(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112778404 B
(45)授权公告日 2022.11.29

(21)申请号 202110117653.8
(22)申请日 2021.01.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112778404 A
(43)申请公布日 2021.05.11
(73)专利权人 中山大学
地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号
专利权人 中山大学肿瘤防治中心(中山大学附属肿瘤医院、中山大学肿瘤研究所)
(72)发明人 曾木圣 孙聪 冯国开 康银峰
(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
专利代理师 胡辉
(51)Int.Cl.
C07K 14/03(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/38(2006.01)
A61K 39/245(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61K 47/62(2017.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 39/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
(56)对比文件
US 6156319 A,2000.12.05
审查员 刘婷

权利要求书1页 说明书9页
序列表21页 附图4页

(54)发明名称

一种含EB病毒gHgL蛋白的自组装纳米颗粒及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种含EB病毒gHgL蛋白的自组装纳米颗粒及其制备方法与应用。该自组装纳米颗粒,包含第一多肽和第二多肽;所述第一多肽包含gHgL蛋白和第一载体亚基,所述第二多肽包含第二载体亚基;所述第一载体亚基为I53-50A1,所述第二载体亚基为I53-50B.4PT1;所述gHgL蛋白与第一载体亚基通过铰链连接。该自组装纳米颗粒首次将EB病毒的gHgL蛋白展示在纳米颗粒表面,其粒径较抗原(gHgL)大,具有更好的抗原驻留体积,热稳定与抗原(gHgL)相当,同时其展示的gHgL数量更多能够更强地刺激B细胞,并且能够诱导更高的抗体滴度,可用于预防EB病毒感染及治疗EB病毒感染所引起的疾病。

CN 112778404 B

1.一种自组装纳米颗粒,其特征在于:包含第一多肽和第二多肽;所述第一多肽包含gHgL蛋白和第一载体亚基,所述第二多肽包含第二载体亚基;所述第一载体亚基为I53-50A1,所述第二载体亚基为I53-50B.4PT1;所述gHgL蛋白与第一载体亚基通过铰链连接;

所述铰链包含柔性序列和刚性接头;

所述柔性序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示;

所述刚性接头的氨基酸序列为EKAAKAEEAA;

所述第一多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示;

所述第二多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示。

2.根据权利要求1所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述I53-50A1的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。

3.根据权利要求1所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述第一多肽还包含稳定蛋白;

所述稳定蛋白位于铰链与gHgL蛋白之间。

4.根据权利要求3所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述稳定蛋白为T4噬菌体纤维蛋白原。

5.根据权利要求4所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述第一多肽形成三聚体,所述第二多肽形成五聚体。

6.根据权利要求5所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述三聚体的拷贝数为18～22,所述五聚体的拷贝数为10～14。

7.根据权利要求1~6中任一项所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述gHgL蛋白包含gH蛋白和gL蛋白。

8.根据权利要求7所述的自组装纳米颗粒,其特征在于:

所述gHgL蛋白还包含链接序列。

9.权利要求1~8中任一项所述的自组装纳米颗粒的制备方法,其特征在于:将第一多肽与第二多肽孵育,得到。

10.根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于:所述第一多肽和第二多肽的摩尔比为1:(3～6)。

11.权利要求1~8中任一项所述的自组装纳米颗粒在制备预防EB病毒感染的药品中的应用。

12.一种疫苗,其特征在于:包含权利要求1~8中任一项所述的自组装纳米颗粒。

13.根据权利要求12所述的疫苗,其特征在于:

所述疫苗还包括佐剂。

14.权利要求1~8中任一项所述的自组装纳米颗粒在制备治疗EB病毒感染所引起的疾病的药品中的应用。

一种含EB病毒gHgL蛋白的自组装纳米颗粒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种含EB病毒gHgL蛋白的自组装纳米颗粒及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] EB病毒(Epstein-Barr virus，EBV)属于γ疱疹病毒，是一种带有包膜的双链DNA病毒，主要感染皮肤、黏膜、神经等外胚层来源的组织。它在人群中感染非常普遍，患病率高达95％，且极易在体内终生潜伏。除了引起传染性单核细胞增多症，EB病毒还可引起移植后淋巴细胞增殖性疾病和一些B细胞、上皮细胞的恶性肿瘤。淋巴细胞增殖性疾病包括Burkitt淋巴瘤、弥漫大B细胞性淋巴瘤、NK/T细胞淋巴瘤等；恶性肿瘤包括鼻咽癌、胃癌等。

[0003] 在EBV的融合蛋白复合体中，既包括在疱疹病毒家族保守存在的gB和gHgL，也包括EBV特有的gp350和gp42。研究发现，gHgL在膜融合过程中作为重要的受体结合蛋白，既能单独发挥作用介导上皮细胞感染，也能与gp42形成共同的复合物参与B细胞感染。此外gHgL中和抗体在上皮细胞感染和B细胞感染中都具有极强的EB病毒中和效果，这些都证实了gHgL是理想的EBV疫苗免疫原。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术所存在的不足，本发明的第一方面的目的，在于提供一种含gHgL蛋白的自组装纳米颗粒。

[0005] 本发明的第二个方面的目的，在于提供一种第一方面的自组装纳米颗粒的制备方法。

[0006] 本发明的第三个方面的目的，在于提供第一方面的自组装纳米颗粒在制备预防EB病毒感染的药品中的应用。

[0007] 本发明的第四个方面的目的，在于提供上述一种包含第一方面的自组装纳米颗粒的疫苗。

[0008] 本发明的第五方面的目的，在于提供第一方面的自组装纳米颗粒在制备治疗EB病毒感染所引起的疾病的药品中的应用。

[0009] 为了实现上述目的，本发明所采取的技术方案是：

[0010] 本发明的第一个方面，提供一种含gHgL蛋白的自组装纳米颗粒，包含第一多肽和第二多肽；所述第一多肽包含gHgL蛋白和第一载体亚基，所述第二多肽包含第二载体亚基；所述第一载体亚基为I53-50A1，所述第二载体亚基为I53-50B.4PT1；所述gHgL蛋白与第一载体亚基通过铰链连接，可以使得组装后的纳米颗粒外展示gHgL蛋白，更好地激发机体的免疫反应。

[0011] 优选的，所述铰链包含柔性序列和刚性接头，铰链用于gHgL蛋白与载体蛋白(载体蛋白由第一载体亚基和第二载体亚基组成)的连接，不影响gHgL蛋白的免疫原性以及蛋白

的正确折叠。

[0012] 优选的,所述柔性序列为含5～9个氨基酸的多肽;进一步为SEQ ID NO:12～SEQ ID NO:16中任一种的多肽;更进一步为如SEQ ID NO:15所示的多肽。

[0013] 优选的,所述刚性接头的氨基酸序列为EKAAKAEEAA(SEQ ID NO:31)。

[0014] 优选的,所述第一载体亚基与所述第二载体亚基以非共价相互作用自组装形成纳米结构,所述第一载体亚基包覆于所述第二载体亚基的表面,所述gHgL蛋白展示在纳米结构表面。

[0015] 优选的,所述gHgL蛋白包含gH蛋白(SEQ ID NO:28)和gL蛋白(SEQ ID NO:29)。

[0016] 优选的,所述gHgL蛋白还包含链接序列(SEQ ID NO:30),所述链接序列用于连接gH蛋白和gL蛋白。

[0017] 优选的,所述I53-50A1的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。

[0018] 优选的,所述I53-50B.4PT1的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示。

[0019] 优选的,所述第一多肽还包含稳定蛋白。

[0020] 优选的,所述稳定蛋白位于铰链与gHgL蛋白之间。

[0021] 优选的,所述稳定蛋白为T4噬菌体纤维蛋白原(T4 fibritin)(SEQ ID NO:32)或GCN4肽段(SEQ ID NO:33);进一步为T4噬菌体纤维蛋白原。

[0022] 优选的,所述第一多肽为第一多肽三聚体。

[0023] 优选的,所述第二多肽为第二多肽五聚体。

[0024] 优选的,所述第一多肽三聚体的拷贝数为18～22,所述第二多肽五聚体的拷贝数为10～14;进一步优选的,所述第一多肽三聚体的拷贝数为20,所述第二多肽五聚体的拷贝数为12。

[0025] 优选的,所述含gHgL蛋白的自组装纳米颗粒具有20面体对称性。

[0026] 本发明的第二个方面,提供一种含gHgL蛋白的自组装纳米颗粒的制备方法,将第一多肽与第二多肽孵育,得到;所述第一多肽包含gHgL蛋白和第一载体亚基,所述第二多肽包含第二载体亚基;所述第一载体亚基为I53-50A1,所述第二载体亚基为I53-50B.4PT1;所述gHgL蛋白与第一载体亚基通过铰链连接,可以使得组装后的纳米颗粒外展示gHgL蛋白,更好地激发机体的免疫反应。

[0027] 优选的,所述I53-50A1的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。

[0028] 优选的,所述I53-50B.4PT1的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示。

[0029] 优选的,所述第一多肽和第二多肽的摩尔比为1:(3～6);进一步为1:5。

[0030] 优选的,所述孵育的条件为在组装缓冲液中孵育0.5～2h。

[0031] 优选的,所述组装缓冲液的组成为250mM NaCl,50mM Tris-HCl pH8.0,5%甘油(质量分数)。

[0032] 优选的,所述gHgL蛋白包含gH蛋白(SEQ ID NO:28)和gL蛋白(SEQ ID NO:29)。

[0033] 优选的,所述gHgL蛋白还包含链接序列(SEQ ID NO:30),所述链接序列用于连接gH蛋白和gL蛋白。

[0034] 优选的,所述铰链包含柔性序列和刚性接头,铰链用于gHgL蛋白与载体蛋白(载体蛋白由第一载体亚基和第二载体亚基组成)的连接,不影响gHgL蛋白的免疫原性以及蛋白的正确折叠。

[0035] 优选的,所述柔性序列为含5～9个氨基酸的多肽;进一步为SEQ ID NO:12～SEQ ID NO:16中任一种的多肽;更进一步为如SEQ ID NO:15所示的多肽。

[0036] 优选的,所述刚性接头的氨基酸序列为EKAAKAEEAA(SEQ ID NO:31)。

[0037] 优选的,所述第一多肽还包含稳定蛋白。

[0038] 优选的,所述稳定蛋白位于铰链与gHgL蛋白之间。

[0039] 所述稳定蛋白优选为T4噬菌体纤维蛋白原(T4 fibritin)(SEQ ID NO:32)或GCN4肽段(SEQ ID NO:33);更优选为T4噬菌体纤维蛋白原。

[0040] 优选的,所述第一多肽和第二多肽还包含纯化标签。

[0041] 所述纯化标签优选为组氨酸标签(His标签),链霉亲和素标签(Strep标签)和麦芽糖结合蛋白(MBP)中的至少一种;更优选为组氨酸标签(His标签);最优选为氨基酸序列如SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35所示的组氨酸标签。

[0042] 优选的,所述第一多肽的纯化标签位于稳定蛋白和铰链之间。

[0043] 优选的,所述第一多肽还包含连接序列。

[0044] 优选的,所述连接序列位于稳定蛋白和纯化标签之间。

[0045] 优选的,所述连接序列如SEQ ID NO:37所示。

[0046] 优选的,所述第二多肽的纯化标签位于第二载体亚基的末端。

[0047] 所述第一多肽还含有信号肽,使目的蛋白在表达后能够分泌至上清。

[0048] 所述信号肽选自CD5信号肽(SEQ ID NO:36)。

[0049] 所述第一多肽优选通过如下方式获得:将表达第一多肽的核酸引入第一宿主细胞;孵育第一宿主细胞表达第一多肽。

[0050] 所述第一宿主细胞优选为真核细胞;更优选为人类胚胎肾293细胞(HEK293F),犬肾细胞(Madin-Daby canine kidney cells,MDCK),非洲绿猴(Chlorocebus sabaeus)肾细胞(VERO),SF9(Spodoptera frugiperda 9)细胞,HighFive细胞、CHO(Chinese Hamster Ovary,中国仓鼠卵巢)细胞和酵母细胞中的至少一种;最优选为人类胚胎肾293细胞。

[0051] 所述第二多肽优选通过如下方式获得:将表达第二多肽的核酸引入第二宿主细胞;孵育第二宿主细胞表达第二多肽。

[0052] 所述第二宿主细胞优选为原核细胞;更优选为大肠杆菌;最优选为Rosetta(DE3)。

[0053] 本发明的第三个方面,提供第一方面的自组装纳米颗粒在制备预防EB病毒感染的药品中的应用。

[0054] 本发明的第四个方面,提供一种包含第一方面的自组装纳米颗粒的疫苗。

[0055] 一种疫苗,包含上述含gHgL蛋白的自组装纳米颗粒。

[0056] 所述疫苗还包括佐剂。

[0057] 所述佐剂优选为铝佐剂,油乳佐剂如水包油、油包水、双向型乳液,微生物来源类佐剂如肽聚糖(PG)、革兰氏阴性菌外膜脂多糖(Lipopolysccharide,LPS)、分枝杆菌及其组份、GpG寡核苷酸(GpG ODN)、霍乱毒素(Cholera toxin,CT)),微粒抗原递送体系如脂质体、聚合微球体、惰性纳米微球、纳米铝佐剂、免疫刺激复合物(Immunostimulating comples,IS-COM)、细胞因子,多糖类如菊粉(MPI),天然来源类如蜂胶(propolis)、皂苷(Sapoin)中的至少一种;更优选为MF59佐剂。

[0058] 本发明的第五方面,提供第一方面的自组装纳米颗粒在制备治疗EB病毒感染所引

起的疾病的药品中的应用。

[0059] 所述疾病优选为传染性疾病、恶性肿瘤、慢性疾病和自身性免疫疾病中的至少一种;更优选为单核细胞增多症、鼻咽癌、胃癌、上皮细胞性肿瘤、Burkitt淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性疲劳综合征、多发性硬化和强直性脊髓炎中的至少一种。

[0060] 所述药品还包括药学上可接受的载体。

[0061] 本发明的有益效果是:

[0062] 本发明提供的自组装纳米颗粒首次将EB病毒的gHgL蛋白展示在纳米颗粒表面,其粒径较抗原(gHgL)大,具有更好的抗原驻留体积,热稳定与抗原(gHgL)相当,具有更好的抗原驻留体积,同时其展示的gHgL数量更多能够更强地刺激B细胞,并且能够诱导更高的抗体滴度,可用于预防EB病毒感染及治疗EB病毒感染所引起的疾病。

[0063] 本发明提供的自组装纳米颗粒,虽然引入了异源基因,但其由于是来源于细菌的蛋白,避免了引起自身免疫疾病,具有安全性高的优势,且不影响免疫效果。

附图说明

[0064] 图1是gHgL-I53-50A1、gHgL-I53-50 NP的结构示意图:其中,A为Remodel设计后的输出结构图:gH与I53-50A1的N端-C端间距为31.6A;B为gHgL-I53-50A1三聚体结构拟合图:可观察其并未发现蛋白链的显著冲突;C为gHgL-I53-50 NP纳米颗粒的结构示意图:其是通过输出结构与I53-50A NP(PDB id:6P6F)进行蛋白结构拟合后的结果。

[0065] 图2是自组装纳米颗粒的SDS-PAGE电泳的考马斯亮蓝染色图。

[0066] 图3是gHgL、gHgL-I53-50A1亚单位和gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒的分子筛色谱图。

[0067] 图4是gHgL、gHgL-I53-50A1亚单位和gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒的动态光散射结果图。

[0068] 图5是gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒的负染电镜图:其中,A为gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒在200nm分辨率下的负染电镜图;B为gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒在100nm分辨率下的负染电镜图。

[0069] 图6是gHgL、gHgL-I53-50A1亚单位和gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒的内在荧光扫描结果图。

[0070] 图7是gHgL、gHgL-I53-50A1亚单位和gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒与中和抗体AMMO1的生物膜干涉检测图:其中,A为gHgL与中和抗体AMMO1的生物膜干涉检测图;B为gHgL-I53-50A1亚单位与中和抗体AMMO1的生物膜干涉检测图;C为gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒与中和抗体AMMO1的生物膜干涉检测图。

[0071] 图8是小鼠免疫后血清gHgL的总抗滴度图:A为免疫后第二周血清gHgL的总抗滴度图,B为免疫后第五周血清gHgL的总抗滴度图;图中,**表示P<0.005。

具体实施方式

[0072] 以下结合具体的实施例及附图对本发明的内容作进一步详细的说明。

[0073] 应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

[0074] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件。实施例中所用到

的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0075] 本申请的纳米颗粒疫苗制备方法包括以下:

[0076] A.通过Rosetta等计算机辅助设计,确定gHgL与三聚体稳定蛋白融合相容性,并根据结果设计表达序列。

[0077] B.通过第一宿主细胞,利用瞬时转染技术将真核表达载体转入第一细胞中表达,获得gHgL-I53-50A1的纳米颗粒亚单位蛋白(第一多肽),同时利用第二宿主细胞,转化另一个I53-50B.4PT1的表达质粒,在IPTG诱导后表达获得I53-50B.4PT1这另一纳米颗粒亚单位蛋白(第二多肽),两种蛋白通过亲和层级以及分子排阻色谱进行进一步纯化后经过SDS-PAGE凝胶电泳鉴定确定纯度。

[0078] C.在组装缓冲液中按一定比例加入gHgL-I53-50A1及I53-50B.4PT1亚单位,在室温下孵育,利用分子排阻色谱分离组装成功的纳米颗粒,并利用负染电镜、动态光散射和差示扫描荧光确定蛋白的粒径分布和稳定性。

[0079] D.利用生物膜干涉技术(BLI)确定纳米颗粒的抗原性。

[0080] E.将纳米颗粒与佐剂进行混匀,通过Balb/C小鼠进行免疫,验证小鼠产生针对gHgL的抗体水平。

[0081] 以下进一步具体阐述本申请的纳米颗粒疫苗的。

[0082] 实施例1铰链(linker)设计

[0083] 通过Rosetta等计算机软件辅助设计,利用rosetta remodel软件进行结构域插入设计(domain insertion design),将三聚体稳定化蛋白与gHgL抗原(SEQ ID NO:1)进行结构对接,从而判断其是否需要插入铰链(linker),最后利用PyMol进行结构可视化进行目测判断,最终选择如下铰链:铰链由柔性序列和刚性接头组成,不同铰链的区别仅在于柔性序列的不同,不同铰链的柔性序列的氨基酸序列和核苷酸序列如表1所示,刚性接头的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0084] 设计采用的软件:

[0085] https://www.rosettacommons.org/docs/latest/application_documentation/design/rosettaremodel;

[0086] Pymol open-source:https://github.com/schrodinger/pymol-open-source。

[0087] 实施例2重组载体的构建和蛋白表达

[0088] 1.实验材料

[0089] (1)表达载体:真核表达载体:pcDNA3.1(+)(ThermoFisher),原核表达载体:pET28a(+)(ThermoFisher),大肠杆菌感受态细胞DH5α(Tiangen)。

[0090] (2)表达系统:真核表达系统细胞HEK293F(ATCC),改造大肠杆菌细胞Rosetta(DE3)(Tiangen)。

[0091] (3)试剂与耗材:PCR酶(GeneStar),重组酶(Vazyme),限制性核酸内切酶(NEB),胶回收试剂(GeneStar),质粒中提试剂盒(MN)细胞转染试剂PEI(Polyscience),293F培养基(Union),TB培养基(翔博生物),组氨酸标签蛋白纯化琼脂糖珠(Roche),等其他常规试剂以及耗材均为商品化购买所得。

[0092] (4)基因:EB病毒(M81毒株)的gH基因、gL基因以及基于细菌蛋白优化的I53-50A1/I53-50B颗粒亚单位基因均通过南京金斯瑞生物有限公司OptimumGeneTM密码子平台优化

和合成。

[0093] 2.铰链的筛选

[0094] 我们尝试了不同铰链(linker),铰链由柔性序列和刚性接头组成,不同铰链的区别仅在于柔性序列的不同,同样构建了表达载体转染表达后,通过最后纯化浓缩测定蛋白浓度,具体步骤如下:(1)通过PCR扩增、酶切重组方法将EB病毒gH基因(SEQ ID NO:2)、链接序列(SEQ ID NO:3)、gL基因(SEQ ID NO:4)、T4 fibritin(SEQ ID NO:5)、I53-50A1(SEQ ID NO:6)及铰链(不同铰链的柔性序列的氨基酸序列和核苷酸序列如表1所示,刚性接头的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示)插入到载体pcDNA3.1(+)中,而其前端带有CD5信号肽(SEQ ID NO:18)用于使表达的多肽分泌到细胞外,T4 fibritin与铰链之间有8个组氨酸的组氨酸标签(SEQ ID NO:19)方便纯化,组氨酸标签前端接有连接序列(SEQ ID NO:20),最终分别得到的表达载体表达的目的基因gHgL-I53-50A1;(2)将重组载体于pcDNA3.1的基因转化至DH5α感受态细菌中,利用氨苄抗性筛选阳性克隆,随后将阳性克隆挑入含0.1%氨苄(0.1mg/mL)的TB培养基中扩大,随后利用中提试剂盒进行抽提,具体方法见产品说明书;(3)将293F细胞置于293F培养基(Union)中悬浮培养扩增,待扩大到一定数量后准备进行瞬时转染,稀释细胞至1L密度为$1*10^6$/mL,随后用新鲜培养基配置1mg pcDNA3.1-目标蛋白载体5mgPEI的转染体系,静置30min后加入到稀释后的293F细胞中,在37℃、30%湿度、5%CO_2浓度以及120rpm震荡培养7天,随后通过离心去除细胞沉淀,上清用0.22μm滤膜过滤,进行蛋白亲和层析和分子筛纯化得到高纯度目的蛋白gHgL-I53-50A1亚单位。结果如表1所示:铰链的柔性序列为GGSGGSGS(SEQ ID NO:15)时,gHgL-I53-50A1亚单位产量最高。

[0095] 表1不同柔性序列的铰链(linker)的载体的蛋白产量

[0096]

柔性序列（核酸序列）	柔性序列（氨基酸序列）	氨基酸序列长度	产量（mg/L培养基）
GGAGGAAGCGGAAGC（SEQ ID NO：7）	GGSGS（SEQ ID NO：12）	5	0.24
GGAGGAAGCGGAGGCTCT（SEQ ID NO：8）	GGSGGS（SEQ ID NO：13）	6	0.21
GGAGGAAGCGGAGGCTCTGGA（SEQ ID NO：9）	GGSGGSG（SEQ ID NO：14）	7	0.38
GGAGGAAGCGGAGGCTCTGGAAGC（SEQ ID NO：10）	GGSGGSGS（SEQ ID NO：15）	8	1.2
GGAGGAAGCGGAGGCTCTGGAGGCTCT（SEQ ID NO：11）	GGSGGSGGS（SEQ ID NO:16）	9	1.0

[0097] 3.自组装纳米颗粒的制备步骤

[0098] (1)通过PCR扩增、酶切重组方法将EB病毒gH基因(SEQ ID NO:2)、链接序列(SEQ ID NO:3)、gL基因(SEQ ID NO:4)、T4 fibritin(SEQ ID NO:5)、I53-50A1(SEQ ID NO:6)及铰链(铰链的柔性序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示,刚性接头的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示)插入到载体pcDNA3.1(+)中,而其前端带有CD5信号肽(SEQ ID NO:18)用于使表达的多肽分泌到细胞外,T4 fibritin与铰链之间有8个组氨酸的组氨酸标签(SEQ ID NO:19)方便纯化,组氨酸标签前端接有连接序列(SEQ ID NO:20),最终得到的表达载体表达的目的基因gHgL-I53-50A1(SEQ ID NO:21)。而I53-50B.4PT1(SEQ ID NO:22)则在合成中直接插入到pET28a(+)载体中,并且其尾端带有6个组氨酸的组氨酸标签(SEQ ID NO:23)

便于纯化，通过测序比对后选择成功构建的载体进行下一步的实验。

[0099] (2)将重组载体于pcDNA3.1的基因转化至DH5α感受态细菌中，利用氨苄抗性筛选阳性克隆，随后将阳性克隆挑入含0.1％氨苄(0.1mg/mL)的TB培养基中扩大，随后利用中提试剂盒进行抽提，具体方法见产品说明书。

[0100] (3)将重组载体于pET28a(+)的基因转化至Rosetta(DE3)感受态细菌中，利用卡那霉素抗性筛选阳性克隆，随后将阳性克隆挑入含0.1％卡那霉素(0.03g/mL)的TB培养基中扩大，随后利用锥形瓶进一步扩大到1L培养，并加入卡那霉素和氯霉素用于筛选阳性细胞，在18℃加入0.2mM化学诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导目的蛋白表达，经过20h诱导，收集菌体，高压破碎，离心取上清和0.22μm过滤，进行蛋白亲和层析和分子筛纯化得到高纯度的带组氨酸标签的目的蛋白I53-50B.4PT1亚单位(SEQ ID NO:24)。

[0101] (4)将293F细胞置于293F培养基(Union)中悬浮培养扩增，待扩大到一定数量后准备进行瞬时转染，稀释细胞至1L密度为$1*10^6$/mL，随后用新鲜培养基配置1mg pcDNA3.1-目标蛋白载体5mgPEI的转染体系，静置30min后加入到稀释后的293F细胞中，在37℃、80％湿度、5％CO_2浓度以及120rpm震荡培养7天，随后通过离心去除细胞沉淀，上清用0.22μm滤膜过滤，进行蛋白亲和层析和分子筛纯化得到高纯度的带组氨酸标签的目的蛋白gHgL-I53-50A1亚单位(SEQ ID NO:25)，gHgL-I53-50A1的结构示意图如图1所示。

[0102] (5)将两带组氨酸标签的亚单位(gHgL-I53-50A1和I53-50B.4PT1)按1:5的摩尔比例加入到组装缓冲液(250mM NaCl，50mM Tris-HCl pH8.0，5％甘油(质量分数)中，常温孵育1小时后利用分子筛分离组装好的纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)，gHgL-I53-50 NP的结构示意图如图1所示。

[0103] 4.结果

[0104] 如图2、3所示，图2为纳米颗粒的SDS-PAGE电泳的考马斯亮蓝染色的结果：从左到右显示了gHgL抗原蛋白(SEQ ID NO:38，制备方法同第3点中gHgL-I53-50A1亚单位制备过程，区别仅在于：步骤(1)中载体pcDNA3.1(+)中不包含T4 fibritin(SEQ ID NO:5)、I53-50A1(SEQ ID NO:6)、连接序列(SEQ ID NO:20)及铰链(铰链的柔性序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示，刚性接头的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示))、I53-50B.4PT1亚单位、gHgL-I53-50A1亚单位(制备方法同第3点中I53-50B.4PT1亚单位、gHgL-I53-50A1亚单位制备过程)以及第3点得到的gHgL-I53-50 NP自组装纳米颗粒；图3为纳米颗粒的分子筛色谱图：可以看出，重组载体构建成功，并且能获得高纯度的纳米颗粒蛋白(gHgL-I53-50 NP)；gHgL-I53-50A1比gHgL分子质量要大。

[0105] 实施例3检测纳米颗粒的结构特征和化学稳定性

[0106] 1.实验材料

[0107] (1)Unchained Uncle高通量蛋白质稳定性分析仪(Unchained Labs)。

[0108] (2)120KV透射电镜(FEI)。

[0109] 2.实验步骤

[0110] (1)检测纳米颗粒的粒径分布

[0111] 首先将实施例2中gHgL自组装纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)、亚单位gHgL-I53-50A1、抗原蛋白(gHgL)稀释至0.5mg/mL，加入200uL样品至Uncle专用的加样槽中，静置5min后，使用Unchained公司的Uncle仪器进行纳米颗粒粒径的检测。

[0112] (2)检测纳米颗粒的结构特征

[0113] 稀释实施例2中gHgL自组装纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)浓度为0.1mg/mL,将蛋白孵育在碳涂层铜网格上,然后与2%乙酸铀孵育染色2min,风干。随后利用120KV透射电镜观察颗粒的大小和形态。

[0114] (3)检测纳米颗粒的热稳定性

[0115] 首先将实施例2中gHgL自组装纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)、亚单位gHgL-I53-50A1、抗原(gHgL)稀释至0.5mg/mL,随后我们使用Unchained公司的Uncle仪器从25℃到90℃进行升温扫描,记录其全波长广谱偏移(BCM)的变化。

[0116] 3.实验结果

[0117] 如图4所示,gHgL自组装纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)具有较均一的粒径分布特征,且其粒径显著大于亚单位gHgL-I53-50A1以及抗原(gHgL),说明了已经组装成为纳米颗粒。

[0118] 如图5所示,负染电镜下可以看到gHgL-I53-50 NP具有较好的均一性,且gHgL-I53-50 NP的颗粒表面有明显的外部的突起,说明gHgL成功展示在了纳米颗粒载体表面。

[0119] 如图6所示,图6展示了gHgL、gHgL-I53-50A1、gHgL-I53-50 NP的差示荧光扫描结果,三者随着温度从25℃上升至95℃,其BCM偏移相近,证实了该改造对gHgL本身蛋白的稳定性无显著影响,同时由于gHgL-I53-50 NP具有纳米颗粒的特征,其发生荧光改变的斜率也较gHgL小。

[0120] 实施例4纳米颗粒的抗原性

[0121] 1.实验材料

[0122] (1)ProteinA传感器(Fortebio),PBS,Tween 20(Sigma-Aldrich)。

[0123] (2)Fortebio Octet 96仪器。

[0124] (3)预湿板、96孔板等均来自商品化常规耗材。

[0125] 2.实验步骤(1)利用BLI检测纳米颗粒与中和抗体的亲和力

[0126] 配置0.5%PBST用于动力学检测,使用proteinA传感器前先在预湿板上加入150uL PBST,放入proteinA传感器孵育10min,随后稀释抗体AMM01(制备方法参考文献Snijder et al.,2018,Immunity 48,799-811)用于偶联,平衡后开始进行偶联,随后将纳米颗粒蛋白等抗原(实施例2中的gHgL、gHgL-I53-50A1、gHgL-I53-50 NP)进行梯度稀释(3.125nM、6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、100nM、200nM),与传感器进行结合,记录其结合信号和解离信号,最后利用甘氨酸溶液进行传感器再生。结合信号利用1:1的结合模型进行拟合,以计算其动力学参数。

[0127] 3.实验结果

[0128] 如图7和表2所示,gHgL纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)与AMM01抗体的结合能力与gHgL相比要更强,证明其抗原性强于gHgL,这一特性有助于在BCR(B细胞抗原受体)上长期驻留,刺激抗体的产生。

[0129] 表2 gHgL、gHgL-I53-50A1和gHgL-I53-50 NP的抗体亲和力动力学参数

[0130]

	KD(M)
gHgL	4.32E-10
gHgL-I53-50A1	2.42E-10
gHgL-I53-50NP	3.39E-11

[0131] 实施例5纳米颗粒蛋白的动物免疫原性

[0132] 1.实验材料

[0133] (1)小鼠:雌性6～8周的BalB/C小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)。

[0134] (2)佐剂:MF59佐剂{0.5%(v/v)Tween 80,0.5%(v/v)Span 85,4.3%(v/v)角鲨烯,10nM柠檬酸钠缓冲液}。

[0135] (3)其他试剂耗材均为商品化常规试剂耗材。

[0136] 2.实验步骤

[0137] (1)将2ug空载的纳米载体(empty-NP,制备方法同实施例2中第3点,区别仅在于:不含gH基因(SEQ ID NO:2)、链接序列(SEQ ID NO:3)、gL基因(SEQ ID NO:4)、T4 fibritin(SEQ ID NO:5)、)、铰链、连接序列(SEQ ID NO:20))2ug EB病毒gHgL蛋白(实施例2中制备得到的gHgL)、以及含等摩尔质量gHgL的gHgL纳米颗粒(实施例2中的gHgL-I53-50 NP),分别与上述MF59佐剂混合,即将佐剂与抗原按质量比1:1的混合,在4℃摇晃孵育过夜,经皮下免疫的方式免疫小鼠。

[0138] (2)在免疫之后的第三周再进行一次免疫,在免疫后第二周以及第六周采集小鼠眼眶血分离收集血清,通过间接酶联免疫吸附试验检测小鼠血清gHgL的总抗滴度。

[0139] 3.实验结果

[0140] 如图8所示,在第2周和第6周的血清抗体滴度检测中,gHgL自组装纳米颗粒(gHgL-I53-50 NP)诱导的血清总抗体滴度相对于单体gHgL来说均要更高,证实了gHgL纳米颗粒能够诱导更强的抗体产生。

[0141] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 中山大学

[0003] 中山大学肿瘤防治中心(中山大学附属肿瘤医院、中山大学肿瘤研究

[0004] 所)

[0005] <120> 一种含EB病毒gHgL蛋白的自组装纳米颗粒及其制备方法与应用

[0006] <130>

[0007] <160> 38

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 789

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <400> 1

[0014] Trp Ala Tyr Pro Cys Cys His Val Thr Gln Leu Arg Ala Gln His Leu

[0015] 1 5 10 15

[0016] Leu Ala Leu Glu Asn Ile Ser Asp Ile Tyr Leu Val Ser Asn Gln Thr

[0017] 20 25 30

[0018] Cys Asp Gly Phe Ser Leu Ala Ser Leu Asn Ser Pro Lys Asn Gly Ser

[0019] 35 40 45

[0020] Asn Gln Leu Val Ile Ser Arg Cys Ala Asn Gly Leu Asn Val Val Ser

[0021] 50 55 60

[0022] Phe Phe Ile Ser Ile Leu Lys Arg Ser Ser Ser Ala Leu Thr Ser His

[0023] 65 70 75 80

[0024] Leu Arg Glu Leu Leu Thr Thr Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Ser Phe Ser

[0025] 85 90 95

[0026] Val Glu Asp Leu Phe Gly Ala Asn Leu Asn Arg Tyr Ala Trp His Arg

[0027] 100 105 110

[0028] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0029] 115 120 125

[0030] Ser Ser Leu Ser Glu Val Lys Leu His Leu Asp Ile Glu Gly His Ala

[0031] 130 135 140

[0032] Ser His Tyr Thr Ile Pro Trp Thr Glu Leu Met Ala Lys Val Pro Gly

[0033] 145 150 155 160

[0034] Leu Ser Pro Glu Ala Leu Trp Arg Glu Ala Asn Val Thr Glu Asp Leu

[0035] 165 170 175

[0036] Ala Ser Met Leu Asn Arg Tyr Lys Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Gly Thr

[0037] 180 185 190

[0038] Leu Gly Ile Ala Leu Ala Glu Pro Val Asp Ile Pro Ala Val Ser Glu

[0039] 195 200 205

[0040] Gly Ser Met Gln Val Asp Ala Ser Lys Val His Pro Gly Val Ile Ser

[0041] 210 215 220

[0042] Gly Leu Asn Ser Pro Ala Cys Met Leu Ser Ala Pro Leu Glu Lys Gln
[0043] 225 230 235 240
[0044] Leu Phe Tyr Tyr Ile Gly Thr Met Leu Pro Asn Thr Arg Pro His Ser
[0045] 245 250 255
[0046] Tyr Val Phe Tyr Gln Leu Arg Cys His Leu Ser Tyr Val Ala Leu Ser
[0047] 260 265 270
[0048] Ile Asn Gly Asp Lys Phe Gln Tyr Thr Gly Ala Met Thr Ser Lys Phe
[0049] 275 280 285
[0050] Leu Met Gly Thr Tyr Lys Arg Val Thr Glu Lys Gly Asp Glu His Val
[0051] 290 295 300
[0052] Leu Ser Leu Ile Phe Gly Lys Thr Lys Asp Leu Pro Asp Leu Arg Gly
[0053] 305 310 315 320
[0054] Pro Phe Ser Tyr Pro Ser Leu Thr Ser Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Ser
[0055] 325 330 335
[0056] Leu Val Ile Val Thr Thr Phe Val His Tyr Ala Asn Phe His Asn Tyr
[0057] 340 345 350
[0058] Phe Val Pro Asn Leu Lys Asp Met Phe Ser Arg Ala Val Thr Met Thr
[0059] 355 360 365
[0060] Ala Ala Ser Tyr Ala Arg Tyr Val Leu Gln Lys Leu Val Leu Leu Glu
[0061] 370 375 380
[0062] Met Lys Gly Gly Cys Arg Glu Pro Glu Leu Asp Thr Glu Thr Leu Thr
[0063] 385 390 395 400
[0064] Thr Met Phe Glu Val Ser Val Ala Phe Phe Lys Val Gly His Ala Val
[0065] 405 410 415
[0066] Gly Glu Thr Gly Asn Gly Cys Val Asp Leu Arg Trp Leu Ala Lys Ser
[0067] 420 425 430
[0068] Phe Phe Glu Leu Thr Val Leu Lys Asp Ile Ile Gly Ile Cys Tyr Gly
[0069] 435 440 445
[0070] Ala Thr Val Lys Gly Met Gln Ser Tyr Gly Leu Glu Arg Leu Ala Ala
[0071] 450 455 460
[0072] Met Leu Met Ala Thr Val Lys Met Glu Glu Leu Gly His Leu Thr Thr
[0073] 465 470 475 480
[0074] Glu Lys Gln Glu Tyr Ala Leu Arg Leu Ala Thr Val Gly Tyr Pro Lys
[0075] 485 490 495
[0076] Ala Gly Val Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Gly Ala Thr Ser Val Leu Leu
[0077] 500 505 510
[0078] Ser Ala Tyr Asn Arg His Pro Leu Phe Gln Pro Leu His Thr Val Met
[0079] 515 520 525
[0080] Arg Glu Thr Leu Phe Ile Gly Ser His Val Val Leu Arg Glu Leu Arg
[0081] 530 535 540
[0082] Leu Asn Val Thr Thr Gln Gly Pro Asn Leu Ala Leu Tyr Gln Leu Leu
[0083] 545 550 555 560

[0084] Ser Thr Ala Leu Cys Ser Ala Leu Glu Ile Gly Glu Val Leu Arg Gly
[0085] 565 570 575
[0086] Leu Ala Leu Gly Thr Glu Ser Gly Leu Phe Ser Pro Cys Tyr Leu Ser
[0087] 580 585 590
[0088] Leu Arg Phe Asp Leu Thr Arg Asp Lys Leu Leu Ser Met Ala Pro Gln
[0089] 595 600 605
[0090] Glu Ala Met Leu Asp Gln Ala Ala Val Ser Asn Ala Val Asp Gly Phe
[0091] 610 615 620
[0092] Leu Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Glu Asp Arg Asp Ala Trp His Leu
[0093] 625 630 635 640
[0094] Pro Ala Tyr Lys Cys Val Asp Arg Leu Asp Lys Val Leu Met Ile Ile
[0095] 645 650 655
[0096] Pro Leu Ile Asn Val Thr Phe Ile Ile Ser Ser Asp Arg Glu Val Arg
[0097] 660 665 670
[0098] Gly Ser Ala Leu Tyr Glu Ala Ser Thr Thr Tyr Leu Ser Ser Ser Leu
[0099] 675 680 685
[0100] Phe Leu Ser Pro Val Ile Met Asn Lys Cys Ser Gln Gly Ala Val Ala
[0101] 690 695 700
[0102] Gly Glu Pro Arg Gln Ile Pro Lys Ile Gln Asn Phe Thr Arg Thr Gln
[0103] 705 710 715 720
[0104] Lys Ser Cys Ile Phe Cys Gly Phe Ala Leu Leu Ser Tyr Asp Glu Lys
[0105] 725 730 735
[0106] Glu Gly Leu Glu Thr Thr Thr Tyr Ile Thr Ser Gln Glu Val Gln Asn
[0107] 740 745 750
[0108] Ser Ile Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Asp Phe Asp Asn Leu His Val His
[0109] 755 760 765
[0110] Tyr Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Val Met Glu Ile Ala Gly Leu
[0111] 770 775 780
[0112] Tyr Glu Glu Arg Ala
[0113] 785
[0114] <210> 2
[0115] <211> 342
[0116] <212> DNA
[0117] <213> Epstein-Barr Virus
[0118] <400> 2
[0119] tgggcatatc catgctgtca cgtgacccag ctgagggcac agcacctgct ggccctggag 60
[0120] aatatctctg acatctacct ggtgagcaac cagacatgcg atggcttctc tctggccagc 120
[0121] ctgaacagcc ccaagaacgg ctccaatcag ctggtcatct ctcgctgtgc caacggcctg 180
[0122] aatgtggtgt ctttctttat cagcatcctg aagcggagct cctctgccct gacctcccac 240
[0123] ctgagagagc tgctgaccac actggagtct ctgtacggca gcttttccgt ggaggacctg 300
[0124] ttcggcgcca acctgaatcg gtatgcctgg cacagaggag ga 342
[0125] <210> 3

[0126] <211> 45

[0127] <212> DNA

[0128] <213> 人工序列

[0129] <400> 3

[0130] ggaggaggag gatctggagg aggaggcagc ggcggcggcg gcagc 45

[0131] <210> 4

[0132] <211> 1980

[0133] <212> DNA

[0134] <213> Epstein-Barr Virus

[0135] <400> 4

[0136] tccctgagcg aggtgaagct gcacctggac atcgagggcc acgcctccca ctacacaatc 60

[0137] ccctggaccg agctgatggc caaggtgcca ggactgtccc cagaggccct gtggcgggag 120

[0138] gccaatgtga ccgaggatct ggcctctatg ctgaacagat acaagctgat ctataagaca 180

[0139] agcggcaccc tgggaatcgc cctggcagag cctgtggaca tcccagccgt gtctgagggc 240

[0140] agcatgcagg tggatgcctc caaggtgcac cctggcgtga tctccggcct gaactctcct 300

[0141] gcctgcatgc tgtctgcccc actggagaag cagctgtttt actatatcgg cacaatgctg 360

[0142] cccaatacca ggcctcacag ctacgtgttc tatcagctgc gctgtcacct gtcctacgtg 420

[0143] gccctgtcta tcaacggcga caagtttcag tatacaggcg ccatgaccag caagttcctg 480

[0144] atgggcacat acaagcgggt gaccgagaag ggcgatgagc acgtgctgtc cctgatcttt 540

[0145] ggcaagacaa aggacctgcc cgatctgaga ggcccattct cctacccctc tctgaccagc 600

[0146] gcccagtccg gcgactattc cctggtcatc gtgaccacat ttgtgcacta cgccaacttt 660

[0147] cacaattatt tcgtgcccaa tctgaaggat atgttcagca gggccgtgac aatgaccgca 720

[0148] gcatcctacg caagatatgt gctgcagaag ctggtgctgc tggagatgaa gggcggctgt 780

[0149] cgggagcctg agctggatac agagaccctg accacaatgt ttgaggtgag cgtggccttc 840

[0150] tttaaagtgg gacacgcagt gggagagaca ggaaacggct gcgtggacct gagatggctg 900

[0151] gccaagtctt tctttgagct gacagtgctg aaggatatca tcggcatctg ttacggcgcc 960

[0152] accgtgaagg gcatgcagag ctatggcctg gagaggctgg ccgccatgct gatggccacc 1020

[0153] gtgaagatgg aggagctggg ccacctgacc acagagaagc aggagtacgc actgaggctg 1080

[0154] gcaacagtgg gataccctaa ggcaggcgtg tattccggac tgatcggagg agccaccagc 1140

[0155] gtgctgctgt ccgcctataa tcggcaccct ctgtttcagc cactgcacac agtgatgaga 1200

[0156] gagaccctgt tcatcggaag ccacgtggtg ctgagggagc tgcgcctgaa tgtgaccaca 1260

[0157] cagggcccaa acctggccct gtaccagctg ctgagcaccg ccctgtgctc cgccctggag 1320

[0158] atcggagagg tgctgagggg actggccctg ggcacagagt ctggcctgtt tagcccatgt 1380

[0159] tatctgtccc tgaggttcga cctgactcgc gataagctgc tgtctatggc accacaggag 1440

[0160] gcaatgctgg accaggcagc cgtgagcaat gccgtggatg gcttcctggg caggctgtcc 1500

[0161] ctggagaggg aggacagaga tgcctggcac ctgcccgcct acaagtgcgt ggaccgcctg 1560

[0162] gataaggtgc tgatgatcat ccctctgatc aacgtgacct ttatcatctc tagcgacagg 1620

[0163] gaggtgcgcg gaagcgccct gtacgaggcc tccaccacat atctgtcctc tagcctgttc 1680

[0164] ctgtcccccg tgatcatgaa taagtgttct cagggagcag tggcaggaga gccaaggcag 1740

[0165] atccctaaga tccagaactt tacaagaacc cagaagtctt gcatcttttg tggcttcgcc 1800

[0166] ctgctgagct acgatgagaa ggagggcctg gagaccacaa cctatatcac atctcaggag 1860

[0167] gtgcagaaca gcatcctgtc ctctaattac ttcgactttg ataacctgca cgtgcactat 1920

[0168] ctgctgctga caaccaacgg caccgtgatg gagatcgccg gcctgtacga ggagagggca 1980

[0169] <210> 5

[0170] <211> 81

[0171] <212> DNA

[0172] <213> 人工序列

[0173] <400> 5

[0174] ggatacatcc cagaggcacc aagggacgga caggcctatg tgcgcaagga tggcgagtgg 60

[0175] gtgctgctgt ctaccttcct g 81

[0176] <210> 6

[0177] <211> 627

[0178] <212> DNA

[0179] <213> 人工序列

[0180] <400> 6

[0181] atgaagatgg aggagctgtt taagaagcac aagatcgtgg ccgtgctgag ggccaactcc 60

[0182] gtggaggagg ccatcgagaa ggcagtggcc gtgttcgcag gaggagtgca cctgatcgag 120

[0183] atcaccttta cagtgcctga cgccgataca gtgatcaagg ccctgagcgt gctgaaggag 180

[0184] aagggagcaa tcatcggagc aggaaccgtg acatccgtgg agcagtgcag gaaggcagtg 240

[0185] gagtccggag ccgagttcat cgtgtctccc cacctggacg aggagatctc tcagttctgt 300

[0186] aaggagaagg gcgtgtttta catgcctggc gtgatgaccc caacagagct ggtgaaggcc 360

[0187] atgaagctgg gccacgatat cctgaagctg ttcccaggag aggtggtggg acctcagttt 420

[0188] gtgaaggcca tgaagggccc cttccctaat gtgaagtttg tgccaaccgg cggcgtgaac 480

[0189] ctggacaacg tgtgcgagtg gttcaaggca ggcgtgctgg cagtgggagt gggcgatgcc 540

[0190] ctggtgaagg gcgaccccga tgaggtgagg gagaaggcca agaagtttgt ggagaagatc 600

[0191] cgcggctgta cagagggctc cctggag 627

[0192] <210> 7

[0193] <211> 15

[0194] <212> DNA

[0195] <213> 人工序列

[0196] <400> 7

[0197] ggaggaagcg gaagc 15

[0198] <210> 8

[0199] <211> 18

[0200] <212> DNA

[0201] <213> 人工序列

[0202] <400> 8

[0203] ggaggaagcg gaggctct 18

[0204] <210> 9

[0205] <211> 21

[0206] <212> DNA

[0207] <213> 人工序列

[0208] <400> 9

[0209] ggaggaagcg gaggctctgg a 21

[0210] <210> 10
[0211] <211> 24
[0212] <212> DNA
[0213] <213> 人工序列
[0214] <400> 10
[0215] ggaggaagcg gaggctctgg aagc 24
[0216] <210> 11
[0217] <211> 27
[0218] <212> DNA
[0219] <213> 人工序列
[0220] <400> 11
[0221] ggaggaagcg gaggctctgg aggctct 27
[0222] <210> 12
[0223] <211> 5
[0224] <212> PRT
[0225] <213> 人工序列
[0226] <400> 12
[0227] Gly Gly Ser Gly Ser
[0228] 1 5
[0229] <210> 13
[0230] <211> 6
[0231] <212> PRT
[0232] <213> 人工序列
[0233] <400> 13
[0234] Gly Gly Ser Gly Gly Ser
[0235] 1 5
[0236] <210> 14
[0237] <211> 7
[0238] <212> PRT
[0239] <213> 人工序列
[0240] <400> 14
[0241] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
[0242] 1 5
[0243] <210> 15
[0244] <211> 8
[0245] <212> PRT
[0246] <213> 人工序列
[0247] <400> 15
[0248] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
[0249] 1 5
[0250] <210> 16
[0251] <211> 9

[0252] <212> PRT

[0253] <213> 人工序列

[0254] <400> 16

[0255] Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

[0256] 1 5

[0257] <210> 17

[0258] <211> 54

[0259] <212> DNA

[0260] <213> 人工序列

[0261] <400> 17

[0262] ggaggaagcg gaggctctgg aagcgagaag gcagcaaagg cagaggaggc agcc 54

[0263] <210> 18

[0264] <211> 72

[0265] <212> DNA

[0266] <213> 人工序列

[0267] <400> 18

[0268] atgccaatgg gctctctgca gcccctggcc acactgtacc tgctgggaat gctggtggca 60

[0269] agctgcctgg ga 72

[0270] <210> 19

[0271] <211> 24

[0272] <212> DNA

[0273] <213> 人工序列

[0274] <400> 19

[0275] catcatcacc accaccacca ccac 24

[0276] <210> 20

[0277] <211> 12

[0278] <212> DNA

[0279] <213> 人工序列

[0280] <400> 20

[0281] ggaagcggat cc 12

[0282] <210> 21

[0283] <211> 3237

[0284] <212> DNA

[0285] <213> 人工序列

[0286] <400> 21

[0287] atgccaatgg gctctctgca gcccctggcc acactgtacc tgctgggaat gctggtggca 60

[0288] agctgcctgg gatgggcata tccatgctgt cacgtgaccc agctgagggc acagcacctg 120

[0289] ctggccctgg agaatatctc tgacatctac ctggtgagca accagacatg cgatggcttc 180

[0290] tctctggcca gcctgaacag ccccaagaac ggctccaatc agctggtcat ctctcgctgt 240

[0291] gccaacggcc tgaatgtggt gtctttcttt atcagcatcc tgaagcggag ctcctctgcc 300

[0292] ctgacctccc acctgagaga gctgctgacc acactggagt ctctgtacgg cagcttttcc 360

[0293] gtggaggacc tgttcggcgc caacctgaat cggtatgcct ggcacagagg aggaggagga 420

[0294] ggaggatctg gaggaggagg cagcggcggc ggcggcagct ccctgagcga ggtgaagctg 480

[0295] cacctggaca tcgagggcca cgcctcccac tacacaatcc cctggaccga gctgatggcc 540

[0296] aaggtgccag gactgtcccc agaggccctg tggcgggagg ccaatgtgac cgaggatctg 600

[0297] gcctctatgc tgaacagata caagctgatc tataagacaa gcggcaccct gggaatcgcc 660

[0298] ctggcagagc ctgtggacat cccagccgtg tctgagggca gcatgcaggt ggatgcctcc 720

[0299] aaggtgcacc ctggcgtgat ctccggcctg aactctcctg cctgcatgct gtctgcccca 780

[0300] ctggagaagc agctgtttta ctatatcggc acaatgctgc ccaataccag gcctcacagc 840

[0301] tacgtgttct atcagctgcg ctgtcacctg tcctacgtgg ccctgtctat caacggcgac 900

[0302] aagtttcagt atacaggcgc catgaccagc aagttcctga tgggcacata caagcgggtg 960

[0303] accgagaagg gcgatgagca cgtgctgtcc ctgatctttg gcaagacaaa ggacctgccc 1020

[0304] gatctgagag gcccattctc ctacccctct ctgaccagcg cccagtccgg cgactattcc 1080

[0305] ctggtcatcg tgaccacatt tgtgcactac gccaactttc acaattattt cgtgcccaat 1140

[0306] ctgaaggata tgttcagcag ggccgtgaca atgaccgcag catcctacgc aagatatgtg 1200

[0307] ctgcagaagc tggtgctgct ggagatgaag ggcggctgtc gggagcctga gctggataca 1260

[0308] gagaccctga ccacaatgtt tgaggtgagc gtggccttct ttaaagtggg acacgcagtg 1320

[0309] ggagagacag gaaacggctg cgtggacctg agatggctgg ccaagtcttt ctttgagctg 1380

[0310] acagtgctga aggatatcat cggcatctgt tacggcgcca ccgtgaaggg catgcagagc 1440

[0311] tatggcctgg agaggctggc cgccatgctg atggccaccg tgaagatgga ggagctgggc 1500

[0312] cacctgacca cagagaagca ggagtacgca ctgaggctgg caacagtggg ataccctaag 1560

[0313] gcaggcgtgt attccggact gatcggagga gccaccagcg tgctgctgtc cgcctataat 1620

[0314] cggcaccctc tgtttcagcc actgcacaca gtgatgagag agaccctgtt catcggaagc 1680

[0315] cacgtggtgc tgagggagct gcgcctgaat gtgaccacac agggcccaaa cctggccctg 1740

[0316] taccagctgc tgagcaccgc cctgtgctcc gccctggaga tcggagaggt gctgagggga 1800

[0317] ctggccctgg gcacagagtc tggcctgttt agcccatgtt atctgtccct gaggttcgac 1860

[0318] ctgactcgcg ataagctgct gtctatggca ccacaggagg caatgctgga ccaggcagcc 1920

[0319] gtgagcaatg ccgtggatgg cttcctgggc aggctgtccc tggagaggga ggacagagat 1980

[0320] gcctggcacc tgcccgccta caagtgcgtg gaccgcctgg ataaggtgct gatgatcatc 2040

[0321] cctctgatca acgtgacctt tatcatctct agcgacaggg aggtgcgcgg aagcgccctg 2100

[0322] tacgaggcct ccaccacata tctgtcctct agcctgttcc tgtcccccgt gatcatgaat 2160

[0323] aagtgttctc agggagcagt ggcaggagag ccaaggcaga tccctaagat ccagaacttt 2220

[0324] acaagaaccc agaagtcttg catcttttgt ggcttcgccc tgctgagcta cgatgagaag 2280

[0325] gagggcctgg agaccacaac ctatatcaca tctcaggagg tgcagaacag catcctgtcc 2340

[0326] tctaattact tcgactttga taacctgcac gtgcactatc tgctgctgac aaccaacggc 2400

[0327] accgtgatgg agatcgccgg cctgtacgag gagagggcag gatacatccc agaggcacca 2460

[0328] agggacggac aggcctatgt gcgcaaggat ggcgagtggg tgctgctgtc taccttcctg 2520

[0329] ggaagcggat cccatcatca ccaccaccac caccacggag gaagcggagg ctctggaagc 2580

[0330] gagaaggcag caaaggcaga ggaggcagcc atgaagatgg aggagctgtt taagaagcac 2640

[0331] aagatcgtgg ccgtgctgag ggccaactcc gtggaggagg ccatcgagaa ggcagtggcc 2700

[0332] gtgttcgcag gaggagtgca cctgatcgag atcaccttta cagtgcctga cgccgataca 2760

[0333] gtgatcaagg ccctgagcgt gctgaaggag aagggagcaa tcatcggagc aggaaccgtg 2820

[0334] acatccgtgg agcagtgcag gaaggcagtg gagtccggag ccgagttcat cgtgtctccc 2880

[0335] cacctggacg aggagatctc tcagttctgt aaggagaagg gcgtgtttta catgcctggc 2940

[0336] gtgatgaccc caacagagct ggtgaaggcc atgaagctgg gccacgatat cctgaagctg 3000

[0337] ttcccaggag aggtggtggg acctcagttt gtgaaggcca tgaagggccc cttccctaat 3060

[0338] gtgaagtttg tgccaaccgg cggcgtgaac ctggacaacg tgtgcgagtg gttcaaggca 3120

[0339] ggcgtgctgg cagtgggagt gggcgatgcc ctggtgaagg gcgaccccga tgaggtgagg 3180

[0340] gagaaggcca agaagtttgt ggagaagatc cgcggctgta cagagggctc cctggag 3237

[0341] <210> 22

[0342] <211> 483

[0343] <212> DNA

[0344] <213> 人工序列

[0345] <400> 22

[0346] atgaaccagc acagccacaa ggaccacgag accgtgcgta ttgcggtggt tcgtgcgcgt 60

[0347] tggcatgcgg agattgtgga tgcgtgcgtt agcgcgttcg aagcggcgat gcgtgacatc 120

[0348] ggtggcgatc gtttcgcggt ggacgttttt gatgtgccgg gtgcgtacga gattccgctg 180

[0349] catgcgcgta ccctggcgga aaccggtcgt tatggcgcgg ttctgggcac cgcgttcgtg 240

[0350] gttaacggtg gcatctaccg tcacgaattt gtggcgagcg cggttattaa cggtatgatg 300

[0351] aacgtgcaac tgaacaccgg cgtgccggtt ctgagcgcgg ttctgacccc gcacaactat 360

[0352] gacaagagca aagcgcacac cctgctgttc ctggcgctgt ttgcggtgaa gggtatggaa 420

[0353] gcggcgcgtg cgtgcgttga gatcctggcg gcgcgtgaaa aaattgcggc gggcagcctg 480

[0354] gaa 483

[0355] <210> 23

[0356] <211> 18

[0357] <212> DNA

[0358] <213> 人工序列

[0359] <400> 23

[0360] catcatcacc accaccac 18

[0361] <210> 24

[0362] <211> 167

[0363] <212> PRT

[0364] <213> 人工序列

[0365] <400> 24

[0366] Met Asn Gln His Ser His Lys Asp His Glu Thr Val Arg Ile Ala Val

[0367] 1 5 10 15

[0368] Val Arg Ala Arg Trp His Ala Glu Ile Val Asp Ala Cys Val Ser Ala

[0369] 20 25 30

[0370] Phe Glu Ala Ala Met Arg Asp Ile Gly Gly Asp Arg Phe Ala Val Asp

[0371] 35 40 45

[0372] Val Phe Asp Val Pro Gly Ala Tyr Glu Ile Pro Leu His Ala Arg Thr

[0373] 50 55 60

[0374] Leu Ala Glu Thr Gly Arg Tyr Gly Ala Val Leu Gly Thr Ala Phe Val

[0375] 65 70 75 80

[0376] Val Asn Gly Gly Ile Tyr Arg His Glu Phe Val Ala Ser Ala Val Ile

[0377] 85 90 95

[0378] Asn Gly Met Met Asn Val Gln Leu Asn Thr Gly Val Pro Val Leu Ser
[0379] 100 105 110
[0380] Ala Val Leu Thr Pro His Asn Tyr Asp Lys Ser Lys Ala His Thr Leu
[0381] 115 120 125
[0382] Leu Phe Leu Ala Leu Phe Ala Val Lys Gly Met Glu Ala Ala Arg Ala
[0383] 130 135 140
[0384] Cys Val Glu Ile Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ile Ala Ala Gly Ser Leu
[0385] 145 150 155 160
[0386] Glu His His His His His His
[0387] 165
[0388] <210> 25
[0389] <211> 1055
[0390] <212> PRT
[0391] <213> 人工序列
[0392] <400> 25
[0393] Trp Ala Tyr Pro Cys Cys His Val Thr Gln Leu Arg Ala Gln His Leu
[0394] 1 5 10 15
[0395] Leu Ala Leu Glu Asn Ile Ser Asp Ile Tyr Leu Val Ser Asn Gln Thr
[0396] 20 25 30
[0397] Cys Asp Gly Phe Ser Leu Ala Ser Leu Asn Ser Pro Lys Asn Gly Ser
[0398] 35 40 45
[0399] Asn Gln Leu Val Ile Ser Arg Cys Ala Asn Gly Leu Asn Val Val Ser
[0400] 50 55 60
[0401] Phe Phe Ile Ser Ile Leu Lys Arg Ser Ser Ser Ala Leu Thr Ser His
[0402] 65 70 75 80
[0403] Leu Arg Glu Leu Leu Thr Thr Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Ser Phe Ser
[0404] 85 90 95
[0405] Val Glu Asp Leu Phe Gly Ala Asn Leu Asn Arg Tyr Ala Trp His Arg
[0406] 100 105 110
[0407] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0408] 115 120 125
[0409] Ser Ser Leu Ser Glu Val Lys Leu His Leu Asp Ile Glu Gly His Ala
[0410] 130 135 140
[0411] Ser His Tyr Thr Ile Pro Trp Thr Glu Leu Met Ala Lys Val Pro Gly
[0412] 145 150 155 160
[0413] Leu Ser Pro Glu Ala Leu Trp Arg Glu Ala Asn Val Thr Glu Asp Leu
[0414] 165 170 175
[0415] Ala Ser Met Leu Asn Arg Tyr Lys Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Gly Thr
[0416] 180 185 190
[0417] Leu Gly Ile Ala Leu Ala Glu Pro Val Asp Ile Pro Ala Val Ser Glu
[0418] 195 200 205
[0419] Gly Ser Met Gln Val Asp Ala Ser Lys Val His Pro Gly Val Ile Ser

[0420] 210 215 220

[0421] Gly Leu Asn Ser Pro Ala Cys Met Leu Ser Ala Pro Leu Glu Lys Gln

[0422] 225 230 235 240

[0423] Leu Phe Tyr Tyr Ile Gly Thr Met Leu Pro Asn Thr Arg Pro His Ser

[0424] 245 250 255

[0425] Tyr Val Phe Tyr Gln Leu Arg Cys His Leu Ser Tyr Val Ala Leu Ser

[0426] 260 265 270

[0427] Ile Asn Gly Asp Lys Phe Gln Tyr Thr Gly Ala Met Thr Ser Lys Phe

[0428] 275 280 285

[0429] Leu Met Gly Thr Tyr Lys Arg Val Thr Glu Lys Gly Asp Glu His Val

[0430] 290 295 300

[0431] Leu Ser Leu Ile Phe Gly Lys Thr Lys Asp Leu Pro Asp Leu Arg Gly

[0432] 305 310 315 320

[0433] Pro Phe Ser Tyr Pro Ser Leu Thr Ser Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Ser

[0434] 325 330 335

[0435] Leu Val Ile Val Thr Thr Phe Val His Tyr Ala Asn Phe His Asn Tyr

[0436] 340 345 350

[0437] Phe Val Pro Asn Leu Lys Asp Met Phe Ser Arg Ala Val Thr Met Thr

[0438] 355 360 365

[0439] Ala Ala Ser Tyr Ala Arg Tyr Val Leu Gln Lys Leu Val Leu Leu Glu

[0440] 370 375 380

[0441] Met Lys Gly Gly Cys Arg Glu Pro Glu Leu Asp Thr Glu Thr Leu Thr

[0442] 385 390 395 400

[0443] Thr Met Phe Glu Val Ser Val Ala Phe Phe Lys Val Gly His Ala Val

[0444] 405 410 415

[0445] Gly Glu Thr Gly Asn Gly Cys Val Asp Leu Arg Trp Leu Ala Lys Ser

[0446] 420 425 430

[0447] Phe Phe Glu Leu Thr Val Leu Lys Asp Ile Ile Gly Ile Cys Tyr Gly

[0448] 435 440 445

[0449] Ala Thr Val Lys Gly Met Gln Ser Tyr Gly Leu Glu Arg Leu Ala Ala

[0450] 450 455 460

[0451] Met Leu Met Ala Thr Val Lys Met Glu Glu Leu Gly His Leu Thr Thr

[0452] 465 470 475 480

[0453] Glu Lys Gln Glu Tyr Ala Leu Arg Leu Ala Thr Val Gly Tyr Pro Lys

[0454] 485 490 495

[0455] Ala Gly Val Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Gly Ala Thr Ser Val Leu Leu

[0456] 500 505 510

[0457] Ser Ala Tyr Asn Arg His Pro Leu Phe Gln Pro Leu His Thr Val Met

[0458] 515 520 525

[0459] Arg Glu Thr Leu Phe Ile Gly Ser His Val Val Leu Arg Glu Leu Arg

[0460] 530 535 540

[0461] Leu Asn Val Thr Thr Gln Gly Pro Asn Leu Ala Leu Tyr Gln Leu Leu

[0462] 545 550 555 560
[0463] Ser Thr Ala Leu Cys Ser Ala Leu Glu Ile Gly Glu Val Leu Arg Gly
[0464] 565 570 575
[0465] Leu Ala Leu Gly Thr Glu Ser Gly Leu Phe Ser Pro Cys Tyr Leu Ser
[0466] 580 585 590
[0467] Leu Arg Phe Asp Leu Thr Arg Asp Lys Leu Leu Ser Met Ala Pro Gln
[0468] 595 600 605
[0469] Glu Ala Met Leu Asp Gln Ala Ala Val Ser Asn Ala Val Asp Gly Phe
[0470] 610 615 620
[0471] Leu Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Glu Asp Arg Asp Ala Trp His Leu
[0472] 625 630 635 640
[0473] Pro Ala Tyr Lys Cys Val Asp Arg Leu Asp Lys Val Leu Met Ile Ile
[0474] 645 650 655
[0475] Pro Leu Ile Asn Val Thr Phe Ile Ile Ser Ser Asp Arg Glu Val Arg
[0476] 660 665 670
[0477] Gly Ser Ala Leu Tyr Glu Ala Ser Thr Thr Tyr Leu Ser Ser Ser Leu
[0478] 675 680 685
[0479] Phe Leu Ser Pro Val Ile Met Asn Lys Cys Ser Gln Gly Ala Val Ala
[0480] 690 695 700
[0481] Gly Glu Pro Arg Gln Ile Pro Lys Ile Gln Asn Phe Thr Arg Thr Gln
[0482] 705 710 715 720
[0483] Lys Ser Cys Ile Phe Cys Gly Phe Ala Leu Leu Ser Tyr Asp Glu Lys
[0484] 725 730 735
[0485] Glu Gly Leu Glu Thr Thr Thr Tyr Ile Thr Ser Gln Glu Val Gln Asn
[0486] 740 745 750
[0487] Ser Ile Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Asp Phe Asp Asn Leu His Val His
[0488] 755 760 765
[0489] Tyr Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Val Met Glu Ile Ala Gly Leu
[0490] 770 775 780
[0491] Tyr Glu Glu Arg Ala Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
[0492] 785 790 795 800
[0493] Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
[0494] 805 810 815
[0495] Gly Ser Gly Ser His His His His His His His His Gly Gly Ser Gly
[0496] 820 825 830
[0497] Gly Ser Gly Ser Glu Lys Ala Ala Lys Ala Glu Glu Ala Ala Met Lys
[0498] 835 840 845
[0499] Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu Arg Ala
[0500] 850 855 860
[0501] Asn Ser Val Glu Glu Ala Ile Glu Lys Ala Val Ala Val Phe Ala Gly
[0502] 865 870 875 880
[0503] Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala Asp Thr

[0504] 885 890 895
[0505] Val Ile Lys Ala Leu Ser Val Leu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Ile Gly
[0506] 900 905 910
[0507] Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val Glu Ser
[0508] 915 920 925
[0509] Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile Ser Gln
[0510] 930 935 940
[0511] Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met Thr Pro
[0512] 945 950 955 960
[0513] Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Asp Ile Leu Lys Leu
[0514] 965 970 975
[0515] Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met Lys Gly
[0516] 980 985 990
[0517] Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp
[0518] 995 1000 1005
[0519] Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly Val
[0520] 1010 1015 1020
[0521] Gly Asp Ala Leu Val Lys Gly Asp Pro Asp Glu Val Arg Glu Lys
[0522] 1025 1030 1035
[0523] Ala Lys Lys Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu Gly Ser
[0524] 1040 1045 1050
[0525] Leu Glu
[0526] 1055
[0527] <210> 26
[0528] <211> 209
[0529] <212> PRT
[0530] <213> 人工序列
[0531] <400> 26
[0532] Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu
[0533] 1 5 10 15
[0534] Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Ile Glu Lys Ala Val Ala Val Phe
[0535] 20 25 30
[0536] Ala Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala
[0537] 35 40 45
[0538] Asp Thr Val Ile Lys Ala Leu Ser Val Leu Lys Glu Lys Gly Ala Ile
[0539] 50 55 60
[0540] Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val
[0541] 65 70 75 80
[0542] Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile
[0543] 85 90 95
[0544] Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met
[0545] 100 105 110

[0546] Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Asp Ile Leu
[0547] 115 120 125
[0548] Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met
[0549] 130 135 140
[0550] Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn
[0551] 145 150 155 160
[0552] Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly
[0553] 165 170 175
[0554] Val Gly Asp Ala Leu Val Lys Gly Asp Pro Asp Glu Val Arg Glu Lys
[0555] 180 185 190
[0556] Ala Lys Lys Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu Gly Ser Leu
[0557] 195 200 205
[0558] Glu
[0559] <210> 27
[0560] <211> 161
[0561] <212> PRT
[0562] <213> 人工序列
[0563] <400> 27
[0564] Met Asn Gln His Ser His Lys Asp His Glu Thr Val Arg Ile Ala Val
[0565] 1 5 10 15
[0566] Val Arg Ala Arg Trp His Ala Glu Ile Val Asp Ala Cys Val Ser Ala
[0567] 20 25 30
[0568] Phe Glu Ala Ala Met Arg Asp Ile Gly Gly Asp Arg Phe Ala Val Asp
[0569] 35 40 45
[0570] Val Phe Asp Val Pro Gly Ala Tyr Glu Ile Pro Leu His Ala Arg Thr
[0571] 50 55 60
[0572] Leu Ala Glu Thr Gly Arg Tyr Gly Ala Val Leu Gly Thr Ala Phe Val
[0573] 65 70 75 80
[0574] Val Asn Gly Gly Ile Tyr Arg His Glu Phe Val Ala Ser Ala Val Ile
[0575] 85 90 95
[0576] Asn Gly Met Met Asn Val Gln Leu Asn Thr Gly Val Pro Val Leu Ser
[0577] 100 105 110
[0578] Ala Val Leu Thr Pro His Asn Tyr Asp Lys Ser Lys Ala His Thr Leu
[0579] 115 120 125
[0580] Leu Phe Leu Ala Leu Phe Ala Val Lys Gly Met Glu Ala Ala Arg Ala
[0581] 130 135 140
[0582] Cys Val Glu Ile Leu Ala Ala Arg Glu Lys Ile Ala Ala Gly Ser Leu
[0583] 145 150 155 160
[0584] Glu
[0585] <210> 28
[0586] <211> 114
[0587] <212> PRT

[0588] <213> Epstein-Barr Virus

[0589] <400> 28

[0590] Trp Ala Tyr Pro Cys Cys His Val Thr Gln Leu Arg Ala Gln His Leu

[0591] 1 5 10 15

[0592] Leu Ala Leu Glu Asn Ile Ser Asp Ile Tyr Leu Val Ser Asn Gln Thr

[0593] 20 25 30

[0594] Cys Asp Gly Phe Ser Leu Ala Ser Leu Asn Ser Pro Lys Asn Gly Ser

[0595] 35 40 45

[0596] Asn Gln Leu Val Ile Ser Arg Cys Ala Asn Gly Leu Asn Val Val Ser

[0597] 50 55 60

[0598] Phe Phe Ile Ser Ile Leu Lys Arg Ser Ser Ser Ala Leu Thr Ser His

[0599] 65 70 75 80

[0600] Leu Arg Glu Leu Leu Thr Thr Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Ser Phe Ser

[0601] 85 90 95

[0602] Val Glu Asp Leu Phe Gly Ala Asn Leu Asn Arg Tyr Ala Trp His Arg

[0603] 100 105 110

[0604] Gly Gly

[0605] <210> 29

[0606] <211> 660

[0607] <212> PRT

[0608] <213> Epstein-Barr Virus

[0609] <400> 29

[0610] Ser Leu Ser Glu Val Lys Leu His Leu Asp Ile Glu Gly His Ala Ser

[0611] 1 5 10 15

[0612] His Tyr Thr Ile Pro Trp Thr Glu Leu Met Ala Lys Val Pro Gly Leu

[0613] 20 25 30

[0614] Ser Pro Glu Ala Leu Trp Arg Glu Ala Asn Val Thr Glu Asp Leu Ala

[0615] 35 40 45

[0616] Ser Met Leu Asn Arg Tyr Lys Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Gly Thr Leu

[0617] 50 55 60

[0618] Gly Ile Ala Leu Ala Glu Pro Val Asp Ile Pro Ala Val Ser Glu Gly

[0619] 65 70 75 80

[0620] Ser Met Gln Val Asp Ala Ser Lys Val His Pro Gly Val Ile Ser Gly

[0621] 85 90 95

[0622] Leu Asn Ser Pro Ala Cys Met Leu Ser Ala Pro Leu Glu Lys Gln Leu

[0623] 100 105 110

[0624] Phe Tyr Tyr Ile Gly Thr Met Leu Pro Asn Thr Arg Pro His Ser Tyr

[0625] 115 120 125

[0626] Val Phe Tyr Gln Leu Arg Cys His Leu Ser Tyr Val Ala Leu Ser Ile

[0627] 130 135 140

[0628] Asn Gly Asp Lys Phe Gln Tyr Thr Gly Ala Met Thr Ser Lys Phe Leu

[0629] 145 150 155 160

[0630] Met Gly Thr Tyr Lys Arg Val Thr Glu Lys Gly Asp Glu His Val Leu
[0631] 165 170 175
[0632] Ser Leu Ile Phe Gly Lys Thr Lys Asp Leu Pro Asp Leu Arg Gly Pro
[0633] 180 185 190
[0634] Phe Ser Tyr Pro Ser Leu Thr Ser Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Ser Leu
[0635] 195 200 205
[0636] Val Ile Val Thr Thr Phe Val His Tyr Ala Asn Phe His Asn Tyr Phe
[0637] 210 215 220
[0638] Val Pro Asn Leu Lys Asp Met Phe Ser Arg Ala Val Thr Met Thr Ala
[0639] 225 230 235 240
[0640] Ala Ser Tyr Ala Arg Tyr Val Leu Gln Lys Leu Val Leu Leu Glu Met
[0641] 245 250 255
[0642] Lys Gly Gly Cys Arg Glu Pro Glu Leu Asp Thr Glu Thr Leu Thr Thr
[0643] 260 265 270
[0644] Met Phe Glu Val Ser Val Ala Phe Phe Lys Val Gly His Ala Val Gly
[0645] 275 280 285
[0646] Glu Thr Gly Asn Gly Cys Val Asp Leu Arg Trp Leu Ala Lys Ser Phe
[0647] 290 295 300
[0648] Phe Glu Leu Thr Val Leu Lys Asp Ile Ile Gly Ile Cys Tyr Gly Ala
[0649] 305 310 315 320
[0650] Thr Val Lys Gly Met Gln Ser Tyr Gly Leu Glu Arg Leu Ala Ala Met
[0651] 325 330 335
[0652] Leu Met Ala Thr Val Lys Met Glu Glu Leu Gly His Leu Thr Thr Glu
[0653] 340 345 350
[0654] Lys Gln Glu Tyr Ala Leu Arg Leu Ala Thr Val Gly Tyr Pro Lys Ala
[0655] 355 360 365
[0656] Gly Val Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Gly Ala Thr Ser Val Leu Leu Ser
[0657] 370 375 380
[0658] Ala Tyr Asn Arg His Pro Leu Phe Gln Pro Leu His Thr Val Met Arg
[0659] 385 390 395 400
[0660] Glu Thr Leu Phe Ile Gly Ser His Val Val Leu Arg Glu Leu Arg Leu
[0661] 405 410 415
[0662] Asn Val Thr Thr Gln Gly Pro Asn Leu Ala Leu Tyr Gln Leu Leu Ser
[0663] 420 425 430
[0664] Thr Ala Leu Cys Ser Ala Leu Glu Ile Gly Glu Val Leu Arg Gly Leu
[0665] 435 440 445
[0666] Ala Leu Gly Thr Glu Ser Gly Leu Phe Ser Pro Cys Tyr Leu Ser Leu
[0667] 450 455 460
[0668] Arg Phe Asp Leu Thr Arg Asp Lys Leu Leu Ser Met Ala Pro Gln Glu
[0669] 465 470 475 480
[0670] Ala Met Leu Asp Gln Ala Ala Val Ser Asn Ala Val Asp Gly Phe Leu
[0671] 485 490 495

[0672] Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Glu Asp Arg Asp Ala Trp His Leu Pro
[0673] 500 505 510
[0674] Ala Tyr Lys Cys Val Asp Arg Leu Asp Lys Val Leu Met Ile Ile Pro
[0675] 515 520 525
[0676] Leu Ile Asn Val Thr Phe Ile Ile Ser Ser Asp Arg Glu Val Arg Gly
[0677] 530 535 540
[0678] Ser Ala Leu Tyr Glu Ala Ser Thr Thr Tyr Leu Ser Ser Ser Leu Phe
[0679] 545 550 555 560
[0680] Leu Ser Pro Val Ile Met Asn Lys Cys Ser Gln Gly Ala Val Ala Gly
[0681] 565 570 575
[0682] Glu Pro Arg Gln Ile Pro Lys Ile Gln Asn Phe Thr Arg Thr Gln Lys
[0683] 580 585 590
[0684] Ser Cys Ile Phe Cys Gly Phe Ala Leu Leu Ser Tyr Asp Glu Lys Glu
[0685] 595 600 605
[0686] Gly Leu Glu Thr Thr Thr Tyr Ile Thr Ser Gln Glu Val Gln Asn Ser
[0687] 610 615 620
[0688] Ile Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Asp Phe Asp Asn Leu His Val His Tyr
[0689] 625 630 635 640
[0690] Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Val Met Glu Ile Ala Gly Leu Tyr
[0691] 645 650 655
[0692] Glu Glu Arg Ala
[0693] 660
[0694] <210> 30
[0695] <211> 15
[0696] <212> PRT
[0697] <213> 人工序列
[0698] <400> 30
[0699] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[0700] 1 5 10 15
[0701] <210> 31
[0702] <211> 10
[0703] <212> PRT
[0704] <213> 人工序列
[0705] <400> 31
[0706] Glu Lys Ala Ala Lys Ala Glu Glu Ala Ala
[0707] 1 5 10
[0708] <210> 32
[0709] <211> 27
[0710] <212> PRT
[0711] <213> 人工序列
[0712] <400> 32
[0713] Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys

[0714] 1 5 10 15

[0715] Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu

[0716] 20 25

[0717] <210> 33

[0718] <211> 32

[0719] <212> PRT

[0720] <213> 人工序列

[0721] <400> 33

[0722] Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr

[0723] 1 5 10 15

[0724] His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Val

[0725] 20 25 30

[0726] <210> 34

[0727] <211> 8

[0728] <212> PRT

[0729] <213> 人工序列

[0730] <400> 34

[0731] His His His His His His His His

[0732] 1 5

[0733] <210> 35

[0734] <211> 6

[0735] <212> PRT

[0736] <213> 人工序列

[0737] <400> 35

[0738] His His His His His His

[0739] 1 5

[0740] <210> 36

[0741] <211> 24

[0742] <212> PRT

[0743] <213> 人工序列

[0744] <400> 36

[0745] Met Pro Met Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Thr Leu Tyr Leu Leu Gly

[0746] 1 5 10 15

[0747] Met Leu Val Ala Ser Cys Leu Gly

[0748] 20

[0749] <210> 37

[0750] <211> 4

[0751] <212> PRT

[0752] <213> 人工序列

[0753] <400> 37

[0754] Gly Ser Gly Ser

[0755] 1

[0756] <210> 38

[0757] <211> 797

[0758] <212> PRT

[0759] <213> 人工序列

[0760] <400> 38

[0761] Trp Ala Tyr Pro Cys Cys His Val Thr Gln Leu Arg Ala Gln His Leu

[0762] 1 5 10 15

[0763] Leu Ala Leu Glu Asn Ile Ser Asp Ile Tyr Leu Val Ser Asn Gln Thr

[0764] 20 25 30

[0765] Cys Asp Gly Phe Ser Leu Ala Ser Leu Asn Ser Pro Lys Asn Gly Ser

[0766] 35 40 45

[0767] Asn Gln Leu Val Ile Ser Arg Cys Ala Asn Gly Leu Asn Val Val Ser

[0768] 50 55 60

[0769] Phe Phe Ile Ser Ile Leu Lys Arg Ser Ser Ser Ala Leu Thr Ser His

[0770] 65 70 75 80

[0771] Leu Arg Glu Leu Leu Thr Thr Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Ser Phe Ser

[0772] 85 90 95

[0773] Val Glu Asp Leu Phe Gly Ala Asn Leu Asn Arg Tyr Ala Trp His Arg

[0774] 100 105 110

[0775] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

[0776] 115 120 125

[0777] Ser Ser Leu Ser Glu Val Lys Leu His Leu Asp Ile Glu Gly His Ala

[0778] 130 135 140

[0779] Ser His Tyr Thr Ile Pro Trp Thr Glu Leu Met Ala Lys Val Pro Gly

[0780] 145 150 155 160

[0781] Leu Ser Pro Glu Ala Leu Trp Arg Glu Ala Asn Val Thr Glu Asp Leu

[0782] 165 170 175

[0783] Ala Ser Met Leu Asn Arg Tyr Lys Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Gly Thr

[0784] 180 185 190

[0785] Leu Gly Ile Ala Leu Ala Glu Pro Val Asp Ile Pro Ala Val Ser Glu

[0786] 195 200 205

[0787] Gly Ser Met Gln Val Asp Ala Ser Lys Val His Pro Gly Val Ile Ser

[0788] 210 215 220

[0789] Gly Leu Asn Ser Pro Ala Cys Met Leu Ser Ala Pro Leu Glu Lys Gln

[0790] 225 230 235 240

[0791] Leu Phe Tyr Tyr Ile Gly Thr Met Leu Pro Asn Thr Arg Pro His Ser

[0792] 245 250 255

[0793] Tyr Val Phe Tyr Gln Leu Arg Cys His Leu Ser Tyr Val Ala Leu Ser

[0794] 260 265 270

[0795] Ile Asn Gly Asp Lys Phe Gln Tyr Thr Gly Ala Met Thr Ser Lys Phe

[0796] 275 280 285

[0797] Leu Met Gly Thr Tyr Lys Arg Val Thr Glu Lys Gly Asp Glu His Val

[0798] 290 295 300

[0799] Leu Ser Leu Ile Phe Gly Lys Thr Lys Asp Leu Pro Asp Leu Arg Gly

[0800] 305 310 315 320

[0801] Pro Phe Ser Tyr Pro Ser Leu Thr Ser Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Ser

[0802] 325 330 335

[0803] Leu Val Ile Val Thr Thr Phe Val His Tyr Ala Asn Phe His Asn Tyr

[0804] 340 345 350

[0805] Phe Val Pro Asn Leu Lys Asp Met Phe Ser Arg Ala Val Thr Met Thr

[0806] 355 360 365

[0807] Ala Ala Ser Tyr Ala Arg Tyr Val Leu Gln Lys Leu Val Leu Leu Glu

[0808] 370 375 380

[0809] Met Lys Gly Gly Cys Arg Glu Pro Glu Leu Asp Thr Glu Thr Leu Thr

[0810] 385 390 395 400

[0811] Thr Met Phe Glu Val Ser Val Ala Phe Phe Lys Val Gly His Ala Val

[0812] 405 410 415

[0813] Gly Glu Thr Gly Asn Gly Cys Val Asp Leu Arg Trp Leu Ala Lys Ser

[0814] 420 425 430

[0815] Phe Phe Glu Leu Thr Val Leu Lys Asp Ile Ile Gly Ile Cys Tyr Gly

[0816] 435 440 445

[0817] Ala Thr Val Lys Gly Met Gln Ser Tyr Gly Leu Glu Arg Leu Ala Ala

[0818] 450 455 460

[0819] Met Leu Met Ala Thr Val Lys Met Glu Glu Leu Gly His Leu Thr Thr

[0820] 465 470 475 480

[0821] Glu Lys Gln Glu Tyr Ala Leu Arg Leu Ala Thr Val Gly Tyr Pro Lys

[0822] 485 490 495

[0823] Ala Gly Val Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Gly Ala Thr Ser Val Leu Leu

[0824] 500 505 510

[0825] Ser Ala Tyr Asn Arg His Pro Leu Phe Gln Pro Leu His Thr Val Met

[0826] 515 520 525

[0827] Arg Glu Thr Leu Phe Ile Gly Ser His Val Val Leu Arg Glu Leu Arg

[0828] 530 535 540

[0829] Leu Asn Val Thr Thr Gln Gly Pro Asn Leu Ala Leu Tyr Gln Leu Leu

[0830] 545 550 555 560

[0831] Ser Thr Ala Leu Cys Ser Ala Leu Glu Ile Gly Glu Val Leu Arg Gly

[0832] 565 570 575

[0833] Leu Ala Leu Gly Thr Glu Ser Gly Leu Phe Ser Pro Cys Tyr Leu Ser

[0834] 580 585 590

[0835] Leu Arg Phe Asp Leu Thr Arg Asp Lys Leu Leu Ser Met Ala Pro Gln

[0836] 595 600 605

[0837] Glu Ala Met Leu Asp Gln Ala Ala Val Ser Asn Ala Val Asp Gly Phe

[0838] 610 615 620

[0839] Leu Gly Arg Leu Ser Leu Glu Arg Glu Asp Arg Asp Ala Trp His Leu

[0840] 625 630 635 640

[0841] Pro Ala Tyr Lys Cys Val Asp Arg Leu Asp Lys Val Leu Met Ile Ile

[0842] 645 650 655

[0843] Pro Leu Ile Asn Val Thr Phe Ile Ile Ser Ser Asp Arg Glu Val Arg

[0844] 660 665 670

[0845] Gly Ser Ala Leu Tyr Glu Ala Ser Thr Thr Tyr Leu Ser Ser Ser Leu

[0846] 675 680 685

[0847] Phe Leu Ser Pro Val Ile Met Asn Lys Cys Ser Gln Gly Ala Val Ala

[0848] 690 695 700

[0849] Gly Glu Pro Arg Gln Ile Pro Lys Ile Gln Asn Phe Thr Arg Thr Gln

[0850] 705 710 715 720

[0851] Lys Ser Cys Ile Phe Cys Gly Phe Ala Leu Leu Ser Tyr Asp Glu Lys

[0852] 725 730 735

[0853] Glu Gly Leu Glu Thr Thr Thr Tyr Ile Thr Ser Gln Glu Val Gln Asn

[0854] 740 745 750

[0855] Ser Ile Leu Ser Ser Asn Tyr Phe Asp Phe Asp Asn Leu His Val His

[0856] 755 760 765

[0857] Tyr Leu Leu Leu Thr Thr Asn Gly Thr Val Met Glu Ile Ala Gly Leu

[0858] 770 775 780

[0859] Tyr Glu Glu Arg Ala His His His His His His His His

[0860] 785 790 795

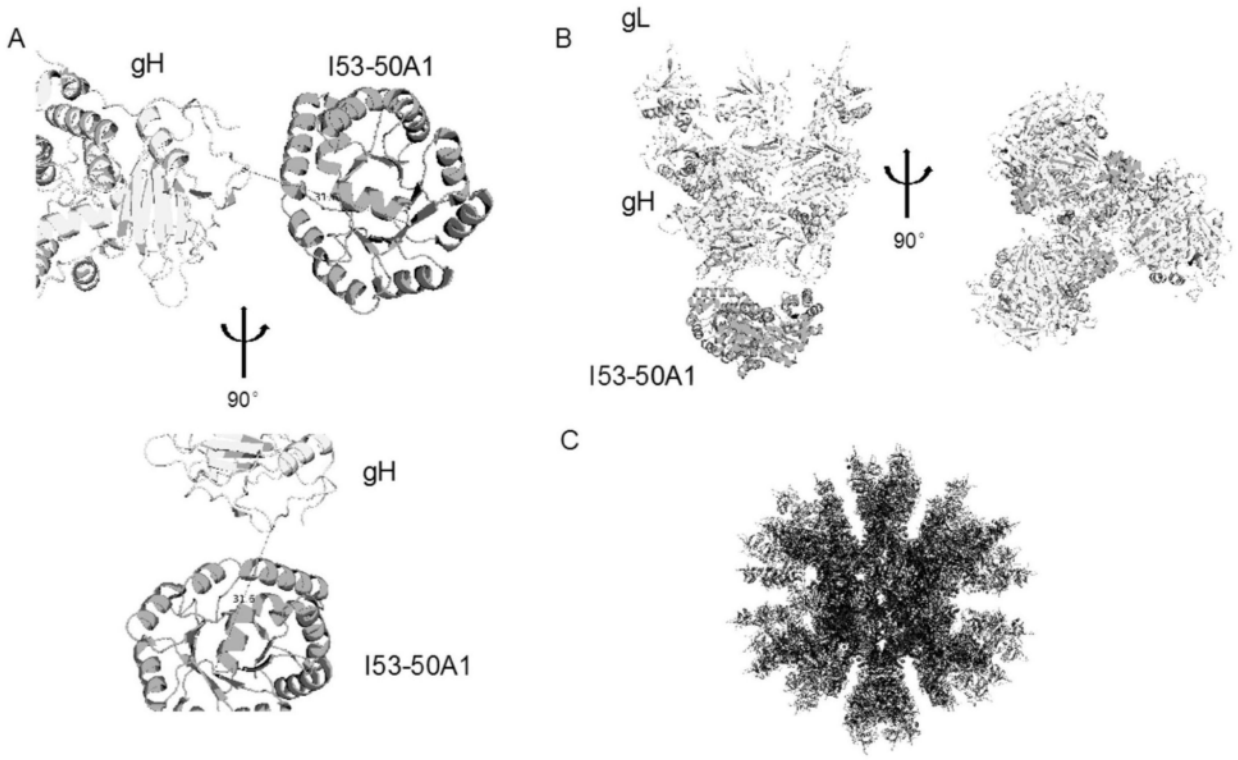
A
gH
I53-50A1
90°
gH
I53-50A1
B
gL
gH
90°
I53-50A1
C

图1

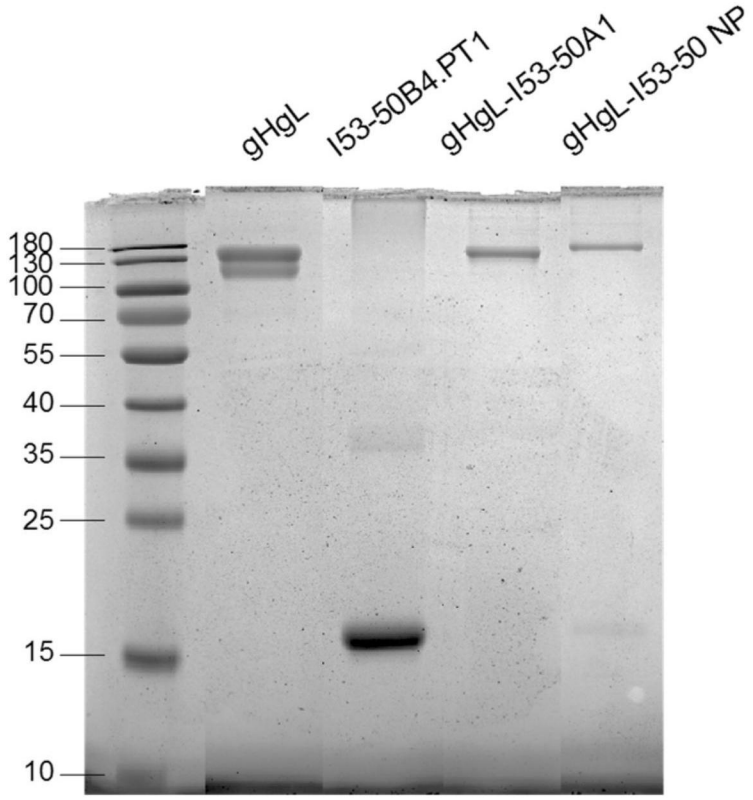
gHgL
I53-50B4.PT1
gHgL-I53-50A1
gHgL-I53-50 NP
180
130
100
70
55
40
35
25
15
10

图2

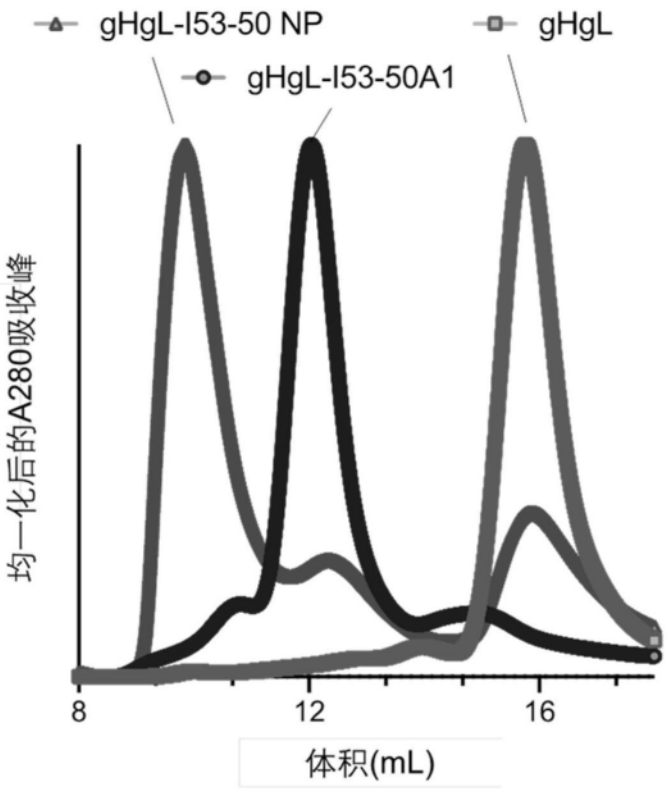
gHgL-I53-50 NP
gHgL
gHgL-I53-50A1
均一化后的A280吸收峰
8
12
16
体积(mL)

图3

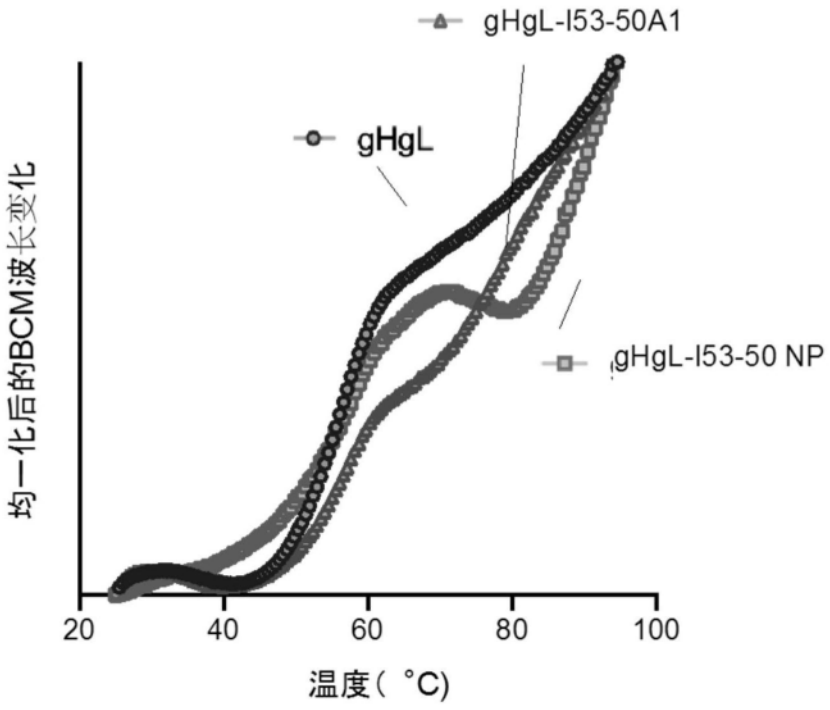
gHgL-I53-50A1
gHgL
gHgL-I53-50 NP
均一化后的BCM波长变化
20
40
60
80
100
温度(°C)

图4

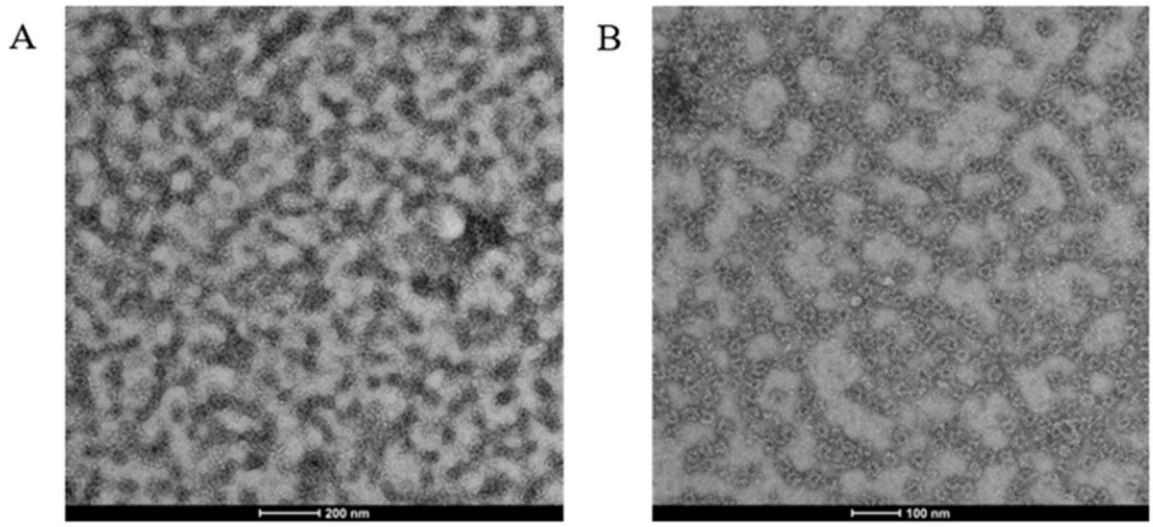
A
200 nm
B
100 nm

图5

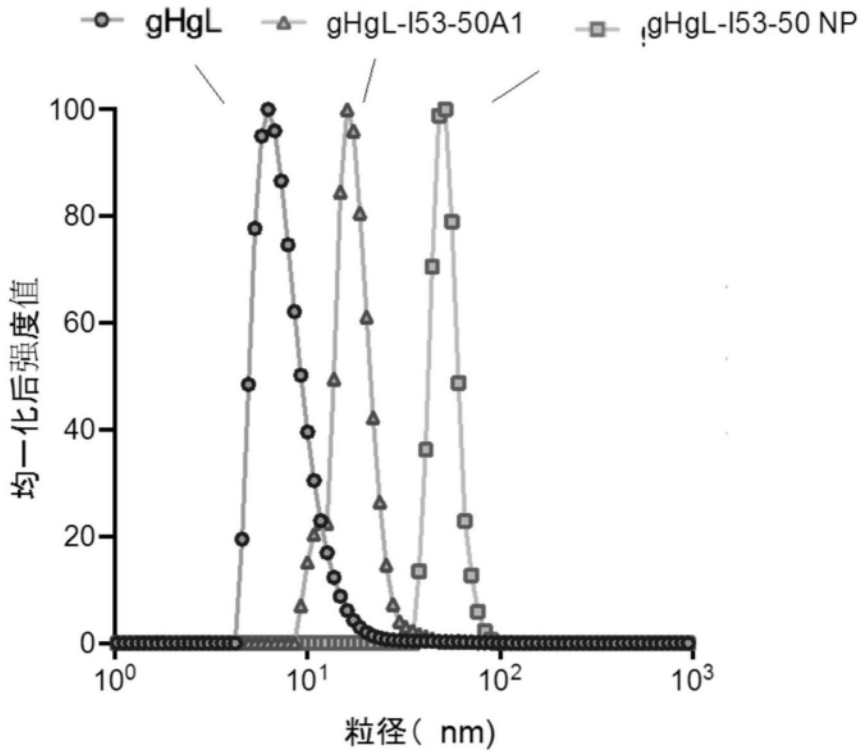
gHgL
gHgL-I53-50A1
gHgL-I53-50 NP
均一化后强度值
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
粒径（ nm)

图6

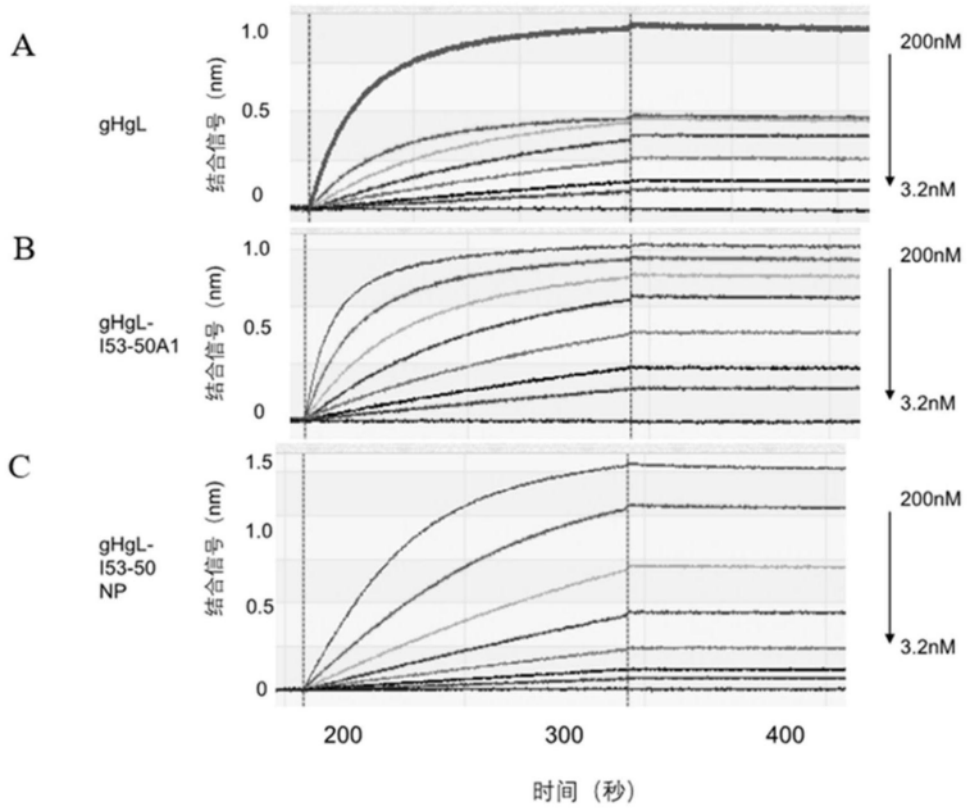
A
gHgL
结合信号（nm）
1.0
0.5
0
200nM
3.2nM
B
gHgL-
I53-50A1
结合信号（nm）
1.0
0.5
0
200nM
3.2nM
C
gHgL-
I53-50
NP
结合信号（nm）
1.5
1.0
0.5
0
200nM
3.2nM
200
300
400
时间（秒）

图7

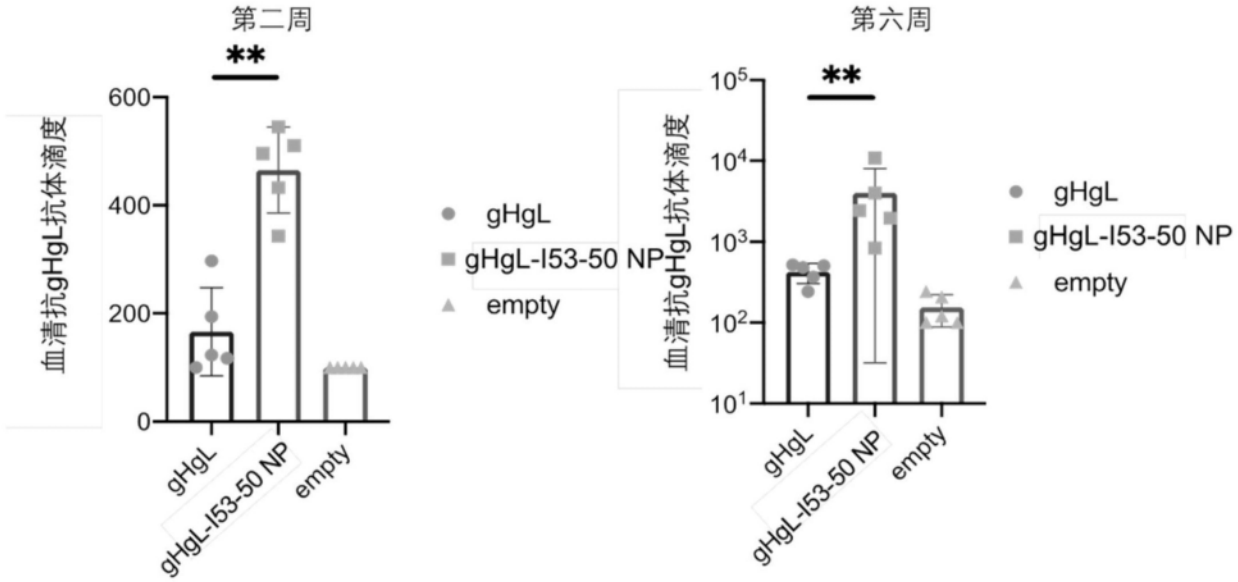
第二周
**
血清抗gHgL抗体滴度
600
400
200
0
gHgL
gHgL-I53-50 NP
empty
gHgL
gHgL-I53-50 NP
empty
第六周
**
血清抗gHgL抗体滴度
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
gHgL
gHgL-I53-50 NP
empty
gHgL
gHgL-I53-50 NP
empty

图8