
GTT	AAT	ACT	AAC	ATG	GGT	TTA	AAG	ATC	AGG	CAA
CTA	TTG	TGG	TTT	CAT	ATA	TCT	TGC	CTT	ACT	TTT
GGA	AGA	GAG	ACT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTG	GTC	TCT
TTC	GGA	GTG	TGG	ATT	CGC	ACT	CCT	CCA	GCC	TAT
AGA	CCA	CCA	AAT	GCC	CCT	ATG	TTA	TCA	ACA	CTT
CCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	AGA	CGA	CGG	GAC	CGA
GGC	AGG	TCC	CCT	AGA	AGA	AGA	ACT	CCC	TCG	CCT
CGC	AGA	CGT	AGA	TCT	CAA	TCG	CCG	CGT	CGC	AGA
AGA	TCT	CAA	TCT	CGG	GAA	TCT	CAA	TGT	TAG	

说明书附图

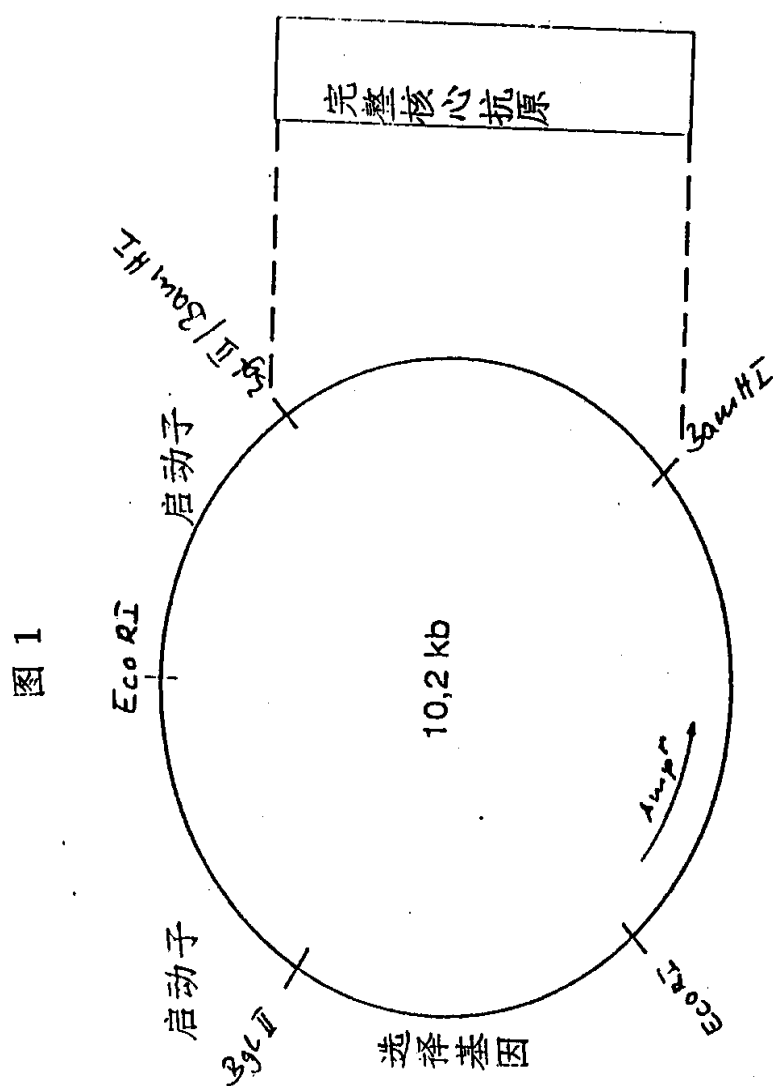


图 2

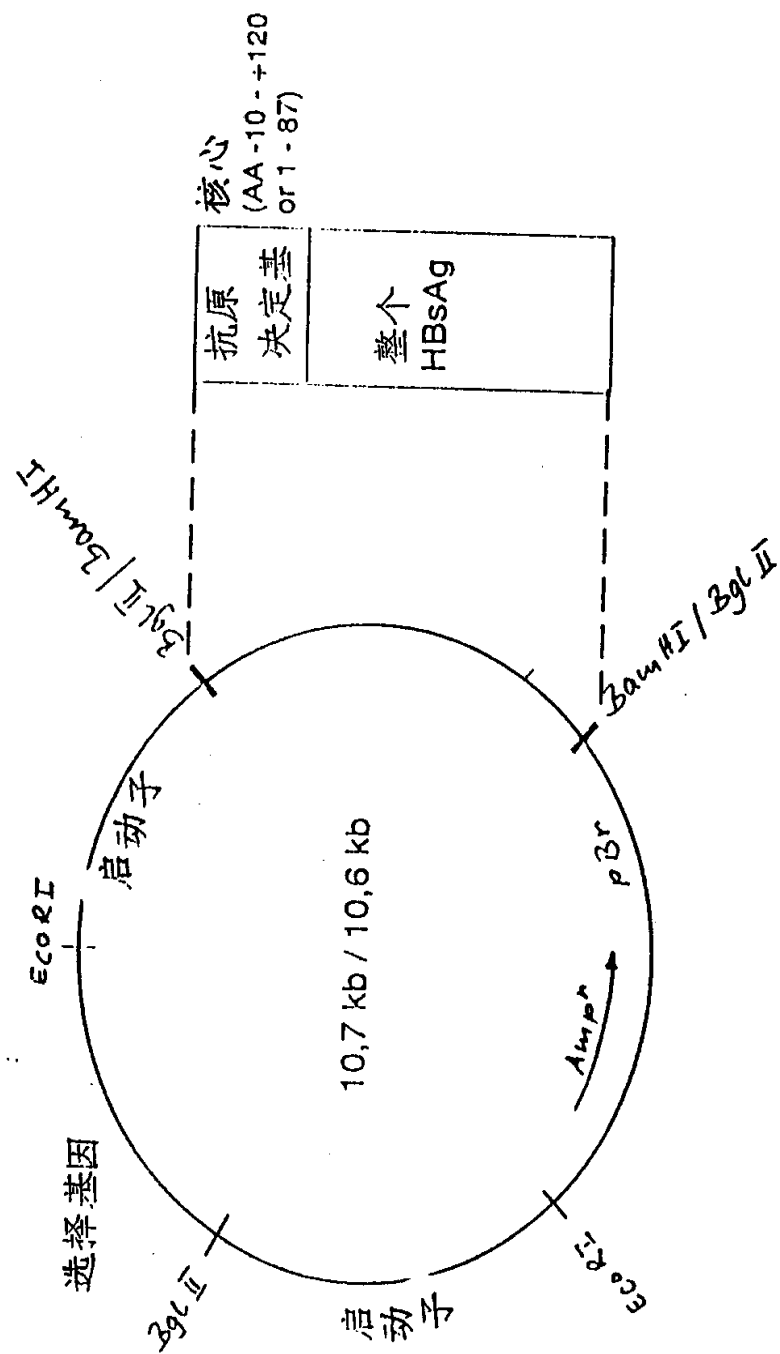


图 3

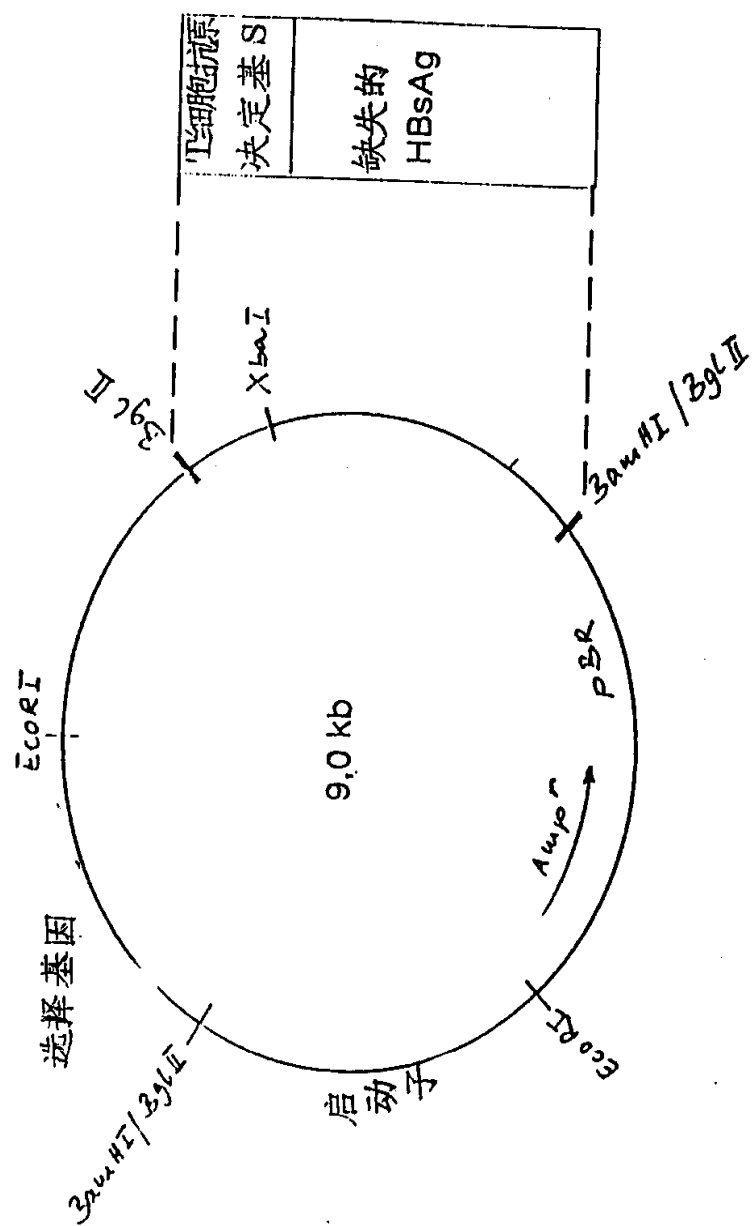


图 4

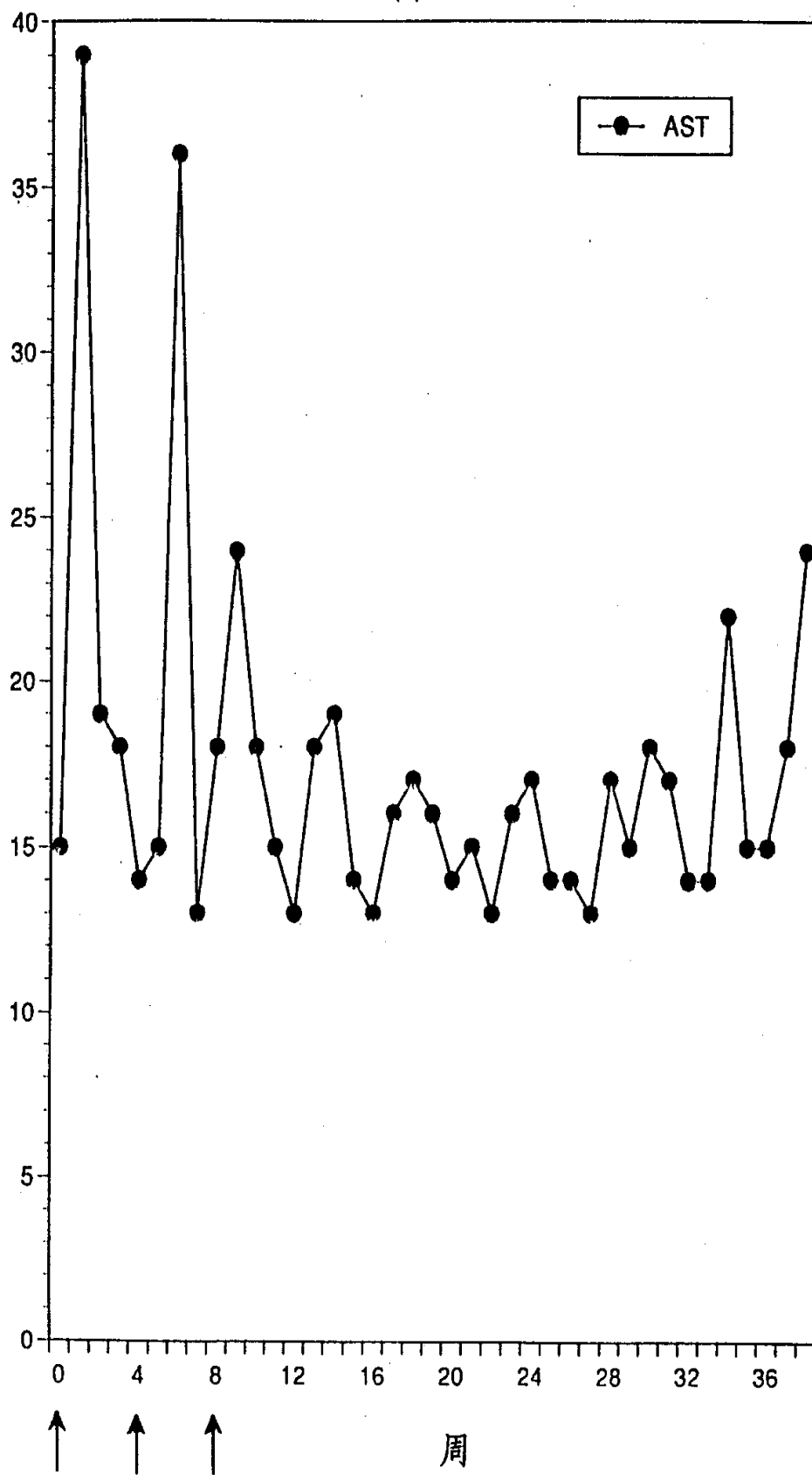


图 5

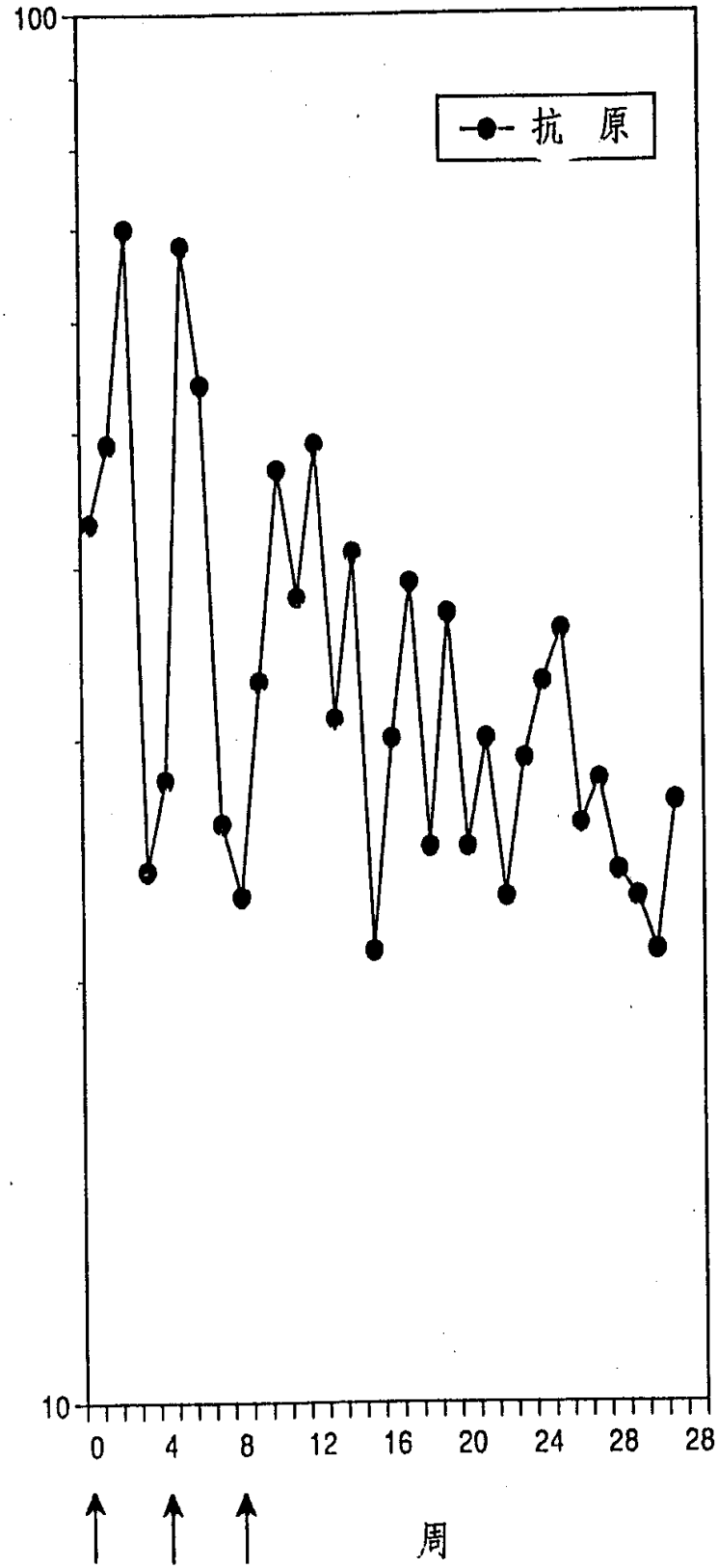


图 6

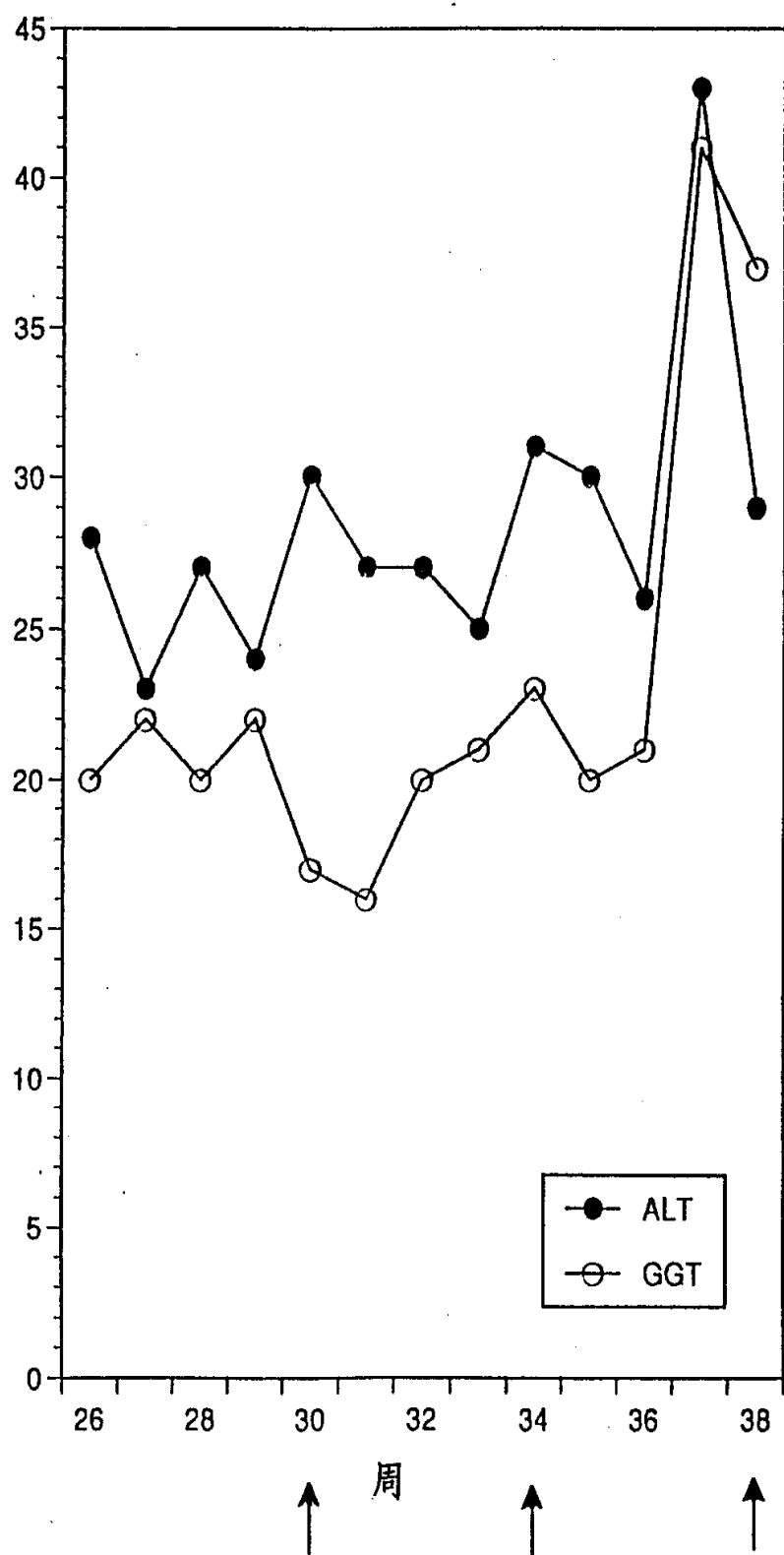


图7

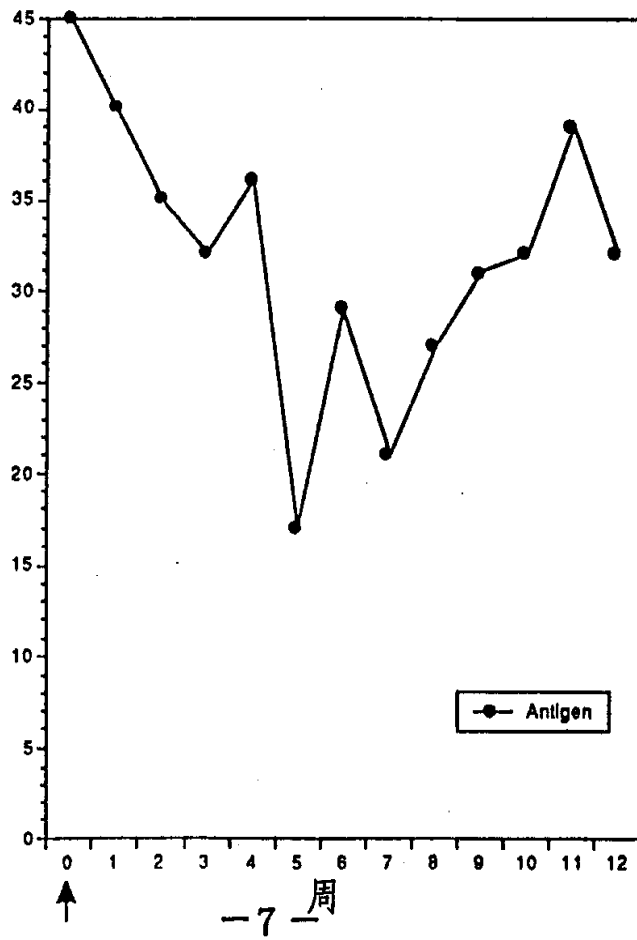
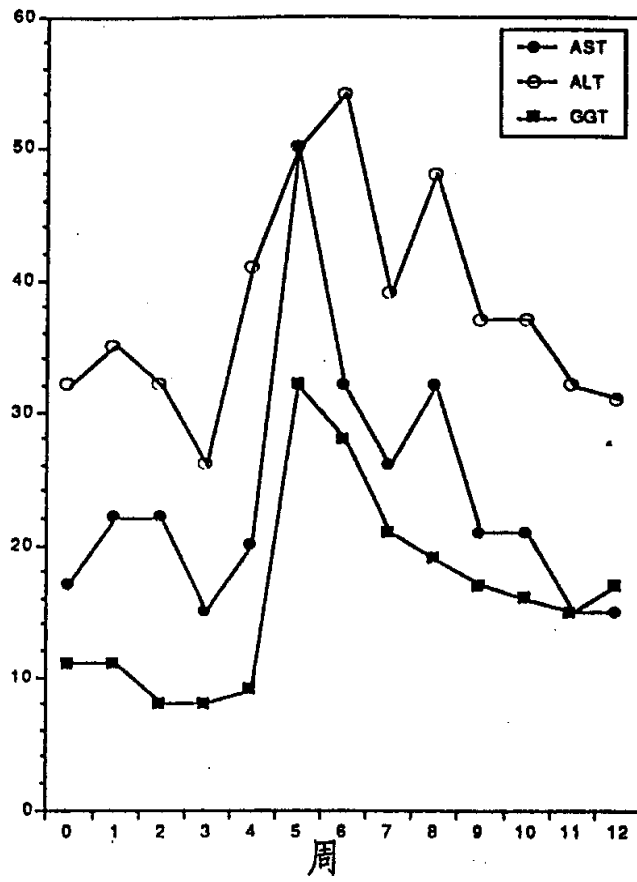


图 8

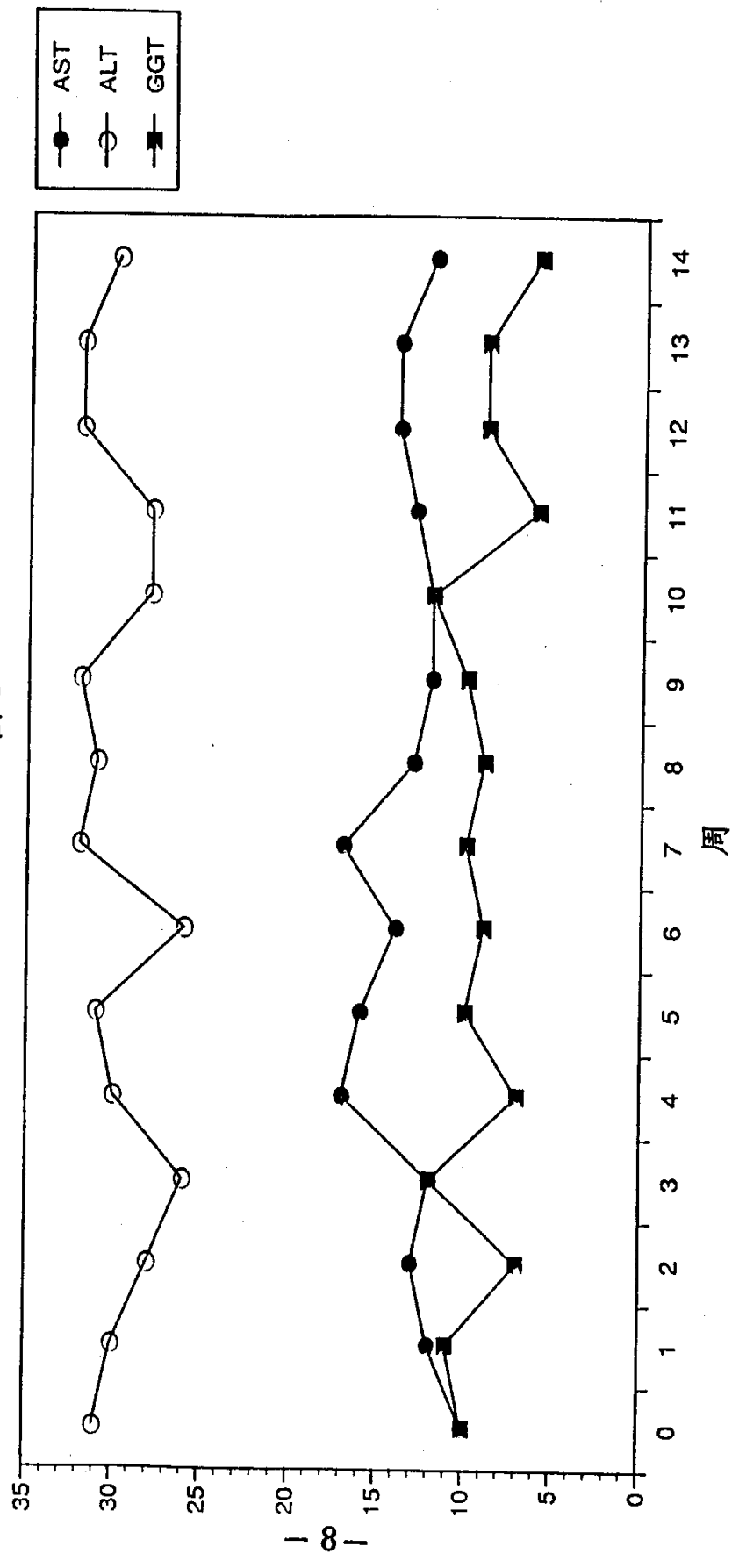


图 9

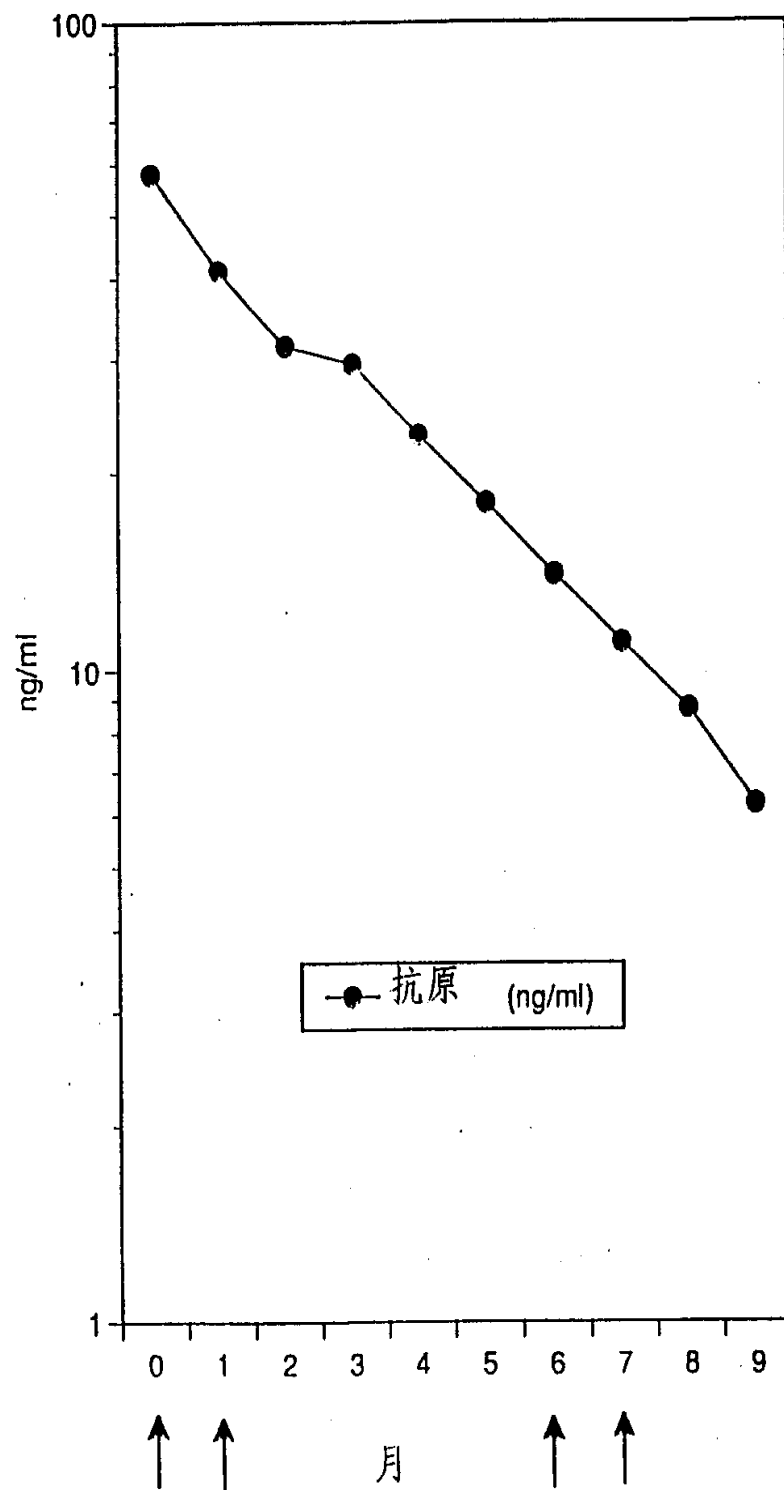


图 10

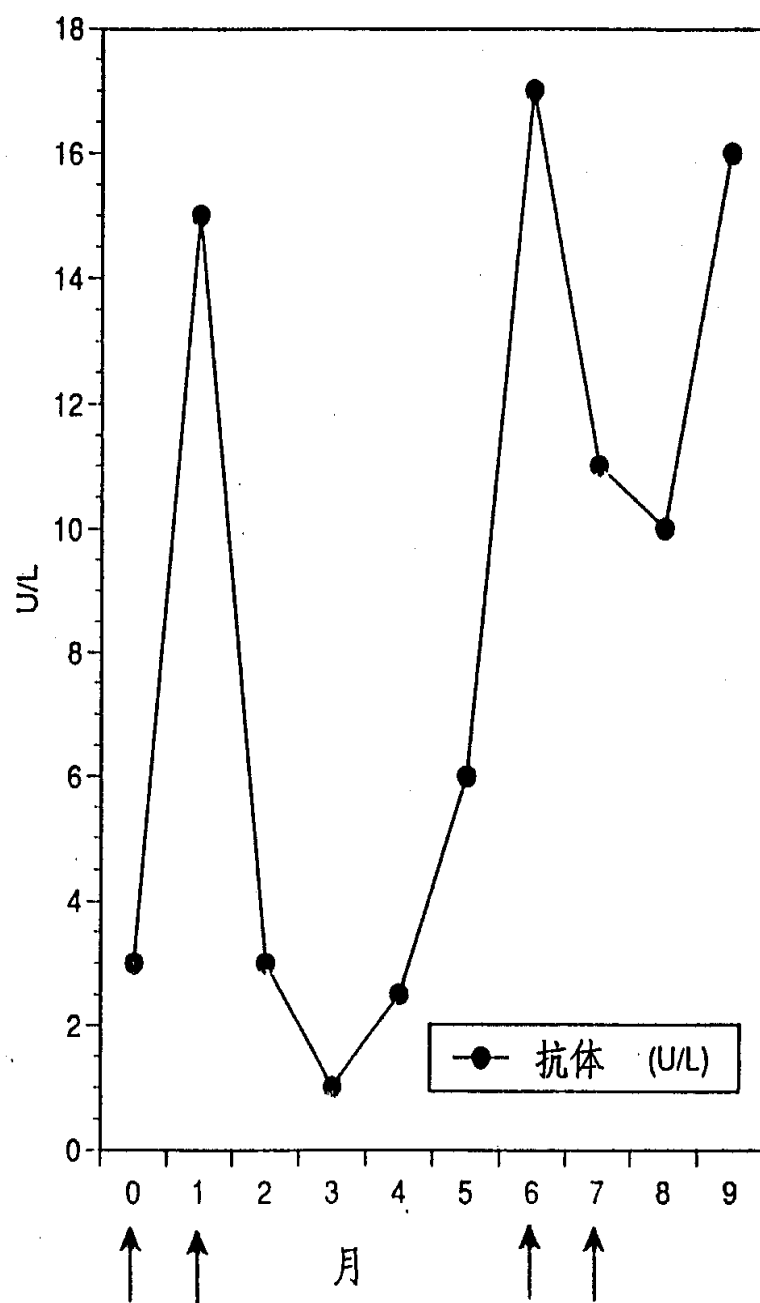


图 11

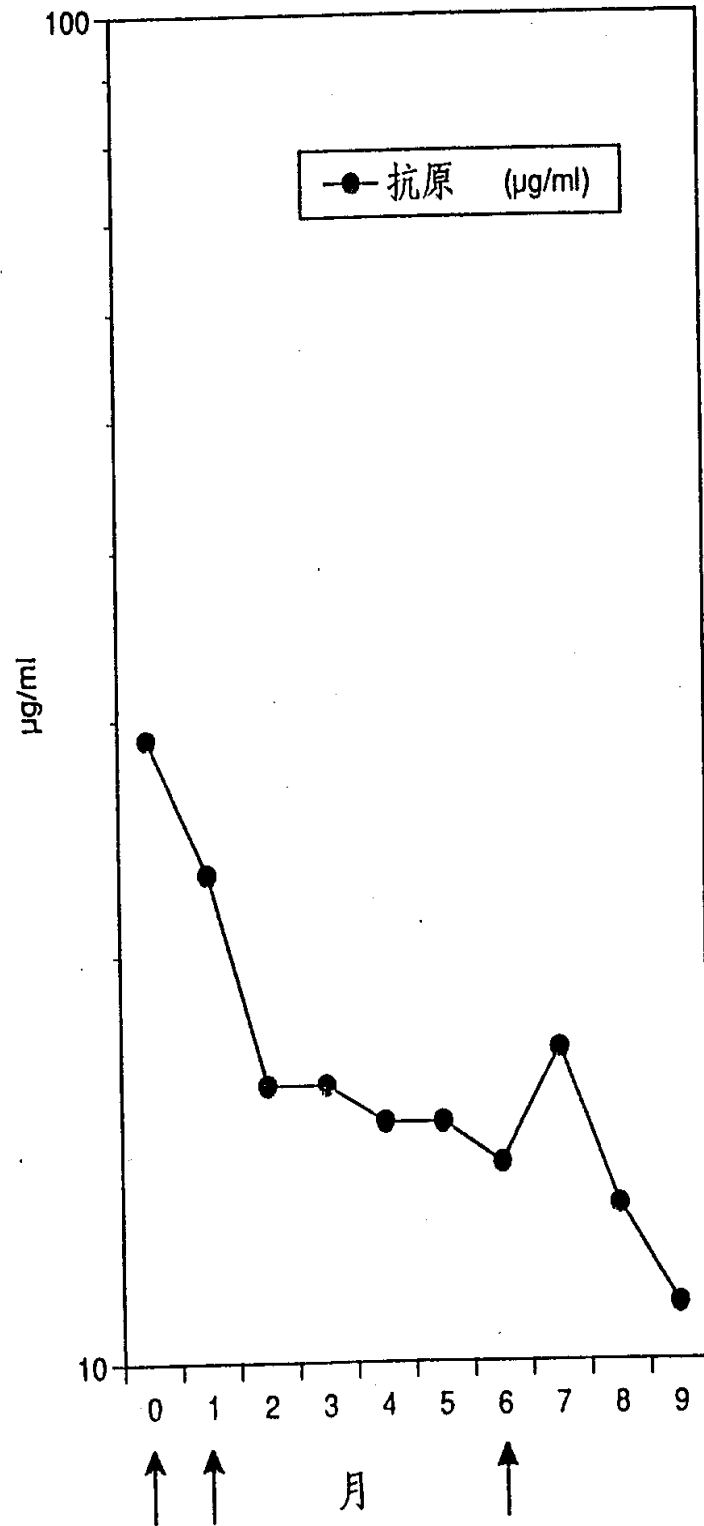


图 1 2

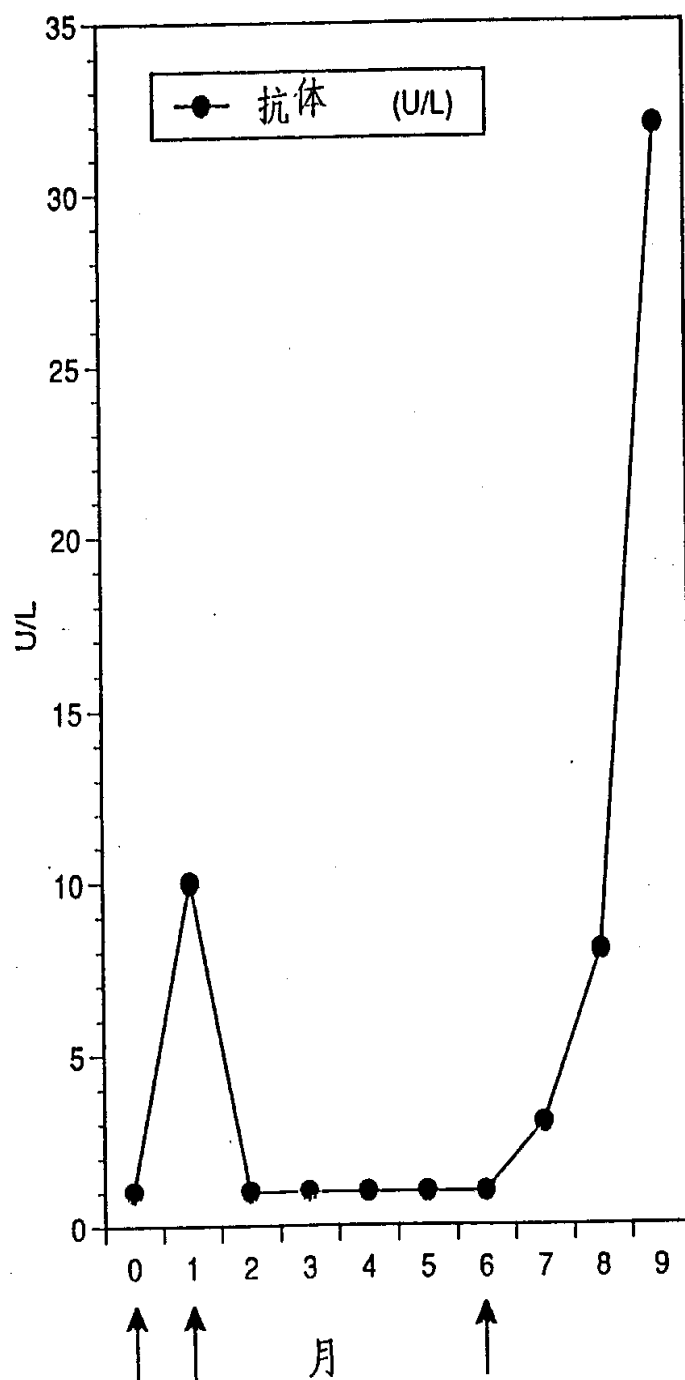


图 1 3

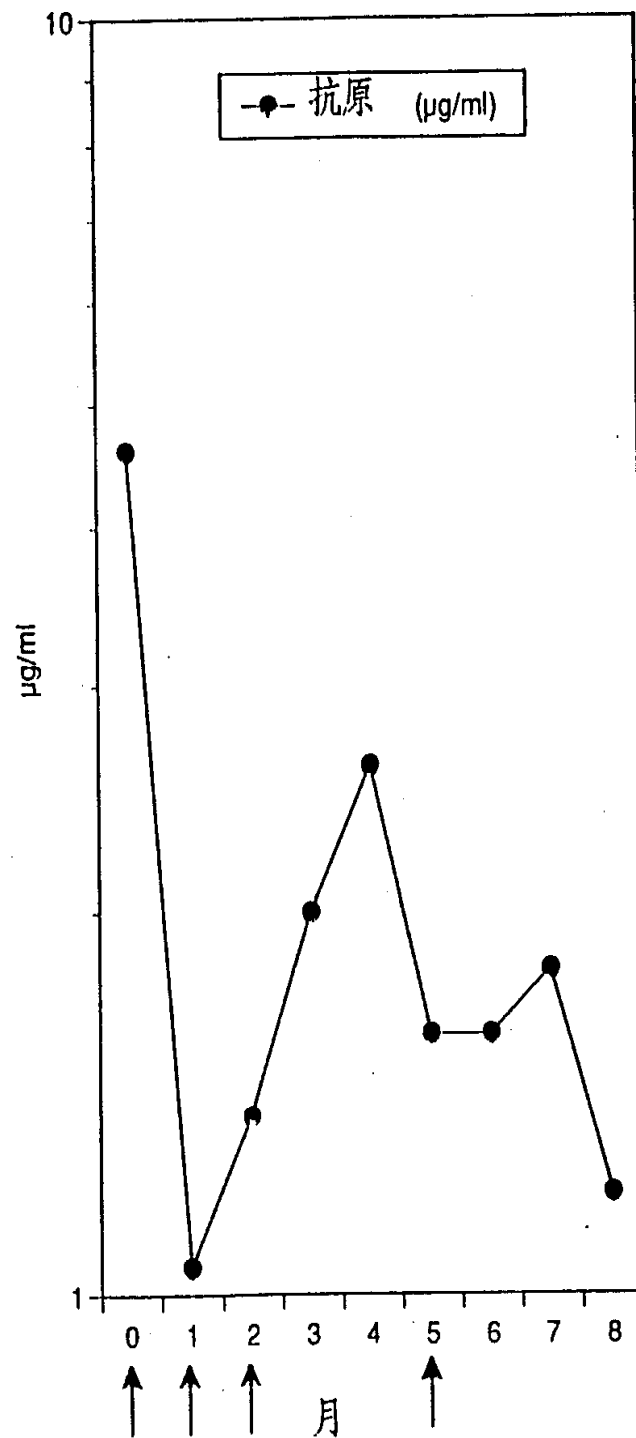


图 1 4

