

· 论 著 ·

人类疱疹病毒 8 抗原融合的构建及初步应用

王 娜¹, 冷 弘², 燕备战³, 王媛媛¹, 臧文巧¹, 李 敏¹, 赵国强^{1△}

(1. 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室, 郑州 450001; 2. 洛阳职业技术学院免疫学与病原生物学教研室, 河南洛阳 471000; 3. 河南省人民医院输血科, 郑州 450003)

摘要:目的 构建人疱疹病毒 8 型(HHV-8)融合蛋白原核表达载体, 为诊断 HHV-8 感染奠定基础。方法 构建 HHV-8 融合蛋白原核表达载体转化大肠杆菌 DH5 α , 诱导表达融合蛋白 ORF59-ORF65-K8. 1。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和免疫印迹(Western blot)法鉴定融合蛋白。融合蛋白对无偿献血人员血清进行检测。结果 SDS-PAGE 显示融合蛋白约 24 KD, 与预期值一致; Western blot 提示该融合蛋白可以和 HHV-8 阳性血清特异性结合。融合蛋白包被酶连免疫吸附实验(ELISA)板后与无偿献血人员血清反应检测 HHV-8 感染情况, 检测结果与市售 HHV-8 ELISA 试剂盒检测结果一致。结论 本文构建的融合蛋白可作为 HHV-8 感染的检测抗原用来筛查献血人员 HHV-8 感染情况及普通人群 HHV-8 感染流行病学调查。

关键词: HHV-8; ORF59, ORF65, K8. 1; 融合抗原; 融合 PCR

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.23.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)23-2703-03

Fusion expression, detection and application of HHV-8 antigen

Wang Na¹, Leng Hong², Yan Beizhan³, Wang Yuanyuan¹, Zang Wenqiao¹, Li Min¹, Zhao Guoqiang^{1△}

(1. Department of Microbiology and Immunology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China; 2. Department of Immunology and Pathogen Biology, Luoyang Vocation & Technical College, Luoyang, Henan 471000, China; 3. Department of Blood Transfusion, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Objective To construct the prokaryotic expression plasmid of HHV-8 fusion antigen for diagnosis of HHV-8 infection. Methods The combined fragment ORF59, ORF65 and K8. 1 by fusion PCR was integrated into pQE-80L and transfected into E. coli DH5 α . Fusion protein was induced to express by IPTG. SDS-PAGE and Western blot were employed to detect the fusion protein. Fusion protein was used to detect serum of blood donors. Results The combined plasmid pQE-80L-ORF59-ORF65-K8. 1 was constructed successfully after verifying by restriction enzyme digestion and sequencing. The fusion protein was about 24 KD and could be specific combined with HHV-8 positive serum. The fusion protein had the same result to detect HHV-8 with the HHV-8 ELISA kit. Conclusion Fusion protein we construct can be used as diagnosis antigen to detect HHV-8 of blood donors and common people.

Key words: HHV-8; ORF59, ORF65, K8. 1; fusion antigen; fusion PCR

人类 8 型疱疹病毒(human herpesvirus 8, HHV-8)又称卡波西肉瘤相关病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV), 属人类疱疹病毒 γ 亚科 DNA 病毒, 是 1994 年由 Chang 等^[1]从 AIDS 患者组织中首先发现的一种新的人类疱疹病毒^[2-3]。HHV-8 在体内存在潜伏感染状态, 受到某些条件的激发, HHV-8 进入病毒裂解状态。关于 HHV-8 的检测, 目前仍没有较理想的检测手段。基于 PCR 的 HHV-8 DNA 检测存在假阳性偏高的问题^[4]。酶连免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测存在单一抗原使灵敏度降低、漏检率偏高。细菌裂解来源的混合抗原导致交叉反应过多, 假阳性偏高。柔性肽具有良好的延展性, 对邻近的肽序列的空间结构影响不大。本实验拟以柔性肽连接 ORF59、ORF65、K8. 1 共 3 片段, 获得具有良好抗原性的融合肽段, 为 HHV-8 血清学诊断奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 原核表达载体 pQE-80L、质粒 DNA 提取纯化试剂盒、Ni-NTE His·Bind Resin 亲和层析树脂(QIAGEN 公司); 大肠杆菌 DH5 α 、DNA 凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 BamH I、Hind III、T4 DNA 连接酶、Protein Molecular Weight

Marker(Low)、DL2000 DNA Marker(大连宝生物公司); 人疱疹病毒 8 型(HHV-8)ELISA 试剂盒购自上海丰翔生物科技有限公司; HHV-8 阳性血清(Uniformed Services University of the Health Sciences 职慧军博士惠赠); HRP 标记的羊抗人 IgG(Sigma 公司); 无偿献血者人员待检血清 220 例由洛阳市中心血站提供。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 公布的 HHV-8 全基因组序列(Accession No. GQ994935), 利用生物信息学软件预测 HHV-8 病毒 ORF59、ORF65、K8. 1 蛋白的良好抗原性区域, 参照文献最终确定 ORF59 片段 96343~96558 位点、ORF65 片段 111894~112100 位点、K8. 1 片段 75731~75948 位点为目的片段。依据融合 PCR 技术方法要领, 分别设计 3 对引物扩增 ORF59、ORF65、K8. 1 基因片段, 并在 ORF59F 5' 端引入 BamHI 酶切位点, 在 ORF59R、ORF65F、ORF65R、K8. 1F 分别加上互补的柔性肽(GGG GSG)DNA 序列, 在 K8. 1R 引入终止密码子和 HindIII 酶切位点。ORF59F(5'-GCA GGA TCC ATG CCT GTG GAT TTT CAC TAT GGG G-3'); ORF59R(5'-ACC CGA TCC ACC TCC GCC GTG TCC

CAC CAG GGG CGT AA-3'); ORF65F(5'-CAC GGC GGA GGT GGA TCG GGT CAT CAT TAT TAT GAG GCC TA-3'); ORF65R(5'-ACC TGA ACC ACC GCC TCC CGA GAC CCC CAG TGA GTC CT-3'); K8. 1F(5'-TCG GGA GGC GGT GGT AGC GGT ATG AGT TCC ACA CAG ATT CGC A-3'); K8. 1R(5'-ATA AAG CTT CTA CCC GTT TAG GGA GAC GGC CTC TAG-3'), 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 目的基因扩增 应用淋巴细胞分层液分离 HHV-8 阳性患者抗凝血中外周血单个核细胞(PBMC), 采用酚-氯仿法抽提 DNA 为模板。常规 PCR 分别扩增 HHV-8 ORF59、ORF65、K8. 1 目的序列。再混合 ORF59、ORF65、ORF59F PCR 产物为模板, 用 ORF59F 和 K8. 1R 为引物进行融合扩增, 获得由柔性肽基因连接的融合基因片段 ORF59-ORF65-K8. 1, 电泳鉴定。

1.2.3 重组表达载体的构建 BamHI 和 HindIII 双酶切融合片段 ORF59-ORF65-K8. 1 和 pQE-80L 原核表达载体, 电泳, 胶回收纯化。载体 pQE-80L 和融合片段在 T4 连接酶作用下, 16 °C 过夜连接后转化大肠埃希菌 DH5 α , 挑取阳性克隆抽提质粒, BamHI 和 HindIII 双酶切电泳鉴定。重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 融合蛋白的诱导表达及纯化 取对数生长期 pQE-80L-ORF59-ORF65-K8. 1 表达载体转化菌, 加入异丙基硫代 D 半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L, 37 °C 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 超声破碎后取上清 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gelelectrophoresis, SDS-PAGE), 检测融合蛋白表达情况。同时将收集的上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤, 利用 Ni-NTE His · Bind Resin 亲和层析纯化融合蛋白, SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 Western blot 检测融合蛋白 取未诱导转化菌裂解产物、诱导转化菌裂解产物及亲和层析纯化融合蛋白进行 SDS-PAGE, 通过半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭 2 h 后, 与 HHV-8 阳性血清 37 °C 孵育结合 1 h, 洗涤后, 加入 HRP 标记的羊抗人 IgG 孵育 1 h, 显色。

1.2.6 包被融合蛋白抗原 ELISA 法检测待检血清 调整纯化的融合蛋白浓度为 3 μ g/mL, 按 100 μ L/孔 4 °C 过夜包被酶标板。0.05% PBS/Tween-20 洗板 3 次, 2% BSA 37 °C 封闭 1 h。用上述包被板检测 220 例无偿献血人员血清。方法: 在 180 μ L PBS 中加入待检血清 20 μ L/孔, 37 °C 反应 45 min; 洗涤 3 次后加入 1:5 000 HRP 标记的羊抗人 IgG(100 μ L/孔), 反应 30 min; 洗涤后加入 TMB 底物(100 μ L/孔), 反应 15 min, 加终止液终止反应, 450 nm 波长测量各孔的吸光度, 换算出个样品抗体浓度, 以大于 5 ng/L 为阳性。220 例待检血清同时用上海丰翔生物科技有限公司人疱疹病毒 8 型(HHV-8) ELISA 试剂盒检测, 比较本实验所包被的融合蛋白抗原检测 HHV-8 感染的检出效果。

2 结果

2.1 目的基因的扩增及融合 以 HHV-8 基因组 DNA 为模板分别对 ORF59、ORF65、K8. 1 基因进行 PCR 扩增, 获得长度分别为 243、247、246 bp 片段。对 3 段目的基因进行融合扩增后, 获得 693 bp 片段, 电泳结果均与预期相符(图 1)。

2.2 重组质粒的双酶切鉴定 重组质粒 pQE-80L-ORF59-ORF65-K8. 1 经 BamHI 和 HindIII 双酶切后, 电泳出现 4.8 kb

的载体条带和 681 bp 的融合基因片段(ORF59-ORF65-K8. 1), 与预期相符(图 2), 测序结果与设计目的片段序列相符, 重组载体成功构建。

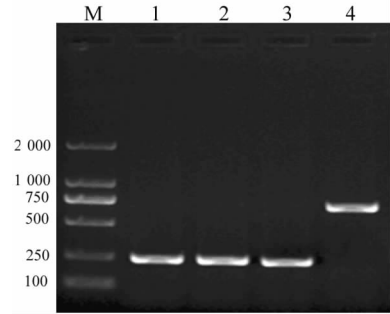


图 1 ORF59、ORF65、K8. 1 和融合基因 ORF59-ORF65-K8. 1 的 PCR 扩增产物电泳图

图 1 ORF59、ORF65、K8. 1 和融合基因 ORF59-ORF65-K8. 1 的 PCR 扩增产物电泳图

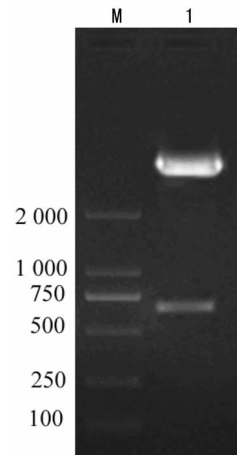


图 2 重组质粒 pQE-80L-ORF59-ORF65-K8. 1 双酶切产物的电泳图

图 2 重组质粒 pQE-80L-ORF59-ORF65-K8. 1 双酶切产物的电泳图

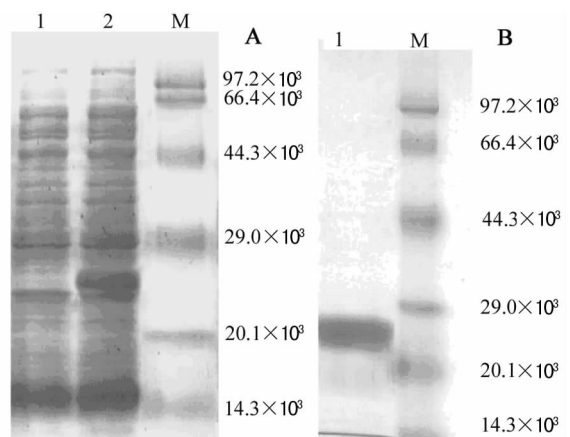
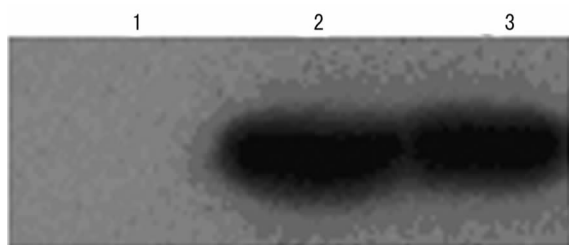


图 3 融合蛋白 SDS-PAGE 分析

2.3 融合蛋白的表达与纯化 将所构建的重组质粒在最佳诱导条件下进行诱导表达, SDS-PAGE 检测表达情况。结果显

示,目的蛋白于 37 ℃ 经 IPTG 诱导呈现高效表达(图 3A)。表达产物经 Ni 柱亲和层析纯化后得到较纯的目的片段,融合蛋白大小约 24 Kd 左右(图 3B)。

2.4 Western blot 检测结果 Western blot 结果显示,诱导转化菌裂解产物及亲和层析纯化融合蛋白 SDS-PAGE 电泳转膜后,能与 HHV-8 阳性血清发生特异性结合而显色,而未诱导转化菌裂解产物不能与 HHV-8 阳性血清发生反应呈融合抗原表达阴性(图 4)。



1:未诱导转化菌裂解产物;2:诱导转化菌裂解产物;3:纯化的融合蛋白。

图 4 融合蛋白的 Western blot 结果

2.5 包被融合蛋白抗原 ELISA 法检测待检血清结果 用本文所包被融合蛋白抗原 ELISA 法和 HHV-8 ELISA 试剂盒分别检测 220 例无偿献血人员血清。本文所包被融合蛋白抗原 ELISA 法对 220 例(男 109 例,女 91 例)无偿献血人员血清中 HHV-8 抗体进行检测,男性标本阳性检出 7 例,女性阳性检出 4 例,阳性标本同时用 HHV-8 ELISA 试剂盒检测结果亦为阳性,其他阴性标本用 HHV-8 ELISA 试剂盒检测结果亦为阴性。证明本文所包被融合蛋白抗原 ELISA 法可以用来作为筛选献血人员 HHV-8 感染情况,可以作为普通人群 HHV-8 感染情况的流行病学调查。

3 讨论

HHV-8 为一新发现的病毒,关于该病毒报道较少。随着对该病毒研究的深入,其传播途径、致病性、检测及免疫逃逸等方面也将逐渐被人们所知^[5-9]。目前,关于 HHV-8 的检测,包括基于 PCR 的 HHV-8 DNA 特异性片段的检测以及基于抗原抗体高度特异的血清学检测 2 种方法。PCR 检测存在模板容易污染、且 HHV-8 与 EB 病毒 DNA 序列有很大的同源性,均易导致假阳性^[10]。

采用血清学检测法时,重点在于检测抗原的选取。HHV-8 潜伏态、裂解态表达不同抗原,不同抗原在 HHV-8 感染人群中表达率、表达水平、抗原性有差异^[11]。因此,采用单一抗原建立的 ELISA 法进行检测时准确率,易造成漏检;若采用几种 HHV-8 特异性抗原进行融合来检测则可以提高检测的灵敏性。目前,HHV-8 可作为检测的抗原有关核抗原(latency-associated nuclear antigen,LANA1)^[12]、HHV-8 小包膜蛋白(ORF65)^[13]、壳膜蛋白(ORF K8.1)^[14]。ORF65 基因编码的蛋白是 HHV-8 特异性衣壳蛋白,具有良好的抗原性,是建立 ELISA 检测方法的重要候选蛋白之一。K8.1 蛋白在 HHV-8 潜伏状态进入裂解周期时大量表达,是 HHV-8 特有的抗原,与其他疱疹病毒不存在交叉反应,具有较强的免疫原性,是目前 HHV-8 重要的检测抗原之一。ORF59 为编码 HHV-8 复制相关蛋白,文献提示其具有良好的免疫原性和抗原特异性。

融合 PCR 技术采用具有互补末端的引物,形成具有重叠链的 PCR 产物,通过 PCR 产物重叠链的延伸,从而将不同来

源的任意 DNA 片段连接起来,为基因重组片段的构建提供了快速简捷的途径^[15]。本文利用融合 PCR 扩增了 HHV-8 ORF59-ORF65-K8.1 融合基因,以柔性肽作为连接手段将融合基因连接,柔性接头利用甘氨酸和色氨酸空间柔性使融合蛋白在结构上能自由伸展,尽可能小地影响目的蛋白的空间结构,避免活性位点的相互掩盖。载入表达载体 pQE-80L 后在大肠杆菌细胞中得到了成功高效表达。利用本文所构建的融合蛋白包被酶标板,对无偿献血人员血清进行 HHV-8 筛查时,和已有的 HHV-8 检测试剂盒显示了相同的检测结果,提示本文所构建的融合蛋白可以作为检测 HHV-8 的备选抗原。为下一步利用融合蛋白建立有效的 HHV-8 血清学检测方法,并对其特异性和灵敏性进行实验比较和评估奠定试验基础。

参考文献:

- [1] Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma[J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1865-1869.
- [2] Uldrick TS, Whitby D. Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi sarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2011, 305(2): 150-162.
- [3] Schwartz RA. Kaposi's sarcoma; an update[J]. *J Surg Oncol*, 2004, 87(3): 146-151.
- [4] Mendez JC, Procop GW, Espy MJ, et al. Detection and semi-quantitative analysis of human herpesvirus 8 DNA in specimens from patients with Kaposi's sarcoma[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(8): 2220-2222.
- [5] Cathomas G. Human herpes virus 8; a new virus discloses its face[J]. *Virchows Arch*, 2000, 436(3): 195-206.
- [6] Cai Q, Verma SC, Lu J, et al. Molecular biology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related oncogenesis[J]. *Adv Virus Res*, 2010, 78: 87-142.
- [7] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(10): 707-719.
- [8] Lee HR, Lee S, Chaudhary PM, et al. Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(9): 1349-1365.
- [9] Kanno T, Sato Y, Nakamura T, et al. Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(3): 400-406.
- [10] Katano H. Epstein-Barr virus(EBV) and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus(KSHV, HHV-8)[J]. *Uirusu*, 2010, 60(2): 237-245.
- [11] Taylor GS, Blackburn DJ. Infectious agents in human cancers; lessons in immunity and immunomodulation from gammaherpesviruses EBV and KSHV[J]. *Cancer Lett*, 2011, 305(2): 263-278.
- [12] Ballestas ME, Kaye KM. The latency-associated nuclear antigen, a multifunctional protein central to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency[J]. *Future Microbiol*, 2011, 6(12): 1399-1413.

较低剂量细胞毒药物即可达到单用药物时高剂量药物对癌细胞的杀伤效果,故对正常细胞、组织的毒副作用也会减少,这将提高患者对药物治疗的耐受力^[16]。有研究证实低剂量超声可提高细胞膜通透性,细胞膜通透性的增加有助于药物进入细胞内,超声辐照可起到与压力波相似的作用,这种膜通透性增加的原因可能与空化效应对细胞膜的损伤有关,特别是使用频率较低的超声波时,更易产生空化效应,超声辐照可使细胞间黏附能力降低,使细胞更易脱落,这种作用在低频超声更加明显,超声可以提高细胞内药物聚集量,从而增强抗肿瘤药物诱导的细胞损伤^[17]。

前期实验结果显示 DHA 能通过下调 Bcl-2、VEGF,上调 Bax、Caspase-3 而有效地促使前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡,凋亡途径多为线粒体途径。本实验显示低频超声能够由于其空化作用对肿瘤细胞产生液化、坏死,促进肿瘤细胞的凋亡,将超声辐照和 DHA 联合应用后,低频超声的空化作用使 DHA 对凋亡相关因子的调控更明显,与 DHA 组及超声组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),其作用机理可能是增加细胞膜的通透性及药物浓度,促使 DHA 抗肿瘤凋亡作用的产生,DHA 能上调 CHOP 蛋白的表达,说明 DHA 诱导 PC-3 细胞凋亡可能与内质网应急有关。其中,超声组与 DHA 组比较差异无统计学意义,说明低频超声能作用于肿瘤细胞,能产生和 DHA 相似的抗凋亡作用,但作用没有联合应用后增强更明显。因此,低频超声和抗肿瘤药物的联合应用能够有效地增强药物对肿瘤细胞的作用,为今后药物的合适剂量研究提供了参考。

综上所述,低频超声能增强 DHA 在细胞水平上对前列腺癌 PC-3 细胞的影响,表现为抑制细胞增殖并诱导凋亡。在分子水平上,表现为对凋亡相关基因(Bcl-2、Bax、VEGF、Caspase-3 及 CHOP)的有效调控,而肿瘤细胞凋亡相关基因又通过抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡并抑制肿瘤血管生成来杀灭癌肿,但其确切机制尚需进一步研究。随着研究的不断深入,超声辅助药物治疗有望成为治疗恶性肿瘤的有效方法。

参考文献:

- [1] Catz SD, Johnson JL. BCL-2 in prostate cancer; a minireview[J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 29-37.
- [2] Califice S, Waltregny D, Castronovo V, et al. Prostate carcinoma cell lines and apoptosis; a review[J]. *Rev Med Liege*, 2004, 59(12): 704-710.
- [3] 李庆春, 高小玲, 石之虎, 等. 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞在体生长干扰的研究(摘要)[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(suppl): 35-37.
- [4] 李庆春, 高小玲, 邹聪, 等. 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞体内生长及 Caspase-3 表达的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(5): 448-451.
- [5] 李庆春, 高小玲, 石之虎, 等. 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞生长及 Survivin 表达的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(1): 61-64.
- [6] Shang X, Wang P, Liu Y, et al. Mechanism of low frequency ultrasound in opening blood-tumor barrier by tight junction[J]. *J Mol Neuro Sci*, 2011, 43(3): 364-369.
- [7] Choi JJ, Pernot M, Small SA, et al. Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound[J]. *Med Biol*, 2007, 33(1): 95-104.
- [8] 徐鸿绪, 王晓波, 陈凌武. 荷人前列腺癌裸鼠移植瘤模型的建立及其应用研究[J]. *实用癌症杂志*, 2006, 21(4): 337-339.
- [9] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biol*, 2008, 9(3): 231-241.
- [10] Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(3): 193-204.
- [11] Jiao Y, Ge CM, Meng QH, et al. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(7): 1045-1056.
- [12] Mu D, Chen W, Yu B, et al. Calcium and survivin are involved in the induction of apoptosis by dihydroartemisinin in human lung cancer SPC-A-1 cells[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, 29(1): 33-38.
- [13] Efferth T. Mechanistic perspectives for 1, 2, 4-trioxanes in anti-cancer therapy[J]. *Drug Resist Updat*, 2005, 8(1/2): 85-97.
- [14] 于廷和, 蔡汉钟. 低频超声对卵巢癌细胞的生物学效应[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22(4): 237-239.
- [15] 李庆春, 罗子国. 青蒿素对肿瘤细胞凋亡相关基因的调控[J]. *国际中医中药杂志*, 2008, 30(2): 119-121.
- [16] 于廷和, 蔡汉钟, 伍烽, 等. 低频超声增强阿霉素对卵巢癌细胞毒作用研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23(1): 26-28.
- [17] 杨艳, 刘帅, 于庭和, 等. 超声增强顺铂对耐药性卵巢癌细胞的 DNA 损伤效应[J]. *中国超声医学杂志*, 2008, 24(10): 875-877.

(收稿日期: 2013-01-11 修回日期: 2013-05-22)

(上接第 2705 页)

- [13] Sathish N, Yuan Y. Functional characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus small capsid protein by bacterial artificial chromosome-based mutagenesis[J]. *Virology*, 2010, 407(2): 306-318.
- [14] Zheng ZM. Split genes and their expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(3): 173-184.
- [15] Cha-Aim K, Hoshida H, Fukunaga T, et al. Fusion PCR via novel overlap sequences[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 852: 97-110.

(收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-04-22)