[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07K 14/08
C12N 15/51
G01N 33/576 A61K 39/29

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 92104338.4

[45]授权公告日 2001 年 10 月 17 日

[11]授权公告号 CN 1073118C

[22]申请日 1992.6.10
[21]申请号 92104338.4
[30]优先权
[32]1991.6.18 [33]KR [31]91－9510
[32]1991.8.6 [33]KR [31]91－13601
[73]专利权人 株式会社乐喜
地址 韩国汉城
[72]发明人 曹重明 李庸范 林国镇
苏弘燮 金成泽 朴荣祜
崔德永 金天炯 梁宰荣
审查员 贾书瑾

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 程 伟

权利要求书 9 页 说明书 124 页 附图页数 61 页

[54]发明名称 C 型肝炎病毒的检测方法

[57]摘要

本发明提供了源自称为 KHCV 的新型 C 型肝炎病毒 cDNA 制备的多核苷酸，和由此编码的多肽以及针对这些多肽的抗体。此外也提供了用上述任何材料作 为活性成份制备的诊断试剂和疫苗。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1、一种用于检测待检样品中针对 KHCV 抗原的抗体的方法，其步骤为：

(a)吸附一种 KHCV 所包含的多肽至一种固相支持物上；

(b)将待检样品加至所述的固相支持物上形成抗原抗体复合物；以及

(c)确定复合物的量，

其中所述 KHCV 的开放阅读框架分别在 842、849 和 853 位氨基酸处编码苯丙氨酸、亮氨酸和苏氨酸。

2、如权利要求 1 的方法，其中一或多种诊断试剂盒被用在每一步骤中，所述的试剂盒包含选自 KHCV UB－CORE 14 蛋白、KHCV 897 蛋白和 KHCV 403 蛋白的一或多种多肽作为活性成分。

3、如权利要求 1 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

4、如权利要求 1 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

5、如权利要求 1 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

6、如权利要求 1 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

Gln Val Trp Val Pro Pro Leu Asn Val Arg

Gly Gly Arg Asp Ala Ile Thr Leu Leu Thr

Cys Val Val His Pro Glu Leu Ile Phe Asp

Ile Thr Lys Tyr Leu Leu Ala Ile Phe Gly

Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr

Arg Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly

Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys

Val Ala Gly Gly His Tyr.

7、如权利要求 1 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 是 KHCV—LBC1。

8、一种用于检测待检样品中针对 KHCV 抗原的抗体的方法，其步骤为：

(a)吸附一种 KHCV 所包含的多肽至一种固相支持物上；

(b)将待检样品加至所述的固相支持物上形成抗原抗体复合物；以及

(c)确定复合物的量，

其中所述 KHCV 的开放阅读框架分别在 842、849 和 853 位氨基酸处编码亮氨酸、苯丙氨酸和丙氨酸。

9、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

Leu Phe Thr Leu Ser Pro His Tyr Lys Val

Phe Leu Ala Arg Leu Ile Trp Trp Leu Gln

Tyr Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala His Leu

Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg

Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr

Cys Ala Val His Ser Glu Leu Ile Phe Asp

Ile Thr Lys Ile Leu Leu Ala Ile Leu Gly

Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Leu Thr

Arg Val Pro Tyr Phe Val Ser Ala Gln Gly

Leu Ile.

10、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

Leu Leu Thr Leu Ser Pro Tyr Tyr Lys Val

Phe Leu Ala Arg Leu Ile Trp Trp Leu Gln

Tyr Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala His Leu

Gln Val Trp Ile Pro Pro Leu Asn Val Arg

Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Ala

Cys Ala Val His Pro Glu Pro Ile Phe Asp

Ile Thr Lys Tyr Leu Leu Ala Ile Phe Gly

Pro Leu Met Val Leu Gln Ala Gly Ile Thr

Arg Val Pro Tyr Phe Trp Arg Ala Gln Gly

Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Ala Arg Lys

Val Ala Gly Gly His Tyr.

11、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

Leu Leu Thr Leu Ser Pro His Tyr Lys Val

Phe Leu Ala Arg Leu Met Trp Trp Leu Gln

Tyr Phe Leu Thr Arg Ala Glu Ala His Leu

Gln Val Trp Val Pro Ser Leu Asn Val Arg

Gly Gly Arg Asp Ala Ile Ile Leu Leu Thr

Cys Ala Val Tyr Pro Glu Leu Ile Phe Asp

Ile Thr Lys Leu Leu Leu Ala Thr Leu Gly

Pro Leu Met Val Leu Gln ala Gly Leu Thr

Arg Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala Gln Gly

Leu Ile Arg Ala Cys Met Leu Val Arg Lys

Val Val Gly Gly His Tyr.

12、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

13、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

14、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框

架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

15、如权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

16、如权利权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

17、如权利权利要求 8 的方法，其中所述的 KHCV cDNA 开放阅读框架编码一种氨基酸序列如下的多肽：

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

18、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽由用一种重组酵母表达载体转化的重组细胞产生，所述的重组酵母表达载体选自 pYLBC-A/G-UB-CORE 14、pYLBC-A/G-UB-CORE 17、pYLBC-A/G-UB-CORE 22、pYLBC-A/G-UB-KHCV 897、pYLBC-A/G-UB-KHCV 403、pYLBC-A/G-UB-KHCV 573、pYLBC-A/G-UB-E2N 和 pYLBC-

A/G-UB-E2C。

19、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽由用一种重组大肠杆菌表达载体转化的重组细胞产生，所述的重组大肠杆菌表达载体选自 ptrpH-UB-CORE14、ptrpH-UB-CORE22、ptrpH-UB-KHCV897、ptrpH-UB-E2N 和 ptrpH-UB-E2C。

20、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽由用一种重组大肠杆菌表达载体转化的重组细胞产生，所述的重组大肠杆菌表达载体选自 pMAL-KHCV 426、pMAL-KHCV 555、pMAL-KHCV 513、pMAL-KHCV 810、pMAL-KHCV 798、pMAL-KHCV 754、pMAL-KHCV 652、pMAL-KHCV 403、pMAL-KHCV 271、pMAL-KHCV 495 和 pMAL-KHCV 494。

21、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽由用下列载体转化的重组酵母细胞产生：pYLBC-A/G-UB-CORE 14、pYLBC-A/G-UB-CORE 17、pYLBC-A/G-UB-CORE 22、pYLBC-A/G-UB-KHCV 897、pYLBC-A/G-UB-KHCV 403、pYLBC-A/G-UB-KHCV 573、pYLBC-A/G-UB-E2N 或 pYLBC-A/G-UB-E2C。

22、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽由用下列载体转化的重组大肠杆菌细胞产生：ptrpH-UB-CORE14、ptrpH-UB-CORE22、ptrpH-UB-KHCV897、ptrpH-UB-E2N 或 ptrpH-UB-E2C。

23、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽由用下列载体转化的重组大肠杆菌细胞产生：pMAL-KHCV 426、pMAL-KHCV 555、pMAL-KHCV 513、pMAL-KHCV 810、pMAL-KHCV 798、 pMAL-KHCV 754、pMAL-KHCV 652、pMAL-KHCV 403、pMAL-KHCV 271、pMAL-KHCV 495 或 pMAL-KHCV 494。

24、如权利要求 1 或 8 的方法，其中所述的多肽是 KHCV UB 897 蛋白、KHCV 897 蛋白、UB E1 蛋白、KHCV 403 蛋白、KHCV CORE 14 蛋白、KHCV UB CORE 14 蛋白、KHCV 573 蛋白、KHCV UB CORE 17 蛋白、E2N 蛋白、E2C 蛋白、UB－E2N 蛋白、UB－E2C 蛋白、KHCV

426 蛋白、KHCV 555 蛋白、KHCV 513 蛋白、KHCV 810 蛋白、KHCV 798 蛋白、KHCV 271 蛋白、KHCV 754 蛋白、KHCV 652 蛋白、KHCV 403 蛋白、KHCV 495 蛋白和 KHCV 494 蛋白。

25、一种用于权利要求 1 或 8 的方法中的试剂盒，包括选自如下一组的一或多种多肽：KHCV UB 897 蛋白、KHCV 897 蛋白、UB E1 蛋白、KHCV 403 蛋白、KHCV CORE 14 蛋白、KHCV UB CORE 14 蛋白、KHCV 573 蛋白、KHCV UB CORE 17 蛋白、E2N 蛋白、E2C 蛋白、UB－E2N 蛋白、UB－E2C 蛋白、KHCV 426 蛋白、KHCV 555 蛋白、KHCV 513 蛋白、KHCV 810 蛋白、KHCV 798 蛋白、KHCV 271 蛋白、KHCV 754 蛋白、KHCV 652 蛋白、KHCV 403 蛋白、KHCV 495 蛋白和 KHCV 494 蛋白。

说　　明　　书

C型肝炎病毒的检测方法

本发明涉及一种新型C型肝炎病毒 (KHCV) cDNA 的寡核苷酸及由此编码的多肽和针对多肽的抗体；以及利用这些活性制剂，即寡核苷酸、多肽和抗体，制备的诊断产品和疫苗。

大家知道通常病毒性肝炎是指由各种肝炎病毒诱发的疾病、包括A型肝炎病毒、B型肝炎病毒、δ型肝炎病毒和E 型肝炎病毒、巨细胞病毒和E－B病毒。自从1980年以来，这些病毒的基因类型已经搞清，为开发诊断制剂，疫苗和治疗制剂提供了方便。

进而业已发现一种被称为非A非B型或C型新型肝炎，其中80%－90%的病例是由输血引起的 [Lancet，2，838 －841 (1975)]，往往这种输入型肝炎大约50%可发展成肝硬化或肝癌。

病人血中存在的C型肝炎病毒 (HCV) 的数量通常非常少。与HCV 相关的抗原抗体系统的特性还不为人们完全理解，因此，开发治疗和诊断制剂还有许多困难。

后来，许多科学家对HCV的研究非常重视 (Alter H. J. et al. , Lancet, 459－463 (1978) ; Tabor, E. et al. , Lanet, 463－466 (1978) ; Hollinger F. B. et al. , Intervirology, 10, 60 － 68 (1978) ; Wyke, R. J. et al. , Lancet, 520－524 (1979) ; Bradley, D. W. et al. , J. Med . Virol. , 9, 253－269 (1979)] 。

Bradley 等 [Gastroenterology, 88, 773－

779(1985)] 确定了HCV 的部分生化和生物物理特性。他们用一个C型肝炎病人的血清感染了一只猩猩(champanzee)，从而获得了许多血清；再从这些血清中提取了HCV病毒，对此病毒进行了分析和研究。

自那以后，采用Bradley 方法分离HCV病毒用于开发诊断、预防或／和治疗C型肝炎的制剂的研究非常多。

Choo 等用C型肝炎病人的血清感染猩猩之后，从其血清中分离出HCV病毒，并对其部分cDNA片段进行了克隆。证明在大肠肝菌和酵母菌体内由这段cDNA表达产品的蛋白质能和C型肝炎病人血清中的抗体发生免疫活性反应。(Science，244，359－362(1989)]。

Kuo 等(Science，244，362－364(1989)]由美国Chiron 公司鉴定的部分HCV cDNA片段和超氧化物歧化酶(SOD) 基因融合在酵母细胞中表达了C100－3 蛋白质。该蛋白质与C型肝炎病人血清有免疫学反应，也能与70%的输入型肝炎病人血清反应。

Houghton 等进一步描述了HCV抗原的用处，特别是C100－3蛋白，它是从患C型肝炎猩猩体内分离出的HCV基因序列所编码的。因此，称其为美洲型HCV。用此抗原去制备疫苗和能检测HCV抗体的诊断试剂(CT WO 89／04669；WO 90／11089)；建立一种用这类抗原(如，C100－3)参与的酶免疫测定诊断法。

以上述为基础，美国Ortho 诊断系统公司在1990年开发并检测HCV抗体的诊断产品。可是，所说的C100－3抗原在用于诊断制剂中活性成份时仅与慢性C型肝炎病人抗体反应，不和急性期病人特别是疾病早期阶段的血清反应。此

外， 由于该蛋白中融合有SOD 因而常出现一些假阳性结果[Shimizu, Y. K. et al, Proc. Natl . Acad . Sci U. S. A, 86, 6441(1990)]。

另一方面， 按Houghton 等人的方法， 部分HCV cDNA 克隆也被得到。 HCV病毒是从收集的日本C型肝炎病人血清中得到的， 包括5′一末端区和编码核心蛋白和外膜蛋白的结构基因。 已经确定了其cDNA 克隆的核苷序列，结果发现该序列与美洲型HCV有约10－15%的不同。 这表明的确出现了一种新型， 称为日本型[kubo, Y, et al ; Nucl . Acid . Res , 17 , 10367－10372(1989); Kato, N. et al., Proc. Japan Acd., 65, 219－223(1990); Kaneko, S. et al., Lancet, 335, 976(1990); Takenchi, K. et al., Gene, 91, 287－291(1990); Tekenchi, K. et al., Nucl . Acid . Res , 18 , 4626 (1990); Takamizawa , A et al., J. Virol. 65, 1105－1113(1991)]； 由日本型HCV得到的抗原制备的疫苗和针对日本型HCV的诊断制剂也已有报导[Okamoto H. et al., Japan J. Exp Med. 60, 167－177(1990)]。

Harada 等[J. virol. 65, 3015(1991)] 的报告指出当编码结构基因5′一末端的核心抗原被用于疑为HCV感染的病人核品中， 诊断HCV的抗体时， 该法可能要比用C100－3蛋白检测抗体提早6－8周。

Lesniewski 等[欧洲专利公开号72534(1990)] 也介绍了一种采用多种抗原的改进诊断法， 该法要比单用C100－3抗原法敏感和特异。 Wang 在EP公开号442394 (1991)

上介绍了另一种诊断方法，该法中选用了多种由 15 －65氨基酸组成的表位决定簇多肽作为抗原检测HCV抗体。这些多肽是从10个不同的HCV 表位决定簇中挑选出来的。

上述公开物表明可用携带不同表位决定簇的多肽混和物替代单一种的抗原，从而改进提高HCV的诊断。

然而，以糖蛋白形式存在于病毒表面的外膜蛋白已经显示有可能用于开发疫苗或诊断制品。因为与HCV 很相似的黄病毒 (flavivirus)，已知外膜蛋白和非结构蛋白 (ICNS1) 在诱导宿主免疫反应中起着重要的作用，而且在把该蛋白结合到宿主细胞受体也起着重要作用。[F. Preugschart, J. Virol. 65, 4749－4758 (1991)] 此外，业已报导针对外膜蛋白抗体形式密切与C型肝炎康复有关 [Lesniewski, R. et al, P59; Watanabe et al., p82, the 3rd International HCV Symposium, Strasbourg, France (1991)]。

进一步Houghton 等推测外膜2蛋白 (E2) 很可能证明是一种重要的抗原用于制备C型肝炎疫苗，为此，所说的E2 蛋白质有人认为与免疫反应机制有密切的关系。因为E2蛋白的氨基端表明了显著的种异质性 (The 3rd International HCV Symposium, p20, Strasbourg, France, 1991)；对日本型和美洲型HCV基因型的核酸序列比较后发现，虽然编码核心蛋白的序列有约91%的同源性，但编码外膜蛋白的同源性约74% [Takeuchi, K. et al., J. Gen. Virol., 71, 3027－3033 (1990)]。

如前所述，HCV 病毒在许多不同国家被发现并表现出地区异质性，而这种异质性可能在决定疫苗的效力和

诊断制剂的敏感性和准确性上都是非常重要的因素。

据此，本发明仅涉及从朝鲜C型肝炎病人（KHCV）分离出的新型HCV的分离和鉴定，不同于已发现的HCV包括美洲型和日本型。

需倍加说明，本发明提供了已知 KHCV 全序列分析 cDNA 和几株HCV变异株cDNA的部分定序。从KHCV的部分 cDNA 序列被用于诊断假定样品中病毒存在的探针或前导序列。使用这种核苷酸序列的诊断试剂盒（kit）和方法也组成了本发明的内容。

除此之外，本发明提供了由上述cDNA编码的多肽，这在诊断试验试剂或/ 和疫苗组成中非常有用。

所说的多肽是指一大类各种不同的多肽，其中包含有重组多肽，如带有一个非HCV 蛋白的融合多肽所构成的KHCV的表型抗原决定簇以及由此而来的各种纯化产品。

本发明另一方面涉及一个重组表达载体，该载体是由KHCV cDNA 的一个敞开阅读框架（ORF）组成。而这个ORF 完全能被自由地联接到一个能与目的宿主微生物相容的调节序列。这种载体可包括：一段编码一种非KHCV蛋白的核苷酸序列以用于制备一种与来自KHCV或其它型病毒蛋白或多肽的多核苷酸的融合片段；一株用这种重组表达载体转化的宿主细胞；以及由此而产生出的多肽。

本发明进一步所涉及的内容就是生产含有KHCV表位决定簇多肽的方法，即：培养含有表达载体转化的宿主细胞，该载体内含有编码KHCV 表位决定簇多肽的一段序列；以及由此而生产出的含有KHCV表位决定簇多肽。

本发明还包括针对KHCV表位决定簇的单克隆抗体和

生产这种单克隆抗体的杂交瘤细胞。

由一种以上多肽，其中包含一种以上KHCV表位决定簇作为活性成份用于检测假定样品中KHCV抗体组成的诊断制剂以及由这些试剂构成的诊断试剂盒也属于本发明的范围。

由一种或多种针对KHCV抗原的单克隆抗体作为活性成份用于检测假定样品中HCV 抗原的诊断制剂以及由此而构成的诊断试剂盒又是本发明的另一个方面。

本发明还需提及的内容就是用于治疗或/ 和预防HCV感染的一种疫苗，它是由含有KHCV 表位决定簇的多肽和灭活或致弱的HCV组成。

附图简要说明

本发明可通过附图更易理解，其中：

图1表明在KHCV－LBC1上各种KHCV cDNA 克隆的相对位置。

图2－1到2－16 说明了KHCV－LBC1的核苷酸序列和由此编码的多肽的氨基酸序列。

图3给出了在KHCV－LBC1上每一个cDNA 克隆开始的核苷酸数和结束核苷酸数。

图4比较分析了KHCV－LBC1与美洲型和日本型HCV基因组的核苷酸序列。

图5比较分析了由KHCV－LBC1和美洲型和日本型HCV编码的氨基酸序列。

图6比较分析了KHCV－LBC1和美洲型和日本型HCV基因组中5′－末端区的核苷酸序列。

图7示cDNA片段NS2－LBC2核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图8示cDNA NS2－LBC3片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图9示cDNA NS2－LBC20 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图10示cDNA NS2－LBC21 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图11示cDNA NS2－LBC23 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图12示cDNA NS2－LBC25 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图13示cDNA NS2－LBC26 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图14示cDNA NS2－LBC27 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图15示cDNA NS2－LBC28 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图16示cDNA NS2－LBC29 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图17示cDNA NS2－LBC30 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图18示cDNA NS2－LBC31 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图19示cDNA NS2－LBC32 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图20示cDNA NS5－LBC20 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图21示cDNA NS5－LBC21 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图22示cDNA NS5－LBC22 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图23示cDNA NS5－LBC25 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图24示cDNA NS5－LBC27 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图25示cDNA NS5－LBC28 片段的核苷酸序列和由此编码的多肽氨基酸序列。

图26比较分析了包括在KHCV－L1或KHCV－L2亚型中的KHCV变异体cDNA 的NS2区所编码的多肽的氨基酸序列。

图27比较分析包括在KHCV－L1中的KHCV变异体cDNA NS2区的核苷酸序列。

图28比较分析包括在KHCV－L2中的KHCV变异体cDNA NS2区的核苷酸序列。

图29分别比较分析包括在KHCV－L1和KHCV－L2中的KHCV变异体cDNA NS5 区的核苷酸序列。

图30示为在酵母细胞中表达一段KHCV cDNA片段而构建的表达载体。

图31A表明KHCV cDNA片段在酵母细胞中表达后进行的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)结果。

图31B示图31A胶上的蛋白印迹分析结果。

图32示在酵母细胞上生产的KHCV E2N和E2C多肽的SDS－PAGE(图31A)和蛋白印迹分析(图31B)的结果。

图33示化学合成的ubiquitine 基因核苷酸序列。

图34示一个含有trp 启动子(promotor) 用于在大肠杆菌中表达一段KHCV cDNA片段的表达载体。

图35示一个含有tac 启动子(promotor) 用于在大肠杆菌中表达一段KHCV cDNA 片段的表达载体。

图36至38示在大肠杆菌中表达一段KHCV cDNA片段后SDS－PAGE结果。

图39至41示图36－38凝胶上的蛋白印迹分析结果。

图42示在大肠杆菌内由tac 启动子控制下KHCV cDNA 片段与MBP基因融合基因表达后SDS－PAGE结果。

图43示图42凝胶上的蛋白印迹分析结果。

图44示酶免疫测定法(EIA)标准曲线， 随用于检测样品中HCV抗体使用抗原浓度而变化。

图45示用单克隆抗体作为样品中KHCV抗原浓度的函数进行EIA的一条标准曲线。

所有此中所引述的参考文献在整个文章所需引述都已标出。

所有文中使用的下列术语都应具有下列意义：

"C型肝炎病毒"是指一种引起非A非B型肝炎或C型肝炎的

病毒。 HCV和NANBV， 以及 NANB 肝炎 (NANBH) 和C型肝炎可对应互换。

"朝鲜型C型肝炎病毒"或"KHCV"是指一种新型的HCV，它是从朝鲜的C型肝炎病人体上分离而得。 它的cDNA有一个核苷酸序列的敞开的阅读框架， 该序列编码的氨基酸序列中在842， 849和853位置上的氨基酸分别为苯丙氨酸、 亮氨酸和苏氨酸； 或分别为亮氨酸、 苯丙氨酸和丙氨酸。

"表型决定簇"是指一个多肽的抗原决定簇， 它能诱发免疫学上担负的宿主动物的免疫应答或／和能特异性将自身连接到相应的抗体。 本发明的表型决定簇通常至少由6个氨基酸组成， 最好是7或8个氨基酸。

"片段"意味着多核苷酸或多肽， 它们由本发明中cDNA或蛋白的亚序列组成。 这些片段可以由酶切大分子而产生。限制性内切酶用于DNA， 蛋白酶用于蛋白质分子。 可是，本发明的片段没限制来自任何特殊形式的酶切产品； 可能包括亚序列、 它们的终点不与任何酶切点相对应。 根据文中提供的序列资料， 这些片段也可由化学合成法获得。 蛋白片段可由编码这些蛋白片段的DNA片段表达而得。 本发明中如果这些蛋白片段包含有足够多的氨基酸残基构成一个免疫活性决定簇和／或抗原决定簇， 那么它们就非常有用了。

"敞开阅读框架"是指一段寡核苷酸序列的区域， 在此区域中连接核苷酸三联序列可做为密码子进行阅读， 它们代表着特殊的氨基酸编码出一个多肽。

"表达载体"是指一个克隆运载体， 通常被设计用于启动寡核苷酸插入物表达的启动。

"调节序列：是指一段DNA序列涉及一段寡核苷酸序列表达的调节，例如，调节序列是指启动子，核糖体联结位点以及终止子。

"重组KHCV多肽"是指一段多肽，由图2－1到2－16和图7至25中KHCV cDNA编码的至少包含6个氨基酸，同时它也可连接到除在KHCV cDNA上编码的多肽上以外的氨基酸上。

"纯化的KHCV 多肽"是指KHCV多肽或片段，它们实际上是纯一或均质的，是从天然存在的细胞组份中分离而得。通常，一种纯化的KHCV多肽是由超过70－90%的这种多肽组成，更好的纯化物则至少高于95%。

其它用于该文中的术语，正如现有技术中所用有正常和方便的意义。

本发明在下面将更专门地加以演示。

KHCV cDNA的克隆

KHCV cDNA文库的制备如下：

HCV病毒子是用超离心沉淀法从患C型肝炎的朝鲜病人血清中分离而得。再以HCV中抽提出HCV RNA；用一个随机前导片段或寡d (T) 前导片段和反转录酶从HCV RNA中合成了双股cDNAs；用PCR扩增后进行克隆或直接克隆到UNI－ZAPXR 载体 (Stratagene CO. 11099 N. Torrey, Pines Rood, CA, USA)，给这个载体上接上一个Eco RI接头后，包装成病毒颗粒制备出cDNA 文库 [Saiki et al., Science, 230, 1350(1985)]。

通常， 肝炎病毒颗粒可从感染肝炎的病人或猩猩肝或血清中分离出。 在本发明中， HCV是从C型肝炎病人血清分离而得， HCV 总 RNA是先用超离心沉淀的病毒颗粒，再以酚抽提和酒精沉淀而得。

之后， 所说的HCV 总 NRA所用作制备cDNA 的模板。 在此反应中使用了一个Zap- cDNA 合成试剂盒(Cat. No. 200400， Stratagene Co.， 11099 N. Torrey Pines Rd.， La Jolla， CA 92037， USA)。

所说的cDNA是由反转录酶反应合成的，这期间使用了总NRA和随机前导引物序列RANPSHCV 或寡聚d(T)前导引物，这里RNAPSHCV 引物 (5′-TTTTTCATGATTGGTGGTGGAACTGGACCGTCTCGAGNNNNNN-3′，其中的N系指A、G、T或 C)和寡聚d(T)引物 (5′-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAG(T)$_{18}$-3′)是由6个随机核苷酸片段(RANPSHCV引物)或18T【寡聚d(T)引物】组成cDNA的3′末端区， 其中有一个Xho I限制性内切酶识别位点。

为了引入一个Eco RI (5′-GAATTC-3′)酶识别位点到合成的cDNA以方便克隆， Eco RI 接头

(5'-CCCCCCGAATTCGGCACGAG-3')
(3'-GGGGGGCTTAAGCCGTGCTC-5')

被连接到合成的cDNA片段上。 之后， cDNA片段在引物PSHCV (5′-TTTTCATGATTGGTGGTGGA-3′)和Eco RI 引物(Eco RI 接头的上面一段， 即5′-3′)存在

下进行PCR扩增； cDNA片段用限制性核酸内切酶Eco RI和Xho I部分酶切； 消化后的cDNA 用UNI－ZAPXR 载体连接， 这种载体是一株λgt.11的变异体， 先经Eco RI和Xho I 酶切后与cDNA 消化片段对接。 连接后的DNA用Gigapack II Gole Packaging 试剂盒在体外包装成λ噬菌体颗粒 (Cat. No. 200214， Stratagene Co., USA) 感染大肠杆菌进一步增殖后即制备出cDNA文库。

cDNA 文库平覆于大肠杆菌的平皿上以形成噬菌斑，然后用免疫学方法 [Huynh， DNA Cloning : A Practical Approach， Vol. 1， pp. 49－78， IRL Press， UK (1985)] 进行筛选， 选出能和C型肝炎病人血清抗体反应的噬菌体克隆株。 这就提示可能会生产出源自KHCV cDNA 的多肽产品。

另一方面， UNI－ZAPXR载体能够在大肠杆菌内进一步产生噬菌体质粒 (phagemid) －pBluescript， 它含有KHCV cDNA片段 [Short et al.， Nucl. Acid. Res.， 16， 7583－7600 (1988)]， 这种质粒可以更容易象一个正常质粒一样操纵。 进一步pBluescript 可以任意获得其单股或 双股形式， 因为它既有Col E1源又有f1 复制源。

从阳性噬斑感染大肠杆菌中分离出的双股pBuescript DNA用限制性内切酶Eco RI和Xho I消化后用凝胶电泳以确定插入在Eco RI和Xho I识别位点之间KHCV cDNA的存在和长度。用Sanger的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.， 74， 5463 (1977)] 进行cDNA片段的核苷酸测序。

后面，我们可以按照cDNA克隆已确定的核苷酸序列合成一些新的寡核苷酸探针以检测 cDNA 文库用以获得全部 KHCV cDNA 其余部分，随后，用这样获得的新 cDNA 克隆再次用于检测筛选，以获得 KHCV cDNA 克隆。同时，KHCV cDNA 一部分可以用早期确定的 KHCV cDNA序列合成的引物，进行 PCR扩增后获得。

重叠的 cDNA片段可以相连，这样就确定 KHCV cDNA 的全长序列和一个敞开阅读框架随后就可推出。

这样获得的有全长 cDNA序列的 KHCV cDNA 被称为 KHCV－LBC1，它已经在1991年5月14日库藏入美国菌种保藏中心 (ATCC)，其编号为ATCC 75008。这是在关于为专利程序目的国际微生物保藏鉴别的《布达佩斯条件》的条款下进行上述手续的。

KHCV－LBC1的全部核苷酸序列和其编码的蛋白氨基酸序列描述在图2－1至2－16。在KHCV－LBC1 序列上的每一个cDNA 克隆的位置在图1和图3中加以表明。KHCV－LBC1有一个长的敞开的阅读框架，它由9030核苷酸碱基组成，5′ 端计数，从第343个核苷酸 (A) 开始直至第9372个核苷酸 (G) 为止。

给定氨基酸的鉴定数已经被确定，这主要依赖从5′－3′ 端方向由上述9030 核苷酸编码的多肽中氨基酸的位置所决定。

在KHCV－LBC1 的5′－末端区，按照本发明，已经发现要比日本型 HCV多出13以上的核苷酸残基 [Kato, N. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 95224 (1990)]。象在图6 中所述，和美洲型

HCV相比，发现有一个核苷酸以上以及在5′一末端区构建一个发卡结构的22个核苷酸上有3 个核苷酸已确定是不同的。5 ′ 一末端区通常在病毒基因表达和调节中起一个很重要的作用，组成22个核苷酸的发卡结构据认为是复制酶和核心蛋白的识别位点。 因此，既使在 此区上有一个细小的结构差异。可能在它的作用或特异性上会出现明显的和本质上的差别。

相似的，KHCV－LBC1的全长核苷酸序列和由此编码的氨基酸序列都和美洲型和日本型HCV进行了比较， 结果表明，以美洲型为例，与 KHCV－LBC1 核苷酸序列的同源性高达约78. 3%，氨基酸序列大约84. 2% 同源。以日本型HCV 为例，与 KHCV－LBC1有90. 9% 核酸序列同源， 氨基酸序列为93% (参见图4至图6) 。 上述结果清楚地表明 KHCV－LBC1是一种新型 HCV的 cDNA，它完全不同于已经鉴定的HCV病毒。

KHCV 变异株部分酶切 cDNA 片段的制备

从C型肝炎病人血清中分离出的所说的 KHCV中抽提出 KHCV RNA， 每一个 KHCV RNA的 cDNA 通过 PCR合成得到，以获得相对应于 NS2区域 NS5区域的cDNA片段。每一个这样获得的cDNA片段的长度是大约分别为 340 bp (NS2) 和320 bp (NS5) 。

然后将这些cDNA片段插入到M13mp18 载体中 [Cat, No. 408, New England Biolabs, 32 Tozer Road Beverly, MA 01915－5599, U. S. A.) ，以确定它

们的核苷酸序列（参见图7至图25）。它们的NS2区的核苷酸序列有91至94%同源性（参见图27和28）。NS5区表明96至99%同源性（图29）而编码在NS2和NS5区的氨基酸序列分别有90－94%和93－99%的同源性（参见图26）。

然而，也已发现，依照NS2区编码的842，849和853位的氨基酸数，KHCV可以被分成2个亚型，即KHCV－L1和KHCV－L2，包括在KHCV－L1中的KHCV的cDNA编码苯丙氨酸、亮氨酸和苏氨酸分别作为842，849和853位鉴定氨基酸，而包括在KHCV－L2的cDNA分别编码亮氨酸、苯丙氨酸和丙氨酸。作为KHCV－L1亚型，还包括：KHCV－LBC1，KHCV－LBC20，KHCV－LBC23，KHCV－LBC26和KHCV－LBC32，而KHCV－L2亚型包括：KHCV－LBC2，KHCV－LBC3，KHCV－LBC21，KHCV－LBC25，KHCV－LBC27，KHCV－LBC28，KHCV－LBC29，KHCV－LBC30和KHCV－LBC31。

应该值得注意的是上述那些特征没能在美洲型HCV中发现，这几处的氨基酸为半胱氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸。可是，日本型与KHCV－L2有相同的特征，即在上述位置中的氨基酸分别为亮氨酸，苯丙氨酸和丙氨酸。M13噬菌体群（M13mp 18－NS2L1）内含M13mp18噬菌体，它由除KHCV－LBC1之外的包括在KHCV－L1内的每一个cDNA组成，即KHCV－LBC20，KHCV－LBC23，KHCV－LBC26和KHCV－LBC32，该M13噬菌体在1992年3月13日存入美国菌种保藏中心（ATCC），并编号ATCC 75211。内含M13mp噬菌体的M13噬菌体

群 (M13mp 18－NS2L2)，它们是由包括在KHCV－L2以内每一个 cDNA组成，即，KHCV－LBC2，KHCV－LBC3，LHCV－LBC21，KHCV－LBC25，KHCV－LBC27，KHCV－LBC28，KHCV－LBC29，KHCV－LBC30 和KHCV－LBC31，其在上述同一天存入ATCC，编号为ATCC 75212。

本发明 cDNA 除了在例子中给的方法之外，即在图2 －1至图2－16和图7至25中所提供的核苷酸序列资料，可以采用化学合成。这种化学合成可用已知的象磷胺－固相支持法 [Matteucci, J. An. Chem. Soc. , 103, 3185 (1991)] 来进行。

然而，由于遗传密码的简并性 (degeneracy)，可以理解有许多潜在核苷酸序列能够编码在图2－ 1至图2－16和图7 至图25的氨基酸序列。

构建表达载体和生产蛋白质

按照本发明， 各种表达系统可以用于制备含有KHCV cDNA 片段的表达载体， 包括能指导生产和其它非KHCV蛋白多肽形成的融合蛋白。

例如，通过采用一种最常用的表达系统可构建这样一种载体系统。在酵母细胞， ubiquitine 已知由 ubiquitinase 酶在离 Arg － Gly － Gly 非常近的那个位点上被切除了 [Ozkaynak et al. , Nature, 312, 663－666 (1987)] 。Bachmair [Sience, 234, 178－186 (1986)] 报道一个融合有ubiquitine 的外源蛋白也可在离ubiquitine 的 Arg － Gly－Gly 上进

行切除。

据此，一个目的KHCV蛋白可通过在酵母表达 KHCV cDNA 片段和 ubiquitine 基因的融合寡聚核苷酸而获得。因为融合的蛋白可用酵母细胞的 ubiquitinase 酶切开移去 ubiquitine，结果，仍仅留下 KHCV 蛋白。

进一步，如果，这个含有 KHCV cDNA 片段和 ubiquitine 基因的融合寡聚核苷酸在大肠杆菌中表达，则内含有 ubiquitine 的融合蛋白将会得到。然而，ubiquitine 在体外就可用 ubiquitinase 酶将其切除。并可获得无 ubiquitinaes 酶污染的 KHCV 蛋白。当然，融合蛋白本身就能达到本发明的目的。只要 KHCV 仍保持有该蛋白必要的特征，如抗原性，它本身就可被使用。

有效地使用上述表达系统，若出现目的蛋白不稳定和易在宿主细胞内被蛋白酶降解，则选用 ubiquitine 作为融合蛋白则可使目的蛋白免遭蛋白酶的攻击并可稳定目的蛋白。

使用 ubiquitine 系统的表达载体可通过将 KHCV cDNA 片段插入到含有 ubiquitine 基因的表达载体上而得到。

另一方面，用麦芽糖连接蛋白 (MBP) 系统的融合表达载体也可用于本发明作为表达载体。在这个系统中，KHCV cDNA 片段被连接到编码MBP 的mal E1基因下游。就可生产出这种 MBP 和KHCV的融合蛋白 [Guam et al., Gene, 67, 21－30 (1987) ; Maina et al., Gene, 74, 369－373 (1988) ; Amann et al.,

Gene, 40, 183－190(1985); Duplay et al., J. Biol. Chem., 256, 10606－10613(1984)]。

上述的 MBP 表达系统非常方便，其原因是含有 MBP 的融合蛋白可以很容易将 MBP亲和到麦芽糖上而加以纯化；MBP在C末端区有一个可被蛋白酶因子Xa 切除的位点，这使得 KHCV 蛋白脱离 MBP。

为了获得 KHCV 目的蛋白，可用含有KHCV cDNA片段的表达载体转化相容的宿主细胞。转化的细胞在允许表达的条件下进行培养。

一个用于表达的 KHCV cDNA片段可用限制性核酸内切酶或核酸酶制备对较大的片段或 KHCV－LBC 进行酶切而制备，也可通过以 KHCV－LBC1或其它片段作为模板，加入引物后进行 PCR扩增而制备出。每一个引物的长度和核苷酸序列可按要表达的 KHCV cDNA位置和长度进行确定。引物完全或部分互补于双股 KHCV cDNA的任何一股。

一旦本发明 KHCV cDNA被制备好和分离出，则进一步插入于一个适当的表达转移载体上，它含有插入基因序列转录和转译所必需的结构组成。有用的克隆载体可由其它非 KHCV 多核苷酸片段包括化学合成的 DNA序列（各种已知细菌质粒、噬菌体 DNA 以及被修饰用于噬菌体 DNA 或其它表达控制序列或酵母质粒的组合物）等组成。

选择一个合适宿主表达微生物受许多已知因素的影响。例如，这些因素包括所选载体的相容性，由重组质粒编码蛋白的毒性，目的蛋白可复性难易程度、蛋白特征、生物

安全性和费用。必须考虑平衡这些因素，也必须理解不是所有的宿主都对表达一个特定的重组 DNA 分子有效。

用在本发明中的合适的宿主生物包括，但不仅限于，植物，哺乳动物或昆虫细胞或酵母细胞和像大肠杆菌类的细菌。

来自 KHCV cDNA的多肽包括所有的核心蛋白，非结构蛋白和外膜蛋白和一种能用于制备诊断制剂和以一种或多种混合后制备疫苗的蛋白质。在宿主细胞内生产的多核苷酸可结合使用常规方法，如细胞破碎、离心、透析、脱盐、层析、凝胶过滤、电泳和电洗脱等，进行分离和纯化。

本发明的多核苷酸也可以 KHCV 病毒子中分离制备，或采用合适的方法，如，排阻固相合成法、部分固相法、片段凝缩或传统溶液法，进行化学合成。最好采用 Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)] 所介绍的固相合成法。

另一方面，对蛋白质进行氨基酸替换并不改变其生物学和免疫学活性。这已由 Neurath 等对此进行了描述 (The Proteins , Academic Press, New York (1979)] ，这一点特别在图6上出现。最常见的氨基酸替换是 Ala/ Ser, Val/ Ile/ ASP/ Glu, Thr/ Ser, Ala/ Gly, Ala/ Thr, Ser/ Asn, Ala/ Val, Ser / Gly, Thr/ Phe, Ala/ Pro, Lys/ Arg, Asp/ Asn , Leu/ Ile, Leu/ Val, Ala/ Glu, Asp/ Gly, 以及反过来也是如此。

这种功能上对等的氨基酸替换是本发明典型的体现，

也是本发明范围之内。无论如何，只要最终产品仍保留一个或更多KHCV 抗原决定簇即可。

在这种专门的情况下，标准的单字母或三字母缩写用于代表核苷酸和氨基酸。这些缩写的意义可以在标准的生化教科书上找到，如，生物化学原理 (Lehninger, Worth Publishers Inc. , New York, pp. 96, 798 (1984)] 。

应用检测KHCV抗体的KHCV抗原多肽诊断C型肝炎的方法

本发明也涉及一个诊断方法，该法中使用一个或更多 KHCV 抗原表位决定簇的 KHCV 多肽作为诊断试剂。这种采用 KHCV 多肽的诊断方法在检测 C型肝炎患者血清样品中 KHCV 抗体时，比任何其它现有的方法都特异和准确。

新的诊断方法包括以下各步：

首先，含有一个或更多 KHCV 多肽的诊断试剂被加到一个固相支持物上，例如， 微量反应板孔可使已知 KHCV 抗原吸附到孔表面。

其次，将假定血清样品用稀释液稀释后加到抗原包被孔内，如果样品中有 KHCV抗体， 则可形成抗原抗体复合物。

再次，酶 (如辣根过氧化物酶 HRP) 标抗人 IgG 加入孔内让 HRP －抗人 IgG 接合到在第二步中形成的复合物上。

最后，加入酶的底物，如，过氧化物酶的底物为邻

本二胺盐酸盐 (OPD) 和过氧化氢，使孔内出现颜色反应。当样品中含有 KHCV 抗体时，就会出现酶和底物的反应，结果出现颜色。加入稀硫酸终止颜色反应。

颜色的强弱程度可用微孔板酶标读数仪测出，依此，可测出 HCV 抗体的存在。诊断方法的固相支持物可以是聚乙烯珠或硝酸纤维素膜。

本发明进一步提供了C型肝炎诊断试剂盒，它由必要的试剂组成来进行上述过程，特别含有 KHCV 多肽并带有一个或更多 KHCV 表位决定簇的诊断试剂。

抗体的制备

本发明提供针对源自 KHCV cDNA 多肽的抗体。简单地说，选出适当的动物进行目的免疫，一定时间后，动物脾脏被切割取出，在选定的条件下将单个脾细胞和骨髓瘤细胞融合。之后，进行细胞的克隆化，将每个克隆上清液进行检测看是否分泌针对抗原目的区域特异的抗体。

这种动物，例如小鼠，可按下述常规方法进行免疫：

大量纯化抗原采用肌肉内，腹腔内，皮内或静脉内注入小鼠。每只注入总量为100至200μg的量，间隔 14至21 天，可再进行几次这样的免疫。如有必要，可同时使用常规弗氏完全或不完全佐剂。在末次免疫后的第三天，移去小鼠脾细胞和存活率高于95%处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞融合。

细胞融合按已知的方法进行，如 Lovborg 所述的方法（"单克隆抗体：生产和保存，William Heinemann, Medical Books Ltd.（1982））。

这样获得的融合细胞用已知的方法进行系列稀释（"免疫学的现代策略"，Wiley Interscience（1991））以检测出分泌目的抗体的克隆。

目的克隆可由一个常规的方法，如酶免疫测定法、空斑法，斑点法，Ouchelny 法和放射免疫法（"杂交瘤技术与单克隆抗体"，Research and Development Press, pp 30－53（1982））进行筛选。

一个技术熟练人员可以很容易从克隆后的抗体产生细胞系获得目的单克隆抗体，进一步用象亲和层析的常规方法进行纯化。

这些抗体对纯化 KHCV 抗原和开发改良的诊断方法检测样品中 KHCV 抗原非常有用。

诊断性寡聚核苷酸探针和试剂盒的制备

以图2－1至 2－16和图7至25所示 KHCV cDNA 已确定的核苷酸序列为基础，至少有8个互补于 KHCV cDNA 双股中任何一股的核苷酸片段可通过酶切或人工合成而制备出。寡核苷酸在标记后可作为杂交探针，例如：用放射性同位素标记，或以 KHCV cDNAs 为模板，此寡核苷酸为引物 PCR 来检测血清样品中的 KHCV。

寡核苷酸既可完全或部分互补于一股 KHCV cDNA，

这依照具体情况而定。

寡核苷酸应该至少有8个核苷酸，最好为10－12个，共有20个左右则更好了。

疫苗的制备和注射方式

选用一种已知方法制备灭活或致弱 KHCV 以及由本发明中 KHCV cDNA 片段所编码的一种或更多的多肽，加入生理上可接受的介质液体即可制成疫苗。适宜的介质液体包括：0.01 M至0.1 M 中性 pH 的磷酸缓冲液或生理盐水。

抵抗 HCV 的强免疫力可通过给疫苗加入一种佐剂或免疫增强剂，或以一种更大形式的多肽，这既包括交叉连接成的复合物或将多肽偶联到成载体状形式。

免疫接种适宜的佐剂包括，但并不仅限于，佐剂65（含有花生油，mannide 单油酸盐和单硬脂酸铝）：矿物胶，如氢氧化铝、磷酸铝和铝胶；表面活性剂，如十六（烷）基胺（hexadecylamine），十八（烷）基胺（octadecylamine），溶血卵磷脂（lysolecithin），二甲基双十八（烷）基一氨溴化物（dimethyldioctadecyl－ammonium bromide），N，N－双十八（烷）基－N′，N′－双（2－羟甲基）丙二胺（N，N－dioctadecyl－N′，N′－bis（2－ hydroxymethyl ）propanediamine），methoxyhexadecyclglycerd 和普卢兰尼克多烃基化合物（pluronic polyols ；聚阴离子，如吡喃，葡聚糖硫

酸盐 (dextran sulfate)， poly IC， 聚丙酸 ，carbopol ； 肽， 如胞壁酰二肽， 二甲基甘氨酸和tuftsin； 和油乳剂。 本发明中的蛋白质在它们制成脂质体或其它微载体时也可进行预防注射。

本发明中蛋白的免疫原性， 特别是较小的片段， 可以通过交互联结或通过偶联到一个免疫原载体分子(如： 有能在宿主动物体上独立激发免疫应答性质的大分子物， 这些分子可将本发明的蛋白质或其片段共价连接)。 交互联结或偶联到一个载体分子可能是很必要的， 因为小的蛋白片段有时象半抗原(该分子能特异性接合到抗体上， 但不能诱发抗体产生， 即它们没有免疫原性。 这种半抗原偶联到免疫载体分子后就可通过通常称作的"载体效应"， 赋与这些半抗原有免疫原性。

适宜的载体分子包括蛋白南和天然的或合成的多聚体化合物(多肽、 多糖、 脂多糖等)。 有用的载体之一是被称作Quil A 的糖甙类物， 这是由 Morein 等介绍的 Quil A 特别适合蛋白分子(Nature， 308， 457 (1984))， 包括(但不仅限于此) 哺乳动物血清蛋白， 如钥孔血蓝素， 人和牛的γ球蛋白， 人、 牛或兔血清白蛋白， 甲基化的这些蛋白质或其衍生物。 其它能用的蛋白质载体将很明显是由操作熟练的人员自行选择。

用各种已知的方法可将半抗原分子共价偶联到载体分子上， 准确有选择要由使用的载体分子的性质来决定。 当载体分子是一个蛋白分子， 则本发明中的蛋白质或片段可以由水溶性碳化二亚胺(双环己基碳化二亚胺)或戊二醛偶联到这样

的载体上。

象这样的偶联剂还可被用于交互联结自身蛋白质或片段，结果避免了使用单独的载体分子。在蛋白质或其片段间的这种交互联结成的聚集物也可增加其免疫原性。

掺入到脂质体或其它微载体，可提供了在更长时间内释放疫苗的效应。

这种疫苗可采用单一剂量接种，或最好采用多剂量接种。在疫苗配方中多肽的有效剂量范围为约5－200 μg，这依照要免疫者的体重，这个人免疫系统产生抗体的能力，以及所期望达到的免疫力程度，初次免疫后1至数月，最好进行再次加强免疫，也可反复多次接种。标准的接种途径是皮下，皮内，肌肉内或静脉内注射。

下面给出的例子企图在不限制本发明的范围内以特别事例说明本发明。例中使用的试验方法完全按照下面给出的参考例子进行，除非有特别说明。

如果不另外特别指出，在固体混合物中固体物，液体中的液体物，液体中的固体物在上面所给的百分比分别表示wt／wt，vol／vol 和 wt／vol。

参考例1：限制性核酸内切酶消化 DNA

限制性酶和反应缓冲液是从NEB (New England Biolabs，Jolla，MA，U.S.A) 公司购到。

反应通常在灭菌的埃朋导夫管内进行。反应体积在50－100 μl 之间，反应温度和时间分别为370℃和1－2小时。

之后， 反应物在65℃热处理15分钟（或在热抗性内切酶情况下用酚抽提和乙醇沉淀）以灭活限制性核酸内切酶。

用于限制性核酸内切酶反应的10倍反应缓冲液有下列配方：

10×NEB 反应缓冲液1：100mM Tris－HCl，100 mM $MgCl_2$，10mM DTT，pH 7.0

10×NEB 反应缓冲液2：100mM Tris－HCl，100mM $MgCl_2$，500mM NaCl，10mM DTT，pH 7.0

10×NEB 反应缓冲液3：100mM Tris－HCl，100mM $MgCl_2$，1000mM NaCl，10 mM DTT，pH 7.0

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

参考例2：酚抽提和乙醇沉淀

在完成酶反应后， 反应混合物用酚抽提， 其目的是灭活酶活性或从反应混合物中恢复 DNA， 这里使用的酚用前先用含有10 mM Tris －HCl （pH 8.0） 和1mM EDTA 缓冲液进行平衡。 酚抽提即将等体积样品和酚溶液混合，用力震摇， 15，000 rpm 离心5分钟， 将上层水相移入新试管中。 重复进行上述过程2～3次。

最后， 水相同等体积氯仿（氯仿： 异戊醇=24：1）抽

提，再一次分离水相。3M 乙酸钠(0.1 个体积) 和乙醇(2.5 体积)加入分离水相中，置－70℃ 30分钟或－20℃ 12小时，再将该混合物在4℃ 15，000 rpm 离心20分钟以恢复原核酸。

参考例3：连接反应

DNA 的连接反应是用T4连接酶进行的，10×连接反应缓冲液(0.5 M Tris －HCl，0.1 M $MgCl_2$，0.2 M DTT，10mM ATP，0.5 mg／ml 牛血清白蛋白(BSA)观自 NEB。反应体积通常是20μl，10单位T4连接酶用于连接 DNA的粘性末端，而100单位用于连接平端DNA。

在16℃反应进行5小时，在4℃进行14个多小时，反应完成后，反应混合物加热到65℃并维持15分钟灭活 T4 DNA连接酶。

参考例4：转化大肠杆菌

用于该例中的大肠杆菌菌株包括 HB101 (ATCC 33694)，W3110(ATCC 27325)，JM 101 (ATCC 33876) 和 JM 105 (ATCC 47016)。用一个已知的方法进行大肠杆菌的转化 (Maniatis et al., in Moleaclar Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y. (1982)；或 Cohen , Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A, 69, 2110(1972))。

参考例5： 转化酵母菌

酵母转化按下面两属文献介绍的方法进行。 Beggs, Nature， 275， 104 (1978) 和Hinnen et al， Proc, Natl， Acad. Sci， U.S.A.， 75， 1929 (1978)。

参考例6： 寡核苷酸合成

用DNA合成仪 (Applied Biosystems Inc.， 380B, U.S.A) 采用自动固相磷酰胺化学法进行寡核苷酸合成。

用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2M 脲， 12%丙烯酰胺和双叉丙烯酰胺 (29： 1)， 50 mM Tris， 50 mM 硼酸, 1 mM EDTA) t SEP －PAK (Waters Inc.， U.S.A) 柱层析纯化合成的寡核苷酸； 在260 nm 处测量 O.D. 值来确定量。

参考例7： 聚合酶链反应 (PCR)

向10－100ng 模板 DNA 混合物中加入10 μl 10× Taq 聚合酶反应缓冲液 (10mM Tris－HCl， 500 mM KCl， 15 mM $MgCl_2$， 0.1% (W／V) 明胶， pH 8. 3)， 10μl d NTP 混合液 (d GTP， d ATP， d TTP 和 d CTP 每一样均为2 mM)， 每一个引物 2μg (通常， 在一个反应中用两个引物， 为防止万一， 也可用3个， 位于中间部分的引物可用0.02μg)。 0.5μl Ampli Taq 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus， U.S.A.) 加入蒸馏

水中使最终体积达到100μl，再加入50μl 矿物油以防止反应混合物的蒸发。

PCR是在一个热循环仪(Perkin Elmer Cetus, U.S.A)中进行。热循环按程序重复25次或更多次。循环程序为: 95℃1分钟→ 55℃1分钟→ 72℃2分钟, 最后反应在72℃中进行10分钟。

在反应被完成后, 混合物用酚抽提, 用乙醇沉淀法复原收储PCR产物。将沉淀物溶解在20μl TE 缓冲液中(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5)。

例1: 制备 KHCV CDNA KHCV-LBC1.

(1-A): 从朝鲜C型肝炎病人血清中分离HCV并进一步抽提出病毒基因组RNA。

从患慢性C型肝炎的朝鲜病人体内取血清50ml(ALT < 60IU, 由朝鲜大学医院和在朝鲜的基督教大学提供), 进一步超速离心沉淀出HCV颗粒。这是按Bradley. D. W., 等推荐的方法进行的(Gastroenterology, 88, 773 (1985))。50ml 血清用TENB 缓冲液(0.05 M Tris. pH 8.0, 0.001M EDTA, 0.1M NaCl) 稀释6倍, 在28, 000 rpm室温下离心6小时, 使用Beckman 转头SW 28(Beckman Inc., Model L8-80M)。

从沉淀的病毒颗粒中抽提出病毒基因RNA是按Cholozynski P., 和Sacchi, N. 介绍的方法进行的(Anal Biochem., 162, pp 156-159 (1987))。沉淀的病毒颗粒悬浮在8ml RNA 抽提液中(4M 硫氰胍, 24mM柠檬

酸的， pH7.0， 0.5% Sarcosyl， 0.1M 2－巯基乙醇)，再加入0.8ml 2M乙酸钠(pH 4.0)， 8ml 酚(BRL Inc, U.S.A， 用蒸馏水事先饱和)和1.6ml氯仿－异戊醇(49:1， V／V)， 并将该混合物以12，000×g 4℃离心15分钟。上清液吸到一支新管中再加入同样体积量的异丙醇和糖原(2μg／ml上清液)作为载体， 在冷冻盒(－20℃)停留1小时， 然后， 以12，000 ×g 4℃离心20分钟获得RNA沉淀物。该沉淀物悬浮于75%乙醇， 以上述同样方式离心， 然后在真空泵中抽干10分钟。病毒RNA沉淀溶解在400μl TE缓冲液(10mM Tris， pH 7.5， 1mM EDTA)，用于下一步骤。以后使用的病毒RNA可以－70℃保存。

(1－B)： KHCV cDNA文库的建立

(1－B－1)： KHCV cDNA的制备

为了制备 cDNA ， 使用了 Zap－cDNA 合成试验盒(Stratagene Inc.， U.S.A)。 C型肝炎病毒RNA按例(1－A)制备， 用于反转录酶的模板， 用DNA合成的寡聚d (T) 引物具有5′－GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAG(T)$_{18}$ －3′序列和一个随机引物具有5′－TTTTTCATGATTGGTGGTGGTGGAACTGGACCGTCTCGAGNNNNNN－3′序列(在此处N可以是相同的或不同的A，T，C或G， 这里被称为"RANPSHCV")用在该试验中。

cDNA的第一股制备如下： 取在例(1－A)中制备的肝炎病毒RNA溶液18μl加入2μl 0.1M CH_3HgOH， 该混合物在室温中放置10分钟使二级RNA结构松散， 再加入2μl 1M的β－巯基乙醇， 其混合物室温下放置5分钟。之后加入5μl反转录酶反应缓冲液(500mM Tris－HCl， pH8.3， 750mM KCl， 30mM $MgCl_2$，10mM DTT)， 2.5 μl 10mM dATP， dGTP， dTTP和5－甲基－dCTP， 2μl 寡－d(T) 引物(1.4 μg／μl)或2μl PANPSHCV(1.0 μg／μl)， 15μl用DEPC 处理过的蒸馏水和1.0μl RNase抑制剂(1单位／μl， Promega， Inc.， U.S.A.)，依次加入； 然后在室温下放10分钟使引物与模板相连， 然后加入2.5μMMLV反转录酶(18单位／μl， 超录RNA酶H^-反转录酶， BRL. Inc.， Cat， No. 8853SA)， 反应混合物温育1小时(在37℃)以合成cDNA的第一股。

cDNA 第二股制备如下： 40μl 10倍第二股反应缓冲液(188mM Tris－HCl， pH6.9， 906 mM KCl_2， 46mM $MgCl_2$， 1.5mM β－NAD， 100mM $(NH_4)_2SO_4$)， 加入45μl上述获得的第1股溶液中， 再加入6.0μl 10mM dNTP混合液(10mM dATP， dCTP， dTTP和dGTP)和298μl蒸馏水， 最后沿管壁滴下1.0μl RNase H (4单位／μl)和10.0μl DNA聚合酶I(11 单位／μl)， 不断混合， 在16℃反应2.5小时。

该反应液中加入等体积的酚－氯仿(1: 1， V／V)，酚事先已用0.5M Tris－Hcl(pH 7.5)和0.1% (V／V) β－

巯基乙醇饱和过。抽提三次。上层水相吸出，加入0.1体积3M乙酸和2倍体积100%乙醇，－20℃过夜，4℃12，000×g离心20分钟，收集沉淀。

(1－B－2)：cDNA 文库的建立

为了使在例(1－B－1)中制备的双股cDNA变成平头，cDNA 沉淀物溶解在43.5μl蒸馏水中，取39μlcDNA液加入5.0μl T 4DNA 聚合酶反应液(670mM Tris－HCl，pH 8.8，166mM $(NH_4)_2SO_4$，67mM $MgCl_2$，100mM β－巯基乙醇，67μM EDTA)，2.5μl 2.5mM dNTP 混合液和3.5μl T 4DNA 聚合酶(2.9单位／μl)，反应混合物在37℃放30分钟，最终产品用酚－氯仿抽提，乙醇沉淀，其方法同例(1－B－1)。

为了在5′端引入一个限制性酶EcoRI识别位点，上述制备的平头双股cDNA按以下方法处理：给平头cDNA中加入7.0μl EcoRI接头(Stratagene Inc.，Zap－cDNA 合成试剂盒Cat. No. 200400，CA. U.S.A)，1.0μl10倍连接缓冲液，1.0μl T 4DNA连接酶(1000单位／μl)和1.0μl 10mM ATP，置4℃过夜，最终产物加热70℃10分钟以灭活连接酶。

这样获得的cDNA可直接用于克隆，可是在这个例子所述的cDNA被进一步扩增然后用于克隆步骤。

为了扩增cDNA，按下述方法进行扩增。向cDNA溶液中加入10μl 10×PCR缓冲液(200mM Tris－HCl，pH 8.

3， 15mM $MgCl_2$， 250mM kCl， 0.5% Tween 20， 1mg／ml明胶）， 10μl 2mM dNTP混合物， 5μl PSHCV含有5′－TTTTTCATGATTGGTGGTGGA－3′的序列的引物和5μl Eco RI 接头的上股（5′－CCCCCCGAATTCGGCACGAG－3′）， 1μl（2.5单位）Taq DNA 多聚酶（Parkin Elmer－Cetus. Inc. 761 Main Avenue， Norwalk， CT 06859－0010， U.S.A.）和69μl蒸馏水。然后用热循环仪（Perkin Elmer－Cetus Inc. U.S.A）进行PCR扩增。它的程序为重复循环25次； 每次为： 95℃ 30秒 → 55℃30秒 → 72℃2分钟， 在完成这个反应后， 残留引物和dNTP用Centricon 100（Amicon Inc.， Cat， No. 4200， P.O. Box 91954， Chicago， IL 60693， U.S.A.）除去。最后获得的产品用氯仿－酚抽提， 用乙醇沉淀， 然后溶解在16μl TE 缓冲液中。

再向最终溶液中加入2μl 10×缓冲液（0.5 M NaCl， 0.5 M Tris－HCl， 50mM $MgCl_2$， 5mM DTT， pH7.9），1μl Eco RI和1μl Xho I （New England Biolabs Inc.， 30 Tozer Rd.， Berverly， MA， U.S.A.）。然后反应液置37℃10分钟部份消化cDNA， cDNA片段用氯仿－酚抽提， 用乙醇沉淀然后溶解在TE缓冲液中。

这样制备的cDNA 片段被克隆到UNI－ZAPXR载体的过程如下： 向10μl Eco RI Xho I消化的cDNA片段液中加入2.0μl 10×连续液冲液， 2.0μl 10mM ATP， 4.0μl事先已用Eco RI／Xho I处理过的UNI－ZAPXR载体溶液

(1μg／μl)和2.0μl T4 DNA 连接酶(4 Weiss 单位／μl)然后在16℃反应10个小时。

(1－B－3)： 体外包装含有cDNA的载体成噬菌体， 扩增cDNA文库

为了将按例(1－B－2)制备的连接好的DNA成为噬菌体， 将在例(1－B－2)中获得的最终溶液10μl加入Gigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene Inc., U.S.A.)中， 在室温下放2小时。

再向该溶液中加入500μl噬菌体稀释液(5.8g NaCl, 2.0g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50ml 1M Tris－HCl, pH7.5, 5ml 2%明胶加至1升水中)和20μl氯仿(参见kretz et al., Nucl. Acid. Res., 17, 5409 (1989))。

按下述方法进行感染和扩增。PLK－F′(Stratagene Inc., Zap －cDNA合成试剂盒Cat. No. 200400)， 大肠杆菌mer A^- 和mer B^- 菌株在LB培养基(10g Bactotrypton, 5g 酵母浸膏, 10gNaCl 溶至1升水中)上培养至$O.D._{600}$值至1.0。取600μl 该菌液和200μl包装混合物， 混加在一起， 37℃15分钟使噬菌体感染大肠杆菌。再向大肠杆菌液中加入6.5ml 0.7%NZY 融化后保持在48℃的琼脂(7gNZ胺, 5g NaCl, 2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5g酵母浸膏, 16g琼脂加水至1升)37℃ 5－8小时以产生噬菌斑。

10ml噬菌体稀释液倾入该板， 在4℃轻晃15分钟以溶

噬菌体至该溶液中，该混合物经4，000×g离心沉淀出E. coli菌，收集上清液，向其中加入0.3%氯仿，cDNA文库的滴度测量后约为$10^{10}-10^{13}$ PFC（噬斑形成单位）/ml。再向该cDNA 文库液中加入100% 二甲基亚砜(DMSO)使最终浓度为7%(V/V)，然后保存于－70℃。

(1－C)：用免疫学方法筛选cDNA 文库和测cDNA 序列。

用免疫学方法筛选cDNA文库是按Huynh, T.V. 等介绍的方法进行(DNA Cloning Techniques: A Practical Approach (D.M. Glover ed), pp. 49－78, IRL Press, Oxford (1985))从例(1－A)制备的6倍稀释血清经离心后上清液经过蛋白G亲和层析柱(Genex Inc., U.S.A.)纯化获得HCV抗体。

按例(1－B－3)制备的cDNA文库溶液稀释成每个150mm直径的平皿上出现5万个PFU，再将该液和600μl按例(1－B－2)同样方法制备的大肠杆菌XL－1 Blue 培养液($O.D._{600}$=0.5 以及6.5ml 0.7% NYZ琼脂混合，每一个培养材料平铺40个NZY琼脂平皿，37℃培养12小时，产生2×10^6 噬菌斑。

此后，将噬菌斑吸附到137mm直径的尼龙滤膜(Bio－Rad Inc., Cat. No162－163, U.S.A.)上，再用10mM IPTG (isopropyl－β－D－thiogalactopyranoside)溶液浸透然后在Whatman 3 MM

滤膜上吸干。每一张滤膜都放在一个平皿琼脂培养，37℃ 3.5小时。用噬菌斑印迹的每一个滤膜用15ml洗液（10mM Tris－HCl，pH8.0，150mM NaCl，0.05% Tween 20）洗。然后向滤膜中加入15ml封闭液（1%牛血清白蛋白，20mM Tris－HCl，pH 7.5，150mM NaCl），在室温下轻轻振荡1小时。之后，每一张滤膜在室温下用TBST缓冲液（20mM Tris－HCl，pH7.5，150mM NaCl，0.05%（V／V）Tween－20）轻轻振荡洗5次，每一次5分钟。再将滤膜放在15ml稀释过的纯化MCV抗体溶液中（最终蛋白浓度为8.2mg／ml）。该抗体溶液的稀释度为1：200，稀释液为TBS 缓冲液（20mMTris－HCl，pH 7.5，150mM NaCl）并含有1%（V／V）FBS（胎牛血清）。在室温下轻轻振荡1小时，再用TBST缓冲液洗5次，每张滤膜放入15ml用含有1%（V／V）FBS的TBS稀释的生物素化山羊抗人IgG和1：2000稀释的亲和素碱性磷酸酶结合物（Pierce Inc.，U.S.A. Cat. Nos. 3177OC，21321C）室温下轻晃1小时，再用TBST 洗膜5次。然后在whatman 3MM滤膜上吸干。

为显色，每张滤膜放入15ml显色液（100mM Tris－HCl，pH 9.5，100mM NaCl，5mMMgCl$_2$，5mg硝基蓝四氮唑，2.5mg 5－溴－4－氯－3－吲哚磷酸盐），暗处室温显色30分钟。紫色的阳性噬菌斑可用肉眼确定，这表明表达了编码重组HCV抗原的cDNA。每张滤膜用TBS缓冲液洗一次，加入颜色终止液（20mM Tris－HCl，pH 2.9，1mM EDTA）以终止显色。在室温下自然干燥后用类极膜（Polaroid film）记录结果。

分离出的阳性噬菌斑放入噬菌体稀释液(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM $MgCl_2$)中，在室温放1－2小时重复进行上述免疫筛选测定从而获得单一噬菌体噬菌斑的克隆。

象过多花精力确定重组HCV基因一样，确定的每一个噬菌斑都放入一个灭菌的微型离心管中，内含500μl SM缓冲液(5.8 g NaCl, 2.0g $MgSO_4$, 50μl 1M Tris-HCl, pH 7.5, 5ml 2%明胶，加水至1升)，再加20μl的氯仿，然后在室温下振荡培养1－2小时。200μl(>1×10^5 噬菌体粒子)这样获得的溶液与1μl辅助性噬菌体R408(>1×10^6 PFU/ml, Stratagene Inc., U.S.A.)和20μl大肠杆菌XL－1细胞悬液(O.D.$_{600}$ =1.0)混合，然后在37℃培养15分钟。之后，再加入5ml 2×YT 培养基(10g NaCl, 10g 酵母浸液, 16g细菌蛋白胨于1升水中)，并在37℃振荡培养3小时，加温至70℃维持20分钟，进一步做1：100倍稀释，200μl稀释后该液和200μl大肠杆菌XL1－Blue 细胞悬液(O.D.$_{600}$=1.0)混合。在37℃培养1小时后，取100μl该培养液加入含有氨苄青霉素(50μg/ml)的LB培养基平皿中。37℃10小时以获得pBluescript 噬菌体质粒(phagemid)菌落拥有双股cDNA。

为了制备单股DNA，pBluescript菌落被培养在含有抗生素四环素(12.5μg/ml)的LB培养基内，再进一步筛选出阳性菌落，如此获得的阳性单一菌落置四环素 $^+$LB肉汤培养基(2－3ml)过夜。再加入0.3ml超级液体培养基(35g细菌蛋白胨，20g酵母浸液，5g NaCl，用NaOH调整至pH

7.5) 37℃振荡培养， 这样， 该培养物就被辅助性噬菌体R感染。培养8小时， 直至$O.D._{600}$ 达到0.3。

在完成这个感染时， 噬菌体／细菌的比大大依赖于cDNA在pBluescript 定居的类型。可能是20: 1， 10: 1， 1: 1或1: 10。单股DNA可从后来获得的上清培养液中抽提而得。

分离和纯化双股噬菌体质粒和单股噬菌体质粒可按Sambrook， J.等介绍的方法进行 (Molecular Cloning, 1，2.73－2.81， Cold Spring Harbor， N.Y. (1989))。

包含在一个克隆中的cDNA长度可用Eco RI和Xho I酶切消化双股噬菌体质粒而确定。3个有cDNA片段和不等长的克隆也已得到。

3个重组cDNA核苷酸序列用纯化的单股重组pBluescript 噬菌体质粒或双股pBluescript 噬菌体质粒作为模板以及由M13－20聚体， T7引物， KS引物， SK引物或T3引物 (Strategene Inc. U.S.A) 按Sanger方法 (Proc. Natl. Acad. Sci， U.S.A.， 74， 5405 (1977)) 进行了测定， 其中得到的cDNA片段分别被命名为KHCV426，KHCV 425和KHCV403 (参见图1－3)。

(1－D)： 用寡核苷酸探针筛选包含有KHCV cDNA的重组噬菌体和核酸定序

(1－D－1)： 分离和KHCV 652重叠的cDNA克隆

为了筛选那些不能用免疫学方法筛选的含HCV cDNA的重组噬菌体，用Benton，W. D.，等介绍的方法进行了噬菌斑杂交(Benton，W.D.，et al.，Science，196，180(1977)；Connor，B.J.，et al.，Proc. Natl. Acad，Sci. U.S.A，80，278(1983)和Jacob，K.，et al，Nature，313，805(1985))。在这个试验中使用了二个寡核苷酸片段P 652a (5′-TTCATACCCGTTGAGTCTATGGAAACTACT-3′)和P652b (5′-GCCATTCCAAGAAGAAGTGTGCGAACTCG-3′)作为探针，这两个片段的核苷酸序列是选自例(1-C)所确定cDNA KHCV 652的核苷酸序列。

按例(1-B)制备含5万PFU的噬菌体文库溶液，然后和600μl按例(1-B-3)制备的大肠杆菌XL1-BLue(稀释到$O.D._{600}$为0.5)混合，再与0.7% NZY琼脂凝胶混合，混合物倒入150mm NZY平皿内，37℃ 12小时。从30个平皿中可获得1.5×10^6噬菌斑。

之后，将137mm直径尼龙膜仔细地贴在平皿面上，印迹噬菌斑到膜上。然后移去尼龙膜自然干燥。

每一个膜放在已用0.2M NaOH／1.5M Nacl浸泡过的whatman 3MM 滤膜上1-2分钟，再转放到用0.4M Tris-HCl，pH 7.6和2×SSC(SSC：17.53g NaCl，8.82g柠檬酸钠，pH 7.0溶至1升水中)浸泡过的滤膜上1-2分钟。最后在真空加热器80℃2小时干燥尼龙膜。

干燥后，尼龙膜在室温下用500ml 3×SSC／0.1%

SDS溶液洗3－4次。再用同样溶液65℃洗2小时。每一块尼龙膜放入500ml预杂交溶液(6×SSC， 5×Denhardt 液，100 μg／ml酵母tRNA， 0.05% 焦磷酸钠)； 标记^{32}P的P652a和P652b各30ng加入该溶液中， 杂交在48℃进行24小时。

上述所用探针的标记如下： 先将32ng探针混合物中加入7.5μl 10×T4 Kination 缓冲液(0.5 M Tris －HCl，pH 7.5， 0.1 M $MgCl_2$， 50mM DTT， 0.5mg／ml BSA)， 100μCi ($\gamma-^{32}P$) ATP和50单位的T4 核苷酸激酶用蒸馏水补至总体积75μl， 激发反应在37℃进行30分钟。

在完成杂交后， 膜用6×SSC／0.05%焦磷酸钠溶液在室温下洗5次， 共10分钟， 用同样溶液在60℃洗30分钟。进一步洗膜， 每15分钟升温2℃， 直至膜用Geiger计数器(Ludlum Model 13)检测确定完全洗净为止。洗过的膜用X线胶片(Kadak X－Omat AR)在－70℃曝光24－48小时。

用上述描述的同一方法把确定为阳性的噬斑挑选出来，获得一个单一噬菌斑的噬斑来。

从获得的阳性噬斑， 制备出双股噬菌体质粒和单股噬菌体质粒， 用例(1－C)定序。

和KHCV652 重叠的cDNA克隆被命名为KHCV752和KHCV675。它们的长度、位置、核酸序列和编码的氨基酸序列参见图1至3。

(1－D－2)： 分离与KHCV426重叠的cDNA

模仿例(1－C)获得的KHCV426cDNA的核酸序列，合成了寡核苷酸P426a (5′－ACGAGACCTCCCGGGGCACTCGCAAGCACC－3′)和P426b (5′－CGTAATTTGGGTAAGGTCATCGACACCCTC－3′)两个片段。将上述两片段作为探针，以例(1－D－1)同样的方式进行噬斑杂交。与KHCV426重叠的cDNA克隆按例(1－C)法检测出来，命名为KHCV240，它的长度、位置和核苷酸序列以及所编码的氨基酸序列参见图1至3。

(1－D－3)： 分离与KHCV240 重叠的cDNA

模仿例(1－D－2)获得的KHCV240的核酸序列合成了寡核苷酸P240b (5′－GTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAACTA－3′)。用P240b作为探针，对从例(1－B)制备的cDNA文库按例(1－D－1)方式进行筛选。这样获得的含约110核苷酸与KHCV240重叠的cDNA克隆称为KHCV513，它的测序是按Sanger方法进行的，其长度、位置和序列以及编码的蛋白质氨基酸序列都列在图1至3。

(1－D－4)： 分离与KHCV513 重叠的cDNA

模仿例(1－D－3)确定的KHCV513序列合成了寡核苷酸P513b (5′－CGCATGGCCTGGGATATGATGATGAACTGG－3′)。以此片段P513b为探针，对从例(1－B)制备的cDNA文库按例(1－D－1)方式进行筛选。与KHCV513重叠130bp的810bp cDNA克隆命名为KHCV 810；测序是按Sagner法。其长度、位置和KHCV 810 核酸序列以及编码的氨基酸序列参见图1至3。

(1－D－5)：分离与KHCV 810 重叠的cDNA

模仿例(1－D－4)确定的KHCV810序列合成了P810b寡核苷酸(5′－AAATGAGACGGACGTGCTGCTCCTTAAC－3′)。以此片段P810b为探针，对从例(1－B)制备的cDNA文库按例(1－D－1)方式进行筛选。与KHCV 810重叠的650bp cDNA克隆命名为KHCV 798，它的测序是按Sanger法。其长度、位置和KHCV798的核酸序列以及编码的氨基酸序列参见图1至3。

(1－D－6)：分离与KHCV 403重叠的cDNA

模仿例(1－D－5) KHCV 403 序列合成了P403A(5′－GAGAAGAATTCGGGGGCCGGAACCTGGCAT－

3′）和P403B（5′－GCTGACCTCATTGAGGCCAACCTCTTGT－3′）两个片段。以此两个片段P403A和P403B为探针，对从例（1－B）获得的cDNA文库按例（1－D－1）方式进行筛选。与KHCV403重叠的160bp cDNA克隆被命名为KHCV932，它的测序是按Sanger法进行。其长度、位置和KHCV 932的核酸序更以及编码的氨基酸序列见图1至3。

（1－D－7）：分离与KHCV932重叠的cDNA

模仿例（1－D－6）KHCV932序列合成了P932b（5′－CCGGGACGTGCTTAAGGAGATGAAGGCGAA－3′）作为探针，对从例（1－B）获得的cDNA文库按例（1－D－1）方式进行筛选。与KHCV932重叠的185 bP cDNA克隆命名为KHCV496，它的测序是按Sanger法进行。其长度、位置和KHCV496的核酸序列以及编码的氨基酸序列参见图1至3。

（1－D－8）：分离与KHCV 496 重叠的cDNA

模仿例（1－D－7）KHCV496 序列合成了P496b片段（5′－CGTGTATGCGAGAAGATGGCCCTTTATGAC－3′）作为探针，对例（1－B）获得的cDNA文库按例（1－D－1）方式进行筛选。与KHCV 496 重叠的160bp共847 bp cDNA克隆命名为KHCV 847，测序是按Sanger法进

行。其长度、位置和KHCV847的核酸序列以及编码的氨基酸序列参见图1至3。

(1－D－9)： 分离与KHCV 847 重叠的cDNA

模仿例(1－D－8) KHCV 847 DNA3′端的序列合成了P847b (5′－TGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAG－3′)片段作为探针对例(1－B)获得的cDNA文库按例(1－D－1)方式进行筛选。与KHCV847重叠的94bp的共494bp的cDNA克隆称为KHCV 494；测序是按Sanger法进行， 其长度， 位置和KHCV 494的核酸序列以及编码的氨基酸序列参见图1至3。

(1－E)： 用PCR制备cDNA

(1－E－1)： 在KHCV 798和KHCV752之间制备KHCV cDNA

为了在KHCV 798的3′端和KHCV 752 5′端克隆HCV cDNA， 按KHCV 798 3′端序列合成了引物P798b (5′－CTGGTTCCCGGAGCGGCATAC－3′)和按KHCV 752 5′端序列合成了引物P752a (5′－CCAGGTGATGACTTTGGTCTCCAT－3′)。用P798b

和P752a作为引物和用例(1－B－1)中以RANPSHCV为引物制备的cDNA文库，按参考例7那样进行聚合酶链反应(PCR)。反应结束后，将一部份反应物加入5%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)以确定cDNA的扩增情况。给剩余部分中加入10单位的Klenow片段和DNA聚合酶，该反应物37℃30分钟使之两端平齐。再做PAGE，并电洗脱出DNA以分离得到纯DNA。纯化的DNA片段克隆到M13mp18噬菌体并测定序列。这样获得的DNA称为KHCV 570，它的核酸序列和其编码的氨基酸序列参见图1至3。

例(1－D－2)制备的KHCV 240，例(1－D－3)制备的KHCV 513，例(1－D－4)制备的KHCV 810，例(1－D－5)制备的KHCV 798和用上述方法制备的KHCV 570 都相互有部分重叠。因此，它们可以连成一个长的敞开阅读的框架，命名为KHCV 2661。

(1－E－2)：制备 KHCV 403 和 KHCV 675 之间的KHCV cDNA

为了克隆处于例(1－C)制备的KHCV 403 和例(1－D－1)制备的KHCV 675 之间的HCV cDNA，按KHCV 675 的3′端序列合成了两段引物P675b (5′－TCGATTCTTCGGTCCTGTGTGAGTGT －3′)和$P675b_2$ (5′－AAAAAGAATTCGGATCCATGACGCGGGTTGTGCGTGGTAC－3′)，按KHCV 403 5′端序列合成了$P403a_2$

引物（5′－CCCCCTCAGAGTCGACTCACTTCACGTTGTCAGTGGTCAT－3′）。用上述制备的P675b，P675b_2和P403a_2以及例（1－D－6）制备的P403a，按下列程序进行PCR。

0.2μg P674b，0.2μg P403a，2μl例（1－B－1）制备的cDNA，加上随机引物RANPSHCV中加入10μl 10×PCR反应缓冲液，10μl 2mM dNTP的混合物及2.5单位Taq聚合酶，加蒸馏水至100μl，第一步PCR重复循环10次，即：95℃2分钟－55℃2分钟－72℃3分钟的循环。在加入2μg P675b_2和2μg P403a于混合物以后，第二步PCR按上述温度循环重复20次。

反应完成后，cDNA扩增确定下来，按例（1－E－1）的同样方法测序。这样获得的cDNA称为KHCV1774，它的核酸序列和编码的氨基酸序列参见图1至3。

（1－E－3）：克隆 KHCV cDNA 3′端区并测序

为了克隆对应于HCV基因的3′端区的cDNA，用引物RANPSHCV和DA17PSHCV（5′－TGGTGGTGGAACTGGACCGTA，－3′）的PCR如下进行。

PSHCVSL 引物（5′－AAAAGTCGACTGGTGGTGGAACTGGACCGT－3′）含有21个例（1－B－1）引物RANPSHCV或者DA17PSHCV

的固定核苷酸和SalI酶识别位点(5′-GTCGAC-3′)；而KHCVR60引物(5′-GTGTCCGCGCTAAGCTACTGTCC-3′)含有那些来自例(1-D-9)KHCV 494 3′端区核苷酸序列。在第一步PCR使用PSHCV和KHCVR60引物，按参考例7中的方法进行。

在第二步PCR，合成KHCVR6引物(5′-TGTGGCAAGTACCTCTTCAACTGG-3′)该引物是互补于KHCV 494 3′端区的核苷酸序列并与KHCVR60靠得更近。

10μl KHCVR61加至第一步PCR的混合物中，然后按参考例7相同的方法进行第二步PCR。

完成反应后，明确cDNA扩增，用例(1-E-1)相同的方法测序。这样获得的cDNA有266，称为KHCV266，它的位置和核酸序列以及所编码的核酸序列参见图1至3。在KHCV 266的序列中，发现了二个末端终止密码子，但没有poly(A)$^+$尾序。

(1-E-4)：克隆KHCV cDNA 5′端区并测序

使用按例(1-C)制备的KHCV 426 5′端侧面序列合成了引物KHCVL 69(5′-GTCCTGTGGGCGGCGGTTGGTGTTACG-3′)制备出单股cDNA，这是按例(1-B-1)相同的方法进行的。从上述获得的50μl混合物，用1ml TE缓冲液(10mM Tris-

HCl， pH 7.5， 1mM EDTA)透析。透析后的溶液用Centricon 100(Amicon Inc.， U.S.A.， #4200)浓缩至10μl， 结果移出剩余的引物和dNTPs。

为了制备polyd(T)接尾的cDNA或者polyd(G)接尾的cDNA向上述获得的cDNA溶液10μl中加入4μl 5×接尾缓冲液(0.5M 二甲胂酸钾， pH7.2， 10mM $CoCl_2$， 1mM DTT)， 4μl 1mM dTTp 或4μl的1mMdGTP和10单位末端脱氧核苷转移酶(BRL Inc.， U.S.A.， #80085B)； 最后加蒸馏水至50μl总体积。反应混合物置37℃30分钟， 然后65℃加热5分钟。

这样得到的接有 polyd(T)$^+$ 尾序的cDNA或polyd(G)尾序的cDNA， 在引物 KHCVL70(5′-TTGAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT -3′)， 或dC12R1RO : 5′ -AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCTATAGGGACCC) -3 dT17RIRO (5′ -AAGGATCCGTCGACATCGATAATACGACTCACTATAGGGA (T)$_{17}$ -3′)，RO (5′ -AAGGATCCGTCGACATC -3′) 和R1 (5′ -GACATCGATAATACGACTCAC-3′)的存在下用PCR进行扩增。这些引物均按例(1-C)制备的KHCV 426序列合成的。

在2μl cDNA 溶液中加入5μl 10×Taq多聚酶缓冲液(100mM Tris-HCl， pH 8.3， 500mM KCl， 15mM $Mgcl_2$， 0.1%明胶)， 5μl 1.5mM dNTPs 混合物， 2.0

μg KHCVL 69和2.0μg dT17R1RO，再加蒸馏水至总体积50μl。在95℃7分钟后冷至75℃，加入2.5单位Taq DNA 聚合酶和30μl矿物油以防蒸发。将反应混合物冷至45℃2分钟让引物与单股cDNA互补结合，72℃ 22分钟。第一步PCR重复30次循环，即：95℃ 45秒－50℃ 25秒－72℃15分钟。

2μg R0（或R1）引物和2μg KHCVL70加到从上述得到的10μl混合物中。第二步PCR和上述同样循环进行30次。完成反应后，有380bp的cDNA扩增经确定进一步按例（1－E－1）相同的方法进行测序。这样获得的cDNA克隆称为KHCV 366，其位置和序列以及编码的氨基酸序列参见图1至3。

将例1获得的所有KHCV cNDA克隆连接可得到有9372bp的全长KHCV cNDA称为KHCV－LBC1，它已于1991年5月14日保藏于ATCC，编号为75008。

例2：制备HCV亚型cDNA

（2－A）：RNA的抽提

从13个患C型肝炎朝鲜病人收集的血清样品（样品#2，#3，#20，#21，#23，#25，#26，#27，#28，#29，#30，#31 和 #32）各取100μl加入300μl RNA zol B（Cinna／Biotecx，P.O.Box 1421，Friendwood，Texas，U.S.A.）用以破碎细胞，然后按

例(1－A)同样的方式抽提出KHCV RNAs。13个样品的KHCV RNAs 分别命名为LBC2， LBC3，LBC20，LBC21，LBC23，LBC25，LBC26，LBC27，LBC28，LBC29，LBC30，LBC31和LBC32。

(2－B)： cDNA的制备

以例(2－A)制备的HCV RNAs为模板， 随机引物(5′－NNNNNN－3′， 这里N可能相同， 也可能不同， 可以具有相同比例的G， A， T或C)作为反转录酶的引物， 按例(1－B－1)相同的方式制备HCV cDNA。这样获得的cDNA分别命名为：KHCV－LBC2 cDNA， KHCV－LBC3 cDNA， KHCV－LBC20 cDNA， KHCV－LBC21 cDNA， KHCV－LBC23 cDNA， KHCV－LBC25 cDNA， KHCV－LBC26 cDNA， KHCV－LBC26， KHCV－LBC27 cDNA， KHCV－LBC28 cDNA， KHCV－LBC29 cDNA， KHCV－LBC30 cDNA， KHCV－LBC31 cDNA， KHCV－LBC32 cDNA。

(2－C)：以PCR 扩增KHCV cNDA

(2－C－1)： 引物的设计

HCV cDNA NS2和NS5区扩增引物设计是按日本

型、美洲型病毒和例1制备的KHCV－LBC1核酸序列中共同存的区进行的（kato， etal.， Proc. Natl. Acad. Sci. USA， 87， 9524－9528（1990）和Takamizawa et al.， J. Virol.， 65， 1105－1113（1991）； Choo et al.， Science， 244， 359－363（1989））。以KHCV－LBC1的核酸序列为基础， 给上述制备的核酸序列位置编码。

HCV cNDA NS2区扩增的引物

NS2S1（5′－CGGGAGATGGCCGCATCGTG－3′）对应于KHCV－LBC1第2776至2795号核酸序列片段的一股， NS2N1（5′－ACCTGCTAGTGCGGCCAGCTTCAT－3′）对应于KHCV－LBC1第3180至3157号核酸序列片段的互补股。这些都用在HCV cNDA NS2区第一步扩增。NS2S2（5′－TTTTGGATCCGCGGTTTTTGTAGGTCTGGT－3′）对应于KHCV－LBC1第2803至2822号核酸序列片段的一股， 这个片段为方便克隆是BamH I识别位点， NS2N2（5′－AAAGTCGACATGAAGACCATTTGGAC－3′）对应于KHCV－LBC1第3159至3142号核酸序列片段的互补股， 它也为克隆方便在5′端有一个Sal I酶识别位点。NS2S2和NS2N2用于第二步PCR扩增。

扩增HCV cDNA NS5区的引物

NS5S1 (5′-ATGGGGATCCATATGACACCCGCTG (T/C) TTTGA-3′) 这段中T/C表示胸腺核苷和胞核苷以1:1比例混合存在) 片段，从5′端第10个核苷酸开始至3′端末与KHCV-LBC1第8252至8273片段对应。在NS5N1 (5′-CCCCGTCGACCTAGTCATAGCCTCCGTGAA-3′) 片段中，从5′端第9个核苷酸开始至3′端末与KHCV-LBC1第8635至8614片段的互补对应。NS5N1引物用于第一步PCR扩增NS5区。

在NS5S2 (5′-TTTGAGGATCCACGGTCACTGAGAA (T/C) GACAT-3′，其中T/C与上述出现过的情况一致) 片段中，从第12个至3′端末的序列与KHCV-LBC1的第8278至8297核苷酸片段相对应。在NS5S2的5′端有BamH I 识别位点。NS5S2引物用于第二步PCR扩增。

上述引物是采用自动固相磷酰胺 化学法在DNA合成仪中合成的 (Applied Biosystems Inc., Model 380 B, USA) 用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离合成引物 (2M脲，12%丙烯酰胺和双叉丙烯酰胺 (29:1，w/w) 溶在50mM Tris，50mM硼酸，1mM EDTA-Na_2)。通过C18层析柱以乙腈-水 (50:50，v/v) 为洗脱液进行纯化。每一个引物的浓度用$O.D._{260}$测定。

(2-C-2)：PCR 扩增KHCV cDNA NS2区

第一步PCR按下述方法进行： 按例(2－B)制备的cDNA (KHCV－LBC2，KHCV－LBC3， KHCV－LBC20， KHCV－LBC21， KHCV－LBC23， KHCV－LBC25， KHCV－LBC26， KHCV－LBC27， KHCV－LBC28， KHCV－LBC29， KHCV－LBC30， KHCV－LBC31和KHCV－LBC32)如例(2－B)各取5μl， 其内加入10μl 10×Taq聚合酶缓冲液(10mM Tris－HCl， pH8.3， 500mM HCl， 15mM $MgCl_2$， 0.1%(w／v)明胶)， 10μl 2mM dNTP混合物， 0.2μg NS2S1， 0.2μg NS2N1和0.5μl Ampli Taq DNA聚合酶(Perkin Elmer－Cetus， USA)， 加蒸馏水至最终体积100μl。这样的溶液每一份各加50μl矿物油以免蒸发。第一步PCR按温度循环进行40次，其顺序为： 95℃ 2分钟－55℃2分钟－72℃3分钟。用1ml第一步PCR产物以及2μgNS2S2／NS2N2引物反复25次制备第二步PCR。

最终反应物加入等体积酚／氯仿溶液， 离心除去残留的酶， 每一份上清液中加入0.1体积的3M乙酸钠和2.5倍体积的纯乙醇。然后离心获得340bp双股DNA。

13个不同模板的DNA片段分别命名为： NS2－LBC2， NS2－LBC3， NS2－LBC20， NS2－LBC21， NS2－LBC23， NS2－LBC25， NS2－LBC26， NS2－LBC27， NS2－LBC28， NS2－LBC29， NS2－LBC30， NS2－LBC31和NS2－LBC32。

(2－C－3)： PCR扩增NS5区 HCV cDNA

引物NS5S1和NS5N1用于第一步PCR扩增， NS5S2和NS5S1引物用于第二步PCR扩增其方法同例(2－C－2)以获得320bp DNA片段。

来自KHCV－LBC20 cDNA， KHCV－LBC21 cDNA， KHCV－LBC23 cDNA， KHCV－LBC25 cDNA， KHCV－LBC26 cDNA， KHCV－LBC27 cDNA， KHCV－LBC28 cDNA，KHCV－LBC29 cDNA， KHCV－LBC30 cDNA， KHCV－LBC31 cDNA和KHCV－LBC32 cDNA扩增得到的DNA片段分别命名为NS5－LBC20， NS5－LBC21， NS5－LBC23， NS5－LBC25， NS5－LBC27， NS5－LBC28， NS5－LBC29 ，NS5 －LBC30 ， NS5 －LBC31 和NS5 －LBC32。

每一片段都用Sa1 I和BamH I 消化， 消化后片段克降到M13 mp 19， 按Sanger法进行测序。其核酸序列参见图7至26。

例3： 制备在酵母菌表达KHCV cDNA片段的载体

(3－A)： 扩增KHCV cDNA片段

(3－A－1)： K384，K510，K573，K897，K403和K590片段的制备

第1步

为将ubiquitine 基因连接到例(1－C)、(1－D)和(1－E)克隆的每一个KHCV cDNA片段上(凡连上ubiquitine 基因的KHCV cDNA 片段都冠有"UB－KHCV")并将克隆UB－KHCV 到酵母表达载体上，按下述所示合成各种引物。

PCOREUBI 引物 (5′－CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTATGAGCACGAATCCTAAACC－3′)在5′端有25序列碱基与ubiquitine基因的3′端重叠，其余部分与KHCV－LBC1的第343至360区的片段对应。

PSALCORE14 (5′－GGGGTCGACTATTAGCATGTGAGGGTGTGGGATGAC－3′)含有一终止密码，正好在第726位核苷酸处终止翻译，此外，还有一个Sa1 I识别位点。

PSALCORE 17 引物 (5′－GGGGTCGACTATTAGGGCAGATTCCCTGTTGCATA－3′)含有一终止密码，正好在第852位核苷酸处终止翻译，还有一个Sa1 I识别位点。

PSALCORe 22 引物(5′-GGGGTCGACTATTAAGCGGAACTGGGGATGGTCAA-3′)含有一终止密码，正好在第915位核苷酸终止翻译，还有一个Sa1 I识别位点。

PK403UBI 引物(5′-CTTGGTGTTGAGACTCCGGTGGTACGGGCATGACCACTGACAA-3′)在5′端有25个核苷酸和PCOREBUI相同，其余核苷酸被设计成启动KHCV-LBC1的第6649处核苷酸的翻译。

PK 573UBI 引物(5′-CTTGGTGTTGAGACTCCGGTGCGGTACATGGACAGGCGCCCTGA-3′)在5′端有25个核苷酸与PCOREUBI相同，其余核苷酸被设计成启动KHCV-LBC1的第7612处核苷酸的翻译。

PK403SAL 引物(5′-GACTGGTCGACTATTACTCTTGCCGCCACAAGAGGTT-3′)被设计正好在KHCV-LBC1第7050处核苷酸终止翻译。有一个Sa1 I识别位点和2个终止密码子(TAATAG)。

PK 897UBI 引物(5′-CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTGCGGTGGAATTCATACCCG-3′)在5′端有25个核苷酸与PCOREUBI相同，其余核苷酸被设计成从KHCV-LBC1的第3916处核苷酸开始启动翻译。

PK897SAL 引物(5′-GACTGGTCGATATTAACACGTATTACAGTCGATC

AC－3′)正好设计成从KHCV－LBC1第4713处核苷酸终止翻译。有一个Sa1 I酶识别位点，二个终止密码子(TAATAG)。

PK573SAL引物(5′－GACTGGTCGACTATTAGTACTGGAATCCGTATGAGGAG－3′)正好设计为终止KHCV－LBC1第8184处核苷酸以后的翻译，有一个Sa1 I酶识别位点，在3′端有二个终止密码(TAATAG)。

P426B引物(5′－GGGTGGGCAGGATGGCTCCTG－3′)是由KHCV－LBC1的第616到636核苷酸序列区组成。

P240B引物(5′－CCTGTTGCATAGTTCACGCCGT－3′)是由KHCV－LBC1的第842到821核柑酸序列区组成。

P652B引物(5′－GTCATTCCAAGAAGAAATGTGACGAGCTCGCTGCAAAG－3′)是由KHCV－LBC1的第4523至4560核苷酸序列区组成。

P403B引物(5′－GCTGACCTCATTGAGGCCAACCTCTTGT－3′)是由KHCV－LBC1的第7012至7039核苷酸序列区组成。

第2步

从3个克隆(即：KHCV 426，KHCV 240和KHCV513序列相互重叠)按下述方法制备出单一的cDNA片

段。向2.0μg PCOREUBI，0.02μg P426B，2μg的P240B和50ng KHCV-LBC1 DNA混合液中加入10μl 10×Taq聚合酶缓冲液，10μl 10mM dNTP混合物和2.5单位Taq聚合酶，补蒸馏水至总体积100μl。按参考例7的热循环重复25次进行第一步PCR。反应产物加样至5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出500bp的PCR产品（称为"PCR产品A"），之后，用60ng PCR产品A和50ng KHCV-LBC1 DNA作为模板，以2μg PCOREUBI和2μg PSALCORE 22为引物，在与第一步相同的条件下进行第二步PCR。反应产物用5%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出580bp的最终产品（称为"PCR产品B"），然后溶解在50μl TE缓冲液中。

第3步

为了进一步用第二步获得的PCR产品B作为模板进一步进行PCR，准备3支试管，A管含有2μg PCOREUBI和2μg PASALCORE14，B管含有2μg PCOREUBI和2μl PSALCORE 17，C管含有2μg PCOREUBI和2μg PSALCORE22，再往每支试管中加入50ng PCR产品B。

另一方面，为了用KHCV-LBC1 DNA作为PCR的模板，选用另外3个试管，D管含有2μg PK 897 SAL，0.02μg P652B和2μg PK 897 UBI，E管含有2μg PK403SAL和2μg PK 403UBI，F管含有2μg PK573SAL，0.022μg P403B和2μg PK573UBI。此外

每管中分别加入50ng KHCV-LBC1 DNA。

以后， A到F管每管都加入10μl 10×Taq聚合酶缓冲液， 10μl 10mM dNTP混合物和25单位Taq聚合酶， 补足蒸馏水至总体积100μl。在与第二步相同条件下进行PCR扩增。

第4步

在第3步获得的PCR产品加样于5%聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果可以确定在A管中生产出384bp DNA片段， B管中生产出510bp DNA， C管为573 bp DNA， D管中为798 bp DNA， E管中402bp DNA， F管中是573bpDNA。按上一步用相同的PAGE 纯化DNA片段，并分别命名为K384片段， K510片段， K573片段， K897片段， K403片段和K590片段。

(3-A-2)： 制备编码KHCV外膜蛋白的cDNA片段

第1步

为了将合成的ubiquitine 基因分别与E 2N和E 2C 基因相连接， 以便分别与酵母菌表达载体克隆， 需合成F列引物。E 2N 基因对应于KHCV-LBC1 的第1510至2010核苷酸区， 而E 2C 基因是KHCV-LBC1的第2011至2529核苷酸区。

PE2NUBI 引物 (5′-CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTGGGGCGCAAGGTCGGGCCGCT-3′) 在5′端区含有25核苷酸与ubiquitine 基因3′重叠，其它核苷酸序列与KHCV-LBC1第1510至1530序列区对应。

PE2NSAL 引物 (5′-GACTGGACTATTAATTCATCCAGGTACAACCGAACCA-3′) 含有一个终止密码正好在KHCV-LBC1的第2010处核苷酸终止密码，有一个Sa1 I 酶识别位点。

PE2CUBI 引物 (5′-CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTGGCACTGGGTTCACCAAGACA-3′) 在5′端有25个核苷酸与ubiquitine 基因3′端区相同，其余与KHCV-LBC1的第2011至2031核苷酸区段相对应。

PE2CSAL 引物 (5′-GACTGGACTATTACGCGTCCGCCAGAAGAAGGAAGAG-3′) 含有一个终止密码正好在KHCV-LBC1的第2529核苷酸首终止翻译，并有一个Sa1 I 酶识别位点。

第2步

A管加入2μg PE2NUBI和2μg PE2NSAL，B管加入2μg PE2CUBI和2μg PE2CSAL，两管中各加入50μg KHCV-LBC1，10μl 10×聚合酶缓冲液，10μl 10mM dNTP混合物和2.5单位Taq聚合酶，补蒸馏水至总

体积100μl。按参考例7相同的热循环过程重复25次PCR反应。

第3步

第二步获得的PCR产品上样至5%PAGE电泳，结果可以确定在A管中501bp DNA，B管中519bp DNA得到了扩增。用上述同样PAGE纯化这些DNA并分别命名为E 2N片段和E 2C片段。

(3－B)：制备用于酵母的表达载体

(3－B－1)：制备pYLBC－A／G－UB－CORE14，pYLBC－A／G－UB－CORE17，pYLBC－A／G－UB－CORE22，

pYLBC－A／G－UB－KHCV897，pYLBC－A／G－UB－KHCV403和pYLBC－UB－KHCV573

在NEB缓冲液3中用Pst I 和Sal I酶完全消化2μg pYLBC－A／G－UB－HGH(ATCC 74071)质粒，而2μg相同的质粒在参考例1NEB缓冲液4中用Pst和Sac II完全消化。上样于0.7%琼脂糖凝胶电泳分离出9.8kb和3.4kb片段，并分别命名为PL2和PT2。

在例(3－A－1)制备的K384，K510，K573，

K987， K403和K590片段之间， K897， K403和K590片段在NBE缓冲液3中用Sal I和Sac II完全消化； K384，K510和K573片段在NEB缓冲液3中用Sal I完全消化。最后用酚／氯仿抽提， 用乙醇沉淀， 溶解在20μl TE缓冲液中。K384， K510和K573片段进一步在NBE缓冲液4中用Sac II部分酶解10分钟； 其后也用酚／氯仿抽提， 乙醇沉淀， 溶解于20μl TE缓冲液里。

上述制备的片段按下述步骤进行连接反应。连接反应管A含有100ng K384片段、管B含100ng K510片段、管C含100ng K573片段， 管D含100ng K897片段， 管E含100ng K403片段， 管F含100ng 573片段。在上述每管中加入100ng PL2片段， 100ng PT2片段， 2μl 10×连接缓冲液和10单位T4 DNA连接酶， 加蒸馏水至总体积20μl， 在16℃12小时进行连接。

连接反应结束后， 上述每一个连接后的载体转化大肠杆菌HB101株(ATCC 33694)。

含K384的载体被分离后命名为pYLBC－A／G－UB－CORE14， 含K510的载体被分离后命名为pYLBC－A／G－UB－CORE17， 含K573的载体被分离后命名为pYLBC－A／G－UB－CORE22， 含K897的载体被分离后命名为pYLBC－A／G－UB－KHCV897， 含K403的载体被分离后命名为pYLBC－A／G－UB－KHCV403， 含K590的载体被分离后命名为pYLBC－A／G－UB－KHCV573。(参见图30)。

(3－B－2)： 制备pYLBC－A／G－UB－E 2N 和 pYLBC－A／G－UB－E 2C

取2 μg pYLBC －A ／G －UB －HGH (ATCC 74071) 质粒在NEB 缓冲液3中用PstI和Sal I完全消化， 2 μg同一质粒在NEB缓冲液4中用Pst I 和Sac II 完全消化， 然后上样于0.7%琼脂糖凝胶电泳分离出9.8Kb和3.4Kb片段， 分别命名为PL2和PT2片段。

在例(3－A－2)中制备的E 2N和E 2C 片段各自在NEB缓冲液4中用Sac II完全消化， 进一步在NEB缓冲液3中用Sal I部分消化， 各自用酚／氯仿抽提， 乙醇沉淀， 溶解在20μl TE缓冲液里。 这两个片段被分别命名为E 2N－T2／L 和 E2C－T2／L片段。

在连接反应管G中加入100ng E2N－T2／L、管F中加入100ng E2C－T2／L， 每管中各加100ng PL2， 100ng PT2， 2μl 10×连接反应缓冲液， 10个单位的T4 DNA 连接酶， 补蒸馏水至总体积20μl。该反应在16℃进行12小时。大肠杆菌HB101株(ATCC 33694)用上述连接好的载体分别转化。含有E2N－T2／L片段的载体被称为pYLBC－A／G－UB－E2N， 含有E2C－T2／L的被称为pYLBC－A／G－UB－E2C(参见图30)。

(3－C)： 转化酵母菌进一步生产出蛋白质

用参考例5中的相同方法将例(3－B－2)制备的表达载体转化至酵母菌，在那些转化后的酵母菌中Saccharomyces cerevisiae DC 04经pYLBC－A／G－UB－KHCV403转化后，于1991年6月27日保藏于ATCC编目号为ATCC 74079 (S. cerevisiae pYLBC－A／G－UB－KHCV 403)；用pYLBC－A／C－UB－CORE14转化的Saccharomyces cerevisiae DC 04于1991年7月1日保藏，编目号为ATCC 74081 (S. cerevisiae DC 04－UB－CORE14)；用pYLBC－A／G－UB－E2C转化后的Saccharomyces cerevisiae DC 04于1991年12月11日保藏，编目号为ATCC 74117(S. Cerevisiae DC 04－UB－E2C)，上述菌株保藏于ATCC是按国际专利关于识别微生物保藏签订的《布达佩斯公约》的条款进行的。

在转化的酵母菌中，将S.cerevisiae DC 04－UB－KHCV 403在3ml无亮氨酸培养基中置于30℃过夜(6.7g 酵母菌无氨基酸氮基菌(Difco Inc., U.S.A.) 2.5g／l无亮氨酸的氨基酸混合物，5％葡萄糖)。然后将培养物转入100yEPD培养基(2％蛋白胨，1％酵母浸膏，2％葡萄糖)30℃过夜以生产出KHCV蛋白质。最终培养液$O.D._{650}$约为25。其它转化的酵母细胞用同样的方法培养生产出KHCV其他蛋白质。

上述每一种培养物在达到$O.D._{650}$等于10时收集离心。沉淀物悬浮在400μl缓冲液中[10mM Tris－HCl，pH7.5，1mM EDTA，2mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride，苯甲硫氟化物) 8M脲]，然后加入等体积玻璃

球（直径0.4mm）剧烈振摇以破坏细胞壁。这样抽提的酵母成分用Laemmli法 [Laemmli et al., Nature, 277, 680（1970）] 在15%＋二烷基磺酸钠（SDS）－聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳（SDS－PAGE），然后，用考马期亮兰R250染色以确定KHCV蛋白的生产情况（参见图31－A）。

在胶上分离的蛋白质印迹在硝酸纤维素膜上。该膜放在PBS（10mM磷酸盐，pH7.0，0.15M Nacl），含0.2% Tween 20 室温振摇2小时以封闭IgG接合到蛋白质之间非特异性吸附。再将滤膜放入稀释的IgG（8.2mg／ml）溶液在室温下轻摇1小时使蛋白质和IgG反应结合。这些稀释的IgG是来自朝鲜病人纯化后血清经200倍PBS稀释（PBS含有0.5%明胶，0.05% Tween 20）。然后将反应的滤膜用含有0.2% Tween 20 PBS 洗5分钟，4次。再在膜上加上辣根过氧化物酶（BTO－Rad Lab., USA，山羊抗人IgG－HRP）标记的抗人IgG（IgG－HRP）室温下振摇1小时。该酶标抗体是用含0.5%明胶和0.05% Tween 20的PBS经200倍稀释后使用的。最后用含0.2% Tween PBS洗膜5分钟，4次。再用50mM pH7.0 的Tris缓冲液洗2次。

给膜上加入50mM Tris 缓冲液，内含400μg／ml 4－氯－1－萘酚和0.03%过氧化氢以便产生颜色反应。从上述蛋白印迹的结果参见图31－B。在图31－B中，第2条显示由pYLBC－A／G－UB－CORE14转化的酵母菌提取物的结果；第3条是由pYLBC－A／G－UB－KHCV897转化的酵母菌提取物的结果；第5条是pyLBC－A／G－UB－KHCV403转化的酵母菌提取物的结果；第6条是pYLBC－

A／G－UB－KHCV573转化的酵母菌提取物的结果。第1和4条表明没有KHCV表达载体的酵母菌提取物的结果； 第M条是标准蛋白分子标志物(单位： 道尔顿dlt)。

图32表明了SDS－PAGE和蛋白印迹结果确定了E2N和E2C蛋白的产量。在图32中， 第1条表明一个质粒转化不带KHCV基因的酵母菌抽提物， 第2条表明用pYLBC－A／G－UB－E2N转化的酵母菌提取物。第3至5条表明了pYLBC－A／G－UB－E2N转化的酵母菌提取物； 第6条是标准分子量标志物结果， 自上而下为： 200， 97， 72， 43， 29， 18和14kd。

例4： 制备在大肠杆菌表达KHCV cDNA片段

(4－A)： 制备含trp启动子的表达载体

(4－A－1)： 制备KHCV cDNA片段

按例(3－A－1)和(3－A－2)制备的K384， K510， K573， K879， E2N和E2C片段用在本试验中。

外膜1(E1)片段定位于KHCV－LBC1第916至1509号核苷酸区段， 采用例(3－A－1)相同的方法和下列引物进行PCR扩增而成。

PEIUB 引 物 (5′－CTTGGTGTTGAGACTCCGCGGTGGTTATGAAGTGGGCAACGCGTCC－3′) 在5′端与KHCV－LBC1第916至936区段有25个核苷酸有与ubiquitine基因重叠部分。

PEISAL 引物 (5′-GACTGGACTATTACCCTGTCACGTGGGTGGTGGTTCC-3′) 含有一个终止密码以终止KHCV-LBC1第1509号核苷酸以后的翻译，并有一个Sal I识别位点。

(4-A-2)： Ubiquitine基因的制备

第一步

三个不同的按下述所示的寡核苷酸是按Ozkaynak等[EMBO. J.6， 1429-1439 (1987)] 报告的Ubiquitine基因资料设计的，用DNA合成仪按以下所示序列合成的：

UBI1: 5′ -CCCCATATGCAAATTTTCGTCAAAACTCTAACAGGGAAGACTATAACCCT
AGAGGTTGAATCTTCCGACACTATTGACAACGTCAA-3′

UBI2: 5′ -TAGTTGCTTACCAGCAAAAATCAATCTCTGCTGATCCGGAGGGATACCTT
CTTTATCTTTGAATTTTACTTTTGACGTTGTCAATAGTCTC-3′

UBI3: 5′ -ACCACCGCGGAGTCTCAACACCAAGTGAAGAGTAGATTCCTTTTGGATGT
TGTAGTCAGACAAGGTTCTACCATCTTCTAGTTGCTTACCAGCAAAAA-3′

UBI1 被设计成在5′端有一个Nde I (5′-CATATG-3′) 并有大约20个核苷酸与UBI2重叠。UBI3被设计了一个Sac II识别位点 (5′-CCGCGG-3′) 但丝毫未能改变所编码的氨基酸序列 (参见图33)。

第2步

给2μgUBI1， 0.02μg UBI2和2μg UBI3混合物中加入10μl 10×PCR缓冲液， 10μl 10mM dNTP混合物和0.5μlTaq聚合酶， 加蒸馏水至总体积100μl， 按参考例7的相同方式进行PCR扩增。然后将反应混合物上样至5% PAGE分离出240bpDNA， 命名为Ub， 分离的Ub片段溶解在20μlTE缓冲液中。

(4－A－3) 将ubiquitine 基因连接到KHCV cDNA

由例(4－A－1)制备的每一种片段按下述方法连接到Ub片段上。

在例(3－A－1)第1步和例(4－A－2)第1步制备的引物被用于PCR引物。

制备以下7支不同的试管:

管A加入50ng K384片段， 50ng Ub， 2μg UBI1引物和2μg PSALCORE 14引物； 管B加入50ng K510片段， 50ng Ub， 2μg UBI1引物和2μg PSALCORE 17引物； 管C加入50ng 573片段， 50ng Ub， 2μg UBI1引物和2μg PSALCORE 22引物， 管D中加入50ng K897片段， 50ng Ub片段， 2μg UBI1引物和2μg PKHCV 897SAL 引物； 管E中加入50ngE2N片段，

50ng Ub, 2μg UBI 1引物和2μg PE2NSAL引物; 管F中加入5ng E2C片段, 50ngUb, 2μg UBI1引物和2μg PE2CSAL 引物; 管G中加入50ng E1 片段, 50ng Ub片段, 2μgUBI1引物和2μg PEISAL引物。

向上述每一管中各加入10μl 10×聚合酶反应缓冲液, 10μl 2mM dNTP混合物, 0.5μl Taq 聚合酶, 补蒸馏水至总体积100μl。按例7相同条件进行PCR扩增。每一种PCR扩增产物都用NdeI和 Sal I酶在NEB缓冲液3中消化, 在管A至管G获得的片段分别称为UBCORE14, UBCORE17, UBCORE22, UBKHCV897, UBE2N, UBE2C和UBE1。

(4－A－4): 表达载体的制备

第1步

2μg ptrp 332－HGH (参见朝鲜专利公报第91－457, KFCC－10667)用Pst1和Sal I完全消化; 2μg质粒在NEB缓冲液4中用Pst I和Nde I完全消化。产品在0.7%琼脂糖电泳分离出1.5kb和0.8kb片段, 分别称为PB和PS。

第2步

在上述第1步和例样(4－A－3)中制备的片段被用于下面的连接反应

连接反应管A中加入100ng UBCORE14，管中加入100ng UBCORE17 管C中加入100ngUBCORE22，管D中100ng UBKHCV897，管E中100ng UBE 2N，管F中100ngUBE2C和管G中100ngUBE1，每一管中都加入100ngUBE1，100ngPB，100ng PS，2μl 10×连接反应缓冲液和10单位T4DNA连接酶，补蒸馏水至总体积20μl，反应后16℃进行12小时。分离连接上的每一个载体，分别转化大肠杆菌E. coli HB101株(ATCC 33694)含有UBCORE14的载体分离后称为ptrpH－UB－CORE14；含有UB CORE 17的载体分离后称为ptrpH－UB－CORE17；含有UBE CORE22片段的载体，分离后称为ptrpH－UB－CORE22；含有UBE2N的载体，分离后称为ptrpH－UB－E2N；含有UBKHCV897片段的载体分离后称作ptrpH－UB－KHCV897；含有UBE2C的载体分离后称为ptrpH－UB－E2C；含有UBE1的载体分离后称为ptrpH－UB－E1(参见图34)。

(4－B)：制备含有tac启动子pMAL－KHCV载体

(4－B－1)：扩增KHCV cDNA片段

第1步

为了在大肠杆菌中因tac启动子表达KHCV cDNA片段成MBP融合蛋白，用DNA合成仪制备出下述引物。

Primer PK426R : 5′ -CTCCGAATTCGGTGCTTGCGAGTGCCCC-3′

Primer PK426X : 5′ -CACGCTCGAGGCATGTGAGGGTGTCGATGAC-3′

Primer PSALCORE17 : 5′ -GGGGTCGACTATTAGGGCAGATTCCCTGTTGC-3′

Primer P426B : 5′ -GGGTGGGCAGGATGGCTCCTG-3′

Primer PK513R : 5′ -CTCCGAATTCGGCACGAGGCTGGAGGACGGCGTGAACT-3′

Primer PK513X : 5′ -CACGCTCGAGAGGCGACCAGTTCATCATCAT-3′

Primer PK810R : 5′ -CTCCGAATTCGGCACGAGGGTTTCCCAGCTGTTCACCTT-3′

Primer PK810X : 5′ -CACGCTCGAGATTCAGCCATGTACAACCGAACC-3′

Primer PK798R : 5′ -CTCCGAATTCGGCACGAGGGACGTGCTGCTCCTTAAC-3′

Primer PK798X : 5′ -CACGCTCGAGCAGAAGCAGCGGCCATACGCC-3′

Primer PK754R : 5′ -AAAAAGAATTCGGCACGAGGCTGCGAGATTGGGCTCACACG-3′

Primer PK754X : 5′ -AAAAACTCGAGCCGCATAGTAGTTTCCATAGACTCAACGGG-
TATGAATT-3′

Primer PK652R : 5′ -AAAAAGAATTCGGCACGAGGTTCATACCCGTTGAGTCTATG-
GAA-3′

Primer PK652X : 5′ -ATTATTGTCGACTATCTATCTACTCGAGTCACAGCTTTGC-
AGCGAGCTCGT-3′

Primer PK403R : 5′ -AAAAAGAATTCACGGGCATGACCACTGAC-3′

Primer PK403X : 5′ -ATTATTCTCGAGTATCACTCTTGCCGCCACAAGAG-3′

Primer PK271R : 5′ -AAAAAGAATTCACTAGCCTTACAGGCCGG-3′

Primer PK271X : 5′ -CACGCTCGAGTCACGTGACCAGGTAAAGGTC-3′

Primer PK495R : 5′ -CCCCCGAATTCGGCACGAGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTT-3′

Primer PK495X : 5′ -AAAAACTCGAGGACCACGTCATAAAGGGCCA-3′

Primer PK494R : 5′ -AAAAGAATTCGGCACGAGCGATGCATCTGGTAAAAGGGT-3′

Primer PK494X : 5′ -AAAACTCGAGATTGGAGTGAGTTTGAGCTT-3′

第2步

11个不同编号的试管准备后按下述加入引物:

管A: 2μg PK426R引物, 2μg PK426×引物,

管B: 2μg PK426R引物, 20ng PK426B引物, 20μg PSAL CORE17

管C: 2μg PK513R引物, 2μg PK513×引物,

管D: 2μg PK810R引物, 2μg PK810×引物,

管E: 2μg PK798R引物, 2μg PK798×引物,

管F: 2μg PK754R引物, 2μg PK754×引物,

管G: 2μg PK652R引物, 2μg PK652×引物,

管H: 2μg PK403R引物, 2μg PK403×引物,

管I: 2μg PK271R引物, 2μg PK271×引物,

管J: 2μg PK495R引物, 2μg PK495×引物,

管K: 2μg PK494R引物, 2μg PK494×引物,

在上述每一管中加入10ng KHCV-LBC1 (ATCC 75008) DNA, 10μl 10×聚合酶缓冲液, 10μl 10mM dNTP 混合物和0.5μl (2单位) Taq聚合酶, 加蒸馏水至总体积100μl。

每一个反应混合物都加入50μl矿物油防止蒸发, 按参考例样7相同方式进行PLR 扩增。

(4-B-2): 制备表达载体:

在NEB缓冲液3中用ECORI和Sal I完全消化2μg PMAL-CR C New England Bilabs Inc. Cat. No.

800 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, U.S.A.) 消化物用酚氯仿抽提，乙醇沉淀，溶介在40μlTE缓冲液中。

在例样(4－B－1)第2步中制备的PCR产品用EcoRI和Xho I酶按如下过程消化：

在管A和管C至管F，管H和管J至管M中，每管加入PCR产品1μg用EcoRI 和Xho I完全消化；在管G和管I中PCR产品加入量为3μg用Xho I酶完全消化，用EcoRI部分消化1μg管C中的PCR产品用EcoRI和Sal I完全消化。这样获得的EcoRI－Xho I以及EcoRI－Sal I 片段分离后溶解在20μl TE缓冲液，方法同参考例样1。

用EcoRI－Xho I和EcoRI 以及 Sal I 消化的上述CDNA 片段各取5μl，每样中加入2μl10×连接缓冲液，1μl(500ng)用EcoRI和Sal I处理的pMal－CR1和10单位T4DNA连接酶；补足蒸馏水至总体积20μl，在16℃反应进行12小时。

连接的每一个载体即重组载体分离后转化大肠杆菌HB101株(ATCC 33694)，管A至管K的载体分别称为：PMAL－KHCV426，PMAL－KHCV555，PMAL－KHCV513，PMAL－KHCV810，PMAL－KHCV798，PMAL－KHCV754，PMAL－KHCV652，PMAL－KHCV403，PMAL－KHCV271，PMAL－KHCV495和PMAL－KHCV494。

用上述重组载体的PMAL－CR1载体描述在图35。

(4－C)在大肠杆菌表达KHCV cDNA

(4－C－1)： 用含有trp启动子的载体表达KHCV cDNA,

第1步

用每一个在例样(4－A)中制备的质粒转化大肠杆菌W3110株(ATCC 38335)，在它们中间，用ptrpH－UB－KHCV897 转化的大肠杆菌W3110 (E. coli W3110 ptroH －UB －KHCV897) 于1991 年6 月27 日保藏在ATCC， 编目号为ATCC 69640， 用ptrpH－UB－CORE17转化的大肠杆菌W3110株(E.Coli W3110 ptrpH－UB－CORE17)也于1991年6月27日保藏于ATCC，编目号为ATCC 68641，用PtrpH－UB－CORE 14转化的大肠杆菌W3110株(E. coli W3110 ptrpH －UB －CORE14) 在1991 年6 月1 日保藏， 编目号为ATCC 68642， 用ptrpH－UB－E， 转化的大肠杆菌W3110株(E. coli W3110 ptrpH－UB－E 1)在1991年12月11日保藏，编目号为ATCC68878；用ptrpH－UB－E2N转化的大肠杆菌W3110株(E. coli W3110 ptrpH－UB－E2N)于1992年4月22日保藏，菌种编目号为ATCC 68966，所有保藏均按国际专利微生物保藏识别《布达佩斯协定》所规定的条款进行。

用ptrph－UB－CORE 14 转化的大肠杆菌在液体LB培养基（1%细菌蛋白胨， 0.5% 酵母浸， 1% NaCl ）并含有 50 g／ml 氨苄青霉素中37℃振荡培养12小时。 取5ml上述培养物转入1升M9 培养基中（40 mM K_2HPO_4，22mM KH_2PO_4， 8.5 mM NaCl， 18.7 mM NH_4Cl，1% 葡萄糖， 0.1mM $MgSO_4$ ， 0.1mM $CaCl_2$， 0.4%酪蛋白水解物， 10 μl／ml 维生素B_1， 40 μg／ml 氨苄青霉素）， 37℃振荡培养3－4小时。 当 $O.D._{650}$ 值达到0.5时， 吲哚丙酸（IAA） 加入其内， 使 IAA 的最终浓度达到 1.4 mM， 5小时后， 培养物3000 rpm 离心25分钟收集沉淀的大肠杆菌。

其它重组大肠杆菌按上述相同方式培养以生产出 KHCV 蛋白质来。

第2步

上述每种细菌细胞悬浮在缓冲液内， 然后在15% SDS－PAGE 采用 Laemmli 法［ Nature， 227， 680（1970）］ 以确定融合 ubiquitine 的 KHCV 蛋白的表达情况。 结果见图36至38。

在图36， M道是标准蛋白分子量标志， 即自上向下72， 43， 29和18 kd； 第一道是不带 KHCV基因的质粒大肠杆菌产物； 第2道是 ptrpH－VB－CORE 14 转化大肠杆菌 ， 23 kd 的蛋白质被翻译出来。 第三道表明由 ptrpH－UB－CORE 17转化的大肠杆菌产物， 是一个27 kd 蛋白质， 第4道是由 ptrpH－UB－CORE 22 转化

大肠杆菌生产的29 kd 蛋白蛋，第5道是由 ptrpH－UB－KHCV 897转化大肠杆菌生产的40 kd 蛋白质。而第6道是纯化的 KHCV 897蛋白质。

在图37，第一道是不带 KHCV质粒的大肠杆菌表达的产品，第2至第5道是 ptrpH－UB－E1 转化的大肠杆菌分别从IAA 添加不同时间2，4，6和12小时后收获的产品。第6道是代表着标准分子量大小标志，即：自上而下 72，43，29，18和 14kd。

在图38，第1道是不带 KHCV基因质粒的大肠杆菌产品，第2道是 ptrph－UB－E2C 转化大肠杆菌的产品，第3道是 ptrpH－UB－E2N转化大肠杆菌的产品。

蛋白印迹是按例(3－C)相同的方法进行是为了确定由上述重组大肠杆菌表达产生的蛋白质能否特异性结合 KHCV 抗体。结果参见图39至图41。

(4－C－2)：由含 tac 启动子的载体表达 KHCV cDNA

第1步

按例4相同的方法将例(4－B)制备的每一个质粒转化至大肠杆菌 D1210 株 (ATCC 27325)，在它们中间，由 pMAL－KHCV 555 (E. coli D 1210 pMAL－KHCV 555，) 转化的大肠杆菌于1991年6月27日保藏于 ATCC 其编号为 ATCC 68639，这一行动是按国际专利微生物保藏识别鉴定的《布达佩斯协定》的条款下进行的。

在含有50μg／ml 氨苄青霉素液体LB培养中振荡培养

12小时， 取5ml 培养物转至1升 M9 培养基(在一升溶液中含有6g Na_2HPO_4， 3g KH_2PO_4， 0.5g NaCl; 1gNH_4Cl， 2μl 1M $MgSO_4$， 100 μl 20% 葡萄糖，0.1 ml $CaCl_2$) 37℃振荡培养3－4小时， 当$O.D._{650}$到达0.5时 ， IPTG 加入到培养物中使其终浓度为0.2 mM，5小时后， 培养物在3000 rpm 离心25分钟收集沉淀的 E. coli 细胞。

第2步

在缓冲液中悬浮细胞沉淀物用 Laemmli 法 [Nature 227， 680(1970)] 上样进15% SDS－ PADG 以确定 KHCV 蛋白的表达。 结果参见图40。 在图42中， M道是标准蛋白分子量标志； 第1道是 pMAL －CR1 转化大肠杆菌产生的40 kd 蛋白质产物； 第2道是 pMAL －KHCV426 转化大肠杆菌产生的 65kd 蛋白质产物 (MBP－KHCV 426蛋白)； 第3道是 pMAL－KHCV 555 转化大肠杆菌产生的70 kd 蛋白质产物(MBP－KHCV 555蛋白质)； 第4道是 pMAL－KHCV 513转化大肠杆菌产生的 65kd 蛋白质 (MBP－ KHCV 513蛋白质)产物； 第5道是 pMAL－KHCV 810转化大肠杆菌产生的75 kd 蛋白质 (MBP－KHCV 810蛋白质)产物； 第6道是pMAL－KHCV 798转化大肠杆菌产生的72 kd蛋白质产物； 第7道是 pMAL－KHCV271 转化大肠杆菌产生的50 kd 蛋白质产物； 第8道是 pMAL－KHCV754 转化大肠杆菌产生的72 kd 蛋白质(MBP－KHCV 754蛋白质)

产物； 第9道是 pMAL－KHCV652 转化大肠杆菌产生的70 kd 蛋白质（ MBP－KHCV652 蛋白质）产物； 第10道是 pMAL－KHCV403 转化大肠杆菌产生的65 kd 蛋白质（ MBP－KHCV403 蛋白质）产物； 第11道是 pMAL－KHCV495 转化大肠杆菌产生的70 kd 蛋白质（ MBP－KHCV495 蛋白质）产物； 第12道是 pMAL－KHCV494 转化大肠杆菌产生的70 kd 蛋白质（ MBP－KHCV494 蛋白质）产物。

蛋白印迹是按例（3－C）相同方式进行的目的是确定上述蛋白质能否特异性的与 KHCV 抗体结合， 结果参见图43。

(4－C－3)： 从融合蛋白消化去除 MBP

MBP融合的每一种蛋白质对 Xa 因子缓冲液（20 mM Tirs－HCl， pH 8.0， 100mM NaCl ， 2mM $CaCl_2$， 1mM 叠氮化钠） 透析24小时。 0.2 μg 每一种透析蛋白液（1mg ／ml）和0.2 μg Xa 因子混合（New England Biolabs， Inc.， Cat.# 800－10L）； 反应物室温24小时存放。

每一种上述处理混合物100℃5分钟， 按例（1－C）相同方法上样进行 SDS－PAGE以确定 MBP是否从融合蛋白中移去。移去MBP的蛋白质被分别做： KHCV 426蛋白， KHCV555 蛋白， KHCV513 蛋白， KHCV810 蛋白， KHCV798 蛋白， KHCV 271蛋白， KHCV754 蛋白， KHCV652 蛋白， HCV403蛋白， KHCV495 蛋白和 KHCV494 蛋白。

按上述所述， 为了制备表达载体各种长度和序列的KHCV cDNA 由PCR 扩张制备而得， 这中间使用了各种各样引物组合。 因此， 很明显其它相似的KHCV cDNA片断以上述揭示的可以很容易由一个技术熟练的人合成。 既然 KHCV 抗原蛋白依赖着KHCV cDNA ， 因此很明显其它 KHCV抗原蛋白质也可由一位技术熟练的人员很容易的合成。 进而， 为制备 KHCV cDNA 和KHCV 抗原蛋白质， 可能要使用不仅在例中用的酶， 接头 (Linker)和其它材料， 而且也包括它们的对应物 (equivalents)。

例5: 纯化由酵母细胞表达的KHCV 蛋白

(5－A)： 纯化 KHCV 403蛋白

第1步： 重组酵母细胞的培养

由含 KHCV 403 cDNA 片段和 ubiquitine 基因的载体 (PYLBC－A／G－UB－KHCV403) 转化的S. cerevisiae DCO4－UB－KHCV403酵母细胞在10 ml 无亮氨酸培养基中30℃12小时培养 (0.67% 酵母无氨基酸的氮基质， 5%葡萄糖， 和0.25% 无亮氨酸的氨基酸的混合物)。 然后， 该培养物转入100 ml 含5%葡萄糖 YEPD培养基(2% 蛋白胨， 1% 酵母浸膏， 5%葡萄糖) 振荡培养在30℃约6小时， 培养物进一步转入一升含5%葡萄糖的YEPD培养基30℃培养6小时。 获得了发酵的种子批培养

物。

10升含2%葡萄糖的 YEPD培养基被装入14升发酵罐 (Bench Top Fermentor: NBS Company U. S. A.)随后将种子批培养物接种其中在30℃以250 rpm 速度振荡培养约48小时， 然后在2500 rpm 下离心20分钟， (Beckman J－6B, Rotor JS. 4. 2)获得重组酵母细胞膏。

第2步： 破碎酵母细胞

第1步获得的重组酵母细胞悬浮在500ml 缓冲液中(50 mM Tris, pH 8.5, 5mM EDTA, 10mM β－巯基乙醇， 1mM 苯甲硫氟化物， 1μg ／ml pepstatin A,)； 加入等体积的 0.4mm 直径的玻璃珠， 用一个匀浆器在4℃处理5分钟(珠破碎器， Biospec Product , U. S. A.)以破坏细胞膜， 破碎的细胞通过滤膜(Whatman 3MM, U.S.A.) 以移去玻璃珠获得酵母匀浆物。

第3步： 鉴定特异性抗原蛋白:

在第2步获得的少量酵母匀浆物进行15% SDS－PAGE。 结果表明在细胞内 ubiquitines 已经被切割下来，从KHCV 403 cDNA 表达的蛋白质(又称为KHCV 403蛋白)分子量大约1.7kd。

在胶上分离的蛋白质印迹到硝酸纤维素膜， 然后， 将该膜放入含有0.5 % Tween 20 的磷酸缓冲盐水(PBS:

10mM 磷酸盐， 0.15 M NaCl， pH 7.0) 的盘中， 轻轻振荡， 室温2小时， 以封闭IgG 非特异性吸附。 之后， IgG （8.2 mg／ml ）， 亲合纯化自一位朝鲜C型肝炎病人血清， 用含有0.5％明胶和0.05％ Tween 20 PBS 以1:200稀释， 稀释后的IgG 溶液10 ml 加入过滤器。 室温轻荡盘1小时； 用含有0.5 ％明胶和0.05 ％ Tween 20 以1: 200 稀释辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG （Bio Red Lab， 山羊抗人 IgG－HRP) 然后加至膜上。 室温下轻荡1小时。 用含0.5 ％ Tween 20， PBS 洗膜四次， 每次5分钟。 再用50mM Tris 缓冲液 (pH 7.0) 洗2次。加50mM Tris 缓冲液 (pH7.0) 内含400μg／ml 4－氯－1－萘酚和0.03％过氧化氢以便出现颜色反应。 结果表明全酵母匀浆物中唯有KHCV 403蛋白能和C型肝炎病人血清进行免疫学反 出现一条可见的带， 因而， 所说的KHCV 蛋白是唯一能结合 KHCV抗体的免疫活性蛋白。

第4步： 除去溶解的杂蛋白

在第二步获得的酵母匀浆物以11000 rpm 离心 (Beckman， J2－21， Rotor JA14 ） 除去上清液， 获得的不溶性沉淀物中， 有KHCV 403蛋白。

第5步： 用脲溶解和分段分离沉淀物

第4步获得的沉淀物溶在750ml 缓冲液中 （50mM Tris ，pH 8.5， 5mM EDTA， 10 mM β－ 巯基乙醇，

1mM 苯甲硫氟化物， 1μg /ml pepstatin A)， 其中含有8M脲。 该溶液离心移去不溶物， 收集上清液。 上清液对含有2M脲的缓冲液(10 mM Tris， pH 9.0， 2mM EDTA， 5mM β－巯基乙醇)， 透析， 离心除去沉淀，上清液中含有KHCV403 蛋白。

第6步： 第1次DEAE 离子交换层析

第5步获得的上清液通过用含有2M脲的缓冲液(10mM Tris， pH 9.0，2mM EDTA， 5mM β－巯基乙醇)， 平衡过的DEAE－ Sepharose (琼脂糖珠)柱(Pharmacia， FF， 5cm× 15cm， U.S.A)。 结合在柱上的蛋白质用含0.2 M NaCl 的750 ml 缓冲液(10 mM Tris， pH9.0， 2mM EDTA， 5mM β－巯基乙醇)洗脱， 分部收集结合蛋白质。

第7步： 第2次DEAE离子交换层析

收集含有KHCV 403蛋白的蛋白部分， 对缓冲液(10mM Tris， pH9.0， 2mM EDTA， 5mM β－巯基乙醇)， 透析以除去脲， 然后， 通过上述缓冲液平衡过的DEAE－琼脂糖珠柱。 加入含有0.1M NaCl 缓冲液(10mM Tris pH9.0， 2mM EDTA， 4mM β－巯基乙醇， 以分离出洗脱蛋白； 有一个从0.1M到0.2M NaCl 的浓度梯度的500ml 缓冲液加入， 分部分离结合到柱上的蛋白

质， 各分部收集的蛋白质进行SDS－PAGE， 以收集含有高纯度 KHCV 403的部分。

第8步： FPLC－苯基层析

第7步获得的分部收集物对含有1.5 M NaCl 的缓冲液（50mM Tris， pH 7.4， 2mM EDTA ， 5mM β－巯基乙醇）， 透析， 然后， 通过用所说的缓冲液平衡达的FPLC－苯基superose 柱（pharmacia， HR 10／10， 1cm×8cm ， U.S.A）。 含有从1.5到0M NaCl 浓度梯度的160ml 缓冲液加进柱内分部洗脱蛋白质。 每分部收集的蛋白质用SDS－PAGE检查其纯度。 含有高纯KHCV 403蛋白的部分，单独收集， 以便能获得有95％以上纯度的KHCV 403蛋白质。

(5－B)：纯化 KHCV CORE14 蛋白质

第1步： 培养重组酵母细胞

酵母菌（Saccharomyces cerevisiae ）DCO4 －UB－CORE 14是由含有编码 KHCV CPRE 14 蛋白和 ubiquitine 基因的载体（ pYLBC －A／G－UB－CORE 14 ）转化而得。 将该菌培养在无亮氨酸的含5％葡萄糖的培养基中， 其过程与例(5--A)中第一步相同。 20ml 培养物转移至100ml 含有4％葡萄糖的YEPD 培养基中， 30℃振

荡6小时， 再转入1升含有2%葡萄糖的YEPD培养基30℃24－48小时。 离心培养物， 收集细胞沉淀。

第2步：破碎酵母细胞

第1步获得的重组酵母的细胞沉淀物重新悬浮在30ml 缓冲液中（50 mMTris， pH 7.5， 5mM EDTA， 10mMβ－巯基乙醇， 1mM 苯甲硫氟化物， 1μg／ml pepstatin），加入等体积的0.4 mm 直径的玻璃珠， 在4℃由一个匀浆器（Bead Beater， Biospec Product， U. S. A）3次处理5分钟， 以破碎细胞膜获得酵母匀浆物。

第3步： 鉴定特定的抗原蛋白质

在第2步中获得的酵母匀浆物取少量在15% SDS－PAGE分析， 并用考马斯亮兰染色， 结果表明 ubiquitine 已从KHCV上分离开了， KHCV cDNA 表达的蛋白质（称为KHCV CORE 14蛋白质）分子量约为16，000道尔顿。

蛋白印迹与例（5－A）第3步相同。 结果表明 KHCV CORE 14蛋白仅仅能和C型肝炎病人血清进行免疫学反应，显示出一条可见的带。

第4步： 去除可溶性蛋白， 洗不溶性沉淀物

第2步获得的酵母匀浆物在11，000 rpm 离心（Beckman， J2－21， Rotor JA－14）去除可溶性蛋白

质， 收集含有 KHCV CORE 14 蛋白的不溶性沉淀物。沉淀悬浮在0.5升含有1% Triton－100， 1mM EDTA和10mM β－巯基乙醇的 PBS中， 振荡10分钟， 离心，沉淀物再用10mM 磷酸盐溶液洗一次(pH 6.8)。

第5步： 用8M脲溶解沉淀物

在第4步获得的不溶性沉淀物悬浮在含有8M脲， 1mM EDTA， 10mM β－巯基乙醇， 10mM 磷酸钠盐溶液(pH 6.5)， 4℃搅拌12小时， 溶解出 KHCV CORE 14 蛋白。 该溶液在15，000 rpm 离心20分钟 (Beckman，J2－21， Rotor， JA 20)， 收集上清液。

第6步： 羧甲基(CM)离子交换树脂层析

在第5步获得的含 KHCV CORE 14 的溶液以 1ml／min 的流量通过装有25 ml CM(羧甲基)－Sepharose 树脂的2.5cm×10cm 的柱 (Pharmacia, Sweden)， 该柱事先用含有6M脲， 1mM EDTA， 10mM β－巯基乙醇和10mM 磷酸盐的缓冲液(pH 6.5) 平衡过。 未吸附到柱上的材料可用所用的平衡缓冲液反复彻底的洗脱而除去。 吸附在柱上的蛋白质用500 ml 已知平衡液， 其内 NaCl 的浓度梯度从0至0.5 M， 以3ml／min 流速洗脱。 洗脱液用SDS－PAGE 分析检查， 结果表明 KHCV CORE 14蛋白存在于大约0.3 M NaCl 溶液中。 含有 KHCV CORE 14 蛋白的分部收集液收集后供下步使用。

第 7 步：S—200 凝胶渗透层析

在第 6 步收集的那部分溶液通过 YM5 超滤膜（Amicon，USA）将上述溶液浓缩至 10ml。该浓缩液再加入已用含 6M 脲素，1mM EDTA 和 10mMβ—巯基乙醇 PBS 平衡过的 S—200 Sephacryl 柱（Pharmacia，Sweden，2.5cm×100cm）流量为 0.5ml/min 按分子量大小将蛋白质加以分离。分部收集的蛋白液用 15%SDS—PAGE 检查，含高纯 KHCV CORE14 蛋白的那部分收集后在 4℃对 PBS 透析以除去脲素，共获得 4mg 高纯 KHCV CORE14 蛋白。应该明白由其它 KHCV cDNA 编码并由酵母菌表达的蛋白质也可由上述描述的相似过程纯化而得。

例 6：纯化在大肠杆菌表达的 KHCV 蛋白质

（6—A）：纯化 KHCV UB897 蛋白质

第 1 步：培养重组大肠杆菌

用含有 KHCV897cDNA 和 ubiquitine 基因的载体（PtrpH—UB—KHCV897）转化的大肠杆菌（E. coliW3110 ptrpH—KHCV897，ATCC68640）在含有 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中（每升中含有 10 g Bactotriptone，5g 酵母浸膏，10g NaCl）振荡培养 12 小时。取 5ml 培养物转移接种至 1 升含有 40μg/ml 氨苄青霉素的 Mg 培养基中（40mM $K_2^HPO_4$，22mMKH_2PO_4，8.5mM NaCl，18.7mM NH_4Cl，1%葡萄糖，0.1mM $MgSO_4$，0.1mM $CaCl_2$，0.4%酪蛋白水解物，10μg/ml 维生素 B_1）37℃震荡培养 3—4 小时。加入吲哚乙烯酸（IAA）使终浓度为 0.14mM，当培养液 OD650 到达 0.5 时，说明开始生产了 KHCV UB897 蛋白。在加入

IAA 后约 5 小时，2500rpm 离心 20 分钟(Beckman J—6B，Rotor IS 4.2)收集大肠杆菌细胞沉淀物。用磷酸盐缓冲生理盐水(10mM 磷酸盐 pH7.0，0.15mM NaCl，)再洗一次沉淀物。

第 2 步：破碎细胞

在第 1 步获得的 3g 大肠杆菌沉淀悬浮在 40 毫升缓冲液(50mM Tris pH8.5，5mM EDTA，2mM β—巯基乙醇，1mM 苯甲硫氟化物，1μg/ml pepstatin A，)。加 0.3ml 50mg/ml 溶菌酶至悬液中 37℃1 小时，在冰上进行超声处理约 5 分钟，超声仪输出功率为 70%(Heat System—Ultrasonics，LnS.，W225，USA)这样就使细胞破碎获得大肠杆菌细胞的匀浆成份。。

第 3 步：鉴定特定的抗原蛋白

第 2 步中获得的大肠杆菌细胞匀浆物，取少许进行 12% SPS—PAGE，结果表明，由所说的载体(涉及 KHCV UB897 蛋白)表达的 KHCV 蛋白有 3.9kd 分子量。

因此，胶上分离的蛋白质转移至硝酸纤维素膜，按例(5—A)第 3 步相同的方法进行蛋白印迹。结果表明只有 KHCV UB897 蛋白能和 C 型肝炎病人血清进行进行免疫学 UB897 反应并形成一条可见的带。在结果的右侧，可以看到所说表达的 KHCV UB 897 蛋白是能够和 HCV 抗体结合的免疫反应蛋白。

第 4 步：除去可溶性蛋白

在第 2 步获得的细胞匀浆物以 11,000rpm 离心 25 分钟(Beckman J2—21，Rotor JA—14)以除去可溶性蛋白获得不溶性沉淀物。

第 5 步：用曲拉通 X—100 和 Tris 缓冲液洗不溶性沉淀物。

第 4 步获得的沉淀物悬浮在 50ml 含 1%。曲拉通 X—100

缓冲液(50mM Tris,5mM EDTA,2mM β—巯基乙醇,pH8.5)中,该悬液在室温下搅拌30分钟后以11,000rpm离心25分钟(Beckman J2—21,Rotor JA14),以除去上清,收集不溶沉淀物。随后,沉淀物悬浮在50ml缓冲液(50mM Tris,5mM EDTA,2mMβ巯基乙醇,pH8.5)中。进一步搅拌离心以除去上清,收集不溶物。

仅仅通过上述简单的洗涤过程,获得的KHCVUB 897蛋白,此时至少有60%的纯度。

第6步:用8M脲素溶解不溶性沉淀物

含有在第5步获得的KHCV UB 897蛋白的不溶性沉淀物悬浮在50ml含有8M脲的缓冲液(20mM磷酸盐,pH6.0.2mM EDTA,2mM β—巯基乙醇,)室温下搅拌1小时,离心除去不溶性沉淀物,收集上清液。

第7步:S—Sepharosse离子交换层析

第6步获得的上清液上样于已用含有4M脲缓冲液(20mM磷酸盐 pH6.0,2mM EDTA,2mM β—巯基乙醇),平衡过的S—Sepharose柱(Pharmacia,FF,2.5cm×7cm,U.S.A)、用600mlNaCl浓度梯度从0至0.2M的缓冲液洗脱。有蛋白部分的洗脱液进行SDS—PAGE,收集含有高纯KHCV UB897蛋白的部分。

第8步:去除脲素并进行FPLC—Mono Q离子交换层析

在第7步收集的含有KHCV UB 897蛋白的分部洗出液对缓冲液(10mM Tris pH8.5,2mM EDTA,2mM β—巯基乙醇,)除去脲素,然后加样通过已用缓冲液平衡过的FPLC—Mono Q离子交换树脂柱(Pharmacia,HR5/5)。用40ml有NaCl 0至0.4M浓度梯度的缓冲液洗脱,含有高纯KHCV UB 897蛋白部分被收

集以便获得至少 90%纯度的 KHCV UB 897 蛋白。

(6—B):纯化 KHCV UB CORE 17 蛋白质

第 1 步:重组大肠杆菌的培养

由含 C 型肝炎病毒 cDNA 和 Ubiquitine 基因的载体(ptrpH—UB—CORE 17)转化的大肠杆菌 W3110 株 ptrpH—UB—CORE 17(ATCC 68641)在含 50μg/ml 的氨苄青霉素,100μg/ml 色氨酸的 LB 培养基上 37℃12 小时培养;将 50ml 的培养物转移到 1 升 Mg 培养基中,37℃下培养 6 到 8 小时。然后收集细胞沉淀物,步骤如例(6—A)的第一步所述。

第 2 步:破碎细胞

第 1 步获得的 3g 大肠杆菌细胞沉淀物在 4℃悬浮在 20ml 缓冲液(50mM Tris,pH7. 5,5mM EDTA,10mM β—巯基乙醇,1mM 苯甲硫氟化物,1μg/ml pepstatin)。然后加入 3mg 溶菌酶,搅 5 分钟。再在冰浴中超声处理 20 分钟(Heat Systemas—Ultrasonics,mc. ,W225,U. S. A)以破碎细胞获得细胞匀浆。

第 3 步:鉴定特定抗原蛋白质

在第 2 步中获得的大肠杆菌匀浆在 15%SDS—PAGE 电泳,然后用考马斯亮兰染色。结果表明表达产生了分子量约为 2. 7Kd 的蛋白质(即 KHCV UB CORE 17 蛋白。)

其后,将凝胶分开的蛋白质转移至硝酸纤维素膜,与例(5—A)第 3 步相同方法进行蛋白印迹。结果表明在大肠杆菌匀浆中只有 KHCV UB CORE 17 蛋白与 C 型肝炎病人血清有免疫学反应,表现出一条可见的带。

第 4 步:用脲素处理

在第 2 步获得的细胞匀浆物经 12,000rpm 离心 20 分钟

(Beckman J2—21,Rotor JA2)除去不溶性材料,收集上清液。加入 9M 脲素至终浓度 6M,4℃搅 12 小时。

第 5 步:酸处理

在第 4 步获得的溶液中加入 1M 乙酸钠(pH4.5)至终浓度 10mM,用 1M 乙酸调至 pH5,搅 1 小时后 11,000rpm 离心(Beckman J2—21,Rotor JA14)除去沉淀,收集上清液。

第 6 步:Mono—S 层析

第 5 步获得的上清液经过 FPLC Mono—S 柱层析(HR5/5,Pharmacia,Sweden)可获得纯品,UB—CORE17 蛋白溶液通过一个事先用含有 8M 脲,1mM EDTA,1mM β—巯基乙醇,10mM 乙酸的缓冲液 A(pH5.0)平衡的柱子。然后,用已知的缓冲液 A 洗脱。最后,用含有 8M 脲,1mM EDTA,1mM β—巯基乙醇,10mM 乙酸和 1M NaCL 的缓冲液 B 逐渐加入缓冲液 A 中。前 5 分钟,B 占 A 液的 17.5%,后来的 55 分钟占 35%,最后 10 分钟占 100%,整个洗脱流速为 0.8ml/min,当缓冲液 B 达到 25%,即,NaCl 浓度为 0.25M 时,KHCV UB—CORE 17 蛋白质开始洗脱下来。

第 7 步:S—200 凝胶渗透层析

第 6 步获得的蛋白溶液通过一个用含有 6M 脲,1mM EDTA 和 1mM β—巯基乙醇的 PBS 缓冲液平衡过的 S—200 Sephacryl 柱(Pharmacia,Sweden,2.5cm×100cm)流速为 0.5ml/min,该层析分离是按分子量大小进行分离的。分部收集有蛋白的洗脱物。对含有 KHCV UB—CORE 17 蛋白的部分进行 SDS—PAGE。然后,此部分在 4℃对 PBS 溶液透析以获得 4mg KHCV UB—CORE 17 蛋白,至少有 90%的纯度。

(6—C)：纯化 UB—E1 蛋白

第一步：重组细菌细胞的培养

能够产生 KHCVE1 蛋白和 Ubiquitine(UB)融合蛋白的大肠杆菌 W3110ptrpH—UB—E1 株(ATCC68878)的培养和收集完全与例(6—A)第一步相同。

第 2 步：破碎细胞

在第 1 步获得细菌细胞沉淀重新悬浮在 50ml 缓冲液中(20mM Tris，pH7.5，1mM EDTA，2mM β—巯基乙醇，1mM 苯甲硫氟化物，1μg/mlPepstatin A)。加入溶菌酶至终浓度 0.2mg/ml38℃30 分钟，并在冰浴中用 70%功率超声处理 5 分钟破碎细胞收集匀浆。

第 3 步：鉴定特定抗原的表达

第 2 步获得的匀浆进行 15%SDS—PAGE 电泳，结果表明有一约 2.7Kd(即 US—E1 蛋白)蛋白由载体表达。

凝胶分离的蛋白质印迹到 Immobilon P 膜上(MILLIPORE，Cat. NO IPUH OOOIO，孔经 0.45μm)并按例(5—A)第 3 步相同的方式进行免疫印迹。

结果表明在全细胞匀浆中只有 UB—E1 蛋白能和 C 型肝炎、病人备清进行免疫学反应并产生一条可见一带。

第 4 步：制备细胞匀浆以 11.000rpm 离心 25 分钟(Beckman J2—21，RotorJA14)除去上请收集沉淀物。

第 5 步：洗不溶性沉淀物

第 4 步：获得的沉淀物悬浮在 30ml 含 1%曲拉通 X—100 缓冲液(20m Tris，pH7.5，1mM EDTA，2mM β—巯基乙醇)，室温搅拌 30 分钟再以 11，000rpm 离心 25 分钟(Beckman，J2—21，

Rotor JA14)除去溶解在1%曲拉通X—100的可溶性蛋白。沉淀蛋白进一步悬浮在30毫升所述的缓冲液1，搅拌并离心，收集不溶沉淀物。

UB—E1蛋白用这样简单洗涤过程可获得至少60%纯度。

第6步：不溶性沉淀物的溶解和分部分离

在第5步获得的含有UB—E1蛋白不溶性沉淀物悬浮在含8M盐酸胍的50ml缓冲液2中(50mM Tris，pH9.0，1mM EDTA，2mM β—巯基乙醇)。悬液在室温下搅30分钟后11，000rpm离心25分钟以除去不溶性沉淀物，收集上清液，上清液用缓冲液2稀释至盐酸胍终浓度为0.5M；离心、收集含UM—E1蛋白的沉淀物

第7步：溶解不溶性沉溶物

在第6步获得的含UB—E1蛋白不溶性沉淀物悬浮在20ml含有8M脲的缓冲液3中(50mM碳酸钠，pH9.5，1mM EDTA、2mMβ—巯基乙醇)。室温搅1小时，除去不溶沉淀物经11，000rpm，25分离心(Backman J2—21，Rotor 5A147)收集上清液。

第8步：Q—Sepharose离子交换层析

第7步收集的上清液通过一个事先已用缓冲液平衡过的Q—Sepharose柱 (pharmacia，FF，1.2cm x 7cm)。有一个0至0.4M NaCl浓度梯度的100ml缓冲液用于洗脱蛋白，有蛋白的洗出液进行15%SDS—PAGE电泳，收集含有UB—E1蛋白的部分，大约UB—E1蛋白的纯度至少90%。

(6—D)：纯化KHCV UB—CORE14蛋白

第1步：重组大肠杆菌的培养

由含有KHCV cDNA和ubiquitine基因的载体(ptrpH—UB—

CORE14)转化的大肠杆菌 W3110ptr pH－UB－CORE 14 株(ATCC68642)在含有 50ug/ml 氨苄青霉素和 100μg/ml 色氨酸的 LB 培养基中 37℃培养 12 小时；50ml 培养物转入 1 升 Mq 培养基 37℃6－8 小时按例(6－A)第 1 步相同过程收集细菌沉淀物(paste)。

第 2 步：破碎细胞

4 克从第 1 步中得到的大肠杆菌细胞在 4℃悬浮在 20ml 缓冲液(50mM Tris，pH7.5，5mM EDTA，10mM β－巯基乙醇，1mM 苯甲硫氟化物，1μg/ml pepstatin)向其内加入 4mg 溶菌霉，搅拌 5 分钟，然后在冰浴中超声处理 20 分钟以破碎细胞。

第 3 步：鉴定特定的抗原蛋白

取少量第 2 步制备的细胞匀浆物进行如前所述的 15%SDS－PAGE 电泳，用考马斯亮兰染色，结果表明表达载体生产出一个约为 2.3Kd 蛋白质，以下称为 KHCV UB－CORE 14 蛋白)。

之后，凝胶分离蛋白转移至硝酸纤维素膜，该膜按例(5－A)相同的方法进行蛋白印迹。结果表明在全大肠杆菌细胞匀浆中只有 KHCV UB－CORE 14 可以和 C 型肝炎病人血清起免疫学反应显示出一条可见的带。

第 4 步：用脲处理

第 2 步获得的匀浆以 12,000rpm 离心 20 分钟(Beckman J2－21，Rotor JA－20)除去不溶性材料收集上清液。再在上清中加入 9M 脲使终浓度成为 8M，室温搅拌 12 小时。

第 5 步：用酸处理

在第 4 步获得的溶液中加入 1M 乙酸钠(pH4.5)至终浓度为 10mM，之后再加入 1M 乙酸调 pH 至 5.0 室温搅拌 1 小时。然

后 11,000rpm 离心(Bdeckman Js—21,Rotor JA—14)除去沉淀,收集上清液。

第 6 步:CM 离子换交层析

在第 5 步得到的含有 KHCV UB—CORE 14 溶液,加入到含 25ml CM—Sepharose 树脂的层析柱中(2.5cm×10cm)(Pharmacia,SWeden)以 1ml/min 流速流入,该柱事先用含有 8M 脲 1mM EDTA,10mM 巯基乙醇,和 10mM 乙酸盐的缓冲液(pH5.0)平衡过。以自由形式存在在柱中的材料彻底用平衡缓冲液洗。在柱中吸附的蛋白质用 500ml 有 0 至 0.5MNaCl 浓度梯度的平衡缓冲液以流速 3ml/min 洗脱。洗脱物用 SDS—PAGE 电泳分析,结果表明在大约 0.3MNaCl 浓度时 KHCV UB—CORE 14 蛋白从柱上洗脱下来。收集这部分含有 KHCV UB—CORE 14 的蛋白用于下一步。

第 7 步:S—200 凝胶渗透层析

从第 6 步收集的那部分洗脱蛋白通过 YM5 超滤膜(Amicon,U.S.A.)浓缩体积至 10ml。浓缩物再通过事先已用含有 6M 脲,1mM EDTA 和 1mM β—巯基乙醇的 PBS 平衡过的 S—200Sephacryl 层析柱(2.5cm×100cm,Pharmacia,Sweden)流速为 0.5ml/min。该层析是以分子量大小来分离蛋白质的。收集的具有蛋白质部分进行 SD—PAGE 电泳。收集含有 KHCV UB—CORE14 蛋白的那部分洗脱液。

第 8 步:Mono—S 层析

在第 7 步获得的 KHCV UB—CORE 14 蛋白液进一步用 FPLC Mono—S 柱(HR5/5,Pharmacia,Sweden)纯化。该柱事先用含有 6M 脲,1mM EDTA,1mM β—巯基乙醇和 10mM 磷酸盐的

缓冲液 A 平衡过(pH7.0),并用相同容积的缓冲液 A 稀释,然后,加样于柱中,先用缓冲液 A 洗脱.之后.使含有 6M 脲.1mM EDTA,1mM β—巯基乙醇,10mM 磷酸盐和 0.4M NaCl 的缓冲液 B 在 A 液中的比例逐渐占 35%的混合液洗脱 5 分钟,提高该比例至 70%时洗脱 55 分钟,最后 10 分钟,用 100%缓冲液 2 洗脱。流速为 0.8ml/min。在缓冲液 B 占 60%时,即氯化钠为 0.25M,KHCV UB—CORE14 蛋白被洗脱下来。

洗脱下来的这部分蛋白对 PBS 4℃透析可获得 4mg 纯度至少为 90%的 KHCVUB—CORE 14 蛋白。

(6—E):纯化 UB—E2N 蛋白

第 1 步:重组细菌细胞的培养

能够产生 KHCV E2N 和 ubiquitine 融合蛋白的大肠杆菌 W3110 ptrpH—UB—E2N(ATCC 68966)株在含有 50μg/ml 氨苄青霉素 LB 培养基振荡培养 12 小时.取 10 毫升培养物转至含有 2%酪氨酸和 10μg/ml 色氨酸,1 升 M9 培养基中 37℃振荡培养约 3 小时,向其内加入吲哚丙酸(IAA)至终浓度为 50μg/ml,此时的培养基 OD_{650}值应达到 0.2,IAA 能诱导产生重组 UB—E2N 蛋白。加入 IAA5 小时后,以 3,500rpm 离心培养物 25 分钟(BeckmanJ6,RotorHS4),收集细胞沉淀物,并用 PBS 离心洗一次。

第 2 步:鉴定特定抗原

上述制备菌体匀心物经 SDS—PAGE(15%)电泳表明表达的 UB—E2N 分子量大约为 28,000 道尔顿(28Kd)。

随后,将凝胶分离的蛋白质转移至 Immobilone P 膜上(Millipore,Cat. No. IPUH00010,孔径 0.45μm)。该膜放入含有 0.5%

Tween20 的 PBS 液中(10mM 磷酸盐,pH7.0,0.15MNaCl)室温振荡 2 小时以封闭 IgG 的非特异性吸附。用含有 0.5%明胶和 0.05%Tween20 的 PBS 液以 1：20 稀释如前所述的 C 型肝炎病人血清,然后将 10ml 该稀释血清与膜进行反应。室温 1 小时振荡后,用含 0.05%Tween20 PBS 洗膜 4 次,每次 5 分钟。用含 0.5%明胶和 0.05%Tween20 PBS 以 1：1000 比例稀释碱性磷酸盐标记的抗人 IgG(Boehringer Manheim,Cat. No. 605415,抗人 IgG—Alp),然后将 10ml 的稀释液加至膜上。室温振荡反应 1 小时,用含 0.05%Tween20PBS 洗四次,再用 100mM Tris 缓冲液(pH9.5,5mM $MgCl_2$,100mM NaCl)洗二次,每次 5 分钟。

最后给膜上加入 100mM Tris 缓冲液,内含 125μg/ml 硝基蓝四氮唑(Pierce,NBT)和 25μg/ml 溴氯吲哚磷酸盐(Pierce,BGIP),以便产生颜色反应。结果在全细胞匀浆中只有 UB—E2N 蛋白能与 C 型肝炎病人血清进行免疫学反应并出现一条可见的带。

第 3 步:破碎细胞并除去可溶性蛋白

从第 1 步估计可获约 3 克细胞沉淀物,把它们悬浮在 50ml 缓冲液 1 中(20mM Tris,pH7.5,1mM EDTA,2mM β—巯基乙醇,1mM 苯甲硫氟化物,1μg/ml pepstatin A),加入溶菌酶使其终浓度为 0.2mg/ml,37℃反应 30 分钟,70%功率冰浴 对上述菌悬液进行超声处理 5 分钟,获得细菌匀浆物。然后以 11,000rpm 离心 25 分钟(Beckman J2—21,Rotor JA 14)除去可溶性蛋白,收集不溶沉淀物。

第 4 步:用曲拉通 X—100 和 Tris 缓冲液洗不溶沉淀物

第 3 步获得的沉淀物悬浮在 30ml 含 1%曲拉通 X—100 的

缓冲液 1(20mM Tris,pH7.5,1mM EDTA,2mM β—巯基乙醇),室温搅拌 30 分钟后以 11,000rpm 离心 25 分钟(Beckman J2—21,RotorJA—14)除去可溶性蛋白,收集沉淀蛋白。沉淀物重新悬浮在 30ml 缓冲液 1 中。搅拌后离心收集不溶蛋白质。

通过上述简单的洗洗过程至少有 70%纯度的 UB—E2N 蛋白被获得。

第 5 步:用 8M 脲溶解不溶性沉淀物

在第 4 步获得的含有 UB—E2N 蛋白不溶性沉淀物悬浮在 40ml 含 8M 脲的缓冲液 2(50mM Tris,pH9.0,1mM EDTA,2mM β—巯基乙醇)中。室温下搅拌 1 小时后,离心除去不溶性沉淀物,收集上清液。

第 6 步:S—200 凝胶渗透层析

在第 5 步获得的含 UB—E2N 40ml 8M 脲溶液用超滤膜 YM10(Amicon)浓缩至 5ml 体积。然后通过用含有 4M 脲的缓冲液 2 平衡过的 S—200 树脂柱(2.5cm×90cm,Pharmacia,lUSA),流速为每小时 40ml,每管收集 2 毫升。收集各管用 SDS—PAGE 分析后其中含有 UB—E2N 蛋白。

第 7 步:Q—Sepharose 离子交换层析

在第 6 步获得的含 UB—E2N 蛋白的溶液通过已事先用含 4M 脲的缓冲液 2 平衡过的 Q—Sepharose 柱(FF,1.2cm×7cm,Pharmacia,USA)。150 毫升含 0 至 1.0M NaCl 浓度梯度的缓冲液洗脱蛋白组份。各收集管用 SDS—PAGE 检查并 UB—E2N 纯度至少为 80%的组份管。

第 8 步:除去脲后进行 FPLC—苯基层析

在第 7 步获得的含 UB—E2N 的 4M 溶液用 YM10 超滤膜浓

缩至 8 毫升(Amicon)用透析膜(Spectum,Medical Industries,Inc.,M. W. cut off 6,000～8,000)对缓冲液 3 透析(20mM Tris,pH9.0,1mM EDTA,2mM β—巯基乙醇,0.2M NaCl)除去脲。然后在该液中加入氯化钠至终浓度 1M。再上样通过 FPLC—苯基 Sepharose 柱(Pharmacia,HR5/5,0.5cm×5cm),40ml 含有从 1.0 至 0M 的 NaCl 浓度梯度的缓冲液用于洗脱分离上述蛋白。洗出液进行 SDS—PAGE 收集含有 UB—E2N 蛋白的部分,它们的纯度至少为 90%。

(6—F):纯化 UB—E2C 蛋白

第 1 步:重组细胞的培养

能产生 KHCV E2C 蛋白和 ubiquitine 融合蛋白在含有 50μg/ml 氨苄青霉素 LB 培养基中 12 小时。20 毫升培养物转入 1 升含 2%酪氨酸和 10μg/ml 色氨酸 M9 培养基,振荡培养 2 小时(37℃),当 OD_{650}在室 0.3 已诱导产生重组 UB—E2C 蛋白,向培养物中加入吲哚丙酸(IAA)至终浓度 50μg/ml。从加入 IAA3 小时后,以 3,500 离心培养物 25 分钟(BEckman J6,Rotor HS—4)收集细胞沉淀,再用 PBS 洗一次沉淀物。

第 2 步:鉴定特定抗原

制备少许沉淀物进行 15%SDS—PAGE 电泳,结果表明 UB—E2C 蛋白分子量约为 25,000 道尔顿。

之后,用胶分离的蛋白质转移至 Immobilone P 膜(Millipore,cat. #. IPUH00010,孔径 0.45μm)上,再将膜放置含 0.5% Tween20 的 PBS 中,室温振荡 2 小时封闭 IgG 非特异性吸附。用含有 0.5%明胶和 0.05%Tween20 的 PBS 以 1∶20 比例稀释 C 型肝炎病人血清 10ml 加入其中,室温下轻荡 1 小时后,用含有

0.05%Tween20PBS 洗膜 4 次，每次 5 分钟。经用含 0.5%明胶和 0.05%Tween20 的 PBS 以 1：500 稀释抗人 IgG 辣根过氧化物酶标记物(Bio—Rad Lab.，抗人 IgG—HRP)10ml 加在膜上室温振荡反应 1 小时，用含 0.05%Tween20 的 PBS 洗膜 4 次，再用 50mM Tris 缓冲液(pH7.0)洗 2 次，每次洗膜 5 分钟。

加滤膜中 50mM Tris 缓冲液，内含 400μg/m 14—氯—1—萘酚和 0.03%过氧化氢引发展颜色反应。结果只有 UB—E2C 蛋白在全细胞匀浆中能和 C 型肝炎病人血清起免疫学反应并出现一条可见的带。

第 3 步：破碎细胞和除去可溶性蛋白

第 1 步获得了约 1 克细胞沉淀物，把它们悬浮在 50ml 的溶菌缓冲液，内含 20mM Tris，pH7.5，1mM EDTA，2mM β—巯基乙醇，1mM 苯甲硫氟化物和 1μg/ml pepstatin A，)再向内加入溶菌酶至终浓度 0.5μg/ml，37℃30 分钟，70%功率，在冰浴中超声处理以破碎细胞以约 5 分钟，获得匀浆物。最后以 11,000rpm 离心 25 分钟移去可溶性蛋白，收集不溶性沉淀。

第 4 步：用曲拉通 X—100 和 Tris 缓冲液洗不溶性沉淀物

以第 3 步获得的沉淀物悬浮在 20ml 含 10%曲拉通 X—100 的缓冲液 1(20mM Tris，pH7.5，1mM EDTA，2mM β—巯基乙醇)。悬液室温下 30 分钟以 11,000rpm 离心 25 分钟(Beckman J2—21，RotorJA—14)以除去可溶蛋白获得沉淀蛋白。将沉淀悬浮在 30ml 缓冲液 1 中，搅拌后再离心获得不溶性蛋白。

第 5 步：用 8M 脲溶解不溶性沉淀物

在第 4 步中获得的含有 UB—E2C 蛋白质的不溶性沉淀物悬浮在含有 8M 脲的 20ml 缓冲液 2 中(50mM 碳酸盐缓冲液，

pH9.5,1mM EDTA,2mM β—巯基乙醇)。室温搅拌1小时,离心除去沉淀,收集上清液。

第6步:FPLC—MonoQ离子交换层析

第5步获得的上清液通过事先用缓冲液2平衡过的(含有0.1M NaCl)FPLC—MonoQ柱(Pharmacia,HR5/5,0.5cm×5cm,USA)。之后,用含有0.1至0.4MNaCl浓度梯度的缓冲液40ml洗脱结合蛋白。各组份进行SDS—PAGE电泳分析,收集纯度至少为80%的蛋白组份。

第7步:除去脲并进行FPLC—苯基层析

通过YM10超滤膜,可使第6步获得的含有UB—E2C的8M脲溶液浓缩成14ml体积,然后对缓冲液3(20mM Tris,pH9.0,1mM EDTA,2mM β—巯基乙醇,0.2M NaCl)透析(透析膜:Sepectum Medical Industrieo,Inc.,M.W.cut off截流分子量6,000—8,000)以除去脲。再向该液中加入NaCl使终浓度为1M。再通过FPLC—苯基Sepharose柱(Pharmacia,HR5/5,0.5cm×5cm),用40ml有NaCl浓度梯度1M至0的缓冲液加入洗脱结合蛋白,并对各组份进行SDS—PAGE分析,收集纯度至少为90%含有UB—E2C蛋白的组份。

例7:用KHCV重组蛋白检测KHCV抗体

(7—A):混合阴阳性血清样品对抗原不同浓度的反应性

用50mM硼酸钠缓冲液(pH9.0)对KHCV403、KHCV897,和KHCV UB—CORE 14蛋白分别以下述3种浓度0.25μg/ml,2.0μg/ml和2.0μg/ml为起点2倍倍比系列稀释。稀释的蛋白溶液加入至微量反应板孔(Dynatech,Immunolon type I微反应板)、每孔200μl,用封口膜(para—film)将板密封后37℃温育2小时。封

膜的目的是防止水份蒸发。

包被 2 小时的板用含有 0.05%(V/V)Tween20 的 PBS (pH7.4,又称为洗液)洗板一次。然后将含 0.1%明胶(V/V)PBS 加入板孔,每孔 210μl 37℃温育 2 小时,每板孔加入 300μl 洗液洗 2 次,再用含 0.25%明胶,1mMEDTA,1.0%(V/V)Triton X—100 和 0.02%硫柳汞的 PBS 190μl/孔洗 2 次,HCV 病人阳性血样或阴性血样每孔加入 10μl,37℃1 小时,再用 Ortho 公司(Ortho Diagnostic Systems,Raritan,NJ88869,USA)C 型肝炎诊断试剂盒检测,该试剂盒使用 C—100 抗原。血清样品是由朝鲜 Yonsei 大学附属 Severance 医院提供血清样品。

37℃反应 1 小时的板孔用 300μl 洗液洗孔 5 次。再加入用含 10%胎牛血清,1%Ficoll(Sigma,V/V),0.02%硫柳汞和 0.05% Tween20 PBS 1∶5000 倍稀释的抗人 IgG r—链标记辣根过氧化物酶标记物(Bio—Rad 公司,Richmond,CA94804,USA,0.1mg 蛋白/ml),每孔 200μl,37℃温育 1 小时,用洗液洗孔五次。之后,加入 200μl 邻苯二胺(OPD,Sigma)(以 10mg/ml 溶解在 50mM 柠檬酸盐缓冲液,并用磷酸盐缓冲液调 pH 至 5.5)于每个孔中,暗中室温温育 30 分钟。即刻每孔加入 50μl 4N 硫酸终止颜色反应。在 492nm 波长用 Dynatech 微量反应板读数仪测定每孔的光密度值(参见图 19)。

(7—B):制备诊断试剂盒

KHCV UB—CORE 14,KHCV 897 和 KHCV403 蛋白纯化的抗原被用于制备诊断盒。这些抗原都是在前述经过纯化的。将该抗原用 50mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)或 10mM 碳酸钠缓冲液(pH9.5)稀释成最适浓度,加至 Immolon type 1 微量反应 96 孔板

各孔中(Dynatech),每孔 150μl 至 200μl,4℃孵育,12—18 小时让抗原吸附至板孔中。

对于每个抗原最适浓度 KHCV UB—CORE 14 蛋白为 0.18 至 0.75μg/ml,KHCV897 蛋白为 0.06 至 0.3μg/ml,KHCV 403 蛋白为 0.12 至 0.5μg/ml。本例中每一种抗原均使用 0.3μg/ml。

用抽吸仪去除每孔内容物。用含 0.05%(W/V)Tween20PBS (PBS,pH7.4)洗板再用含 0.1%(w/v)明胶缓冲液(210μg/孔,pH7.4)阻断 2 小时 37℃,用洗液洗板三次。板里残留湿气用吸抽装置去除。

每孔加入 190μl 含有 1%牛血清缓冲液(10mM Tris,pH7.5,150mM NaCl,0.2%曲拉通 x—100,0.1mM EDTA,0.02%硫柳汞和 10μl 血清样品,37℃ 60 分钟使样品中 HCV 抗体和吸附在板孔上的抗原结合。用含 0.05%Tween 20(v/v)的 PBS(pH7.4)洗板 5 次,加入用含 10%牛血清白蛋白(w/v)的缓冲液(10mM Tris, PH7.5, 150mM NaCl,0.02%硫柳汞,1%聚遮糖(Ficoll))稀释抗人 IgG—HRP(山羊抗人 IgG—HRP,BIO—Rad Lab,U.S.A)每孔 200μl,37℃60 分钟,用含 0.05%Tween20(v/v)的 PBS(pH7.4)洗板孔。加入 200μl OPD 液于每孔室温 30 分钟。最后加入 50μl 4N 硫酸中止反应然后,在 OD_{492} 波长处测定结果。确定阴阳性标准的 OD 值称为结果判定值(Cut—off value)已确定为 0.4 加阴性对照样品的 OD 值。

对于每一种 KHCV 蛋白和混合抗原与上述对应的结果列在表 1。比较对照用的商品试剂来自 Ortho Diagnostic Systoms,使用按制造商说明书。

表 1:用酶免疫法确定 KHCV 蛋白与 KHCV 抗体的反应性样品号 (详见附后的表1)

注:1)++++:判定值+1.5≤光密度吸收值(OD)

+++:判定值+1.0≤OD<判定值+1.5

++:判定值+0.5≤OD<判定值+1.0

+:判定值≤OD<判定值+0.5

−:OD<判定值

2)对于 KHCV897 抗原的判定值为 0.32,对于 KHCV UB—CORE 14 蛋白为 0.27,对于 KHCV403 蛋白为 0.35,对混合抗原为 0.483,对 ortho 诊断试剂盒为 0.453

3)Ortho HCV 诊断试剂盒来自 Ortho Diagnostic Systems, USA 的商品。

(7-C):诊断的准确性

为了演示现诊断方法获得结果的准确性,用由 Ortho Diagnostic Systems 制造和出售的 HCV 诊断试剂盒确定为阳性的 17 个血清样品再用本发明诊断试剂盒进行诊断,也用免疫印迹试剂盒检查(Chiron,RIBA HCV Test System,第二代,Ortho 诊断 Systems 制造,产品号 933491),该法用来验证,由除 SOD 对照抗原以外,4 种抗原组成(参见 Van der Poel,C. L. et al,Lancet,337,

317－319(1991)该结果列在表 2，表明本发明诊断方法比 Ortho HCV 诊断试剂盒有较低假阳性结果。

表 2. Ortho 第二代免疫印迹试剂盒和本发明诊断试剂盒诊断结果比较（详见附后的表2）

★：如果发现有一个以上＋，即，表明除 OD 对照外至少有 2 个抗原有阳性反应就被判为阳性。

★★：以例(7－13)制备的混合抗原用在本试剂中。

例 8：用聚合酶链反应和基因探针确定 HCV 的存在

(8-A)：从 HCV 病毒抽提 RNA

向一待检血清 100μl 加入 TNE 溶液(100mM TrisHCl，pH8. 0，0. 2mM EDTA，0. 2M NaCl) 100μl，RNAzol 溶液 300μl (TM Cinna Scientific，Inc，Texas 77546，USA)和氯仿 300μl，彻底摇混。然后，15，000 rpm 离心 5 分钟(4℃，Eppendorf 离心机)形成沉淀收集上清，用 300μl 酚和 300μl 氯仿抽提，离心沉淀，沉淀物用 10μlTE 缓冲液(10mM Tris－HCl，pH8. 0，0. 1mM EDTA)溶解负 70℃保存。

(8－B)：用聚合酶链反应检查 HCV 的存在

上述抽提的 RNA 加入 4μl 蒸馏水和 1μl 0. 1M CH_3HgOH、室温 10 分钟。然后加入 0. 5μl 1M β－巯基乙醇，10μl RNasin，5μl x RT 缓冲液 CBRL，Gaitherburg，MD20877，USA)，1. 25μl d NTP (10mM dGTP，dTTP，dCTP 和 dATP)，1μg 随机引物，1. 25μl(18

单位/μl)SuperscvipT H⁻反向转录酶(BRL. U. S. A)补足蒸馏水至总体积 25μl,42℃反应 1 小时。

反应后,将该反应物加热至 65℃维持 15 分钟以灭活酶和用于 PCR.

第一步 PCR 扩增按下进行:0. 5μl Amplitaq DNA 聚合酶(Perkin Elmer Cetus,USA)加入 10μl 10×Tag 聚合酶缓冲液(10mMM Tris—HCl,pH8. 3,500mM KCl,155mM $MgCl_2$,0. 1%(v/v)明胶),10μl 1. 25mM dNTP 混合物,2μg 引物 A(5'1—CATAGTGGTCTGCGGAACCG—3'),2μg 引物 B(5'—TTG-AGGTTTAGGATTCGTGC—3')和 75μl 蒸馏水。加入 50μl 矿物油以防溶液的蒸发。以下面温度循环重复 40 次进行第一步 PCR:96℃2 分钟→55℃2 分钟→72℃3 分钟。

第 2 步 PCR 是在取第 1 步 PCR 产品 1μl 加入 1μg 引物 C(5'—TACACCGGAATTGCCAGGAC—3')和 1μg 引物 D(51—TCATGGTGCACGGTCTACGAG—3')后按第一步 PCR 相同的反应条件重复进行 40 次温度循环。

约 5μl 第 2 步 PCR 产品用于 7%PAGE 电泳以确定 HCV 病毒的存在(阳性样品应展示出一条 182bp 的 DNA 带来。

(9—A):

例四:制备特异性针对 C 型肝炎 KHCV 蛋白抗原:免疫

溶解在生理盐水中的 KHCV897 蛋白和等量的费氏完全佐剂混合,含有 50μg 这种蛋白的 0. 2ml 混悬液腹腔内注入约 10 周龄的 Bal b/c 系小鼠。30μg 该蛋白和费氏不完全佐剂混合后在间隔 2—3 同时再行腹腔接种。二次免疫后两周,从鼠尾抽少量血进行免疫酶测定以确定抗体滴度。当抗体滴度达到 10000,在

0.5ml 生理盐水中溶解 50—100μg 这种蛋白进一步接种。抗体滴度被定义为在 ELISA 方法中 0.2 吸收单位产生的血清稀释。3—4 天后，收集小鼠脾细胞用于制备生产单克隆抗体的细胞。

(9-B)：细胞融合

免疫过的脾细胞和 $P_3\times63$—Ag8.653 株小鼠骨髓瘤细胞融合(ATCC CRL 1580)融合。5×10^7 免疫鼠脾细胞和 2×10^7 骨髓瘤细胞混合后 300g 离心 10 分钟。细胞沉淀物用 IMDM 培养基离心洗，弃去上清液，沉淀细泡中滴入 1ml50%PEG(Kodak，分子量 1450dlt)，边滴边搅 1 分钟以上，再离心 2 分钟(200g)，在 3 分钟以上缓慢加入 5ml IMDM 培养基，再加入含胎牛血清(10%)的 5ml IMDM 培养基，边加边搅，5 分钟内完成。

含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基随后加至总体积为 50ml，离心 10 分钟。弃上清。加 10%胎血血清，100μM 次黄嘌呤，0.4μM 氨基喋呤和 16μM%胸腺嘧啶至 IMDM 培养基，用此培养基稀释细胸成每毫升 5×10^5 $P_3\times63$—Ag8.653 细胞。然后，将该液以 0.1ml/孔的量加入细胞培养的 96 孔板。含 1×10^5 个细胞/ml 腹腔巨噬胞的 0.1ml 加入板孔，此外这些巨噬细胞在融合之前应制备好并培养一天。骨髓瘤细胞和脾细胞不能在 HAT 培养基中生长。

据此，能在 HAT 培养基生长的细胞就是融合细胞。当杂交瘤生长至 10—50%水平时，上清取样检查抗体活性。

(9—c)：单克隆抗体滴度检测

在第 9—B 步生产的单克隆抗体，可采用下列的酶免疫测定法来检测其滴度。

第 1 步

将 KHCV897 蛋白溶解在 50mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)中，使其终浓度为 2μg/ml 给 Immunolon type I 板(Dynatech)每孔加入上述溶液 100μl37℃温育 2 小时。

第 2 步：

然后，用含有 0.05%Tween 20(v/v)的 PBS(pH7.4，称为洗液)洗板孔一次，再加入含 0.1%明胶(w/v)PBS 液，各孔 200μl，以封闭残留在板孔中的蛋白吸附位点，同样在 37℃温育 2 小时。

第 3 步

第 2 步各板孔用洗液洗 2 次后，回入 50μl 含 0.25%明胶(w/v)，1.0mM EDTA，1%m 曲拉通 X—100(v/v)和 0.02%硫柳汞的 PBS 液，之后每孔再加入 50μl 已经生长后的融合细胞上清液，37℃温育 1 小时。

第 4 步

第 3 步中处理的板孔用洗液洗 5 次。以 1：5000 比例用含 10%胎牛血清(v/v)，1%聚蔗糖(v/v)，0.02%硫柳汞(w/v)和 0.05% Tween 20 (v/v)PBS 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗鼠 IgG—HRP(Boehringer Manheim，Cat. No. 705—250)。然后每孔加入稀释的 IgG—HRP 液 100μl 37℃1 小时。反应后，用洗液洗板 5 次。

第5步：

每孔加入含 10mg/5ml OPD(Sigma Chemical Co.)的 50mM 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH5.5)100μl 室温避光反应 30 分钟，再加入 50μl 2N 硫酸以终止反应。在波长 492 处测完每孔的光吸收值。具有所需抗体活性的杂交瘤转入并生长在一个六孔板或 24 孔板上，若必要可加入小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞用于提供融合细胞生长所需的生长因子。

(9—D)： 抗体的生产

4 个细胞系(Lucky1.1,1.2,1.3 和 1.4)它们都能分泌所需的单克隆抗体在上步中获得。

本发明所用抗体既来自用常规方法细胞培养杂交瘤克隆株的上清液也来自生长在 Balb/c 小鼠腹腔中的杂交瘤克隆的腹水。

2.5×10^6 融合细胞注入于 7—14 天前已用 Pristane(Sigma)预处理过的一只 Balb/c 小鼠腹腔内。1—2 周后，收集腹水，用常规方法分离抗体。

(9—E)： 单克隆抗体特性检查

在例(9—D)中获得的每一株克隆制备出的单克隆抗体其特性鉴定按下述过程进行。

第1步：抗体的亚类

用杂交瘤亚一异型试剂盒(Calbiochem,USA)确定这些小鼠抗体的亚类，结果见表 3。

第 2 步：酶免疫测定

将 KHCV897 蛋白溶解在 50mM 硼酸钠缓冲液中，使其终浓度为 2μg/ml，给微量反应板（Dynatech Immunolon type I）每孔加入 200μl 上清液，37℃温育 2 小时。用含有 0.05%Tween 20（v/v）的 PBS 洗板。从每一个克隆收集的抗体经用常规方法纯化后调整其深度为 1mg/ml，用含 0.25%明胶（w/v），1.0%曲拉通 X—100，0.02%硫柳汞和 1mM EDTA 的 PBS 二倍倍比系列稀释。每孔加入 210μl 含 0.1%明胶的 PBS 37℃1 小时，然后用洗液洗板。

奖辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG（Boehringer Manheim，Cat. No. 605—250）溶解在含 10%FBS（v/v），1%聚蔗糖（v/v）和 0.05% Tween 20 的 PBS 中，每孔加入 200μl 37℃1 小时。按例（9—C）相同的方式进行反应。当 OD 值（495nm）高于 1.0 时每一种抗体的 EIA 效力以稀释倍数的倒数来表示。结果见表 3。

第 3 步：确定分子量

每一个杂交瘤克隆用板或小鼠腹腔培养，获得的上清液或腹水通过蛋白 G Sepharlse 柱进行亲和层析分离出 IgG，然后进行 SDS—PAGE 以确定上述获得的小鼠抗体重链和轻链的分子量。结果见表 3。

第 4 步：确定表位决定簇（epitope）

KHCV897 cDNA 在不同地方被切割，并构建了许多编码下列蛋白的克隆体，在本发明中每一种单克隆抗体与这些蛋白的反应性也进行了检查。

(1)KHCV897 蛋白：一种由 KHCVLBC1 编码的氨基酸序列中第 1192 至 1457 号区段的蛋白质。

(2)KHCV 290 蛋白：一种由 KHCV—LBC1 编码的氨基酸序列中第 1192 至 1289 号区段的蛋白质。

(3)KHCV430 蛋白：一种由 KHCV—LBC1 编码的氨基酸序列中第 1192 至 1335 号区段的蛋白质。

(4)KHCV570 蛋白：一种由 KHCV—LBC1 编码的氨基酸序列中第 1192 至 1382 号区段的蛋白质。

(5)KHCV652 蛋白：一种由 KHCV—LBC1 编码的氨基酸序列中第 1192 至 1407 号区段的蛋白质。(6)KHCV150 蛋白，一种由 KHCV—LBC1 编码的氨基酸序列中第 1408 至 1457 号区段的蛋白质。

(7)KHCV257 蛋白：一种由 KHCV—LCBC1 编码的氨基酸序列中第 1371 至 1457 号区段的蛋白质。

(8)KHCV518 蛋白质：一种由 KHCV—LBC1 编码的氨基酸序列中第 1285 至 1457 号区段的蛋白质。

SDS—PAGE 样品的制备是将缓冲液[Laemmli, U. K., Nature 277, 680(1970)]加入表达每一种 KHCV cDNA 片段的大肠杆菌细胞中，然后 100℃煮沸 5 分钟。制备样品对抗体的反应性检查是采用免疫印迹法[Towbin, H., J. Immunol. Metbods, 72, 313—340(1984)]。结果见表 3 和表 4。

从这个结果可以看出从 Lucky1. 1 株获得的抗体对 C 型肝氨基酸序列的第 1192 至 1289 区段为识别位点；而 Lucky1. 2, 1. 3 和 1. 4 株获得的抗体对第 1371 至 1407 区段为识别位点。对相互有不同表位的单克隆抗体可用以制备试剂盒，用以盒试剂

可用于检测血清样品中的抗原，使用方法为夹心法酶免疫检测。

表 3：本发明单克隆抗体的特性检查

（详见附后的表3）。

表 4：不同 KHCV897 cDNA 切割构建的表达载体产生的各种蛋白质与单克隆抗体之间的免疫反应性（详见附后的表4）。

Lucky1.1 和 Lucky1.2 细胞系于 1991 年 12 月 18 日按国际专利《布达佩斯条约》有关条款保藏于美国菌种保藏中心(ATCC),其编目号为 ATCC 10949 和 ATCC 10950。

例 10:由针对 KHCN 抗原的抗体组成的诊断试剂

第 1 步:辣根过氧化物酶标记 Lucky1.1 株产生的单克隆抗体

首先,所说的 Lucky1.1 细胞系产生的抗体用辣根过氧化物酶标记是采用如下所述的过碘酸盐法[Nakane et al.,J. Histochem. Cytochem.,22,1084(1974)]

将 0.3ml 在 10mM 磷酸钠缓冲液(pH7.0)中的 0.1M 过碘酸钠溶液加入至 1.2ml 溶有 5mg 过氧化物酶的蒸馏水中。该混合物在室温下反应 20 分钟。反应物对 1mM 乙酸钠缓冲液透析 16 小时。将 1.5ml 过氧化物酶溶液和 1ml 被标记抗体混合。该抗体已事先溶解在 20mM 碳酸钠溶液(pH9.5)中,终浓度为 10mg/ml。上述酶和抗体混合物在室温下反应 2 小时。加入 100μl 4mg/ml 溶解在蒸馏水中的单水化钠(Sodium monohydride)以减少未反应的 Schiff 碱。然后对 PBS(pH7.4)透析过夜,再上样于 Sephacryl S300 层析柱以除去未柱记上的单克隆抗体。

第 2 步:吸附 Lucky1.2 单克隆抗体到微量反应板上

取 200μl 用 PBS 稀释的 Lucky1.2 抗体液加入每一个板孔中在 37℃2 小时让其吸附到孔壁上。

第 3 步：封闭非特异性吸附位点

第 2 步制备的微量反应板用含 0.05% Tween 20 和 0.02% 硫柳汞 PBS 液（称为洗液）洗板一次，然后每板孔加入含 0.1% 明胶的 200μlPBS 包被蛋白吸附位点 1 小时，再用洗液洗板 2 次。

第 4 步：诊断抗原的存在

KHCV897 抗原用含 0.25%(w/v)明胶，1.0%(v/v)曲拉通 X—100，1mMEDTA 和 0.02%硫柳汞的 PBS 从 200mg/ml 开始 2 倍倍比系列稀释，每孔加入 200μl。为比较起见，将 KHCV 蛋白加入到一个正常血样中使其终浓度为 400mg/ml；含有 KHCV 抗原的正常血样也进行 2 倍倍比系列稀释，100μl 稀释血样和 100μl 所说缓冲液混合后加入每一个孔中。这企图表明血液样品中 C 型肝炎抗原能够用已制备抗体建立的夹心法酶免疫测定进行检测。未加 KHCV897 抗原的正常血样被用于阴性对照。板在 37℃ 温育 1 小时后用洗液洗 5 次。

第 5 步：用标记过氧化物酶的 Lucky1.1 抗体检测抗原

用含有 10%(v/v)胎牛血清，1%聚蔗糖 0.05%Tween20 和 0.02%硫柳汞的 PBS 稀释 Lucky1.1 抗体成终浓度 5μg/ml，取 200μl 加至每一个板孔中，37℃温育 1 小时。

第 6 步：显色反应

第 5 步处理的板用洗液洗 5 次。取邻苯二胺加入 50mM 柠

檬酸盐/磷酸盐缓冲液(pH5.5)中使其终浓度为 2mg/ml，每孔加入 200μl 上述溶液，避光室温 30 分钟显色。之后加入 50μl 4N 硫酸终止反应。在 492nm 波长下测定光吸收值。结果见图 43。

例 11：用夹心法酶免疫测定检测 C 型肝炎病人血清

100μl 待检血清和 100μl 例样 10 第 4 步所用缓冲液混合后加入用例样 10 中相同过程制备的已吸附单克隆抗体的微量反应板孔。血清中抗原的检测和例样 10 相同，结果见表 5。

231 个样品中有 220 样品(220/231)在 492nm 波长处光吸收值低于 0.15；另外 11 个样品的 OD 值变化范围为 0.15—0.8，并被判为阳性。与 Halbert 法[Halbert, S. P. et al. Clin. Clim. Acta 1271, 69(1983)]一致，结果判定值(cut—off value)定在 0.15。

有 15 个样品(包括上述 11 个样品)按例 7 相同的过程测定了 KHCV 的抗体。结果见表 6。

用夹心 ELISA 法测定 KHCV897 抗原很有用，并可用于早期测定 KHCV 的感染。同 EIA 测定抗体一道使用，测抗原的 ELISA 用于 HCV 患者的治疗和预防。

表 5：夹心法酶免疫测定确定样品的吸收值

（详见附后的表5）

其中：

注：1)百分率(%)$=\frac{\text{检查样品数}}{\text{总样品数}}$

表 6：C 型肝炎抗体和抗原的检测

（详见附后的表6）

其中：

注：1)抗原诊断的结果判定值定在 0.15 光吸收值，抗体诊断定在 0.33

据此，本发明的 KHCV 蛋白，特别是含有 3 种蛋白的混合抗原比表 1 中所列的已商品化的 HCV 诊断试剂盒对 KHCV 抗体有更强的反应性。本发明所建立的试剂盒比已商品化的试剂盒所获结果的准确度更高的多。像列在表 2 中的那样也比确定结果测完的试剂盒更方便和经济。

本发明涉及的微生物和细胞系，已保藏在 ATCC，另外也保藏在中国典型微生物保藏中心（武汉）(CCTCC)(6 月 9 日 1992)。其中涉及三个个组，即：Saccharomyces cerevisiae DC04 (pYCBC－A/G－UB－KHCV)它包括用 pYLBC－A/G－UB－KHCV4－3 转化的 S. cerevisiae DC04，用 ρYLBC－A/G－UB－CORE14 转化的 S. cerevisiae DC 04，以及用 pYLBC－A/G－UB－E2C 转化的 S. cerevisiae DC 04；大肠杆菌 (E. coli) W3110 (ptrpH－UB－KHCV)，它包括用 ptrpH－UB－KHCV897 转化的大肠杆菌 W3110，用 ptrpH－UB－CORE17 转化的大肠杆菌 W3110，用 ptrpH－UB－CORE14 转化的大肠杆菌 W3110，用 ptrpH－UB－E1 转化的大肠杆菌；用 ptrpH－UB－E2N 转化的大肠杆菌以及用 KHCV－LBC1 转化的大肠杆菌；和含 Lucky1.1 和 Lucky1.2 杂交瘤细胞系的 Lucky1C。

虽然本发明已描述了某些特定的实施例，但本领域技术人员认识到它可进行各种明显的改动和变化，但均落入本发明限定的权利要求的保护范围之内。

表 1

样品号	KHCV 897 抗原蛋白	KIICV UB-CORE 14 抗原蛋白	KHCV 403 抗原蛋白	混合抗原 (三种抗原的)	Ortho HCV 诊断试剂盒
1	++	+++	-	++++	-
2	++++	++++	++	++++	+
3	+	-	-	++	-
4	+	+	-	++	-
5	++++	++++	++++	++++	+
6	++	-	-	+++	-
7	++++	+++	-	++++	+
8	-	++	-	+++	-
9	-	-	+++	++++	-
10	-	+++	-	++++	-
11	++	+	-	+++	-
12	++++	+++	+++	++++	+
13	++	-	-	++	-

表2

样品号	*Ortho* 第2代免疫印迹试剂盒					判定 *	本发明诊断试剂盒 ** (7—B)
	5-1-1	C100-3	C33c	C22-3	SOD		
1**	+/-	+/-	-	-	-	-	-
2	++++	++++	++++	++++	-	+	++++
3	+	+/-	++++	++++	-	+	++++
4	+	++++	++++	+/-	-	+	++++
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+/-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+/-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
Positive Control	++	++++	++++	++	-	+	++++
Negative Control	-	-	-	-	-	-	-

表3

特性 / 单克隆抗体	抗体亚类	分子量	*EIA* 效力	结合位点（氨基酸序列）
Lucky 1.1	IgG1	162,000	x 51,200	1192-1289
Lucky 1.2	IgG1	159,700	x102,400	1371-1407
Lucky 1.3	IgG1	180,800	x 51,200	1371-1407
Lucky 1.4	IgG1	177,700	x 400	1371-1407

表4

抗体 / 抗原	Lucky 1.1	Lucky 1.2	Lucky 1.3	Lucky 1.4
KHCV 897	+	+	+	+
KHCV 290	+	-	-	-
KHCV 430	+	-	-	-
KHCV 570	+	-	-	-
KHCV 652	+	-	-	-
KHCV 150	-	-	-	-
KHCV 257	-	+	+	+
KHCV 518	-	+	+	+
Negative Control	-	-	-	-
氨基酸序列识别位点	1192-1289	1371-1407	1371-1407	1371-1407

表5

光吸收值	样品数	百分数[1)]
>= 0.5	1	0.43
0.3 - 0.5	3	1.30
0.2 - 0.3	4	1.73
0.15 - 0.2	3	1.30
< 0.15	220	95.24
总计	231	100.00

表6

样品	C型肝炎的抗体	C型肝炎的抗原
1	-	+
2	-	+
3	-	-
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	-
8	+	-
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-	+
13	-	+
14	+	+
15	-	-

说 明 书 附 图

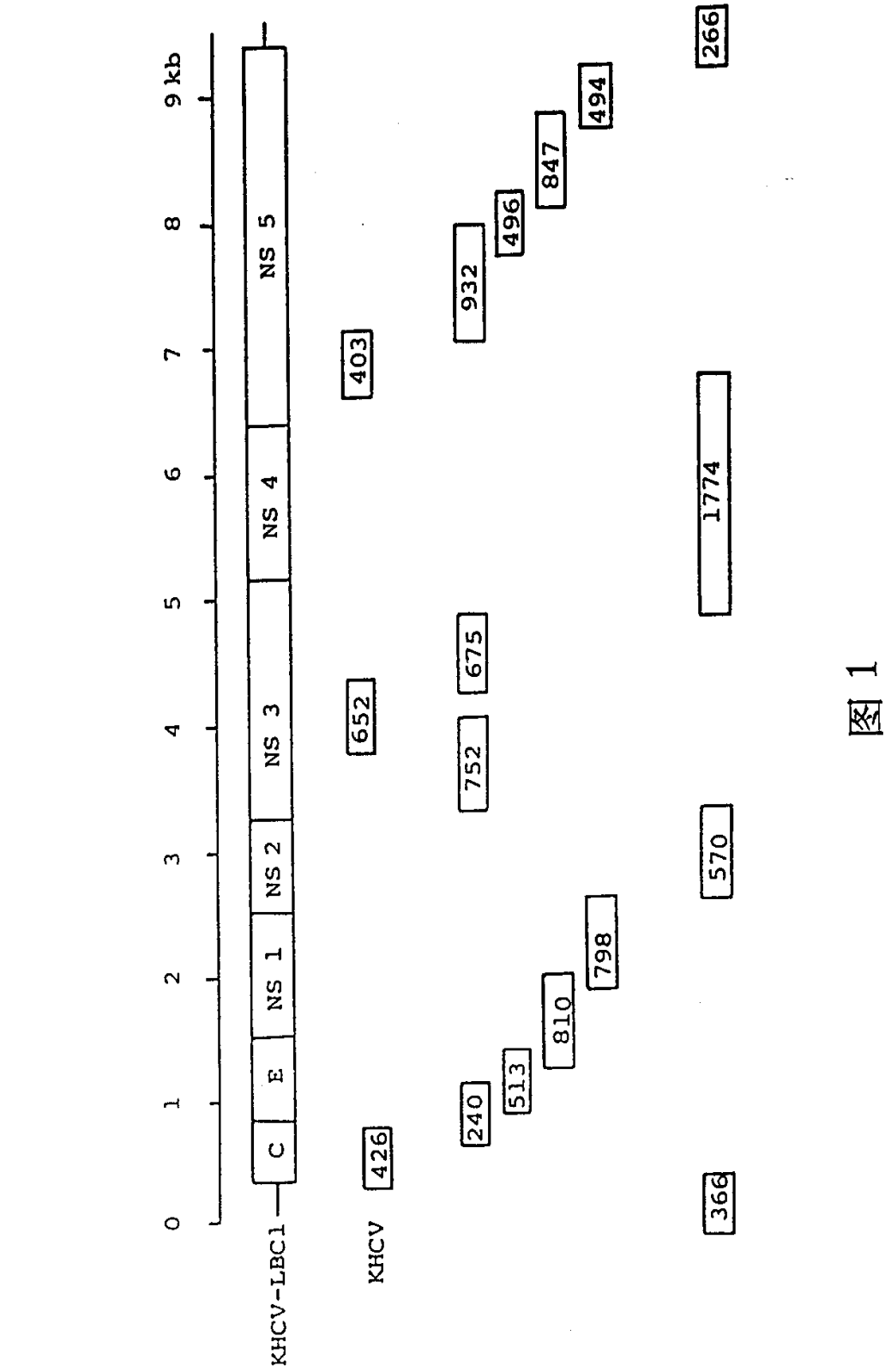

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9 kb
KHCV-LBC1
C
E
NS 1
NS 2
NS 3
NS 4
NS 5
KHCV
426
403
652
240
513
752
675
810
798
932
496
847
494
570
1774
366
266

图 1

```
        10         20         30         40         50         60
TGCCAGCCCCCGATTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACT
ACGGTCGGGGGCTAACCCCCGCTGTGAGGTGGTATCTAGTGAGGGGACACTCCTTGATGA

        70         80         90        100        110        120
GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA
CAGAAGTGCGTCTTTCGCAGATCGGTACCGCAATCATACTCACAGCACGTCGGAGGTCCT

       130        140        150        160        170        180
CCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA
GGGGGGGAGGGCCCTCTCGGTATCACCAGACGCCTTGGCCACTCATGTGGCCTTAACGGT

       190        200        210        220        230        240
GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC
CCTGCTGGCCCAGGAAAGAACCTAGTTGGGCGAGTTACGGACCTCTAAACCCGCACGGGG

       250        260        270        280        290        300
CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG
GCGCTCTGACGATCGGCTCATCACAACCCAGCGCTTTCCGGAACACCATGACGGACTATC

       310        320        330        340        350        360
GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA
CCACGAACGCTCACGGGGCCCTCCAGAGCATCTGGCACGTGGTACTCGTGCTTAGGATTT
                                              M  S  T  N  P  K

       370        380        390        400        410        420
CCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCCACAGGATATTAAGTTCCCGGGC
GGAGTTTCTTTTTGGTTTGCATTGTGGTTGGCGGCGGGTGTCCTATAATTCAAGGGCCCG
 P  Q  R  K  T  K  R  N  T  N  R  R  P  Q  D  I  K  F  P  G

       430        440        450        460        470        480
GGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACTTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTG
CCACCAGTCTAGCAACCACCTCAAATGAACAACGGCGCGTCCCCGGGGTCCAACCCACAC
 G  G  Q  I  V  G  G  V  Y  L  L  P  R  R  G  P  R  L  G  V

       490        500        510        520        530        540
CGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGTGGAAGGCGACAGCCTATCCCC
GCGCGCTGATCCTTCTGAAGGCTCGCCAGCGTTGGAGCACCTTCCGCTGTCGGATAGGGG
 R  A  T  R  K  T  S  E  R  S  Q  P  R  G  R  R  Q  P  I  P

       550        560        570        580        590        600
AAGGCTCGCCGGCCCGAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCTCTAT
TTCCGAGCGGCCGGGCTCCCGTCCCGGACCCGAGTCGGGCCCATGGGAACCGGGGAGATA
 K  A  R  R  P  E  G  R  A  W  A  Q  P  G  Y  P  W  P  L  Y
```

图 2-1

```
      610       620       630       640       650       660
GGCAATGAGGGCTTGGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTCACCCCGCGGCTCCCGGCCTAGT
CCGTTACTCCCGAACCCCACCCGTCCTACCGAGGACAGTGGGGCGCCGAGGGCCGGATCA
 G  N  E  G  L  G  W  A  G  W  L  L  S  P  R  G  S  R  P  S

      670       680       690       700       710       720
TGGGGCCCCACGGACCCCCGGCGTAAGTCGCGTAATTTGGGTAAGGTCATCGACACCCTC
ACCCCGGGGTGCCTGGGGGCCGCATTCAGCGCATTAAACCCATTCCAGTAGCTGTGGGAG
 W  G  P  T  D  P  R  R  K  S  R  N  L  G  K  V  I  D  T  L

      730       740       750       760       770       780
ACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGC
TGTACGCCGAAGCGGCTGGAGTACCCCATGTAAGGCGAGCAGCCGCGGGGGGATCCCCCG
 T  C  G  F  A  D  L  M  G  Y  I  P  L  V  G  A  P  L  G  G

      790       800       810       820       830       840
GTTGCCAGGGCCCTGGCACATGGTGTCCGGGTGCTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACA
CAACGGTCCCGGGACCGTGTACCACAGGCCCACGACCTCCTGCCGCACTTGATACGTTGT
 V  A  R  A  L  A  H  G  V  R  V  L  E  D  G  V  N  Y  A  T

      850       860       870       880       890       900
GGGAATCTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTCTGCTGTCTTGTTTGACC
CCCTTAGACGGGCCAACGAGAAAGAGATAGAAGGAGAACCGAGACGACAGAACAAACTGG
 G  N  L  P  G  C  S  F  S  I  F  L  L  A  L  L  S  C  L  T

      910       920       930       940       950       960
ACCCCAGTTTCCGCTTATGAAGTGCGTAACGCGTCCGGGATGTACCATGTCACGAACGAC
TGGGGTCAAAGGCGAATACTTCACGCATTGCGCAGGCCCTACATGGTACAGTGCTTGCTG
 T  P  V  S  A  Y  E  V  R  N  A  S  G  M  Y  H  V  T  N  D

      970       980       990      1000      1010      1020
TGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACTCCCGGGTGC
ACGAGGTTGAGTTCGTAACACATACTCCGTCGCCTGTACTAGTACGTGTGAGGGCCCACG
 C  S  N  S  S  I  V  Y  E  A  A  D  M  I  M  H  T  P  G  C

     1030      1040      1050      1060      1070      1080
GTGCCCTGCGTTCGGGAGGACAACTCCTCCCGTTGCTGGGTGGCACTTACTCCCACGCTC
CACGGGACGCAAGCCCTCCTGTTGAGGAGGGCAACGACCCACCGTGAATGAGGGTGCGAG
 V  P  C  V  R  E  D  N  S  S  R  C  W  V  A  L  T  P  T  L

     1090      1100      1110      1120      1130      1140
GCGGCCAGGAATGCCAGCGTCCCCACTACGACATTGCGACGCCATGTCGACTTGCTCGTT
CGCCGGTCCTTACGGTCGCAGGGGTGATGCTGTAACGCTGCGGTACAGCTGAACGAGCAA
 A  A  R  N  A  S  V  P  T  T  T  L  R  R  H  V  D  L  L  V

     1150      1160      1170      1180      1190      1200
GGGGTAGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGACCTCTGCGGATCTGTTTTCCTT
CCCCATCGACGAAAGACAAGGCGATACATGCACCCCCTGGAGACGCCTAGACAAAAGGAA
 G  V  A  A  F  C  S  A  M  Y  V  G  D  L  C  G  S  V  F  L
```

图 2-2

```
      1210       1220       1230       1240       1250       1260
GTTTCCCAGCTGTTCACCTTTTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTACAGGACTGCAACTGC
CAAAGGGTCGACAAGTGGAAAAGCGGAGCGGCCGTACTCTGCCATGTCCTGACGTTGACG
 V  S  Q  L  F  T  F  S  P  R  R  H  E  T  V  Q  D  C  N  C

      1270       1280       1290       1300       1310       1320
TCAATCTATCCCGGCCGCGTATCAGGTCACCGCATGGCCTGGGATATGATGATGAACTGG
AGTTAGATAGGGCCGGCGCATAGTCCAGTGGCGTACCGGACCCTATACTACTACTTGACC
 S  I  Y  P  G  R  V  S  G  H  R  M  A  W  D  M  M  M  N  W

      1330       1340       1350       1360       1370       1380
TCGCCTACAACAGCCCTAGTGGTATCGCAGCTACTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGAC
AGCGGATGTTGTCGGGATCACCATAGCGTCGATGAGGCCTAGGGTGTTCGACAGCACCTG
 S  P  T  T  A  L  V  V  S  Q  L  L  R  I  P  Q  A  V  V  D

      1390       1400       1410       1420       1430       1440
ATGGTGACAGGGTCCCACTGGGGAATCCTGGCGGGCCTTGCCTACTATTCCATGGTGGGG
TACCACTGTCCCAGGGTGACCCCTTAGGACCGCCCGGAACGGATGATAAGGTACCACCCC
 M  V  T  G  S  H  W  G  I  L  A  G  L  A  Y  Y  S  M  V  G

      1450       1460       1470       1480       1490       1500
AACTGGGCTAAGGTCTTAATTGCGATGCTACTCTTTGCCGGCGTTGACGGAACCACCCAC
TTGACCCGATTCCAGAATTAACGCTACGATGAGAAACGGCCGCAACTGCCTTGGTGGGTG
 N  W  A  K  V  L  I  A  M  L  L  F  A  G  V  D  G  T  T  H

      1510       1520       1530       1540       1550       1560
GTGACAGGGGGGGCGCAAGGTCGGGCCGCTAGCTCGCTAACGTCCCTCTTTAGCCCTGGG
CACTGTCCCCCCCGCGTTCCAGCCCGGCGATCGAGCGATTGCAGGGAGAAATCGGGACCC
 V  T  G  G  A  Q  G  R  A  A  S  S  L  T  S  L  F  S  P  G

      1570       1580       1590       1600       1610       1620
CCGGTTCAGCACCTCCAGCTCATAAACACCAACGGCAGCTGGCATATCAACAGGACCGCC
GGCCAAGTCGTGGAGGTCGAGTATTTGTGGTTGCCGTCGACCGTATAGTTGTCCTGGCGG
 P  V  Q  H  L  Q  L  I  N  T  N  G  S  W  H  I  N  R  T  A

      1630       1640       1650       1660       1670       1680
CTGAGCTGCAATGACTCCCTCAACACTGGGTTTGTTGCCGCGCTGTTCTACAAATACAGG
GACTCGACGTTACTGAGGGAGTTGTGACCCAAACAACGGCGCGACAAGATGTTTATGTCC
 L  S  C  N  D  S  L  N  T  G  F  V  A  A  L  F  Y  K  Y  R

      1690       1700       1710       1720       1730       1740
TTCAACGCGTCCGGGTGCCCGGAGCGCTTGGCCACGTGCCGCCCCATTGATACATTCGCG
AAGTTGCGCAGGCCCACGGGCCTCGCGAACCGGTGCACGGCGGGGTAACTATGTAAGCGC
 F  N  A  S  G  C  P  E  R  L  A  T  C  R  P  I  D  T  F  A

      1750       1760       1770       1780       1790       1800
CAGGGGTGGGGTCCCATCACTTACACTGAGCCTCATGATTTGGATCAGAGGCCCTATTGC
GTCCCCACCCCAGGGTAGTGAATGTGACTCGGAGTACTAAACCTAGTCTCCGGGATAACG
 Q  G  W  G  P  I  T  Y  T  E  P  H  D  L  D  Q  R  P  Y  C
```

图 2-3

```
      1810       1820       1830       1840       1850       1860
TGGCACTACGCGCCTCAACCGTGTGGTATTGTGCCCACGTTGCAGGTGTGTGGCCCAGTA
ACCGTGATGCGCGGAGTTGGCACACCATAACACGGGTGCAACGTCCACACACCGGGTCAT
 W  H  Y  A  P  Q  P  C  G  I  V  P  T  L  Q  V  C  G  P  V

      1870       1880       1890       1900       1910       1920
TACTGCTTCACCCCGAGTCCTGTTGCGGTGGGGACTACCGATCGTTTCGGTGCCCCTACA
ATGACGAAGTGGGGCTCAGGACAACGCCACCCCTGATGGCTAGCAAAGCCACGGGGATGT
 Y  C  F  T  P  S  P  V  A  V  G  T  T  D  R  F  G  A  P  T

      1930       1940       1950       1960       1970       1980
TACAGATGGGGGGCAAATGAGACGGACGTGCTGCTCCTTAACAACGCCGGGCCGCCGCAA
ATGTCTACCCCCCGTTTACTCTGCCTGCACGACGAGGAATTGTTGCGGCCCGGCGGCGTT
 Y  R  W  G  A  N  E  T  D  V  L  L  L  N  N  A  G  P  P  Q

      1990       2000       2010       2020       2030       2040
GGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTCACCAAGACATGTGGGGGC
CCGTTGACCAAGCCGACATGTACCTACTTACCGTGACCCAAGTGGTTCTGTACACCCCCG
 G  N  W  F  G  C  T  W  M  N  G  T  G  F  T  K  T  C  G  G

      2050       2060       2070       2080       2090       2100
CCCCCGTGTAACATCGGGGGGGTCGGCAACAATACCTTGACCTGCCCCACGGACTGCTTC
GGGGGCACATTGTAGCCCCCCCAGCCGTTGTTATGGAACTGGACGGGGTGCCTGACGAAG
 P  P  C  N  I  G  G  V  G  N  N  T  L  T  C  P  T  D  C  F

      2110       2120       2130       2140       2150       2160
CGAAAGCACCCCGGGGCCACTTACACCAAATGCGGTTCGGGGCCTTGGTTAACACCCAGG
GCTTTCGTGGGGCCCCGGTGAATGTGGTTTACGCCAAGCCCCGGAACCAATTGTGGGTCC
 R  K  H  P  G  A  T  Y  T  K  C  G  S  G  P  W  L  T  P  R

      2170       2180       2190       2200       2210       2220
TGCTTAGTCGACTACCCGTACAGGCTCTGGCATTACCCCTGCACTGTCAACTTTACCATC
ACGAATCAGCTGATGGGCATGTCCGAGACCGTAATGGGGACGTGACAGTTGAAATGGTAG
 C  L  V  D  Y  P  Y  R  L  W  H  Y  P  C  T  V  N  F  T  I

      2230       2240       2250       2260       2270       2280
TTTAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGCGGAGCACAGGCTCGACGCCGCATGCAACTGG
AAATTCCAATCCTACATGCACCCCCCGCGCCTCGTGTCCGAGCTGCGGCGTACGTTGACC
 F  K  V  R  M  Y  V  G  G  A  E  H  R  L  D  A  A  C  N  W

      2290       2300       2310       2320       2330       2340
ACTCGGGGAGAGCGTTGTGACCTGGAGGACAGGGATAGGTCAGAGCTTAGCCCGCTGCTG
TGAGCCCCTCTCGCAACACTGGACCTCCTGTCCCTATCCAGTCTCGAATCGGGCGACGAC
 T  R  G  E  R  C  D  L  E  D  R  D  R  S  E  L  S  P  L  L

      2350       2360       2370       2380       2390       2400
CTGTCTACAACAGAGTGGCAGGTACTGCCCTGTTCCTTCACAACCCTACCGGCTCTGTCC
GACAGATGTTGTCTCACCGTCCATGACGGGACAAGGAAGTGTTGGGATGGCCGAGACAGG
 L  S  T  T  E  W  Q  V  L  P  C  S  F  T  T  L  P  A  L  S
```

图 2-4

```
      2410       2420       2430       2440       2450       2460
ACTGGTTTGATTCATCTCCATCAGAACATCGTGGACATACAATACCTGTACGGTATAGGG
TGACCAAACTAAGTAGAGGTAGTCTTGTAGCACCTGTATGTTATGGACATGCCATATCCC
  T   G   L   I   H   L   H   Q   N   I   V   D   I   Q   Y   L   Y   G   I   G

      2470       2480       2490       2500       2510       2520
TCGGCGGTTGTCTCCTTTGCGATCAAATGGGAGTATATTGTGCTGCTCTTCCTTCTTCTG
AGCCGCCAACAGAGGAAACGCTAGTTTACCCTCATATAACACGACGAGAAGGAAGAAGAC
  S   A   V   V   S   F   A   I   K   W   E   Y   I   V   L   L   F   L   L   L

      2530       2540       2550       2560       2570       2580
GCGGACGCGCGCGTCTGCGCTTGCTTGTGGATGATGCTGCTGGTAGCGCAAGCCGAGGCC
CGCCTGCGCGCGCAGACGCGAACGAACACCTACTACGACGACCATCGCGTTCGGCTCCGG
  A   D   A   R   V   C   A   C   L   W   M   M   L   L   V   A   Q   A   E   A

      2590       2600       2610       2620       2630       2640
GCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCTCAATGCAGCGTCCGTGGCCGGAGCGCATGGCATTCTT
CGGAATCTCTTGGACCACCAGGAGTTACGTCGCAGGCACCGGCCTCGCGTACCGTAAGAA
  A   L   E   N   L   V   V   L   N   A   A   S   V   A   G   A   H   G   I   L

      2650       2660       2670       2680       2690       2700
TCCTTCATTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTTCCCGGAGCG
AGGAAGTAACACAAGAAGACACGACGGACCATGTAGTTCCCGTCCGACCAAGGGCCTCGC
  S   F   I   V   F   F   C   A   A   W   Y   I   K   G   R   L   V   P   G   A

      2710       2720       2730       2740       2750       2760
GCATACGCCCTCTATGGCGTATGGCCGCTGCTTCTGCTTCTGCTGGCGTTACCACCACGG
CGTATGCGGGAGATACCGCATACCGGCGACGAAGACGAAGACGACCGCAATGGTGGTGCC
  A   Y   A   L   Y   G   V   W   P   L   L   L   L   L   L   A   L   P   P   R

      2770       2780       2790       2800       2810       2820
GCGTACGCCATGGACCGGGAGATGGCCGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTAGGTCTG
CGCATGCGGTACCTGGCCCTCTACCGGCGTAGCACGCCTCCGCGCCAAAAACATCCAGAC
  A   Y   A   M   D   R   E   M   A   A   S   C   G   G   A   V   F   V   G   L

      2830       2840       2850       2860       2870       2880
GTACTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCATATGGTGGCTA
CATGAGAACTGGAACAGTGGTGTGATATTTCACAAGGAACGGTCCAAGTATACCACCGAT
  V   L   L   T   L   S   P   H   Y   K   V   F   L   A   R   F   I   W   W   L

      2890       2900       2910       2920       2930       2940
CAATATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTT
GTTATAGAGTAGTGGTCTTGGCTTCGCGTAGACGTTCACACCCAGGGGGGAGAGTTGCAA
  Q   Y   L   I   T   R   T   E   A   H   L   Q   V   W   V   P   P   L   N   V

      2950       2960       2970       2980       2990       3000
CGGGGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTT
GCCCCCCCAGCGCTACGGTAGTAGGAGGAGTGTACGCACCAGGTGGGTCTCGATTAGAAA
  R   G   G   R   D   A   I   I   L   L   T   C   V   V   H   P   E   L   I   F
```

图 2-5

```
    3010      3020      3030      3040      3050      3060
GACATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATA
CTGTAGTGTTTTATAAACGAGCGGTATAAGCCGGGCGAGTACCACGAGGTCCGGCCGTAT
 D  I  T  K  Y  L  L  A  I  F  G  P  L  M  V  L  Q  A  G  I

    3070      3080      3090      3100      3110      3120
ACTAGAGTGCCGTACTTCGTGCGCGCACAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGG
TGATCTCACGGCATGAAGCACGCGCGTGTTCCCGAGTAAGCACGTACGTACAACCGCGCC
 T  R  V  P  Y  F  V  R  A  Q  G  L  I  R  A  C  M  L  A  R

    3130      3140      3150      3160      3170      3180
AAAGTCGTGGGGGGTCATTACGTCCAAATGGTCTTCATGAAGCTGGCCGCACTAGCAGGT
TTTCAGCACCCCCCAGTAATGCAGGTTTACCAGAAGTACTTCGACCGGCGTGATCGTCCA
 K  V  V  G  G  H  Y  V  Q  M  V  F  M  K  L  A  A  L  A  G

    3190      3200      3210      3220      3230      3240
ACGTACGTTTATGACCATCTTACTCCACTGCGAGATTGGGCTCACACGGGCTTACGAGAC
TGCATGCAAATACTGGTAGAATGAGGTGACGCTCTAACCCGAGTGTGCCCGAATGCTCTG
 T  Y  V  Y  D  H  L  T  P  L  R  D  W  A  H  T  G  L  R  D

    3250      3260      3270      3280      3290      3300
CTTGCAGTGGCAGTAGAGCCCGTTGTCTTCTCTGACATGGAGACCAAAGTCATCACCTGG
GAACGTCACCGTCATCTCGGGCAACAGAAGAGACTGTACCTCTGGTTTCAGTAGTGGACC
 L  A  V  A  V  E  P  V  V  F  S  D  M  E  T  K  V  I  T  W

    3310      3320      3330      3340      3350      3360
GGGGCAGACACCGCGGCGTGCGGGGACATCATCTTGGCCCTGCCTGCTTCCGCCCGAAGG
CCCCGTCTGTGGCGCCGCACGCCCCTGTAGTAGAACCGGGACGGACGAAGGCGGGCTTCC
 G  A  D  T  A  A  C  G  D  I  I  L  A  L  P  A  S  A  R  R

    3370      3380      3390      3400      3410      3420
GGGAAGGAGATACTTCTGGGACCGGCCGATAGTCTTGAAGGACAGGGGTGGCGACTCCTT
CCCTTCCTCTATGAAGACCCTGGCCGGCTATCAGAACTTCCTGTCCCCACCGCTGAGGAA
 G  K  E  I  L  L  G  P  A  D  S  L  E  G  Q  G  W  R  L  L

    3430      3440      3450      3460      3470      3480
GCGCCCATCACGGCCTACTCCCAACAAACGCGAGGCCTGCTTGGTTGCATCATCACTAGC
CGCGGGTAGTGCCGGATGAGGGTTGTTTGCGCTCCGGACGAACCAACGTAGTAGTGATCG
 A  P  I  T  A  Y  S  Q  Q  T  R  G  L  L  G  C  I  I  T  S

    3490      3500      3510      3520      3530      3540
CTTACAGGCCGGGACAAGAACCAGGTTGAGGGGGAGGTTCAAGTGGTTTCCACCGCAACA
GAATGTCCGGCCCTGTTCTTGGTCCAACTCCCCCTCCAAGTTCACCAAAGGTGGCGTTGT
 L  T  G  R  D  K  N  Q  V  E  G  E  V  Q  V  V  S  T  A  T

    3550      3560      3570      3580      3590      3600
CAATCTTTCCTGGCGACCTGCATCAATGGCGTGTGTTGGACTGTCTTCCACGGCGCCGGC
GTTAGAAAGGACCGCTGGACGTAGTTACCGCACACAACCTGACAGAAGGTGCCGCGGCCG
 Q  S  F  L  A  T  C  I  N  G  V  C  W  T  V  F  H  G  A  G
```

图 2-6

```
      3610       3620       3630       3640       3650       3660
TCAAAGACCCTAGCCGGCCCAAAGGGTCCAATCACCCAAATGTACACCAATGTAGACCAG
AGTTTCTGGGATCGGCCGGGTTTCCCAGGTTAGTGGGTTTACATGTGGTTACATCTGGTC
 S  K  T  L  A  G  P  K  G  P  I  T  Q  M  Y  T  N  V  D  Q

      3670       3680       3690       3700       3710       3720
GACCTTGTTGGCTGGCCGGCACCTCCTGGGGCGCGTTCCCTGACACCATGCACTTGCGGC
CTGGAACAACCGACCGGCCGTGGAGGACCCCGCGCAAGGGACTGTGGTACGTGAACGCCG
 D  L  V  G  W  P  A  P  P  G  A  R  S  L  T  P  C  T  C  G

      3730       3740       3750       3760       3770       3780
TCCTCGGACCTTTACCTGGTCACGAGACATGCTGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGGGT
AGGAGCCTGGAAATGGACCAGTGCTCTGTACGACTACAGTAAGGCCACGCGGCCGCCCCA
 S  S  D  L  Y  L  V  T  R  H  A  D  V  I  P  V  R  R  R  G

      3790       3800       3810       3820       3830       3840
GACGGTAGGGGGAGCCTACTCCCCCCCAGGCCTGTCTCCTACTTGAAGGGCTCCTCGGGT
CTGCCATCCCCCTCGGATGAGGGGGGGTCCGGACAGAGGATGAACTTCCCGAGGAGCCCA
 D  G  R  G  S  L  L  P  P  R  P  V  S  Y  L  K  G  S  S  G

      3850       3860       3870       3880       3890       3900
GGTCCACTGCTCTGCCCTTCGGGGCACGCTGTCGGCATACTTCCGGCTGCTGTATGCACC
CCAGGTGACGAGACGGGAAGCCCCGTGCGACAGCCGTATGAAGGCCGACGACATACGTGG
 G  P  L  L  C  P  S  G  H  A  V  G  I  L  P  A  A  V  C  T

      3910       3920       3930       3940       3950       3960
CGGGGGGTTGCCATGGCGGTGGAATTCATACCCGTTGAGTCTATGGAAACTACTATGCGG
GCCCCCCAACGGTACCGCCACCTTAAGTATGGGCAACTCAGATACCTTTGATGATACGCC
 R  G  V  A  M  A  V  E  F  I  P  V  E  S  M  E  T  T  M  R

      3970       3980       3990       4000       4010       4020
TCTCCGGTCTTCACGGACAATCCGTCTCCCCCGGCTGTACCGCAGACATTCCAAGTGGCC
AGAGGCCAGAAGTGCCTGTTAGGCAGAGGGGGCCGACATGGCGTCTGTAAGGTTCACCGG
 S  P  V  F  T  D  N  P  S  P  P  A  V  P  Q  T  F  Q  V  A

      4030       4040       4050       4060       4070       4080
CACTTACACGCTCCCACCGGCAGCGGCAAGAGCACTAGGGTGCCGGCTGCATATGCAGCC
GTGAATGTGCGAGGGTGGCCGTCGCCGTTCTCGTGATCCCACGGCCGACGTATACGTCGG
 H  L  H  A  P  T  G  S  G  K  S  T  R  V  P  A  A  Y  A  A

      4090       4100       4110       4120       4130       4140
CAAGGGTACAAGGTGCTCGTCCTAAATCCGTCCGTCGCCGCCACCTTGGGTTTTGGGGCG
GTTCCCATGTTCCACGAGCAGGATTTAGGCAGGCAGCGGCGGTGGAACCCAAAACCCCGC
 Q  G  Y  K  V  L  V  L  N  P  S  V  A  A  T  L  G  F  G  A

      4150       4160       4170       4180       4190       4200
TATATGTCCAAGGCACATGGTATCGACCCCAACCTTAGAACTGGGGTAAGGACCATCACC
ATATACAGGTTCCGTGTACCATAGCTGGGGTTGGAATCTTGACCCCATTCCTGGTAGTGG
 Y  M  S  K  A  H  G  I  D  P  N  L  R  T  G  V  R  T  I  T
```

图 2-7

```
      4210       4220       4230       4240       4250       4260
ACAGGTGCCCCTATCACATACTCCACCTATGGCAAGTTCCTTGCCGACGGTGGCGGCTCC
TGTCCACGGGGATAGTGTATGAGGTGGATACCGTTCAAGGAACGGCTGCCACCGCCGAGG
 T  G  A  P  I  T  Y  S  T  Y  G  K  F  L  A  D  G  G  G  S

      4270       4280       4290       4300       4310       4320
GGGGGCGCCTATGACATCATAATGTGTGATGAGTGCCACTCAACTGACTCGACTACCATT
CCCCCGCGGATACTGTAGTATTACACACTACTCACGGTGAGTTGACTGAGCTGATGGTAA
 G  G  A  Y  D  I  I  M  C  D  E  C  H  S  T  D  S  T  T  I

      4330       4340       4350       4360       4370       4380
TATGGCATCGGCACAGTCCTGGACCAAGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTCGTGGTGCTC
ATACCGTAGCCGTGTCAGGACCTGGTTCGCCTCTGCCGACCTCGCGCCGAGCACCACGAG
 Y  G  I  G  T  V  L  D  Q  A  E  T  A  G  A  R  L  V  V  L

      4390       4400       4410       4420       4430       4440
TCCACCGCTACGCCTCCGGGATCGGTCACCGTGCCACACCTCAATATCGAGGAGGTGGCC
AGGTGGCGATGCGGAGGCCCTAGCCAGTGGCACGGTGTGGAGTTATAGCTCCTCCACCGG
 S  T  A  T  P  P  G  S  V  T  V  P  H  L  N  I  E  E  V  A

      4450       4460       4470       4480       4490       4500
CTGTCTAATACTGGAGAGATCCCCTTCTACGGCAAAGCCATTCCCATCGAGGCTATCAAG
GACAGATTATGACCTCTCTAGGGGAAGATGCCGTTTCGGTAAGGGTAGCTCCGATAGTTC
 L  S  N  T  G  E  I  P  F  Y  G  K  A  I  P  I  E  A  I  K

      4510       4520       4530       4540       4550       4560
GGGGGAAGGCATCTCATTTTCTGCCATTCCAAGAAGAAGTGTGACGAACTCGCCGCAAAG
CCCCCTTCCGTAGAGTAAAAGACGGTAAGGTTCTTCTTCACACTGCTTGAGCGGCGTTTC
 G  G  R  H  L  I  F  C  H  S  K  K  K  C  D  E  L  A  A  K

      4570       4580       4590       4600       4610       4620
CTGTCAGGCCTCGGACTCAATGCCGTAGCGTATTACCGGGGTCTTGACGTGTCCGTCATA
GACAGTCCGGAGCCTGAGTTACGGCATCGCATAATGGCCCCAGAACTGCACAGGCAGTAT
 L  S  G  L  G  L  N  A  V  A  Y  Y  R  G  L  D  V  S  V  I

      4630       4640       4650       4660       4670       4680
CCGACCAGCGGAGACGTTGTTGTCGTGGCGACGGACGCTCTAATGACGGGCTTTACCGGC
GGCTGGTCGCCTCTGCAACAACAGCACCGCTGCCTGCGAGATTACTGCCCGAAATGGCCG
 P  T  S  G  D  V  V  V  V  A  T  D  A  L  M  T  G  F  T  G

      4690       4700       4710       4720       4730       4740
GACTTTGACTCAGTGATCGACTGTAATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGATTTCAGCTTG
CTGAAACTGAGTCACTAGCTGACATTATGCACACAGTGGGTCTGTCAGCTAAAGTCGAAC
 D  F  D  S  V  I  D  C  N  T  C  V  T  Q  T  V  D  F  S  L

      4750       4760       4770       4780       4790       4800
GACCCCACCTTCACCATTGAGACGACGACCGTGCCCCAAGACGCAGTGTCGCGCTCGCAG
CTGGGGTGGAAGTGGTAACTCTGCTGCTGGCACGGGGTTCTGCGTCACAGCGCGAGCGTC
 D  P  T  F  T  I  E  T  T  T  V  P  Q  D  A  V  S  R  S  Q
```

图 2-8

```
      4810       4820       4830       4840       4850       4860
AGGCGAGGCAGGACTGGTAGGGGCAGGGCTGGCATATACAGGTTTGTGACTCCAGGAGAA
TCCGCTCCGTCCTGACCATCCCCGTCCCGACCGTATATGTCCAAACACTGAGGTCCTCTT
 R  R  G  R  T  G  R  G  R  A  G  I  Y  R  F  V  T  P  G  E

      4870       4880       4890       4900       4910       4920
CGGCCCTCGGGCATGTTCGATTCTTCGGTCCTGTGTGAGTGTTATGACGCGGGTTGTGCG
GCCGGGAGCCCGTACAAGCTAAGAAGCCAGGACACACTCACAATACTGCGCCCAACACGC
 R  P  S  G  M  F  D  S  S  V  L  C  E  C  Y  D  A  G  C  A

      4930       4940       4950       4960       4970       4980
TGGTACGAACTCACGCCCGCTGAGACCTCGGTTAGGTTGCGGGCGTACCTAAACACACCA
ACCATGCTTGAGTGCGGGCGACTCTGGAGCCAATCCAACGCCCGCATGGATTTGTGTGGT
 W  Y  E  L  T  P  A  E  T  S  V  R  L  R  A  Y  L  N  T  P

      4990       5000       5010       5020       5030       5040
GGGTTGCCCGTCTGCCAGGACCATCTGGAGTTCTCGGAGGGTGTCTTCACAGGCCTCACC
CCCAACGGGCAGACGGTCCTGGTAGACCTCAAGAGCCTCCCACAGAAGTGTCCGGAGTGG
 G  L  P  V  C  Q  D  H  L  E  F  S  E  G  V  F  T  G  L  T

      5050       5060       5070       5080       5090       5100
CACATAGATGCCCACTTCTTATCCCAGACTAAACAGGCAGGAGAGAACTTCCCCTACTTG
GTGTATCTACGGGTGAAGAATAGGGTCTGATTTGTCCGTCCTCTCTTGAAGGGGATGAAC
 H  I  D  A  H  F  L  S  Q  T  K  Q  A  G  E  N  F  P  Y  L

      5110       5120       5130       5140       5150       5160
GTAGCATACCAGGCTACAGTGTGCGCCAGGGCTCAAGCCCCACCTCCATCGTGGGATGAA
CATCGTATGGTCCGATGTCACACGCGGTCCCGAGTTCGGGGGTGGAGGTAGCACCCTACTT
 V  A  Y  Q  A  T  V  C  A  R  A  Q  A  P  P  P  S  W  D  E

      5170       5180       5190       5200       5210       5220
ATGTGGAGGTGTCTCATACGGCTGAAACCTACGCTGCACGGGCCAACACCCCTGCTGTAT
TACACCTCCACAGAGTATGCCGACTTTGGATGCGACGTGCCCGGTTGTGGGGACGACATA
 M  W  R  C  L  I  R  L  K  P  T  L  H  G  P  T  P  L  L  Y

      5230       5240       5250       5260       5270       5280
AGGTTAGGAGCCGTCCAAAATGAGGTCACCCTCACACACCCCATAACCAAATTCATCATG
TCCAATCCTCGGCAGGTTTTACTCCAGTGGGAGTGTGTGGGGTATTGGTTTAAGTAGTAC
 R  L  G  A  V  Q  N  E  V  T  L  T  H  P  I  T  K  F  I  M

      5290       5300       5310       5320       5330       5340
ACATGTATGTCGGCTGACCTGGAGGTCGTCACCAGCACCTGGGTGCTGGTAGGCGGAGTC
TGTACATACAGCCGACTGGACCTCCAGCAGTGGTCGTGGACCCACGACCATCCGCCTCAG
 T  C  M  S  A  D  L  E  V  V  T  S  T  W  V  L  V  G  G  V

      5350       5360       5370       5380       5390       5400
CTCGCAGCTCTGGCCGCGTACTGCCTGACAACAGGCAGCGTGGTCATTGTGGGCAGGATC
GAGCGTCGAGACCGGCGCATGACGGACTGTTGTCCGTCGCACCAGTAACACCCGTCCTAG
 L  A  A  L  A  A  Y  C  L  T  T  G  S  V  V  I  V  G  R  I
```

图 2-9

```
      5410       5420       5430       5440       5450       5460
ATCCTGTCCGGGAAGCCGGCTATCATCCCCGATAGGGAAGTTCTCTACCAGGAGTTCGAC
TAGGACAGGCCCTTCGGCCGATAGTAGGGGCTATCCCTTCAAGAGATGGTCCTCAAGCTG
  I  L  S  G  K  P  A  I  I  P  D  R  E  V  L  Y  Q  E  F  D

      5470       5480       5490       5500       5510       5520
GAGATGGAGGAGTGTGCCTCACACCTCCCTTACTTCGAACAGGGAATGCAGCTCGCCGAG
CTCTACCTCCTCACACGGAGTGTGGAGGGAATGAAGCTTGTCCCTTACGTCGAGCGGCTC
  E  M  E  E  C  A  S  H  L  P  Y  F  E  Q  G  M  Q  L  A  E

      5530       5540       5550       5560       5570       5580
CAATTCAAACAGAAGGCGCTCGGGTTGCTGCAAACAGCCACCAAGCAGGCGGAGGCTGCT
GTTAAGTTTGTCTTCCGCGAGCCCAACGACGTTTGTCGGTGGTTCGTCCGCCTCCGACGA
  Q  F  K  Q  K  A  L  G  L  L  Q  T  A  T  K  Q  A  E  A  A

      5590       5600       5610       5620       5630       5640
GCTCCCGTGGTGGAGTCCAAGTGGCGAGCCCTTGAGACCTTCTGGGCGAAGCACATGTGG
CGAGGGCACCACCTCAGGTTCACCGCTCGGGAACTCTGGAAGACCCGCTTCGTGTACACC
  A  P  V  V  E  S  K  W  R  A  L  E  T  F  W  A  K  H  M  W

      5650       5660       5670       5680       5690       5700
AACTTCATTAGTGGGATACAGTACTTGGCAGGCTTGTCCACTCTGCCTGGGAACCCCGCA
TTGAAGTAATCACCCTATGTCATGAACCGTCCGAACAGGTGAGACGGACCCTTGGGGCGT
  N  F  I  S  G  I  Q  Y  L  A  G  L  S  T  L  P  G  N  P  A

      5710       5720       5730       5740       5750       5760
ATACGATCACCGATGGCATTCACAGCCTCCATCACCAGCCCGCTCACCACCCAGCATACC
TATGCTAGTGGCTACCGTAAGTGTCGGAGGTAGTGGTCGGGCGAGTGGTGGGTCGTATGG
  I  R  S  P  M  A  F  T  A  S  I  T  S  P  L  T  T  Q  H  T

      5770       5780       5790       5800       5810       5820
CTCTTGTTTAACATCTTGGGGGGATGGGTGGCTGCCCAACTCGCCCCCCCCAGCGCTGCC
GAGAACAAATTGTAGAACCCCCCTACCCACCGACGGGTTGAGCGGGGGGGGTCGCGACGG
  L  L  F  N  I  L  G  G  W  V  A  A  Q  L  A  P  P  S  A  A

      5830       5840       5850       5860       5870       5880
TCAGCTTTCGTGGGCGCCGGCATCGCTGGAGCCGCTGTTGGCACGATAGGCCTTGGGAAG
AGTCGAAAGCACCCGCGGCCGTAGCGACCTCGGCGACAACCGTGCTATCCGGAACCCTTC
  S  A  F  V  G  A  G  I  A  G  A  A  V  G  T  I  G  L  G  K

      5890       5900       5910       5920       5930       5940
GTGCTTGTGGACATTCTGGCAGGTTATGGAGCAGGGGTGGCGGGCGCACTTGTGGCCTTT
CACGAACACCTGTAAGACCGTCCAATACCTCGTCCCCACCGCCCGCGTGAACACCGGAAA
  V  L  V  D  I  L  A  G  Y  G  A  G  V  A  G  A  L  V  A  F

      5950       5960       5970       5980       5990       6000
AAGATCATGAGCGGCGAGATGCCTTCAGCCGAGGACATGGTCAACTTACTCCCTGCCATC
TTCTAGTACTCGCCGCTCTACGGAAGTCGGCTCCTGTACCAGTTGAATGAGGGACGGTAG
  K  I  M  S  G  E  M  P  S  A  E  D  M  V  N  L  L  P  A  I
```

图 2-10

```
      6010       6020       6030       6040       6050       6060
CTTTCTCCCGGTGCCCTGGTCGTCGGGATTGTGTGTGCAGCAATACTGCGTCGGCATGTG
GAAAGAGGGCCACGGGACCAGCAGCCCTAACACACACGTCGTTATGACGCAGCCGTACAC
 L  S  P  G  A  L  V  V  G  I  V  C  A  A  I  L  R  R  H  V

      6070       6080       6090       6100       6110       6120
GGCCCAGGGGAAGGGGCTGTGCAGTGGATGAACCGGCTGATAGCGTTCGCCTCGCGGGGT
CCGGGTCCCCTTCCCCGACACGTCACCTACTTGGCCGACTATCGCAAGCGGAGCGCCCCA
 G  P  G  E  G  A  V  Q  W  M  N  R  L  I  A  F  A  S  R  G

      6130       6140       6150       6160       6170       6180
AACCACGTCTCCCCCAGGCACTATGTGCCAGAGAGCGAGCCTGCAGCGCGTGTTACCCAG
TTGGTGCAGAGGGGGTCCGTGATACACGGTCTCTCGCTCGGACGTCGCGCACAATGGGTC
 N  H  V  S  P  R  H  Y  V  P  E  S  E  P  A  A  R  V  T  Q

      6190       6200       6210       6220       6230       6240
ATCCTTTCCAGCCTCACCATCACTCAGCTGTTGAAGAGACTCCACCAGTGGATTAATGAG
TAGGAAAGGTCGGAGTGGTAGTGAGTCGACAACTTCTCTGAGGTGGTCACCTAATTACTC
 I  L  S  S  L  T  I  T  Q  L  L  K  R  L  H  Q  W  I  N  E

      6250       6260       6270       6280       6290       6300
GACTGCTCTACGCCATGCTCCAGCTCGTGGCTAAGGGAGATTTGGGACTGGATCTGCACG
CTGACGAGATGCGGTACGAGGTCGAGCACCGATTCCCTCTAAACCCTGACCTAGACGTGC
 D  C  S  T  P  C  S  S  S  W  L  R  E  I  W  D  W  I  C  T

      6310       6320       6330       6340       6350       6360
GTGTTGACTGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTACCGGGAGTC
CACAACTGACTGAAGTTCTGGACCGAGGTCAGGTTCGAGGACGGCGCTAATGGCCCTCAG
 V  L  T  D  F  K  T  W  L  Q  S  K  L  L  P  R  L  P  G  V

      6370       6380       6390       6400       6410       6420
CCTTTTTTCTCATGCCAACGCGGGTATAAGGGAGTCTGGCGGGGGGACGGCATCATGCAC
GGAAAAAAGAGTACGGTTGCGCCCATATTCCCTCAGACCGCCCCCCTGCCGTAGTACGTG
 P  F  F  S  C  Q  R  G  Y  K  G  V  W  R  G  D  G  I  M  H

      6430       6440       6450       6460       6470       6480
ACCACCTGCCCATGCGGAGCACAGATCACCGGACACGTCAAAAACGGTTCCATGAGGATC
TGGTGGACGGGTACGCCTCGTGTCTAGTGGCCTGTGCAGTTTTTGCCAAGGTACTCCTAG
 T  T  C  P  C  G  A  Q  I  T  G  H  V  K  N  G  S  M  R  I

      6490       6500       6510       6520       6530       6540
GTTGGGCCTAAAACCTGCAGCAACACGTGGTACGGGACATTCCCCATCAACGCGTACACC
CAACCCGGATTTTGGACGTCGTTGTGCACCATGCCCTGTAAGGGGTAGTTGCGCATGTGG
 V  G  P  K  T  C  S  N  T  W  Y  G  T  F  P  I  N  A  Y  T

      6550       6560       6570       6580       6590       6600
ACGGGCCCCTGCACACCCTCCCCGGCGCCAAACTATTCCAAGGCATTGTGGAGAGTGGCC
TGCCCGGGGACGTGTGGGAGGGGCCGCGGTTTGATAAGGTTCCGTAACACCTCTCACCGG
 T  G  P  C  T  P  S  P  A  P  N  Y  S  K  A  L  W  R  V  A
```

图 2-11

```
      6610       6620       6630       6640       6650       6660
GCTGAGGAGTACGTGGAGGTCACGCGGGTGGGAGATTTTCACTACGTGACGGGCATGACC
CGACTCCTCATGCACCTCCAGTGCGCCCACCCTCTAAAAGTGATGCACTGCCCGTACTGG
 A  E  E  Y  V  E  V  T  R  V  G  D  F  H  Y  V  T  G  M  T

      6670       6680       6690       6700       6710       6720
ACTGACAACGTGAAGTGTCCATGCCAGGTTCCGGCCCCCGAATTCTTCACGGAGGTGGAT
TGACTGTTGCACTTCACAGGTACGGTCCAAGGCCGGGGGCTTAAGAAGTGCCTCCACCTA
 T  D  N  V  K  C  P  C  Q  V  P  A  P  E  F  F  T  E  V  D

      6730       6740       6750       6760       6770       6780
GGAGTGCGGTTGCACAGGTACGCTCCGGCGTGCAGACCTCTCCTACGGGAGGAGGTCGTA
CCTCACGCCAACGTGTCCATGCGAGGCCGCACGTCTGGAGAGGATGCCCTCCTCCAGCAT
 G  V  R  L  H  R  Y  A  P  A  C  R  P  L  L  R  E  E  V  V

      6790       6800       6810       6820       6830       6840
TTCCAGGTCGGGCTCCACCAGTACCTGGTCGGGTCACAGCTCCCATGCGAGCCCGAACCG
AAGGTCCAGCCCGAGGTGGTCATGGACCAGCCCAGTGTCGAGGGTACGCTCGGGCTTGGC
 F  Q  V  G  L  H  Q  Y  L  V  G  S  Q  L  P  C  E  P  E  P

      6850       6860       6870       6880       6890       6900
GATGTAGCAGTGCTCACTTCCATGCTCACTGACCCCTCCCACATTACAGCAGAGACGGCT
CTACATCGTCACGAGTGAAGGTACGAGTGACTGGGGAGGGTGTAATGTCGTCTCTGCCGA
 D  V  A  V  L  T  S  M  L  T  D  P  S  H  I  T  A  E  T  A

      6910       6920       6930       6940       6950       6960
AAGCGTAGGCTGGCCAGGGGGTCTCCCCCCTCCTTGGCCAGCTCTTCAGCTAGCCAGTTG
TTCGCATCCGACCGGTCCCCCAGAGGGGGGAGGAACCGGTCGAGAAGTCGATCGGTCAAC
 K  R  R  L  A  R  G  S  P  P  S  L  A  S  S  S  A  S  Q  L

      6970       6980       6990       7000       7010       7020
TCTGCGCCTTCCTTGAAGGCGACATGCACTACCCATCATGACTCCCCGGACGCTGACCTC
AGACGCGGAAGGAACTTCCGCTGTACGTGATGGGTAGTACTGAGGGGCCTGCGACTGGAG
 S  A  P  S  L  K  A  T  C  T  T  H  H  D  S  P  D  A  D  L

      7030       7040       7050       7060       7070       7080
ATTGAGGCCAACCTCTTGTGGCGGCAAGAGATGGGCGGGAACATCACCCGCGTGGAGTCA
TAACTCCGGTTGGAGAACACCGCCGTTCTCTACCCGCCCTTGTAGTGGGCGCACCTCAGT
 I  E  A  N  L  L  W  R  Q  E  M  G  G  N  I  T  R  V  E  S

      7090       7100       7110       7120       7130       7140
GAGAATAAGGTGGTAATCCTGGACTCTTTCGACCCGCTCCGAGCGGAGGATGATGAGGGG
CTCTTATTCCACCATTAGGACCTGAGAAAGCTGGGCGAGGCTCGCCTCCTACTACTCCCC
 E  N  K  V  V  I  L  D  S  F  D  P  L  R  A  E  D  D  E  G

      7150       7160       7170       7180       7190       7200
GAAATATCCGTTCCGGCGGAGATCCTGCGGAAATCCAGGAAATTCCCCCCAGCGCTGCCC
CTTTATAGGCAAGGCCGCCTCTAGGACGCCTTTAGGTCCTTTAAGGGGGGTCGCGACGGG
 E  I  S  V  P  A  E  I  L  R  K  S  R  K  F  P  P  A  L  P
```

图 2-12

```
      7210       7220       7230       7240       7250       7260
ATATGGGCGCCGCCGGATTACAACCCTCCGCTGCTAGAGTCCTGGAAGGACCCGGACTAC
TATACCCGCGGCGGCCTAATGTTGGGAGGCGACGATCTCAGGACCTTCCTGGGCCTGATG
 I  W  A  P  P  D  Y  N  P  P  L  L  E  S  W  K  D  P  D  Y

      7270       7280       7290       7300       7310       7320
GTTCCTCCGGTGGTACACGGGTGCCCGTTGCCGCCCACCAAGGCCCCTCCAATACCACCT
CAAGGAGGCCACCATGTGCCCACGGGCAACGGCGGGTGGTTCCGGGGAGGTTATGGTGGA
 V  P  P  V  V  H  G  C  P  L  P  P  T  K  A  P  P  I  P  P

      7330       7340       7350       7360       7370       7380
CCACGGAGGAAGAGGACGGTTGTCCTGACAGAATCCACCGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAG
GGTGCCTCCTTCTCCTGCCAACAGGACTGTCTTAGGTGGCACAGAAGACGGAACCGCCTC
 P  R  R  K  R  T  V  V  L  T  E  S  T  V  S  S  A  L  A  E

      7390       7400       7410       7420       7430       7440
CTCGCTACTAAGACCTTCGGCAGCTCCGGATCGTCGGCCATCGACAGCGGTACGGCGACC
GAGCGATGATTCTGGAAGCCGTCGAGGCCTAGCAGCCGGTAGCTGTCGCCATGCCGCTGG
 L  A  T  K  T  F  G  S  S  G  S  S  A  I  D  S  G  T  A  T

      7450       7460       7470       7480       7490       7500
GCCCCTCCTGACCAAGCCTCCGGTGACGGCGACAGAGAGTCCGACGTTGAGTCGTTCTCC
CGGGGAGGACTGGTTCGGAGGCCACTGCCGCTGTCTCTCAGGCTGCAACTCAGCAAGAGG
 A  P  P  D  Q  A  S  G  D  G  D  R  E  S  D  V  E  S  F  S

      7510       7520       7530       7540       7550       7560
TCCATGCCCCCCCTTGAGGGAGAGCCGGGGGACCCCGATCTCAGCGACGGATCTTGGTCC
AGGTACGGGGGGGAACTCCCTCTCGGCCCCCTGGGGCTAGAGTCGCTGCCTAGAACCAGG
 S  M  P  P  L  E  G  E  P  G  D  P  D  L  S  D  G  S  W  S

      7570       7580       7590       7600       7610       7620
ACCGTGAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGTTCGATGTCCTACACATGGACA
TGGCACTCGCTCCTCCGATCACTCCTGCAGCAGACGACAAGCTACAGGATGTGTACCTGT
 T  V  S  E  E  A  S  E  D  V  V  C  C  S  M  S  Y  T  W  T

      7630       7640       7650       7660       7670       7680
GGCGCCCTGATCACGCCATGCGCTGCGGAGGAAAGCAAGTTGCCCATCAACCCGTTGAGC
CCGCGGGACTAGTGCGGTACGCGACGCCTCCTTTCGTTCAACGGGTAGTTGGGCAACTCG
 G  A  L  I  T  P  C  A  A  E  E  S  K  L  P  I  N  P  L  S

      7690       7700       7710       7720       7730       7740
AATTCTTTGCTACGTCACCACAACATGGTCTATGCTACAACATCCCGCAGCGCAGGCCTG
TTAAGAAACGATGCAGTGGTGTTGTACCAGATACGATGTTGTAGGGCGTCGCGTCCGGAC
 N  S  L  L  R  H  H  N  M  V  Y  A  T  T  S  R  S  A  G  L

      7750       7760       7770       7780       7790       7800
CGGCAGAAGAAGGTCACCTTTGACAGACTGCAAGTCCTGGACGACCACTACCGGGACGTG
GCCGTCTTCTTCCAGTGGAAACTGTCTGACGTTCAGGACCTGCTGGTGATGGCCCTGCAC
 R  Q  K  K  V  T  F  D  R  L  Q  V  L  D  D  H  Y  R  D  V
```

图 2-13

```
      7810       7820       7830       7840       7850       7860
CTTAAGGAGATGAAGGCGAAGGCGTCCACAGTTAAGGCTAAACTTCTATCTGTAGAAGAA
GAATTCCTCTACTTCCGCTTCCGCAGGTGTCAATTCCGATTTGAAGATAGACATCTTCTT
 L  K  E  M  K  A  K  A  S  T  V  K  A  K  L  L  S  V  E  E

      7870       7880       7890       7900       7910       7920
GCCTGCAAACTGACGCCCCCACATTCGGCCAAATCCAAATTTGGCTACGGGGCGAAGGAC
CGGACGTTTGACTGCGGGGGTGTAAGCCGGTTTAGGTTTAAACCGATGCCCCGCTTCCTG
 A  C  K  L  T  P  P  H  S  A  K  S  K  F  G  Y  G  A  K  D

      7930       7940       7950       7960       7970       7980
GTCCGGAGCCTATCCAGCAGGGCCGTTACCCACATCCGCTCCGTGTGGAAGGACCTGCTG
CAGGCCTCGGATAGGTCGTCCCGGCAATGGGTGTAGGCGAGGCACACCTTCCTGGACGAC
 V  R  S  L  S  S  R  A  V  T  H  I  R  S  V  W  K  D  L  L

      7990       8000       8010       8020       8030       8040
GAAGACACTGAAACACCAATTAGCACTACCATCATGGCAAAAAATGAGGTTTTCTGTGTC
CTTCTGTGACTTTGTGGTTAATCGTGATGGTAGTACCGTTTTTTACTCCAAAAGACACAG
 E  D  T  E  T  P  I  S  T  T  I  M  A  K  N  E  V  F  C  V

      8050       8060       8070       8080       8090       8100
CAACCAGAGAAGGGAGGCCGCAAGCCAGCTCGCCTTATCGTGTTCCCAGATCTGGGAGTT
GTTGGTCTCTTCCCTCCGGCGTTCGGTCGAGCGGAATAGCACAAGGGTCTAGACCCTCAA
 Q  P  E  K  G  G  R  K  P  A  R  L  I  V  F  P  D  L  G  V

      8110       8120       8130       8140       8150       8160
CGTGTATGCGAGAAGATGGCCCTTTATGACGTGGTCTCCACCCTTCCTCAGGCCGTGATG
GCACATACGCTCTTCTACCGGGAAATACTGCACCAGAGGTGGGAAGGAGTCCGGCACTAC
 R  V  C  E  K  M  A  L  Y  D  V  V  S  T  L  P  Q  A  V  M

      8170       8180       8190       8200       8210       8220
GGCTCCTCATACGGATTCCAGTACTCTCCTAAGCAGCGGGTCGAGTTCCTGGTGAATACC
CCGAGGAGTATGCCTAAGGTCATGAGAGGATTCGTCGCCCAGCTCAAGGACCACTTATGG
 G  S  S  Y  G  F  Q  Y  S  P  K  Q  R  V  E  F  L  V  N  T

      8230       8240       8250       8260       8270       8280
TGGAAATCAAAGAAATGCCCCATGGGCTTCTCATATGACACCCGCTGTTTTGACTCAACG
ACCTTTAGTTTCTTTACGGGGTACCCGAAGAGTATACTGTGGGCGACAAAACTGAGTTGC
 W  K  S  K  K  C  P  M  G  F  S  Y  D  T  R  C  F  D  S  T

      8290       8300       8310       8320       8330       8340
GTCACTGAGAATGACATCCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCC
CAGTGACTCTTACTGTAGGCACAACTCCTCAGTTAAATGGTTACAACACTGAACCGGGGG
 V  T  E  N  D  I  R  V  E  E  S  I  Y  Q  C  C  D  L  A  P

      8350       8360       8370       8380       8390       8400
GAAGCCAAACTGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACT
CTTCGGTTTGACCGGTATTTCAGCGAGTGTCTCGCCGAGATATAGCCCCCAGGGGACTGA
 E  A  K  L  A  I  K  S  L  T  E  R  L  Y  I  G  G  P  L  T
```

图 2-14

```
      8410       8420       8430       8440       8450       8460
AATTCAAAAGGGCAGAACTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGCGAGCGGCGTGCTGACGACT
TTAAGTTTTCCCGTCTTGACGCCAATGGCGGCCACGGCGCGCTCGCCGCACGACTGCTGA
 N  S  K  G  Q  N  C  G  Y  R  R  C  R  A  S  G  V  L  T  T

      8470       8480       8490       8500       8510       8520
AGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAG
TCGACGCCATTATGGGAGTGTACAATGGACTTTCGGTGACGCCGGACAGCTCGACGCTTC
 S  C  G  N  T  L  T  C  Y  L  K  A  T  A  A  C  R  A  A  K

      8530       8540       8550       8560       8570       8580
CTCCGGGACTGCACGATGCTCGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCG
GAGGCCCTGACGTGCTACGAGCACTTGCCTCTGCTGGAACAGCAATAGACACTTTCGCGC
 L  R  D  C  T  M  L  V  N  G  D  D  L  V  V  I  C  E  S  A

      8590       8600       8610       8620       8630       8640
GGAACCCAAGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTCTTCACGGAGGCTATGACTAGGTACTCT
CCTTGGGTTCTCCTACGCCGCTCGGATGCTCAGAAGTGCCTCCGATACTGATCCATGAGA
 G  T  Q  E  D  A  A  S  L  R  V  F  T  E  A  M  T  R  Y  S

      8650       8660       8670       8680       8690       8700
GCCCCCCCTGGGGACCCGCCTCAACCGGAATACGACTTGGAGTTGATAACATCATGTTCC
CGGGGGGGACCCCTGGGCGGAGTTGGCCTTATGCTGAACCTCAACTATTGTAGTACAAGG
 A  P  P  G  D  P  P  Q  P  E  Y  D  L  E  L  I  T  S  C  S

      8710       8720       8730       8740       8750       8760
TCCAATGTGTCGGTCGCACACGATGCATCTGGTAAAAGGGTGTACTACCTCACCCGTGAC
AGGTTACACAGCCAGCGTGTGCTACGTAGACCATTTTCCCACATGATGGAGTGGGCACTG
 S  N  V  S  V  A  H  D  A  S  G  K  R  V  Y  Y  L  T  R  D

      8770       8780       8790       8800       8810       8820
CCTACCACCCCCCTTGCACGGGCTGCGTGGGAGACAGCTAGACACACTCCAGTCAACTCC
GGATGGTGGGGGGAACGTGCCCGACGCACCCTCTGTCGATCTGTGTGAGGTCAGTTGAGG
 P  T  T  P  L  A  R  A  A  W  E  T  A  R  H  T  P  V  N  S

      8830       8840       8850       8860       8870       8880
TGGCTAGGCAACATCATCATGTATGCGCCCACCTTATGGGCAAGGATGATTCTGATGACT
ACCGATCCGTTGTAGTAGTACATACGCGGGTGGAATACCCGTTCCTACTAAGACTACTGA
 W  L  G  N  I  I  M  Y  A  P  T  L  W  A  R  M  I  L  M  T

      8890       8900       8910       8920       8930       8940
CATTTCTTCTCCATCCTTCTAGCTCAGGAGCAACTTGAAAAAACCCTAGATTGTCAGATC
GTAAAGAAGAGGTAGGAAGATCGAGTCCTCGTTGAACTTTTTTGGGATCTAACAGTCTAG
 H  F  F  S  I  L  L  A  Q  E  Q  L  E  K  T  L  D  C  Q  I

      8950       8960       8970       8980       8990       9000
TACGGGGCCTGTTACTCCATTGAACCACTTGATCTACCTCAGATCATTGAGCGACTCCAT
ATGCCCCGGACAATGAGGTAACTTGGTGAACTAGATGGAGTCTAGTAACTCGCTGAGGTA
 Y  G  A  C  Y  S  I  E  P  L  D  L  P  Q  I  I  E  R  L  H
```

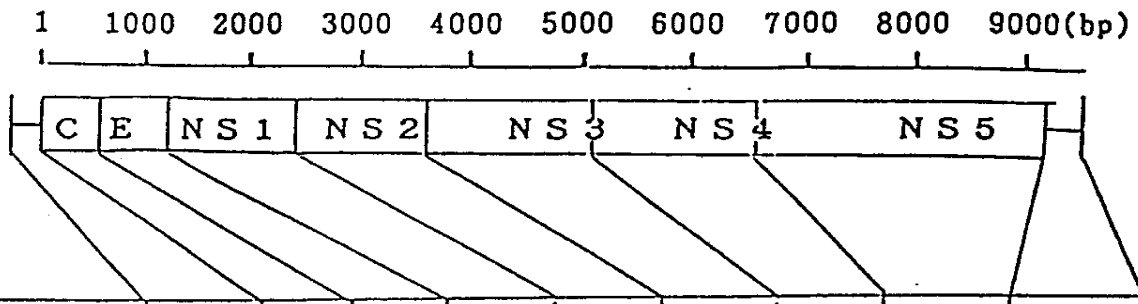
图 2-15

```
      9010       9020       9030       9040       9050       9060
GGTCTTAGCGCATTTTCACTCCATAGTTACTCTCCAGGCGAGATCAATAGGGTGGCTTCA
CCAGAATCGCGTAAAAGTGAGGTATCAATGAGAGGTCCGCTCTAGTTATCCCACCGAAGT
 G  L  S  A  F  S  L  H  S  Y  S  P  G  E  I  N  R  V  A  S

      9070       9080       9090       9100       9110       9120
TGCCTCAGAAAACTTGGGGTACCACCCTTGCGAGCCTGGAGACATCGGGCCAGAAGTGTC
ACGGAGTCTTTTGAACCCCATGGTGGGAACGCTCGGACCTCTGTAGCCCGGTCTTCACAG
 C  L  R  K  L  G  V  P  P  L  R  A  W  R  H  R  A  R  S  V

      9130       9140       9150       9160       9170       9180
CGCGCTAAGCTACTGTCCCAGGGGGGGAGGGCCGCCACTTGTGGCAAGTACCTCTTCAAC
GCGCGATTCGATGACAGGGTCCCCCCCTCCCGGCGGTGAACACCGTTCATGGAGAAGTTG
 R  A  K  L  L  S  Q  G  G  R  A  A  T  C  G  K  Y  L  F  N

      9190       9200       9210       9220       9230       9240
TGGGCGGTGAGGACCAAGCTCAAACTCACTCCAATCCCAGCCGCGTCCCGGTTGGACTTG
ACCCGCCACTCCTGGTTCGAGTTTGAGTGAGGTTAGGGTCGGCGCAGGGCCAACCTGAAC
 W  A  V  R  T  K  L  K  L  T  P  I  P  A  A  S  R  L  D  L

      9250       9260       9270       9280       9290       9300
TCCGGCTGGTTCGTTGCTGGTTACAGCGGGGGAGACATATATCACAGCCTGTCTCGTGCC
AGGCCGACCAAGCAACGACCAATGTCGCCCCCTCTGTATATAGTGTCGGACAGAGCACGG
 S  G  W  F  V  A  G  Y  S  G  G  D  I  Y  H  S  L  S  R  A

      9310       9320       9330       9340       9350       9360
CGACCCCGCTGGTTCATGTTGTGCCTACTCCTACTTTCCGTGGGGGTAGGCATCTACCTG
GCTGGGGCGACCAAGTACAACACGGATGAGGATGAAAGGCACCCCCATCCGTAGATGGAC
 R  P  R  W  F  M  L  C  L  L  L  L  S  V  G  V  G  I  Y  L

      9370       9380       9390       9400       9410       9420
CTCCCCAACCGATGAATGGGGAGCTAAACACTCCAGGCCAATAGGCCGTTTCTCTTTTTT
GAGGGGTTGGCTACTTACCCCTCGATTTGTGAGGTCCGGTTATCCGGCAAAGAGAAAAAA
 L  P  N  R

      9430       9440       9450       9460       9470
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 2-16

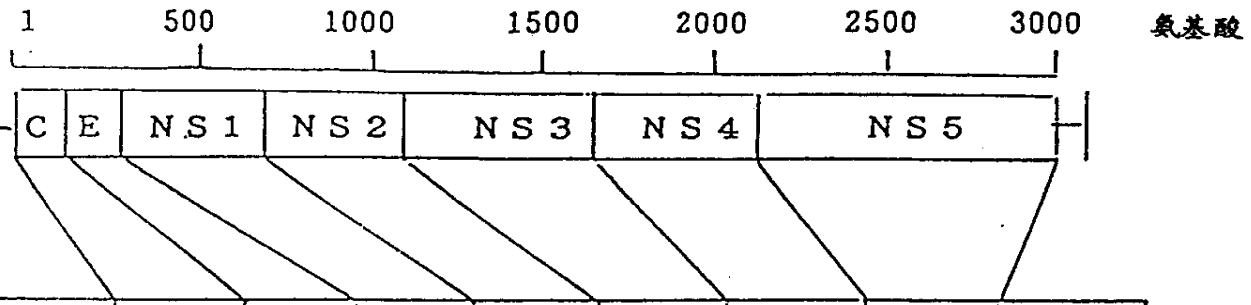
cDNA 克隆 名称	在KHCV－LBC1中的位置 （核苷酸序数）
KHCV 426	301 至 726
KHCV 652	3928 至 4563
KHCV 403	6649 至 7050
KHCV 752	3208 至 3960
KHCV 675	4264 至 4938
KHCV 240	616 至 855
KHCV 513	814 至 1326
KHCV 810	1201 至 2016
KHCV 798	1945 至 2742
KHCV 932	6892 至 7824
KHCV 496	7642 至 8136
KHCV 847	7969 至 8814
KHCV 494	8722 至 9216
KHCV 570	2686 至 3300
KHCV 1774	4903 至 6677
KHCV 266	9160 至 9472
KHCV 366	1 至 366

图 3



片段 / 亚型	5'一端	C	E	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	3'一端	全部
KHCV-LBC1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HCPT-CHIRON	98.2	90.4	73.9	72.9	73.0	79.1	78.3	83.3	81.6	78.3
JHCV-HCI	99.4	96.0	90.4	86.5	88.7	90.6	90.0	93.3	93.6	90.9
JHCV-OSAKA	100	96.3	89.1	85.0	86.3	90.3	90.5	93.1	91.7	90.9

图 4



片段 / 亚型	C	E	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	全部
KHCV-LBC1	100	100	100	100	100	100	100	100
HCPT-CHIRON	95.3	76.3	78.2	74.7	89.0	86.7	84.8	94.2
JHCV-NCI	96.3	91.9	86.6	92.4	93.5	94.0	95.5	93.3
JHCV-OSAKA	96.9	89.9	85.0	87.7	94.1	94.9	95.6	93.0

(%)

图 5

```
KHCV366          1  gGCCAGCCCCCgaTTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACT
HCPT-CHIRON      1   GCCAGCCCCCtgaTGGGGGCGACACTCCACCATgaATCACTCCCCTGTGAGGAACTACT
JHCV-NCI         1                TTGGGGGCGACACTCCACCATAGATCACTCCCCTGTGAGGAACTACT

KHCV366         61  GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA
HCPT-CHIRON     60  GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGCCTCCAGGA
JHCV-NCI        48  GTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTtGTGCAGCCTCCAGGA

KHCV366        121  CCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA
HCPT-CHIRON    120  CCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA
JHCV-NCI       108  CCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCA

KHCV366        181  GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC
HCPT-CHIRON    180  GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC
JHCV-NCI       168  GGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACgCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCC

KHCV366        241  CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG
HCPT-CHIRON    240  CGCaAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG
JHCV-NCI       228  CGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAG

KHCV366        301  GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA
HCPT-CHIRON    300  GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAA
JHCV-NCI       288  GGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCAtCATGAGCACaAATCCTAAA
```

图 6

```
         10         20         30         40         50         60
         |          |          |          |          |          |
CTCTTTACCCTGTCACCACACTACAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG
LeuPheThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln

         70         80         90        100        110        120
         |          |          |          |          |          |
TATTTTATCACCAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCCTCAACGTTCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg

        130        140        150        160        170        180
         |          |          |          |          |          |
GGGGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGTGCGGTCCACTCAGAGCTGATTTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValHisSerGluLeuIlePheAsp

        190        200        210        220        230        240
         |          |          |          |          |          |
ATCACCAAGATCTTGCTCGCCATACTTGGTCCGCTCATGGTACTCCAGGCTGGCCTAACC
IleThrLysIleLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr

        250        260        270
         |          |          |
AGAGTGCCGTACTTTGTCAGCGCTCAAGGGCTCATCC
ArgValProTyrPheValSerAlaGlnGlyLeuIle
```

图 7

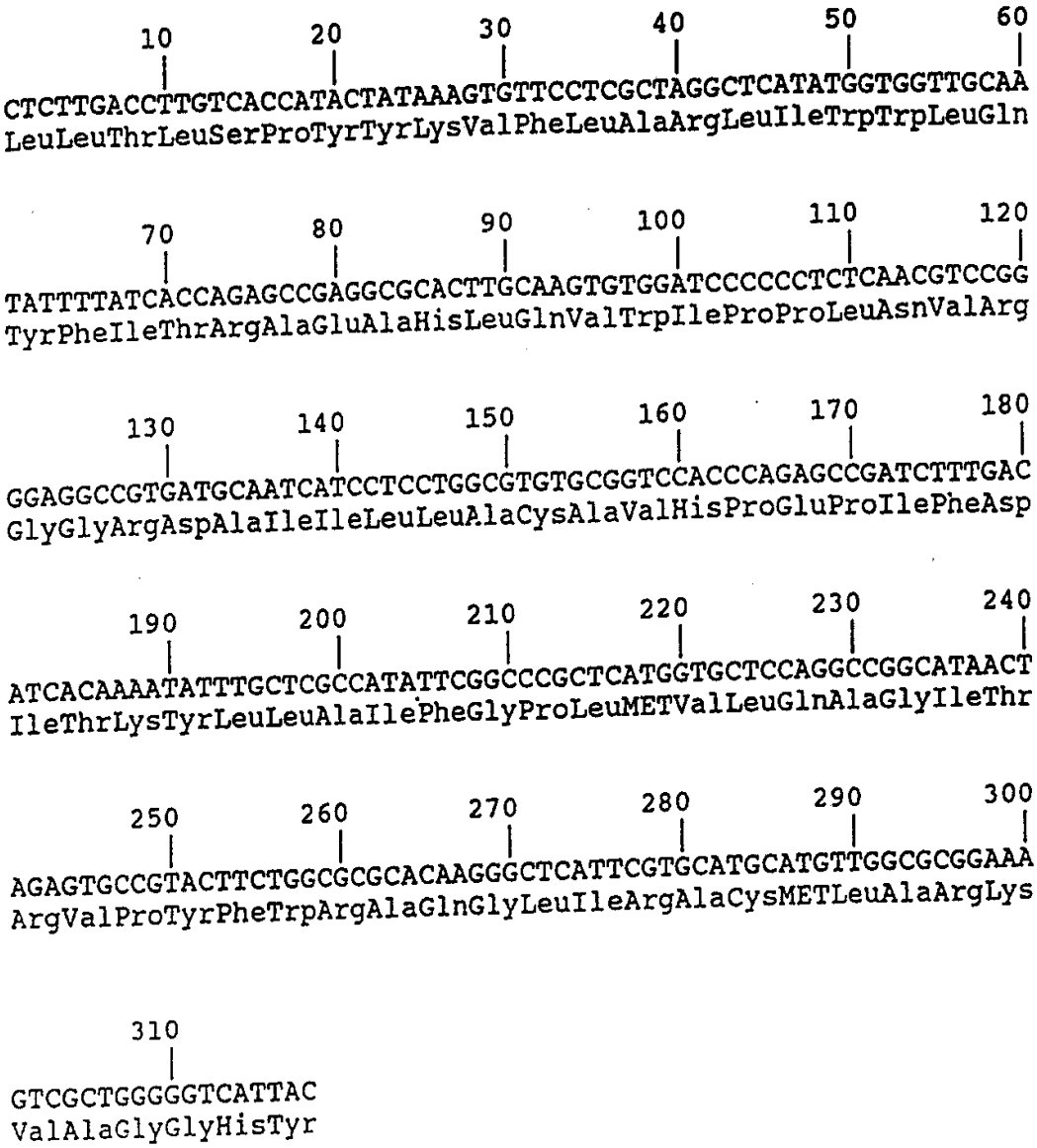

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCATACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA
LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATTTTATCACCAGAGCCGAGGCGCACTTGCAAGTGTGGATCCCCCCTCTCAACGTCCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGTGATGCAATCATCCTCCTGGCGTGTGCGGTCCACCCAGAGCCGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluProIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACT
IleThrLysTyrLeuLeuAlaIlePheGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyIleThr
250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTCTGGCGCGCACAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGGAAA
ArgValProTyrPheTrpArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuAlaArgLys
310
GTCGCTGGGGGTCATTAC
ValAlaGlyGlyHisTyr

图8

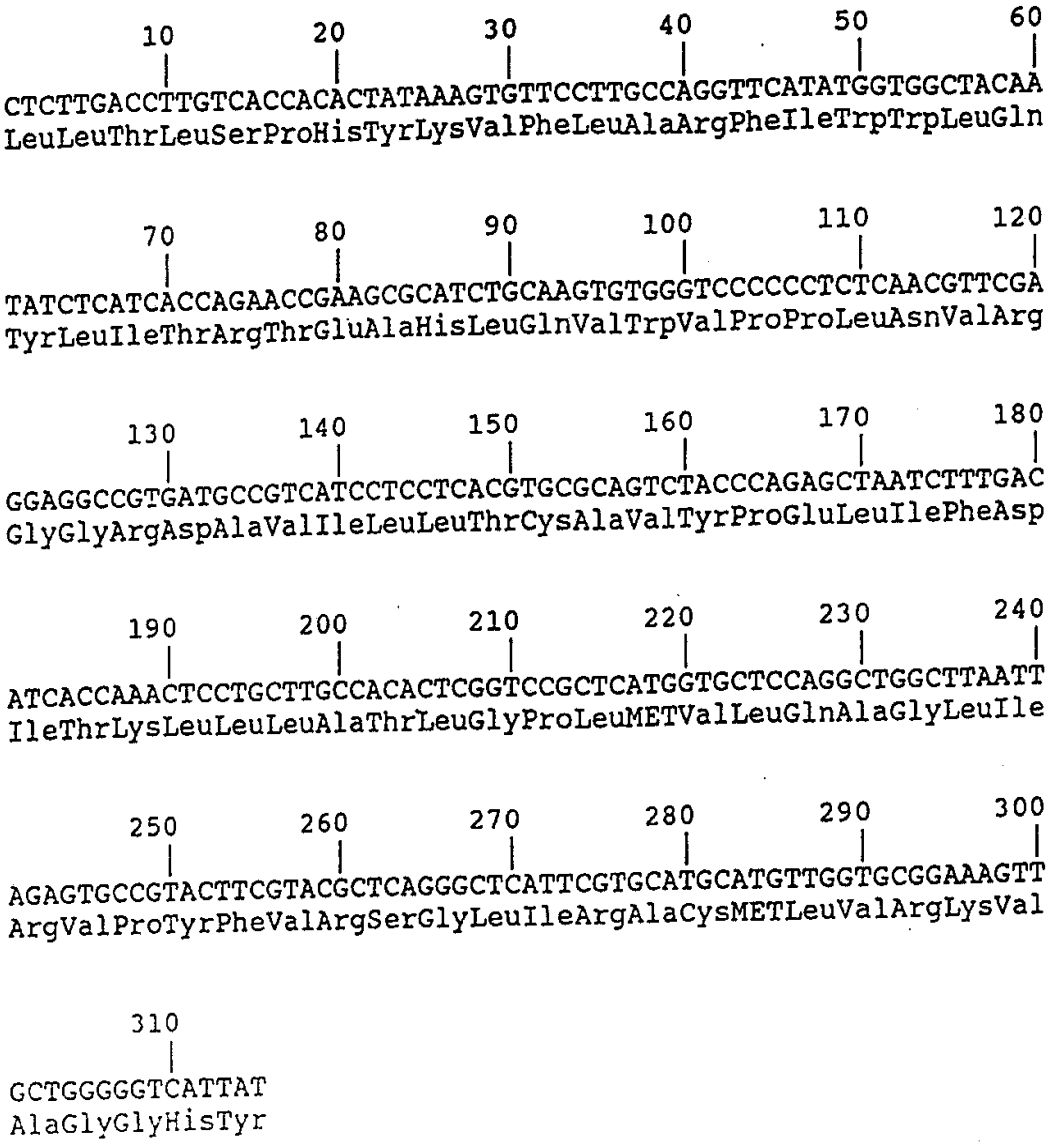

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTTCGA
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGTGATGCCGTCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaValIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCCTGCTTGCCACACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuIle
250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTCGTACGCTCAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAAGTT
ArgValProTyrPheValArgSerGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLysVal
310
GCTGGGGGTCATTAT
AlaGlyGlyHisTyr

图9

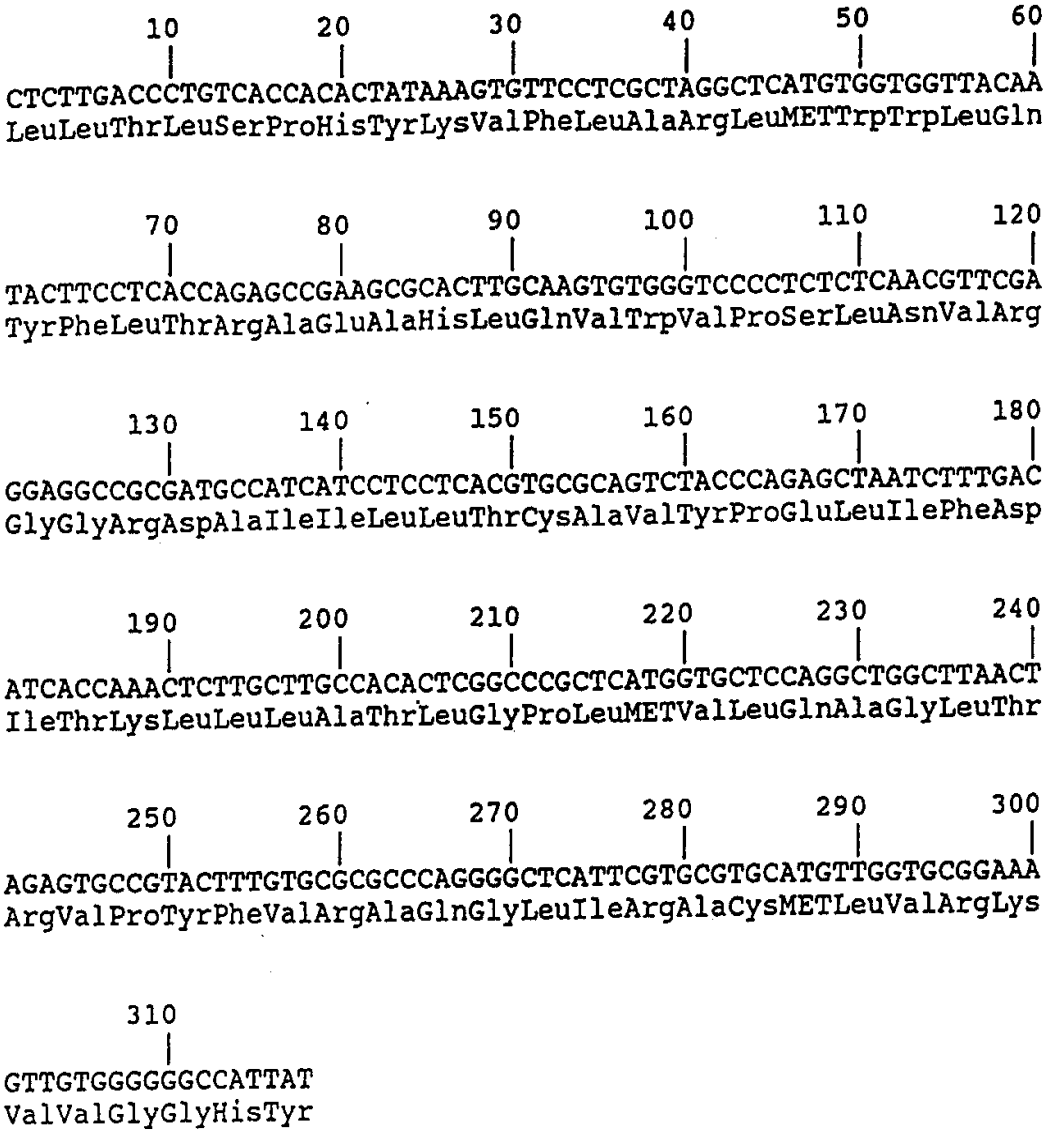

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCCTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATGTGGTGGTTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuMETTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TACTTCCTCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCTCTCTCAACGTTCGA
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTTGCCACACTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAACT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr
250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCCCAGGGGCTCATTCGTGCGTGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GTTGTGGGGGGCCATTAT
ValValGlyGlyHisTyr

图10

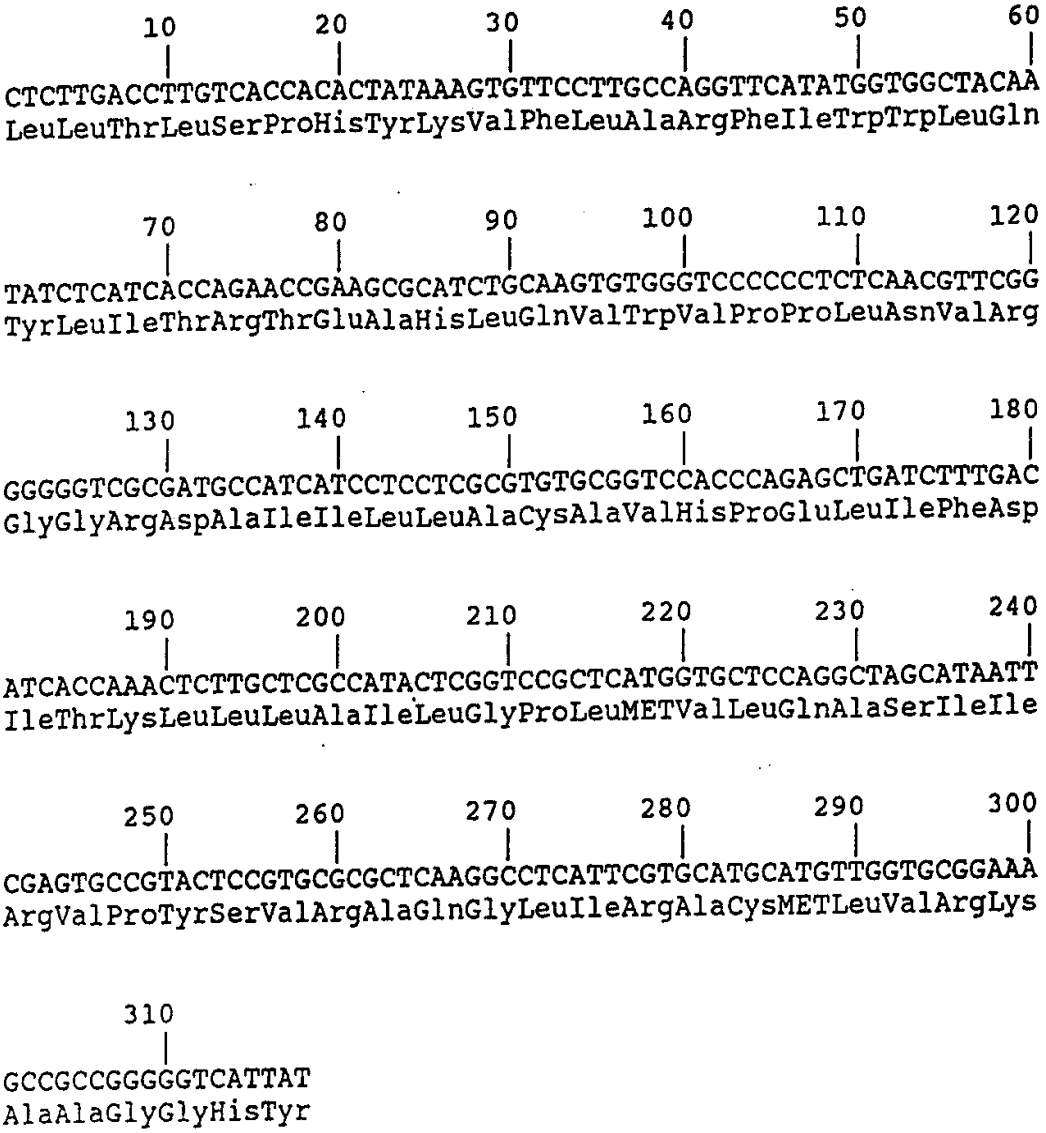

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTTCGG
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCGCGTGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTCCGTGCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrSerValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr

图 11

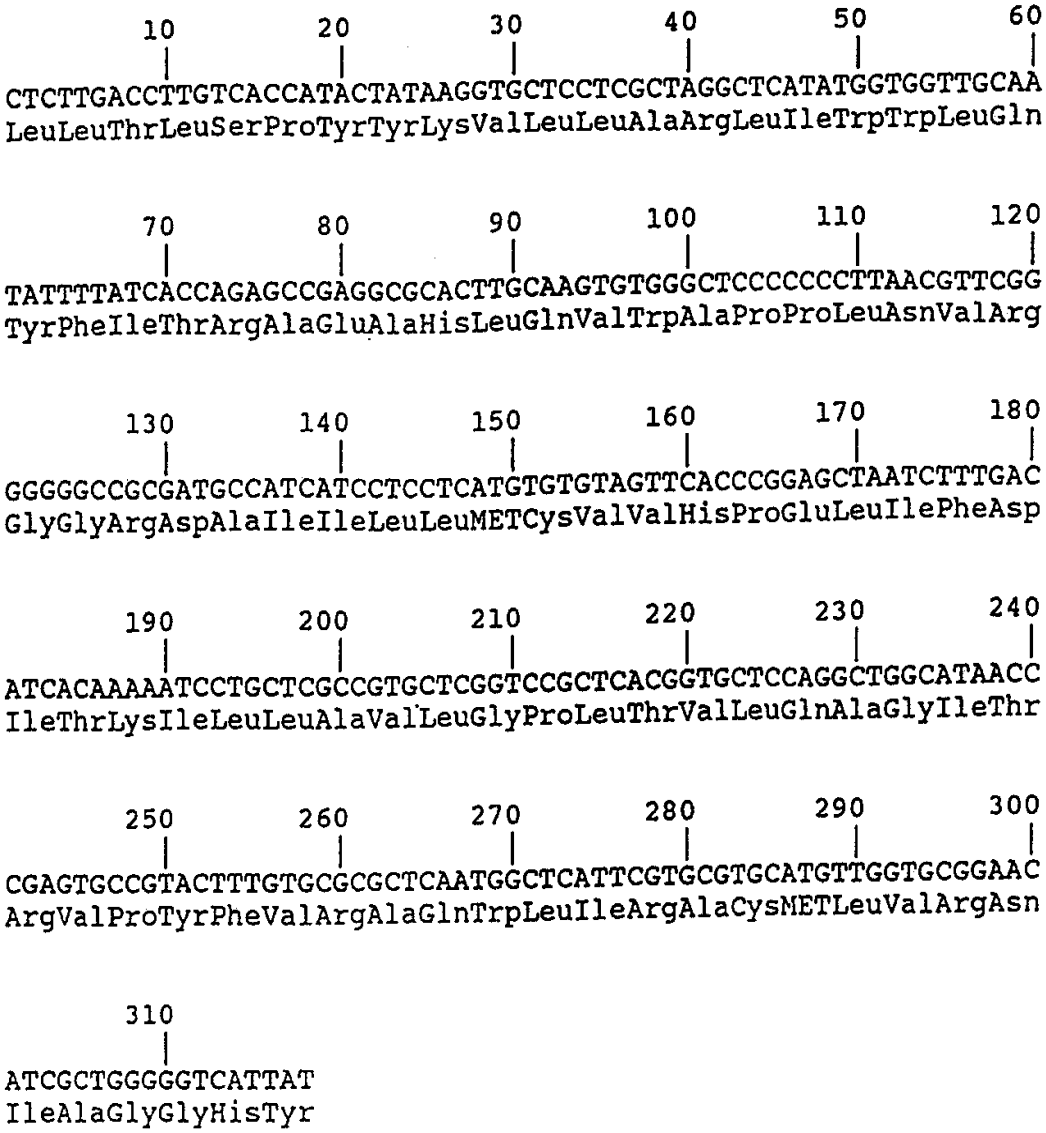

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCATACTATAAGGTGCTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA
LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValLeuLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATTTTATCACCAGAGCCGAGGCGCACTTGCAAGTGTGGGCTCCCCCCCTTAACGTTCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpAlaProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGGGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCATGTGTGTAGTTCACCCGGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuMETCysValValHisProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACAAAAATCCTGCTCGCCGTGCTCGGTCCGCTCACGGTGCTCCAGGCTGGCATAACC
IleThrLysIleLeuLeuAlaValLeuGlyProLeuThrValLeuGlnAlaGlyIleThr
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCTCAATGGCTCATTCGTGCGTGCATGTTGGTGCGGAAC
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnTrpLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgAsn
310
ATCGCTGGGGGTCATTAT
IleAlaGlyGlyHisTyr

图12

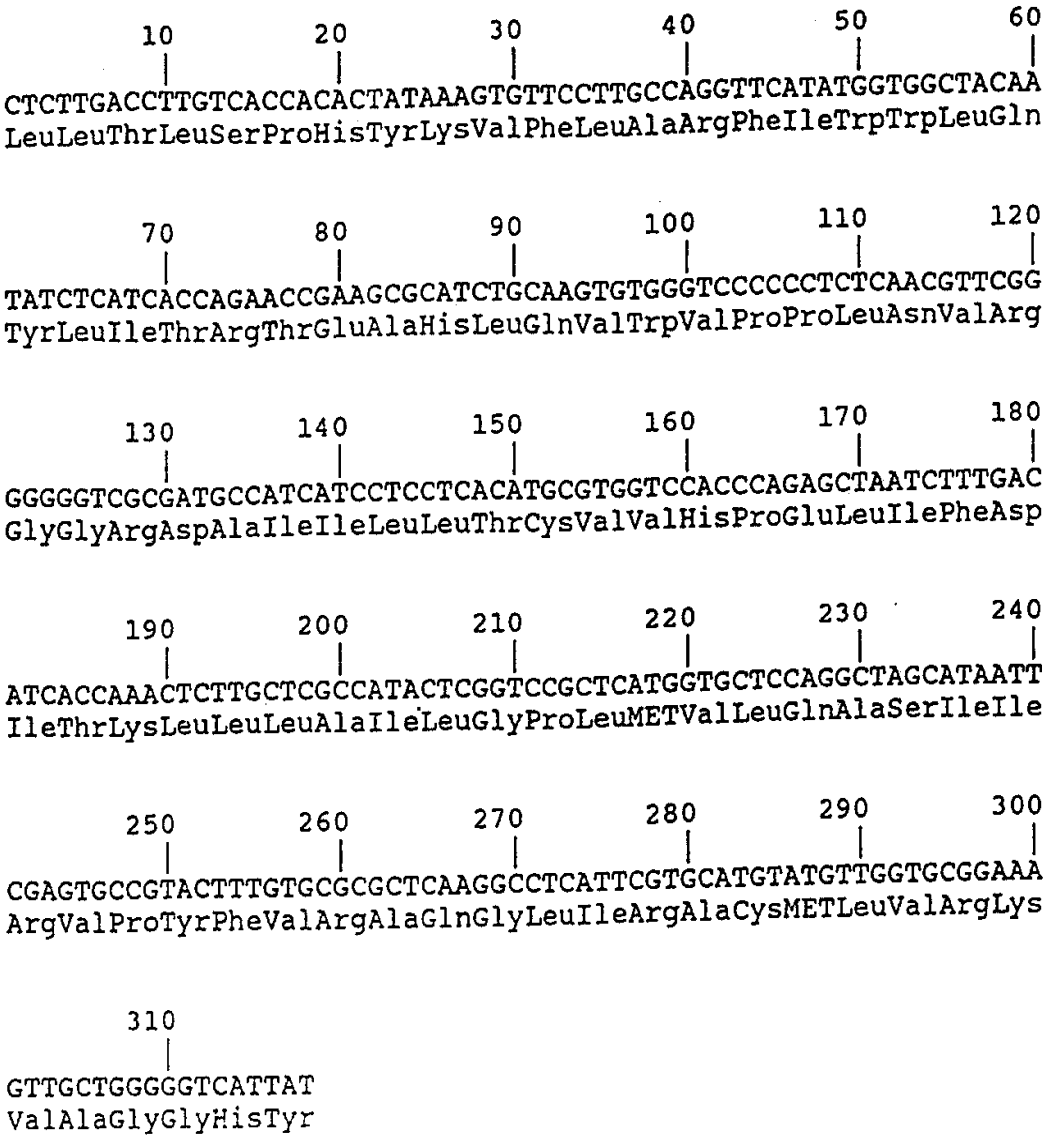

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTTCGG
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysValValHisProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGTATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GTTGCTGGGGGTCATTAT
ValAlaGlyGlyHisTyr

图13

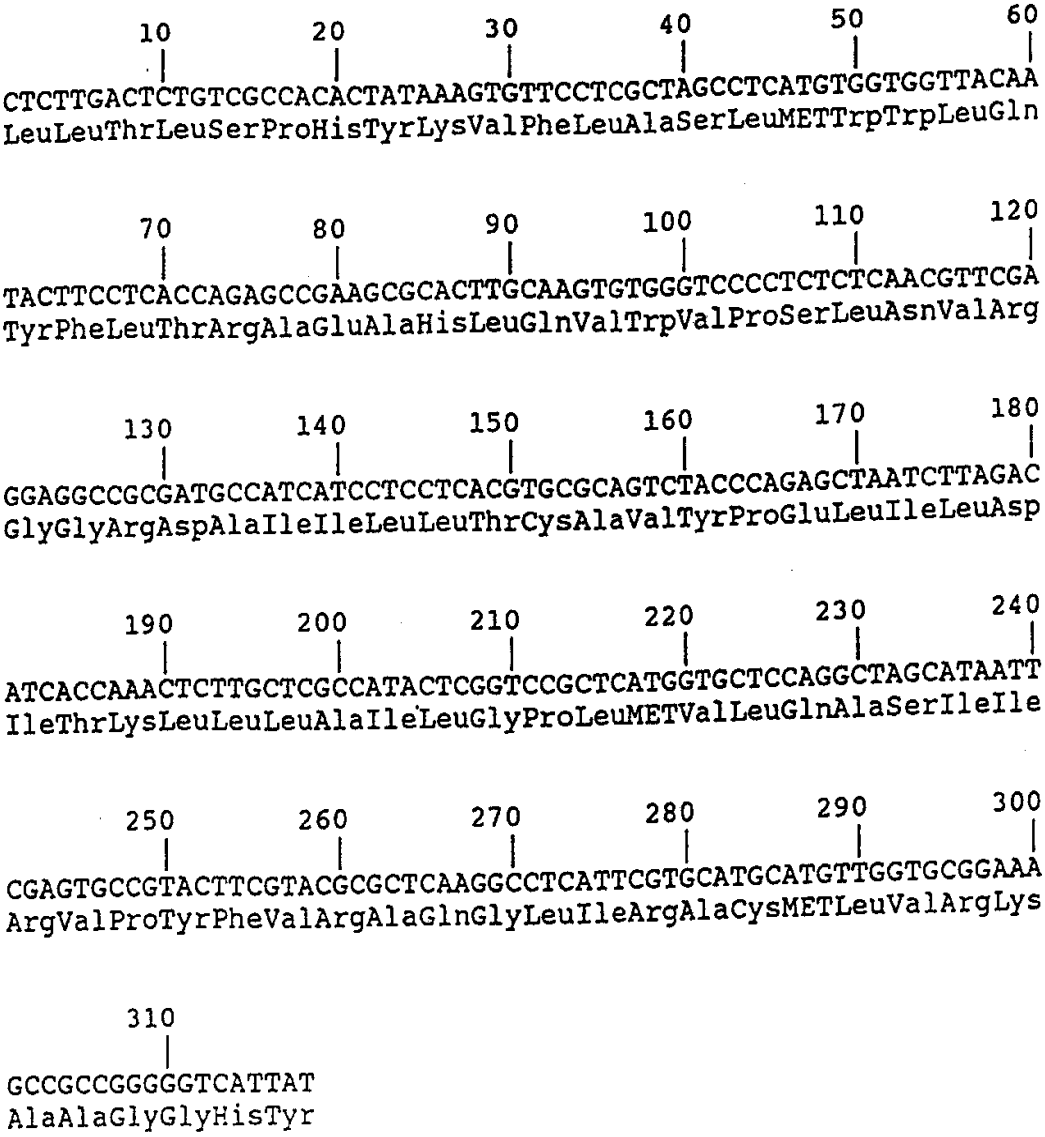

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACTCTGTCGCCACACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGCCTCATGTGGTGGTTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaSerLeuMETTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TACTTCCTCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCTCTCTCAACGTTCGA
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTAGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIleLeuAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTCGTACGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr

图14

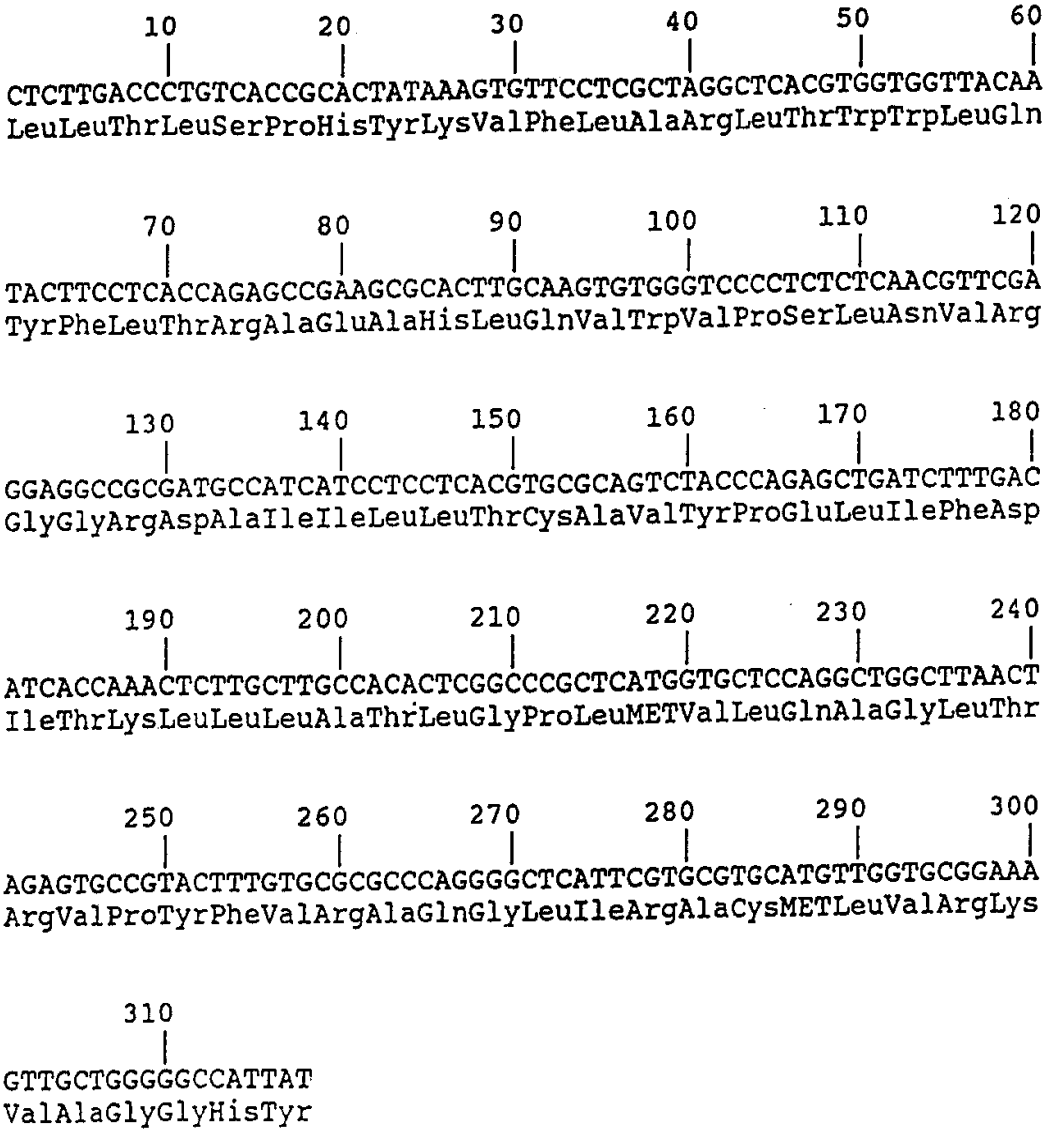

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCCTGTCACCGCACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCACGTGGTGGTTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuThrTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TACTTCCTCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCTCTCTCAACGTTCGA
TyrPheLeuThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProSerLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGCGATGCCATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTTGCCACACTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTGGCTTAACT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaThrLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyLeuThr
250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTTGTGCGCGCCCAGGGGCTCATTCGTGCGTGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GTTGCTGGGGGCCATTAT
ValAlaGlyGlyHisTyr

图15

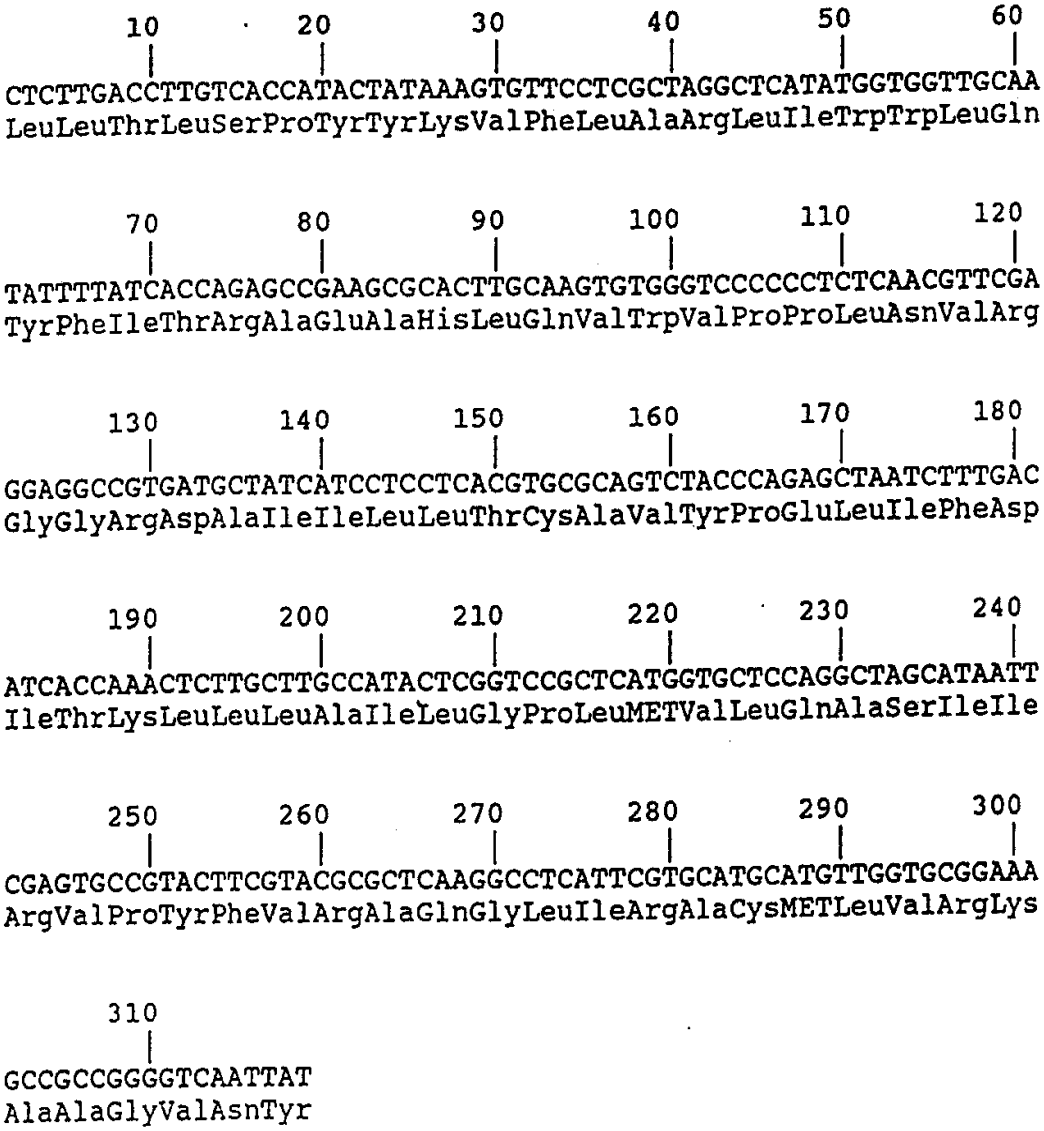

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCATACTATAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTGCAA
LeuLeuThrLeuSerProTyrTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATTTTATCACCAGAGCCGAAGCGCACTTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTTCGA
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGAGGCCGTGATGCTATCATCCTCCTCACGTGCGCAGTCTACCCAGAGCTAATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuThrCysAlaValTyrProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTTGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTCGTACGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GCCGCCGGGGTCAATTAT
AlaAlaGlyValAsnTyr

图16

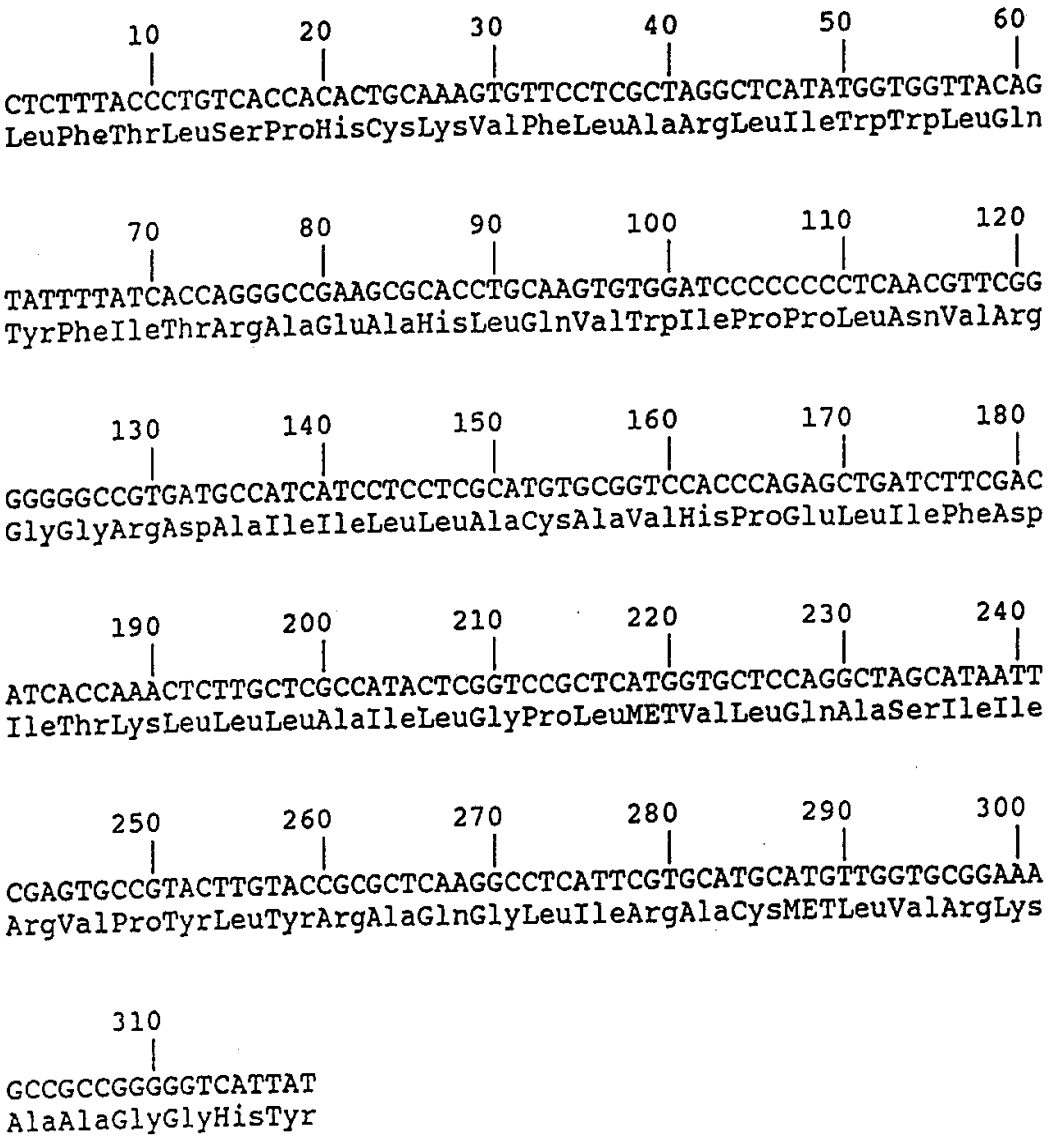

10 20 30 40 50 60
CTCTTTACCCTGTCACCACACTGCAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG
LeuPheThrLeuSerProHisCysLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATTTTATCACCAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCCTCAACGTTCGG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGGGGCCGTGATGCCATCATCCTCCTCGCATGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTCGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTGTACCGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrLeuTyrArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr

图17

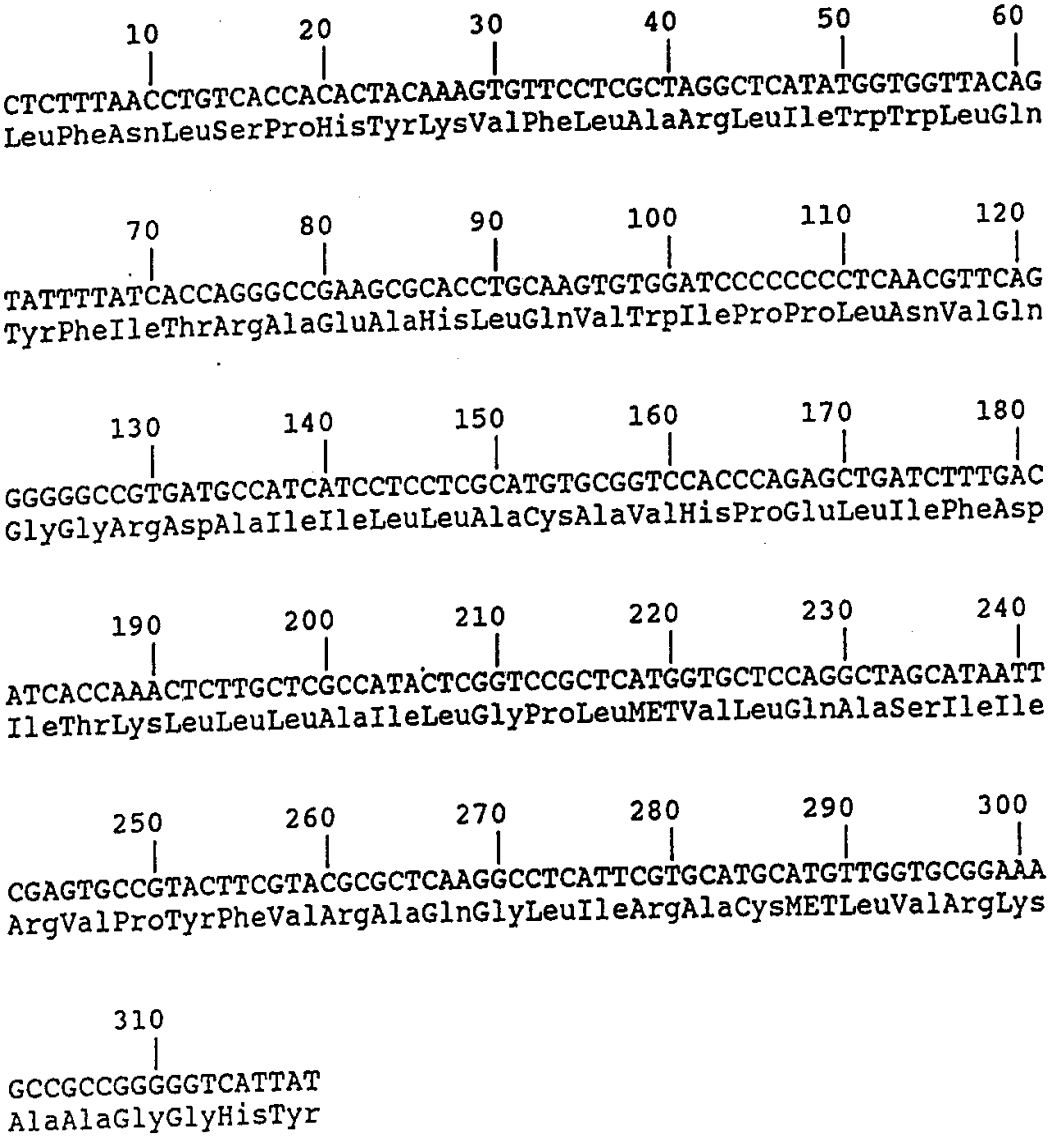

10 20 30 40 50 60
CTCTTTAACCTGTCACCACACTACAAAGTGTTCCTCGCTAGGCTCATATGGTGGTTACAG
LeuPheAsnLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgLeuIleTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATTTTATCACCAGGGCCGAAGCGCACCTGCAAGTGTGGATCCCCCCCCCTCAACGTTCAG
TyrPheIleThrArgAlaGluAlaHisLeuGlnValTrpIleProProLeuAsnValGln
130 140 150 160 170 180
GGGGGCCGTGATGCCATCATCCTCCTCGCATGTGCGGTCCACCCAGAGCTGATCTTTGAC
GlyGlyArgAspAlaIleIleLeuLeuAlaCysAlaValHisProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACCAAACTCTTGCTCGCCATACTCGGTCCGCTCATGGTGCTCCAGGCTAGCATAATT
IleThrLysLeuLeuLeuAlaIleLeuGlyProLeuMETValLeuGlnAlaSerIleIle
250 260 270 280 290 300
CGAGTGCCGTACTTCGTACGCGCTCAAGGCCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GCCGCCGGGGGTCATTAT
AlaAlaGlyGlyHisTyr

图18

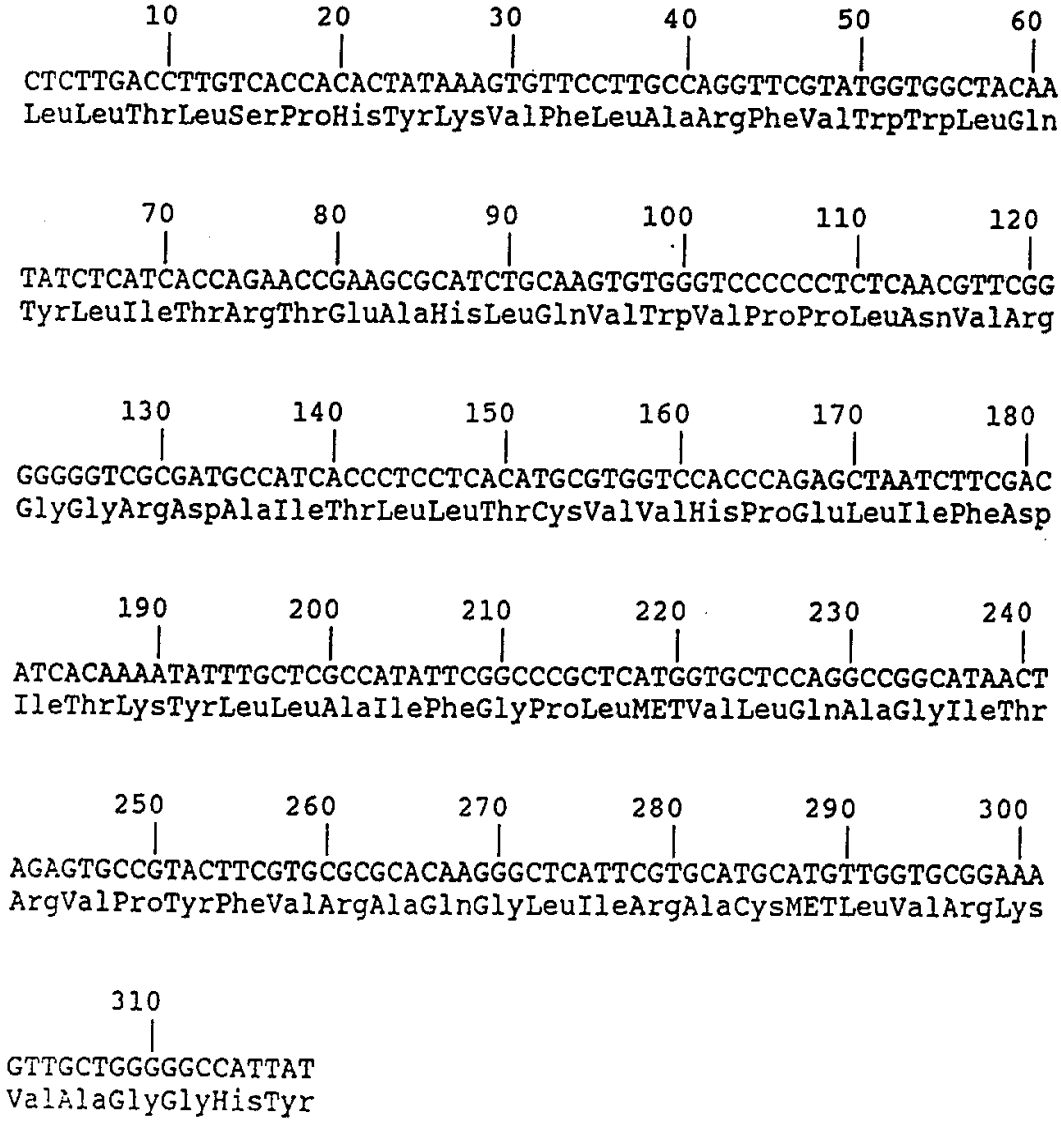

10 20 30 40 50 60
CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCGTATGGTGGCTACAA
LeuLeuThrLeuSerProHisTyrLysValPheLeuAlaArgPheValTrpTrpLeuGln
70 80 90 100 110 120
TATCTCATCACCAGAACCGAAGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCCTCTCAACGTTCGG
TyrLeuIleThrArgThrGluAlaHisLeuGlnValTrpValProProLeuAsnValArg
130 140 150 160 170 180
GGGGGTCGCGATGCCATCACCCTCCTCACATGCGTGGTCCACCCAGAGCTAATCTTCGAC
GlyGlyArgAspAlaIleThrLeuLeuThrCysValValHisProGluLeuIlePheAsp
190 200 210 220 230 240
ATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACT
IleThrLysTyrLeuLeuAlaIlePheGlyProLeuMETValLeuGlnAlaGlyIleThr
250 260 270 280 290 300
AGAGTGCCGTACTTCGTGCGCGCACAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGTGCGGAAA
ArgValProTyrPheValArgAlaGlnGlyLeuIleArgAlaCysMETLeuValArgLys
310
GTTGCTGGGGGCCATTAT
ValAlaGlyGlyHisTyr

图 19

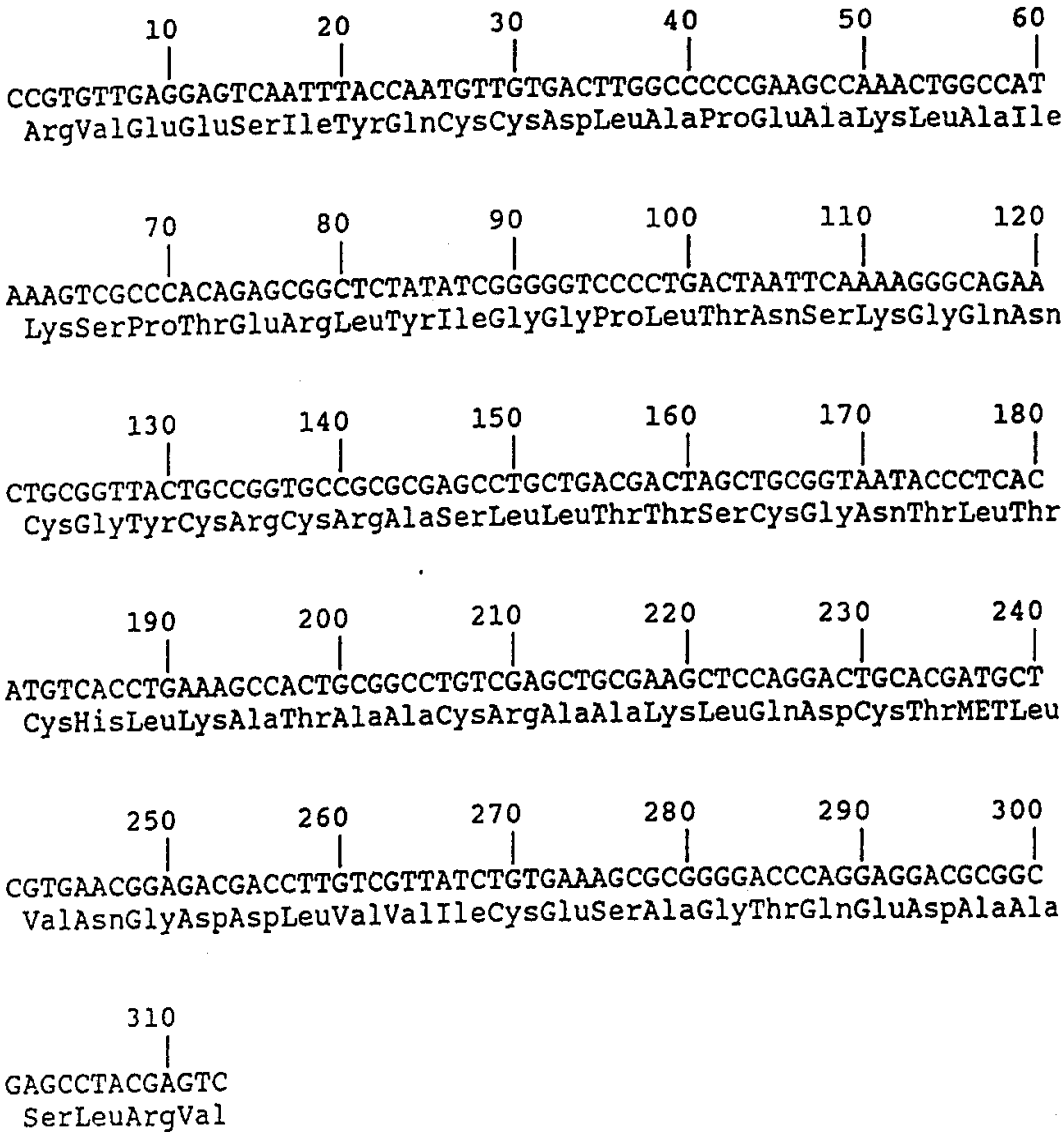

10 20 30 40 50 60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle
70 80 90 100 110 120
AAAGTCGCCCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerProThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn
130 140 150 160 170 180
CTGCGGTTACTGCCGGTGCCGCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC
CysGlyTyrCysArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr
190 200 210 220 230 240
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCT
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuGlnAspCysThrMETLeu
250 260 270 280 290 300
CGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGC
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAlaAla
310
GAGCCTACGAGTC
SerLeuArgVal

图20

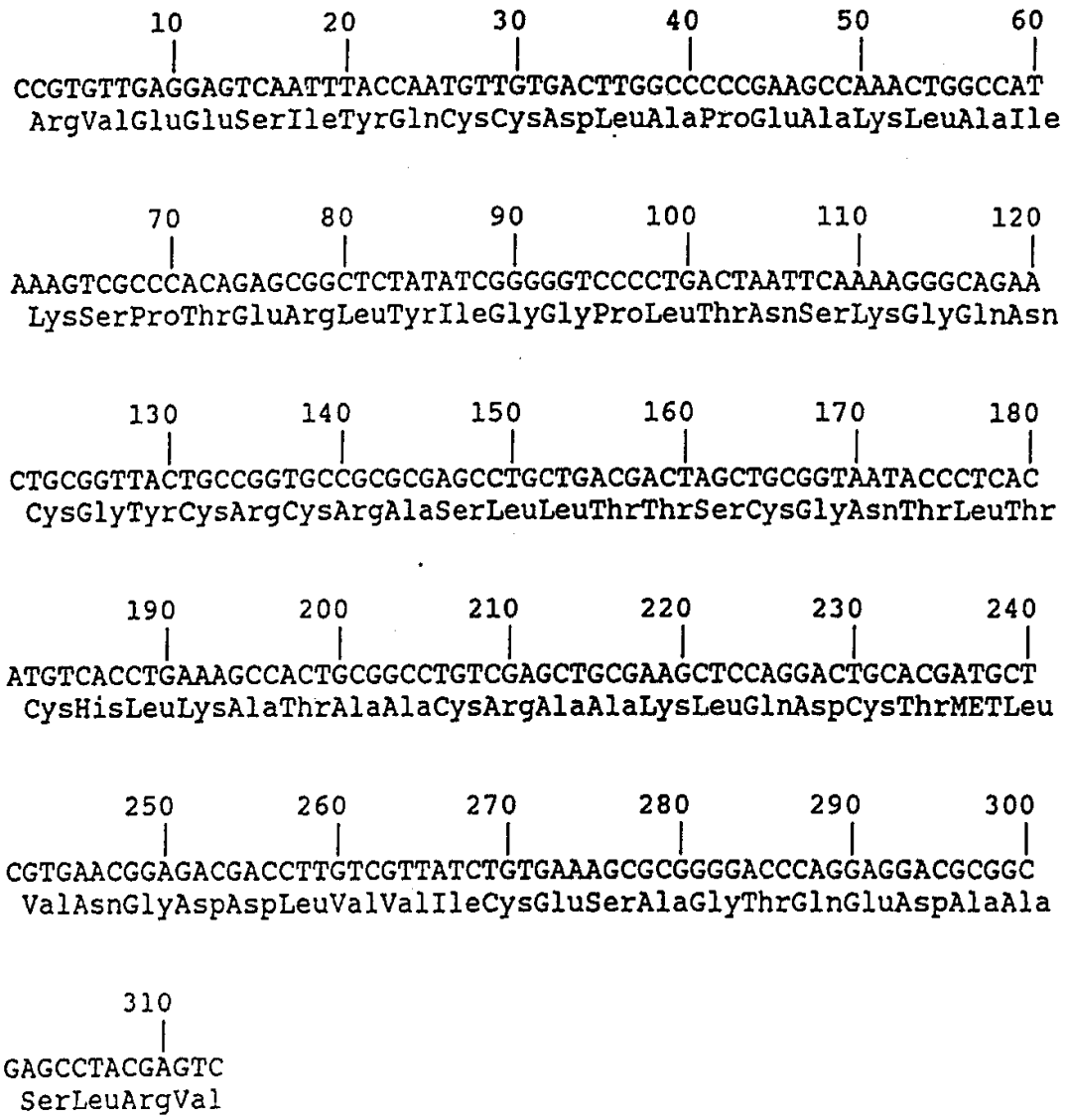

10 20 30 40 50 60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle
70 80 90 100 110 120
AAAGTCGCCCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerProThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn
130 140 150 160 170 180
CTGCGGTTACTGCCGGTGCCGCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC
CysGlyTyrCysArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr
190 200 210 220 230 240
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCAGGACTGCACGATGCT
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuGlnAspCysThrMETLeu
250 260 270 280 290 300
CGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGCGGC
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAlaAla
310
GAGCCTACGAGTC
SerLeuArgVal

图21

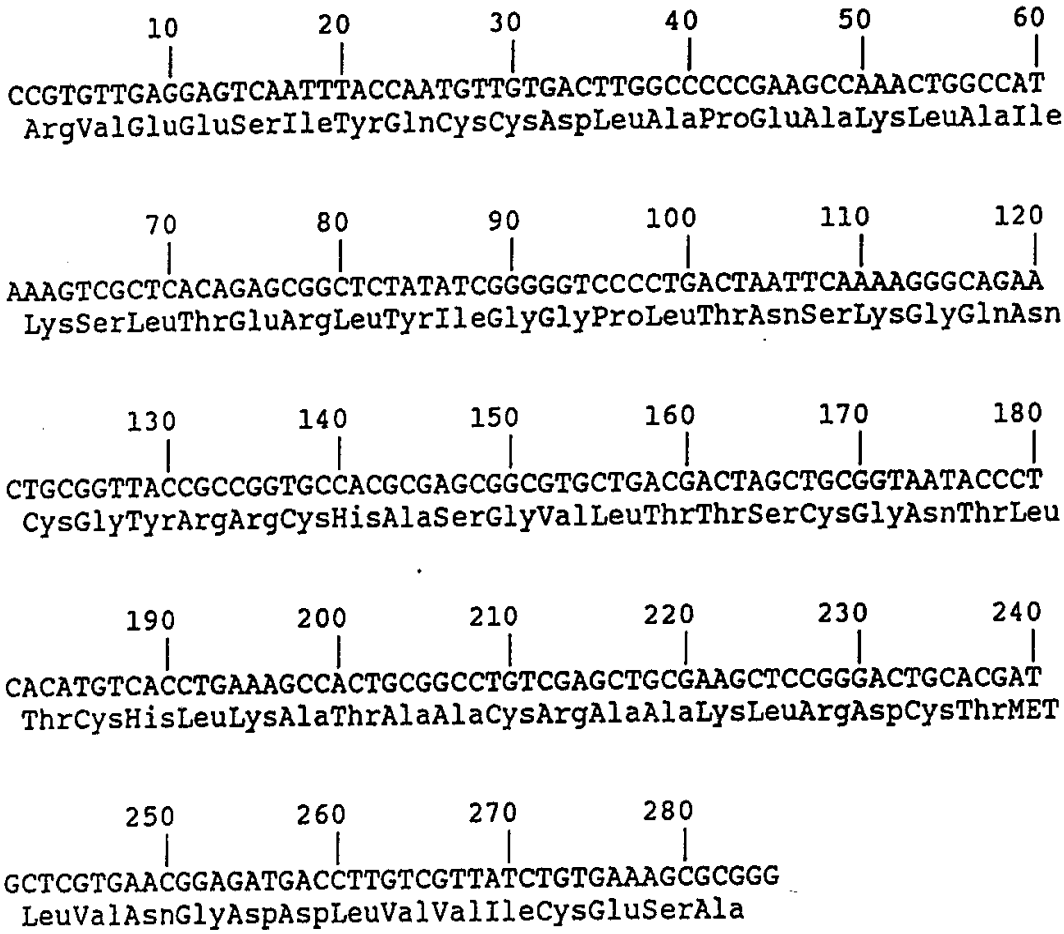

10 20 30 40 50 60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle
70 80 90 100 110 120
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn
130 140 150 160 170 180
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCT
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu
190 200 210 220 230 240
CACATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGAT
ThrCysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMET
250 260 270 280
GCTCGTGAACGGAGATGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGG
LeuValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAla

图22

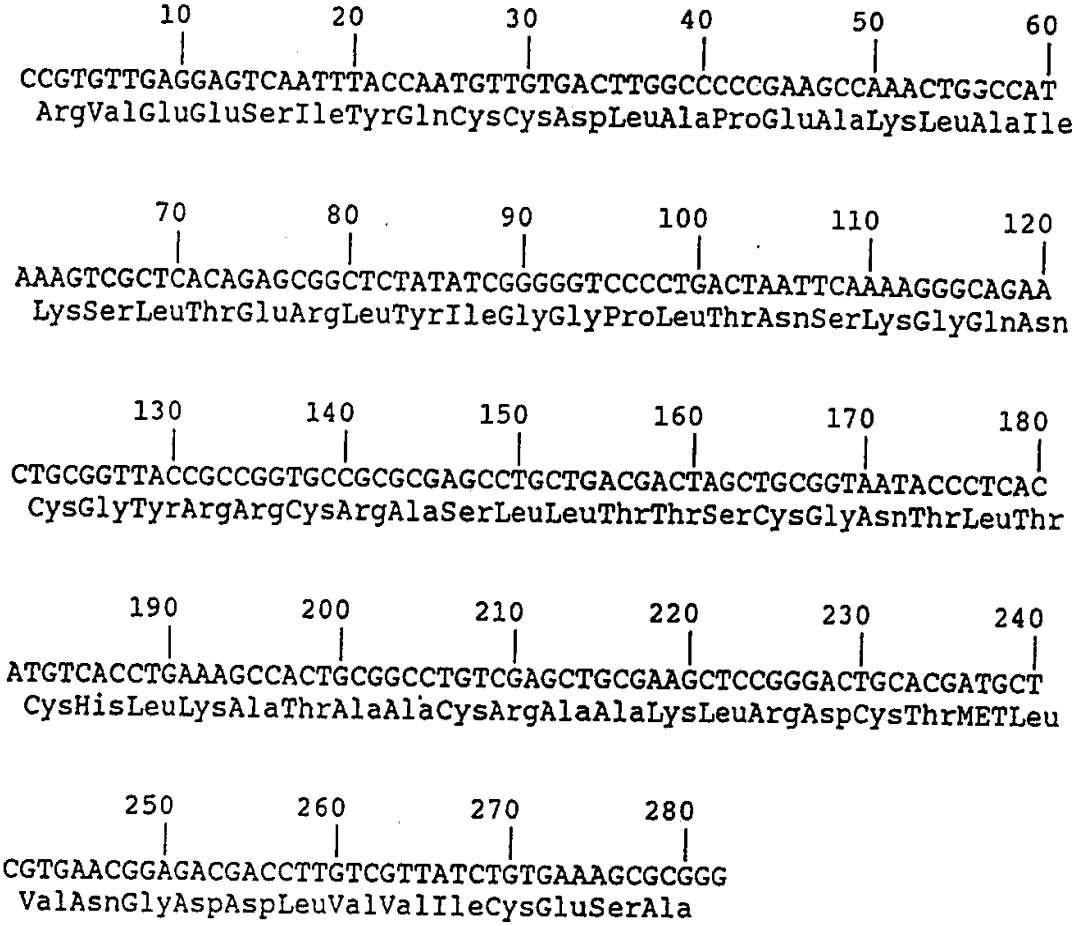

10 20 30 40 50 60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle
70 80 90 100 110 120
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn
130 140 150 160 170 180
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGCGAGCCTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCAC
CysGlyTyrArgArgCysArgAlaSerLeuLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeuThr
190 200 210 220 230 240
ATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGATGCT
CysHisLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMETLeu
250 260 270 280
CGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGG
ValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAla

图23

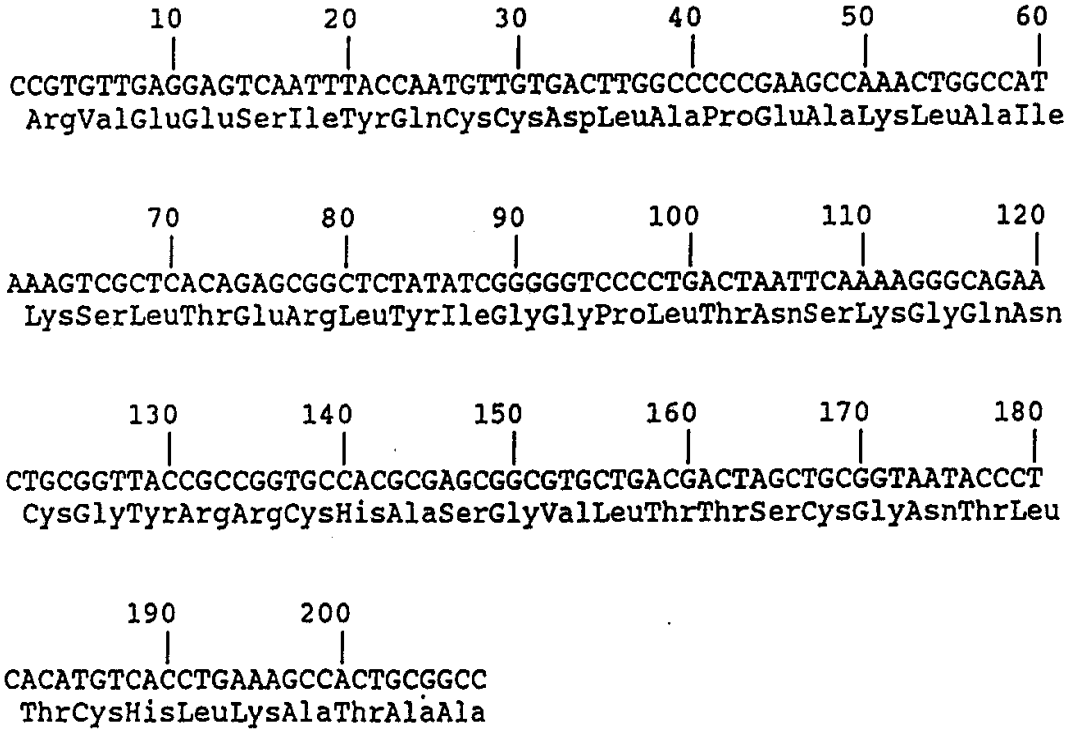

10 20 30 40 50 60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle
70 80 90 100 110 120
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn
130 140 150 160 170 180
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCT
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu
190 200
CACATGTCACCTGAAAGCCACTGCGGCC
ThrCysHisLeuLysAlaThrAlaAla

图24

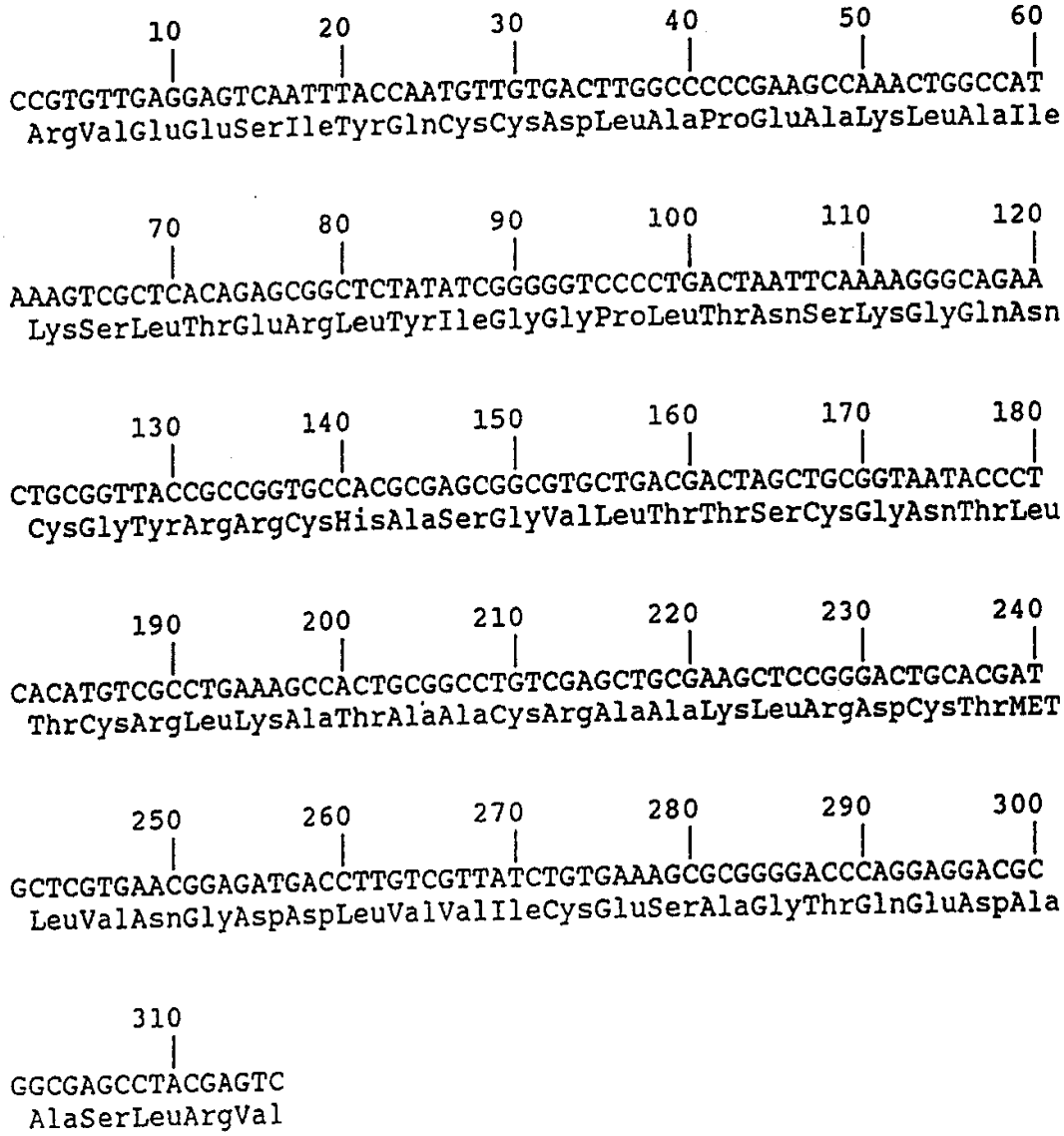

10 20 30 40 50 60
CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCAT
ArgValGluGluSerIleTyrGlnCysCysAspLeuAlaProGluAlaLysLeuAlaIle
70 80 90 100 110 120
AAAGTCGCTCACAGAGCGGCTCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAA
LysSerLeuThrGluArgLeuTyrIleGlyGlyProLeuThrAsnSerLysGlyGlnAsn
130 140 150 160 170 180
CTGCGGTTACCGCCGGTGCCACGCGAGCGGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCT
CysGlyTyrArgArgCysHisAlaSerGlyValLeuThrThrSerCysGlyAsnThrLeu
190 200 210 220 230 240
CACATGTCGCCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGAT
ThrCysArgLeuLysAlaThrAlaAlaCysArgAlaAlaLysLeuArgAspCysThrMET
250 260 270 280 290 300
GCTCGTGAACGGAGATGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGGACCCAGGAGGACGC
LeuValAsnGlyAspAspLeuValValIleCysGluSerAlaGlyThrGlnGluAspAla
310
GGCGAGCCTACGAGTC
AlaSerLeuArgVal

图25

```
            828            842     849 853                                880
KHCV-LBC1    LLTLSPHYKVFLARFIWWLQYLITRTEAHLQVWVPPLNVRGGRDAIILLTCVV
KHCV-LBC23   --------------F------L---T-----------------------A-A-
KHCV-LBC26   --------------F------L---T--------------------------
KHCV-LBC20   --------------F------L---T-------------------V-----A-

KHCV-LBC2    -F------------L------F---A-------I-----------------A-
KHCV-LBC3    -F----Y-------L------F---A-------I---------------A-A-
KHCV-LBC25   -F----Y---L---L------F---A-------A---------------M---
KHCV-LBC21   --------------LM-----FL--A---------S---------------A-
KHCV-LBC27   --------------LM-----FL--A---------S---------------A-
KHCV-LBC28   --------------LM-----FL--A----R----S---------------A-
JHCV-NCI     ------Y-------L------F---A-------------------------A-
JHCV-OSAKA   ------Y-------L------FT--A--D-H--I----A----------M-A-

HCPT-CHIRON  A--------RYISWCL------L--V--Q-H--I-----------V---M-A-


                                                                933
KHCV-LBC1    HPELIFDITKYLLAIFGPLMVLQAGITRVPYFVRAQGLIRACMLARKVVGGHY
KHCV-LBC23   ----------L----L--------S-I----S------------V--AA----
KHCV-LBC26   ----------L----L--P-----S-I-----------------V---A----
KHCV-LBC20   Y---------L---TL---------LI-------S --------V---A----

KHCV-LBC2    -S--------I----L---------L-------S-----
KHCV-LBC3    ---P----------------------------W---------------A----
KHCV-LBC25   ----------I---VL---T----------------W-------V-NIA----
KHCV-LBC21   Y---------L---TL---------L-------------------V--------
KHCV-LBC27   Y----L----L----L--------S-I-----------------V--AA----
KHCV-LBC28   Y---------L---TL---------L-------------------V---A----
JHCV-NCI     ----------L----L-----------------------------V---A----
JHCV-OSAKA   ----------L-I--L-----------------------H----V---A----

HCPT-CHIRON  --T-V-----L---V----WI---SLLK------V---L-F-A----MI----
```

图 26

```
HCV-LBC1     CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAATATCTCATCACCAGAACCGA 2904
HCV-LBC23    --------------------------------------------------------------------------------
HCV-LBC26    --------------------------------------------------------------------------------
HCV-LBC20    --------------------------------------------------------------------------------
HCV-LBC32    ----------------------------------------G-------------------------------------

HCV-LBC1     AGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTTCGGGGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCA 2984
HCV-LBC23    ------------------------------------------------------------G-G--T-C-------
HCV-LBC26    --------------------------------------------------------------------------------
HCV-LBC20    ----------------------------------------A--A--C--T------G-------------G-----CA---T-
HCV-LBC32    ------------------------------------------------------------C-------------------

HCV-LBC1     CCCAGAGCTAATCTTTGACATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACTAG 3065
HCV-LBC23    ---------G--------------C---CTC-----------C-----T-------------------TA------T-C-
HCV-LBC26    ------------------------C---CTC-----------C-----T-----CT------------TA------T-C-
HCV-LBC20    ------------------------C---CTCC----T-----C-C-----T-------------------T---T---T---
HCV-LBC32    ----------------C-------------------------------------------------------------C-

HCV-LBC1     AGTGCCGTACTTCGTGCGCGCACAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGGAAAGTCGTGGGGGGTCATTAC 3141
HCV-LBC23    -----------C----------T------C--------------------T---------C--CC-----------T
HCV-LBC26    -----------T---------T------C---------------T--------T---------TT-CT-----------T
HCV-LBC20    ---------------A---T-    ------------------------T----------T-CT-----------T
HCV-LBC32    ------------------------------------------------T----------T-CT-----C-----T
```

图27

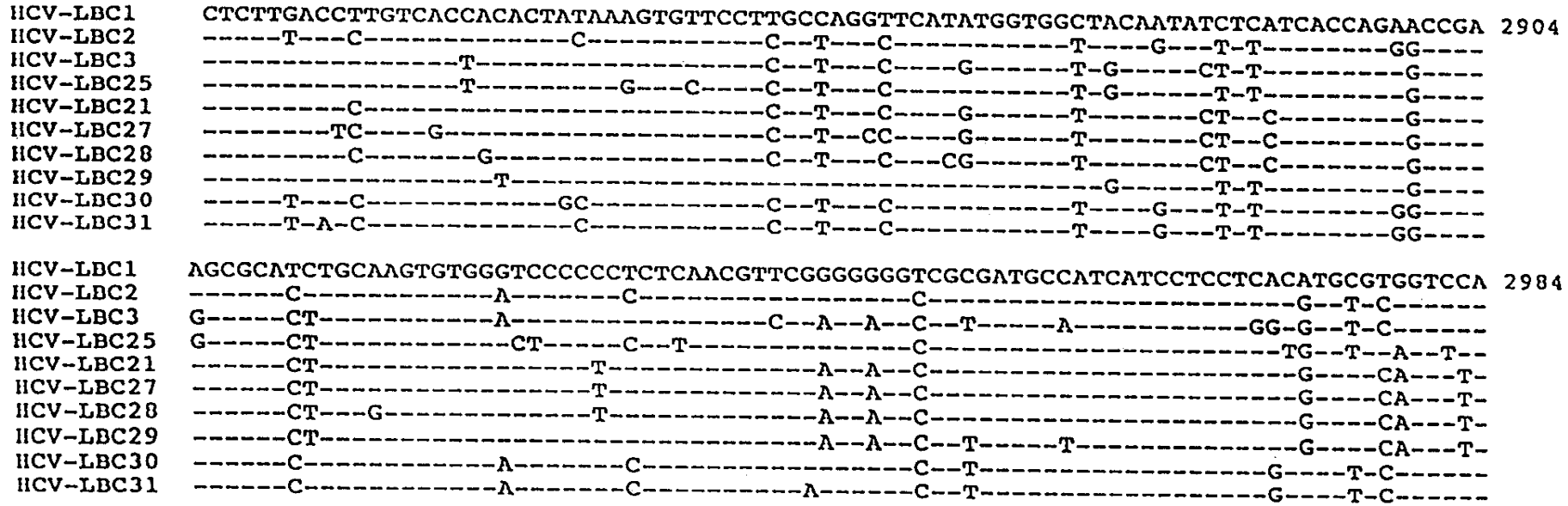

HCV-LBC1 CTCTTGACCTTGTCACCACACTATAAAGTGTTCCTTGCCAGGTTCATATGGTGGCTACAATATCTCATCACCAGAACCGA 2904
HCV-LBC2 -----T---C----------C----------C--T---C----------T----G---T-T--------GG----
HCV-LBC3 ----------T----------C--T---C----G------T-G-----CT-T---------G----
HCV-LBC25 ----------T---------G---C----C--T---C----------T-G------T-T---------G----
HCV-LBC21 ---------C----------C--T---C----G------T-------CT--C--------G----
HCV-LBC27 --------TC----G----------C--T--CC----G------T-------CT--C--------G----
HCV-LBC28 ---------C-------G----------C--T---C---CG------T-------CT--C--------G----
HCV-LBC29 ----------T----------G------T-T---------G----
HCV-LBC30 -----T---C----------GC----------C--T---C----------T----G---T-T--------GG----
HCV-LBC31 -----T-A-C----------C----------C--T---C----------T----G---T-T--------GG----
HCV-LBC1 AGCGCATCTGCAAGTGTGGGTCCCCCCTCTCAACGTTCGGGGGGGTCGCGATGCCATCATCCTCCTCACATGCGTGGTCCA 2984
HCV-LBC2 ------C----------A-------C----------C----------G--T-C------
HCV-LBC3 G-----CT----------A----------C--A--A--C--T-----A----------GG-G--T-C------
HCV-LBC25 G-----CT----------CT-----C--T----------C----------TG--T--A--T--
HCV-LBC21 ------CT----------T----------A--A--C----------G----CA---T-
HCV-LBC27 ------CT----------T----------A--A--C----------G----CA---T-
HCV-LBC28 ------CT---G----------T----------A--A--C----------G----CA---T-
HCV-LBC29 ------CT----------A--A--C--T-----T----------G----CA---T-
HCV-LBC30 ------C----------A-------C----------C--T----------G----T-C------
HCV-LBC31 ------C----------A-------C----------A------C--T----------G----T-C------

图28－1

```
HCV-LBC1    CCCAGAGCTAATCTTTGACATCACAAAATATTTGCTCGCCATATTCGGCCCGCTCATGGTGCTCCAGGCCGGCATAACTAG 3065
HCV-LBC2    -T--------G--T-----------C--GATC-----------C-T--T----------A--------T---C-----C--
HCV-LBC3    --------CG-------------------------------------------------------------------------
HCV-LBC25   ---G-----------------------ATCC--------G-GC----T-------C----------T--------C--
HCV-LBC21   ------------------------C---CTC-----T----C-C-------------------------T---T-------
HCV-LBC27   ---------------A--------C---CTC----------C----T-------------------TA------T-C-
HCV-LBC28   ---------G--------------C---CTC-----T----C-C-------------------------T---T-------
HCV-LBC29   ------------------------C---CTC-----T------C----T-------------------TA------T-C-
HCV-LBC30   ---------G-----C--------C---CTC----------C----T-------------------TA------T-C-
HCV-LBC31   ---------G--------------C---CTC----------C----T-------------------TA------T-C-

HCV-LBC1    AGTGCCGTACTTCGTGCGCGCACAAGGGCTCATTCGTGCATGCATGTTGGCGCGGAAAGTCGTGGGGGGTCATTAC 3141
HCV-LBC2    ------------T--CA----T----------
HCV-LBC3    -------------TG-------------------------------------------------CT----------
HCV-LBC25   ------------T--------T---T----------G----------T------CA---CT----------T
HCV-LBC21   ------------T--------C--G----------G----------T---------T--------C------
HCV-LBC27   ---------------A-----T-------------------------T--------C--CC-----T-----T
HCV-LBC28   ------------T--------C--G----------G----------T---------T-CT-----C-----T
HCV-LBC29   ---------------A-----T-------------------------T--------C--CC----TCA----T
HCV-LBC30   ------------GTAC-----T-------------------------T--------C--CC----------T
HCV-LBC31   ---------------A-----T-----C-------------------T--------C--CC----------T
```

图28－2

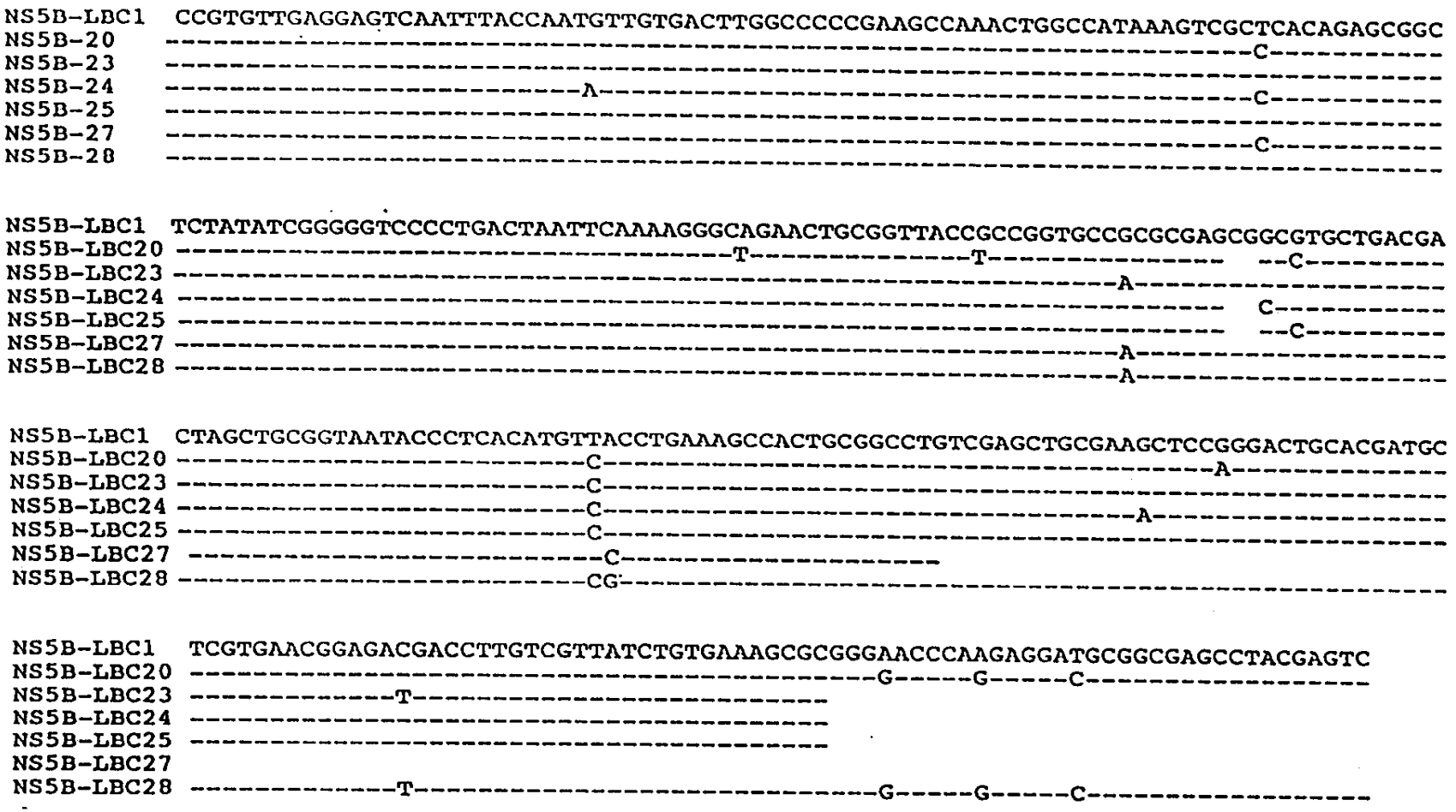

NS5B-LBC1 CCGTGTTGAGGAGTCAATTTACCAATGTTGTGACTTGGCCCCCGAAGCCAAACTGGCCATAAAGTCGCTCACAGAGCGGC
NS5B-20 C
NS5B-23
NS5B-24 A
NS5B-25 C
NS5B-27
NS5B-28 C
NS5B-LBC1 TCTATATCGGGGGTCCCCTGACTAATTCAAAAGGGCAGAACTGCGGTTACCGCCGGTGCCGCGCGAGCGGCGTGCTGACGA
NS5B-LBC20 T T --C
NS5B-LBC23 A
NS5B-LBC24 C
NS5B-LBC25 --C
NS5B-LBC27 A
NS5B-LBC28 A
NS5B-LBC1 CTAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACCTGAAAGCCACTGCGGCCTGTCGAGCTGCGAAGCTCCGGGACTGCACGATGC
NS5B-LBC20 C A
NS5B-LBC23 C
NS5B-LBC24 C A
NS5B-LBC25 C
NS5B-LBC27 C
NS5B-LBC28 CG
NS5B-LBC1 TCGTGAACGGAGACGACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGGAACCCAAGAGGATGCGGCGAGCCTACGAGTC
NS5B-LBC20 G G C
NS5B-LBC23 T
NS5B-LBC24
NS5B-LBC25
NS5B-LBC27
NS5B-LBC28 T G G C

图29

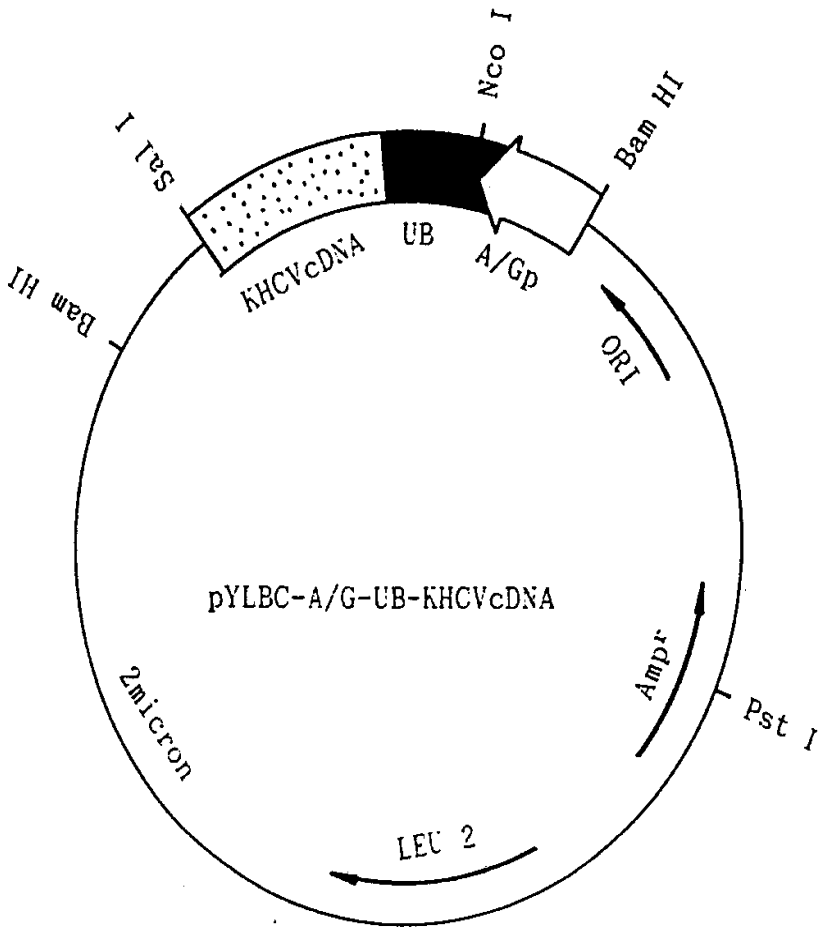
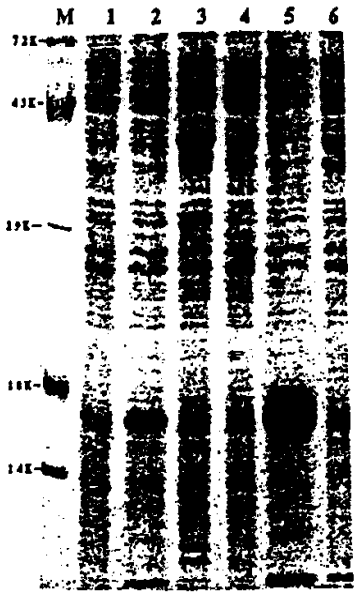

Nco I
Bam HI
Sal I
Bam HI
KHCVcDNA
UB
A/Gp
ORI
pYLBC-A/G-UB-KHCVcDNA
Ampr
Pst I
2micron
LEU 2

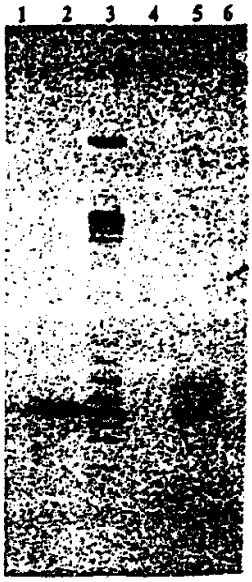
图30

(A)



SDS-PAGE

(B)



Western Blotting

图31

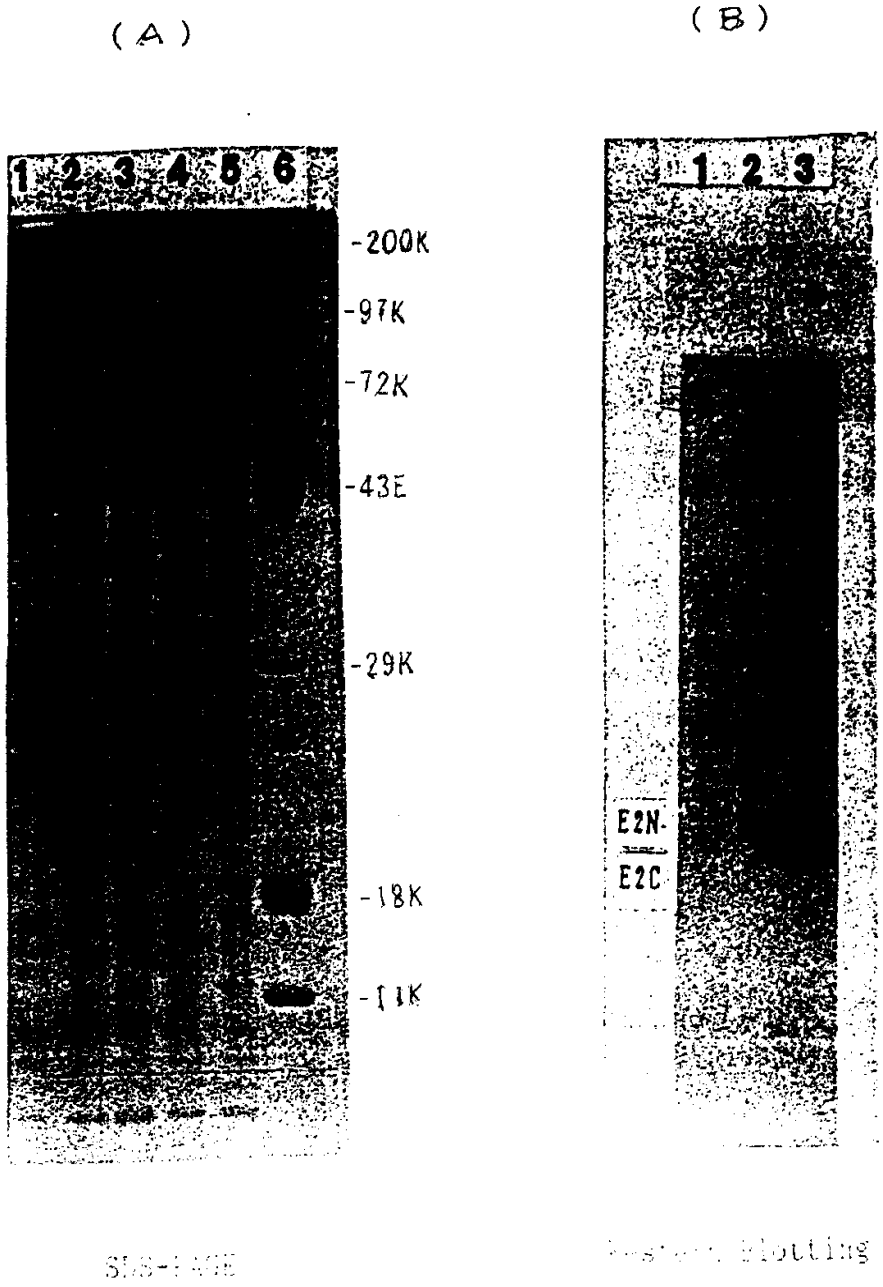

(A)
(B)
1 2 3 4 5 6
-200K
-97K
-72K
-43E
-29K
-18K
-11K
1 2 3
E2N-
E2C
SDS-PAGE
Western Blotting

图32

```
          10         20         30         40         50         60
ATGCAAATTT TCGTCAAAAC TCTAACAGGG AAGACTATAA CCCTAGAGGT TGAATCTTCC
TACGTTTAAA AGCAGTTTTG AGATTGTCCC TTCTGATATT GGGATCTCCA ACTTAGAAGG

          70         80         90         100        110        120
GACACTATTG ACAACGTCAA AAGTAAAATT CAAGATAAAG AAGGTATCCC TCCGGATCAG
CTGTGATAAC TGTTGCAGTT TTCATTTTAA GTTCTATTTC TTCCATAGGG AGGCCTAGTC

          130        140        150        160        170        180
CAGAGATTGA TTTTTGCTGG TAAGCAACTA GAAGATGGTA GAACCTTGTC TGACTACAAC
GTCTCTAACT AAAAACGACC ATTCGTTGAT CTTCTACCAT CTTGGAACAG ACTGATGTTG

          190        200        210        220
ATCCAAAAGG AATCTACTCT TCACTTGGTG TTGAGACTCC GCGGTGGT
TAGGTTTTCC TTAGATGAGA AGTGAACCAC AACTCTGAGG CGCCACCA
```

图 33

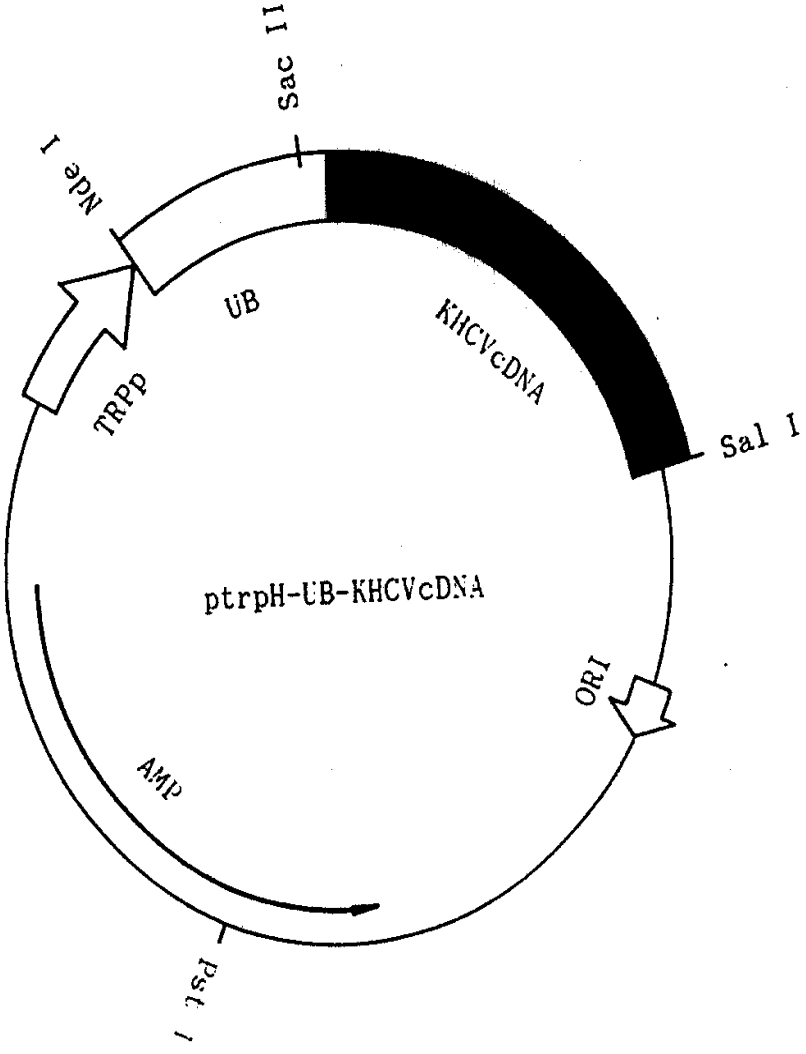

Sac II
Nde I
UB
KHCVcDNA
Sal I
TRPp
ptrpH-UB-KHCVcDNA
ORI
AMP
Pst I

图34

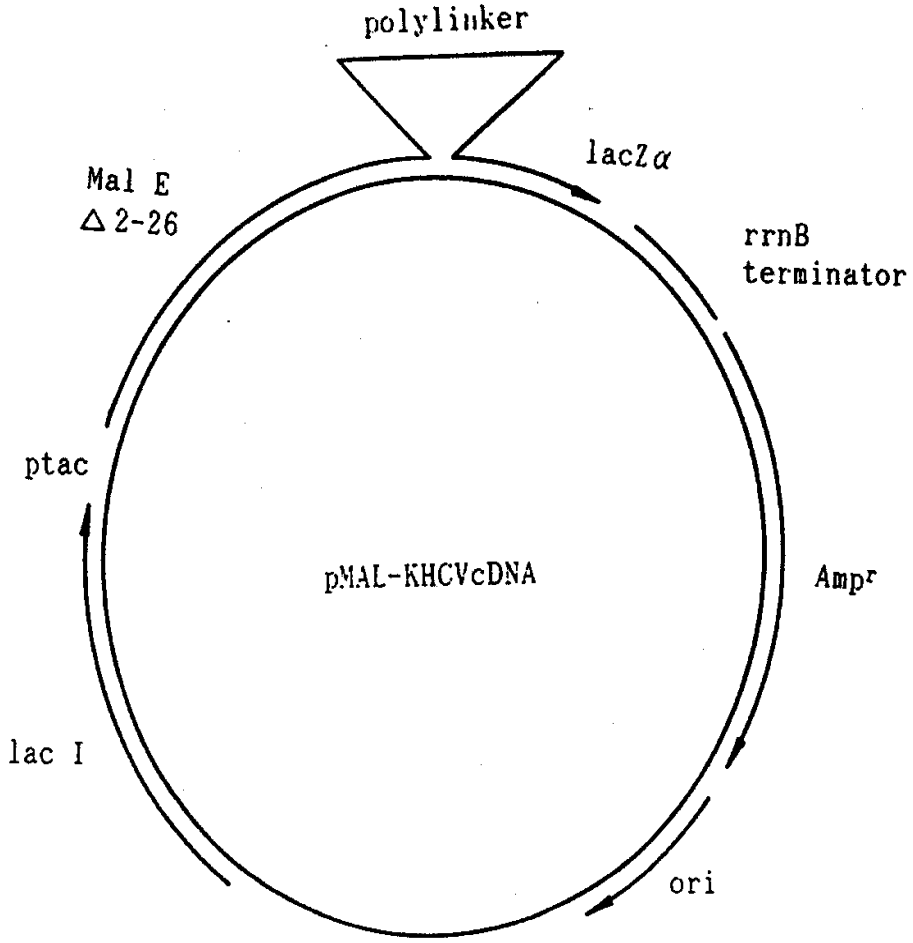

polylinker
lacZα
Mal E
Δ2-26
rrnB
terminator
ptac
pMAL-KHCVcDNA
Amp
lac I
ori

图35

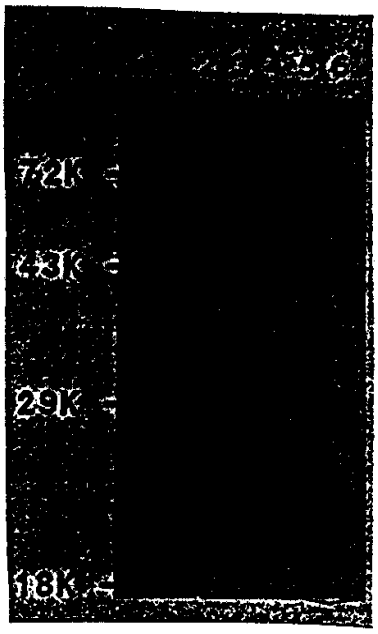


图36

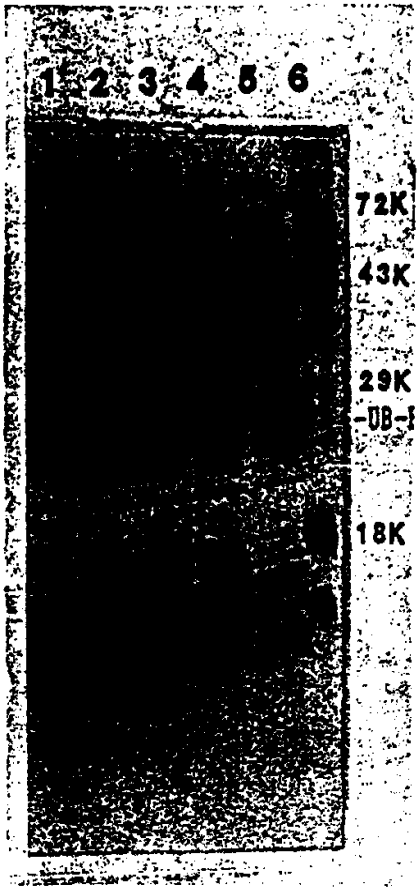


图37

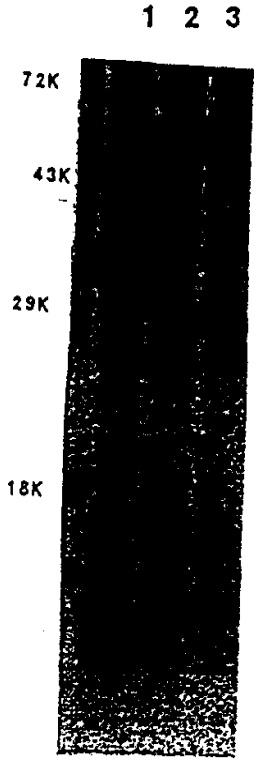


图38

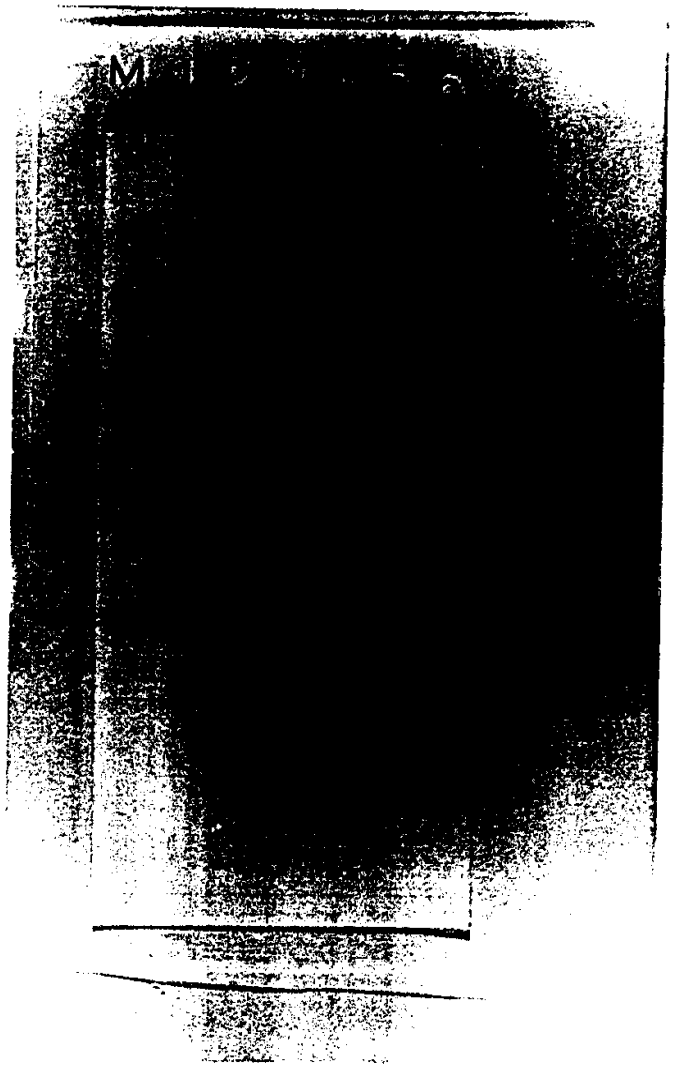


图39

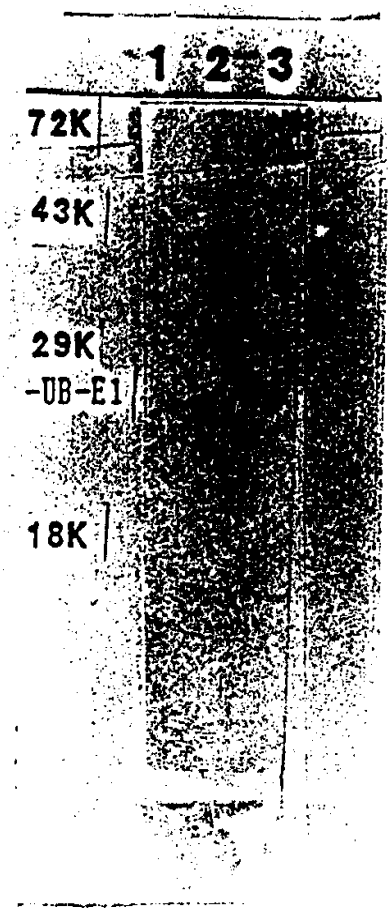


图 40

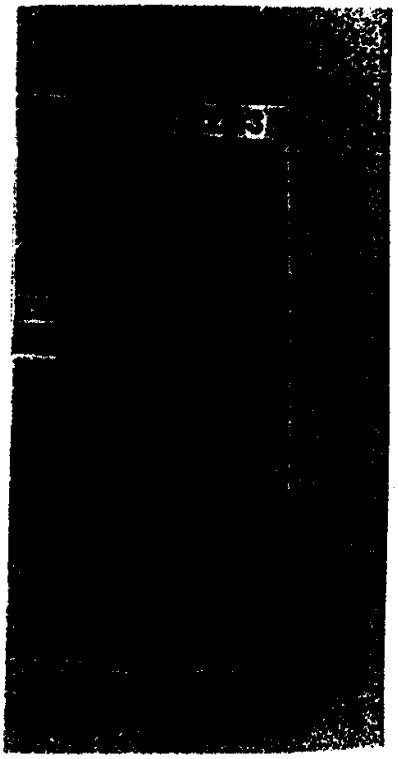


图41

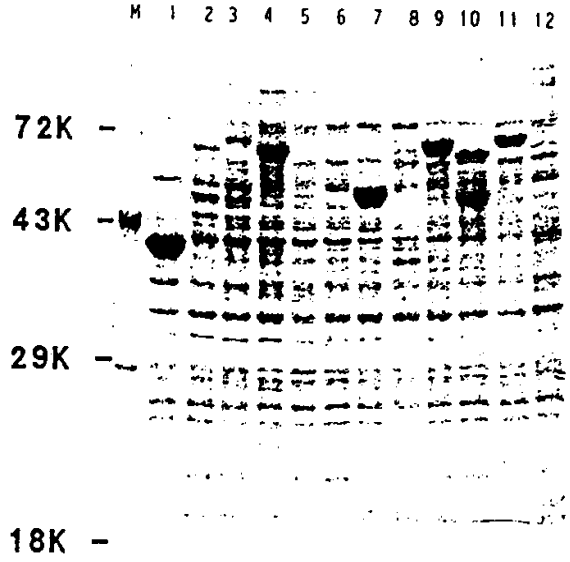


图42

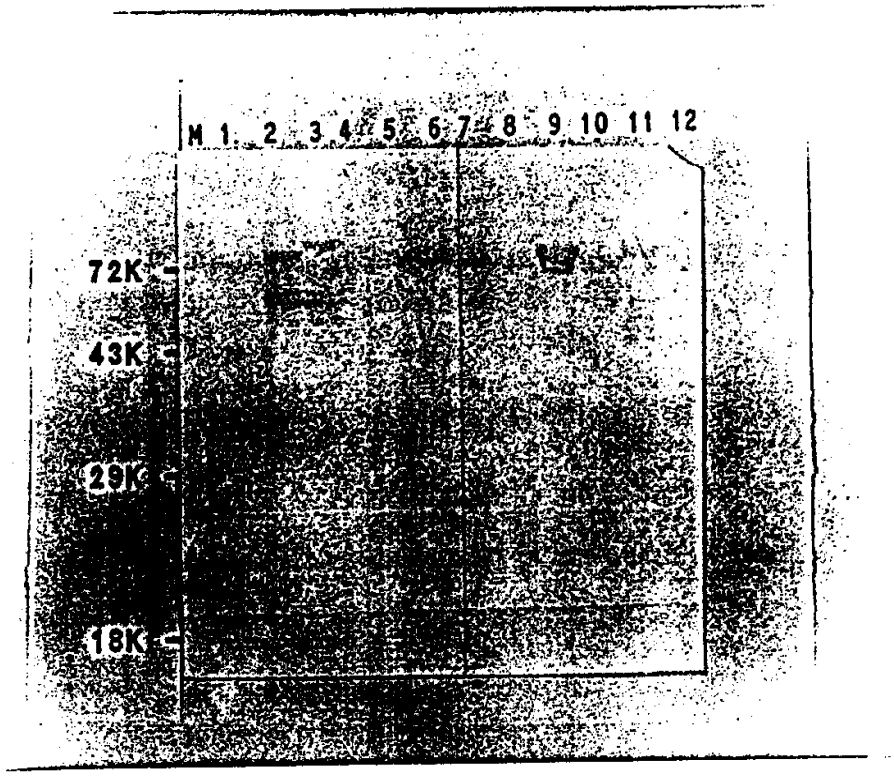


图43

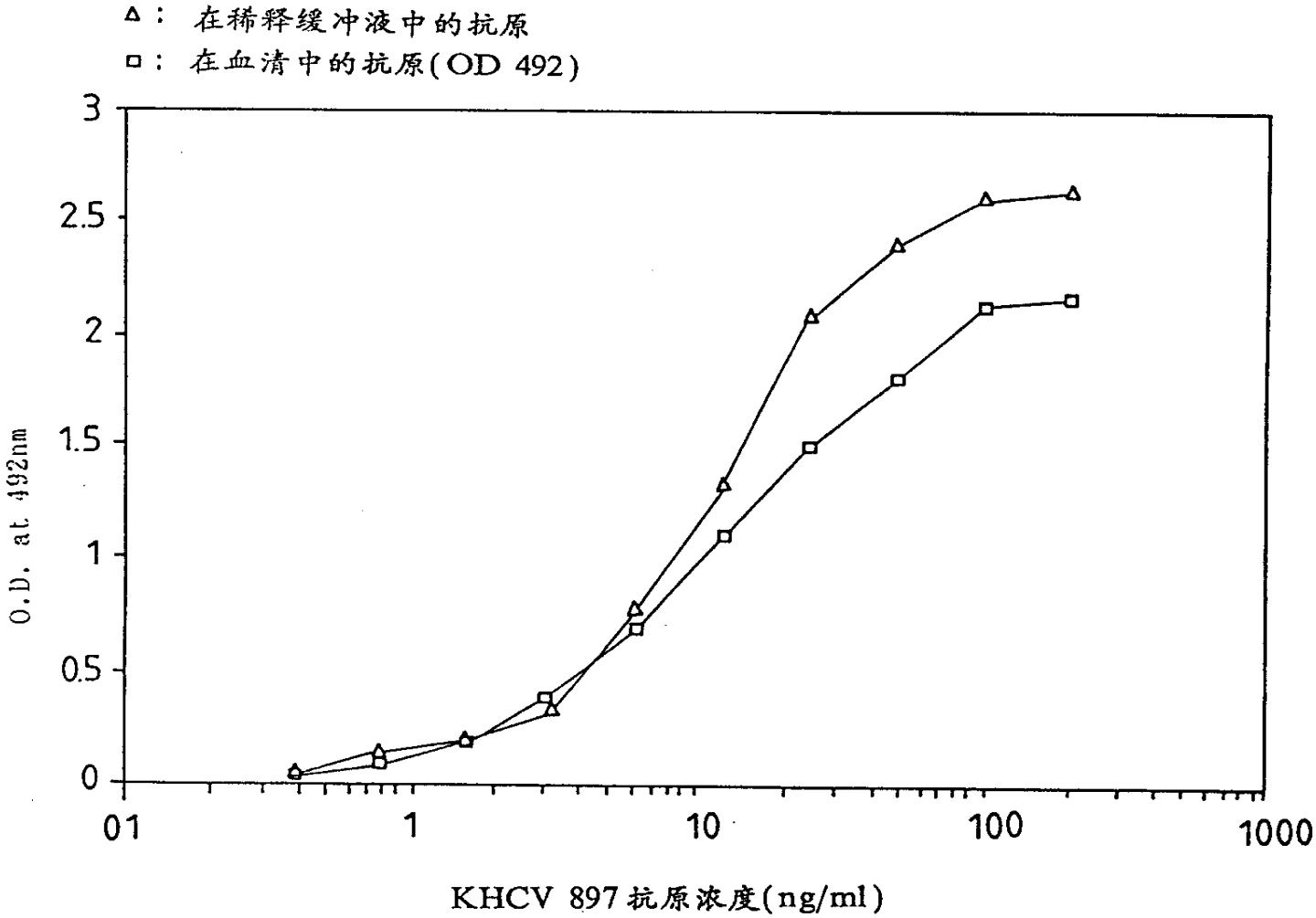

△： 在稀释缓冲液中的抗原
□： 在血清中的抗原(OD 492)
O.D. at 492nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
01
1
10
100
1000
KHCV 897 抗原浓度(ng/ml)

图44

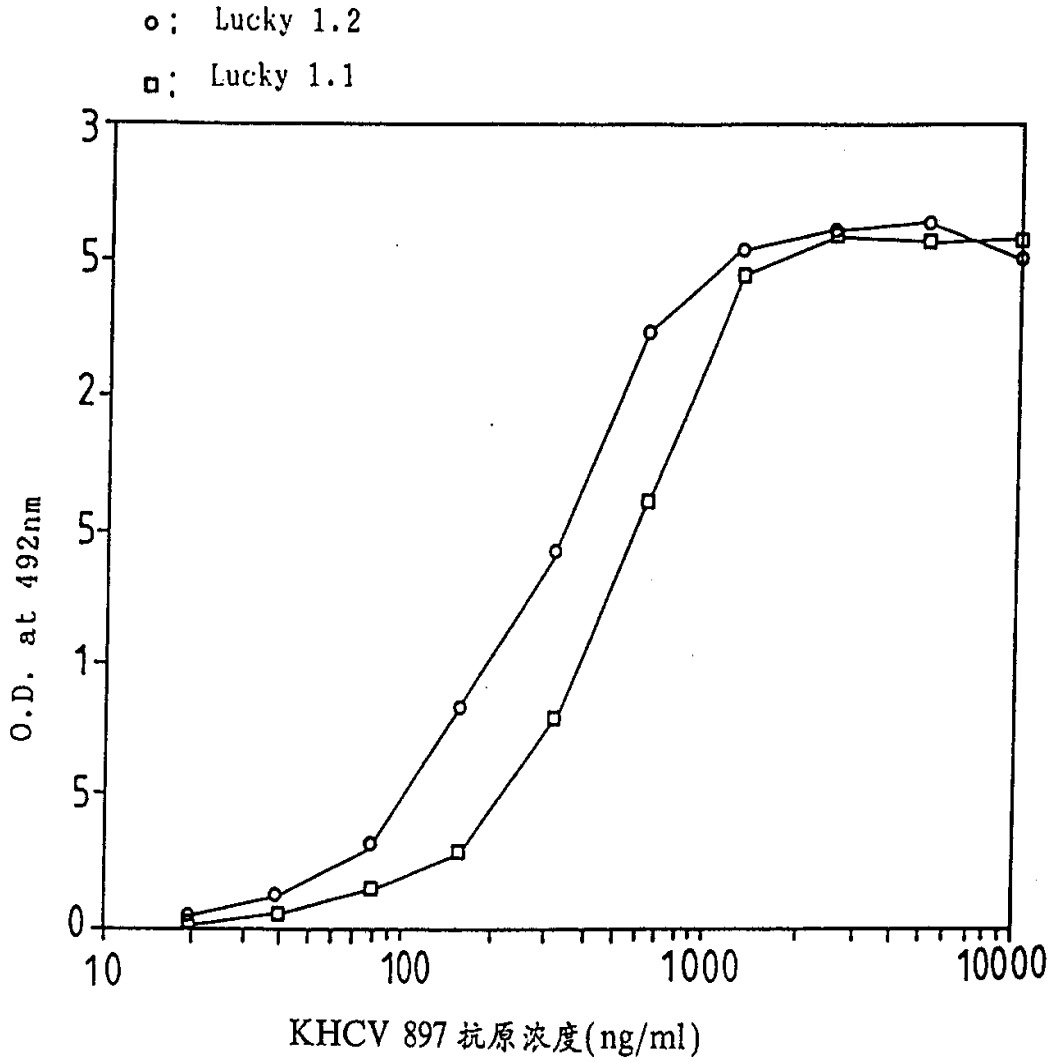

o; Lucky 1.2
□; Lucky 1.1
O.D. at 492nm
3
5
2
5
1
5
0
10
100
1000
10000
KHCV 897 抗原浓度(ng/ml)

图45