

## 呼吸道合胞病毒 G 蛋白基因片段的克隆及高效表达

范昌发, 龚伟<sup>#</sup>, 梅兴国<sup>\*\*</sup>, 刘燕

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

Cloning of Gene Encoding G Protein from Respiratory Syncytial Virus and  
Co-expression of G Protein Fragments with Diverse Carrier ProteinsFAN Chang-fa, GONG Wei<sup>#</sup>, MEI Xing-guo<sup>\*\*</sup>, LIU Yan

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, 27 Taiping Road, Beijing 100850, China)

**Abstract:** Although severe diseases may be caused by respiratory syncytial virus (RSV) infection in the world, no efficacious vaccine against this virus is licensed. In an effort to seek recombinant protein antigens that may be used in the future vaccine development, we constructed a series of expression vectors which can co-express carrier proteins and G protein fragments based on cloning the full cDNA sequence of G protein from RSV. An expression system that can efficiently express recombinant protein antigens in soluble form was selected for subsequent researches. Balb/c mice were immunized with one of the purified recombinant protein antigens, DsbA-G101, for production of anti-serum. Based on ELISA assays, good immunogenicity of DsbA-G101 was revealed. The constructed expression vectors can be used in immunogenicity analysis of different G protein fragments and in selection of ideal carrier proteins, two aspects which are important for the future development of vaccine against this virus.

**Key words:** Respiratory syncytial virus; G protein; Carrier protein; Expression; Vaccine

**摘要:** 呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染遍布全球, 并可导致严重的疾病, 但目前尚无成功的疫苗问世。为寻求可能用于 RSV 疫苗研制的重组蛋白抗原, 我们在克隆 RSV-A 全长 G 蛋白基因的基础上, 构建了多种共表达载体蛋白和 G 蛋白片段的表达载体, 并从中筛选出能以可溶形式高效表达抗原蛋白的原核表达体系。通过亲和层析纯化了重组蛋白抗原 DsbA-G101, 将其免疫 Balb/c 小鼠后获得了相应的抗血清。经 ELISA 检测表明 DsbA-G101 具有良好的免疫原性。基于本研究所构建的系列表达载体, 可以比较不同的 G 蛋白片段免疫原性的强弱及载体蛋白的优劣, 从中发现最佳的 RSV 抗原蛋白。

**关键词:** RSV; G 蛋白; 载体蛋白; 表达; 疫苗

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0553-06

在全球范围内, 呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus, RSV) 的感染十分普遍。每年约有 6500 万人感染, 100 多万人因之死亡。RSV 对婴幼儿危害甚重, 是引起严重下呼吸道疾病的最为重要的原因<sup>[1,2]</sup>。世界卫生组织 (WHO) 十分重视该疫苗的开发, 早在 1987 年的全球疫苗发展规划 (Global Program for Vaccines) 中已将其列为优先发展对象<sup>[3]</sup>。但由于多种限制因素的制约, 迄今尚无成功的

疫苗问世<sup>[4]</sup>。

G 蛋白是 RSV A、B 两亚型病毒具有免疫原性的被膜蛋白之一<sup>[2,5]</sup>, 全长的 G 蛋白或其特定片段是 RSV 疫苗研制的优选抗原<sup>[6,7]</sup>。但它在疫苗研制中的应用面临以下几个方面的问题: 一是 G 蛋白抗原片段的选择, 用于疫苗研制的抗原蛋白必需具有免疫原性, 能有效地诱导产生中和抗体; 而且必需安全, 无毒副作用。此外, 由于 RSV 存在 A、B 两

收稿日期: 2004-05-31, 修回日期: 2004-07-28

作者简介: 范昌发 (1970-), 男, 重庆籍, 博士, 主要从事生物技术药物研究。E-mail: fanchangfa@sohu.com.

<sup>#</sup> 同为第一作者

<sup>\*\*</sup> 通讯作者。Corresponding author. Tel: 010-66932644, Fax: 010-66932654, E-mail: xg\_Mei@yahoo.com.

种亚型,且呈交替流行的态势,所以抗原蛋白片段必需具有交叉保护的能力。二是需提高抗原片段的免疫原性及在体内的半衰期。现有资料已证明单独的G蛋白片段在体内的免疫原性很弱,需要采用合适的载体蛋白提高其免疫原性<sup>[8]</sup>。三是需要高效的表达体系,使得抗原能在 *E. coli* 或其它体系中高效表达,以较低成本获得充足的免疫原。

本文选择了不同的三个G蛋白片段,分别为G101、G126和G151,并与多种载体蛋白DsbA(disulfide bond isomerase)、CKS(CMP-KDO synthetase)、GST(glutathione S-transferase)、MBP(maltose binding protein)等实现共表达;从中筛选确立了能以可溶形式高效表达抗原蛋白的表达体系,探索了分离纯化条件,制备了抗部分重组蛋白和抗RSV的抗体,并通过ELISA检测了纯化的重组蛋白的免疫原性和免疫反应性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用病毒为RSV A亚型(Long strain, ATCC VR-26),在Hep-2 cells(ATCC CCL-23)上增殖。克隆用的质粒和菌株为pUC18, *E. coli* 5a;表达用菌株和质粒为 *E. coli* BL21(DE3), pET-15b(Novagen), pMBP-P(GenPower)。

### 1.2 试剂

限制性内切酶、dNTP、Taq DNA酶等购自TaKaRa公司;DEPC购自Sigma公司,病毒RNA分离试剂盒(RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Cat. No. 74104)购自Qiagen公司;T4 DNA连接酶、cDNA合成试剂盒(Universal RiboClone<sup>®</sup> cDNA Synthesis System, Cat. No. C4360)、凝血酶等购自Promega公司;亲和层析介质Chelating Sepharose<sup>®</sup> Fast Flow购自Pharmacia Biotech公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗购自北京中山生物技术有限公司。

### 1.3 引物

扩增全长G蛋白基因引物,P1(正向):5'-GC GAATTCGGGGCAAATGCAAACATG-3';P2(反向):5'-GCAAGCTT TAACTACTGGCGTGTGT-3'

扩增G101基因片段引物,P3(正向):5'-GC GGATCCAACCTGCAACCCACAACAG-3';P6(反向):5'-GCGCGGCTAGCTACTTCCTTCGGTTTAG TGGT-3'

扩增G126基因片段引物,P4(正向):5'-GC GGATCCAGCTTCTCCAATCTGTCTGA-3';P6(反

向):5'-GCGCGGCTAGCTACTTCCTTCGGTTTAG TGGT-3'

扩增G151基因片段引物,P5(正向):5'-GCG GATCCATCATAACAAGATGCAACAAGC-3';P6(反向):5'-GCGCGGCTAGCTACTTCCTTCGGTTTAG TGGT-3'

### 1.4 细胞、病毒培养及克隆

Hep-2细胞、RSV的培养参照文献<sup>[6,7]</sup>进行;病毒RNA的提取、cDNA的合成按试剂盒说明书操作;PCR扩增参照文献<sup>[9]</sup>的方法;PCR产物的回收和纯化、酶切、连接、转化及阳性克隆的筛选参照文献<sup>[10]</sup>的方法进行。

### 1.5 基因克隆及表达载体的构建

通过RT-PCR扩增获得全长的G蛋白基因,经Hind III和EcoR I双切后插入pUC18,并测序。表达载体的构建分两步进行:首先通过PCR扩增获得载体蛋白DsbA、CKS和GST基因,并插入pET-15b中,获得表达载体蛋白的载体pET-15b(DsbA)、pET-15b(CKS)和pET-15b(GST),表达载体蛋白MBP的载体为pMBP-P。然后将扩增的G101(125-225氨基酸)、G126(100-225氨基酸)和G151(75-225氨基酸)片段插入相应载体蛋白基因的3'端,获得表达载体pET-15b(DsbA-G101)、pET-15b(DsbA-G126)、pET-15b(DsbA-G151)、pET-15b(CKS-G101)、pET-15b(CKS-G126)、pET-15b(GST-G101)、pET-15b(GST-G126)、pMBP-P-G101和pMBP-P-G126。为了便于纯化和获得单独的G蛋白片段,在载体蛋白的N端带有6×His(组氨酸)标签,在载体蛋白和G蛋白片段之间有凝血酶位点。

### 1.6 诱导表达

将表达载体转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态菌,涂布的平板在35°C下培养11 h左右,挑取单菌落接种于20 mL LB培养基(补加葡萄糖0.2%,氨苄青霉素120 μg/mL),30°C培养至OD<sub>600</sub>约0.5,加诱导剂IPTG至100 μg/mL,35°C下诱导2 h,吸取适量菌液按文献<sup>[10]</sup>的方法进行SDS-PAGE。

### 1.7 可溶性测试

经小样表达测试确认表达的菌株,采用200 mL摇瓶发酵确认表达产物是否可溶。按上述方法诱导表达,离心收集菌体,PBS约20 mL悬浮菌体,-70°C冷冻三次破碎,4°C下12000×g离心15 min,将沉淀和上清分别SDS-PAGE检查。

### 1.8 分离纯化及凝血酶切割

基于Ni<sup>2+</sup>与位于重组蛋白N端的6×His标签的结合,采用一步亲和层析法纯化目标蛋白<sup>[11]</sup>。

纯化的重组蛋白经透析、冷冻干燥后溶于 PBS, 按 10 Unite/mg 蛋白加入凝血酶, 在室温下切割 16 h, 电泳检测切割结果。

1.9 抗体的制备

取纯化的重组蛋白与佐剂 Al(OH)<sub>3</sub> 混合, 经腹腔途径免疫 Balb/c 小鼠 (6~8 周龄, 雌性), 共 3 次, 间隔 10d, 每次 25μg/只, 最后一次免疫 10d 后心脏采血收集抗血清。将 1×10<sup>5</sup> PFU/mL 的 RSV 经 PEG 6000 沉淀浓缩 10 倍后与完全佛氏佐剂 (初次免疫) 和不完全佛氏佐剂 (加强免疫) 经背部皮下多点接种新西兰大白兔 (2.5 kg 左右, 雄性), 每次 2 mL, 接种 8 次, 每次间隔一周。最后一次接种一周后心脏采血收集 RSV 抗血清。

1.10 ELISA 检测抗原的免疫原性和免疫反应性

包被抗原的浓度为 5 μg/mL, 二抗按 1:2500 倍稀释, 在 492 nm 下读数, 其余步骤按 ELISA 标准程序进行。

1.11 空斑抑制实验

不含补体的空斑抑制实验按如下程序进行: 将血清样品以病毒维持液稀释 10 倍, 与等体积的滴度为 800 PFU/mL 的 RSV 混匀, 37°C 下结合 1 h,

按 30 μL/孔把病毒-血清混合物加载到长有单层 Hep-2 细胞的 96 孔板。37°C 吸附 1.5 h 后, 覆盖 200 μL 以维持液配制的 0.8% 甲基纤维素, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 4 d, 显微镜下统计病变。

1.12 统计学分析

统计学分析用软件 Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA) 完成。

2 结果

2.1 G 蛋白基因的克隆及氨基酸同源性分析

收集出现典型细胞融合病变的 Hep-2 感染细胞, 分离总 RNA。通过 RT-PCR 获得大小为 930 bp 的 G 蛋白基因片段 (包括 EcoR I 和 Hind III 酶切位点), 经双切后插入 pUC18 后测序, 序列正确的克隆命名为 pUC18(G10)。

本文拟选择的片段位于 G 蛋白第 75—225 氨基酸之间, 该区域与已知的 A 型病毒<sup>[12,13]</sup>氨基酸同源性为 98.7%, 与 B 型病毒<sup>[14]</sup>的氨基酸同源性为 49.7% (图 1)。虽然与 B 型病毒的氨基酸同源性较低, 但本区域含有两亚型病毒的共同表位, 以此为抗原, 可诱导产生交叉保护反应<sup>[7]</sup>。

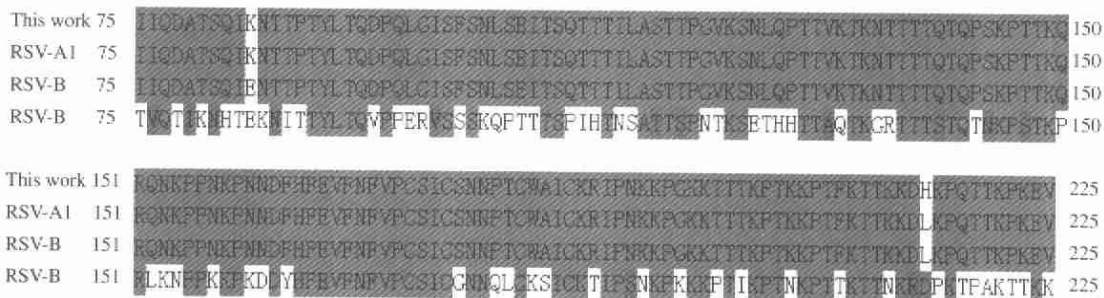


图 1 RSV A、B 亚型 G 蛋白第 75—225 位氨基酸同源性比对

Fig.1 Alignment of amino acids from 75 to 225 of protein G of RSV A and B

The G protein sequence in this work was cloned from long strain, a standard strain of RSV-A; RSV-A1 from ref. 13; RSV-A2 from ref. 14; RSV-B from ref. 15. Alignment was analyzed by software DNAssist 2.0.

2.2 表达载体的构建

以 pUC18(G10)质粒为模板, 通过 PCR 扩增出 G101、G126 和 G151 三个基因片段, 分别编码 101、126 和 151 个氨基酸。PCR 扩增片段经 BamH I 和 Nhe I 双切后插入到表达载体中。经 PCR (图 2) 和双酶切进行鉴定, 获得 8 个表达载体 pET-15b(DsbA-G101)、pET-15b (DsbA-G126)、pET-15b (DsbA-G151)、pET-15b(CKS-G101)、pET-15b (CKS-G126)、pET-15b (GST-G101)、pMBP-P-G101 和 pMBP-P-G126, 加上仅载体蛋白的 3 个载体 pET-15b(DsbA)、pET-15b(CKS)、pET-15b(GST) 和 pMBP-P, 共计 11 个。

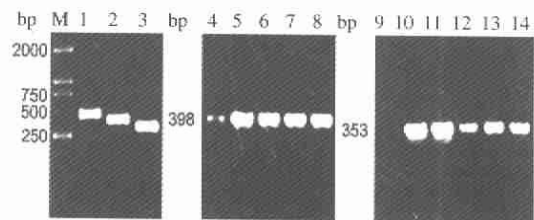


图 2 插入 G101、G126 和 G151 基因片段的重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmids by PCR method M, molecular weight marker DL-2000 (TaKaRa); 1, pET-15b(DsbA-G151); 2, pET-15b(DsbA-G126); 3, pET-15b(DsbA-G101); 4, negative control; 5, positive control; 6, DNA marker with 398 bp in size; 7, pET-15b(CKS-G126); 8, pMBP-P-G126; 9, negative control; 10, positive control; 11, DNA marker with 353 bp in size; 12, pET-15b(CKS-G101); 13, pET-15b(GST-G101); 14, pMBP-P-G101.

### 2.3 重组蛋白在 *E. coli* 中获得高效表达

各表达载体在 *E. coli* 中均获得成功表达 (图3), 表达的蛋白分子量与预期一致。除 pMBP-P-

G101 和 pMBP-P-G126 表达量较低外, 其余蛋白均获得高效表达 (图3)。

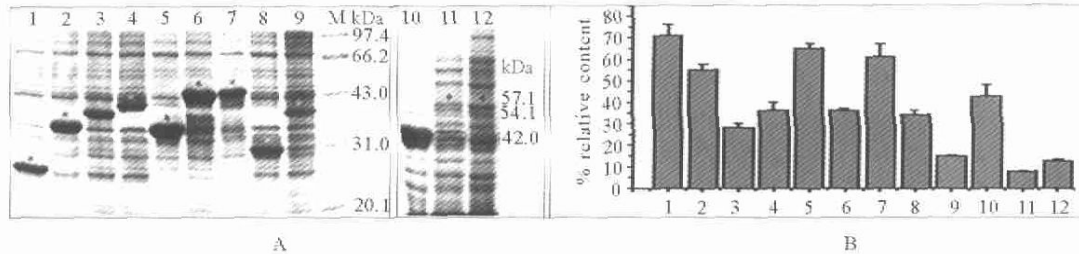


图3 重组蛋白抗原表达的 SDS-PAGE(A)和相对含量(B)分析

Fig.3 Results of SDS-PAGE(A) of the expressed recombinant protein antigens and relative contents(B)

Target proteins were indicated by asterisks. The relative content was evaluated by software Gel-Pro IMAGER (Media Cybernetics, USA). The data depict the mean value of three separate experiments  $\pm$  se. 1, pET-15b(DsbA); 2, pET-15b(DsbA-G101); 3, pET-15b(DsbA-G126); 4, pET-15b(DsbA-G151); 5, pET-15b(CKS); 6, pET-15b(CKS-G101); 7, pET-15b(CKS-G126); 8, pET-15b(GST); 9, pET-15b(GST-G101); M, protein marker; 10, pMBP-P; 11, pMBP-P-G126; 12, pMBP-P-G101.

### 2.4 重组蛋白的可溶性测试

经离心收集诱导表达的菌体, 冷冻破碎, 收集沉淀和上清, 分别作 SDS-PAGE 检查。结果表明, pET-15b(DsbA-G101)、pET-15b(DsbA-G126)和 pET-15b(DsbA-G151)主要以可溶形式表达(图4), 可溶性成份占 80%左右。在沉淀中也出现比较丰富的目标蛋白, 这可能是由于反复冻融不能完全破菌所致。如果改用超声波破碎, 也许能彻底破菌。pET-15b(CKS-G101)和 pET-15b(CKS-G126)则主要以包涵体(inclusion body)形式表达, 而 pET-15b(GST-G101)表达的重组蛋白抗原约有 50%左右可溶。由于 pMBP-P-G101 和 pMBP-P-G126 载体中的 MBP 分子可引导重组蛋白在周质空间分泌表达, 其表达形式也是可溶的<sup>[15]</sup>。

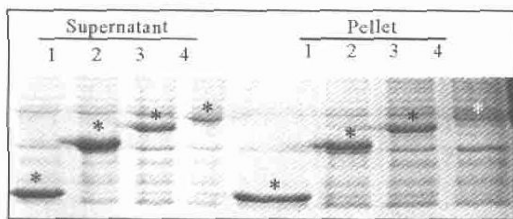


图4 表达产物的可溶性分析

Fig.4 Analysis of expression form of recombinant protein antigens

*E. coli* cells expressing recombinant products were collected and lysed and supernatants and pellets obtained by centrifugation were run on SDS-PAGE. Target proteins were indicated by asterisks. 1, pET-15b(DsbA); 2, pET-15b(DsbA-G101); 3, pET-15b(DsbA-G126); 4, pET-15b(DsbA-G151).

### 2.5 重组蛋白纯化和凝血酶切割

通过一步亲和层析法获得了纯化的重组蛋白

DsbA-G101, 其纯度在 95%以上。经凝血酶切割, 能将载体蛋白 DsbA 和抗原 G101 分离 (图5)。纯化获得的 G 蛋白片段有多条带 (图5, 泳道3), 表明有部分降解。这为获得足够的抗原蛋白分子、分析载体蛋白的功能打下了基础。

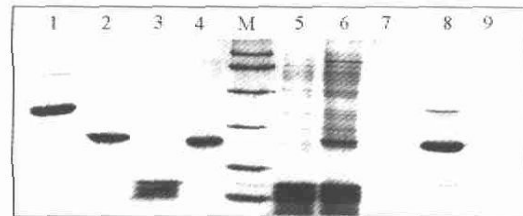


图5 重组蛋白抗原 DsbA-G101 的纯化和凝血酶切割

Fig.5 Purification and digestion of DsbA-G101

DsbA-G101(lane1)and DsbA(lane2, 4) were isolated by affinity purification, and then DsbA-G101 was digested by thrombin for 16 h. 3, flow through; M, protein marker, for the size of each bands, see Fig. 2; 5~7, washing buffers, in which G101 was detected; 8, 9, elution buffers, in which eluted DsbA were detected.

### 2.6 ELISA 抗体滴度及中和抗体滴度检测

将纯化的 DsbA-G101 蛋白和浓缩的 RSV 分别免疫 Balb/c 小鼠和新西兰大白兔, 获得了重组蛋白和 RSV 的抗血清。经 ELISA 检测, DsbA-G101 能在小鼠体内产生高滴度的针对抗原本身的抗体 (表2)。空斑抑制实验表明, 抗血清在体外能很好的抑制病毒 (表2)。这表明重组蛋白具有良好的免疫原性, 能够有效的诱导产生针对抗原本身的抗体。同时, DsbA-G101 也能与抗 RSV 的抗血清结合 (数据未显示), 这表明该重组蛋白具有良好的免疫反应性。

表 2 DsbA-G101 诱导产生的抗 DsbA-G101、RSV 抗体及中和抗体滴度

Table 2 Induction of DsbA-G101, RSV-specific and neutralizing antibody responses

Immunization	Mice number	IgG titer(log <sub>10</sub> )		RSV neutralization (log <sub>10</sub> )
DsbA-G101	6	5.2	3.5	1.9
PBS	6	<1	<0.75	0

### 3 讨论

RSV 疫苗的研制是 WHO 及国内外学者渴求征服的难点, 其难点在于免疫原性强、稳定性好、安全、能提供交叉保护的抗原的获得。G 蛋白是发展 RSV 疫苗的首选抗原之一<sup>[6-8]</sup>。现已证明, 体外表达的 A 和 B 亚型病毒的 G 蛋白 (298 个氨基酸) 能诱导小鼠产生保护性免疫反应, 但是不具备交叉保护的能力<sup>[6]</sup>。而不含 N-端 56 个氨基酸的 G 蛋白片段 (57-298 氨基酸) 的 DNA 疫苗具有全长 G 蛋白类似的效果<sup>[16]</sup>, 而且更加安全, 不引起嗜嗜红血球增多现象 (BAL eosinophilia)。G 蛋白中某些氨基酸对中和抗体诱导的贡献甚微, 如 N-端的 70 个氨基酸<sup>[17]</sup>, 而某些特定的 G 蛋白片段诱导抗体的能力超过了全长的 G 蛋白, 如 N-端的 230 个氨基酸<sup>[17]</sup>, 特定的 G 蛋白片段甚至具有良好的交叉保护作用<sup>[7]</sup>。由此可见, G 蛋白片段的选择对 RSV 重组蛋白疫苗以及其它类型疫苗的研制意义重大。在综合分析现有文献资料的前提下, 结合生物信息学分析, 我们选择了 G101, G126 和 G151 三个 G 蛋白片段, 构建了相应的表达载体, 并在 *E. coli* 中成功的表达了这些重组蛋白 (图 3)。

重组蛋白疫苗的研制是一项复杂的系统工程, 如何获得可溶的、充足的目的蛋白也是该系统工程中倍受关注的问题。在大肠杆菌中表达的外源蛋白往往会形成不溶的、无活性的包涵体<sup>[10,18,19]</sup>; 其原因在于新合成的大量外源蛋白在折叠过程中缺乏足够的分子伴侣<sup>[10,20]</sup>。将适当的分子伴侣 (即本文所选的载体蛋白) 与目的蛋白共表达, 是解决这一问题的有效途径<sup>[20]</sup>。在本研究中所选择的 DsbA、CKS、GST 和 MBP 等四个载体蛋白分子中, DsbA 最适合用于 RSV 抗原片段的共表达。因为与 DsbA 融合的三个 G 蛋白片段均获得了高效表达, 而且表达的重组蛋白是可溶的 (图 4)。可溶性表达目的蛋白有很多优势, 如它能保持目的蛋白的天然结构, 保持活性; 它有利于分离纯化, 免去了复杂的变性和复性过程, 降低生产成本。

除了助溶外, 载体蛋白分子还可以提高抗原片段的免疫原性<sup>[21]</sup>、延长抗原在体内的半衰期<sup>[8]</sup>。已有资料显示, 单纯的 G 蛋白片段在体内的免疫原性较弱, 半衰期短, 不能有效的诱导产生高滴度的中和抗体。而将来自链球菌的 BB 蛋白片段与之融合后, 提高了免疫原性<sup>[7,8]</sup>。

总之, 本研究在克隆 RSV (A 型) 全长 G 蛋白基础上, 选择了三个 G 蛋白片段, 并与载体蛋白 DsbA、CKS、GST 和 MBP 等共表达; 建立了在 *E. coli* 中高效表达 G 蛋白抗原片段的表达体系; 并从 8 个表达载体中筛选出了表达量高、且以可溶形式表达的载体 pET-15b(DsbA-G101)、pET-15b(DsbA-G126) 和 pET-15b(DsbA-G151)。在此基础上, 建立了分离纯化、凝血酶切割、抗体制备以及检测等技术平台。基于此技术体系, 不仅可以方便的获得足够的 G 蛋白片段抗原供活性研究、比较不同长度的 G 蛋白片段抗原性的优劣, 而且从中可以进行载体蛋白的筛选, 发现最佳的载体蛋白, 为 RSV 蛋白疫苗的研制奠定了基础。

### 参考文献

- Hall C B. Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine [J]. *Science*, 1994, 265: 1393-1394.
- Brandenburg A H, Neijens H J, Osterhaus A D M E. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 2769-2782.
- Pringle C R. Progress towards control the acute respiratory viral diseases of children [J]. *Bull WHO*, 1987, 65: 133.
- Kneyber M C, Kimpen J L. Advances in respiratory syncytial virus vaccine development [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2004, 5: 163-170.
- 耿学辉, 王之梁, 钱 渊, 等. 呼吸道合胞病毒北京地区分离株 G 蛋白的基因分析 [J]. *病毒学报*, 1996, 12: 317-322.
- Sullender W M, Britt W J. Antigenic and immunogenic analysis of group A and group B respiratory syncytial virus G proteins expressed from recombinant baculoviruses [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 641-648.
- Plotnicky-Gilquin H, Cyblat-Chanal D, Goetsch L *et al*. Passive transfer of serum antibodies induced by BBG2Na, a subunit vaccine, in the elderly protects SCID mouse lungs against respiratory syncytial virus challenge [J]. *Virology*, 2002, 303: 130-137.
- Power U F, Plotnicky-Gilquin H, Huss T *et al*. Induction of protective immunity in rodents by vaccination with a prokaryotically expressed recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment [J]. *Virology*, 1997, 230: 155-166.
- 范昌发, 孙春昀, 孙 毅, 等. 高粱细胞质雄性不育系及保持系的

- RAPD 技术优化[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2002, 32: 298-302.
- [10] 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版, 北京: 北京科学出版社, 1992. 1-75, 908.
- [11] Qiu J, Swartz J R, Georgiou G. Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *E. coli* [J]. Appl. Environ Microbiol, 1998, 64: 4891-4896.
- [12] Johnson P R, Spriggs M K, Olmsted R A, *et al.* The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5625-5629.
- [13] Garcia O, Martin M, Dopazo J, *et al.* Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein [J]. J. Virol, 1994, 68: 5448-5459.
- [14] Karron R A, Buonagurio D A, Georgiu A F, *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13961-13966.
- [15] Dolby N, Dombrowski K E, Wright S E. Design and expression of a synthetic mucin gene fragment in *E. coli* [J]. Protein Expr Purif, 1999, 15: 146-154.
- [16] Miller M, Cho J Y, Baek K J, *et al.* Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein protects against RSV-induced airway hyperresponsiveness [J]. Vaccine, 2002, 20: 3023-3033.
- [17] Olmsted R A, Murphy B R, Lawrence L A, *et al.* Processing, surface expression, and immunogenicity of carboxy-terminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial virus [J]. J Virol, 1989, 63: 411-420.
- [18] 许崇波, 卫广森. 表达大肠杆菌 K88ac-ST1-LTB 融合蛋白基因工程菌株的构建 [J]. 生物工程学报, 2002, 18: 216-220.
- [19] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 1-20.
- [20] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamental to commercial systems [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60: 523-533.
- [21] Yip Y L, Smith G, Ward R. Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice [J]. Immunol Lett, 2001, 79: 197-202.