



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113527443 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 07

(21) 申请号 202010298864.1

A61K 39/145 (2006.01)

(22) 申请日 2020.04.16

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113527443 A

(56) 对比文件

CN 105722976 A, 2016.06.29

US 2020016262 A1, 2020.01.16

(43) 申请公布日 2021.10.22

(73) 专利权人 中国科学院微生物研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院3号

Paul ThiamJoo Tan等. Conservation and Diversity of Influenza A H1N1 HLA-

Restricted T Cell Epitope Candidates for Epitope-Based Vaccines.《PLOS ONE》.2010,第5卷(第1期),

(72) 发明人 孟颂东 王子豪 张含 郑华国 鞠莹

资海荣. 甲型流感病毒PB1-F2蛋白功能的研究进展.《东南大学学报(医学版)》.2013,第32卷(第05期),

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 白凤莹

审查员 高雨欣

(51) Int. Cl.

C07K 14/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表10页 附图6页

(54) 发明名称

甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段及其应用

(57) 摘要

本发明公开了甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段及其应用。本发明首先提供了氨基酸序列为SEQ ID No.2或SEQ ID No.10或SEQ ID No.11的甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽。本发明进一步提供了上述多肽在制备流感疫苗中的应用。本发明筛选并鉴定出甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段,在接种该抗原表位时,以gp96蛋白作为免疫佐剂,极大激发病毒特异性T细胞免疫反应,能有效引起针对不同亚型的流感病毒株的交叉免疫保护,这为将来研发具有交叉保护功能的新型流感病毒疫苗奠定基础。

1. 一种多肽或其药用盐,其特征在于:所述多肽的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。
2. 编码权利要求1所述的多肽的DNA分子。
3. 包含权利要求2所述的DNA分子的重组载体、表达盒或重组微生物。
4. 权利要求1所述的多肽的衍生物,其特征在于:所述衍生物为如下任一所示:
 - B1) 在所述多肽的氨基末端连接氨基端保护基和/或在所述多肽的羧基末端连接羧基端保护基得到的连接物;
 - B2) 在所述多肽的氨基末端和/或羧基末端添加氨基酸残基得到的能与H-2K^D结合的多肽;
 - B3) 在所述多肽的氨基末端和/或羧基末端连接寡肽得到的能与H-2K^D结合的多肽。
5. C1) 或C2) 的多聚体:
 - C1) 由权利要求1所述的多肽或其药用盐形成的多聚体;
 - C2) 由权利要求4所述的衍生物形成的多聚体。
6. 权利要求1所述的多肽或其药用盐,或权利要求2所述的DNA分子,或权利要求3所述的重组载体、表达盒或重组微生物,或权利要求4所述的衍生物,或权利要求5所述的多聚体在制备流感疫苗中的应用。
7. 权利要求1所述的多肽或其药用盐,或权利要求2所述的DNA分子,或权利要求3所述的重组载体、表达盒或重组微生物,或权利要求4所述的衍生物,或权利要求5所述的多聚体在制备治疗和/或预防由流感病毒引起的疾病的药物中的应用;所述流感病毒为PR8病毒、WSN病毒、H3N2病毒和/或H7N9病毒。
8. 一种流感疫苗,其特征在于:所述流感疫苗的活性成分为权利要求1所述的多肽或其药用盐,或权利要求4所述的衍生物,或权利要求5所述的多聚体。
9. 根据权利要求8所述的流感疫苗,其特征在于:所述流感疫苗还包括免疫佐剂,所述免疫佐剂为gp96蛋白。
10. 根据权利要求9所述的流感疫苗,其特征在于:所述gp96蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。

甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域,具体涉及甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段及其应用。

背景技术

[0002] 流感病毒传播迅速、流行广泛、致病性强,是当今世界最为严重的公共卫生问题之一。20世纪30年代人类就开始了对流感病毒的认知及疫苗的开发,然而时至今日流感病毒依然是威胁人类和动物健康的重要病原。流感病毒依据其表面抗原血凝素(hemagglutinin,HA)和神经氨酸酶(neuraminidase,NA)不同又可分为若干不同的亚型。迄今为止,共发现了18种HA亚型(H1至H18)和11种NA亚型(N1至N11)。流感病毒在感染不同宿主过程中主要发生两个方面的变异:基因组片段的重排(reassortment)和病毒编码蛋白氨基酸的变异。由于这些变异机制的存在,使得流感病毒存在着大量的变异毒株,对流感病毒的预防和控制造成极大困难。毫无疑问,疫苗免疫依旧是预防流感的主要方法。但是,目前使用的疫苗只对特定的与其HA(血凝素)和NA(神经氨酸酶)抗原非常类似的病毒株具有保护效力,对于其它与其不类似的病毒株则保护作用不佳。因此,一旦出现流感病毒新亚型或新毒株,现有疫苗就会失去其保护效力。很显然,受限于流感病毒“抗原转变”和“抗原漂移”的特性,采用常规以各亚型为主开发的流感灭活疫苗和裂解疫苗,已经无法有效预防和抵御新的流感病毒感染。新亚型的出现和流行的趋势,严重时甚至发生流感大流行。因此,开发针对多种亚型流感病毒的具有交叉保护并且长期保护功能的流感疫苗成为研究的新热点。

[0003] 现有的流感疫苗免疫主要产生针对病毒HA的抗体,而HA容易发生变异,这也是现有流感疫苗不能有效产生交叉保护的根本原因。流感病毒HA抗体水平被认为是产生免疫保护作用的直接因素,然而对其免疫保护效果却仍然存在争议,1:40的HAI抗体滴度能够降低成人50%感染,但是在儿童中,1:110的HAI抗体滴度能够降低50%感染,而1:40的HAI抗体滴度只能产生20%保护力。大量研究表明,T细胞免疫在控制流感病毒感染过程中发挥了重要作用,免疫保护效果与T细胞免疫水平而非中和抗体水平密切相关。流感病毒T细胞免疫主要由其内部蛋白产生,如M1,PB1,NP等,这些内部蛋白所包含的T细胞表位在多种A型流感病毒中相对于表面蛋白HA和NA较为保守。研究表明,机体由于A型H1N1、H3N2及B型流感病毒等周期性流行,存在大量的流感病毒特异性T细胞,这些特异性T细胞能够广泛的交叉识别甚至来源于H5N1病毒的T细胞表位。例如,在小鼠感染模型中已经证实,不同亚型流感病毒感染产生的T细胞免疫反应能够对其他亚型流感病毒产生交叉保护作用。用H1N1病毒感染小鼠并用H3N2病毒再次感染,呼吸道组织处的T细胞免疫反应可以对H7N7病毒的入侵提供有效的交叉保护作用,这种交叉反应在病毒感染后3天内即可引发并产生效应。在雪貂流感病毒感染模型中,H3N2(A/Brisbane/010/2007)病毒感染后能够对H5N1(A/Indonesia/5/05)病毒再次感染产生交叉保护,而这种交叉保护作用与PBMCs中的流感病毒特异性T细胞频率具有显著的相关性。在禽类感染模型中的研究,H9N2流感病毒感染3-70天后再次感染

高致病性H5N1流感病毒,尽管不存在能够对H5N1病毒产生交叉反应的中和抗体的存在,仍然能够使感染H5N1的鸡得以存活下来。更进一步的研究表明,当将H9N2病毒感染后鸡体内产生的CD8+T细胞注入到未免疫的鸡体内,能够有效的保护其在致死剂量H5N1病毒下的感染,而注入CD4+T细胞则不能产生有效的保护作用。在灵长类动物模型中,季节性H1N1 (A/Kawasaki/173/2001) 流感病毒感染后,其产生的特异性T细胞能够在再次感染2009H1N1 (A/California/04/2009) 流感病毒2天内产生效应并清除病毒,而此时中和抗体尚未得到有效激活。这些动物感染模型中的研究充分表明,T细胞免疫介导的交叉反应能够有效保护动物在再次接触不同流感病毒的入侵。

[0004] 同样,特异性记忆T细胞的产生在对流感病毒的长效交叉保护中起到了至关重要的作用。例如,2009年甲型H1N1流感流行之际,对300余名志愿者的健康状况进行了跟踪研究,并着重分析了他们的免疫系统对这种新型流感病毒的反应。结果发现,在那些没有出现显著症状的志愿者血液内,特异性CD8+T (CTL) 细胞含量普遍较高。另有最新的研究显示,在H7N9重症感染者中,凡2至3周内可快速康复出院的患者在感染早期(约1至2周)就会出现高水平的H7N9特异性CD8+T细胞应答;大于30天方可出院、康复较慢的患者则需要较晚期(约4周)才会出现较好的特异性T细胞应答;而最终因感染而死亡的患者,机体内仅有低水平的H7N9特异性免疫应答,CD8+T细胞的应答水平则更低,这项研究表明,在H7N9重症感染者中,记忆性CD8+T细胞直接参与了患者或康复、或死亡的过程,它的应答水平高低与感染保护密切相关。上述表明细胞免疫尤其是T细胞免疫是机体抵抗侵入胞内流感病毒(包括新型H1N1,H5N1,H7N9病毒等)的重要防线,病毒特异性T细胞介导的免疫应答对于控制宿主对流感病毒易感性和感染病情严重程度、病程转归、死亡率至关重要,尤其是在抗体反应不能有效控制和中和病毒时,T细胞免疫在免疫保护中发挥重要作用,通过细胞表面表达的T细胞受体识别抗原多肽与感染细胞主要组织相容性分子复合体,从而识别并清除感染细胞。在由于抗原漂移引发的流感流行性爆发或由于出现新型流感病毒引发的世界范围内的爆发中,抗体介导的免疫反应往往不能有效控制病毒,在这些情况下,靶向病毒内部相对保守蛋白的T细胞可发挥免疫交叉保护,事实上目前已知的流感病毒CTL表位大多很保守,这对于免疫交叉保护至关重要。临床研究表明细胞免疫对于预防和控制流感等病毒感染,提高流感疫苗的交叉保护的免疫原性,增强传统疫苗对抗原漂移的流感病毒的交叉保护能力,增强流感疫苗对特殊人群的免疫保护,减少疫苗用量,缩短疫苗免疫后的免疫应答时间、增强免疫应答的特异性和记忆性等至关重要。

[0005] 热休克蛋白gp96属于HSP90家族的成员,也是目前唯一用于临床自体治疗肿瘤的天然佐剂分子。通过分析临床样本、免疫学实验,都证明gp96与来源于病毒的多肽表位直接结合,发现gp96在乙肝病毒感染中结合MHC I类分子限制性抗原肽,并对其结合的分子区域进行初步阐明,gp96蛋白N端是结合多肽的部位,通过抗原呈递将结合的抗原呈递给MHC I类分子供CTL识别;同时gp96与TLR-2 (Toll样受体) 和TLR-4相互作用介导天然免疫,进一步促进特异性T细胞活化与增殖。这些研究为了解gp96激活T细胞的免疫机制奠定了基础,揭示了gp96通过抗原呈递的免疫放大机制,从理论上证实gp96作为通用T细胞疫苗佐剂的可行性。研究发现目前流感病毒灭活苗或裂解苗中的抗原表位仅能活化较强的抗体免疫,并不能有效活化T细胞免疫,而加入热休克蛋白gp96作为佐剂后则疫苗特异性CD8+T细胞(即CTL,细胞毒性T细胞) 应答水平增加几十倍。以gp96为佐剂的流感病毒抗原表位具有交叉免

疫保护能力,而单纯疫苗不能有效引起针对不同种流感病毒株的交叉免疫保护,这种交叉保护能力与流感病毒内部保守抗原特异性CTL细胞应答密切相关。热休克蛋白gp96作为机体内参与免疫调节的重要蛋白能够帮助外源性的蛋白或多肽被MHC I类分子呈递,激活很强的CD8+T细胞免疫反应。

[0006] 表位(epitope)是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团,也是TCR/BCR和抗体特异结合的基本单位,表位在抗原中起着关键性作用。CTL细胞表位可以介导细胞毒性淋巴细胞功能并可启动炎症因子,在病毒清除过程中占有重要作用。根据流感病毒抗原表位来研制疫苗,不仅可有效地利用流感病毒的保护性抗原,增强免疫应答的特异性,而且可通过选择具有交叉保护性的抗原表位来达到预防多个毒株的目的。目前报道流感病毒引发机体内T细胞免疫反应的蛋白主要是其内部蛋白,M、NP、PB1等。目前,有研究人员对已报道过的流感病毒T细胞表位进行测试,最终选用6条CD8+T细胞表位与3条CD4+T细胞表位设计一种针对美国的通用流感疫苗,覆盖美国境内95%的流感病毒。以及8条CD8+T细胞表位与3条CD4+T细胞表位设计一种针对全球范围的通用流感疫苗,覆盖全球88%已知的流感病毒,用以防止未来可能出现的全球性大流感的爆发。另有研究显示,某些表位能诱发强烈的活性,却不能抵御病毒的攻击。因此,虽然以表位为基础的疫苗具有很多优点,但表位发挥功能的机制及强弱,表位的限制性,表位与表位间协同机制等问题还尚不完全清楚,甚至某些已鉴定的表位本身还存在争议。但以表位为基础疫苗为流感疫苗开发提供了一条全新的思路,也值得更深入的研究。

[0007] 因此,筛选和鉴定出相应的流感功能表位对于深入揭示流感病毒感染与免疫机制,流感功能表位的认知,表位疫苗的研究具有重要的理论和实践价值。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是如何获得具有交叉保护功能的通用流感疫苗。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了一种甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽或其药用盐。

[0010] 本发明所提供的甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽为如下任一所示:

[0011] A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.2的多肽;

[0012] A2) 氨基酸序列为SEQ ID No.10的多肽;

[0013] A3) 氨基酸序列为SEQ ID No.11的多肽。

[0014] 其中,所述多肽为九肽。

[0015] 上述多肽可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0016] 编码上述甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽的DNA分子也在本发明的保护范围之内。

[0017] 包含上述DNA分子的重组载体、表达盒或重组微生物均在本发明的保护范围之内。

[0018] 本发明进一步提供了上述多肽的衍生物。

[0019] 本发明中所述衍生物为如下任一所示:

[0020] B1) 在所述多肽的氨基末端连接氨基端保护基和/或在所述多肽的羧基末端连接羧基端保护基得到的连接物;

[0021] B2) 在所述多肽的氨基末端和/或羧基末端添加氨基酸残基得到的能与H-2K^D分子

结合的多肽；

[0022] B3) 在所述多肽的氨基末端和/或羧基末端连接寡肽得到的能与H-2K^D分子结合的多肽。

[0023] 上述衍生物中,所述H-2K^D分子由重链和轻链组成,重链的编码序列如SEQ ID NO.4所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;轻链的编码序列如SEQ ID NO.6所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0024] 上述多肽或其药用盐、或其衍生物中,本发明多肽的氨基末端可含有氨基端保护基,所述氨基端保护基可为乙酰基、氨基、马来酰基、琥珀酰基、叔丁氧羰基或苄氧或其他疏水基团或大分子载体基团中的任一基团;本发明多肽的羧基末端可含有羧基端保护基,所述羧基端保护基可为氨基、酰胺基、羧基、或叔丁氧羰基或其他疏水基团或大分子载体基团中的任一基团。

[0025] C1) 或C2) 的多聚体也在本发明的保护范围之内:

[0026] C1) 由上述多肽或其药用盐形成的多聚体;

[0027] C2) 由上述衍生物形成的多聚体。

[0028] 为解决上述技术问题,本发明还提供了上述甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽或其药用盐、上述DNA分子、上述重组载体、表达盒或重组微生物、上述衍生物或上述多聚体在制备流感疫苗中的应用。

[0029] 上述甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽或其药用盐、上述DNA分子、上述重组载体、表达盒或重组微生物、上述衍生物或上述多聚体在制备治疗或预防由流感病毒引起的疾病中的药物中的应用也在本发明的保护范围之内。

[0030] 上述应用中,所述流感病毒为甲型流感病毒,具体的为PR8病毒、WSN病毒、H3N2病毒和/或H7N9病毒。

[0031] 为解决上述技术问题,本发明进一步还提供了一种流感疫苗。

[0032] 本发明所提供的流感疫苗的活性成分为上述甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽或其药用盐或上述衍生物或上述多聚体。

[0033] 上述流感疫苗中,还包括免疫佐剂。

[0034] 上述流感疫苗中,所述免疫佐剂为gp96蛋白,所述gp96蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示。

[0035] 上述流感疫苗中,所述gp96蛋白和所述甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽的质量比可为1:(0.5-10),具体的为3:5。

[0036] 上述gp96蛋白可人工合成,也可先合成其编码基因(所述编码基因的序列如SEQ ID NO.8所示),再进行生物表达得到。

[0037] 本发明中所述gp96蛋白通过昆虫杆状病毒感染的昆虫细胞分泌表达获得,具体如下:

[0038] 1) 构建包含SEQ ID NO.8所示的gp96基因的重组质粒pFastBacTM1-gp96:所述重组质粒pFastBacTM1-gp96是将pFastBacTM1的EcoRI和XbaI酶切位点间的DNA片段替换为了SEQ ID NO.8所示的gp96基因片段,并保持pFastBacTM1其他序列不变得到的人gp96基因表达载体;

[0039] 2) 将pFastBacTM1-gp96转染到Sf9昆虫细胞中,诱导Sf9昆虫细胞表达获得gp96蛋

白。

[0040] 本发明筛选并鉴定出甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段,在接种该抗原表位时,以gp96蛋白作为免疫佐剂,极大激发病毒特异性T细胞免疫反应,能有效引起针对不同亚型的流感病毒株的交叉免疫保护,这为将来研发具有交叉保护功能的新型流感病毒疫苗奠定基础。

附图说明

[0041] 图1为PB1 81-89多肽与H-2K^D重链包涵体蛋白以及轻链β2m包涵体蛋白构成复合物的体外重折叠(refolding)的实验结果。

[0042] 图2为western blotting结果。

[0043] 图3为多肽免疫BALB/c小鼠,其脾细胞中多肽特异性CTL免疫反应的ELISPOT检测结果。

[0044] 图4为多肽免疫BALB/c小鼠后进行PR8病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其体重变化。

[0045] 图5为多肽免疫BALB/c小鼠后进行PR8病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其存活率。

[0046] 图6为多肽免疫BALB/c小鼠后进行WSN病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其体重变化。

[0047] 图7为多肽免疫BALB/c小鼠后进行WSN病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其存活率。

[0048] 图8为多肽免疫BALB/c小鼠后进行H3N2病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其体重变化。

[0049] 图9为多肽免疫BALB/c小鼠后进行H3N2病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其存活率。

[0050] 图10为多肽免疫BALB/c小鼠后进行H7N9病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其体重变化。

[0051] 图11为多肽免疫BALB/c小鼠后进行H7N9病毒的攻毒实验,与阴性对照组相比,其存活率。

具体实施方式

[0052] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0053] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0054] PBS缓冲液:8g NaCl、0.2g KCl、3.625g Na₂HPO₄·12H₂O、0.24g KH₂PO₄,加水至1L,调pH7.3。

[0055] 实施例1、制备PB1衍生的九肽

[0056] 甲型流感病毒(PR8)PB1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,以此作为合成多肽片

段PB1 81-89的序列来源。人工合成多肽片段PB1 81-89、除PB1 81-89锚定氨基酸外随机构建点突变(对应的突变多肽片段a、b)以及实验中所用阴性对照乙肝病毒HBc82-90肽(简称为多肽片段HBc82-90)。

[0057] 这四条多肽的氨基酸序列如下所示(从左至右是由氮末端至碳末端方向):

[0058] 多肽片段PB1 81-89(SEQ ID NO.2):GYAQTDCVL

[0059] 多肽片段HBc82-90(SEQ ID NO.3):RELVVSYVN

[0060] 突变多肽片段a(SEQ ID NO.10):GYAQADCVL

[0061] 突变多肽片段b(SEQ ID NO.11):GYAQTD AVL

[0062] 上述多肽的化学合成通过常规氨基酸缩合反应来实现,由吉尔生化(上海)有限公司合成,通过HPLC检测纯度均在95%以上。

[0063] 实施例2、PB1 81-89多肽片段与H-2K^D分子的结合力

[0064] 一、体外重折叠(refolding)实验检测多肽与H-2K^D分子的结合能力

[0065] 在体外重折叠实验中,如果多肽能与H-2K^D分子结合,那么多肽、H-2K^D以及β2微球蛋白(β2m)就能形成稳定的多肽-H-2K^D-β2m三元复合物,在分子筛层析图谱中出现多肽-H-2K^D-β2m复合物蛋白峰。H-2K^D分子由重链和轻链组成,重链的编码序列如SEQ ID NO.4所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示;轻链的编码序列如SEQ ID NO.6所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0066] (一)H-2K^D重链胞外区表达质粒的构建

[0067] 将编码H-2K^D重链胞外区的DNA(Genbank号为KF831066.1自5'末端第64-1080位核苷酸)插入pET-28的限制性内切酶HindIII的酶切位点间,得到H-2K^D重链胞外区表达质粒,命名为H-2K^D-HC质粒。

[0068] (二)鼠轻链β2m表达质粒的构建

[0069] 将编码鼠β2m的DNA(Genbank号为M84365.1自5'末端第61-357位核苷酸)插入pET-28的限制性内切酶HindIII的酶切位点间,得到轻链重组质粒,命名为轻链β2m表达质粒。

[0070] (三)原核提取H-2K^D重链蛋白和轻链蛋白

[0071] 1、将H-2K^D-HC质粒转入BL21(DE3)感受态细胞中(购自天根生化科技公司,产品号CB105-02),从平板上挑取单克隆菌落接种到含100mg/ml氨苄霉素的5ml的LB培养基(胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,氯化钠10g,加水定容至1L)中,小量活化,培养10-12h。然后按照1%的接种量接种到2L LB培养基中大量培养(37℃,200rpm转速),培养至OD=0.4-0.6,在无菌条件下加入IPTG(终浓度为1mM),37℃诱导4-6小时,4℃,7000rpm,离心10min收集菌体。

[0072] 2、用PBS将步骤1得到的菌体重悬,在冰浴条件下进行超声破碎(超声6s,间隔12s,99次,250W,多个循环),直至菌体悬液透明。4℃,12000rpm离心20min收集超声后的菌液,沉淀中呈白色致密块即为包涵体。

[0073] 3、用玻璃棒将步骤2得到的包涵体上的菌体残渣刮去,用包涵体清洗液(washing buffer)将包涵体悬起,用超声裂解方法进一步纯化蛋白(超声4s,间隔10s,40次,250w),4℃,12000rpm离心20min收集沉淀。此步骤重复三次。再用包涵体重悬液(resuspension buffer)将包涵体沉淀悬起,并超声裂解一次,4℃,12000rpm离心20min收集包涵体。注:每次超声裂解离心过后,都需要用玻璃棒将表面的菌体残渣尽量刮去。

[0074] 4、将步骤3得到的包涵体，倒置控干，称重，按30mg/ml的比例用包涵体溶解液(Dissolution Buffer)溶解，4℃搅拌溶解过夜。4℃，12000rpm，离心20min收集上清，即获得H-2K^D重链胞外区包涵体蛋白溶液(简称H-2K^D重链包涵体蛋白溶液)，分装后-20℃冻存。

[0075] 将H-2K^D-HC质粒替换为轻链β2m表达质粒，其他步骤不变，得到轻链β2m包涵体蛋白溶液。

[0076] 其中，包涵体清洗液(washing buffer)：溶剂为水，溶质为0.5%Triton-100,50mM Tris pH 8.0,300mM NaCl,10mM EDTA,10mM DTT(现用现加)；

[0077] 包涵体重悬液(resuspension buffer)：溶剂为水，溶质为50mM Tris pH 8.0,100mM NaCl,10mM EDTA,10mM DTT(现用现加)；

[0078] 包涵体溶解液(Dissolution Buffer)：溶剂为水，溶质为6M Gua-HCl(或8M Urea),10%甘油,50mM Tris pH8.0,100mM NaCl,10mM EDTA,10mM DTT(现用现加)。

[0079] (四)、包涵体体外复性

[0080] 1、将复性液(refolding buffer)装入烧杯中，放置在磁力搅拌器上，转子的搅拌速度为1s转子转一圈较好。用1ml注射器的针头替换5ml或10ml注射器的针头，将替换组合后的注射器固定在烧杯上，在注射器中依次加入蛋白溶液，使其能一滴一滴地缓慢滴入refolding buffer中，具体的顺序为：最先轻链β2m包涵体蛋白溶液，其次PB181-89多肽溶液，再次H-2K^D重链包涵体蛋白溶液加入，以H-2K^D重链包涵体蛋白：轻链β2m包涵体蛋白：PB181-89多肽=1:1:3的摩尔比加入。H-2K^D重链包涵体蛋白分3次加入，每次加入的时间间隔8-10h，PB181-89多肽可以溶解在100-200微升二甲亚砜获得PB181-89多肽溶液一次性注入。

[0081] 其中，复性液(refolding buffer)：溶剂为水，溶质为100mM Tris pH 8.0,400mM L-Arg HCl,2mM EDTA,5mM GSH(还原性谷胱甘肽，溶液预冷后加入)，0.5mM GSSG(氧化性谷胱甘肽，溶液预冷后加入)，0.5mM PMSF(可不加)，注意还原性谷胱甘肽及氧化性谷胱甘肽一定要溶液预冷后再加入。

[0082] 2、将复性结束后的复性液用浓缩杯进行浓缩(在加入浓缩杯之前最好12000rpm,4℃离心20min，尽量去除沉淀以减小沉淀堵住浓缩膜的可能性)，并换液到分子筛缓冲液(20mM Tris,50mM NaCl,pH8.0)，当溶液体积最终小于50ml之后换到浓缩管继续浓缩至5ml以内，12000rpm,4℃离心10min后取上清准备上样。将准备好的复性浓缩液注入AKTAFPLC，根据superdex 200 10/300GL(GE公司，货号为17-5175-01)分子筛层析的结果检测复性效果。分子筛层析过程中，收集各个蛋白峰的样品，经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

[0083] 复性结果如图1所示，在目标位置85ml处出现了明显的复合物蛋白峰，说明PB181-89多肽与H-2K^D分子具有明显的结合力。

[0084] 实施例3、昆虫杆状病毒表达系统表达热休克蛋白gp96

[0085] 一、pFastBacTM1-gp96质粒的构建

[0086] 1、gp96引物的设计与合成：根据GenBank中人gp96基因的序列(序列号为NM_003299，其基因序列如SEQ ID NO.8所示，其编码氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示)为模板，在gp96基因5'端加入EcoRI酶切位点，3'端加入XbaI酶切位点。正向引物序列为：5'-GGAATTCATGGGCAGCAGCCATCAT-3'(下划线为EcoRI酶切位点)；反向引物序列为：5'-GCTCTAGACTATTACAATTCATCTTTTTC-3'(下划线为XbaI酶切位点)，委托上海生工生物工程技

术服务公司合成该引物,测序验证引物的序列正确无误。

[0087] 2、提取人肝癌细胞HepG2的mRNA,反转录合成cDNA。

[0088] 3、以步骤2的cDNA为模板,利用步骤1的正向引物和反向引物进行PCR扩增得到gp96的PCR产物。

[0089] 4、用EcoRI和XbaI双酶切gp96的PCR产物,回收酶切产物。

[0090] 5、用EcoRI和XbaI双酶切pFastBacTM1空载质粒(购自Invitrogen,货号为10359-016),回收载体骨架。

[0091] 6、将步骤4的酶切产物和步骤5的载体骨架连接,得到连接产物。

[0092] 7、将步骤6的连接产物转化大肠杆菌DH10Bac感受态细胞(购自北京原平皓生物技术有限公司,产品号CL108-01),通过定点转移获得重组大肠杆菌的质粒。PCR扩增验证阳性克隆正向引物序列为:5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3',反向引物序列为:5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'。若PCR产生了一个含有大小为4.7-5kb的目的条带,则为阳性重组质粒,随后对其进行测序,测序正确的质粒命名为pFastBacTM1-gp96。所述将pFastBacTM1的EcoRI和XbaI酶切位点间的DNA片段替换为了SEQ ID NO.8所示的gp96基因片段,并保持pFastBacTM1其他序列不变得到的人gp96基因表达载体。

[0093] 二、昆虫细胞表达gp96蛋白

[0094] 提取pFastBacTM1-gp96,利用Cellfectin II reagent(购自Life technologies,货号:10362-100)将其转染到Sf9昆虫细胞中。将转染质粒的Sf9昆虫细胞培养72h,通过细胞病变情况表明含有重组的一代杆状病毒(P1)已经释放到培养基中,收取细胞上清获得P1毒。加适量P1毒到Sf9单层(1×10^6 细胞/mL)细胞中,27℃,培养72h,4000rpm离心5min,收取上清获得二代毒(P2毒)。将适量P2毒加到100ml Sf9(1.6×10^6 细胞/mL)的悬浮细胞中27℃,100-120rpm/min培养72h,扩增获得三代毒(P3毒)。将P3毒进行western blotting杂交,其中,所用的抗体为(sc-393402)GRP 94Antibody(H-10)(购自Santa Cruz Biotechnology),结果如图2所示,表明gp96蛋白已经在Sf9细胞中表达。

[0095] 在新鲜的Sf9细胞(1.5×10^6 细胞/mL,300ml)中加入适量P3毒,27℃,100-120rpm/min在Insect-XPRESSTM Protein-free Insect Cells medium with L-Glutamine(Catalog No:12-730Q)培养基中,27℃,100-120rpm/min悬浮培养。感染72小时后,将悬浮液7000rpm离心20分钟得到清澈的上清液,经过0.22mm滤膜滤过后,经过HiTrap-Q Sepharose离子交换层析和Superdex 200 10/300GL分子筛纯化后得到较纯的gp96蛋白。蛋白经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。将上述收集的gp96蛋白用PBS缓冲液换液,浓缩,采用BCA法测定蛋白浓度,最后将蛋白分装,贮存于-80℃。

[0096] 其中,所述HiTrap-Q Sepharose离子交换层析包括如下步骤:(a)将所述过滤后的上清液上样于层析柱,流速为1ml/min;(b)用5ml NaCl浓度为200mM pH7.5的PBS(溶剂为水,溶质为200mM NaCl、0.2g/L KCl、3.625g/L Na₂HPO₄·12H₂O、0.24g/L KH₂PO₄)洗涤步骤(a)的层析柱,流速为1ml/min;(c)用10ml NaCl浓度为300mM pH7.5的PBS(溶剂为水,溶质为300mM NaCl、0.2g/L KCl、3.625g/L Na₂HPO₄·12H₂O、0.24g/L KH₂PO₄)洗涤步骤(b)的层析柱,流速为1ml/min;(d)用3ml NaCl浓度为600mM pH7.5的PBS(溶剂为水,溶质为600mM NaCl、0.2g/L KCl、3.625g/L Na₂HPO₄·12H₂O、0.24g/L KH₂PO₄)洗涤步骤(c)的层析柱,流速为1ml/min,得到的洗脱液即为含有gp96蛋白的提取物。

[0097] 所述Superdex 200 10/300GL分子筛层析包括如下步骤:(a)将HiTrap-Q Sepharose离子交换层析所得gp96蛋白的提取物通过50Kd超滤管(Merck Millipore,货号:UFC905096)浓缩换液,浓缩为1ml PBS溶液;(b)通过上样环将(a)上样于层析柱,流速为0.25ml/min;(c)用PBS缓冲液洗涤柱子,流速为0.25ml/min,收取gp96蛋白。

[0098] 实施例4、多肽刺激BALB/c转基因鼠特异性CTL(细胞毒性T细胞)的产生

[0099] 本实施例中用于动物免疫的gp96是实施例3中制备得到的昆虫细胞表达的gp96蛋白。用于动物免疫的多肽是实施例1中的多肽:实验组的动物免疫多肽为多肽片段PB1 81-89,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;阴性对照组的动物免疫多肽为乙肝病毒HBc82-90肽(即多肽片段HBc82-90),其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0100] 一、分组免疫

[0101] 4-6周龄的BALB/c小鼠(购自Jackson laboratory)进行分组,每组10只,体重为18-20g,分别免疫。免疫前,将用于免疫的gp96和一种多肽(PB1 81-89或HBc82-90)在组装溶液中进行组装,得到免疫原溶液。组装溶液的溶剂为水,溶质及其浓度如下:NaCl 8g/L, KCl 0.2g/L, KH_2PO_4 0.24g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.63g/L;组装条件:55°C 10min,室温放置30分钟。按照该方法共得到4种免疫原溶液,第一种免疫原溶液中,溶质为gp96和HBc82-90, HBc82-90和gp96的质量比为5:3;第二种免疫原溶液中,溶质为gp96和PB1 81-89, PB1 81-89和gp96的质量比为5:3;第三种免疫原溶液中,溶质为gp96和PB1 81-89, PB1 81-89和gp96的质量比为1:2;第四种免疫原溶液中,溶质为gp96和PB1 81-89, PB1 81-89和gp96的质量比为10:1。

[0102] 免疫方式为皮下注射,第一次免疫时间为实验第一周、第二次免疫时间为实验第二周、第三次免疫时间为实验第四周。每只鼠每次注射的免疫原溶液的体积相同,均为0.2mL。

[0103] 第一组(阴性对照组):第一次免疫多肽片段HBc82-90(50微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽片段HBc82-90(50微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽片段HBc82-90(50微克/只)、gp96(30微克/只);

[0104] 第二组(实验组):第一次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只)、gp96(30微克/只);

[0105] 第三组(实验组):第一次免疫多肽PB1 81-89(15微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽PB1 81-89(15微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽PB1 81-89(15微克/只)、gp96(30微克/只);

[0106] 第四组(实验组):第一次免疫多肽PB1 81-89(300微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽PB1 81-89(300微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽PB181-89(300微克/只)、gp96(30微克/只);

[0107] 第五组(单独表位免疫组):第一次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只);第二次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只);第三次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只);

[0108] 第六组(单独gp96免疫组):第一次gp96(30微克/只);第二次免疫gp96(30微克/只);第三次免疫gp96(30微克/只)。

[0109] 二、免疫相关因子的分析

[0110] 免疫结束后,取小鼠脾细胞进行酶联免疫斑点检测(ELISPOT)分析(ELISPOT检测试剂盒购自BD公司,产品号551083,操作方法见试剂盒产商说明书),结果见图3:各处理组之间小鼠脾细胞ELISPOT结果对比如下,第二组:PB1 81-89VS HBc82-90=373.10±40.66VS 8.47±12.01,P<0.001;第三组:PB1 81-89VS HBc82-90=257.67±74.22VS 8.47±12.01,P<0.001;第四组:PB1 81-89VS HBc82-90=359.57±42.08VS 8.47±12.01,P<0.001;第五组PB1 81-89VS HBc82-90=46.90±44.07VS 8.47±12.01,P<0.05;第六组:gp96 VS HBc82-90=27.7±38.32VS 8.47±12.01,P>0.05。阴性对照组(第一组)和单独gp96免疫组(第六组)几乎没有特异性IFN- γ 分泌的T细胞,实验组(第一组、第二组和第三组)和单独表位免疫组(第五组)均能引起很强的特异性IFN- γ 分泌,说明多肽片段PB1 81-89可以在小鼠体内激起较强的细胞毒性T细胞免疫反应,单独gp96和阴性对照多肽片段HBc82-90均不能活化细胞毒性T细胞免疫反应。

[0111] 实施例5、多肽免疫BALB/c小鼠后进行攻毒

[0112] 本实施例中用于动物免疫的gp96是实施例3中制备得到的昆虫细胞表达的gp96蛋白,用于动物免疫的多肽是实施例1中的多肽:PB1多肽组的动物免疫多肽为多肽片段PB1 81-89,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;突变多肽a组的动物免疫多肽为突变多肽片段a,其氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示;突变多肽b组的动物免疫多肽为突变多肽片段b,其氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示;阴性对照组的动物免疫多肽为乙肝病毒HBc82-90肽(即多肽片段HBc82-90),其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0113] 一、分组免疫

[0114] 4-6周龄的BALB/c小鼠(购自Jackson laboratory)进行分组,每组40只,体重为18-20g,分别免疫。免疫前,将用于免疫的gp96和一种多肽(PB1 81-89或HBc82-90或突变多肽片段a或突变多肽片段b)在组装溶液中进行组装,得到免疫原溶液。组装溶液的溶剂为水,溶质及其浓度如下:NaCl 8g/L,KCl 0.2g/L,KH₂PO₄ 0.24g/L,Na₂HPO₄·12H₂O 3.63g/L;组装条件:55℃10min,室温放置30分钟。按照该方法共得到4种免疫原溶液,第一种免疫原溶液中,溶质为gp96和HBc82-90,HBc82-90和gp96的质量比为5:3;第二种免疫原溶液中,溶质为gp96和PB1 81-89,PB1 81-89和gp96的质量比为5:3;第三种免疫原溶液中,溶质为gp96和突变多肽片段a,突变多肽片段a和gp96的质量比为5:3;第四种免疫原溶液中,溶质为gp96和突变多肽片段b,突变多肽片段b和gp96的质量比为5:3。

[0115] 免疫方式为皮下注射,第一次免疫时间为实验第一周、第二次免疫时间为实验第二周、第三次免疫时间为实验第四周。每只鼠每次注射的免疫原溶液的体积相同,均为0.2mL。

[0116] 第一组(阴性对照组):第一次免疫多肽HBc82-90(50微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽HBc82-90(50微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽HBc82-90(50微克/只)、gp96(30微克/只);

[0117] 第二组(PB1 81-89多肽组):第一次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽PB1 81-89(50微克/只)、gp96(30微克/只);

[0118] 第三组(突变多肽a组):第一次免疫多肽突变多肽片段a(50微克/只)、gp96(30微克/只);第二次免疫多肽突变多肽片段a(50微克/只)、gp96(30微克/只);第三次免疫多肽

突变多肽片段a (50微克/只)、gp96 (30微克/只)；

[0119] 第四组(突变多肽b组)：第一次免疫多肽突变多肽片段b (50微克/只)、gp96 (30微克/只)；第二次免疫多肽突变多肽片段b (50微克/只)、gp96 (30微克/只)；第三次免疫多肽突变多肽片段b (50微克/只)、gp96 (30微克/只)。

[0120] 二、PR8攻毒实验

[0121] 取步骤一免疫后的各组小鼠，每组10只，用水合氯醛对进行麻醉，即按小鼠体重静脉注射水合氯醛，注射剂量为375mg/kg体重。在麻醉的情况下，对小鼠进行PR8病毒液(即甲型流感病毒A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)，记载于非专利文献“彭善鑫. 宿主细胞microRNA库调控甲型流感病毒复制的机制研究. 中国科学院微生物研究所. 博士论文. 2018年6月.”)中的滴鼻，保证体系在50 μ l，PR8的剂量为10⁴PFUs/只小鼠。每天观察小鼠的状态并记录小鼠的体重，共观察14天，结果见图4，第一组(阴性对照组)小鼠体重迅速持续下降，在第6天到第12天之间死亡；相比之下，第二组(PB181-89多肽组)、第三组(突变多肽a组)和第四组(免疫突变多肽b组)的小鼠尽管体重也经历了最初的下降，但它们的体重在第9天或第10天达到了最低点，随后又恢复。计算小鼠的存活率，结果见图5，第一组(阴性对照组)小鼠在感染病毒后第6天死亡1只，第10天死亡3只，第11天死亡3只，第12天死亡3只，截止到感染后第12天该组小鼠已全部死亡；而第二组(PB181-89多肽组)、第三组(突变多肽a组)和第四组(免疫突变多肽b组)小鼠在病毒感染后进行观察的14天，小鼠全部存活，与第一组(阴性对照组)相比均有明显差异($p < 0.0001$)。

[0122] 三、WSN攻毒实验

[0123] 取步骤一免疫后的各组小鼠，每组10只，用水合氯醛对进行麻醉，即按小鼠体重静脉注射水合氯醛，注射剂量为375mg/kg体重。在麻醉的情况下，对小鼠进行WSN病毒液(即甲型流感病毒A/WSN/1933 (H1N1)，记载于非专利文献“Tian X, Zhang K, Min J, Chen C, Cao Y, Ding C, Liu W, Li J. Metabolomic Analysis of Influenza A Virus A/WSN/1933 (H1N1) Infected A549 Cells during First Cycle of Viral Replication. *Viruses* 2019 Oct; 11 (11)”中的滴鼻，保证体系在50 μ l，WSN的剂量为10⁴PFUs/小鼠。每天观察小鼠的状态并记录小鼠的体重，共观察14天，结果见图6，第一组(阴性对照组)小鼠体重迅速持续下降，在第10天到第12天之间死亡；相比之下，第二组(PB181-89多肽组)、第三组(突变多肽a组)和第四组(免疫突变多肽b组)小鼠尽管体重也经历了最初的下降，但它们的体重在第10天达到了最低点，随后又恢复。计算小鼠的存活率，结果见图7，第一组(阴性对照组)小鼠在感染病毒后第10天死亡4只，第11天死亡3只，第12天死亡3只，截止到感染后第12天该组小鼠已全部死亡；而第二组免疫PB181-89多肽组和第三组免疫突变多肽a组均在感染病毒后第10天死亡1只，第四组免疫突变多肽b组小鼠在病毒感染后进行观察的14天，小鼠全部存活，与阴性对照组相比均有明显差异($p < 0.0001$)。

[0124] 四、H3N2攻毒实验

[0125] 取步骤一免疫后的各组小鼠，每组10只，用水合氯醛对进行麻醉，即按小鼠体重静脉注射水合氯醛，注射剂量为375mg/kg体重。在麻醉的情况下，对小鼠进行H3N2病毒液(即甲型流感病毒A/JIANGXI/206/2005 (H3N2)，记载于非专利文献“彭善鑫. 宿主细胞microRNA库调控甲型流感病毒复制的机制研究. 中国科学院微生物研究所. 博士论文. 2018年6月.”)中的滴鼻，保证体系在50 μ l，H3N2的剂量为10⁴PFUs/小鼠。每天观察小鼠的状态并记录小

鼠的体重,共观察14天,结果见图8,第一组(阴性对照组)小鼠体重迅速持续下降,在第10天到第13天之间死亡;相比之下,第二组(PB181-89多肽组)、第三组(突变多肽a组)和第四组(免疫突变多肽b组)小鼠尽管体重也经历了最初的下降,但它们的体重在第9天或第10天达到了最低点,随后又恢复。计算小鼠的存活率,结果见图9,第一组(阴性对照组)小鼠在感染病毒后第10天死亡2只,第11天死亡2只,第12天死亡8只,截止到感染后第12天该组小鼠已全部死亡;而第二组(PB181-89多肽组)和第四组(免疫突变多肽b组)小鼠分别在病毒感染后第11天和第13天死亡2只,与对照组相比均有显著差异($p < 0.001$),第三组(突变多肽a组)在感染病毒后进行观察的14天,小鼠全部存活,与阴性对照组相比有明显差异($p < 0.0001$)。

[0126] 五、H7N9攻毒实验

[0127] 取步骤一免疫后的各组小鼠,每组10只,用水合氯醛对进行麻醉,即按小鼠体重静脉注射水合氯醛,注射剂量为375mg/kg体重。在麻醉的情况下,对小鼠进行H7N9病毒液(即甲型流感病毒(A/Shanghai/02/2013(H7N9)),记载于非专利文献“Xu J, Li S, Wang X, Liu J, Shan P, Zhou Y, Zhao J, Wang Z, Xu C, Chen M, Chen Z, Zhao K, Qu D. Systemic and mucosal humoral immune responses induced by the JY-adjuvanted nasal spray H7N9 vaccine in mice. *Emerg Microbes Infect* 2018Aug;7(1):140.”中)的滴鼻,保证体系在50 μ l, H7N9的剂量为 10^4 PFUs/小鼠。每天观察小鼠的状态并记录小鼠的体重,共观察14天,结果见图10,第一组(阴性对照组)体重迅速持续下降,在第9天到第11天之间死亡;相比之下,第二组(PB1 81-89多肽组)、第三组(突变多肽a组)和第四组(免疫突变多肽b组)小鼠尽管体重也经历了最初的下降,但它们的体重在第9天或第10天达到了最低点,随后又恢复。计算小鼠的存活率,结果见图11,第一组(阴性对照组)小鼠在感染病毒后第9天死亡3只,第10天死亡3只,第11天死亡4只,截止到感染后第11天该组小鼠已全部死亡;而第三组免疫突变多肽a组和第四组免疫突变多肽b组小鼠分别在病毒感染后第12天和第11天死亡3只,与对照组相比均有显著差异($p < 0.001$),第二组免疫PB1 81-89多肽组在感染病毒后进行观察的14天,小鼠全部存活,与阴性对照组相比有明显差异($p < 0.0001$)。

[0128] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 中国科学院微生物研究所
 [0003] <120> 甲型流感病毒PB1蛋白T细胞表位多肽片段及其应用
 [0004] <130> GNCFY200610
 [0005] <160> 11
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 757
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0011] <400> 1
 [0012] Met Asp Val Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val Pro Ala Gln Asn
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ala Ile Ser Thr Thr Phe Pro Tyr Thr Gly Asp Pro Pro Tyr Ser His
 [0015] 20 25 30
 [0016] Gly Thr Gly Thr Gly Tyr Thr Met Asp Thr Val Asn Arg Thr His Gln
 [0017] 35 40 45
 [0018] Tyr Ser Glu Lys Ala Arg Trp Thr Thr Asn Thr Glu Thr Gly Ala Pro
 [0019] 50 55 60
 [0020] Gln Leu Asn Pro Ile Asp Gly Pro Leu Pro Glu Asp Asn Glu Pro Ser
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu Glu Ala Met Ala Phe Leu Glu
 [0023] 85 90 95
 [0024] Glu Ser His Pro Gly Ile Phe Glu Asn Ser Cys Ile Glu Thr Met Glu
 [0025] 100 105 110
 [0026] Val Val Gln Gln Thr Arg Val Asp Lys Leu Thr Gln Gly Arg Gln Thr
 [0027] 115 120 125
 [0028] Tyr Asp Trp Thr Leu Asn Arg Asn Gln Pro Ala Ala Thr Ala Leu Ala
 [0029] 130 135 140
 [0030] Asn Thr Ile Glu Val Phe Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ala Asn Glu Ser
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Glu Ser Met Lys Lys
 [0033] 165 170 175
 [0034] Glu Glu Met Gly Ile Thr Thr His Phe Gln Arg Lys Arg Arg Val Arg
 [0035] 180 185 190
 [0036] Asp Asn Met Thr Lys Lys Met Ile Thr Gln Arg Thr Ile Gly Lys Arg
 [0037] 195 200 205
 [0038] Lys Gln Arg Leu Asn Lys Arg Ser Tyr Leu Ile Arg Ala Leu Thr Leu
 [0039] 210 215 220
 [0040] Asn Thr Met Thr Lys Asp Ala Glu Arg Gly Lys Leu Lys Arg Arg Ala
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Ile Ala Thr Pro Gly Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe Val Glu
[0043]	245 250 255
[0044]	Thr Leu Ala Arg Ser Ile Cys Glu Lys Leu Glu Gln Ser Gly Leu Pro
[0045]	260 265 270
[0046]	Val Gly Gly Asn Glu Lys Lys Ala Lys Leu Ala Asn Val Val Arg Lys
[0047]	275 280 285
[0048]	Met Met Thr Asn Ser Gln Asp Thr Glu Leu Ser Leu Thr Ile Thr Gly
[0049]	290 295 300
[0050]	Asp Asn Thr Lys Trp Asn Glu Asn Gln Asn Pro Arg Met Phe Leu Ala
[0051]	305 310 315 320
[0052]	Met Ile Thr Tyr Met Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val
[0053]	325 330 335
[0054]	Leu Ser Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly
[0055]	340 345 350
[0056]	Lys Gly Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile
[0057]	355 360 365
[0058]	Pro Ala Glu Met Leu Ala Ser Ile Asp Leu Lys Tyr Phe Asn Asp Ser
[0059]	370 375 380
[0060]	Thr Arg Lys Lys Ile Glu Lys Ile Arg Pro Leu Leu Ile Glu Gly Thr
[0061]	385 390 395 400
[0062]	Ala Ser Leu Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser
[0063]	405 410 415
[0064]	Thr Val Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Arg Tyr Thr
[0065]	420 425 430
[0066]	Lys Thr Thr Tyr Trp Trp Asp Gly Leu Gln Ser Ser Asp Asp Phe Ala
[0067]	435 440 445
[0068]	Leu Ile Val Asn Ala Pro Asn His Glu Gly Ile Gln Ala Gly Val Asp
[0069]	450 455 460
[0070]	Arg Phe Tyr Arg Thr Cys Lys Leu His Gly Ile Asn Met Ser Lys Lys
[0071]	465 470 475 480
[0072]	Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
[0073]	485 490 495
[0074]	Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
[0075]	500 505 510
[0076]	Gly Val Ser Gly Ser Asn Glu Ser Ala Asp Met Ser Ile Gly Val Thr
[0077]	515 520 525
[0078]	Val Ile Lys Asn Asn Met Ile Asn Asn Asp Leu Gly Pro Ala Thr Ala
[0079]	530 535 540
[0080]	Gln Met Ala Leu Gln Leu Phe Ile Lys Asp Tyr Arg Tyr Thr Tyr Arg
[0081]	545 550 555 560
[0082]	Cys His Arg Gly Asp Thr Gln Ile Gln Thr Arg Arg Ser Phe Glu Ile
[0083]	565 570 575

[0084]	Lys Lys Leu Trp Glu Gln Thr Arg Ser Lys Ala Gly Leu Leu Val Ser
[0085]	580 585 590
[0086]	Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr Asn Ile Arg Asn Leu His Ile Pro Glu
[0087]	595 600 605
[0088]	Val Cys Leu Lys Trp Glu Leu Met Asp Glu Asp Tyr Gln Gly Arg Leu
[0089]	610 615 620
[0090]	Cys Asn Pro Leu Asn Pro Phe Val Ser His Lys Glu Ile Glu Ser Met
[0091]	625 630 635 640
[0092]	Asn Asn Ala Val Met Met Pro Ala His Gly Pro Ala Lys Asn Met Glu
[0093]	645 650 655
[0094]	Tyr Asp Ala Val Ala Thr Thr His Ser Trp Ile Pro Lys Arg Asn Arg
[0095]	660 665 670
[0096]	Ser Ile Leu Asn Thr Ser Gln Arg Gly Val Leu Glu Asp Glu Gln Met
[0097]	675 680 685
[0098]	Tyr Gln Arg Cys Cys Asn Leu Phe Glu Lys Phe Phe Pro Ser Ser Ser
[0099]	690 695 700
[0100]	Tyr Arg Arg Pro Val Gly Ile Ser Ser Met Val Glu Ala Met Val Ser
[0101]	705 710 715 720
[0102]	Arg Ala Arg Ile Asp Ala Arg Ile Asp Phe Glu Ser Gly Arg Ile Lys
[0103]	725 730 735
[0104]	Lys Glu Glu Phe Thr Glu Ile Met Lys Ile Cys Ser Thr Ile Glu Glu
[0105]	740 745 750
[0106]	Leu Arg Arg Gln Lys
[0107]	755
[0108]	<210> 2
[0109]	<211> 9
[0110]	<212> PRT
[0111]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112]	<400> 2
[0113]	Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Cys Val Leu
[0114]	1 5
[0115]	<210> 3
[0116]	<211> 9
[0117]	<212> PRT
[0118]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0119]	<400> 3
[0120]	Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn
[0121]	1 5
[0122]	<210> 4
[0123]	<211> 1560
[0124]	<212> DNA
[0125]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0126] <400> 4

[0127] aagtcgctaa tcgccgacca gtgcgatggc accctgcacg ctgctcctgc tgttggcggc 60

[0128] cgccctggcc cccactcaga cccgcgcggg cccacattcg ctgaggtatt tcgtcacccg 120

[0129] cgtgtcccgg cccggcctcg gggagccccg gttcatcgct gtcggctacg tggacgacac 180

[0130] gcagttcgtg cgcttcgaca gcgacgcgga taatccgaga tttgagccgc gggcgccgtg 240

[0131] gatggagcag gaggggccgg agtattggga ggagcagaca cagagagcca agagcgatga 300

[0132] gcagtggttc cgagtgagcc tgaggaccgc acagagatac tacaaccaga gcaagggcgg 360

[0133] ctctcacacg ttccagcggg tgttcgctg tgacgtgggg tcggactggc gcctcctccg 420

[0134] cgggtaccat cagttcgct acgacggccg cgattacatc gccctgaacg aagacctgaa 480

[0135] aacgtggacg gcggcggaca cggcggcgct gatcaccaga cgcaagtggg agcaggctgg 540

[0136] tgatgcagag tattacaggg cctacctaga gggcgagtgc gtggagtggc tccgcagata 600

[0137] cctggagctc gggaatgaga cgctgctgcg cacagattcc ccaaaggccc atgtgacctc 660

[0138] tcacccaga tctcaagttg atgtcacctc gaggtgctgg gccctgggct tctaccctgc 720

[0139] tgatatacc ctgacctggc agttgaatgg ggaggacctg acccaggaca tggagcttgt 780

[0140] agagaccagg cctgcagggg atggaacctt ccagaagtgg gcagctgtgg tgggtgcctc 840

[0141] tgggaaggag cagaattaca catgccatgt gcaccataag gggctgctg agcctctcac 900

[0142] cctgagatgg aagcttcctc catccactgt ctccaacacg gtaatcattg ctgttctggt 960

[0143] tgtccttggg gctgcaatag tcaactggagc tgtggtggct tttgtgatga agatgagaag 1020

[0144] gaacacaggt ggaaaaggag tgaactatgc tctggctcca ggctcccaga cctctgatct 1080

[0145] gtctetccca gatggtaaag tgatggttca tgacctcat tctctagcgt gaagacagct 1140

[0146] gcctggagtg gacttggtga cagacaatgt cttcacacat ctctatgac atccagagcc 1200

[0147] ctcagttctc tttagtcaag tgtctgatgt tcctgtgag cctatggact caaagtgaag 1260

[0148] aactgtggag ccagctccac ccctccacac cagcacctg tcctgcaact gctctgtctt 1320

[0149] ccctccaca gccaaccttg ctggttcagc caaacactgg gggacatctg cagcctgtca 1380

[0150] gctccatgct acctgacct gcagctctc acttccacac tgagaatagt aatttgaatg 1440

[0151] taacctgat tgttatcatc ttgacctagg gctgatttct tgtaatttc atgcttagag 1500

[0152] gttttgtttg tttgtttgat ttgtttttt tttttgaaga aataaatgat agatgaataa 1560

[0153] <210> 5

[0154] <211> 275

[0155] <212> PRT

[0156] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0157] <400> 5

[0158] Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu

[0159] 1 5 10 15

[0160] Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe

[0161] 20 25 30

[0162] Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala

[0163] 35 40 45

[0164] Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln

[0165] 50 55 60

[0166] Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr Ala

[0167] 65 70 75 80

[0168]	Gln Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln Arg
[0169]	85 90 95
[0170]	Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
[0171]	100 105 110
[0172]	His Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
[0173]	115 120 125
[0174]	Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg Arg
[0175]	130 135 140
[0176]	Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu
[0177]	145 150 155 160
[0178]	Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn Glu
[0179]	165 170 175
[0180]	Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His Pro
[0181]	180 185 190
[0182]	Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
[0183]	195 200 205
[0184]	Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
[0185]	210 215 220
[0186]	Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
[0187]	225 230 235 240
[0188]	Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
[0189]	245 250 255
[0190]	Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
[0191]	260 265 270
[0192]	Trp Lys Pro
[0193]	275
[0194]	<210> 6
[0195]	<211> 357
[0196]	<212> DNA
[0197]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0198]	<400> 6
[0199]	atggctcgct cggtgaccct ggtctttctg gtgcttgct cactgaccgg cctgtatgct 60
[0200]	atccagaaaa cccctcaaat tcaagtatac tcacgccacc caccggagaa tgggaagecg 120
[0201]	aacatactga actgctactg aacacagttc caccgcctc acattgaaat ccaaatgctg 180
[0202]	aagaacggga aaaaaattcc taaagtagag atgtcagata tgtccttcag caaggactgg 240
[0203]	tctttctata tcttggtca cactgaattc acccccactg agactgatac atacgcctgc 300
[0204]	agagttaagc atgtcagtat ggccgagccc aagaccgtct actgggatcg agacatg 357
[0205]	<210> 7
[0206]	<211> 119
[0207]	<212> PRT
[0208]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0209]	<400> 7

[0210]	Met Ala Arg Ser Val Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Val Ser Leu Thr	
[0211]	1	5 10 15
[0212]	Gly Leu Tyr Ala Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln Val Tyr Ser Arg	
[0213]		20 25 30
[0214]	His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn Cys Tyr Val Thr	
[0215]		35 40 45
[0216]	Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu Lys Asn Gly Lys	
[0217]		50 55 60
[0218]	Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe Ser Lys Asp Trp	
[0219]	65	70 75 80
[0220]	Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Thr Asp	
[0221]		85 90 95
[0222]	Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Ala Ser Met Ala Glu Pro Lys Thr	
[0223]		100 105 110
[0224]	Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met	
[0225]		115
[0226]	<210> 8	
[0227]	<211> 2349	
[0228]	<212> DNA	
[0229]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0230]	<400> 8	
[0231]	gacgatgaag ttgatgtgga tggtacagta gaagaggatc tgggtaaaag tagagaagga	60
[0232]	tcaaggacgg atgatgaagt agtacagaga gaggaagaag ctattcagtt ggatggatta	120
[0233]	aatgcatcac aaataagaga acttagagag aagtcggaaa agtttgcctt ccaagccgaa	180
[0234]	gttaacagaa tgatgaaact tatcatcaat tcattgtata aaaataaaga gattttcctg	240
[0235]	agagaactga tttcaaatgc ttctgatgct ttagataaga taaggcta atcactgact	300
[0236]	gatgaaaatg ctctttctgg aatgaggaa ctaacagtca aaattaagt tgataaggag	360
[0237]	aagaacctgc tgcatgtcac agacaccggt gtaggaatga ccagagaaga gttggttaaa	420
[0238]	aaccttgta ccatagccaa atctgggaca agcgagtttt taaacaaat gactgaagca	480
[0239]	caggaagatg gccagtcaac ttctgaattg attggccagt ttggtgtcgg tttctattcc	540
[0240]	gccttccttg tagcagataa ggttattgtc acttcaaac acaacaacga taccagcac	600
[0241]	atctgggagt ctgactccaa tgaattttct gtaattgctg acccaagagg aaacactcta	660
[0242]	ggacgggaa cgacaattac cttgtctta aaagaagaag catctgatta cttggaattg	720
[0243]	gatacaatta aaaatctcgt caaaaaatat tcacagtta taaactttcc tatttatgta	780
[0244]	tggagcagca agactgaaac tgttgaggag cccatggagg aagaagaagc agccaaagaa	840
[0245]	gagaaagaag aatctgatga tgaagctgca gtagaggaag aagaagaaga aaagaaacca	900
[0246]	aagactaaaa aagttgaaaa aactgtctgg gactgggaac ttatgaatga tatcaacca	960
[0247]	atatggcaga gaccatcaaa agaagtagaa gaagatgaat acaaagcttt ctacaaatca	1020
[0248]	ttttcaaagg aaagtgatga ccccatggct tatattcact ttactgctga aggggaagtt	1080
[0249]	acctcaaat caattttatt tgtaccaca tctgctccac gtggtctgtt tgacgaatat	1140
[0250]	ggatctaaaa agagcgatta cattaagctc tatgtgccc gtgtattcat cacagacgac	1200
[0251]	ttccatgata tgatgcctaa atacctcaat tttgtcaagg gtgtggtgga ctcatgat	1260

[0294]	Leu His Val Thr Asp Thr Gly Val Gly Met Thr Arg Glu Glu Leu Val
[0295]	145 150 155 160
[0296]	Lys Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys Ser Gly Thr Ser Glu Phe Leu Asn
[0297]	165 170 175
[0298]	Lys Met Thr Glu Ala Gln Glu Asp Gly Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile
[0299]	180 185 190
[0300]	Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Phe Leu Val Ala Asp Lys
[0301]	195 200 205
[0302]	Val Ile Val Thr Ser Lys His Asn Asn Asp Thr Gln His Ile Trp Glu
[0303]	210 215 220
[0304]	Ser Asp Ser Asn Glu Phe Ser Val Ile Ala Asp Pro Arg Gly Asn Thr
[0305]	225 230 235 240
[0306]	Leu Gly Arg Gly Thr Thr Ile Thr Leu Val Leu Lys Glu Glu Ala Ser
[0307]	245 250 255
[0308]	Asp Tyr Leu Glu Leu Asp Thr Ile Lys Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser
[0309]	260 265 270
[0310]	Gln Phe Ile Asn Phe Pro Ile Tyr Val Trp Ser Ser Lys Thr Glu Thr
[0311]	275 280 285
[0312]	Val Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Glu Lys Glu
[0313]	290 295 300
[0314]	Glu Ser Asp Asp Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys
[0315]	305 310 315 320
[0316]	Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met
[0317]	325 330 335
[0318]	Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu
[0319]	340 345 350
[0320]	Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp
[0321]	355 360 365
[0322]	Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys
[0323]	370 375 380
[0324]	Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu
[0325]	385 390 395 400
[0326]	Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
[0327]	405 410 415
[0328]	Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe
[0329]	420 425 430
[0330]	Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg
[0331]	435 440 445
[0332]	Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu
[0333]	450 455 460
[0334]	Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr
[0335]	465 470 475 480

[0336]	Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val		
[0337]		485	490 495
[0338]	Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe		
[0339]		500	505 510
[0340]	Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val		
[0341]		515	520 525
[0342]	Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser		
[0343]		530	535 540
[0344]	Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys		
[0345]		545	550 555 560
[0346]	Lys Gly Tyr Glu Val Ile Tyr Leu Thr Glu Pro Val Asp Glu Tyr Cys		
[0347]		565	570 575
[0348]	Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala		
[0349]		580	585 590
[0350]	Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg		
[0351]		595	600 605
[0352]	Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp		
[0353]		610	615 620
[0354]	Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu		
[0355]		625	630 635 640
[0356]	Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly		
[0357]		645	650 655
[0358]	Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp		
[0359]		660	665 670
[0360]	Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn		
[0361]		675	680 685
[0362]	Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp		
[0363]		690	695 700
[0364]	Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr		
[0365]		705	710 715 720
[0366]	Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly		
[0367]		725	730 735
[0368]	Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp		
[0369]		740	745 750
[0370]	Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu		
[0371]		755	760 765
[0372]	Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val		
[0373]		770	775 780
[0374]	Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu Lys		
[0375]		785	790 795 800
[0376]	Asp Glu Leu		
[0377]	<210> 10		

-
- [0378] <211> 9
[0379] <212> PRT
[0380] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0381] <400> 10
[0382] Gly Tyr Ala Gln Ala Asp Cys Val Leu
[0383] 1 5
[0384] <210> 11
[0385] <211> 9
[0386] <212> PRT
[0387] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0388] <400> 11
[0389] Gly Tyr Ala Gln Thr Asp Ala Val Leu
[0390] 1 5

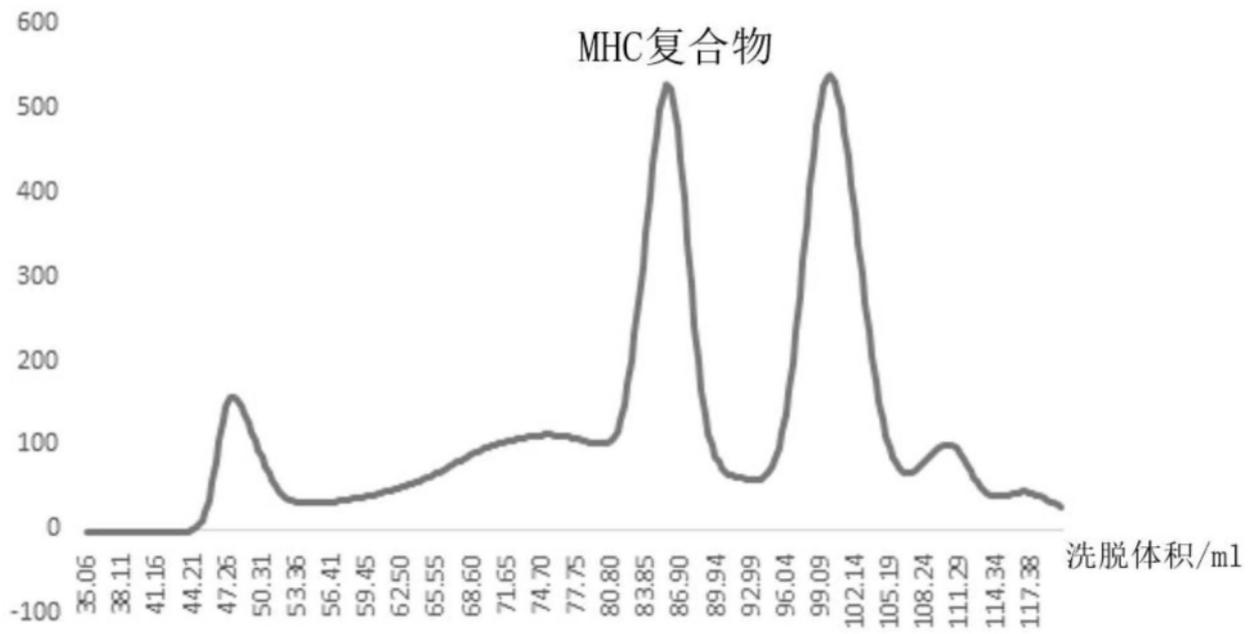


图1

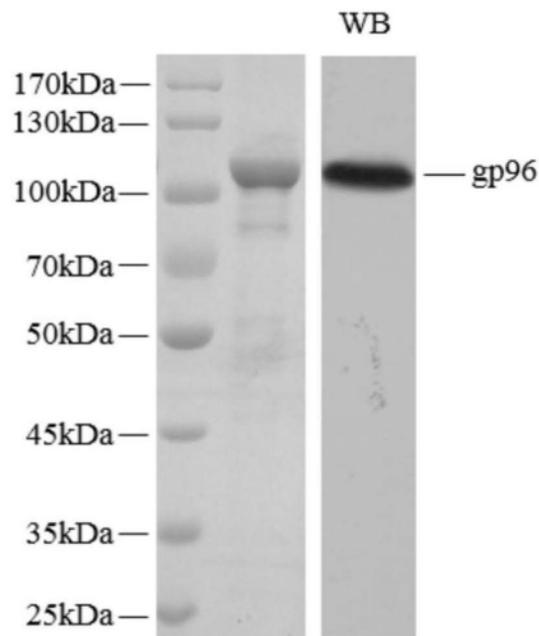


图2

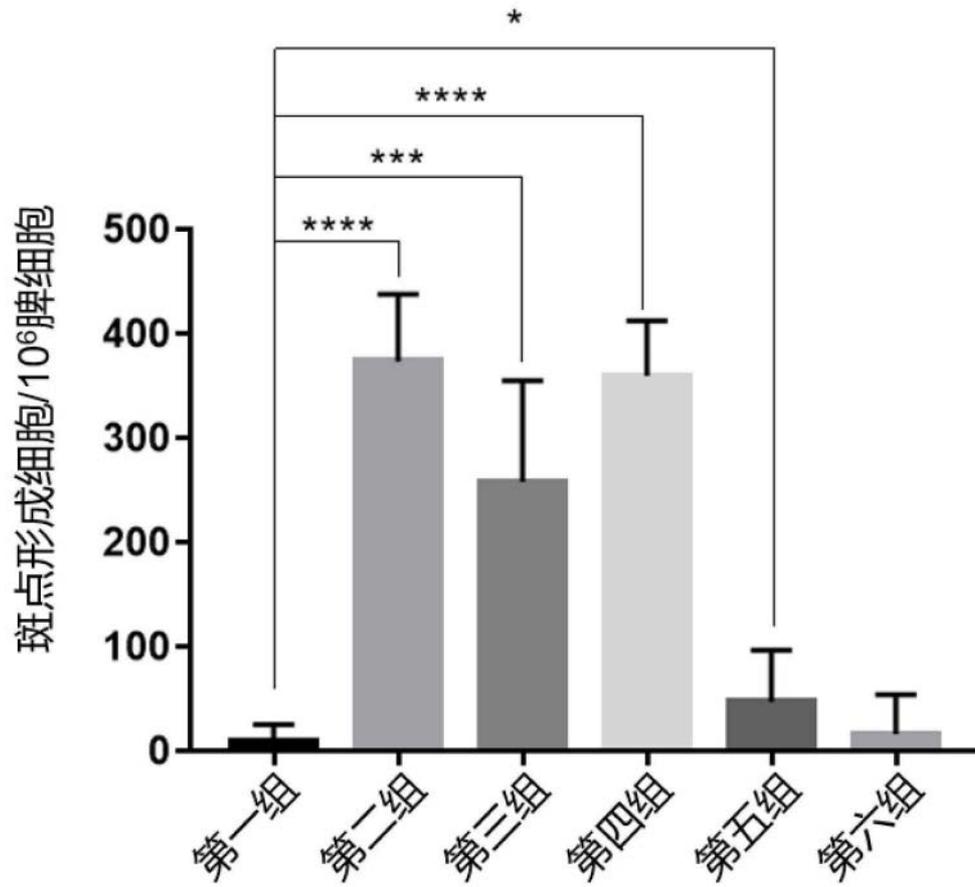


图3

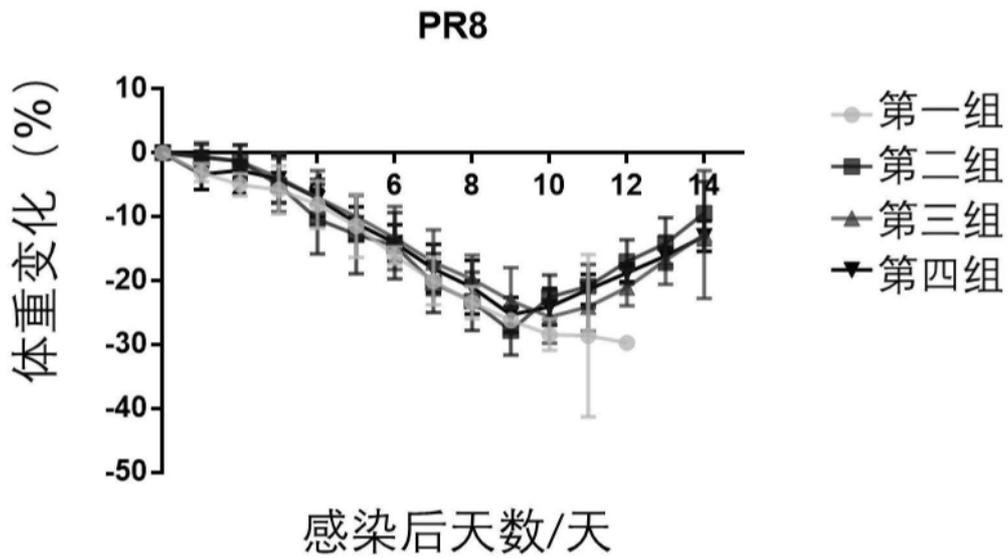


图4

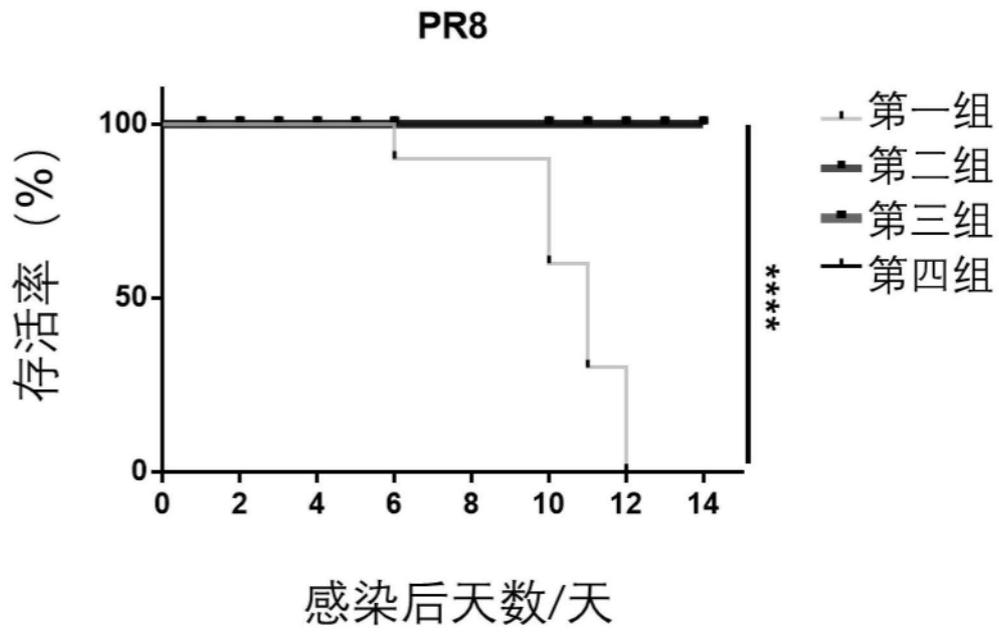


图5

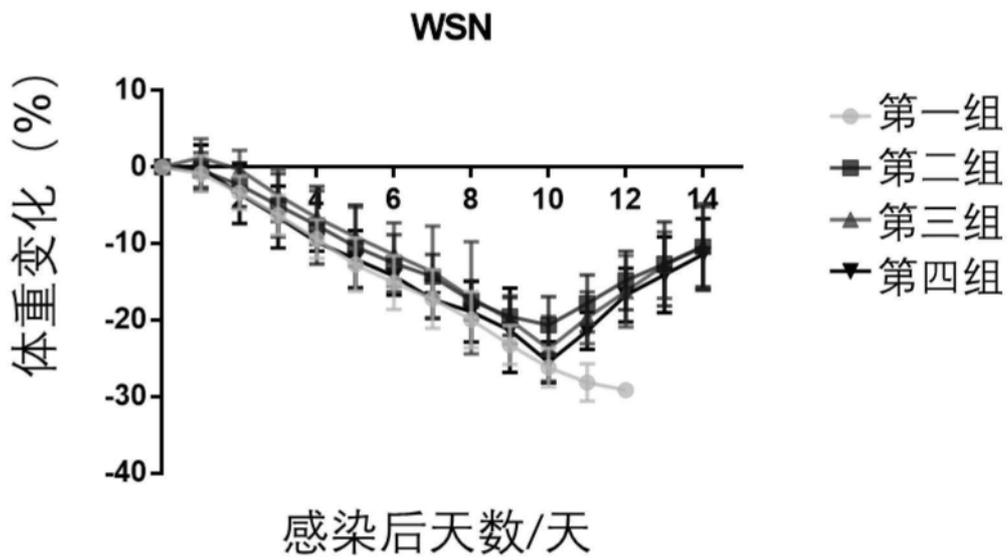


图6

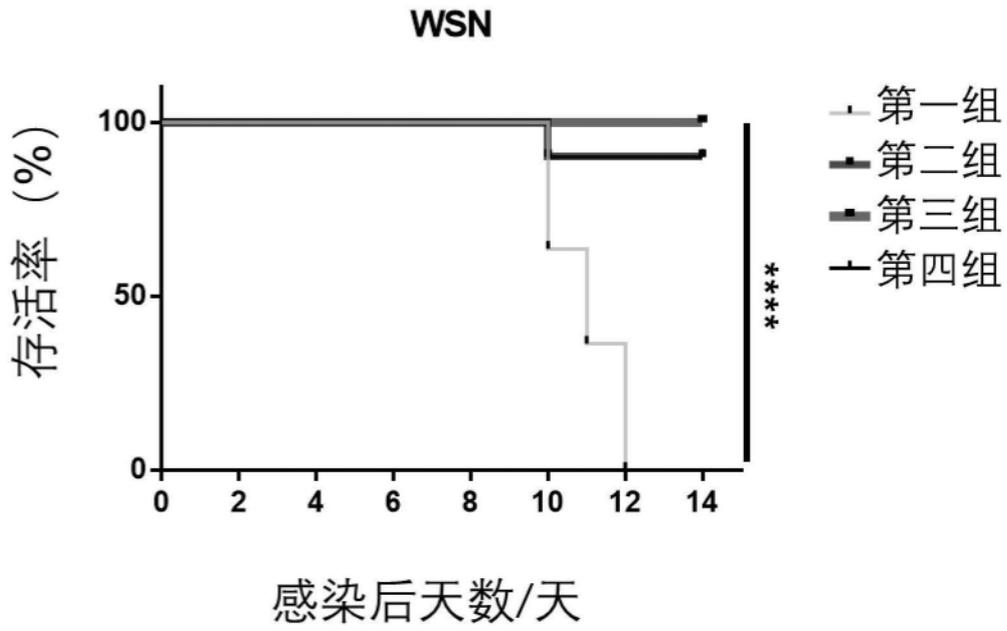


图7

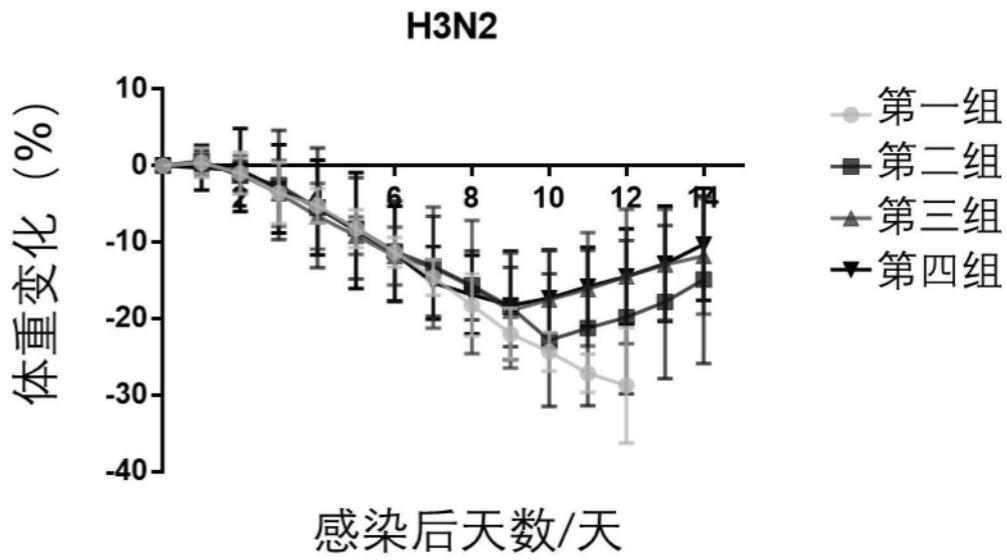


图8

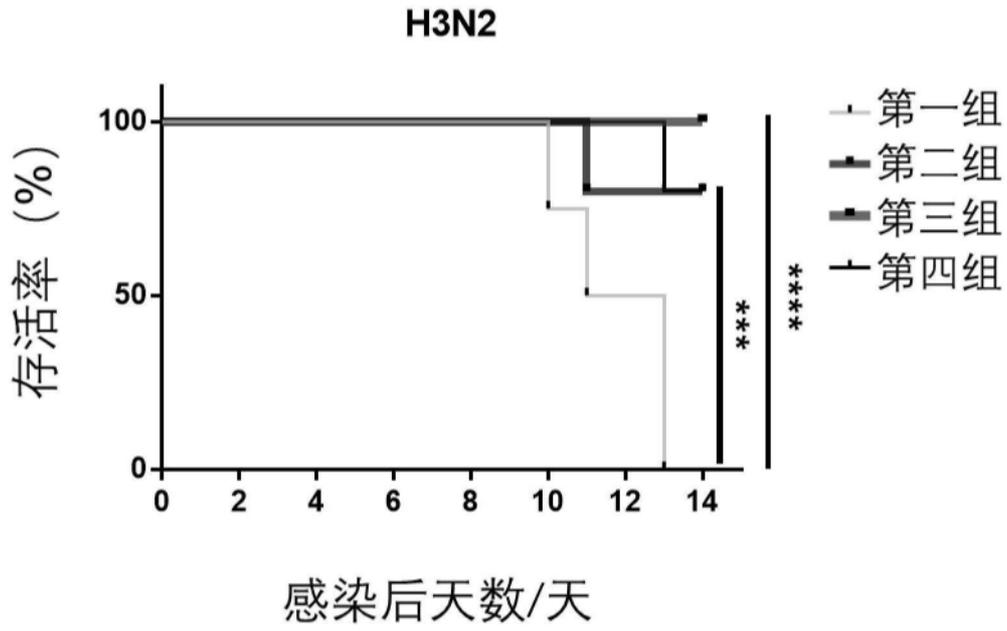


图9

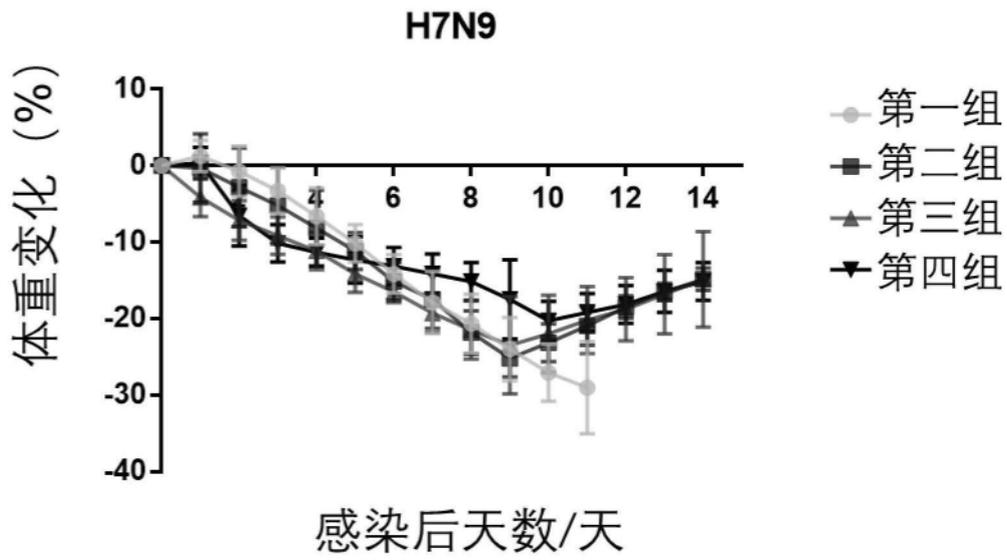


图10

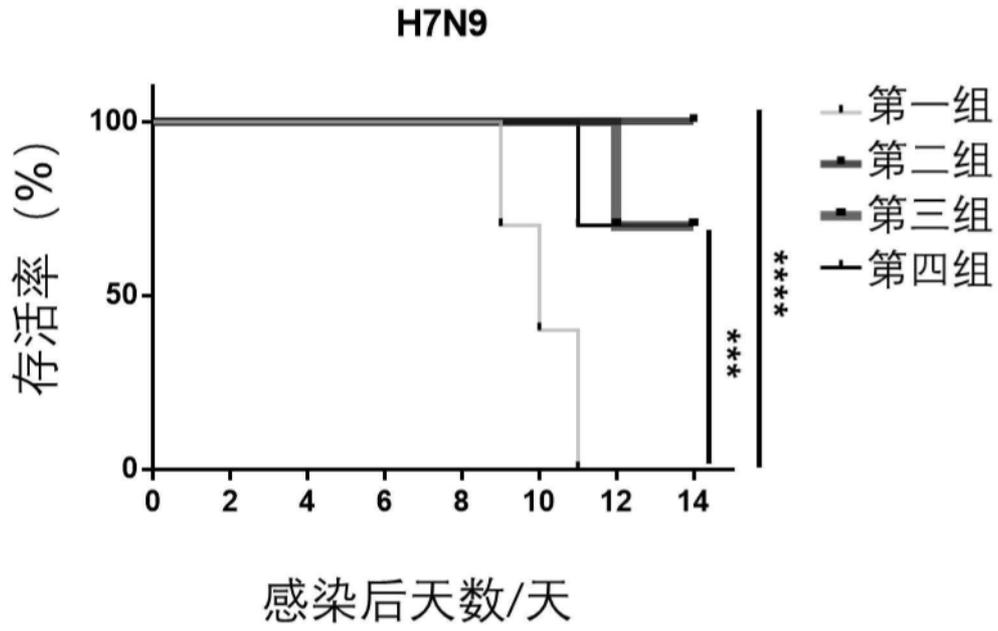


图11