

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910184631.2

G12N 15/38 (2006.01)
C07K 14/035 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月10日

[11] 公开号 CN 101643737A

[22] 申请日 2009.8.27

[21] 申请号 200910184631.2

[71] 申请人 李越希

地址 210002 江苏省南京市玄武区中山东路
293 号南京军区军事医学研究所

[72] 发明人 李越希 王正茂 管文燕 李琳
李素芹 潘英 潘明洁

[74] 专利代理机构 南京君陶专利商标代理有限公司
代理人 奚胜元

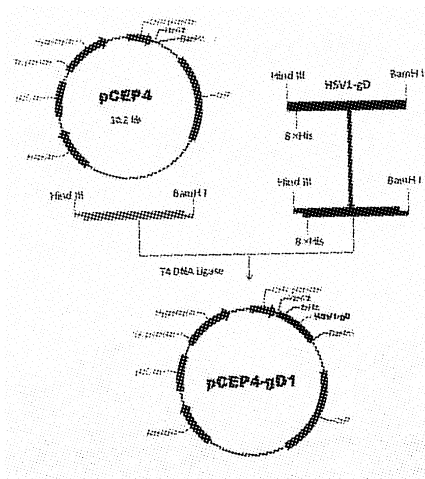
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

[54] 发明名称

化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因
片段及其表达、应用

[57] 摘要

本发明化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用涉及基因工程技术、疫苗和诊断试剂领域。本发明通过计算机分析，筛选出含强抗原表位的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段，第 1 个氨基酸至第 284 个氨基酸，共 284 个氨基酸，选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成抗原表位的全新基因序列，利用基因工程技术表达该基因片段、制备 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的强抗原表位片段及 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的抗血清。表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白可用于疫苗、HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。



1. 一种化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段, 该基因片段编码含强抗原表位的 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白胞外区片段, 即第 1 个氨基酸至第 284 个氨基酸, 共 284 个氨基酸, 化学合成的基因序列全长 852 bp, 序列如下:

```
AAG TAC GCT CTG GCC GAT GCT AGC CTG AAG ATG GCT GAT CCT AAC CGC TTC AGA
GGT AAG GAC CTG CCT GTG CTG GAC CAG CTG ACC GAC CCT CCT GGC GTG CGC AGA
GTG TAC CAC ATT CAG GCT GGT CTG CCT GAC CCT TTC CAG CCT CCT AGC CTG CCT
ATC ACC GTG TAC TAC GCC GTG CTG GAG AGA GCC TGT CGC AGC GTG CTG CTG AAC
GCT CCT AGC GAG GCT CCT CAG ATC GTG AGA GGT GCT AGC GAA GAC GTG AGG AAG
CAG CCT TAC AAC CTG ACC ATC GCC TGG TTC AGG ATG GGT GGT AAC TGT GCT ATC
CCT ATC ACC GTG ATG GAG TAC ACC GAG TGT TCT TAC AAC AAG AGC CTG GGC GCT
TGT CCT ATC CGC ACC CAG CCT AGG TGG AAC TAC TAC GAC AGC TTC AGC GCT GTG
AGC GAG GAC AAC CTG GGC TTC CTG ATG CAC GCT CCT GCC TTC GAG ACC GCT GGC
ACC TAC CTG AGG CTG GTG AAG ATC AAC GAC TGG ACC GAG ATC ACC CAG TTC ATC
CTG GAG CAC AGA GCC AAG GGT AGC TGT AAG TAC GCT CTG CCT CTG AGA ATC CCT
CCT AGC GCT TGT CTG AGC CCT CAG GCC TAC CAG CAA GGC GTG ACC GTG GAC AGC
ATC GGT ATG CTG CCT CGC TTC ATC CCT GAG AAC CAG AGG ACC GTG GCT GTG TAC
AGC CTG AAG ATC GCT GGC TGG CAC GGT CCT AAG GCT CCT TAC ACC AGC ACT CTG
CTG CCT CCT GAG CTG AGC GAG ACC CCT AAC GCC ACT CAG CCT GAG CTG GCT CCT
GAG GAC CCT GAG GAC AGC GCT CTG CTG GAG GAC CCT GTG GGT
```

2. 权利要求 1 所述的化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段, 利用细菌、酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞及转基因动植物进行重组表达, 制备 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白胞外区 284 个氨基酸蛋白片段, 序列如下:

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

Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu Asp Pro Val Gly

3. 权利要求 2 所述方法制备的化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段在制备 HSV1 病毒疫苗及检测试剂中的应用。

化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用

技术领域

本发明是化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区的全新基因片段，利用基因工程技术，制备重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白。通过计算机分析，筛选出含强抗原表位的 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白胞外区片段，选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成全新的基因序列，利用基因工程技术表达，表达的蛋白可用于疫苗及 HSV1 病毒抗体或抗原的检测等，本发明涉及基因工程技术、疫苗和诊断试剂领域。

背景技术

单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 是最早发现的人类疱疹病毒，容易导致复发性感染和潜伏感染，对人体危害严重，分为 HSV-1 及 HSV-2 两个血清型。1 型单纯疱疹病毒主要引起口面部感染、眼部感染和疱疹性脑炎等；而 2 型主要引起生殖器感染，并且和女性宫颈癌的发生密切相关。近年 HSV1 的感染显著增多，约占该病的 10%~40%。目前药物治疗 HSV 感染时常出现相应耐药性，所以研制疫苗是切实可行的有效方法，它能使机体在抗 HSV 感染免疫中，发挥体液免疫和细胞免疫功能来消除 HSV 感染。至今已研制了多种 HSV 疫苗，已有两种 HSV 糖蛋白疫苗进入 III 期临床试验，即 Chiron 公司研制的重组 gD2/gB2 糖蛋白与 MF59 佐剂配伍而成的疫苗以及 Glaxo Smith Kline (GSK) 公司开发的重组 gD2 糖蛋白与另一佐剂 (3-de-O-酰化单磷酸类脂 A 和明矾) 配伍而成的疫苗，这两种疫苗均有一定的保护作用，但临床效果有限。国内目前对 HSV 疫苗的研究，主要集中在 DNA 核酸疫苗的探索研究方面。

目前认为 HSV 基因组有 34 个基因，编码 70 多种蛋白质，其中胞膜糖蛋白正式命名的有 12 种，它们以独特或复合体的形式在 HSV 复制循环及病毒的感染致病中发挥不同的作用。其中 gD 由 HSV 的 US6 基因编码，是病毒胞膜的主要成分，对于病毒与细胞稳定结合具有重要意义，促进病毒胞膜和细胞间的溶解，介导病毒的胞间扩散、释放。同时 gD 蛋白在病毒的复制和刺激中和抗体的产生中起重要作用，也是宿主细胞免疫和体液免疫反应的主要靶标之一，因此 HSV1gD 糖蛋白是构建 HSV 基因疫苗理想的目的基因。

HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因全长 1185bp，编码 312 个氨基酸序列的胞外区、54 个氨基酸序列的跨膜区、28 氨基酸序列的胞内区。研究表明，为增强编码抗原蛋白的免疫原性，可去除其部分功能性编码序列，特别在完整抗原蛋白对宿主具有毒性或免疫抑制作用的情况下，对抗原蛋白进行截短表达就尤其重要。而截短后的 gD 基因构建的疫苗，与用完整 gD 基因构建的疫苗对 HSV1 病毒攻击具有相同的保护作用。故本研究通过计算机分析，我们筛选出含强抗原表位的 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白胞外区片段，选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成全新的基因序列，利用基因工程技术表达，表达产物具有较好的抗原性和免疫原性，表达的蛋白可用于疫苗及 HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。

发明内容

本发明是化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区的全新基因片段，利用基因工程技术，制备重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段。通过计算机分析，筛选出含强抗原表位的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段，第 1 个氨基酸到第 284 个氨基酸，共 284 个氨基酸，选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成全新的基因序列，利用基因工程技术表达该基因。表达的

蛋白可用于疫苗、HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。

化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用是采取以下步骤实施的：

1. HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区抗原表位的筛选及其基因片段的化学合成：

利用 ANTHEWIN 等软件，通过计算机分析 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的氨基酸序列，发现 gD 糖蛋白的 N 端（第 1 氨基酸到第 284 氨基酸）含有较强的抗原决定簇。选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成全新的基因序列，并且在 5' 端增加了 Hind III 酶切位点（下画线部分），转录调控序列（GCCGCCACC），起始密码子（ATG），人 IgG κ 轻链信号肽（波浪线部分），8×His 标签及 TEV 蛋白酶酶切位点（gaaaacctgtacttccagggt），在 3' 端增加了终止密码子（TAA）和 BamH I 酶切位点（下画线部分），使该基因片段易于克隆至质粒 pCEP4 内的 Hind III 和 BamH I 酶切位点内，并且使 gD 蛋白更易于表达和纯化。

筛选的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白内的抗原表位氨基酸序列（第 1 个氨基酸到第 284 个氨基酸）：

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

化学合成的含 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区抗原表位基因的 DNA 序列（981 bp）：

AAGCTT GCC GCC ACC ATG GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA
GAT ACC ACC GGA CAT CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT GAA AAC CTG TAC TTC CAG GGT AAG TAC
GCT CTG GCC GAT GCT AGC CTG AAG ATG GCT GAT CCT AAC CGC TTC AGA GGT AAG GAC CTG CCT
GTG CTG GAC CAG CTG ACC GAC CCT CCT GGC GTG CGC AGA GTG TAC CAC ATT CAG GCT GGT CTG
CCT GAC CCT TTC CAG CCT CCT AGC CTG CCT ATC ACC GTG TAC TAC GCC GTG CTG GAG AGA GCC
TGT CGC AGC GTG CTG CTG AAC GCT CCT AGC GAG GCT CCT CAG ATC GTG AGA GGT GCT AGC GAA
GAC GTG AGG AAG CAG CCT TAC AAC CTG ACC ATC GCC TGG TTC AGG ATG GGT GGT AAC TGT GCT
ATC CCT ATC ACC GTG ATG GAG TAC ACC GAG TGT TCT TAC AAC AAG AGC CTG GGC GCT TGT CCT
ATC CGC ACC CAG CCT AGG TGG AAC TAC TAC GAC AGC TTC AGC GCT GTG AGC GAG GAC AAC CTG
GGC TTC CTG ATG CAC GCT CCT GCC TTC GAG ACC GCT GGC ACC TAC CTG AGG CTG GTG AAG ATC
AAC GAC TGG ACC GAG ATC ACC CAG TTC ATC CTG GAG CAC AGA GCC AAG GGT AGC TGT AAG TAC
GCT CTG CCT CTG AGA ATC CCT CCT AGC GCT TGT CTG AGC CCT CAG GCC TAC CAG CAA GGC GTG
ACC GTG GAC AGC ATC GGT ATG CTG CCT CGC TTC ATC CCT GAG AAC CAG AGG ACC GTG GCT GTG

TAC AGC CTG AAG ATC GCT GGC TGG CAC GGT CCT AAG GCT CCT TAC ACC AGC ACT CTG CTG CCT
 CCT GAG CTG AGC GAG ACC CCT AAC GCC ACT CAG CCT GAG CTG GCT CCT GAG GAC CCT GAG GAC
 AGC GCT CTG CTG GAG GAC CCT GTG GGT TAA GGATCC

2. 表达 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段重组质粒的构建:

提取质粒 pCEP4, 用 Hind III 和 BamH I 双酶切, 电泳后回收酶切的质粒大片段, 溶于去离子水内。同样用 Hind III 和 BamH I 双酶切化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段, 电泳回收后, 溶于去离子水内。

取等摩尔浓度的上述两种酶切后 DNA 片段, 在同一离心管内用 T4 DNA 连接酶连接, 使 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段插入到真核质粒 pCEP4 内的 Hind III 和 BamH I 位点之间, 构成重组真核表达载体 pCEP4-gD1。

3. 重组质粒的筛选与鉴定:

将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布含氨苄青霉素(100ug/ml) LB 平板, 置 37 $^{\circ}$ C 过夜。次日随机挑取转化菌落和 1 个对照菌(质粒 pCEP4 转化菌), 分别提取质粒, 以提取的质粒为模板, PCR 扩增 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段, 含 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段的阳性重组质粒, 应扩增出长约 981bp 的基因片段。将含有外源基因的质粒进行 DNA 序列分析, 序列分析证实重组质粒含有合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段, 序列完全正确:

AAGCTT GCC GCC ACC ATG GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA
 GAT ACC ACC GGA CAT CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT GAA AAC CTG TAC TTC CAG GGT AAG TAC
 GCT CTG GCC GAT GCT AGC CTG AAG ATG GCT GAT CCT AAC CGC TTC AGA GGT AAG GAC CTG CCT
 GTG CTG GAC CAG CTG ACC GAC CCT CCT GGC GTG CGC AGA GTG TAC CAC ATT CAG GCT GGT CTG
 CCT GAC CCT TTC CAG CCT CCT AGC CTG CCT ATC ACC GTG TAC TAC GCC GTG CTG GAG AGA GCC
 TGT CGC AGC GTG CTG CTG AAC GCT CCT AGC GAG GCT CCT CAG ATC GTG AGA GGT GCT AGC GAA
 GAC GTG AGG AAG CAG CCT TAC AAC CTG ACC ATC GCC TGG TTC AGG ATG GGT GGT AAC TGT GCT
 ATC CCT ATC ACC GTG ATG GAG TAC ACC GAG TGT TCT TAC AAC AAG AGC CTG GGC GCT TGT CCT
 ATC CGC ACC CAG CCT AGG TGG AAC TAC TAC GAC AGC TTC AGC GCT GTG AGC GAG GAC AAC CTG
 GGC TTC CTG ATG CAC GCT CCT GCC TTC GAG ACC GCT GGC ACC TAC CTG AGG CTG GTG AAG ATC
 AAC GAC TGG ACC GAG ATC ACC CAG TTC ATC CTG GAG CAC AGA GCC AAG GGT AGC TGT AAG TAC
 GCT CTG CCT CTG AGA ATC CCT CCT AGC GCT TGT CTG AGC CCT CAG GCC TAC CAG CAA GGC GTG
 ACC GTG GAC AGC ATC GGT ATG CTG CCT CGC TTC ATC CCT GAG AAC CAG AGG ACC GTG GCT GTG
 TAC AGC CTG AAG ATC GCT GGC TGG CAC GGT CCT AAG GCT CCT TAC ACC AGC ACT CTG CTG CCT
 CCT GAG CTG AGC GAG ACC CCT AAC GCC ACT CAG CCT GAG CTG GCT CCT GAG GAC CCT GAG GAC
 AGC GCT CTG CTG GAG GAC CCT GTG GGT TAA GGATCC

构建的重组质粒表达 HSV1 的病毒 gD 糖蛋白胞外区片段(284 个氨基酸), 在其 N 端添加了 8 \times His 标签(8 个氨基酸)及 TEV 蛋白酶酶切位点(7 个氨基酸), 全长 299 个氨基酸, 其氨基酸序列如下:

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

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

4. 重组质粒的真核转染与细胞表达上清的蛋白检测:

提取阳性重组质粒 pCEP4-gD1, 用脂质体转染法对 HEK293 细胞进行转染, 37°C; 5%CO₂ 温箱培养 48 小时后, 收集细胞上清进行 SDS-PAGE 电泳检测, 同时以 1: 10000 稀释的 anti-His 抗体对带有 His 标签的蛋白的表达情况进行 Western Blot 检测, 转染细胞表达相对分子量约为 46kDa 的 HSV1 病毒 gD 重组糖蛋白, 而阴性对照质粒 pCEP4 无此蛋白带。

5. 表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的纯化:

将 Ni-Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析柱连接至常压层析系统, 先用平衡液冲洗平衡, 细胞上清液加 Ni-Sepharose 6 Fast Flow 凝胶室温结合, 上柱后收集穿透液。用平衡缓冲液洗涤柱子, 接着用含 500mM 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 检测目的蛋白。

6. ELISA 检测纯化的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的抗原性:

将纯化的重组蛋白用 PBS 倍比稀释, 并将阴性对照以同样浓度稀释后包被酶联板, 羊抗 HSV1+HSV2 多抗作为一抗, 兔抗山羊 IgG-HRP 作为二抗, 间接酶联免疫法检测纯化蛋白 gD1 的抗原性和特异性。结果显示 (表 1) 表达的重组蛋白具有较好的抗原性和特异性。

7. ELISA 检测纯化的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的免疫原性:

1) HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗血清的制备

将纯化的重组蛋白与福氏佐剂混合后分别于第 1, 3, 5 周腹腔注射免疫小鼠 (阴性对照组注射 PBS), 并于第 3, 5, 7 周眼眶采血。血液 37°C 放置 1h 后 4°C 过夜, 2000rpm 离心 20 分钟, 取上清, 4°C, 12000rpm 离心 20 分钟, 取上清即得 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的抗血清。

2) HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗血清效价检测:

将纯化的重组蛋白用 PBS 按 1: 100 稀释后包被酶联板, 抗血清梯度稀释后作为一抗, 二抗用羊抗小鼠 IgG-HRP, 间接酶联免疫法测抗血清效价, 阳性血清能与 HSV1 病毒 gD 糖蛋白反应, 阴性血清则不能。间接 ELISA 结果显示 (表 2) 表达的重组蛋白具有较好的免疫原性。

8. 将表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白片段, 用于疫苗、HSV1 病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗 HSV1 病毒单抗和多抗等。

9. 将合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段与其他基因片段连接, 以融合蛋白的形式进行表达、制备。

上述方法制备的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段在制备 HSV1 病毒亚单位疫苗中的应用。

化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段, 可利用细菌、酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞及转基因动植物进行重组表达、制备。

所述方法制备的化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段在制备 HSV1 病毒疫苗及检测试剂中的应用。

本发明与现有技术相比具有的优点

1. 本发明表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段用作抗原, 制备 HSV1 病毒抗体的酶联免疫检测试剂盒, 具有生产较安全、成本低、与其他病毒交叉反应少等优点。

2. HSV1 病毒的 gD 糖蛋白是病毒胞膜的主要成分, 在病毒的复制和刺激中和抗体的产生中起重要作用, 也是宿主细胞免疫和体液免疫反应的主要靶标之一, 因此 HSV1 病毒 gD 糖蛋白是构建 HSV 疫苗理想的目的基因。本发明选择了其强抗原表位, 利用基因工程技术表达制备, 为研制基因工程疫苗奠定基础。基因工程疫苗安全、成本低。

3. 本研究采用真核细胞表达系统, 表达的蛋白产物能正确地完成折叠、磷酸化、糖基化、二硫键形成、酰基化、蛋白酶加工等蛋白质翻译后加工过程, 得到的重组蛋白有较高的生物学活性。

4. 本发明根据筛选出的 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白胞外区片段氨基酸序列, 选用真核及原核细胞均偏爱的密码子, 化学合成全新的基因序列, 并且在 N 端添加人 IgG κ 轻链信号肽, 适宜在哺乳动物细胞中高表达。

5. 本发明构建的表达的 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白的工程细胞, 蛋白表达量高, 可溶性好, 易于纯化, 并且具有较好的抗原性和免疫原性。

附图说明

以下将结合附图对本发明作进一步说明:

图 1 是表达 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白的重组质粒构建流程图。

图 2 是 1% 的 Agarose 凝胶检测 8 个重组子的 PCR 扩增产物。Lane 1: 以化学合成含 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区抗原表位基因的 DNA 序列为模板 PCR 扩增产物, 阳性对照; Lane 2: 以空质粒 pCEP4 为模板 PCR 扩增产物, 阴性对照; Lane 3-10: 1-8 号转化子 PCR 扩增产物, 其中 2, 4, 5, 7 号转化子扩增出 981bp 的目的基因片段, 即图内箭头标示的位置; Lane M: DL2000 Marker (TaKaRa)。

图 3 是 1% 的 Agarose 凝胶检测阳性重组子的 PCR 扩增产物和酶切鉴定产物。Lane 1: 4 号阳性重组子 PCR 扩增产物; Lane 2: 4 号阳性重组子酶切鉴定产物; Lane M: DL2000 Marker (TaKaRa)。

图 4 是表达重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的细胞上清 Western Blot 检测。Lane M: 标准分子量蛋白 Marker; Lane 1: Multiple-tag, 阳性对照; Lane 2: 空质粒 pCEP4 转染的细胞上清, 阴性对照; Lane 3: 转染重组质粒 pCEP4-gD1 的细胞上清。

图 5 是纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白 Western Blot 检测。Lane 1: 纯化后的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白; Lane 2: 空质粒 pCEP4 转染的细胞上清, 阴性对照; Lane 3: 标准分子量蛋白 Marker; Lane 4: 25ng Multiple-tag, 阳性对照。

具体实施方式

本发明实施方式的详细说明:

HSV1 病毒的 gD 糖蛋白抗原表位的分析、基因合成及载体构建

通过计算机分析 HSV1 病毒的全 gD 糖蛋白的全部氨基酸序列, 筛选出 HSV1 病毒 gD 糖蛋白内的强抗原表位, 选用原核及真核均偏爱的密码子, 化学合成 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白含强抗原表位的全新基因片段。将基因片段克隆至质粒 pCEP4 内的 Hind III/BamH I 位点, 构建重组真核表达载体 pCEP4-gD1。

材料与方法

1. 菌种与质粒:

大肠杆菌 DH5 α 及真核表达载体 pCEP4 由本实验室保存。

2. 试剂和仪器:

PrimerSTAR HS DNA Polymerase, dNTP, Hind III, BamH I, T4 DNA 连接酶, 质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品。TAE 电泳缓冲液、SDS-PAGE 蛋白电泳试剂等由本室配制 (配方参考《精编分子生物学实验指南》)。PCR 扩增仪; 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); 琼脂糖凝胶电泳装置; 蛋白电泳装置 (Bio-Rad 公司); 脱色摇床 (江苏兴化市分析仪器厂)。

3. 基因片段的合成:

由公司帮助合成。

4. 表达 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段重组质粒的构建:

提取质粒 pCEP4, 用 Hind III 和 BamH I 双酶切, 电泳后回收酶切的质粒大片段, 溶于去离子水内。同样用 Hind III 和 BamH I 双酶切化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段, 电泳回收后, 溶于去离子水内。取等摩尔浓度的上述两种酶切后 DNA 片段, 在同一离心管内用 T4 DNA 连接酶连接, 使 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段插入到真核质粒 pCEP4 内的 Hind III 和 BamH I 位点之间, 构成重组真核表达载体 pCEP4-gD1。

5. 重组质粒的筛选与鉴定:

将上步连接的重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α , 将转化产物涂布含氨苄青霉素 (100ug/ml) 的固体 LB 培养基上, 置 37°C 培养过夜。次日随机挑选 8 个转化子菌落 (分别标记为 1-8 号) 和 1 个对照菌 (质粒 pCEP4 转化菌), 分别接种到含 3 ml 液体 LB 培养基 (含氨苄青霉素

100ug/ml) 的试管内, 置 37°C 振荡培养 5 小时, 取菌液 1ml, 离心收菌。分别用 50ul 去离子水悬浮菌体, 沸水煮 5 分钟, 4°C, 12000rpm 离心 5 分钟, 取上清 (内有质粒) 2ul 用作 PCR 模板, PCR 扩增插入载体内的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区截短形式基因片段, PCR 反应浓度为: 质粒模板 2ul、HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段的正链引物 P1 (GCAAGCTTGCCGCCACCATGGAA) 和负链引物 P2 (GCGGATCCTTAACCCACAGGGTC) 各 1ul、10×pyrobest buffer 2.0ul、2.5 mmol/L dNTP 2.0ul、PrimerSTAR HS DNA 聚合酶 0.5ul (1.25 U)、去离子水 11.5ul, 总体积 20ul。扩增条件为: 98°C 预变性 1 分钟, 98°C 10 秒、55°C 10 秒、72°C 1 分钟, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 7 分钟。取 PCR 扩增产物 5ul, 用 1.0% 的 Agarose 凝胶检测, 阳性转化子应能扩增出 981bp 的目的片段, 而空质粒转化菌无此带。用 Hind III 和 BamH I 酶双酶切, 重组质粒酶切产物应在 975bp、10200bp 处出现条带。

6. DNA 序列分析:

用 QIAGEN 公司质粒纯化试剂盒纯化质粒, 用 DNA 全自动测序仪测序。

结果

1. HSV1 病毒的 gD 糖蛋白抗原表位筛选及基因片段的合成:

利用 ANTHEWIN 等软件, 通过计算机分析 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白的全部氨基酸序列 (GeneBank, 登录号: EF157320), 筛选出 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白内的强抗原表位, 即从第 1 个氨基酸到第 284 个氨基酸, 其氨基酸序列如下:

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

根据筛选的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白内的抗原表位氨基酸序列, 选择真核和原核生物均偏爱的密码子, 化学合成全新的基因序列, 并且在 5' 端增加了 Hind III 酶切位点 (下画线部分), 转录调控序列 (GCCGCCACC), 起始密码子 (ATG), 人 IgG κ 轻链信号肽 (波浪线部分), 8×His 标签及 TEV 蛋白酶酶切位点 (gaaaacctgtacttccagggt), 在 3' 端增加了终止密码子 (TAA) 和 BamH I 酶切位点 (下画线部分), 使该基因片段易于克隆至质粒 pCEP4 内的 Hind III 和 BamH

I 酶切位点内，并且使 gD 蛋白更易于表达和纯化。化学合成的含 HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗原表位基因的 DNA 序列（981bp）如下：

AAGCTT GCC GCC ACC ATG GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA
GAT ACC ACC GGA CAT CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT GAA AAC CTG TAC TTC CAG GGT AAG TAC
 GCT CTG GCC GAT GCT AGC CTG AAG ATG GCT GAT CCT AAC CGC TTC AGA GGT AAG GAC CTG CCT
 GTG CTG GAC CAG CTG ACC GAC CCT CCT GGC GTG CGC AGA GTG TAC CAC ATT CAG GCT GGT CTG
 CCT GAC CCT TTC CAG CCT CCT AGC CTG CCT ATC ACC GTG TAC TAC GCC GTG CTG GAG AGA GCC
 TGT CGC AGC GTG CTG CTG AAC GCT CCT AGC GAG GCT CCT CAG ATC GTG AGA GGT GCT AGC GAA
 GAC GTG AGG AAG CAG CCT TAC AAC CTG ACC ATC GCC TGG TTC AGG ATG GGT GGT AAC TGT GCT
 ATC CCT ATC ACC GTG ATG GAG TAC ACC GAG TGT TCT TAC AAC AAG AGC CTG GGC GCT TGT CCT
 ATC CGC ACC CAG CCT AGG TGG AAC TAC TAC GAC AGC TTC AGC GCT GTG AGC GAG GAC AAC CTG
 GGC TTC CTG ATG CAC GCT CCT GCC TTC GAG ACC GCT GGC ACC TAC CTG AGG CTG GTG AAG ATC
 AAC GAC TGG ACC GAG ATC ACC CAG TTC ATC CTG GAG CAC AGA GCC AAG GGT AGC TGT AAG TAC
 GCT CTG CCT CTG AGA ATC CCT CCT AGC GCT TGT CTG AGC CCT CAG GCC TAC CAG CAA GGC GTG
 ACC GTG GAC AGC ATC GGT ATG CTG CCT CGC TTC ATC CCT GAG AAC CAG AGG ACC GTG GCT GTG
 TAC AGC CTG AAG ATC GCT GGC TGG CAC GGT CCT AAG GCT CCT TAC ACC AGC ACT CTG CTG CCT
 CCT GAG CTG AGC GAG ACC CCT AAC GCC ACT CAG CCT GAG CTG GCT CCT GAG GAC CCT GAG GAC
 AGC GCT CTG CTG GAG GAC CCT GTG GGT TAA GGATCC

2. 表达 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段重组质粒的构建：

将目的基因克隆到 pCEP4 载体的 Hind III 和 BamH I 酶切位点之间，构成重组真核表达载体 pCEP4-gD1。（构建流程见图 1）。

3. 重组质粒的筛选与鉴定：

第 2、4、5、7 号 4 个转化子扩增出 981bp 的目的基因片段，而含质粒 pCEP4 的对照菌没有扩增出该基因片段（见图 2）。提取 4 号重组子的质粒，用 Hind III 和 BamH I 酶双酶切，酶切产物在约 975bp、10200bp 处出现条带，与预期大小相符（见图 3）。提取 4 号重组子的质粒，测定质粒内的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因序列，DNA 序列分析证实，重组质粒含有合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白基因片段，序列完全正确：

AAGCTT GCC GCC ACC ATG GAA ACC CCA GCG CAG CTT CTC TTC CTC CTG CTA CTC TGG CTC CCA
 GAT ACC ACC GGA CAT CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT GAA AAC CTG TAC TTC CAG GGT AAG TAC
 GCT CTG GCC GAT GCT AGC CTG AAG ATG GCT GAT CCT AAC CGC TTC AGA GGT AAG GAC CTG CCT
 GTG CTG GAC CAG CTG ACC GAC CCT CCT GGC GTG CGC AGA GTG TAC CAC ATT CAG GCT GGT CTG
 CCT GAC CCT TTC CAG CCT CCT AGC CTG CCT ATC ACC GTG TAC TAC GCC GTG CTG GAG AGA GCC
 TGT CGC AGC GTG CTG CTG AAC GCT CCT AGC GAG GCT CCT CAG ATC GTG AGA GGT GCT AGC GAA
 GAC GTG AGG AAG CAG CCT TAC AAC CTG ACC ATC GCC TGG TTC AGG ATG GGT GGT AAC TGT GCT
 ATC CCT ATC ACC GTG ATG GAG TAC ACC GAG TGT TCT TAC AAC AAG AGC CTG GGC GCT TGT CCT
 ATC CGC ACC CAG CCT AGG TGG AAC TAC TAC GAC AGC TTC AGC GCT GTG AGC GAG GAC AAC CTG
 GGC TTC CTG ATG CAC GCT CCT GCC TTC GAG ACC GCT GGC ACC TAC CTG AGG CTG GTG AAG ATC
 AAC GAC TGG ACC GAG ATC ACC CAG TTC ATC CTG GAG CAC AGA GCC AAG GGT AGC TGT AAG TAC
 GCT CTG CCT CTG AGA ATC CCT CCT AGC GCT TGT CTG AGC CCT CAG GCC TAC CAG CAA GGC GTG

ACC GTG GAC AGC ATC GGT ATG CTG CCT CGC TTC ATC CCT GAG AAC CAG AGG ACC GTG GCT GTG
TAC AGC CTG AAG ATC GCT GGC TGG CAC GGT CCT AAG GCT CCT TAC ACC AGC ACT CTG CTG CCT
CCT GAG CTG AGC GAG ACC CCT AAC GCC ACT CAG CCT GAG CTG GCT CCT GAG GAC CCT GAG GAC
AGC GCT CTG CTG GAG GAC CCT GTG GGT TAA GGATCC

构建的重组质粒表达 HSV1 的病毒 gD 糖蛋白片段 (284 个氨基酸), 在其 N 端添加了 8×His 标签 (8 个氨基酸) 及 TEV 蛋白酶酶切位点 (7 个氨基酸), 全长 299 个氨基酸, 其氨基酸序列如下:
His His His His His His His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp
Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val Leu Asp Pro
Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe
Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val
Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys
Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr
Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln
Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met
His Ala Pro Ala Phe Glu Thr Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr
Glu Ile Thr Gln Phe Ile Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu
Arg Ile Pro Pro Ser Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser
Ile Gly Met Leu Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys
Ile Ala Gly Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser
Glu Thr Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu
Glu Asp Pro Val Gly

重组质粒的真核转染、细胞表达上清的蛋白检测与纯化

提取阳性重组质粒 pCEP4-gD1, 用脂质体转染法对 HEK293 细胞进行转染。收集细胞上清, 根据表达 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的氨基酸序列, 分析其理化特性, 确定适当的纯化方法。我们所表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白在 N 端添加了 8×His 标签, 可很方便使用镍琼脂糖凝胶分离, 因此我们决定采用亲和层析法, 用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶进行纯化。具体步骤如下:

材料和方法

1. 主要试剂:

Lipofectamine 2000 为 invitrogen 公司产品, Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶为 GE Healthcare 公司产品, 小鼠抗 His 单抗、羊抗小鼠 IgG-HRP 为金斯特公司产品。其它试剂为国产或进口分析纯试剂。

2. 重组质粒 pCEP4-gD1 真核转染:

转染前一天以 $0.5-2 \times 10^5$ /孔的密度接种 HEK293 细胞至 24 孔板, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 温箱培养过夜, 使其达到孔底面积 90-95% 时进行转染。取重组质粒 pCEP4-gD1 5ul (200ng/ul) 稀释于 50ul 无血清 DMEM 培养基中 (设对照空质粒 pCEP4), 温和混匀。取 Lipofectamine 2000 2ul 稀释于 50ul 无血清 DMEM 培养基中, 温和混匀, 室温静置 5 分钟。将稀释的重组质粒和脂质体温和混匀, 室温静置 20 分钟后加入到含有 HEK293 细胞的 24 孔板中, 100ul/孔, 温和混匀, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 温箱培养 48 小时后, 收集细胞上清进行检测。

3. Western Blot 检测表达重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的细胞上清:

收集转染细胞上清进行 SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜湿转, 100V, 1 小时, 4℃ 封闭过夜 (5% milk-PBST)。PBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟, 小鼠抗 His 单抗 (1mg/ml) 1: 10000 稀释于封闭液中, 室温孵育 2 小时, 洗膜 3×10 分钟, 羊抗小鼠 IgG-HRP 1: 10000 稀释于封闭液中, 室温孵育 1 小时, 洗膜 3×10 分钟, 加发光底物反应 3 分钟, 暗室中压片曝光。

4. 重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的纯化:

上清溶液加已经平衡的 Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶 3ml, 混匀后 4℃ 结合过夜, 上样, 收集穿透液。用十倍柱床体积的平衡液 (1×PBS, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L imidazole, pH7.4) 洗涤柱子, 接着将 1ml 洗脱液 (1×PBS, 0.5mol/L NaCl, 500mmol/L imidazole, pH7.4) 加入胶体中, 静置 20 分钟后洗脱目的蛋白, 即为纯化的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段。

5. Western Blot 检测纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白:

对纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白进行 12% SDS-PAGE 胶电泳, 19mA, 80 分钟。PVDF 膜湿转, 100V, 1 小时, 4℃ 封闭过夜 (5% milk-PBST)。PBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟, 小鼠抗 His 单抗 (1mg/ml) 1: 10000 稀释于封闭液中, 室温孵育 2 小时, 洗膜 3×10 分钟, 羊抗小鼠 IgG-HRP 1: 10000 稀释于封闭液中, 室温孵育 1 小时, 洗膜 3×10 分钟, 加发光底物反应 3 分钟, 暗室中压片曝光。

结果

1. Western Blot 检测表达重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的细胞上清:

经重组质粒转染的 HEK293 细胞明显表达出重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白, 表达产物以可溶性形式存在于细胞上清中, 分子量约 46kDa, 与预期大小相符。结果表明, 重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白表达成功 (见图 4)。

2. Western Blot 检测纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白:

将从 Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶柱上洗脱的蛋白进行 Western Blot 分析, 蛋白带分子量约 46kDa, 与预期大小相符。结果表明, 重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白纯化成功 (见图 5)。

纯化 HSV1 病毒的 gD 糖蛋白的鉴定及应用

将纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗原, 通过间接 ELISA 试验方法检测, 以鉴定表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的抗原性和特异性。再用纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗原免疫小鼠, 通过间接 ELISA 试验方法检测小鼠血清中抗体浓度, 以鉴定表达的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的免疫原性。

材料和方法

1. 主要试剂及材料:

山羊抗 HSV1+HSV2 多抗为 Abcam 公司产品, 兔抗山羊 IgG-HRP 为博士德公司产品, 完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂为 SIGMA 公司产品。其它试剂为国产或进口分析纯试剂。实验动物 4 周龄雄性昆明小鼠, SPF 级, 购自北京军事医学科学院实验动物中心。

2. 重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的鉴定:

采用间接 ELISA 检测重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的抗原性。基本步骤为: 用 1×PBS (pH7.4) 按 1:25-1:400 倍比稀释纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白, 包被酶联板 (阴性对照取正常 HEK293 细胞上清), 每孔 100 μ l, 4℃ 过夜。次日用封闭液 (1×PBS, 1% 小牛血清) 封闭, 每孔 130 μ l, 室

温 2 小时。将山羊抗 HSV1+HSV2 多抗，用样本稀释液（1×PBS，0.1%小牛血清）1：500 稀释后，分别加至封闭后的酶联板孔内，每孔 100ul，37℃反应 1 小时，用 PBST 液（1×PBS，0.5%吐温-20）洗 5 遍后，加 1：40000 稀释的兔抗山羊 IgG-HRP，每孔 100ul，37℃反应 30 分钟，PBST 洗 5 遍，加底物 TMB 溶液，每孔 100ul，37℃避光显色 10 分钟，每孔加 50ul 1N 盐酸终止反应，用酶联仪测定 A450 值。

3. HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗血清的制备：

将纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白与福氏佐剂等体积混合后分别于第 1，3，5 周（第 1 周用完全福氏佐剂，第 3，5 周用不完全福氏佐剂）腹腔注射免疫小鼠，1.25ug/只/次（阴性对照组注射等体积 PBS），并于第 3,5,7 周眼眶采血。血液 37℃放置 1 小时后 4℃过夜，2000rpm 离心 20 分钟，取上清，4℃，12000rpm 离心 20 分钟，取上清即得 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的抗血清。

4. HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗血清效价检测：

采用间接 ELISA 检测重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白的免疫原性。基本步骤为：用 1×PBS 按 1：100 稀释纯化的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白，包被酶联板，每孔 100ul，4℃过夜。次日用封闭液封闭酶联板，每孔 130ul，室温 2 小时。将抗血清用样本稀释液按 1：50，1：500，1：5000 稀释后，分别加至封闭后的酶联板孔内，每孔 100ul，37℃反应 1 小时，用 PBST 洗 5 遍后，加 1：10000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP，每孔 100ul，37℃反应 30 分钟，PBST 洗 5 遍，加底物 TMB 溶液每孔 100ul，37℃避光显色 10 分钟，加 50ul 1N 盐酸终止反应，用酶联仪测定 A450 值。阳性血清应能与 HSV1 病毒 gD 糖蛋白反应，阴性血清则不能。

结果

1. 重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗原性鉴定：

用间接 ELISA 法检测纯化的重组蛋白的抗原性，结果显示（表 1）蛋白浓度与其 OD 值之间有良好的线性关系，说明表达的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白有较好的抗原性和特异性。

2. 重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白免疫原性鉴定：

用间接 ELISA 法检测纯化的重组蛋白的免疫原性，结果显示（表 2）第一次免疫后抗体水平较低，第二次免疫后抗体水平明显上升，第三次免疫后抗体水平与第二次持平，说明表达的重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白有良好的免疫原性，为的研制奠定了基础。

表 1 表达蛋白抗原性检测的 ELISA 实验结果

蛋白稀释浓度	重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白					阴性对照
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	原液
A450 吸光度值	0.461	0.383	0.221	0.071	0.039	0.004

表2 表达蛋白免疫原性检测的 ELISA 实验结果

稀释浓度	重组 HSV1 病毒 gD 糖蛋白抗血清			阴性对照		
	1:50	1:500	1:5000	1:50	1:500	1:5000
第一次免疫	0.137	-	-	0.125	-	-
第二次免疫	2.199	2.063	1.104	0.065	0.046	0.018
第三次免疫	2.050	1.844	0.741	0.061	0.023	0.021

化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段序列列表

<110> 李越希

<120> 化学合成的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用

<160> 2

<210> 1

<211> 852

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (852)

<223> 人工合成的全新基因片段，编码含强抗原表位的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区 284 个氨基酸片段。

<400> 1

```

AAG TAC GCT CTG GCC GAT GCT AGC CTG AAG ATG GCT GAT CCT AAC CGC TTC AGA GGT AAG   60
GAC CTG CCT GTG CTG GAC CAG CTG ACC GAC CCT CCT GGC GTG CGC AGA GTG TAC CAC ATT   120
CAG GCT GGT CTG CCT GAC CCT TTC CAG CCT CCT AGC CTG CCT ATC ACC GTG TAC TAC GCC   180
GTG CTG GAG AGA GCC TGT CGC AGC GTG CTG CTG AAC GCT CCT AGC GAG GCT CCT CAG ATC   240
GTG AGA GGT GCT AGC GAA GAC GTG AGG AAG CAG CCT TAC AAC CTG ACC ATC GCC TGG TTC   300
AGG ATG GGT GGT AAC TGT GCT ATC CCT ATC ACC GTG ATG GAG TAC ACC GAG TGT TCT TAC   360
AAC AAG AGC CTG GGC GCT TGT CCT ATC CGC ACC CAG CCT AGG TGG AAC TAC TAC GAC AGC   420
TTC AGC GCT GTG AGC GAG GAC AAC CTG GGC TTC CTG ATG CAC GCT CCT GCC TTC GAG ACC   480
GT GGC ACC TAC CTG AGG CTG GTG AAG ATC AAC GAC TGG ACC GAG ATC ACC CAG TTC ATC   540
CTG GAG CAC AGA GCC AAG GGT AGC TGT AAG TAC GCT CTG CCT CTG AGA ATC CCT CCT AGC   600
GCT TGT CTG AGC CCT CAG GCC TAC CAG CAA GGC GTG ACC GTG GAC AGC ATC GGT ATG CTG   660
CCT CGC TTC ATC CCT GAG AAC CAG AGG ACC GTG GCT GTG TAC AGC CTG AAG ATC GCT GGC   720
TGG CAC GGT CCT AAG GCT CCT TAC ACC AGC ACT CTG CTG CCT CCT GAG CTG AGC GAG ACC   780
CCT AAC GCC ACT CAG CCT GAG CTG GCT CCT GAG GAC CCT GAG GAC AGC GCT CTG CTG GAG   840
GAC CCT GTG GGT

```

<210> 2

<211> 284

<212> PRT

<213> HSV1 病毒 gD 蛋白胞外区片段

<220>

<223> 含强抗原表位的 HSV1 病毒 gD 糖蛋白胞外区片段, 第 1 个氨基酸 — 第 284 个 氨基酸, 共 284 个氨基酸。

<400> 2

```

Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys
1           5           10           15           20
Asp Leu Pro Val Leu Asp Pro Leu Thr Asp Pro Pro Gly Val Arg Arg Val Tyr His Ile
21          25          30          35          40
Gln Ala Gly Leu Pro Asp Pro Phe Gln Pro Pro Ser Leu Pro Ile Thr Val Tyr Tyr Ala
41          45          50          55          60
Val Leu Glu Arg Ala Cys Arg Ser Val Leu Leu Asn Ala Pro Ser Glu Ala Pro Gln Ile
61          65          70          75          80
Val Arg Gly Ala Ser Glu Asp Val Arg Lys Gln Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ala Trp Phe
81          85          90          95          100
Arg Met Gly Gly Asn Cys Ala Ile Pro Ile Thr Val Met Glu Tyr Thr Glu Cys Ser Tyr
101         105         110         115         120
Asn Lys Ser Leu Gly Ala Cys Pro Ile Arg Thr Gln Pro Arg Trp Asn Tyr Tyr Asp Ser
121         125         130         135         140
Phe Ser Ala Val Ser Glu Asp Asn Leu Gly Phe Leu Met His Ala Pro Ala Phe Glu Thr
141         145         150         155         160
Ala Gly Thr Tyr Leu Arg Leu Val Lys Ile Asn Asp Trp Thr Glu Ile Thr Gln Phe Ile
161         165         170         175         180
Leu Glu His Arg Ala Lys Gly Ser Cys Lys Tyr Ala Leu Pro Leu Arg Ile Pro Pro Ser
181         185         190         195         200
Ala Cys Leu Ser Pro Gln Ala Tyr Gln Gln Gly Val Thr Val Asp Ser Ile Gly Met Leu
201         205         210         215         220
Pro Arg Phe Ile Pro Glu Asn Gln Arg Thr Val Ala Val Tyr Ser Leu Lys Ile Ala Gly
221         225         230         235         240
Trp His Gly Pro Lys Ala Pro Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Pro Glu Leu Ser Glu Thr
241         245         250         255         260
Pro Asn Ala Thr Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser Ala Leu Leu Glu
261         265         270         275         280
Asp Pro Val Gly
281

```

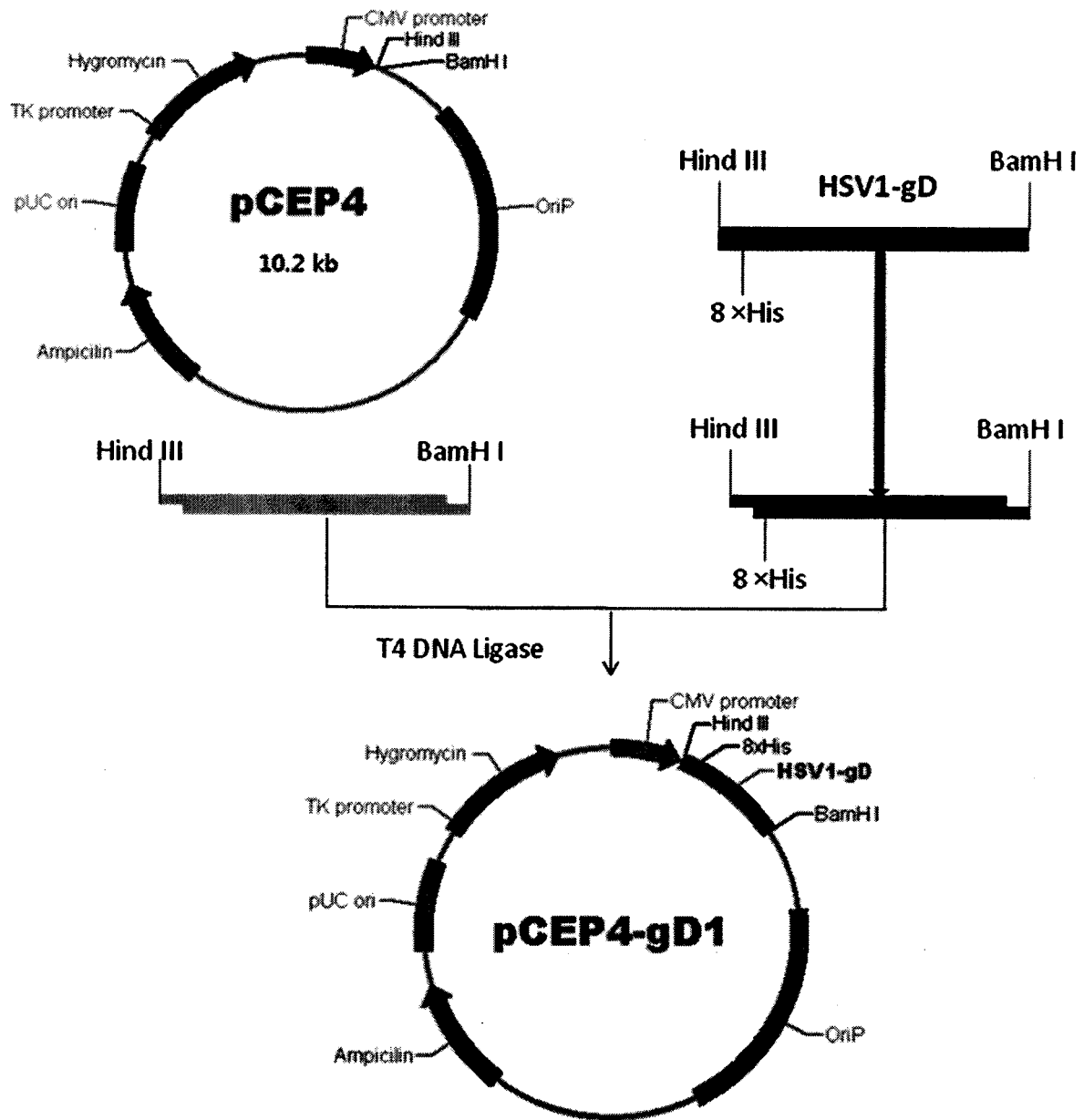


图 1

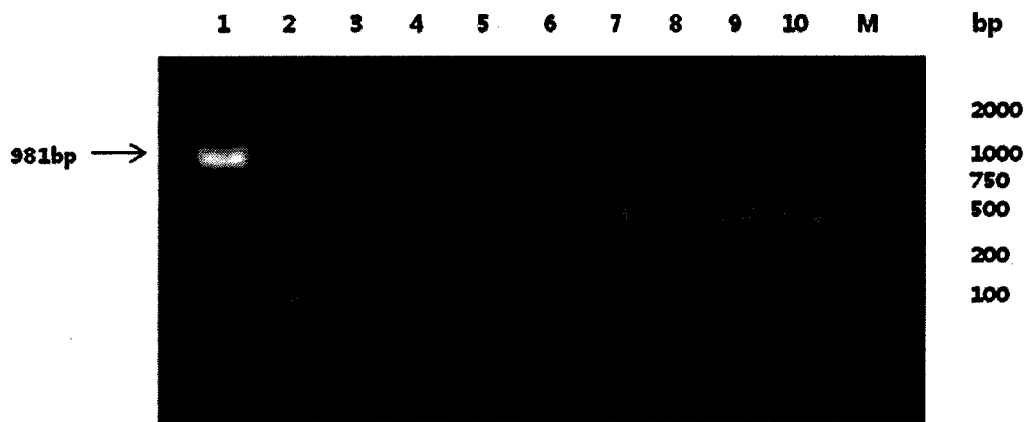


图 2

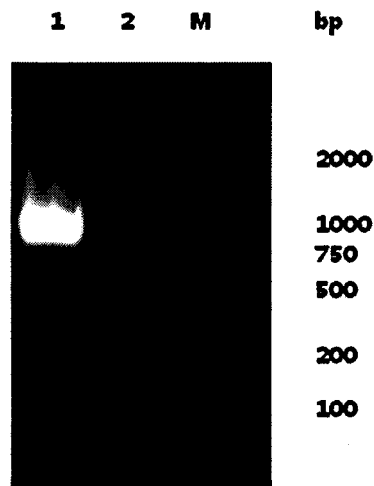


图 3

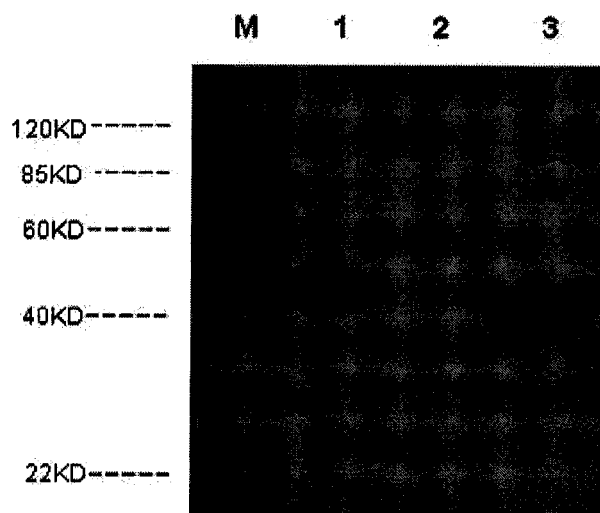


图 4

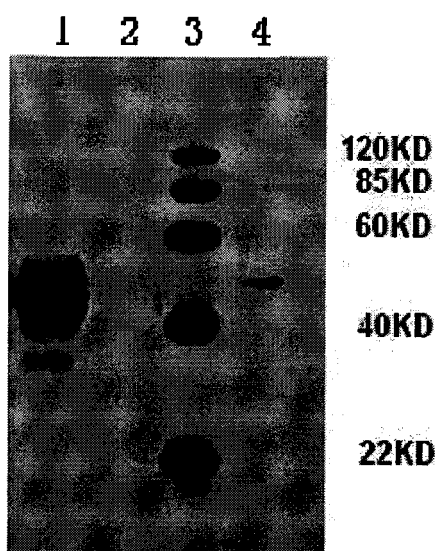


图 5

专利名称(译)	化学合成的HSV1病毒gD糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用		
公开(公告)号	CN101643737A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200910184631.2	申请日	2009-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	李越希		
申请(专利权)人(译)	李越希		
当前申请(专利权)人(译)	李越希		
[标]发明人	李越希 王正茂 管文燕 李琳 李素芹 潘英 潘明洁		
发明人	李越希 王正茂 管文燕 李琳 李素芹 潘英 潘明洁		
IPC分类号	C12N15/38 C07K14/035 A61K39/245 A61P31/22 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明化学合成的HSV1病毒gD糖蛋白胞外区基因片段及其表达、应用涉及基因工程技术、疫苗和诊断试剂领域。本发明通过计算机分析，筛选出含强抗原表位的HSV1病毒gD糖蛋白胞外区片段，第1个氨基酸至第284个氨基酸，共284个氨基酸，选择真核和原核生物均偏爱的密码子，化学合成抗原表位的全新基因序列，利用基因工程技术表达该基因片段、制备HSV1病毒gD糖蛋白的强抗原表位片段及HSV1病毒gD糖蛋白的抗血清。表达的HSV1病毒gD糖蛋白可用于疫苗、HSV1病毒抗体或抗原的检测及用于免疫制备抗HSV1病毒单抗和多抗等。

