

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03153606.9

C07K 14/165

C07K 16/10 C12N 15/50

C12N 5/00 C07H 21/00

A61K 39/215 A61K 39/395

A61K 35/16 G01N 33/68

G01N 33/569 C12Q 1/68

A61P 31/14 A61P 11/00

[43] 公开日 2005 年 2 月 16 日

[11] 公开号 CN 1580072A

[22] 申请日 2003.8.15 [21] 申请号 03153606.9

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区

共同申请人 中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 饶子和 庞海 李慎海 李雪梅

韩雪清 金英花 徐彦辉

[74] 专利代理机构 北京东方亿思专利代理有限公司

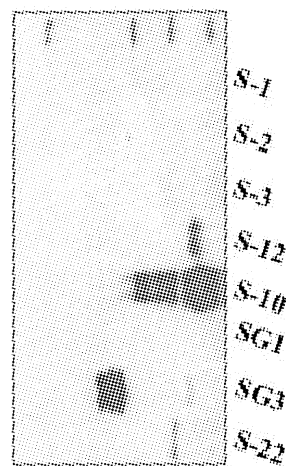
代理人 吴湘文

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 2 页

[54] 发明名称 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段、编码序列及其应用

[57] 摘要

本发明一方面提供了 SARS 冠状病毒钉状蛋白的 SG3 片段, 该片段由 148 个氨基酸构成, 具有很高的免疫原性和血清学反应特异性, 并且可以在原核表达系统中高效表达。 本发明另一方面提供了 SG3 片段的编码序列, 以及 SG3 片段的克隆、表达、纯化及变、复性的方法。 本发明还提供了 SG3 片段及其编码序列在制备疫苗、单克隆抗体、动物源治疗血清及临床诊断试剂中的应用。



1. 一种多肽分子，所述的多肽分子与 SEQ ID NO: 1 所示的多肽分子具有相同的免疫学功能。
- 5 2. 一种多肽分子，包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
3. 如权利要求 2 所述的多肽分子，具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
4. 一种核酸分子，其编码的多肽与 SEQ ID NO: 1 所示的多肽具有相同的免疫学功能。
- 10 5. 一种核酸分子，包含 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。
6. 如权利要求 5 所述的核酸分子，具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。
7. 一种表达载体，包含权利要求 4-6 之一所述的核酸分子，以及必要的基因调控元件。
- 15 8. 一种细胞，所述的细胞是经权利要求 7 所述的表达载体转化或转导而获得的。
9. 一种细胞系，所述的细胞系是通过对权利要求 8 所述的细胞进行培养而获得的。
10. 一种疫苗，所述的疫苗是基于权利要求 1-3 之一所述的多肽分子
- 20 或权利要求 4-6 之一所述的核酸分子而制得的。
11. 一种单克隆抗体，所述的单克隆抗体是基于权利要求 1-3 之一所述的多肽分子而制得的。
12. 一种动物源治疗血清，所述的动物源治疗血清是基于权利要求 1-3 之一所述的多肽分子或权利要求 4-6 之一所述的核酸分子而制得的。
- 25 13. 一种临床检测试剂，所述的临床检测试剂是基于权利要求 1-3 之一所述的多肽分子或权利要求 4-6 之一所述的核酸分子而制得的。

SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段、编码序列及其应用

5 技术领域

本发明涉及病毒蛋白质片段及其编码序列，更具体地说，本发明涉及 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段、编码序列，及其在制备疫苗、单克隆抗体、动物源治疗血清及临床诊断试剂中的应用。

10 背景技术

严重急性呼吸系统综合征 (Severe Acute Respiratory Syndrome, 以下简称为 SARS)，又称传染性非典型肺炎，是由 SARS 冠状病毒 (SARS-Associated Coronavirus) 引起的人的急性、致死性传染病。该病的致病途径和机理尚不清楚，目前尚无特效治疗药物、疫苗和治疗血清，严重威胁着人类的身体健康和生命安全。(Preliminary clinical description of severe acute respiratory syndrome. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52:255-256; Kathryn V. Holmes. 2003. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy *Invest. J. Clin.* 111:1605-1609)

2002 年 11 月，SARS 病人首次出现在中国的广东省，随后 SARS 病毒传染迅速在东南亚地区蔓延，波及至中国大陆、香港、台湾和越南、新加坡等地，加拿大、美国、欧洲等地也有病例出现。至 2003 年 4 月，各地发病达到高峰。SARS 病毒的潜伏期一般为 2-11 天，具有很强的传染性。

(Tsang, K.W., et al. 2003. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* In press)

Poutanen, S.M.等人从病人痰中分离得到一株新病毒，该病毒适合猴肾细胞系培养，通过电镜方法鉴定该病毒为一种冠状病毒 (Poutanen, S.M., et al. 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N. Engl. J. Med.* In press.)。用 SARS 相关的冠状病毒接种猴，可引起与 SARS 相似的间质性肺炎，并可从鼻和喉部分离到病毒。此外，SARS 病毒感染

人，使人发病不需要其它病毒或细菌协同诱导发病，符合 Koch 原则，因此 SARS 冠状病毒是 SARS 的唯一病因（Fouchier, R.A.M., et al. 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*. 423:240）。

首先是加拿大，随后中国香港、新加坡、中国内地、中国台湾、德国、意大利和美国也报导了各自国内分离的病毒株的核酸序列（Marra, M.A., et al. 2003. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. doi:10.1126/science.1085953；钟南山, SARS 临床诊治现状, 中国医学论坛报, 2003 年 4 月 29 日），证明 SARS 病毒是一个新的人冠状病毒，不同于无致病性的人 229E 和 OC43 冠状病毒，而且由不同国家和不同地区分离的 SARS 病毒株之间差异微小（Tsui SK et al. 2003. Coronavirus genomic-sequence variations and the epidemiology of the severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 349(2):187-8），不象 HIV-1 病毒和流感病毒变异那样激烈，是很稳定的一种病毒，这表明开发研制预防 SARS 病毒感染的疫苗和治疗血清是可能的。

SARS 病毒具有冠状病毒科病毒共同的结构特性，单股正链病毒 RNA 基因组，全长为 29.7kb，编码 11 个推导的有功能的蛋白质和 12 个未确定的蛋白质。SARS 病毒蛋白质可分为组成病毒形态、构造的结构蛋白质和在感染宿主细胞内担负着病毒复制任务的功能蛋白质（或称非结构蛋白质）。SARS 病毒的结构蛋白质包括钉状蛋白（spike protein）、M 糖蛋白、小糖蛋白 E、核蛋白（N 蛋白）等，它们是抗病毒疫苗研制和特异诊断试剂开发的重要靶标。RNA 聚合酶、蛋白裂解酶（3CL）以及其它调节蛋白质等属于 SARS 病毒的非结构蛋白质，它们在病毒复制方面具有重要意义，也是研究抗 SARS 病毒药物的重要目标蛋白质。

由于冠状病毒是一种正链 RNA 病毒，其基因组具有 mRNA 的特性，使用灭活 SARS 病毒疫苗接种人类具有很大的危险性（因为基因组 RNA 可能被细胞吞饮，在细胞中合成病毒粒子），因此，有必要开发一种无 SARS 病毒核酸的安全蛋白质疫苗或亚单位疫苗用于预防 SARS 病毒感染。

钉状蛋白为 SARS 冠状病毒的主要结构蛋白质，由 1255 个氨基酸构成，分子量为 139KD，其全长氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

(Drosten, C., et al. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* In press; Lewicki, D.N., and Gallagher, T.M. 2002. Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors. *J. Biol. Chem.* 277:19727-19734.) 它是中和抗体的主要靶标，在研制 SARS 疫苗和诊断试剂中占有重要地位。但是，全长钉状蛋白的分子量比较大，难于在原核表达体系中大量表达，而且血清学反应特异性较差，在 SARS 康复患者和健康人的血清中都有较强反应，无法用于疫苗和诊断试剂的制备。因此，有必要找出钉状蛋白的免疫原性高、特异性好的最佳抗原片段，以便在疫苗、单克隆抗体、治疗血清、特异诊断试剂的研制等方面加以应用。

15 发明内容

本发明的一个目的是提供 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段。

本发明的另一个目的是提供编码 SARS 冠状病毒钉状蛋白高免疫原性片段的核酸序列。

20 本发明的另一个目的是提供包含 SARS 冠状病毒钉状蛋白高免疫原性片段编码序列的表达载体。

本发明的另一个目的是提供经包含 SARS 冠状病毒钉状蛋白高免疫原性片段编码序列的表达载体转化或转导而获得的细胞。

25 本发明的另一个目的是提供一种细胞系，该细胞系是通过培养经包含 SARS 冠状病毒钉状蛋白高免疫原性片段编码序列的表达载体转化或转导而获得的细胞而得到的。

本发明的另一个目的是提供 SARS 冠状病毒钉状蛋白高免疫原性片段的适于大规模工业化生产的纯化和变、复性方法。

本发明的另一个目的是提供基于 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原

性片段或其编码序列而制得的疫苗。

本发明的另一个目的是提供基于 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段而制得的单克隆抗体。

5 本发明的另一个目的是提供基于 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段或其编码序列而制得的动物源治疗血清。

本发明的另一个目的是提供基于 SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段或其编码序列而制得的临床检测试剂。

10 本发明中，将 SARS 冠状病毒钉状蛋白划分为 8 个重组表达片段（有些片段之间存在部分序列的重叠），如图 2 所示。对这 8 个片段逐一进行克隆、表达和纯化，并利用采自 SARS 患者不同发病时期的血清，采用 Western Blotting 和 ELISA 等实验手段，对这 8 个片段进行免疫学分析。结果表明，SG3 片段是免疫原性最强的一个片段，由 148 个氨基酸组成，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，其编码 DNA 序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

15 研究发现，SG3 片段的免疫原性很强，在 SARS 康复患者血清中含有很高的抗 SG3 片段抗体，而且 SG3 片段的表达纯化非常方便，因此，在制备高度安全的多肽/亚单位疫苗以及高效价动物源治疗血清方面有很好的应用前景。同时，SG3 片段在 SARS 阴性血清中却几乎没有反应，因此，它具有很好的血清学反应特异性，在制备高灵敏度的特异诊断试剂方面将

20 有很好的应用前景。

在本发明的一些实施例中，提供了 SG3 片段的克隆、表达、纯化以及变、复性的方法。SG3 片段可以在本发明所提供的大肠杆菌原核表达系统中高效表达，而且以包含体的形式存在，纯化方法简单，非常适合于大规模工业化生产

25 在本发明的一个实施例中，通过 Western Blotting 方法对上述的 8 个片段进行了分析，结果表明 SG3 片段的免疫原性最强。

在本发明的另一个实施例中，通过 ELISA 方法对 SG3 片段进行了免疫学分析，结果表明 SG3 片段的免疫原性很强，并且具有很好的血清学反应特异性。

在本发明的另一个实施例中，提供了基于 SG3 片段的动物源治疗血清，并且通过体外病毒中和实验证实了该治疗血清能够中和 SARS 冠状病毒。

在本发明的另一个实施例中，提供了基于 SG3 片段的疫苗，并且通过动物实验证实了经过该疫苗免疫的动物能够抵抗 SARS 冠状病毒的感染。

在本发明的一些实施例中，提供了基于 SG3 片段的单克隆抗体、临床检测试剂及其制备方法。

附图说明

附图不一定是成比例的，其目的仅仅在于更好地解释本发明，以便于读者理解。将附图与具体实施方式结合在一起考虑，可以更好地理解本发明。

图 1 示出了包含 SG3 基因的 pET28(a) 表达载体的结构。

图 2 示出了分段重叠表达的 SARS 冠状病毒钉状蛋白的 8 个片段。其中，最上方的标尺示出了全长钉状蛋白的氨基酸位点，左侧为氨基端，右侧为羧基端，其中的数字代表了该位点的编号；S1 和 S2 为钉状蛋白的两个结构域；最下方有 8 个小片段，每个片段两端的数字为该片段的氨基端（左侧）和羧基端（右侧）在全长钉状蛋白氨基酸序列中所占的位置，每个片段中央的标识（字母加数字）为该片段的编号。

图 3 示出了上述 8 个片段的 Western Blotting 结果，其中，电泳图上方的标识为片段的编号。

图 4 为 SG3 片段的 ELISA 结果。其中，左侧的浅灰色柱代表感染初期血清反应结果；中间的深灰色柱代表病重期血清反应结果；右侧的白色柱代表康复期血清反应结果。

25

具体实施方式

为了更加详细地解释本发明，下面将结合附图给出本发明的具体实施例。在对这些实施例进行描述时，没有对公知的实验方法、仪器、试剂和材料等进行详细的描述，以避免喧宾夺主、淡化了本发明的主要内容。

实施例一 SG3 基因片段的 PCR 扩增

根据已发表的 SARS 病毒基因组的核酸序列（加拿大 Tor2 株）（Poutanen, S.M., et al. 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N. Engl. J. Med.* In press.），设计了一对扩增钉状蛋白 SG3 基因片段的引物（nt.23675-24118）：上游引物（pSG3-F）：5'-CCGGAATTCCTTCTCCAATATGGTAGC-3'；下游引物（pSG3-R）：5'-TCCGCTCGAGCATAGCAAAAGGTATTT-3'。为了方便基因定向克隆，在其上游和下游引物两端分别附加了一个 EcoR I 和 Xho I 酶切位点。

10 使用 PCR 扩增仪（Eppendorf）扩增 SG3 基因片段，其反应体系为：以 SARS 病毒 BJ01 株（Genbank Accession: AY278488）cDNA 为模板，加入 0.5 μ l（约 5ng）；上游和下游引物各 25pmol，dNTP 为 200 μ mol/L，Ex Taq DNA 聚合酶（购于日本宝公司，5 μ g/ μ l）0.25 μ l，加水至 50 μ l。反应条件为：预变性 95 $^{\circ}$ C 5 分钟之后，进行 35 个扩增循环（95 $^{\circ}$ C 30 秒钟，50 $^{\circ}$ C 45 秒钟，72 $^{\circ}$ C 1 分钟），最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

15 然后，可以通过各种常规实验手段从 PCR 产物中回收目的基因片段，例如本发明所采用的 1%琼脂糖凝胶电泳法。

实施例二 SG3 基因片段原核表达载体的构建

20 利用 EcoR I 和 Xho I 过夜酶切扩增得到的 SG3 基因片段。使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳回收酶切片段。利用 EcoR I 和 Xho I 酶切 pET28(a)载体。利用连接酶将双酶切后的 SG3 基因片段和 pET28(a)载体加以连接。包含 SG3 基因的 pET28(a)表达载体的结构如图 1 所示。连接产物转化到 DH5a 大肠杆菌中。提取重组质粒酶切鉴定。具体操作方法可以参见《分子克隆实验指南》（黄培堂等译，第三版，北京：科学出版社，2002）等本领域常用工具书。

实施例三 SG3 基因片段的表达

将阳性重组质粒转化到大肠杆菌 BL21（DE3）表达宿主菌中，挑取单

菌落，接种到 5ml 的 LB（含 50 μ g/mL 卡那霉素）培养基中，37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜，次日以 1% 的接种量转入 5ml 的 LB 培养基（含 50 μ g/mL 卡那霉素）中，培养至 OD₆₀₀ 值约 0.6 时，加 IPTG（终浓度为 1mM）诱导表达 4~6 小时，离心（4000rpm \times 20min）收集菌体，15% SDS-PAGE 鉴定表达。

实施例四 SG3 片段的表达、纯化及其变、复性方法

挑取单菌落，接种到 20ml 的 LB 培养基（含 50 μ g/mL 卡那霉素）中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜，次日以 1% 的量接种 1L 的 LB 培养基（含 50 μ g/mL 卡那霉素），37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀=0.6-0.8 时，加入 IPTG（终浓度为 1mM）诱导蛋白质表达，37 $^{\circ}$ C 诱导 4 小时。将菌液 5000rpm 离心 10 分钟，收集菌体。将菌体用裂解缓冲液（10mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl、10mM EDTA pH 8.0 和 400ug/ml 溶菌酶）重悬，冰浴 30 分钟，超声破菌（工作 4 秒，间隙 6 秒，30 次为一个循环，共进行 3 个循环），15,000rpm 离心 30 分钟，弃上清，加入 30ml 的洗涤缓冲液（50mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl、10mM EDTA pH8.0 和 1% Triton X-100）重悬，再次超声破菌，离心，弃上清，重复 3 次，方法同上。用 20mM Tris-HCl pH8.0 代替洗涤缓冲液，重复 2 次，直至沉淀变白为止。此处的沉淀即为包含体。每克沉淀加入 10ml 的变性缓冲液（10mM Tris-HCl pH8.0、140mM NaCl、6M 盐酸胍和 5mM DTT）悬浮沉淀，转移至小烧杯中，室温下搅拌直至沉淀完全溶解。将其缓慢加入透析袋中，密封后放入含 4M 盐酸胍的复性缓冲液（100mM Tris-HCl pH8.0、400mM L-精氨酸盐、2mM EDTA pH 8.0、5 mM 还原性谷胱甘肽、0.5 mM 氧化性谷胱甘肽、5mM PMSF 和 5mM DTT）中，4 $^{\circ}$ C 缓慢透析 4 小时；再将其转入含 2M 盐酸胍的复性缓冲液中继续缓慢透析 4 小时；最后将其转入含 1M 盐酸胍的复性缓冲液中继续缓慢透析 6 小时；将透析袋中的溶液取出后，15,000rpm 高速离心 30 分钟，除去不溶性的部分，上清即为复性的 SG3 片段。

实施例五 利用 Western Blotting 分析 8 个片段的免疫原性

我们从中国人民解放军总医院（301 医院）获得了 4 例 SARS 患者血清，即感染初期血清（因发热而入院时采集的血清）、病重期血清（临床症状明显、病情严重期采集的血清）和康复后血清（入院治疗康复后出院前采集的血清）。使用这些血清，我们进行了 Western Blotting 实验。

5

1、实验方法

纯化的蛋白质 3 μ l（约 30ng）加 5 \times 加样缓冲液（60mM Tris-HCl pH6.8、25%甘油、14.4 mM 巯基乙醇、0.1%溴酚兰和 2% SDS），于 95 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟放置冰浴备用。对处理好的蛋白质样品进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳（15 毫安/电泳板，约电泳 2 小时），然后再将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜上（40V 恒压转膜 2 小时），把 PVDF 膜放入含有 5%脱脂奶粉的 PBST（14mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄ 和 0.02% Tween-20）封闭液里封闭 1 小时后，以 1:3000 的比例加抗血清（患者血清），室温温育 3 小时。用适量 PBST 漂洗 PVDF 膜三次，每次 10 分钟。用辣根过氧化物酶标记的山羊抗人二次抗体温育漂洗好的 PVDF 膜 1 小时，再用 PBST 漂洗滤膜，每 10 分钟换液一次，最后用蒸馏水漂洗一次。把用蒸馏水漂洗好的 PVDF 膜置于适量 ECL 溶液（Amersham）中室温静置反应约 1 分钟后，在感光胶片上感光 1-3 分钟，进行显影和定影，可获得免疫印记杂交图谱。

20

2、8 个重组表达片段的克隆、表达和纯化

如图 2 所示，将 SARS 冠状病毒钉状蛋白划分为 8 个重组表达片段，其中，有些片段之间有一部分序列是重叠的。对这 8 个片段逐一进行克隆、表达和纯化。其中，SG3 片段的制备已在前面进行了详细的描述。其他 7 个片段的制备过程与 SG3 片段相似，而且与本发明的关系不大，所以此处没有进行详细的描述，以免淡化了本发明的主要内容。

3、实验结果

8 个重组表达片段的 Western Blotting 结果如图 3 所示。从该电泳图中

可以看出，S-1、S-2、S-3 和 SG1 片段呈阴性反应，S-22 呈弱反应，表明这些片段的免疫原性较差，在 SARS 患者的血清里基本不含抗这些片段的抗体；S-10 和 S-12 片段反应较强，但是由图 2 可以看出，S-10 片段中包含 S-22 和 SG3 片段，S-12 片段中包含 S-3 和 SG3 片段，而且 S-22 和 S-3 片段的免疫原性都很差，因此，S-10 和 S-12 片段的免疫原性实际上主要来源于 SG3 片段；而且从电泳图中可以看出，SG3 片段的反应最强。因此，从上述的实验结果可以看出，SG3 片段的免疫原性是 8 个片段中最好的。

10 实施例六 利用 ELISA 分析 SG3 片段的免疫原性和特异性

实验用阳性血清为从中国人民解放军总医院（301 医院）获得的 4 例 SARS 患者血清（同上），阴性对照血清为 SARS 病毒检查（RT-PCR 法）阴性的健康人血清。

15 1、实验方法

用 50mM 碳酸盐缓冲液（pH 9.6）稀释纯化的 SARS 病毒蛋白质抗原（1: 100），每孔加 100 μ l（约 1 μ g）于 ELISA 用 96 孔板（Costar Inc.）中，4 $^{\circ}$ C 过夜包被抗原。次日，用 PBST（含有 0.05% Tween-20 的 PBS，pH7.4）洗板 3 次（300 μ l/孔），再用封闭缓冲液（含有 3% BSA）37 $^{\circ}$ C 封闭 1~2 小时。用 PBST 洗板 3 次，加入 100 μ l 含 1% BSA 的 PBST 缓冲液稀释的 SARS 病人康复血清和健康人血清（1:1600），37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用 PBST 洗板 3 次之后，加稀释的辣根过氧化物酶联羊-抗人 IgG（1: 50000，No: A-0170 Sigma），每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用 PBST 充分洗板（约 7 次），加入 100 μ l 新鲜配制（A 液: B 液 = 1: 1）的底物（3,3',5,5'- tetramethylbenzidine, TMB）37 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟后，加入 50 μ l 的 2M H₂SO₄ 终止反应，用 Bio-RAD550 微测量酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

2、实验结果

如图 4 所示，SG3 片段在血清稀释度 1:1600 时呈现很强的反应，而且 4 例血清反应差异不大，图中的 OD₄₅₀ 数值为 4 例患者血清反应的平均值减去阴性对照值。从图中可以看出，在患者感染初期血清中就已经含有很高的抗 SG3 片段的抗体，病重期略有下降，但在康复后又有回升。值得注意的是，作为阴性对照的健康人血清的 OD₄₅₀ 值仅为 0.029，接近于本底值，这表明在健康人的血清中基本不含抗 SG3 片段的抗体；而采自 SARS 患者的阳性血清的 OD₄₅₀ 值都在 0.5 左右，表明其中含有大量的抗 SG3 片段的抗体，因此，SG3 片段的血清学反应特异性是相当好的。

10 本发明的权利要求中所提及的“具有相同的免疫学功能”，其含义包括但不限于：两种分子（例如多肽）

(1) 具有相同的表位；

(2) 免疫动物后，能够使动物产生相同的免疫反应，例如对某种疾病的抗性、白细胞数量的变化等；

15 (3) 免疫动物后，所获得的抗血清具有相同的中和某种病原体（例如病毒）的能力；

(4) 免疫动物后，所产生抗体的种类和数量相同。

如果有上述的一种或多种情况存在，即可认为所比较的两种分子具有相同的免疫学功能。

20

本文中所涉及的参考文献，包括专利文件、学术论文、出版物等，均以引用的方式将其全部内容包括在本文中。

应当注意，本发明中所涉及的各种实验操作，包括但不限于：设计 PCR 引物、在质粒中引入酶切位点、PCR、琼脂糖凝胶电泳、转化、限制性酶切、透析、Western Blotting、ELISA 等，均为本领域的常规技术，如果 25 在文中没有特别说明，则本领域的普通技术人员可以参照本发明申请日之前的各种常用工具书、科技文献或相关的说明书、手册等加以实施。

本文中所涉及的各种实验用品（包括但不限于：化学试剂、生物制品、细胞、生物体、仪器等）之中，对于那些特殊的或不易获得的，文中

均已注明了制造商、参考文献或详细的制备方法；未经特别说明的，均为常规实验用品，在本发明申请日之前，可以通过各种方式（例如购买、自行制备等）很方便地获得。

5 本发明中所涉及的 DNA 序列和氨基酸序列，除了可以用本发明所提供的方法制备外，还可以通过化学合成或者向试剂公司订购等途径获得。

以上所列出的典型实施例是出于解释和说明的目的，不应该被理解为本发明范围的限制。虽然本发明是结合上述的具体实施例进行描述的，但本发明也可以以其他方式加以实施，而限于所公开的内容。

10 应当理解，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，本领域的普通技术人员可以在形式和细节上对其做出各种改变和改进，而这些均被认为落入了本发明的保护范围。例如，根据密码子兼并原则或碱基互补原则所获得的功能基本相同的核酸分子，以及在对蛋白质功能不起主要作用的位点上进行氨基酸替换所得到的功能基本相同的蛋白质或多肽，均被认为落入了本发明的保护范围。

15

- <110> 清华大学；中国科学院生物物理研究所
- <120> SARS 冠状病毒钉状蛋白的高免疫原性片段、编码序列及其应用
- 5 <160> 3
- <210> 1
- <211> 148
- <212> PRT
- 10 <213> SARS-Associated Coronavirus
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 15 | Leu | Leu | Gln | Tyr | Gly | Ser | Phe | Cys | Thr | Gln | Leu | Asn | Arg | Ala | Leu |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| | Ser | Gly | Ile | Ala | Ala | Glu | Gln | Asp | Arg | Asn | Thr | Arg | Glu | Val | Phe |
| | | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 |
| 20 | Ala | Gln | Val | Lys | Gln | Met | Tyr | Lys | Thr | Pro | Thr | Leu | Lys | Tyr | Phe |
| | | | | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 |
| | Gly | Gly | Phe | Asn | Phe | Ser | Gln | Ile | Leu | Pro | Asp | Pro | Leu | Lys | Pro |
| | | | | 50 | | | | | | 55 | | | | | 60 |
| 25 | Thr | Lys | Arg | Ser | Phe | Ile | Glu | Asp | Leu | Leu | Phe | Asn | Lys | Val | Thr |
| | | | | 65 | | | | | | 70 | | | | | 75 |
| | Leu | Ala | Asp | Ala | Gly | Phe | Met | Lys | Gln | Tyr | Gly | Glu | Cys | Leu | Gly |
| | | | | 80 | | | | | | 85 | | | | | 90 |
| 30 | Asp | Ile | Asn | Ala | Arg | Asp | Leu | Ile | Cys | Ala | Gln | Lys | Phe | Asn | Gly |
| | | | | 95 | | | | | | 100 | | | | | 105 |
| | Leu | Thr | Val | Leu | Pro | Pro | Leu | Leu | Thr | Asp | Asp | Met | Ile | Ala | Ala |
| 35 | | | | 110 | | | | | | 115 | | | | | 120 |
| | Tyr | Thr | Ala | Ala | Leu | Val | Ser | Gly | Thr | Ala | Thr | Ala | Gly | Trp | Thr |
| | | | | 125 | | | | | | 130 | | | | | 135 |
| 40 | Phe | Gly | Ala | Gly | Ala | Ala | Leu | Gln | Ile | Pro | Phe | Ala | Met | | |
| | | | | 140 | | | | | | 145 | | | 148 | | |
- 45
- <210> 2
- <211> 444
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- 50
- <400> 2

```

CTTCTCCAAT ATGGTAGCTT TTGCACACAA CTAATCGTG CACTCTCAGG TATTGCTGCT 60
GAACAGGATC GCAACACACG TGAAGTGTC GCTCAAGTCA AACAAATGTA CAAAACCCCA 120
5 ACTTTGAAAT ATTTTGGTGG TTTTAATTTT TCACAAATAT TACCTGACCC TCTAAAGCCA 180
ACTAAGAGGT CTTTATTGA GGACTTGCTC TTTAATAAGG TGACACTCGC TGATGCTGGC 240
TTCATGAAGC AATATGGCGA ATGCCTAGGT GATATTAATG CTAGAGATCT CATTTGTGCG 300
10 CAGAAGTTCA ATGGACTTAC AGTGTTGCCA CCTCTGCTCA CTGATGATAT GATTGCTGCC 360
TACTGCTG CTCTAGTTAG TGGTACTGCC ACTGCTGGAT GGACATTTGG TGCTGGCGCT 420
15 GCTCTTCAAA TACCTTTTGC TATG 444

```

<210> 3

20 <211> 1255

<212> PRT

<213> SARS-Associated Coronavirus

<400> 3

```

25 Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp
   1           5           10           15
Leu Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr
   20           25           30
30 Thr Gln His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu
   35           40           45
35 Ile Phe Arg Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu
   50           55           60
Pro Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr
   65           70           75
40 Phe Asp Asn Pro Val Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala
   80           85           90
Ala Thr Glu Lys Ser Asn Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser
   95           100          105
45 Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser
   110          115          120
50 Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn
   125          130          135
Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met Gly Thr Gln Thr His Thr
   140          145          150
55 Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Ile Ser
   155          160          165

```

	Asp	Ala	Phe	Ser	Leu	Asp	Val	Ser	Glu	Lys	Ser	Gly	Asn	Phe	Lys
					170					175					180
5	His	Leu	Arg	Glu	Phe	Val	Phe	Lys	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Leu	Tyr
					185					190					195
	Val	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Gln	Pro	Ile	Asp	Val	Val	Arg	Asp	Leu	Pro
					200					205					210
10	Ser	Gly	Phe	Asn	Thr	Leu	Lys	Pro	Ile	Phe	Lys	Leu	Pro	Leu	Gly
					215					220					225
	Ile	Asn	Ile	Thr	Asn	Phe	Arg	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Phe	Ser	Pro
15					230					235					240
	Ala	Gln	Asp	Thr	Trp	Gly	Thr	Ser	Ala	Ala	Ala	Tyr	Phe	Val	Gly
					245					250					255
20	Tyr	Leu	Lys	Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Leu	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asn	Gly
					260					265					270
	Thr	Ile	Thr	Asp	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Leu	Ala	Glu
					275					280					285
25	Leu	Lys	Cys	Ser	Val	Lys	Ser	Phe	Glu	Ile	Asp	Lys	Gly	Ile	Tyr
					290					295					300
	Gln	Thr	Ser	Asn	Phe	Arg	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Asp	Val	Val	Arg
30					305					310					315
	Phe	Pro	Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys	Pro	Phe	Gly	Glu	Val	Phe	Asn
					320					325					330
35	Ala	Thr	Lys	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Ala	Trp	Glu	Arg	Lys	Lys	Ile
					335					340					345
	Ser	Asn	Cys	Val	Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe
					350					355					360
40	Phe	Ser	Thr	Phe	Lys	Cys	Tyr	Gly	Val	Ser	Ala	Thr	Lys	Leu	Asn
					365					370					375
	Asp	Leu	Cys	Phe	Ser	Asn	Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Val	Val	Lys
45					380					385					390
	Gly	Asp	Asp	Val	Arg	Gln	Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Gly	Val	Ile
					395					400					405
50	Ala	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Met	Gly	Cys	Val
					410					415					420
	Leu	Ala	Trp	Asn	Thr	Arg	Asn	Ile	Asp	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asn
					425					430					435
55	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Arg	His	Gly	Lys	Leu	Arg	Pro
					440					445					450

	Phe	Glu	Arg	Asp	Ile	Ser	Asn	Val	Pro	Phe	Ser	Pro	Asp	Gly	Lys
					455					460					465
5	Pro	Cys	Thr	Pro	Pro	Ala	Leu	Asn	Cys	Tyr	Trp	Pro	Leu	Asn	Asp
					470					475					480
	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Thr	Thr	Gly	Ile	Gly	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Arg
10					485					490					495
	Val	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Pro	Ala	Thr	Val
					500					505					510
15	Cys	Gly	Pro	Lys	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Gln	Cys	Val
					515					520					525
	Asn	Phe	Asn	Phe	Asn	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Pro
					530					535					540
20	Ser	Ser	Lys	Arg	Phe	Gln	Pro	Phe	Gln	Gln	Phe	Gly	Arg	Asp	Val
					545					550					555
	Ser	Asp	Phe	Thr	Asp	Ser	Val	Arg	Asp	Pro	Lys	Thr	Ser	Glu	Ile
25					560					565					570
	Leu	Asp	Ile	Ser	Pro	Cys	Ser	Phe	Gly	Gly	Val	Ser	Val	Ile	Thr
					575					580					585
30	Pro	Gly	Thr	Asn	Ala	Ser	Ser	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Tyr	Gln	Asp
					590					595					600
	Val	Asn	Cys	Thr	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	His	Ala	Asp	Gln	Leu
					605					610					615
35	Thr	Pro	Ala	Trp	Arg	Ile	Tyr	Ser	Thr	Gly	Asn	Asn	Val	Phe	Gln
					620					625					630
	Thr	Gln	Ala	Gly	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Glu	His	Val	Asp	Thr	Ser
40					635					640					645
	Tyr	Glu	Cys	Asp	Ile	Pro	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Ala	Ser	Tyr
					650					655					660
45	His	Thr	Val	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser	Thr	Ser	Gln	Lys	Ser	Ile	Val
					665					670					675
	Ala	Tyr	Thr	Met	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Ser	Ser	Ile	Ala	Tyr	Ser
					680					685					690
50	Asn	Asn	Thr	Ile	Ala	Ile	Pro	Thr	Asn	Phe	Ser	Ile	Ser	Ile	Thr
					695					700					705
	Thr	Glu	Val	Met	Pro	Val	Ser	Met	Ala	Lys	Thr	Ser	Val	Asp	Cys
55					710					715					720
	Asn	Met	Tyr	Ile	Cys	Gly	Asp	Ser	Thr	Glu	Cys	Ala	Asn	Leu	Leu
					725					730					735

	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Gln	Leu	Asn	Arg	Ala	Leu	Ser
					740					745					750
5	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	Gln	Asp	Arg	Asn	Thr	Arg	Glu	Val	Phe	Ala
					755					760					765
	Gln	Val	Lys	Gln	Met	Tyr	Lys	Thr	Pro	Thr	Leu	Lys	Tyr	Phe	Gly
10					770					775					780
	Gly	Phe	Asn	Phe	Ser	Gln	Ile	Leu	Pro	Asp	Pro	Leu	Lys	Pro	Thr
					785					790					795
15	Lys	Arg	Ser	Phe	Ile	Glu	Asp	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Val	Thr	Leu
					800					805					810
	Ala	Asp	Ala	Gly	Phe	Met	Lys	Gln	Tyr	Gly	Glu	Cys	Leu	Gly	Asp
					815					820					825
20	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Leu	Ile	Cys	Ala	Gln	Lys	Phe	Asn	Gly	Leu
					830					835					840
	Thr	Val	Leu	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Asp	Asp	Met	Ile	Ala	Ala	Tyr
25					845					850					855
	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Trp	Thr	Phe
					860					865					870
30	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Pro	Phe	Ala	Met	Gln	Met	Ala
					875					880					885
	Tyr	Arg	Phe	Asn	Gly	Ile	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Val	Leu	Tyr	Glu
					890					895					900
35	Asn	Gln	Lys	Gln	Ile	Ala	Asn	Gln	Phe	Asn	Lys	Ala	Ile	Ser	Gln
					905					910					915
	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu
40					920					925					930
	Gln	Asp	Val	Val	Asn	Gln	Asn	Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Val
					935					940					945
45	Lys	Gln	Leu	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Val	Leu	Asn
					950					955					960
	Asp	Ile	Leu	Ser	Arg	Leu	Asp	Lys	Val	Glu	Ala	Glu	Val	Gln	Ile
					965					970					975
50	Asp	Arg	Leu	Ile	Thr	Gly	Arg	Leu	Gln	Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Val
					980					985					990
	Thr	Gln	Gln	Leu	Ile	Arg	Ala	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	Ser	Ala	Asn
55					995					1000					1005
	Leu	Ala	Ala	Thr	Lys	Met	Ser	Glu	Cys	Val	Leu	Gly	Gln	Ser	Lys
					1010					1015					1020

	Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro	1025	1030	1035
5	Gln Ala Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val	1040	1045	1050
	Pro Ser Gln Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His	1055	1060	1065
10	Glu Gly Lys Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn	1070	1075	1080
	Gly Thr Ser Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln	1085	1090	1095
15	Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val	1100	1105	1110
	Val Ile Gly Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro	1115	1120	1125
	Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn	1130	1135	1140
25	His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn	1145	1150	1155
	Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu	1160	1165	1170
	Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu	1175	1180	1185
35	Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu	1190	1195	1200
	Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu	1205	1210	1215
40	Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys	1220	1225	1230
	Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro	1235	1240	1245
	Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr	1250	1255	
50				

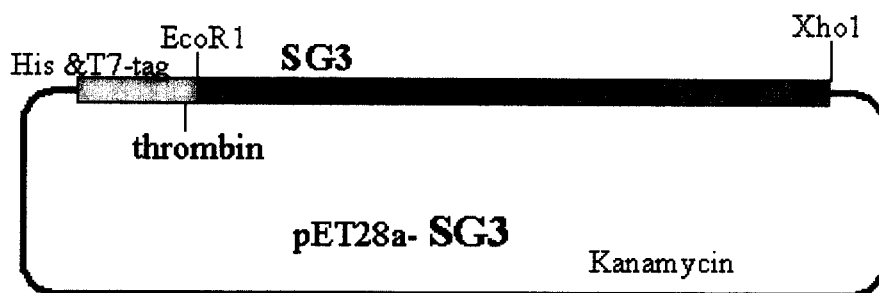


图 1

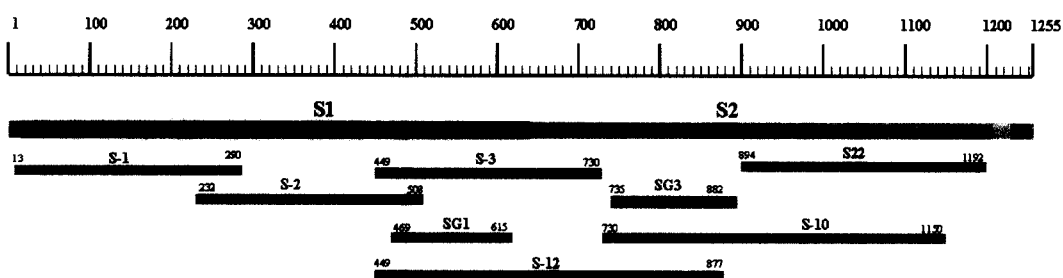


图 2

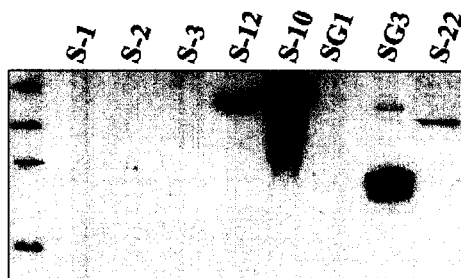


图 3

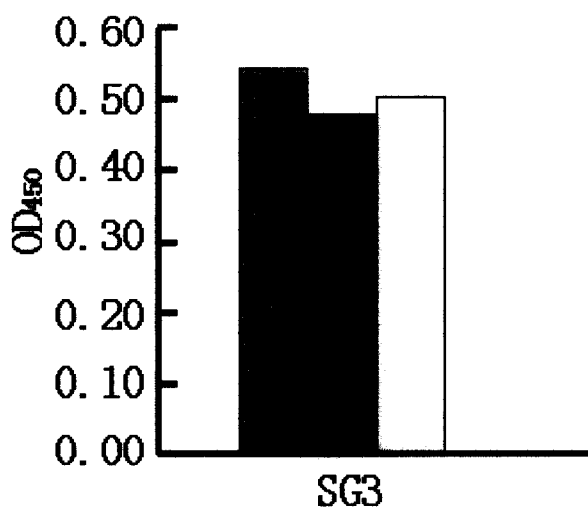


图 4