



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108148863 B

(45)授权公告日 2019.12.17

(21)申请号 201611103319.2

(22)申请日 2016.12.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108148863 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(73)专利权人 上海优卡迪生物医药科技有限公
司

地址 201201 上海市浦东新区张江高科技
产业东区瑞庆路526号3幢A区305室

(72)发明人 祁伟 俞磊 康立清 余宙

(74)专利代理机构 上海市汇业律师事务所
31325

代理人 王函

(51)Int.Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

(续)

(56)对比文件

CN 105950662 A,2016.09.21,

CN 105814083 A,2016.07.27,

CN 105602992 A,2016.05.25,

YeLei Guo 等.Chimeric Antigen

Receptor-Modified T Cells for Solid

Tumors: Challenges and Prospects.《Journal
of Immunology Research》.2016,第2016卷
Article ID 3850839.

Fang Chen等.Measuring IL-6 and sIL-6R
in serum from patients treated with
tocilizumab and/or siltuximab following
CAR T cell therapy.《J Immunol Methods.》
.2016,第434卷1-8.

王蕾 等.嵌合抗原受体修饰的CAR-T/NK细
胞在多发性骨髓瘤治疗中的应用.《中国实验血
液学杂志》.2015,第23卷(第2期),

审查员 杨佳倩

权利要求书2页 说明书20页

序列表19页 附图10页

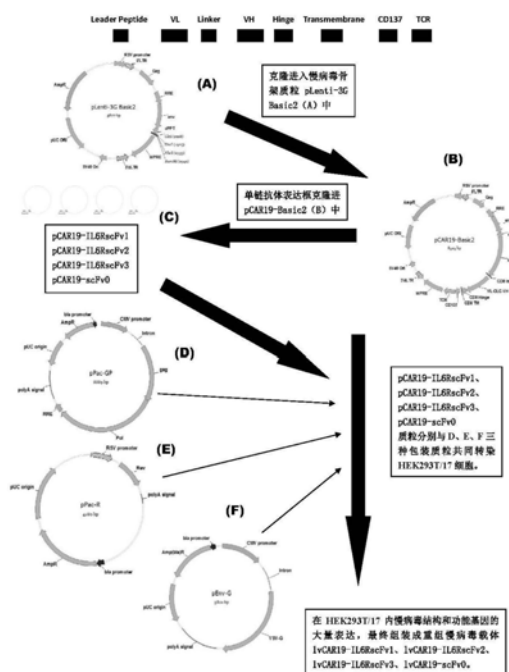
(54)发明名称

一种封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基
因载体及其构建方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种封闭IL6R的用于缓解CRS
的CAR-T转基因载体,包括:含氨苄青霉素抗性基
因AmpR序列(SEQ ID NO.1);原核复制子pUC Ori
序列(SEQ ID NO.2);病毒复制子SV40 Ori序列
(SEQ ID NO.3);eWPRE增强型土拨鼠乙肝病
毒转录后调控元件(SEQ ID NO.11);人EF1 α 启动子
(SEQ ID NO.12);用于慢病毒包装的慢病毒包
装顺式元件;人IL6R的人源化单链抗体IL6RscFv1
(SEQ ID NO.21)、IL6RscFv2(SEQ ID NO.22)、或
IL6RscFv3(SEQ ID NO.23);IRES核糖体结合序
列(SEQ ID NO.25);IL6信号肽(SEQ ID NO.26);
人源抗体Fc段(SEQ ID NO.27);以及用于组成集
识别、传递、启动于一体的二代CAR或三代CAR
的嵌合抗原受体。此外,本发明还公开了该载体

构建方法及其在制备缓解CRS的药物中的应用。



CN 108148863 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

A61P 35/00(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

1. 一种封闭IL6R的用于缓解细胞因子释放综合症的CAR-T转基因载体,其特征在于,包括:

用于目的菌株大量扩增的含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列,如SEQ ID NO.1所示;

用于质粒复制的原核复制子pUC Ori序列,如SEQ ID NO.2所示;

用于增强真核细胞内的复制的病毒复制子SV40 Ori序列,如SEQ ID NO.3所示;

用于增强转基因的表达效率的eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件,如SEQ ID NO.11所示;

用于嵌合抗原受体基因的真核转录的人EF1 α 启动子,如SEQ ID NO.12所示;

用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件;

编码人IL6R的人源化单链抗体的核苷酸序列,所述人IL6R的人源化单链抗体为如SEQ ID NO.21所示的IL6RscFv1,或者如SEQ ID NO.22所示的IL6RscFv2,或者如SEQ ID NO.23所示的IL6RscFv3;

用于共同转录表达蛋白质的IRES核糖体结合序列,如SEQ ID NO.25所示;

编码IL6信号肽的核苷酸序列,如SEQ ID NO.26所示;

编码人源抗体Fc段的核苷酸序列,如SEQ ID NO.27所示;

以及编码用于组成集识别、传递、启动于一体的二代CAR或三代CAR的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

2. 如权利要求1所述的载体,其特征在于,所述编码人IL6R的人源化单链抗体的核苷酸序列为如SEQ ID NO.21所示的IL6RscFv1。

3. 如权利要求1所述的载体,其特征在于,所述慢病毒包装顺式元件采用第二代慢病毒载体包括:如SEQ ID NO.5所示的慢病毒5 terminal LTR、如SEQ ID NO.6所示的慢病毒3 terminal Self-Inactivating LTR、如SEQ ID NO.7所示的Gag顺式元件、如SEQ ID NO.8所示的RRE顺式元件、如SEQ ID NO.9所示的env顺式元件、以及如SEQ ID NO.10所示的cPPT顺式元件。

4. 如权利要求1所述的载体,其特征在于,所述慢病毒包装顺式元件采用第三代慢病毒载体包括:如SEQ ID NO.5所示的慢病毒5 terminal LTR、如SEQ ID NO.6所示的慢病毒3 terminal Self-Inactivating LTR、如SEQ ID NO.7所示的Gag顺式元件、如SEQ ID NO.8所示的RRE顺式元件、如SEQ ID NO.9所示的env顺式元件、如SEQ ID NO.10所示的cPPT顺式元件,以及如SEQ ID NO.4所示的RSV启动子。

5. 如权利要求1所述的载体,其特征在于,所述编码用于组成集识别、传递、启动于一体的二代CAR的嵌合抗原受体的核苷酸序列包括:如SEQ ID NO.13所示的编码CD8 leader嵌合受体信号肽的核苷酸序列、如SEQ ID NO.14所示的编码CD19单链抗体轻链VL的核苷酸序列、如SEQ ID NO.15所示的Optimal Linker C、如SEQ ID NO.16所示的编码CD19单链抗体重链VH的核苷酸序列、如SEQ ID NO.17所示的编码CD8 Hinge嵌合受体铰链的核苷酸序列、如SEQ ID NO.18所示的编码CD8 Transmembrane嵌合受体跨膜区的核苷酸序列、如SEQ ID NO.19所示的编码CD137嵌合受体共刺激因子的核苷酸序列、如SEQ ID NO.20所示的编码TCR嵌合受体T细胞激活域的核苷酸序列;

所述编码用于组成集识别、传递、启动于一体的三代CAR的嵌合抗原受体的核苷酸序列包括:如SEQ ID NO.13所示的编码CD8 leader嵌合受体信号肽的核苷酸序列、如SEQ ID

NO.14所示的编码CD19单链抗体轻链VL的核苷酸序列、如SEQ ID NO.15所示的Optimal Linker C、如SEQ ID NO.16所示的编码CD19单链抗体重链VH的核苷酸序列、如SEQ ID NO.17所示的编码CD8 Hinge嵌合受体铰链的核苷酸序列、如SEQ ID NO.18所示的编码CD8 Transmembrane嵌合受体跨膜区的核苷酸序列、如SEQ ID NO.19所示的编码CD137嵌合受体共刺激因子的核苷酸序列、如SEQ ID NO.20所示的编码TCR嵌合受体T细胞激活域的核苷酸序列、以及如SEQ ID NO.28所示的编码CD28嵌合受体共刺激因子的核苷酸序列。

6. 如权利要求1-5任一项所述的载体,其特征在于,所述eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件有6个核苷酸的增强突变,为:g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T。

7. 一种如权利要求1-6任一项所述的封闭IL6R的用于缓解细胞因子释放综合症的CAR-T转基因载体的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将如SEQ ID NO.1所示的含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列、如SEQ ID NO.2所示的原核复制子pUC Ori序列、如SEQ ID NO.3所示的病毒复制子SV40 Ori序列、用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件、如SEQ ID NO.11所示的eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件存储于慢病毒骨架质粒上;

(2) 将如SEQ ID NO.12所示的人EF1 α 启动子、用于组成集识别、传递、启动于一体的二代CAR或三代CAR的嵌合抗原受体组合成二代CAR或三代CAR设计方案,经过酶切、连接、重组反应克隆至慢病毒骨架质粒中,得到二代CAR或三代CAR设计的重组慢病毒质粒;

(3) 将人IL6R的人源化单链抗体IL6RscFv1、IL6RscFv2、或IL6RscFv3, IRES核糖体结合序列、IL6信号肽以及人源抗体Fc段克隆至重组慢病毒质粒中,得到IL-6R阻断重组慢病毒质粒;

(4) 将得到的重组慢病毒质粒分别与慢病毒包装质粒pPac-GP、pPac-R以及膜蛋白质粒pEnv-G共同转染HEK293T/17细胞,在HEK293T/17细胞中进行基因转录表达后,包装成功重组慢病毒载体会释放到细胞培养上清中,收集包含的重组慢病毒载体的上清液;

(5) 将得到的重组慢病毒上清采用抽滤、吸附、洗脱的柱纯化方式进行纯化,分别得到重组慢病毒载体。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(3)中,由人EF1 α 启动子启动整个CAR基因表达;CAR蛋白定位于细胞膜表面,识别CD19抗原,刺激T细胞增殖和细胞因子分泌,激活下游信号通路的表达;靶向CD19的scfv区域与CD19抗原结合,信号通过嵌合受体传递至细胞内,从而产生T细胞增殖、细胞因子分泌增加、抗细胞凋亡蛋白分泌增加、细胞死亡延迟、裂解靶细胞一系列生物学效应;由IRES核糖体结合序列共表达IL6RscFv与Fc的融合蛋白,并在IL6信号肽的引导下分泌到细胞外,通过与IL6R的结合,阻断IL-6与IL6R的结合,从而阻断IL6的信号通路,达到抑制细胞因子释放综合症的效果。

9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,步骤(5)中,所述抽滤步骤要控制上清体积在200ml~2000ml,控制真空度在-0.5MPa~-0.9MPa,防止由于堵孔带来的载体损失;所述吸附步骤要控制溶液的pH值在6~8,防止pH的变化导致载体失活;所述洗脱步骤要控制洗脱液的离子强度在0.5M~1.0M,防止离子强度的变化导致洗脱不完全或者载体失活。

10. 如权利要求1-6任一项所述的载体在制备缓解细胞因子释放综合症的药物中的应用。

一种封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学生物领域,具体涉及一种载体,尤其涉及一种封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基因载体。此外,本发明还涉及该载体的构建方法和应用。

背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗的理论基础是免疫系统具有识别肿瘤相关抗原、调控机体攻击肿瘤细胞(高度特异性的细胞溶解)的能力。1950年代,Burnet和Thomas提出了“免疫监视”理论,认为机体中经常会出现的突变的肿瘤细胞可被免疫系统所识别而清除,为肿瘤免疫治疗奠定了理论基础[Burnet FM.Immunological aspects of malignant disease.Lancet,1967;1:1171-4]。随后,各种肿瘤免疫疗法包括细胞因子疗法、单克隆抗体疗法、过继免疫疗法、疫苗疗法等相继应用于临床。

[0003] 2013年一种更先进的肿瘤免疫疗法---CAR-T疗法成功用于临床,并表现了前所未有的临床疗效。CAR-T,全称是Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy,嵌合抗原受体T细胞免疫疗法。CAR-T疗法在临床上最领先的有诺华的CLT019,采用CLT019治疗复发难治急性淋巴细胞白血病患者,六个月的肿瘤无进展生存率达到67%,其中最长的应答时间达到两年多。总部位于中国上海的上海优卡迪生物医药科技有限公司与医院合作,共治疗复发难治急性淋巴细胞白血病患者36例,其中完全24例,缓解比例达到66.6%。这是抗癌研究的颠覆性突破。CAR-T细胞疗法可能是最有可能治愈癌症的手段之一,并被《Science》杂志评为2013年度十大科技突破之首。

[0004] CAR-T疗法虽然效果显著,但是在治疗过程中会出现一类特殊的临床综合症,临床常表现为发热,低血压,寒颤,以及出现与血清中一系列细胞因子水平显着升高有关的神经系统症状,被称为细胞因子释放综合症(Cytokine Release Syndrome,CRS)。其发生机制是由于抗原与T细胞受体结合后,激活了T细胞,T细胞被激活后释放了包括IL-6在内的一系列细胞因子,造成了一种系统性的炎症反应,IL-6信号通路如图1A所示。如果治疗不及时,会导致一系列的症包括肺部感染、凝血指标不正常、肝功能不正常、重要器官损害,甚至很引起肺水肿而导致患者死亡。

[0005] 目前临床上可通过静脉注射抗组胺类药物(如扑尔敏)或皮质类固醇(如氢化可的松)来抑制炎症反应,但是相应的,CAR-T细胞对肿瘤的杀伤作用也被抑制,使得这类患者,有较高的复发率,影响CAR-T治疗的疗效。

[0006] 还有一个比较可行的方案是使用商品化的托珠单抗(雅美罗®)来控制CRS的发生程度。托珠单抗是一种人源化的IL-6受体单克隆抗体(Tocilizumab),托珠单抗与IL-6受体发生特异性结合,阻断IL-6信号转导,从而减少急性时相反应物、降低铁调素产物、减少B细胞活化、减少骨吸收和软骨转化,以及抑制T淋巴细胞向Th17细胞的分化,从而有效控制炎症反应。但是使用托珠单抗的费用很高,一支10kg体重剂量的托珠单抗价格约为2000元RMB,成年患者一般一次要用5支,普通家庭难以承受。

[0007] 因此,如何采用低成本的方法来控制或缓解CRS的发生,并且不影响CAR-T治疗的疗效,成为了本领域的一个技术难题。

发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题之一是提供一种封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基因载体。首先,其节约了成本,省去了购买抗体药物的昂贵费用。其次,避免了scFv基因的在体递送效率低的问题。第三,通过慢病毒转导的IL6R scFv基因,能够有效利用细胞内的蛋白质翻译体系,大量表达出相应的IL6R scFv,经过体液循环,达到良好的IL6R封闭效果,不影响CAR-T治疗的疗效。

[0009] 本发明要解决的技术问题之二是提供该载体的构建方法。

[0010] 本发明要解决的技术问题之三是提供该载体的应用。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0012] 在本发明的一方面,提供一种封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基因载体,包括:

[0013] 用于目的菌株大量扩增的含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列,如SEQ ID NO.1所示;

[0014] 用于质粒复制的原核复制子pUC Ori序列,如SEQ ID NO.2所示;

[0015] 用于增强真核细胞内的复制的病毒复制子SV400ri序列,如SEQ ID NO.3所示;

[0016] 用于增强转基因的表达效率的eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件,如SEQ ID NO.11所示;

[0017] 用于嵌合抗原受体基因的真核转录的人EF1 α 启动子,如SEQ ID NO.12所示;

[0018] 用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件;

[0019] 人IL6R的人源化单链抗体,所述人IL6R的人源化单链抗体为如SEQ ID NO.21所示的IL6RscFv1,或者如SEQ ID NO.22所示的IL6RscFv2,或者如SEQ ID NO.23所示的IL6RscFv3;

[0020] 用于共同转录表达蛋白质的IRES核糖体结合序列,如SEQ ID NO.25所示;

[0021] IL6信号肽,如SEQ ID NO.26所示;

[0022] 人源抗体Fc段,如SEQ ID NO.27所示;

[0023] 以及用于组成集识别、传递、启动于一体的二代CAR或三代CAR的嵌合抗原受体。

[0024] 作为本发明优选的技术方案,所述人IL6R的人源化单链抗体为如SEQ ID NO.21所示的IL6RscFv1。

[0025] 所述慢病毒包装顺式元件可以采用第二代慢病毒载体或者第三代慢病毒载体,优选第三代慢病毒载体。所述第二代慢病毒载体包括:如SEQ ID NO.5所示的慢病毒5terminal LTR、如SEQ ID NO.6所示的慢病毒3terminal Self-Inactivating LTR、如SEQ ID NO.7所示的Gag顺式元件、如SEQ ID NO.8所示的RRE顺式元件、如SEQ ID NO.9所示的env顺式元件、如SEQ ID NO.10所示的cPPT顺式元件。所述第三代慢病毒载体包括:如SEQ ID NO.5所示的慢病毒5terminal LTR、如SEQ ID NO.6所示的慢病毒3terminal Self-Inactivating LTR、如SEQ ID NO.7所示的Gag顺式元件、如SEQ ID NO.8所示的RRE顺式元件、如SEQ ID NO.9所示的env顺式元件、如SEQ ID NO.10所示的cPPT顺式元件,以及如SEQ ID NO.4所示的RSV启动子。

[0026] 作为本发明优选的技术方案,所述用于组成集识别、传递、启动于一体的二代CAR

的嵌合抗原受体包括:如SEQ ID NO.13所示的CD8leader嵌合受体信号肽、如SEQ ID NO.14所示的CD19单链抗体轻链VL、如SEQ ID NO.15所示的Optimal Linker C、如SEQ ID NO.16所示的CD19单链抗体重链VH、如SEQ ID NO.17所示的CD8Hinge嵌合受体铰链、如SEQ ID NO.18所示的CD8Transmembrane嵌合受体跨膜区、如SEQ ID NO.19所示的CD137嵌合受体共刺激因子、如SEQ ID NO.20所示的TCR嵌合受体T细胞激活域;所述用于组成集识别、传递、启动于一体的三代CAR的嵌合抗原受体包括:如SEQ ID NO.13所示的CD8leader嵌合受体信号肽、如SEQ ID NO.14所示的CD19单链抗体轻链VL、如SEQ ID NO.15所示的Optimal Linker C、如SEQ ID NO.16所示的CD19单链抗体重链VH、如SEQ ID NO.17所示的CD8Hinge嵌合受体铰链、如SEQ ID NO.18所示的CD8Transmembrane嵌合受体跨膜区、如SEQ ID NO.19所示的CD137嵌合受体共刺激因子、如SEQ ID NO.20所示的TCR嵌合受体T细胞激活域、以及如SEQ ID NO.28所示的CD28嵌合受体共刺激因子。

[0027] 作为本发明优选的技术方案,所述eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件有6个核苷酸的增强突变,具体为:g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T。

[0028] 在本发明的第二方面,提供一种上述封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基因载体的构建方法,包括以下步骤:

[0029] (1)将如SEQ ID NO.1所示的含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列、如SEQ ID NO.2所示的原核复制子pUC Ori序列、如SEQ ID NO.3所示的病毒复制子SV40Ori序列、用于慢病毒包装的慢病毒包装顺式元件、如SEQ ID NO.11所示的eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件存储于慢病毒骨架质粒上;

[0030] (2)将如SEQ ID NO.12所示的人EF1 α 启动子、用于组成集识别、传递、启动于一体的二代CAR或三代CAR的嵌合抗原受体组合成二代CAR或三代CAR设计方案,经过酶切、连接、重组反应克隆至慢病毒骨架质粒中,得到二代CAR或三代CAR设计的重组慢病毒质粒;

[0031] (3)将人IL6R的人源化单链抗体IL6RscFv1、IL6RscFv2、或IL6RscFv3,IRES核糖体结合序列、IL6信号肽以及人源抗体Fc段分别克隆至重组慢病毒质粒中,得到IL-6R阻断重组慢病毒质粒pCAR19-IL6RscFv1、pCAR19-IL6RscFv2、或pCAR19-IL6RscFv3;

[0032] (4)将得到的重组慢病毒质粒pCAR19-IL6RscFv1、pCAR19-IL6RscFv2、或pCAR19-IL6RscFv3分别与慢病毒包装质粒pPac-GP、pPac-R以及膜蛋白质粒pEnv-G共同转染HEK293T/17细胞,在HEK293T/17细胞中进行基因转录表达后,包装成功重组慢病毒载体会释放到细胞培养上清中,收集包含的重组慢病毒载体的上清液;

[0033] (5)将得到的重组慢病毒上清采用抽滤、吸附、洗脱的柱纯化方式进行纯化,分别得到重组慢病毒载体。

[0034] 作为本发明优选的技术方案,步骤(3)中,由人EF1 α 启动子启动整个CAR基因表达;CAR蛋白定位于细胞膜表面,识别CD19抗原,刺激T细胞增殖和细胞因子分泌,激活下游信号通路的表达;当scfv区域与CD19抗原结合时,信号通过嵌合受体传递至细胞内,从而产生T细胞增殖、细胞因子分泌增加、抗细胞凋亡蛋白分泌增加、细胞死亡延迟、裂解靶细胞一系列生物学效应;由IRES核糖体结合序列共表达IL6RscFv与Fc的融合蛋白,并在IL6信号肽的引导下分泌到细胞外,通过与IL6R的结合,阻断IL-6的与IL6R的结合,从而阻断IL6的信号通路,达到抑制CRS的效果。

[0035] 作为本发明优选的技术方案,步骤(5)中,所述抽滤步骤要控制上清体积在200ml~2000ml,控制真空度在-0.5MPa~-0.9MPa,防止由于堵孔带来的载体损失;所述吸附步骤要控制溶液的PH值在6~8,防止PH的变化导致载体失活;所述洗脱步骤要控制洗脱液的离子强度在0.5M~1.0M,防止离子强度的变化导致洗脱不完全或者载体失活。

[0036] 在本发明的第三方面,提供上述载体在制备缓解CRS的药物中的应用。

[0037] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0038] 本发明是将IL6信号肽、人IL6R的单链抗体、IRES核糖体结合序列、人源抗体Fc段、人EF1 α 启动子、CD8leader嵌合受体信号肽、CD19单链抗体轻链VL、Optimal Linker C、CD19单链抗体重链VH、CD8Hinge嵌合受体铰链、CD8Transmembrane嵌合受体跨膜区、CD137嵌合受体共刺激因子、TCR嵌合受体T细胞激活域构建进入重组慢病毒载体,由人EF1 α 启动子启动整个CAR基因表达。CAR蛋白定位于细胞膜表面,识别CD19抗原,刺激T细胞增殖和细胞因子分泌,激活下游信号通路的表达。当scfv区域与CD19抗原结合时,信号通过嵌合受体传递至细胞内,从而产生T细胞增殖、细胞因子分泌增加、抗细胞凋亡蛋白分泌增加、细胞死亡延迟、裂解靶细胞等一系列生物学效应。由IRES核糖体结合序列共表达IL6RscFv与Fc的融合蛋白,并在IL6信号肽的引导下分泌到细胞外,通过与IL6R的结合,阻断IL-6的与IL6R的结合,从而阻断IL6的信号通路,达到抑制CRS的效果。

[0039] 本发明所采用的IL6R的阻断方案,可以应用于第二代或第三代CAR设计方案。第三代CAR设计与第二代设计相比,增加了CD28嵌合受体共刺激因子(SEQ ID NO.28),文献报道会有更强的信号放大作用[Eleanor J.Cheadle,et al.CAR T cells:driving the road from the laboratory to the clinic.Immunological Reviews 2014.Vol.257:91-106]。

[0040] 本发明所采用的慢病毒载体柱纯化系统(如图7所示),系本申请人开发出的慢病毒规模化生产工艺(已在2016年3月17日申请的“一种基于复制缺陷性重组慢病毒的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用”发明专利中公开)。常用的超速离心法或者高速离心法,是利用离心沉降原理分离慢病毒颗粒,不可避免的会残留很多沉降系数相近的杂质,对后续实验带来不利影响。并且,装管过程复杂、操作繁琐、多次转换容器带来更多的污染机会。而本公司开发的慢病毒载体柱纯化工艺为半自动化操作,全部过程在百级实验区域完成,避免人工操作的繁琐、失误和污染几率,所回收的慢病毒载体在内毒素、支原体、宿主DNA残留等指标上完全达到临床标准。后续可跟进开发全自动纯化仪。

[0041] 本发明所采用CAR设计方案也可以应用于第二代慢病毒载体结构上(已在2016年3月17日申请的“一种基于复制缺陷性重组慢病毒的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用”发明专利中公开)。第二代和第三代慢病毒载体在结构上的区别(如图2B所示),主要是第三代慢病毒载体把第二代载体5' LTR的U3区域替换为RSV启动子,这样就消除了U3转录时对Tat蛋白的依赖,既可以在慢病毒的结构基因里去除Tat序列,也提高了慢病毒基因组转录水平和转录持续性。第二代和第三代慢病毒载体主要是基因组转录方式的差别,因此本发明所采用CAR设计方案可以应用于这两代慢病毒载体。本发明所采用的载体骨架优选为第三代慢病毒载体(如图2A所示)(已在2016年3月17日申请的“一种基于复制缺陷性重组慢病毒的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用”发明专利中公开),3' SIN LTR去除了U3区域,消除了慢病毒载体自我复制的可能性,大大提高了安全性;增加了cPPT和WPPE元件,提高了转导效率和转基因的表达效率;采用RSV启动子保证了慢病毒载体包装时核心RNA的持续高

效转录;采用人自身的EF1 α 启动子,使CAR基因能够在人体内长时间持续表达。

[0042] 由本申请人开发的第三代慢病毒骨架质粒(已在2016年3月17日申请的“一种基于复制缺陷性重组慢病毒的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用”发明专利中公开),采用enhancedWPRE元件,与宾州大学Carl H. June等人(Porter DL,Levine BL,Kalos M,Bagg A,June CH.Chimeric antigen receptormodified T cells in chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med 2011;365:725-33.)所采用的WPRE元件相比,有6个核苷酸的增强突变(g.396G>A、g.397C>T、g.398T>C、g.399G>A、g.400A>T、g.411A>T),能够增强初级转录产物的多聚腺苷化,增加细胞内mRNA的含量,增强转基因的表达效率。

[0043] 本申请采用的Lentival包装系统是无辅助病毒的四质粒包装系统(已在2016年3月17日申请的“一种基于复制缺陷性重组慢病毒的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用”发明专利中公开),通过四种质粒共同转染至HEK293T/17细胞中,产生重组慢病毒载体。重组后的慢病毒载体是复制缺陷型载体,能将外源片段整合入宿主基因,一次性使用,无法复制和增殖,安全性有很大提高。

[0044] 本发明所采用的是针对IL-6R的单链抗体封闭技术,单链抗体(single chain antibody fragment,scFv),是由抗体重链可变区和轻链可变区通过15~20个氨基酸的短肽(linker)连接而成。scFv能较好地保留其对抗原的亲合活性,并具有分子量小、穿透力强和抗原性弱等特点。本发明所采用的人IL6R阻断单链抗体设计,能够有效在T细胞中过表达并分泌至胞外,能够有效阻断IL-6与IL6R结合,阻断IL6信号通路的激活,在T细胞杀伤实验中,经过QPCR检测,能有效抑制PBMC中C-reactive protein的mRNA的转录水平,降低细胞培养上清中的C-reactive protein蛋白含量,经IL-6R阻断效果评估实验证明,本发明载体可以在体内抑制IL-6信号通路,减轻并缓解CRS的症状。

[0045] 本发明中采用的scFv片段和抗体Fc段,均经过人源化改造,能有效减少体内人抗鼠抗体(Human anti-mouse antibodies,HAMA)的产生,提高scFv的半衰期和作用效果。

[0046] 本发明采用的scfv段的Linker设计(已在2016年3月17日申请的“一种基于复制缺陷性重组慢病毒的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用”发明专利中公开),能够显著提高细胞因子的分泌、CAR-T细胞的体外杀伤作用以及临床治疗效果。

[0047] 本发明采用IL6R scFv的作用方式(如图1B所示)。首先,节约了成本,省去了购买抗体药物的昂贵费用。其次,避免了scFv基因的在体递送效率低的问题。第三,通过慢病毒转导的IL6R scFv基因,能够有效利用细胞内的蛋白质翻译体系,大量表达出相应的IL6R scFv,经过体液循环,达到良好的IL6R封闭效果。本发明筛选了一系列IL6R抗体的基因序列、氨基酸序列等生物信息学方面的信息,预测了IL6R scFv的重链及轻链的可变区,分析了IL6R scFv组合的二级结构及其物理化学性质,通过可溶性表达和间接ELISA法测定了IL6R scFv的亲合力常数,从中优选出3条scFv进行细胞功能水平的检测,最终确定了IL6RscFv1作为最佳选择,未来可进入临床研究阶段。本发明的重组慢病毒载体骨架可以搭载不同的治疗性基因并广泛地用于过继性细胞治疗领域,搭载IL6R scFv基因用于封闭IL6R。本发明的重组慢病毒载体可以实现人在T淋巴细胞上表达CD19嵌合抗原受体,引导并激活T淋巴细胞对CD19阳性细胞的杀伤作用,在临床上用于治疗B淋巴细胞白血病、B淋巴瘤和多发性骨髓瘤。在人T淋巴细胞内表达白介素-6受体(IL-6R)的scFv,有效封闭IL6R,阻断IL-6信号通路,临床上可用于缓解细胞因子释放综合症CRS。可见,本发明采用低成本的方法

法来控制或缓解CRS的发生,并且不影响CAR-T治疗的疗效,解决了本领域的技术难题,且达到了预料不到的技术效果。

[0048] 本发明所述的IL-6R单链抗体表达框及其基因表达产物,不仅可以应用于CAR19-T(CD19-CAR-T)治疗急性B淋巴细胞白血病(ALL)中用于消除或减轻CRS的症状,还可应用于缓解CAR-T治疗诸如胰腺癌、脑胶质瘤、骨髓瘤等等所有类型肿瘤时引起的CRS症状,甚至还可以应用于缓解其他类型的治疗引起的CRS。

附图说明

[0049] 图1A是本发明的IL-6信号通路示意图。

[0050] 图1B是本发明的IL6R scFv的作用方式示意图;

[0051] 图2是本发明的慢病毒载体结构示意图;其中图2A是本发明采用的第三代慢病毒载体结构示意图,图2B是第二代和第三代慢病毒载体结构比较示意图;

[0052] 图3为本发明实施例1中构建本发明所述的重组慢病毒载体的构建流程图。其中,(A)图是慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2的结构示意图;(B)图是pCAR19-Basic2质粒的结构示意图;(C)图是pCAR19-IL6RscFv1、pCAR19-IL6RscFv2、pCAR19-IL6RscFv3、pCAR19-scFv0质粒的示意图;(D)图是慢病毒包装质粒pPac-GP的结构示意图;(E)图是慢病毒包装质粒pPac-R的结构示意图;(F)图是膜蛋白pEnv-G的结构示意图;

[0053] 图4是本发明实施例1中慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2的酶切预测及酶切琼脂糖凝胶电泳图;图4A是慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2的酶切预测示意图,其中,lane 1是pLenti-3G Basic2的Cla I+BamH I酶切预测,条带从上到下依次为:5854bp;lane 2是1kb DNA ladder Marker预测,条带从上到下依次为:10kb、8kb、6kb、5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp;图4B是慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2的酶切琼脂糖凝胶电泳图,其中,lane 1是pLenti-3G Basic2的Cla I+BamH I酶切电泳结果;lane 2是1kb DNA ladder Marker的电泳结果;

[0054] 图5是本发明实施例1中重组慢病毒质粒pCAR19-Basic2的酶切预测及酶切琼脂糖凝胶电泳图;图5A是重组慢病毒质粒pCAR19-Basic2的酶切预测图,其中,lane 1是1kb DNA ladder Marker,条带从上到下依次为:10kb、8kb、6kb、5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp;lane 2是pCAR19-Basic2的Nde I+Hpa I酶切预测,条带从上到下依次为:6511bp、2014bp;图5B是重组慢病毒质粒pCAR19-Basic2的酶切琼脂糖凝胶电泳图,其中,lane1是1kb DNA ladder Marker的电泳结果;lane2是pCAR19-Basic2的Nde I+Hpa I酶切电泳结果;

[0055] 图6是本发明实施例1中重组慢病毒质粒pCAR19-IL6RscFv1、pCAR19-IL6RscFv2和pCAR19-IL6RscFv3的酶切预测及酶切琼脂糖凝胶电泳图;图6A是pCAR19-IL6RscFv1的酶切预测图,其中,lane1是1kb DNA ladder Marker,条带从上到下依次为:10kb、8kb、6kb、5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp;lane2是pCAR19-IL6RscFv1的ApaL I酶切预测,条带从上到下依次为:4230bp、2137bp、1726bp、1246bp、1054bp、497bp;图6B是pCAR19-IL6RscFv1的酶切琼脂糖凝胶电泳图,其中,lane1是1kb DNA ladder Marker的电泳结果,lane2是pCAR19-IL6RscFv1的ApaL I酶切电泳结果;图6C是pCAR19-IL6RscFv2的酶切预测图,其中,lane1是1kb DNA ladder Marker,条带从上到下依次为:10kb、8kb、

6kb、5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp；lane2是pCAR19-IL6RscFv2的Kpn I酶切预测，条带从上到下依次为：8335bp、2555bp；图6D是pCAR19-IL6RscFv2的酶切琼脂糖凝胶电泳图，其中lane1是1kb DNA ladder Marker的电泳结果；lane2是pCAR19-IL6RscFv2的Kpn I酶切电泳结果；图6E是pCAR19-IL6RscFv3的酶切预测图，其中，lane1是1kb DNA ladder Marker，条带从上到下依次为：10kb、8kb、6kb、5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp；lane2是pCAR19-IL6RscFv3的Pvu II酶切预测：条带从上到下依次为：7703bp、2364bp、823bp；图6F是pCAR19-IL6RscFv3的酶切琼脂糖凝胶电泳图，其中lane1是1kb DNA ladder Marker的电泳结果，lane2是pCAR19-IL6RscFv3的Pvu II酶切电泳结果；图6G是pCAR19-scFv0的酶切预测图，其中，lane1是1kb DNA ladder Marker，条带从上到下依次为：10kb、8kb、6kb、5kb、4kb、3.5kb、3kb、2.5kb、2kb、1.5kb、1kb、750bp、500bp、250bp；lane2是pCAR19-scFv0的Sac II酶切预测，条带从上到下依次为：5577bp、3835bp、895bp、347bp；图6H是pCAR19-scFv0的酶切琼脂糖凝胶电泳图，其中，lane1是1kb DNA ladder Marker的电泳结果，lane2是pCAR19-scFv0的Sac II酶切电泳结果。

[0056] 图7是本发明实施例2中离子交换色谱法纯化重组慢病毒载体的流程图；

[0057] 图8是本发明实施例2中重组慢病毒载体的滴度检测结果示意图；

[0058] 图9是本发明实施例2中重组慢病毒载体的不同纯化方式的支原体检测结果示意图，其中，lane1为DL2000marker，从上到下条带条带从上到下依次为：2kb、1kb、750bp、500bp、250bp、100bp；lane2为阳性对照；lane3为阴性对照；lane4为PBS；lane5为水；lane6为lvCAR19-IL6RscFv1；lane7为lvCAR19-IL6RscFv2；lane8为lvCAR19-IL6RscFv3；lane9为lvCAR19-scFv0；

[0059] 图10是本发明实施例3中mRNA相对表达量的柱状图；其中，图10A是RT-QPCR结果示意图，表明CAR基因在PBMC细胞内高效转录；图10B是RT-QPCR结果示意图，表明scFv基因在PBMC细胞内高效转录；

[0060] 图11是本发明实施例3中CAR蛋白表达量的WB检测图，结果表明CAR蛋白在PBMC细胞内高效表达，图11A中，M为蛋白Marker，lane1为PBMC空细胞，lane2为对照病毒MOCK，lane3为lvCAR19-IL6RscFv1，lane4为lvCAR19-IL6RscFv2，lane5为lvCAR19-IL6RscFv3，lane6为lvCAR19-scFv0；图11B是beta-actin内参条带；

[0061] 图12是本发明实施例3中scFv蛋白表达量的ELISA检测结果图，结果表明scFv蛋白在PBMC细胞中高效表达；

[0062] 图13是本发明实施例3中重组慢病毒载体转导的PBMC，在不同效靶比条件下共培养，24h后检测对靶细胞的杀伤情况示意图；

[0063] 图14是本发明实施例3中不同效应细胞分别与靶细胞共培养条件下，12h mRNA转录水平的变化情况示意图；

[0064] 图15是本发明实施例3中不同组上清培养12h后，PBMC中CRP mRNA转录水平的变化情况示意图。

具体实施方式

[0065] 下面结合具体实施例进一步阐述此发明。应理解的是，在此描述的特定实施方式

通过举例的方式来表示,并不作为对本发明的限制。在不偏离本发明范围的情况下,本发明的主要特征可以用于各种实施方式。实施例1构建重组慢病毒载体

[0066] 一、材料

[0067] 1、慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2,慢病毒包装质粒pPac-GP、pPac-R以及膜蛋白质粒pEnv-G,HEK293T/17细胞、同源重组酶由世翱(上海)生物医药科技有限公司提供;

[0068] 2、引物:根据引物设计原则设计扩增DNA片段和靶位点所需的引物,该引物由上海生物公司合成,具体为:

[0069] EF1 α -F:5' -ATTCAAATTTTATCGATGCTCCGGTGCCCGTCAGT-3' (SEQ ID NO.29)

[0070] EF1 α -R:5' -TCACGACACCTGAAATGGAAGA-3' (SEQ ID NO.30)

[0071] CD8 leader-F:5' -GGTGTCTGTGAGGATCCGCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3'

[0072] (SEQ ID NO.31)

[0073] CD8 leader-R:5' -GTGTCATCTGGATGTCCGGCCTGGCGGCGTG-3' (SEQ ID NO.32)

[0074] VL-F:5' -CACGCCGCCAGGCCGACATCCAGATGACACAGACTACATC-3' (SEQ ID NO.33)

[0075] VL-R:5' -TGTGATCTCCAGCTTGGTCC-3' (SEQ ID NO.34)

[0076] OLC-VH-F:5' -CAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCG

[0077] GGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCA-3' (SEQ ID NO.35)

[0078] VH-R:5' -TGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3' (SEQ ID NO.36)

[0079] CD8 Hinge-F:5' -AGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCC-3' (SEQ ID NO.37)

[0080] CD8 Hinge-R:5' -GTAGATATCACAGGCGAAGTCCA-3' (SEQ ID NO.38)

[0081] CD8 Transmembrane-F:5' -CGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC-3' (SEQ ID NO.39)

[0082] CD8 Transmembrane-R:5' -TCTTTCTGCCCGTTTGCAGTAAAGGGTGATAACCAGTG-3' (SEQ ID NO.40)

[0083] CD137-F:5' -AAACGGGGCAGAAAGAAACTC-3' (SEQ ID NO.41)

[0084] CD137-R:5' -TGCTGAACTTCACTCTCAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTC-3' (SEQ ID NO.42)

[0085] TCR-F:5' -AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG-3' (SEQ ID NO.43)

[0086] TCR-R:5' -GGAGAGGGGCGTCTGACTTAGCGAGGGGGCAGGGC-3' (SEQ ID NO.44)

[0087] IRES-F:5' -GCCCTGCCCCCTCGCTAAGCCCCCTCCTCCCTCCC-3' (SEQ ID NO.45)

[0088] IRES-R:5' -CCAGGGAGAAGGCAACTGGACCGAAGGCGCTTGTGGAGAAGGAGTTC

[0089] ATGGTGGCATTATCATCGTGTGTTTTTCAAAGGA-3' (SEQ ID NO.46)

[0090] IL6Rs1-F:5' -GTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTGCTGCTGCCTTCCCTG

[0091] CCCCAGACATCCAGATGACCCAGAG-3' (SEQ ID NO.47)

[0092] IL6Rs1-R:5' -GCAGCTTTTCGGTTCTGAGGAGACTGTGACGAGGCT-3' (SEQ ID NO.48)

[0093] IL6Rs2-F:5' -GTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTGCTGCTGCCTTCCCTG

[0094] CCCCAGAAATTGTGATGACCCAGAG-3' (SEQ ID NO.49)

[0095] IL6Rs2-R:5' -GCAGCTTTTCGGTTCTGCTCACGGTCACGGTGGT-3' (SEQ ID NO.50)

[0096] IL6Rs3-F:5' -GTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTGCTGCTGCCTTCCCTG

[0097] CCCCAGATATTCAGATGACCCAGAG-3' (SEQ ID NO.51)

[0098] IL6Rs3-R:5' -GCAGCTTTTCGGTTCTGCTCACGGTCACGGTGGT-3' (SEQ ID NO.52)

- [0099] s0-F:5' -GTTGCCTTCTCCCTGGGGCTGCTCCTGGTGTTCCTGCTGCCTTCCCTG
- [0100] CCCCATTGTTCTGGATTCTGCTTCCA-3' (SEQ ID NO.53)
- [0101] s0-R:5' -GCAGCTTTTCGGTTCTGCAGAGACAGAGACCAGAGT-3' (SEQ ID NO.54)
- [0102] Fc-F:5' -GAACCGAAAAGCTGCGATAAAAC-3' (SEQ ID NO.55)
- [0103] Fc-R:5' -CTAGCAATCTAGAGGTTATTTGCCCGGGCTCAGGCTCA-3' (SEQ ID NO.56)
- [0104] WPRE-QPCR-F:5' -CCTTTCCGGGACTTTTCGCTTT-3' (SEQ ID NO.57)
- [0105] WPRE-QPCR-R:5' -GCAGAATCCAGGTGGCAACA-3' (SEQ ID NO.58)
- [0106] Actin-QPCR-F:5' -CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' (SEQ ID NO.59)
- [0107] Actin-QPCR-R:5' -CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3' (SEQ ID NO.60)
- [0108] CAR-QPCR-F:5' -GACTTGTGGGGTCCTTCTCCT-3' (SEQ ID NO.61)
- [0109] CAR-QPCR-R:5' -GCAGCTACAGCCATCTTCCTC-3' (SEQ ID NO.62)
- [0110] IL6-QPCR-F:5' -GGATTCAATGAGGAGACTT-3' (SEQ ID NO.63)
- [0111] IL6-QPCR-R:5' -ATCTGTTCTGGAGGTACT-3' (SEQ ID NO.64)
- [0112] CRP-QPCR-F:5' -GACATTGGAAATGTGAACATGT-3' (SEQ ID NO.65)
- [0113] CRP-QPCR-R:5' -CACAGCTGGGGTTTGGTGA-3' (SEQ ID NO.66)
- [0114] Fc-QPCR-F:5' -GACATTGGAAATGTGAACATGT-3' (SEQ ID NO.67)
- [0115] Fc-QPCR-R:5' -CACAGCTGGGGTTTGGTGA-3' (SEQ ID NO.68)
- [0116] 3、SEQ ID NO.12~SEQ ID NO.68所示的DNA序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成,并以寡核苷酸干粉或者质粒形式保存;
- [0117] 4、工具酶Nde I、Hpa I、Pvu II、Sac II、ApaI I、BamH I、Kpn I、Cla I、T4DNA连接酶均购自NEB公司;
- [0118] 5、高保真酶PrimeSTAR、RN购自Takara公司;
- [0119] 6、0.22μm-0.8μm PES滤器购自millipore公司;
- [0120] 7、质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自MN公司;
- [0121] 8、感受态细胞TOP10购自tiangen公司;
- [0122] 9、NaCl、KCl、Na₂HPO₄·12H₂O、KH₂PO₄、Trypsin、EDTA、CaCl₂、NaOH、PEG6000均购自上海生工;
- [0123] 10、Opti-MEM、FBS、DMEM、1640、Pen-Srep、Hepes、购自invitrogen公司;
- [0124] 11、Biotinylated protein L、proteinG-HRP购自GeneScript公司;
- [0125] 12、辣根过氧化物酶标记的二抗、DAB工作液均购自北京中杉金桥;
- [0126] 13、ECL+plusTM Western blotting system购自Amersham公司;
- [0127] 14、DNeasy试剂盒购自上海捷瑞公司;
- [0128] 15、淋巴细胞分离液购自深圳达科为公司;
- [0129] 16、phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin购自BD Bioscience公司;
- [0130] 17、SA-HRP、TMB底物溶液、ELISA反应终止液购自上海翊圣公司;
- [0131] 18、支原体检测试剂盒、内毒素检测试剂盒、CD19⁺K562细胞购自世翱(上海)公司;
- [0132] 19、LDH检测试剂盒购自promega公司;
- [0133] 二、重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0的构建方法。

[0134] 参见图3,本发明所述重组慢病毒载体的构建方法如下:

[0135] 1、将人EF1 α 启动子、CD8leader嵌合受体信号肽、CD19单链抗体轻链VL、Optimal Linker C、CD19单链抗体重链VH、CD8Hinge嵌合受体铰链、CD8Transmembrane嵌合受体跨膜区、CD137嵌合受体共刺激因子、TCR嵌合受体T细胞激活域片段克隆至慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2,得到重组慢病毒质粒pCAR19-Basic2,再将scFv片段与Fc片段分别连接到pCAR19-Basic2中,得到IL-6R阻断重组慢病毒质粒pCAR19-IL6RscFv1、pCAR19-IL6RscFv2、pCAR19-IL6RscFv3以及对照pCAR19-scFv0。

[0136] (1) 将慢病毒骨架质粒pLenti-3G Basic2使用Cla I和BamH I限制性内切酶进行双酶切,产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认5854bp的片段V1(如图4所示),并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0137]	1、溶胶	按 200 μ l NTI/100 mg gel 比例加入溶胶液, 50 $^{\circ}$ C水浴放置 5-10 分钟。
	2、结合 DNA	11000g 离心 30 秒, 弃去滤液。
	3、洗膜	加入 700 μ l NT3, 11000g 离心 30 秒, 弃去滤液。
	4、洗膜	重复第三步一次
	5、晾干	11000g 离心 1 分钟, 换新的收集管, 室温放置 1 分钟。
	6、洗脱 DNA	加入 15-30 μ l NE, 室温放置 1 分钟, 11000g 离心 1 分钟, 收集滤液。

[0138] 表1琼脂糖凝胶回收步骤

[0139] (2) 用引物EF1 α -F和EF1 α -R以合成的SEQ ID NO.12为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98 $^{\circ}$ C3min, (98 $^{\circ}$ C10sec, 55 $^{\circ}$ C15sec, 72 $^{\circ}$ C2min)*35cycle, 72 $^{\circ}$ C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认1208bp的片段a,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0140]	试剂	体积(μ l)
	H ₂ O	32.5
	5 \times Buffer (with Mg ²⁺)	10
	dNTP (各2.5mM)	4
	Primer1 (+) (10 μ M)	1
	Primer2 (-) (10 μ M)	1
	Template	1
	PrimeSTAR	0.5

[0141] 表2 50 μ l PCR反应体系

[0142] (3) 用引物CD8leader-F和CD8leader-R以合成的SEQ ID NO.13为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98 $^{\circ}$ C3min, (98 $^{\circ}$ C10sec, 55 $^{\circ}$ C15sec, 72 $^{\circ}$ C30sec)*35cycle, 72 $^{\circ}$ C5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认101bp的片段b,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0143] (4) 用引物VL-F和VL-R以合成的SEQ ID NO.14为模板,使用表2中的体系,PCR循环

条件为:98℃3min,(98℃10sec,55℃15sec,72℃30sec)*35cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认336bp的片段c,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0144] (5)用引物OLC-VH-F和VH-R以合成的SEQ ID NO.16为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98℃3min,(98℃10sec,55℃15sec,72℃30sec)*35cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认421bp的片段d,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0145] (6)用引物CD8Hinge-F和CD8Hinge-R以合成的SEQ ID NO.17为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98℃3min,(98℃10sec,55℃15sec,72℃30sec)*35cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认147bp的片段e,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0146] (7)用引物CD8Transmembrane-F和CD8Transmembrane-R以合成的SEQ ID NO.18为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98℃3min,(98℃10sec,55℃15sec,72℃30sec)*35cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认100bp的片段f,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0147] (8)用引物CD137-F和CD137-R以合成的SEQ ID NO.19为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98℃3min,(98℃10sec,55℃15sec,72℃30sec)*35cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认142bp的片段g,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0148] (9)用引物TCR-F和TCR-R以合成的SEQ ID NO.20为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98℃3min,(98℃10sec,55℃15sec,72℃30sec)*35cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认355bp的片段h,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0149] (10)将DNA片段b、c、d各1μl作为模板,使用表3中的体系,除引物外加入Eppendorf管内,PCR循环条件为:98℃3min,(98℃10sec,60℃10sec,72℃30sec)*6cycle,加入引物CD8leader-F/VH-R,(98℃10sec,60℃10sec,72℃40sec)*24cycle,72℃5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认814bp的片段i,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

试剂	体积(μl)
H ₂ O	33.5-1*模板数
5×Buffer(with Mg ²⁺)	10
dNTP(各2.5mM)	4
Primer1(+)(10μM)	1
Primer2(-)(10μM)	1
Template	1*模板数
PrimeSTAR	0.5

[0151] 表3 50μl重叠PCR反应体系

[0152] (11)将DNA片段e、f、g、h各1μl作为模板,使用表3中的体系,除引物外加入

Eppendorf管内,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,60°C10sec,72°C30sec)*6cycle,加入引物CD8Hinge-F/TCR-R,(98°C10sec,60°C10sec,72°C30sec)*24cycle,72°C5min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认704bp的片段j,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0153] (12) 将DNA片段V1、a、i、j以5μl总体积且摩尔比1:1:1:1的比例加入Eppendorf管内,加入同源重组酶反应液15μl,混匀后在42°C孵育30分钟,转移至冰上放置2-3分钟,将反应液加入50μl TOP10中,轻轻旋转以混匀内容物,在冰中放置30分钟,将管放到预加温到42°C的恒温水浴锅中热激90秒,快速将管转移到冰浴中,使细胞冷却2-3分钟,每管加900μl LB培养液,然后将管转移到37°C摇床上,温育1小时使细菌复苏,取100μl的转化菌液涂布于Amp LB琼脂平板上,倒置平皿,于恒温培养箱中37°C培养,16小时。

[0154] 挑取克隆进行菌落PCR鉴定,鉴定正确的克隆即为重组慢病毒质粒pCAR19-Basic2,对正确的克隆进行酶切鉴定(见图5);

[0155] (13) 将重组慢病毒质粒pCAR19-Basic2使用Sal I和Nhe I限制性内切酶进行双酶切,产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认8491bp的片段V2,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0156] (14) 用引物IRES-F和IRES-R以合成的SEQ ID NO.25为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,55°C15sec,72°C2min)*35cycle,72°C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认605bp的片段k,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0157] (15) 用引物IL6Rs1-F和IL6Rs1-R以合成的SEQ ID NO.21为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,55°C15sec,72°C2min)*35cycle,72°C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认754bp的片段l,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0158] (16) 用引物IL6Rs2-F和IL6Rs2-R以合成的SEQ ID NO.22为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,55°C15sec,72°C2min)*35cycle,72°C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认777bp的片段m,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0159] (17) 用引物IL6Rs3-F和IL6Rs3-R以合成的SEQ ID NO.23为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,55°C15sec,72°C2min)*35cycle,72°C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认774bp的片段n,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0160] (18) 用引物s0-F和s0-R以合成的SEQ ID NO.24为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,55°C15sec,72°C2min)*35cycle,72°C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认729bp的片段o,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0161] (19) 用引物Fc-F和Fc-R以合成的SEQ ID NO.27为模板,使用表2中的体系,PCR循环条件为:98°C3min,(98°C10sec,55°C15sec,72°C2min)*35cycle,72°C10min。产物经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳,确认726bp的片段p,并割胶回收置于Eppendorf管内,用MN公司的

琼脂糖凝胶回收试剂盒回收相应的片段(见表1),并测定产物的纯度和浓度;

[0162] (20) 将DNA片段(V2、k、l、p)、(V2、k、m、p)、(V2、k、n、p)、(V2、k、o、p)分别以5 μ l总体积且摩尔比1:1:1:1的比例加入Eppendorf管内,加入同源重组酶反应液15 μ l,混匀后在42 $^{\circ}$ C孵育30分钟,转移至冰上放置2-3分钟,将反应液加入50 μ l TOP10中,轻轻旋转以混匀内容物,在冰中放置30分钟,将管放到预加温到42 $^{\circ}$ C的恒温水浴锅中热激90秒,快速将管转移到冰浴中,使细胞冷却2-3分钟,每管加900 μ l LB培养液,然后将管转移到37 $^{\circ}$ C摇床上,温育1小时使细菌复苏,取100 μ l的转化菌液涂布于Amp LB琼脂平板上,倒置平皿,于恒温培养箱中37 $^{\circ}$ C培养,16小时。挑取克隆进行菌落PCR鉴定,鉴定正确的克隆即为重组慢病毒质粒pCAR19-IL6RscFv1、pCAR19-IL6RscFv2、pCAR19-IL6RscFv3以及对照pCAR19-scFv0,对正确的克隆进行酶切鉴定(见图6);

[0163] 2、重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0的包装。

[0164] (1) 完全培养基:取出预热好的新鲜培养基,加入10%FBS+5ml Pen-Srep,上下颠倒混匀即可;

[0165] (2) 1XPBS溶液:称量NaCl 8g,KCl 0.2,Na₂HPO₄·12H₂O 3.58g,KH₂PO₄ 0.24g置于1000ml烧杯中,加入900ml Milli-Q grade超纯水溶解,溶解完成后,使用1000ml量筒定容至1000ml,121 $^{\circ}$ C高温湿热灭菌20min;

[0166] (3) 0.25%Trypsin溶液:称量Trypsin 2.5g,EDTA 0.19729g置于1000ml烧杯中,加入900ml 1XPBS溶解,溶解完成后,使用1000ml量筒定容至1000ml,0.22 μ M过滤除菌,长期使用可保存至-20 $^{\circ}$ C冰箱;

[0167] (4) 0.5M CaCl₂溶液:称量36.75g CaCl₂用400ml Milli-Q grade超纯水溶解;用Milli-Q grade超纯水将总体积定容至500ml,混匀;0.22 μ m过滤除菌,分装保存到50ml离心管中,每管45ml左右,4 $^{\circ}$ C保存。

[0168] (5) 2XHBS溶液:称量4.09g NaCl,0.269g Na₂HPO₄,5.96g HEPES,用400ml Milli-Q grade超纯水溶解;校准pH仪后,用2M NaOH溶液将HBS溶液的pH调到7.05。调整每瓶HBS的PH消耗2M NaOH为3ml左右;

[0169] (6) 从液氮罐中取出冻存的HEK293T/17细胞,迅速转移到37 $^{\circ}$ C水浴中,1~2min后转移到超净台中,无菌操作将冻存管中的液体全部转移至10cm²培养皿中,补足含10%FBS的DMEM至8ml/10cm²dish,24h后显微镜观察细胞,细胞汇合的程度大于80%进行传代;

[0170] (7) 选择细胞状态良好、无污染的HEK293T/17细胞,每2-6个培养皿为一组,将细胞胰酶消化后,用电动移液器吸取4-12ml完全培养基,向每个消化后的培养皿中加2ml,避免培养皿变干;使用1ml移液器将所有细胞吹打成单细胞悬液,转移到培养基瓶中;

[0171] (8) 将上述2-6个培养皿中的剩余细胞转移到培养基瓶中,并用培养基再冲洗一便培养皿;

[0172] (9) 盖紧培养基瓶盖,上下颠倒10次左右充分混匀细胞悬液,将细胞传到8-24个10cm²培养皿中,每皿的细胞密度应当约4 \times 10⁶个/10ml完全培养基左右。如果细胞密度和预期的相差较大,则需要对细胞进行计数,然后按照4 \times 10⁶个/皿的量接种;

[0173] (10) 每6个培养皿整理为一摞,注意保持上下皿之间的配合。将培养皿左右,前后晃动数次,使细胞充分铺开,然后放入5%CO₂培养箱。剩余细胞做同样处理;

[0174] (11) 检查所传代细胞,细胞汇合度应当为70-80%,轮廓饱满,贴壁良好,在细胞培养皿中均匀分布;

[0175] (12) 为细胞换液,将培养基替换为新鲜完全培养基,每皿9ml,并将培养箱的CO₂浓度设定值提高到8%;

[0176] (13) 按照N+0.5配DNA/CaCl₂溶液。每皿HEK293T/17细胞转染质粒量按照下列比例使用:重组慢病毒质粒(20μg),pPac-GP(15μg),pPac-R(10μg),pEnv-G(7.5μg)。取一个新的5ml离心管,加入0.5M CaCl₂:0.25ml,重组慢病毒质粒20μg:pPac-GP 15μg:pPac-R 10μg:pEnv-G 7.5μg,补充超纯水至0.5ml盖上盖子,充分混匀;

[0177] (14) 另取一支5ml离心管,加入0.5ml DNA/CaCl₂溶液。打开涡旋振荡器,一只手拿住5ml离心管的上端,使管底接触振荡头,使液体在管壁上散开流动,另一只手拿一把1ml移液枪,吸取0.5mL 2×HBS溶液,缓慢滴加进入离心管,控制流速,以半分钟滴完为宜。2×HBS加入后,继续振荡5秒钟,停止振荡,可直接加入需要转染的细胞中;

[0178] (15) 取一皿细胞,将离心管中的1ml钙转液滴加进去,尽可能使钙转试剂分布到整个培养皿中;

[0179] (16) 钙转液加入后,在皿盖上做好标记,将培养皿放还到另一个5%CO₂培养箱中。确保培养皿水平放置,每擦培养皿不要超过6个。在5%CO₂培养箱中放置(6-8h);

[0180] (17) 将第一个培养箱的CO₂浓度设定值调回到5%;

[0181] (18) 24小时后,检查细胞状态。细胞汇合度应当为80-85%左右,状态良好。将培养基吸走,更换10ml新鲜的DMEM完全培养基;

[0182] (19) 48小时后,观察转染效率。绝大多数细胞仍然是贴壁的。可以看到超过95%细胞都会带有绿色荧光。将同一个病毒包装上清液收集到一起,并向培养皿中继续添加10mL新鲜培养基;

[0183] (20) 72小时后,再次将同一个病毒上清液收集到一起,两次收集的病毒可以放在一起,丢弃培养皿;此时收集的上清液包含了重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0。

[0184] 实施例2重组慢病毒载体的浓缩及检测

[0185] 一、离子交换色谱法纯化重组慢病毒载体(如图7所示):

[0186] (1) 将收集的上清液使用Thermo真空泵,经0.22μm-0.8μm的PES滤器抽滤,除去杂质;

[0187] (2) 按1:1~1:10的比例往上清中加入1.5M NaCl 250mM Tris-HCl(pH 6-8);

[0188] (3) 将2个离子交换柱串联放置,用4ml 1M NaOH、4ml 1M NaCl、5ml 0.15M NaCl 25mM Tris-HCl(pH 6-8)溶液依次过柱;

[0189] (4) 将步骤2中获得的溶液通过蠕动泵以1-10ml/min的速度给离子交换柱上样;

[0190] (5) 全部上清液过柱后,使用10ml 0.15M NaCl 25mM Tris-HCl(pH 6-8)溶液清洗一遍;

[0191] (6) 根据上样量使用1-5ml 1.5M NaCl 25mM Tris-HCl(pH 6-8)进行洗脱,收集洗脱液;

[0192] (7) 将洗脱液分成25到50μl一管,冻存到-80℃冰箱,进行长期保存。

[0193] 二、滴度测定:

[0194] (1) 取24孔板接种293T细胞。每孔细胞为 5×10^4 个,所加培养基体积为500 μ l,不同种类的细胞生长速度有所差异,进行病毒感染时的细胞融合率为40%-60%;

[0195] (2) 准备3个无菌EP管,在每个管中加入90 μ l的新鲜完全培养基(高糖DMEM+10% FBS)接种细胞24小时后,取两个孔的细胞用血球计数板计数,确定感染时细胞的实际数目,记为N;

[0196] (3) 取待测定的病毒原液10 μ l加入到第一个管中,轻轻混匀后,取10 μ l加入到第二个管中,然后依次操作直到最后一管;在每管中加入410 μ l完全培养基(高糖DMEM+10% FBS),终体积为500 μ l;

[0197] (4) 感染开始后20小时,除去培养上清,更换为500 μ l完全培养基(高糖DMEM+10% FBS),5%CO₂继续培养48小时;

[0198] (5) 72小时后,观察荧光表达情况,正常情况下,荧光细胞数随稀释倍数增加而相应减少,并拍照;

[0199] (6) 用0.2ml 0.25%胰酶-EDTA溶液消化细胞,在37℃放置1分钟。用培养基吹洗整个细胞面,离心收集细胞。按照DNeasy试剂盒的说明抽提基因组DNA。每个样品管中加入200 μ l洗脱液洗下DNA并定量;

[0200] (7) 准备目的DNA检测qPCRmix总管I(QPCR引物序列为SEQ ID NO.57---SEQ ID NO.58):

	2× TaqMan Master Mix	25 μ l × n
	Forward primer (100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μ l × n
[0201]	Reverse primer (100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μ l × n
	Probe (100 pmol ml ⁻¹)	0.1 μ l × n
	H ₂ O	19.7 μ l × n

[0202] n=number of reactions.例如:总反应数为40,将1ml 2×TaqMan Universal PCR Master Mix,4 μ l forward primer,4 μ l reverse primer,4 μ l probe和788 μ l H₂O混和。震荡后放在冰上;

[0203] (8) 准备内参DNA检测qPCRmix管II(QPCR引物序列为SEQ ID NO.59---SEQ ID NO.60):

[0204]	2×TaqMan Master Mix	25 μ l × n
[0205]	10×RNaseP primer/probe mix	2.5 μ l × n
[0206]	H ₂ O	17.5 μ l × n

[0207] n=number of reactions.例如:总反应数为40,将1ml 2×TaqMan Universal PCR Master Mix,100 μ l10×RNaseP primer/probe mix和700 μ l H₂O混和。震荡后放在冰上;

[0208] (9) 在预冷的96孔PCR板上完成PCR体系建立。从总管I中各取45 μ l加入到A-D各行的孔中,从总管II中各取45 μ l加入到E-G各行的孔中。

[0209] (10) 分别取5 μ l质粒标准品和待测样品基因组DNA加入到A-D行中,每个样品重复1次。另留1个孔加入5 μ l的水做为无模板对照(no-template control)。

[0210] (11) 分别取5 μ l基因组标准品和待测样品基因组DNA加入到E-G行中,每个样品重复1次。另留1个孔加入5 μ l的水做为无模板对照(no-template control)。

[0211] (12) 所使用定量PCR仪为ABI PRISM 7500定量系统。循环条件设定为:50℃2分钟,95℃10分钟,然后是95℃15秒,60℃1分钟的40个循环。

[0212] 数据分析:测得的DNA样品中整合的慢病毒载体拷贝数用基因组数加以标定,得到每基因组整合的病毒拷贝数。

[0213] 滴度(integration units per ml, IU ml⁻¹)的计算公式如下:

$$[0214] \quad IU \text{ ml}^{-1} = (C \times N \times D \times 1000) / V$$

[0215] 其中:C=平均每基因组整合的病毒拷贝数

[0216] N=感染时细胞的数目(约为1×10⁵)

[0217] D=病毒载体的稀释倍数

[0218] V=加入的稀释病毒的体积数

[0219] (13) 重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0的滴度结果(如图8所示)。

[0220] 三、内毒素测定:

[0221] (1)、内毒素工作标准品为15EU/支;

[0222] (2)、鲎试剂灵敏度λ=0.25EU/ml,0.5ml/管;

[0223] (3)、内毒素标准品稀释:取内毒素标准品一支,分别用BET水按比例稀释成4λ和2λ的溶解,封口膜封口,震荡溶解15min;稀释时每稀释一步均应在漩涡混合器上混匀30s;

[0224] (4)、加样:取鲎试剂若干支,每支加入BET水0.5ml溶解,分装至若干支无内毒素试管中,每管0.1ml。其中2支为阴性对照管,加入BET水0.1ml;

[0225] 2支为阳性对照管,加入2λ浓度的内毒素工作标准品溶液0.1ml;

[0226] 2支为样品阳性对照管,加入0.1ml含2λ内毒素标准品的样品溶液(稀释20倍的待测样品1ml+4λ的内毒素标准品溶液1ml=2ml含2λ内毒素标准品的稀释40倍样品)。

[0227] 样品管中加入0.1ml样品,稀释比例见表5,37±1℃水浴(或培养箱)保温60±1min;

[0228]	稀释倍数	原液	5	10	20	40	80	160
	对应EU/ml	0.25	1.25	2.5	5	10	20	40
	结果							

[0229] 表5内毒素稀释比例及对应内毒素含量

[0230] (5)、重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0的内毒素检测结果(如表6所示),内毒素含量在0~2.5EU/ml之间,符合要求;

[0231]	稀释倍数	原液	5	10	20	40	80	160
	对应EU/ml	0.25	1.25	2.5	5	10	20	40
	lvCAR19-IL6RscFv1	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	lvCAR19-IL6RscFv2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

lvCAR19-IL6RscFv3	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
lvCAR19-scFv0	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

[0232] 表6重组慢病毒载体的内毒素检测结果

[0233] 四、支原体测定及比较：

[0234] (1) 在实验前三日，细胞样品用无抗生素培养基进行培养；

[0235] (2) 收集1ml细胞悬浮液(细胞数大于 1×10^5)，置于1.5ml离心管中；

[0236] (3) $13000 \times g$ 离心1min，收集沉淀，弃去培养基；

[0237] (4) 加入500ul PBS用枪头吹吸或涡旋振荡，重悬沉淀。 $13000 \times g$ 离心5min；

[0238] (5) 步骤4重复一次；

[0239] (6) 加入50 μ l Cell Lysis Buffer，用枪头吹吸，充分混匀后，在55℃水浴中孵育20min；

[0240] (7) 将样品置于95℃中加热5min；

[0241] (8) $13000 \times g$ 离心5min后，取5 μ l上清作为模板，25 μ l PCR反应体系为：ddH₂O 6.5 μ l、Myco Mix 1 μ l、2x Taq Plus Mix Master (Dye Plus) 12.5 μ l、模板5 μ l；PCR循环条件为：95℃30sec，(95℃30sec，56℃30sec，72℃30sec)*30cycle，72℃5min。

[0242] (9) 支原体检测结果显示(如图9所示)，重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、

[0243] lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0均不含支原体。

[0244] 实施例3重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0的功能检测。

[0245] 一、CAR基因的细胞水平表达检测：

[0246] (1) 重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0和对照病毒Mock感染PBMC细胞后，收集细胞采用RT-PCR进行CAR基因和scFv基因mRNA转录水平的检测，验证CAR基因和scFv基因的表达，如果CAR基因和scFv基因mRNA转录水平增高，则说明CAR基因和scFv基因的转录水平表达成功；

[0247] (2) 重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0和对照病毒Mock感染PBMC细胞后，收集细胞采用western blot进行CAR蛋白表达水平的检测，验证CAR基因的表达，如果CAR蛋白表达水平增高，则说明CAR基因的翻译水平表达成功；

[0248] (3) 重组慢病毒载体lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0和对照病毒Mock感染PBMC细胞后，收集细胞培养上清采用ELISA进行scFv蛋白表达水平的检测，验证scFv基因的表达，如果scFv蛋白表达水平增高，则说明scFv基因的翻译水平表达成功；

[0249] (4) 分别将MOI = 15的lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0和对照病毒Mock感染细胞，48h后提取6孔板中细胞的总RNA和总蛋白分别进行荧光定量PCR实验和免疫印迹实验。具体步骤：包被6孔板的四个孔，每个孔加入相应的PBS和RN，4℃过夜。12小时后按MOI = 15包被病毒，37℃培养箱放置5h；取出的6孔板，弃掉病毒上清，用PBS洗两遍，按 1×10^6 /孔，包被PBMC(用淋巴细胞分离液从人血中分离)，加入500ul培养基(含10%血清、20U/ml IL-2、Polybrene 8ug/ml)。静置20min，1000g

20℃离心30min,37℃培养48h。

[0250] (5) Trizol法提取6孔板中PBMC细胞的总RNA,逆转录扩增cDNA,用CAR基因QPCR引物(序列为SEQ ID NO.61---SEQ ID NO.62)和scFv基因QPCR引物(序列为SEQ ID NO.67---SEQ ID NO.68)进行荧光定量PCR实验,反应体系见表7,以内参Actin为对照组,验证其mRNA的转录情况。

[0251]	试剂	体积(μl)
	SYBR premix ex taq:	10μl
	ROX Reverse Dye (50x)	0.4μl
	上游引物 (2.5μM) :	0.5μl
	下游引物 (2.5μM) :	0.5μl
	cDNA	1.0μl
	ddH ₂ O	7.6μl

[0252] 表7 20μl qPCR反应体系

[0253] (6) 蛋白免疫印迹(Western Blot)通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将从PBMC中提取的总蛋白质按相对分子质量分离。采用湿转(4℃,400mA,120min),将蛋白转移到PVDF膜上。用封闭液(含5%脱脂牛奶的TBST溶液)室温封闭PVDF膜1h,封闭液1:1000稀释Biotinylated protein L,然后与封闭好的PVDF膜室温孵育4℃过夜。TBST洗膜3次,每次10min。封闭液1:500稀释相应的SA-HRP,室温下孵育PVDF膜2h,TBST洗膜3次,每次10min。采用Amersham公司ECL+plus™ Western blotting system试剂盒进行显色。X光显影获得显示条带的胶片。

[0254] (7) 酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay,ELISA)通过将1:2、1:5、1:10稀释的细胞培养上清包被至96孔板中,同时设置阴性对照、阳性对照和空白孔,4℃过夜。次日洗涤3次,于反应孔中,加入新鲜1:10000稀释的proteinG-HRP 0.1ml,37℃孵育30-60分钟,洗涤,最后一遍用纯水洗涤。于各反应孔中加入的TMB底物溶液0.1ml,37℃孵育10~30分钟。于各反应孔中加入ELISA反应终止液0.05ml。在酶标仪上,于405nm处,测各孔OD值。

[0255] (8) RT-QPCR检测显示,重组慢病毒载体感染PBMC后的CAR基因和scFv基因的转录水平比空细胞有明显升高(如图10所示),说明CAR基因和scFv基因的转录水平表达成功。

[0256] (9) 蛋白免疫印迹(Western Blot)的结果表明,重组慢病毒载体感染PBMC后CAR蛋白的表达水平比对照病毒MOCK和空细胞有明显升高(如图11所示),说明CAR基因的翻译水平表达成功。

[0257] (10) 酶联免疫吸附测定(ELISA)的结果表明,重组慢病毒载体感染PBMC后scFv蛋白的表达水平比对照病毒MOCK和空细胞有明显升高(如图12所示),说明scFv基因的翻译水平表达成功。

[0258] 二、细胞杀伤实验效果评估。

[0259] (1) 分别培养CD19+K562细胞和PBMC细胞;

[0260] (2) 实验开始前4天,分别用MOI=15的1vCAR19-IL6RscFv1、1vCAR19-IL6RscFv2、1vCAR19-IL6RscFv3、1vCAR19-scFv0的病毒感染PBMC细胞,培养72-96h后可安排开始实验;

[0261] (3) 收集靶细胞(CD19+K562) 4×10^5 cells和效应细胞(1vCAR19-IL6RscFv1、1vCAR19-IL6RscFv2、1vCAR19-IL6RscFv3、1vCAR19-scFv0分别转导的PBMC细胞)

2.8x10⁶cells,800g,6min离心,弃上清;

[0262] (4) 用1ml 1xPBS溶液分别重悬靶细胞和效应细胞,800g,6min离心,弃上清;

[0263] (5) 重复步骤3一次;

[0264] (6) 用700ul培养基(1640培养基+10%FBS)重悬效应细胞,用2ml培养基(1640培养基+10%FBS)重悬靶细胞;

[0265] (7) 设置效靶比为1:1、5:1、10:1的实验孔,并设置对照组,每组3个复孔;

[0266] (8) 250xg,5min平板离心;

[0267] (9) 37℃5%CO₂培养箱中培养24小时;

[0268] (10) 250xg,5min平板离心;

[0269] (11) 取每个孔的50ul上清到新96孔板中,并且每孔加入50ul底物溶液(避光操作);

[0270] (12) 避光孵育25分钟;

[0271] (13) 每孔加入50ul终止液;

[0272] (14) 酶标仪检测490nm吸光度;

[0273] (15) 将3个复孔取平均值;将所有实验孔、靶细胞孔和效应细胞孔的吸光值减去培养基背景吸光值的均值;将靶细胞最大值的吸光值减去体积校正对照吸光值的均值。

[0274] (16) 将步骤15中获得的经过校正的值带入下面公式,计算每个效靶比所产生的细胞毒性百分比。结果如图13所示,lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0重组慢病毒载体转导的PBMC细胞在几个效靶比条件下杀伤效率明显高于PBMC空细胞和对照病毒,说明scFv基因的表达对CAR基因的功能影响较小。

[0275] 杀伤效率 = (实验孔 - 效应细胞孔 - 靶细胞孔) / (靶细胞最大孔 - 靶细胞孔) X 100%。

[0276] 三、IL-6R阻断效果评估(IL-6和CRP mRNA转录水平)。

[0277] (1) 分别培养CD19+K562细胞和PBMC细胞;

[0278] (2) 实验开始前4天,分别用MOI = 15的lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0的病毒感染PBMC细胞,培养72-96h后可安排开始实验;

[0279] (3) 收集靶细胞(CD19+K562) 4x10⁵cells和效应细胞(lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0分别转导的PBMC细胞) 2.8x10⁶cells,800g,6min离心,弃上清;(4) 用1ml 1xPBS溶液分别重悬靶细胞和效应细胞,800g,6min离心,弃上清;

[0280] (5) 重复步骤4一次;

[0281] (6) 用700ul培养基(1640培养基+10%FBS)重悬效应细胞,用2ml培养基(1640培养基+10%FBS)重悬靶细胞;

[0282] (7) 设置效靶比为10:1的实验孔,并设置对照组;

[0283] (8) 250xg,5min平板离心;

[0284] (9) 37℃5%CO₂培养箱中共培养12小时,1000xg,2min平板离心,收集细胞抽总mRNA,反转cDNA,检测IL-6mRNA转录水平;

[0285] (10) 上清中加入空白PBMC细胞,继续37℃5%CO₂培养箱中共培养至24小时,1000xg,2min平板离心,收集细胞抽总mRNA,反转cDNA,检测CRP mRNA转录水平;

[0286] (11) 用IL-6基因QPCR引物(序列为SEQ ID NO.63---SEQ ID NO.64)和CRP基因

QPCR引物(序列为SEQ ID NO.65---SEQ ID NO.66)进行荧光定量PCR实验,反应体系见表6,以内参Actin为对照组,验证其mRNA的转录情况。

[0287] (12) RT-QPCR检测结果显示,lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0转导的PBMC并与靶细胞孵育后,IL-6基因的mRNA水平与Mock组和空细胞组相比明显升高,lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0四组之间的IL-6基因的mRNA水平则没有太大差别(如图14所示),而其后通过检测不同组上清培养的PBMC细胞中CRP基因的mRNA水平发现,lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3、lvCAR19-scFv0三组与对照病毒lvCAR19-scFv0组相比CRP mRNA转录水平明显降低,其中lvCAR19-IL6RscFv1组的CRP基因的转录mRNA水平降低最为明显(如图15所示),说明lvCAR19-IL6RscFv1、lvCAR19-IL6RscFv2、lvCAR19-IL6RscFv3组均能有效阻断IL-6信号通路(其中lvCAR19-IL6RscFv1阻断IL-6信号通路效果最明显),进而在临床上能有效缓解CRS。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>上海优卡迪生物医药科技有限公司
- [0003] <120>一种封闭IL6R的用于缓解CRS的CAR-T转基因载体及其构建方法和应用
- [0004] <130> HJ16-12295
- [0005] <160> 68
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 861
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213>人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] atgagtattc aacatttccg tgtegccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct 60
- [0013] gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 120
- [0014] cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 180
- [0015] gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 240
- [0016] cgtattgacg cggggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca gaatgacttg 300
- [0017] gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 360
- [0018] tgcagtgctg ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 420
- [0019] ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 480
- [0020] gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 540
- [0021] cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 600
- [0022] tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 660
- [0023] tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggatga gcgtgggtct 720
- [0024] cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 780
- [0025] acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgcgtga gataggtgcc 840
- [0026] tcaactgatta agcattggta a 861
- [0027] <210> 2
- [0028] <211> 674
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213>人工序列
- [0031] <400> 2
- [0032] cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 60
- [0033] ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca 120
- [0034] actctttttc cgaaggtaac tggtctcagc agagcgcaga taccaatac tgtccttcta 180
- [0035] gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgt 240
- [0036] ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 300
- [0037] gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 360
- [0038] acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta 420

[0039] tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 480
[0040] gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 540
[0041] cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtegatattt tgtgatgctc gtcagggggg 600
[0042] cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg 660
[0043] cttttgctc acat 674
[0044] <210> 3
[0045] <211> 147
[0046] <212> DNA
[0047] <213>人工序列
[0048] <400> 3
[0049] atcccccccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 60
[0050] tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga 120
[0051] ggcttttttg gaggcctaga cttttgc 147
[0052] <210> 4
[0053] <211> 228
[0054] <212> DNA
[0055] <213>人工序列
[0056] <400> 4
[0057] gtagtcttat gcaatactct ttagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 60
[0058] cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattgggtg gaagtaaggt ggtacgatcg 120
[0059] tgccttatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 180
[0060] gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaacg 228
[0061] <210> 5
[0062] <211> 180
[0063] <212> DNA
[0064] <213>人工序列
[0065] <400> 5
[0066] ggtctctctg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac 60
[0067] tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt 120
[0068] gtgactctgg taactagaga tccctcagac ctttttagtc agtgtggaaa atctctagca 180
[0069] <210> 6
[0070] <211> 234
[0071] <212> DNA
[0072] <213>人工序列
[0073] <400> 6
[0074] tgctagagat tttccacact gactaaaagg gtctgaggga tctctagtta ccagagtcac 60
[0075] acaacagacg ggcacacact acttgaagca ctcaaggcaa gctttattga ggcttaagca 120
[0076] gtgggttccc tagttagcca gagagctccc aggctcagat ctggtctaac cagagagacc 180
[0077] cagtacaagc aaaaagcaga tcttattttc gttgggagtg aattagccct tcca 234

- [0078] <210> 7
- [0079] <211> 353
- [0080] <212> DNA
- [0081] <213>人工序列
- [0082] <400> 7
- [0083] atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgcgatgg gaaaaaatc 60
- [0084] ggttaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaca tatagtatgg gcaagcagg 120
- [0085] agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgttagaac atcagaaggc tntagacaaa 180
- [0086] tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga tcattatata 240
- [0087] atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc aaaggataga gataaaagac accaaggaag 300
- [0088] ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagac caccgcacag caa 353
- [0089] <210> 8
- [0090] <211> 233
- [0091] <212> DNA
- [0092] <213>人工序列
- [0093] <400> 8
- [0094] aggagctttg ttccttggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 60
- [0095] gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 120
- [0096] gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 180
- [0097] gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcc 233
- [0098] <210> 9
- [0099] <211> 489
- [0100] <212> DNA
- [0101] <213>人工序列
- [0102] <400> 9
- [0103] tggggatttg gggttgctct ggaaaactca tttgcaccac tgctgtgcct tggaatgcta 60
- [0104] gttggagtaa taaatctctg gaacagattg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag 120
- [0105] agaaattaac aattacacaa gcttaataca ctcttaatt gaagaatcgc aaaaccagca 180
- [0106] agaaaagaat gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagttgt ggaattggtt 240
- [0107] taacataaca aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttgg 300
- [0108] aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 360
- [0109] accattatcg tttcagacc acctcccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 420
- [0110] agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatctcg 480
- [0111] acggttaac 489
- [0112] <210> 10
- [0113] <211> 119
- [0114] <212> DNA
- [0115] <213>人工序列
- [0116] <400> 10

[0117] ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60
 [0118] agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaatttta 119
 [0119] <210> 11
 [0120] <211> 592
 [0121] <212> DNA
 [0122] <213>人工序列
 [0123] <400> 11
 [0124] aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 60
 [0125] ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120
 [0126] atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagtgg 180
 [0127] tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtgggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240
 [0128] ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt cccctccct 300
 [0129] attgccacgg cggaactcat cgccgctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggtg 360
 [0130] ttgggcaactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc 420
 [0131] gcctgtgttg ccacctggat tctgcgctgg acgtccttct gctacgtccc ttcggccctc 480
 [0132] aatccagcgg accttccttc ccgcgccctg ctgccggctc tgcggcctct tccgctctt 540
 [0133] cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccc cctccccgcc tg 592
 [0134] <210> 12
 [0135] <211> 1178
 [0136] <212> DNA
 [0137] <213>人工序列
 [0138] <400> 12
 [0139] gctccggtgc ccgtcagtgg gcagagcgca catgcccac agtccccgag aagttggggg 60
 [0140] gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg 120
 [0141] atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtggggg agaaccgtat ataagtgcag 180
 [0142] tagtcgccgt gaacgttctt tttcgaacg gttttgccg cagaacacag gtaagtgccg 240
 [0143] tgtgtggttc ccgcgggcct ggcctcttta cgggttatgg cccttgctg ccttgaatta 300
 [0144] cttccacctg gctgcagtac gtgattcttg atcccagct tcgggttgga agtgggtggg 360
 [0145] agagttcgag gccttgctgct taaggagccc cttcgctcg tgcttgagtt gaggcctggc 420
 [0146] ctgggcgctg gggccgccgc gtgcgaatct ggtggacct tcgcgctgt ctcgctgctt 480
 [0147] tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc 540
 [0148] aagatagtct tgtaaagcg ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt tttggggccc 600
 [0149] cgggcccga cggggcccgt gcgtcccagc gcacatgttc ggcgagcgg ggctgcgag 660
 [0150] cgcgccacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagetgg ccggcctgct ctggtgctg 720
 [0151] gcctcgcgcc gccgtgtatc gccccccct gggcggaag gctggcccgg tcggcaccag 780
 [0152] ttgcgtgagc gaaagatgg ccgcttcccg gcctgctgc agggagctca aatggagga 840
 [0153] cgcgcgctc gggagagcgg gcgggtgagt caccacaca aaggaaaagg gcctttccgt 900
 [0154] cctcagccgt cgcttcatgt gactccactg agtaccgggc gccctcagg cacctcgatt 960
 [0155] agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggaggggttt tatgcgatgg 1020

[0156] agtttcccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat 1080
 [0157] tctccttggga atttgcctt tttgagtttg gatcttggtt cattctcaag cctcagacag 1140
 [0158] tggttcaaag tttttttctt ccatttcagg tgctcgtga 1178
 [0159] <210> 13
 [0160] <211> 63
 [0161] <212> DNA
 [0162] <213>人工序列
 [0163] <400> 13
 [0164] atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 [0165] ccg 63
 [0166] <210> 14
 [0167] <211> 321
 [0168] <212> DNA
 [0169] <213>人工序列
 [0170] <400> 14
 [0171] gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
 [0172] atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aatatattaa attggtatca gcagaaacca 120
 [0173] gatggaactg ttaaactcct gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 [0174] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
 [0175] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac gttcggaggg 300
 [0176] gggaccaagc tggagatcac a 321
 [0177] <210> 15
 [0178] <211> 45
 [0179] <212> DNA
 [0180] <213>人工序列
 [0181] <400> 15
 [0182] ggtggcgggtg gctcgggchg tggtgggtcg ggtggcggcg gatct 45
 [0183] <210> 16
 [0184] <211> 360
 [0185] <212> DNA
 [0186] <213>人工序列
 [0187] <400> 16
 [0188] gaggtgaaac tgcaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccgtc 60
 [0189] acatgcactg tctcaggggt ctctattacc gactatgggtg taagctggat tcgccagcct 120
 [0190] ccacgaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggta gtgaaaccac ataactataat 180
 [0191] tcagctctca aatccagact gaccatcctc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 [0192] aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatttact actgtgcca acattattac 300
 [0193] tacggtggta gctatgctat ggactactgg ggccaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
 [0194] <210> 17

- [0195] <211> 141
[0196] <212> DNA
[0197] <213>人工序列
[0198] <400> 17
[0199] accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60
[0200] tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
[0201] gacttcgcct gtgatatcta c 141
[0202] <210> 18
[0203] <211> 66
[0204] <212> DNA
[0205] <213>人工序列
[0206] <400> 18
[0207] atctggggcg ccttggccgg gacttgtggg gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt 60
[0208] tactgc 66
[0209] <210> 19
[0210] <211> 126
[0211] <212> DNA
[0212] <213>人工序列
[0213] <400> 19
[0214] aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa 60
[0215] actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
[0216] gaactg 126
[0217] <210> 20
[0218] <211> 336
[0219] <212> DNA
[0220] <213>人工序列
[0221] <400> 20
[0222] agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggccca gaaccagctc 60
[0223] tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
[0224] cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
[0225] gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
[0226] cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
[0227] tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336
[0228] <210> 21
[0229] <211> 723
[0230] <212> DNA
[0231] <213>人工序列
[0232] <400> 21
[0233] gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

[0234]	atcacctgta gagccagcca ggacatcagc agttacctga attggtacca gcagaagcca	120
[0235]	ggaaaggctc caaagctgct gatctactac acctccagac tgcactctgg tgtgccaagc	180
[0236]	agattcagcg gtagcggtag cggtaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctccagcca	240
[0237]	gaggacatcg ctacctacta ctgccaacag ggtaacacgc ttccatacac gttcggccaa	300
[0238]	gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtgggtc ggggtggcggc	360
[0239]	ggatctcagg tccaactgca ggagagcggt ccaggtcttg tgagacctag ccagaccctg	420
[0240]	agcctgacct gcaccgtgtc tggctactca attaccagcg atcatgcctg gagctggggtt	480
[0241]	cgccagccac ctggacgagg tcttgagtgg attggataca ttagttatag tggaaatcaca	540
[0242]	acctataatc catctctcaa atccagagtg acaatgctga gagacaccag caagaaccag	600
[0243]	ttcagcctga gactcagcag cgtgacagcc gccgacaccg cggtttatta ttgtgcaaga	660
[0244]	tcctagctc ggactacggc tatggactac tggggtcaag gcagcctcgt cacagtctcc	720
[0245]	tca	723
[0246]	<210>	22
[0247]	<211>	747
[0248]	<212>	DNA
[0249]	<213>	人工序列
[0250]	<400>	22
[0251]	gaaattgtga tgacctagag cccggcgacc ctgagcgtga gcccgggcca acgcgcgacc	60
[0252]	attacctgcc gcgcgagcca gggcattagc agctggctgg cgtggtatca gcagaaaccg	120
[0253]	ggccaggcgc cgcgcctgct gatttatggc gcgagcacc cgcgcaccgg cattccggcg	180
[0254]	cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga ccattagcag cctgcagccg	240
[0255]	gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcag tatagcagct ggccgccgta tacctttggc	300
[0256]	cagggcacca aactggaat taaaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc	360
[0257]	ggcggatctg aagtgcagct ggtggaaagc ggcggcaacc tgggtgcagcc gggccgcagc	420
[0258]	ctgcgcctga gctgcgcggc gagcggcttt atttttgatg attatgcgat gcattgggtg	480
[0259]	cgccaggcgc cgggcaaagg cctggaatgg gtgagcggca ttagctggaa cagcggcagc	540
[0260]	attggctatg cggatagcgt gaaaggccgc tttaccatta gccgcgataa cgcgaaaaac	600
[0261]	agcctgtatc tgcagatgaa cagcctgcgc gcggaagata ccgcgctgta ttattgcgcg	660
[0262]	aaagatggcg gcagcagctg gctgccgttt gtgtattatt atggcatgga tgtgtggggc	720
[0263]	cagggcacca ccgtgaccgt gacgagc	747
[0264]	<210>	23
[0265]	<211>	744
[0266]	<212>	DNA
[0267]	<213>	人工序列
[0268]	<400>	23
[0269]	gatattcaga tgacctagag cccgagcagc gtgagcgcga gcgtgggcca tcgcgtgacc	60
[0270]	ctgagctgcc gcgcgagcca gagcattagc agcaactttg cgtggtatca gcagaaaccg	120
[0271]	ggcaaagcgc cgaactgct gatttatggc gcgagcagcc tggaaagcgg cgtgccgagc	180
[0272]	cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga ccattagcag cctgcagagc	240

[0273]	gaagattttg cgagctatta ttgccagcag gcgaacagct ttccgtatac ctttggccag	300
[0274]	ggcacciaaac tggaaattaa aggtggcggt ggctcgggcg gtggtgggtc ggggtggcggc	360
[0275]	ggatctgaag tgcagctggt ggaaagcggc ggcggcctgg tgcagccggg ccgcagcctg	420
[0276]	cgctgagct gcgcggcgag cggctttatt tttgatgatt atgcgatgca ttgggtgcgc	480
[0277]	caggcgccgg gcaaaggcct ggaatgggtg agcggcatta gctggaacag cggcagcatt	540
[0278]	ggctatgcgg atagcgtgaa aggccgcttt accattagcc gcgataacgc gaaaaacagc	600
[0279]	ctgtatctgc agatgaacag cctgcgcgcg gaagataccg cgctgtatta ttgcgcgaaa	660
[0280]	gatggcggca gcagctggct gccgtttgtg tattattatg gcatggatgt gtggggccag	720
[0281]	ggcaccaccg tgaccgtgag cagc	744
[0282]	<210>	24
[0283]	<211>	699
[0284]	<212>	DNA
[0285]	<213>	人工序列
[0286]	<400>	24
[0287]	ttgttctgga ttcttcttc catcagtgat gttgtgatga cccaaactgt cagtcttga	60
[0288]	gatcaagctt ccatctcttg cagatctagt cagaacctg tacacaaca tggaaacacc	120
[0289]	tatttatatt ggttctctgca gaagtcaggc cagtctccaa agctcctgat ttatagggt	180
[0290]	tccatccgat tttctggggt ccagacagg ttcagtggca gtggatcaga gacagatttc	240
[0291]	acactcaaga tcagcagagt ggaggcttat ttctgcttcc aaggtacaca tgttccgtg	300
[0292]	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaatc aaaggtggcg gtggctcggg cgggtggtgg	360
[0293]	tcgggtggcg gcggatctga ggtgctgctg caacagtctg gacctgagct ggtgaagata	420
[0294]	ccctgcaagg cttctggata cacattcact gactacaaca tggactggat gaagcagagc	480
[0295]	catggaaga gccttgagtg gattggagat attaatecta agagtggtaa ttccatctac	540
[0296]	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca agtccctccag cacagcctac	600
[0297]	atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct atgactggtc tgcctggttt	660
[0298]	gctttctggg gccaaaggac tctggtctct gtctctgca	699
[0299]	<210>	25
[0300]	<211>	575
[0301]	<212>	DNA
[0302]	<213>	人工序列
[0303]	<400>	25
[0304]	gcccctctcc ctccccccc cctaactgta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt	60
[0305]	gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggcc	120
[0306]	ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca ttctagggg tctttccct ctcgcaaaag	180
[0307]	gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac	240
[0308]	aaacaacgtc tgtagegacc ctttgcaggc agcggaaacc ccacctggc gacaggtgcc	300
[0309]	tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcaca cccagtgcc	360
[0310]	acgttgtgag ttggatagtt gtggaagag tcaaatggct cacctcaagc gtattcaaca	420
[0311]	aggggctgaa ggatgccag aaggtaccc attgtatggg atctgatctg gggcctcgg	480

- [0312] gcacatgctt tacatgtggt tagtcgaggt taaaaaacgt ctaggccccc cgaaccacgg 540
- [0313] ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgatg ataata 575
- [0314] <210> 26
- [0315] <211> 87
- [0316] <212> DNA
- [0317] <213>人工序列
- [0318] <400> 26
- [0319] atgaactcct tctccacaag cgccttcggt ccagttgcct tctccctggg gctgctcctg 60
- [0320] gtgttgccctg ctgccttccc tgcccca 87
- [0321] <210> 27
- [0322] <211> 696
- [0323] <212> DNA
- [0324] <213>人工序列
- [0325] <400> 27
- [0326] gaaccgaaaa gctgcgataa aaccataacc tgcccgcctg gcccgccgc ggaactgctg 60
- [0327] ggcggcccca gcgtgtttct gtttccgccg aaaccgaaag ataccctgat gattagccgc 120
- [0328] accccggaag tgacctgcgt ggtggtggat gtgagccatg aagatccgga agtgaaat 180
- [0329] aactggtatg tggatggcgt ggaagtgcata aacgcgaaaa ccaaaccgcg cgaagaacag 240
- [0330] tataacagca cctatcgcgt ggtgagcgtg ctgaccgtgc tgcatacagga ttggctgaac 300
- [0331] ggcaaagaat ataaatgcaa agtgagcaac aaagcgtgc cggcgccgat tgaaaaaacc 360
- [0332] attagcaaag cgaaaggcca gccgcgcgaa ccgcaggtgt ataccctgcc gccgagccgc 420
- [0333] gaagaaatga ccaaaaacca ggtgagcctg acctgcctgg tgaaaggctt ttatccgagc 480
- [0334] gatattgcgg tggaatggga aagcaacggc cagccggaaa acaactataa aaccaccccg 540
- [0335] ccggtgctgg atagcgatgg cagctttttt ctgtatagca aactgaccgt ggataaaagc 600
- [0336] cgctggcagc agggcaactg gtttagctgc agcgtgatgc atgaagcgt gcataacat 660
- [0337] tataccaga aaagcctgag cctgagcccg ggcaaa 696
- [0338] <210> 28
- [0339] <211> 123
- [0340] <212> DNA
- [0341] <213>人工序列
- [0342] <400> 28
- [0343] aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
- [0344] gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
- [0345] tcc 123
- [0346] <210> 29
- [0347] <211> 36
- [0348] <212> DNA
- [0349] <213>人工序列
- [0350] <220>

[0351] <221> misc_feature
[0352] <223>引物
[0353] <400> 29
[0354] attcaaaatt ttatcgatgc tccggtgccc gtcagt 36
[0355] <210> 30
[0356] <211> 22
[0357] <212> DNA
[0358] <213>人工序列
[0359] <220>
[0360] <221> misc_feature
[0361] <223>引物
[0362] <400> 30
[0363] tcacgacacc tgaaatggaa ga 22
[0364] <210> 31
[0365] <211> 42
[0366] <212> DNA
[0367] <213>人工序列
[0368] <220>
[0369] <221> misc_feature
[0370] <223>引物
[0371] <400> 31
[0372] ggtgtcgtga ggatccgcca ccatggcctt accagtgacc gc 42
[0373] <210> 32
[0374] <211> 31
[0375] <212> DNA
[0376] <213>人工序列
[0377] <220>
[0378] <221> misc_feature
[0379] <223>引物
[0380] <400> 32
[0381] gtgtcatctg gatgtccggc ctggcggcgt g 31
[0382] <210> 33
[0383] <211> 41
[0384] <212> DNA
[0385] <213>人工序列
[0386] <220>
[0387] <221> misc_feature
[0388] <223>引物
[0389] <400> 33

[0390] cacgccgcca ggccggacat ccagatgaca cagactacat c 41
[0391] <210> 34
[0392] <211> 20
[0393] <212> DNA
[0394] <213>人工序列
[0395] <220>
[0396] <221> misc_feature
[0397] <223>引物
[0398] <400> 34
[0399] tgtgatctcc agcttgggtcc 20
[0400] <210> 35
[0401] <211> 82
[0402] <212> DNA
[0403] <213>人工序列
[0404] <220>
[0405] <221> misc_feature
[0406] <223>引物
[0407] <400> 35
[0408] caagctggag atcacaggtg gcggtggctc gggcgggtgt gggtcgggtg gcggcggatc 60
[0409] tgaggtgaaa ctgcaggagt ca 82
[0410] <210> 36
[0411] <211> 21
[0412] <212> DNA
[0413] <213>人工序列
[0414] <220>
[0415] <221> misc_feature
[0416] <223>引物
[0417] <400> 36
[0418] tgaggagacg gtgactgagg t 21
[0419] <210> 37
[0420] <211> 33
[0421] <212> DNA
[0422] <213>人工序列
[0423] <220>
[0424] <221> misc_feature
[0425] <223>引物
[0426] <400> 37
[0427] agtcaccgtc tctcaacca cgacgccagc gcc 33
[0428] <210> 38

- [0429] <211> 23
[0430] <212> DNA
[0431] <213>人工序列
[0432] <220>
[0433] <221> misc_feature
[0434] <223>引物
[0435] <400> 38
[0436] gtagatatca caggcgaagt cca 23
[0437] <210> 39
[0438] <211> 33
[0439] <212> DNA
[0440] <213>人工序列
[0441] <220>
[0442] <221> misc_feature
[0443] <223>引物
[0444] <400> 39
[0445] cgcctgtgat atctacatct gggcgccctt ggc 33
[0446] <210> 40
[0447] <211> 39
[0448] <212> DNA
[0449] <213>人工序列
[0450] <220>
[0451] <221> misc_feature
[0452] <223>引物
[0453] <400> 40
[0454] tctttctgcc ccgtttgcag taaagggtga taaccagtg 39
[0455] <210> 41
[0456] <211> 21
[0457] <212> DNA
[0458] <213>人工序列
[0459] <220>
[0460] <221> misc_feature
[0461] <223>引物
[0462] <400> 41
[0463] aaacggggca gaaagaaact c 21
[0464] <210> 42
[0465] <211> 40
[0466] <212> DNA
[0467] <213>人工序列

[0468] <220>
[0469] <221> misc_feature
[0470] <223>引物
[0471] <400> 42
[0472] tgctgaactt cactctcagt tcacatcctc cttctttcttc 40
[0473] <210> 43
[0474] <211> 22
[0475] <212> DNA
[0476] <213>人工序列
[0477] <220>
[0478] <221> misc_feature
[0479] <223>引物
[0480] <400> 43
[0481] agagtgaagt tcagcaggag cg 22
[0482] <210> 44
[0483] <211> 34
[0484] <212> DNA
[0485] <213>人工序列
[0486] <220>
[0487] <221> misc_feature
[0488] <223>引物
[0489] <400> 44
[0490] ggagaggggc gtcgacttag cgagggggca gggc 34
[0491] <210> 45
[0492] <211> 34
[0493] <212> DNA
[0494] <213>人工序列
[0495] <220>
[0496] <221> misc_feature
[0497] <223>引物
[0498] <400> 45
[0499] gccctgcccc ctcgctaagc ccctctccct cccc 34
[0500] <210> 46
[0501] <211> 79
[0502] <212> DNA
[0503] <213>人工序列
[0504] <220>
[0505] <221> misc_feature
[0506] <223>引物

[0507] <400> 46
[0508] ccagggagaa ggcaactgga ccgaaggcgc ttgtggagaa ggagttcatg gtggcattat 60
[0509] catcgtgttt ttcaaagga 79
[0510] <210> 47
[0511] <211> 74
[0512] <212> DNA
[0513] <213>人工序列
[0514] <220>
[0515] <221> misc_feature
[0516] <223>引物
[0517] <400> 47
[0518] gttgccttct cctggggct gctcctggtg ttgcctgctg ccttccctgc ccagacatc 60
[0519] cagatgaccc agag 74
[0520] <210> 48
[0521] <211> 36
[0522] <212> DNA
[0523] <213>人工序列
[0524] <220>
[0525] <221> misc_feature
[0526] <223>引物
[0527] <400> 48
[0528] gcagcttttc ggttctgagg agactgtgac gaggct 36
[0529] <210> 49
[0530] <211> 74
[0531] <212> DNA
[0532] <213>人工序列
[0533] <220>
[0534] <221> misc_feature
[0535] <223>引物
[0536] <400> 49
[0537] gttgccttct cctggggct gctcctggtg ttgcctgctg ccttccctgc ccagaaatt 60
[0538] gtgatgaccc agag 74
[0539] <210> 50
[0540] <211> 36
[0541] <212> DNA
[0542] <213>人工序列
[0543] <220>
[0544] <221> misc_feature
[0545] <223>引物

- [0546] <400> 50
[0547] gcagcttttc ggttcgctgc tcacggtcac ggtggt 36
[0548] <210> 51
[0549] <211> 74
[0550] <212> DNA
[0551] <213>人工序列
[0552] <220>
[0553] <221> misc_feature
[0554] <223>引物
[0555] <400> 51
[0556] gttgccttct ccttggggct gctcctggtg ttgcctgctg ccttccctgc ccagatatt 60
[0557] cagatgaccc agag 74
[0558] <210> 52
[0559] <211> 36
[0560] <212> DNA
[0561] <213>人工序列
[0562] <220>
[0563] <221> misc_feature
[0564] <223>引物
[0565] <400> 52
[0566] gcagcttttc ggttcgctgc tcacggtcac ggtggt 36
[0567] <210> 53
[0568] <211> 76
[0569] <212> DNA
[0570] <213>人工序列
[0571] <220>
[0572] <221> misc_feature
[0573] <223>引物
[0574] <400> 53
[0575] gttgccttct ccttggggct gctcctggtg ttgcctgctg ccttccctgc ccattgttc 60
[0576] tggattcctg cttcca 76
[0577] <210> 54
[0578] <211> 36
[0579] <212> DNA
[0580] <213>人工序列
[0581] <220>
[0582] <221> misc_feature
[0583] <223>引物
[0584] <400> 54

[0585] gcagcttttc ggttctgcag agacagagac cagagt 36
[0586] <210> 55
[0587] <211> 23
[0588] <212> DNA
[0589] <213>人工序列
[0590] <220>
[0591] <221> misc_feature
[0592] <223>引物
[0593] <400> 55
[0594] gaaccgaaaa gctgcgataa aac 23
[0595] <210> 56
[0596] <211> 38
[0597] <212> DNA
[0598] <213>人工序列
[0599] <220>
[0600] <221> misc_feature
[0601] <223>引物
[0602] <400> 56
[0603] ctagcaatct agaggttatt tgcccgggct caggctca 38
[0604] <210> 57
[0605] <211> 21
[0606] <212> DNA
[0607] <213>人工序列
[0608] <220>
[0609] <221> misc_feature
[0610] <223>引物
[0611] <400> 57
[0612] cctttccggg actttcgctt t 21
[0613] <210> 58
[0614] <211> 20
[0615] <212> DNA
[0616] <213>人工序列
[0617] <220>
[0618] <221> misc_feature
[0619] <223>引物
[0620] <400> 58
[0621] gcagaatcca ggtggcaaca 20
[0622] <210> 59
[0623] <211> 21

- [0624] <212> DNA
[0625] <213>人工序列
[0626] <220>
[0627] <221> misc_feature
[0628] <223>引物
[0629] <400> 59
[0630] catgtacggt gctatccagg c 21
[0631] <210> 60
[0632] <211> 21
[0633] <212> DNA
[0634] <213>人工序列
[0635] <220>
[0636] <221> misc_feature
[0637] <223>引物
[0638] <400> 60
[0639] ctccttaatg tcacgcacga t 21
[0640] <210> 61
[0641] <211> 21
[0642] <212> DNA
[0643] <213>人工序列
[0644] <220>
[0645] <221> misc_feature
[0646] <223>引物
[0647] <400> 61
[0648] gacttgtggg gtccttctcc t 21
[0649] <210> 62
[0650] <211> 21
[0651] <212> DNA
[0652] <213>人工序列
[0653] <220>
[0654] <221> misc_feature
[0655] <223>引物
[0656] <400> 62
[0657] gcagctacag ccatcttct c 21
[0658] <210> 63
[0659] <211> 19
[0660] <212> DNA
[0661] <213>人工序列
[0662] <220>

[0663] <221> misc_feature
[0664] <223>引物
[0665] <400> 63
[0666] ggattcaatg aggagactt 19
[0667] <210> 64
[0668] <211> 18
[0669] <212> DNA
[0670] <213>人工序列
[0671] <220>
[0672] <221> misc_feature
[0673] <223>引物
[0674] <400> 64
[0675] atctgttctg gaggtact 18
[0676] <210> 65
[0677] <211> 22
[0678] <212> DNA
[0679] <213>人工序列
[0680] <220>
[0681] <221> misc_feature
[0682] <223>引物
[0683] <400> 65
[0684] gacattggaa atgtgaacat gt 22
[0685] <210> 66
[0686] <211> 19
[0687] <212> DNA
[0688] <213>人工序列
[0689] <220>
[0690] <221> misc_feature
[0691] <223>引物
[0692] <400> 66
[0693] cacagctggg gtttgggtga 19
[0694] <210> 67
[0695] <211> 22
[0696] <212> DNA
[0697] <213>人工序列
[0698] <220>
[0699] <221> misc_feature
[0700] <223>引物
[0701] <400> 67

[0702] gacattggaa atgtgaacat gt 22
[0703] <210> 68
[0704] <211> 19
[0705] <212> DNA
[0706] <213>人工序列
[0707] <220>
[0708] <221> misc_feature
[0709] <223>引物
[0710] <400> 68
[0711] cacagctggg gtttggga 19

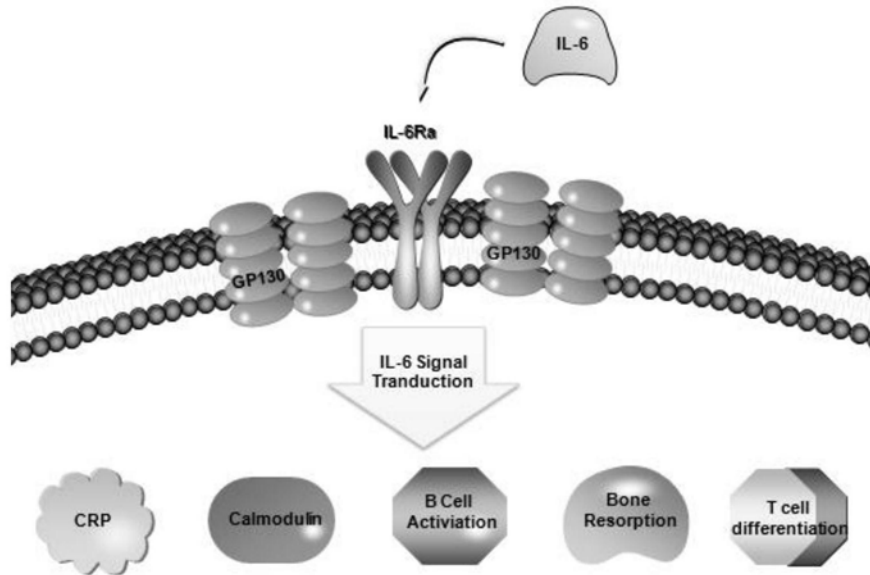


图1A

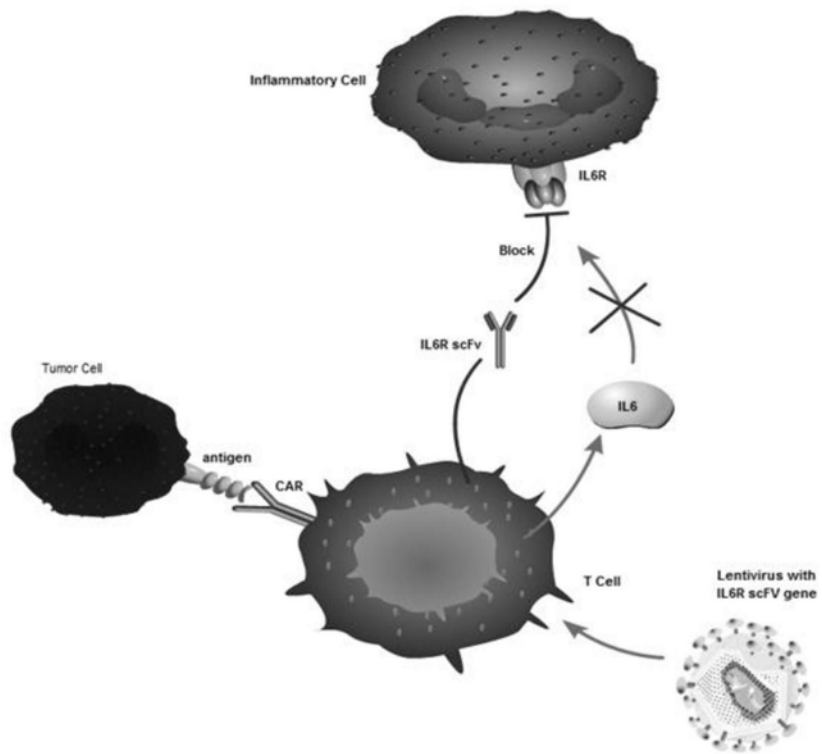
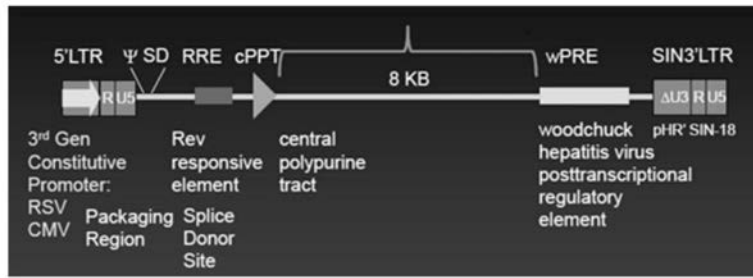
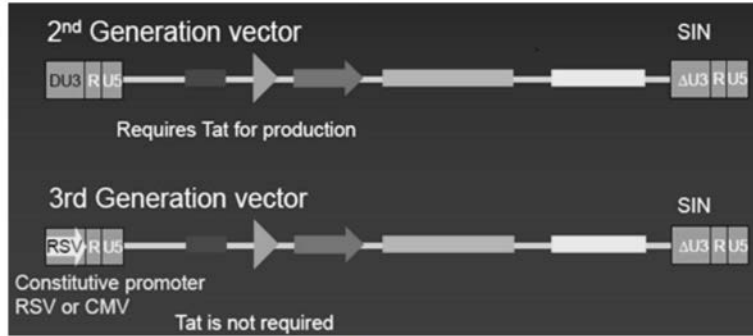


图1B



A



B

图2

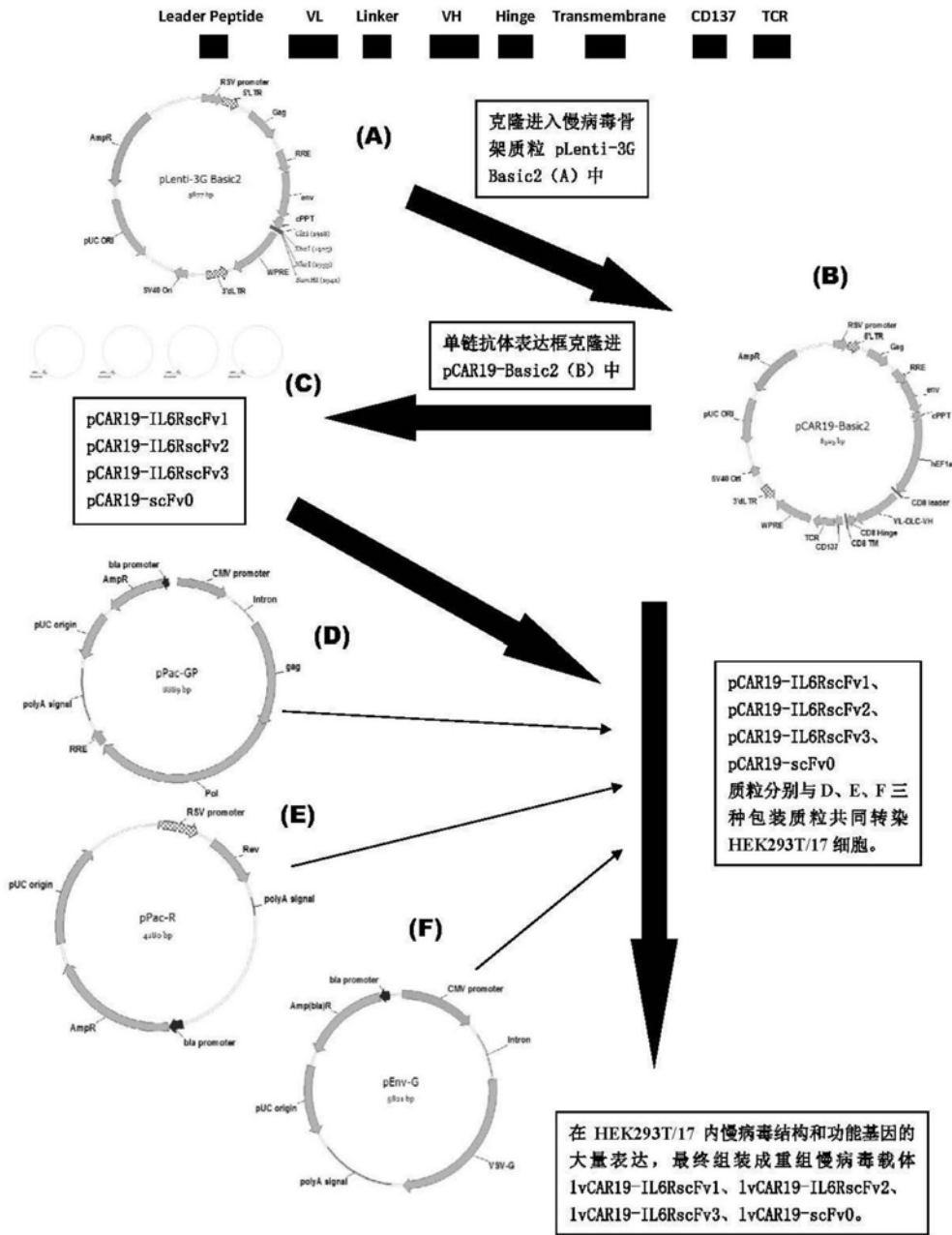


图3

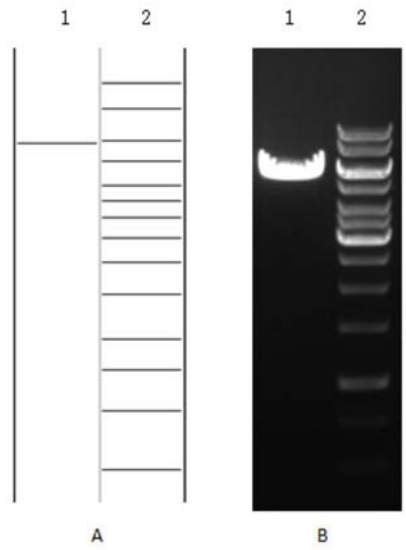


图4

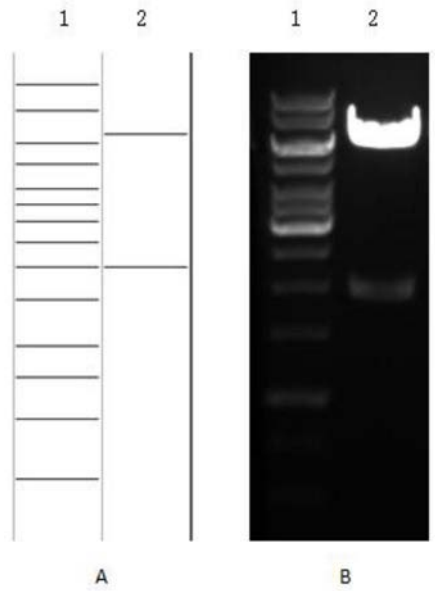


图5

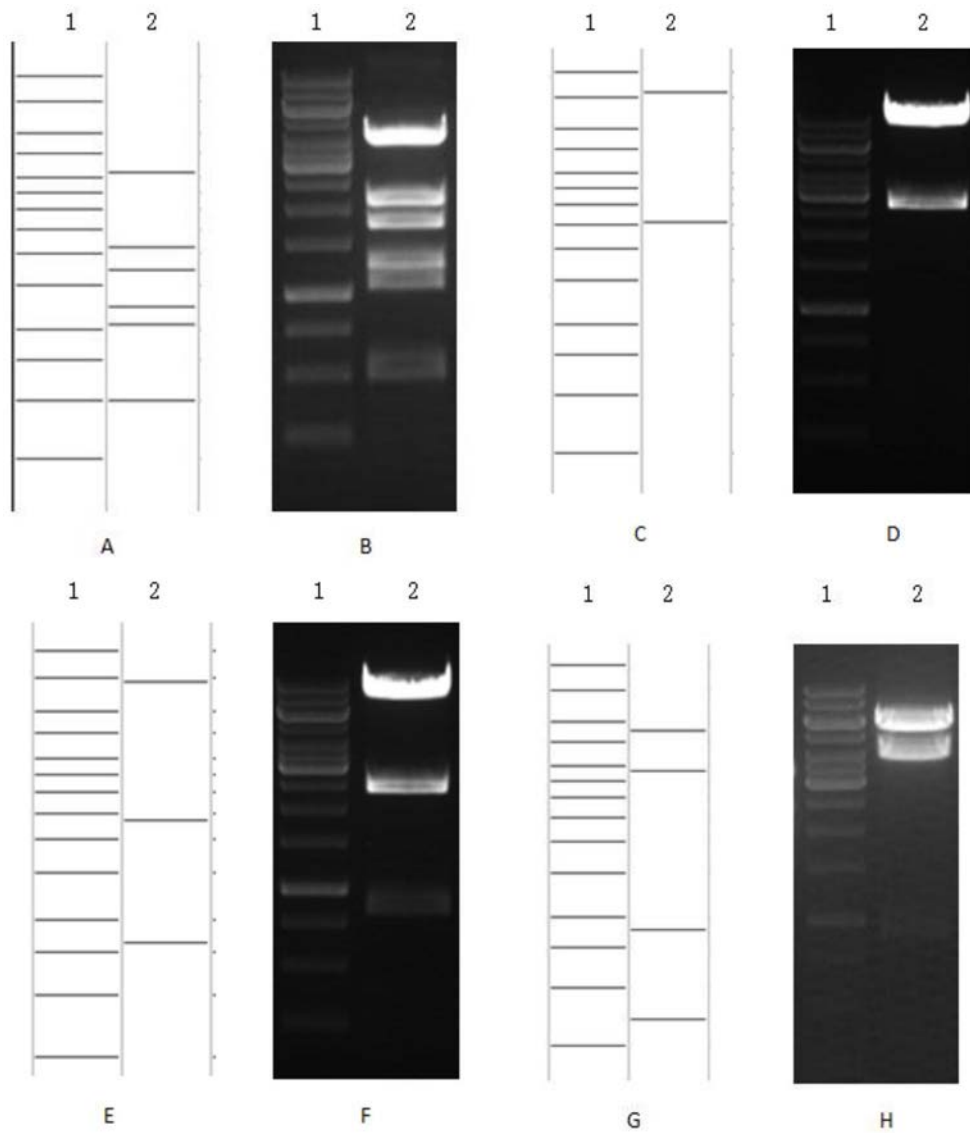


图6

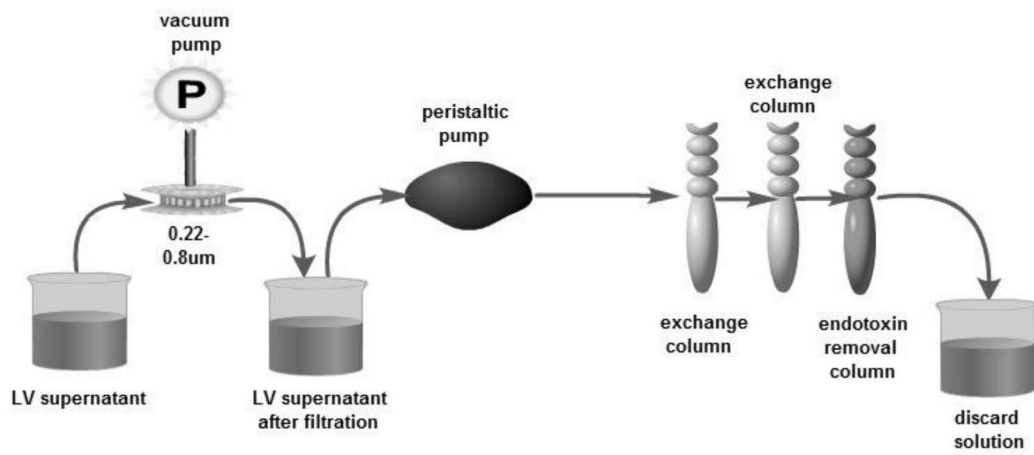


图7

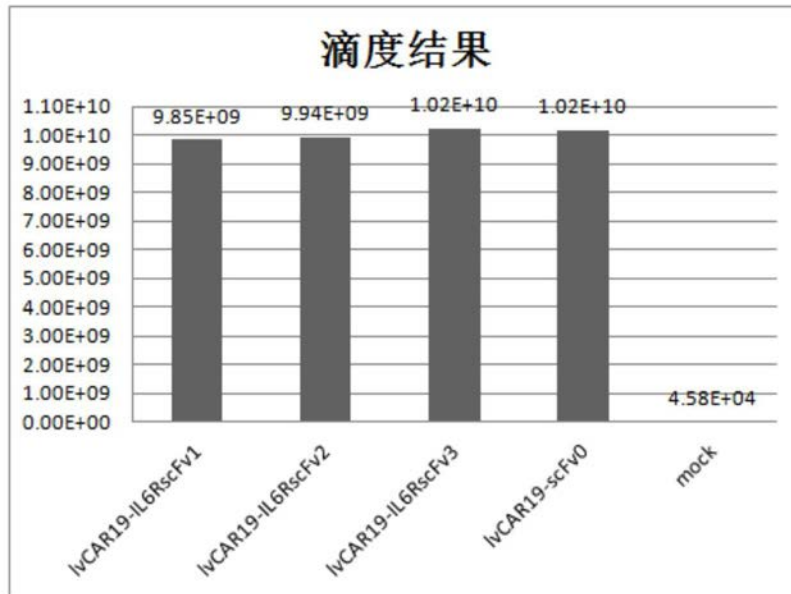
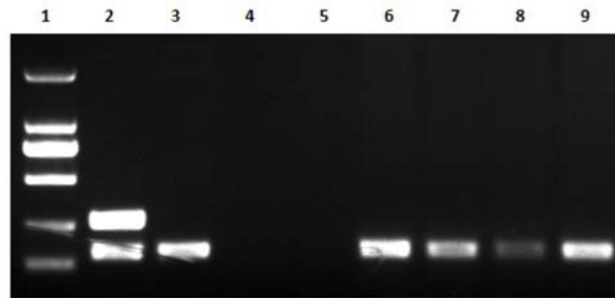


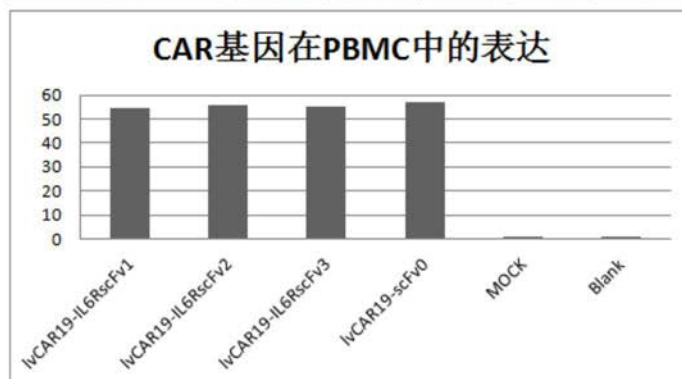
图8



PCR 模板	PCR 产物	判定说明
阳性对照	有 280bp 和 150bp 条带	阳性成立
	无或者只有一条带	阳性不成立
阴性对照	150bp 条带	阴性成立
	无或有两条带以上	阴性不成立
样品	有 280 和 150 条带	支原体污染
	只有 280 条带	支原体严重污染
	只有 150bp	无支原体污染
	无条带	细胞量过少或 PCR 反应被抑制

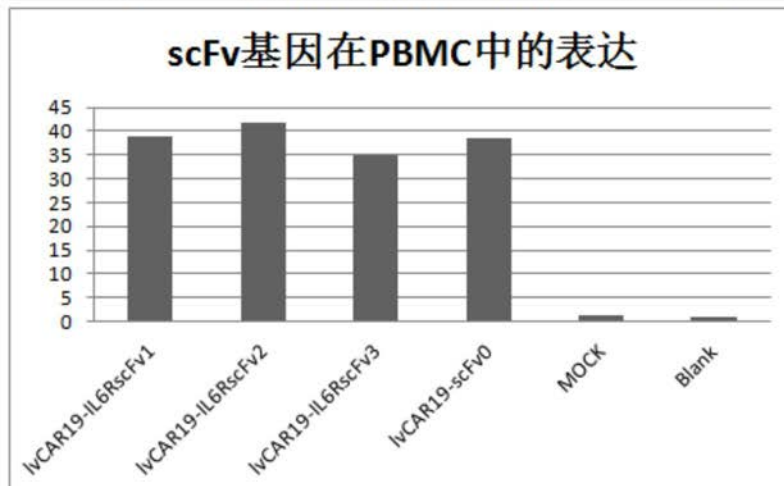
图9

Sample name	Actin (CT)	CAR (CT)	- Δ Ct	- $\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
IvCAR19-IL6RscFv1	20.4502	30.09621	-9.64602	5.76444	54.35868
IvCAR19-IL6RscFv2	19.64072	29.24799	-9.60727	5.80319	55.83843
IvCAR19-IL6RscFv3	19.72143	29.34251	-9.62107	5.78938	55.30658
IvCAR19-scFv0	19.96796	29.55263	-9.58467	5.82578	56.71996
MOCK	19.44765	34.98443	-15.5368	-0.12634	0.916156
Blank	19.89311	35.30357	-15.4105	0	1



A

Sample name	Actin (CT)	scFv (CT)	- Δ Ct	- $\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
IvCAR19-IL6RscFv1	20.03179	30.28445	-10.2527	5.278666	38.81831
IvCAR19-IL6RscFv2	20.15316	30.29473	-10.1416	5.389753	41.92542
IvCAR19-IL6RscFv3	20.15806	30.56919	-10.4111	5.120203	34.78041
IvCAR19-scFv0	20.05949	30.31907	-10.2596	5.271751	38.63272
MOCK	20.13126	35.14801	-15.0167	0.514582	1.42858
Blank	20.09787	35.6292	-15.5313	0	1



B

图10

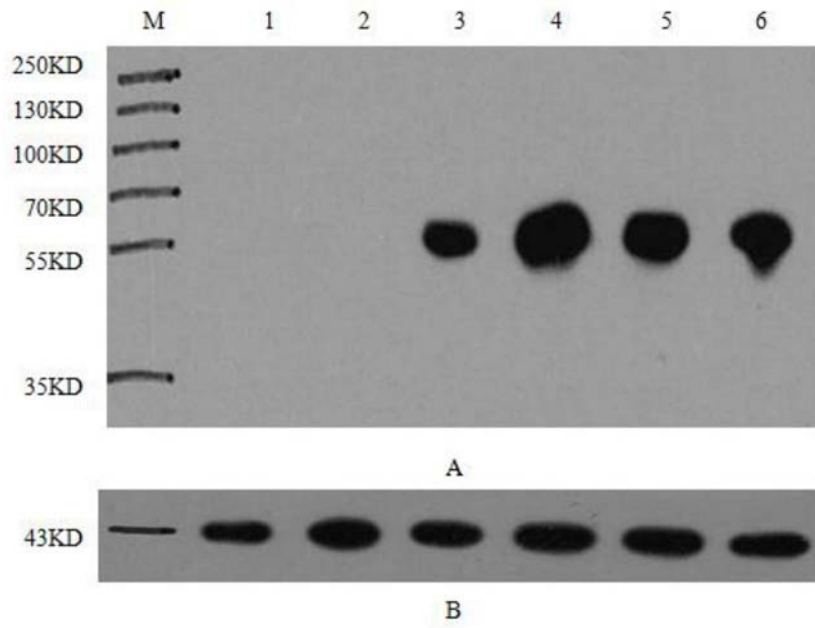


图11

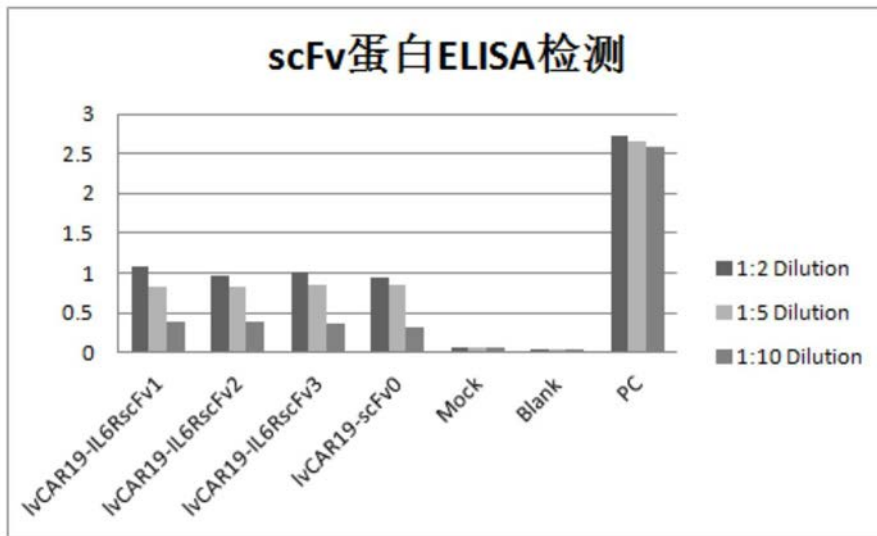


图12

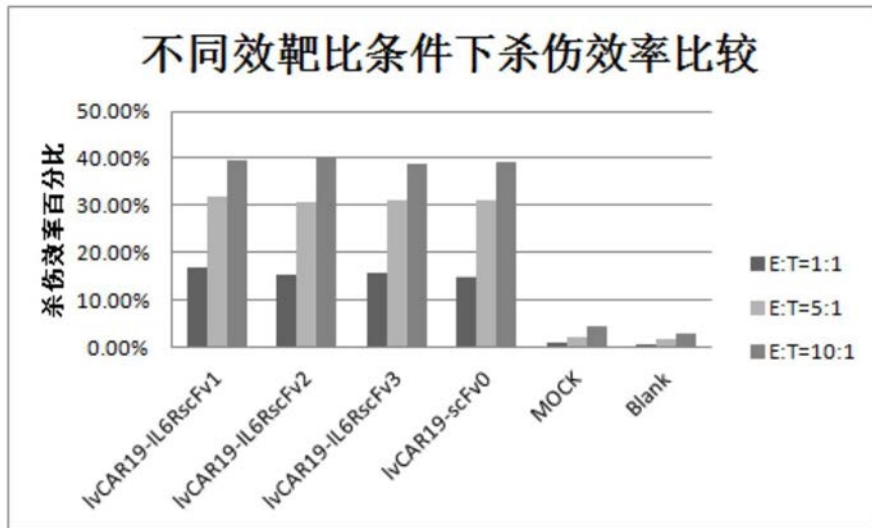


图13

Sample name	Actin (CT)	IL-6 (CT)	-ΔCt	-ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
Blank	18.5767	30.26625	-11.6895	-0.69771	0.61655
Mock	19.1516	30.14343	-10.9918	0	1
IvCAR19-IL6RscFv1	18.95351	25.64934	-6.69583	4.296004	19.64382
IvCAR19-IL6RscFv2	18.26384	25.07564	-6.81179	4.18004	18.12665
IvCAR19-IL6RscFv3	18.87789	25.5722	-6.69431	4.297523	19.66452
IvCAR19-scFv0	17.936	24.62249	-6.68648	4.30535	19.77149

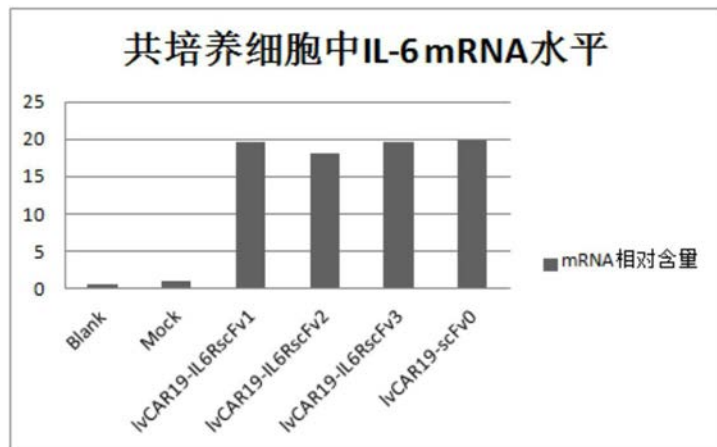


图14

Sample name	Actin (CT)	CRP (CT)	- Δ Ct	- $\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
Blank	19.94035	33.26043	-13.3201	-0.3097	0.806812
Mock	19.95335	32.96374	-13.0104	0	1
IvCAR19-IL6RscFv1	19.945	30.91692	-10.9719	2.038464	4.108078
IvCAR19-IL6RscFv2	21.07762	29.52365	-8.44603	4.564362	23.65973
IvCAR19-IL6RscFv3	21.16579	29.53978	-8.37399	4.636396	24.87107
IvCAR19-scFv0	21.1766	28.37814	-7.20154	5.808849	56.05804

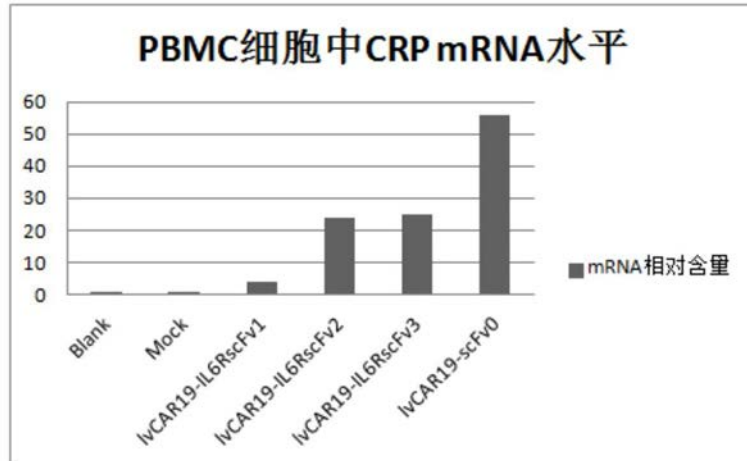


图15