

单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D 胞外区的真核表达及生物学活性分析

王正茂¹, 李琳¹, 管文燕¹, 李越希^{1,2}

1 南京医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 南京 210029

2 南京军区军事医学研究所, 南京 210002

摘要: 单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 包膜糖蛋白 D (glycoprotein D, gD) 是 HSV 的结构蛋白之一, 具有重要抗原表位, 是目前疫苗研究的热点。为了分离纯化 HSV gD1 糖蛋白胞外区片段并对其生物学活性进行分析, 本研究将化学合成的 gD1 胞外区基因片段克隆至真核表达载体 pCEP4, 重组质粒转染 HEK293 细胞进行瞬时表达, 产物经 Western blotting 检测后用亲和层析法进行分离纯化, ELISA 检测其抗原性。以纯化的重组蛋白作为抗原免疫小鼠, ELISA 测血清特异性抗体效价以评价其免疫原性。构建的重组质粒经测序显示基因序列完全正确。表达产物的 Western blotting 分析发现, 在相对分子量约 46 kDa 处有外源蛋白表达, 与预期蛋白带一致。用 Ni 柱得到了纯化的重组 gD1 蛋白, ELISA 检测显示其具有良好的抗原性, 免疫小鼠 7 周后血清中抗体效价达到 5×10^3 。重组 gD1 蛋白的抗原性及免疫原性分析为 HSV 检测试剂和基因重组亚单位疫苗的研制提供了实验依据。

关键词: 单纯疱疹病毒, 包膜糖蛋白 gD1, 真核表达, 抗原性, 免疫原性

Eucaryotic expression and bioactivity analysis of the recombinant HSV-gD1

Zhengmao Wang¹, Lin Li¹, Wenyan Guan¹, and Yuexi Li^{1,2}

1 Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Preclinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

2 East-China Institute for Medical Biotechniques, Nanjing 210002, China

Abstract: Envelope proteins of herpes simplex virus (HSV) plays a vital role not only in the infection process of adsorption and invasion but also in the stimulation to the organism that gives rise to immune response. Among the envelope proteins, glycoprotein D (gD), which can induce specific immune response, are the primary targets of humoral and cellular immunity of the host. In order to analyze the antigenicity and immunogenicity of HSV-gD1, we chemically synthesized the extracellular domain fragment gene of gD1, cloned it into eucaryotic expression vector pCEP4, and transfected the HEK293 cells with the recombinant vector. Then we identified the recombinant protein by Western blotting, and detected antigenicity of the protein by ELISA. Finally, we used the purified gD1 protein to immunize Kunming mice in 1, 3, 5 weeks, and collected antiserum in 3, 5 and 7 weeks. We titrated the sera for the detection of anti gD1 using an ELISA assay. Gene sequencing analysis demonstrated that the recombinant plasmid pCEP4-gD1 was constructed successfully. Western blotting analysis indicated one major protein band, which molecular weights is

Received: December 23, 2009; **Accepted:** March 24, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02A226).

Corresponding author: Yuexi Li. Tel: +86-25-84542419; E-mail: liyxi2007@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02A226) 资助。

approximate 46 kDa corresponding to the truncated forms of gD1 protein, was observed. ELISA assay showed that the expressed recombinant protein gD1 had good antigenicity. After the third immunization, antibody titer of the mouse anti-gD1 was at least 5×10^3 . The successful expression of the recombinant protein gD1, which can induce humoral immune response, lays a foundation for serological diagnosis and vaccine study of HSV.

Keywords: Herpes simplex virus Type I (HSV-I), gD1, eucaryotic cell expression, antigenicity, immunogenicity

单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) 是一种双链 DNA 病毒, 属疱疹病毒科 α 亚科, 根据抗原性差别可分为 I 型和 II 型。I 型主要引起口面部感染、眼部感染和疱疹性脑炎等; II 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^[1]。HSV 可在感染组织或附近部位繁殖形成原发灶, 并在感觉神经节建立终身潜伏期, 同时消除宿主的免疫应答, 当受到外界刺激时又可重新繁殖并通过轴突运输返回原发感染灶附近形成复发感染^[2]。这些因素导致人体一旦感染 HSV, 很难被有效清除。美国每年新发病人达 70 万, 复发的病人约有 1 000 万。在发展中国家, HSV II 血清流行率高达 41%~83%。近年来我国的 HSV 感染发病率迅速上升, 其中 HSV I 的感染显著增多, 约占该病的 10%~40%。尽管目前的抗病毒药物治疗能缩短原发感染的病程, 但不能有效预防原发感染、已经建立的潜伏感染及复发性疾病^[3-4]。因此, 研制和接种安全有效的 HSV 疫苗是预防该病毒感染的理想方法^[5]。目前较为普遍并且已经进入 III 期临床的亚单位疫苗是由 Glaxo Smith Kline 公司生产的 gD2-硫酸铝钾-3dMPL 疫苗, 所用佐剂 3-dMPL 能够增强 Th1 应答, 虽然可以明显减轻首次感染 HSV II 的症状, 但该结果仅限于 HSV I 和 HSV II 血清学反应阴性的女性中。Chiron 公司研制的一种重组 gD2/gB2 糖蛋白与 MF59 佐剂配伍而成的疫苗增强了 Th2 应答, 人类中可引起强烈的中和抗体, 但是 III 期临床试验效果有限。

HSV 包膜糖蛋白在病毒的感染过程中起重要作用, 介导病毒与宿主细胞的结合及融合, 其中 gD 糖蛋白能诱发中和抗体的产生及细胞免疫^[6], 具有重要的抗原表位, 是宿主细胞免疫和体液免疫的主要靶标之一, 是构建 HSV 疫苗的理想抗原。本研究将 HSV1 gD 蛋白的胞外区片段在真核表达系的 HEK293 细胞中表达、纯化, 对纯化的蛋白进行抗

原性鉴定, 免疫小鼠检测血清中抗 gD1 抗体效价以评价其免疫原性, 为 HSV 基因重组亚单位疫苗的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、HEK293 细胞及真核表达载体 pCEP4 由本实验室保存。PrimerSTAR HS DNA Polymerase、dNTPs、*Hind* III、*Bam*H 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。Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。DMEM 培养基、胎牛血清为 Gibco 公司产品。Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶为 GE Healthcare 公司产品。羊抗 HSV1+HSV2 多抗为 Abcam 公司产品。小鼠抗 His 单抗、羊抗小鼠 IgG-HRP 为金斯特公司产品。雄性昆明小鼠, 6~8 周龄, 购自中国军事医学科学院实验动物中心。其他试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 抗原表位筛选及基因片段合成

利用 ANTHEWIN 等软件, 通过计算机分析 GenBank 中 HSV 病毒 I 型 KOS 株包膜糖蛋白 D 的胞外区氨基酸序列, 筛选抗原表位富集区, 选择真核和原核生物均偏爱的密码子, 并且在 5'端添加人 IgG 轻链可变区信号肽序列、8 \times His 标签及 TEV 酶切位点, 用化学合成的方法合成全新的基因序列 gD1。

1.2.2 pCEP4-gD1 重组质粒的构建、克隆和鉴定

用质粒提取试剂盒分别提取含重组基因片段 gD1 的质粒和 pCEP4 质粒, 两种质粒经 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切后, 电泳回收 gD1 基因片段和 pCEP4 质粒片段, T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α , 以氨苄青霉素为筛选

标记, 菌落 PCR 鉴定筛选含重组质粒的克隆, 提取重组质粒 pCEP4-gD1 进行 PCR 鉴定, 酶切鉴定及 DNA 序列测定。

1.2.3 重组质粒的真核瞬时转染及表达鉴定

转染前 1 天以 2×10^5 /孔的密度接种 HEK293 细胞至 24 孔板, 37°C 、5% CO_2 温箱培养过夜, 使其达到孔底面积 90%~95% 时进行转染。用脂质体转染法对 HEK293 细胞进行转染, 详细方法见 Lipofectamine 2000 操作手册。 37°C 、5% CO_2 、DMEM 培养基温箱培养 48 h 后, 收集细胞上清进行 SDS-PAGE 电泳, NC 膜湿转, 100 V, 1 h, 室温封闭 1 h (5% milk-PBST)。PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 小鼠抗 His 单抗 (1 mg/mL) 1 : 5 000 稀释于封闭液中, 室温孵育 2 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 羊抗小鼠 IgG-HRP 1 : 5 000 稀释于封闭液中, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加发光底物反应 3 min, 暗室中压片曝光。

1.2.4 重组糖蛋白的纯化、鉴定及浓度检测

上清溶液加已经平衡的 Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶 3 mL, 混匀后 4°C 结合过夜, 上样, 收集穿透液。用 10 倍柱床体积的平衡液 (1× PBS, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole, pH 7.4) 洗涤柱子, 洗脱亲和层析柱上未结合的杂蛋白, 接着将 1 mL 洗脱液 (1× PBS, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, pH 7.4) 加入胶体中, 静置 20 min 后洗脱, 收集洗脱液, 用透析液 (1× PBS, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4) 透析过夜, 即为纯化的目的蛋白, Western blotting 检测, 方法同前。BCA 法检测纯化后总蛋白的浓度。

1.2.5 重组糖蛋白抗原性检测

用 1× PBS (pH 7.4) 按 1 : 25~1 : 800 倍比稀释纯化的重组 gD1 糖蛋白, 包被酶联板 (阴性对照取正常 HEK293 细胞上清), 每孔 100 μL , 4°C 过夜。次日用封闭液 (1× PBS, 1% 小牛血清) 封闭, 每孔 130 μL , 室温 2 h。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 100 μL , 37°C 孵育 1 h, 用 PBST (1× PBS, 0.5% 吐温-20) 洗 5 遍后, 加 1 : 40 000 稀释的兔抗山羊 IgG-HRP, 每

孔 100 μL , 37°C 反应 30 min, PBST 洗 5 遍, 加底物 TMB 溶液, 每孔 100 μL , 37°C 避光显色 10 min, 每孔加 50 μL 1 mol/L 盐酸终止反应, 用酶联仪测定 A_{450} 值。

1.2.6 免疫小鼠及 gD1 抗血清的制备

将小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只。将纯化的重组 gD1 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, 高剂量组 1.25 μg /只/次, 低剂量组 0.5 μg /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°C 放置 1 h 后 4°C 过夜, 2 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 4°C 、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清即得重组蛋白 gD1 抗血清。

1.2.7 重组蛋白 gD1 的免疫原性检测

用 1× PBS 按 1 : 100 稀释纯化的重组 gD1 糖蛋白, 包被酶联板, 每孔 100 μL , 4°C 过夜。次日用封闭液封闭酶联板, 每孔 130 μL , 室温 2 h。将制备的抗血清用样本稀释液按 1 : 50、1 : 500、1 : 5 000 稀释后, 分别加至封闭后的酶联板孔内, 每孔 100 μL , 37°C 反应 1 h, 用 PBST 洗 5 遍后, 加 1 : 10 000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP, 每孔 100 μL , 37°C 反应 30 min, PBST 洗 5 遍, 加底物 TMB 溶液每孔 100 μL , 37°C 避光显色 10 min, 加 50 μL 1 mol/L 盐酸终止反应, 用酶联仪测定 A_{450} 值。

2 结果

2.1 目的基因片段的获得

通过 ANTHEWIN 等软件分析 gD1 糖蛋白胞外区氨基酸序列, 发现 N 端的第 1~284 个氨基酸为抗原表位富集区, 且亲水性较好, 采用 OptimumGene 软件对对应的编码 DNA 序列进行以下方面优化: 消除稀有密码子而采用最佳密码子、调整编码序列 GC 含量、最小化 mRNA 二级结构影响、消除 CpG 岛、避免重复序列和内部核糖体结合位点等影响, 化学合成了全新的基因序列 gD1。同时分别在合成基因的两端添加了 Hind III 和 BamH I 酶切位点, 在 5' 端酶切位点之后插入转录调控序列, 起始密码子,

人 IgG 轻链可变区信号肽, 8×His 标签及 TEV 蛋白酶酶切位点, 在 3' 端酶切位点之前插入终止密码子, 使该基因片段易于克隆至质粒 pCEP4 的 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点之间, 并且使重组蛋白更易于表达和纯化 (图 1)。

2.2 重组质粒 pCEP4-gD1 的构建、克隆及序列测定

将重组基因经酶切后克隆到真核表达载体 pCEP4 中 (图 2), 菌落 PCR 鉴定筛选含重组质粒的克隆, 提取阳性克隆质粒进一步 PCR 鉴定, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析表明扩增的片段与预期大小一致, 为 981 bp (图 3)。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析表明酶切片段大小与预期相符 (图 4)。DNA 序列测定进一步证实, 重组质粒中含有合成的

gD1 基因片段, 序列完全正确。

2.3 重组糖蛋白 gD1 的真核表达及纯化

重组质粒 pCEP4-gD1 转染至 HEK293 细胞 48 h 后, SDS-PAGE 蛋白电泳检测蛋白浓度很低几乎看不见条带 (图 5A)。Western blotting 检测显示表达产物以可溶性形式存在于细胞上清中, 分子量约 46 kDa, 与预期大小相符, 而空质粒转染组无此条带 (图 6A)。构建的重组质粒 N 端带有 8 个组氨酸标签, 所以利用 Ni-NTA 进行亲和层析纯化, 吸附于 Ni-NTA 亲和柱的 gD1 在咪唑浓度为 500 mmol/L 时被洗脱, 对透析液充分透析后, SDS-PAGE 蛋白电泳 (图 5B) 和 Western blotting 检测显示纯化后重组蛋白浓度明显大于纯化前 (图 6B)。BCA 法检测总蛋白浓度约 95 μg/mL。

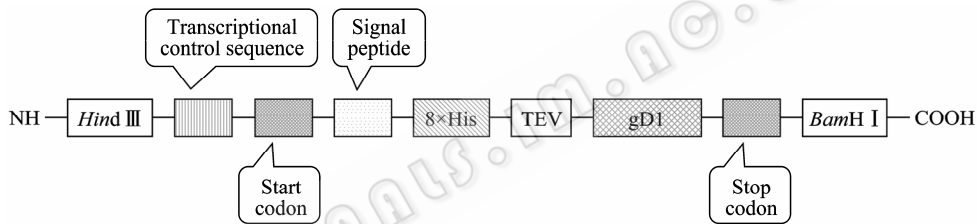


图 1 gD1 重组基因片段构建示意图

Fig. 1 Structure sketch of gD1 recombinant gene.

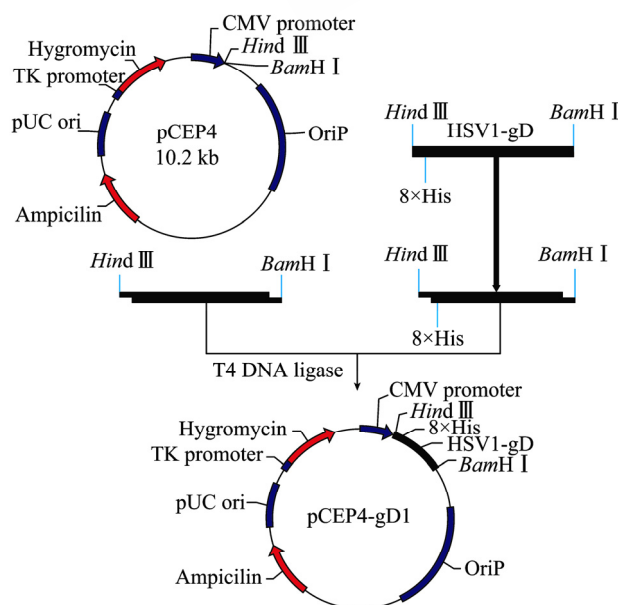


图 2 重组质粒 pCEP4-gD1 构建流程

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pCEP4-gD1.

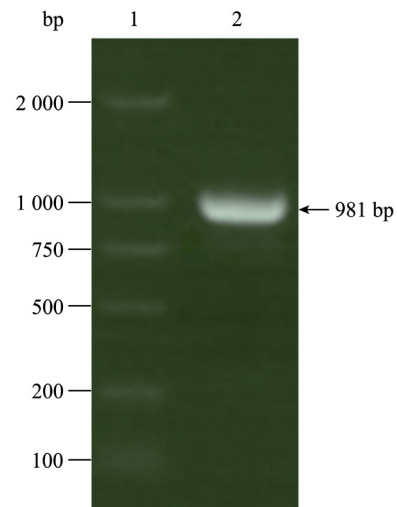


图 3 重组基因片段 gD1 PCR 检测

Fig. 3 Detection of the recombinant gene fragment gD1 by PCR amplification. 1: DL2000 marker; 2: gD1 DNA fragment amplified by PCR.

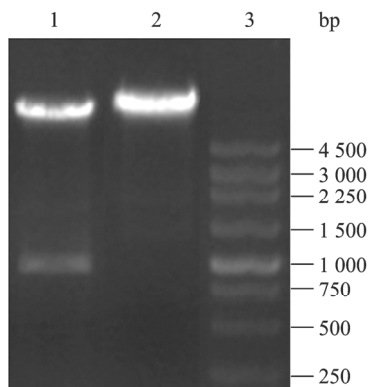


图 4 重组质粒 pCEP4-gD1 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant plasmid pCEP4-gD1 by digestion with *Hind* III and *Bam* H I. 1: pCEP4-gD1 digested with *Hind* III and *Bam* H I; 2: pCEP4 digested with *Hind* III and *Bam* H I; 3: 250 bp marker.

2.4 重组蛋白 gD1 的抗原性分析

为检验纯化得到的重组蛋白是否具有生物学活性, 用 ELISA 法检测了该重组蛋白与羊抗 HSV1+HSV2 多抗在体外的结合能力。结果表明 gD1 重组蛋白与羊抗 HSV1+HSV2 有较好抗原抗体反应 (图 7)。说明经真核修饰表达的 gD1 在纯化后保持其与特异性抗体结合的能力, 具有良好的生物学活性。

2.5 重组蛋白 gD1 的免疫原性分析

每次免疫后间隔 1 周小鼠眼底静脉丛取血, 常规方法制备抗血清后, ELISA 法检测血清中抗体滴度。结果显示低剂量免疫组免疫效果较差, 3 次免

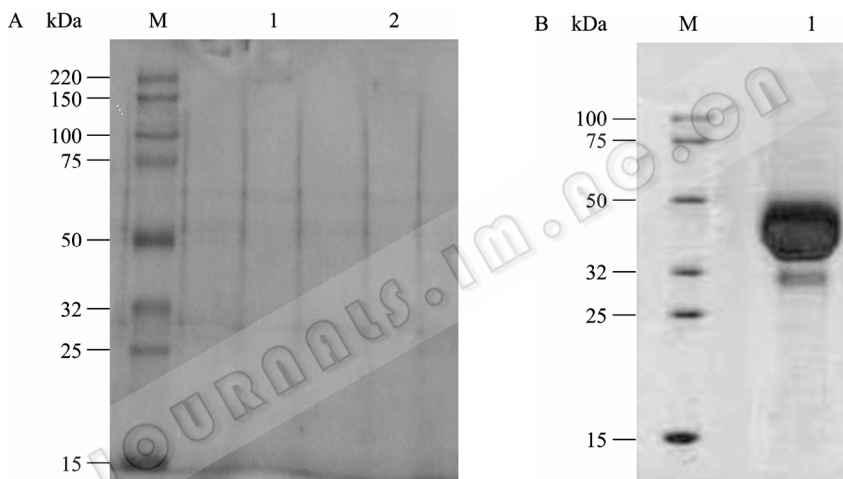


图 5 SDS-PAGE 检测重组 gD1 蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified gD1 protein. (A) Detection of non-purified fraction of gD1 by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: supernatant of HEK293/pCEP4, negative control; 2: supernatant of HEK293/pCEP4-gD1. (B) Detection of purified fraction of gD1 by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: purified fraction of gD1.

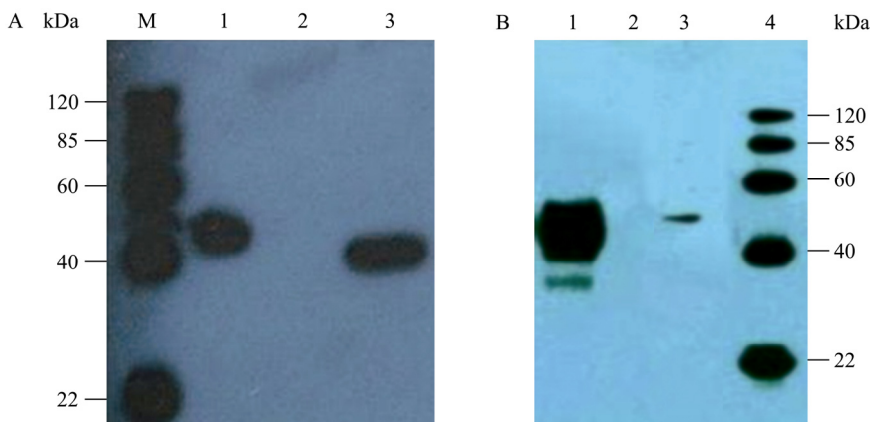


图 6 Western blotting 检测纯化前 (A) 和纯化后 (B) 的重组 gD1 蛋白

Fig. 6 Western blotting analysis of the purified gD1 protein. (A) Detection of non-purified fraction of gD1 by Western blotting. M: protein marker; 1: supernatant of HEK293/pCEP4-gD1; 2: supernatant of HEK293/pCEP4, negative control; 3: 25 ng Multiple-tag, positive control. (B) Detection of purified fraction of gD1 by Western blotting. 1: purified fraction of gD1; 2: supernatant of HEK293/pCEP4, negative control; 3: 25 ng Multiple-tag, positive control; 4: protein marker.

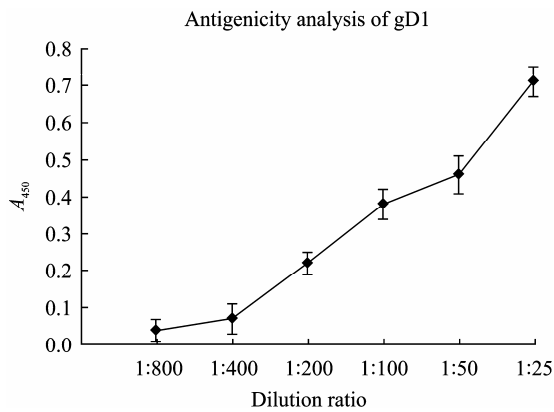


图7 ELISA 检测重组蛋白 gD1 抗原性

Fig. 7 Detection of the antigenicity of the recombinant protein gD1 by ELISA.

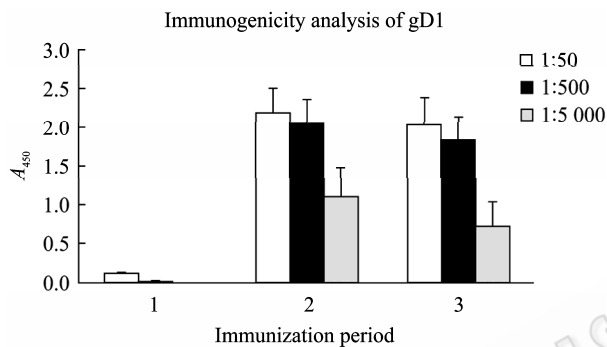


图8 ELISA 检测小鼠血清抗重组蛋白 gD1 抗体效价

Fig. 8 Determination of the polyclonal antibody titer of the mouse serum by indirect ELISA. 1: serum of pre-immunization; 2: serum of 2nd-immunization; 3: serum of 3rd-immunization.

疫的血清中抗体水平无明显差异, 1:50 稀释后 A_{450} 最高值为 0.168 (未在图中显示); 高剂量组免疫效果较好, 第 2 次免疫后血清中抗体水平最高, 1:5000 稀释后 $A_{450}=1.104\pm 0.384$, 第 3 次免疫后血清抗体水平稍有下降 (图 8), PBS 阴性对照组血清中基本无特性抗体产生, 1:50 稀释后 $A_{450}=0.004\pm 0.001$ 。高剂量组抗血清中抗体浓度与 OD 值良好的线性关系说明制备的重组蛋白 gD1 能够刺激免疫系统产生较好的体液免疫效果, 具有较好的免疫原性。

3 讨论

外源蛋白质表达系统按照表达载体的不同可分为原核表达系统和真核表达系统。原核表达的优点在于能够在较短时间内获得基因表达产物, 产量高, 且所需成本相对较低廉, 虽然原核表达技术已经十分成熟, 但还存在一些难以克服的缺点, 如目的

蛋白常以包涵体形式表达, 导致产物纯化困难; 翻译后的加工修饰系统不完善使得表达的蛋白与天然蛋白的构象差距较大, 生物学活性较低^[7]。与原核表达系统相比, 真核表达系统则在翻译后修饰方面有较大优势。目前基因工程中常用的真核表达系统有: 酵母表达系统、昆虫细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统及植物细胞表达系统。在这些表达系统中, 哺乳动物系统在蛋白的起始信号、加工、分泌、糖基化方面具有独特优势, 适合完整的大分子蛋白的表达。而外源基因在哺乳动物中的表达又可分为: 病毒介导的表达; 外源基因在哺乳动物中的瞬时表达; 外源基因在哺乳动物中的稳定表达; 转基因动物; 核酸免疫等。通常在选择稳定序列表达之前先进行瞬时表达研究, 以鉴定整个系统是否适合外源蛋白的表达, 因此本研究采用在 HEK293 细胞中做 gD1 蛋白的瞬时表达, 以检测表达蛋白的生物学活性。该细胞株是目前应用最广泛的哺乳动物基因表达受体细胞之一。它适合多种蛋白质的分泌表达和胞内表达, 已有多种外源基因如人组织性纤溶酶原激活剂、干扰素 γ 、干扰素 β 、凝血因子 VIII 等在 HEK293 细胞中得到表达^[8]。

HSV 包膜糖蛋白中 gD 免疫原性及诱导保护作用最强, 能诱发特异性应答, HSV I 上的免疫显性表位广泛分布在此蛋白质上, 具有重要的抗原表位, 是宿主细胞免疫和体液免疫的主要靶标之一^[9], 并参与病毒穿膜过程, 介导了病毒的细胞间扩散, 在病毒感染和宿主免疫过程中起着重要作用, 因此 gD 糖蛋白是目前 HSV 疫苗研究的热点^[10-11]。

有研究报道去除 gD 蛋白分子部分胞浆区和跨膜结构域有助于蛋白转运到细胞外, 更有利于 MHC 分子的递呈, 产生较高水平的免疫应答, 在体内外均能阻断 HSV 对细胞的感染, 抑制病毒在细胞间的传播^[12-13]。本实验选取去除了胞浆区及跨膜结构域的 gD1 基因胞外区序列, 并将 5'端天然信号肽序列替换为人 IgG 轻链可变区信号肽序列, 这样的核酸序列修饰增强了 gD1 基因的体内免疫原性、稳定性和其他药理特性。在克隆至真核表达载体 pCEP4 并转染至 HEK293 细胞后, 表达产物经 Western blotting 分析, 所获得的重组 gD1 蛋白主要分子量条带约为

46 kDa, 糖基化均一, 无其他杂带, 经镍柱亲和层析后, 取得较好的纯化效果, ELISA 检测显示其能与 HSV1+HSV2 多抗特异性结合, 具有较好的抗原性。纯化后的重组 gD1 蛋白免疫昆明小鼠后可诱发针对 gD1 的特异性体液免疫应答, 具有确切的免疫原性。而高剂量组与低剂量组血清中抗体水平的差异指出了抗原浓度对于免疫效果的影响, 为下一步抗原免疫浓度的制定提供了实验数据。本研究结果为 HSV 亚单位疫苗和 HSV 诊断抗原的进一步研究开发打下基础。

REFERENCES

- [1] Levi M, Ruden U, Wahren B, *et al.* Peptide sequences of glycoprotein G-2 discriminate between herpes simplex virus type 2 (HSV2) and HSV1 antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996, **3**(3): 265–269.
- [2] Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*, 1998, **26**(3): 541–555.
- [3] Straus SE, Croen KD, Sawyer MH, *et al.* Acyclovir suppression of frequently recurring genital herpes: efficacy and diminishing need during successive years of treatment. *JAMA*, 1988, **260**(15): 2227–2230.
- [4] Kaplowitz LG, Baker D, Gelb L, *et al.* Prolonged continuous acyclovir treatment of normal adults with frequently recurring genital herpes simplex virus infection. The acyclovir study group. *JAMA*, 1991, **265**(6): 747–751.
- [5] Stanberry LR, Cunningham AL, Mindel A, *et al.* Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin Infect Dis*, 2000, **30**(3): 549–566.
- [6] Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest*, 2002, **110**(2): 145–151.
- [7] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**(5): 497–501.
- [8] Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**(2): 117–123.
- [9] Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*, 2004, **6**(5): 401–410.
- [10] Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, *et al.* Glycoprotein D adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med*, 2002, **347**(21): 1652–1661.
- [11] Bourne N, Bravo FJ, Francotte M, *et al.* Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis*, 2003, **187**(4): 542–549.
- [12] Nicola AV, Willis SH, Naidoo NN, *et al.* Structure-function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol*, 1996, **70**(6): 3815–3822.
- [13] Nicola AV, Peng C, Lou H, *et al.* Antigenic structure of soluble herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D correlates with inhibition of HSV infection. *J Virol*, 1997, **71**(4): 2940–2946.